

(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2011-514517

(P2011-514517A)

(43) 公表日 **平成23年5月6日(2011.5.6)**

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 N	4 H O 4 5
GO 1 N 33/564 (2006.01)	GO 1 N 33/564 B	
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 8 1 D	
CO 7 K 14/435 (2006.01)	CO 7 K 14/435	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 24 頁)

(21) 出願番号	特願2010-547246 (P2010-547246)	(71) 出願人	510226347
(86) (22) 出願日	平成21年2月20日 (2009. 2. 20)		アクシス-シールド ダイアグノスティックス リミテッド
(85) 翻訳文提出日	平成22年10月19日 (2010. 10. 19)		イギリス、スコットランド、ディーディー
(86) 国際出願番号	PCT/GB2009/000470		2 1 エックスエー ダンディ、ザ テク
(87) 国際公開番号	W02009/103988		ノロジー パーク、ルナ プレイス
(87) 国際公開日	平成21年8月27日 (2009. 8. 27)	(74) 代理人	110000040
(31) 優先権主張番号	0803107. 2		特許業務法人池内・佐藤アンドパートナーズ
(32) 優先日	平成20年2月20日 (2008. 2. 20)	(72) 発明者	ミルン、ケン
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		イギリス、ディーディー 2 1 エックスエー
(31) 優先権主張番号	61/046082		ダンディ、ザ テクノロジー パーク
(32) 優先日	平成20年4月18日 (2008. 4. 18)		、ルナ プレイス、アクシス-シールド
(33) 優先権主張国	米国 (US)		ダイアグノスティックス リミテッド内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 環状シトルリン化ペプチドに対する抗体のアッセイ方法

(57) 【要約】

本発明は、臨床サンプル中の抗環状シトルリン化ペプチド抗体をアッセイする方法であって、前記サンプルを、抗 C C P 抗体の特異的バインダーを少なくとも 1 つ含む少なくとも 1 つのホモジニアス試薬に接触させることで、ホモジニアスサンプル混合物において抗 C C P 結合パートナー複合体の溶液または懸濁液を形成する工程と、ホモジニアス液相の前記抗 C C P 結合パートナー複合体の存在またはレベルを検出する工程とを含む方法に関する。本発明はまた、対象における R A の存在、リスク、可能性または傾向を評価する方法であって、本発明に係るホモジニアスアッセイにおいて前記対象の身体サンプル中の抗 C C P をアッセイすることで、前記サンプル中の抗 C C P 抗体のレベルを測定する工程と、このように測定されたレベルを前記対象における R A の存在、リスク、可能性または傾向と関連付ける工程とを含む方法に関する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

臨床サンプル中の抗 C C P 抗体をアッセイする方法であって、前記サンプルを、抗 C C P 抗体の特異的バインダーを少なくとも 1 つ含む少なくとも 1 つのホモジニアス試薬に接触させることで、ホモジニアスサンプル混合物において抗 C C P 結合パートナー複合体の溶液または懸濁液を形成する工程と、ホモジニアス液相の前記抗 C C P 結合パートナー複合体の存在またはレベルを検出する工程とを含む、方法。

【請求項 2】

対象における R A の存在、リスク、可能性または傾向を評価する方法であって、請求項 1 に記載のホモジニアスアッセイにおいて前記対象の身体サンプル中の抗 C C P をアッセイすることで、前記サンプル中の抗 C C P 抗体のレベルを測定する工程と、このように測定されたレベルを前記対象における R A の存在、リスク、可能性または傾向と関連付ける工程とを含む、方法。

10

【請求項 3】

抗 C C P の存在または 1 つ以上の閾値を超える抗 C C P の濃度を、R A の存在、重篤度増大、リスク増大、可能性増大および / または傾向増大と関連付け、抗 C C P の非存在または 1 つ以上の閾値未満の抗 C C P の濃度を、R A の非存在、重篤度低下、リスク低下、可能性低下および / または傾向低下と関連付ける、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記閾値は、アクシスシールド・D I A S T A T (T M) 抗 C C P E L I S A アッセイにより測定される 5 U / m l であり、前記閾値を超える抗 C C P の濃度を、R A の存在、リスク増大、可能性増大および / または傾向増大と関連付ける、請求項 3 に記載の方法。

20

【請求項 5】

抗 C C P の評価と組み合わせて、リウマチ因子 (R F) 等のその他の生化学的マーカーの評価を行う、請求項 2 ~ 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6】

抗 C C P 抗体の前記特異的バインダーは、少なくとも 1 つのシグナル生成部分に結合する、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

前記シグナル生成部分と、同じまたは異なる種類の少なくとも 1 つのその他のシグナル生成部分とを含む複合体を形成することで、検出可能なシグナルが生成される、請求項 6 に記載の方法。

30

【請求項 8】

前記シグナル生成部分は、ナノ粒子である、請求項 6 または 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記ナノ粒子は、抗 C C P 抗体の 2 つ以上の特異的バインダーに結合する、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

抗 C C P 抗体の前記特異的バインダーは、少なくとも 1 つの C C P ペプチドである、請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の方法。

40

【請求項 11】

前記臨床サンプルは、血液、血液製剤、血清、血漿、尿、脳脊髄液、口腔液、滑液および気腫液から選択される、請求項 1 ~ 10 のいずれかに記載の方法。

【請求項 12】

前記検出は、タービジメトリーにより行われる、請求項 1 ~ 11 のいずれかに記載の方法。

【請求項 13】

不透明化エンハンサーを添加する工程をさらに含む、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

50

この方法を、アクシスシールド・D I A S T A T (T M) 抗 C C P E L I S A アッセイにより測定される抗 C C P 含有量が 0 ~ 2 0 0 0 U / m l の校正サンプルに対して行う工程をさらに含む、請求項 1 ~ 1 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 5】

前記対象は、高齢の対象、骨の損傷または障害を患った対象、高まるまたは異常な関節疲労を患った対象、炎症性および/または自己免疫性疾患を有する対象、R A の家族歴を有する対象、遺伝子検査により R A の傾向増大が指摘された対象、および R A を示すものであるか疑わしい臨床症状を有する対象からなる対象群から選択される対象である、請求項 2 ~ 1 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 6】

本発明に係る方法を行うキットであって、抗 C C P 抗体の少なくとも 1 つのホモジニアス特異的バインダーと、少なくとも 1 つのホモジニアスシグナル生成部分とを含み、前記少なくとも 1 つのホモジニアスシグナル生成部分は、任意に前記特異的バインダーに結合するかまたは前記特異的バインダーに固有のホモジニアスシグナル生成部分である、キット。

10

【請求項 1 7】

本発明に係る方法を行うキットであって、少なくとも 1 つのホモジニアス特異的バインダーを含み、そのホモジニアス特異的バインダーと抗 C C P 抗体との結合反応によりシグナルが生成される、キット。

【請求項 1 8】

少なくとも 1 つのシグナル生成部分と、
既知濃度の少なくとも抗 C C P 溶液と、
少なくとも 1 つの不透明化エンハンサーと、
光透過容器と、
検出器という任意の構成要素のうち、少なくとも 1 つをさらに含む、請求項 1 6 に記載のキット。

20

【請求項 1 9】

抗 C C P 含有体液サンプルを受け、シグナル生成部分（例えば、ナノ粒子）に結合した抗 C C P 特異的バインダーを加え、任意に不透明化エンハンサーを加え、そして抗 C C P 含有量を評価するように配置された、自動化装置。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、対象における関節リウマチ（R A）の存在、可能性または傾向を検出するインビトロアッセイ方法に関する。本発明は特に、自動化されたアッセイ、特に、対象における環状シトルリン化ペプチドに特異性を有する内因性抗体（抗 C C P）の存在またはレベルを測定することを含む関節リウマチ（R A）を評価するアッセイ方法に関する。本発明はまた、対象における環状シトルリン化ペプチドに特異性を有する内因性抗体（抗 C C P）の存在またはレベルを測定する方法に関する。

【背景技術】

40

【0 0 0 2】

関節リウマチ（R A）は、成人人口の 0 . 5 ~ 1 % を襲う一般的な全身性自己免疫疾患である。R A は、滑膜関節の炎症を特徴とする。これにより、関節破壊が進行し、その結果、生活の質が損なわれる可能性がある。不可逆的な関節損傷を防止する上で早期の介入が不可欠であることは一般的に認められており、そのため、疾患のできるだけ早い段階で R A の診断を行うことが重要である。1 9 8 7 年米国リウマチ学会（A C R）の分類は、早期の関節リウマチ（R A）の診断にはあまり適していないものの、R A の診断において広く用いられている。これは、A C R の基準が臨床症状の発現に大きく依存したもので、早期 R A においてこれらは明白でないことが多いためである。理想的には、積極的な治療養生法の対象として恩恵を受けると思われる患者をリウマチ学者が特定することができる

50

よう、特異性および感度の高いRAの血清学的マーカーが求められる。現在、RAの血清学的マーカーとして、リウマチ因子(RF)試験が広く用いられているが、この試験は特異性に欠け、また疾患に存在しない(血清反応陰性関節リウマチ)ことが多いことが認められている。

