

(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2011-528799

(P2011-528799A)

(43) 公表日 平成23年11月24日(2011.11.24)

(51) Int.Cl. F 1 テーマコード(参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01) GO 1 N 33/53 Z N A N 4 B O 2 4
 C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 A

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 23 頁)

(21) 出願番号 特願2011-519271 (P2011-519271)
 (86) (22) 出願日 平成21年7月21日(2009.7.21)
 (85) 翻訳文提出日 平成23年3月22日(2011.3.22)
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2009/053160
 (87) 国際公開番号 W02010/010514
 (87) 国際公開日 平成22年1月28日(2010.1.28)
 (31) 優先権主張番号 P0800448
 (32) 優先日 平成20年7月21日(2008.7.21)
 (33) 優先権主張国 ハンガリー (HU)

(71) 出願人 511018099
 ユニバーシティ オブ ペーチ
 ハンガリー共和国 エイチ - 7 6 2 2
 ペーチ、バスパーリ パール ユー. 4
 .
 (74) 代理人 110000855
 特許業務法人浅村特許事務所
 (74) 代理人 100066692
 弁理士 浅村 皓
 (74) 代理人 100072040
 弁理士 浅村 肇
 (74) 代理人 100143258
 弁理士 長瀬 裕子
 (74) 代理人 100088926
 弁理士 長沼 暉夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 全身性疾患の診断

(57) 【要約】

dcSSc患者、lcSSc患者及びSLE患者の間で、認識されるtopoIエピトープの型が異なることが発見された。F4断片(アミノ酸(AA)450~600)は、試験した全ての患者によって認識された。F1断片(AA5~30)及びF8断片(AA350~400)は、それぞれ、dcSSc及びSLEに対して特徴的なエピトープを表す。本発明は、診断への使用及び方法、並びに診断において使用するためのキットに関する。

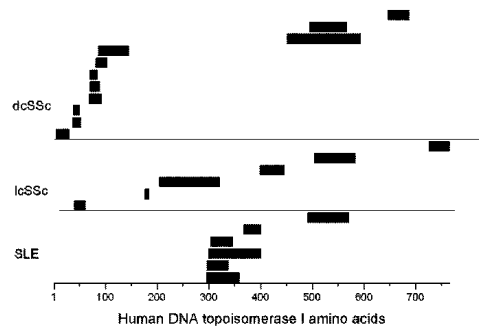


FIGURE 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

全身性自己免疫障害を診断するための、1つ又は複数の単離ペプチドの使用であって、前記1つ又は複数のペプチドが、下記のエピトープ：

a) アミノ酸5～30にわたるDNAトポイソメラーゼIの一部のうち少なくとも20アミノ酸長のセグメントの免疫学的特性を有するエピトープ、

b) アミノ酸350～400にわたるDNAトポイソメラーゼIの一部のうち少なくとも20アミノ酸長のセグメントの免疫学的特性を有するエピトープ、

の少なくとも1つを別々に、又は同時に含み、

前記1つ又は複数のペプチドが、野生型DNAトポイソメラーゼIのペプチド断片のアミノ酸配列と少なくとも70%、75%、80%、85%又は90%、92%、94%、96%又は98%相同であるアミノ酸配列を有し、

患者からの試料の自己抗体の、a)によるエピトープへの結合が検出された場合、そのことは、前記患者におけるびまん型全身性強皮症(dSSc)、好ましくは遅発性のdSScを示していることとみなされ、

患者からの試料の自己抗体の、b)によるエピトープへの結合が検出された場合、そのことは、前記患者における全身性エリテマトーデス(SLE)、好ましくはレイノー現象を伴うSLEを示していることとみなされる、

上記使用。

【請求項 2】

1つ又は複数の単離ペプチドが、

c) アミノ酸451～593にわたる前記DNAトポイソメラーゼIの一部のうち少なくとも20アミノ酸長のセグメントの免疫学的特性を有するエピトープ

をさらに含み、

患者からの試料の自己抗体の、a)によるエピトープ及びc)によるエピトープへの結合が検出され、且つ、好ましくは前記患者試料の自己抗体の、b)によるエピトープへの結合が検出されなかった場合、そのことは、前記患者におけるびまん型全身性強皮症(dSSc)、又は好ましくは遅発性のdSScを示していることとみなされ、

患者からの試料の自己抗体の、b)によるエピトープ及びc)によるエピトープへの結合が検出され、且つ、好ましくは前記患者試料の自己抗体の、a)によるエピトープへの結合が検出されなかった場合、そのことは、前記患者における全身性エリテマトーデス(SLE)、又は好ましくはレイノー現象を伴うSLEを示していることとみなされる、請求項1に記載の使用。

【請求項 3】

前記ペプチドのエピトープが、野生型配列のそれぞれのエピトープから、10アミノ酸、9アミノ酸、8アミノ酸、7アミノ酸、6アミノ酸、5アミノ酸、4アミノ酸、3アミノ酸、2アミノ酸又は1アミノ酸以下が相違している、請求項1又は2に記載の使用。

【請求項 4】

a)によるエピトープが、アミノ酸5～30にわたる前記DNAトポイソメラーゼIの一部のうち少なくとも20アミノ酸長のセグメントであり、

b)によるエピトープが、アミノ酸350～400にわたる前記DNAトポイソメラーゼIの一部のうち少なくとも20アミノ酸長のセグメントであり、好ましくは、

c)によるエピトープが、アミノ酸451～593にわたる前記DNAトポイソメラーゼIの一部のうち少なくとも20アミノ酸長のセグメントである、請求項1から3までのいずれか一項に記載の使用。

【請求項 5】

エピトープが別々のペプチド上に存在している、請求項1から4までのいずれか一項に記載の使用。

【請求項 6】

請求項1から5までのいずれか一項に記載の1つ又は複数のペプチドを含む、全身性自

10

20

30

40

50

己免疫障害の診断において使用するための診断用キットであって、
前記1つ又は複数のペプチドが、下記のエピトープ：

- a) アミノ酸5～30にわたるDNAトポイソメラーゼIの一部のうち少なくとも20アミノ酸長のセグメントの免疫学的特性を有するエピトープ、
 - b) アミノ酸350～400にわたるDNAトポイソメラーゼIの一部のうち少なくとも20アミノ酸長のセグメントの免疫学的特性を有するエピトープ、及び好ましくは、
 - c) アミノ酸451～593にわたる前記DNAトポイソメラーゼIの一部のうち少なくとも20アミノ酸長のセグメントの免疫学的特性を有するエピトープ
- の少なくとも2つを別々に、又は同時に含む、上記キット。

【請求項7】

- a) アミノ酸5～30にわたるDNAトポイソメラーゼIの一部のうち少なくとも20アミノ酸長のセグメントの免疫学的特性を有するエピトープを含むペプチド、
 - b) アミノ酸350～400にわたるDNAトポイソメラーゼIの一部のうち少なくとも20アミノ酸長のセグメントの免疫学的特性を有するエピトープを含むペプチド
- から選択される少なくとも1つのペプチドと、

アミノ酸451～593にわたるDNAトポイソメラーゼIの一部のうち少なくとも20アミノ酸長のセグメントの免疫学的特性を有するエピトープを含む参照ペプチドと、場合によって、

患者の自己抗体の、ペプチドのエピトープへの結合を検出するための手段とを含む、請求項6に記載の診断用キット。

【請求項8】

- a) によるペプチドが、アミノ酸5～30にわたる前記DNAトポイソメラーゼIのペプチド断片であり、
- b) によるペプチドが、アミノ酸350～400にわたる前記DNAトポイソメラーゼIのペプチド断片であり、
- c) によるペプチドが、アミノ酸451～593にわたる前記DNAトポイソメラーゼIのペプチド断片である、請求項7に記載の診断用キット。

【請求項9】

全身性自己免疫障害を示差的に診断するために有用な診断方法であって、

i) 患者から得た試料を、下記のエピトープ：

- a) アミノ酸5～30にわたる前記DNAトポイソメラーゼIの一部のうち少なくとも20アミノ酸長のセグメントの免疫学的特性を有するエピトープ、
- b) アミノ酸350～400にわたる前記DNAトポイソメラーゼIの一部のうち少なくとも20アミノ酸長のセグメントの免疫学的特性を有するエピトープ

の少なくとも1つを含み、野生型DNAトポイソメラーゼIのペプチド断片のアミノ酸配列と少なくとも70%、75%、80%、85%又は90%、92%、94%、96%又は98%相同であるアミノ酸配列を有する1つ又は複数のペプチドと接触させるステップを含み、

前記試料の自己抗体の、a) によるエピトープへの結合が検出された場合、そのことは、前記患者におけるびまん型全身性強皮症(d s S S C)、好ましくは遅発性のd s S S Cを示していることとみなされ、

