

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-528581

(P2005-528581A)

(43) 公表日 平成17年9月22日(2005.9.22)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53 Z N A D	2 G O 4 5
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68 A	4 B O 6 3
GO 1 N 33/50	GO 1 N 33/50 P	
GO 1 N 33/543	GO 1 N 33/50 X	
GO 1 N 33/564	GO 1 N 33/543 5 4 5 A	

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 39 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-568028 (P2002-568028)	(71) 出願人	502300026 ストライカー コーポレイション アメリカ合衆国ミシガン州49003, カ ラマズー, フェアフィールド・ロード 2 725
(86) (22) 出願日	平成14年2月20日 (2002. 2. 20)	(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(85) 翻訳文提出日	平成15年8月20日 (2003. 8. 20)	(74) 代理人	100062409 弁理士 安村 高明
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/005551	(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(87) 国際公開番号	W02002/068962	(72) 発明者	チュビンスカヤ, スザンナ アメリカ合衆国 イリノイ 60061, バーノン ヒルズ, アナポリス ドラ イヴ 131
(87) 国際公開日	平成14年9月6日 (2002. 9. 6)		最終頁に続く
(31) 優先権主張番号	60/270, 528		
(32) 優先日	平成13年2月21日 (2001. 2. 21)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/348, 111		
(32) 優先日	平成13年11月9日 (2001. 11. 9)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 骨形態形成タンパク質を使用する、軟骨変性および老化の測定

(57) 【要約】

滑液または関節組織中の骨形成性タンパク質 - 1 (O P - 1) のタンパク質レベルおよび / または m R N A レベルを測定することによって、患者中の間接組織における軟骨変性または軟骨再生を決定するための方法が、提供される。本発明に従う方法は、炎症性関節疾患または加齢関連障害を含む患者中の関節組織変性および関節組織再生に対する素因を、検出、診断、予測、決定すること、ならびに炎症性関節疾患または加齢関連障害を含む患者中の関節組織変性および関節組織再生をモニタリングすることに有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

患者中の炎症性疾患の存在を決定する方法であって、該方法は、以下：

(a) 該患者由来の関節組織サンプル中に存在する OP - 1 タンパク質の量を決定する工程；および

(b) 該 OP - 1 タンパク質の量と予め決定された標準とを比較する工程、を包含し、

ここで、該サンプル中に存在する OP - 1 タンパク質の量と予め決定された標準との差異が、炎症性疾患の存在を示す、方法。

【請求項 2】

10

患者中の炎症性疾患の存在を決定する方法であって、該方法は、以下：

(a) 該患者由来の関節組織サンプル中に存在する OP - 1 mRNA の量を決定する工程；および

(b) 該 OP - 1 mRNA の量と予め決定された標準とを比較する工程、を包含し、

ここで、該サンプル中に存在する OP - 1 mRNA の量と予め決定された標準との差異が、炎症性疾患の存在を示す、方法。

【請求項 3】

患者中の炎症性疾患の臨床的重篤度を決定するための方法であって、該方法は、以下：

(a) 関節組織サンプル中に存在する OP - 1 タンパク質の量を決定する工程；および 20

(b) 該量に予め決定された統計学的な関係を適用する工程であって、該統計学的な関係は、該炎症性疾患を有する集団のメンバーから得られた関節組織サンプル中に存在する OP - 1 タンパク質の量の範囲を該疾患の臨床的重篤度と相関付ける、工程、を包含し、

これによって該患者中の該炎症性疾患の臨床的重篤度を決定する、方法。

【請求項 4】

患者中の炎症性疾患の臨床的重篤度を決定するための方法であって、該方法は、以下：

(a) 関節組織サンプル中に存在する OP - 1 mRNA の量を決定する工程；および

(b) 該量に予め決定された統計学的な関係を適用する工程であって、該統計学的な関係は、該炎症性疾患を有する集団のメンバーから得られた関節組織サンプル中に存在する OP - 1 mRNA の量の範囲を該疾患の臨床的重篤度と相関付ける、工程、を包含し、 30

これによって該患者中の該炎症性疾患の臨床的重篤度を決定する、方法。

【請求項 5】

前記関節組織サンプルが、軟骨、靭帯、半月板、腱、滑膜、滑液、および椎間円板組織からなる群より選択される組織を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

前記関節組織サンプルが、滑液を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

40

前記関節組織サンプル中に存在する OP - 1 タンパク質の量を決定する工程が、酵素結合イムノソルベント検定法 (ELISA) を実行する工程を包含する、請求項 1 または 3 に記載の方法。

【請求項 8】

前記炎症性疾患が、慢性関節リウマチ、エリテマトーデス、痛風、結合組織炎症候群、リウマチ性多発性筋痛、乾癬、細菌感染、ウイルス感染および真菌感染からなる群より選択される、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

患者中の加齢関連組織障害の存在を決定する方法であって、該方法は、以下：

(a) 該患者由来の関節組織サンプル中に存在する OP - 1 タンパク質の量を決定する 50

工程；および

(b) 該 O P - 1 タンパク質の量と予め決定された標準とを比較する工程、
を包含し、

ここで、該サンプル中に存在する O P - 1 タンパク質の量と予め決定された標準との差異が、加齢関連組織障害を示す、方法。

【請求項 10】

患者中の加齢関連組織障害の存在を決定する方法であって、該方法は、以下：

(a) 該患者由来の関節組織サンプル中に存在する O P - 1 m R N A の量を決定する工程；および

(b) 該 O P - 1 m R N A の量と予め決定された標準とを比較する工程、
を包含し、

10

ここで、該サンプル中に存在する O P - 1 m R N A の量と予め決定された標準との差異が、加齢関連組織障害を示す、方法。

【請求項 11】

患者中の加速した組織加齢または異常な組織加齢によって特徴付けられる障害の存在を決定するための方法であって、該方法は、以下：

(a) 該患者由来の関節組織サンプル中に存在する O P - 1 タンパク質の量を決定する工程；および

(b) 該 O P - 1 タンパク質の量と予め決定された標準とを比較する工程、
を包含し、

20

ここで、該サンプル中に存在する O P - 1 タンパク質の量と予め決定された標準との差異が、加速した組織加齢または異常な組織加齢によって特徴付けられる障害を示す、方法。

【請求項 12】

患者中の加速した組織加齢または異常な組織加齢によって特徴付けられる障害の存在を決定するための方法であって、該方法は、以下：

(a) 該患者由来の関節組織サンプル中に存在する O P - 1 m R N A の量を決定する工程；および

(b) 該 O P - 1 m R N A の量と予め決定された標準とを比較する工程、
を包含し、

30

ここで、該サンプル中に存在する O P - 1 m R N A の量と予め決定された標準との差異が、加速した組織加齢または異常な組織加齢によって特徴付けられる障害を示す、方法。

【請求項 13】

患者中の加齢関連組織障害の臨床的重篤度を決定するための方法であって、該方法は、以下：

(a) 関節組織サンプル中に存在する O P - 1 タンパク質の量を決定する工程；および

(b) 該量に予め決定された統計学的な関係を適用する工程であって、該統計学的な関係は、該加齢関連組織障害を有する集団のメンバーから得られた関節組織サンプル中に存在する O P - 1 タンパク質の量の範囲を該障害の臨床的重篤度と相関付ける、工程、
を包含し、

40

これによって該患者中の該加齢関連組織障害の臨床的重篤度を決定する、方法。

【請求項 14】

患者中の加齢関連組織障害の臨床的重篤度を決定するための方法であって、該方法は、以下：

(a) 関節組織サンプル中に存在する O P - 1 m R N A の量を決定する工程；および

(b) 該量に予め決定された統計学的な関係を適用する工程であって、該統計学的な関係は、該加齢関連組織障害を有する集団のメンバーから得られた関節組織サンプル中に存在する O P - 1 m R N A の量の範囲を該障害の臨床的重篤度と相関付ける、工程、
を包含し、

50

これによって該患者中の該加齢関連組織障害の臨床的重篤度を決定する、方法。

【請求項 15】

患者中の加速された組織加齢または異常な組織加齢によって特徴付けられる障害の臨床的重篤度を決定するための方法であって、該方法は、以下：

- (a) 関節組織サンプル中に存在する O P - 1 タンパク質の量を決定する工程；および
- (b) 該量に予め決定された統計学的な関係を適用する工程であって、該統計学的な関係は、該加齢関連組織障害を有する集団のメンバーから得られた関節組織サンプル中に存在する O P - 1 タンパク質の量の範囲を該障害の臨床的重篤度と相関付ける、工程、を包含し、

これによって該患者中の加速された組織加齢または異常な組織加齢によって特徴付けられる障害の臨床的重篤度を決定する、方法。 10

【請求項 16】

患者中の異常な組織加齢によって特徴付けられる障害の臨床的重篤度を決定するための方法であって、該方法は、以下：

- (a) 関節組織サンプル中に存在する O P - 1 m R N A の量を決定する工程；および
- (b) 該量に予め決定された統計学的な関係を適用する工程であって、該統計学的な関係は、該加齢関連組織障害を有する集団のメンバーから得られた関節組織サンプル中に存在する O P - 1 m R N A の量の範囲を該障害の臨床的重篤度と相関付ける、工程、を包含し、

これによって該患者中の異常な組織加齢によって特徴付けられる障害の臨床的重篤度を決定する、方法。 20

【請求項 17】

前記関節組織サンプルが、軟骨、靭帯、半月板、腱、滑膜、滑液、および椎間円板組織からなる群より選択される組織を含む、請求項 9 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 18】

前記関節組織サンプルが、滑液を含む、請求項 9 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 19】

前記関節組織中に存在する O P - 1 タンパク質の量を決定する工程が、酵素結合イムノソルベント検定法 (E L I S A) を実行する工程を包含する、請求項 9、11、13、または 15 のいずれか 1 項に記載の方法。 30

【請求項 20】

前記加齢関連組織障害が、暦年齢と無関係である、請求項 9、10、13 または 14 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 21】

前記加齢関連組織障害が、変形性関節症および骨粗鬆症からなる群より選択される疾患を示す、請求項 9、10、13 または 14 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 22】

前記異常な組織加齢によって特徴付けられる障害が、変性障害である、請求項 11、12、15 または 16 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 23】

前記予め決定された標準が、年齢に相関する標準である、請求項 9、10、11、または 12 のいずれか 1 項に記載の方法。 40

【請求項 24】

患者中の自己免疫疾患の存在を決定する方法であって、該方法は、以下：

- (a) 該患者由来の関節組織サンプル中に存在する O P - 1 タンパク質の量を決定する工程；および
- (b) 該 O P - 1 タンパク質の量と予め決定された標準とを比較する工程、を包含し、

ここで、該サンプル中に存在する O P - 1 タンパク質の量と予め決定された標準との差異が、自己免疫疾患の存在を示す、方法。 50

【請求項 25】

患者中の自己免疫疾患の存在を決定する方法であって、該方法は、以下：

(a) 該患者由来の関節組織サンプル中に存在する OP - 1 mRNA の量を決定する工程；および

(b) 該 OP - 1 mRNA の量と予め決定された標準とを比較する工程、を包含し、

ここで、該サンプル中に存在する OP - 1 mRNA の量と予め決定された標準との差異が、自己免疫疾患の存在を示す、方法。

【請求項 26】

患者中の自己免疫疾患の臨床的重篤度を決定するための方法であって、該方法は、以下： 10

(a) 関節組織サンプル中に存在する OP - 1 タンパク質の量を決定する工程；および

(b) 該量に予め決定された統計学的な関係を適用する工程であって、該統計学的な関係は、該自己免疫疾患を有する集団のメンバーから得られた関節組織サンプル中に存在する OP - 1 タンパク質の量の範囲を該疾患の臨床的重篤度と相関付ける、工程、を包含し、

これによって該患者中の該自己免疫疾患の臨床的重篤度を決定する、方法。

【請求項 27】

患者中の自己免疫疾患の臨床的重篤度を決定するための方法であって、該方法は、以下：

(a) 関節組織サンプル中に存在する OP - 1 mRNA の量を決定する工程；および 20

(b) 該量に予め決定された統計学的な関係を適用する工程であって、該統計学的な関係は、該自己免疫疾患を有する集団のメンバーから得られた関節組織サンプル中に存在する OP - 1 mRNA の量の範囲を該疾患の臨床的重篤度と相関付ける、工程、を包含し、

これによって該患者中の該自己免疫疾患の臨床的重篤度を決定する、方法。

【請求項 28】

前記自己免疫疾患が、関節組織中の組織形態学的変化と関連する、請求項 24 ~ 27 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 29】

前記関節組織サンプルが、軟骨、靭帯、半月板、腱、滑膜、滑液、および椎間円板組織からなる群より選択される組織を含む、請求項 24 ~ 27 のいずれか 1 項に記載の方法。 30

【請求項 30】

前記関節組織サンプルが、滑液を含む、請求項 24 ~ 27 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 31】

前記関節組織サンプル中に存在する OP - 1 タンパク質の量を決定する工程が、酵素結合イムノソルベント検定法 (ELISA) を実行する工程を包含する、請求項 24 または 26 に記載の方法。

【請求項 32】

前記自己免疫疾患が、慢性関節リウマチ、エリテマトーデスおよび非炎症性単関節炎、および乾癬からなる群より選択される、請求項 24 ~ 27 のいずれか 1 項に記載の方法。 40

【請求項 33】

前記予め決定された標準が、平均値を含む、請求項 1、2、9、10、11、12、24、または 25 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 34】

前記予め決定された標準が、加齢調整標準である、請求項 1、2、9、10、11、12、24、または 25 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 35】

患者中で軟骨分解または軟骨変性を生じる疾患についての素因を決定する方法であって、該方法は、以下：

(a) 該患者由来の関節組織サンプル中に存在する OP - 1 タンパク質の量を決定する 50

工程；および

(b) 該 O P - 1 タンパク質の量と予め決定された標準とを比較する工程、
を包含し、

ここで、該サンプル中に存在する O P - 1 タンパク質の量と予め決定された標準との差異が、炎症性疾患、患者中の異常な組織加齢によって特徴付けられる障害、自己免疫疾患、関節変性疾患、および/または関節の外傷誘導性疾患についての素因を示す、方法。

【請求項 36】

患者の関節領域の臨床状態を決定する方法であって、該方法は、以下：

(a) 患者の関節領域から得られた組織サンプル中に存在する O P - 1 タンパク質の量を決定する工程；および

(b) 該量と予め決定された標準とを比較し、それによって該量の該標準での偏差を示す値を決定する、工程、
を包含し、

ここで、該値は、該関節領域の臨床状態を示す、方法。

【請求項 37】

前記予め決定された標準は、前記患者の年齢と関連付けられ、臨床的に正常な関節領域中に存在することが予想される O P - 1 タンパク質の量を示す、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 38】

