

(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2008-510168

(P2008-510168A)

(43) 公表日 平成20年4月3日(2008.4.3)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
G01N 33/53 (2006.01)	G01N 33/53 P	2G045
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68 A	4B063
C12Q 1/02 (2006.01)	C12Q 1/02	4C084
A61K 45/00 (2006.01)	A61K 45/00	
A61P 19/02 (2006.01)	A61P 19/02	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 106 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2007-527900 (P2007-527900)
 (86) (22) 出願日 平成17年8月12日 (2005.8.12)
 (85) 翻訳文提出日 平成19年3月30日 (2007.3.30)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2005/028871
 (87) 国際公開番号 W02006/023412
 (87) 国際公開日 平成18年3月2日 (2006.3.2)
 (31) 優先権主張番号 60/602,334
 (32) 優先日 平成16年8月18日 (2004.8.18)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 502006782
 アメリカ合衆国
 アメリカ合衆国 メリーランド州 208
 52, ロックヴィル, エグゼクティブ・
 ブールバード 6011, スイート 32
 5, ナショナル インスティテューツ・オブ・
 ヘルス, オフィス・オブ・テクノロジー・
 トランスファー
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100128048
 弁理士 新見 浩一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 骨関節炎のバイオマーカー

(57) 【要約】

骨関節炎 (O A) の評価方法、例えば、O A の診断、O A の診断の確証、O A の進行の評価または予後の実施、O A をもつ被験者の重症度の判定、将来 O A を発症する被験者のリスクの判定のための方法、また、本方法を行うために使用されるアレイおよびキットが提供される。ある特定の実施例において、本方法は、可溶性血管付着タンパク質 1 (s V A P - 1) またはインターロイキン 15 (I L - 15) などの O A リスク関連分子の活性量 (存在するタンパク質の量または発現量など) を判定する段階を含む。また、O A 関連分子の活性を変更する 1 つ以上の化合物を同定し、それによって、潜在的抗骨関節炎剤を同定する方法も提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被験者における骨関節炎（O A）リスクの評価方法であって、前記被験者の試料における、少なくとも4つのO Aリスク関連分子の差次的活性を検知する段階を備え、前記少なくとも4つのO Aリスク関連分子のうち2つは、インターロイキン15（I L - 15）と可溶性血管付着タンパク質1（s V A P - 1）を備え、差次的活性を検知する段階は、少なくともI L - 15の上方制御がみられるかどうかを判定する段階と、少なくともs V A P - 1の下方制御がみられるかどうかを判定する段階とを備え、前記少なくとも4つのO Aリスク関連分子の差次的活性の存在が、前記被験者のO Aリスクの増加を示す、方法。

10

【請求項 2】

前記少なくとも4つのO Aリスク関連分子が、表8および10～13のいずれかに挙げた、少なくとも4つの分子を備える、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記少なくとも4つのO Aリスク関連分子が、表8および10～13のいずれかに挙げた、少なくとも10の分子を備える、請求項1に記載の方法。

【請求項 4】

前記少なくとも4つのO Aリスク関連分子が、表8および10～13のいずれかに挙げた、少なくとも13の分子を備える、請求項1に記載の方法。

【請求項 5】

前記少なくとも4つのO Aリスク関連分子が、表8および10～13のいずれかに挙げた、少なくとも16の分子を備える、請求項1に記載の方法。

20

【請求項 6】

前記少なくとも4つのO Aリスク関連分子が、表8および10～13のいずれかに挙げた、少なくとも20の分子を備える、請求項1に記載の方法。

【請求項 7】

前記少なくとも4つのO Aリスク関連分子は、マトリックスメタロプロテイナーゼ7（M M P - 7）およびプラスミノ-ゲン活性抑制物質1（P A M - 1）を備え、差次的活性を検知する段階は、少なくともM M P - 7およびP A M - 1の上方制御がみられるかどうかを判定する段階をさらに備える、請求項1に記載の方法。

30

【請求項 8】

前記少なくとも4つのO Aリスク関連分子は、Dダイマー5（D D 5）、D D 6、エオタキシン2（E o t 2）、細胞間接着分子1（I C A M - 1）、M M P - 2およびPセレクチンを備え、差次的活性を検知する段階は、少なくともD D 5、D D 6、E o t 2、I C A M - 1、M M P - 2およびPセレクチンの下方制御がみられるかどうかを判定する段階をさらに備え、P A I - 1、D D 5、D D 6、E o t 2、I C A M - 1、M M P - 2およびPセレクチンの下方制御の存在と、I L - 15、M M P - 7およびs V A P - 1の上方制御の存在が、前記被験者の将来のO A発症リスクの増加を示唆する、請求項7に記載の方法。

【請求項 9】

前記少なくとも4つのO Aリスク関連分子が、インターロイキン1（I L - 1）、I L - 2、マクロファージ抑制タンパク質（M I P）- 1、Bリンパ球ケモカイン（B L C）、6ケモカイン（C k i n e）、線維芽細胞増殖因子（F G F）- 7、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（G M - C S F）、インスリン様成長因子結合タンパク質（I G F B P）- 2、ニューロトロフィン4（N T 4）、I C A M - 3、血管内皮（V E）カドヘリンおよびメタロプロテイナーゼ1の組織障害剤（T I M P - 1）を備え、差次的活性を検知する段階は、少なくともI L - 1、I L - 2、マクロファ-ジM I P - 1、B L C、6 - C k i n e、F G F - 7、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（G M - C S F）、I G F B P - 2、N T 4、I C A M - 3、V EカドヘリンおよびT I M P - 1の上方制御がみられるかどうかを判定する段階をさらに備え、P A I - 1の下方制御の存

40

50

在とIL-15、MMP-7、sVAP-1、IL-1、IL-2、MIP-1、BLC、6-Ckine、FGF-7、GM-CSF、IGFBP-2、NT4、ICAM-3、VEカドヘリンおよびTIMP-1の上方制御の存在が、前記被験者のOAを示唆する、請求項7に記載の方法。

【請求項10】

前記少なくとも4つのOAリスク関連分子が、マクロファージ炎症性タンパク質1 (MIP-1)、マクロファージ炎症性タンパク質1 (MIP-1)、ウロキナーゼ型活性プラスミノゲン化因子受容体(UPAR)および血管細胞接着分子1(VCAM-1)を備え、差次的活性を検知する段階は、少なくともMIP-1、UPARとVCAM-1の上方制御と、少なくともMIP-1の調節解除がみられるかどうかを判定する段階をさらに備え、IL-15、sVAP-1、UPAR、VCAM-1およびMIP-1の上方制御と、MIP-1の下方制御の存在が、前記被験者のOAリスクの増加を示唆する、請求項1に記載の方法。

10

【請求項11】

前記少なくとも4つのOAリスク関連分子が、脳から派生した神経栄養因子(BDNF)、上皮増殖因子(EGF)、血液濾液CCケモカイン1(HCC1)、レプチン、MMP-7およびプロラクチンを備え、差次的活性を検知する段階は、少なくともHCC1、レプチン、MMP-7およびBDNFの上方制御と、少なくともEGFおよびプロラクチンの下方制御がみられるかどうかを判定する段階をさらに備え、IL-15、sVAP-1、MIP-1、HCC1、レプチン、MMP-7、UPAR、VCAM-1、HCC1、レプチン、MMP-7およびBDNFの上方制御の存在と、MIP-1、EGFおよびプロラクチンの下方制御が、前記被験者が、将来、OAを発症する恐れがあることを示唆する、請求項10に記載の方法。

20

【請求項12】

前記少なくとも4つのOAリスク関連分子が、IL-2、Eot2、IGFBP-4、ICAM-3、インターフェロンにより誘発されるモノカイン(MIG)、MMP-7、骨髄性前駆細胞抑制因子1(MPIF-1)、胸腺および活性調節性ケモカイン(TARC)(thymus and activation regulated chemokine)、6-CkineおよびTGF受容体III(TGF-RIII)を備え、差次的活性を検知する段階は、少なくともIL-2、IGFBP-4、ICAM-3、MIG、MMP-7、MPIF-1、6-CkineおよびTGF-RIIIの上方制御と、少なくともEot2およびTARCの下方制御がみられるかどうかを判定する段階をさらに備え、IL-2、IGFBP-4、ICAM-3、MIG、MMP-7、MPIF-1、UPAR、VCAM-1、6-CkineおよびMIP-1の上方制御と、MIP-1、Eot2およびTARCの下方制御の存在は、前記被験者のOAを示唆する、請求項10に記載の方法。

30

【請求項13】

上方制御として表10~11に挙げる、少なくとも10のOAリスク関連分子の任意の組み合わせの上方制御の存在が、前記被験者のOAを示唆する、請求項1に記載の方法。

【請求項14】

下方制御として表12~13に挙げる、少なくとも6つのOAリスク関連分子の任意の組み合わせの下方制御の存在が、前記被験者の将来のOA発症リスクの増加を示唆する、請求項1に記載の方法。

40

【請求項15】

前記差次的活性が、前記被験者のOAリスクの増加を示唆する場合、OA疾病を回避または減少するために、前記被験者に治療を施すことをさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項16】

前記少なくとも4つのOAリスク関連分子の前記検知された差次的活性が、少なくとも4つのOAリスク関連分子のそれぞれの基準値と比較される、請求項1に記載の方法。

50

【請求項 17】

前記基準値が、O A リスクのない、前記少なくとも4つのO A リスク関連分子のそれぞれの活性を備える、請求項16に記載の方法。

【請求項 18】

前記被験者と同じ性別で同じ年齢範囲の被験者において、前記基準値は、前記少なくとも4つのO A リスク関連分子のそれぞれの活性の範囲である、請求項17に記載の方法。

【請求項 19】

前記試料は、血液、血清、血漿、滑液または脳脊髄液を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 20】

前記方法は、O A 進行の判定方法であり、少なくとも4つのO A リスク関連分子の差次的活性を検知する段階は、

第一および第二時間点で判定された前記被験者の前記少なくとも4つのO A リスク関連分子の第一および第二活性を比較する段階であって、前記少なくとも4つのO A リスク関連分子の前記第一および第二活性間で、 p 値 0.05 である統計上有意味な差異は、前記被験者のO A の進行を意味する段階を備える、請求項1に記載の方法。

【請求項 21】

骨関節炎(O A)の評価方法であって、前記方法は、被験者の年齢に関連したO A リスク関連分子の分類方法であり、

前記被験者の試料において少なくとも4つのO A リスク関連分子の差次的活性を検知する段階であって、前記少なくとも4つのO A リスク関連分子が、脳から派生した神経栄養因子(BDNF)、上皮増殖因子(EGF)、6Ckine、細胞間接着分子3(ICAM-3)、TGF 受容体III(TGF-RIII)、ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター受容体(UPAR)、血管細胞接着分子1(VCAM-1)、インターロイキン2(IL-2)、インターフェロンにより誘発されるモノカイン(MIG)、マトリックスメタロプロテイナーゼ7(MMP7)および骨髄性前駆細胞抑制因子1(MPIF-1)を備え、差次的活性を検知する段階は、少なくともBDNF、6Ckine、ICAM-3、TGF-RIII、UPAR、VCAM-1、IL-2、MIG、MMP7およびMPIF-1の上方制御がみられるかどうかを判定する段階と、少なくともEGFの下方制御がみられるかどうかを判定する段階とを備え、前記少なくとも4つのO A リスク関連分子の差次的活性の前記存在が、前記被験者の年齢に相関するO A リスクの増加を示唆する段階、を備える、方法。

【請求項 22】

前記O A リスク関連分子は、O A リスク関連タンパク質を備える、請求項1に記載の方法。

【請求項 23】

差次的活性を検知する段階は、前記少なくとも4つのO A リスク関連タンパク質量を定量化する段階を備える、請求項22に記載の方法。

【請求項 24】

少なくとも4つのO A リスク関連タンパク質の差次的活性がみられるかどうかを判定する段階は、

前記被験者から得られた試料における少なくとも4つのO A リスク関連タンパク質量を測定する段階であって、O A リスクがない被験者の前記少なくとも4つのO A リスク関連タンパク質のそれぞれの基準値の量に対する、前記試料の前記少なくとも4つのO A リスク関連タンパク質の量における差異が、少なくとも4つの血管リスク関連分子のそれらの差次的活性である、請求項22に記載の方法。

【請求項 25】

前記被験者から得られた前記試料の量と前記基準値との間の p 値 0.05 である統計上有意味な差異が、前記O A リスク関連タンパク質において差次的活性がみられることを示唆する、請求項24に記載の方法。

【請求項 26】

前記被験者から得られた前記試料の量と前記基準値との間の少なくとも4倍の差異は、前記OAリスク関連タンパク質において差次的活性がみられることを示唆する、請求項24に記載の方法。

【請求項27】

前記タンパク質は前記被験者から得られ、前記タンパク質は、前記タンパク質が前記少なくとも4つのOAリスク関連タンパク質を検知する抗体に十分結合できる条件下で培養される、請求項24に記載の方法。

【請求項28】

前記タンパク質が抗体に十分結合できる条件下での前記タンパク質を培養する段階は、前記タンパク質と抗体間で特定の結合を可能にするために十分な間、前記タンパク質を前記抗体で培養するステップであって、それによって、タンパク質・抗体複合体を形成する段階と、

10

前記タンパク質の活性が、変更されたかどうかを判定するために前記タンパク質・抗体複合体を分析する段階であって、少なくとも4つのOAリスク関連タンパク質の差次的活性の存在は、前記被験者のOAリスクの増加を示唆する段階と、を備える、請求項27に記載の方法。

【請求項29】

前記タンパク質・抗体複合体を分析する段階は、タンパク質・抗体複合体の量を判定する段階と、前記量を、OAリスクのない被験者の前記少なくとも4つのOAリスク関連タンパク質のそれぞれの基準値と比較する段階とを備える、請求項28に記載の方法。

20

【請求項30】

前記タンパク質・抗体複合体の分析は、前記複合体を検知する段階と定量化する段階とを備える、請求項29に記載の方法。

【請求項31】

前記抗体は、アレイ基盤に存在する、請求項27に記載の方法。

【請求項32】

前記抗体は、特に、表8および10～13に挙げる、少なくとも4つの分子の任意の組み合わせに結合する、請求項27に記載の方法。

【請求項33】

前記OAリスク関連分子は、前記OAリスク関連核酸分子を備える、請求項1に記載の方法。

30

【請求項34】

差次的活性を検知する段階は、少なくとも4つのOAリスク関連核酸分子の発現を定量化する段階を備える、請求項33に記載の方法。

【請求項35】

前記核酸分子は、mRNAまたはcDNAを備える、請求項33に記載の方法。

【請求項36】

前記核酸分子は、前記被験者から得た試料から単離され、それによって、単離された核酸分子を生成し、前記単離された核酸分子が、前記少なくとも4つのOAリスク関連分子を検知するオリゴヌクレオチドと交雑される、請求項33に記載の方法。

40

【請求項37】

前記オリゴヌクレオチドと交雑する段階は、前記単離された核酸分子とオリゴヌクレオチド間で交雑させるのに十分な時間、前記単離された核酸分子をオリゴヌクレオチドで培養する段階であって、それによって、単離された核酸分子・オリゴヌクレオチド複合体を形成する段階と、

前記単離された核酸分子の活性が変更されたかどうかを判定するために前記単離された核酸分子・オリゴヌクレオチド複合体を分析する段階であり、少なくとも4つのOAリスク関連核酸の差次的活性の存在が、被験者のOAリスクの増加を示唆する段階と、を備える、請求項36に記載の方法。

【請求項38】

50

前記単離された核酸分子・オリゴヌクレオチド複合体を分析する段階は、核酸の交雑量を判定する段階と、前記交雑量を、O A リスクのない被験者からの少なくとも4つのO A リスク関連核酸酸の交雑量の基準値と比較する段階を備える、請求項37に記載の方法。

【請求項39】

前記単離された核酸分子・オリゴヌクレオチド複合体を分析する段階は、前記複合体を検知する段階と、定量化する段階とを備える、請求項37に記載の方法。

【請求項40】

前記オリゴヌクレオチドは、アレイ基盤に存在する、請求項36に記載の方法。

【請求項41】

前記オリゴヌクレオチドは、表8および10～13に挙げる、少なくとも4つの分子の任意の組み合わせに相補的である、請求項36に記載の方法。

10

【請求項42】

少なくとも4つのO A リスク関連分子の差次的活性を検知する段階は、前記被験者から得られた前記試料の少なくとも4つのO A リスク関連分子のレベルを測定する段階であって、O A リスクのない被験者からの類似試料の前記少なくとも4つのO A リスク関連分子のレベルに対して、前記試料における前記少なくとも4つのO A リスク関連分子のレベルにおける差異は、少なくとも4つのO A リスク関連分子のそれらの差次的活性である段階と、
を備える、請求項1に記載の方法。

【請求項43】

20

O A リスクを評価する段階は、前記被験者のO A を判定する段階と、前記被験者のO A 疾病リスクの増加を判定する段階と、前記被験者のO A 進行を判定する段階と、または前記被験者のO A の重傷度を判定する段階とを備える、請求項1に記載の方法。

【請求項44】

前記被験者に前記選択された治療法を施す段階をさらに備える、請求項15に記載の方法。

【請求項45】

前記治療法は、抗炎症剤を備える、請求項44に記載の方法。

【請求項46】

少なくとも4つのO A リスク関連分子の任意の組み合わせの差次的活性を検知する段階は、前記被験者から得られた、核酸分子またはタンパク質を定量的または定性的に分析する段階を備える、請求項1に記載の方法。

30

【請求項47】

被験者のO A リスクの評価方法であって、
被験者から得られたタンパク質をアレイに適用する段階であって、前記アレイは、表10～13に挙げる36のO A リスク関連タンパク質の全てに相補である抗体を備える段階と、
前記タンパク質と抗体間で特定の結合を可能にするために十分な時間、前記タンパク質をアレイでインキュベートする段階であって、それによって、タンパク質・抗体複合体を形成する段階と、
前記試料に存在する前記タンパク質のそれぞれの量を判定するために、前記タンパク質・抗体複合体を分析する段階と、

40

前記試料における前記タンパク質のそれぞれの量を基準値と比較する段階であって、前記基準値は、O A リスクが存在しない場合の前記タンパク質のそれぞれの量であり、前記36のタンパク質のうちの少なくとも4つに対する前記基準値と比較して、前記試料の前記タンパク質量の4倍の差異の存在は、前記被験者のO A リスクの増加を示唆する段階と、
を備える、方法。

【請求項48】

前記タンパク質・抗体複合体を分析する段階は、ローリングサークル増幅を使用して前記タンパク質・抗体複合体を検知する段階を備える、請求項47に記載の方法。

50

【請求項 49】

OA リスクを判定するためのアレイであって、表 8 および 10 ~ 13 に挙げる前記 OA リスク関連分子タンパク質の少なくとも 4 つを認識する抗体を備える、アレイ。

【請求項 50】

前記少なくとも 4 つの OA リスク関連タンパク質は、表 8 に挙げる前記 OA リスク関連タンパク質を備える、請求項 49 に記載のアレイ。

【請求項 51】

前記少なくとも 4 つの OA リスク関連タンパク質は、表 10、11、12 または 13 に挙げる前記 OA リスク関連タンパク質を備える、請求項 49 に記載のアレイ。

【請求項 52】

被験者の OA リスクを評価するためのキットであって、請求項 49 に記載のアレイと、別のパッケージで緩衝液と、を備える、キット。

10

【請求項 53】

表 8 および 10 ~ 13 に挙げる OA リスク関連分子の活性を変更する薬剤を同定する方法であって、

OA を模擬または誘発するのに十分な条件下で細胞を培養する段階と、一つ以上の試験薬が OA リスク関連分子の活性を変更するのに十分な条件下で、前記一つ以上の試験薬を前記細胞に接触させる段階と、前記 OA リスク関連分子の差次的活性を検知する段階であって、前記 OA リスク関連分子の差次的活性の存在は、前記試験薬が、表 8 および 10 ~ 13 に挙げる OA リスク関連分子の活性を変更することを示唆する段階と、を備える、方法。

20

【請求項 54】

表 8 および 10 ~ 13 に挙げる前記 OA リスク関連分子は、IL - 15 または sVAP - 1 を備える、請求項 53 に記載の方法。

【請求項 55】

表 8 および 10 ~ 13 に挙げる前記 OA リスク関連分子は、6Ckine、BDNF、EGF、Eot2、HCC1、ICAM - 3、IGFBP - 4、IL - 2、レプチン、MIG、MIP - 1、MIP - 1、MMP7、MPIF - 1、プロラクチン、TARC、TGF - 、TGF - RIII、UPAR または VCAM - 1 を備える、請求項 53 に記載の方法。

30

【請求項 56】

表 8 および 10 ~ 13 に挙げる前記 OA リスク関連分子は、核酸配列を備え、前記 OA リスク関連分子の差次的活性を検知する段階は、差次的 RNA 発現を検知する段階を備える、請求項 53 に記載の方法。

【請求項 57】

表 8 および 10 ~ 13 に挙げる前記 OA リスク関連分子は、タンパク質の配列を備え、前記 OA リスク関連分子の差次的発現を検知する段階は、タンパク質の存在量を検知する段階を備える、請求項 53 に記載の方法。

40

【請求項 58】

OA を模擬するのに十分な条件は、低酸素条件下で前記細胞を培養する段階を備える、請求項 53 に記載の方法。

【請求項 59】

前記細胞は、哺乳動物に存在し、OA を模擬するのに十分な条件下での前記細胞を培養する段階は、前記哺乳動物において OA を誘発する段階、または OA をもつ哺乳動物を提供する段階を備え、前記細胞を 1 つ以上の試験薬と接触させる段階は、前記 1 つ以上の試験薬を前記哺乳動物に投与する段階を備える、請求項 53 に記載の方法。

【請求項 60】

50

前記方法は、前記細胞が、表 8 および 10 ~ 13 に挙げる前記 O A リスク関連分子の少なくとも 4 つの任意の組み合わせの差次的活性を有するかどうかを判定する段階を備え、
0.05 の p 値である、少なくとも 4 つの O A リスク関連分子のいずれか一つの増加または減少の存在が、前記試験薬が前記 O A リスク関連分子の活性を変更することを示唆する、請求項 53 に記載の方法。

【請求項 61】

前記方法は、前記細胞が、表 8 および 10 ~ 13 に挙げる前記 O A リスク関連分子の全ての差次的発現を有するかどうかを判定する段階を備え、0.05 の p 値である、前記 O A リスク関連分子のいずれか 1 つの増加または減少の存在が、前記試験薬が前記 O A リスク関連分子の活性を変更することを示唆する、請求項 53 に記載の方法。

10

【請求項 62】

O A をもつ哺乳動物の治療方法であって、前記哺乳動物に請求項 53 に記載の方法を使用して同定された前記薬剤を投与する段階を備える、治療方法。

【請求項 63】

将来、O A の発症リスクが高い哺乳動物の治療方法であって、前記哺乳動物に請求項 53 に記載の方法を使用して同定された前記薬剤を投与する段階を備える、治療方法。

【請求項 64】

前記 O A リスク関連分子の差次的活性を検知する段階は、前記 O A リスク関連分子の活性を、O A リスクが存在しない場合の、前記 O A リスク関連分子の基準値と比較する段階を備える、請求項 53 に記載の方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

分野

本開示は、骨関節炎の評価方法、骨関節炎関連分子の活性を変更する化合物の同定する方法、そして開示された方法を行うために使用されるアレイとキットに関する。

【0002】

関連出願の相互参照

本出願は、2004年8月18日に記入された、米国仮出願番号 60/602,334 に対して優先権を主張し、参照によりその全体が本明細書に記載されているものとみなす。

30

【背景技術】

【0003】

背景

骨関節炎 (O A) は、軟骨下骨の病的変化、骨関節炎性結節の増殖を含む骨の肥大、および痛みと硬直、そして最後には機能の喪失を伴う変化により、柔らかく、摩滅され、薄くなる関節軟骨の分裂と腐食により特徴づけされる、変形性関節疾患である。骨関節炎は、主に、荷重関節に影響する。臨床的に明白なとき、骨関節炎は、関節痛、朝のこわばりおよび運動制限のため、特に高齢者にとって、罹患および障害の主な原因であり、通常、頸、腰、膝、臀部および指の関節を含む (Lawrenceら、Arthritis Rheum., 41:778-99, 1998 (非特許文献1); Lingら、J. Am. Geriatr. Soc. 46:216-25, 1998 (非特許文献2))。骨関節炎は、過去に損傷または外傷を受けた、または長期間頻繁に使用された関節で発症することもある。

40

【0004】

従来 X 線撮影は、臨床的症状を予測するための非感受性と、初期の疾病または経時的な微妙な変化を検知するための非感受性にもかかわらず、一般的に、O A の診断および分類の判断基準とみなされる。(Lethbridge-Cejku et al., Arthritis Care Res. 8:182-83, 1995 (非特許文献3); Altman et al., Arthritis Rheum. 30:1214-25, 1987 (非特許文献4))。診断または疾病の臨床経過の予測に使用される滑液、血清、または尿で測定されるバイオマーカーの探求は、近年、強まっている。初期の研究は、軟骨前駆体、構成要素お

50

よび分解生成物に焦点を置いていた (Bruyereら、J. Rheumatol. 30 : 1043 - 50、2003 (非特許文献5) ; Dragomirら、Osteoarthritis Cartilage 10 : 687 - 91、2002 (非特許文献6) ; Lohmanderら、Arthritis. Rheum. 42 : 534 - 44、1999 (非特許文献7) ; Poole、Arthritis. Rheum. 46 : 2549 - 52、2002 (非特許文献8) ; Pooleら、J. Immunol. Meth. 294 : 145 - 53、2004 (非特許文献9) ; Clarkら、Arthritis. Rheum. 42 : 2356 - 64、1999 (非特許文献10) ; Vilimら、Osteoarthritis Cartilage 10 : 707 - 13、2002 (非特許文献11))。しかし、現在利用可能なマーカーは、すでに発生した軟骨と骨の損傷しか反映しないため、他のOAマーカーの同定が必要とされる。よって、初期発生、OAの素因または継続する疾病過程を含む要因を反映するマーカーの同定が、例えば、OAの早期介入から利益を得る患者を同定するために役立つ。さらに、OAバイオマーカーの同定は、新規の治療標的の同定を可能にするかもしれない。

【0005】

【非特許文献1】Lawrenceら、Arthritis Rheum.、41 : 778 - 99、1998

【非特許文献2】Lingら、J. Am. Geriatr. Soc. 46 : 216 - 25、1998

【非特許文献3】Lethbridge-Cejku et al., Arthritis Care Res. 8 : 182-83, 1995

【非特許文献4】Altman et al., Arthritis Rheum. 30 : 1214-25, 1987

【非特許文献5】Bruyereら、J. Rheumatol. 30 : 1043 - 50、2003

【非特許文献6】Dragomirら、Osteoarthritis Cartilage 10 : 687 - 91、2002

【非特許文献7】Lohmanderら、Arthritis. Rheum. 42 : 534 - 44、1999

【非特許文献8】Poole、Arthritis. Rheum. 46 : 2549 - 52、2002

【非特許文献9】Pooleら、J. Immunol. Meth. 294 : 145 - 53、2004

【非特許文献10】Clarkら、Arthritis. Rheum. 42 : 2356 - 64、1999

【非特許文献11】Vilimら、Osteoarthritis Cartilage 10 : 707 - 13、2002

【発明の開示】

【0006】

要旨

骨関節炎(OA)評価のための新規方法が開示される。発明者は、OAを分析するために使用される、複数の骨関節炎マーカーを同定した。長期間縦軸的に追跡し、表現型がよく特徴づけされた被験者からの試料は、169の可溶性血清タンパク質を測定するために、多重抗体ベースのタンパク質マイクロアレイを使用して分析された。膝および手のOA発症は、血清タンパク質の検知可能な変化により特徴づけされることが分った。確認されたOAに存在するマーカーと同様、OAの発症に関連するマーカーが、同定された。よって、開示されたOAリスク関連マーカーは、被験者が将来OAを発症するかを判定するため、診断またはOAの診断を確認するため、OAの進行を判断またはOAの進行の予後を実行するため、OAの重症度を判定するため、特定のOA治療から利益を得る可能性のある被験者を同定するため、またはこれらの組み合わせにより使用される。

【0007】

開示された方法は、多くのOAリスク関連分子(OAリスク関連タンパク質または酢酸

分子など)を、同時および順次に、スクリーニングすることを可能にする。ある実施例において、比較的少量の生体試料(生体液、例えば、血液、血清または尿など)のみが、必要とされる。タンパク質の量の変化は、使用されたアルゴリズムの感受性と特異性、および分析されたパラメータにより、少なくとも10のタンパク質、少なくとも13のタンパク質、少なくとも16のタンパク質または少なくとも17のタンパク質でみられた。

【0008】

ある特定の実施例において、OAの被験者は、インターロイキン15(IL-15)、可溶性血管付着タンパク質1(sVAP-1)、マトロプロテイナーゼ7(MMP-7)、インターロイキン1(IL-1)、IL-2、マクロファージ抑制タンパク質(MIP)-1、Bリンパ球ケモカイン(BLC)、6ケモカイン(Ckine)、線維芽細胞増殖因子(FGF)-7、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、インスリン様成長因子結合タンパク質(IGFBP)-2、ニューロトロフィン4(NT4)、ICAM-3、血管内皮(VE)カドヘリン、マトロプロテイナーゼ1の組織障害剤(TIMP-1)量の増加、およびプラスミノゲン活性抑制物質1(PAI-1)量の減少を示した。別のある特定の実施例において、OAの被験者は、マクロファージ炎症性タンパク質1(MIP-1)、ウロキナーゼ型活性プラスミノゲン化因子受容体(UPAR)、血管細胞接着分子1(VCAM-1)、IL-2、IGFBP-4、ICAM-3、インターフェロンにより誘発されるモノカイン(MIG)、MMP-7、骨髄性前駆細胞抑制因子1(MPIF-1)、TGF受容体II(TGF-RII)(および、ある実施例において6-Ckineも)量の増加、およびマクロファージ炎症性タンパク質1(MIP-1)、エオタキシン2(Eot2)および胸腺および活性調節性ケモカイン(TARC)(thymus and activation regulated chemokine)量の減少を示した。

10

20

30

40

【0009】

ある特定の実施例において、最初にOAではなかったが、後にOAを発症した被験者は、OAを発症する前、例えば、OAがX線により検知可能でなかった場合、IL-15、sVAP-1、MMP-7量の増加、およびPAI-1、Dダイマー5(DD5)、DD6、Eot2、細胞間接着分子1(ICAM-1)、MMP-2、Pセレクトリン量の減少を示した。別のある特定の実施例において、最初はOAではなかったが、後にOAを発症した被験者は、MIP-1、UPAR、VCAM-1、血液濾液CCケモカイン1(HCC1)、レプチン、MMP-7、脳から派生した神経栄養因子(BDNF)、6-Ckine、TGF-RIIおよびICAM-3量の増加、およびマクロファージ炎症性タンパク質1(MIP-1)、上皮増殖因子(EGF)およびプロラクチン量の減少を示した。

【0010】

一実施例において、被験者のOAリスクの評価方法は、OAリスク関連分子の活性の増加とOAリスク関連分子の活性の減少のパターンの検知、または双方を含む。このような活性のパターンは、核酸レベル(タンパク質発現に関連するmRNAsの定量など)またはタンパク質レベル(タンパク質の定量的検知など)で検知が可能である。ある方法は、発現パターンの検知だけでなく、発現の規模(増加、減少、または双方)の検知も備え、そのようなパターンは、OAである、またはOA発症のリスクがある被験者と関連、または重傷度またはOAの進行など、予測された臨床的後遺症と関連する。

【0011】

開示された方法は、例えば、X線写真の検査の前または後など、OAの疑いのある被験者に実行することができる。他の実施例において、本方法は、例えば、OAの進行をモニタリングするため、OAの重傷度を判定するため、またはOAの放射線学的診断を確認するためなど、OAと分っている被験者に実行される。他の実施例において、開示された方法は、例えば、OAである、またはOAを発症するリスクがあると知らない被験者の疾病に対するスクリーニングの一部として、疾病に対する被験者のスクリーニングとして実行される。

50

【 0 0 1 2 】

一実施例において、O Aの評価方法は、被験者が、表8と10～13に示す配列(D N A、R N Aまたはタンパク質の配列など)を含む、基本的に構成する、または構成する、1つ以上のO Aリスク関連分子の活性の変化を示すかどうかを判定することを備え、1つ以上のO Aリスク関連分子の差次的活性の存在は、被験者が、将来のO Aの発症リスクの増加またはO Aの診断など、O Aリスクの増加を示唆する。特定の実施例において、O Aの評価方法は、被験者が、表8および10～13に示す配列を含む、基本的に構成する、または構成する、2つ以上のO Aリスク関連分子(3つ以上、4つ以上、5つ以上、または6つ以上など)の活性の変化を示すかどうかを判定することを備え、少なくとも2つ以上、少なくとも3つ以上、少なくとも4つ以上、少なくとも5つ以上または少なくとも6

10

【 0 0 1 3 】

一実施例において、1つ以上、2つ以上、3つ以上、または4つ以上のO Aリスク関連分子は、インターロイキン15(I L - 1 5)または可溶性血管付着タンパク質1(s V A P - 1)を備え、本方法は、少なくともI L - 1 5の上方制御がみられるかどうかの判定、または少なくともs V A P - 1の下方制御がみられるかどうかの判定を含む。他の実施例において、少なくとも、4つのO Aリスク関連分子は、マトリックスメタロプロテイナーゼ7(M M P - 7)およびプラスミノゲン活性抑制物質(P A M - 1)をさらに備え、本方法は、少なくともM M P - 7およびP A M - 1の上方制御がみられるかどうかの判定をさらに含む。さらに他の実施例において、少なくとも、4つのO Aリスク関連分子は、マクロファージ炎症性タンパク質1(M I P - 1)、マクロファージ炎症性タンパク質1(M I P - 1)、ウロキナーゼ型活性プラスミノゲン化因子受容体(U P A R)および血管細胞接着分子1(V C A M - 1)をさらに備え、本方法は、少なくともM I P - 1、U P A RおよびV C A M - 1の上方制御、および少なくともM I P - 1の調節解除がみられるかどうかの判定を含む。さらに他の実施例において、少なくとも、4つのO Aリスク関連分子は、M I P - 1、M I P - 1、U P A R、V C A M - 1、6 - C k i n e、I C A M - 3およびT G F - R I I Iをさらに備え、本方法は、少なくともM I P - 1、U P A R、V C A M - 1、6 - C k i n e、I C A M - 3およびT G F - R I I Iの上方制御、および少なくともM I P - 1の調節解除がみられるか

20

30

【 0 0 1 4 】

一実施例において、O Aリスクの評価方法は、被験者の将来のO Aの発症リスクの増加の判定を含む。一実施例において、そのような方法は、少なくともI L - 1 5、s V A P - 1とM M P - 7の上方制御がみられるかどうかの判定、および少なくともP A I - 1、Dダイマー5(D D 5)、D D 6、エオタキシン2(E o t 2)、細胞間接着分子1(I C A M - 1)、M M P - 2およびPセレクチンの下方制御がみられるかどうかの判定を備え、P A I - 1、D D 5、D D 6、E o t 2、I C A M - 1、M M P - 2およびPセレクチンの下方制御の存在と、I L - 1 5、M M P - 7とs V A P - 1の上方制御の存在は、被験者の将来のO A発症のリスクの増加を示す。他の実施例において、そのような方法は、少なくともM I P - 1、U P A R、V C A M - 1、6 - C k i n e、I C A M - 3、B D N F、H C C 1、レプチン、M M P - 7およびT G F - R I I Iの上方制御と、少なくともM I P - 1、プロラクチンおよびE G Fの下方制御がみられるかどうかの判定を備え、M I P - 1、U P A R、V C A M - 1、6 - C k i n e、I C A M - 3、B D N F、H C C 1、レプチン、M M P - 7およびT G F - R I I Iの上方制御の存在と、M I P - 1、プロラクチンおよびE G Fの下方制御は、被験者がO A発症の恐れがあることを示唆する。そのような実施例において、被験者は、O Aの放射能学的証拠がなく

40

【 0 0 1 5 】

一実施例において、O Aリスクの評価方法は、被験者がO Aをもつかの判定を含む。一

50

実施例において、そのような方法は、少なくともインターロイキン1 (IL-1)、IL-2、マクロファージ抑制タンパク質(MIP)-1、Bリンパ球ケモカイン(BLC)、6ケモカイン(Ckine)、線維芽細胞増殖因子(FGF)-7、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、インスリン様成長因子結合タンパク質(IGFBP)-2、ニュートロフィン4(NT4)、ICAM-3、血管内皮(VE)カドヘリンおよびメタロプロテイナーゼ1の組織阻害剤(TIMP-1)の上方制御がみられるかどうかの判定をさらに備え、PAI-1の下方制御の存在と、IL-15、MMP-7、sVAP-1、IL-1、IL-2、MIP-1、BLC、6-Ckine、FGF-7、GM-CSF、IGFBP-2、NT4、ICAM-3、VEカドヘリンおよびTIMP-1の上方制御の存在は、被験者のOAを示唆する。他の実施例において、そのような方法は、少なくともMIP-1、UPAR、6-Ckine、VCAM-1、ICAM-3、TGF-RIII、IL-2、IGFBP-4、MIG、MMP-7、MPIF-1の上方制御と、少なくともMIP-1、Eot2およびTARCの下方制御がみられるかどうかの判定をさらに備え、少なくともMIP-1、UPAR、6-Ckine、VCAM-1、ICAM-3、TGF-RIII、IL-2、IGFBP-4、MIG、MMP-7、MPIF-1の上方制御の存在と、少なくともMIP-1、Eot2およびTARCの下方制御は、被験者のOAを示唆する。

10

【0016】

一実施例において、OAリスクの評価方法は、被験者のOAの進行の判定を含む。本方法は、表8と10~13に挙げる1つ以上の分子の上方制御、または表8および10~13に挙げる1つ以上の分子の下方制御がみられるかどうかの判定を含む。例えば、2つの異なる時期に得た試料のOAリスク関連分子活性の量が比較される。後の時間点のOAリスク関連分子の活性が、差次的活性を示す、または大規模な差次的活性を示し続ける場合、OAが進行していることを示唆する。反対に、後の時間点のOAリスク関連分子の活性が、もはや差次的活性を示さない、または小規模の差次的活性を示す場合、OAが進行していない、またはOAの進行が遅いことを示唆する。他の実施例において、試料のOAリスク関連分子活性の量は、基準値または対照値と比較される。試験試料のOAリスク関連分子の活性が、OAを表さない対照または規準値より大規模な差次的活性を示す場合、OAが進行していることを示唆する。反対に、試験試料のOAリスク関連分子の活性が、OAを表さないコントロールまたは規準値より統計上類似した量の差次的活性を示す場合、OAが進行していない、またはOAの進行が遅いことを示唆する。

20

30

【0017】

特定の実施例において、OAリスク関連分子は、MMP-7、PAI-1、DD5、DD6、Eot2、ICAM-1、MMP-2、Pセレクトリン、IL-1、IL-2、MIP-1、BLC、6-Ckine、FGF-7、GM-CSF、IGFBP-2、NT4、ICAM-3、VEカドヘリン、TIMP-1、MIP-1、MIP-1、UPAR、VCAM-1、BDNF、EGF、HCC1、レプチン、プロラクチン、IGFBP-4、MIG、MPIF-1、TARC、およびTGF-RIIIの1つ以上と組み合わせるIL-15またはsVAP-1、または1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33または34と任意で組み合わせるIL-15またはsVAP-1を含む、本質的に構成する、または構成する。例えば、OA関連分子は、表8および10~13に挙げる2つ以上、3つ以上、4つ以上、5つ以上、6つ以上、7つ以上、8つ以上、9つ以上、10以上、11以上、12以上、13以上、14以上、15以上、16以上、17以上、18以上、19以上、20以上、21以上、22以上、23以上、24以上、25以上、26以上、27以上、28以上、29以上、30以上、31以上、32以上、33以上、34以上、35以上、36以上の分子を含む、本質的に構成する、または構成することが可能である。あらゆる同定された分子は、そのようなセットまたはサブセットの分子と組み合わせ使用することが可能である。

40

50

【 0 0 1 8 】

ある特定の実施例において、O Aの評価は、I L - 1 5またはs V A P - 1を含む、表8および10～13に挙げる、少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、または少なくとも4つのタンパク質（または対応する核酸）の任意の組み合わせなど、被験者の少なくとも1つのO Aリスク関連分子の差次的活性の検知を備え、少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、または少なくとも4つのO Aリスク関連分子の差次的活性の存在は、被験者が、O Aである、または将来O Aを発症する恐れがあることを示唆する。特定の実施例において、少なくとも2つ、少なくとも3つ、または少なくとも4つのO Aリスク関連分子は、M M P - 7、P A M - 1、D D 5、D D 6、E o t 2、I C A M - 1、M M P - 2、Pセレクチン、I L - 1、I L - 2、M I P - 1、B L C、6 - C k i n e、F G F - 7、G M - C S F、I G F B P - 2、N T 4、I C A M - 3、V Eカドヘリン、T I M P - 1、M I P - 1、M I P - 1、U P A R、V C A M - 1、B D N F、E G F、H C C 1、レプチン、プロラクチン、I G F B P - 4、M I G、M P I F - 1、T A R CまたはT G F - R I I Iの少なくとも1つとの組み合わせる、任意で、被験者が、表8と10～13に挙げるO Aリスク関連分子の少なくとも3つの他の分子（例えば、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、少なくとも8つ、少なくとも9つ、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、少なくとも20、少なくとも21、少なくとも22、少なくとも23、少なくとも24、少なくとも25、少なくとも26、少なくとも27、少なくとも28、少なくとも29、少なくとも30、少なくとも31、少なくとも32、少なくとも33、または少なくとも34でさえ）の任意の組み合わせなど、他のO Aリスク関連分子の任意の他の組み合わせの活性を変更したかどうかの判定と組み合わせる、I L - 1 5またはs V A P - 1、を含む。

