

(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2017-507659

(P2017-507659A)

(43) 公表日 平成29年3月23日(2017.3.23)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 9/64 (2006.01)	C 1 2 N 9/64	Z N A Z 4 B 0 5 0
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53	D 4 B 0 6 3
G O 1 N 33/543 (2006.01)	G O 1 N 33/543	5 O 1 A
C 1 2 Q 1/37 (2006.01)	C 1 2 Q 1/37	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 47 頁)

(21) 出願番号	特願2016-554676 (P2016-554676)	(71) 出願人	516257305 オイ メディックス バイオケミカ エー ビー フィンランド国、エフアイー02180 エスポー、クロヴィンペッロンティエ 3
(86) (22) 出願日	平成27年2月27日 (2015.2.27)	(71) 出願人	510256609 デントグノステイツクス・ゲー・エム・ベ ー・ハー ドイツ国、07745・イエーナ、タツツ エントプロムナーデ・2
(85) 翻訳文提出日	平成28年8月25日 (2016.8.25)	(74) 代理人	100080791 弁理士 高島 一
(86) 国際出願番号	PCT/FI2015/050121	(74) 代理人	100125070 弁理士 土井 京子
(87) 国際公開番号	W02015/128549		
(87) 国際公開日	平成27年9月3日 (2015.9.3)		
(31) 優先権主張番号	20145192		
(32) 優先日	平成26年2月27日 (2014.2.27)		
(33) 優先権主張国	フィンランド (FI)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 MMP-8 活性化物質及び同物質の判定並びに使用

(57) 【要約】

本発明は、MMP-8 中間部分活性化物質等、新規のMMP-8 活性化物質に係る。本発明はまた、被験者から得られた生体試料におけるMMP-8 活性化物質又は活性型MMP-8 フラグメント等の検出と、活性型MMP-8 のレベル異常又は上昇に関連の疾患の診断におけるその使用とに係る。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

MMP - 8 活性化物質、好ましくは MMP - 8 中間部分活性化物質であって、1つ以上の MMP - 8 活性フラグメントを含み、20 ~ 35 kDa、好ましくは 20 kDa、25 kDa、30 kDa、又は 35 kDa のサイズを有することを特徴とする MMP - 8 活性化物質。

【請求項 2】

前記活性化物質のサイズは、APMA で天然 MMP - 8 を活性化することによって得られた活性化物質に対応する請求項 1 に記載の MMP - 8 活性化物質。

【請求項 3】

前記活性化物質のサイズは、タンパク質分解除去又は好ましくは NaOCl による酸化的活性化での化学的修飾により天然 MMP - 8 を活性化することによって得られた活性化物質に対応する請求項 1 に記載の MMP - 8 活性化物質。

【請求項 4】

前記活性化物質は、配列番号 1 の配列を含む請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の MMP - 8 活性化物質。

【請求項 5】

前記活性化物質は、配列番号 2 の配列を含む請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の MMP - 8 活性化物質。

【請求項 6】

試料中の MMP - 8 活性の判定方法であって、
a) 被験者からの生体試料を提供するステップと、
b) 前記生体試料において、1つ以上の MMP - 8 活性フラグメントを含み、20 ~ 35 kDa、好ましくは 20 kDa、25 kDa、30 kDa、又は 35 kDa のサイズを有する 1つ以上の MMP - 8 活性化物質、好ましくは MMP - 8 中間部分活性化物質の存在を検出するステップと、
c) 選択的に、MMP - 8 活性化物質の存在を前記試料中の活性型 MMP - 8 の存在と相互に関連付けるステップと、及び/又は、
d) 選択的に、MMP - 8 活性化物質の存在を前記試料中の他のより多くの部分を占める活性型 MMP - 8 の存在と相互に関連付けるステップを備え、
前記生体試料中の MMP - 8 活性化物質の存在は、前記試料中の活性型 MMP - 8 の存在を表示、確認、及び/又は予測するものである方法。

【請求項 7】

前記試料は、口腔、歯肉溝滲出液、インプラント周囲内縁流体、オーラルプラーク、歯垢、口濯ぎ液、口洗浄液、唾液、根管流体、傷からの滲出液、PUS、オーラルバイオフィルム、組織バイオブシー、口腔スワップ、口腔病斑からの血液より得られる請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記試料は、羊水、血清、血漿、腔洗浄、鼻洗浄、副鼻腔、耳、静脈洞、尿、関節液、脳脊髄液、排泄物、スワップ、涙液、洗浄(肺)、組織バイオブシー、及び/又は汗より得られる請求項 6 に記載の方法。

【請求項 9】

前記活性化物質のサイズは、APMA で天然 MMP - 8 を活性化することによって得られた活性化物質に対応する請求項 6 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記活性化物質のサイズは、タンパク質分解除去又は好ましくは NaOCl による酸化的活性化での化学的修飾により天然 MMP - 8 を活性化することによって得られた活性化物質に対応する請求項 6 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

前記活性化物質は、配列番号 1 の配列を含む請求項 6 ~ 10 のいずれか一項に記載の方

10

20

30

40

50

法。

【請求項 1 2】

前記活性化物質は、配列番号 2 の配列を含む請求項 6 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記 MMP - 8 活性化物質の存在は、前記生体試料中の MMP - 8 フラグメントの検出を行うリガンドシステムを使用して判定される請求項 6 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記リガンドシステムは、1つ以上の抗体、抗体対、及び/又は抗体フラグメントからなり、検定は、好ましくはウェスタンブロッティング、IFMA、EIA、EIMA、ELISA、ラテラルフロー検定、表面プラズモン共鳴検定、及び電気化学検定からなる群より選択される定量的、半定量的、又は定性的な免疫学的測定法である請求項 1 3 に記載の方法。

10

【請求項 1 5】

前記 MMP - 8 活性化物質の存在は、前記生体試料中の MMP - 8 中間部分活性化物質の直接的タンパク質検出技術を使用して判定される請求項 6 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記方法はさらに、ステップ b) で得られた結果を参照試料と比較することにより、疾患又は疾患進行の素因又はリスクを診断するステップをさらに備え、

20

a) 前記参照試料は、現在通常レベルの MMP - 8 を有することが分かっている被験者群又は患者群より得て、前記生体試料と前記参照試料とで結果が類似していた場合、前記被験者が罹患していない、又は罹患しにくいこと、若しくは疾患が進展又は進行するリスクを有していない、又はそのリスクが生じにくいことを示し、前記生体試料中の MMP - 8 活性化物質のレベルが前記参照試料に比して上昇している場合、前記被験者が罹患している、又は罹患し易いこと、若しくは疾患が進展又は進行するリスクが増加し易いことを示し、又は、

b) 前記参照試料は、現在罹患している、又は罹患し易いことが分かっている被験者群又は患者群より得て、前記生体試料と前記参照試料とで結果が類似していた場合、前記被験者が罹患している、又は罹患し易いこと、若しくは疾患が進展又は進行するリスクを有している、又はそのリスクが生じ易いことを示す請求項 6 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 1 7】

前記疾患は、歯周組織炎症、歯周組織喪失(劣化)、歯肉炎、歯周炎、インプラント周囲炎、インプラント周囲粘膜炎、歯の喪失、歯科インプラント寛解、歯槽骨喪失、粘膜炎、粘膜の変化、根尖性歯周組織炎、歯根管炎症、虫歯、上下顎骨断裂、歯の矯正移動、アレルギー性炎症反応、及び/又は口腔内細菌によって発生する菌血症である請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記 MMP - 8 活性化物質の存在は、慢性又は急性の歯周炎又はインプラント周囲炎症等の歯周病を表示又は予測するものであり、これらの口腔内疾患は、糖尿病 I、糖尿病 II、COPD(慢性閉塞性肺疾患)、リウマチ疾患、関節炎疾患、骨粗鬆症、整形外科的疾患、自己免疫疾患、組織移植疾患、脳卒中、心筋梗塞、動脈硬化等のエンドプロテゼ心血管疾患、早期産、低出生体重等の妊娠関連リスク、勃起障害、精子数の減少、及び精子細胞の可動性低下等の生殖リスク等の全身性の疾患又は障害の表示、増強、または既知のリスク因子である請求項 1 6 又は 1 7 に記載の方法。

40

【請求項 1 9】

前記疾患は、羊膜内炎症、母体炎症、新生児疾患、早期分娩、低出生体重、羊膜病理等の婦人科疾患、悪性腫瘍、乳癌、白血病等の癌性疾患、リウマチ関節炎、関節症等の関節

50

炎/リウマチ疾患、あらゆる形態の糖尿病、腎症疾患、腎疾患、難治性糖尿病性創傷等の糖尿病性疾患、円錐角膜、角膜のペルーシド角膜変性等の眼球疾患、耳鼻咽喉科的疾患（例えば、耳、副鼻腔からの疾患）、ポリオ症、敗血症、全身性炎症反応症候群（SIRS）、HIV、ヘリコバクターピロリ感染症、全身性炎症、全身性軽度炎症等の感染症又は炎症、気管支炎、気管支拡張症、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、小児感染症/炎症等の肺感染症及び炎症、髄膜炎、クローン病等の神経系感染症、炎症、及び疾患、血管疾患、動脈内プラーク炎症等のアテローム性動脈硬化、塞栓症、及び脳卒中等の心血管疾患、重症、難治性創傷、及び皮膚熱傷等の創傷、（糞便検査からの）腸管疾患、トラウマ又は事故後の疾患、及び/又は、メタボリック症候群及び肥満である請求項16に記載の方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、診断法分野全般に係る。本発明は、特に、MMP-8活性化物質、好ましくはMMP-8中間部分活性化物質と、被験者から得られた生体試料におけるMMP-8活性、MMP-8活性化物質、又は活性型MMP-8フラグメントの検出と、疾患又は疾患進行の素因又はリスクの判定とに係る。本発明はまた、活性型MMP-8のレベル異常又は上昇に関連の疾患の診断におけるMMP-8活性化物質の使用に係る。

【背景技術】

【0002】

歯周病は、ヒトの歯における主要な問題である。実際、虫歯よりも歯周病によって失われる歯の方が多い。そこで信頼度の高い歯周病診断テストのニーズが高い。特に、早期の歯肉炎ステージであっても、疾患発症の早期ステージでの診断、すなわち明らかな破壊兆候が発生する前の組織破壊が開始する初期ステージでの診断のニーズがある。

20

【0003】

歯周病は、歯肉（歯茎）及び歯を支える歯槽骨構造に影響する感染症に由来した炎症群である。

【0004】

歯周病の主な原因は、歯に付着した歯垢及びバイオフィームである。これらは歯茎の炎症を引き起こし、結果として歯周病となり、実際の歯列支持構造及び骨を破壊してしまう。一般的に、歯茎線の上（歯肉縁上）下（歯肉縁下）双方で歯垢及びバイオフィームには大量の細菌が堆積している。

30

【0005】

歯肉炎（歯茎炎）は、歯肉炎の中でも、歯肉が炎症を起こしているものの、深い（>4mm）歯周ポケットが検出されない歯周炎と区別される。従って軟性及び硬性の（骨質）歯列支持構造の不可逆的破壊は歯肉炎とは関連付けられない。歯周炎は、歯肉の炎症と、軟性及び硬性の（骨質）歯列支持構造の破壊とに特徴付けられる。しかしながら歯周炎は、臨床的に健康に見える歯肉においては見落とされ得る。

【0006】

出版物（例えば、Pubmed search、2010年4月/2013年7月：MMP-8、引用640/891、歯周/インプラント学におけるMMP-8、引用95/136）に反映されるように、過去20年に亘って診断システムの改良のために多大な研究開発が行われてきたものの、歯科インプラントのインプラント周囲炎における歯周病とそれが進行した場合の歯科治療費は未だ莫大なものである。

