(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第5265923号
(P5265923)
(45)発行日　平成25年8月14日(2013.8.14)　(24)登録日　平成25年5月10日(2013.5.10)

(51)Int.Cl.　　F I
C12Q 1/68 (2006.01)　C12Q 1/68 ZNAA
G01N 33/53 (2006.01)　G01N 33/53 M
C12N 15/09 (2006.01)　C12N 15/00 A

請求項の数 6　(全 187 頁)

(21)出願番号　特願2007-554258 (P2007-554258)
(86)(22)出願日　平成18年2月6日 (2006.2.6)
(65)公表番号　特表2008-532489 (P2008-532489A)
(43)公表日　平成20年8月21日 (2008.8.21)
(86)国際出願番号　PCT/US2006/003926
(87)国際公開番号　WO2006/086242
(87)国際公開日　平成18年8月17日 (2006.8.17)
審査請求日　平成20年12月3日 (2008.12.3)
(31)優先権主張番号　60/650,685
(32)優先日　平成17年2月7日 (2005.2.7)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者　506041899
ジーンニュース　インコーポレーテッド
カナダ国　エム３ジェイ　３ケイ４　オンタリオ，トロント，ペトロリア　ロード　８００，ユニット　１５
(74)代理人　100083806
弁理士　三好　秀和
(74)代理人　100095500
弁理士　伊藤　正和
(74)代理人　100111235
弁理士　原　裕子
(72)発明者　ルー、　チューン－チン
カナダ国　エム２アール　３エス１　オンタリオ　トロント　ミラーズグローブ　ドライブ　８１

最終頁に続く

(54)【発明の名称】軽度の変形性関節症のバイオマーカーおよびその使用

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
IL13RA1とCPT1Aとからなる遺伝子セットのそれぞれの遺伝子について遺伝子のｃDNAを特異的に増幅するためのプライマーを含む、変形性関節症に罹患していない個体と比較して被検個体が軽度の変形性関節症に罹患している可能性を決定するためのキットであって、
前記プライマーが、被検個体からの血液サンプル中の前記遺伝子のｍＲＮＡレベルを測定するために用いられる、キット。
【請求項２】
IL13RA1のｃDNAを特異的に増幅するためのプライマーの増幅産物に特異的にハイブリダイゼーションすることができるポリヌクレオチドプローブと、CPT1Aのｃ DNAを特異的に増幅するためのプライマーの増幅産物に特異的にハイブリダイゼーションすることができるポリヌクレオチドプローブとをさらに含む、請求項１に記載のキット。
【請求項３】
逆転写酵素活性を有する酵素をさらに含む、請求項１または２に記載のキット。
【請求項４】
耐熱性DNAポリメラーゼ活性を有する酵素をさらに含む、請求項１～３のいずれか１項に記載のキット。
【請求項５】
ハウスキーピング遺伝子のｃDNAを特異的に増幅するためのプライマーをさらに含む、

請求項１～４のいずれか１項に記載のキット。
【請求項６】
ハウスキーピング遺伝子がβ－アクチン遺伝子である、請求項５に記載のキット。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、変形性関節症を有さない個体と比較した場合に軽度の変形性関節症を有する個体において差動的に発現される新規な軽度変形性関節症バイオマーカーの同定および選択、ならびに新規なバイオマーカーの組み合わせの同定および選択を包含する。本発明のバイオマーカーおよびバイオマーカーの組み合わせの産物の発現の測定は、疾患の初期における変形性関節症を有するとして個体を診断する際に特定の利点を実証する。理解されるように、本発明のバイオマーカーの産物を測定するために、本発明のバイオマーカーの産物に特異的および／または選択的にハイブリダイズ／結合するポリヌクレオチドおよびタンパク質もまた、軽度の変形性関節症（ＯＡ）を有する個体を診断する際の使用のための上記ポリヌクレオチドおよびタンパク質を含むキットと同様に、本発明の範囲に包含される。本発明はまた、本発明のバイオマーカー遺伝子を結合し、および／またはその活性を調節する化合物の同定において本発明のバイオマーカーの産物を使用する方法を提供する。このような方法を介して同定された化合物は、変形性関節症および変形性関節症の進行を研究するためのアッセイの開発のために有用である。さらに、このような方法を介して同定された化合物は、変形性関節症またはその症状の予防、治療、管理、および／または改善のための予防用組成物および治療用組成物の開発におけるリード化合物として有用である。
【背景技術】
【０００２】
変形性関節症（ＯＡ）は、関節の接合表面を形成する骨端に存在する関節軟骨が経時的に徐々に変性する慢性疾患である。患者を変形性関節症に罹患しやすくなる素因と考えられている多くの要因が存在し、これには、遺伝的感受性、肥満、偶発的なまたは運動競技での外傷、外科手術、薬剤および激しい身体的な要求が含まれる。変形性関節症は、関節の軟骨に対する損傷によって発症すると考えられている。関節に対する２つの最も一般的な損傷は、スポーツ関連の損傷および長期間の「反復使用」関節損傷である。変形性関節症によって最も一般的に影響を受ける関節は、膝、腰、および手である。大半の場合、膝および腰の本質的な体重支持機能に起因して、これらの関節における変形性関節症は、手の変形性関節症よりもはるかにより多くの能力障害を引き起こす。軟骨の変性が進行するにつれて、骨、筋肉、靱帯、半月板および滑膜を含む、軟骨の中およびその周辺の組織において、二次的な変化が起こる。軟骨組織の一次的な損失および他の組織への二次的な損傷の正味の影響は、患者が罹患した関節における疼痛、腫脹、脱力、および機能的能力の損失を経験することである。これらの症状は、しばしば、彼らが、患者にとって生産性および／または生活の質の結果を失うことによって顕著な影響をもたらす時点まで進行する。
【０００３】
関節軟骨は、主として、軟骨細胞、ＩＩ型コラーゲン、プロテオグリカン、および水から構成される。関節軟骨は血液または神経分布を有さず、軟骨細胞はこの組織における唯一の細胞型である。軟骨細胞は、軟骨基質を形成するＩＩ型コラーゲンおよびプロテオグリカンを製造することに関与する。この基質は、次には、水による基質の飽和を可能にする物理化学的特性を有する。この構造－機能関連の正味の影響は、関節軟骨が例外的な摩耗特性を有し、関節軟骨表面同士でほとんど摩擦のない運動を可能にすることである。変形性関節症の非存在下では、関節軟骨は、しばしば、身体的要求の高い状態下でさえ、一生涯の疼痛を伴わない体重支持と制限されることのない関節運動をもたらす。
【０００４】
すべての生体組織と同様に、関節軟骨は、更新のプロセスを継続して受けており、ここ

では、「古い」細胞および基質成分が除去され（異化作用）、「新規な」細胞および分子が産生される（同化作用）。大部分の細胞と比較して、関節軟骨における異化／同化代謝回転の速度は低い。成熟軟骨の構造的な完全性の長期的な維持は、基質の合成と分解の適切なバランスに依存する。軟骨細胞は、それらの環境からの化学的および機械的刺激に応答することによって基質の平衡を維持する。これらの刺激に対する適切かつ有効な軟骨細胞の応答は、軟骨の生体恒常性のために必須である。不適切な同化作用または過度の異化作用を通した生体恒常性の崩壊は、軟骨の分解および変形性関節症を生じ得る（Adamsら、1995、Nature 377 追補: 3-174）。損傷されかつ異化作用が亢進した組織の大半は、組織治癒を可能にする同化応答の亢進が可能である。不運にも、軟骨細胞は、軟骨基質の損傷または喪失に応答して、それらの同化作用を上方制御し、ならびにプロテオグリカンおよびＩＩ型コラーゲンの合成を促進させるための能力が非常に限られている。

【０００５】

現在、この軟骨損傷の影響を逆転させるための公知の治療法は存在しない。むしろ、変形性関節症のための現在のすべての治療は、症状を治療することに向けられている。加えて、変形性関節症の潜行性発症および遅い進行のために、変形性関節症の同定は、強力な治療が有効である可能性がより高い、疾患の進行の初期よりも、疾患の発症のより後期段階でしばしば行われる。結果として、変形性関節症の疾患プロセスを予防、緩和、または治癒するためのさらなる進歩は、初期の介入を可能にするために、疾患の初期の診断マーカーの同定に決定的に依存する。

【０００６】

「軽度の変形性関節症」は、現在、診断するのが非常に困難である。医師は、患者の既往歴および変形性関節症の診断を行うための理学的検査に主として頼っており、Ｘ線は特定の軟骨では初期の変化を示さない。現在、軽度の変形性関節症の診断を確認するために使用されている、認められている生化学的マーカーは存在しない。突発性の関節の痛みは、初期の変形性関節症の一般的な症状である。関節は、症状の発現の間に敏感になり、これは、数日間から数週間続き、自発的に軽減する可能性がある。しかし、これらの症状は、軟骨への損傷の病理学的段階とは十分に相関はしていない。「軽度の」変形性関節症のより信頼性の高い尺度は、軟骨損傷の程度を決定することによって得ることができるが、しかし、比較的非侵襲性である軟骨の劣化を測定するための方法は現在存在しない。

【発明の開示】

【発明の効果】

【０００７】

本発明は、変形性関節症を有さない個体と比較して、軽度の変形性関節症を有する個体において差動的に発現されている新規な軽度変形性関節症バイオマーカーの同定および選択、ならびに新規な軽度変形性関節症バイオマーカーの組み合わせの同定および選択、ならびに新規なバイオマーカーの組み合わせを選択する手段を包含する。本発明のバイオマーカーおよびバイオマーカーの組み合わせの産物の発現の測定は、個体を軽度の変形性関節症を有すると診断する際に特定の利点を実証する。理解されるように、本発明のバイオマーカーの産物を測定するために、本発明のバイオマーカーの産物およびその誘導体に特異的におよび／または選択的にハイブリダイズ／結合するポリヌクレオチドおよびタンパク質もまた、個体を軽度の変形性関節症を有すると診断する際の使用のための上記ポリヌクレオチドおよびタンパク質を含むキットと同様に、本発明の範囲に包含される。個体における疾患の進行をモニターするため、および治療レジメンの有効性をモニターするために、本発明のバイオマーカーの産物に特異的および／または選択的にハイブリダイズするポリヌクレオチドおよびタンパク質の使用は、さらに本発明に包含される。本発明はまた、変形性関節症についての新規な治療標的の同定における本発明のバイオマーカーの産物を使用する方法の同定を提供する。本発明はまた、本発明の遺伝子を結合し、および／またはその活性を調節する化合物の同定において本発明のバイオマーカーの産物を使用する方法の同定を提供する。このような方法を介して同定された化合物は、変形性関節症および変形性関節症の進行を研究するためのアッセイの開発のために有用である。さらに、こ

のような方法を介して同定された化合物は、変形性関節症またはその症状の予防、治療、管理、および／または改善のための予防用組成物および治療用組成物の開発におけるリード化合物として有用である。

【０００８】

本発明は、少なくとも２つの単離されたポリヌクレオチドを含む組成物を含み、ここで、各単離されたポリヌクレオチドが、表１または表４に示されるバイオマーカーから選択されるバイオマーカーに選択的にハイブリダイズし、上記組成物は少なくとも２つの上記バイオマーカーの発現レベルの測定を可能にする。

【０００９】

単離されたポリヌクレオチドは一本鎖ＲＮＡまたは二本鎖ＤＮＡであり得る。

【００１０】

本発明はまた、少なくとも２つの単離されたポリヌクレオチドを含む組成物を含み、ここで、各単離されたポリヌクレオチドが、表１もしく表４に示されるバイオマーカーから選択されるバイオマーカーのＲＮＡ産物、および／またはこのＲＮＡ産物に対して相補的なポリヌクレオチド配列に選択的にハイブリダイズし、上記組成物は少なくとも２つの上記バイオマーカーのＲＮＡ発現レベルの測定を可能にする。

【００１１】

本発明はさらに、少なくとも２つ以上の単離されたポリヌクレオチドのコレクションを含む組成物を特徴とし、ここで、各単離されたポリヌクレオチドは、表３もしくは表５に示されるＲＮＡ配列、および／またはこのＲＮＡ配列に対して相補的なポリヌクレオチド配列に選択的にハイブリダイズする。

【００１２】

本発明はまた、表６および／または表８に示される少なくとも２つのバイオマーカー特異的プライマーを含む組成物を含む。本発明はまた、表８に示される少なくとも２つのポリヌクレオチドプローブを含む組成物を含む。

【００１３】

本発明はまた、２つ以上の単離されたタンパク質のコレクションを含む組成物を含み、ここで、各単離されたタンパク質は、表１または表４に示されるバイオマーカーから選択されるバイオマーカーのタンパク質産物に選択的に結合し、上記組成物は少なくとも２つの上記バイオマーカーの発現レベルの測定するために使用される。本発明の範囲内にある単離されたタンパク質の例は表７に示される。

【００１４】

単離されたタンパク質はリガンドであり得、ここで、リガンドは抗体またはそのフラグメントを含む。モノクローナル抗体とポリクローナル抗体の両方が本発明の範囲内にある。

【００１５】

少なくとも２つの抗体を含む組成物もまた、本発明の範囲内にあることが意図され、ここで、各抗体は、表１または表４に示されるバイオマーカーから選択されるバイオマーカーのタンパク質産物に選択的に結合し、上記組成物は少なくとも２つの上記バイオマーカーの発現レベルの測定を可能にする。本発明に含まれる抗体の例は表７に示される。

【００１６】

抗体は、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体を含むことができる。

【００１７】

本発明は、個体における軽度の変形性関節症を診断または検出する方法を特徴とし：個体からの血液サンプル中で表１および／または表４に示されるバイオマーカーを含む１種以上のバイオマーカーのＲＮＡ産物のレベルを決定する工程、および上記個体からの血液サンプル中のＲＮＡ産物のレベルを、対照中の同じＲＮＡ産物のレベルと比較し、ここで、上記個体と上記対照との間のＲＮＡ産物の差動的な発現が個体における軽度の変形性関節症を示す工程を包含する。血液サンプルは全血、１滴の全血、または溶解した血液であり得る。

【００１８】
この方法はまた、血液サンプルからＲＮＡを単離する工程を含み得る。
【００１９】
上記ＲＮＡ産物のレベルを決定する工程は、定量ＲＴ－ＰＣＲ（ＱＲＴ－ＰＣＲ）を使用して実施することができ、これは任意に、上記１種以上のＲＮＡ産物またはその相補物にハイブリダイズするプライマーを、ＲＮＡ産物またはその相補物にハイブリダイズさせる工程を含む。プライマーは４～４０ヌクレオチドの長さ、好ましくは８～３５ヌクレオチド、好ましくは１０～３０ヌクレオチドの長さであり、さらにより好ましくは、プライマーは１５～２５ヌクレオチドの長さである。加えて、各々のＲＮＡ産物のレベルを決定する工程は、１つ以上のＲＮＡ転写物に対応する第１の複数の単離されたポリヌクレオチドを、第２の複数の単離されたポリヌクレオチドを含むアレイにハイブリダイズすることによって実施される。ポリヌクレオチドの第１の集団は、任意に、ＲＮＡ、ＤＮＡ、ｃＤＮＡ、ＰＣＲ産物、またはＥＳＴを含む。アレイ上の第２の複数の単離されたポリヌクレオチドは、表１および／または表４のバイオマーカーの１つ以上に対応するポリヌクレオチドを含むことができる。
【００２０】
別の実施形態において、ＲＮＡ産物のレベルを決定する工程が、複数の単離されたポリヌクレオチドを含むアレイに、上記単離されたＲＮＡをハイブリダイズすることによって実施することができる。アレイは、ＲＮＡ、ＤＮＡ、ｃＤＮＡ、ＰＣＲ産物、またはＥＳＴを含む複数の単離されたポリヌクレオチドを任意に含むことができる。上記アレイ上の複数の単離されたポリヌクレオチドはまた、表１および／または表４のバイオマーカーの１つ以上に対応するポリヌクレオチドを含むことができる。
【００２１】
１つの実施形態において、対照は軽度の変形性関節症を有さない個体に由来する。
【００２２】
本発明はまた、前述の組成物のいずれか１つおよび使用のための説明書を含む、軽度の変形性関節症を診断または検出するためのキットを含む。
【００２３】
本発明はさらに、少なくとも２セットのバイオマーカー特異的プライマーを含む、軽度の変形性関節症を診断または検出するためのキットを含み、ここで、バイオマーカー特異的プライマーの各セットは、表１および／または表４から選択される固有なバイオマーカーに相補的な二本鎖ＤＮＡを生じ、そして上記セットの各第１のプライマーは、上記バイオマーカーの１つに相補的なＲＮＡ、ｃＤＮＡ、またはＥＳＴに選択的にハイブリダイズすることができる配列を含み伸長産物を作製し、そして上記セットの各上記第２のプライマーは上記伸長産物に選択的にハイブリダイズことが可能である。このキットはまた、逆転写酵素活性を有する酵素、耐熱性ＤＮＡポリメラーゼ活性を有する酵素、または標識手段をさらに含むことができる。
【００２４】
本発明はまた、個体における軽度の変形性関節症を診断または検出する方法を特徴とし、この方法は、個体からの血液サンプル中で表１および／または表４に示されるバイオマーカーからなる群より選択される１種以上のバイオマーカーのタンパク質産物のレベルを決定する工程、および血液サンプル中のタンパク質産物のレベルを対照と比較し、ここで、上記個体と上記対照との間のタンパク質産物の差動的な発現が個体における軽度の変形性関節症を示す工程を包含する。タンパク質産物のレベルは、表７に示される抗体を含む抗体またはそのフラグメントを使用して決定することができる。抗体は、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を含むことができる。
【００２５】
本発明はまた、少なくとも２つのポリヌクレオチドを含む組成物を含み、ここで、各単離されたポリヌクレオチドは、表１、表２、および／または表４に示されるバイオマーカーに選択的にハイブリダイズし、上記組成物が少なくとも２つのバイオマーカーの発現レ

ベルの測定を可能にし、そしてその少なくとも１つが表１または表４から選択される。

【００２６】

本発明はまた、少なくとも２つの単離されたポリヌクレオチドを含む組成物を含み、ここで、各単離されたポリヌクレオチドは、表１、表２もしくは表４に示されるバイオマーカーから選択されるバイオマーカーのＲＮＡ産物、および／またはこのＲＮＡ産物に相補的なポリヌクレオチド配列に選択的にハイブリダイズし、上記組成物が少なくとも２つの上記バイオマーカーのＲＮＡ発現レベルの測定を可能にし、そして上記バイオマーカーの少なくとも１つが表１もしくは表４から選択される。

【００２７】

本発明はさらに、少なくとも２つの抗体を含む組成物を含み、各抗体が、表１、表２、および／または表４に示されるバイオマーカーから選択されるバイオマーカーのタンパク質産物に選択的に結合し、上記組成物が少なくとも２つの上記バイオマーカーの発現レベルの測定を可能にし、そして上記バイオマーカーの少なくとも１つが表１または表４から選択される。

【００２８】

本発明はまた、２つ以上の単離されたポリヌクレオチドのコレクションを含む組成物を特徴とし、ここで、各単離されたポリヌクレオチドは、表１または表４に示されるバイオマーカーから選択されるバイオマーカーに選択的にハイブリダイズする。上記組成物は、少なくとも２つの上記バイオマーカーの発現レベルの測定を可能にし、上記バイオマーカーは、個体が軽度の変形性関節症を有するか否かを、ＲＯＣ曲線分析を使用して決定されるように、決定することが可能である。好ましくは、ＲＯＣ曲線下の面積は０．５よりも大きく、好ましくは約０．６、０．７、０．８よりも大きく、または約０．９よりも大きい。

【００２９】

本発明はまた、個体が軽度の変形性関節症を有するか否かを検出するための方法を特徴とし、この方法は、個体からの血液サンプル中で表１、表２、および／または表４に示されるバイオマーカーを含む１種以上のバイオマーカーのＲＮＡ産物またはタンパク質産物のレベルを決定する工程、ＲＯＣ曲線分析を実施する工程、ならびにＲＯＣ曲線下の面積を測定する工程を包含し、ここで、ＲＯＣ曲線下の面積が約０．５よりも大きく、好ましくは約０．６、０．７、０．８よりも大きく、または好ましくは約０．９よりも大きい場合は、軽度の変形性関節症は個体において検出されたと結論付けられる。

【００３０】

本発明は、変形性関節症またはその症状を予防、治療、管理、または改善する能力について試験される化合物を同定するための方法を提供する。この方法は、本発明の１種以上のバイオマーカーのタンパク質産物もしくはそのフラグメント、または本発明の１種以上のバイオマーカーのＲＮＡ産物もしくはそのフラグメントを試験化合物と接触させる工程、およびタンパク質産物またはＲＮＡ産物に結合する化合物の能力を決定する工程を包含し、その結果、化合物がタンパク質産物に結合する場合、上記化合物が変形性関節症またはその症状を予防、治療、管理、または改善する能力について試験される化合物であると同定される。

【００３１】

本発明はまた、変形性関節症またはその症状を予防、治療、管理、または改善する能力について試験される化合物を同定するための方法を提供する。この方法は、本発明の１種以上のバイオマーカーのタンパク質産物またはＲＮＡ産物を発現する細胞を試験化合物と接触させる工程、インキュベーション期間後、本明細書中上記の組成物のいずれかを使用して、タンパク質産物またはＲＮＡ産物の量が試験化合物と接触させた細胞を提示することを決定する工程、および試験化合物と接触させていない対応する対照細胞中に存在するものと、その量またはタンパク質またはＲＮＡ産物とを比較する工程を包含し、その結果、タンパク質またはＲＮＡ産物が、対照中の量と比較して変化している場合、上記化合物が変形性関節症またはその症状を予防、治療、管理、または改善する能力について試験さ

れる化合物であると同定される。

【００３２】

本発明はまた、変形性関節症またはその症状を予防、治療、管理、または改善する能力について試験される化合物を同定するための方法を提供する。この方法は、本発明の１種以上のバイオマーカーのタンパク質産物またはＲＮＡ産物をコードする核酸配列と、無細胞抽出物（例えば、軟骨細胞抽出物）を接触させる工程、無細胞抽出物中に存在するタンパク質産物またはＲＮＡ産物の量を決定する工程、およびＲＮＡ産物またはタンパク質産物の量を、試験化合物と接触させていない対応する対照中に存在するその量とを比較する工程を包含し、その結果、タンパク質またはＲＮＡ産物の量が、対照中の量と比較して変化している場合、上記化合物が変形性関節症またはその症状を予防、治療、管理、または改善する能力について試験される化合物であると同定される。

【発明を実施するための最良の形態】

【００３３】

３．１　定義

以下の定義は、以下に書かれた明細書において使用される特定の用語のために提供される。

【００３４】

本明細書で使用される場合、「３’末端」という用語は、最後の１０００ヌクレオチドまでまたは１／３のｍＲＮＡの末端をいい、ここで、３’末端ヌクレオチドは、存在する場合、ポリＡテールに隣接するコード領域または非翻訳領域の末端ヌクレオチドである。すなわち、ｍＲＮＡの３’末端は、存在する場合、ポリＡテールを含まない。遺伝子の「３’領域」は、遺伝子の３’末端の中にまたはそこに位置するポリヌクレオチド（二本鎖または一本鎖）をいい、存在する場合、３’非翻訳領域および遺伝子の３’タンパク質コード領域を含むがこれらに限定されない。３’領域は、８ヌクレオチド以上の長さであり、かつ１０００ヌクレオチド以下の長さである。他の可能な３’領域の長さには、１０ヌクレオチド、２０ヌクレオチド、２５ヌクレオチド、５０ヌクレオチド、１００ヌクレオチド、２００ヌクレオチド、４００ヌクレオチド、および５００ヌクレオチドが含まれるがこれらに限定されない。

【００３５】

本明細書で使用される場合、「５’末端」という用語は、ｍＲＮＡの最初のヌクレオチドで開始して、最初の１０００ヌクレオチドまでまたは１／３のｍＲＮＡの末端をいう（ここで、全長のｍＲＮＡはポリＡテールを含まない）。遺伝子の「５’領域」は、遺伝子の５’末端の中にまたはそこに位置するポリヌクレオチド（二本鎖または一本鎖）をいい、存在する場合、５’非翻訳領域および遺伝子の５’タンパク質コード領域を含むがこれらに限定されない。５’領域は、８ヌクレオチド以上の長さであり、かつ１０００ヌクレオチド以下の長さである。他の可能な５’領域の長さには、１０ヌクレオチド、２０ヌクレオチド、２５ヌクレオチド、５０ヌクレオチド、１００ヌクレオチド、２００ヌクレオチド、４００ヌクレオチド、および５００ヌクレオチドが含まれるがこれらに限定されない。

【００３６】

本明細書で使用される場合、「増幅された」という用語は、それによって１つ以上の核酸配列の１つ以上のコピーが、好ましくはポリメラーゼ連鎖反応の方法（MullisとFaloona、１９８７、Methods Enzymol. 155: 335）によって、鋳型核酸から生成されるプロセスをいう。「ポリメラーゼ連鎖反応」または「ＰＣＲ」とは、１つ以上の核酸鋳型配列を増幅するためのｉｎ　ｖｉｔｒｏ法をいう。ＰＣＲ反応は、一連の反復する温度サイクルを含み、典型的には５０～１００μｌの容量で実施される。反応混合液は、ｄＮＴＰ（４種のデオキシヌクレオチドｄＡＴＰ、ｄＣＴＰ、ｄＧＴＰ、およびｄＴＴＰの各々）、プライマー、緩衝液、ＤＮＡポリメラーゼ、および核酸鋳型を含む。ＰＣＲ反応は以下の工程を含む：第１のプライマーが、増幅される核酸鋳型配列の一方の鎖における相補的な配列を含みかつ相補的ＤＮＡ鎖の合成を開始し、第２のプライマーが、増幅される特定の標的

核酸配列の第２の鎖における領域に相補的な配列を含みかつ相補的ＤＮＡ鎖の合成を開始する、少なくとも１セットのポリヌクレオチドプライマーを提供する工程、ならびに、（ｉ）鋳型配列中に含まれる標的核酸配列への、増幅のために必要とされるプライマーのアニーリングの段階、（ｉｉ）核酸ポリメラーゼがプライマー伸長産物を合成する、プライマーを伸長させる段階、および任意の変性段階のＰＣＲサイクルを許容しうる条件下で、鋳型依存性重合剤として核酸ポリメラーゼを利用して、核酸鋳型を増幅する工程。「ポリヌクレオチドプライマーのセット」または「ＰＣＲプライマーのセット」は、２個、３個、４個、またはそれ以上のプライマーを含むことができる。１つの実施形態において、エキソ－ＤＮＡポリメラーゼが、ＰＣＲ反応において核酸鋳型を増幅するために使用される。他の増幅の方法には、リガーゼ連鎖反応（ＬＣＲ）、ポリヌクレオチド特異性ベース増幅（ＮＳＢＡ）、または当該分野で公知である任意の他の核酸増幅方法が含まれるがこれらに限定されない。

【００３７】

本明細書で使用される場合、ポリペプチドの「アミノ末端」領域という用語は、遺伝子の５’末端にまたはそこに位置するポリヌクレオチド配列（二本鎖または一本鎖）によってコードされ、遺伝子の５’タンパク質コード領域を含むがこれに限定されないポリペプチド配列をいう。本明細書で使用される場合、「アミノ末端」領域という用語は、ポリペプチドの最初のアミノ酸で開始して、ポリペプチドの最初の３００アミノ酸までまたは１／３のポリペプチドのアミノ末端をいう。ポリペプチドの「アミノ末端」領域は、３アミノ酸以上の長さであり、３５０あるいはそれより長いアミノ酸である。他の可能な「アミノ末端」領域の長さには、５アミノ酸、１０アミノ酸、２０アミノ酸、２５アミノ酸、５０アミノ酸、１００アミノ酸および２００アミノ酸が含まれるがこれらに限定されない。

【００３８】

本明細書で使用される場合、「アナログ（類似物）」という用語は、タンパク質因子（例えば、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、および抗体）の状況において、第２のタンパク質因子と類似のまたは同一の機能を有するが、第２のタンパク質因子の類似のもしくは同一のアミノ酸配列、または第２のタンパク質因子の類似のもしくは同一の構造を必ずしも含まないタンパク質因子をいう。類似のアミノ酸配列を有するタンパク質因子は、少なくとも以下の少なくとも１つを満たす第２のタンパク質因子をいう：（ａ）第２のタンパク質因子のアミノ酸配列に対して少なくとも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５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％または少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を有するタンパク質因子、（ｂ）少なくとも５個の連続するアミノ酸残基、少なくとも１０個の連続するアミノ酸残基、少なくとも１５個の連続するアミノ酸残基、少なくとも２０個の連続するアミノ酸残基、少なくとも２５個の連続するアミノ酸残基、少なくとも４０個の連続するアミノ酸残基、少なくとも５０個の連続するアミノ酸残基、少なくとも６０個の連続するアミノ残基、少なくとも７０個の連続するアミノ酸残基、少なくとも８０個の連続するアミノ酸残基、少なくとも９０個の連続するアミノ酸残基、少なくとも１００個の連続するアミノ酸残基、少なくとも１２５個の連続するアミノ酸残基、または少なくとも１５０個の連続するアミノ酸残基の第２のタンパク質因子をコードするヌクレオチド配列に、緊縮性条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列によってコードされるタンパク質因子、および（ｃ）第２のタンパク質因子をコードするヌクレオチド配列に対して、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５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％または少なくとも９９％同一であるヌクレオチド配列によってコードされるタンパク質因子。第２のタンパク質因子に対して類似の構造を有するタンパク質因子とは、第２のタンパク質因子に対して類似の二次構造、三次構造、または四次構造を有するタンパク質因子をいう。タンパク質因子の構造は、Ｘ線結晶解析、核磁気共鳴、

円偏光二色性分析、および結晶電子顕微鏡法を含むがこれらに限定されない、当業者に公知の方法によって決定することができる。

【００３９】

２つのアミノ酸配列または２つの核酸配列の同一性パーセントを決定するために、配列は、最適な比較目的のためにアライメントされる（例えば、第２のアミノ酸配列または核酸配列との最適なアライメントのために、第１のアミノ酸配列または核酸配列の配列の中にギャップを導入することができる）。次いで、対応するアミノ酸の位置またはヌクレオチドの位置におけるアミノ酸残基またはヌクレオチドが比較される。第１の配列中の位置が第２配列中の対応する位置として同じアミノ酸残基またはヌクレオチドによって占められている場合、これらの分子はその位置において同一である。２つの配列間の同一性パーセントは、配列によって共有される同一の位置の数の関数である（すなわち、同一性％＝同一の重複する位置の数／位置の総数×１００％）。１つの実施形態において、２つの配列は同じ長さである。

【００４０】

２つの配列間の同一性パーセントの決定はまた、数学的アルゴリズムを使用して決定することができる。２つの配列の比較のために利用されている数学的アルゴリズムの好ましい非限定的な例は、KarlinとAltschul，１９９３，Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 90: 5873-5877において改変されたような、KarlinとAltschul，１９９０，Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 87: 2264-2268のアルゴリズムである。このようなアルゴリズムは、Altschulら、１９９０，J.MoI.Biol. 215: 403のＮＢＬＡＳＴおよびＸＢＬＡＳＴプログラムに組み込まれている。ＢＬＡＳＴヌクレオチド検索は、本発明の核酸分子に対して相同性であるヌクレオチド配列を得るために、例えば、スコア＝１００、ワード長＝１２に設定したＮＢＬＡＳＴプログラムパラメーターを用いて実施することができる。ＢＬＡＳＴタンパク質検索は、本発明のタンパク質分子に対して相同性であるアミノ酸配列を得るために、例えば、スコア－５０、ワード長＝３に設定したＸＢＬＡＳＴプログラムパラメーターを用いて実施することができる。比較目的のためにギャップを付けたアライメントを得るために、ギャップ付きＢＬＡＳＴを、Altschulら、１９９７，Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402において記載されるように利用することができる。代替的には、ＰＳＩ－ＢＬＡＳＴを、分子間の遠くの関連性を検出する反復検索を実施するために使用することができる（同上）。プログラムＢＬＡＳＴ、ギャップ付きＢＬＡＳＴ、およびＰＳＩ－ＢＬＡＳＴを利用するとき、それぞれのプログラム（例えば、ＸＢＬＡＳＴおよびＮＢＬＡＳＴ）のデフォルトパラメーターを使用することができる（例えば、ＮＣＢＩウェブサイトを参照）。配列の比較のために利用される、他の好ましい非限定的な数学的アルゴリズムの例は、MyersとMiller，１９８８，CABIOS 4: 11-17のアルゴリズムである。このようなアルゴリズムは、ＧＣＧ配列アライメントソフトウェアパッケージの一部であるＡＬＩＧＮプログラム（バージョン２．０）に組み込まれている。アミノ酸配列を比較するためにＡＬＩＧＮプログラムを利用するときに、ＰＡＭ１２０重量残基表、１２のギャップペナルティー、および４のギャップペナルティーを使用することができる。２つの配列間の同一性パーセントは、ギャップを許容する場合としない場合とで、上記のものと類似の技術を用いて決定することができる。同一性パーセントを計算する際に、典型的には、正確な一致のみが計数される。

【００４１】

本明細書で使用される場合、「アナログ」という用語は、非タンパク質アナログの状況において、第１の有機分子または無機分子と類似のまたは同一の機能を有し、かつ第１の有機分子または無機分子と構造的に類似するする第２の有機分子または無機分子をいう。

【００４２】

本明細書で使用される場合、「バイオマーカー」という用語は、軽度の変形性関節症を有する個体と、変形性関節症を有さない個体の間で差動的に発現される遺伝子をいう。

【００４３】

「バイオマーカー特異的プライマー」という用語は、本明細書で使用される場合、本発

明のバイオマーカーのＲＮＡ産物の一部に相補的なＤＮＡの合成を開始することができるプライマーをいう。例えば、プライマーは、伸長産物を作製するために、本発明のバイオマーカーの領域に相補的なＲＮＡ、ｃＤＮＡ、またはＥＳＴに選択的にハイブリダイズすることができる配列である第１のプライマー、および本発明のバイオマーカーの領域に相補的である二本鎖ＤＮＡを産生するために使用される、伸長産物に選択的にハイブリダイズすることが可能である第２のプライマーを含むことができる。本発明は、本発明のバイオマーカーのＲＮＡ産物の発現を測定するために有用であるプライマーを含む。表８は、プライマーの代表的な種を提供する。

【００４４】

「バイオマーカー特異的プローブ」という用語は、本明細書で使用される場合、本発明のバイオマーカーの配列、またはそれに相補的であるＲＮＡ、ｃＤＮＡ、もしくはＥＳＴに選択的にハイブリダイズすることができる核酸プローブをいう。例えば、プローブはマイクロアレイを含むアレイに添付することができ、またはプローブは、定量リアルタイムＲＴ－ＰＣＲを可能にするためのバイオマーカー特異的プライマーとともに使用することができる（例えば、TaqMan（登録商標）またはMolecular Beacon（登録商標）プローブ）。表８は、本発明において利用することができるTaqMan（登録商標）プローブおよび対応するプライマーの代表的な種を提供する。バイオマーカー特異的プローブは、バイオマーカーの全体の配列まで、またはそれを含む、バイオマーカーの配列またはその相補物の一部（例えば、少なくとも約８個の連続する核酸残基）に選択的にハイブリダイズすることできる。例えば、バイオマーカー特異的プローブは、バイオマーカーまたはその相補物の全体の配列まで、またはそれを含む、少なくとも約８個、１０個、１５個、２０個、２５個、３０個、３５個、４０個、４５個、５０個、５５個、６０個、６５個、７０個、７５個、８０個、８５個、９０個、９５個、または１００個以上の配列に選択的にハイブリダイズすることができる。

【００４５】

本明細書で使用される場合、「データ」または「バイオマーカーデータ」という用語は、一般的に、血液サンプル中に見出されるバイオマーカーの産物の豊富さを反映するデータをいう。

【００４６】

本明細書で使用される場合、「患者サンプル」という用語は、軽度の変形性関節症についてのバイオマーカーをそこから検出することができる、患者からの生物学的サンプルをいう。患者サンプルには、血液、血清、唾液、尿、滑液、組織などのサンプルが含まれるがこれらに限定されない。好ましくは、患者サンプルは血液サンプルである。

【００４７】

本明細書で使用される場合、「血液核酸サンプル」という用語は、血液から得られた核酸をいい、全血、遠心分離された溶解血液、血清を含まない全血、または本明細書に記載されるような他の血液の画分から得られた核酸を含むことができる。全血は、未分画の血液、例えば、１滴の血液を意味し、ここで、１滴の血液には、５μｌ、１０μｌ、１５μｌ、２０μｌ、２５μｌ、３０μｌの量を含む。遠心分離された溶解血液または「溶解された血液」は、本明細書に記載されるように（実施例２を参照）、溶解緩衝液と混合され、遠心分離された全血を意味する。血清を含まない血液は、本明細書に記載されるように（実施例２を参照）、血清または血漿が遠心分離によって除去されている全血を意味する。好ましくは、血液核酸サンプルは、全血または遠心分離された溶解血液であり、および総ＲＮＡ、ｍＲＮＡであり、またはｍＲＮＡに対応する核酸、例えば、上記血液から単離されたｃＤＮＡである。血液核酸サンプルはまた、総ＲＮＡ、ｍＲＮＡ、またはｃＤＮＡから得られたＰＣＲ産物を含むことができる。

【００４８】

本明細書で使用される場合、「カルボキシ末端」という用語は、遺伝子の３’末端の中にまたはそこに位置するポリヌクレオチド配列（二本鎖または一本鎖）によってコードされ、かつ遺伝子の３’タンパク質コード領域を含むがこれに限定されない、ポリペプチド

配列をいう。本明細書で使用される場合、「カルボキシ末端」領域は、ポリペプチドの最後のアミノ酸から３００アミノ酸までのポリペプチドまたは１／３のポリペプチドのカルボキシ末端をいう。「３’末端」は、存在する場合、ポリＡテールを含まない。ポリペプチドの「カルボキシ末端」領域は、３アミノ酸以上の長さであり、かつ３５０アミノ酸以下の長さである。他の可能な「カルボキシ末端」の長さには、５アミノ酸、１０アミノ酸、２０アミノ酸、２５アミノ酸、５０アミノ酸、１００アミノ酸、および２００アミノ酸が含まれるがこれらに限定されない。

【００４９】

本明細書で使用される場合、「軟骨核酸サンプル」という用語は、軟骨に由来する核酸をいう。好ましくは、軟骨核酸サンプルは、総ＲＮＡ、ｍＲＮＡ、またはＲＮＡに対応する核酸、例えば、ｃＤＮＡである。軟骨核酸サンプルはまた、総ＲＮＡ、ｍＲＮＡ、またはｃＤＮＡに由来するＰＣＲ産物を含むことができる。

【００５０】

本明細書で使用される場合、「本発明のバイオマーカーの組み合わせ」という用語は、上記組み合わせのバイオマーカーの少なくとも１つが表１からのものである限り、表１または表４に開示されるような任意の１種以上のバイオマーカー、ならびに表１および／または表２に開示されるような任意の２種以上のバイオマーカーの組み合わせをいう。「本発明のバイオマーカーの組み合わせ」という用語は、上記組み合わせのバイオマーカーの少なくとも１つが表４に由来する限り、表４および／または表２に開示されるような任意の２つ以上のバイオマーカーの任意の組み合わせをいう。「本発明のバイオマーカーの組み合わせ」という用語は、上記組み合わせのバイオマーカーの少なくとも１つが表１または表４に由来する限り、表１および表４ならびに／または表２に開示される任意の２つ以上のバイオマーカーの任意の組み合わせをいう。

【００５１】

本明細書で使用される場合、「化合物」および「薬剤（因子）」という用語は交換可能に使用される。

【００５２】

本明細書で使用される場合、「本質的には」とは、軽度の変形性関節症を診断するために有用であるバイオマーカー遺伝子の最大数をいう。１つの実施形態において、軽度の変形性関節症の診断のためのバイオマーカーは、本質的には、表１および／または表４のバイオマーカーの１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個、１１個、１２個、１３個、１４個、１５個、１６個、１７個、１８個、１９個、２０個、２５個、３０個、３５個、４０個、４５個、５０個、１００個、１５０個までの少なくともいずれかで、またはそのすべてで構成されている。別の実施形態において、軽度の変形性関節症の診断のためのバイオマーカーは、本質的には、出願番号１０／９１５，６８０に開示され、かつ表２に提供されるバイオマーカーの１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、または１０個、１５個、２０個、３０個、４０個、５０個までの少なくともいずれか、またはそのすべてと組み合わせた、表１および／または表４のバイオマーカーの１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個、１１個、１３個、１５個、２０個、２５個、３０個、３５個、４０個、４５個、５０個、１００個、１５０個までの少なくともいずれかで構成されている。１つの実施形態において、軽度の変形性関節症の診断のためのバイオマーカーは、本質的には、表４のバイオマーカーの１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個、１１個、１２個、１３個、１４個、１５個、１６個、１７個、１８個、１９個、２０個、２５個、３０個までの少なくともいずれかで、またはそのすべてで構成されている。

【００５３】

本明細書で使用される場合、「対照」または「対照サンプル」という用語は、軽度の変形性関節症を診断することの状況において、本発明のバイオマーカー以外の手段を使用して、変形性関節症を有さないと決定された個体（すなわち、「正常対照」）または軽度の変形性関節症であると決定された個体（すなわち、「軽度の変形性関節症対照」）または

これらの個体の分から単離された１つ以上のサンプルをいう。対照または対照サンプルという用語はまた、変形性関節症を有さないとして分類される１つ以上の個体（すなわち、「正常対照」）または軽度の変形性関節症を有するとして分類される１つ以上の個体（すなわち、「軽度の変形性関節症対照」）からのサンプルに由来するデータの編集をいう。本明細書で使用される場合、「対照」という用語は、予防薬剤または治療薬剤についてのスクリーニングの状況において、他の条件を比較することができるアッセイまたは方法論についての基準または参照をいう。

【００５４】

本明細書で使用される場合、「誘導体」という用語は、タンパク質因子（例えば、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、および抗体）の状況において、１つ以上のアミノ酸残基の置換、欠失、および／または付加の導入によって変化されたアミノ酸配列を含むタンパク質因子をいう。「誘導体」という用語はまた、本明細書で使用される場合、すなわち、タンパク質因子への任意の型の分子の共有結合によって修飾されたタンパク質因子をいう。例えば、しかし限定されるものではなく、抗体は、例えば、公知の保護基／封鎖基、タンパク質分解性切断、細胞リガンドまたは他のタンパク質への連結などによって修飾されてもよい。タンパク質因子の誘導体は、特異的化学切断、アセチル化、ホルミル化、ツニカマイシンの代謝的合成が含まれるがこれらに限定されない、当業者に公知の技術を用いる化学修飾によって産生されてもよい。さらに、タンパク質因子の誘導体は、１つ以上の古典的でないアミノ酸を含んでもよい。タンパク質因子の誘導体は、これが由来したタンパク質因子と類似のまたは同一の機能を有する。

【００５５】

本明細書で使用される場合、「分類子」という用語は、２つ以上の表現型形質の間－例えば、軽度の変形性関節症を有する個体またはそれを有さない個体を識別するその能力に基づいて生成される数学モデルの出力を説明するために使用される。

【００５６】

本明細書で使用される場合、「誘導体」という用語は、非タンパク質誘導体の状況において、第１の有機分子または無機分子の構造に基づいて形成される第２の有機分子または無機分子をいう。有機分子の誘導体には、例えば、ヒドロキシル基、メチル基、エチル基、カルボキシル基、またはアミン基の付加または欠失によって修飾された分子が含まれるがこれらに限定されない。有機分子はまた、エステル化、アルキル化、および／またはリン酸化されてもよい。

【００５７】

本明細書で使用される場合、「軽度の変形性関節症の診断」または「軽度変形性関節症診断」は、本発明の１つの態様に従うと、個体が軽度の変形性関節症に罹患しているか否かを決定するプロセスをいう。特定の実施形態において、「軽度の変形性関節症の診断」または「軽度変形性関節症診断」は、個体が軽度の変形性関節症を有していること、または個体が軽度の変形性関節症を有していないことの２つの選択肢の間の決定をいう。別の特定の実施形態において、「診断」とは、個体が軽度の変形性関節症を有している、個体が軽度の変形性関節症を有していない、または個体が軽度の変形性関節症を有しているかもしくは軽度の変形性関節症を有していないかを十分な程度の確実性で決定することができない、の３つの選択肢の間の決定をいう。当業者によって理解されるように、この状況において、「十分な程度の確実性」は、診断のために必要とされる感度および特異性に依存する。より特定には、十分な程度の確実性は、５０％より高い感度および／または特異性、６０％より高い感度および／または特異性、７０％より高い感度および／または特異性、８０％より高い感度および／または特異性、９０％より高い感度および／または特異性、および１００％の感度および／または特異性を含む。

【００５８】

本明細書で使用される場合、「差動的な発現」という用語は、ＲＮＡまたはタンパク質の量またはレベルによって測定されるような、１種以上の本発明のバイオマーカーのＲＮＡおよび／またはタンパク質の産物の発現レベルの違いをいう。ＲＮＡに関しては、これ

は、第２のサンプル中のｍＲＮＡおよび／またはｍＲＮＡの１つ以上のスプライシング変異体を含むＲＮＡの量またはレベルによって測定されるような、本発明の同じ１種以上のバイオマーカーの発現レベルと比較して、１つのサンプル中のｍＲＮＡ、および／またはｍＲＮＡの１つ以上のスプライシング変異体のレベルの違いを含み得る。「差動的に発現される」または「差動的な発現」はまた、本発明のバイオマーカーの１種以上のタンパク質改変体を含む、タンパク質発現の量またはレベルと比較されるような、サンプルまたはサンプルの集団における本発明のバイオマーカーによってコードされるタンパク質、または１種以上のタンパク質改変体の測定を含み得る。差動的な発現は、本明細書に記載され、かつ当業者によって理解されるように決定することができる。「差動的に発現される」または「発現レベルの変化」という用語は、第２のサンプル中のバイオマーカーの所定の産物の測定可能な発現レベルと比較される場合の、サンプル中のＲＮＡの量および／またはタンパク質の量によって測定されるようなバイオマーカーの所定の産物の測定可能な発現レベルの増加または減少をいう。第１のサンプルおよび第２のサンプルは異なる患者由来である必要はないが、しかし、異なる時点で同じ患者から取られたサンプルであり得る。「差動的に発現される」または「発現レベルの変化」という用語はまた、サンプルの第２の集団におけるバイオマーカーの測定可能な発現レベルを比較される場合の、サンプルの集団における所定のバイオマーカーの測定可能な発現レベルの増加または減少をいうことができる。本明細書で使用される場合、「差動的に発現される」とは、単一のサンプルについて言及する場合には、対照集団の所定のバイオマーカーの平均発現レベルと比較される場合の、上記サンプル中の所定のバイオマーカーの発現レベルの比率を使用して測定することでき、ここで、その比率は１．０に等しくはない。差動的に発現されるはまた、第２のサンプルの集団と比較されるような第１のサンプルの集団、またはサンプルの集団に対する単一のサンプルを、発現レベルの比率を使用することまたはｐ－値を使用することのいずれかで、比較することを含むことができる。ｐ－値を使用する場合、ｈｎＲＮＡおよびｍＲＮＡを含む核酸転写物は、ｐ－値が０．１未満、０．０５未満、０．０１未満、０．００５未満、０．００１未満などの場合に、第１の集団と第２の集団の間で差動的に発現されるとして同定される。遺伝子産物のレベルの比率に基づいて差動的な発現を決定する場合、ＲＮＡまたはタンパク質の遺伝子産物は、第１のサンプル中のそのＲＮＡまたはタンパク質の産物を第２のサンプル中のそれと比較した比率が１．０より大きいかまたは小さい場合、差動的に発現される。例えば、遺伝子のＲＮＡまたはタンパク質の産物の１より大きな比率、例えば、１．２、１．５、１．７、２、３、４、１０、２０、または１より小さな比率、例えば、０．８、０．６、０．４、０．２、０．１、０．０５は、差動的な発現を示す。本発明の別の実施形態において、ｈｎＲＮＡおよびｍＲＮＡを含む核酸転写物は、第１の核酸集団における第１の転写物の発現の平均レベルを第２の集団におけるその発現の平均レベルと比較した比率が１．０より大きいかまたは小さい場合、差動的に発現される。例えば、１より大きな比率、例えば、１．２、１．５、１．７、２、３、４、１０、２０、または１より小さな比率、例えば、０．８、０．６、０．４、０．２、０．１、０．０５は、差動的な発現を示す。本発明の別の実施形態において、ｈｎＲＮＡおよびｍＲＮＡを含む核酸転写物は、第１のサンプル中のその発現レベルを第２の集団の平均と比較した比率が１．０より大きいかまたは小さい場合、差動的に発現され、例えば、１より大きな比率、例えば、１．２、１．５、１．７、２、３、４、１０、２０、または１より小さな比率、例えば、０．８、０．６、０．４、０．２、０．１、０．０５を含む。「差動的に増加した発現」とは、第２の集団の発現レベルの平均などの基準と比較して、１．１倍、１．２倍、１．４倍、１．６倍、１．８倍、またはそれ以上をいう。「差動的に減少した発現」とは、第２の集団の発現レベルの平均などの基準と比較して、１．０倍未満、０．８倍、０．６倍、０．４倍、０．２倍、０．１倍またはそれ以下をいう。

【００５９】

本明細書で使用される場合、「薬効」という用語は薬剤の有効性をいう。「薬効」は、通常、薬剤で治療されたか、または薬剤で治療されている患者の臨床的な応答によって測

定される。薬剤は、それが所望の臨床的結果、例えば、変形性関節症の症状の軽減、または本明細書において記載されるような変形性関節症の進行の予防を達成する場合、高度の有効性を有すると見なされる。吸収される薬剤の量は、患者の応答を予測するために使用されてもよい。一般的な規則は、薬剤の用量が増加するにつれて、より大きな効果が、最大の所望の効果に達するまで、患者において見られることである。最大点に達した後でより多くの薬剤が投与される場合、通常は副作用が増加する。

【００６０】

本明細書で使用される場合、「有効量」という用語は、変形性関節症またはその１つ以上の症状の進行、重症度、および／または継続期間を減少または改善し、変形性関節症またはその１つ以上の症状の発症、再発、または開始を予防し、変形性関節症またはその１つ以上の症状の進展を予防し、あるいは別の治療の予防的または治療的効果を増強または改善するために十分である化合物の量をいう。

【００６１】

本明細書で使用される場合、「フラグメント」という用語は、タンパク質因子の状況において、ポリペプチドまたはタンパク質のアミノ酸配列の少なくとも５個の連続するアミノ酸残基、少なくとも１０個の連続するアミノ酸残基、少なくとも１５個の連続するアミノ酸残基、少なくとも２０個の連続するアミノ酸残基、少なくとも２５個の連続するアミノ酸残基、少なくとも４０個の連続するアミノ酸残基、少なくとも５０個の連続するアミノ酸残基、少なくとも６０個の連続するアミノ酸残基、少なくとも７０個の連続するアミノ酸残基、少なくとも８０個の連続するアミノ酸残基、少なくとも９０個の連続するアミノ酸残基、少なくとも１００個の連続するアミノ酸残基、少なくとも１２５個の連続するアミノ酸残基、少なくとも１５０個の連続するアミノ酸残基、少なくとも１７５個の連続するアミノ酸残基、少なくとも２００個の連続するアミノ酸残基、または少なくとも２５０個の連続するアミノ酸残基のアミノ酸配列を含むペプチドまたはポリペプチドをいう。特定の実施形態において、タンパク質またはポリペプチドのフラグメントは、タンパク質またはポリペプチドの少なくとも１つの機能を保持している。別の実施形態において、タンパク質またはポリペプチドのフラグメントは、タンパク質またはポリペプチドの少なくとも１つ、２つ、３つ、４つ、または５つの機能を保持している。好ましくは、抗体のフラグメントは、抗原に免疫特異的に結合する能力を保持している。

【００６２】

本明細書で使用される場合、「融合タンパク質」という用語は、第１のタンパク質またはポリペプチドまたはそのフラグメント、またはその機能的フラグメント、またはそのアナログもしくは誘導体のアミノ酸配列、および異種タンパク質、ポリペプチド、またはペプチド（すなわち、第１のタンパク質またはそのフラグメント、そのアナログもしくは誘導体とは異なる、第２のタンパク質またはポリペプチドまたはそのフラグメント、そのアナログもしくは誘導体）のアミノ酸配列を含むポリペプチドをいう。１つの実施形態において、融合タンパク質は、異種タンパク質、ポリペプチド、またはペプチドに融合された予防薬剤または治療薬剤を含む。この実施形態に従って、異種タンパク質、ポリペプチド、またはペプチドは、異なるタイプの予防薬剤または治療薬剤であってもよいし、そうでなくてもよい。

【００６３】

本明細書で使用される場合、「遺伝子発現パターン」「遺伝子発現プロフィール」および「核酸アレイ発現プロフィール」という用語は交換可能に使用され、非変形性関節症の個体または正常個体と比較した場合に、軽度の変形性関節症の個体について、アレイ上の複数の核酸プローブにハイブリダイズする複数の標的核酸配列のハイブリダイゼーションのパターンを含む。「遺伝子発現パターン」「遺伝子発現プロフィール」および「核酸アレイ発現プロフィール」はまた、本明細書の２つ以上のバイオマーカーに対応するＲＮＡおよび／またはタンパク質のレベルを測定するために、当該分野において公知の任意の方法論によって決定されるような、上記のＲＮＡおよび／またはタンパク質の豊富さのレベルのパターンをいうことができる。例えば、このパターンは、パターンの数学的表現、例

えば、数学の方程式、ベクトルなどであり得る。

【００６４】

本明細書で使用される場合、「にハイブリダイズする」および「ハイブリダイゼーション」は、相補的核酸との配列特異的な非共有結合的相互作用、例えば、アレイ上の標的核酸と核酸メンバーとの相互作用をいう。

【００６５】

本明細書で使用される場合、「免疫グロブリン」という用語は、免疫グロブリン遺伝子またはその抗原結合フラグメントによって実質的にコードされる１つ以上のポリペプチドからなるタンパク質をいう。認識されているヒト免疫グロブリン遺伝子には、カッパ、ラムダ、アルファ（ＩｇＡ１およびＩｇＡ２）、ガンマ（ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４）、デルタ、イプシロンおよびミューの定常領域遺伝子、ならびに無数の免疫グロブリン可変領域遺伝子が含まれる。全長免疫グロブリン「軽鎖」（約２５Ｋｄまたは２１４アミノ酸）は、ＮＨ２－末端における可変領域遺伝子（約１１０アミノ酸）およびＣＯＯＨ－末端におけるカッパまたはラムダ定常領域遺伝子によってコードされている。全長免疫グロブリン「重鎖」（約５０Ｋｄまたは４４６アミノ酸）は、可変領域遺伝子（約１１６アミノ酸）および１つの他の上述の定常領域遺伝子、例えば、ガンマ（約３３０アミノ酸をコードする）によって同様にコードされている。

【００６６】

本明細書で使用される場合、治療に関する「組み合わせて」という用語は、１つより多くの治療（例えば、１つより多くの予防薬剤および／または治療薬剤）の使用をいう。「組み合わせて」という用語の使用は、治療（例えば、予防薬剤および／または治療薬剤）が被験体に投与される順序を制限しない。第１の治療（例えば、第１の予防薬剤および／または治療薬剤）は、第２の治療（例えば、第２の予防薬剤および／または治療薬剤）の投与の前に（例えば、５分前、１５分前、３０分前、４５分前、１時間前、２時間前、４時間前、６時間前、１２時間前、２４時間前、４８時間前、７２時間前、９６時間前、１週間前、２週間前、３週間前、４週間前、５週間前、６週間前、８週間前、または１２週間前）、それと同時に、またはその後で（例えば、５分後、１５分後、３０分後、４５分後、１時間後、２時間後、４時間後、６時間後、１２時間後、２４時間後、４８時間後、７２時間後、９６時間後、１週間後、２週間後、３週間後、４週間後、５週間後、６週間後、８週間後、または１２週間後）、被験体に投与することができる。

【００６７】

本明細書で使用される場合、「疾患または状態を示す」は、発現パターンに言及する場合、発現パターンが、疾患または状態を有さない患者よりも上記疾患または状態を有する患者において有意により頻繁に見出されるように、疾患または状態の診断である発現パターン（例えば、軽度の変形性関節症の存在）を示し、あるいは、軽度の変形性関節症を有するリスクを示す（最低で７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％などの信頼水準を設定する日常的な統計学的方法を使用して決定する）。好ましくは、疾患を示す発現パターンは、疾患を有する患者において少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％またはそれ以上で見出され、疾患を有さない患者において、１０％未満、８％未満、５％未満、２．５％未満、または１％未満で見出される。「疾患を示す」はまた、発現パターンが、疾患を有さない個体の対照発現パターンと比較する場合に、疾患を有する個体の対照発現パターンをより正確に分類するような疾患の診断である発現パターンを示し、このとき、当業者によって理解され、例えば、Silicon Geneticsによって提供されるものなどの市販のプログラム（例えば、GeneSpring（商標））が参照されるようなクラス予測のための統計学的アルゴリズムを使用する。

【００６８】

本明細書で使用される場合、遺伝子の「内部コード領域」という用語は、本明細書に定義されるような遺伝子の５’領域と３’領域の間に位置するポリヌクレオチド（二本鎖または一本鎖）をいう。「内部コード領域」は、８ヌクレオチド以上の長さであり、かつ１

０００ヌクレオチド以下の長さである。他の可能な「内部コード領域」の長さには、１０ヌクレオチド、２０ヌクレオチド、２５ヌクレオチド、５０ヌクレオチド、１００ヌクレオチド、２００ヌクレオチド、４００ヌクレオチド、および５００ヌクレオチドが含まれるがこれらに限定されない。５’領域、３’領域、および内部領域は重複しておらず、連続してもよいがその必要はなく、そして全長の対応する遺伝子まで加えられてもよいがその必要はない。

【００６９】

本明細書で使用される場合、ポリペプチドの「内部ポリペプチド領域」という用語は、本明細書に定義されるような、ポリペプチドのアミノ末端領域とカルボキシ末端領域の間に位置するポリペプチド配列をいう。ポリペプチドの「内部ポリペプチド領域」は、３アミノ酸以上の長さであり、かつ３５０アミノ酸以下であり得る長さである。他の可能な「内部ポリペプチド領域」の長さには、５アミノ酸、１０アミノ酸、２０アミノ酸、２５アミノ酸、５０アミノ酸、１００アミノ酸および２００アミノ酸が含まれるがこれらに限定されない。

【００７０】

ポリペプチドのアミノ末端領域、カルボキシ末端領域、および内部ポリペプチド領域は重複しておらず、連続してもよいがその必要はなく、そして全長の対応するポリペプチドまで加えられてもよいがその必要はない。

【００７１】

本明細書で使用される場合、「単離された」または「精製された」は、核酸に関連して使用される場合、天然型配列がその通常の細胞の（例えば、染色体の）環境から取り出され、または天然でない環境において合成されている（例えば、人工的に合成されている）ことを意味する。従って、「単離された」または「精製された」配列は、無細胞溶液中にあってもよく、または異なる細胞環境に配置されてもよい。「精製された」という用語は、その配列が唯一の存在するヌクレオチドであることを意味しないが、その配列は、その配列に天然に付随する非ヌクレオチド物質を本質的に含まない（約９０～９５％純粋）であり、従って、単離された染色体から区別されることを意味する。

【００７２】

本明細書で使用される場合、「単離された」または「精製された」は、タンパク質因子（例えば、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、または抗体）の状況においては、細胞物質を実質的に含まず、ある実施形態においては、それが由来する細胞または組織供給源からの異種タンパク質因子（例えば、夾雑タンパク質）を実質的に含まず、または化学合成された場合には、化学前駆物質もしくは他の化学物質を実質的に含まないタンパク質因子をいう。「細胞物質を実質的に含まない」という言葉は、タンパク質因子の調製物を含み、ここでこのタンパク質因子は、それがそこから単離されたか、または組換え技術により産生された細胞の細胞成分から分離されている。従って、細胞物質を実質的に含まないタンパク質因子は、約３０％、２０％、１０％、または５％（乾燥重量による）未満の異種タンパク質因子（例えば、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、または抗体、「夾雑タンパク質」ともいわれる）を有するタンパク質因子の調製物を含む。タンパク質因子が組換え技術により産生される場合、これはまた、好ましくは、培地を実質的に含まず、すなわち、培養培地は、タンパク質調製物の容量の約２０％、１０％、または５％未満を表す。タンパク質因子が化学合成によって産生される場合、これは、好ましくは、化学前駆物質または他の化学物質を実質的に含まず、すなわち、これは、化学前駆物質、またはタンパク質因子の合成に関与する他の化学物質から分離されている。従って、タンパク質因子のこのような調製物は、約３０％、２０％、１０％、または５％（乾燥重量による）未満の化学前駆物質、または関連のタンパク質因子以外の化合物を有する。好ましくは、本明細書に開示されるタンパク質因子は単離されている。

【００７３】

本明細書で使用される場合、「発現レベル」という用語は、当業者に公知であり、本明細書に記載されるような方法によって決定される、所定の核酸またはタンパク質の測定可

能な量をいう。本発明のバイオマーカーに対応するＲＮＡ、ｈｎＲＮＡ、ｍＲＮＡ、またはｍＲＮＡのスプライシング変異体に関連して、発現レベルは、ハイブリダイゼーション、またはSYBR（登録商標）green、TaqMan（登録商標）およびMolecular Beacons技術の使用を含む、定量リアルタイムＲＴ－ＰＣＲなどのより定量的な測定によって決定することができる。

【００７４】

本明細書で使用される場合、「リガンド」は、本発明のバイオマーカーの遺伝子の１つによってコードされるポリペプチドに特異的に結合する分子である。リガンドは、核酸（ＲＮＡまたはＤＮＡ）、ポリペプチド、ペプチドまたは化学化合物であり得る。本発明のリガンドは、ペプチドリガンド、例えば、骨格ペプチド、直鎖状ペプチド、または環状ペプチドであり得る。好ましい実施形態において、ポリペプチドリガンドは抗体である。抗体はヒト抗体、キメラ抗体、組換え抗体、ヒト化抗体、モノクローナル抗体もしくはその抗原結合フラグメント、またはポリクローナル抗体であり得る。抗体はインタクトな免疫グロブリン、例えば、ＩｇＡ、ＩｇＧ、ＩｇＥ、ＩｇＤ、ＩｇＭ、またはそのサブタイプであり得る。抗体は、第２の異なるポリペプチドであってもよい機能的部分（例えば、生物学的または化学的機能を有する化合物）、治療薬剤、細胞毒性剤、検出可能な部分、または固体支持体に結合体化することができる。本発明のポリペプチドリガンド（例えば、抗体ポリペプチド）は、バイオマーカーの遺伝子の１つによってコードされるポリペプチドと、高い親和性および特異性で相互作用する。例えば、ポリペプチドリガンドは、少なくとも$10^{7}M^{-1}$、好ましくは、少なくとも$10^{8}M^{-1}$、$10^{9}M^{-1}$、または$10^{10}M^{-1}$の親和定数で、バイオマーカーの遺伝子の１つによってコードされるポリペプチドに結合する。

【００７５】

本明細書で使用される場合、「大部分」という用語は、組成物の全体のメンバーの５０％より多く（例えば、５１％、６０％、または７０％、または８０％、または９０％、または１００％まで）を表す数をいう。「大部分」という用語は、アレイについていう場合、これは、アレイの固体基材と安定して結合する全体の核酸メンバーの５０％より多く（例えば、５１％、６０％、または７０％、または８０％、または９０％、または１００％まで）を意味する。

【００７６】

本明細書で使用される場合、「管理する」「管理すること」および「管理」という用語は、変形性関節症の治癒を生じない治療（例えば、予防薬剤または治療薬剤）から被験体が導き出す有益な効果をいう。特定の実施形態において、被験体は、変形性関節症の悪化または進行を予防するため、変形性関節症を「管理する」ために１種以上の治療を投与される。

【００７７】

本明細書で使用される場合、「ｍＲＮＡの完全性」とは、軟骨または血液のいずれかのサンプルからのｍＲＮＡ抽出物の品質をいう。良好な完全性を有するｍＲＮＡ抽出物は、当該分野において周知の方法、例えば、ＲＮＡアガロースゲル電気泳動（Ausubelら、John Weley & Sons,Inc., １９９７, 分子生物学の最新プロトコル（Current Protocols in Molecular Biology））によって調べた場合に、分解しているように見えない。好ましくは、ｍＲＮＡサンプルは、それが抽出された軟骨または血液のサンプルの遺伝子発現レベルを実際に表すために、良好な完全性を有する（例えば、ｍＲＮＡの１０％未満、好ましくは５％未満、およびより好ましくは１％未満が分解される）。

【００７８】

本明細書で使用される場合、「非応答性」および「不応性」は、変形性関節症に伴う１つ以上の症状を軽減するために臨床的に十分でない、変形性関節症のための現在利用可能な治療（例えば、予防薬剤または治療薬剤）で治療された患者を説明する。典型的には、このような患者は、重度の、永続的に活性な疾患に苦しんでおり、彼らの変形性関節症に付随する症状を改善するためにさらなる治療を必要としている。

【００７９】
本明細書で使用される場合、「正常」は、関節の痛みを含むいかなる変形性関節症の症状も示しておらず、かつ軟骨損傷または変形性関節症であると診断されていない個体または個体の群をいう。好ましくは、上記正常個体は、変形性関節症に影響を及ぼす投薬を受けておらず、かつ任意の他の疾患と診断されていない。より好ましくは、正常個体は、試験サンプルと比較して、同様の性別、年齢、および体脂肪指数（ＢＭＩ）を有する。「正常」はまた、本発明に従って、正常個体から単離されたサンプルをいい、正常個体から単離された総ＲＮＡまたはｍＲＮＡを含む。正常個体から取られたサンプルは、軟骨組織サンプルから単離されたＲＮＡを含むことができ、ここで、ＲＮＡは、組織の取り出しの時点で変形性関節症と診断されておらず、かついかなる変形性関節症の症状も示していない個体からの軟骨組織から単離された全体の軟骨または軟骨の小片から単離される。本発明の１つの実施形態において、「正常」軟骨サンプルは、死後１４時間で単離され、抽出されたｍＲＮＡサンプルの完全性が確認される。正常個体から取られたサンプルはまた、血液サンプルから単離されたＲＮＡを含むことができ、ここで、血液は、変形性関節症と診断されておらず、かついかなる変形性関節症の症状も示していない個体由来である。
【００８０】
本明細書で使用される場合、「核酸」は、「ポリヌクレオチド」という用語と交換可能であり、これは一般的に、未修飾のＲＮＡもしくはＤＮＡ、または修飾されたＲＮＡもしくはＤＮＡ、またはその任意の組み合わせであってもよい、任意のポリリボヌクレオチドまたはポリデオキシリボヌクレオチドをいう。「核酸」は、非限定的に、一本鎖および二本鎖の核酸を含む。本明細書で使用される場合、「核酸」という用語は、１つ以上の修飾された塩基を含む、上記のようなＤＮＡまたはＲＮＡを含む。安定性のためまたは他の理由のために骨格を有するＤＮＡまたはＲＮＡは「核酸」である。「核酸」という用語は、本明細書で使用される場合、このような化学的、酵素的、または代謝的に修飾された型の核酸、ならびに、ウイルス、および例えば、単純細胞または複雑型細胞を含む細胞に特徴的な化学型のＤＮＡおよびＲＮＡを包含する。「核酸」または「核酸配列」はまた、一本鎖または二本鎖のＲＮＡまたはＤＮＡまたはその任意の組み合わせの領域を含んでもよく、本発明のある実施形態に従って発現配列タグ（ＥＳＴ）を含むことができる。ＥＳＴは、ｃＤＮＡを作製するために、ｍＲＮＡの領域を逆転写することによって作製された、遺伝子の発現された配列の部分（すなわち、配列の「タグ」）である。
【００８１】
本明細書で定義されるように、「核酸アレイ」は、支持体に結合された複数の固有な核酸（または「核酸メンバー」）をいい、この支持体では、核酸メンバーの各々が固有なあらかじめ選択された領域で支持体に結合される。１つの実施形態において、支持体の表面に結合される核酸メンバーはＤＮＡである。好ましい実施形態において、支持体の表面に結合される核酸メンバーは、ｃＤＮＡまたはオリゴヌクレオチドのいずれかである。別の好ましい実施形態において、支持体の表面に結合される核酸メンバーは、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）によって合成されたｃＤＮＡである。「核酸」という用語は、本明細書で使用される場合、「ポリヌクレオチド」という用語と交換可能である。別の好ましい実施形態において、「核酸アレイ」とは、ニトロセルロース、またはサザンブロッティング技術および／もしくはノーザンブロッティング技術において使用される他のメンブレンに結合された複数の固有な核酸をいう。
【００８２】
本明細書で使用される場合、「核酸プローブ」は、相補的塩基対形成相互作用を含む一連の非共有結合的相互作用を通して、アレイ上の核酸メンバーの相補的配列に結合することが可能な核酸を含む。本明細書で使用される場合、核酸プローブは、天然の塩基（すなわち、Ａ、Ｇ、Ｃ、またはＴ）または修飾塩基（７－デアザグアノシン、イノシンなど）を含んでもよい。加えて、核酸プローブ中の塩基は、それがハイブリダイゼーションに干渉しない限り、ホスホジエステル結合以外の連結によって結合されてもよい（すなわち、核酸プローブは、標準的な緊縮性または選択的なハイブリダイゼーション条件下で、その

相補的配列になお特異的に結合する）。従って、核酸プローブは、構成成分の塩基がホスホジエステル結合よりもむしろペプチド結合によって結合される、ペプチド核酸であってもよい。

【００８３】

本明細書で使用される場合、「核酸標的」または「核酸メンバー」は、アレイに結合することが可能である核酸として定義される。核酸標的は遺伝子もしくはその部分に対応する単離された核酸配列であり得、または核酸標的はサンプルから単離された総ＲＮＡもしくはｍＲＮＡであり得るかのいずれかである。好ましくは、核酸標的または核酸マーカーは、ヒトの軟骨、血液、または滑液の抽出物に由来する。より好ましくは、核酸標的は、ヒトの軟骨、血液、または滑液の総ＲＮＡ抽出物、好ましくはｍＲＮＡ抽出物からの一本鎖または二本鎖のＤＮＡ、ＲＮＡ、またはＤＮＡ－ＲＮＡハイブリッドである。

【００８４】

１つの実施形態において、アレイに結合する「標的」配列の従来の核酸アレイは、完全なヒトゲノム、例えば、Affymetrixチップに代表されることができ、少なくとも１つのバイオマーカー特異的プローブが表１または表４からのものである限り、表１、表４および／または表２に記載される遺伝子に対応する２種以上のバイオマーカー特異的プローブからなるか、またはそれを含む単離されたバイオマーカーが、慣用的なアレイに適用される。

【００８５】

別の実施形態において、アレイに結合される配列は、本発明のバイオマーカーに対応する単離されたオリゴヌクレオチド、ｃＤＮＡ、ＥＳＴまたはＰＣＲ産物であり得、全細胞ＲＮＡがアレイに適用される。

【００８６】

本明細書で使用される場合、「オリゴヌクレオチド」という用語は、２つ以上、好ましくは３つ以上のデオキシリボヌクレオチドおよび／またはリボヌクレオチドから構成される分子として定義される。その正確なサイズは多くの要因に依存し、次には、オリゴヌクレオチドの最終的な機能および用途に依存する。オリゴヌクレオチドは、約８～約１，０００ヌクレオチド長であってもよい。８～１００ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドが本発明において有用であるが、好ましいオリゴヌクレオチドは、約８～約１５塩基の長さ、約８～約２０塩基の長さ、約８～約２５塩基の長さ、約８～約３０塩基の長さ、約８～約４０塩基の長さ、または約８～約５０塩基の長さの範囲である。

【００８７】

本明細書で使用される場合、「変形性関節症」とは、特定の型の関節炎、特に、関節の接合表面を形成する骨端に存在する関節軟骨が経時的に徐々に変性する慢性疾患をいう。

【００８８】

本明細書で使用される場合、「軽度の変形性関節症（ＯＡ）」とは、個体における変形性関節症の特定の前進もしくは進行、またはMarshall（Marshall W., １９９６, The Journal of Rheumatology, 23: 582-584、参照により援用される）のスコアリングシステムに従って定義される特定のレベルの変形性関節症の病理をいう。この方法に従うと、６つの関節面（膝蓋骨、大腿骨膝蓋面、大腿骨内側顆、脛骨内側プラトー、大腿骨外側顆および脛骨外側プラトー）の各々が、その特異的表面上に存在する最悪の病変に基づいて軟骨等級を割り当てされる。軽度の変形性関節症の指定は、その表面についての軟骨の重症度を反映するように各関節表面に提供されたスコアの累積スコアを示す。例えば、大腿骨内側顆は、その最も重度の軟骨損傷として等級Ｉの病変を有し、１の値が割り当てられる。次いで、患者についての全体のスコアが、６つの関節表面に対するスコアの合計から導き出される。全体のスコアに基づいて、各患者は、４つの変形性関節症群の１つに配置される：「軽度」（初期）は１～６のMarshallスコアを有すると定義され、「中程度」は７～１２のMarshallスコアを有すると定義され、「顕著」は１３～１８のMarshallスコアを有すると定義され、そして「重度」は１８のMarshallスコアを有すると定義される。

【００８９】

本明細書で使用される場合、「薬理学的に受容可能な塩」という語句は、本発明の方法を使用して同定された化合物中に存在する場合がある酸性基または塩基性基の塩を含むがこれに限定されない。天然で塩基性である化合物は、種々の無機酸および有機酸と広範な種々の塩を形成することが可能である。このような塩基性化合物の薬理学的に受容可能な酸付加塩を調製するために使用することができる酸は、非毒性酸付加塩、すなわち、薬理学的に受容可能なアニオンを含む塩であり、これには以下が含まれるがこれらに限定されない：硫酸、クエン酸、マレイン酸、酢酸、シュウ酸、塩酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、硝酸、硫酸塩、重硫酸、リン酸、過リン酸、イソニコチン酸、酢酸塩、乳酸、サリチル酸、クエン酸塩、酸性クエン酸、酒石酸、オレイン酸、タンニン酸、パントテン酸、酒石酸水素、アスコルビン酸塩、コハク酸、マレイン酸、ゲンチシン酸、フマル酸、グルコン酸、グルカロン酸、サッカリン酸、ギ酸、安息香酸、グルタミン酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、ｐ－トルエンスルホン酸、およびパモン酸（すなわち、１，１’－メチレン－ビス－（２－ヒドロキシ－３－ナフトエ酸））の塩。アミノ部分を含む化合物は、上述の酸に加えて、種々のアミノ酸とともに薬理学的に受容可能な塩を形成してもよい。天然で酸性である化合物は、種々の薬理学的に受容可能なカチオンとともに塩基性の塩を形成することが可能である。このような塩の例には、アルカリ金属またはアルカリ土類金属の塩、特に、カルシウム、マグネシウム、ナトリウム、リチウム、亜鉛、カリウム、および鉄の塩が含まれる。