前記試料の自己抗体の、b) によるエピトープへの結合が検出された場合、そのことは、前記患者における全身性エリテマトーデス(S L E)、好ましくはレイノー現象を伴うS L Eを示していることとみなされる、上記診断方法。

【請求項10】

1つ又は複数の単離ペプチドが、

- c) アミノ酸451～593にわたる前記DNAトポイソメラーゼIの一部のうち少なくとも20アミノ酸長のセグメントの免疫学的特性を有するエピトープ
- をさらに含み、

自己抗体の、a) によるエピトープ及びc) によるエピトープへの結合が検出され、且つ

10

20

30

40

50

、好ましくは前記患者試料の自己抗体の、b)によるエピトープへの結合が検出されなかった場合、そのことは、前記患者におけるびまん型全身性強皮症(d s S S C)、又は好ましくは遅発性のd s S S Cを示していることとみなされ、自己抗体の、b)によるエピトープ及びc)によるエピトープへの結合が検出され、且つ、好ましくは前記患者試料の自己抗体の、a)によるエピトープへの結合が検出されなかった場合、そのことは、前記患者における全身性エリテマトーデス(S L E)、又は好ましくはレイノー現象を伴うS L Eを示していることとみなされる、請求項9に記載の診断方法。

【請求項11】

使用の請求項3から5まで又はキットの請求項6若しくは7のいずれか一項に記載の1つ又は複数のペプチドが使用される、請求項9又は10に記載の診断方法。

10

【請求項12】

試料が血液試料、好ましくは血清試料である、請求項1に記載の診断方法、請求項2から4までのいずれか一項に記載の使用又は請求項6に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、全身性強皮症及び全身性エリテマトーデスの新規診断方法、そのような診断のための、抗トポイソメラーゼI及びその断片の使用、並びに診断用キットに関する。

【背景技術】

20

【0002】

全身性強皮症(S S c)は、皮膚及び種々の内臓の免疫活性化、血管損傷、炎症、線維症を特徴とする全身性自己免疫障害である。免疫系の活性化によって、疾患特異的自己抗体の産生、リンパ球の活性化及び種々のサイトカインの分泌が導かれる[1]。大多数のS S c患者は、DNAトポイソメラーゼI(t o p o I又はT O P I)、RNAポリメラーゼ、セントロメアタンパク質、及びU3RNPを主に認識する抗核抗体を有する[2]。

【0003】

T o p o Iは、765アミノ酸(AA)長のDNA緩和酵素であり、5つの別個の領域：N末端ドメイン(AA1~215)、コアサブドメインI~II(AA216~435)、コアサブドメインIII(AA436~636)、リンカードメイン(637~713)及びC末端ドメイン(AA714~765)を含有する。

30

【0004】

S S cの臨床患者は、2つの別個のサブセットに分類することができる。d c S S cは、皮膚、肺及び他の内臓の広範な線維症を特徴とするが、一方l c S S cでは、血管性の異常が中心であり、線維症は限られている[5]。

【0005】

S S cに加えて、全身性強皮症の臨床的な徴候及び症状を示していない全身性エリテマトーデス(S L E)患者において、抗t o p o I抗体の存在が実証された[6、7]。これらの発見は、抗t o p o I抗体の存在が、異種の臨床的結果を有し得ることを示唆している。

40

【0006】

自己抗体の検出におけるt o p o - I及びt o p o - Iペプチドの使用が提案されている。

【0007】

米国特許第5070192号に、t o p o - Iポリペプチドのクローニングについて記載されており、前記t o p o - Iポリペプチドと結合させることによって患者試料中の自己抗体を検出することが示されている。米国特許第5849503号に、突然変異t o p o - Iポリペプチドについて記載されており、それは、例えばイムノアッセイにおいて自己抗体を検出するために有用であると考えられている。

50

【 0 0 0 8 】

後に、いくつかのグループが、SSc患者における抗topoI抗体のエピトープ特異性について研究した。これらの研究では、やはり、分子の中心部分及びC末端部分において種々のエピトープが示唆されている[15~20]。報告では、topoIの免疫優性領域がAA489~573にわたることが示唆されている[15、16、19]。しかし、topoIのドメイン構造を基にして構築した組換え融合タンパク質を使用した研究により、コアサブドメインI~IIが、コアサブドメインIIIよりも頻りに認識されることが実証された[11]。抗topoI自己抗体の縦断的分析により、これらの領域に対する反応性は安定であることが明らかになったが[9、11]、限定数の血清を使用した研究により、抗topoI自己抗体によって認識される領域は経時的に変化することが示された[10]。したがって、全身性疾患におけるtopoIエピトープに関して、当技術分野にいくつかの不確実性が存在し、抗topoI自己抗体のエピトープ特異性について、いくつかのグループによって研究されているにもかかわらず、dcSSc患者、lcSSc患者及びSLE患者における比較的なエピトープのマッピングの報告はなく、また、異なるエピトープに結合する自己抗体に基づくこれらの疾患の示差的診断については示唆されていない。

10

【 発明の概要 】

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 9 】

本発明は、全身性自己免疫障害を診断するための、1つ又は複数の単離ペプチドの使用であって、前記1つ又は複数のペプチドが、下記のエピトープ：

20

a) アミノ酸5~30にわたるDNAトポイソメラーゼIの一部のうち少なくとも20アミノ酸長のセグメントの免疫学的特性を有するエピトープ、

b) アミノ酸350~400にわたるDNAトポイソメラーゼIの一部のうち少なくとも20アミノ酸長のセグメントの免疫学的特性を有するエピトープ

の少なくとも1つを別々に、又は同時に含み、

前記1つ又は複数のペプチドが、野生型DNAトポイソメラーゼIのペプチド断片のアミノ酸配列と少なくとも70%、75%、80%、85%又は90%、92%、94%、96%又は98%相同であるアミノ酸配列を有し、

患者からの試料の自己抗体の、a)によるエピトープへの結合が検出された場合、そのことは、前記患者におけるびまん型全身性強皮症(dsSSC)、好ましくは遅発性のdsSSCを示しているとみなされ、

30

患者からの試料の自己抗体の、b)によるエピトープへの結合が検出された場合、そのことは、前記患者における全身性エリテマトーデス(SLE)、好ましくはレイノー現象を伴うSLEを示しているとみなされる、

使用に関する。

【 0 0 1 0 】

好ましい実施形態において、1つ又は複数の単離ペプチドは、

c) アミノ酸451~593にわたる前記DNAトポイソメラーゼIの一部のうち少なくとも20アミノ酸長のセグメントの免疫学的特性を有するエピトープも含み、

40

患者からの試料の自己抗体の、a)によるエピトープ及びc)によるエピトープへの結合が検出され、且つ、好ましくは前記患者試料の自己抗体の、b)によるエピトープへの結合が検出されなかった場合、そのことは、前記患者におけるびまん型全身性強皮症(dsSSC)、又は好ましくは遅発性のdsSSCを示しているとみなされ、

患者からの試料の自己抗体の、b)によるエピトープ及びc)によるエピトープへの結合が検出され、且つ、好ましくは前記患者試料の自己抗体の、a)によるエピトープへの結合が検出されなかった場合、そのことは、前記患者における全身性エリテマトーデス(SLE)、又は好ましくはレイノー現象を伴うSLEを示しているとみなされる。

【 0 0 1 1 】

前記ペプチドのエピトープは、野生型配列のそれぞれのエピトープから、10アミノ酸

50

、 9 アミノ酸、 8 アミノ酸、 7 アミノ酸、 6 アミノ酸、 5 アミノ酸、 4 アミノ酸、 3 アミノ酸、 2 アミノ酸又は 1 アミノ酸以下が相違していることが好ましい。

【 0 0 1 2 】

別の好ましい実施形態において、

a) によるエピトープは、アミノ酸 5 ~ 3 0 にわたる前記 DNA トポイソメラーゼ I の一部のうち少なくとも 2 0 アミノ酸長のセグメントであり、且つ / 又は

b) によるエピトープは、アミノ酸 3 5 0 ~ 4 0 0 にわたる前記 DNA トポイソメラーゼ I の一部のうち少なくとも 2 0 アミノ酸長のセグメントであり、且つ / 又は好ましくは、

c) によるエピトープは、アミノ酸 4 5 1 ~ 5 9 3 にわたる前記 DNA トポイソメラーゼ I の一部のうち少なくとも 2 0 アミノ酸長のセグメントである。

10

【 0 0 1 3 】

好ましい実施形態において、全てのエピトープは別々のペプチド上に存在する。

【 0 0 1 4 】

ある実施形態において、ペプチドのエピトープ a) 及び b) は、異なるペプチド上に存在する。ある実施形態において、ペプチドは、 a) によるエピトープ及び c) によるエピトープが同じペプチド上に存在し、 b) によるエピトープが異なるエピトープ上に存在する、又は b) によるエピトープ及び c) によるエピトープが同じペプチド上に存在し、 a) によるエピトープが異なるペプチド上に存在するところで使用することができる。