前記予め決定された標準は、ある範囲の値を含む、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 39】

患者の関節領域内での再生活性または変性活性をモニタリングする方法であって、該方法は、以下：

該患者の関節領域から得られた少なくとも 1 つの組織サンプル中に存在する O P - 1 タンパク質の相対量を決定し、ここで、該少なくとも 1 つの組織サンプルは、O P - 1 タンパク質量が既に決定された最初の最も早い組織サンプルよりも後の時点のものに対応する、工程

を包含し、

ここで、該後期組織サンプル中に存在する O P - 1 タンパク質量における増加は、該関節領域における再生活性の発症もしくは再生活性の増加を示し、一方、該後期組織サンプル中に存在する O P - 1 タンパク質量における低下は、該関節領域における再生活性の停止もしくは再生活性の低下を示す、方法。

【請求項 40】

患者の関節領域の臨床状態を決定する方法であって、該方法は、以下：

(a) 患者の関節領域から得られた組織サンプル中に存在する O P - 1 タンパク質の量を決定する工程；および

(b) 該量、臨床的に正常な関節領域に存在することが予想される O P - 1 タンパク質の量を示す予め決定された標準とを比較する工程、
を包含し、

ここで、該標準に対してほぼ等しい工程 (a) において決定した量は、該患者の該関節領域の正常な臨床状態を示し、そして該標準とあまり等しくない量は、該患者の該関節領域の異常な臨床状態を示す、方法。

【請求項 41】

患者における抗炎症薬剤の有効量を決定するための方法であって、該方法は、以下：

(a) ある用量の抗炎症薬剤が先に投与された被験体から、組織サンプル、体液サンプル、または細胞サンプルを得る工程；

(b) 該サンプル中の O P - 1 タンパク質濃度または O P - 1 m R N A 濃度を決定する工程；

(c) その発現が炎症によって変化していない第 2 の遺伝子によってコードされるタンパク質または m R N A の濃度を該同じサンプル中で決定する工程；および

(d) 該 O P - 1 タンパク質濃度または該 O P - 1 m R N A 濃度を、該第 2 の遺伝子

10

20

30

40

50

のタンパク質濃度または該第2の遺伝子のmRNA濃度と比較する工程であって、ここで、該OP-1タンパク質濃度または該OP-1 mRNA濃度と、該第2の遺伝子のタンパク質濃度または該第2の遺伝子のmRNA濃度との間の差異は、該患者における該抗炎症薬剤の有効量を示す、工程、
を包含する、方法。

【請求項42】

抗炎症薬剤に応答する患者の能力を決定するための方法であって、該方法は、以下：

(a) ある用量の抗炎症薬剤が先に投与された被験体から、組織サンプル、体液サンプル、または細胞サンプルを得る工程；

(b) 該サンプル中のOP-1タンパク質濃度またはOP-1 mRNA濃度を決定する工程； 10

(c) その発現が炎症によって変化していない第2の遺伝子によってコードされるタンパク質またはmRNAの濃度を該同じサンプル中で決定する工程；および

(d) 該OP-1タンパク質濃度または該OP-1 mRNA濃度を、該第2の遺伝子のタンパク質濃度または該第2の遺伝子のmRNA濃度と比較して、比率を作製する工程であって、ここで、該比率が、未処理の被験体もしくは非応答性の被験体について予め決定されたコントロール比率よりも高いか、または該被験体が応答性であることが以前に決定されていた場合は、該被験体について以前の比率と類似する場合、該被験体は、抗炎症薬剤に応答性である、工程、
を包含する、方法。 20

【請求項43】

該炎症性疾患が、慢性関節リウマチである、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項44】

前記加齢関連組織障害が、変形性関節症である、請求項9、10、13、または14のいずれか1項に記載の方法。

【請求項45】

前記自己免疫性疾患が、慢性関節リウマチである、請求項24～27のいずれか1項に記載の方法。

【請求項46】

関節組織の変質を決定する方法であって、該変質は、疾患または加齢に関連する変質を含み、該方法は、以下： 30

(a) OP-1に関連するタンパク質またはOP-1に関連するタンパク質をコードするmRNAの量を、関節組織サンプル中で決定する工程；および

(b) 該タンパク質の量または該mRNAの量を、予め決定された標準と比較する工程、
を包含し、

ここで、該サンプル中の該タンパク質量または該mRNA量と、予め決定された標準との差異は、関節組織の変質を示す、方法。

【請求項47】

関節組織の加齢を決定する方法であって、該加齢は、疾患に早熟の加齢を含み、該方法は、以下： 40

(a) OP-1に関連する骨形態形成タンパク質の量またはOP-1に関連するタンパク質をコードするmRNAの量を、関節組織サンプル中で決定する工程；および

(b) 該タンパク質の量または該mRNAの量を、予め決定された標準と比較する工程、
を包含し、

ここで、該サンプル中の該タンパク質量または該mRNA量と、予め決定された標準との差異は、関節組織の加齢を示す、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、一般に、組織完全性または劣化の生体マーカーとしてのOP-1および他の骨形態形成タンパク質の使用に関連し、そして、より具体的には、炎症性疾患および加齢に関連する軟骨変性の診断および/またはモニターリングを行うための方法に関する。

【0002】

(関連出願)

本願は、USSN 60/348,111(2001年11月9日出願)およびUSSN 60/270,528(2001年2月21日出願)(これらの内容は、本明細書中で、参考として援用される)に関連し、そしてこの利益を主張する。

【背景技術】

10

【0003】

(発明の背景)

多数の因子は、外傷および炎症性疾患を含む、哺乳動物における軟骨変性を生じ得るか、または、それに寄与し得る。炎症性応答の影響から生じる細胞に対する損傷は、減少した軟骨機能または関節の疾患(例えば、慢性関節リウマチ(RA)および変形性関節症(OA))における軟骨機能の消失の原因として関連付けられている。さらに、自己免疫疾患(例えば、全身性エリテマトーデス(systemic lupus erythematosis: SLE)および強皮症)はまた、結合組織の分解によって特徴付けられ得る。いくつかの軟骨変性疾患(例えば、変形性関節症(OA))の場合、関節性軟骨の通常の老化を、病的な状態のOA過程へと変える機構は、現在未だに知られていない。

20

【0004】

OAは、主に老齢期の人を襲う消耗性関節疾患である。OAは、若年成人においては、稀であり、40歳代後半および50歳代までの成人において症状およびX線像によってみたとときに、発症し始めており、次いで、60歳代~70歳代で有病率において急激に上昇する(Hammerman(1993)J. Am. Geriatr. Soc. 41:760)。しかし、概して、任意の生物学的な組織または器官は加齢するに従い、機能は次第に低下し、そして、疾患および損傷に対する罹病性は増大する(Buckwalterら(1993)JBJS 75-A:1533)。組織生合成における加齢関連の変化としては、以下が挙げられる:1)II型コラーゲン変性の増加(Hollanderら(1995)J. Clin. Invest. 96(6):2859);2)DNA(Ribaultら(1998)Mechan. Ageing & Devel. 100(1):25)、プロテオグリカン、および結合タンパク質(DeGrootら(1999)Arthrit. Rheum. 42(5):1003;Iqbalら(2000)Biochem. Biophys. Res. Commun. 274(2):467;Verbruggenら(2000)Osteoarthr. Cartil. 8(3):170;Boltonら(1999)Biochem. J. 337(Pt 1):77)の合成の低下;3)コンドロイチンサルフェートの硫酸化の増大(Brownら(1998)Am. J. Vet. Res. 59(6):786);4)ヒアルロン酸(Plattら(1998)Equine Vet. J. 30(1):43)および軟骨中間層タンパク質(Lorenzら(1998)J. Biol. Chem. 273(36):23463)の蓄積;5)

30

40

【0005】

重要なことに、加齢とともに、異なる増殖因子(例えば、トランスフォーミング増殖因子

50

(TGF -) (Iqbalら2000 ; Guemera (1995) Arthrit . Rheum . 38 (7) : 960)、インスリン様増殖因子 - 1 (IGF - 1) (Messaiら (2000) Mechan . Ageing & Devel . 115 (12) : 21)、上皮増殖因子 (EGF) (Ribaultら1998)、骨形成タンパク質 - 1 (OP - 1) (Flechtenmacherら (1996) Arthrit . Rheum . 39 : 1896)) などに対する関節軟骨の対応性がまた、変更され得る。

【 0006 】

加齢に伴って見られるかまたは、炎症性疾患に起因する、関節軟骨変性の根底にある原因は、これまで同定されてこなかったが、増殖因子 (特に、軟骨において内因的に発現される増殖因子) およびサイトカインが重要な介在的役割を担っていることの証拠がますます存在する。例えば、増殖因子の骨形態形成タンパク質 (BMP) ファミリーは、特定の変性過程をまた阻害し得る基質産生の重要な調節因子である。BMPは、もともと、皮下移植において異所性軟骨内骨形成を誘導し得るタンパク質として同定された (Uristら (1979) Proc . Natl . Acad . Sci . USA 76 : 1828 ; SampathおよびReddi (1981) Proc . Natl . Acad . Sci . USA 78 : 7599)。その後の分子クローニングによって、BMPファミリーは、TGF - スーパーファミリーに属する多数の関連分子からなることが明らかになった。BMPは、骨基質においてははじめに見出されたが、現在では、これらは、種々の組織において発現されることが明らかである。

【 0007 】

骨形成タンパク質 1 (OP - 1) は、BMPファミリーの7番目のメンバー (BMP - 7) である。これは、成熟タンパク質の約3倍である、分子量の大きい前駆体として合成され、そして、最終的には、C末端領域でタンパク質分解的にプロセシングされ、成熟ジスルフィド結合ダイマーを産生する。OP - 1は、BMP - 6およびBMP - 5に最も近く関連しており (それぞれ、88% 相同性および87% 相同性)、そして、より低い程度で、BMP - 2およびBMP - 4に関連しており (それぞれ、60% 相同性および58% 相同性)、そして、BMP - 3 (42% 相同性) およびTGF - (約30% 相同性) に対して幾分、相同性である (CookおよびRueger (1996) Clin . Orthoped . Rel . Res . 324 : 29 ; SampathおよびRueger (1994) Complicat . Orthoped . Winter : 101)。もともとは、OP - 1は、ウシの鉱物質除去骨から精製され (Sampathら (1990) J . Biol . Chem . 265 (22) : 13198)、その後、その組換え形態は、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞中で、ヒトcDNAライブラリーからクローニングされた (Ozkaynakら (1990) EMBO J . 9 : 2085)。

【 0008 】

軟骨形成および骨形成についてのBMPのおおきな重要性は、トランスジェニックアプローチを使用して実証された : いくつかのBMP遺伝子の欠損は、骨格異常を引き起こし、そして最終的には、マウス胚の死亡に至る (Dudleyら (1995) Genes Dev . 9 : 2795 ; Luoら (1995) Genes Dev . 9 : 2808)。近年の研究は、ヒトおよびウシの軟骨の恒常性および修復における外因性OP - 1の潜在的な役割に焦点がおかれている (Flechtenmacherら1996 ; Huchら (1997) Arthrit . Rheum . 40 : 2157 ; Koepplら (1999) Inflamm . Res . 47 : 1 ; Nishidaら (2000) Arthrit . Rheum . 43 : 206)。これらの研究によって、ヒト組換えOP - 1 (rhOP - 1) が、関節軟骨において有意な同化応答を引き起こすことが示された。これは、軟骨細胞表現型の連続した発現を伴う異なる年齢のヒト軟骨における主要な基質成分であるアグリカン (aggrecan) およびII型コラーゲンの合成を誘導する (Flechtenmacherら1996 ; Huchら1997)。さらに、OP - 1は、ヒアルロン酸、そのレセプターCD44およびヒアルロン酸シンダーゼ - 2の合成を誘導し、細胞外マトリックスの形成および保持を促進し (Nishidaら 2000)、異化事象 (例えば、

インターロイキン-1 (IL-1)、フィブロネクチン (FN-f) およびコラーゲンフラグメント誘導性軟骨分解) を妨げることが示されている (Huchら, 1997; Koepplら, 1999; Jenningsら (2001) Connect. Tiss. Res. 42 (1): 71-86)。FN-f でチャレンジした軟骨におけるOP-1の効果が、TGF- β の効果と比較されたとき、TGF- β は、FN-f 媒介性プロテオグリカン (PG) 消耗を遮断するだけでなく、それ自体で軟骨PG含有量の低下を促進することが見出された (Koepplら, 1999)。重要なことに、rhOP-1は、ヒトおよびウシの成体関節軟骨細胞における軟骨の増殖および分化に至らなかった (Flecht enmacherら, 1996 Chenら (1993)ら Biochem. Biophys. Res. Commun. 197; 1253)。

10

【0009】

近年、ヒト成体関節軟骨細胞において、OP-1が内因的に発現されることが実証された (Chubinskayaら (2000) J. Histochem. Cytochem. 48 (2): 239)。さらに、ヒトの関節軟骨において、OP-1は以下の2形態で存在する: プロセシングを受けていない、プロ形態およびプロセシングを受けた、成熟形態。成熟OP-1は、主に軟骨の表層に免疫局所化 (immunolocalized) しているが、プロOP-1は、深い層で検出された。関節軟骨細胞によるOP-1の内因性発現は、関節軟骨が修復能を有していることを示し、そして組織保護および組織再生におけるこのBMPの独特の役割を示唆し得る。これは、マウスにおけるOP-1の過剰発現が、基質の高分子である、II型コラーゲンおよびPGの増大した合成に至ることを実証する近年のデータによって支持される (Hidakaら (2000) Trans. ORS 46: 41)。

20

【0010】

RAについての診断アッセイとしては、リウマチ様因子の検出に基づくRoseの方法、Hellerによる改変Rose法、RAHA試験、およびRA試験が挙げられる。しかし、これらの方法は、血液リウマチ様因子が、RAを有する患者に特異的ではないという点で、不利益を保持する。このような方法に基づくリウマチ様因子アッセイキットはまた乏しい精度および再現性を有する。

