

(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2015-511012

(P2015-511012A)

(43) 公表日 平成27年4月13日(2015.4.13)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/531 (2006.01)	GO 1 N 33/531 A	4 B 0 5 0
GO 1 N 33/564 (2006.01)	GO 1 N 33/564	4 H 0 4 5
GO 1 N 33/577 (2006.01)	GO 1 N 33/577 B	
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 4 5 A	
CO 7 K 16/24 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 7 5	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 39 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-561090 (P2014-561090)
 (86) (22) 出願日 平成25年3月6日 (2013.3.6)
 (85) 翻訳文提出日 平成26年10月14日 (2014.10.14)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2013/029452
 (87) 国際公開番号 W02013/134431
 (87) 国際公開日 平成25年9月12日 (2013.9.12)
 (31) 優先権主張番号 61/607,422
 (32) 優先日 平成24年3月6日 (2012.3.6)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

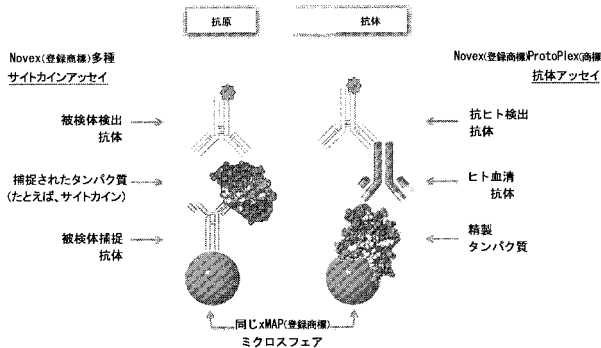
(71) 出願人 502221282
 ライフ テクノロジーズ コーポレーショ
 ン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 920
 08, カールスバッド, パン アレン
 ウェイ 5791
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫
 (74) 代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝
 (74) 代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

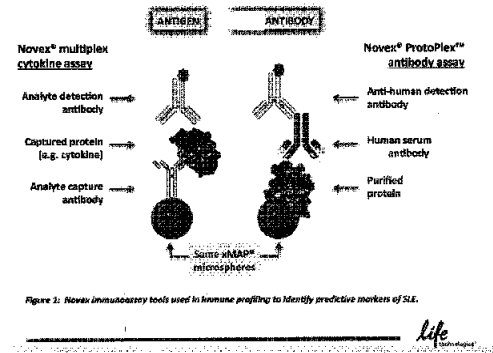
(54) 【発明の名称】 全身性エリテマトーデスのためのバイオマーカー

(57) 【要約】

本開示は、新規SLEバイオマーカーを提供する。本開示はさらに、新規SLEバイオマーカーを利用することによって、疾患を有する対象を診断、予後を判定、および分類するキットおよび方法を提供する。



SLEの予測マーカーを同定するための免疫プロファイリングにおいて用いられるNovexイムノアッセイツール



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

a) Regulated and Normal T Cell Expressed and Secreted (RANTES) に特異的に結合する第一の抗体；

b) RANTESに特異的に結合する第二の抗体；

c) ヒト抗体に特異的に結合する第三の抗体；および

d) トランスグルタミナーゼを含む精製抗原を含むキット。

【請求項 2】

全身性エリテマトーデス (SLE) を有する1人または複数の対象の血清を含む陽性対照をさらに含む、請求項1記載のキット。 10

【請求項 3】

抗体の少なくとも1つがモノクローナル抗体である、請求項1記載のキット。

【請求項 4】

RANTESに特異的に結合する抗体の両方がモノクローナル抗体であり、各々が異なるエピトープに結合する、請求項1記載のキット。

【請求項 5】

ヒト抗体に特異的に結合する抗体が、ヒト抗体の結晶化可能領域断片に結合する、請求項1記載のキット。

【請求項 6】

RANTESに特異的に結合する抗体の1つおよびヒト抗体に特異的に結合する抗体が検出可能に標識される、請求項1記載のキット。 20

【請求項 7】

検出可能な標識が酵素を含む、請求項6記載のキット。

【請求項 8】

抗体が異なるように標識される、請求項6記載のキット。

【請求項 9】

検出可能な標識が蛍光標識である、請求項6記載のキット。

【請求項 10】

第一、第二、および第三の抗体が各々異なる容器に存在する、請求項1記載のキット。 30

【請求項 11】

a) 3つの抗体および精製抗原を、血清を含む対象の試料に接触させる段階であって、最初の2つの抗体がRANTESに特異的に結合し、第三の抗体がヒト抗体に特異的に結合し、ならびに精製抗原がトランスグルタミナーゼであり、該接触の前に3つの抗体および精製抗原がキットに存在する段階；

b) 3つの抗体の結合の有無を検出して、それによって結合レベルを決定する段階；

c) 結合レベルを対照結合レベルと比較する段階であって、対照結合レベルが、全身性エリテマトーデス (SLE) を有しない対象の血清を含む対照試料に由来し、結合レベルと対照結合レベルの差がSLEの診断指標である、段階；

d) 免疫抑制療法を施す段階、を含む方法。 40

【請求項 12】

RANTESポリペプチドに特異的に結合する抗体の1つおよびヒト抗体に特異的に結合する抗体が標識される、請求項11記載の方法。

【請求項 13】

抗体が異なるように標識される、請求項12記載の方法。

【請求項 14】

標識が蛍光である、請求項13記載の方法。

【請求項 15】

試料を提供する段階をさらに含む、請求項11記載の方法。 50

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

関連出願

本出願は、その内容が参照により本明細書に組み入れられる、2012年3月6日に提出された、「全身性エリテマトーデスのためのバイオマーカー」と題する米国特許仮出願第61/607,422号の提出日の恩典を主張する。

【0002】

背景

全身性エリテマトーデス（SLEまたは「狼瘡」）は、心臓、関節、皮膚、肺、血管、肝臓、腎臓および神経系を含む多数の臓器に罹患しうる自己免疫障害である。患者によって持続および効果が異なる多様な症状のために、SLEの診断は難しくなりうる。この難しさのために、狼瘡は診断を誤れば致死性の疾患となりうる。SLEは、主に非ヨーロッパ系の子孫の女性に罹患して、米国では250,000人を超える患者に罹患していると推定されている。SLEの症状は免疫抑制治療によって管理することができるが、現状では治癒しない。

【0003】

現在、SLEに関していくつかの臨床マーカーが存在するが、これらのマーカーは、感度および特異性が不良であり、その有効性が制限される。SLE診断の複雑さ、影響を及ぼす集団の広さ、ならびに利用可能なおよび開発中の処置の数を考慮すると、患者の生存およびクオリティオブライフを改善するために適切な処置を施すことができるように、診断のためおよび患者の試料をよりよく分類するためのいずれにとっても有効なバイオマーカーが必要である。

【発明の概要】

【0004】

本明細書において、SLEを検出および診断する方法を提供するバイオマーカーおよび方法が開示される。

【0005】

簡単な概要

現在、単独でSLEの診断を確立する試験はない。医師がSLE診断の精度を改善するのを助けるために、全米リウマチ学会（American Rheumatism Association）によって11個の基準が確立された。これらの11個の基準は、SLEの患者において観察される多様な症状に密接に関連している。患者がこれらの基準の4個またはそれより多くを有する場合、SLEの診断が強く示唆される。しかし、SLEを有することが疑われる何人かの患者は、確定診断にとって十分な基準を決して示さない可能性がある。わずか数ヶ月または数年の観察後に十分な証拠を蓄積する患者もある。それでもなおSLEの診断は、何らかの状況においてこれらの古典的基準をごくわずかしが有しない患者においても行われうる。これらの患者の中で、何人かは後に他の基準を示しうるが、多くの患者は決して示さない。

【0006】

SLEの診断のために通常用いられる11個の基準は、顔の頬の上の骨または「蝶形」の紅斑；円板状皮疹；光線過敏症；粘膜潰瘍；関節炎；胸膜炎/心膜炎；腎臓の異常；急発作（痙攣）および/または精神病；血球数異常；免疫障害；および抗核抗体陽性である。

【0007】

これらの基準は、狼瘡を他の関連する自己免疫疾患と区別するそれらの特徴の有用なりマインダーとして役立つものの、それらはやむを得ず誤りに陥りがちである。

【0008】

したがって、いくつかの態様において、a) 表IIもしくはIIIの抗原またはエピトープを含むその断片を含む標的抗原；およびb) 標的抗原に対する試験試料中の1つまたは複数の分子の結合を検出する手段を含む、SLEを診断するためのキットが提供される。

【0009】

もう1つの態様において、本開示は、a) サイトカインに特異的に結合する1つまたは複

10

20

30

40

50

数の親和性試薬を試験試料に接触させる段階、b) ヒト抗体に特異的に結合する親和性試薬を試験試料に接触させる段階であって、ヒト抗体が、表IIもしくは表IIIに見いだされるポリペプチドまたはヒト抗体によって認識されるエピトープを含むその断片のいずれか1つに結合する段階、b) イムノアッセイを用いて親和性試薬の1つまたは複数の結合を検出する段階、c) イムノアッセイを用いて、SLEを有しない対照個体の試料における結合を検出する段階、およびd) 試験試料において見いだされた検出可能な結合を、SLEを有しない対照の個体の試料の結合と比較する段階であって、対照と比較して試験試料における検出可能なシグナルがより大きければSLEであることが示される段階を含む、SLEを有することが疑われる個体における全身性エリテマトーデス(SLE)を診断する方法を提供する。いくつかの態様において、イムノアッセイは、Protoplex免疫応答アッセイである。

10

【0010】

もう1つの態様において、a) 表IIもしくはIIIまたはエピトープを含むその断片の1つもしくは複数の標的抗原；b) 1つより多くの親和性試薬；およびc) SLEを有することが疑われる個体の試験試料、を含む混合物が開示される。

【0011】

さらなる態様は、サイトカインならびに表IIおよびIIIの抗原を利用して、SLEを有する対象の予後を判定して分類する方法を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】十分に確立されたNovex抗原検出イムノアッセイに関するPROTOPLEX(商標)免疫応答アッセイの設計の概略図である。

20

【図2】各抗原に関して計算した免疫応答のp値および発生率のグラフである(点=公知のSLEマーカー；同心円を有する点=新規マーカー)。20%より高い発生率を示した信頼性の高い応答は、四角の枠の中である。

【図3】PROTOPLEX(商標)免疫応答アッセイを用いて、対応する免疫応答に関して特徴を調べた15個の新規SLE抗原の表である。SLE試料および対照に関する応答の発生率を計算した。M統計量を用いて有意性を計算した。

【図4】SLEバイオマーカーRo52(A)、RNP複合体(B)、EIF2C1(C)、およびHMGN1(D)の感度(y-軸)および特異性(x-軸)に関する一連のグラフである。各マーカーに関して曲線下面積(AUC)を計算した。

30

【図5】新規(A)、確立された(B)、および両者を合わせたSLEマーカー(C)の感度および特異性を示す一連の格子状の表である。

【図6】健康な対照およびSLEと診断された個体の試験したヒト血清試料177例における血清中サイトカインレベルの分布を示す。

【図7】健康な対照およびSLEと診断された個体のヒト血清試料177例における特定のタンパク質に対する血清中抗体レベルの分布を示す。

【図8】一連のマッチング行列である(「混同行列」とも呼ばれる)。これらの行列は、SLE予測パネルを強調する(A、サイトカイン；B、同定された特定のタンパク質に対する抗体；およびC、サイトカインと同定された特定のタンパク質に対する抗体との併用)。公知の診断起源の血清を、サイトカイン濃度または明記された抗原に対する抗体レベルに関して分析した。真の陽性(左上)および真の陰性(右下)は、各パネルに記入される予測値に対応する。

40

【発明を実施するための形態】

【0013】

詳細な説明

本開示は、全身性エリテマトーデス(SLE)を高度に示し、それによって個体がSLEに罹っているか否かをより正確に評価することができるバイオマーカーおよびバイオマーカーパネルを提供する。さらに、開示のバイオマーカーパネルは、SLEを有する個体と別の疾患を有する個体とを識別することができる。たとえば、本明細書において開示されるバイオマーカーパネルを用いて、SLEと、クローン病、リウマチ性関節炎および多発性硬化症

50

などの他の疾患とを識別することが可能である。それゆえ、開示のバイオマーカーパネルは、SLEの診断において用いられうる。

【0014】

SLEは、核自己抗原に対する自己抗体の産生および血液中の免疫複合体を特徴とする全身性の自己免疫疾患である。これにより、皮膚、関節、腎臓、および中枢神経系を含む様々な臓器または系に対する損傷が起こる。SLEの臨床症状は多様でありえて、糸球体腎炎、皮膚炎、血栓症、血管炎、急発作、および関節炎を含みうる。臨床症状がこのように不均一であるために、SLEを正確に早期に同定することは難題である。

【0015】

したがって、本開示は、部分的に、1つまたは複数のサイトカインを捕捉および/または検出するための親和性試薬と、生物試料中の特定の抗原を認識する1つまたは複数の抗体とを組み合わせるキット、およびその使用方法を提供する。サイトカインの検出と、特定の抗原を認識する抗体の検出とを組み合わせると、SLEと高度に相関する。

10

【0016】

本明細書における「親和性試薬」、「結合リガンド」、「捕捉結合リガンド」、「捕捉結合種」、「捕捉プローブ」、または「捕捉リガンド」とは、標的被検体もしくは標的種の存在を検出するため、または標的被検体もしくは標的種を相対的もしくは絶対的に定量するために用いられ、標的被検体もしくは標的種に結合する化合物を意味する。結合リガンドは、詳しくは以下にさらに考察されるように抗体またはその断片を含むタンパク質を含む。

20

【0017】

一般的に、捕捉結合リガンドによって、標的種または標的配列を、本明細書においてさらに記述される検出目的のために固相支持体に結合させることができる。捕捉結合リガンドに対する標的種の結合は、直接または間接的でありうる。

【0018】

いくつかの態様において、本開示は、サイトカインを捕捉および/または検出するための第一および第二の親和性試薬、ならびに表IIまたは表IIIに開示されるポリペプチドまたはその断片に特異的に結合する抗体を捕捉および/または検出するための親和性試薬を混合する段階を含む、キットおよびその使用方法を提供する。

30

【0019】

「サイトカイン」は、他の細胞の機能に影響を及ぼす任意の分泌型ポリペプチドであり、免疫応答または炎症反応における細胞間の相互作用を調節する分子である。サイトカインは、それらを産生する細胞によらず、モノカイン、ケモカイン、およびリンフォカインを含むがこれらに限定されるわけではない。例として、モノカインは一般的に、マクロファージおよび/または単球などの単核球によって産生および分泌されると言われるが、ナチュラルキラー細胞、線維芽細胞、好塩基球、好中球、内皮細胞、脳星細胞、骨髄間質細胞、表皮ケラチノサイト、およびBリンパ球などの他の多くの細胞がモノカインを産生する。リンフォカインは、一般的に、リンパ球によって産生されると言われる。

