



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107076742 A

(43)申请公布日 2017.08.18

(21)申请号 201580058686.2

(22)申请日 2015.10.29

(30)优先权数据

2014-222096 2014.10.30 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.04.27

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2015/080522 2015.10.29

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/068226 JA 2016.05.06

(71)申请人 国立研究开发法人产业技术综合研究所

地址 日本东京都

申请人 学校法人庆应义塾

格莱克白欧马克领先创新有限公司

(72)发明人 久野敦 松田厚志 成松久

竹内勤 铃木胜也 竹下胜

(74)专利代理机构 北京信慧永光知识产权代理有限公司 11290

代理人 张淑珍 王维玉

(51)Int.Cl.

G01N 33/564(2006.01)

C07K 14/42(2006.01)

C12N 9/64(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/573(2006.01)

权利要求书4页 说明书31页 附图10页

(54)发明名称

类风湿性关节炎标志物

(57)摘要

本发明提供通过简便的方法高灵敏度且可靠地评价类风湿性关节炎的疾病活动性的方法以及用于该方法的试剂盒。进一步地,本发明还提供类似的类风湿性疾病类风湿性多发肌痛症和复发性多发软骨炎的正确的方法、类风湿性关节炎的鉴别方法以及用于该方法的试剂盒。本发明提供作为负相关性的类风湿性关节炎诊断用标志物的Jacalin结合性O-结合型糖链抗原表位,并且通过将血液中的MMP-3与Jacalin的结合量的倒数乘以血液中的MMP-3的量或血液中的MMP-3与ABA、ACA或ACG的结合量得到的值的变化量,更客观地判定类风湿性关节炎的疾病活动性,从而使更正确的病情把握成为可能。另外,发现血液中的MMP-3上的LEL或STL反应性糖链成为类风湿性多发肌痛症和复发性多发软骨炎诊断用糖链标志物,提供了类风湿性多发肌痛症和复发性多发软骨炎的正确的方法。进一步地,通过测定血液中的MMP-3上的LEL或STL结合量与

MMP-3上的Jacalin或ACG等的结合量之比,提供了可以与类似的类风湿性疾病鉴别的类风湿性关节炎的正确的方法。

1. 提供用于判定类风湿性关节炎的疾病活动性的数据的方法,所述方法包括:测定受试体液试样中的MMP-3上的O-结合型糖链的糖链结构的变化的工序。

2. 如权利要求1所记载的方法,所述方法如下进行:

前述糖链结构的变化的测定是将显示受试体液试样中的MMP-3总量的测定信号乘以显示MMP-3上的Jacalin结合性O-结合型糖链总量的测定信号的倒数,或者,前述糖链结构的变化的测定是将显示受试体液试样中的MMP-3总量的测定信号的倒数乘以显示MMP-3上的Jacalin结合性O-结合型糖链总量的测定信号,计算下述糖链修饰判别指数X或Y;

$X = \text{显示受试体液试样中的MMP-3总量的测定信号} / \text{显示同一MMP-3上的Jacalin结合性O-结合型糖链总量的测定信号}$ ,

$Y = \text{显示受试体液试样中的MMP-3上的Jacalin结合性O-结合型糖链总量的测定信号} / \text{显示同一MMP-3总量的测定信号}$ 。

3. 如权利要求2所记载的方法,其中,糖链修饰判别指数X的值越高,判定为类风湿性关节炎的疾病活动性越高;或者,糖链修饰判别指数Y的值越高,判定为类风湿性关节炎的疾病活动性越低。

4. 如权利要求2或3所记载的方法,其中,显示前述MMP-3上的Jacalin结合性O-结合型糖链总量的测定信号是使用Jacalin凝集素测定的值。

5. 如权利要求2~4中任意一项所记载的方法,其中,显示前述MMP-3总量的测定信号是体液试样中的MMP-3存在量的测定值或者是根据体液试样中的MMP-3存在量而增减的测定信号。

6. 如权利要求5所记载的方法,其中,根据前述MMP-3存在量而增减的测定信号是使用对MMP-3的多肽链特异性地识别的抗MMP-3抗体测定的信号值或者是显示体液试样中的MMP-3与从ABA、ACA和ACG中选择的任意一种凝集素的结合量的测定信号值。

7. 判定类风湿性关节炎的疾病活动性的方法,所述方法包括下述(1)~(5)的工序:

(1) 测定显示受试体液试样中的MMP-3与Jacalin的结合量的信号的工序;

(2) 测定显示同一受试体液试样中的MMP-3存在量、或者同一MMP-3与从ABA、ACA和ACG中选择的任意一种凝集素的结合量或与抗MMP-3抗体的结合量的信号的工序;

(3) 将由工序(1)得到的测定值的倒数乘以由工序(2)得到的测定值来计算糖链修饰判别指数X,或者将由工序(1)得到的测定值乘以由工序(2)得到的测定值的倒数来计算糖链修饰判别指数Y的工序;

(4) 将由工序(3)计算的值(X)或(Y)与基准值( $X_0$ )或( $Y_0$ )进行比较的工序;

(5) 在工序(4)中X高于基准值 $X_0$ 的情况下( $X > X_0$ ),判定为类风湿性关节炎的疾病活动性高或者正在罹患类风湿性关节炎的工序,或者

在工序(4)中Y低于基准值 $Y_0$ 的情况下( $Y < Y_0$ ),判定为类风湿性关节炎的疾病活动性高或者正在罹患类风湿性关节炎的工序。

8. 如权利要求7所记载的方法,其中,前述基准值 $X_0$ 或 $Y_0$ 是对来自于健康个体的体液试样经工序(1)~(3)计算的值。

9. 判定受试者的类风湿性关节炎的疾病活动性的经时性的病情变化的方法,所述方法包括下述(1)~(5)的工序:

(1) 测定显示受试体液试样中的MMP-3与Jacalin的结合量的信号的工序;

(2) 测定显示同一受试体液试样中的MMP-3存在量、或者同一MMP-3与从ABA、ACA和ACG中选择的任意一种凝集素的结合量或与抗MMP-3抗体的结合量的信号的工序；

(3) 将由工序(1)得到的测定值的倒数乘以由工序(2)得到的测定值计算糖链修饰判别指数 $X'$ ，或者将由工序(1)得到的测定值乘以由工序(2)得到的测定值的倒数计算糖链修饰判别指数 $Y'$ 的工序；

(4) 将由工序(3)计算的值( $X'$ )或( $Y'$ )与对同一受试者的检测日以前的体液试样经工序(1)~(3)计算的值( $X'_0$ )或( $Y'_0$ )进行比较的工序；

(5) 在工序(4)的比较工序中,对于 $X'$ 在出现比检测日以前高的数值的情况下( $X' > X'_0$ )、对于 $Y'$ 在出现比检测日以前低的数值的情况下( $Y' < Y'_0$ )，判定为受试者的类风湿性关节炎的疾病活动性恶化,在出现低的数值的情况下( $X' < X'_0$ )或出现高的数值的情况下( $Y' > Y'_0$ )，判定为疾病活动性改善的工序。

10. 如权利要求9所记载的方法,其中,前述受试体液试样是来自于类风湿性关节炎治疗后的受试者的体液试样,前述检测日以前的体液试样是来自于治疗前的同一受试者的体液试样；

在工序(4)的比较工序中,对于 $X'$ 在比治疗前低的情况下( $X' < X'_0$ )、对于 $Y'$ 在比治疗前高的情况下( $Y' > Y'_0$ )，判定为通过对受试者实施的类风湿性关节炎的治疗具有治疗效果；在比治疗前高或者没有变化的情况下( $X' \geq X'_0$ )、或者比治疗前低或者没有变化的情况下( $Y' \leq Y'_0$ )，判定为没有治疗效果。

11. 成为类风湿性关节炎活动性判定用标志物的糖链抗原表位,其特征在于,其为MMP-3上的O-结合型糖链,而且是Jacalin非结合性的。

12. 成为类风湿性关节炎活动性判定用标志物的糖链抗原表位,其特征在于,其为MMP-3上的O-结合型糖链,而且在MMP-3的肽链中的Ser/Thr上结合的GalNAc被 $\alpha 2,6$ 唾液酸修饰。

13. 由如权利要求11或12所记载的糖链抗原表位形成的类风湿性关节炎活动性判定用标志物。

14. MMP-3上的O-结合型糖链、并且在MMP-3的肽链中的Ser/Thr上结合的GalNAc被 $\alpha 2,6$ 唾液酸修饰的O-结合型糖链在类风湿性关节炎的疾病活动性的判定方法中的使用。

15. 在类风湿性关节炎的疾病活动性的判定方法中使用的、在MMP-3的肽链中的Ser/Thr上结合的GalNAc被 $\alpha 2,6$ 唾液酸修饰的O-结合型糖链。

16. 可适用于受试体液试样的类风湿性关节炎疾病活动性判定用试剂,所述试剂包含:特异性地识别权利要求11或12所记载的糖链抗原表位的物质或特异性地识别含有多个该糖链抗原表位的MMP-3的物质。

17. 如权利要求16所记载的类风湿性关节炎疾病活动性判定用试剂,其中,前述特异性地识别糖链抗原表位的物质是从糖链识别抗体、凝集素、糖链识别肽和糖链识别适体中选择的物质。

18. 可适用于受试体液试样的类风湿性关节炎疾病活动性判定用试剂,前述试剂包含:识别在MMP-3上的Ser/Thr上结合的含有 $\alpha$ GalNAc的糖链且不识别在该 $\alpha$ GalNAc上结合了 $\alpha 2,6$ 唾液酸的糖链的物质。

19. 如权利要求18所记载的类风湿性关节炎的疾病活动性判定用试剂,其中,前述识别在MMP-3上的Ser/Thr上结合的含有 $\alpha$ GalNAc的糖链且不识别在该 $\alpha$ GalNAc上结合了 $\alpha 2,6$ 唾

液酸的糖链的物质是Jacalin。

20. 类风湿性关节炎疾病活动性判定用试剂盒,其中,前述试剂盒包含:权利要求16~19中的任意一项所记载的类风湿性关节炎疾病活动性判定用试剂;以及进一步地,对于体液试样中的MMP-3,依赖于MMP-3存在量而与MMP-3特异性地结合的物质。

21. 如权利要求20所记载的类风湿性关节炎疾病活动性判定用试剂盒,其中,前述对于体液试样中的MMP-3,依赖于MMP-3存在量而与MMP-3特异性地结合的物质是从ABA、ACA和ACG中选择的凝集素或抗MMP-3抗体。

22. 成为类风湿性多发肌痛症(PMR)和/或复发性多发软骨炎(RP)诊断用标志物的糖链抗原表位,其特征在于,其为受试体液试样中的MMP-3上的糖链,并且含有与识别多聚乳糖胺结构的凝集素具有结合活性的糖链。

23. 如权利要求22所记载的糖链抗原表位,其中,识别多聚乳糖胺结构的凝集素是LEL凝集素或STL凝集素。

24. 由如权利要求22或23所记载的糖链抗原表位形成的类风湿性多发肌痛症(PMR)和/或复发性多发软骨炎(RP)诊断用标志物。

25. 可适用于受试血液试样的类风湿性多发肌痛症(PMR)和/或复发性多发软骨炎(RP)诊断用试剂,前述试剂包含:特异性地识别权利要求22或23所记载的糖链抗原表位的物质或特异性地识别含有该糖链抗原表位的MMP-3的物质。

26. 提供用于诊断类风湿性多发肌痛症(PMR)和/或复发性多发软骨炎(RP)的数据的方法,其特征在于,所述方法包括下述工序:对于受试体液试样,测定既显示与抗MMP-3抗体的结合活性、又显示与识别多聚乳糖胺结构的凝集素的结合活性的糖链的存在量。

27. 如权利要求26所记载的方法,其中,识别多聚乳糖胺结构的凝集素是LEL凝集素或STL凝集素。

28. 如权利要求26或27所记载的方法,其中,前述测定工序是通过抗MMP-3抗体和识别多聚乳糖胺结构的凝集素的三明治分析法进行的测定工序。

29. 罹患类风湿性多发肌痛症(PMR)和/或复发性多发软骨炎(RP)的判定方法,其特征在于:对于来自于怀疑是否罹患类风湿性多发肌痛症(PMR)和/或复发性多发软骨炎(RP)的受试者的体液试样,通过下述(1)~(3)的工序进行判定:

(1) 对于来自于受试者的体液试样,测定既显示与抗MMP-3抗体的结合活性、又显示与识别多聚乳糖胺结构的凝集素的结合活性的糖链的存在量的工序;

(2) 对于来自于健康个体和/或类风湿性关节炎患者的体液试样,测定既显示与抗MMP-3抗体的结合活性、又显示与识别多聚乳糖胺结构的凝集素的结合活性的糖链的存在量的工序;

(3) 在由(1)得到的显示糖链的存在量的数值显著高于由(2)得到的显示糖链的存在量的数值的情况下,判定为正在罹患类风湿性多发肌痛症(PMR)和/或复发性多发软骨炎(RP)的工序。

30. 如权利要求29所记载的方法,其中,前述(1)和(2)的测定工序是抗MMP-3抗体和LEL凝集素或STL凝集素的三明治分析法。

31. 提供用于诊断类风湿性关节炎(RA)的数据的方法,其特征在于,对于受试体液试样,至少适用下述(1)和(2)的测定工序:

(1) 测定既显示与抗MMP-3抗体的结合活性、又显示与识别多聚乳糖胺结构的凝集素的结合活性的糖链的存在量的工序；

(2) 测定既显示与抗MMP-3抗体的结合活性、又显示与从Jacalin、ABA、ACA和ACG中选择的至少一种O-结合型糖链识别凝集素的结合活性的糖链的存在量的工序。

32. 如权利要求31所记载的方法,其特征在于:通过使用了前述抗MMP-3抗体以及包含识别多聚乳糖胺结构的凝集素和前述O-结合型糖链识别凝集素的凝集素芯片的三明治分析法同时进行前述(1)和(2)测定工序。

33. 罹患类风湿性关节炎的判定方法,其特征在于:对于来自于怀疑是否罹患类风湿性关节炎的受试者的体液试样,通过下述(1)~(4)的工序进行判定:

(1) 测定既显示与抗MMP-3抗体的结合活性、又显示与识别多聚乳糖胺结构的凝集素的结合活性的糖链的存在量的工序;

(2) 测定既显示与抗MMP-3抗体的结合活性、又显示与从Jacalin、ABA、ACA和ACG中选择的至少一种O-结合型糖链识别凝集素的结合活性的糖链的存在量的工序;

(3) 计算由(2)得到的糖链的存在量与由(1)得到的糖链的存在量之比的工序;

(4) 与预先或者同时对于来自于健康个体的体液试样使用(1)~(3)的工序计算的糖链的存在量之比的数值进行比较,在由(3)得到的数值显著高的情况下,判定为受试者正在罹患类风湿性关节炎的工序。

34. 如权利要求33所记载的方法,其特征在于:通过使用了前述抗MMP-3抗体以及包含识别多聚乳糖胺结构的凝集素和前述O-结合型糖链识别凝集素的凝集素芯片的三明治分析法同时进行前述(1)和(2)测定工序。

35. 类风湿性多发肌痛症(PMR)和/或复发性多发软骨炎(RP)诊断用试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包含下述(1)和(2):

(1) 抗MMP-3抗体;

(2) 识别多聚乳糖胺结构的凝集素。

36. 如权利要求35所记载的试剂盒,其中,识别多聚乳糖胺结构的凝集素是LEL凝集素或STL凝集素。

37. 类风湿性关节炎诊断用试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包含下述(1)~(3):

(1) 抗MMP-3抗体;

(2) 识别多聚乳糖胺结构的凝集素;

(3) 从Jacalin、ABA、ACA和ACG中选择的至少一种识别O-结合型糖链的凝集素。

38. 如权利要求37所记载的试剂盒,其中,(2)和(3)的凝集素在同一凝集素芯片上存在。

## 类风湿性关节炎标志物

### 技术领域

[0001] 本发明涉及类风湿性关节炎的简便且正确的疾病活动性评价方法和评价用试剂盒。

### 背景技术

[0002] 类风湿性关节炎(RA)是近1%人口罹患的高频度的疾病,是伴随关节的滑膜增殖发生关节破坏的进展性且难治性的炎症性疾病。从在全身关节发生滑膜炎并增殖了的滑膜组织分泌IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 等炎症性细胞因子和各种蛋白酶,关节软骨和骨逐渐被侵蚀,如果继续进展,则关节被破坏而变形。由被炎症性细胞因子活化的软骨细胞和滑膜细胞分泌的细胞外基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases:MMPs)强烈参与软骨破坏,其中,已知基质金属蛋白酶-3(MMP-3)在类风湿性关节炎的滑膜细胞中大量产生,强烈参与软骨破坏的进展(非专利文献1~3)。同时,已知这些炎症性细胞因子也通过破骨细胞的活化、骨芽细胞的抑制引起骨破坏,由关节破坏引起功能障碍,使患者的日常生活动作(activities of daily living,ADL)显著降低(非专利文献4)。

[0003] 对于类风湿性关节炎患者,除了肾上腺皮质激素药以外,也进行非甾体消炎剂(NSAID)、抗风湿药剂(DMARD)和生物学药剂(抗TNF受体拮抗剂、抗IL-1 $\beta$ 拮抗剂、抗IL-6受体拮抗剂)等药物治疗,然而,任何一种药剂都在效果上个体差异大,同时,尽管使用多种药剂,也有不能达到缓解的病例存在。

[0004] 在这样的难治性类风湿性关节炎的治疗中,通过早期发现和早期治疗将病情至少控制在低疾病活动性以下,从而抑制关节破坏的进展被认为是重要的(非专利文献5)。

[0005] 然而,类风湿性关节炎的临床观察的个体差别大,因为迄今还没有特异性的检查,与其他关节炎的鉴别也难,所以被认为在早期诊断中需要专业的知识,可以认为,其治疗效果的判定也同样需要继续的专业医师的诊断检查(非专利文献6)。

[0006] 为了将类风湿性关节炎疾病活动性进行定量化评价,以前编制出了各种各样的评价方法,然而,难于正确地进行定量化。其中,作为将类风湿性关节炎的疾病活动性正确定量的评价方法而开发的疾病活动度评分(Disease Activity Score:DAS),是对压痛关节数和肿胀关节数进行考查,而且加上患者的身体状况的自我评价,使用特别的算式进行判定的方法,在临床研究中,作为疾病活动性的评价方法成为主流。

[0007] 但是,对于28个关节的熟练医师的诊断检查不可或缺,此外,需要使用平方根、对数的复杂计算,因此,就日常的诊断检查而言,被指出花费时间而且无法反映脚关节和脚指关节的症状等问题(非专利文献7)。尽管经“DAS28”评价为“缓解”,也存在关节破坏发生进展的情况,因此,作为临床的缓解标准,被认为需要使用另外的Boolean标准和SDAI等标准(非专利文献8)。

[0008] 因此,期待有简便且不放过所谓关节破坏的严重的疾病活动性的、可以正确评价的类风湿性关节炎标志物的研究以及使用该类风湿性关节炎标志物的新的评价方法的开发,正在进行活跃的研究开发。

[0009] 例如,也有下述提议:髓磷脂碱性蛋白质自身抗体和髓磷脂碱性蛋白质基因多态性的检测(专利文献1、2);新的多肽人踝蛋白的F1结构域或F3结构域的检测(专利文献3);富亮氨酸 $\alpha$ 2糖蛋白(LRG)检测(专利文献4);在滑膜细胞高表达的与滑膜细胞的异常增殖相关联的新的蛋白质滑膜素(Synoviolin)、其基因及其自身抗体的检测(专利文献5~8); $\gamma$ -谷氨酰转肽酶( $\gamma$ -GTP)及其基因的检测(专利文献9);含有硒半胱氨酸的蛋白质的含量的测定(专利文献10);抗醛缩酶A抗体的检测(专利文献11);通过检测IX型胶原 $\alpha$ -1链的切断蛋白质片段的切断位置的抗体进行IX型胶原破坏的诊断(专利文献12);通过1,4,5-三磷酸肌醇受体(IP<sub>3</sub>R)检测自身抗体(专利文献13);由作为RA抗原的cloneA多肽和卵泡抑素相关蛋白(FRP)导致的慢性类风湿性关节炎患者特异性抗体的检测(专利文献14)等;另外,还有对RA滑膜细胞特异性表达进行增减的miRNA(miR124a)的检测(专利文献15)。同时,也有下述提议:通过检测关节液中的肌腱蛋白C的选择性剪接位置和量的抗体来鉴别变形性关节炎和类风湿性关节炎的方法(专利文献16)。但是,至今仍不存在实用的活动性评价体系标志物。

[0010] 在这些类风湿性关节炎标志物中,现在,血清MMP-3值作为可靠性最高的关节破坏的预后预测因子而受到瞩目(非专利文献9),在临床中也被用于早期类风湿性关节炎的诊断以及治疗方针的确定等。据说,从前作为类风湿性关节炎诊断用的炎症标志物使用的血清CRP和ESR反映全身的炎症,与之相对,血清MMP-3反映关节局部的病态,在与早期RA鉴别困难的变形性关节炎、痛风、外伤性关节炎等的鉴别中发挥威力。另一方面,作为同样与早期RA鉴别困难的类风湿性疾病类风湿性多发肌痛症(PMR)也显示高值,进一步地,即使是各种胶原病、肾病等也变为高值等,不能说特异性高。因此,为了进行类风湿性关节炎的正确诊断,不得不组合使用血清CRP等炎症标志物等(非专利文献10)。