【 0 0 1 5 】

抗体のエピトープへの結合を特異的に検出することができる場合、代替の実施形態において、 a) によるエピトープ及び c) によるエピトープは 1 つのペプチド上に存在してよく、 b) によるエピトープ及び c) によるエピトープは別のペプチド上に存在してよい。

20

【 0 0 1 6 】

必要に応じて、適切な抗体標準品を使用することができる。

【 0 0 1 7 】

別の態様において、本発明は、先の請求項のいずれか一項に記載の 1 つ又は複数のペプチドを含む、全身性自己免疫障害の診断において使用するためのキット、好ましくは診断用キットであって、

前記 1 つ又は複数のペプチドが、下記のエピトープ：

a) アミノ酸 5 ~ 3 0 にわたる DNA トポイソメラーゼ I の一部のうち少なくとも 2 0 アミノ酸長のセグメントの免疫学的特性を有するエピトープ、

b) アミノ酸 3 5 0 ~ 4 0 0 にわたる DNA トポイソメラーゼ I の一部のうち少なくとも 2 0 アミノ酸長のセグメントの免疫学的特性を有するエピトープ、及び好ましくは、

c) アミノ酸 4 5 1 ~ 5 9 3 にわたる DNA トポイソメラーゼ I の一部のうち少なくとも 2 0 アミノ酸長のセグメントの免疫学的特性を有するエピトープ

の少なくとも 2 つを別々に、又は同時に含むキットに関する。

30

【 0 0 1 8 】

本発明の好ましいキットは、

a) アミノ酸 5 ~ 3 0 にわたる DNA トポイソメラーゼ I の一部のうち少なくとも 2 0 アミノ酸長のセグメントの免疫学的特性を有するエピトープを含むペプチド、

b) アミノ酸 3 5 0 ~ 4 0 0 にわたる DNA トポイソメラーゼ I の一部のうち少なくとも 2 0 アミノ酸長のセグメントの免疫学的特性を有するエピトープを含むペプチド

から選択される少なくとも 1 つのペプチドと、

アミノ酸 4 5 1 ~ 5 9 3 にわたる DNA トポイソメラーゼ I の一部のうち少なくとも 2 0 アミノ酸長のセグメントの免疫学的特性を有するエピトープを含む参照ペプチドと、場合によって、

患者の自己抗体の、ペプチドのエピトープへの結合を検出するための手段とを含む。

40

【 0 0 1 9 】

a) によるペプチドは、アミノ酸 5 ~ 3 0 にわたる前記 DNA トポイソメラーゼ I のペ

50

プチド断片であり、

b) によるペプチドは、アミノ酸 350 ~ 400 にわたる前記 DNA トポイソメラーゼ I のペプチド断片であり、

c) によるペプチドは、アミノ酸 451 ~ 593 にわたる前記 DNA トポイソメラーゼ I のペプチド断片であることが好ましい。

【0020】

別の態様において、本発明は、全身性自己免疫障害を示差的に診断するために有用な診断方法であって、

i) 患者から得た試料を、下記のエピトープ：

a) アミノ酸 5 ~ 30 にわたる前記 DNA トポイソメラーゼ I の一部のうち少なくとも 20 アミノ酸長のセグメントの免疫学的特性を有するエピトープ、

b) アミノ酸 350 ~ 400 にわたる前記 DNA トポイソメラーゼ I の一部のうち少なくとも 20 アミノ酸長のセグメントの免疫学的特性を有するエピトープ

の少なくとも 1 つを含み、野生型 DNA トポイソメラーゼ I のペプチド断片のアミノ酸配列と少なくとも 70%、75%、80%、85% 又は 90%、92%、94%、96% 又は 98% 相同であるアミノ酸配列を有する 1 つ又は複数のペプチドと接触させるステップを含み、

前記試料の自己抗体の、a) によるエピトープへの結合が検出された場合、そのことは、前記患者におけるびまん型全身性強皮症 (dsSSC)、好ましくは遅発性の dsSSC を示しているとみなされ、

前記試料の自己抗体の、b) によるエピトープへの結合が検出された場合、そのことは、前記患者における全身性エリテマトーデス (SLE)、好ましくはレイノー現象を伴う SLE を示しているとみなされる、診断方法に関する。

【0021】

本発明の好ましい方法において、1 つ又は複数の単離ペプチドは、

c) アミノ酸 451 ~ 593 にわたる前記 DNA トポイソメラーゼ I の一部のうち少なくとも 20 アミノ酸長のセグメントの免疫学的特性を有するエピトープ

をさらに含み、

自己抗体の、a) によるエピトープ及び c) によるエピトープへの結合が検出され、且つ、好ましくは前記患者試料の自己抗体の、b) によるエピトープへの結合が検出されなかった場合、そのことは、前記患者におけるびまん型全身性強皮症 (dsSSC)、又は好ましくは遅発性の dsSSC を示しているとみなされ、

自己抗体の、b) によるエピトープ及び c) によるエピトープへの結合が検出され、且つ、好ましくは前記患者試料の自己抗体の、a) によるエピトープへの結合が検出されなかった場合、そのことは、前記患者における全身性エリテマトーデス (SLE) 又は好ましくはレイノー現象を伴う SLE を示しているとみなされる。

【0022】

上記で定義した 1 つ又は複数のペプチドは、本発明の方法、使用及び / 又はキットにおいて使用されることが好ましい。

【0023】

好ましい実施形態において、試料は血液試料であり、血清試料であることが好ましい。

【0024】

定義

「DNA トポイソメラーゼ I の一部のセグメントの免疫学的特性を有するエピトープ」は、本明細書では、抗体と結合可能であり、同様に前記セグメント、好ましくは患者の抗体、より好ましくは全身性疾患、好ましくは全身性強皮症又は全身性エリテマトーデスを有する患者の抗体と結合可能なエピトープと理解される。

【0025】

本発明による「DNA トポイソメラーゼ I」は、真核生物、好ましくは脊椎動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒトの供給源からの野生型 DNA トポイソメラーゼ I (

10

20

30

40

50

EC5.99.1.2)であってよく、又はそのような野生型DNAトポイソメラーゼIと相同な配列を有する、又は、それらと少なくとも50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、93%、95%、97%、98%、99%又は100%の配列相同性を有する突然変異体であってよい。前記突然変異DNAトポイソメラーゼIの少なくとも1つの免疫学的特性が維持されていること、又は、野生型タンパク質と結合可能な1つ又は複数の抗体が、突然変異型タンパク質とも同様に結合可能であることが好ましい。前記DNAトポイソメラーゼIは、天然の供給源から単離することができ、又は組換えで調製することができる。

【0026】

本明細書で使用する「ペプチド」という用語は、真核生物、好ましくは脊椎動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒトのトポイソメラーゼI (topo I) に対する自己抗体に対するエピトープを有する任意のアミノ酸配列を示す。前記ペプチドのアミノ酸配列は、前記topo Iをコードするポリヌクレオチド、例えばcDNAの全部又は一部によってコードされている、又は前記ペプチドのアミノ酸配列が、それらと少なくとも50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、93%、95%、97%、98%、99%又は100%の配列相同性を有することが好ましい。

【0027】

「自己抗体」は、対象の抗体であり、前記対象のタンパク質に対して生じた、又は前記対象のタンパク質に結合可能な抗体である。

【0028】

本明細書で使用する「患者」は、治療、診断、若しくはその体の試料が分析される、又は、治療、診断若しくは分析される予定の動物対象又はヒト対象を指す。

【図面の簡単な説明】

【0029】

【図1】認識されたトポイソメラーゼI (topo I) エピトープの型が、dcSSc患者、lcSSc患者及びSLE患者の間で異なることを示す図である。びまん型全身性強皮症 (dcSSc) の患者5個体、限局型全身性強皮症 (lcSSc) 患者6個体及び全身性エリテマトーデス (SLE) 患者4個体から精製したIgGを用いて選択したファージクローンの推定アミノ酸配列を、ヒトtopo I配列に沿ってプロットした。

【図2】本研究において使用した組換えトポイソメラーゼI - マルトース結合性タンパク質融合構築物を示す図である。

【図3】トポイソメラーゼI (topo I) 融合タンパク質F4及びF1を抗原として使用した免疫プロットを示す図である。精製した組換え融合タンパク質 (パネルA: F4、パネルB: F1) 又はマルトース結合性タンパク質 (MBP) を、10% SDS ポリアクリルアミドゲルで分離し、ニトロセルロース膜に移した。膜を条片状に切り、患者の連続的な血清試料 (示した日に得た) 又は抗MBP抗体 (a-MBP) でプローブした。MW: 分子量マーカー (kDa)。