【００９０】

本明細書で使用される場合、「ポリヌクレオチド」は、８ヌクレオチドより長い長さの二本鎖ＤＮＡ、一本鎖ＤＮＡ、および二本鎖または一本鎖のＲＮＡを包含する。

【００９１】

本明細書で使用される場合、「によってコードされるポリペプチド配列」または「バイオマーカーのタンパク質産物」とは、本明細書で定義されるようなバイオマーカーのタンパク質コード領域の翻訳後に得られるアミノ酸配列をいう。本発明のバイオマーカーの各々についてのｍＲＮＡヌクレオチド配列は、そのＲＮＡ受入番号（表３または表５を参照）によって同定され、対応するポリペプチド配列は、タンパク質受入番号（表３または表５を参照）によって同定される。

【００９２】

タンパク質またはタンパク質のフラグメントが宿主動物を免疫処理するために使用される場合、タンパク質の多数の領域が、そのタンパク質の所定の領域または三次元構造に特異的に結合する抗体の産生を誘導してもよい、これらの領域または構造は、エピトープまたは抗原決定基と呼ばれる。本明細書で使用される場合、「抗原フラグメント」とは、１つ以上のエピトープを含むポリペプチドの部分をいう。エピトープは、直鎖状であり、抗原からの直鎖状配列を本質的に含み、または立体配置的であり、他の配列によって遺伝子が分離されていないが、ポリペプチドリガンドについての結合部位において構造的に一緒になる配列を含む。「抗原フラグメント」は、５０００個、１０００個、５００個、４００個、３００個、２００個、１００個、５０個、２５個、または２０個、または１０個、または５個のアミノ酸の長さのいずれか１つまでであってもよい。

【００９３】

本明細書で使用される場合、「あらかじめ選択された領域」、「所定の領域」、または「固有な位置」とは、核酸の沈着のために使用され、使用された、または使用することが意図される、基剤上の局在化領域をいい、そうでなければ、ここでは代替的に「選択された領域」または単純に「領域」と呼ぶ。このあらかじめ選択された領域は、任意の便利な形状、例えば、円形、長方形、楕円形、くさび形などを有してもよい。ある実施形態において、あらかじめ選択された領域は、約１ｃｍ$^2$よりも小さく、より好ましくは１ｍｍ$^2$未満、なおより好ましくは０．５ｍｍ$^2$未満、およびある実施形態において０．１ｍｍ$^2$未満である。「あらかじめ選択された領域」、「所定の領域」、または「固有な位置」における核酸メンバーは、その同一性（例えば、配列）が、領域または固有な位置におけるその位置のために決定できるものである。

【００９４】
本明細書で使用される場合、「予防する」、「予防すること」および「予防」は、本発明の方法に従って同定される１種以上の化合物の投与、またはこのような化合物および別の治療との併用での投与から生じる、軽度の変形性関節症またはその１種以上の症状の発症、再発、または開始の予防をいう。
【００９５】
「プライマー」という用語は、本明細書で使用される場合、精製された制限消化物として天然型か、または合成により産生されたかに関わらず、核酸鎖に相補的であるプライマー伸長産物の合成が誘導される条件下、すなわち、ヌクレオチドおよびＤＮＡポリメラーゼなどの誘導剤の存在下、ならびに適切な温度およびｐＨに置かれた場合に、合成の開始点として作用することが可能であるオリゴヌクレオチドをいう。プライマーは、一本鎖または二本鎖のいずれかであってもよく、誘導剤の存在下で所望の伸長産物の合成を開始するために十分に長くなければならない。プライマーの正確な長さは、温度、プライマーの供給源、および使用する方法を含む、多くの要因に依存することになる。例えば、診断的適用のために、標的配列の複雑さに依存して、オリゴヌクレオチドプライマーは、典型的には、１５～２５個以上のヌクレオチドを含むが、これはより少ないヌクレオチドを含んでもよい。適切な長さのプライマーを決定する際に関係する要因は、当業者に容易に知られる。一般的に、本発明によって具体化されるプライマーの設計および選択は、標準的でありかつ周知である方法に従う。以下を参照のこと：Dieffenbach,C.W., Lowe,T.M.J., Dveksler,G.S.（１９９５）「ＰＣＲプライマー設計のための一般的概念（General Concepts for PCR Primer Design）」、「ＰＣＲプライマー、実験室マニュアル（PCR Primer, A Laboratory Manual）」（Dieffenbach,C.W.,とDveksler,G.S.編）所収、Cold Spring Harbor Laboratory Press, ニューヨーク, 133-155、Innis,M.A.,とGelfand,D.H.（１９９０）「ＰＣＲの最適化（Optimization of PCRs）」、「ＰＣＲプロトコル、方法および応用のガイド（PCR protocols,A Guide to Methods and Applications）」（Innis,M.A., Gelfand,D.H., Sninsky,J.J.,とWhite,T.J.編）所収、Academic Press, San Diego, 3-12、Sharrocks,A.D.（１９９４）「ＰＣＲのためのプライマーの設計（The design of primers for PCR）」、「ＰＣＲ技術、現在の技術革新（PCR Technology,Current Innovations）」（編集者　Griffin,H.G.および Griffin,A.M.編）所収、CRC Press, London, 5-11。
【００９６】
本明細書で使用される場合、「プローブ」という用語は、オリゴヌクレオチドおよびアナログを意味し、標的配列のヌクレオチド塩基との水素結合相互作用を通してポリヌクレオチド標的配列を認識する化学種の範囲をいう。プローブまたは標的配列は、一本鎖もしくは二本鎖のＲＮＡ、または一本鎖もしくは二本鎖のＤＮＡ、またはＤＮＡおよびＲＮＡの塩基の組み合わせであってもよい。プローブは少なくとも８ヌクレオチドの長さであり、完全な遺伝子の長さよりも少ない。プローブは、１０ヌクレオチド、２０ヌクレオチド、３０ヌクレオチド、５０ヌクレオチド、７５ヌクレオチド、１００ヌクレオチド、１５０ヌクレオチド、２００ヌクレオチド、２５０ヌクレオチド、４００ヌクレオチド、５００ヌクレオチドおよび２０００ヌクレオチドまでの長さであり得る。プローブは、蛍光、化学発光などによって検出可能なタグを有するために修飾されたオリゴヌクレオチドを含むことができる。プローブはまた、検出可能なタグとクエンチャー分子の両方、例えば、TaqMan（登録商標）およびMolecular Beacon（登録商標）プローブを有するために修飾することができる。
【００９７】
オリゴヌクレオチドおよびそのアナログは、ＲＮＡもしくはＤＮＡ、またはＲＮＡもしくはＤＮＡのアナログであってもよく、一般的にはアンチセンスオリゴマーまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドと呼ばれる。このようなＲＮＡまたはＤＮＡアナログは、以下を含むがこれらに限定されない：２－’Ｏ－アルキル糖修飾、メチルホスホネート、ホスホロチエート、ホスホロジチオエート、ホルムアセタール、３’－チオホルムアセタール

、スルホン、スルファメート、およびニトロオキサイド骨格修飾、ならびに塩基部分が修飾されているアナログ。加えて、オリゴマーのアナログは、糖部分が修飾されているか、または別の適切な部分によって置き換えられ、モルホリノアナログおよびペプチド核酸（ＰＮＡ）アナログを含むがこれらに限定されないポリマーを生じるポリマーであり得る（Egholmら、アキラルペプチド骨格を有するペプチド核酸（ＰＮＡ）--オリゴヌクレオチドアナログ（Peptide Nucleic Acids（ＰＮＡ）--Oligonucleotide Analogues with an Achiral Peptide Backbone），（１９９２））。

【００９８】

プローブはまた、一緒にまたはネイティブなＤＮＡもしくはＲＮＡと組み合わせた、オリゴヌクレオチドアナログ型のいずれかの混合物であってもよい。同時に、オリゴヌクレオチドおよびそのアナログは、単独でまたは１種以上のさらなるオリゴヌクレオチドもしくはそのアナログと組み合わせて使用されてもよい。

【００９９】

本明細書で使用される場合、「予防薬剤」という用語は、変形性関節症の予防において使用することができる任意の化合物をいう。特定の実施形態において、「予防薬剤」という用語は、本明細書に記載されるスクリーニングアッセイにおいて同定される化合物をいう。特定の他の実施形態において、「予防薬剤」という用語は、本明細書に記載されるスクリーニングアッセイにおいて同定された、有用であることが知られているか、あるいは変形性関節症またはその１つ以上の症状の開始、発症および／または進行を予防または阻害するために使用されてきたか、またはそのために現在使用されている化合物以外の薬剤をいう。

【０１００】

本明細書で使用される場合、「予防有効量」という語句は、変形性関節症またはその１つ以上の症状の発症、再発、または開始の予防を生じるために十分である治療（例えば、予防剤）の量をいう。

【０１０１】

本明細書で使用される場合、「タンパク質」および「ポリペプチド」および「タンパク質因子」という用語は、天然のまたは非天然のアミノ酸を任意に含むことができる、ペプチド結合によって一緒にアミノ酸連結された鎖をいうために交換可能に使用される。任意に、タンパク質またはペプチドは、アミノ酸に加えて、他の分子を含むことができる。上記鎖は任意の長さであり得る。特定の実施形態において、タンパク質は、ペプチド結合によって一緒に連結された、２００個未満、１７５個未満、１５０個未満、１２５個未満、１００個未満、５０個未満、４５個未満、４０個未満、３５個未満、３０個未満、２５個未満、２０個未満、１５個未満、１０個未満、または５個未満のアミノ酸から構成される。別の実施形態において、タンパク質は、ペプチド結合によって一緒に連結された、少なくとも２００個、少なくとも２５０個、少なくとも３００個、少なくとも３５０個、少なくとも４００個、少なくとも４５０個、少なくとも５００個またはそれ以上のアミノ酸から構成される。

【０１０２】

本明細書で使用される場合、「複数の」または「一連の」は、２つより多く、例えば、３以上、１０以上、１００以上、または１０００以上、または１０，０００以上をいう。

【０１０３】

本明細書で使用される場合、「ＲＮＡ部分」または「その部分」という用語は、本明細書のバイオマーカーのＲＮＡ産物の状況において、本発明のバイオマーカーのＲＮＡ産物の少なくとも６個、少なくとも９個、少なくとも１５個、少なくとも１８個、少なくとも２１個、少なくとも２４個、少なくとも３０個、少なくとも６０個、少なくとも９０個、少なくとも９９個、または少なくとも１０８個、またはそれ以上の核酸配列を含むＲＮＡ転写物をいう。

【０１０４】

本明細書で使用される場合、「本発明のバイオマーカーの産物」という用語は、本発明

のバイオマーカーに対応する遺伝子によって発現されるＲＮＡおよび／またはタンパク質をいう。「本発明のバイオマーカーの産物」は、異核ＲＮＡ（「ｈｎＲＮＡ」）、ｍＲＮＡ、およびｍＲＮＡのスプライシング変異体のすべてまたはいくつかを含むことができる１種以上の産物を含み、その発現の測定は、本明細書に開示される教示に従ってバイオマーカーとして使用することができる。「本発明のバイオマーカーのタンパク質産物」は、タンパク質、タンパク質改変体、および任意の翻訳後修飾タンパク質を含むことができる、バイオマーカーの１種以上の産物を含む。

【０１０５】

本明細書で使用される場合、「選択的に増幅される」または「選択的増幅」という用語は、それによって、特定の標的核酸配列の１つ以上のコピーが鋳型核酸から選択的に生成されるプロセスをいう。選択的増幅、または選択的に増幅された、というのは、核酸配列（例えば、ｍＲＮＡ）の集団を増幅するために、例えば、ランダムプライマーおよびオリゴｄＴプライマーを組み合わせる方法として使用することができる、一般的な増幅と比較されるということである。選択的増幅は、好ましくは、ポリメラーゼ連鎖反応の方法によって行われる（MullisとFaloona, １９８７, Methods Enzymol. 155: 335）。

【０１０６】

本明細書で使用される場合、「選択的に結合する」という用語は、本発明によって包含されるタンパク質の状況において、任意の２つのペプチド、タンパク質、ポリペプチド、および抗体の特異的相互作用をいい、ここで、この相互作用は、任意の他のペプチド、タンパク質、ポリペプチド、および抗体と比較した場合に、任意の２つのペプチド、タンパク質、ポリペプチド、および抗体の間で優先的に起こる。例えば、２つの分子がタンパク質分子である場合、第１の分子上の構造は、他のタンパク質ではなく、第２の分子上の構造を認識し、かつこれに結合する。「選択的結合」は、本明細書で使用される用語として、分子がその特異的結合パートナーに、それが非特異的分子に結合するよりも、少なくとも２倍高い親和性で、好ましくは、少なくとも１０倍、２０倍、５０倍、１００倍、またはそれ以上の親和性で結合することを意味する。

【０１０７】

本明細書で使用される場合、「選択的ハイブリダイゼーション」とは、本発明の状況において、本発明によって包含されるポリヌクレオチドおよびＲＮＡと、その相補物、または本発明のバイオマーカーのタンパク質産物の間で起こるハイブリダイゼーションをいい、ここで、ハイブリダイゼーションは、ポリヌクレオチドが、問題のゲノム中の他の遺伝子のＲＮＡ産物と比較して、本発明のバイオマーカーのＲＮＡ産物に優先的に結合するようなものである。好ましい実施形態において、「選択的にハイブリダイズする」ポリヌクレオチドは、７０％より高い、８０％より高い、９０％より高い、および最も好ましくは１００％より高い選択性でハイブリダイズするものである（すなわち、他のＲＮＡ種との交差ハイブリダイゼーションは、好ましくは、３０％未満、２０％未満、１０％未満で起こる）。当業者によって理解されるように、本発明のバイオマーカーのＲＮＡ産物に「選択的にハイブリダイズする」ポリヌクレオチドは、長さおよび組成を考慮に入れて決定することができる。

【０１０８】

本明細書で使用される場合、「特異的にハイブリダイズする」、「特異的ハイブリダイゼーション」とは、２つの核酸配列が実質的に相補的である場合（少なくとも１４～２５ヌクレオチドのストレッチに対して少なくとも約６５％の相補性、好ましくは約７５％の相補性、より好ましくは約９０％の相補性）に起こるハイブリダイゼーションをいう。参照により本明細書に援用される、Kanehisa,M., １９８４, Nucleic acids Res., 12: 203を参照のこと。結果として、ある程度のミスマッチが許容されることが予測される。このようなミスマッチは小さく、例えば、モノ－、ジ－、またはトリ－ヌクレオチドであってもよい。代替的には、ミスマッチの領域はループを含むことができ、これは、中断されない一連の４個以上のヌクレオチド中にミスマッチが存在する領域として定義される。多数の要因が２つの核酸のハイブリダイゼーション、例えば、標的核酸配列へのアレイ上の核

酸メンバーのハイブリダイゼーションの効率および選択性に影響を与える。これらの要因には、核酸メンバーの長さ、ヌクレオチド配列および／または組成、ハイブリダイゼーション温度、緩衝液組成、および核酸メンバーがハイブリダイズするために必要とされる領域中の立体障害の可能性が含まれる。核酸の長さと、核酸が標的配列にアニールする効率と正確さの両方の間には正の相関が存在する。特に、より長い配列は、短いものよりもより高い融解温度（$T_M$）を有し、所定の標的配列内で反復される可能性がより低く、それによって、非特異的ハイブリダイゼーションを最小化する。ハイブリダイゼーション温度は、核酸メンバーのアニーリング効率と反比例する。同様に、ハイブリダイゼーション混合液中の有機溶媒、例えば、ホルムアミドの濃度は、アニーリング効率と反比例するが、ハイブリダイゼーション混合液中の塩濃度の増加はアニーリングを容易にする。緊縮性アニーリング条件下では、より長い核酸は、より許容される条件下では十分である、より短い核酸よりも効率的にハイブリダイズする。

【０１０９】

本明細書で使用される場合、「特異的に結合する」という用語は、２つの分子、例えば、リガンドおよびタンパク質もしくはペプチド、または抗体およびタンパク質もしくはペプチドの相互作用をいい、ここで、この相互作用は、それぞれの分子上の特定の構造の存在に依存する。例えば、２つの分子がタンパク質分子である場合、第１の分子上の構造は、一般的なタンパク質よりもむしろ、第２の分子上の構造を認識しかつこれに結合する。「特異的結合」は、この用語が本明細書で使用される場合、分子がその特異的結合パートナーに、それが非特異的分子に結合するよりも、少なくとも２倍高い親和性で、好ましくは、少なくとも１０倍、２０倍、５０倍、１００倍、またはそれ以上の親和性で結合することを意味する。

【０１１０】

本明細書で使用される場合、「標準的な緊縮性条件」および「緊縮性条件」という用語は、ハイブリダイゼーションが、配列間で少なくとも９５％、および好ましくは、少なくとも９７％の同一性が存在する場合にのみ起こることを意味する。１つの実施形態において、配列は、４２℃で一晩の配列のインキュベーション、その後の緊縮性洗浄（０．２×ＳＳＣ、６５℃）に従う緊縮性条件下でハイブリダイズする。洗浄の緊縮性の程度は、温度、ｐＨ、イオン強度、二価カチオン濃度、容量および洗浄時間を変化させることによって変化させることができる。例えば、ハイブリダイゼーションの緊縮性は、プローブの融解温度の下の様々な温度でハイブリダイゼーションを実施することによって変化されてもよい。プローブの融解温度は、以下の式を使用して計算することができる：

オリゴヌクレオチドプローブについては、１４～７０個のヌクレオチド長では、摂氏での融解温度は以下の式を使用して計算することができる：Ｔｍ＝８１．５＋１６．６（ｌｏｇ［Ｎａ＋］）＋０．４１（Ｇ＋Ｃ画分）－（６００／Ｎ）、ここで、Ｎはオリゴヌクレオチドの長さである。

【０１１１】

例えば、ハイブリダイゼーション温度は、約１ＭのＮａ＋濃度を有するハイブリダイゼーション緩衝液中で、６８℃～４２℃まで５℃ずつ降下させてもよい。ハイブリダイゼーション後、フィルターは２×ＳＳＣ、０．５％ＳＤＳを用いて、ハイブリダイゼーションの温度にて洗浄してもよい。これらの条件は、５０℃よりも上の「中程度の緊縮性」、および５０℃より下の「低緊縮性」と見なされる。「中程度の緊縮性」ハイブリダイゼーション条件の特定の例は、上記のハイブリダイゼーションが５５℃で行われる場合である。「低緊縮性」ハイブリダイゼーション条件の特定の例は、上記のハイブリダイゼーションが４５℃で行われる場合である。

【０１１２】

ハイブリダイゼーションがホルムアミドを含む溶液中で実行される場合、アニーリングする核酸鎖の融解温度は、等式Ｔｍ＝８１．５＋１６．６（ｌｏｇ［$Na^+$］）＋０．４１（Ｇ＋Ｃ画分）－（０．６３％ホルムアミド）－（６００／Ｎ）を使用して計算することができ、ここで、Ｎはプローブの長さである。

【０１１３】
例えば、ハイブリダイゼーションは、ホルムアミドを含む、６×ＳＳＣなどの緩衝液中で、４２℃にて実行されてもよい。この場合、ハイブリダイゼーション緩衝液中のホルムアミドの濃度は、プローブの相同性のレベルを減少させているクローンを同定するために、５０％～０％まで５％ずつ減少させてもよい。ハイブリダイゼーション後、フィルターは６×ＳＳＣ、０．５％ＳＤＳを用いて、５０℃にて洗浄してもよい。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溶液が２５％よりも上のホルムアミドから構成される場合に「中程度の緊縮性」、およびハイブリダイゼーション溶液が２５％よりも下のホルムアミドから構成される場合に「低緊縮性」と見なされる。「中程度の緊縮性」ハイブリダイゼーション条件の特定の例は、上記のハイブリダイゼーションが３０％ホルムアミドで行われる場合である。「低緊縮性」ハイブリダイゼーション条件の特定の例は、上記のハイブリダイゼーションが１０％ホルムアミドで行われる場合である。ハイブリダイゼーション条件は、この条件が、例えば、６×ＳＳＣ、４５℃におけるハイブリダイゼーション、その後の０．２×ＳＳＣ、０．１％ＳＤＳ、６５℃における１回以上の洗浄を含む場合に、「高緊縮性」と見なされる。

【０１１４】
本明細書で使用される場合、「被験体」および「患者」および「個体」という用語は、動物（例えば、哺乳動物、魚類、両生類、爬虫類、鳥類、および昆虫）をいうために交換可能に使用される。特定の実施形態において、被験体は哺乳動物（例えば、非ヒト哺乳動物およびヒト）である。別の実施形態において、被験体はペット（例えば、イヌ、ネコ、モルモット、サル、および鳥類）、家畜（例えば、ウマ、ウシ、ブタ、ヤギ、およびニワトリ）または実験用動物（例えば、マウスおよびラット）である。別の実施形態において、被験体は霊長類（例えば、チンパンジーおよびヒト）である。別の実施形態において、被験体はヒトである。

【０１１５】
本明細書で使用される場合、「相乗的」とは、治療の相加的効果よりもより効果的である、本明細書に記載される方法の１つおよび別の治療（例えば、薬剤）を使用して同定される化合物の組み合わせをいう。好ましくは、このような他の治療は、変形性関節症またはその症状を予防、治療、管理、または改善するために行われたか、または現在行われている。治療（例えば、予防薬剤または治療薬剤）の併用における相乗効果は、変形性関節症を有する被験体に対する、より少ない投与量の１つ以上の治療、および／またはより頻度の少ない上記治療投与を可能にする。より少ない投与量の治療（例えば、予防薬剤または治療薬剤）を利用し、および／またはより頻度の少ない上記治療を投与する能力は、変形性関節症の予防、治療、管理、または改善における上記治療の有効性を低下させることなく、被験体に対する上記薬剤の投与に伴う毒性を低下させる。加えて、相乗効果は、変形性関節症の予防、治療、管理、または改善における治療（例えば、薬剤）の有効性の改善を生じることができる。最後に、治療（例えば、予防薬剤または治療薬剤）の併用における相乗効果は、いずれかの治療単独の使用に伴う有害なまたは望ましくない副作用を回避または減少させる可能性がある。

【０１１６】
本明細書で使用される場合、「滑液」とは、各関節を取り囲む「滑液嚢」から分泌される液体をいう。滑液は、関節を保護し、関節を潤滑し、そして関節軟骨に栄養を提供するように働く。本発明に従って有用である滑液は細胞を含み、そこからＲＮＡが、本明細書に記載されるように、当該分野で公知の方法に従って単離することができる。

【０１１７】
本明細書で使用される場合、「治療薬剤」および「治療薬剤」という用語は、変形性関節症またはその１つ以上の症状の治療、管理、または改善において使用することができる任意の化合物をいう。特定の実施形態において、「治療薬剤」という用語は、本明細書に定義されるような、正常個体からの軟骨細胞と比較して、軽度の変形性関節症からの軟骨細胞において差動的に発現されるポリヌクレオチド配列の発現を増加または減少させる化

合物をいう。本発明に従う治療薬剤はまた、軟骨細胞の同化作用を促進または低下させる化合物をいう。本発明は、患者に投与されたときに、１）変形性関節症の開始を予防し、２）罹患した関節における痛み、腫脹、脱力、および機能的能力の損失などの変形性関節症の症状を減少、遅延、または除去し、３）軟骨の変性を減少、遅延、もしくは除去し、ならびに／または軟骨細胞の代謝活性および細胞分裂速度を増強し、ならびに／あるいは４）１つ以上の疾患を示す患者の核酸の１つ以上の発現プロフィールを、正常個体のそれとより類似したプロフィールまで回復させる「治療薬剤」を提供する。特定の実施形態において、「治療薬剤」という用語は、本明細書に記載されるスクリーニングアッセイにおいて同定される化合物をいう。他の実施形態において、「治療薬剤」という用語は、本明細書に記載されるスクリーニングアッセイにおいて同定された、有用であることが知られているか、あるいは変形性関節症またはその１つ以上の症状を治療、管理、または改善するために使用されてきたか、またはそのために現在使用されている化合物以外の薬剤をいう。

【０１１８】

本明細書で使用される場合、「治療有効量」とは、変形性関節症またはその１つ以上の症状の改善を生じ、変形性関節症の進行を予防し、変形性関節症の後退を引き起こし、または別の治療の治療効果を増強もしくは改善するために十分である治療（例えば、治療薬剤）の量をいう。特定の実施形態において、治療有効量とは、関節の痛みまたは関節の腫れを軽減する治療（例えば、治療薬剤）の量をいう。好ましくは、治療（例えば、治療薬剤）の治療有効量は、リン酸緩衝化生理食塩水（「ＰＢＳ」）などの対照と比較して、少なくとも５％、好ましくは少なくとも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％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、または少なくとも１００％、関節の腫れを軽減させる。

【０１１９】

本明細書で使用される場合、「治療する」、「治療」および「治療すること」とは、本発明の方法に従って同定された１種以上の化合物、または本発明に従って同定された１種以上の化合物および別の治療と併用した投与から生じる、変形性関節症またはその１つ以上の症状の進行、重症度、および／または持続期間の減少または改善をいう。

【０１２０】

本明細書で使用される場合、「上方制御される」または「発現レベルの増加」は、本発明の状況においては、その配列の量の測定が遺伝子の発現レベルの増加を実証する、発現された遺伝子に対応する配列をいい、これは、変形性関節症、または変形性関節症の段階によって決定されるような変形性関節症の同定された疾患状態を有する個体から単離された軟骨または血液中で、アレイ分析または他の同様な分析を使用して決定することができ、そして正常個体、または変形性関節症の段階によって決定されるような変形性関節症の同定された異なる疾患状態を有する個体から単離された軟骨または血液中の同じ遺伝子と比較される。本発明に従う「発現レベルの増加」は、例えば、本発明の方法に従って、ハイブリダイゼーションの完全性によって測定されるように、少なくとも１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％またはそれ以上、例えば、２０％、３０％、４０％、または５０％、６０％、７０％、８０％、９０％またはそれ以上、または１倍より多く、２倍、３倍、４倍、５倍、１０倍、５０倍、１００倍またはそれ以上までの発現の増加である。例えば、上方制御された配列は、正常個体から単離された軟骨と比較した場合に、軽度、中程度、顕著な、および重度の変形性関節症を有すると特徴付けられた個体から単離された軟骨または血液中の発現レベルの増加を有する配列を含む。上方制御された配列はまた、別の段階の変形性関節症と比較した場合に（例えば、顕著な変形性関節症対重度のＯＡ）、１つの段階の変形性関節症を有すると特徴付けられた個体から単離された軟骨または血液における発現レベルの増加を有する配列を含むことができる。

【０１２１】

４．図面および表の簡単な説明

図１は、表４に列挙した遺伝子の比率の、全ての可能な組み合わせの分析の結果を示し、ここで、ＲＯＣは、軽度の変形性関節症を診断するために０．６より高かった。ＲＯＣ面積、感度（特異性は５０％閾値に設定すると仮定）および特異性（感度は５０％閾値に設定すると仮定）のグラフ表示を示す。さらなる詳細は実施例８に記載される。

【０１２２】

本発明の目的および特徴は、本明細書の実施例の節の後に含まれる、表１、表２、表３、表４、表５、および表６、表７および表８、ならびに図１を参照して、より良好に理解することができる。

【０１２３】

表１は、１つの実施形態において、本発明の遺伝子を示す、特に、それらの遺伝子座リンクＩＤに基づいて遺伝子を同定する表である。

【０１２４】

表２は、出願番号１０／９１５，６８０に開示されるバイオマーカーの特定の実施形態を示す表である。

【０１２５】

表３は、１つの実施形態において、表１において同定されるバイオマーカーに対応するＲＮＡ産物、ならびにＲＮＡ産物の各々についての核酸参照受入番号およびタンパク質参照受入番号を示す表である。

【０１２６】

表４は、１つの実施形態において、軽度の変形性関節症を各々個別に示し、かつ軽度の変形性関節症を示す組み合わせにおいて有用である本発明のバイオマーカーの選択を示す表である。表４は、遺伝子ＩＤ（以前には遺伝子座リンクＩＤ）によって各バイオマーカーを同定し、バイオマーカーの識別子として、遺伝子記号、代わりの遺伝子記号、および遺伝子の説明を含む。加えて、実施例９にさらに記載されるような、特定のｐ値および倍数変化の結果を示す。

【０１２７】

表５は、１つの実施形態において、表４のバイオマーカーに対応する、ＲＮＡおよびタンパク質改変体の代表的な例を示す表である。

【０１２８】

表６は、１つの実施形態において、表４に列挙されたバイオマーカーの選択されたＲＮＡ種に対する定量リアルタイムＲＴ－ＰＣＲのために使用されるプライマーの選択を示す表である。

【０１２９】

表７は、１つの実施形態において、表４のバイオマーカーのタンパク質産物に特異的な市販の抗体を示す表である。

【０１３０】

表８は、１つの実施形態において、表４に列挙されるバイオマーカーのＲＮＡ産物を測定するために有用なプライマーの代表的な種およびTaqMan（登録商標）プローブを提供する。

【０１３１】

５．発明の詳細な説明

本発明の実施は、当業者の範囲内にある、分子生物学、微生物学および組換えＤＮＡ技術の従来の技術を部分的に利用する。例えば、以下を参照：Sambrook, Fritsch & Maniatis, １９８９,「分子クローニング：実験室マニュアル（Molecular Cloning:A Laboratory Manual）」, 第２版、「オリゴヌクレオチド合成（Oligonucleotide Synthesis）」（M.J.Gait編, １９８４）、「核酸ハイブリダイゼーション（Nucleic Acid Hybridization）」（B.D.Harnes & S.J.Higgins編, １９８４）、「分子クローニングの実用ガイド（A Practical Guide to Molecular Cloning）」（B.Perbal, １９８４）、および「酵素学の方法シリーズ（a series,Methods in Enzymology）」（Academic Press,Inc.）、「分子

生物学の簡単なプロトコル（Short Protocols In Molecular Biology）」，（Ausubelら編，１９９５）。上記と下記の両方で本明細書で言及されるすべての特許、特許出願、および刊行物は、それらの全体が参照により本明細書に援用される。

【０１３２】

本明細書において開示される本発明は、軽度であると診断する際に有用であり、および／または軽度の変形性関節症と非変形性関節症との間を区別する際に有用である、バイオマーカーおよびバイオマーカーの組み合わせを同定する。これらのバイオマーカーを使用するために、本発明は、ＲＮＡ産物およびタンパク質産物を含むこれらのバイオマーカーの産物の同定を教示する。本発明はさらに、オリゴヌクレオチド、ｃＤＮＡ、ＤＮＡ、ＲＮＡ、ＰＣＲ産物、合成ＤＮＡ、合成ＲＮＡ、およびそのフラグメント、または、本発明のバイオマーカーのＲＮＡ産物に特異的および／もしくは選択的にハイブリダイズする天然型修飾ヌクレオチドの他の組み合わせを開示する。本発明はさらに、タンパク質、ペプチド、抗体、リガンド、および、本発明のバイオマーカーのタンパク質産物に特異的および／もしくは選択的にハイブリダイズする抗原結合フラグメントを含む、そのフラグメントを開示する。本発明のバイオマーカーおよびバイオマーカーの組み合わせのＲＮＡ産物の発現の測定は、ＲＮＡ産物の発現を定量するために、本発明のバイオマーカーのＲＮＡ産物について、特異的および／または選択的であるこれらのポリヌクレオチドを使用することによって行うことができる。本発明の特定の実施形態において、ＲＮＡ産物について特異的および／または選択的であるポリヌクレオチドはプローブまたはプライマーである。１つの実施形態において、これらのポリヌクレオチドは、製造されたアレイにハイブリダイズすることができる核酸プローブの型である。別の実施形態において、市販のアレイは、ＲＮＡ産物の発現を測定するために使用することができ、本発明はどの組み合わせを分析するかを教示する。別の実施形態において、本発明のバイオマーカーのＲＮＡ産物に特異的および／または選択的であるポリヌクレオチドは、例えば、SYBR（登録商標）GreenもしくはTaqMan（登録商標）を使用する、定量リアルタイムＲＴ　ＰＣＲなどの技術においてプローブまたはプライマーの型で使用され、または分子ビーコン（Molecular Beacon）技術において使用され、ここでは、使用されるポリヌクレオチドは、フォワードプライマー、リバースプライマー、TaqMan標識プローブ、または分子ビーコン標識プローブの型で使用される。１つの特定の実施形態において、本発明のＲＮＡ産物の発現レベルを測定することから生じる結果は、バイオマーカーの組み合わせを同定するために使用される本発明のモデルに入力され、このモデルによって規定される診断を決定することができる。好ましい実施形態において、同じ方法が使用されて、試験個体を診断するために使用される数学モデルを生成するために使用される発現データを生成する。

【０１３３】

本発明はさらに、本発明のバイオマーカーのタンパク質産物を測定するために、本明細書に開示され、当業者によって公知であるようなタンパク質またはポリペプチドの使用を意図する。次いで、当業者に公知である技術（例えば、ウェスタンブロッティング、免疫沈殿、タンパク質マイクロアレイ分析などのような技術）が、本発明のバイオマーカーに対応するタンパク質産物のレベルを測定するために使用することができる。当業者によって理解されるように、本発明のバイオマーカーのタンパク質産物の発現レベルの測定は、本発明の各バイオマーカーに対応するタンパク質産物の１つ以上に特異的または選択的に結合するタンパク質を必要とする。次いで、本発明のバイオマーカーのタンパク質産物の発現レベルを代表するデータが、組み合わせを同定するために生成されたモデルに入力され、このモデルによって規定される診断を決定することができる。好ましい実施形態において、同じ方法が使用されて、試験個体を診断するために使用される数学モデルを生成するために使用される発現データを生成する。

【０１３４】

５．１　本発明における使用のためのサンプル

本明細書で他に示さない限り、任意の被験体から得られた任意の組織サンプル（例えば、軟骨、滑液または血液のサンプル）または細胞サンプル（例えば、軟骨細胞サンプルま

たは血液細胞サンプル）が、本発明の方法に従って使用されてもよい。このようなサンプルが本発明の方法に従ってそこから入手または利用されてもよい被験体の例には以下が含まれるがこれらに限定されない：無症候性被験体、変形性関節症の１つ、２つ、３つ、４つまたはそれ以上の症状が現れているか、またはそれらを示す被験体、変形性関節症であると臨床的に診断された被験体、変形性関節症に対する素因がある被験体（例えば、変形性関節症の家族歴を有する被験体、変形性関節症に対する遺伝的な素因を有する被験体、および、彼らに変形性関節症に対する素因をもたらす生活様式になっていくか、または変形性関節症に罹患する可能性が増加している被験体）、変形性関節症を有することが疑われている被験体、変形性関節症のための治療を受けている被験体、変形性関節症および少なくとも１つの他の症状を有する被験体（例えば、２つ、３つ、４つ、または５つ以上の症状を示す被験体）、変形性関節症のための治療を受けていない被験体、医療従事者（例えば、医師）によって、健常であるかまたは変形性関節症を有さない（すなわち、正常）と決定された被験体、変形性関節症が治癒した被験体、彼らの変形性関節症を管理している被験体、および変形性関節症と診断されていない被験体。特定の実施形態において、そこからサンプルが入手および利用される可能性がある被験体は、手、足、脊椎、膝、腰、および／または手首の変形性関節症を有する。

【０１３５】

別の実施形態において、そこからサンプルが入手および利用される可能性がある被験体は、軽度の変形性関節症を有する。さらなる実施形態において、そこからサンプルが入手される可能性がある被験体は試験個体であり、ここで、人が変形性関節症を有するか否かは未知であり、および／または試験個体がどの段階の変形性関節症を有するかは未知である。

【０１３６】

疾患状態に従って個体を分類するために、軟骨に基づくスコアリングシステムが使用されてもよく、それによって、関節鏡検査者による主観的判断が最小化される。本明細書に記載される疾患状態を規定するスコアリングシステムの例は、参照により本明細書に援用される、Marshall，１９９６，The Journal of Rheumatology 23: 582-584のそれである。この方法に従うと、６つの関節面（膝蓋骨、大腿骨膝蓋面、大腿骨内側顆、脛骨内側プラトー、大腿骨外側顆および脛骨外側プラトー）の各々が、その特異的表面上に存在する最悪の病変に基づいて軟骨等級を割り当てされる。次いで、表９に示されるように、各関節表面がその表面についての軟骨の重症度を反映する変形性関節症の重症度の数値を受け取るスコアリングシステムが適用される。

【表９】

表９．関節軟骨等級付けシステム

| 等級 | 関節軟骨 | 点数 |
|---|---|---|
| 0 | 正常 | 0 |
| I | 表面無傷－軟化、浮腫 | 1 |
| II | 表面－破壊－部分的な厚い病変<br>(骨までの伸長なし) | 2 |
| III | 十分に厚い病変－無傷の骨への伸長 | 3 |
| IV | 骨の浸食または象牙質化 | 4 |

【０１３７】

例えば、大腿骨内側顆がその最も重度の軟骨損傷としてＩ級病変を有する場合、１の値が割り当てられる。次いで、患者についての全体のスコアが、６つの関節表面に対するスコアの合計から導き出される。全体のスコアに基づいて、各患者は、４つの変形性関節症群の１つに配置される：軽度（１～６）、中程度（７～１２）、顕著（１３～１８）および重度（＞１８）である。

【０１３８】

特定の実施形態において、被験体から得られたサンプルは軟骨サンプル（軟骨からの細胞のサンプルを含む）である。他の実施形態において、被験体から得られたサンプルは滑液サンプル（滑液からの細胞のサンプルを含む）である。なお他の実施形態において、被験体から得られたサンプルは血液サンプル（血液からの細胞のサンプルを含む）である。

【０１３９】

５．１．１　軟骨

１つの態様において、軟骨サンプルは、当該分野において公知であり、かつ以下に記載される方法に従って、生きている正常個体から得られ、または死後１４時間未満で軟骨組織から得られる。ヒト成体からの正常関節軟骨は、任意の公知の方法を使用して得られる。特定の実施形態において、軟骨は、関節鏡検査または人工膝関節全置換術を受けている個体から得られ、そしてサンプルは使用するまで液体窒素中に保存される。典型的には、本物の正常軟骨は、一般的には、倫理的な配慮のために、生体ドナーからサンプリングすることはできない。従って、好ましくは、正常軟骨サンプルは、この時間帯を超えると観察されるＲＮＡの分解を最小化するために、サンプリングされる関節への灌流の停止後に、死後１４時間以内の時間帯である死亡したドナーから得られる。他の実施形態において、「正常」組織は、死後１４時間未満、例えば、死後１３時間、１２時間、１１時間、１０時間、９時間、８時間、７時間、６時間、５時間、４時間、３時間、２時間、または１時間以下で得られる。好ましくは、正常軟骨は、死後１２時間未満に得られる。

【０１４０】

別の態様において、軟骨は、軽度の変形性関節症と診断された被験体から得られる。変形性関節症個体からのヒト軟骨サンプルは、任意の公知の方法を使用して得られる。好ましくは、軟骨サンプルは、必要とされるまで、液体窒素中に保存される。特定の実施形態において、最小限０．０５ｇの軟骨サンプルが単離されて、２μｇの総ＲＮＡ抽出物が得られる。別の実施形態において、最小限０．０２５ｇの軟骨サンプルが単離されて、１μｇの総ＲＮＡ抽出物が得られる。本発明に従って有用である軟骨細胞サンプルは、本発明に従う１種以上の核酸配列またはアミノ酸配列の検出のために十分な量である。

【０１４１】

収集した軟骨は、任意にしかし好ましくは、本発明の方法に従う使用の前に、冷蔵温度、例えば、４℃で保存される。ある実施形態において、軟骨サンプルの一部は、最初の時点で本発明の方法に従って使用されるのに対して、サンプルの１つ以上の残りの部分は、より後での使用のために、一定時間保存される。この一定時間は、１時間以上、１日以上、１週間以上、１ヶ月以上、１年以上、または無期限であり得る。長期間の保存のために、当該分野において周知である保存方法、例えば、冷凍温度（例えば、－６０℃より下）における保存を使用することができる。ある実施形態において、軟骨の保存に加えて、または軟骨の保存の代わりに、単離された核酸またはタンパク質が、より後での使用のために、一定時間（例えば、１時間以上、１日以上、１週間以上、１ヶ月以上、１年以上、または無期限）保存される。

【０１４２】

本発明のある実施形態において、軟骨中に存在する軟骨細胞は、当該分野において公知である技術を用いて分離され、本発明の方法に従って使用される。軟骨細胞は、軽度の変形性関節症を有する被験体、変形性関節症を有さない被験体、または試験被験体から入手されてもよい。軟骨細胞は、本発明の方法における使用の前に、標準的な技術によって凍結することができる。

【０１４３】

５．１．２　滑液

１つの態様において、滑液のサンプルが、当該分野において周知である方法に従って被験体から得られる。例えば、関節穿刺が実行されてもよい。関節穿刺の間、滅菌針は、関節から滑液を取り出すために使用される。滑液は、膝、肘、手首、指、腰、脊椎、または任意の他の関節から、関節穿刺を使用して収集されてもよい。特定の実施形態において、滑液は、変形性関節症によって影響を受けたか、または影響を受けることが疑われる関節から収集される。滑液は、軽度の変形性関節症を有する被験体、変形性関節症を有さない被験体、または試験被験体から入手されてもよい。

【０１４４】

本発明に従って有用である滑液サンプルは、本発明に従う１種以上の核酸配列またはアミノ酸配列の検出のために十分な量である。特定の実施形態において、本発明に従って有用である滑液サンプルは、０．１ｍｌ～２０ｍｌ、０．１ｍｌ～１５ｍｌ、０．１ｍｌ～１０ｍｌ、０．１ｍｌ～５ｍｌ、０．１～２ｍｌ、０．５ｍｌ～２０ｍｌ、０．５ｍｌ～１５ｍｌ、０．５ｍｌ～１０ｍｌ、０．５ｍｌ～５ｍｌ、または０．５ｍｌ～２ｍｌの範囲の量である。別の実施形態において、本発明に従って有用である滑液サンプルは、０．１ｍｌ以上、０．５ｍｌ以上、１ｍｌ以上、２ｍｌ以上、３ｍｌ以上、４ｍｌ以上、５ｍｌ以上、６ｍｌ以上、７ｍｌ以上、８ｍｌ以上、９ｍｌ以上、１０ｍｌ以上、１１ｍｌ以上、１２ｍｌ以上、１３ｍｌ以上、１４ｍｌ以上、１５ｍｌ以上、１６ｍｌ以上、１７ｍｌ以上、１８ｍｌ以上、１９ｍｌ以上、または２０ｍｌ以上である。

【０１４５】

収集した滑液は、任意にしかし好ましくは、本発明の方法に従う使用の前に、冷蔵温度、例えば、４℃で保存される。ある実施形態において、滑液サンプルの一部は、最初の時点で本発明の方法に従って使用されるのに対して、サンプルの１つ以上の残りの部分は、より後での使用のために、一定時間保存される。この一定時間は、１時間以上、１日以上、１週間以上、１ヶ月以上、１年以上、または無期限であり得る。長期間の保存のために、当該分野において周知である保存方法、例えば、冷凍温度（例えば、－６０℃より下）における保存を使用することができる。ある実施形態において、滑液の保存に加えて、または滑液の保存の代わりに、単離された核酸またはタンパク質が、より後での使用のために、一定時間（例えば、１時間以上、１日以上、１週間以上、１ヶ月以上、１年以上、または無期限）保存される。

【０１４６】

本発明のある実施形態において、滑液中に存在する細胞は、当該分野において公知である技術を用いて分離され、本発明の方法に従って使用される。一般的に、以下の細胞が滑液中で見出される：リンパ球（Ｂリンパ球およびＴリンパ球）、単球、好中球、滑膜細胞、およびマクロファージ。変形性関節症などの病理学的状態を有する患者からの滑液において、以下の細胞が見出され得る：軟骨細胞、骨芽細胞、および破骨細胞。特定の実施形態において、リンパ球（Ｂリンパ球およびＴリンパ球）が滑液細胞から単離され、本発明の方法に従って使用される。別の実施形態において、単球または好中球が滑液細胞から単離され、本発明の方法に従って使用される。滑液から単離された細胞は、本発明の方法における使用の前に標準的な技術によって凍結させることができる。

【０１４７】

５．１．３　血液

１つの態様において、血液のサンプルが、当該分野において周知である方法に従って被験体から得られる。血液のサンプルは、軽度の変形性関節症を有する被験体、変形性関節症を有さない被験体、個体が変形性関節症を有するかもしくは変形性関節症の段階を有するかが未知である試験被験体から入手されてもよい。ある実施形態において、１滴の血液が、被験体の皮膚で行われた単一のピン穿刺から収集される。このような実施形態において、ピン穿刺から収集されるこの血液の１滴が、必要とされるすべてである。血液は、当業者に公知の技術、特に、当該分野で公知である瀉血を使用して、被験体から、身体の任意の部分（例えば、指、手、手首、腕、脚、足、足首、胃、および首）から引き出されて

もよい。特定の実施形態において、静脈血が被験体から得られ、本発明の方法に従って利用される。別の実施形態において、動脈血が被験体から得られ、本発明の方法に従って利用される。静脈血の組成は、それが活動している身体の領域の代謝的な必要性に従って変動する。対照的に、動脈血の組成は、身体を通じて一貫している。日常的な血液試験のためには、静脈血が一般的に使用される。

【０１４８】

静脈血は、尺側皮静脈、橈側皮静脈、または正中静脈から得ることができる。動脈血は、橈骨動脈、上腕動脈、または大腿動脈から得ることできる。真空チューブ、シリンジ、またはバタフライが、血液を引き出すために使用されてもよい、典型的には、穿刺部位は清浄化され、止血帯が、穿刺部位の上に約３～４インチ適用され、針は１５～４５°の角度で挿入され、そして針が静脈の壁に貫通するとすぐに、チューブが針のホルダーに押し込まれる。血液の収集を完了した後、針は取り外され、圧力が穿刺部位上で維持される。通常、血液が凝固しないように、ヘパリンまたは別の型の抗凝血剤が、血液が収集されるチューブまたはバイアルの中に入れられる。動脈血を収集する際には、収集の前に麻酔剤が投与され得る。

【０１４９】

収集した血液の量は、収集の部位、本発明の方法のために必要とされる量、および被験体の快適さに依存して変動する。しかし、本発明の１つの実施形態の利点は、本発明の方法を実施するために必要とされる血液の量が少なく、より多くの侵襲的な手順がサンプルを得るために必要とされないことが可能なことである。例えば、ある実施形態において、必要とされるすべてのものは１滴の血液である。この１滴の血液は、例えば、単一のピン穿刺から得ることができる。ある実施形態において、任意の量の血液が収集され、これは、表１に列挙される１種、２種、３種、４種、５種、１０種またはそれ以上の遺伝子の発現を検出するために十分である。このようにして、ある実施形態において、収集される血液の量は、１μｌ以下、０．５μｌ以下、０．１μｌ以下、または０．０１μｌ以下である。しかし、本発明は、このような実施形態に限定されない。ある実施形態において、より多くの血液が利用可能であり、ある実施形態において、本発明の方法をもたらすためにより多くの血液を使用することができる。このようにして、種々の特定の実施形態において、０．００１ｍｌ、０．００５ｍｌ、０．０１ｍｌ、０．０５ｍｌ、０．１ｍｌ、０．１５ｍｌ、０．２ｍｌ、０．２５ｍｌ、０．５ｍｌ、０．７５ｍｌ、１ｍｌ、１．５ｍｌ、２ｍｌ、３ｍｌ、４ｍｌ、５ｍｌ、１０ｍｌ、１５ｍｌまたはそれ以上の血液が被験体から収集される。別の実施形態において、０．００１ｍｌ～１５ｍｌ、０．０１ｍｌ～１０ｍｌ、０．１ｍｌ～１０ｍｌ、０．１ｍｌ～５ｍｌ、１～５ｍｌの血液が被験体から収集される。

【０１５０】

本発明のある実施形態において、血液はＫ３／ＥＤＴＡチューブ中に保存される。別の実施形態において、米国特許第６，６１７，１７０号（参照により本明細書に援用される）に開示されるような安定化剤を含む血液を保存するためのチューブを利用することができる。別の実施形態において、PreAnalytiX, a Qiagen/BD companyにより提供されるPAXgene（商標）血液ＲＮＡシステムが、血液を収集するために使用されてもよい。なお別の実施形態において、Applied Biosystemsによって提供されるTempus（商標）血液ＲＮＡ収集チューブが使用されてもよい。Tempus（商標）収集チューブは、全血収集のためのＲＮＡ安定化試薬を含む密閉真空プラスチックチューブを提供する。

【０１５１】

収集した血液は、任意にしかし好ましくは、本発明の方法に従う使用の前に、冷蔵温度、例えば、４℃で保存される。ある実施形態において、血液サンプルの一部は、最初の時点で本発明の方法に従って使用されるのに対して、血液サンプルの１つ以上の残りの部分は、より後での使用のために、一定時間保存される。この一定時間は、１時間以上、１日以上、１週間以上、１ヶ月以上、１年以上、または無期限であり得る。長期間の保存のために、当該分野において周知である保存方法、例えば、冷凍温度（例えば、－６０℃より

下）における保存を使用することができる。ある実施形態において、血液の保存に加えて、または血液の保存の代わりに、単離された核酸またはタンパク質が、より後での使用のために、一定時間保存される。このような分子マーカーの保存は、１時間以上、１日以上、１週間以上、１ヶ月以上、１年以上、または無期限であり得る。

【０１５２】

１つの態様において、全血は、当該分野において周知である瀉血の方法に従って、正常個体、変形性関節症と診断された個体、または変形性関節症を有する疑いのある個体から得られる。全血には、直接的に使用することができる血液、および血清または血漿が除去されており、残りの血液サンプルからＲＮＡまたはｍＲＮＡが当該分野において周知である方法（例えば、好ましくは、５～１０分間の間、３００～８００×ｇにおける穏やかな遠心分離を使用する）に従って単離されている血液が含まれる。特定の実施形態において、被験体から得られた全血（すなわち、分離されていない血液）は、溶解緩衝液（例えば、溶解緩衝液（１Ｌ）：０．６ｇ　ＥＤＴＡ、１．０ｇ　$KHCO_2$、８．２ｇ　$NH_4Cl$、ｐＨ７．４に調整（ＮａＯＨを使用））と混合され、サンプルは遠心分離されかつ細胞ペレットは保持され、そしてＲＮＡまたはｍＲＮＡは当該分野において公知の方法に従って抽出される（「溶解血液」）（例えば、Sambrookら、を参照）。全血の使用は、これにより血液中の細胞型を分離するという高価で時間のかかる必要性が避けられるため、好ましい（Kimoto, １９９８, Mol.Gen.Genet 258:233-239、Chelly Jら、１９８９, Proc.Nat.Acad.Sci.USA 86:2617-2621、Chelly Jら、１９８８, Nature 333: 858-860）。

【０１５３】

本発明のある実施形態において、被験体から収集された全血は画分とされる（すなわち、成分に分離される）。本発明の特定の実施形態において、血液細胞は、当該分野において公知の技術を用いて被験体から収集された全血から分離される。例えば、被験体から収集された血液は、Ficoll-Hypaque（Pharmacia）勾配遠心分離に供すことができる。このような遠心分離は、様々な型の有核細胞から、および血漿から赤血球を分離する。特に、Ficoll-Hypaque勾配遠心分離は、末梢血白血球（ＰＢＬ）を単離するために有用であり、これは、本発明の方法に従って使用することができる。

【０１５４】

例示目的であるが非限定的に、マクロファージは以下のようにして得ることができる。単核細胞は、血液のシリンジ取り出し、続いてFicoll-Hypaqueグラジエント遠心分離によって、被験体の末梢血から単離される。組織培養ディッシュを、被験体自身の血清、またはＡＢ＋ヒド血清でプレコートし、３７℃で１時間インキュベートする。非接着細胞はピペッティングによって除去する。リン酸緩衝化生理食塩水中の冷却（４℃）１ｍＭ　ＥＤＴＡをディッシュの中に残った接着細胞に添加し、ディッシュを室温で１５分間静置する。細胞を収集し、ＲＰＭＩ緩衝液で洗浄し、そしてＲＰＭＩ緩衝液に懸濁する。増加した数のマクロファージを、マクロファージ－コロニー刺激因子（Ｍ－ＣＳＦ）と３７℃でインキュベートすることによって得ることができる。Ｍａｃ－１などのマクロファージ特異的表面マーカーに対する抗体は、マクロファージの検出および分離を容易にするために、このような分子への親和性化合物の結合体化によって標識することができる。使用することができる親和性化合物には、ビオチン、フォトビオチン、フルオレセインイソチオシアネート（ＦＩＴＣ）、またはフィコエリトリン（ＰＥ）、または当該分野において公知である他の化合物が含まれるがこれらに限定されない。次いで、標識された抗体を保持している細胞が、例えば、種々の細胞ソーティング法、アフィニティークロマトグラフィー、およびパニングであるがこれらに限定されない、当該分野において公知である技術によって、このような抗体を結合しない細胞から分離される。

【０１５５】

血液細胞は、蛍光活性化細胞ソーター（ＦＡＣＳ）を使用して選別することができる。蛍光活性化細胞ソーティング（ＦＡＣＳ）は、粒子の蛍光特性に基づいて、細胞を含む粒子を分離するための公知の方法である。例えば、Kamarch, １９８７, Methods Enzymol 151: 150-165を参照のこと。個々の粒子中の蛍光部分のレーザー励起は、小さな電荷を生

じ、混合物から、正電荷粒子および負電荷粒子の電磁的分離を可能にする。特定の血液細胞の細胞表面上に存在する血液細胞の抗原決定基を検出するために使用される抗体またはリガンドは、ＦＩＴＣまたはフィコエリトリンなどの蛍光色素で標識される。細胞は、蛍光標識された抗体またはリガンドが細胞に結合するために十分な時間の間、蛍光標識された抗体またはリガンドとインキュベートされる。細胞は、細胞ソーターを通して処理され、他の細胞からの関連の細胞の分離を可能にする。ＦＡＣＳで選別された粒子は、分離を容易にするために、マイクロタイタープレートの個々のウェルに直接的に沈着させることができる。

【０１５６】

磁気ビーズもまた、本発明のある実施形態において、血液細胞を分離するために使用することができる。例えば、血液細胞は、それらの磁気ビーズ（０．５～１００ｍ直径）に結合する能力に基づいて粒子を分離するための方法である、磁気活性化細胞ソーティング（ＭＡＣＳ）技術を用いて選別することができる。種々の有用な修飾が、磁気ミクロスフェア上で実施することができ、これには、細胞－固相表面分子またはハプテンを特異的に認識する抗体の共有結合的付加が含まれる。次いで、選択されたビーズを物理的に操作するために、磁気が適用される。特定の実施形態において、血液細胞表面マーカーに対する抗体は、磁気ビーズにカップリングされる。次いで、ビーズは、血液細胞培養と混合され、結合を可能にする。次いで、細胞は磁場を通過させ、関連の血液細胞表面マーカーを有する細胞を分離する。次いで、これらの細胞を単離することができる。

【０１５７】

ある実施形態において、培養ディッシュの表面は抗体でコートされてもよく、パニングと呼ばれる方法によって血液細胞を分離するために使用されてもよい。別々のディッシュを特定の血液細胞に特異的な抗体でコートすることができる。細胞は、最初に、関連の血液細胞特異的抗体でコートされたディッシュに加えることができる。徹底的なすすぎの後、ディッシュに結合したままである細胞は、関連の血液細胞表面マーカーを発現する細胞である。細胞表面の抗原決定基またはマーカーの例としては以下が含まれるが、これらに限定されない：Ｔリンパ球およびナチュラルキラー細胞についてのＣＤ２、Ｔリンパ球についてのＣＤ３、白血球についてのＣＤ１１ａ、Ｔリンパ球についてのＣＤ２８、Ｂリンパ球についてのＣＤ２２、Ｂリンパ球についてのＣＤ２３、白血球についてのＣＤ２９、単球についてのＣＤ１４、血小板についてのＣＤ４１、血小板についてのＣＤ６１、顆粒球についてのＣＤ６６、顆粒球についてのＣＤ６７、ならびに単球およびマクロファージについてのＣＤ６８。

【０１５８】

全血は、白血球、血小板、赤血球などのような細胞型に分離することができ、このような細胞型は、本発明の方法に従って使用することができる。白血球は、標準的な技術を用いて、顆粒球および無顆粒白血球にさらに分けることができ、このような細胞は、本発明の方法に従って使用することができる。顆粒球は、標準的な技術を用いて、好中球、好酸球、および好塩基球などの細胞型に分けることができ、このような細胞は、本発明の方法に従って使用することができる。無顆粒白血球は、標準的な技術を用いて、リンパ球（例えば、Ｔリンパ球およびＢリンパ球）および単球に分けることができ、このような細胞は、本発明の方法に従って使用することができる。Ｔリンパ球は、Ｂリンパ球および、細胞傷害性Ｔ細胞から分けられたヘルパーＴ細胞から分けることができ、このような細胞は、本発明の方法に従って使用することができる。分離された血液細胞（例えば、白血球）は、本発明の方法における使用の前に、標準的な技術によって凍結させることができる。

【０１５９】

本発明に従って有用である血液サンプルは、本発明に従う１種以上の核酸またはアミノ酸の配列の検出のために十分な量である。特定の実施形態において、本発明に従って有用な血液サンプルは、１μｌ～１００ｍｌ、好ましくは１０μｌ～５０ｍｌ、より好ましくは１０μｌ～２５ｍｌ、および最も好ましくは１０μｌ～１ｍｌの範囲の量である。

【０１６０】

５．１．４　ＲＮＡ調製

本発明の１つの態様において、ＲＮＡは、本発明のバイオマーカーのＲＮＡ産物を測定するために個体から単離される。ＲＮＡは、本明細書に記載されるように、軟骨サンプルから単離される。サンプルは、単一の患者由来であり得、または複数の患者からプールされ得る。

【０１６１】

別の態様において、ＲＮＡは、本明細書に記載されるように、変形性関節症を有する人の滑液から直接的に単離される。サンプルは、単一の患者由来であり得、または複数の患者からプールされ得る。

【０１６２】

別の態様において、ＲＮＡは、本明細書に記載されるように、変形性関節症を有する人の血液サンプルから直接的に単離される。サンプルは、単一の患者由来であり得、または複数の患者からプールされ得る。

【０１６３】

総ＲＮＡは、当業者に周知の方法に従って、軟骨サンプルから抽出される。１つの実施形態において、ＲＮＡは、以下の方法に従って軟骨組織から精製される。個体または患者からの関連の組織の取り出し後、組織は、液体窒素中で急速冷凍され、ＲＮＡの分解を阻害する。一定容量の組織グアニジニウム溶液の付加後、組織試料は、２回または３回の１０秒間のバーストを用いて、ティシュマイザー（tissuemizer）中ですりつぶされる。組織グアニジニウム溶液（１Ｌ）を調製するために、５９０．８ｇグアニジニウムイソチオシアネートを約４００ｍｌ　ＤＥＰＣ－処理$H_2O$に溶解する。２５ｍｌの２Ｍ　Ｔｒｉｓ－Ｃｌ、ｐＨ７．５（最終０．０５Ｍ）および２０ｍｌ　$Na_2EDTA$（最終０．０１Ｍ）を加える。この溶液を一晩攪拌し、容量を９５０ｍｌに調整し、そして５０ｍｌ　２－ＭＥを加える。

【０１６４】

ホモジナイズした組織試料を、１２℃における１２，０００×ｇで１０分間の遠心分離に供する。得られる上清を、９ｍｌの５．７Ｍ　ＣｓＣｌ溶液（０．１ｇ　ＣｓＣｌ／ｍｌ）上に重層した、０．１容量の２０％サルコシルの存在下で、６５℃にて２分間インキュベートし、２２℃における１１３，０００×ｇで一晩の遠心分離によって分離する。上清の注意深い除去後、チューブを逆さにして水分を除く。チューブの底（ＲＮＡペレットを含む）を５０ｍｌプラスチックチューブに配置し、３ｍｌ組織再懸濁緩衝液（５ｍＭ　ＥＤＴＡ、０．５％（ｖ／ｖ）サルコシル、５％（ｖ／ｖ）２－ＭＥ）の存在下で、４℃にて一晩（またはそれ以上）インキュベートして、ＲＮＡペレットの完全な再懸濁を可能にする。得られるＲＮＡ溶液を、２５：２４：１　フェノール／クロロホルム／イソアミルアルコール、続いて２４：１　クロロホルム／イソアミルアルコールで連続的に抽出し、イソアミルアルコールは３Ｍ酢酸ナトリウムの添加により沈殿し、ｐＨ５．２および２．５容量の１００％エタノールの添加によって沈殿させ、そしてＤＥＰＣ水中に再懸濁する（Chirgwinら、１９７９，Biochemistry, 18: 5294）。

【０１６５】

代替的には、ＲＮＡは、以下の単一工程プロトコルに従って軟骨組織から単離される。関連の組織は、１００ｍｇ組織あたり、１ｍｌ変性溶液（４Ｍグアニジニウムチオサルフェート、２５ｍＭクエン酸ナトリウム、ｐＨ７．０、０．１Ｍ　２－ＭＥ、０．５％（ｗ／ｖ）Ｎ－ラウリルサルコシン）中、ガラステフロン（登録商標）ホモジナイザー中での均質化によって調製する。５－ｍｌポリプロピレンチューブへのホモジネートの移動後、０．１ｍｌの２Ｍ酢酸ナトリウム、ｐＨ４、１ｍｌ水飽和フェノール、および０．２ｍｌの４９：１　クロロホルム／イソアミルアルコールを連続的に加える。サンプルを、各成分の添加後に混合し、すべての成分を加えた後で、０～４℃で１５分間インキュベートした。サンプルは、４℃にて１０，０００×ｇ、２０分間の遠心分離によって分離し、１ｍｌの１００％イソプロパノールの添加によって沈殿させ、－２０℃で３０分間インキュベートし、そして４℃にて１０，０００×ｇ、１０分間の遠心分離によってペレット化する

。得られるＲＮＡペレットを０．３ｍｌ変性溶液に溶解し、微量遠心チューブに移し、０．３ｍｌの１００％イソプロパノールの添加によって、－２０℃で３０分間沈殿させ、そして４℃にて１０，０００×ｇで１０分間遠心分離する。ＲＮＡペレットを７０％エタノールで洗浄し、乾燥させ、そして１００～２００μｌ　ＤＥＰＣ－処理水またはＤＥＰＣ－処理０．５％ＳＤＳに再懸濁する（ChomczynskiとSacchi，１９８７，Anal.Biochem.，162：156）。

【０１６６】

好ましくは、軟骨サンプルは、液体窒素下で微細に粉末化し、総ＲＮＡをTRIzol（登録商標）試薬（GIBCO/BRL）を使用して抽出する。

【０１６７】

代替的には、ＲＮＡは、以下のプロトコルによって血液から単離される。溶解緩衝液は、３部の溶解緩衝液対１部の血液の比率で、血液サンプルに加えられる（溶解緩衝液（１Ｌ）０．６ｇ　ＥＤＴＡ、１．０ｇ　$KHCO_2$、８．２ｇ　$NH_4Cl$、ｐＨ７．４に調整（ＮａＯＨを使用））。サンプルを混合し、透明になるまで５～１０分間、氷上に配置する。溶解したサンプルを、４℃にて１０００ｒｐｍで１０分間遠心分離し、上清を吸引する。ペレットを５ｍｌ溶解緩衝液に再懸濁し、再度、４℃にて１０００ｒｐｍで１０分間遠心分離する。ペレット化した細胞を、もともとの血液サンプルの１０ｍｌ毎に約６ｍｌのTRIzol（登録商標）の比率でTRIzol（登録商標）（GIBCO/BRL）を使用して、ホモジナイズし、十分にボルテックスする。サンプルを室温で５分間放置する。ＲＮＡは、１ｍｌのTRIzol（登録商標）あたり１．２ｍｌのクロロホルムを使用して抽出する。サンプルは、４℃にて１２，０００×ｇで５分間遠心分離し、上層を収集する。この上層に、イソプロパノールを、１ｍｌのTRIzol（登録商標）あたり０．５ｍｌの比率で加える。サンプルを、－２０℃で一晩または－２０℃で１時間静置する。ＲＮＡを、公知の方法に従ってペレット化し、ＲＮＡペレットを空気乾燥し、そしてペレットをＤＥＰＣ処理ｄｄ$H_2O$に再懸濁する。ＲＮＡサンプルはまた、７５％エタノール中で保存することができ、この条件ではサンプルは輸送のための室温において安定である。

【０１６８】

代替的には、ＲＮＡは、上記のようにTRIzol（登録商標）試薬（GIBCO/BRL）を使用して滑液から単離される。

【０１６９】

ＲＮＡの純度および完全性は、２６０／２８０ｎｍにおける吸収、およびアガロースゲル電気泳動、その後の紫外光の下での検査によって評価される。

【０１７０】

５．２　本発明のバイオマーカー

１つの実施形態において、本発明は、バイオマーカーの産物の発現レベルの測定が軽度の変形性関節症の存在を示すバイオマーカーおよびバイオマーカーの組み合わせを提供する。別の実施形態において、本発明は、バイオマーカーの産物の発現レベルの測定が、個体が軽度の変形性関節症の存在を有するかまたは変形性関節症を有さないかを診断するために使用することができるバイオマーカーおよびバイオマーカーの組み合わせを提供する。

【０１７１】

表１は、本発明のバイオマーカーについての遺伝子名および付随する遺伝子座リンクＩＤのリストを提供し、ここで、バイオマーカーの発現レベルの測定が、個々にまたは組み合わせてのいずれかで、軽度の変形性関節症を有するとして個体を診断するために使用することができ、または個体が変形性関節症を有するか、もしくは変形性関節症を有さないかを決定するかのいずれかである。当業者によって理解されるように、遺伝子座リンクＩＤは、本発明のバイオマーカーに対応するすべてのＲＮＡ転写物、およびすべてのタンパク質の配列を決定するために使用することができる。

【０１７２】

表２は、出願番号１０／９１５，６８０に開示されるバイオマーカーを提供し、これは

、軽度の変形性関節症を診断するために、または軽度の変形性関節症と非変形性関節症の間を区別するために、本明細書に教示されるような表１に開示される１つ以上のバイオマーカーと組み合わせて使用することができる。

【０１７３】

表３は、特に、表１に列挙されるバイオマーカーのＲＮＡ産物に対応する参照受入番号、およびバイオマーカーのタンパク質産物に対応する参照受入番号を示す。従って、本発明は、上記に概略された目的の各々のためのこれらのバイオマーカーおよびバイオマーカーの組み合わせの発現を測定するために、当業者に公知であり、かつ本明細書に概略された方法の使用を包含する。

【０１７４】

表４は、本発明のバイオマーカーの選択のための遺伝子名および付随する遺伝子座リンクＩＤ（遺伝子ＩＤ）のリストを提供し、ここで、バイオマーカーの発現レベルの測定は、個々にまたは組み合わせてのいずれかで、軽度の変形性関節症を有するか、または変形性関節症を有さないかのいずれかとして個体を診断するために使用することができる。当業者によって理解されるように、遺伝子座リンクＩＤは、本発明のバイオマーカーに対応するすべてのＲＮＡ転写物、およびすべてのタンパク質の配列を決定するために使用することができる。

【０１７５】

表５は、特に、表１に列挙されるバイオマーカーのＲＮＡ産物に対応する参照受入番号、およびバイオマーカーのタンパク質産物に対応する参照受入番号を開示する。従って、本発明は、上記に概略された目的の各々のためのこれらのバイオマーカーおよびバイオマーカーの組み合わせの発現を測定するために、当業者に公知であり、かつ本明細書に概略された方法の使用を包含する。

【０１７６】

５．３　バイオマーカーの組み合わせ

バイオマーカーの組み合わせ

１つの実施形態において、本発明のバイオマーカーの組み合わせは、表１に列挙されたバイオマーカーの２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、１０個、２０個、３０個、４０個、５０個、１００個またはすべてまでの任意の数の任意の組み合わせを含む。本発明の別の実施形態において、本発明のバイオマーカーの組み合わせは、表１に列挙されたバイオマーカーの任意の１つ、または１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、１０個、２０個、３０個、４０個、５０個、１００個またはすべてまでの任意の数と組み合わせた、表２に列挙されたバイオマーカーの任意の１つ、または１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、１０個、２０個、３０個、４０個、５０個、１００個もしくはすべてまでの任意の数の任意の組み合わせを含み、その産物の発現の測定は、個体が軽度の変形性関節症を有するか、または変形性関節症を有さないかを診断するために使用することができる。別の実施形態において、本発明のバイオマーカーの組み合わせは、表３に列挙されたＲＮＡ産物および／またはタンパク質産物の２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、１０個、２０個、３０個、４０個、５０個、１００個またはすべてまでの任意の数の任意の組み合わせを含む。別の本発明の実施形態において、本発明のバイオマーカーの組み合わせは、表３に列挙されたＲＮＡ産物および／またはタンパク質産物の任意の１つ、または１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、１０個、２０個、３０個、４０個、５０個、１００個もしくはすべてまでの任意の数と組み合わせた、表２に列挙されたバイオマーカーの任意の１つ、または１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、１０個、２０個、３０個、４０個、５０個、１００個もしくはすべてまでの任意の数の任意の組み合わせを含み、その産物の発現の測定は、個体が軽度の変形性関節症を有するか、または変形性関節症を有さないかを診断するために使用することができる。１つの実施形態において、本発明のバイオマーカーの組み合わせは、表４に列挙されたバイオマーカーの２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個、１１個、１２個、１３個、１４個、１５個、１６個、１７個、１８個、１９個、２０個、

２１個、２２個、２３個、２４個、２５個、２６個、２７個、２８個、２９個、３０個、３１個またはすべてまでの任意の数の任意の組み合わせを含む。別の本発明の実施形態において、本発明のバイオマーカーの組み合わせは、表４に列挙されたバイオマーカーの任意の１つまたはすべてまでの任意の数と組み合わせた、表２に列挙されたバイオマーカーの任意の１つ、または１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、１０個、２０個、３０個、４０個、５０個、１００個もしくはすべてまでの任意の数の任意の組み合わせを含む。

【０１７７】

例えば、ｎ個の遺伝子のサブセットｍの、可能な組み合わせの数は、Feller, 確率理論の序論（Intro to Probability Theory）、第３版、第１巻、１９６８、J. Wiley編に記載されており、以下の数式を使用する：

ｍ！／（ｎ）！（ｍ－ｎ）！

【０１７８】

１つの実施形態において、ｎが２でありｍが１９である場合、

１９！／２！（１９－２）！＝１９×１８×１７×１６×１５×１４×１３×１２×１１×１０×９×８×７×６×５×４×３×２×１／（２×１）（１９×１８×１７×１６×１５×１４×１３×１２×１１×１０×９×８×７×６×５×４×３×２×１）＝１．２１６　１０$^{17}$／７．１１　１０$^{14}$＝１７１

個の固有な２個の遺伝子の組み合わせが存在する。これらの２個の遺伝子の組み合わせの各々の遺伝子発現の測定は、患者が変形性関節症を有するか否かを決定するために独立して使用することができる。ｍが１９でありｎが３である別の特定の例において、１９！／３！（１９－３）！の固有な３個の遺伝子組み合わせが存在する。これらの固有な３個の遺伝子の組み合わせは、患者が変形性関節症を有するか否かを決定するために独立して使用することができる。

【０１７９】

５．４　特に有用なバイオマーカーの組み合わせ

本発明の表１および表４に列挙されたバイオマーカーの組み合わせのすべてが、表１および／または表４からの少なくとも１つ以上のバイオマーカーとともに、表２からバイオマーカーを選択するバイオマーカーの組み合わせとして、軽度の変形性関節症を診断するために有用であるが、本発明はさらに、軽度の変形性関節症を診断するために特に有用であるバイオマーカーの組み合わせを選択および評価する手段を提供する。

【０１８０】

バイオマーカーの有用な組み合わせを同定するために、本発明の数学的モデルが、１つ以上の分類子を作製するために使用され、各分類子は、モデルへの入力のために使用されるトレーニング集団の軽度の変形性関節症を有する個体（第１の表現型サブグループ）と変形性関節症を有さない個体（第２の表現型サブグループ）の間を分けるために、特定のバイオマーカーの組み合わせの中の各バイオマーカーに代表的なデータを使用する。

【０１８１】

生成した分類子は、次に、５．５節において説明されるトレーニング集団の各個体を正確に呼び出す分類子の能力を決定することによって、５．９節において概説されるように評価または点数付けすることができる。生成した分類子はまた、「点数付け集団」の１つ以上の個体を正確に呼び出す分類子の能力を決定することによって、評価または点数付けすることができる。点数付け集団は、以下の５．５節に記載されるトレーニング集団と類似しているが、しかし、点数付け集団は、分類子を生成するために使用されない、１つ以上の個体を形成する。このようにして、点数付け集団は、軽度の変形性関節症を有するとすでに診断された個体（第１の表現型群）および変形性関節症を有さない個体（第２の表現型群）から構成される。１つの実施形態において、点数付け集団は、トレーニング集団において使用されない１つ以上のメンバーに加えて、トレーニング集団のメンバーを含む。ある実施形態において、５パーセント以下、１０パーセント以下、２０パーセント以下、３０パーセント以下、５０パーセント以下、または９０パーセント以下のトレーニング

