

(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2009-505049

(P2009-505049A)

(43) 公表日 平成21年2月5日(2009.2.5)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/564 (2006.01)	GO 1 N 33/564 B	4 C 0 8 4
CO 7 K 14/78 (2006.01)	CO 7 K 14/78 Z N A	4 H 0 4 5
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 7 5	
GO 1 N 33/536 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 4 5 A	
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	GO 1 N 33/536 B	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 23 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2008-525592 (P2008-525592)	(71) 出願人	508042065 プロコラーゲン オーワイ フィンランド F I - 9 0 5 0 0 オウル 、レートランタ 1 7
(86) (22) 出願日	平成18年8月10日 (2006. 8. 10)	(74) 代理人	100064447 弁理士 岡部 正夫
(85) 翻訳文提出日	平成20年3月25日 (2008. 3. 25)	(74) 代理人	100085176 弁理士 加藤 伸晃
(86) 国際出願番号	PCT/FI2006/000275	(74) 代理人	100094112 弁理士 岡部 譲
(87) 国際公開番号	W02007/017556	(74) 代理人	100096943 弁理士 白井 伸一
(87) 国際公開日	平成19年2月15日 (2007. 2. 15)	(74) 代理人	100091889 弁理士 藤野 育男
(31) 優先権主張番号	20050814		
(32) 優先日	平成17年8月11日 (2005. 8. 11)		
(33) 優先権主張国	フィンランド (FI)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 関節リウマチにおいて形成される自己抗体を検出するための方法

(57) 【要約】

I型コラーゲンおよびII型コラーゲンのC-テロペプチド由来のシトルリン化ペプチドに対して反応する自己抗体が、関節リウマチを有する患者において見出される。これらは、I型コラーゲンの1鎖由来の配列 - Y Y X A もしくは 2鎖由来の配列 - F Y X A、またはII型コラーゲンの1鎖由来の配列 - Y M X A (式中、Xはシトルリンである) を検出する。これらの抗体は、抗フィラグリン抗体とは異なる。本発明のペプチドは、関節リウマチの診断において使用できる。シトルリン化ペプチドの経口投与は、寛容を誘導し、関節リウマチの治療を導き得る。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

関節リウマチに関連して形成された自己抗体を検出するための方法であって、

1種または複数の免疫複合体の形成に適した条件下で1種または複数のペプチドを生体液試料と接触させるステップ、および

形成された自己抗体を検出し、その量を任意選択で測定するステップからなり、

前記ペプチドが、

I型コラーゲンの1鎖のカルボキシ末端テロペプチド由来の配列からなるペプチド、

I型コラーゲンの2鎖のカルボキシ末端テロペプチド由来の配列からなるペプチド、

II型コラーゲンの1鎖のカルボキシ末端テロペプチド由来の配列からなるペプチド

10

からなる群から選択され、ペプチド配列中の少なくとも最後のアルギニン残基がシトルリンに変換されている、方法。

【請求項 2】

ペプチド(1種または複数)が、-YYXA、-FYXAおよび-YYMAからなる群から選択される配列で終わり、Xがシトルリンである、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

ペプチド(1種または複数)が組織コラーゲンから単離され、アルギニン(1種または複数)が*in vitro*でシトルリン(1種または複数)に変換される、請求項1または2に記載の方法。

20

【請求項 4】

ペプチド(1種または複数)が、部分的または完全に合成ペプチドである、請求項1または2に記載の方法。

【請求項 5】

ペプチド(1種または複数)の長さが、10~50アミノ酸、好ましくは12~30アミノ酸である、請求項1乃至4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 6】

ペプチド(1種または複数)が、EK AHDGGRYYXA(配列番号1)、YDFGYDGD FYXA(配列番号2)およびEKGPDP LQYYMA(配列番号3)からなる群から選択される配列を含み、Xがシトルリンである、請求項1乃至5のいずれか1項に記載の方法。

30

【請求項 7】

生体液試料が、血清試料または滑液試料である、請求項1乃至6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 8】

ペプチド(1種または複数)が、放射性標識、発光標識、蛍光標識、ランタニドおよび酵素からなる群から選択される標識を含む、請求項1乃至7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 9】

ペプチドと生体液試料との間の免疫反応が固相中で実施され、ペプチドが、試験管もしくはプレートまたは対応する固相に直接的または間接的に結合する、請求項1乃至8のいずれか1項に記載の方法。

40

【請求項 10】

ペプチドと生体液試料との間の免疫反応が液相中で実施され、ペプチド配列が液体中で固体粒子に直接的または間接的に結合する、請求項1乃至9のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 11】

ELISAアッセイにおける吸光度の強度として、自己抗体が検出されるかまたは自己抗体の量が測定される、請求項1乃至10のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 12】

50

化学発光アッセイにおける放射光として、自己抗体が検出されるかまたは自己抗体の量が測定される、請求項 1 乃至 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

結合したシトルリンペプチドが、結合したアルギニンペプチドと比較されるように、自己抗体が検出されるかまたは自己抗体の量が測定される、請求項 1 乃至 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

可溶性シトルリンペプチドからなるアッセイ溶液中で、自己抗体が検出されるかまたは自己抗体の量が測定される、請求項 1 乃至 13 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 15】

I 型コラーゲンの 1 鎖のカルボキシ末端テロペプチド由来の配列をからなるペプチド、
I 型コラーゲンの 2 鎖のカルボキシ末端テロペプチド由来の配列からなるペプチド、
II 型コラーゲンの 1 鎖のカルボキシ末端テロペプチド由来の配列からなるペプチド、
からなる群から選択されるシトルリン化ペプチドであって、ペプチド配列中の少なくとも最後のアルギニン残基がシトルリンに変換されている、ペプチド。

【請求項 16】

- Y Y X A、- F Y X A および - Y M X A からなる群から選択される配列で終わり、X がシトルリンである、請求項 15 に記載のシトルリン化ペプチド。

【請求項 17】

ペプチド (1 種または複数) の長さが、10 ~ 50 アミノ酸、好ましくは 12 ~ 30 アミノ酸である、請求項 15 または 16 に記載のシトルリン化ペプチド。

【請求項 18】

ペプチド配列が、E K A H D G G R Y Y X A (配列番号 1)、Y D F G Y D G D F Y X A (配列番号 2) および E K G P D P L Q Y M X A (配列番号 3) からなる群から選択される配列からなる、請求項 15 乃至 17 のいずれか 1 項に記載のシトルリン化ペプチド。

【請求項 19】

請求項 15 乃至 18 のいずれか 1 項に記載の少なくとも 1 種のシトルリン化ペプチドを含む、キット。

【請求項 20】

請求項 15 乃至 18 のいずれか 1 項に記載のペプチドの少なくとも 1 種の有効量を含む、医薬組成物。

【請求項 21】

経口投与または注射に適している、請求項 20 に記載の医薬組成物。

【請求項 22】

1 ~ 50 μg / 日、好ましくは 1 ~ 25 μg / 日の量で患者に投与される、請求項 20 または 21 に記載の医薬組成物。

【請求項 23】

関節リウマチを治療するための方法であって、そのような治療を必要とする個体に請求項 15 乃至 18 のいずれか 1 項に記載のペプチドの少なくとも 1 種の有効量を投与することを含む、方法。

【請求項 24】

I 型および / または II 型コラーゲンに対する免疫寛容を誘導するための方法であって、そのような治療を必要とする個体に請求項 15 乃至 18 のいずれか 1 項に記載のペプチドの少なくとも 1 種の有効量を投与することを含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、関節リウマチ (RA) を有する患者において見出される自己抗体を検出する

10

20

30

40

50

ための方法に関する。

【背景技術】

【0002】

関節リウマチは、世界人口の約1%が罹患している一般的な自己免疫疾患である。この疾患は、早期段階で認識することが難しく、この疾患は次に、軟骨を破壊することおよび関節周囲の骨のびらんを導くことによって、関節における不可逆的な損傷へと進行する。

