

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2019-81774

(P2019-81774A)

(43) 公開日 令和1年5月30日(2019.5.30)

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)	
<b>C07K 14/47</b>	<b>(2006.01)</b>	C O 7 K	14/47	Z N A	4 B O 6 5
<b>C07K 17/00</b>	<b>(2006.01)</b>	C O 7 K	17/00		4 H O 4 5
<b>C07K 16/18</b>	<b>(2006.01)</b>	C O 7 K	16/18		
<b>C12N 5/12</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N	5/12		
<b>C12N 5/10</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N	5/10		

審査請求 有 請求項の数 20 O L 外国語出願 (全 33 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2019-14527 (P2019-14527)  
 (22) 出願日 平成31年1月30日 (2019.1.30)  
 (62) 分割の表示 特願2014-536080 (P2014-536080) の分割  
 原出願日 平成24年10月19日 (2012.10.19)  
 (31) 優先権主張番号 61/550,046  
 (32) 優先日 平成23年10月21日 (2011.10.21)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 511219526  
 オージェックス ライフ サイエンスズ  
 コーポレイション  
 カナダ国, ブイアキー 1 エス7 プリテ  
 イッシュ コロンビア, ノース バンクー  
 バー, デンプシー ロード 1 4 2 3  
 (74) 代理人 100099759  
 弁理士 青木 篤  
 (74) 代理人 100077517  
 弁理士 石田 敬  
 (74) 代理人 100087871  
 弁理士 福本 積  
 (74) 代理人 100087413  
 弁理士 古賀 哲次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 シトルリン化14-3-3由来の抗原、及び関節リウマチの診断におけるその使用

(57) 【要約】

【課題】本発明は、関節炎症状、例えば関節リウマチを評価するための、シトルリン化14-3-3 ペプチド及びこれに対する抗体、並びにこれらを用いる方法を提供する。

【解決手段】関節炎症状に罹患している患者の血清中に存在する抗14-3-3 自己抗体により特異的に認識される、単離されたシトルリン化14-3-3 タンパク質又はこれの断片。

【選択図】 図1

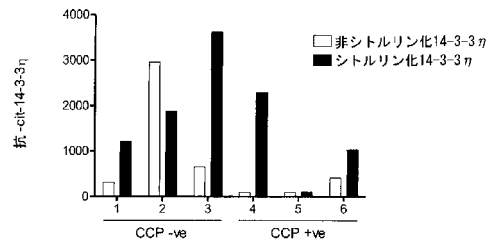


FIG. 1

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

関節炎症状に罹患している患者の血清中に存在する抗 1 4 - 3 - 3 自己抗体により特異的に認識される、単離されたシトルリン化 1 4 - 3 - 3 タンパク質又はこれの断片。

**【請求項 2】**

配列番号 5 の 4 番目、1 2 番目、1 9 番目、4 2 番目、6 1 番目、8 6 番目、及び 2 2 7 番目からなる群から選択される位置においてシトルリン残基を含む、請求項 1 に記載のタンパク質。

**【請求項 3】**

配列番号 1 6 ~ 2 2 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載のタンパク質。

10

**【請求項 4】**

前記関節炎症状が関節リウマチである、請求項 1 に記載のタンパク質。

**【請求項 5】**

固体支持体と結合する、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の少なくとも 1 つのシトルリン化 1 4 - 3 - 3 タンパク質を含む、組成物。

**【請求項 6】**

請求項 1 に記載の少なくとも 1 つのシトルリン化 1 4 - 3 - 3 タンパク質を含むキット。

**【請求項 7】**

20

対象の関節炎症状を診断する方法であって、

シトルリン化 1 4 - 3 - 3 タンパク質又はこれらの断片と、生体サンプル中に存在し得るシトルリン化 1 4 - 3 - 3 タンパク質又はこれの断片に対する自己抗体との少なくとも 1 つの免疫複合体の形成に好適な条件下で、対象由来の生体サンプルと、少なくとも 1 つのシトルリン化 1 4 - 3 - 3 タンパク質又はこれらの断片を接触させ；そして

シトルリン化 1 4 - 3 - 3 タンパク質又はこれらの断片と、シトルリン化 1 4 - 3 - 3 タンパク質又はこれらの断片に対する自己抗体との免疫複合体の存在を検出することを含み；

ここで、前記免疫複合体の前記存在が、前記対象における関節炎症状の指標である、方法。

30

**【請求項 8】**

前記検出工程が、シトルリン化 1 4 - 3 - 3 タンパク質又はこれの断片に対する自己抗体の量を測定することをさらに含む、請求項 7 に記載の方法。

**【請求項 9】**

前記シトルリン化 1 4 - 3 - 3 タンパク質が、シトルリン化 1 4 - 3 - 3 である、請求項 7 に記載の方法。

**【請求項 10】**

前記シトルリン化 1 4 - 3 - 3 タンパク質が、シトルリン化 1 4 - 3 - 3 の断片である、請求項 7 に記載の方法。

**【請求項 11】**

40

前記シトルリン化 1 4 - 3 - 3 タンパク質又はこれの断片が、放射性標識、発光標識及び蛍光標識、並びに酵素からなる群から選択される標識により検出可能に標識される、請求項 7 に記載の方法。

**【請求項 12】**

前記シトルリン化 1 4 - 3 - 3 タンパク質又はこれの断片が固体支持体に結合する、請求項 7 に記載の方法。

**【請求項 13】**

前記自己抗体が、E L I S A アッセイにより検出される、請求項 7 に記載の方法。

**【請求項 14】**

前記検出が、化学発光により生じる、請求項 7 に記載の方法。

50

## 【請求項 15】

前記関節炎症状が関節リウマチである、請求項 7 に記載の方法。

## 【請求項 16】

請求項 1 に記載のシトルリン化 14 - 3 - 3 タンパク質に対する抗体。

## 【請求項 17】

前記抗体が、シトルリン化形態と選択的に結合する、請求項 16 に記載の抗体。

## 【請求項 18】

請求項 16 に記載の抗体を産生する非ヒト宿主。

## 【請求項 19】

前記宿主が、ハイブリドーマ細胞株である、請求項 19 に記載の宿主。

10

## 【請求項 20】

対象の関節炎症状を診断及び / 又は予後診断する方法であって、

抗体と生体サンプル中に存在し得るシトルリン化 14 - 3 - 3 タンパク質との少なくとも 1 つの免疫複合体の形成に好適な条件下で、対象由来の生体サンプルと、シトルリン化ヒト 14 - 3 - 3 タンパク質又はこれの断片に対して選択的に結合することができる少なくとも 1 つの抗体を接触させ ; そして

前記シトルリン化 14 - 3 - 3 タンパク質内の少なくとも 1 つのシトルリン残基の存在、程度、及び / 又は位置を検出することを含み、

ここで、前記少なくとも 1 つのシトルリン残基の存在、程度、及び / 又は位置は、前記対象の関節炎症状の指標又は前記対象の予後の情報である、方法。

20

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

## 発明の分野

本発明は、一般に、関節炎症状に罹患している患者の血清中に存在する血清自己抗体、及び特に、抗 14 - 3 - 3 自己抗体により特異的に結合されるシトルリン化ペプチドに関する。かかるペプチドは、天然配列中のアルギニンがシトルリンに脱イミノ化されている、シトルリン化 14 - 3 - 3 配列、又はこれらの部分を含む。本発明はまた、関節リウマチを含む関節炎症状を評価するためのこれらのペプチド、及びこれらのシトルリン化ペプチドに対する抗体の使用に関する。

30

## 【背景技術】

## 【0002】

## 発明の背景

関節炎又は関節痛は、一般に、身体の関節の炎症性障害を意味し、通常、痛み、腫脹及び硬直を伴う。関節炎は、感染症、外傷、変性疾患、代謝性疾患若しくは妨害、又は他の未知の病因を含むいくつかの原因のいずれかに起因する可能性がある。

## 【0003】

関節リウマチ (RA) は、例えば、滑膜の慢性炎症性疾患であり、最も一般的な全身性自己免疫疾患の一つである。RA の診断は、臨床症状に主に依存するが、実験室での結果は、鑑別診断や疾患管理に役立つ。RA の早期診断は、病気の治療と管理の両方において重要である (Kim and Weisman (2000) *Arthritis. Rheum.* 43:473-84)。

40

## 【0004】

罹患患者の血清は、疾患についてのマーカーである可能性のある因子を含み、早期診断を可能にする。歴史的に見て、リウマチ因子 (RF) は、長い間、RA の主要な血清学的指標の一つとなっている。さらに、抗核周固自己抗体としても知られている抗ケラチン自己抗体 (AKA) は、RA 患者の 40 ~ 55 %、及び RF 陰性である臨床的に診断された RA 患者の 40 ~ 50 % において検出される (Vincent et al. (1989) *Ann. Rheum. Dis.* 48:712-22; Corconnier et al. (1996) *Br. J. Rheumatol.* 35:620-4; Gabay et al. (1993) *Ann. Rheum. Dis.* 52:785-9)。AKA は、一般に、RF よりも有意に特異的であると考えられている。さらに、AKA は数ヶ月又は数年、RA の臨床的所見に先行し得る。

50

“Compositions and Methods for Characterizing Arthritic Conditions”のタイトルが付けられたPCT出願公開第2010102412号はまた、14-3-3タンパク質に対する自己抗体や、RAなどの関節炎症状を評価するためにそれらを使用する方法を記載する。例えば、14-3-3は、通常は細胞内タンパク質であり、疾患状態においてのみ、それは細胞外空間に放出される。このような、血清14-3-3及び/又はこれに対する自己抗体は、早期の及び確立したRAにおける他の血清学的指標を補完するマーカーとして診断の有用性を有し、RA及びPsAにおける関節損傷に関連する。

#### 【0005】

近年、AKAが、シトルリンを含むエピトープを認識することが解明された(von Venrooj (2000) Arthritis Res. 52:785-9)。シトルリン化は、翻訳後修飾(PTM)の形態であり、ペプチジルアルギニンデイミナーゼ(PAD)が、アミノ酸であるアルギニン(R)から窒素を含有する部分を遊離させる化学的変化をもたらすシトルリン(C)への脱イミノ化を触媒する。調節不全のシトルリン化は、RA等の炎症性症状における活性プロセスであるように見え、「発作(insult)」は、1)PADの活性化;2)PAD酵素の滑膜腔への放出;3)ピメンチン及びフィラグリン等の細胞外タンパク質のシトルリン化;4)シトルリン化抗原に対する体液性免疫応答;及び5)疾患の持続をもたらす。これらの抗シトルリン化抗体の検出は、RAの早期診断においても有用であり得る。

#### 【0006】

CCP(環状シトルリン化ペプチド)として知られているシトルリンを含む合成ペプチドに対するIgG抗体は、RAの他の自己免疫疾患からの識別において、AKAテスト又はRFテストのいずれかよりも優れていることが証明されており、抗CCP抗体の存在は、RAに罹患した患者において、RFレベルの上昇に独立して生じる。しかしながら、著しい割合の患者は、抗CCPに対して血清学的に陰性であるか、血清学的に陰性であるままである。従って、この疾患の優れた、且つより特異的な診断指標の著しい必要性は、当該技術分野において依然として存在する。

#### 【発明の概要】

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0007】

#### 発明の概要

本明細書に開示されるように、ヒト14-3-3のシトルリン化部位は、インシリコで、インビトロで、そして臨床サンプルを用いて同定されている。14-3-3のシトルリン化形態、及び/又は14-3-3の生来の又は非シトルリン化形態と比べてこれらの翻訳後修飾に特異的な抗14-3-3自己抗体は、抗CCP陰性患者を含む関節リウマチの診断及び予後診断のために用いられ得る。特に、そして本明細書で初めて開示されるように、14-3-3は、健康な対象に対して抗CCP陰性RA患者において差次的に発現される新規シトルリン化標的を表し、シトルリン化タンパク質、及び/又はシトルリン化14-3-3に特異的な自己抗体の検出は、RA診断を著しく改善し得ることを示す。

#### 【0008】

従って、本発明は、例えば、関節リウマチの診断および予後診断のための、シトルリン化14-3-3タンパク質又はこれのシトルリン化断片を含む組成物、及びこれらを用いる方法を提供する。また、本明細書において、対応する生来の又は非シトルリン化形態と対照的に、シトルリン化14-3-3タンパク質と選択的に、又は前記タンパク質内のシトルリン化部位に特異的に結合するモノクローナル抗体を含む組成物、及びこれらを用いる方法も提供する。

#### 【0009】

1つの態様では、本発明は、生体サンプル中の14-3-3のシトルリン化形態に対する自己抗体の存在/量が、対象における関節炎症状の存在及び/又は状態の指標であるという発見に関する。本明細書において、対象由来の生体サンプルにおいて、少なくとも1つのシトルリン化14-3-3タンパク質又はこれの断片との循環免疫複合体を検出

10

20

30

40

50

することを含む、哺乳動物対象における関節炎症状を評価及び／又は特徴付けるための方法も提供する。

【0010】

好ましい実施形態では、該シトルリン化14-3-3タンパク質又はこれの断片は、少なくとも1つのシトルリン化部位、好ましくは、生来の14-3-3配列の4番目、12番目、19番目、42番目、61番目、86番目、若しくは277番目からなる群から選択される部位、又はこれらの組み合わせにおいて、少なくとも1つのシトルリン残基を含む。シトルリン化14-3-3タンパク質又はこれの断片は、単離されてもよく、あるいは、より好ましくは、本明細書においてより詳細に記載するように、固体支持体と結合してもよい。

10

【0011】

従って、哺乳動物対象において関節炎症状を評価及び／又は特徴付けるための方法であって、対象由来の生体サンプルと少なくとも1つのシトルリン化14-3-3タンパク質又はこれの断片を接触させ、そしてシトルリン化14-3-3タンパク質又はこれの断片に対する自己抗体を検出することを含み、ここで前記少なくとも1つのシトルリン化14-3-3タンパク質又はこれの断片に対する自己抗体の存在／量が、対象における関節炎症状の存在及び／又は状態の指標である方法は、本明細書に記載される。また、哺乳動物対象において関節炎症状を評価及び／又は特徴付けるための方法であって、対象由来の生体サンプル中の自己抗体と少なくとも1つのシトルリン化14-3-3タンパク質との循環免疫複合体を検出することを含み、ここでサンプル中の存在する免疫複合体の存在／量が、対象における関節炎症状の存在及び／又は状態の指標である方法は、明細書において提供される。

