

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4769712号

(P4769712)

(45) 発行日 平成23年9月7日(2011.9.7)

(24) 登録日 平成23年6月24日(2011.6.24)

(51) Int.Cl.		F I			
CO7K	7/08	(2006.01)	CO7K	7/08	ZNA
GO1N	33/53	(2006.01)	GO1N	33/53	N
GO1N	33/564	(2006.01)	GO1N	33/564	Z

請求項の数 16 (全 21 頁)

(21) 出願番号	特願2006-508002 (P2006-508002)	(73) 特許権者	502043547
(86) (22) 出願日	平成16年4月2日(2004.4.2)		ファディア・アー・ペー
(65) 公表番号	特表2007-528840 (P2007-528840A)		スウェーデン国、751 37・ウブサラ
(43) 公表日	平成19年10月18日(2007.10.18)		、ボックス・6460
(86) 国際出願番号	PCT/SE2004/000526	(74) 代理人	100062007
(87) 国際公開番号	W02004/087745		弁理士 川口 義雄
(87) 国際公開日	平成16年10月14日(2004.10.14)	(74) 代理人	100114188
審査請求日	平成19年3月20日(2007.3.20)		弁理士 小野 誠
(31) 優先権主張番号	0300958-6	(74) 代理人	100119253
(32) 優先日	平成15年4月2日(2003.4.2)		弁理士 金山 賢教
(33) 優先権主張国	スウェーデン(SE)	(74) 代理人	100103920
			弁理士 大崎 勝真
		(74) 代理人	100124855
			弁理士 坪倉 道明

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 分析方法及びそのキット

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

全身性エリテマトーデス(SLE)の患者由来の血清中に存在する抗体と反応することができる、アミノ酸配列AARGs dRGRGMGRGNIF(式中、sdRは対称ジメチル化アルギニンである)からなるペプチド。

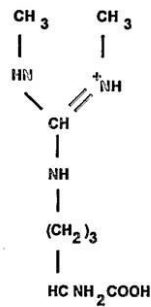
【請求項2】

前記ジメチル化アルギニンが、SmD3のポリペプチド配列において112番の位置にある請求項1に記載のペプチド。

【請求項3】

前記対称ジメチル化アルギニンの構造が、

【化 1】



10

である請求項 1 又は 2 に記載のペプチド。

【請求項 4】

全身性エリテマトーデス (SLE) 患者の診断用組成物を製造するための、全身性エリテマトーデス (SLE) 患者由来の血清中に存在する抗体と反応することができる、アミノ酸配列 AARGsdRGRGMGRGNIF (式中、sdR は対称ジメチル化アルギニンである) からなるペプチドの使用。

【請求項 5】

前記診断が SLE 患者と混合性結合組織病 (MCTD) 患者とを見分けるための鑑別診断である請求項 4 に記載の使用。

20

【請求項 6】

前記診断が SLE のインビトロ診断である請求項 4 に記載の使用。

【請求項 7】

前記ペプチドが、dsDNA 陰性 SLE 患者の全身性エリテマトーデス (SLE) の治療効果のインビトロ監視のために使用される請求項 4 に記載の使用。

【請求項 8】

前記ペプチドが、SLE と MCTD との鑑別のために使用される請求項 4 に記載の使用。

【請求項 9】

前記ジメチル化アルギニンが、SmD3 のポリペプチド配列において 112 番目の位置にある、請求項 4 から 8 のいずれかに記載の使用。

30

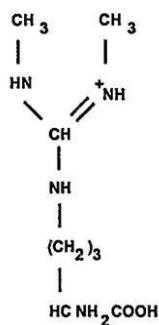
【請求項 10】

請求項 1 に記載のペプチドを含む、多量体ペプチドの使用。

【請求項 11】

前記対称ジメチル化アルギニンの構造が、

【化 2】



40

である、請求項 4 から 10 のいずれかに記載の使用。

【請求項 12】

全身性エリテマトーデス (SLE) 患者由来の血清中に存在する抗体と反応することが

50

できる、アミノ酸配列 $A A R G s d R G R G M G R G N I F$ (式中、 $s d R$ は対称ジメチル化アルギニンである)のペプチドからなる抗体の検出のためのキット。

【請求項 1 3】

前記ペプチドが、SLEのインビトロ診断のために使用される請求項 1 2 に記載のキット。

【請求項 1 4】

SLEと混合性結合組織病(MCTD)とを区別するための鑑別診断に前記ペプチドが使用される請求項 1 2 に記載のキット。

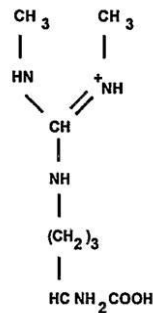
【請求項 1 5】

前記ジメチル化アルギニンが、SmD3のポリペプチド配列において112番の位置にある、請求項 1 2 から 1 4 のいずれかに記載のペプチドの使用のためのキット。

10

【請求項 1 6】

前記対称ジメチル化アルギニンの構造が、
【化 3】



20

である、請求項 1 2 から 1 5 のいずれかに記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、対称ジメチル化アルギニンを含有し、全身性エリテマトーデス(SLE)の患者由来の血清に存在する抗体の免疫学的決定基を構成し、前記抗体との反応に対してメチル化が必要条件であるペプチドに関する。本発明はまた、SLEの診断及びSLEと混合性結合組織病(MCTD)との鑑別のための前記ペプチドの使用にも関する。

30

【背景技術】

【0002】

全身性リウマチ性疾患の特徴は、一定の細胞内標的に対する循環性の自己抗体が生じることである(von Muhlen及びTan、1995にまとめられている)。それらの自己抗体のうち最初に同定されたものは、抗-Smであり、これは、全身性エリテマトーデス(SLE)と密接に関連している(Tan及びKunkel、1996)。従って、抗-Sm抗体は、この疾患に対するAmerican College of Rheumatology分類基準の1つに含まれている(Tanら、1982)。Sm-複合体抗DNAを標的とする自己抗体とは別に、抗-PCNA、抗-U1-RNP、抗-ヌクレオソーム、抗-ヒストン、抗-Ro/SS-A、抗-La/SS-B、抗-リボソームRNP及び抗-リン脂質抗体が、SLEに罹患している患者において見られることが多い(von Muhlen及びTan、1995)。

40

【0003】

抗-Sm反応性は、平均でSLE患者の5%から30%で見られるが、特異的頻度は、検出系及びSLE集団の人種構成により様々となる(Abuafr、1990; Jaekelら、2001)。Sm-抗原は、核の前駆体m-RNAのスプライシングを触媒するスプライソソーム複合体の一部である(Seraphin、1995; Lernerら、1980)。その複合体そのものが、少なくとも9個の、分子量が9kDaから25k