【0003】

シトルリンは、酵素ペプチジルアルギニンデイミナーゼ(PAD)によって、ペプチドまたはタンパク質中のアルギニンから翻訳後に形成されるアミノ酸である。RA患者におけるいくつかの自己抗体はシトルリンを含むタンパク質に対するものである。この構造は、リウマチ学においてかなりの注意を引いてきた。最初のこのような自己抗体は、早くも1964年にはNeinhuisおよびMandemaによって記載された、抗核周囲因子(APF)であった(Ann Rheum Dis 1964; 23:302~305頁)。この抗原は、ヒト頰粘膜細胞の核の周囲のケラトヒアリン顆粒中に存在する。1979年に、Youngら(BMJ 1979; 2:97~99頁)は、ラット食道の切片を使用した間接的免疫蛍光によって、抗ケラチン抗体(AKA)を発見した。Schellekensら(J Clin Invest 1998; 101:273~281頁)およびGirbal-Neuhauserら(J Immunol 1999; 162:585~594頁)は後に、APFおよびAKAの両方が、シトルリン残基を含む(プロ)フィラグリンに特異的に結合することを、独立して示した。これらの自己抗体は、American College of Rheumatologyによって提唱された分類基準の1つを構成する特定の従来自己抗体(例えば、リウマチ因子)よりも、RAに対して特異的である(Arnettら、Arthritis Rheum 1988; 31:315~324頁)。他方、それらの特異性に起因して、シトルリン化タンパク質に対する抗体は、RAの病因および/または病原に關与し得ると推測されてきた(van Boekelら、Arthritis Res 2002; 4:87~93頁)。しかし、抗シトルリン化フィラグリン抗体の産生が疾患の発病に先立つという事実は、シトルリン化および/または抗シトルリン化フィラグリン抗体がそれ自体病原性であるという単純な仮説と矛盾している(Yamadaら、Front Biosci 2005; 10:54~64頁)。例えば、関節周囲の組織における軟骨の深在性の破壊および骨びらは、これらの自己抗体によっては誘導できない。

【0004】

シトルリン化タンパク質に対する自己抗体の結合は、いくつかの方法によって検出され得る。最初に使用された免疫染色法は、臨床検査室において慣用的に使用するには適していなかったが、後に、環状シトルリン化ペプチドを抗原(抗CCP)として用いた酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)の導入は、良好な再現性でこのような抗体の決定を大いに簡略化した(Schellekensら、Arthritis Rheum 2000; 43:155~163頁)。抗CCP抗体の存在は、見た目には健康な個人におけるRAの発症(Rantapaa-Dahlqvistら、Arthritis Rheum 2003; 48:2741~2749頁およびNielenら、Arthritis Rheum 2004; 50:380~386頁)およびRAへの未分化関節炎の進行(van Gaalenら、Arthritis Rheum 2004; 50:709~715頁)を予測することが報告されている。これらの抗体の病原の役割に関する可能な手がかりには、アポトーシスとシトルリン化との関連、臨床症状の発生前の抗CCP抗体の出現およびRAに対するそれらの特異性、ならびにRAに関連するシトルリン化の増加を導く示唆された遺伝的リスク因子が含まれる(van Gaalen FAr, Arthritis Rheum 2004; 50:709~715頁を参照のこと)。

【0005】

関節内には抗CCP抗原は存在せず、このことは、これらの抗原と反応する自己抗体はいずれも、免疫交差反応を反映しているに過ぎない可能性が最も高いことを意味する(Y

10

20

30

40

50

amadaら、Front Biosci 2005; 10: 54 - 64頁)。本来の免疫原の可能な候補には、滑膜組織中のフィブリンのシトルリン化された鎖および鎖 (Masson-Bessiereら、J Immunol 2001; 166: 4177 ~ 4184頁)ならびにシトルリン化ビメンチンとして同定されたSa抗原 (Vossenaarら、Arthritis Res Ther 2004; 6: R142 ~ R150)が含まれる。

【0006】

コラーゲンに対する自己免疫は、RAの病原に関与し得ると長く想定されていた。しかし、その証拠は、状況証拠に過ぎない。特定の動物種 (例えば、ラット、マウス、ウサギおよびサル)において、II型コラーゲンでの免疫は、ヒトRAに似た多発性関節炎の発症を生じる。II型コラーゲンは翻訳後に修飾され、これらの修飾 (例えば、264位でのリジンのグリコシル化)のなかには、T細胞により認識され得るものがある (Holmdahlら、Ageing Res Rev 2002; 1: 135 ~ 147頁)。抗コラーゲン抗体は、軟骨コラーゲンに対して形成されるだけではなく、骨 (I型コラーゲン)および軟組織コラーゲン (例えば、III型およびV型コラーゲン)に対しても形成される (Stuartら、Arthritis Rheum 1983; 26: 832 ~ 840頁)。変性コラーゲンに対する抗体は、ネイティブなコラーゲンに対する抗体よりも、RA血清においてより高頻度かつより高濃度で存在する (Nijenhuisら、Clin Chem Acta 2004; 350: 17 ~ 34頁およびNomura K、Arch Biochem Biophys 1992; 293: 362 ~ 369頁)。これらの抗コラーゲン抗体は、決してRAに特異的なのではなく、それらの形成はこの疾患の原因ではなく、結合組織の破壊に対して二次的なものであり得る。

【0007】

数年前、経口投与されたII型コラーゲンによる関節リウマチの治療を扱う多数の論文が刊行された (Trenthamら、Science 1993; 262: 1727 ~ 1730頁)。しかし、これらの実験は何の利益も示さなかった (Cazzolaら、Clin Exp Rheumatol 2000; 18: 571 ~ 577頁)、あるいはごく僅かなRAの疾患の改善しか示さなかったため (Choyら、Arthritis Rheum 2001; 44: 1993 ~ 1997頁)、この仮説における興味はそれ以来失われていた。

【0008】

Burckhardtら (Eur J Immunol 2005; 35: 1643 ~ 1652頁)は、コラーゲンII (CII)が、この軟骨特異的自己抗原に対する自己寛容の破壊を生じ得る、PAD酵素による構造的修飾の基質であり得るか否かという仮説を試験した。その結果は、PAD2 (PADアイソタイプ2)が、自己抗体形成のための免疫優勢なCII領域における、アルギニンのシトルリンへの変換を触媒するという証拠を与え、早期RA患者においてシトルリン化三重螺旋コラーゲンペプチドCIIのアミノ酸残基359 ~ 369に特異的に結合する循環自己抗体の存在を示した。Burckhardtらによれば、彼らの結果は、シトルリン化コラーゲンの自己免疫認識が早期RAにおいて頻繁な事象であることを示している。著者らはさらに、シトルリン化CIIに対するIgG抗体が、RAの早期マーカーとして使用される抗CCP自己抗体の存在と相関するというに、さらに注目している。

【0009】

Suzukiら (Biochem Biophys Res Commun 2005; 33: 418 ~ 426頁)は、免疫スクリーニングによるRA滑膜細胞cDNAライブラリーを使用して、ヒトI型コラーゲンがこの自己抗原の1つであり得ることを見出した。彼らは、I型コラーゲンおよびII型コラーゲンが、シトルリン化の基質として使用されるか否かという仮説を試験した。以前の論文 (Burckhardtら、Eur J Immunol 2005; 35: 1643 ~ 1652頁)の知見とは対照的に、RAにおいてシトルリン化II型コラーゲンに対する特異的抗体は存在しなかったが、シトルリン

10

20

30

40

50

化I型コラーゲンに対する抗体は見出された。

【0010】

抗CCP自己抗体は、関節リウマチに非常に特異的ではあるが、おそらく無害である。なぜなら、この自己抗体は、軟骨および関節周囲の骨の破壊を担い得ないからである。抗CCPに対する公開された第1のアッセイ(マーク1)は、-STXG-(式中、Xはシトルリンである)の配列を有するシトルリン化フィラグリンを検出する(Schellkensら、Arthritis Rheum 2000; 43: 155~163頁)。抗CCPに対する公開された第2のアッセイ(マーク2)は、RA血清とコントロール血清との間の識別に基づいてランダムに作成された合成ペプチドから選択された、いくつかのペプチド配列に基づく(Zendman Aら、Rheumatology 2006、45: 20-5およびKinloch AJら、Expert Rev Clin Immunol 2006; 2: 365~375頁)。これらの配列は公開されていないが、フィラグリンにもヒトの身体において見出される任意の他のタンパク質のいずれにも関係していない。