【0020】

サイトカインの例には、Regulated and Normal T Cell Expressed and Secreted (RANTES)、上皮細胞増殖因子(EGF)、インターロイキン-2(IL-2)、インターロイキン-15(IL-15)、ヒト成長因子(HGF)、インターロイキン-7(IL-7)、マクロファージ炎症タンパク質-1(MIP-1)、エオタキシン、インターロイキン-17(IL-17)、インターフェロン- (IFN-)、インターロイキン-8(IL-8)、マクロファージ炎症タンパク質-1(MIP-1)、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)、インターロイキン-4(IL-4)、インターフェロン- 誘導タンパク質10(IP-10)、インターフェロン- (IFN-)、インターロイキン-10(IL-10)、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、インターロイキン-5(IL-5)、単球走化性タンパク質-1(MCP-1)、インターロイキン-12(IL-12)、腫瘍壊死因子- (TNF-)、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、インターロイキン-6(IL-6)、インターフェロン誘導モノカイン(MIG)、インターロイキン-1(IL-

40

50

1)、インターロイキン-13 (IL-13)、および血管内皮増殖因子 (VEGF)、および regulated and normal T cell expressed and secreted (RANTES) が挙げられるがこれらに限定されるわけではない。

【0021】

いくつかの態様において、1つまたは複数の親和性試薬が特異的に結合するサイトカインは、RANTESである。ケモカイン (C-Cモチーフ) リガンド5 (CCL5) と呼ばれるRANTESは、ヒトにおいてcc15遺伝子によってコードされるタンパク質である。Schlecker et al. (2012)。RANTESのポリペプチド配列は、SEQ ID NO: 1に提供され、GenBankアクセッション番号NP_002976.2として掲載される。

SEQ ID NO:1 (RANTES)

MKVSAAALAVILIATALCAPASASPYSSDTPCCFAYIARPLPRAHIKEYFYTSGKCSNPA
VVFVTRKNR QVCANPEKKWVREYINSLEMS

【0022】

いくつかの態様において、1つまたは複数の親和性試薬は抗体である。「抗体」は、1つの免疫グロブリン遺伝子もしくは複数の免疫グロブリン遺伝子によって実質的にコードされるポリペプチド、またはエピトープに特異的に結合および認識するその断片を意味する。一般に認められる免疫グロブリン遺伝子は、および軽鎖定常領域遺伝子、およびμ重鎖定常領域遺伝子、ならびに無数の免疫グロブリン可変領域遺伝子を含む。たとえば抗体は、インタクト抗体として、または様々なペプチダーゼによる消化によって産生された十分に特徴が調べられた多数の断片として存在する。これには、たとえばFab'およびF(ab')₂断片が挙げられる。

【0023】

このように、いくつかの態様において、RANTESに特異的に結合する第一および第二の抗体、ならびに表IIおよびIIIに提供されるポリペプチドまたはその断片のいずれか1つに特異的に結合する抗体に特異的に結合する第三の抗体を含む、キットおよびその使用方法が提供される。

【0024】

抗体という用語はまた、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を含む。本明細書において用いられる「ポリクローナル抗体」および「複数のポリクローナル抗体」という用語は、同じ抗原上のいくつかの異なるエピトープに結合するかまたは反応することができる抗体分子の不均一な混合物を意味する。免疫した動物の血液、乳汁、初乳、または卵から単離されたポリクローナル抗体調製物は典型的に、標的抗原に対して特異的な抗体に加えて、標的抗原に対して特異的でない抗体を含む。このように、本明細書において用いられる「ポリクローナル抗体」という用語は、特定の抗原に対して特異的な抗体が、たとえば抗原アフィニティクロマトグラフィーによって濃縮されている抗体調製物、およびそのように濃縮されていない調製物の両方を意味する。

【0025】

したがって、いくつかの態様において、1つまたは複数の抗体は、ポリクローナル抗体または抗体調製物である。他の態様において、1つまたは複数の抗体はモノクローナル抗体である。「モノクローナル」抗体は、1つのハイブリドーマ (またはそのクローン) もしくは他の細胞株によって、またはトランスジェニック動物によって産生される抗体を意味し、そのためモノクローナル抗体は典型的に抗原上の1つのエピトープを認識する。モノクローナル抗体組成物は、特定のエピトープに対して1つの結合特異性を示す。

【0026】

抗体という用語はまた、抗体全体の修飾によって産生された抗体断片、または組み換えDNA方法論を用いてデノボで合成された抗体断片を含む。抗体は、二重特異性抗体、ミニボディ、ドメイン抗体、合成抗体 (時に、本明細書において「抗体模倣体」と呼ばれる)、キメラ抗体、ヒト化抗体、抗体融合体 (時に、「抗体コンジュゲート」と呼ばれる)、および各々の断片をそれぞれ含むがこれらに限定されるわけではない多様な構造でありう

10

20

30

40

50

る。

【0027】

いくつかの態様において、自己抗体の結晶化可能領域断片に特異的に結合する抗体が提供される。抗体の「結晶化可能領域断片」、「Fc領域」、「Fcドメイン」、「Fc」部分は、1つまたは複数の重鎖定常領域ドメイン、 C_H1 、 C_H2 、および C_H3 を含むが重鎖可変領域を含まない免疫グロブリン重鎖のその部分を意味する。

【0028】

他の態様において、抗体軽鎖の定常領域（ および/または ）に特異的に結合する抗体が提供される。

【0029】

「自己抗体」とは、対象において本来存在するエピトープに向けられて、それ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。

【0030】

いくつかの態様において、対象はヒトであり、ヒトにおいて本来存在するエピトープに特異的に結合する抗体が検出される；すなわち、検出される抗体は自己抗体であり、自己抗体が結合する抗原は自己抗原である。このため、いくつかの態様において、RANTESに特異的に結合する第一および第二の抗体と、ヒト自己抗体に特異的に結合する第三の抗体とを含むキットおよびその使用方法が提供される。いくつかの態様において、第三の抗体は、表IIおよびIIIに提供されるポリペプチドまたはその断片のいずれか1つに特異的に結合する抗体に特異的に結合する。

【0031】

相補性決定領域（CDR）とも呼ばれる抗体超可変領域はまた、抗体の抗原結合部位、またはより詳しくはエピトープ結合部位の形成に寄与する。「エピトープ」は、パラトープとして知られる抗体分子の可変領域における特異的結合部位と相互作用する決定基である。エピトープは、アミノ酸または糖側鎖などの分子群であり、通常、特異的構造特徴ならびに特異的電荷特徴を有する。1つの抗原は、1つより多くのエピトープを有しうる。

【0032】

エピトープは、コンフォメーションエピトープまたは線形エピトープのいずれかでありうる。コンフォメーションエピトープは、線形のポリペプチド鎖の異なるセグメントからの空間的に近接したアミノ酸によって産生される。線形エピトープは、ポリペプチド鎖における隣接するアミノ酸残基によって産生されるエピトープである。

【0033】

コンフォメーションおよび非コンフォメーションエピトープは、変性溶媒の存在下ではコンフォメーションエピトープに対する結合が失われるが、非コンフォメーションエピトープに対する結合は失われないという点において識別されうる。エピトープは典型的に、独自の空間的コンフォメーションで少なくとも3個、およびより通常少なくとも5個または8~10個のアミノ酸を含む。1つの抗体が標的抗原に対するもう一つの抗体の結合を遮断できること、たとえば「ビニング」を示す、同じエピトープを認識する抗体は、単純なイムノアッセイにおいて確認することができる。

【0034】

本明細書において用いられる「抗原」は、それに対してBリンパ球を伴う免疫応答が生成されうる、核酸、脂質、炭水化物、プロテオグリカン、リボヌクレオタンパク質複合体、タンパク質複合体、タンパク質、糖タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、脂質、糖脂質、およびそのような分子の本来存在するまたは合成による（インビトロ）修飾体などの分子を意味する。各々の抗原に関して、1つより多くのエピトープが存在する。

【0035】

本明細書において用いられる、「標的抗原」とは、対象の試料中の抗体の存在、非存在、または量を決定するために用いられる、タンパク質、またはタンパク質の免疫反応性を有するその一部、断片、変種、イソ型、そのプロセシング産物を意味する。「試験抗原」は、標的抗原として用いられるか否かに関して評価されるタンパク質である。それゆえ、

10

20

30

40

50

試験抗原は、試験集団の一部がそれに対して反応性の抗体を有するか否かを決定するために用いられる候補標的抗原またはタンパク質である。

【0036】

「標的抗原」および「試験抗原」という用語の使用は、完全な野生型成熟タンパク質を含むことを意味するか、または同様に標的抗原、試験抗原、もしくは抗原が、試験試料の1つもしくは複数の抗体に対する参照タンパク質の特異的結合特徴を保持もしくは保有する、表記のタンパク質の前駆体、プロセシング型（タンパク質分解によるプロセシング型または他の切断型）、非プロセシング型、翻訳後修飾型、または化学修飾型も示しうる。タンパク質は、たとえば、異常なプロセシング、切断または分解、アミノ酸残基の酸化、異型グリコシル化パターン等を含む、正常な細胞によって産生されるタンパク質において典型的に見いだされない1つまたは複数の修飾を有しうる。「標的抗原」または「試験抗原」という用語の使用はまた、参照タンパク質のスプライスイソ型もしくは対立遺伝子変種を含むか、または「標的抗原」および「試験抗原」が、試験試料の1つまたは複数の自己抗体に対する参照タンパク質の免疫反応性を保持または保有する限り、参照タンパク質の配列変種でありうる。「標的抗原」および「試験抗原」という用語の使用は、参照タンパク質の抗体結合特異性を有する参照タンパク質の断片（「抗原性断片」）を含む。

10

【0037】

本明細書において用いられる「タンパク質」という用語は、完全長のタンパク質、タンパク質の一部、またはペプチドを意味する。タンパク質は、より大きいタンパク質の断片化を介して産生されうるか、または化学合成されうる。タンパク質は、たとえば、細菌、酵母、昆虫細胞、および哺乳動物細胞などの、しかしこれらに限定されるわけではない種における組み換え型過剰発現によって調製されうる。本発明のタンパク質マイクロアレイに配置されるタンパク質は、たとえば精製および/または固定を助けるために少なくとも1つのアフィニティタグとの融合タンパク質でありうる。本発明のある局面において、少なくとも2個のタグがタンパク質に存在し、その1つは精製を助けるために用いることができ、他の1つは、固定を助けるために用いることができる。ある説明的な局面において、タグはHisタグ、GSTタグ、またはビオチンタグである、タグがビオチンタグである場合、市販の試薬（Invitrogen, Carlsbad, Calif.）を用いて、タグをインビトロまたはインピボでタンパク質に会合させることができる。タグがインビトロでタンパク質に会合している局面では、Bioeaseタグ（Invitrogen, Carlsbad, Calif.）を用いることができる。

20

30

【0038】

本明細書において用いられる、「ペプチド」、「オリゴペプチド」、および「ポリペプチド」という用語は、本明細書においてタンパク質と互換的に用いられ、ペプチド結合によって連結された隣接アミノ酸の配列を意味する。本明細書において用いられる、「タンパク質」という用語は、タンパク質のアミノ酸の修飾を含む翻訳後修飾を同様に含むことができ、およびアミノ酸骨格ではない化学基または生体分子の付加を含みうるポリペプチドを意味する。この用語は、1つまたは複数のアミノ酸残基が、対応する天然起源のアミノ酸のアナログまたは模倣体であるアミノ酸ポリマー、ならびに天然起源のアミノ酸ポリマーに適用される。ポリペプチドを、たとえば炭水化物残基を付加することによって修飾して、糖タンパク質を形成することができる。「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」という用語は、糖タンパク質ならびに非糖タンパク質を含む。

40

【0039】

本明細書において用いられるポリペプチドまたはタンパク質の「変種」は、参照ポリペプチドまたはタンパク質から1つまたは複数のアミノ酸が変化しているアミノ酸配列を意味する。好ましくは、ポリペプチドの変種は、少なくとも15個のアミノ酸の配列に関して、参照タンパク質と少なくとも60%の同一性を有する。より好ましくは、ポリペプチドの変種は、少なくとも15個のアミノ酸の配列に関して、参照タンパク質と少なくとも70%同一である。タンパク質変種はたとえば、少なくとも15個のアミノ酸の配列に関して参照ポリペプチドと少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%同一でありうる。本発明のタンパク質変種はたとえば、少なくとも20個のアミノ酸の配列

50

に関して、参照ポリペプチドと少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%同一でありうる。変種は、置換されたアミノ酸が類似の構造または化学特性（たとえば、ロイシンをイソロイシンに置換）を有する「保存的变化」を有しうる。変種はまた、「非保存的」変化（たとえば、グリシンのトリプトファンへの置換）を有しうる。類似の軽微な変化はまた、アミノ酸の欠失、または挿入、または両方を含みうる。

【0040】

特定の抗原またはエピトープに対して「特異的結合」または「特異的に結合する」または「特異的である」とは、非特異的相互作用とは測定可能に異なる結合を意味する。特異的結合は、たとえば一般的に結合活性を有しない類似の構造の分子である対照分子の結合と比較して分子の結合を決定することによって測定することができる。たとえば、特異的結合は、標的と類似である対照分子との競合によって決定することができる。

10

【0041】

特定の抗原またはエピトープに対する特異的結合は、たとえば特定の抗体-抗原相互作用の解離定数を意味する、抗原またはエピトープのKDが、少なくとも約 10^{-4} M、少なくとも約 10^{-5} M、少なくとも約 10^{-6} M、少なくとも約 10^{-7} M、少なくとも約 10^{-8} M、少なくとも約 10^{-9} M、少なくとも約 10^{-10} M、少なくとも約 10^{-11} M、少なくとも約 10^{-12} Mまたはそれ以上である抗体によって示されうる。典型的に、抗原に特異的に結合する抗体は、抗原またはエピトープと比較して対照分子に関して20倍、50倍、100倍、500倍、1000倍、5000倍、10000倍またはそれより高いKDを有するであろう。

【0042】

同様に、特定の抗原またはエピトープに対する特異的結合は、たとえば、特定の抗体-抗原相互作用の結合定数を意味する、抗原またはエピトープのKAまたはKaが、対照と比較してエピトープに関して少なくとも20倍、50倍、100倍、500倍、1000倍、5,000倍、10,000倍、またはそれより高い抗体によって示されうる。

20

【0043】

タンパク質またはペプチドについて言及する場合の、抗体に「選択的に結合する」または「選択的に免疫反応する」という表現は、タンパク質および他の生物学的物質の不均一な集団においてタンパク質の存在を決定する結合反応を意味する。このため、指定されたイムノアッセイ条件では、明記された抗体は、特定のタンパク質にバックグラウンドの少なくとも2倍で結合して、試料中に存在する他のタンパク質に有意な量で実質的に結合しない。たとえば、固相ELISAイムノアッセイは、タンパク質と特異的に免疫反応性である抗体を選択するためにルーチンで用いられる（たとえば、特異的免疫反応性を決定するために用いることができるイムノアッセイフォーマットおよび条件の説明に関しては、Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (1988)を参照されたい)。典型的に、特異的または選択的反応は、バックグラウンドシグナルまたはノイズの少なくとも2倍であり、より典型的にバックグラウンドの10倍より上から100倍であろう。

30

【0044】

いくつかの態様において、RANTESに特異的に結合する第一および第二の抗体、表IIおよびIIIに提供されるタンパク質またはその断片のいずれかに特異的に結合するヒト抗体に特異的に結合する第三の抗体、ならびに精製抗原を含む、キットおよびその使用方法が提供される。他の態様において、ヒト抗体は自己抗体である。