50

Daの範囲にある様々なポリペプチドを含有する[B(B1、28kDa)、B'(B2、29kDa)、N(B3、29.5kDa)、D1(16kDa)、D2(16.5kDa)、D3(18kDa)、E(12kDa)、F(11kDa)及びG(9kDa)](Hoch、1994)。それらのコアタンパク質は全て、抗Sm免疫反応の標的として働き得るが、最も頻度が高いのは、B及びDポリペプチドであり、従ってこれらは主要な抗原とみなされている(Hoch、1994; Brahmら、1997; Ouら、1997)。しかし、MCTD患者において自己抗体の標的となることが多いSmBB'及びU1特異的RNPsは交差反応性エピトープを共有しているため、SmDが最も特異的なSm-抗原とみなされる(van Verooijら、1991; Hochら、1999)。SmDファミリーの中で、SmD1/D3パターンは、SmD1に対する顕著な免疫反応性によるSmD1/D2/D3認識よりも少なくとも4倍よく見られる(Hochら、1999)。エピトープマッピング研究において、直線状及び立体エピトープがいくつかSmB及びDタンパク質にマッピングされている(Rokeachら、1992; Hirakataら、1993)。SmD1及びBB'において、主要な反応は、主にC-末端伸長において見られる(Rokeachら、1992; Hirakataら、1993; Rokeach及びHoch、1992)。SmBB'のC-末端伸長内で3回起こるエピトープ、PPPGMRPP(配列番号1)は、U1特異的抗原等のスプライソソーム自己抗原及びHIV-1のp24 gag等のレトロウイルスタンパク質の他のプロリンリッチな構造と交差反応することが示された(De Keyserら、1992)。追跡研究及び免疫付与と試験から、このモチーフが常に、BB'分子内の、及びSmD-ポリペプチドに対するエピトープスプレディング(epitope spreading)の開始点として作用する、初期の検出可能なSmBB'エピトープであることが明らかになった(Arbuckle、1999; Greidinger及びHoffman、2001)。最近の研究で、全分子に分布する、SmD2における5個の直線状エピトープ及びSmD3における4個の直線状エピトープが同定された(McClainら、2002)。これらのエピトープは全て、同じ基本的特性を有し、それらを抗原にならしめるタンパク質表面で露出される(McClainら、2002)。SmD3における説明したB-細胞エピトープの1つ(エピトープ4; aa 104-126)は、最終的に交差反応を導くSmD1タンパク質由来の抗原領域と密接なホモロジーを示した(McClainら、2002)。診断目的に対して、診断に使用できる感度及び特異性、それぞれ36%から70%の範囲及び91.7%から97.2%の範囲、を有するELISAシステムを開発するために、SmD1のC-末端伸長に相当する合成ペプチドが用いられた(Riemekastenら、1998; Jaekelら、2001)。最近、ポリペプチドD1、D3及びBB'が、SmD1のC-末端内で主要な自己エピトープを構成する対称ジメチルアルギニン(sDMA)を含有することが示された(Brahmsら、2000; Brahmら、2001)。これらの研究のうちの1つにおいて、sDMAを含有するSmD1の合成ペプチド(aa 95-119)が、以前のデータとの矛盾を示す非修飾ペプチドと比較して、免疫反応が顕著に高いことが明らかとなった(Riemekastenら、1998; Brahmら、2000)。

【0004】

国際特許WO第99/11667号において、メチル化アルギニンを含有し、SLE患者由来の血清中又はエプスタインバーウイルス(Epstein-Barr virus (EBV))に存在する抗体の抗原決定基を構成し、前記抗体と反応するためにそのメチル化が必要条件であるペプチドを調製するための方法が記載されている。しかし、これらのペプチドは概括的に説明されており、ペプチド配列と自己免疫疾患診断能との間の関係は何ら開示されていない。

【0005】

本発明の要約

ここで、発明者らは、発明者らの請求する、ある一定の位置に対称ジメチル化アルギニンを含有するペプチドがSLEの診断に不可欠であることを見出し、驚くべきことに、S

10

20

30

40

50

L E患者の鑑別及びS L EとM C T Dとを鑑別するための特異性及び信頼性が高い診断免疫アッセイにこのペプチドを使用することができることを示した。本ペプチドの多量体もまた、同じ目的に対して使用できる。請求するペプチドを含有するキットは、S L Eの診断ならびにS L EとM C T Dとの鑑別に使用することができる。本発明の長所は、M C T D試料群から偽陽性試料を拾い上げないことである。

【0006】

本発明の目的は、抗 - S m抗体を検出するための分析方法を提供することである。

【0007】

本発明により、驚くべきことに、S m D 3配列内のあるアルギニン残基の対称ジメチル化がその抗原性に重要であることが分かった。

10

【0008】

従って、ある局面において、本発明は、抗体と反応することができる、対称なジメチル化アルギニン (s DMA) を含む15個から16個のアミノ酸を含有するペプチド (S 3 3) を提供するが、前記ペプチドと前記抗体との反応に前記ジメチル化が不可欠であり、前記抗体は全身性エリテマトーデス (S L E) の患者由来の血清中に存在する。

【0009】

第2の局面において、本S 3 3ペプチドは、アミノ酸配列、

A A R G s D M A G R G M G R G N I F (配列番号2) を含有する。

【0010】

第3の局面において、本対称ジメチル化アルギニンは、S m D 3のポリペプチド配列における112番の位置にある。

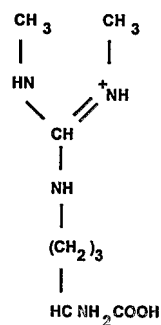
20

【0011】

第4の局面において、本S 3 3ペプチドは、構造、

【0012】

【化4】



30

を有する対称ジメチル化アルギニンを含有する。

【0013】

第5の局面において、本発明は、S L Eのインビトロ診断に本S 3 3ペプチドを使用するための方法である。

40

【0014】

第6の局面において、本発明は、S L Eと混合性結合組織病 (M C T D) との鑑別のために本S 3 3ペプチドを使用するための方法である。

【0015】

第7の局面において、本発明は、d s D N A陰性S L E患者における疾患活性のインビトロ監視に本S 3 3ペプチドを使用するためのキットであるが、ここで疾患活性とは、新規ミトープペプチドに対する抗体の力価とその疾患活性との間の相関関係として定義される。

【0016】

第8の局面において、本発明は、治療効果又は疾患活性を監視するために反復試験によ

50

り前記抗体力価を追跡するための方法である。

【0017】

第9の局面において、本発明は、本S33ペプチドを複数含有する多量体ペプチドである。

【0018】

本発明の詳細な説明

【実施例1】

【0019】

血清サンプル

血清 (n = 628) は、全身性エリテマトーデス (SLE; n = 176)、関節リウマチ (RA、n = 86)、シェーグレン症候群 (SS、n = 24); 混合性結合組織病 (MCTD、n = 26)、強皮症 (Ssc、n = 26) 及び多発性筋炎/皮膚筋炎 (PM/DM、n = 13) の患者から回収した。各疾患に対するACR基準 (Tanら、1982; Arnettら、1988) により全患者を分類した。さらにそのアッセイ特異性を評価するために、発明者らは、C型肝炎 (HCV; n = 30)、サイトメガロウイルス (CMV; n = 22) 及びエプスタインバーウイルス (EBV; n = 25) を含む感染症患者 (n = 77)、由来の血清群、ならびに192名の健常血液提供者由来の血清群を分析した。使用するまで全血清を -80 で保存した。エピトープマッピングのために、抗-Sm抗体を含有する5つの血清のパネルを使用した。ネガティブコントロールとして、抗-Sm以外の他の抗体特異性を有する自己免疫血清を選択した。