10

【0011】

Lundbergら(Arthritis Res Ther 2005; 7: R458~R467)は、未修飾ラット血清アルブミン(RSA)と比較して、ラットT細胞およびB細胞の、シトルリン化ラット血清アルブミン(Cit-RSA)に対する応答を試験した。Cit-RSA抗原およびRSA抗原の両方に対して抗体が産生されたことから、Cit-RSAが免疫寛容の破壊を導くことが見出された。しかし、RSA単独では抗体をまったく誘導しなかった。シトルリン化II型コラーゲン(Cit-CII)は、ネイティブの対応物よりも高い発生率およびより早期の発生で、関節炎を誘導した。シトルリン化タンパク質および酵素PAD4の量は、Lundbergらによれば、炎症の重篤度に相関し、健康な関節においては検出不能であった。

20

【0012】

公知のコラーゲンのアミノ酸配列の例は、例えば、データベースEMBL-EBI、ACQ8N473、01-OCT-2002、UniProtKB/TrEMBL、I型コラーゲン 1、前タンパク質、EMBL-EBI、ACQ7Z5S6、01-OCT-2003、UniProtKB/TrEMBL、I型コラーゲン 2、EMBL-EBI、ACQ96IT5、01-DEC-2001、UniProtKB/TrEMBL、COL2A1タンパク質(I型コラーゲン 1)において見出され得る。

30

【0013】

I型コラーゲンの架橋されたカルボキシ末端テロペプチド(ICTP)についてのアッセイは、関節リウマチなどのいくつかの病理的状态においてI型コラーゲン分解の増加を反映していることが示された。ICTPアッセイによって認識される抗原決定基は、ヒトI型コラーゲンの2つの1鎖のカルボキシ末端テロペプチド(ヒトI型コラーゲン中のAGFDFFSL)の疎水性フェニルアラニンリッチ領域内に存在することが、Sassi M.-L.ら(Bone, April 2000; 26(4): 367~373頁)によって示された。Nordic Bioscience diagnostics CrossLaps(登録商標)ELISA(<http://www.nbdiagnostics.com>)アッセイは、骨吸収の評価に使用され得る。これは、破骨細胞の骨吸収の間に生成されるI型コラーゲンフラグメントを検出し、異性体化形態中のエピートープGlu-Lys-Ala-His-Asp-Gly-Gly-Argを含むI型コラーゲン1鎖のC-テロペプチドフラグメントを認識するモノクローナル抗体を使用する。

40

【0014】

関節リウマチを診断する際の使用が示唆されるペプチドを開示する、いくつかの特許公報が存在する。国際特許公開WO95/08115号は、体液中のコラーゲンフラグメントを決定するための方法を記載している。この方法は、架橋のための潜在的な部位を含むコラーゲン由来の合成ペプチドを使用する。米国特許第6355442号においても、コラーゲンフラグメントを決定するための方法が開示されている。国際特許公開WO03/

50

050542号は、関節リウマチに罹患している患者から自己抗体を検出するための方法を記載している。この方法は、XGモチーフおよびX非Gを含むペプチド単位の使用を含み、ここでXは、シトルリン残基またはそのアナログであり、Gはアミノ酸グリシンであり、非Gはグリシン以外のアミノ酸である。国際特許公開WO2004/07898号は、エピトープを共有するMHCクラスII分子に対する親和性が増加したシトルリン化ペプチドを開示している。このようなペプチドは、関節リウマチを診断する際に使用されることが示唆される。国際特許公開WO2004/087747号は、線状シトルリン化合成ペプチドおよびそれらを含む複数の抗原ペプチドを開示している。これらのペプチドは、関節リウマチを診断する際に使用されることが示唆される。

【0015】

- 【非特許文献1】NeinhuisおよびMandema、Ann Rheum Dis 1964; 23: 302~305頁
- 【非特許文献2】Youngら、BMJ 1979; 2: 97~99頁
- 【非特許文献3】Schellekensら、J Clin Invest 1998; 101: 273~281頁
- 【非特許文献4】Girbal~Neuhauserら、J Immunol 1999; 162: 585~594頁
- 【非特許文献5】Arnettら、Arthritis Rheum 1988; 31: 315~324頁
- 【非特許文献6】van Boekelら、Arthritis Res 2002; 4: 87~93頁
- 【非特許文献7】Yamadaら、Front Biosci 2005; 10: 54~64頁
- 【非特許文献8】Schellekensら、Arthritis Rheum 2000; 43: 155~163頁
- 【非特許文献9】Rantapaa-Dahlqvistら、Arthritis Rheum 2003; 48: 2741~2749頁
- 【非特許文献10】Nielenら、Arthritis Rheum 2004; 50: 380~386頁
- 【非特許文献11】van Gaalenら、Arthritis Rheum 2004; 50: 709~715頁
- 【非特許文献12】Masson-Bessiereら、J Immunol 2001; 166: 4177~4184頁
- 【非特許文献13】Vossenaarら、Arthritis Res Ther 2004; 6: R142~R150
- 【非特許文献14】Holmdahlら、Ageing Res Rev 2002; 1: 135~147頁
- 【非特許文献15】Stuartら、Arthritis Rheum 1983; 26: 832~840頁
- 【非特許文献16】Nijenhuisら、Clin Chem Acta 2004; 350: 17~34頁
- 【非特許文献17】Nomura K、Arch Biochem Biophys 1992; 293: 362~369頁
- 【非特許文献18】Trenthamら、Science 1993; 262: 1727~1730頁
- 【非特許文献19】Cazzolaら、Clin Exp Rheumatol 2000; 18: 571~577頁
- 【非特許文献20】Choyら、Arthritis Rheum 2001; 44: 1993~1997頁
- 【非特許文献21】Burckhardtら、Eur J Immunol 2005. 50

35 : 1643 ~ 1652 頁

【非特許文献22】Suzuki S、Bioch Biophys Res Commun 2005 ; 33 : 418 ~ 426 頁

【非特許文献23】Zendman A S、Rheumatology 2006、45 : 20 - 5

【非特許文献24】Kinloch A J S、Expert Rev Clin Immunol 2006 ; 2 ; 365 ~ 375 頁

【非特許文献25】Lundberg S、Arthritis Res Ther 2005 ; 7 : R458 ~ R467

【非特許文献26】Sassi M. - L. S、Bone、April 2000 ; 26 (4) : 367 ~ 373 頁

【特許文献1】国際特許公開WO95 / 08115号

【特許文献2】米国特許第6355442号

【特許文献3】国際特許公開WO03 / 050542号

【特許文献4】国際特許公開WO2004 / 07898号

【特許文献5】国際特許公開WO2004 / 087747号

【非特許文献27】Merrifield、1964. J. Am. Chem. Assoc. 65 : 2149

【非特許文献28】J. Amer. Chem. Soc. 85 : 2149 (1963)

【非特許文献29】Int. J. Peptide Protein Res. 35 : 161 ~ 214 頁 (1990)

【非特許文献30】Methods of Organic Chemistry、E. Wansch (Ed. Vol. 15 pts. I and II. Thieme、Stuttgart (1987))

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0016】

本発明の目的は、関節リウマチを診断するための改善された方法を提供することである。本発明の目的はまた、関節リウマチの治療のためおよびこのような治療をモニタリングするための新規方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0017】

本発明の1つの目的は、関節リウマチに関連する自己抗体を検出するための方法である。この方法は、この疾患の診断において使用され得る。

【0018】

この方法は、関節リウマチを有する患者において自己抗体がコラーゲンペプチドの部分に対して形成されたという知見に基づいている。特に、コラーゲンペプチドのこのような部分はテロペプチドであり、より具体的にはカルボキシ末端テロペプチドである。C - テロペプチドが、-YYXA、-FYXAおよび-YMXA (式中、Xは、シトルリンに変換されたアルギニンを示す)の群から選択されるペプチド配列を含むことが見出された。-YYXAは、I型コラーゲンの1鎖中に見出され、-FYXAは、I型コラーゲンの2鎖中に見出され、-YMXAは、II型コラーゲンの1鎖中に見出された。これらの自己抗体は、フィラグリンに基づく配列を用いて検出されたものとは異なっていた。従って、先行技術 (Schellekens S、Arthritis Rheum 2000 ; 43 : 155 ~ 163 頁)において示唆された抗CCP法は、関節リウマチに関連する正確なペプチド配列を検出できなかった。