40

【0007】

認識が一層深まり、治療と、一方でチェアサイド検査又は実験室検査で疾患を特定することのできる改良型テストシステムの能力とに関して多大な尽力がなされているにもかかわらず、ドイツ等の先進工業国では疾患が劇的に蔓延、拡大している。

【0008】

「近心面頬面部位および遠心舌側部位を考慮したCDCの定義によると、歯周炎の有病

50

率は、双方の年齢コホートで70.9%及び87.4%であり、各々、1/4及び1/2は深刻な状況であった」(B. Holtfreterら、2010年)。

【0009】

過去25年間、数年前の歯周炎及びその他の理由で喪失した歯を代替することのできる歯科インプラントが開発されたことにより、修復技術は劇的な発展を遂げてきた。

【0010】

しかしながら、歯周炎の天然歯と同一又は類似の病理学が歯科インプラントにも当てはまる。

【0011】

天然歯について上述したように、歯周炎は主に、インプラント面、インプラントと支台歯との間の接続部分、歯科補綴学上部構造とに付着したバイオフィルムの病原体によって引き起こされ、歯科インプラントの周囲組織には細菌残屑(LPS)がトリガとなって類似の宿主反応が生じ、炎症反応が誘発されると制御が効かず、その途中で主としてMMP-8等の大量のプロテアーゼを排出するであろう。

【0012】

天然歯と同様に、MMP-8の不均衡な活性化により、インプラント周囲溝滲出液(PISF)中の活性型MMP-8(aMMP-8)の過反応及び著しい高濃度化が生じ(Ma Jら、2000年。Xu Lら、2008年)、個別に予測不能な期間で歯槽骨の顕著な喪失(インプラント周囲炎)と引いてはインプラントの喪失を生じる。

【0013】

一旦インプラント周囲炎のステージになってしまうと、疾患を治療する選択肢はほぼない。歯周炎と同等に、インプラント周囲炎においては、臨床診断(Ma Jら、2000年。Xu Lら、2008年)は、例えばアタッチメントロスのプロービング又はX線検査等により、疾患が既に引き起こした破壊のレベルを測定することを意味する。タンパク質解析等その他の方法が十分に特異性を有するかは証明されておらず、パラメータにはチェアサイド診断でアクセスすることができず、関連生体試料はルーチン診断のために特定実験室に送られる程に安定的ではない。

【0014】

従って、歯科専門家、医療専門家、及び患者のホームモニタリングにとっても、活性型プロテアーゼ(MMP-8等)のみならず、活性化プロセスをも認識可能な検査システム、特に迅速なチェアサイド検査の開発が未だに主な関心事となっている。これにより、個々の歯周状況の予測判断又は予後解析を改良することができるが、このことは天然歯において将来又は現在存在する歯周病のケース、及びインプラントについてはインプラント周囲障害のリスクの早期検出を行うために重要である。

【0015】

これにより、医師らはできる限り早期にリスクのある患者を歯科専門家に紹介できるようになり、歯科専門家はより早期の予防治療を実施できるようになり、患者に一層の口腔衛生を実現するよう動機づけることとなろう。歯周病/障害の早期検出とそれに続く予防的治療を行うことにより、ヘルスケアシステムがかつて虫歯予防について学習した様に、莫大な治療及び修復コストを節約するのに役立つ。

【0016】

さらに今日、(慢性)歯周炎が多数の全身性疾患と相互作用し、糖尿病、心筋梗塞(MI)、脳卒中、及びその他の心血管及び神経系疾患(CVD)、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、リウマチ関節炎(RA)、クローン病(MC)、敗血症、HIV、ポリレオ症、及びその他の全身性軽度炎症、メタボリック症候群、肥満、腎症、組織移植、整形外科的障害、及び早期産(PTD)については低出生体重、及び勃起障害、精子数の減少、並びに精子細胞の可動性低下等の生殖リスク等、多数の全身性疾患の重大なリスク因子とみなされることが十分に実証されている。

【0017】

例えば、オッズ比は、健康な歯周の患者に対して歯肉炎の患者で増え、糖尿病(死亡率

10

20

30

40

50

) = 7.7、PTD = 7.5、脳卒中 = 8.5である。歯周炎は、MI、糖尿病、及び脳卒中のリスク因子としてよく認識されている。これらの研究の多くは、歯周病の全身及び局所（口腔）バイオマーカーとしてのMMP-8の関連性も示している。

【0018】

このように、歯周病の早期発症診断と予後検査システムによる歯周障害の進展及び進行のリスクのある患者の特定とができるようになるということは、歯科産業/分野のみにとって重大なことではなく、実際には医療産業/分野全体及びヘルスケアシステムにとって重大なことである。

【0019】

米国ヘルスケア保険のAETNAは、例えば歯周病治療を経験していない糖尿病の健康総コストに対する歯周病治療を経験した糖尿病の健康総コストは16%低く、口腔疾患の重要性及び影響力を示しており、予防治療との組み合わせで歯周リスクの早期検出を改良することは、患者や将来のヘルスケアの総コストにとって意義のあることと言えよう。

10

【0020】

全身MMP-8は、他の疾患においても役割を果たしている。細胞外マトリクス再生、炎症反応の調節、及びその他の生理的プロセスにおけるMMP-8の優勢な役割、広範に亘る病理学におけるMMP-8の関与、及び一部の炎症及び癌進行における薬物標的又は疾患マーカーとしてのMMP-8の役割については十分に実証されている。MMP-8は、広範に亘る炎症性障害において可能な薬物標的として記されており、患者のMMP-9レベルが上昇した場合、炎症性疾患の進行としばしば関連付けられる(Dejonckheere E.ら、2011年)。

20

【0021】

早期の血清MMP-8レベル上昇は、敗血症性感染症及び心血管疾患における致命的転帰を予測するものであることが分かっている。さらに細菌性髄膜炎(BM)の患者は、脳脊髄液(CSF)中のMMP-8レベルが高い、すなわち上昇していること、またBMの子供のCSF中のMMP-8レベルは、非死亡患者に比べて死亡患者において顕著に高いことが示されている。

羊水における炎症及び/又は感染症が早産及び異常新生児転帰のリスク因子であることも知られている。MMP-8は、感染症/炎症の予測及び診断、並びに早産及び新生児合併症の進展のマーカーとしても使用されている。

30

【発明の概要】

【0022】

本発明の目的は、歯周又はインプラント周囲組織の劣化、歯周又はインプラント周囲の炎症に関連の疾患のリスク増加、素因、又はこれに繋がる活性プロセスを判定する新規の方法を提供することである。

【0023】

本発明の他の目的は、被験者から得た生体試料におけるMMP-8活性又は活性化プロセスの検出を行う新規の方法を提供することである。

【0024】

本発明の他の目的は、異なる患者群から得た試料におけるMMP-8種の存在の検出を行う新規の方法を提供することである。

40

【0025】

本発明の他の目的は、MMP-8、特にMMP-8中間部分活性化物質等のMMP-8活性化物質の形成、存在、濃度上昇、又は活性化に関連の疾患の診断を行う新規の方法を開発することである。

【0026】

MMP-8中間部分活性化物質の個別の検出、群毎の検出、又はより大きな活性型MMP-8種とともに検出を行う併用検定も設計することができる。併用検定は、抗体に認識されるエピトープが活性化物質及び活性型MMP-8の双方において双方の分子又は一部の分子に存在する共通エピトープである場合、及び/又は、エピトープがより大きな活性

50

型 MMP - 8 分子に比して MMP - 8 の活性物質に数倍存在する場合、及び / 又は、活性化プロセスの立体増加作用と称される現象中、MMP - 8 の多数の活性化物質が単一の MMP - 8 分子から生成される場合に特に有用である。

【0027】

本発明の様態は、5 ~ 35 kDa、好ましくは 10 ~ 30 kDa、より好ましくは 20 ~ 35 kDa、好適には約 5 kDa、6 kDa、7 kDa、8 kDa、9 kDa、10 kDa、11 kDa、12 kDa、13 kDa、14 kDa、15 kDa、16 kDa、17 kDa、18 kDa、19 kDa、20 kDa、21 kDa、22 kDa、23 kDa、24 kDa、25 kDa、26 kDa、27 kDa、29 kDa、30 kDa、31 kDa、32 kDa、33 kDa、34 kDa、及び / 又は 35 kDa のサイズを有する MMP - 8 中間部分活性化物質等の MMP - 8 活性化物質と、試料におけるこのような MMP - 8 活性化物質の検出とに係る。

10

【0028】

本発明の他の様態は、試料中の MMP - 8 活性を判定する方法に係り、被験者からの生体試料を提供するステップと、試料中における 1 つ以上の MMP - 8 活性化物質、特に MMP - 8 中間部分活性化物質の存在を検出するステップと、任意で試料中の MMP - 8 活性化物質又は MMP - 8 中間部分活性化物質の存在を試料中のより多くの部分を占める活性型 MMP - 8 の存在とを関連付けるステップとを備え、試料中の MMP - 8 活性化物質又は MMP - 8 中間部分活性化物質の存在は、試料中の活性型 MMP - 8 の存在を表示、予測、及び / 又は確認するものであり、これによって、例えば活性型 MMP - 8 の分析検出及び検定におけるその予測力を改良する。例えば、反復的又は慢性的な口腔液の MMP - 8 活性化物質の増加は治療反応を予測するものであり、例えば歯周炎のアタッチメントロス等、疾患進行のリスクのある部位及び / 又は患者を示す。

20

【0029】

本発明の他の様態は、さらなる疾患又は疾患進行の素因の存在の診断に係り、被験者から得た生体試料中における 1 つ以上の MMP - 8 中間部分活性化物質等の MMP - 8 活性化物質の存在を判定するステップと、検出結果を参照試料と比較することにより、疾患の存在又は素因を診断するステップとを備え、

a) 参照試料は、通常レベルの MMP - 8 を有することが分かっている被験者群又は患者群より得て、生体試料と参照試料とで結果が類似していた場合、被験者が現在罹患していない、又は罹患し易くないこと、若しくは疾患が進展又は進行するリスクを有していない、又はそのリスクが生じ易くないことを示し、生体試料中の MMP - 8 活性化物質又は MMP - 8 中間部分活性化物質のレベルが参照試料に比して上昇している場合、被験者が現在 (検査時) 罹患している、又は罹患し易いこと、若しくは疾患が進展又は進行するリスクが増加し易いことを示し、又は、

30

b) 参照試料は、現在罹患している、又は罹患し易いことが分かっている被験者群又は患者群より得て、生体試料と参照試料とで結果が類似していた場合、被験者が罹患している、又は罹患し易いこと、若しくは疾患が進展又は進行するリスクを有している、又はそのリスクが生じ易いことを示す。

【0030】

本発明を特徴付ける特性を添付のクレームに示す。

40

【0031】

本発明の他の目的は、MMP - 8 活性フラグメントを示す MMP - 8 分子種と、時間分解免疫蛍光分析検定 (IFMA) 及び免疫 ELISA 法 (IEMA、ELISA) によって解析された異なる歯周組織炎症負荷レベルの MMP - 8 免疫反応性レベルとの相関を見出すことである。

【図面の簡単な説明】

【0032】

【図 1 A】図 1 A は、歯数を考慮に入れた場合の喫煙ステータスに応じた検査群 1 ~ 4 (実施例 1) の MMP - 8 IFMA を示し、図 1 B は、MMP - 8 IEM レベルを示してい

50

る。群 1 ~ 4 までの非喫煙者の動向は、I F M A ($p = 0.010$) 及び I E M A ($p = 0.028$) の双方において顕著である。

