

(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2013-524213
(P2013-524213A)

(43) 公表日 平成25年6月17日(2013.6.17)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/68	2 GO 4 5
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	D

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 18 頁)

(21) 出願番号	特願2013-502539 (P2013-502539)	(71) 出願人	509234515 アナマー エービー
(86) (22) 出願日	平成23年3月30日 (2011. 3. 30)		スウェーデン国 イェーテボリ エスイー
(85) 翻訳文提出日	平成24年9月28日 (2012. 9. 28)		- 4 1 1 3 6 クングスボルツアベニン
(86) 国際出願番号	PCT/SE2011/050369		2 2
(87) 国際公開番号	W02011/123044	(74) 代理人	110000855 特許業務法人浅村特許事務所
(87) 国際公開日	平成23年10月6日 (2011. 10. 6)		
(31) 優先権主張番号	1050310-0	(72) 発明者	ブロム、アンナ
(32) 優先日	平成22年3月31日 (2010. 3. 31)		スウェーデン国、マルメ、カール グスタ
(33) 優先権主張国	スウェーデン (SE)	(72) 発明者	フス ヴェク 4 4
			ハッポネン、カイサ
			スウェーデン国、マルメ、アミラルスガタ
			ン 2 7

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 炎症をもたらす組織分解を検出する方法

(57) 【要約】

本発明は、一般的には、炎症応答をもたらし、組織破壊の増加の悪循環の道を開く組織分解プロセスを判定するための方法、アッセイ及びキットに関する。さらに具体的には、本発明は、補体を活性化したCOMPと補体因子C3b又はC3bの天然の分解断片との間の複合体により例示されるCOMP断片複合体の存在について、ヒト試料を分析することが可能なアッセイのためのキット及び方法に関する。

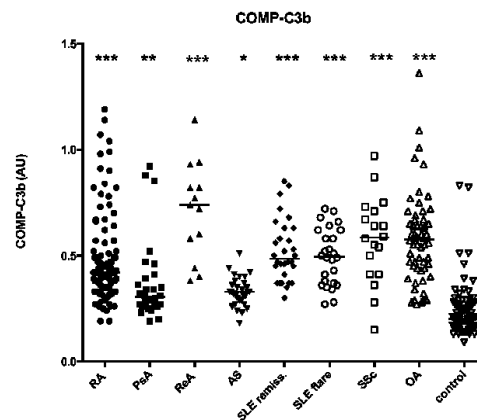


Figure 1

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

ヒトCOMPと1つ又は複数の補体因子又はその断片との間の複合体の存在を検出することを含む、補体活性化をもたらす組織分解プロセスを判定する方法。

【請求項 2】

以下のステップ、

- a) 試料を準備するステップ、
 - b) a) の試料を分析するステップ、
 - c) ヒトCOMPと補体因子との間の複合体の存在を検出するステップ
- を含む、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

試料が臨床試料、好ましくは血清又は滑液由来の臨床試料である、請求項 1 又は 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4】

補体因子がヒトC3b又はその断片である、請求項 1 から 3 までのいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

補体因子がヒトC3b又はその断片である請求項 1 から 4 までのいずれか一項において定義される試料を、炎症成分を有し結合組織を冒す疾患における補体活性化を測定するため又はモニターするために使用する、アッセイ。

20

【請求項 6】

試料を、疑われているRA及びOAにおける補体活性化を測定するために使用する、請求項 5 に記載のアッセイ。

【請求項 7】

試料を、乾癬性関節炎、慢性若年性関節炎及び骨盤脊椎炎における補体活性化を測定するために使用する、請求項 5 に記載のアッセイ。

【請求項 8】

試料を、RA及びOA、全身性硬化症、腱炎並びにアテローム性動脈硬化症を含む心血管疾患などの、炎症性成分を有し結合組織を冒す疾患における補体活性化を測定するために使用する、請求項 5 に記載のアッセイ。

30

【請求項 9】

試料を、RA及びOA、全身性硬化症、腱炎並びにアテローム性動脈硬化症を含む心血管疾患などの炎症性成分を有し結合組織を冒す疾患に罹患した患者における疾患進行をモニターするために使用する、請求項 5 に記載のアッセイ。

【請求項 10】

試料中のヒトCOMPと補体因子との間の複合体の存在を検出することを含む、補体活性化をもたらす組織分解プロセスを判定するためのキット。

【請求項 11】

- a) COMP - C3b複合体を形成する成分のうちの1つに結合する、1つ又は複数の抗体、又は別のリガンド、
 - b) 前記複合体のその他の成分に結合する1つ又は複数の抗体の形態のディテクター、及び
 - c) 1つ又は複数の抗体が上記の断片の1つ又は複数のエピトープと反応したかどうかを検出するための手段
- を含む、請求項 10 に記載のキット。

40

【請求項 12】

臨床試料中の補体因子と複合体になっているヒトCOMPの存在を分析するための、請求項 10 又は 11 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 13】