【0019】

本発明のさらなる1つの目的は、RAを治療するためのペプチドおよび医薬組成物である。シトルリン化コラーゲンの部分がコラーゲンの潜在的に有害なシトルリン化に対する免疫寛容を誘導し得ることが、本発明において見出された。従って、RA患者は、シトル

10

20

30

40

50

リン化コラーゲンの部分を投与することによって治療され得る。特に、コラーゲンのこのような部分は、テロペプチド、より具体的にはカルボキシ末端テロペプチド由来であった。C-テロペプチドが-Y Y X A、-F Y X Aおよび-Y M X A(式中、Xは、シトルリンに変換されたアルギニンを示す)の群から選択されるペプチド配列を含むことが見出された。

【0020】

先行技術の刊行物は、RAを有する患者における自己抗体形成におけるコラーゲンテロペプチドの役割の研究を開示していない。その理由は、このような自己抗体が、ペプシン消化によって可溶性になったコラーゲン調製物を使用することによって主に試験されてきたからである。このプロテアーゼは、コラーゲンのカルボキシテロペプチドを除去し、従って、先行技術の刊行物の著者らは、テロペプチドの観察をまったくできていなかった。

10

【0021】

さらに、本発明は、本発明のペプチドで治療されたRAを有する患者をモニタリングするために使用され得る。

【0022】

この研究において開発されたアッセイは、自己抗体を検出して患者においてRAを診断するため、および本発明のペプチドで治療されたRAを有する患者をモニタリングするための両方に使用され得る。

【0023】

抗CCP法は、関節リウマチの診断において十分に機能する。しかし、この方法によって検出される自己抗体は、軟骨および骨の分解を担い得ない。従って、薬物による最も積極的な治療を必要とする患者を認識することが重要である。

20

【0024】

関節リウマチを有するかまたは関節リウマチを有すると疑われる患者を治療するために使用される多数の薬物は、いくつかの副作用を引き起こす。従って、この薬物を全ての患者に与えることはできない。患者がシトルリン化コラーゲンに対する抗体を有することが示された場合、これは、最も積極的な様式で患者を治療する理由である。最も最近の薬物は非常に高価でもあり、それらの広範な使用を妨げている。本発明の方法を使用することによって、最も有効な治療を必要とする患者を認識でき、この治療を適正な患者群に与えることができる。

30

【発明を実施するための最良の形態】

【0025】

「関節リウマチ」(RA)は、滑膜炎およびパンヌス形成によって特徴付けられる一般的な自己免疫疾患であり、軟骨および骨の分解を導き得る。

【0026】

3つのクラスのヒトコラーゲンが記載されている。第1の群は、いくつかのコラーゲン型(例えば、I型、II型、III型およびV型)を含む。これらのうち、I型コラーゲンは、有機骨基質の90%より多くを占める。II型コラーゲンは、関節の軟骨中に豊富な分子である。I型コラーゲンおよびII型コラーゲンは、コアコラーゲン分子に結合したN末端およびC末端のプロペプチド配列を含むプロコラーゲンとして合成される。プロペプチドが除去されると、コラーゲン分子の残りのコアは、非螺旋の短い末端テロペプチド配列を有する三重螺旋ドメインからなる。

40

【0027】

用語「自己抗体」は、関節リウマチを有する患者において、アルギニン含有ペプチドまたはそのシトルリン化形態に対して形成された抗体を意味する。これらの自己抗体は、軟骨および骨の分解に関連して形成される。

【0028】

本発明において、特に、カルボキシ末端テロペプチドが自己抗体の検出において使用され得る配列を含むことが見出された。このような配列は、I型コラーゲンの1鎖、I型コラーゲンの2鎖およびII型コラーゲンの1鎖から特異的に見出された。さらに、

50

ペプチド配列中の最後のアルギニン残基がシトルリンに変換されている場合、これらのカルボキシ末端部分由来の配列を含むペプチド配列が、自己抗体の検出において使用されることが見出された。

【0029】

I型コラーゲンの1鎖のカルボキシ末端テロペプチドの長さは、26アミノ酸である。I型コラーゲン2鎖のカルボキシ末端テロペプチドの長さは17アミノ酸であり、II型コラーゲンの1鎖のカルボキシ末端テロペプチドの長さは27アミノ酸である。

【0030】

本発明は、カルボキシ末端テロペプチドのC末端部分のアミノ酸配列を含むペプチドを特に包含する。免疫複合体の形成に適した条件下で生体液試料と接触させた場合に、自己抗体複合体の形成を誘導し得るテロペプチド(1種または複数)の部分が、特に対象となる。

10

【0031】

このペプチドは好ましくは、-YYXA、-FYXAおよび-YMXA(式中、Xはシトルリンである)を含む群から選択される配列で終わる。

【0032】

本発明の最も好ましい実施形態によれば、このペプチドは、EK A H D G G R Y Y X A(配列番号1)、Y D F G Y D G D F Y X A(配列番号2)およびEK G P D P L Q Y M X A(配列番号3)(式中、Xはシトルリンである)を含む群から選択された配列を含むかまたは有する。

20

【0033】

表現「カルボキシ末端テロペプチド由来の配列を含むペプチド配列」とは、そのペプチド配列が、カルボキシ末端テロペプチドと同じ配列を含むか、またはそのペプチド配列が同じ様式でなお機能するようなアミノ酸変化を有していることを意味する。好ましくは、このペプチド配列は、カルボキシ末端テロペプチドと同じ配列を含む。

【0034】

本発明のペプチド配列の長さは、好ましくは10~30アミノ酸、より好ましくは12~27アミノ酸である。好ましくは、それらの長さは少なくとも12アミノ酸、より好ましくは少なくとも17アミノ酸、最も好ましくは少なくとも26アミノ酸である。

【0035】

ペプチド配列は、組織コラーゲンから単離され得、アルギニンは*in vitro*でシトルリンへと変換され得る。精製は、当業者に周知のタンパク質精製方法によって達成され得る。タンパク質精製方法は、例えば、クロマトグラフィー法(例えば、ゲル濾過、イオン交換および免疫親和性、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)、高速等電点電気泳動法ならびに疎水性相互作用クロマトグラフィー)、または沈降、特に免疫沈降である。

30

【0036】

アルギニンは、脱イミノ化を介してシトルリンへと翻訳後修飾され得る。このプロセスは、酵素ペプチジルアルギニンデイミナーゼ(PAD)によって触媒される。この脱イミノ化プロセスは*in vitro*で実施され得る。

40

【0037】

ペプチド配列は、当業者に周知の方法でも合成できる。このような方法は、例えば、固相合成(Merrifield, 1964, J. Am. Chem. Assoc. 65: 2149; J. Amer. Chem. Soc. 85: 2149 (1963)およびInt. J. Peptide Protein Res. 35: 161~214頁(1990))などの化学合成法であるか、またはこの合成は、均質溶液中で実施され得る(Methods of Organic Chemistry, E. Wansch (Ed. Vol. 15 pts. I and II, Thieme, Stuttgart (1987))。

【0038】

ペプチド配列は、当業者に周知の組換えDNA技術によっても調製できる。脱イミノ化

50

プロセスは、酵素ペプチジルアルギニンデイミナーゼ (PAD) を使用することによって *in vitro* で実施され得る。

【0039】

体液試料は、好ましくは、血清試料または別の生体液の試料、例えば、滑液試料である。

【0040】

本発明のペプチド配列は、種々のアッセイにおけるそれらの検出を促進するために、標識で標識してもよい。このような標識の例は、例えば、放射性標識、蛍光標識、発光標識、ランタニドまたは酵素である。

【0041】

ペプチド配列と生体液試料との間の免疫反応は、固相中で実施され得る。これらのペプチドは、金もしくはポリスチレンのマイクロスフィア、スライド、チップまたはマイクロタイタープレートの壁などの固体担体に共有結合または非共有結合によりカップリングさせてもよい。ペプチド配列は、直接的に、または例えばストレプトアビジンを介して間接的に、試験管またはプレートに結合され得る。