【発明を実施するための形態】

【0030】

SScの発病における抗topo I抗体の役割は、完全に理解されていないが、本発明に基づいて、topo Iに対する免疫応答は、異なるエピトープ特異性を持つ抗topo I自己抗体の産生を導く抗topo I陽性の患者の間で異なる可能性があることと仮定することができる。

【0031】

先行技術において、topo Iのドメイン構造又は抗原性の予測のいずれかに基づいて設計された種々の組換えtopo I断片が使用されており、そのどちらも、可能性のあるエピトープを見落とす恐れがある [12~18]。例えば、Huら [21] は、N末端ドメイン全長 (AA1~213) を包含する融合タンパク質を使用し、分子のこの部分が抗topo I抗体の標的にならないことを示した。それとは反対に、AA70から始まるN末端ドメインを包含する融合タンパク質を用いて行われた他の以前の研究では、分子のこ

10

20

30

40

50

の部分抗 *topo I* 抗体によって認識されることが報告された [13、16、20]。

【 0032 】

これらの表面上矛盾した結果は、適用された異なる方法及び抗原構築物に起因する可能性があり、また、三次構造内に埋め込まれた短いエピトープの接近容易性に影響を及ぼし得る、可能性のある立体構造因子に起因する可能性が非常に高い。ここで、本発明者らが N 末端部分で同定した新規エピトープ含有断片は、F1 を含め、大部分が、20 ~ 30 AA のみにわたることを予め示す。

【 0033 】

したがって、本発明者らは、異なる戦略を選択し、バクテリオファージラムダ上に提示された *topo I* の抗原断片ライブラリーを構築し、このライブラリーを *dcSSc* 患者、*lcSSc* 患者及び *SLE* 患者の血清を用いてスクリーニングした。ライブラリーから選択した *topo I* の領域を組換え融合タンパク質として発現させ、患者の血清を用いてさらに試験した。エピトープ特異性の縦断的分析を行い、臨床所見と比較した。

10

【 0034 】

ファージ提示抗原断片ライブラリーから選択した断片に基づいて、9つの *topo I* - MBP 融合タンパク質を発現させ、これらの断片を、抗 *topo I* 抗体陽性の患者の血清 67 体を用いて試験した。我々の結果によると、大半の断片 (F2、F3、F5 ~ 7、F9) の認識は、所与の疾患サブグループに対して特徴的なのではなく、ライブラリーのスクリーニングに使用した個々の患者の血清に対して特徴的である。このことは、認識された *topo I* エピトープにおいて個体間の差異と縦断的差異の両方を見いだした *Henry* らの結果と一致する [20]。しかし、F4 断片 (AA451 ~ 593) が試験した患者の血清全てにおいて検出された以外には、F1 断片 (AA5 ~ 30) が *dcSSc* 患者の血清のサブセットによって特異的に認識され、F8 断片 (350 ~ 400) が *SLE* 患者によって認識され、このことは、これらの断片が、それぞれ、*dcSSc* 及び *SLE* に対して特徴的なエピトープを表している可能性があることを示している。

20

【 0035 】

したがって、ファージ提示に基づいた手法で得られたデータは、認識されるエピトープの型が、*dcSSc* 患者、*lcSSc* 患者及び *SLE* 患者の間で異なることを明白に実証している。AA451 ~ 593 領域 (F4 断片) に位置する、全ての *Topo I* 反応性患者によって認識される共通断片が見出されたことは、以前に発表された結果と一致する [12、13]。しかし、本結果によると、F4 断片を用いて行った *ELISA* などの免疫学的アッセイにより、全長抗原を使用する従来の *ELISA* 系よりも感度が高い、抗 *topo I* 自己抗体を検出するためのツールが示される可能性がある。

30

【 0036 】

topo I の免疫優性部分 (F4 断片) に加え、以前は抗 *topo I* 抗体の標的になることが示されていなかった 2 つの新規領域が同定された。*dcSSc* 患者は、分子の N 末端部分において、いくつかの短い断片 (AA5 ~ 145 にわたる) を認識した。特に、F1 断片 (AA5 ~ 30) は、*dcSSc* 患者の血清のサブセットによって認識され、一方 F8 断片は、*SLE* 患者によって認識された。

【 0037 】

さらに、臨床データの分析により、F1 断片に対する自己抗体が、*dcSSc* の後期における疾患の進展を示す可能性があることが示唆されている。この F1 断片は、実験的に証明されたグランザイム B 切断部位を含有する [22]。したがって、T 細胞媒介細胞障害性応答の間に放出されるグランザイム B によって *topo I* が *in vivo* で切断された結果、F1 断片によって表される新生抗原決定基が形成され得る。全長抗原又は全長 N 末端ドメインを使用した *in vitro* アッセイでは、これらの短いエピトープを認識する抗体を検出することができない恐れがある。

40

【 0038 】

臨床データの分析では、抗 *topo I* 抗体のエピトープ特異性と疾患の臨床的な症状との間の明白な関連を実証することができなかった。しかし、理論にとらわれずに、抗 F1

50

抗体陽性の d c S S c 患者と抗 F 1 抗体陰性の d c S S c 患者との間の疾患の持続期間の差異は、我々の縦断的分析の知見とともに、抗 t o p o I 免疫応答が、分子の免疫優性部分 (F 4 断片) に対して開始され、疾患の経過中の後期に N 末端部分を標的とする可能性があることを示し得る。したがって、F 1 断片に対する自己抗体は、後期 d c S S c の新規マーカーを表し得る。d c S S c におけるこの「エピトープ拡散」の機構及びそれを容易にする因子については、さらに研究されなければならない。

【 0 0 3 9 】

さらに、F 8 陽性の S L E 患者 4 個体及び F 8 陰性の S L E 患者 2 6 1 個体の臨床データを比較することにより、F 8 断片に対する抗体を持つ S L E 患者はレイノー現象を有し、疾患の症状は軽度である (関節炎、中枢神経系及び腎臓の合併症がない) ことが示唆されている。

10

【 0 0 4 0 】

診断方法若しくは使用又は本発明のキットにおける好ましい実施形態において、自己抗体によって認識されるエピトープは、別々のペプチド上に存在する。別の好ましい実施形態において、抗体標準品は、通常免疫学的方法によって調製することができる。

【 0 0 4 1 】

自己抗体の結合を検出することは、十分に当業者の技能の範囲内である。動態学的方法並びに結合親和性又は結合活性を特徴とする方法のどちらも適用することができることは当業者にはすぐにわかる。例えば、下記の任意の方法を、どんな制限もなしに適用することができる：

20

イムノアッセイ、例えば、E L I S A、R I A、ラテラルフロー、免疫沈降法、結合アッセイ、例えば、パイアコア (B i a c o r e)、蛍光消光、分光光度的方法、例えば、F T - I R、円偏光二色性、N M R、物理化学的方法、例えば、熱量測定法、超遠心分離法など。

【 0 0 4 2 】

診断方法の好ましい実施形態は、R I A 若しくは D E L P H I A のようなイムノアッセイの形で、又は、好ましくは E L I S A のような免疫吸着アッセイで行われる。

【 0 0 4 3 】

詳細な教示は、例えば Y e h u d a S h e o e n f e l d、P i e r - L u i g i M e r o n i、M . E r i c G e r s h w i n による書籍「自己抗体 (A u t o a n t i b o d i e s)」、E l s e v i e r、s e c o n d e d i t i o n において見ることができる。

30

【 0 0 4 4 】

ある特定の実施形態において、その目的は、障害及び他の抗体に関連付けられる複数の患者の自己抗体間を選択的に区別するアッセイを提供することであり得る。アッセイの感度を設定することは、十分に当業者の技能の範囲内であり、その当業者は適切な対照ペプチドを見つけることができる。そのようなペプチドの例は、本明細書で提供される。陽性内部対照は、実際には F 4 断片それ自体である。陰性対照として、他の、非免疫原性断片又は M B P のような他のタンパク質を使用することができる。

【 0 0 4 5 】

好ましい変異形において、患者が I g M 及び I g G のいずれの種も欠損していなければ、I g M 又は I g G が自己抗体として測定される。

40

【 0 0 4 6 】

本発明は、概要を上記した診断方法を実行するためのキットにも関する。これらのキットは、上記の部品又は概要を上記した方法を行うのに有用な部品を含んでよい。キットは、エピトープを担持しているペプチド及び少なくとも使用説明書を必ず含む。

【 0 0 4 7 】

非限定的な実施例によって、以下に本発明をより詳細に説明する。しかし、当業者は、本発明の観念に基づき、且つ本発明の範囲内である他の実施形態を、当技術分野の知識及び当業者の一般知識に基づく実行において減らすことができることを理解されたい。さら