【0011】

赤血球の沈降速度 (ESR) またはC反応性タンパク質 (CRP) についてのアッセイは、RAのような炎症性疾患の活性を決定するのに有用であるが、これらの診断において使用するには適切ではない。抗核抗体およびLE細胞の検出を使用して、RAを検出し得るが、これらの方法がRAについて特異的でなく、そしてこのような抗体または細胞が、他のコラーゲン性疾患において、頻りに検出され得るので、正確にRAを診断することは困難である。さらに、これらの方法は、RAに関連する軟骨変性を特異的に検出しない。

30

【0012】

したがって、後天性の、軟骨分解および軟骨崩壊の存在、または素因を特異的かつ再現性をもって検出するために使用され得る生体マーカーに対する必要性が存在する。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

40

【0013】

(発明の要旨)

本発明は、一般的に、生体マーカーとして、骨形態形成タンパク質 (例えば、OP-1) を使用する、組織完全性を決定するための方法に関連する。具体的には、本発明は、患者の組織サンプル中のOP-1タンパク質および/またはOP-1 mRNAのレベルを測定することによって、患者における軟骨のような組織の健康または不健康 (例えば、変性、劣化または再生) を決定するための方法に関する。特に、本発明は、OP-1が炎症関連、自己免疫、および加齢関連の組織変化 (例えば、軟骨の劣化) についての生体マーカーであるという発見に基づく。

【0014】

50

1つの局面において、本発明は、炎症に起因する患者における軟骨変性を、検出するか、診断するか、それについての素因を決定するか、または、モニターリングするための方法に関する。1つの実施形態において、本発明は、患者の関節組織サンプル中に存在する、OP-1タンパク質および/またはOP-1 mRNAの量を決定し、そして、この量を予め決定した基準に対して比較することによって、患者における炎症性疾患の存在を決定する方法を提供する。この予め決定した基準は、ある範囲のOP-1タンパク質および/またはOP-1 mRNAの濃度値を含み得、かつ年齢により調節された基準であり得る。サンプル中の、OP-1タンパク質またはOP-1 mRNAレベルと、予め決定されたOP-1タンパク質またはOP-1 mRNAの基準との差異は、炎症性疾患の存在（または非存在）を示し得る。試験される関節組織サンプルは、例えば、軟骨、靭帯、関節間軟骨、腱、滑膜、滑液、または椎間円板組織であり得る。OP-1タンパク質は、好ましくは、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）を使用して測定され得る。OP-1 mRNAは、好ましくは、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）を使用して、測定され得る。好ましい実施形態において、本発明に従う方法を使用して、例えば、以下のような炎症性疾患の存在を決定する：自己免疫疾患（例えば、慢性関節リウマチ、エリテマトーデスおよび非炎症性関節炎（monoarthritis）、痛風、結合組織炎、およびリウマチ性多発性筋痛。1つの実施形態において、疾患は、関節組織における組織形態学的な変化に関連する。関節組織における組織形態学的変化は、変性疾患、自己免疫疾患、炎症性結合組織疾患、または外傷誘導性疾患を示し得る。関節組織における組織形態学的変化はまた、関節における再生過程および修復過程を示し得る。

10

20

【0015】

別の実施形態において、本発明は、関節サンプル中に存在するOP-1タンパク質および/またはOP-1 mRNAの量を決定し、そして、この量を予め決定された統計的な関係と比較することによって、患者における炎症性疾患の臨床的重篤度を決定する方法を提供する。予め決定された統計関係は、異なる臨床的重篤度の炎症性疾患を有する集団のメンバーから取得した、OP-1タンパク質および/またはOP-1 mRNAのレベルの比較に基づく。OP-1タンパク質および/またはOP-1 mRNAによって測定されるような疾患の重篤度は、臨床的な知見と相関しても、相関しなくともよく、すなわち、例えば、患者は、正常であるように見える得るが、変更されたOP-1タンパク質および/またはmRNAのレベルを表し得、これによって、炎症性疾患の存在または素因を示す。同様に、加齢関連性疾患の存在または素因も決定され得る。

30

【0016】

別の実施形態において、本発明は、患者の関節組織サンプル中に存在する、OP-1タンパク質および/またはOP-1 mRNAの量を決定し、この量を予め決定された基準と比較することによって、患者における炎症性（例えば、自己免疫性）疾患についての素因を決定する方法を提供する。予め決定された基準は、ある範囲のOP-1タンパク質および/またはOP-1 mRNAの濃度値が含み得、かつ年齢より調節された基準であり得る。サンプルにおけるOP-1タンパク質および/またはOP-1 mRNAのレベルと、予め決定された基準との差異は、炎症性（例えば、自己免疫性）疾患の発症についての素因を示す。

40

【0017】

別の局面において、本発明は、加齢関連組織障害または加速されたか、または異常な組織の老化によって特徴付けられる障害に起因する患者における軟骨変性を、検出するか、診断するか、それについての素因を決定するか、または、モニターリングするための方法に関する。1つの実施形態において、本発明は、関節組織サンプル中に存在する、OP-1タンパク質および/またはOP-1 mRNAの量を決定し、し、そして、この量を予め決定した基準に対して比較することによって、患者における加齢関連組織障害または加速されたか、または異常な組織の老化によって特徴付けられる障害の存在を決定する方法を提供する。サンプル中の、OP-1タンパク質および/またはOP-1 mRNAレベルと予め決定された基準との差異は、加齢関連障害または異常な組織老化によって特徴付け

50

られる障害の存在を示す。試験された関節組織サンプルは、例えば、軟骨、靭帯、関節間軟骨、腱、滑膜、滑液、または椎間円板組織であり得る。OP-1タンパク質は、好ましくは、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)を使用して測定され得る。OP-1 mRNAは、好ましくは、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)を使用して、測定される。好ましい実施形態において、本発明に従う方法を使用して、例えば、骨粗しょう症または変形性関節炎のような炎症性疾患の存在を決定する。1つの実施形態において、加齢関連組織障害は、暦年齢とは独立している。別の実施形態において、予め決定された基準は、年齢に相関する。

【0018】

別の実施形態において、本発明は、関節組織サンプル中に存在する、OP-1タンパク質および/またはOP-1 mRNAの量を決定し、そしてこの量を予め決定された統計的関係と比較することによって、加齢関連性組織障害または加速されたか、または異常である組織老化によって特徴付けられる障害の臨床的重篤度を決定する方法を提供する。予め決定された統計的関係は、加齢関連性組織障害または異常組織老化によって特徴付けられる障害の異なる臨床的重篤度を有する集団のメンバーから取得されたOP-1タンパク質および/またはOP-1 mRNAのレベルの比較に基づく。

10

【0019】

別の実施形態では、本発明は、以下により、患者における、加齢性組織障害、加速された組織加齢もしくは異常な組織加齢により特徴付けられる障害、炎症性疾患、自己免疫疾患、関節変性疾患、または関節損傷誘発性疾患についての素因を決定する方法を提供する：関節組織サンプル中存在するOP-1タンパク質および/またはOP-1 mRNAの量を決定し、そして予め決定された標準に対して、この量を比較する。この予め決定された標準は、ある範囲の値を含み得、かつ/または、加齢調整標準であり得る。サンプルにおけるOP-1タンパク質レベルおよび/またはOP-1 mRNAレベルと、予め決定された標準におけるOP-1タンパク質レベルおよび/またはOP-1 mRNAレベルとの差異は、加齢性組織障害、または異常な組織加齢により特徴付けられる障害についての素因を示す。

20

【0020】

別の局面では、本発明は、以下により、患者における、関節領域の臨床的状态または疾患状態を決定する方法を提供する：関節領域由来の患者組織サンプル中存在する、OP-1タンパク質および/またはOP-1 mRNAの量を決定し、そして予め決定された標準に対して、この量を比較する。この予め決定された標準は、ある範囲のOP-1タンパク質および/もしくはOP-1 mRNAの濃度値を含み得、かつ/または、年齢で調整した標準であり得る。サンプルにおけるOP-1タンパク質レベルおよび/またはOP-1 mRNAレベルは、予め決定された標準におけるOP-1タンパク質および/またはOP-1 mRNAの量と比較されて、標準に対する患者レベルの偏差を示す値を決定する。この値は、患者の関節領域の臨床的状态を示す。ある実施形態では、予め決定された標準は、患者の年齢と関連し、そして臨床的に正常な関節領域に存在することが予想されるOP-1タンパク質および/またはOP-1 mRNAの量を表す。別の実施形態では、予め決定された標準は、ある範囲の値を有する。

30

40

【0021】

別の実施形態では、本発明は、以下により、患者の関節領域内の変性活性または再生活性をモニタリングする方法を提供する：特定の時点で、患者の関節領域から得られた組織サンプル中のOP-1タンパク質レベルおよび/またはOP-1 mRNAレベルを決定し、第2のより遅い時点で、患者の関節領域から得られた組織サンプル中に存在するOP-1タンパク質および/またはOP-1 mRNAの量を決定し、そして第2の時点でのOP-1タンパク質レベルおよび/またはOP-1 mRNAレベルを、第1の時点のレベルと比較する。存在するOP-1タンパク質および/またはOP-1 mRNAの量の増加は、関節領域における再生活性の発生もしくは増加を示し、そして関節領域に存在するOP-1タンパク質および/またはOP-1 mRNAの量の減少は、関節領域におけ

50

る再生活性の休止または低下を示す。

【0022】

別の実施形態では、本発明は、以下により、患者の関節領域の臨床的状态を決定する方法を提供する：患者の関節領域から得られた組織サンプル中に存在するOP-1タンパク質および/またはOP-1 mRNAの量を決定し、そして、この量を、臨床的に正常な関節領域に存在すると予想されるOP-1タンパク質レベルおよび/またはOP-1 mRNAレベルを示す予め決定された標準と比較する。標準に対してほぼ等しい組織サンプル中に存在するOP-1タンパク質および/またはmRNAの量は、関節領域の正常な臨床的状态を示し、そして標準に対してあまり等しくない量は、この患者の関節領域の異常な臨床的状态を示す。

10

【0023】

別の局面では、本発明は、以下により、被験体における抗炎症剤の有効量を決定するための方法を提供する：被験体にある用量の抗炎症剤を投与し、被験体から組織サンプル、体液サンプルまたは細胞サンプルを獲得し、このサンプルにおけるOP-1タンパク質濃度またはOP-1 mRNA濃度を決定し、第2の遺伝子（その発現は、炎症により変更されない）によりコードされるタンパク質またはmRNAの濃度を決定し；そして、OP-1タンパク質濃度またはOP-1 mRNA濃度を、第2の遺伝子のOP-1タンパク質濃度またはOP-1 mRNA濃度と比較し、ここで、OP-1タンパク質濃度またはmRNA濃度と、第2の遺伝子のタンパク質濃度またはRNA濃度との間の差異は、OP-1タンパク質濃度またはmRNA濃度の有効な増加または減少（従って、患者における抗炎症剤用量の有効性）を示す。

20

【0024】

別の実施形態では、本発明は、以下により、抗炎症剤に応答する患者の能力を決定するための方法を提供する：被験体にある用量の抗炎症剤を投与し、ある用量の抗炎症剤が以前に投与された被験体から組織サンプル、体液サンプルまたは細胞サンプルを獲得し、このサンプルにおける、OP-1タンパク質濃度またはOP-1 mRNA濃度を決定し、この同じサンプルにおける、第2の遺伝子（その発現は、炎症により変更されない）によりコードされるタンパク質またはmRNAの濃度を決定し、そして、OP-1タンパク質濃度またはOP-1 mRNA濃度を、第2の遺伝子のOP-1タンパク質濃度またはOP-1 mRNA濃度と比較して、割合を決め、ここで、被験体は、この割合が、未処置の被験体または非応答性の被験体についての予め決定されたコントロールの割合よりも高い場合か、あるいは、被験体が以前に応答性であると決定されていた時には、被験体についての以前の割合に類似する場合、抗炎症剤に応答性である。

30

【0025】

（発明の詳細な説明）

本発明は、正常な加齢の結果としておよび炎症に応答して、OP-1タンパク質レベルおよびOP-1 mRNAレベルが低下するという発見に基づく。軟骨におけるOP-1タンパク質レベルおよびOP-1 mRNAレベルは、観察可能な軟骨分解の存在に関わらず、患者の年齢の増加と共に減少する。さらに、OP-1タンパク質レベルおよびmRNAレベルは、炎症した組織（例えば、炎症した関節組織（例えば、軟骨組織））において低下する。類似の結果は、滑液が試験される場合に得られる。

40

【0026】

本発明は、軟骨または滑液における例示的骨形態形成タンパク質（OP-1）、またはそのmRNAの濃度が、正常な加齢において、および炎症した組織（例えば、関節組織）の周りで減少されるという発見に基づく。2つの方法（サンドイッチELISAおよびウェスタンブロット）を、これらのサンプルにおける内因性OP-1タンパク質のレベルの定量に適用した。しかし、タンパク質の定量について任意の方法が用いられ得る。軟骨組織を凍結乾燥し、そしてOP-1タンパク質を抽出した。ヒト組換え成熟OP-1ならびにモノクローナルOP-1抗体およびポリクローナルOP-1抗体をELISAに用い、そして結果を、組織サンプルの乾燥重量に対して正規化した。同じ抗体を、ウェスタンブ

50

ロット分析に用いた。特定の免疫反応性のバンドの濃度測定を、Fluor-S Multi Imagerを用いて分析した。ウェスタンブロットの結果を、総タンパク質含有量に対して正規化した。

【0027】

OP-1 mRNA発現を、結合組織または滑液由来の総RNAに対する慣用的なネストRT-PCRを用いて測定した；しかし、OP-1 mRNAを定量化するための任意の方法が用いられ得、そして多数の組織のいずれか（例えば、罹患した位置（例えば、炎症している、そして/または軟骨が損傷している、膝関節、肘関節、または中手指節関節のような、整形外科的部位）に曝露されている結合組織）が、試験され得る。RT-PCRバンドの濃度を、Fluor-S Multi Imagerおよび添付のソフトウェアプログラムを用いて評価し、そしてコントロールGADPH mRNAバンドの濃度に対して正規化した；しかし、OP-1 mRNAの値は、任意のmRNAのRT-PCR産物に対して正規化され得、炎症または年齢により、その濃度は変化されない（すなわち、上方制御も下方制御もされない）。多数のPCR産物のいずれかは、OP-1 mRNAまたは正規化のコントロールとして用いられる第2の遺伝子のmRNAを増幅し得る、異なるPCRプライマーを用いて生成され得る。