10

20

【 0 0 1 9 】

ある特定の実施例において、差次的活性は、被験者がI L - 1 5、s V A P - 1、M M P - 7、I L - 1、I L - 2、M I P - 1、B L C、6 - C k i n e、F G F - 7、G M - C S F、I G F B P - 2、N T 4、I C A M - 3、V Eカドヘリン、T I M P - 1、M I P - 1、U P A R、V C A M - 1、T G F - R I I I、B D N F、H C C、レプチン、I G F B P - 4、M I GおよびM P I F - 1の少なくとも1つの活性の増加を示すかどうかを判定することにより検知される。別の実施例において、差次的活性は、被験者がP A I - 1、D D 5、D D 6、E o t 2、I C A M - 1、M M P - 2、Pセレクチン、M I P - 1、E o T 2およびT A R Cの少なくとも1つの活性の減少を示すかどうかを判定することにより検知される。例えば、差次的発現は、被験者が、血清試料などの被験者から得た試料のI L - 1 5、s V A P - 1、M M P - 7、I L - 1、I L - 2、M I P - 1、B L C、6 - C k i n e、F G F - 7、G M - C S F、I G F B P - 2、N T 4、I C A M - 3、V Eカドヘリン、T I M P - 1、M I P - 1、U P A R、V C A M - 1、T G F - R I I I、B D N F、H C C、レプチン、I G F B P - 4、M I GおよびM P I F - 1量の増加を示すかどうかを判定すること、および被験者が、P A I - 1、D D 5、D D 6、E o t 2、I C A M - 1、M M P - 2、Pセレクチン、M I P - 1、E o T 2およびT A R C量の減少を示すかどうかを判定することにより検知することができる。

30

40

【 0 0 2 0 】

ある実施例において、本方法は、被験者が、I L - 1 5、s V A P - 1および表10～11に挙げる分子の2つ以上の任意の組み合わせでの活性増加、例えば、表10～11に挙げる分子の少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、少なくとも8つ、少なくとも9つ、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、または少なくとも16における増加を示すかどうかを判定することを含む。表10～11に挙げる分子の4つ以上の任意の組み合わせの活性の増加は、被験者のO Aを示唆する。表10～11のO Aリ

50

スク関連分子の任意の1つは、OAリスク関連分子（核酸またはタンパク質など）の組み合わせまたは下位の組み合わせを生成するために、表10～11のOAリスク関連分子の任意の他の組み合わせと組み合わせることができる。

【0021】

他の実施例において、本方法は、被験者が、表12～13に挙げる少なくとも2つ以上の任意の分子と組み合わせるPAI-1の活性の減少、例えば、表12～13に挙げる分子の少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、少なくとも8つ、少なくとも9つまたは少なくとも10の減少、を示すかどうかを判定することを含む。表12～13に挙げる分子の4つ以上の任意の組み合わせの活性の減少は、被験者の将来のOAの発症リスクの増加を示唆する。表12～13のOAリスク関連分子の任意の1つは、OAリスク関連分子（核酸またはタンパク質など）の組み合わせまたは下位の組み合わせを生成するために、表12～13のOAリスク関連分子の任意の他の組み合わせと組み合わせることができる。

10

【0022】

ある実施例において、被験者のOAリスク関連分子の活性量が、OAでない、およびOAのリスクがないと予想される被験者のOAリスク関連分子の活性量など（タンパク質存在量または遺伝子発現量など）の基準値と比較され、表8および10～13に挙げる1つ以上のOAリスク関連分子（表8および10～13に挙げる、2つ以上、3つ以上、4つ以上のOAリスク関連分子など）の任意の組み合わせの活性の増加または減少は、被験者のOA、または将来のOA発現のリスクを示唆する。一実施例において、基準値は、同じ性別の被験者および試験被験者と同じ年齢範囲における、各標的OAリスク関連分子の活性の範囲である。例えば、p値 0.05または少なくとも25%、少なくとも50%、少なくとも75%、少なくとも100%、または少なくとも400%の変化規模など、試験被験者値と基準値間の統計上有意な差異は、試験被験者における分子の差次的活性を示唆する。

20

【0023】

開示された方法は、差次的活性の存在が、被験者のOA、またはOA発症のリスクの増加を示唆する場合、損傷を回避または減少するために、被験者に治療を投与することをさらに含む。例えば、IL-15またはsVAP1を含む組み合わせなど、表8および10～13に挙げる少なくとも2つ、少なくとも3つまたは少なくとも4つの他の分子と組み合わせる、少なくとも4つのOAリスク関連分子の活性の変化は、被験者がOA、またはOAを発症する恐れがあり、適切な治療の投与（顆粒球または抗炎症剤の投与など）を必要とするかもしれないことを示唆する。ある実施例において、被験者の差次的活性量が、OAの恐れがない、またはOAでない被験者の活性の基準値（値の範囲など）と比較され、基準値と比較される表8および10～13に挙げる、少なくとも4つのOAリスク関連分子の活性の有意な変化は、被験者が、OAを治療または回避するための治療法から効果を得ることを示唆する。

30

【0024】

ある特定の実施例において、差次的発現は、以下のOAを示唆する臨床的兆候および症状のオンセット後に検知される。このような兆候および症状の実施例は、これに制限されるものではないが、関節の痛み、関節の腫れ、関節の硬直、関節運動の制限、関節の変形、痛みを伴う関節のひび割れまたは「きしみ」（軋音）、および当該分野に精通した者により認識される関節の他の影響を含む。

40

【0025】

一実施例において、分析される試験試料は、OAリスク関連タンパク質を含む。特定の実施例において、差次的活性の検知は、試験被験者から得られた試料に存在する、少なくとも4つのOAリスク関連タンパク質量の定量化を含む。例えば、本方法は、試料の少なくとも4つのOAリスク関連タンパク質の量を測定することを含むことができ、OAリスクのない被験者の、各少なくとも4つのOAリスク関連分子の基準値の量に対して、試料の少なくとも4つのOAリスク関連タンパク質量の差異は、少なくとも4つのOAリスク

50

関連分子の差次的活性である。ある実施例において、被験者からの試料は、表 8 および 10 ~ 13 に挙げるような、少なくとも 4 つの異なる O A リスク関連タンパク質を検知できる抗体を含むアレイなど、タンパク質を検知できるアレイに適用される。特定の実施例において、ローリングサークル増幅が、アレイ上で特異的に抗体に結合した試料からのタンパク質を検知および定量化するために使用される。

【 0 0 2 6 】

他の特定の実施例において、O A リスク関連分子は、m R N A または c D N A 分子などの、単離された O A リスク関連核酸分子を含む。単離された核酸分子は、例えば、核酸分子をアレイ、例えば、表 8 および 10 ~ 13 に挙げる遺伝子など、少なくとも 4 つの O A リスク関連遺伝子に交雑可能なオリゴヌクレオチドプローブを含むアレイに接触することにより、検知および定量化されることができる。

10

【 0 0 2 7 】

また、本明細書で提供されるアレイは、O A の評価ができる分子を含む。このようなアレイは、特定の実施例において、血清タンパク質を含む試料など、試料に存在する O A リスク関連核酸またはタンパク質の配列の定量化を可能にする。一実施例において、アレイは、表 8 および 10 ~ 13 に挙げるタンパク質など、少なくとも 4 つの O A リスク関連タンパク質を認識する抗体を本質的に含む、または含む。特定の実施例において、アレイは、表 8 および 10 ~ 13 のいずれかに挙げる、少なくとも 4 つのタンパク質、例えば、表 8 および 10 ~ 13 のいずれかに挙げる 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34 または 35 のタンパク質の任意の組み合わせを認識する抗体を含む、または本質的に含む。ある実施例において、アレイは、1 つ以上の対照抗体をさらに含む。このようなアレイを含むキットも開示される。

20

【 0 0 2 8 】

また、表 8 および 10 ~ 13 に挙げる 1 つ以上の分子など、O A リスク関連分子（例えば、遺伝子またはタンパク質）の活性（活性など）を変更する 1 つ以上の薬剤を同定する方法が、本開示で提供される。このような同定された分子は、抗骨関節炎薬剤の候補である。

【 0 0 2 9 】

所望するなら、複数の試験薬および複数の O A リスク関連分子を、同時にスクリーニングすることができる。一実施例において、本方法は、複数の O A リスク関連分子（表 8、10、11、12 または 13 に挙げる全ての O A リスク関連分子など）で、1 つの試験薬の効果を同時にスクリーニングするのに使用される。他の実施例において、本方法は、表 8 および 10 ~ 13（例えば、I L - 15 または P A I - 1）に挙げる分子の 1 つなど、1 つの O A リスク関連分子で、複数の試験薬の効果をスクリーニングするのに使用される。特定の実施例において、同定された薬剤は、O A の発症前または O A の発症後に、上方制御または下方制御された、O A リスク関連分子の活性を変更する。例えば、薬剤は、O A 後に下方制御される（P A I - 1 など）O A リスク関連分子の活性を増加すること、または O A 後に上方制御される（I L - 2 など）O A リスク関連分子の活性を減少することなどにより、O A 発症後に上方制御または下方制御される O A リスク関連分子の活性を正常化できる。他の実施例において、薬剤は、O A 発症前に下方制御される（E o t 2 など）O A リスク関連分子の活性を増加すること、または O A 発症前に上方制御される（I L - 15 または s V A P - 1 など）O A リスク関連分子の活性を減少することなどにより、O A 発症前に上方制御または下方制御される O A リスク関連分子の活性を正常化できる。開示された方法は、インビトロ（例えば、細胞培養で）またはインビボ（哺乳動物などで）で実施することができる。

30

40

【 0 0 3 0 】

一実施例において、試験薬は、O A を治療するために、臨床試験前または臨床試験、または規制機関（食品医薬品局、F D A など）により認可された薬剤である。例えば、本方法は、薬剤が、治療への反応を修正する 1 つ以上の O A リスク関連分子の活性を変更する

50

かどうかを判定するために使用でき、最良の反応薬剤を予測できる。

【0031】

他の実施例において、本方法は、炎症に対して効果的な薬剤など、薬剤の特定のクラスを同定するのに使用される。例えば、1つ以上の試験薬は、本明細書で開示された方法を使用してスクリーニングすることができ、IL-15など、開示された炎症関連遺伝子（またはタンパク質）の差次的発現が測定される。1つ以上の開示された炎症関連分子の活性を変更する試験薬は、炎症の治療の候補である。

【0032】

また、OAである、または将来OAを発症するリスクの増加を示す哺乳動物を治療する方法が、提供され、本方法は、哺乳動物への開示されたスクリーニング方法を使用して同定された薬剤の投与を含む。

10

【0033】

上述および本開示の他の特徴は、以下のいくつかの実施形態の詳細な説明により、より明確になるだろう。

【0034】

いくつかの態様の詳細な説明

略語および用語

以下の用語および方法に関する説明は、本発明をより良く説明し、本発明の実施に際して当業者を導くものである。単数形は、内容が明確に指示しない限り1つあるいは2つ以上を言及する。例えば、「OAリスク関連分子を備える」という表現は、単数または複数のOAリスク関連分子を含み、「少なくとも1つのOAリスク関連分子を備える」という語句と同等にみなされる。「あるいは（または）」という用語は、内容が明確に示唆しない限り、述べられた代替要素の1つ、あるいは2つ以上の要素の組み合わせを言及する。本明細書で使用されるように、「備える」は「含む」を意味する。したがって、「AまたはBを備える」は、追加要素を除外せずに「A、BあるいはAおよびBを含む」という意味である。

20

【0035】

説明されない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語および科学用語は、本発明を所有する当業者が一般的に理解する意味を有する。本明細書で説明される方法および構成要素と類似あるいは同等の方法および構成要素が、本発明の実施あるいは試験に際して使用可能であるが、適切な方法および構成要素を以下に説明する。構成要素、方法および例は、実施例となるだけのものであり、制限するものではない。

30

【0036】

OA：骨関節炎

【0037】

RCA：ローリングサークル型増幅

【0038】

投与：任意の効果的な経路によって被験者に薬剤を与えること。投与の典型的経路として、経口、注射（関節内、皮下、筋内、皮内、腹腔内、静脈内など）、舌下、直腸、経皮（関節の真上あるいは全身のいずれか）、鼻内、腔内および吸入の経路があるが、これらに限定されない。

40

【0039】

核酸分子を増幅する：例えば、OA関連遺伝子の領域などの、遺伝子あるいは遺伝子の断片などの核酸分子の転写数を増加する。得られた産物は増幅産物と称される。

【0040】

インビトロでの増幅の一例として、試料中の核酸分子とのプライマーのハイブリダイゼーションを可能にする条件の下で、被験者から得られた生体試料が一对のオリゴヌクレオチドプライマーと接触するポリメラーゼ連鎖反応（PCR）がある。プライマーは、適切な条件の下で延長され、鋳型から分離し、そして核酸分子の転写数を増幅するためにリアニール、延長、分離される。その他のインビトロ増幅法の例として、定量的リアルタイム

50

PCR法、鎖置換増幅(USPN5, 744, 311を参照)、転写なし等温増幅(USPN6, 033, 881を参照)、修復連鎖反応増幅(WO90/01069を参照)、リガーゼ連鎖反応増幅(EP-A-320 308を参照)、ギャップ充填リガーゼ連鎖反応増幅(USPN5, 427, 930を参照)、結合リガーゼ検知およびPCR(USPN6, 027, 889を参照)、およびNASBA(商標)RNA転写なし増幅(USPN6, 025, 134を参照)があげられる。

【0041】

抗炎症剤：炎症を減らす、あるいは防ぐ薬剤。抗炎症剤は、1つ以上の鎮痛、解熱または抗炎症作用を有する。例えば、シクロオキシゲナーゼの非選択的抑制剤のように作用する非ステロイド性抗炎症薬(NSAID)(アスピリン、イブプロフェン、ナプロキセン、エトドラク、フェノプロフェンカルシウムなど)、あるいはシクロオキシゲナーゼ-2(COX-2)またはCOX-3を選択的に阻害する非ステロイド性抗炎症薬があるが、これらに限定されない。抗炎症剤の投与は、OAの治療の一つであり、例えば、患部関節の疼痛および膨れを軽減する。OAの治療に使用される他の薬剤には、グルコサミンおよびコンドロイチン硫酸およびそれらの誘導体、カスパーゼ、テトラサイクリン誘導体、マトリックスメタロプロテイナーゼおよびIL-1の抑制剤および調節剤(IL-1変換酵素阻害薬など)、誘導型一酸化窒素合成酵素(iNOS)、P38、MEK-1/2、およびペルオキシソーム増殖因子活性化受容体(PPAR)がある。

10

【0042】

アレイ：生体高分子(タンパク質または核酸分子など)または生体試料(組織切片など)などの、基盤上あるいは基盤内のアドレス可能な記憶場所にある分子の配列。「マイクロアレイ」は、評価あるいは分析のために、顕微鏡検査を必要とする、または使用できるように小型化されたアレイである。

20

【0043】

分子(「特徴」)のアレイによって、試料に対して一度に多数の分析が可能となる。特定のアレイの例において、1つ以上の分子(オリゴヌクレオチドプローブまたは抗体など)は、例えば、内部制御を提供するために、複数回(2回など)アレイ上で発生する。アレイ上のアドレス可能な記憶場所の数は変化し、例えば、少なくとも4から少なくとも10、少なくとも16、少なくとも20、少なくとも30、少なくとも50、少なくとも75、少なくとも100、少なくとも150、少なくとも200、少なくとも300、少なくとも500、少なくとも1,000、少なくとも10,000、あるいはそれ以上となる。

30

【0044】

アレイ内では、各配列された試料の位置がアレイの少なくとも二次元の中で確実かつ一様に判定可能であるという点で、各配列された試料はアドレス可能である。アレイの特徴適用位置は、異なる形が想定可能である。例えば、アレイは規則的(均一な行および列に配列されているなど)、あるいは不規則的である。したがって、秩序アレイにおいて、各試料の位置は、アレイに適用される際に試料に割り当てられ、適切な標的または特徴位置と各位置を相互に関連付けるために、鍵が与えられる場合がある。多くの場合、秩序アレイは、左右対称の格子図形で配列されるが、試料は他の図形で配列されることがある(放射状に分布された線、渦巻線、または秩序クラスターなど)。アドレス可能なアレイは、コンピュータがその位置にある試料に関する情報(例えば、信号強度などを含むハイブリダイゼーションまたは結合データ)とアレイ上の特定のアドレスを相互に関連付けるようプログラミングされるという点において、通常、コンピュータに読み込み可能である。コンピュータに読み込み可能な形式のいくつかの例では、アレイの個々の特徴は、例えば、デカルト格子図形で規則的に配列され、コンピュータによってアドレス情報と相互に関連付けられる。

40

【0045】

タンパク質に基づくアレイには、タンパク質である、あるいはタンパク質を含むプローブ分子、または標的分子がタンパク質である、あるいはタンパク質を含む場所、およびタ

50

ンパク質が結合した核酸などのアレイ、またはその逆のものがある。いくつかの例において、アレイには、例えば、表 8 および 10 ~ 13 に挙げられるタンパク質の少なくとも 4、少なくとも 5、少なくとも 6、少なくとも 7、少なくとも 8、少なくとも 9、少なくとも 10、少なくとも 14、少なくとも 16、少なくとも 20、少なくとも 25、少なくとも 30、または少なくとも 35 のタンパク質など、例えば、表 8 および 10 ~ 13 に挙げられる少なくとも 4 つの抗体の組み合わせなどの、特に OA リスク関連タンパク質と結合する抗体が含まれる。

【0046】

アレイには、例えば、約 15 ~ 40 ヌクレオチドの長さの、長さ少なくとも 15 ヌクレオチドのオリゴヌクレオチド配列などの核酸分子が含まれる。ある例では、アレイは、例えば、表 8 および 10 ~ 13 に挙げられる少なくとも 4、少なくとも 5、少なくとも 6、少なくとも 7、少なくとも 8、少なくとも 9、少なくとも 10、少なくとも 14、少なくとも 16、少なくとも 20、少なくとも 25、少なくとも 30、少なくとも 35、または少なくとも 35 の配列など、例えば、表 8 および 10 ~ 13 に挙げられる少なくとも 4 つのオリゴヌクレオチドプローブあるいはプライマーの任意の組み合わせなどの、OA リスク関連配列を検知するために使用可能なオリゴヌクレオチドプローブあるいはプライマーを含む。

10

【0047】

結合または特異結合：核酸分子の他の核酸分子（またはそれ自体）へのハイブリダイゼーションなどの、2 つの物質あるいは分子間での連関、抗体のペプチドとの連関、あるいはタンパク質の他のタンパク質または核酸分子との連関。

20

【0048】

オリゴヌクレオチド分子は、十分な量のオリゴヌクレオチド分子が塩基対を形成、またはその標的核酸分子にハイブリダイズされる場合、標的核酸分子に結合、あるいは安定的に結合し（OA リスク関連 cDNA または mRNA など）、その結合の検知を可能にする。結合は、例えば、標的（オリゴヌクレオチド複合体）の物理的または機能的特性によって、当業者に周知の任意の方法で検知可能である。例えば、結合は、結合が遺伝子の発現、DNA 複製、転写、翻訳などの生合成過程で観察可能な影響を有するかどうかを判定することによって、機能的に検知可能である。核酸分子の相補鎖の結合を検知する物理的方法には、sDNA sel あるいは化学的フットプリント法、ゲルシフトおよび親和性切断

30

【0049】

抗体は、標的タンパク質のみと実質的に結合し、標的タンパク質を含む試料中の他のタンパク質と実質的に結合しない場合、標的タンパク質（OA リスク関連タンパク質など）と特異的に結合する。そのような特異性は、ウエスタンブロット法、酵素免疫測定法（ELISA）、免疫拡散法、インサイチュー免疫学的検定（例えば、コロイド金、酵素またはラジオアイソトープラベルを使用して）、凝集反応、免疫電気泳動法、放射性アレルギー吸着試験（RAST）、蛍光顕微鏡法、フローサイトメトリー、グリッド、ドット、組織ブロットおよびオイルゲージ法、あるいは抗体アレイなどの当技術分野において周知の方法を使用して判定可能である。

40

【0050】

骨関節炎の臨床的適応：OA の被験者に伴う 1 つ以上の徴候あるいは症状。特定例として、疼痛（一般的に手、腰、膝または足、時々、背骨）、関節の圧痛および偶発的膨れ、長い非活動時間（睡眠後の朝あるいは長時間座った後）後の凝り（例えば、1 時間以内で続く）、関節の制限された動き、関節の変形（通常、骨関節炎の後期）、疼痛を伴う関節の亀裂または「きしみ」（捻髪音）、および当業者によって認識される関節に及ぶ影響があるが、これらに限定されない。

【0051】

50

相補性および相補性の割合：相補的核酸を有する分子は、ワトソクリック型、フーグスティー型あるいは逆フーグスティー型塩基対を形成することによって、鎖がお互いに結合する（ハイブリダイズ）際に、安定した二本鎖あるいは三本鎖を形成する。オリゴヌクレオチド分子が、検知可能な程度で、所要の条件の下で標的核酸配列と結合したままである場合、安定した結合が生じる。

【0052】

相補性とは、1つの核酸の塩基が、第二の核酸の鎖の塩基（例えば、OAリスク関連核酸分子にハイブリダイズすることが可能な、アレイ上の核酸分子など）を有する塩基対（被験者から得られた核酸分子など）を残す程度を表す。相補性は割合で表され、すなわち2つの鎖間または2つの鎖の特定領域や範囲内に塩基対を形成するヌクレオチドの比率を表す。例えば、15-ヌクレオチドオリゴヌクレオチドの10ヌクレオチドが、核酸分子の目標とされた領域を有する塩基対を形成する場合、そのオリゴヌクレオチドは、核酸の領域に対して66.67%の相補性が目標となると言われる。

10

【0053】

本発明において、「十分な相補性」とは、検知可能な結合を達成するために、オリゴヌクレオチド分子および標的核酸配列（例えば、表8および10～13に挙げられる任意の配列などの、OAリスク関連配列など）の間には十分な数の塩基対が存在するということを意味する。形成された塩基対の割合で表示または測定される場合、この目標を達成する相補性の割合は、最低約50%の相補性から完全な（100%）相補性まで変動可能である。一般的に、十分な相補性は、例えば、少なくとも約75%の相補性、少なくとも約90%の相補性、少なくとも約95%の相補性、少なくとも約98%の相補性、あるいは少なくとも約100%の相補性など、少なくとも約50%である。

20

【0054】

当業者が所望の条件での使用に適切なオリゴヌクレオチドを設計できるようにする結合条件の確立に関わる定性的および定量的考慮の徹底的な治療は、Beltzらによって提供される。Methods Enzymol. 100:266-285、1983、およびSambrookら（編集）、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第二版、1～3巻、コールドスプリングハーバー研究所プレス（Cold Spring Harbor Laboratory Press）、コールドスプリングハーバー、ニューヨーク州、1989。

30

【0055】

DNA（デオキシリボ核酸）：ほとんどの生体の遺伝物質を含む長い鎖状重合体（リボ核酸、RNAを含む遺伝子を有するウイルスもある）。DNA重合体の繰り返し単位は、4つの異なるヌクレオチドであり、それぞれ、リン酸基が付着するデオキシリボース糖と結合するアデニン、グアニン、シトシンおよびチミンの4つの塩基のうち1つを含む。コドンと称される、DNA分子中のヌクレオチドのトリプレットは、ペプチドにあるアミノ酸をコードする。

【0056】

特異的活性：増減などの、遺伝子（OAリスク関連遺伝子など）のメッセンジャーRNAへの発現、mRNAのタンパク質への変換、タンパク質の生物活性、タンパク質の量における差異、またはその組み合わせ。いくつかの例において、差異は、現在OAではない被験者またはOAを発症する危険性がない被験者において予期される遺伝子発現あるいはタンパク質提示の量、またはOAである、あるいは将来、OAを発症する危険性がある被験者において予期される量などの、対照あるいは基準値と相対的である。特異的活性の検知には、遺伝子発現の変化の測定が含まれる。具体例では、特異的活性の検知には、タンパク質提示の相対量の判定が含まれる。

40

【0057】

特異的活性判定のための、試料に対する比較用の対照あるいは基準は、場合により任意で設定されるかもしれないが、検査値のみならず、正常と思われる試料（例えば、OAではない被験者あるいはOAを発症する危険性がない被験者からの試料など、所望の特徴を

50

有するよう改変されていないという点で)も含まれるが、それらの値は実験室によって異なるということを留意しなければならない。実験室基準および基準値は、周知あるいは決められた母集団値に基づいて設定可能であり、測定され実験的に決定した値の比較を可能にするグラフまたは表の形式において提供可能である。

【0058】

下方制御した、または不活性化：タンパク質の発現あるいは生物活性に関連して使用される場合、タンパク質の生物活性を低下させる任意の過程のみならず、タンパク質の産出を低下させる任意の過程(例えば、遺伝子の転写またはmRNAの翻訳の低下)も言及する。

【0059】

転写を低下させる過程の例として、転写開始複合体の低下を促進する過程、転写開始率を低下させる過程、転写伸長速度を低下させる過程、転写過程を低下させる過程、および転写抑制を低下させる過程が挙げられる。遺伝子の下方制御には、既存のレベルを超える発現の低下が含まれる。翻訳を低下させる過程の例として、翻訳開始を低下させる過程、翻訳伸長を低下させる過程、およびmRNA安定性を低下させる過程が挙げられる。タンパク質の活性を低下させる過程の例として、タンパク質を分解する過程、あるいは1つ以上の標的と相互に作用するために、タンパク質の能力を妨害する過程が挙げられる。

【0060】

遺伝子の下方制御には、OAリスク関連遺伝子産物などの遺伝子産物の産出における任意の検知可能な低下が含まれる。特定例において、遺伝子産物の産出は、対照(同種の正常細胞における遺伝子発現の量など)と比べて、例えば、少なくとも5倍、または少なくとも10倍など、少なくとも4倍に低下する。一例では、対照は、現在OAではない被験者あるいはOAの危険性が検知されない被験者の、血清などの生体試料における遺伝子発現またはタンパク質発現の相対量である。

【0061】

タンパク質の下方制御あるいは不活性化は、OAリスク関連タンパク質などの、タンパク質における任意の検知可能な低下を含む。一例では、検知可能なOAリスク関連タンパク質の量は、対照(同種の正常細胞における同一タンパク質の量など)と比べて、例えば、少なくとも5倍、または少なくとも10倍など、少なくとも4倍に低下する。一例において、対照は、現在OAではない被験者あるいはOAの危険性が検知されない被験者の、血清などの生体試料でのタンパク質提示の相対量である。

【0062】

骨関節炎を評価する：例えば、被験者がOAを患っているかどうか(膝や手など)を判定し、被験者が将来、OAを発症する危険性が高いかどうかの判定、OAの診断の確認、被験者のOAの重症度の判定、OAを有する被験者の起こり得る回復、OAを有する被験者、あるいはOAを発症する危険性が高い被験者に対する適切な治療の判定、被験者のOAの進行度の把握などのため、あるいはその組み合わせのために、被験者のOAの状態を判定する。

【0063】

発現：タンパク質合成など、遺伝子のコード化された情報が細胞の使用可能、使用不可能または構造上の部分に変換される過程。

【0064】

遺伝子発現プロファイル(フィンガープリント)：差次的または変化した遺伝子発現は、遺伝子発現(cDNAまたはmRNAなど)の検知可能な量の変化、あるいはそれらの遺伝子によって発現したタンパク質の検知可能な量の変化によって検知可能である。例えば、ESTなどの、明確な一連の遺伝子や遺伝子を指標とする核酸の高発現および低発現のパターンなどの、遺伝子発現の識別可能あるいは特定可能なパターンであり、いくつかの例において、わずか1つあるいは2つの遺伝子はプロファイルを提供するが、それ以上の遺伝子がプロファイルにおいて使用される場合があり、例えば、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも8、少

10

20

30

40

50

なくとも10、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも18、少なくとも20、少なくとも25、あるいは少なくとも30またはそれ以上の遺伝子である。遺伝子発現プロファイル(フィンガープリントとも称される)は、組織や細胞の種類(血清など)、正常な組織増殖または疾患の増悪(OAなど)の特定の段階、あるいは予見可能な形で遺伝子発現に影響を与える任意の他の識別可能または特定可能な条件と関連可能である。遺伝子発現プロファイルには、特定の遺伝子の絶対的発現レベルのみならず、相対的なものが含まれ、基準または対照の試料プロファイル(OAではない被験者の試料など)と比べると、試験試料の内容において見ることができる。一例において、被験者における遺伝子発現プロファイルは、アレイ(核酸またはタンパク質アレイなど)によって判定される。

10

【0065】

ハイブリダイゼーション: DNA、RNAの2つの鎖の相補的領域の間、またはDNAとRNAの間に塩基対を形成し、それによって、例えば、被験者から得られた核酸分子とOAリスク関連核酸分子の間に二本鎖分子を形成するなど、二本鎖分子を形成する。特有のストリンジェンシーをもたらすハイブリダイゼーション条件は、ハイブリダイゼーション方法の性質、ハイブリダイゼーションする核酸配列の構成および長さによって異なる。一般的に、ハイブリダイゼーション温度およびハイブリダイゼーション緩衝液のイオン強度(Na⁺濃度など)が、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーを判定する。特有のストリンジェンシーに到達するためのハイブリダイゼーション条件に関する計算は、Sambrookらの(1989)Molecular Cloning、第二版、コールドスプリングハーバー研究所プレス(Cold Spring Harbor Laboratory)、プレーンビュー、ニューヨーク州(第9章および11章)で検討されている。以下は、一連のハイブリダイゼーション条件例であるが、これに限定するものではない。

20

【0066】

非常に高いストリンジェンシー(90%の同一性を占める配列を検知する)

ハイブリダイゼーション: 5xSSC、65度で16時間

洗浄2回: 2xSSC、それぞれ室温(RT)で15分

洗浄2回: 0.5xSSC、それぞれ65度で20分

高いストリンジェンシー(80%以上の同一性を占める配列を検知する)

ハイブリダイゼーション: 5x~6xSSC、65度~70度で16~20時間

洗浄2回: 2xSSC、それぞれRTで5~20分

洗浄2回: 1xSSC、それぞれ55度~70度で30分

低いストリンジェンシー(50%を超える同一性を占める配列を検知する)

ハイブリダイゼーション: 6xSSC、RT~55度で16~20時間

少なくとも2回の洗浄: 2x~3xSSC、RT~55度それぞれ20~30分

30

【0067】

インターロイキン(IL)-15: 生得の適応免疫システムに關与する多面性炎症性サイトカイン。IL-15は、T細胞、好中球およびマクロファージの活性化を促進し、炎症性サイトカインIL-17、IL-6および腫瘍壊死因子の産出を誘導する。いくつかの例において、IL-15は、ナチュラルキラー(NK)細胞の発達、ホメオスタシス、機能および生存にとって不可欠である。

40

【0068】

IL-15という用語は、任意のIL-15遺伝子、cDNA、mRNA、あるいは任意の生物からのタンパク質、すなわち、T細胞、好中球およびマクロファージを活性化するIL-15を含む。IL-15配列は、公的に入手可能である。例えば、GenBank Accession Nos:それぞれY09908およびCAA71044公開ヒトIL-15核酸およびタンパク質配列、およびGenBank Accession Nos:それぞれU14332およびAAA75377公開マウスIL-15核酸およびタンパク質配列がある。

50

【0069】

一例において、IL-15配列には、IL-15対立遺伝子多型、変異型、断片、ホモログあるいはT細胞、好中球およびマクロファージを活性化する能力を保持する融合配列のみならず、完全長野生型（または自然型）配列も含まれる。ある例では、IL-15は、自然型IL-15に対して、例えば、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、あるいは少なくとも98%など、少なくとも80%の配列同一性を有する。他の例では、IL-15は、GenBank Accession No. Y09908またはU14332に記述されている配列に、非常に高いストリンジェンシー条件（例えば、上記を参照）の下でハイブリダイズし、IL-15活性を保持する配列を有する。さらに他の例では、IL-15タンパク質は、IL-15抗体と結合可能な配列を有する。

10

【0070】

単離された：「単離された」生物学的要素（核酸分子、タンパク質あるいは細胞など）は、他の染色体および染色体外DNAおよびRNA、タンパク質および細胞などの、要素が自然に発生する生物の細胞あるいは生物自体にある他の生物学的要素から実質的に分離、あるいは精製されている。「単離された」核酸分子およびタンパク質は、標準的な精製法によって精製された核酸分子およびタンパク質を含む。この用語は、化学的に合成した核酸分子およびタンパク質のみならず、宿主細胞での組み換え発現によって精製された核酸分子およびタンパク質も含む。一例において、生物学的要素は、例えば、被験者から得られた血清検体などの、被験者から単離された血清である。

20

【0071】

ラベル：例えば、ELISA、分光光度法、フローサイトメトリー、あるいは顕微鏡法などで検知可能な薬剤である。例えば、ラベルは核酸分子またはタンパク質に付着可能で（直接的または間接的に）、それによって核酸分子またはタンパク質の検知を可能にする。ラベルの例として、放射性同位体、酵素基盤、共同因子、リガンド、化学発光薬、蛍光プローブ、ハプテン、酵素、およびその組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。ラベリング法および様々な目的に適切なラベルの選択指導は、例えば、Sambrookらの研究（Molecular Cloning: A Laboratory Manual、コールドスプリングハーバー、ニューヨーク州、1989）およびAusubelらの研究（In Current Protocols in Molecular Biology、ジョン・ワイリー・アンド・サンズ John Wiley & Sons、ニューヨーク州、1998）において検討されている。

30

【0072】

マトリックスメタロプロテイナーゼ（MMP）-7：細胞外基質に作用可能な分泌性プロテアーゼ、および、それによって細胞移動および組織修復を調整する。また、当業者ではマトリリシンと称される。いくつかの例において、MMP-7はタンパク質分解的にプロデフェンシンなどの抗菌性ペプチドを活性化する。

【0073】

MMP-7という用語は、任意のMMP-7遺伝子、cDNA、mRNAあるいは任意の生物からのタンパク質および細胞移動および組織修復を調整するよう機能するMMP-7であるタンパク質を含む。MMP-7配列は、公的に入手可能である。例えば、GenBank Accession Nos：それぞれAY795972およびAAV40839公開ヒトMMP-7核酸およびタンパク質配列、およびGenBank Accession Nos：それぞれNM_010810およびNP_034940公開マウスMMP-7核酸およびタンパク質配列がある。

40

【0074】

一例において、MMP-7配列には、MMP-7対立遺伝子多型、変異型、断片、ホモログあるいは細胞移動および組織修復を調整する能力を保持する融合配列のみならず、完全長野生型（または自然型）配列も含まれる。ある例では、MMP-7は、自然型MMP-7に対して、例えば、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、あるいは少なくとも98%などの、少なくとも80%の配列同一性を有する。他の例では、MMP

50

-7は、GenBank Accession No. AY795972またはNM_010810に記述されている配列に、非常に高いストリンジェンシー条件（例えば、上記を参照）の下でハイブリダイズし、MMP-7活性を保持する配列を有する。さらに他の例では、MMP-7タンパク質は、MMP-7抗体と結合可能な配列を有する。

【0075】

核酸アレイ：cDNAアレイで見られるアレイあるいはオリゴヌクレオチドアレイなど、基質上に割り当てられた位置にある核酸（DNAまたはRNAなど）の配列。

【0076】

核酸分子：cDNA、mRNA、ゲノムのDNAおよび合成の（例えば、化学的に合成した）DNAを含むがこれに限定されない、デオキシリボヌクレオチドあるいはリボヌクレオチド重合体。核酸分子は、二本鎖あるいは一本鎖になり得る。一本鎖の場合、核酸分子は、センス鎖あるいはアンチセンス鎖になり得る。さらに、核酸分子は円形または直線になり得る。

10

【0077】

本発明は、例えば、表8および10～13に挙げられるタンパク質をコード化する分子などの、OAリスク関連ヌクレオチド配列の特定された長さを含む単離された核酸分子を含む。そのような分子には、これらの配列の少なくとも10、少なくとも15、少なくとも20、少なくとも25、少なくとも30、少なくとも35、少なくとも40、少なくとも45、少なくとも50、あるいはそれ以上の連続したヌクレオチドが含まれ、OAリスク関連核酸分子の任意の領域から取得可能である。

20

【0078】

ヌクレオチド：ピリミジン、プリンまたはその合成類似化合物などの糖に結ばれた塩基、あるいはペプチド核酸（PNA）に見られるようなアミノ酸に結ばれた塩基を含む単量体が含まれるが、これらに限定されない。ヌクレオチドは、ポリヌクレオチドにある1つの単量体である。ヌクレオチド配列は、ポリヌクレオチドにある塩基の配列を言及する。

【0079】

オリゴヌクレオチド：長さ約6～約300ヌクレオチドの間の、自然型リン酸ジエステル結合によって結合した複数の結合ヌクレオチド。オリゴヌクレオチド類似体は、オリゴヌクレオチドと同様の機能をする構成部分を言及するが、非自然的に発生する部分を有する。例えば、オリゴヌクレオチド類似体には、ホスホロチオエートオリゴデオキシヌクレオチドなどの、変化した糖成分あるいは糖質間の連鎖など、非自然的に発生する部分が含まれる。

30

【0080】

特定のオリゴヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド類似体には、少なくとも6ヌクレオチド、例えば、少なくとも8、少なくとも10、少なくとも15、少なくとも20、少なくとも21、少なくとも25、少なくとも30、少なくとも35、少なくとも40、少なくとも45、少なくとも50、少なくとも100、あるいは少なくとも200ヌクレオチドの長ささえ、あるいは約6～約50ヌクレオチドなど、例えば12、15、または20ヌクレオチドなどの約10～25ヌクレオチドの、OAリスク関連核酸配列（DNAあるいはRNAなど）の、長さ約200ヌクレオチドまでの直線配列が含まれる。

40

【0081】

オリゴヌクレオチドプローブ：分子雑種形成によって相補配列の存在を検知するために使用される、長さ少なくとも8、少なくとも10、少なくとも15、少なくとも20、少なくとも21、少なくとも25、あるいは少なくとも30ヌクレオチドなどの、ヌクレオチドの短配列。特定例において、オリゴヌクレオチドプローブは、オリゴヌクレオチドプローブ：標的配列ハイブリダイゼーション複合体の検知を可能にするラベルを含む。例えば、オリゴヌクレオチドプローブは、OAリスク関連核酸分子の存在を検知するために使用可能である。

【0082】

骨関節炎：骨がお互いに擦れ合うまで、軟骨の進行性破壊を引き起こす関節軟骨の疾患

50

。これは、組織および下層の骨に損傷を与え、骨関節炎の痛みを伴う関節症状を引き起こす。骨関節炎は、最も多く見られる形の関節炎であり、指、腰、膝、足あるいは背骨の関節に多く影響を与える。

【0083】

骨関節炎リスク：膝または手のOAなど、被験者が現在OAであるという可能性、あるいは将来、OAを発症する可能性。

【0084】

骨関節炎リスク関連（または連関）分子：OAの影響を受ける活性（cDNAまたはmRNAの発現、あるいはタンパク質の量など）を有する分子。そのような分子は、例えば、核酸配列（DNA、cDNAまたはmRNAなど）およびタンパク質を含む。具体例として、活性がOAの存在あるいはOA発症の危険性に反応して変化した（上方制御した、または下方制御した、など）完全長遺伝子、cDNAあるいはmRNA（および、それによってコード化したタンパク質）の断片のみならず、表8および10～13に挙げられる分子がある。

10

【0085】

活性がOAに反応して上方制御されたOAリスク関連分子の例として、IL-15、sVAP-1およびMMP-7がある。OAの発症以前に、活性が下方制御したOAリスク関連分子の例として、PAI-1、DD5、DD6、Eot2、ICAM-1、MMP-2およびP-セレクチンがある。

【0086】

OAリスク関連分子は、原因となる（OAリスク関連分子の変化が、OAの発症あるいは進行となるという点において）あるいは結果となる（OAの発症あるいは進行が、OAリスク関連分子の変化となるという点において）など、多くの違った意味で、OAに関与したり影響を受けたりすることがある。

20

【0087】

プラスミノゲンアクチベーター阻害剤（PAI）-1：インビボのプラスミノゲン活性化の主要な生理学的阻害剤であるセリンプロテイナーゼ阻害剤であるので、線溶系の主要な調節因子である。特定例において、PAI-1は、創傷治癒、アテローム性動脈硬化、代謝障害（肥満およびインスリン抵抗性など）、腫瘍の血管新生、慢性ストレス、骨再形成、ぜんそく、関節リウマチ、線維症、糸球体腎炎および敗血症において機能的役割を果たす。

30

【0088】

PAI-1という用語は、任意のPAI-1遺伝子、cDNA、mRNA、あるいは任意の生物からのタンパク質、すなわち、プラスミノゲンアクチベーターを低下または阻害するPAI-1を含む。MMP-7配列は、公的に入手可能である。例えば、GenBank Accession Nos：それぞれX04744およびCAA28444公開ヒトPAI-1核酸およびタンパク質配列、およびGenBank Accession Nos：それぞれM33960およびAAA39887公開マウスPAI-1核酸およびタンパク質配列がある。

【0089】

一例において、PAI-1配列は、PAI-1対立遺伝子多型、変異型、断片、ホモログあるいは、プラスミノゲンアクチベーターを低下あるいは阻害する能力を保持する融合配列のみならず、完全長野生型（または自然型）配列も含まれる。ある例では、PAI-1は、自然型PAI-1に対して、例えば、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、あるいは少なくとも98%など、少なくとも80%の配列同一性を有する。他の例では、PAI-1は、GenBank Accession No. X04744またはM33960に記述されている配列に、非常に高いストリンジェンシー条件の下でハイブリダイズし、PAI-1活性を保持する配列を有する。さらに他の例では、PAI-1タンパク質は、PAI-1抗体と結合可能な配列を有する。

40

【0090】

50

プライマー：例えば、12、15、20、25、30または50ヌクレオチド、あるいはそれ以上の長さの、長さ10～100ヌクレオチドのDNAオリゴヌクレオチドなどの短い核酸分子。プライマーは、プライマーと相補標的DNA鎖(OAリスク関連DNAなど)の間にハイブリッドを形成するために、核酸雑種形成によって相補的標的DNA鎖にアニール可能である。プライマー対は、PCRまたは当技術分野で周知の他の核酸増幅法などによって、核酸配列の増幅に使用可能である。

【0091】

核酸プライマーの調製法および使用法は、例えば、Sambrookら(In Molecular Cloning: A Laboratory Manual、CSHL、ニューヨーク州、1989)、Ausubelら(編集)(In Current Protocols in Molecular Biology、ジョン・ワイリー・アンド・サンズ John Wiley & Sons、ニューヨーク州、1998)、および Innisら(PCR Protocols、A Guide to Methods and Applications、アカデミックプレス社 Academic Press Inc.、サンディエゴ、カリフォルニア州、1990)で記載される。PCRプライマー対は、例えば、Primer (Version 0.5、(著作権)1991、ホワイトヘッド研究所 Whitehead Institute for Biomedical Research、ケンブリッジ、マサチューセッツ州)など、その用途に適したコンピュータプログラムなどを使用して、周知の配列から派生可能である。当業者は、特定のプライマーの特異性の長さに伴う増加を高く評価するであろう。したがって、例えば、OAリスク関連核酸配列の30の連続したヌクレオチドを含むプライマーは、15ヌクレオチドのみの対応するプライマーより高い特異性を有する、指定されたOAリスク関連分子の他のホモログなどの標的配列にアニールする。そのため、より高い特異性を得るために、少なくとも20、少なくとも25、少なくとも30、少なくとも35、少なくとも40、少なくとも45、少なくとも50、あるいはそれ以上連続したOAリスク関連ヌクレオチド配列を含むプライマーが、選択可能である。