50

に、引用した参考文献の教示は、特に本明細書に組み込まれる。

【実施例】

【0048】

方法

患者及び対照

我々の全強皮症コホート内の患者293個体から、従来のELISA試験(Hycor、Vienna、Austria)において抗トポイソメラーゼ抗体陽性を示したSScの症例59個体を選択した(これらの患者のうち34個体がdcSScを有すると分類され、25個体がlcSScと診断された)。従来のELISAキットを用いて抗topo I抗体の存在について試験したSLE患者265個体のうち、8個体が陽性の反応を示し、この試験のために選択された。SSc患者59個体からの血清試料177検体(各患者から3検体)及びSLE患者8個体からの血清試料24検体を、2004年~2007年に、6~12カ月の間隔で得た。患者の臨床データを、我々の標準プロトコールを使用してコード化した[8]。

10

【0049】

対照用に、さまざまな年齢の健康な女性及び男性からの抗topo I抗体陰性の血清試料146検体を使用した。さらに、年齢を適合させた、異なる炎症性のリウマチ性疾患の患者110個体(血管炎8個体、血清反応陰性脊髄関節炎40個体、筋肉炎11個体、シェーグレン症候群11個体、乾癬性関節炎10個体、関節リウマチ20個体、リウマチ性多発筋痛10個体)についても調査した。

20

【0050】

この研究は、ペーチ大学医療センターの倫理委員会によって承認された。全ての患者及び健康な個体からインフォームド・コンセントを得た。

【0051】

topo I抗原断片ライブラリーの構築及び親和性選択

全長ヒトtopo Iのコード領域を、全RNAから逆転写したcDNAからPCRによって増幅した。PCR産物を、Inst/Aclone PCR Product Cloning Kit(Fermentas、Vilnius、Lithuania)を使用してT/Aベクターにクローニングした。ラムダD-バイオファージ提示ベクター[9]を、以前述べられたように[10]微改変して使用してライブラリーの構築を行った。topo Iの一次ライブラリーは、独立したクローンを有する挿入断片を 2×10^7 個含有し、増幅されたライブラリーの力価は 3×10^{11} /mlであった。dcSSc患者5個体、lcSSc患者6個体及びSLE患者4個体由来の、プロテインGセファロース(Amersham Pharmacia、Uppsala、Sweden)で精製したIgGを用いたtopo I抗原断片ライブラリーの親和性選択を、基本的に記載の通りに行った[11]。3回の選択後、個々のクローンを、さらに増殖させてDNA配列決定するために取り出した。

30

【0052】

組換えtopo I融合タンパク質の発現

選択したtopo I断片を、pMAL Protein Fusion and Purification system(New England Biolabs、Ipswich、UK)を使用して、組換えマルトース結合性タンパク質(MBP)融合タンパク質として発現させた。AA5~30(F1)、AA69~92(F2)、AA87~145(F3)、AA450~600(F4)、AA640~705(F5)、AA170~290(F6)、AA295~350(F7)、AA350~400(F8)、AA295~400(F9)を、EcoRI制限酵素部位及びBamHI制限酵素部位を含有するPCRプライマーを用いて増幅し、pMal-c2ベクターにクローニングした。融合タンパク質を、製造者(New England Biolabs、Ipswich、UK)の説明書に従ってアミロース樹脂での親和性クロマトグラフィーを用いて溶菌液から精製し、精製されたタンパク質の完全性を、10%ゲルSDS-PAGE、続いてクー

40

50

マシーブリリアントブルー染色によって検証した。

【0053】

Elisa

96ウェルのポリスチレンプレート(Nunc、Roskilde、Denmark)を、PBS中組換えtopoI断片又はPBS中MBPを10 μ g/mlの濃度で用いてコーティングした。プレートを、洗浄緩衝液(PBS、0.05%Tween-20)で洗浄し、洗浄緩衝液中3%脱脂粉乳で1時間ブロッキングした。血清試料を、2%脱脂粉乳を含有する洗浄緩衝液中、1:250希釈度で、3連で1時間インキュベートした。最後に、プレートを、HRPコンジュゲート抗ヒトIgG二次抗体(Dako、Glostrup、Denmark)と一緒に60分間インキュベートした。o-フェニレンジアミン(Sigma-Aldrich、Budapest、Hungary)を用いて反応を展開させ、492nmにおける光学濃度(OD)を測定した。さらなる測定のためのカットオフ値を決定するために、健康な対照146個体の血清(予め、市販のELISAキットを用いて抗topoI抗体に対して陰性であることを試験した)を、全topoI断片及びMBPに対して試験した。健康な対照の血清とtopoI断片及びMBPとの反応性は最小であることが示され(OD₄₉₂ 0.019~0.032)、さらなる測定のためにカットオフ値0.1を選択した。

10

【0054】

免疫ブロット

SDS試料緩衝液で1:1希釈した、精製MBP融合タンパク質又はMBP(40 μ g/ml)を10分間煮沸し、10%SDS-ポリアクリルアミドゲルで分離し、ニトロセルロース膜に移した。洗浄緩衝液(100mM NaCl、10mMトリス塩基pH7.4、0.1%Tween20)中5%脱脂粉乳(Bio-Red、Budapest、Hungary)で1時間ブロッキングした後、膜を、洗浄緩衝液中2%脱脂粉乳で1:500に希釈した血清と一緒に1時間インキュベートした。洗浄後、1:2000に希釈したHRPコンジュゲート抗ヒトIgGを1時間にわたって加えた。MBP融合タンパク質を検出するために、膜の条片を、まずウサギ抗MBP抗体(New England Biolabs、Ipswich、UK)(1:5000)と一緒にインキュベートし、続いてHRPコンジュゲートヤギ抗ウサギ抗体(1:2000)と一緒にインキュベートした。膜を、SuperSignal West Pico Chemiluminescent(Pierce、Rockford、USA)基質を用いて展開し、X線フィルムに暴露させた。

20

30

【0055】

統計分析

分類別のデータを、カイ二乗検定によって分析した。患者群間の可能性のある差異を調査するために、連続的な変数の頻度及び平均値を、スチューデントのt検定によって試験した。スピアマンの順位相関係数を使用して、光学密度の値と連続的な変数との間の関係を検定した。0.05未満のp値を統計学的に有意であるとみなした。統計分析は、SPSS統計ソフトウェアパッケージを使用して行った。

【0056】

したがって、本診断方法は、それぞれの場合に適用できないことがあると同時に、患者がtopoI反応性抗体を有する場合、少なくともdcSScとSLEとを、安全に区別することができる。

40

【0057】

結果

ファージ提示されたtopoIライブラリーを用いた、抗topoI抗体のエピトープのマッピング

抗topoI抗体によって認識されるエピトープを同定するために、バクテリオファージラムダ上に提示されたtopoI抗原断片ライブラリーを構築し、その後抗topoI陽性患者(dcSSc患者5個体、lcSSc患者6個体及びSLE患者4個体)の血清

50

から精製した個々の I g G を用いてこのライブラリーをスクリーニングした。3 回の親和性選択の後、60 クローン（各患者群から 30）の挿入断片を配列決定した。推定アミノ酸配列をヒト t o p o I と配列比較することにより、認識されたエピトープの型が、d c S S c 患者、l c S S c 患者及び S L E 患者の間で異なることが示された（図 1）。

【 0 0 5 8 】

抗 t o p o I 抗体による、組換え t o p o I 融合タンパク質の認識

t o p o I 抗原断片ライブラリーの親和性選択によって得られた結果を検証するために、組換え t o p o I - M B P 融合タンパク質を構築した。ライブラリーの選択によって同定された断片に基づいて、9 つの融合タンパク質を構築し、発現させた（図 2）。これらの融合タンパク質の認識を、E L I S A によるライブラリーの選択に使用したものを含めた、抗 t o p o I 抗体陽性患者 67 個体（d c S S c 34 個体、l c S S c 25 個体及び S L E 8 個体）の血清を用いて試験した。結果を表 1 に要約する。

【表 1】

表 1 抗 t o p o I 抗体陽性患者の血清を使用した E L I S A によって決定した、組換えトポイソメラーゼ I (t o p o I) 断片の認識頻度

| T o p o I 断片 (アミノ酸) | dcSSc (n = 34) | lcSSc (n = 25) | SLE (n = 8) |
|---------------------|-------------------|-------------------|----------------|
| F1 (5-30) | 9 (26%) | 1 (4%) | 0 |
| F2 (69-92) | 1 (3%) | 1 (4%) | 0 |
| F3 (87-145) | 1 (3%) | 0 | 0 |
| F4 (450-600) | 34 (100%) | 25 (100%) | 8 (100%) |
| F5 (640-705) | 2 (6%) | 0 | 0 |
| F6 (170-290) | 2 (6%) | 2 (8%) | 0 |
| F7 (295-400) | 0 | 0 | 1 (12%) |
| F8 (350-400) | 0 | 0 | 4 (50%) |
| F9 (295-350) | 0 | 0 | 1 (12%) |