20

【0012】

1つの実施形態では、前記検出工程は、対照サンプルと比較するための、生体サンプル中のシトルリン化14-3-3タンパク質若しくはこれの断片に対する自己抗体、又はシトルリン化14-3-3タンパク質若しくはこれの断片との免疫複合体のレベルを定量／測定することを含む。従って、対象における関節炎症状を評価するための現在特許請求の範囲に記載の方法は、予後診断及び診断決定を提供することができる。

【0013】

1つの態様では、該対照サンプルは正常対照であり、そして比較は、関節炎診断の指標である。1つの実施形態では、正常対照サンプル（例えば、関節炎症状を有しない別の対象からの）と比べた前記生体サンプル中のシトルリン化14-3-3タンパク質若しくはこれの断片に対する自己抗体、又はシトルリン化14-3-3タンパク質若しくはこれの断片との免疫複合体の増加したレベルは、前記対象における関節炎症状の診断的指標である。

30

【0014】

従って、態様によっては、対象由来の生体サンプル中のシトルリン化14-3-3タンパク質に対する自己抗体若しくはこれらの免疫複合体の存在、及び／又は正常な（即ち、非関節炎の）対照サンプル中のかかる自己抗体又は免疫複合体のレベルと比較して、対象由来の生体サンプル中のかかる自己抗体又は免疫複合体の上昇したレベルの存在は、対象が関節炎症状を有するという診断を提供する。

40

【0015】

1つの態様では、対照サンプルは、哺乳動物対象由来の先の生体サンプルであり、そして比較は、疾患進行及び／又は治療計画の有効性の指標である。1つの実施形態では、先のサンプル（例えば前記対象由来のベースライン生体サンプル）と比較した前記サンプル中のシトルリン化14-3-3に対する自己抗体、又はこれらの循環免疫複合体の減少したレベルは、継続中の治療計画の有効性の指標である。別の実施形態では、先のサンプルと比較した前記サンプル中のシトルリン化14-3-3に対する自己抗体、又はこれらの循環免疫複合体の上昇したレベルは、治療計画に対する応答の欠如の指標である。

【0016】

50

従って、態様によっては、同一の対象からのベースライン生体サンプル中に存在するかどうか自己抗体又は複合体のレベルと比較した、対象由来の生体サンプル中で検出されるシトルリン化 1 4 - 3 - 3 若しくはこれの断片に対する自己抗体、又はシトルリン化 1 4 - 3 - 3 若しくはこれの断片との免疫複合体の相対レベルは、関節炎症状の診断的指標、及び / 又は提案される治療計画の潜在的な有効性の治療診断的 (theranostic) 指標を提供する。

【 0 0 1 7 】

1つの態様では、対照サンプルは、哺乳動物対象由来の同一の生体サンプルであり、そして比較は、生来の又は非シトルリン化 1 4 - 3 - 3 に対する自己抗体の相対レベル又は量であり、これは、本明細書に記載されるような疾患進行及び / 又は潜在的な治療計画の有効性の指標となり得る。1つの実施形態では、同一のサンプル中の生来の又は非シトルリン化 1 4 - 3 - 3 に対する自己抗体、又はこれの循環免疫複合体のレベルと比較した、前記サンプル中のシトルリン化 1 4 - 3 - 3 に対する自己抗体、又はこれらの循環免疫複合体の上昇したレベルは、疾患のステージ及び / 又は予後の指標であり、あるいは潜在的な治療介入 (例えば、ペプチジルアルギニンデイミナーゼ等を直接標的とする阻害剤) の示唆である。

10

【 0 0 1 8 】

従って、態様によっては、対象からの同一の又は連続する生体サンプル中の生来の又は非シトルリン化形態に対する自己抗体又は複合体のレベルと比較した、対象由来の生体サンプル中で検出されるシトルリン化 1 4 - 3 - 3 又はこれの断片に対する自己抗体、又はシトルリン化 1 4 - 3 - 3 又はこれの断片との免疫複合体の相対レベルは、関節炎症状の予後診断的指標、及び / 又は提案される治療計画の潜在的な有効性の治療診断的指標を提供する。

20

【 0 0 1 9 】

1つの態様では、前記対照サンプルは関節炎対象であり、前記比較は、疾患予後の指標である。1つの実施形態では、関節炎対照サンプル (例えば、明確に定義された関節炎症状を有する別の対象からの) と比較したシトルリン化 1 4 - 3 - 3 に対する自己抗体又はこれの免疫複合体の相対レベルは、関節炎の予後診断的指標である。

【 0 0 2 0 】

従って、態様によっては、異なる関節炎状態を有する対象は、少なくとも1つのシトルリン化 1 4 - 3 - 3 タンパク質又はこれの断片に対する自己抗体、及び / 又はこれの循環免疫複合体のレベルにおける検出可能な差異を有し、そしてこれらの差異は予後診断的に関連する。1つの例によれば、別の患者等において、関節炎症状の経過、例えば治療前、治療の間、治療後を通じて存在する、先に決定されたレベルと比較した、対象において検出される自己抗体の相対レベルに基づいて、関節炎症状の特定の疾患ステージ、又は組織病理学的表現型を決定するために用いられる方法は、本明細書で開示される。別の例によれば、本明細書で開示される方法は、例えばデータベースに保存されてもよい対照サンプルと比較した生体サンプル中で検出される自己抗体の相対レベルに基づいて、関節炎症状の発症についての高いリスクにおける対象に由来するとして生体サンプルを分類するために用いてもよい。

30

40

【 0 0 2 1 】

別の態様では、本明細書で開示される方法は、診断的治療目的、例えば対照サンプル、例えば、提案された治療計画を用いて首尾よく治療された第二の対象由来の第二の生体サンプルと比較した、対象由来の生体サンプル中において検出される自己抗体の相対レベルに基づいて提案された治療計画に対する対象の応答性を予測するために用いてもよい。

【 0 0 2 2 】

従って、態様によっては、第一の対象由来の生体サンプル中の少なくとも1つのシトルリン化 1 4 - 3 - 3 タンパク質若しくはこれの断片に対する自己抗体、又はシトルリン化 1 4 - 3 - 3 タンパク質若しくはこれの断片との免疫複合体の相対レベルは、治療に対して応答する能力が知られている対象由来の生体サンプル中のシトルリン化 1 4 - 3 -

50

3 に対する自己抗体、又はシトルリン化 14-3-3 との免疫複合体のレベルは比較され、ここでかかる比較は、治療に対する第一の対象の応答可能性を決定する。治療計画に対する対象の感受性の決定は、従って、関節炎症状を有する対象を治療する方法を知らせるために用いられてもよい。例えば、関節炎症状を有する対象を治療する方法であって、対象由来の生体サンプル中のシトルリン化 14-3-3 に対する自己抗体のレベルを測定すること（例えば、自己抗体/シトルリン化 14-3-3 免疫複合体形成のレベルを測定することにより）、治療計画に対する対象の感受性と、シトルリン化 14-3-3 に対する自己抗体、又はシトルリン化 14-3-3 との免疫複合体のレベルとを関連づけること、及び対象に治療計画を提供することを含む方法は、本明細書に記載される。1つの態様では、本発明は、関節炎症状の治療をモニタリングするための方法であって、患者サンプル中の少なくとも1つのシトルリン化 14-3-3 タンパク質若しくはこれの断片に対する自己抗体、又はシトルリン化 14-3-3 タンパク質若しくはこれの断片との免疫複合体のレベルを決定すること、及び治療中の患者中のシトルリン化 14-3-3 に関する自己抗体/免疫複合体のレベルをモニタリングすることを含む方法を提供する。

10

**【0023】**

別の態様では、患者において、関節炎のサブタイプを決定及び/又は識別するための方法が本明細書において提供される。この態様では、第一の対象由来の生体サンプル中の少なくとも1つのシトルリン化 14-3-3 タンパク質若しくはこれの断片に対する自己抗体、又はシトルリン化 14-3-3 タンパク質若しくはこれの断片との免疫複合体の相対レベルは、関節炎のサブタイプが知られている、そして/あるいは予め確立されている1又はそれ以上の他の対象由来の生体サンプル中のシトルリン化 14-3-3 に対する自己抗体、又はシトルリン化 14-3-3 との免疫複合体のレベルは比較され、ここでかかる比較は、第一の対象についての関節炎のサブタイプを決定する。

20

**【0024】**

第一の対象由来の生体サンプル中の少なくとも1つのシトルリン化 14-3-3 タンパク質若しくはこれの断片に対する自己抗体、又はシトルリン化 14-3-3 タンパク質若しくはこれの断片との免疫複合体のレベルが、関節炎のサブタイプが知られている、そして/あるいは予め確立されている別の対象由来の生体サンプル中の少なくとも1つのシトルリン化 14-3-3 タンパク質若しくはこれの断片に対する自己抗体、又はシトルリン化 14-3-3 タンパク質若しくはこれの断片との免疫複合体のレベルが同等であるとの決定は、第一の対象が、他の対象と同一の関節炎のサブタイプを有することを示し得る。例えば、第一の対象由来の生体サンプル中と、炎症性関節炎、例えば関節リウマチを有することが知られている別の対象の生体サンプル中の少なくとも1つのシトルリン化 14-3-3 タンパク質若しくはこれの断片に対する自己抗体、又はシトルリン化 14-3-3 タンパク質若しくはこれの断片との免疫複合体の同様のレベルは、第一の対象はまた、炎症性関節炎、例えば関節リウマチを有することを決定してもよい。

30

**【0025】**

加えて、第一の対象由来の生体サンプル中の少なくとも1つのシトルリン化 14-3-3 タンパク質若しくはこれの断片に対する自己抗体、又はシトルリン化 14-3-3 タンパク質若しくはこれの断片との免疫複合体のレベルが、関節炎のサブタイプが知られている、そして/あるいは予め確立されている別の対象由来の生体サンプル中の少なくとも1つのシトルリン化 14-3-3 タンパク質若しくはこれの断片に対する自己抗体、又はシトルリン化 14-3-3 タンパク質若しくはこれの断片との免疫複合体のレベルが異なることの決定は、第一の対象が他の対象のサブタイプと異なる関節炎のサブタイプを有することを示し得る。例えば、第一の対象由来の生体サンプル中と、非炎症性関節炎、例えば、骨関節炎を有することが知られている別の対象の生体サンプル中の少なくとも1つのシトルリン化 14-3-3 タンパク質若しくはこれの断片に対する自己抗体、又はシトルリン化 14-3-3 タンパク質若しくはこれの断片との免疫複合体の異なるレベルは、第一の対象はまた、炎症性関節炎、例えば関節リウマチを有することを決定してもよい。

40

50

## 【 0 0 2 6 】

1つの実施形態では、検出工程は、免疫学に基づく技術、例えば免疫沈殿、E L I S A、ウェスタンブロット分析、免疫組織化学、免疫蛍光、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫放射線アッセイ、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散アッセイ、インサイチュイムノアッセイ、沈殿反応、凝集アッセイ、補体結合アッセイ、タンパク質Aアッセイ、免疫電気泳動アッセイ、蛍光活性化セルソーティング(F A C S)分析、ラジオイムノアッセイ等を含む。

## 【 0 0 2 7 】

本明細書に記載される方法に従って、シトルリン化14-3-3タンパク質又はこれの断片に対する抗体を決定及び/又は測定することは、従って、自己抗体とシトルリン化14-3-3若しくはこれの断片との免疫複合体の形成を観察すること、あるいは、サンプル中に存在する自己抗体/シトルリン化14-3-3複合体の存在を決定することにより行なわれてもよい。1つの実施形態では、前記形成は、検出可能に標識されたシトルリン化14-3-3タンパク質又はこれの断片を用いることにより検出されてもよい。別の実施形態では、前記複合体は、自己抗体/シトルリン化14-3-3複合体と、免疫グロブリン、例えば、自己抗体の免疫グロブリン主鎖と結合する検出可能に標識された二次抗体との第二の免疫複合体を形成することにより検出してもよい。

10

## 【 0 0 2 8 】

1つの実施形態では、患者の血液、滑液、血漿、血清、又は組織(例えば滑膜関節、損傷した関節組織等)中のシトルリン化14-3-3に対する自己抗体、又はこれの循環免疫複合体を検出することに関する。1つの実施形態では、検出は、シトルリン化14-3-3タンパク質又はこれの断片を用いて、血液、滑液、血漿、血清、又は組織由来のシトルリン化14-3-3に対する自己抗体の免疫沈殿により行なう。1つの実施形態では、検出は、E L I S Aの使用に関する。1つの実施形態では、検出は、患者由来の滑液、血漿又は血清を含むサンプルのウェスタンブロット分析に関する。1つの実施形態では、検出は、ラジオイムノアッセイの使用に関する。1つの実施形態では、検出は、ストリップテストの使用に関する。1つの実施形態では、検出は、ポイントオブケア試験の使用に関する。1つの実施形態では、シトルリン化14-3-3タンパク質に対する自己抗体又はこれの循環複合体の検出は、関節炎(例えば、M M P、抗C C P、抗R F及び/又はC R P)の別のマーカーの検出と組み合わせられる。

20

30

## 【 0 0 2 9 】

対象における関節炎症状を評価するための試薬を含むキットであって、前記試薬は、シトルリン化14-3-3タンパク質又はこれの断片に対する自己抗体を特異的に認識するキットはまた、本明細書に記載される。1つの実施形態では、前記試薬は、固体支持体上で固定化されてもよい、検出可能に標識されたシトルリン化14-3-3タンパク質又はこれの断片を含んでもよい。シトルリン化14-3-3タンパク質又はこれの断片は、複数の14-3-3タンパク質アイソフォーム間で共有されるエピトープを含んでもよく、あるいは、シトルリン化14-3-3タンパク質アイソフォームの1つ又はサブセットに特有のエピトープを含んでもよい。好ましい実施形態では、シトルリン化14-3-3タンパク質又はこれの断片は、シトルリン化14-3-3及び/又はエピトープを含む。1つの実施形態では、前記シトルリン化14-3-3タンパク質又はこれの断片は、少なくとも1つの他のシトルリン化14-3-3アイソフォーム、例えば14-3-3により共有されるシトルリン化14-3-3エピトープを含む。別の実施形態では、シトルリン化14-3-3エピトープは、14-3-3に特有である。

40

## 【 0 0 3 0 】

別の態様では、生来のヒト14-3-3タンパク質又はこれらの生来のヒト14-3-3断片よりも、それぞれシトルリン化ヒト14-3-3タンパク質、又はこれらのシトルリン化断片に選択的に結合することができる抗体が、本明細書で提供される。好ましい実施形態では、単離された抗体は、14-3-3タンパク質の生来の又は非シトルリン化形態に特異的な抗14-3-3自己抗体ではなく、シトルリン化14-3-3タ