40

【0045】

他の態様において、RANTESに結合する第一および第二の抗体がモノクローナル抗体であり、第一および第二の抗体が別個のエピトープを認識する、キットおよびその使用方法が提供される。

【0046】

本明細書において用いられる「精製された」および「単離された」という用語は、同意語であり、他の成分を実質的または本質的に含まない材料を意味する。たとえば、1つの態様において、組み換え型タンパク質は、クローニング反応または固相合成において用いられる他の成分を含まない場合、単離または精製されており、単離または精製は一般的に

50

、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、質量分析、または高速液体クロマトグラフィー（HPLC）などの分析化学技術を用いて決定される。1つの態様において、本発明のポリヌクレオチド、タンパク質、またはペプチドは、それが調製物に存在する主な種である場合、単離されていると見なされる。本発明の精製タンパク質、ペプチド、または核酸分子は、調製物に存在する高分子種の約80%より多く、存在する高分子種の約90%より多く、存在する高分子種の約95%より多く、存在する高分子種の約96%より多く、存在する高分子種の約97%より多く、存在する高分子種の約98%より多く、存在する高分子種の約99%より多くを表す。

【0047】

いくつかの態様において、トランスグルタミナーゼである精製抗原が提供される。「トランスグルタミナーゼ」は、遊離のアミン基と、タンパク質またはペプチド結合したグルタミンのカルボキサミド基のあいだの共有結合の形成を触媒する酵素ファミリーを意味する。トランスグルタミナーゼファミリーメンバーは、第XIII因子、ケラチノサイトトランスグルタミナーゼ、組織トランスグルタミナーゼ、上皮トランスグルタミナーゼ、前立腺トランスグルタミナーゼ、TGM X、TGM Y、TGM Z、および赤血球バンド4.2を含む。Korsgrenらは、赤血球バンド4.2、モルモット肝トランスグルタミナーゼ、およびヒト第XIII因子のAサブユニットのアミノ酸配列、ならびに赤血球バンド4.2の核酸配列を記述している。Proc. Nat'l Acad. Sci. USA (1990) 87:613-617。これらの各々のアミノ酸配列は以下のとおりである。

SEQ ID NO:2 (赤血球バンド4.2)

RRGSVPILRQWLTGRGRPVYDGGQAWVLA AVACTVLRCLGIPARVVTTTFASAQGTGGRL
LIDEYYNEEGLQNGEGQRGRIWIFQTSTECWMTRPALPQGYDGWQILDPSAPNGGGVL
GSCDLVPVRAVKEGTVGLTPAVSDLFAAINASCVVWKCCEDGTLELTDSNTKYVGNIS
TKGVGSDRCEDITQNYKYPEGSLQEKEVLERVEKEKMEREKDNGIRPPS

SEQ ID NO:3 (モルモット肝トランスグルタミナーゼ)

SPMSWIGSVDILRRWKDYGCQRVKYGCWVFAAVACTVLRCLAIPTRVVTNFNSAHD
QNSNLLIEYFRNESGEIEGNKSEMIWNFHSLLGGVVDDQAGPGAWVRGVQALDPTPQE
KSEGTYCCGPVPVRAIKEGHLNVKYDAPFVFAEVNADVNNWIRQKDGSLRKSINHLVV
GLKISTKSVGRDEREDITHYKYPEGSEEEREAFVRANHLNKLATKEEAQEETG

SEQ ID NO:4 (第XIII因子Aサブユニット)

GSVDILLEYSSENPNRYGQCWVFAGVFNTFLRCLGIPARIVTNYFSAHDNDANLQMDI
FLEEDGNVNSKLTKDSVWNYHCWNEAWMTRPDLPGFGGWQAVDSTPQENS DGM YR
CGPASVQAIKHGHVCFQFDAPFVFAEVNSDLIYITAKKDGTHVVENV DATHIGKLIVTK
QIGGDGMMDITDTYKFQEGQEEERLALETALMYGAKKPLNTEG

【0048】

いくつかの態様において、RANTESに特異的に結合する第一および第二の抗体と、トランスグルタミナーゼに特異的に結合するヒト抗体に特異的に結合する第三の抗体を含むキットおよびその使用方法が提供される。いくつかの態様において、ヒト抗体は、モルモット肝トランスグルタミナーゼに特異的に結合する。他の態様において、ヒト抗体は、モルモット肝トランスグルタミナーゼエピトープに特異的に結合する。

【0049】

アレイ

本開示は、SLEに関連する反応性を有する抗体の同定に部分的に基づく。健康な個体ならびに自己免疫疾患を有する患者の血清試料を、多数のSLE特異的バイオマーカーを同定

10

20

30

40

50

するために、以下により詳細に記述されるPROTOARRAY（商標）ヒトタンパク質マイクロアレイ（Invitrogen Corporation, Carlsbad, Calif.）においてプロファイル調べた。タンパク質の量がより少なく済むこと、ネイティブのコンフォメーション、および昆虫細胞由来翻訳後修飾を含むアレイの完璧な内容により、SLEに関連することがこれまで知られていなかったバイオマーカーの同定が可能となった。

【0050】

これらのバイオマーカーを含むマイクロアレイ、または他のアッセイフォーマットは、患者の試料中でバイオマーカーに結合する抗体の存在を検出することができ、それによって疾患の診断およびモニタリングが可能となる。マイクロアレイまたは他のアッセイは、SLEに関連するバイオマーカーなどの、特異的バイオマーカーまたは特異的バイオマーカーの群を含みうる。

10

【0051】

本明細書において用いられる「アレイ」という用語は、基質上であるパターンで構成要素が整列していることを意味する。そのパターンは典型的に二次元パターンであるが、パターンはまた、三次元パターンでもありうる。タンパク質アレイにおいて、構成要素はタンパク質である。ある態様において、アレイはマイクロアレイまたはナノアレイでありうる。「ナノアレイ」は、個別の構成要素が0.1 nmから10 μm、たとえば1 nmから1 μm離れているアレイである。「マイクロアレイ」は、アレイ上の構成要素の密度が少なくとも10⁶個/cm²であるアレイである。マイクロアレイ上で、個別の構成要素はたとえば1 μmより大きく離れうる。

20

【0052】

本明細書において用いられる「タンパク質アレイ」という用語は、タンパク質アレイ、タンパク質マイクロアレイ、またはタンパク質ナノアレイを意味する。タンパク質アレイは、たとえば「PROTOARRAY（商標）」タンパク質高密度アレイ（Invitrogen, Carlsbad, Calif.、インターネット上でInvitrogen.comから入手可能）を含みうるがこれらに限定されるわけではない。PROTOARRAY（商標）高密度タンパク質アレイは、ヒトタンパク質に対する自己抗体の有無に関してアッセイするために、血清などの複雑な生物学的混合物をスクリーニングするために用いることができる。代わりに、自己抗体バイオマーカーを検出するために、本明細書において提供される自己抗原などの自己抗原を含むカスタムタンパク質アレイを用いて、ヒトタンパク質に対する自己抗体の有無に関してアッセイすることができる。

30

【0053】

「タンパク質チップ」という用語は、本出願において、タンパク質アレイまたはマイクロアレイと同義で用いられる。

【0054】

バイオマーカー

本発明のタンパク質アレイにおいて用いられるタンパク質バイオマーカーは、完全なタンパク質または完全なタンパク質の断片でありうる。タンパク質断片は、断片が抗体によって認識されるエピトープを含む限り、タンパク質アレイの一部として用いるために適している。所定の完全なタンパク質に関して必要なエピトープを、タンパク質マイクロアレイを用いておよびELISPOTまたはELISA技術によってマップすることができる。本発明によって提供される抗原バイオマーカーは、完全なタンパク質ならびにエピトープを含むその断片を含むことを意味すると理解される。典型的に、適したタンパク質断片は、完全長のタンパク質アミノ酸配列の少なくとも5%、6%、7%、8%、9%、少なくとも10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、少なくとも20%、25%、30%、35%、45%、または少なくとも50%、60%、70%、80%、90%を含む。本発明の1つの態様において、タンパク質断片は、少なくとも6個の隣接アミノ酸、少なくとも10個の隣接アミノ酸、少なくとも20個の隣接アミノ酸、少なくとも50個の隣接アミノ酸、少なくとも100個の隣接アミノ酸、または少なくとも200個の隣接アミノ酸を含む。

40

【0055】

50

「バイオマーカー」は、疾患もしくは状態、または疾患もしくは状態の処置の効果を検出、診断、予後を判定、直接処置、またはその進行を測定するために用いることができる生化学特徴を意味する。バイオマーカーは、個体において疾患の存在に関連する核酸、タンパク質、炭水化物、またはその組み合わせの存在を含むがこれらに限定されるわけではない。バイオマーカーのさらなる例は、抗体およびサイトカインを含む。

【0056】

本明細書において用いられる「バイオマーカー検出パネル」または「バイオマーカーパネル」は、バイオマーカーの組（パネル）に関する検出値に基づいて、疾患または状態を検出、診断、予後を判定、病期分類、またはモニターするために同時に提供されるバイオマーカーの組を意味する。

10

【0057】

開示の1つの態様は、a) 個体の試験試料に、表IIもしくはIIIまたはエピトープを含むその断片の1つもしくは複数の標的抗原を接触させる段階、およびb) 1つまたは複数の標的抗原の結合を検出する段階であって、1つまたは複数の標的抗原が結合すれば、試験試料中に1つまたは複数の標的抗体が存在することが検出される段階を含む、SLEなどの自己免疫疾患を有することが疑われる個体の試験試料中の1つまたは複数の標的抗体を検出する方法である。

【0058】

さらなる態様において、試験試料に、表IIIの抗原またはエピトープを含むその断片の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、もしくは22個を接触させる。さらなる態様において、各バイオマーカーに結合する抗体の定量的量が決定される。

20

【0059】

さらなる態様において、自己免疫疾患の存在を示すためには、少なくとも1つまたは2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22個またはそれより多くの抗原バイオマーカーの任意の組み合わせに、試験試料の抗体が結合しなければならない。

【0060】

本開示のもう1つの態様は、a) 各々が表IIもしくはIIIの抗原またはエピトープを含むその断片を含む、1つまたは複数の標的抗原を個体の試験試料に接触させる段階、およびb) 試験試料中の1つまたは複数の抗体に対する1つまたは複数の標的抗原の結合を検出する段階であって、1つまたは複数の標的抗原に結合した1つまたは複数の抗体が存在すれば、SLEであることが示される段階を含む、個体におけるSLEを診断する方法である。

30

【0061】

さらなる態様において、試験試料に、表IIもしくは表IIIの抗原またはエピトープを含むその断片の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、または22個を接触させる。さらなる態様において、各バイオマーカーに結合する抗体の定量的量が決定される。

【0062】

さらなる態様において、SLEの存在を示すためには、表IIもしくは表IIIまたはエピトープを含むその断片の少なくとも1つ、または2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22個、もしくはそれより多くの抗原の任意の組み合わせに試験試料の抗体が結合しなければならない。

40

【0063】

開示のもう1つの態様は、表IIもしくはIIIまたはエピトープを含むその断片の1つもしくは複数の抗原と、SLEを有することが疑われる個体の試験試料とを含む混合物である。混合物は任意でさらに、1つまたは複数の標的抗原に対する対照抗体を含む。さらなる態様において、混合物は、表IIもしくはIIIの抗原またはエピトープを含むその断片の2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、もしくは22個を含む。試験試料は、個体からの細胞、組織、または体液を含むがこれらに限定されるわ

50

けではない。

【0064】

開示の他の態様において、試験試料、第一の親和性試薬、第二の親和性試薬、第三の親和性試薬、および精製抗原を含む混合物が提供される。いくつかの態様において、親和性試薬の1つまたは複数は抗体である。なお他の態様において、精製抗原は、トランスグルタミナーゼである。

【0065】

開示のいくつかの態様において、試験試料、RANTESに特異的に結合する第一の抗体、RANTESに特異的に結合する第二の抗体、ヒト抗体に特異的に結合する第三の抗体、およびトランスグルタミナーゼである精製抗原を含む混合物が提供される。他の態様において、トランスグルタミナーゼは、モルモット肝トランスグルタミナーゼである。

10

【0066】

本開示は、可能性のある診断マーカーまたは治療標的に関する重要な新規候補物質プールを表す抗体によって選択的に認識されるタンパク質を同定する。

【0067】

診断法

本発明は、SLEと診断された対象の血清中に存在する抗体であるSLEのバイオマーカーを提供する。本発明におけるバイオマーカー抗体は、最も可能性が高いのはその量が増加した結果として、自己免疫疾患を有する個体における反応性の増加を示す抗体である。これらの抗体は、抗原との接触によって検出することができる。

20

【0068】

本発明の方法は、自己免疫疾患を有することが疑われる個体および疾患を有すると診断されている個体を含む患者に由来する試験試料について行われる。本明細書において用いられる「試験試料」は、好ましくは動物、最も好ましくはヒトの細胞もしくは組織の試料、または体液の試料などの任意のタイプの試料でありうる。試料は、スワブもしくはスメアなどの組織試料、または腫瘍組織を含む組織の病理もしくは生検試料でありうる。試料はまた、たとえば組織生検または剖検材料からの組織抽出物でありうる。試料は、血液、血漿、血清、喀痰、精液、滑液、脳脊髄液、尿、肺吸引液、乳頭吸引液、涙液、または洗浄液などの、しかしこれらに限定されない体液試料でありうる。試料はまた、たとえば患者から得られたホモジネート、細胞溶解物、または可溶化組織などの細胞または組織抽出物を含みうる。好ましい試料は血液または血清試料である。

30

【0069】

「血液」とは、全血、血漿、血清、または血液の任意の派生物を含むことを意味する。血液試料はたとえば血清でありうる。

【0070】

「患者」は、疾患を有すると診断される、または疾患の存在に関して試験される個体である。疾患に関して試験される患者は、疾患状態の1つもしくは複数の指標を有しうるか、または疾患状態のいかなる指標も存在しない場合に疾患の存在に関してスクリーニングされうる。本明細書において用いられる、疾患を有することが「疑われる」個体は、疾患状態の1つもしくは複数の指標を有しうるか、または疾患状態のいかなる指標も存在しない場合に疾患に関してルーチンでスクリーニングされる集団の一部でありうる。

40

【0071】

試験試料が採取される個体は、任意の健康な個体、または自己免疫疾患を有することが疑われる個体でありうるが、より詳しくは、個体はSLEに関してスクリーニングされる。

【0072】

「自己免疫疾患を有することが疑われる個体」とは、SLEであると診断されている個体、または自己免疫疾患の少なくとも1つの指標を有する個体、または年齢、環境および/または栄養的要因もしくは遺伝的要因により、自己免疫疾患を発症するリスクが増加している個体を意味する。

【0073】

50

本明細書において用いられる「診断」という表現は、患者が所定の疾患または状態に罹っているか否かを、当業者が推定および/または決定することができる方法を意味する。当業者はしばしば、1つまたは複数の診断指標、すなわちその存在、非存在、もしくは量が、状態の存在、重症度、もしくは非存在を示すマーカー、身体的特徴（組織内または組織上の瘤または硬い領域）、または生検もしくは採取した組織もしくは細胞の組織学的もしくは生化学的分析、またはこれらの組み合わせに基づいて診断を行う。