集団のメンバーが、点数付け集団と共通である。

【０１８２】

当業者によって理解されるように、このことは、その表現型の特徴付けが未知である個体を適切に特徴付けする分類子の能力を予測することを可能にする。

【０１８３】

数学的モデルへの入力であるデータは、評価されるバイオマーカーの組み合わせの各バイオマーカーの産物の発現レベルに代表的である任意のデータであり得る。本発明の１つの実施形態において、表１におけるバイオマーカーの各々の可能な組み合わせが評価される。本発明の別の実施形態において、表１の２個、３個、４個、５個、１０個、２０個、３０個などまでの任意の可能な組み合わせが評価される。本発明の別の実施形態において、表１におけるバイオマーカーは、個々のｐ値に基づいて順位付けされ、ここで、ｐ値は、軽度の変形性関節症を有するメンバーと変形性関節症を有さないメンバーの間を区別する各バイオマーカーの能力を示し、次いで、上位の４０個、３０個、２０個、または１０個に順位付けされたバイオマーカーが評価される。本発明の別の実施形態において、表１および表２において見出されるバイオマーカーの各々の可能な組み合わせが評価され、そしてバイオマーカーの組み合わせが選択され、ここで、この組み合わせは、表１に列挙されるような少なくとも１つのバイオマーカーを含む。本発明の別の実施形態において、表１および表２において見出される２個、３個、４個、５個、１０個、２０個、３０個などのバイオマーカーの各々の可能な組み合わせが評価され、そしてバイオマーカーの組み合わせが選択され、ここで、この組み合わせは、表１に列挙されるような少なくとも１つのバイオマーカーを含む。本発明の別の実施形態において、表１および表２におけるバイオマーカーは、個々のｐ値に基づいて順位付けされ、ここで、ｐ値は、軽度の変形性関節症を有するメンバーと変形性関節症を有さないメンバーの間を個別に区別する各バイオマーカーの能力を示し、次いで、上位の４０個、３０個、２０個、または１０個に順位付けされたバイオマーカーが評価され、そしてバイオマーカーの組み合わせが選択され、ここで、この組み合わせは、表１に列挙されるような少なくとも１つのバイオマーカーを含む。本発明の別の実施形態において、表４におけるバイオマーカーの各々の可能な組み合わせが評価される。本発明の別の実施形態において、表４の２個、３個、４個、５個、１０個、２０個、３０個などまで任意の各々の可能な組み合わせが評価される。本発明の別の実施形態において、表１におけるバイオマーカーは、個々のｐ値に基づいて順位付けされ、ここでｐ値は、軽度の変形性関節症を有するメンバーと変形性関節症を有さないメンバーの間を区別する各バイオマーカーの能力を示し、次いで、上位の３０個、２０個、または１０個に順位付けされたバイオマーカーが評価される。本発明の別の実施形態において、表４および表２において見出されるバイオマーカーの各々の可能な組み合わせが評価され、そしてバイオマーカーの組み合わせが選択され、ここで、この組み合わせは、表４に列挙されるような少なくとも１つのバイオマーカーを含む。本発明の別の実施形態において、表４および表２において見出されるような２個、３個、４個、５個、１０個、２０個、３０個などのバイオマーカーの各々の可能な組み合わせが評価され、そしてバイオマーカーの組み合わせが選択され、ここで、この組み合わせは、表４に列挙されるような少なくとも１つのバイオマーカーを含む。本発明の別の実施形態において、表４および表２におけるバイオマーカーは、個々のｐ値に基づいて順位付けされ、ここで、ｐ値は、軽度の変形性関節症を有するメンバーと変形性関節症を有さないメンバーの間を個別に区別する各バイオマーカーの能力を示し、次いで、上位の４０個、３０個、２０個、または１０個に順位付けされたバイオマーカーが評価され、そしてバイオマーカーの組み合わせが選択され、ここで、この組み合わせは、表４に列挙されるような少なくとも１つのバイオマーカーを含む。本発明の１つの実施形態において、使用される数学的モデルは以下から選択される：回帰モデル、ロジスティック回帰モデル、ニューラルネットワーク、クラスター化モデル、主成分分析、最近傍分類子分析、線形判別分析、二次判別分析、サポートベクタマシン、決定木、遺伝的アルゴリズム、バギングを使用する分類子最適化、ブースティングを使用する分類子最適化、ランダム部分空間法を使用する分類子最適化、射影追跡、お

よび加重投票。

【０１８４】

得られる分類子は、上記試験個体が軽度の変形性関節症を有するか否かを決定するために、未知のまたは試験個体を診断するために使用することができる。１つの実施形態において、数学的モデル（例えば、ロジスティック回帰）によって生成される１つ以上の分類子から生じる診断は、２つの結果、軽度の変形性関節症を有するか、またはそれを有さない、の１つである。本発明のなお別の実施形態において、答えは、決定不可能という答えであり得る。各分類子はバイオマーカーの組み合わせを使用し、この分類子は各バイオマーカーの発現レベルを代表するデータを使用して生成されることに注目することは重要である。従って、例えば、数学的モデルがロジスティック表示である場合、得られる分類子は、重み付け因子と組み合わせて、１０個の遺伝子の各々の発現レベルを代表するデータを使用する。１つの実施形態において、分類子それ自体が、上記のように診断する際に有用である。しかし、別の実施形態において、同定された組み合わせ（例えば、１０個の遺伝子）は、遺伝子を同定した分類子とは独立して使用することができる。例えば、１０個の遺伝子から生じるプロフィールが試験個体を評価するためにモニターすることができ、ここで、試験個体のプロフィールは、軽度の変形性関節症を有する個体からの１０個の遺伝子のプロフィール、および変形性関節症を有さない個体からの１０個の遺伝子のプロフィールと比較される。

【０１８５】

５．５　軽度の変形性関節症の診断のためのバイオマーカーの組み合わせを同定するための数学的モデルへの入力のためのデータ

例えば、軽度の変形性関節症を有するか、または変形性関節症を有さない個体を診断する際に有用であるこれらのバイオマーカーを同定するために、表１、表２、および／または表４のバイオマーカーの１つ以上のｍＲＮＡの発現レベルを反映するデータが、軽度の変形性関節症を有する個体の集団、および変形性関節症を有さない個体の第２の集団（「トレーニング集団」）から使用される。トレーニング集団を、指定された表現型亜集団に特徴付けする目的のために、変形性関節症診断の任意の方法を使用することができる。好ましい実施形態において、本明細書に記載されるようなMarshallの選別方法が使用される。

【０１８６】

別の実施形態において、軽度の変形性関節症を有するか、または変形性関節症を有さないとして個体を診断する際に有用であるバイオマーカーの組み合わせを同定するために、トレーニング集団中の個体から、表３に記されるような表１のバイオマーカーの１つ以上のｍＲＮＡ産物の発現レベルを反映するデータが使用される。なお別の実施形態において、軽度の変形性関節症を有するか、または変形性関節症を有さないとして個体を診断する際に有用であるバイオマーカーの組み合わせを同定するために、トレーニング集団中の個体から、表５に記されるような表４のバイオマーカーの１つ以上のｍＲＮＡ産物の発現レベルを反映するデータが使用される。

【０１８７】

別の実施形態において、トレーニング集団中の個体から、表１、表２および／または表４のバイオマーカーの１つ以上のタンパク質産物の発現レベルを反映するデータが使用される。表１および表４のバイオマーカーのタンパク質産物の種は、それぞれ、表３および表５に記される。

【０１８８】

５．６　トレーニング集団

ある実施形態において、参照集団またはトレーニング集団は１０から３０例の被験体を含む。別の実施形態において、トレーニング集団は３０から５０例の被験体を含む。なお他の実施形態において、参照集団は、５０から１００例、１００から５００例、５００から１０００例、または１０００例より多くの被験体を各々含む２つ以上の集団を含む。

【０１８９】

例えば、軽度の変形性関節症を有するか、または変形性関節症を有さないとして個体を診断する際に有用であるバイオマーカーを同定するために、表１のバイオマーカーのｍＲＮＡ産物（例えば、表３に記されるもの）および／または表４のバイオマーカーのｍＲＮＡ産物（例えば、表５に記されるもの）の１つ以上の発現レベルを反映するデータは、第１の表現型サブグループ（軽度の変形性関節症を有する個体）、および第２の表現型サブグループ（変形性関節症を有さない個体）から構成されるトレーニング集団から使用される。ある実施形態において、表２のバイオマーカーの１つ以上のｍＲＮＡ産物の発現を反映するデータもまた利用される。１つの実施形態において、トレーニング集団の各表現型サブグループ中の他の表現型形質（年齢、性別、体脂肪指数、同時罹患状態、投薬など）の分布は、同じかまたは類似している。例えば、第１の表現型サブグループおよび第２の表現型サブグループ中の個体の年齢分布は、同じかまたは類似している。好ましい実施形態において、トレーニングセットにおいて使用される２つの集団の表現型特性は類似しているが、しかし変形性関節症を有するかまたは変形性関節症を有さないかについては類似していない。

【０１９０】

別の実施形態において、軽度の変形性関節症を有するか、または変形性関節症を有さないとして個体を診断する際に有用であるバイオマーカーの組み合わせを同定するために、任意に、表２におけるバイオマーカーの１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個、２０個、３０個、４０個またはすべてまでの任意の１つ以上とともに、表５に記されるように、表３および／または表４に記されるものを含む、表１のバイオマーカーのｍＲＮＡ産物の任意の１つ以上の発現レベルを反映するデータが使用される。

【０１９１】

別の実施形態において、軽度の変形性関節症を有するか、または変形性関節症を有さないとして個体を診断する際に有用であるバイオマーカーの組み合わせを同定するために、軽度の変形性関節症を有する個体の集団、および変形性関節症を有さない個体の第２の集団から得られる血液中で発現される表５に記されるようなものを含む、表３および／または表４に記されるものを含む、表１のバイオマーカーの任意の数またはすべてのＲＮＡ産物の任意の数またはすべての発現レベルを反映するデータが使用される。

【０１９２】

５．７　回帰分析

ある実施形態において、試験されるバイオマーカーの各々の組み合わせのための発現データは、回帰モデル、好ましくは、ロジスティック回帰モデルの中で使用される。このような回帰モデルは、試験されるバイオマーカーの各々の可能な組み合わせについての数式を決定し、各数式は、モデルによって提示される各個々のバイオマーカーの発現レベルを反映するデータによって乗算される係数を提供する。

【０１９３】

一般的に、関連の重回帰の数式は以下のように書くことができる：

$Y = \alpha + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \cdots + \beta_k X_k + \varepsilon$

ここで、従属変数Ｙは、第１の表現型形質（例えば、軽度の変形性関節症）の存在（Ｙがポジティブ）または非存在（Ｙがネガティブ）である。このモデルは、従属変数Ｙが、説明変数ｋ（トレーニング集団の中の第１の表現型サブグループおよび第２の表現型サブグループ中の被験体からのｋ個の選択遺伝子についての関連の組織中での遺伝子産物のレベルに代表的な測定値）、プラス種々の特定されていない除外された因子を包含する誤差項に依存することを述べている。上記に同定されるモデルにおいて、パラメーター$\beta_1$は、従属変数に対する第１の説明変数$X_1$の効果を測定し、他の説明変数は一定に保持する。同様に、$\beta_2$はＹに対する説明変数$X_2$の効果を測定し、残りの説明変数は一定に保持する。

【０１９４】

ロジスティック回帰モデルは、直線回帰の非線形変換である、ロジスティック変換モデルは、「ロジット（Ｌｏｇｉｔ）」モデルと呼ばれ、以下のように表現することができる

：
ｌｎ［ｐ／（１－ｐ）］＝α＋β$_{1}$Ｘ$_{1}$＋β$_{2}$Ｘ$_{2}$＋・・・β$_{k}$Ｘ$_{k}$＋εまたは
［ｐ／（１－ｐ）］＝ｅｘｐ$^{α}$ｅｘｐ$^{β1X1}$ｅｘｐ$^{β2X2}$×・・・×ｅｘｐ$^{βkXk}$ｅｘｐ$^{ε}$
ここで、
ｌｎは自然対数ｌｏｇ$^{ｅｘｐ}$、ここでｅｘｐ＝２．７１８２８・・・　であり、
ｐは事象Ｙが起こる確率、ｐ（Ｙ＝１）であり、
ｐ／（１－ｐ）は「オッズ比」であり、
ｌｎ［ｐ／（１－ｐ）］はログオッズ比、または「ロジット」であり、そして
モデルのすべての他の成分は、上記の一般的な回帰方程式と同じである。αおよびεについての項が同じ定数にまとめられ得ることが当業者によって認識される。確かに、好ましい実施形態において、単一の項がαおよびεを表すために使用される。「ロジスティック」分布は、Ｓ字型分布の関数である。ロジット分布は、見積もられる確率（ｐ）を０から１の間になるように制約する。

【０１９５】

本発明のある実施形態において、ロジスティック回帰モデルは、最尤推定値（ＭＬＥ）によってフィットされる。換言すると、係数（例えば、α，β$_{1}$，β$_{2}$，・・・）は、最尤によって決定される。尤度関数は、条件付き確率（例えば、Ｐ（Ｙ｜Ｘ）、Ｘを仮定したＹの確率）である。尤度関数（Ｌ）は、サンプルデータセットの中で起こる従属変数の値（Ｙ$_{1}$，Ｙ$_{2}$，．．．，Ｙ$_{n}$）の特定のセットを観察する確率を測定する。これは、従属変数の積の確率として書かれる：
Ｌ＝Ｐｒｏｂ（Ｙ$_{1}$＊Ｙ$_{2}$＊＊＊Ｙ$_{n}$）

【０１９６】

尤度関数が高いほど、サンプル中でＹを観察する確率が高くなる。ＭＬＥは、可能な限り大きな尤度関数（ＬＬ＜０）または可能な限り小さな尤度関数の－２倍ｌｏｇ（－２ＬＬ）を生じる係数（α，β$_{1}$，β$_{2}$，．．．）を見出すことを含む。ＭＬＥにおいて、パラメーターα，β$_{1}$，β$_{2}$，．．．のある初期の見積もりが作成される。次いで、これあのパラメーターの見積もりを与えるデータの尤度が計算される。これらのパラメーターの見積もりは改善され、データの尤度が再計算される。このプロセスは、パラメーターの見積もりが大きく変化しなくなるまで（例えば、確率における．０１または．００１未満の変化）、反復される。ロジスティック回帰の例およびロジスティック回帰モデルのフィッティングは、その全体が本明細書に援用される、Hastie, 統計学習の初歩（The Elements of Statistical Learning）, Springer, ニューヨーク, ２００１, pp. 95-100において見出される。

【０１９７】

５．８　ニューラルネットワーク

別の実施形態において、本発明のバイオマーカーの各々について測定される発現は、ニューラルネットワークをトレーニングために使用することができる。ニューラルネットワークは、２段階回帰または分類モデルである。ニューラルネットワークは、出力ユニットのレイヤーに重みのレイヤーによって接続された入力ユニットのレイヤー（およびバイアス）を含む、レイヤー構造を有する。回帰のために、出力単位のレイヤーは、典型的には、１つのみの出力ユニットを含む。しかし、ニューラルネットワークは、シームレス様式で複数の定量応答を扱うことができる。このようなニューラルネットワークは、２つより多くの集団の間を区別するバイオマーカーの同定を可能にするように適用することができる。１つの特定の例において、ニューラルネットワークは、変形性関節症を有さない任意の個体と比較した場合に、軽度の変形性関節症について特異的であるバイオマーカーの組み合わせを同定するために、表３に記されるものを含む表１におけるバイオマーカーの産物からの発現データを使用してトレーニングすることができる。結果として、トレーニングしたニューラルネットワークは、軽度の変形性関節症を診断するために有用であるバイオマーカーの組み合わせを直接的に同定するために使用することができる。ある実施形態

において、EasyNN-Plusバージョン4.0ｇソフトフェアパッケージ（Neural Planner Software Inc.）において見出される１０個のニューロンの単一の隠れレイヤー（１０個の隠れレイヤー）を含む、逆伝搬ニューラルネットワーク（例えば、Abdi，１９９４，「ニューラルネットワークプライマー（A neural network primer）」，J.Biol.System.2，247-283を参照）が使用される。

【０１９８】

ニューラルネットワークは、その全体が本明細書に援用されるDudaら、２００１，パターン識別（Pattern Classification），第２版，John Wiley & Sons,Inc.，ニューヨーク、およびHastieら、２００１，統計学習の初歩，Springer-Verlag，ニューヨークに記載されている。

【０１９９】

５．９　他の数学的モデル

上記のパターン分類および統計学的技術は、軽度の変形性関節症分類モデルを構築するために使用することができるモデル、例えば、以下の単なる例である：その全体が参照により本明細書に援用されるDudaとHart，パターン識別およびシーン解析（Pattern Classification and Scene Analysis），１９７３，John Wiley & Sons,Inc.，ニューヨークの211～256頁に記載されるようなクラスタリング、主成分分析（参照により本明細書に援用される、Jolliffe，１９８６，主成分分析（Principal Component Analysis），Springer，ニューヨークを参照）、最近傍分類子分析（例えば、Duda，パターン解析，第２版，２００１，John Wiley & Sons,Inc、およびHastie，２００１，統計学習の初歩，Springer，ニューヨークを参照）、線形判別分析（例えば、Duda，パターン解析，第２版，２００１，John Wiley & Sons,Inc.，およびHastie，２００１，統計学習の初歩，Springer，ニューヨーク、Venables & Ripley，１９９７，s-plusを用いる現代の応用統計学（Modern Applied Statistics with s-plus），Springer，ニューヨークを参照）、サポートベクタマシン（例えば、これらのすべてが参照により本明細書に援用される、CristianiniとShawe-Taylor，２０００，サポートベクタマシンへの序論（An Introduction to Support Vector Machines），Cambridge University Press，Cambridge、Boserら、１９９２，「最適マージン分類子のためのトレーニングアルゴリズム（A training algorithm for optimal margin classifiers）」,計算論的学習理論における第五年次ＡＣＭワークショップ紀要（Proceedings of the 5$^{th}$ Annual ACM Workshop on Computational Learning Theory），ACM Press，Pittsburgh，ペンシルバニア州，pp. 142-152、Vapnik，１９９８，統計学習理論（Statistical Learning Theory），Wiley，ニューヨークを参照）。

【０２００】

５．１０　分類子の評価

一旦、１つ以上の分類子が数学的モデルを使用して計算されると、分類子は、どの分類子が所望の目的のために有効であるかを決定するために評価することができる。例えば、各分類子は、軽度の変形性関節症を有するかまたは変形性関節症を有さないとしてトレーニング集団の各個体を適切に特徴付けするその能力について、評価および点数付けされる。例えば、標準的であり、開示されている標準的な統計学的手法を使用する相互検証、リーブアウト相互検証、ｎ－倍相互検証、ジャックナイフ分析を使用して、分類子を評価することができる。本明細書で使用される場合、分類子を評価するプロセスは「点数付け」と呼ばれる。ある実施形態において、ある実施形態において、点数付けはトレーニング集団を使用して行われる。他の実施形態において、点数付けは本明細書に記載されるような「点数付け集団」を使用して行われる。１つの実施形態において、点数付け集団には、トレーニング集団において使用されない１つ以上のメンバーに加えて、トレーニング集団のメンバーが含まれる。ある実施形態において、５パーセント未満、１０パーセント未満、２０パーセント未満、３０パーセント未満、５０パーセント未満、または９０パーセント未満のトレーニング集団のメンバーが点数付け集団に共通である。

【０２０１】

ある実施形態において、パーセント補正予測統計値が各分類子を点数付けするために使

用される「パーセント補正予測」統計値は、推定のｐが０．５以上である場合は事象が起こり、そうでなければ起こらないことを仮定する。これらの確率が０または１であることを仮定することによって、何パーセントのトレーニング集団が正確にサンプリングされたかを決定するために、トレーニング集団中のサンプルの値に対して、比較を行うことができる。

【０２０２】

１つの実施形態において、トレーニング集団の個々の個体を適切に特徴付けるその能力について分類子を評価するために使用される方法は、分類子の感度（ＴＰＦ、真の正の画分）および１－特異性（ＴＮＦ、真の負の画分）を評価する方法である。例えば、１つの実施形態において、受信者動作特性（「ＲＯＣ」）が利用される。ＲＯＣは、生成した方程式の診断結果の感度と特異性の両方を評価するためのいくつかのパラメーターを提供する。例えば、１つの実施形態において、ＲＯＣ面積（曲線下面積）が、方程式を評価するために使用される。好ましい実施形態において、０．５、０．６、０．７、０．８、０．９よりも大きなＲＯＣ面積が好ましい。他方、１．０の完全なＲＯＣ面積スコアは、１００％感度と１００％特異性の両方を有することを示す。

【０２０３】

関連分野における当業者によって理解されるように、曲線下面積は、ＲＯＣ曲線中に含まれる二次元情報を一次元情報に転換する。他の実施形態において、ＲＯＣ曲線の二次現態様からの情報が直接的に利用される。例えば、ＲＯＣ曲線はまた、分類子の感度および特異性に関する情報を提供する。ある実施形態において、分類子は、感度または特異性のいずれかに基づいて選択される。これは、重要な点数付け指標であり得る。例えば、高い特異性（すなわち、より少ない数の偽陰性）を有する診断分類子は、人を正常であると誤って診断することよりもむしろ、個体が疾患を有すると誤って診断することが安全である状況において重要である可能性がある。それゆえに、ある実施形態において、カットオフは感度または特異性のいずれかについて設定することができ、そして分類子は残りの変数に基づいて等級付けまたは点数付けすることができる。ある実施形態において、ＲＯＣ曲線は、データを生成するために、任意の公知の方法を使用して、各分類子について生成される。ある実施形態において、データは、マイクロアレイを使用して生成される。ある実施形態において、データは、定量ＲＴ－ＰＣＲを利用して生成される。

【０２０４】

ある実施形態において、分類子は、マルチカテゴリーロジットモデルによって特徴付けられた加重ロジスティック回帰モデルである。例えば、ある実施形態において、分類子は、２つより多くの異なる形質群の間を区別する。マルチカテゴリーロジットモデルを含むロジットモデルは、Agresti，カテゴリーデータ分析の序説（An Introduction to Categorical Data Analysis），John Wiley & Sons,Inc.，１９９６，ニューヨーク，７章および８章において記載され、これは参照により本明細書に援用される。表１０は、ロジット：

$$\ln[p/(1-p)] = \alpha + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \varepsilon$$

を使用する数学的モデルに適用される発現データに基づくＲＯＣ曲線を形成するために使用されるデータを例示する。

【表１０】

表 10: データセット44を使用するロジット $\ln[p/(1-p)]=\alpha+\beta_1 X_1+\beta_2 X_2+\varepsilon$ についての値

| ln[p/(1-p)] | 形質の存在/不在 |
|---|---|
| 0.98 | 存在 |
| 0.97 | 存在 |
| 0.95 | 存在 |
| 0.93 | 存在 |
| 0.91 | 不在 |
| 0.11 | 存在 |
| 0.07 | 不在 |
| 0.03 | 不在 |

【０２０５】

表１０における各行は、点数付け集団における異なる標本に対応する。左の列は、サンプリングされた分類子についてのロジットの結果を表す。表１０における標本は、左の列に列挙されたロジットスコアによって順位付けされる。右の列は、回帰方程式によって考慮される形質の存在の有無を詳述する。表１０はＲＯＣ曲線を計算するために使用することができ、ここでは、表１０における各行が、ＲＯＣ曲線のデータ点を計算するために閾値のカットオフ値と見なされる。次いで、ＲＯＣ曲線下の面積は、分類子の予測性質を評価するために計算することができる。

【０２０６】

５．１１　本明細書のバイオマーカーの産物

当業者によって理解されるように、軽度の変形性関節症と非変形性関節症との間で差動的に発現されるバイオマーカーの１つ以上の組み合わせの同定は、同定される組み合わせのバイオマーカー（遺伝子）の産物の発現を反映するデータを使用して、試験個体についての軽度の変形性関節症の診断を可能にする。

【０２０７】

本発明のバイオマーカーの各々の産物は、ＲＮＡとタンパク質の両方を含む。本発明のバイオマーカーのＲＮＡ産物は本発明のバイオマーカーの転写産物であり、ｈｎＲＮＡ、ｍＲＮＡ、およびｍＲＮＡの１つ以上のスプライシング変異体の集団を含む。本発明の実施するために、本発明のバイオマーカーのＲＮＡ産物の集団の１つ以上の測定は、診断の目的のために使用することができる。より特定には、軽度の変形性関節症と非変形性関節症との間で差動的に発現されるバイオマーカーのＲＮＡ産物の集団の測定が本発明に包含される。

【０２０８】

本発明の１つの実施形態において、測定される本発明のバイオマーカーのＲＮＡ産物は

、ｈｎＲＮＡ、ｍＲＮＡ、およびｍＲＮＡのすべてのスプライシング変異体を含むＲＮＡ産物の集団である。別の実施形態にいて、測定される本発明のバイオマーカーのＲＮＡ産物はｍＲＮＡの集団である。本発明の別の実施形態において、測定される本発明のバイオマーカーのＲＮＡ産物は、軟骨細胞または滑液の中で発現されるｍＲＮＡの集団である。本発明のなお別の実施形態において、測定される本発明のバイオマーカーのＲＮＡ産物は、ｍＲＮＡの１つ以上のスプライシング変異体の集団である。本発明のなお別の実施形態において、測定される本発明のバイオマーカーのＲＮＡ産物は、軟骨細胞または滑液の中で発現されるｍＲＮＡの１つ以上のスプライシング変異体の集団である。本発明のなお別の実施形態において、本発明のバイオマーカーのＲＮＡ産物は、表３および表５に列挙されるＲＮＡ産物である。

【０２０９】

本発明のバイオマーカーのタンパク質産物もまた本発明の範囲に含まれ、これは本発明のバイオマーカーから生じるタンパク質産物の全体の集団を含む。当業者によって理解されるように、本発明のバイオマーカーから生じるタンパク質の全体の集団には、タンパク質、タンパク質改変体、ｍＲＮＡスプライシング変異体から生じるタンパク質改変体、および翻訳後修飾されたタンパク質が含まれる。１つの実施形態において、本発明のバイオマーカーのタンパク質産物は、表１および表４に同定される遺伝子座リンク（遺伝子ＩＤ）に対応するすべてのタンパク質である。本発明の別の実施形態において、測定される本発明のバイオマーカーのタンパク質産物は、血液中で発現される、表１および表４における遺伝子座リンクに対応するタンパク質である。本発明のさらに別の実施形態において、本発明のバイオマーカーのタンパク質産物は、表３および表５に列挙される産物である。本発明を実施するために、本発明のバイオマーカーのタンパク質産物の１つ以上の集団の測定を、診断の目的のために使用することができる。より特定には、軽度の変形性関節症を有する個体と変形性関節症を有さない個体との間で差動的に発現されるバイオマーカーのタンパク質産物の手段の測定は、診断の目的のために有用であり、本発明に包含される。

【０２１０】

本発明の１つの実施形態において、測定される本発明のバイオマーカーのタンパク質産物は、本発明のバイオマーカーのＲＮＡ産物から翻訳されるタンパク質産物の全体の集団である。別の実施形態において、本発明のバイオマーカーのタンパク質産物は、血液および／または軟骨細胞および／または滑液の中で発現されたタンパク質産物である。本発明のなお別の実施形態において、本発明のバイオマーカーの任意の１つ以上のタンパク質産物は、ｍＲＮＡスプライシング変異体の任意の１つ以上から翻訳されたタンパク質産物の任意の１つ以上である。本発明のなお別の実施形態において、本発明のバイオマーカーのタンパク質産物は、血液および／または軟骨細胞および／または滑液の中で発現されたｍＲＮＡスプライシング変異体の任意の１つ以上から翻訳されたタンパク質産物の任意の１つ以上である。

【０２１１】

５．１２　軽度の変形性関節症を診断するために同定される組み合わせの使用

本明細書に記載されるように、試験されたバイオマーカーの組み合わせの各バイオマーカーの発現レベルに対応するデータを使用する数学的モデル（例えば、ロジスティック回帰モデル）の適用は、分類子を作成する。分類子は、試験されたバイオマーカーの組み合わせの各々のバイオマーカーに代表的なデータを、個体が軽度の変形性関節症を有するかまたは変形性関節症を有さないかの診断的決定に転換する。分類子は、軽度の変形性関節症を有するかまたは変形性関節症を有さないかのいずれかとして、試験集団および／または点数付け集団の中の個体を適切に呼び出す（すなわち、診断する）分類子の能力を決定するために、本明細書に記載される方法を使用して点数付けすることができる。分類子は、入力のための試験個体についてのデータを診断的決定を生じる分類子に提供することによって、軽度の変形性関節症を有するかまたは変形性関節症を有さないかとして個体を診断するために直接的に使用することができる。例えば、分類子がロジスティック回帰を使

用して作成される場合、分類子は以下のような型をとる：
$Y = \alpha + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \cdots + \beta_k X_k + \varepsilon$
ここで、この式のＸ１，Ｘ２，．．．Ｘｋは、関連の組織中での遺伝子産物のレベルに代表的な測定値を表し、ｋは分類子を生成するために使用される組み合わせのバイオマーカーを選択する。従って、試験個体を診断するために、この式の各バイオマーカーについての測定値は入力であり、Ｙの値は上記試験個体の診断を決定する。

【０２１２】

同定された組み合わせはまた、分類子とは独立して使用することができる。例えば、３個のバイオマーカーを使用する分類子が選択される場合（例えば、高い感度および高い特異性を示す０．９のＲＯＣ曲線下面積スコアを有する）、試験個体における３個のバイオマーカーの各々についての産物の豊富さを測定することができ、そして試験個体の発現のパターンが、軽度の変形性関節症を有する対照または変形性関節症を有さない対照とより類似しているか否かを決定するために、３個のバイオマーカーの各々の豊富さの測定を、軽度の変形性関節症を有する個体の対照集団からの１つ以上の個体と、および／または変形性関節症を有さない個体の対照集団からの１つ以上の個体と比較することができる。好ましい実施形態において、個体を診断するために、例えば、分類子への入力のための、試験個体中で同定された組み合わせのバイオマーカーのＲＮＡおよび／またはタンパク質の生成物の発現レベルの測定によって、生成した分類子を使用する。１つの実施形態において、試験個体を診断するために使用するのと同じ方法が、数学的モデルを生成するために使用される発現データを生成するために使用される。

【０２１３】

５．１３　変形性関節症の回帰をモニターするために同定される組み合わせの使用

本発明は、軽度の変形性関節症または変形性関節症を有さないとして個体を診断する目的のための組み合わせについてのバイオマーカーおよび分類子の有用な組み合わせを同定する能力を教示する。軽度の変形性関節症または非変形性関節症について診断する組み合わせおよび分類子もまた、例えば、治療に応答して、それらの変形性関節症の重症度に関して、個体が進行したかまたは後退したかを決定する際に有用であることが当業者によって理解される。例えば、個体は、同定された組み合わせの１つ以上を使用する治療の前に軽度の変形性関節症を有すると診断することができる。治療に続いて、個体は、上記個体がなお軽度の変形性関節症を有しているか否かを決定するために再度試験することができる。個体が治療の前の段階であると、もはや同定することができない事象において、このことはそれ自体、治療が有効であることを示唆し得る。加えて、治療は、個体が今や変形性関節症を有さないと診断されるように、変形性関節症の段階の抗体に導き得る。このようにして、変形性関節症の段階を診断することに対して特異的であると同定された組み合わせの１つ以上は、治療に応答した変形性関節症の後退をモニターするために有用である。

【０２１４】

５．１４　本発明のバイオマーカーの産物を測定するために使用されるポリヌクレオチド

本発明のバイオマーカーのＲＮＡ産物の発現を測定する手段として、本発明のサンプル中でＲＮＡ発現を測定するための１つ以上の方法と組み合わせて、当業者によって理解されるような以下のものの１つ以上を使用することができる：ｃＤＮＡ、ＤＮＡ、ＲＮＡ、ＰＣＲ産物、合成ＤＮＡ、合成ＲＮＡ、または本発明のバイオマーカーのＲＮＡ産物の１つ以上に特異的にハイブリダイズする自然発生した修飾ヌクレオチドの他の組み合わせ。別の特定の実施形態において、オリゴヌクレオチド、ｃＤＮＡ、ＤＮＡ、ＲＮＡ、ＰＣＲ産物、合成ＤＮＡ、合成ＲＮＡ、または本発明のバイオマーカーのＲＮＡ産物の１つ以上に選択的にハイブリダイズする自然発生した修飾オリゴヌクレオチドの他の組み合わせが使用される。好ましい実施形態において、オリゴヌクレオチド、ｃＤＮＡ、ＤＮＡ、ＲＮＡ、ＰＣＲ産物、合成ＤＮＡ、合成ＲＮＡ、または本発明のバイオマーカーのＲＮＡ産物の１つ以上に特異的と選択的の両方でハイブリダイズする自然発生した修飾ヌクレオチドオリゴヌクレオチドの他の組み合わせが使用される。

【０２１５】

５．１５　本発明のバイオマーカーのＲＮＡ産物を測定するための技術

アレイハイブリダイゼーション

本発明の１つの実施形態において、本発明のＲＮＡ産物を測定するために使用されるポリヌクレオチドは、本発明の１つの態様に従うアレイを含むために、支持体に安定して結合された核酸メンバーとして使用することができる。核酸メンバーの長さは、８～１０００ヌクレオチドの長さの範囲であり得、本発明のバイオマーカーのＲＮＡ産物に特異的であるように選択される。１つの実施形態において、これらのメンバーは、本発明のバイオマーカーのＲＮＡ産物について特異的および／または選択的である。なお別の実施形態において、これらのメンバーは、本発明のバイオマーカーのｍＲＮＡ産物について特異的および／または選択的である。好ましい実施形態において、これらのメンバーは、本発明のバイオマーカーのｍＲＮＡ産物のすべての改変体について特異的および／または選択的である。なお別の好ましい実施形態において、これらのメンバーは、本発明のバイオマーカーのｍＲＮＡ産物の１つ以上の改変体について特異的および／または選択的である。核酸は一本鎖および／もしくは二本鎖であってもよく、ならびに／またはオリゴヌクレオチドもしくはｃＤＮＡから増幅されたＰＣＲフラグメントであってもよい。好ましくは、オリゴヌクレオチドは、約２０～３０ヌクレオチドの長さである。ＥＳＴは、好ましくは、１００～６００ヌクレオチドの長さである。本発明のバイオマーカーの発現された領域の一部を、アレイ上のプローブとして利用できることが当業者によって理解される。より特定には、本発明の遺伝子および／または本発明の遺伝子から導き出されたｃＤＮＡもしくはＥＳＴに相補的であるオリゴヌクレオチドが有用である。本発明のある実施形態において、本発明のバイオマーカーのＲＮＡ産物に特異的および／または選択的にハイブリダイズすることが可能であるポリヌクレオチドは、本発明における使用のためにアレイにスポットすることができる。オリゴヌクレオチドベースのアレイのために、プローブとして有用である関連の遺伝子に対応するオリゴヌクレオチドの選択は、当該分野において十分に理解されている。より特定には、標的核酸へのハイブリダイズを可能にする領域を選択することが重要である。オリゴヌクレオチドのＴｍ、ＣＧ含量パーセント、二次構造の程度および核酸の長さなどの因子は重要な因子である。例えば、米国特許第６，５５１，７８４号を参照のこと。１つの実施形態において、アレイは、表３および／または表５に記される特異的転写物を含む、表１および／または表４に開示されるような本発明のバイオマーカーの各々の産物の１つ以上にハイブリダイズ可能である、１０～１０００のヌクレオチド配列からなる。

【０２１６】

本発明のアレイとハイブリダイズされ、かつこれを用いて分析される標的核酸サンプルは、好ましくは、ヒトの軟骨、血液または滑液に由来する。この手順の限界は、標的核酸サンプルとしての使用のために利用可能なＲＮＡの量にある。好ましくは、少なくとも１マイクログラムの総ＲＮＡが、本発明に従う使用のために得られる。より少ない量のＲＮＡは、ＰＣＲおよびｍＲＮＡ亜種（例えば、ポリＴオリゴヌクレオチド）に指向されるプライマーと組み合わせて使用することができる。

【０２１７】

核酸アレイの構築

対象の方法において、支持体の表面と安定に結合した核酸メンバーのアレイは、アレイ上の固有な位置における１つ以上の相補的核酸メンバーが標的核酸に特異的にハイブリダイズする、相補的核酸メンバー／標的複合体のハイブリダイゼーションパターンを生じるために十分なハイブリダイゼーション条件下で、標的核酸を含むサンプルと接触される。ハイブリダイズする標的核酸の同一性は、アレイ上の核酸メンバーの位置を参照して決定することができる。

【０２１８】

核酸メンバーは、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）および逆転写（ＲＴ）などの確立された技術を用いて製造されてもよい。これらの方法は、現在当該分野において公知である

ものと同様である（例えば、ＰＣＲ戦略（PCR Strategies），Michael A. Innis（編集）ら、（１９９５）および　ＰＣＲ：バイオ技術への序論シリーズ（Introduction to Biotechniques Series），C.R.Newton, A.Graham（１９９７）を参照）。増幅された核酸は、当該分野において周知である方法（例えば、カラム精製またはアルコール沈殿）によって精製される。核酸は、プライマーおよび所望の核酸の合成の間に生じる不完全な産物を実質的に含まないように単離された場合に純粋であると見なされる。好ましくは、精製された核酸はまた、分子の特異的結合活性を阻害するか、でなければマスクする可能性がある交雑物を実質的に含まない。

【０２１９】

アレイは、本発明の１つの態様に従って、２０種の異なる核酸／ｃｍ$^2$を超える密度で、支持体の１つの表面に結合した複数の核酸を含み、ここで、各々の核酸は、同一ではないあらかじめ選択された領域（例えば、マイクロアレイ）において、支持体の表面に結合される。アレイ上の各結合したサンプルは、以下により詳細に説明されるように、既知の同一性の、通常は既知の配列の核酸組成物を含む。任意の想定し得る基剤が本発明において利用されてもよい。

【０２２０】

１つの実施形態において、基剤の表面に結合される核酸はＤＮＡである。好ましい実施形態において、基剤の表面に結合される核酸はｃＤＮＡまたはＲＮＡである。別の好ましい実施形態において、基剤の表面に結合される核酸は、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）によって合成されたｃＤＮＡである。好ましくは、アレイ中の核酸メンバーは、本発明に従って、少なくとも１０、２５または５０ヌクレオチドの長さである。１つの実施形態において、核酸メンバーは少なくとも１５０ヌクレオチドの長さである。好ましくは、核酸メンバーは少なくとも１０００ヌクレオチドの長さである。より好ましくは、核酸メンバーは５００ヌクレオチド未満の長さである。

【０２２１】

本発明のアレイにおいて、核酸組成物は、支持体の表面と安定に結合しており、ここで、この支持体は、柔軟なまたは強固な固体支持体であり得る。「安定に結合する」とは、ハイブリダイゼーションおよび洗浄の条件下で、各核酸メンバーが固体支持体に対して固有な位置を維持することを意味する。このようにして、サンプルは、非共有結合的にまたは共有結合的に、支持体表面と安定に結合される。非共有結合的結合の例には、非特異的吸着、静電的相互作用に基づく結合（例えば、イオン対相互作用）、疎水性相互作用、水素結合相互作用、支持体表面に共有結合した特異的結合対メンバーを通しての特異的結合などが含まれる。共有結合の例には、強固な支持体の表面上に存在する核酸と官能基（例えば、－－ＯＨ）との間に形成する共有結合が含まれ、ここで、この官能基は、以下により詳細に説明されるように、天然型か、または導入された連結基のメンバーとして存在してもよい。

【０２２２】

各組成物中に存在する核酸の量は、アレイが利用されるアッセイの間に、標的核酸配列の十分なハイブリダイゼーションおよび検出を提供するために十分である。一般的に、アレイの固体支持体と安定に結合した各核酸メンバーの量は、少なくとも約０．００１ｎｇ、好ましくは少なくとも約０．０２ｎｇ、およびより好ましくは少なくとも約０．０５ｎｇであり、ここで、この量は、１０００ｎｇ以上まで高くてもよいが、通常は約２０ｎｇを超えない。好ましくは、統計学的に有意な結果を保証するために、単一の遺伝子に対応する複数のサンプルがアレイ上にスポットされる。核酸メンバーが、全体としては円形の寸法を含むスポットで固体支持体に「スポットされる」場合、「スポット」の直径は、一般的に約１０～５，０００μｍ、通常は約２０～２，０００μｍ、およびより通常は約１００～２００μｍの範囲である。

【０２２３】

対照核酸メンバーは、ゲノムＤＮＡ、ハウスキーピング遺伝子、ベクター配列、植物核酸配列、陰性対照遺伝子および陽性対照遺伝子などに対応するオリゴヌクレオチドまたは

核酸を含む核酸メンバーを含有するアレイ上に存在してもよい。対照核酸メンバーは、較正遺伝子または対照遺伝子であり、その機能は、関連の特定の「キー」遺伝子が発現されるか否かを示すことではなく、むしろ、発現のバックグラウンドまたはベースのレベルなど、他の有用な情報を提供することである。

【０２２４】

他の対照核酸はアレイ上にスポットされ、標的発現制御核酸およびミスマッチ制御核酸として使用され、プローブが指向されている標的以外のサンプル中の核酸への非特異的結合または交差ハイブリダイゼーションをモニターする。従って、ミスマッチプローブは、ハイブリダイゼーションが特異的であるか否かを示す。例えば、標的が存在する場合、完全にマッチしたプローブは、ミスマッチプローブよりも、一貫してより明るいはずである。加えて、すべての対照ミスマッチが存在する場合、ミスマッチプローブは変異を検出するために使用される。

【０２２５】

基材

アレイは、本発明に従って、アレイが利用されるアッセイ条件下で、特に、高スループット取り扱い条件下で、物理的な支持および構造をその上に存在する結合した核酸に提供するために十分な基材から構成される。

【０２２６】

基材は、生物製剤、非生物製剤、有機物質、無機物質、またはこれらの任意の組み合わせであってもよく、粒子、ストランド、沈殿、ゲル、シート、チュービング、球体、ビーズ、容器、キャピラリー、パッド、スライス、フィルム、プレート、スライド、チップなどとして存在する。基材は、円盤、正方形、球状、円形などの任意の便利な形状を有してもよい。基材は、好ましくは、平らであるかまたは平面であるが、しかし種々の代替的な表面配置を取ってもよい。基材は、重合Langmuir Blodgettフィルム、官能基化ガラス、Ｓｉ、Ｇｅ、ＧａＡｓ、ＧａＰ、$SiO_2$、$SIN_4$、修飾ケイ素、または広範な種々のゲルもしくはポリマーの任意の１つ、例えば、（ポリ）テトラフルオロエチレン、（ポリ）ビニリデンジフルオリド、ポリスチレン、ポリカーボネート、またはこれらの組み合わせであってもよい。他の基材材料は、本開示の再検討に際して、当業者に容易に明らかである。

【０２２７】

好ましい実施形態において、基材は、板ガラスまたは単結晶シリコンである。ある実施形態に従って、基材の表面は、所望の表面特性を提供するために周知の技術を用いてエッチングされる。例えば、深い溝、ｖ－溝、メサ構造などの形成によって、合成領域は、衝突する光の焦点の中により密接して配置され、蛍光源からの光の収集の最大化のために反射性の「ミラー」構造を提供される、などであってもよい。

【０２２８】

基材上の表面は、通常、基材と同じ材料から構成されるが、常にそうであるわけではない。代替的には、表面は、広範な種々の任意の材料、例えば、ポリマー、プラスチック、樹脂、ポリサッカリド、シリカ、またはシリカベースの材料、炭素、金属、無機ガラス、メンブレン、または上記に列挙した基材材料のいずれかから構成されてもよい。ある実施形態において、表面は、基材の表面に堅く結合したケージ化結合メンバーの使用を提供してもよい。好ましくは、表面は、カルボキシル、アミノ、ヒドロキシルなどの反応基を含む。最も好ましくは、表面は光学的に透明であり、例えばシリカ表面に見出されるような表面Ｓｉ－ＯＨ官能基を有する。

【０２２９】

基材の表面は、好ましくは、リンカー分子のレイヤーを提供されるが、リンカー分子は、本発明の必要な要素ではないことが理解される。リンカー分子は、好ましくは、本発明の核酸を許容するために十分な長さであり、基材上にあって、他の核酸分子にハイブリダイズし、そして基材に曝露された分子と自由に相互作用する。

【０２３０】

しばしば、基材は、ケイ素またはガラス表面、（ポリ）テトラフルオロエチレン、（ポリ）ビニリデンジフルオリド、ポリスチレン、ポリカーボネート、電荷を有するメンブレン、例えば、ナイロン６６またはニトロセルロース、またはこれらの組み合わせである。好ましい実施形態において、支持体はガラスである。好ましくは、少なくとも１つの基材の表面は実質的に平らである。好ましくは、支持体の表面は、カルボキシル、アミノ、ヒドロキシル、チオールなどを含むがこれらに限定されない反応基を含む。１つの実施形態において、表面は光学的に透明である。好ましい実施形態において、基材は、ポリリジンコートされたスライドまたはガンマアミノプロピルシランコートされたCorning Microarray Technology－ＧＡＰＳもしくはＣＭＴ－ＧＡＰ２コートされたスライドである。

【０２３１】

核酸メンバーが結合された任意の支持体を本発明において使用することができる。適切な支持体材料の例には、ガラスおよびシリカゲルなどのケイ酸、セルロースおよびニトロセルロースペーパー、ナイロン、ポリスチレン、ポリメタクリレート、ラテックス、ラバー、およびテフロン（登録商標）などのフルオロカーボン樹脂が含まれるがこれらに限定されない。

【０２３２】

支持体材料は、スライドおよびビーズを含むがこれらに限定されない、種々の形状で使用されてもよい。スライドは、いくつかの機能的な利点を提供し、従って、好ましい支持体の型である。それらの平らな表面に起因して、プローブおよびハイブリダイゼーション試薬は、ガラススライドを使用して最小化される。スライドはまた、試薬の標的化された適用を可能にし、一定の温度に保持することが容易であり、支持体に固定化されたＲＮＡおよび／またはＤＮＡの直接的な可視化を容易にする。支持体に固定化されたＲＮＡおよび／またはＤＮＡの除去もまた、スライドを使用して容易にされる。

【０２３３】

支持体として選択される特定の材料は、それが記載される機能を提供する限り、本発明に必須ではない。通常、本発明を行うかまたは使用する人は、コストおよび利用性の経済性、最終産物の予測される適用要件、ならびに全体の製造プロセスの要求に基づいて、最良の市販の材料を選択する。

【０２３４】

スポッティング方法

１つの態様において、本発明は、アレイを含む核酸メンバーが支持体にスポットされるアレイを提供する。

【０２３５】

好ましくは、スポッティングは以下のように実行される。変形性関節症、胎児、または正常の軟骨ｃＤＮＡライブラリーからのＰＣＲ産物（～４０μｌ）のｃＤＮＡクローンを、増幅のために使用したのと同じ９６ウェルチューブ中で、３M酢酸ナトリウム（ｐＨ５．２）および１００μｌ（２．５容量）のエタノールを用いて沈殿させ、－２０℃で一晩保存する。次いで、これらを、３，３００ｒｐｍ、１時間、４℃にて遠心分離する。得られるペレットを５０μｌ氷冷７０％エタノールで洗浄し、再度３０分間遠心分離する。次いで、ペレットを空気乾燥し、２０μｌ　３×ＳＳＣまたは５０％ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）に一晩十分に再懸濁する。次いで、サンプルを、ロボットＧＭＳ　４１７または４２７アレイヤー（Affymetrix，カリフォルニア州）を使用して、単一または二連のいずれかでスポットする。

【０２３６】

マイクロアレイ上のスポットの境界は、ダイアモンドスクライバーを用いてマークしてもよい（スポットは処理後に見えなくなる）。アレイは、粒子を含まない温かいｄｄＨ$_2$Ｏのディッシュの上にスライドを１分間浮かせることによって再水和し（スポットはわずかに膨潤するが互いに混ざることはない）、７０～８０℃の逆さにしたヒーティングブロック上で３秒間、瞬間的に乾燥させる。次いで、核酸をスライドにＵＶ架橋させ（Stratagene，Stratalinker，６５ｍＪ－６５０×１００ｕＪである「６５０」にディスプレイを

設定）、またはアレイはハイブリダイゼーションの前２～４時間、８０℃でベーキングする。アレイはスライドラックに配置する。空のスライドチャンバーを準備し、以下の溶液で満たす：３．０グラムの無水コハク酸（Aldrich）を１８９ｍｌの１－メチル－２－ピロリドン（試薬の迅速な添加が決定的に重要である）に溶解する、無水コハク酸の最後のフレークが溶解した直後に、２１．０ｍｌの０．２Ｍホウ酸ナトリウムを混合し、溶液をスライドチャンバーに注ぐ。スライドラックを迅速かつ均一にスライドチャンバーに突っ込み、数秒間激しく上下に振盪し、スライドと溶液が離れていないことを確実にし、次いで、１５～２０分間、軌道シェーカー上で混合する。次いで、スライドラックを、２分間、９５℃ｄｄＨ$_2$Ｏに穏やかに突っ込み、続いて、９５％エタノールに５回突っ込む。次いで、過剰のエタノールをペーパータオルに滴下させることによって、スライドを空気乾燥させる。アレイは使用するまで室温にてスライドボックスに保存する。

【０２３７】

多数の方法が、本発明の核酸メンバーの基材への結合（「スポッティング」と呼ばれるプロセス）のために使用されてもよい。例えば、核酸は、例えば、ポリマー結合の方法を教示するための米国特許第５，８０７，５２２号の技術を用いて結合され、これは参照により本明細書に援用される。

【０２３８】

代替的には、スポッティングは、当該分野において公知であるように、密着焼付け技術を用いて実行することができる。

【０２３９】

マイクロアレイの使用

本発明に従う核酸アレイは、１つ以上の標的核酸配列を含むサンプル中の多数の核酸をアッセイすることができる高スループット技術において使用することができる。本発明のアレイは、遺伝子発現分析、変形性関節症の診断および変形性関節症の予後診断、治療に対する患者の応答をモニターすること、薬剤スクリーニングなどを含む種々の適用における使用を見出す。

【０２４０】

アレイはまた、薬剤の発見および研究、例えば、本発明の遺伝子の発現パターンに対する特定の遺伝子の効果のための広範なスケールのスクリーニングにおいて有用であり、ここで、このような情報は、薬剤の有効性および毒性、環境モニタリング、疾患研究などを明らかにするために使用される。

【０２４１】

アレイは、軽度の変形性関節症を診断する手段として、または治療の有効性をモニターする目的のために、これらの配列の少なくとも１つ、より好ましくはこれらの配列の組み合わせを使用して作製することができる。

【０２４２】

標準的なサンプルの選択は当業者によって十分に理解され、１つ以上の正常個体から単離されたＲＮＡに相補的なサンプルを含み、ここで、正常個体は変形性関節症に罹患していない個体である。治療の有効性をモニターし、または軽度の変形性関節症を含む段階特異的な変形性関節症を同定する場合、対照は、種々の程度の変形性関節症に罹患している人、および／または治療に応答している人からのサンプルを含むことが当業者によって理解される。標準サンプルはまた、軟骨から、血液から、または滑液から単離されたＲＮＡに相補的なサンプルを含む。

【０２４３】

標的の調製

本発明に従うアレイのための標的は、好ましくは、ヒトの軟骨、血液、または滑液に由来する。

【０２４４】

標的核酸は、１つ以上の型の化学結合、通常は、相補的塩基対形成を通して、通常は水素結合形成を通して、核酸プローブまたは相補的配列の核酸メンバーに結合可能である。

【０２４５】
本明細書で使用される場合、「ｍＲＮＡ転写物に由来する核酸」または「ｍＲＮＡに対応する核酸」とは、ｍＲＮＡ転写物またはそのサブ配列の合成が最終的にそのための鋳型として働いている核酸をいう。従って、ｍＲＮＡから逆転写されたｃＤＮＡ、ｃＤＮＡから転写されたＲＮＡ、ｃＤＮＡから増幅されたＤＮＡ、増幅したＤＮＡから転写されたＲＮＡなどは、すべてｍＲＮＡ転写物から誘導され、またはｍＲＮＡ転写物に対応し、このような誘導された産物または対応する産物の検出は、サンプル中のもともとの転写物の存在および／または非存在を示すか、またはそれに比例する。従って、適切な標的核酸サンプルには、遺伝子のｍＲＮＡ転写物、ｍＲＮＡから逆転写されたｃＤＮＡ、ｃＤＮＡから転写されたｃＲＮＡ、遺伝子から増幅されたＤＮＡ、増幅されたＤＮＡから転写されたＲＮＡなどが含まれるがこれらに限定されない。本発明で使用される核酸標的は、好ましくは、ヒトの軟骨、血液、または滑液に由来する。好ましくは、標的は、ヒトの軟骨、血液、または滑液の抽出物に由来する核酸である。核酸は、当該分野において公知の方法、例えば、逆転写またはＰＣＲを使用して、ヒトの軟骨、血液、または滑液のｍＲＮＡ抽出物から合成された一本鎖または二本鎖のＤＮＡ、ＲＮＡ、またはＤＮＡ－ＲＮＡハイブリッドであり得る。

【０２４６】
最も単純な実施形態において、このような核酸標的は、軟骨、血液、または滑液のサンプルから単離されたｍＲＮＡ（例えば、ｃＤＮＡ）に対応する総ｍＲＮＡまたは核酸のサンプルを含む。別の実施形態において、総ｍＲＮＡは、例えば、酸グアニジウム－フェノール－クロロホルム抽出法を使用して所定のサンプルから単離され、ポリＡ＋ｍＲＮＡは、オリゴｄＴカラムクロマトグラフィーまたは（ｄＴ）ｎ磁気ビーズを使用することによって単離される（例えば、Sambrookら、「分子クローニング：実験室マニュアル」（第２版），１－３巻、Cold Spring Harbor Laboratory，（１９８９）、または分子生物学の現在のプロトコル、F.Ausubelら編 Greene Publishing and Wiley-Interscience，ニューヨーク（１９８７）を参照）。好ましい実施形態において、総ＲＮＡは、TRIzol（登録商標）試薬（GIBCO/BRL，Invitrogen Life Technologies，カタログ番号１５５９６）を使用して抽出される。ＲＮＡの純度および完全性は、２６０／２８０ｎｍの吸収によって、およびアガロースゲル電気泳動、その後の紫外光下での検査によって評価される。

【０２４７】
ある実施形態において、例えば、滑液が使用される場合に、ハイブリダイゼーションの前に標的核酸サンプルを増幅することが所望される。当業者は、どの増幅方法を使用するかに関わらず、定量な結果が所望される場合には、増幅された核酸の相対的な頻度を維持または制御する方法を使用するための配慮がなされなくてはならないことを認識する。「定量」増幅の方法は当業者に周知である。例えば、定量ＰＣＲは、同じプライマーを使用する既知量の対照配列の同時増幅を含む。このことは、ＰＣＲ反応を較正するために使用されてもよい内部基準を提供する。次いで、高密度アレイは、増幅された核酸の定量のための内部基準に特異的なプローブを含んでもよい。定量ＰＣＲのための詳細なプロトコルは、「ＰＣＲプロトコル、方法および応用のガイド」、Innisら、Academic Press,Inc.ニューヨーク，（１９９０）に提供されている。

【０２４８】
他の適切な増幅方法には、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）（Innisら、「ＰＣＲプロトコル、方法および応用のガイド」，Academic Press,Inc. San Diego,（１９９０））、リガーゼ連鎖反応（ＬＣＲ）（WuおよびWallace，１９８９，Genomics,4: 560、Landegrenら、１９８８，Science，241: 1077およびBarringerら、１９９０，Gene，89: 117を参照）、転写増幅（Kwohら、１９８９，Proc.Natl.Acad.Set USA，86: 1173）、および自律的（self-sustained）配列複製（Guatelliら、１９９０，Proc.Nat.Acad.ScL USA，87: １８７４）が含まれるがこれらに限定されない。

【０２４９】
特に好ましい実施形態において、標的核酸サンプルのｍＲＮＡは、逆転写酵素、ならび

にオリゴｄＴおよびファージＴ７プロモーターをコードする配列からなるプライマーを用いて逆転写され、一本鎖ＤＮＡ鋳型を提供する。第２のＤＮＡ鎖は、ＤＮＡポリメラーゼを使用して重合される。二本鎖ＤＮＡの合成後、Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼが加えられ、ＲＮＡはｃＤＮＡ鋳型から転写される。各単独のｃＤＮＡ鋳型からの転写の逐次的なラウンドは、増幅ＲＮＡを生じる。ｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写の方法は当業者に周知であり（例えば、Sambrook、前出を参照）、この特定の方法は、Van Gelderら、１９９０，Proc.Natl.Acad.Sci.USA，87: 1663-1667によって詳細に記載されており、彼らは、この方法に従うｉｎ　ｖｉｔｒｏ増幅が、種々のＲＮＡ転写物の相対的な頻度を保存することを実証している。さらに、Eberwineら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA，89: 3010-3014は、もともとの出発物質の$10^6$倍の増幅よりも多くを達成するために、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写を介する２ラウンドの増幅を使用し、それによって、生物学的サンプルが制限されている場合でさえ、発現のモニタリングを可能にするプロトコルを提供する。

【０２５０】

標的または核酸プローブの標識

標的またはプローブのいずれかを標識することができる。

【０２５１】

分子に結合されるか、または分子に取り込まれる任意の分析的に検出可能なマーカーが、本発明において使用されてもよい。分析的に検出可能なマーカーとは、分析的に検出および定量される任意の分子、部分、または原子をいう。

【０２５２】

本発明における使用のために適切な検出可能な標識には、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、電気的、光学的、または化学的な手段による、検出可能な任意の組成物が含まれる。本発明における有用な標識には、標識されたストレプトアビジン結合体を用いる染色のためのビオチン、磁気ビーズ（例えば、Dynabeads（商標））、蛍光色素（例えば、フルオレセイン、テキサスレッド、ローダミン、グリーン蛍光タンパク質など）、放射性標識（例えば、$^{3}$Ｈ、$^{125}$Ｉ、３５Ｓ、$^{14}$Ｃ、または$^{32}$Ｐ）、酵素（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、およびＥＬＩＳＡにおいて一般的に使用される他の酵素）、およびコロイド金または着色ガラスもしくはプラスチック（例えば、ポリスチレン、ポリプロピレン、ラテックスなど）のビーズなどの比色分析用ビーズが含まれる。このような標識の使用を教示する特許には、米国特許第３，８１７，８３７号、同第３，８５０，７５２号、同第３，９３９，３５０号、同第３，９９６，３４５号、同第４，２７７，４３７号、同第４，２７５，１４９号、および同第４，３６６，２４１号が含まれ、その全体は参照により本明細書に援用される。

【０２５３】

このような標識を検出する手段は当業者に周知である。従って、例えば、放射性標識は、写真フィルムまたはシンチレーションカウンターを使用して検出されてもよく、蛍光マーカーは放射光を検出するための光検出器を使用して検出されてもよい。酵素標識は、典型的には、基質とともに酵素を提供すること、および基質に対する酵素の作用によって生じる反応生成物を検出することによって検出され、比色分析標識は、着色した標識を単に可視化することによって検出される。

【０２５４】

標識は、当業者に周知である多数の手段のいずれかによって組み込まれてもよい。しかし、好ましい実施形態において、標識は、サンプル核酸の調製における増幅段階において同時に組み込まれる。従って、例えば、標識プライマーまたは標識ヌクレオチドを用いるポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）は、標識された増幅産物を提供する。好ましい実施形態において、上記のような転写増幅は、標識ヌクレオチド（例えば、フルオレセイン標識ＵＴＰおよび／またはＣＴＰ）を使用して、転写された核酸に標識を組み込む。

【０２５５】

代替的には、標識は、もともとの核酸サンプル（例えば、ｍＲＮＡ、ポリＡ　ｍＲＮＡ、ｃＤＮＡなど）に、または増幅が完了した後で増幅産物に直接的に加えられてもよい。

核酸に標識を結合させる手段は当業者に周知であり、これには例えば、ニックトランスレーション、または核酸のキナーゼ処理、続いてサンプル核酸を標識（例えば、蛍光色素分子）に結合する核酸リンカーの結合（ライゲーション）による末端標識（例えば、標識ＲＮＡを用いる）が含まれる。

【０２５６】

好ましい実施形態において、蛍光修飾は、シアニン色素、例えば、Ｃｙ－３／Ｃｙ－５ ｄＵＴＰ、Ｃｙ－３／Ｃｙ－５ ｄＣＴＰ（Amersham Pharmacia）またはalexa色素（Khanら、１９９８，Cancer Res. 58: 5009-5013）による。

【０２５７】

好ましい実施形態において、比較のために使用される２つの標的サンプルが、区別できる検出シグナルを生じる異なった蛍光色素を用いて標識され、例えば、正常軟骨から作られた標的はＣｙ５で標識され、軽度の変形性関節症である軟骨から作られた標的はＣｙ３で標識される。異なって標識される標的サンプルは、同じマイクロアレイに同時にハイブリダイズされる。好ましい実施形態において、標識された標的は、当該分野において公知の方法を使用して、例えば、エタノール沈殿またはカラム精製によって精製される。

【０２５８】

好ましい実施形態において、標的は、マイクロアレイから生成するシグナルを標準化するために、マイクロアレイ上の対照プローブにハイブリダイズする１つ以上の対照分子を含む。好ましくは、標識された標準化標的は、上記のようにマイクロアレイにスポットされる対照オリゴヌクレオチドに完全に相補的である核酸配列である。ハイブリダイゼーション後に標準化対照から得られるシグナルは、ハイブリダイゼーション条件、標識の強度、「読み取り」効率、および完全なハイブリダイゼーションのシグナルをアレイ間で変動させ得る他の要因の変動についての対照を提供する。好ましい実施形態において、アレイ中の他のすべてのプローブから読み取られるシグナル（例えば、蛍光強度）は、対照プローブからのシグナル（例えば、蛍光強度）によって除算され、それによって測定を標準化する。

【０２５９】

好ましい標準化標的は、サンプル中に存在する他の標的の平均長を反映するように選択されるが、しかし、これらは、一定の長さを網羅するように選択される。標準化対照はまた、アレイ中の他のプローブの（平均）塩基組成を反映するように選択することができるが、しかし、好ましい実施形態において、１つまたは数個のみの標準化プローブが使用され、これらのプローブは、これらが十分にハイブリダイズし（すなわち、二次構造を有さず、かつ自己ハイブリダイズしない）、かついかなる標的分子とも一致しないように選択される。

【０２６０】

標準化プローブは、ハイブリダイゼーション効率の空間的な変動を制御するために、アレイ中の任意の位置に、またはアレイの全体を通して複数の位置に局在化される。好ましい実施形態において、標準化対照は、アレイの角または端、ならびに中央部に局在化される。

【０２６１】

ハイブリダイゼーション条件

核酸ハイブリダイゼーションは、プローブまたは標的核酸メンバーおよびその相補的標的が、相補的塩基対形成を通して、安定なハイブリッド二重鎖を形成することができる条件下で、変性したプローブまたは標的核酸メンバーおよびその相補的標的を提供する工程を含む。次いで、ハイブリッド二重鎖を形成しない核酸は洗い流されて、代表的には、結合した検出可能な標識の検出を通して検出されるハイブリダイズした核酸を残す。核酸が、温度を上昇させること、または核酸を含む緩衝液の塩濃度を低下させることによって変性されることは一般的に認識されている。低緊縮性条件（例えば、低温および／または高塩）下では、アニールした配列が完全に相補的ではない場合でさえ、ハイブリッド二重鎖（例えば、ＤＮＡ：ＤＮＡ、ＲＮＡ：ＲＮＡ、またはＲＮＡ：ＤＮＡ）が形成する。従っ

て、ハイブリダイゼーションの特異性は、より低い緊縮性で低下する。逆に、より高い緊縮性（例えば、高温または低塩）において、首尾よいハイブリダイゼーションはより少ないミスマッチを必要とする。

【０２６２】

本発明は、Ｄｉｇハイブリダイゼーションミックス（Boehringer）、または、例えば、Ausubelら、前出およびSambrookら、前出に記載されるようなホルムアミドベースのハイブリダイゼーション溶液を含むハイブリダイゼーション条件を提供する。

【０２６３】

ハイブリダイゼーション条件を最適化する方法は当業者に周知である（例えば、生化学および分子生物学における実験室技術（Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology）、第２４巻：核酸プローブを用いるハイブリダイゼーション（Hybridization With Nucleic acid Probes），P.Tijssen編、Elsevier，ニューヨーク，（１９９３）を参照）。

【０２６４】

ハイブリダイゼーション後、ハイブリダイズしていない標識された核酸または未標識核酸は、洗浄によって便利に支持体表面から除去され、それによって、基材表面上のハイブリダイズした標的核酸のパターンを生成する。種々の洗浄溶液は当業者に公知であり、使用されてもよい。標識され、ハイブリダイズされたオリゴヌクレオチドおよび／または核酸の生じたハイブリダイゼーションパターンは、種々の方法で可視化または検出されてもよく、特定の検出の様式は試験核酸の特定の標識に基づいて選択され、ここで、代表的な検出手段には、シンチレーション計数、オートラジオグラフィー、蛍光測定、熱量分析、光放射測定などが含まれる。

【０２６５】

画像の取得およびデータ分析

上記のようなハイブリダイゼーションならびに任意の洗浄工程および／または引き続く処理の後、生じたハイブリダイゼーションパターンが検出される。ハイブリダイゼーションパターンを検出および可視化する際に、標識の強度またはシグナルの値は、検出されるだけではなく定量され、それによって、ハイブリダイゼーションの各スポットからのシグナルが測定され、既知数の末端標識された標的核酸によって放出されるシグナルに対応する単位値に対して比較され、ハイブリダイゼーションパターンにおけるアレイ上の特定のスポットにハイブリダイズされる各末端標識された標的のコピー数の計数または絶対値を得ることが意味される。

【０２６６】

アレイへのハイブリダイゼーションから収集されたデータを分析するための方法は当該分野において周知である。例えば、ハイブリダイゼーションの検出が蛍光標識を含む場合、データ分析は、収集したデータから基材の位置の関数として蛍光強度を決定する工程、異常値、すなわち、あらかじめ決定した統計学的分布から逸脱したデータを除外する工程、および残りのデータから試験核酸の相対的な結合親和性を計算する工程を含むことができる。得られるデータは、結合したオリゴヌクレオチドおよび／または核酸と試験核酸との結合親和性に従って変化する、各領域における強度を有する画像として表示される。

【０２６７】

以下の検出プロトコルは、比較される２つの軟骨サンプルの同時分析のために使用され、ここで、各サンプルは、異なる蛍光色素を用いて標識される。

【０２６８】

マイクロアレイの各エレメントは、第１の蛍光色についてスキャンされる。各アレイエレメントにおける蛍光の強度は、サンプル中の遺伝子の発現レベルに比例する。

【０２６９】

スキャニング操作は第２の蛍光標識について反復する。２つの蛍光強度の比率は、２つの組織サンプルにおける相対的発現レベルの高度に正確かつ定量な測定を提供する。

【０２７０】

好ましい実施形態において、固定化された標的核酸配列の蛍光強度は、レーザー励起光源ならびにＣｙ３蛍光およびＣｙ５蛍光のために適切な干渉フィルターを備えた特注の共焦点顕微鏡を用いて得られた画像から決定した。別々のスキャンを、ピクセルあたり２２５μｍ$^2$の解像度および６５，５３６グレーレベルで各蛍光について行った。ハイブリダイゼーションの領域を同定するための画像のセグメント化、２つの蛍光画像の間の強度の標準化、および各標的における標準化された平均蛍光値の計算は記載されている通りである（Khanら、１９９８，Cancer Res.58:5009-5013。Chenら、１９９７，Biomed, Optics 2: 364-374）。画像間の標準化は、標識の異なる効率および２つの異なる蛍光を用いる検出について調整するために使用される。これは、アレイ上にスポットされた一連の内部対照遺伝子の１つのシグナル強度の比率の値と釣り合わせることによって達成される。

【０２７１】

別の好ましい実施形態において、アレイは、Ｃｙ３およびＣｙ５のチャンネルでスキャンされ、別々の１６ビットＴＩＦＦ画像として保存される。これらの画像は取り込まれ、アレイ上の各スポットからのハイブリダイゼーション強度データをキャプチャするためのグリッド化プロセスを含むソフトウェアを使用して分析する。各スポットの蛍光強度およびバックグラウンドを差し引いたハイブリダイゼーション強度が収集され、Ｃｙ５対Ｃｙ３の測定された平均強度の比率が計算される。直線回帰アプローチが標準化のために使用され、測定されたＣｙ５対Ｃｙ３の強度のスキャッタープロットは１の傾きを有するはずであることを前提とする。比率の平均が計算され、そして使用されて、データをリスケールし、傾きを１に調整する。１に等しくない発現の比率は、差動的な遺伝子発現の表示として使用される。

【０２７２】

特に好ましい実施形態において、サンプル中の１つ以上の核酸配列の転写レベル（およびそれによって発現）を定量することが所望される場合、標的核酸サンプルは、遺伝子のｍＲＮＡ転写物の濃度またはｍＲＮＡ転写物に由来する核酸の濃度が、その遺伝子の転写レベル（およびそれゆえに発現レベル）に比例するものである。同様に、ハイブリダイゼーションシグナル強度がハイブリダイズした核酸の量に比例することが好ましい。この比例は、比較的厳密であることが好ましいが（例えば、転写速度の倍加は、サンプル核酸プール中のｍＲＮＡ転写物の倍加およびハイブリダイゼーションシグナルの倍加を生じる）、当業者は、比例がより緩和されおよび非線形でさえあり得、なお意味のある結果を提供することを認識する。従って、例えば、標的ｍＲＮＡの濃度の５倍の違いがハイブリダイゼーション強度において３～６倍の違いを生じるアッセイは、大半の目的において十分である。より正確な定量化が必要とされる場合、適切な対照は、本明細書に記載されるようなサンプル調製およびハイブリダイゼーションに導入されるバリエーションについて補正するために実行される。加えて、「標準的」標的ｍＲＮＡの段階希釈は、当業者に周知である方法に従って較正曲線を準備するために使用される。当然、転写物の存在または非存在の単純な検出が所望される場合、複雑な制御や較正は必要とされない。

【０２７３】

例えば、アレイ上の核酸メンバーがハイブリダイゼーション後に標識されない場合、このことは、この核酸メンバーを含む遺伝子が、いずれのサンプル中においても発現されないことを示す。核酸メンバーが単色で標識される場合には、これは、標識された遺伝子が１つのサンプル中でのみ発現されたことを示す。アレイを含む核酸メンバーの両方の色での標識は、その遺伝子が両方のサンプル中で発現されたことを示す。細胞あたり１回だけ発現された遺伝子さえもが検出される（１００，０００中１部の感度）。比較される２つのサンプル中での発現強度の違いは、差動的な発現を示し、２つのサンプル中の強度の比率は１．０に等しくなく、好ましくは０．７未満または１．２より上、より好ましくは０．５未満または１．５より上である。

【０２７４】

ＲＴ－ＰＣＲ

本発明の態様において、本発明のバイオマーカーのＲＮＡ産物の発現レベルは、ポリメ

ラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）と組み合わせて逆転写（ＲＴ）を使用して、サンプルからのバイオマーカーのＲＮＡ産物を増幅することによって測定することができる。本発明の１つの実施形態に従って、ＲＴは、当業者によって理解されるように定量であり得る。

【０２７５】

総ＲＮＡ、またはサンプルからのｍＲＮＡがテンプレートとして使用され、本発明のバイオマーカーの転写される部分に特異的なプライマーが、逆転写を開始するために使用される。ＲＮＡをｃＤＮＡに逆転写する方法は周知であり、Sambrookら、１９８９、前出に記載されている。プライマー設計は、市販のソフトウェア（例えば、Primer Designer 1.0,Scientific Softwareなど）を利用し、標準的かつ当該分野において周知である方法を使用して達成することができる。

【０２７６】

本発明によって包含されるプライマーを設計および選択するために使用されるプロトコルの１つの実施形態は、SYBR-Greenアッセイを用いるリアルタイムＰＣＲにおける使用のためのプライマーの設計に含まれる原理および工程を説明する。好ましくは、このプロトコルは、The National Center for Biotechnology Information（ＮＣＢＩ）のサーチエンジンおよびPrimerQuestプライマー設計ソフトウェアの適用を使用する。PrimerQuestは、Integrated DNA Technologies,Inc.（ＩＤＴ）のために開発されたウェブベースのソフトウェアである。このソフトウェアは、Whitehead Institute for Biomedical Researchによって開発されたPrimer3に基づく。

【０２７７】

本発明によって包含されるプライマーを設計するために使用される好ましいガイドラインは、産物またはアンプリコンの長さが、好ましくは１００～１５０塩基であること、最適Ｔｍが好ましくは６０℃であり、５８～６２℃の好ましい範囲もまた受容可能であること、および最も好ましくはＧＣ含量が５０％であり、４５～５５％の好ましい範囲もまた受容可能であることである。「プライマー－ダイマー」形成を減少させるために、各々のプライマーの３’末端の、それ自体または他のプライマーに対する、３塩基の相補的ストリングが回避されることが好ましい。プライマー配列の中とプライマーの対との相補的配列が回避されることもまた好ましい。好ましくは、３’末端における３つ以上のＧ’またはＣ’の連続は、３塩基より長い単一の塩基の反復と同様に回避される。バランスのとれていないＧ／ＣおよびＡ／Ｔリッチドメインの分布は好ましくは回避され、好ましくは、プライマーは、３’末端にＧまたはＣを有する。３’末端にＴを有するプライマーはミスマッチに対してより高い耐容性を有するので、プライマーの３’末端はＴではないことが好ましい。とりわけ、３’末端におけるミスマッチを回避することが好ましい、そして３’末端に少なくとも７個の固有な塩基を配置することが好ましい。好ましくは、ゲノム増幅は回避され、このようにして、任意の１つのプライマーがイントロンに及ぶべきであることが好ましい。好ましくは、プライマーは、プライマーの半分または少なくとも７個のヌクレオチドが１つのエキソンの３’末端、および残りは隣接するエキソンの５’末端までハイブリダイズするように、設計されるべきである。

【０２７８】

プライマーソフトウェアプログラムは、以下のウェブサイトリンク： biotools.idtdna.com/primerquest/ より入手可能である「The Primer Questソフトウェア」などの、本発明によって包含されるプライマーの設計および選択において補助するために使用することができる。

【０２７９】

以下のウェブサイトリンクは、好ましくは、遺伝子または配列の説明、登録ＩＤまたは配列ＩＤ、遺伝子記号、ＲｅｆＳｅｑ番号、および／またはＵｎｉＧｅｎｅ番号などの妥当なバイオマーカー情報を使用して、バイオマーカープライマー設計における使用のためにヒトゲノムデータベース（the Human Genome Database）からの配列情報を検索およびアップデートする際に有用である：１）the NCBI LocusLinkホームページ： www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink/ 、および2) Ensemble Human Genome Browser: www.ensembl.org/H

omo_sapiens 。

【０２８０】

一旦、プライマーがそこから生成される正確な標的ＤＮＡ配列が得られたら、関連の遺伝子について、LocusLinkのリンクから、またはEnsembl Gene Browserから、Exon-Intron Boundariesに注目することが好ましい。プライマー設計を最適化するための１つの好ましい手段は、PrimerQuestソフトウェアの中のBASIC、STANDARDおよびADVANCEの３つのオプションを使用することである。

【０２８１】

PrimerQuestソフトウェアのＢＡＳＩＣ関数の好ましい使用は、最初に、配列情報の下で、プライマーの名称を［Name］ボックスに入力し、そして標的配列を［Sequence］ボックスにカットアンドペーストし、リアルタイムＰＣＲのパラメーター設定を使用してＰＣＲプライマーを設計するように選択することである。標準的な配列設計の下では、返すプライマーセットの数として（the Number of Primer Set to Return）５０を選択し、使用するミスプリンティングライブラリー（the Mispriming Library to use）としてヒトを選択することが好ましい。標準プライマー設計の拡張機能の下では、以下の選択を入力することが好ましい：最適プライマーサイズ：２０（ｎｔ）、最適プライマーＴｍ：６０（℃）、最適プライマーＧＣ％：５０（％）、産物サイズ範囲：１００～１５０。さらに、標準機能の下では、好ましくは以下のオプションが微調整され得る：プライマー選択、除外領域、含有領域および開始コドン位置。