補体因子がヒトC3b又はその断片である、請求項 10 又は 11 のいずれか一項に記載

50

のキット。

【請求項 1 4】

a) 溶液である又は固相担体に結合している、ヒトCOMPに対する抗体、好ましくはモノクローナル抗体又は別のリガンド、
 b) ヒトCOMP - C3b断片複合体を含有することが疑われる試料であって、ステップ a) の第1の抗体に対し、得られた混合物を水溶液中でインキュベートする試料、
 c) ヒトC3b又はその断片に対する第2の抗体、好ましくはモノクローナル抗体又は別のリガンドであって、検出可能で定量できるシグナルを発する標識を含む第2の抗体、
 d) 標識由来のシグナルを定量する手段であって、前記シグナルが前記試料においてヒトCOMP - C3b複合体の濃度の測定値である手段

10

を含む、請求項 1 1 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、一般的には、組織分解プロセス並びに、特に、関節疾患における炎症及び伝播に関連する事象を判定するための方法及び製品に関する。本発明は、補体系を活性化したCOMPと補体因子C3b又はC3bの天然の分解断片との間の複合体で例示されるCOMP断片複合体の存在について、血清及び他のヒト試料（滑液を含むがこれに限定されない）を分析するのに使用することが可能なアッセイに関する。

【背景技術】

20

【0002】

関節炎には100を超える異なった種類が存在するが、もっとも一般的なものは、関節リウマチ（RA）及び骨関節炎（OA）並びに脊椎関節炎及び若年性特発性関節炎である。米国では約130万人がRAに罹患しており、このほぼ10倍がOAに罹患している。

【0003】

軟骨などの関節構造を破壊する組織分解をもたらす病態は、大きな医学的、社会的及び経済的問題をなす。65歳を超える人では、1,000人のうち約500人が関節炎に罹患している。組織分解プロセスは、組織分子成分の分解の結果である。これは、たとえば、物理的ストレス、毒性化合物により、又は分解酵素の産生をもたらす炎症により誘発されることがある。このために、数多くの方法により診断、疾病モニタリング、治療等の目的で組織分解プロセスを判定するが可能である。関節炎状態、動脈硬化症、変形性関節炎状態等などの結合組織疾患において分解プロセスを判定する1つの方法は、結合組織成分の分解産物の存在を検出することである。たとえば、関節炎状態などの炎症プロセスの診断において用いられてきた白血球の増加量を測定する間接的方法と比べて、これにより分解プロセスの直接検出が可能になる。別のパラメータは、X線又はMRIなどの画像法により検出されるプロセスの終期に観察される組織の消失である。

30

【0004】

従来、関節炎の臨床診断は、患者病歴、理学的検査に基づき、RAの場合には、特にある種の抗体についての臨床検査及びX線像に基づいている。関節炎患者の予後、治療及び臨床成績は、一連の判定により評価される。しかし、軟骨変性に関連する病態により引き起こされる永久的組織損傷を最小限に抑えるためには、そのような状態を早期の段階で診断し、特に、そのプロセスを伝播し症状を強める可能のある事象のリスクを評価できることが重要である。したがって、この10年間、病的な軟骨変性を早期に検出できる適切な生物学的マーカーを見つける努力が払われてきた。

40

【0005】

1つのそのような生物学的マーカーは、軟骨オリゴマー基質タンパク質（COMP又はトロンボスポンジンV）である。COMPの血清レベルの上昇はこれまでRAにおける関節破壊と関連付けられてきた。

【0006】

COMPは軟骨の構成成分であり、COMPは成長している組織においてはコラーゲン

50

原線維形成の触媒としての機能を果たすと思われ、高齢者においては組織完全性を維持する上で構造的役割を有すると思われる。さらに、COMPは軟骨において優勢発現するペントマー糖タンパク質である。このタンパク質は関節破壊の主要な分子マーカーの1つであり、COMPレベルの上昇は活動性関節疾患患者の滑液においても血清においても見られる[1、2]。COMPは軟骨[3]及び腱の圧力負荷部分においてもっとも豊富に認められる。さらに、滑膜及び皮膚の線維芽細胞並びにアテローム性動脈硬化症における血管壁においてもある程度の発現が報告されてきた。興味深いことに、COMPレベルの上昇は、皮膚病変の全身性硬化症患者の血液中で見出すことができる[4]。

【0007】

COMPの主要な機能の1つは、コラーゲン原線維形成を触媒してI型/I型コラーゲンとの直接相互作用により組織構造を安定化し、コラーゲン線維の末梢におけるIX型コラーゲン及びマトリリンとの相互作用を介してコラーゲン網を安定化することである。COMPは、細胞表面インテグリンとの相互作用を通じて細胞外基質への軟骨細胞の付着を媒介することも提唱されてきた。構造的には、COMPは、N末端に近いコイルドコイル構造により互いに連結されている5個の同一のサブユニットからなるペントマーである。N末端には4つの上皮増殖因子(EGF)ドメイン、8つの3型トロンボスポンジン(TSP3)反復及び球状C末端が続く[5]。COMPの変異は偽性軟骨形成不全症及び多発性骨端異形成症をもたらすことが明らかにされている。

