

(19)日本国特許庁(J P)

(12) 公表特許公報 (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 504314

(P2003 - 504314A)

(43)公表日 平成15年2月4日(2003.2.4)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 0 7 K 14/75		C 0 7 K 14/75	4 C 0 8 4
A 6 1 K 38/00		A 6 1 P 19/02	4 H 0 4 5
A 6 1 P 19/02		29/00 101	
29/00	101	G 0 1 N 33/53	N
G 0 1 N 33/53		A 6 1 K 37/02	

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 23数)

(21)出願番号 特願2001 - 508224(P2001 - 508224)

(86)(22)出願日 平成12年6月30日(2000.6.30)

(85)翻訳文提出日 平成13年12月26日(2001.12.26)

(86)国際出願番号 PCT/FR00/01857

(87)国際公開番号 W001/002437

(87)国際公開日 平成13年1月11日(2001.1.11)

(31)優先権主張番号 99/08470

(32)優先日 平成11年7月1日(1999.7.1)

(33)優先権主張国 フランス(FR)

(71)出願人 ユニヴェルシテ ポール サバティエ - ト
ウールーズトロワ

UNIVERSITE PAUL SA

BATIER - TOULOUSE I I

I

フランス、エフ - 31062 トウールーズ セ

デックス 4、ルート ドゥ ナルボンヌ、

118

(74)代理人 弁理士 野河 信太郎

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 フィブリンのシトルリン誘導体及び慢性関節リウマチの診断又は治療のためのその使用

(57)【要約】

本発明は、慢性関節リウマチの診断又は治療に有用なフィブリンに由来するシトルリンポリペプチドに関する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 少なくとも1つのアルギニン残基をシトルリン残基で置換した脊椎動物のフィブリンの -鎖又は -鎖の全部又は一部の配列に由来するシトルリン化ポリペプチド。

【請求項2】 脊椎動物のフィブリンの -鎖又は -鎖の少なくとも5つの連続したアミノ酸配列に由来する請求項1に記載のシトルリン化ポリペプチド。

【請求項3】 脊椎動物のフィブリンが哺乳動物のフィブリン、好ましくはヒトのフィブリンであることを特徴とする請求項1及び2のいずれかに記載のシトルリン化ポリペプチド。

【請求項4】 生体外で慢性関節リウマチを診断するための請求項1～3のいずれか1つに記載のポリペプチドの使用。

【請求項5】 任意に担体分子で標識された及び/又はそれと接合された請求項1～3のいずれか1つに記載の少なくとも1つのシトルリン化ポリペプチドを含むことを特徴とする、生物学的サンプル中の慢性関節リウマチ特異性自己抗体の存在を診断するための抗原性組成物。

【請求項6】 -存在する可能性のある慢性関節リウマチ特異性自己抗体を有する抗原/抗体複合体の生成を可能にする条件下、請求項1～3のいずれか1つに記載の少なくとも1つのポリペプチドに生物学的サンプルを接触させ；
-適切ないずれかの手段で、形成される可能性のある抗原/抗体複合体を検出することからなるのを特徴とする、生物学的サンプル中の慢性関節リウマチ特異性自己抗体を検出するための方法。

【請求項7】 請求項1～3のいずれか1つに記載の少なくとも1つのポリペプチド、また抗原/抗体複合体の生成を可能にする反応媒質の構成に適した緩衝液及び試薬、ならびに/又は抗原/抗体複合体を検出するための手段からなることを特徴とする、生物学的サンプル中の慢性関節リウマチ特異性自己抗体を検出するためのキット。

【請求項8】 医薬品を製造するための請求項1～3のいずれか1つに記載のシトルリン化ポリペプチドの使用。

【請求項9】 医薬品がRAに関連する自己免疫反応の中和を目的とすること

を特徴とする請求項8に記載の使用。

【請求項10】 請求項1～3のいずれか1つに記載の少なくとも1つのシトルリン化ポリペプチドを有効成分として含有することを特徴とする医薬組成物。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

この発明は、フィブリンのシトルリン化誘導体及び慢性関節リウマチの診断及び治療におけるその使用に関する。

慢性関節リウマチ（以下、“RA”に省略）は、慢性的な炎症性リウマチの最も一般的な形態である。それは自己免疫疾患で、病気に冒された患者の血清は自己抗体を含み、一部は特異的で、この病気のマーカーを構成し、それが初期段階でも診断を可能にしている。

発明者らのチームによる以前の研究により、これらの抗体は（プロ）フィラグリンファミリーの異なる分子形態を認識することが証明されている（レビューには、例えばSERRE及びVINCENT, In: Autoantibodies, PETER及びSHOENFIELD Eds, Elsevier Science Publishers, 271-276, 1996を参照）。この理由のために、これらの抗体は、“抗フィラグリン自己抗体(AFA)”と命名されている。EP出願第0511116号には、これらの抗体により認識されるフィラグリンファミリー抗原の精製及び特性、ならびに慢性関節リウマチの診断のためのその使用が記載されている。

【0002】

本発明者らによって、AFAに認識されるエピトープがフィラグリン分子のいくつかの領域にあり、その領域では少なくともアルギニンのいくつかがデイミネート化（deiminate）されることによって、シトルリンに形質転換されること； AFAによって特異的に認識されるシトルリン化ペプチドは、このようにしてフィラグリンの主な免疫反応性領域から得られることが分かった。これらのペプチド及びRAの診断のためのその使用は、BIOMERIEUX 名義の出願PCT/FR97/01541号 及び出願PCT/FR98/02899号の主題である。RA-特異性自己抗体とのフィラグリンの反応性におけるシトルリン残基の役割に関する発明者らの観察は、後に他の研究者達[SCHELLEKENSら、Arthritis Rheum., 40, no. 9 supplement, p. S276, summary 1471 (1997); VISSERら、Arthritis Rheum., 40, no. 9 supplement, p. S289, summary 1551 (1997)]により確証されている。