[0011] 着眼于血清中的糖蛋白的糖链组成的变化的研究也很活跃。从前有将免疫球蛋白G糖链等血清中的糖蛋白加热变性后,将糖链切下进行标记、纯化,使用经ODS-硅胶柱的高效液相色谱进行糖链分析,基于来自于健康个体试样的糖链组成的变化进行类风湿性关节炎诊断的方法(专利文献17),然而,存在分析用试样的配制烦杂、灵敏度低的问题。近年来,着眼于被分泌至血清中的N-结合型糖链,有提议基于使用MS/MS光谱的分析的诊断方法,将被观察到在类风湿性关节炎患者中表达量显著增加的多种N-结合型糖链,特别是具有(Hex)<sub>3</sub>(HexNAc)<sub>3</sub>(Deoxyhexose)<sub>1</sub>(NeuAc)<sub>3+</sub>(Man)<sub>3</sub>(GlcNAc)<sub>2</sub>的糖组成的糖链的存在量以及与该糖链的脱氧己糖(Deoxyhexose)的结合位置不同的结构异构体的存在比例作为类风湿性关节炎的诊断用标志物(专利文献18)。然而,这些N-结合型糖链的大多数即使在健康个体中也存在于血中,在病毒性肝炎患者的病情恶化中也观察到特征性的(Hex)<sub>3</sub>(HexNAc)<sub>3</sub>(Deoxyhexose)<sub>1</sub>(NeuAc)<sub>3+</sub>(Man)<sub>3</sub>(GlcNAc)<sub>2</sub>的增加(例如,Nakagawa T等人,Journal of Biological Chemistry 281(40)29797-29806(2006)等多篇),因此,在作为类风湿性关节炎诊断用标志物的临床上的实用性上存在问题。

[0012] 也有多个下述提议:通过将多个类风湿性关节炎标志物进行组合,使用特别的算式进行评分,用于进行正确的类风湿性关节炎诊断和预后预测的评价方法。

[0013] 例如,有下述提议:基于第1标志物(SLC16A4)基因表达量信息和第2标志物(SLC02B1、PTPRM、SHB或ATP9A)基因表达量信息的类风湿性关节炎的存在的评价方法(专利文献19)。

[0014] 最近,美国Crescendo公司开发了通过测定由血清中的IL-6、EGF、VEGFA、LEP、SAA1、VCAM1、CRP、MMP-1、MMP-3、TNFRSF1A、RETN和CHI3L1组成的12个生物标志物,使用特殊的算式进行评分的疾病活动性指标(DAI)进行类风湿性关节炎的诊断、监测的方法(专利文献20、非专利文献11)。该方法与“DAS28”的相关也高,可以说,不需要由熟练的医师进行详细的诊断,使较正确的类风湿性关节炎的诊断成为可能。然而,多达12个生物标志物的测定需要巨额资金,还需要通过复杂的算式进行计算,因此,在临床现场几乎不能说是实用的方法。

[0015] 由于这样的背景,强烈期望提供经由不需要复杂的算式、通过尽量少的生物标志物的简便的测定就可以正确评价类风湿性关节炎的疾病活动性的新的类风湿性关节炎标志物。

[0016] 同时,类风湿性关节炎、特别是就发病初期而言,有时与同样是类风湿性疾病的一种的类风湿性多发肌痛症(PMR)呈现相似的症状(非专利文献12),散见两者的鉴别困难的病例。因此,需要有用正确鉴别类风湿性关节炎与类风湿性多发肌痛症的方法。

[0017] 另一方面,在类风湿性疾病中,复发性多发软骨炎(RP)是极为罕见的疾病,其症状具有特征性,已知存在症状有时出现有时消失的活动期和非活动期。同时,作为特异性的血液检查方法,有使用抗胶原抗体的方法,然而,阳性率也并不那么高,存在即使是类风湿性关节炎也成为阳性的问题(非专利文献13)。因此,急切期望提供无论活动期、非活动期都可以正确测定的优异的标志物和检查方法。

[0018] 现有技术文献

[0019] 专利文献

[0020] 专利文献1:W02012/144512

[0021] 专利文献2:日本特开2014-170012号公报

[0022] 专利文献3:日本特开2011-157301号公报

[0023] 专利文献4:日本特开2010-286279号公报

[0024] 专利文献5:日本特开2007-325595号公报

[0025] 专利文献6:日本特开2007-82545号公报

[0026] 专利文献7:日本特开2007-75106号公报

[0027] 专利文献8:W002/052007

[0028] 专利文献9:日本特开2003-24099号公报

[0029] 专利文献10:日本特开2003-26598号公报

[0030] 专利文献11:日本特开平11-94836号公报

[0031] 专利文献12:W02008/108723

[0032] 专利文献13:W02008/001944

[0033] 专利文献14:W097/17441

[0034] 专利文献15:W02010/001632

[0035] 专利文献16:日本特开2004-138489号公报

[0036] 专利文献17:日本特开平8-228795号公报

[0037] 专利文献18:W02009/096403

[0038] 专利文献19:日本特开2012-152198号公报

- [0039] 专利文献20:W02011/047358
- [0040] 非专利文献
- [0041] 非专利文献1:Lab Invest.1992Jun;66 (6) :680-690
- [0042] 非专利文献2:J.Biol.Chem.1986Oct 25;261 (30) :14245-14255
- [0043] 非专利文献3:Inflammation and Regeneration 2004May;24 (3) :154-160
- [0044] 非专利文献4:J Immunol Res.2014;2014:263625
- [0045] 非专利文献5:Ann Rheum Dis.2010Apr;69 (4) :631-637
- [0046] 非专利文献6:Ann Rheum Dis.2014Mar;73 (3) :492-509
- [0047] 非专利文献7:Arthritis Rheum.2012May;64 (5) :1316-1322
- [0048] 非专利文献8:Arthritis Rheum.2011Mar;63 (3) :573-586
- [0049] 非专利文献9:J Rheumatol.2000Dec;27 (12) :2761-2768
- [0050] 非专利文献10:Ann Rheum Dis.2002Feb;61 (2) :161-166
- [0051] 非专利文献11:Arthritis Care Res.2012;64:1794-1803
- [0052] 非专利文献12:J Autoimmun.2014;Feb-Mar;48-49:76-8
- [0053] 非专利文献13:Arthritis Rheum.1990Oct 33 (19) :1493-1500
- [0054] 非专利文献14:Molecular&Cellular Proteomics 2009;8 (1) :99-108
- [0055] 非专利文献15:Biochemistry 1990Nov 6;29 (44) :10261-10270
- [0056] 非专利文献16:Nature Methods 2005;2:851-856
- [0057] 非专利文献17:Clin Chem 2011Jan;57 (1) :48-56

## 发明内容

[0058] 发明要解决的技术问题

[0059] 本发明的课题是通过简便的方法提供灵敏度高且可靠地评价类风湿性关节炎的疾病活动性的方法以及用于该方法的试剂盒,具体而言,使用新的类风湿性关节炎标志物,通过可以使用于医疗现场的简便方法,以在适用性、灵敏度、精度方面在临床上可以允许的性能,提供评价类风湿性关节炎疾病活动性的方法、判定类风湿性关节炎治疗效果的方法和判定类风湿性关节炎缓解的方法以及用于该方法的试剂盒。

[0060] 同时,本发明的课题还提供用于正确鉴别与类风湿性关节炎类似的类风湿性疾病类风湿性多发肌痛症 (PMR) 的判定方法以及用于该方法的试剂盒,进一步提供类风湿性疾病中的复发性多发软骨炎 (RP) 的正确判定方法以及用于该方法的试剂盒。

[0061] 解决技术问题的技术手段

[0062] 本发明人为了能够解决上述课题,在对用于在临床现场可以使用的类风湿性关节炎疾病活动性的评价方法的类风湿性关节炎标志物进行努力研究中,着眼于在已知的各种标志物中被认为最能够反映关节局部病态的血清中的MMP-3,进一步进行了详细研究。于是,发现血清中的MMP-3在罹患类风湿性关节炎时,其分泌量具有增加的趋势,然而,与此同时,其糖链的组成中也发生很大变化。

[0063] 本发明人了解以前在罹患各种疾病时,根据病情血清中的特定糖蛋白的糖链组成存在导致发生变化的情况,因此,考虑到根据类风湿性关节炎性的疾病活动性,在血清中的MMP-3的糖链组成上出现变化的可能性。但是,虽然说血清中的MMP-3蛋白由于类风湿性关

节炎的罹患而增加,至多只有100ng/ml至1000 $\mu$ g/ml左右,是极其微量的,相对于血中糖蛋白总量的存在比例在100~1,000,000分之一以下,是极少的。因此,将存在于MMP-3上的糖链的糖链变化从血清中所含有的所有糖蛋白的糖链特异性地检测出来,因S/N比变低、灵敏度低,所以正确地测定是困难的。在此,本发明人利用使用抗MMP-3抗体的抗体覆盖·凝集素芯片法(antibody overlay lectin array method),构筑了得到血清中微量MMP-3上的糖链结构信息的方法。如果该方法对市售的重组MMP-3蛋白使用,则即使是仅有100pg至1ng左右的MMP-3蛋白量,得到最低限度的糖链结构信息也是可能的。这显示即使是健康个体的血液中所含有的微量MMP-3(40ng/ml左右),也能够以敏锐的灵敏度进行分析,可以研究病情相应的糖链变化。

[0064] 接着,将罹患类风湿性关节炎的患者等的血清作为对象,使用经由抗体覆盖·凝集素芯片法的分析,选出识别患者血清中的MMP-3上的糖链上的特异性糖链的凝集素,尝试对成为类风湿性关节炎标志物的糖链进行鉴定。

[0065] 其结果,在类风湿性关节炎患者血清中的MMP-3中,在凝集素ACG、Jacalin、ABA、ACA中观察到显著高的信号。在此,因为除ACG以外的Jacalin、ABA、ACA凝集素明显是O-结合型糖链(O-glycan)识别凝集素,因此,该结果意味着,由于类风湿性关节炎的罹患,作为血清中的MMP-3上的糖链,存在O-结合型糖链,至少存在由Jacalin、ABA和ACA凝集素的任意一种识别的O-结合型糖链。从前,作为血清中的糖蛋白的糖链组成变化,主要是N-结合型糖链受到瞩目(专利文献18等),至于MMP-3上的糖链,因为仅报告了O-结合型糖链的存在,因此可以认为,作为类风湿性关节炎特异性糖链抗原表位的糖链结构是新的糖链结构。

[0066] 但是,仅就表达量多的糖链而言,不管是否罹患类风湿性关节炎,MMP-3本来具有的糖链伴随着向血清中MMP-3分泌量的增大,也存在观察到信号的增大的可能性。于是,对于各凝集素信号量,从与血清中的MMP-3的量的相关性来看,ACG、ABA、ACA都与MMP-3表达量高度相关,然而,仅在Jacalin凝集素的情况下相关性较弱,特别是,观察到在MMP-3表达量高的组中Jacalin信号显著低的实例。在计算高度相关于MMP-3的ABA和ACA与Jacalin的相关性时,相对于ABA与ACA的高度相关性,任意一种凝集素都与Jacalin的相关性低。

[0067] 这些结果存在着反映Jacalin分别与ABA、ACA之间的糖链识别的不同的可能性。本发明人考虑,从迄今为止的知识来看,结果反映了对在O-结合型糖链的肽上结合的N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)的第6位的糖链修饰的不同。判断为,特别是Jacalin不允许对O-结合型糖链的GalNAc的第6位的修饰,该修饰使反应性消失(非专利文献14)。作为对该位置的代表性的修饰,有唾液酸修饰。于是,使用前述的患者血清中的一些血清试样,实施作为唾液酸分解酶的唾液酸酶处理。将唾液酸酶处理前后的样品作为对象进行凝集素芯片分析,结果显示,就处理后的样品而言,Jacalin的信号也与ABA、ACA一样与MMP-3的量相关。

[0068] 以上的结果表明,如果罹患类风湿病,MMP-3的血中浓度升高,然而,对在MMP-3上存在的O-结合型糖链的肽上直接结合的GalNAc的唾液酸修饰,根据患者会不同。而且,在类风湿性关节炎的疾病活动性恶化的患者组中,从观察到Jacalin信号变弱的显著趋势来看,疾病活动性的恶化与该唾液酸修饰存在负相关的可能性大。

[0069] 于是,接下来,对该不同的临床实用性进行调查,作为捕捉MMP-3上的O-结合型糖链的“质的变化”的指标,研究了ABA/Jacalin值。将该值与临床参数的相关性在统计学上进行验证的结果,与从前作为表示类风湿性关节炎疾病活动性的数值DAS28-CRP、DAS28-ESR、

CDAI、SDAI和医师VAS的值全部具有显著相关性,特别是,与DAS28显示 $p \leq 0.0001$ 这样的高度相关性。

[0070] 这意味着,通过使用以凝集素芯片和凝集素-抗体三明治ELISA法为代表的使用凝集素的特定蛋白质上的糖链分析方法,仅通过测定对血清中的MMP-3的Jacalin反应性以及ABA、ACA或ACG的反应性,求出两者之比,不需要熟练医师的诊断或通过复杂算式的烦杂计算,就可以客观把握类风湿性关节炎的疾病活动性,可以提供与DAS28同等程度的类风湿性关节炎的诊断精度。

[0071] 同时, Jacalin识别的糖链是O-结合型糖链,是在肽链的Ser/Thr上结合的O-结合型糖链的核心结构-1(核心1:Gal( $\beta$ 1,3)GalNAc)或Tn抗原(GalNAc)。然后,在其上存在的GalNAc的第6位导入唾液酸的情况下,通过该修饰, Jacalin反应性受到阻碍。另一方面,ABA和ACA也与Jacalin一样,是O-结合型糖链识别凝集素,然而,识别或者可以允许该位置的唾液酸修饰(Kuno A等人, *Molecular&Cellular Proteomics* 8(1) 99-108(2009))。也就是说,上述结果强烈暗示,通过罹患类风湿性关节炎,对在血清中的MMP-3所具有的O-结合型糖链的核心结构-1的GalNAc的第6位的唾液酸修饰持续增加。

[0072] 为了验证这一点,使用从实际的类风湿性关节炎患者的病变关节采取的滑液试样,根据MMP-3的量对Jacalin信号作图,显示漂亮的呈现负相关的曲线。另一方面,从与早期的类风湿性关节炎鉴别困难的变形关节病患者得到的滑液试样显示与健康个体同样的曲线。

[0073] 该结果证实,如果罹患类风湿性关节炎,伴随其病情的恶化,在滑膜组织内的滑膜细胞产生的MMP-3上的Jacalin结合性糖链抗原表位减少,也就是说,在同一MMP-3上的O-结合型糖链的核心结构-1上对GalNAc的第6位的唾液酸修饰持续增加。与此同时,不容置疑,在罹患类风湿性关节炎患者血清试样中观察到的MMP-3上的Jacalin结合性O-结合型糖链抗原表位减少的现象正确反映来自于滑膜组织的MMP-3上的糖链结构变化。这也证实,使用对受试者侵入性较低的血清试样,进行正确的类风湿性关节炎诊断是可能的。

[0074] 通过得到以上知识,从而完成了本发明。

[0075] 即,可以说,本发明提供由血清中的MMP-3上的凝集素Jacalin结合性O-结合型糖链抗原表位形成的类风湿性关节炎的负相关的(负的)糖链生物标志物。具体而言,通过测定血液(例如血清)中的Jacalin信号的倒数经MMP-3值或者ABA、ACA或ACG信号值修正后的值,可以评价类风湿性关节炎的疾病活动性。或者,即使观察血液(血清)中的MMP-3上的Jacalin结合性O-结合型糖链的核心结构-1“Gal( $\beta$ 1,3)GalNAc”的修饰GalNAc的第6位的唾液酸(NeuNAc)的修饰程度(如果唾液酸修饰增加, Jacalin的反应性降低),也可以评价类风湿性关节炎的疾病活动性。

[0076] 本发明的类风湿性关节炎的疾病活动性评价方法使得将类风湿性关节炎在适用性、灵敏度、精度方面以临床上可允许的性能进行检测和判别成为可能。而且,使得通过简便的方法,使用可以用于医疗现场的方法,评价类风湿性关节炎的疾病活动性成为可能。

[0077] 在本发明中,受试试样中的类风湿性关节炎糖链标志物的减少可以通过标记化的Jacalin以及进一步标记化的ABA、ACA和ACG的染色或者通过与标记化的MMP-3或标记抗MMP-3抗体的三明治法进行。作为在该三明治法中使用的抗MMP-3抗体,可以使用市售的(商品名)抗体。另外,在作为抗MMP-3抗体不使用市售的抗体的情况下,基于已知的MMP-3的序

列信息,通过本身公知的方法可以制作特异性抗体。本发明所使用的抗体可以是多克隆抗体、单克隆抗体的任意一种。这些抗体可以按照本身公知的抗体或抗血清的制造方法进行制造。

[0078] 本发明的作为用于分析作为负的类风湿性关节炎糖链标志物的MMP-3上的Jacalin结合性O-结合型糖链的糖链结构的技术,可以列举,通过前沿亲和色谱法(FAC)、凝集素微芯片、质谱法或串联质谱法(MS或MS<sup>n</sup>)等的糖链图谱分析。如果确定了该糖链结构,基于其信息可以选择正的类风湿性关节炎糖链标志物。关于凝集素的信息,可以从凝集素前沿数据库(LfDB)或日本产业技术综合研究所·糖链医工学研究中心的主页等获取。同时,也可以使用识别上述糖链结构的抗体。

[0079] 使用本发明的类风湿性关节炎的疾病活动性评价方法,使用疑似类风湿性关节炎的受试者的血液试样(血清或血浆),使得在医疗现场的简便且精度高的类风湿性关节炎的疾病活动性的评价成为可能。同时,作为侵入性最低的试样,优选血液试样,但使用关节液(滑液)也可以得到同样的结果,此外,当然,如果是胸腔积液、腹水、淋巴液、唾液、髓液等来自于受试者的体液,也同样可以诊断。另外,就以下的说明而言,主要对典型的血液试样进行叙述,然而,本发明不只限于血液试样。

[0080] 本发明包括类风湿性关节炎的疾病活动性评价用试剂盒,所述试剂盒在用于实施本发明的类风湿性关节炎的疾病活动性评价方法中使用,配备有:将凝集素或抗体的任意一种进行标记的、从Jacalin和ABA、ACA和ACG中选择的任意一种凝集素以及抗MMP-3抗体。

[0081] 在该试剂盒中,将包含从Jacalin以及ABA、ACA、ACG中选择的任意一种凝集素的多种凝集素在支承体上进行固相化,优选使用凝集素芯片,然而,也可以将各凝集素制成生物素化凝集素,在链霉亲和素包覆的支承体上以固相化的形态进行配制。

[0082] 进一步地,与类风湿性关节炎一样,为了正确判定是否分别罹患类风湿性疾病类风湿性多发肌痛症(PMR)和复发性多发软骨炎(RP)以考察用于与类风湿性关节炎进行正确鉴别的标志物,重新评估了凝集素芯片图谱分析的结果,选择统计学上具有显著差异的LEL和STL这样的均可识别多聚乳糖胺结构的凝集素,使用新配制的类风湿性关节炎(RA)、类风湿性多发肌痛症(PMR)和复发性多发软骨炎(RP)的患者血清,研究了与MMP-3浓缩组分的LEL和STL凝集素的反应性。

[0083] 其结果,对于任意一种凝集素,得到这样的显著的结果:来自于复发性多发软骨炎(RP)患者的试样的反应性极高,然后,是来自于类风湿性多发肌痛症(PMR)患者的试样反应性高,来自于类风湿性关节炎(RA)患者和健康个体(HC)的试样几乎没有反应性。

[0084] 这显示,MMP-3上的LEL或STL凝集素反应性糖链成为类风湿性多发肌痛症(PMR)和/或复发性多发软骨炎(RP)的罹患判定用的优异的糖链标志物。

[0085] 同时,通过计算LEL凝集素信号与Jacalin或ACG信号之比,与来自于类风湿性多发肌痛症(PMR)、复发性多发软骨炎(RP)患者和健康个体(HC)的血清进行比较,确认仅有来自于类风湿性关节炎(RA)患者的血清显示高的数值。

[0086] 从这些结果来看,与受试血清试样中的MMP-3上的LEL或STL凝集素反应性糖链的反应性,使用例如抗MMP-3抗体和LEL或STL凝集素的三明治分析法等进行测定,可以将类风湿性多发肌痛症(PMR)和/或复发性多发软骨炎(RP)与类风湿性关节炎(RA)相识别,正确诊断是否罹患。

[0087] 同时,通过测定与受试血清试样中的MMP-3上的LEL或STL凝集素反应性糖链的反应性信号与Jacalin、ACG等MMP-3上的前述O-结合型糖链的反应性信号之比,可以正确诊断与类似的类风湿性疾病相鉴别的、正在罹患的类风湿性关节炎(RA)。

[0088] 通过得到以上的知识,也可以解决本发明的其他课题。

[0089] 也就是说,本发明包括以下的发明。

[0090] (1)类风湿性关节炎的疾病活动性的判定方法,所述方法包括:测定受试体液试样中的MMP-3上的O-结合型糖链的糖链结构的变化的工序。

[0091] 本发明也可以表达如下。

[0092] (1')提供用于判定类风湿性关节炎的疾病活动性的数据的方法,所述方法包括:测定受试体液试样中的MMP-3上的O-结合型糖链的糖链结构的变化的工序。

[0093] (2)如前述(1)所记载的判定方法,所述方法如下进行:前述糖链结构的变化的测定是将显示受试体液试样中的MMP-3总量的测定信号乘以显示MMP-3上的Jacalin结合性O-结合型糖链总量的测定信号的倒数,或者,前述糖链结构的变化的测定是将显示受试体液试样中的MMP-3总量的测定信号的倒数乘以显示MMP-3上的Jacalin结合性O-结合型糖链总量的测定信号,计算下述糖链修饰判别指数X或Y;