【0074】

同様に、予後はしばしば、その存在または量が、患者（または患者から得た試料）において所定の経過または転帰が起こる確率を知らせる、1つまたは複数の「予後指標」を調べることによって決定される。たとえば、1つまたは複数の予後指標がそのような患者から得られた試料中で十分に高いレベルに達している場合、そのレベルは、より低いマーカーレベルを示す類似の患者と比較して、患者が疾患または状態を有する確率が増加していることを知らせる可能性がある。予後指標のレベルまたはレベルの変化は、次に有病率または死亡の確率の増加に関連しており、これは患者における「有害転帰に対する素因の増加に関連する」と言われる。たとえば、好ましい予後マーカーは、表IIもしくはIIIの1つもしくは複数の標的抗体を有する患者における自己免疫疾患の発症、または疾患を有すると診断された患者における自己免疫疾患のより進行した段階を予測することができる。

【0075】

本明細書において用いられる「相関する」という用語は、患者における指標の存在または量を、所定の状態に罹っていることがわかっている人、または所定の状態のリスクがあることがわかっている人、または所定の状態を有しないことがわかっている人における指標の存在または量と比較することを意味する。先に考察したように、患者の試料中のマーカーレベルを、自己免疫疾患に関連することがわかっているレベルと比較することができる。試料のマーカーレベルは、診断に相関していると言われる；すなわち、当業者は、マーカーレベルを用いて、患者が自己免疫疾患を有するか否かを決定することができ、それに従って対応することができる。または、試料のマーカーレベルを、良好な転帰（たとえば、自己免疫疾患の非存在等）に関連することがわかっているマーカーレベルと比較することができる。好ましい態様において、マーカーレベルのプロファイルは、ROC曲線を用いて、全体的な確率または特定の転帰と相関する。

【0076】

本明細書において用いられる「予後を決定する」という表現は、それによって当業者が、患者における状態の経過または転帰を予測することができる方法を意味する。「予後」という用語は、100%の精度で状態の経過もしくは転帰を予測することができることを意味するのではなく、または所定の経過もしくは転帰が起こらない場合より起こる可能性が高いことを意味するのでもない。その代わりに、当業者は、「予後」という用語が、ある経過または転帰が起こる確率の増加を意味することを理解するであろう；すなわち、状態を示さない個体と比較して、所定の状態を示す患者において経過または転帰が起こる可能性がより高いことを理解するであろう。たとえば、状態を示さない個体において、所定の転帰の見込みは約3%でありうる。好ましい態様において、予後は、所定の転帰の約5%の見込み、約7%の見込み、約10%の見込み、約12%の見込み、約15%の見込み、約20%の見込み、約25%の見込み、約30%の見込み、約40%の見込み、約50%の見込み、約60%の見込み、約75%の見込み、約90%の見込み、および約95%の見込みである。この文脈における「約」という用語は、±1%を意味する。

【0077】

「異なるように存在する」という表現は、自己免疫疾患を有しない患者（たとえば、健康または健康な患者）から採取した同等の試料と比較して、自己免疫疾患を有する患者から採取した試料中に存在する生体分子（抗体などの）の量に差があることを意味する。一方の試料におけるポリペプチドの量が、他方の試料におけるポリペプチドの量と有意差があれば、生体分子は2つの試料間で異なるように存在する。たとえば、ポリペプチドは、他方の試料に存在する場合より少なくとも約150%、少なくとも約200%、少なくとも約50

10

20

30

40

50

0%、もしくは少なくとも約1000%多いもしくは少ない量（たとえば、濃度、質量、モル量など）で存在する場合、または一方の試料では検出可能である（バックグラウンドまたは陰性対照より有意に大きいシグナルを生じる）が、他方の試料では検出可能でない場合、2つの試料間で異なるように存在する。自己免疫疾患を有しない対象と比較して自己免疫疾患患者から採取した試料中に異なるように存在するいかなる生体分子も、バイオマーカーとして用いることができる。

【0078】

「バイオマーカー」は、生物起源の有機分子、たとえばステロイド、脂肪酸、アミノ酸、ヌクレオチド、糖、ペプチド、ポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、複合糖質または脂質を意味する。

【0079】

疾患の進行または寛解は、異なる時期に採取した個体の試験試料に、抗原またはサイトカイン特異的捕捉抗体のパネルを接触させることによってモニターすることができる。たとえば、第二の試験試料を患者から採取して、第一の試験試料の数日から数週間後に抗原パネルに接触させる。または第二のもしくはその後の試験試料を患者から採取して、1日1回、週に1回、月に1回、年に4回、半年に1回、または年に1回などの定期的な間隔で、抗原のパネルに対して試験することができる。患者の試験試料を異なる時期で試験することによって、抗体（および/またはサイトカイン）の存在、およびそれゆえ疾患の病期を比較することができる。本発明のさらなる態様は、a) 個体の第一の試験試料に、1つまたは複数の標的抗原の第一の組を接触させる段階；b) 1つまたは複数の標的抗原の結合を検出する段階であって、1つまたは複数の標的抗原が結合すれば、第一の試験試料中に1つまたは複数の標的抗体が存在することが検出される段階；c) 個体からの第二の試験試料に、1つまたは複数の標的抗原の第二の組を接触させる段階；d) 1つまたは複数の標的抗原の結合を検出する段階であって、1つまたは複数の標的抗原が結合すれば、第二の試験試料中に1つまたは複数の標的抗体が存在することが検出される段階；およびe) 第一の試験試料からの1つまたは複数の標的抗原に結合した1つまたは複数の抗体の存在を、第二の試験試料からの1つまたは複数の標的抗原に結合した1つまたは複数の抗体と比較する段階を含む、自己免疫疾患を有すると診断された個体の試験試料における1つまたは複数の標的抗体をモニターする方法であって、1つまたは複数の標的抗原の各々が表IIもしくはIIIの抗原またはエピトープを含むその断片を含む方法である。

【0080】

疾患の進行は、表IIおよび表IIIの抗原に結合する抗体の量を定量的に比較することによって、さらにモニターされる。したがって、本発明のもう1つの態様は、第一の試験試料および第二の試験試料における1つまたは複数の抗原に対する1つまたは複数の抗体の量を検出する段階；および第一の試験試料からの1つまたは複数の抗体の量を、第二の試験試料からの1つまたは複数の抗体の量と比較する段階をさらに含む。

【0081】

「感度」は、関心対象のバイオマーカーが検出される疾患を有する個体（自己免疫疾患を有する個体）の百分率（真の陽性者数 / 疾患を有する患者の総数 × 100）として定義される。試験によって疾患を有すると診断された疾患を有しない個体は、「擬陽性」である。

【0082】

「特異性」は、関心対象のバイオマーカーが検出されない、疾患を有しない個体の百分率（真の陰性者数 / 疾患を有しない総数 × 100）として定義される。アッセイによって検出されないが疾患を有する個体は、「擬陰性」である。疾患を有さず、しかもアッセイにおいて試験陰性である対象は「真の陰性」と呼ばれる。

【0083】

マーカーの「診断量」は、自己免疫疾患の診断と一貫する対象の試料中のマーカーの量を意味する。診断量は、絶対量（たとえば、Xナノグラム/ml）または相対量（たとえば、シグナルの相対強度）のいずれかでありうる。

10

20

30

40

50

【0084】

マーカの「試験量」は、試験される試料に存在するマーカの量を意味する。試験量は、絶対量（たとえば、Xナノグラム/ml）、または相対量（たとえば、シグナルの相対強度）のいずれかでありうる。

【0085】

マーカの「対照量」は、マーカの試験量と比較される任意の量または量の範囲でありうる。たとえば、マーカの対照量は、自己免疫疾患患者または健常な患者におけるマーカ量でありうる。対照量は、絶対量（たとえば、Xナノグラム/ml）、または相対量（たとえば、シグナルの相対強度）のいずれかでありうる。

【0086】

検出

いくつかの態様において、1つまたは複数の親和性試薬は、検出可能に標識される。いくつかの態様において、1つまたは複数の親和性試薬は抗体である。

【0087】

「検出する」とは、検出される対象物の存在、非存在、または量を同定することを意味する。

【0088】

「標識」、「検出可能な標識」、または「検出可能な部分」とは、分光的、光化学的、生化学的、免疫化学的、または化学的手段によって検出可能な組成物を意味する。たとえば、有用な標識は、 ^{32}P 、 ^{35}S 、または ^{125}I などの放射標識；蛍光色素；発色団、電子密度の高い試薬；検出可能なシグナルを生成する酵素（たとえば、ELISAにおいて一般的に用いられる酵素）；またはスピン標識を含む。標識または検出可能な部分は、試料中の結合した検出可能な部分の量を定量するために用いることができる、放射活性、色素形成、または蛍光シグナルなどの測定可能なシグナルを有するまたは生成する。

【0089】

したがって、いくつかの態様において、検出可能な標識は蛍光標識である。他の態様において、検出可能な標識は酵素標識である。

【0090】

検出可能な部分は、共有結合、またはイオン結合、ファンデルワールス結合もしくは水素結合を通して、たとえば放射活性ヌクレオチドまたはストレプトアビジンによって認識されるビオチニル化ヌクレオチドを組み入れることを通して、プライマーまたはプローブに組み入れるまたは結合させることができる。標識または検出可能な部分は、直接または間接的に検出可能でありうる。間接的検出は、検出可能な部分に第二の直接または間接的に検出可能な部分を結合させる段階を伴いうる。たとえば、検出可能な部分は、ストレプトアビジンの結合パートナーであるビオチン、またはそれが特異的にハイブリダイズすることができる相補的配列の結合パートナーであるヌクレオチド配列などの結合パートナーのリガンドでありうる。結合パートナーは、それ自身直接検出可能でありえて、たとえば、抗体はそれ自身、蛍光分子によって標識されうる。結合パートナーはまた、間接的に検出可能でありえて、たとえば相補的ヌクレオチド配列を有する核酸は、他の標識核酸分子とのハイブリダイゼーションを通して検出可能となる分岐DNA分子の一部でありうる（P. D. Fahrlander and A. Klausner, *Bio/Technology* 6:1165 (1988)を参照されたい）。シグナルの定量は、たとえばシンチレーション計数、密度測定、またはフローサイトメトリーによって行われる。

【0091】

抗体は時に、たとえば検出可能な標識（たとえば、色素、蛍光体、放射性同位元素、光散乱物質（たとえば、銀、金）、または結合物質（たとえば、ビオチン、ストレプトアビジン）などの機能的分子によって誘導体化される。

【0092】

その文法的形態の全てにおける「測定する」とは、身体の構成要素または化学組成物の量（モル量を含む）、濃度、または質量を、定量の場合には絶対値で、または同等の身体

10

20

30

40

50

の構成要素または化学組成物と比較して相対的に、検出、定量、または定性することを意味する。

【0093】

本開示は、1つの局面において、個体の試験試料において1つまたは複数の標的抗体を検出する方法を提供する。方法は、各々が表IIもしくはIIIの抗原または標的抗体によって認識されるエピトープを含むその断片を含む、本発明の1つまたは複数の標的抗原を個体の試験試料に接触させる段階、および1つまたは複数の標的抗原に対する試料中の1つまたは複数の抗体の結合を検出して、それによって、試料中の1つまたは複数の標的抗体の存在を検出する段階を含む。標的抗原は、表IIもしくはIIIに提供される標的抗原またはエピトープを含むその断片のいずれかでありうる。さらに、標的抗原は、たとえば、表IIまたはIIIの2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20個、または全ての標的抗原を含む標的抗原のパネルでありうる。方法は、実質的に任意のイムノアッセイ法を用いて行うことができる。イムノアッセイ法の非制限的な例を以下に提供する。

10

【0094】

結合は典型的に、以下に詳細に記述されるように様々なフォーマットでありうるイムノアッセイを用いて検出される。ある例示的な態様において結合の検出は、個体、典型的にヒト対象の試料が適用される基質上に試験抗原が固定されている1つまたは複数の固相支持体を利用する。試料を固定された抗原と共にインキュベートした後、または任意で、試料のインキュベーションと同時に、ヒト抗体に対して反応性である抗体（たとえば、ヒト以外の種、たとえばヤギ、ウサギ、ブタ、マウス等からの抗ヒトIgG抗体）を、試料がインキュベートされる固相支持体に適用することができる。非ヒト抗体は、直接または間接的に標識される。非特異的に結合した抗体を除去した後、標識からのシグナルがバックグラウンドレベルより有意に上であれば、固相支持体上の試験抗原に試料からのヒト抗体が結合したことを示している。

20

【0095】

本明細書において提供される方法において、試料は、細胞もしくは組織、または体液の任意の試料でありうる。スクリーニングされる抗体は血液中を循環して、血液試料においてかなり安定であることから、ある例示的な態様において、試験試料は、血液、またはたとえば血清などのその分画である。試料は、試験抗原に接触させる前、無処理でありうるか、または1つもしくは複数の処理段階を受けた試料でありうる。たとえば、血液試料を処理して、赤血球を除去して血清を得ることができる。

30

【0096】

試験試料を、溶液相で提供される試験抗原に接触させることができ、または試験抗原を、固相支持体に結合させて提供することができる。好ましい態様において、検出は、以下により詳細に記述されるようにイムノアッセイによって行われる。試験抗原に対する標的試料の結合が検出されれば、試料中の試験抗原に特異的に結合する自己抗体が存在することを示している。個体の試料中に存在する自己抗体の同定を用いて、疾患もしくは状態のバイオマーカーを同定する、または疾患もしくは状態を診断することができる。

40

【0097】

検出は、ビーズ、ディッシュ、プレート、ウェル、シート、メンブレン、スライド、チップ、または、マイクロアレイおよび任意で高密度マイクロアレイでありうるタンパク質アレイなどのアレイなどの、任意の固相支持体において行うことができる。

【0098】

検出法は、陽性/陰性結合結果を提供しうるか、または試料中の自己抗体バイオマーカーレベルに関して相対値もしくは絶対値でありうる値を生じうる。結果は、診断、予後を提供しうるか、または診断もしくは予後が得られうるもしくは得られないさらなる試験もしくは評価を行うための指標として用いられうる。

【0099】

方法は、抗体を検出するために用いられる試験抗原の1つまたは複数、または表IIまたはIIIの

50

試験抗原である、個体の試料において1つより多くの自己抗体を検出する段階を含む。

【0100】

いくつかの態様において、検出は、マイクロアレイでありうる、および任意で少なくとも100個/cm²、または1000個/cm²、または400個/cm²より高い密度でタンパク質を含むマイクロアレイでありうるタンパク質アレイにおいて行われる。

【0101】

検出法は、陽性/陰性結合結果を提供しうるか、または試料中の自己抗体バイオマーカーレベルの相対値もしくは絶対値でありうる値を生じうる。

【0102】

方法は、たとえば疾患前の状態をモニターするために、疾患の進行をモニターするために、または処置治療法をモニターするために、経時的に繰り返すことができる。試験抗原に対する患者の試料の免疫反応性を決定する診断試験の結果を、より早期に行った同じ診断試験の結果と比較することができる。経時的に見て免疫反応性に有意な差があれば、自己免疫疾患の診断または予後に寄与しうる。

10

【0103】

ある態様において、バイオマーカー検出パネルは、対象における正常な状態と疾患状態とを識別するために、0.550もしくはそれより上、0.600もしくはそれより上、0.650もしくはそれより上、0.700もしくはそれより上、0.750もしくはそれより上、0.800もしくはそれより上、0.850もしくはそれより上、または0.900もしくはそれより上のROC/AUCを有する。