【0003】

発明者らはまた、AFAが滑膜リウマチ組織の介在性免疫グロブリンについてかなりの割合を示し、これらの組織中に存在する特定の形質細胞により局所的に合成されることを証明したが、このことはAFAがRAと関連する自己免疫反応に関与しているという仮説を確証している。この自己免疫反応を中和するためにフィラグリン又はそれに由来するシトルリン化ペプチドを用いることは、UNIVERSITE PAUL SABATIER[Paul Sabatier University](TOULOUSE III)名義の出願PCT/FR98/02900号の主題である。

しかしながら、RAと関連する自己免疫反応における免疫原又は標的抗原としてのフィラグリンの関与は確認されていない。この反応に関わる真の抗原は、依然として同定されないままである。

【0004】

本発明者はここでこの抗原の特性づけに成功し、この結果、それがフィブリンの -及び/又は -鎖のシトルリン化誘導体から構成されていることを示した。

本発明の主題は、少なくとも1つのアルギニン残基をシトルリン残基で置換した、脊椎動物のフィブリンの -鎖又は -鎖の全部又は一部の配列に由来するシトルリン化ポリペプチドである。

【0005】

好ましくは、本発明によるポリペプチドは、哺乳動物のフィブリンの -鎖又は -鎖配列の、少なくとも1つのシトルリンを含む少なくとも5つの連続したアミノ酸及び有利には少なくとも10個の連続したアミノ酸からなる。脊椎動物のフィブリンは哺乳動物のフィブリン、好ましくはヒトのフィブリンであることが有利である。

本発明によるシトルリン化ポリペプチドは、ペプチジルアルギニンデイミナーゼ(PAD)の作用により少なくとも1つのアルギニン残基からなる、例えば天然、組換え又は合成のフィブリンあるいはフィブリノゲン、又はそのフラグメントから得ることができる。それらは、1以上のシトルリン残基を合成ペプチドに直接組み込むペプチド合成によっても得ることができる。

【0006】

本発明によるシトルリン化ポリペプチドはまた、上記の -又は -鎖のフィブ

リン又はそのフラグメントに由来するシトルリン化ポリペプチドと同じ三次元構造を有することにより、同じ免疫反応を有する偽ペプチドであってもよい。それらはまた、例えばL-アミノ酸が再生されるべきペプチド配列の逆配列に従って結合されるレトロタイプの偽ペプチド、又は再生されるべきペプチド配列の逆配列に従って(天然ペプチドのL-系列アミノ酸の代わりに)結合するD-系列アミノ酸から成るレトロ-インバーソ(retro-inverso)タイプの偽ペプチド、あるいはまたCO-NHペプチド結合の代わりにCH₂-NH結合を含む偽ペプチドであってもよい。これらの様々なタイプの偽ペプチドは、例えばBENKIRANEら[J. Biol. Chem., 270, p. 11921-11926, (1995); J. Biol. Chem., 271, p. 33218-33224, (1996)]; BRIANDら(J. Biol. Chem., 270, p. 20686-20691, (1995); GUICHARDら[J. Biol. Chem., 270, p. 26057-26059, (1995)]に記載されている。

【0007】

本発明の主題はまた、生体外のRA診断のための上記に定義されるような本発明によるポリペプチドの使用である。

本発明は特に、任意に担体分子で標識された及び/又はそれと接合された少なくとも1つの本発明のポリペプチドを含むことを特徴とする、生物学的サンプル中のRA-特異性自己抗体の存在を診断するための抗原性組成物を包含する。

本発明の主題はまた、生物学的サンプル中のG群のRA-特異性自己抗体を検出するための方法で、その方法は、

-存在する可能性のあるRA-特異性自己抗体との抗原/抗体の複合体の生成を可能にする条件下、生物学的サンプルを上記に定義したような本発明による少なくとも1つのポリペプチドに接触させ;

-適切ないずれかの手段で、形成される可能性のある抗原/抗体の複合体を検出する

ことからなることを特徴とする。

【0008】

この検出方法は、本発明による少なくとも1つの抗原、及び抗原/抗体の複合体の生成を可能にする反応媒質の構成に適した緩衝液及び試薬、ならびに/又は抗原/抗体の複合体を検出するための手段からなるキットを用いて行われてもよい

。キットはまた、適切であれば、1以上の陰性血清及び1以上の陽性血清のような標準サンプルを含んでもよい。

本発明の主題はまた、医薬品、特にRAに関連する自己免疫反応を中和し、特に自己免疫反応の体液性又は細胞性作用因子がリウマチ組織に存在するフィブリンの -又は -鎖のシトルリン化誘導体に接着するのを阻害することを目的とする医薬品を製造するための本発明によるシトルリン化ポリペプチドの使用である。

【0009】

この生体内の自己免疫反応の中和は、RA又はフィブリンの -あるいは -鎖のシトルリン化誘導体と交差反応を示すエピトープに対する自己免疫反応により誘発される障害を伴うと思われる他の疾患の治療に貢献し得る。

生体内の投与のためには、特にプロテアーゼ耐性を増すことによって生体内で有効期間を延ばすよう修飾されたポリペプチドを選択するのが有利である。それらは特に、上記のような偽ペプチドであってもよい。

本発明はまた、本発明による少なくとも1つのポリペプチドを有効成分として含有することを特徴とする、特に慢性関節リウマチの治療用の医薬組成物を包含する。

【0010】

本発明による医薬組成物は、それ自体が公知である適切ないずれかの手段によって投与することができる。それらは例えば、全身的、経口的、非経口的又は皮下、静脈内あるいは筋肉内注射によって投与してもよく、炎症性滑膜組織に局部的、例えば関節内注射又は関節鏡検査法に基づき、顕微注射によって投与してもよい。