【0042】

あるいは、ペプチド配列と生体液試料との間の免疫反応は、液相中で実施してもよく、ペプチド配列は、直接的に、または例えばストレプトアビジンを介して間接的に、固体粒子 (例えば、磁性粒子) に結合させてもよい。

【0043】

本発明は、医薬組成物もまた包含する。この医薬組成物は、少なくとも1つの本発明のペプチド配列の有効量を含む。この医薬組成物は、患者への *in vivo* の投与に適した、生物学的に適合した形態である。このような組成物は、いずれの毒性効果も有すべきではない。医薬組成物は、有効量のペプチド配列および医薬として許容される添加物を含む。添加物とは、ゼラチン、デキストリン、ペクチン、寒天、油、生理食塩水、スクロース、ラクトース、リン酸カルシウムおよび水などの医薬として許容される担体、炭水化物 (例えば、マンニトール、デンプン、スクロース、デキストリン、グルコースおよびソルビトール)、タンパク質 (例えば、カゼインおよびアルブミン) などの安定剤、ならびに緩衝剤を意味する。医薬組成物はまた、1種または複数のアジュバントを含み得る。

【0044】

「有効量」とは、ヒトにおいて所望される結果を達成するために必要な投薬量および期間で有効な量である。所望の結果は、ヒトにおける免疫応答であり、年齢、体重、健康状態、性別または疾患状態に依存し得る。この医薬組成物は、1 ~ 50 μg / 日の量で投与され得る。好ましくは、この量は、1 ~ 25 μg / 日である。投与量は、投与経路、投与時間に依存し得、個体の免疫応答に依存して変動し得る。

【0045】

適切な投与経路は、皮下注射、筋内注射、静脈内注射または腹腔内注射、経口および鼻腔内投与である。最も適切な経路は、経口投与または注射である。

【0046】

関節リウマチを治療するための方法は、そのような治療を必要とする個体に、少なくとも1つの本発明のペプチドの有効量を投与することを含む。投与は、医薬組成物の形態で与えられ得る。

【0047】

I型コラーゲンおよび/またはII型コラーゲンに対する免疫寛容を誘導するための方法は、少なくとも1つの本発明のペプチドの有効量を個体に投与することを含む。

【0048】

キットは、本発明による少なくとも1種のペプチドを含む。試験キットは、本発明による診断方法またはモニタリング方法で使用され得る。

【0049】

本発明の好ましい実施形態によれば、生物学的流体試料中の自己抗体は、本発明のシト

10

20

30

40

50

ルリン化ペプチドでコーティングした固体基板（例えば、マイクロタイタープレート）を使用することによって検出され得る。生体液の試料は、基板上に吸着したペプチドと接触するように配置され、これらと共にインキュベートされる。生物学的試料の非結合物質は、洗浄によって除去される。シトルリン化ペプチド/抗シトルリン化ペプチド抗体複合体中に存在する任意の抗体を結合し得るインジケータ抗体が、固体基板に添加される。このインジケータは、抗ヒトIgG免疫グロブリンであり得る。固体基板上のシトルリン化ペプチド/抗シトルリン化ペプチド抗体/インジケータ抗体複合体の存在が検出される。この検出は、例えば、ルミノメータによって検出される化学発光および放射光に基づき得る。

【0050】

本発明の別の好ましい実施形態によれば、このアッセイは、ELISA法によって実施され、このとき、インジケータ抗体は酵素にコンジュゲートしている。適切な酵素は、例えば、発色基質の使用によって検出できる酵素である。このような酵素は、例えば、アルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼおよび - ガラクトシダーゼである。発色基質は、酵素との反応の結果として着色産物を生じる。この着色産物は、分光分析法によって検出できる。

【0051】

生体液試料中の自己抗体の存在は、例えばELISA法または化学発光イムノアッセイを使用することによって、本発明のペプチドとの免疫反応として検出され得る。生体液中の自己抗体の豊富さは、分光光度計による吸光度の強度またはルミノメータによって定量される化学発光反応の光として測定され得る。本発明のペプチドによるRAの治療は、治療前後で患者における自己抗体の量を比較することによってモニタリングできる。

【0052】

関節リウマチには正常なI型コラーゲンおよびII型コラーゲンに対する抗体も存在するので、シトルリン化形態に対する特異的抗体を検出するために、I型コラーゲンまたはII型コラーゲンのカルボキシテロペプチドのアルギニン含有ペプチドおよびシトルリン含有ペプチドの両方を使用する2つのアッセイを実施すべきである。アルギニン含有ペプチドの吸光度がシトルリン含有ペプチドの吸光度から減算されるか、またはシトルリン含有ペプチドとアルギニン含有ペプチドとの結合比が計算される。あるいは、シトルリン化ペプチドを用いるアッセイバージョンのみを使用して、免疫学的結合の阻害剤としての可溶性形態の同じまたは類似のペプチドの添加ありおよびなしの両方で、それを実施することが可能である。

【0053】

本発明をさらに詳細に説明するために以下に実施例を示すが、本発明の範囲はこれらの実施例によって限定されるものではない。

【実施例1】

【0054】

ELISAアッセイ

120人のRAを有する患者由来の血清試料を、Division of Rheumatology of Oulu University Hospitalから得た。コントロールは、年齢および性別が一致した健康な人由来の81の血清からなった。6対のビオチン化ペプチドを、NeomPS (Strasbourg, France)によって合成した。図1は、ヒトI型コラーゲンおよびII型コラーゲンの一次構造における選択されたペプチドの配列および位置を示す。図1A~Cは、II型コラーゲン中のペプチドCC1~CC4の位置およびそれらの配列を示す。括弧内の数字はアルギニン残基を示す：CC1(1059)、CC2(1048)、CC3(799)およびCC4(28)。コラゲナーゼ切断部位は、図1A中で矢印で示される-GPPGPQG LAGQRGE-(配列番号9)。図1Bは、配列CC1 EKGPDPLQYMXA(配列番号3)、CC2 SAFAGLGPXEKGPD(配列番号6)、CC3 LAGQXGIVGLP(配列番号7)およびCC4 GPMGPXGPPGPA(配列番号8)を示す。X

10

20

30

40

50

はアルギニン/シトルリンである。図1Cは、II型コラーゲンのカルボキシ末端テロペプチドの詳細な構造を示す(GPPは螺旋に属する)。II型コラーゲンのC-テロペプチドは、配列GPGIDMSAFAGLGP REKGP DPLQYMXAを有する。配列GPPGPGIDMSAFAGLGP REKGP DPLQYMXAは、配列番号10として配列表に示される。カルボキシ末端の12アミノ酸は、ペプチドCC1を示す。図1Dは、I型コラーゲンの1鎖(EKAHDGGRYYXA;配列番号1)および2鎖(YDFGYDGDIFYXA;配列番号2)のカルボキシ末端テロペプチドの配列を示す。各対の一方のメンバーは、それぞれの遺伝子によって予測されるアルギニンを含んだが、一方でその対の他方のメンバーでは、このアルギニンはシトルリンで置換されていた。

【0055】

ビオチン化ペプチドを、10 μ g/ウェルの濃度で、ストレプトアビジンでコーティングされた96穴アッセイプレート(BioBind Assembly, Thermo Labsystems Oy, Vantaa, Finland)にカップリングさせた。このカップリングは、室温でpH7.5で2時間実施した。ストレプトアビジンでコーティングしたウェルは、非特異的結合を防止するために、製造者によってブロッキングされたものであった。

【0056】

試験すべき血清を、1%ウサギ血清を補充したアッセイ緩衝液(10mM Tris-HCl、350mM NaCl、1% BSA、1% [体積/体積] Triton X-100、0.5% [重量/体積] デオキシコール酸Na、0.1% SDS; pH7.6)中に希釈し、室温で1時間インキュベートした。洗浄(PBS/0.05% [体積/体積] Tween-20で3回)後、EIA緩衝液(20mM Tris-HCl、150mM NaCl、0.1% BSA、0.05% Tween-20、pH7.5)中に1:7500希釈した、ペルオキシダーゼにコンジュゲートした抗ヒトIgG(Product #31412, Pierce, Rockford, IL, USA)を100 μ l添加した。室温で1時間インキュベートした後、プレートを洗浄した(PBS/Tween-20で3回)。結合した抗体を、基質として3,3'-5,5'-テトラメチル-ベンジジン(Sigma-Aldrich, St. Louis, MN, USA)(100mM 酢酸ナトリウム3水和物、1.5mM クエン酸1水和物、0.0015% H₂O₂中、1ウェル当たり0.01mg/100 μ l)を用いて検出した。30分後、100 μ lの2M硫酸/ウェルを添加することによって反応を停止させた。プレートを、Victor²機器(Wallac, Turku, Finland)中で450nmの波長で読み取り、Multicalc(Wallac)によって計算した。全ての血清は2連で試験した。変動係数は一般に10%未満であった。