【0003】

ここ数年に渡り、RA患者に対して高特異性(>95%)かつ高感度(>80%)であることが報告されている新規な抗体マーカーが記載されている。RAを有する対象は、環状シトルリン化ペプチドに対する内因性自己抗体(抗CCP)を発達させることが分かっており、これらが早期RAの診断におけるマーカーとして用いられている。血中に存在し、アミノ酸シトルリンを含む合成ペプチドと反応する抗体は、RAに高い特異性を有しているという1998年の第1回目の報告以来、患者の血液、血清または血漿中の抗CCP抗体を測定することが、この疾患の早期かつ正確な診断における選り抜きの方法となっている。

10

【0004】

CCPに特異的な内因性抗体(抗CCP)のアッセイは、リウマチ因子試験と同様の感度を有しているが、特異性ははるかに高いものである。その上、抗CCPの試験が陽性である場合、無症候性個体および未分化関節炎患者の両方において、今後RAが発症することの予測が可能となる。また、発現時の抗体レベルをびらん性疾患への進行と関連付けることが示されている。早期診断および治療を、好ましくは症状の発現から最初の数ヶ月以内に行うことは、不可逆的な関節損傷の防止に役立つ。

20

【発明の概要】

【0005】

先行技術において、抗CCP抗体を測定するためにヘテロジニアス免疫アッセイが提案されている。このようなヘテロジニアス測定は、直接または間接的にCCPを固相にコーティングし、この固相を、抗CCP抗体がCCPに結合し得る条件下で、抗CCP抗体を含むと認識または推測されるサンプルとインキュベートし、直接または間接的に抗CCP抗体の結合を検出することに基づくものである。さらなるアッセイ形式は、いわゆる二重抗原架橋アッセイで、抗CCPを測定する場合、この免疫アッセイの固相側および検出側の両方でCCPを用い、患者サンプル中の自己抗体がこれら「二重」抗原間に架橋を形成するものである。通常、ヘテロジニアス免疫アッセイが行われる間、数回の洗浄工程が含まれる。このような方法は効果的であるが、比較的時間がかかり、要求される試薬および装置の点で厳しい。また、このようなアッセイを自動化することは困難で、自動化すると信頼性が比較的低くなる。

30

【0006】

上記に鑑み、特に生化学的パラメータに基づいた、関節リウマチの評価に役立つ方法が明確に必要とされている。さらに、RAの可能性または傾向を診断または指摘する選り抜きの試験として抗CCPが出現したことに伴い、ますます多くの患者に対して抗CCP抗体の存在の試験をすることが明確に必要とされている。このため、身体サンプル中の抗CCP抗体を検出および/または定量化するための、簡素化、高速化、高感度化、精密化、ハイスループット化および/またはより自動化されたアッセイ方法が必要である。

40

【0007】

本発明者らは、驚いたことに、本明細書に示されるように身体サンプル中の抗CCP抗体のホモジニアスアッセイ(homogeneous assay)を行うことにより、上記要素の一部または全部のバランスが向上し、より効果的な臨床アッセイを行い得ることを確認した。

【0008】

よって、第1の局面において、本発明は、臨床サンプル中の抗CCP抗体をアッセイする方法であって、前記サンプルを、抗CCP抗体の結合パートナーを少なくとも1つ含む少なくとも1つのホモジニアス試薬(homogeneous reagent)に接触させることで、ホモジニアスサンプル混合物(homogeneous sample mixture)において抗CCP結合パートナー複合体(binding partner complex)の溶液または懸濁液を形成する工程と、前記抗CCP結

50

合パートナー複合体の存在またはレベルを検出する工程とを含む方法を提供する。

【0009】

本発明の抗CCP抗体の評価の主な用途は、現在のところ、臨床サンプルを採取した対象におけるRAの存在、リスク、可能性および/または傾向を分析することである。

【0010】

したがって、第2の局面において、本発明は、対象におけるRAの存在、リスク、可能性または傾向を評価する方法であって、本発明に係るホモジニアスアッセイ(homogeneous assay)において前記対象の身体サンプル中の抗CCPをアッセイすることで、前記サンプル中の抗CCP抗体のレベル(例えば、存在、非存在または関連性もしくは絶対濃度)を測定する工程と、このように測定されたレベルを前記対象におけるRAの存在、リスク、可能性または傾向と関連付ける工程とを含む方法を提供する。

10

【0011】

この方法において、抗CCPの存在または1つ以上の閾値を超える抗CCPの濃度を、RAの存在、リスク増大、可能性増大および/または傾向増大と関連付け、抗CCPの非存在または1つ以上の閾値未満の濃度を、RAの非存在、リスク低下、可能性低下および/または傾向低下と関連付けることが好ましい。

【0012】

対象におけるRAの評価に関する本発明の全ての局面において、この方法は、上記に示した抗CCPの評価と組み合わせて、任意に、リウマチ因子(RF)等のその他の生化学的マーカーの評価を行っても良い。そして、測定された各因子に適切な重み付けを行うことで、RAの存在、リスク、可能性および/もしくは傾向の確率または度合いを測定しても良い。2つ以上の独立した因子を用いた場合も、評価として予測を信頼し得る余地がある。全ての因子が一致すれば、例えば、高い信頼性が存在する。しかしながら、因子が一致しなければ、個々の各因子が偽陽性または偽陰性を示す傾向が考慮され得る(例えば、RA患者の約20%は、RFが陰性であることが知られている)。

20

【0013】

本発明の第2の局面の方法において、RAの治療を受けているまたは受けた患者において、抗CCPの非存在または少なくとも1つの閾値(例えば、本明細書に示したような絶対値もしくは相対値、または同じ対象に対して本方法により行われた先のアッセイで確立された値(治療の有無により予測される疾患の進行の補正因子を含む))未満の濃度により、効果的な治療を示しても良い。反対に、抗CCPの存在または少なくとも1つの閾値(例えば、本明細書に示したような絶対もしくは相対値、または同じ対象に対して本方法により行われた先のアッセイで確立された値(治療の有無により予測される疾患の進行の補正因子を含む))を超える濃度により、効果の低いまたは効果のない治療を示しても良い。よって、この方法は、RAを患っている患者における治療の有効性のモニタリング、またはRAを患うリスクもしくは傾向の高い対象における予防にも役立つ。

30

【0014】

さらなる局面において、本発明はまた、本発明に係る方法を行うキットであって、抗CCP抗体の少なくとも1つのホモジニアス特異的バインダー(homogeneous specific binder)を含むキットを提供する。本発明のキットは、任意に、測定を行うための補助試薬を含んでいても良い。

40

【0015】

シトルリン化ペプチドは、RA患者の血清中に見られる重要な自己抗体の抗原である。RAの臨床的可能性の高い自己抗体は、シトルリン含有エピトープに対する抗シトルリン化タンパク質抗体である。シトルリンは、酵素ペプチジルアルギニンデアミナーゼ(PAD)によるアルギニン残基の翻訳後修飾により生成された非標準アミノ酸であって、このプロセスをシトルリン化と称する。

【0016】

本発明のアッセイ方法は、少なくとも1つの特異的バインダーを利用し、バインダーとサンプルからの抗CCP抗体とを含む複合体を生成する。そして、この複合体を検出する

50

。好ましい実施形態において、抗CCPは、1つ以上のCCPを抗原バインダーとして用いることで測定される。そして、適切な手段により、サンプルに含まれる抗CCP抗体のCCP抗原に対する結合を検出する。もう一つの方法として、または抗原バインダーと組み合わせ、抗CCP抗体自体に対して産出された抗体（抗抗CCP (anti-anti-CCP)）を特異的バインダーとして用いることもできる。

【0017】

本明細書で用いられる「結合パートナー」および「特異的バインダー」という語は、当該成分（概して、抗CCP）に特異的に結合するバインダー、パートナーまたはリガンドを示すために用いられている。このようなバインダーは、一般的に、サンプルのその他の成分、例えば、その他のペプチド、タンパク質または抗体に対して結合親和性をほとんどまたは全く示さない。例えば、同じ対象からの非抗CCP抗体に対する親和性は、バインダーまたはリガンドの抗CCPに対する親和性の1/100以下、好ましくは1/1,000以下、最も好ましくは1/10,000以下であるべきである。非抗CCP抗体に対する相対的親和性は、1/10⁴~1/10⁸であることが特に好ましい。

10

【0018】

本発明のアッセイはホモジニアス(homogeneous)であり、方法の簡素化、自動化の容易化、試薬および反応工程数の削減ならびに信頼性の向上において大きなメリットを提供する。しかしながら、過剰または未結合の試薬を洗い流す機会がないため、アッセイの設計には多大な要求が課される。

【0019】

本発明者らは、適切な結合および検出技術により、ヘテロニジアス相の洗浄および分離を必要とすることなく高感度および高信頼性を実現する、抗CCP抗体のホモジニアスアッセイを設計し得ることを認識した。

20

【0020】

本明細書で用いられる「ホモジニアス(homogeneous)」という語は、サンプル試薬またはその他の混合物が、安定した単一の液相であることを示している。よって、十分に小さい微粒子の懸濁液が、少なくとも実験を行うための所要時間、好ましくは1時間、より好ましくは3時間に渡り、バルク液相に沈澱したり、有意に浮遊したりしないものを、分子溶液はホモジニアスであると考え。最も好ましいのは、より長期間、例えば、少なくとも1週間、好ましくは少なくとも1ヶ月に渡り安定した浮遊物である。タービジメトリー等により検出するに当たり、本発明の方法はホモジニアス技術を用いる。この場合、正確な測定を行うために混合物が十分な時間（通常、20秒~3時間、より好ましくは2~60分）、ホモジニアスを保つことのみが必要である。