【0028】

好ましい実施形態では、RNAレベルは、RNAの逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）によるRNAの増幅によって定量される。この反応産物は、例えば、ゲル電気泳動（例えば、スラブまたはキャピラリー）によって、分解/定量され得るか、あるいは非増幅RNAは、走査レーザー、ノーザンブロット分析によってか、または、プローブとの直接ハイブリダイゼーションによって、定量され得る。あるいは、RNAレベルは、インサイチュ検出により定量される。本発明の実施形態では、OP-1 mRNAに特異的にハイブリダイズし得るプローブは、固相支持体（例えば、「チップ」または「DNAプローブアレイ」）に付着される。オリゴヌクレオチドは、リソグラフィを含む種々のプロセスにより、固体支持体に結合され得る。例えば、チップは、約250,000個のオリゴヌクレオチドまでを保持し得る。次いで、この固相支持体は、試験核酸と接触され、そして特定のプローブに対するハイブリダイゼーションが検出される。従って、多数のサンプル（例えば、同じ個体由来の異なる組織または異なる個体由来のサンプル）の定量は、単一のハイブリダイゼーション実験で実施され得る。

【0029】

診断的タンパク質またはmRNA手順はまた、生検サンプルの一部においてOP-1タンパク質および/またはmRNAならびにコントロールタンパク質および/またはRNA（例えば、GADPH）の相対強度を観察することにより、生検または切除から得られた組織の切片（固定または凍結された）に対してインサイチュで直接実施され得、その結果、タンパク質または核酸の精製の必要がない。核酸試薬または抗体は、このようなインサイチュ手順のためのプローブおよび/またはプライマーとして用いられ得る。

【0030】

RNAは、器官、体液、または有核細胞を含む、任意の組織から定量され得る。例えば、組織は、好ましくは、軟骨であり、そして体液は、好ましくは、滑液または血液である。組織が得られ、そして、好ましくは、安定化溶液中に保存されるか、または分析の前に、凍結保存されて、mRNAおよびタンパク質の分解を最小にする。ある実施形態では、組織は、例えば、膝、肘、肩、股関節部、大腿、頸部、椎骨、中手指節関節、指、手首または足根関節の組織のような、関節（すなわち、関節組織または関節領域）に由来する。

【0031】

本明細書中で意図されるように、組織は、それ自体、炎症し得るか、あるいは、炎症した組織に隣接する場合、または炎症した組織に生理学的に関連する場合、さもなければ、炎症した組織または炎症した解剖学的構造と接触される場合、体液が炎症したとみなされる。炎症は、数例を挙げると、潮紅（redness）、腫脹、熱、および/または疼痛、ならびに/あるいは傷害または損傷の部位への血漿の溢出および白血球の浸潤により類

10

20

30

40

50

型化される。この炎症または炎症性疾患は、任意の傷害または損傷により生じ得、保護応答（例えば、免疫応答）を開始させることにより身体を応答させる。この保護応答は、潮紅、腫脹、熱、および/または疼痛、ならびに/または傷害または損傷の部位への血漿の溢出および白血球の浸潤を生じる。傷害または損傷は、例えば、外傷、感染、アレルギー、疾患または手術に起因し得る。特定の好ましい実施形態では、炎症または炎症性疾患を生じる傷害は、本質的に遺伝的であり得、従って、個体を炎症性疾患にかかりやすくするか、または個体を炎症性疾患に特にかかりやすくする。炎症または炎症性疾患は、超急性（hyperacute/peracute）炎症、急性炎症、亜急性炎症、または慢性炎症であり得る。組織損傷の程度は、特定の組織に対して表在性または深在性、非特異的または特異的であり得る。炎症の原因となる免疫病理学的機構は、例えば、細胞傷害性抗体により媒介されるアレルギー（反応体）に起因し得るか、免疫複合体により媒介されるアレルギー（反応体）に起因し得るか、または遅延型過敏性反応であり得る。

10

【0032】

OP-1タンパク質および/またはOP-1 mRNAのレベルは、予め決定された標準的なコントロールレベルに匹敵し得る。このレベルは、特定の疾患、疾患の特定の段階、疾患の特定の重篤度、または特定の組織グレード（例えば、Collinsグレード）に対応する。患者サンプルにおけるOP-1タンパク質および/またはOP-1 mRNAのレベルと、疾患の特定の段階もしくは重篤度、または組織グレードでのOP-1タンパク質および/またはOP-1 mRNAについての予め決められた基準値との比較は、それぞれ、段階、重篤度、または組織グレードを示す。あるいは、患者におけるOP-1タンパク質レベルおよび/またはOP-1 mRNAレベルは、疾患の発症の前、または疾患の寛解の間に測定された患者のレベルと比較され得る。標準は、加齢調整標準（すなわち、特定の年齢群に由来する組織サンプルの測定から誘導され、そして値が、この年齢群を代表する標準）であり得る。

20

【0033】

疾患の重篤度とは、疼痛、腫脹、水腫、潮紅、組織変性、関与する組織の生合成活性の変化（例えば、炎症媒介因子または他のタンパク質の合成の増加または低下）のような、疾患の症状または症状発現の強度をいう。疾患の重篤度はまた、種々の測定判定基準により確立した、診断群内の疾病の重篤度の予め決められたレベル（すなわち、広範に用いられているCollinsグレーディングシステム（grading system）のような、疾病指標の重篤度）に相関し得る。臨床的疾患とは、特定の臨床的兆候および症状で存在する疾患をいい、この臨床的兆候および症状は、臨床的兆候を伴わない準臨床的疾患を除外して、認識可能である。疾患に対する素因とは、ストレス、年齢、または損傷によるような特定の条件下で活性化され得る疾患に対する潜在的感受性をいう。素因とは、疾患の臨床的症状の発症にかかわらず、時間のいくつかの点で、疾患の状態を獲得する可能性を言及し得る。素因は、遺伝的素因であり得、疾患は、若いときには存在しないが、人生の後になって発現し得る。

30

【0034】

本発明は、以下により、抗炎症剤に対する被験体の応答をモニタリングするための方法を提供する：被験体に、ある用量の抗炎症剤を投与し、この被験体から組織サンプル、体液サンプル、または細胞サンプルを獲得し、OP-1遺伝子の発現レベル（タンパク質および/またはmRNAのいずれか）を決定し、そして処置前と後のOP-1遺伝子発現を比較して、この被験体が、抗炎症剤に対して応答性である（例えば、正常なOP-1遺伝子発現を有する）か否かを決定する。あるいは、本発明は、以下により、OP-1調節剤（例えば、OP-1 RNAおよび/またはOP-1タンパク質の発現を調節する薬剤）に対する、被験体の応答をモニタリングするための方法を提供する：被験体にある用量のOP-1調節剤を投与し、この被験体から組織サンプル、体液サンプル、または細胞サンプルを獲得し、OP-1遺伝子の発現のレベル（OP-1タンパク質および/またはOP-1 mRNA）を決定し、そして処置の前と後のOP-1遺伝子発現を比較して、この被験体がOP-1調節剤に対して応答性であるか否かを決定する。

40

50

【0035】

別の実施形態では、本発明は、抗炎症剤またはOP-1調節薬物にインビトロで曝露した後、組織（体液または細胞を含む）における薬物応答性を決定するための方法を提供する。さらに別の実施形態では、本発明は、哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ブタ、ヤギ、イヌ、ウシ、ウマ、ネコ）のような動物の、組織、体液、または細胞における、OP-1タンパク質レベルもしくはOP-1 mRNAレベル、または薬物応答性を決定するための方法を提供する。ある実施形態では、動物は、トランスジェニック動物または疾患モデル動物（例えば、慢性関節リウマチについてのヤギモデル）である。この動物は、この動物に、抗炎症剤またはOP-1調節薬物を投与した後の、OP-1タンパク質レベルおよび/またはOP-1 mRNAレベルについて分析され得る。

10

【0036】

BMPファミリーのタンパク質の他のメンバーが、例示的なメンバーであるOP-1について本明細書中に開示されるように、骨格組織および関節組織の疾患または年齢状態についての生体マーカーとして用いられ得ることが意図される。RT-PCR法は、他のBMP mRNAを増幅するためのプライマーを設計することにより変更され得る。OP-1に構造的および生化学的に関連した、BMPファミリーのタンパク質の他のメンバー、ならびにこれらの対応するアミノ酸配列およびそのヌクレオチド配列の詳細な記述は、当該分野において、例えば、米国特許第5,011,691号（1991年4月30日発行）、米国特許第5,258,494号（1993年11月2日発行）、米国特許第5,324,819号（1994年6月28日発行）、米国特許第5,750,651号（1998年5月12日発行）、米国特許第5,266,683号（1993年11月30日発行）、米国特許第5,863,758号（1999年1月26日発行）、米国特許第6,262,835号（2001年7月17日発行）（これらの内容の全ては、本明細書中で参考として援用される）において見出され得る。さらに、本明細書中に記載されるELISA法およびウェスタンブロット法は、慣用的な実験を用いて、容易に適用され得、そして、他のBMPタンパク質を測定するために用いられ得る。同様に、BMPを検出するための抗体に関する、ならびにこのような抗体を調製するための例示的教示は、米国特許第5,468,845号（1995年11月21日発行）および米国特許第5,714,589号（1998年2月3日発行）（これらの内容の全ては、本明細書中で参考として援用される）において見出され得る。

20

30

【0037】

本発明の方法は、疾患（例えば、変形性関節症、慢性関節リウマチ、乾癬性関節炎または突発性関節炎）を罹患しているかまたは罹患しやすい被験体を、予知するか、決定するか、測定するか、またはモニターするために特に有用である。本発明に従う方法にはまた、自己免疫疾患（例えば、全身性エリテマトーデス）を罹患しているかまたは罹患しやすい被験体を、予知するか、決定するか、測定するか、またはモニターするために特に有用である。炎症性成分または帰結を有する他の疾患および状態としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：自己免疫関節炎、若年性関節リウマチ、乾癬性関節炎、歯肉炎、歯周疾患に起因する炎症、通風。炎症性成分を有する他の疾患としては、細菌感染、ウイルス感染および真菌感染が挙げられる。疾患組織および正常組織におけるOP-1のタンパク質レベルとmRNAレベルとの間の差異は大きく変動し得るか、あるいは、OP-1のタンパク質レベルおよび/またはmRNAレベルは、疾患の型、疾患の重篤度または疾患の段階に依存して正常より高くあっても低くあってもよいようである。

40

【0038】

上記にもかかわらず、本発明が、軟骨変性、または炎症に付随し得る分解のような組織変質と、軟骨変性、または炎症もしくは疾患に非依存的に生じ得る分解のような組織変質との間を区別することは、理解される。

【0039】

すなわち、OP-1のタンパク質レベルまたはmRNAレベルは、組織整合性または健康の指標であり得るが、組織変質または不健康の潜在的原因の指標である必要はない。例

50

えば、本明細書中に開示されるように、OP-1は、炎症性の間接疾患、および疾患に非依存的な加齢関連軟骨変質に付随する軟骨変性の指標である。

【実施例】

【0040】

(実施例1：OP-1のタンパク質レベルおよびmRNAレベルは、年齢の増加につれて減少する)

ヒト関節軟骨の加齢に伴う内因性OP-1(タンパク質およびmRNA)の発現における変化を、研究した。軟骨抽出物中の総内因性OP-1タンパク質の濃度を定量的に評価するために、サンドイッチ酵素連結イムノソルベントアッセイ(ELISA)を開発し、そしてウエスタンブロット測定および逆転写ポリメラーゼ鎖反応(RT-PCR)測定と比較した。結果は、増加した年齢を伴う、総OP-1タンパク質と成熟OP-1タンパク質との間、および総OP-1 mRNAと成熟OP-1 mRNAとの間の減少に相関が存在することを示す。

10

【0041】

(材料および方法)

(試薬)

ヒト組換えプロOP-1および成熟OP-1、BMP-6、抗プロ(R2854)OP-1抗体および抗成熟(1B12)OP-1抗体を、Stryker Biotech(Hopkinton, MA)より得た。他の2つの抗OP-1抗体(#SC-9305および#MAB354)を、それぞれSanta Cruz Biotechnology, Inc.(Santa Cruz, CA)およびR&D Systems(Minneapolis, MN)より購入した。電気泳動グレードの試薬を、Bio-Rad(Hercules, CA)より購入した。薬品(試薬グレードまたは分子生物グレード)を、他で注意しない限り、Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO)より得た。ケラターゼ(keratanase)(Pseudomonas sp.; EC3.2.1.103)、ケラターゼII(Bacillus sp. Ks36)およびコンドロイチナーゼABC(Proteus vulgaris; EC4.2.2.2)を、生化学(日本)より得た。ヒアルロニダーゼ(ウシ精巢)を、Sigma(St. Louis, MO)より購入した。

20

【0042】

(組織獲得)

全層正常ヒト関節軟骨を、関節疾患の病歴を有さない、死後24時間以内のドナーの大腿顆の圧力(load bearing)領域より切開した。20歳~80歳にわたる男女からのサンプルを、the Regional Organ Bank of Illinoisを介する機関の承認を有してthe Regional Organ Bank of Illinoisのプロトコルに従って得た。関節を開放した後、軟骨の表面を、グロス実験に供した。すべての軟骨サンプルを正常ドナーより得たが、これらの全てが正常ではないようである。いくつかのサンプルが、変性性の形態的变化を示した。全ての軟骨サンプルを、メッセンジャーRNA抽出またはタンパク質抽出のいずれかに処理した。

30

40

【0043】

(OP-1抗体)

以下の抗体を使用した：OP-1のプロ形態に特異的なポリクローナル抗体(R2854(Stryker Biotech))(Chubinskaya et al. 2000; Jones et al. (1994) Growth Fact. 11. 215; Helder et al. (1998) J. Dent. Res. 77: 545; Vulkicevic et al. (1994) Biochem. Biophys. Res. Commun. 198: 693); OP-1の成熟ドメイン全体に特異的な2つのモノクローナル抗体(1B12(Stryker Biotech)および#MAB354(R&D Systems)); ならびに成熟OP-1のN末端由来の15アミノ酸の合成ペ

50

ブチドに特異的なポリクローナル抗体 (#SC9305 (Santa Cruz))。最初は、全ての抗体の特異性を、供給業者によって試験した。しかし、OP-1タンパク質とBMP-6タンパク質との間の高度な相同性、および抗OP-1抗体が産生された後にBMP-6がクローニングされた事実を考慮して、全ての抗体を試験して、BMP-6との交差反応性がないことを確認した。抗プロOP-1抗体(R2854)は、BMP-6または成熟OP-1のいずれかに対する特異的結合がないことを示す。