【0092】

タンパク質：少なくとも10のアミノ酸を含む配列などの、アミノ酸の重合体。本発明は、例えば、表8および10～13に挙げられるタンパク質など、OAリスク関連タンパク質の完全長または断片を含むタンパク質を含む。

【0093】

タンパク質(またはペプチド)アレイ：RCAタンパク質チップにおいて見られるアレイなど、基質上で割り当てられた位置にあるタンパク質(抗体など)の配列。そのようなアレイは、血清試料中のOAリスク関連タンパク質の量など、試料中にある1つ以上のタンパク質の量を同定および定量化するために使用可能である。

【0094】

精製した：「精製した」という用語は、必ずしも完全な純度を意味するものではなく、むしろ、相対語としての目的を持つ。したがって、例えば、精製したタンパク質製剤は、言及されるタンパク質が、細胞内の自然な状態にあるタンパク質より高い純度のタンパク質であるタンパク質製剤のことである。例えば、タンパク質製剤は、タンパク質が製剤の総タンパク量の少なくとも50%に相当するよう精製される。同様に、精製したオリゴヌクレオチド製剤は、オリゴヌクレオチドが、オリゴヌクレオチドの複合混合物を含む状態の製剤より高い純度である製剤のことである。さらに、精製した血清試料は、血清が、血清検体に存在する他の構成要素から実質的に分離している血清試料のことである。

【0095】

ローリングサークル型増幅(RCA)：配列が1つ以上の抗体を通してOAリスク関連分子に付着するなどの、核酸配列の複転写を発生させる過程(等温過程など)であり、産物の蓄積が時間とともに直線的に進行する。例となる方法は、本明細書に記載されており、さらに、KingsmoreおよびPatel(Curr. Opin. Biotech、14:74-81、2003、およびPerleeeら、Proteome Sci.、

10

20

30

40

50

2 : 9、2004)において公開されている。

【0096】

試料：被験者から得られた、ゲノムのDNA、RNA (mRNA など)、タンパク質あるいはその組み合わせを含む生物検体。例として、血清または血漿、尿、唾液、組織生検、外科標本、滑液、脳脊髄液および剖検材料など、末梢血あるいはその副構成要素があるが、これらに限定されない。ある具体例においては、試料は血清であり、あるいは血清を含む。

【0097】

可溶性血管付着タンパク質 (V A P) - 1 (s V A P - 1) : 血液 (または血清など、その画分) 中に見られる血管付着タンパク質 (V A P) の型。s V A P は、組織への血液循環からの運搬を促進するために、リンパ球および顆粒球を内皮細胞に付着する炎症誘導細胞の表面分子である。

10

【0098】

s V A P - 1 という用語は、任意の s V A P - 1 遺伝子、c D N A、m R N A、あるいは任意の生物からのタンパク質、すなわち、リンパ球および顆粒球を内皮細胞に付着可能な s V A P - 1 を含む。s V A P - 1 は、タンパク質分解切断による V A P - 1 の膜貫通型から派生したと考えられる (例えば、Kurki jar vi ら、J . Immunol .、161 : 1549-57、1998 を参照)。V A P - 1 の膜貫通および細胞質領域の欠失は、V A P - 1 の分子量の約 2 k D a のみの低下を引き起こす。V A P - 1 配列は、公的に入手可能である。例えば、GenBank Accession Nos : それぞれ NM _ 003734 および NP _ 003725 公開ヒト V A P - 1 核酸およびタンパク質配列、および GenBank Accession Nos : それぞれ AF078705 および AAC35839 公開マウス V A P - 1 核酸およびタンパク質配列がある。

20

【0099】

一例において、s V A P - 1 配列は、s V A P - 1 対立遺伝子多型、変異型、断片、ホモログあるいは、リンパ球および顆粒球を内皮細胞に付着する能力を保持する融合配列のみならず、完全長野生型 (または自然型) 配列も含む。ある例では、s V A P - 1 は、自然型 s V A P - 1 に対して、例えば、少なくとも 85 %、90 %、95 % あるいは 98 % など、少なくとも 80 % の配列同一性を有する。他の例では、s V A P - 1 は、GenBank Accession No . : NM _ 003734 または AF078705 に記述されている配列に、非常に高いストリンジェンシー条件の下でハイブリダイズし、s V A P - 1 活性を保持する配列を有する。さらに他の例では、s V A P - 1 タンパク質は、s V A P - 1 抗体と結合可能な配列を有する。

30

【0100】

被験者：人間および人間以外の哺乳動物を含むカテゴリーである、生きている多細胞脊椎動物。

【0101】

試験薬：タンパク質 (抗体など)、核酸分子、有機化合物、無機化合物、あるいは関与する他の分子などの、任意の物質であるが、これらに限定されない。特定例において、試験薬は、細胞膜を通過可能である (単独または担体の存在の下)。

40

【0102】

治療的有効量：単独または薬学的に容認可能な担体や 1 つ以上の追加治療薬とともに、所望の反応を誘導する医用調製物の量。抗炎症剤 (非ステロイド性抗炎症薬、NSAID など)、カプサイシンあるいはグルコサミン治療薬などの抗炎症剤は、治療的有効量で投与される。

【0103】

治療薬の有効量は、OA の軽減あるいは OA の被験者の生理的状態の改善のための検査など、多くの異なる方法で判定可能である。有効量も、様々なインビトロ、インビボまたはインサイチュアッセイによって判定可能である。

【0104】

50

治療薬は、例えば、治療の間、1日1回などの、単回投与または反復投与で投与可能である。しかしながら、有効量は、適用される起源、治療を受ける被験者、治療を受ける状態の重症度および種類、および投与方法によることがある。

【0105】

一例において、被験者のOAの症状を部分的または完全に軽減するに十分な量である。治療は、OAの進行を一時的に遅くするだけであるが、恒久的にOAの進行を停止あるいは後進することも可能である。例えば、医用調製物は1つ以上のOAの症状を軽減することができ、医用調製物の非使用と比較して、例えば、少なくとも20%、少なくとも50%、少なくとも70%、少なくとも90%、少なくとも98%、あるいは少なくとも100%、症状を軽減することが可能である。

10

【0106】

疾患を治療する：「治療」は、OAの兆候あるいは症状などの、疾患の兆候あるいは症状または病態を改善する治療的介入を言及する。治療は、OAなどの状態の寛解または回復の誘導も可能である。特定例において、治療は、例えば、疾患の完全な発症を抑制するなど、OAの発症防止などの疾患の防止を含む。疾患の防止は、必ずしも疾患が完全に存在しなくなることを意味するわけではない。例えば、少なくとも50%の低減でも十分である。

【0107】

十分な条件の下で：所望の活性を可能にする任意の環境を記載するために使用される表現。

20

【0108】

一例において、低酸素状態での細胞の培養などの、OAを模倣または誘導するために十分な条件の下での培養細胞（軟骨細胞など）を含む。

【0109】

他の例では、所望の活性を可能にするに十分な細胞培養あるいは被験者に試験薬を投与することを含む。特定例において、所望の活性は、OAリスク関連分子の活性（発現など）を変える。

【0110】

上方制御された、または活性化：タンパク質の発現あるいは生物活性に関連して使用される場合、タンパク質の生物活性を増加させる任意の過程のみならず、タンパク質の産出を増加させる任意の過程（例えば、遺伝子の転写またはmRNAの翻訳の増加）も言及する。

30

【0111】

転写を増加させる過程の例として、転写開始複合体の形成を促進する過程、転写開始率を増加させる過程、転写伸長速度を増加させる過程、転写過程を増加させる過程、転写抑制を軽減する過程（例えば、転写抑制体の結合を阻害することによる）が挙げられる。遺伝子上方制御には、既存のレベルを超える発現を刺激することのみならず、抑制も阻止可能である。翻訳を増加させる過程の例として、翻訳開始を増加させる過程、翻訳伸長を増加させる過程、mRNA安定性を増加させる過程がある。タンパク質の活性を増加させる過程の例として、タンパク質の分解を低下させる過程、あるいは1つ以上の標的と相互に作用するタンパク質の能力を高める過程が挙げられる。

40

【0112】

遺伝子の上方制御は、OAリスク関連遺伝子産物などの遺伝子産物の産出における任意の検知可能な増加が含まれる。特定例において、遺伝子産物の産出は、対照（同種の正常細胞における遺伝子発現の量など）と比べて、例えば、少なくとも5倍、または少なくとも10倍など、少なくとも4倍に増加する。一例では、対照は、現在OAではない被験者あるいはOAの危険性が検知されない被験者の、血清などの生体試料における遺伝子発現またはタンパク質発現の相対量である。

【0113】

タンパク質の上方制御あるいは活性化は、OAリスク関連タンパク質などの、タンパク

50

質における任意の検知可能な増加を含む。一例では、検知可能なOAリスク関連タンパク質の量は、対照（同種の正常細胞における同一タンパク質の量など）と比べて、例えば、少なくとも5倍、または少なくとも10倍など、少なくとも4倍に増加する。一例において、対照は、現在OAではない被験者あるいはOAの危険性が検知されない被験者の、血清などの生体試料でのタンパク質提示の相対量である。

【0114】

骨関節炎リスクの評価

発明者らは、活性が（核酸またはタンパク質の発現など）OAの後、あるいは発症前に変化した（上方制御したあるいは下方制御した、など）、少なくとも36のOAリスク関連分子を同定した。同定した分子の数は、使用したアルゴリズムの特異性および感受性によって異なった。例えば、分散分析を使用すると、19のOAリスク関連分子が同定され（表8および図4）、ANOVAおよびマイクロアレイ有意性解析（SAM）法の混合モデルを使用すると、22のOAリスク関連分子が同定された（表10および12、および図5）。IL-15およびsVAP-1などの、OAとあらかじめ関連性のない複数のOAリスク関連分子が同定された。

10

【0115】

これらのOAリスク関連分子の同定に基づき、ヒト以外の他の哺乳動物（例えば、動物の被験体）などの被験体におけるOAリスクを評価するための方法が開発された。OAリスクを評価する特定例として、健康な被験者でなければ、OAの疑いがある被験者あるいはOAの危険性がある被験者などの被験者が、OAであるか、または将来、OAを発症する危険性が高いかどうかの判定（例えば、他の臨床症状はないがOAの被験者）、OAの被験者におけるOAの重症度の判断、OAの被験者あるいはOA発症の疑いが高くなっている被験者の進行度の把握、特定の抗OA治療に反応するOAの被験者の同定、またはその組み合わせを含む。いくつかの例において、被験者から得られた血清は、OAリスクを評価するために使用される。しかしながら、当業者は、他の生体試料が使用可能になることを高く評価するであろう。

20

【0116】

特定例において、公開された本方法は、OAの以前の診断を確認するために使用される（例えば、レントゲン写真または他の画像検査法による診断）。例えば、被験者は、例えば、レントゲン写真または他の撮像法（MRIなど）を使用して、OAと診断されていたかもしれない。そのような例では、診断方法は、OAの診断を確認するため、診断の重症度を示すため、またはOAの進行を把握するために使用可能である。

30

【0117】

特定例において、公開された本方法は、OAに伴う徴候および症状の発症後に行われる。それらの症状の例として、疼痛、炎症、凝り、あるいは膝、手、足、腰または背骨など、患部関節の制限された動き、および当業者によって認識される関節に及ぶ他の影響があるが、これらに限定されない。

【0118】

いくつかの例において、本方法は、レントゲン写真または他の画像検査法の使用より早くにOAの検知を可能にする。したがって、本明細書に記載される試験は、いくつかの例において、OAの決定的な画像での証拠が周知される以前に、OAを検知可能である。例えば、OAの初期段階を検知するいくつかの画像診断法（レントゲン写真およびMRIなど）では困難であるため、本明細書で公開される方法は、レントゲン写真または他の画像検査法では検知不可能なOAの検知を可能にするかもしれない。そのため、いくつかの例において、本方法は、任意の診断画像検査（OAの解剖学的証拠を見つける検査など）を行う前に行われる。特定例において、本方法は、適当な量の感受性および特異性によって、被験者がOAである、または将来（少なくとも5年後、少なくとも10年後、あるいは少なくとも20年後など）、OAを発症する危険性があるかどうか判定可能である。

40

【0119】

特定例において、本方法は、さらに、OAの被験者、あるいは将来、OAを発症する危

50

険性が高い被験者に適切な治療を与える。検査結果は、抗OA治療が被験者に使用されるべきかどうかを判定するために使用可能（単独で、または他の臨床上の証拠あるいは画像との併用で）である。例えば、公開された方法を用いてOAを有すると同定または評価された被験者には、抗炎症剤（例えば、NSAID）などのOAを有すると確認された被験者にとって適切な治療が提供される。他の特定例では、公開された方法で、将来、OAを発症する危険性が高いと同定または評価された被験者は、グルコサミン、コンドロイチン硫酸およびそれらの誘導体の投与などの、適切な治療を与えられ、例えば、被験者のOAの発症を防止あるいは延期するために、体重がかかるOAに対する予防手段としての体重管理を始める、反復的損傷を少なくする動作の生体力学を改善する手段を開発する、OAを発症する危険性がある若年成人のスポーツ関連損傷を減少させ、回復プログラムを開始するプログラムを始める。

10

【0120】

被験者におけるOAリスクの評価に関するある特定例は、年齢に相関する、被験者における1つ以上のOAリスク関連分子の活性の判定を含む。見つかった、年齢に相関するOAリスク関連分子は、脳から派生した神経栄養因子（BDNF）、上皮増殖因子（EGF）、6Ckine、細胞間接着分子-3（ICAM-3）、TGF受容体II（TGF-RII）、ウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化受容体（UPAR）、血管細胞接着分子-1（VCAM-1）、インターロイキン2（IL-2）、インターフェロンにより誘発されるモノカイン（MIG）、マトリックスメタロプロテイナーゼ7（MMP7）および骨髄性前駆細胞抑制因子1（MIF-1）（図4も参照）であった。例えば、ICAM-3は、統計的に、60歳以上のOA被験者で上昇し、BDNF基準は、50歳までのOAでは低く、60歳以上のOAでは高かった。BDNFフォローアップは、60歳までのOAでは低く、それ以降はのOAでは高くなり、EGF基準は、50歳までのOA被験者では低く、60歳以上のOA被験者では確実に高くなった。IL-2の上昇は、50歳を下回るOA被験者では低く、65歳を上回る被験者では高かった。MIGは、統計的に、70歳以上のOA被験者で上昇し、MMP7は、OA被験者あるいは60歳またはそれより年下の被験者で高かった（基準はすべての年齢においてOAでは高い）。MIF1は、60歳またはそれより年下のOA被験者では高く（基準はすべての年齢においてOAでは高い）、プロラクチン基準は、50歳またはそれより年下のOA被験者では高かった。TGF-RIIは、60歳またはそれより年上のOAの被験者では高かった。

20

30

【0121】

したがって、被験者が60歳以上の場合、本方法には、ICAM-3、BDNF、IL-2、EGFあるいはTGF-RII（または、これらのうち1、2、3、4、5あるいは6つの組み合わせ）が被験者において活性を増加させたかどうかの判定が含まれ、このうち少なくとも1つの活性の増加の存在が、被験者のOAリスクが増加したことを示す（例えば、OAを有する、またはOAを発症する危険性が高い）。被験者が70歳以下の場合、本方法には、ICAM-3、BDNF、IL-2、TGF-RII、EGFあるいはMIG（または、これらのうち1、2、3、4、5あるいは6つの組み合わせ）が、被験者において活性を増加させたかどうかの判定が含まれ、これらのOAリスク関連分子の少なくとも1つの活性の増加の存在が、被験者のOAリスクが増加したことを示す（例えば、OAを有する、またはOAを発症する危険性が高い）。被験者が60歳以下の場合、本方法には、MMP-7あるいはMIF1（または、これらの2つの組み合わせ）が、被験者において活性を増加させたか、またはBDNFが被験者において活性を増加させたかどうかの判定が含まれ、これらのOAリスク関連分子の少なくとも1つの活性の増加の存在が、被験者のOAリスクが増加したことを示す（例えば、OAを有する、またはOAを発症する危険性が高い）。被験者が50以下の場合、本方法には、MMP-7、MIF1、EGFあるいはBDNF（または、これらのうち2、3あるいは4つなどの組み合わせ）が、被験者において活性を増加させたか、またはプロラクチン活性の増加があるかどうかの判定が含まれ、これらのOAリスク関連分子の少なくとも1つの特異的活性の

40

50

存在が、被験者の O A リスクが増加したことを示す（例えば、O A を有する、または O A を発症する危険性が高い）。

【 0 1 2 2 】

さらに、本発明は、老化または性別に伴う差次的発現を有するバイオマーカーを提供する。

【 0 1 2 3 】

O A リスク関連分子の活性を検知する

特定例において、被験者における O A リスクの評価法は、被験者の少なくとも 4 つの O A リスク関連分子の活性を検知し、少なくとも 4 つの O A リスク関連分子における特異的活性の存在が、被験者の O A リスクが増加したことを示す。いくつかの例において、特異的活性の検知は、O A リスク関連 DNA、mRNA、cDNA、タンパク質、あるいはその組み合わせの定量的または定性的な分析を含む。本明細書で使用されるように、「O A リスク関連分子」という用語は、O A リスク関連核酸分子（例えば、cDNA または mRNA などの、DNA、RNA）および O A リスク関連タンパク質を含む。用語は、表 8 および 10 ~ 13（および、表にあげられる分子に対応する分子）に挙げられるそれらの分子（および、表にあげられる分子に対応する分子）に限られないが、本明細書に挙げられるすべてのそのような分子を含む O A の影響を受ける他の核酸分子およびタンパク質が含まれる。特定の O A リスク関連分子の例は、IL-15 および VCAM-1 など、表 8 および 10 ~ 13 に挙げられる。

10

【 0 1 2 4 】

例えば、本方法には、インターロイキン 15（IL-15）または可溶性血管付着タンパク質 1（sVAP-1）の活性、および、被験者から得られた、または派生した試料中の、例えば、表 8 および 10 ~ 13 に挙げられる分子などの、少なくとも 2 つの他の O A リスク関連分子の任意の組み合わせの判定が含まれる。特異的活性を検知する特定例において、少なくとも IL-15 の上方制御があるかどうかの判定、および少なくとも sVAP-1 の下方制御があるかどうかの判定を含み、少なくとも 4 つの O A リスク関連分子における特異的活性の存在が、被験者の O A リスクが増加したことを示す。例えば、本方法には、例えば、表 8 および 10 ~ 13 に挙げられる少なくとも 3、少なくとも 4、少なくとも 5、少なくとも 6、少なくとも 7、少なくとも 8、少なくとも 9、少なくとも 10、少なくとも 11、少なくとも 12、少なくとも 13、少なくとも 14、少なくとも 15、少なくとも 16、少なくとも 17、少なくとも 18、少なくとも 19、少なくとも 20、少なくとも 21、少なくとも 22、少なくとも 23、少なくとも 24、少なくとも 25、少なくとも 26、少なくとも 27、少なくとも 28、少なくとも 29、少なくとも 30、少なくとも 31、少なくとも 32、少なくとも 33、少なくとも 34、あるいは少なくとも 35 の追加分子を含む任意の組み合わせなど、表 8 および 10 ~ 13 に挙げられる少なくとも 2 つの追加分子を含む任意の組み合わせなどの、他の O A リスク関連分子とともに、試料における IL-15 または sVAP-1 活性（または両方）のスクリーニング、あるいは判定が含まれる。

20

30

【 0 1 2 5 】

一例において、本方法は、IL-15、sVAP-1、およびメタロプロテイナーゼ-7（MMP-7）およびプラスミノゲン活性抑制物質-1（PAI-1）などの、他の O A リスク関連分子の活性の判定を含み、本方法は、さらに、少なくとも MMP-7 の上方制御、および少なくとも PAI-1 の下方制御があるかどうかの判定を含む。いくつかの例において、IL-15、MMP-7 および sVAP-1 の上方制御、および PAI-1 の下方制御は、被験者の O A リスクが増加したことを示す。ある具体例では、本方法は、D-ダイマー 5（DD5）、DD6、エオタキシン 2（Eot2）、細胞間接着分子-1（ICAM-1）、MMP-2 および P-セレクチンを含む少なくとも 4 つの他の O A リスク関連分子のみならず、IL-15、sVAP-1、MMP-1、PAI-1 の活性の判定を含む。そのような方法では、本方法には、少なくとも DD5、DD6、Eot2、ICAM-1、MMP-2 および P-セレクチンの下方制御があるかどうかの判断が含まれ、PAI-1、

40

50

DD5、DD6、Eot2、ICAM-1、MMP-2およびP-セレクチンの2つ以上の下方制御の存在（例えば、これらのうち、2、3、4、5、6あるいは7つの下方制御）、およびIL-15、MMP-7およびsVAP-1の上方制御の存在が、被験者が将来、OAを発症する危険性が高いことを示す。

【0126】

さらに他の例では、本方法は、IL-15、sVAP-1およびマクロファージ炎症性タンパク質1（MIP-1）、マクロファージ炎症性タンパク質1（MIP-1）、ウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化受容体（UPAR）および血管細胞接着分子-1（VCAM-1）の2つ以上を含む他のOAリスク関連分子の活性の判定を含み、本方法は、少なくともMIP-1、IL-15、sVAP-1、UPARおよびVCAM-1の上方制御、および少なくともMIP-1の下方制御があるかどうかの判定も含む。いくつかの例において、IL-15、sVAP-1、MIP-1、UPARおよびVCAM-1の3つ以上の上方制御（例えば、これらのうち、3、4あるいは5つの上方制御）、およびMIP-1の下方制御は、被験者にOAリスクがあることを示す。具体例では、本方法は、脳から派生した神経栄養因子（BDNF）、上皮増殖因子（EGF）、濾液血液CCケモカイン1（HCC1）、レプチン、MMP-7およびプロラクチンの少なくとも4つ（または、少なくとも5あるいは少なくとも6つ）を含む少なくとも4つの他のOAリスク関連分子のみならず、MIP-1、MIP-1、UPARおよびVCAM-1の活性の判定を含む。そのような方法では、本方法には、少なくともMIP-1、HCC、レプチン、MMP-7、UPAR、VCAM-1およびBDNFの上方制御、およびMIP-1、EGFおよびプロラクチンの下方制御があるかどうかの判定が含まれ、MIP-1、EGFおよびプロラクチンの2つ以上の下方制御の存在、およびMIP-1、HCC、レプチン、MMP-7、UPAR、VCAM-1およびBDNFの2つ以上の上方制御の存在が、被験者が将来、OAを発症する危険性が高いことを示す。

10

20

【0127】

例えば、被験者が将来、OAを発症する危険性が高いという表示は、少なくとも5年、少なくとも10年、少なくとも15年、あるいは少なくとも20年後にOAを発症する可能性が高いことを示すことが可能である。一例では、被験者には、OAの他の臨床的適応は見られない。例えば、被験者には、関節の疼痛または膨れがない場合がある。

【0128】

他の例では、本方法は、IL-15、sVAP-1および、MMP-7、PAI-1、インターロイキン1（IL-1）、IL-2、マクロファージ抑制タンパク質（MIP）-1、B-リンパ球ケモカイン（BLC）、6-ケモカイン（Ckine）、線維芽細胞増殖因子（FGF）-7、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、インスリン様成長因子結合タンパク質（IGFBP）-2、ニューロトロフィン-4（NT4）、ICAM-3、血管内皮（VE）カドヘリンおよびメタロプロテイナーゼ1の組織阻害剤（TIMP-1）を含む他のOAリスク関連分子の活性の判定を含み、本方法は、少なくともMMP-7、PAI-1、IL-1、IL-2、マクロファージMIP-1、BLC、6-Ckine、FGF-7、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、IGFBP-2、NT4、ICAM-3、VE-カドヘリンおよびTIMP-1に上方制御があるかどうかの判定も含む。いくつかの例において、PAI-1の下方制御、およびIL-15、MMP-7、sVAP-1、IL-1、IL-2、MIP-1、BLC、6-Ckine、FGF-7、GM-CSF、IGFBP-2、NT4、ICAM-3、VE-カドヘリンおよびTIMP-1の3つ以上の上方制御の存在が（例えば、これらのうち、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、あるいは13の上方制御）、被験者がOAであることを示す。

30

40

【0129】

他の例では、本方法は、IL-15、sVAP-1、およびIL-2、Eot2、IGFBP-4、ICAM-3、インターフェロンにより誘発されるモノカイン（MIG）、MMP-7、骨髄性前駆細胞抑制因子1（MPIF-1）、胸腺および活性化調節ケモカイン

50

(TARC) および TGF 受容体 III (TGF-RIII) の 2 つ以上 (例えば、少なくとも 3、少なくとも 4、少なくとも 5、少なくとも 6、少なくとも 7、少なくとも 8、または少なくとも 9) を含む他の OA リスク関連分子の活性の判定を含み、本方法は、少なくとも IL-2、IGFBP-4、ICAM-3、MIG、MMP-7、MPIF-1 および TGF-RIII の上方制御、および少なくとも Eot2 および TARC の下方制御があるかどうかの判定も含む。いくつかの例において、Eot2 および TARC の下方制御、および IL-2、IGFBP-4、ICAM-3、MIG、MMP-7、MPIF-1 および TGF-RIII のうち 2 つ以上の上方制御の存在が (例えば、これらのうち、2、3、4、5、6、あるいは 7 の上方制御)、被験者が OA であることを示す。具体例では、本方法は、IL-2、Eot2、IGFBP-4、ICAM-3、MIG、MMP-7、MPIF-1、TARC および TGF-RIII などのうち、1、2、3、4、5、6、7、8、あるいは 9 つの、少なくとも 1 つの他の OA リスク関連分子のみならず、MIP-1、MIP-1、UPAR および VCAM-1 の活性の判定も含む。そのような方法では、本方法には、少なくとも MIP-1、IL-2、IGFBP-4、ICAM-3、MIG、MMP-7、MPIF-1、UPAR、VCAM-1、6-Ckine および TGF-RIII の上方制御、および少なくとも MIP-1、Eot2 および TARC の下方制御があるかどうかの判定が含まれ、MIP-1、Eot2 および TARC の 2 つ以上の下方制御の存在 (例えば、これらのうち、2 あるいは 3 つの下方制御)、および MIP-1、IL-2、IGFBP-4、ICAM-3、MIG、MMP-7、MPIF-1、UPAR、VCAM-1、6-Ckine および TGF-RIII の 2 つ以上の上方制御の存在 (例えば、これらのうち、2、3、4、5、6、8、9、10、あるいは 11 の上方制御) が、被験者が OA であることを示す。

【0130】

特定例において、スクリーニングされた OA リスク関連分子の数は、少なくとも 5、少なくとも 6、少なくとも 7、少なくとも 8、少なくとも 9、少なくとも 10、少なくとも 11、少なくとも 12、少なくとも 13、少なくとも 14、少なくとも 15、少なくとも 16、少なくとも 17、少なくとも 18、少なくとも 19、少なくとも 20、少なくとも 21、少なくとも 22、少なくとも 23、少なくとも 24、少なくとも 25、少なくとも 26、少なくとも 27、少なくとも 28、少なくとも 29、少なくとも 30、あるいは少なくとも 35 の OA リスク関連分子である。他の例では、本方法は、70 未満、60 未満、50 未満、40 未満、35 未満、30 未満、29 未満、28 未満、27 未満、26 未満、25 未満、24 未満、23 未満、22 未満、21 未満、20 未満、19 未満、18 未満、17 未満、16 未満、15 未満、14 未満、13 未満、12 未満、11 未満、10 未満、9 未満、8 未満、7 未満、6 未満、5 未満、あるいは 4 未満の OA リスク関連分子のスクリーニングを使用する。特定の OA リスク関連分子の例は、表 8 および 10 ~ 13 に示す。

【0131】

特異的活性

特異的活性は、OA リスク関連分子の核酸あるいはタンパク質活性の増減によって表される。例えば、特異的活性は、核酸分子またはタンパク質の量の増減、核酸分子またはタンパク質の安定性、核酸分子またはタンパク質の局在性、あるいは核酸分子またはタンパク質の生物活性を含むが、これらに限定されない。特定例は、例えば、表 8 および 10 ~ 13 で挙げられる OA リスク関連分子など、少なくとも 4、少なくとも 5、少なくとも 6、少なくとも 7、少なくとも 8、少なくとも 9、少なくとも 10、少なくとも 11、少なくとも 12、少なくとも 13、少なくとも 14、少なくとも 15、少なくとも 16、少なくとも 17、少なくとも 18、少なくとも 19、少なくとも 20、少なくとも 21、少なくとも 22、少なくとも 23、少なくとも 24、少なくとも 25、少なくとも 26、少なくとも 27、少なくとも 28、少なくとも 29、少なくとも 30、少なくとも 31、少なくとも 32、少なくとも 33、少なくとも 34、少なくとも 35、あるいは少なくとも 36 の OA リスク関連分子の任意の組み合わせにおける活性の変化など、少なくとも 4 つの O

A リスク関連核酸分子またはタンパク質における活性の変化を検知する評価方法を含む（例えば、OA であると思われる、またはOA であることが知られていた被験者から得られた核酸あるいはタンパク質）。いくつかの例において、特異的活性は、被験者の所望のOA リスク関連分子の活性が増加したかどうかの判定、および被験者の所望のOA リスク関連分子の活性が減少したかどうかの判定によって検知される。

【0132】

特定例において、特異的活性は、上方制御されたOA リスク関連分子、および下方制御されたOA リスク関連分子の両方において検知される。例えば、少なくとも4つのOA リスク関連分子が被験者において特異的活性を有する、IL-15、MMP-7、sVAP-1、IL-1、IL-2、MIP-1、BLC、6-Ckine、FGF-7、GM-CSF、IGFBP-2、NT4、TIMP-1、VE-カドヘリン、MIP-1、UPAR、VCAM-1、IGFBP-4、ICAM-3、MIG、MPIF-1およびTGF-RIIの1つ以上の活性の増加、およびPAI-1、MIP-1、Eot2およびTARCの1つ以上の活性の減少は、被験者がOA である、重度のOA である、あるいはその組み合わせであることを示す。他の例では、少なくとも4つのOA リスク関連分子が被験者において特異的活性を有する、IL-15、MMP-7、sVAP-1、MIP-1、UPAR、VCAM-1、HCC、レプチンおよびBDNFの1つ以上の活性の増加、およびMIP-1、PAI-1、DD5、DD6、Eot2、ICAM-1、MMP-2、P-セレクチン、EGFおよびプロラクチンの1つ以上の活性の減少は、被験者に将来、OA が発症する危険性が高い、被験者が重度のOA である、あるいはその組み合わせであることを示す。

10

20

【0133】

上方制御あるいは下方制御の検知には、例えば、IL-15では少なくとも25%、MMP-7では少なくとも25%、sVAP-1では少なくとも25%、IL-1では少なくとも25%、IL-2では少なくとも25%、MIP-1では少なくとも25%、BLCでは少なくとも25%、6-Ckineでは少なくとも25%、FGF-7では少なくとも25%、GM-CSFでは少なくとも25%、IGFBP-2では少なくとも25%、NT4では少なくとも25%、ICAM-3では少なくとも25%、TIMP-1では少なくとも25%、VE-カドヘリンでは少なくとも25%、MIP-1では少なくとも25%、UPARでは少なくとも25%、VCAM-1では少なくとも25%、IGFBP-4では少なくとも25%、ICAM-3では少なくとも25%、MIGでは少なくとも25%、MPIF-1では少なくとも25%、TGF-RIIでは少なくとも25%、HCCでは少なくとも25%、レプチンでは少なくとも25%、6-Ckineでは少なくとも25%、およびBDNFでは少なくとも25%の増加の変化の大きさ、あるいはPAI-1では少なくとも25%、MIP-1では少なくとも25%、Eot2では少なくとも25%、TARCでは少なくとも25%、EGFでは少なくとも25%、プロラクチンでは少なくとも25%、DD5では少なくとも25%、DD6では少なくとも25%、ICAM-1では少なくとも25%、MMP-2では少なくとも25%、およびP-セレクチンでは少なくとも25%の減少の変化の大きさなど、上方制御に対する少なくとも25%、少なくとも50%、少なくとも75%、あるいは少なくとも100%または少なくとも200%の変化の大きさが含まれる。また、上方制御および下方制御は、例えば、少なくとも5倍、少なくとも6倍、あるいは少なくとも10倍など、少なくとも4倍の変化（例えば、対照と相対的な）の大きさによる。

30

40

【0134】

タンパク質活性を検知する

いくつかの例における検知されたOA リスク関連分子は、OA リスク関連タンパク質である。例えば、特異的活性の検知方法には、OA リスク関連タンパク質の量の定量化が含まれる。いくつかのOA リスク関連タンパク質は、隔離して考える場合、OA リスクの情報を提供するかもしれないが、一般的に、複数のOA リスク関連タンパク質の活性は、診断あるいは予後診断を判定する際、検査され考慮される。例えば、少なくとも4つのOA

50

リスク関連タンパク質の発現は、4、5、6、あるいは7つのタンパク質などにみなされる。いくつかの例において、より多くのO Aリスク関連タンパク質が分析されるが、サブセットのみが診断あるいは予後診断の提供に十分であることがある。いくつかの例において、例えば、さらなる統計的検出力を得るために、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、あるいは36のタンパク質など、さらに多くのO Aリスク関連タンパク質が検査される。特定例において、活性が増加するO Aリスク関連タンパク質および活性が減少するO Aリスク関連タンパク質の両方が、同一の検査で検知される。

【0135】

O Aリスク関連タンパク質は、当技術分野で周知の任意の手段によって試験試料中で検知可能である。例えば、抗体などのタンパク質特異的結合剤へのハイブリダイゼーションなどの、インビトロハイブリダイゼーション（数量的ハイブリダイゼーションが含まれる）、固相免疫測定法（例えば、RCAタンパク質チップなどの、抗体プローブアレイ）、定量的分光法（例えば、表面増強レーザー脱離/イオン化質量分析（SELDI）に基づく質量分析法などの）、あるいはその組み合わせなど、当技術分野で周知の任意の免疫学的検知方法が使用可能である。非核酸分析物の検知に核酸の信号増幅を適用する方法（ローリングサークル型増幅、RCAなど）は、試料中の特定のタンパク質分析物を検知、判定および定量化するために使用可能である（例えば、本明細書で文献として組み込まれている米国特許番号6,531,283を参照）。しかしながら、当業者は、当技術分野で周知の他の方法が使用可能であることを認識するであろう。

【0136】

様々な固相基盤は、O Aリスク関連タンパク質などのタンパク質の濃度を定量化する、あるいは判定するために使用可能である。基盤は、型どおりの生活をする人によって選択が可能であり、利便性、コスト、技術、あるいは他の配慮に基づく。有用な基盤には、ビーズ、瓶、表面、基盤、繊維、針金、骨組構造物、管、フィラメント、プレート、シートおよびウェルがあるが、これらに限定されない。例となる基盤には、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリカーボネート、ガラス、プラスチック、金属、合金、セルロース、セルロース誘導体、ナイロン、被覆表面、アクリルアミドまたはその誘導体およびその重合体、アガロース、ラテックス、あるいはその組み合わせがある。本リストは、包括的なものではなく、説明用である。

【0137】

タンパク質の検知および測定の方法は、免疫学的検定で定量化された、マイクロウェルプレートにあるビーズあるいはウェルと結合した抗体を使用する。この検定形式では、単一タンパク質は、各検定において検知可能である。検査は、本発明の方法で到達可能な同一の結果に本質的に達するため、複数のタンパク質に対する抗体で反復可能である。ビーズ検査は、それぞれ、ある方法で一意的にラベルを付けられた複数のビーズを使用することによって多重化が可能である。例えば、各種ビーズは、あらかじめ選択された蛍光プローブの量を包含することが可能である。ビーズの種類は、ビーズから放射される蛍光性（または波長）の量を判定することによって識別可能である。そのような蛍光標識されたビーズは、ルミネックス社（Luminex Corporation、オースティン、テキサス州）から市販されており、同時に100までのタンパク質の測定を可能にする。

【0138】

タンパク質分析物は、また、1つのマイクロウェルごとに単一タンパク質測定することを可能とし、1つのプレートごとに384まであるいはそれ以上の測定をすることが可能な、酵素免疫測定法（ELISA）によって測定可能である。非免疫アッセイも使用可能である。酵素活性に基づいた検査は、高度な感受性を得ることができ、使用可能である。特異結合タンパク質測定は、タンパク質が高い結合親和力（低い解離定数）を有する特異結合対の一部である場合に使用可能である。特異結合対の他の部分は、タンパク質あるい

10

20

30

40

50

は特異的にタンパク質と結合した核酸配列などの、非タンパク質であることがある。

【0139】

一例において、O A リスク関連タンパク質の特異的活性の検知方法は、被験者から得られた試料中の少なくとも4つのO A リスク関連タンパク質の数量測定を含み、少なくとも4つの各O A リスク関連タンパク質の数量と相対的な、試料中の少なくとも4つのO A リスク関連タンパク質の数量の差異（例えば、O A リスクを有さない被験者に対する量を表す値または値域など）が、それらの少なくとも4つの血管のリスク関連分子における特異的活性である。例えば、統計的差異は、当技術分野で周知の統計的方法（スチューデントのt-検定など）を使用して判定可能である。精度および感受性の判定は、当業者の技術では十分である。一例において、被験者から得られた試料の数量と基準（対照）値の間にある、p値 0.05である統計的に有意な差異は、O A リスク関連タンパク質に特異的活性があることを示す。他の例では、被験者から得られた試料の数量と基準値の間にある少なくとも4倍の差異は、O A リスク関連タンパク質に特異的活性があることを示す。

10

【0140】

一例において、試験試料中にあるタンパク質は、タンパク質が特異的に抗体と結合するに十分な条件の下で、O A リスク関連タンパク質を認識する抗体の存在下で培養される。例えば、本方法には、タンパク質および抗体（アレイ基盤上の抗体など）の間で特異結合が可能となるに十分な期間、抗体を有するタンパク質含有試料を培養すること、それによって、タンパク質（抗体複合体）を形成し、その後、タンパク質の活性が変化したかどうかを判定するためにタンパク質（抗体複合体）を分析することが含まれる。一例において、タンパク質（抗体複合体）の分析は、試料中に存在するタンパク質（抗体複合体）の量を判定し、検査した各O A リスク関連タンパク質の基準値（例えば、O A リスクを有する被験者に対するタンパク質の量あるいは量の範囲）とその量を比較することを含む。例えば、タンパク質（抗体複合体）は、検知および定量化が可能である。少なくとも4つのO A リスク関連タンパク質の特異的活性の存在は、被験者がO A リスクを有することを示す。

20

【0141】

多種タンパク質は、例えば、様々なタンパク質に特異的な一次抗体がアレイ上などに固定されているマイクロアレイ上でのサンドイッチ免疫測定法によって分析可能である。例えば、タンパク質を含有する試験試料は、O A リスク関連タンパク質を認識する抗体を含むアレイとともに培養される。試料中に存在する場合、タンパク質分析物は、特定の抗原-抗体の相互作用に有利な条件の下で、マイクロアレイを有する試料の培養によって、アレイ上の同種の位置に捕らえられる。捕らえられたタンパク質は、例えば、タンパク質に存在するラベルを検知する、あるいは他のラベル付きの一般的な抗体と捕らえられたタンパク質を結合させてラベルを検知することによって検知可能である。いくつかの例において、ローリングサークル型増幅（RCA）プライマーは、検知されたタンパク質に対して特異的で、RCAプライマーまたはハプテンに接合した二次抗体を使用して、様々なタンパク質分析物と関連付けられる。直接免疫学的検定において、二次抗体は、他のRCAプライマーと直接、接合する。関節免疫学的検定では、二次抗体は、ビオチンなどのハプテンに接合し、検知抗体複合体またはRCAプライマーに接合するストレプトアビジンとともに培養される。プライマーに感作されたローリングサークル型複製は、タンパク質が固定されたアレイの部位で大量のDNA産出を生じさせる。増幅したDNAは、タンパク質に対する、容易に検知可能な信号として作用する。この信号は、検知および定量化可能であり、基準値または対照値と比較可能である。

30

40

【0142】

アレイ中にある異なるタンパク質は、複数の方法で識別可能である。例えば、増幅したDNAの位置は、異なるタンパク質がアレイの所定の位置に固定されている場合、関連のあるタンパク質を示す。また、各異なるタンパク質は、異なるDNAサークル型のローリングサークル型複製を次々に感作する、異なるローリングサークル型複製プライマーと関連することができる。その結果、各異なるタンパク質に対する識別可能な増幅したDNA

50

ができる。異なる増幅したDNAは、任意の適切な配列に基づいた核酸検知方法によって識別可能である。2つ以上の異なる試料で見られたタンパク質分析物の比較は、当技術分野で周知の任意の手段を使用して行われる。例えば、第一の試料は、第一のアレイで分析可能であり、第二の試料は、第一アレイの複製である、第二のアレイで分析される。第一アレイの各タンパク質に対する位置の強度は、第二アレイの対応する位置の強度と比較可能である。第一および第二アレイの位置の強度の差異は、タンパク質の濃度が両試料において異なるかどうかを判定する。差異が見られる場合、それらは、タンパク質活性の増加、またはタンパク質活性の低下として記録される。また、異なる試料からの同じタンパク質は、異なる増幅したDNAを産出するために異なるDNAサークル型の複製を感作する異なるプライマーと関連することができる。このように、複数の試料の多くの各タンパク質提示は定量化可能である。

10

【0143】

OARリスク関連タンパク質は直接、分析可能であり、タンパク質の誘導体も分析可能である。誘導体は、試料処理の間、自然に、または計画的にのどちらかで、体内で発生するタンパク質の形、あるいは産出される形となり得る。誘導体の例として、タンパク質分解産物、リン酸化産物、アセチル化産物、ミリスチル化産物、アミノ基転移産物、タンパク質複合体産物および複合体解離産物がある。そのようなすべての誘導体は、「OARリスク関連タンパク質」という用語に含まれる。

【0144】

いくつかの例において、被験者におけるOARリスク関連タンパク質の結果として生じるパターンは、OARリスクに対する被験者の発現プロファイルを提供する。そのようなプロファイルは、OARではない被験者のプロファイルなどの、対照プロファイルと比較可能であり、いくつかの例においては、ほぼ同年齢または年齢幅、同性、あるいはその組み合わせのプロファイルである。