10

【0008】

補体系は、自然免疫系の一部としての防御に際して急速に活性化され得る一連の因子である。補体は炎症応答を活性化し、免疫細胞をその部位に動員する。補体はまた、たとえば、損傷を受けて死にかけている細胞、ミスフォールドしたタンパク質、病原体及び生物由来の外来物質の除去において適応免疫系を支援する。しかし、別の重要な事象は、B細胞の食作用及び活性化を表す強力なシグナルである、C3b及びその断片を有する補体により認識される標的のオプソニン化である。

20

【0009】

補体系は、通常は不活性前駆物質(プロタンパク質)として循環しているいくつかのタンパク質からなる。グリコシル化された血清タンパク質及び細胞膜受容体を含む、30を超えるタンパク質及びタンパク質断片が補体系を構成している。これらのタンパク質は主に肝臓で合成され、血清のグロブリン分画の約5%を占めている。いくつかの誘因のうちの1つによって刺激されると、系中のプロテアーゼは、特定のタンパク質を切断して化学遊走物質アナフィラトキシンを放出し、さらなる切断の増幅カスケードを開始する。この活性化カスケードの最終結果は応答の大幅な増幅であり、細胞動員に活性な因子が形成され、ポア形成膜侵襲複合体が最終的に活性化される。

30

【0010】

補体系は、アポトーシス細胞及びネクローシス細胞並びに免疫複合体の除去を支援する危険センサーであると共に外来病原体に対する防御機構である。一方、制御されない補体の活性化は、いくつかの自己免疫障害及び病的炎症状態の一因となることがある。補体の活性化はRA患者の関節において起こることが明らかにされており、RAの病態に補体が関与していることは動物モデルにおいて実証されている[6]。

40

【0011】

3つの生化学的経路、すなわち、古典的補体経路、第2の補体経路及びマンノース結合レクチン経路が補体系を活性化し、これらの経路は主要な補体成分であるC3を活性化するC3コンバーゼのレベルで合わさる。古典的経路は典型的には免疫複合体により誘発されるが、レクチン経路は病原体表面に存在する特定の糖鎖構造により開始される。第2の補体経路は他の2つの経路の増幅ループとしての機能も果たす自己活性化経路である。最近、プロパージンが第2の経路を直接活性化することができることが確かめられている[7]。補体活性化の3つの経路すべてにおいて、極めて重要なステップは成分C3のC3bへのタンパク質分解性転換である。補体カスケードの酵素によりC3bが切断されると、アミノ基又はヒドロキシル基のどちらかを捕獲するチオエステル結合によりC3bは

50

抗原表面上に共有結合することが可能になる。これは補体オプソニン化の最初のステップであり、続いて結合しているC3bが補体阻害因子Iによりタンパク質分解されると、異なった受容体により認識される断片であるiC3b、C3c及びC3dgが生成される。C3は、13の別個のドメインからなる複合した柔軟なタンパク質である。C3b及びC3c構造をC3と比べると、この分子は各タンパク質分解ステップで大きな立体構造の再構成を受けて、細胞受容体及び他のリガンドと相互作用することが可能な分子の追加の新たな表面が露出することが示されている。補体活性化の大半の阻害剤は、補体コンバーターの中心的成分であるC3bのレベルで作用する。

【0012】

補体は、小ロイシンリッチリピートタンパク質(SLRP)ファミリーのメンバーなどのいくつかの内在性リガンドにより誘発されることもある[8]。SLRPは軟骨において、たとえば、組織の構造的安定性に寄与するいくつかの役割を有する。病的軟骨破壊中、SLRPは断片化されて滑液中に放出され、そこで補体と相互作用をすることができる。これが、RA及びOAなどの関節疾患に罹患している患者の、炎症が蔓延している関節において局所的炎症環境の一因になると提唱されてきた。

10

【0013】

上記のように、組織分解プロセス並びにOA及びRAの発症を判定するためのさらに優れた改良された方法及び製品の必要性が存在する。本発明は、新しいアプローチを使用して、組織破壊プロセスの結果として放出される産物により推進される補体活性化/炎症の特定のプロセスを同定する。組織から放出される分子/断片と補体活性化から生じる補体因子との間で形成される複合体は、COMPとC3b又はC3bの天然の/追加の分解産物との間の複合体のアッセイを説明している本明細書の本発明における免疫化学的方法によりアッセイされる。

20

【0014】

WO0138876には、細胞系から産生される2種類のモノクローナル抗体を用いたサンドイッチELISA技術を使用して臨床試料中のヒトCOMPの存在を分析する方法のためのアッセイが記載されている。WO0138876に記載される方法は本発明において部分的に使用することが可能であり、前記特許文献はこれにより参照によって完全に組み込まれるが、補体活性化又はC3bとの複合体形成におけるCOMPの役割に関して現在提供されている概念に関する情報はそこにはない。