【0044】

(軟骨抽出)

500mgの新鮮なドナー軟骨を、一晚凍結乾燥し、そして組織の乾燥重量を測定した。サンプルを、液体窒素中で粉碎し、150mg(乾燥重量)の軟骨組織を、10mM CaCl₂、50mM Trisおよび1錠/10mlのプロテアーゼインヒビター(Roche Diagnostics #1836153, Indianapolis, IN)を含有する、の3.5mlの氷冷1M GuHCl緩衝液(pH7.5)で抽出した。軟骨抽出物を、回転させながら4で4時間行った。上清を、2500rpmにて4で10分間遠心分離し、4で貯蔵した。上清を、水中で2日間透析(12,000~14,000MWカットオフ)し、そして4で保存した。抽出の効率を実証するために、軟骨組織を、上清を除去した後に、再度抽出し、抽出物をウエスタンブロットおよびELISAによって分析した。

10

【0045】

Collinsグレード0は、一般に、軟骨変性または骨増殖体がない軟骨に関する。Collinsグレード1は、一般に、関節表面および軽度の原線維性の限定された分裂が存在する軟骨に関する。Collinsグレード2は、一般に、裂を有する軟骨の原線維性、およびおそらくいくつかの小さな骨増殖体が存在する軟骨に関する。Collinsグレード3は、一般に、約30%以下の軟骨表面が肋軟骨下骨(病巣(focal lesion))に侵食されておりかつ骨増殖体が存在する、広範な原線維性および裂形成(fissuring)が存在する軟骨に関する。Collinsグレード4は、一般に、30%より多い軟骨表面が著しい幾何変化を伴う肋軟骨下骨に侵食され、かつ骨増殖体が存在する、軟骨に関する。

20

【0046】

(ウエスタンブロット分析)

上記の抗プロ(R2854)OP-1抗体および抗成熟(1B12)OP-1抗体を用いて、イムノブロット分析を行った。10mM Tris(pH6.5)、1% SDS、10%グリセロールおよび0.016%プロモフェノール青を含有する緩衝液中で、凍結乾燥サンプルを、可溶化した。このサンプルを、10mMジチオトレイトール(DTT)で還元した。Micro BSA Protein Assay Reagent Kit(Pierce, Rockford, IL)によって、タンパク質濃度を定量化した。30μgの各軟骨サンプルを、12% SDS-PAGEゲルにロードし、電気泳動し、そして標準法に従ってウエスタンブロットした。非特異的結合部位を、5%ミルク(Bio-Rad, Hercules, CA)を含有するブロッキング溶液で1時間ブロックした。このブロットを、以下の希釈での一次抗体とともにインキュベーションした: R & D Systemsより得た抗プロ-OP-1抗体(R2854)および抗成熟OP-1抗体(#MAB354)について1:250; Santa Cruzより得た抗成熟OP-1抗体(#SC-9305)について1:100。西洋ワサビペルオキシダーゼと結合体化されたImmunoPure Goat Anti-Mouse IgG(Pierce, Rockford, IL)またはDonkey Anti-Rabbit IgG(Pierce, Rockford, IL)のいずれかを、1:10,000に希釈し、そして二次抗体として使用した。ECL-PLUSキット(Amersham Life Science, England)を使用して、ウエスタンブロットを、感光した。組換えプロOP-1または成熟OP-1に対する抗体の結合特異性を、標準法に従って確認した。二次抗体をまた、標準法に従って、非特異的結合について試験した。

30

40

50

【0047】

(化学発光OP-1サンドイッチELISA)

サンドイッチELISAについて、2つの抗体(1つはポリクローナル#SC-9305 (Santa Cruz)および1つはモノクローナル1B12 (Stryker Biotech))を使用した。ポリクローナル抗OP-1抗体(#SC-9305)を、プレートコーティング抗体として使用し、そして1B12を、二次抗体として使用した。プレートを、Tris緩衝化生理食塩水(TBS)(pH7.5)中50ng/ウェルの#SC-9305でコートし、そして4で一晚インキュベートした。プレートを、TBS/T(TBS(pH7.5)中0.1%Tween20)で4回洗浄した。5%脱脂粉乳(Bio-Rad #170-6404, Hercules, CA)をTBS/T (pH7.5)中に含有するブロッキング溶液20μl/ウェルで、室温(RT)で2時間のインキュベーションによって、非特異的結合をブロックした。プレートを、TBS/Tで4回洗浄した。

10

【0048】

標準曲線を作製するために、成熟組換えOP-1 (Stryker Biotech)を、10ng/ml~0.01ng/mlの範囲の種々の濃度にTBS/Tで希釈した。100μlのOP-1溶液または軟骨抽出物のいずれかを、プレートウェルに(3連で)添加し、そして室温で1時間インキュベートした。プレートを、TBS/Tで4回洗浄した。100μlの1B12 (TBS/Tで1:1000に希釈した)を、各ウェルに添加し、そして室温で1時間インキュベートした。プレートを、TBS/Tで4回洗浄した。次いで、100μlのImmunoPureヤギ抗マウスIgGペルオキシダーゼ結合体抗体(Pierce, #31434) (TBS/Tで1:10,000に希釈した)を、各ウェルに添加し、そして室温で1時間インキュベートした。プレートを、TBS/Tで4回洗浄した。この反応を、100μlのSupersignal ELISA Femto Maximum Sensitivity Substrate (Pierce, #37075) (Supersignal ELISA Femto Luminol/Enhancer溶液とSupersignal ELISA Femto安定ペルオキシド溶液とを等量で混合することによって調製した)を添加することによって展開し、そしてシェーカー上で1分間振盪した。化学発光ELISAプレートリーダーVictor² (Wallac)を使用して相対的光単位(Relative Light Unit (RLU))として、データを得た。

20

30

【0049】

(逆転写ポリメラーゼ鎖反応(RT-PCR))

総RNAを、以前に記載された酸-グアニジニウムチオシアネート(Cs-Szabo et al. (1997) Arthrit. Rheum. 40:1037)を使用して軟骨組織より直接抽出した。OP-1に特異的なオリゴヌクレオチドプライマー対(Chubinskaya et al. 2000)およびグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)を合成した。これらのプライマー対を、異なるサイズのPCR産物を得るために設計した: GAPDHについて319塩基対(bp)およびOP-1について313塩基対。ネステッド(nested)RT-PCRについて使用したOP-1プライマーは、以下である: a) 21マーのアンチセンス、1810~1830の位置、5'-TTTTCTTTTCGCACAGACACC-3'(配列番号1); b) 20マーのセンス、1328~1347の位置、5'-TGCCATCTCCGTCCTCTACT-3'(配列番号2); およびc) 23マーのセンス、1518~1540の位置、5'-TTCCTCTCCCTATCCCAACTTT-3'(配列番号3)。これらのプライマーの特異性は、以前に示された(Chubinskaya et al. 2000)。GAPDHプライマーは、としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない: である: センスプライマー 5'-GGTATCGTGGAAAGGACTCAT-3'(配列番号4)およびアンチセンスプライマー 5'-ACCACCTGGTGCTCAGTGTA-3'(配列番号5)。Cs-Szabo et al. (1997)に

40

50

よって記載されるように、約 1 μ g の総 RNA を、逆転写酵素を使用して転写した。ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によって、特定の上流プライマーおよび下流プライマー (各 15 pM; OP-1 mRNA についてのプライマー (a) および (b)) の存在下で、Taq DNA ポリメラーゼ (Promega, Madison, WI) を使用して、5 μ l の生じた cDNA を増幅した。0.5 μ l の第 1 増幅産物および第 2 センスプライマー (プライマー (c); ネステッドプライマー) を、引き続き増幅工程に使用した。最適な条件で RT-PCR を行うために、そして対数的に直線な産物形成を持続するために、30 サイクル (使用したプライマーについて、95 で 45 秒間、57 で 30 秒間のアニーリング温度、および 72 で 45 秒間)、続いて 72 で 5 分間の最終伸長を選択した。PCR 産物を、3% Metaphor アガロースゲル (FMC BioProducts, Rockland, ME) 中で分離し、そしてエチジウムブロミド染色によって可視化した。バンドの密度を、Fluor-S MultiImager (Bio-Rad, Hercules, CA) を添付のソフトウェアプログラム Quantity One (Bio-Rad, Hercules, CA) とともに使用して測定した。OP-1 バンドの密度を、サンプル中の可変性を制御するために GAPDH バンドの密度に対して正規化した。

【0050】

(統計学的分析)

示した全ての結果は、少なくとも 3 つの別々の実験の平均 \pm S.E. であり、各点について 3 連で決定した。共分散有意性を、正常データの Pearson 相関によって決定した。

【0051】

(結果)

(OP-1 サンドイッチ ELISA)

OP-1 についてのサンドイッチ ELISA を最適化するために、いくつかのパラメータ (異なる抗 OP-1 抗体組み合わせ、アッセイの感受性に対する pH の効果、種々の抽出緩衝液および酵素の効果、ならびに OP-1 濃度の総タンパク質含有量または乾燥重量に対する正規化を含む) を試験した。ほとんどの感受性アッセイは、コーティング抗体としてのポリクローナル #SC-9305 (Santa Cruz) と二次抗体としてのモノクローナル 1B12 (Stryker Biotech) との組み合わせを使用したアッセイであった。図 1 は、ヒト組換え成熟 OP-1 を種々の希釈 (0.01 ~ 10 ng/ml の範囲) で使用して調製した例示的標準曲線を図示する。図 2 は、アッセイにおいて使用した TBS/Tween 緩衝液について広範な範囲の pH の効果を図示する。抽出緩衝液は、中性 pH を有し、そして中性 pH の ELISA リーディングは、真ん中の範囲であるので、この pH を、OP-1 サンドイッチ ELISA についての標準として選択した。ELISA を使用する評価の前に、軟骨抽出物が透析されねばならないか否かを決定するために、2 つの抽出緩衝液 (1 M GuHCl および溶解緩衝液) を試験した。図 3 A に示されるように、1 M GuHCl 緩衝液は、OP-1 の結合を 50% 以上阻害したが、溶解緩衝液は、ELISA 結果に影響しなかった (図 3 B)。しかし、同一の軟骨標本を両方の緩衝液で抽出し、次いで ELISA によって分析した場合、より多くの抗原性 OP-1 を、溶解緩衝液よりも GuHCl 緩衝液で軟骨組織から抽出し得た。この問題を克服するために、GuHCl 緩衝液を、抽出緩衝液として選択したが、全てのサンプルを、さらなる分析に使用する前に透析した。

【0052】

ELISA 法を標準化し、そして細胞数の起こり得る減少、および加齢に伴う軟骨抽出能 (extractability) を影響するマトリクス分子の枯渇に指向するために、抽出の前に、500 mg の組織湿重量を、(マトリクスの影響を避けるために) 常に凍結乾燥し、液体窒素中で粉碎し、そして 1 M GuHCl (3.5 ml の緩衝液当たり 150 mg (乾燥重量) の組織の比で) を用いて抽出する。4 M GuHCl 緩衝液での反復した抽出によって残った組織は、ELISA によって検出されるような抽出可能な OP

- 1を残さないことを示した。1 M GuHCl 緩衝液がほとんどのOP - 1タンパク質を抽出することを定量的に確認するために、同一軟骨サンプルのアリコートをも、以下の種々の抽出緩衝液で抽出した：1) 1 M GuHCl、0.005 M EDTA、0.05 M NaCl；2) 50 mM Tris、1 M GuHCl；3) 50 mM Tris、4 M GuHCl；4) 50 mM Tris、20 mM Na₂HPO₄；5) 50 mM Tris、1% SDS；6) 50 mM Tris、0.15 M -メルカプトエタノール；7) 50 mM Tris、0.1 M NaCl、8 M 尿素；および8) 50 mM Tris、1 M NaCl、8 M 尿素。これらの緩衝液全てを、OP - 1サンドウィッチELISAを使用して定量的に分析した。1 M GuHCl 緩衝液は、ヒト成体関節軟骨からのOP - 1抽出について最も適切であった。

10

【0053】

最も感受性のELISA条件を得るために、軟骨抽出物の異なる酵素処理を試験した。軟骨抽出物を、プロテイナーゼK、ヒアルロニダーゼ、コラーゲナーゼ、コンドロイチナーゼABC (CHase)、ケラタナーゼ (Ker)、またはケラタナーゼII (Ker II)、あるいはこれらの酵素の組み合わせで処理し、そしてOP - 1サンドウィッチELISAによって分析した。処置群のELISA値を、予備処理なしで得られた値と比較した(表1)。これらの群の間に有意な差異はなかった。従って、酵素消化は、ELISAのための標準プロトコルに含まれない。

【0054】

【表1】

20

表1. 異なる酵素消化を用いるELISA値の比較

処置の型	ELISA (ng/ml)
1 M GuHCl 緩衝液のみ	0.03 ± 0.0027
1 M GuHCl 緩衝液 + CHase, Ker, Ker II	0.027 ± 0.0019
1 M GuHCl 緩衝液 + CHase, コラーゲナーゼ	0.022 ± 0.0024
1 M GuHCl 緩衝液 + ヒアルロニダーゼ	0.025 ± 0.0027
1 M GuHCl 緩衝液 + コラーゲナーゼ	0.0181 ± 0.0011
溶解液緩衝液	0.017 ± 0.0013
溶解液緩衝液 + CHase, コラーゲナーゼ	0.017 ± 0.0009

30

種々の年齢の正常な患者(コリンズ等級0~2)由来の全ての軟骨サンプルからの抽出物を、上記のOP - 1サンドウィッチELISAで分析した。図4Aを参照すると、内因性OP - 1タンパク質の含有量は、年齢が増加すると共に有意に減少した($p < 0.02$)。ドナーの年齢およびOP - 1タンパク質のレベルは、有意な共変を示した(ピアソン相関 $p < 0.02$)。重要なことに、これらのサンプルのうちでも、正常な組織形態学的外観を有する軟骨サンプル、および変質形態変化を有する軟骨サンプルであるが、これらの全ては、関節疾患の病歴のない器官ドナーから得られた。図4Bを参照すると、正常な組織形態学を有する軟骨サンプルが別のサブグループに単離され、そしてOP - 1タンパク質の含有量について分析される場合、同じ統計学的差異が検出された。正常軟骨の加齢を伴ってさえも、内因性OP - 1の含有量の減少が存在した。成体組織において、OP - 1タンパク質発現における変化は、線形回帰を有した。40歳と70歳との間には、少なくとも3~4倍の、OP - 1 mRNAレベルの差異が存在した。