[0094]  $X = \text{显示受试体液试样中的MMP-3总量的测定信号} / \text{显示同一MMP-3上的Jacalin结合性O-结合型糖链总量的测定信号}$ ,

[0095]  $Y = \text{显示受试体液试样中的MMP-3上的Jacalin结合性O-结合型糖链总量的测定信号} / \text{显示同一MMP-3总量的测定信号}$ 。

[0096] (3)如前述(2)所记载的方法,其中,糖链修饰判别指数X的值越高,判定为类风湿性关节炎的疾病活动性越高;或者,糖链修饰判别指数Y的值越高,判定为类风湿性关节炎的疾病活动性越低。

[0097] (4)如前述(2)或(3)所记载的方法,其中,显示前述MMP-3上的Jacalin结合性O-结合型糖链总量的测定信号是使用Jacalin凝集素测定的值。

[0098] (5)如前述(2)~(4)中任意一项所记载的方法,其中,显示前述MMP-3总量的测定信号是体液试样中的MMP-3存在量的测定值或者是根据体液试样中的MMP-3存在量而增减的测定信号。

[0099] (6)如前述(5)所记载的方法,其中,根据前述MMP-3存在量而增减的测定信号是使用对MMP-3的多肽链特异性地识别的抗MMP-3抗体测定的信号值或者是显示体液试样中的MMP-3与从ABA、ACA和ACG中选择的任意一种凝集素的结合量的测定信号值。

[0100] (7)判定类风湿性关节炎的疾病活动性的方法,所述方法包括下述(1)~(5)的工序:

[0101] (1)测定显示受试体液试样中的MMP-3与Jacalin的结合量的信号的工序;

[0102] (2)测定显示同一受试体液试样中的MMP-3存在量、或者同一MMP-3与从ABA、ACA和ACG中选择的任意一种凝集素的结合量或与抗MMP-3抗体的结合量的信号的工序;

[0103] (3)将由工序(1)得到的测定值的倒数乘以由工序(2)得到的测定值来计算糖链修饰判别指数X,或者将由工序(1)得到的测定值乘以由工序(2)得到的测定值的倒数来计算糖链修饰判别指数Y的工序;

[0104] (4)将由工序(3)计算的值(X)或(Y)与基准值( $X_0$ )或( $Y_0$ )进行比较的工序;

[0105] (5)在工序(4)中 $X$ 高于基准值 $X_0$ 的情况下( $X > X_0$ ),判定为类风湿性关节炎的疾病活动性高或者正在罹患类风湿性关节炎的工序;或者

[0106] 在工序(4)中 $Y$ 低于基准值 $Y_0$ 的情况下( $Y < Y_0$ ),判定为类风湿性关节炎的疾病活动性高或者正在罹患类风湿性关节炎的工序。

[0107] (8)如前述(7)所记载的方法,其中,前述基准值 $X_0$ 或 $Y_0$ 是对来自于健康个体的体液试样经工序(1)~(3)计算的值。

[0108] (9)判定受试者的类风湿性关节炎的疾病活动性的经时性的病情变化的方法,所述方法包括下述(1)~(5)的工序:

[0109] (1)测定显示受试体液试样中的MMP-3与Jacalin的结合量的信号的工序;

[0110] (2)测定显示同一受试体液试样中的MMP-3存在量、或者同一MMP-3与从ABA、ACA和ACG中选择的任意一种凝集素的结合量或与抗MMP-3抗体的结合量的信号的工序;

[0111] (3)将由工序(1)得到的测定值的倒数乘以由工序(2)得到的测定值来计算糖链修饰判别指数 $X'$ ,或者将由工序(1)得到的测定值乘以由工序(2)得到的测定值的倒数来计算糖链修饰判别指数 $Y'$ 的工序;

[0112] (4)将由工序(3)计算的值( $X'$ )或( $Y'$ )与对同一受试者的检测日以前的体液试样经工序(1)~(3)计算的值( $X'_0$ )或( $Y'_0$ )进行比较的工序;

[0113] (5)在工序(4)的比较工序中,对于 $X'$ 在出现比检测日以前高的数值的情况下( $X' > X'_0$ )、对于 $Y'$ 在出现比检测日以前低的数值的情况下( $Y' < Y'_0$ ),判定为受试者的类风湿性关节炎的疾病活动性恶化,在出现低的数值的情况下( $X' < X'_0$ )或出现高的数值的情况下( $Y' > Y'_0$ ),判定为疾病活动性改善的工序。

[0114] (10)如前述(9)所记载的方法,其中,前述受试体液试样是来自于类风湿性关节炎治疗后的受试者的体液试样,前述检测日以前的体液试样是来自于治疗前的同一受试者的体液试样;

[0115] 在工序(4)的比较工序中,对于 $X'$ 在比治疗前低的情况下( $X' < X'_0$ )、对于 $Y'$ 在比治疗前高的情况下( $Y' > Y'_0$ ),判定为通过对受试者实施的类风湿性关节炎的治疗具有治疗效果;在比治疗前高或者没有变化的情况下( $X' \geq X'_0$ )、或者比治疗前低或者没有变化的情况下( $Y' \leq Y'_0$ ),判定为没有治疗效果。

[0116] (11)成为类风湿性关节炎活动性判定用标志物的糖链抗原表位,其特征在于,其为MMP-3上的O-结合型糖链,而且是Jacalin非结合性的。

[0117] (12)成为类风湿性关节炎活动性判定用标志物的糖链抗原表位,其特征在于,其为MMP-3上的O-结合型糖链,而且在MMP-3的肽链中的Ser/Thr上结合的GalNAc被 $\alpha 2,6$ 唾液酸修饰。

[0118] (13)由前述(11)或(12)所记载的糖链抗原表位形成的类风湿性关节炎活动性判定用标志物。

[0119] (14)MMP-3,其为用于在类风湿性关节炎的疾病活动性的判定方法中使用的MMP-3,而且是在肽链中的Ser/Thr上结合的GalNAc具有多个被 $\alpha 2,6$ 唾液酸修饰的O-结合型糖链。

[0120] (15)MMP-3,其为用于在类风湿性关节炎的疾病活动性的判定方法中使用的MMP-3,从受试体液试样制备,而且具有多个Jacalin非结合性的O-结合型糖链。

[0121] (16)MMP-3上的O-结合型糖链、并且在MMP-3的肽链中的Ser/Thr上结合的GalNAc被 $\alpha$ 2,6唾液酸修饰的O-结合型糖链在类风湿性关节炎的疾病活动性的判定方法中的使用。

[0122] (17)在类风湿性关节炎的疾病活动性的判定方法中使用的、在MMP-3的肽链中的Ser/Thr上结合的GalNAc被 $\alpha$ 2,6唾液酸修饰的O-结合型糖链。

[0123] (18)可适用于受试体液试样的类风湿性关节炎疾病活动性判定用试剂,所述试剂包含:特异性地识别前述(11)或(12)所记载的糖链抗原表位的物质或者特异性地识别前述(14)或(15)所记载的MMP-3的物质。

[0124] (19)前述(18)所记载的类风湿性关节炎疾病活动性判定用试剂,其中,前述特异性地识别糖链抗原表位的物质是从糖链识别抗体、凝集素、糖链识别肽和糖链识别适体中选择的物质。

[0125] (20)可适用于受试体液试样的类风湿性关节炎疾病活动性判定用试剂,前述试剂包含:识别在MMP-3上的Ser/Thr上结合的含有 $\alpha$ GalNAc的糖链且不识别在该 $\alpha$ GalNAc上结合了 $\alpha$ 2,6唾液酸的糖链的物质。

[0126] (21)前述(20)所记载的类风湿性关节炎的疾病活动性判定用试剂,其中,前述识别在MMP-3上的Ser/Thr上结合的含有 $\alpha$ GalNAc的糖链且不识别在该 $\alpha$ GalNAc上结合了 $\alpha$ 2,6唾液酸的糖链的物质是Jacalin。

[0127] (22)类风湿性关节炎疾病活动性判定用试剂盒,前述试剂盒包含:前述(18)~(21)中的任意一项所记载的类风湿性关节炎疾病活动性判定用试剂;以及进一步地,对于体液试样中的MMP-3,依赖于MMP-3存在量而与MMP-3特异性地结合的物质。

[0128] (23)前述(22)所记载的类风湿性关节炎疾病活动性判定用试剂盒,其中,前述对于体液试样中的MMP-3,依赖于MMP-3存在量而与MMP-3特异性地结合的物质是从ABA、ACA和ACG中选择的凝集素或抗MMP-3抗体。

[0129] (24)Jacalin在类风湿性关节炎的疾病活动性的判定方法中的用途。

[0130] (25)在类风湿性关节炎的疾病活动性的判定方法中使用的Jacalin。

[0131] (26)Jacalin在类风湿性关节炎的疾病活动性判定用试剂的制造中的用途。

[0132] (27)成为类风湿性多发肌痛症(PMR)和/或复发性多发软骨炎(RP)诊断用标志物的糖链抗原表位,其特征在于,其为受试体液试样中的MMP-3上的糖链,并且含有与识别多聚乳糖胺结构的凝集素具有结合活性的糖链。

[0133] (28)如前述(27)所记载的糖链抗原表位,其中,识别多聚乳糖胺结构的凝集素是LEL凝集素或STL凝集素。

[0134] (29)由如前述(27)或(28)所记载的糖链抗原表位形成的类风湿性多发肌痛症(PMR)和/或复发性多发软骨炎(RP)诊断用标志物。

[0135] (30)可适用于受试血液试样的类风湿性多发肌痛症(PMR)和/或复发性多发软骨炎(RP)诊断用试剂,前述试剂包含:特异性地识别前述(27)或(28)所记载的糖链抗原表位的物质或特异性地识别含有该糖链抗原表位的MMP-3的物质。

[0136] (31)类风湿性多发肌痛症(PMR)和/或复发性多发软骨炎(RP)的诊断方法,其特征在于,所述方法包括下述工序:对于受试体液试样,测定既显示与抗MMP-3抗体的结合活性、又显示与识别多聚乳糖胺结构的凝集素的结合活性的糖链的存在量。

[0137] 本发明也可以表达如下。

[0138] (31')提供用于诊断类风湿性多发肌痛症(PMR)和/或复发性多发软骨炎(RP)的数据的方法,其特征在于,所述方法包括如下工序:对于受试体液试样,测定既显示与抗MMP-3抗体的结合活性、又显示与识别多聚乳糖胺结构的凝集素的结合活性的糖链的存在量。

[0139] (32)如前述(31)所记载的方法,其中,识别多聚乳糖胺结构的凝集素是LEL凝集素或STL凝集素。

[0140] 同时,本发明也可以表达如下。

[0141] (32')LEL凝集素或STL凝集素在类风湿性多发肌痛症(PMR)和/或复发性多发软骨炎(RP)的诊断方法中的用途。

[0142] (32'')在类风湿性多发肌痛症(PMR)和/或复发性多发软骨炎(RP)的诊断方法中使用的LEL凝集素或STL凝集素。

[0143] (32''')在类风湿性多发肌痛症(PMR)和/或复发性多发软骨炎(RP)的诊断用试剂中使用的LEL凝集素或STL凝集素。

[0144] (33)如前述(31)或(32)所记载的方法,其中,前述测定工序是通过抗MMP-3抗体和识别多聚乳糖胺结构的凝集素的三明治分析法进行的测定工序。

[0145] (34)罹患类风湿性多发肌痛症(PMR)和/或复发性多发软骨炎(RP)的判定方法,其特征在于:对于来自于怀疑是否罹患类风湿性多发肌痛症(PMR)和/或复发性多发软骨炎(RP)的受试者的体液试样,通过下述(1)~(3)的工序进行判定:

[0146] (1)对于来自于受试者的体液试样,测定既显示与抗MMP-3抗体的结合活性、又显示与识别多聚乳糖胺结构的凝集素的结合活性的糖链的存在量的工序;

[0147] (2)对于来自于健康个体和/或类风湿性关节炎患者的体液试样,测定既显示与抗MMP-3抗体的结合活性、又显示与识别多聚乳糖胺结构的凝集素的结合活性的糖链的存在量的工序;

[0148] (3)在由(1)得到的显示糖链的存在量的数值显著高于由(2)得到的显示糖链的存在量的数值的情况下,判定为正在罹患类风湿性多发肌痛症(PMR)和/或复发性多发软骨炎(RP)的工序。

[0149] 另外,在此,典型的识别多聚乳糖胺结构的凝集素是LEL凝集素或STL凝集素。

[0150] (35)如前述(34)所记载的方法,其中,前述(1)和(2)的测定工序是抗MMP-3抗体和LEL凝集素或STL凝集素的三明治分析法。

[0151] (36)类风湿性关节炎(RA)的诊断方法,其特征在于:对于受试体液试样,至少适用下述(1)和(2)的测定工序:

[0152] (1)测定既显示与抗MMP-3抗体的结合活性、又显示与识别多聚乳糖胺结构的凝集素的结合活性的糖链的存在量的工序;

[0153] (2)测定既显示与抗MMP-3抗体的结合活性、又显示与从Jacalin、ABA、ACA和ACG中选择的至少一种O-结合型糖链识别凝集素的结合活性的糖链的存在量的工序。

[0154] 另外,在此,典型的识别多聚乳糖胺结构的凝集素是LEL凝集素或STL凝集素。

[0155] 并且,本发明也可以表达如下。

[0156] (36')提供用于诊断类风湿性关节炎(RA)的数据的方法,其特征在于,对于受试体液试样,至少适用下述(1)和(2)的测定工序:

[0157] (1)测定既显示与抗MMP-3抗体的结合活性、又显示与识别多聚乳糖胺结构的凝集

素的结合活性的糖链的存在量的工序；

[0158] (2) 测定既显示与抗MMP-3抗体的结合活性、又显示与从Jacalin、ABA、ACA和ACG中选择的至少一种O-结合型糖链识别凝集素的结合活性的糖链的存在量的工序。

[0159] (37) 如前述(36)所记载的方法,其特征在于:通过使用了前述抗MMP-3抗体以及包含识别多聚乳糖胺结构的凝集素和前述O-结合型糖链识别凝集素的凝集素芯片的三明治分析法同时进行前述(1)和(2)测定工序。

[0160] (38) 罹患类风湿性关节炎的判定方法,其特征在于:对于来自于怀疑是否罹患类风湿性关节炎的受试者的体液试样,通过下述(1)~(4)的工序进行判定:

[0161] (1) 测定既显示与抗MMP-3抗体的结合活性、又显示与识别多聚乳糖胺结构的凝集素的结合活性的糖链的存在量的工序;

[0162] (2) 测定既显示与抗MMP-3抗体的结合活性、又显示与从Jacalin、ABA、ACA和ACG中选择的至少一种O-结合型糖链识别凝集素的结合活性的糖链的存在量的工序;

[0163] (3) 计算由(2)得到的糖链的存在量与由(1)得到的糖链的存在量之比的工序;

[0164] (4) 与预先或者同时对于来自于健康个体的体液试样使用(1)~(3)的工序计算的糖链的存在量之比的数值进行比较,在由(3)得到的数值显著高的情况下,判定为受试者正在罹患类风湿性关节炎的工序。

[0165] 另外,在此,典型的识别多聚乳糖胺结构的凝集素是LEL凝集素或STL凝集素。

[0166] (39) 如前述(38)所记载的方法,其特征在于:通过使用了前述抗MMP-3抗体以及包含识别多聚乳糖胺结构的凝集素和前述O-结合型糖链识别凝集素的凝集素芯片的三明治分析法同时进行前述(1)和(2)测定工序。

[0167] (40) 类风湿性多发肌痛症(PMR)和/或复发性多发软骨炎(RP)诊断用试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包含下述(1)和(2):

[0168] (1) 抗MMP-3抗体;

[0169] (2) 识别多聚乳糖胺结构的凝集素。

[0170] (41) 如前述(40)所记载的试剂盒,其中,识别多聚乳糖胺结构的凝集素是LEL凝集素或STL凝集素。

[0171] (42) 类风湿性关节炎诊断用试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包含下述(1)~(3):

[0172] (1) 抗MMP-3抗体;

[0173] (2) 识别多聚乳糖胺结构的凝集素;

[0174] (3) 从Jacalin、ABA、ACA和ACG中选择的至少一种识别O-结合型糖链的凝集素。

[0175] (43) 如前述(42)所记载的试剂盒,其中,(2)和(3)的凝集素在同一凝集素芯片上存在。

[0176] 发明效果

[0177] 本发明的观察MMP-3上的Jacalin结合性O-结合型糖链的减少的类风湿性关节炎疾病活动性评价方法,可以客观地判定类风湿性关节炎的疾病活动性,使得更正确的病情把握成为可能。而且,因为仅通过测定与血清中的Jacalin以及从ABA、ACA和ACG中选择的任何一种凝集素或者抗MMP-3抗体的结合性信号的简单操作,使得与必须经过熟练医师的详细诊断和经过烦杂算式的分析的“DAS28”相匹敌的正确判定成为可能,所以对医疗现场的贡献是不可估量的。而且,已证实,本发明中,在血液试样(血清试样)或关节液(滑液)试样

等体液试样中观察到的MMP-3上的O-结合型糖链的质的变化正确地反映在滑膜组织中产生的MMP-3上的O-结合型糖链的质的变化。根据本发明,可以提供在医疗现场可以容易使用的、具有简便性和精度的、在临床使用上优异的类风湿性关节炎疾病活动性判定用试剂盒。也期待使用该试剂盒可以与从前困难的早期的类风湿性关节炎与变形性关节炎等其他关节炎炎症性疾病进行鉴别的可能性。

[0178] 进一步地,通过本发明判明受试体液试样中的MMP-3上的LEL或STL凝集素反应性糖链成为用于正确判定是否分别罹患类风湿性关节炎与同样是类风湿性疾病的类风湿性多发肌痛症(PMR)和复发性多发软骨炎(RP)的糖链标志物,通过与抗MMP-3抗体一起使用LEL和/或STL凝集素,提供类风湿性多发肌痛症(PMR)和复发性多发软骨炎(RP)的正确的诊断方法以及与类风湿性关节炎的鉴别方法。

[0179] 进一步地,提供类风湿性关节炎(RA)的正确的诊断方法以及与类似的类风湿性疾病的鉴别方法,包括下述工序:测定与受试体液试样中的MMP-3上的LEL或STL凝集素反应性糖链的反应性信号以及与从Jacalin、ACG、ABA、ACA和ACG中选择的MMP-3上的O-结合型糖链识别凝集素的反应性信号之比的工序。

[0180] 同时,根据本发明,通过抗MMP-3抗体与LEL或STL凝集素等识别多聚乳糖胺结构的凝集素的组合、或者进一步组合从Jacalin、ACG、ABA、ACA和ACG中选择的MMP-3上的O-结合型糖链识别凝集素,可以提供能够与类似的类风湿性疾病显著识别的类风湿性多发肌痛症(PMR)、复发性多发软骨炎(RP)以及类风湿性关节炎(RA)用诊断用试剂盒。

## 附图说明

[0181] 图1表示洗脱组分(MMP-3-IP)的蛋白质印迹(WB)。另外,为了使各血清试样可以换算为重组MMP-3的量,事先通过预实验进行调整使试样内的MMP-3的量落入标准rMMP-3的范围(50~400pg)内,然后加样至凝胶。图中的括号内显示样品的加样量(未表示:0.1 $\mu$ L(相当于血清0.2 $\mu$ L); $\times 1/4$ :0.025 $\mu$ L(相当于血清0.05 $\mu$ L); $\times 1/2$ :0.05 $\mu$ L(相当于血清0.1 $\mu$ L); $\times 2$ :0.2 $\mu$ L(相当于血清0.4 $\mu$ L); $\times 4$ :0.4 $\mu$ L(相当于血清0.8 $\mu$ L))。

[0182] 图2表示由WB的条带强度估算的MMP-3的量与通常测定MMP-3的量的相关图。

[0183] 图3表示来自于患者血清的MMP-3的凝集素芯片分析结果。是关于测定的36个病例中显示典型性的谱的两例的图。可以看得出, $\alpha 2,3$ 唾液酸识别凝集素ACG与O-结合型糖链识别凝集素ABA和ACA在信号模式上十分相似,与此相对,同样是O-结合型糖链识别凝集素Jacalin的相对强度是不同的。各个病例中,将Jacalin值低的情况称为“模式(1)”,将Jacalin值高的情况称为“模式(2)”。

[0184] 图4表示通过凝集素芯片分析设想的MMP-3的主要O-结合型糖链结构。图中,将画下划线的糖链结构设想为MMP-3的主要O-结合型糖链结构。另外, $\square$ 表示GalNAc, $\circ$ 表示Gal, $\blacklozenge$ 表示NeuNAc。

[0185] 图5表示MMP-3的血清中浓度分别与ABA、ACA、ACG和Jacalin的信号强度的相关图。ABA、ACA和ACG信号分别与MMP-3浓度存在相关性,与之相对,没有确认到Jacalin信号与MMP-3浓度的相关性。

[0186] 图6表示ABA、ACA和Jacalin凝集素信号之间的相关图。在ABA、ACA之间确认到强烈的相关性,而Jacalin与任何一种凝集素都未确认到相关性,表明仅Jacalin与MMP-3的量之

间显示不同的趋势。

[0187] 图7表示ABA/Jacalin值与类风湿性关节炎疾病活动性的相关图。使用与MMP-3的量存在强烈相关性的凝集素之一ABA的信号以及Jacalin信号,以糖链修饰判别指数 $X = \text{ABA}/\text{Jacalin}$ 值为横轴、以被称为表示类风湿性关节炎疾病活动性的各种参数的值为纵轴作图,考察两者之间的相关性。其结果,确认到与除患者VAS值以外的全部参数具有一定程度的相关性。