30

【0021】

上記と対応し、本明細書で用いられる「ホモジニアスアッセイ(homogeneous assay)」という語は、サンプルと少なくとも1つの試薬とを混合してシグナルを生成し、相分離を伴う分離または洗浄工程を行うことなく、そのシグナルを検出するアッセイ方法である。よって、本発明のホモジニアスアッセイ方法において、固体支持体に対する結合または捕獲により、サンプルの抗CCP抗体成分または抗CCP抗体成分を含む複合体がバルク液相から分離されることはない。よって、相分離工程の必要がなく、この方法のプロセスは著しく簡素化される。本発明の方法に先立ち、相分離による抗CCPの予備濃縮を行うことができるが、工程数およびアッセイの全体的な複雑性が増加するため、これは好適さに劣る実施形態である。本明細書に詳細に記載されるように、このようなホモジニアスアッセイ方法において洗浄工程を不要とすることができるため、これを念頭において方法、バインダーおよびシグナル生成部分を選択しなければならないことは明白である。

40

【0022】

例えば、固体表面を必要とするホモジニアスではない技術の自動化と比較して、適切でホモジニアスアッセイの自動化は、比較的容易である。また、その結果自動化されたホモジニアスプロセスは、信頼性が高く、必要とされる計器装備がより簡素であるため、例えば、故障しにくいことが多い。また、自動化されたホモジニアスアッセイは、高速で、サ

50

ンプルのハイスループットを可能にし、比較的廉価で作動する。

【0023】

ホモジニアスアッセイを行うため、様々な種類の周知のアッセイ形式を適用しても良く、特に有用であるのは、サンプルの成分を集約することでシグナルを生成するアッセイ形式である。抗体は、その多価（特に、二価）性により架橋剤として機能するため、それらのバインダーを2個ずつ集約したり、また特異的バインダーの少なくともいくつかが多価である場合は、より大きな集合体に集約したりする。したがって、抗CCP結合パートナー複合体は、抗体または結合パートナーを単独で著しく検出することのない手段によって検出可能であることが好ましい。適切な方法として、蛍光共鳴エネルギー転移（FRET - 2つの蛍光団を別々に2つの抗CCP結合パートナーに付着させる）、シンチレーション近接アッセイ（SP - 放射性標識およびシンチラントを別々に2つの抗CCP結合パートナーに付着させる）、蛍光偏光（FP - より大きな複合体を形成することで、少なくとも1つの特異的バインダーに付着した蛍光団の転回(tumbling)そして偏光解消を減速させる）および特に、凝集（サンプル中の小粒子および/または成分の凝集により入射放射（特に、レーザー光等の光）の吸収または散乱を増加させ、小粒子/成分により形成され、それらの総効果よりも大きな散乱効果を有するより大きな粒子を生成する）が挙げられる。粒子凝集は、通常、タービジメトリーまたはネフェロメトリーにより測定される。

10

【0024】

よって、本発明の非常に好ましい実施形態は、CCPペプチドおよび/または抗CCP結合アプタマー等の抗CCPバインダーでコーティングされるか、または抗CCPバインダーに付着した粒子（ラテックス粒子等）の凝集を伴うホモジニアスアッセイ形式により、抗CCP抗体を評価することである。

20

【0025】

閾値および基準範囲は、多くの実用技術により決定され得る。閾値は、最終的に、様々なステージの患者を試験し、その結果を健康ボランティアの対照群と比較したものに基いていなければならない。これは周知の慣習であり、試験が行われる地域における当該人口群のプロフィールを確立するため、本発明のアッセイ方法に関して直接的に行われることが好ましい。好ましい閾値とは、臨床的にRAであると確認された患者の少なくとも80%が、その選択された値を超えるシグナルを生成するサンプルを提供する（好ましくは、少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、例えば95%~略100%）ような値である。同様に、好ましい閾値は、健康な対照被験者の少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%（例えば、95%~略100%）が、その閾値を超えるシグナルを生成するサンプルを提供するように選択される。

30

【0026】

抗CCPおよびそのRAとの相関性を測定する既存の方法が利用可能かつ有効であるため、上記方法に対する代替的または補完的な手法は、本方法から生成されたシグナルを、1つ以上の既存の抗CCP RAアッセイ方法のスケールに対して較正するものである。一例として、英国Dundeeのアクシスシールド・ダイアグノスティクス(Axis-Shield Diagnostics)社より入手可能なDIASTAT(TM)抗CCP ELISA(DIASTAT(TM) Anti-CCP ELISA)アッセイは、市販され広く利用可能な抗CCPのヘテロジニアスアッセイ方法で、U/mlと呼ばれる1ml当たりの任意の単位でアッセイ結果が提供される。一連のサンプルを両方の方法を用いて処理し、2つのスケールを関連付ける較正曲線を作成することで、本発明の方法をこのような方法に対して較正し得ることは明白である。これにより、閾値および基準値を周知の基準から本発明の新規なホモジニアス方法に変換することができる。

40

【0027】

本発明の方法を上記DIASTAT(TM)抗CCP ELISAアッセイに対して較正した場合、（健康個体に関して）抗CCP濃度の値が一般的に確認される相当基準範囲は、 $< 1.0 \sim 2.9$ U/mlである。血清または血漿中の抗CCP濃度が 5.0 U/mlを超える（例えば、 $3.5 \sim 2000$ 、好ましくは $5.0 \sim 500$ 、特に $8.0 \sim 20$

50

0 (以上) U / m l) 場合、一般的に、R A の可能性または R A の傾向を非常に強く示している。一実施形態において、抗 C C P 値が閾値 (例えば、3 U / m l 、好ましくは 5 U / m l) を超えて高いほど、R A の傾向が強いと考えられる。

【0028】

本発明において抗 C C P の濃度を評価する特に好ましいアッセイ方法は、粒子ベースのイムノアッセイである。これは、抗 C C P 抗体により仲介された懸濁液中のナノ粒子の凝集をタービジメトリー検出し、それに応じて抗 C C P 濃度を決定することに基づく感度の高い技術である。このアッセイにより提供される感度には、体液 (例えば、血漿または血清) サンプル中の比較的低濃度の抗 C C P を高水準の精度で測定できるという利点がある。同時に、比較的高濃度の抗 C C P も正確に測定することができる。

10

【0029】

通常、抗 C C P の含有量が広範囲に渡る較正サンプルを用いてアッセイ方法の較正および標準化が行われる。最も効果的かつ代表的な較正サンプルは、一般的に、抗 C C P 抗体の総数が非常に多い患者から採取され、較正範囲を形成するため必要に応じて希釈された臨床サンプルから得られる。上記 D I A S T A T (T M) 抗 C C P E L I S A アッセイに対して標準化された較正範囲 0 ~ 2 0 0 0 U / m l が非常に適切であるが、実際には、0 ~ 2 0 0 U / m l の範囲で十分に必要な臨床情報が得られ得る。この検体には国際的な参照基準傾向が存在しないため、このアッセイは、本明細書に詳細に記載される任意のアクシスシールド単位 (U / m l) を用いる。本発明のアッセイ方法は、濃度 0 . 5 U / m l までの C C P 、好ましくは 0 . 1 U / m l までの C C P に対して感度を有することが好ましい。よって、検出可能な範囲は、約 0 . 1 ~ 2 0 0 0 U / m l 、例えば 0 . 1 ~ 2 0 0 0 U / m l となる。

20

【0030】

上記に示したように、本発明の方法を標準サンプルに対して直接的に較正することが好都合であり、患者群および健康個体の対照群を試験することで適切な閾値を決定すべきである。多くの場合、抗 C C P 抗体の絶対的な濃度と特定の閾値または検出値との相関関係を知る必要はない。再現性があり、好ましくは、結果の直接比較を可能にするため、上記に述べた D I A S T A T 方法等のその他の一般的な方法で用いられるスケールとの関連付けが可能であれば、任意のスケールで十分である。全ての局面における本発明のアッセイ方法は、定性的、半定量的または完全定量的であり得るが、1つ以上の対照サンプルに対してレベルを評価する定性アッセイが最も容易に行われる実施形態である。しかしながら、標準曲線への補間等の適切な方法により、任意または絶対的なスケールに対する半定量または完全定量アッセイを行い得る。

30

【0031】

上記目盛り 0 . 1 ~ 2 0 0 U / m l は、約 1 0 n g / m l ~ 2 0 μ g / m l の抗 C C P 抗体に対応すると考えられるが、これは異なる抗体の親和性の相違に左右される。よって、R A を有する対象および R A を有さない対象の個体群を参照することで1つ以上の閾値を決定することは、好適かつ幾分必要であるが、これをヒト対象に関する適切な検出範囲および閾値の指針として用いることができる。よって、R A の存在または非存在の適切な閾値は、約 0 . 1 μ g / m l ~ 約 5 μ g / m l 、特に約 0 . 2 μ g / m l ~ 約 2 μ g / m l 、最も好ましくは約 0 . 4 μ g / m l ~ 約 1 μ g / m l であり得る。それに対応し、適切な検出範囲および標準液または較正液の適切な範囲は、約 1 n g / m l ~ 約 2 0 0 μ g / m l 、好ましくは 1 0 n g / m l ~ 約 1 0 0 μ g / m l である。