20

【0104】

バイオマーカー検出パネルに存在する標的抗原は、標的抗原（たとえば、表IIまたはIIIに記載される標的抗原）と呼ばれるタンパク質などのタンパク質の完全な成熟型でありうるか、またはタンパク質の修飾型、プロセシング型、もしくは変種が、個体の試料中に存在する抗原に対する結合能を有する限り、前駆体、プロセシング型、非プロセシング型、イソ型、変種、エピトープを含むその断片、もしくはその対立遺伝子変種でありうる。

【0105】

いくつかの態様において、自己免疫疾患を検出するために用いられるバイオマーカー検出パネルは、表1の1つまたは複数の標的抗原を含む。いくつかの態様において、自己免疫疾患を検出するために用いられるバイオマーカー検出パネルは、表IIまたはIIIの2つまたはそれより多くの標的抗原を含む。いくつかの態様において、自己免疫疾患を検出するために用いられるバイオマーカー検出パネルは、表IIまたはIIIの3つまたはそれより多くの標的抗原を含む。いくつかの態様において、自己免疫疾患を検出するために用いられるバイオマーカー検出パネルは、表IIまたはIIIの4つまたはそれより多くの標的抗原を含む。いくつかの態様において、試験試料を、表IIまたはIIIの5つまたはそれより多くの標的抗原を含むバイオマーカー検出パネルに接触させる。いくつかの態様において、本開示の方法において用いられるバイオマーカー検出パネルは、表IIまたはIIIの6、7、8、9、10、11、または12個の標的抗原を含む。いくつかの態様において、本開示の方法において用いられるバイオマーカー検出パネルは、表IIまたはIIIの12、13、14、15個またはそれより多くの標的抗原を含む。

30

40

【0106】

イムノアッセイ

「イムノアッセイ」は、抗体が抗原に特異的に結合して、抗体または抗原の検出および/または定量を提供するアッセイである。イムノアッセイは、抗原を単離する、標的とする、および/または定量するために特定の抗体の特異的結合特性を用いることを特徴とする。

【0107】

いくつかの態様において、第一の2つの親和性試薬がRANTESに特異的に結合して、第三の親和性試薬がヒト抗体に特異的に結合する、3つの親和性試薬および精製抗原を試験試料に接触させる段階；3つの親和性試薬の結合の有無を検出して、それによって結合レベ

50

ルを決定する段階；結合レベルを対照の結合レベルと比較する段階であって、対照の結合レベルが全身性エリテマトーデス（SLE）を有しない対象の試験試料を含む対照試料に由来し、結合レベルと対照の結合レベルのあいだの差がSLEの診断指標である段階、を含む方法が提供される。

【0108】

他の態様において、抗体である3つの親和性試薬および精製抗原を試験試料に接触させる段階を含む方法が提供される。いくつかの態様において、方法はさらに、試験試料を提供する段階を含む。他の態様において、試験試料は対象からの試料である。

【0109】

なおさらなる態様において、免疫抑制処置または治療を与える方法が提供される。

10

【0110】

いくつかの態様において、方法はイムノアッセイを含む。なおさらなる態様において、イムノアッセイは少なくともサンドイッチアッセイを含む。他の態様において、イムノアッセイはprotoplex免疫応答アッセイである。

【0111】

「結合レベル」は、特定の親和性試薬/リガンド相互作用または多数の親和性試薬/リガンド相互作用に関して検出可能な結合事象の合成または総和である。結合レベルは、本質的に定性的または定量的でありうる。

【0112】

当技術分野において公知の実質的にいかなるイムノアッセイ技術も、本発明の方法およびキットに従って抗原に結合する抗体を検出するために用いることができる。そのようなイムノアッセイ法は、ラジオイムノアッセイ、免疫組織化学アッセイ、競合的結合アッセイ、ウェスタンブロット分析、ELISAアッセイ、サンドイッチアッセイ、二次元ゲル電気泳動（2D電気泳動）、および質量分析またはタンパク質相互作用プロファイリングなどの非ゲルアプローチを含むがこれらに限定されるわけではなく、それらは全て当業者に公知である。これらの方法は、当技術分野において公知であるように、自動で行われうる。そのようなイムノアッセイ法は、標的抗原に対する試料中の抗体の結合を検出するために用いられうる。

20

【0113】

ELISA法の1つの例において、方法は、試料を標的タンパク質と共にインキュベートする段階、および標的タンパク質と会合して反応産物を形成する試料からの抗体に結合することによって反応産物に結合する、第二抗体などの結合パートナーによって形成される反応産物をインキュベートする段階を含む。いくつかの場合において、これらは2つの個別の段階を含みうる、言い換えれば2つの段階は同時でありうるか、または同じインキュベーション段階で行われうる。抗体に対する標的タンパク質の結合の検出法の例は、抗ヒトIgG（または他の）抗体またはプロテインAを用いることである。この検出抗体を、たとえば西洋ワサビペルオキシダーゼなどのペルオキシダーゼに連結してもよい。

30

【0114】

イムノアッセイに関してタンパク質アレイを用いることにより、多数のタンパク質を同時に分析することが可能となる。たとえば、試料中に存在しうるバイオマーカーを認識する標的抗原または抗体を、マイクロアレイ上に固定する。次に、特異的抗原抗体相互作用に都合のよい条件で試料をマイクロアレイと共にインキュベートすることによって、バイオマーカー抗体またはタンパク質が、試料中に存在すれば、アレイ上の同種のスポット上に捕捉される。試料中のタンパク質または抗体の結合を、二次抗体または他の結合する標識、タンパク質、もしくは被検体を用いて決定することができる。当技術分野において公知の任意の手段を用いて、2つまたはそれより多くの異なる試料中に見いだされるタンパク質または抗体の比較を行うことができる。たとえば、第一の試料を1つのアレイにおいて分析して、第二の試料を第一のアレイの複製物である第二のアレイにおいて分析することができる。

40

【0115】

50

「サンドイッチアッセイ」という用語は、抗原が、典型的に抗体である2つの結合試薬の間に挟まれるイムノアッセイを意味する。第一の結合試薬/抗体を、表面に結合させて、第二の結合試薬/抗体は、検出可能な部分または標識を含む。検出可能な部分の例には、たとえば蛍光体、酵素、第二の結合試薬に結合するエピトープ（たとえば、第二の結合試薬/抗体が、蛍光標識抗マウス抗体によって検出されるマウス抗体である場合）、たとえば抗原またはビオチンなどの結合対のメンバーが挙げられるがこれらに限定されるわけではない。表面は、本明細書において記述される典型的な格子型アレイ（たとえば、96ウェルプレートおよび平面のマイクロアレイ、しかしこれらに限定されるわけではない）の場合などの平面の表面、またはビーズの各々の「種」がたとえば蛍光体によって標識されるコーティングビーズアレイ技術（本明細書において、ならびに米国特許第6,599,331号、第6,592,822号、および第6,268,222号に記述されるLuminex技術などの）、もしくは量子ドット技術（たとえば、米国特許第6,306,610号に記述される）と同様の非平面表面でありうる。

10

【0116】

多様な異なる固相基質を用いて、試料中のタンパク質もしくは抗体を検出する、または試料中のタンパク質もしくは抗体の濃度を定量もしくは決定することができる。基質の選択は、簡便さ、費用、熟練、または他の検討に基づいて当業者が容易に行うことができる。有用な基質は、ビーズ、ボトル、表面、基質、繊維、ワイヤ、枠組み構造、チューブ、フィラメント、プレート、シート、およびウェルを含むがこれらに限定されるわけではない。これらの基質は、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリカーボネート、ガラス、プラスチック、金属、合金、セルロース、セルロース誘導体、ナイロン、コーティング表面、アクリルアミドまたはその誘導体およびそのポリマー、アガロース、もしくはラテックス、またはその組み合わせから作製されうる。この一覧は、網羅的ではなくて例示的である。

20

【0117】

当技術分野において記述されるタンパク質を検出および測定する他の方法もまた、用いることができる。たとえば、1つの抗体をビーズまたはマイクロウェルプレートのウェルにカップリングさせて、イムノアッセイによって定量することができる。このアッセイフォーマットでは、各アッセイにおいて検出することができるのは1つのタンパク質である。アッセイを、多くの被検体に対する抗体によって繰り返して、本発明の方法を用いて得ることができる結果と本質的に同じ結果を得ることができる。ビーズアッセイは、その各々が何らかの手法で独自に標識される多数のビーズを使用することによって、多重にすることができる。たとえば、各タイプのビーズは、予め選択された量の蛍光体を含むことができる。ビーズのタイプは、ビーズによって放射される蛍光の量（および/または波長）を決定することによって識別することができる。そのような蛍光標識ビーズは、Luminex Corporation (Austin, Tex.; luminexcorp.comのワールドワイドウェブのアドレスを参照されたい) から販売されている。Luminexアッセイは、典型的なサンドイッチELISAアッセイと非常に類似しているが、抗体またはタンパク質にコンジュゲートしたLuminexマイクロスフェアを利用する (Vignali, J. Immunol. Methods 243:243-255 (2000))。

30

【0118】

様々な抗体アッセイの方法論および段階は、当業者に公知である。追加の情報は、たとえば、Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chap. 14 (1988); Bolton and Hunter, "Radioimmunoassay and Related Methods," in Handbook of Experimental Immunology (D. M. Weir, ed.), Blackwell Scientific Publications, 1996; and Current Protocols in Immunology, (John E. Coligan, et al, eds) (1993)において見いだされうる。

40

【0119】

本明細書において用いられる「免疫反応性」は、1つまたは複数の標的抗原に対する試料中の抗体または複数の抗体の結合の存在またはレベルを意味する。「免疫反応性のパターン」は、複数の標的抗原に対する試料中の抗体の結合のプロファイルを意味する。

50

【0120】

ある態様において、1つまたは複数の自己抗体バイオマーカーなどの1つまたは複数の診断（または予後）バイオマーカーは、そのバイオマーカーの存在または非存在によって状態または疾患と相関する。他の態様において、診断または予後バイオマーカーの閾値レベルを確立することができ、試料中のバイオマーカーレベルを単純に閾値レベルと比較することができる。

【0121】

任意の特定のバイオマーカーに関して理解されるように、疾患を有するおよび有しない対象に関するバイオマーカーレベルの分布はおそらく重なり合うであろう。そのような条件下で、試験は、100%の精度で疾患と正常とを絶対的に識別するわけではなく、重なり合う領域は、試験が正常と疾患とを識別できない場合を示している。閾値を選択して、それより上（またはバイオマーカーが疾患と共にどのように変化するかによっては、それより下）であれば、試験は異常であると見なされ、およびそれより下であれば試験は正常であると見なされる。受信者動作特性曲線または「ROC」曲線は典型的に、「正常」および「疾患」集団におけるその相対度数に対して変数の値をプロットすることによって作成される。ROC曲線下面積は、認められた測定によって状態の正確な同定が得られる確率の測定である。ROC曲線はまた、相対的結果または順位結果を用いても作成することができる。ROC曲線を作成する方法およびその使用は、当技術分野において周知である。たとえば、Hanley et al, Radiology 143: 29-36 (1982)を参照されたい。

【0122】

1つまたは複数の試験抗原は、単独で検討する場合には比較的低い診断または予後値を有しうるが、バイオマーカー検出のための他の試薬（他の試験抗原などの、しかしこれらに限定されるわけではない）を含むパネルの一部として用いる場合には、そのような試験抗原は特定の診断または予後の判定に寄与することができる。好ましい態様において、対象から得られたマーカーレベルのプロファイルが特定の診断または予後を示すか否かを決定する場合、バイオマーカー検出パネルにおける1つまたは複数の試験抗原に関する特定の閾値には依存しない。むしろ、本発明は、たとえば特定のバイオマーカー検出パネルの感度に関するROC曲線をプロットすることによって、バイオマーカー検出パネルのマーカープロファイル全体の評価を利用しうる。これらの方法において、個体の試料からのバイオマーカー測定のプロファイルは、個体がたとえば自己免疫疾患を有する総確率（数値スコアとしてまたは百分率リスクのいずれかとして表記される）を提供する場合に、共に検討される。そのような態様において、1人の患者における特定の診断（または予後）を示すためには、バイオマーカーのあるサブセット（1つまたは複数の抗体を含むバイオマーカーのサブセットなどの）の増加で十分でありえて、別の患者における同じまたは異なる診断（または予後）を示すためには、異なるサブセットのバイオマーカー（1つまたは複数の抗体を含むバイオマーカーのサブセットなど）の増加で十分でありうる。重み付け係数もまた、検出される1つまたは複数のバイオマーカーに適用されうる。一例として、バイオマーカーが、特定の診断または予後を同定するために特に高度の有用性を有する場合、所定のレベルで、陽性の診断を示すためにそれが単独で十分であるように重み付けされうる。もう1つの例において、重み付け係数によって、特定のマーカーの所定のレベルが陽性結果を伝えるためには十分ではないが、もう1つのマーカーも同様に分析に寄与する場合に限って結果を伝えることが提供されうる。

【0123】

好ましい態様において、マーカーおよび/またはマーカーパネルは、少なくとも70%の特異性、より好ましくは少なくとも80%の特異性、さらにより好ましくは少なくとも85%の特異性、なおより好ましくは少なくとも90%の特異性、および最も好ましくは少なくとも95%の特異性と共に、少なくとも70%の感度、より好ましくは少なくとも80%の感度、さらにより好ましくは少なくとも85%の感度、なおより好ましくは少なくとも90%の感度、および最も好ましくは少なくとも95%の感度を示すように選択される。特に好ましい態様において、感度および特異性はいずれも、少なくとも75%、より好ましくは少なくとも

80%、さらにより好ましくは少なくとも85%、さらにより好ましくは少なくとも90%、および最も好ましくは少なくとも95%である。

【0124】

表IIまたはIIIに提供される試験抗原の様々なサブセットを用いて、本開示は、個体の試料中の抗体を検出するための試験抗体、個体における自己免疫疾患を検出するための抗体、ならびに高い感度および特異性でSLEを検出および/または診断するために用いることができる表1の試験抗原の組み合わせを含むバイオマーカー検出パネルを提供する。したがって、個体におけるSLEの検出、診断、病期分類、およびモニタリングのための方法、組成物、およびキットが本明細書において提供される。

【0125】

本明細書において記述される方法において利用されるシステムなどのイムノアッセイを行うための自動システムは、広く知られており、医学的診断において用いられている。たとえば、当技術分野において公知であるように、ランダムモードまたはバッチアナライザイムノアッセイシステムを用いることができる。これらは、磁性粒子もしくは非磁性の粒子もしくは微粒子を利用することができ、またはたとえば、蛍光もしくは化学発光読み出し情報を利用することができる。非制限的な例として、自動システムは、自動マイクロアレイハイブリダイゼーションステーション、自動液体取扱ロボット、Beckman ACCESS常磁性粒子、化学発光イムノアッセイ、Bayer ACS: 180化学発光イムノアッセイまたはAbbott AxSYM微粒子酵素イムノアッセイでありうる。そのような自動システムは、ユーザーが何度も介入することなく、個々の抗原または多数の抗原に関して本明細書において提供される方法を行うように設計することができる。