【０２８２】

一旦、必要とされるパラメーターが入力または選択されると、可能なプライマー選択のためのPrimer Quest検索が開始され、潜在的なフォワードプライマーおよびリバースプライマーに対する詳細な説明を生じ、これには、実際の配列、その開始位置、長さ、Ｔｍ、ＧＣ％、産物サイズペナルティー値、および二次構造を予測するための手段－ｍＦｏｌｄが含まれる。以下の２つの判断基準が最も有用である：好ましくはΔＧは－３．０ｋｃａｌ．ｍｏｌ－１より大きくあるべきであり、そして好ましくはＴＭは５０℃未満、かつ５５℃以下であるべきである。ドットプロットは解釈することがより少し困難であるが、一般的には、ドットプロット中の黒いドットの長い対角線を生じるプライマーを選択することは好ましくない。なぜなら、これはヘアピンを形成する可能性が高いからである。

【０２８３】

好ましくは、プライマーは、標的遺伝子に対して固有であり、偽遺伝子とは一致すべきではなく、これは、プライマーの特異性を調べるために［BLAST］を使用することによって検証することができる。好ましくは、IDT BioToolsによって提供されるOligo Analyzer ３．０は、自己ダイマーおよびヘテロダイマー形成の可能性を調べるために使用することができる。好ましくは、IDT BioToolsまたはPrimer ３によって提供される情報およびガイドラインは、本発明のバイオマーカーの研究のために最高の可能なプライマー対の選択のために使用することができる。融解曲線分析およびアガロースゲル電気泳動分離によって決定されるような、予測産物に一致するサイズを有する単一のアンプリコンを生成したプライマーのみが、バイオマーカー研究において使用されることが可能である。

【０２８４】

以下の関連する参考文献は、参照により本発明に援用される：Dieffenbach,C.W., Lowe,T.M.J., Dveksler,G.S.（１９９５）「ＰＣＲプライマー設計のための一般的概念」、「ＰＣＲプライマー、実験室マニュアル」（Dieffenbach,C.W.,とDveksler,G.S.編）所収、Cold Spring Harbor Laboratory Press,ニューヨーク, 133-155、Innis,M.A.,とGelfand,D.H.（１９９０）「ＰＣＲの最適化」、「ＰＣＲプロトコル、方法および応用へのガイド」（Innis,M.A., Gelfand,D.H., Sninsky,J.J.およびWhite,T.J.編）所収、Academic Press, San Diego, 3-12、Sharrocks,A.D.（１９９４）「ＰＣＲのためのプライマーの設計」「ＰＣＲ技術、現在の技術革新」（PCR Technology,Current Innovations）（Griffin,H.G.,とGriffin,A.M.編）所収CRC Press,London,5-11。

【０２８５】

逆転写の産物は、引き続いて、ＰＣＲのためのテンプレートとして使用される。

【０２８６】

ＰＣＲは、関連の標的配列を増幅するために、耐熱性のＤＮＡ－依存性ＤＮＡポリメラーゼによって触媒されるＤＮＡ複製の複数サイクルを使用することによって、特定の核酸配列を迅速に増幅するための方法を提供する。ＰＣＲは、増幅される核酸、増幅される配列に隣接する二本鎖オリゴヌクレオチドプライマー、ＤＮＡポリメラーゼ、デオキシリボヌクレオシド三リン酸、緩衝液および塩の存在を必要とする。

【０２８７】

ＰＣＲの方法は当該分野で周知である。ＰＣＲはMullisとFaloona，１９８７，Methods Enzymol.，155：335に記載されるように実施され、これは参照により本明細書に援用される。ＰＣＲは、テンプレートＤＮＡ（少なくとも１　ｆｇ、より有用には、１～１０００　ｎｇ）および少なくとも２５ｐｍｏｌのオリゴヌクレオチドプライマーを使用して実施される。典型的な反応混合液は以下を含む：２μｌのＤＮＡ、２５ｐｍｏｌのオリゴヌクレオチドプライマー、２．５μｌの１０Ｈ　ＰＣＲ緩衝液１（Perkin-Elmer，Foster City,カリフォルニア州）、０．４μｌの１．２５μＭ　ｄＮＴＰ、０．１５μｌ（または２．５単位）のＴａｑ　ＤＮＡポリメラーゼ（Perkin Elmer,Foster City，カリフォルニア州）および総量２５μｌまでの脱イオン水。ミネラルオイルを重層し、プログラム可能なサーマルサイクラーを使用してＰＣＲを実施する。

【０２８８】

ＰＣＲサイクルの各段階の長さおよび温度、ならびにサイクルの数は、効果における緊縮性の要求に従って調整される。アニーリングの温度およびタイミングは、プライマーがテンプレートとアニールすることが予想される効率と、許容されるミスマッチの程度の両方によって決定される。プライマーアニーリング条件の緊縮性を最適化する能力は、当業者の知識の十分に範囲内にある。３０℃から７２℃のアニーリング温度が使用される。鋳型分子の最初の変性は、通常、９２℃から９９℃の間で４分間行われ、続いて、変性（９４～９９℃で１５秒間～１分間）、アニーリング（上記に説明したように決定する温度、１～２分間）、および伸長（７２℃、１分間）からなる２０～４０サイクルを行う。最終の伸長段階は、一般的に、７２℃で４分間実行され、４℃での無期限（０～２４時間）段階が続いてもよい。

【０２８９】

実際上定量であるＱＲＴ－ＰＣＲもまた、遺伝子発現レベルの定量法を提供するために実施することができる。ＱＲＴ－ＰＣＲにおいて、逆転写およびＰＣＲは２段階で実行することができ、またはＰＣＲと組み合わせた逆転写を同時に実施することができる。TaqMan（Perkin Elmer，Foster City，カリフォルニア州）などの市販のキットが存在するこれらの技術の１つは、転写物特異的アンチセンスプローブを用いて実施される。このプローブは、ＰＣＲ産物（例えば、遺伝子に由来する核酸フラグメント）に特異的であり、オリゴヌクレオチドの５’末端に複合体化されたクエンチャーおよび蛍光レポータープローブとともに調製される。異なる蛍光マーカーが異なるレポーターに結合され、１つの反応中で２つの産物の測定を可能にする。Ｔａｑ　ＤＮＡポリメラーゼが活性化される場合、これは、その５’－から－３’のエキソヌクレアーゼ活性によって、テンプレートに結合したプローブの蛍光レポーターを切断する。クエンチャーの非存在下では、ここでレポーターは蛍光を発する。レポーター中の色の変化は、各々の特異的産物の量に比例し、フルオロメーターによって測定され、それゆえに、各色の量が測定され、ＰＣＲ産物が定量される。ＰＣＲ反応は、多くの個体に由来するサンプルが同時に処理および測定されるように、９６ウェルプレート中で実施される。TaqManシステムは、ゲル電気泳動を必要としないというさらなる利点を有し、標準曲線とともに使用するときには定量を可能にする。

【０２９０】

ＰＣＲ産物を定量に検出するために有用な第２の技術は、市販のQuantiTect SYBR Green PCR（Qiagen,Valenciaカリフォルニア州）などの挿入色素を使用することである。ＲＴ－ＰＣＲは、蛍光標識としてSYBR greenを使用して実施され、これは、ＰＣＲ段階の間に

ＰＣＲ産物に組み込まれ、ＰＣＲ産物の量に比例して蛍光を産生する。

【０２９１】

TaqManシステムとQuantiTect SYBRシステムの両方は、ＲＮＡの逆転写に続いて使用することができる。逆転写は、ＰＣＲ段階と同じ反応混合液中で実施することができ（１段階プロトコル）、または逆転写は、ＰＣＲを利用する増幅の前に最初に実施することができる（２段階プロトコル）かのいずれかである。

【０２９２】

加えて、ｍＲＮＡ発現産物を定量に測定するための他のシステムが知られており、これには、分子ビーコン（Molecular Beacons（登録商標））が含まれ、これは、蛍光分子およびクエンチャー分子を有するプローブを使用し、このプローブは、ヘアピン型のときは蛍光分子がクエンチされ、ハイブリダイズされると蛍光が増加して遺伝子発現の定量測定をもたらすような、ヘアピン構造を形成することが可能である。

【０２９３】

ＲＮＡ発現を定量に測定するためのさらなる技術には以下が含まれるがこれらに限定されない：ポリメラーゼ連鎖反応、リガーゼ連鎖反応、Ｑベータレプリカーゼ（例えば、国際出願第ＰＣＴ／ＵＳ８７／００８８０号を参照）、等温増幅法（例えば、Walkerら（１９９２）PNAS 89:382-396を参照）、鎖置換増幅（ＳＤＡ）、修復鎖反応、非対称定量ＰＣＲ（例えば、米国出願第ＵＳ２００３３０１３４３０７Ａ１号を参照）、およびFujaら、２００４，Journal of Biotechnology 108:193-205において記載されている多重ミクロスフェアビーズアッセイ。

【０２９４】

遺伝子発現レベルは、核酸配列増幅（ＮＡＳＢＡ）および３ＳＲを含む、転写ベースの増幅システム（ＴＡＳ）を使用して、サンプルからＲＮＡを増幅することによって測定することができる。例えば、Kwohら（１９８９）PNAS USA 86: 1173、国際公開ＷＯ８８／１０３１５、および米国特許第６，３２９，１７９号を参照のこと。ＮＡＳＢＡにおいては、核酸は、従来のフェノール／クロロホルム抽出、熱変性、溶解緩衝液を用いる処理、ならびにＤＮＡおよびＲＮＡの単離のためのミニスピンカラム、またはＲＮＡの塩化グアニジニウム抽出を使用して、増幅のために調製されてもよい。これらの増幅技術は、標的特異的配列を有するプライマーをアニーリングする工程を含む。重合後、ＤＮＡ／ＲＮＡハイブリッドはＲＮアーゼＨで消化されるのに対し、二本鎖ＤＮＡ分子は再度熱変性される。いずれの場合においても、一本鎖ＤＮＡは、第２の標的特異的プライマーの添加によって完全に二本鎖にされ、その後重合を行う。次いで、二本鎖ＤＮＡ分子は、Ｔ７またはＳＰ６などのポリメラーゼによって多重的に転写される。等温サイクル反応においては、ＲＮＡは、二本鎖ＤＮＡに逆転写され、Ｔ７またはＳＰ６などのポリメラーゼによって１回転写される。得られる産物は、短縮型または完全型に関わらず、標的特異的配列を示す。

【０２９５】

いくつかの技術が、増幅産物を分離するために使用されてもよい。例えば、増幅産物は、従来の方法を使用して、アガロース、アガロース／アクリルアミド、またはポリアクリルアミドのゲル電気泳動によって分離されてもよい。Sambrookら、１９８９を参照のこと。電気泳動なしでＰＣＲ産物を定量に検出するためのいくつかの技術もまた、本発明に従って使用されてもよい（例えば、「ＰＣＲプロトコル、方法および応用のガイド」，Innisら、Academic Press,Inc. ニューヨーク州（１９９０）を参照）。例えば、クロマトグラフィー技術が、分離をもたらすために利用されてもよい。本発明において使用されてもよい、多くの種類のクロマトグラフィーが存在する：吸着、分配、イオン交換および分子ふるい、ＨＰＬＣ、ならびにカラムクロマトグラフィー、ペーパークロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー、およびガスクロマトグラフィーを含む、これらを使用するための多くの特定化された技術（Freifelder，生化学および分子生物学への物理生化学の応用（Physical Biochemistry Applications to Biochemistry and Molecular Biology）、第２版，Wm. Freeman and Co.，ニューヨーク，ニューヨーク州，１９８２）。

【０２９６】
分離の方法論のもう一つの例は、種々の型の小分子リガンドを用いて、ＰＣＲ反応中に使用されるオリゴヌクレオチドプライマーを共有結合的に標識することによって行われる。１つのそのような分離において、異なるリガンドが各ヌクレオチド上に存在する。リガンドの１つに特異的に結合する分子、おそらく、リガンドがビオチンの場合は抗体またはアビジンが、９６ウェルＥＬＩＳＡプレートなどのプレートの表面をコートするために使用される。このような調製したプレートの表面へのＰＣＲ反応の適用に際して、ＰＣＲ産物が、表面への特異性を伴って結合される。未結合の試薬を除去するためのプレートの洗浄後、第１のリガンドに結合する第２の分子を含む溶液が加えられる。第２の分子は、ある種のレポーター系と結合させられている。第２の分子は、ＰＣＲ産物が産生された場合にのみプレートに結合し、それによって、両方のオリゴヌクレオチドプライマーが最終ＰＣＲ産物に取り込まれる。次いで、ＰＣＲ産物の量が、ＥＬＩＳＡ反応が検出および定量されるのと同程度に、市販のプレートリーダーにおいて検出および定量される。本明細書に記載されるものなどのＥＬＩＳＡ様システムは、商品名C-Trackで、Raggio Italgene社によって開発されている。

【０２９７】
増幅産物は、関連の核酸配列の増幅を確認するために、可視化されなければならない。１つの典型的な可視化方法は、臭化エチジウムを用いるゲルの染色、およびＵＶ光下での可視化を含む。代替的には、増幅産物が、放射性標識または蛍光定量標識されたヌクレオチドで全体的に標識される場合、増幅産物は、分離後に、適切な刺激的なスペクトル下で、ｘ線フィルムに曝露されるか、または可視化されてもよい。

【０２９８】
１つの実施形態において、可視化は間接的に達成される。増幅産物の分離後、標識された核酸プローブが、関連の増幅された核酸配列と接触される。プローブは、好ましくは、発色団と結合体化されるが、放射性標識されてもよい。別の実施形態において、プローブは、抗体またはビオチンなどの結合パートナーに結合体化され、ここで、結合対の他のメンバーは検出可能な部分を有する。

【０２９９】
別の実施形態において、検出は、サザンブロッティングおよび標識プローブを用いるハイブリダイゼーションによる。サザンブロッティングに含まれる技術は当業者に周知であり、分子プロトコルに関する多くの標準的な書籍の中に見出すことができる。Sambrookら、１９８９、前出を参照のこと。手短に述べると、増幅産物は、ゲル電気泳動によって分離される。次いで、ゲルは、ニトロセルロースなどのメンブレンと接触され、核酸の転写および非共有結合を可能にする。続いて、メンブレンは、標的増幅産物とハイブリダイズ可能である発色団結合体化プローブとともにインキュベートされる。検出は、ｘ線フィルムまたはイオン放射検出デバイスへのメンブレンの曝露による。

【０３００】
前述の１つの例は、参照により本明細書に援用される米国特許第５，２７９，７２１号に記載されており、これは、自動化された電気泳動および核酸の転写のための装置および方法を開示する。この装置は、ゲルの外部的な操作なしで電気泳動およびブロッティングを可能にし、本発明に従う方法を実行するために理想的に適している。

【０３０１】
ヌクレアーゼ保護アッセイ

本発明の別の実施形態において、ヌクレアーゼ保護アッセイ（リボヌクレアーゼ保護アッセイおよびＳ１ヌクレアーゼ保護アッセイの両方を含む）を、本発明のバイオマーカーのＲＮＡ産物を検出および定量するために使用することができる。ヌクレアーゼ保護アッセイにおいて、アンチセンスプローブ（例えば、放射性標識またはアイソトープ以外で標識される）は、溶液中でＲＮＡサンプルにハイブリダイズする。ハイブリダイゼーション後、一本鎖の、ハイブリダイズしていないプローブおよびＲＮＡが、ヌクレアーゼによって分解される。アクリルアミドゲルが、残っている保護フラグメントを分離するために使

用される。典型的には、溶液ハイブリダイゼーションは、メンブレンベースのハイブリダイゼーションよりも効率がよく、溶液ハイブリダイゼーションは、ブロットハイブリダイゼーションの最大２０～３０μｇよりも、サンプルＲＮＡの１００μｇまでに対応することができる。

【０３０２】

最も一般的な型のヌクレアーゼ保護アッセイであるリボヌクレアーゼ保護アッセイは、ＲＮＡプローブの使用を必要とする。オリゴヌクレオチドおよび他の一本鎖ＤＮＡプローブのみを、Ｓ１ヌクレアーゼを含むアッセイにおいては使用することができる。一本鎖のアンチセンスプローブは、典型的には、ヌクレアーゼによるプローブ：標的ハイブリッドの切断を防止するために、標的ＲＮＡに対して完全に相同性でなければならない。

【０３０３】

ノーザンブロット

標準的なノーザンブロットアッセイもまた、ＲＮＡ転写物サイズを確認するため、選択的スプライシングＲＮＡを同定するため、および本発明のバイオマーカーのＲＮＡ産物の相対量を確認するために、当業者に公知である従来のノーザンハイブリダイゼーション技術に従って使用することができる。ノーザンブロットにおいて、ＲＮＡサンプルは、最初に、変性条件下で、アガロースゲル中の電気泳動を介してサイズによって分離される。次いで、ＲＮＡは、メンブレンに転写され、架橋され、そして標識プローブとともにハイブリダイズされる。非アイソトープ性または高比活性放射標識プローブを使用することができ、これは、ランダムプライミングされ、ニックトランスレーションされ、またはＰＣＲ生成されたＤＮＡプローブ、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写されたＲＮＡプローブ、およびオリゴヌクレオチドを含む。加えて、部分的な相同性のみを有する配列（例えば、異なる種からのｃＤＮＡまたはエキソンを含む可能性があるゲノムＤＮＡフラグメント）がプローブとして使用されてもよい。全長、一本鎖ＤＮＡ、またはＤＮＡ配列のフラグメントのいずれかを含む標識プローブ、例えば、放射標識ｃＤＮＡは、少なくとも２０個、少なくとも３０個、少なくとも５０個、または少なくとも１００個までの任意の長さのヌクレオチド長であってもよい。プローブは、当業者に公知である任意の多くの異なる方法によって標識することができる。これらの研究のために最も一般的に利用される標識は、放射性元素、酵素、紫外光に曝露されたときに蛍光を発する化学物質その他である。多数の蛍光物質が公知であり、標識として利用することができる。これらには以下が含まれるがこれらに限定されない：フルオレセイン、ローダミン、オーラミン、テキサスレッド、ＡＭＣＡブルー、およびルシファーイエロー。特定の検出物質は、ヤギにおいて調製され、イソチシアネートを通して結合体化された抗ウサギ抗体である。タンパク質もまた、放射性元素または酵素で標識することができる。放射活性標識は、現在利用可能な計数手段のいずれかによって検出することができる。アイソトープの非限定的な例には、$^{3}$Ｈ、$^{14}$Ｃ、$^{32}$Ｐ、$^{35}$Ｓ、$^{36}$Ｃｌ、$^{51}$Ｃｒ、$^{57}$Ｃｏ、$^{58}$Ｃｏ、$^{59}$Ｆｅ、$^{90}$Ｙ、$^{125}$Ｉ、$^{131}$Ｉ、および$^{186}$Ｒｅが含まれる。酵素標識も同様に有用であり、現在利用されている比色分析、分光光度法、蛍光分光光度法、電流測定法、またはガス定量法の技術のいずれかによって検出することができる。酵素は、カルボジイミド、ジイソシアネート、グルタルアルデヒドなどのような架橋分子との反応によって、選択した粒子に結合体化される。当業者に公知の任意の酵素を利用することができる。このような酵素の例には、ペルオキシダーゼ、β－Ｄ－ガラクトシダーゼ、ウレアーゼ、グルコースオキシダーゼおよびペルオキシダーゼ、ならびにアルカリホスファターゼが含まれるがこれらに限定されない。米国特許第３，６５４，０９０号、同第３，８５０，７５２号、および同第４，０１６，０４３号は、代替的な標識の材料および方法のそれらの開示について、一例として参照される。

【０３０４】

５．１６　本発明のバイオマーカーのタンパク質産物を測定するための技術

タンパク質産物

標準的な技術はまた、サンプル中に存在する関連のタンパク質の量を決定するために利

用することができる。例えば、標準的な技術は、例えば、イムノアッセイ、例えば、ウェスタンブロット、免疫沈殿とそれに続くドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＳＤＳ－ＰＡＧＥ）など、免疫組織化学などを使用して利用することができ、サンプル中に存在する関連のタンパク質の量を決定することができる。関連のタンパク質を検出するための好ましい薬剤は、関連のタンパク質に結合可能である抗体、好ましくは、検出可能な標識を有する抗体である。

【０３０５】

このような検出方法のために、分析されるサンプルからのタンパク質は、当業者に周知である技術を用いて容易に単離することができる。タンパク質単離方法は、例えば、HarlowとLane、「抗体：実験室マニュアル（Antibodies: A Laboratory Manual）」, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, ニューヨーク（１９８８））に記載されるものなどであり得る。

【０３０６】

関連のタンパク質の検出のために好ましい方法は、タンパク質特異的抗体との相互作用を介するそれらの検出を含む。例えば、関連のタンパク質を指向する抗体は、本明細書に記載されるように利用することができる。抗体は、当業者に周知である標準的な技術を利用して生成することができる。例えば、本願の５．１９．１節、および参照により本明細書に援用される、このような抗体生成技術のより詳細な説明のための米国特許出願第２００４００１８２００号の５．２節を参照のこと。手短に述べると、このような抗体は、ポリクローナル抗体、より好ましくは、モノクローナル抗体であり得る。例えば、インタクトな抗体、または抗原結合フラグメント（例えば、ＦａｂまたはＦ（ａｂ’）$_2$）を使用することができる。好ましくは、抗体はヒト抗体またはヒト化抗体である。

【０３０７】

例えば、関連のタンパク質に特異的な抗体または抗体のフラグメントは、タンパク質の存在を定量または定性的に検出するために使用することができる。これは、例えば、免疫蛍光技術によって達成することができる。抗体（またはそのフラグメント）は、加えて、関連のタンパク質のｉｎ　ｓｉｔｕ検出のために、免疫蛍光または免疫電子顕微鏡法におけるように、組織学的に利用することができる。ｉｎ　ｓｉｔｕ検出は、患者から組織学的試料（例えば、生検試料）を取り出すこと、およびタンパク質に指向されるそれに対する標識抗体をその試料に適用することによって達成することができる。抗体（またはフラグメント）は、好ましくは、標識抗体（またはフラグメント）を生物学的サンプルに重層することによって適用される。このような手順の使用を通して、関連のタンパク質の存在だけでなく、サンプル中の細胞（例えば、軟骨細胞およびリンパ球）におけるその分布、その存在もまた決定することが可能である。広範な種々の周知の組織学的方法（染色手順など）は、このようなｉｎ　ｓｉｔｕ検出を達成するために利用することができる。

【０３０８】

関連のタンパク質についてのイムノアッセイは、典型的には、関連のタンパク質を同定することが可能である検出可能に標識された抗体の生物学的サンプルをインキュベートすること、および当該分野において周知である多数の技術のいずれかによって、結合した抗体を検出することを含む。以下により詳細に説明されるように、「標識された」という用語は、例えば、検出可能な物質を抗体にカップリングする（例えば、物理的に結合する）ことを介する、抗体の直接的な標識をいうことができ、直接的に標識される別の試薬との反応性による抗体の間接的な標識もまたいうことができる。間接的な標識の例には、蛍光標識された二次抗体を使用する一次抗体の検出が含まれる。

【０３０９】

例えば、生物学的サンプルは、相支持体または担持体、例えばニトロセルロース、または細胞、細胞粒子、もしくは可溶性タンパク質を固定化することが可能な他の支持体に、接触させ、かつ固定化させることができる。次いで、支持体は、適切な緩衝液で洗浄し、続いて、検出可能に標識したフィンガープリント遺伝子特異的抗体を用いる処理を行うことができる。次いで、相支持体は、非結合抗体を除去するために緩衝液で２回目の洗浄を

行うことができる。次いで、支持体上の結合標識の量を、従来の手段によって検出することができる。

【０３１０】

「相支持体または担持体」は、タンパク質因子の状況において、抗原または抗体を結合することが可能である任意の支持体を意図する。周知の支持体または担持体には、ガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、アミラーゼ、天然および修飾セルロース、ポリアクリルアミド、斑れい岩（gabbro）、およびマグネタイトが含まれる。担持体の性質は、本発明の目的のために、ある程度可溶性であるか、または不溶性であるかのいずれかであり得る。支持体材料は、結合した分子が抗原または抗体に結合可能である限り、実質的に任意の可能な構造配置を有することができる。従って、支持体の配置は、ビーズにおけるように球状、または試験管の内部表面もしくはロッドの外部表面におけるように円筒形であり得る。代替的には、表面は、シート、試験ストリップなどのように平面であり得る。好ましい支持体にはポリスチレンビーズが含まれる。当業者は、抗体もしく抗原を結合するための多くの他の適切な担持体を知っており、または日常的な実験の使用によってこれらを確認することができる。

【０３１１】

特異的抗体を検出可能に標識することができる１つの方法は、抗体を酵素に連結すること、およびエンザイムイムノアッセイ（ＥＩＡ）（Voller,A.,「酵素結合免疫吸着アッセイ（The Enzyme Linked Immunosorbent Assay）（ELISA）」，１９７８，Diagnostic Horizons 2: 1-7, Microbiological Associates Quarterly Publication, Walkersville, メリーランド州）、Voller,A.ら、１９７８，J.Clin.Pathol. 31: 507-520、Butler,J.E.，１９８１，Meth.Enzymol. 73: 482-523、Maggio,E.（編），１９８０，エンザイムイムノアッセイ（Enzyme Immunoassay），CRC Press, Boca Raton, フロリダ州、Ishikawa,E.ら編)，１９８１，エンザイムイムノアッセイ(Enzyme Immunoassay)，Kgaku Shoin, 東京）における使用による。抗体に結合される酵素は、例えば、分光光度法的、蛍光分析的、または視覚的な手段によって検出することができる化学部分を産生するような様式で、適切な基質、好ましくは、発色性基質と反応する。検出可能に標識するために使用することができる酵素には、例えば、以下が含まれるがこれらに限定されない：リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、スタフィロコッカスヌクレアーゼ、Δ－５－ステロイドイソメラーゼ、酵母アルコールデヒドロゲナーゼ、α－グリセロリン酸デヒドロゲナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、β－ガラクトシダーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース－６－リン酸デヒドロゲナーゼ、グルコアミラーゼ、およびアセチルコリンエステラーゼ。検出は、酵素についての発色性基質を利用する比色分析法によって達成することができる。検出はまた、同様に調製された標準と比較して、基質の酵素反応の程度の視覚的比較によって達成することができる。

【０３１２】

検出はまた、種々の他のイムノアッセイのいずれかを使用して達成することができる。例えば、抗体または抗体フラグメントを放射性標識することによって、ラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）の使用を通して関連のタンパク質を検出することが可能である（例えば、Weintraub,B., ラジオイムノアッセイの原理、ラジオイムノアッセイ技術の第７回訓練課程（Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques）を参照のこと、これは、参照により本明細書に援用される）。放射性同位元素（例えば、$^{125}$Ｉ、$^{131}$Ｉ、$^{35}$Ｓまたは$^{3}$Ｈ）は、ガンマカウンターもしくはシンチレーションカウンターの使用のような手段によって、またはオートラジオグラフィーによって検出することができる。

【０３１３】

蛍光化合物で抗体を標識することもまた可能である。蛍光標識された抗体が適切な波長の光に曝露される場合、その存在は、蛍光に起因して検出することができる。最も一般的に使用される蛍光標識化合物には、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、フ

ィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、ｏ－フタルアルデヒド、およびフルオレスカミンである。

【０３１４】

抗体はまた、$^{152}$Ｅｕまたはランタニド系列のその他の金属などの蛍光放出金属を使用して検出可能に標識することができる。これらの金属は、ジエチレントリアミン五酢酸（ＤＴＰＡ）またはエチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）などの金属キレート基を使用して、金属に結合させることができる。

【０３１５】

抗体はまた、それを化学発光化合物にカップリングすることによって検出可能に標識することができる。次いで、化学発光タグ付き抗体の存在は、化学反応の過程において生じる化学発光の存在を検出することによって決定される。特に有用な化学発光化合物の例は、ルミノール、イソルミノール、セロマティック（theromatic）アクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩およびシュウ酸塩である。

【０３１６】

同様に、生物発光化合物は、本発明の抗体を標識するために使用することができる。生物発光は、触媒性タンパク質が化学発光反応の効率を高める、生物学的系において見出されるタイプの化学発光である。生物発光タンパク質の存在は、発光の存在を検出することによって決定される。標識の目的のための重要な生物発光化合物は、ルシフェリン、ルシフェラーゼ、およびエクオリンである。

【０３１７】

タンパク質アレイ

本発明のバイオマーカーのタンパク質産物に特異的および／または選択的に結合するポリペプチドは、タンパク質アレイ上に固定化することができる。タンパク質は、例えば、本発明のバイオマーカーのポリペプチドタンパク質産物の存在について、医学的サンプル（単離された細胞、血液、滑液、血清、生検など）をスクリーニングするために、診断ツールとして使用することができる。タンパク質はまた、抗体ならびに他のリガンド、例えば、本発明のバイオマーカーによってコードされるポリペプチドに結合するリガンドを含むことができる。

【０３１８】

ポリペプチドアレイを産生する方法は、例えば、以下に記載されている：De Wildtら、２０００，Nature Biotech. 18: 989-994、Luekingら、１９９９，Anal.Biochem. 270: 103-111、Ge，２０００，Nuc.Acids Res. 28: e3，MacBeathとSchreiber，２０００，Science 289: 1760-1763、国際公開番号ＷＯ０１／４０８０３およびＷＯ９９／５１７７３Ａ１、ならびに米国特許第６，４０６，９２１号。アレイのためのポリペプチドは、例えば、市販のロボット装置、例えば、Genetic MicroSystemsおよびAffymetrix（Santa Clara，カリフォルニア州，米国）またはBioRobotics（Cambridge，英国）からの装置を使用して、高速でスポットすることができる。アレイ基材は、例えば、ニトロセルロース、プラスチック、ガラス、例えば、表面修飾ガラスであり得る。アレイはまた、多孔質マトリックス、例えば、アクリルアミド、アガロース、または別のポリマーを含むことができる。

【０３１９】

例えば、アレイは、例えば、De Wildt，前出に記載されるような抗体のアレイであり得る。ポリペプチドリガンドを産生する細胞は、アレイ形式でフィルター上で増殖させることができる。ポリペプチド産生が誘導され、発現された抗体が細胞の位置においてフィルターに固定化される。アレイの各アドレスにおける結合の程度に関する情報は、例えば、コンピュータデータベースの中に、プロフィールとして保存することができる。

【０３２０】

１つの実施形態において、アレイは、本発明のバイオマーカーの１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個、１５個、２０個、２５個、３０個、３５個、４０個、４５個、５０個、すべてまでの任意の数またはその任意の組み合わせを含むタ

ンパク質産物のアレイである。別の実施形態において、アレイは、本質的には、本発明のバイオマーカーの１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個、１５個、２０個、２５個、３０個、３５個、４０個、４５個、５０個、すべてまでの任意の数またはその任意の組み合わせで構成されたタンパク質産物のアレイである。別の実施形態において、アレイは、本質的には、表２におけるバイオマーカーのタンパク質産物の１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個、２０個、３０個、４０個、すべてまでの任意の１つ以上またはその任意の組み合わせとともに、表３に記されるものを含む表１のバイオマーカーのタンパク質産物の任意の１つ以上から構成されたタンパク質産物のアレイである。別の実施形態において、アレイは、表２におけるバイオマーカーのタンパク質産物の１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個、２０個、３０個、４０個、すべてまでの任意の１つ以上またはその任意の組み合わせとともに、表３に記されるものを含む表１のバイオマーカーのタンパク質産物の任意の１つ以上からなるタンパク質産物のアレイである。

【０３２１】

１つの態様において、本発明は、本発明のバイオマーカーのタンパク質産物に選択的に結合するアレイに結合される、抗体またはその抗原結合フラグメントを提供する。

【０３２２】

５．１７　タンパク質産生

標準的な組換え核酸法は、本発明のポリペプチドまたは抗体（例えば、本発明のバイオマーカーのタンパク質産物）を発現するために使用することができる。一般的に、ポリペプチドをコードする核酸配列は、核酸発現ベクターにクローニングされる。当然、タンパク質が複数のポリペプチド鎖を含む場合、各鎖は、発現ベクター、例えば、同じかまたは異なる細胞で発現される、同じかまたは異なるベクターにクローニングされなくてはならない。タンパク質が十分に小さい、すなわち、タンパク質が、５０アミノ酸未満である場合、このタンパク質は、自動化有機合成方法を使用して合成することができる。本発明のバイオマーカーの５’領域、３’領域、または内部コード領域を含むポリペプチドは、本発明のバイオマーカーの５’領域、３’領域、または内部コード領域に対応するヌクレオチド配列のみを含む核酸発現ベクターから発現される。本発明のバイオマーカーのタンパク質産物、または本発明のバイオマーカーの５’領域、３’領域、または内部コード領域によってコードされるポリペプチドに指向される抗体を産生するための方法。

【０３２３】

ポリペプチドを発現するための発現ベクターは、ポリペプチドまたはそのフラグメントをコードするセグメントに加えて、関連の核酸に作動可能に連結された、例えば、プロモーターを含む調節配列を含むことができる。多数の適切なベクターおよびプロモーターが当業者に公知であり、本発明の組換え構築物を生成するために市販されている。以下のベクターが例として提供される：細菌：ｐＢｓ、phagescript、ＰｓｉＸ１７４、pBluescript SK、ｐＢｓ　ＫＳ、ｐＮＨ８ａ、ｐＮＨ１６ａ、ｐＮＨ１８ａ、ｐＮＨ４６ａ（Stratagene, La Jolla, カリフォルニア, 米国）、ｐＴｒｃ９９Ａ、ｐＫＫ２２３－３、ｐＫＫ２３３－３、ｐＤＲ５４０、およびｐＲＩＴ５（Pharmacia, Uppsala, スウェーデン）。真核生物：ｐＷＬｎｅｏ、ｐＳＶ２ｃａｔ、ｐＯＧ４４、ＰＸＴＩ、ｐＳＧ（Stratagene）ｐＳＶＫ３、ｐＢＰＶ、ｐＭＳＧ、およびｐＳＶＬ（Pharmacia）。好ましいライブラリーの１つの好ましいクラスは、以下に説明されるファージライブラリーである。

【０３２４】

当業者に周知である方法は、本発明のポリヌクレオチドおよび適切な転写／翻訳制御シグナルを含むベクターを構築するために使用することができる。これらの方法は、ｉｎｖｉｔｒｏ組換えＤＮＡ技術、合成技術、およびｉｎ　ｖｉｖｏ組換え／遺伝子組換えを含む。例えば、SambrookとRussell, 「分子クローニング：実験室マニュアル」、第３版, Cold Spring Harbor Laboratory, ニューヨーク州（２００１）およびAusubelら、分子生物学の最新プロトコル、Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, ニューヨーク州（１９８９）に記載される技術を参照のこと。プロモーター領域は、ＣＡＴ

（クロラムフェニコールトランスフェラーゼ）ベクターまたは選択マーカーを有する他のベクターを使用して、任意の所望の遺伝子から選択することができる。２つの適切なベクターはｐＫＫ２３２－８およびｐＣＭ７である。特に指定される細菌プロモーターには、ｌａｃＩ、ｌａｃＺ、Ｔ３、Ｔ７、ｇｐｔ、ｌａｍｂｄａ　Ｐ、およびｔｒｃが含まれる。真核生物プロモーターには、ＣＭＶ（サイトメガロウイルス）最初期プロモーター、ＨＳＶチミジンキナーゼプロモーター、初期および後期ＳＶ４０、レトロウイルスからのＬＴＲプロモーター、マウスメタロチオネイン－Ｉプロモーター、および種々の当該分野で公知の組織特異的プロモーターが含まれる。特定の実施形態において、プロモーターは誘導性プロモーターである。他の実施形態において、プロモーターは構成的プロモーターである。なお他の実施形態において、プロモーターは組織特異的プロモーターである。

【０３２５】

一般的に、組換え発現ベクターは、複製起点および宿主細胞の形質転換を可能にする選択マーカー、例えば、E. coliのアンピシリン耐性遺伝子およびS. cerevisiaeの栄養要求性マーカー（ＵＲＡ３遺伝子、ＬＥＵ２遺伝子、ＨＩＳ３遺伝子、およびＴＲＰｌ遺伝子など）、ならびに下流の構造的配列の転写を方向付ける高度に発現される遺伝子に由来するプロモーターを含む。このようなプロモーターは、とりわけ、３－ホスホグリセリン酸キナーゼ（ＰＧＫ）などの糖分解酵素、ａ－因子、酸性ホスファターゼ、または熱ショックタンパク質をコードするオペロンに由来し得る。本発明のポリヌクレオチドは、翻訳開始配列および終結配列、および好ましくは、細胞膜周辺腔または細胞外培地への翻訳されたタンパク質の分泌を方向付け可能なリーダー配列と、適切な段階でアセンブルされる。任意に、本発明の核酸は、所望の特性、例えば、発現された組換え産物の安定化または簡単な精製を付与するＮ末端同定ペプチド（N-terminal identification peptide）を含む融合タンパク質をコードすることができる。細菌のための有用な発現ベクターは、任意に、機能的プロモーターとともに作動可能な読み枠において、適切な翻訳開始および終結のシグナルと一緒に本発明のポリヌクレオチドを挿入することによって構築される。ベクターは、ベクターの維持を確実にするため、および所望される場合、宿主中での増幅を提供するために、１つ以上の表現型選択マーカーおよび複製起点を含む。形質転換のための適切な真核生物宿主には、E.coli、Bacillus subtilis、Salmonella typhimurium、およびPseudomonas属、Streptomyces属、およびStaphylococcus属内の種々の種が含まれるが、その他もまた、選択の問題として利用しできる。

【０３２６】

代表的であるが非限定的な例として、細菌についての有用な発現ベクターは、周知のクローニングベクターｐＢＲ３２２（ＡＴＣＣ　３７０１７）の遺伝因子を含む市販のプラスミドに由来する、選択マーカーおよび細菌の複製起点を含むことができる。このような市販のベクターには、例えば、ｐＫＫ２２３－３（Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, スウェーデン）およびｐＧＥＭ１（Promega, Madison, ウィスコンシン州, 米国）が含まれる。

【０３２７】

本発明は、本発明のポリヌクレオチドを含むように遺伝子操作された宿主細胞を提供する。例えば、このような宿主細胞は、公知の形質転換、トランスフェクション、または感染の方法を使用して宿主細胞に導入された本発明の核酸を含むことができる。本発明はまた、本発明のポリヌクレオチドを発現するように遺伝子操作された宿主細胞を提供し、ここで、このようなポリヌクレオチドは、細胞中でポリヌクレオチドの発現を駆動する、宿主細胞に対して異種である調節配列と作動可能に結合されている。

【０３２８】

本発明はさらに、本発明のベクターを含む宿主細胞を提供し、ここで、核酸は、公知の形質転換、トランスフェクション、または感染の方法を使用して宿主細胞に導入されている。宿主細胞は、哺乳動物細胞などの真核生物宿主細胞、酵母細胞などの下等真核生物宿主細胞であり得、または宿主細胞は、細菌細胞などの原核生物細胞であり得る。宿主細胞への組換え構築物の導入は、例えば、リン酸カルシウムトランスフェクション、ＤＥＡＥ

、デキストラン媒介トランスフェクション、またはエレクトロポレーションによってもたらすことができる（Davis,L.ら、分子生物学の基本的方法（Basic Methods in Molecular Biology）（１９８６））。無細胞翻訳系もまた、本発明のＤＮＡ構築物に由来するＲＮＡを使用してこのようなタンパク質を産生するために利用することができる。

【０３２９】

任意の宿主／ベクター系を、表２に列挙される遺伝子またはスプライシング変異体の１つ以上を発現するために使用することができる。原核生物または真核生物の宿主を用いる使用のための適切なクローニングベクターおよび発現ベクターは、「分子クローニング：実験室マニュアル」、第２版，Cold Spring Harbor，ニューヨーク（１９８９）によって記載され、この開示は参照によりその全体が本明細書に援用される。最も好ましい宿主細胞は、通常は特定のポリペプチドを発現しないもの、または低い自然レベルでそのポリペプチドを発現するものである。

【０３３０】

特定の実施形態において、宿主細胞は、誘導性調節エレメントの制御下で本明細書のポリヌクレオチドを含む内因性遺伝子を発現するように操作されており、この場合において、内因性遺伝子の調節配列は、相同組換えによって配置されてもよい。本明細書に記載されるように、遺伝子ターゲッティングは、異なる遺伝子から単離された調節配列、または遺伝子操作法によって合成された新規な調節配列で、遺伝子の既存の調節領域を置き換えるために使用してもよい。このような調節配列は、プロモーター、エンハンサー、足場付着領域（scaffold-attachment regions）、ネガティブ調節エレメント、転写開始部位、調節タンパク質結合部位、または上記の配列の組み合わせから構成されてもよい。代替的には、産生されるＲＮＡまたはタンパク質の構造または安定性に影響を及ぼす配列は、置換、除去、付加、またそうでない場合はターゲッティングによって修飾されてもよく、これには、ポリアデニル化シグナル、ｍＲＮＡ安定性エレメント、スプライシング部位、タンパク質の輸送もしくは分泌特性を増強もしくは修飾するためのリーダー配列、またはタンパク質分子もしくはＲＮＡ分子の機能もしくは安定性を変化もしくは改善する他の配列が含まれる。

【０３３１】

本発明の宿主はまた、酵母または他の真菌であってもよい。酵母において、構成的プロモーターまたは誘導性プロモーターを含む多数のベクターが使用されてもよい。概説としては以下を参照のこと：Ausubelら（編），分子生物学の最新プロトコル，第２巻，Greene Publish.Assoc. & Wiley Interscience，１３章（１９８８）、Grantら、１９８７，「酵母のための発現ベクターおよび分泌ベクター（Expression and Secretion Vectors for Yeast）」，Methods Enzymol. 153: 516-544、Glover，ＤＮＡクローニング（DNA Cloning）,第ＩＩ巻，IRL Press，Wash.，D.C.,３章（１９８６）、Bitter，１９８７，「酵母における異種遺伝子発現（Heterologous Gene Expression in Yeast）」，Methods Enzymol. 152: 673-684、およびStrathernら（編），酵母サッカロミセスの分子生物学（The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces），Cold Spring Harbor Press，第Ｉ巻および第ＩＩ巻（１９８２）。

【０３３２】

潜在的に適切な酵母株には、Saccharomyces cerevisiae、Schizosaccharomyces pombe、Kluyveromyces株、Candida、または異種タンパク質を発現することが可能な任意の酵母株が含まれる。潜在的に適切な細菌株には、Escherichia coli，Serratia marescansなどの腸内細菌科、Bacillus subtilisなどの桿菌、Salmonella typhimurium、シュードモナスまたは異種タンパク質を発現することが可能な任意の細菌株が含まれる。タンパク質が酵母または細菌の中で作られる場合、機能的タンパク質を得るために、例えば、適切な部位のリン酸化またはグリコシル化によって、そこで産生されたタンパク質を修飾することが必要となる場合がある。このような共有結合は、公知の化学的または酵素的な方法を使用して達成されてもよい。

【０３３３】

種々の哺乳動物細胞培養系もまた、組換えタンパク質を発現するために利用することができる。哺乳動物発現系の例には以下が含まれる：Gluzman, １９８１, Cell 23: 175（１９８１）によって記載されたサル腎臓線維芽細胞のＣＯＳ－７株などのサルＣＯＳ細胞、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞、ヒト腎臓２９３細胞、ヒト上皮Ａ４３１細胞、ヒトＣｏｌｏ２０５細胞、３Ｔ３細胞、ＣＶ－１細胞、正常２倍体細胞、一次組織のｉｎ　ｖｉｔｒｏ培養に由来する細胞株、一次外植片、HeLa細胞、マウスＬ細胞、ＢＨＫ、ＨＬ－６０、Ｕ９３７、ＨａＫ、Ｃ１２７、３Ｔ３、またはジャーカット細胞、および適合可能なベクターを発現可能な他の細胞株。哺乳動物発現ベクターは、複製起点、適切なプロモーター、ならびにまた、任意の必要なリボソーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライシングドナーおよびアクセプターの部位、転写終結配列、および５’隣接非転写配列を含むことになる。

【０３３４】

タンパク質の発現において利用される微生物細胞は、凍結－融解サイクリング、超音波処理、機械的破壊、または細胞溶解剤の使用を含む、任意の便利な方法によって破壊することができる。細菌培養において産生される組換えポリペプチドは、通常、細胞ペレットからの初期の抽出、続いて塩析、水性イオン交換、またはサイズ排除クロマトグラフィーの１つ以上の工程によって単離される。ある実施形態において、テンプレート核酸はまた、ポリペプチドタグ、例えば、ペンター またはヘキサ－ヒスチジンをコードする。

【０３３５】

組換えタンパク質は、当該分野で周知の方法を使用して単離することができる。例えば、Scopes（タンパク質精製：原理および実践（Protein Purification: Principles and Practice）, Springer-Verlag, ニューヨーク（１９９４））は、組換えタンパク質（および非組換えタンパク質）を精製するための多数の一般的方法を提供する。これらの方法には、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、選択的沈殿、透析、および疎水性相互作用クロマトグラフィーが含まれる。

【０３３６】

本明細書に記載されるものの変更、修正、および他の実行は、本発明の技術思想および範囲から逸脱することなく、当業者によって行われる。

【０３３７】

本明細書に記載される本発明がより完全に理解され得るために、以下の実施例が示される。本実施例は、例示的なものであり、いかなる方法においても本発明を限定するものとして解釈されないことが理解されるべきである。

【０３３８】

５．１８　変形性関節症またはその症状の予防、治療、管理、または改善における使用のための化合物を同定するための方法

５．１８．１　バイオマーカーの発現または活性を調節する化合物を同定するための方法

本発明は、本発明のバイオマーカーの産物に結合する化合物を同定する方法を提供する。本発明はまた、本発明のバイオマーカーの産物の発現および／または活性を調節する化合物を同定するための方法を提供する。このような方法を介して同定された化合物は、変形性関節症を研究するための１つ以上の動物モデルの開発のために有用である。さらに、このような方法を介して同定された化合物は、変形性関節症またはその症状の予防、治療、管理、および／または改善のための予防用組成物および治療用組成物の開発におけるリード化合物として有用である。このような方法は、ｉｎ　ｖｉｖｏで潜在的な予防剤および治療剤を試験する際に関わる労力および莫大な費用が、本明細書に記載されるｉｎ　ｖｉｔｒｏおよびエキソビボの方法を介して同定されたこれらの化合物に集中されるという点で特に有用である。

【０３３９】

本発明は、変形性関節症またはその症状を予防、治療、管理、または改善する能力につ

いて試験される化合物を同定するための方法を提供し、上記方法は、（ａ）本発明のバイオマーカーの１つ以上のタンパク質産物もしくはそのフラグメント、または本発明のバイオマーカーの１つ以上のＲＮＡ産物もしくはそのフラグメントを発現する細胞を、試験化合物と接触させる工程、および（ｂ）タンパク質産物、タンパク質フラグメント、ＲＮＡ産物、またはＲＮＡ部分に結合する試験化合物の能力を決定し、その結果、化合物がタンパク質産物、タンパク質フラグメント、ＲＮＡ産物、ＲＮＡ部分に結合する場合に、変形性関節症またはその症状を予防、治療、管理、または改善する能力について試験される化合物が同定される工程を包含する。タンパク質産物、タンパク質フラグメント、ＲＮＡ産物、またはＲＮＡ部分に結合する試験化合物の能力を決定する工程は、例えば、試験化合物を放射性同位元素または酵素標識とカップリングすることによって達成することができ、その結果、タンパク質産物、タンパク質フラグメント、ＲＮＡ産物、またはＲＮＡ部分への試験化合物の結合は、複合体中の標識化合物を検出することによって決定することができる。例えば、試験化合物は、直接的または間接的のいずれかで、$^{125}$Ｉ、$^{35}$Ｓ、$^{14}$Ｃ、または$^{3}$Ｈで標識され、放射性同位元素は、放射能の放出の直接的計数によって、またはシンチレーション計数によって検出することができる。代替的には、試験化合物は、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、またはルシフェラーゼで酵素的に標識され、そして酵素標識は、適切な基質の生成物への転換の測定によって検出することができる。特定の実施形態において、アッセイは、本発明の１つ以上のバイオマーカーのタンパク質産物もしくはそのフラグメント、または本発明のバイオマーカーの１つ以上のＲＮＡ産物もしくはそのフラグメントを発現する細胞を、タンパク質産物、タンパク質フラグメント、ＲＮＡ産物、またはＲＮＡ部分に結合する公知の化合物と接触させて、アッセイ混合液を形成する工程、アッセイ混合液を試験化合物と接触させる工程、およびタンパク質産物、タンパク質フラグメント、ＲＮＡ産物、またはＲＮＡ部分と相互作用する試験化合物の能力を決定する工程を包含し、ここで、タンパク質産物、タンパク質フラグメント、ＲＮＡ産物、またはＲＮＡ部分と相互作用する試験化合物の能力を決定する工程は、公知の化合物と比較して、タンパク質産物、タンパク質フラグメント、ＲＮＡ産物、またはＲＮＡ部分に優先的に結合する試験化合物の能力を決定することを含む。

【０３４０】

本発明は、変形性関節症またはその症状を予防、治療、管理、または改善する能力について試験される化合物を同定するための方法を提供し、上記方法は、（ａ）本発明のバイオマーカーの１つ以上のタンパク質産物もしくはそのフラグメント、または本発明のバイオマーカーの１つ以上のＲＮＡ産物もしくはそのフラグメントを、試験化合物と接触させる工程、および（ｂ）タンパク質産物、タンパク質フラグメント、ＲＮＡ産物、またはＲＮＡ部分に結合する試験化合物の能力を決定し、その結果、化合物がタンパク質産物、タンパク質フラグメント、ＲＮＡ産物、ＲＮＡ部分に結合する場合に、変形性関節症またはその症状を予防、治療、管理、または改善する能力について試験される化合物が同定される工程を包含する。タンパク質産物またはタンパク質フラグメントへの試験化合物の結合は、直接的または間接的のいずれかで決定することができる。特定の実施形態において、アッセイは、本発明の１つ以上のバイオマーカーのタンパク質産物もしくはそのフラグメント、または本発明のバイオマーカーの１つ以上のＲＮＡ産物もしくはそのフラグメントを、タンパク質産物、タンパク質フラグメント、ＲＮＡ産物、またはＲＮＡ部分に結合する公知の化合物と接触させて、アッセイ混合液を形成する工程、アッセイ混合液を試験化合物と接触させる工程、およびタンパク質産物、タンパク質フラグメント、ＲＮＡ産物、またはＲＮＡ部分と相互作用する試験化合物の能力を決定する工程を包含し、ここで、タンパク質産物、タンパク質フラグメント、ＲＮＡ産物、またはＲＮＡ部分と相互作用する試験化合物の能力を決定する工程は、公知の化合物と比較して、タンパク質産物、タンパク質フラグメント、ＲＮＡ産物、またはＲＮＡ部分に優先的に結合する試験化合物の能力を決定することを含む。当該分野で周知の技術を、試験化合物と、本発明のバイオマーカーのタンパク質産物もしくはそのフラグメント、または本発明のバイオマーカーのＲＮＡ

産物もしくはそのフラグメントとの間の結合を決定するために使用することができる。

【０３４１】

本発明の上記のアッセイ方法のある実施形態において、ＲＮＡ産物もしくはその部分の非複合体化型、標的分子、またはその両方からの複合体化型の分離を容易にするために、ならびにアッセイの自動化を適合させるために、本発明のバイオマーカーのＲＮＡ産物もしくはその部分またはその標的分子を固定化することが所望されてもよい。本発明の上記のアッセイ方法の２つ以上の実施形態において、タンパク質の一方または両方の非複合体型からの複合体化型の分離を容易にするために、ならびにアッセイの自動化を適合させるために、本発明のバイオマーカーのタンパク質産物もしくはそのフラグメントまたはその標的分子のいずれかを固定化することが所望されてもよい。本発明のバイオマーカーのタンパク質産物またはそのフラグメントへの試験化合物の結合は、反応物質を含むために適切な任意の容器中で達成することができる。このような容器には、マイクロタイタープレート、試験管、および微量遠心管が含まれる。１つの実施形態において、タンパク質の一方または両方がマトリックスに結合することを可能にするドメインを加える融合タンパク質を提供することができる。例えば、グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）融合タンパク質は、グルタチオンセファロース（Sigma Chemical, St. Louis, ミズーリ州）またはグルタチオン誘導体化マイクロタイタープレートに吸着させることができ、次いでこれは、試験化合物、または試験化合物および非吸着標的タンパク質もしくは本発明のバイオマーカーのタンパク質産物もしくはそのフラグメントと合わされ、この混合物は、複合体形成に寄与する条件下で（例えば、塩およびｐＨについて生理学的条件下で）インキュベートされる。インキュベート後、ビーズまたはマイクロタイタープレートを洗浄して、あらゆる未結合成分を除去し、複合体形成は、例えば、上記のように、直接的または間接的のいずれかで測定される。代替的には、複合体は、マトリックスから解離させることができ、本発明のバイオマーカーのタンパク質産物またはそのフラグメントの結合のレベルは、標準的な技術を用いて決定することができる。

【０３４２】

マトリックス上にタンパク質を固定化するための他の技術はまた、本発明のスクリーニングアッセイにおいて使用することができる。例えば、本発明のバイオマーカーのタンパク質産物もしくはそのフラグメント、または標的分子のいずれかを、ビオチンおよびストレプトアビジンの結合体化を利用して固定化させることができる。ビオチン化された、本発明のバイオマーカーのタンパク質産物または標的分子は、当該分野において周知の方法（例えば、ビオチン化キット（biotinylation kit）、Pierce Chemicals、Rockford, イリノイ州）を使用してビオチン－ＮＨＳ（Ｎ－ヒドロキシ－スクシンイミド）から調製され、そしてストレプトアビジンコートされた９６ウェルプレート（Pierce Chemical）のウェルに固定化することができる。代替的には、本発明のバイオマーカーのタンパク質産物またはそのフラグメントと反応性である抗体をプレートのウェルに誘導体化し、そしてタンパク質を、抗体の結合体化によってウェル中でトラップすることができる。このような複合体を検出するための方法には、ＧＳＴ－固定化複合体について上記に記載したものに加えて、本発明のバイオマーカーのタンパク質産物と反応性である抗体を使用する複合体の免疫検出、ならびに本発明のバイオマーカーのタンパク質産物もしくはそのフラグメント、または標的分子と関連する酵素活性を検出することに依存する酵素結合アッセイが含まれる。

【０３４３】

試験化合物に対する、本発明のバイオマーカーのタンパク質産物またはそのフラグメントの相互作用または結合もまた、ツーハイブリッドアッセイまたはスリーハイブリッドアッセイにおける「おとりタンパク質（bait protein）」としてこのようなタンパク質またはタンパク質フラグメントを使用して決定することができる（例えば、米国特許第５，２８３，３１７号、Zervosら、（１９９３）Cell 72:223-232、Maduraら、（１９９３）J.Biol.Chem. 268: 12046-12054、Bartelら、（１９９３）Bio/Techniques 14: 920-924、Iwabuchiら、（１９９３）Oncogene 8: 1693-1696、および国際公開番号ＷＯ９４／１０３

００を参照）。

【０３４４】

本発明は、変形性関節症またはその症状を予防、治療、管理、または改善する能力について試験される化合物を同定するための方法を提供し、上記方法は、（ａ）本発明の１種以上のバイオマーカーのタンパク質産物またはＲＮＡ産物を発現する細胞を試験化合物と接触させる工程、（ｂ）インキュベーション期間の後、（ａ）に存在するタンパク質産物またはＲＮＡ産物の量を決定する工程、および（ｃ）（ａ）における量を、試験化合物と接触させていない対応する対照細胞中に存在する量と比較し、その結果、タンパク質産物またはＲＮＡ産物の量が、対照中の量と比較して変化している場合、変形性関節症またはその症状を予防、治療、管理、または改善する能力について試験される化合物が同定される工程を包含する。特定の実施形態において、発現レベルは、本明細書に記載されるアッセイ（例えば、マイクロアレイまたはＲＴ－ＰＣＲ）または当業者に周知のアッセイを利用することによって決定されるように、対照における発現レベルと比較して、５％、１０％、１５％、２５％、３０％、４０％、５０％、５～２５％、１０～３０％、少なくとも１倍、少なくとも１．５倍、少なくとも２倍、４倍、５倍、１０倍、２５倍、１～１０倍、または５～２５倍変化する。代替的な実施形態において、このような方法は、細胞中に存在する、表１に列挙されるような本発明のバイオマーカー（表３に記される特異的な産物を含む）、または表２に列挙されたバイオマーカーの産物の任意の１つ以上と組み合わせた、表１に列挙されるような本発明のバイオマーカー（表３に記される特異的な産物を含む）の、少なくとも２個、少なくとも３個、少なくとも４個、少なくとも５個、少なくとも６個、少なくとも７個、少なくとも８個、少なくとも９個、少なくとも１０個、少なくとも１２個、少なくとも１５個、少なくとも２０個、少なくとも２５個、少なくとも３０個、少なくとも３５個、少なくとも４０個、少なくとも４５個、少なくとも５０個、１～５個、１～１０個、５～１０個、５～２５個、または１０～４０個、すべて、またはその任意の組み合わせのいずれかのタンパク質産物またはＲＮＡ産物の量を決定する工程、およびこれらの量を対照中に存在する量と比較する工程を包含する。

【０３４５】

本発明に記載される細胞ベースのアッセイにおいて利用される細胞は、当該分野において公知である技術を利用して、本発明のバイオマーカーを発現するように操作することができる。例えば、参照により本明細書に援用される、米国特許第６，２４５，５２７号の「組換え発現ベクターおよび宿主細胞（Recombinant Expression Vectors and Host Cells）」という表題のＩＩＩ節を参照のこと。代替的には、本発明のバイオマーカーを内因的に発現する細胞を使用することができる。例えば、軟骨細胞が使用されてもよい。

【０３４６】

特定の実施形態において、軟骨細胞は、「正常」個体、または軽度の、中程度の、顕著な、もしくは重度の変形性関節症を有する個体から単離され、そして種々の長さの時間（すなわち、３０分間、１時間、５時間、２４時間、４８時間および９６時間）、試験化合物の存在下および非存在下でインキュベートされる。予防薬剤または治療薬剤についてスクリーニングする場合、本発明のバイオマーカーの全長配列のクローン、またはその機能的部分は、軟骨細胞をトランスフェクトするために使用される。トランスフェクトされた軟骨細胞は、種々の長さの時間（すなわち、１、２、３、５、７、１０、または１４日間）、試験化合物の存在下または非存在下で培養される。インキュベーション後、標的核酸サンプルが軟骨細胞から調製され、そして以下の任意の２つ：正常、軽度の変形性関節症、中程度の変形性関節症、および重度の変形性関節症に由来する軟骨細胞において差動的に発現される核酸配列に対応する核酸プローブにハイブリダイズされる。核酸プローブは、例えば、当該分野で周知でありかつ本明細書に記載される方法に従って、放射活性標識で標識される。ハイブリダイゼーションは、例えば、Ausubelら、前出またはSambrookら、前出において記載されるように、ノーザンブロットによって実行される。軽度の変形性関節症、中程度の変形性関節症、顕著な変形性関節症、および重度の変形性関節症のいずれか１つからのＲＮＡと比較して、正常からのアレイ上のサンプルに対する、標的の、本

明細書に定義したような差動的なハイブリダイゼーションは、差動的に発現された軟骨細胞特異的核酸配列に対応するＲＮＡの発現レベルを示す。試験化合物の存在下におけるインキュベーション工程の結果としての標的配列の発現レベルの変化は、対応する軟骨細胞特異的核酸配列の発現を増加または減少する化合物を示す。

【０３４７】

本発明はまた、変形性関節症またはその症状を予防、治療、管理、または改善する能力について試験される化合物を同定するための方法を提供し、上記方法は、（ａ）無細胞抽出物（例えば、軟骨細胞抽出物）を、本発明の１種以上のバイオマーカーのタンパク質産物またはＲＮＡ産物をコードする核酸配列、および試験化合物と接触させる工程、（ｂ）（ａ）に存在するタンパク質産物またはＲＮＡ産物の量を決定する工程、ならびに（ｃ）（ａ）における量を、試験化合物と接触させていない対応する対照と比較し、その結果、タンパク質産物またはＲＮＡ産物の量が、対照中の量と比較して変化している場合、変形性関節症またはその症状を予防、治療、管理、または改善する能力について試験される化合物が同定される工程を包含する。特定の実施形態において、発現レベルは、本明細書に記載されるアッセイ（例えば、マイクロアレイまたはＲＴ－ＰＣＲ）または当業者に周知のアッセイを利用することによって決定されるように、対照サンプルにおける発現レベルと比較して、５％、１０％、１５％、２５％、３０％、４０％、５０％、５～２５％、１０～３０％、少なくとも１倍、少なくとも１．５倍、少なくとも２倍、４倍、５倍、１０倍、２５倍、１～１０倍、または５～２５倍変化する。代替的な実施形態において、このような方法は、抽出物中に存在する本発明のバイオマーカーの、少なくとも２個、少なくとも３個、少なくとも４個、少なくとも５個、少なくとも６個、少なくとも７個、少なくとも８個、少なくとも９個、少なくとも１０個、少なくとも１２個、少なくとも１５個、少なくとも２０個、少なくとも２５個、少なくとも３０個、少なくとも３５個、少なくとも４０個、少なくとも４５個、少なくとも５０個、１～５個、１～１０個、５～１０個、５～２５個、または１０～４０個、すべて、またはその任意の組み合わせのタンパク質産物またはＲＮＡ産物の量を決定する工程、およびこれらの量を対照中に存在する量と比較する工程を包含する。

【０３４８】

特定の実施形態において、本発明のバイオマーカーのＲＮＡ産物の量が決定され、他の実施形態において、本発明のバイオマーカーのタンパク質産物の量が決定されるのに対して、なお他の実施形態において、本発明のバイオマーカーのＲＮＡ産物およびタンパク質産物の量が決定される。本発明のバイオマーカーのＲＮＡ産物またはタンパク質産物の量を決定するために、標準的な方法および組成物を利用することができる。このような方法および組成物は、上記に詳細に記載されている。

【０３４９】

特定の実施形態において、本明細書に記載されるスクリーニングアッセイにおいて、本発明のバイオマーカーのタンパク質産物またはＲＮＡ産物の量はキットを利用して決定される。このようなキットは、少なくとも１個、少なくとも２個、少なくとも３個、少なくとも４個、少なくとも５個、少なくとも６個、少なくとも７個、少なくとも８個、少なくとも９個、少なくとも１０個、少なくとも１５個、少なくとも２０個、少なくとも２５個、少なくとも３０個、少なくとも３５個、少なくとも４０個、少なくとも４５個、少なくとも５０個、すべて、またはその任意の組み合わせの本発明のバイオマーカーの、少なくとも１個、少なくとも２個、少なくとも３個、少なくとも４個、少なくとも５個、少なくとも６個、少なくとも７個、少なくとも８個、少なくとも９個、少なくとも１０個、少なくとも１５個、少なくとも２０個、少なくとも２５個、少なくとも３０個、少なくとも３５個、少なくとも４０個、少なくとも４５個、少なくとも５０個までの、またはそれ以上の任意の数のタンパク質産物またはＲＮＡ産物の発現を測定するための材料および試薬を含む。特定の実施形態において、このキットはさらに、種々の方法において利用される、以下のような１種以上のさらなる試薬を含んでもよい：（１）血液、軟骨細胞、または滑液からＲＮＡを精製するための試薬、（２）試験核酸を生成するためのプライマー、（３

）任意に１種以上の固有に標識されたｄＮＴＰおよび／またはｒＮＴＰ（例えば、ビオチン化またはＣｙ３もしくはＣｙ５タグ付きｄＮＴＰ）を伴うｄＮＴＰおよび／またはｒＮＴＰ、（４）合成後標識試薬、例えば、蛍光色素の化学的に活性な誘導体、（５）酵素、例えば、逆転写酵素、ＤＮＡポリメラーゼなど、（６）種々の緩衝媒体、例えば、ハイブリダイゼーション緩衝液および洗浄緩衝液、（７）標識プローブ精製試薬および成分、例えば、スピンカラムなど、ならびに（８）タンパク質精製試薬、（９）シグナル生成および検出試薬、例えば、ストレプトアビジン－アルカリホスファターゼ結合体、化学蛍光または化学発光基質など。特定の実施形態において、キットは、対照としての使用のための前標識され品質管理されたタンパク質およびまたはＲＮＡ転写物（好ましくは、ｍＲＮＡ）を含む。

【０３５０】

ある実施形態において、キットはＲＴ－ＰＣＲキットである。他の実施形態において、キットは、核酸アレイおよびタンパク質アレイである。本発明に従うこのようなキットは、そのため、本発明の関連するタンパク質メンバーまたは核酸メンバーを有するアレイ、およびパッケージング手段を少なくとも含むことになる。代替的には、本発明のタンパク質メンバーまたは核酸メンバーはアレイにあらかじめパッケージされてもよい。

【０３５１】

特定の実施形態において、本発明のバイオマーカーのＲＮＡ産物を測定するためのキットは、ＲＮＡ産物の発現を測定するために必要な材料および試薬を含む。例えば、マイクロアレイまたはＲＴ－ＰＣＲキットが使用されてもよく、これは、本発明のバイオマーカーの少なくとも１個、少なくとも２個、少なくとも３個、少なくとも４個、少なくとも５個、少なくとも６個、少なくとも７個、少なくとも８個、少なくとも９個、少なくとも１０個、少なくとも１５個、少なくとも２０個、少なくとも２５個、少なくとも３０個、少なくとも３５個、少なくとも４０個、少なくとも４５個、少なくとも５０個、すべてまでの任意の数、またはその任意の組み合わせの、ＲＮＡ産物のレベルを測定するために必要な試薬および材料のみを含む。代替的には、ある実施形態において、キットは、１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個、１５個、２０個、２５個、３０個、３５個、４０個、４５個、５０個、すべてまでの本発明のバイオマーカーの任意の数、またはその任意の組み合わせのＲＮＡ産物のレベルを測定するために必要なものに限定されない試薬および材料を含むことができる。例えば、マイクロアレイキットは、少なくとも１個、少なくとも２個、少なくとも３個、少なくとも４個、少なくとも５個、少なくとも６個、少なくとも７個、少なくとも８個、少なくとも９個、少なくとも１０個、少なくとも１５個、少なくとも２０個、少なくとも２５個、少なくとも３０個、少なくとも３５個、少なくとも４０個、少なくとも４５個、少なくとも５０個までの、またはそれ以上の任意の数の本発明のバイオマーカー以外の遺伝子のＲＮＡ産物のレベルを測定するために必要な試薬および材料に加えて、１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個、１５個、２０個、２５個、３０個、３５個、４０個、４５個、５０個、すべてまでの本発明のバイオマーカーの任意の数、またはその任意の組み合わせのＲＮＡ産物のレベルを測定するために必要な試薬および材料を含んでもよい。特定の実施形態において、マイクロアレイまたはＲＴ－ＰＣＲキットは、少なくとも１個、少なくとも２個、少なくとも３個、少なくとも４個、少なくとも５個、少なくとも６個、少なくとも７個、少なくとも８個、少なくとも９個、少なくとも１０個、少なくとも１５個、少なくとも２０個、少なくとも２５個、少なくとも３０個、少なくとも３５個、少なくとも４０個、少なくとも４５個、少なくとも５０個までの任意の数、もしくは任意の組み合わせの本発明のバイオマーカーのＲＮＡ産物、ならびに１個、２個、３個、４個、５個、１０個、１５個、２０個、２５個、３０個、３５個、４０個、４５個、５０個、５５個、６０個、６５個、７０個、７５個、８０個、８５個、９０個、９５個、１００個、１２５個、１５０個、１７５個、２００個、２２５個、２５０個、３００個、３５０個、４００個、４５０個、５００個、１０００個、５０００個、１５，０００個、２０，０００個もしくはそれ以上までの任意の数の本発明のバイオマーカー以外の遺伝子、または１～１０個、１～１

００個、１～１５０個、１～２００個、１～３００個、１～４００個、１～５００個、１～１０００個、２５～１００個、２５～２００個、２５～３００個、２５～４００個、２５～５００個、２５～１０００個、１００～１５０個、１００～２００個、１００～３００個、１００～４００個、１００～５００個、１００～１０００個または５００～１０００個、１０００　～５０００個、５０００　～１０，０００個、１０，０００　～２０，０００個もしくはそれ以上の任意の数の本発明のバイオマーカー以外の遺伝子のレベルを測定するために必要な試薬および材料を含む。

【０３５２】

核酸マイクロアレイキットについては、このキットは、一般的に、支持体表面に結合されたプローブを含む。プローブは、検出可能な標識で標識されてもよい。特定の実施形態において、プローブは、１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個、１５個、２０個、２５個、３０個、３５個、４０個、４５個、５０個、すべてまでの本発明のバイオマーカーの任意の数、またはその任意の組み合わせの、５’領域、３’領域、内部コーディング領域、エキソン、イントロン、エキソンジャンクション、またはエキソン－イントロンジャンクションに特異的である。マイクロアレイキットは、アッセイならびにアッセイの実施から得られるデータを解釈および分析するための方法を実施するための説明書を含んでもよい。キットはまた、ハイブリダイゼーション試薬および／またはプローブが標的核酸配列にハイブリダイズするときに産生されるシグナルを検出するために必要な試薬を含んでもよい。一般的に、マイクロアレイキットのための材料および試薬は、１つ以上の容器の中にある。キットの各成分は、一般的に、それ自体が適切な容器の中にある。

【０３５３】

ＲＴ－ＰＣＲキットについては、このキットは、一般的に、１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個、１５個、２０個、２５個、３０個、３５個、４０個、４５個、５０個、すべてまでの本発明のバイオマーカーの任意の数、またはその任意の組み合わせの特定のＲＮＡ産物（エキソン、イントロン、エキソンジャンクション、およびエキソン－イントロンジャンクション）に特異的である、あらかじめ選択されたプライマーを含む。ＲＴ－ＰＣＲキットはまた、核酸を逆転写および／または増幅するために適切である酵素（例えば、Ｔａｑなどのポリメラーゼ）、ならびに逆転写および増幅のための反応混合液のために必要であるデオキシヌクレオチドおよび緩衝液を含んでもよい。ＲＴ－ＰＣＲキットはまた、１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個、１５個、２０個、２５個、３０個、３５個、４０個、４５個、５０個、すべてまでの任意の数の本発明のバイオマーカー、またはその任意の組み合わせに特異的なプローブを含んでもよい。このプローブは、検出可能な標識（例えば、蛍光標識）で標識されてもよいし、標識されなくてもよい。ＲＴ－ＰＣＲキットの各成分は、一般的に、それ自体が適切な容器の中にある。従って、これらのキットは、一般的に、各々個々の試薬、酵素、プライマーおよびプローブのために適切な個別の容器を含む。さらに、ＲＴ－ＰＣＲキットは、アッセイならびにアッセイの実施から得られるデータを解釈および分析するための方法を実施するための説明書を含んでもよい。

【０３５４】

抗体ベースのキットについては、このキットは、例えば、以下を含むことができる：（１）関連のタンパク質（１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個、１５個、２０個、２５個、３０個、３５個、４０個、４５個、５０個、すべてまでの任意の数の本発明のバイオマーカー、またはその任意の組み合わせのタンパク質産物）に結合する第１の抗体（これは支持体に結合してもよいし、結合しなくてもよい）、および任意に、（２）タンパク質または抗体のいずれかに結合し、そして検出可能な標識（例えば、蛍光標識、放射性同位元素または酵素）に結合体化されている第２の異なる抗体。抗体ベースのキットはまた、免疫沈殿を実行するためのビーズを含んでもよい。抗体ベースのキットの各成分は、一般的に、それ自体が適切な容器の中にある。従って、これらのキットは、一般的に、各抗体に対し適切な個別の容器を含む。さらに、抗体ベースのキット

は、アッセイならびにアッセイの実施から得られるデータを解釈および分析するための方法を実施するための説明書を含んでもよい。

【０３５５】

レポーター遺伝子ベースのアッセイもまた、変形性関節症またはその症状を予防、治療、管理、または改善する能力について試験される化合物を同定するために行われてもよい。特定の実施形態において、本発明は、変形性関節症またはその症状を予防、治療、管理、または改善する能力について試験される化合物を同定するための方法を提供し、上記方法は、（ａ）本発明のバイオマーカーの調節エレメント（例えば、プロモーター／エンハンサーエレメント）に作動可能に連結されたレポーター遺伝子を含むレポーター遺伝子構築物を発現する細胞と、化合物を接触させる工程、（ｂ）上記レポーター遺伝子の発現を測定する工程、および（ｃ）（ａ）における量を、試験化合物と接触させていない対応する対照細胞に存在する量と比較し、その結果、発現したレポーター遺伝子の量が、対照細胞中の量と比較して変化している場合、変形性関節症またはその症状を予防、治療、管理、または改善する能力について試験される化合物が同定される工程を包含する。この実施形態に従って、細胞は、バイオマーカーを天然に発現してもよいし、またはバイオマーカーを発現するように操作されてもよい。別の実施形態において、本発明は、変形性関節症またはその症状を予防、治療、管理、または改善する能力について試験される化合物を同定するための方法を提供し、上記方法は、（ａ）無細胞抽出物、および本発明のバイオマーカーの調節エレメント（例えば、プロモーター／エンハンサーエレメント）に作動可能に連結されたレポーター遺伝子を含むレポーター遺伝子構築物と、化合物を接触させる工程、（ｂ）上記レポーター遺伝子の発現を測定する工程、および（ｃ）（ａ）における量を、試験化合物と接触させていない対応する対照に存在する量と比較し、その結果、発現したレポーター遺伝子の量が、対照における量と比較して変化している場合、変形性関節症またはその症状を予防、治療、管理、または改善する能力について試験される化合物が同定される工程を包含する。