40

【0032】

上記に述べたように、タービジメトリー法は本発明の非常に好ましい実施形態であり、このようなアッセイを自動化するのに必要な設備は周知であるため、主にタービジメトリー法を参照して本発明を説明する。しかしながら、当該技術における従来の標識 / 検出システムを用いて以下に開示される方法を適合させることで、本明細書において上記したような、成分を集約して新たなシグナルを生成することに基づくアッセイ方法も同等に用いられ得る。混濁液は、吸着 (タービジメトリー) 法または散乱 (ネフェロメトリー) 法に

50

より分析され得るため、本明細書で用いられる「タービジメトリー」という語は、文脈が許す場合、ネフェロメトリー検出を含む。

【0033】

本発明におけるタービジメトリー測定はホモジニアスであるため、アッセイにおける物理的分離に固体表面が不要で、多数の洗浄および/または分離工程が不要であるという利点もある。よって、先行技術(例えば、ELISA)と比較して、本発明のホモジニアス方法において、抗CCPの測定は迅速かつ容易に実施され、例えば、簡単に自動化され得る。

【0034】

上記に述べたように、自動化されたホモジニアスタービジメトリーアッセイも、高速であり、サンプルのハイスループットを可能にし、比較的廉価で作動する。通常、例えば、ロシュ・ダイアグノスティクス(Roche Diagnostics)社より入手可能なCobas MiraまたはHitachi 711等の市販のロボットを用いて行うことができる。このような自動化されたアッセイは、RAの可能性または傾向に関し、個体(例えば、本明細書に記載される高リスク群の個体)を定期的に検査することが予想される場合に、特に魅力的である。

10

【0035】

本発明の全ての方法において、重要な工程は、抗CCP濃度の測定であり、抗CCP含有サンプルは、一般的に、体液、例えば、尿、脳脊髄液、口腔液、滑液(synovial fluid)または気腫液(emphysema fluid)、より好ましくは全血または血液由来サンプルである。血液由来サンプルを用いる場合、分析に用いられるサンプルは、細胞が減少したもの(例えば、血清または血漿)であることが好ましい。通常、細胞欠乏(cell depletion)は、細胞の少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%をサンプルから除去することによるものである。実質的に100%までの細胞を除去し得る。血液および血液製剤を含むサンプル液は、アッセイされていない細胞および/またはサンプル成分が除去されるように処理され得る。サンプルは、(例えば、抗CCP抗体を別個の(例えば、個体基質)媒体に移し、分離し、そしてより高濃度で再懸濁させることで)濃縮または希釈されるように処理されても良い。必要に応じ、遠心分離、特定成分の分離または抗凝固剤等の防腐剤の添加を含む、その他の周知のサンプル前処理方法も適切である。例えば、水、緩衝液またはその他の水性媒体を添加することでサンプルを希釈しても良い。あるいは、サンプル、特に全血、血清または血漿サンプルを直接用いることも好ましい。本発明の方法に用いられるサンプルは、一般的に、「抗CCP含有サンプル」で、これは、本明細書において、特にRAまたはRAの傾向を有する対象における、抗CCPを通常含むサンプルを示すために用いられている。よって、このようなサンプルにおける抗CCPの存在はある程度想定されるが、アッセイ方法により測定される。それに対応し、このようなサンプルにおいて抗CCPが適切な検出レベルで非存在であることは、RAの欠如またはRAのリスクもしくは傾向の低下を示すものと見なすことができる。

20

30

【0036】

サンプルを採取してリスクまたは可能性の診断または分析を行う対象は、ヒトまたは非ヒト動物対象、特に哺乳類、好ましくはヒト、イヌ科またはネコ科の哺乳類である。ヒト対象が最も好ましい。対象は、RAの臨床症状が存在している対象であっても存在していない対象であっても良い。いかなる対象も試験に適しているが、最も適しているのは、RAの既知のリスクまたは徴候を多少有する個体や、リスクのある群に含まれる個体、例えば、高齢の対象(例えば、50歳、特に60歳、最も特に65歳を超えるヒト対象、例えば、50~100歳の対象)、骨の損傷または障害を患った対象、高まるもしくは異常な関節疲労を患った対象(例えば、運動選手)または関節疲労を罹患しやすい職業に就いているもしくは就いていた対象である。RAを罹患しやすいその他の条件を有する対象、特に、炎症性および/または自己免疫性疾患を有する対象、RAの家族歴を有する対象および/または遺伝子検査によりRAを発症しやすい素質であることが指摘された対象も非常に適している。その他の可能性のある対象群として、RAを示し得るがその他の症状を示している可能性がある臨床症状、例えば、関節硬直や関節痛を有する対象が挙げられる。

40

50

この方法は、症状のない患者（例えば、高リスク群に含まれる外見上は健康な対象）や、R Aの軽度または初期の症状しかない患者において特に有益で、不可逆的な損傷が発生する前に、診断が実施、確認または支持され、適切な治療が開始され得る。

【0037】

本発明の重要な一局面は、抗CCP抗体の特異的バインダーとして、少なくとも1つのCCPペプチド抗原を用いることに関する。合成CCPペプチドは既知で、一般的な技術または商業的ペプチド合成を用いて利用可能である。組換えペプチドを形成し、必要に応じて修飾することでCCPペプチドを生成することもできる。適切なCCPペプチドおよびそれらの類似体の配列および性状は、W098/22503より入手可能で、その全開示を本願に引用して援用する。適切なCCPペプチドは、（直接または間接的に）シグナル生成部分に結合、連結またはリンクすることで、CCP/抗CCP結合の程度に対応したシグナルを生成するように用いられ得る。例えば、従来ペプチド形成技術により得られたCCPペプチドを本発明の方法に用いても良い。

10

【0038】

抗CCP抗体は、環状シトルリン化ペプチドおよびそれらの環状類似体だけでなく、適切な配列の直鎖状ペプチドとも特異的に反応することが示されている（例えば、W098/22503を参照）。よって、本発明に用いられるCCPペプチドは、環状であり得るが、環状であれ直鎖状であれ、少なくとも1つの修飾アルギニン残基、特にシトルリン化するよう修飾されたアルギニンを有するペプチドまたはその類似体である。このようなペプチドは、鎖内にジスルフィド結合が存在することで環状となり得るが、その他の形式の架橋が用いられても良い。適切なペプチドは、任意の大きさであり得るが、長さが約5~200残基、好ましくは8~80残基、より好ましくは約10~30残基のペプチドであることが好ましい。特に好ましいシトルリン化部分および特に好ましいCCPペプチド配列の定義を含む上記W098/22503のFORMULA SHEETおよびその請求項2を特に参照する。よって、W098/22503のFORMULA SHEETおよびその請求項2を本発明の開示に特に援用する。

20

【0039】

シグナル生成部分は、例えば、タービジメトリーアッセイの場合は粒子であり、FPアッセイの場合は第1のシグナル生成部分として蛍光団で、また任意に、第2のシグナル生成部分として粒子や高分子等のより大きな分子であり、FRETアッセイの場合は所要の蛍光団の一方または両方であり、SPアッセイではシンチラントおよび/または放射性同位体であり得る。サンプル中の抗CCP抗体による結合、特に二重結合/架橋の作用によって様々なシグナル生成部分が集約されると、対応するシグナルが生成され、対応する方法により検出され得る。FRETやSP等の特定の場合、2つ以上のシグナル生成部分が必要とされ、特定の比率（例えば、1:1）または制御された方法で集約されることが最も好都合である。このような場合、比率および結合が制御されるよう、抗CCP抗体の単一の特異的バインダーを各種類のシグナル生成部分に付着させることが好都合であり得る。これらは、よく制御された組み合わせで抗CCP抗体がシグナル生成部分を集約するよう、非重複的（例えば、CCPペプチドと適切な抗CCP結合アダプター）であり得る。これらの場合、各シグナル生成部分は、通常、単一の特異的バインダーに付着する。

30

40

【0040】

タービジメトリー等のその他の方法において、いくつかのシグナル結合部分を集約して拡張ネットワークを形成することが非常に有用であり得る。これは、2つ以上（例えば、2~1000、特に2~100）の特異的バインダーを単一のシグナル生成部分に結合させることで達成され得る。本発明の一実施形態において、シグナル生成部分は、別個の存在物(entity)ではなく、特異的バインダー自体であっても良い。このような場合、シグナルを生成するのは結合作用であって、このようなシグナルは、通常、サンプルの散乱特性の違い等の物理的变化または放出された結合エネルギーによるサンプル温度の非常に小さな変化である。特異的バインダーが抗体のように本質的に多価（例えば、二価）であり、特に、抗CCP抗体の異なる領域（エピトープ）を認識する様々なバインダー（例えば、

50

異なる領域を認識する少なくとも2つの異なる抗CCP結合アプタマー)が存在する場合、特異的バインダーが集約されると、検出可能な大きさの生成凝集体が架橋ネットワークにより形成されるため、バインダー自体の大部分がシグナル生成部分となり得る。同様に、いくつかのCCP抗原配列が、単一のペプチドにおいて、または骨格分子もしくは粒子に付着した抗原として相互にリンクしている場合、検出可能な大きさの生成凝集体が架橋ネットワークにより形成される。