40

【0055】

(ウェスタンプロット分析)

代表的なサンプルを、10年の範囲の年齢(age decade)(20歳、32歳

50

、40歳、58歳、69歳および75歳)の各々から採り、そして抗成熟OP-1抗体# M A B 3 5 4を使用して、ウェスタンブロットによって分析した。標準的な方法に従って、ゲルを走査し、そしてデンストメトリーを実施した。2つの主要なOP-1バンドが、ドナーの年齢にかかわらず、試験した全ての軟骨において存在した(データは示さない)。これらのバンドは、完全にプロセスされた成熟OP-1(分子量約36kD)および部分的にプロセスされたOP-1タンパク質(分子量約75kD)の中間体形態を表した。これらのバンドの各々の、半定量的デンストメトリー分析は、年齢の増加に伴うこれらのバンドの強度の統計的減少を実証し、これは、ELISAのデータと相関した($P < 0.05$)。活性な成熟OP-1の量は、年齢が増加すると共に有意に減少した。75kDのOP-1および成熟OP-1(36kDおよび17kD)のヘミダイマー形態を表すバンドは、変質した軟骨および加齢した軟骨において消失し、このことは、主要な変化が、プロセスされた成熟OP-1のレベルに対して起こり得ることを示唆する。図5は、プロセスされた成熟OP-1ダイマー(36kD)およびOP-1のヘミダイマー形態(75kD)に対応する、ウェスタンブロットバンドの定量的画像分析を表す。図6を参照すると、同じ軟骨抽出物が、抗プロOP-1抗体R2854を用いて分析され、そして画像分析器を使用して定量される場合、ヘミダイマー形態のプロOP-1タンパク質に対応するバンドの増加が観察された。より低い分子量のバンド(プロOP-1還元モノマーおよびプロOP-1ドメイン)が、軟骨の加齢と共に消失した。

10

【0056】

(RT-PCR)

20

総RNAを、軟骨細胞の単離も培養もなしに、軟骨組織から直接抽出し、そしてOP-1およびGAPDH特異的プライマーセットを使用する、ネステッドRT-PCR(nested RT-PCR)分析に供した。両方のPCR産物を、同じサイクル数だけ増幅した。GAPDHを、標準化因子として選択した。なぜなら、これはハウスキーピング遺伝子であり、そして正常軟骨におけるGAPDH mRNA発現のレベルは、年齢によって10%より大きくは変化しないからである。図7は、軟骨ドナーの年齢に対してプロットされた、OP-1/GAPDH比を示す。関節軟骨におけるOP-1 mRNAレベルは、ドナーの年齢の増加と共に減少した($P < 0.001$)。最も高レベルのOP-1 mRNAは、新生児および若年成人のドナーにおいて検出され、一方で、OP-1発現は、加齢プロセスを通して顕著にダウンレギュレートされた。成人組織において、OP-1 mRNAレベルの変化は、線形回帰を有した。30歳と80歳との間では、少なくとも4~5倍のOP-1 mRNAレベルの差異が存在した。80歳までに、OP-1 mRNAレベルは、非常に低いかまたはかろうじて検出可能であり、いくらかのドナーは、検出限界より低いOP-1 mRNAレベルを有した。

30

【0057】

(実施例2:慢性関節リウマチおよび変形性関節症におけるOP-1タンパク質およびmRNAレベル)

上記OP-1サンドウィッチELISAを使用して、OP-1タンパク質が滑液において検出され得るか否か、滑液におけるOP-1タンパク質の評価に対して定量的アプローチが適合され得るか否か、ならびに正常ドナーと慢性関節リウマチ(RA)および変形性関節症(OA)に罹患する患者との間に、OP-1タンパク質のレベルの差異が存在するか否かを、決定した。これらの結果は、滑液OP-1が、RAとOAとの両方に対する有用な診断および予後マーカーであることを示唆する。

40

【0058】

滑液を、RAおよびOAに罹患する被験体、ならびにヒト器官ドナーの正常関節から、標準的な方法に従って吸引した。74個の関節(13個の正常、25個のRA、29個のOAおよび7個の他の炎症性疾患)からの軟骨標本もまた得た。滑液および軟骨を、抗プロOP-1抗体および抗成熟OP-1抗体を用いるウェスタンブロットによって分析し、そしてOP-1タンパク質の濃度を、実施例1に記載されるように、OP-1サンドウィッチELISAを使用して測定した。サンプル中のOP-1濃度を、5つのセットで定量

50

し、そして少なくとも3～5個について5回試験した。滑液を1：100に希釈し、その後、ウェスタンブロット分析およびELISAを行った。

【0059】

(結果)

(OP-1サンドウィッチELISA結果およびRT-PCR)

図8は、ELISAについての代表的な標準曲線を示す。OP-1タンパク質のプロ形態および成熟形態は、試験した全てのサンプルに存在した。図9Aは、軟骨中のOP-1タンパク質濃度と、正常患者およびOA患者における軟骨変質の進行との間の関係を示す。患者におけるコリンズ等級の増加またはOAの存在は、内因性OP-1タンパク質濃度の有意な減少に相関した。等級2および3の軟骨における内因性OP-1タンパク質のレベルは、等級0および1の軟骨と比較した場合に、2分の1に減少し(それぞれ $p < 0.02$ および $p < 0.05$)、そして等級4およびOA患者由来の軟骨において、4分の1から6分の1に減少した($p < 0.003$)。 10

【0060】

図9Aにおいて、ELISAによって分析した同じ軟骨サンプルを、RT-PCRを用いて、OP-1 mRNA濃度について試験した。図9Bを参照すると、OP-1 mRNA発現は、等級0および1の軟骨と比較した場合、等級2および3の軟骨において、2分の1に減少した($p < 0.05$)。しかし、OA軟骨において、OP-1 mRNAのレベルは、正常組織(等級0および1)におけるレベルに匹敵した。これらの結果は、OA組織が、軟骨組織の再生のための同化作用の応答を引き起こすことを示唆する。顕著なことに、器官ドナー由来の滑液におけるOP-1タンパク質の濃度は、同じドナーからの軟骨抽出物において検出された濃度に匹敵した。OP-1タンパク質濃度は、変質変化を有するドナーにおいてより、正常な膝関節を有するドナーにおいて高かった($p < 0.015$)。OP-1タンパク質濃度は、OA患者から得られた滑液よりも、RA患者から得られた滑液において高かった($p < 0.03$)。 20

【0061】

図10は、正常患者、OA患者、およびRA患者、ならびに他の種々の型の関節炎(例えば、痛風、線維筋痛症候群(*fibromyalgia syndrome*)(FMS)、およびリウマチ性多発性筋痛(*polymyalgia rheumatica*)(PMR))に罹患する患者由来のヒト滑液における、OP-1タンパク質のレベルを示す。滑液中のOP-1タンパク質は、OAおよびRAに罹患する患者において増加し、そしてOP-1タンパク質の濃度は、正常患者またはOA患者と比較して、RA患者および組み合わせた他の全ての型の関節炎の群由来の滑液において、少なくとも2倍高い。 30

【0062】

しかし、これらの増加が、滑液に存在する全タンパク質を考慮する場合、これらの結果は、OA患者およびRA患者における、OP-1タンパク質の顕著な減少を示す。図11は、OA、RAおよび他の疾患に罹患する患者由来の滑液における全タンパク質の量を示す。全タンパク質は、全ての疾患組織において、増加する。

【0063】

図12を参照すると、滑液中のOP-1タンパク質濃度が全タンパク質濃度に対して標準化される場合、OP-1タンパク質は、OA患者において劇的に減少する。OP-1タンパク質はまた、RA患者において減少するが、OA患者より少ない程度である；OP-1タンパク質の標準化された濃度もまた、RA患者由来の滑液において2倍高い。 40

【0064】

OP-1タンパク質およびmRNAの発現を、膝関節由来の他の結合組織において試験した。靭帯、腱、半月板、および滑膜を、コリンズ等級2を有する正常ヒトドナーの膝組織から得た。ELISAおよびRT-PCRを、実施例1に記載されるように実施した。図13Aを参照すると、OP-1タンパク質は、全ての組織において検出され、最大レベルのOP-1タンパク質は、靭帯、腱および滑膜において検出された。図13Bを参照すると、OP-1 mRNAは、全ての組織において類似のレベルで検出され、腱において 50

最高レベルで検出された。

【0065】

(ウェスタンブロット)

ウェスタンブロット分析は、滑液由来のOP-1の免疫反応性バンドの分布が、ヒト関節軟骨について記載されたもの(図示せず)と類似であることを実証した。ヒアルロニダーゼおよび/またはコンドロイチナーゼで消化した滑液のウェスタンブロット分析は、これらの酵素が、抗OP-1抗体によって検出される免疫バンドのパターンを変化させなかった。これらの結果に基づいて、滑液は、ELISAの前に、酵素消化に供されなかった。

【0066】

(実施例3:変形性関節炎におけるOP-1タンパク質およびmRNAレベルの減少)

証明された関節疾患の病歴を有さない、正常な新生児および正常な成人のドナー由来のヒト正常軟骨を、標準的な手順に従って得た。変形性関節症の軟骨(OA)を、膝の関節形成術を受けた、OAに罹患すると診断された患者から取り出した。各型の3つのサンプルを試験した。OP-1およびGADPH mRNAのRT-PCRを、実施例1に記載されるように実施した。OP-1 mRNAの、正常な新生児および正常な成人の軟骨におけるレベルは、類似であったが、OA軟骨におけるOP-1 mRNA発現は、2~3倍アップレギュレートされた(表2)。

【0067】

【表2】

表2:ヒト関節軟骨におけるOP-1 mRNA発現

軟骨の型	OP-1/GADPH	標本の数
正常な新生児の軟骨	0.518 ± 0.066	N=3
正常な成人の軟骨	0.567 ± 0.067	N=3
OA軟骨	1.148 ± 0.234 P<0.01	N=3

OP-1タンパク質を、1MのGuHClを用いて、プロテアーゼインヒビターの存在下で組織から抽出し、凍結乾燥し、そして実施例1に記載されるように、非還元条件下でウェスタンブロットによって分析した。免疫反応性OP-1タンパク質のバンドの密度を、Fluor-S MultiImager (BioRad)に取り付けたQuantify One Softwareで定量した。全てのデータを、全タンパク質含有量に対して標準化した。プロOP-1タンパク質および成熟OP-1タンパク質の全密度は、OA軟骨における密度より正常軟骨において、統計的に高かった。このことは、OA組織と比較した場合、正常組織に存在するプロOP-1タンパク質および成熟OP-1タンパク質の含有量が、より高いことを示す(表3)。これらの結果は、OA軟骨細胞が、OP-1 mRNA発現のアップレギュレーションによる組織変成のプロセスを代償するが、これはタンパク質レベルでは明らかではないことを示唆する。

【0068】

10

20

30

40

【表 3】

表 3. ヒト関節軟骨におけるプロ OP-1 タンパク質および成熟 OP-1 タンパク質の全含有量

軟骨の型	プロ OP-1	成熟 OP-1	標本の数
正常軟骨	0.69 ± 0.26	1.05 ± 0.19	N=4
OA 軟骨	0.37 ± 0.05	0.41 ± 0.10	N=4
	P<0.05	P<0.001	

(実施例 4 : IL-1 を使用する、インビトロでの OP-1 発現の調節)

IL-1 (インビトロでの軟骨破壊に関連することが公知の異化作用の媒介物質) での処置に対する OP-1 遺伝子の応答を試験した。IL-1 を、炎症の間のヒト関節軟骨における最初の変化の異化作用モデルとして選択した。

【0069】

正常軟骨を、証明された関節疾患の病歴を有さないヒト器官ドナー由来の膝関節の大腿顆から得た。軟骨スライスを調製し、そしてダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) 中で短時間洗浄し、そして 3 ~ 5 平方 mm の体外移植組織に切断し、そして以下の標準的な培養条件下で培養した: 25 μg/ml アスコルビン酸、50 μg/ml ゲンタマイシンおよび 10 ml/L のインスリン-トランスフェリン-セレン A (ITS, Gibco) を補充した 50% DMEM、50% ハム F12。FBS 中に存在する増殖因子の、内因性 OP-1 発現に対する影響を減少させるために、ITS を選択した。軟骨体外移植組織を、加湿雰囲気中で 7% CO₂、37 °C で、1 日おきに培地を交換しながらインキュベートした。IL-1 を、低用量の 0.1 ng/ml IL-1 ~ 高用量の 1.0 ng/ml IL-1 で (それぞれ 6 のドナー)、体外移植組織培養物に添加した。IL-1 で処理する前に、組織スライスを 4 日間、標準的な培養条件 (定常状態近くの OP-1) に馴化させ、次いで、体外移植組織を、IL-1 で 48 時間または 96 時間処理した。1 日おきに培地を交換し、そして収集した。培養後、体外移植組織をタンパク質抽出のためにプロセスし、そして OP-1 タンパク質の含有量を、ウェスタンブロットおよび ELISA によって分析した。同じ組織抽出物を利用して、PG レベル (硫酸化グリコサミノグリカン (GAG) の含有量) を、標準的な DMMB 法によって検出した。培養培地を、GAG および OP-1 の放出についてアッセイした。3 人のさらなるドナー由来の正常軟骨を、コントロールと同じ条件下で培養し、そして低用量および高用量の IL-1 で処理した。この組織を収集し、そして RNA 抽出のためにプロセスした。

【0070】

(低用量の IL-1 に対する応答)

6 人の正常ドナー由来の軟骨を使用して、低用量の IL-1 に対する OP-1 の応答を試験した。4 日間の平衡化期間 (培地のみの存在下での培養) の後に、体外移植組織を、0.1 ng/ml の IL-1 で、48 時間または 96 時間処理した。図 14 を参照すると、低用量の IL-1 の存在下での 48 時間の培養は、内因性 OP-1 タンパク質の有意な蓄積を導いた ($p < 0.01$); しかし、IL-1 へのより長い曝露 (96 時間) は、内因性 OP-1 タンパク質のより少ない増加を誘導した。6 つの軟骨抽出物のうちの 5 つにおいて、低用量の IL-1 との 48 時間の培養は、培養されたコントロールより、内因性 OP-1 の濃度が 2 ~ 3 倍増加した。96 時間後、OP-1 タンパク質レベルは、IL-1 処置群において、1.5 倍高かった ($p < 0.01$)。これらの結果は、低用量の IL-1 での処理に応答した内因性 OP-1 のレベルの、全体的な増加を示唆する。