30

【0015】

WO05116658には、本発明と同じ群からのCOMPネオエピトープの検出により組織分解プロセスを判定するためのアッセイが記載されている。WO05116658に記載される方法の一部は本発明において使用することが可能であり、前記特許文献はこれにより参照によって完全に組み込まれるが、COMPとC3bなどの別の因子との間の複合体をアッセイすることに関する情報もそこにはない。

【0016】

US2008233113は、対象におけるC3b阻害剤による補体活性化を抑制する方法に関するものであるが、補体を活性化する作用薬及び得られるCOMPとC3bとの間の複合体についてのアッセイに関連してはいない。その手法は、OAとRA両方の滑液における補体活性化がCOMP放出に関係していることを示すことに適用されていない。

40

【0017】

WO2004031240は、炎症反応、さらに具体的には、補体系の活性化をインビボで抑制する方法を記載している。この発明は、C3の活性化には不可欠なドメインである、補体の天然の第3成分であるC3上の新規の機能的ドメインの同定及び抑制からなるが、この活性化を実現するどんな作用薬にも、COMPとC3bとの間の複合体のアッセイにも関連していない。

【0018】

WO2008154251では、この発明はC3bに対する特定の抗体並びにそのような抗体を使用する補体関連障害の予防及び治療に関する。しかし、この発明はCOMPと

50

C 3 b との間の複合体のアッセイには関連していない。

【 0 0 1 9 】

関節疾患中に軟骨が過剰に分解すると、滑膜内で分子変化が起こる。軟骨からのCOMP放出は、RAでもOAでも、放射線学的に観察される軟骨損傷に先行する初期事象であることが明らかにされている。したがって、COMPレベルの上昇は、活動性疾患に罹患した患者の滑液においても血清においても検出することができる。補体活性化は、特に、ある種の軟骨プロテオグリカンにより補体の古典的経路が活性化されることが発見されて以来、関節において炎症状態を持続する要因のうちの1つであることが提案されてきた。古典的経路でも第2の経路でも補体活性化産物は、活動性RAに罹患した患者の滑液に見出すことができ、これは関節炎疾患モデルにおける補体タンパク質の欠損の保護的効果並びに補体阻害の治療的効果を示すいくつかの動物モデルにより支持されるシナリオである [6]。

10

【 0 0 2 0 】

我々の発明は、COMP - C 3 b 複合体が、インビボにおけるCOMP誘導補体活性化の指標としてRA患者の血清中にも滑液中にも存在することに基づいている。血清又は滑液においてはCOMPの量とCOMP - C 3 b 複合体の間には相関関係はなく、COMPのある種の放出された断片のみが補体活性化特性を有していること、又は他の制限する要因が存在することを示している。RA患者の滑液中のCOMPレベルは血清中よりも有意に高く、COMP - C 3 b レベルは血清に比べていくらか低い。1つの説は、血液中の事象は違った寄与をする可能性のある多くの関節を反映しているというものであり、別の説は、補体の他に全タンパク質レベルも一般に血清中よりも滑液中のほうがはるかに低く、プロパージン及びC 3 の利用可能性は制限要因である可能性があるというものである。

20

【 0 0 2 1 】

本明細書の発明は、補体調節におけるCOMPの役割についての発見及びCOMPが第2の経路を通じて補体活性化を誘導することができることに基づいている。

【 0 0 2 2 】

COMPだけではなく、血清中でCOMP - C 3 b 複合体を検出することにより、循環COMPレベルが正常な範囲に留まっていることがある患者において、活動性疾患、たとえば、RA又はOAを同定することが可能である。これらの複合体は、本発明の方法に、アッセイ及びキットに含まれる。

30

【 0 0 2 3 】

本発明は、COMP放出を伴う他の炎症状態、たとえば、脊椎関節炎及び若年性特発性関節炎並びに全身性硬化症及び腱病のような他の状態における、軟骨から放出される断片により推進される補体活性化の役割を同定するのにも有用であることが判明するであろう。これは、診断を迅速に確定するための追加の価値あるツールを提供し、広範な関節破壊を回避するための患者の早期治療を選択し開始することになる。本発見及び本発明、たとえば、COMPと補体成分C 3 b 又はC 3 b の天然の分解産物との間の共有結合性複合体を検出するバイオアッセイは、疾患治療をモニターするのに特に有用なRA病の新しいバイオマーカーを検出することになる。前記アッセイは、特に出現する補体阻害剤を用いた治療を受け入れられるRA患者の下位群もおそらく同定することになる。