50

ンパク質に特異的な抗 14-3-3 自己抗体と、シトルリン化 14-3-3 タンパク質との結合について、競合する。

【0031】

1つの実施形態では、該抗体は、それぞれ生来の 14-3-3 タンパク質又は生来の 14-3-3 タンパク質断片よりも、シトルリン化 14-3-3 タンパク質又はそのシトルリン化断片と選択的に結合することができる。好ましい実施形態では、該抗体は、それぞれ、配列番号 9 ~ 15 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む生来の 14-3-3 タンパク質よりも、配列番号 16 ~ 22 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むシトルリン化 14-3-3 タンパク質と選択的に結合することができる。1つの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号 16 のアミノ酸配列を含むタンパク質と選択的に結合するが、配列番号 9 のアミノ酸配列を含むタンパク質と結合しない。1つの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号 17 のアミノ酸配列を含むタンパク質と選択的に結合するが、配列番号 10 のアミノ酸配列を含むタンパク質と結合しない。1つの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号 18 のアミノ酸配列を含むタンパク質と選択的に結合するが、配列番号 11 のアミノ酸配列を含むタンパク質と結合しない。1つの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号 19 のアミノ酸配列を含むタンパク質と選択的に結合するが、配列番号 12 のアミノ酸配列を含むタンパク質と結合しない。1つの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号 20 のアミノ酸配列を含むタンパク質と選択的に結合するが、配列番号 13 のアミノ酸配列を含むタンパク質と結合しない。1つの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号 21 のアミノ酸配列を含むタンパク質と選択的に結合するが、配列番号 14 のアミノ酸配列を含むタンパク質と結合しない。1つの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号 22 のアミノ酸配列を含むタンパク質と選択的に結合するが、配列番号 15 のアミノ酸配列を含むタンパク質と結合しない。別の実施形態では、該抗体は、生来の 14-3-3 タンパク質よりも、シトルリン化 14-3-3 タンパク質と選択的に結合することができる。

10

20

【0032】

別の態様では、本発明は、個人の 14-3-3 タンパク質のシトルリン化の程度及び/又はシトルリンの同定が、タンパク質内の特定の部位、例えば配列番号 5 の、位置 4、12、19、42、61、86 及び 227 の 1つ又はそれ以上において存在し、対象における関節炎症状の存在及び/又は状態の指標でもあるという発見に関する。哺乳動物対象中の関節炎症状を評価する、及び/又は特徴付けるための方法であって、前述の選択的な抗体を用いて、対象由来の生体サンプル中の少なくとも 1つのシトルリン化 14-3-3 タンパク質又はこれの断片の程度、及び/又は特定のシトルリン化位置を検出することを含まない方法も本明細書で提供される。

30

【0033】

従って、哺乳動物対象における関節炎症状を評価する、及び/又は特徴付けるための方法であって、対象由来の生体サンプルを、シトルリン化ヒト 14-3-3 タンパク質又はこれらのシトルリン化断片と選択的に結合することができる 1又は複数の抗体と接触させ、そしてシトルリン化 14-3-3 タンパク質又はこれの断片を検出することを含み、前記 14-3-3 タンパク質又はこれの断片内のシトルリン化の存在、程度及び位置が、定義された臨床試験結果標準と比較して、対象における関節炎症状の存在及び/又は症状の指標である方法を、本明細書で提供する。

40

【図面の簡単な説明】

【0034】

【図 1】図 1 は、14-3-3 抗原の組み換え非シトルリン化又はシトルリン化形態のいずれかに対する自己抗体の反応性により測定されるような、抗 CCP 陰性及び抗 CCP 陽性関節リウマチ (RA) 患者における 14-3-3 シトルリン化特異的自己抗体応答を表す棒グラフを示す。14-3-3 自己抗体は、抗 CCP 陰性及び陽性患者の両者において、14-3-3 抗原のシトルリン化形態と優先的に結合する。

50

## 【0035】

【図2】図2は、30の抗CCP陰性関節リウマチ(RA)患者( )と比較した30の抗CCP陰性健康対象( )における14-3-3 シトルリン化特異的自己抗体応答を表すドットプロットを示す。y軸(抗cit-14-3-3)は、各個人の対象に対する14-3-3 抗原のシトルリン化形態に対する自己抗体応答を表す。

## 【発明を実施するための形態】

## 【0036】

## 詳細な説明

「14-3-3」及び「14-3-3タンパク質」は互換的に用いられ、14-3-3ファミリーの少なくとも1つのメンバーを意味する。14-3-3タンパク質は、真核生物において偏在的に発現される保存された細胞内調節分子のファミリーのメンバーである。14-3-3タンパク質は、キナーゼ、ホスファターゼ、及び膜貫通受容体を含む、多数の機能的に多様なシグナル伝達タンパク質と結合する能力を有する。実際、100超のシグナル伝達タンパク質が、14-3-3リガンドとして報告されている。14-3-3タンパク質は、テトラトリコペプチド反復スーパーファミリーの進化したメンバーと考えられ得る。これらは、一般的に、9又は10個のヘリックスを有し、そして、通常、これらのアミノ末端のヘリックスに沿ったホモダイマー及び/又はヘテロダイマー相互作用を形成する。これらのタンパク質は、二価カチオン相互作用、リン酸化、及びアシル化について、中でもタンパク質分解的切断についての領域を含む、多数の既知のドメインを含む。

10

20

## 【0037】

哺乳動物において発現することが知られている14-3-3タンパク質の遺伝的に異なってコードされている7つのアイソフォームが存在し、各アイソフォームは242~255アミノ酸を含む。7つの14-3-3タンパク質アイソフォームは、14-3-3a/(アルファ/ベータ)、14-3-3δ/(デルタ/ゼータ)、14-3-3ε/(イプシロン)、14-3-3γ/(ガンマ)、14-3-3η/(エータ)、14-3-3θ/(タウ/シータ)、及び14-3-3σ/(シグマ/ストラテフィン(stratifin))として命名される。14-3-3タンパク質は、高い程度の配列相同性を有し、翻訳後プロセッシング、例えばリン酸化、シトルリン化等を経ることが知られている。例えば、Megidish et al. (1998) J. Biol. Chem. 273: 21834-45を参照のこと。結果として、抗14-3-3自己抗体は、1超の14-3-3タンパク質アイソフォームと特異的に結合及び/又は認識してもよく、1つのアイソフォーム(例えば、14-3-3ε)とのみ特異的に結合及び/又は認識してもよい。

30

40

## 【0038】

シトルリン化は、翻訳後修飾(PTM)の形態であり、これはペプチジルアルギニンデアミナーゼ(PAD)が、アミノ酸であるアルギニン(R)のシトルリン(C)への窒素含有部分を遊離させる化学変化をもたらす脱イミノ化を触媒する。従って、用語「シトルリン化14-3-3タンパク質」及び「シトルリン化14-3-3ペプチド」は互換的であり、シトルリン化配列中にシトルリン残基を有する生来の配列中の少なくとも1つのアルギニン残基の置換を別にして、生来の14-3-3タンパク質(例えば、翻訳後に修飾されない14-3-3タンパク質)と同一であるアミノ酸配列を有するタンパク質を意味する。

## 【0039】

「により置換される」又は「により置き換えられる」は、例えば、シトルリン残基により置換される、あるいは置き換えられるアルギニン残基に改変されることを含み、例えばPADとのインキュベーションによりシトルリン残基に改変されたアルギニン残基を意味し得る。PADによるシトルリン化は、主にタンパク質のNH<sub>2</sub>末端において開始するが、例外的に、これは、タンパク質のCOOH末端から開始し得る。この場合、いくつかのアルギニン残基は、シトルリン残基により置き換えられ、これは、前記のいくつかのアルギニン残基について、各1つのアルギニン残基が、単一のシトルリン残基により置き換え

50

られることを意味する。

【0040】

ペプチジルアルギニンデイミナーゼ (PAD) はまた、タンパク質 - アルギニンデイミナーゼとも称され、カルシウムイオンの存在下で、ペプチド中のアルギニン残基をシトルリン残基に変換する翻訳後修飾酵素のファミリーである。

【0041】

「シトルリン」及び「Cit」とは、2 - アミノ - 5 - (カルバモイルアミノ) ペンタン酸を意味し、以下の式： $H_2NC(O)NH(CH_2)_3CH(NH_2)CO_2H$ を有する - アミノ酸である。

【0042】

用語「ペプチド」及び「タンパク質」は、本明細書において互換的に用いられ、ペプチド結合により結合した2 ~ 200アミノ酸のアミノ酸配列を含む分子を意味する。ペプチドは、任意の標準的な20のアミノ酸又はこれらの改変された形態、及び化学的ペプチド合成により、又は化学若しくは酵素的改変により組み込まれた任意の非天然アミノ酸を含み得る。ペプチドは、抗原として用いられ得、そして1又は複数のエピトープを含み得る。

10

【0043】

タンパク質について言及する際に本明細書で用いられる用語「誘導体」、「変異体」及び「断片」は、少なくとも前記タンパク質の活性部分、例えば前記タンパク質の少なくともエピトープ及び/又はシトルリン残基、抗14 - 3 - 3自己抗体により特異的に結合するもののいずれか、又は双方を含む分子を意味する。

20

【0044】

用語「エピトープ」とは、抗体若しくはその部分 (Fab', Fab2' 等) 又はB若しくはT細胞リンパ球の細胞表面において提示される受容体により特異的に認識及び結合し、且つ前記結合により免疫応答を誘導することができる、抗原タンパク質の1つ又はいくつかの部分 (立体構造エピトープを定義してもよい) を意味する。エピトープは、分子の表面上に一般的に存在する化学的特徴であり、抗体との相互作用に利用しやすい。典型的な化学的特徴は、三次元構造的な特性、並びに電荷、親水性及び親油性を含む化学的特徴を有するアミノ酸及び糖部分である。立体構造エピトープは、化学的構造の根底にある任意の変化を含まない分子の特別なエレメントにおける変化による、抗体との反応性の喪失による非立体構造エピトープと区別される。

30

【0045】

当業者は、自己抗体が抗原の断片を認識することを認識する。従って、本明細書で用いられるように、「これらの断片」及び「エピトープ」は、互換的に用いられ、一般的に、抗体、例えば自己抗体と結合することができる14 - 3 - 3の決定要因を意味する。従って、14 - 3 - 3タンパク質又は特定のアイソマーへの言及において用いられる場合、用語「エピトープ」は、一般的に、抗体、例えば自己抗体と結合することができる、シトルリン化14 - 3 - 3タンパク質を含むタンパク質の断片を意味する。

【0046】

少なくとも1つのシトルリン残基を含み、関節炎、特に関節リウマチと診断された患者において自己抗体により認識されるシトルリン化14 - 3 - 3エピトープ、対象において関節炎症状を評価及び/又は特徴付けるために斯かるエピトープを用いる方法、及び斯かるエピトープを含むキットは、本明細書において開示される。エピトープは、エピトープに特有の空間的立体構造においてわずか3つのアミノ酸を含み得る。一般的に、エピトープは、少なくとも6つの斯かるアミノ酸、より通常には少なくとも8 ~ 10の斯かるアミノ酸からなる。エピトープを構成するアミノ酸を決定するための方法は、X線結晶解析、2次元核磁気共鳴、及びエピトープマッピングが挙げられる。

40

【0047】

「抗体」とは、対応する抗原に特異的に結合するタンパク質を含む構成物 (composition) を意味し、免疫グロブリンの共通の、一般的構造を有する。抗体なる用語は、これら

50

が所望の生物学的活性を示す限り、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ダイマー、マルチマー、多重特異的抗体（例えば、二重特異的抗体）、及び抗体断片を特に網羅する。抗体は、マウス、ヒト、ヒト化、キメラ、又は他の種に由来するものであってもよい。典型的に、抗体は、ジスルフィド結合により相互接続された少なくとも2つの重鎖及び2つの軽鎖を含み、これは、抗原と相互作用する結合ドメインから組み合わされる。各重鎖は、重鎖可変領域（VH）と重鎖定常領域（CH）からなる。重鎖定常領域は、3つのドメインであるCH1、CH2及びCH3からなり、 $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\gamma$ 、又はアイソタイプでもよい。同様に、軽鎖は、軽鎖可変領域（VL）と軽鎖定常領域（CL）からなる。軽鎖定常領域は、1つのドメインCLからなり、これは、 $\kappa$ 、 $\lambda$ 、又はアイソタイプでもよい。VH及びVL領域は、相補性決定領域（CDR）と名付けられる超可変性の領域にさらに細分され、フレームワーク領域（FR）と名付けられる、より保存性を有する領域が散りばめられている。各VH及びVLは、3つのCDRと4つのFRからなり、以下の順序：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4でアミノ末端からカルボキシ末端まで配列される。重鎖及び軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含む。抗体の定常領域は、免疫系の様々な細胞（例えばエフェクター細胞）及び古典的補体系の第一の補体（C1q）を含む宿主組織又は因子に対する免疫グロブリンの結合を仲介し得る。重鎖定常領域は、特に、細胞受容体、例えばFc受容体（例えば、FcγRI、FcγRII、FcγRIII等）を介する宿主組織又は宿主因子に対する免疫グロブリンの結合を仲介する。本明細書で用いられるように、抗体は、抗原と結合する能力を保持する免疫グロブリンの抗原結合部分も含む。これらとしては、例えば、VL-CL及びVH-CH抗体ドメインの一価断片であるF(ab)；並びにヒンジ領域においてジスルフィド結合により連結した2つのF(ab)断片を含む二価断片であるF(ab')<sub>2</sub>断片が挙げられる。抗体なる用語はまた、組み換え一本鎖Fv断片（scFv）及び二重特異的分子、例えばダイアボディ、トリアボディ、及びテトラボディを意味する（例えば、米国特許第5,844,094号を参照のこと）。

10

20

## 【0048】

「抗原」は、幅広く解釈され、そして抗体と特異的に結合することができる任意の分子、構成物、又は粒子を意味する。抗原は、抗体と相互作用する1又は複数のエピトープを有し得るが、必ずしもその抗体の生産を誘導しない。

## 【0049】

「自己抗体」は、自己の抗原、即ち通常の組織構成要素と特異的に結合する内因性抗体である。自己抗体は、自己抗体を生産する同一の体の天然に生じる抗原に対する応答において産生される。従って、用語「14-3-3に対する自己抗体（autoantibodies against 14-3-3）」及び「14-3-3に対する自己抗体（autoantibodies to 14-3-3）」は、互換的に用いられ、シトルリン化され得る14-3-3タンパク質と特異的に結合する哺乳動物対象により産生される内因性抗体、又は前記宿主由来のこれらの断片を意味する。