10

20

【0020】

無作為に選択したSLE患者血清の血清学的特性

ヒストン、dsDNA及びSm-複合体に対する自己抗体について、定量的Vareliisa^(R) (Pharmacia Diagnostics, Freiburg, Germany) を用いて、自己免疫患者の血清を全て試験した。予想外の結果を示したSLE血清及び試料もまた、半定量的ANA-Split ELISA research Kit (Pharmacia, Freiburg, Germany) において測定した。後者のアッセイには、自己抗原 U1-68kDa、U1-A、U1-C、SmBB'、SmD、Ro-52、Ro-60及びLaが含まれる。ELISAは全て、使用説明書に従って行った。

30

【実施例2】

【0021】

固定化オリゴペプチドを用いたエピトープマッピング

SmD1の公表されている配列、P13641 (Rokeachら、1988) 及びSmD3、P43331、(Lehmeierら、1994) を使用して、Gausepohl及びBehn (2002) により述べられたプロトコールに従い、ピペッティングロボットを用いて重複15マーペプチドを合成した。オフセットを2アミノ酸にして、両ポリペプチドのC-末端伸長を合成した (13アミノ酸重複)。天然アルギニン、sDMA又は非対称ジメチルアルギニン (asDMA) をそれぞれの位置に有する3種類の変異体として各アルギニン含有ペプチドを合成した。後に、天然アルギニン及びsDMAの一定の組み合わせを用いてSmD3の高反応性ペプチドを合成した。ペプチド合成完了後、ブロッキング緩衝液 (BB) 中で室温 (RT) にてメンブレンを一晩インキュベーションすることにより非特異的結合部位をブロックした。1回の洗浄段階後、BB中で1:100に希釈した血清試料とともに、RTにて2時間、膜をインキュベーションした。洗浄段階を3回行い、非結合抗体を除去した。検出のために、ペルオキシダーゼ共役ヤギ抗ヒトIgG抗体をBB中で1:5000に希釈し、75分間インキュベーションを行った (RT)。洗浄段階を3回行い過剰な二次抗体を除去した。最後に、高感度化学発光 (ECL) 検出系を使用して、結合した抗体を視覚化した。アッセイ条件はネガティブ血清が反応性を示さない条件を用いた。

40

【実施例3】

50

【0022】

S33 - ペプチドELISA
ELISA - プレートの調製

凍結乾燥させたS33ペプチドを使用して、10 µg / µlの保存溶液を調製し、使用するまで分注したものを-20において保存した。各ウェルの最終体積が120 µlとなるようにして、被覆用緩衝液中で本ペプチド2.5 µg / mlを用いてELISAプレートに対する本ペプチドの結合を行った。被覆手順は15にて20時間行った。非特異的結合部位をブロッキング溶液でブロックした。そのブロッキング溶液を捨てた後、固相を37にて2時間乾燥させ、密封した。

【0023】

本アッセイは、Vareliisa^(R)システム(Pharmacia Diagnostics, Freiburg)の一般プロトコールに従い行った。供血者の反応性は、0.4 U / mlから11.5 U / mlの範囲であり、その結果、平均値が2.2 U / ml及びSDが1.2 U / mlであることが明らかになった。カットオフは、ROC - 解析後に技術的に1.3 U / mlに設定した。PPVs及びNPVsは、異なるカットオフ値で計算した。

【0024】

精度と再現性

不正確さの測定(アッセイ間及びアッセイ内の変動)は、それぞれ4回及び6回繰り返して行った。抗-Sm血清に適切な抗-S33ペプチドELISAの精度を評価するために、1日の間に5回の独立した試験において(アッセイ間)、又は1回の試験において(アッセイ内)、低値試料(L);中間値試料(M)及び高値試料(H)をアッセイした。試験内精度を調べるために、1つの固相においてL、M及びHを6回反復測定した。ANOVA解析を用いて精度データを計算した。

【0025】

直線性

最高濃度の標準試料(S6)の、及び精度解析における高値試料(H)の希釈物(1:1;2:3;1:2;1:4;1:8;1:16;1:32)を試験することにより、直線性を解析した。各希釈点に対して、予想値に対する測定反応値の比を計算し、この比率から1を差し引いた。

【実施例4】

【0026】

相関研究

様々な製造者の市販の抗-Sm抗体テスト(Sm test A-Sm Test D)を使用して、無作為に選択したSLE血清(n=50)及び様々な対照(n=100)を試験し、抗-S33ELISAテストの所見とその結果を比較した。

【実施例5】

【0027】

SLE患者の追跡研究

男性のSLE患者を臨床的及び血清学的に18ヶ月の期間にわたり観察した(6例の血清試料;図3参照。)。Pharmacia Diagnosticsのそれぞれのテストキットを使用して、RNP/Sm複合体、Sm抗原、単離U1-RNP複合体、ヒストン、dsDNA及びS33ペプチドに対する抗体について、本患者を試験した。

【0028】

結果

SmD1及びD3のC-末端伸長のエピトープ精細マッピング

SmD1及びSmD3の抗原性に対するアルギニン-ジメチル化の影響を評価し、両ポリペプチドにおける関連エピトープをマッピングするために、SmD1(P13641)及びSmD3(P43331)のC-末端領域を含むペプチドアレイ(15マー、2オフセット)を用いて、抗-Sm血清のパネルを試験した。

10

20

30

40

50

【0029】

その結果、アルギニン残基のジメチル化が、C - 末端 SmD1 及び D3 ポリペプチドに対する抗 - Sm 抗体の結合に顕著に影響を与えることが示される (図 1 参照)。抗 SmD 血清は全て (#36、#37、#31、#84、#Sm)、対称形態のジメチルアルギニン (sDMA) を含有する SmD1 ペプチドに対する結合性が上昇していることが明らかになった。特に、グリシン及び DMA リピートからなるペプチドのみが、それらの抗体に対して強い反応性を示した (ペプチド番号 9、10)。とは言え、DMA を含有する SmD1 ポリペプチドは、抗 - セントロメア抗体 (ACA; #serum CEN (centromer)) の標的でもあるので、抗 - Sm 抗体にとってむしろ非特異的な基質である。興味深いことに、それらの ACA は、非対称形の DMA を含有するペプチドにも結合した。