20

【0145】

核酸活性を検知する

いくつかの例において、検知されたOARリスク関連分子は、OARリスク関連核酸である。例えば、特異的活性の検知方法には、OARリスク関連核酸分子の発現量の定量化が含まれる。例となる核酸分子には、mRNAまたはcDNAがある。いくつかのOARリスク関連核酸は、隔離して考える場合、OARリスクの情報を提供するかもしれないが、一般的に、複数のOARリスク関連核酸の活性は、診断あるいは予後診断を判定する際、検査され考慮される。例えば、少なくとも4つのOARリスク関連核酸の発現は、4、5、6、あるいは7つの核酸などにみなされる。いくつかの例において、より多くのOARリスク関連核酸が分析されるが、サブセットのみが診断あるいは予後診断の提供に十分であるかもしれない。いくつかの例において、例えば、さらなる統計的検出力を得るために、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、あるいは36の核酸など、さらに多くのOARリスク関連核酸が検査される。特定例において、活性が増加するOARリスク関連核酸および活性が減少するOARリスク関連核酸の両方が、同一の検査で検知される。

30

40

【0146】

任意の核酸分子の検知方法が使用可能である。例えば、遺伝子活性のレベルは、例えば、RNAse保護アッセイ、核酸または抗体プローブアレイ、インビトロ核酸増幅(RT-PCRまたはリアルタイムPCRなど)、核酸雑種形成(数量的ハイブリダイゼーションを含む)、ドットプロット分析、インサイチューハイブリダイゼーション、あるいはその組み合わせなどの、当技術分野で周知の方法を使用して、定量化可能である。しかしながら、当業者は、他の方法が使用可能になることを高く評価するであろう。

【0147】

一例において、核酸分子は、被験者から得られた試料から単離され、それによって、単離された核酸分子を生成する。結果として生じる単離された核酸分子は、例えば、OAR

50

スク関連分子を検知可能なオリゴヌクレオチドとハイブリダイズすることによって、検知可能である。一例において、オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションは、単離された核酸分子およびオリゴヌクレオチドの間でのハイブリダイゼーションが可能となるのに十分な期間、単離された核酸分子をオリゴヌクレオチドとインキュベートすることを含み、それによって、単離された核酸分子（オリゴヌクレオチド複合体）を形成する。結果として生じる複合体は、単離された核酸分子活性が変化したかどうかを判定するために分析可能であり、少なくとも4つのOAリスク関連核酸の特異的活性の存在が、被験者のOAリスクが増加したということを示す。例えば、核酸雑種形成の量は、例えば、複合体を検知および定量化することによって判定可能であり、検査された各OAリスク関連核酸に対するハイブリダイゼーションの量の基準値と比較可能である（例えば、OAリスクを有さない被験者で予期される値または値域など）。

【0148】

特定例において、OAリスク関連分子を検知可能なオリゴヌクレオチドは、アレイ基盤上に存在する。そのようなオリゴヌクレオチドは、表8および10～13に挙げられる少なくとも4つの分子の任意の組み合わせに相補的である。例えば、被験者から得られる核酸分子は、ハイブリダイゼーション複合体を形成するための適切なハイブリダイゼーション条件の下で、OAリスク検知アレイに適用可能である。特定例において、アレイ上のオリゴヌクレオチドはラベルを含む。他の例では、被験者から単離した核酸分子もラベルを含む。一例において、有機化合物の前処理済み溶液、有機化合物を含む溶液、あるいは温水は、ハイブリダイゼーションの前に適用可能である（本明細書で文献として組み込まれている米国特許番号5,985,567を参照）。

【0149】

アレイおよびターゲット材の既定の組み合わせに対するハイブリダイゼーション条件は、予期された二本鎖の T_m に近い実験に基づいた方法で、規定どおりに最適化が可能であり、それによって、本方法の識別力を最大限にする。結合が生じる細胞などの、アレイの位置の同定は、増幅した材料に存在するOAリスクと関連する配列の迅速かつ正確な同定を可能にする（下記参照）。

【0150】

ハイブリダイゼーション条件は、一致したオリゴヌクレオチドおよび不一致のオリゴヌクレオチドの識別が可能になるよう選択される。ハイブリダイゼーション条件は、フィルタにハイブリダイズするための標準的な方法において適切となるそれらの周知の条件と対応するよう選択可能であり、本発明のアレイとの使用に対して最適化可能である。例えば、1種類の標的のハイブリダイゼーションに対して適切な条件は、アレイのほかの標的を使用できるように調節される。特に、温度は、正確に相補的なOAリスク関連配列以外の配列間にある二本鎖の形成を実質的に取り除くためにコントロールされる。様々な周知のハイブリダイゼーション溶媒が使用可能であり、その選択は当業者に周知の配慮による（米国特許番号5,981,185を参照）。

【0151】

被験者からのOAリスクと関連のある核酸分子がOAリスク検知アレイに存在するオリゴヌクレオチドをハイブリダイズされると、例えば、複合体を検知することによって、ハイブリダイゼーション複合体の存在が分析され、いくつかの例においては、複合体の定量化を含む。

【0152】

オリゴヌクレオチドプローブのアレイにあるハイブリダイズされた複合体を検知することは、上記で記述された（本明細書で文献として組み込まれている米国特許番号5,985,567を参照）。一例において、検知は、オリゴヌクレオチド上に存在する1つ以上のラベル、被験者から得られる核酸分子上に存在する1つ以上のラベル、あるいはその両方の検知を含む。特定例において、開発は、緩衝液の適用を含む。一例において、緩衝液は、クエン酸ナトリウム生理食塩水、リン酸ナトリウム生理食塩水、塩化テトラメチルアンモニウム、エチレンジアミン四酢酸のクエン酸ナトリウム生理食塩水、ドデシル硫酸ナ

トリウム、クエン酸ナトリウム生理食塩水、エチレンジアミン四酢酸のリン酸ナトリウム生理食塩水、ドデシル硫酸ナトリウムのリン酸ナトリウム生理食塩水、エチレンジアミン四酢酸の塩化テトラメチルアンモニウム、ドデシル硫酸ナトリウムの塩化テトラメチルアンモニウム、あるいはその組み合わせである。しかしながら、他の適切な緩衝液も使用可能である。

【0153】

さらに検知には、ハイブリダイズされた複合体の検知ラベルとの接合または結合をもたらすために、ハイブリダイズされた複合体を接合溶液で処理すること、および接合し、結合したハイブリダイズされた複合体を検知試薬で処理することが含まれる。一例において、接合溶液には、ストレプトアビジンアルカリホスファターゼ、アビジンアルカリホスファターゼ、あるいは西洋ワサビペルオキシダーゼがある。接合溶液の特定の限定されない例は、ストレプトアビジンアルカリホスファターゼ、アビジンアルカリホスファターゼ、あるいは西洋ワサビペルオキシダーゼを含む。接合し、ハイブリダイズされた複合体は、検知試薬で処理可能である。一例において、検知試薬は、酵素標識蛍光試薬または熱量測定試薬を含む。特定の限定されない例では、検知試薬は、モレキュラープローブ社 (Molecular Probes, Inc.、ユージーン、オレゴン州) の酵素標識蛍光試薬 (ELF) である。ハイブリダイズされた複合体は、紫外線 (UV) トランスイルミネータ (UVP社製、UVP, Inc.、アップランド、カリフォルニア州) などの、検知装置に設置可能である。信号は開発され、信号強度の増強は、電荷結合素子 (CCD) カメラ (フォトメトリクス社製、Photometrics, Inc.、トゥーソン、アリゾナ州) などの、記録装置で記録可能である。特定例において、これらの工程は、蛍光プローブまたは放射標識が使用される場合は行われぬ。

10

20

【0154】

OAリスク関連分子のラベリング

核酸分子およびタンパク質が検知されるようにするためのラベリング法は知られている。そのようなラベルの例として、非放射標識および放射標識がある。非放射標識には、酵素、化学発光化合物、蛍光プローブ、金属複合体、ハプテン、比色薬、染料、あるいはその組み合わせがあるが、これらに限定されない。放射標識には、 ^{125}I および ^{35}S があるが、これらに限定されない。当技術分野で周知の他の方法のみならず、放射性および蛍光性ラベリング法は、本発明で使用するのに適切である。一例において、核酸分子を増幅するために使用されるプライマーには、ラベルが付いている (例えば、ピオチン、放射標識、あるいは蛍光プローブの)。他の例では、増幅した核酸試料には、標識増幅した物質を形成するよう末端ラベルが付いている。例えば、増幅した核酸分子は、増幅反応において標識ヌクレオチドを含むことによって、ラベルが付けられる。他の例では、被験者から得られた核酸分子にはラベルが付けられ、オリゴヌクレオチドを含むアレイに適用される。特定例において、被験者から得られたタンパク質には、ラベルが付けられ、その後、例えば、アレイに適用されることによって分析される。

30

【0155】

対照との比較

活性レベルの判定には、血清試料などの、被験者から派生した試料にあるOAリスク関連分子の量の測定が含まれる。

40

【0156】

そのような量は、対照の試料に存在する量と比較可能であり (OAではない被験者あるいはOAを発症する素因のない被験者から派生した試料、あるいはOAではない被験者あるいはOAを発症する素因のない1つ以上の被験者からの類似試料における標準的なOAリスク関連分子レベルなど)、対照の試料に相対的な被験者における、表8および10~13に挙げられる少なくとも4つのOAリスク関連分子の任意の組み合わせなどの、表8および10~13に挙げられる少なくとも4つのOAリスク関連分子の任意の組み合わせのレベルの差異 (それぞれ上方制御または下方制御を反映する増減など) が、OAの診断あるいは予後診断に用いられる。

50

【0157】

他の例では、その量は、対照の試料に存在する量と比較可能であり（OAではない被験者あるいはOAを発症する素因のない被験者から派生した試料、あるいはOAではない被験者あるいはOAを発症する素因のない1つ以上の被験者からの類似試料における標準的なOAリスク関連分子レベルなど）、対照の試料に相対的な被験者における、表8および10～13に挙げられる少なくとも4つのOAリスク関連分子の任意の組み合わせなどの、表8および10～13に挙げられる少なくとも4つのOAリスク関連分子の任意の組み合わせのレベルに存在する同様の量（4倍未満の差異など）が、OAの診断あるいは予後診断に用いられる。

【0158】

他の例では、OAリスク関連分子の量は、OAではない被験者、OAを発症する素因のない被験者、OAの被験者、あるいはOAを発症する素因のある被験者で予期されるOAリスク関連分子の量を表している、値域または標準曲線などの、基準値と比較される。

【0159】

特定例において、対照、標準、あるいは基準値は、被験者と同じ性別の他の被験者、被験者と同じ年齢幅の他の被験者（例えば、10年、12年、あるいは15年以内を含む、被験者の年齢から5年以内）、あるいはその組み合わせに対するものである。

【0160】

臨床試料

OAリスクを判定する際の本発明で使用する適切な試料は、例えば、血液または血液分画（血清または血漿など）などの、任意の従来臨床試料を含む。他の試料の例として、滑液、脳脊髄液、尿、痰、涙液、唾液、排泄物、生検および頬粘膜塗抹標本が挙げられる。そのような試料の採取方法は、当技術分野において周知である（例えば、血清試料の採取は、Schlugerら、J. Exp. Med. 176: 1327-33、1992を参照）。血清あるいは他の血液分画は、従来の方法で用意可能である。例えば、約200 μ Lの血清は、増幅反応で使用するためのDNAの抽出に使用可能である。しかしながら、DNAが増幅していない場合、より大量の血液が、採取可能である。例えば、少なくとも5 μ gのmRNAを目的とする場合、約20～30 mlの血液が採取される。同様に、約20 μ lの血清がRCAマイクロアレイ分析に使用可能である。

【0161】

一度、試料が得られると、試料は直接使用可能であり、濃縮（例えば、遠心分離またはろ過によって）、精製、増幅、画分、あるいは、例えば、感受性の改善と背景の減少などの、その組み合わせが可能である。例えば、当技術分野で周知の任意の分別、濃度、あるいは精製法は、試験試料として使用される画分に所望の検体が残る限り、使用可能である。例えば、迅速なDNAの調製は、市販されているキット（InstaGene Matrix、バイオ・ラッド社 BioRad、ハーキュリーズ、カリフォルニア州；NucleiSens isolation Kit、オルガノン・テクニカ社 Organon Teknika、オランダなど）を使用して調製可能である。一例において、DNAの調製方法は、核酸増幅を行いやすく、その影響を受けやすいヌクレオチド調製をもたらす。同様に、RNAも、市販されているキット（RNeasy Mini Kit、キアゲン社 Qiagen、パレンシア、カリフォルニア州）を使用して調製可能である。

【0162】

対照の試料は、健康な被験者あるいは病気を患ってはいるがOAではない被験者から取得、または派生可能である。対照の試料は、個別で、あるいはまとめて検査可能である。個々の対象からのデータは、「正常」値の範囲を規定するために保存可能である。データは、初期段階で取得可能である。したがって、対照は、試験試料と比較するような形で実行されなくてよい。いくつかの目的に対しては、異なる時点で得られた個人からの試料は、お互いに比較される。そのような場合、評価の必要はないが、任意の対照あるいは正常な試料では必要であることがある。対照の試料は、人口あるいは天然の生体試料のどちら

10

20

30

40

50

かにおける、特定の分析物の周知の数量を混合することによって、合成的にも産出可能である。

【0163】

差次的活性検知のためのアレイ

特定の実施例において、表8および10～13に挙げる、開示されたOAリスク関連分子の活性変化を検知するための方法は、本明細書で開示されたアレイを使用する。アレイは、例えば、特異なオリゴヌクレオチドプローブまたは抗体プローブを使用して、OAを生じる、またはOAに反応して活性が上方制御または下方制御される、核酸またはタンパク質の存在を検知するために使用されることができる。本明細書で「OAリスク検知アレイ」と称するアレイは、例えば、被験者がOAであるか野判定、将来OAを発症するリスクの増加があるかの判定、OA被験者のOAの重傷度の判定、OA被験者またはOA発症の感受性増加の被験者のOAの進行のモニタリング、特定の抗OA治療に反応するOA被験者の同定、またはその組み合わせなど、OAリスクの評価に使用される。

10

【0164】

OAリスク検知アレイも、本明細書により提供される。

【0165】

核酸アレイ

一実施例において、アレイは、表8および10～13に挙げるOAリスク関連核酸の2-36、4-36、4-30、4-25、4-20、4-16、4-15または4-10の任意の組み合わせなど、表8および10～13に挙げるOAリスク関連核酸の少なくとも二つの任意の組み合わせと交雑できる核酸オリゴヌクレオチドを含む。他の特定の実施例において、OAリスク検知アレイは、表8および10～13に挙げるOAリスク関連核酸分子の少なくとも4つに、高緊縮の条件下で特異的に交雑できるオリゴヌクレオチドを含む。ある特定の実施例において、アレイは、表8および10～13に挙げるOAリスク関連核酸分子の4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、31、32、33、34、35または36の任意の組み合わせを認識するオリゴヌクレオチドから構成することができる。例えば、アレイは、表10、11、12または13の1つに挙げるOAリスク関連分子を認識するオリゴヌクレオチドから構成することができる。当該分野に精通した者は、このようなアレイは、内部対照として非OAリスク関連核酸分子を認識するオリゴヌクレオチドも含むことができることを理解する。このようなアレイ（本明細書で説明する方法同様）のいくつかは、表8および10～13に挙げられていないOAリスク関連分子を含むことができる。

20

30

【0166】

一実施例において、一連のオリゴヌクレオチドプローブは、被験者から得た核酸分子の配列（cDNAまたはmRNAなど）など、OAリスク関連の配列検知に使用される固体支持体の表面に付着される。さらに、内部対照の核酸の配列が、（OAでない被験者から得た核酸の配列など）使用される場合、オリゴヌクレオチドプローブは、この対照核酸分子の存在を検知するために含まれる。

【0167】

アレイに結合されたオリゴヌクレオチドプローブは、被験者から得た、または被験者から増幅された（高緊縮の条件下など）配列を特異的に結合することができる。よって、本方法で使用する配列は、表8および10～13に挙げる遺伝子配列（または対応するタンパク質）など、OAリスク関連配列を認識するオリゴヌクレオチドプローブである。このような配列は、異なる種属の配列の検査と、特定のOAリスク関連配列（表8および10～13に挙げる配列など）に特異的に徐冷するが、他には徐冷しない、オリゴヌクレオチドの選択により、判定されることが可能である。当該分野に精通した者は、他のOAリスク関連核酸の配列の検知のために、個体支持体の表面に付着できる、他のOAリスク関連オリゴヌクレオチド分子を同定できる。

40

【0168】

50

本開示による方法および装置は、適切な条件下で、オリゴヌクレオチドが、相補的ベース配列をもつ核酸分子とベースペア二重鎖を形成するという事実を利用する。二重鎖の安定性は、オリゴヌクレオチドの長さ、ベース成分および交雑が生じる溶液の成分を含む、多くの要因に依存する。二重鎖の安定性のベース成分の作用は、特定の溶液、例えば、第三または第四アミンの高濃度の存在で、交雑を実行することにより減少させることができる。

【0169】

二重鎖の熱安定性は、配列間の配列の類似性の程度にも依存する。標的配列とアレイに結合されたオリゴヌクレオチド間で形成されると予想される二重鎖のタイプの予測された T_m 's に近い温度で交雑を実行することにより、不一致の二重体形成程度が、大幅に減少されるかもしれない。

10

【0170】

アレイで使用される各オリゴヌクレオチドの配列の長さは、標的の O A リスク関連核酸の配列結合を最適化するために選定されることができる。特異的なスクリーニング条件下で、特定の O A リスク関連核酸の配列と使用するための最適な長さが、経験に基づいて判定できる。よって、アレイの配列を含む、一連のオリゴヌクレオチドの配列の各個別の要素の長さが、スクリーニングのために最適化される。一実施例において、オリゴヌクレオチドプローブは、長さが約 20 から約 35 ヌクレオチド、または長さが約 25 から約 40 ヌクレオチドである。

20

【0171】

アレイを形成するオリゴヌクレオチドプローブは、直接支持体に付着できる。代替的に、オリゴヌクレオチドプローブは、スペーサーまたは個体支持体へのリンカーとして働く、オリゴヌクレオチドまたは他の分子など、非 O A リスク関連の配列により支持体に付着される。

【0172】

タンパク質アレイ

特定の実施例において、アレイは、表__に挙げる O A リスク関連タンパク質の 2 - 36、4 - 36、4 - 30、4 - 25、4 - 20、4 - 16、4 - 15、または 4 - 10 の任にの組み合わせなど、表 8 および 10 ~ 13 に挙げる（特異的に結合する）O A リスク関連タンパク質の少なくとも 4 つを認識するタンパク質の配列（またはこのようなタンパク質の断片またはこのようなタンパク質またはタンパク質の断片に特異的な抗体）を含む。ある特定の実施例において、アレイは、表 8 および 10 ~ 13 に挙げる O A リスク関連タンパク質の 4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35 または 36 の任意の組み合わせを認識するオリゴヌクレオチドから構成することができる。例えば、アレイは、表 10、11、12 または 13 の 1 つに挙げる O A リスク関連分子を認識する抗体から構成することができる。当該分野に精通した者は、このようなアレイは、内部対照として非 O A リスク関連タンパク質を認識する抗体も含むことができることを理解する。

30

【0173】

アレイを形成するタンパク質または抗体は、支持体に直接連結することができる。代替的に、タンパク質または抗体は、個体支持体にスペーサーまたはリンカーにより、支持体に付着することができる。

40

【0174】

O A リスク関連タンパク質の発現の変化は、例えば、検知できる薬剤を用いて、場合により、標識される O A リスクタンパク質特異結合薬剤を使用して検知できる。特定の実施例において、タンパク質の発現変化の検知は、（例えば、アレイ上に存在する）O A リスクタンパク質特異結合薬剤により被験者から得たタンパク質試料を接触し、結合薬剤が、試料により結合されたかどうかを検知し、これにより、試料に存在する O A リスク関連タンパク質のレベルを測定することを含む。特定の実施例において、O A でない被験者から

50

の類似した試料で得た O A リスク関連タンパク質のレベルと比較した、試料の O A リスク関連タンパク質のレベルの差異は、被験者が O A であること示唆する。

【 0 1 7 5 】

アレイ基質

個体支持体は、有機ポリマーから形成することができる。個体支持体に適切な材料は、これに制限されるものではないが、ポリピロピレン、ポリエチレン、ポリブチレン、ポリイソブチレン、ポリブタジエン、ポリイソブレン、ポリビニルピロリジン、ポリテトラフルオロエチレン、ポリビニリデンフルオライド、ポリフルオロエチレン-プロピレン、ポリエチレンビニルアルコール、ポリメチルペンテン、ポリクロロトリフルオロエチレン、ポリスルホン、ヒドロキシル化二軸配向ポリプロピレン、アミノ化二軸配向ポリプロピレン、チオール化二軸配向ポリプロピレン、エチレンアクリル酸、エチレンメタアクリル酸およびこれらのコポリマーの混合（米国特許番号 5, 985, 567 を参照資料として本明細書の一部とする）を含む。一実施例において、個体支持体の表面は、ポリプロピレンである。

10

【 0 1 7 6 】

一般的に、個体支持体の表面の形成に使用できる材料の適切な特徴は、活性時に支持体の表面が、オリゴヌクレオチドの表面付着など、生体分子を共有結合的に付着できるため、表面の活性に適切である、生体分子の原位置合成に適切である、オリゴヌクレオチドまたはタンパク質により占有されていない支持体上の部分は、非特異結合に適切でないため、化学的に不活性、または非特異結合が生じる場合、そのような材料は、オリゴヌクレオチドまたはタンパク質を除去せずに、容易に表面から除去できる、ことを含む。

20

【 0 1 7 7 】

他の実施例において、表面活性された有機ポリマーは、個体支持体の表面として使用される。表面活性された有機ポリマーの一実施例は、ラジオ周波数プラズマ放電を介してアミン化された、ポリプロピレンである。活性された有機ポリマー上のアミングループは、ヌクレオチド分子がポリマーに結合されるため、ヌクレオチド分子と反応性である。カルボキシル化、ヒドロキシル化、チオール化または活性エステルグループなど、他の反応性グループも使用できる。

【 0 1 7 8 】

アレイ形

多様なアレイ形が、本開示により使用されることが可能である。一実施例は、当該分野において、一般的にディップスティックいわれる、オリゴヌクレオチドまたはタンパク質のバンドの直線アレイを含む。他の適切な形は、個別細胞の二次元パターン（64 x 64 アレイで 4096 平方など）を含む。当該分野に精通した者に理解されるように、これに制限されるものではないが、スロット（長方形）および円形アレイを含む他のアレイ形は、使用に等しく適切である（米国特許番号 5, 981, 185 を参照）。一実施例において、アレイは、糸、膜またはフィルムである、ポリマー媒体で形成される。有機ポリマー媒体の一例は、フィルムの厚さは、重要ではなく、かなり幅広い範囲で変更できるが、約 1 m i l (0 . 0 0 1 イ ン チ) から 約 2 0 m i l の 厚 さ の ポ リ プ ロ ピ レ ン シ ー ト である。特に、開示されたアレイの調製は、二軸配向ポリプロピレン（BOPP）フィルムである。

30

40

【 0 1 7 9 】

本開示のアレイ形には、多様な異なる形のタイプが含まれる。「形」は、マイクロタイタープレート、試験管、無機シート、ディップスティック、およびそれに似たものなど、個体支持体が付着できる任意の形である。例えば、個体支持体がポリプロピレン系の場合、1つ以上のポリプロピレン系は、プラスチックのディップスティックタイプのデバイスに付着することができ、ポリプロピレン膜は、ガラスのスライドに付着できる。特定の形自体は、重要でない。必要なことは、個体支持体が、個体支持体または個体支持体に吸収された任意のバイオポリマーの機能的作用に影響することなく付着でき、形（ディップスティックまたはスライドなど）が、デバイスが導入される任意の材料（臨床資料および交

50

雑溶液など)において安定していることである。

【0180】

本開示のアレイは、多様な方法で調製することができる。一実施例において、オリゴヌクレオチドまたはタンパク質の配列が、個々に合成されてから、個体支持体に付着される(米国特許番号6,013,789を参照)。他の実施例において、配列は、所望のアレイを得るために、直接、支持体に合成される(米国特許番号5,554,501を参照)。共有結合的にオリゴヌクレオチドおよびタンパク質を個体支持体に結合し、オリゴヌクレオチドまたはタンパク質を支持体に直接合成するための適切な方法は、当該分野で働くものには周知である。適切な方法の要約は、Matsonら、Anal. Biochem. 217:306-10, 1994で確認できる。一実施例において、オリゴヌクレオチドは、個体支持体にオリゴヌクレオチドを調製するための従来の化学方法を使用して、支持体に合成される(PCT出願WO85/01051およびWO89/10977または米国特許番号5,554,501の参照など)。

10

【0181】

オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの3'末端またはオリゴヌクレオチドの5'末端により、個体支持体に結合される。当該分野に精通した者が、オリゴヌクレオチドの3'末端または5'末端の使用が、個体支持体への結合に適切かどうかを判定することができる。一般的に、3'末端または5'末端の領域でのオリゴヌクレオチドプローブの内部相補は、支持体への結合を判定する。

20

【0182】

特定の実施例において、アレイ上のオリゴヌクレオチドまたはタンパク質プローブは、プローブ:標的配列複合体の検知を可能にする、1つ以上の標識を含む。

【0183】

キット

本開示は、例えば、被験者がOAであるかどうかの判定、将来OAを発現するリスクの増加があるかどうかの判定、OAである被験者のOAの重傷度の評価、OAの被験者またはOA発症の感受性増加の被験者のOAの進行のモニタリング、特定の抗OA治療に反応するOAの被験者の同定、またはその組み合わせなど、OAリスクの評価のために使用されるキットを提供する。このようなキットは、技術者に、被験者が表8および10~13に挙げる分子の4つ以上の任意の組み合わせなど、OAリスク関連分子の差次的活性をもつかどうかの判定を可能にする。

30

【0184】

開示されたキットは、キットの標的であるOAリスク関連分子と任意に交雑または結合する、オリゴヌクレオチドプローブまたはタンパク質プローブ(抗体プローブなど)、結合分子を含む。特定の実施例において、プローブは、本明細書で説明されたアレイなどに付着される。一実施例において、キットは、表8および10~13に挙げる分子の少なくとも4つの任意の組み合わせを認識する。

【0185】

キットは、1つ以上の緩衝液、重要な信号発現のための共役溶液、または重要な信号検知のための検知試薬をさらに含み、それぞれ、容器などに別々に梱包される。他の実施例において、キットは、陽性対照として働くため、OA検知アレイと結合するための複数のOAリスク関連標的分子を含む。標的分子は、DNA、RNAなどのオリゴヌクレオチド、ペプチド-核酸、PCR断片またはタンパク質(抗体など)を含むことができる。

40

【0186】

骨関節炎の治療

本開示は、本開示の方法を使用して、OAと診断された被験者または将来のOAの発症リスクの増加の判定など、被験者のOAリスクの増加を判定するOAの治療方法を提供する。例えば、上述のアッセイを使用して、表8および10~13に挙げる少なくとも4つのOAリスク関連分子活性の変更が、被験者において検知される、例えば、表8および10~13に挙げるOAリスク関連分子の少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも1

50

0、少なくとも13、または少なくとも16が、被験者において検知される場合、治療は、関節損傷の回避または減少、または関節損傷のオンセットの遅延のために選択される。そして、被験者は、この選択、例えば、1つ以上の抗炎症剤の投与、グルコサミンまたはコンドロイチン硫酸およびその派生物の投与、荷重関節OAの予防戦略としての体重管理の開始、反復損傷軽減するための仕事に関連する生体工学改善の戦略の展開、スポーツ関連損傷減少のためのプログラムの開始、およびOAの発症リスクのある青少年の回復プログラムの開始、例えば、被験者のOA発症の回避または遅延またはその組み合わせなど、により治療される。ある実施例において、選択された治療は、1つ以上のOAリスク関連分子の被験者のプロファイルの分析に基づき、特定で、被験者に合うように調整される。

【0187】

試験薬のスクリーニング

分子の活性がOAに反応して、またはOAを生じるために変更される、複数のOAリスク関連分子(表8および10~13に挙げる分子など)の同定に基づき、本開示は、これらの作用を向上、正常化または反転できる薬剤の同定方法を提供する。例えば、本方法は、OAリスク関連分子の活性を正常化する薬剤の同定が可能である。OAリスク関連分子の活性(活性など)の正常化は、活性がOAに反応して、またはOAを生じるために増加するOAリスク関連分子の活性の減少、または活性がOAに反応して、またはOAを生じるために減少するOAリスク関連分子の活性の増加を含む。他の実施例において、本方法は、活性が、OAである、またはOA発症のリスクの増加がある被験者に保護的作用を提供するOAリスク関連分子の活性を向上する薬剤の同定が可能である。例えば、本方法は、拮抗剤の同定が可能である。さらに他の実施例において、本方法は、OAリスク関連分子の活性が1つ以上のOAのマイナス的症状を生じるなど、OAリスク関連分子の活性を減少する薬剤の同定を可能にする。例えば、本方法は、拮抗剤の同定が可能である。

【0188】

特定の実施例において、同定された薬剤は、OAの被験者または将来OAを発症するリスクの増加のある被験者の治療に使用できる。例えば、OAの哺乳動物(ヒトまたは獣医学被験対象)または将来OAを発症するリスクの増加のある哺乳動物は、哺乳動物治療のために開示されたスクリーニング方法を使用して同定された1つ以上の薬剤を投与される。

【0189】

開示された方法は、例えば、培養された細胞に試験薬を添加することにより、インビトロで実行できる、または例えば、哺乳動物(ヒトまたは実験動物、例えばマウス、ラット、イヌまたはウサギなど)に試験薬を投与することにより、インビボで実行できる。特定の実施例において、本方法は、OAを模擬または誘発するのに十分な条件に細胞または哺乳動物を暴露することを含む。このような方法は、当該分野において周知である。1つ以上の試験薬が、表8および10~13に挙げる分子の少なくとも1つなど、1つ以上のOA関連分子の活性を変更するのに十分な条件下で、細胞培養に添加または哺乳動物に投与される。その後、OAリスク関連分子の活性が、例えば、1つ以上のOAリスク関連分子の発現の測定により、または1つ以上のOA関連タンパク質の生体活性量の測定により、判定される。1つ以上のOAリスク関連分子の活性の変更は、試験薬が、表8および10~13に挙げるOAリスク関連分子の活性を変更することを示唆する。特定の実施例において、活性の変更は、OAでない、またはOAリスクのないときの活性量の存在、またはOAである、またはOAリスクのあるときの活性量の存在など、標準または基準値との比較、または対照(試験薬を投与されない細胞または被験者など)との比較により判定される。

【0190】

本開示の方法を用いて同定した治療薬は、さらに大きな所望する活性の他の薬剤を同定するためのリード化合物として使用できる。さらに、同定された化学成分の類似体、または変種、断片またはペプチド試験薬の融合は、開示されたアッセイを使用してOAリスク関連分子の活性の変更能力を試験できる。候補薬剤は、動物で安全性を試験し、その後、

10

20

30

40

50

動物またはヒトで臨床試験に使用することができる。

【0191】

試験薬

任意の適切な化合物または成分は、芳香族、脂肪酸、および炭水化物を含む有機または無機化学物質、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体および他の特異結合薬剤を含むペプチド、ホスホペプチドまたは核酸分子など、試験薬として使用できる。ある特定の実施例において、試験薬は、無作為のペプチドライブラリー（例えば、Lamら、Nature 354:82-4, 1991を参照）、無作為または部分的変性の方向づけされたホスホペプチドライブラリー（例えば、Songyangら、Cell 72:767-78, 1993を参照）を含む。試験薬は、複雑混合物または分子の「カクテル」も含む。

10

【0192】

試験薬剤は、当該分野で既に周知の薬理剤、または任意の医薬活性をもつ以前未知であった化合物であってよい。化合物は、自然に発生、または実験室で設計されることができる。化合物は、微生物、動物または植物から単離され、組換えにより生成、または当該分野で周知の化学方法により合成できる。所望するなら、試験物質は、これに制限されるものではないが、生物学的ライブラリー、空間的位置決定可能な並列固相ライブラリーまたは溶相ライブラリー、分解分離を要する合成ライブラリー法、「1ピース1化合物」ライブラリー法、および親和性クロマトグラフ選択を使用した合成ライブラリー法を含む、当該分野において周知の任意の多数の組み合わせライブラリー法を使用して得ることができる。生物学的ライブラリー法は、ポリペプチドライブラリーに制限されるが、他の4つの方法は、ポリペプチド、非ペプチドオリゴマーまたは化合物の小分子ライブラリーに適用される（例えば、Lam, Anticancer Drug Des. 12:145, 1997を参照）。

20

【0193】

分子ライブラリーの合成方法は、当該分野において周知である（例えば、DeWittら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:6909, 1993; Erbら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91:11422, 1994; Zuckermannら、J. Med. Chem. 37:2678, 1994; Choら、Science 261:1303, 1993; Carellら、Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33:2059, 1994; Carellら、Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33:2061; Gallopら、J. Med. Chem. 37:1233, 1994を参照）。化合物のライブラリーは、溶液中（例えば、Houghten, BioTechniques 13:412-21, 1992を参照）またはビーズ上（Lam, Nature 354, 82-4, 1991）、チップ（Fodor, Nature 364:555-6, 1993）、細菌または孢子（Ladner, 米国特許5, 223, 409）、プラスミド（Cullら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:1865-9, 1992）またはファージ（Scott&Smith, Science 249:386-90, 1990; Devlin, Science 249:404-6, 1990; Cwirllaら、Proc. Natl. Acad. Sci. 97:6378-82, 1990; Felici, J. Mol. Biol. 222:301-10, 1991; and Ladner, 米国特許5, 223, 409）に存在する。

30

40

【0194】

インビトロアッセイ

一実施例において、本方法は、インビトロアッセイである。例えば、インビボでOAに反応してなにが起こるのか、またはOAを生じる（軟骨細胞など）のなにが起こるのかのモデルを提供する細胞などの細胞は、酸化ストレスなど、OAを模擬するのに十分な条件下で培養される。他の実施例において、OAの被験者から得た細胞（例えば、軟骨細胞）が、使用される。1つ以上の試験薬は、例えば、OAリスク関連分子の活性を変更（正

50

常化など)するためなど、試験薬が細胞に所望の作用を与えるのに十分な条件下で細胞と培養される。細胞が、OAを模擬または誘発するために処置される実施例において、試験薬は、このような治療前、治療中、または治療後に添加される。他の実施例において、細胞は、OAの哺乳動物から得、試験薬と培養される。特定の実施例において、試験薬は、1つ以上のOAリスク関連分子に所望の作用を与える。

【0195】

使用される細胞の例は、これに制限されるものではないが、軟骨細胞を含む。軟骨細胞は、哺乳動物などの被験者からも得られ、一般的な方法を使用して一次培養として増殖される。例えば、軟骨細胞は、軟骨から得られる(例えば、Yudohra, Arthritis Res Ther. 7(2):R380-91, 2005を参照)。一実施例において、アメリカ培養細胞系統保存機関(ATCC)および他の市販供給源から入手可能なものなど、確立された軟骨培養細胞株が、使用される。例えば、適切な媒体で軟骨細胞に分化される軟骨細胞マウス間質細胞(ATCC番号CRL-12424)は、使用される細胞株のある特定の実施例である。しかし、当該分野に精通した者は、他の細胞株が使用できることを理解する。

10

【0196】

インビトロでOAを模擬または誘発するのに十分な条件を提供する方法は、当該分野において周知である。例えば、OAは、H₂O₂の存在下、細胞培養により軟骨細胞で誘発できる。OAの模擬には、OA被験者の関節軟骨から得た軟骨細胞など、OAの哺乳動物からの細胞を培養することができる。

20

【0197】

1つ以上の試験薬は、試験薬が細胞に所望の作用を与えるのに十分な条件下で細胞と培養される。細胞がOAを模擬または誘発するために処置される実施例において、試験薬は、OAの模擬または誘発する前、後または実質的に同時に細胞に添加される。一実施例において、薬剤は、OAの模擬または誘発の少なくとも1日後、少なくとも5日後、少なくとも7日後、少なくとも14日後、少なくとも30日後、少なくとも60日後またはさらに少なくとも90日後など、OAの模擬または誘発の12時間後に添加される。

【0198】

試験薬は、少なくとも10分間、少なくとも30分間、少なくとも1時間、少なくとも6時間、少なくとも24時間、少なくとも72時間、少なくとも7日間、少なくとも14日間または少なくとも30日間など、試験薬が細胞に所望の作用を与えるのに十分な時間で細胞と培養される。

30

【0199】

インビボアッセイ

他の実施例において、本方法は、インビボアッセイである。例えば、インビトロアッセイで候補として同定された薬剤は、OAリスク関連分子(表8および10~13に挙げる分子の1つ以上など)の活性変更(正常化など)の能力を、インビボで試験される。特定の実施例において、試験哺乳動物は、OAを自然に発症、またはOAを誘発する条件に暴露される。同時またはその後、例えば、OAリスク関連分子の活性またはOAリスク関連分子のパターンを変更(正常化など)するなど、試験薬が被験者に所望の作用を与えるのに十分な条件下で、1つ以上の試験薬が被験者に投与される。特定の実施例において、試験薬は、1つ以上のOAリスク関連分子に所望の作用を与える。

40

【0200】

インビボでOAを誘発するのに十分な条件を提供する方法は、当該分野において周知である。例えば、OAの動物モデルは、ラットOAモデル(例えば、Fernihoughら、Neurosci. Lett. 2005 Jul 19)、マウスOAモデル(再見にはYoung, Trends Pharmacol. Sci. 26:333-5, 2005を参照)およびウサギOAモデル(例えば、Kobayashiら、Inflamm Res. 54:249-55, 2005)など、容易に利用可能である。例えば、部分的な内側半月板切除術、またはノードアセテートの滑膜腔への注

50

入（例えば、Fernihoughら、Neurosci. Lett. 2005 Jul 19を参照）により、OAを哺乳動物（ラット、マウス、ヒト以外の霊長類など）に誘発できる。さらに、STR/1Nマウス（例えば、Averbeckら、J. Rheumatol. 31:2013-20, 2004を参照）およびアカゲザル（例えば、Chateauvertら、J. Rheumatol. 17:73-83, 1990を参照）などの自然にOAを発症する動物モデルは、当該分野において周知である。

【0201】

試験薬が被験者に所望の作用を与えるのに十分な条件下で、1つ以上の試験薬が被験者に投与される。静脈内、筋肉内、経皮または患部関節への直接注入など、任意の適切な投与方法が使用される。薬剤は、OAの発症または誘発の後、またはOAの発症または誘発と実質的に同時に投与されることができる。一実施例において、薬剤は、OAの発症または誘発の少なくとも1日後、少なくとも5日後、少なくとも7日後、少なくとも14日後、少なくとも30日後、少なくとも60日後またはさらには少なくとも90日後に添加される。

10

【0202】

試験薬は、例えば、1つ以上の用量で、一、二または三投与など、または毎日、週毎、または月毎の投与など、試験薬が哺乳動物のOAに所望の作用を与えるのに十分な条件下で、1つ以上の用量で哺乳動物に投与することができる。

20

【0203】

作用の判定

1つ以上OAリスク関連分子の活性における1つ以上の試験薬の作用は、当該分野で周知の方法を使用して判定できる。例えば、1つ以上のOAリスク関連分子の活性に体する作用は、本明細書で開示したアレイおよび方法により判定することができる。

30

【0204】

例えば、RNAは、試験薬に暴露された培養細胞から、または試験薬を投与した被験者から得た細胞から、単離することができる。単離されたRNAは、標識され、表8および10~13に挙げる遺伝子の少なくとも1つ、少なくとも2つ、または少なくとも3つなど、1つ以上の事前選択されたOAリスク関連遺伝子、またはOAリスクに関連するような遺伝子のパターンに、特異的に交雑することができる、1つ以上の核酸分子（プライマーまたはプローブなど）を含むアレイに暴露される。亜特定の実施例において、1つ以上の事前選択されたOA関連遺伝子は、IL-15、sVAP-1、UPAR、vCAM-1、MIP-1、MIP1-、6-Ckine、ICAM-3、TGF-RIIまたはPAI-1の1つ以上を含む。

40

【0205】

他の実施例において、タンパク質は、試験薬に暴露された培養細胞から、または試験薬（血清試料など）を投与した被験者から得られた。タンパク質を含む試料は、表8および10~13に挙げるタンパク質の少なくとも1つ、少なくとも2つ、または少なくとも3つなど、1つ以上のOAリスク関連タンパク質の発現量または生物学的活性、または事前に同定された、または事前に選別されたタンパク質の上方制御または下方制御のパターンを判定するために分析される。ある特定の実施例において、1つ以上の事前に選別されたOA関連タンパク質は、IL-15、sVAP-1、UPAR、vCAM-1、MIP-1、MIP1-、6-Ckine、ICAM-3、TGF-RIIまたはPAI-1の1つ以上を含む。ある特定の実施例において、RCAタンパク質チップは、タンパク質を分析するために使用される。

50

【0206】

特定の実施例において、OAリスク関連分子の差次的活性は、標準、基準値または対照と比較される。一実施例は、OAでない被験者に存在する、またはOAでない被験者に予測されるOAリスク関連分子の活性量を含み、対照と比較されたOA関連分子（表8および10~13に挙げる分子など）の試験試料の活性の増加または減少は、試験薬が少なく

50

とも1つのOAリスク関連分子の活性を変更することを示唆する。他の実施例は、OAの被験者に存在する、またはOAの被験者に予測されるOAリスク関連分子の活性量を含み、対照と比較されたOAリスク関連分子（表8および10～13に挙げる分子など）の試験試料の活性の増加または減少は、試験薬が少なくとも1つのOA関連分子の活性を変更することを示唆する。他の実施例において、対照は、試験薬の不在で存在する活性の量を含む。差次的活性の検知は、遺伝子発現での変化の測定、タンパク質量の測定、またはタンパク質が存在する生物学的活性量の判定を含む。

【0207】

理想的には、試験薬は、OAリスク関連分子（タンパク質など）の活性を正常化するため、試験薬の存在において、OAリスク関連分子の活性は、OAリスク不在のOAリスク関連分子の活性により近く類似する。つまり、OAリスク関連分子の活性が、OAリスク不在の分子の活性に対して、OA被験者で減少する場合、試験薬は、試験薬を受けた試料のOAリスク関連分子の活性を理想的に上昇する。同様に、OAリスク関連分子の活性が、OAリスク不在の分子の活性に対して、OA被験者で上昇する場合、試験薬は、試験薬を受けた試料のOAリスク関連分子の活性を理想的に減少する。特定の実施例において、差次的活性は、標準、基準値、または対照試験物質と比較した試験試料が、試験物質の不在のOAリスク関連分子の活性に対して、統計上有意な量（ $p < 0.05$ ）で、OAリスク関連分子の活性を減少または増加する時、存在する。他の実施例において、差次的活性は、標準、基準値または対照（OAの被験者のOAリスク関連分子の活性量など）と比較した試験試料が、対照のOAリスク関連分子の活性に対して少なくとも5倍、または少なくとも10倍など、少なくとも4倍のOAリスク関連分子の活性を減少または増加する。