【0126】

バイオマーカー検出パネル

本発明はまた、試験パネルのタンパク質の少なくとも50%が表IIまたはIIIのタンパク質である、表IIまたはIIIから選択される2つまたはそれより多くの標的抗原をバイオマーカー検出パネルが含む、SLEを診断、予後を判定、モニターまたは病期分類するためのバイオマーカー検出パネルを提供する。いくつかの好ましい態様において、バイオマーカー検出パネルのタンパク質は、パネルのタンパク質が結合する1つまたは複数の固相支持体上のタンパク質の少なくとも50%が表IIまたはIIIのタンパク質である、1つまたは複数の固相支持体上で提供される。バイオマーカー検出パネルのタンパク質は、ビーズ、マトリクス、ディッシュ、ウェル、プレート、スライド、シート、メンブレン、フィルター、繊維、チップ、またはアレイの形状で固相支持体に結合して提供されうる。いくつかの好ましい態様において、バイオマーカー検出パネルのタンパク質は、アレイ上のタンパク質の50%またはそれより多くがバイオマーカー検出パネルの標的抗原であるタンパク質アレイ上で提供される。

【0127】

バイオマーカー検出パネルにおけるバイオマーカーの組は、電子的または好ましくは物理的に会合している。たとえば、バイオマーカー検出パネルの各々のバイオマーカーは、共に販売および/または輸送される個別のチューブに入れて単離型で、たとえばキットの一部として提供されうる。ある態様において、単離バイオマーカーは、同じ固相支持体にそれらを結合させることによって検出パネルへと形成される。バイオマーカーパネルのバイオマーカーはまた、同じ溶液中で共に混合されうる。

【0128】

本発明はまた、バイオマーカー検出パネルが、表IIまたはIIIから選択される2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれより多くの標的抗原を含む、自己免疫疾患を診断、予後判定、モニター、または病期分類するためのバイオマーカー検出パネルを提供する。

【0129】

いくつかの態様において、本開示の方法において用いられるバイオマーカー検出パネルは、表IIまたはIIIの6、7、8、9、10、11、または12、13、14、15個、またはそれより多くの標的抗原を含む。いくつかの態様において、表IIまたはIIIの6、7、8、9、10、11、

10

20

30

40

50

または12、13、14、15個またはそれより多くの標的抗原を含むバイオマーカー検出パネルを、試験試料に接触させる。

【0130】

タンパク質抗原を合成する方法

本明細書において提供される方法、キット、およびシステムは、典型的にタンパク質抗原である自己抗原を含む。本明細書において提供される方法において用いられるタンパク質抗原を得るために、ハイスループット分析を行うことができる容易に規模拡大可能なフォーマットで、ウイルス、原核細胞または真核細胞のタンパク質を作製および単離するための公知の方法を用いることができる。たとえば、方法は、自動技術と互換性があるアレイフォーマットでタンパク質を合成および精製する段階を含む。それゆえ、1つの態様において、本発明のタンパク質マイクロアレイは、調節配列に機能的に連結された異種配列を有するベクターによって形質転換された真核細胞を生育させる段階、異種配列によってコードされるタンパク質の発現を増強する誘導物質を調節配列に接触させる段階、細胞を溶解する段階、タンパク質と結合物質のあいだに複合体が形成されるようにタンパク質に結合物質を接触させる段階、細胞破片から複合体を単離する段階、および複合体からタンパク質を単離する段階を含む、真核細胞タンパク質を作製および単離する方法であって、各段階が96ウェルフォーマットで行われる方法によって作製される。

10

【0131】

特定の態様において、真核細胞タンパク質は、96アレイフォーマット（すなわち、プロセシングが起こる固相支持体上の各部位は、96個の部位の1つである）、たとえば96ウェルマイクロタイタープレートで作製および精製される。もう1つの態様において、固相支持体は、タンパク質に結合しない（たとえば非タンパク質結合マイクロタイタープレート）。

20

【0132】

ある態様において、タンパク質は、当技術分野において一般的に公知の方法に従ってインビトロ翻訳によって合成される。たとえば、コムギ胚芽、ウサギ網赤血球、またはExpresswayなどの細菌抽出物を用いて、タンパク質を発現させることができる。

【0133】

タンパク質合成を促進するための誘導型プロモーターを有する任意の発現構築物を、本発明の方法に従って用いることができる。発現構築物は、たとえば形質転換のために用いられる細胞タイプに合わせて作製される。発現構築物と宿主細胞との適合性は当技術分野において公知であり、その変種の使用もまた本発明に含まれる。

30

【0134】

特定の態様において、融合タンパク質はGSTタグを有し、タンパク質にグルタチオンビーズを接触させることによってアフィニティ精製される。さらなる態様において、融合タンパク質が結合するグルタチオンビーズは、試料の取扱を容易にするためおよび試料の交叉汚染を防止するために、フィルタープレートを用いることなく、96ウェルボックスにおいて洗浄することができる。

【0135】

加えて、融合タンパク質を、溶出緩衝液によって結合化合物（たとえば、グルタチオンビーズ）から溶出させて、所望のタンパク質濃度を提供することができる。特異的態様において、融合タンパク質を、溶出緩衝液30 μ lによってグルタチオンビーズから溶出させて、所望のタンパク質濃度を提供する。

40

【0136】

最終的に、精製タンパク質を顕微鏡スライドガラス上にスポットするために、グルタチオンビーズを精製タンパク質から分離する。1つの例において、固相支持体に精製タンパク質をスポットするために用いられるマイクロアレイピンのブロッキングを回避するために、グルタチオンビーズを全て除去する。1つの態様において、グルタチオンビーズは、たとえば非タンパク質結合固相支持体を含むフィルタープレートを用いて精製タンパク質から分離される。精製タンパク質を含む溶出液の濾過によって、タンパク質の90%より高

50

い回収が得られるはずである。

【0137】

溶出緩衝液は、たとえば、15%から50%グリセロール、たとえば約25%グリセロールなどの高粘度液体をたとえば含む。グリセロール溶液は、溶液中のタンパク質を安定化させて、マイクロアレイを用いたプリント段階の際のタンパク質溶液の脱水を防止する。

【0138】

精製タンパク質は、たとえばタンパク質を安定化させて試料の乾燥を防止する培地中で保存される。たとえば、精製タンパク質を、たとえば15%から50%グリセロール、たとえば約25%グリセロールなどの高粘度液体中で保存することができる。1つの例において、凍結/融解サイクルによって生じるタンパク質活性の喪失を回避するために、精製タンパク質を含む試料をアリコートにしてもよい。

10

【0139】

当業者は、所望のタンパク質の純度レベルを制御するために、精製プロトコルを調節することができる。いくつかの例において、関心対象タンパク質と会合する分子の単離が望ましい。たとえば、関心対象の過剰産生されたタンパク質を含む二量体、三量体、またはそれより高次のホモタイプまたはヘテロタイプ複合体を、本明細書において提供される精製法またはその改変版を用いて単離することができる。さらに、会合した分子を、当技術分野において公知の方法（たとえば、質量分析）を用いて個々に単離および同定することができる。

20

【0140】

産生されたタンパク質抗原を、「位置特定可能な」アレイの一部として、本明細書において提供されるバイオマーカーパネル、方法およびキットにおいて用いることができる。アレイは、各々の標的抗原が固相支持体上の異なる位置に存在する複数の標的抗原を含む。アレイは、たとえば、1、2、3、4、5、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、40、50、100、200、300、400、または500個の異なるタンパク質を含む。アレイは、表IIまたはIIIの1、2、3、4、5、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20個またはそれより多くの標的抗原を含む。1つの局面において、アレイ上のタンパク質の大部分は、自己抗原バイオマーカー検出パネルと共に提供される場合、特定の疾患または医学的状態に関する診断値を有することができる自己抗原として同定されるタンパク質を含む。

30

【0141】

1つの局面において、タンパク質アレイは、ビーズに基づくアレイである。もう1つの局面において、タンパク質アレイは平面アレイである。コンタクトプリンティングなどによるタンパク質アレイを作製する方法は周知である。いくつかの態様において、検出は、マイクロアレイでありうるタンパク質アレイにおいて、および任意で少なくとも100個/cm²、または1000個/cm²、または400個/cm²より高い濃度でタンパク質を含むマイクロアレイでありうるタンパク質アレイにおいて行われる。

【0142】

キット

40

本発明のある態様において、キットが提供される。このように、いくつかの態様において、表IIまたはIIIに提供される試験抗原タンパク質の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15個またはそれより多くを含むキットが提供される。本発明のキットは、表IIまたはIIIの2つまたはそれより多くの試験抗原を含むバイオマーカーパネルを含むがこれらに限定されるわけではない、本明細書において開示される任意のバイオマーカー検出パネルを含む。

【0143】

1つの態様において、SLEを診断するためのキットは、表IIもしくはIIIの抗原またはエピトープを含むその断片の1つまたは複数、2個またはそれより多くの、10個またはそれより多くの、または全ての抗原、および試験試料中の1つまたは複数の分子が抗原の1つまた

50

は複数に結合するか否かを検出するための手段を含む。さらなる態様において、キットはさらに、抗原の1つまたは複数に対する対照抗体を含む。

【0144】

さらなる態様において、キットは、表IIもしくはIIIを含む群から選択される抗原またはエピトープを含むその断片の1つまたは複数、2個またはそれより多く、10個またはそれより多く、または全てを含む。

【0145】

キットは、1つまたは複数の陽性対照、1つまたは複数の陰性対照、および/または1つまたは複数の標準化対照を含みうる。

【0146】

キットのタンパク質は、たとえば固相支持体または表面上に固定されうる。タンパク質は、たとえばアレイに固定されうる。タンパク質マイクロアレイは、Luminex技術(Luminex Corp., Austin, Tex.)などのビーズ技術を用いてもよい。試験タンパク質アレイは、タンパク質少なくとも100個/cm²を含む高密度タンパク質マイクロアレイであってもよく、またはなくてもよい。キットは、アレイ上に固定された本明細書において記述されるタンパク質のバイオマーカー検出パネルを提供することができる。アレイ上に固定されたタンパク質の少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%が、バイオマーカー試験パネルのタンパク質でありうる。アレイは、アレイ上に固定された1つまたは複数の陽性対照タンパク質、1つまたは複数の陰性対照、および/または1つまたは複数の標準化対照を含みうる。

【0147】

キットはさらに、検出可能な標識に連結されたヒト抗体に結合する抗体などのタンパク質に対するヒト抗体の結合を検出するためのレポーター試薬を含みうる。キットはさらに、ELISAまたは当業者に公知の他のイムノアッセイ技術などの様々な免疫反応性アッセイにとって有用な試薬を含みうる。キット試薬を用いることができるアッセイは、競合アッセイ、サンドイッチアッセイでありえて、標識は、ラジオイムノアッセイ、蛍光または化学発光イムノアッセイのために用いられる周知の標識の群から選択されうる。

【0148】

キットは、任意の組み合わせで本明細書において記述される試薬を含みうる。たとえば、1つの局面において、キットは、固相支持体上に固定された本明細書において提供されるバイオマーカー検出パネル、および溶液中で検出するための抗ヒト抗体を含む。検出抗体は標識を含みうる。

【0149】

キットはまた、本明細書において提供される方法を実践するためにキットを用いて行われる方法の結果を分析するためにコンピューター読み取り可能な型のプログラムを含みうる。

【0150】

本発明のキットはまた、任意の数の異なる容器、パッケージ、チューブ、バイアル、マイクロタイプレートおよびその他において1つもしくは複数の成分を含みうるか、または成分は、そのような容器において様々な組み合わせで混合されうる。

【0151】

本発明のキットはまた、本明細書において記述される1つまたは複数の方法を行うための使用説明書、および/または本明細書において記述される1つまたは複数の組成物または試薬の説明書を含みうる。使用説明書および/または説明書は、印刷された書面であってもよく、キットの添付文書に含めてもよい。キットはまた、そのような使用説明書または説明書を提供するインターネット上のロケーションの書面での説明書を含みうる。

【実施例】

【0152】

実施例I：タンパク質マイクロアレイを用いたSLE患者の血清中の自己抗体の検出

10

20

30

40

50

SLE患者の血清試料33例および陰性対照血清試料41例について、新規自己抗体応答を同定するための試験を行った。これらの試料を、Invitrogen、PROTOARRAY（登録商標）ヒトタンパク質マイクロアレイv5.0において、製造元のプロトコールに従ってスクリーニングした。簡単に説明すると、マイクロアレイスライドガラスを最初に、ブロッキング緩衝液（Invitrogen PrtotoArray（登録商標）キット）によって4で1時間、軽く攪拌しながら処置した。ブロック後、アレイを取り出して、新しく調製したPBST緩衝液（1×PBS、0.1% Tween-20および1% BSA）中で希釈した各試料の1：10倍希釈液によって4で2時間ブロッキングした。次に、アレイをPBST緩衝液によって5回洗浄した。最終濃度1µg/mlに希釈したAlexaFluor 647コンジュゲートヤギ抗ヒトIgG抗体を、各アレイに適用して、4で90分間軽く振とうさせながらインキュベートした。このインキュベーション後、PBST緩衝液による洗浄によって過剰量の抗体を除去して、アレイをAxon GenePix 400B蛍光マイクロアレイスキャナを用いてスキャンした。Prospector Imager and Analyzer（Invitrogen）を用いて結果を分析した。陰性対照アッセイを、以下に記述されるように試料と同時にを行った。各タンパク質は、アレイ上で2回出現することから、アレイからの1試料あたり2個ずつの平均値をデータ分析のために用いる。

10

20

30

【0153】

陰性対照アッセイにおいて、AlexaFluor（登録商標）647-コンジュゲートヤギ抗ヒトIgG抗体とインキュベートする前に、血清を含まない緩衝液中でインキュベートしたことを除き、タンパク質マイクロアレイを、実験アッセイと同一の手法で処置した。各ProtoArrayマイクロアレイは、データ獲得および分析のための基準点を提供するために用いられる対照タンパク質（AlexaFluor（登録商標）コンジュゲート抗体、ヒトIgG等）を含む。AlexaFluor（登録商標）コンジュゲート抗体により、データ獲得のためにスポット発見ソフトウェアが適切に整列することができる。各サブアレイは、ヒトIgGの勾配を含み、これは検出試薬が適切に作用するための対照として役立つ。加えて、抗ヒトIgG抗体はあらゆるサブアレイにおいて勾配としてスポットされる。抗体は、唾液試料中に存在するIgGに結合して、アッセイが適切に作用するための陽性対照として役立つ。

【0154】

疾患特異的試料中の陽性免疫応答を、PROTOARRAY（登録商標）ProspectorソフトウェアにおけるM統計関数を用いて同定した。ソフトウェアは、バックグラウンド補正、標準化、および有意性に関する統計学的計算を含む、分析の全ての局面を実行する。

【0155】

この初回スクリーニングにより、健康な対照試料（表1を参照されたい）と比較してSLE試料中で上昇した57個の候補バイオマーカー（表1を参照されたい）に対する自己抗体が同定された。