10

【0030】

SmD3 由来のペプチドとの結合実験から同様の結果が示された。sDMA 含有 SmD3 ペプチドのみが、抗 - Sm 抗体と反応したことから、アルギニン残基の対称的メチル化が重要であることが確認される (図 1 b 参照)。SmD1 と比較して、対照血清 (例えば CEN) では、SmD3 由来ペプチドに対する抗体結合は見られないが、これは高い特異性を反映するものである。ある特定のペプチド (第 77 番、¹⁰⁸ A A s d R G s d R G s d R G M G s d R G N I F ^{1 2 2}、配列番号 3) が、5 種類の抗 - Sm 血清のうち 3 種類により強く認識された。¹⁰⁸ A A R G R G R G M G R G N I F ^{1 2 2} (配列番号 4) のアルギニン残基が連続的に sDMA に置換された突然変異分析を用いて、発明者らは、1 個のジメチル化アルギニン残基を 112 番の位置に有するミモトープペプチドが 5 種類の抗 - Sm 血清全て (#36、#37、#31、#84、#Sm) に対して免疫反応性を示すが対照 (例えば CEN; 図 1 c 参照) には示さないことを明らかにすることができた。従って、sDMA を 1 個のみ、SmD3 の決められた位置 (アミノ酸 112) に導入することにより、特異性を失うことなく、このペプチド (¹⁰⁸ A A R G s d R G R G M G R G N I F ^{1 2 2}; S33、配列番号 2) の感度を増強することができた。この候補ペプチドをその後、可溶性抗原として合成し、ELISA における基質として使用した。

20

【0031】

SLE 患者群の免疫血清学的性質

発明者らの SLE 患者コホートが典型的な SLE 血清パネルを示すか否かを評価するために、約 100 検体の SLE 試料を無作為に選択し、U1 - 68 kD、U1 - A、U1 - C、SmBB'、SmD、Ro - 52 / SS - A、Ro - 60 / SS - A、La / SS - B、ヒストン dsDNA 及び 2 - 糖タンパク質反応性 (Split ANA - Prof il research assay, Pharmacia Diagnostics, Freiburg, Germany) について試験した。様々な自己抗体の保有率は、先行研究と十分一致していた (Jaekelら、2001)。従って、それらの自己抗体プロファイルに関して、本 SLE コホートは、典型的な SLE 集団であると思われる。この SLE パネルの測定結果を表 1 にまとめる。

30

【0032】

表 1 . SLE 患者における臨床的に意義のある自己抗体特異性の保有率 (%) (n = 101)

40

【0033】

【表1】

表1. SLE患者における臨床的に意義のある自己抗体特異性の保有率(%) (n=101)

自己抗体										
U1- 68	U1- A	U1- C	SmBB	Sm D	Ro- 52	Ro- 60	ヒストン La e	dsDN A	β2- 糖タンパク質 n	
15.	24.	25.			21.	47.	21.			
8	8	7	21.8	15.8	8	5	8	37.6	51	17

10

【0034】

抗-S33ペプチド ELISA

S P O Tアッセイにおいて最高の感度及び特異性を示した15個のアミノ酸可溶性ペプチド(108 A A R G s d R G R G M G R G N I F 1 2 2、配列番号2)を、技術的な理由でC-末端にCysを追加することにより合成した。このペプチドをその後、Varellisa^(R)テスト(Pharmacia, Freiburg, Germany)の一般プロトコールに基づきELISAシステムを開発するために使用した。

【0035】

アッセイの性能特性

アッセイの性能特性の精密度を評価するために、再現性及び直線性を分析した。3種類の試料のアッセイ内及びアッセイ間の変動(CV%)は、それぞれ、1.82%から6.52%及び2.27%から7.42%の範囲であることが分かった。2つの試料の連続希釈物から、5回の連続希釈の範囲で直線性が示された(>20% 偏差)。カットオフの定義のために、SLE及び対照血清を用いて受信者動作特性(ROC)解析を行った。アッセイ内及びアッセイ間変動(a.)、直線性(b.)、ROC-解析、PPV、NPV及び効率(c.)を含む新規の抗-S33試験のアッセイ性能特性を図2(a-c)にまとめる。

20

【0036】

この新規テストの診断適合率を評価するために、13U/mlの技術的カットオフを使用して、特異性を高くして感度を中程度にした。176名のSLE患者、181名のSLE以外の診断を受けた自己免疫疾患患者、77名の感染症患者及び192名のヒト健常供血者から得た血清を、この新規ELISAシステムで分析した。28名のSLE患者(15.9%)において、平均値43U/ml(SD=160.2U/ml)、最高で952U/mlまで反応性が著しく上昇し、抗-S33抗体に対して陽性であると分析された。関連疾患の患者では、この新規ELISAシステムにおいて反応性が著しく低いことが分かった(平均3.36U/ml)。RA群でただ1名の患者のみ、陽性と分析された(24.6U/ml)。SSc(n=26)、PM/DM(n=13)、MCTD(n=126)又は感染症(n=77)患者を含め、残りの対照は、このS33ペプチドに対する反応性を示さなかった。健常供血者と比較しても(平均2.21U/ml;最高値11.5U/ml)、感染症患者由来の試料は反応性が低い(平均0.67U/ml;最高値3.3U/ml)ことが分かった。感染症患者血清の最高値は、EBV群で見られた。この結果を表2にまとめる。

30

40

【0037】

表2. SLE及び様々な対照血清に対するS33を使用したELISAの結果

【0038】

【表2】

表2. SLE及び様々な対照血清に対するS33を使用したELISAの結果

	抗-S33陽性 血清数(%)	平均値 (U/ml)	最高値 (U/ml)
<i>SLE (n=176)</i>	28 (15.9)	43.0	1190.0
リウマチ疾患 (181)	1 (0.6)	2.2	24.6
<i>RA (86)</i>	1 (1.2)	1.6	24.6
<i>pSS (24)</i>	0	1.9	3.9
<i>MCTD (26)</i>	0	3.1	12.8
<i>SSc (26)</i>	0	2.4	4.3
<i>PM/DM (13)</i>	0	2.8	9.6
感染症(77)	0	0.67	3.3
<i>HCV (30)</i>	0	0.42	1.1
<i>CMV (22)</i>	0	0.8	3.2
<i>EBV (25)</i>	0	0.78	3.3
健常者(192)	0	2.21	11.5

【0039】

要約すると、SLE群(n=176)のうち15試料及び対照のうち1血清のみ(n=449、0.2%)が陽性と分析され、その結果、診断特異性は99.8%、感度は15.9%となった。PPV及びNPV、ならびに診断効率率は、計算の結果、それぞれ96.6%、75.3%及び76.3%となった(図2c参照)。これらのデータから、抗-S33抗体がSLE患者由来の血清にのみ存在すると思われる。

【0040】

抗-S33ペプチド反応性とは別に、偽陽性ra試料は、u1-rnps-68kDa(比率4.5)、u1-c(比率9.4)及びヒストン(133.8u/ml)に対する抗体のタイターが高い(表3参照)。elisaにより測定した場合、抗-smbb'及び抗-smDタイターは、対照と比較して上昇していたが、依然としてカットオフ値以下であった(表3参照)。