【０３５６】

当業者に周知である任意のレポーター遺伝子が、本発明の方法に従って使用されるレポーター遺伝子構築物中で使用されてもよい。レポーター遺伝子とは、その存在（例えば、ＲＴ－ＰＣＲ、ノーザンブロット、ウェスタンブロット、ＥＬＩＳＡなどによる）または活性のいずれかによって容易に検出可能である、ＲＮＡ転写物またはタンパク質をコードするヌクレオチド配列をいう。レポーター遺伝子の非限定的な例は、以下の表５に列挙されている。レポーター遺伝子は入手され、当業者に周知である任意の方法によってエレメントのヌクレオチド配列が決定されてもよい。レポーター遺伝子のヌクレオチド配列は、例えば、文献から、またはＧｅｎＢａｎｋなどのデータベースから入手することができる。代替的には、レポーター遺伝子をコードするヌクレオチド配列は、適切な供給源からの核酸から生成されてもよい。特定のレポーター遺伝子をコードする核酸を含むクローンが利用可能でないが、レポーター遺伝子の配列が公知である場合、レポーターをコードする核酸は化学合成されてもよいし、または適切な供給源（例えば、ｃＤＮＡライブラリー、またはレポーター遺伝子を発現する任意の組織もしくは細胞から生成したｃＤＮＡライブラリー、またはそこから単離した核酸、好ましくはポリＡ＋ＲＮＡ）からＰＣＲによって入手されてもよい。一旦、レポーター遺伝子のヌクレオチド配列が決定されると、レポーター遺伝子のヌクレオチド配列は、例えば、アミノ酸の置換、欠失、および／または挿入を行うために、ヌクレオチド配列の操作のために当該分野で周知の方法、例えば、組換えＤＮＡ技術、部位特異的変異誘発、ＰＣＲなど（例えば、Sambrookら、１９９０，分子クローニング、実験室マニュアル(Molecular Cloning, A Laboratory Manual) 第２版、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, ニューヨーク州およびAusubelら編、１９９８，分子生物学の最新のプロトコル、John Wiley & Sons, ニューヨーク州、に記載される技術を参照のこと、これらの両方はそれらの全体が参照により本明細書に援用される）を使用して操作され、異なるアミノ酸配列を有するレポーター遺伝子を生成してもよい。

【表１１】

表11：レポーター遺伝子およびレポーター遺伝子産物の特性

| レポーター遺伝子 | タンパク質活性および測定値 |
|---|---|
| CAT（クロラムフェニコール アセチルトランスフェラーゼ） | 放射活性アセチル基をクロラムフェニコールに転移、または、薄層クロマトグラフィーおよびオートラジオグラフィーによる検出 |
| GAL（β－ガラクトシダーゼ） | 無色のガラクトシダーゼを加水分解し着色生成物を得る |
| GUS（β-グルクロニダーゼ） | 無色のグルクロニダーゼを加水分解し、着色生成物を得る |
| LUC（ルシフェラーゼ） | ルシフェリンを酸化し、光子を放出する |
| GFP（グリーン蛍光タンパク質） | 基質を伴わない蛍光タンパク質 |
| SEAP（分泌性アルカリホスファターゼ） | 適切な基質または発色団を生成する基質との発光反応 |
| HRP（西洋ワサビペルオキシダーゼ） | 酸化水素の存在下で3，3’，5，5’-テトラメチルベンジジンの酸化により着色複合体を形成 |
| AP（アルカリホスファターゼ） | 適切な基質または発色団を生成する基質との発光反応 |

【０３５７】

本発明に従って、本発明のバイオマーカーの１つ以上、すべて、または任意の組み合わせを天然にまたは正常に発現する細胞は、本明細書に記載される方法において使用することができる。代替的には、細胞は、当該分野で周知でありかつ本明細書に記載される方法において使用される技術を用いて、本発明のバイオマーカーの１つ以上、すべて、もしくは任意の組み合わせ、またはレポーター遺伝子を発現するように操作することができる。このような技術の例には、リン酸カルシウム沈殿（例えば、Graham & Van der Eb，１９７８，Virol．52：546を参照）、デキストラン媒介トランスフェクション、リン酸カルシウム媒介トランスフェクション、ポリブレン媒介トランスフェクション、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション、リポソーム中での核酸のカプセル化、および核への核酸の直接的マイクロインジェクションが含まれるがこれらに限定されない。

【０３５８】

特定の実施形態において、本明細書に記載される方法において使用される細胞は、軟骨細胞、リンパ球（Ｔリンパ球またはＢリンパ球）、単球、好中球、マクロファージ、好酸球、好塩基球、赤血球、または血小板である。好ましい実施形態において、本明細書に記

載される方法において使用される細胞は軟骨細胞である。別の好ましい実施形態において、本明細書に記載される方法において使用される細胞はリンパ球である。別の実施形態において、本明細書に記載される方法において使用される細胞は、供給源、例えば、組織から誘導された不死化細胞株である。

【０３５９】

核酸の翻訳を、および任意にしかし好ましくは転写を、可能にする任意の無細胞抽出物は、本明細書に記載される方法に従って使用することができる。無細胞抽出物は、任意の種起源の細胞から単離されてもよい。例えば、無細胞翻訳抽出物は、ヒト細胞、培養マウス細胞、培養ラット細胞、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞、Xenopus卵母細胞、ウサギ網状赤血球、コムギ胚芽、またはライムギ胚芽から単離されてもよい（例えば、Krieg & Melton, １９８４, Nature 308: 203、およびDignamら、１９９０ Methods Enzymol. 182: 194-203を参照）。代替的には、無細胞翻訳抽出物、例えば、ウサギ網状赤血球溶解物およびコムギ胚芽抽出物は、例えば、Promega, （Madison, ウィスコンシン州）から購入することができる。好ましい実施形態において、無細胞抽出物は、ヒト細胞から単離された抽出物である。特定の実施形態において、ヒト細胞はHeLa細胞、リンパ球、または軟骨細胞である。

【０３６０】

本発明のバイオマーカーのＲＮＡ産物および／またはタンパク質産物の発現レベルを調節する能力に加えて、少なくとも特定の例においては、化合物が本発明のバイオマーカーのタンパク質産物の活性を調節することが所望されてもよい。従って、本発明は、変形性関節症またはその症状を予防、治療、管理、または改善する能力について試験される化合物を同定する方法を提供し、これには、本発明の１つ以上のバイオマーカーのタンパク質産物の活性を調節する化合物を同定するための方法が含まれる。このような方法は以下の工程を包含し得る：（ａ）本発明の１つ以上のバイオマーカーのタンパク質産物を発現する細胞を試験化合物と接触させる工程、（ｂ）インキュベーション期間後に、タンパク質産物の活性レベルを決定する工程、および（ｃ）この活性レベルを、試験化合物と接触させていない対応する対照における活性と比較し、その結果、（ａ）における活性のレベルが、対照細胞における活性のレベルと比較して変化している場合、変形性関節症またはその症状を予防、治療、管理、または改善する能力について試験される化合物が同定される工程。特定の実施形態において、活性レベルは、本明細書に記載されるアッセイ（例えば、マイクロアレイまたはＲＴ－ＰＣＲ）または当業者に周知のアッセイを利用することによって決定されるように、対照における発現レベルと比較して、５％、１０％、１５％、２５％、３０％、４０％、５０％、５～２５％、１０～３０％、少なくとも１倍、少なくとも１．５倍、少なくとも２倍、４倍、５倍、１０倍、２５倍、１～１０倍、または５～２５倍変化する。代替的な実施形態において、このような方法は、細胞中に存在する本発明のバイオマーカーの、少なくとも２個、少なくとも３個、少なくとも４個、少なくとも５個、少なくとも６個、少なくとも７個、少なくとも８個、少なくとも９個、少なくとも１０個、少なくとも１２個、少なくとも１５個、少なくとも２０個、少なくとも２５個、少なくとも３０個、少なくとも３５個、少なくとも４０個、少なくとも４５個、少なくとも５０個、１～５個、１～１０個、５～１０個、５～２５個、または１０～４０個、すべてまでの任意の数、またはその任意の組み合わせのタンパク質産物の活性レベルを決定する工程、およびこれらの活性レベルを対照中に存在する量と比較する工程を包含する。

【０３６１】

本発明は、変形性関節症またはその症状を予防、治療、管理、または改善する能力について試験される化合物を同定する方法を提供し、この方法は以下の工程を包含する：（ａ）無細胞抽出物を、本発明の１つ以上のバイオマーカーのタンパク質産物をコードする核酸およびを試験化合物と接触させる工程、（ｂ）インキュベーション期間後に、タンパク質産物の活性レベルを決定する工程、および（ｃ）この活性レベルを、試験化合物と接触させていない対応する対照における活性と比較し、その結果、（ａ）における活性のレベルが、対照細胞における活性のレベルと比較して変化している場合、変形性関節症または

その症状を予防、治療、管理、または改善する能力について試験される化合物が同定される工程。特定の実施形態において、活性レベルは、本明細書に記載されるアッセイ（例えば、マイクロアレイまたはＲＴ－ＰＣＲ）または当業者に周知のアッセイを利用することによって決定されるように、対照における発現レベルと比較して、１％、５％、１０％、１５％、２５％、３０％、４０％、５０％、５～２５％、１０～３０％、少なくとも１倍、少なくとも１．５倍、少なくとも２倍、４倍、５倍、１０倍、２５倍、１～１０倍、または５～２５倍変化する。代替的な実施形態において、このような方法は、サンプル中に存在する本発明のバイオマーカーの、少なくとも１個、少なくとも２個、少なくとも３個、少なくとも４個、少なくとも５個、少なくとも６個、少なくとも７個、少なくとも８個、少なくとも９個、少なくとも１０個、少なくとも１２個、少なくとも１５個、少なくとも２０個、少なくとも２５個、少なくとも３０個、少なくとも３５個、少なくとも４０個、少なくとも４５個、少なくとも５０個、１～５個、１～１０個、５～１０個、５～２５個、または１０～４０個、すべてまでの任意の数、またはその任意の組み合わせのタンパク質産物の活性レベルを決定する工程、およびこれらの活性レベルを対照中に存在する活性レベルと比較する工程を包含する。

【０３６２】

標準的な技術を、本発明のバイオマーカーのタンパク質産物の活性のレベルを決定するために利用することができる。

【０３６３】

５．１８．２　化合物の生物学的活性

変形性関節症またはその症状を予防、治療、管理、または改善する能力について試験される化合物（便宜上、本明細書では「リード」化合物と呼ぶ）の同定に際して、化合物をさらに調べることができる。例えば、本発明の方法を介して同定された化合物は、炎症、例えば、関節炎、およびより好ましくは、変形性関節症の受け入れられている動物モデルにおいてｉｎ　ｖｉｖｏでさらに試験することができる。さらに、これらの方法を介して同定された化合物は、それらの特異性に関して分析することができる。特に、これらの化合物は、軟骨細胞によるＩＩ型コラーゲンおよびプロテオグリカンの製造に対する効果について、当業者に公知の方法、例えば、Nelsonら、J.Clin.Invest. １０２巻, １２号, １９９８年１２月, 2115-2125、変形性関節症を有する患者におけるＩＩ型コラーゲンの合成の変化の証拠（Evidence for Altered Synthesis of Type II Collagen in Patients with Osteoarthritis），およびVenkatesan,N.ら（２００４年１２月）PNAS 101(52): 18087-92、グルクロノシルトランスフェラーゼ－Ｉ遺伝子送達によるプロテオグリカン合成の刺激：軟骨修復を促進するためのストラテジー（Stimulation of proteoglycan synthesis by glucuronosyltransferase-I gene delivery:A strategy to promote cartilage repair）を参照のこと、これらの両方は参照により援用される、によって試験することができる。このようなさらなる化合物の研究のための技術は当業者に周知である。

【０３６４】

１つの実施形態において、リード化合物の効果は、細胞増殖または標的細胞の生存能力を測定することによってアッセイすることができる。このようなアッセイは、変形性関節症に関与する細胞型に代表的な細胞（例えば、軟骨細胞）を用いて実行することができる。代替的には、患者からの細胞を培養することの代わりに、リード化合物は、細胞株の細胞を使用してスクリーニングされてもよい。

【０３６５】

当該分野において周知の多くのアッセイが、リード化合物への曝露後に患者の細胞または細胞株の生存および／または増殖を評価するために使用することができ、例えば、細胞増殖は、ブロモデオキシウリジン（ＢｒｄＵ）取り込み（例えば、Hoshinoら、１９８６, Int.J.Cancer 38, 369、Campanaら、１９８８, J.Immunol.Meth. 107: 79を参照）または（$^{3}$Ｈ）－チミジン取り込み（Chen,J., １９９６, Oncogene 13: 1395-403、Jeoung,J.,１９９５, J.Biol.Chem. 270: 18367-73）を測定することによって、直接細胞計数によって、癌原遺伝子（例えば、ｆｏｓ、ｍｙｃ）または細胞周期マーカー（Ｒｂ、ｃｄｃ２

、サイクリンＡ、Ｄ１、Ｄ２、Ｄ３、Ｅなど）などの公知の遺伝子の転写、翻訳、または活性の変化を検出することによって、アッセイすることができる。このようなタンパク質およびＲＮＡ（例えば、ｍＲＮＡ）および活性のレベルは、当該分野で周知の任意の方法によって決定することができる。例えば、タンパク質は、市販の抗体を使用して、ウェスタンブロッティングまたは免疫沈殿などの公知の免疫診断法によって定量することができる。ｍＲＮＡは、当該分野において周知でありかつ日常的な方法を使用して、例えば、ノーザン分析、ＲＮアーゼ保護、逆転写と関連付けたポリメラーゼ連鎖反応を使用して、定量することができる。細胞生存能力は、トリパンブルー染色または当該分野で公知の他の細胞死もしくは生存能力マーカーを使用することによって評価することができる。特定の実施形態において、細胞ＡＴＰのレベルが、細胞生存能力を決定するために測定される。分化は、例えば、形態学的変化に基づいて目視的に評価することができる。

【０３６６】

軟骨細胞増殖アッセイの１つの例は以下の通りである：軟骨細胞は、以前に記載されたように、ヒト重度変形性関節症軟骨スライスから回収する（Doherty PJ, Zhang H, Trembley L, Manolopoulos V, およびMarshall KW., １９９８, Osteoarthritis and Cartilage 6: 153-160）。次いで細胞を洗浄し、計数し、そしてＤＭＥＭ＋＋中、平底９６ウェルプレート（Corning）中で、$1\times10^4$細胞／ウェルにて播種する。細胞がプレートに結合した後、これらをＤＭＥＭのみで洗浄し、次いで、１０％ＦＣＳを含むかまたは含まないＤＭＥＭ中で、異なる濃度のリード化合物とともに、４８時間インキュベートする。次いで、各ウェル中の細胞数を、１０μｌのＷＳＴ－１（生細胞中のミトコンドリアデヒドロゲナーゼによってホルマザンに切断することができるテトラゾリウム塩）を各ウェルに加えること、１分間徹底的に混合すること、および３７℃で１．５時間インキュベートすることによって決定する。次いで、プレートを、マイクロプレートオートリーダー（BIO-TEK Instruments）によって、４５０ｎｍの吸収においてスキャンする。生存可能細胞の数は、４５０ｎｍにおける吸収を測定することによって定量される、形成したホルマザンの量によって反映される（Lang I, Hoffmann C, Olip H, Pabst MA, Hahn T, Dohr G, Desoye G., ２００１, ヒトの大血管および微小血管の内皮細胞の差動的なマイトジェン応答はそれらの表現型の不均一性を強調する（Differential mitogenic responses of human macrovascular and microvascular endothelial cells to cytokines underline their phenotypic heterogeneity）. Cell Prolif 34: 143-55）。

【０３６７】

リード化合物に曝露された軟骨細胞によるＩＩ型コラーゲンおよびプロテオグリカンの製造に対する効果は、当該分野で周知の技術を用いて決定することができる。さらに、特に変形性関節症の症状の予防、治療、管理、または改善のための治療の有効性を評価するための当該分野において周知の任意のアッセイは、リード化合物を使用して実施することができる。

【０３６８】

動物モデル

化合物は、ヒトにおける使用の前に、適切な動物モデル系において試験することができる。このような動物モデル系には、ラット、マウス、ニワトリ、ウシ、サル、ブタ、イヌ、ウサギなどが含まれるがこれらに限定されない。当該分野で周知である任意の動物系が使用されてもよい。特定の実施形態において、化合物は、マウスモデルにおいて試験される。化合物は、反復して投与することができる。

【０３６９】

受け入れられた動物モデルは、変形性関節症またはその症状の予防、治療、管理、または改善のために、上記の方法を介して同定された化合物の有効性を決定するために利用することができる。このようなモデルは、当該分野で公知であり、かつCrofford L.J.と Wilder R.L., 「動物における関節炎および自己免疫（Arthritis and Autoimmunity in Animal）」, 関節炎および関連症状：リウマチ学の教科書（Arthritis and Allied Conditions:A Textbook of Rheumatology）, McCartyら（編）, ３０章、所収（LeeとFebiger, 1

９９３）に記載される炎症性関節炎の種々の実験動物モデルを含むことができる。当該分野において公知でありかつ広範に使用されている関節炎または炎症性疾患のための主要な動物モデルには、アジュバント誘発性関節炎ラットモデル、コラーゲン誘発性関節炎ラットおよびマウスモデル、ならびに抗原誘発性関節炎ラット、ウサギ、およびハムスターモデルが含まれ、すべてが、その全体が参照により本明細書に援用される、Crofford L.J.とWilder R.L.，「動物における関節炎および自己免疫」，関節炎および関連症状：リウマチ学の教科書，McCartyら（編），３０章所収（LeeとFebiger，１９９３）に記載されている。

【０３７０】

１つの実施形態において、変形性関節症またはその症状の予防、治療、管理、または改善のための化合物の有効性は、カラギーナン誘発性関節炎ラットモデルを使用して決定される。カラギーナン誘発性関節炎は、慢性関節炎または炎症の研究において、ウサギ、イヌ、およびブタにおいてもまた使用されてきた。定量組織形態計測評価は、治療の有効性を決定するために使用される。このようなカラギーナン誘発性関節炎モデルを使用するための方法は、Hansra P.ら、「ラットにおけるカラギーナン誘発性関節炎（Carrageenan-induced Arthritis in the Rat）」，Inflammation，24(2)：141-155，（２０００）において記載されている。当該分野において公知でありかつ記載されるようなザイモサン誘導性炎症動物モデルもまた一般的に使用される。

【０３７１】

化合物の抗炎症活性は、Winter C.A.ら、「抗炎症性薬剤についてのアッセイとしてのラットの後足におけるカラギーナン誘導性浮腫（Carrageenan-induced Edema in Hind Paw of the Rat as an Assay for Anti-inflammatory Drugs）」Proc.Soc.Exp.Biol Med. 111，544-547，（１９６２）に記載された方法の改変を使用して、ラットにおけるカラギーナン誘導性の足の浮腫の阻害を測定することによって評価することができる。このアッセイは、大半の非ステロイド抗炎症薬（ＮＳＡＩＤ）の抗炎症活性についての最初のｉｎｖｉｖｏスクリーニングとして使用されており、ヒトへの有効性の予測と見なされている。試験化合物の抗炎症活性は、媒体を投与した対照群と比較した、試験群の後足の重量の増加の阻害パーセントとして表現される。

【０３７２】

別の実施形態において、変形性関節症またはその症状の予防、治療、管理、および／または改善のための化合物の有効性は、コラーゲン誘発性関節炎（ＣＩＡ）モデルを使用して決定される。ＣＩＡは、ヒトの自己免疫疾患である関節リウマチ（ＲＡ）のための動物モデルである（Trenthornら、１９７７，J.Exp.Med.，146 :857）。この疾患は、異種ＩＩ型コラーゲンの投与によって多くの種において誘導することができる（Courtenayら、１９８０，Nature 283：665、Cathcartら、１９８６，Lab.Invest,54 :26）。関節炎の動物モデルに関しては、加えて、例えば、Holmdahl,R.，１９９９，Curr.Biol.15:R528-530を参照のこと。

【０３７３】

別の実施形態において、変形性関節症またはその症状の予防、治療、管理、および／または改善のための化合物の有効性は、骨形成および／または骨量の減少を決定するアッセイを使用して決定される。卵巣切除誘導性骨再吸収マウス、ラット、およびウサギモデルなどの動物モデルは、骨形成についての動的パラメーターを得るために当該分野において公知である。Yositakeら、またはYamamotoらによって記載されているものなどの方法を使用して、骨量は、マイクロコンピュータ断層撮影分析および骨組織形態計測分析によってｉｎ　ｖｉｖｏで測定される。Yoshitakeら、「オステオポンチン欠損マウスは卵巣切除誘導性骨再吸収に対して抵抗性である（Osteopontin-Deficient Mice Are Resist ant to Ovariectomy-Induced Bone Resorption）」，Proc.Natl.Acad.Sci. 96：8156-8160，（１９９９）、Yamamotoら，「インテグリンリガンド　エキスタチンは卵巣切除したマウスおよびラットにおける骨量の減少を阻害する（The Integrin Ligand Echistatin Prevents Bone Loss in Ovariectomized Mice and Rats）」，Endocrinology 139(3)：1411-1419

，（１９９８）、両方がそれらの全体が参照により本明細書に援用される。

【０３７４】

毒性

本発明に従って同定された化合物の毒性および／または有効性は、例えば、ＬＤ$_{50}$（集団の５０％に対して致死的な用量）およびＥＤ$_{50}$（集団の５０％において治療有効量）を決定するために、細胞培養または実験動物において標準的な薬理学的手順によって決定することができる。本発明に従って同定される化合物の細胞毒性を評価するために使用することができる細胞または細胞株には、末梢血単核球（ＰＢＭＣ）、Ｃａｃｏ－２細胞、およびＨｕｈ７細胞が含まれるがこれらに限定されない。毒性作用と治療効果との間の用量比が治療指数であり、これは比率ＬＤ$_{50}$／ＥＤ$_{50}$として表現することができる。大きな治療指数を示す、本発明に従って同定された化合物が好ましい。毒性の副作用を示す、本発明に従って同定された化合物が使用されてもよいが、罹患していない細胞に対する損傷の可能性を最小化するために、罹患した組織の部位にこのような薬剤を標的化する送達系を設計し、それによって副作用を減少させるという配慮がなされるべきである。

【０３７５】

細胞培養アッセイおよび動物研究から得られたデータは、ヒトにおける使用のために本発明に従って同定された化合物の一定範囲の投与量を処方する際に使用することができる。このような薬剤の投与量は、好ましくは、ほとんど毒性がないかまたは全く毒性がない、ＥＤ$_{50}$を含む一連の血中濃度にある。この投与量は、利用される剤形および使用される投与経路に依存して、この範囲内で変動してもよい。本発明の方法において使用される任意の薬剤について、治療有効用量は、最初に細胞培養アッセイから見積もることができる。用量は、細胞培養において決定されるような、ＩＣ$_{50}$（症状の最大半減阻害を達成する化合物の濃度）を含む循環血漿濃度範囲を達成するように動物モデルにおいて処方されてもよい。このような情報は、ヒトにおいて有用な用量をより正確に決定するために使用することができる。血漿中のレベルは、例えば、高速液体クロマトグラフィーによって測定されてもよい。

【０３７６】

コンジナーまたはアナログの設計

所望の生物学的活性を示す化合物は、有用な薬理学的活性を有するコンジナー（同類物）またはアナログ（類似物）の開発または設計のためのリード化合物として使用することができる。例えば、一旦リード化合物が同定されると、分子モデリング技術は、より有効であり得る化合物の改変体を設計するために使用することができる。分子モデリングシステムの例は、ＣＨＡＲＭおよびQUANTAプログラム（Polygen Corporation, Waltham, マサチューセッツ州）である。ＣＨＡＲＭは、エネルギー最小化および分子動力学の関数を実行する。QUANTAは、構造、グラフィックモデリング、および分子構造の分析を実行する。QUANTAは、相互作用的な構造、修飾、可視化、および互いとの分子の挙動いの分析を可能にする。

【０３７７】

多くの論文が、特定のタンパク質と相互作用的である薬剤のコンピュータモデリングを概説しており、これらは例えば以下である：Rotivinenら、１９８８, Acta Pharmaceutical Fennica 97: 159-166、Ripka, １９９８, New Scientist 54-57、McKinalyとRossmann, １９８９, Annu.Rev.Pharmacol.Toxiciol. 29: 111-122、PerryとDavies, ＱＳＡＲ：薬剤設計における定量構造－活性との関係（Quantitative Structure-Activity Relationships in Drug Design）pp.189-193（Alan R.Liss,Inc. １９８９）、LewisとDean, １９８９, Proc.R.Soc.Lond. 236: 125-140および141-162、Askewら、１９８９, J.Am.Chem.Soc. 111 : 1082-1090。化学物質をスクリーニングしかつ図形的に描く他のコンピュータプログラムは、BioDesign,Inc.（Pasadena, カリフォルニア）, Allelix,Inc. (Mississauga, Ontario, カナダ), およびHypercube,Inc. （Cambridge, オンタリオ）などの企業から市販されている。これらは、最初に、特定のタンパク質に特異的である薬剤への適用のために設計されるが、これらは任意の同定された領域に特異的である薬剤の設計に適合

させることができる。アナログおよびコンジナーは、生物学的活性についての上記のスクリーニングを使用して、関連のタンパク質（すなわち、本発明のバイオマーカーのタンパク質産物）への結合について試験することができる。代替的には、スクリーニングにおいて確認されるように、ほとんど生物学的活性がないか、または全く生物学的活性がないリード化合物もまた、生物学的活性を有する化合物のアナログおよびコンジナーを設計するために使用することができる。

【０３７８】

５．１８．３　化合物

本明細書に記載される方法によって試験および同定することができる化合物には、以下を含む任意の供給元から市販されている化合物を含むことができるがこれらに限定されない：Aldrich (1001 West St.Paul Ave., Milwaukee, ウィスコンシン州 53233)、Sigma Chemical (P.O.Box 14508, St Louis, ミズーリ州 63178)、Fluka Chemie AG (Industriestrasse 25, CH-9471 Buchs, スイス (Fluka Chemical Corp. 980 South 2nd Street, Ronkonkoma, ニューヨーク州 11779))、Eastman Chemical Company, Fine Chemicals (P.O Box 431, Kingsport, テネシー州 37662)、Boehringer Mannheim GmbH (Sandhofer Strasse 116,D-68298 Mannheim)、Takasago (4 Volvo Drive, Rockleigh, ニュージャージー州 07647)、SST Corporation (635 Brighton Road, Clifton, ニュージャージー州 07012)、Ferro (111 West Irene Road, Zachary, ルイジアナ州 70791)、Riedel-deHaen Aktiengesellschaft (P.O.Box D-30918,Seelze, ドイツ)、PPG Industries Inc.、Fine Chemicals (One PPG Place,34th Floor, Pittsburgh, ペンシルヴェニア州15272）。さらに、微生物、真菌、植物、または動物の抽出物を含む、任意の種類の天然産物が、本明細書の方法を使用してスクリーニングされてもよい。

【０３７９】

合成または天然の化合物の大規模なライブラリーからの化合物をスクリーニングすることができる。サッカリド、ペプチド、および核酸ベースの化合物のランダムまたは指向性の合成のために、多数の手段が現在使用されている。合成化合物ライブラリーは、Maybridge Chemical Co.（Trevillet, Cornwall, 英国）、Comgenex（Princeton, ニュージャージー州）、Brandon Associates（Merrimack, ニューハンプシャー州）、およびMicrosource（New Milford, コネチカット州）を含む多くの企業から市販されている。珍しい化学ライブラリーはAldrich（Milwaukee, ウィスコンシン州）から市販されている。コンビナトリアルライブラリーが利用可能でありかつ調製される。代替的には、細菌、真菌、植物、または動物の抽出物の型である天然の化合物のライブラリーは、例えば、Pan Laboratories（Bothell, ワシントン州）もしくはMycoSearch（ノースカロライナ州）から利用可能であり、または当該分野において周知の方法によって容易に製造可能である。加えて、天然および合成により製造されたライブラリーおよび化合物は、従来の化学的、物理的、および生化学的な手段を通して容易に修飾される。

【０３８０】

さらに、小分子試験化合物を含む、試験化合物の多様なライブラリーが利用されてもよい。本発明の方法を使用してスクリーニングされたライブラリーは、種々の型の化合物を含むことができる。本発明の方法に従ってスクリーニングすることができるライブラリーの例には以下が含まれるがこれらに限定されない：ペプトイド、ランダムバイオオリゴマー、ヒダントイン、ベンゾジアゼピン、およびジペプチドなどのディバーソマー、ビニル性ポリペプチド、非ペプチド性ペプチド模倣剤、オリゴカルバメート、ペプチジルホスホネート、ペプチド核酸ライブラリー、抗体ライブラリー、炭水化物ライブラリー、および小分子ライブラリー（好ましくは、有機小分子ライブラリー）。ある実施形態において、スクリーニングされるライブラリー中の化合物は核酸またはペプチド分子である。非限定的な例において、ペプチド分子は、ファージディスプレイライブラリー中に存在することができる。他の実施形態において、化合物の型には以下が含まれるがこれらに限定されない：非天然型アミノ酸、例えば、Ｄ－アミノ酸、アミノ酸のリンアナログ、例えば、α－アミノリン酸およびα－アミノリン酸、または非ペプチド結合を有するアミノ酸を含むペ

プチドを含むペプチドアナログ、核酸アナログ、例えば、ホスホロチオエートおよびＰＮＡ、ホルモン、抗原、合成または天然型薬剤、アヘン剤、ドーパミン、セロトニン、カテコールアミン、トロンビン、アセチルコリン、プロスタグランジン、有機分子、フェロモン、アデノシン、スクロース、グルコース、ラクトース、およびガラクトース。ポリペプチドまたはタンパク質のライブラリーもまた、本発明のアッセイにおいて使用することができる。

【０３８１】

特定の実施形態において、コンビナトリアルライブラリーは、ベンゾジアゼピン、イソプレノイド、チアゾリジノン、メタチアザノン、ピロリジン、モルホリノ化合物、およびベンゾジアゼピンを含むがこれらに限定されない小分子有機ライブラリーである。別の実施形態において、コンビナトリアルライブラリーは、ペプトイド、ランダムバイオーオリゴマー、ベンゾジアゼピン、ヒダントインなどのディバーソマー、ベンゾジアゼピンおよびジペプチド、ビニル性ポリペプチド、非ペプチド性ペプチド模倣剤、オリゴカルバメート、ペプチジルホスホネート、ペプチド核酸ライブラリー、抗体ライブラリー、または炭水化物ライブラリーを含む。コンビナトリアルライブラリーは、それ自体市販されている。例えば、ライブラリーは、例えば、Specs and BioSpecs B.V. (Rijswijk, オランダ)、Chembridge Corporation（San Diego, カリフォルニア州）、Contract Service Company（Dolgoprudny, Moscow地方, ロシア）、Comgenex USA Inc.（Princeton, ニュージャージー州）、Maybridge Chemicals Ltd.（Cornwall PL34 OHW, 英国）、Asirtex（Moscow, ロシア）、ComGenex（Princeton, ニュージャージー州）、Ru,Tripos,Inc.（St. Louis, ミシシッピ州）、ChemStar,Ltd（Moscow, ロシア）、3D Pharmaceuticals（Exton, ペンシルヴェニア州）、およびMartek Biosciences（Columbia, メリーランド州）から市販されてもよい。

【０３８２】

好ましい実施形態において、ライブラリーは、ライブラリーの化合物が、細胞の取り込みのためにより受け入れ可能であるようにあらかじめ選択される。例えば、化合物は、細胞に入る化合物の可能性を高める、サイズ、親油性、疎水性、および水素結合などであるがこれらに限定されない特定のパラメーターに基づいて選択される。別の実施形態において、化合物は、三次元または四次元コンピューター計算プログラムによって分析される。

【０３８３】

本発明の方法に従う使用のためのコンビナトリアル化合物ライブラリーが合成されてもよい。薬理学的、生物学的、または他の活性についてスクリーニングすることができる、有機小化合物の大きなコレクションまたはライブラリーの作製に向けた合成方法には大きな関心が存在する。巨大なコンビナトリアルライブラリーを作製するために適用される合成方法は、溶液中で、または相中で、すなわち、支持体上で実施される。固相合成は、過剰量の試薬を容易に加え、各反応段階の後に洗い流すことができるので、多段階反応を実行すること、および反応を高収率で完了させることをより容易にする。固相コンビナトリアル合成はまた、単離、精製、およびスクリーニングを改善する傾向がある。しかし、より伝統的な固相化学は、固相化学よりもより広範な種々の有機反応を補助する。

【０３８４】

本発明のコンビナトリアル化合物ライブラリーは、その全体が参照により本明細書に援用される、Kilcoinらへの米国特許第６，１９０，６１９号に記載される装置を使用して合成されてもよい。米国特許第６，１９０，６１９号は、複数の個別の化合物の並行した合成のため、または化合物のコンビナトリアルライブラリーのための複数の反応容器を保持することが可能である合成装置を開示している。

【０３８５】

１つの実施形態において、コンビナトリアル化合物ライブラリーは、溶液中で合成することができる。その全体が参照により本明細書に援用される、Bogerらへの米国特許第６，１９４，６１２号に開示される方法は、コンビナトリアルライブラリーの溶液相合成のためのテンプレートとして有用である化合物を特徴とする。テンプレートは、液体／液体

または固体／液体の抽出を使用して、反応産物が未反応の反応物質から容易に精製できるように設計される。テンプレートを使用してコンビナトリアル合成によって産生される化合物は、好ましくは、有機小分子である。ライブラリー中のある化合物は、非ペプチドまたはペプチドの効果を模倣してもよい。コンビナトリアル化合物ライブラリーの固相合成とは対照的に、液相合成は、多段階固相合成の個々の段階をモニターするために特定化されたプロトコルの使用を必要としない（Egnerら、１９９５，J.Org.Chem. 60: 2652、Andersonら、１９９５，J.Org.Chem. 60: 2650、Fitch ら、１９９４，J.Org.Chem. 59: 7955、Lookら、１９９４，J.Org.Chem. 49: 7588、Metzgerら、１９９３，Angew.Chem., Int.Ed.Engl. 32: 894、Youngquistら、１９９４，Rapid Commun. Mass Spect. 8: 77、Chuら、１９９５，J.Am.Chem.Soc. 117: 5419、Brummelら、１９９４，Science 264:399、およびStevanovicら、１９９３，Bioorg.Med.Chem.Lett. 3: 431）。

【０３８６】

本発明の方法のために有用なコンビナトリアル化合物ライブラリーは、固体支持体上で合成することができる。１つの実施形態において、合成の間に支持体を分離および混合するプロトコルである分割合成法は、固体支持体上の化合物のライブラリーを合成するために使用される（例えば、Lamら、１９９７，Chem.Rev. 97: 41-448、Ohlmeyerら、１９９３，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90: 10922-10926およびそこに引用される参考文献を参照）。最終ライブラリーにおける各固体支持体は、その表面に結合された実質的に１つの型の化合物を有する。１つの産物が各支持体に結合されている、固体支持体上でコンビナトリアルライブラリーを合成するための他の方法は、当業者に公知である（例えば、Nefziら、１９９７，Chem.Rev. 97: 449-472を参照）。

【０３８７】

本発明のある実施形態において、化合物は、リンカーを介して固体支持体に結合させることができる。リンカーは、統合型でありかつ固体支持体の一部であり得、または非統合型であってもよく、固体支持体上で合成され、もしくは合成後にそこに結合されるかのいずれかである。リンカーは、固体支持体への化合物の結合の点を提供するためだけではなく、リンカーの性質に依存して、異なる分子の基が異なる条件下で固体支持体から切断されることを可能にするためにも有用である。例えば、リンカーは、とりわけ、求電子性に切断され、求核性に切断され、光切断可能であり、酵素切断され、金属によって切断され、還元条件下で切断され、または酸化条件下で切断されることが可能である。好ましい実施形態において、化合物は、化合物の高スループットスクリーニングの前に、固体支持体から切断される。

【０３８８】

ライブラリーが化合物のアレイまたはマイクロアレイを含み、ここで、各化合物がアドレスまたは識別子を有する場合、化合物は、例えば、個々の試験アッセイに適用されたもともとの化合物リストに対してポジティブサンプルを相互参照することによって、逆重畳することができる。ライブラリーがペプチドまたは核酸ライブラリーである場合、化合物の配列は、ペプチドまたは核酸の配列を直接配列決定によって決定することができる。このような方法は当業者に周知である。

【０３８９】

多数の物理化学的技術が、化合物のデノボ特徴付けのために使用することができる。このような技術の例には、質量スペクトル分析、ＮＭＲスペクトル分析、Ｘ線結晶解析、および振動スペクトル分析が含まれるがこれらに限定されない。

【０３９０】

５．１９　変形性関節症またはその症状を予防、治療、管理、または改善するための同定された化合物の使用

本発明は、変形性関節症またはその症状を予防、治療、管理、または改善する方法を提供し、上記方法は、本発明の方法に従って同定された１種以上の化合物を、その必要がある被験体に投与する工程を包含する。好ましい実施形態において、被験体はヒトである。

【０３９１】

１つの実施形態において、本発明は、変形性関節症またはその症状を予防、治療、管理、または改善する方法を提供し、上記方法は、本発明の方法に従って同定された１種以上の化合物の予防的または治療的有効量の１回の用量を、その必要がある被験体に投与する工程を包含する。特定の実施形態において、本発明の方法に従って同定された化合物は、このような化合物が変形性関節症またはその症状を予防、治療、管理、または改善するために以前に使用された場合には、変形性関節症またはその症状を予防、治療、または改善するために投与されない。別の実施形態において、本発明の方法に従って同定された化合物は、このような化合物が変形性関節症またはその症状を予防、治療、管理、または改善するために使用されることが示唆されている場合には、変形性関節症またはその症状を予防、治療、管理、または改善するために投与されない。別の実施形態において、本発明の方法に従って同定された化合物が、本発明の１つのみのバイオマーカーのタンパク質産物またはＲＮＡ産物に特異的に結合し、ならびに／またはその発現および／もしくは活性のレベルを変化させる。なお別の実施形態において、本発明の方法に従って同定された化合物は、少なくとも２個、少なくとも３個、少なくとも４個、少なくとも５個、少なくとも１０個、少なくとも１５個、少なくとも２０個、少なくとも２５個、少なくとも３０個、少なくとも３５個、少なくとも４０個までの、またはそれ以上の任意の数の本発明のバイオマーカーのタンパク質産物またはＲＮＡ産物に特異的に結合し、ならびに／またはその発現および／もしくは活性のレベルを変化させる。

【０３９２】

特定の実施形態において、本発明の方法に従って同定された化合物は、軟骨細胞の同化活性および／または異化活性を亢進または低下させる。好ましくは、このような化合物は、軟骨細胞の同化活性および／または異化活性を、未投与の軟骨細胞と比較して、１．０倍より多く、より好ましくは、１．５～５倍、および最も好ましくは、５～１００倍、亢進または低下させる。別の実施形態において、本発明の方法に従って同定された化合物は、軟骨変性、または軟骨変性に関連する、罹患した関節における疼痛、腫脹、脱力、および／または機能的能力の損失を含む、変形性関節症に関連する症状および／または変化の少なくとも１つを改善する。特定の実施形態において、変形性関節症またはその症状を予防、治療、管理、または改善するために投与される予防薬剤または治療薬剤は、合成化合物または天然産物（例えば、植物抽出物または培養上清）、または化合物の混合物である。

【０３９３】

本発明はまた、変形性関節症またはその症状を予防、治療、管理、または改善する方法を提供し、上記方法は、本明細書に記載されるスクリーニング方法を利用して同定された１種以上の化合物、および１種以上の他の治療（例えば、予防薬剤または治療薬剤および外科手術）をその必要がある被験体に投与する工程を包含する。特定の実施形態において、このような治療は現在使用されており、使用されてきたか、または変形性関節症またはその症状の予防、治療、管理、または改善において有用であることが知られている（本明細書以下の１．２１．２？？節に列挙した予防薬剤または治療薬剤を含むがこれらに限定されない）。本発明の併用療法の治療（例えば、予防薬剤または治療薬剤）は、逐次的にまたは同時に投与することができる。特定の実施形態において、本発明の併用療法は、本発明に従って同定された化合物、および上記化合物と同じ作用のメカニズムを有する少なくとも１つの他の治療を含む。別の特定の実施形態において、本発明の併用療法は、本発明の方法に従って同定された化合物、および上記化合物とは異なる作用のメカニズムを有する少なくとも１つの治療（例えば、予防薬剤または治療薬剤）を含む。本発明の併用療法は、化合物とともに、相加効果または相乗効果を有するように機能させることによって、本発明の化合物の予防効果または治療効果を改善する。本発明の併用療法は、治療（例えば、予防薬剤または治療薬剤）に関連する副作用を減少する。

【０３９４】

併用療法の予防薬剤または治療薬剤は、同じ医薬組成物中で被験体に投与することができる。代替的には、併用療法の予防薬剤または治療薬剤は、別々の医薬組成物中で同時に

被験体に投与することができる。予防薬剤または治療薬剤は、同じまたは異なる投与経路によって被験体に投与されてもよい。

【０３９５】

特定の実施形態において、本明細書に記載されるアッセイにおいて同定された１種以上の化合物を含む医薬組成物は、変形性関節症またはその症状を予防、治療、管理、または改善するために、被験体、好ましくは、ヒトに投与される。本発明に従って、医薬組成物は、１種以上の予防薬剤または治療薬剤を含んでもよい。好ましくは、このような薬剤は、現在使用されており、使用されてきたか、または変形性関節症またはその症状の予防、治療、管理、または改善において有用であることが知られている。

【０３９６】

本発明の方法に従って同定された化合物は、第１の、第２の、第３の、第４の、または第５の一連の変形性関節症のための治療として使用されてもよい。本発明は、変形性関節症のための従来の治療に対して不応性である被験体において、変形性関節症またはその症状を治療、管理、または改善するための方法を提供し、上記方法は、本発明の方法に従って同定された化合物の予防有効量または治療有効量の用量を上記被験体に投与する工程を包含する。

【０３９７】

本発明は、変形性関節症のための既存の単独の薬剤治療に対して不応性である被験体において、変形性関節症またはその症状を治療、管理、または改善するための方法を提供し、上記方法は、本発明の方法に従って同定された化合物の予防有効量または治療有効量の用量、および１種以上の他の治療（予防薬剤または治療薬剤）の予防有効量または治療有効量の用量を上記被験体に投与する工程を包含する。この方法はまた、他の治療に対して不応性であることが判明し、もはやその治療を受けていない患者に対して、任意の他の治療と併用して、本発明の方法に従って同定された化合物を投与することによって、変形性関節症を治療または管理するための方法を提供する。本発明はまた、変形性関節症を有し、かつ以前に他の治療を受けたという理由により免疫抑制された患者の治療または管理のための方法を提供する。本発明はまた、ホルモン療法および／または生物療法／免疫治療が毒性が強すぎることが判明したか、または毒性が強いと判明する可能性があり、すなわち、治療または管理される被験体にとって受け入れ難いまたは耐え難い副作用を生じる、変形性関節症の治療または管理のための代替方法を提供する。

【０３９８】

５．１９．１　変形性関節症またはその症状を治療、管理、または改善する際の使用のための化合物

変形性関節症またはその症状を予防、治療、管理、および／または改善するために、本発明の方法に従って使用することができる化合物の代表的な非限定的な例は、以下に詳細に記載される。

【０３９９】

第１に、このような化合物は、例えば、本発明のバイオマーカーのタンパク質産物またはＲＮＡ産物の発現または活性を下方制御することができる、アンチセンス、リゾザイム、または三重らせん化合物を含むことができる。

【０４００】

第２に、このような化合物は、例えば、本発明のバイオマーカーのタンパク質産物もしくはＲＮＡ産物の発現、または本発明のバイオマーカーのタンパク質産物の活性を調節することができる抗体組成物を含むことができる。特定の実施形態において、この抗体組成物は、本発明のバイオマーカーのタンパク質産物もしくはＲＮＡ産物の発現、または本発明のバイオマーカーのタンパク質産物の活性を下方制御する。このような化合物は、以下のサブセクションに詳細に記載される。

【０４０１】

第３に、このような化合物は、例えば、本発明のバイオマーカーのタンパク質産物を含むことができる。本発明は、変形性関節症またはその症状を予防、治療、管理、および／

または改善するために、本発明のバイオマーカーのタンパク質産物を模倣するように選択されるペプチドまたはペプチド模倣剤の使用を包含する。さらに、このような化合物は、例えば、本発明のバイオマーカーのタンパク質産物もしくはＲＮＡ産物の発現、または本発明のバイオマーカーのタンパク質産物の活性を調節することができる、ドミナントネガティブポリペプチドを含むことができる。

【０４０２】

本発明の方法はまた、変形性関節症またはその症状を予防、治療、管理、または改善するための本発明のバイオマーカーのタンパク質産物の誘導体、アナログ、およびフラグメントの使用を包含する。特に、本発明は、変形性関節症またはその症状を予防、治療、管理、または改善するためのこのようなタンパク質の１つ以上のドメインを含む本発明のバイオマーカーのタンパク質産物のフラグメントの使用を包含する。別の特定の実施形態において、本発明は、本発明のバイオマーカーのタンパク質産物、または融合物として発現されるこのようなタンパク質のアナログ、誘導体、もしくはフラグメント、またはキメラタンパク質産物（異種タンパク質配列に結合されたペプチドを介して結合されたタンパク質、フラグメント、アナログ、または誘導体を含む）の使用を包含する。

【０４０３】

特定の実施形態において、本発明のバイオマーカーの少なくとも１個、少なくとも２個、少なくとも３個、少なくとも４個、少なくとも５個、少なくとも６個、少なくとも７個、少なくとも８個、少なくとも９個、少なくとも１０個、少なくとも１５個、少なくとも２０個、少なくとも２５個、少なくとも３０個、少なくとも３５個、少なくとも４０個、少なくとも４５個、少なくとも５０個、またはそれ以上のアンチセンスヌクレオチドは、変形性関節症またはその症状を予防、治療、管理、または改善するために投与される。他の実施形態において、本発明のバイオマーカーのタンパク質産物、またはそのフラグメント、アナログ、もしくは誘導体の１つ以上が、変形性関節症またはその症状を予防、治療、管理、または改善するために投与される。他の実施形態において、本発明のタンパク質産物に特異的に結合する１つ以上の抗体は、変形性関節症またはその症状を予防、治療、管理、または改善するために投与される。他の実施形態において、１つ以上のドミナントネガティブポリペプチドが、変形性関節症またはその症状を予防、治療、管理、または改善するために投与される。

【０４０４】

アンチセンス、リボザイム、三重らせん組成物

標準的な技術は、本明細書に記載される方法の一部としての使用のために、アンチセンス、三重らせん、またはリボザイム分子を産生するために利用することができる。最初に、標準的な技術は、アンチセンス核酸分子、すなわち、例えば、二本鎖ｃＤＮＡ分子のコード鎖に相補的であるかまたはｍＲＮＡ配列に相補的である、関連のポリペプチドをコードするセンス核酸に相補的である分子の産生のために利用することができる。従って、アンチセンス核酸は、センス核酸に対して水素結合することができる。アンチセンス核酸は、全体のコード鎖、またはその一部のみ、例えば、タンパク質コード領域（またはオープンリーディングフレーム）のすべてまたは一部に相補的であり得る。アンチセンス核酸分子は、関連のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列のコード鎖の非コード領域のすべてまたは一部に対するアンチセンスであり得る。非コード領域（「５’および３’非翻訳領域」）は、コード領域に隣接する５’および３’配列であり、アミノ酸に翻訳されない。

【０４０５】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、約５個、１０個、１５個、２０個、２５個、３０個、３５個、４０個、４５個、または５０個またはそれ以上までの任意の数のヌクレオチドの長さであり得る。本発明のアンチセンス核酸は、当該分野で公知の手順を使用して、化学合成および酵素的ライゲーションを使用して構築することができる。例えば、アンチセンス核酸（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド）は、天然型ヌクレオチド、または分子の生物学的安定性を高めるようにもしくはアンチセンスとセンスの核酸との間に形

成される二重鎖の物理的安定性を高めるように設計された様々に修飾されたヌクレオチドを使用して、化学的に合成することができ、例えば、ホスホロチオエート誘導体およびアクリジン置換ヌクレオチドを使用することができる。アンチセンス核酸を生成するために使用することができる修飾ヌクレオチドの例には以下が含まれる：５－フルオロウラシル、５－ブロモウラシル、５－クロロウラシル、５－ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、４－アセチルシトシン、５－（カルボキシヒドロキシメチル）ウラシル、５－カルボキシメチルアミノメチル－２－チオウリジン、５－カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、β－Ｄ－ガラクトシルクエオシン、イノシン、Ｎ６－イソペンテニルアデニン、１－メチルグアニン、１－メチルイノシン、２，２－ジメチルグアニン、２－メチルアデニン、２－メチルグアニン、３－メチルシトシン、５－メチルシトシン、Ｎ６－アデニン、７－メチルグアニン、５－メチルアミノメチルウラシル、５－メトキシアミノメチル－２－チオウラシル、β－Ｄ－マンノシルクエノシン、５’－メトキシカルボキシルメチルウラシル、５－メトキシウラシル、２－メチルチオ－Ｎ６－イソペンテニルアデニン、ウラシル－５－オキシ酢酸（ｖ）、ワイブトキソシン、プソイドウラシル、クエオシン、２－チオシトシン、５－メチル－２－チオウラシル、２－チオウラシル、４－チオウラシル、５－メチルウラシル、ウラシル－５－オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル－５－オキシ酢酸（ｖ）、５－メチル－２－チオウラシル、３－（３－アミノ－３－Ｎ－２－カルボキシプロピル）ウラシル、（ａｃｐ３）ｗ、および２，６－ジアミノプリン。代替的には、アンチセンス核酸は、核酸がアンチセンス方向でサブクローニングされた発現ベクターを使用して生物学的に産生することができる（すなわち、挿入された核酸から転写されたＲＮＡは、関連の標的核酸に対してアンチセンス方向である）。

【０４０６】

アンチセンス核酸分子は、これらが関連のポリペプチドをコードする細胞ｍＲＮＡにハイブリダイズするかまたはこれに結合するように、被験体に投与され、またはｉｎ　ｓｉｔｕで生成されて、それによって、例えば、転写および／または翻訳を阻害することによって発現を阻害する。このハイブリダイゼーションは、安定な二重鎖を形成するために相補的な従来のヌクレオチドによってであり、または例えば、ＤＮＡ二重鎖に結合するアンチセンス核酸分子の場合には、二重らせんの大きな溝の中での特異的相互作用を通してであり得る。本発明のアンチセンス核酸分子の投与経路の例には、組織、例えば、関節（例えば、膝、腰、肘、および指関節）の部位における直接注射が含まれる。代替的には、アンチセンス核酸は、選択された細胞を標的とするように修飾し、次いで、全身投与することができる。例えば、全身投与のために、アンチセンス分子は、それらが、選択された細胞、例えば、Ｔ細胞または軟骨細胞の表面上で発現される受容体または抗原に特異的に結合するように、アンチセンス核酸分子を、細胞表面受容体または抗原に結合するペプチドまたは抗体に連結することによって、修飾することができる。アンチセンス核酸はまた、以下に記載されるベクター、例えば、遺伝子治療ベクターを使用して、細胞に送達することができる。アンチセンス分子の十分な細胞内濃度を達成するために、アンチセンス核酸分子が強力なｐｏｌ　ＩＩまたはｐｏｌ　ＩＩＩプロモーターの制御下に配置されているベクター構築物が好ましい。

【０４０７】

関連のアンチセンス核酸分子は、α－アノマー性核酸分子であり得る。α－アノマー性核酸分子は、相補的ＲＮＡと特異的二本鎖ハイブリッドを形成し、ここでは、通常のα－単位とは反対に、鎖が互いに平行になっている（Gaultierら、１９８７，Nucleic Acids Res. 15: 6625-6641）。アンチセンス核酸分子はまた、２’－ｏ－メチルリボヌクレオチド（Inoueら、１９８７，Nucleic Acids Res. 15: 6131-6148）またはキメラＲＮＡ－ＤＮＡアナログ（Inoueら、１９８７，FEBS Lett. 215: 327-330）を含むことができる。

【０４０８】

リボザイムは、ｍＲＮＡなどの一本鎖核酸を切断可能であるリボヌクレアーゼ活性を有する触媒性ＲＮＡ分子であり、このリボザイムはこの一本鎖核酸に対する相補的領域を有し、そしてまた、標準的な技術を用いて生成することができる。従って、リボザイム（例

えば、ハンマーヘッドリボザイム（HaselhoffとGerlach，１９８８，Nature 334: 585-591において記載））は、ｍＲＮＡ転写物を触媒的に切断し、それによって、ｍＲＮＡによってコードされるタンパク質の翻訳を阻害することができる。関連のポリペプチドをコードする核酸分子についての特異性を有するリボザイムは、本明細書に開示されるｃＤＮＡのヌクレオチド配列に基づいて設計することができる。例えば、Tetrahymena Ｌ－１９ＩＶＳ　ＲＮＡの誘導体を構築することができ、ここでは、活性部位のヌクレオチド配列は、Cechら、米国特許第４，９８７，０７１号、およびCechらの米国特許第５，１１６，７４２号において切断されるヌクレオチド配列に相補的である。代替的には、関連のポリペプチドをコードするｍＲＮＡは、ＲＮＡ分子のプールから、特異的リボヌクレアーゼ活性を有する触媒ＲＮＡを選択するために使用することができる。例えば、Bartel とSzostak，１９９３，Science 261: 1411-1418を参照のこと。

【０４０９】

三重らせん構造もまた、周知の技術を用いて生成することができる。例えば、関連のポリペプチドの発現は、ポリペプチドをコードする遺伝子の調節領域（例えば、プロモーターおよび／またはエンハンサー）に相補的なヌクレオチド配列を標的とすることによって阻害され、標的細胞中で遺伝子の転写を阻害する三重らせん構造を形成することができる。一般的には、Helene,１９９１，Anticancer Drug Des. 6(6): 569-84、Helene，１９９２，Ann.N.Y.Acad.Sci. 660: 27-36、およびMaher，１９９２，Bioassays 14 (12): 807-15を参照のこと。

【０４１０】

種々の実施形態において、核酸組成物は、例えば、分子の安定性、ハイブリダイゼーション、または溶解性を改善するために、塩基部分、糖部分、またはリン酸骨格において修飾することができる。例えば、核酸のデオキシリボースリン酸骨格は、修飾されて、ペプチド核酸を生成することができる（例えば、Hyrupら、１９９６，Bioorganic & Medicinal Chemistry 4(1):5-23を参照）。本明細書で使用される場合、「ペプチド核酸」または「ＰＮＡ」という用語は、デオキシリボースリン酸骨格がプソイドペプチド骨格によって置き換えられ、４つの天然の核酸塩基のみが保持されている、核酸模倣剤、例えば、ＤＮＡ模倣剤をいう。ＰＮＡの中性骨格は、低イオン強度の条件下で、ＤＮＡおよびＲＮＡへの特異的ハイブリダイゼーションを可能にすることが示されてきた。ＰＮＡオリゴマーの合成は、Hyrupら、１９９６，前出、Perry-O’Keefら、１９９６，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 93: 14670-675において記載されるように、標準的な固相ペプチド合成プロトコルを使用して実施することができる。

【０４１１】

ＰＮＡは、例えば、親油基または他の補助基をＰＮＡに結合させることによって、ＰＮＡ－ＤＮＡキメラの形成によって、またはリポソームもしくは当該分野で公知の薬剤送達の他の技術の使用によって、例えば、ＰＮＡの安定性または細胞の取り込みを増強するために、修飾することができる。例えば、ＰＮＡおよびＤＮＡの有利な特性を合わせ得るＰＮＡ－ＤＮＡキメラを生成することができる。このようなキメラは、ＤＮＡ認識酵素、例えば、ＲＮアーゼＨおよびＤＮＡポリメラーゼがＤＮＡ部分と相互作用することを可能にするのに対して、ＰＮＡ部分は、高い結合親和性および特異性を提供する。ＰＮＡ－ＤＮＡキメラは、塩基の重なり、核酸塩基間の結合の数、および配向によって選択される適切な長さのリンカーを使用して連結することができる（Hyrup，１９９６、前出）。ＰＮＡ－ＤＮＡキメラの合成は、Hyrup，１９９６、前出およびFinnら、１９９６，Nucleic Acids Res. 24(17): 3357-63において記載されるように実施することができる。例えば、ＤＮＡ鎖は、標準的なホスホルアミダイトカップリング化学および修飾ヌクレオシドアナログを使用して、固体支持体上で合成することができる。５’－（４－メトキシトリチル）アミノ－５’－デオキシ－チミジンホスホルアミダイトなどの化合物は、ＰＮＡと、ＤＮＡの５’末端との間の連結として使用することができる（Magら、１９８９，Nucleic Acids Res. 17: 5973-88）。次いで、ＰＮＡプロモーターは、５’ＰＮＡセグメントおよび３’ＤＮＡセグメントを有するキメラ分子を産生するために、段階的な方法でカップリン

グされる（Finnら、１９９６，Nucleic Acids Res. 24(17): 3357-63）。代替的には、キメラ分子は、５’ＤＮＡセグメントおよび３’ＰＮＡセグメントを伴って合成することができる（Petersenら、１９７５，Bioorganic Med.Chem.Lett.5:1119-11124）。

【０４１２】

他の実施形態において、ヌクレオチドは、ペプチドなどの他の付加基（例えば、ｉｎｖｉｖｏで宿主細胞受容体を標的とするため）、または細胞膜（例えば、Letsingerら、１９８９，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:6553-6556、Lemaitreら、１９８７，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84: 648-652、国際公開番号ＷＯ８８／０９８１０を参照）もしくは血液脳関門（例えば、国際公開番号ＷＯ８９／１０１３４を参照）を横切る通過を容易にする因子を含んでもよい。加えて、オリゴヌクレオチドは、ハイブリダイゼーション誘発性切断剤（例えば、Krolら、１９８８，Bio/Techniques 6:958-976を参照）または挿入剤（例えば、Zon，１９８８，Pharm.Res.5: 539-549を参照）で修飾することができる。この目的のために、オリゴヌクレオチドは、別の分子、例えば、ペプチド、ハイブリダイゼーション誘発性架橋剤、輸送剤、ハイブリダイゼーション誘発性切断剤などに結合体化されてもよい。

【０４１３】

抗体組成物

１つの実施形態において、本発明の１種以上のバイオマーカーの１種以上のタンパク質産物に特異的に結合する抗体が、変形性関節症またはその症状を予防、治療、管理、または改善するために、被験体、好ましくは、ヒトに投与される。別の実施形態において、本発明の１種以上のバイオマーカーの１種以上のタンパク質産物に特異的に結合する抗体の任意の組み合わせが、変形性関節症またはその症状を予防、治療、管理、または改善するために、被験体、好ましくは、ヒトに投与される。特定の実施形態において、本発明の１種以上のバイオマーカーの１種以上のタンパク質産物に特異的に結合する１種以上の抗体が、変形性関節症またはその症状を予防、治療、管理、または改善するために、他の型の治療（例えば、ＮＳＡＩＤ）と併用して、被験体、好ましくは、ヒトに投与される。特定の実施形態において、本発明の１種以上のバイオマーカーの１種以上のタンパク質産物に特異的に結合する当該分野で公知の抗体が、変形性関節症またはその症状を予防、治療、管理、または改善するために、単独で、または他の型の治療（例えば、ＮＳＡＩＤ）と組み合わせて、被験体、好ましくは、ヒトに投与される。他の実施形態において、本発明の１種以上のバイオマーカーの１種以上のタンパク質産物に特異的に結合する当該分野で公知の抗体が、変形性関節症またはその症状を予防、治療、管理、または改善するために、単独で、または他の型の治療（例えば、ＮＳＡＩＤ）と組み合わせて、被験体、好ましくは、ヒトに投与されない。

【０４１４】

本発明の１種以上のバイオマーカーの１種以上のタンパク質産物に特異的に結合する１種以上の抗体は、当業者に公知である種々の送達系を使用して、被験体、好ましくは、ヒトに投与される。例えば、このような抗体は、リポソーム、微粒子、またはマイクロカプセル中でのカプセル化によって投与することができる。例えば、米国特許第５，７６２，９０４号、米国特許第６，００４，５３４号、および国際公開番号ＷＯ９９／５２５６３を参照のこと。加えて、このような抗体は、抗体を発現可能な組換え細胞、またはレトロウイルス、他のウイルスベクター、もしくは抗体を発癌可能な非ウイルスベクターを使用して投与することができる。

【０４１５】

本発明の１種以上のバイオマーカーの１種以上のタンパク質産物に特異的に結合する抗体は、任意の公知の供給源から入手することができる。代替的には、本発明の１種以上のバイオマーカーの１種以上のタンパク質産物に特異的に結合する抗体は、抗体を産生するために当該分野で公知の任意の方法によって、特に、化学合成によって、または組換え発現技術によって産生することができる。

【０４１６】

抗体には以下が含まれるがこれらに限定されない：ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、二特異的抗体、多特異的抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、ラクダ化抗体、キメラ抗体、単鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）（Birdら（１９８８）Science 242: 423-426、およびHustonら（１９８８）Proc.Natl.Acad.Sci USA 85: 5879-5883）、単鎖抗体、単一ドメイン抗体、Ｆａｂフラグメント、Ｆ（ａｂ’）フラグメント、ジスルフィド連結Ｆｖ（ｓｄＦｖ）、および抗イディオタイプ（抗Ｉｄ）抗体（例えば、本発明の抗体に対する抗Ｉｄ抗体を含む）、ならびに上記のいずれかの抗原結合フラグメントおよび／またはエピトープ結合フラグメント。「抗体」という用語は、本明細書に記載されるように、免疫グロブリン分子および免疫グロブリン分子の免疫学的に活性なフラグメント、すなわち、抗原結合部位を含む分子をいう。免疫グロブリン分子は、任意の型（例えば、ＩｇＧ、ＩｇＥ、ＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＡおよびＩｇＹ）、クラス（$IgG_1$、$IgG_2$、$IgG_3$、$IgG_4$、$IgA_1$および$IgA_2$）、またはサブクラスであり得る。免疫グロブリン分子の免疫学的に活性なフラグメントの例には、Ｆ（ａｂ）フラグメント（ＶＬ、ＶＨ、ＣＬおよびＣＨ１ドメインからなる一価のフラグメント）およびＦ（ａｂ’）２フラグメント（ヒンジ領域におけるジスルフィド結合によって連結された２つのＦａｂフラグメントを含む二価フラグメント）が含まれ、これらは、ペプシンまたはパパインなどの酵素を用いて抗体を処理することによって生成することができる。免疫学的に活性なフラグメントにはまた以下が含まれるがこれらに限定されない：Ｆｄフラグメント（ＶＨドメインおよびＣＨ１ドメインからなる）、Ｆｖフラグメント（抗体の単一アームのＶＬドメインおよびＶＨドメインからなる）、ｄＡｂフラグメント（ＶＨドメインからなる、Wardら、（１９８９）Nature 341:544-546）、および相補性決定領域（ＣＤＲ）。抗原に特異的に結合する抗体は、抗体を産生するために当該分野で公知の任意の方法によって、特に、化学合成によって、または組換え発現技術によって産生することができる。

【０４１７】

抗原に特異的に結合するポリクローナル抗体は、当該分野において周知の種々の手順によって産生することができる。例えば、ヒト抗原は、ウサギ、マウス、ラットなどを含むがこれらに限定されない宿主動物に投与して、ヒト抗原に特異的なポリクローナル抗体を含む血清の産生を誘導することができる。種々のアジュバントが、宿主種に依存して、免疫学的応答を促進させるために使用されてもよく、これには以下が含まれるがこれらに限定されない：フロイント（完全および不完全）、水酸化アルミニウムなどのミネラルゲル、リゾレシチンなどの界面活性剤、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、オイルエマルジョン、キーホールリンペットヘモシアニン、ジニトロフェノール、ならびにＢＣＧ（カルメット－ゲラン桿菌）およびコリネバクテリウム　パルバムなどの潜在的に有用なヒトアジュバント。このようなアジュバントはまた当該分野で周知である。

【０４１８】

「単一特異性抗体」という用語は、特定の標的、例えば、エピトープについての単一の結合特異性および親和性を示す抗体をいう。この用語はモノクローナル抗体を含む。モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ、組換え、およびファージディスプレイ技術、またはその組み合わせの使用を含む当該分野で公知である広範な種々の技術を用いて調製することができる。例えば、参照として援用される、米国特許ＲＥ　３２，０１１号、米国特許第４，９０２，６１４号、同第４，５４３，４３９号、同第４，４１１，９９３号および同第４，１９６，２６５号、Kennettら（編），「モノクローナル抗体、ハイブリドーマ：生物学的分析の新たな次元（Monoclonal Antibodies,Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses）」，Plenum Press（１９８０）、およびHarlowとLane（編），「抗体　実験室マニュアル」，Cold Spring Harbor Laboratory Press（１９８８）を参照のこと。例えば、モノクローナル抗体は、当該分野で公知の技術を含むハイブリドーマ技術を用いて産生することができ、例えば、Harlowら、「抗体：実験室マニュアル」，（Cold Spring Harbor Laboratory Press，第２版、１９８８）、Hammerlingら、「モノクローナル抗体およびＴ細胞ハイブリドーマ（Monoclonal Antibodies and T-CeIl Hybridomas）」563-681所収（Elsevier，ニューヨーク州，１９８１）において教示されている（上

記文献はその全体が参照により援用される）。組換え技術を通して抗体の産生を可能にする他の技術（例えば、Stratacyte, La Jolla, カリフォルニア州、から入手可能である市販の系を含む、William D.Huseら、１９８９, Science,246:1275-1281、L.Sastryら、１９８９, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 86: 5728-5732、およびMichelle Alting-Meesら、Strategies in Molecular Biology, 3: 1-9（１９９０）によって記載される技術）もまた、モノクローナル抗体を構築するために利用されてもよい。「モノクローナル抗体」という用語は、本明細書で使用される場合、ハイブリドーマ技術を通して産生される抗体に限定されない。「モノクローナル抗体」という用語は、任意の真核生物、原核生物、またはファージクローンを含む単一クローンから誘導される抗体をいい、それが産生された方法には関わらない。

【０４１９】

ハイブリドーマ技術を用いて特異的抗体を産生およびスクリーニングするための方法は、日常的でありかつ当該分野で周知である。手短に述べると、マウスは本発明のバイオマーカーのタンパク質産物で免疫することができ、一旦免疫応答が検出されると、例えば、タンパク質に特異的な抗体がマウス血清で検出され、マウス脾臓が収集され、そして脾細胞が単離される。次いで、脾細胞が、周知の方法によって、任意の適切なミエローマ細胞、例えば、ＡＴＣＣから入手可能である細胞株ＳＰ２０からの細胞に融合される。ハイブリドーマは、限界希釈によって選択およびクローニングされる。加えて、ＲＩＭＭＳ（反復免疫複数部位）技術が動物を免疫するために使用することができる（その全体が参照により援用される、Kilptrackら、１９９７, Hybridoma 16: 381-9）。次いで、ハイブリドーマクローンは、本発明のポリペプチドを結合することが可能な抗体を分泌する細胞について、当該分野で公知の方法によってアッセイする。高レベルの抗体を一般的に含む腹水は、ポジティブハイブリドーマクローンを用いてマウスを免疫することによって生成することができる。

【０４２０】

従って、本発明は、本発明の抗体を分泌するハイブリドーマ細胞を培養することによって抗体を生成する方法を提供し、好ましくは、ハイブリドーマは、本発明のバイオマーカーのタンパク質産物で免疫処理したマウスから単離した脾細胞を、ミエローマ細胞と融合すること、次いで、タンパク質またはタンパク質フラグメントに結合することができる抗体を分泌するハイブリドーマクローンの融合物から生じるハイブリドーマをスクリーニングすることによって生成される。

【０４２１】

本発明のバイオマーカーのタンパク質産物の特異的エピトープを認識する抗体フラグメントは、当業者に公知である任意の技術によって生成されてもよい。例えば、本発明のＦａｂおよびＦ（ａｂ’）２フラグメントは、パパイン（Ｆａｂフラグメントを産生するため）またはペプシン（Ｆ（ａｂ’）２フラグメントを産生するため）などの酵素を使用する、免疫グロブリン分子のタンパク質分解によって産生されてもよい。Ｆ（ａｂ’）２フラグメントは、可変領域、軽鎖定常領域および重鎖のＣＨ１ドメインを含む。さらに、本発明の抗体はまた、当該分野で公知の種々のファージディスプレイ法を使用して生成することができる。

【０４２２】

ファージディスプレイ法において、機能的抗体ドメインは、それらをコードするポリヌクレオチド配列を有するファージ粒子の表面上に表示される。特に、ＶＨおよびＶＬドメインをコードするＤＮＡ配列が動物ｃＤＮＡライブラリー（例えば、罹患した組織のヒトまたはマウスｃＤＮＡライブラリー）から増幅される。ＶＨおよびＶＬドメインをコードするＤＮＡは、ＰＣＲによってｓｃＦｖリンカーとともに組み換えられ、ファージミドベクターにクローニングされる。このベクターはE. coli中にエレクトロポレーションされ、このE. coliはヘルパーファージで感染される。これらの方法において使用されるファージは、典型的には、ｆｄおよびＭ１３を含む糸状ファージであり、ＶＨおよびＶＬドメインは通常、ファージの遺伝子ＩＩＩまたは遺伝子ＶＩＩＩのいずれかに組換え技術によ

り融合される。特定の抗原に結合する抗原結合ドメインを発現するファージは、例えば、標識抗原、または固体表面もしくはビーズに結合もしくは捕捉された抗原を使用して選択または同定することができる。本発明の抗体を作製するために使用することができるファージディスプレイ法の例には以下に開示されるものが含まれ、これらの各々はその全体が参照により本明細書に援用される：Brinkmanら、１９９５，J.Immunol.Methods 182:41-50、Amesら、１９９５，J.Immunol.Methods 184:177-186、Kettleboroughら、１９９４，Eur.J.Immunol.24:952-958、Persicら、１９９７，Gene 187:9-18、Burtonら、１９９４，Advances in Immunology 57: 191-280、ＰＣＴ出願番号ＰＣＴ／ＧＢ９１／Ｏ１　１３４、国際出願番号ＷＯ９０／０２８０９、ＷＯ９１／１０７３７、ＷＯ９２／０１０４７、ＷＯ９２／１８６１９、ＷＯ９３／１　１２３６、ＷＯ９５／１５９８２、ＷＯ９５／２０４０１、およびＷＯ９７／１３８４４、ならびに米国特許第５，６９８，４２６号、同第５，２２３，４０９号、同第５，４０３，４８４号、同第５，５８０，７１７号、同第５，４２７，９０８号、同第５，７５０，７５３号、同第５，８２１，０４７号、同第５，５７１，６９８号、同第５，４２７，９０８号、同第５，５１６，６３７号、同第５，７８０，２２５号、同第５，６５８，７２７号、同第５，７３３，７４３号、および同第５，９６９，１０８号。

【０４２３】

上記の参考文献に記載されるように、ファージからの抗体コード領域は、例えば、以下に記載されるように、単離され、ヒト抗体を含む全体の抗体または任意の他の所望の抗原結合フラグメントを生成するために使用され、そして哺乳動物細胞、昆虫細胞、植物細胞、酵母、および細菌を含む任意の所望の宿主の中で発現される。Ｆａｂ、Ｆａｂ’およびＦ（ａｂ’）２フラグメントを組換え技術により産生するための技術はまた、国際出願番号ＷＯ９２／２２３２４、Mullinaxら、１９９２，BioTechniques 12(6):864-869、Sawaiら、１９９５，AJRI 34: 26-34、およびBetterら、１９８８，Science 240: 1041-1043に開示されるものなどの当該分野で公知の方法を使用して利用することができる（上記の参考文献はそれらの全体が参照により援用される）。

【０４２４】

全体の抗体を生成するために、ＶＨまたはＶＬヌクレオチド配列、制限部位、および制限部位を保護するための隣接配列を含むＰＣＲプライマーが、ｓｃＦｖクローン中でＶＨまたはＶＬ配列を増幅するために使用することができる。当業者に公知であるクローニング技術を利用して、ＰＣＲ増幅されたＶＨドメインは、ＶＨ定常領域、例えば、ヒトγ４定常領域を発現するベクターにクローニングすることができ、そしてＰＣＲ増幅されたＶＬドメインは、ＶＬ定常領域、例えば、ヒトκまたはλ定常領域を発現するベクターにクローニングすることができる。好ましくは、ＶＨまたはＶＬドメインを発現するためのベクターは、ＥＦ－１αプロモーター、分泌シグナル、可変ドメイン、定常ドメインのためのクローニング部位、およびネオマイシンなどの選択マーカーを含む。ＶＨおよびＶＬドメインはまた、必要な定常領域を発現する１つのベクターにクローニングされてもよい。次いで、重鎖転換ベクターおよび軽鎖転換ベクターが、当業者に公知の技術を用いて、細胞株に同時トランスフェクトされ、全長抗体、例えば、ＩｇＧを発現する安定なまたは一過性の細胞株を生成する。

【０４２５】

ヒトにおける抗体のｉｎ　ｖｉｖｏ使用およびｉｎ　ｖｉｔｒｏ検出アッセイを含む、ある使用において、ヒトまたはキメラ抗体を使用することが好ましい場合がある。完全なヒト抗体は、ヒト患者の治療的処置のために特に所望される。ヒト抗体は、ヒト免疫グロブリン配列から誘導された抗体ライブラリーを使用して、上記のファージディスプレイ法を含む当該分野で公知である種々の方法によって作製することができる。米国特許第４，４４４，８８７号および同第４，７１６，１１１号、ならびに国際公開番号ＷＯ９８／４６６４５、同ＷＯ９８／５０４３３、同ＷＯ９８／２４８９３、同ＷＯ９８／１６６５４、同ＷＯ９６／３４０９６、同ＷＯ９６／３３７３５、および同ＷＯ９１／１０７４１もまた参照のこと。これらの各々はその全体が参照により本明細書に援用される。

【０４２６】
抗体はまた、トランスジェニック動物によって産生させることができる。特に、ヒト抗体は、機能的内因性免疫グロブリンを発現することが不可能であるが、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現することができるトランスジェニックマウスを使用して産生することができる。例えば、重鎖および軽鎖免疫グロブリン遺伝子複合体は、ランダムに導入されるか、または相同組換えによってマウス胚性幹細胞に導入されてもよい。代替的には、ヒト可変領域、定常領域、および多様な領域が、ヒト重鎖および軽鎖遺伝子に加えて、マウス胚性幹細胞に導入されてもよい。マウス重鎖および軽鎖免疫グロブリン遺伝子は、相同組換えによるヒト免疫グロブリン遺伝子座の導入とは別々に、またはそれと同時に、非機能性にされてもよい。特に、$J_H$領域のホモ接合性欠失は内因性抗体産生を阻害する。修飾された胚性幹細胞は増大され、胚盤胞に微量注入されてキメラマウスを産生する。次いで、キメラマウスは繁殖され、ヒト抗体を発現するホモ接合性子孫を生じる。トランスジェニックマウスは、選択された抗原、例えば、本発明のポリペプチドのすべてまたは一部を用いて通常の様式で免疫される。抗原に対して指向されるモノクローナル抗体は、従来のハイブリドーマ技術を用いて、免疫処理したトランスジェニックマウスから得ることができる。トランスジェニックマウスによって保有されるヒト免疫グロブリン導入遺伝子は、Ｂ細胞分化の間に再編成し、続いてクラススイッチングおよび体細胞変異を受ける。従って、このような技術を用いて、治療的に有用なＩｇＧ、ＩｇＡ、ＩｇＭおよびＩｇＥ抗体を産生することが可能である。ヒト抗体を産生するためのこの技術の概要については、Lonberg とHuszar（１９９５，Int.Rev.Immunol. 13: 65-93）を参照のこと。ヒト抗体およびヒトモノクローナル抗体を産生するためのこの技術、およびこのような抗体を産生するためのプロトコルの詳細な説明については、例えば、国際公開番号ＷＯ９８／２４８９３、同ＷＯ９６／３４０９６、および同ＷＯ９６／３３７３５、ならびに米国特許第５，４１３，９２３号、同第５，６２５，１２６号、同第５，６３３，４２５号、同第５，５６９，８２５号、同第５，６６１，０１６号、同第５，５４５，８０６号、同第５，８１４，３１８号、および同第５，９３９，５９８号を参照のこと。これらはそれらの全体が参照により本明細書に援用される。加えて、Abgenix,Inc.（Freemont，カリフォルニア州）およびGenpharm（San Jose，カリフォルニア州）などの企業が、上記のものと類似の技術を用いて、選択された抗原に対して指向されるヒト抗体を提供するために従事することができる。