本発明は、リウマチ組織におけるヒトフィブリンの -鎖又は -鎖のデイミネート形態の同定、及び血清サンプル中のAFA の存在を検出するためのデイミネート化フィブリノゲンの使用に言及する以下の更なる記載を用いてより明確に理解されるであろう。

【0011】

実施例1: リウマチ滑膜組織中のAFA によって認識される抗原性タンパク質の精

製及び特性

1) リウマチ滑膜組織の分析

材料及び方法:

タンパク質抽出のために用いた滑膜組織サンプルは、慢性関節リウマチを患った患者から、手首又は膝の滑膜切除もしくは関節形成中に採取した。全て、従来の組織学的リウマチの滑膜障害の座部である組織フラグメントに相当する。それらを、液体窒素で冷却したイソペンタンで凍結して保存する。

4人の患者からの滑膜組織フラグメントを、低イオン強度緩衝液、尿素緩衝液及び尿素/DTT緩衝液中で連続的に抽出した。

【0012】

滑膜抽出物の調製

Ultra-Turraxホモジナイザー(T25 ベーシック、IKA Labortechnik, Staufen, Germany)を用いて組織1g当たり6 ml容量の緩衝液で抽出を行った。

以下の緩衝液； 150 mMのNaClを含む40 mMのTris-HCl、 pH 7.4[低イオン強度緩衝液]；イオン交換樹脂(AG 501-X8, Biorad, Hercules, CA)で脱イオンした8Mの尿素を含む40 mMのTris-HCl、 pH 7.4[尿素緩衝液]；8Mの脱イオン尿素及び50 mMのジチオスレイトール(DTT)を含む40 mMのTris-HCl、 pH 7.4 (Sigma) [尿素/DTT緩衝液]を、0 °Cの温度で用いた。全ての緩衝液を20 mMのEDTA、0.02%のアジ化ナトリウム、2 µg/mlのアプロチニン、10 mMのN-エチルマレイミド及び1 mMのフェニルメチルスルホニルフルオリド(Sigma, Saint Louis, MI)で補った。各抽出後、ホモジネートを4 °Cの温度で20分間15,000 gで遠心分離した。尿素緩衝液及び尿素/DTT緩衝液抽出物を、電気泳動及びイムノトランスファーによって分析する前に、水で透析した。

【0013】

電気泳動及び免疫検出

様々な抽出物の滑膜タンパク質を、変性SDS緩衝液中の10%ポリアクリルアミドゲル(SDS-PAGE)で電気泳動により分離し、次いで強化ニトロセルロース膜(Hybond-TMC extra, Amersham, Little Chalfont, UK)上で電子トランスファーした。

膜を以下の抗体調製物で免疫検出した；AFA-陽性又はAFA-陰性のリウマチのヒ

ト血清；他の形態の炎症性リウマチを患った患者又は健康な個体由来の非リウマチ性のヒトの対照血清(1/100)；精製したAFAのフラクション(10 μ g/ml)；ヒトのフィブリン及びフィブリノゲンに対するマウスのモノクローナル抗体(5 μ g/ml)；ヒトのフィブリノゲンの組換え α -及び β -鎖のそれぞれに対する2つのヒツジ抗血清(1/1000) (Cambio, Cambridge, UK)；ヒトのフィブリノゲンの組換え α -鎖に対するウサギの抗血清(1/200000) (Cambio)。

【0014】

使用されるヒト血清は、American College of Rheumatologyの基準による臨床的かつ生物学的な観点から完全に特徴付けられる慢性関節リウマチ(RA)を患った95人の患者、非リウマチ性の炎症性リウマチ又は非炎症性病理学的症状を患っている24人の患者(対照血清)及び10人の健康な個体に由来する。血清中の抗フィラグリン抗体(AFA)の半定量的な力価測定は、以前公開されたプロトコル[VINCENTら、Ann. Rheum. Dis., 48, 712-722 (1989)；VINCENTら、J. Rheumatol., 25, 838-846 (1998)]にしたがって、ラットの食道上皮細胞の凍結切片標本上での間接免疫蛍光検査法及びフィラグリン酸変異体の豊富な表皮抽出物でのイムノトランスファーによって行った。"AFA-陽性"血清は、双方の方法を用いて検出した後、かなりの力価でAFAを示すものであり、"AFA-陰性"血清は、2つの方法のいずれか一方でも検出可能なAFAを示さないものである。

【0015】

GIRBAL-NEUHAUSERら(J. Immunol., 162, 585-594 (1999))に記載のプロトコルにしたがって、高AFA力価を有する45個のリウマチ血清を用いて、表皮性フィラグリン酸変異体上でアフィニティークロマトグラフィによりAFAを精製した。精製された抗体フラクションを貯留した。

ペルオキシダーゼ接合第2分子プローブを、全ての1次抗体：タンパク質A(Sigma)、マウスIgGに対するヒツジ抗体(Biosys, Compiègne, France)、ウサギのIgGに対するヤギFabフラグメント(Biosys)及びヒツジIgGに対するウサギのF(ab')₂フラグメント(Southern Biotech. Inc)を検出し、ヒト、マウス、ウサギ及びヒツジの各IgGを検出するために使用した。ペルオキシダーゼ活性を、製造業者により提示されたプロトコルによって、ECLTM検出システム(Amersham International

al, Aylesbury, UK)を用いて可視化した。

【0016】

結果

精製されたAFA 及びAFA-陽性リウマチ血清との特異的な反応は、尿素/ DTT 緩衝液中で生成された抽出物でのみ観察された。

結果を図1に示す：

図1の凡例：

- AFAp = 精製AFA;
- RA 血清 = リウマチ血清:
 - * AFA+ = AFA-陽性;
 - * AFA- = AFA-陰性;
- 対照血清 = RA以外の炎症性リウマチ形態を患った患者又は健康なドナー由来の血清。