【0041】

表3. 新規S33ペプチドアッセイにおける偽陽性RA患者の自己抗体プロファイル

【0042】

【表3】

表3. 新規S33ペプチドアッセイにおける偽陽性RA患者の自己抗体プロファイル

血清 mID #	対照 ol 群	U1- 68kD *	U1 - A*	U1 - C*	SmBB' *	SmD *	Ro 52 *	Ro 60 *	La *	ヒストン e ¹ [U/ml]	dsDN A ² [U/ml]
R15	Ra	4.5	0.6	9.2	0.8	0.8	0.2	0.7	0.5	133.8	15.6

* 半定量的アッセイ(ANA-Split); カットオフ>1.4

¹ カットオフ(30U/ml)

² カットオフ(55U/ml)

【0043】

他の自己抗体に対する相関

抗-S33抗体と他の自己抗体種との間に存在しうる相関関係について、約100例の無作為選択血清のSLEパネルを用いて統計学的評価を行った。U1-68kDa (p = 0.0335)、U1-A (p < 0.0001)、U1-C (p < 0.0001)、SmB B' (p < 0.0001)、SmD (p < 0.0001)、dsDNA (p < 0.0001) 及びヒストン (p < 0.0001) と有意な相関があったが、Ro-52 (p = 0.2192)、Ro-60 (p = 0.2212) 及びLa (p = 0.8785) とは有意な相関がなかった(表4参照)。

【0044】

表4. SLEにおける抗-S33陽性結果と他のAab種との間の関連

10

【0045】

【表4】

表4. SLEにおける抗-S33陽性結果と他のAab種との間の関連

Aab to	U1-68kD	U1-A	U1-C	SmB B'	SmD	Ro-52	Ro-60	La	ヒストン ne	dsDNA NA	β2-糖タンパク質
S33	8/16	12/2	11/2	11/2	11/1	5/22	12/4	4/22	10/3	13/5	4/16
+		5	6	2	6		8		8	1	
	50%	48%	42.3%	50%	68.8%	22.7%	25%	18.2%	26.3%	25.5%	25%
2-tailed p	0.033	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	0.2192	0.2212	0.8785	<0.0001*	<0.0001*	0.3792

20

ピアソン相関;*統計学的に有意

30

【0046】

Sm複合体に対する反応性に注目すると、無作為選択したSLE患者(n=101)のうち5例が精製SmD抗原と反応したが、S33ペプチドとは反応しなかった。残りの11例のSmD陽性血清(68.8%)も、この新規抗-S33ペプチドELISAにおいて陽性であると分析された。興味深いことに、抗-S33陽性試料のうち、4名の患者(#89、#92、#20627、#9811)の全てが抗-SmD陰性で、それぞれ15.4、21.3、41.3及び13.9ユニットの抗-S33ペプチド反応性を示した。

【0047】

様々な製造元の市販の抗-Sm抗体テストとの相関を評価するために、SLE患者群由来の50検体の無作為選択SLE血清及び100検体の対照を、様々な製造元の抗-Sm抗体テストを用いて試験した。この抗-S33抗体テストにおいて50検体のSLE血清のうち6検体(12%)が陽性となったが対照では陽性になつたものはなく(0%)、その結果、12%の感度及び100%の特異性となった。一方、様々な製造元の抗-Smアッセイ、SmテストA、B及びCでは、わずか5検体のSLE試料(10%)しか陽性とならず、対照群の患者では、6検体(SmテストA、C)から12検体(SmテストD)が陽性となった。偽陽性となった結果のほとんどがMCTD患者の群で見られた(表5参照)。

40

【0048】

表5. 様々な製造元のテストにおける対照血清(主にMCTD)の反応性

50

【0049】

【表5】

表5. 様々な製造元のテストにおける対照血清 (主にMCTD) の反応性

血清			免疫アッセイ				
番号	ID	診断	Vare lisa (R) (R) S33 U/ml 13#	Sm Test A RE 20#	Sm Test B ユニット 40#	Sm Test C 比 1#	Sm Test D 比 1#
105	25516	MCTD	3.0	87.9	118.8	1.1	4.8
107	22518	MCTD	1.0	14.4	37.5	0.3	1.4
108	22519	MCTD	0.0	6.7	52.0	0.9	2.7
110	25521	MCTD	0.5	87.4	111.7	1.5	4.2
112	25523	MCTD	0.0	21.6	34.1	0.6	0.3
121	25532	MCTD	2.6	7.4	26.9	0.3	3.5
123	25534	MCTD	1.1	10.5	41.7	0.6	2.3
126	25537	MCTD	3.2	7.2	41.4	0.3	0.3
128	25539	MCTD	0.7	4.2	67.1	0.5	3.7
129	25540	MCTD	4.1	118.5	132.4	2.4	3.1
132	25543	MCTD	2.4	12.8	42.7	0.3	2.3
133	25544	MCTD	9.9	136.0	153.7	7.9	5.4
		; SLE					
137	25448	Ssc	2.2	72.2	105.3	1.2	2.8
145	25456	MCTD	1.1	8.4	30.9	0.3	1.5

#カットオフ値を示す。

【0050】

SLE患者の追跡研究

男性SLE患者を臨床的及び血清学的に18ヶ月の期間にわたり観察した(6検体の血清試料; 図3参照)。追跡研究の最初に、この患者はRNP/Sm複合体(比率18)、Sm抗原(比率6)、新規Sm抗原(337.5U/ml)に対して強い免疫反応を示し、単離U1-RNP複合体(比率2)ならびにヒストン(59.5U/ml)に対して中程度の反応を示した。dsDNAに対する反応性は見られなかった(19.1U/ml; カットオフ値55U/ml)。その時点で、医療記録によると、疾患の非活動フェーズであると報告されていた。後に、新規Sm抗原に対する抗体に対する抗体力価が顕著に上昇し、1999年8月に採取した3番目の血清試料においてピークに到達した。一方、抗-RNP/Smタイターは、2番目と4番目の血液試料との間で上昇が観察され、5番目の試料においてさらに強い上昇が見られた。その時点で、新規Sm抗原(S33)に対するタイターは、以前よりも低下しており、疾患の状態は、医療記録によると非活動として報告されていた。その患者の観察期間中に抗-dsDNA及び抗-ヒストンタイターにおいては顕著な変化が観察されなかった。

【0051】

示した実施例において、Sm抗原D1及びD3に対して、抗-Sm免疫反応を分析したが、これらはSLE特異的ポリペプチドと考えられる(van Venrooijら、1991; Hochら、1999)。固定化ペプチドを用いて、両自己抗原においてアルギニン残基の対称ジメチル化が主要なB細胞エピトープの形成に重要な役割を果たすことが示された。この観察は、Braahmsら(2000)の結果とよく一致しており、従っ

10

20

30

40

50

て、R i e m e k a s t e n及び共同研究者ら(1998)の知見とは矛盾していた。興味深いことに、先行研究に加えて、既に述べたように、ペプチドに関して、S m D 3ペプチドはS m D 1由来のものよりも特異性が高いことが分かった。