【0208】

特定の実施例において、OAリスク関連分子の活性を正常化する試験薬は、例えば、さらなる臨床分析のために選択される。

【0209】

ハイスループットスクリーニング

試験薬は、ハイスループットスクリーニングを使用して、1つ以上のOAリスク関連分子（タンパク質またはタンパク質をコード化するポリヌクレオチドなど）の活性（正常化など）に影響をおよぼす能力においてスクリーニングされる。ハイスループットスクリーニングを使用して、多くの個別の化合物が、並列して試験されるため、数多くの試験物質が速くスクリーニングできる。幅広く確立された方法は、96ウェルマイクロタイタープレートを使用する。マイクロタイタープレートのウェルは、基本的に50から500 μ lの範囲のアッセイ容量を使用する。プレートに加え、多くの器具、材料、ピペッター、自動装置、プレートワッシャーおよびプレートリーダーが、96ウェル形式に装着するのに市場で入手可能である。

【0210】

代替的に、「自由形式アッセイ」または試料間で物理的障害のないアッセイが使用される。例えば、組み合わせペプチドライブラリーの簡単な均一アッセイで色素細胞（メラニン細胞）を使用したアッセイは、Jayawickrama, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 19, 1614-18 (1994)により説明される。細胞は、アガロース下でペトリ皿に置かれ、次に組み合わせ化合物を保有するビーズが、アガロースの表面上に置かれる。組み合わせ化合物は、部分的にビーズから遊離される。化合物がゲル基質に局所的に拡散すると、活性化合物は細胞の色を変化させるため、活性化合物は暗い色素領域として可視化される。

【0211】

他のハイスループットスクリーニング方法は、Beutelら、米国特許5,976,813で説明される。この方法において、試験試料は、多孔性基質に置かれる。1つ以上のアッセイ成分は、次にゲル、プラスチックシート、フィルターまたは容易に処理される個体支持体の他の形など、基質の内、上または底に置かれる。試料が多孔性基質に投入されると、それらは、徐々に拡散するため、アッセイは、試験試料が共に処理されずに実行

される。

【0212】

本開示は、以下の制限のない実施例により、さらに図示される。

【0213】

実施例1

評価される被験者

ケースコントロール研究は、Baltimore Longitudinal Study of Aging (BLSA)内で行われた。BLSAは、40年以上、総合的な隔年検査を通じて、大規模なボランティア集団による、規範的な老化現象の長期的な研究である(Shock. The physiological basis of aging. New York: Human Sciences; 1985)

10

【0214】

参加者は、ほとんどが白色人種(96%)であり、上流中産階級の社会・経済的地位を持つ、研究参加には19歳から92歳の地域社会に暮らす健康ボランティアであった。さらなる詳細は、表1に提供される。

【0215】

(表1) 年齢層別の被験者数および初期および分類X線の特徴

	初期X線 (1984-1991)		分類X線 (1994-1996)	
	OA (n=21)	対照 (n=61)	OA (n=19)	対照 (n=66)
年齢 (平均値±SD年数)	58.04±15.18	52.31±14.39	69.38±15.69	65.71±14.19
年齢層				
<45	3	16	1	6
45-70	12	36	6	31
>70	6	9	12	29
男性:女性	9:12	25:36	8:11	29:38
肥満度指数 (kg/m ²)	25.38±3.07	25.55±4.37	26.72±4.75	26.88±4.84

20

【0216】

1984年から1991年の間、両手の単一の後方から前方への(PA)放射線写真、および体重を支える、十分に伸ばした両膝の前後(AP)の放射線写真が、1984年から1991年の間に半年ごとの一度以上の訪問で取得され、同様の手順を用いて取得した膝のX線の複写セットは、1995年から1998年の間で半年ごとの訪問の際に取得された。初期およびフォローアップのX線の平均間隔は、約10年であった(Hochberg et al. Osteoarthritis Cartilage 12 Suppl A: S45-8, 2004)。

30

【0217】

1984年から1991年の間に撮られたすべての放射線写真は、アトラスの標準放射線写真で説明されたようにKellgren-Lawrence(KL)を用いて、二人の訓練された助手により1992年から1993年にOAのために単独で評価された(Kellgren and Lawrence, Atlas of Standard Radiographs of Arthritis. The Epidemiology of Chronic Rheumatism. 1963;11)。膝のOAの定義は、どちらか一方でも膝のKLグレードが2より高いものとして定義された。手のOAは、どちらか一方でも手の遠位指節間(DIP)、近位指節間(PIP)、第一手根中手(CMC1)関節にあたる1つ以上でKLのグレードが2より高いものとして定義された。対の放射線写真は、二人の訓練を受けた助手、意見の不一致を判定する第三の訓練を受けた助手により、参加者の身元確認、検査の時間および配列から盲目的に行われた。二人の検査人の間でのKLグレードでの同意のためのクラス内相関係数は、基準およびフォローアップフィルムで0.83から0.85であった(Scott et al. Invest. Radiol. 28:497-501, 1993)。

40

【0218】

BLSAの参加者が、基準X線セットでOA、および対応する時間間隔で取得した血清

50

試料のセットの証拠がないとして記録された手および膝のX線の2セットを持つ場合、適格者とされた。ここに報告されたデータは、初期X線で同時に取得した1つめの試料、および対照から症例を判別する第2X線の時期に取得した第2試料からのものである。初期X線に先立って、約5年参加者を管理することから取得した第3の試料も分析された。

【0219】

第2X線において、片膝または両膝および片手または両手にX線写真でOAを有する参加者は、偶発的なOA症例として分類された。両時点で「正常な」膝と手のX線を有する参加者は、対照となる。年齢、性別および肥満度指数により一致した3つの対照がそれぞれの偶発的なOA症例として選択された。これらの詳細は、図1に説明されている。

【0220】

実施例2

Rolling Circle Amplification (RCA) タンパク質マイクロアレイ

【0221】

スライドガラスには、3-シアノプロピルトリエトキシシランで洗浄され、誘導体化された。スライドは、スライドを直径0.65cmの16のウェルに分割したテフロンマスクまたは、サブアレイと称する循環分析サイトを装備した(図2)。それぞれのマイクロアレイスポットに溶滴(~350pL)を分注する、圧電性のチップを備えたPerkin-Elmer Spot Array Enterpriseの非接触アレイヤーを用いて印刷を仕上げた。抗体には、確定位置で0.5mg/mLの濃度で適応した。各チップは、アレイ1、2、3、4、5、または6のいずれかのうち1タイプのアレイ16枚のコピーで印刷した。下記の表2~7に示されたように、各サブアレイで4通作成したスポットを用いて抗体のセットを印刷した。

【0222】

印刷後、チップは、軽視顕微鏡を用いて検査した。観測された欠落スポットの割合が5%より大きい場合、失敗したバッチおよびスライドは、直ちに処分された。ここに説明されたすべての印刷では、抗体機能の100%および95%を超えるビオチン口径測定器を印刷した。

【0223】

2つの方法で条件付きの試薬セットに呼応して、マイクロアレイチップを認証した。初めに1から3の異なるサイトカインの混合物を高強度信号に供給するために準備し、(抗体検出器の最大総補体までの異なる混合物を扱う、各ウェルを備えた)チップにある14のウェルに使用した。空白の対照として2つのアレイを使用した。チップを発展、走査し、結果の信号を特定のアレイの位置地図と比較した。第2に、周知の試料マトリクスを用いて、特定アレイですべてのタンパク質検体の滴定品質管理が行われた。正常ヒューマン血清とヘパリン化血漿は、ストレートまたは、アレイ中にすべてのタンパク質検体を代表する精製された組み換えサイトカインを用いた溶液で測定した。混合溶液は、サイトカインのっていない対照試料のための2つのサブアレイに加えて、サイトカイン濃度が9,000pg/mLから37pg/mL含まれたスライドのサブアレイを滴定した。データは定量化され、アレイ中のすべてのタンパク質分析物に関して、濃度の関数として強度挙動機能を検定するために滴定曲線が生成された。これらをもとにして、アレイ機能および試薬セットの活性を確認するためにこのデータを使用した。

【0224】

(表2)アレイ1のタンパク質分析物

10

20

30

40

	分析物	名称
1	ANG	アンジオゲニン
2	BLC (BCA-1)	B-リンパ球化学誘引物質
3	EGF	上皮細胞増殖因子
4	ENA-78	上皮細胞由来好中球活性化ペプチド
5	Eot	エオタキシン
6	Eot-2	エオタキシン-2
7	Fas	Fas (CD95)
8	FGF-7	繊維芽細胞増殖因子-7
9	FGF-9	繊維芽細胞増殖因子-9
10	GDNF	グリア細胞株由来神経栄養因子
11	GM-CSF	顆粒球マクロファージコロニー刺激因子
12	IL-1ra	インターロイキン1受容体拮抗物質
13	IL-2 sR α	インターロイキン2可溶性受容体 α
14	IL-3	インターロイキン3
15	IL-4	インターロイキン4
16	IL-5	インターロイキン5
17	IL-6	インターロイキン6
18	IL-7	インターロイキン7
19	IL-8	インターロイキン8
20	IL-13	インターロイキン13
21	IL-15	インターロイキン15
22	MCP-2	単球走化性タンパク質2
23	MCP-3	単球走化性タンパク質3
24	MIP-1 α	マクロファージ炎症性タンパク質1 α
25	MPIF	骨髄性前駆細胞抑制因子1
26	OSM	オンコスタチンM
27	PlGF	胎盤増殖因子

10

20

30

【 0 2 2 5 】

(表3) アレイ2のタンパク質分析物

	分析物	名称
1	AR	アンフィレグリン
2	BDNF	脳由来神経栄養因子
3	Flt-3 Lig	f m s 様チロシンキナーゼ-3 リガンド
4	GCP-2	顆粒球走化性タンパク質 2
5	HCC4 (NCC4)	血液濾液 C C ケモカイン 4
6	I-309	I-309
7	IL-1 α	インターロイキン 1 α
8	IL-1 β	インターロイキン 1 β
9	IL-2	インターロイキン 2
10	IL-17	インターロイキン 1 7
11	MCP-1	単球走化性タンパク質 1
12	M-CSF	マクロファージコロニー刺激因子
13	MIG	インターフェロン γ により誘導されたモノカイン
14	MIP-1 β	マクロファージ炎症性タンパク質 1 β
15	MIP-1 δ	マクロファージ炎症性タンパク質 1 δ
16	NT-3	ニューロトロフィン 3
17	NT-4	ニューロトロフィン 4
18	PARC	肺および活性化調節ケモカイン
19	RANTES	活性化時に調節される、正常 T 発現および分泌されると推定される
20	SCF	幹細胞因子
21	sgp130	可溶性糖タンパク質 1 3 0
22	TARC	胸腺および活性化調節ケモカイン
23	TNF-RI	腫瘍壊死因子受容体 I
24	TNF- α	腫瘍壊死因子 α
25	TNF- β	腫瘍壊死因子 β
26	VEGF	血管内皮増殖因子

10

20

30

【 0 2 2 6 】

(表 4) アレイ 3 のタンパク質分析物

	分析物	名称
1	BTC	ベータセルリン
2	DR6	細胞死受容体 6
3	Fas Lig	Fas リガンド
4	FGF 酸 (FGF-1)	酸性線維芽細胞増殖因子
5	フラクタルカイン	フラクタルカイン
6	GRO-β	増殖関連癌遺伝子 β
7	HCC-1	血液濾液 C C ケモカイン 1
8	HGF	肝細胞増殖因子
9	HVEM	ヘルペスウイルス侵入メディエーター
10	ICAM-3 (CD50)	細胞間接着分子 3
11	IGFBP-2	インスリン様成長因子結合タンパク質 2
12	IL-2 R γ	インターロイキン 2 受容体 γ
13	IL-5 R α (CD125)	インターロイキン 5 受容体 α
14	IL-9	インターロイキン 9
15	レプチン/OB	レプチン
16	L-セレクトリン(CD62L)	白血球セレクトリン
17	MCP-4	単球走化性タンパク質 4
18	MIP-3 β	マクロファージ炎症性タンパク質 3 β
19	MMP-7 (総量)	マトリックスメタロプロテイナーゼ 7
20	MMP-9	マトリックスメタロプロテイナーゼ 9
21	PECAM-1 (CD31)	血小板内皮細胞接着分子-1
22	RANK	NF- κ -B の受容体アクチベーター
23	SCF R	幹細胞因子受容体
24	TIMP-1	メタロプロテイナーゼ 1 の組織阻害剤
25	TRAIL R4	TNF 関連アポトーシス誘導性リガンド受容体 4
26	VEGF-R2 (Flk-1/KDR)	血管内皮増殖因子受容体 2
27	ST2	インターロイキン 1 受容体 4

10

20

30

【 0 2 2 7 】

(表 5) アレイ 4 のタンパク質分析物

	分析物	名称
1	ALCAM	活性化白血球細胞接着分子
2	β -NGF	β 神経増殖因子
3	CD27	CD27
4	CTACK	皮膚T細胞誘引ケモカイン
5	CD30	CD30
6	Eot-3	エオタキシン-3
7	FGF-2	線維芽細胞増殖分子-2 (FGF 塩基性)
8	FGF-4	線維芽細胞増殖分子-4
9	フォリスタチン	フォリスタチン
10	GRO- γ	増殖関連癌遺伝子 γ
11	ICAM-1	細胞間接着分子1
12	IFN- γ	インターフェロン γ
13	IFN- ω	インターフェロン ω
14	IGF-1R	インスリン様成長因子I受容体
15	IGFBP-1	インスリン様成長因子結合タンパク質1
16	IGFBP-3	インスリン様成長因子結合タンパク質3
17	IGFBP-4	インスリン様成長因子結合タンパク質4
18	IGF-II	インスリン様成長因子II
19	IL-1 sR1	インターロイキン1可溶性受容体I
20	IL-1 sRII	インターロイキン1可溶性受容体II
21	IL-10 R β	インターロイキン10受容体 β
22	IL-16	インターロイキン16
23	IL-2 R β	インターロイキン2受容体 β
24	I-TAC	インターフェロン γ 誘導性T細胞 α 化学誘引物質
25	Lptn	リンフォタクチン
26	LT β R	リンホトキシン β 受容体
27	M-CSF R	マクロファージコロニー刺激因子受容体
28	MIP-3 α	マクロファージ炎症性タンパク質3 α
29	MMP-10	マトリックスメタロプロテイナーゼ10
30	PDGF R α	血小板由来増殖因子受容体 α
31	PF4	血小板因子-4
32	sVAP-1	可溶性血管付着タンパク質-1
33	TGF- α	形質転換増殖因子 α
34	TIMP-2	メタロプロテイナーゼ2の組織阻害剤
35	TRAIL R1	TNF関連アポトーシス誘導性リガンド受容体1
36	VE-カドヘリン	血管内皮カドヘリン
37	VEGF-D	血管内皮増殖因子-D

10

20

30

40

【 0 2 2 8 】

(表6) アレイ5のタンパク質分析物

	分析物	名称
1	4-1BB (CD137)	4-1BB
2	ACE-2	アンジオテンシン I 変換酵素-2
3	AFP	α フェトプロテイン
4	AgRP	アグーチ関連タンパク質
5	CD141	トロンボモジュリン / CD 141
6	CD40	CD40
7	CNTF R α	繊毛様神経栄養因子受容体 α
8	CRP	C反応性タンパク質
9	D-ダイマー	D-ダイマー
10	E-セレクトイン	E-セレクトイン
11	HCG	ヒト絨毛性ゴナドトロピン
12	IGFBP-6	インスリン様成長因子結合タンパク質 6
13	IL-12 (p40)	インターロイキン 12 p 40
14	IL-18	インターロイキン 18
15	LIF R α (gp190)	白血病抑制因子可溶性受容体 α
16	MIF	マクロファージ遊走阻害因子
17	MMP-8 (総量)	マトリックスメタロプロテイナーゼ-8
18	NAP-2	好中球活性化ペプチド 2
19	好中球エラスターゼ	好中球エラスターゼ
20	PAI-II	プラスミノゲンアクチベーター阻害剤-II
21	プロラクチン	プロラクチン
22	タンパク質 C	ヒトタンパク質 C
23	タンパク質 S	ヒトタンパク質 S
24	P-セレクトイン	P-セレクトイン
25	TSH	甲状腺刺激ホルモン

10

20

【 0 2 2 9 】

(表 7) アレイ 6 のタンパク質分析物

30

	分析物	名称
1	6Ckine	6Ckine
2	ACE	アンジオテンシン変換酵素
3	CA 125	癌抗原 1 2 5
4	CNTF	繊毛様神経栄養因子
5	エンドスタチン	エンドスタチン
6	エンドセリン3	エンドセリン3
7	ErbB1	上皮細胞増殖因子受容体 1
8	ErbB2	上皮細胞増殖因子受容体 2
9	FGF R3 (IIIc)	線維芽細胞増殖因子受容体 3 I I I cアイソフォーム
10	FGF-6	線維芽細胞増殖因子-6
11	FGF-R3 (IIIb)	線維芽細胞増殖因子受容体 3 I I I bアイソフォーム
12	G-CSF	顆粒球コロニー刺激因子
13	HB-EGF	ヘパリン結合 E G F 様増殖因子
14	IFN-a	インターフェロン α
15	LIF	白血病抑制因子
16	MMP-1	マトリックスメタロプロテイナーゼ 1
17	MMP-2	マトリックスメタロプロテイナーゼ 2
18	オステオポンチン	オステオポンチン
19	PAI-1	プラスミノゲンアクチベーター阻害剤 1 型
20	PDGF Rb	血小板由来増殖因子受容体 β
21	PEDF	色素上皮由来因子
22	sVCAM-1	可溶性 V C A M - 1
23	TGF- β RIII	形質転換増殖因子 β 受容体 I I I
24	Tie-2	I g および E G F 相同ドメイン 2 を有するチロシンキナーゼ
25	uPA	ウロキナーゼ・プラスミノゲンアクチベーター
26	uPAR	ウロキナーゼ・プラスミノゲンアクチベーター受容体
27	VEGF R3	VEGF 受容体 3

10

20

30

【 0 2 3 0 】

実施例 3

Rolling Circle Amplification (RCA) 免疫学的検定

この実施例は、調査の参加者から少なくとも2つの異なる時点(分類時期および10年前)で採取した血清中で、表2~7に記載されている169のタンパク質の存在を分析するための使用方法を説明するものである。当業者は、類似の方法がほかのタンパク質および異なる試料(尿または滑液など)を分析するために使用されることを十分理解しうる。RCA信号増幅を有する免疫測定を行うための基礎は、周知のことである(例えば、Schweitzer et al., Nat. Biotechnol. 20:359-65、2002、Kingsmore et al. Curr. Opin. Biotechnol. 14:74-81、2003、および Perlee et al. Proteome Sci. 2:9、2004を参照)。

40

【 0 2 3 1 】

アッセイに先立って、室温で保存された密閉された容器から取り出され、湿度を管理された部屋で、スライドを開封した(45~55%)。スライドは、Seablock(Pierce Chemical Co.)を用いて閉鎖し、湿気のある部屋の中で37で一時間のPBSを備え、一対一の割合に薄められた。ブロッキング溶液を除去後、試料の使用に先立って、Brij 35の1xPBS/0.5%を用いて2回洗浄した。4通作成で各169のタンパク質(表2~7)を試験した。4つの対照には、全滴定曲線上で4

50

つのアンカー・ポイントに対応する熟知の濃度を持つ各試料スライドに含んだ。試験試料は、残り12のサブアレイでアッセイした。

【0232】

1984年から1991年の間に取得した初期の膝および手のX線にある、深刻なOAでない被験者は、1995年から1998年の間に行われたフォローアップのX線によりOA症例(n=19)またはOAでない対照(n=66)で分類され、年齢、性別および肥満度指数により一致させた。分類時期および10年前に取得した血清試料は、169のタンパク質を分析したマイクロアレイプラットフォームに適用した。すべての血清試料は、夜間絶食後、参加者より取得し、直ちに処理し、検査まで-80°Cで保存した。分析に先立って、冷凍状態の血清試料(216の試料、OAでない被験者から170、OA被験者より46)を解かし、粒子状物質を除去するために遠心分離し、Heteroblock(Omega)の0.25mg/ml、IIR(Bioreclamation)の0.25mg/mlおよびTween-20の0.1%を用いて混合した。その後、20μLの処理済の試料は、各サブアレイに適用し、成形複合体は、RCA間接滴定測定を用いて検出した。

10

【0233】

スライドは、LS200スキャナー(TECAN)を用いて走査した。走査像は、特許ソフトウェア(Molecular Staging, Inc.)を用いて分析した。各品質管理および試料のためにマイクロアレイスポットの蛍光強度を分析し、その結果である平均強度を決定した。選択したタンパク質の用量反応曲線は、検出強度が背景をはるかに超え、被分析物濃度を増加させると共に強度を増加することを示した。対照空白よりも平均信号強度が4倍高いタンパク質は、Z値により標準化し、多変量解析法(有意性p<0.05)を用いて、症例および対照間で比較した。

20

【0234】

スライドからスライドへの精度は、回帰に基づいた標準化を用いて改善された。スライドからスライドの変動(CV)は、それぞれのアレイ1、2、3、4、5および6に対して、17%、20%、17%、19%、18%、および17%であった。最低基準を満たした合格率である85%を超える、試料の88%以上が品質管理を合格し、MSIのSOPによるデータ生成の無事完成を示す。失敗した主要源は、試料不足であった。

30

【0235】

実施例4

共分散分析を用いたOAバイオマーカーの検証

ここでは、実施例3で取得したデータを分析するのに使用した方法を説明する。実施例5では、データを分析するために使用したもう1つのアルゴリズムを説明する。

【0236】

データは、2つの変化する変動を安定させ、データの標準化を向上するために対数ベースであった。検査された169のタンパク質のうち、68は、非特異性機能を持つBLANKの総変動よりも高い総変動(分散)を示した。BLANKよりも4倍高い平均強度の差異を有する68のタンパク質検体は、統計分析に含まれた。blankの評価は、非特異性信号に反する安全装置に含まれた。blankの分析は、各アレイの分散分解を検証することにより達成される。実験誤差による分散は、ほとんどのタンパク質検体に比較でき、生物学的変動よりも一般的に低い。これは、測定の再現性が生物学的差異を検出するのに十分低かったことを示す。しかしながら、各ウェルに印刷されるBLANK機能(獲得抗体を印刷するのに使用されるキャリアタンパク質を含む)は、実験誤差よりも大きい分散を示し、しばしば、調査タンパク質検体のいくつかで観測された分散に比較できる。

40

【0237】

理想としては、BLANKの分散は、観測された実験誤差と同等であるべきである。BLANKの調整を行うために異なる方法はあるが、使用した方法は、特定のプラットフォーム経験に基づいている。その手順は、BLANKの分散よりも高くするために、特定機能の総分散を必要とする、保守的なアプローチを示す。言い換えれば、BLANKの分散

50

は、実験誤差の測定として使用される。加えて、特定機能の平均強度は、BLANKよりも4倍高くなる必要がある(均等目盛上)。

【0238】

共分散分析は、年齢とOAに関連したタンパク質検体の変化を決定するのに使用された。SAS(登録商標)混合の手順(SAS Institute Inc.、1992年、SAS Technical Report P-229、SAS/STAT Software: Changes and Enhancements, Release 6.07、Cary、NC:SAS Institute Inc.)は、年齢とOAと共に発現したタンパク質検体の有意な変化を決定するために適用した。PROCの混合アルゴリズムは、欠落した値への安定性、さらに高度なモデル化法のための微妙な真の共分散構造への能力、および一変量の分析を比べる強化された力に基づいて選択された。

10

【0239】

それぞれの統計的なモデルは、年齢と分析を備えたタンパク質検体レベルの関連を分析するのに使用された。被験者モデル内で3つ(年齢非依存、共通の傾きおよび異なる傾き)が共分散として年齢を備えた、ベースライン(時点1)タンパク質検体レベルと変化を利用して適応された。

年齢非依存モデル: $ExpressionAtTimePoint2 = \text{ベースライン} + OA + \text{性別}$

共通の傾きモデル: $ExpressionAtTimePoint2 = \text{ベースライン} + OA + d_{age} + \text{性別}$ 、 $(d_{age} = AgeAtTimepoint2 - AgeAtBaseline)$

20

異なる傾きモデル: $ExpressionAtTimePoint2 = \text{ベースライン} + OA + d_{age} * OA + \text{性別}$

【0240】

これらのモデルは、長期的な分析に反映し、それは、ベースライン値での差異のような、被験者効果内で調整される。

【0241】

同様に、3つの被験者モデル(年齢非依存、共通の傾きおよび異なる傾き)間では、ベースライン調整なしに時点1と時点2で調整した。

年齢非依存モデル: $(ExpressionAtTimePoint1 \text{または} ExpressionAtTimePoint2) = OA + \text{性別}$

30

共通の傾きモデル: $(ExpressionAtTimePoint1 \text{または} ExpressionAtTimePoint2) = OA + \text{年齢} + \text{性別}$ 、年齢は、特定時点での個人の年齢である。

異なる傾きモデル: $(\text{時点1での発現または時点2での発現}) = OA + \text{年齢} * OA + \text{性別}$

【0242】

これらのモデルは、断面解析に反映する。各タンパク質検体の適切なモデルを選択するためのアプローチは、以下ようになる。

1. 傾きは、モデルの発現 = [ベースライン] + OA + 性別 + 年齢 * OA を用い、零点から異なることを確認する。

40

2. 効果年齢 * OA が、有意である場合、モデルの発現 = [ベースライン] + 性別 + OA + 年齢 + 年齢 * OA を確認する。

3. 年齢 * OA が、段階2で有意である場合、異なる傾きモデルを選択する。

4. 年齢 * OA が、段階2で有意でない場合、共通の傾きモデルを選択する。

5. 年齢 * OA が、段階1で有意でない場合、年齢非依存モデルを選択する。

【0243】

フィッティングの結果が、直線回帰式である。モデル内の各期間の統計的有意性は、PROC混合手順からのタイプIIIの二乗の合計を用いて決定された。効果は、P値が0.05である場合、有意に考慮された。OA(OA、OA * 年齢、OA * 年齢²)に関連した効果に対する発現での統計的に有意な(P値 < 0.05)差異を有するタンパク質検

50

体は、表 8 に示される。表 8 での「モデル」欄は、上記で検討された 3 つの異なるモデルを示す。「調査タイプ」欄の「長期的」は、共分散としてのベースラインを備えたモデルに関連する。「調査タイプ」欄の「ベースライン」または「時点 2」は、ベースラインまたは「時点 2」のは発現レベルが、モデル内の左側として使用された。表 8 に示されたように、19 のタンパク質は、健康対照と比較したように、O A に関連した発現で有意に (p 値 0 . 0 5) 異なった。これら 19 のタンパク質検体のうち、11 の発現は、1 つ以上の効果のために有意に異なった。

【 0 2 4 4 】

(表 8) 時間と共に O A および健康対照間で有意な差異 (p 値 0 . 0 5) を示すタンパク質

タンパク質	効果	モデル	調査タイプ	OAの傾向	p値
6Ckine	dage*OA	異なる傾き	長期的	OAでは、時間と共に増加	<.0001
BDNF	年齢*OA	異なる傾き	ベースライン	両時点において、OAでは、年齢が上がるにつれて高くなり、年齢が下がるにつれて低くなる	0.002
BDNF	OA	異なる傾き	ベースライン		<.0001
BDNF	年齢*OA	異なる傾き	時点2		0.007
BDNF	OA	異なる傾き	時点2		0.001
EGF	年齢*OA	異なる傾き	ベースライン	OAでは、年齢が上がるにつれて高くなり、年齢が下がるにつれて低くなる	<.0001
EGF	OA	異なる傾き	ベースライン		0.02
EGF	OA	年齢非依存	時点2	OAが対照よりも低い	0.009
Eot2	OA	年齢非依存	時点2	OAが対照よりも低い	<.0001
HCC1	OA	年齢非依存	ベースライン	OAが対照よりも高い	0.02
ICAM3	OA	年齢非依存	時点2	OAが対照よりも高い	0.02
ICAM3	dage*OA	異なる傾き	長期的	OAでは年齢と共に増加	0.02
IGFBP-4	OA	年齢非依存	時点2	OAが対照よりも高い	0.03
IL-2	年齢*OA	異なる傾き	時点2	OAでは、年齢が上がるにつれて高くなる	<.0001
IL-2	OA	異なる傾き	時点2	OAがより高い	0.001
レプチン	OA	年齢非依存	ベースライン	OAが対照よりも高い	0.05
MIG	年齢*OA	異なる傾き	時点2	OAでは、年齢が上がるにつれて高くなる	<.0001
MIG	OA	異なる傾き	時点2	OAが対照よりも高い	0.02
MIP-1β	OA	年齢非依存	長期的	OAでは、時間と共に増加	0.02
MIP-1δ	OA	年齢非依存	長期的	OAでは、時間と共に減少	0.02
MMP7	OA	共通の傾き	ベースライン	OAが対照よりも高い	0.007
MMP7	年齢*OA	異なる傾き	時点2	OAでは年齢が下がるにつれて高くなる	<.0001
MMP7	OA	異なる傾き	時点2	OAが対照よりも高い	0.001
MPIF-1	年齢*OA	異なる傾き	時点2	OAでは年齢が上がるにつれて高くなる	0.0005
MPIF-1	OA	異なる傾き	時点2	OAが対照よりも高い	0.006
プロラクチン	年齢*OA	異なる傾き	ベースライン	対照では、年齢が上がるにつれて高くなり、OAでは、年齢による差異なし	0.001
プロラクチン	OA	異なる傾き	ベースライン		0.05
TARC	OA	共通の傾き	時点2	OAが対照よりも低い	0.02
TGF-β RIII	OA	年齢非依存	時点2	OAがより高い	0.001
TGF-β RIII	dage*OA	異なる傾き	長期的	OAでは、年齢が上がるにつれて高くなる	0.02
UPAR	dage*OA	異なる傾き	長期的	OAでは、時間と共に増加	<.0001
UPAR	OA	異なる傾き	長期的		0.02
VCAM-1	dage*OA	異なる傾き	長期的	OAでは、時間と共に増加	0.02
VCAM-1	OA	異なる傾き	長期的		0.01

10

20

30

40

50

【 0 2 4 5 】

上記の統計的なモデルへのデータの適応は、2つの直線回帰式をもたらす。1つめの方程式は、OAの患者と時間の発現値間での直線フィットである。もう1つの直線回帰式は、健康な対照と時間の発現値間での直線フィットである。各直線回帰は、切片および傾きで説明される。傾きおよび切片の概算の誤差はまた、決定される。傾きがOAおよび健康対照の直線フィット間で異なる場合、仮定を分析することが可能である。OAおよび健康対照の直線フィットが異なる場合もまた、比較可能である。図3A-Dは、次に示される

ように統計的なモデルである、異なる傾き、共通の傾き、および年齢非依存で、傾きおよび切片の異なる合成を示す。

【0246】

効果OAが有意である場合、タンパク質の発現の直線回帰フィットがOAおよび健康対照間で異なることを示す(図3A、CおよびD参照)。

【0247】

効果 $dage * OA$ ($dage = AgeAtTimepoint2 - AgeAtBaseline$)は、長期調査タイプに関するものである。効果 $dage * OA$ は、有意である場合、時間と共にタンパク質発現の直線回帰フィットの傾きが、OAおよび健康対照間で異なることを示す(図3AおよびBに類似)。

10

【0248】

効果年齢*OA(年齢は、AgeAtTimepoint2またはAgeAtBaselineの年齢である。)は、時点2およびベースラインに関するものである。効果年齢*OAが有意である場合、時間と共にタンパク質発現の直線回帰フィットの傾きが、OAおよび健康対照間で異なることを示す(図3AおよびBに類似)。

【0249】

共通の傾きモデルは、図3Cに示されている。OAおよび健康対照間のための直線フィットの直線は、互いに平行であり、それは同じ傾きであることを示す。共通の傾きモデルは、切片に有意な差異があるモデルに限定され、共通の傾きモデルのためのOA効果が有意値(p値 0.05)であることを意味する。

20

【0250】

年齢非依存の傾向は、図3Dに示される。発現レベルは、時間と共に変化せず、傾きがゼロの指標となり、切片またはOA効果の差異を示す。

【0251】

結果の要旨は、図4に示される。左に記載されるタンパク質は、活性がOA発症に先立って変化するものであるため、将来OA発症被験者のリスクを予測するために使用可能である。右に記載されるタンパク質は、活性がOAを構築する間に変化するものであるため、OAの経過を診断し、モニタリングするために使用可能である。中央に記載されるタンパク質は、活性がOA発症前後に変化するため、将来、OA発症被験者のリスクを予測し、OAの経過を診断し、モニタリングし、OAの重症度を決定し、またはその合成に使用可能である。

30

【0252】

BDNF、EGFおよびプロラクチンは、ベースラインでOAおよび健康対照間で年齢と共に有意な差異の傾向を示した。BDNFおよびEGFは、OAの患者で年齢と共に増加し、健康対照では、減少した。対照的に、プロラクチンのレベルは、健康対照で増加し、OA患者で安定を維持した。

【0253】

OAおよび健康対照間で、BDNF、EGFおよびMMP7の発現差異におけるOA効果および年齢*OAは、ベースラインで有意である。切片および傾きが直線フィット間で差異があることを示す。ゆえに、BDNF、EGF、MMP7およびプロラクチンの発現の有意な差異は、将来OA発症リスクのような、OAリスクを決定するのに使用可能である。

40

【0254】

HCC1およびレプチンのレベルはまた、OAおよび健康対照間で、年齢のベースライン依存で有意な差異が認められるが、後の時点では見られなかった。これは、HCC1およびレプチンが初期のOAに関連がある可能性があることを示す。

【0255】

MMP-7およびMPIF-1のレベルが健康対照に対してOA患者で年齢と共に減少している一方、BDNF、IL-2およびMIGのレベルは、健康対照に対してOA患者で年齢と共に増加した。

50

【0256】

EGFおよびEoT2のレベルは、OA患者でより低く、年齢に依存していた。対照的に、ICAM3、IGFBP-4およびTGFβ IIIのレベルは、OA患者でより高くなった。

【0257】

ベースラインの差異のような、被験者効果内での調整は、長期的に計画された調査に、その結論を加えることにより達成可能である(表8の「長期的」を参照)。健康対照で観測されたタンパク質検体レベルに対して、6Ckine、ICAM3、uPARおよびVCAM-1のレベルは、診断するのに先立って時間と共にOA患者で増加した。ゆえに、このようなタンパク質は、将来OA発症リスクを予測するために使用可能である。

10

【0258】

長期的検体で有意が認められたモデルは、年齢(年数)で変化すること、変化において調整した年ごとに示された。6ckineの傾きの直線の交差は7年で、ICAM3の傾きの直線の交差は6年で、MIP-1bの傾きの直線の交差は10年で、MIP-1dの傾きの直線の交差は6年で、TGFβ RIIIの傾きの直線の交差は5年で、uPARの傾きの直線の交差は9年で、VCAM-1の傾きの直線の交差は9から10年である。

【0259】

実施例5

年齢によるバイオマーカーの同定

この分析は健康な対照からのタンパク質検体レベルで独占的に行われたものであることを除き、実施例4で使用されたものと同様の統計的なモデルが年齢と共にタンパク質検体レベルの関連を決定するために使用された。

20

【0260】

被験者モデル内で3つ(年齢非依存、共通の傾きおよび異なる傾き)が共分散として年齢を備えた、ベースラインタンパク質検体レベルと変化を利用して適応された。

年齢非依存モデル: $ExpressionAtTimePoint2or3 = \text{ベースライン} + \text{性別}$

共通の傾きモデル: $ExpressionAtTimePoint2or3 = \text{ベースライン} + \text{性別} + \text{dage}$

($dage = AgeAtTimepoint2or3 - AgeAtBaseline$)

異なる傾きモデル: $ExpressionAtTimePoint2or3 = \text{ベースライン} + \text{性別} + \text{年齢} * \text{性別}$

30

【0261】

これらのモデルは、長期的な分析に反映し、それはベースライン値での差異のような被験者効果内での調整を可能とする。

【0262】

3つの被験者モデル(年齢非依存、共通の傾きおよび異なる傾き)間では、ベースライン調整なしに時点1で調整した。

年齢非依存モデル: $ExpressionAtTimePoint1 = \text{性別}$

共通の傾きモデル: $ExpressionAtTimePoint1 = \text{年齢} + \text{性別}$ 、年齢は、時点1での個人の年齢である。

異なる傾きモデル: $ExpressionAtTimePoint1 = \text{年齢} * \text{性別} + \text{性別}$

40

【0263】

これらのモデルは、断面解析に反映する。各タンパク質検体の適切なモデルを選択するためのアプローチは、以下ようになる。

1. 傾きは、モデルの発現 = [ベースライン] + 性別 + 年齢 * 性別を用い、零点から異なることを確認する。

2. 効果年齢 * OAが有意である場合、モデルの発現 = [ベースライン] + 性別 + 年齢 + 年齢 * 性別を確認する。

3. 年齢 * 性別が段階2で有意である場合、異なる傾きモデルを選択する。

50

4. 年齢 * 性別が段階 2 で有意でない場合、共通の傾きモデルを選択する。
 5. 年齢 * 性別が段階 1 で有意でない場合、年齢非依存モデルを選択する。

【0264】

フィッティングの結果は、直線回帰式である。モデルの各期間の統計的な有意は、P R O C 混合の手順からタイプ III の 2 乗の合計を用いて決定された。効果は、P 値が 0 . 0 5 以下である場合、有意に考慮された。

【0265】

年齢 (d a g e 、 d a g e * 性別、年齢、性別 * 年齢) に関連した効果に対する発現での統計的に有意な (P 値 0 . 0 5) 差異を有するタンパク質分析物は、表 9 に示される。表 9 での「モデル」欄は、上記で検討された 3 つの異なるモデルを示す。「調査タイプ」欄の「長期的」は、共分散としてのベースラインを備えたモデルに関連する。「調査タイプ」欄の「ベースライン」は、ベースラインの発現レベルがモデル内の左側に使用された。表 9 に示されたように、39 のタンパク質は、健康対照からの試料で、年齢および性別に関連した発現において、有意に (p 0 . 0 5) 異なった。これら 39 のタンパク質検体のうち、15 の発現は、1 つ以上の効果のために有意に異なった。

10

【0266】

(表 9) 時間と共に発現に有意な差異を示すタンパク質

タンパク質	効果	モデル	調査タイプ	p 値
6Ckine	年齢	共通の傾き	ベースライン	0.005
6Ckine	dage	共通の傾き	長期的	<0.001
AFP	年齢	共通の傾き	ベースライン	<0.001
AFP	dage*性別	異なる傾き	範囲内	0.019
BDNF	年齢	共通の傾き	ベースライン	0.021
BDNF	dage*性別	異なる傾き	範囲内	<0.001
CNTF Ra	dage	共通の傾き	範囲内	0.012
CTACK	年齢	共通の傾き	ベースライン	0.012
CTACK	dage	共通の傾き	範囲内	0.001
DR6	年齢 * 性別	異なる傾き	ベースライン	0.010
EGF	年齢	共通の傾き	ベースライン	<0.001
EGF	dage	共通の傾き	範囲内	0.002
ENA-78	年齢	共通の傾き	ベースライン	0.001

20

30

Eot2	dage	共通の傾き	範囲内	0.001
HCC4	年齢	共通の傾き	ベースライン	0.012
HCC4	dage*性別_	異なる傾き	範囲内	<0.001
HVEM	年齢 * 性別_	異なる傾き	ベースライン	0.001
ICAM3	年齢 * 性別_	異なる傾き	ベースライン	0.006
IGFBP-1	dage	共通の傾き	範囲内	<0.001
IGFBP2	年齢 * 性別_	異なる傾き	ベースライン	0.043
IGFBP2	dage*性別_	異なる傾き	範囲内	0.001
IGFBP-4	dage*性別_	異なる傾き	範囲内	<0.001
IGFBP-6	年齢	共通の傾き	ベースライン	<0.001
IGFBP-6	dage*性別_	異なる傾き	範囲内	<0.001
IGF-II	dage	共通の傾き	範囲内	0.004
IL-17	dage	共通の傾き	範囲内	<0.001
IL-18	年齢 * 性別_	異なる傾き	ベースライン	0.006
IL-2	年齢	共通の傾き	ベースライン	0.008
IL-2	dage*性別_	異なる傾き	範囲内	<0.001
IL-8	年齢 * 性別_	異なる傾き	ベースライン	0.046
MIF	dage	共通の傾き	範囲内	0.009
MIG	年齢 * 性別_	異なる傾き	ベースライン	<0.001
MMP-1	年齢	共通の傾き	ベースライン	0.003
MMP-1	dage	共通の傾き	範囲内	0.002
MMP7	年齢	共通の傾き	ベースライン	<0.001
MMP7	dage	共通の傾き	範囲内	0.014
MMP-8	dage*性別_	異なる傾き	範囲内	<0.001
MMP9	dage	共通の傾き	範囲内	<0.001
MPIF-1	年齢	共通の傾き	ベースライン	0.009
MPIF-1	dage	共通の傾き	範囲内	0.015
OPN	年齢	共通の傾き	ベースライン	0.002
OPN	dage	共通の傾き	範囲内	<0.001
OSM	dage*性別_	異なる傾き	範囲内	<0.001

10

20

30

40

PECAM1	dage	共通の傾き	範囲内	0.002
プロラクチン	年齢	共通の傾き	ベースライン	0.001
TGF-b RIII	年齢	共通の傾き	ベースライン	0.003
TGF-b RIII	dage	共通の傾き	範囲内	0.020
Tie-2	dage*性別_	異なる傾き	範囲内	<0.001
TIMP1	dage	共通の傾き	範囲内	0.003
uPAR	年齢	共通の傾き	ベースライン	0.009
uPAR	dage	共通の傾き	範囲内	0.001
VEGF	dage	共通の傾き	範囲内	<0.001
VEGF R2	年齢*性別_	異なる傾き	ベースライン	<0.001
VEGF R3	dage	共通の傾き	範囲内	0.001

10

【0267】

解釈は、性別がOA用に置換されたものを除き、表8に提供されたものと同一である。

【0268】

6 C k i n e、C T A C K、E G F、E N A - 7 8、E O T 2、I G F B P - 1、I G F - I I、I L - 1 7、M I F、M M P - 1、M M P - 7、M M P - 9、M P I F - 1、O P N、P E C A M 1、プロラクチン、T G F - b R I I I、T I M P 1、U P A R、V E G F および V E G F R 3 の検体レベルは、年齢と共に変化する。