【0017】

これらの結果は、精製AFA及びAFA-陽性リウマチ血清との特異的な反応が、およそ64 kD ~ 78 kD (w64 ~ 78)及び55 kD ~ 61 kD (w55 ~ 61)のそれぞれの見掛け分子量の2つのタンパク質バンドに関係することを示す。これらのタンパク質バンドは、AFA-陰性血清がRAを患った患者又は炎症性リウマチの他の形態、あるいは健康なドナー由来のものか否かに関わらず、AFA-陰性血清によっては検出されなかった。

精製AFA及びAFA-陽性リウマチ血清により特に認識されたこれらのタンパク質の存在は、研究対象の4人のリウマチ患者由来の滑膜組織の尿素/DTT抽出物中で観察された。

【0018】

合計で48個のAFA-陽性リウマチ血清を、少なくとも1つの滑膜尿素/DTT抽出物上にイムノトランスファーすることによって試験した。これらの血清中、w64-78を認識したものは40個、w55-61を認識したものは39個、w64-78とw55-61の両方を認識したものは37個、w64-78しか認識しなかったものは3個、w55-61しか認識しなかったものは2個であった。

13個のAFA-陰性リウマチ血清を、滑膜組織の少なくとも1つの尿素/DTT抽出物上にイムノトランスファーすることによって試験した。これらの血清はw64-78又はw55-61のいずれも認識しなかった。

健康なドナー由来の10個の血清及び炎症性リウマチの他の形態を患った患者由来の5つの血清も、少なくとも1つの滑膜尿素/DTT抽出物上にイムノトランスファーすることによって試験した。これらの血清は、w64-78又はw55-61のいずれも認識しなかった。

【0019】

2) w64-78及びw55-61の抗原性タンパク質の特徴づけ

RAを患った患者のうち1人の滑膜組織の尿素/DTT緩衝液抽出物のタンパク質を、4容量の氷アセトンで沈殿させ、次いで初期濃度より15倍高い濃度で尿素/DTT緩衝液中で再度溶解した。

濃縮した抽出物のタンパク質を二次元電気泳動、等焦点分画電気泳動次いでSDS-PAGE によって分離した。

二次元電気泳動分離をPhastSystem™(Pharmacia)で行った。第一の電気泳動分離をPhastGel(等焦点分画電気泳動(IEF)ゲルで行ったが、このゲルは予め、洗浄、乾燥し、8 M の尿素、0.5%のNonidet P-40、3~10のpH勾配をもたらす両性電解質(Pharmacia)を含む脱イオン化緩衝液中で再水和化した。第二次元を7.5%のポリアクリルアミドゲルでSDS-PAGEによって行った。

【0020】

次いで、タンパク質を、50 mM Tris及び50 mMのホウ酸中でポリビニルジフルオライド(PVDF)膜(ProBlott™membranes, Applied Biosystems, Foster City, CA)に電子トランスファーした。最後に膜を、0.1%のアミドブラック、1%の酢酸及び45%のメタノールの水溶液で染色するか、又は上記1)に記載のプロトコルにしたがってリウマチ血清で免疫検出した。

図2は、PVDF 膜上で電子トランスファーした後に得られたプロフィールを示す：

- a) アミドブラックで染色；又は
- b) AFA-陽性リウマチ血清で免疫検出；又は
- c) AFA-陰性リウマチ血清で免疫検出。

図2の凡例:

- アミドブラック = アミドブラックで染色;
- AFA+ = AFA-陽性リウマチ血清で免疫検出;
- AFA- = AFA-陰性リウマチ血清で免疫検出。

【0021】

アミドブラックで染色した後、64~78 kD 及び55~61 kDの見掛け分子量及びおよそ5.85~8.45の pIを有する 2つの主なタンパク質が観察される。

これらのタンパク質をAFA-陰性リウマチ血清ではなく、AFA-陽性リウマチ血清で免疫検出する。

二次元電気泳動後、PVDF膜上への同一の転移を用いて、各反応免疫性ゾーンの中心に相当する膜フラグメントを切除し、次いで製造業者が推奨する方法によって、Applied Biosystemsシーケンサー(494A又は473A)でアミノ末端塩基配列決定に付した。

配列gly-pro-arg-val-val-glu-arg-his-gln-ser-alalは、w64~78 抗原に相当する膜フラグメントから得られた。この配列は、ヒトフィブリノゲンの(-鎖前駆体遺伝子の産物の配列36~46と全く同一である。w64~78の免疫反応性ゾーンの右又は左の末端に相当する膜フラグメントを切除し、次いでそれぞれアミノ末端塩基配列決定の各3つのサイクルに付したところ、gly-pro-arg配列が毎回確認され、全てのp64~78の免疫反応性ゾーンが同一のアミノ末端を有することが示された。

【0022】

配列gly-his-arg-pro-leu-asp-lys-lys-arglは、w55~61抗原に相当する免疫反応性ゾーンの中心に相当する膜フラグメントから得られた。この配列は、ヒトフィブリノゲンの -鎖の前駆体遺伝子の産物の配列45~54と全く同一である。w55~61の免疫反応性ゾーンの左末端に相当する膜フラグメントを切除し、次いでアミノ末端塩基配列決定の2つのサイクルに付したところ、gly-his配列が認められた。w55~61免疫反応性ゾーンの右末端に相当する膜フラグメントを切除し、次いでアミノ末端塩基配列決定の6つのサイクルに付したところ、gly-his-arg-pro-leu-asp配列及び gly-pro-arg-val-val-glu 配列が認められた。これは、全て

のw55～61の免疫反応性ゾーンが同一のアミノ末端を有し、部分的にはw64～78抗原と同時に移動する (co-migrate) ことを示している。

w64～78及びw55～61 抗原性タンパク質のアミノ末端は、トロンビンによるフィブリノペプチド A及びBの各切断後、ヒトのフィブリノゲンの -及び -鎖のアミノ末端にそれぞれ相当する。したがって、w64～78及びw55～61抗原性タンパク質のアミノ末端はそれぞれ、ヒトのフィブリンの -鎖及び -鎖のアミノ末端と同一である。