【0071】

放出された OP-1 の含有量についての、培養培地の ELISA 分析は、検出可能なレベルの OP-1 タンパク質を、培地中に示さなかった。このことは、放出された OP-1 の迅速な分解、またはこの培地中の OP-1 タンパク質の濃度がアッセイの検出限界未満

10

20

30

40

50

であることのいずれかを示唆する。

【0072】

IL-1 へのより長い曝露(96時間)は、より短い培養(48時間)と比較して、OP-1タンパク質のさらなる誘導を導かないことを見出した後に、IL-1の除去後の内因性OP-1タンパク質レベルの変化を試験した。軟骨サンプルを、まず48時間、0.1 ng/ml IL-1の存在下で培養し、このIL-1を除去し、そして軟骨を、培地のみで、さらに48時間培養した。図15を参照すると、ELISA分析は、IL-1の除去後、内因性OP-1のレベルは、少なくともさらなる48時間の間上昇したままであるが、回収後の絶対値は、(48時間と96時間との両方で)IL-1の存在下より低かったことを示した。

10

【0073】

OP-1免疫応答性バンドの出現を、ウェスタンブロットによって分析した。低用量のIL-1で処理した軟骨抽出物において、以下の3つの主要なバンドが検出された：成熟OP-1ダイマーに対応するバンド、OP-1の中間体型体、およびモノマーまたは分解フラグメント。低用量のIL-1での、48時間の処理と96時間の処理の両方の後に、成熟OP-1に対応するバンドの強度は、未処理のコントロールにおいてよりも、IL-1で処理された抽出物において強かった。OP-1の中間体形態に対応するOP-1バンドにおいて、差異は検出されなかった。IL-1で処理した培地から収集された培地もまた、ウェスタンブロットによって分析し、そしてOP-1は検出されなかった。

20

【0074】

OP-1 mRNAのレベルを試験して、IL-1によって誘導されたOP-1タンパク質の上昇が、そのmRNA発現の変化に関連するか否かを決定した。3つの別のドナー由来の軟骨サンプルを、同じ条件下で培養し、そしてOP-1 mRNAレベルを決定した。結果を、GADPH mRNAに対するOP-1 mRNAの比として報告した。同数のサイクルを使用して、両方の遺伝子産物を作製した。低用量のIL-1での処理の48時間後、IL-1で処理した組織サンプルと未処理の(コントロール)組織サンプルとの間で、OP-1 mRNA発現の有意な差異は存在しなかった。しかし、IL-1の存在下96時間において、OP-1 mRNAは、30%高かった。

【0075】

(高用量のIL-1に対する応答)

軟骨サンプルを、低用量での実験に関して上記したように得、そして代わりに高用量(1.0 ng/ml)のIL-1で処理し、そしてELISAによって分析した。図16を参照すると、高用量のIL-1での処理の48時間後および96時間後、6つの軟骨サンプルの各々からの抽出物は、OP-1タンパク質のレベルの類似の減少を示した。図17を参照すると、IL-1の除去後、かつ培養中の回収の48時間後に、内因性OP-1タンパク質のレベルは、培養コントロールにおいて検出されたレベルに達しなかった。

30

【0076】

高用量のIL-1に反応したOP-1 mRNAのレベルを、(実施例1に記載されるように)RT-PCRによって測定した。培養の48時間後、OP-1 mRNA濃度の上昇が見られた(約40%、 $p < 0.05$)。

40

【0077】

(均等物)

本発明は、本発明の精神または本質的な特徴から逸脱することなく、他の特定の形態で実施され得る。従って、上述の実施形態は、本明細書中に記載される本発明を限定するのではなく、全ての局面において、例示であるとみなされるべきである。

【0078】

本発明の前述および他の目的、特徴および利点、ならびに本発明自体は、添付の図面をともに参照すると、好ましい実施形態の前述の記載からより十分に理解される。

【図面の簡単な説明】

50

【 0 0 7 9 】

【図 1】図 1 は、OP - 1 サンドイッチ E L I S A (0 . 0 1 ~ 1 0 n g / m l の範囲の異なる希釈にて、ヒト組換え成熟 OP - 1 を調製した) により作成された例示的標準曲線である。

【図 2】図 2 は、OP - 1 サンドイッチ E L I S A において、OP - 1 の種々の濃度の測定値に対する、T B S / T w e e n 緩衝液の広範な pH 範囲の効果を例示する。

【図 3】図 3 は、OP - 1 サンドイッチ E L I S A により作成した標準曲線に対する、1 M G u H C l 抽出緩衝液 (A) および溶解抽出緩衝液 (B) の効果を例示する。黒四角は、T B S 緩衝液中で希釈した OP - 1 を示し ; 白丸は、G u H C l 緩衝液 (A) 中または溶解 (B) 緩衝液中のいずれかで希釈した OP - 1 を示す。

10

【図 4】図 4 A は、OP - 1 サンドイッチ E L I S A で分析した、異なる年齢の正常個体に由来する軟骨サンプル中の OP - 1 タンパク質のレベルを示す。図 4 B は、OP - 1 サンドイッチ E L I S A で分析した、さらに軟骨もまた正常な組織形態を有していた正常個体由来の軟骨サンプル中の OP - 1 タンパク質のレベルを例示する。

【図 5】図 5 は、成熟 OP - 1 二量体 (3 6 k D) および OP - 1 ヘミ二量体 (7 5 k D) に対応するウェスタンブロットバンドの半定量的画像分析を示す。

【図 6】図 6 は、プロ OP - 1 のヘミ二量体に対応するウェスタンブロットバンドの定量画像分析を示す。

【図 7】図 7 は、ドナーの年齢に対してプロットした、軟骨サンプル由来の OP - 1 m R N A / G A D P H m R N A 比の半定量的 P C R を示す。

20

【図 8】図 8 は、OP - 1 サンドイッチ E L I S A についての例示的な標準曲線を例示する。

【図 9】図 9 A は、0 ~ 4 の軟骨コリンズ段階を有する患者および変形性関節症 (O A) 患者における OP - 1 タンパク質濃度を例示する。図 9 B は、0 ~ 4 の軟骨コリンズ段階を有する患者および変形性関節症 (O A) 患者における OP - 1 m R N A 濃度を例示する。

【図 1 0】図 1 0 は、正常、O A、および慢性関節リウマチ (R A)、ならびに種々の関節性疾患 (例えば、痛風、線維筋痛症候群 (f i b r o m y a l g e a s y n d r o m e) (F M S)、およびリウマチ性多発性筋痛 (P M R)) を有する他の患者からのヒト滑液中の OP - 1 タンパク質のレベルを例示する。

30

【図 1 1】図 1 1 は、正常、O A、R A、ならびに種々の関節性疾患 (例えば、痛風、線維筋痛症候群 (F M S)、およびリウマチ性多発性筋痛 (P M R)) を有する他の患者からの滑液中の総タンパク質の量を例示する。

【図 1 2】図 1 2 は、正常、O A、および R A ならびに種々の関節性疾患 (例えば、痛風、線維筋痛症候群 (F M S)、およびリウマチ性多発性筋痛 (P M R)) を有する他の患者由来の滑液中の総タンパク質濃度に対して正規化した OP - 1 タンパク質のレベルを例示する。

【図 1 3】図 1 3 A は、正常軟骨、靱帯、腱、半月板、および滑膜中の OP - 1 タンパク質のレベルを例示する。図 1 3 B は、正常軟骨、靱帯、腱、半月板、および滑膜中の OP - 1 m R N A のレベルを例示する。

40

【図 1 4】図 1 4 は、低用量の I L - 1 に応答した、正常ドナー由来の軟骨培養物中の OP - 1 タンパク質発現のレベルを例示する。4 日間の平衡期間 (培地のみを存在させた場合の培養) の後、外植片を 0 . 1 n g / m l の I L - 1 で 4 8 時間または 9 6 時間処理した。

【図 1 5】図 1 5 は、低用量の I L - 1 の除去後に内因性 OP - 1 タンパク質の回復を例示する。軟骨サンプルを、最初に、0 . 1 n g / m l I L - 1 の存在下で 4 8 時間培養し、この I L - 1 を除去し、軟骨を培地のみの中でさらに 4 8 時間培養した。

【図 1 6】図 1 6 は、高用量の I L - 1 に応答した、正常ドナー由来の軟骨培養物中の OP - 1 タンパク質発現のレベルを示す。4 日間の平衡期間 (培地のみを存在させた場合の培養) の後、外植片を 1 . 0 n g / m l の I L - 1 で 4 8 時間または 9 6 時間処理し

50

た。

【図17】図17は、高用量のIL-1の除去後の軟骨培養物中の内因性OP-1タンパク質レベルの変化を例示する。軟骨サンプルを、最初に、1.0ng/mlのIL-1の存在下で48時間培養し、このIL-1を除去し、軟骨を培地のみの中でさらに48時間培養した。

【図1】

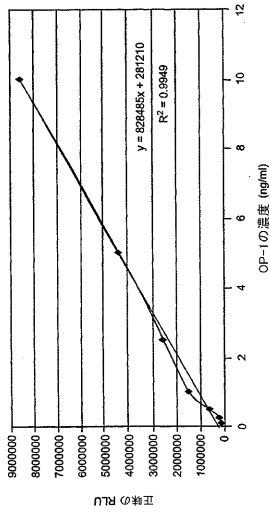


FIG. 1

【図2】

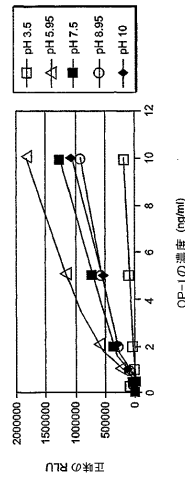


FIG. 2

【 図 3 】

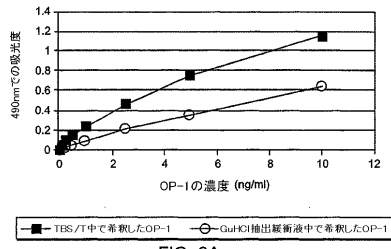


FIG. 3A

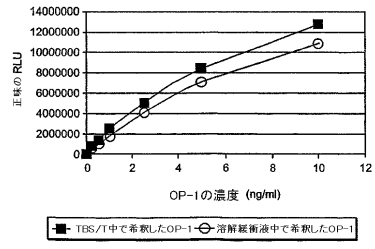


FIG. 3B

【 図 4 】

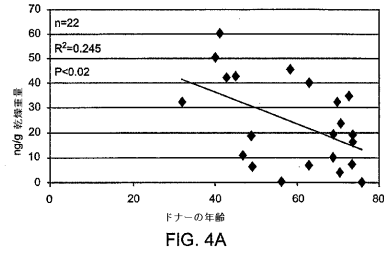


FIG. 4A

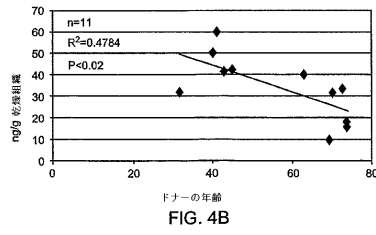


FIG. 4B

【 図 5 】

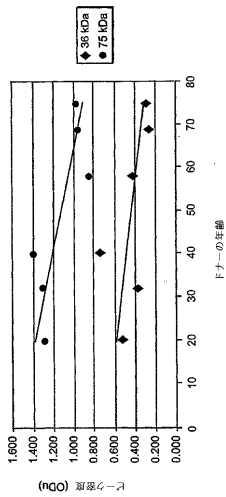


FIG. 5

【 図 6 】

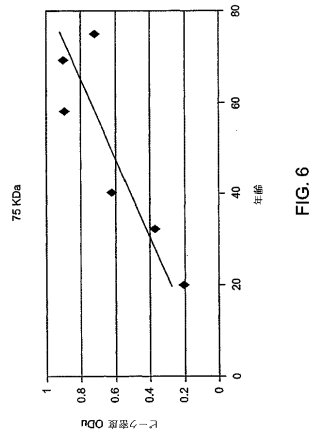


FIG. 6

【 図 7 】

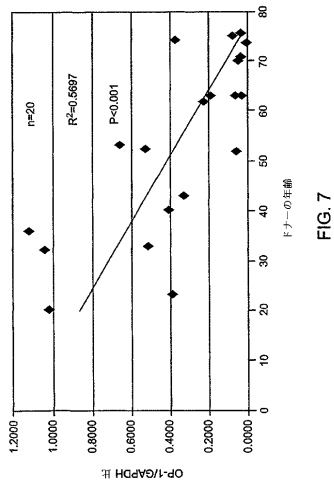


FIG. 7

【 図 8 】

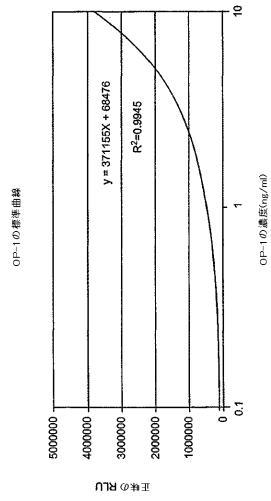


FIG. 8

【 図 9 】

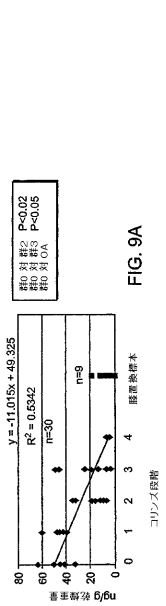


FIG. 9A

9/15

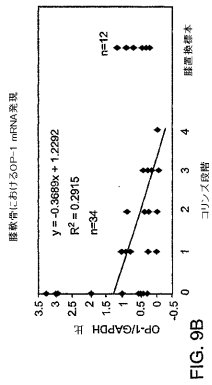


FIG. 9B

腫瘍病におけるOP-1 mRNA発現

【 図 10 】

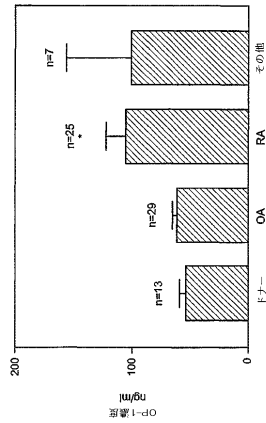
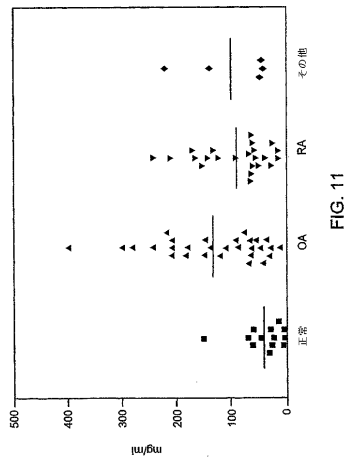
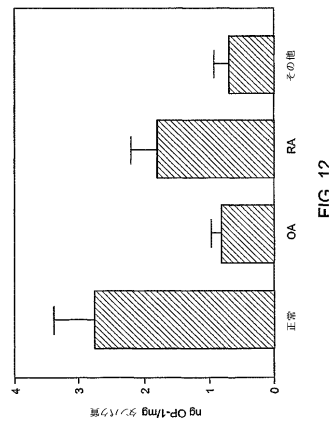