40

【 0 0 2 4 】

したがって、活動性疾患に罹患した患者を同定する他にも活動性疾患に罹患した患者の関節腔において局所的炎症を引き起こす事象を同定することが本発明の目的である。

【 0 0 2 5 】

上記の発明及び先行技術は、単独で採用されても組み合わせて採用されても、どれ1つとして、本発明を記載していないし本発明をもたらす情報を提供してはいない。

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 2 6 】

炎症は大半の疾患の特徴である。以前の発見では、組織から放出される分子は、炎症の

50

重要な一部としての補体活性化に影響を与えることが示されている。そのような分子は体液中で同定することが可能である。本発明は、組織破壊プロセスにより誘導される進行中の補体活性化を検出する新しい方法を示している。COMPだけではなく、血清中においてCOMP-C3b複合体を検出することにより、RAについて数倍より感度の高い特異的検出を得ることが可能である。関節疾患に罹患した患者の滑液中のそのような複合体を同定することにより、軟骨分解から生じる炎症の局所的活性化を同定することが可能である。

【0027】

たとえば、RA、OAなどの関節疾患並びに腱炎、全身性硬化症及び主要な血管を冒す心血管疾患（アテローム性動脈硬化症を含む）の潜在的なある種の段階に罹患した患者由来の血液及び滑液試料を、COMP-C3b複合体の内容物について分析することが可能である。

10

【0028】

本発明の主目的は、進行中の治療計画の成功を測定しモニターするために使用することができるアッセイを提供することであり、すなわち、COMP-C3bアッセイにおけるシグナルは患者の疾患活動性に従う。

【0029】

本発明の別の目的は、RAに罹患した患者を同定するための改良されたアッセイを提供することである。

【0030】

本発明の実施形態は、本発明の方法においてのように、臨床試料を、炎症性成分を有し結合組織を冒す疾患における補体活性化を測定するために使用するアッセイである。

20

【0031】

本発明の実施形態は、本発明の方法においてのように、試料を、疑われているRA及びOAにおける補体活性化を測定するために使用するアッセイである。

【0032】

本発明の実施形態は、本発明の方法においてのように、試料を、乾癬性関節炎、慢性若年性関節炎及び骨盤脊椎炎における補体活性化を測定するために使用するアッセイである。

【0033】

本発明の実施形態は、本発明の方法においてのように、試料を、RA及びOA、全身性硬化症、腱炎並びにアテローム性動脈硬化症を含む心血管疾患における補体活性化を測定するために使用するアッセイである。

30

【0034】

本発明の実施形態は、本発明の方法においてのように、RA及びOA、全身性硬化症、腱炎並びにアテローム性動脈硬化症を含む心血管疾患などの炎症性成分を有し結合組織を冒す疾患に罹患した患者において疾患進行をモニターするためのアッセイである。

【図面の簡単な説明】

【0035】

【図1】図1は、様々な疾患群における血清COMP-C3b複合体のレベルを示す。

40

【発明を実施するための形態】

【0036】

炎症は大半の疾患の構成要素である。以前の発見では、組織から放出される分子は、炎症の重要な一部としての補体活性化に影響を与えることが示されている。COMPは、主にプロパージンとの相互作用を通じて補体系の第2の経路を活性化することができ、これにより補体攻撃をCOMPが露出している表面に向けられる可能性があることを我々は発見していた。COMPのペンタマー構造（pCOMP）はプロパージンの結合を促進するのに必要ではなく、血清中において切断されたCOMPの放出された断片は補体活性化特性を有するというインビボの知見を支持していた。興味深いことに、C3及びC3bはCOMPと直接相互作用することも見出された。これにより、COMPの効果は、C3b

50

とプロパージン両方との相互作用を通じて代替C3コンバーゼを安定化することであるのか、又はもっと単純に、プロパージンを動員し、したがってコンバーゼ会合体にプラットフォームを提供することにより補体活性化を標的にすることなのかどうかという疑問が生じる。

【0037】

本発明は、患者において炎症全般を検出するために使用することを目的とする。

【0038】

本発明は、たとえば、以下の成分、

i) WO 0 1 3 8 8 7 6 / AU 9 9 0 4 2 3 6 (本明細書に組み込まれている)に記載される手順に従ってCOMPに対する抗体により本出願において例示されている、COMP - C3b複合体を形成する成分のうちの1つを捕獲する1つ又は複数の抗体又は他のリガンドを含む第1の成分(前記抗体は、COMPのリガンド、ファージディスプレイ法により同定される断片を含むFab若しくはF(ab)'₂などの抗体断片又はCOMPエピトープに結合する無傷の抗体であることが可能である)、

ii) 補体因子C3b若しくは天然の分解産物に対する抗体又はその断片により本出願において例示されている、前記複合体のその他の成分に結合する1つ又は複数の抗体の形態のディテクターを含む第2の成分、

iii) 1つ又は複数の抗体が上記の断片の1つ又は複数のエピトープと反応したかどうかを検出するための手段を含む第3の成分(これは、標識されたディテクター抗体又は前記ディテクター抗体に結合する標識されたリガンドを使用することにより実現することが可能である。典型的なアプローチでは、最終的な検出は、一般に使用されているアプローチ、たとえば、結合した酵素又は他の任意のプロープの活性を測定することを含むアプローチによるものである)