20

【0269】

A F P、B D N F、H C C 4、I G F B P - 6、I L - 2 は、ベースラインで年齢と共に性別依存の変化が見られるが、年齢関連の変化は、長期的調査で、時点1、2および3の間で、性別に敏感に反応する。

【0270】

I G F B P - 2 は、性別間で異なる年齢依存の変化を示す。

【0271】

これらの結果に基づいて、これらの分子は、時効対照として使用可能である。

30

【0272】

実施例6

A N O V A の混合モデルおよびマイクロアレイの有意な分析を用いたデータ分析 (S A M)

この実施例は、例4で取得したデータを分析するために混合モデルA N O V A およびマイクロアレイの有意な分析 (S A M) を示す。

【0273】

すべての分析は、Zスコアにより標準化された、背景よりも4倍高いすべてのタンパク質のために平均蛍光強度 (M F I) において行われた。混合モデルA N O V A およびマイクロアレイの有意な分析 (S A M) を用いたOA症例および対照間で区別をつけて発現したタンパク質は、同定された。A N O V A 分析では、個人試料は、変量効果として、滞在時間は、反復測定として、および「OA」対「OA未発症」は、固定効果として処理された。S A M 分析では、区別をつけて発現したタンパク質は、反復測定の順列を介して、偽発見率 (F D R < 0 . 2 7) に基づいて決定した (for example see Tusher et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:5116-21, 2001)。

40

【0274】

A N O V A および S A M により同定されたタンパク質 (図5を参照) は、対照とは特異な症例における感受性および特異性は、受信者動作特性 (R O C) 曲線を用いて評価された。特に、すべての測定済みのタンパク質と同様に区別をつけて発現したタンパク質は、決定木の分類のための予測変数として使用され、その結果は、曲線に統合された。

50

【0275】

ANOVAおよびSAMで取得した結果をさらに交差確認するために、主成分分析(PCA)は、差次的発現として同定されたタンパク質の相関行列に基づいて行われた。PCAでは、異なる年齢層の中で変数パターンを探すために、年齢群(22~50、51~69および70~92歳)によるものと同様に、すべての年齢群からの統合データで行われた(PCA分析における合成年齢のみ、図5に示される)。加えて、核タンパク質において、発現値の平均Zスコアは各年齢群に対して、曲線で表された。

【0276】

決定木は、OA未発症参加者から差次的発現したタンパク質がOAを識別した範囲を見極めるために構築された。予期結果の交差評価に関して、多数分類処理は、全タンパク質の発現データのたびに、無作為に構築された2つのデータセットで行われた。総データの70%からなる、第1のデータセットは、訓練データセットとして使用され、残りの30%のデータからなる、そのほかのデータセットは、予期および確認処理のデータとして使用された。業務用のソフトウェアPartekおよびInsightful Miner 3.0および無料のソフトウェアBioconductor Rパッケージを用いて、すべての分析は、別々の訪問に先立って、X線および時点を分類する時間に取得した試料で行われた(Gentleman et al. Genome Biol. 5:R80, 2004)。

【0277】

合計216の血清試料が分析された(偶発的な膝OAとして分類された21の患者から2回以上の訪問で採取した46の試料および66の対照から3回以上の訪問で採取した170の試料)。1つまたは両時点において、症例および対照間で大幅に差異が認められるタンパク質のみ、検討した(初期X線で10、フォローアップのX線で16)。

【0278】

症例および対照間で差次的発現したタンパク質のZスコアは、OAを持たない(対照)残りの予測できるパターンと比較してOA発症を予測できるパターンに温度を示す図のプロットで表された。OA症例および対照間での差異は、さらにより若い年齢群で目覚しかった。同様に、症例および対照を分類するために、第2X線でOAに関連したパターンのZスコアを使用した。2つの時点でOAに関連した血清タンパク質発現パターンの比較は、一般的なOAに関連したタンパク質がOA発症の予測できるものとは異なることを示す。

【0279】

PCA分析の結果は、上記で検討された差次的発現したタンパク質のANOVAおよびSAM検出を確認し、交差検証する。X線分類の時に同定されたOAおよび対照試料間で、16の差次的発現したタンパク質を用いて、PCA分析のための3つの主要素は、総変動の56.5%(それぞれ第1、2、3の主要素として、26.3%、17.9%および12.3%)を占めた。同様に、3つのPCは、初期のX線の時に同定された10の差次的発現したタンパク質を用いたPCAに関して、総変動の57.4%(それぞれ第1、2、3の主要素として、38.8%、9.7%および8.9%)を占めた。さらに、類似のPCAがすべて169のタンパク質を用いて行われた場合、症例および対照間での区別は、有意に低く、第1時点では、総変動の37.0%(それぞれ第1、2、3の主要素として、18.8%、9.9%および8.3%)のみを占め、第2時点では、総変動の34.1%(それぞれ上位3主要素として、14.8%、10.9%および8.4%)を占めた。受信者動作特性(ROC)曲線はまた、16の一般的なOA関連タンパク質および10のOA予測タンパク質のうち、再帰的決定木分類(Zhang et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:6730-5, 2001)を用いて生成され、すべての169のタンパク質で比較した、差次的発現したタンパク質を用いて、優れた曲線の識別力を確認した。図6A-Gは、OAおよび対照試料間で、4つの差次的発現したタンパク質(IL-15、MMP-7、PAI-1およびsVAP-1)のZスコアを示す。

【0280】

数少ない例外を備え、OA関連として同定された特定のタンパク質は、2つの時点で差

10

20

30

40

50

異が認められた(図5)。初期のX線の時に、OAの続発発展は、マトリクス・メタロプロテイナーゼ(MMP)-2、D-ダイマーDD5およびDD6、エオタキシン2、細胞内接着分子(ICAM-1)、およびP-セレクチン、プラスミノゲン活性抑制物質(PAI)-1、およびMMP-7のより大きな発現、可溶性血管付着タンパク質(VAP)-1、およびインターロイキン(IL)-15のより低い発現に有意に関連した。ゆえに、血清タンパク質の変化は、膝および手の骨関節炎(OA)に付随して起こり、OAがX線写真上で明らかになる前の数年で検出されうる。分類X線の時に、Bリンパ球ケモカイン(BLC)、6ケモカイン(Ckine)、マクロファージ抑制タンパク質(MIP)-1、IL-1、IL-2、IL-15、線維芽細胞増殖分子(FGF)-7、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、MMP-7、ニューロトロフィン4(NT4)、ICAM-3、VAP-1、および血管内皮(VE)-カドヘリン、およびインスリン様成長因子結合タンパク質(IGFBP)-2の過剰発現に、予測OAは関連した。これらの16のタンパク質は、X線写真の膝または手のOAの証拠なしで年齢、性別、およびBMIで一致した対照と比較して、X線写真の膝または手のOAの証拠を持つ患者で差次的発現であった。IL-15、MMP-7、sVAP-1およびPAI-1は、両時点で2つの群間で差次的発現であった(図5)。IL-15、MMP-7およびVAP-1は、両時点でOA関連ではすべて高かった。対照的に、PAI-I発現は、両時点でOA関連では低かった。

10

【0281】

結果の要旨は、図5に示される。左に記載されるタンパク質は、活性がOA発症に先立って変化するものであるため、将来OA発症被験者のリスクを予測するために使用可能である。右に記載されるタンパク質は、活性がOAを構築する間に変化するものであるため、OAの経過を診断し、モニタリングするために使用可能である。中央に記載されるタンパク質は、活性がOA発症前後に変化するため、将来、OA発症被験者のリスクを予測し、OAの経過を診断し、モニタリングし、OAの重症度を決定し、またはその合成に使用可能である。

20

【0282】

再帰的な分割(Zhang et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:6730-5, 2001)を用いて、差次的発現したタンパク質およびZスコア閾値を用いて、症例を識別する能力間の関係を決定した。誤判別誤差率は、初期X線(図7A)で10の差次的発現したタンパク質では0.06098で、分類X線訪問(図7B)で同定された16の差次的発現したタンパク質では0.07059であった。個々のタンパク質を段階的に入力した。双方図7Aおよび7Bは、症例および対照として分類されている参加者任意のタンパク質値が、訪問により異なり(PAI-1)、また、ほかの発現したタンパク質(ICAM-1)の発現およびレベルにより影響を受ける可能性がある。

30

【0283】

ゆえに、16のタンパク質は、対照と比較して、OA関連の差次タンパク質活性を有した。4つのタンパク質(MMP-7、IL-15、PAI-1およびsVAP-1)はまた、10年前に取得した試料でも差次的発現した。ゆえに、これら16のタンパク質は、OAの診断または診断の確認、OAの重症度の決定、またはOAの進行のモニタリング、またはその組み合わせのために使用可能である。6つの追加のタンパク質(MMP-2、DダイマーDD5およびDD6、ICAM-1、P-セレクチンおよびEOT-2)は、続発OAに関連したもののみで、従来OAには関連しない。ゆえに、MMP-7、IL-15、PAI-1およびsVAP-1のうち1つ以上の単独または組み合わせである、これら10のタンパク質は、被験者が将来OA発症増加リスクを有するかどうかの決定、OAの進行のモニタリング、またはその組み合わせのために使用可能である。例えば、MMP-7、s-VAP1およびIL-15の高い濃度、およびPAI-1のより低い濃度の検出は、例えば、X線写真の分類に先立って最長10年までOA発症増加リスクを示す可能性がある。例の中には、タンパク質結合が単一のタンパク質を用いて達成された症例および対照間で分類の正確さを向上できる。

40

50

【0284】

要約すれば、マトリクス低下に伴う血清タンパク質の変化、細胞活性化および炎症は、初期OA発症に付随して起こり、数年前にX線写真検出することが可能である。

【0285】

特定の理論でならなければならないということなしに、通常初期X線の時に同定された差次的発現したタンパク質(DD5、DD6、EOT2、ICAM-1、MMP-2、P-セレクチン、IL-15、MMP-7、sVAPおよびPAI-1)は、細胞外のマトリクス低下を起こすことにより、またはこの分解処理をさらに増幅するサイトカインおよびケモカインを生産する能力がある炎症細胞を化学誘引することにより、OAを助長する可能性がある。OA症例でより高い濃度を検出したMMP(MMP-2およびMMP-7)は、OAの顕著な特徴であると考えられる軟骨低下を引き起こす、IL-1およびTNF- α の物質による、線維芽細胞、滑膜細胞および軟骨細胞により生産される可能性がある。MMP-7とは異なり、MMP-2は、通常および骨関節炎の関節の軟骨細胞により構造的に発現される(Duerr et al., Clin. Exp. Rheumatol. 22:603-8, 2004)。ゆえに、初期X線時に観測されたMMP-2の減少レベルは、軟骨のリモデリングおよび健康維持を必要とする不十分な代謝回転に反映する可能性がある。OAを有するプラスミノゲン活性抑制物質(PAI-1)のより低い濃度は、骨および軟骨のプラスミン媒介マトリクス低下を脱抑制することにより、または関節の炎症を残留感覚させることにより、OA発症を助長する可能性がある。線維素溶解要因である、ICAM-1およびVCAM-1は、破骨細胞の接着を伴い、それゆえに、マトリクスおよび骨吸収サイトカインの生産を刺激する可能性がある。驚くほどに、高いICAM-1およびP-セレクチンよりむしろ低い、しばしば炎症状態(Cush et al. Arthritis Rheum. 36:1098-102, 1993)で上昇することが分かった2つの分子は、OAの発展の予測となることが分かった。

10

20

【0286】

また、初期時点で差次的発現であった細胞外のマトリクス関連(MMP-7およびPAI-1)および炎症のタンパク質(sVAP-1、IL-15)に加えて、炎症メディエーター(IL-1、IL-2、MIP-1、6Ckine、BLC)、接着分子(VE-カドヘリン、ICAM-3)、メタロプロテイナーゼの組織阻害剤(TIMP-1)および増殖因子(IGFBP-2、FGF-7、GM-CSF)の広範囲のカテゴリーの下で、タンパク質は、特に予測OAに関連した。細胞外のマトリクス低下(MMP-7およびPAI-1)のメディエーターと共にOAを有する増殖因子の関連性は、修繕の試みのマーカーであることを示す。

30

【0287】

これらの結果はまた、OAが純変性でも軟骨に限定されるものでもないことを示す。MMP-7、IL-15およびs-VAPの高濃度および分類前および分類時点の双方で取得したOA試料に観測されるPAI-1の低濃度は、持続処理と同様に間接初期疾病をとりなす可能性があることを示す。変化によって、被験者にOAへの発展が生じやすくなることを遺伝的に符号化された差異に反映する可能性がある。追加として、4つのタンパク質を除き、初期X線の時にOAに関連したタンパク質のセット(図5を参照)は、第2X線の時に差次的発現されなかった、その逆にこれらのタンパク質の外形は、時間と共に変化に対応し、初期事象のメディエーターは、疾病を維持するメディエーターと区別するものであるという考えを支持する。

40

【0288】

実施例7

OAの存在に関連した差次的活性

この実施例は、OAの存在に関連したタンパク質のレベルにおける特有の変化を説明する。特有のOAリスク分子は、この実施例に記載されているが、当事者は、ほかの分子がこの開示で教えに基づいて使用可能であることの評価を得る。例えば、特有のOAリスク関連分子は、ほかのOAリスク関連分子と結合して使用可能であり、また、OAリスク関連分子の副結合は、(下記の分子の少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なく

50

とも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17)単一またはほかのOAリスク関連分子との結合で使用可能である。

【0289】

特定の実施例では、差次的活性の検出は、タンパク質レベルにおいて差異(増加、減少、または双方)を検出することを含む。あるいは、差次的活性の検出は、核酸レベルにおいて差異(増加、減少、または双方)を検出することを含む。その方法は、活性の差異の偏差を決定することを有し、変化の偏差は、OAの存在に関連することを含む。

【0290】

OAリスク関連分子の特定の実施例は、OA関連の差次的発現であり、変化の方向性(上方制御、または下方制御)、および変化の偏差(fold changeとして発現した)は、表10、11に供給されている。

10

【0291】

(表10)骨関節炎に関連した発現の例示的なパターン

OAリスク関連分子	発現における変化	変化の規模
IL-15	上方制御	少なくとも4倍、Z値は、 $p < 0.05$ で対照よりもOA試料で有意に高い
MMP-7	上方制御	少なくとも4倍、Z値は、 $p < 0.05$ で対照よりもOA試料で有意に高い
sVAP-1	上方制御	少なくとも4倍、Z値は、 $p < 0.05$ で対照よりもOA試料で有意に高い
PAI-1	下方制御	少なくとも4倍、Z値は、 $p < 0.05$ で対照よりもOA試料で有意に低い
IL-1 α	上方制御	少なくとも4倍、Z値は、 $p < 0.05$ で対照よりもOA試料で有意に高い
IL-2	上方制御	少なくとも4倍、Z値は、 $p < 0.05$ で対照よりもOA試料で有意に高い
MIP- α	上方制御	少なくとも4倍、Z値は、 $p < 0.05$ で対照よりもOA試料で有意に高い
BLC	上方制御	少なくとも4倍、Z値は、 $p < 0.05$ で対照よりもOA試料で有意に高い
6-Ckine	上方制御	少なくとも4倍、Z値は、 $p < 0.05$ で対照よりもOA試料で有意に高い
FGF-7	上方制御	少なくとも4倍、Z値は、 $p < 0.05$ で対照よりもOA試料で有意に高い
GM-CSF	上方制御	少なくとも4倍、Z値は、 $p < 0.05$ で対照よりもOA試料で有意に高い
IGFBP-2	上方制御	少なくとも4倍、Z値は、 $p < 0.05$ で対照よりもOA試料で有意に高い
NT4	上方制御	少なくとも4倍、Z値は、 $p < 0.05$ で対照よりもOA試料で有意に高い
ICAM-3	上方制御	少なくとも4倍、Z値は、 $p < 0.05$ で対照よりもOA試料で有意に高い
TIMP-1	上方制御	少なくとも4倍、Z値は、 $p < 0.05$ で対照よりもOA試料で有意に高い
VE-カドヘリン	上方制御	少なくとも4倍、Z値は、 $p < 0.05$ で対照よりもOA試料で有意に高い

20

30

40

【0292】

ゆえに、各IL-15、MMP-7、sVAP-1、IL-1、IL-2、MIP-1、BLC、6-Ckine、FGF-7、GM-CSF、IGFBP-2、NT4、ICAM-3、TIMP-1およびVE-カドヘリンは、 $p < 0.05$ で、対照よりもOA試料で有意に高いZ値を有するバックグラウンドよりも少なくとも4倍大きい信号強度を有する。平均値以上のZ値は、上方制御と見なされ、平均値より低いZ値は、下方制御と見なされた。すなわち、IL-15、MMP-7、VAP-1、IL-1、IL-2、MIP-1、BLC、6-Ckine、FGF-7、GM-CSF、IGFBP-2、NT4、ICAM-3、TIMP-1およびVE-カドヘリンは、OA関連量、例えば

50

、バックグラウンドよりも少なくとも4倍大きく、Z値が $p < 0.05$ レベルでOAおよび対照試料間において、有意な差異が見られる量により、上方制御である。さらに、PAI-1の信号強度は、バックグラウンドよりも少なくとも4倍大きかったが、Z値が $p < 0.05$ レベルで対照試料よりもOA試料においては、有意に低下したため、下方制御であった。すなわち、PAI-1は、OA関連量により下方制御である。

【0293】

OAに関連する可能性があるタンパク質発現パターンの一例は、IL-15、MMP-7、およびsVAP-1の上方制御であり、それぞれが $p < 0.05$ レベルで対照試料よりもOA試料においては、有意に高いZ値を有するバックグラウンドよりも少なくとも4倍大きい信号強度を有する。

10

【0294】

OAに関連する可能性があるタンパク質発現パターンの別例は、IL-15、MMP-7、およびsVAP-1の上方制御で、PAI-1の下方制御であり、例えば、それぞれが $p < 0.05$ レベルで対照試料よりもOA試料においては、有意に高いZ値を有する(IL-15、MMP-7およびsVAP-1)または有意に低いZ値を有する(PAI-1)バックグラウンドよりも少なくとも4倍大きい信号強度を有する。

【0295】

さらに、OAに関連する可能性があるタンパク質発現パターンの別例は、IL-1、IL-2、MIP-1、BLC、6-Ckine、FGF-7、GM-CSF、IGFBP-2、NT4、ICAM-3、TIMP-1およびVE-カドヘリンの上方制御であり、それぞれが $p < 0.05$ レベルで対照試料よりもOA試料においては、有意に高いZ値を有するバックグラウンドよりも少なくとも4倍大きい信号強度を有する。

20

【0296】

さらに、OAに関連する可能性があるタンパク質発現パターンの別の特有例は、IL-15、IL-1、IL-2、MIP-1、BLC、6-Ckine、FGF-7、GM-CSF、IGFBP-2、NT4、ICAM-3、TIMP-1およびVE-カドヘリンの上方制御であり、それぞれが $p < 0.05$ レベルで対照試料よりもOA試料においては、有意に高いZ値を有するバックグラウンドよりも少なくとも4倍大きい信号強度を有する。

【0297】

OAに関連する可能性があるタンパク質発現パターンの別例は、sVAP-1、IL-1、IL-2、MIP-1、BLC、6-Ckine、FGF-7、GM-CSF、IGFBP-2、NT4、ICAM-3、TIMP-1およびVE-カドヘリンの上方制御であり、例えば、それぞれが $p < 0.05$ レベルで対照試料よりもOA試料においては、有意に高いZ値を有するバックグラウンドよりも少なくとも4倍大きい信号強度を有する。

30

【0298】

OAに関連する可能性があるタンパク質発現パターンの別例は、IL-15、MMP-7、sVAP-1、IL-1、IL-2、MIP-1、BLC、6-Ckine、FGF-7、GM-CSF、IGFBP-2、NT4、ICAM-3、TIMP-1およびVE-カドヘリンの上方制御で、PAI-1の下方制御であり、例えば、それぞれが $p < 0.05$ レベルで対照試料よりもOA試料においては、有意に高いZ値を有する(IL-15、MMP-7、sVAP-1、IL-1、IL-2、MIP-1、BLC、6-Ckine、FGF-7、GM-CSF、IGFBP-2、NT4、ICAM-3、TIMP-1およびVE-カドヘリン)または有意に低いZ値を有する(PAI-1)バックグラウンドよりも少なくとも4倍大きい信号強度を有する。

40

【0299】

(表11) 骨関節炎に関連した発現の例示的なパターン

OAリスク関連分子	発現における変化	変化の規模
MIP-1β	上方制御	少なくとも4倍、Z値は、p値<0.05で対照よりもOA試料で有意に高い
MIP-1δ	下方制御	少なくとも4倍、Z値は、p値<0.05で対照よりもOA試料で有意に低い
UPAR	上方制御	少なくとも4倍、Z値は、p値<0.05で対照よりもOA試料で有意に高い
VCAM-1	上方制御	少なくとも4倍、Z値は、p値<0.05で対照よりもOA試料で有意に高い
6-Ckine	上方制御	少なくとも4倍、Z値は、p値<0.05で対照よりもOA試料で有意に高い
IL-2	上方制御	少なくとも4倍、Z値は、p値<0.05で対照よりもOA試料で有意に高い
Eot2	下方制御	少なくとも4倍、Z値は、p値<0.05で対照よりもOA試料で有意に低い
IGFBP-4	上方制御	少なくとも4倍、Z値は、p値<0.05で対照よりもOA試料で有意に高い
ICAM-3	上方制御	少なくとも4倍、Z値は、p値<0.05で対照よりもOA試料で有意に高い
MIG	上方制御	少なくとも4倍、Z値は、p値<0.05で対照よりもOA試料で有意に高い
MMP-7	上方制御	少なくとも4倍、Z値は、p値<0.05で対照よりもOA試料で有意に高い
MPIF-1	上方制御	少なくとも4倍、Z値は、p値<0.05で対照よりもOA試料で有意に高い
TARC	下方制御	少なくとも4倍、Z値は、p値<0.05で対照よりもOA試料で有意に低い
TGF-β RIII	上方制御	少なくとも4倍、Z値は、p値<0.05で対照よりもOA試料で有意に高い

10

20

30

40

50

【0300】

ゆえに、各MIP-1、UPAR、VCAM-1、6-Ckine、IL-2、IGFBP-4、ICAM-3、MIG、MMP-7、MPIF-1、およびTGF-β RIIIのそれぞれは、 $p < 0.05$ で、制御よりもOA試料で有意に高いZ値を有するバックグラウンドよりも少なくとも4倍大きい信号強度を有する。すなわち、MIP-1、UPAR、VCAM-1、6-Ckine、IL-2、IGFBP-4、ICAM-3、MIG、MMP-7、MPIF-1、およびTGF-β RIIIは、OA関連量、例えば、バックグラウンドよりも少なくとも4倍大きく、Z値が $p < 0.05$ レベルでOAおよび制御試料間において、有意な差異が見られる量により、上方制御である。さらに、各MIP-1、Eot2、およびTARCの信号強度は、バックグラウンドよりも少なくとも4倍大きく、 $p < 0.05$ レベルで制御試料よりもOA試料においては、有意に低いZ値を有した。すなわち、MIP-1、Eot2、およびTARCは、OA関連量、例えば、バックグラウンドよりも少なくとも4倍大きく、Z値が $p < 0.05$ レベルでOAおよび制御試料間において、有意な差異が見られる量により、下方制御である。

【0301】

OAに関連する可能性があるタンパク質発現パターンの一例は、MIP-1、UPAR、およびVCAM-1の上方制御であり、それぞれが $p < 0.05$ レベルで制御試料よりもOA試料においては、有意に高いZ値を有するバックグラウンドよりも少なくとも4倍大きい信号強度を有する。

【0302】

OAに関連する可能性があるタンパク質発現パターンの別例は、MIP-1、UPAR、VCAM-1、6-Ckine、ICAM-3、およびTGF-β RIIIの上方制御で、MIP-1の下方制御であり、例えば、それぞれが $p < 0.05$ レベルで制御試料よりもOA試料においては、有意に高いZ値を有する(MIP-1、UPAR、VCAM-1、6-Ckine、ICAM-3、およびTGF-β RIII)または有意に低いZ値を有する(MIP-1)バックグラウンドよりも少なくとも4倍大きい信号強

度を有する。

【0303】

さらに、OAに関連する可能性があるタンパク質発現パターンの別例は、MIP-1、UPAR、VCAM-1、6-Ckine、IL-2、IGFBP-4、ICAM-3、MIG、MMP-7、MPIF-1、およびTGF-RIIIの上方制御であり、それぞれが $p < 0.05$ レベルで制御試料よりもOA試料においては、有意に高いZ値を有するバックグラウンドよりも少なくとも4倍大きい信号強度を有する。

【0304】

OAに関連する可能性があるタンパク質発現パターンの別例は、MIP-1、UPAR、VCAM-1、6-Ckine、IL-2、IGFBP-4、ICAM-3、MIG、MMP-7、MPIF-1、およびTGF-RIIIの上方制御で、MIP-1、Eot2、およびTARCの下方制御であり、それぞれが $p < 0.05$ レベルで制御試料よりもOA試料においては、有意に高いZ値を有する(MIP-1、UPAR、VCAM-1、6-Ckine、IL-2、IGFBP-4、ICAM-3、MIG、MMP-7、MPIF-1、およびTGF-RIII)または有意に低いZ値を有する(MIP-1、Eot2、およびTARC)バックグラウンドよりも少なくとも4倍大きい信号強度を有する。

10

【0305】

実施例8

OA発症リスク関連差次的活性

この実施例は、OA発症の増加リスクに関連するタンパク質レベルの特有変化を説明する。特有のOAリスク分子は、この実施例に記載されているが、当事者は、ほかの分子がこの開示の教えに基づいて使用可能であることの評価を得る。例えば、特有のOAリスク関連分子は、ほかのOAリスク関連分子と結合して使用可能であり、また、OAリスク関連分子の副結合は、(下記の分子のうち少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、少なくとも20、少なくとも21、少なくとも22など)単一またはほかのOAリスク関連分子との結合で使用可能である。

20

【0306】

特定の実施例では、差次的活性の検出は、タンパク質レベルにおいて差異(増加、減少、または双方)を検出することを含む。あるいは、差次的活性の検出は、核酸レベルにおいて差異(増加、減少、または双方)を検出することを含む。その方法は、活性の差異の偏差を決定することを有し、変化の偏差は、OAの存在に関連することを含む。)

30

【0307】

OAリスク関連分子の特定の実施例は、OA発症の高リスク関連の差次的発現(少なくとも5年以内に、少なくとも10年以内に、少なくとも15年以内に、少なくとも20年以内に、または、少なくとも30年以内に、OA発症など)であり、変化の検出(上方制御、または下方制御)、および変化の偏差(フォールド変化として発現した)は、表12、13に供給されている。

40

【0308】

(表12) OA発症の高リスクに関連した発現の例示的なパターン

OAリスク関連分子 IL-15	発現における変化 上方制御	変化の規模 少なくとも4倍、Z値は、 $p < 0.05$ で 対照よりもOA試料で有意に高い
MMP-7	上方制御	少なくとも4倍、Z値は、 $p < 0.05$ で 対照よりもOA試料で有意に高い
sVAP-1	上方制御	少なくとも4倍、Z値は、 $p < 0.05$ で 対照よりもOA試料で有意に高い
PAI-1	下方制御	少なくとも4倍、Z値は、 $p < 0.05$ で 対照よりもOA試料で有意に低い
DD5	下方制御	少なくとも4倍、Z値は、 $p < 0.05$ で 対照よりもOA試料で有意に低い
DD6	下方制御	少なくとも4倍、Z値は、 $p < 0.05$ で 対照よりもOA試料で有意に低い
EoT2	下方制御	少なくとも4倍、Z値は、 $p < 0.05$ で 対照よりもOA試料で有意に低い
ICAM-1	下方制御	少なくとも4倍、Z値は、 $p < 0.05$ で 対照よりもOA試料で有意に低い
MMP-2	下方制御	少なくとも4倍、Z値は、 $p < 0.05$ で 対照よりもOA試料で有意に低い
P-セレクチン	下方制御	少なくとも4倍、Z値は、 $p < 0.05$ で 対照よりもOA試料で有意に低い

10

【0309】

ゆえに、各IL-15、MMP-7、およびsVAP-1は、 $p < 0.05$ で、制御よりもOA試料で有意に高いZ値を有するバックグラウンドよりも少なくとも4倍大きい信号強度を有する。すなわち、IL-15、MMP-7、およびsVAP-1は、将来OA発病増加リスク関連量、例えば、バックグラウンドよりも少なくとも4倍大きく、Z値が $p < 0.05$ レベルでOAおよび制御試料間において、有意な差異が見られる量により、上方制御である。さらに、各PAI-1、DD5、DD6、EoT2、ICAM-1、MMP-2およびP-セレクチンの信号強度は、バックグラウンドよりも少なくとも4倍大きい、 $p < 0.05$ レベルで制御試料よりもOA試料においては、有意に低いZ値を有し、下方制御であることを示す。すなわち、PAI-1、DD5、DD6、EoT2、ICAM-1、MMP-2およびP-セレクチンは、将来OA発病増加リスク関連量、例えば、バックグラウンドよりも少なくとも4倍大きく、Z値が $p < 0.05$ レベルでOAおよび制御試料間において、有意な差異が見られる量により、下方制御である。

20

30

【0310】

将来OA発病増加リスクに関連する可能性があるタンパク質発現パターンの一例は、IL-15、MMP-7、およびsVAP-1の上方制御であり、それぞれが $p < 0.05$ レベルで制御試料よりもOA試料においては、有意に高いZ値を有するバックグラウンドよりも少なくとも4倍大きい信号強度を有する。

【0311】

OA発病増加リスクに関連する可能性があるタンパク質発現パターンの別例は、IL-15、MMP-7、およびsVAP-1の上方制御で、PAI-1の下方制御であり、例えば、それぞれが $p < 0.05$ レベルで制御試料よりもOA試料においては、有意に高いZ値を有する(IL-15、MMP-7およびsVAP-1)または有意に低いZ値を有する(PAI-1)バックグラウンドよりも少なくとも4倍大きい信号強度を有する。

40

【0312】

さらに、OA発病増加リスクに関連する可能性があるタンパク質発現パターンの別例は、DD5、DD6、EoT2、ICAM-1、MMP-2およびP-セレクチンの下方制御であり、それぞれが $p < 0.05$ レベルで制御試料よりもOA試料においては、有意に低いZ値を有するバックグラウンドよりも少なくとも4倍大きい信号強度を有する。

【0313】

さらに、OA発病増加リスクに関連する可能性があるタンパク質発現パターンの別の特有例は、IL-15、IL-1、IL-2、MIP-1、BLC、6-Ckine、FGF-7、GM-CSF、IGFBP-2、NT4、ICAM-3、TIMP-1およ

50

びVE - カドヘリンの上方制御であり、それぞれが $p < 0.05$ レベルで制御試料よりもOA試料においては、有意に高いZ値を有するバックグラウンドよりも少なくとも4倍大きい信号強度を有する。

【0314】

OAに関連する可能性があるタンパク質発現パターンの別例は、IL - 15の上方制御で、DD5、DD6、EoT2、ICAM - 1、MMP - 2およびP - セレクチンの下方制御であり、例えば、それぞれが $p < 0.05$ レベルで制御試料よりもOA試料においては、有意に低いZ値を有するバックグラウンドよりも少なくとも4倍大きい信号強度を有する。

【0315】

OAに関連する可能性があるタンパク質発現パターンの別例は、sVAPの上方制御で、DD5、DD6、EoT2、ICAM - 1、MMP - 2およびP - セレクチンの下方制御であり、それぞれが $p < 0.05$ レベルで制御試料よりもOA試料においては、有意に高いZ値を有する(sVAP)または有意に低いZ値を有する(DD5、DD6、EoT2、ICAM - 1、MMP - 2およびP - セレクチン)バックグラウンドよりも少なくとも4倍大きい信号強度を有する。

10

【0316】

OAに関連する可能性があるタンパク質発現パターンの別例は、IL - 15の上方制御で、DD5、DD6、EoT2、ICAM - 1、MMP - 2、PAI - 1およびP - セレクチンの下方制御であり、例えば、それぞれが $p < 0.05$ レベルで制御試料よりもOA試料においては、有意に高いZ値を有する(IL - 15)または有意に低いZ値を有する(DD5、DD6、EoT2、ICAM - 1、MMP - 2、PAI - 1およびP - セレクチン)バックグラウンドよりも少なくとも4倍大きい信号強度を有する。

20

【0317】

OAに関連する可能性があるタンパク質発現パターンの別例は、sVAPの上方制御で、DD5、DD6、EoT2、ICAM - 1、MMP - 2、PAI - 1およびP - セレクチンの下方制御であり、それぞれが $p < 0.05$ レベルで制御試料よりもOA試料においては、有意に高いZ値を有する(sVAP)または有意に低いZ値を有する(DD5、DD6、EoT2、ICAM - 1、MMP - 2、PAI - 1およびP - セレクチン)バックグラウンドよりも少なくとも4倍大きい信号強度を有する。

30

【0318】

(表13) OA発症の増加したリスクに関連した発現の例示的なパターン

OAリスク関連分子	発現における変化	変化の規模
MIP-1β	上方制御	少なくとも4倍、Z値は、p値<0.05で対照よりもOA試料で有意に高い
MIP-1δ	下方制御	少なくとも4倍、Z値は、p値<0.05で対照よりもOA試料で有意に低い
UPAR	上方制御	少なくとも4倍、Z値は、p値<0.05で対照よりもOA試料で有意に高い
VCAM-1	上方制御	少なくとも4倍、Z値は、p値<0.05で対照よりもOA試料で有意に高い
6-Ckine	上方制御	少なくとも4倍、Z値は、p値<0.05で対照よりもOA試料で有意に高い
ICAM-3	上方制御	少なくとも4倍、Z値は、p値<0.05で対照よりもOA試料で有意に高い
TGF-β RIII	上方制御	少なくとも4倍、Z値は、p値<0.05で対照よりもOA試料で有意に高い
BDNF	上方制御	少なくとも4倍、Z値は、p値<0.05で対照よりもOA試料で有意に高い
EGF	下方制御	少なくとも4倍、Z値は、p値<0.05で対照よりもOA試料で有意に低い
HCC1	上方制御	少なくとも4倍、Z値は、p値<0.05で対照よりもOA試料で有意に高い
レプチン	上方制御	少なくとも4倍、Z値は、p値<0.05で対照よりもOA試料で有意に高い
MMP-7	上方制御	少なくとも4倍、Z値は、p値<0.05で対照よりもOA試料で有意に高い
プロラクチン	下方制御	少なくとも4倍、Z値は、p値<0.05で対照よりもOA試料で有意に低い

10

20

【0319】

ゆえに、各MIP-1、UPAR、VCAM-1、6-Ckine、ICAM-3、TGF-RIII、IL-2、HCC、レプチン、MMP-7およびBDNFは、 $p < 0.05$ で、制御よりもOA試料で有意に高いZ値を有するバックグラウンドよりも少なくとも4倍大きい信号強度を有する。すなわち、MIP-1、UPAR、VCAM-1、6-Ckine、ICAM-3、TGF-RIII、IL-2、HCC、レプチン、MMP-7およびBDNFは、OA発病増加リスク関連量、例えば、バックグラウンドよりも少なくとも4倍大きく、Z値が $p < 0.05$ レベルでOAおよび制御試料間において、有意な差異が見られる量により、上方制御である。さらに、各MIP-1、プロラクチンおよびEGFの信号強度は、バックグラウンドよりも少なくとも4倍大きい、 $p < 0.05$ レベルで制御試料よりもOA試料においては、有意に低いZ値を有する。すなわち、MIP-1、プロラクチンおよびEGFは、OA発病増加リスク関連量、例えば、バックグラウンドよりも少なくとも4倍大きく、Z値が $p < 0.05$ レベルでOAおよび制御試料間において、有意な差異が見られる量により、下方制御である。

30

【0320】

OA発病増加リスクに関連する可能性があるタンパク質発現パターンの一例は、MIP-1、UPAR、およびVCAM-1の上方制御であり、それぞれが $p < 0.05$ レベルで制御試料よりもOA試料においては、有意に高いZ値を有するバックグラウンドよりも少なくとも4倍大きい信号強度を有する。

40

【0321】

OA発病増加リスクに関連する可能性があるタンパク質発現パターンの別例は、MIP-1、UPAR、VCAM-1、6-Ckine、ICAM-3、およびTGF-RIIIの上方制御で、MIP-1の下方制御であり、例えば、それぞれが $p < 0.05$ レベルで制御試料よりもOA試料においては、有意に高いZ値を有する(MIP-1、UPAR、VCAM-1、6-Ckine、ICAM-3、およびTGF-RIII)または有意に低いZ値を有する(MIP-1)バックグラウンドよりも少なくとも4倍大きい信号強度を有する。

【0322】

50

さらに、OA発病増加リスクに関連する可能性があるタンパク質発現パターンの別例は、MIP-1、UPAR、VCAM-1、6-Ckine、ICAM-3、TGF-RIII、IL-2、HCC、レプチン、MMP-7およびBDNFの上方制御であり、それぞれが $p < 0.05$ レベルで制御試料よりもOA試料においては、有意に高いZ値を有するバックグラウンドよりも少なくとも4倍大きい信号強度を有する。

【0323】

OA発病増加リスクに関連する可能性があるタンパク質発現パターンの別例は、MIP-1、UPAR、VCAM-1、6-Ckine、ICAM-3、TGF-RIII、IL-2、HCC、レプチン、MMP-7およびBDNFの上方制御で、MIP-1、プラクチン、およびEGFの下方制御であり、それぞれが $p < 0.05$ レベルで制御試料よりもOA試料においては、有意に高いZ値を有する(MIP-1、UPAR、VCAM-1、6-Ckine、ICAM-3、TGF-RIII、IL-2、HCC、レプチン、MMP-7およびBDNF)または有意に低いZ値を有する(MIP-1、プラクチン、およびEGF)バックグラウンドよりも少なくとも4倍大きい信号強度を有する。

10

【0324】

実施例9

OAを診断する

この実施例は、被験者においてOAを診断、または、例えば、ヒトまたは動物の被験者において、OAの事前の診断を確認するために使用可能である方法を説明する。OAリスク関連分子の特有の結合は、このような分析を行うために開示されるが、当事者は、開示されたOAリスク関連分子のすべてを含む結合または副結合など、ほかの結合を使用可能であることは周知のことである。

20

【0325】

被験者から取得した試料(血清試料など)は、開示された方法を用いて分析することができる。一例では、ほかの処理のための二次的OA(外傷)と比べて、被験者は、OA(例えば、手および膝のOA)を一般化する。ある例では、被験者は、患部の関節の痛みおよび腫れなど、OA関連の1つ以上の症状を有する。

【0326】

特定例では、OAの解剖学的形跡を見つけるために日常的に行われる任意の画像検査を行うのに先立って、アッセイを行うことができる。例えば、OAの初期ステージを検出するのは、画像診断法(X線およびMRIなど)では、しばしば困難である。従って、特有の例においてここに説明された分析は、決定的なOAの画像証拠が分かる前にでさえ、OAを検出することが可能である。

30

【0327】

ある例では、抗OA治療法は、被験者がOAを有することをアッセイが示す場合、差次的活性アッセイの結果が知られた時点で、被験者に施される。

【0328】

使用する検出方法のために必要である場合、ヒトまたは動物の被験など、検査被験から取得または生成した試料を操作する。この実施例は、タンパク質発現を分析するための血清試料の前処理を説明するが、当業者は、ほかの生物学試料(尿および滑液など)使用可能であり、発現を分析するその他の方法も使用可能であることは、十分理解することである。血清は、規定通りの方法を用いて血液試料から取得可能である。血清は、粒子状物質を除去するために遠心分離機にかけ、Heteroblock(Omega)の0.25 mg/ml、IIR(Bioreclamation)の0.25 mg/mlおよびTween-20の0.1%を混合する。

40

【0329】

アレイは、試料に適用するのに先立って、特定しない結合を減らすために遮断する。例えば、湿気のある部屋で37で1時間PBSを用いて1対1に薄めた、Seablock(Pierce Chemical Co.)を用いて、アレイを処理することができ

50

る。ブロッキング溶液の除去しながら、アレイは、試料の使用に先立って、Brj 35の1×PBS/0.5%を用いて2度洗浄する。処理済の血清（例えば、10～50μl、20μlなど）は、特有のタンパク質の形成を容認する状態である、抗体複合体（37で30から120分、または37で30分など）の下で、少なくとも4つのOARリスク関連タンパク質を認識する抗体を含むアレイに使用する。非結合タンパク質は、例えば、Brj-35のPBX/0.5%を用いて、アレイを洗浄することにより、除去される。

【0330】

アレイは、制御として供給する他のタンパク質と同様に、1つ以上のOARリスク関連タンパク質（2つ以上、3つ以上、または4つ以上OARリスク関連タンパク質など）を見分ける抗体を含むことができる。具体例では、アレイは、少なくともインターロイキン15（IL-15）、可溶性血管付着タンパク質1（sVAP-1）、マトロプロテイナーゼ7（MMP-7）、プラスミノゲン活性抑制物質1（PAI-1）、インターロイキン1（IL-1）、IL-2、マクロファージ阻止因子（MIP）-1、Bリンパ球ケモカイン（BLC）、6ケモカイン（Ckine）、線維芽細胞増殖因子（FGF）-7、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、インスリン様成長因子結合タンパク質（IGFBP）-2、ニューロトロフィン4（NT4）、ICAM-3、血管内皮（VE）-カドヘリン、およびマトロプロテイナーゼ1の組織阻害剤（TIMP-1）を見分ける抗体を含む。別の具体例では、アレイは、少なくともマクロファージ炎症性タンパク質1（MIP-1）、マクロファージ炎症性タンパク質1（MIP-1）、ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター受容体（UPAR）、および血管細胞接着分子1（VCAM-1）、IL-2、Eot2、IGFBP-4、ICAM-3、インターフェロンにより誘発されるモノカイン（MIG）、MMP-7、骨髄性前駆細胞抑制因子1（MPIF-1）、TGF受容体II（TGF-RII）、および胸腺活性統制ケモカイン（TARC）を見分ける抗体を含み、さらに6-Ckineを見分ける抗体を含むことができる。さらに別の具体例では、アレイは少なくともIL-15、sVAP-1、MMP-7、PAI-1、IL-1、IL-2、MIP-1、BLC、6-Ckine、FGF-7、GM-CSF、IGFBP-2、NT4、ICAM-3、VE-カドヘリン、TIMP-1、MIP-1、MIP-1、UPAR、VCAM-1、Eot2、IGFBP-4、MIG、MPIF-1、TGF-RII、およびTARCを見分ける抗体を含む。