【0057】

単一のペプチドを直接分析したところ、RAを有する患者のうち42%~53%が、特にII型コラーゲン由来のペプチドの結合の増加を示した(表1)。

【0058】

表1. ELISAにおけるヒト血清に対するペプチドの結合

10

20

30

40

【表 1】

	コントロール 平均±SD 吸光度	コントロール 平均+2SDを 超えた数	RA患者 平均+2SD を超えた数
$\alpha 1$ (I) のC-テロペ プチド アルギニンペプチドシ トルリンペプチド	0.288±0.142 0.314±0.117	4/81 2/81	6/120ns 24/120***
$\alpha 2$ (I) のC-テロペ プチド アルギニンペプチド シトルリンペプチド	0.692±0.326 0.763±0.356	3/81 3/81	22/120*** 12/120***
CC1= $\alpha 1$ (II) のC- テロペプチド アルギニンペプチド シトルリンペプチド	0.181±0.077 0.155±0.065	2/81 2/81	54/120*** 35/120***
CC2 アルギニンペプチド シトルリンペプチド	0.162±0.053 0.135±0.054	3/81 1/81	50/120*** 25/120***
CC3 アルギニンペプチド シトルリンペプチド	0.182±0.073 0.181±0.067	2/81 2/81	63/120*** 32/120***
CC4 アルギニンペプチド シトルリンペプチド	0.179±0.070 0.184±0.071	3/81 2/81	60/120*** 22/120***

10

20

30

40

50

ⁿ s 有意差なし、コントロールと比較して * * p < 0 . 0 1 および * * * p < 0 . 0 0 1

【 0 0 5 9 】

各ペプチド対を試験したとき、コントロール試料の差異の平均（シトルリン化ペプチドの吸光度値 - アルギニンペプチドの吸光度値）および分散は、CC1について - 0 . 0 2 6 (SD 0 . 0 3 2)、CC2について - 0 . 0 2 7 (0 . 0 2 9)、CC3について - 0 . 0 0 1 (0 . 0 2 6) およびCC4について + 0 . 0 0 5 (0 . 0 2 0)。RA血清のCC3およびCC4のシトルリン化形態への特異的結合は存在しなかった。しかし、RA患者中のペプチドCC2および特にペプチドCC1は差異を示した。なぜなら、ペプチドCC2群中の2つの血清およびペプチドCC1群中の12の血清は、正常なペプチドよりもシトルリン化ペプチドと結合したからである。I型コラーゲンの1鎖について、コントロール試料の差異の平均（シトルリン化ペプチドの吸光度値 - アルギニンペプチドの吸光度値）および分散は、約 + 0 . 0 2 6 (0 . 0 7 4)であった。I型コラーゲン由来の2鎖のC-テロペプチドを用いると、コントロール試料間の差異の平均および分散は、+ 0 . 0 7 1 (0 . 2 5 2)であった。20のRA血清は、それぞれのアルギニンペプチドよりも強力に、I型コラーゲンの1鎖（1 (I) テロペプチド）由来のシトルリン化カルボキシテロペプチドと結合した。

【 0 0 6 0 】

本発明者らは、ペプチドCC1およびより低い程度までペプチドCC2が、シトルリン化タンパク質に対する自己抗体に特異的に結合することを見出した。これらの結果は、アルギニンが、PAD酵素の作用に感受性のカルボキシ末端に近いことを示す。

【実施例 2】

【 0 0 6 1 】

化学発光アッセイ

測定を、ヒト I 型コラーゲンおよび II 型コラーゲンの 1 鎖の合成 C - テロペプチド (それぞれ、NeoMPS、Strasbourg、France 製の EKAHDGGRYYRA (配列番号 4) および EKGPDPLQYMR A (配列番号 5)、または EKAHDGGRYYXA (配列番号 1) および EKGPDPLQYMXA (配列番号 3) (式中、X はシトルリンを示す)) に対する IgG 抗体を検出する 2 部位化学発光イムノアッセイで実施した。最初に、血清試料を、10 mM Tris - HCl、350 mM NaCl、1% BSA、1% [体積/体積] Triton X - 100、0.5% [重量/体積] デオキシコール酸 Na、0.1% SDS を含む緩衝液 (pH 7.6) 中に 1:10 希釈し、適切な濃度の上記ペプチドの 1 つ (ビオチン化形態) およびストレプトアビジンでコーティングした磁性粒子と共に、37 で 10 分間インキュベートした。未結合のビオチン化抗原および抗体を、反応混合物の吸引および引き続く洗浄によって、磁性粒子に結合した複合体から分離した。その後、アクリジニウム標識した抗ヒト IgG 抗体を反応混合物に添加し、その後もう 10 分間インキュベートして、サンドイッチ複合体を生成した。未結合の標識を、反応混合物の吸引および引き続く洗浄によって分離した。洗浄した、複合体を伴う磁性粒子に、本発明者らは、化学発光反応を開始するトリガー 1 および 2 を注入した。トリガー 1 溶液は、希酸中に過酸化水素を含み、トリガー 2 溶液は希水酸化ナトリウムを含んだ。

10

【0062】

早期 RA を有する 120 人の患者由来の血清試料を、Division of Rheumatology of Oulu University Hospital から得た。コントロールは、年齢および性別が一致した健康な個人由来の 81 の血清からなつた。

20

【0063】

120 人中 44 人の RA 患者において、血清は、I 型コラーゲンの 1 鎖由来のシトルリン化合成 C - テロペプチドの結合の増加を示した (コントロールと比較して $p = 0.003$)。II 型コラーゲンの 1 鎖由来の対応する C - テロペプチド対について、35 人の患者の血清はアルギニンペプチドよりも強力にシトルリン化ペプチドに結合したが、コントロールと比較した差異は有意ではなかった ($p = 0.074$)。2 つのカルボキシテロペプチド間の相関は、 $r = 0.473$ ($p < 0.001$) であった。

30

【実施例 3】

【0064】

関節リウマチ患者の血清における自己抗体の特異性

抗体特異性を検出するために、本発明者らは、I 型コラーゲンおよび II 型コラーゲンの両方のテロペプチドアッセイおよび抗 CCP マーク 2 アッセイキットを試験した。患者の血清を、各アッセイにおける最初の結合がそれぞれのペプチドで著しく阻害できるように、アッセイ緩衝液中に希釈した。競合ペプチド (1 (I) および 1 (II) のコラーゲン C - テロペプチドのアルギニン形態およびシトルリン形態) の段階希釈物を添加した (図 2)。プレートにカップリングされたものと同じペプチドの可溶性形態による阻害は、両方のテロペプチドアッセイにおいて、特異性コントロールとして機能した。抗 CCP アッセイについて、このようなペプチドは特異性試験には利用可能でなかった。% 阻害を、可溶性ペプチドの濃度に対してプロットした。ヒト血清のみ (最初の結合) で得られたシグナル (450 nm の波長) を 0% 阻害として定義し、ブランク (血清試料なし) のシグナルを 100% 阻害として定義した。本発明者らは、可溶性形態の正常抗原またはシトルリン化抗原のいずれかとの結合を阻害した。可溶性テロペプチド抗原は、I 型コラーゲンおよび II 型コラーゲンの両方のテロペプチドアッセイにおいて結合を阻害した (図 2A および 2B)。

40

【0065】

図 2 . 競合アッセイ。1 つの血清試料を、3 つの異なる ELISA において試験した: I 型コラーゲン (A) および II 型コラーゲン (B) の 1 鎖のシトルリン化カルボキシ