【0023】

w64～78及びw55～61抗原の見掛け分子量は、ヒトのフィブリンの(-鎖及び(-鎖についての理論的分子量値とそれぞれ適合する。

一方のw64～78抗原とフィブリンの -鎖との同一性及び他方のw55～61抗原とフィブリンの -鎖の同一性は、これらの抗原に対する抗フィブリン(フィブリノゲン)抗体の反応性を分析することによって確認された。尿素/ DTT中で調製された滑膜組織の抽出物を使用するイムノトランスファーによって、「311」マウスのモノクローナル抗体(ヒトのフィブリノゲン及びフィブリンの3つの鎖、及び弱いものであるが を認識する)は、w64～78及びw55～61抗原に関して主に反応性である。同様に、それぞれ組換え型 -及び -鎖のフィブリノゲンに対するヒツジ及びウサギの2つの抗血清は、w64～78抗原と共に移動するタンパク質及びw55～61抗原と共に移動するタンパク質をそれぞれ主に認識した。

【0024】

実施例2：生体外でのリウマチ血清及び精製AFAのデイミネート化フィブリノゲンとの反応性

デイミネート化及び非デイミネート化フィブリノゲンに対する反応性を、イムノトランスファーによって研究した。精製されたAFAフラクション、力価を徐々に少なくした37個のAFA-陽性リウマチ血清、10個のAFA-陰性リウマチ血清及び炎症性又は非炎症性リウマチの形態を患った患者由来の19個のAFA-陰性血清を使用した(AFA力価はフィラグリニン酸変異体の豊富な表皮抽出物上でイムノトランスファーによって測定)。

結果は、非デイミネート化フィブリノゲンの場合は図3A、デイミネート化フィ

ブリノゲンの場合は図3Bに示す。

【0025】

図3の凡例:

図3A: 精製した非デイミネート化ヒトフィブリノゲン;

- 311 = 抗フィブリノゲンモノクローナル抗体311;
- 対照血清 = RA以外の炎症性リウマチの形態を患った患者又は健康なドナー由来の血清;
- RA 血清 = リウマチ血清;
 - * AFA+ = AFA-陽性;
 - * AFA- = AFA-陰性;

図3B: PADでデイミネート化した精製したヒトフィブリノゲン;

- 311 = 抗フィブリノゲンモノクローナル抗体311;
- C1 = マウスIgGに対するヒツジ抗体;
- C2 = タンパク質Aに対するヒツジ抗体;
- 対照血清 = RA以外の炎症性リウマチの形態を患った患者又は健康なドナー由来の血清;
- RA 血清 = リウマチ血清;
 - * AFA+ = AFA-陽性;
 - * AFA- = AFA-陰性;

【0026】

非デイミネート化フィブリノゲン

上記実施例1に記載の条件下、SDS-PAGEで分離した後、非デイミネート化フィブリノゲンは、タンパク質を形成する -、 -及び -ポリペプチド鎖の予期された見掛け分子量に相当する48 kDa、58 kDa及び69 kDaの各見かけ分子量を有する3つのポリペプチドから構成される(結果の提示なし)。“311”抗フィブリノゲンモノクローナル抗体は、 -及び -ポリペプチド鎖を強く認識し、 -ポリペプチド鎖を非常に弱く認識する(図3A)。

フィブリノゲンの -、 -及び -鎖それぞれに特異的な抗血清は、それらがそれぞれ目的とする鎖に対しても反応性を示した(結果は提示せず)。

【0027】

フィブリノゲンのデイミネート化

ウサギの骨格筋から精製したペプチジルアルギニンデイミナーゼ(PAD) (Sigma, St. Louis, MO)を使用した。ヒトのフィブリノゲン(Calbiochem, San Diego, CA)を10 mMのCaCl₂及び5 mMのDTTを含む 0.1 M Tris-HCl緩衝液pH7.4中PAD (7 U/mgのタンパク質)の存在下又は不在下、0.86 mg/mlの濃度、50 で2時間インキュベートした。これらの条件は、AFAにより認識されるヒトの組換えフィラグリン上でエピトープの発生を予め可能にするものである[GIRBAL-NEUHAUSERら、J. Immunol., 162, 585-594 (1999)]。次いで、デイミネート化を2%のSDS を添加し、100 で3分間加熱することによって止めた。

2時間デイミネート化した後、2つの -及び -ポリペプチドのSDS-PAGE による電気泳動移動度は変化したが、 -ポリペプチドでは不変のままであった。特に -鎖に相当するタンパク質はこの時82 ~ 95 kDaの拡散したバンドの形状で生じ、"311"抗フィブリノゲンモノクローナル抗体(図3B)ならびに -鎖のフィブリノゲンに対する抗血清(結果は提示せず)の両方により免疫検出された。

【0028】

-鎖に相当するタンパク質は、下方のバンドに対して458 kD及び上方のバンドに対して60 kDの分子量を有する明確なダブルットの形状で生じ、それは"311"抗フィブリノゲンモノクローナル抗体(図3B)では認識されず、ヒトのフィブリノゲンの組換え -鎖に対するウサギ抗血清によって免疫検出された(結果は提示せず)。

-鎖又は -鎖に対する反応は、C1及びC2抗体で観察されない。

【0029】

血清の反応

非デイミネート化フィブリノゲンの -及び -鎖に対する血清の反応性はゼロであるか又は非常に弱く、特定のサブグループに属さず稀にしか生じない極少数の血清に関わった。