【 0 0 5 9 】

数字は、所与の断片に対して陽性である個々の患者を示し、括弧内の数字は陽性血清の割合を示す（d c S S c : びまん型全身性強皮症 ; l c S S c ; 限局型全身性強皮症 ; S L E : 全身性エリテマトーデス）

【 0 0 6 0 】

F 4 断片（A A 4 5 0 ~ 6 0 0）は、患者の血清 67 検体全てによって認識された。F 1 断片（A A 5 ~ 3 0）は、それぞれ、d c S S c 患者 34 個体のうち 9 個体、l c S S c 患者 25 個体のうち 1 個体、及び S L E 患者 8 個体のうち 0 個体によって認識された。F 8 断片（A A 3 5 0 ~ 4 0 0）は、S L E 患者 8 個体のうち 4 個体によって認識され、S S c 患者には認識されなかった。

【 0 0 6 1 】

t o p o I エピトープの反応性についての縦断的分析

F 1 断片、F 4 断片及び F 8 断片に対する抗体の反応が、経時的に一定のままであるかどうかを決定するために、各患者の 3 つの連続的な血清試料において、これらの断片に対する抗体の反応性を E L I S A によって測定した。E L I S A の結果を、F 1 陽性患者 10 個体、F 4 陽性患者の無作為に選択した 10 個体、及び F 8 陽性患者 4 個体におけるウ

ウェスタンブロットによって確認した。各血清試料は、従来の抗 S c l - 7 0 E L I S A によっても検定した。

【 0 0 6 2 】

縦断的分析により、F 4 断片に対する反応性は 6 1 症例 (9 4 %) で安定であったことが示された。患者 6 7 個体のうち 1 8 個体が、従来の抗 S c l - 7 0 E L I S A による測定で t o p o I に対する抗体反応がない血清試料を少なくとも 1 つ有した。F 4 断片を用いた E L I S A の結果をウェスタンブロットによって確認し、E L I S A において F 4 反応性が陽性であった各血清はウェスタンブロットにおいても陽性であったことが示された (図 3 A)。

【 0 0 6 3 】

F 1 断片に対する反応性は経時的に変化した。4 症例において、初期の血清試料は F 1 に対する検出可能な抗体を少しも有さなかったが、免疫応答は経時的に陽性になり、強くなった。一症例において、F 1 に対する反応性は 2 番目の試料に現れたが、続く試料では見られなかった。残りの d c S S c 患者 4 個体の全ての血清試料は、抗 F 1 抗体に対して陽性であった。E L I S A の結果をウェスタンブロットによって確認し、この 2 つの方法によって得られた結果が完全に相関することが示された (図 3 B)。

【 0 0 6 4 】

F 8 に対する抗体に対して陽性である S L E 患者 4 個体の中で、反応性は患者 1 個体では安定であり、残りの 3 個体では変化した。

【 0 0 6 5 】

臨床知見

臨床データ (皮膚合併症の程度、手の拘縮、高窒素血症及び / 又は悪性高血圧症、心臓合併症、運動不全並びに食道の狭窄 / 拡張、肺線維症の程度、努力性肺活量) の統計分析により、抗 t o p o I 抗体のエピトープ特異性と S S c の臨床的な症状との間に関連は示されなかった。しかし、S S c 患者の F 1 陰性群と F 1 陽性群との間で、平均年齢 (F 1 陰性 (患者数 : 4 9) : 54.8 ± 13.5 歳 ; F 1 陽性 (患者数 : 1 0) : 63.9 ± 9.4 歳 ; $p = 0.048$) 及び疾患の持続期間 (F 1 陰性 (患者数 : 4 9) : 10.0 ± 7.3 年 ; F 1 陽性 (患者数 : 1 0) : 17.1 ± 12.9 年 ; $p = 0.019$) に有意な差異があった。さらに、F 1 断片に対して陽性である血清を持つ d c S S c 患者の平均年齢は、F 1 に対して検出可能なレベルの抗体を示さない患者と比較して有意に高かった (F 1 陰性 (患者数 : 2 5) : 51.9 ± 14.3 歳 ; F 1 陽性 (患者数 : 9) : 63.7 ± 10.0 歳 ; $p = 0.03$)。

【 0 0 6 6 】

F 1 ペプチドに対する抗体が、S S c 患者に特異的であったか、及びその抗体の出現が単に加齢の結果ではないかを調査するために、年齢を適合させた (平均年齢 : 62.4 ± 5.4 歳) 健康な対照 6 4 個体からの血清を、F 1 に対する抗体について試験した。1 つの血清試料のみが陽性であるとわかった。F 1 断片に対する抗体の存在が S S c に特異的かどうかを試験するために、年齢を適合させた (平均年齢 : 65.5 ± 4.8 歳) 、異なる結合組織病の患者 1 1 0 個体からの血清も試験し、4 つの血清試料 (血清陰性脊髄関節炎 2 検体、筋肉炎 1 検体、シェーグレン症候群 1 検体) のみが陽性であるとわかった。

【 0 0 6 7 】

F 8 陽性の S L E 患者 4 個体及び F 8 陰性の S L E 患者 2 6 1 個体の臨床データを比較することにより、F 8 断片に対する抗体を持つ S L E 患者はレイノー現象を有し、疾患の症状は軽度である (関節炎、中枢神経系及び腎臓の合併症がない) ことが示唆された。

【 0 0 6 8 】

要約すると、t o p o I の免疫優性部分に加え、d c S S c 、l c S S c 及び S L E の患者の血清が、別個の t o p o I エピトープを認識することが実証された。我々は、大半の断片の認識が、所与の疾患サブグループに対して特徴的ではなく、個々の患者に対して特徴的であることを示した。しかし、F 1 断片 (A A 5 ~ 3 0) は、d c S S c 患者の血清のサブセットによって特異的に認識され、F 8 断片 (3 5 0 ~ 4 0 0) は S L E 患

10

20

30

40

50

者によって認識され、このことは、F 1 断片及びF 8 断片が、それぞれ、d c S S c 及び S L E に対して特徴的なエピトープを表している可能性があることを示している。

【 0 0 6 9 】

財源：国家保険基金 (N a t i o n a l H e a l t h F u n d) (E T T : 3 2 / K O / 2 0 0 4)

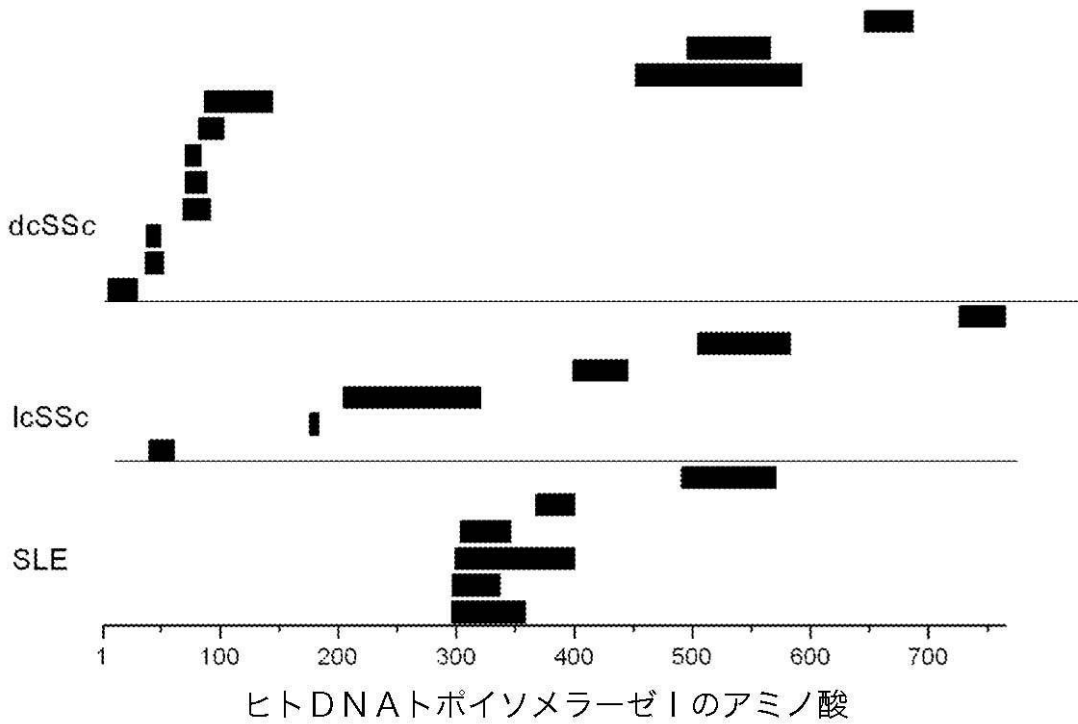
【 0 0 7 0 】

(参 考 文 献)