【図 1 B】図 1 A は、歯数を考慮に入れた場合の喫煙ステータスに応じた検査群 1 ~ 4 (実施例 1) の M M P - 8 I F M A を示し、図 1 B は、M M P - 8 I E M レベルを示している。群 1 ~ 4 までの非喫煙者の動向は、I F M A ($p = 0.010$) 及び I E M A ($p = 0.028$) の双方において顕著である。

【図 2 A】図 2 A は、M M P - 8 種及びそれらの組み合わせを示している。フォレストプロットは、M M P - 8 k D a 種の有病率のオッズ比 (95% の信頼水準 $c 1$) を示している。従変数：I F M A レベル (歯数で調整) > 群 4 (高度歯周組織炎症負荷) における中間レベル。相関が有意である。図 2 B は、M M P - 8 種及びそれらの組み合わせを示している。フォレストプロットは、M M P - 8 k D a 種の有病率のオッズ比 (95% $c 1$) を示している。従変数：喫煙。相関が有意である。図 2 C は、M M P - 8 k D a 種及びそれらの組み合わせを示している。フォレストプロットは、M M P - 8 k D a 種の有病率のオッズ比 (95% $c 1$) を示している。従変数：喫煙。相関が有意である。

【図 2 B】図 2 A は、M M P - 8 種及びそれらの組み合わせを示している。フォレストプロットは、M M P - 8 k D a 種の有病率のオッズ比 (95% の信頼水準 $c 1$) を示している。従変数：I F M A レベル (歯数で調整) > 群 4 (高度歯周組織炎症負荷) における中間レベル。相関が有意である。図 2 B は、M M P - 8 種及びそれらの組み合わせを示している。フォレストプロットは、M M P - 8 k D a 種の有病率のオッズ比 (95% $c 1$) を示している。従変数：喫煙。相関が有意である。図 2 C は、M M P - 8 k D a 種及びそれらの組み合わせを示している。フォレストプロットは、M M P - 8 k D a 種の有病率のオッズ比 (95% $c 1$) を示している。従変数：喫煙。相関が有意である。

【図 2 C】図 2 A は、M M P - 8 種及びそれらの組み合わせを示している。フォレストプロットは、M M P - 8 k D a 種の有病率のオッズ比 (95% の信頼水準 $c 1$) を示している。従変数：I F M A レベル (歯数で調整) > 群 4 (高度歯周組織炎症負荷) における中間レベル。相関が有意である。図 2 B は、M M P - 8 種及びそれらの組み合わせを示している。フォレストプロットは、M M P - 8 k D a 種の有病率のオッズ比 (95% $c 1$) を示している。従変数：喫煙。相関が有意である。図 2 C は、M M P - 8 k D a 種及びそれらの組み合わせを示している。フォレストプロットは、M M P - 8 k D a 種の有病率のオッズ比 (95% $c 1$) を示している。従変数：喫煙。相関が有意である。

【図 3 A】図 3 は、M M P - 8 I F M A 及び I E M A の診断感度及び特異度の評価を行う受信者動作特性 (R O C) 曲線分析 (図 3 A) と、状態変数として高度歯周組織炎症負荷を与えた群 4 における 25 + 35 k D a の M M P - 8 種の有病率 (図 3 B) とを示している。R O C 曲線下の領域については、95% の信頼区間及び p 値である。実施例 1 を参照のこと。

【図 3 B】図 3 は、M M P - 8 I F M A 及び I E M A の診断感度及び特異度の評価を行う受信者動作特性 (R O C) 曲線分析 (図 3 A) と、状態変数として高度歯周組織炎症負荷を与えた群 4 における 25 + 35 k D a の M M P - 8 種の有病率 (図 3 B) とを示している。R O C 曲線下の領域については、95% の信頼区間及び p 値である。実施例 1 を参照のこと。

【図 4 A】図 4 は、組み換えヒト M M P - 8 (P r o t e a i m m u n 社) の有機水銀化合物 A P M A (図 4 A) 及び酸化物 N a O C l (図 4 B) 活性化因子の作用の S D S - P A G E (10%) 解析を示す。r h M M P - 8 の量及び培養時間を示す。A P M A 及び N a O C l は双方ともに、活性化に際して低分子量の M M P - 8 種の生成を誘発する。矢印によって示される 20 ~ 30 k D a 活性化フラグメントの時間依存形成を観察されたい。図 4 C は、A P M A 及び N a O C l、ヒトの体液及び血清による、3つの異なる製造元 (P r o t e a i m m u n、M e r c k、及び I n v e n t) から入手の r h M M P - 8 を使用したウェスタンイムノプロット解析を示す。レーン 1：P r o t e a i m m u n による r M M P - 8、レーン 2：レーン 1 と同一のものプラス A P M A、レーン 3：レーン 1 と同一のものプラス N a O C l、レーン 4：M e r c k による r h M M P - 8、レーン 5

10

20

30

40

50

：レーン４と同一のものプラスＡＰＭＡ、レーン６：レーン４と同一のものプラスＮａＯＣ１、レーン７：本発明のＭＭＰ－８抗原、レーン８：レーン７と同一のものプラスＡＰＭＡ、レーン９：レーン７と同一のものプラスＮａＯＣ１、レーン１０：ヒトの歯周炎歯肉溝滲出液（ＧＣＦ）、レーン１１：ヒトのインプラント周囲炎内縁流体（ＰＩＳＦ）、レーン１２：ヒトの矯正治療を行った歯のＧＣＦ、レーン１３：ヒトの歯周炎唾液、レーン１４：ヒトの歯周炎口濯ぎ液、レーン１５：感染したヒトの羊水、レーン１６：ヒトの脳脊髄液、レーン１７：ヒトの敗血症血清。ＭＭＰ－８の活性化に際して形成される優勢な２０～３０ｋＤａフラグメントを矢印で示す。実施例２を参照のこと。

【図４Ｂ】図４は、組み換えヒトＭＭＰ－８（Ｐｒｏｔｅａｉｍｍｕｎ社）の有機水銀化合物ＡＰＭＡ（図４Ａ）及び酸化物ＮａＯＣ１（図４Ｂ）活性化因子の作用のＳＤＳ－ＰＡＧＥ（１０％）解析を示す。ｒｈＭＭＰ－８の量及び培養時間を示す。ＡＰＭＡ及びＮａＯＣ１は双方ともに、活性化に際して低分子量のＭＭＰ－８種の生成を誘発する。矢印によって示される２０～３０ｋＤａ活性化フラグメントの時間依存形成を観察されたい。図４Ｃは、ＡＰＭＡ及びＮａＯＣ１、ヒトの体液及び血清による、３つの異なる製造元（Ｐｒｏｔｅａｉｍｍｕｎ、Ｍｅｒｃｋ、及びＩｎｖｅｎｔ）から入手のｒｈＭＭＰ－８を使用したウェスタンイムノブロット解析を示す。レーン１：ＰｒｏｔｅａｉｍｍｕｎによるｒＭＭＰ－８、レーン２：レーン１と同一のものプラスＡＰＭＡ、レーン３：レーン１と同一のものプラスＮａＯＣ１、レーン４：ＭｅｒｃｋによるｒｈＭＭＰ－８、レーン５：レーン４と同一のものプラスＡＰＭＡ、レーン６：レーン４と同一のものプラスＮａＯＣ１、レーン７：本発明のＭＭＰ－８抗原、レーン８：レーン７と同一のものプラスＡＰ
10
20

【図４Ｃ】図４は、組み換えヒトＭＭＰ－８（Ｐｒｏｔｅａｉｍｍｕｎ社）の有機水銀化合物ＡＰＭＡ（図４Ａ）及び酸化物ＮａＯＣ１（図４Ｂ）活性化因子の作用のＳＤＳ－ＰＡＧＥ（１０％）解析を示す。ｒｈＭＭＰ－８の量及び培養時間を示す。ＡＰＭＡ及びＮ
30
40

ａＯＣ１は双方ともに、活性化に際して低分子量のＭＭＰ－８種の生成を誘発する。矢印によって示される２０～３０ｋＤａ活性化フラグメントの時間依存形成を観察されたい。図４Ｃは、ＡＰＭＡ及びＮａＯＣ１、ヒトの体液及び血清による、３つの異なる製造元（Ｐｒｏｔｅａｉｍｍｕｎ、Ｍｅｒｃｋ、及びＩｎｖｅｎｔ）から入手のｒｈＭＭＰ－８を使用したウェスタンイムノブロット解析を示す。レーン１：Ｐｒｏｔｅａｉｍｍｕｎによるｒ
40

ＭＭＰ－８、レーン２：レーン１と同一のものプラスＡＰＭＡ、レーン３：レーン１と同一のものプラスＮａＯＣ１、レーン４：ＭｅｒｃｋによるｒｈＭＭＰ－８、レーン５：レーン４と同一のものプラスＡＰＭＡ、レーン６：レーン４と同一のものプラスＮ
40

ａＯＣ１、レーン７：本発明のＭＭＰ－８抗原、レーン８：レーン７と同一のものプラスＡ
40

Ｐ
40

Ｍ
40

Ａ、レーン９：レーン７と同一のものプラスＮ
40

ａ
40

Ｏ
40

Ｃ
40

１、レーン１０：ヒトの歯周炎歯
40

肉
40

溝
40

滲
40

出
40

液
40

（
40

Ｇ
40

Ｃ
40

Ｆ）、レーン１１：ヒトのインプラント周囲炎内縁流体（Ｐ
40

Ｉ
40

Ｓ
40

Ｆ）、
40

レーン１２：ヒトの矯正治療を行った歯のＧ
40

Ｃ
40

Ｆ、レーン１３：ヒトの歯周炎唾液、レーン
40

１
40

４
40

：
40

ヒ
40

ト
40

の
40

歯
40

周
40

炎
40

口
40

濯
40

ぎ
40

液、レーン１５：感染したヒトの羊水、レーン
40

１
40

６
40

：
40

ヒ
40

ト
40

の
40

脳
40

脊
40

髄
40

液、レーン１７：ヒトの敗血症血清。Ｍ
40

Ｍ
40

Ｐ
40

－
40

８
40

の
40

活
40

性
40

化
40

に
40

際
40

し
40

て
40

形
40

成
40

さ
40

れ
40

る
40

優
40

勢
40

な
40

２
40

０
40

～
40

３
40

０
40

ｋ
40

Ｄ
40

ａ
40

フ
40

ラ
40

グ
40

メ
40

ン
40

ト
40

を
40

矢
40

印
40

で
40

示
40

す。実施例２を参照のこと。

【図５】図５は、ＭＭＰ－８抗体及びＭＭＰ－８濃度を異ならせた非感染（＃１６）及び感染（＃１２、＃１３、及び＃１９）ヒト羊水試料のウェスタンイムノブロット解析を示している。

【図６】図６は、培養時間を異ならせてＡＰＭＡによって活性化した組み換えヒトＭ
40

Ｍ
40

Ｐ
40

－
40

８
40

（
40

Ｐ
40

ｒ
40

ｏ
40

ｔ
40

ｅ
40

ａ
40

ｉ
40

ｍ
40

ｍ
40

ｕ
40

ｎ
40

）
40

の
40

Ｓ
40

Ｄ
40

Ｓ
40

－
40

Ｐ
40

Ａ
40

Ｇ
40

Ｅ
40

解
40

析
40

を
40

示
40

し
40

て
40

い
40

る。シーケンシングに使用したバンドを図中に示す。

10

20

30

40

50

【図7】図7は、種々の画分の精製活性型MMP-8のSDS-PAGEを示している。試料は、左から右に向かって、分子量マーカーPAGE Ruler、1)~4)種々の画分の精製hMMP-8、分子量マーカーSpectra Multicolorである。