他方では、デイミネート化後、デイミネート化 -及び -鎖に相当するポリペプチドは、精製AFA(結果は提示せず)及び37個の全てのAFA-陽性リウマチ血清(

最も低いAFA力価を有するものを除く)に強く反応する。さらに、10個のうち6個のAFA-陰性リウマチ血清は、デイミネート化した -又は -ポリペプチドも明確に認識し、2つは -ポリペプチド又は -ポリペプチドダブルットを免疫検出し、他の3つは -ポリペプチドダブルットのみを検出し、1つだけは -ポリペプチドのみを免疫検出した。他方では、 -ポリペプチドダブルット上で反応性のシェーグレン症候群を患った患者由来の血清を除いて、対照血清はデイミネート化フィブリノゲンを免疫検出しなかった。

【0030】

2つのデイミネート化 -及び -ポリペプチドに対するAFA-陽性リウマチ血清のアフィニティーは、血清ごとに僅かに変化することが分かった。従って、6つの血清は、ポリペプチドを強く検出したが、ポリペプチドについては極めて弱く認識するにすぎなかった。同様に、 -ポリペプチドに対して高い反応性の3つの血清は、デイミネート化 -ポリペプチドを検出しなかった。さらに、2つのポリペプチドの標識化の強度は、総合的に血清のAFA力価に比例すると思われる。フィブリノゲンのデイミネート化 -及び -ポリペプチドで反応性の血清は、フィブリノゲンのデイミネート化の間に生じた高分子量(200 kD以上)のポリペプチドにも反応性であったことに留意されたい。抗フィブリノゲン抗体と明らかに反応するこれらのポリペプチドは、おそらくフィブリノゲン鎖の凝集体であろう。

【0031】

結論として、非デイミネート化ポリペプチドは決して認識されなかったため、リウマチ血清によるフィブリノゲンの -及び -ポリペプチドの認識は、それらのデイミネート化に完全に依存しているだけでなく、これらの血清の抗フィラゲリン反応性に明らかに関連している。これらのデイミネート化ポリペプチドによって、リウマチ血清中に存在するAFAを優れた感度で検出できることに留意されたい。

これらの結果は、リウマチ性の滑膜性関節中のASAの抗原標的がヒトフィブリノの -鎖及び -鎖のデイミネート化形態であることを明確に立証している。

【0032】

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1の凡例: AFAp = 精製AFA; RA 血清 = リウマチ血清: * AFA+ = AFA-陽性;
* AFA- = AFA-陰性; 対照血清 = RA以外の炎症性リウマチ形態を患った患者又は健康なドナー由来の血清。