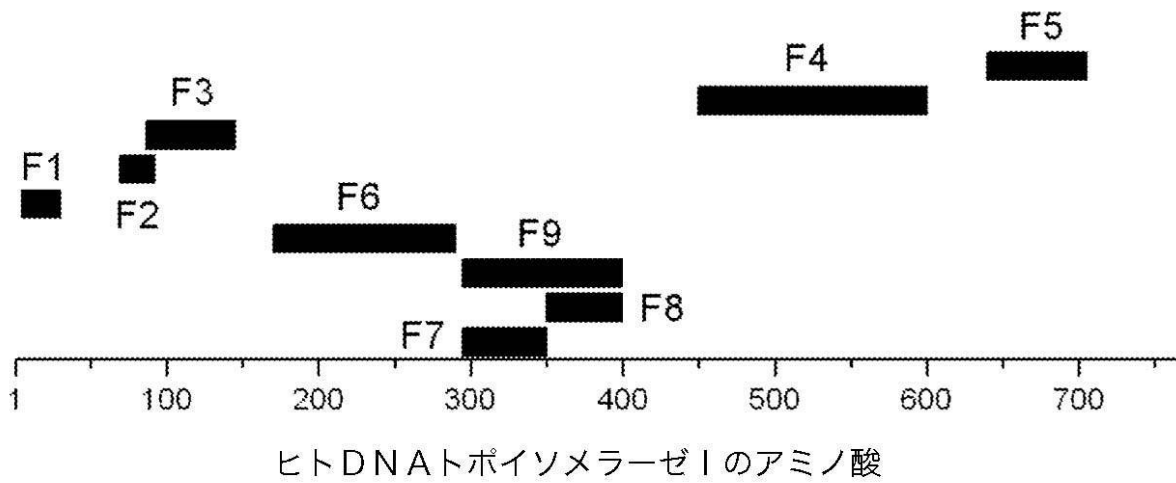
1. Varga J, Abraham D. Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. *J Clin Invest* 2007;**117**:557-67.
2. Okano Y. Antinuclear antibody in systemic sclerosis (scleroderma). *Rheum Dis Clin North Am* 1996;**22**:709-35.
3. Steen VD, Powell DL, Medsger TA Jr. Clinical correlations and prognosis based on serum autoantibodies in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1988;**31**:196-203.
4. Kuwana M, Kaburaki J, Okano Y, Tojo T, Homma M. Clinical and prognostic associations based on serum antinuclear antibodies in Japanese patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1994;**37**:75-83. 10
5. LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R, Jablonska S, Krieg T, Medsger TA Jr, et al. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol* 1988;**15**:9202-5.
6. Gussin HA, Ignat GP, Varga J, Teodorescu M. Anti-topoisomerase I (anti-Scl-70) antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2001;**44**:376-83.
7. Hamidou MA, Audrain MA, Masseur A, Agard C, Moreau A. Anti-topoisomerase I antibodies in systemic lupus erythematosus as a marker of severe nephritis. *Clin Rheumatol* 2006;**25**:542-3. 20
8. Czirják L, Kumánovics G, Varjú C, Nagy Z, Pákozdi A, Szekanecz Z et al. Survival and causes of death in 366 Hungarian patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*. 2008;**67**:59-63.
9. Ansuini H, Cicchini C, Nicosia A, Tripodi M, Cortese R, Luzzago A. Biotin-tagged cDNA expression libraries displayed on lambda phage: a new tool for the selection of natural protein ligands. *Nucleic Acids Res* 2002;**30**: e78.
10. Czömpöly T, Olasz K, Simon D, Nyárády Z, Pálincás L, Czirják L et al. A possible new bridge between innate and adaptive immunity: Are the anti-mitochondrial citrate synthase autoantibodies components of the natural antibody network? *Mol Immunol* 2006;**43**:1761-8. 30
11. Santini C, Brennan D, Mennuni C, Hoess RH, Nicosia A, Cortese R et al. Efficient display of an HCV cDNA expression library as C-terminal fusion to the capsid protein D of bacteriophage lambda. *J Mol Biol* 1998;**282**:125-35.
12. D'Arpa, P, White-Cooper H, Cleveland DW, Rothfield NF, Earnshaw WC. Use of molecular cloning methods to map the distribution of epitopes on topoisomerase I (Scl-70) recognized by sera of scleroderma patients. *Arthritis Rheum* 1990;**33**:1501-11. 40
13. Verheijen, R, Van den Hoogen F, Beijer R, Richter A, Penner E, Habets WJ et al. A recombinant topoisomerase I used for autoantibody detection in sera from patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol* 1990;**80**:38-43.
14. Piccinini G, Cardellini E, Reimer G, Arnett FC, Durban E. An antigenic region of topoisomerase I in DNA polymerase chain reaction-generated fragments recognized by autoantibodies of scleroderma patients. *Mol Immunol* 1991;**28**:333-9.

15. Cram DS, Fisicaro N, McNeilage LJ, Coppel RL, Harrison LC. Antibody specificities of Thai and Australian scleroderma sera with topoisomerase I recombinant fusion proteins. *J Immunol* 1993;**151**:6872-81.
16. Kuwana M, Kaburaki J, Mimori T, Tojo T, Homma M. 1993. Autoantigenic epitopes on DNA topoisomerase I: clinical and immunogenetic associations in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1993;**36**:1406-13.
17. Seelig HP, Schroter H, Ehrfeld H, Renz M. Autoantibodies against topoisomerase I detected with the natural enzyme and overlapping recombinant peptides. *J Immunol Methods* 1993;**165**:241-52. 10
18. Kato T, Yamamoto K, Takeuchi H, Okubo M, Hara E, Nakada S, *et al.* Identification of a universal B cell epitope on DNA topoisomerase I, an autoantigen associated with scleroderma. *Arthritis Rheum* 1993;**36**:1580-7.
19. Kuwana M, Kaburaki J, Medsger TA Jr, Wright TM. An immunodominant epitope on DNA topoisomerase I is conformational in nature: heterogeneity in its recognition by systemic sclerosis sera. *Arthritis Rheum* 1999;**42**:1179-88.
20. Henry PA, Atamas SP, Yurovsky VV, Luzina I, Wigley FM, White B. Diversity and plasticity of the anti-DNA topoisomerase I autoantibody response in scleroderma. *Arthritis Rheum* 2000;**43**:2733-42. 20
21. Hu PQ, Fertig N, Medsger TA Jr, Wright TM. Molecular recognition patterns of serum anti-DNA topoisomerase I antibody in systemic sclerosis. *J Immunol* 2004;**173**:2834-41.
22. Casciola-Rosen L, Andrade F, Ulanet D, Wong WB, Rosen A. Cleavage by granzyme B is strongly predictive of autoantigen status: implications for initiation of autoimmunity. *J Exp Med* 1999;**190**:815-26. 30
23. Redinbo, M. R., Stewart, L., Kuhn, P., Champoux, J. J. and Hol, W. G. J. 1998. Crystal structures of human topoisomerase I in covalent and noncovalent complexes with DNA. *Science* 279:1504.