【図8】図8は、anti-hMMP-8-MoAb1491-E6-F7で染色した種々のアリコートの精製hMMP-8のウェスタンブロットを示している。試料は、左から右に向かって、分子量マーカーDual Xtra、1)~4)種々の画分の精製hMMP-8、5)精製前の胎盤抽出物である。

【発明を実施するための形態】

【0033】

配列一覧

配列番号1：図6に示すバンド3、4、5、及び6のMMP-8活性化物質に見出されるMMP-8中間部分配列であって、例えばバンド3の場合、25kDaのサイズを有する。

配列番号2：図6に示すバンド2、3、4、5、及び8のMMP-8活性化物質に見出されるMMP-8中間部分配列であって、例えばバンド4の場合、21kDaのサイズを有する。

【0034】

本発明の詳細な説明

本発明者らは、驚くべきことに、5~35kDa、好ましくは約10~30kDa、より好ましくは約20~35kDaのサイズを有するMMP-8中間部分活性化物質等、新規に発見したMMP-活性化物質を検出することにより、活性型MMP-8の存在が種々の生体試料において検出できることを見出した。断片化MMP-8は、5kDa、6kDa、7kDa、8kDa、9kDa、10kDa、11kDa、12kDa、13kDa、14kDa、15kDa、16kDa、17kDa、18kDa、19kDa、20kDa、21kDa、22kDa、23kDa、24kDa、25kDa、26kDa、27kDa、29kDa、30kDa、31kDa、32kDa、33kDa、34kDa、及び35kDaのサイズを有し、配列番号1又は配列番号2の配列を備える、種々に規定された分子形態で存在する。

一様態において、フラグメントの異なる分子種を試料種別と相互に関連付けることができ、フラグメントの特定の組み合わせを使用して、試料を得た被験者における特定の状態、疾患の存在、疾患進展のリスクを示すことができる。

【0035】

少なくとも1つのMMP-8のフラグメントを含むMMP-8活性化物質又はMMP-8中間部分活性化物質は、従来既知のいずれかの方法を使用して試料中に検出することができる。検定は、定性的、半定量的、又は定量的な免疫学的測定法とすることができる。本発明に係る好適な検出方法の非限定的例として、ウェスタンブロッティング、IFMA、EIA、ELISA、ラテラルフロー検定、ディップスティック検定、表面プラズモン共鳴検定、電気化学検定、又はその他既知のリガンド結合、又は直接検出検定システムが挙げられる。直接検出検定システム又は技術とは、解析のためのリガンド結合に基づかないいずれかの方法、すなわち、高圧液体クロマトグラフィー[HP LC]等のサイズ排除クロマトグラフィー[SEC]、SDS-PAGE等のゲル浸透クロマトグラフィー(GPC)、核磁気共鳴分光法(NMR)、UV/VIS-分光法、エレクトロスプレーイオン化(ESI)等の分子分光法等の技術を意味する。

【0036】

指摘の無い限り、明細書及びクレームで使用される用語は、診断分野において通常使用される意味を有するものである。具体的には、以下の用語は次に示す意味を有する。

【0037】

MMP-8活性化物質とは、生体内又は生体外においてMMP-8活性化中、自然形成されるマトリクスメタロプロテアーゼの1つ以上のフラグメントを含む物質をいう。MM

10

20

30

40

50

P - 活性化物質は、内生的に（すなわち、自動活性化により）生成可能であり、又は A P M A、N a O C l、その他の酸化剤、及び / 又は宿主由来及び微生物由来のプロテアーゼ等の活性化剤又は活性化因子を使用して生成可能である。

【 0 0 3 8 】

M M P - 中間部分活性化物質とは、1つ以上の配列が実質的に C 末端又は N 末端部分の一部でない、すなわち、完全には C 末端又は N 末端の一部でない M M P - 8 配列全体の中間領域ドメインから 1つ以上の配列を有するマトリクスメタロプロテアーゼ（M M P - 8）の少なくとも 1つのフラグメントを含む物質をいう。これらの配列は、例えば、全長タンパク質のアミノ酸 A s n ^{1 1 9} ~ A l a ^{1 3 2} 又はアミノ酸 I l e ^{1 5 1} ~ A s p ^{1 6 5} に亘るものであってもよい。

10

【 0 0 3 9 】

活性型 M M P - 8 とは、その潜在型又は前駆体の形態に対して異なる形態の活性型コラーゲナーゼをいう。

【 0 0 4 0 】

M M P - 8 活性とは、M M P - 8 のプリフォームを活性型 M M P - 8 に転換する生物学的又は生化学的プロセスをいう。

【 0 0 4 1 】

本発明者らは、驚くべきことに、高分子量種の活性型 M M P - 8 でなく M M P - 8 中間部分活性化物質等の M M P - 8 活性化物質を検出することにより、活性型 M M P - 8 の検出を改良できることを見出した。いかなる理論にも拘束されるものでないが、M M P - 8 活性化物質又は M M P - 8 中間部分活性化物質は絶対濃度がより高く、生体試料中、55 ~ 95 k D a の通常サイズを有してより多くの部分を占める活性型 M M P - 8 分子の数に比してエピトープの数が多いと考えられる。従ってバイオマーカーとして低分子量 M M P - 8 中間部分活性化物質を使用することにより、例えば、免疫学的測定法における捕捉抗体により、予後値又は診断値をより容易に得ることができるようになる。

20

【 0 0 4 2 】

なぜより小さな M M P - 8 フラグメントの検出が高分子量種の活性型 M M P - 8 の検出に比して診断及び予測の目的においてより効果的であるかは完全には明らかとなっていない。何等かの説明モデルを確約するものでないが、予備的観察により、細菌をトリガとして環境的、後天的、及び遺伝的因子によって支持され、バイオフィーム P M N 内の病原体に対する免疫学的宿主応答を生じ、細菌攻撃部分に M M P - 8 の 85 k D a のプロ酵素を運び、この 85 k D a プロ酵素を活性化するものであることを提案する。そしてこの 85 k D a プロ酵素は、64 k D a フラグメントに転換され、64 k D a はコラーゲン及び細菌 / バイオフィームに結合し、歯肉組織及び歯槽骨にコラーゲン分解を生じる。コラーゲンと結合可能な量を超えて 64 k D a が生成された場合、64 k D a の過剰分は天然の M M P システムレギュレータである T I M P に結合するであろう。

30

【 0 0 4 3 】

その後、64 k D a の過剰分が依然として形成される場合、これらは内生的に、且つ / 又は、酸化剤及び宿主由来及び / 又は細菌由来のプロテアーゼの作用により、自己分解でフラグメントが 40 k D a フラグメント及び 24 k D a フラグメントとなり、恐らくは、例えば、5 k D a、9 k D a、14 k D a 等の小さな多数の M M P - 8 フラグメントにもなる。

40

【 0 0 4 4 】

40 k D a フラグメントが 85 k D a プロ酵素のさらなる活性化のトリガとなり、これを支持するものの、活性は低減してしまうことが知られている。

生理的状況として、まずフェーズ I において、最初に活性化された 64 k D a の大部分が歯周病変におけるコラーゲン種別 1 に結合され、バイオフィームの細菌と結合されてコラーゲン分解を起こすと考えられる。

【 0 0 4 5 】

次にフェーズ I I において、64 k D a の過剰分があれば、これらが T I M P（T I M

50

P 1 及び T I M P 2) に結合し、40 k D a への断片化が開始し、これも T I M P に結合するであろう。64 k D a 及び 40 k D a はともに、約 1 : 1 の分子比の複合体を形成し、T I M P 1 / T I M P 2 により阻害される。64 k D a 及び 40 k D a は、歯肉マトリクス及びバイオフィルムに結合されているため、恐らく歯肉溝滲出液 (G C F) 及びインプラント周囲溝滲出液 (P I S F) 又は唾液若しくは口洗浄液に溶解した G C F 等の検体に存在する量が少ない。しかしながら 24 k D a 及びその他の微小な M M P - 8 フラグメント等、「自由な」非結合フラグメントが上昇濃度、すなわち高濃度で存在することとなり、M M P - 8 の早期活性化プロセスのフェーズを表示及び反映する。

【 0 0 4 6 】

フェーズ I I I において、進行中の 85 k D a から 64 k D a への活性化により 64 k D a の過剰分が生成された場合、これらは 40 k D a フラグメントへと自己分解され (これが活性化を支持し、状況をさらに悪化させるであろう)、微小な M M P - 8 活性化物質又は M M P - 8 中間部分活性化物質を含むその他のフラグメントへと自己分解されるであろう。より微小なフラグメント、すなわち、恐らくはその他のフラグメントである 5 k D a ~ 35 k D a のすべてが検体に存在し、急速に軟質及び硬質の組織が崩壊するリスクが増加しているフェーズであることを表示、反映、又は提示するであろう。

診断情報、バイオマーカー情報にとって、このことは引いては、「結合」又は「阻害」された 64 k D a の自然平衡が均衡を失う、又は既に失っており、64 k D a の過剰分の自己分解又はさらなる断片化が可能であるときに、生体内で自己分解によって形成されたこれらのより微小なフラグメントが臨床状況でのみ高濃度となって現れることを意味し、疾患の形成又は進行のリスクが高まっていることを示す。

【 0 0 4 7 】

本発明の第 1 実施形態は、M M P - 8 活性化物質又は M M P - 8 中間部分活性化物質が M M P - 8 の活性化フラグメントを含み、20 ~ 35 k D a、好ましくは約 20 k D a、25 k D a、30 k D a、又は 35 k D a のサイズを有することを特徴とする M M P - 8 活性化物質、好ましくは M M P - 8 中間部分活性化物質を提供するものである。

【 0 0 4 8 】

第 2 実施形態は、第 1 実施形態の M M P - 8 活性化物質又は M M P - 8 中間部分活性化物質において、活性化物質及び活性化物質のサイズが、天然 M M P - 8 を A P M A で活性化して得られた活性化物質に対応するものを提供する。

【 0 0 4 9 】

第 3 実施形態は、第 1 実施形態の M M P - 8 活性化物質又は M M P - 8 中間部分活性化物質において、活性化物質及び活性化物質のサイズが、タンパク質分解除去、又は N a O C l 若しくは反応性酸素主による酸化の活性化による化学的修飾で天然 M M P - 8 を活性化して得られた活性化物質に対応するものを提供する。

【 0 0 5 0 】

第 4 実施形態は、第 1 ~ 第 3 実施形態のいずれかの M M P - 8 活性化物質又は M M P - 8 中間部分活性化物質において、活性化物質が、M M P - 8 の中間部分ドメイン (C 末端又は N 末端でない) となる配列番号 1 の配列を含むものを提供する。

【 0 0 5 1 】

第 5 実施形態は、第 1 ~ 第 4 実施形態の M M P - 8 活性化物質又は M M P - 8 中間部分活性化物質において、活性化物質が、M M P - 8 の中間部分ドメイン (C 末端又は N 末端でない) となる配列番号 2 の配列を含むものを提供する。

【 0 0 5 2 】

本発明のさらに他の実施形態は、試料中の M M P - 8 活性の判定方法であって、

A . 被験者からの生体試料を提供するステップと、

B . 生体試料において、1 つ以上の M M P - 8 活性フラグメントを含み、5 ~ 35 k D a、好ましくは 10 ~ 30、さらに好ましくは約 10 k D a、15 k D a、20 k D a、25 k D a、30 k D a、又は 35 k D a のサイズを有する 1 つ以上の M M P - 8 活性化物質、好ましくは M M P - 8 中間部分活性化物質の存在を検出するステップと、