【0052】

M c C l a i n及び共同研究者ら(2002)は、S m D 3の4個の抗原性領域について述べているが、そのうち抗原領域4は、104-126の領域を包含している。この発明において、ピン上で合成したペプチドを分析に供したが、アルギニンの修飾型は用いなかった。本発明において、この領域内の反応性は、天然アルギニンをs D M Aに置換した場合にのみ見られる。これらの矛盾する結果は、異なる血清、方法の使用及び/又はペプチドの長さが様々であることにより説明できるであろう。5種類の血清のうち3種類が、この実施例のペプチド、¹⁰⁸ A A s d R G s d R G s d R G M G s d R G N I F ¹²² (配列番号3)を特異的に認識した。

10

【0053】

興味深いことに、決められた位置(a a 112)で1個のアルギニンのみをジメチル化することにより、特異性を失うことなく、この特定のミモトープペプチドの感度をさらに向上させることができる。このデータに基づき、候補ペプチド(¹⁰⁸ A A R G s d R G R G M G R G N I F ¹²²、配列番号2)を使用してE L I S Aシステムを開発した。この新規抗-S mアッセイ(抗-S 33)は、ループスに対して14.9%の感度及び99.7%の特異性を示し、その結果、陽性的中率(P P V; 93.7%)及び陰性的中率(N P V; 80.2%)が高くなり、したがって高い診断効率(80.7%)が得られたことが示された。したがって、相関研究により明らかになったように、このテストにより、全身性エリテマトーデス診断、特にS L EとM C T Dとの鑑別に対する新たな機会が得られる。

20

【0054】

同定されたS m - エピトープの生化学的特性に着目すると、p IがS m複合体の抗原性の予想因子とみなすことができることが分かる。U 1 - R N P - A、S m B '及びD 1において、抗原性領域の平均p Iは、10.4(非抗原性領域は6.0)であり、S m D 2及びD 3では、p Iが9.0を超えていた(M c C l a i nら、2002)。これらの独創的な知見は、S 33ペプチドのp Iが高値(>12.88)であることとよく一致する。塩基性の性質であることが単純にこれらの領域の表面露出、つまり抗体へ接触の可能性を上昇させているだけであるか否かについて、さらに調べる必要がある。

30

【0055】

E B V、E B V A及び抗-S m D抗体

S m D 1におけるエピトープマッピング研究により、エプスタインバーウイルス核抗原1(E B N A - 1)の相同配列35-58と交差反応するエピトープモチーフ(a a 95-119)が同定された(S a b b a t i n i ら、1993; S a b b a t i n i ら、1993; M a r c h i n i ら、1994)。さらに最近の研究により、このエピトープがグリシンアルギニンリピート(R G R G R G M G R)を含有するS m D 3の相同領域とも交差反応することが示された(M c C l a i nら、2002)。さらに、G P R R(S m D 1のa a 114-119)が共通の交差反応性自己エピトープモチーフを表し、それはE B N A - 1においてだけでなく、C E N P - A、B、C、S m B B '、S m D 1及びR o - 52(これらはごく一部である。)を含む様々な自己抗原においても存在することが明らかになった(M a h l e r ら、2001)。したがって、感染性単核球症又はS L E関連疾患の患者は、S m D 1又はS m D 3のC - 末端伸長を用いたE L I S Aにおいて偽陽性となる可能性がある。さらに、あるいくつかの研究から、ループス様状態の進行におけるE B Vの影響が示唆される(J a m e s ら、1997)。したがって、E B V陽性血清を対照として使用することは、特異性及び信頼性が高い抗-S m D免疫アッセイに向けての重要な発見であると考えられる。提示された25例のE B V疾患対照の中で偽陽性の試料が見られなかったことから、抗-S 33 - a b sアッセイが高い特異性を有するという示唆が裏付けられる。残念ながら、R i e m e k a s t e n及び共同研究者ら(1

40

50

998)は、それらのテストの評価にこの患者群を含めていなかった。

【0056】

他の自己抗体種に対する相関

DNAとSm抗原との間で重複する反応性があることを報告している文献がある(Bloomら、1993; Reichlinら、1994; Zhangら、1995)。これらの研究においては全長SmDが使用されているが、一方、本発明においては抗-dsDNA及び抗-S33反応性の相関もあった($p < 0.0001$)。DNAの他に、本発明では、U1-68($p < 0.0001$)、U1-A($p < 0.0001$)、U1-C($p < 0.0001$)、SmBB'($p < 0.0001$)、Sm($p < 0.0001$)及びSmD($p < 0.0001$)に対する抗-S33の正相関も示されたが、ヒストン($p = 0.0259$)、La($p = 0.8747$)、Ro-52($p = 0.4034$)及びRo-60($p = 0.0143$)に対する相関関係は示されなかった。観察された関連性が、交差反応性により生じるのか、又は同時に生じることが多い異なる自己抗体種により生じるのか否かについては依然として分かっていない。この問題をさらに明らかにするために、さらなる研究に取り組む必要がある。

10

【0057】

RiemekastenとBraahms

RiemekastenらとBraahmsらの結果が明らかに矛盾することは、SmD1のC-末端伸長に様々なエピトープが存在することにより説明することが可能であろう。ペプチドaa 83-119(Riemekastenら、1989)は立体エピトープを形成し得るが、一方で、第二の研究で使用された短いペプチドは、直線状の、sDMA依存性結合部位を含有する(Braahmsら、2000)。さらに、SmD1₈₃₋₁₁₉ペプチドと比較して、全長SmD1に対する反応性が低下している(Riemekastenら、1998)ことから、このペプチドエピトープが隠れた構造を示すことが示唆される。この観察により、どのエピトープがインビトロで「見られ」、どのエピトープがSLEの発症機序において中心的役割を果たすのか、という疑問が浮上する。最近の研究において、キャリアタンパク質と融合させたSmD1₈₃₋₁₁₉の注射により、ループス傾向のマウスの発病過程を加速することが可能であることが明らかとなった(Riemekastenら、2001)。

20

【0058】

「ループス」症候群

関節リウマチ(RA)及び全身性エリテマトーデス(SLE)は、自己免疫病因の関連疾患である。両疾患とも、一定の構造に対する自己反応性抗体の出現を伴う。いくつかの研究において、RAとループスとの間の重複する症候群が報告されており、従って、「ループス」症候群と呼ばれることがある(Miyachi及びTan, 1979; Panushら、1988; Brandら、1992)。本実施例において、RA群内で、抗-S33反応性(24.6 U/ml)を示す患者が見出された。この結果が偽陽性の試験結果を反映するか否か、又は本S33ペプチドに対する自己抗体がループス様状態の前駆体となるか否かについては未だ明らかではなく、取り組むべき問題である。