FIG. 10

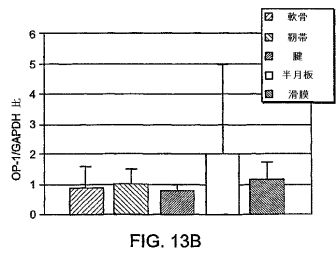
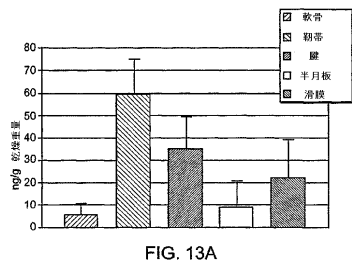
【 図 1 1 】



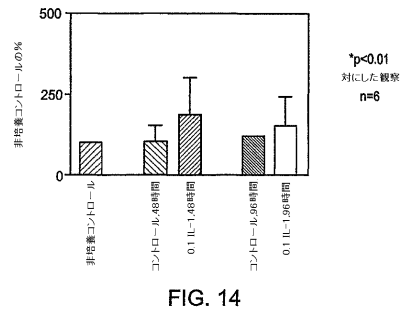
【 図 1 2 】



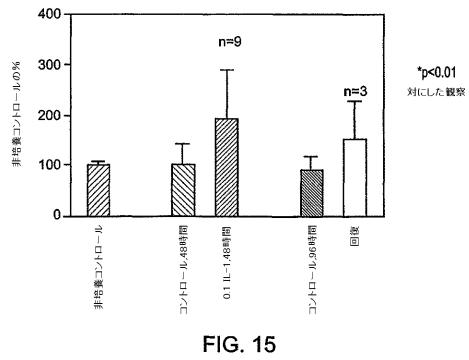
【 図 1 3 】



【 図 1 4 】



【 図 1 5 】



【 図 1 6 】

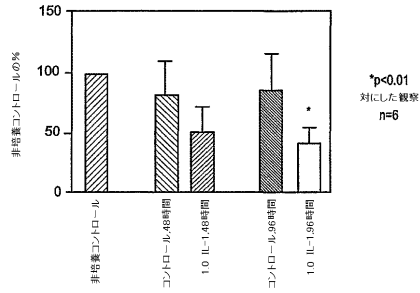


FIG. 16

【 図 1 7 】

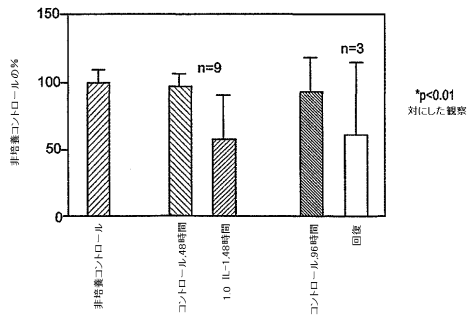


FIG. 17

【 手続 補正書 】

【 提出日 】 平成 17 年 6 月 22 日 (2005.6.22)

【 手続 補正 1 】

【 補正 対象 書類 名 】 明細書

【 補正 対象 項目 名 】 配列表

【 補正 方法 】 追加

【 補正 の 内容 】

【 配列表 】

2005528581000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International application No PCT/US 02/05551
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/68 C12Q1/68 G01N33/564		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 4 857 456 A (URIST MARSHALL R) 15 August 1989 (1989-08-15) abstract column 2, line 41-59 column 3, line 63 -column 4, line 53 ---	1-46
Y	US 5 707 810 A (KUBERASAMPATH THANGAVEL ET AL) 13 January 1998 (1998-01-13) abstract; claims 1-27 --- -/--	1-46
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
7 February 2003	18/02/2003	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Diez Schlereth, D	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International	Application No
PCT/US	02/05551

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BAUER D C ET AL: "BIOCHEMICAL MARKERS OF BONE TURNOVER AND PREDICTION OF HIP BONE LOSS IN OLDER WOMEN: THE STUDY OF OSTEOPOROTIC FRACTURES" JOURNAL OF BONE AND MINERAL RESEARCH, NEW YORK, NY, US, vol. 14, no. 8, 1999, pages 1404-1410, XP002952591 ISSN: 0884-0431 abstract ---	1-46
A	WO 96 39431 A (COLEMAN TIMOTHY A ; HUMAN GENOME SCIENCES INC (US); HE WEI WU (US);) 12 December 1996 (1996-12-12) abstract page 24, paragraph 4 -page 25, paragraph 1 ---	1-46
A	WO 98 54572 A (CREATIVE BIOMOLECULES INC ; COHEN CHARLES M (US); SAMPATH KUBER T () 3 December 1998 (1998-12-03) claims 1-122 ---	1-46
P,A	US 6 194 376 B1 (KUBERASAMPATH THANGAVEL ET AL) 27 February 2001 (2001-02-27) abstract -----	1-46

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 02/05551

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

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

1. Claims Nos.: —
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

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

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

Remark on Protest

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

International Application No. PCT/US 02 05551

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Claims 1-34 and 40-46 have been searched although they are directed to diagnostic methods which may be practised on the human/animal body.

Continuation of Box I.1

The subject-matter of claims 1-34 and 40-46 falls under the provisions of Rule 67.1(iv) PCT (diagnostic methods practised on the human/animal body (Rule 39.1 (iv) PCT).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4857456	A	15-08-1989	NONE	
US 5707810	A	13-01-1998	US 5650276 A	22-07-1997
			US 5741641 A	21-04-1998
			US 5994131 A	30-11-1999
			US 6153583 A	28-11-2000
			US 5652337 A	29-07-1997
			US 5652118 A	29-07-1997
			US 5854071 A	29-12-1998
			AT 192931 T	15-06-2000
			AT 197611 T	15-12-2000
			AU 669127 B2	30-05-1996
			AU 2564592 A	05-04-1993
			AU 678345 B2	29-05-1997
			AU 2862492 A	05-04-1993
			AU 670558 B2	25-07-1996
			AU 3176293 A	27-04-1993
			AU 696364 B2	10-09-1998
			AU 3604097 A	20-11-1997
			CA 2116559 A1	01-04-1993
			CA 2116560 A1	18-03-1993
			CA 2116562 A1	18-03-1993
			DE 69231062 D1	21-06-2000
			DE 69231062 T2	15-02-2001
			DE 69231567 D1	21-12-2000
			DE 69231567 T2	28-06-2001
			EP 1033574 A2	06-09-2000
			EP 0601106 A1	15-06-1994
			EP 0601129 A1	15-06-1994
			EP 0601135 A1	15-06-1994
			EP 0825442 A2	25-02-1998
			ES 2149776 T3	16-11-2000
			ES 2156862 T3	01-08-2001
			JP 6510989 T	08-12-1994
			JP 6510432 T	24-11-1994
			JP 7502021 T	02-03-1995
			WO 9304692 A1	18-03-1993
			WO 9305172 A1	18-03-1993
			WO 9305751 A2	01-04-1993
			AT 203166 T	15-08-2001
			AU 660019 B2	08-06-1995
			AU 1754392 A	06-10-1992
			CA 2104678 A1	12-09-1992
			DE 69231946 D1	23-08-2001
			DE 69231946 T2	04-04-2002
			DK 575555 T3	05-11-2001
			EP 0575555 A1	29-12-1993
			ES 2161693 T3	16-12-2001
			GR 3036950 T3	31-01-2002
			JP 6506360 T	21-07-1994
			WO 9215323 A1	17-09-1992
WO 9639431	A	12-12-1996	WO 9639431 A1	12-12-1996
			AU 2947395 A	24-12-1996
WO 9854572	A	03-12-1998	AU 742663 B2	10-01-2002
			AU 7802498 A	30-12-1998
			EP 0985149 A1	15-03-2000

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9854572		A	JP	2001526788 T	18-12-2001
			WO	9854572 A1	03-12-1998
US 6194376		B1	27-02-2001	US 6288031 B1	11-09-2001
				AT 192931 T	15-06-2000
				AU 669127 B2	30-05-1996
				AU 2564592 A	05-04-1993
				CA 2116562 A1	18-03-1993
				DE 69231062 D1	21-06-2000
				DE 69231062 T2	15-02-2001
				EP 0601106 A1	15-06-1994
				ES 2149776 T3	16-11-2000
				JP 6510989 T	08-12-1994
				WO 9304692 A1	18-03-1993
				US 5656593 A	12-08-1997
				US 6153583 A	28-11-2000
				US 6211146 B1	03-04-2001
				US 6077823 A	20-06-2000
				US 5849686 A	15-12-1998
				US 6495513 B1	17-12-2002
				US 6399569 B1	04-06-2002
				US 5972884 A	26-10-1999
				US 5739107 A	14-04-1998
				US 5652337 A	29-07-1997
				US 6090776 A	18-07-2000
				US 5652118 A	29-07-1997
				US 5733878 A	31-03-1998
				US 5854071 A	29-12-1998
				US 2002049159 A1	25-04-2002
				AT 203166 T	15-08-2001
				AU 660019 B2	08-06-1995
				AU 1754392 A	06-10-1992
				CA 2104678 A1	12-09-1992
				DE 69231946 D1	23-08-2001
				DE 69231946 T2	04-04-2002
				DK 575555 T3	05-11-2001
				EP 0575555 A1	29-12-1993
				ES 2161693 T3	16-12-2001
				GR 3036950 T3	31-01-2002
				JP 6506360 T	21-07-1994
				WO 9215323 A1	17-09-1992
				US 6333312 B1	25-12-2001
				US 6395883 B1	28-05-2002
				US 5674844 A	07-10-1997
				US 5741641 A	21-04-1998
				US 5834179 A	10-11-1998
				US 5707810 A	13-01-1998
				US 6071708 A	06-06-2000
				US 5994131 A	30-11-1999

フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁷

F I

テーマコード(参考)

G 0 1 N 33/564

B

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

(72) 発明者 ルガー, デイビッド シー.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1 7 7 2, サウスボロ, パイン ヒル ロード 8 1

(72) 発明者 クエツナー, クラウス イー.

アメリカ合衆国 イリノイ 6 0 6 5 7, シカゴ, ブリアー 4 4 5

F ターム(参考) 2G045 AA35 AA40 BB10 BB16 BB50 BB51 CB01 CB13 DA13 DA14

DA36 FA11 FB01 FB02 FB03 FB05 FB07 FB13 GC15 JA01

4B063 QA01 QA18 QA19 QQ42 QQ52 QR08 QR42 QR62 QS25 QS34

QS36 QX02

专利名称(译)	用骨形态发生蛋白测量软骨退变和衰老		
公开(公告)号	JP2005528581A	公开(公告)日	2005-09-22
申请号	JP2002568028	申请日	2002-02-20
[标]申请(专利权)人(译)	史赛克公司		
申请(专利权)人(译)	史赛克公司		
[标]发明人	チュビンスカヤスザンナ ルガーデイビッドシー クエツナークラウスイー		
发明人	チュビンスカヤ, スザンナ ルガー, デイビッド シー, クエツナー, クラウス イー .		
IPC分类号	G01N33/53 C12Q1/68 G01N33/50 G01N33/543 G01N33/564 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/6893 G01N33/564 G01N2333/51 G01N2800/105		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.D C12Q1/68.A G01N33/50.P G01N33/50.X G01N33/543.545.A G01N33/564.B		
F-TERM分类号	2G045/AA35 2G045/AA40 2G045/BB10 2G045/BB16 2G045/BB50 2G045/BB51 2G045/CB01 2G045/CB13 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FA11 2G045/FB01 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB05 2G045/FB07 2G045/FB13 2G045/GC15 2G045/JA01 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR08 4B063/QR42 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX02		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/270528 2001-02-21 US 60/348111 2001-11-09 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

一种通过测量滑液或关节组织中成骨蛋白-1 (OP-1) 的蛋白质水平和/或 mRNA 水平来确定患者间接组织中软骨退化或软骨再生的方法, 提供。根据本发明的方法中, 易感性关节组织变性和关节组织的再生的患者包括炎性关节病或年龄相关性病症, 检测, 诊断, 预测, 确定, 以及炎性关节病或与年龄相关的监测患者的关节退变和关节组织再生它对振铃非常有用。

行表4000-0205

(P2005-528581)

(43) 公表日 平成17年9月22日(2005.9.2)

(6) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
G01N 33/53	G01N 33/53 ZNAD	2G045
C12Q 1/68	C12Q 1/68 A	4B063
G01N 33/50	G01N 33/50 P	
G01N 33/543	G01N 33/50 X	
G01N 33/564	G01N 33/543 545A	
	審査請求有 予備審査請求有 (全 39 頁) 最終頁に続	
(2) 出願番号	特願2002-568028 (P2002-568028)	(7) 出願人
(6) (22) 出願日	平成14年2月20日 (2002.2.20)	ストライカー コーポレーション
(8) 翻訳文提出日	平成15年8月20日 (2003.8.20)	アメリカ合衆国ミシガン州49003, ;
(8) 国際出願番号	PCT/US2002/005551	ラマズー, フェアフィールド・ロード ;
(8) 国際公開番号	W02002/068962	725
(8) 国際公開日	平成14年9月6日 (2002.9.6)	(7) 代理人
(3) 優先権主張番号	60/270, 528	弁理士 山本 秀策
(3) 優先日	平成13年2月21日 (2001.2.21)	(7) 代理人
(3) 優先権主張国	米国 (US)	弁理士 安村 高明
(3) 優先権主張番号	60/348, 111	(7) 代理人
(3) 優先日	平成13年11月9日 (2001.11.9)	弁理士 森下 夏樹
(3) 優先権主張国	米国 (US)	(7) 発明者
		チュビンスカヤ, スザンナ
		アメリカ合衆国 イリノイ 60061,
		ハーノン ヒルズ, アナポリス ;
		イヴ 131
		最終頁に続く