C．選択的に、MMP-8 活性化物質又はMMP-8 中間部分活性化物質の存在を試料中の活性型MMP-8 の存在と相互に関連付けるステップと、及び/又は、

D．選択的に、MMP-8 活性化物質又はMMP-8 中間部分活性化物質の存在を試料中の他のより多くの部分を占める活性型MMP-8 の存在と相互に関連付けるステップを備え、

生体試料中の1つ以上のMMP-8 活性化物質又はMMP-8 中間部分活性化物質の存在は、試料中の活性型MMP-8 の存在を表示、及び/又は、確認、及び/又は、予測するものであり、検定における活性型MMP-8 の解析的検出及び/又はその予測力を向上するものである。

【0053】

1つ以上のMMP-8 活性化物質又はMMP-8 中間部分活性化物質の存在は、通常、生体試料中のMMP-8 の活性化物質の検出にリガンドシステムを使用することによって判定される。リガンドシステムは、1つ以上の抗体、抗体対、及び/又は抗体フラグメントを含むことが好ましく、この検定は、ウェスタンブロッティング、IFMA、EIA、ELISA、ラテラルフロー検定、ディップスティック検定、表面プラズモン共鳴検定、電気化学検定、又はその他既知のリガンド結合検定システム等、定量的、半定量的、又は定性的な免疫学的測定法である。本発明の異なる様態において使用される抗体は、単クローン性、及び/又は多クローン性とすることができ、選択的に組み換えとすることができる。

【0054】

本発明の他の様態によると、1つ以上のMMP-8 活性化物質又はMMP-8 中間部分活性化物質の存在は、生体試料中のMMP-8 の活性化物質の直接タンパク質検出技術を使用して判定される。

【0055】

本発明の一実施形態によると、この方法は疾患又は疾患進行の素因又はリスクの診断に使用され、

I．被験者から得た生体試料中におけるMMP-8 活性化物質又はMMP-8 中間部分活性化物質の存在を判定するステップと、

II．ステップIで得られた結果を参照試料と比較することにより、疾患又は疾患進行の素因又はリスクを診断するステップとを備え、

a) 参照試料は、通常レベルのMMP-8 を有することが分かっている被験者群又は患者群より得て、生体試料と参照試料とで結果が類似していた場合、被験者が現在罹患していない、又は罹患しにくいこと、若しくは疾患が進展又は進行するリスクを有していない、又はそのリスクが生じにくいことを示し、生体試料中のMMP-8 活性化物質又はMMP-8 中間部分活性化物質のレベルが参照試料に比して上昇している場合、被験者が現在罹患している、又は罹患し易いこと、若しくは疾患が進展又は進行するリスクが増加し易いことを示し、又は、

b) 参照試料は、現在罹患している、又は罹患し易いことが分かっている被験者群又は患者群より得て、生体試料と参照試料とで結果が類似していた場合、被験者が罹患している、又は罹患し易いこと、若しくは疾患が進展又は進行するリスクを有している、又はそのリスクが生じやすくなっていることを示す。

【0056】

本発明の異なる実施形態によると、試料は、通常、歯肉溝滲出液、インプラント周囲内縁流体、オーラルプラーク、歯垢、口濯ぎ液、口洗浄液、唾液、根管流体、傷からの滲出液、PUS、オーラルバイオフィilm、組織バイオブシー、オーラルスワップ、口腔病斑からの血液から得られ、或いは、口腔からでなく、羊水、血清、血漿、腔洗浄、鼻洗浄、副鼻腔、耳、静脈洞、尿、関節液、脳脊髄液、排泄物、スワップ、涙液、洗浄(肺)、唾液、組織バイオブシー、傷からの滲出液、及び/又は汗から得られる。

【0057】

本発明の好適な実施形態において、疾患は、口腔内細菌によって引き起こされる歯周組

10

20

30

40

50

織炎、歯周組織喪失（劣化）、歯肉炎、歯周炎、インプラント周囲炎、歯の喪失、歯科インプラント寛解、歯槽骨喪失、粘膜炎、粘膜の変化、根尖性歯周組織炎、歯根管炎症、虫歯、上下顎骨断裂、歯の矯正移動、アレルギー炎症反応、及び/又は菌血症のうちの1つ以上である。

【0058】

本発明のさらに他の実施形態によると、1つ以上のMMP-8活性化物質又はMMP-8中間部分活性化物質の存在は、慢性又は急性の歯周炎又はインプラント周囲炎等の歯周病を表示または予測するものであり、これらの口腔疾患はさらに、糖尿病I、糖尿病II、COPD（慢性閉塞性肺疾患）、メタボリック症候群、肥満、リウマチ疾患、関節炎疾患、骨粗鬆症、整形外科的疾患、自己免疫疾患、組織移植疾患、関節炎、感染症、又はエンドプロテアーゼの寛解等の全身性疾患又は障害、脳卒中、心筋梗塞、動脈硬化等の心血管疾患、早期産、低出生体重を含むがこれに限られない妊娠関連リスク、勃起障害、精子数の減少、及び精子細胞の可動性低下等の生殖リスク等の表示、増強、又は既知のリスク因子である。

10

【0059】

本発明のさらに他の実施形態によると、疾患は、

a) 羊膜内炎症、母体炎症、新生児疾患、早期分娩、低出生体重、及び羊膜病理等の婦人科疾患、

b) 例えば、乳癌及び白血病など悪性腫瘍等の癌疾患、

c) リウマチ関節炎及び関節症等の関節炎/リウマチ疾患、

20

d) すべての形態の糖尿病、腎症疾患、腎疾患、及び難治性糖尿病創傷を含む糖尿病疾患、

e) 円錐角膜及びペルーシド角膜変性等の（例えば、涙液からの）眼球疾患、

f) （例えば、耳、副鼻腔からの）耳鼻咽喉科的疾患、

g) ポリレオ症、敗血症、全身性炎症反応症候群（SIR）、HIV、ヘリコバクターピロリ感染症、全身性炎症、全身性軽度炎症等の感染症又は炎症、気管支炎、気管支拡張症、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、小児感染症/炎症等の肺感染症及び炎症等の肺感染症及び炎症、髄膜炎、クローン病等の神経系感染症及び炎症、

h) 血管疾患等の心血管疾患、動脈内プラーク炎症、塞栓症、及び脳卒中等のアテローム性動脈硬化、

30

i) 重症、慢性創傷、難治性創傷、皮膚熱傷等の創傷（例えば、傷からの滲出液）、

j) （糞便検査からの）腸管疾患、

k) トラウマ又は事故後の疾患、及び/又は、

l) メタボリック症候群及び肥満である。

【0060】

本発明の実施形態はまた、MMP-8活性化物質又はMMP-8中間部分活性化物質の判定又は配列情報に基づき、コンピュータシステムに個人が特定の（以上に規定の）疾患、障害、又は特定疾患又は障害の素因を有するか否かの判定方法を実施させるシステム及びコンピュータの可読媒体も提供する。

【0061】

40

特に、本発明はさらに、生体試料の解析システムに係り、

a) 生体試料を受容し、MMP-8の活性化フラグメントを含み、5~35kDaのサイズを有するMMP-8活性化物質又はMMP-8中間部分活性化物質を判定するよう構成された判定モジュール、及び/又は、

b) 配列番号1及び/又は配列番号2を含む配列情報、

c) 判定モジュールからの配列情報を記憶する記憶装置、

d) 記憶装置に記憶された配列情報を参照データと比較し、

現在通常レベルのMMP-8を有することが分かっている被験者群又は患者群であり、生体試料と参照試料とで結果が類似していた場合、被験者が現在罹患していない、又は罹患し易くないこと、若しくは疾患が進展又は進行するリスクを有していない、又はその

50

リスクが生じ易くないことを示し、及び/又は、

罹患している、又は罹患し易いことが分かっている被験者群又は患者群であり、生体試料と参照試料とで結果が類似していた場合、被験者が罹患している、又は罹患し易いこと、若しくは疾患が進展又は進行するリスクを有すること、又はそのリスクが生じ易いことを示すよう、

対象から得られた参照試料より得た比較結果を提供するよう適応された比較モジュール、及び

e) ユーザに対して比較結果に部分的に基づく内容を表示する表示モジュールとを備え、この内容は、参照試料と比較した場合の生体試料中のMMP-8活性化物質又はMMP-8中間部分活性化物質の存在又はレベル上昇を示す信号であり、これは被験者が現在罹患している、又は罹患し易いこと、若しくは疾患が進展又は進行するリスクが増加し易いことを示す。

10

【0062】

本発明の他の実施形態によると、本発明はさらに、コンピュータ上で方法を実行するための比較モジュール及び表示モジュールを含むソフトウェアモジュールを規定するコンピュータ可読指示を記録したコンピュータ可読媒体によっても利用することができ、当該方法は、

a) 比較モジュールにより、記憶装置に記憶されたデータを参照データと比較することにより、比較結果を提供するステップを備え、比較結果、すなわち参照試料と比較した場合の生体試料中のMMP-8活性化物質又はMMP-8中間部分活性化物質の存在又はレベル上昇は、被験者が現在罹患している、又は罹患し易いこと、若しくは疾患の進展又は進行のリスク増加が生じ易いこと、又はそのリスクが増加したことを示し、

20

b) ユーザに対して部分的に比較結果に基づく内容を表示するステップとを備え、この内容は、罹患している、又は罹患し易いこと、若しくは疾患が進展又は進行するリスクが増加し易い、又はそのリスクが増加したことを示す。

【実施例】

【0063】

以下の実施例は、本発明の種々の実施形態を説明する目的のみに示されるものであり、いずれの意味においても本発明を限定するものでない。当業者は、添付のクレームによって規定される本発明が目的を達成し、上述の結果及び効果を得るよう十分に適応されることを容易に理解するであろう。

30

【0064】

MMP-8の免疫蛍光分析検査

MMP-8濃度は、時間分解免疫蛍光分析検定(IFMA)によって判定した。単クローン性MMP-8フラグメント特定抗体1491-E6-F7及び1492-B3-C11(Medix Biochemica、フィンランド、カウニアイネン)を各々、捕捉抗体及びトレーサ抗体として使用した。トレーサ抗体は、ユーロピウムキレートを使用してラベル付けした(Hemmilaら、1984年)。検定緩衝剤は、20mMのtris-HCl(pH7.5)と、0.5MのNaClと、5mMのCaCl₂と、50µMのZnCl₂と、0.5%BSAと、0.05%アジ化ナトリウムと、20mg/lのジエチレントリアミンペンタアセテート酸(DTPA)とを含有した。試料を検定緩衝剤中で希釈し、1時間培養した後、トレーサ抗体とともに1時間培養した。増進剤を添加し、5分後、1234Delfia Research Fluorometer(Wallac、フィンランド、トゥルク)を使用して蛍光を測定した。MMP-8に対する単クローン性抗体の特異度は、多クローン性MMP-8に対する特異度に対応するものであった。

40

【0065】

ウェスタンイムノブロットティング

製造メーカー(GE Healthcare、英国、アマシャム)により推奨されたプロトコルに準じ、改定ECLウェスタンブロットティングキットでMMP-8の分子形態を

50

検出した。指摘の組み換えヒトMMP-8と、指摘の体液/分泌液と、血清試料とを、還元剤を用いることなくLaemmliの緩衝剤と混合し、5分間加熱した後、11%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)-ポリアクリルアミドゲルでタンパク質分離を行った。電気泳動後、タンパク質をニトロセルロース膜(Protran, Whatman GmbH、ドイツ、ダッセル)上に電気泳動転写した。TBS緩衝剤(22mMのNaCl及び0.05% Triton-Xを含有した10mMのTris-HCl(pH7.5))中、5%粉乳(Valio Ltd.、フィンランド、ヘルシンキ)で1時間、非特異結合を妨害した。その後、膜を一晚、1次抗体1491-E6-F7(Medix Bioc hemica、フィンランド、カウニアイネン)で培養した後、西洋わさびペルオキシダーゼ結合2次抗体(GE Healthcare、英国、バッキンガムシャー)で1時間、培養した。この膜は、各ステップの間にTBSにおいて、15分間4回洗浄した。改良化学発光(ECL)システム(GE Healthcare)を使用してタンパク質を可視化した。