30

【表 6】

参考文献

- Abuaf N, Johanet C, Chretien P, Absalon BI, Homberg JC, Buri JF.** Detection of autoantibodies to Sm antigen in systemic lupus erythematosus by immunodiffusion, ELISA and immunoblotting: variability of incidence related to assays and ethnic origin of patients. *Eur J Clin Invest.* 1990 Aug;20(4):354-9. 10
- Arbuckle MR, Reichlin M, Harley JB, James JA.** Shared early autoantibody recognition events in the development of anti-Sm B/B' in human lupus. *Scand J Immunol.* 1999 Nov;50(5):447-55.
- Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS, et al.** The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1988 Mar;31(3):315-24.
- Arnett FC, Hamilton RG, Roebber MG, Harley JB, Reichlin M.** Increased frequencies of Sm and nRNP autoantibodies in American blacks compared to whites with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1988 Dec;15(12):1773-6 20
- Bloom DD, Davignon JL, Cohen PL, Eisenberg RA, Clarke SH.** Overlap of the anti-Sm and anti-DNA responses of MRL/Mp-lpr/lpr mice. *J Immunol.* 1993 Feb 15;150(4):1579-90.
- Brahms H, Raker VA, van Venrooij WJ, Luhrmann R.** A major, novel systemic lupus erythematosus autoantibody class recognizes the E, F, and G Sm snRNP proteins as an E-F-G complex but not in their denatured states. *Arthritis Rheum.* 1997 Apr;40(4):672-82. 30
- Brahms H, Raymackers J, Union A, de Keyser F, Meheus L, Lührmann R.** The C-terminal RG dipeptide repeats of the spliceosomal Sm proteins D1 and D3 contain symmetrical dimethylarginines, which form a major B-cell epitope for anti-Sm autoantibodies. *J. Biol. Chem.* **275**, 17122-17129, 2000.
- Brahms H, Meheus L, de Brabandere V, Fischer U, Luhrmann R.** Symmetrical dimethylation of arginine residues in spliceosomal Sm protein B/B' and the Sm-like protein LSm4, and their interaction with the SMN protein. *RNA.* 2001 Nov;7(11):1531-42. 40

De Keyser F, Hoch SO, Takei M, Dang H, De Keyser H, Rokeach LA, Talal N. Cross-reactivity of the B/B' subunit of the Sm ribonucleoprotein autoantigen with proline-rich polypeptides. *Clin Immunol Immunopathol* 1992 Mar;62(3):285-90

Gausepohl, H., Behn, C. Automated Synthesis of Solid-Phase Bound Peptides. *In* "Peptide Arrays on Membrane supports, Synthesis and Applications" (J. Koch and M. Mahler, Eds), pp.55-68, Springer Verlag, Heidelberg, New York, 2002.

Greidinger EL, Hoffman RW. The appearance of U1 RNP antibody specificities in sequential autoimmune human antisera follows a characteristic order that implicates the U1-70 kd and B'/B proteins as predominant U1 RNP immunogens. *Arthritis Rheum.* 2001 Feb;44(2):368-75.

10

Hirakata M, Craft J, Hardin JA. Autoantigenic epitopes of the B and D polypeptides of the U1 snRNP. Analysis of domains recognized by the Y12 monoclonal anti-Sm antibody and by patient sera. *J Immunol.* 1993 Apr 15;150(8 Pt 1):3592-601.

Hoch SO, Eisenberg RA, Sharp GC. Diverse antibody recognition patterns of the multiple Sm-D antigen polypeptides. *Clin Immunol.* 1999 Aug;92(2):203-8.

20

Hoch, S. O., The Sm antigens. In „Manual of biological Markers of disease“ (R. N. Maini and W.J. van Venrooji, Eds.), pp. B2.4/1-29, Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands, 1994.

Jackel HP, Klopsch T, Benkenstein B, Grobe N, Baldauf A, Schoessler W, Werle E. Reactivities to the Sm Autoantigenic Complex and the Synthetic SmD1-aa83-119 Peptide in Systemic Lupus Erythematosus and other Autoimmune Diseases. *J Autoimmun.* 2001 Dec;17(4):347-54.

30

James JA, Kaufman KM, Farris AD, Taylor-Albert E, Lehman TJ, Harley JB. An increased prevalence of Epstein-Barr virus infection in young patients suggests a possible etiology for systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest.* 1997 Dec 15;100(12):3019-26.

Lehmeier T, Raker V, Hermann H, Luhrmann R. CDNA cloning of the Sm proteins D2 and D3 from human small nuclear ribonucleoproteins: Evidence for a direct D1-D2 interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1994 Dec; 91:12317-12321

Lerner MR, Boyle JA, Mount SM, Wolin SL, Steitz JA. Are snRNPs involved in splicing? *Nature.* 1980 Jan 10; 283(5743):220-4.

40

- Mahler M, Mierau R, Schlumberger W, Bluthner M.** A population of autoantibodies against a centromere-associated protein A major epitope motif cross-reacts with related cryptic epitopes on other nuclear autoantigens and on the Epstein-Barr nuclear antigen 1. *J Mol Med* 79, 722-31
- Marchini B, Dolcher MP, Sabbatini A, Klein G, Migliorini P.** Immune response to different sequences of the EBNA I molecule in Epstein-Barr virus-related disorders and in autoimmune diseases. *J Autoimmun.* 1994 Apr;7(2):179-91. 10
- McClain MT, Ramsland PA, Kaufman KM, James JA.** Anti-sm autoantibodies in systemic lupus target highly basic surface structures of complexed spliceosomal autoantigens. *J Immunol.* 2002 Feb 15;168(4):2054-62.
- Panush RS, Edwards NL, Longley S, Webster E.** 'Rhus' syndrome. *Arch Intern Med.* 1988 Jul;148(7):1633-6.
- Reichlin M, Martin A, Taylor-Albert E, Tsuzaka K, Zhang W, Reichlin MW, Koren E, Ebling FM, Tsao B, Hahn BH.** Lupus autoantibodies to native DNA cross-react with the A and D SnRNP polypeptides. *J Clin Invest.* 1994 Jan;93(1):443-9. 20
- Riemekasten G, Marell J, Trebeljahr G, Klein R, Hausdorf G, Haupl T, Schneider-Mergener J, Burmester GR, Hiepe F.** A novel epitope on the C-terminus of SmD1 is recognized by the majority of sera from patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest.* 1998 Aug 15;102(4):754-63.
- Riemekasten G, Kawald A, Weiss C, Meine A, Marell J, Klein R, Hocher B, Meisel C, Hausdorf G, Manz R, Kamradt T, Burmester GR, Hiepe F.** Strong acceleration of murine lupus by injection of the SmD1(83-119) peptide. *Arthritis Rheum.* 2001 Oct;44(10):2435-45. 30
- Roeach LA, Haselby JA, Hoch SO.** Molecular cloning of a cDNA encoding the human Sm-D autoantigen. *Proc. Natl. Acad. Sci* 1988 Jul; 85(13): 4832-6
- Rokeach LA, Jannatipour M, Haselby JA, Hoch SO.** Mapping of the immunoreactive domains of a small nuclear ribonucleoprotein-associated Sm-D autoantigen. *Clin Immunol Immunopathol.* 1992 Dec;65(3):315-24.
- Rokeach LA, Hoch SO.** B-cell epitopes of Sm autoantigens. *Mol Biol Rep.* 1992 Jun;16(3):165-74. Review. 40

Sabbatini A, Bombardieri S, Migliorini P. Autoantibodies from patients with systemic lupus erythematosus bind a shared sequence of SmD and Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen EBNA I. *Eur J Immunol* 1993 May;23(5):1146-52

Sabbatini A, Dolcher MP, Marchini B, Bombardieri S, Migliorini P. Mapping of epitopes on the SmD molecule: the use of multiple antigen peptides to measure autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 1993 Oct;20(10):1679-83.