[0188] 图8表示ABA/Jacalin值与疾病活动性分类的相关图。基于DAS28-ESR、SDAI和CDAI各自的标准,将36个病例的血清试样分为4类(缓解、低疾病活动性、中等程度疾病活动性和高疾病活动性),将ABA/Jacalin值作图,考察各自的分布,其结果,随着活动性增高,ABA/Jacalin值的数值升高。另一方面,未观察到MMP-3值与疾病活动性的相关性。P值由斯皮尔曼等级相关系数求出。

[0189] 图9表示唾液酸酶消化对来自于血清的MMP-3的糖链谱产生的影响。对于12个病例的血清试样,将MMP-3进行唾液酸酶消化,包括未处理试样全部进行凝集素芯片分析,其结果,消化前,Jacalin信号具有显著差异(参见图3),然而,消化后,其差异消除。表示出从该结果设想的唾液酸酶消化前后的糖链结构变化。另外,□表示GalNAc,○表示Gal,◆表示NeuNAc。

[0190] 图10显示滑液中的MMP-3的蛋白质印迹。将从罹患类风湿性关节炎(RA)和变形性关节炎(OA)的各3个病例的患者采集的滑液中的MMP-3的量进行测定,由预先调整为 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度的各自的滑液稀释试样,通过抗MMP-3抗体进行免疫沉降(IP),将取得的洗脱液(MMP-3-IP)加样于等量凝胶进行蛋白质印迹。在任何一个试样中测定到基本同等程度的MMP-3值。

[0191] 图11表示来自于滑液的MMP-3的比较糖链分析。将从罹患类风湿性关节炎(RA)和变形性关节炎(OA)的各3个病例的患者采集的滑液中的MMP-3通过凝集素芯片进行比较糖链分析。上图显示来自于类风湿性关节炎患者3个病例的滑液试样的糖链谱,下图显示来自于变形性关节炎患者3个病例的滑液试样的糖链谱。就本实验而言,因为同时测定了MMP-3的量,所以信号的差异意味着MMP-3的糖链的质的差异。来自于类风湿性关节炎患者的滑液试样的MMP-3糖链谱与从类风湿性关节炎患者中、特别是疾病活动性高的患者的血清试样得到的MMP-3的糖链谱类似,即使在滑液试样中也具有Jacalin值相对较低的特征。这意味着,即使在滑膜组织内产生的MMP-3上的Jacalin结合性O-结合型糖链抗原表位的糖链结构被分泌至血清中,也保持同样的糖链结构,因此,显示使用对患者负担较小的血液试样(血清试样),能够以与滑液试样几乎同等精度的精度进行糖链抗原表位分析。

[0192] 图12表示滑液中的4种凝集素信号的比较数据。图11的糖链谱中,对于在类风湿性关节炎患者血清试样中确认到显著的信号强度的ACG、ABA、ACA和Jacalin,将类风湿性关节炎(RA)和变形性关节炎(OA)的滑液试样之间的数值作图。4种凝集素均在RA和OA之间确认到显著差异,特别是在Jacalin中两者之间确认到显著差异,就RA而言,可观察到Jacalin值低的趋势。即证实,对血清试样使用MMP-3上的糖链抗原表位分析正确地反映了滑液中的MMP-3上的糖链抗原表位的状态。

[0193] 图13表示使用其他病例(类风湿性关节炎:RA;类风湿性多发肌痛症:PMR;复发性多发软骨炎:RP)患者组共计29名的血清,MMP-3的血清浓度与ABA、ACA、ACG和Jacalin各自

的信号强度的相关图。与图5一样,ABA、ACA和ACG信号都与MMP-3浓度相关,与此相对,未确认到Jacalin信号与MMP-3浓度的相关性。

[0194] 图14是分别对于RA、PMR、RP和健康个体(HC),将Jacalin值和MMP-3值作图的图。就RA而言,未观察到MMP-3值和Jacalin值之间相关,也可以看出,与图5的背离实例一样,MMP-3值越高,Jacalin值好像越低;然而,非RA未观察到这样的趋势,Jacalin和MMP-3值的相关性高。

[0195] 图15是分别对于RA、PMR、RP和HC,将ACG/Jacalin值和MMP-3值作图的图。可知,仅RA中,在类风湿性关节炎(RA)活动性高的组中,ACG/Jacalin值高。

[0196] 图16是测定RA、PMR、RP和HC各自的STL和LEL凝集素信号,进行Wilcoxon检验和ROC分析的图。就类风湿性多发肌痛症(PMR)和复发性多发软骨炎(RP)而言,AUC=1.0,显示对任何一种疾病都可以特异性地鉴别。

[0197] 图17是测定RA、PMR、RP和HC各自的Jacalin/LEL值和ACG/LEL值,进行Wilcoxon检验和ROC分析的图。就类风湿性关节炎(RA)而言,在Jacalin/LEL值的情况下,AUC=0.983,在ACG/LEL值的情况下,AUC=0.956,显示任意值都可以特异性地鉴别。

## 具体实施方式

[0198] 1. 本发明中的类风湿性关节炎糖链标志物

[0199] 在本发明中,作为与类风湿性关节炎诊断负相关的(负的)的糖链生物标志物而使用的糖链,是可以在血清中观察的来自于滑膜组织的基质金属蛋白酶3(matrix metalloproteinases-3;MMP-3)上的糖链,且可观察到随着类风湿性关节炎疾病活动性的增大而渐渐丧失的Jacalin结合性糖链。

[0200] 将Jacalin结合性糖链的量使用血清中的MMP-3存在量或在MMP-3上特定存在的糖链的量或者以显示存在与MMP-3存在量相关的反应性的凝集素为代表的糖链识别探针的结合量进行修正后的值,成为本发明的糖链生物标志物的量。

[0201] (1-1) 对于MMP-3

[0202] 已知MMP-3在类风湿性关节炎的滑膜细胞中大量产生,与软骨破坏的进展强烈相关(非专利文献1~3)。

[0203] 从前作为类风湿性关节炎诊断用的炎症标志物使用的血清CRP和ESR反映全身的炎症,与此相对,据说血清中的MMP-3值反映关节局部的病态,现在,作为可靠性最高的关节破坏的预后预测因子而受到瞩目。同时,初期的类风湿性关节炎与变形性关节炎等其他关节性疾病的鉴别困难,然而,从反映软骨破坏程度的血清中的MMP-3值来看,类风湿性关节炎可以在初期阶段进行诊断。

[0204] 但是,因为与成为类风湿性关节炎疾病活动性的指标的“DAS28”的相关性并不那么高,所以不能单独作为成为类风湿性关节炎的病态指标的诊断用标志物使用,在临床上用于与“DAS28”等进行组合的早期类风湿性关节炎的诊断以及治疗方针的确定等。

[0205] MMP-3从软骨细胞和滑膜细胞作为分泌型(分子量57,000或59,000)而被分泌,去除信号肽等而成为活性型(分子量45,000、28,000),是分解构成基底膜和软骨的软骨蛋白聚糖、III、IV、V、VII、IX型胶原、层粘连蛋白、纤维连接蛋白和明胶的金属蛋白酶(非专利文献2、非专利文献15)。

[0206] MMP-3被除去信号序列和前体序列后成为MMP-3成熟蛋白而被活化。可以认为,与其他MMP家族成员一样,MMP-3具有如下结构域结构:与Zn结合的酶活性结构域(结合结构域)和参与底物识别的血红素结合蛋白样结构域通过75个氨基酸残基以下的铰链区(连接结构域)相连。MMP-3上的糖链结构和附加位置信息匮乏,已知有关N-结合型糖链存在酶活性结构域。然而,完全没有关于O-结合型糖链的知识。如果基于其他MMP的知识进行预测,可以认为,罹患类风湿性关节炎后,在MMP-3的铰链区上,存在多个与在滑膜组织和血清中观察到糖链结构变化的MMP-3上的Jacalin、ABA、ACA凝集素结合的O-结合型糖链,在其他区域也有存在的可能性。

[0207] (1-2) 本发明中的类风湿性关节炎糖链标志物结合性的凝集素

[0208] 在本发明中,作为负的糖链生物标志物,可以特异性判定类风湿性关节炎的疾病活动性的类风湿性关节炎标志物是“来自于滑膜组织的MMP-3上的凝集素Jacalin结合性O-结合型糖链”。另外,“凝集素”被定义为“特异性地识别糖链并结合、形成交联的蛋白质”,本发明所使用的Jacalin、ABA、ACA和ACG都是凝集素的一种。

[0209] 本发明的识别糖链标志物的凝集素“Jacalin”是指从菠萝蜜(学名:Artocarpus integrifolia)的种子分离的凝集素,属于Jacalin相关凝集素家族。已知在Gal上具有单糖特异性(根据凝集素前沿数据库(LfDB))。

[0210] Jacalin可以通过将菠萝蜜的种子破碎后提取进行纯化,也可以使用已知的碱基序列通过基因重组技术由大肠菌宿主等大量生产。就本发明的实施例而言,使用Vector公司制非缀合(Unconjugated) Jacalin(商品编号L-1150)和生物素化(Biotinylated) Jacalin(商品编号B-1155)、或包含Jacalin的凝集素芯片(商品名“LecChip™”(GlycoTechnica公司制))。

[0211] 另外,用于类风湿性关节炎诊断的在类风湿性关节炎疾病活动性分析中使用的其他凝集素中,ABA是从双孢蘑菇(学名:Agaricus bisporus)分离的凝集素,是对Gal和GlcNAc具有特异性的凝集素;ACA是从苋科的苋属(学名:Amaranthus)的种子分离的凝集素,是对GalNAc具有特异性的凝集素;ACG是从茶树菇(学名:Agrocybe cylindracea)分离的属于半乳糖凝集素家族的凝集素(根据凝集素前沿数据库(LfDB))。

[0212] ABA、ACA和ACG都可以由其来源的植物或蘑菇提取,另外也可以由各碱基序列信息(各数据库的编号)利用基因重组技术进行合成,ABA来自于日本WAKO社(重组蛋白)和日本MBL社(来自于天然)等,ACA来自于日本Vector社(来自于天然)等,另外,重组ACG来自于日本WAKO社等,分别都是在市场上销售的,配置有这些ABA、ACA和ACG的凝集素芯片也以商品名“LecChip™”由日本GlycoTechnica社在市场上销售。就本发明的实施例而言,使用“LecChip™”。

[0213] (1-3) 关于成为本发明的糖链生物标志物的糖链抗原表位

[0214] 成为本发明的类风湿性关节炎诊断用的负的糖链生物标志物的糖链抗原表位是MMP-3上的Jacalin结合性O-结合型糖链。而且,可以认为,在MMP-3的酶活性结构域(结合结构域)和与血红素结合蛋白样结构域紧密相连的铰链区(连接结构域)上存在多个该O-结合型糖链,可以认为,存在多个该O-结合型糖链,使得凝集素之间在反应性上产生很大不同。

[0215] 另外,Jacalin与在肽链的Ser/Thr上结合的O-结合型糖链的核心结构-1(核心1)“Gal( $\beta$ 1,3)GalNAc”或Tn抗原(GalNAc)进行配位,已知,通过向它们的GalNAc的第6位导入

唾液酸 (NeuNAc) 的修饰而使识别被消除。也就是说,可以认为, Jacalin 信号量的减少对应于对上述糖链骨架的“GalNAc”的第6位的唾液酸的修饰率增加的状态。另外, Jacalin 是由于对 GalNAc 的 $\alpha 2,6$ 唾液酸修饰从而结合性降低的代表性的实例,如果是具有同样特征的凝集素和糖链识别抗体或者糖链识别肽、糖链识别适体,也是可以替代使用的。

[0216] 进一步地,如果一并考虑可以识别或允许修饰核心1的“Gal”和“GalNAc”的任何一种的唾液酸的ABA和ACA的信号与MMP-3值的行为一致,可以认为,按照发明人的凝集素芯片分析数据,健康个体的MMP-3的连接结构域上的O-结合型糖链为以核心1为母骨架,仅是“Gal”和“GalNAc”的Gal被唾液酸 (NeuNAc) 修饰或者都被唾液酸 (NeuNAc) 修饰,如果罹患类风湿性关节炎,则对应于类风湿性关节炎疾病活动性的增高,渐渐地唾液酸 (NeuNAc) 的导入率增加,未对第6位修饰的“GalNAc”的量逐渐消失。

[0217] 根据对MMP-3使用唾液酸酶的唾液酸切断实验的结果(图9),MMP-3所具有的主要的O-结合型糖链的结构是核心1结构(Gal( $\beta 1,3$ )GalNAc),可以理解为,对Gal几乎都进行了 $\alpha 2,3$ 唾液酸的修饰。而且,对GalNAc的 $\alpha 2,6$ 唾液酸修饰的程度,就健康个体而言是低频率的,得到以下结论:随着类风湿性关节炎的疾病活动性增高,其修饰程度持续增大。

[0218] 由此证实,核心1结构中的对GalNAc的 $\alpha 2,6$ 唾液酸修饰程度成为类风湿性关节炎疾病活动性的标志物,并且,来自于Jacalin的信号成为负的活动性标志物,同时,连同来自于ABA和ACA的信号一起,来自于ACG的信号也与血清中的MMP-3的量显示同样的行为。

[0219] 也就是说,成为本发明的类风湿性关节炎活动性的判定用标志物的糖链抗原表位,可以表达如下。

[0220] “糖链抗原表位,其特征在于:其为MMP-3上的O-结合型糖链,是Jacalin非结合性的。”或者

[0221] “糖链抗原表位,其特征在于:其为MMP-3上的O-结合型糖链,在MMP-3的肽链中的Ser/Thr上结合的GalNAc由 $\alpha 2,6$ 唾液酸进行修饰。”

[0222] 而且,这表示,不仅是Jacalin,只要是识别在MMP-3上的Ser/Thr上结合的含有 $\alpha$ GalNAc的糖链、且不识别在该 $\alpha$ GalNAc上结合了 $\alpha 2,6$ 唾液酸的糖链的物质,都可以作为类风湿性关节炎疾病活动性判定用试剂使用。

[0223] 具体而言,可以使用对在MMP-3的肽链中的Ser/Thr上结合的GalNAc的 $\alpha 2,6$ 唾液酸的修饰识别并结合的凝集素、糖链识别抗体、糖链识别肽、糖链识别适体等。相反,识别在MMP-3上的Ser/Thr上结合的含有 $\alpha$ GalNAc的糖链且不识别在该 $\alpha$ GalNAc上结合了 $\alpha 2,6$ 唾液酸的糖链的物质,即从识别含有在Ser/Thr上结合的 $\alpha$ GalNAc的糖链且不识别在该 $\alpha$ GalNAc上结合了 $\alpha 2,6$ 唾液酸的糖链的糖链识别抗体、结合性凝集素、糖链识别肽和糖链识别适体中选择的物质,同时也可以作为类风湿性关节炎疾病活动性判定用试剂使用。后者的典型的实例是在本实施例中使用的Jacalin。

[0224] 2. 本发明的类风湿性关节炎的疾病活动性的判定方法

[0225] (2-1) 用于判定本发明的类风湿性关节炎的疾病活动性的标志物

[0226] 本发明的特征在于:为了判定类风湿性关节炎的疾病活动性,测定在受试血液试样中的MMP-3上的O-结合型糖链的糖链结构的变化。

[0227] 为此,成为类风湿性关节炎活动性的判定用标志物的正的糖链抗原表位可以表达如下。

[0228] “糖链抗原表位,其特征在于:其为MMP-3上的O-结合型糖链,并且是Jacalin非结合性的。”或者

[0229] “糖链抗原表位,其特征在于:其为MMP-3上的O-结合型糖链,在MMP-3的肽链中的Ser/Thr上结合的GalNAc由 $\alpha$ 2,6唾液酸进行修饰。”

[0230] 而且,通过将该糖链抗原表位进行检测和定量,可以判定是否罹患类风湿性关节炎以及类风湿性关节炎的疾病活动性的程度。

[0231] 特异性地识别该糖链抗原表位的物质,即,从特异性地识别在Ser/Thr上结合的GalNAc被 $\alpha$ 2,6唾液酸修饰的O-结合型糖链的糖链识别抗体、结合性凝集素、糖链识别肽和糖链识别适体中选择的物质,成为用于检测和定量该糖链抗原表位的类风湿性关节炎疾病活动性判定用试剂。

[0232] 相反,识别在MMP-3上的Ser/Thr上结合的含有 $\alpha$ GalNAc的糖链且不识别在该 $\alpha$ GalNAc上结合了 $\alpha$ 2,6唾液酸的糖链的物质,即,从识别在Ser/Thr上结合的含有 $\alpha$ GalNAc的糖链且不识别在该 $\alpha$ GalNAc上结合了 $\alpha$ 2,6唾液酸的糖链的糖链识别抗体、结合性凝集素、糖链识别肽和糖链识别适体中选择的物质,同时也可以作为类风湿性关节炎疾病活动性判定用试剂使用。后者的典型的实例是在本实施例中使用的Jacalin。在以下的分析方法中,主要使用Jacalin进行说明,然而并不限于Jacalin。

[0233] 同时,从受试血液试样等受试体液试样制备的MMP-3且具有多个Jacalin非结合性的O-结合型糖链的MMP-3本身,即,具有多个在肽链中的Ser/Thr上结合的GalNAc被 $\alpha$ 2,6唾液酸修饰的O-结合型糖链的MMP-3本身成为类风湿性关节炎活动性的判定用标志物。

[0234] 为了检测或定量这样的MMP-3,可以使用与上述糖链抗原表位同样的分析方法。

[0235] 而且,为了判定受试血液试样等受试体液试样中的类风湿性关节炎的疾病活动性,在测定糖链结构的变化时,将显示受试血液试样中的MMP-3总量的测定信号乘以显示MMP-3上的Jacalin结合性O-结合型糖链总量的测定信号的倒数,或者,前述糖链结构的变化测定是将显示受试体液试样中的MMP-3总量的测定信号的倒数乘以显示MMP-3上的Jacalin结合性O-结合型糖链总量的测定信号,可以对下述糖链修饰判别指数X或Y进行计算。

[0236] 另外,糖链修饰判别指数(X或Y)可以定义为:“具有类似的特异性的多个凝集素组,特别是对于某种母骨架糖链结构(例如就本发明而言,是核心1结构)修饰的成分(例如唾液酸或脱氧己糖等)、方式(在哪个糖链上在哪个位置)、比例不同的情况下,各凝集素的结合强度不同。在该结合强度可以转换为能够定量的信号的情况下,通过将它们组合进行公式化,可用于对母骨架的修饰状态进行比较评价的指数”。

[0237]  $X = \text{显示受试体液试样中的MMP-3总量的测定信号} / \text{显示同一MMP-3上的Jacalin结合性O-结合型糖链总量的测定信号};$

[0238]  $Y = \text{显示受试体液试样中的MMP-3上的Jacalin结合性O-结合型糖链总量的测定信号} / \text{显示同一MMP-3总量的测定信号}。$

[0239] 此时,糖链修饰判别指数X的值越高,可以判定类风湿性关节炎的疾病活动性越高;相反,糖链修饰判别指数Y的值越高,可以判定类风湿性关节炎的疾病活动性越低。

[0240] 为了判定受试者是否罹患类风湿性关节炎或者判定特定时期的类风湿性关节炎的疾病活动性,优选设置下述工序:设定健康个体中的基准值( $X_0$ )或( $Y_0$ ),使用来自于受试

者的体液试样进行测定,将计算的X和Y进行比较。

[0241] 在X高于基准值 $X_0$  ( $X > X_0$ ) 的情况下,判定类风湿性关节炎的疾病活动性高或正在罹患类风湿性关节炎的工序;或者,在Y低于基准值 $Y_0$  的情况下 ( $Y < Y_0$ ),判定为类风湿性关节炎的疾病活动性高或正在罹患类风湿性关节炎。

[0242] 经时性地观察受试者,也可以判定受试者的类风湿性关节炎的疾病活动性的经时性的病情变化。

[0243] 在此情况下,优选设置下述工序:使用来自于受试者的体液试样进行测定,将计算出的 $X'$  和 $Y'$  与对同一受试者的检测日以前的体液试样计算出的值 ( $X'_0$ ) 或 $Y'_0$ ) 进行比较。对于 $X'$  在出现比检测日以前高的数值的情况下 ( $X' > X'_0$ )、对于 $Y'$  在出现比检测日以前低的数值的情况下 ( $Y' < Y'_0$ ),判定受试者的类风湿性关节炎的疾病活动性恶化;在出现低的数值的情况下 ( $X' < X'_0$ ) 或出现高的数值的情况下 ( $Y' > Y'_0$ ),判定疾病活动性改善。

[0244] 通过使用来自于类风湿性关节炎治疗后的受试者的体液试样与治疗前的体液试样进行比较,可以判定治疗效果。

[0245] 在此,作为受试体液试样中的“显示MMP-3总量的测定信号”,可以使用体液试样中的MMP-3存在量的测定值或随着体液试样中的MMP-3存在量而增减的测定信号。

[0246] 体液试样中的MMP-3存在量的测定值是指受试体液试样中含有的MMP-3存在量的绝对值的测定值,对于本领域技术人员来说,试样中的MMP-3存在量的测定方法是已知的。具体而言,可以对于MMP-3使用将单克隆抗体包覆在胶乳颗粒上的胶乳凝集法等。

[0247] 另外,作为受试体液试样中的“随着MMP-3存在量而增减的测定信号”,除了使用抗MMP-3抗体(特异性地识别MMP-3的多肽链的抗体)测定的信号值以外,还可以优选使用与MMP-3值显示同样行为的来自于ABA、ACA或ACG的信号量,即,显示体液试样中的MMP-3与ABA、ACA或ACG的结合量的测定信号值。另外,不限于ABA、ACA、ACG,只要是被认为与MMP-3的量相关的凝集素,就可以替代使用。