10

【0066】

密度計解析

異なる分子量形態のMMP-8の強度を走査し、GS-700 Imaging Densitometer Scanner(Bio-Rad、米国、カリフォルニア州ハーキュリーズ)と、バックグランド値に合わせて補正したBio-Rad Quantity Oneプログラムを使用して解析した。

20

【0067】

シーケンシング

Turunenら(2012年)によって説明された方法に準じて、タンパク質特定及びプロテオームデータ解析を実施した。

【0068】

MDmAb免疫染色に匹敵する切除ゲルバンドを洗浄し、アセトニトリル(ACN)で脱水した。タンパク質を20mMのジチオトレイトールで還元し、室温の暗所にて15分間、55mMのイオドアセトアミド-0.1Mの炭化水素アンモニウム(NH₄HCO₃)でアルキル化を行うのに先立ち、56で30分間、培養した。0.1MのNH₄HCO₃で洗浄し、ACNで脱水した後、最終的なトリプシンの濃度が0.01µg/µlとなるまで、0.1MのNH₄HCO₃中において10~15µlシーケンシンググレード修飾トリプシン(Promega、米国)中でゲル片を再水和し、消化のため、37で一晚培養を行った。各々室温で15分間、25mMのNH₄HCO₃中と5%ギ酸で2度、連続培養を行うことにより、ゲル片からトリプシンペプチドを溶出した。結果として得られたトリプシン消化ペプチドを、Zip TipのµC-18逆フェーズカラム(Millipore、米国)を使用して脱塩し、MALDI標的板上に50%ACN-0.1%トリフルオロ酢酸(TFA)で直接溶出した。33%ACN-0.1%TFA中の-シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸(CHCA)(Sigma、米国)の飽和マトリクス溶液を添加した。

30

【0069】

Smart Beam(登録商標)レーザー(355nm)を備え、ポジティブモード及びリフレクティブモードで作動するAutoflex III(Bruker Daltonics、ドイツ、ブレーメン)により、MALDI-TOF解析を実施した。通常、MS/MSスペクトルについては2000レーザーショットと10000までのスペクトルを積算することにより、マススペクトルを得た。ペプチドキャリブレーション標準(Bruker Daltonik GmbH、ドイツ、ライプツィヒ)を使用して、分子配置を行うために外部キャリブレーションを実施した。トリプシン自己分解ペプチドの質量を使用して、キャリブレーションのチェック又は補正を行った。これらの自己分解ペプチドと、存在する場合には派生したものであるがケラチンとを、検索に供する前に除去した。ファイル(同一箇所から得たPMF及び僅かなLiftスペクトル(MSMS))とSwissProtデータベースの検索とを組み合わせるにより、タンパク質の特定を

40

50

実施した。Matrix Scienceの Mascot (Matrix Science Ltd.、英国)を使用して、「その他の細菌」を分類法フィールド(42100を上回る配列)から選択した。Flex Analysis(登録商標)v3.0及びBioTools(登録商標)v3.1ソフトウェア(Bruker Daltonics)を分子同位体質量のMSスペクトルのピークへの割り当てに使用し、各々、マスリストデータ転送とMascotサーバ内のデータベースとの間の検索エンジンインタフェースとして使用した。検索には、以下のパラメータを設定した。MS及びMS/MSの組み合わせ検索には、0.1 Daの前駆体トレランスと0.5 Da又は1 DaのMS/MSフラグメントトレランスを設定し、固定及び可変の修飾を考慮し(各々、カルバミドメチル化システイン及び酸化メチオニン)、1つのトリプシン切断部位を許容した。算出分子質量及び観察分子質量と、MS/MS質量スペクトルと特定したペプチドに匹敵するアミノ酸配列の評価とを比較することにより、タンパク質特定をさらに評価した。

10

【0070】

実施例 1

材料及び方法

ランダムに選択した一般の歯科診療所の192名の患者をこの横断的研究の対象とした。研究プロトコルは、Leppilähti JMら(2011年)により詳述されている。簡潔に述べると、口腔検査は、2名の適応一般歯科医師によるフロリダプローブによる歯周ポケット深さ(PPD)の測定とブローピング値の出血(BOP)の測定とからなる。背景特性を質問票で記録し、すべての患者から口濯ぎ液試料を回収した。すべての患者がインフォームドコンセントを与え、歯科医療研究所、ヘルシンキ大学、及びヘルシンキ大学中央病院の倫理委員会によって研究プロトコルを承認された。

20

研究対象患者は、歯周組織炎症負荷指標(Lindy Oら、2008年)とBOP%(Leppilähti JMら、2011年)の組み合わせによる歯周組織炎症負荷レベルに基づき、4つの群に分類した。形成された患者群は、1)深い(4mm)歯周ポケットが無く、且つ、BOP<10%である31名の健康な歯周の被験者(群1)と、2)BOP 10%であるものの、軽度の歯周組織炎症負荷とみなされる深い歯周ポケットの無い17名の患者(群2)と、3)PIBIxBOP 100の97名の患者(中程度歯周組織炎症負荷レベル：群3)と、4)PIBIxBOP>100の47名の患者(高度歯周炎症レベル：群4)とである。

30

【0071】

口濯ぎ液試料

使い捨てプラスチックピペットにより、1mlの水道水を患者の口に入れ、1分間濯いだ後、濯ぎ液をチューブ内に回収した。この試料は、さらなる解析のため直ちに冷凍した(Leppilähti JMら、2011年)。

【0072】

MMP-8解析

口濯ぎ液試料を解凍した後、Hanemaaijer Rら(1997年)らによって述べられるとおり、時間分解免疫蛍光検定(IFMA)によってMMP-8レベルの解析を行った。簡単に述べると、単クローン性MMP-8フラグメント特定抗体1491-E6-F7及び1492-B3-C11を各々、捕捉抗体及びトレーサ抗体として使用した。トレーサ抗体をユーロピウムキレートを使用してラベル付けした(Hemmilaら、1984年。時間分解免疫蛍光分析検定におけるラベルとしてのユーロピウム。Anal Biochem 137:335~343)。検定緩衝剤は、20mMのtris-HCl(pH7.5)、0.5MのNaClと、5mMのCaCl₂と、50µMのZnCl₂と、0.5%ウシ血清アルブミンと、0.05%アジ化ナトリウムと、20mg/リットルのDTPAとを含有させた。試料を検定緩衝剤で希釈し、1時間培養した後、トレーサ抗体で1時間培養した。増強液を添加し、5分後、1234Delfia Research Fluorometer(Wallac、フィンランド、トゥルク)を使用して蛍光を測定した。上述のIFMA法により、MMP-8レベルも解析した。また走査画像

40

50

解析により異なる分子形態（21、25、35、45、55、及び60～70kDa）のMMP-8を特定するIFMA法のトレーサ抗体（1492-B3-C11）を使用し、上述のようなウェスタンイムノブロッティングで試料を解析した。

【0073】

データ解析

異なるMMP-8分子形態の有病率と全MMP-8の割合を走査画像より解析し、すべての患者について算出した。MMP-8のIFMA及びIEMAレベル、各MMP-8分子形態の絶対量、それらの割合、及び組み合わせについて、異なる試験群と、喫煙者及び非喫煙者との間でノンパラメトリック検査（一対比較のためのマンホイットニー検査、複数の群についてのクラスカルウォリス検査、順序付対立の動向を調べるヨルクヒールタブストラ検査）を行って比較した。異なる検査群における異なるMMP-8kDa種の有病率/発現をカイ2乗検査で解析した。

10

【0074】

以下のロジスティック回帰を非調整及び多変量調整で実施した。

1) IFMAレベル及びIEMAレベルと異なるMMP-8kDa種（従変数）との相関。多変量調整ロジスティック回帰分析では、歯数、BOP%、連続変数としての4～5mm及び6mmのポケット数、及び二分（yes/no）変数としての喫煙。

2) MMP-8kDa種の割合及び絶対走査単位と、その高度IFMAレベル及びIEMAレベル（高度歯周組織炎症負荷を伴う群4の歯数レベルを考慮した中央値IFMA及びIEMA）との組み合わせの相関。多変量調整では、モデルBOP%、連続変数としての4～5mm及び6mmのポケット数、及び二分（yes/no）変数としての喫煙。

20

3) MMP-8kDa種と高度歯周組織炎症負荷レベル（群4）との相関。多変量調整では、モデルBOP%、連続変数としての4～5mm及び6mmのポケット数、及び二分（yes/no）変数としての喫煙。

4) MMP-8kDa種と喫煙との相関。多変量調整では、モデル歯数、BOP、連続変数としての4～5mm及び6mmのポケット数。

高度歯周組織炎症負荷下の患者の認識モデルを前進型段階的ロジスティック回帰解析で実施した。IFMAレベル及びIEMAレベル（歯数を考慮）、BOP%、及び喫煙ステータス（yes/no）を有病率、21kDa、25kDa、35kDaのMMP-8種の絶対量及び割合とともに1つずつ、及び組み合わせにより検査した。

30

【0075】

受信者動作特性（ROC）解析を実施し、MMP-8のIFMAレベル及びIEMAレベルの診断感度及び特異度と、試験群における25+35kDa種の有病率とを評価した。

【0076】

p値<0.05を統計的に有意であるとみなした。IBMのSPSS統計バージョン20で統計解析を実施した。

【0077】

結果

表1は、歯周組織炎症負荷に基づく、4つの試験群の特性を表示している。群1及び群2では、喫煙者が4名（12.9%）及び3名（17.6%）であり、喫煙者全員につき10本/日であった。群3及び群4では、喫煙がより一般的であり[各々、20名（20.6%）及び23名（48.9%）]、群3では10名（50%）の患者と群4では17名（73.9%）の患者につき>10本/日であった。男性患者数は、歯周組織炎症負荷（p=0.011）の増加に合わせて増加した。

40

【0078】

【表 1】

表 1 検査群 (群 1 ~ 4) の特性

	群 1 N = 31	群 2 N = 17	群 3 N = 97	群 4 N = 47	p 値
性別 男性数 (%)	5 (16.1)	3 (17.6)	33 (34)	23 (48.9)	0.011*
平均年齢 (s d)	59 (8.6)	56.2 (7.3)	56.3 (6.9)	57.8 (9.0)	0.408**
平均歯数 (s d)	24.1 (4.6)	24.5 (3.9)	25.1 (4.2)	22.7 (5.7)	0.041**
BOB 中央値% (IQR)	4.3 (4.2)	14.1 (4.0)	6.8 (9.5)	20.3 (14.4)	< 0.001 ^s
ポケット中央値 4 ~ 5MM (IQR)	-	-	2 (3)	9 (11)	< 0.001 ^s
ポケット中央値 ≥ 6mm (IQR)	-	-	0 (1)	2 (6)	< 0.001 ^s
PIBI 中央値 (IQR)	0	0	2 (3)	15 (19)	< 0.001 ^s
喫煙者数 (%)	4 (12.9)	3 (17.6)	20 (20.6)	23 (48.9)	0.001*
喫煙 > 10回/日 (%)	-	-	10 (50)	17 (73.9)	0.007*