Seraphin B. Sm and Sm-like proteins belong to a large family: identification of proteins of the U6 as well as the U1, U2, U4 and U5 snRNPs. *EMBO J.* 1995 May 1;14(9):2089-98.

Tan EM, Kunkel HG. Characteristics of a soluble nuclear antigen precipitating with sera of patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 1966 Mar;96(3):464-71.

Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, Schaller JG,

Talal N, Winchester RJ. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1982 Nov;25(11):1271-7.

von Muhlen CA, Tan EM. Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases. *Semin Arthritis Rheum.* 1995 Apr;24(5):323-58. Review.

Ou Y, Sun D, Sharp GC, Hoch SO. Screening of SLE sera using purified recombinant Sm-D1 protein from a baculovirus expression system. *Clin Immunol Immunopathol.* 1997 Jun;83(3):310-7.

Zhang W, Reichlin M. IgM anti-A and D SnRNP proteins and IgM anti-dsDNA are closely associated in SLE sera. *Clin Immunol Immunopathol.* 1995 Jan;74(1):70-6.

Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma).

Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association

Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. *Arthritis Rheum.* 1980 May;23(5):581-90.

【図面の簡単な説明】

【 0 0 5 9 】

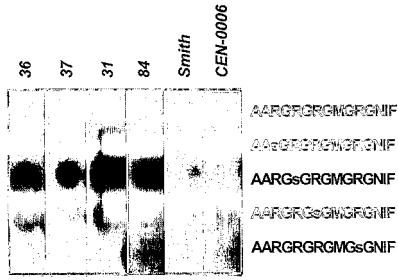
【図 1 a】 SmD 1 及び SmD 3 のエピトープ分析。 SmD 1 (a) 及び SmD 3 (b) の C - 末端伸長をペプチドアレイとして合成し (1 5 マー、 a a カットオフ)、患者の血清を用いて調べた。免疫活性ペプチド番号 7 7 をミモトープ変異体 (c) としてさらに試験した。

【図 1 b】 SmD 1 及び SmD 3 のエピトープ分析。 SmD 1 (a) 及び SmD 3 (b) の C - 末端伸長をペプチドアレイとして合成し (1 5 マー、 a a カットオフ)、患者の血清を用いて調べた。免疫活性ペプチド番号 7 7 をミモトープ変異体 (c) としてさらに試験した。

【図 1 c】 SmD 1 及び SmD 3 のエピトープ分析。 SmD 1 (a) 及び SmD 3 (b) の C - 末端伸長をペプチドアレイとして合成し (1 5 マー、 a a カットオフ)、患者の血清を用いて調べた。免疫活性ペプチド番号 7 7 をミモトープ変異体 (c) としてさらに試験した。

【図 1 c】

Fig. 1.c.)



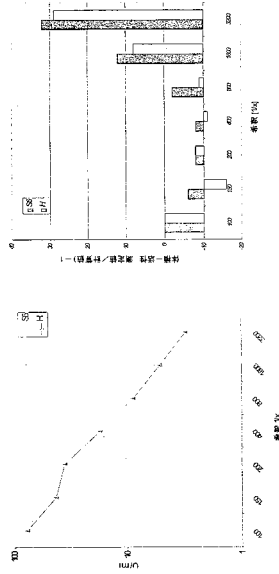
【図 2 a】

Fig. 2a

	抗体濃度		
	低	中	高
アッセイ内			
平均[U/ml]	7.1	36.3	83.8
CV (%)	1.82	3.79	6.52
アッセイ間			
平均[U/ml]	7.48	36.54	91
CV (%)	3.97	7.42	2.27

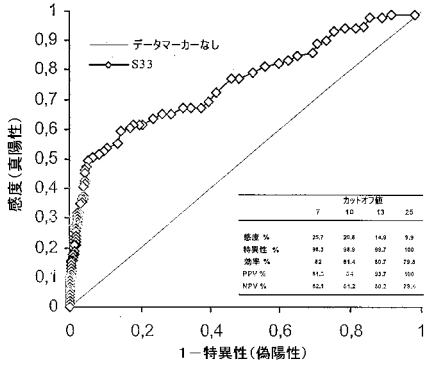
【図 2 b】

Fig. 2b



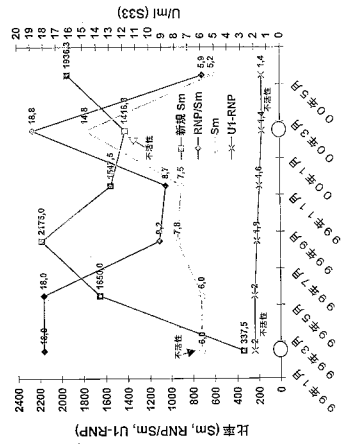
【図 2 c】

Fig. 2c



【図 3】

Fig. 3



フロントページの続き

(72)発明者 マーラー, ミヒヤエル

ドイツ国、4 1 4 6 8 ・ノイス、ポナーシュトラークセ・2 1 6

審査官 松田 芳子

(56)参考文献 特表2 0 0 1 - 5 0 5 7 8 5 (J P , A)

J. Biol. Chem. , 2 0 0 0 年, Vol.275 , p.17122-9

Muscle Nerve , 2 0 0 1 年, Vol.24 , p.701-4

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C07K 7/0

CA/REGISTRY(STN)

专利名称(译)	分析方法和试剂盒		
公开(公告)号	JP4769712B2	公开(公告)日	2011-09-07
申请号	JP2006508002	申请日	2004-04-02
[标]申请(专利权)人(译)	基于机管局华天		
申请(专利权)人(译)	Fuadeia基于		
当前申请(专利权)人(译)	Fuadeia基于		
[标]发明人	マーラーミヒヤエル		
发明人	マーラー,ミヒヤエル		
IPC分类号	C07K7/08 G01N33/53 G01N33/564 C07K14/47 C07K14/525		
CPC分类号	C07K14/525 C07K14/4713 G01N33/564 G01N2800/104		
FI分类号	C07K7/08.ZNA G01N33/53.N G01N33/564.Z		
代理人(译)	小野 诚 金山 贤教 Masarushin大崎		
审查员(译)	松田良子		
优先权	0300958 2003-04-02 SE		
其他公开文献	JP2007528840A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明包括对称的二甲基化精氨酸，并构成系统性红斑狼疮（SLE）患者血清中存在的抗体的免疫决定因子，并且与所述抗体反应需要甲基化。涉及一种肽是。本发明还涉及所述肽用于SLE诊断和SLE与MCTD之间分化的用途。