50

テロペプチドアッセイならびに抗CCPアッセイ(C)。阻害剤は、EK A H D G G R Y Y R A (配列番号4) (白三角)、EK A H D G G R Y Y X A (配列番号1) (黒三角、I型コラーゲンアッセイにおける固定化抗原に対応する)、EK G P D P L Q Y M R A (配列番号5) (白四角)およびEK G P D P L Q Y M X A (配列番号3) (黒四角、I型コラーゲンアッセイにおける固定化抗原に対応する)であった。

【0066】

このように、同一または類似の抗体が結合に関与するようである。しかし、コラーゲンテロペプチドは、抗CCPアッセイとは異なる抗体種に結合する。なぜなら、抗CCP結合は、これらのペプチドを阻害できないからである(図2C)。

【0067】

コラーゲンに対する自己抗体は、抗CCPアッセイで検出されたものとは異なるが、両方の自己抗体が、関節リウマチを有する患者において増加する。表2中に示すように、これらの自己抗体間には有意な相関が存在した。

【0068】

表2. I型コラーゲン(1鎖および2鎖)およびII型コラーゲン(1鎖)由来のシトルリン化C-テロペプチドに対する抗体結合と抗CCPアッセイ結果との間の一致係数(120人の関節リウマチ患者由来の血清に基づく)。*** p < 0.001

【表2】

	抗 α 1 (I)	抗 α 2 (I)	抗 α 1 (II)	抗CCP アッセイ
抗 α 1 (I)		C=0.380*** P < 0.001	C=0.286*** P=0.001	C=0.310*** P < 0.001
抗 α 2 (I)	C=0.380*** P < 0.001		C=0.398*** P < 0.001	C=0.112 P=0.217
抗 α 1 (II)	C=0.286*** P=0.001	C=0.398*** P < 0.001		C=0.215* P=0.016
抗CCP アッセイ	C=0.310*** P < 0.001	C=0.112 P=0.217	C=0.215*** P=0.016	

【実施例4】

【0069】

阻害アッセイ

関節リウマチにおいて、正常なI型コラーゲンおよびII型コラーゲンに対する抗体もまた存在するので、シトルリン化形態に対する特異的抗体を検出するために、I型またはII型のカルボキシテロペプチドのアルギニン含有ペプチドおよびシトルリン含有ペプチドの両方を使用する2つのアッセイを実施すべきである。次いで、アルギニン含有ペプチドとの反応の吸光度を、それぞれのシトルリン含有ペプチドとの反応の吸光度から減算するか、またはシトルリン含有ペプチドとアルギニン含有ペプチドとの結合比を計算する。

【0070】

優先的に、シトルリン化ペプチドアッセイバージョンのみを使用することも可能であり、このとき、このアッセイは標準条件で、アッセイ溶液中の同じまたは類似の可溶性ペプチド(200 μ g/ml)を添加して実施される。

【0071】

RA患者(n=120)由来の血清およびコントロール(n=81)由来の血清を、アッセイ緩衝液および/または阻害緩衝液(可溶性シトルリン含有ペプチド(200 μ g/ml)を含む)中に1:100希釈した。阻害時間は30分間であった。阻害反応後、血清を、ビオチン化したシトルリン含有ペプチドをカップリングさせておいた、ストレプトアビジンでコーティングした96穴アッセイプレートのウェルに移した。洗浄(PBS/

10

20

30

40

50

0.05% [体積/体積] Tween-20で3回)後、EIA緩衝液(20mM Tris-HCl、150mM NaCl、0.1% BSA、0.05% Tween-20、pH7.5)中に1:7500希釈した、ペルオキシダーゼにコンジュゲートした抗ヒトIgG(Product#31412、Pierce、Rockford、IL、USA)を100 μ l添加した。室温で1時間インキュベートした後、プレートを洗浄した(PBS/Tween-20で3回)。結合した抗体を、基質として3,3'-5,5'-テトラメチル-ベンジジン(Sigma-Aldrich、St.Louis、MN、USA)(100mM 酢酸ナトリウム3水和物、1.5mM クエン酸1水和物、0.0015% H₂O₂中、1ウェル当たり0.01mg/100 μ l)を用いて検出した。30分後、100 μ lの2M硫酸/ウェルを添加することによって反応を停止させた。プレートを、Victor²機器(Wallac、Turku、Finland)中で450nmの波長で読み取った。全ての血清は2連で試験した。変動係数は一般に10%未満であった。

10

【0072】

EIISA実験においてII型コラーゲンカルボキシテロペプチドを用いたとき、コントロール中のそれぞれの可溶性抗原による阻害%は5.4% \pm 3.8(平均 \pm SD)であり、RA患者において、120人中38人が阻害の増加を示した(13.0%を上回る阻害)。

【0073】

このように、これらの自己抗体が対応する可溶性抗原で阻害され得ることがさらに確認された場合、これは、テロペプチドのシトルリン化形態を用いたアッセイを行うのに充分である。1つのアッセイのみが使用されるので、この修飾は変動を減少させ、2つのEIISAアッセイを使用した試験よりも、驚くほど多くのポジティブが見出された。

20

【図面の簡単な説明】

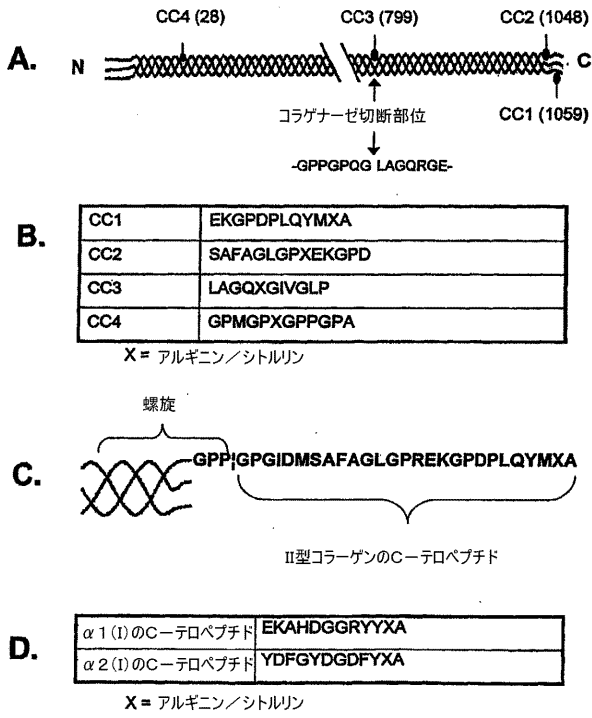
【0074】

【図1】ヒトI型コラーゲンおよびII型コラーゲンの一次構造における選択されたペプチドの配列および位置を示す図である。

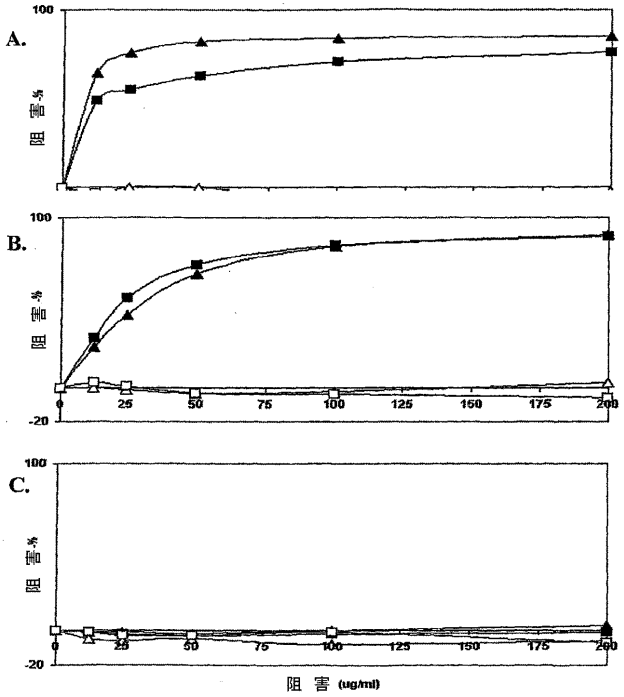
【図2】血清試料を、3つの異なるEIISA:I型コラーゲン(A)およびII型コラーゲン(B)の1鎖のシトルリン化カルボキシテロペプチドの結合ならびに抗CCP2アッセイ(C)における反応で試験したグラフである。