30

## 【0050】

「免疫学的結合」及び「免疫複合体の形成」は、互換的に用いられ、本明細書において、一般的に抗体、例えば自己抗体と、抗体が特異的である抗原との間に生じる非共有結合的相互作用の種類を意味する。免疫学的結合相互作用の強度又は親和性は、相互作用の解離定数（ $K_d$ ）の用語において表され得、ここでより小さい $K_d$ は、より優れた親和性を表す。免疫学的特性は、当該技術分野によく知られている方法により定量され得る。例えば、Davies et al. (1990) Annual Rev. Biochem. 59:439-473を参照のこと。抗体、又はこれらの抗原結合断片は、「特異的結合」、「免疫学的結合」と言われ、及び/又はそれが検出可能なレベルにおいてリガンドと反応し（例えば、ELISAアッセイ内で）、且つ同様の条件下で関係ないリガンドと検出可能な反応をしない場合、「免疫学的に活性である」とも言われる。

40

## 【0051】

タンパク質又はペプチドについて言及する場合、抗体との「特異的（又は選択的）結合」なる語句は、タンパク質及び他の生物製剤の異種の集団におけるタンパク質の存在の決

50

定である結合反応を意味する。抗体について言及する場合、タンパク質又はペプチドに「対する」なる用語は、タンパク質及び他の生物製剤の異種の集団における前記抗体によるタンパク質の存在の決定である特異的結合反応を意味する。従って、指定されるイムノアッセイ条件下において、特異的な抗体は、少なくともバックグラウンドの2倍特定のタンパク質と結合するが、サンプル中に存在する他のタンパク質と有意な量において実質的に結合しない。斯かる条件下での抗体との特異的な結合は、特定のタンパク質についてのその特異性について選択される抗体を要求し得る。例えば特定の種、例えばラット、マウス、又はヒト由来のマーカ―「X」について生じるポリクローナル抗体は、マーカ―「X」との特異的な免疫反応であり、多形変異体及びマーカ―「X」の対立遺伝子を除く他のタンパク質と特異的ではない、これらのポリクローナル抗体のみを得るために選択され得る。この選択は、他の種からのマーカ―「X」分子と交差反応する抗体を除くことにより達成されてもよい。様々なイムノアッセイ形式は、特定のタンパク質と特異的な免疫反応性を有する抗体を選択するために用いられてもよい。例えば、固相ELISAイムノアッセイは、タンパク質との特異的な免疫反応性を有する抗体を選択するために日常的に用いられる（特異的免疫反応性を決定するために用いられ得るイムノアッセイ形式及び条件の記載については、例えば、Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (1988)を参照のこと）。典型的に、特異的又は選択的反応は、バックグラウンドシグナル又はノイズの少なくとも2倍であり、より典型的にはバックグラウンドシグナルの10～100倍超である。

10

**【0052】**

20

「診断」とは、本明細書に開示されるシトルリン化14-3-3タンパク質に対する1又は複数の自己抗体の存在又は不存在に基づいて、対象における病態の存在又は性質を同定することを意味する。診断方法は、シトルリン化14-3-3タンパク質に対する自己抗体の存在と、特定の疾患、例えば関節リウマチ又は疾患の群（例えば関節炎症状）の出現とを関連付ける。

**【0053】**

「予後診断」とは、本明細書に開示されるシトルリン化14-3-3タンパク質に対する1又は複数の自己抗体の存在/不存在、及び/又は量に基づいて、治療をしている、あるいはしていない対象における病態及び/又は疾患進行の潜在的進行又は結果を決定することを意味する。予後診断方法は、シトルリン化14-3-3タンパク質に対する自己抗体の存在及び/又は量と、関節炎症状の進行及び/又はあり得る結果とを関連付ける。

30

**【0054】**

「治療的診断」とは、本明細書に開示されるシトルリン化14-3-3タンパク質に対する1又は複数の自己抗体の存在/不存在、及び/又は量に基づいて、病態及び/又は疾患進行についての提案された治療プロトコールに対する可能性及び/又は起こりうる反応を決定すること、及びその結果に基づいて対象について適切な治療を調整することを意味する。治療的診断方法は、シトルリン化14-3-3タンパク質に対する自己抗体の存在及び/又は量と、対象における関節炎症状の様々な治療選択肢の推定される有効性とを関連付ける。

**【0055】**

40

「対象」及び「患者」は、互換的に用いられ、示される場合を除いて、哺乳動物、例えばヒト及び非ヒト霊長類、並びにウサギ、ラット、マウス、ヤギ、ブタ、並びに他の哺乳動物種を意味する。

**【0056】**

「関節炎症状」、「関節炎」及び「関節痛」は、互換的に用いられ、示される場合を除いて、一般的に、身体の関節の炎症性疾患を意味する。疼痛、腫脹、硬直及び動作の困難性は、しばしば関節炎症状と関連する。関節炎は、100超の様々な症状からなる。これらは、相対的に軽症型から深刻な全身型のいずれかであり得る、例えば、[www.arthritis.ca/types%20of%20arthritis/default.asp?s=1](http://www.arthritis.ca/types%20of%20arthritis/default.asp?s=1)を参照のこと。関節炎症状は、感染、外傷、変性疾患、代謝性疾患若しくは障害、又は他の既知の病因に起因してもよい。

50

## 【 0 0 5 7 】

関節炎症状は、より具体的に、サブタイプ、例えば関節リウマチ、混合性結合組織疾患 (MCTD)、結晶誘発性関節炎、反応性関節炎、脊椎関節症、骨関節炎、サルコイドーシス、回帰性リウマチ、外傷性 (post traumatic) 関節炎、悪性腫瘍に関連する関節炎、敗血症性関節炎、ライム関節炎、骨関節炎、細菌感染性関節炎等に従って記載されてもよい。関節炎は、さらに、痛風、強直性脊椎炎、全身性エリテマトーデス、炎症性腸疾患、乾癬等を含む他の同定される疾患と同時に起こってもよい。明確に定義された関節炎症状とは、関節炎の種類、及びそのステージ、例えば発症、緩解、再発等に関する認識を意味する。

## 【 0 0 5 8 】

シトルリン化 14-3-3 タンパク質

生来の 14-3-3 タンパク質のアミノ酸配列は、表 1 に記載される。態様によっては、14-3-3 タンパク質は、表 1 に提供される生来の 14-3-3 タンパク質配列と同一である。14-3-3 タンパク質は、表 1 に提供される生来の 14-3-3 タンパク質配列と実質的に相同的でもよく、且つ 14-3-3 タンパク質の機能的活性、例えば抗 14-3-3 自己抗体との特異的結合を保持していてもよいが、生来の対立遺伝子変異又は突然変異のためにアミノ酸配列が異なってもよい。

## 【 0 0 5 9 】

【表 1】

表 1 : 14-3-3 タンパク質

14-3-3 タンパク質	NCBI 受入番号	配列番号
14-3-3 $\alpha/\beta$	NP_003395.1	1
14-3-3 $\delta/\xi$	NP_001129171.1	2
14-3-3 $\epsilon$	NP_006752.1	3
14-3-3 $\gamma$	NP_036611.2	4
14-3-3 $\eta$	NP_003396.1	5
14-3-3 $\tau/\theta$	NP_006817.1	6
14-3-3 $\sigma$	NP_006133.1	7

## 【 0 0 6 0 】

本明細書で用いられるように、語句「14-3-3 タンパク質」とは、配列番号 5、及び実質的にこれらと相同的であるタンパク質、例えば配列番号 5 と少なくとも 75%、より好ましくは 80%~90%、さらにより好ましくは 90%~95%、なおより好ましくは 95%、そして最も好ましくは 98% のアミノ酸配列同一性を有するタンパク質を含むタンパク質を意味する。配列番号 5 のアミノ酸配列は、以下に提供される。

## 【 0 0 6 1 】

MGDREQLLQR ARLAEQAERY DDMASAMKAV TELNEPLSNE DRNLLSVAYK NVVGARRSSW RVISSIEQKT MAD GNEKKLE KVKAYREKIE KELETVCNDV LSLLDKFLIK NCNDFQYESK VFYLYKMKGDY YRYLAEVASG EKKNSV VEAS EAAYKEAFEI SKEQMOPHTP IRLGLALNFS VFYYEIQNAP EQACLLAKQA FDDAIAELDT LNEDSYKDS T LIMQLLRDNL TLWTSQQQDE EAGEGN

## 【 0 0 6 2 】

2つのアミノ酸配列又は2つのポリヌクレオチド配列の%同一性を決定するために、該配列は最適な比較のためにアライメントされる(例えば、ギャップは、最適配列のために第一の及び第二のアミノ酸又はポリヌクレオチド配列の1方又は双方に導入され得、非同性的な配列は比較のために無視され得る)。好ましい実施形態では、比較のためにアライメントされた基準配列の長さは、基準配列の長さの、少なくとも30%、好ましくは少

10

20

30

40

50

なくとも40%、より好ましくは少なくとも50%、さらにより好ましくは少なくとも60%、そしてなおより好ましくは少なくとも70%、80%、若しくは90%である。対応するアミノ酸位置又はヌクレオチド位置におけるアミノ酸残基又はヌクレオチドは、その後比較される。第一の配列における位置が第二の配列における対応する位置と同一のアミノ酸残基又はヌクレオチドを占める場合、その位置に置いてその分子は同一である（本明細書で用いられる場合、アミノ酸又はポリヌクレオチド「同一性」は、アミノ酸又はポリヌクレオチド「相同性」と同等である）。2つの配列間の%同一性は、2つの配列の最適なアライメントのために導入することが必要とされるギャップの数、及び各ギャップの長さを考慮した配列により共有される同一な位置の数の関数である。

#### 【0063】

2つの配列間の配列の比較及び%同一性の決定は、数学的アルゴリズムを用いて達成される。好ましい実施形態では、2つのアミノ酸配列間の%同一性は、Blossom 62マトリックス又はPAM250マトリックスのいずれか、及び16、14、12、10、8、6若しくは4のギャップ重量、及び1、2、3、4、5若しくは6の長さ重量を用いて、GCGソフトウェアパッケージ (<http://www.gcg.com>において入手可能である)中のGAPプログラムに組み込まれているNeedleman及びWunsch (J. Mol. Biol. (48):444-453 (1970))のアルゴリズムを用いて決定される。さらに別の好ましい実施形態では、2つのヌクレオチド配列間の%同一性は、NWSgapdna.CMPマトリックス、及び40、50、60、70若しくは80のギャップ重量、及び1、2、3、4、5若しくは6の長さ重量を用いて、GCGソフトウェアパッケージ (<http://www.gcg.com>において入手可能である)中のGAPプログラムを用いて決定される。別の実施形態では、2つのアミノ酸又はヌクレオチド配列間の%同一性は、PAM120重量残基表、12のギャップ長ペナルティ、及び4のギャップペナルティを用いた、ALIGNプログラム(バージョン2.0)に組み込まれるE. Meyers及びW. Miller (CABIOS, 4:11-17 (1989))のアルゴリズムを用いて決定される。

#### 【0064】

本発明のタンパク質配列は、公のデータベースに対するサーチを実行するための、例えば、他のファミリーメンバー又は関連する配列を同定するための、「クエリー配列」としてさらに用いられ得る。かかるサーチは、Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10のNBLAST及びXBLASTプログラム(バージョン2.0)を用いて実行され得る。BLASTヌクレオチドサーチは、本発明のポリヌクレオチド分子と相同的なヌクレオチド配列を得るために、NBLASTプログラム、スコア=100、ワード長=12を用いて行なわれ得る。BLASTタンパク質サーチは、本発明の14-3-3タンパク質分子と相同的なアミノ酸配列を得るために、XBLASTプログラム、スコア=50、ワード長=3を用いて行なわれ得る。比較のためのギャップが導入されたアライメントを得るために、Gapped BLASTは、Altschul et al., (1997) Polynucleotide Res. 25(17):3389-3402に記載されるように用いられ得る。BLAST及びGapped BLASTプログラムを用いる場合、代表的なプログラム(例えば、XBLAST及びNBLAST)の初期パラメータは、例えば[www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)において用いられ得る。

#### 【0065】

既知の方法に従った、14-3-3タンパク質、これらの断片又は融合物と、ペプチジルアルギニンデイミナーゼとのインキュベーションは、シトルリン化14-3-3タンパク質、これらの断片又は融合物をもたらす。かかるシトルリン化14-3-3タンパク質、これらの断片又は融合物は、抗14-3-3抗体を生産し、抗14-3-3抗体を精製するための免疫原として、本明細書に記載されるような診断、予後診断、及び治療的診断アッセイにおいて、用いられ得る。

#### 【0066】

本発明に従って、インシリコ、及びインビトロにおいて、臨床サンプルを用いて同定したヒト14-3-3シトルリン化部位を表2に提供する。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 7 】

【 表 2 】

表 2

AA 位置	AA 配列	アルギニン化ペプチド	シトルリン化ペプチド
4	1 - 12	MGD[R]EQLLQRR (配列番号 9)	MGD[Cit]EQLLQRR (配列番号 16)
12	4 - 18	REQLLQRA[R]LAEQAE (配列番号 10)	REQLLQRA[Cit]LAEQAE (配列番号 17)
19	12 - 26	RLAEQAE[R]YDDMASA (配列番号 11)	RLAEQAE[Cit]YDDMASA (配列番号 18)
42	29 - 45	KAVTELNEPLSNED[R]NLL (配列番号 12)	KAVTELNEPLSNED[Cit]NLL (配列番号 19)
61	50 - 69	KNVVGARRSSW[R]VISSIEQK (配列番号 13)	KNVVGARRSSW[Cit]VISSIEQK (配列番号 20)
86	77 - 89	KKLEKVKAY[R]EKI (配列番号 14)	KKLEKVKAY[Cit]EKI (配列番号 21)
227	217 - 235	KDSTLIMQLL[R]DNLTWTS (配列番号 15)	KDSTLIMQLL[Cit]DNLTWTS (配列番号 22)

10

20

【 0 0 6 8 】

本発明のシトルリン化タンパク質は、表 2 に列挙したアミノ酸位置の 1 つにおける少なくともシトルリン残基を含む。1 つの実施形態では、本発明のシトルリン化 1 4 - 3 - 3 断片は、配列番号 1 6 ~ 2 2 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【 0 0 6 9 】

表 3 に示すように、表 2 に挙げられる 7 つのシトルリン化部位のうち全てではない幾つかは、他の 1 4 - 3 - 3 アイソフォームにおいて同様に保存されている。従って、これらのシトルリン化部位が他の 1 4 - 3 - 3 アイソフォームに保存される限りにおいては、これらの部位は、本明細書に開示される方法及び材料を用いて他の 1 4 - 3 - 3 アイソフォームのシトルリン化状態を決定するために用いられてもよい。