【0041】

タービジメトリーアッセイにおいて、抗CCP含有サンプルまたはそのアリコート、好ましくはナノ粒子等の不透明化発生部分に結合したCCPペプチド抗原に接触させることで、不透明化が発生し得る。特に好ましい方法において、2つ以上(例えば、2~1000、特に2~100)の抗CCPペプチドを各粒子に結合し得る。

10

【0042】

抗CCP濃度を測定する本発明の方法において有用なCCPペプチドは、溶離液中に存在し得るその他の血液タンパク質との交差反応を全くまたはほとんど示さないことが好ましい。いかなる場合においても、ペプチドの使用量は、当然、抗CCP含有標準サンプルに対して最適化され得る。これは、タービジメトリー等の方法や架橋/オリゴマー化を伴うその他の方法において特に重要である。なぜなら、これらの効果は非線形であり得るからである。タービジメトリーに関し、付着効果に起因して不透明化が発生することで、抗CCPの多重結合により不透明化中心が生じる。しかしながら、この効果に要する結合の程度は、シグナル生成部分の大きさや、これらの各々にリンクした特異的バインダーの平均数等の因子に左右される。

20

【0043】

タービジメトリーの好ましい一実施形態において、CCPペプチドは、均一なタービジメトリーアッセイにおける固定化に広く用いられている周知の固体支持体またはマトリックスに、結合または連結により、直接または間接的に固定化されても良い。

【0044】

本発明の全てのタービジメトリー方法において(ネフェロメトリー検出を用いる方法を含む)、固体支持体またはマトリックスは、粒子形態であることが好ましく、水性媒体に懸濁し得る、赤色光、好ましくは青色光、より好ましくは紫外線光の波長よりも小さい(例えば、250nm未満)粒子形態であることが最も好ましい。ナノ粒子、特に、直径が0.5~800nm、好ましくは2~250nm、より好ましくは10~100nmの粒子が最も好ましい。固体支持体は、ガラス、シリカ、ラテックス、金属(例えば、金)または高分子材料(例えば、ポリエチレン)で形成されることが便利である。固体支持体は、ポリエチレン等の高分子材料で形成されることが好ましい。

30

【0045】

タービジメトリーの実施形態において、特異的バインダー(例えば、CCPペプチド、抗体、抗体断片またはアプタマー)が結合し得る粒子は、通常、球形である。このアッセイに用いられる粒子の大きさは、抗CCP濃度の測定精度に影響し得る。粒子が大きいと、低濃度の抗CCPの検出が可能であるが、それらの表面積が減少することは、結合能が低下することを意味する。例えば、粒径を2倍にすると、粒子の質量単位の結合能は半減する。

40

【0046】

さらに、粒形を大きくすると、このようなアッセイで通常用いられる波長(例えば、330~600nm)におけるバックグラウンド光吸収および光懸濁のレベルが増加する。よって、粒子が大きいとアッセイの感度は増加するが、これにより精度が幾分低下し、特に、偽陰性結果の数が増加し得る。これは、特に、比較的高濃度の抗CCPを含むサンプル(例えば、RAの可能性または傾向が高い個体から得られたサンプル)に見られる可能性が高く、この場合、ナノ粒子が結合した結合部位は、全ての抗CCPが結合することなく飽和し得る。しかしながら、アッセイを適切に設計することで、臨床診断における当該閾値を十分に超える濃度でこの飽和点に達するようにすることができる。この非常に高い

50

レベルを定量化する必要がある場合、より高い抗CCP濃度範囲に適した別の試薬を用いるか、より好ましくは単に周知の倍数（例えば、10または100）で元のサンプルを希釈して再度それを元のアッセイ方法にかけることにより、第2の試験を行うようにアッセイ操作者を促すことができる。

【0047】

粒径の変化に伴うこれらの反作用的効果（例えば、粒径を大きくすると感度は増加するが、精度は低下する）は、体液中に存在する抗CCPレベルの範囲をタービジメトリーにより検出する高感度アッセイの発展において克服すべき重大な問題を表している。しかしながら、このようなアッセイを本明細書において記載し、添付の実施例において説明する。

10

【0048】

本発明のアッセイ方法において、使用される粒子および方法は、広範囲の抗CCP濃度の正確な測定を可能にするものであることがさらに好ましい。これは、高い信頼性は、陰性結果（すなわち、閾値を下回る濃度）および陽性結果の両方に起因し得るものであることを意味し得る。本発明のアッセイ方法において、1 pg/ml ~ 100 µg/ml、好ましくは1 ng/ml ~ 50 µg/ml、より好ましくは10 ng/ml ~ 10 µg/ml（例えば、0.05 U/ml ~ 200 U/mlまたは0.5 ~ 200 U/mlに略対応する、例えば、10 ng/ml ~ 1 µg/mlまたは100 ng/ml ~ 10 µg/ml）の範囲の抗CCP濃度を有するサンプルを測定可能であることが特に好ましい。

【0049】

CCPペプチド、アプタマー等の抗CCPバインダーが結合し得る粒子は、通常、直径が1 ~ 150 nm、例えば10 ~ 90 nmまたは15 ~ 60 nm、例えば44 nmの球形である。本発明の特に好ましいアッセイ方法において、CCPペプチド等の抗CCPバインダーが結合し得る粒子は、直径が55 ~ 140 nm、より好ましくは65 ~ 110 nm、例えば70 ~ 90 nmである。

20

【0050】

粒子は、「裸」の状態およびコーティングされた状態の両方において、分光光度測定に用いられる光の波長をそれ自体で吸収することができない直径を有することが好ましい。よって、コーティングされたナノ粒子の懸濁液は、抗CCPに誘導された凝集体形成が生じ、その結果より大きな直径の凝集体が形成されるまで、略（例えば、実質的に）透明である。このような凝集体は、分光光度計に用いられる光の波長を吸収および散乱させる能力を有する。

30

【0051】

さらに、粒子は、実質的に全て同じ大きさ、すなわち全て同じ直径であることが好ましい。したがって、1%未満の粒子が平均の2倍を超える直径を有する場合があります。単分散金属（例えば、金）または高分子粒子を用いることが好ましい。単分散高分子粒子は、ノルウェー、オスロのダイナル・バイオテックAS (Dyna Biotech AS) 社より入手可能である。

【0052】

理論に縛られることを望まないが、実質的に全て同じ大きさの固体支持体またはマトリックス（例えば、ナノ粒子）を用いることで、タービジメトリーアッセイの感度が増加し得ると考えられている。

40

【0053】

CCPペプチドまたはその他のペプチド特異的バインダーの結合または固定化は、任意の従来技術を用いて達成し得る。例えば、アビジン（ピアース・ケミカル社 (Pierce Chemical Company) より入手可能）を、緩衝液中で攪拌する（例えば、室温で24時間）ことでクロロメチル活性ポリスチレンナノ粒子（米国インターフェイシャル・ダイナミック社 (Interfacial Dynamic Corporation) より入手可能）上に固定化し、ビオチン標識CCPペプチド（当該技術における従来技術に従って調製）と共に使用しても良い。よって、例えば、分光光度計の石英容器内におけるアビジンでコーティングされたナノ粒子の溶液に

50

、試験対象から採取した血漿を添加した後、ビオチン標識CCPペプチドを添加する。その後、濁度の読み取りを行う。このような方法の結果を図1に示す。

【0054】

あるいは、血漿または血清を添加する前に、ビオチン標識ペプチドを添加しても良い。換言すると、濁度検出に用いられる計器に関わらず、通常同じ試薬が用いられるが、様々な試薬が添加される正確な順序は異なり得る。一般的に、用いられる順序は、使用される分光光度計（例えば、シマヅ(Shimadzu)UV-160分光光度計）に付随する説明書に従うべきである。

【0055】

濁度の読み取りを行い（すなわち、適切な周波数における光吸収または光散乱を一定間隔で測定し）、基準に対する測定値を求める。当該技術において周知であるように、その他の検出方法に類似の方法が用いられる。任意に、多波長計器を用いて濁度の読み取りを行い、より正確な結果を提供しても良い。濁度の読み取りを行う適切な計器として、Cobas Mira、ロシュインテグラ(Roche Integra)およびメルクのタービクアント(Merck's Turbiquant)が挙げられる。

10

【0056】

別の実験装置において、粒状透明化発生部分に対するCCPペプチドの結合または固定化を、その他の従来技術を用いて達成しても良い。例えば、非特異的IgGまたは疎水性タンパク質を、緩衝液中で攪拌する（例えば、室温で24時間）ことでクロロメチル活性ポリスチレンナノ粒子（米国インターフェイス・ダイナミック社より入手可能）上に固定化し、ナノ粒子に対するIgG分子の結合前または後に、架橋試薬（米国ピアース社より入手可能、当該技術における従来技術に従って調製）を用いてCCPペプチドに連結しても良い。よって、例えば、分光光度計の石英容器内におけるコーティングされたナノ粒子の溶液に、RAの可能性または傾向を試験する対象から採取した血漿を添加する。その後、濁度の読み取りを行う。図2および図3を参照のこと。