を含む、本発明に従った方法により組織分解プロセスを判定するためのキットに関する。

【0039】

さらに、本発明は、以下の成分、

i) 抗体、たとえば、溶液又はプレートのウェルなどの固相担体に結合している、ヒトCOMPに対するモノクローナル抗体又は他のリガンドを提供する第1の成分、

ii) ヒトCOMP - C3b断片複合体を含有すると疑われている臨床試料をステップ1)の第1の抗体に添加し、得られた混合物を水溶液中でインキュベートすること、

iii) 第2の抗体、たとえば、ヒトC3bに対するモノクローナル抗体若しくは他のリガンド又はその断片をステップii)の混合物に添加し(前記第2の抗体は検出可能であり定量できるシグナルを発する標識を含む)、標識由来のシグナルを定量する(前記シグナルは前記試料中のヒトCOMP - C3b複合体の濃度の測定値となる)こと

を含む、本発明に従った方法により組織分解プロセスを判定するためのキットにも関することが可能である。

【0040】

本発明の抗体は、試料中に存在するCOMP - C3b複合体に結合した抗体のレベルを測定するために、たとえば、酵素、放射性の、蛍光性の又は発光性の標識で随意に標識されている。

【0041】

サンドイッチアッセイでは、固相に結合している成分は、第1の成分でも第2の成分でもよい。上に与えられた例では、第1の成分は固相に結合している。サンドイッチアッセイの別の例では、本発明の抗体を含む第2の成分は、たとえば、プレートのウェルなどの固相に結合している。次に、試料中におけるCOMP - C3b断片の存在は、まず試料をプレートのウェルに添加することにより検出することが可能である。COMP - C3b断片を含有する1つ又は複数の複合体が試料中に存在する場合には、断片は抗体を介して固相に結合しており、この抗体はCOMP - C3b複合体に結合する。次に、C3bエピトープを含有する断片の存在は、1つ又は複数の物質を含む第1の成分を添加することにより測定することが可能であり、この物質は1つ又は複数の断片に結合する。前記1つ又は

10

20

30

40

50

複数の物質は、試料中に存在する断片に結合している物質のレベルを測定するために、たとえば、酵素又は放射性若しくは蛍光性標識で随意に標識されている。第2の抗体と反応する、抗体などの標識されたりガンドも検出のために使用することが可能である。

【0042】

本発明は、関節疾患における軟骨分解プロセスにより誘導される補体活性化の滑液レベルに関する情報を提供することになる。血清分析は、COMPの放出された断片により誘導される補体活性化のレベルに関する情報を提供し、RA及びOAに罹患している患者をさらにうまく同定することになる。特に、炎症を誘発する際の基質成分の役割に関する情報は、将来の治療努力を評価すること並びにそのような治療のために患者を選択することにも重要な成分を提供する。

10

【0043】

本発明は、活動性疾患に罹患したRA患者を明確にする新規の手段を提供し、前臨床段階において現在の診断を行うことができる前の患者を含むことになる。

【0044】

本発明は、組織破壊の強度が低すぎて従来からある現在のアッセイにより検出することができない場合でも、COMPについての疾患活動性を含む疾患活動性を明確にすることになる。

【0045】

本発明は、疾患進行が比較的激しい高リスク患者を明確にすることになる。

【0046】

本発明は、外傷後に変性関節疾患を発症する比較的高いリスクを有する患者を滑液の分析により明確にすることになる。

20

【0047】

本発明は、乾癬性関節炎、慢性若年性関節炎及び骨盤脊椎炎における補体活性化を明確にすることになる。

【0048】

本発明は、血清試料の分析により、背痛をもたらす脊椎におけるプロセスを同定することになる。その理論的根拠は、放出されるCOMP断片が補体を活性化して炎症プロセスを誘導し、今度は疼痛を生じるというものである。補体活性化を示す複合体は、前記プロセスの直接の評価基準を提供することになる。

30

【実施例】

【0049】

(例1)

血液試料を、静脈穿刺により収集し、凝固させる。血清を遠心分離により分離する。次に、試料を、試料希釈液(0.05M Tris-HCl、pH7.5、0.90パーセント(wt)NaCl、1パーセントウシ血清アルブミン、0.05パーセントTween20、0.15パーセントKathon CG、0.01パーセントタートラジン、0.001M CaCl₂、0.01パーセントウシIgG、0.45マイクロメートルフィルターを使用して濾過される)で1対10で希釈する(12μL(マイクロリットル)試料対108μL(マイクロリットル)試料希釈液)。

40

【0050】

滑液は関節吸引により収集し、直ちに遠心分離して、細胞及びすべての粒子を除去する。滑液は、血清試料と同様に、試料希釈液で1対10で希釈する。

【0051】

各判定は、標準及び未知の試料では2通りに実施される。細胞系DSM ACC2406により産生されるモノクローナル抗体がウェルに固定化されている、ポリスチレン96ウェルマイクロタイタープレートを使用する。50μLの未知の試料又は標準試料(我々の場合は、標準として1.7U/lキャリブレーション対照を使用した)をウェルに添加し、プレートを回転プレート上、室温で120分間インキュベートする。350μLの洗浄緩衝液(0.14M NaCl、0.003M KCl、0.05% Tween20