30

【 0 0 7 0 】

【 表 3 】

表 3

$\eta$ におけるアミノ酸部位	$\eta$	$\Gamma$	$\alpha/\beta$	$\varepsilon$	$\sigma$	$\theta$	$\zeta$
4	存在	存在	なし	存在	存在	なし	なし
12	存在	存在	なし	なし	なし	なし	なし
19	存在	存在	存在	存在	存在	存在	存在
42	存在	存在	存在	存在	存在	存在	存在
61	存在	存在	存在	存在	存在	存在	存在
86	存在	存在	存在	存在	存在	存在	存在
227	存在	存在	存在	存在	存在	存在	存在

40

【 0 0 7 1 】

本発明のいくつかの態様は、単離されたシトルリン化 1 4 - 3 - 3 タンパク質、及びこれの生物学的に活性な部分、例えば抗シトルリン化 1 4 - 3 - 3 自己抗体に対する抗原としての使用に好適な断片に関する。これらの断片を含むシトルリン化 1 4 - 3 - 3 タンバ

50

ク質は、生来の、組み換えの、又はペプチジルアルギニンデイミナーゼの作用を介して、例えば生来の14-3-3タンパク質又はこれの断片を既知の方法に従ってペプチジルアルギニンデイミナーゼとインキュベートすることにより、合成14-3-3タンパク質(それぞれこれの断片を含む)から単離されてもよい。あるいは、シトルリン化14-3-3タンパク質は、既知の方法、例えば合成されたペプチドへのシトルリン残基の直接的な組み込みによるペプチド合成により単離されてもよい。

#### 【0072】

1つの実施形態では、14-3-3タンパク質は、標準的なタンパク質精製技術を用いて適切な精製スキームにより細胞又は組織起源から単離することができる。別の実施形態では、14-3-3タンパク質は、組み換えDNA技術により生産される。

10

#### 【0073】

好ましくは、本発明の14-3-3タンパク質又はこれの断片は、標準的な組み換えDNA技術により生産される。例えば、14-3-3タンパク質又はこれの断片をコードするDNA断片は、従来の技術、例えばライゲーションのための平滑断片又はずれた断片末端、適切な末端を提供するための制限酵素消化、必要に応じて接着性末端の穴埋め(filling-in)、望ましくない連結を避けるためのアルカリホスファターゼ処理、及び酵素ライゲーションを用いることにより、発現ベクターのインフレームで、ライゲートされる。あるいは、遺伝子断片のPCR増幅は、続けてアニール及び再増幅され得る2つの連続した遺伝子断片間の相補的な覆い被さりを生じるアンカープライマーを用いて実行され、ac遺伝子配列を生成し得る(例えば、Current Protocols In Molecular Biology, eds. A usubel et al. John Wiley & Sons: 1992を参照のこと)。さらに、部分、例えば検出可能な部分を既にコードする多くの発現ベクターは、市販されている。14-3-3タンパク質又はこれの断片をコードするポリヌクレオチドは、部分、例えば検出可能な部分が、14-3-3タンパク質又は断片とインフレームで連結されているように、かかる発現ベクターにクローンされ得る。

20

#### 【0074】

シグナル配列は、分泌されたタンパク質又は目的の他のタンパク質の分泌及び単離を容易にするために用いられ得る。シグナル配列は、典型的に、1又は複数の切断イベントにおいて、分泌の間成熟タンパク質から一般的に切断される疎水性アミノ酸のコアにより特徴付けられる。かかるシグナルペプチドは、これらが分泌経路を通過するような、成熟タンパク質からのシグナル配列の切断を可能にするプロセッシング部位を含む。従って、本発明は、シグナル配列を有する記載されるポリペプチド、及びシグナル配列がそれからタンパク質分解的に切断されるポリペプチド(即ち切断産物)に関する。1つの実施形態では、シグナル配列をコードするポリヌクレオチド配列は、発現ベクターにおいて目的のタンパク質、例えば通常分泌されない、あるいはさもなければ単離するのが困難なタンパク質と作動式に連結され得る。シグナル配列は、例えば発現ベクターが形質転換された真核性宿主由来のタンパク質の分泌を指示し、シグナル配列は、その後又は同時に切断される。その後、タンパク質を、当該技術分野において認識されている方法により細胞外培地から容易に精製することができる。

30

#### 【0075】

あるいは、シグナル配列は、精製を容易にする配列、例えばGSTドメインを用いて、生来の若しくはシトルリン化14-3-3タンパク質、これらの断片又は融合物と連結させることができる。

40

#### 【0076】

シトルリン化14-3-3タンパク質及びこれの断片に対する抗体

他の実施形態では、本発明は、RAの診断、予後診断、モニタリング及び/又は治療に有用であり得る、シトルリン化14-3-3タンパク質又はこれの断片、好ましくは哺乳動物(例えば、ヒト)14-3-3タンパク質と特異的に結合する抗体、即ち無傷の抗体、及びこれらの抗原結合断片を提供する。

#### 【0077】

50

本発明のポリペプチドに対する抗体分子、例えばシトルリン化14-3-3タンパク質又はこれらのシトルリン化断片は、当業者によく知られている方法により産生されてもよい。例えば、モノクローナル抗体は、既知の方法に従って、ハイブリドーマの作成により産生されてもよい。この方法で形成されるハイブリドーマは、その後、本発明のポリペプチドと特異的に結合する抗体を産生する1又は複数のハイブリドーマを同定するために、標準的な方法、例えば酵素結合免疫吸着法(ELISA)を用いてスクリーニングされる。例えば、本発明のシトルリン化14-3-3タンパク質又はこれのシトルリン化断片を、シトルリン化14-3-3タンパク質又はこれのシトルリン化断片と反応するが、生来の14-3-3タンパク質又は生来のこれらの断片とは反応しないポリクローナル及びモノクローナル抗体を得るために、非ヒト宿主、例えばロバ、ヤギ、ヒツジ、モルモット、ハムスター、ウサギ、ラット及びノ又はマウスを免疫付与するために用いてもよい。ペプチド免疫原は、カルボキシル末端においてシステイン残基をさらに含んでもよく、ハプテン、例えばキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)と結合してもよい。さらなるペプチド免疫原は、チロシン残基を硫酸化チロシン残基に置き換えることにより生成されてもよい。かかるペプチドを合成するための方法は、当該技術分野においてよく知られている。本発明の全長ポリペプチドは、免疫原として用いられてもよく、あるいはポリペプチドの抗原ペプチド断片が用いられてもよい。本発明のポリペプチドの抗原ペプチドは、少なくとも7個の連続するアミノ酸残基を含み、そしてペプチドに対する抗体が、ポリペプチドとの特異的な免疫複合体を形成するようなエピトープを含む。好ましくは、抗原ペプチドは、少なくとも10アミノ酸残基、より好ましくは少なくとも15アミノ酸残基、さらにより好ましくは少なくとも20アミノ酸残基、そして最も好ましくは少なくとも30アミノ酸残基を含む。

10

20

#### 【0078】

モノクローナル抗体は、組み換えDNA技術の分野における当業者に知られている他の方法により作成されてもよい。モノクローナル抗体分泌ハイブリドーマを調製する代替の方法として、本発明のポリペプチドに対するモノクローナル抗体は、本発明に関するポリペプチド(例えば、シトルリン化14-3-3タンパク質又はこれのシトルリン化断片)を用いて組み換えコンビナトリアル免疫グロブリンライブラリー(例えば、抗体ファージディスプレイライブラリー)をスクリーニングし、これにより本発明に関するポリペプチド(例えば、シトルリン化14-3-3タンパク質又はこれらのシトルリン化断片)と結合する免疫グロブリンライブラリーを単離することにより、同定及び単離してもよい。ファージディスプレイライブラリーを作成及びスクリーニングするため技術及び市販のキットは、当業者によく知られている。加えて、抗体ディスプレイライブラリーを作成及びスクリーニングに特に使用可能な方法及び試薬の例は、文献に見出すことができる。例えば、「コンビナトリアル抗体ディスプレイ」法は、よく知られており、特定の抗原特異性を有する抗体断片を同定及び単離するために開発され、そしてモノクローナル抗体を生産するために用いることができる。上記のような免疫原を用いて動物に免疫付与した後、得られたB細胞プールの抗体レパートリーはクローンされる。オリゴマープライマーの混合物及びPCRを用いることによる、免疫グロブリン分子の多様な集団の可変領域のDNA配列を得るための方法は、一般的に知られている。例えば、5'リーダー(シグナルペプチド)配列及びノ又はフレームワーク1(FR1)配列に対応する混合オリゴヌクレオチドプライマー、並びに保存された3'定常領域に対するプライマーは、多くのマウス抗体由来の重鎖及び軽鎖可変領域のPCR増幅のために用いられ得；同様の戦略は、ヒト抗体由来のヒト重鎖及び軽鎖可変領域を増幅するためにも用いられる。

30

40

#### 【0079】

ポリクローナル血清及び抗体は、本発明のポリペプチドを用いて好適な対象を免疫付与することにより産生されてもよい。免疫付与された対象における抗体力価は、長時間に亘り、標準的な技術、例えば固定化されたタンパク質を用いたELISAにより観察されてもよい。必要に応じて、本発明のポリペプチドに対する抗体分子は、対象又は培養培地から単離されてもよく、そしてよく知られている技術、例えばタンパク質Aクロマトグラフ

50

ィーによりさらに精製されて I g G 画分を得てもよい。

【 0 0 8 0 】

本発明のポリペプチドに対する抗体の断片は、当該技術分野においてよく知られている方法に従って、抗体の切断により生産されてもよい。例えば、免疫学的に活性な F a b 及び F ( a b ' ) . s u b . 2 断片は、抗体を酵素、例えばペプシンで処理することにより作成されてもよい。

【 0 0 8 1 】

加えて、ヒト及び非ヒト部分の双方を含む、本発明のポリペプチドに対するキメラ、ヒト化、及び一本鎖抗体は、標準的な組み換え D N A 技術及び / 又は組み換えコンビナトリアル免疫グロブリンライブラリーを用いて生産されてもよい。ヒト化抗体は、内因性の免疫グロブリン重鎖及び軽鎖遺伝子を発現することができないが、ヒト重鎖及び軽鎖遺伝子を発現することができるトランスジェニックマウスを用いて生産されてもよい。例えば、シトルリン化 1 4 - 3 - 3 タンパク質又はこれの断片に対するヒトモノクローナル抗体 ( m A b s ) は、マウス免疫グロブリン遺伝子よりもヒト免疫グロブリン遺伝子を運ぶトランスジェニックマウスを用いることにより作成されてもよい。目的の抗原を用いて免疫付与したこれらのトランスジェニックマウス由来の脾臓細胞は、従って、ヒトタンパク質由来のエピトープについての特異的な親和性を有するヒト m A b を分泌するハイブリドーマを生産するために用いてもよい。

【 0 0 8 2 】

キメラ免疫グロブリン鎖を含むキメラ抗体は、当該技術分野において知られている組み換え D N A 技術により生産されてもよい。例えば、マウス ( 又は他の種 ) のモノクローナル抗体分子の F c 定常領域をコードする遺伝子は、マウス F c をコードする領域を除去するために、制限酵素を用いて消化され、ヒト F c 定常領域をコードする遺伝子の相当部分は置換される。

【 0 0 8 3 】

抗体又は免疫グロブリン鎖は、当該技術分野において知られている方法によりヒト化されてもよい。ヒト化免疫グロブリン鎖を含むヒト化抗体は、ヒト F v 可変領域からの相当配列との抗原結合に直接関与しない F v 可変領域の配列を置き換えることにより作成されてもよい。ヒト化抗体を作成するための一般的な方法は、Morrison (1985) Science 229: 1202-07; Oi et al. (1986) BioTechniques 4:214; Queen et al., 米国特許第 5 , 5 8 5 , 0 8 9 号 ; 第 5 , 6 9 3 , 7 6 1 号 ; 第 5 , 6 9 3 , 7 6 2 号 ( その全ての内容は、参照により本明細書に組み込まれる ) により提供される。これらの方法は、少なくとも 1 つの重鎖又は軽鎖からの免疫グロブリン F v 可変領域の全て又は部分をコードする核酸配列を単離、操作、及び発現することを含む。かかる核酸配列の起源は、当業者によく知られており、例えば、予め決められた標的に対する抗体を産生するハイブリドーマから得られもよい。ヒト化抗体又はこれの断片をコードする組み換え D N A は、従って、適切な発現ベクターにクローンすることができる。

【 0 0 8 4 】

ヒト化又は C D R 移植抗体分子又は免疫グロブリンは、C D R 移植又は免疫グロブリン鎖の 1、2 又は全ての C D R が置き換えられる C D R 置換により生産されてもよい。例えば、米国特許第 5 , 2 2 5 , 5 3 9 号 ; Jones et al. (1986) Nature 321:552-25; Verhoeven et al. (1988) Science 239:1534 ; Beidler et al. (1988) J. Immunol. 141:405 3-60 ; Winter、米国特許第 5 , 2 2 5 , 5 3 9 号を参照のこと ( その全ての内容は、参照により本明細書に組み込まれる ) 。 Winter は、本発明のヒト化抗体を調製するために用いられ得る C D R 移植方法を記載し ( 英国特許出願第 2 1 8 8 6 3 8 A 号 ; Winter、米国特許第 5 , 2 2 5 , 5 3 9 号 ) 、その全ての内容は、参照により本明細書に組み込まれる。特定のヒト抗体の全ての C D R は、少なくとも非ヒト C D R の一部分と置き換えられ得、あるいはいくつかの C D R のみが非ヒト C D R と置き換えられる。ヒト化抗体と予め決められた抗原との結合に要求される C D R の数のみ置き換えれば十分である。

【 0 0 8 5 】

ヒト化又は C D R 移植抗体分子又は免疫グロブリンは、C D R 移植又は免疫グロブリン鎖の 1、2 又は全ての C D R が置き換えられる C D R 置換により生産されてもよい。例えば、米国特許第 5 , 2 2 5 , 5 3 9 号 ; Jones et al. (1986) Nature 321:552-25; Verhoeven et al. (1988) Science 239:1534 ; Beidler et al. (1988) J. Immunol. 141:405 3-60 ; Winter、米国特許第 5 , 2 2 5 , 5 3 9 号を参照のこと ( その全ての内容は、参照により本明細書に組み込まれる ) 。 Winter は、本発明のヒト化抗体を調製するために用いられ得る C D R 移植方法を記載し ( 英国特許出願第 2 1 8 8 6 3 8 A 号 ; Winter、米国特許第 5 , 2 2 5 , 5 3 9 号 ) 、その全ての内容は、参照により本明細書に組み込まれる。特定のヒト抗体の全ての C D R は、少なくとも非ヒト C D R の一部分と置き換えられ得、あるいはいくつかの C D R のみが非ヒト C D R と置き換えられる。ヒト化抗体と予め決められた抗原との結合に要求される C D R の数のみ置き換えれば十分である。