【0331】

例えば、RCA間接免疫学的検定を用いて、アレイ上の血清および抗体のタンパク質間の形成複合体を検出する。二次的ビオチン化検出抗体を、抗体複合体（例えば、37で30から120分間、37で30分間など、Brj-35のPBS/0.5%の中で0.1μg/ml Ab）および取得タンパク質に結合したタンパク質を用いて培養する。上記に説明されたように洗浄することによって、非結合ビオチン化検出抗体を除去する。

【0332】

アレイは、ユニバーサル抗ビオチン抗体を用いて培養され、それは厳密に言えばビオチン化検出抗体上で結合できる。万能抗ビオチン抗体は、相補的円形オリゴヌクレオチドにプレアニールしたプライマー・オリゴヌクレオチドに接合されている。上記に説明されたように洗浄することによって、非結合ビオチン化検出抗体接合を除去する。

【0333】

円周のプライマーの3'末端拡張を認める状況下（37で45分など）で、抗体複合体である、タンパク質に付着しているss-RCA製品をもたらしながら、RCA反応は、DNAポリメラーゼおよび検出精査（Cy5ラベル付きの精査）存在下でのアレイ上に、そのとき行われる。特定の培養状態および濃度は、従来知られている（例えば、参照することによりここに組み込まれるSchweitzer et al., Nat. Biotechnol. 20(4):359-65, 2002を参照）。

【0334】

10

20

30

40

50

アレイを走査し、アレイ上の各タンパク質の平均蛍光強度を決定した。バックグラウンド蛍光強度は、必要に応じて、すべての実験蛍光強度から引くことができる。各タンパク質の強度は、制御または基準値と比較可能である。例えば、基準蛍光信号強度は、OAが存在または未存在な場合、予期されるOAリスク関連タンパク質の値または値範囲である。制御値は、OAを有する、またはOAを所持しない被験者から並列制御試料から取得した各OAリスク関連タンパク質の平均蛍光強度である。ある例では、同年齢の範囲（例えば、 ± 2 年、 ± 5 年または ± 10 年）またはその合成で、制御値は、同姓の被験者の値を示す。

【0335】

OAリスク関連タンパク質の平均蛍光強度が、OAがない基準または制御値に対して、有意な増加（ $p < 0.05$ ）がある場合、またはOAリスク関連タンパク質の平均蛍光強度が、OAの存在下で、基準または制御値に有意な類似値がある場合、OAリスク関連タンパク質は、被験者には過剰発現または上方制御であったと見なされる。別例では、強度値からバックグラウンド信号強度を差し引いた後、OAがない基準または制御値に対して、OAリスク関連タンパク質の平均蛍光強度が、少なくとも50%、少なくとも100%、または少なくとも200%増加する場合、OAリスク関連タンパク質は、被験者には過剰発現または上方制御であったと見なされる。

10

【0336】

OAリスク関連タンパク質の平均蛍光強度が、OAがない基準または制御値に対して、有意な減少（ $p < 0.05$ ）がある場合、またはOAリスク関連タンパク質の平均蛍光強度が、OAの存在下で、基準または制御値に有意な類似値がある場合、OAリスク関連タンパク質は、被験者には過小発現または下方制御であったと見なされる。別例では、強度値からバックグラウンド信号強度を差し引いた後、OAがない基準または制御値に対して、OAリスク関連タンパク質の平均蛍光強度が、少なくとも30%、少なくとも50%、または少なくとも75%減少する場合、OAリスク関連タンパク質は、被験者には過小発現または下方制御であったと見なされる。

20

【0337】

平均蛍光強度を考慮するために、理想としては、平均蛍光強度は、バックグラウンドよりも少なくとも4倍高いことである。

【0338】

OAリスク関連タンパク質のうち少なくとも2つ、少なくとも3つ、または少なくとも4つの検出量（タンパク質のうち少なくとも10、少なくとも15、少なくとも20など）における統計的有意な差異の存在は、被験者がOAを有することを示す。

30

【0339】

実施例10

将来OAを発病するリスクを検出する

この実施例は、例えば、ヒトまたは動物の被験者において、被験者が将来OA発病の増加リスクを有する場合、決定可能である方法を説明する。OAリスク関連分子の特有の結合は、このような分析を行うために開示されるが、当事者は、開示されたOAリスク関連分子のすべてを含む結合または副結合など、ほかの結合を使用可能であることは周知のことである。

40

【0340】

被験者から取得した試料（血清試料など）は、開示された方法を用いて分析することができる。一例では、被験者は、患部の関節の痛みおよび腫れなど、OA関連の他の臨床症状を持たない。特定例では、OAの解剖学的形跡を見つけるためにいくつかの画像検査を行うのに先立って、アッセイを行うことができる。OAの初期ステージを検出するのは、画像診断法（X線およびMRIなど）では、しばしば困難であるため、この実施例は、OA発病のより可能性が高い被験者を同定するための方法を供給し、ゆえに、より注意深いモニタリングまたは処置を必要とされる。

【0341】

50

ある例では、抗OA治療法は、被験者が将来OA発病の増加したリスクを有することをアッセイが示す場合、差次的活性アッセイの結果が知られた時点で、被験者に施される。

【0342】

使用する検出方法のために必要である場合、ヒトまたは動物の被験など、検査被験から取得または生成した試料を操作する。この実施例は、タンパク質発現を分析するための血清試料の前処理を説明するが、当業者は、ほかの生物学試料（尿および滑液など）使用可能であり、発現を分析するその他の方法も使用可能であることは、十分理解することである。血清は、実施例9に記載されているように、規定通りの方法を用いて血液試料から取得可能であり、準備される。

【0343】

実施例9に記載されているように、アレイをブロックし、洗浄し、血清試料を培養する。アレイは、制御として供給する他のタンパク質と同様に、4つ以上のOAリスク関連タンパク質を見分ける抗体を含むことができる。具体例では、アレイは、少なくともインターロイキン15（IL-15）、可溶性血管付着タンパク質1（sVAP-1）、マトロプロテイナーゼ7（MMP-7）、プラスミノゲン活性抑制物質1（PAI-1）、DD5、DD6、エオタキシン2（Eot2）、細胞間接着分子1（ICAM-1）、MMP-2、およびP-セレクチンを見分ける抗体を含む。別の具体例では、アレイは、少なくともマクロファージ炎症性タンパク質1（MIP-1）、マクロファージ炎症性タンパク質1（MIP-1）、ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター受容体（UPAR）、血管細胞接着分子1（VCAM-1）、6-Ckine、ICAM-3、TGF-RIII、脳から派生した神経栄養因子（BDNF）、上皮増殖因子（EGF）、血液濾液CCケモカイン1（HCC1）、レプチン、MMP-7、およびプロラクチンを見分ける抗体を含むことができる。さらに別の具体例では、アレイは少なくともIL-15、sVAP-1、MMP-7、PAI-1、DD5、DD6、Eot2、ICAM-1、MMP-2、P-セレクチン、MIP-1、MIP-1、UPAR、VCAM-1、6-Ckine、ICAM-3、TGF-RIII、BDNF、EGF、HCC1、レプチン、およびプロラクチンを見分ける抗体を含むことができる。

【0344】

例えば、実施例9に記載されたように、RCA間接免疫学的検定を用いて、アレイ上の血清および抗体のタンパク質間の形成複合体を検出する。

【0345】

アレイを走査し、アレイ上の各タンパク質の平均蛍光強度を決定した。バックグラウンド蛍光強度は、必要に応じて、すべての実験蛍光強度から引くことができる。各タンパク質の強度は、制御または基準値と比較可能である。例えば、基準蛍光信号強度は、将来OA発病の増加リスクが存在または未存在な場合、予期されるOAリスク関連タンパク質の値または値範囲である。制御値は、OAリスクを有する、またはOAリスクを所持しない被験者から並列制御試料から取得した各OAリスク関連タンパク質の平均蛍光強度である。ある例では、同年齢の範囲（例えば、±2年、±5年または±10年）またはその合成で、制御値は、同姓の被験者の値を示す。

【0346】

OAリスク関連タンパク質の平均蛍光強度が、将来的なOAリスクがない基準または制御値に対して、有意な増加（ $p < 0.05$ ）がある場合、またはOAリスク関連タンパク質の平均蛍光強度が、将来的なOAリスクの存在下で、基準または制御値に有意な類似値（ $p < 0.05$ ）がある場合、OAリスク関連タンパク質は、被験者において過剰発現または上方制御であったと見なされる。別例では、強度値からバックグラウンド信号強度を差し引いた後、将来OAリスクがない基準または制御値に対して、OAリスク関連タンパク質の平均蛍光強度が、少なくとも50%、少なくとも100%、または少なくとも200%増加する場合、OAリスク関連タンパク質は、被験者には過剰発現または上方制御であったと見なされる。

10

20

30

40

50

【0347】

OAリスク関連タンパク質の平均蛍光強度が、将来的なOAリスクがない基準または制御値に対して、有意な減少 ($p < 0.05$) がある場合、またはOAリスク関連タンパク質の平均蛍光強度が、将来的なOAリスクの存在下で、基準または制御値に有意な類似値 ($p < 0.05$) がある場合、OAリスク関連タンパク質は、被験者において過小発現または下方制御であったと見なされる。別例では、強度値からバックグラウンド信号強度を差し引いた後、将来OAリスクがない基準または制御値に対して、OAリスク関連タンパク質の平均蛍光強度が、少なくとも30%、少なくとも50%、または少なくとも75%減少する場合、OAリスク関連タンパク質は、被験者には過小発現または下方制御であったと見なされる。

10

【0348】

平均蛍光強度を考慮するために、理想としては、平均蛍光強度は、バックグラウンドよりも少なくとも4倍高いことである。

【0349】

OAリスク関連タンパク質のうち少なくとも2つの検出量 (タンパク質のうち少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、少なくとも8つ、少なくとも9つ、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、少なくとも20、少なくとも21、少なくとも22など) における統計的有意な差異の存在は、被験者が将来OA増加リスクを有することを示す。

20

【0350】

実施例11

骨関節炎の重傷度の予測

本実施例は、被験者のOAの重傷度を判定するため、または被験者が発症した場合、どのくらい重傷のOAになるかを予測するために使用することができる方法を説明する。ある実施例において、OAの重傷度は、一般的なOA (例えば、手および膝のOA) の被験者など、OAの被験者において判定される。他の実施例において、被験者が発症した場合、OAがどのくらい重度であるかの予測は、OAの臨床的症狀 (患部関節の痛み、腫れおよび硬直など) はないが、将来OAの発症リスクの増加を示す被験者において、判定される。アッセイは、OAに関連する兆候および症状のオンセット前または後に実行することができる。

30

【0351】

OAの重傷度は、現在、放射線写真結果、症状および関節の機能、および軟骨および骨の代謝を使用して分類される。実施例3で得られたデータは、表14に示すように、OAの重傷度と関連するタンパク質と、OA疾病重傷度の予測であるタンパク質とを判定するために分析されることができる。表8、10および12に挙げる炎症サイトカインおよびケモカインは、疾病の重傷度と関連させることができ、表8、10および12に挙げる成長因子は、X線写真の重傷度と関連させることができる。

【0352】

(表14) OAの重傷度の分類

40

重傷度分類	定義は、手、膝、手および膝を合わせて適用される
放射線写真	明確なOAをもつ関節の合計数 (KLグレード>1)
	KellgrenおよびLawrenceグレードの合計
	関節隙狭小化グレードの合計
	骨増殖体グレードの合計
症状	痛みの症状の存在
	痛みの症状の程度 (痛む関節の数)
	痛みの症状の分布
	痛みの症状の重症度
機能	運動能力 (歩行速度、椅子の立上り時間、膝伸筋力)
軟骨および骨の代謝	尿ヘリコペプチド (helicopeptide)、 ピリジノリン架橋結合血清プロコラーゲンペプチド、ピリジノ リン架橋結合、n-テロペプチド、追加の「バイオマーカー」

10

【0353】

表8および10～13に挙げるOAリスク関連分子を使用して、OAの重傷度は、以下のように判定することができる。ヒトまたは獣医学被験対象などの試験被験者から得た、または派生した試料は、使用される検知方法に必要なように処理される。この実施例は、タンパク質の発現を分析するための血清試料の調製を説明するが、当該分野に精通した者は、他の生体試料 (尿または滑液など) を使用することが可能で、他の発現の分析方法を使用することが可能であることを理解する。血清は、実施例9で説明するように得られ、処理され、(閉鎖され、洗浄された) アレイに適用することができる。

20

【0354】

アレイは、対照に使用できる他のタンパク質と同様に、4つ以上のOAリスク関連タンパク質を認識する抗体を含むことができる。特定の実施例において、アレイは、少なくともインターロイキン15 (IL-15)、可溶性血管付着タンパク質1 (sVAP-1)、マトロプロテイナーゼ7 (MMP-7)、プラスミノゲン活性抑制物質-1 (PAI-1)、インターロイキン1 (IL-1)、IL-2、マクローファージ抑制タンパク質 (MIP)-1、Bリンパ球ケモカイン (BLC)、6ケモカイン (Ckine)、線維芽細胞増殖因子 (FGF)-7、顆粒球マクローファージコロニー刺激因子 (GM-CSF)、インスリン様成長因子結合タンパク質 (IGFBP)-2、ニューロトロフィン4 (NT4)、ICAM-3、血管内皮 (VE) カドヘリンおよびマトロプロテイナーゼ1の組織阻害剤 (TIMP-1) を認識する抗体を含む。他の特定の実施例において、アレイは、少なくともマクローファージ炎症性タンパク質1 (MIP-1)、マクローファージ炎症性タンパク質1 (MIP-1)、ウロキナーゼ型活性プラスミノゲン化因子受容体 (UPAR) および血管細胞接着分子1 (VCAM-1)、IL-2、Eot2、IGFBP-4、ICAM-3、インターフェロンにより誘発されるモノカイン (MIG)、MMP-7、骨髄性前駆細胞抑制因子1 (MPIF-1)、TGF受容体I (TGF-RII) および胸腺および活性調節性ケモカイン (TARC) を認識する抗体を備え、6-Ckineを認識する抗体をさらに含むことができる。

30

40

【0355】

特定の実施例において、アレイは、少なくともIL-15、sVAP-1、MMP-7、PAI-1、DD5、DD6、Eot2、ICAM-1、MMP-2、Pセレクチン、IL-1、IL-2、MIP-1、BLC、6-Ckine、FGF-7、GM-CSF、IGFBP-2、NT4、ICAM-3、VEカドヘリンおよびTIMP-1を認識する抗体を含む。他の特定の実施例において、アレイは、少なくともMIP-1、MIP-1、UPAR、VCAM-1、IL-2、Eot2、IGFBP-4、ICAM-3、MMP-7、MIG、MPIF-1、TGF-RII、6-Ckine、TARC、BDNF、EGF、HCC1、レプチンおよびプロラクチンを認識する抗体を含む。

50

【0356】

さらに他の特定の実施例において、アレイは、少なくともIL-15、sVAP-1、MMP-7、PAI-1、DD5、DD6、Eot2、ICAM-1、MMP-2、Pセレクチン、MIP-1、MIP-1、UPAR、VCAM-1、BDNF、EGF、HCC1、レプチン、プロラクチン、IL-1、IL-2、MIP-1、BLC、6-Cytokine、FGF-7、GM-CSF、IGFBP-2、NT4、ICAM-3、VEカドヘリン、TIMP-1、IGFBP-4、MIG、MPIF-1、TGF-RIIおよびTARCを認識する抗体を含む。

【0357】

血清中のタンパク質とアレイ上の抗体の間で形成された複合体は、例えば、実施例9で説明される方法を使用して、RCA社の間接免疫測定法を使用して検知される。

10

【0358】

アレイを走査し、アレイ上の各タンパク質の平均蛍光強度を判定する。背景蛍光強度は、所望するならば、全ての実験蛍光強度から減算することができる。各タンパク質の強度は、対照または基準値と比較される。例えば、様々なOA重傷度が存在またはOAが存在しないとき、基準蛍光信号強度値は、予測されるOAリスク関連タンパク質の値または値の範囲である。対照値は、OAの重傷度が分っている、またはOAでない被験者からの並列対照試料から得た、OAリスク関連タンパク質の平均蛍光強度である。ある実施例において、対照値は、同じ性別、同じ年齢範囲（例えば、±2年、±5年または±10年）またはその組み合わせの被験者の値を表す。

20

【0359】

OAの重傷度、または被験者が重度のOAを発症する可能性を判定するために、標的のOAリスク関連分子の活性の変化の規模を、被験者において判定することができる。例えば、OAリスク関連分子が、OAに反応して、またはOAを引き起こす（例えば、上方制御と注釈された表10～13のタンパク質）ために上方制御される分子ならば、重傷度は、対照（OA不在の活性など）に対して増加した活性の規模を判定することにより判定され、より大規模な活性の増加は、より重度なOA（または被験者が重度のOAを発症する、より大きな可能性）を示唆する。例えば、一つ以上のOAリスク関連分子の活性が、対照に対して少なくとも2倍増加の被験者は、一つ以上のOAリスク関連分子の活性が、対照に対して少なくとも10倍増加の被験者より重度の低いOAと言える。特定の実施例において、一つ以上のOAリスク関連分子の活性の少なくとも4倍、少なくとも5倍、または少なくとも10倍の増加は、被験者が、重度のOAである、または重度のOAを発症する可能性があることを示唆する。例えば、上方制御と注釈された表10および12に挙げる、一つ以上（少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、または少なくとも5つなど）のOAリスク関連分子の活性の少なくとも4倍、少なくとも5倍、または少なくとも10倍の増加は、被験者が重度のOAであることを示唆する。他の実施例において、上方制御と注釈された表11および13に挙げる、一つ以上（少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、または少なくとも5つなど）のOAリスク関連分子の活性の少なくとも4倍、少なくとも5倍、または少なくとも10倍の増加は、被験者が重度のOAを発症する可能性があることを示唆する。

30

40

【0360】

例えば、OAリスク関連分子が、OAに反応して（例えば、下方制御と注釈された表10～13のタンパク質）下方制御される分子ならば、重傷度は、対照（OA不在の活性など）に対して減少した活性の規模を判定することにより判定され、より大規模な活性の減少は、より重度なOA（または被験者が重度のOAを発症する、より大きな可能性）を示唆する。例えば、一つ以上のOAリスク関連分子の活性が、対照に対して少なくとも2倍減少の被験者は、一つ以上のOAリスク関連分子の活性が、対照に対して少なくとも10倍減少の被験者より重度の低いOAと言える。特定の実施例において、一つ以上のOAリスク関連分子の活性の少なくとも4倍、少なくとも5倍、または少なくとも10倍の減少は、被験者が、重度のOAである、または重度のOAを発症する可能性があることを示唆

50

する。例えば、下方制御と注釈された表 10 および 12 に挙げる、一つ以上（少なくとも 2 つ、少なくとも 3 つ、少なくとも 4 つ、または少なくとも 5 つなど）の OA リスク関連分子の活性の少なくとも 4 倍、少なくとも 5 倍、または少なくとも 10 倍の減少は、被験者が重度の OA であることを示唆する。他の実施例において、下方制御と注釈された表 11 および 13 に挙げる、一つ以上（少なくとも 2 つ、少なくとも 3 つ、少なくとも 4 つ、または少なくとも 5 つなど）の OA リスク関連分子の活性の少なくとも 4 倍、少なくとも 5 倍、または少なくとも 10 倍の減少は、被験者が重度の OA を発症する可能性があることを示唆する。

【0361】

よって、ある実施例において、OA リスク関連タンパク質の少なくとも一つ（タンパク質の少なくとも 2 つ、少なくとも 3 つ、少なくとも 4 つ、少なくとも 5 つ、少なくとも 6 つ、少なくとも 7 つ、少なくとも 8 つ、少なくとも 9 つ、少なくとも 10、少なくとも 11、少なくとも 12、少なくとも 13、少なくとも 14、少なくとも 15、少なくとも 16、少なくとも 17、少なくとも 18、少なくとも 19、少なくとも 20、少なくとも 21、少なくとも 22、少なくとも 23、少なくとも 24、少なくとも 25、少なくとも 26、少なくとも 27、少なくとも 28、少なくとも 29、少なくとも 30、少なくとも 31、少なくとも 32、少なくとも 33、少なくとも 34、少なくとも 35、少なくとも 36 など）の少なくとも 4 倍の変更規模における統計上有意な差異の存在は、被験者が、重度の OA または将来重度の OA を発症する恐れがあることを示唆する。

10

【0362】

平均蛍光強度を考慮に入れるため、蛍光強度は、理論的には、背景より少なくとも 4 倍高い。

20

【0363】

一実施例において、統計上有意な規模の変化は、OA の不在または将来の OA リスクの不在における同じ OA リスク関連分子の値と比較したとき、 p 値 0.05 である規模の変化を含む。

【0364】

実施例 12

OA の進行のモニタリング

本実施例は、OA の被験者または OA の臨床的症状（患部関節の痛み、腫れおよび硬直など）はないが、将来 OA の発症リスクの増加を示す被験者など、被験者の OA の進行をモニタリングするために使用することができる。一実施例において、被験者は、他の過程（外傷など）の二次的な OA と比較して、一般的な OA（例えば、手および膝の OA）である。アッセイは、OA に関連する兆候および症状のオンセット前または後に実行することができる。

30

【0365】

被験者から得た試料（血清試料など）は、開示された方法を使用して分析することができる。特定の実施例において、アッセイは、被験者が OA である、または OA を発症しやすい、例えば、将来の OA の発症リスクの増加などを確認した後に実行することができる。特定の実施例において、複数の試料が、少なくとも 1 ヶ月間隔、少なくとも 6 ヶ月間隔または少なくとも 1 年間隔など、異なる時間点で、被験者から得る。

40

【0366】

ヒトまたは獣医学被験対象などの試験被験者から得た、または派生した試料は、使用される検知方法に必要なように処理される。この実施例は、タンパク質の発現を分析するための血清試料の調製を説明するが、当該分野に精通した者は、他の生体試料（尿または滑液など）を使用することが可能で、他の発現の分析方法を使用することが可能であることを理解する。血清は、実施例 9 で説明するように得られ、処理され、（閉鎖され、洗浄された）アレイに適用することができる。

【0367】

アレイは、対照に使用できる他のタンパク質と同様に、4 つ以上の OA リスク関連タン

50

パク質を認識する抗体を含むことができる。特定の実施例において、アレイは、少なくともインターロイキン15 (IL-15)、可溶性血管付着タンパク質1 (sVAP-1)、メタロプロテイナーゼ7 (MMP-7)、プラスミノゲン活性抑制物質1 (PAI-1)、インターロイキン1 (IL-1)、IL-2、マクrofアージ抑制タンパク質 (MIP)-1、Bリンパ球ケモカイン (BLC)、6ケモカイン (Ckine)、線維芽細胞増殖因子 (FGF)-7、顆粒球マクrofアージコロニー刺激因子 (GM-CSF)、インスリン様成長因子結合タンパク質 (IGFBP)2、ニューロトロフィン4 (NT4)、ICAM-3、血管内皮 (VE)カドヘリンおよびメタロプロテイナーゼ1の組織阻害剤 (TIMP-1)を認識する抗体を含む。他の特定の実施例において、アレイは、少なくともマクrofアージ炎症性タンパク質1 (MIP-1)、マクrofアージ炎症性タンパク質1 (MIP-1)、ウロキナーゼ型活性プラスミノゲン化因子受容体 (UPAR)および血管細胞接着分子1 (VCAM-1)、IL-2、Eot2、IGFBP-4、ICAM-3、インターフェロンにより誘発されるモノカイン (MIG)、MMP-7、骨髄性前駆細胞抑制因子1 (MPIF-1)、TGF受容体II (TGF-RII)および胸腺および活性調節性ケモカイン (TARC)を認識する抗体を備え、6-Ckineを認識する抗体をさらに含むことができる。

10

【0368】

特定の実施例において、アレイは、少なくともIL-15、sVAP-1、MMP-7、PAI-1、DD5、DD6、Eot2、ICAM-1、MMP-2、Pセレクトリン、IL-1、IL-2、MIP-1、BLC、6-Ckine、FGF-7、GM-CSF、IGFBP-2、NT4、ICAM-3、VEカドヘリンおよびTIMP-1を認識する抗体を含む。他の特定の実施例において、アレイは、少なくともMIP-1、MIP-1、UPAR、VCAM-1、IL-2、Eot2、IGFBP-4、ICAM-3、MMP-7、MIG、MPIF-1、TGF-RII、6-Ckine、TARC、BDNF、EGF、HCC1、レプチンおよびプロラクチンを認識する抗体を含む。

20

【0369】

さらに他の特定の実施例において、アレイは、少なくともIL-15、sVAP-1、MMP-7、PAI-1、DD5、DD6、Eot2、ICAM-1、MMP-2、Pセレクトリン、MIP-1、MIP-1、UPAR、VCAM-1、BDNF、EGF、HCC1、レプチン、プロラクチン、IL-1、IL-2、MIP-1、BLC、6-Ckine、FGF-7、GM-CSF、IGFBP-2、NT4、ICAM-3、VEカドヘリン、TIMP-1、IGFBP-4、MIG、MPIF-1、TGF-RIIおよびTARCを認識する抗体を含む。

30

【0370】

血清中のタンパク質とアレイ上の抗体の間で形成された複合体は、例えば、実施例9で説明される方法を使用して、RCA社の間接免疫測定法を使用して検知される。

【0371】

アレイを走査し、アレイ上の各タンパク質の平均蛍光強度を判定する。背景蛍光強度は、所望するならば、全ての実験蛍光強度から減算することができる。各タンパク質の強度は、対照または基準値と比較される。例えば、OAが存在またはOAが存在しないとき、基準蛍光信号強度値は、予測されるOAリスク関連タンパク質の値または値の範囲である。一実施例において、対照値は、少なくとも1ヶ月前、少なくとも6ヶ月前、少なくとも1年前または少なくとも10年前など、一つ以上前の時間点での被験者の特定のOAリスク関連タンパク質のタンパク質濃度である。ある実施例において、対照値は、同じ性別、同じ年齢範囲 (例えば、±2年、±5年または±10年) またはその組み合わせの被験者の値を表す。

40

【0372】

OAの進行をモニタリングするために、標的のOAリスク関連分子の活性を、同じ被験者で経時的にモニタリングすることができる。例えば、OAリスク関連分子が、OAに反

50

応して、またはOAを引き起こす（例えば、上方制御と注釈された表10～13のタンパク質）ために上方制御される分子ならば、標的のOAリスク関連分子の活性のさらなる統計上有意な増加は、OAが速い速度で悪化または進行していることを示唆する。反対に、このような標的のOAリスク関連分子の活性の統計上有意な減少は、OAが改善されている、または進行が減少したことを示唆する。

【0373】

もし、OAリスク関連分子が、OAに反応して下方制御される分子（例えば、下方制御と注釈された表10～13のタンパク質）ならば、標的のOAリスク関連分子の活性のさらなる統計上有意な減少は、OAが速い速度で悪化または進行していることを示唆する。反対に、このような標的のOAリスク関連分子の活性の統計上有意な増加は、OAが改善されている、または進行が減少したことを示唆する。

10

【0374】

一実施例において、統計上有意な増加または減少は、被験者の一つ以上前の時間点で同じOAリスク関連分子の値と比較したとき、p値0.05であるそれらを含む。他の実施例において、統計上有意な増加または減少は、被験者の一つ以上前の時間点で同じOAリスク関連分子の値と比較したとき、活性の規模の増加または減少を伴うそれらを含む。規模の増加は、少なくとも25%、少なくとも50%、少なくとも75%、少なくとも100%または少なくとも200%増加の可能性がある。規模の減少は、少なくとも25%、少なくとも50%または少なくとも75%減少の可能性がある。

20

【0375】

実施例13

OAリスクを評価するためのアレイ

本実施例は、例えば、OAを診断するため、または被験者が将来OAを発症するリスクの増加があるかどうかを判定する、OAリスクを評価するために使用される特別なアレイを説明する。

【0376】

一実施例において、アレイは、一つ以上のIL-15、MMP-7、sVAP-1、IL-1、IL-2、MIP-1、BLC、6-Ckine、FGF-7、GM-CSF、IGFBP-2、NT4、ICAM-3、TIMP-1、VEカドヘリン、MIP-1、UPAR、IGFBP-4、MIG、MPIF-1、TGF-RIII、BDNF、HCCおよびレプチン、または1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23または24の分子のいずれかなど、OAリスクに反応して上方制御される、少なくとも一つのOAリスク関連分子（核酸またはタンパク質など）を認識できるプローブ（オリゴヌクレオチドまたは抗体）を含む。例えば、アレイは、IL-15を認識するプローブ（オリゴヌクレオチドまたは抗体）を含むことができる。さらに他の実施例において、アレイは、一つ以上のPAI-1、MIP-1、Eot2、TARC、DD5、DD6、ICAM-1、MMP-2、Pセレクトリン、MIP-1、EGF、およびプロラクチン、または1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11または12のいずれかなど、OAリスクに反応して下方制御される、少なくとも一つのOAリスク関連分子（核酸またはタンパク質）を認識できるプローブ（オリゴヌクレオチドまたは抗体）を含む。

30

40

【0377】

特定の実施例において、アレイは、OAリスクに反応して上方制御（IL-15、MMP-7、sVAP-1、IL-1、IL-2、MIP-1、BLC、6-Ckine、FGF-7、GM-CSF、IGFBP-2、NT4、ICAM-3、TIMP-1、VEカドヘリン、MIP-1、UPAR、IGFBP-4、MIG、MPIF-1、TGF-RIII、BDNF、HCCおよびレプチンの少なくとも一つ）される、少なくとも一つのOAリスク関連分子（核酸またはタンパク質）、およびOAリスクに反応して下方制御（PAI-1、MIP-1、Eot2、TARC、DD5、DD6、ICAM-1、MMP-2、Pセレクトリン、MIP-1、EGF、およびプロラクチン）される

50

、少なくとも一つの遺伝子（またはタンパク質）を認識できるプローブ（オリゴヌクレオチドまたは抗体）を含む。

【0378】

ある特定の実施例において、アレイは、IL-15、MMP-7、sVAP-1、IL-1、IL-2、MIP-1、BLC、6-Ckine、FGF-7、GM-CSF、IGFBP-2、NT4、ICAM-3、TIMP-1、VEカドヘリン、MIP-1、UPAR、IGFBP-4、MIG、MPIF-1、TGF-RIII、BDNF、HCCおよびレプチン、PAI-1、MIP-1、Eot2、TARC、DD5、DD6、ICAM-1、MMP-2、Pセレクトリン、MIP-1、EGF、およびプロラクチンを認識できるプローブ（オリゴヌクレオチドまたは抗体など）を含む。しかし、アレイは、対照プローブをさらに含むことができる。

10

【0379】

使用可能な他の代表的なプローブを表8および10～13に挙げる。例えば、アレイは、表10、11、12または13に挙げるOAリスク関連分子を認識するプローブ（オリゴヌクレオチドまたは抗体など）を構成することができる。他の実施例において、アレイは、表10～13の全てに挙げるOAリスク関連分子を認識するプローブ（オリゴヌクレオチドまたは抗体など）を構成することができる。

【0380】

OAリスク関連プローブは、プローブおよび標的の配列間の交雑または特異結合信号の検知を可能にする、一つ以上の検知可能な標識をさらに含むことができる。

20

【0381】

交雑または特異結合信号の「減少」および「増加」のコンパイルは、表8および10～13に挙げるOAリスク関連遺伝子に関する個々の状態を明らかにする。

【0382】

実施例14

定量分光法

本実施例は、例えば、RCA社の間接免疫測定法使用の代替として、OAリスク関連タンパク質（表8および10～13に挙げるタンパク質など）の差次的タンパク質活性を検知するために使用されるSELDIなど、特別な定量的分光法を説明する。

【0383】

一実施例において、レーザー脱離イオン化飛行時間型（SELDI-TOF）質量分析が、例えば、ProteinChip（商標）（Ciphergen Biosystems、Palo Alto、CA）を使用して、OAリスク関連タンパク質の差次的活性の変化を検知するために使用される。このような方法は、当該分野において、周知である（例えば、米国特許番号5,719,060、米国特許番号6,897,072および米国特許番号6,881,586を参照し、これら全てを参考資料として本明細書の一部とする）。SELDIは、分析物が、分析物の取り込みまたは脱着を促進する表面のエネルギー流に向けられる、脱着のための固相法である。

30

【0384】

つまり、SELDIの変形の一つは、OAリスク関連タンパク質など、興味のある分析物を選択的に取り込む、化学的性質を用いるクロマトグラフ表面を使用する。クロマトグラフ表面は、疎水性、親水性、イオン交換、固定化金属または他の化学的性質からなる。例えば、表面の化学的性質は、分析物の共有結合または非共有結合固定の酸素依存、炭素依存、硫黄依存または窒素依存の手段に基づく結合機能を含むことができる。活性表面は、タンパク質-タンパク質およびタンパク質-DNA相互作用などの生体分子相互作用の研究にしばしば使用される、抗体、受容体またはオリゴヌクレオチドなどの特定の「ベート」分子を共有結合的に固定するために使用される。

40

【0385】

表面の化学的性質は、結合した分析物を保持し、結合していない物質を洗い流す。続いて、表面に結合した分析物（OAリスク関連タンパク質など）は、脱着され、例えば、質

50

量分析を使用するなど、いくつかの手段のいずれかにより分析されることができる。分析物が、レーザー脱離イオン化質量分析などの、脱着の過程でイオン化されると、検知器は、イオン検知器である。質量分析器は、一般的に、脱着イオンの飛行時間を判定するための手段を含む。この情報は、質量に変換される。しかし、技術者は、イオンを分析および検知するために、脱着したイオンを判定する必要はない。イオン化された分析物が様々な時点で検出器に当たるという事実は、イオンの検知および分析を提供する。代替的に、分析物は、検知可能なように、（例えば、フルオロフォアまたは放射性同位元素を用いて）表示される。これらの場合において、検知器は、フルオロフォアまたは放射性同位元素検知器である。複数の検知手段を、アレイの各位置で保持された分子に関連する分析物要素および機能を完全に識別するために、連続で実施することができる。

10

【0386】

従って、特定の実施例において、クロマトグラフ表面は、IL-15およびsVAP-1などのOAリスク関連タンパク質を認識する抗体を含む。一実施例において、抗体は、細菌Fc結合支持体を使用して、表面上に固定される。クロマトグラフ表面は、血清タンパク質を含む試料など、被験者からの試料を用いて培養される。試料に存在する抗原は、クロマトグラフ表面上の抗体を認識する。結合されないタンパク質および質量分析妨害化合物は、洗い流され、クロマトグラフ表面上に保持されるタンパク質は、SELDI-TOFにより分析され、検知される。試料からのMSプロファイルは、次に、特定の分子量でのタンパク質の相対的発現レベルは、様々な統計技術および生体情報科学ソフトウェアシステムにより比較される、差次的タンパク質発現の位置付けを使用して比較される。

20

【0387】

実施例15

核酸ベースの分析

本明細書で開示された（表8および10～13で開示された分子など）OAリスク関連核酸分子は、例えば、被験者がOAであるかどうかの判定、被験者が将来OAを発症するリスクがあるかどうかの判定、OAの重傷度の判定、被験者のOAの進行のモニタリング、およびOAの被験者の治療計画の判定など、OAリスクの評価において使用することができる。このような手順において、被験者の生体試料は、表8および10～13に挙げる分子など、OAリスク関連核酸分子の活性（発現など）の増加または減少においてアッセイすることができる。適切な生体試料は、末梢血液、尿、唾液、組織生検、外科検体および滑液に存在するゲノムDNAまたはRNAなど、被験者の細胞から得たゲノムDNAまたはRNA（mRNAを含む）を含む試料を含む。

30

【0388】

RNAは、以下のように細胞から分離することができる。完全RNA（5～15μg）は、各製造会社のプロトコルに沿って、RNeasyミニキット（Qiagen Cat.#75162、Valencia、CA）を使用して、全血から分離した細胞から抽出することができる。つまり、採取細胞は、PBSで稀釈され、4000rpmで10分間遠心分離される。生じた上澄み液を破棄し、ペレットを均質化し、RNAを回収した。RNAは、当該分野で周知の方法を使用して標識することができる。一実施例において、RNAは、例えば、標識されたcRNA標的を生成するために、エンゾバイオアレイ高収率RNA転写標識キット3（Affymetrix社、P/N900182）を使用して、ヒトゲノムアレイのAffymetrix社のガイドラインに沿って、ピオチン標識、および洗浄された。最初に分離した完全RNAの質を確実にするために、DNA分解酵素が、試料から汚染されたDNAを除去するために使用される。

40

【0389】

表8および10～13に挙げる四つ以上の分子の任意の組み合わせ（IL-15またはsVAP-1を含む組み合わせなど）など、四つ以上のOAリスク関連核酸分子の生体試料の発現の増加または減少の検知は、当該分野において周知の方法で達成することができる。ある実施例において、発現は、少なくともIL-15、MMP-7、sVAP-1、PAI-1、または少なくともMIP-1、MIP-1、UPAR、VCAM-1、

50

6 - C k i n e、I C A M - 3 および T G F - R I I I において判定される。

【0390】

OA リスク関連分子の発現の増加または減少は、OA リスク関連核酸分子特異 mRNA の細胞レベルを測定することにより、検知することもできる。mRNA は、例えば、ノーザン分析、RT - PCR、および mRNA 切片上ハイブリッド形成法を含む、当該分野でよく知られた技術を使用して測定することができる。mRNA 分析手順の詳細は、例えば、提供された実施例および Sambrook ら (ed.)、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、2nd ed.、vol. 1 - 3、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、NY、1989 において確認することができる。

10

【0391】

OA リスク関連配列に特異的なオリゴヌクレオチドは、市場で入手可能な装置を使用して化学的に合成することができる。これらのオリゴヌクレオチドは、次に、例えば、放射性同位元素 (^{32}P など) またはビオチン (Ward and Langer ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 6633-57、1981) またはフルオロフォアなどの非放射性標識を用いて標識され、ドットプロットまたは電気泳動後ゲルから移動することにより、膜または他の個体支持体に固定された個々の DNA 試料と交雑することができる。これらの特異な配列は、例えば、オートラジオグラフィーまたは蛍光法 (Landegren ら、Science 242: 229 - 37、1989) または比色反応 (Gebeyehu ら、Nucleic Acids Res. 15: 4513 - 34、1987) などの方法により、視覚化される。

20

【0392】

細胞から単離された核酸分子は、核酸増幅産物を形成するために、慣用的方法を使用して増幅することができる。これらの核酸増幅産物は、次に、OA リスク関連核酸と厳密な条件下で交雑するオリゴヌクレオチドプローブと接触することができる。プローブと交雑する核酸増幅産物は、次に、定量化される。オリゴヌクレオチドプローブの配列は、表 8 および 10 ~ 13 に挙げる OA リスク関連分子を符号化する核酸分子に特異的に結合することができる。

【0393】

実施例 16

タンパク質ベースの分析

本実施例は、OA リスク関連タンパク質の活性 (発現または生物学的活性など) の変化を検知するために使用することができる。OA リスク関連タンパク質の配列は、例えば、被験者が OA であるかどうかの判定、OA である被験者の OA の重傷度の判定、被験者の OA の進行のモニタリング、被験者が将来 OA を発症するリスクがあるかどうかの判定、および OA または OA の発症リスクの増加にある被験者の治療計画の判定など、OA リスクの評価方法に使用することができる。このような手順において、被験者の生体試料は、表 8 および 10 ~ 13 に挙げる分子の少なくとも二つと組み合わせる、少なくとも IL - 15 または s V A P を含む任意の組み合わせなど、少なくとも四つの OA リスク関連タンパク質の任意の組み合わせ、または表 8 および 10 ~ 13 に挙げる分子の少なくとも二つと組み合わせる、M I P - 1、M I P - 1、U P A R、V C A M - 1、6 - C k i n e、I C A M - 3 および T G F - R I I I の二つ以上を含む任意の組み合わせの活性の変化 (増加または減少など) のためにアッセイされる。ある実施例において、OA リスク関連の量は、少なくとも M I P - 1、M I P - 1、U P A R、V C A M - 1、6 - C k i n e、I C A M - 3 および T G F - R I I I において判定される。ある実施例において、OA リスク関連の量は、少なくとも IL - 15、s V A P、M M P - 7 および P A I - 1 において判定される。

30

40

【0394】

適切な生体試料は、血清 (または他の血液画分) または滑液に存在するタンパク質のようなタンパク質を含む、試料を含む。表 8 および 10 ~ 13 に挙げる四つ以上の OA 関連

50

タンパク質の増加または減少など、被験者の四つ以上のO Aリスク関連タンパク質量の変化は、被験者がO Aである、または将来O Aが発症する恐れがあることを示唆する。

【0395】

正常な被験者(O Aでない、またはO Aのリスクのない被験者など)のそのような発現と比較すると、O Aリスク関連タンパク質レベルの増加または減少の判定は、上に要約した方法による、O Aリスク関連核酸の配列の発現レベルの直接的判定に対する代替または相補的方法である。O Aリスク関連タンパク質に特異な抗体の利用は、HarlowおよびLane (Antibodies, A Laboratory Manual, CSHL, New York, 1988)において発表される方法のように、当該分野においてよく知られた数ある免疫検定方法の一つにより、O Aリスク関連タンパク質の検知および定量化を容易にする。このような抗体の形成方法は、当該分野において周知である。

10

【0396】

任意の一般的な免疫検定フォーマット(ELISA、ウエスタンブロットまたはRIAアッセイなど)が、O Aリスク関連タンパク質レベルを測定するために使用することができる。野生型(正常)のO Aリスク関連タンパク質レベルと比較した、O Aリスク関連ペプチドレベルの増加または減少(表8および10~13に挙げる少なくとも4つのタンパク質の任意の組み合わせの増加、または表8および10~13に挙げる少なくとも4つのタンパク質の任意の組み合わせの減少など)は、O Aまたは将来O Aを発現するリスクを示唆する。免疫組織化学法も、O Aリスク関連タンパク質の検知および定量化に使用することができる。例えば、組織試料を、被験者から得、ある部分が、適切なO Aリスク関連タンパク質特異的結合物質および任意の一般的な検知システム(西洋わさびペルオキシダーゼと結合した二次抗体を含むシステムなど)を使用して、O Aリスク関連タンパク質の存在に対して着色される。このような方法に関する一般的な指針は、BancroftおよびStevens (Theory and Practice of Histological Techniques, Churchill Livingstone, 1982)およびAusubelら (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, 1998)において確かめることができる。