【0156】

（表I）

57個の候補SLEバイオマーカー			
B01R04C07~BC005332.1	B33R02C19~NM_006223.1	B14R13C09~NM_005371.2	10
B01R14C07~NM_032359.1	B33R12C07~BC026104.2	B15R06C17~BC063275.1	
B01R15C17~PV4215	B34R04C13~BC038953.1	B15R09C05~NM_031303.1	
B01R16C07~NM_005801.2	B34R07C09~NM_017629.2	B17R04C03~BC004967.1	
B01R17C01~NM_012280.1	B34R09C01~NM_018439.1	B21R05C01~NM_004645.1	
B01R20C07~BC005914.1	B34R19C07~BC032749.1	B21R19C09~NM_001821.2	
B02R20C13~NM_006521.3	B36R16C11~BC024209.1	B22R08C17~NM_004728.2	
B05R05C01~NM_002391.1	B38R02C13~BC057237.1	B24R18C21~NM_005526.1	
B05R12C01~NM_145212.1	B38R02C17~BC035973.1	B25R18C19~BC066958.1	
B05R12C21~BC002940.1	B38R17C15~BC017305.1	B26R15C17~PV3817	
B06R08C17~BC017258.2	B40R02C13~BC023569.1	B27R08C09~NM_001008572.1	20
B09R02C21~BC041009.2	B40R14C05~NM_033256.1	B28R08C15~NM_004058.2	
B09R12C07~BC016842.1	B41R17C15~BC001494.1	B28R12C17~NM_198081.1	
B09R15C13~Ro/SS-A抗原	B43R15C11~NM_000854.2	B29R04C01~BC015416.1	
B09R17C03~BC012566.1	B44R06C09~BC026039.1	B29R16C15~NM_002904.4	
B10R04C15~NM_004526.2	B44R13C17~NM_152576.1	B32R02C17~NM_007194.2	
B10R08C07~NM_052969.1	B46R15C13~RNP_COMPL EX	B32R17C19~NM_001003712.1	
B11R05C11~BC007957.1	B46R15C21~PV3822		
B11R17C03~BC021983.1	B47R15C05~NM_022777.1		
B13R09C05~XM_378988.2	B47R20C05~BC043391.1		

【 0 1 5 7 】

実施例II：自己抗体バイオマーカーのバリデーション

ProtoPlex (商標) 免疫応答アッセイを、SLE試料中で同定された、表IIおよびIIIにおいて見いだされる抗原に対する抗体のバリデーションのための直交プラットフォームとして用いた (図1を参照されたい)。GST融合タンパク質を、昆虫細胞において発現させ、抗GST抗体を介して、SEROMAP (商標) ミクロスフェアにおいて捕捉する。タンパク質カップリングビーズを多重化して、96ウェルプレートにアリコートにして、患者の試料と共にインキュベートする。試料中に存在する抗体は抗原に結合して、この結合を、RPEによって標識した抗ヒトIgGカップリング二次抗体を用いて検出した後、LUMINEX (登録商標) 機器においてビーズのインタロゲーションを行う。

【 0 1 5 8 】

実施例III：患者の試料の新しいコホートにおける候補バイオマーカーのバリデーション

実施例IのPROTOARRAY（登録商標）アッセイにおいて発見された候補バイオマーカーをバリデートするために、全体で年齢をマッチさせた試料108例の新しいコホート：SLE患者試料71例、対照の対象試料50例、および無関係疾患（クローン病、リウマチ性関節炎、および多発性硬化症）試料59例のプロファイルを、PROTOPLEX（商標）免疫応答アッセイを用いて、実施例Iにおいて既に確立されたこれらの47個の候補バイオマーカーおよび7個のSLE自己抗原（SCL-70、CENP-B、La/SS-B、RNP複合体、Ro/SS-A、Jo-1）に対するその免疫応答に関して調べた。確立されたマーカー4個および候補バイオマーカー15個が、統計学的に有意なp値を有し、SLE集団において20%より高い発生率を示した（図2、3、および表11）。さらに、新規マーカー15個中12個は、マーカーに関する曲線下面積（AUC）に基づく、確立されたマーカーと同等の成績を示した（図4）。新規SLEマーカー、確立されたSLEマーカー、および新規および確立されたSLEマーカーを組み合わせた場合の感度および特異性を図5に示す。公知のおよび新規SLEバイオマーカーの複合パネルを表IIIに示す。

10

【 0 1 5 9 】

図3に示される新規SLE自己抗原を、PROTOPLEX（商標）免疫応答アッセイを用いて対応する免疫応答に関して特徴を調べた。SLE試料および対照試料に関するこれらの自己免疫応答マーカーの発生率および統計学的有意性（M統計量）を計算した。

【 0 1 6 0 】

（表II）

20

15個の新規SLEバイオマーカー	
DDX54	C1orf77
NPM1	EIF2C1
HMGN1	RPS19
RDBP	SNRP70
METTL1	PIN4
EIF2C4	C3orf26
MRPS6	PPP1R14A
C1orf83	

30

【 0 1 6 1 】

（表III）

40

22個のSLEバイオマーカーパネル	
DDX54	C1orf77
NPM1	EIF2C1
HMGN1	RPS19
RDBP	SNRP70
METTL1	PIN4
EIF2C4	C3orf26
MRPS6	PPP1R14A
C1orf83	SCL-70
CENP-B	トランスグルタミナーゼ
La/SS-B	RNP 複合体
Ro/SS-A,	Jo-1

10

20

30

40

【 0 1 6 2 】

実施例 IV

SLEバイオマーカー同定の予測力を改善するため（正しく分類される例の百分率の増加およびパネルにおけるマーカー数の減少）の新規方法を探索するために、本発明者らは、サイトカインおよび自己抗体免疫プロファイリングを組み合わせて行う影響を調べた。Novex 30種ヒトサイトカイン磁性パネル（LHC6003M、表4）およびNovex 19種自己抗原パネル（表5）を、SLE 92例および健康な対照試料85例の血清プロファイリングにおいて利用した。各々のキットを、製造元の提案するガイドラインに従って実行した。特徴の選択はWekaデータマイニングツール（Mark Hall, Elbe Frank, Geoffrey Holmes, Bernhard Pfahringer, Peter Reutemann, Ian H. Witten [2009]; The WEKA Data Mining Software; An Update; SIGKDD Explorations, Volume 11, Issue 1.）に基づき、特徴選択分析のために用いた。各列に血清試料の分類（健康またはSLE）および各行にタンパク質の名称を示す、作成されたシグナル強度の.csvファイルを、ソフトウェアへの入力として用いた。各抗原またはサイトカインを、M-Statアルゴリズム（M-Statに関する説明を参照されたい）によって選択される1つのバイオマーカーとして扱い、学習スキームによって属性の組を評価する評価法であるWrapperSubsetEval法（Ron Kohavi, George H John [1997]. Wrappers or feature subset selection. Artificial Intelligence. 97 [1-2] :273-324）を選択し、学習のアルゴリズムとしてロジスティック回帰を選択した。10分割交差確認を用いて、過剰適合を減少させ、属性の組に関する学習スキームの精度を推定した。特徴の組、すなわちタンパク質マーカーのサブセットが、ソフトウェアによって、混同行列における予測の誤差率と共に報告される。

【 0 1 6 3 】

(表IV)

Novex 30種ヒトサイトカイン磁性パネル	
EGF	IFN- γ
IL-2	IL-10
IL-15	RANTES
HGF	G-CSF
IL-7	IL-5
MIP-1 α	MCP-1
エオタキシン	IL-RA
IL-2R	IL-12
IL-17	TNF- α
IFN- α	GM-CSF
IL-8	IL-6
MIP-1 β	MIG
FGF-塩基性	IL-1 β
IL-4	IL-13
IP-10	VEGFA

10

20

30

【 0 1 6 4 】

(表 V)

Novex 19種ヒト自己抗原パネル	
カルジオリピン	Ro/SS-A 抗原
セントロメアタンパク質B	Scl-34
H2a(F2A2) & H4(F2A1)	Scl-70 抗原
ヒストンタイプIIA	Smith 抗原
Jo-1	サイログロブリン
La/SS-B 抗原	甲状腺ペルオキシダーゼ
Mi-2b	トランスグルタミナーゼ
ミエロペルオキシダーゼ	U1-snRNP 68
プロテイナーゼ-3	RNP 複合体
ピルビン酸デヒドロゲナーゼ	

10

20

【0165】

全ての85例の健康血清試料および92例のSLE血清試料について、Novex 30種ヒトサイトカイン磁性パネルによって血清プロファイリングを行ったところ、SLEを98%予測する5種類のサイトカインパネルが同定された(図6および8a)。Novex 19種ヒト自己抗原パネルを利用してこれらの同じ177例の血清試料を試験すると、疾患を80%予測する9種の自己抗体サブセットを示すデータが得られた(図7および8b)。177例の血清試料の組からの全てのデータ(30種のサイトカインおよび19種の自己抗体)を調べたところ、SLEを98%予測する統計学的に強力な2種(サイトカインおよび自己抗体)が同定された(図8c)。

30

【0166】

それ以外であることを示している場合を除き、本明細書および特許請求の範囲において用いられる成分の量、分子量、反応条件およびその他などの特性を表す全ての数値は、全ての例において「約」という用語によって修飾されると理解される。したがって、反対であることを示している場合を除き、明細書および添付の特許請求の範囲に示される数値パラメータは、本発明によって得ることが求められる望ましい特性に応じて変化する概算である。いずれにせよ、および特許請求の範囲と同等の教義の応用を制限するつもりはないが、各々の数値パラメータは、報告された有意な桁の数に照らして、および通常の端数処理技術を適用することによって少なくとも解釈されるべきである。本発明の広い範囲を述べる数値範囲およびパラメータは概算であるとはいえ、特異的例において記載される数値は可能な限り正確に報告される。しかし、いかなる数値も、本来、そのそれぞれの試験測定において見いだされる標準偏差により必然的に生じる一定の誤差を含む。

40

【0167】

本発明を記述する文脈(特に、以下の特許請求の範囲の文脈)において用いられる「1つの」、「1つの(an)」、「その」という用語および類似の表現は、本明細書においてそれ以外であると示している場合を除き、または本文と明らかに矛盾する場合を除き、単数形と複数形の両方を含むと解釈されるべきである。本明細書において記述される値の範囲の詳説は、範囲内に入る各々の個別の値に個々に言及する略式の方法として役立つと単に意図される。本明細書においてそれ以外であると示している場合を除き、各々の個々の値は、それが本明細書に個々に詳説されているかのように明細書に組み入れられる。本明

50

細書において記述される全ての方法は、本明細書においてそれ以外であると示している場合を除き、またはそうでなければ本文と明らかに矛盾する場合を除き、任意の適した順序で行うことができる。本明細書において提供される、任意のおよび全ての例または例示的な言語（たとえば、「などの」）の使用は、本発明をよりよく説明することを単に意図しており、それとは別に特許請求される本発明の範囲を制限するものではない。本明細書における言語は、本発明の実践にとって必須の任意の請求されていない要素を示すと解釈してはならない。「または」という用語は、1つまたはそれが指定する用語しかないことを意味するのではない。たとえば、構成の表現において用いられる場合のように、「AまたはB」は、A単独、B単独、またはAとBの両方を示しうる。本明細書において開示される本発明の代わりに要素または態様の群は、制限的であると解釈されない。各群のメンバーは、個々に、または本明細書において見いだされる群の他のメンバーもしくは他の要素との任意の組み合わせで言及および特許請求されうる。群の1つまたは複数のメンバーは、便宜上および/または特許資格の理由から、群に含められうるまたは群から除外されうると予想される。そのような任意の包含または除外が起こる場合、本明細書は、修飾された群を含むと考えられ、そのため、添付の特許請求の範囲において用いられる全てのマーカッシュ群に関する書面での説明を満たしている。

10

【0168】

本発明を実践するために本発明者らにとって公知の最善の様式を含む、本発明のある態様が本明細書において記述される。当然、前述の説明を読むことによって、これらの記述の態様の変化形が当業者に明らかとなるであろう。本発明者らは、当業者がそのような変更を必要に応じて用いることを予想し、本発明者らは、本明細書において具体的に記述される手法以外で本発明が実践されることを意図する。したがって、本発明は、適用可能な法律によって許容される限り、本明細書において添付される特許請求の範囲において詳説される主題の全ての修飾および同等物を含む。その上、本明細書においてそれ以外であると示している場合を除き、またはそうでなければ本文と明らかに矛盾する場合を除き、その起こりうる全ての変化における上記の要素の任意の組み合わせが、本発明に含まれる。

20

【0169】

本明細書において開示される特異的態様は、「からなる」または「本質的にからなる」という用語を用いて、特許請求の範囲においてさらに制限されうる。特許請求の範囲において用いる場合、修正版に従ってファイルされるまたは追加されるか否かによらず、「からなる」という接続語は、特許請求の範囲において明記されないいかなる要素、段階、または成分も除外する。「本質的にからなる」という接続語は、明記された材料または段階、および基本の新規特徴に実質的に影響を及ぼさない材料または段階に、特許請求の範囲を制限する。そのように特許請求される本発明の態様は、本明細書において固有にまたは明白に記述され、実行される。

30

【0170】

さらに、本明細書を通して特許および印刷刊行物に対して多数の参照がなされている。上記で引用された参考文献および印刷刊行物は、その全内容が個々に参照により本明細書に組み入れられる。

【0171】

最後に、本明細書において開示される本発明の態様は、本発明の原理を説明すると理解されるべきである。用いられうる他の変更も本発明の範囲内である。このように、例として、本明細書の教示に従って本発明の代わりに構造を利用してもよいがそれに限定されるわけではない。したがって、本発明は、正確に示され、記述される内容に限定されない。

40

【0172】

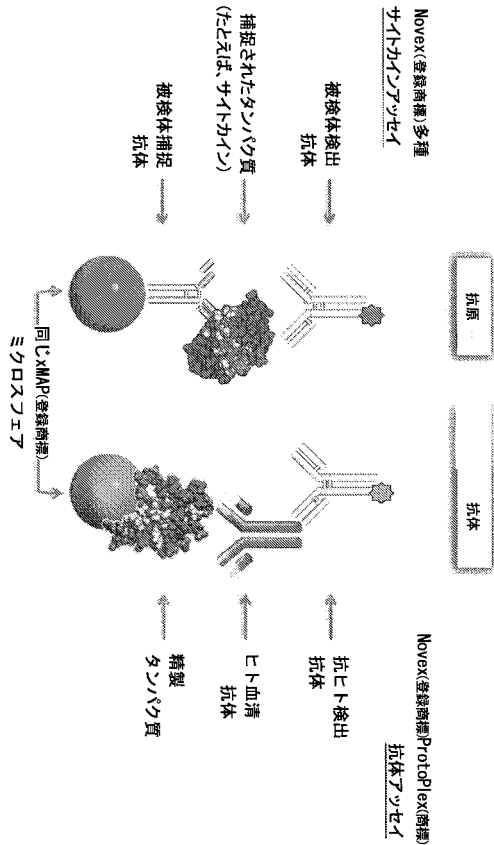
本明細書において開示される特異的態様は、「からなる」または「本質的にからなる」という用語を用いて、特許請求の範囲においてさらに制限されうる。特許請求の範囲において用いられる場合、修正版に従ってファイルされるまたは追加されるか否かによらず、「からなる」という接続語は、特許請求の範囲において明記されないいかなる要素、段階、または成分も除外する。「本質的にからなる」という接続語は、明記された材料または