[0248] 本发明最优选的X和Y如下。

[0249]  $X =$  来自于受试体液试样中的ABA的测定信号/来自于同一试样的Jacalin的测定信号;

[0250]  $Y =$  来自于受试体液试样中的Jacalin的测定信号/来自于同一试样的ABA的测定信号。

[0251] (2-2) 通过凝集素芯片或三明治ELISA法的检测和定量

[0252] 在本发明中,将受试试样使用凝集素芯片或三明治ELISA法测定Jacalin信号值,通过将其倒数使用同时测定的ABA、ACA或ACG信号值进行修正,可以判定是否罹患类风湿性关节炎或类风湿性关节炎疾病活动性。ABA、ACA或ACG信号值可以用MMP-3值代替。

[0253] 凝集素芯片可以通过下述任意一种方法进行分析:将MMP-3进行荧光标记后加样于凝集素芯片,进行结合反应后检测信号的直接法;或者将未标记的MMP-3加样于凝集素芯片后,使用抗体覆盖法检测结合信号的间接法。

[0254] 在此,作为受试试样,不只限于从受试者采取的血液得到的血清和血浆,也可以将关节液(滑液)、胸腔积液、腹水、滑膜液、淋巴液等其他体液试样作为对象,受试者不受到特别限定,可以广泛适用于患有或未患有类风湿性关节炎的人、或者需要判定类风湿性关节炎疾病活动性的人。

[0255] 另外,为了追求受试者的负担小且检查时间的缩短,最优选将受试者的血液(血清、血浆等)作为受试试样。

[0256] 通过本发明的检测方法检测受试试样中的类风湿性关节炎糖链标志物的减少,可以确切评价类风湿性关节炎的疾病活动性。同时,可以确切判定类风湿性关节炎治疗的效果,确定缓解程度。

[0257] (2-3)凝集素芯片分析法

[0258] 含MMP-3组分的浓缩

[0259] 因为成为本发明的负相关的(负的)类风湿性关节炎糖链标志物的Jacalin结合性糖链是MMP-3上的糖链,所以在受试者的血液试样等受试试样为微量等的情况下,通过使用抗MMP-3抗体的亲和柱等的MMP-3浓缩组分,使得更正确地判定类风湿性关节炎疾病活动性成为可能。

[0260] 另外,效仿在W02011/007797中记载的链霉亲和素包覆磁珠的纯化方法,即使使用将抗MMP-3抗体进行生物素化并缀合在链霉亲和素包覆磁珠上的磁珠,也可以高效率地进行浓缩。就本发明的实施例而言,使用该磁珠可以得到MMP-3浓缩组分。

[0261] 标记化

[0262] 作为标记物质的实例,可以列举,例如:荧光物质(例如,FITC、罗丹明、Cy-3、Cy-5);放射性物质(例如, $^{14}\text{C}$ 、 $^3\text{H}$ );酶(例如,碱性磷酸酶、过氧化物酶(辣根过氧化物酶等);葡糖氧化酶; $\beta$ -半乳糖苷酶)等。同时,也可以利用生物素和(链霉)亲和素的结合。将检测剂使用生物素进行标记,将(链霉)亲和素以上述标记物质进行标记,可以利用生物素和(链霉)亲和素的结合进行检测。

[0263] 在作为标记物质使用酶的情况下,根据所使用的酶,使用适当的底物进行检测。例如,在作为酶使用过氧化物酶的情况下,作为底物,使用邻苯二胺(OPD)、四甲基联苯胺(TMB)等;在使用碱性磷酸酶的情况下,作为底物,使用对硝基苯磷酸盐/酯(PNPP)等。对于酶反应终止液、底物溶解液,可以根据所选择的酶,从以往公知的溶液中适当选择。凝集素芯片的配制

[0264] 作为凝集素芯片,使用包含Jacalin凝集素以及ABA、ACA和ACG的任一凝集素的任何形式的凝集素芯片即可。例如,可以使用本发明人开发的特异性不同的45种植物凝集素在同一基板上固定化的凝集素芯片(非专利文献16)或LecChip<sup>TM</sup> Ver.1.0(日本グライコテクニカ社制),也可以按照适当的公知方法进行配制。

[0265] 在凝集素芯片中,与Jacalin凝集素一起,可以仅包含ABA、ACA和ACG的任一凝集素即可,然而,优选包含全部ABA、ACA和ACG凝集素,进一步优选将多种其他凝集素在支承体上进行固相化。作为此时的其他凝集素,可以列举:MAH凝集素、MAL凝集素、WGA凝集素等。

[0266] 可以将Jacalin和其他凝集素直接在支承体上进行固相化(直接法),然而,通过将Jacalin等制成生物素化Jacalin等,以在链霉亲和素包覆的支承体上以固相化的形态进行配制(间接法),可以大幅增进检测灵敏度的提高和背景的减少。

[0267] 作为凝集素芯片的支承体,只要是倏逝波可以透过的透明物质即可,一般可以使用载玻片、聚碳酸酯等合成树脂等。

[0268] 对凝集素芯片的添加和清洗

[0269] 将用Cy-3等标记的受试试样使用缓冲液稀释或不稀释,添加至凝集素芯片反应

槽,使之相互作用后,将非特异性结合的夹杂物使用凝集素芯片用缓冲液(市售)进行清洗。另外,在使用倏逝波检测的情况下,也可以省略清洗工序。

#### [0270] 检测方法

[0271] 一般而言,与抗原抗体反应的结合相比,凝集素对糖链的结合一般较弱,抗原抗体反应的结合常数为 $10^6\sim 10^9\text{M}^{-1}$ 左右,相对于此,凝集素和糖链间的结合常数被认为是 $10^4\sim 10^7\text{M}^{-1}$ ,所以在凝集素的糖链结合信号的检测中,通常优选使用倏逝波激发型荧光检测法进行,在本发明中也优选使用倏逝波激发型荧光检测法。倏逝波激发型荧光检测法是指利用下述现象的方法:在载玻片的端面(侧面)以发生全反射的条件将光入射,则在玻璃(固相)和水(液相)等折射率不同的两相之间的情况下,仅在离界面数百纳米左右的近场,被称为倏逝波的射程距离极短的光(被称为近场光)渗出。根据该方法,将荧光物质的激发光从端面入射,仅激发在近场存在的荧光物质,进行荧光观察。倏逝波激发型荧光检测法记载于非专利文献16等。在该检测中,可以使用GlycoStation<sup>TM</sup>Reader 1200(日本モリテックス:グライコテクニカ社)等。

[0272] 但是,在本发明中成为检测对象的Jacalin等凝集素与MMP-3上的O-结合型糖链抗原表位的结合性,根据在实施例中的分析结果,结果显示为可以估算为非常高的结合常数。可以认为,这是被认为存在于MMP-3铰链区存在多个O-结合型糖链而导致的集群效应。在基板上被固定的高密度的凝集素与糖链的相互作用被认为是通过集群效应而导致结合常数在2位数以上的效果。同时,因为特别是据说该集群效应具有显著降低解离速度的效果,因此,可以认为,即使需要清洗工序的检测体系也可以检测出来。因此,可以使用包括清洗工序的间接法的抗体覆盖·凝集素芯片法以及如下文所述的三明治ELISA法等抗原抗体反应的检测体系所使用的一般检测法。

#### [0273] 评价方法

[0274] 通过凝集素芯片的评价是选择识别来自于体液例如血清的MMP-3中基本上以一定比例存在的糖链的、或与MMP-3的量结合信号值存在相关性的凝集素ABA凝集素等,作为内标凝集素,在同一凝集素芯片基板上固定,在将Jacalin信号等目的凝集素信号进行相对值化之后,通过判断超过或不超某临界值进行。这样的以某凝集素的值为基准的目的凝集素的信号进行相对值化以用于判别的方法可以按照本发明人以前发表的论文(非专利文献17)进行。可以使用标本化的多种类风湿性关节炎患者的体液例如血清预先进行临界值的设定。也就是说,基于从预先的来自于多名类风湿性关节炎患者的血清和健康个体血清作为对象的凝集素芯片分析得到的上述相对值,计算后述的糖链修饰判别指数(X或Y)。更优选预先作成多名对应于类风湿性关节炎的疾病活动性的程度的糖链修饰判别指数,与来自于受试血液试样的糖链修饰判别指数进行比较,判定受试者的类风湿性关节炎的疾病活动性的程度,判定受试者是否罹患类风湿性关节炎,另外,判定类风湿性关节炎疾病活动性为何种程度。

#### [0275] (2-4) 三明治法

[0276] 就三明治法而言,使Jacalin等凝集素的任一种以及抗MMP-3抗体结合在固相上。以下,将固相化的结合物质称为“捕捉剂”,将对方物质称为“检测剂”。作为将捕捉剂固相化的支承体(固相),可以列举:平板(例如,微孔板);微芯片基板(例如,微芯片用载玻片);管;珠(例如,塑料珠、磁珠);色谱法用载体(例如, Sepharose(商标));膜(例如,硝化纤维素膜、

PVDF膜);凝胶(例如,聚丙烯酰胺凝胶)等。其中,优选使用平板、珠和膜,从处理的简便性来看,最优选使用平板。可以通过只要能得到充分的结合强度的任意方法对捕捉剂进行固相化,例如,通过共价键、离子键、物理吸附等进行固相化。或者,也可以使用预先将捕捉剂进行了固相化的支承体。

[0277] 检测剂也可以通过间接的或直接的标记物质进行标记。作为标记物质的实例,可以列举,例如:荧光物质(例如,FITC、罗丹明、Cy-3、Cy-5);放射性物质(例如, $^{13}\text{C}$ 、 $^3\text{H}$ );酶(例如,碱性磷酸酶、过氧化物酶(辣根过氧化物酶等)、葡糖氧化酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶)等。同时,也可以将检测剂进行生物素标记,将(链霉)亲和素使用上述标记物质进行标记,将生物素和(链霉)亲和素结合使用。

[0278] 在作为标记物质使用酶的情况下,根据使用的酶,使用适当的底物进行检测。例如,在作为酶使用过氧化物酶的情况下,作为底物,使用邻苯二胺(OPD)、四甲基联苯胺(TMB)等;在使用碱性磷酸酶的情况下,作为底物,使用磷酸对硝基苯盐/酯(PNPP)等。对于酶反应终止液、底物溶解液,可以根据选择的酶,从以往公知的溶液中适当选择。

[0279] 捕捉剂与血液试样中的MMP-3或者与MMP-3上的Jacalin、ABA、ACA和ACG凝集素结合性糖链形成复合物。通过测定适用于该复合物的检测剂所产生的信号,对血清中的MMP-3上的Jacalin、ABA、ACA和ACG凝集素结合性糖链进行检测·定量。利用与所使用的标记物质相应的适当的测定装置进行信号的测定即可。

[0280] 作为本发明的用于测定Jacalin结合性糖链抗原表位的三明治法,具体而言,是在支承体上将包含Jacalin在内的多种凝集素进行固相化,添加受试试样,进行反应,由此提示在反应场上与该凝集素结合的MMP-3,对此可以通过使标记的该MMP-3结合物质发生作用进行检测。使用的多种凝集素可以在同一支承体上排列(芯片化),也可以在各自不同的支承体上固定并进行并行测定。此时,代替将Jacalin等凝集素直接在支承体上进行固相化的方法(直接法),通过将Jacalin等凝集素分别进行生物素化,以将该生物素化的凝集素在链霉亲和素包覆的支承体上以固相化的形态进行配制的方法(间接法),可以大幅增进检测灵敏度的提高和背景的减少。

[0281] 作为其他方法,将MMP-3结合物质在支承体上进行固相化,通过添加受试试样进行反应,使MMP-3在结合物质上以覆盖MMP-3的形态的进行准备之后,可以通过标记化的Jacalin凝集素和其他标记凝集素,检测与该凝集素显示反应性的MMP-3。

[0282] 在本发明的Jacalin结合性糖链含量的测定中,可以使用ELISA、免疫色谱法、放射免疫分析(RIA)、荧光免疫分析(FIA法)、化学发光免疫分析、倏逝波分析法等。这些方法是本领域技术人员所公知的,选择任意一种方法即可。同时,这些方法按照通常的步骤实施即可,实际的反应条件的设定等在本领域技术人员通常可以进行的技术范围内。其中,特别优选使用凝集素·抗体三明治ELISA,该方法使用抗MMP-3抗体作为MMP-3结合物质。

[0283] 受试血液试样等受试体液试样中的具有Jacalin结合性糖链的MMP-3与作为捕捉剂使用的支承体上的Jacalin等凝集素或者抗MMP-3抗体形成复合物。通过测定在该复合物上使用检测剂标记化凝集素或者标记化抗MMP-3抗体而产生的信号,对受试试样中的Jacalin结合性糖链进行检测·定量。利用与所使用的标记物质相应的适当的测定装置进行信号的测定即可。

[0284] 在将受试者的血液试样作为受试试样的情况下,例如可以通过以下步骤进行三明

治ELISA分析。

[0285] 含有标记化的受试试样的制备方法与(2-2)的凝集素芯片分析法相同。

[0286] 接着,例如,在以链霉亲和素包覆的ELISA平板的各孔中,使生物素化Jacalin结合,添加受试血液试样或其MMP-3组分,使之与试样中的MMP-3进行相互作用。接着,以缓冲液清洗或不清洗,使用未反应的Jacalin作为封闭剂进行封闭,使标记MMP-3抗体进行反应。

[0287] 另外,在三明治ELISA中,优选与Jacalin以外的ABA、ACA或ACG凝集素等其他凝集素并用,这与在凝集素芯片分析的情况一样。

[0288] 进一步地,代替凝集素包覆ELISA平板,可以使用将抗MMP-3抗体在支承体上进行固相化的抗体包覆ELISA平板。在此情况下,添加受试血液试样进行抗原抗体反应后,可以使标记化的Jacalin和其他标记化凝集素(ABA、ACA或ACG)进行反应,测定各自的信号值。

[0289] 类风湿性关节炎性活动性标志物的检测和判别方法

[0290] ELISA法是公知的方法,按照通常的步骤实施即可,可以根据标志物使用最适合的测定装置。

[0291] 根据本法的类风湿性关节炎标志物的定量性的检测,可以从血清等进行配制,将蛋白质质量公知的Jacalin结合性MMP-3作为标准物质使用,作成标准曲线,作为标准物质的相当量进行换算。在标准物质中,如果确认与Jacalin具有结合性,也可以是重组MMP-3。例如,如实施例1所述,可以使用在小鼠骨髓瘤细胞(N0细胞)大量表达并纯化的市售重组MMP-3(R&D Systems公司制,产品编号513-MP-010)作为标准物质使用。同时,作为不使用标准物质的评价方法,效仿上述凝集素芯片法,可以根据病变信号不发生变动的凝集素作为内标凝集素使用,在将Jacalin信号进行相对值化之后,进行超过或不超过某临界值的判断。另外,可以使用多名判明疾病活动性的类风湿性关节炎患者的血液试样事先进行内标凝集素的选择以及临界值的设定。也就是说,可以根据将预先从多名疾病活动性不同的患者采取的血液试样作为对象的凝集素芯片分析,通过统计学事先设定内标。同时,以通过将预先从多名疾病活动性不同的患者采取的血液试样作为对象的ELISA测定得到的上述相对值作为基础作成判别公式。更优选对应于类风湿性关节炎的进行或疾病活动性恶化的程度作成多个判别公式,判定受试血液试样的类风湿性关节炎的进行或疾病活动性恶化程度,判定受试者是否罹患类风湿性关节炎性,另外判定类风湿性关节炎疾患活动性的阶段是哪种程度。

[0292] 例如,在作为内标凝集素使用ABA的情况下,使用分别将40 $\mu$ L血液试样使用以MMP-3-ABA、MMP-3-Jacalin制成的三明治测定的数值,判定MMP-3-ABA/MMP-3-Jacalin比值小于2为缓解,2以上且小于3为低疾病活动性,3以上且小于8为中疾病活动性,8以上为高疾病活动性。

[0293] 另外,也可以将ELISA测定替换为微芯片或基于SPR等不同的相互作用分析原理的测定方法。在此情况下,因为这些都是公知的方法,所以按照通常的步骤实施即可,可以根据方法使用最合适的测定装置。

[0294] 3. 类风湿性关节炎的疾病活动性的判定用试剂盒

[0295] 可以将识别在MMP-3上的Ser/Thr上结合的含有 $\alpha$ GalNAc的糖链、且不识别在该 $\alpha$ GalNAc上结合了 $\alpha$ 2,6唾液酸的糖链的物质、优选将Jacalin作为类风湿性关节炎的疾病活动性判定用试剂的有效成分使用。

[0296] 进一步地,对于血液试样中的MMP-3,依赖于MMP-3存在量与MMP-3特异性结合的物质,具体而言,可以将从ABA、ACA和ACG中选择的凝集素或抗MMP-3抗体进行组合,作为类风湿性关节炎疾病活动性判定用试剂盒使用。

[0297] 本发明的活动性的判定用试剂盒,例如可以是下述组合。

[0298] (1) (a) 将包含Jacalin作为必需凝集素以及进一步优选包含ABA、ACA或ACG的至少一种的多种凝集素直接或者通过生物素-亲和素间接地进行结合的支承体;和

[0299] (b) 可以标记受试血液试样中的MMP-3的标记物质。

[0300] (2) (a) 将包含Jacalin作为必需凝集素以及进一步优选包含成为内标凝集素的ABA、ACA或ACG的至少一种的多种凝集素直接或者通过生物素-亲和素间接地进行结合的支承体;和

[0301] (b) 标记化的抗MMP-3抗体。

[0302] (3) (a) 将抗MMP-3抗体直接或者通过生物素-亲和素间接结合的支承体;和

[0303] (b) 包含标记化的Jacalin以及进一步优选包含ABA、ACA或ACG的至少一种的多种标记化的凝集素。

[0304] 此时,能够以一个支承体固定多种凝集素,也可以分别将各凝集素固定于不同支承体使用。

[0305] 本发明的诊断用试剂或诊断用试剂盒可以用于希望获知是否罹患类风湿性关节炎的受试者,特别用于判定是否罹患与变形性关节炎等显示类似症状的早期类风湿性关节炎。此时,可以预先将使用健康个体和/或类风湿性关节炎患者所得到的测定值作为基准值。

[0306] 同时,在类风湿性关节炎患者中,可以用于正确把握经时性的疾病活动性的病态变化。

[0307] 并且,可以用于客观地判定在接受类风湿性关节炎治疗的患者中的该治疗的效果。特别是,用于判定是否缓解,即是否不需要继续治疗。4. 类似的类风湿性疾病的正确诊断方法以及用于该方法的诊断用试剂盒

[0308] 根据本发明,受试体液试样(血清试样等)中的MMP-3上的LEL或STL凝集素等识别多聚乳糖胺结构的凝集素反应性糖链与类风湿性疾病中特别是在复发性多发软骨炎(RP)患者体液试样的反应性具有极高的显著差异;接着,与类风湿性多发肌痛症(PMR)患者体液试样的反应性,与类风湿性关节炎(RA)患者以及与健康个体(HC)体液试样的反应性显示具有高的显著性差异。

[0309] 也就是说,抗MMP-3抗体与LEL和/或STL凝集素等识别多聚乳糖胺结构的凝集素进行组合的试剂盒成为复发性多发软骨炎(RP)诊断用试剂盒和/或类风湿性多发肌痛症(PMR)诊断用试剂盒。

[0310] 在此,LEL凝集素作为来自于番茄(*Lycopersicon esculentum*)的GlcNAc反应性凝集素、STL凝集素作为来自于马铃薯(*Solanum tuberosum*)的GlcNAc反应性凝集素以前为人们所熟知,可以认为,两种凝集素识别多聚乳糖胺结构的GlcNAc。另外,关于LEL凝集素的其他信息详细记载于本发明人的文献(Methods in Enzymology, vol. 479, 2010, p. 185-204);同时,关于STL凝集素的其他信息详细记载于本发明人的文献(Methods in Enzymology, vol. 478, 2010, p. 181-195)。

[0311] 同时,作为其他识别多聚乳糖胺结构的凝集素,已知有Galectin-3等。

[0312] 作为具体的受试体液试样(血清试样等)中的MMP-3上的LEL或STL凝集素反应性糖链等的测定方法,使用前述(2-3)中记载的凝集素芯片法,可以将受试血清试样等受试体液试样使用包含对MMP-3浓缩组分的LEL和/或STL凝集素等识别多聚乳糖胺结构的凝集素的凝集素芯片进行测定的方法。

[0313] 同时,使用在前述(2-4)中记载的三明治法,将受试血清试样等受试体液试样使用抗MMP-3抗体以及LEL和/或STL凝集素等识别多聚乳糖胺结构的凝集素的三明治法,例如有:将标记抗MMP-3抗体与包含LEL和/或STL凝集素的凝集素芯片进行组合而成的三明治ELISA法等。

[0314] 通过使用该测定方法,可以特异性地诊断复发性多发软骨炎(RP)和/或类风湿性多发肌痛症(PMR)。

[0315] 通过在上述抗MMP-3抗体与LEL和/或STL凝集素等识别多聚乳糖胺结构的凝集素进行组合的试剂盒中,进一步将Jacalin、ACG等MMP-3上的O-结合型糖链识别凝集素进行组合,可以提供能够分别显著识别类似的类风湿性疾病的类风湿性多发肌痛症(PMR)、复发性多发软骨炎(RP)和类风湿性关节炎(RA)用的诊断用试剂盒。在此,在叙述“MMP-3上的O-结合型糖链识别凝集素”时,是指在前述(1-2)中记载的通过与类风湿性关节炎(RA)血清中的MMP-3浓缩组分的结合性已得到确认的Jacalin、ABA、ACA和ACG。另外,也可以使用其他例如识别唾液酸核心1结构的MAH凝集素等。