30

【 図 1 】



【 図 2 】



【 配 列 表 】

2009505049000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FI2006/000275

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. GOIN33/564		
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) GOIN		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data, EMBASE, BIOSIS, INSPEC, FSTA, COMPENDEX, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BURKHARDT H ET AL: "Humoral immune response to citruillinated collagen type II determinants in early rheumatoid arthritis" ANNALS OF THE RHEUMATIC DISEASES, vol. 64, no. Suppl. 3, July 2005 (2005-07), page 164, XP008072566 & ANNUAL EUROPEAN CONGRESS OF RHEUMATOLOGY; VIENNA, AUSTRIA; JUNE 08 11, 2005 ISSN: 0003-4967 abstract	1-24
A	WO 2004/087747 A2 (UNI DI PISA [IT]; MIGLIORINI PAOLA [IT]) 14 October 2004 (2004-10-14) claims 1-15,19,20 figure 1	1-24
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
<p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
12 December 2006		21/12/2006
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer VAN DER KOOIJ, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/FI2006/000275

(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 03/050542 A2 (STICHTING TECH WETENSCHAPP [NL]; VAN VENROOIJ WALTHERUS JACOBUS [NL];) 19 June 2003 (2003-06-19) cited in the application the whole document	1-24
A	WO 2004/078098 A2 (LONDON HEALTH SCIENCES CT RES [CA]; HILL JONATHAN [CA]; CAIRNS EWA [CA]) 16 September 2004 (2004-09-16) cited in the application the whole document	1-24
A	WO 03/032909 A2 (ILEX PRODUCTS INC [US]; MOLONEY STEPHEN J [US]; JECMINEK ALBERT A [US]) 24 April 2003 (2003-04-24) sequence 1	15-22
A	WO 00/79284 A (WASHINGTON RES FOUNDATION [US]; EYRE DAVID R [US]) 28 December 2000 (2000-12-28) sequences 5,9	15-22
A	WO 03/068919 A2 (UNIV CALIFORNIA [US]) 21 August 2003 (2003-08-21) sequences 6,7,10	15-22
P,X	KOIVULA M -K ET AL: "Are there autoantibodies reacting against citrullinated peptides derived from type I and type II collagens in patients with rheumatoid arthritis?" ANNALS OF THE RHEUMATIC DISEASES, vol. 64, no. 10, October 2005 (2005-10), pages 1443-1450, XP008072561 ISSN: 0003-4967 the whole document	1-24
P,X	KOIVULA MARJA-KAISA ET AL: "Sensitive immunoassays for the autoantibodies reacting against citrullinated carboxy-terminal telopeptides of type I and type II collagens in patients with rheumatoid arthritis" CLINICAL CHEMISTRY AND LABORATORY MEDICINE, vol. 43, no. 12, December 2005 (2005-12), pages 1400-1405, XP008072567 ISSN: 1434-6621 the whole document	1-24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/FI2006/000275

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 23-24 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/FI2006/000275

Patent document cited in search report	Publication data	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004087747	A2	14-10-2004	NONE
WO 03050542	A2	19-06-2003	AT 329267 T 15-06-2006 AU 2002354397 A1 23-06-2003 BR 0214872 A 26-10-2004 CA 2489167 A1 19-06-2003 CN 1602426 A 30-03-2005 DK 1456662 T3 18-09-2006 EP 1456662 A2 15-09-2004 JP 2005512092 T 28-04-2005 NL 1019540 C2 01-07-2003
WO 2004078098	A2	16-09-2004	AU 2004216925 A1 16-09-2004 CA 2518187 A1 16-09-2004 EP 1603937 A2 14-12-2005
WO 03032909	A2	24-04-2003	EP 1435970 A2 14-07-2004 JP 2005511526 T 28-04-2005
WO 0079284	A	28-12-2000	AT 278965 T 15-10-2004 AU 3118300 A 09-01-2001 DE 69920981 D1 11-11-2004 DE 69920981 T2 21-07-2005 EP 1210606 A1 05-06-2002 JP 2003502672 T 21-01-2003
WO 03068919	A2	21-08-2003	AU 2003217385 A1 04-09-2003 CA 2475924 A1 21-08-2003 EP 1483399 A2 08-12-2004 JP 2005517904 T 16-06-2005

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 29/00	(2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 P 19/02	(2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 37/06	(2006.01)	A 6 1 P 19/02	
		A 6 1 P 37/06	

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

(74)代理人 100101498

弁理士 越智 隆夫

(74)代理人 100102808

弁理士 高梨 憲通

(74)代理人 100128646

弁理士 小林 恒夫

(74)代理人 100128668

弁理士 齋藤 正巳

(74)代理人 100134393

弁理士 木村 克彦

(72)発明者 コイヴェラ, マリア - カイサ

フィンランド F I - 9 0 4 2 0 オウル, アナンデルンティエ 1 0 B 9

(72)発明者 リステリ, ユハ

フィンランド F I - 9 0 5 0 0 オウル, レートランタ 1 7

Fターム(参考) 4C084 AA02 AA03 AA07 BA01 BA08 BA18 BA23 BA31 CA18 MA52

MA66 NA14 ZA961 ZA962 ZB081 ZB082 ZB151 ZB152

4H045 AA10 AA30 BA09 BA16 CA40 EA20 EA50

专利名称(译)	检测类风湿性关节炎中形成的自身抗体的方法		
公开(公告)号	JP2009505049A	公开(公告)日	2009-02-05
申请号	JP2008525592	申请日	2006-08-10
[标]申请(专利权)人(译)	专业科拉根围哦		
申请(专利权)人(译)	Purokorrage Owai		
[标]发明人	コイヴェラマリアカイサ リステリユハ		
发明人	コイヴェラ,マリア-カイサ リステリ,ユハ		
IPC分类号	G01N33/564 C07K14/78 G01N33/543 G01N33/536 A61K38/00 A61P29/00 A61P19/02 A61P37/06 C07K		
CPC分类号	A61P19/02 A61P29/00 G01N33/564 G01N2333/78 G01N2800/102		
FI分类号	G01N33/564.B C07K14/78.ZNA G01N33/543.575 G01N33/543.545.A G01N33/536.B A61K37/02 A61P29/00.101 A61P19/02 A61P37/06		
F-TERM分类号	4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA07 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA18 4C084/BA23 4C084/BA31 4C084/CA18 4C084/MA52 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZA961 4C084/ZA962 4C084/ZB081 4C084/ZB082 4C084/ZB151 4C084/ZB152 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA09 4H045/BA16 4H045/CA40 4H045/EA20 4H045/EA50		
代理人(译)	臼井伸一 藤野郁夫 小林恒夫 木村胜彦		
优先权	2005000814 2005-08-11 FI		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

在类风湿性关节炎患者中发现了与源自I型和II型胶原蛋白C端肽的瓜氨酸化肽反应的自身抗体。他们检测来自I型胶原的alpha1链的-YYXA或来自I型胶原的alpha2链的-FYXA序列或来自II型胶原的alpha1链的-YMXA序列，其中X是瓜氨酸。抗体不同于抗丝蛋白抗体。本发明的肽可用于诊断类风湿性关节炎。口服瓜氨酸化肽可诱导耐受性并导致类风湿性关节炎的治疗。

【表1】

	コントロール 平均±SD 吸光度	コントロール 平均+2SDを 超えた数	RA患者 平均+2SD を超えた数
α1(I)のC-テロペ プチド			
アルギニンペプチドシ トルリンペプチド	0.288±0.142 0.314±0.117	4/81 2/81	6/120ns 24/120***
α2(I)のC-テロペ プチド			
アルギニンペプチド シトルリンペプチド	0.692±0.326 0.763±0.356	3/81 3/81	22/120*** 12/120***
CC1=α1(I)のC- テロペプチド			
アルギニンペプチド シトルリンペプチド	0.181±0.077 0.155±0.065	2/81 2/81	54/120*** 35/120***
CC2			
アルギニンペプチド シトルリンペプチド	0.162±0.053 0.135±0.054	3/81 1/81	50/120*** 25/120***
CC3			
アルギニンペプチド シトルリンペプチド	0.182±0.073 0.181±0.067	2/81 2/81	63/120*** 32/120***
CC4			
アルギニンペプチド シトルリンペプチド	0.179±0.070 0.184±0.071	3/81 2/81	60/120*** 22/120***