20

【0057】

濁度検出に用いられる計器に関わらず、通常同じ試薬が用いられるが、様々な試薬が添加される正確な順序は異なり得る。一般的に、用いられる順序は、使用される分光光度計（例えば、シマヅUV-160分光光度計）に付随する説明書に従うべきである。

【0058】

本発明の濁度アッセイ方法に従って濁度の読み取りを行うのに適した自動化ロボットとして、例えば、ロシュ・ダイアグノスティクス社より入手可能なCobas MiraおよびHitachi 711が挙げられる。

30

【0059】

上記に示したように、実質的に全て同じ大きさの固体支持体またはマトリックス（例えば、ナノ粒子）を用いることで、タービジメトリーアッセイの感度がさらに増加し得る。

【0060】

本発明のアッセイ方法の様々な特徴を最適化して結果を向上させても良い。これらには、以下の好ましい特徴（全て、任意かつ単独で使用可能）が含まれる。

【0061】

任意に、抗CCP濃度を測定する際、キネティック読み取りモードを用いても良い。この方法は、本発明の全ての局面、特にタービジメトリー技術において用いられることが好ましい。

40

【0062】

一般的に、アッセイ方法を実施する際、評価中のサンプルに加え、周知の抗CCP含有量を有する校正サンプルも評価される。このような測定を用いることで、評価中のサンプルの抗CCP含有量を測定可能な校正曲線を描くことができる。

【0063】

抗CCP含有量が10 μ g/ml（例えば、0、1、2、4、5、8および10 μ g/mlのいずれかから選択、またはその他の中間値）までの校正サンプルを用いることが

50

好ましい。

【0064】

シグナル（例えば、FRETまたはFPの蛍光団のシグナル）の刺激が必要である場合、この刺激は、通常、電磁放射線、特に、レーザー光を含む単色光等の光によるものである。適切な波長は、例えば100～800nm、好ましくは250～600nm、最も好ましくは300～600nmである。検出は、（FRETの場合は単独で）同様の範囲で行われ得る。

【0065】

好ましいタービメトリー検出方法において、アッセイ方法を最高のパフォーマンスとするため、いくつかの追加的特徴を最適化しても良い。

10

【0066】

タービメトリーアッセイにおいて慣例化しているように、ポリエチレングリコール等の高分子不透明化エンハンサー(opacity enhancer)も溶離液に添加することが好ましい。

【0067】

タービメトリー測定を行う前に、好ましくはナノ粒子に結合し、任意に不透明化エンハンサーを含む分画、抗体または抗体断片を、短期間、例えば5分～1時間、好ましくは8～20分間（例えば、約10分間）室温でインキュベートしても良い。

【0068】

不透明化の測定に用いられる光は、適切な波長、例えば300～600nmを有するべきである。この点に関し、300～450nmのフィルター、好ましくは340nmまたは405nmのフィルターを用いると、特に良い結果が得られることが分かった。560nmのフィルターを用いても特に良い結果が得られ得る。

20

【0069】

抗CCPを測定する上記アッセイ方法（特に、タービメトリー法により測定する方法）は、驚くほど信頼性が高く、迅速、安価かつ容易で、自動化し易い。これは、比較的複雑で、診断研究所で一般的に用いられている自動化マルチタスク診断装置に直接適用することができない現在利用可能なアッセイ方法とは対照的である。

【0070】

自動化は、多数の混合、添加および/または希釈工程が含まれる場合に特に望ましい。なぜなら、これらをより高精度で達成し得るからである。ロボットも、より高度の信頼性および/または再現性を提供し得る。自動化は、スループットも向上させる。

30

【0071】

しかしながら、妥当な水準の精度を提供し得る現在利用可能なアッセイ方法（例えば、ELISA）は、自動化が困難である。この理由として、少なくとも一つには、通常、それらには多数の洗浄および分離工程（例えば、固体表面への付着）が含まれ、不均一なプロセスの自動化には問題があることが多いことが挙げられる。また、これらのプロセスには、通常、自動化プロトコルを複雑化する比較的多数の工程が含まれる。

【0072】

よって、非常に好ましい実施形態によると、本発明は、抗CCP含有体液における抗CCPを測定するアッセイ方法であって、（a）前記液または前記液由来の抗CCP含有液体サンプルを取得する工程と、（b）任意にナノ粒子が結合したCCPペプチドに前記体液の前記サンプルを接触させ、前記抗CCPを結合させる工程と、（c）任意に、不透明化エンハンサー(opacity enhancer)を添加する工程と、（d）タービメトリーにより抗CCP含有量を評価する工程とを含む方法を提供する。

40

【0073】

このようなアッセイは、異常なレベル（例えば、高レベル）の抗CCPを特徴とするRAの症状の診断に有用であり得る。よって、抗CCPの上昇、例えば、測定可能レベルの抗CCPの上昇や、本明細書に示したような所定の閾値を超える抗CCPの上昇は、本明細書に示した任意の個体を含む任意の個体群またはそれら個体群の組み合わせにおけるR

50

A発症のリスクファクターと見なされ得る。よって、本発明は、RAが存在するリスク、RAの可能性のあるリスクおよび/またはRAの傾向があるリスクを含む、対象におけるRAのリスクを評価するための対応する方法を提供する。抗CCPの上昇は、単独のリスクファクターとして、またはその他のリスクファクターと組み合わせて用いられ得る。本発明に係る抗CCPの評価は、RAと考えられる症状を有しているか、RAのリスクがある対象におけるRAの存在を検証または支持する際にも用いられ得る。適切な個体群は、本明細書において言及された全ての任意の組み合わせを含む。

【0074】

タービジメトリーアッセイ方法に用いられる身体サンプルは、任意の抗CCP含有サンプルまたは抗CCP抗体を含んでいるかもしれない任意のサンプル、例えば、体液もしくは組織サンプルまたは懸濁液等であり得る。好ましいサンプルの種類は、本明細書において上記した。

10

【0075】

一局面において、本発明は、本発明に係るアッセイ方法を行うキットであって、抗CCPのホモジニアス特異的バインダーを少なくとも1つ含むキットを提供する。このキットはまた、少なくとも1つのシグナル生成部分と、好ましくは既知濃度の抗CCP溶液、より好ましくは様々な抗CCP濃度を有する一連のこのような溶液と、好ましくは光透過容器と、好ましくは検出器とを含むことが好ましい。

【0076】

抗CCP抗体特異的バインダーは、少なくとも1つのCCPペプチドおよび/または少なくとも1つの抗抗CCP抗体であることが好ましい。

20

【0077】

この方法がタービジメトリーである場合、抗CCP抗体特異的バインダーは、固体支持体（例えば、ナノ粒子）上に固定化されることが好ましく、キットは、PEGや本明細書に記載したもののような不透明化エンハンサーをさらに含むことが好ましい。

【0078】

必要に応じ、抗CCP含有体液サンプルを受け、シグナル生成部分（例えば、ナノ粒子）に結合した抗CCP特異的バインダーを加え、任意に不透明化エンハンサーを加え、そして抗CCP含有量を評価するように自動化装置を配置しても良い。このような装置も本発明の範囲内に含まれるものと見なされる。

30

【0079】

例示目的で示され、本発明を限定するものではない以下の実施例を参照し、本発明を説明する。添付の図面により、本発明をさらに説明する。

【図面の簡単な説明】

【0080】

【図1】図1は、アビジンでコーティングされたナノ粒子およびビオチン標識CCPペプチドの溶液における抗CCPによる架橋を概略的に示している。

【図2】図2は、CCPが結合した第2の抗体でコーティングされたナノ粒子の溶液における抗CCPによる架橋を概略的に示している。

【図3】図3は、CCPが結合した疎水性タンパク質でコーティングされたナノ粒子の溶液における抗CCPによる架橋を概略的に示している。

40

【実施例】

【0081】

実施例1

抗CCPのタービジメトリーアッセイ

(a)アビジンでコーティングされたナノ粒子の調製

米国インターフェイスナル・ダイナミック社より入手可能な4.2%w/vのクロロメチル活性ナノ粒子（直径44nm）600μlを、孔径が300,000Daの膜を用いて、水に対して透析する。

【0082】

50

ホウ酸塩 (10 mM) および塩化ナトリウム (15 mM) の pH 9.0 の溶液 0.5 ml を加えて混合する。10 mM のホウ酸塩および 15 mM の NaCl の pH 9.0 の溶液 0.5 ml 中に溶解された 10 mg のアビジン (ピアース・ケミカル社より入手可能) を加え、その混合物を室温で 24 時間攪拌する。その後、グリシン溶液 (2 M、pH 9.0) 40 μ l を添加し、その混合物を室温でさらに 4 時間攪拌する。

【0083】

その後、粒子を体積が 100 ml となるよう希釈し、ペリコン XL フィルター (Pellicon XL Filter) (cut off 300, 000) およびラボスケール TTF システム (lab-scale TTF system) (ミリポア (Millipore) 社より入手可能) を用いて、計器の供給業者から提供される説明書に従い、初めに 10 mM のホウ酸塩および 15 mM の塩化ナトリウムの pH 9.0 の溶液 500 ml で、次に 25 mM のトリス、150 mM の塩化ナトリウムおよび 0.01% のツイーン (Tweens) 20 の pH 7.4 の溶液 (米国シグマ (Sigma) 社より入手可能) でダイアフィルトレーションする。アビジンでコーティングされたナノ粒子の所望の濃度は、最終的に、25 mM のトリス、150 mM の塩化ナトリウムおよび 0.01% のツイーン 20 の溶液中の粒子の遠心分離および再懸濁により得られる。この調製手順において形成された凝集体は、遅い遠心分離によって除去しても良い。