50

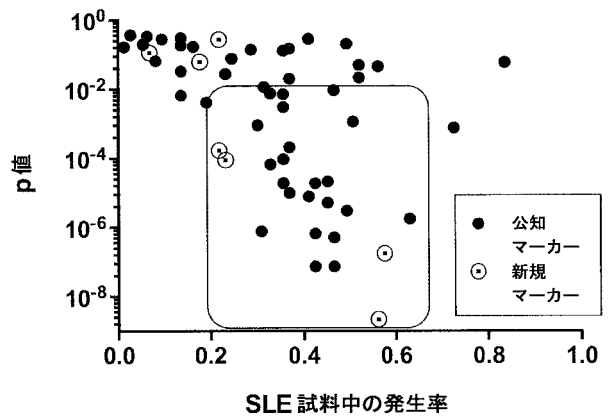
段階、および基本の新規特徴に実質的に影響を及ぼさない材料または段階に、特許請求の範囲を制限する。そのように特許請求される本発明の態様は、本明細書において固有にまたは明白に記述され、実行される。

【 図 1 】

SLEの予測マーカーを同定するための免疫フロアインシリブにおいて用いられるNovexイムノアッセイツール



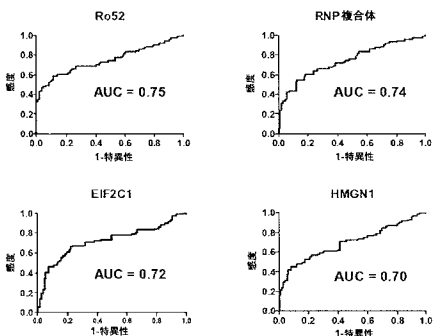
【 図 2 】



【 図 3 】

遺伝子記号	アクセスンID	最終的なORF ID	SLEにおける発生率	対照+他の疾患における発生率	統計学的有意性 (p値)
DDX54	BC001132.1	IOH3853	0.383562	0.099099	3.90E-06
Clorf77	BC002733.2	IOH5365	0.39726	0.09009	1.61E-06
NPM1	BC021983.1	IOH27884	0.356104	0.108108	4.85E-05
EIF2C1	BC063225.1	IOH48423	0.405753	0.081081	1.75E-08
HMG1	BC070154.1	IOH63011	0.424658	0.072072	8.27E-09
RPS19	NM_001022.3	IOH4572	0.356104	0.072072	1.13E-06
ROBP	NM_002904.4	IOH14621	0.315088	0.027027	1.76E-08
SNRP70	NM_003089.4	IOH40192	0.452095	0.108108	1.05E-07
METTL1	NM_005371.2	IOH4172	0.356104	0.081081	3.27E-06
FIN4	NM_006223.1	IOH7150	0.383562	0.099099	2.18E-05
EIF2C4	NM_017629.2	IOH38411	0.328767	0.054054	6.79E-07
C3orf26	NM_032359.3	IOH5762	0.342406	0.072072	2.81E-06
RARP56	NM_032476.1	IOH13845	0.369863	0.081081	1.33E-06
PPP1R14A	NM_032256.1	IOH12214	0.493151	0.126126	1.06E-07
Clorf83	NM_153035.1	IOH27410	0.356104	0.081081	3.27E-06

【 図 4 】

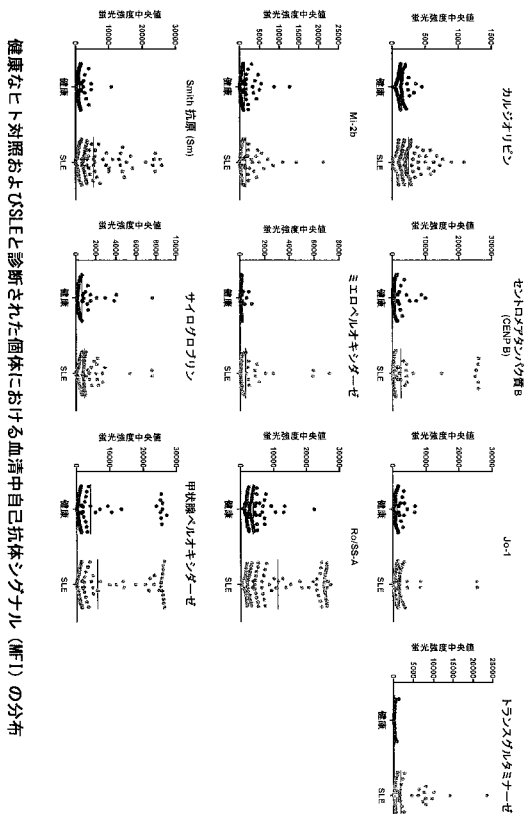


【 図 5 】

公知マーカーによる試験		新規マーカーによる試験		公知および新規マーカーによる試験	
SLE	非SLE	SLE	非SLE	SLE	非SLE
42	29	41	30	51	20
6	103	8	101	6	103

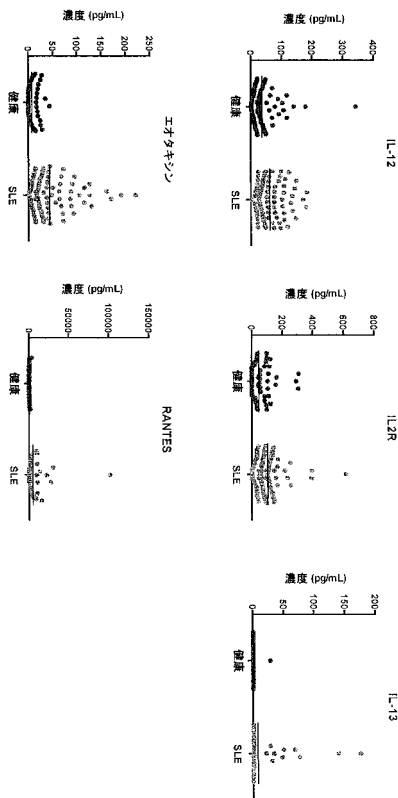
SCL-70, CENP-B, トランスグルタミナーゼ, La/SS-B, RNP複合体, Ro/SS-A, Jo-1
 マーカー-1, マーカー-2, マーカー-3, マーカー-4, マーカー-5
 Ro/SS-A, マーカー-1, マーカー-2, マーカー-6-12

【 図 7 】



健康なヒト対照およびSLEと診断された個体における血清中自己抗体シグナル (蛍1) の分布

【 図 6 】



健康なヒト対照およびSLEと診断された個体における血清中サイトカインレベルの分布

【 図 8 】

A) サイトカイン		B) 抗体		C) サイトカイン&抗体	
SLE	非SLE	SLE	非SLE	SLE	非SLE
91	1	65	27	91	1
2	83	8	77	2	83

IL 13, IL 12, RANTES, エオタキニン, IL 2R
 カルシオペリン, CENP B, Jo-1, Mi-2b, ミエロペルオキシダーゼ, Ro/SS-A, Smith抗原, サイロクログリン, 甲状腺ペルオキシダーゼ

98% 予測
 80% 予測
 98% 予測

SLE予測/抗体を強調するマツチング行列 (A, サイトカイン; B, 抗体; またはC, サイトカインおよび抗体)。公知の診断起源の血清を、サイトカイン濃度または明記された自己抗原に対する抗体レベルに関して分析した。真の陽性 (左上) および真の陰性 (右下) は、各パネルに記入される予測値に対応する。

【手続補正書】

【提出日】平成26年11月7日(2014.11.7)

【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】

2015511012000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2013/029452

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/564 G01N33/68 ADD.		
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 practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, FSTA, PAJ, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MAN-MAN LU ET AL: "Increased serum RANTES in patients with systemic lupus erythematosus", RHEUMATOLOGY INTERNATIONAL, vol. 32, no. 5, 22 January 2011 (2011-01-22), pages 1231-1233, XP55065449, ISSN: 0172-8172, DOI: 10.1007/s00296-010-1761-2 abstract ----- -/--	1-15
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
24 June 2013		28/06/2013
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 Lunter, Pim

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2013/029452

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>LUIS M VILÁ ET AL: "Association of serum MIP-1[alpha], MIP-1[beta], and RANTES with clinical manifestations, disease activity, and damage accrual in systemic lupus erythematosus", CLINICAL RHEUMATOLOGY ; JOURNAL OF THE INTERNATIONAL LEAGUE OF ASSOCIATIONS FOR RHEUMATOLOGY, SPRINGER-VERLAG, LO, vol. 26, no. 5, 19 August 2006 (2006-08-19), pages 718-722, XP019494526, ISSN: 1434-9949 abstract</p> <p>-----</p>	1-15
Y	<p>TANAY AMIR ET AL: "TG or not TG: IgG-anti-tissue transglutaminase in systemic lupus erythematosus: new role for an old enzyme.", THE ISRAEL MEDICAL ASSOCIATION JOURNAL : IMAJ NOV 2002, vol. 4, no. 11 Suppl, November 2002 (2002-11), pages 878-879, XP008162849, ISSN: 1565-1088 abstract page 878</p> <p>-----</p>	1-15
Y	<p>FEIGHERY L ET AL: "Anti-transglutaminase antibodies and the serological diagnosis of coeliac disease", BRITISH JOURNAL OF BIOMEDICAL SCIENCE, ROYAL SOCIETY OF MEDICINE SERVICES, LONDON, GB, vol. 60, no. 1, 1 January 2003 (2003-01-01), pages 14-18, XP008162835, ISSN: 0967-4845 abstract</p> <p>-----</p>	1-15
Y	<p>SZODORAY P ET AL: "CIRCULATING CYTOKINES IN PRIMARY SJOGREN'S SYNDROME DETERMINED BY A MULTIPLEX CYTOKINE ARRAY SYSTEM", SCANDINAVIAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, BLACKWELL SCIENCE PUBL., OXFORD, GB, vol. 59, no. 6, 1 June 2004 (2004-06-01), pages 592-599, XP001203983, ISSN: 0300-9475, DOI: 10.1111/J.0300-9475.2004.01432.X abstract</p> <p>-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2013/029452

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>LUFT LEEANNE M ET AL: "Autoantibodies to tissue transglutaminase in Sjögren's syndrome and related rheumatic diseases.", THE JOURNAL OF RHEUMATOLOGY DEC 2003, vol. 30, no. 12, December 2003 (2003-12), pages 2613-2619, XP008162843, ISSN: 0315-162X abstract</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-10
Y	<p>SHEN HU ET AL: "Identification of autoantibody biomarkers for primary Sjögren's syndrome using protein microarrays", PROTEOMICS, vol. 11, no. 8, 17 April 2011 (2011-04-17), pages 1499-1507, XP055065747, ISSN: 1615-9853, DOI: 10.1002/pmic.201000206 abstract</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-10
Y	<p>ANSARI N ET AL: "Comparison of RANTES expression in Crohn's disease and ulcerative colitis: an aid in the differential diagnosis?", JOURNAL OF CLINICAL PATHOLOGY, BMJ PUBLISHING GROUP, GB, vol. 59, no. 10, 1 October 2006 (2006-10-01), pages 1066-1072, XP008146728, ISSN: 0021-9746 abstract</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-10
Y	<p>TOROK HELGA P ET AL: "Increased serum levels of anti-tissue transglutaminase antibodies in patients with ulcerative colitis", GASTROENTEROLOGY, [Online] vol. 130, no. 4, Suppl. 2, 24 May 2006 (2006-05-24), page A361, XP008162840, ISSN: 0016-5085 Retrieved from the Internet: URL:http://dg1-2.internal.epo.org/pddoc/ev1/journals/6229.php [retrieved on 2013-06-06] abstract</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-10

フロントページの続き

(51) Int. Cl.		F I		テーマコード (参考)
C 0 7 K 16/42 (2006.01)		C 0 7 K 16/24	Z N A	
C 1 2 N 9/10 (2006.01)		C 0 7 K 16/42		
		C 1 2 N 9/10		

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, T M), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, R S, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, H U, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(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 100130845
弁理士 渡邊 伸一

(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 ラマチャンドラン ニロシャン
アメリカ合衆国 カリフォルニア カールスバッド バン アレン ウェイ 5 7 9 1 ライフ
テクノロジーズ コーポレーション

(72) 発明者 メン リハオ
アメリカ合衆国 カリフォルニア カールスバッド バン アレン ウェイ 5 7 9 1 ライフ
テクノロジーズ コーポレーション

(72) 発明者 チェン ゲンシン
アメリカ合衆国 カリフォルニア サンマテオ サウス ノーフォーク ストリート 2 7 2 1
アパートメント 3 1 0

(72) 発明者 ブルドン デイビッド
アメリカ合衆国 カリフォルニア カールスバッド バン アレン ウェイ 5 7 9 1 ライフ
テクノロジーズ コーポレーション

(72) 発明者 ヴァン レー スージー
アメリカ合衆国 カリフォルニア カールスバッド バン アレン ウェイ 5 7 9 1 ライフ
テクノロジーズ コーポレーション

F ターム(参考) 4B050 DD11 LL03

4H045 AA11 AA30 BA10 CA40 DA75 DA76 DA86 DA89 EA50

专利名称(译)	系统性红斑狼疮的生物标志物		
公开(公告)号	JP2015511012A	公开(公告)日	2015-04-13
申请号	JP2014561090	申请日	2013-03-06
[标]申请(专利权)人(译)	生命技术公司		
申请(专利权)人(译)	Life Technologies公司		
[标]发明人	ラマチャンドランニロシャン メンリハオ チェンゲンシン ブルドンデイビッド ヴァンレースージー		
发明人	ラマチャンドラン ニロシャン メン リハオ チェン ゲンシン ブルドン デイビッド ヴァン レー スージー		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/564 G01N33/577 G01N33/543 C07K16/24 C07K16/42 C12N9/10		
CPC分类号	G01N33/564 G01N33/6893 G01N2333/52 G01N2333/523 G01N2800/104 G01N2800/52		
FI分类号	G01N33/531.A G01N33/564 G01N33/577.B G01N33/543.545.A G01N33/543.575 C07K16/24.ZNA C07K16/42 C12N9/10		
F-TERM分类号	4B050/DD11 4B050/LL03 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/DA89 4H045/EA50		
代理人(译)	清水初衷 井上隆一 佐藤俊光 小林智彦 渡边真一 正人大关 五十嵐弘		
优先权	61/607422 2012-03-06 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本公开提供了新颖的SLE生物标记。本公开进一步提供了通过利用新型SLE生物标记物来诊断，预后和分类患有疾病的受试者的试剂盒和方法。

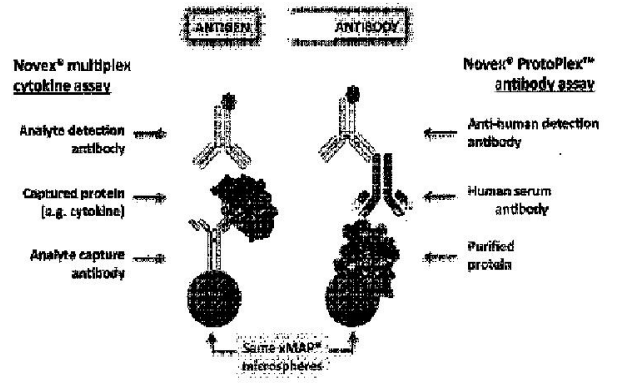


Figure 1: Novex immunoassay tools used in immune profiling to identify predictive markers of SLE.