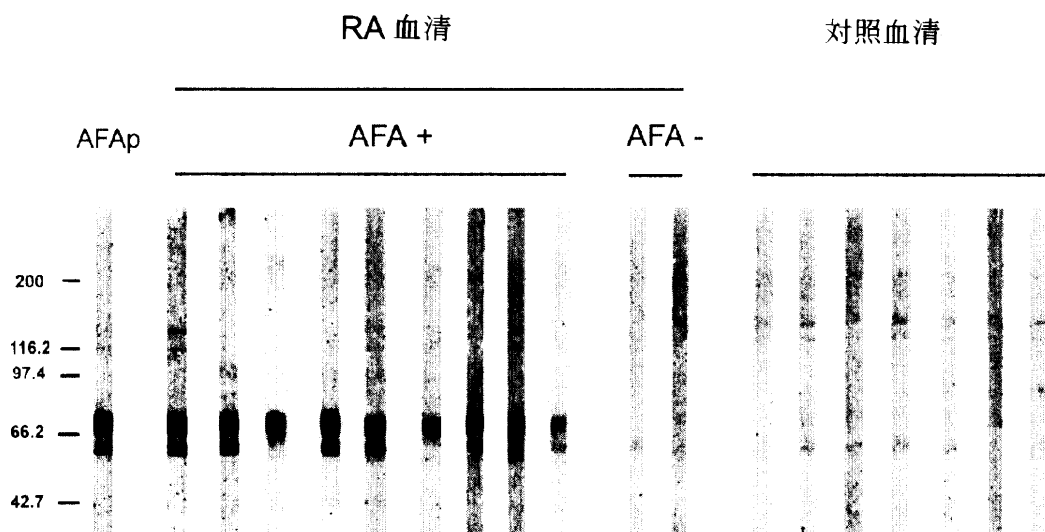
【図2】

図2の凡例: アミドブラック = アミドブラックで染色; AFA+ = AFA-陽性リウマチ血清で免疫検出; AFA- = AFA-陰性リウマチ血清で免疫検出。

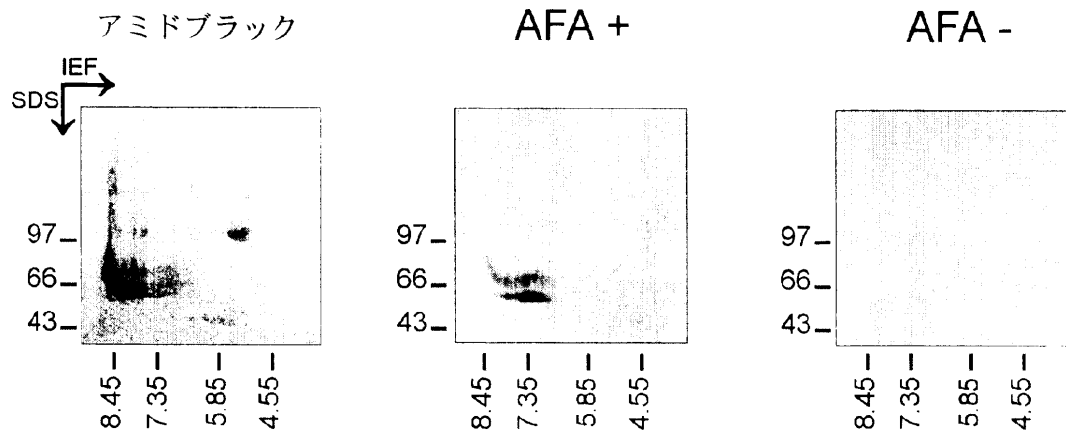
【図3】

図3の凡例: 図3A:精製した非デイミネート化ヒトフィブリノゲン; 311 = 抗フィブリノゲンモノクローナル抗体311; 対照血清 = RA以外の炎症性リウマチの形態を患った患者又は健康なドナー由来の血清; RA 血清 = リウマチ血清; *AFA+ = AFA-陽性; *AFA- = AFA-陰性; 図3B: PADでデイミネート化した精製したヒトフィブリノゲン; 311 = 抗フィブリノゲンモノクローナル抗体311; C1 = マウスIgGに対するヒツジ抗体; C2 = タンパク質Aに対するヒツジ抗体; 対照血清 = RA以外の炎症性リウマチの形態を患った患者又は健康なドナー由来の血清; RA 血清 = リウマチ血清; *AFA+ = AFA-陽性; *AFA- = AFA-陰性。