10

20

30

40

50

ヒト抗体は、加えて、抗原によるチャレンジに应答して、動物の内因性の抗体よりも完全なヒト抗体を生産するように改変されたトランスジェニック非ヒト動物を用いて生産されてもよい。例えば、PCT出願公開WO94/02602を参照のこと。非ヒト宿主において、重鎖及び軽鎖免疫グロブリンをコードする内因性遺伝子は不能化され、ヒト重鎖及び軽鎖免疫グロブリンをコードする活性座は、宿主のゲノムに挿入される。ヒト遺伝子は、例えば、必須のヒトDNAセグメントを含む酵母人工染色体を用いて組み込まれる。全ての所望の改変を提供する動物は、その後、改変の完全な捕捉物よりも少ないものを含む中間のトランスジェニック動物を交雑育種することにより子孫として得られる。かかる非ヒト動物の好ましい実施形態は、マウスであり、PCT出願公開WO96/33735及びWO96/34096に開示されるようにXENOMOUSE（商標）と名付けられる。この動物は、完全なヒト免疫グロブリンを分泌するB細胞を生産する。抗体は、例えばポリクローナル抗体の調製物として目的の免疫原で免疫付与後の動物から、あるいは、動物由来の不死化B細胞、例えばモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマから直接得ることができる。加えて、ヒト可変領域を含む免疫グロブリンをコードする遺伝子を、抗体を直接得るために回収及び発現させることができ、あるいは、抗体のアナログ、例えば一本鎖Fv分子を得るためにさらに改変することができる。

10

#### 【0086】

抗体の他の部分、例えば定常領域の、例えば欠失、付加又は置換により改変されたモノクローナル、キメラ、及びヒト化抗体も、本発明の範囲内である。非限定的な例としては、抗体は、定常領域を欠失させることにより、定常領域を別の定常領域、例えば、抗体の半減期、安定性、若しくは親和性を増加させることを意図する定常領域、又は別の種由来若しくは抗体クラス由来の定常領域で置き換えることにより、そして定常領域内の1又は複数のアミノ酸を改変することにより、例えばグリコシル化部位の数、エフェクター細胞機能、Fc受容体（FcR）結合、補体結合等を改変することにより、改変され得る。

20

#### 【0087】

抗体の定常領域を改変するための方法は、当該技術分野において知られている。改変された機能を有する抗体、例えば、エフェクターリガンドについての改変された親和性を有する抗体、例えば細胞上のFcR、又は補体のC1成分は、抗体の定常部分の少なくとも1つのアミノ酸残基を異なる残基で置き換えることにより生産され得る（例えば、EP388,151A1、米国特許第5,624,821号及び米国特許第5,648,260号を参照のこと、これらの内容の全ては、参照により本明細書に組み込まれる）。マウス（又は他の種）免疫グロブリンに対する同様の種類の改変は、これらの機能を減少又は除去するために増幅されてもよく、当該技術分野において知られている。

30

#### 【0088】

例えば、FcR（例えば、FcR1）又はC1q結合についての抗体（例えば、IgG、例えばヒトIgG）のFc領域の親和性を改変することは、特定の残基をその側鎖に適切な官能基を有する残基により置き換えることにより、あるいは変更された官能基、例えばグルタミン酸若しくはアスパラギン酸、又は芳香族非極性残基、例えばフェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、若しくはアラニンを導入することにより、可能である（例えば、米国特許第5,624,821号を参照のこと）。

40

#### 【0089】

診断、予後診断、及び治療的診断方法、並びに治療モニタリング

1つの態様では、本発明は、シトルリン化14-3-3に対する自己抗体に關与する疾患及び症状を診断する方法を提供する。一般的に、関節リウマチの存在又は不存在は、又は患者の予後は、(a)哺乳動物対象から得られた生体サンプルを、少なくとも1つのシトルリン化14-3-3タンパク質又はこれの断片と接触させること；(b)シトルリン化14-3-3タンパク質又はこれの断片と特異的に結合する自己抗体のサンプル中のレベルを検出すること；及び(c)かかる抗体のレベルと適切な対照、例えば生来の又は非シトルリン化14-3-3タンパク質のレベルとを比較すること、により決定されてもよい。

50

## 【0090】

該方法は、少なくとも1つのシトルリン化14-3-3タンパク質又はこれの断片を用いて、該タンパク質に対する自己抗体を検出することを含む。サンプル中の抗体を検出するための、タンパク質を用いた、当業者に知られている様々なアッセイ形式が存在する。例えば、Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988を参照のこと。非限定的な例としては、シトルリン化14-3-3に対する自己抗体の検出は、よく知られている方法又はアッセイ、例えば免疫沈殿、ELISA、ウェスタンブロット分析、免疫組織化学、免疫蛍光、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫放射線アッセイ、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散アッセイ、インサイチュイムノアッセイ、沈殿反応、凝集アッセイ、補体結合アッセイ、タンパク質Aアッセイ、免疫電気泳動アッセイ、蛍光活性化セルソーティング(FACS)分析、ラジオイムノアッセイ、ストリップテスト、ポイントオブケア等を用いて行ってもよい。当業者は、これらの方法は、生体サンプル中のシトルリン化14-3-3タンパク質に対する自己抗体又はシトルリン化14-3-3タンパク質との免疫複合体のレベルを測定するために用いられてもよいことを認識する。

10

## 【0091】

いくつかの実施形態では、自動検出アッセイが用いられる。イムノアッセイの自動化のための方法は、米国特許第5,885,530号、第4,981,785号、第6,159,750号及び第5,358,691号に記載されるものを含み、これらのそれぞれは、参照により本明細書に組み込まれる。実施形態によっては、結果の分析及び説明も自動化される。例えば、態様によっては、シトルリン化14-3-3タンパク質を含む、関節炎症状に対応する一連のタンパク質の存在又は不存在に基づく予後を作成するソフトウェアが用いられる。

20

## 【0092】

1つの実施形態では、該アッセイは、サンプルの残余物からのシトルリン化14-3-3タンパク質と特異的に結合する自己抗体と結合及び捕捉する固体支持体上に固定化された少なくとも1つのシトルリン化14-3-3タンパク質又はこれの断片の使用に関する。結合した自己抗体は、その後、レポーター基を含み、抗体/タンパク質複合体と特異的に結合する検出試薬を用いて検出される。かかる検出試薬としては、例えば自己抗体と特異的に結合する結合試薬、例えば抗ヒト抗体が挙げられる。

30

## 【0093】

該固体支持体は、当業者に知られる任意の材料でもよい。例えば、固体支持体は、マイクロタイタープレート中の試験ウェル、又はニトロセルロス若しくは他の好適な膜でもよい。あるいは、該支持体は、ビーズ若しくはディスク、例えばガラス、ファイバーガラス、ラテックス、又はプラスチック材料、例えばポリスチレン又はポリビニルクロリドでもよい。該支持体は、磁気粒子、又は光ファイバーセンサー、例えば、米国特許第5,359,681号に開示されるようなものでもよい。該シトルリン化14-3-3タンパク質又はこれの断片は、当該技術分野において知られている様々な技術を用いて固体支持体上に固定化されてもよく、これは特許及び科学文献に十分に記載される。本発明の文脈において、用語「固定化」とは、非共有結合、例えば吸着、及び共有結合(これは抗体と支持体上の官能基と直接結合でもよく、あるいは架橋剤により結合されてもよい)の双方を意味する。マイクロタイタープレート中のウェル又は膜への吸着による固定化は、好ましい。かかる場合、吸着は、好適なバッファ中での好適な期間の時間にわたる、抗体と固体支持体との接触により達成されてもよい。接触時間は、温度によって変更してもよいが、典型的に約1時間~約1日である。1つの実施形態では、ストレプトアビジンでコートしたマイクロタイタープレートが、ビオチン化されたシトルリン化14-3-3タンパク質又はこれの断片と併せて用いられる。

40

## 【0094】

シトルリン化14-3-3タンパク質又はこれの断片の固体支持体との共有結合は、一般的に、支持体と、支持体及びシトルリン化14-3-3タンパク質又はこれの断片の両

50

者と反応する二官能性試薬とを最初に反応させることにより達成され得る。捕捉された自己抗体は、自己抗体に対する標識されたりリガンドが洗浄された固相に曝露される非競合的「サンドイッチ」技術を用いて検出することができる。あるいは、競合的形式は、標識された及び標識されていない形態が固相と結合について競合するような、サンプルへの標識された抗体の先立つ導入に頼る。かかるアッセイ技術は、よく知られており、特許及び科学文献の双方によく記載される。例えば、米国特許第3,791,932号；第3,817,837号；第3,839,153号；第3,850,752号；第3,850,578号；第3,853,987号；第3,867,517号；第3,879,262号；第3,901,654号；第3,935,074号；第3,984,533号；第3,996,345号；第4,034,074号；及び第4,098,876号を参照のこと。酵素結合免疫吸着（ELISA）法は、米国特許第3,791,932；第3,839,153号；第3,850,752号；第3,879,262号；及び第4,034,074号に詳細に記載される。ELISAアッセイは、非常に低い力価の自己抗体を検出する。

#### 【0095】

自己抗体は、固相ラジオイムノアッセイ（RIA）により検出することができる。該固相は、固定化されたりリガンドとの結合と競合する放射性標識された抗体の存在中で、血清サンプルに曝露される。このアッセイでは、固相と結合する放射性標識の量は、血清サンプル中に最初に存在する自己抗体の量に反比例する関係を有する。固相の分離後、非特異的に結合した放射性標識は、洗浄により除去され、そして固相と結合した放射性標識の量が決定される。結合した放射性標識の量は、サンプル中に最初に存在する自己抗体の量と同様に関連する。

#### 【0096】

1つの実施形態では、該アッセイは、シトルリン化14-3-3タンパク質又はこれの断片が、膜、例えばニトロセルロース上に固定化された、フロースルー又はストリップテスト形式において行なわれる。フロースルーテストにおいては、サンプルが膜と接触するので、サンプル内のシトルリン化14-3-3タンパク質に対する自己抗体は、固定化されたシトルリン化14-3-3タンパク質又はこれの断片と結合する。次に、標識された結合試薬は、その後、第二の結合試薬を含む溶液を膜と接触させるので、免疫複合体と結合する。結合した第二の結合試薬の検出は、従って、上述のように行なわれてもよい。ストリップテスト形式においては、シトルリン化14-3-3タンパク質又はこれの断片が結合する膜の一端が、サンプルを含む溶液中に浸漬される。サンプルは、第二の結合試薬を含む領域から、例えば自己抗体、及び固定化されたシトルリン化14-3-3タンパク質又はこれの断片の領域までの膜に亘り移動する。固定化されたシトルリン化14-3-3タンパク質又はこれの断片の領域における第二の結合試薬の濃度は、関節炎症状の存在又は患者の予後等を示す。典型的に、その部位における第二の結合試薬の濃度は、目視することができるパターン、例えば、ラインを生じる。かかるパターンの不存在は、陰性の結果を示す。一般的に、膜上に固定化された結合試薬の量は、上述の形式において、生体サンプルがアッセイにおける陽性シグナルを生じるのに十分な自己抗体のレベルを含む場合、可視的に識別可能なパターンを生じるように選択される。かかるアッセイに使用のために好ましい結合試薬は、シトルリン化14-3-3タンパク質及びこれらの断片である。かかる試験は、典型的に、極少量の生体サンプルを用いて、ポイントオブケアにおいて行なわれ、これは定量可能であってもよい。

#### 【0097】

サンプル中の自己抗体の存在の検出に加えて、多くの方法は、自己抗体のレベルを定量的に測定するために用いることができる。方法によっては、抗原は、液相中で自己抗体と反応し、そして自己抗体は、免疫沈殿技術により定量的に測定される。例えば、シトルリン化14-3-3タンパク質又はこれの断片（即ち全長のアイソマー又は抗原断片）は、（例えば、アイソトープ又は酵素を用いて）検出可能に標識され得る。ポリペプチドは、合成の間（例えば、インピトロ翻訳系又は細胞内発現系に35S-メチオニンを加えることより）又は合成後に標識され得る。検出可能な抗原は、液体生体サンプル（例えば、血

10

20

30

40

50

清)に直接添加されて、免疫複合体を形成する。該免疫複合体は、ポリエチレングリコールを用いて沈殿され得る。該免疫複合体は、二次抗体(例えば、ヤギ抗ヒト免疫グロブリン)、又は固体支持体(例えば、アガロース又はセファロースビーズ)と結合する他の種類の結合分子(例えば、タンパク質A又はタンパク質G)を用いて単離され得る。免疫沈殿物は、液体サンプルから分離された後、数回洗浄され、検出可能な標識(例えば、放射活性)の強度について試験される。サンプル中に存在する任意の自己抗体は、従って、検出及び定量され得る。任意で、標識されていないポリペプチドはまた、自己抗体との結合について標識されたポリペプチドと競合させるために、添加されてもよい。

#### 【0098】

本発明の診断方法はまた、対象におけるシトルリン化14-3-3タンパク質と自己抗体で形成される循環免疫複合体の検出に関する。上述の方法は、かかる免疫複合体の検出のために容易に変更することができる。例えば、固定化された結合分子(例えば、ビーズと結合したタンパク質A又はタンパク質G)は、液体生体サンプルに添加され得る。液相のからの離後、結合分子により捕捉される免疫複合体は、SDS-PAGEにより分析され、シトルリン化14-3-3タンパク質に対する様々な抗体を用いてプローブされ得る。捕捉される抗原はまた、直接、アミノ酸配列分析に供されてもよい。免疫複合体の同一性は、その後明らかにされ得る。アッセイの多くは、対象中の循環免疫複合体検出するために日常的に行なわれ、例えば、Tomimori-Yamashita et al., *Lepr Rev*, 70(3):261-71, 1999(抗体型酵素結合免疫吸着アッセイ); Krapf et al., *J Clin Lab Immunol*, 21(4):183-7, 1986(蛍光結合免疫吸着アッセイ); Kazeem et al., *East Afr Med J*, 67(6):396-403, 1990(レーザー免疫比濁法); 及びRodrick et al., *J Clin Lab Immunol*, 7(3):193-8, 1982(タンパク質Aガラスファイバーフィルターアッセイ、PA-GFF、及びポリエチレングリコール可溶化アッセイ)に記載される。