【０４２７】
米国特許第５，８４９，９９２号は、例えば、トランスジェニック動物の乳腺中で抗体を発現する方法を記載している。乳特異的プロモーター、および関連の抗体をコードする核酸、および分泌のためのシグナル配列を含む導入遺伝子が構築される。このようなトランスジェニック動物の雌によって産生される乳は、そこに分泌された関連の抗体を含む。この抗体は乳から精製することができ、またはある応用においては、直接的に使用することができる。

【０４２８】
キメラ抗体は、抗体の異なる部分が異なる免疫グロブリン分子から誘導される分子である。キメラ抗体を産生するための方法は当該分野で公知である。例えば、Morrison, 1985, Science 229:1202、Oiら、１９８６，BioTechniques 4:214、Gilliesら、１９８９，J. Immunol.Methods 125: 191-202、ならびに米国特許第５，８０７，７１５号、同第４，８１６，５６７号、同第４，８１６，３９７号、および同第６，３３１，４１５号を参照のこと。これらはそれらの全体が参照により本明細書に援用される。

【０４２９】
ヒト化抗体は、所定の抗原に結合可能であり、そしてヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を実質的に有するフレームワーク領域、および非ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を実質的に有するＣＤＲを含む、抗体またはその改変体またはフラグメントである。ヒト化抗体は、少なくとも１つ、および典型的には２つの可変ドメイン（Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、Ｆａｂｃ、Ｆｖ）のすべてを実質的に含み、ここで、すべてまたは実質的

にすべてのＣＤＲ領域は非ヒト免疫グロブリン（すなわち、ドナー抗体）のそれに対応し、そしてすべてまたは実質的にすべてのフレームワーク領域はヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のそれである。好ましくは、ヒト化抗体はまた、免疫グロブリン定常領域（Ｆｃ）の少なくとも一部、典型的にはヒト免疫グロブリンのそれを含む。通常、抗体は、軽鎖ならびに少なくとも重鎖の可変ドメインの両方を含むことになる。抗体はまた、重鎖のＣＨ１、ヒンジ、ＣＨ２、ＣＨ３、およびＣＨ４領域を含んでもよい。ヒト化抗体は、ＩｇＭ、ＩｇＧ、ＩｇＤ、ＩｇＡおよびＩｇＥを含む免疫グロブリンの任意のクラス、ＩｇＧ$_1$、ＩｇＧ$_2$、ＩｇＧ$_3$およびＩｇＧ$_4$を含む任意のアイソタイプから選択することができる。通常、定常ドメインは、ヒト化抗体が細胞毒性活性を示すことが所望される場合、補体結合定常ドメインであり、そしてクラスは典型的にはＩｇＧ$_1$である。このような細胞毒性活性が所望されない場合、定常ドメインはＩｇＧ$_2$であり得る。ヒト化抗体は、１つより多くのクラスまたはアイソタイプからの配列を含んでもよいが、所望のエフェクター機能を最適化するために特定の定常ドメインを選択することは、当業者の範囲内である。ヒト化抗体のフレームワークおよびＣＤＲ領域は、親の配列に対して正確に一致する必要はなく、例えば、ドナーＣＤＲまたはコンセンサスフレームワークは、少なくとも１つの残基の置換、挿入、または欠失によって変異されてもよく、その結果、その部位におけるＣＤＲまたはフレームワーク残基は、コンセンサスまたはインポート抗体のいずれにも一致しない。しかし、このような変異は広範囲ではない。通常、ヒト化抗体残基の少なくとも７５％、より頻繁には９０％、および最も好ましくは９５％より多くが、親のＦＲおよびＣＤＲ配列のそれに一致する。ヒト化抗体は、以下を含むがこれらに限定されない、当該分野で公知である種々の技術を用いて産生することができる：ＣＤＲ移植（欧州特許第ＥＰ　２３９，４００号、国際公開番号ＷＯ９１／０９９６７、および米国特許第５，２２５，５３９号、同第５，５３０，１０１号、同第５，５８５，０８９号）、ベニアリングおよび再表面化（欧州特許第ＥＰ　５９２，１０６号および同第ＥＰ　５１９，５９６号、Padlan，１９９１，Molecular Immunology 28(4/5): 489-498、Studmckaら、１９９４，Protein Engineering 7(6):805-814、およびRoguskaら、１９９４，PNAS 91: 969-973）、チェーンシャッフリング（米国特許第５，５６５，３３２号）、ならびに例えば、米国特許第６，４０７，２１３号、米国特許第５，７６６，８８６号、ＷＯ９３１７１０５、Tanら、２００２，J.Immunol.169:1119-25、Caldasら、２０００，Protein Eng. 13(5): 353-60、Morea　ら、２０００，Methods 20(3): 267-79、Bacaら、１９９７，J. Biol.Chem. 272(16): 10678-84、Roguskaら、１９９６，Protein Eng. 9(10): 895-904、Coutoら、１９９５，Cancer Res. 55 (23補遺): 5973s-5977s、Coutoら、１９９５，Cancer Res. 55(8): 1717-22、Sandhu JS，1994,Gene 150(2):409-10、およびPedersenら、１９９４，J.Mol.Biol. 235(3): 959-73に開示される技術。しばしば、フレームワーク領域中のフレームワーク残基は、抗原結合を変化させるため、好ましくは、改善するために、ＣＤＲドナー抗体から対応する残基で置換される。これらのフレームワーク置換は、当該分野で周知の技術によって、例えば、特定の位置における通常でないフレームワーク残基を同定するために、抗原結合のために重要なフレームワーク残基を同定するためのＣＤＲおよびフレームワーク残基の相互作用のモデリングならびに配列比較によって同定される（例えば、Queenら、米国特許第５，５８５，０８９号、およびRiechmannら、１９８８，Nature 332: 323を参照のこと、これらはそれらの全体が参照により本明細書に援用される）。

【０４３０】

単一ドメイン抗体、例えば、軽鎖を欠く抗体は、当該分野で周知である方法によって産生することができる。Riechmannら、１９９９，J.Immuno. 231 : 25-38、Nuttallら、２０００，Curr.Pharm.Biotechnol. 1(3): 253-263、Muylderman，２００１，J.Biotechnol. 74(4): 277302、米国特許第６，００５，０７９号、ならびに国際公開番号ＷＯ９４／０４６７８、同ＷＯ９４／２５５９１、および同ＷＯ０１／４４３０１を参照のこと。これらの各々はその全体が参照により本明細書に援用される。

【０４３１】

さらに、抗原に特異的に結合する抗体は、次には、当業者に周知の技術を用いて抗原を「模倣する」抗イディオタイプ抗体を生成するために利用することができる（例えば、GreenspanとBona,１９８９，FASEB Ｊ．7(5)：437-444、およびNissinoff，１９９１，J.Immunol．147(8)：2429-2438を参照）。このような抗体は、変形性関節症またはその症状の予防、治療、管理、または改善の際に、単独でまたは他の治療と併用して使用することができる。

【０４３２】

本発明は、抗原に特異的に結合する抗体またはそのフラグメントをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを含む。本発明はまた、高緊縮性、中程度の緊縮性、またはより低い緊縮性のハイブリダイゼーション条件下で、本発明の抗体をコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む。

【０４３３】

当該分野で公知である任意の方法によって、ポリヌクレオチドは入手され、そしてポリヌクレオチドのヌクレオチド配列は決定されてもよい。公知の抗体をコードするヌクレオチド配列は、当該分野で周知である方法を使用して決定することができ、すなわち、特定のアミノ酸をコードすることが知られているヌクレオチドコドンは、抗体をコードするアミノ酸を生成するようなやり方でアセンブルされる。抗体をコードするこのようなポリヌクレオチドは、化学合成されたオリゴヌクレオチド）からアセンブルされ（例えば、Kutmeierら、１９９４，BioTechniques 17：242に記載されるように）、これは、手短に述べると、抗体、そのフラグメント、または改変体をコードする配列の一部を含む重複するオリゴヌクレオチドの合成、アニーリング、およびこれらのオリゴヌクレオチドのライゲーション、ならびに次いで、ＰＣＲによってライゲーションしたオリゴヌクレオチドの増幅を含む。

【０４３４】

代替的には、抗体をコードするポリヌクレオチドは、適切な供給源からの核酸から生成されてもよい。特定の抗体をコードする核酸を含むクローンが入手可能でないが、しかし抗体分子の配列が知られている場合、免疫グロブリンをコードする核酸は、化学合成されてもよいし、または、配列の３’末端および５’末端にハイブリダイズ可能な合成プライマーを使用するＰＣＲ増幅によって、もしくは例えば、抗体をコードするｃＤＮＡライブラリーからのｃＤＮＡクローンを同定するために特定の遺伝子配列に特異的なオリゴヌクレオチドプローブを使用するクローニングによって、適切な供給源（例えば、抗体ｃＤＮＡライブラリー、または抗体を発現する任意の組織もしくは細胞、例えば、本発明の抗体を発現するために選択されるハイブリドーマ細胞から生成されたｃＤＮＡライブラリー、もしくはそこから単離された核酸、好ましくはポリＡ＋ＲＮＡ）から入手されてもよい。次いで、ＰＣＲによって生成された増幅された核酸は、当該分野において周知である任意の方法を使用して複製可能なクローニングベクターにクローニングされてもよい。

【０４３５】

一旦、抗体のヌクレオチド配列が決定されると、抗体のヌクレオチド配列は、異なるアミノ酸配列を有する抗体を産生するために、例えば、アミノ酸の置換、欠失、および／または挿入を行うために、ヌクレオチド配列の操作のために当該分野で周知である方法、例えば、組換えＤＮＡ技術、部位特異的変異誘発、ＰＣＲなど（例えば、Sambrookら、１９９０，「分子クローニング：実験室マニュアル」（第２版），Cold Spring Harbor Laboratory，Cold Spring Harbor，ニューヨーク州およびAusubelら編 １９９８，分子生物学の最新プロトコル，John Wiley & Sons，ニューヨーク州に記載される技術を参照のこと、これらは両方ともそれらの全体が参照により本明細書に援用される）を使用して操作されてもよい。

【０４３６】

一旦、本発明の抗体分子、抗体の重鎖もしくは軽鎖、またはそのフラグメント（好ましくは、しかし必要ではなく、重鎖または軽鎖可変ドメインを含む）をコードするポリヌクレオチドが得られると、抗体分子の産生のためのベクターが、当該分野において周知であ

る技術を用いる組換えＤＮＡ技術によって産生されてもよい。

【０４３７】

１つの好ましい実施形態において、モノクローナル抗体は哺乳動物細胞中で産生される。クローン抗体またはその抗原結合フラグメントを発現するために好ましい哺乳動物宿主細胞には、例えば、KaufmanとSharp（１９８２，Mol.Biol.159: 601-621）において記載されるように、ＤＨＦＲ選択マーカーとともに使用されるチャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞（UrlaubとChasin（１９８０，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77: 4216-4220）に記載されるｄｈｆｒ－ＣＨＯ細胞を含む）、リンパ球細胞株、例えば、ＮＳ０ミエローマ細胞およびＳＰ２細胞、ＣＯＳ細胞、およびトランスジェニック動物、例えば、トランスジェニック哺乳動物からの細胞が含まれる。例えば、細胞は、哺乳動物上皮細胞である。

【０４３８】

多様な免疫グロブリンドメインをコードする核酸配列に加えて、組換え発現ベクターは、さらなる配列、例えば、宿主細胞中のベクターの複製を調節する配列（例えば、複製起点）および選択マーカー配列を有してもよい。選択マーカー遺伝子は、ベクターが導入された宿主細胞の選択を容易にする（例えば、米国特許第第４，３９９，２１６号、同第４，６３４，６６５号、および同５，１７９，０１７号を参照）。例えば、典型的には、選択マーカー遺伝子は、ベクターが導入された宿主細胞に、Ｇ４１８、ハイグロマイシン、またはメトトレキサートなどの薬剤に対する耐性を付与する。好ましい選択マーカー遺伝子には、ジヒドロ葉酸還元酵素（ＤＨＦＲ）遺伝子（メトトレキサート選択／増幅を伴うｄｈｆｒ－宿主細胞における使用のため）およびｎｅｏ遺伝子（Ｇ４１８選択のため）が含まれる。

【０４３９】

本発明の抗体またはその抗原結合部分の組換え発現のための例示的な系において、抗体重鎖と抗体軽鎖の両方をコードする組換え発現ベクターが、リン酸カルシウム媒介トランスフェクションによって、ｄｈｆｒ－ＣＨＯ細胞に導入される。組換え発現ベクターの中で、抗体重鎖および軽鎖遺伝子は、遺伝子の高いレベルの転写を駆動するために、各々、エンハンサー／プロモーター調節エレメント（例えば、ＳＶ４０、ＣＭＶ、アデノウイルスなどから誘導され、例えば、ＣＭＶエンハンサー／ＡｄＭＬＰプロモーター調節エレメントまたはＳＶ４０エンハンサー／ＡｄＭＬＰプロモーター調節エレメントである）に連結される。組換え発現ベクターはまたＤＨＦＲ遺伝子を有し、これは、メトトレキサート選択／増幅を使用して、ベクターでトランスフェクトされたＣＨＯ細胞の選択を可能にする。選択された形質転換体宿主細胞は、抗体重鎖および軽鎖の発現を可能にするために培養され、インタクトな抗体が培養培地から回収される。標準的な分子生物学技術が、組換え発現ベクターを調製し、宿主細胞をトランスフェクトし、形質転換体を選択し、宿主細胞を培養し、そして培養培地から抗体を回収するために使用される。例えば、ある抗体は、プロテインＡまたはプロテインＧを用いるアフィニティークロマトグラフィーによって単離することができる。

【０４４０】

Ｆｃドメインを含む抗体については、抗体産生系は、好ましくは、Ｆｃ領域がグリコシル化されている抗体を合成する。例えば、ＩｇＧ分子のＦｃドメインは、ＣＨ２ドメイン中のアスパラギン２９７においてグリコシル化される。このアスパラギンは、二分岐型オリゴサッカリドを用いる修飾のための部位である。このグリコシル化が、Ｆｃ　受容体および補体Ｃ１ｑによって媒介されるエフェクター機能のために必要とされることが実証されている（BurtonとWoof，１９９２，Adv.Immunol. 51: 1-84，Jefferisら、１９９８，Immunol.Rev. 163: 59-76））。好ましい実施形態において、Ｆｃドメインは、アスパラギン２９７に対応する残基を適切にグリコシル化する哺乳動物発現系中で産生される。Ｆｃドメインはまた、他の真核生物翻訳後修飾を含むことができる。

【０４４１】

一旦、抗体分子が組換え発現によって産生されると、これは、免疫グロブリン分子の精製のための当該分野で公知である任意の方法によって、例えば、クロマトグラフィー（例

えば、イオン交換、親和性、特にプロテインＡ後の特異的抗原についての親和性によって、およびサイズ分画クロマトグラフィー）、遠心分離、溶解度の違いによって、またはタンパク質の精製のための任意の他の標準的な技術によって精製されてもよい。さらに、抗体またはそのフラグメントは、精製を容易にするために、当該分野で公知である異種ポリペプチド配列に融合されてもよい。

【０４４２】

遺伝子治療技術

遺伝子治療は、発現されたか、または発現可能な核酸の被験体への投与によって実施される治療をいう。当該分野において入手可能な遺伝子治療のための任意の治療を、本発明に従って使用することができる。例示的な方法は以下に記載される。

【０４４３】

特定の実施形態において、本発明の１種以上のバイオマーカーについての１種以上のアンチセンスオリゴヌクレオチドが、遺伝子治療によって変形性関節症またはその症状を予防、治療、管理、または改善するために投与される。他の実施形態において、本発明の１種以上のバイオマーカーの１種以上のタンパク質産物に特異的に結合する１種以上の抗体をコードするヌクレオチドを含む１種以上の核酸分子は、遺伝子治療によって変形性関節症またはその症状を予防、治療、管理、または改善するために投与される。他の実施形態において、本発明の１種以上のバイオマーカーまたはそのアナログ、誘導体、もしくはフラグメントのタンパク質産物をコードするヌクレオチドを含む１種以上の核酸分子は、遺伝子治療によって変形性関節症またはその症状を予防、治療、管理、または改善するために投与される。なお他の実施形態において、本発明の１種以上のバイオマーカーの１種以上のタンパク質産物の１種以上のドミナントネガティブポリペプチドをコードするヌクレオチドを含む１種以上の核酸分子は、遺伝子治療によって変形性関節症またはその症状を予防、治療、管理、または改善するために投与される。

【０４４４】

遺伝子治療の方法の一般的な概説については、Goldspielら、１９９３，Clinical Pharmacy 12:488-505、WuとWu，１９９１，Biotherapy 3: 87-95、Tolstoshev，１９９３，Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol. 32: 573-596、Mulligan，１９９３，Science 260: 926-932、および、MorganとAnderson，１９９３，Ann.Rev.Biochem. 62: 191-217、May，１９９３，TIBTECH 11(5): 155-215）を参照のこと。使用することができる組換えＤＮＡ技術の分野において一般的に公知である方法は、Ausubelら（編），１９９３，分子生物学の最新プロトコル，John Wiley & Sons，ニューヨーク州、およびKriegler，１９９０，遺伝子移入および発現（Gene Transfer and Expression），A Laboratory Manual，Stockton Press，ニューヨーク州、に記載されている。

【０４４５】

１つの態様において、本発明の組成物は、本発明の１種以上のバイオマーカーの１種以上のタンパク質産物に特異的に結合する１種以上の抗体をコードする核酸配列を含み、上記核酸配列は、適切な宿主の中で１種以上の抗体を発現する発現ベクターの一部である。特に、このような核酸配列は抗体に作動可能に連結されたプロモーターを有し、上記プロモーターは、誘導性または構成的、および任意に組織特異的である。

【０４４６】

別の態様において、本発明の組成物は、本発明の１種以上のバイオマーカーの１種以上のタンパク質産物のドミナントネガティブポリペプチドをコードする核酸配列を含み、上記核酸配列は、適切な宿主の中でドミナントネガティブポリペプチドを発現する発現ベクターの一部である。特に、このような核酸配列はドミナントネガティブポリペプチドに作動可能に連結されたプロモーターを有し、上記プロモーターは、誘導性または構成的、および任意に組織特異的である。別の特定の実施形態において、ドミナントネガティブコード配列および任意の他の所望の配列が、ゲノム中の所望の位置において相同組換えを促進する領域によって隣接されている核酸分子が使用され、従って、ドミナントネガティブ核酸の染色体内発現を提供する。（KollerとSmithies，１９８９，Proc.Natl.Acad.Sci.USA

86: 8932-8935、Zijlstraら、１９８９，Nature 342: 435-438）。

【０４４７】

患者への核酸の送達は、直接的であってもよく、この場合、患者は核酸または核酸保有ベクターに直接的に曝露され、または間接的であってもよく、この場合、細胞はｉｎ　ｖｉｔｒｏで核酸で形質転換され、次いで患者に移植されるかのいずれかである。これらの２つのアプローチは、それぞれ、ｉｎ　ｖｉｖｏまたはエキソビボ遺伝子治療として知られている。

【０４４８】

特定の実施形態において、核酸配列は、ｉｎ　ｖｉｖｏで直接的に投与され、ここでは核酸が発現されてコードされた産物を産生する。これは、当該分野で公知である任意の多数の方法によって、例えば、適切な核酸発現ベクターの一部としてこれを構築し、その結果、これが細胞内になること、例えば、欠損性もしくは弱毒化レトロウイルスもしくは他のウイルスベクターを使用する感染によって（例えば、米国特許第４，９８０，２８６号を参照）、または裸のＤＮＡの直接的注入によって、または微粒子ボンバードメントの使用によって（例えば、遺伝子銃、Biolistic，Dupont）、または脂質もしくは細胞表面受容体もしくはトランスフェクション剤でコートすること、リポソーム、微粒子、もしくはマイクロカプセル中でのカプセル化、または核にはいることが知られているペプチドに連結させてこれを投与することによって、受容体媒介エンドサイトーシスを受けるリガンドに連結させてこれを投与すること（例えば、WuとWu，１９８７，J.Biol.Chem. 262: 4429-4432を参照）（これは、受容体を特異的に発現する細胞型を標的とするために使用することができる）によって、などによって達成することができる。別の実施形態において、リガンドがエンドソームを破壊するために融合性ウイルスペプチドを含み、核酸がリソソーム分解を回避することを可能にする核酸－リガンド複合体を形成することができる。なお別の実施形態において、核酸は、特異的受容体を標的とすることによって、細胞特異的な取り込みおよび発現のためにｉｎ　ｖｉｖｏで標的化することができる（例えば、国際公開番号ＷＯ９２／０６１８０　１９９２年４月１６日（Wuら）、ＷＯ９２／２２６３５　１９９２年１２月２３日（Wilsonら）、ＷＯ９２／２０３１６　１９９２年１１月２６日（Findeisら）、ＷＯ９３／１４１８８　１９９３年7月２２日（Clarkeら）、ＷＯ９３／２０２２１　１９９３年１０月１４日（Young）を参照）。代替的には、核酸は、相同組換えによって、発現のために、細胞内に導入され、そして宿主細胞ＤＮＡ中に組み込まれることができる（KollerとSmithies，１９８９，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86: 8932-8935、Zijlstraら、１９８９，Nature 342: 435-438）。

【０４４９】

例えば、レトロウイルスベクターを使用することができる。これらのレトロウイルスベクターは、ウイルスゲノムへのパッケージングのため、および宿主細胞ＤＮＡへの組み込みのために必要ではないレトロウイルス配列を除外するように改変されている。遺伝子治療において使用される、関連の抗体、または関連のタンパク質もしくはそのフラグメントをコードする核酸配列が、患者への遺伝子の送達を容易にする、１種以上のベクターにクローニングされる。レトロウイルスベクターに関するさらなる詳細は、Boesenら、１９９４，Biotherapy 6:291-302において見出すことができ、これは、造血幹細胞の化学療法に対する抵抗性を高めるために、その幹細胞にｍｄｒ１遺伝子を送達するためのレトロウイルスベクターの使用を記載する。遺伝子治療におけるレトロウイルスベクターの使用を例示している他の参考文献は以下である：Clowesら、１９９４，J.Clin.Invest. 93: 644-651、Kiemら、１９９４，Blood 83: 1467-1473、SalmonsとGunzberg，１９９３，Human Gene Therapy 4: 129-141、およびGrossmanとWilson，１９９３，Curr.Opin.in Genetics and Devel. 3: 110-114。

【０４５０】

アデノウイルスは、遺伝子治療において使用することができる他のウイルスベクターである。アデノウイルスは、呼吸上皮に遺伝子を送達するためにとりわけ魅力的な媒体である。アデノウイルスは、天然で呼吸上皮に感染し、そこで軽度の疾患を引き起こす。アデ

ノウイルスベースの送達系についての他の標的は肝臓、中枢神経系、内皮細胞、および筋肉である。アデノウイルスは、分裂していない細胞に感染することができる利点を有する。KozarskyとWilson, １９９３, Current Opinion in Genetics and Development 3: 499-503は、アデノウイルスベースの遺伝子治療の概説を提示する。Boutら、１９９４, Human Gene Therapy 5: 3-10は、アカゲザルの呼吸上皮に遺伝子を移入するためのアデノウイルスベクターの使用を実証した。遺伝子治療におけるアデノウイルスの使用の他の例は、Rosenfeldら、１９９１, Science 252: 431-434、Rosenfeldら、１９９２, Cell 68: 143-155、Mastrangeliら、１９９３, J.Clin.Invest. 91: 225-234、ＰＣＴ公開ＷＯ９４／１２６４９、およびWangら、１９９５, Gene Therapy 2: 775-783において見出すことができる。好ましい実施形態において、アデノウイルスベクターが使用される。

【０４５１】

アデノ関連ウイルス（ＡＡＶ）もまた、遺伝子治療における使用について提案されてきた（Walshら、１９９３, Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 204: 289-300、米国特許第５，４３６，１４６号）。

【０４５２】

遺伝子治療に対する別のアプローチは、エレクトロポレーション、リポフェクション、リン酸カルシウム媒介トランスフェクション、またはウイルス感染のような方法によって、組織培養中の細胞に遺伝子を移入することを含む。通常、移入の方法は、細胞への選択マーカーの移入を含む。次いで、細胞は、移入された遺伝子を取り込みかつそれを発現する細胞を単離するための選択下に配置される。次いで、これらの細胞は患者に送達される。

【０４５３】

この実施形態において、核酸は、得られる組換え細胞のｉｎ　ｖｉｖｏでの投与の前に細胞に導入される。このような導入は、トランスフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、核酸配列を含むウイルスまたはバクテリオファージベクターでの感染、細胞融合、染色体媒介遺伝子移入、マイクロセル媒介遺伝子移入、スフェロプラスト融合などを含むがこれらに限定されない、当該分野で公知である任意の方法によって実行することができる。細胞への外来遺伝子の導入のための多数の技術が公知であり（例えば、LoefflerとBehr, １９９３, Meth.Enzymol. 217: 599-618、Cohenら、１９９３, Meth.Enzymol. 217: 618-644、Cline, １９８５, Pharmac.Ther. 29: 69-92を参照）、レシピエント細胞の必要な発生的および生理学的機能が破壊されていない場合、本発明に従って使用されてもよい。これらの技術は、細胞への核酸の安定な移入を提供するはずであり、その結果、核酸は、細胞によって発現可能であり、好ましくは遺伝性であり、その細胞子孫によって発現可能である。

【０４５４】

得られる組換え細胞は、種々の当該分野で公知の方法によって患者に送達することができる。組換え血液細胞（例えば、造血幹細胞または前駆細胞）および／または軟骨細胞は、好ましくは、静脈内投与される。使用のために想定される細胞の量は、所望の効果、患者の状態などに依存し、当業者によって決定することができる。

【０４５５】

核酸を遺伝子治療の目的のために導入することができる細胞には、任意の所望される、入手可能な細胞型が含まれ、これには以下が含まれるがこれらに限定されない：上皮細胞、内皮細胞、ケラチノサイト、軟骨細胞、線維芽細胞、筋肉細胞、肝細胞、Ｔリンパ球、Ｂリンパ球、単球、マクロファージ、好中球、好酸球、巨核球、顆粒球などの血液細胞、例えば、骨髄、臍帯血、末梢血、胎児肝臓などから得られた種々の幹細胞または前駆細胞、特に造血幹細胞または前駆細胞。

【０４５６】

好ましい実施形態において、遺伝子治療のために使用される細胞は、患者において自己由来である。

【０４５７】

組換え細胞が遺伝子治療において使用される１つの実施形態において、関連の抗体、または関連のタンパク質もしくはそのフラグメントをコードする核酸配列は、これらが細胞またはそれらの子孫によって発現可能であるように細胞に導入され、次いで、治療効果のためにｉｎ　ｖｉｖｏで投与される。特定の実施形態において、幹細胞または前駆細胞が使用される。単離することができ、かつｉｎ　ｖｉｔｒｏで維持することができる任意の幹細胞および／または前駆細胞が、本発明のこの実施形態に従って潜在的に使用することができる（例えば、国際公開番号ＷＯ９４／０８５９８　１９９４年４月２８日、StempleとAnderson，１９９２，Cell 71: 973-985、Rheinwald，１９８０，Meth.Cell Bio. 21A: 229、およびPittelkowおよびScott，1986，Mayo Clinic Proc. 61: 771を参照）。

【０４５８】

関連の抗体、関連のタンパク質またはそのフラグメントをコードする核酸配列の発現を制御するために使用されてもよいプロモーターは、構成的、誘導性、または組織特異的であってもよい。非限定的な例には以下が含まれる：ＳＶ４０初期プロモーター領域（BernoistとChambon，１９８１，Nature 290: 304-310）、ラウス肉腫ウイルスの３’長末端反復に含まれるプロモーター（Yamamotoら、１９８０，Cell 22: 787-797）、ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター（（Wagnerら、１９８１，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 78: 1441-1445）、メタロチオネイン遺伝子の調節配列（Brinsterら、１９８２，Nature 296: 39-42）、β－ラクタマーゼプロモーターなどの原核生物発現ベクター（Villa-Kamaroffら、１９７８，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 75: 3727-3731）、またはｔａｃプロモーター（DeBoerら、１９８３，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 80: 21-25）、以下もまた参照のこと：「組換え細菌からの有用なタンパク質（Useful proteins from recombinant bacteria）」Scientific American，１９８０，242: 74-94所収、ノパリンシンテターゼプロモーター領域を含む植物発現ベクター（Herrera-Estrellaら、Nature 303: 209-213）またはカリフラワーモザイクウイルス３５Ｓ　ＲＮＡプロモーター（Gardnerら、１９８１，Nucl.Acids Res. 9: 2871）、および光合成酵素リブロース二リン酸カルボキシラーゼのプロモーター（Herrera-Estrellaら、１９８４，Nature 310: 115-120）、Ｇａｌ　４プロモーター、ＡＤＣ（アルコールデヒドロゲナーゼ）プロモーター、ＰＧＫ（ホスホグリセロールキナーゼ）プロモーター、アルカリホスファターゼプロモーター、およびトランスジェニック動物において組織特異性を示し、かつ利用されてきた以下の動物転写制御領域：膵腺房細胞において活性であるエラスターゼＩ遺伝子領域（Swiftら、１９８４，Cell 38: 639-646、Ornitzら、１９８６，Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol. 50: 399-409、MacDonald，１９８７，Hepatology 7: 425-515）、膵臓β細胞において活性であるインスリン遺伝子制御領域（Hanahan，１９８５，Nature 315: 115-122）、リンパ細胞において活性である免疫グロブリン遺伝子制御領域（Grosschedlら、１９８４，Cell 38: 647-658、Adamesら、１９８５，Nature 318: 533-538、Alexanderら、１９８７，Mol.Cell.Biol. 7:1436-1444）、精巣、乳房、リンパ、および肥満細胞において活性であるマウス乳房腫瘍ウイルス制御領域（Lederら、１９８６，Cell 45: 485-495）、肝臓において活性であるアルブミン遺伝子制御領域（Pinkertら、１９８７，Genes and Devel.1: 268-276）、肝臓において活性であるα－フェトプロテイン遺伝子制御領域（Krumlaufら、１９８５，Mol.Cell.Biol. 5: 1639-1648、Hammerら、１９８７，Science 235: 53-58）、肝臓において活性であるα１－アンチトリプシン遺伝子制御領域（Kelseyら、１９８７，Genes and Devel. 1: 161-171）、骨髄細胞において活性であるβ－グロビン遺伝子制御領域（Mogramら、１９８５，Nature 315: 338-340、Kolliasら、１９８６，Cell 46: 89-94）、脳の乏突起膠細胞において活性であるミエリン塩基性タンパク質遺伝子制御領域（Readheadら、１９８７，Cell 48:703-712）、骨格筋において活性であるミオシン軽鎖－２遺伝子制御領域（Sani，１９８５，Nature 314:283-286）、および視床下部において活性である性腺刺激ホルモン放出ホルモン制御領域（Masonら、１９８６，Science 234: 1372-1378）。

【０４５９】

特定の実施形態において、遺伝子治療の目的のために導入される核酸は、核酸の発現が転写のインデューサーの存在の有無を制御することによって制御可能であるように、コー

ド領域に作動可能に連結された誘導性プロモーターを含む。

【０４６０】

５．１９．２　抗炎症治療

抗炎症剤は、変形性関節症を治療、管理、および改善する際に成功を示しており、現在は、このような障害のための一般的かつ標準的な治療である。当業者に周知である任意の抗炎症剤は、本発明の組成物および方法において使用することができる。抗炎症剤の非限定的な例には以下が含まれる：非ステロイド抗炎症薬剤（ＮＳＡＩＤ）、ステロイド抗炎症性薬剤、β－アゴニスト、抗コリン作用剤、およびメチルキサンチン。非ステロイド抗炎症薬の例には以下が含まれるがこれらに限定されない：アスピリン、イブプロフェン、セレコキシブ（CELEBREX（商標））、ジクロフェナク（VOLTAREN（商標））、エトドラク（LODINE（商標））、フェノプロフェン（NALFON（商標））、インドメタシン（INDOCIN（商標））、ケトララク（TORADOL（商標））、オキサプロジン（DAYPRO（商標））、ナブメントン（RELAFEN（商標））、スリンダク（CLINORIL（商標））、トルメンチン（TOLECTIN（商標））、ロフェコキシブ（VIOXX（商標））、ナプロキセン（ALEVE（商標）、NAPROSYN（商標））、ケトプロフェン（ACTRON（商標））、およびナブメトン（RELAFEN（商標））。このようなＮＳＡＩＤは、シクロオキシゲナーゼ酵素（例えば、ＣＯＸ－１および／またはＣＯＸ－２）を阻害することによって機能する。ステロイド系抗炎症薬剤の例には以下が含まれるがこれらに限定されない：糖質コルチコイド、デキサメタゾン（DECADRON（商標））、コルチゾン、ハイドロコルチゾン、プレドニゾン（DELTASONE（商標））、プレドニゾロン、トリアムシノロン、アズルフィジン、およびエイコサノイド、例えば、プロスタグランジン、トロンボキサン、およびロイコトリエン。

【０４６１】

５．２０　医薬組成物

本発明の方法を使用して同定される生物学的に活性な化合物またはその薬理学的に受容可能な塩は、変形性関節症に罹患している被験体、好ましくは、哺乳動物に投与することができる。特定の実施形態において、化合物またはその薬理学的に受容可能な塩は、以下の段階：軽度、中程度、顕著または重度の変形性関節症に罹患している患者、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒトに投与される。別の実施形態において、化合物またはその薬理学的に受容可能な塩は、変形性関節症に対する予防的手段として、患者、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒトに投与される。これらの実施形態に従って、患者は子供、成人、または高齢者であってもよく、ここで「子供」は２４ヶ月齢から１８歳までの年齢の被験体、「成人」は１８歳以上の年齢の被験体、および「高齢者」は６５歳以上の年齢の被験体である。

【０４６２】

患者に投与されるとき、化合物またはその薬理学的に受容可能な塩は、好ましくは、任意に薬理学的に受容可能な媒体を含む組成物の成分として投与される。この組成物は、経口で、または任意の他の便利な経路によって、例えば、注入またはボーラス注入によって、上皮または皮膚粘膜裏層（例えば、蛍光粘膜、直腸、および腸粘膜など）を通しての吸収によって投与されてもよく、そして別の生物学的に活性な薬剤と一緒に投与されてもよい。投与は、全身または局所的であり得る。種々の送達系、例えば、リポソーム、微粒子、マイクロカプセル、カプセルなどの中でのカプセル化が公知であり、化合物およびその薬理学的に受容可能な塩を送達することができる。

【０４６３】

投与の方法には、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下、鼻内、硬膜外、経口、鼻内、脳内、膣内、経皮、直腸、吸入により、または局所的に、特に、耳に、鼻に、眼に、もしくは皮膚に含まれるがこれらに限定されない。投与の形態は、担当開業医の裁量に任されている。多くの例において、投与は、化合物またはその薬理学的に受容可能な塩の血流への放出を生じる。

【０４６４】

特定の実施形態において、化合物またはその薬理学的に受容可能な塩を局所的に投与す

ることが所望されてもよい。これは、例えば、しかし限定されるものではなく、手術時の局所的注入、局所的適用、例えば、手術後に創傷包帯とともに、注射によって、カテーテルによって、坐剤によって、または移植物によって達成されてもよく、上記移植物は、シアラスチック（sialastic）メンブレンなどのメンブレンまたは繊維を含む、多孔性、非多孔性、またはゼラチン質材料である。特定の実施形態において、化合物は、変形性関節症に罹患した関節に局所的に投与される。

【０４６５】

特定の実施形態において、化合物またはその薬理学的に受容可能な塩を、脳室内、くも膜下腔内、および硬膜外の注射を含む任意の適切な経路によって、中枢神経系に導入することが所望され得る。脳室内注射は、例えば、Ommayaリザーバーなどのリザーバーに結合した脳室内カテーテルによって容易にされてもよい。

【０４６６】

肺投与もまた、例えば、吸入器または噴霧器、およびエアロゾル剤を有する製剤の使用によって、またはフルオロカーボンまたは合成肺界面活性物質中での灌流によって、利用することができる。特定の実施形態において、化合物およびその薬理学的に受容可能な塩は、伝統的な結合剤および媒体、例えば、トリグリセリドを用いて、坐剤として製剤化することができる。

【０４６７】

別の実施形態において、化合物およびその薬理学的に受容可能な塩は、ベシクル中で、特にリポソーム中で送達することができる（以下を参照のこと：「感染性疾患および癌の治療におけるリポソーム（Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer）」，Science 249: 1527-1533（１９９９），Langer），Lopez-BersteinとFidler（編），Liss，ニューヨーク，pp.353-365（１９８９）所収、Lopez-Berestein，同上 pp.317-327、一般的には同上を参照）。

【０４６８】

なお別の実施形態において、化合物およびその薬理学的に受容可能な塩は、制御放出系い送達することができる（例えば、Goodson，「制御放出の医療用適用（Medical Applications of Controlled Release）」，前出，第２巻，pp.115-138（１９８４）所収を参照）。Langer，１９９０，Science 249: 1527-1533による概説において説明されている他の制御放出系が使用されてもよい。１つの実施形態において、ポンプが使用されてもよい（Langer，前出、Sefton，１９８７，CRC Crit.Ref.Biomed.Eng. 14: 201、Buchwaldら、1980，Surgery 88:507、Saudekら、１９８９，N.Engl.J.Med. 321:574を参照）。別の実施形態において、ポリマー材料を使用することができる（以下を参照のこと：制御放出の医療用適用，LangerとWise（編），CRC Pres.，Boca Raton，Florida（１９７４）、薬剤の生物学的利用能、薬剤製品設計、および性能の制御（Controlled Drug Bioavailability，Drug Product Design and Performance），SmolenとBall（編），Wiley，ニューヨーク（１９８４）、RangerとPeppas，１９８３，J.Macromol.Sci.Rev.Macromol.Chem. ２３：６１、以下もまた参照のこと：Levyら、１９８５，Science 228: 190、Duringら、１９８９，Ann.Neurol. 25: 351、Howardら、１９８９，J.Neurosurg. 71:105）。さらに別の実施形態において、制御放出系は、化合物のＲＮＡ標的またはその薬理学的に受容可能な塩に近接して配置することができ、従って、全身用量の一部分のみを必要とする。

【０４６９】

本明細書に記載される化合物は、投与のために適切な医薬組成物に取り込むことができる。このような組成物は、典型的には、活性化合物および薬理学的に受容可能な担持体を含む。本明細書で使用される場合、「薬理学的に受容可能な担持体」という言葉は、薬理学的投与と適合可能である任意のおよびすべての、溶媒、分散媒体、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などを含むことが意図される。薬理学的に活性な物質のためのこのような媒体および薬剤の使用は当該分野において周知である。従来の媒体または薬剤が活性化合物と適合可能でない場合を除いて、組成物中でのその使用が意図される。補助的な活性化合物もまた、組成物中に取り込むことができる。

【０４７０】
本発明は、関連のポリペプチドまたは核酸の発現または活性を調節するための医薬組成物を調製するための方法を含む。このような方法は、関連のポリペプチドまたは核酸の発現または活性を調節する薬剤とともに、薬理学的に受容可能な担持体を製剤化する工程を包含する。このような組成物は、さらなる活性薬剤をさらに含むことができる。従って、本発明はさらに、関連のポリペプチドまたは核酸の発現または活性を調節する薬剤、および１種以上のさらなる活性化合物とともに、薬理学的に受容可能な担持体を製剤化することによって、医薬組成物を調製するための方法を包含する。

【０４７１】
本発明の医薬組成物は、その意図された投与経路と適合性であるように製剤化される。投与経路の例には、非経口、例えば、静脈内、皮内、皮下、経口（例えば、吸入）、経皮（局所的）、経粘膜、および直腸の投与が含まれる。静脈内投与が好ましい。非経口、経皮、または皮下投与のために使用される溶液または懸濁液は以下の成分を含むことができる：滅菌希釈液、例えば、注射のための水、生理食塩水溶液、固定油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたは他の合成溶媒、抗微生物剤、例えば、ベンジルアルコールまたはメチルパラベン、抗酸化剤、例えば、アスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウム、キレート剤、例えば、エチレンジアミン四酢酸、緩衝剤、例えば、酢酸、クエン酸、またはリン酸、および張度の調整のための薬剤、例えば、塩化ナトリウムまたはデキストロース。ｐＨは酸または塩基、例えば、塩酸または水酸化ナトリウムで調整することができる。非経口調製物は、アンプル、使い捨てシリンジ、またはガラスもしくはプラスチック製の多用量バイアルの中に密封することができる。

【０４７２】
注射用途のために適切な医薬組成物は、滅菌水溶液（水溶性である場合）または懸濁液、および滅菌注射液または懸濁液の即席調製のための滅菌粉末を含む。静脈内投与のために、適切な担持体は、生理食塩水、静菌水、Cremophor EL（商標）（ＢＡＳＦ、Parsippany, ニュージャージー州）またはリン酸緩衝化生理食塩水（ＰＢＳ）を含む。すべての場合において、組成物は滅菌でなくてはならず、容易なシリンジ通過性が存在する程度まで流動性であるべきである。これは、製造および保存の条件下で安定でなくてはならず、細菌および真菌などの微生物の夾雑作用に対抗して保存されなければならない。担持体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど）、およびこれらの適切な混合物を含む溶媒または分散媒体であり得る。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングの使用によって、分散液の場合には必要とされる粒子サイズの維持によって、そして界面活性剤の使用によって維持することができる。微生物の作用の阻害は、種々の抗菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チロメサールなどによって達成することができる。多くの場合において、等張剤、例えば、糖、ポリアルコール、例えば、マンニトール、ソルビトール、塩化ナトリウムを組成物中に含めることが好ましい。注射組成物の吸収の延長は、吸収を遅延させる薬剤、例えば、モノステアリン酸マグネシウムおよびゼラチンを組成物中に含めることによってもたらすことができる。

【０４７３】
滅菌注射溶液は、必要とされる量で、活性化合物（例えば、ポリペプチドまたは抗体）を上記に列挙した成分の１つまたは組み合わせとともに適切な溶媒中に取り込むこと、および必要とされる場合、その後の濾過滅菌によって調製することができる。一般的に、分散液は、基本的な分散媒体および上記に列挙したものからの必要とされる他の成分を含む滅菌媒体に、活性化合物を取り込むことによって調製される。滅菌注射溶液の調製のための滅菌粉末の場合、好ましい調製の方法は、真空乾燥および凍結乾燥であり、これは、以前に滅菌濾過したその溶液から、活性成分および任意のさらなる所望の成分の粉末を生じる。

【０４７４】

経口組成物は、一般的に、不活性希釈剤または可食性担持体を含む。これらは、ゼラチンカプセル中に密封し、または錠剤に圧縮することができる。経口治療投与の目的のために、活性化合物は、賦形剤とともに取り込み、そして錠剤、トローチ、またはカプセルの剤形で使用することができる。経口組成物はまた、マウスウォッシュとしての使用のために流体担持体を使用して調製することができ、ここで、流体担持体中の化合物は、経口で適用され、そして口の中をすすぎ、そして吐き出されまたは飲み込まれる。

【０４７５】

薬理学的に適合性である結合剤および／またはアジュバント材料は、組成物の一部として含めることができる。錠剤、丸剤、カプセル、トローチなどは、以下の成分のいずれか、もしくは類似の性質の化合物を含むことができる：結合剤、例えば、微結晶性セルロース、トラガカントガムもしくはゼラチン、賦形剤、例えば、デンプンもしくはラクトース、崩壊剤、例えば、アルギン酸、Primogel、もしくはコーンスターチ、滑沢剤、例えば、ステアリン酸マグネシウムもしくはステロート（Sterote）、流動促進剤、例えば、コロイド状二酸化ケイ素、甘味料、例えば、スクロースもしくはサッカリン、または香料、例えば、ペパーミント、サリチル酸、またはオレンジ香料。

【０４７６】

吸入による投与のために、化合物は、適切な噴霧剤、例えば、二酸化炭素などのガスを含む加圧容器または分配器、または噴霧器からのエアロゾルスプレーの剤形で送達される。

【０４７７】

全身投与はまた、経粘膜または経皮手段によってであり得る。経粘膜または経皮投与のために、浸透する障壁に対して適切な浸透剤が製剤中で使用される。このような浸透剤は、当該分野で一般的に公知であり、そして例えば、経粘膜投与のために、界面活性剤、胆汁酸塩、およびフシジン酸誘導体を含む。経粘膜投与は、鼻スプレーまたは坐剤の使用を通して達成することができる。経皮投与のために、活性化合物は、当該分野で一般的に公知であるように、軟膏剤（ointment）、軟膏（salve）、ゲル、またはクリームに製剤化される。

【０４７８】

化合物はまた、直腸送達のための坐剤（例えば、ココアバターおよび他のグリセリドなどの従来の坐剤基剤を用いる）または保持浣腸剤の剤形で調製することができる。

【０４７９】

１つの実施形態において、活性化合物は、身体からの迅速な除去に対して化合物を保護する担持体、例えば、移植物およびマイクロカプセル化送達系を含む、制御放出製剤とともに調製される。生物分解性、生体適合性のポリマー、例えば、エチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸を使用することができる。このような製剤の調製のための方法は、当業者には明らかである。材料はまた、Alza CorporationおよびNova Pharmaceuticals,Inc.から市販されている。リポソーム懸濁液（ウイルス抗原に対するモノクローナル抗体を用いて感染細胞に標的化されるリポソームを含む）もまた、薬理学的に受容可能な担持体として使用することができる。これらは、例えば、米国特許第４，５２２，８１１号に記載されるように、当業者に公知である方法に従って調製することができる。

【０４８０】

投与の容易さおよび投与量の均一性のために単位剤形で経口または非経口組成物を製剤化することがとりわけ有利である。単位剤形とは、本明細書で使用される場合、治療される被験体のための単位となる投与量として適している物理的に個別の単位をいい、各単位は、必要とされる薬理学的担持体と共同して、所望の治療的効果を生じるために計算された活性化合物の所定の量を含む。本発明の単位剤形についての詳細は、活性化合物の固有な特性、および達成される特定の治療効果、および個体の治療のために活性化合物を化合物化することの当該分野における固有の制限によって、およびこれらに直接的に依存して指示される。

【０４８１】
抗体については、好ましい投与量は、体重の０．１ｍｇ／ｋｇ～１００ｍｇ／ｋｇ（より好ましくは、０．１～２０ｍｇ／ｋｇ、０．１～１０ｍｇ／ｋｇ、または０．１～１．０ｍｇ／ｋｇ）である。抗体が脳において作用する場合、５０ｍｇ／ｋｇ～１００ｍｇ／ｋｇの投与量が通常適切である。一般的に、部分的なヒト抗体および完全なヒト抗体は、他の抗体よりもヒトの身体中でより長い半減期を有する。従って、より低い投与量およびより低頻度の投与がしばしば可能である。脂質化などの修飾は、抗体を安定化するため、ならびに取り込みおよび組織浸透（例えば、脳への）を増強するために使用することができる。抗体の脂質化のための方法は、Cruikshankら（１９９７，J.Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology 14:193）によって記載されている。

【０４８２】
特定の実施形態において、タンパク質またはポリペプチドの有効量（すなわち、有効投与量）は、０．００１～３０ｍｇ／ｋｇ体重、好ましくは、０．０１～２５ｍｇ／ｋｇ体重、より好ましくは、約０．１～２０ｍｇ／ｋｇ体重、およびさらにより好ましくは、約０．１～１．０ｍｇ／ｋｇ、１～１０ｍｇ／ｋｇ、２～９ｍｇ／ｋｇ、３～８ｍｇ／ｋｇ、４～７ｍｇ／ｋｇ、または５～６ｍｇ／ｋｇ体重の範囲である。

【０４８３】
当業者は、疾患または障害の重症度、過去の治療、一般的健康および／または被験体の年齢、および存在する他の疾患を含むがこれらに限定されない特定の要因が、被験体を有効に治療するために必要とされる投与量に影響を及ぼす可能性があることを認識する。さらに、タンパク質、ポリペプチド、または抗体の治療有効量を用いる被験体の治療は、一連の治療を含むことができる。

【０４８４】
上記の化合物に加えて、本発明は、関連の核酸またはポリペプチドの発現または活性を調節する小分子の使用を包含する。小分子の非限定的な例には以下が含まれる：ペプチド、ペプチド模倣剤、アミノ酸、アミノ酸アナログ、ポリヌクレオチド、ポリヌクレオチドアナログ、ヌクレオチド、ヌクレオチドアナログ、１モルあたり約１０，０００グラム未満の分子量を有する有機化合物または無機化合物（すなわち、ヘテロ有機化合物および有機金属化合物）、１モルあたり約５，０００グラム未満の分子量を有する有機化合物または無機化合物、１モルあたり約１，０００グラム未満の分子量を有する有機化合物または無機化合物、１モルあたり約５００グラム未満の分子量を有する有機化合物または無機化合物、ならびにこれら化合物の塩、エステル、および他の薬理学的に受容可能な形態。

【０４８５】
小分子薬剤の適切な用量は、通常の技能を有する医師、獣医、または研究者の知識の範囲内にある多数の要因に依存することが理解される。小分子の用量は、例えば、治療される被験体またはサンプルの同一性、サイズ、および状態に依存して、さらに組成物が投与される経路、もし適用可能である場合、担当開業医が小分子に所望する、本発明の核酸またはポリペプチドに対する効果に依存して変化する。

【０４８６】
例示的な用量は、被験体またはサンプルの重量キログラムあたりの、小分子のミリグラムまたはマイクログラム量を含む（例えば、キログラムあたり約１マイクログラム～約５００ミリグラム、キログラムあたり約１００マイクログラム～約５ミリグラム、またはキログラムあたり約１マイクログラム～約５０マイクログラム）。さらに、小分子の適切な用量は、調節される発現または活性に関する小分子の潜在的効力に依存することが理解される。このような適切な用量は、本明細書に記載されるアッセイを使用して決定されてもよい。本発明のポリペプチドまたは核酸の発現または活性を調節するために、１種以上のこれらの小分子が被験体（例えば、ヒト）に投与される場合、医師、獣医、または研究者は、例えば、最初は比較的低用量で処方し、引き続いて、適切な応答が得られるまで、用量を増加させてもよい。加えて、任意の特定の動物被験体についての特定の用量レベルは、利用される特定の化合物の活性、被験体の齢、体重、一般的健康、性別、および食事、

投与の時間、投与経路、排出の速度、任意の薬剤の組み合わせ、および調節される発現または活性の程度を含む種々の要因に依存することが理解される。

【０４８７】

医薬組成物は、投与のための指示書とともに、容器、パック、またはディスペンサーに含めることができる。

【０４８８】

５．２１　キット

本発明は、本発明のバイオマーカーの少なくとも１個、少なくとも２個、少なくとも３個、少なくとも４個、少なくとも５個、少なくとも６個、少なくとも７個、少なくとも８個、少なくとも９個、少なくとも１０個、少なくとも１５個、少なくとも２０個、少なくとも２５個、少なくとも３０個、少なくとも３５個、少なくとも４０個、少なくとも４５個、少なくとも５０個、すべて、またはその任意の組み合わせのタンパク質およびＲＮＡ産物の発現を測定するためのキットを提供する。このようなキットは、このようなタンパク質およびＲＮＡ産物の発現を測定するために必要とされる材料および試薬を含む。特定の実施形態において、このキットは、例えば、以下のような、種々の方法において利用される１種以上のさらなる試薬をさらに含んでもよい：（１）血液、軟骨細胞または滑液からＲＮＡを精製するための試薬、（２）試験核酸を生成するためのプライマー、（３）任意に１種以上の固有に標識されたｄＮＴＰおよび／またはｒＮＴＰ（例えば、ビオチン化またはＣｙ３もしくはＣｙ５タグ付きｄＮＴＰ）を伴うｄＮＴＰおよび／またはｒＮＴＰ（あらかじめ混合するかまたは別々のいずれか）、（４）合成後標識試薬、例えば、蛍光色素の化学的に活性な誘導体、（５）酵素、例えば、逆転写酵素、ＤＮＡポリメラーゼなど、（６）種々の緩衝媒体、例えば、ハイブリダイゼーション緩衝液および洗浄緩衝液、（７）標識プローブ精製試薬および成分、例えば、スピンカラムなど、ならびに（８）タンパク質精製試薬、（９）シグナル生成および検出試薬、例えば、ストレプトアビジン－アルカリホスファターゼ結合体、化学蛍光または化学発光基質など。特定の実施形態において、このキットは、対照としての使用のための、サンプル（例えば、血液、軟骨細胞または滑液）から単離された、前標識され品質管理されたタンパク質およびまたはＲＮＡを含む。

【０４８９】

ある実施形態において、キットはＲＴ－ＰＣＲキットである。他の実施形態において、キットは、核酸アレイおよびタンパク質アレイである。本発明に従うこのようなキットは、それゆえに、本発明の関連するタンパク質メンバーまたは核酸メンバーを有するアレイ、およびパッケージング手段を少なくとも含むことになる。代替的には、本発明のタンパク質メンバーまたは核酸メンバーはアレイにあらかじめパッケージされてもよい。

【０４９０】

ある実施形態において、キットは定量ＲＴ－ＰＣＲキットである。１つの実施形態において、定量ＲＴ－ＰＣＲキットは以下を含む：（ａ）本発明のバイオマーカーの各々の組み合わせを増幅するために使用されるプライマー、（ｂ）緩衝液および逆転写酵素（reverse transcripate）を含む酵素、（ｃ）１種以上の耐熱性ポリメラーゼ、ならびに（ｄ）Sybr（登録商標）Green。好ましい実施形態において、本発明のキットはまた、（ａ）参照対照ＲＮＡおよび（ｂ）スパイク対照ＲＮＡを含む。

【０４９１】

本発明は、（ａ）個体を、変形性関節症を有すると診断すること、（ｂ）変形性関節症（ＯＡ）の２つの段階を区別すること、および（ｃ）個体を変形性関節症（ＯＡ）の特定の段階を有すると診断することのために有用であるキットを提供する。例えば、本発明の特定の実施形態において、このキットは、フォワードおよびリバースプライマーを含み、ここで、フォワードおよびリバースプライマーは、個体が軽度の変形性関節症を有するかまたは変形性関節症を有さないかを決定する際に有用である、本発明に従って同定されるようなバイオマーカーの各々に対応するｍＲＮＡ種のすべての発現を定量するように設計される。特定の実施形態において、少なくとも１種のプライマーが、エキソンジャンクシ

ョンにまたがるように設計される。

【０４９２】

本発明は、サンプル中の本発明のバイオマーカーの少なくとも１個、少なくとも２個、少なくとも３個、少なくとも４個、少なくとも５個、少なくとも６個、少なくとも７個、少なくとも８個、少なくとも９個、少なくとも１０個、少なくとも１５個、少なくとも２０個、少なくとも２５個、少なくとも３０個、少なくとも３５個、少なくとも４０個、少なくとも４５個、少なくとも５０個、すべての数、またはその任意の組み合わせのタンパク質産物またはＲＮＡ産物の発現に基づいて変形性関節症を検出、診断、モニタリング、および予後診断するために有用であるキットを提供する。特定の実施形態において、このようなキットは、変形性関節症と関連していることが先行技術によって示唆されている本発明のバイオマーカーのタンパク質産物またはＲＮＡ産物の発現を測定するための材料および試薬を含まない。他の実施形態において、このようなキットは、変形性関節症と関連していることが先行技術によって示唆されている本発明のバイオマーカー、および少なくとも１個、少なくとも２個、少なくとも３個、少なくとも４個、少なくとも５個、少なくとも６個、少なくとも７個、少なくとも８個、少なくとも９個、少なくとも１０個、少なくとも１５個、少なくとも２０個、少なくとも２５個、少なくとも３０個、少なくとも３５個、少なくとも４０個、少なくとも４５個、またはそれ以上の本発明のバイオマーカー以外の遺伝子のタンパク質産物またはＲＮＡ産物の発現を測定するための材料および試薬を含む。

【０４９３】

本発明は、サンプル中の本発明のバイオマーカーの少なくとも１個、少なくとも２個、少なくとも３個、少なくとも４個、少なくとも５個、少なくとも６個、少なくとも７個、少なくとも８個、少なくとも９個、少なくとも１０個、少なくとも１５個、少なくとも２０個、少なくとも２５個、少なくとも３０個、少なくとも３５個、少なくとも４０個、少なくとも４５個、少なくとも５０個、すべてまでの任意の数、またはその任意の組み合わせのタンパク質産物またはＲＮＡ産物の発現に基づいて被験体が受ける１つ以上の治療の有効性をモニターするために有用であるキットを提供する。特定の実施形態において、このようなキットは、変形性関節症と関連していることが先行技術によって示唆されている本発明のバイオマーカーのタンパク質産物またはＲＮＡ産物の発現を測定するための材料および試薬を含まない。他の実施形態において、このようなキットは、変形性関節症と関連していることが先行技術によって示唆されている本発明のバイオマーカー、および少なくとも１個、少なくとも２個、少なくとも３個、少なくとも４個、少なくとも５個、少なくとも６個、少なくとも７個、少なくとも８個、少なくとも９個、少なくとも１０個、少なくとも１５個、少なくとも２０個、少なくとも２５個、少なくとも３０個、少なくとも３５個、少なくとも４０個、少なくとも４５個までの、またはそれ以上の任意の数の本発明のバイオマーカー以外の遺伝子のタンパク質産物またはＲＮＡ産物の発現を測定するための材料および試薬を含む。

【０４９４】

本発明は、サンプル中の本発明のバイオマーカーの少なくとも１個、少なくとも２個、少なくとも３個、少なくとも４個、少なくとも５個、少なくとも６個、少なくとも７個、少なくとも８個、少なくとも９個、少なくとも１０個、少なくとも１５個、少なくとも２０個、少なくとも２５個、少なくとも３０個、少なくとも３５個、少なくとも４０個、少なくとも４５個、少なくとも５０個、すべてまでの任意の数、またはその任意の組み合わせのタンパク質産物またはＲＮＡ産物の発現に基づく治療に対して、被験体が応答性であるか否かを決定するために使用するキットを提供する。特定の実施形態において、このようなキットは、変形性関節症と関連していることが先行技術によって示唆されている本発明のバイオマーカーのタンパク質産物またはＲＮＡ産物の発現を測定するための材料および試薬を含まない。他の実施形態において、このようなキットは、変形性関節症と関連していることが先行技術によって示唆されている本発明のバイオマーカー、および少なくとも１個、少なくとも２個、少なくとも３個、少なくとも４個、少なくとも５個、少なくと

も６個、少なくとも７個、少なくとも８個、少なくとも９個、少なくとも１０個、少なくとも１５個、少なくとも２０個、少なくとも２５個、少なくとも３０個、少なくとも３５個、少なくとも４０個、少なくとも４５個までの、またはそれ以上の任意の数の本発明のバイオマーカー以外の遺伝子のタンパク質産物またはＲＮＡ産物の発現を測定するための材料および試薬を含む。

【０４９５】

本発明は、サンプル中の本発明のバイオマーカーの少なくとも１個、少なくとも２個、少なくとも３個、少なくとも４個、少なくとも５個、少なくとも６個、少なくとも７個、少なくとも８個、少なくとも９個、少なくとも１０個、少なくとも１５個、少なくとも２０個、少なくとも２５個、少なくとも３０個、少なくとも３５個、少なくとも４０個、少なくとも４５個、少なくとも５０個、すべてまでの任意の数、またはその任意の組み合わせのＲＮＡ産物の発現を測定するためのキットを提供する。特定の実施形態において、このようなキットは、本発明のバイオマーカーのＲＮＡ産物の発現を測定するために必要な材料および試薬を含む。例えば、変形性関節症についてのマイクロアレイまたはＲＴ－ＰＣＲキットが製造されてもよく、これは、本発明のバイオマーカーの少なくとも１個、少なくとも２個、少なくとも３個、少なくとも４個、少なくとも５個、少なくとも６個、少なくとも７個、少なくとも８個、少なくとも９個、少なくとも１０個、少なくとも１５個、少なくとも２０個、少なくとも２５個、少なくとも３０個、少なくとも３５個、少なくとも４０個、少なくとも４５個、少なくとも５０個、すべてまでの任意の数、またはその任意の組み合わせのＲＮＡ産物のレベルを測定するために必要な試薬および材料のみを含む。代替的には、ある実施形態において、このキットは、１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個、１５個、２０個、２５個、３０個、３５個、４０個、４５個、５０個、すべてまでの本発明のバイオマーカーの任意の数、またはその任意の組み合わせのＲＮＡ産物のレベルを測定するために必要なものに限定されない試薬および材料を含むことができる。例えば、マイクロアレイキットは、少なくとも１個、少なくとも２個、少なくとも３個、少なくとも４個、少なくとも５個、少なくとも６個、少なくとも７個、少なくとも８個、少なくとも９個、少なくとも１０個、少なくとも１５個、少なくとも２０個、少なくとも２５個、少なくとも３０個、少なくとも３５個、少なくとも４０個、少なくとも４５個、少なくとも５０個までの、またはそれ以上の任意の数の本発明のバイオマーカー以外の遺伝子のＲＮＡ産物のレベルを測定するために必要な試薬および材料に加えて、変形性関節症と必ずしも関連しないか、またはそれを示さないＲＮＡ産物のレベルを測定するために必要な試薬および材料を含んでもよい。特定の実施形態において、マイクロアレイまたはＲＴ－ＰＣＲキットは、少なくとも１個、少なくとも２個、少なくとも３個、少なくとも４個、少なくとも５個、少なくとも６個、少なくとも７個、少なくとも８個、少なくとも９個、少なくとも１０個、少なくとも１５個、少なくとも２０個、少なくとも２５個、少なくとも３０個、少なくとも３５個、少なくとも４０個、少なくとも４５個、少なくとも５０個までの任意の数、もしくは任意の組み合わせの本発明のバイオマーカーのＲＮＡ産物、ならびに１個、２個、３個、４個、５個、１０個、１５個、２０個、２５個、３０個、３５個、４０個、４５個、５０個、５５個、６０個、６５個、７０個、７５個、８０個、８５個、９０個、９５個、１００個、１２５個、１５０個、１７５個、２００個、２２５個、２５０個、３００個、３５０個、４００個、４５０個、もしくはそれ以上までの任意の数の本発明のバイオマーカー以外の遺伝子、または１～１０個、１～１００個、１～１５０個、１～２００個、１～３００個、１～４００個、１～５００個、１～１０００個、２５～１００個、２５～２００個、２５～３００個、２５～４００個、２５～５００個、２５～１０００個、１００～１５０個、１００～２００個、１００～３００個、１００～４００個、１００～５００個、１００～１０００個、５００～１０００個の本発明のバイオマーカー以外の遺伝子のレベルを測定するために必要な試薬および材料を含む。

【０４９６】

核酸マイクロアレイキットについては、このキットは、一般的に、支持体表面に結合さ

れたプローブを含む。プローブは、検出可能な標識で標識されてもよい。特定の実施形態において、プローブは、１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個、１５個、２０個、２５個、３０個、３５個、４０個、４５個、５０個、すべてまでの本発明のバイオマーカーの任意の数、またはその任意の組み合わせの、エキソン、イントロン、エキソンジャンクション、またはエキソン－イントロンジャンクションに特異的である。マイクロアレイキットは、アッセイならびにアッセイの実施から得られるデータを解釈および分析するための方法を実施するための説明書を含んでもよい。特定の実施形態において、このキットは変形性関節症を診断するための説明書を含んでもよい。このキットはまた、ハイブリダイゼーション試薬および／またはプローブが標的核酸配列にハイブリダイズするときに産生されるシグナルを検出するために必要な試薬を含んでもよい。一般的に、マイクロアレイキットのための材料および試薬は、１つ以上の容器の中にある。キットの各成分は、一般的に、それ自体が適切な容器の中にある。

【０４９７】

ＲＴ－ＰＣＲキットについては、このキットは、一般的に、１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個、１５個、２０個、２５個、３０個、３５個、４０個、４５個、５０個、すべてまでの本発明のバイオマーカーの任意の数、またはその任意の組み合わせの特定のＲＮＡ産物（エキソン、イントロン、エキソンジャンクション、およびエキソン－イントロンジャンクション）に特異的である、あらかじめ選択されたプライマーを含む。このＲＴ－ＰＣＲキットはまた、核酸を逆転写および／または増幅するために適切である酵素（例えば、Ｔａｑなどのポリメラーゼ）、ならびに逆転写および増幅のための反応混合液のために必要であるデオキシヌクレオチドおよび緩衝液を含んでもよい。このＲＴ－ＰＣＲキットはまた、１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個、１５個、２０個、２５個、３０個、３５個、４０個、４５個、５０個、すべてまでの任意の数の本発明のバイオマーカー、またはその任意の組み合わせに特異的なプローブを含んでもよい。このプローブは、検出可能な標識（例えば、蛍光標識）で標識されてもよいし、標識されなくてもよい。ＲＴ－ＰＣＲキットの各成分は、一般的に、それ自体が適切な容器の中にある。従って、これらのキットは、一般的に、各々個々の試薬、酵素、プライマーおよびプローブのために適切な個別の容器を含む。さらに、このＲＴ－ＰＣＲキットは、アッセイならびにアッセイの実施から得られるデータを解釈および分析するための方法を実施するための説明書を含んでもよい。特定の実施形態において、このキットは、変形性関節症を診断するための説明書を含む。

【０４９８】

特定の実施形態において、キットはリアルタイムＲＴ－ＰＣＲキットである。このようなキットは、９６ウェルプレート、ならびにSYBR Green検出のために必要である試薬および材料を含む。このキットは、β－アクチンが結果を標準化するために使用することができるような試薬および材料を含んでもよい。このキットはまた、水、リン酸緩衝化生理食塩水、およびファージＭＳ２　ＲＮＡなどの対照を含んでもよい。さらに、このキットは、アッセイならびにアッセイの実施から得られるデータを解釈および分析するための方法を実施するための説明書を含んでもよい。特定の実施形態において、説明書は、１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個、１５個、２０個、２５個、３０個、３５個、４０個、４５個、５０個、すべてまでの任意の数の本発明のバイオマーカー、またはその任意の組み合わせのＲＮＡ産物のレベルが、例えば、５倍～１０倍異なる２つの濃度で試験されるべきであることをことを述べる。

【０４９９】

抗体ベースのキットについては、このキットは、例えば、以下を含むことができる：（１）関連のタンパク質（１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個、１５個、２０個、２５個、３０個、３５個、４０個、４５個、５０個、すべてまでの任意の数の本発明のバイオマーカー、またはその任意の組み合わせのタンパク質産物）に結合する第１の抗体（これは支持体に結合してもよいし、結合しなくてもよい）、および任意に、（２）タンパク質または第１の抗体のいずれかに結合し、そして検出可能な標識

（例えば、蛍光標識、放射性同位元素または酵素）に結合体化されている第２の異なる抗体。抗体ベースのキットはまた、免疫沈殿を実行するためのビーズを含んでもよい。抗体ベースのキットの各成分は、一般的に、それ自体が適切な容器の中にある。従って、これらのキットは、一般的に、各抗体に対し適切な個別の容器を含む。さらに、抗体ベースのキットは、アッセイならびにアッセイの実施から得られるデータを解釈および分析するための方法を実施するための説明書を含んでもよい。特定の実施形態において、このキットは、変形性関節症を診断するための説明書を含む。

【実施例】

【０５００】

以下の実施例は非限定的であり、本発明の種々の態様および特徴を単に代表するものである。

【０５０１】

（実施例１）

マイクロアレイの構築

本発明の１つの態様に従うアレイを以下のように構築した。

【０５０２】

増幅のために使用したのと同じ９６ウェルチューブ中の変形性関節症軟骨ｃＤＮＡライブラリーからのｃＤＮＡクローンのＰＣＲ産物（～４０μｌ）を、４μｌ（１／１０容量）の３M酢酸ナトリウム（ｐＨ５．２）および１００μｌ（２．５容量）のエタノールを用いて沈殿させ、－２０℃で一晩保存した。次いで、これらを３，３００ｒｐｍで１時間、４℃にて遠心分離した。得られたペレットを５０μｌ氷冷７０％エタノールで洗浄し、再度３０分間遠心分離した。次いでペレットを空気乾燥し、そして５０％ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）または２０μｌ　３×ＳＳＣ中で一晩十分に再懸濁した。次いで、サンプルを、γアミノプロピルシラン（Gamma Amino Propyl Silane）（Corning　ＣＭＴ－ＧＡＰＳまたはＣＭＴ－ＧＡＰ２、カタログ番号４０００３、４０００４）またはポリリジン－コートスライド（Sigma カタログ番号Ｐ０４２５）の上に、単独でまたは二連でのいずれかで、ロボットＧＭＳ　４１７または４２７アレイヤー（Affymetrix, カリフォルニア州）を使用して沈着させた。マイクロアレイ上のＤＮＡスポットの境界は、ダイアモンドスクライバーを用いてマークする。本発明は、１０～２０，０００個のＰＣＲ産物が、アレイを調製するために固体支持体にスポットされているアレイを提供する。

【０５０３】

アレイは、粒子を含まない温かいｄｄＨ$_2$Ｏのディッシュの上にスライドを約１分間浮かせることによって再水和し（スポットはわずかに膨潤するが互いに混ざることはない）、７０～８０℃の逆さにしたヒーティングブロック上で３秒間、瞬間的に乾燥させる。次いで、核酸をスライドにＵＶ架橋させ（Stratagene, Stratalinker、６５ｍＪ－６５０×１００μＪである「６５０」にディスプレイを設定）、またはハイブリダイゼーションの前２～４時間、８０℃でベーキングする。アレイはスライドラックに配置する。空のスライドチャンバーを準備し、以下の溶液で満たす：３．０グラムの無水コハク酸（Aldrich）を１８９ｍｌの１－メチル－２－ピロリドン（試薬の迅速な添加が決定的に重要である）に溶解する、無水コハク酸の最後のフレークが溶解した直後に、２１．０ｍｌの０．２Mホウ酸ナトリウムを混合し、溶液をスライドチャンバーに注ぐ。スライドラックを迅速かつ均一にスライドチャンバーに突っ込み、数秒間激しく上下に振盪し、スライドと溶液が離れていないことを確実にし、次いで、１５～２０分間、軌道シェーカー上で混合する。次いで、スライドラックを、２分間、９５℃ｄｄＨ$_2$Ｏに穏やかに突っ込み、続いて、９５％エタノールに５回突っ込む。次いで、過剰のエタノールをペーパータオルに滴下させることによって、スライドを空気乾燥させる。次いで、アレイは使用するまで室温にてスライドボックスに保存する。

【０５０４】

（実施例２）

ＲＮＡ単離

全血から

１００μｌ全血を微量遠心管に取り、４℃にて２，０００ｒｐｍ（８００ｇ）で５分間遠心分離し、そして上清を除去する。ペレット化した細胞を、血液サンプルの原試料１０μｌ毎に約６μｌのTRIzol（登録商標）の比率でTRIzol（登録商標）（GIBCO/BRL）を使用してホモジナイズし、そして十分にボルテックスする。サンプルを室温で５分間放置する。ＲＮＡを、１０μｌのTRIzol（登録商標）あたり１２μｌのクロロホルムを使用して抽出する、サンプルを、４℃にて１２，０００×ｇで５分間遠心分離し、上層を収集する。上層に、イソプロパノールを１０μｌのTRIzol（登録商標）あたり５μｌの比率で加える。サンプルを－２０℃で一晩、または－２０℃で１時間放置する。ＲＮＡを公知の方法に従ってペレット化し、ＲＮＡを空気乾燥し、そしてペレットをＤＥＰＣ処理ｄｄ$H_2O$中に再懸濁する。ＲＮＡサンプルはまた、７５％エタノール中で保存することができ、この条件ではサンプルは輸送のための室温において安定である。

【０５０５】

遠心分離した溶解血から

１０ｍｌ全血をバキュテイナー（Vacutainer）に取り、４℃にて２，０００ｒｐｍ（８００ｇ）で５分間遠心分離し、そして血漿上清を除去する。溶解緩衝液を、１部の血液に対して３部の溶解緩衝液の比率で血液サンプルに加える（溶解緩衝液（１Ｌ）０．６ｇ ＥＤＴＡ、１．０ｇ $KHCO_2$、８．２ｇ $NH_4Cl$、ｐＨ７．４に調整（ＮａＯＨを使用））。サンプルを混合し、透明になるまで５～１０分間、氷上に配置する。溶解したサンプルを、４℃にて１０００ｒｐｍで１０分間遠心分離し、上清を吸引する。ペレットを５ｍｌ溶解緩衝液に再懸濁し、再度、４℃にて１０００ｒｐｍで１０分間遠心分離する。ペレット化した細胞を、もともとの血液サンプルの１０ｍｌ毎に約６ｍｌのTRIzol（登録商標）の比率でTRIzol（登録商標）（GIBCO/BRL）を使用して、ホモジナイズし、十分にボルテックスする。サンプルを室温で５分間放置する。ＲＮＡは、１ｍｌのTRIzol（登録商標）あたり１．２ｍｌのクロロホルムを使用して抽出する。サンプルは、４℃にて１２，０００×ｇで５分間遠心分離し、上層を収集する。この上層に、イソプロパノールを、１ｍｌのTRIzol（登録商標）あたり０．５ｍｌの比率で加える。サンプルを、－２０℃で一晩または－２０℃で１時間静置する。ＲＮＡを、公知の方法に従ってペレット化し、ＲＮＡペレットを空気乾燥し、そしてペレットをＤＥＰＣ処理ｄｄ$H_2O$に再懸濁する。ＲＮＡサンプルはまた、７５％エタノール中で保存することができ、この条件ではサンプルは輸送のための室温において安定である。