50

、0.01Mリン酸緩衝液 pH7.4)を用いて4回洗浄した後、Sigma社製(S t . L o u i s、M O 6 3 1 7 8、米国)のC3b認識抗体C7761を含有する50μLのコンジュゲート溶液希釈液(0.05M T r i s ベース pH7.5、0.9パーセント(wt)NaCl、0.001M C a C l ₂ × 2 H ₂ O、1パーセントBSA、0.05パーセント T w e e n 2 0、0.15パーセントK a t h o n C G、0.03パーセントパテントブルー、0.01パーセントウシI g G、0.005パーセントヘテロ親和性ブロッキング試薬-1)(1対3000に希釈する)をすべてのウェルに添加し、プレートを室温で60分間、回転板上でインキュベートする。プレートは洗浄緩衝液を用いて4回洗浄し、コンジュゲート溶液希釈液中のウサギ抗ヤギHRP(D a k o C y t o m a t i o n社製のP0449、1対2000に希釈される)50μLを各ウェルに添加する。プレートを、回転板上、RT(室温)で60分間インキュベートし、その後、上記と同じように洗浄緩衝液を用いて4回洗浄する。200μLの3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(1mM)を各ウェルに添加し、プレートを室温で3分30秒間インキュベートする。呈色反応は、各ウェルに50μLの0.5M H₂SO₄を添加することにより停止する。450nmの吸光度を測定する。標準試料の吸光度を1に設定し、患者試料の読み出しは標準に対して規準化する。

【0052】

(例2)

例1と同じであるが、未知の試料におけるCOMP-C3bレベルの定量的評価基準を得るための直接的な標準参照としての1つ又は複数のレベルの複合体を表す血清の陽性プールも使用する。

(参考文献)

- 1 **Morozzi, G., Fabbroni, M., Bellisai, F., Pucci, G. and Galeazzi, M.,** Cartilage oligomeric matrix protein level in rheumatic diseases: potential use as a marker for measuring articular cartilage damage and/or the therapeutic efficacy of treatments. *Ann N Y Acad Sci* 2007. **1108**: 398-407.
- 2 **Saxne, T. and Heinegård, D.,** Cartilage oligomeric matrix protein: a novel marker of cartilage turnover detectable in synovial fluid and blood. *Br J Rheumatol* 1992. **31**: 583-591.
- 3 **Hedbom, E., Antonsson, P., Hjerpe, A., Aeschlimann, D., Paulsson, M., Rosa-Pimentel, E., Sommarin, Y., Wendel, M., Oldberg, A. and Heinegård, D.,** Cartilage matrix proteins. An acidic oligomeric protein (COMP) detected only in cartilage. *J Biol Chem* 1992. **267**: 6132-6136.
- 4 **Hesselstrand, R., Kassner, A., Heinegård, D. and Saxne, T.,** COMP: a candidate molecule in the pathogenesis of systemic sclerosis with a potential as a disease marker. *Ann Rheum Dis* 2008. **67**: 1242-1248.
- 5 **Oldberg, A., Antonsson, P., Lindblom, K. and Heinegård, D.,** COMP (cartilage oligomeric matrix protein) is structurally related to the thrombospondins. *J Biol Chem* 1992. **267**: 22346-22350.
- 6 **Okroj, M., Heinegård, D., Holmdahl, R. and Blom, A. M.,** Rheumatoid arthritis and the complement system. *Ann Med* 2007. **39**: 517-530.
- 7 **Spitzer, D., Mitchell, L. M., Atkinson, J. P. and Hourcade, D. E.,** Properdin can initiate complement activation by binding specific target surfaces and providing a platform for de novo convertase assembly. *J Immunol* 2007. **179**: 2600-2608.
- 8 **Sjöberg, A. P., Trouw, L. A. and Blom, A. M.,** Complement activation and inhibition: a delicate balance. *Trends Immunol* 2009. **30**: 83-90.