20

【0397】

ある特定の例において、RCAタンパク質アレイは、被験者から得られた試料に、四つ以上のO Aリスク関連タンパク質の差次的発現があるかどうかを判定するために使用される。つまり、タンパク質を含む試料は、タンパク質が特異的に適切な抗体に結合するのに十分な条件下で、表8および10~13に挙げる四つ以上のペプチドなど、四つ以上のO Aリスク関連ペプチドを認識する抗体を含むアレイに適用される。ビオチン化抗体が、次に、取り込まれたタンパク質に結合するのに十分な条件下で添加され、これにより、高度な特異性免疫複合体を生成する。相補的な円形オリゴヌクレオチドに予備徐冷される、プライマーオリゴヌクレオチドに結合された凡用の抗ビオチン抗体が、次に、ビオチン化抗体に結合するのに十分な条件下で添加される。凡用抗体は、円形の周りのプライマーの3'末端を拡張するDNAポリメラーゼを使用するRCAを使用して増幅され、結果として、複合体に結合されたままの長い単鎖RCA産物を生じる。RCA産物は、標識付けされた(フルオロフォアなど、例えば、Cy-3、Cy-5またはFITC)相補的オリゴヌクレオチドとの交雑により検知することができる。

30

40

【0398】

O Aリスク関連タンパク質を定量化する目的のため、細胞タンパク質を含む被験者の生体試料を使用することができる。O Aリスク関連タンパク質の定量化は、免疫検定およびO Aでない、または将来O Aのリスクがある被験者からの細胞で発見されたタンパク質のレベルと比較した量により、達成することができる。正常なヒト細胞で発見された同じO Aリスク関連タンパク質の量と比較して、被験者の細胞における四つ以上のO Aリスク関連タンパク質の量の有意な増加は、通常、少なくとも4倍以上の差異がある。四つ以上のO Aリスク関連タンパク質(表8および10~13に挙げるタンパク質など)の実質的な

50

過剰発現は、OAのリスクを示唆する可能性がある。同様に、正常なヒト細胞で発見された同じOAリスク関連タンパク質の量と比較して、被験者の細胞における四つ以上のOAリスク関連タンパク質の量の有意な減少は、通常、少なくとも4倍以上の差異がある。四つ以上のOAリスク関連タンパク質（表8および10～13に挙げるタンパク質など）の実質的な過剰発現は、将来のOA発症のリスクの増加を示唆する可能性がある。

【0399】

OAリスクを評価する代替方法は、被験者における、例えば、被験者の細胞における四つ以上のOAリスク関連タンパク質のレベルを定量化することである。この診断ツールは、例えば、特定の手法が、例えばタンパク質のサイズの変化を検知するために使用されるが、OAリスク関連タンパク質のレベルの減少または増加を検知するのに役立つ。OAリスク関連タンパク質の局所化または同調発現（時間的または空間的）も、周知の方法を使用して検査することができる。

10

【0400】

実施例17

発現のプロファイル（フィンガープリント）

多くのOAリスク関連分子（例えば、表8および10～13に挙げる分子により示される）の開示により、OAリスクを評価する情報を提供する発現のプロファイル、例えば、被験者がOAであるかどうかの判定、OAの重症度の判定、OAの進行のモニタリング、被験者が将来OAを発現するリスクの増加があるかどうか、およびOAである、またはOA発症のリスクがある被験者の治療計画の判定が、可能になる。

20

【0401】

OAリスク関連発現のプロファイルは、明確で識別可能な一連のOAリスク関連遺伝子またはタンパク質の発現パターン（またはレベル）、例えば、定義された一連の遺伝子またはタンパク質の発現の増加または減少のパターン、またはmRNAレベルまたはタンパク質レベルまたは活性など、このような分子に関連のある分子、を含む。特定のプロファイルにおける一連の分子は、表8および10～13のいずれかに挙げる、少なくとも四つの分子の任意の組み合わせを含むことができる。一実施例において、プロファイルに含まれる分子は、例えば、DD5、DD6、Eot2、ICAM-1、MMP-2およびPセレクトインの少なくとも二つと組み合わせる、またはIL-1、IL-2、MIP-1、BLC、6-Ckine、FGF-7、GM-CSF、IGFBP-2、T4、ICAM-3、VEカドヘリンおよびTIMP-1の少なくとも二つと組み合わせる、少なくともIL-15、MMP-7、sVAP-1およびPAI-1を含む。他の実施例において、プロファイルに含まれる分子は、例えば、BDNF、EGF、HCC1、レプチン、MMP-7およびプロクラチンの少なくとも二つと組み合わせる、またはIL-2、IGFBP-4、MIG、MMP-7、MPIF-1、Eot2およびTARCの少なくとも二つと組み合わせる、少なくともMIP-1、MIP-1、UPAR、VCAM-1、6-Ckine、ICAM-3およびTGF-RIIIを含む。

30

【0402】

特定のプロファイルは、特定の段階または正常な組織の年齢（血清または滑液など）に対して特異的である。よって、発現プロファイルは、前OA試料（OAを模擬または誘発する条件の対象でない正常な組織など）またはOA組織から単離された細胞のために確立される。これらの各プロファイルは、発現がOAを生じるために変更、またはOAの結果として変更される、少なくとも四つ以上の遺伝子またはタンパク質の発現レベルでの情報を含む。このような情報は、特異的遺伝子またはタンパク質の絶対発現レベルと同様、相対発現レベルも含むことができる。同様に、測定された値は、「遺伝子発現レベル」と相関する、タンパク質活性の相対または絶対レベルである。個々の被験者の発現プロファイルの結果は、基準または対照試料の識別特徴/プロファイルと比較して、試験試料の状況とみなされる。

40

【0403】

発現プロファイルを構成する分子のレベルは、あらゆる様々な周知の方法により測定す

50

ることができ、これらの方法は、測定される分子のタイプに対して特異的かもしれない。よって、核酸レベル（直接的遺伝子発現レベルなど、mRNA発現のレベルなど）は、特異的な核酸交雑反応を使用して測定することができる。タンパク質レベルは、一般的なタンパク質アッセイを使用して、免疫学ベースのアッセイ（ELISAおよびタンパク質アッセイなど、RCAタンパク質アッセイなど）を使用して、または活性アッセイを使用して測定することができる。核酸およびタンパク質レベル測定の実施例は、本明細書において提供される。他の方法は、当該分野に精通した者には周知である。

【0404】

OAリスク発現プロファイルの実施例は、ヌクレオチドまたはタンパク質アレイまたはマイクロアレイなど、アレイフォーマットである。生体高分子採取の存在またはレベルを判定するためのアレイの使用は、周知である。アレイベースの測定方法において、アレイは、被験者の試料からのポリヌクレオチド（核酸ベースのアレイの場合）またはタンパク質（タンパク質ベースの場合）と接触させることができる。次に、被験者の核酸分子またはタンパク質の結合の量または位置を、例えば、その被験者の発現プロファイルを作成するために、判定することができる。そのような遺伝子発現プロファイルは、例えば、OAであると分かっている、またはOAであると知らない被験者からの対照発現プロファイルなど、他の発現プロファイルと比較することができる。このような方法は、被験者がOAであるかどうかの判定、またはOAの重症度の判定のために使用することができる。さらに、被験者の発現プロファイルは、例えば、OAレベルの対照（または一連の対照）発現プロファイルと関連させることができる、一つ以上の適切な治療と関連させることができる。

10

20

【0405】

実施例18

迅速スクリーニングアッセイ

OAリスク関連分子の活性（発現の量など）を変更する薬剤を同定するための任意のアッセイを実行する前に、薬剤がOAリスク関連タンパク質に結合するかどうかを判定するため、迅速スクリーニングアッセイが数多くの薬剤をスクリーニングするために使用される。

【0406】

HIVタンパク質への結合を検知するための迅速スクリーニングアッセイが、例えば、米国特許番号5,230,998で開示されており、参考資料として本明細書の一部とする。つまり、OA関連タンパク質（例えば、IL-15、MMP-7、sVAP-1またはVCAM-1など、表8および10~13に挙げる一つ以上のタンパク質など）は、タンパク質に結合可能な一次抗体と培養され、一つ以上の試験薬と培養される。過剰な結合されない一次抗体は、洗浄、除去され、OAリスク関連タンパク質に結合された抗体は、一次抗体を結合する二次標識された抗体を添加することにより検知される。過剰な結合されない二次抗体は、次に、除去され、検知可能な標識の量が定量化される。結合の効果は、次に、公式により百分率で判定される。（試験薬の不在における標識の量） - （試験薬の存在における標識の量 / 試験薬の不在における標識の量） × 100。

30

【0407】

OAリスク関連タンパク質に対して高結合親和性である薬剤は、さらに薬剤の存在におけるOAリスク関連分子の活性（発現など）を判定するために特別に設計された、他のアッセイ（以下の実施例で説明される方法など）に使用される。

40

【0408】

実施例19

インビトロスクリーニングアッセイ

本実施例は、OA関連分子の活性を変更する試験薬の能力をスクリーニングするために使用される、独特なインビトロ方法を説明する。しかし、本開示は、これらの独特な方法に制限されるものではない。当該分野に精通した者は、他のインビトロアッセイが使用できることを理解する。

50

【0409】

上の実施例で開示されたように、開示されたOA関連分子（表8および10～13に挙げる分子など）の活性は、OAの結果として、またはOAを引き起こすために、増加または減少する。よって、スクリーニングアッセイは、そのような活性（OAに反応して、またはOAを引き起こすために増加した核酸またはタンパク質の活性の減少、OAに反応して、またはOAを引き起こすために減少した核酸またはタンパク質の活性の増加、またはその組み合わせなど）を正常化する、または活性の変化（OAに反応して、またはOAを引き起こすために減少した核酸またはタンパク質の活性のさらなる減少、またはOAに反応して、またはOAを引き起こすために増加した核酸またはタンパク質の活性のさらなる増加など）を高める薬剤を同定および分析するために使用される。例えば、このような変化が、被験者に有益な効果を与えるなら、活性の変化をさらに高めることが所望されるかもしれないし、このような変化が、被験者に有害な作用（炎症など）を与えるなら、活性の変化を中和することが所望されるかもしれない。

【0410】

開示されたアッセイにより同定された薬剤は、例えば、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも50%または、たとえ少なくとも90%の減少など、OAに関連する一つ以上の症状を減少するのに役立つ可能性がある。ひとたび同定されると、OAリスク関連分子の活性を変更するために発見された試験薬は、薬学的に許容し得る形態で、治療薬（または予防薬として）に製剤化され、OAである、または将来OAを発症するリスクの増加がある被験者を治療するために使用される。

【0411】

OAの被験者のインビボで何が起こるかのモデルを提供する細胞（少なくとも10,000細胞、例えば、 $1 \times 10^4 - 1 \times 10^6$ 細胞など）が、低酸素条件で培養される。例えば、軟骨細胞は、Yudohら（Arthritis Res Ther. 7(2): R380-91, 2005）に説明される方法を使用して低酸素条件下で、37℃で培養することができる。つまり、軟骨細胞は、市販または軟骨から得て、 $0.1 \mu\text{mol/l}$ などの、 $0.1 \sim 200.0 \mu\text{mol/l}$ の濃度で、 H_2O_2 の存在下、5%の CO_2 で培養される。軟骨細胞は、少なくとも4時間、または少なくとも24時間など、少なくとも1時間、低酸素条件下で、培養される。試験薬は、 H_2O_2 で、細胞の培養前、培養中または培養後に添加される。一実施例において、薬剤は、低酸素条件下で、細胞を培養後に、少なくとも1時間、少なくとも2時間、少なくとも6時間または少なくとも24時間、細胞と培養される。

【0412】

他の実施例において、骨関節炎の被験者からの細胞が、当該分野で周知の方法（例えば、Yudohら、Arthritis Res Ther. 7(2): R380-91, 2005）を使用して、単離、および培養される。つまり、軟骨細胞は、以下のように、軟骨の肉眼的に無損傷の地域から単離される。軟骨組織は、小片に切り、リン酸緩衝食塩水（PBS）で洗浄し、 1.5 mg/ml コラゲナーゼB（Sigma）を含むダルベッコ変法イーグル培地（DMEM: Sigma, St. Louis, MO, USA）で、37℃で一晩、振盪台で、温浸する。細胞は、遠心分離され、PBSで洗浄され、新しいDMEMと培養される。得られた軟骨細胞は、 10% の熱失活した子ウシの胎児の血清、 2 mmol/l の1-グルタミン、 25 mmol/l のHEPES、および 100 ユニット/mlのペニシリンおよびストレプトマイシンを補充したDMEMで、37℃の加湿した5% CO_2 気圧で培養される。軟骨細胞表現型が、経過中維持されたことを確認するため、細胞形態およびプロテオグリカンを生成する可能性をモニタリングすることができる。所望する間中、試験薬を細胞に添加する。

【0413】

例えば、OAリスク関連分子の活性を変更（正常化するため）するために、試験薬が細胞に所望の効果を与えるのに十分な条件下で、一つ以上の試験薬を細胞と培養する。一実施例において、薬剤は、少なくとも1時間、少なくとも2時間、少なくとも6時間、少な

くとも24時間、または少なくとも1週間、細胞と培養される。

【0414】

一つ以上のOAリスク関連分子の活性に対する試験薬の効果を判定するために、RNAが、当該分野で周知の方法を使用して、細胞から単離、および標識される。標識されたRNAは、例えば、一つ以上のIL-15、MMP-7、sVAP-1、MIP-1、MIP-1、UPAR、V-CAM-1、6-Ckine、ICAM-3、TGB-RIIIまたはPAI-1などの表8および10~13に挙げる遺伝子の少なくとも1つ、少なくとも2つ、または少なくとも3つなど、一つ以上のOAリスク関連遺伝子に特異的に交雑できる、一つ以上の核酸分子(プライマーまたはプローブなど)を含むアレイに曝露される。交雑複合体を検知することにより、標的OAリスク関連分子の核酸活性の変化が、試験薬により作用されたかどうか、例えば、試験薬が不在の対照または基準値と比較することにより、判定される。

10

【0415】

代替的に、一つ以上のOAリスク関連分子の活性に対する試験薬の効果を判定するために、細胞からのタンパク質を分析することができる。例えば、一つ以上のIL-15、MMP-7、sVAP-1、MIP-1、MIP-1、UPAR、V-CAM-1、6-Ckine、ICAM-3、TGB-RIIIまたはPAI-1などの表8および10~13に挙げるタンパク質の少なくとも1つ、少なくとも2つまたは少なくとも3つなど、一つ以上のOAリスク関連タンパク質の差次的活性を検知するために、タンパク質(または単離されたタンパク質など)を分析することができる。一実施例において、実施例9で説明した方法が、使用される。タンパク質を検知することにより、標的OAリスク関連分子のタンパク質活性の変化が、試験薬により作用されたかどうか、例えば、試験薬が不在の対照または基準値と比較することにより、判定される。

20

【0416】

実施例20

インビボスクリーニングアッセイ

本実施例は、OA関連分子の活性を変更する試験薬の能力をスクリーニングするために使用される、独特なインビボ方法を説明する。しかし、本開示は、これらの独特な方法に制限されるものではない。当該分野に精通した者は、他のインビボアッセイ(例えば、他の哺乳動物または他の試験被験者におけるOAを誘導する他の方法)が使用できることを理解する。

30

【0417】

OAを自然に発症する哺乳動物(STR/1Nマウス)またはOAを誘発する状態に曝露された哺乳動物が使用される。ある特定の実施例において、OAが、ウサギにおいて、麻酔(例えば、ケタミン(15mg/kg体重)およびキシラジン(1.5~2mg/kg体重)の筋肉内注射)下、部分的な内側半月板切除術により誘発される。ウサギに麻酔をし、皮膚を内側側枝靭帯より前で切開する。関節包を垂直に開いた後、内側半月の前挿入性靭帯を切除し、前角および半月の内側部を莢膜付着および内側側枝靭帯から取り除く。後挿入靭帯を後包切開の方法で解体した後、内側半月を除去する。通常の食塩水で関節洗浄の後、関節包および皮膚を単一縫合で閉口する。

40

【0418】

OAの誘発と同時、または誘発前または誘発後に、試験薬が被験者に所望する効果を与えるのに十分な条件で、一つ以上の試験薬を被験者に投与する。静脈内、筋肉内、経皮または患部関節への直接注入などのあらゆる適切な投与方法が、使用される。一実施例において、試験薬は、半月板切除術の少なくとも24時間後、少なくとも2日後、少なくとも3日後、少なくとも7日後、少なくとも10日後、少なくとも2週間後または少なくとも1ヶ月後など、部分的な内側半月板切除術の少なくとも12時間後に投与される。

【0419】

試験薬が被験者に所望する効果を与えるのに十分な条件下、例えば、OAリスク関連分子の活性を変更(正常化など)する条件下で、一つ以上の試験薬を試験哺乳動物で培養す

50

る。一実施例において、一つ以上の試験薬の多重投与量が、例えば、毎日、毎週または毎月、例えば、少なくとも2週間、少なくとも1ヶ月またはすく膜とも3ヶ月、投与される。

【0420】

一つ以上のOAリスク関連分子の活性における試験薬の効果は、本明細書で説明された方法を使用して判定することができる。例えば、血清を、試験薬に暴露した後、哺乳動物から単離し、一つ以上のOAリスク関連分子の差次的活性を、例えば、実施例9で説明した方法を使用して判定する。他の実施例において、哺乳動物の生体試料から単離したRNAは、一つ以上のOAリスク関連分子の活性を、例えば、実施例15で説明した方法を使用して、判定するために分析される。OAリスク関連分子を検知することにより、標的OAリスク関連分子の活性の変化が、試験薬によって生じたかどうか、例えば、試験薬の不在の対照または基準値との比較により、判定される。

10

【0421】

さらに他の実施例において、動物が、関節の痛みなどのOAの他の臨床的兆候に対して、例えば、X線で患部関節を検査することにより、検査された。試験薬の存在によるOAに関連した症状の発症の減少は、試験薬が、被験者のOAを軽減、またはさらにOAを阻害することにも使用可能な治療薬剤である証拠を提供する。

【0422】

実施例21

有効量および骨関節炎に対する効果判定のアッセイ

20

本実施例は、OAリスク関連分子の活性を変更する、実施例19および20で説明した方法を使用して同定した分子など、試験薬をさらに評価するために使用することができる。例えば、試験薬の効果的な用量とOAを治療するための薬剤の能力が、インビトロまたはインビボで判定できる。

【0423】

細胞ベースのアッセイ

細胞(20,000から500,000の軟骨細胞など)を、低酸素状態などのOAを模擬する状態に暴露し、少なくとも12時間(少なくとも24時間、または少なくとも48時間など)培養を続ける。試験薬は、OAの模擬前、模擬中または模擬後に適用できる。代替的に、OAの被験者からの軟骨細胞が、単離(実施例19で説明した方法を使用するなど)され、試験薬が培養細胞と培養された。

30

【0424】

ある実施例において、潜在的な治療薬剤の複数の異なる用量が、最適な範囲を同定するために、細胞と培養された。例えば、ミリグラム、マイクログラム、およびナノグラム濃度が使用される。次に、一つ以上のOAリスク関連分子の活性を判定するためのアッセイ、例えば、OAリスク関連タンパク質量またはOAリスク関連核酸発現量(例えば、上述の実施例を参照)を測定するためのアッセイなどが、実行される。

【0425】

動物モデルアッセイ

上に提供した方法を使用して同定される薬剤などのOAの治療のための薬剤の能力は、動物モデルにおいて評価が可能である。哺乳動物でOAを誘発するいくつかの方法が知られているが、特定の実施例を本明細書で提供する。これに制限されるものではないが、マウス、ラット、ウサギ、犬、ギニアピッグ、ブタ、マイクロブタ、ヤギおよびアカゲザルなどのヒト以外の霊長類を含む、任意の種属の哺乳動物が、OAの動物モデルを生成するために使用可能である。このような動物モデルは、OAに関連した症状を改善するための薬剤の能力を試験するためにも、使用が可能である。さらに、このような動物モデルは、動物被験対象のLD50およびED50を判定するために使用することができ、このようなデータは、候補薬のインビボの有効性を判定するために使用することができる。

40

【0426】

OAを自然に発症する動物を使用、または代替的に、OAを哺乳動物で誘発(実施例2

50

0を参照)し、上の実施例で同定された一つ以上の試験薬を投与する。投与される試験薬の量は、熟練した当業者により判定される。ある実施例において、最適な用量範囲を同定するために、複数の異なる候補治療薬剤の用量が、異なる試験被験者に投与される。治療薬剤は、OA誘発前、誘発中または誘発後に投与することができる。一つ以上の試験薬の投与後、動物は、OAに関連する一つ以上の症状について観察される。試験薬の存在によるOAに関連した症状の発症の減少は、試験薬が、被験者のOAを軽減、またはさらにOAを阻害することにも使用可能な治療薬剤である証拠を提供する。

【0427】

我々の開示の原則が適用されるであろう多様の可能な実施形態の見解において、図示の実施形態は実施例であって、本開示の範囲を制限するものではないことを理解するべきである。むしろ、本開示の範囲は、以下の特許請求の範囲で定義される。よって、我々は、これらの請求の範囲および精神に含まれる全てを我々の発明と主張する。

10

【図面の簡単な説明】

【0428】

【図1】研究設計および試料選択を図示した概略図である。「発生例ひざOA」または「対照」のように、参加者を分類するために使用されたX線と並行して空腹時の血清試料が、評価された。初期X線の約5年前に得た各「対照」から得た第三試料も評価された。対照群は、手OAのX線写真の証拠もなかった。

【図2】16のサブアレイ(A-L)をもつ、試料タンパク質マイクロアレイスライドの図式的描写である。「サブアレイ」とは、スライド上の16のウェルまたは円分析サイトを意味する。「アレイ」とは、ウェルに印刷された抗体量を意味する。各マイクロアレイスライドは、一タイプのアレイのみを含む。

20

【図3】図3A~Dは、異なるモデルのシミュレーションと傾きおよび切片の効果を示す図式的描写である。(A)OAと正常間の異なる切片および傾き、(B)OAと正常間の異なる傾き、しかし同じ切片、(C)OAと正常間の異なる切片、しかし同じ傾き、(D)OAと正常間の異なる切片、しかし傾きはゼロに等しい。

【図4】共分散分析を使用して同定されたタンパク質を示す、Ven概略図であり、発現がOAの発症前に変更されたものと、OAが現れたときに発現が変更されたものである。

【図5】複合モデルANOVAおよび有意なマイクロアレイ分析(SAM)を使用して同定されたタンパク質を示す、Ven概略図であり、発現がOAの発症前に変更されたものと、OAが現れたときに発現が変更されたものである。

30

【図6】図6A~Gは、OAおよび対照試料間の4つの差次的に発現したタンパク質のZスコアを示すグラフである。発現が、来院時の初期X線および診断X線でOAおよび健康な試料間で著しく異なる、4つのタンパク質(インターロイキン-15[IL-15]、マトリックスメタロプロテイナーゼ[MMP]-7、プラスミノゲン活性抑制物質[PAI]-1、可溶性血管付着タンパク質[sVAP]-1)の一連のプロット。X軸は3つの年齢グループで、Y軸はMSIマイクロアレイチップ上のタンパク質発現値およびZスコア対応する値を示す。3つの年齢グループにおいて、異なる来院時のタンパク質の発現データの未加工値およびZスコアが、個別、および合計平均により作図された。

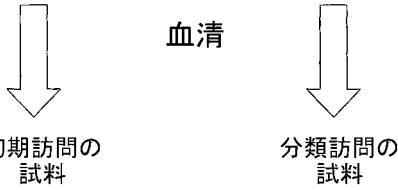
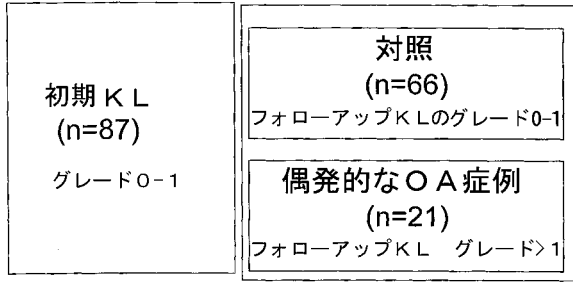
【図7】図7Aおよび7Bは、来院時の初期および分類X線の差次的発現タンパク質を使用した分類系図を示す、概略図である。初期のX線時またはそれ以前(A)、および分類X線時(B)に観察されたタンパク質の発現に基づく、OAおよび対照試料の反復的な回帰系図分類。各タンパク質の横に、試料を分類するために使用された限界値Zスコアを表示する。各タンパク質に関連する奇数値は、括弧内に表示する。2つの数字が各ノード(丸または四角で図示される)に表示される。そのタンパク質によりOAと分類された試料の数は、上に示され、対照と分類された参加者の数は、下に示される。誤分類エラー発生率は、(A)において0.06098、および(B)において0.07059であった。

40

【 図 1 】

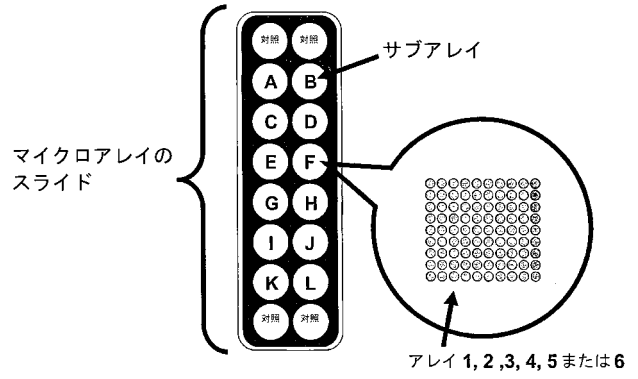
1984-1991 1994-1996

膝および手のX線

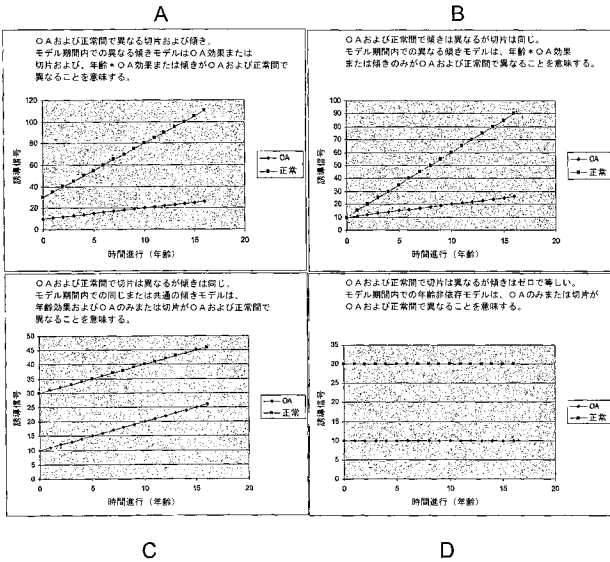


年数 -15 -10 0

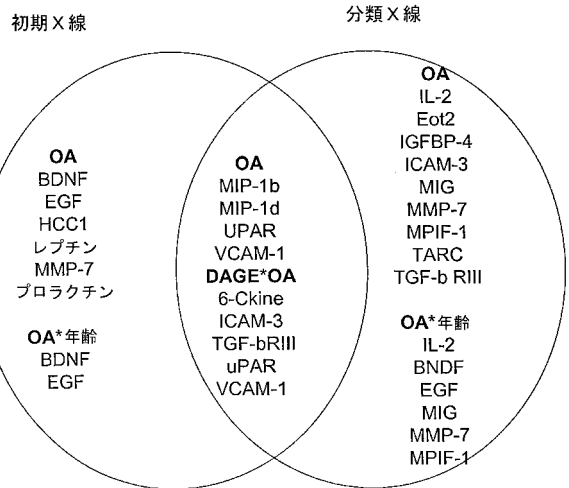
【 図 2 】



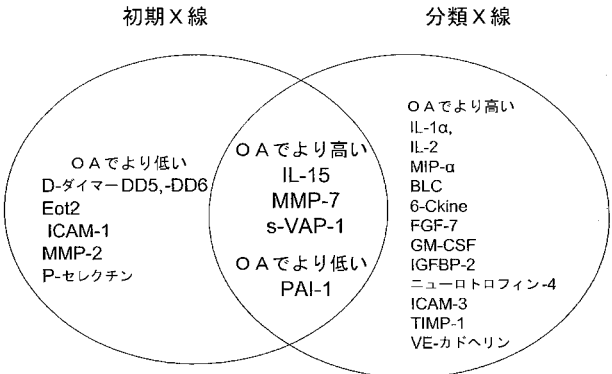
【 図 3 】



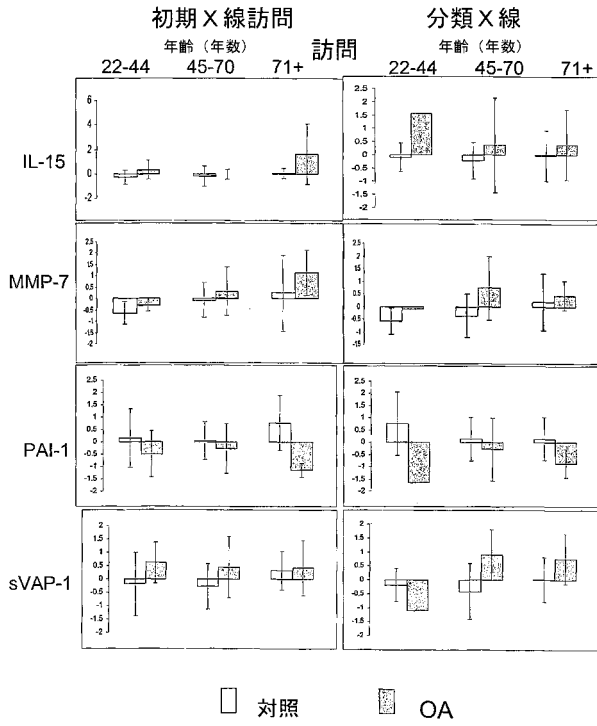
【 図 4 】



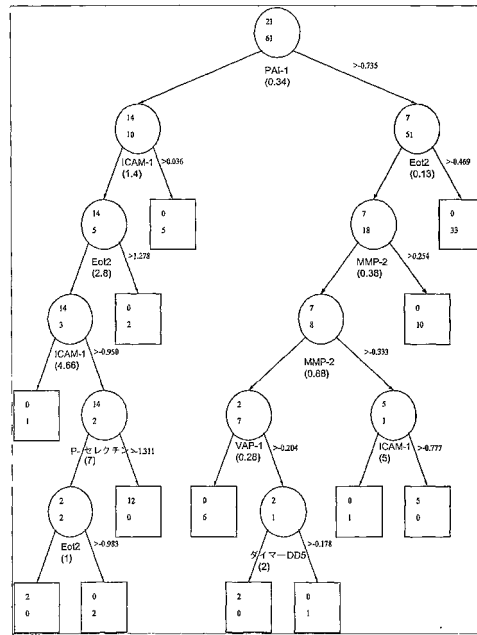
【 図 5 】



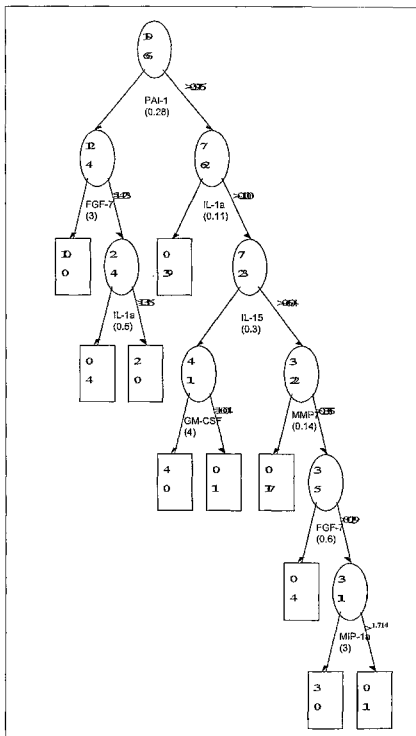
【 図 6 】



【 図 7 A 】



【 図 7 B 】



【 国際調査報告 】

60700430016



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2005/028871

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/68 C07K14/47 C12Q1/68		
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 C07K C12Q		
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, EMBASE, BIOSIS, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GARNERO PATRICK ET AL: "Biomarkers in osteoarthritis." CURRENT OPINION IN RHEUMATOLOGY. SEP 2003, vol. 15, no. 5, September 2003 (2003-09), pages 641-646, XP009072888 ISSN: 1040-8711 the whole document	1-20, 22-48
A	OTTERNESS I G ET AL: "An analysis of 14 molecular markers for monitoring osteoarthritis. Relationship of the markers to clinical end-points." OSTEOARTHRITIS AND CARTILAGE / OARS, OSTEOARTHRITIS RESEARCH SOCIETY. APR 2001, vol. 9, no. 3, April 2001 (2001-04), pages 224-231, XP002402192 ISSN: 1063-4584 the whole document	1-20, 22-48
-/--		
<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		"I" 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
"E" earlier document but published on or after the International filing date		"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
"L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		"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.
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 18 October 2006		Date of mailing of the International search report 29. 01. 2007
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5518 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 051 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer STRICKER, J

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

page 1 of 3

29. 6. 2007

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2005/028871

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DATABASE WPI Week 200430 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 2004-329477 XP002402201 & WO 2004/024892 A2 (CHONDROGENE INC) 25 March 2004 (2004-03-25) abstract Remark: as WO 2004/024892 is 1014 pages long and does apparently not cite IL-15 and sVAP-1 (AOC3) as being markers of osteoarthritis, only the WPI abstract thereof is cited in this search report.</p>	1-20, 22-48
A	<p>AIGNER T ET AL: "FUNCTIONAL GENOMICS OF OSTEOARTHRITIS" PHARMACOGENOMICS, ASHLEY PUBLICATIONS, GB, vol. 3, no. 5, September 2002 (2002-09), pages 635-650, XP009048818 ISSN: 1462-2416 the whole document</p>	1-20, 22-48
A	<p>KURKIJÄRVI R ET AL: "Circulating form of human vascular adhesion protein-1 (VAP-1): increased serum levels in inflammatory liver diseases." JOURNAL OF IMMUNOLOGY (BALTIMORE, MD. : 1950) 1 AUG 1998, vol. 161, no. 3, 1 August 1998 (1998-08-01), pages 1549-1557, XP002402193 ISSN: 0022-1767 abstract</p>	1-20, 22-48
A	<p>SHAH M H ET AL: "A ROLE FOR IL-15 IN RHEUMATOID ARTHRITIS?" NATURE MEDICINE, NATURE AMERICA, NEW YORK, US, vol. 4, no. 6, June 1998 (1998-06), page 643, XP001027669 ISSN: 1078-8956 the whole document</p>	1-20, 22-48
A	<p>THURKOW E W ET AL: "Increased expression of IL-15 in the synovium of patients with rheumatoid arthritis compared with patients with Yersinia-induced arthritis and osteoarthritis." THE JOURNAL OF PATHOLOGY, APR 1997, vol. 181, no. 4, April 1997 (1997-04), pages 444-450, XP002402194 ISSN: 0022-3417 abstract table III</p>	1-20, 22-48

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2005/028871

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HUANG R P ET AL: "Simultaneous detection of multiple cytokines from conditioned media and patient's sera by an antibody-based protein array system." ANALYTICAL BIOCHEMISTRY. 1 JUL 2001, vol. 294, no. 1, 1 July 2001 (2001-07-01), pages 55-62, XP002403464 ISSN: 0003-2697 abstract figure 1A	49,51,52
P,A	EP 1 477 571 A (EPPENDORF AG [DE]) 17 November 2004 (2004-11-17) paragraphs [0038], [0081]	49,51,52

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2005/028871**Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

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

1. Claims Nos.: 62, 63
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 15, 44 and 45 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. Claims Nos.: 62, 63
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-20 and 22-48 (all entirely); 49, 51 and 52 (all in part)

Remark on Protest

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

International Application No. PCT/US2005/028871

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.1

Although claims 15, 44 and 45 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box II.1

Claims Nos.: 62,63

Rule 39.1(iv) PCT - Method for treatment of the human or animal body by therapy
(Claims 15, 44 and 45)

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 62,63

Present claims 62 and 63 relate to the use of an extremely large number of possible compounds, including a plethora of yet unknown, thus hypothetical agonists/antagonists, for which no support and/or disclosure within the meaning of Art. 5 PCT can be found.

It should be borne in mind that claims 62 and 63 relate to the use of any molecule identified by the method of claims 53 - 61 and 64. They are not therefore limited to a compound of any precisely defined structure; they include within their scope any known or unknown molecule, with the sole requirement that these molecules are identifiable by the methods of claims 53 - 61 and 64. This manner of claiming has two consequences:

- Identifying a compound by an allegedly novel method does not necessarily confer novelty to the molecule (implicit lack of novelty).
- As the scope of product claim is not limited by any structural characteristics, the requirements of clarity and sufficiency of disclosure are not met, insofar as the broadly claimed scope is not supported by the description and the claimed alleged invention cannot be carried out by the skilled person.

Consequently, claims 62 and 63 have not been searched at all.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has

International Application No. PCT/US2005/028871

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-20 and 22-48 (all entirely); 49, 51 and 52 (all in part)

A method of evaluating osteoarthritis (OA) risk in a subject, comprising: detecting differential activity of at least four OA risk-related molecules in a sample of the subject, wherein two of the at least four OA risk-related molecules comprise IL-15 and sVAP-1.
Arrays having a basis in the present application, said arrays comprising antibodies that recognize at least IL-15 and sVAP-1.

2. claim: 21

A method of evaluating OA, wherein the method is a method of classifying age-related OA risk related molecules in a subject, comprising: detecting differential activity of at least four OA risk-related molecules in a sample of the subject, wherein the at least four OA risk-related molecules comprise BDNF, EGF, 6Ckine, ICAM-3, TGF-[beta]RIII, UPAR, VCAM-I, IL-2, MIG, MMP7, and MP1F-I.

3. claims: 50 (entirely); 49, 51 and 52 (all in part)

Arrays having a basis in the present application and not being covered by the first invention above.

4. claims: 53-61,64

A method of identifying an agent that alters an activity of an OA risk-related molecule listed in Tables 8 and 10-13, comprising: culturing a cell under conditions sufficient to mimic or induce OA; contacting the cell with one or more test agents under conditions sufficient for the one or more test agents to alter the activity of an OA risk-related molecule; and detecting differential activity of the OA risk-related molecule, wherein the presence of differential activity of the OA risk-related molecule indicates that the test agent alters the activity of an OA-related molecule listed in Tables 8 and 10-13.

International Application No. PCT/US2005/028871

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2005/028871

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004024892 A2	25-03-2004	AU 2003272465 A1	30-04-2004
		CA 2495252 A1	25-03-2004
		EP 1581652 A2	05-10-2005
		JP 2005506979 T	02-03-2006
EP 1477571 A	17-11-2004	US 2004229225 A1	18-11-2004
		US 2005208518 A1	22-09-2005

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)	
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	
G 0 1 N	33/50	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	D
G 0 1 N	33/15	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	M
G 0 1 N	37/00	(2006.01)	G 0 1 N	33/50	Z
			G 0 1 N	33/15	Z
			G 0 1 N	37/00	1 0 2

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

- (72)発明者 リング シャリ エム .
 アメリカ合衆国 メリーランド州 エリコット シティー フィーガ フラム コート 1 0 2 1
 1
- (72)発明者 パーリー ローラー
 アメリカ合衆国 コネチカット州 ウィルトン ブルー リッジ ロード 1 3 0
- (72)発明者 チェルネフ ベリツァー ティー .
 アメリカ合衆国 コネチカット州 ブランフォード ジェファーソン ロード 4 5 # 3 - 1 2
- (72)発明者 レジュナイン セルゲイ
 アメリカ合衆国 コネチカット州 ロッキー ヒル コールド スプリング ロード 2 0 0
- (72)発明者 パテル ダバルクマール ディー .
 アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 チャプテル ヒル テルライド トレイル 2 0 3
- (72)発明者 フェルッチ ルイージ
 アメリカ合衆国 メリーランド州 ボルティモア ユニバーシティー パークウェイ 6 1 9
- (72)発明者 チャン ミン
 アメリカ合衆国 メリーランド州 ジャーマンタウン シェーファー ロード 1 4 2 0 6

F ターム(参考) 2G045 CB01 DA12 DA13 DA14 DA36 FB03
 4B063 QA01 QA05 QA18 QA19 QQ08 QQ52 QQ79 QR08 QR32 QR56
 QR62 QR69 QR77 QS24 QS25 QS34 QS36 QX02
 4C084 AA17 NA14 ZA962 ZB112

专利名称(译)	骨关节炎的骨标志物		
公开(公告)号	JP2008510168A	公开(公告)日	2008-04-03
申请号	JP2007527900	申请日	2005-08-12
[标]申请(专利权)人(译)	美国政府		
申请(专利权)人(译)	美国		
[标]发明人	リングシャリエム パーリーローラー チエルネフベリツアーティー レジュナインセルゲイ パテルダバルクマールディー フェルツチルイージ チャンミン		
发明人	リング シャリ エム. パーリー ローラー チエルネフ ベリツアー ティー. レジュナイン セルゲイ パテル ダバルクマール ディー. フェルツチ ルイージ チャン ミン		
IPC分类号	G01N33/53 C12Q1/68 C12Q1/02 A61K45/00 A61P19/02 A61P29/00 G01N33/50 G01N33/15 G01N37/00		
CPC分类号	A61P19/02 A61P29/00 C12Q1/6883 C12Q2600/112 C12Q2600/158 G01N33/54366 G01N33/6887 G01N33/6893 G01N2800/105		
FI分类号	G01N33/53.P C12Q1/68.A C12Q1/02 A61K45/00 A61P19/02 A61P29/00 G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/50.Z G01N33/15.Z G01N37/00.102		
F-TERM分类号	2G045/CB01 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB03 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ52 4B063/QQ79 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QR69 4B063/QR77 4B063/QS24 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX02 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZA962 4C084/ZB112		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	60/602334 2004-08-18 US		
其他公开文献	JP2008510168A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了用于评估骨关节炎 (OA) 的方法, 例如用于诊断OA, 确认OA的诊断, 评估或预测OA的进展, 确定患有OA的受试者的严重性, 以及确定受试者患OA的风险。未来, 以及可用于实践方法的阵列和工具包。在特定实例中, 该方法包括确定OA风险相关分子的活性量 (例如存在的蛋白质量或表达量), 例如可溶性血管粘附蛋白1 (sVAP-1) 或白细胞介素-15 (IL-15) 。还提供了鉴定一种或多种改变OA相关分子活性的化合物的方法, 从而鉴定潜在的抗骨关节炎药物。

	初期X線 (1984-1991)		分類X線 (1994-1996)	
	OA (n=21)	对照 (n=61)	OA (n=19)	对照 (n=66)
年齢 (平均値±SD年数)	58.04±15.18	52.31±14.39	69.38±15.69	65.71±14.19
年齢層				
<45	3	16	1	6
45-70	12	36	6	31
>70	6	9	12	29
男性:女性	9:12	25:36	8:11	29:38
肥満度指数 (kg/m ²)	25.38±3.07	25.55±4.37	26.72±4.75	26.88±4.84