#### 【0099】

臨床感度を改善するために、複数のマーカーが所定のサンプル内でアッセイされ得る。特に、関節炎の1又はそれ以上の他のマーカー、又は予後診断的指標等は、シトルリン化14-3-3タンパク質に対する自己抗体と組み合わせてアッセイされてもよい。これらの他のマーカーは、タンパク質又は核酸でもよい。好ましい実施形態では、1又はそれ以上の他のマーカーは、MMPタンパク質若しくは核酸、又は関節炎の指標として一般的に用いられる他の因子、例えば抗CCP、抗RF、CRP、SAA、IL-6、SIOO、オステオポンチン、RF、MMP-1、MMP-3、ヒアルロン酸、sCD14、血管新生マーカー及び骨、軟骨、又は滑膜代謝の生成物(例えばCTX-I及びCTX-II)等である。基準配列に基づく核酸を単離及びアッセイする方法は、患者のサンプル内の目的のタンパク質を検出するための方法のように、当該技術分野においてよく知られている。

#### 【0100】

当業者は、これらのよく知られているアッセイのそれぞれが、本発明の方法のために、生体サンプル中の循環免疫複合体を検出するために用いられ得ることを認識する。同様に、これらのよく知られているアッセイのそれぞれは、臨床試験手順の一部として、例えば本明細書に記載される診断、予後診断、及び治療的診断アッセイにおいて、生体サンプル中の14-3-3タンパク質のシトルリン化状態を観察するために、例えばいくつの14-3-3タンパク質がシトルリン化されるのか、そして/あるいは14-3-3タンパク質のどの部位、及びいくつの部位がシトルリン化されるのかを決定するために、本発明に開示されるシトルリン化14-3-3タンパク質(及びこれの断片)に対する抗体を用いて行なわれ得る。当業者は、生体サンプル中の14-3-3タンパク質のシトルリン化状態を決定するために、本明細書に記載されるシトルリン化14-3-3タンパク質に対する抗体を使用するアッセイ形式、診断、予後診断及び治療的診断アッセイ、並びにキットのそれぞれを適合させる方法を容易に認識する。

#### 【0101】

組み合わせアッセイは、同時に又は連続して行なわれてもよい。マーカーの選択は、日

10

20

30

40

50

常的な実験に基づいて、最適な感度をもたらす組み合わせを決定してもよい。

【0102】

1つの実施形態では、関節炎症状を診断する方法を提供する。一般的に、関節炎症状は、患者において、患者の滑液、滑膜関節、血液、血漿又は血清中のシトルリン化14-3-3に対する自己抗体の存在に基づいて、検出されてもよい。換言すれば、シトルリン化14-3-3タンパク質に対する自己抗体は、関節炎症状を示すマーカーとして用いられてもよい。

【0103】

好ましい実施形態では、本発明は、関節リウマチを診断する方法を提供する。一般的に、関節リウマチは、患者において、患者の滑液、滑膜関節、血液、血漿又は血清中のシトルリン化14-3-3に対する自己抗体の存在に基づいて、検出されてもよい。換言すれば、シトルリン化14-3-3タンパク質に対する自己抗体は、関節リウマチを示すマーカーとして用いられてもよい。特に好ましい実施形態では、シトルリン化14-3-3タンパク質は、14-3-3である。

10

【0104】

加えて、シトルリン化14-3-3タンパク質又はこれの断片の使用により決定されるシトルリン化14-3-3に対する自己抗体の存在、又はシトルリン化14-3-3に対する自己抗体の相対レベルは、衰弱形態に進行する前の関節リウマチの早期ステージの予後診断指標であってもよい。早期の予後診断又は診断の利点は、治療計画の早期の実施である。

20

【0105】

対象における関節リウマチの存在又は不存在を決定するために、対象由来の生体サンプル中のシトルリン化14-3-3に対する自己抗体又はシトルリン化14-3-3との免疫複合体のレベルは、一般的に、正常対照に対応する自己抗体/免疫複合体のレベルと比較されてもよい。1つの好ましい実施形態では、正常な対照は、関節リウマチを有さない患者由来のサンプル中のシトルリン化14-3-3に対する自己抗体又はシトルリン化14-3-3との免疫複合体の平均レベルから確立される。代替の実施形態では、正常対照値は、受信者動作特性曲線を用いて決定されてもよい(例えばSackett et al., *Clinical Epidemiology: A Basic Science for Clinical Medicine*, Little Brown and Co., 1985, p. 106-7に記載の方法を参照のこと)。手短に言えば、この実施形態において、対照値は、診断試験結果についてのそれぞれの妥当なカットオフ値に対応する真陽性率(即ち感度)及び偽陽性率(100%特異度)の対のプロットから決定されてもよい。左上隅に最も近いプロット上の対照値(即ち、大きな領域を含む値)は、最も正確な値を提供し、そしてこの方法により決定される対照値よりも高いシグナルを生じるサンプルは、陽性であると考えられる。あるいは、対照値は、偽陽性率を最小化するためにプロットに沿って左にシフトさせてもよく、あるいは偽陰性率を最小化するために、右にシフトさせてもよい。一般的に、この方法により決定される対照値よりも高いシグナルを生じるサンプルは、関節炎について陽性であると考えられる。

30

【0106】

1つの態様では、本発明は、関節炎のサブタイプ間を識別するための方法を提供する。1つの実施形態では、該方法は、少なくとも1つのシトルリン化14-3-3タンパク質若しくはこれの断片に対する自己抗体又はシトルリン化14-3-3タンパク質若しくはこれの断片との免疫複合体のレベルの決定に関する。患者におけるシトルリン化14-3-3に対する自己抗体/シトルリン化14-3-3との免疫複合体のレベルは、関節炎のサブタイプが知られている、及び/又はすでに確立されている対象からのサンプルのものと比較される。

40

【0107】

1つの態様では、本発明は、関節リウマチへの治療に対する患者の応答可能性を決定するための方法に関する。1つの実施形態では、該方法は、患者サンプルにおける少なくとも1つのシトルリン化14-3-3タンパク質若しくはこれの断片に対する自己抗体又は

50

シトルリン化 14-3-3 タンパク質若しくはこれの断片との免疫複合体のレベルの決定に関する。好ましい実施形態では、患者サンプルにおけるシトルリン化 14-3-3 に対する自己抗体 / シトルリン化 14-3-3 との免疫複合体のレベルは、治療に対して応答する能力が知られている対象由来のサンプルのレベルと比較される。非炎症対象由来のサンプル及び / 又は別の炎症性患者由来のサンプルと比較して、第一の患者サンプルにおけるシトルリン化 14-3-3 に対する自己抗体 / シトルリン化 14-3-3 との免疫複合体の相対的に高いレベルは、第一の患者はよく知られている治療、例えば疾患修飾性抗リウマチ薬 (DMARD) 治療、例えば抗 TNF、メトトレキサート、ミノサイクリン、ヒドロキシクロロキン、スルファサラジン、アザチオプリン (azathioprine)、抗 IL-1、抗 IL-6r 等のための好ましい候補であることを示し得る。反対に、別の炎症性患者由来のサンプルと比較して、第一の患者サンプルにおけるシトルリン化 14-3-3 に対する自己抗体 / シトルリン化 14-3-3 との免疫複合体の相対的に低いレベルは、特にそのレベルが非炎症性対象由来のサンプルのレベルと近い場合、第一の患者がよく知られている治療に対する好ましい候補でないことを示し得る。

10

20

30

40

50

#### 【0108】

様々な種類の関節炎についての治療計画は、当該技術分野において知られている。例えば、関節リウマチと診断された患者は、不快を緩和するために、及び炎症を低減させるために、最初に非ステロイド系抗炎症性薬 (NSAID) が処方されてもよい。他の治療計画は、例えば、ステロイド系抗炎症薬 (SAID、例えばコルチゾール、プレドニゾン)、シクロオキシゲナーゼ 2 特異的阻害剤 (COX-2)、グルココルチコイド、及び / 又は標準的な疾患修飾性抗リウマチ薬 (DMARD)、例えば抗 TNF - 中和剤、免疫抑制薬 (例えば、シクロスポリン、アザチオプリン、シクロホスファミド)、抗生物質、抗マラリア剤、及び細胞傷害性薬剤 (例えば、メトトレキサート、スルファサラジン、レフルノミド) を含んでもよい。治療計画はまた、シトルリン化 14-3-3 タンパク質を直接標的とするものを有利に含んでもよい (例えば、PCT/CA2008/002154 を参照のこと)。特定の薬剤の用量又は実施例に関する詳細は、当業者に知られており、例えば、Harrison's Principles of Internal Medicine 15th ed. BRAUNWALD et al eds. McGraw-Hill 又は "The Pharmacological basis of therapeutics", 10th edition. 5 HARDMAN HG., LIMBIRD LE. editors. McGraw-Hill, New York, and in "Clinical Oncology", 3rd edition. Churchill Livingstone/ Elsevier Press, 2004. ABELOFF, MD. editor に見出すことができる。

#### 【0109】

1つの態様では、本発明は、関節リウマチの治療をモニタリングするための方法を提供する。1つの実施形態では、該方法は、患者サンプル中の少なくとも1つのシトルリン化 14-3-3 タンパク質又はこれの断片に対する自己抗体又はシトルリン化 14-3-3 タンパク質又はこれの断片との免疫複合体のレベルの決定、及び治療を受けている患者中のシトルリン化 14-3-3 に対する自己抗体 / シトルリン化 14-3-3 との免疫複合体のレベルのモニタリングに関する。

#### 【0110】

シトルリン化 14-3-3 に対する自己抗体 / シトルリン化 14-3-3 との免疫複合体の存在又は相対レベルを、患者における関節炎症状に関連することが知られている他のタンパク質の存在又は相対レベルと相関させてもよい。関節炎症状と関連することが知られているタンパク質の非限定的な例としては、炎症性サイトカイン、例えば腫瘍壊死因子、及びマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP)、例えば MMP-1 又は MMP-3 等が挙げられる。少なくとも25の異なる MMP が同定されている。患者サンプルにおける少なくとも1つの炎症性サイトカイン及び / 又は MMP の検出と組み合わせたシトルリン化 14-3-3 に対する自己抗体の検出は、関節炎を診断するために用いられてもよい。加えて、患者サンプル中の少なくとも1つの MMP 及び / 又は少なくとも1つの炎症性サイトカインと組み合わせたシトルリン化 14-3-3 に対する自己抗体 / シトルリン化 14-3-3 との免疫複合体の存在又は相対レベルは、関節炎が衰弱形態に進行する前の早

期ステージの予後診断指標として用いられてもよい。

【0111】

関節炎症状、特に関節リウマチを評価するためのキットはまた、本明細書に記載される。かかるキットは、典型的に、診断、予後診断及び/又は治療的診断アッセイを行なうために必要な2又はそれ以上の構成要素を含む。構成要素は、化合物、試薬、容器、使用説明書、及び/又は装置であってもよい。例えば、キット内の1つの容器は、1又はそれ以上のシトルリン化14-3-3タンパク質又はこれの断片を含んでもよい。かかるキットはまた、抗体結合の直接的又は間接的検出に好適なレポーター基を含む上述のような検出試薬を含んでもよい。

【0112】

従って、患者サンプルにおいて、シトルリン化14-3-3に対する自己抗体/シトルリン化14-3-3との免疫複合体、及び任意で他のマーカー、例えばMMPの存在を検出するためのキットは本明細書に記載され、該キットは、様々な関節炎症状、及びより好ましくは関節リウマチを診断又は識別するのに好適な診断又は予後診断結果を提供するのに有用である。シトルリン化14-3-3タンパク質及び/又は自己抗体の存在が示唆されるさらなる指標はまた、例えば心臓血管障害及び/又は神経変性障害を含む。キットは、任意で、例えば放射活性標識、発光標識、蛍光標識、酵素等を用いて、検出可能に標識される少なくとも1つのシトルリン化14-3-3タンパク質又はこれの断片を含んでもよい。タンパク質を検出可能に標識するための方法は、当該技術分野においてよく知られている。かかるキットは、関節炎の他のマーカー、例えば抗CCP、抗RF、CRP、SAA、IL-6、SIOO、オステオポンチン、RF、MMP-I、MMP-3、ヒアルロン酸、sCD14、血管新生マーカー及び骨、軟骨、又は滑膜代謝の生成物(例えばCTX-I及びCTX-II)等に特異的な検出試薬をさらに含んでもよい。該キットは、シトルリン化14-3-3に対する自己抗体の免疫学的な検出のために必要な二次試薬、例えば標識された抗体(例えば抗ヒト抗体)、発色又は蛍光発生試薬、重合剤等をさらに含んでもよい。特定の疾患状態において、かかる自己抗体のレベルを定量及び/又は評価するための、適切な比較スタンダードを含む、診断又は予後診断のためのキットを用いるための使用説明書は、有利に、印刷された形態で、及び/又は好適な媒体上に記録されて提供されてもよい。

【実施例】

【0113】

実施例

PAD酵素が存在するRAにおいて、14-3-3は滑膜腔中に遊離するので、我々は、14-3-3はRAの診断に用いられ得るシトルリン化標的であるか否か、そしてそうであるならば、シトルリン化14-3-3又は断片は、抗CCP陰性RA患者を同定するために用いることができるか否かを調査した。14-3-3におけるシトルリン化部位の同定は、3つのステージプロセス、1)インシリコ予測、2)インビトロ決定、及び3)臨床標本を用いた検証又は同定に関した。

【0114】

実施例1:シトルリン化部位のインシリコ同定

推定されるシトルリン化部位を代表するアルギニン(R)部分を、1)生来の3Dタンパク質立体配置に関する「R」の位置;2)PAD酵素に対する「R」のアクセス容易性;及び3)「R」に隣接する配列に基づいて、同定した。5つの推定されるシトルリン化部位は、「R」:4、12、19、61及び227に対応して同定された。

【0115】

実施例2:シトルリン化部位のインビトロにおける決定

インビトロシトルリン化は、これらの2つのアイソフォームは、RAにおいて最も関連する2つであると報告されているので、組み換えヒト14-3-3と組み換えヒトPAD2又はPAD4とを共インキュベートすることにより行なわれた。

【0116】

手短に言えば、PAD2 (MQ16.201) 及び PAD4 (MQ16.203) は、ModiQuest Researchから調達される。酵素は、100  $\mu$ l の PAD バッファ (0.1 M Tris HCl, pH 7.4、5 mM DTT を含む 10 mM CaCl<sub>2</sub>、1 mM PMSF、10  $\mu$ g/ml アプロトニン (aprotinin)、10  $\mu$ g/ml ロイペプチン及び 10  $\mu$ g/ml ペプスタチン) でさらに希釈され、ストック濃度は、PAD2 について 80 mU/ $\mu$ l、及び PAD4 について 82.5 mU/ $\mu$ l となった。