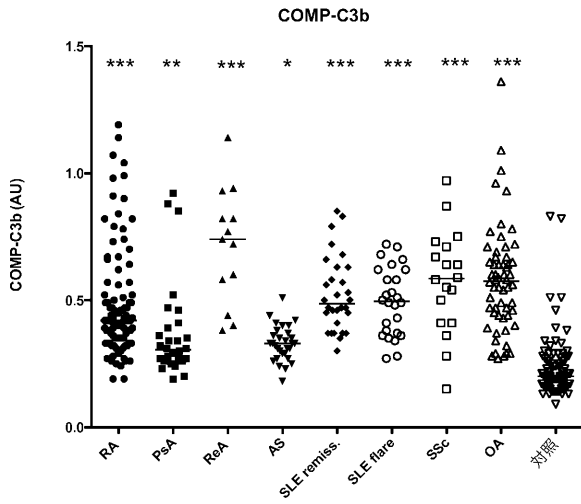
10

20

30

40

【 図 1 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/SE2011/050369
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC: see extra sheet		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC: G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
SE, DK, FI, NO classes as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
EPO-Internal, PAJ, WPI data, BIOSIS, COMPENDEX, EMBASE, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Sjöberg A. P. et al., "Complement activation and inhibition: a delicate balance", Trends in Immunology, 2009, Vol. 30, No. 2, pages 83-90; page 86, column 2, paragraph 2 - page 87, column 2, paragraph 1; table 1 --	1-14
A	Happonen K.E. et al., "Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) has a dual role in complement regulation", Molecular Immunology, 2009, Vol. 46, No. 14, page 2829 --	1-14
A	Saxne T. et al., "Cartilage oligomeric matrix protein: A novel marker of cartilage turnover detectable in synovial fluid and blood", British Journal of Rheumatology, 1992, Vol. 31, No. 9, pages 583-591 --	1-14
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 01-06-2011		Date of mailing of the international search report 20-06-2011
Name and mailing address of the ISA/SE Patent- och registreringsverket Box 5085 S-102 42 STOCKHOLM Facsimile No. + 46 8 666 02 85		Authorized officer Terese Sandström Telephone No. + 46 8 782 25 00

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/SE2011/050369
--

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 0138876 A1 (ANAMAR MEDICAL AB ET AL), 31 May 2001 (2001-05-31) --	1-14
P, X	Happonen K. E. et al., "Regulation of complement by cartilage oligomeric matrix protein allows for a novel molecular diagnostic principle in rheumatoid arthritis", Arthritis & Rheumatism, December 2010, Vol. 62, No. 12, pages 3574-3583 -- -----	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/SE2011/050369
--

Box No. 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.: 1-9
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 1-9 relate to a method for treatment of the human or animal body by surgery, see PCT rule 39.1 (iv), since the claims include, implicit or explicit, a step which includes the taking of a sample of the human or animal body .../...
2. Claims Nos.: 10 (partially), 12 (partially) and 13 (partially)
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:

Claim 10 does not fulfil the requirement of clarity (Article 6 PCT). Claim 10 relates to a kit. The claim specifies what the kit should be used for but the claim does not specify the components of the kit. .../...
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 No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

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

- Remark on Protest**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/SE2011/050369**Continuation of: Box No. II**

1.
(see the expression "providing a sample" in claim 2).

Nevertheless, a search has been made for these claims. The search has been directed to the technical content of the claims.

2.
The only specified components are the ones in claims 11 and 14, and therefore, the search made for claim 10 has been limited to these components. The same reasoning applies for the parts of claims 12 and 13 which refer to claim 10.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/SE2011/050369
--

Continuation of: second sheet

International Patent Classification (IPC)

G01N 33/68 (2006.01)

Download your patent documents at www.prv.se

The cited patent documents can be downloaded:

- From "Cited documents" found under our online services at www.prv.se
(English version)
- From "Anförda dokument" found under "e-tjänster" at www.prv.se
(Swedish version)

Use the application number as username. The password is **ZNDPSGSOJ**.

Paper copies can be ordered at a cost of 50 SEK per copy from PRV InterPat (telephone number 08-782 28 85).

Cited literature, if any, will be enclosed in paper form.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/SE2011/050369

WO	0138876 A1	31/05/2001	AU	1653501 A	04/06/2001
			AU	777553 B2	21/10/2004
			CA	2396342 C	15/02/2011
			EP	1232394 A1	21/08/2002
			JP	2003515171 T	22/04/2003
			US	20100210039 A1	19/08/2010
			US	7732156 B2	08/06/2010
			US	20070154969 A1	05/07/2007

フロントページの続き

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

(72)発明者 ハイネゴルド、ディック
スウェーデン国、ルンド、プロトコルグレンデン 1 1
(72)発明者 サクスネ、トーレ
スウェーデン国、ルンド、ストラ セデルガタン 2 3
Fターム(参考) 2G045 AA25 CA26 DA36

专利名称(译)	检测导致炎症的组织退化的方法		
公开(公告)号	JP2013524213A	公开(公告)日	2013-06-17
申请号	JP2013502539	申请日	2011-03-30
[标]申请(专利权)人(译)	安娜三月AB		
申请(专利权)人(译)	排雷署AB		
[标]发明人	ブロムアンナ ハツポネンカイサ ヘイネゴルドディック サクスネトーレ		
发明人	ブロム、アンナ ハツポネン、カイサ ヘイネゴルド、ディック サクスネ、トーレ		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/6893 G01N2800/102		
FI分类号	G01N33/68 G01N33/53.D		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/CA26 2G045/DA36		
优先权	1050310 2010-03-31 SE		
其他公开文献	JP2013524213A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明一般涉及用于确定组织降解过程的方法，试验和试剂盒，其导致炎症反应开放以增加组织破坏的恶性循环。更具体地，本发明涉及用于分析人样品的试剂盒和方法，其中存在COMP片段复合物，其具有活化的补体，例如COMP和补体因子C3b之间的复合物或C3b的天然分解片段。