10

【0084】

(b) アビジンでコーティングされたナノ粒子を用いた抗 CCP のアッセイ

上記アビジンでコーティングされたナノ粒子の粒子濃度が 1 ml 当たり約 0.30 mg である懸濁液を、25 mM のトリス、150 mM の NaCl、0.1% のツイーン 20 および 2% の PEG 6000 の pH 7.4 の溶液 (シグマ社より入手可能) 中の上記調製物の遠心分離および再懸濁により調製する。この粒子懸濁液 500 μ l を、記録分光光度計 (例えば、シマツ UV-160) の読み取り石英容器内において、RA の傾向を試験している対象から採取した血漿サンプル (約 20 μ l) と混合する。

20

【0085】

340 nm の単色光の吸収を記録し、60 秒後、1.0 nmol のビオチンで標識した CCP ペプチド (例えば、ビオチン標識 CCP ペプチド) 1.5 μ g を 25 mM のトリス、150 mM の NaCl および 0.1% のツイーン 20 の pH 7.4 の溶液 50 μ l に希釈して石英容器に添加し、混合する。340 nm の単色光の吸収は、25 mM のトリス、150 mM の NaCl および 0.1% のツイーン 20 の pH 7.4 の溶液を含む参照キュベットを用いて迅速に記録され、約 15 分経過するまで一定間隔で (例えば、2 分毎に) 再度記録される。各時点における光吸収の増加は、キネティックモードでの標準的な濁度読み取りまたは「エンドポイント」読み取りに従い計算される。すなわち、各時点における光吸収の増加は、CCP でコーティングされたナノ粒子の添加前および / または記録の終盤に行われる読み取りに対して計算される。

30

【0086】

既知濃度の抗 CCP を有する基準に対して同一の手順を行うことで、校正曲線が作成される。その後、校正曲線からサンプル中の抗 CCP の濃度を計算する。

【0087】

実施例 2 : 抗 CCP の別のタービジメトリーアッセイ

40

(a) CCP ペプチドでコーティングされたナノ粒子の調製

米国インターフェイス・ダイナミック社より入手可能な 4.2% w/v のクロロメチル活性ナノ粒子 (直径 44 nm) 1 ml を、孔径が 300, 000 Da の膜を用いて、水に対して透析する。

【0088】

その後、10 mM のホウ酸塩および 15 mM の塩化ナトリウムの pH 9.0 の溶液 0.5 ml を添加する。精製 CCP ペプチド (例えば、アフィニティー精製 CCP ペプチド) 1.5 μ g を 10 mM のホウ酸塩および 15 mM の塩化ナトリウムの pH 9.0 の溶液に対して透析する。

【0089】

50

ナノ粒子を精製 CCP ペプチドに添加した後、その混合物を室温で 24 時間攪拌する。その後、グリシン溶液 (2 M、pH 9.0) 40 μ l を添加し、その混合物を室温でさらに 4 時間攪拌する。

【0090】

その後、粒子を全体積が 100 ml となるよう希釈し、ペリコン XL フィルター (cut off 300, 000) およびラボスケール TFF システム (ミリポア社より入手可能) を用いて、計器の供給業者から提供される説明書に従い、0.10% のツイーン 20 および 3 mg/ml の卵白アルブミンが添加された、10 mM のホウ酸塩および 15 mM の塩化ナトリウムの pH 9.0 の溶液 1000 ml でダイアフィルトレーションする。

【0091】

CCP ペプチドでコーティングされたナノ粒子の所望の濃度は、最終的に、溶液中の粒子の遠心分離および再懸濁により得られる。この調製手順において形成された凝集体は、任意に、遅い遠心分離によって除去される。

【0092】

(b) CCP ペプチドでコーティングされたナノ粒子を用いた抗 CCP のアッセイ

10 mM のホウ酸塩、15 mM の NaCl、0.1% のツイーン 20、3 g/l の卵白アルブミンの pH 9.0 の溶液 50 μ l 中に上記 CCP ペプチドでコーティングされたナノ粒子 400 μ g を含む懸濁液を調製する。

【0093】

同時に、アッセイ緩衝液 (25 mM のトリス、150 mM の NaCl、0.1% のツイーン 20 および 2% の PEG 6000、pH 7.4 (シグマ社より入手可能)) 500 μ l 中における、RA の可能性を試験している対象から採取した血漿 20 μ l を、記録分光光度計 (例えば、シマツ W-160) の読み取り石英容器に入れ、340 nm の単色光の光吸収を測定する。

【0094】

60 秒後、CCP ペプチドでコーティングされたナノ粒子 400 μ g を含む上記懸濁液を添加し、キュベット内で混合する。CCP でコーティングされたナノ粒子を添加した直後の光吸収を記録し、約 15 分経過するまで一定間隔で (例えば、2 分毎に) 再度記録する。各時点における光吸収の増加は、CCP でコーティングされたナノ粒子の添加前および/または記録の終盤に行われる読み取りに対して計算される。換言すると、キネティックモードでの濁度読み取りまたは「エンドポイント」読み取りが行われる。

【0095】

既知濃度の抗 CCP を有する基準に対して同一の手順を行うことで、校正曲線も作成される。その後、曲線からサンプル中の抗 CCP の濃度を計算する。

【0096】

実施例 3 : 抗 CCP のタービジメトリーアッセイ

(a) ストレプトアビジンでコーティングされたナノ粒子の調製

米国インターフェイス・ダイナミック社より入手可能な 4.2% w/v のクロロメチル活性ナノ粒子 (直径 67 nm) 600 μ l を、孔径が 300, 000 Da の膜を用いて、水に対して透析する。

【0097】

リン酸塩 (10 mM) および塩化ナトリウム (150 mM) の pH 7.4 の緩衝液 0.5 ml をストレプトアビジン 10 mg と共に添加し、10 mM のリン酸塩および 150 mM の NaCl の pH 7.4 の緩衝液 (ピアース・ケミカル社より入手可能) 0.5 ml 中に溶解し、その混合物を室温で 24 時間攪拌する。その後、グリシン溶液 (2 M、pH 9.0) 40 μ l を添加し、その混合物を室温でさらに 4 時間攪拌する。

【0098】

その後、粒子を体積が 100 ml となるよう希釈し、ペリコン XL フィルター (cut off 300, 000) およびラボスケール TFF システム (ミリポア社より入手可能) を用いて、計器の供給業者から提供される説明書に従い、初めに 10 mM のホウ酸塩および 1

10

20

30

40

50

5 m Mの塩化ナトリウムのp H 9 . 0の溶液5 0 0 m lで、次に2 5 m Mのトリス、1 5 0 m Mの塩化ナトリウムおよび0 . 0 1 %のツイーン2 0のp H 7 . 4の溶液（米国シグマ社より入手可能）でダイアフィルトレーションする。ストレプトアビジンでコーティングされたナノ粒子の所望の濃度は、最終的に、2 5 m Mのトリス、1 5 0 m Mの塩化ナトリウムおよび0 . 0 1 %のツイーン2 0の溶液中の粒子の遠心分離および再懸濁により得られる。この調製手順において形成された凝集体は、遅い遠心分離によって除去しても良い。

【0099】

ストレプトアビジンでコーティングされたナノ粒子の平均粒形の測定値は、8 2 n mである。

10

【0100】

（b）ストレプトアビジンでコーティングされたナノ粒子を用いた抗CCPのアッセイ
上記ストレプトアビジンでコーティングされたナノ粒子の粒子濃度が1 m l当たり約0 . 6 0 m gである懸濁液を、2 5 m Mのトリス、1 5 0 m MのNa C l、0 . 1 %のツイーン2 0および1 %のPEG 6 0 0 0のp H 7 . 4の溶液（シグマ社より入手可能）中の上記調製物の遠心分離および再懸濁により調製する。この粒子懸濁液5 0 0 μ lを、記録分光光度計（例えば、シマツW - 1 6 0）の読み取り石英容器内において、RAの傾向を試験している対象から採取した血漿サンプル（約5 μ l）と混合する。

【0101】

5 6 0 n mの単色光の吸収を記録し、6 0 秒後、1 . 0 n m o lのビオチンで標識したCCPペプチド（例えば、ビオチン標識CCPペプチド）1 . 5 μ gを2 5 m Mのトリス、1 5 0 m MのNa C lおよび0 . 1 %のツイーン2 0のp H 7 . 4の溶液5 0 μ lに希釈して石英容器に添加し、混合する。3 4 0 n mの単色光の吸収は、2 5 m Mのトリス、1 5 0 m MのNa C lおよび0 . 1 %のツイーン2 0のp H 7 . 4の溶液を含む参照キュベットを用いて迅速に記録され、約1 5分経過するまで一定間隔で（例えば、2分毎に）再度記録される。各時点における吸収の増加は、キネティックモードでの標準的な濁度読み取りまたは「エンドポイント」読み取りに従い計算される。すなわち、各時点における光吸収の増加は、CCPでコーティングされたナノ粒子の添加前および/または記録の終盤に行われる読み取りに対して計算される。