【0117】

10  $\mu$ g の全長組み換え 14-3-3 を、PAD2 (8 mU) 又は PAD4 (8.2 mU) のいずれかとインキュベートした。反応混合物を、PAD バッファを用いて 100  $\mu$ l に調節し、37 で 2 時間インキュベートした。インキュベーション後、反応を 25  $\mu$ l の 4X ラメリ (Lammelli) バッファの添加により終了させた。タンパク質を SDS-PAGE により分離させ、14-3-3 に対応するバンドを切り出した。切り出したバンドをゲルから溶出させ、トリプシン消化し、その後フーリエ変換質量分析計を用いて分析し、他に記載されるように、脱イミノ化部位を同定した。結果を、PAD2 及び 3、PAD4 を有する 4 つの推定シトルリン化部位をもたらし、その結果については、表 4 に記載される。

【0118】

【表 4】

表 4：インビトロで決定された 14-3-3 $\eta$  のシトルリン化部位

部位	配列	PAD なし	PAD2	PAD4
4 番目	mgdReqlIq	No	Yes	Yes
19 番目	qaeRyddma	No	Yes	Yes
42 番目	dRnllsvayk	No	Yes	Yes
61 番目	sswRvissie	No	Yes	No

【0119】

実施例 3：臨床サンプルを用いたシトルリン化 14-3-3 に対する抗体の検出

インビトロシトルリン化は、実施例 2 に記載されるように行ない、96 ウェルプレート を、組み換え 14-3-3 のシトルリン化又は非シトルリン化形態でコートした。抗 CCP 陽性及び陰性患者における 14-3-3 の生来の又はシトルリン形態のいずれかに対するヒト自己抗体応答を、抗ヒト抗体を用いて定量した。

【0120】

これらの新規の自己抗体が抗 CCP 陰性 RA 患者において検出可能か否か、そして健康対照と比較して識別可能に発現されるか否か評価するために、非シトルリン化及びシトルリン化 14-3-3 の両者に対する反応性を 30 人の抗 CCP 陰性 RA 患者及び 30 人の確認された抗 CCP 陰性健康対照において測定した。単位 (U) で表される平均及び中央値自己抗体レベルを、評価し、対応する t 検定及びマン・ホイットニーの U 検定を群内及び群間の差異を決定するために用いた。ROC 曲線下面積 (AUC) は、診断有用性の推定のために、及び様々な抗シトルリン化 14-3-3 カットオフについての尤度比 (LR) を決定するために作成された。

【0121】

図 1 は、抗 CCP 陽性 RA 患者の 3 人中 2 人において、非シトルリン化 14-3-3 と比較して、シトルリン化 14-3-3 に対する最大 25 倍の反応性が観察されたことを示し、これは、RA における 14-3-3 のシトルリン化形態に対する自己抗体の発現を初めて明らかにする。抗 CCP 陰性 RA 群内において、生来の 14-3-3 と比較して、シトルリン化 14-3-3 に対する著しく高い反応性が、観察された (1943 U 対 395 U、p = 0.01)。反応性の著しい差異は、健康な群においては観察されなかった。図 2 は、抗シトルリン化 14-3-3 抗体発現が、抗 CCP 陰性 RA 患者にお

いて著しく高かったことを示し、1943U (3045U) 及び306U (68-8982U) の平均 (SD) 及び中央値 (最小-最大) であるのに対して、健康な対照は155U (122U) 及び100U (45-564U) であった ( $p < 0.002$ )。健康な対照と比較した抗CCP陰性RA患者における抗シトルリン化14-3-3抗体差次的発現についての対応するROC AUCは、0.79 (95% CI 0.68-0.91;  $p < 0.0001$ ) であった。320Uのカットオフにおいて、特異度及び感度は、90%及び50%であり、5のLR陽性をもたらし、439Uにおいて14まで増加し、97%の対応する特異度及び47%の感度を有した。

【0122】

【表5】

10

	健康 N=58	CCP-ve RA 患者 N=30
平均 (SD)	155U (122U)	1943U (3045U)
中央値(最小-最大)	100U (45-564U)	306U (68-8982U)
AUC	0.79	
95% CI	0.68-0.91	
P-値	<0.0001	
カットオフ	439U	
LR	14	
特異度	97%	
感度	47%	

20

【0123】

実施例4：臨床サンプルを用いたシトルリン化部位の同定

14-3-3は、14-3-3タンパク質について陽性の臨床サンプルから免疫沈殿され、免疫沈殿されたタンパク質は、SDS-PAGEにより分離され、14-3-3に対応するバンドは、切り出される。切り出されたバンドは、ゲルから溶出され、トリプシン消化され、その後タンパク質上の脱イミノ化部位を同定するために、フーリエ変換質量分析計を用いて分析される。

30

【0124】

臨床的に関連する14-3-3シトルリン化部位の選択

最も関連する得14-3-3シトルリン化部位を同定するために、アルギニン化又はシトルリン化部分を有するペプチドは、タンパク質の非シトルリン化形態を区別し、そして健康な個人と関節炎に罹患している個人を識別するために用いることができる14-3-3上の最も関連するシトルリン化部位をスクリーニング及び選択するために用いられる。

40

【0125】

2つの異なるアプローチであるMRM/LC-MS及びELISAによる測定を用いた臨床サンプルにおける14-3-3発現レベルの比較は、タンパク質がシトルリン化される場合にトリプシンは切断しないことから、シトルリンを生ずるアルギニンの脱イミノ化は誤った切断 (mis-cleavage) をもたらずので、発現における差異が、シトルリン化に起因し得ることを例証する (表5を参照のこと)。特に、サンプル1~6における14-3-3タンパク質の高いレベルは、ELISAにより検出可能であるが、質量分析により測定された場合、サンプル7~12と比較して、無視できるレベルを有するよう見える。質量分析計サンプルはトリプシン消化され、そして特異的ペプチド質量の結果として14-3-3レベルはピーク強度の測定を介して定量化されるとともに、そのペプチドは、シトルリン化部位として本明細書に記載されるArg-42の次に存在する「AV

50

TELNEPLSNED」である。Arg - 42に対するシトルリン化特異的抗体は、サンプル1～12においてELISAにより試験され、Arg - 42が、臨床的に関連するシトルリン化部位であることを実証する。

【0126】

【表6】

表5

サンプル ID	質量分析	ELISA
1	0	297.8
2	0	23.85
3	0	33.11
4	139	1078.1
5	0	65.85
6	0	18.7
7	5679	64.47
8	1283	29.07
9	9791	7.9
10	14278	47.7
11	1602	3.2
12	2451	31.3

10

20

【0127】

実施例5：診断、予後診断、及び/又は治療モニタリング

臨床サンプル中のシトルリン化14-3-3タンパク質に対する自己抗体の検出

図1に表されるデータは、全長の14-3-3のシトルリン化形態に対する自己抗体の検出が、抗CCP陰性である患者の同定に有用であることを例証し、従って、血清陰性RA患者の診断における抗CCP試験を補う。図2に表されるRA対健康な個人における発現の差異は、抗シトルリン化14-3-3自己抗体が、RA患者において高く、RAに非常に特異的である傾向であることを例証する。異なるシトルリン化部位をそれぞれ有する抗シトルリン化14-3-3断片は、異なる部位のそれぞれに対する自己抗体を検出するためにも用いられる。部位特異的な自己抗体についてのかかる検出は、全長シトルリン化14-3-3タンパク質よりもRAに特異的、又はより特異的である傾向である。

30

【0128】

臨床サンプル中の14-3-3タンパク質のシトルリン化状態の決定

患者がシトルリン化14-3-3タンパク質に対する自己抗体について陽性として測定される場合、該タンパク質のシトルリン化状態は、全長シトルリン化14-3-3タンパク質又はこれらのシトルリン化断片のいずれか又は両者に対するモノクローナル抗体を用いて評価され、2つのパラメーター：

40

1) どのくらいのタンパク質がシトルリン化されるか？

2) タンパク質上のどの部位がシトルリン化されるのか、そして/あるいは幾つの部位がシトルリン化されるのか？

を評価する。

【0129】

シトルリン化14-3-3自己抗体の力価は、それ自体、並びに14-3-3血清タンパク質レベル及びタンパク質のシトルリン化状態に関して試験される。下記の表5は、起こりうる結果を定義する。

50

【 0 1 3 0 】

【 表 7 】

表 5

抗シトルリン化 14-3-3 $\eta$ 自己抗体レベル	14-3-3 $\eta$ タンパク質 レベル	予後
高い	高い	悪い
	低い	良い
低い	高い	悪い
	低い	良い又は14-3-3 $\eta$ は疾患プロセスに 主要ではない。

10

【 0 1 3 1 】

治療応答及びモニタリングのために、抗シトルリン化 14 - 3 - 3 自己抗体の高いレベルは、他のものより特定の治療の使用を示唆する。加えて、シトルリン化されるタンパク質の高い%は、より著しい疾患負荷と相関することが予測される。異なるシトルリン化部位は、タンパク質上の異なる生物学的活性を示唆し、従って異なる臨床結果に関連することも予測される。この情報は、従って、特定の患者について最良である治療の種類の設定を支援するために、及び治療応答をモニタリングするために用いられてもよい。

20

【 0 1 3 2 】

例えば、高い力価及び/又は高いシトルリン化状態は、リツキシマブのようなB細胞阻害剤、又はペプチジルアルギニンデイミナーゼを直接標的とする阻害剤を用いる治療に有用である。治療前及び治療後のレベルを測定することにより結果をモニタリングすることは、有用であり得る。例えば、レベルが減少すると、その後患者は、薬剤から利益、即ち治療に対する応答を受けてもよい一方で、レベルが変化又は増加しないままである場合、従って、治療的用量は、増加させることが必要であってもよく、あるいは治療のクラスの変更が必要とされてもよい。

30

【 0 1 3 3 】

本明細書において参照される全ての特許及び特許公報は、参照により本明細書に組み込まれる。

【 0 1 3 4 】

先の記載を読んだ当業者は、特定の改変及び改善を思い付く。全ての斯かる改変及び改善は、簡潔さ及び読みやすさの目的のために、本明細書において削除されているが、適切に添付の特許請求の範囲内であることは理解されるべきである。

【 図 1 】

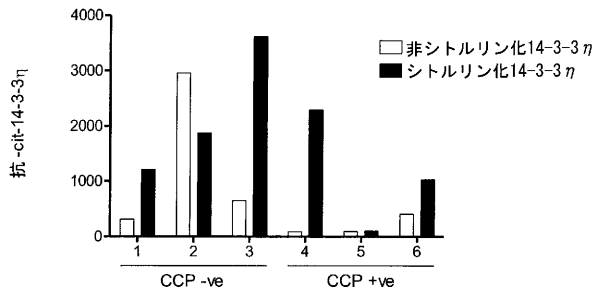


FIG. 1

【 図 2 】

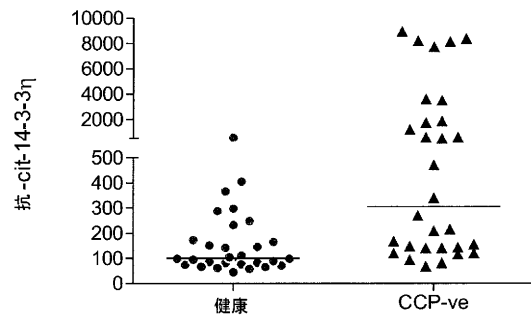


FIG. 2

【 配列表 】

2019081774000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
<b>G 0 1 N 33/53</b>	<b>(2006.01)</b>	G 0 1 N	33/53	D
C 1 2 N 15/13	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	N
		C 1 2 N	15/13	

(74)代理人 100117019

弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100141977

弁理士 中島 勝

(74)代理人 100150810

弁理士 武居 良太郎

(72)発明者 アンソニー マロッタ

カナダ国, プリティッシュ コロンビア ブイ 5 シー 5 ワイ 8 , バーナビー , アルバート スト  
リート 3 7 6 0 , ユニット 1 4 0 5

F ターム(参考) 4B065 AA87X AA87Y AA90X AA90Y AA91X AA91Y AB01 AB02 AB04 AC14  
BA01 BA08 CA24 CA25 CA46  
4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 BA60 BA71 CA40 CA42 DA75 DA76  
EA50 FA10 FA74 FA81 GA21

【外国語明細書】

2019081774000001.pdf

专利名称(译)	源自瓜氨酸化14-3-3的抗原及其在类风湿性关节炎的诊断中的用途		
公开(公告)号	<a href="#">JP2019081774A</a>	公开(公告)日	2019-05-30
申请号	JP2019014527	申请日	2019-01-30
[标]申请(专利权)人(译)	奥古雷克斯生命科学公司		
申请(专利权)人(译)	哦 - Gurekkusu生命科学公司		
[标]发明人	アンソニーマロッタ		
发明人	アンソニー マロッタ		
IPC分类号	C07K14/47 C07K17/00 C07K16/18 C12N5/12 C12N5/10 G01N33/53 C12N15/13		
CPC分类号	C07K14/4713 G01N33/564 G01N33/6893 G01N2440/18 G01N2800/105 C07K14/47 G01N33/54306		
FI分类号	C07K14/47.ZNA C07K17/00 C07K16/18 C12N5/12 C12N5/10 G01N33/53.D G01N33/53.N C12N15/13		
F-TERM分类号	4B065/AA87X 4B065/AA87Y 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AA91X 4B065/AA91Y 4B065/AB01 4B065/AB02 4B065/AB04 4B065/AC14 4B065/BA01 4B065/BA08 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA46 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA60 4H045/BA71 4H045/CA40 4H045/CA42 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA10 4H045/FA74 4H045/FA81 4H045/GA21		
代理人(译)	青木 笃 石田 敬 渡边洋一 中岛胜 武井良太郎		
优先权	61/550046 2011-10-21 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明提供了瓜氨酸化的14-3-3 eta肽及其抗体，以及使用它们的方法，用于评价关节炎病症，例如类风湿性关节炎。分离的瓜氨酸化的14-3-3 eta蛋白或其片段，其特异性地被患有有关节炎病症的患者的血清中存在的抗14-3-3η自身抗体识别。 [选图]图1

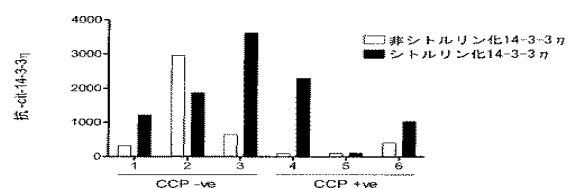


FIG. 1