[0316] 包括下述工序的方法成为类风湿性关节炎(RA)的正确诊断方法以及与类似的类风湿性疾病的鉴别方法:计算与受试体液试样(血清试样等)中的MMP-3上的LEL或STL凝集素反应性糖链的反应性信号以及与Jacalin、ACG等MMP-3上的O-结合型糖链识别凝集素的反应性信号之比的工序。

[0317] 具体而言,适用前述(2-3)中记载的凝集素芯片法,可以使用:将受试血清试样等受试体液试样的MMP-3浓缩组分使用包含LEL和/或STL凝集素等识别多聚乳糖胺结构的凝集素以及Jacalin、ACG等MMP-3上的O-结合型糖链识别凝集素的凝集素芯片进行测定的方法。

[0318] 同时,使用前述(2-4)中记载的三明治法,将受试血清试样等受试体液试样,使用抗MMP-3抗体和LEL和/或STL凝集素等识别多聚乳糖胺结构的凝集素以及进一步的Jacalin、ACG等的MMP-3上的O-结合型糖链识别凝集素的三明治法,例如有:将标记抗MMP-3抗体以及包含LEL和/或STL凝集素连同Jacalin、ACG等MMP-3上的O-结合型糖链识别凝集素的凝集素芯片组合而成的三明治ELISA法等。

[0319] 实施例

[0320] 显示以下实施例,对本发明具体进行说明,但本发明并不限于这些实施例。

[0321] 本发明中的其他用语和概念是基于该技术领域惯常使用的用语的意义。为了实施本发明而使用的各种各样的技术,尤其是除了明示其出处的技术以外,只要是本领域技术人员均是基于公知的文献等就可以容易且可靠地实施。同时,各种分析等可以根据所使用的分析仪器或试剂、试剂盒的使用说明书、目录等记载的方法进行。

[0322] 另外,在本说明书中引用的技术文献、日本专利公报和日本专利申请说明书中的记载内容作为本发明的记载内容进行参考。

[0323] 同时,在各实施例中使用的所有体液(血清和滑液),来自于在采集场所临床机构获取知情同意的患者且接受了发明人各自所属机构的伦理审查并获得批准。

[0324] 实施例1:受试血清试样中的MMP-3存在量的测定

[0325] 就本实施例而言,收集了类风湿性关节炎患者32个病例和其他关节炎4个病例的血清,以其中30个病例作为对象。

[0326] 血清中MMP-3的简易分级、浓缩(富集)是基于本发明人以前开发的方法(非专利文献14),与以往发明人分析的蛋白质进行比较,为血中浓度非常低的MMP-3蛋白质进行了条件的最优化,如下进行。

[0327] (1-1) 预清洗工序:

[0328] 在血清中含有的蛋白质中,进行对利用抗原抗体反应场的磁珠非特异性地结合的物质预先除去作业(预清洗)。也就是说,对于1.5mL容量的管分离的血清40 $\mu$ L,加入预先使用反应缓冲液(含有1% Triton X-100的Tris缓冲的生理盐水(TBSTx))清洗过3次的链霉亲和素固定化磁珠(SA珠)溶液(日本多摩川精機社制,10mg/mL) 10 $\mu$ L和反应缓冲液36 $\mu$ L进行溶液调整,在4 $^{\circ}$ C振荡反应30分钟。反应后,使用磁石将磁珠捕捉到一处,将得到的上清回收于另一1.5mL容量的管。

[0329] 免疫沉降工序:

[0330] 向回收的上清中,加入生物素化MMP-3抗体(R&D Systems公司制)(50 $\mu$ g/mL) 4 $\mu$ L,一边在4 $^{\circ}$ C振荡一夜、一边进行抗原抗体反应。反应后,加入使用反应缓冲液清洗过的SA珠溶液(10mg/mL) 10 $\mu$ L,在4 $^{\circ}$ C进行振荡反应30分钟。通过磁石回收与抗原-抗体复合物结合的磁珠,除去得到的上清后,将珠使用反应缓冲液200 $\mu$ L清洗3次。在使用磁石回收珠时,为了完全除去珠和珠之间夹杂的被非特异性回收的蛋白质杂质的清洗如下:向磁珠加入反应缓冲液,然后使用超声波分散装置(日本多摩川精機社制)和破碎·离心多功能一体机BugCrasher(日本タイテック社制)等,实现将珠完全分散。

[0331] (1-3) 洗脱工序:

[0332] 为了洗脱在珠上通过抗体间接捕捉的MMP-3,向洗净的珠中加入含有0.2% SDS的TBS 10 $\mu$ L,在95 $^{\circ}$ C加热5分钟灭活抗体,使MMP-3游离。使用磁石将磁珠捕捉在一处,回收得到的上清。

[0333] (1-4) 生物素标记抗体除去工序:

[0334] 在所得到的上清中,不仅是MMP-3,还并存灭活的抗MMP-3抗体。因为该抗体被生物素标记,所以容易通过SA珠捕捉。于是,向1.5mL容量的管加入洗脱液和预先用反应缓冲液清洗了3次的SA珠(20mg/mL) 10 $\mu$ L,在4 $^{\circ}$ C进行生物素-亲和素反应30分钟,反应后迅速用磁石将磁珠捕捉至一处。回收得到的上清,作为MMP-3-IP产物(20 $\mu$ L)。

[0335] (1-5) 结果:

[0336] 为了估算各样品的回收量,使用上述生物素标记抗体进行蛋白质印迹(WB)。预先使用市售的重组型人MMP-3(rMMP-3,R&D Systems公司制),通过WB计算该蛋白质的检测下限,其结果为50pg。于是,将rMMP-3 50pg、100pg、200pg、400pg作为标准物质,与样品一起加样至凝胶,通过进行WB,对各样品中MMP-3的量进行半定量分析。另外,分别将0.1 $\mu$ L样品加样至凝胶。

[0337] 其结果,因为有些样品在超过了rMMP-3加样400pg时的条带强度,所以分别适当稀

释,再次进行WB。其结果记录于图1。

[0338] 因为各样品的条带信号落于标准物质的信号范围内,所以由标准物质的信号作成标准曲线,作为rMMP-3换算计算各样品的血中浓度。各自的换算浓度表示于图2。

[0339] 为了验证富集的妥当性,与在临床现场测定的MMP-3值进行比较,结果显示强的相关性(图2右)。这暗示,通过富集得到的MMP-3的量依赖于在血中存在时的浓度。

[0340] 另外,将此次计算的数值与临床现场进行通常测定的值进行比较,结果有很大的偏离,然而,可以认为,这是因为本实施例所使用的标准物质与在临床现场所用的测定体系所使用的标准物质不同,从而与抗体的反应性不同。

[0341] 进一步地,此次对来自于市售健康个体血清(日本コージンバイオ社制)的MMP-3也进行同样的实验,可以在文献所报道的健康个体的MMP-3浓度范围进行回收。

[0342] 实施例2:通过抗体覆盖·凝集素芯片的糖链谱分析

[0343] 就本实施例而言,对于在实施例1进行了MMP-3的简易分级·浓缩(富集)的受试血清试样MMP-3-IP中的MMP-3,使用通过凝集素芯片的比较糖链谱分析,考察伴随类风湿病的MMP-3上的糖链变化。

[0344] 取在实施例(1-4)得到的各个受试MMP-3-IP试样2 $\mu$ L,使用作为凝集素芯片反应缓冲液的含有1%TritonX-100的磷酸缓冲的生理盐水(PBSTx),调整至60 $\mu$ L。将该溶液添加至凝集素芯片(LecChip<sup>TM</sup>(日本グライコテクニカ社制))的各反应槽(每片玻璃形成有7个反应槽),在20 $^{\circ}$ C进行相互作用反应10小时以上。由此,试样中的MMP-3上的糖链与在芯片基板上固定的45种凝集素的结合反应达到平衡状态。此后,为了避免检测用抗体上的糖链结合于未反应的基盘上的凝集素从而产生噪声信号,加入来自于人血清的IgG溶液(Sigma公司制)2 $\mu$ L(相当于20 $\mu$ g),反应30分钟。在进行该封闭反应后,使用60 $\mu$ L的PBSTx清洗各反应槽3次后,向PBSTx溶液58 $\mu$ L再次加入来自于人血清的IgG溶液2 $\mu$ L,进行若干搅拌后,加入相当于100ng的检测用抗MMP-3抗体(生物素标记物),在20 $^{\circ}$ C反应1小时。抗原抗体反应后,使用60 $\mu$ L的PBSTx清洗各反应槽3次,接着加入含有相当于200ng的Cy-3标记链霉亲和素(日本GEヘルスケア社制)的PBSTx溶液,进一步在20 $^{\circ}$ C反应30分钟。反应后,使用60 $\mu$ L的PBSTx清洗各反应槽3次后,通过芯片扫描仪GlycoStation<sup>TM</sup>(日本グライコテクニカ社制)进行芯片扫描。

[0345] 其结果,可以取得MMP-3的糖链结构信息。该MMP-3的糖链结构信息目前未见报告。取得的信号随血中MMP-3浓度而增减。在图3中表示测定的30个病例的数据的典型实例。全部病例中显示显著的信号强度的凝集素仅有ACG、ABA、Jacalin、ACA四种。另外,ACG是识别 $\alpha$ 2,3唾液酸的凝集素,ABA、Jacalin、ACA是识别详细的特异性不同的基本上以核心1结构或Tn结构为骨架的O-结合型糖链的凝集素。

[0346] 如图4所示,根据以上结果,设想MMP-3上的糖链结构是以核心1结构或Tn结构为骨架的O-结合型糖链,估计是唾液酸修饰程度不同的结构群。

[0347] 然后,验证了各凝集素信号与血中MMP-3的量的相关性。如图5所示,显示ACG、ABA和ACA比较强烈相关,Jacalin未显示相关性。在考察O-结合型糖链识别凝集素之间的相关性的情况下,也观察到了这种Jacalin的背离(图6)。这三个O-结合型糖链识别凝集素各自特异性存在差异,特别是在核心1结构的GalNAc上导入 $\alpha$ 2,6唾液酸(NeuNAc)的修饰的情况下,其允许性不同,其他糖蛋白的分析表明,Jacalin的反应性最低(非专利文献14)。具体而

言, Jacalin不允许在O-结合型糖链的核心1结构的GalNAc上导入 $\alpha$ 2,6唾液酸(NeuNAc)的修饰,在ABA和ACA的情况下,可以允许或者没有关系。

[0348] 由以上暗示,与在健康个体血清中也存在的MMP-3的O-结合型糖链相比,伴随罹患类风湿性关节炎的血中浓度上升的MMP-3上的O-结合型糖链对核心1结构的唾液酸修饰、特别是 $\alpha$ 2,6唾液酸修饰是丰富的。

[0349] 该现象与MMP-3的量不相关,这很有意思,以后验证了对于与临床参数的相关性。

[0350] 实施例3:取得的数据与临床参数的比较分析

[0351] 考察了实施例2所得到的MMP-3上独特的凝集素信号与临床参数的相关性。另外,在验证时,在反映蛋白质上的O-结合型糖链的质的变化的糖链修饰判别指数X中,使用了 $X = ABA/Jacalin$ 的情况下的值。在验证了的参数中,与显示类风湿性关节炎的活动性的参数的比较表示于图7。显示了与除患者VAS以外的参数(DAS28-CRP、DAS28-ESR、CDAI、SDAI、医师VAS)具有某种程度的相关性。因为迄今为止报道称MMP-3的量与疾病的活动性的相关程度低,但与上述报道相反,反映其蛋白质上的糖链的质的变化的ABA/Jacalin值与疾病活动性之间存在相关性,这是非常有趣的。

[0352] 接着,对各患者通过表示类风湿性关节炎的活动性的3个评价方法(DAS28-ESR、SDAI、CDAI)划分为4个阶段(缓解、低疾病活动性、中等程度疾病活动性和高疾病活动性),将活动性和ABA/Jacalin值的相关性作图(图8)。

[0353] 其结果,糖链修饰判别指数ABA/Jacalin值与疾病活动性指标高度相关(通过斯皮尔曼等级相关系数求出的P值为 $P < 0.001$ )。另一方面,对于MMP-3的量也作图,然而,对于任意一种评价方法都没有显示相关性。

[0354] 从以上的结果可知,首次发现了将MMP-3上的O-结合型糖链的质的变化作为糖链修饰判别指数进行定量测量在评价类风湿性关节炎的活动性中适用的可能性。

[0355] 为了验证这样的糖链的质的变化是否是由唾液酸的修饰的方式的差异或比例的变化导致的,对于唾液酸酶消化前后的MMP-3,通过凝集素芯片进行比较分析。

[0356] 实施例4:对唾液酸酶消化的糖链谱的影响

[0357] 从实施例3的结果可以认为,对于血清中的MMP-3的各凝集素的反应性的变化是由对MMP-3上的O-结合型糖链的唾液酸修饰的方式的差异、比例的变化而产生的可能性高。因此,就本实施例而言,选择在实施例1和实施例2的分析中所使用的受试血清试样中的糖链修饰判别指数(ABA/Jacalin值)低值组和高值组各6例共计12个病例,在对于各血清试样将MMP-3上的唾液酸残基切除的情况下,考察了对糖链谱产生的影响。

[0358] (4-1) 血清中MMP-3的富集

[0359] 按照实施例1的方法,对于前述选定的12个病例的血清试样,再次对血清中的MMP-3进行富集,得到12种受试MMP-3-IP试样。糖链修饰判别指数(ABA/Jacalin值)低值组的样品名为RA07、RA20、RA31、RA33、RA34、RA35,高值组的样品名为RA10、RA13、RA14、RA17、RA21、RA24。

[0360] (4-2) 唾液酸酶消化

[0361] 将得到的MMP-3-IP溶液20 $\mu$ L中的2 $\mu$ L在唾液酸酶消化中使用。向溶液2 $\mu$ L加入专用的5 $\times$ 反应缓冲液B 2 $\mu$ L和唾液酸酶A(皆为Prozyme公司制)0.5 $\mu$ L(终浓度:0.125U/mL),使用超纯水配制为10 $\mu$ L。在37 $^{\circ}$ C反应1小时,将唾液酸( $\alpha$ 2,3唾液酸和 $\alpha$ 2,6唾液酸两种)从MMP-

3切除。作为对照,也配制在所述成分中不含有唾液酸酶的反应溶液,同时进行反应。在全部反应结束后,将反应溶液暂时在冰上静置。将由此得到的溶液作为唾液酸酶消化产物。

[0362] (4-3) 通过抗体覆盖·凝集素芯片法的糖链谱分析

[0363] 通过与实施例1同样的方法进行抗体覆盖·凝集素芯片法。另外,唾液酸酶反应溶液在预先以PBSTx配制使总容量成为60 $\mu$ L后使用于凝集素芯片分析。

[0364] 其结果显示于图9。在切断唾液酸后,使用识别O-结合型糖链上的唾液酸的凝集素(ACG/MAH),信号几乎是0。同时,在所有样品中,出现了完全不允许唾液酸修饰的核心1结构识别凝集素PNA的信号。另一方面,识别Tn结构的凝集素HPA、VVA和GALI在唾液酸消化后也没有得到信号。

[0365] 通过以上内容可以解释为:MMP-3所具有的主要的O-结合型糖链的结构是核心1结构(Gal( $\beta$ 1,3)GalNAc),对Gal的 $\alpha$ 2,3唾液酸的修饰几乎都已经完成。而且,可以得出下述结论:对GalNAc的 $\alpha$ 2,6唾液酸修饰的程度以低频率进行,其比例随着病态发生变化。由此,核心1结构中的对GalNAc的 $\alpha$ 2,6唾液酸修饰程度成为类风湿性关节炎疾病活动性的标志物,并且来自于Jacalin的信号成为负的活动性标志物,同时,连同来自于ABA和ACA的信号,来自于ACG的信号也同时证实了与血清中的MMP-3的量显示同样的行为。总之,作为在糖链修饰判别指数X或Y的计算中使用的“显示受试血清试样中的MMP-3总量的测定信号”,可以使用:MMP-3存在量的测定值;通过抗MMP-3抗体测定的信号值;显示血清试样中的MMP-3与从ABA、ACA和ACG中选择的任意一种凝集素的结合量的测定信号值。

[0366] 同时,因为唾液酸消化后的ABA标准化糖链谱几乎一致,所以暗示,根据样品不同而产生的反应性的区别起因于唾液酸的修饰的方式和程度(参见图9中右图所示的设想的反应前后的结构变化)。

[0367] 实施例5:滑液中MMP-3的糖链谱分析

[0368] 从成为病变部位的滑膜组织产生的MMP-3向滑液中释放,从而参与骨破坏。其中一部分向血中移动,以在血清中的MMP-3的量与在滑膜组织的产生量具有相关性为前提,可以考虑将以前血清中的MMP-3的量作为标志物使用。然而,在实施例2中经凝集素芯片分析的可观察到与类风湿性关节炎活动性相关的血清中的MMP-3上的O-结合型糖链上的唾液酸的修饰的方式、程度的变化是否正确地反映在滑膜组织产生的MMP-3上的糖链结构的变化,这只是推测。

[0369] 因此,就本实施例而言,通过考察向滑液中释放的MMP-3是什么样的糖链谱,验证了血中MMP-3的糖链变化与类风湿性关节炎活动性的关联的妥当性。

[0370] (5-1) 滑液中MMP-3的富集

[0371] 按照实施例1的方法,对于类风湿性关节炎(RA)3个病例、变形性关节炎(OA)3个病例,从滑液将MMP-3进行富集。另外,因为在RA和OA中,滑液中的MMP-3的量有很大的不同,所以预先测定滑液中的MMP-3的量,利用同样的MMP-3的量进行富集。其结果,如图10所示,取得的MMP-3的量几乎是一样的。

[0372] (5-2) 通过抗体覆盖·凝集素芯片的糖链谱分析

[0373] 抗体覆盖·凝集素芯片按照与实施例2同样的方法进行。其结果表示于图11。

[0374] 非常有意思的是,RA和OA的MMP-3的糖链谱存在很大不同。而且,与血清中的MMP-3同样,其差异可以通过4种凝集素进行说明。来自于RA患者的MMP-3相对来说具有Jacalin信

号弱、ACG信号强的趋势(图12)。该Jacalin信号的趋势与伴随由类风湿性关节炎患者血清得到的疾病活动性的Jacalin信号的减弱是一致的。

[0375] 通过以上内容,暗示滑膜细胞伴随着活化使MMP-3的释放量增加,由于活化在细胞的糖链合成机制上产生变化,作为其结果,蛋白质上的O-结合型糖链的唾液酸修饰、特别是 $\alpha 2,6$ 唾液酸的修饰产生变化,成为高度修饰。同时,证实了在实施例2和实施例3的受试血清试样中得到的知识正确地反映了从滑膜组织产生的MMP-3上的糖链结构的变化。

[0376] 实施例6:MMP-3阳性疾病的鉴别能力

[0377] (6-1) 与使用来自于其他类风湿性疾病患者的血清的MMP-3上的Jacalin等O-结合型糖链的反应性比较

[0378] 就本实例而言,以类风湿性关节炎患者(RA) 14例、类风湿性多发肌痛症患者(PMR) 8例、复发性多发软骨炎患者(RP) 7例、健康个体(HC) 5例的血清为对象,进行了实施例1和实施例2的验证。RA、PMR、RP都是血清MMP-3容易成为高值的疾病。在临床诊断上,费心鉴别RA和PMR的情况很多,RP是临床症状比较具有特征性的疾病,然而不存在灵敏度高的检查方法。具体而言,从上述各对象疾病的患者血清使用与实施例1同样的方法将MMP-3进行浓缩,使用与实施例2同样的方法进行来自于各疾病的MMP-3的糖链谱分析。

[0379] 其结果,可以取得各疾病中的糖链结构信息。从所得到的所有患者的数据来看,首先将ACG、ABA、ACA和Jacalin值进行比较研究,其结果,如图13所示,以实施例1(1-1)中作为对象的风湿病患者血清的结果(图5)一样,得到ACG、ABA、ACA与MMP-3值相关,而Jacalin不相关的结果。

[0380] 为了观察Jacalin与MMP-3值背离产生哪些疾病,分别以疾病分组作图(图14)。其结果,有意思的是,RA和非RA趋势不同:就RA而言,MMP-3值越高,与Jacalin值的背离趋势越高,反而看起来是下降的样子;与此相对,非RA未观察到这样的趋势,Jacalin和MMP-3值高度相关。

[0381] 于是,取所有类风湿性疾病显示与MMP-3值高度相关的典型的凝集素ACG与Jacalin之比,计算ACG/Jacalin值并作图(图15),其结果,显示该值为高值的只有RA活动性高的组。

[0382] 然而,如实施例4所证实的,Jacalin值的下降可以理解为反映MMP-3所含有的O-结合型糖链的GalNAc中的 $\alpha 2,6$ 唾液酸修饰。而且,反映这样的GalNAc的 $\alpha 2,6$ 唾液酸修饰的Jacalin值的下降现象在类风湿性疾病中也是RA所特有的,且在RA活动性高的病例中是具有特征性的,这在本实施例中再次得到证实。

[0383] (6-2) 与识别多聚乳糖胺结构的凝集素的反应性比较

[0384] 如(6-1),再次证明了作为Jacalin信号显示RA活动性的事实,暗示也可以用于鉴别RA和非RA,因此对其他凝集素的信号的差异也再次进行比较研究(图16)。

[0385] 作为其他凝集素,选择了(6-1)的凝集素芯片谱分析的结果具有统计学性显著差异的被称为LEL(来自于番茄)和STL(来自于马铃薯)的识别多聚乳糖胺结构的凝集素。可以认为,这两种凝集素识别多聚乳糖胺结构的GlcNAc。

[0386] 测定LEL和STL凝集素反应性糖链的信号,通过Steel-Dwass检验进行判定,其结果,得到与HC、RA相比,PMR、RP具有显著高值的结果,发现对于不同疾病存在很大的不同(图16上图)。