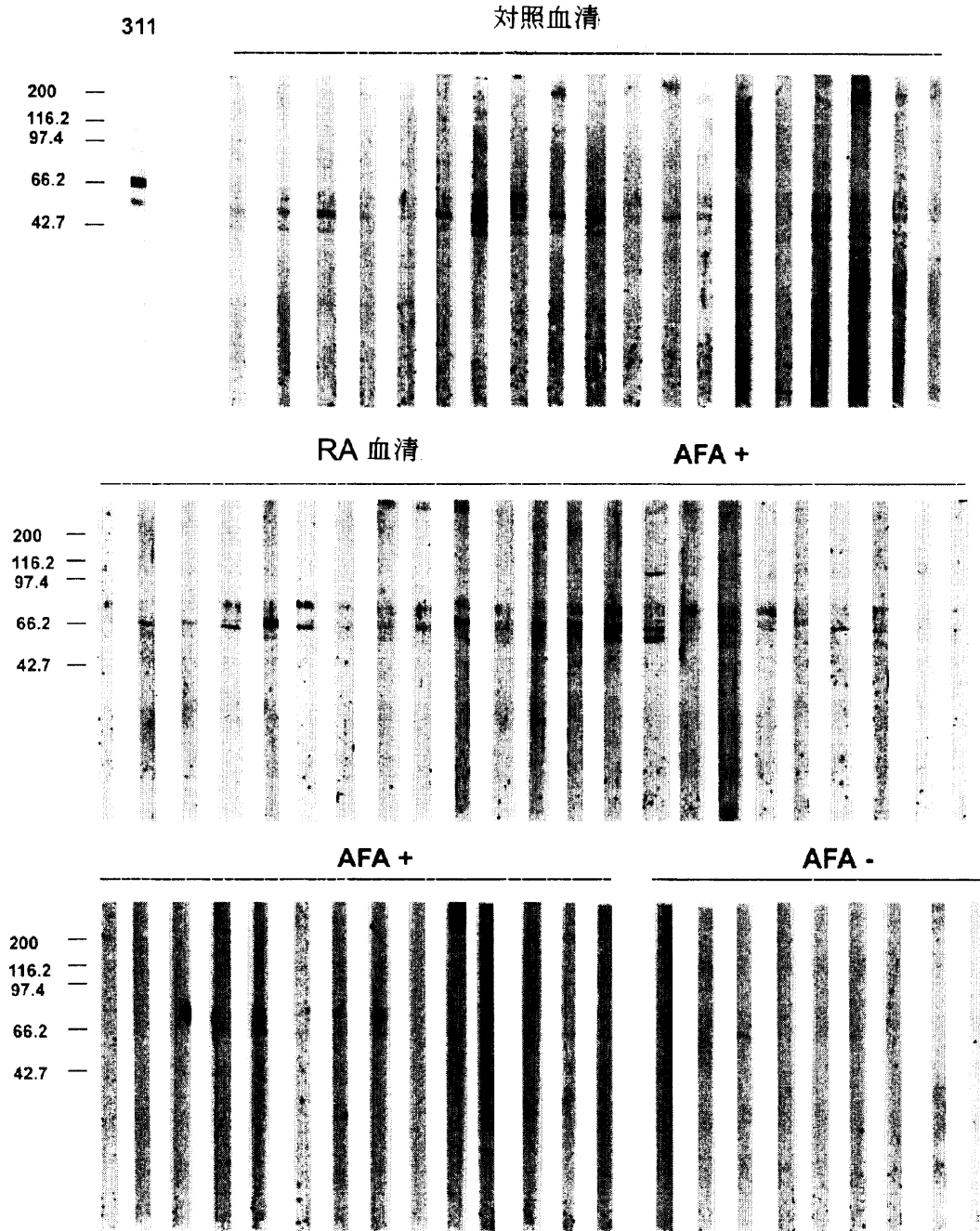
【図1】



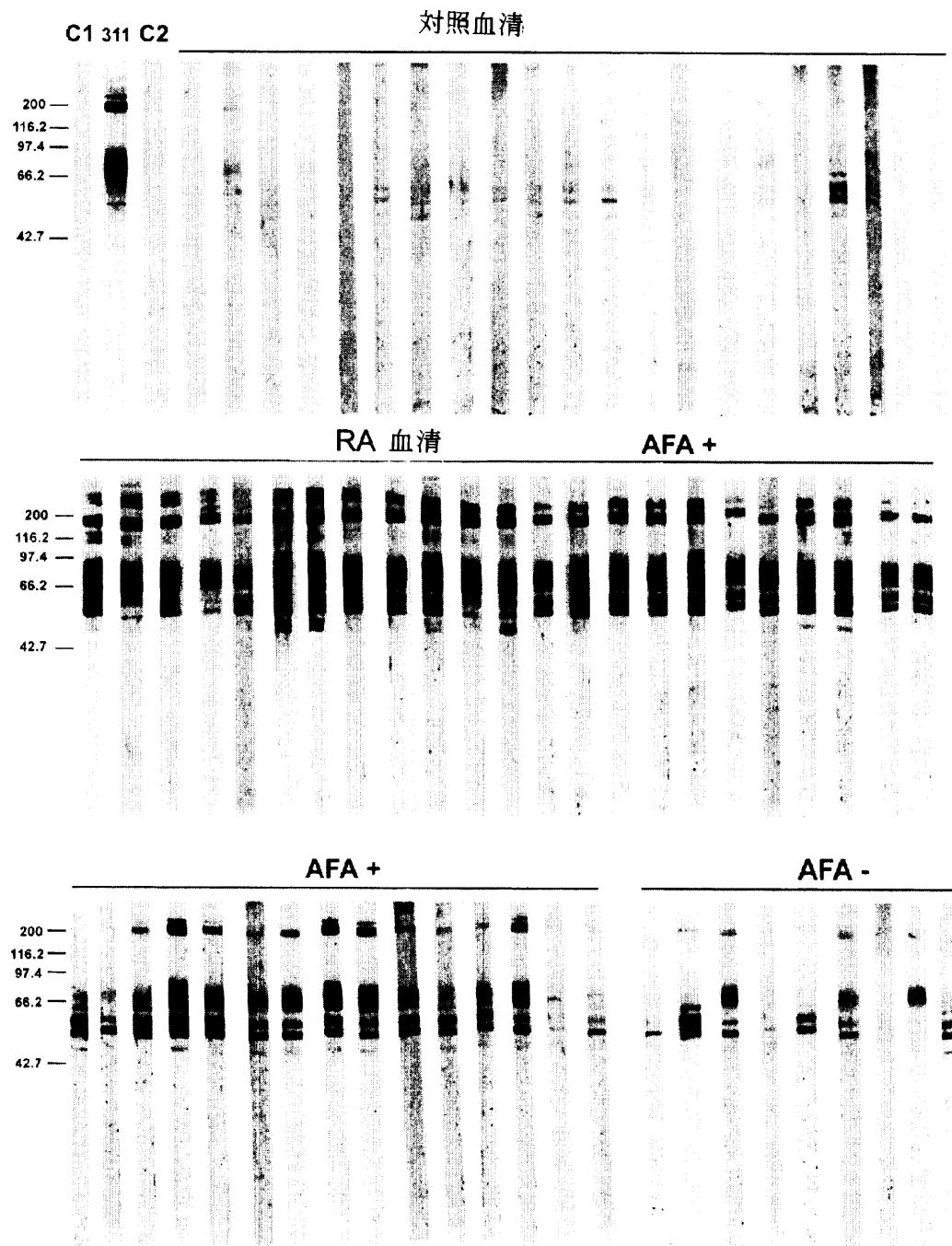
【図2】



【图3A】



【图3B】



【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No. PCT/FR 00/01857
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/75 A61K38/36 A61P19/02 G01N33/53		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K A61K A61P G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) WPI Data, PAJ, EPO-Internal, CHEM ABS Data, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 98 22503 A (RAATS JOZEF MARIA HENDRIK ; SCHELLEKENS GERARDUS ANTONIUS (NL); HOE) 28 May 1998 (1998-05-28) -----	
A	WO 95 28946 A (SCRIPPS RESEARCH INST) 2 November 1995 (1995-11-02) -----	
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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 document 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. "Z" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 19 October 2000		Date of mailing of the international search report 26/10/2000
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 581d Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Cervigni, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/FR 00/01857

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9822503 A	28-05-1998	NL 1004539 C	20-05-1998
		AU 4970797 A	10-06-1998
		BR 9712955 A	07-12-1999
		EP 0941244 A	15-09-1999
WO 9528946 A	02-11-1995	US 5599790 A	04-02-1997
		AU 2366295 A	16-11-1995
		US 5919754 A	06-07-1999

フロントページの続き

(72)発明者 セール, ギ

フランス、エフ - 31100 トゥールーズ、
アヴェニュー ウィンストン チャーチル
10、レジダンス デュ ラック アパルト
マン 46

(72)発明者 セバ, ミレーユ

フランス、エフ - 31500 トゥールーズ、
リュ ア . フレド 3

Fターム(参考) 4C084 AA02 AA03 AA07 BA05 BA34
CA18 MA52 MA55 MA65 MA66
NA14 ZA962 ZB152 ZC412
4H045 AA10 AA30 CA40 DA86 EA22
EA50

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2003504314A5	公开(公告)日	2007-06-21
申请号	JP2001508224	申请日	2000-06-30
申请(专利权)人(译)	Universite电保罗萨巴蒂埃 - 图卢兹特鲁瓦		
当前申请(专利权)人(译)	Universite电保罗萨巴蒂埃 - 图卢兹特鲁瓦		
[标]发明人	セールギ セバミレーユ		
发明人	セール,ギ セバ,ミレーユ		
IPC分类号	C07K14/75 A61P19/02 A61P29/00 G01N33/53 A61K38/00		
CPC分类号	A61K38/00 C07K14/4713 G01N2800/102 C07K14/75 A61P19/02 A61P29/00 A61P37/00		
FI分类号	C07K14/75 A61P19/02 A61P29/00.101 G01N33/53.N A61K37/02		
F-TERM分类号	4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA07 4C084/BA05 4C084/BA34 4C084/CA18 4C084/MA52 4C084/MA55 4C084/MA65 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZA962 4C084/ZB152 4C084/ZC412 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA86 4H045/EA22 4H045/EA50		
优先权	1999008470 1999-07-01 FR		
其他公开文献	JP2003504314A JP4794102B2		

摘要(译)

本发明涉及可用于诊断或治疗类风湿性关节炎的纤维蛋白衍生的瓜氨酸多肽。