*カイ 2 乗検査 ** ANOVA §クラスカルウォリス検査

【 0 0 7 9 】

MMP - 8 k D a 種の有病率、絶対量、及び割合

10

20

30

40

50

すべての試験群につき、異なるMMP-8 kDa種の有病率パーセンテージ、絶対量（走査単位）の中央値（IQR）レベル、及び割合を表3に示した。さらに、すべての試験群の間で顕著な差を示したMMP-8分子形態、すなわち25 kDa種と35 kDa種の有病率及び絶対量を、喫煙者及び非喫煙者について別々に計算し、表2に示した。

【0080】

群4では、喫煙者で、25 kDa種、35 kDa種、及び25 + 35 kDa種の有病率及び絶対量がともに著しく高かった。24 kDa種の有病率はすべての群（ $p = 0.025$ ）の間で著しく異なり、喫煙者（ $p = 0.011$ ）及び非喫煙者（ $p = 0.046$ ）のいずれの25 + 35 kDa有病率も群4で高かった。非喫煙者中、35 kDa種の総量はすべての試験群間で著しく異なった。組み合わせ群1～3対群4で差異を解析したとき、群4の喫煙者の25 kDa種、35 kDa種、及び25 + 35 kDa種の有病率が著しく高かった（各p値は、0.011、0.038、及び0.005）。

【0081】

【 表 2 - 1 】

表 2 検査群 1 ～ 4 における喫煙者及び非喫煙者の有病率及び 25 kDa MMP-8 種及び 35 kDa MMP-8 種の絶対量。p 値は、ピ
アソンのカイ 2 乗による有病率、クラスカルウォリス検査 (いくつかの独立群) 及びマンホイットニー検査 (2 つの独立群) による絶対量
に対するものである。

群	非喫煙者			喫煙者			非喫煙者対喫煙者の p 値		
	25	35	25+35	25	35	25+35	25	35	25+35
1 非喫煙 n = 27	23 (85.2)	24 (88.9)	21 (77.8)	3 (75)	3 (75)	3 (75)	0.605	0.439	0.901
喫煙 n = 4	0.37 (1.57)	0.62 (2.033)	1.41 (5.32)	0.31 (0.85)	1.41 (4.78)	1.72 (5.62)	0.589	0.755	0.842
2 非喫煙 n = 14	9 (64.3)	8 (57.1)	7 (50)	3 (100)	3 (100)	3 (100)	0.218	0.159	0.110
喫煙 n = 3	0.29 (0.52)	1.17 (1.09)	0.83 (1.37)	0.97 (-)	0.30 (-)	1.61 (-)	0.047	0.509	0.244
3	45 (58.4)	48 (62.3)	36 (46.8)	12 (60)	14 (70)	11 (55)	0.900	0.525	0.511

【 0 0 8 2 】

【表 2 - 3】

非喫煙	有病率	0.011	0.038	0.005						
	喫煙	0.519	0.242	0.375						

10

20

30

40

【 表 3 - 1 】

表 3 群 1 ~ 4 における有病率、絶対走査単位、MMP-8 kDa 分子形態の割合。群 1 ~ 4 の顕著な差異を示す数値を太字で示す [有病率については、35 kDa ($p=0.031$)、25 kDa ($p=0.006$)、及び 25+35 kDa ($p=0.002$) 種 (カイ2乗検査)；絶対量については、35 kDa 種 ($p=0.042$) (クラスカルウォリス検査)]

分子形態	群 1 N=31			群 2 N=17			群 3 N=97			群 4 N=47		
	有病数 (%)	走査単位中央値 (IQR)	割合中央値 (IQR)	有病数 (%)	走査単位中央値 (IQR)	割合中央値 (IQR)	有病数 (%)	走査単位中央値 (IQR)	割合中央値 (IQR)	有病数 (%)	走査単位中央値 (IQR)	割合中央値 (IQR)
60-70	3 (9.7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0.28)	-	5 (5.2)	0 (0)	0 (0)	3 (6.4)	0 (0)	0 (0)
55	16 (51.6)	0.002 (0.35)	2.5 (8.1)	8 (47.1)	0 (0.36)	0 (22.6)	50 (51.5)	0.018 (0.18)	1.8 (20.5)	28 (59.6)	0.031 (0.22)	3.7 (10.8)
45	7 (22.6)	0 (0)	0 (0.46)	5 (29.4)	0 (0.36)	0 (16.7)	25 (25.8)	0 (0.072)	0 (4.8)	17 (36.2)	0 (0.13)	0 (14.1)
35	27 (87.1)	0.62 (2.28)	39.6 (53.1)	11 (64.7)	0.27 (1.13)	14.4 (47.3)	62 (63.9)	0.21 (1.03)	23.6 (66.2)	38 (80.9)	0.42 (1.29)	34.1 (63.9)
25	26 (83.9)	0.37	28 (31.3)	12 (70.6)	0.35	7.8	57 (58.8)	0.18	20.5	39 (82.9)	0.26	21.5

【 0 0 8 5 】

【表 3 - 2】

		(1.13)		(0.85)	(37.4)		(0.66)	(38.1)		(0.76)	(37.5)
21	13 (41.9)	0 (0.82)	0 (24.4)	9 (52.9)	0.014	0.5	36 (37.1)	0 (0.19)	0 (22.8)	19 (40.4)	0 (0.23)
25+35	24 (61.1)	1.41	84.7	10 (58.8)	(0.62)	(29.8)	47 (48.5)	0.67	70.8	36 (76.6)	0.77
		(5.32)	(45.8)		0.96	50.8		(1.85)	(70.5)		(2.41)
					(1.28)	(78.6)					(42.5)

10

20

30

40

【表 4 - 1】

表 4 歯数及び喫煙状態を考慮に入れた場合のすべての検査群について I FMA 及び I EMA で解析した中央値 (I Q R) M M P - 8 レベル。 N S : 非喫煙者、 S : 喫煙者

	群 1	群 2	群 3	群 4	p 値*	p 値**	p 値§
I F M A μ g / 1	436 (938)	283 (566)	331 (1085)	946 (1643)	0.147	0.035	0.035
I E M A μ g / 1	312 (691)	237 (401)	218 (771)	497 (940)	0.173	0.123	0.058
I F M A / 歯数 μ g / 1	16.3 (42.3)	10.5 (24.1)	12.9 (37.6)	38.2 (71.2)	0.070	0.075	0.016
I E M A / 歯数 μ g / 1	10.8 (30.4)	9.0 (16.9)	9.7 (28.2)	26.5 (40.9)	0.075	0.091	0.025
N S I F M A / 歯数 μ g / 1	15.6 (62.5)	11.9 (28.1)	17.5 (41.6)	40.0 (65.8)	0.053	0.031	0.010
S I F M A / 歯 数 μ g / 1	26.7 (27.5)	6.4 (-)	10.9 (26.4)	30.4 (70.2)	0.393	0.974	0.436
N S I E M A / 歯数 μ g / 1	10.1 (36.8)	10.2 (20.0)	11.3 (30.8)	27.4 (37.2)	0.087	0.048	0.023

【 0 0 8 7 】

10

20

30

40

【表 4 - 2】

S I E M A / 歯 数 μ g / 1	20.5 (21.8)	7.5 (-)	6.5 (12.9)	23.7 (43.1)	0.287	1.0	0.414
--------------------------------	-------------	---------	------------	-------------	-------	-----	-------

- * 群 1 ~ 4 にクラスカルウォリス検査を施した場合
- ** 群 1 ~ 3 対群 4 にマンホイットニー検査を施した場合
- 5 群 1 ~ 4 にヨソクヒールタプストラ検査を施した場合

10

20

30

40

【 0 0 8 8 】

I F M A 解析結果と I E M A 解析結果の相関は非常に高かった（ピアソン相関係数は 0.954、 $p < 0.01$ レベルで有意）。現在の I F M A 解析と依然の I F M A 解析（L e p p i l a h t i ら、2011年）の間のピアソン相関係数は 0.627 で $p < 0.01$ レベルで有意であった。

【0089】

表4は、すべての試験群について、歯数及び喫煙ステータスを考慮に入れた際の I F M A 及び I E M A で解析した MMP - 8 レベルを示している。MMP - 8 I F M A レベルの上昇に対して群1~4で有意な動向が存在し、動向は順序付対立について検査した際（ $p = 0.035$ ）で有意となり、I F M A について検査した際（ $p = 0.058$ ）で有意となった。歯数を考慮した場合、I F M A 及び I E M A の双方についての動向が群1~4で有意であった（各々、 $p = 0.016$ 及び $p = 0.025$ ）。群4のレベルを群1~3のレベルと比較したとき、すべての比較において、 p 値 0.035、0.033、0.013、及び 0.011 で有意な結果となった。群1~3の間のレベルは類似していた（各々、 p 値 0.643、0.822、0.647、及び 0.816）。

10

【0090】

喫煙を考慮にいれたとき、非喫煙者において動向はより強くなり、I F M A については $p = 0.020$ 、I E M A については $p = 0.038$ であり、歯数も考慮に入れたとき、I F M A については $p = 0.010$ 、I E M A については $p = 0.028$ であった（表4、図1）。喫煙者については有意な動向が見られなかった。群4の喫煙者レベル及び非喫煙者レベルを考慮し、歯数を群1~3の喫煙者レベル及び非喫煙者レベルと比較したとき、群4の非喫煙患者の I F M A レベル及び I E M A レベルは他の試験群（各々、 p 値が 0.009 及び 0.013）より著しく高かった。しかしながら、群3及び4の研究被験者を非喫煙者、10本/日の喫煙患者、又は > 10本/日の喫煙患者に分けたとき、統計的有意性は見られなかったものの、> 10本/日の喫煙者における分布が 10本/日の喫煙患者における分布より幅広く、特に群4の非喫煙者と類似していた（図1）。

20

【0091】

異なる MMP - 8 k D a 種との関連における I F M A レベル及び I E M A レベル

I F M A レベル及び I E M A レベルは、21 k D a MMP - 8 種陽性患者において著しく高レベルであった（各々、 p 値は 0.011 及び 0.003 であった。非喫煙者については、0.005 及び 0.002 であった。喫煙者については、差は顕著でなかった）。しかしながら、喫煙は 21 k D a 種の有病率に顕著な作用を及ぼすことはなかった。

30

【0092】

多変量調整ロジスティック回帰解析では、I F M A レベル及び I E M A レベルは、21 k D a（I F M A については $OR = 1.95$ 、 $95\% CI 1 \sim 1.001$ 、 $p = 0.008$ 。I E M A については $OR = 1.95$ 、 $95\% CI 1 \sim 1.001$ 、 $p = 0.004$ ）と、21 及び 25 k D a の組み合わせ（I F M A については $OR = 1.95$ 、 $95\% CI 1 \sim 1.001$ 、 $p = 0.002$ 。I E M A については $OR = 1.95$ 、 $95\% CI 1 \sim 1.001$ 、 $p = 0.001$ ）と、25 及び 35 k D a 種（21~35 k D a）（I F M A については $OR = 1.95$ 、 $95\% CI 1 \sim 1.001$ 、 $p = 0.002$ 。I E M A については $OR = 1.95$ 、 $95\% CI 1 \sim 1.001$ 、 $p = 0.001$ ）を合わせたものとの有病率とに相関したものの、25 k D a 種及び 35 k D a 種単独の有病率とは相関しなかった。また非調整ロジスティック回帰解析（双方について、 $OR = 1.95$ 、 $95\% CI 1 \sim 1.001$ 、 $p = 0.028$ ）では、21 + 45 k D a 種の組み合わせが I F M A レベル及び I E M A レベルと相関した。多変量調整ロジスティック回帰解析における他の共変量のうち、I F M A が共変量であるとき、又は I E M A が共変量であるときの双方で、喫煙は 25、35、25 + 35、21 + 35 k D a 種と有意に相関し、BOP は 45、21 + 45、21 - 45、25 + 45、及び 35 + 45 k D a 種と相関した。