[0387] 以血清MMP-3浓度对各疾病进行同样的Steel-Dwass检验,仅就血清MMP-3浓度而言,这样的差异无法观察到(图16下左图)。

[0388] 使用这些信号能否鉴别HC·RA与PMR、HC·RA·PMR与RP,通过以纵轴为真阳性率、以横轴为假阳性率作图的受试者工作特征曲线(ROC曲线)进行分析。在3组中,对于与RA鉴别最困难的PMR进行ROC分析,结果判明,具有 $ROC=1.0$ 且ROC曲线下面积(AUC)=1.0这样的非常高的鉴别能力(图16下右图)。发现STL、LEL两信号都具有PMR和RA/HC、或者RP和PMR/RA/HC为AUC=1.0这样的非常高的鉴别能力(同图16下右图)。

[0389] 也就是说,结果显示,在受试血清试样中的MMP-3上的LEL和/或STL凝集素反应性糖链成为类风湿性多发肌痛症(PMR)和复发性多发软骨炎(RP)各自的优异的糖链标志物。

[0390] 这意味着,通过测定受试血清试样的MMP-3浓缩组分中与LEL或STL凝集素的反应性、或者通过使用抗MMP-3抗体与LEL或STL凝集素的三明治分析法的测定值,可以判定是否罹患类风湿性多发肌痛症(PMR)和/或是否罹患复发性多发软骨炎(RP)。进一步地,这也是显示可以正确鉴别以前鉴别困难的类风湿性关节炎和类风湿性多发肌痛症的结果。

[0391] 可以将难于鉴别的病例类风湿性多发肌痛症(PMR)和类风湿性关节炎(RA)正确识别的同时,可以提供尚未确立正确的诊断方法的复发性多发软骨炎(RP)的正确的诊断方法,这是划时代的。

[0392] 使用MMP-3的糖链谱分析数据详细分析了上述实验数据,探索了在MMP-3容易成为高值的疾病中仅对RA特异性地检测的方法。

[0393] 就RA而言,因为与PMR、RP相比,被称为LEL或STL信号的识别多聚乳糖胺的凝集素的信号较低,可以与PMR和RP进行鉴别,然而,因为HC也是LEL或STL信号低,因而还是不能与HC进行鉴别。于是,对于RA,为了突出与HC的不同,取MMP-3上的ACG、Jacalin等O-结合型糖链的信号之比,可以作成仅RA为高值的指标(例如, Jacalin/LEL和ACG/LEL)(图17上图)。以这些信号值为基础,研究疾病中仅检测RA的能力,进行ROC分析,其结果,显示具有AOC=0.95~0.98这样的高鉴别能力(图17下图)。

[0394] 即,显示在类似的类风湿性疾病中,为了正确鉴别为类风湿性关节炎,测定受试血清试样的MMP-3反应性组分中的LEL或STL凝集素与Jacalin、ACG等O-结合型糖链的反应性之比即可。

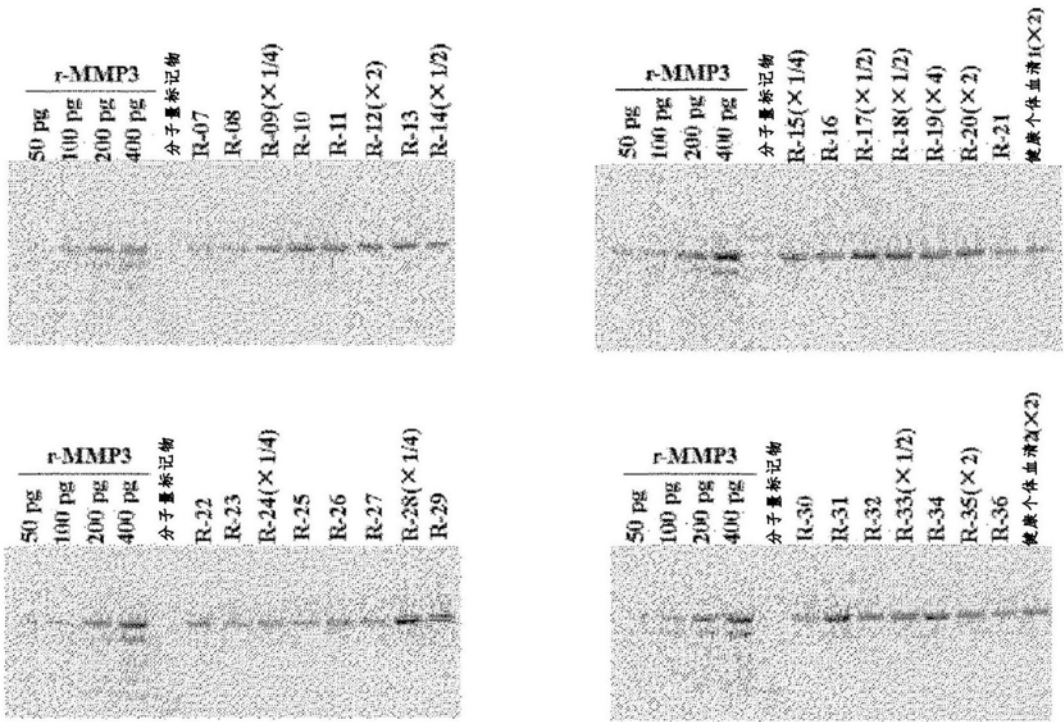


图1

样品 ID	信号	rMMP3换算血清中的MMP3浓度 (ng/mL)
R07	77412	558
R08	95104	650
R09	160342	3957
R10	246722	2961
R11	224610	2446
R12	171178	602
R13	191663	1680
R14	136664	1732
R15	216682	4091
R16	233560	1114
R17	318072	3140
R18	319317	3153
R19	250182	301
R20	255402	616
R21	136745	654
R22	152041	884
R23	107783	637
R24	153338	3566
R25	133258	779
R26	160121	929
R27	129453	758
R28	362796	8585
R29	230964	1351
R30	166411	873
R31	354600	2467
R32	224665	1299
R33	212423	2377
R34	258440	1602
R35	201218	544
R36	145445	767
健康个体血清2	194522	514
健康个体血清1	147054	350