【０５０６】

無血清全血から

１０ｍｌ全血をバキュテイナーに取り、４℃にて２，０００ｒｐｍ（８００ｇ）で５分間遠心分離し、そして血漿上清を除去する。ペレット化した細胞を、もともとの血液サンプルの１０ｍｌ毎に約６ｍｌのTRIzol（登録商標）の比率でTRIzol（登録商標）（GIBCO/BRL）を使用して、ホモジナイズし、十分にボルテックスする。サンプルを室温で５分間放置する。ＲＮＡは、１ｍｌのTRIzol（登録商標）あたり１．２ｍｌのクロロホルムを使用して抽出する。サンプルは、４℃にて１２，０００×ｇで５分間遠心分離し、上層を収集する。この上層に、イソプロパノールを、１ｍｌのTRIzol（登録商標）あたり０．５ｍｌの比率で加える。サンプルを、－２０℃で一晩または－２０℃で１時間静置する。ＲＮＡを、公知の方法に従ってペレット化し、ＲＮＡペレットを空気乾燥し、そしてペレットをＤＥＰＣ処理ｄｄ$H_2O$に再懸濁する。ＲＮＡサンプルはまた、７５％エタノール中で保存することができ、この条件ではサンプルは輸送のための室温において安定である。

【０５０７】

（実施例３）

標的核酸の調製およびハイブリダイゼーション

ｍＲＮＡからの蛍光ＤＮＡプローブの調製

ＲＮＡの蛍光標識標的化句酸サンプルは、本発明のアレイを用いる分析のために調製する。

【０５０８】
１μｇオリゴ－ｄＴプライマーは、軽度の変形性関節症を有すると診断されたか、または軽度の変形性関節症を有すると疑われた患者の血液から単離した１０μｇの総ＲＮＡに、総量１０μｌで、７０℃で１０分間加熱することによってアニールし、そして氷上で冷却する。ｍＲＮＡは、最終濃度の５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．３）、７５ｍＭＫＣｌ、３ｍＭｍｇＣｌ２、２５ｍＭ　ＤＴＴ、２５ｍＭ未標識ｄＮＴＰ、４００単位のSuperscript II（２００Ｕ／μＬ，Gibco BRL）、および１５ｍＭのＣｙ３またはＣｙ５（Amersham）を含む２５μｌ容量中で、４２℃にて４０分間サンプルをインキュベートすることによって逆転写する。反応は、２．５μｌの５００ｍＭ　ＥＤＴＡおよび５μｌの１Ｍ　ＮａＯＨの添加ならびに６５℃で１０分間のインキュベーションにより停止する。反応混合液は、１２．５μｌの１Ｍ　ＴｒｉｓＨＣｌ（ｐＨ７．６）の添加により中和する。

【０５０９】
標識した標的核酸サンプルを、セントリコン（Centricon）－３０微量濃縮器（Amicon）中での遠心分離によって精製する。２つの異なる標的核酸（例えば、異なる患者に由来する２つのサンプル）は、同じアレイへのハイブリダイゼーションによって分析および比較し、各標的核酸は異なる蛍光標識（例えば、Ｃｙ３およびＣｙ５）で標識し、別々に濃縮する。別々に濃縮された標的核酸サンプル（Ｃｙ３およびＣｙ５されている）は、新鮮なセントリコン中で合わせて、５００μｌ　ＴＥで洗浄し、そして再度、７μｌ未満の量に濃縮する。１μＬの１０μｇ／μｌポリＡ　ＲＮＡ（Sigma，＃Ｐ９４０３）および１μｌの１０μｇ／μｌ　ｔＲＮＡ（Gibco-BRL，＃１５４０１－０１１）を加え、容量を９．５μｌの蒸留水で調整する。最終標的核酸調製物については、２．１μｌ　２０×ＳＳＣ（１．５Ｍ　ＮａＣｌ、１５０ｍＭクエン酸Ｎａ（ｐＨ８．０））および０．３５μｌ　１０％ＳＤＳを加える。

【０５１０】
ハイブリダイゼーション
標識核酸は、１００℃で２分間加熱することによって変性させ、３７℃で２０～３０分間インキュベートし、その後２２ｍｍ×２２ｍｍガラスカバースリップの下の核酸アレイ上に配置する。ハイブリダイゼーションは、３×ＳＳＣの小さなリザーバーによって湿度維持された特注のスライドチャンバー中で、６５℃で１４～１８時間実行する。アレイは、２×ＳＳＣおよび０．１％ＳＤＳ、続いて１×ＳＳＣおよび０．１×ＳＳＣを用いて、浸漬および２～５分間の攪拌によって洗浄する。最後に、アレイは、Microplus carriersにおけるBeckman ＧＳ－６卓上遠心分離機中のスライドラック中で、６５０ＲＰＭにて２分間の遠心分離によって乾燥させる。

【０５１１】
（実施例４）
リアルタイムＲＴ　ＰＣＲ
リアルタイムＲＴ　ＰＣＲは、開示されたバイオマーカーのＲＮＡ産物に対して実行することができる。「バイオマーカー特異的プライマー」は、本明細書で使用される場合、本発明のバイオマーカーの１つ以上のＲＮＡ産物の一部に相補的な二本鎖ＤＮＡを生成することができるプライマーのセットをいう。例えば、これらのプライマーは、本発明のバイオマーカーの領域に相補的なＲＮＡ、ｃＤＮＡまたはＥＳＴに選択的にハイブリダイズすることができ、伸長産物を作製する配列である第１のプライマー、および本発明のバイオマーカーの領域に相補的な二本鎖ＤＮＡを生成するために使用される、伸長産物に選択的にハイブリダイズ可能な第２のプライマーを含むことができる。本発明は、本発明のバイオマーカーのＲＮＡ産物の発現を測定するために有用なプライマーを含む。表５および表８は、本発明のプライマーおよびプローブの代表的な種を提供する。

【０５１２】
これには、例えば、QiagenからのSYBR（登録商標）Greenキット（製品番号２０４１４３）を使用する、表３に記されるものが含まれる。

【０５１３】
１段階（逆転写およびＰＣＲを合わせる）または２段階（最初に逆転写、次いで引き続くＰＣＲ）のいずれかを使用することができる。２段階プロトコルの場合において、逆転写は、最初にApplied BiosystemsからのHigh-Capacity cDNA Archiveキット（製品番号４３２２１７１）を使用して実施し、そこで利用されるプロトコルに従った。
【０５１４】
より詳細には、以前に本明細書に記載された精製ＲＮＡを、逆転写酵素緩衝液、ｄＮＴＰ、ランダムプライマー、および逆転写酵素とともにインキュベートし、そして２５℃で１０分間、続いて３７℃で２時間インキュベートし、得られる混合物を定量ＰＣＲのための出発物質として利用した。
【０５１５】
逆転写酵素から得られるｃＤＮＡは、提供されるようなQuantiTect SYBR（登録商標）Green PCR Master Mixとともにインキュベートすることができ、マグネシウム濃度については調整を行わない。ウラシル－Ｎ－グリコシラーゼは任意である。本発明の遺伝子に特異的なフォワードプライマーとリバースプライマーの両方の５μｌを加え、反応をインキュベートし、そしてABI PRISM 7700/ABI GeneAmp 5700/iCycler/DNA Engine Opticonを利用して標準的なプロトコルに従ってモニターする。
【０５１６】
（実施例５）
TAQMAN（登録商標）
定量リアルタイムＲＴ　ＰＣＲは、QiagenからのQuantiTect（商標）Probe ＲＴ－ＰＣＲシステム（製品番号２０４３４３）を、TAQMAN（登録商標）二重標識プローブおよび関連の遺伝子に対応するプライマーとともに使用して実施することができる。TAQMAN（登録商標）プローブおよびプライマーは、Applied Biosystems Assays-On-Demand（商標）に注文することができる。
【０５１７】
二重標識プローブは、蛍光色素分子とクエンチャー分子の両方を含む。クエンチャーとの蛍光レポーターの近接性は、レポーターが蛍光を発することを阻害するが、ＰＣＲ伸長段階の間にＴａｑＤＮＡポリメラーゼの５’－３’エキソヌクレアーゼ活性が蛍光色素分子を遊離し、このことは蛍光色素分子が蛍光を発することを可能にする。このようにして、蛍光の量は生成したＰＣＲ産物の量と相関する。
【０５１８】
（実施例６）
リアルタイムＰＣＲの統計学的解析
正常または軽度の変形性関節症を有すると分類された個体から単離された血液サンプルに対するリアルタイムＰＣＲは、トレーニング集団における本発明のバイオマーカーの豊富さのレベルに対応するデータを得るために公知の方法を使用して統計学的に解析する。
【０５１９】
好ましくは、類似の年齢および体脂肪指数（ＢＭＩ）を有する個体が、さらなる解析のために選択される。年齢およびＢＭＩに基づいて比較を行うことができるサンプルの選択は、当業者によって理解されるように、順位に関するＫＷ一元分散解析を使用して決定する。
【０５２０】
デルタＣＴ値およびMW順位和検定は、約２０～５０サイズの年齢およびＢＭＩが一致したサンプルセットに対して利用することができる。当業者に明らかなように、類似の解析が任意の本発明に同定される配列について実施することができる。
【０５２１】
（実施例７）
図１に記載されるバイオマーカーのＲＮＡ産物を使用する、正常個体からの遺伝子発現プロフィールと比較した、軽度の変形性関節症を有する個体からの血液サンプルの遺伝子発

現プロフィールの解析

本実施例は、健常患者から取られた血液サンプルと比較して、軽度の変形性関節症を有する患者から採取した血液サンプルにおける差動的な遺伝子発現を検出することによって軽度の変形性関節症を診断するための、特許請求された発明の使用を実証する。

【０５２２】

血液サンプルは、本明細書に定義されたような軽度の変形性関節症を有すると臨床的に診断された患者、本明細書に定義されたような変形性関節症を有さないと臨床的に診断された患者から採取する。次いで、本発明のバイオマーカーの組み合わせの遺伝子発現プロフィールを解析し、試験個体プロフィールを２つの対照プロフィールと比較する。

【０５２３】

溶解した全血からの総ｍＲＮＡを、TRIzol（登録商標）試薬（GIBCO）を使用して各患者から最初に単離し、次いで、各血液サンプルについて蛍光標識したプローブを、生成し、変性させ、そして図１に記載されるような１９個の遺伝子の各々について全長ｃＤＮＡ配列を含むマイクロアレイにハイブリダイズさせる。次いで、アレイに対する特異的ハイブリダイゼーションの検出は、ＧＭＳスキャナー４１８を用いるスキャニング、およびScanalyzerソフトウェア（Michael Eisen，スタンフォード大学）を用いる実験データの処理、続いてGeneSpringソフトウェア（Silicon Genetics，カリフォルニア州）解析によって測定する。２つの対照集団および試験個体の間としての、バイオマーカーに対応する血液サンプル中のＲＮＡの差動的な発現は、Wilcox Mann Whitney順位和検定（Glantz SA. 生物統計学の入門(Primer of Biostatistics). 第５版. ニューヨーク，米国：McGraw-Hill Medical Publishing Division，２００２）を使用する統計学的解析によって決定することができる。

【０５２４】

（実施例８）

図１に記載されるバイオマーカーのＲＮＡ産物を使用して非変形性関節症から軽度の変形性関節症を区別する際に有用な分類子および組み合わせを同定するためのロジスティック回帰の適用

ＲＮＡは、Marshallのシステム（前出）および８２例の正常被験体を使用して分類されるような軽度の変形性関節症を有する８２例の患者の血液サンプルから単離する。１６４例の患者の各々について表１から選択された４つのバイオマーカーについてのＲＮＡ産物のレベルに対応するデータを、４つのバイオマーカーの表３に記されるｍＲＮＡ産物を増幅するために設計されたプライマーを使用して収集する。４つのバイオマーカーについてのＱＲＴ－ＰＣＲから生じるΔＣｔ値からなる参照データセットは、これらの４つの候補バイオマーカーからのΔＣｔ値の異なる組み合わせの診断能力を決定するために、ロジスティック回帰への入力のために利用する。$2^4-1$通りの可能なバイオマーカーの組み合わせについて、各組み合わせは最大確率－ロジスティック回帰において評価され、「軽度の変形性関節症」対「対照」の区別能力（ＲＯＣ面積＞０．５）を決定する。

【０５２５】

（実施例９）

ロジスティック回帰を使用する、非変形性関節症から軽度の変形性関節症を区別するバイオマーカーおよび分類子の組み合わせの同定

軽度の変形性関節症を有すると診断された患者および変形性関節症を有さないと診断された患者からのサンプルの初期の解析は、Affymetrix U133Plus 2.0遺伝子チップ（Affymetrix、Santa Clara，カリフォルニア州）上への標識サンプルのハイブリダイゼーションによって各々解析した。手短に述べると、ハイブリダイゼーションシグナルは、各アレイについて全体トリム平均シグナル強度値（the global trimmed mean signal intensity value）を５００に調整することによって決定された倍率を使用して、Affymetrix GCOSソフトウェア（バージョン１．１．１）の中で倍率を変え、そしてGeneSpringバージョン７．２（Silicon Genetics，Redwood City，カリフォルニア州）にインポートする。次いで、シグナル強度を、各チップの５０パーセンタイル値に、そして各個々の遺伝子について

、全体のサンプルセットのメジアン強度に中心を置いた。サンプルの各群の少なくとも８０％でＧＣＯＳソフトウェアによって存在または境界として呼び出された遺伝子のみをさらなる解析のために使用した。差動的に発現された遺伝子は、（ａ）ノンパラメトリックWilcoxon-Mann-Whitneyノンパラメトリック検定（Ｐ＜０．０５）、２）または（ｂ）パラメトリックｔ検定（Ｐ＜０．０５）を含む種々の統計学的検定の１つを使用して同定した。多数のマイクロアレイ実験からの結果を解析し（データ示さず）、以下にさらに記載されるように、遺伝子の選択をさらなるサンプルに対してリアルタイムＲＴ－ＰＣＲ法を使用して引き続いて解析した。

【０５２６】

合計で１００例の個体をリアルタイムＲＴ－ＰＣＲを使用して解析した。軽度の変形性関節症と診断された患者は、トロント大学におけるトロント西病院（the Toronto Western Hospital）、大学保健ネットワーク（University Health Network）（ＵＨＮ）から募集した。ＵＨＮ研究倫理委員会は研究を認可し、参加者は書面によりインフォームドコンセントを提供された。患者は、半月板断裂、前十字靱帯（ＡＣＬ）損傷、および／または膝蓋変形軌道（maltracking）の結果として関節鏡検査を受けながら、外来的に変形性関節症と診断され、等級付けされた。重症度は、Marshall KWにおいて記載される確立された関節鏡検査スコアリング法を用いて等級付けした（関節鏡検査において変形性関節症の重症度を等級付けする単純な方法としての症例（The case for a simple method of grading osteoarthritis severity at arthroscopy）。J Rheumatol １９９６、23:582-5）。手短に述べると、このシステムは、６つの関節表面の各々に対して最悪の病変まで０～４のスコアを割り当てる。等級０は正常（０点）、等級Ｉ軟骨は軟化または浮腫を有するが、関節表面は無傷である（１点）。等級ＩＩ病変において、軟骨表面は無傷ではなく、病変は軟骨の下の骨までは広がっていない（２点）。等級ＩＩＩの損傷は、軟骨の下の骨まで広がるが、骨は浸食または象牙質化のいずれにもなっていない（３点）。等級ＩＶ病変において、骨の浸食または象牙質化が存在する（４点）。すべての表面からのスコアを合計して、全体のスコアを生じ、これは、変形性関節症の重症度を、軽度（初期）：１～６、中程度：７～１２、顕著：１３～１８、および重度：１９～２４に分類するために使用する。

【０５２７】

５１例の個体を軽度の変形性関節症を有すると診断し、膝の症状および過去の膝損傷の履歴を有さない対照被験体からの４９例のサンプルと比較した。

【０５２８】

１０ｍｌの末梢全血を各々個々にＥＤＴＡバキュテイナーチューブ（Vacutainer tube）（Becton Dickinson,Franklin Lakes, ニュージャージー州）に収集し、処理するまで氷上に保存した（６時間以内）。遠心分離に際して、血液サンプルは、血漿、バフィーコート、および赤血球の層に分離した。血漿を除去し、赤血球細胞を溶解するために低張性緩衝液（１．６ｍＭ　ＥＤＴＡ、１０ｍＭ　$KHCO_3$、１５３ｍＭ　$NH_4Cl$、ｐＨ７．４）を３：１容量比で加えた。この混合液を遠心分離して細胞ペレットを生じ、これを、製造者の指示書に従って、１．０ｍｌのTRIzol（登録商標）試薬（Invitrogen Corp.,Carlsbad, カリフォルニア州）および０．２ｍｌのクロロホルムに溶解およびホモジナイズした。遠心分離後、水相にイソプロパノールを１：１の比率で加え、－２０℃で沈殿させた。引き続く遠心分離は、実験的使用のために水に再懸濁したＲＮＡペレットを生じた。ＲＮＡの品質は、Agilent 2100 Bioanalyzer RNA 6000 ナノチップ上で、製造者によって特定されるように評価し、そしてＲＮＡの量は、Beckman-Coulter DU640分光光度計において、２６０ｎｍにおける吸収によって決定した。

【０５２９】

定量リアルタイムＲＴ　ＰＣＲ（ＱＲＴ－ＰＣＲ）は、Qiagen（製品番号２０４１４３）からのSYBR（登録商標）Greenキットを使用して実施した。アンプリコンは、Prism 7500装置（Applied Biosystems）を使用して、リアルタイムで検出した。逆転写は、Applied Biosystems（製品番号４３２２１７１）からのHigh-Capacity cDNA Archiveキットを使

用して最初に実施し、そこで利用されるプロトコルに従った。

【０５３０】

より詳細には、精製したＲＮＡは、本明細書で以前に記載されたように、逆転写酵素緩衝液、ｄＮＴＰ、ランダムプライマーおよび逆転写酵素とともにインキュベートし、そして２５℃で１０分間インキュベートし、続いて３７℃で２時間インキュベートし、そして得られた混合物は定量ＰＣＲのための出発物質として利用した。逆転写から得られるｃＤＮＡは、提供されるようなQuantiTect SYBR（登録商標）Green PCR Master Mixとともにインキュベートし、そしてマグネシウム濃度については調整を行わない。ウラシル－Ｎ－グリコシラーゼは加えなかった。選択された遺伝子に特異的なフォワードプライマーとリバースプライマーの両方の５μｌを加え、反応をインキュベートし、そしてＡＢＩ PRISM 7700／ＡＢＩ GeneAmp 5700/iCycler/DNA Engine Opticonを利用して標準的なプロトコルに従ってモニターした。少なくとも＜０．２のｐ値を示した遺伝子を選択したが、しかし、０．０５未満のｐ値を伴うものを優先的に選択した。本発明者らは、０．０５から０．２のｐ値を示すが、個々のバイオマーカーとしては有意ではない遺伝子が、診断の目的のための遺伝子の組み合わせに有意に寄与可能であることを以前に見出した。軽度の変形性関節症と非変形性関節症とを区別するための＜０．２のｐ値を有していた、３２遺伝子の選抜を同定した。これらの遺伝子を表４に示す。

【０５３１】

表５に記載されるようなプライマーを使用して、表４に同定される遺伝子についてのΔＣｔ値を含む、参照（トレーニング）データセットを構築した。表４に同定されるバイオマーカーのすべての可能な組み合わせを試験し、本明細書に記載されるような技術を用いて、バイオマーカーの各組合わせについての診断用分類子を誘導し、そして引き続いて、さらに記載されるように、最も有用な組み合わせおよび分類子の選択において補助するために点数付けすることができる。試験される選択された組み合わせについて同定された代表的な分類子を以下に説明する。

【０５３２】

ロジスティック回帰を使用して、参照データセットからのΔＣｔに対する、バイナリ変数Ｙ（０＝対照、１＝疾患）の依存性を解析した。Ｐ＝患者が「疾患である」と同定される確率である場合、関数Ｘ＝Ｌｏｇｉｔ（ｐ）は以下のように定義することができる：

$$X=Logit(P)=\ln(P/(1-P))=b_0+b_1\Delta Ct_1+b_2\Delta Ct_2+\ldots+b_n\Delta Ct_n \quad (式1)$$

【０５３３】

Ｘ≧閾値である場合、Ｙ＝１（診断＝「軽度の変形性関節症を有する」）であり、Ｘ＜閾値である場合、Ｙ＝０（診断＝「変形性関節症を有さない」）である。Ｘと実験測定値｛ΔＣｔｉ、ここで、ｉはサンプルを表す｝との間の関係を規定する（経験）係数｛ｂｉ｝は、最大確率（ＭＬ）フィッティング法によって得た。同一｛ｂｉ｝値は、いくつかの市販のソフトウェアプログラム：MedCalc（MedCalc Software, Mariakerke, Belgium）およびＸＬ－Ｓｔａｔ（Addinsoft Software, Paris, フランス）を使用して得た。次いで、ＲＯＣ曲線解析は、組み合わせの区別力を評価するために使用した。分類子は、軽度の変形性関節症を有する５１例の個体および変形性関節症を有さない４９例の個体にわたる、表６におけるプライマーを使用して、表４に同定された遺伝子についての定量リアルタイムＲＴ－ＰＣＲを使用して、表４に同定されたバイオマーカーのすべての２つの遺伝子の比率について誘導した。２つの遺伝子の比率の結果は以下の式の型から生じる：

$$X=Logit(P)=\ln(P/(1-P))=b_0+b_1(\Delta Ct_1-\Delta Ct_2) \quad (式2)$$

【０５３４】

可能な８６１通りの２つの遺伝子の比率のうち、これらの４６５通りが、０．６０よりも大きな曲線下面積（ＡＵＣ）を有し、試験した組み合わせに依存して、感度および特異性を変化した。この解析の結果はグラフにより図１に見ることができる。１９通りの組み合わせは、０．８０超の大きなＡＵＣを有した。０．７未満のＡＵＣがなお価値があり、

有意な臨床的に有用な組み合わせをなお提供することができることに注意のこと。例えば、９５％の特異性および７５％の感度を有する組み合わせは、０．７だけの曲線下面積をなお生じることができる。これらの１９通りの組み合わせについての結果を表Ａにおいて以下に示す。

【表Ａ】

表Ａ

| AUC | 50% 特異性における感度 | 50% 感度における特異性 | ２つの遺伝子の組み合わせ | 定数 B0) | 係数 (B1) |
|---|---|---|---|---|---|
| **0.892** | 96.08 | 93.88 | CPT1A/IL13RA1 | -9.44E-02 | -2.1336 |
| **0.8619** | 96.08 | 93.88 | IL13RA1/ILF1 | 4.1019 | 2.6663 |
| **0.8439** | 94.12 | 87.76 | IL13RA1/KIAA0010 | 0.79656 | 2.2328 |
| **0.8439** | 90.2 | 95.92 | PDK4/PF4 | 10.911 | -1.3515 |
| **0.8371** | 92.16 | 89.8 | B2M/IL13RA1 | -18.274 | -2.5853 |
| **0.8359** | 96.08 | 89.8 | IL13RA1/PDK4 | 8.2667 | 1.2839 |
| **0.8355** | 94.12 | 85.71 | CPT1A/LAMCA | -9.0048 | -1.6535 |
| **0.8355** | 84.31 | 97.96 | IL13RA1/LOC286286 | 10.652 | 1.3885 |
| **0.8295** | 88.24 | 93.88 | HDGF/IL13RA1 | -0.54205 | -1.8387 |
| **0.8255** | 88.24 | 93.88 | IL13RA1/NOV | 3.9782 | 1.4352 |
| **0.8255** | 86.27 | 95.92 | CLIC5/IL13RA1 | 8.2454 | -1.5523 |
| **0.8231** | 90.2 | 91.84 | IL13RA1/PRG1 | -12.426 | 2.188 |
| **0.8143** | 88.24 | 87.76 | CKLFSF7/CPT1A | -9.46E-02 | 1.8735 |
| **0.8123** | 90.2 | 85.71 | ASAHL/IL13RA1 | -1.6458 | -1.412 |
| **0.8115** | 88.24 | 91.84 | LAMCA/PDK4 | 1.398 | 1.303 |
| **0.8087** | 90.2 | 81.63 | ATP1B1/IL13RA1 | 5.3727 | -1.2825 |
| **0.8071** | 90.2 | 81.63 | CPT1A/PF4 | 1.7992 | -1.1558 |
| **0.8015** | 92.16 | 89.8 | PDK4/SERPINE1 | 0.17073 | -1.1786 |
| **0.8007** | 92.16 | 81.63 | IL13RA1/PBEF1 | -8.1824 | 1.5323 |

【０５３５】

ＡＵＣは曲線下面積であり、そして感度は特異性が５０％に設定されている場合に列挙されることに注意のこと。同様に、特異性は感度が５０％に設定されている場合に示される。式２において記される式についての定数（$B_0$）および係数（$B_1$）を示す。

【０５３６】

分類子はまた、軽度の変形性関節症を有する５１例の個体および変形性関節症を有さない４９例の個体にわたる、表５におけるプライマーを使用して、表４に同定された遺伝子についての定量リアルタイムＲＴ－ＰＣＲを使用して、表４に同定されたバイオマーカーの４セットの２つの遺伝子の比率（例えば、８個のバイオマーカーの組み合わせ、各々２つのバイオマーカーの比率）について誘導した。結果は以下の式の型から生じる：

$X = Logit(P) = \ln(P/(1-P)) = b_0 + b_1(\Delta Ct_1 - \Delta Ct_2) +$

$b_2$（$\Delta Ct_3-\Delta Ct_4$）＋$b_3$（$\Delta Ct_5-\Delta Ct_6$）＋$b_4$（$\Delta Ct_7-\Delta Ct_8$）（式３）

【０５３７】

以下の表ＢはＡＵＣ（曲線下面積）を示し、そして感度は特異性が９０％に設定されている場合に列挙されることに注意のこと。同様に、特異性は感度が９０％に設定されている場合に示される。式３において記される式についての定数（$B_0$）および係数$B_1$、係数Ｂ２、係数Ｂ３、係数Ｂ４を示す。

【表Ｂ】

表B

| AUC | 90%感度 | 90%特異性 | Delat Ct1/Ct2 | デルタCt3/Ct4 | デルタCt5/Ct6 | デルタCt7/Ct8 | 定数(B0) | 係数B1 | 係数B2 | 係数B3 | 係数B4 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0.9796 | 98.04 | 95.92 | G2AN/IL1RN | IL13RA1/ILF1 | FLJ11142/NOV | CPTIAPF4 | 10.752 | 2.1522 | 7.1374 | 1.036 | -2.7848 |
| 0.9780 | 92.16 | 91.84 | CPT1A/G2AN | IL13RA1/ILF1 | ASAHL/LAMCA | PBEF1/SERPINE1 | -23.019 | -2.6623 | 6.0707 | -1.7348 | -1.5536 |
| 0.9728 | 94.12 | 91.84 | IL13RA1/ILF1 | CPTIALAMCA | ASAHL/PF4 | ASAHL/WASF2 | -6.6422 | 5.5159 | -2.0784 | -1.4765 | -0.4188 |
| 0.9720 | 90.20 | 95.92 | IL13RA1/ILF1 | FLJ11142/NOV | CPTIAPF4 | B2M/RPS6KA2 | 0.79507 | 5.7281 | 0.7486 | -2.066 | -0.9578 |
| 0.9716 | 92.16 | 93.88 | HDGF/IL13RA1 | GDF15/PDK4 ASGR1/LOC28628 | LRPPRC-B-NS/PF4 | NOV/PF4 | 18.277 | -3.8357 | 2.4527 | -1.4383 | -1.2075 |
| 0.9712 | 90.20 | 91.84 | HDGF/IL13RA1 | 6 | G2AN/PBEF1 | CKLFSF7/PDK4 | 21.745 | -4.3857 | 2.1262 | 1.0588 | 2.5306 |
| 0.9712 | 90.20 | 91.84 | ASGR1/KIAA0010 | CPTIAPF4 | IL13RA1/TNFSF10S | ILF1/TNFSF10S | 5.9169 | 1.6859 | -2.0491 | 5.3561 | -4.4945 |
| 0.9704 | 94.12 | 93.88 | CPT1A/ILF1 | IL13RA1/ILF1 | IL1RN/PF4 | IL13RA1/SETBP1 | -2.7173 | -2.9259 | 7.841 | -1.6725 | -1.6814 |
| 0.9704 | 92.16 | 91.84 | CKLFSF7/CPT1A | HDGF/IL13RA1 | HDGF/IL1RN | LOC286286/SETBP1 | 6.46E-02 | 2.9078 | -3.9019 | 0.8530 5 | -1.6729 |
| 0.9704 | 86.27 | 87.76 | ASGR1/HDGF | ASAHL/LAMCA | BMP6/LOC286286 | IL13RA1/PDK4 | 8.8334 | 2.7625 | -1.8465 | 1.7467 | 2.816 |
| 0.9700 | 96.08 | 93.88 | IL13RA1/ILF1 | CPTIAPF4 | PDK4/RPS6KA2 | CKLF_A_NS/WASF2 | 9.9077 | 5.4365 | -2.0623 | -0.7923 2 | -0.3204 7 |
| 0.9696 | 94.12 | 91.84 | CKLFSF3/CPT1A | IL13RA1/ILF1 | KIAA0010/PF4 | PDK4/SERPINE1 | 10.631 | 2.1326 | 4.5517 | -1.4928 | -0.8657 5 |
| 0.9696 | 88.24 | 89.80 | CKLFSF3/CPT1A | IL13RA1/ILF1 | NOV/PF4 | LAMCA/TNFAIP6 | 10.319 | 1.9704 | 4.5866 | -1.0143 | 0.4485 3 |
| 0.9696 | 88.24 | 87.76 | CKLFSF3CPT1A | DNAPTP6/G2AN | IL13RA1/ILF1 | PF4/PRG1(45) | 4.2496 | 2.2554 | -0.4807 2 | 6.2534 | 2.0314 |
| 0.9682 | 82.35 | 87.76 | ASGR1/CPT1A | FLJ11142/IKBKAP | IL13RA1/ILF1 | B2M/PF4 | -6.3408 | 2.0089 | 0.6732 7 | 5.8672 | -2.1416 |
| 0.9684 | 94.12 | 91.84 | CKLFSF3/HDGF | IL13RA1/KIAA0010 | ATP1B1/PF4 | NOV/RPS6KA2 | 8.8752 | 2.6989 | 3.6492 | -1.6935 | -1.4434 |
| 0.9680 | 92.16 | 91.84 | ASGR1/ATP1B1 | HDGF/IL13RA1 | ASGR1/PDK4 | LOC286286/SERPINE1 | 16.272 | 1.4204 | -4.0948 | 2.2948 | -1.6186 |

| | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0.968 | | 91.8 | | | ASGR1/LOC28628 | | | | | | | |
| 0 | 92.16 | 4 | ATP1B1/CKLF | CPTIAIL13RA1 | 6 | LAMCA/TNFSF10S | 1.2999 | -0.8925 | -3.2649 | 1.5093 | 1.607 | |
| 0.968 | | 83.6 | | | | | | 7 | | | | |
| 0 | 88.24 | 7 | ASGR1/BMPR2 | IL13RA1/KIAA0010 | PDK4/PF4 | ASAHL/SETBP1 | 3.8103 | 2.4261 | 2.965 | -1.9102 | -1.7 | |
| 0.967 | | 93.8 | | | | | | | | | -0.8248 | |
| 2 | 94.12 | 8 | IL13RA1/ILF1 | CPTIALAMCA | CLECSF6/PF4 | ASAHL/WASF2 | -8.0027 | 5.9124 | -1.9042 | -1.3612 | 3 | |
| 0.967 | | 87.7 | IL13RA1/KIAA001 | | | | | | | | | |
| 2 | 88.24 | 6 | 0 | ATP1B1/LAMCA | IKBKAP/NOV | PF4/PRG1 | -4.3813 | 4.7389 | -1.9183 | 1.5604 | 1.1841 | |
| 0.966 | | 89.8 | | | | | | | | 0.7205 | | |
| 8 | 88.24 | 0 | CPT1A/IL1RN | IL13RA1/ILF1 | F2RL1_F/NOV | CPTIAPF4 | 13.105 | 0.3154 | 4.9576 | 6 | -2.564 | |
| 0.966 | | 87.7 | | | | | | | 2.0898 | | | |
| 8 | 86.27 | 6 | CPT1A/IL13RA1 | GDF15/ILF1 | LOC283337/PF4 | SETBP1/TNFSF10S | -5.0587 | -4.103 | 1.33E- | -1.2855 | 1.5378 | |
| 0.966 | | 85.7 | | | | | | | 02 | | | |
| 8 | 88.24 | 1 | CKLFSF3/CPT1A | HSPCA/IKBKAP | IL13RA1/ILF1 | PF4/PRG1(45) | 1.9013 | 1.9932 | | 5.6783 | 1.8445 | |
| 0.966 | | 91.8 | | | | | | | | | | |
| 4 | 90.20 | 4 | ASGR1/CYBRD1 | CPTIAIL13RA1 | CPTIAILF1 | HDGF/SERPINE1 | -4.6434 | 1.2305 | -4.7797 | 2.6575 | -1.2957 | |
| 0.966 | | 85.7 | | | ASGR1/LOC28628 | | | | | | | |
| 0 | 88.24 | 1 | BMPR2/CKLFSF3 | CPTIAIL13RA1 | 6 | KIAA0010/SETBP1 | -0.64252 | -1.1506 | -3.5385 | 1.6628 | -2.1683 | |
| 0.966 | | 83.6 | | | | | | | | -0.2968 | | |
| 0 | 84.31 | 7 | BMPR2/CPT1A | IL13RA1/ILF1 | DNAPTP6/LAMCA | LAMCA/PBEF1 | -18.312 | 2.023 | 5.954 | 8 | 2.2115 | |
| 0.965 | | 91.8 | | CKLFSF3/KIAA001 | | | | | | | | |
| 6 | 90.20 | 4 | ASGR1/FLJ11142 | 0 | IL13RA1/PDK4 | HDGF/PF4 | 24.691 | 1.7387 | 2.2619 | 2.5986 | -2.3179 | |
| 0.965 | | 89.8 | | ASGR1/LOC28628 | | | | | | | | |
| 6 | 88.24 | 0 | HDGF/LAMCA | 6 | CPTIASETBP1 | IL13RA1/SETBP1 | -3.2892 | -1.5424 | 1.4252 | -3.4094 | 2.9185 | |
| 0.965 | | 89.8 | | | IL13RA1/TNFSF10 | | | | | | | |
| 6 | 88.24 | 0 | CPT1A-/PF4 | KIAA0010/SETBP1 | S | ILF1/TNFSF10S | 1.569 | -2.4172 | -1.4707 | 5.458 | -5.1279 | |
| 0.965 | | 87.7 | | | CKLFSF3/KIAA001 | | | | | | | |
| 6 | 84.31 | 6 | HDGF/IL13RA1 | BMPR2/IL1RN | 0 | CPTIALAMCA | -13.969 | -3.8708 | 1.3911 | 2.768 | -1.9937 | |
| 0.965 | | 93.8 | | | | | | | | -0.3180 | | |
| 2 | 94.12 | 8 | CPT1A/IL13RA1 | CKLFSF3/ILF1 | IL1RN/ILF1 | HDGF/PF4 | 7.2972 | -3.1978 | 3.1344 | 9 | -1.7931 | |
| 0.964 | | 89.8 | | | | | | | | | 0.7733 | |
| 8 | 88.24 | 0 | CPT1A/IL13RA1 | G2AN/LOC286286 | LAMCA/PBEF1 | CKLFSF3/PDK4 | 2.4464 | -3.0586 | 1.4994 | 1.2046 | 9 | |
| 0.964 | | 91.8 | | | | | | | | | | |
| 4 | 94.12 | 4 | CPT1A/ILF1 | IL13RA1/ILF1 | BMP6/LOC286286 | CYBRD1/RPS6KA2 | 5.9149 | -2.0276 | 4.4205 | 1.2494 | -1.0971 | |

【０５３８】

（実施例１０）

試験個体における軽度の変形性関節症の存在の有無を決定するための分類子の使用

実施例９に同定されるものなどの分類子は、試験個体を診断するために使用することができる。例えば、表Ａに記される任意の１つの式のバイオマーカーに対応するＲＮＡ種についての値の測定は、試験個体について決定することができる。従って、例えば、２つのバイオマーカーＣＰＴＩＡおよびＩＬ１３ＲＡ１を使用する以下に記される分類子を使用

し、ＣＰＴ１ＡおよびＩＬ１３ＲＡ１に対応するＲＮＡ産物の測定は、定量リアルタイムＰＣＲを使用して決定する。ＣＰＴ１ＡおよびＩＬ１３ＲＡ１に特異的なプライマーは、表５ならびに表８に記されている。Ｃｔは定量リアルタイムＲＴ－ＰＣＲを使用して測定し、Sybr（登録商標）Greenなどの挿入色素（intercolating dye）とともに、説明されるようなプライマーを使用して得ることができ、またはTaqMan（登録商標）プローブとともに使用されてもよい。２つのバイオマーカーについての例示的なTaqMan（登録商標）プローブを表８に記す。

【表Ｃ】

| AUC | 50% 特異性における感度 | 50% 感度における特異性 | ２つの遺伝子の組み合わせ | 定数 B0) | 係数 (B1) |
|---|---|---|---|---|---|
| 0.892 | 96.08 | 93.88 | CPT1A/IL13RA1 | -9.44E-02 | -2.1336 |

| AUC | 50% 特異性における感度 | 50% 感度における特異性 | ２つの遺伝子の組み合わせ | 定数 B0) | 係数 (B1) |
|---|---|---|---|---|---|
| 0.892 | 96.08 | 93.88 | CPT1A/IL13RA1 | -9.44E-02 | -2.1336 |

【０５３９】

生のＣｔ値は、軽度の変形性関節症を有する個体と変形性関節症を有さない個体との間で差動的に発現されていないことが決定されているβ－アクチンなどのハウスキーピング遺伝子を使用して、ΔＣｔに転換する。ＣＰＴ１Ａ（Ｃｔ１）およびＩＬ１３ＲＡ１（Ｃｔ２）についてのΔＣｔ値は、以下に列挙した式の中に置換される：

$X＝Logit（P）＝ln（P／（1－P））＝b_0＋b_1（ΔCt_1－ΔCt_2）$（式２）

$X＝Logit（P）＝ln（P／1－P）＝－9．44×10－2－2．1336（ΔCt_1－ΔCt_2）$

【０５４０】

ここで、Ｘは、個体が軽度の変形性関節症を有する確率を示す。ある実施形態において、軽度の変形性関節症および非変形性関節症を示すために選択されるカットオフは０であり、その結果、０より大きなＸが軽度の変形性関節症を有することを示すのに対して、０未満のＸは個体が変形性関節症を有さないことを示す。ある場合において、カットオフは０であるが、トレーニングセットまたはスコアリング集団に基づいて選択され、その結果、個体の最大の集団が正確に呼び出されることを確実なものとし、または選択された判断基準に基づいて感度もしくは特異性を確実に向上させる。

【０５４１】

（実施例１１）

バイオマーカーの組み合わせのＲＮＡ産物またはタンパク質産物を測定することによる、試験個体における軽度の変形性関節症の存在の有無を決定するために同定された組み合わせの使用

実施例９に同定されるものなどの分類子によって同定されたバイオマーカーの組み合わせはまた、試験個体を診断するために、分類子とは独立して使用することができる。表Ａに記される任意の１つの式のバイオマーカーのＲＮＡ産物またはタンパク質産物についての値の測定は、試験個体について決定することができる。従って、例えば、２つのバイオマーカーＣＰＴＩＡおよびＩＬ１３ＲＡ１を使用する以下に記される分類子を使用し、ＣＰＴ１ＡおよびＩＬ１３ＲＡ１に対応するＲＮＡ産物の測定は、定量リアルタイムＰＣＲを使用して決定する。ＣＰＴ１ＡおよびＩＬ１３ＲＡ１に特異的なプライマーは、表５ならびに表８に記されている。Ｃｔは定量リアルタイムＲＴ－ＰＣＴを使用して測定し、Sybr（登録商標）Greenなどの挿入色素とともに、説明されるようなプライマーを使用して得ることができ、またはTaqMan（登録商標）プローブとともに使用されてもよい。２つのバイオマーカーについての例示的なTaqMan（登録商標）プローブを表８に記す。代替的に

は、ＣＰＴ１ＡおよびＩＬ１３ＲＡ１のタンパク質産物に対応する抗体を利用することができる。表４におけるバイオマーカーに対応する市販されている抗体は表８に見出される。本発明の他のバイオマーカーに対応するさらなる抗体は、本明細書でさらに記載されるように、標準的な分子生物学的技術を用いて作製することができる。軽度の変形性関節症を有する陽性対照個体および変形性関節症を有さない陰性対照個体を含む対照における、ＣＰＴ１ＡおよびＩＬ１３ＲＡ１に対応する産物の量と比較した場合に、試験個体におけるＣＰＴ１ＡおよびＩＬ１３ＲＡ１に対応するタンパク質産物またはＲＮＡ産物の量を比較することによって、分類子を使用することなく、試験個体を診断することができる。次いで、試験個体は、試験個体中の遺伝子発現パターンが、陰性対照個体と比較した場合に、陽性対照個体により類似している場合、軽度の変形性関節症を有すると診断される。

【０５４２】

$X = Logit(P) = In(P/(1-P)) = b_0 + b_1(\Delta Ct_1 - \Delta Ct_2)$（式２）

$X = Logit(P) = In(P/1-P) = -9.44 \times 10-2-2.1336(\Delta Ct_1 - \Delta Ct_2)$

【０５４３】

ここで、Ｘは、個体が軽度の変形性関節症を有する確率を示す。ある実施形態において、軽度の変形性関節症および非変形性関節症を示すために選択されるカットオフは０であり、その結果、０より大きなＸが軽度の変形性関節症を有することを示すのに対して、０未満のＸは個体が変形性関節症を有さないことを示す。ある場合において、カットオフは０であるが、トレーニングセットまたはスコアリング集団に基づいて選択され、その結果、個体の最大の集団が正確に呼び出されることを確実にし、または選択された判断基準に基づいて感度もしくは特異性を確実に向上させる。

【表１】

表 1

| 遺伝子座ID | 遺伝子記号 | デフォルト遺伝子名 |
|---|---|---|
| 196294 | FLJ25059 | 仮想タンパク質 FLJ25059 |
| 53635 | PTOV1 | 前立腺腫瘍過剰発現 遺伝子1 |
| 84937 | ZNRF1 | ジンクおよびリング フィンガータンパク質 1 |
| 152100 | MGC61571 | 仮想タンパク質 MGC61571 |
| 111 | ADCY5 | アデニル酸シクラーゼ 5 |
| 51602 | NOP5/NOP58 | 核小体タンパク質 NOP5/NOP58 |
| 54583 | EGLN1 | egl 9 ホモログ 1 (C. elegans) |
| 1652 | DDT | D-ドーパクロームタウロメラーゼ |
| 10963 | STIP1 | ストレス誘導性 ホスホタンパク質1 (Hsp70/Hsp90-組織化 タンパク質) |
| 64223 | GBL | Gタンパク質βサブユニット様 |
| 10245 | TIMM17B | ミトコンドリア内膜の トランスロカーゼ 17 ホモログB(酵母) |
| 53827 | FXYD5 | イオン輸送制御因子５を含む FXYDドメイン |
| 9524 | GPSN2 | 糖タンパク質，シナプス性２ |
| 56929 | FEM1C | fem-1ホモログc (C.elegans) |

【０５４４】

| | | |
|---|---|---|
| 5433 | POLR2D | ポリメラーゼ(RNA) II (DNA指向性) ポリペプチドD |
| 114609 | TIRAP | アダプタータンパク質を含むtoll-インターロイキン1受容体(TIR)ドメイン |
| 891 | CCNB1 | サイクリンB1 |
| 5216 | PFN1 | プロフィリン1 |
| 51594 | NAG | 神経芽細胞腫増幅タンパク質 |
| 4192 | MDK | ミドカイン (神経突起成長促進因子-2) |
| 10082 | GPC6 | グリピカン6 |
| 54986 | FLJ20574 | 仮想タンパク質 FLJ20574 |
| 23558 | WBP2 | WWドメイン結合タンパク質2 |
| 283588 | LOC283588 | 仮想タンパク質 LOC283588 |
| 9787 | DLG7 | ディスク,ラージホモログ7 (ショウジョウバエ) |
| 150094 | SNF1LK | SNF1-様キナーゼ |
| 25804 | LSM4 | LSM4ホモログ,U6低分子核RNA関連 (S. cerevisiae) |
| 5714 | PSMD8 | プロテアソーム(プロソーム,マクロペイン)26Sサブユニット,非ATPアーゼ,8 |
| 57017 | DKFZP434K046 | 仮想タンパク質 DKFZp434K046 |
| 841 | CASP8 | カスパーゼ8,アポトーシス関連システインプロテアーゼ |
| 25894 | DKFZP434I216 | DKFZP434I21タンパク質 |

【0545】

| | | |
|---|---|---|
| 1376 | CPT2 | カルニチン パルミトイル トランスフェラーゼ II |
| 1196 | CLK2 | CDC-様キナーゼ2 |
| 55920 | TD-60 | RCC1-様 |
| 2244 | FGB | フィブリノゲン, B βポリペプチド |
| 51042 | ZNF593 | ジンクフィンガータンパク質593 |
| 23240 | KIAA0922 | KIAA0922タンパク質 |
| 533 | ATP6V0B | ATPアーゼ, H+輸送, リソソーム性, 21kDa, V0 サブユニット c" |
| 2628 | GATM | グリシンアミノトランス フェラーゼ (L-アルギニン: グリシンアミジノ トランスフェラーゼ) |
| 344978 | LOC344978 | アクチニン, α 4に類似 |
| 2104 | ESRRG | エストロゲン関連受容体γ |
| 55030 | FBXO34 | F-ボックスタンパク質34 |
| 5998 | RGS3 | G-タンパク質シグナル伝達の制御因子 3 |
| 3476 | IGBP1 | 免疫グロブリン (CD79A) 結合タンパク質 1 |
| 10365 | KLF2 | Kruppel-様因子 2 (肺) |
| 29763 | PACSIN3 | ニューロンにおける プロテインキナーゼCおよび カゼインキナーゼの基質3 |
| 3727 | JUND | jun D癌原遺伝子 |
| 10381 | TUBB4 | チューブリン, β, 4 |
| 890 | CCNA2 | サイクリン A2 |
| 10519 | CIB1 | カルシウムおよび インテグリン結合1 (カルミリン) |

【０５４６】

| | | |
|---|---|---|
| 285196 | FLJ25863 | 仮想タンパク質<br>FLJ25863 |
| 378938 | MALAT1 | 転移関連肺腺癌転写物１<br>（非コードＲＮＡ） |
| 359844 | PRDX2P1 | ペルオキシレドキシン２<br>擬似遺伝子１ |
| 23506 | KIAA0240 | KIAA0240 |
| 283658 | LOC283658 | 仮想タンパク質<br>LOC283658 |
| 4594 | MUT | メチルメラノイル<br>コエンザイムＡムターゼ |
| 9204 | ZNF258 | ジンクフィンガータンパク質258 |
| 10000 | AKT3 | v-aktマウス胸腺腫<br>ウイルス癌遺伝子ホモログ３<br>（プロテインキナーゼＢ，γ） |
| 84641 | FLJ14753 | 仮想タンパク質<br>FLJ14753 |
| 51605 | CGI-09 | CGI-09タンパク質 |
| 254013 | MGC50559 | 仮想タンパク質<br>MGC50559 |
| 401459 | FLJ46365 | FLJ46365タンパク質 |
| 158947 | MGC40053 | 仮想タンパク質<br>MGC40053 |
| 9343 | U5-116KD | U5 snRNP-特異的タンパク質，116 kD |
| 1880 | EBI2 | エプスタイン-バーウイルス誘導性遺伝子２<br>（リンパ球特異的Ｇタンパク質共役受容体） |
| 604 | BCL6 | B-細胞 CLL/リンパ腫６<br>(ジンクフィンガータンパク質51) |
| 54583 | EGLN1 | egl 9 ホモログ 1<br>(C. elegans) |

【０５４７】

| | | |
|---|---|---|
| 170687 | NUDT4P1 | ヌディックス(ヌクレオシド二リン酸連結部分X)型モチーフ４ 疑似遺伝子１ |
| 10269 | ZMPSTE24 | 亜鉛メタロプロテイナーゼ(STE24ホモログ，酵母) |
| 54433 | NOLA1 | 核タンパク質ファミリーA，メンバー１(H/ACA核内低分子RNP) |
| 285813 | LOC285813 | 仮想タンパク質LOC285813 |
| 57219 | KIAA1327 | KIAA1327タンパク質 |
| 55827 | PC326 | PC326タンパク質 |
| 22877 | MONDOA | Mlxインターアクター |
| 378938 | MALAT1 | 転移関連肺腺癌転写物１(非コードＲＮＡ) |
| 92822 | ZFP276 | ジンクフィンガータンパク質276ホモログ(マウス) |
| 23408 | SIRT5 | サーチュイン(サイレント接合型情報調節２ホモログ)5 (S. cerevisiae) |
| 8544 | PIR | ピリン(鉄結合核タンパク質) |
| 10806 | SDCCAG8 | 血清学的に定義された結腸癌抗原８ |
| 338755 | OR2AG2 | 嗅覚受容体，ファミリー２，サブファミリーAG，メンバー２ |
| 55352 | HSA272196 | 仮想タンパク質，クローン2746033 |
| 122552 | PPIAP4 | ペプチジルプロリルイソメラーゼA(シクロフィリンA)擬似遺伝子４ |
| 10785 | WDR4 | WD反復ドメイン4 |

【０５４８】

| | | |
|---|---|---|
| 140890 | SFRS12 | スプライシング因子,<br>アルギニン/セリン-リッチ12 |
| 195 | AHNAK | AHNAK核タンパク質<br>(デスモイオキン) |
| 140688 | C20orf112 | 染色体20オープンリーディング<br>フレーム112 |
| 8815 | BANF1 | 自己組み込み因子のバリア１ |
| 378938 | MALAT1 | 転移関連肺腺癌転写物１<br>（非コードＲＮＡ） |
| 160335 | DKFZp762A217 | 仮想タンパク質<br>DKFZp762A217 |
| 10367 | CBARA1 | カルシウム結合アトピー関連<br>自己抗原１ |
| 378938 | MALAT1 | 転移関連肺腺癌転写物１<br>（非コードＲＮＡ） |
| 55500 | EKI1 | エタノールアミンキナーゼ |
| 7453 | WARS | トリプロファニルーｔＲＮＡ<br>シンターゼ |
| 5527 | PPP2R5C | タンパク質ホスファターゼ２,<br>調節サブユニットＢ(B56),<br>γアイソフォーム |
| 6722 | SRF | 血清応答因子<br>(c-fos血清応答エレメント<br>結合転写因子) |
| 29005 | PRO1073 | PRO1073タンパク質 |
| 7786 | MAP3K12 | マイトジェン活性化タンパク質<br>キナーゼキナーゼキナーゼ12 |
| 282991 | BLOC1S2 | リソソーム関連オルガネラ<br>複合体１の生合成,<br>サブユニット２ |
| 4065 | LY75 | リンパ球抗原75 |

【０５４９】

| | | |
|---|---|---|
| 378938 | MALAT1 | 転移関連肺腺癌転写物１（非コードＲＮＡ） |
| 50618 | ITSN2 | インターセクチン２ |
| 170954 | KIAA1949 | KIAA1949 |
| 29005 | PRO1073 | PRO1073タンパク質 |
| 378938 | MALAT1 | 転移関連肺腺癌転写物１（非コードＲＮＡ） |
| 11083 | DATF1 | 死滅関連転写因子１ |
| 25937 | TAZ | PDZ-結合モチーフを有する転写同時アクチベーター(TAZ) |
| 7571 | ZNF23 | ジンクフィンガータンパク質 23 (KOX 16) |
| 23035 | KIAA0931 | KIAA0931タンパク質 |
| 4739 | NEDD9 | 発生的に下方制御される神経前駆細胞発現９ |
| 51780 | JMJD1B | jumonjiドメイン含有1B |
| 3652 | IPP | 脳槽内Ａ粒子促進ポリペプチド |
| 1793 | DOCK1 | 細胞質分裂のデディケーター１ |
| 29005 | PRO1073 | PRO1073タンパク質 |
| 23404 | EXOSC2 | エキソソーム成分２ |
| 170371 | C10orf128 | 染色体10オープンリーディングフレーム128 |
| 246135 | LOC246135 | TBP-関連因子９様擬似遺伝子 |
| 27173 | SLC39A1 | 溶質担持体ファミリー39（亜鉛輸送体），メンバー1 |

【０５５０】

| | | |
|---|---|---|
| 50809 | HP1-BP74 | HP1-BP74 |
| 5869 | RAB5B | RAB5B, メンバーRAS<br>癌遺伝子ファミリー |
| 27236 | ARFIP1 | ADP-リボシル化因子<br>相互作用タンパク質1<br>(arfaptin 1) |
| 51077 | C14orf111 | 染色体14オープンリーディング<br>フレーム111 |
| 399511 | LOC399511 | 転写伸長因子A (SII), 1<br>擬似遺伝子 |
| 10771 | ZMYND11 | ジンクフィンガー, MYND<br>ドメイン含有11 |
| 55250 | STATIP1 | シグナルトランスデューサー<br>および転写のアクチベーター3<br>相互作用タンパク質1 |
| 29005 | PRO1073 | PRO1073タンパク質 |
| 8578 | SCARF1 | スカベンジャー受容体<br>クラスF, メンバー1 |
| 4092 | SMAD7 | SMAD, DPPに対する<br>マザーホモログ7<br>(ショウジョウバエ) |
| 3778 | KCNMA1 | カリウムラージ<br>コンダクタンス カルシウム<br>活性化チャネル,<br>サブファミリーM,<br>αメンバー1 |
| 27125 | AF5Q31 | 5q31由来ALL1融合遺伝子 |
| 5179 | PENK | プロエンケファリン |
| 828 | CAPS | カルシフォシン |
| 26520 | TIMM9 | ミトコンドリア内膜の<br>トランスロカーゼ9<br>ホモログ(酵母) |

【０５５１】

| | | |
|---|---|---|
| 220359 | TIGD3 | ティガー転移性エレメント由来３ |
| 9874 | TLK1 | 「くしゃくしゃ」様キナーゼ１ |
| 57213 | C13orf1 | 染色体13オープンリーディングフレーム1 |
| 7372 | UMPS | ウリジン一リン酸シンターゼ(オロチン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼおよび オロチジン-5'-デカルボキシラーゼ) |
| 65983 | NS3TP2 | HCV NS3-トランス活性化タンパク質２ |
| 128637 | C20orf140 | 染色体20オープンリーディングフレーム140 |
| 5594 | MAPK1 | マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ１ |
| 25923 | DKFZP564J0863 | DKFZP564J0863タンパク質 |
| 7249 | TSC2 | 結節硬化症２ |
| 8621 | CDC2L5 | 細胞分裂周期２-様５(コリンエステラーゼ関連細胞分裂制御因子) |
| 23032 | USP33 | ユビキチン特異的プロテアーゼ33 |
| 80790 | CMIP | c-Maf-誘導タンパク質 |
| 246784 | LOC246784 | C. elegansのホモログsmu-1擬似遺伝子 |
| 2013 | EMP2 | 上皮膜タンパク質２ |
| 113386 | LOC113386 | エンベロープタンパク質に類似 |
| 51692 | CPSF3 | 切断およびポリアデニル化特異的因子３, 73kDa |
| 11238 | CA5B | カルボニックアンヒドラーゼＶＢ，ミトコンドリア |

【０５５２】

| | | |
|---|---|---|
| 23389 | THRAP2 | 甲状腺ホルモン受容体関連タンパク質２ |
| 10747 | MASP2 | マンナン結合レクチンセリンプロテアーゼ２ |
| 84641 | FLJ14753 | 仮想タンパク質FLJ14753 |
| 7024 | TFCP2 | 転写因子CP2 |
| 10489 | MUF1 | MUF1タンパク質 |
| 8543 | LMO4 | LIMドメインのみ４ |
| 9847 | KIAA0528 | KIAA0528遺伝子産物 |
| 267 | AMFR | オートクリン移動性因子受容体 |
| 1387 | CREBBP | CREB結合タンパク質(ルビンシュタイン-テイビ症候群) |
| 3608 | ILF2 | インターロイキンエンハンサー結合因子２, 45kDa |
| 3328 | HSPCP2 | 熱ショック90kDaタンパク質１，β擬似遺伝子２ |
| 25852 | HSPC056 | HSPC056タンパク質 |
| 10046 | CXorf6 | 染色体Xオープンリーディングフレーム６ |
| 317786 | C14orf62 | 染色体14オープンリーディングフレーム62 |
| 200765 | TIGD1 | ティガー転移性エレメント由来１ |
| 10569 | SLU7 | ステップIIスプライシング因子SLU7 |
| 83 | ACTGP10 | アクチン，γ擬似遺伝子10 |
| 57489 | KIAA1229 | KIAA1229タンパク質 |

【０５５３】

| | | |
|---|---|---|
| 29005 | PRO1073 | PRO1073タンパク質 |
| 10124 | ARL4A | ADP-リボシル化因子様4A |
| 10124 | ARL4A | ADP-リボシル化因子様4A |
| 83478 | ARHGAP24 | Rho GTPアーゼ活性化タンパク質24 |
| 167153 | PAPD4 | PAP関連ドメイン含有４ |
| 51710 | ZNF44 | ジンクフィンガータンパク質44 (KOX 7) |
| 84864 | MINA | MYC誘導核抗原 |

【表２】
表 2

| 代替的な遺伝子記号 | HGNC_記号 | 遺伝子座リンクID |
|---|---|---|
| ABCA1 | ABCA1 | 19 |
| ABCG1 | ABCG1 | 9619 |
| ACP1 | ACP1 | 52 |
| ADPRT | ADPRT | 142 |
| ANGPTL2 | ANGPTL2 | 23452 |
| B2M | B2M | 567 |
| BCL6 | BCL6 | 604 |
| BMPR2 | BMPR2 | 659 |
| C19orf13 | C19orf13 | 26065 |
| C1QR1 | C1QR1 | 22918 |

【０５５４】

| 代替的な遺伝子記号 | HGNC_記号 | 遺伝子座リンクID |
|---|---|---|
| CCNC | CCNC | 892 |
| CLECSF6 | CLECSF6 | 50856 |
| CLIC4 | CLIC4 | 25932 |
| CLN3 | CLN3 | 1201 |
| DNAPTP6 | DNAPTP6 | 26010 |
| EBNA1BP2 | EBNA1BP2 | 10969 |
| EGR1 | EGR1 | 1958 |
| F2RL1 | F2RL1 | 2150 |
| FLJ11000 | FLJ11000 | 55281 |
| FLJ11142 | FLJ11142 | 55779 |
| FLJ13612 | EFHD1 | 80303 |
| FLJ32234 | C6orf151 | 154007 |
| G2AN | GANAB | 23193 |
| HSPCA | HSPCAL3 | 3320 |
| HSPCB | HSPCB | 3326 |
| IKBKAP | IKBKAP | 8518 |
| IL13RA1 | IL13RA1 | 3597 |
| ILF1 | FOXK2 | 3607 |
| IRF1 | IRF1 | 3659 |
| LAMC1 | LAMC1 | 3915 |
| LCMT2 | LCMT2 | 9836 |
| MAFB | MAFB | 9935 |
| NCOA1 | NCOA1 | 8648 |

【０５５５】

| 代替的な遺伝子記号 | HGNC_記号 | 遺伝子座リンクID |
|---|---|---|
| NXN | NXN | 64359 |
| PAIP2 | PAIP2 | 51247 |
| PDCD5 | PDCD5 | 9141 |
| PDK4 | PDK4 | 5166 |
| PER1 | PER1 | 5187 |
| PF4 | PF4V1 | 5196 |
| PF4 | PF4 | 5197 |
| PMSCL2 | EXOSC10 | 5394 |
| PPIF | PPIF | 10105 |
| SETBP1 | SETBP1 | 26040 |
| SFRS6 | SFRS6 | 6431 |
| SLC5A6 | SLC5A6 | 8884 |
| TNFAIP6 | TNFAIP6 | 7130 |
| TSPAN2 | TSPAN-2 | 64521 |
| WDR9 | C21orf107 | 54014 |
| YES1 | YES1 | 7525 |
| ZFR | ZFR | 51663 |
| ZNF397 | ZNF397 | 84307 |
| WWP2 | WWP2 | 11060 |

【表３】

表 3

| 遺伝子記号 | 遺伝子座リンクＩＤ | 受入 | RefSeq受入 | タンパク質受入 | 遺伝子名 |
|---|---|---|---|---|---|
| ACTGP10 | 83 | AL139396 | NG_003039 | | |
| ADCY5 | 111 | AF497517 | NM_183357 | NP_899200 | Homo sapiens アデニル酸シクラーゼ5 (ADCY5), mRNA |
| ADCY5 | 111 | AF497517 | XM_351567 | XP_351568 | |
| AF5Q31 | 27125 | NM_014423 | NM_014423 | NP_055238 | Homo sapiens ALL1融合タンパク質,5q31由来 (AF5Q31), mRNA |
| AHNAK | 195 | M80902 | | | |
| AKT3 | 10000 | AK055109 | NM_005465 | NP_005456 | Homo sapiens v-akt マウス胸腺腫ウイルス癌遺伝子ホモログ3 (プロテインキナーゼB, γ) (AKT3), 転写変異体 1, mRNA |
| AKT3 | 10000 | AK055109 | NM_181690 | NP_859029 | Homo sapiens v-akt マウス胸腺腫ウイルス癌遺伝子ホモログ3 (プロテインキナーゼB, γ) (AKT3), 転写変異体 2, mRNA |
| AMFR | 267 | NM_001144 | NM_001144 | NP_001135 | Homo sapiens オートクリン移動性因子受容体 (AMFR), 転写変異体1, mRNA |
| AMFR | 267 | NM_001144 | NM_138958 | NP_620408 | Homo sapiens オートクリン移動性因子受容体 (AMFR), 転写変異体2, mRNA |

【０５５６】

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| ARFIP1 | 27236 | AK096509 | NM_014447 | NP_055262 | Homo sapiens ADP-リボシル化因子相互作用タンパク質１（アーファプチン１）(ARFIP1), mRNA |
| ARHGAP24 | 83478 | NM_031305 | NM_031305 | NP_112595 | Homo sapiens Rho GTP 活性化タンパク質24 (ARHGAP24), mRNA |
| ARL4A | 10124 | NM_005738 | NM_005738 | NP_005729 | Homo sapiens ADP-リボシル化因子様4A (ARL4A), 転写変異体1, mRNA |
| ARL4A | 10124 | NM_005738 | NM_212460 | NP_997625 | Homo sapiens ADP-リボシル化因子様4A (ARL4A), 転写変異体2, mRNA |
| ATP6V0B | 533 | NM_004047 | NM_004047 | NP_004038 | Homo sapiens ATPアーゼ, H+輸送, リソソーム21kDa, V0サブユニットc" (ATP6V0B), mRNA |
| BANF1 | 8815 | NM_003860 | NM_003860 | NP_003851 | Homo sapiens 自己組み込み因子へのバリア１ (BANF1), mRNA |
| BCL6 | 604 | NM_138931 | NM_001706 | NP_001697 | Homo sapiens B-細胞CLL/リンパ腫６ (ジンクフィンガータンパク質51) (BCL6), 転写変異体１, mRNA |

【０５５７】

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| BCL6 | 604 | NM_138931 | NM_138931 | NP_620309 | Homo sapiens B-細胞 CLL/リンパ腫6 (ジンクフィンガータンパク質51) (BCL6), 転写変異体2, mRNA |
| BLOC1S2 | 282991 | AK054697 | NM_001001342 | NP_001001342 | Homo sapiens リソソーム関連オルガネラ複合体の生合成-1, サブユニット2 (BLOC1S2), 転写変異体 2, mRNA |
| BLOC1S2 | 282991 | AK054697 | NM_173809 | NP_776170 | Homo sapiens リソソーム関連オルガネラ複合体の生合成-1, サブユニット2 (BLOC1S2), 転写変異体 1, mRNA |
| C10orf128 | 170371 | BC031641 | XM_498485 | XP_498485 | 予測：Homo sapiens 染色体13オープンリーディングフレーム128 (C10orf128), mRNA |
| C13orf1 | 57213 | NM_020456 | NM_020456 | NP_065189 | Homo sapiens 染色体13オープンリーディングフレーム1 (C13orf1), mRNA |
| C14orf111 | 51077 | NM_015962 | NM_015962 | NP_057046 | Homo sapiens 染色体14オープンリーディングフレーム111 (C14orf111), mRNA |

【０５５８】

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| C14orf62 | 317786 | AL133467 | NR_001459 | | Homo sapiens 染色体14オープンリーディングフレーム62 (C14orf62) 染色体14上 |
| C20orf112 | 140688 | AL122043 | NM_080616 | NP_542183 | Homo sapiens 染色体20オープンリーディングフレーム112 (C20orf112), mRNA |
| C20orf140 | 128637 | AK095110 | NM_144628 | NP_653229 | Homo sapiens TBC1ドメインファミリー、メンバー20 (TBC1D20), mRNA |
| CA5B | 11238 | AK057568 | NM_007220 | NP_009151 | Homo sapiens カルボニックアンヒドラーゼVB, ミトコンドリア (CA5B), ミトコンドリアタンパク質をコードする核遺伝子, mRNA |
| CAPS | 828 | NM_004058 | NM_004058 | NP_004049 | Homo sapiens カルシホシン (CAPS),転写変異体1, mRNA |
| CAPS | 828 | NM_004058 | NM_080590 | NP_542157 | Homo sapiens カルシホシン (CAPS),転写変異体2, mRNA |
| CASP8 | 841 | NM_033357 | NM_001228 | NP_001219 | Homo sapiens カスパーゼ8, アポトーシス関連システインプロテアーゼ (CASP8), 転写変異体A, mRNA |
| CASP8 | 841 | NM_033357 | NM_033355 | NP_203519 | Homo sapiens カスパーゼ8, アポトーシス関連システインプロテアーゼ (CASP8), 転写変異体B, mRNA |

【０５５９】

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| CASP8 | 841 | NM_033357 | NM_033356 | NP_203520 | Homo sapiens カスパーゼ８, アポトーシス関連 システインプロテ アーゼ (CASP8), 転写変異体C, mRNA |
| CASP8 | 841 | NM_033357 | NM_033357 | NP_203521 | Homo sapiens カスパーゼ８, アポトーシス関連 システインプロテ アーゼ (CASP8), 転写変異体D, mRNA |
| CASP8 | 841 | NM_033357 | NM_033358 | NP_203522 | Homo sapiens カスパーゼ８, アポトーシス関連 システインプロテ アーゼ (CASP8), 転写変異体E, mRNA |
| CBARA1 | 10367 | NM_006077 | NM_006077 | NP_006068 | Homo sapiens カルシウム結合 アトピー関連 自己抗原１ (CBARA1), mRNA |
| CCNA2 | 890 | AF518006 | NM_001237 | NP_001228 | Homo sapiens サイクリンA2 (CCNA2), mRNA |
| CCNB1 | 891 | NM_031966 | NM_031966 | NP_114172 | Homo sapiens サイクリンB1 (CCNB1), mRNA |
| CDC2L5 | 8621 | NM_003718 | NM_003718 | NP_003709 | Homo sapiens cell 細胞分裂周期２－ 様５ コリンエステラーゼ 関連細胞分裂 制御因子 (CDC2L5), 転写変異体１, mRNA |

【０５６０】

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| CDC2L5 | 8621 | NM_003718 | NM_031267 | NP_112557 | Homo sapiens cell 細胞分裂周期２－様５ コリンエステラーゼ関連細胞分裂制御因子 (CDC2L5), 転写変異体２, mRNA |
| CGI-09 | 51605 | NM_015939 | NM_015939 | NP_057023 | Homo sapiens CGI-09タンパク質 (CGI-09), mRNA |
| CIB1 | 10519 | AB021866 | NM_006384 | NP_006375 | Homo sapiens カルシウムおよびインテグリン結合１(カルミリン)(CIB1), mRNA |
| CLK2 | 1196 | NM_003993 | NM_001291 | NP_001282 | Homo sapiens CDC-様キナーゼ2 (CLK2), 転写変異体2, mRNA |
| CLK2 | 1196 | NM_003993 | NM_003993 | NP_003984 | Homo sapiens CDC-様キナーゼ2 (CLK2), 転写変異体1, mRNA |
| CMIP | 80790 | AB051481 | NM_030629 | NP_085132 | Homo sapiens c-Maf-誘導タンパク質(CMIP), 転写変異体 Tc-mip, mRNA |
| CMIP | 80790 | AB051481 | NM_198390 | NP_938204 | Homo sapiens c-Maf-誘導タンパク質(CMIP), 転写変異体 C-mip, mRNA |
| CPSF3 | 51692 | NM_016207 | NM_016207 | NP_057291 | Homo sapiens 切断およびポリアデニル化特異的因子, 73kDa (CPSF3), mRNA |

【０５６１】

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| CPT2 | 1376 | NM_000098 | NM_000098 | NP_000089 | Homo sapiens カルニチン パルミトイル トランスフェラーゼ II (CPT2), ミトコンドリア タンパク質をコードする核遺伝子, mRNA |
| CREBBP | 1387 | NM_004380 | NM_004380 | NP_004371 | Homo sapiens CREB結合 タンパク質 (ルビンシュタイン-テイビ症候群) (CREBBP), mRNA |
| CXorf6 | 10046 | NM_005491 | NM_005491 | NP_005482 | Homo sapiens 染色体Xオープン リーディング フレーム6 (CXorf6), mRNA |
| DATF1 | 11083 | NM_022105 | NM_022105 | NP_071388 | Homo sapiens 死滅関連転写因子1 (DATF1), 転写変異体1, mRNA |
| DATF1 | 11083 | NM_022105 | NM_080796 | NP_542986 | Homo sapiens 死滅関連転写因子1 (DATF1), 転写変異体2, mRNA |
| DATF1 | 11083 | NM_022105 | NM_080797 | NP_542987 | Homo sapiens 死滅関連転写因子1 (DATF1), 転写変異体3, mRNA |
| DDT | 1652 | AF058293 | NM_001355 | NP_001346 | Homo sapiens D-ドパクロム トートメラーゼ (DDT), mRNA |

【０５６２】

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| DKFZP434I216 | 25894 | AK024475 | NM_015432 | NP_056247 | Homo sapiens DKFZP434I216 タンパク質 (DKFZP434I216), mRNA |
| DKFZP434I216 | 25894 | AK024475 | XM_290684 | XP_290684 | |
| DKFZP434K046 | 57017 | BC029341 | NM_020312 | NP_064708 | Homo sapiens 仮想タンパク質 DKFZp434K046 (DKFZP434K046), mRNA |
| DKFZP434K046 | 57017 | BC029341 | XM_166276 | XP_166276 | |
| DKFZP564J0863 | 25923 | AK090822 | NM_015459 | NP_056274 | Homo sapiens DKFZP564J0863 タンパク質 (DKFZP564J0863), mRNA |
| DKFZP564J0863 | 25923 | AK090822 | NM_175893 | NP_787089 | |
| DKFZp762A217 | 160335 | NM_152588 | NM_152588 | NP_689801 | Homo sapiens 仮想タンパク質 DKFZp762A217 (DKFZp762A217), mRNA |
| DLG7 | 9787 | NM_014750 | NM_014750 | NP_055565 | Homo sapiens ディスク, ラージ ホモログ 7 (ショウジョウバエ) (DLG7), mRNA |
| DOCK1 | 1793 | NM_001380 | NM_001380 | NP_001371 | Homo sapiens デディケーター1 (DOCK1), mRNA |
| EBI2 | 1880 | NM_004951 | NM_004951 | NP_004942 | Homo sapiens エプスタイン-バー ウイルス誘導性 遺伝子２（リンパ球 特異的Ｇタンパク 質共役受容体） (EBI2), mRNA |

【０５６３】

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| EGLN1 | 54583 | AJ310543 | NM_022051 | NP_071334 | Homo sapiens egl 9 ホモログ 1 (C. elegans) (EGLN1), mRNA |
| EGLN1 | 54583 | AF246631 | NM_022051 | NP_071334 | Homo sapiens egl 9 ホモログ 1 (C. elegans) (EGLN1), mRNA |
| EKI1 | 55500 | NM_018638 | NM_018638 | NP_061108 | Homo sapiens エタノールアミンキナーゼ 1 (ETNK1), mRNA |
| EMP2 | 2013 | NM_001424 | NM_001424 | NP_001415 | Homo sapiens 上皮膜タンパク質 2 (EMP2), mRNA |
| ESRRG | 2104 | NM_001438 | NM_001438 | NP_001429 | Homo sapiens エストロゲン関連受容体γ (ESRRG), 転写変異体 1, mRNA |
| ESRRG | 2104 | NM_001438 | NM_206594 | NP_996317 | Homo sapiens エストロゲン関連受容体γ (ESRRG), 転写変異体2, mRNA |
| ESRRG | 2104 | NM_001438 | NM_206595 | NP_996318 | Homo sapiens エストロゲン関連受容体γ (ESRRG), 転写変異体3, mRNA |
| EXOSC2 | 23404 | NM_014285 | NM_014285 | NP_055100 | Homo sapiens エキソソーム成分 2 (EXOSC2), mRNA |
| FBXO34 | 55030 | NM_017943 | NM_017943 | NP_060413 | Homo sapiens F-ボックスタンパク質34 (FBXO34), mRNA |

【０５６４】

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| FEM1C | 56929 | BC028369 | NM_020177 | NP_064562 | Homo sapiens fem-1ホモログc (C.elegans) (FEM1C), mRNA |
| FGB | 2244 | NM_005141 | NM_005141 | NP_005132 | Homo sapiens フィブリノゲン, B βポリペプチド (FGB), mRNA |
| FLJ10094 | 55068 | NM_017993 | NM_017993 | NP_060463 | Homo sapiens 仮想タンパク質 FLJ10094 (FLJ10094), mRNA |
| FLJ14753 | 84641 | NM_032558 | NM_032558 | NP_115947 | Homo sapiens 仮想タンパク質 FLJ14753 (FLJ14753), mRNA |
| FLJ14753 | 84641 | NM_032558 | NM_032558 | NP_115947 | Homo sapiens 仮想タンパク質 FLJ14753 (FLJ14753), mRNA |
| FLJ20574 | 54986 | NM_017886 | | | |
| FLJ25059 | 196294 | NM_144981 | NM_144981 | NP_659418 | Homo sapiens 仮想タンパク質 FLJ25059 (FLJ25059), mRNA |
| FLJ25863 | 285196 | BC043583 | | | |
| FLJ46365 | 401459 | AK128232 | NM_207504 | NP_997387 | Homo sapiens FLJ46365タンパク質 (FLJ46365), mRNA |
| FXYD5 | 53827 | NM_014164 | NM_014164 | NP_054883 | Homo sapiens FXYD ドメイン含有イオン輸送調節因子５ (FXYD5), 転写変異体2, mRNA |