20

【0102】

既知濃度の抗CCPを有する基準に対して同一の手順を行うことで、較正曲線が作成される。その後、較正曲線からサンプル中の抗CCPの濃度を計算する。

30

【0103】

実施例4：抗CCPのタービジメトリーアッセイ

（a）疎水性タンパク質でコーティングされたナノ粒子の調製

米国インターフェイス・ダイナミック社より入手可能な4 . 2 % w / vのクロロメチル活性ナノ粒子（直径6 7 n m）6 0 0 μ lを、孔径が3 0 0 , 0 0 0 D aの膜を用いて、水に対して透析する。

【0104】

リン酸塩（1 0 m M）および塩化ナトリウム（1 5 0 m M）のp H 7 . 4の緩衝液0 . 5 m lを疎水性タンパク質（例えば、ウシ血清アルブミン）1 0 m gと共に添加し、1 0 m Mのリン酸塩および1 5 0 m MのNa C lのp H 7 . 4の緩衝液（ピアース・ケミカル社より入手可能）0 . 5 m l中に溶解し、その混合物を室温で2 4時間攪拌する。その後、グリシン溶液（2 M、p H 9 . 0）4 0 μ lを添加し、その混合物を室温でさらに4時間攪拌する。

40

【0105】

その後、粒子を体積が1 0 0 m lとなるよう希釈し、ペリコンX Lフィルター（cut of f 3 0 0 , 0 0 0）およびラボスケールTTFシステム（ミリポア社より入手可能）を用いて、計器の供給業者から提供される説明書に従い、初めに1 0 m Mのホウ酸塩および1 5 m Mの塩化ナトリウムのp H 9 . 0の溶液5 0 0 m lで、次に2 5 m Mのトリス、1 5

50

0 m M の塩化ナトリウムおよび 0 . 0 1 % のツイーン 2 0 の p H 7 . 4 の溶液（米国シグマ社より入手可能）でダイアフィルトレーションする。疎水性タンパク質でコーティングされたナノ粒子の所望の濃度は、最終的に、2 5 m M のトリス、1 5 0 m M の塩化ナトリウムおよび 0 . 0 1 % のツイーン 2 0 の溶液中の粒子の遠心分離および再懸濁により得られる。この調製手順において形成された凝集体は、任意に、遅い遠心分離によって除去される。

【 0 1 0 6 】

疎水性タンパク質でコーティングされたナノ粒子の平均粒形の測定値は、8 2 n m である。

【 0 1 0 7 】

C C P ペプチドは、従来技術により調製された架橋試薬（米国ピアース社より入手可能）を用いて疎水性タンパク質ナノ粒子に連結する。

【 0 1 0 8 】

（ b ） 疎水性タンパク質でコーティングされたナノ粒子を用いた抗 C C P のアッセイ

上記疎水性タンパク質でコーティングされたナノ粒子の粒子濃度が 1 m l 当たり約 0 . 6 0 m g である懸濁液を、2 5 m M のトリス、1 5 0 m M の N a C l 、 0 . 1 % のツイーン 2 0 および 1 % の P E G 6 0 0 0 の p H 7 . 4 の溶液（シグマ社より入手可能）中の上記調製物の遠心分離および再懸濁により調製する。この粒子懸濁液 5 0 0 μ l を、記録分光光度計（例えば、シマツ W - 1 6 0 ）の読み取り石英容器内において、R A の傾向を試験している対象から採取した血漿サンプル（約 5 μ l ）と混合する。3 4 0 n m の単色光の吸収は、2 5 m M のトリス、1 5 0 m M の N a C l および 0 . 1 % のツイーン 2 0 の p H 7 . 4 の溶液を含む参照キュベットを用いて迅速に記録され、約 1 5 分経過するまで一定間隔で（例えば、2 分毎に）再度記録される。各時点における吸収の増加は、キネティックモードでの標準的な濁度読み取りまたは「エンドポイント」読み取りに従い計算される。すなわち、各時点における光吸収の増加は、C C P でコーティングされたナノ粒子の添加前および / または記録の終盤に行われる読み取りに対して計算される。

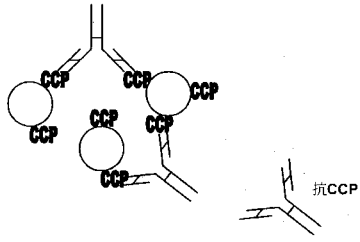
【 0 1 0 9 】

既知濃度の抗 C C P を有する基準に対して同一の手順を行うことで、較正曲線が作成される。その後、較正曲線からサンプル中の抗 C C P の濃度を計算する。

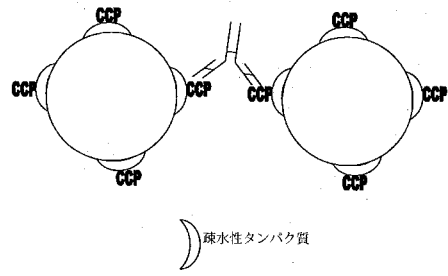
10

20

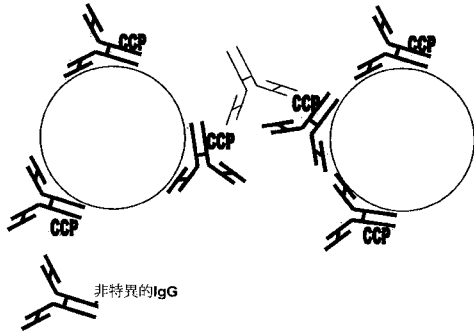
【 図 1 】



【 図 3 】



【 図 2 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2009/000470

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/543 G01N33/564		
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) 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) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 1 882 946 A (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH [DE]; HOFFMANN LA ROCHE [CH]) 30 January 2008 (2008-01-30) paragraph [0033] examples 1-4 claims 1-6	1-19
X	WO 01/46222 A (INNOGENETICS NV [BE]; UNION ANN [BE]; MOEREELS HENRI [BE]; MEHEUS LYDI) 28 June 2001 (2001-06-28) page 22 - page 24; claims 1-22	1-19
-/--		
<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 :		
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. *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 15 April 2009		Date of mailing of the International search report 28/04/2009
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 6816 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040 Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Bayer, Martin

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/GB2009/000470

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>BAS S ET AL: "Diagnostic tests for rheumatoid arthritis: comparison of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies, anti-keratin antibodies and IgM rheumatoid factors" RHEUMATOLOGY, OXFORD UNIVERSITY PRESS, LONDON, GB, vol. 41, no. 7, 1 July 2002 (2002-07-01), pages 809-814, XP002333658 ISSN: 1462-0324 the whole document</p>	1-19
Y	<p>SHOVMAN O ET AL: "The diagnostic utility of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies, matrix metalloproteinase-3, rheumatoid factor, erythrocyte sedimentation rate, and C-reactive protein in patients with erosive and non-erosive rheumatoid arthritis." CLINICAL & DEVELOPMENTAL IMMUNOLOGY SEP 2005, vol. 12, no. 3, September 2005 (2005-09), pages 197-202, XP002523636 ISSN: 1740-2522 the whole document</p>	1-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2009/000470

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1882946	A	30-01-2008	EP 1700129 A2	13-09-2006
WO 0146222	A	28-06-2001	AU 2012301 A	03-07-2001
			CA 2391356 A1	28-06-2001
			DE 1240180 T1	14-08-2003
			ES 2174770 T1	16-11-2002
			US 2002143143 A1	03-10-2002

フロントページの続き

(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, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, 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, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, 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, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 プリチャード、デイビッド

イギリス、ディーディー2 1エックスエー ダンディ、ザ テクノロジー パーク、ルナ プレ
イス、アクシス - シールド ダイアグノスティックス リミテッド内

(72)発明者 サンドレハーゲン、アーリング

ノールウェー、エヌ - 0 5 1 0 オスロ、オケルン ピー . オー . ボックス 2 0 6、ウルフェンフ
アイエン 8 7、アクシス - シールド エイエスエイ内

Fターム(参考) 4H045 AA11 AA30 CA40 DA86 EA50 FA40

专利名称(译)	测定针对环瓜氨酸化肽的抗体的方法		
公开(公告)号	JP2011514517A	公开(公告)日	2011-05-06
申请号	JP2010547246	申请日	2009-02-20
申请(专利权)人(译)	轴 - 盾诊断有限公司		
[标]发明人	ミルンケン プリチャードデイビッド サンドレハーゲンアーリング		
发明人	ミルン、ケン プリチャード、デイビッド サンドレハーゲン、アーリング		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/564 G01N33/543 C07K14/435		
CPC分类号	G01N33/564 G01N2800/102		
FI分类号	G01N33/53.N G01N33/564.B G01N33/543.581.D C07K14/435		
F-TERM分类号	4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA86 4H045/EA50 4H045/FA40		
优先权	2008003107 2008-02-20 GB 61/046082 2008-04-18 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及在临床样品中测定抗环瓜氨酸化肽抗体的方法，所述方法包括使所述样品与至少一种包含至少一种用于抗CCP抗体的特异性结合剂的均相试剂接触，从而形成溶液或悬浮液在均相样品混合物中测定抗CCP结合配偶体复合物，并在均相液相中检测所述抗CCP结合配偶体复合物的存在或水平。本发明还涉及一种评估存在的方法；风险；潜力；或倾向于受试者的RA。