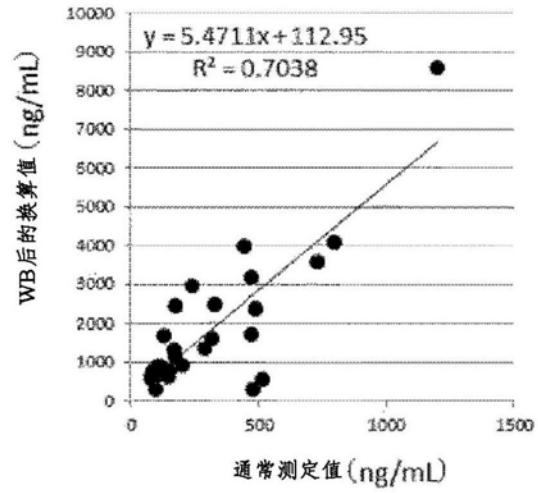


图2

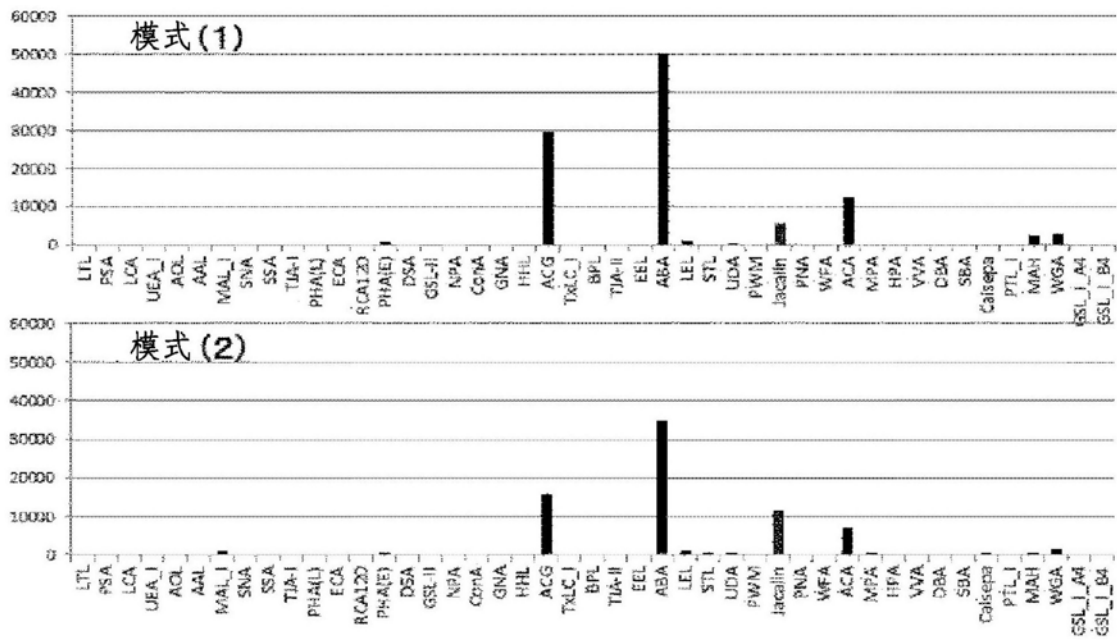


图3

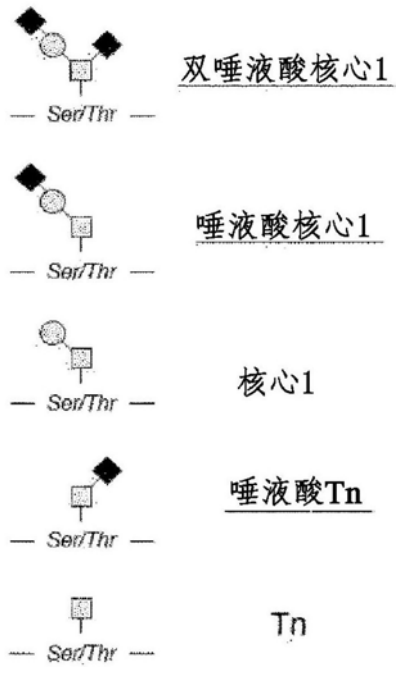


图4

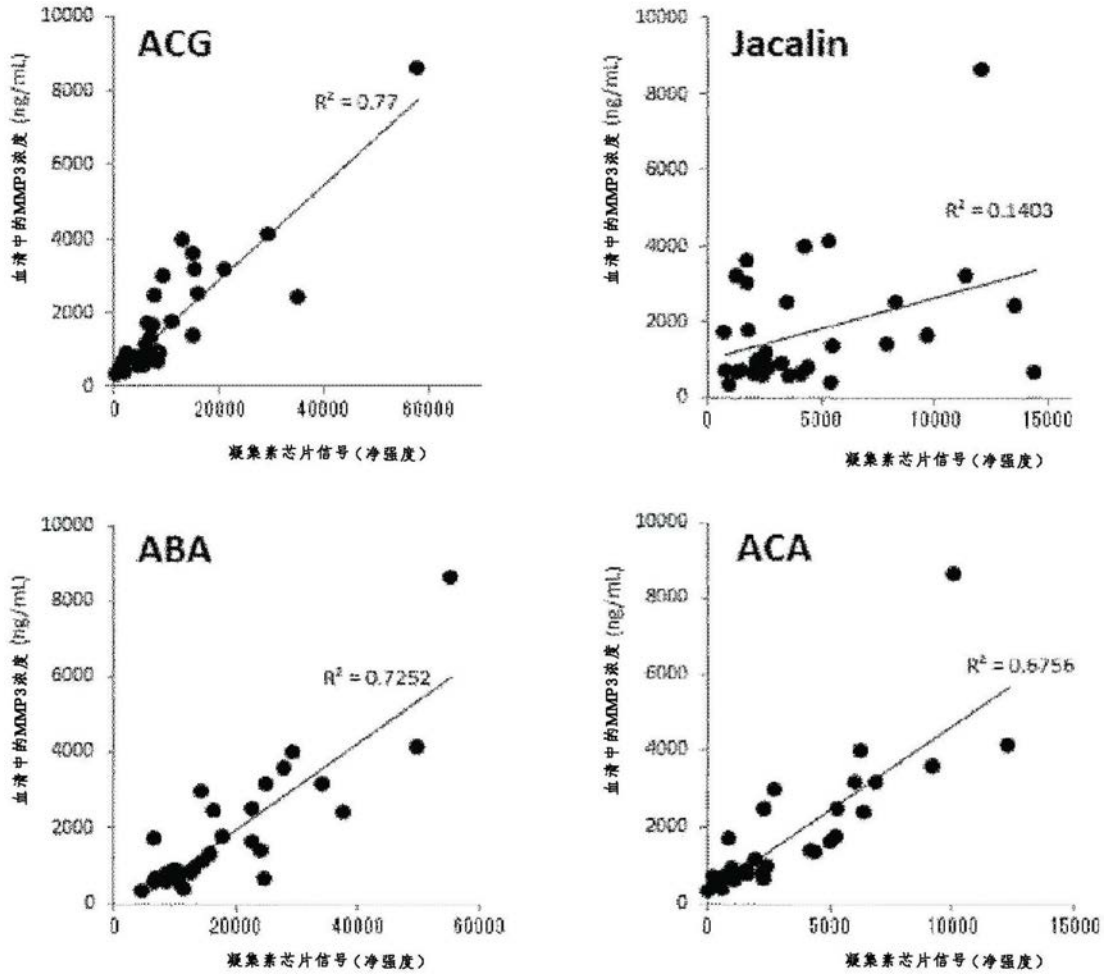


图5

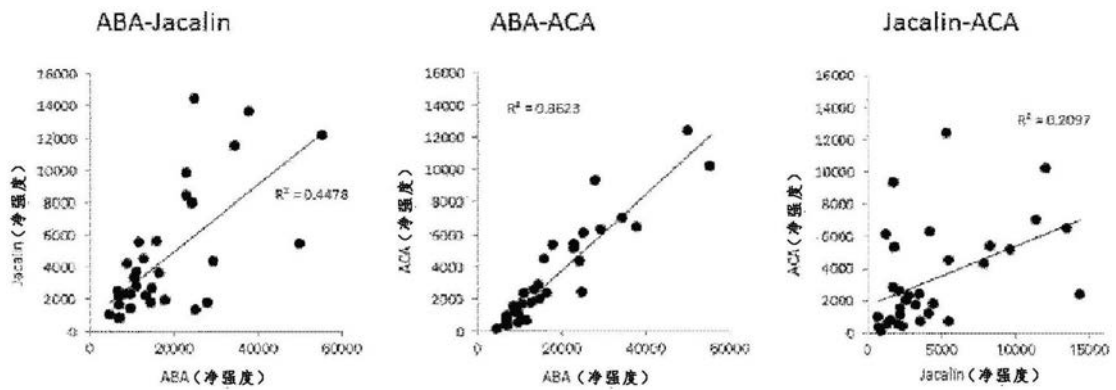


图6

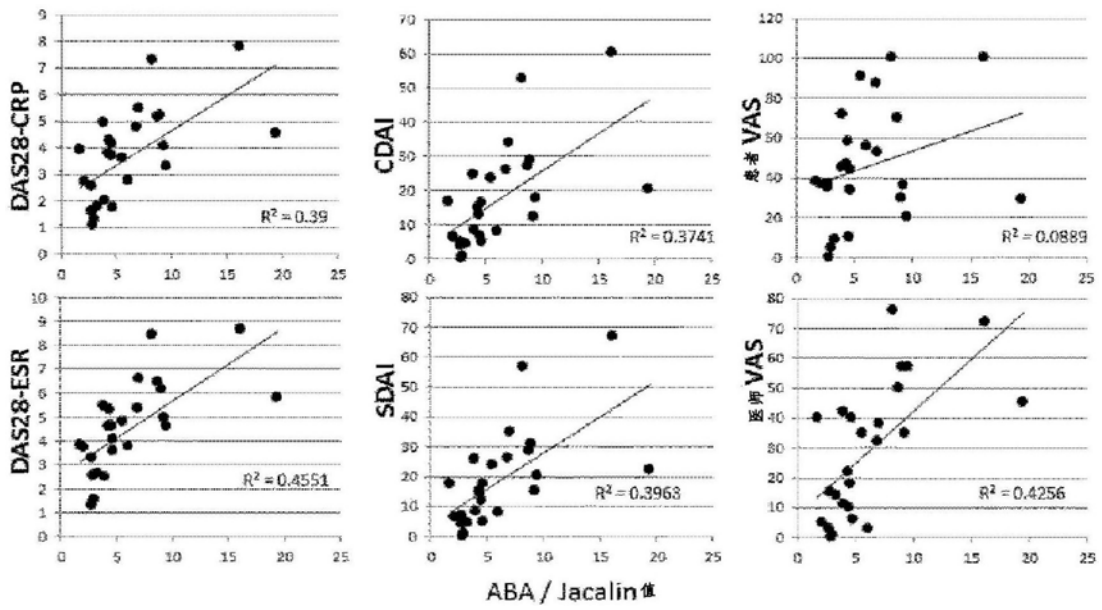


图7

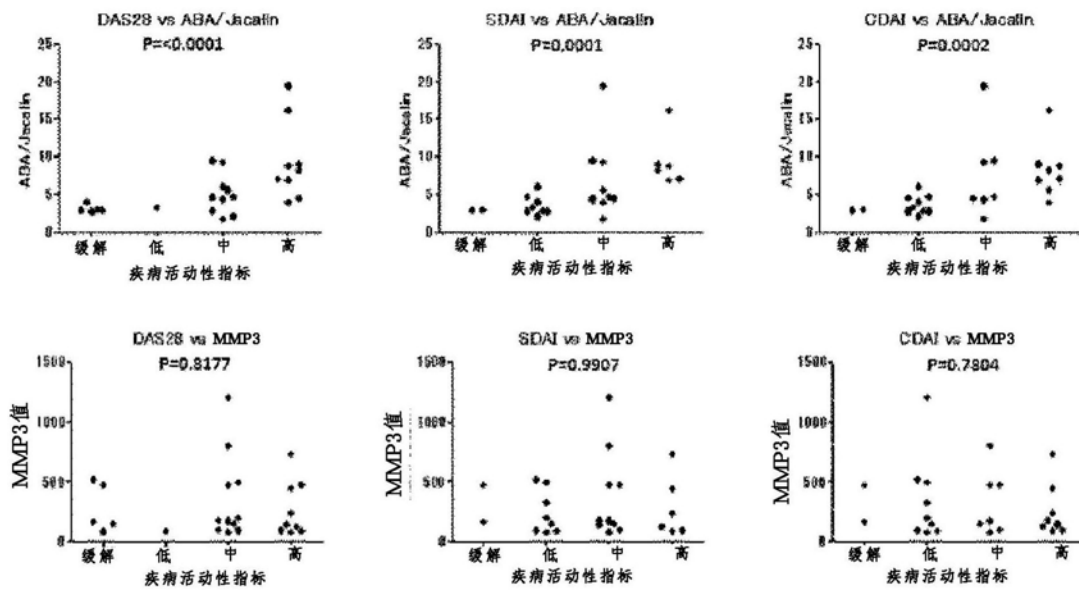


图8

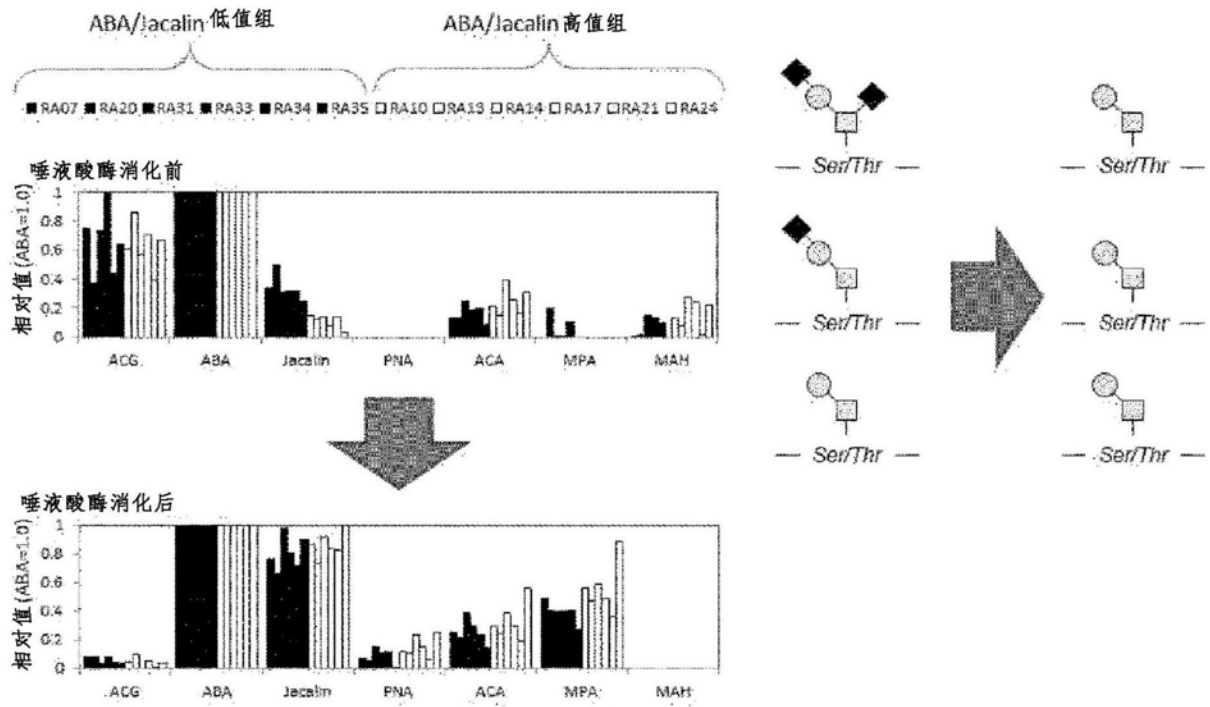


图9

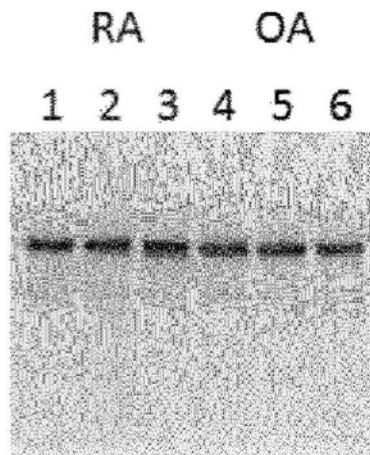


图10

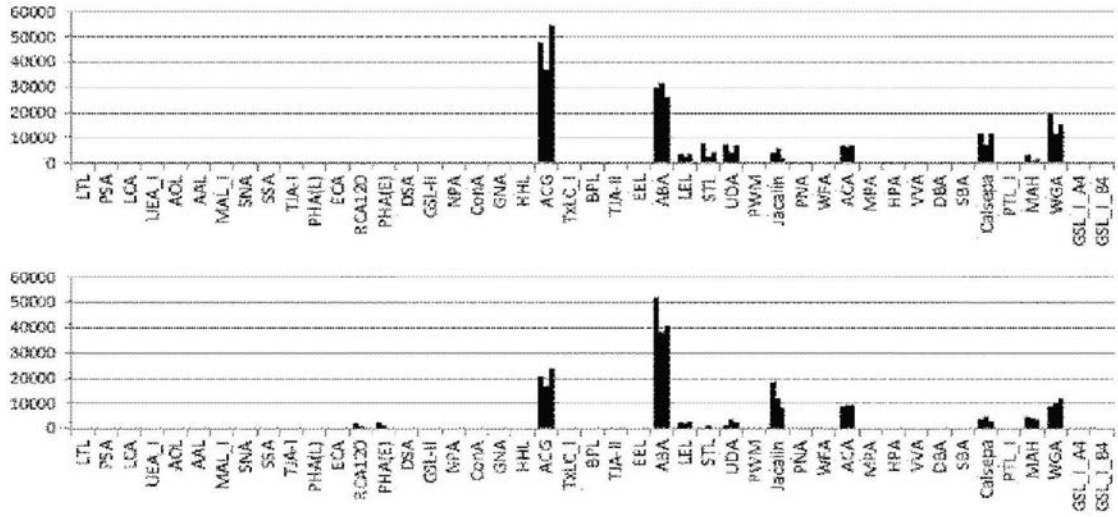


图11

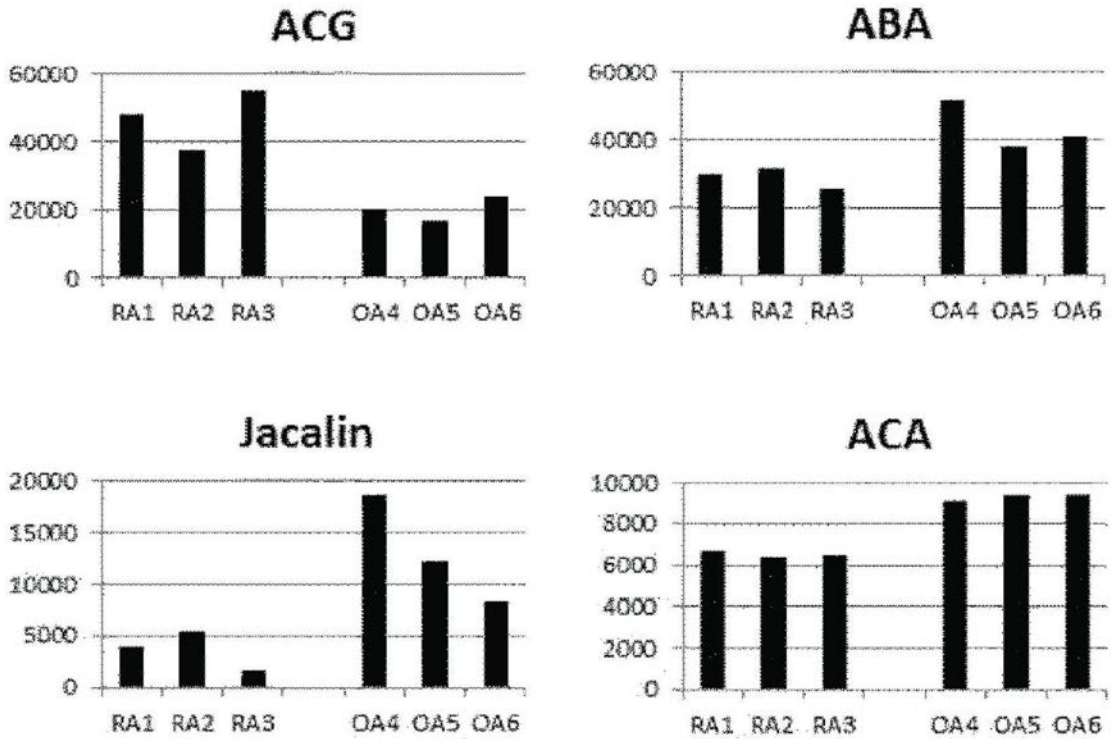


图12

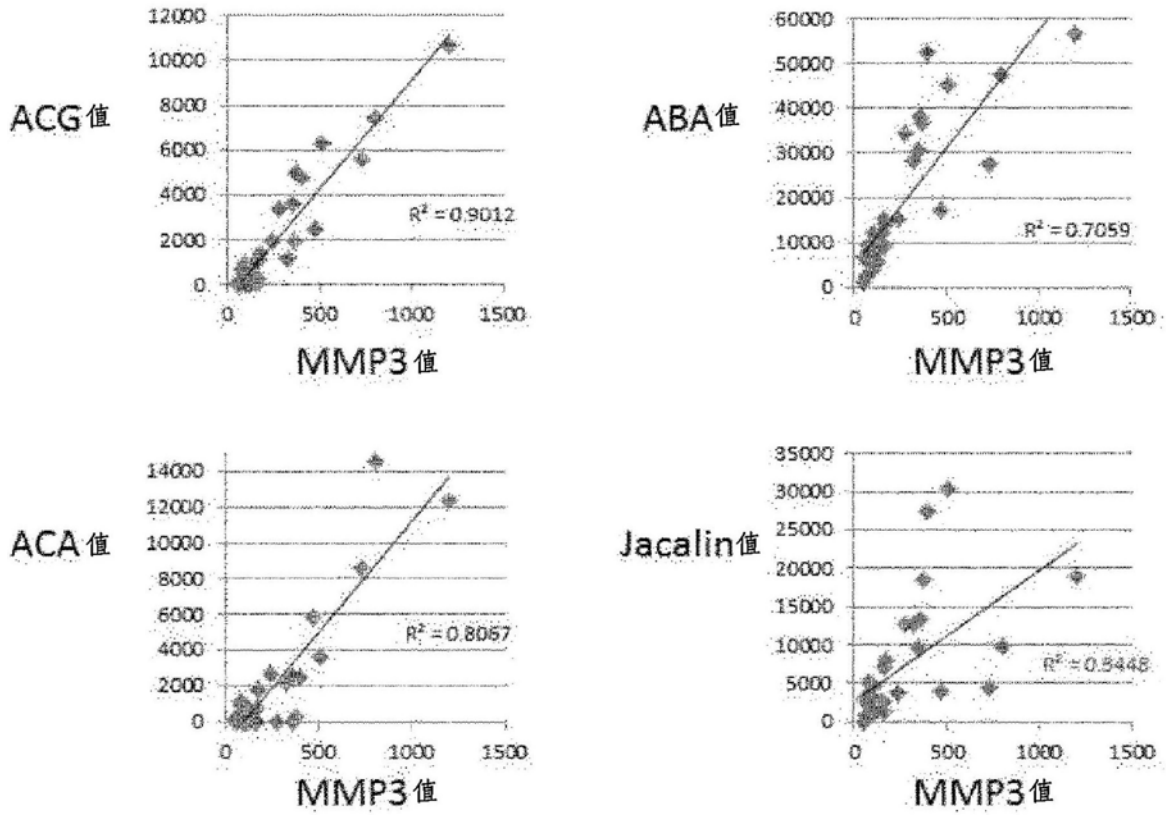


图13

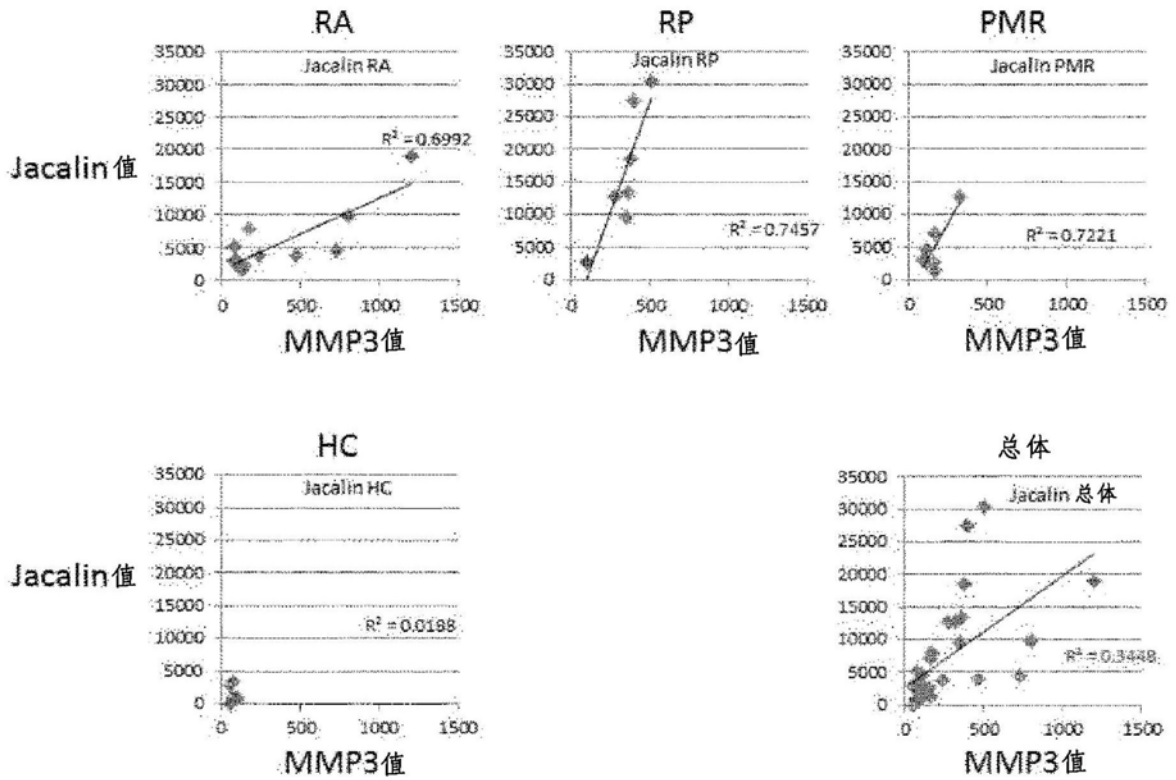


图14

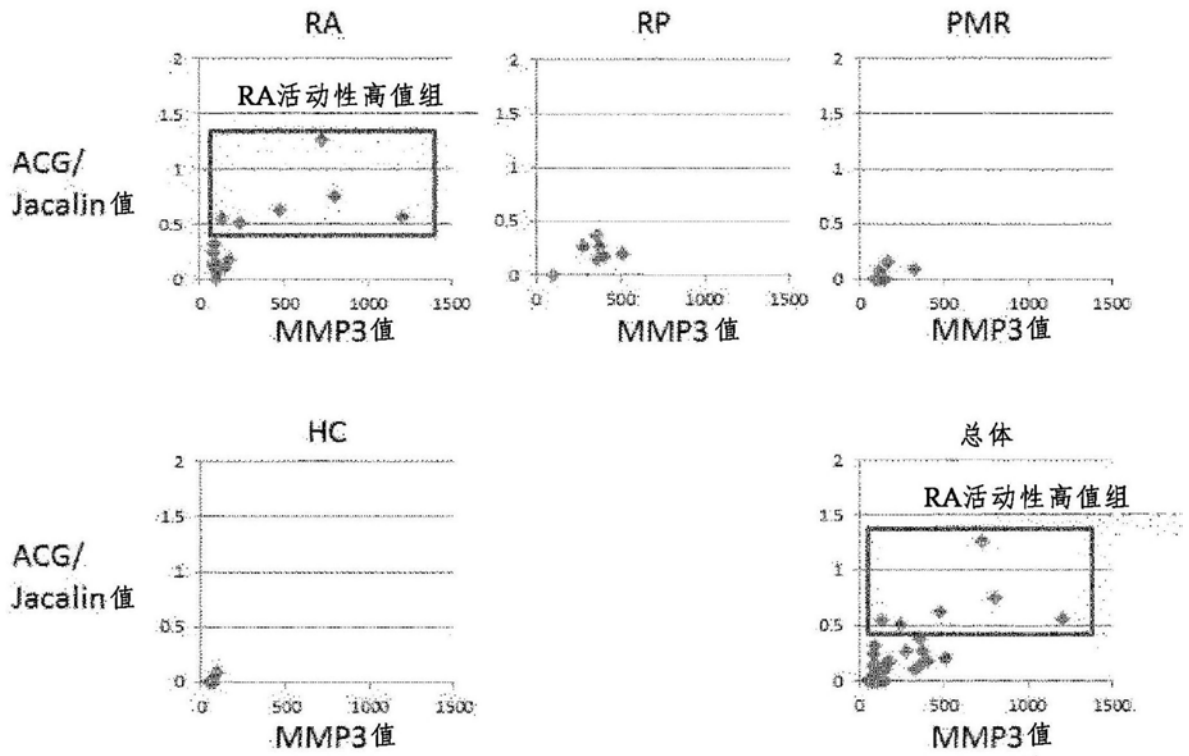


图15

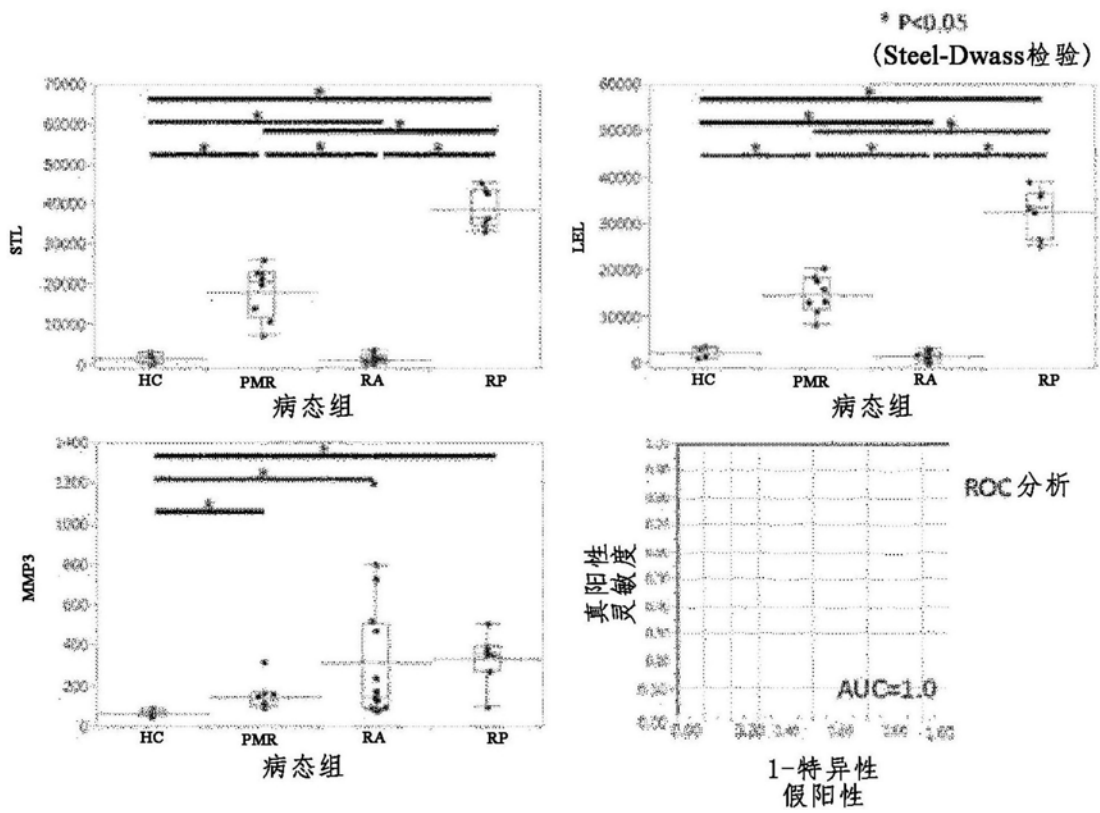


图16

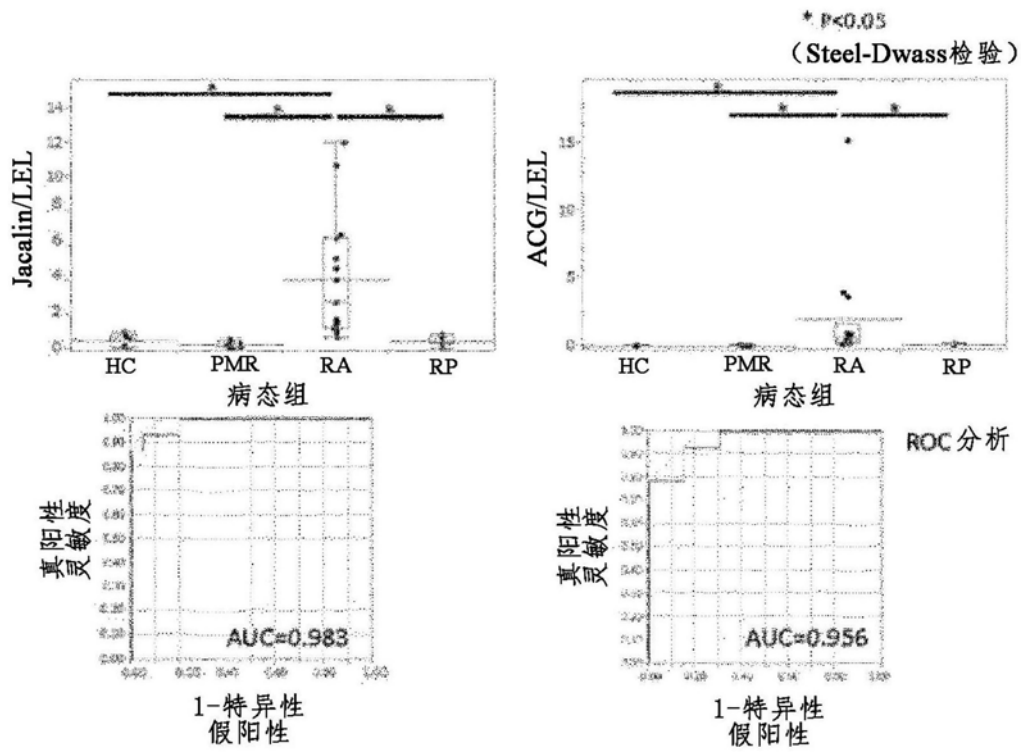


图17

专利名称(译)	类风湿性关节炎标志物		
公开(公告)号	<a href="#">CN107076742A</a>	公开(公告)日	2017-08-18
申请号	CN201580058686.2	申请日	2015-10-29
[标]申请(专利权)人(译)	学校法人庆应义塾		
申请(专利权)人(译)	国立研究开发法人产业技术综合研究所 学校法人庆应义塾		
当前申请(专利权)人(译)	国立研究开发法人产业技术综合研究所 学校法人庆应义塾		
[标]发明人	久野敦 松田厚志 成松久 竹内勤 铃木胜也 竹下胜		
发明人	久野敦 松田厚志 成松久 竹内勤 铃木胜也 竹下胜		
IPC分类号	G01N33/564 C07K14/42 C12N9/64 G01N33/53 G01N33/573		
CPC分类号	G01N33/573 C07K14/42 C07K16/40 C12N9/64 C12Y304/24017 G01N33/53 G01N33/564 G01N2333/96494 G01N2800/102		
代理人(译)	张淑珍 王维玉		
优先权	2014222096 2014-10-30 JP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供通过简便的方法高灵敏度且可靠地评价类风湿性关节炎的疾病活动性的方法以及用于该方法试剂盒。进一步地，本发明还提供类似的类风湿性疾病类风湿性多发肌痛症和复发性多发软骨炎的正确诊断方法、类风湿性关节炎的鉴别方法以及用于该方法的试剂盒。本发明提供作为负相关性的类风湿性关节炎诊断用标志物的Jacalin结合性O-结合型糖链抗原表位，并且通过将血液中的MMP-3与Jacalin的结合量的倒数乘以血液中的MMP-3的量或血液中的MMP-3与ABA、ACA或ACG的结合量得到的值的变化量，更客观地判定类风湿性关节炎的疾病活动性，从而使更正确的病情把握成为可能。另外，发现血液中的MMP-3上的LEL或STL反应性糖链成为类风湿性多发肌痛症和复发性多发软骨炎诊断用糖链标志物，提供了类风湿性多发肌痛症和复发性多发软骨炎的正确诊断方法。进一步地，通过测定血液中的MMP-3上的LEL或STL结合量与MMP-3上的Jacalin或ACG等的结合量之比，提供了可以与类似的类风湿性疾病鉴别的类风湿性关节炎的正确诊断方法。