【０５６５】

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| FXYD5 | 53827 | NM_014164 | NM_144779 | NP_659003 | Homo sapiens FXYD ドメイン含有イオン輸送調節因子５ (FXYD5), 転写変異体1, mRNA |
| GATM | 2628 | NM_001482 | NM_001482 | NP_001473 | Homo sapiens グリシンアミジノトランスフェラーゼ (L-アルギニン:グリシンアミジノトランスフェラーゼ) (GATM), mRNA |
| GBL | 64223 | NM_022372 | NM_022372 | NP_071767 | Homo sapiens Gタンパク質βサブユニット様 (GBL), mRNA |
| GPC6 | 10082 | NM_005708 | NM_005708 | NP_005699 | Homo sapiens グリピカン６ (GPC6), mRNA |
| GPSN2 | 9524 | NM_138501 | NM_004868 | NP_004859 | Homo sapiens 糖タンパク質シナプス性２ (GPSN2), mRNA |
| GPSN2 | 9524 | NM_138501 | NM_138501 | NP_612510 | Homo sapiens 糖タンパク質シナプス性２ (GPSN2), mRNA |
| HP1-BP74 | 50809 | AK023129 | NM_016287 | NP_057371 | Homo sapiens HP1-BP74 (HP1-BP74), mRNA |
| HSA272196 | 55352 | AJ272196 | NM_018405 | NP_060875 | Homo sapiens 仮想タンパク質, クローン 2746033 (HSA272196), mRNA |
| HSPC056 | 25852 | NM_015396 | NM_014154 | NP_054873 | Homo sapiens アルマジロリピート含有８ (ARMC8), mRNA |

【０５６６】

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| HSPC056 | 25852 | NM_015396 | NM_015396 | NP_056211 | Homo sapiens アルマジロ リピート含有８ (ARMC8), mRNA |
| HSPC056 | 25852 | NM_015396 | NM_213654 | NP_998819 | Homo sapiens アルマジロ リピート含有８ (ARMC8), mRNA |
| HSPCP2 | 3328 | AC091046 | | | |
| IGBP1 | 3476 | BT006736 | NM_001551 | NP_001542 | Homo sapiens 免疫グロブリン (CD79A) 結合タンパク質１ (IGBP1), mRNA |
| ILF2 | 3608 | NM_004515 | NM_004515 | NP_004506 | Homo sapiens インターロイキン エンハンサー結合 因子２, 45kDa (ILF2), mRNA |
| IPP | 3652 | NM_005897 | NM_005897 | NP_005888 | Homo sapiens 嚢内Ａ粒子− 促進ポリペプチド (IPP), mRNA |
| ITSN2 | 50618 | NM_006277 | NM_006277 | NP_006268 | Homo sapiens インターセクチン2 (ITSN2),転写変異 体１, mRNA |
| ITSN2 | 50618 | NM_006277 | NM_019595 | NP_062541 | Homo sapiens インターセクチン2 (ITSN2), 体３, mRNA |
| ITSN2 | 50618 | NM_006277 | NM_147152 | NP_671494 | Homo sapiens インターセクチン2 (ITSN2),転写変異 体２, mRNA |
| JMJD1B | 51780 | NM_016604 | NM_016604 | NP_057688 | Homo sapiens jumonjiドメイン 含有１Ｂ (JMJD1B), mRNA |

【０５６７】

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| JUND | 3727 | NM_005354 | NM_005354 | NP_005345 | Homo sapiens jun D癌原遺伝子 (JUND), mRNA |
| KCNMA1 | 3778 | NM_002247 | NM_002247 | NP_002238 | Homo sapiens カリウムラージコンダクタンスカルシウム活性化チャネル, サブファミリーM, αメンバー1 (KCNMA1), mRNA |
| KIAA0240 | 23506 | AL833540 | NM_015349 | NP_056164 | Homo sapiens KIAA0240 (KIAA0240), mRNA |
| KIAA0240 | 23506 | AL833540 | XM_166479 | XP_166479 | |
| KIAA0528 | 9847 | AB011100 | NM_014802 | NP_055617 | Homo sapiens KIAA0528遺伝子産物 (KIAA0528), mRNA |
| KIAA0922 | 23240 | NM_015196 | NM_015196 | NP_056011 | Homo sapiens KIAA0922タンパク質 (KIAA0922), mRNA |
| KIAA0931 | 23035 | AB023148 | NM_015020 | NP_055835 | Homo sapiens KIAA0931タンパク質 (KIAA0931), mRNA |
| KIAA0931 | 23035 | AB023148 | XM_041191 | XP_041191 | |
| KIAA1229 | 57489 | AB033055 | NM_001007022 | NP_001007023 | Homo sapiens KIAA1229タンパク質 (KIAA1229), 転写変異体2, mRNA |
| KIAA1229 | 57489 | AB033055 | NM_020729 | NP_065780 | Homo sapiens KIAA1229タンパク質 (KIAA1229), 転写変異体1, mRNA |

【０５６８】

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| KIAA1229 | 57489 | AB033055 | XM_030665 | XP_030665 | |
| KIAA1327 | 57219 | AB037748 | | | |
| KIAA1596 | 57697 | AL833656 | XM_048128 | XP_048128 | 予測：<br>Homo sapiens KIAA1596 (KIAA1596), mRNA |
| KIAA1949 | 170954 | AB075829 | | | |
| KLF2 | 10365 | NM_016270 | NM_016270 | NP_057354 | Homo sapiens Kruppel-様因子 2 (肺) (KLF2), mRNA |
| LMO4 | 8543 | NM_006769 | NM_006769 | NP_006760 | Homo sapiens LIMドメインのみ 4 (LMO4), mRNA |
| LOC113386 | 113386 | NM_138781 | NM_138781 | NP_620136 | Homo sapiens エンベロープ タンパク質に類似 (LOC113386), mRNA |
| LOC246135 | 246135 | AC092798 | NG_001574 | | |
| LOC246784 | 246784 | AL157713 | NG_001588 | | |
| LOC283588 | 283588 | AK095276 | | | |
| LOC283658 | 283658 | AL833463 | | | |
| LOC285813 | 285813 | AK094269 | | | |
| LOC344978 | 344978 | XM_293669 | | | |
| LOC399511 | 399511 | AC097359 | NG_003186 | | |

【０５６９】

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| LSM4 | 25804 | NM_012321 | NM_012321 | NP_036453 | Homo sapiens LSM4ホモログ, U6核内低分子RNA関連 (S. cerevisiae) (LSM4), mRNA |
| LY75 | 4065 | NM_002349 | NM_002349 | NP_002340 | Homo sapiens リンパ球抗原75 (LY75), mRNA |
| MALAT1 | 378938 | AF001540 | | | |
| MALAT1 | 378938 | AF203815 | | | |
| MALAT1 | 378938 | AF203815 | | | |
| MALAT1 | 378938 | AF203815 | | | |
| MALAT1 | 378938 | AF203815 | | | |
| MALAT1 | 378938 | AF203815 | | | |
| MALAT1 | 378938 | AF203815 | | | |
| MAP3K12 | 7786 | NM_006301 | NM_006301 | NP_006292 | Homo sapiens マイトジェン活性化タンパク質キナーゼキナーゼキナーゼ12 (MAP3K12), mRNA |
| MAPK1 | 5594 | NM_002745 | NM_002745 | NP_002736 | Homo sapiens マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ1 (MAPK1), 転写変異体1, mRNA |
| MAPK1 | 5594 | NM_002745 | NM_138957 | NP_620407 | Homo sapiens マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ1 (MAPK1), 転写変異体2, mRNA |
| MASP2 | 10747 | NM_006610 | NM_006610 | NP_006601 | Homo sapiens マンナン-結合レクチンセリンプロテアーゼ2 (MASP2), 転写変異体1, mRNA |

【０５７０】

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| MASP2 | 10747 | NM_006610 | NM_139208 | NP_631947 | Homo sapiens マンナン-結合レクチンセリンプロテアーゼ２(MASP2), 転写変異体２, mRNA |
| MDK | 4192 | NM_002391 | NM_002391 | NP_002382 | Homo sapiens ミドカイン(神経突起成長促進因子２)(MDK), mRNA |
| MGC40053 | 158947 | NM_152583 | NM_152583 | NP_689796 | Homo sapiens アルマジロリピート含有, X-連鎖４(ARMCX4), mRNA |
| MGC50559 | 254013 | BC039417 | NM_173802 | NP_776163 | Homo sapiens 仮想タンパク質MGC50559(MGC50559), mRNA |
| MGC61571 | 152100 | BX648671 | NM_182523 | NP_872329 | Homo sapiens 仮想タンパク質MGC61571(MGC61571), mRNA |
| MINA | 84864 | NM_032778 | NM_032778 | NP_116167 | Homo sapiens MYC 誘導性核抗原(MINA), 転写変異体2, mRNA |
| MINA | 84864 | NM_032778 | NM_153182 | NP_694822 | Homo sapiens MYC 誘導性核抗原(MINA), 転写変異体3, mRNA |

【０５７１】

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| MONDOA | 22877 | NM_014938 | NM_014938 | NP_055753 | Homo sapiens Mlx インターアクター (MONDOA), mRNA |
| MUF1 | 10489 | NM_006369 | NM_006369 | NP_006360 | Homo sapiens MUF1タンパク質 (MUF1), mRNA |
| MUT | 4594 | NM_000255 | NM_000255 | NP_000246 | Homo sapiens メチルマロニル コエンザイムA ムターゼ (MUT), 核遺伝子をコードするミトコンドリアタンパク質, mRNA |
| NAG | 51594 | NM_015909 | NM_015909 | NP_056993 | Homo sapiens 神経芽細胞腫増幅タンパク質 (NAG), mRNA |
| NEDD9 | 4739 | NM_006403 | NM_006403 | NP_006394 | Homo sapiens 発生的に下方制御される神経前駆細胞発現 9 (NEDD9), mRNA |
| NEDD9 | 4739 | NM_006403 | NM_182966 | NP_892011 | Homo sapiens 発生的に下方制御される神経前駆細胞発現 9 (NEDD9), mRNA |
| NOLA1 | 54433 | NM_018983 | NM_018983 | NP_061856 | Homo sapiens 核小体タンパク質ファミリーA, メンバー1, (H/ACA核内低分子RNP) (NOLA1), 転写変異体1, mRNA |
| NOLA1 | 54433 | NM_018983 | NM_032993 | NP_127460 | Homo sapiens 核小体タンパク質ファミリーA, メンバー1, (H/ACA核内低分子RNP) (NOLA1), 転写変異体2, mRNA |

【０５７２】

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| NOP5/NOP58 | 51602 | NM_015934 | NM_015934 | NP_057018 | Homo sapiens 核小体タンパク質 NOP5/NOP58 (NOP5/NOP58), mRNA |
| NS3TP2 | 65983 | NM_023927 | NM_023927 | NP_076416 | Homo sapiens HCV NS3-トランス活性化タンパク質２ (NS3TP2), mRNA |
| NUDT4P1 | 170687 | AL359758 | | | |
| OR2AG2 | 338755 | AC091564 | NM_001004490 | NP_001004490 | Homo sapiens 嗅覚受容体, ファミリー２, サブファミリーＡＧ, メンバー２ (OR2AG2), mRNA |
| OR2AG2 | 338755 | AC091564 | XM_291980 | XP_291980 | |
| PACSIN3 | 29763 | NM_016223 | NM_016223 | NP_057307 | Homo sapiens ニューロンにおけるプロテインキナーゼCおよびカゼインキナーゼ基質３ (PACSIN3), mRNA |
| PAPD4 | 167153 | BC047581 | NM_173797 | NP_776158 | Homo sapiens PAP関連ドメイン含有 (PAPD4), mRNA |
| PC326 | 55827 | NM_018442 | NM_018442 | NP_060912 | Homo sapiens IQモチーフおよびWD反復１ (IQWD1), mRNA |
| PENK | 5179 | J00123 | NM_006211 | NP_006202 | Homo sapiens プロエンケファリン (PENK), mRNA |

【０５７３】

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| PFN1 | 5216 | NM_005022 | NM_005022 | NP_005013 | Homo sapiens プロフィリン1 (PFN1), mRNA |
| PIR | 8544 | NM_003662 | NM_003662 | NP_003653 | Homo sapiens ピリン(鉄結合核タンパク質) (PIR), mRNA |
| POLR2D | 5433 | NM_004805 | NM_004805 | NP_004796 | Homo sapiens ポリメラーゼ (RNA)II (DNA 指向性) ポリペプチドD (POLR2D), mRNA |
| PPIAP4 | 122552 | AL109628 | NG_002483 | | |
| PPP2R5C | 5527 | AY052369 | NM_002719 | NP_002710 | Homo sapiens タンパク質ホスファターゼ2, 調節サブユニットB (B56), γアイソフォーム (PPP2R5C), 転写変異体1, mRNA |
| PPP2R5C | 5527 | AY052369 | NM_178586 | NP_848701 | Homo sapiens タンパク質ホスファターゼ2, 調節サブユニットB (B56), γアイソフォーム (PPP2R5C), 転写変異体2, mRNA |
| PPP2R5C | 5527 | AY052369 | NM_178587 | NP_848702 | Homo sapiens タンパク質ホスファターゼ2, 調節サブユニットB (B56), γアイソフォーム (PPP2R5C), 転写変異体3, mRNA |

【0574】

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| PPP2R5C | 5527 | AY052369 | NM_178588 | NP_848703 | Homo sapiens タンパク質ホスファターゼ２，調節サブユニットＢ(B56)，γアイソフォーム(PPP2R5C)，転写変異体４，mRNA |
| PRDX2P1 | 359844 | AL356750 | NG_002915 | | |
| PRO1073 | 29005 | AF001542 | | | |
| PRO1073 | 29005 | AF001542 | | | |
| PRO1073 | 29005 | AF001542 | | | |
| PRO1073 | 29005 | AF001542 | | | |
| PRO1073 | 29005 | AF001542 | | | |
| PSMD8 | 5714 | NM_002812 | NM_002812 | NP_002803 | Homo sapiens プロテアソーム(プロソーム，マクロペイン)26Ｓサブユニット，非ATPアーゼ，8(PSMD8)，mRNA |
| PTOV1 | 53635 | NM_017432 | NM_017432 | NP_059128 | Homo sapiens 前立腺腫瘍過剰発現遺伝子１(PTOV1)，mRNA |
| RAB5B | 5869 | BC050558 | NM_002868 | NP_002859 | Homo sapiens RAB5B，メンバーＲＡＳ 癌遺伝子ファミリー(RAB5B)，mRNA |
| RGS3 | 5998 | NM_144488 | NM_017790 | NP_060260 | Homo sapiens Ｇ-タンパク質シグナル伝達の制御因子(RGS3)，転写変異体３，mRNA |
| RGS3 | 5998 | NM_144488 | NM_021106 | NP_066929 | Homo sapiens Ｇ-タンパク質シグナル伝達の制御因子(RGS3)，転写変異体２，mRNA |

【０５７５】

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| RGS3 | 5998 | NM_144488 | NM_130795 | NP_570613 | Homo sapiens G-タンパク質シグナル伝達の制御因子 (RGS3), 転写変異体1, mRNA |
| RGS3 | 5998 | NM_144488 | NM_134427 | NP_602299 | Homo sapiens G-タンパク質シグナル伝達の制御因子 (RGS3), 転写変異体4, mRNA |
| RGS3 | 5998 | NM_144488 | NM_144488 | NP_652759 | Homo sapiens G-タンパク質シグナル伝達の制御因子 (RGS3), 転写変異体6, mRNA |
| RGS3 | 5998 | NM_144488 | NM_144489 | NP_652760 | Homo sapiens G-タンパク質シグナル伝達の制御因子 (RGS3), 転写変異体5, mRNA |
| SCARF1 | 8578 | NM_003693 | NM_003693 | NP_003684 | Homo sapiens スカベンジャー受容体クラスF, メンバー1 (SCARF1), 転写変異体1, mRNA |
| SCARF1 | 8578 | NM_003693 | NM_145349 | NP_663324 | Homo sapiens スカベンジャー受容体クラスF, メンバー1 (SCARF1), 転写変異体2, mRNA |
| SCARF1 | 8578 | NM_003693 | NM_145350 | NP_663325 | Homo sapiens スカベンジャー受容体クラスF, メンバー1 (SCARF1), 転写変異体3, mRNA |

【０５７６】

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| SCARF1 | 8578 | NM_003693 | NM_145351 | NP_663326 | Homo sapiens スカベンジャー受容体クラスF, メンバー1 (SCARF1), 転写変異体4, mRNA |
| SCARF1 | 8578 | NM_003693 | NM_145352 | NP_663327 | Homo sapiens スカベンジャー受容体クラスF, メンバー1 (SCARF1), 転写変異体5, mRNA |
| SDCCAG8 | 10806 | NM_006642 | NM_006642 | NP_006633 | Homo sapiens 血清学的に定義された結腸癌抗原8 (SDCCAG8), mRNA |
| SFRS12 | 140890 | NM_139168 | NM_139168 | NP_631907 | Homo sapiens スプライシング因子, アルギニン/セリンリッチ12 (SFRS12), mRNA |
| SIRT5 | 23408 | AL441883 | NM_012241 | NP_036373 | Homo sapiens サーチュイン(サイレント接合型情報調節2ホモログ)5 (S. cerevisiae) (SIRT5), 転写変異体1, mRNA |
| SIRT5 | 23408 | AL441883 | NM_031244 | NP_112534 | Homo sapiens サーチュイン(サイレント接合型情報調節2ホモログ)5 (S. cerevisiae) (SIRT5), 転写変異体2, mRNA |

【０５７７】

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| SLC39A1 | 27173 | NM_014437 | NM_014437 | NP_055252 | Homo sapiens 溶質担持体ファミリー39(亜鉛輸送体), メンバー1 (SLC39A1), mRNA |
| SLU7 | 10569 | NM_006425 | NM_006425 | NP_006416 | Homo sapiens ステップII スプライシング因子 (SLU7), mRNA |
| SMAD7 | 4092 | NM_005904 | NM_005904 | NP_005895 | Homo sapiens SMAD, ＤＰＰに対するマザーホモログ７ (ショウジョウバエ) (SMAD7), mRNA |
| SNF1LK | 150094 | NM_173354 | NM_173354 | NP_775490 | Homo sapiens SNF1-様キナーゼ (SNF1LK), mRNA |
| SRF | 6722 | NM_003131 | NM_003131 | NP_003122 | Homo sapiens 血清応答因子 (c-fos血清応答エレメント結合転写因子) (SRF), mRNA |
| STATIP1 | 55250 | NM_018255 | NM_018255 | NP_060725 | Homo sapiens シグナルトランスデューサーおよび転写のアクチベーター３相互作用タンパク質1 (STATIP1), mRNA |
| STIP1 | 10963 | NM_006819 | NM_006819 | NP_006810 | Homo sapiens ストレス誘導性ホスホタンパク質 (Hsp70/Hsp90-組織化タンパク質) (STIP1), mRNA |

【０５７８】

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| TAZ | 25937 | AL833852 | NM_015472 | NP_056287 | Homo sapiens WWドメイン含有転写調節因子1 (WWTR1), mRNA |
| TD-60 | 55920 | AJ421269 | NM_018715 | NP_061185 | Homo sapiens RCC1-様 (TD-60), mRNA |
| TFCP2 | 7024 | NM_005653 | NM_005653 | NP_005644 | Homo sapiens 転写因子CP2 (TFCP2), mRNA |
| THRAP2 | 23389 | AB028948 | NM_015335 | NP_056150 | Homo sapiens 甲状腺ホルモン受容体関連タンパク質2 (THRAP2), mRNA |
| THRAP2 | 23389 | AB028948 | XM_034056 | XP_034056 | |
| TIGD1 | 200765 | NM_145702 | NM_145702 | NP_663748 | Homo sapiens ティガー転移性エレメント由来1 (TIGD1), mRNA |
| TIGD3 | 220359 | AC000353 | NM_145719 | NP_663771 | Homo sapiens ティガー転移性エレメント由来3 (TIGD3), mRNA |
| TIMM17B | 10245 | NM_005834 | NM_005834 | NP_005825 | Homo sapiens ミトコンドリア内膜のトランスロカーゼ17ホモログB (酵母) (TIMM17B), mRNA |
| TIMM9 | 26520 | AF150100 | NM_012460 | NP_036592 | Homo sapiens ミトコンドリア内膜のトランスロカーゼ9ホモログ (酵母) (TIMM9), mRNA |

【０５７９】

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| TIRAP | 114609 | NM_052887 | NM_052887 | NP_443119 | Homo sapiens toll-インターロイキン1受容体 (TIR) ドメイン含有アダプタータンパク質 (TIRAP), 転写変異体1, mRNA |
| TIRAP | 114609 | NM_052887 | NM_148910 | NP_683708 | Homo sapiens toll-インターロイキン1受容体 (TIR) ドメイン含有アダプタータンパク質 (TIRAP), 転写変異体2, mRNA |
| TLK1 | 9874 | BC032657 | NM_012290 | NP_036422 | Homo sapiens「くしゃくしゃ」様キナーゼ1 (TLK1), mRNA |
| TSC2 | 7249 | NM_000548 | NM_000548 | NP_000539 | Homo sapiens 結節硬化症2 (TSC2), 転写変異体1, mRNA |
| TSC2 | 7249 | NM_000548 | NM_021055 | NP_066399 | Homo sapiens 結節硬化症2 (TSC2), 転写変異体2, mRNA |
| TSC2 | 7249 | NM_000548 | NM_021056 | NP_066400 | Homo sapiens 結節硬化症2 (TSC2), 転写変異体3, mRNA |
| TUBB4 | 10381 | NM_006086 | NM_006086 | NP_006077 | Homo sapiens チューブリン, β 3 (TUBB3), mRNA |
| U5-116KD | 9343 | NM_004247 | NM_004247 | NP_004238 | Homo sapiens U5 snRNP-特異的タンパク質, 116 kD (U5-116KD), mRNA |

【０５８０】

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| UMPS | 7372 | NM_000373 | NM_000373 | NP_000364 | Homo sapiens ウリジン一リン酸シンテターゼ(オロチン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼおよびオロチジン-5'-デカルボキシラーゼ)(UMPS), mRNA |
| USP33 | 23032 | NM_015017 | NM_015017 | NP_055832 | Homo sapiens ユビキチン特異的プロテアーゼ33(USP33), 転写変異体1, mRNA |
| USP33 | 23032 | NM_015017 | NM_201624 | NP_963918 | Homo sapiens ユビキチン特異的プロテアーゼ33(USP33), 転写変異体2, mRNA |
| USP33 | 23032 | NM_015017 | NM_201626 | NP_963920 | Homo sapiens ユビキチン特異的プロテアーゼ33(USP33), 転写変異体3, mRNA |
| WARS | 7453 | NM_004184 | NM_004184 | NP_004175 | Homo sapiens トリプトファンtRNAシンテターゼ(WARS), 転写変異体1, mRNA |
| WARS | 7453 | NM_004184 | NM_173701 | NP_776049 | Homo sapiens トリプトファンtRNAシンテターゼ(WARS), 転写変異体2, mRNA |
| WARS | 7453 | NM_004184 | NM_213645 | NP_998810 | Homo sapiens トリプトファンtRNAシンテターゼ(WARS), 転写変異体3, mRNA |

【０５８１】

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| WARS | 7453 | NM_004184 | NM_213646 | NP_998811 | Homo sapiens トリプトファンtRNAシンテターゼ(WARS), 転写変異体4, mRNA |
| WBP2 | 23558 | NM_012478 | NM_012478 | NP_036610 | Homo sapiens WWドメイン結合タンパク質2(WBP2), mRNA |
| WDR4 | 10785 | AB039887 | NM_018669 | NP_061139 | Homo sapiens WD反復ドメイン4(WDR4), 転写変異体1, mRNA |
| WDR4 | 10785 | AB039887 | NM_033661 | NP_387510 | Homo sapiens WD反復ドメイン4(WDR4), 転写変異体2, mRNA |
| WDR4 | 10785 | AB039887 | NM_033662 | NP_387511 | |
| ZFP276 | 92822 | BC038839 | NM_152287 | NP_689500 | Homo sapiensジンクフィンガータンパク質276ホモログ(マウス)(ZFP276), mRNA |
| ZMPSTE24 | 10269 | NM_005857 | NM_005857 | NP_005848 | Homo sapiens 亜鉛メタロペプチダーゼ(STE24ホモログ, 酵母)(ZMPSTE24), mRNA |
| ZMYND11 | 10771 | NM_006624 | NM_006624 | NP_006615 | Homo sapiens ジンクフィンガー, MYNDドメイン含有11 (ZMYND11), 転写変異体1, mRNA |
| ZMYND11 | 10771 | NM_006624 | NM_212479 | NP_997644 | Homo sapiens zinc ジンクフィンガー, MYNDドメイン含有11 (ZMYND11) 転写変異体2, mRNA |

【０５８２】

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| ZNF23 | 7571 | NM_145911 | NM_145911 | NP_666016 | Homo sapiens ジンクフィンガータンパク質23 (KOX 16) (ZNF23), mRNA |
| ZNF258 | 9204 | NM_007167 | NM_007167 | NP_009098 | Homo sapiensジンクフィンガータンパク質258 (ZNF258), mRNA |
| ZNF258 | 9204 | NM_007167 | NM_145310 | NP_660353 | Homo sapiensジンクフィンガータンパク質258 (ZNF258), mRNA |
| ZNF44 | 51710 | NM_016264 | NM_016264 | NP_057348 | Homo sapiensジンクフィンガータンパク質44 (KOX 7) (ZNF44), mRNA |
| ZNF593 | 51042 | NM_015871 | NM_015871 | NP_056955 | Homo sapiensジンクフィンガータンパク質593 (ZNF593), mRNA |
| ZNRF1 | 84937 | NM_032268 | NM_032268 | NP_115644 | Homo sapiensジンクおよびリングフィンガー (ZNRF1), mRNA |
| ZNRF1 | 84937 | NM_032268 | NM_032851 | NP_116240 | |

【表４】
表 4

| 遺伝子記号 | デフォルト遺伝子記号 | 遺伝子ID | p値 | 軽度の変形性関節症 / 対照 | 方向 | デフォルト遺伝子説明 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ASAHL | ASAHL | 27163 | 0.009 | 1.274891308 | 上方制御される | N-アシルスフィンゴシンアミドヒドロラーゼ(酸セラミダーゼ)様 |
| ASGR1 | ASGR1 | 432 | 0.077 | 0.861159722 | 下方制御される | アシアロ糖タンパク質受容体１ |
| ATP1B1 | ATP1B1 | 481 | 0.005 | 1.316358494 | 上方制御される | ATPアーゼ, Na+/K+輸送, β１ポリペプチド |
| BMP6 | BMP6 | 654 | 0.003 | 0.796341318 | 下方制御される | 骨形成タンパク質６ |
| C4BPA | C4BPA | 722 | 0.037 | 0.737432267 | 下方制御される | 補体成分４結合タンパク質, α |
| CKLF | CKLF | 51192 | 0.177 | 0.956880843 | 下方制御される | ケモカイン様因子 |
| CKLFSF3 | CMTM3 | 123920 | 0.17 | 0.881792622 | 下方制御される | CKLF-様 MARVEL膜貫通ドメイン含有３ |
| CKLFSF7 | CMTM7 | 112616 | 0.007 | 0.830860996 | 下方制御される | CKLF-様 MARVEL膜貫通ドメイン含有７ |
| CLECSF6 | CLEC4A | 50856 | <0.001 | 0.882012865 | 下方制御される | C型レクチンドメインファミリー４, メンバーA |
| CLIC5 | CLIC5 | 53405 | 0.007 | 1.361931949 | 上方制御される | 塩素イオン細胞内チャネル５ |
| CPT1A | CPT1A | 1374 | 0.000 | 1.515183811 | 上方制御される | カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ1A(肝臓) |
| F2RL1 | F2RL1 | 2150 | 0.03 | 0.748628617 | 下方制御される | 凝固因子 II (トロンビン)受容体様１ |
| FLJ11142 | WDR52 | 55779 | 0.097 | 1.033432697 | | WD反復ドメイン52 |
| HDGF | HDGF | 3068 | 0.015 | 1.172846981 | 上方制御される | 肝癌由来成長因子(高移動度群タンパク質１様) |
| HSPCA | HSPCA | 3320 | 0.092 | 0.908589998 | 下方制御される | 熱ショック90kDaタンパク質１, α |
| IL13RA1 | IL13RA1 | 3597 | 2.4586674377e-009 | 0.601129904 | 下方制御される | インターロイキン13受容体, α１ |
| ILF1 | FOXK2 | 3607 | 0.096 | 1.129335679 | 上方制御される | フォークヘッドボックスK2 |
| KIAA0010 | UBE3C | 9690 | 0.039 | 1.147791932 | 上方制御される | ユビキチンタンパク質リガーゼE3C |
| LOC283337 | LOC283337 | 283337 | 0.071 | 1.201988295 | 上方制御される | 仮想タンパク質LOC283337 |
| LOC286286 | FLJ30435 | 387628 | 0.003 | 1.299053205 | 上方制御される | 仮想タンパク質FLJ30435 |
| LRMP | LRMP | 4033 | 0.199 | 0.91529472 | 下方制御される | リンパ制限膜タンパク質 |
| LRPPRC | LRPPRC | 10128 | 0.067 | 1.159461432 | 上方制御される | ロイシンリッチPPRモチーフ含有 |

【０５８３】

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| NOV | NOV | 4856 | 0.052 | 1.334728983 | 上方制御される | 腎芽細胞腫過剰発現遺伝子 |
| PDK4 | PDK4 | 5166 | 0.0001 | 1.414873975 | 上方制御される | ピルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ, アイソザイム４ |
| PF4 | PF4 | 5196 | 3.1409597922e-005 | 0.584997455 | 下方制御される | 血小板因子４(ケモカイン(C-X-Cモチーフ)リガンド４) |
| RPS6KA2 | RPS6KA2 | 6196 | 0.173 | 0.898669396 | 下方制御される | リボソームタンパク質S6キナーゼ, 90kDa, ポリペプチド２ |
| SERPINE1 | SERPINE1 | 5054 | 0.014 | 0.661094627 | 下方制御される | セルピンペプチダーゼ阻害因子, クレードE(ネキシン, Ｉ型プラスミノーゲン活性化因子阻害因子), メンバー１ |
| SERPING1 | SERPING1 | 710 | 0.045 | 0.750552389 | 下方制御される | セルピンペプチダーゼ阻害因子, クレードG(C1阻害因子), メンバー１, (血管性浮腫, 遺伝性) |
| SETBP1 | SETBP1 | 26040 | 0.122 | 0.97735996 | | SET結合タンパク質１ |
| TNF | TNF | 7124 | 0.060 | 0.882124093 | 下方制御される | 腫瘍壊死因子(TNFスーパーファミリー, メンバー２) |
| TNFAIP6 | TNFAIP6 | 7130 | 0.017 | 0.732318557 | 下方制御される | 腫瘍壊死因子, α-誘導性タンパク質６ |
| TNFSF6 | FASLG | 356 | 0.005 | 1.329513627 | 上方制御される | Fasリガンド(TNFスーパーファミリー, メンバー６) |
| WASF2 | WASF2 | 10163 | 0.09 | 0.74783735 | 下方制御される | WASタンパク質ファミリー, メンバー２ |

【表５】

表 5

| 遺伝子記号 | デフォルト遺伝子記号 | 遺伝子ＩＤ | Rna受入 | タンパク質受入 |
|---|---|---|---|---|
| ASAHL | ASAHL | 27163 | NM_014435 | NP_055250 |
| ASGR1 | ASGR1 | 432 | NM_001671 | NP_001662 |
| ATP1B1 | ATP1B1 | 481 | NM_001001787 | NP_001001787 |
| ATP1B1 | ATP1B1 | 481 | NM_001677 | NP_001668 |
| BMP6 | BMP6 | 654 | NM_001718 | NP_001709 |
| C4BPA | C4BPA | 722 | NM_000715 | NP_000706 |
| CKLF | CKLF | 51192 | NM_016326 | NP_057410 |
| CKLF | CKLF | 51192 | NM_016951 | NP_058647 |
| CKLF | CKLF | 51192 | NM_181640 | NP_857591 |
| CKLF | CKLF | 51192 | NM_181641 | NP_857592 |
| CKLFSF3 | CMTM3 | 123920 | NM_144601 | NP_653202 |
| CKLFSF3 | CMTM3 | 123920 | NM_181553 | NP_853531 |
| CKLFSF3 | CMTM3 | 123920 | NM_181554 | NP_853532 |
| CKLFSF3 | CMTM3 | 123920 | NM_181555 | NP_853533 |
| CKLFSF7 | CMTM7 | 112616 | NM_138410 | NP_612419 |
| CKLFSF7 | CMTM7 | 112616 | NM_181472 | NP_852137 |
| CLECSF6 | CLEC4A | 50856 | NM_016184 | NP_057268 |
| CLECSF6 | CLEC4A | 50856 | NM_194447 | NP_919429 |
| CLECSF6 | CLEC4A | 50856 | NM_194448 | NP_919430 |
| CLECSF6 | CLEC4A | 50856 | NM_194450 | NP_919432 |
| CLIC5 | CLIC5 | 53405 | NM_016929 | NP_058625 |
| CPT1A | CPT1A | 1374 | NM_001876 | NP_001867 |
| F2RL1 | F2RL1 | 2150 | NM_005242 | NP_005233 |
| FLJ11142 | WDR52 | 55779 | NM_018338 | NP_060808 |
| HDGF | HDGF | 3068 | NM_004494 | NP_004485 |
| HSPCA | HSPCA | 3320 | NM_005348 | NP_005339 |
| IL13RA1 | IL13RA1 | 3597 | NM_001560 | NP_001551 |
| ILF1 | FOXK2 | 3607 | NM_004514 | NP_004505 |
| ILF1 | FOXK2 | 3607 | NM_181430 | NP_852095 |
| ILF1 | FOXK2 | 3607 | NM_181431 | NP_852096 |
| KIAA0010 | UBE3C | 9690 | NM_014671 | NP_055486 |
| LOC283337 | LOC283337 | 283337 | NM_001004304 | NP_001004304 |
| LOC286286 | FLJ30435 | 387628 | NM_174950 | NP_777610 |
| LRMP | LRMP | 4033 | NM_006152 | NP_006143 |
| LRPPRC | LRPPRC | 10128 | NM_133259 | NP_573566 |
| NOV | NOV | 4856 | NM_002514 | NP_002505 |
| PDK4 | PDK4 | 5166 | NM_002612 | NP_002603 |
| PF4 | PF4 | 5196 | NM_002619 | NP_002610 |
| RPS6KA2 | RPS6KA2 | 6196 | NM_001006932 | NP_001006933 |
| RPS6KA2 | RPS6KA2 | 6196 | NM_021135 | NP_066958 |
| SERPINE1 | SERPINE1 | 5054 | NM_000602 | NP_000593 |
| SERPING1 | SERPING1 | 710 | NM_000062 | NP_000053 |
| SETBP1 | SETBP1 | 26040 | NM_015559 | NP_056374 |
| TNF | TNF | 7124 | NM_000594 | NP_000585 |
| TNFAIP6 | TNFAIP6 | 7130 | NM_007115 | NP_009046 |
| TNFSF6 | FASLG | 356 | NM_000639 | NP_000630 |
| WASF2 | WASF2 | 10163 | NM_006990 | NP_008921 |

【表６】

表 6

| 記号 | 参照ID | 5'プライマー | | | 3'プライマー | | | 産物の長さ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | プライマー配列 | 位置 | 配列番号 | プライマー配列 | 位置 | 配列番号 | |
| ASAHL | NM_014435 | CTACGAGTCCTCCG TGTTC | 410 | 1 | AGAATTGCACAT CCACTGTC | 537 | 2 | 128 |
| ASGR1 | NM_001671 | GGAGCAGAAATTT GTCCAGCAC | 767 | 3 | TTCTTGAAGCCCG TCTCGTAGT | 883 | 4 | 117 |
| ATP1B1 | NM_001677 | CTAAGCCTCCCAAG AATGAG | 649 | 5 | CTTATCTTCATCT CGCTTGC | 749 | 6 | 101 |
| BMP6 | NM_001718 | ATGGCAGGACTGG ATCATTGC | 1454 | 7 | AATCGCGTGGTTG GTTGCAT | 1559 | 8 | 106 |
| C4BPA | NM_000715 | CCTGCAGTTATTCA CACTGG | 1594 | 9 | CACCATAGCCAG AATCACAT | 1743 | 10 | 150 |
| CKLF | NM_016951 | TTCTGCTTCAGTGT GAAAGG | 184 | 11 | ATAACGGTGACTT CAAATCCA | 314 | 12 | 131 |
| CKLFSF3 | NM_181553 | AGTCGGGTCTCTCA TTCATC | 285 | 13 | GCATCAGCAAAG AGGAAGTA | 399 | 14 | 115 |
| CKLFSF7 | NM_138410 | TTTACCTGGTCCAC CTCTTC | 508 | 15 | CGCTCTGGTTGTA ACTCTTG | 651 | 16 | 144 |

【０５８４】

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| CLECSF6 | NM_016184 | ATATGCCCGTGGA AGAGACA | 531 | 17 | TGAGCCTCCATTC TAGCACAGT | 666 | 18 | 136 |
| CLIC5 | NM_016929 | TCCATGTGGTCAAG ATTGTGGC | 890 | 19 | TAGGCCAACTCG ATCTCACTGT | 1037 | 20 | 148 |
| CPT1A | NM_001876 | CTGAGCCTTGGAG ATTATCA | 2112 | 21 | ATGTACGACACA CCATAGCC | 2250 | 22 | 139 |
| F2RL1 | NM_005242 | TGGCACCATCCAA GGAACCAAT | 223 | 23 | TTCCAGTGAGGA CAGATGCAGA | 368 | 24 | 146 |
| FLJ11142 | NM_018338 | TCGTTTCTTGGTGA CTGCTGGA | 2656 | 25 | TCCAAACCTGGG AGATGGAACT | 2767 | 26 | 112 |
| HDGF | NM_004494 | CAAAGACCTCTTCC CTTACG | 495 | 27 | TTTCTGGGAGGAC TGATAGC | 630 | 28 | 136 |
| HSPCA | NM_005348 | ATGATTGGCCAGTT CGGTGTTG | | 29 | TTCACCTGTGTCT GTCCTCACT | | 30 | 147 |
| IL13RA1 | NM_001560 | CATTGTTCCAGTCA TCGTCGCA | | 31 | TCTTGCCAGGATC AGGAATTGG | | 32 | 101 |
| ILF1 | NM_181431 | AGACAGCCCGAAG GATGATT | 921 | 33 | TTGTCCGCAGTCC TGTAGTA | 1070 | 34 | 150 |
| KIAA0010 | BC014029 | TGATGGTACCCAA AGTCAGGCT | 1385 | 35 | AACGGTACCATA GACCCTGTGA | 1505 | 36 | 121 |
| LOC283337 | BM786513 | AACAGGACTGATG GGACACGAA | 268 | 37 | ACTTGCCTGAGCC ATGCTGAT | 412 | 38 | 145 |
| LOC286286 | NM_174950 | CACCAGGAGCACA CTTATATCATGGA | 638 | 39 | CCTCGTTCATTGC AAGATAGAATTC AC | 737 | 40 | 100 |

【０５８５】

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| LRMP | NM_006152 | GAGCACGCTGAAT TAGAAGA | 1848 | 41 | GAGAAGATGGCT TGGAGTTT | 1977 | 42 | 130 |
| LRPPRC | NM_133259 | CGTTTGACGTACCT GAGTTGTGG | | 43 | TTGGTTCAATCGG CAGGCAA | | 44 | 119 |
| NOV | NM_002514 | CAGAGCAGCCAAC AGATAAG | 830 | 45 | AGAACCTGGGCT TGTAGGT | 946 | 46 | 117 |
| PDK4 | NM_002612 | ACTCGGATGCTGAT GAACCA | 705 | 47 | AAGGCATCTTGG ACCACTGCTA | 823 | 48 | 119 |
| PF4 | NM_002619 | GTTGCTGCTCCTGC CACTT | | 49 | GTGGCTATCAGTT GGGCAGT | | 50 | |
| RPS6KA2 | NM_021135 | ACCCAATCGTGCA GCAGTTACA | 1411 | 51 | ATGCACACATCG CTTGCACA | 1520 | 52 | 110 |
| SERPINE 1 | NM_000602 | ATCAGCCACTGGA AAGGCAACA | 919 | 53 | AACATGTCGGTC ATTCCCAGGT | 1040 | 54 | 122 |
| SERPING 1 | NM_000062 | CCCATGATGAATA GCAAGAA | 1027 | 55 | AGACGATGTTTCA GGTTCTG | 1160 | 56 | 134 |
| SETBP1 | NM_015559 | TGAAGGCTTTGGA ACGTACAGG | 3752 | 57 | GGGACTTGGCAT CCCTGGAG | 3857 | 58 | 106 |
| TNF | NM_000594 | ATGTTGTAGCAAAC CCTCAA | 441 | 59 | GAAGAGGACCTG GGAGTAGA | 589 | 60 | 149 |
| TNFAIP6 | NM_007115 | ATATGGCTTGAACG AGCAGC | 161 | 61 | TGGCCGCCTTCAA ATTCACA | 267 | 62 | 107 |

【０５８６】

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| TNFSF6 | NM_000639 | CATTTAACAGGCA AGTCCAA | 599 | 63 | CAAGGCCACCCTT CTTATAC | 701 | 64 | 103 |
| WASF2 | NM_006990 | GTTCAGCAACTTCA CAGCGA | 407 | 65 | CACTCAGGTCCTT CTGCTGTTT | 531 | 66 | 125 |

【表７】

表 7

| 遺伝子記号 | 説明 | 一般に市販されている抗体の参照 | 科学文献 |
|---|---|---|---|
| ASAHL | N-アシルスフィンゴシンアミドヒドロラーゼ(酸セラミダーゼ)様 | | |
| ASGR1 | アシアロ糖タンパク質受容体１ | | |
| ATP1B1 | ATPアーゼ, Na+/K+輸送, β１ポリペプチド | | |
| BMP6 | 骨形成タンパク質６ | ab15640およびab10859<br><br>AbCam抗ヒトラットモノクローナル | Schluesener HJ & Meyermann R<br>正常およびアテローム硬化性平滑筋細胞における新規なTGF-β関連サイトカイン、BMP-6の免疫局在化<br>*Atherosclerosis* **113**:153-6 (1995) |
| C4BPA | 補体成分４結合タンパク質, α | | |
| CKLF | ケモカイン様因子 | | |
| CKLFSF3 | CKLF-様MARVEL膜貫通ドメイン含有３ | | |
| CKLFSF7 | CKLF-様MARVEL膜貫通ドメイン含有７ | | |
| CLECSF6 | C型レクチンドメインファミリー４, メンバーA | ab15854<br>AbCam抗ヒトニワトリポリクローナル | Bates EEら，APCは免疫受容体チロシンベースの阻害モチーフを含む新規なC型レクチン表面受容体, DCIRを発現する<br>*J Immunol* **163**:1973-83 (1999). |
| CLIC5 | 塩素イオン細胞内チャネル５ | | |

【０５８７】

| | | | |
|---|---|---|---|
| CPT1A | カルニチン パルミトイル トランスフェラーゼ 1 A (肝臓) | | |
| F2RL1 | 凝固因子 II (トロンビン) 受容体様 1 | AbCam Ab13097または Ab13388<br><br>PAR2抗ヒト ウサギポリクローナル 抗体 | |
| FLJ11142 | WD反復 ドメイン52 | | |
| HDGF | 肝癌由来 成長因子 (高移動度群 タンパク質1 様) | | |
| HSPCA | 熱ショック 90kDa タンパク質1, α | AbCam Ab1429<br><br>抗ヒト マウスモノクローナル 抗体 | Riehl RMら，トリステロイド受容体の非ホルモン結合性成分が広範な組織および種において存在する免疫学的証拠<br>*Biochemistry* **24**:6586-91 (1985). |
| IL13RA1 | インター ロイキン13 受容体, α 1 | | |
| ILF1 | フォーク ヘッド ボックス K2 | AbCam Ab5298<br>抗ヒト ヤギポリクローナル 抗体 | Li Cら，ヒト免疫不全ウイルス長末端反復中のNFAT-様モチーフに結合する細胞因子, インターロイキン結合因子のクローニング<br>*Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:7739-43 (1991). |
| KIAA0010 | ユビキチン タンパク質 リガーゼE3C | | |
| LOC283337 | 仮想 タンパク質 LOC283337 | | |
| LOC286286 | 仮想 タンパク質 FLJ30435 | | |
| LRMP | リンパ制限 膜タンパク質 | AbCam Ab9931<br><br>抗ヒト ヤギポリクローナル 抗体 | Behrens TWら，小胞体のリンパタンパク質JAW1のカルボキシ末端標的化および新規な翻訳後プロセシング<br>*J Biol Chem* **271**:23528-34 (1996). |
| LRPPRC | ロイシン リッチ PPR-モチーフ含有 | | |

【0588】

| | | | |
|---|---|---|---|
| NOV | 腎芽細胞腫過剰発現遺伝子 | Abcam Ab 10888<br>CCN3 抗体<br>ヒトと反応すると予想されているウサギポリクローナル | Lin CG ら，血管形成インデューサーNOV（CCN3）のインテグリン依存性機能：創傷治癒における意味<br>*J Biol Chem* **280**:8229-37 (2005). |
| PDK4 | ピルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼアイソザイム４ | | |
| PF4 | 血小板因子４（ケモカイン(C-X-Cモチーフ)リガンド４） | Abcam Ab9561<br>抗ヒトウサギポリクローナル | |
| RPS6KA2 | リボソームタンパク質S6キナーゼ，90kDa，ポリペプチド2 | | |
| SERPINE1 | セルピンペプチダーゼ阻害因子(クレードE(ネキシン，プラスミノーゲン活性化因子阻害因子１型)，メンバー１ | AbCam Ab12499<br>PAI1<br>抗ヒトマウスモノクローナル | |
| SERPING1 | セルピンペプチダーゼ阻害因子，クレードG(Ｃ１阻害因子)メンバー１，(血管性浮腫，遺伝性) | AbCam Ab8778<br>C1<br>抗ヒトヒツジポリクローナル<br>Ab17193<br>抗ヒトマウスモノクローナル | |
| SETBP1 | SET結合タンパク質１ | | |
| TNF | 腫瘍壊死因子（ＴＮＦスーパーファミリー，メンバー２） | AbCam Ab6671<br>抗ヒトウサギポリクローナル | Baarsch MJ ら，Ｌ９２９線維芽細胞バイオアッセイを使用する、ブタ肺胞マクロファージからの腫瘍壊死因子αの検出<br>*J Immunol Methods* **140**:15-22 (1991). |

【０５８９】

| | | | |
|---|---|---|---|
| TNFAIP6 | 腫瘍壊死因子,α誘導性タンパク質６ | | |
| TNFSF6 | Fasリガンド(ＴＮＦスーパーファミリー,メンバー６) | | |
| WASF2 | WASタンパク質ファミリー,メンバー２ | | |

10

【表８】

表 8

| 遺伝子記号 | 受入番号 | センスプライマー | 配列番号 | アンチセンスプライマー | 配列番号 | TaqManプローブ | 配列番号 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ASAHL | NM_014435 | TAATGCTACAGGACAAG CAAA | 67 | GGTCTTGAACTCCTG ACCTC | 68 | CACCGCACCTGGCCTGCTT T | 69 |
| ASAHL | NM_014435 | CTACGAGTCCTCCGTGTT C | 70 | AGAATTGCACATCC ACTGTC | 71 | TGGCTCAAGACTCCAGAGG CCA | 72 |
| ASAHL | NM_014435 | TTGGCCTCTAGATCCTTT GA | 73 | TTTGCTTGTCCTGTA GCATT | 74 | CCACTGGAAGCCAGCACCC A | 75 |
| ASGR1 | NM_001671 | AGAGACGTTCAGCAACT TCA | 76 | AGGTCCTTCTGCTGT TTCTC | 77 | CCCTTGACCTGGGCCTCCG T | 78 |
| ASGR1 | NM_001671 | TGAGAGAGACGTTCAGC AAC | 79 | AGGTCCTTCTGCTGT TTCTC | 80 | CCCTTGACCTGGGCCTCCG T | 81 |
| ASGR1 | NM_001671 | AGAGACGTTCAGCAACT TCA | 82 | ACTCAGGTCCTTCTG CTGTT | 83 | CCCTTGACCTGGGCCTCCG T | 84 |
| ATP1B1 | NM_001677 | CCTCCGGTATGTTCTAAA GC | 85 | ATGTGATGCCTCCAG AAAG | 86 | TGGATCTGCCCATCACTTT GGC | 87 |
| ATP1B1 | NM_001677 | GTACAAAGATTCAGCCC AGA | 88 | GCTCTCCTCGTTCAT GATTA | 89 | TCACTGGGCACATCGCCAC A | 90 |
| ATP1B1 | NM_001677 | GGACACTGAAAATTCGCA TAG | 91 | AAATGGCTAGTGGG AAAGAT | 92 | CCCAATGTTCTCACCGTAC GCCT | 93 |
| BMP6 | NM_001718 | GTGCCTTATTACCCAGG AAG | 94 | GCAGTTACCAGACCT TATGCT | 95 | CATCCAAACTCAGCTTGCT ACAGACCA | 96 |
| BMP6 | NM_001718 | AGTGCCTTATTACCCAG GAA | 97 | GCAGTTACCAGACCT TATGCT | 98 | CATCCAAACTCAGCTTGCT ACAGACCA | 99 |

【０５９０】

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| BMP6 | NM_001718 | TCATGCCAGTGCCTTATT AC | 100 | TTTCTGCAGTTACCA GACCT | 101 | TGCTACAGACATCCAAACT CAGCTTGC | 102 |
| C4BPA | NM_000715 | AATGGAATCCTTCTCCTC CT | 103 | CCTTAACACAGTCCC AACAA | 104 | CAGACATTCCACATGCTTC CTGGG | 105 |
| C4BPA | NM_000715 | TCCACCCACTTTATCATT TG | 106 | CTGAGTTGAATGGG ATCTGA | 107 | TGAAATACACCTGCCTCCC TGGC | 108 |
| C4BPA | NM_000715 | TCCACCCACTTTATCATT TG | 109 | TCTGAGTTGAATGGG ATCTG | 110 | ACACCTGCCTCCCTGGCTA CGT | 111 |
| CKLF | NM_181641 | TCACTGGATTTGAAGTC ACC | 112 | GTCGGCAAGACAGC ATAC | 113 | TGCAAACACAAGCAAAGG CCAAA | 114 |
| CKLF | NM_181641 | CAGCCAGCTGAGAAGAG TT | 115 | GCCTTTCACACTGAA GCAG | 116 | CGCGTCTGCAGACCCAGCA G | 117 |
| CKLF | NM_181641 | CCCTTCTGCTTCAGTGTG | 118 | GGTGACTTCAAATCC AGTGA | 119 | CCAGCCGCAGCATCTTCAC G | 120 |
| CLIC5 | NM_016929 | TGGATGACTACCTGAAC ACC | 121 | ATCTTGACCACATGG AGCTT | 122 | CCATCCAGGAACTTGCGCC G | 123 |
| CLIC5 | NM_016929 | GAGTACCGAGCTGGCTA TG | 124 | TGCAACAAACTGAG AATGTG | 125 | CCAGTCTGGCCCTTAGTGC CCA | 126 |
| CLIC5 | NM_016929 | AGCCTCATCTTGCTGGTA TC | 127 | CGAAAGGTGGACTG TGTCTA | 128 | CAGCACCATCCCTGGCCTC C | 129 |
| CPT1A | NM_001876 | AAGACTTCAAACGGATG ACA | 130 | AGATGTACTCCCTCCC ACCAG | 131 | TCTTGGTCCAAGACCGACA GCAA | 132 |
| CPT1A | NM_001876 | AAGACTTCAAACGGATG ACA | 133 | TAGATGTACTCCTCC CACCA | 134 | TCTTGGTCCAAGACCGACA GCAA | 135 |

【０５９１】

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| CPT1A | NM_001876 | GACAGCACTTGCTCAAG<br>ATT | 136 | ATGTACTCCTCCCAC<br>CAGTC | 137 | TCTTGGTCCAAGACCGACA<br>GCAA | 138 |
| F2RL1 | NM_005242 | GCCTCTCTACCCTTAACA<br>GC | 139 | CTTTACAGTGCGGAC<br>ACTTC | 140 | TGCAAAGAACGCTCTCCTT<br>TGCC | 141 |
| F2RL1 | NM_005242 | CCTCTGCCTCTCTACCCT<br>TA | 142 | CTTTACAGTGCGGAC<br>ACTTC | 143 | TGCAAAGAACGCTCTCCTT<br>TGCC | 144 |
| F2RL1 | NM_005242 | GTAACCTTCTGCTTGTGG<br>TG | 145 | TGCAGCTGTTAAGG<br>GTAGAG | 146 | CATGGCTCTGGCCCTGGCT<br>C | 147 |
| HDGF | NM_004494 | CAGCCAACAAATACCAA<br>GTC | 148 | CTGAACCCTTTCCTC<br>TTGTT | 149 | CCGTCTCGTGGGTCCCGAA<br>A | 150 |
| HDGF | NM_004494 | GTAGGAATGGAAGGATG<br>GAG | 151 | TAGGCAGCTGGGAT<br>AATAGG | 152 | CACAGGAGGGCGGCCTCCT<br>T | 153 |
| HDGF | NM_004494 | GAGACCTGAAGGGTTGA<br>CTT | 154 | TGACTATAAGCTGGC<br>CTTGA | 155 | TCAACACTCCCACCCAAAT<br>GGG | 156 |
| HSPCA | BX247955 | TACACATCTGCCTCTGGT<br>G | 157 | GTTAGCTACCTGGTC<br>CTTGG | 158 | TCTGGTTCTCCTTCATTCTG<br>GTGCA | 159 |
| HSPCA | BX247955 | AAATCGGAAGAAGCTTT<br>CAG | 160 | CTGGTTCTCCTTCAT<br>TCTGG | 161 | CCATCTCATCACCAGAGGC<br>AGATGTG | 162 |
| HSPCA | BX247955 | TGGTGATGAGATGGTTT<br>CTC | 163 | CTAAGCCATGTTTCC<br>GAAG | 164 | CCTGGTCCTTGGTCTCACCT<br>GTGA | 165 |
| IL13RA1 | NM_001560 | CTCATTGTTCCAGTCATC<br>GT | 166 | TCATTCTGGTCTCCA<br>AACAT | 167 | CCCTCCAATTCCTGATCCTG<br>GCA | 168 |
| IL13RA1 | NM_001560 | GTCAAGGATAATGCAGG<br>AAA | 169 | GTCATCATTGTGGAA<br>GGAGA | 170 | CCCGTGTGAAACCTGATCC<br>TCCA | 171 |
| IL13RA1 | NM_001560 | ACCTAAGCAAACCCAGT<br>GTC | 172 | AACAATCCCTGGTTG<br>AAGAC | 173 | CCCTTCATCTGGGCACTGA<br>AGGG | 174 |

【0592】

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| LRMP | NM_006152 | GAGCACGCTGAATTAGA AGA | 175 | GGCTTGGAGTTTAGA GAAGC | 176 | TCCTCTTGAAGATGATGAT GACTGCCA | 177 |
| LRMP | NM_006152 | GAGCACGCTGAATTAGA AGA | 178 | TTCGTAGAGAAGAT GGCTTG | 179 | TCCTCTTGAAGATGATGAT GACTGCCA | 180 |
| LRMP | NM_006152 | AGGAAGCCAAGTCTTTC TGA | 181 | GGCCTTATTAGCCTT TCTGA | 182 | TGGGCAACAAATCTCAAGT CCTCCA | 183 |
| LRPPR C | NM_133259 | CCTGTTACTTGTGCTTGG TC | 184 | CCGAGACTCAATTTC AGAGA | 185 | TGCCGAAGAGCCTCCAGGC A | 186 |
| LRPPR C | NM_133259 | TTGATTGACAGCATGAG TGA | 187 | TGGTAGCTTTCCAGG AGATT | 188 | TCTCAAATGCTCCTCCTTGG CCTG | 189 |
| LRPPR C | NM_133259 | CAGCTGGAGAAGATGAA TGT | 190 | CTCTCAACCAACAA GTGAGC | 191 | TCTCCTGGAAAGCTACCAT GTTCCTGA | 192 |
| NOV | NM_002514 | TACCGCAGTGGAGAGAA AT | 193 | AGTTAGGCTCAGGC AGTAGC | 194 | TGCCCATCTCTGCAGGTGC A | 195 |
| NOV | NM_002514 | CAGATGAGGAGGATTCA CTG | 196 | TCTGTGGTCTGTTCA ATGC | 197 | CAGGCCAGAAGCCACCCTA GGA | 198 |
| NOV | NM_002514 | ATTGAGGTTCATTGGGA AGA | 199 | GTCATGTTGAAGAG CTGCAT | 200 | CCAGCTCTGAACTTCCAAG CTCCA | 201 |
| PDK4 | NM_002612 | CCTTTGAGTGTTCAAGG ATG | 202 | AGAGCATATGATGG AGGTGA | 203 | TCCAGACCAACCAATTCAC ATCGTG | 204 |
| PDK4 | NM_002612 | CCTTTGAGTGTTCAAGG ATG | 205 | GAGCATATGATGGA GGTGAG | 206 | TCCAGACCAACCAATTCAC ATCGTG | 207 |
| PDK4 | NM_002612 | CCTTTGAGTGTTCAAGG ATG | 208 | AGCATATGATGGAG GTGAGA | 209 | TCCAGACCAACCAATTCAC ATCGTG | 210 |
| PF4 | NM_002619 | ACTGATAGCCACGCTGA A | 211 | ATAGCAAATGCACA CACGTA | 212 | TTTGCTTGGACCTGCAAGC CC | 213 |

【０５９３】

【0594】

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| PF4 | NM_002619 | CTGTGTGTGAAGACCAC CTC | 214 | CTTCAGCGTGGCTAT CAG | 215 | CCGTCCCAGGCACATCACC A | 216 |
| PF4 | NM_002619 | AACTGATAGCCACGCTG AA | 217 | ATAGCAAATGCACA CACGTAG | 218 | TTTGCTTGGACCTGCAAGC CC | 219 |
| RPS6KA2 | NM_021135 | GACCGAGTGAGATCGAA GAT | 220 | GGAAGTCCAGGATC AGGTAG | 221 | AGCTTTCCTTCCGTCTGAA AGGCA | 222 |
| RPS6KA2 | NM_021135 | GCTTCATTATGCCTTTCA GA | 223 | TGAACATGACCTCTT TGGAG | 224 | CCCGCAGGAAGTCCAGGAT CA | 225 |
| RPS6KA2 | NM_021135 | TGAGATCGAAGATGGAG AGA | 226 | AGTCCAGGATCAGG TAGAGC | 227 | CCTTCCGTCTGAAAGGCAT AATGAAGC | 228 |
| SERPINE1 | NM_000602 | ATGAGATCAGCACCACA GAC | 229 | TTGATGATGAATCTG GCTCT | 230 | TGGTCCAGGGCTTCATGCC C | 231 |
| SERPINE1 | NM_000602 | AATGACTGGGTGAAGAC ACA | 232 | TTGAAGTAGAGGGC ATTCAC | 233 | CCAGCTGACACGGCTGGTG C | 234 |
| SERPINE1 | NM_000602 | GCAGCTATGGGATTCAA GAT | 235 | GTGCTGATCTCATCC TTGTT | 236 | CCGCCCTCCGGCATCTGTA C | 237 |
| SERPING1 | NM_000062 | CATAAGGGACACCTTTG TGA | 238 | GCTGATCTTGTTGTT GGTGT | 239 | TCATCAACACCTGGGTGGC CA | 240 |
| SERPING1 | NM_000062 | CTCTGCTCTGACTTGGAG AG | 241 | ATGTTGGTCTCCACC TTCTT | 242 | CCCAACACGGCCTCTGTTG AATG | 243 |
| SERPING1 | NM_000062 | CTCTCTGCTCTGACTTGG AG | 244 | ATGTTGGTCTCCACC TTCTT | 245 | CCCAACACGGCCTCTGTTG AATG | 246 |
| SETBP1 | NM_015559 | CAGATCTTGTCCTGTTCC AG | 247 | TCTTGCCAATGTAGA TGGTT | 248 | TGCTTTCAATGGCTGCTGC CC | 249 |
| SETBP1 | NM_015559 | TCAAGATGGAGGAGGTA CAA | 250 | GGGTTTGGTATGGTC TGACT | 251 | CCACCTACGGTGGGCAGCA A | 252 |

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| SETBP1 | NM_015559 | TCAAGATGGAGGAGGTA CAA | 253 | GTCTGGGTTTGGTAT GGTCT | 254 | CCACCTACGGTGGGCAGCA A | 255 |
| TNF | NM_000594 | ATCCCTGACATCTGGAA TCT | 256 | GGAAACATCTGGAG AGAGGA | 257 | TGGCCAGAACCAAAGGCTC CC | 258 |
| TNF | NM_000594 | ATCCCTGACATCTGGAA TCT | 259 | AACATCTGGAGAGA GGAAGG | 260 | TGGCCAGAACCAAAGGCTC CC | 261 |
| TNF | NM_000594 | ACATCTGGAATCTGGAG ACC | 262 | GAGAGAGGAAGGCC TAAGGT | 263 | TGGCCAGAACCAAAGGCTC CC | 264 |
| TNFAIP 6 | NM_007115 | GGTGTGTACCACAGAGA AGC | 265 | AGCACAGACATGAA ATCCAA | 266 | TTTGAAGGCGGCCATCTCG C | 267 |
| TNFAIP 6 | NM_007115 | TATGGTCAGCGTATTCAC CT | 268 | TCCACAGTATCTTCC CACAA | 269 | TCAGCCAAGCAACCTGGGT CA | 270 |
| TNFAIP 6 | NM_007115 | TACTGTGGAGATGAGCT TCC | 271 | ACAGGATCCATTGC AACATA | 272 | CCTCCAGCTGTCACTGAAG CATCA | 273 |
| WASF2 | NM_006990 | ATCCCTTTGGTGAGTATG GT | 274 | TGTCAGGGATAGTTT GGTCA | 275 | TCAGGATGCACCACCACCA CC | 276 |
| WASF2 | NM_006990 | CTGCGGAAGGTAGGATT AGA | 277 | GGACTTGCAGATCAT TACCA | 278 | AGCACATCGAAACCCTAGG AGGTCA | 279 |
| WASF2 | NM_006990 | CTTTCTGTAGGCTGGTGT TG | 280 | AGGGATAGTTTGGTC ATGGA | 281 | TGCCTCCCTCCCAGGATCC C | 282 |

【０５９５】

参考文献

Zaleske DJ.軟骨および骨の発生(Cartilage and Bone Development). Instr Course Lect 1998、47: 461-

Buckwalter JA, Mankin HJ. 関節軟骨：組織設計および軟骨細胞－マトリックス相互作用

（Articular Cartilage: Tissue Design and Chondrocyte-Matrix Interactions）. Instr Course Lect １９９８、47: 477-86.
Westacott CI, Sharif M. 変形性関節症におけるサイトカイン：関節破壊のメディエーターまたはマーカー？（Cytokines in Osteoarthritis: Mediators or Markers of Joint Destruction?） Semin Arthritis Rheum １９９６、25:254-72
Adams MD, Kerlavage AR, Fleischmann RD, Fuldner RA, BuIt CJ, Lee NHら、ｃＤＮＡ配列の８３００万ヌクレオチドに基づくヒト遺伝子の多様性および発現パターンの初期評価（Initial assessment of human gene diversity and expression patterns based upon 83 million nucleotides of cDNA sequence）. Nature １９９５、377 補遺: 3-174.
Hwang DM, Dempsey AA, Wang RX, Rezvani M, Barrans JD, Dai KSら、分子心臓血管医学のためのゲノムベースの資源：心臓血管遺伝子の概要に向けて(A Genome-Based Resource for Molecular Cardiovascular Medicine: Toward a Compendium of Cardiovascular Genes).Circulation 1997、96:4146-203.
Mao M, Fu G, Wu JS, Zhang QH, Zhou J, Kan LXら、発現配列タグおよび効率的なｃＤＮＡクローニングによるヒトＣＤ３４$^{+}$造血幹細胞／前駆細胞において発現される遺伝子の同定(Identification of genes expressed in human CD34$^{+}$ hematopoietic stem/progenitor cells by expressed sequence tags and efficient full-length cDNA cloning).Proc Natl Acad Sci 1998、95:8175-80.
Hillier LD, Lennon G, Becker M, Bonaldo MF, Chiapelli B, Chissoe Sら、２８０，０００個の発現配列タグの生成および分析(Generation and analysis of 280,000 human expressed sequence tags).Genome Res.1996、6:807-28.
Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ.基本的な局所的アラインメント検索ツール(Basic local alignment search tool).J Mol Biol 1990、215:403-10.
Mundlos S, Zabel B. ヒト軟骨マトリックスタンパク質の発生的発現(Developmental Expression of Human Cartilage Matrix Protein.Dev Dyn 1994、199:241-52.
Nakamura S, Kamihagi K, Satakeda H, Katayama M, Pan H, Okamoto Hら、関節軟骨におけるSPARC（オステオネクチン）の増強。関節リウマチの患者からの滑液中でのレベルの増加および軟骨細胞培養における成長因子およびサイトカインによる調節(Enhancement of SPARC(osteonectin)synthesis in arthritic cartilage. Increased levels in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis and regulation by growth factors and cytokines in chondrocyte cultures).Arthritis Rheum 1996、39:539-51.
Eyre DR, 関節軟骨のコラーゲン(The Collagens of Articular Cartilage).Semin Arthritis Rheum 1991、21 (3 補遺 2): 2-l l.
Okihana H, Yamada K. マウス成長軟骨からのｃＤＮＡライブラリーの調製および１４００個の遺伝子の予備的評価(Preparation of a cDNA Library and Preliminary Assessment of 1400 Genes from Mouse Growth Cartilage).J Bone Miner Res 1999、14:304-10.
Morrison EH, Ferguson MWJ, Bayliss MT, Archer CW. 関節軟骨の発生：Ｉ．コラーゲン型の空間的および時間的パターン(The developmental of articular cartilage: I.The spatial and temporal patterns of collagen types).J Anat 1996、189:9-22.
Treilleux I, Mallein-Gerin F, le Guellec D, Herbage D. I型、II型、III型コラーゲンの発現の局在化、および発生しているヒト関節軟骨におけるアグリカンコアタンパク質遺伝子(Localization of the Expression of Type I,II,III Collagens,and Aggrecan Core Protein Genes in Developing Human Articular Cartilage).Matrix 1992、12:221-32.
Eyre DR, Wu JJ, Niyibizi C. 骨および軟骨のコラーゲン：分子的多様性および超分子アセンブリー(The collagens of bone and cartilage: Molecular diversity and supramolecular assembly).In Cohn DV,Glorieux FH,Martin TJ,編. カルシウム調節および骨代謝(Calcium Regulation and Bone Metabolism)所収。Amsterdam.The Netherlands:Elsevier、1990.p.188-94.
Birnbacher R. Amann G, Breitschopf H, Lassmann H, Suchanek G, Heinz-Erian P. ヒ

ト胎児および胎盤におけるインスリン様成長因子ＩＩ　ｍＲＮＡの細胞局在：ジゴキシゲニン標識ｃＲＮＡプローブおよび免疫細胞化学を用いる検出(Cellular localization of insulin-like growth factor II mRNA in the human fetus and the placenta:detection with a digoxigenin-labeled cRNA probe and immunocytochemistry).Pediatr Res 1998、43:614-20.
Wang E, Wang J, Chin E, Zhou J, Bondy CA. マウスの軟骨形成および骨形成におけるインスリン様成長因子系遺伝子発現の細胞パターン(Cellular patterns of insulin-like growth factor system gene expression in murine chondrogenesis and osteogenesis).Endocrinology 1995、136:2741-51.
van Kleffens M, Groffen C, Rosato RR, van den Eijnde SM, van Neck SW, Linderbergh-Kortleve DJら、ホールマウントｉｎ　ｓｉｔｕハイブリダイゼーションによって決定されるマウス肢芽発生の間のＩＧＦ系のｍＲＮＡ発現パターン(mRNA expression patterns of the IGF system during mouse limb bud development,determined by whole mount in situ hybridization).Mol Cell Endocrinol 1998、138:151-61.
Braulke T, Gotz W, Claussen M. ヒト胎児組織におけるインスリン様成長因子結合タンパク質－１、－３、および－４の免疫組織化学的局在化および胎児組織外植片からの培地中のそれらの分析(Immunohistochemical localization of insulin-like growth factor binding protein-1,-3,and-4 in human fetal tissues and their analysis in media from fetal tissue explants).Growth Regul 1996、6:55-65.
Kessler E, Takahara K, Biniaminov L, Brusel M, Greenspan DS. 骨形成タンパク質－１：Ｉ型プロコラーゲンＣ－プロテイナーゼ(Bone Morphogenetic Protein-1: The Type I Procollagen C-Proteinase.Science 1996、271:360-2.
Ausubelら、John Weley & Sons,Inc., １９９７, 分子生物学の最新プロトコル（Current Protocols in Molecular Biology）
Marshall,K.ら、２０００，第４６回年次総会，ＯＲＳ，論文No.919.
Kumar,S.ら、２０００，第４６回年次総会，ＯＲＳ，論文No.1031.
Marshall K.ら、２００２，第４８回年次総会，ＯＲＳ（提出済み）.
Migita K.ら、Biochem Biophys Res Commun １９９７, 239: 621-625.
Migita K.ら、Kidney Int １９９９, 55: 572-578.

【０５９６】

本願を通して引用されるすべての参考文献、特許、および特許出願（公開された特許出願を含む）の内容は、参照により本明細書に援用される。

【０５９７】

等価物

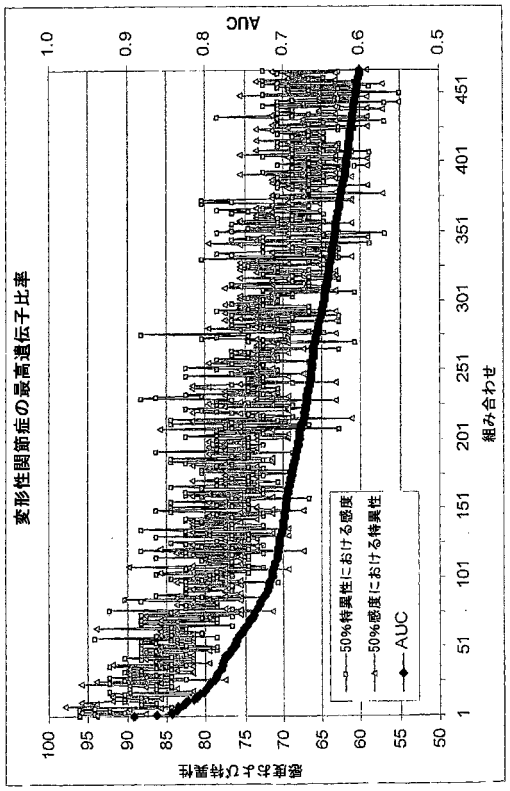
当業者は、本明細書に記載された本発明の特定の実施形態に対する多くの等価物を、日常的な実験を超えないものを使用して、認識、または確認する。このような等価物は添付の特許請求の範囲に含まれることが意図される。

【図面の簡単な説明】

【０５９８】

【図１】図１は、表４に列挙した遺伝子の比率の、全ての可能な組み合わせの分析の結果を示す。

【図１】




【配列表】

0005265923000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 ザン、 ホンウェイ
カナダ国 エム９ブイ １エル１ オンタリオ トロント アトウッド プレイス ３
(72)発明者 デンプシー、 アダム
カナダ国 エム２エヌ ７ジー７ オンタリオ トロント オリバー アベニュー ２６ スイート エルピーエイチ０７
(72)発明者 イェイガー、 トーマス
カナダ国 エル５エイチ ３ブイ４ オンタリオ ミッシソーガイ セーメル ドライブ １２６８
(72)発明者 チャオ、 サミュエル
カナダ国 エル４ケイ １ティ６ オンタリオ コンコード グレン シールズ アベニュー １１４

審査官 藤井 美穂

(56)参考文献 特表２００４－５３６５７５（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２００４／０２４８９２（WO，Ａ１）
国際公開第２００４／１１２５８９（WO，Ａ１）
国際公開第２００５／０１４７９５（WO，Ａ１）
米国特許出願公開第２００５／０２２１３８３（ＵＳ，Ａ１）
OsteoArthritis and Certilage，２００５年１０月，Vol.13，pp.861-871

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ １５／００ － １５／９０
Ｃ１２Ｑ １／００ － ３／００
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩ）
ＣＡＰＬＵＳ／ＢＩＯＳＩＳ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＷＰＩＤＳ（ＳＴＮ）

| | | | |
|---|---|---|---|
| 专利名称(译) | 轻度骨关节炎的生物标志物及其用途 | | |
| 公开(公告)号 | JP5265923B2 | 公开(公告)日 | 2013-08-14 |
| 申请号 | JP2007554258 | 申请日 | 2006-02-06 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 让新闻公司 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 让新闻公司 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 让新闻公司 | | |
| [标]发明人 | ルーチューンチン<br>ザンホンウェイ<br>デンプシーアダム<br>イェイガートーマス<br>チャオサミュエル | | |
| 发明人 | ルー、 チューン-チン<br>ザン、 ホンウェイ<br>デンプシー、 アダム<br>イェイガー、 トーマス<br>チャオ、 サミュエル | | |
| IPC分类号 | C12Q1/68 G01N33/53 C12N15/09 | | |
| CPC分类号 | C12Q1/6883 C12Q2600/136 C12Q2600/158 G01N2800/102 | | |
| FI分类号 | C12Q1/68.ZNA.A G01N33/53.M C12N15/00.A | | |
| 代理人(译) | 三好秀<br>伊藤雅一<br>原 裕子 | | |
| 审查员(译) | 藤井美穂 | | |
| 优先权 | 60/650685 2005-02-07 US | | |
| 其他公开文献 | JP2008532489A<br>JP2008532489A5 | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |


摘要(译)

本发明涉及与没有骨关节炎的个体相比在具有轻度骨关节炎的个体中差异表达的新型RNA生物标志物组合的鉴定和选择。本发明是一种通过测定特定RNA产物的水平来诊断或检测骨关节炎（OA）的方法，例如， IL13RA1的RNA产物，在测试中，例如，血液或软骨，样本。

表９．関節軟骨等級付けシステム

| 等級 | 関節軟骨 | 点数 |
|---|---|---|
| 0 | 正常 | 0 |
| I | 表面無傷－軟化、浮腫 | 1 |
| II | 表面－破壊－部分的な厚い病変<br>（骨までの伸長なし） | 2 |
| III | 十分に厚い病変－無傷の骨への伸長 | 3 |
| IV | 骨の浸食または象牙質化 | 4 |