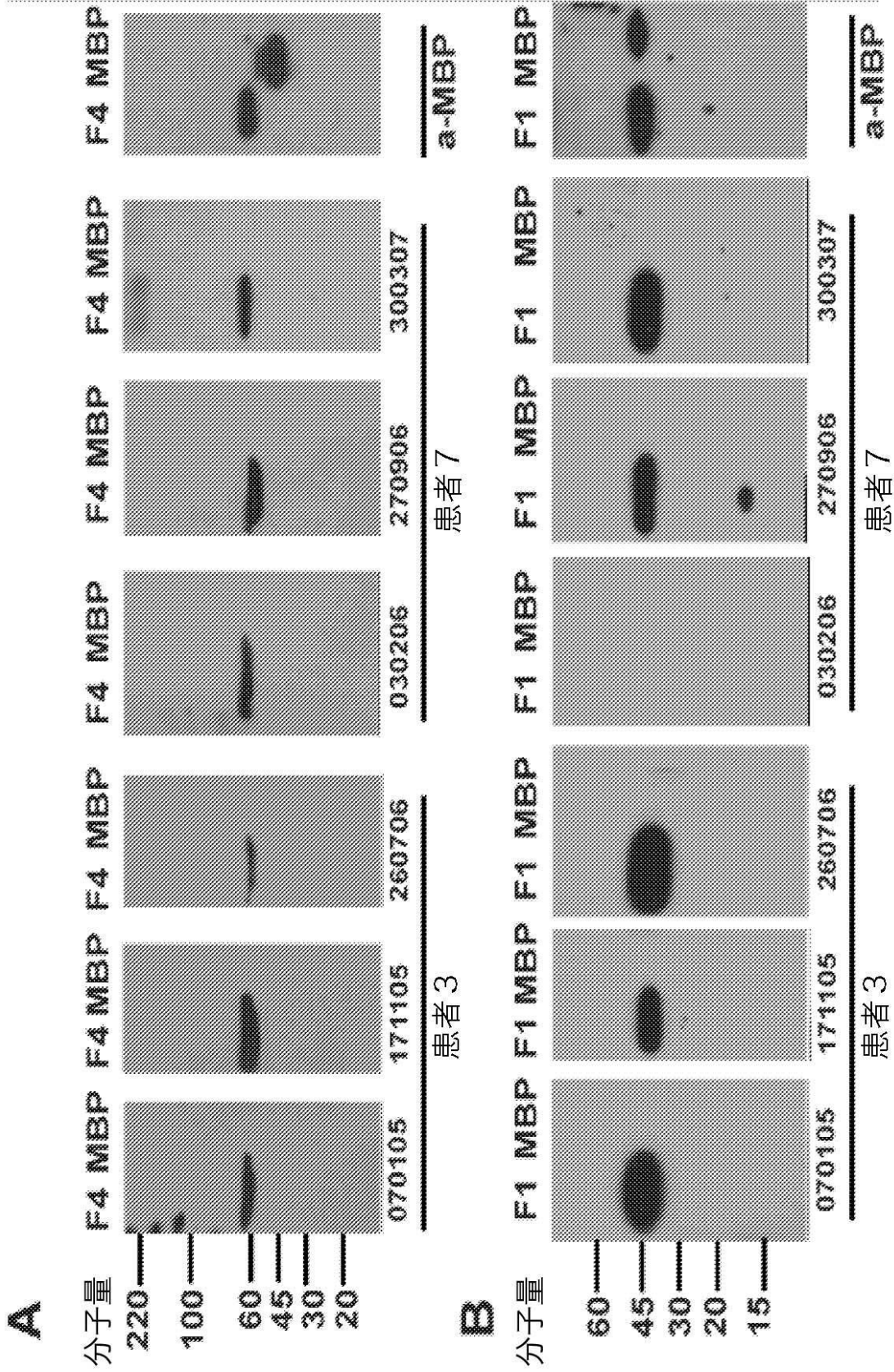
【図1】



【図2】



【 図 3 】



【 配 列 表 】

2011528799000001 . app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2009/053160

| | | |
|---|---|---|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/53 | | |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED | | |
| Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | MAUL G G ET AL: "Determination of an epitope of th ediffuse sytemic sclerosis marker antigen DNA topoisomerase I: Sequence similarity with retroviral p30 gag protein suggest a possible cause for autoimmunity in systemic sclerosis" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, DC, US, no. 86, 1 November 1989 (1989-11-01), pages 8492-8496, XP002079331 ISSN: 0027-8424 abstract ----- -/- | 1-12 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Further documents are listed in the continuation of Box C. | <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex. |
| * Special categories of cited documents: | | |
| *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance | | *T* 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 |
| *E* earlier document but published on or after the international filing date | | *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 |
| *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | | *Y* 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. |
| *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means | | *Z* document member of the same patent family |
| *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | | |
| Date of the actual completion of the international search | Date of mailing of the international search report | |
| 15 October 2009 | 28/10/2009 | |
| Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016 | Authorized officer Moreno de Vega, C | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2009/053160

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|--|-----------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages. | Relevant to claim No. |
| A | D'ARPA P. ET AL: "Use of molecular cloning methods to map the distribution of epitopes on topoisomerase I (Sc1-70) recognized by sera of scleroderma patients" ARTHRITIS AND RHEUMATISM, LIPPINCOTT, PHILADELPHIA, US, [Online] vol. 33, no. 10, 1 January 1990 (1990-01-01), pages 1501-1511, XP009124204 ISSN: 0004-3591 Retrieved from the Internet: URL: http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/jhome/112142621 the whole document | 1-12 |
| A | EP 0 787 795 A1 (HOECHST JAPAN [JP]) 6 August 1997 (1997-08-06) claims 1-24 | 1-12 |
| A | HU, PAUL Q.: "MOLECULAR RECOGNITION PATTERNS OF SERUM ANTI-DNA TOPOISOMERASE I ANTIBODY IN SYSTEMIC SCLEROSIS" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 173, 2004, pages 2834-2841, XP002550660 cited in the application the whole document | 1-12 |
| X,P | SIMON, D. ET AL: "Naturally occurring and disease-associated autoantibodies against topoisomerase I: a fine epitope mapping study in systemic sclerosis and systemic lupus erythematosus." INTERNATIONAL IMMUNOLOGY, vol. 21, no. 4, 11 February 2009 (2009-02-11), pages 415-422, XP002550661 the whole document | 1-12 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2009/053160

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|------------------|-------------------------|------------------|
| EP 0787795 A1 | 06-08-1997 | AU 696549 B2 | 10-09-1998 |
| | | AU 1283395 A | 17-07-1995 |
| | | AU 8177394 A | 06-07-1995 |
| | | CA 2138932 A1 | 29-06-1995 |
| | | WO 9518218 A1 | 06-07-1995 |
| | | US 5849503 A | 15-12-1998 |

フロントページの続き

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

(74)代理人 100102897
弁理士 池田 幸弘

(74)代理人 100097870
弁理士 梶原 齋子

(74)代理人 100140556
弁理士 新村 守男

(74)代理人 100114719
弁理士 金森 久司

(74)代理人 100124969
弁理士 井上 洋一

(74)代理人 100132492
弁理士 弓削 麻理

(74)代理人 100163485
弁理士 渡邊 義敬

(74)代理人 100112243
弁理士 下村 克彦

(72)発明者 メネス、ペーター
ハンガリー共和国、ペーチ、ハビヘギー ユー . 5 8 / 1

(72)発明者 チェムペリー、タマス
ハンガリー共和国、ドムボパール、ラドノティ ユー . 4 0 .

(72)発明者 ベルキ、ティメア
ハンガリー共和国、ペーチ、ハビヘギー ユー . 5 8 / 1

(72)発明者 チルヤク、ラズロ
ハンガリー共和国、ペーチ、ハビヘギー ユー . 5 6 / 3

Fターム(参考) 4B024 AA11 BA11 CA11 DA05 EA04 GA11 HA01

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 诊断全身性疾病 | | |
| 公开(公告)号 | JP2011528799A | 公开(公告)日 | 2011-11-24 |
| 申请号 | JP2011519271 | 申请日 | 2009-07-21 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 佩奇大学 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 佩奇大学 | | |
| [标]发明人 | メネスペーター チェムペリータマス ベルキティメア チルヤクラズロ | | |
| 发明人 | メネス、ペーター チェムペリー、タマス ベルキ、ティメア チルヤク、ラズロ | | |
| IPC分类号 | G01N33/53 C12N15/09 | | |
| CPC分类号 | G01N33/564 C12Q1/533 G01N2333/99 G01N2800/104 | | |
| FI分类号 | G01N33/53.ZNA.N C12N15/00.A | | |
| F-TERM分类号 | 4B024/AA11 4B024/BA11 4B024/CA11 4B024/DA05 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 | | |
| 代理人(译) | 池田幸 新村守男 井上洋一 下村胜彦 | | |
| 优先权 | 2008000448 2008-07-21 HU | | |
| 其他公开文献 | JP2011528799A5 | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

发现在dcSSc患者，lcSSc患者和SLE患者之间识别的拓扑I表位的类型是不同的。F4片段（氨基酸（AA）450-600）被所有检查的患者识别。F1片段（AA 5-30）和F8片段（AA 350-400）分别代表dcSSc和SLE的特征性表位。本发明涉及诊断用途和方法以及用于诊断的试剂盒。

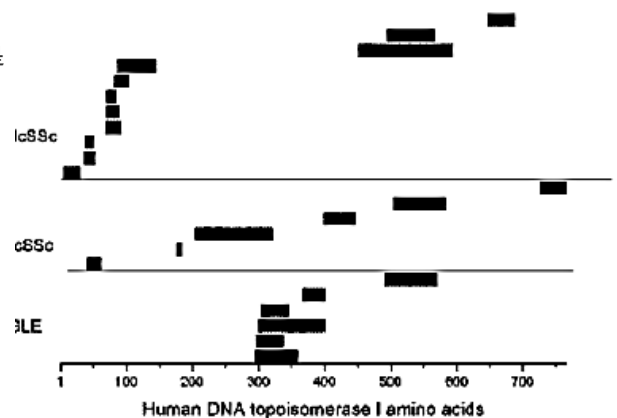


FIGURE 1