40

【0093】

さらに有病率、MMP - 8 k D a 種の総走査単位及び絶対走査単位からの有病率、割合、及び高 I F M A レベル（歯数を考慮した群4の中間レベル）との組み合わせの相関に

50

ついて解析した。非調整回帰解析及び多変量回帰解析の双方において、21 kDa ($p = 0.011$)、25 kDa ($p = 0.050$)、21 + 25 kDa ($p = 0.011$)、21 + 35 kDa ($p = 0.006$)、21 + 45 kDa ($p = 0.012$)、21 - 35 kDa ($p = 0.009$)、及び21 - 45 kDa ($p = 0.010$)の絶対量(多変量回帰解析のp値については括弧内)と、MMP-8総量($p = 0.010$)が高IFMAレベル(図2A)と相関した。

【0094】

高IFMAレベルについても同様の検査を実施した。多変量調整回帰解析では、21 kDa ($p = 0.013$)、25 kDa ($p = 0.044$)、21 + 25 kDa ($p = 0.011$)、21 + 35 kDa ($p = 0.006$)、21 + 45 kDa ($p = 0.014$)、21 - 35 kDa ($p = 0.007$)、及び21 - 45 kDa ($p = 0.008$)の総量並びにMMP-8 ($p = 0.007$)の総量が有意であった。

10

【0095】

21 kDa種に対する他のMMP-8分子形態の有病率

25 kDa種及び35 kDa種の有病率を、21 kDa種陽性被験者及び21 kDa種陰性被験者について解析した。すべての研究被験者をととも解析したとき、35 kDa種有病率は、21 kDa種陰性患者(56.5%)に比して21 kDa種陽性患者(89.6%)において著しく高かった($p < 0.001$)。21 kDa種が陽性/陰性であるとき($p < 0.001$)、群3における25 kDa種別は88.3%/44.3%と顕著な差が見られた。また群4における各値は、21 kDa種が陽性/陰性であるとき、35 kDa種については94.7%/71.4% ($p = 0.046$)であり、25 kDa種については100%/71.4% ($p = 0.011$)であった。

20

【0096】

IFMA、IFMA、及びMMP-8分子形態の高度歯周組織炎症負荷との相関

25 kDa (OR 2.566、95%CI 1.114 ~ 5.909、 $p = 0.027$)、25 + 35 kDa (OR 2.586、95%CI 1.221 ~ 5.477、 $p = 0.013$)、及び21 - 45 kDa (OR 3.10、95%CI 1.121 ~ 8.568、 $p = 0.029$)種の有病率は、高度歯周組織炎症負荷(群4)と有意に相関した。しかしながらこの相関は、多変量調整解析では有意でなかった(25 + 35 kDa種の組み合わせで有意となった。 $p = 0.053$)。

30

【0097】

非調整解析において、IFMAレベル及びIFMAレベルの双方は、高度歯周組織炎症負荷の群4に相関した。IFMAについては、OR 1、95%CI 1.0 ~ 1.001、 $p = 0.029$ であり、IFMAについては、OR 1、95%CI 1.0 ~ 1.001、 $p = 0.046$ であった。

代わりに、共変量BOP%及び喫煙が高度歯周組織炎症負荷の群4と強く相関し、すべての解析において、BOP%については $p < 0.001$ であり、喫煙については $< 0.001 \sim 0.002$ であった。

【0098】

IFMA及びMMP-8 kDa種と喫煙との相関

非調整ロジスティック回帰解析及び調整ロジスティック回帰解析の双方において、35 kDa MMP-8種と25 + 35 kDa MMP-8種の有病率は喫煙と有意に相関しており、多変量調整モデルにおいてp値は各々0.033及び0.008であった。45 kDa種は、非調整解析においては有意でなかったものの、調整モデルでは防御可能であった($p = 0.033$) (図3B)。

40

【0099】

また35 kDa ($p < 0.001$)の割合、25 + 35 ($p < 0.001$)、25 - 45 (0.003)、35 + 45 (0.010)、21 - 45 ($p = 0.012$)、及び21 + 35 ($p = 0.002$) kDa種の組み合わせの割合が喫煙と相関した(図3C) (各々、MMP-8種について述べた後、多変量調整モデルのp値を括弧内に示した)。い

50

ずれの MMP - 8 種別の絶対量も、喫煙とは有意に相関しなかった。すべての多変量調整回帰解析において、4 ~ 5 mm のポケット数は喫煙と有意に相関した。

【0100】

BOP % と異なる MMP - 8 種別の相関

すべての研究被験者において、45 kDa 種の有病率は、BOP 25 % の患者で BOP < 25 % の患者より高かった ($p = 0.003$ 、カイ2乗)。この差は、45 kDa 種別 ($p = 0.002$) の少量についても、非喫煙者 ($p = 0.001$) においても統計的に有意であった。しかしながら有病率 25 % のプロービング値の出血は、群 1 において 0、群 2 及び 3 の双方において 9.1 %、群 4 において 81.8 % であった。従って 25 % のケースの最大 BOP は、主として群 4 に属するものであった。群 4 では、45 kDa 種の絶対量、有病率、及び割合が、BOP < 25 % の患者に比して BOP 25 % の患者において顕著に高かった (各々、 p 値は 0.009、0.022、及び 0.037)。群 4 の喫煙者と非喫煙者との間には有意な差は見られなかった。

10

【0101】

非調整ロジスティック回帰解析では、45 kDa 種別の MMP - 8 の有病率が BOP 25 % と相関し、OR 3.66、95 % CI 1.523 ~ 8.797、 $p = 0.004$ であった。多変量調整ロジスティック回帰解析では、45 kDa 種別の有病率が BOP 25 % と相関し、OR 3.66、95 % CI 1.309 ~ 8.634、 $p = 0.012$ であった。その他の共変量は有意でなかった。その他の MMP = 8 分子形態は BOP 25 % と相関しなかった。

20

【0102】

モデル化及び受信者動作特性解析

前進型段階的ロジスティック回帰解析により、口濯ぎ液試料から高度歯周組織炎症負荷下の患者 (群 4) の認識モデルを実行した。IFMA 及び IEMA (歯数を考慮)、BOP %、及び喫煙ステータス (yes / no) とともに、21、25、及び 35 kDa 種 1 つずつ、及びその組み合わせの有病率、絶対量、及び割合を検査した。ベストモデルは、25 + 35 kDa 種の BOP %、喫煙ステータス、及び有病率の組み合わせであり、各々、 p 値が < 0.001、0.006、及び 0.044 であった。

【0103】

受信者動作特性 (ROC) 解析を実施し、試験群における MMP - 8 の IFMA レベル及び IEMA レベル、25 + 35 kDa 種の有病率の診断感度及び特異度を評価した。群 4 の IFMA、IEMA、及び 25 + 35 kDa 種について、相違は状態変数として有意であった (図 4)。群 4 の IFMA については、ROC 曲線下方の領域が 0.602 であり、95 % 信頼区間 (CI) が 0.507 ~ 0.698、 p 値が 0.035 であった。IEMA については、ROC 下方の領域が 0.604 であり、95 % CI が 0.510 ~ 0.697、 p 値が 0.033 であった。25 + 35 kDa の有病率については、ROC 曲線下方の領域が 0.604、95 % CI が 0.514 ~ 0.693、 p 値が 0.033 であった。BOP 値については、ROC 曲線下方の領域が 0.880、95 % CI が 0.832 ~ 0.928、 p 値が 0.025 であった。ROC 解析により、25 + 35 kDa MMP - 8 活性化物質は、55 ~ 70 kDa MMP - 8 種とは異なり、IFMA 及び IEMA の解析とともに歯周炎患者を識別するものであることを明らかにした。

30

40

【0104】

実施例 2

SDS - PAGE (10 %) 解析を Killi Mら (2002年) に準じて実施した。

【0105】

rhMMP - 8 の量及び培養時間を図 4 に示す。図 4 A は、組み換えヒト MMP - 8 (Proteasimmun) に対する有機水銀化合物 APMA の作用を示し、図 4 B は、NaOCl 活性化因子の作用を示す。APMA 及び NaOCl はともに活性化に際して低分子量 MMP - 8 種の生成を誘発する。20 ~ 30 kDa 活性化フラグメントの時間依存形

50

成を矢印で示す。

上述のウェスタンイムノブロッティング法を使用してウェスタンイムノブロット解析を実施した。図4Cは、APMA及びNaOCl並びに血清及び異なるヒトの体液により、活性化rhMMP-8の1491-E6-F7-単クローン性anti-MMP-8抗体(Proteaimmun、Merck、及び本発明のMMP-8抗原)を使用したウェスタンイムノブロット解析を示す。

【0106】

ヒトの歯周炎歯肉溝浸出液(GCF)、ヒトのインプラント周囲炎内縁流体(PISF)、ヒトの矯正治療歯のGCF、ヒトの歯周炎唾液、ヒトの歯周炎口濯ぎ液、ヒトの羊水の感染試料、ヒトの脳脊髄液、及びヒトの敗血症血清の試料を以下のレーン10~レーン17に使用した。

【0107】

レーン1: ProteaimmunによるrMMP-8
 レーン2: レーン1と同一のものプラスAPMA
 レーン3: レーン1と同一のものプラスNaOCl
 レーン4: MerckによるrhMMP-8
 レーン5: レーン4と同一のものプラスAPMA
 レーン6: レーン4と同一のものプラスNaOCl
 レーン7: 本発明のMMP-8抗原
 レーン8: レーン7と同一のものプラスAPMA
 レーン9: レーン7と同一のものプラスNaOCl
 レーン10: ヒトの歯周炎歯肉溝浸出液(GCF)
 レーン11: ヒトのインプラント周囲炎内縁流体(PISF)
 レーン12: ヒトの矯正治療を行った歯のGCF
 レーン13: ヒトの歯周炎唾液
 レーン14: ヒトの歯周炎口濯ぎ液
 レーン15: 感染したヒトの羊水
 レーン16: ヒトの脳脊髄液
 レーン17: ヒトの敗血症血清

【0108】

MMP-8の活性化に際して形成される優勢な20~30kDaフラグメントを矢印で示す。

【0109】

実施例3

非感染(#16)及び感染(#12、#13、及び#19)ヒト羊水試料を使用し、上述のウェスタンイムノブロッティング法によりウェスタンイムノブロット解析を実施した。解析に用いたIFMAで査定の異なる試料、及び異なるMMP-8濃度について次の各レーンに示す。使用したゲルは11%であった。検査は3つの異なる抗体、すなわち単クローン性MMP-8特定抗体1491-E6-F7(7.)、1492-B3-C11(4.) (Medix Biochemica、フィンランド、カウニアイネン)、及び多クローン性抗体(3.) (Lauhio Aら、1994年)を使用して実施した。その他、使用したすべての抗体についてレーンは同一であったが、多クローン性anti-MMP-8についてレーン8及び10には試料がなかった。結果を図5に示す。MMP-8フラグメント25kDa+35kDaのレベルは、IFMAで査定したMMP-9レベルに相関した。

【0110】

レーン1 標準
 レーン2 #16、210µg/l MMP-8(14µl×15µg·l)/well
 レーン3 #12、210µg/l MMP-8

レーン 4 # 12、2000 $\mu\text{g}/\text{l}$ MMP - 8
 レーン 5 # 12、40000 $\mu\text{g}/\text{l}$ MMP - 8
 レーン 6 # 12、76160 $\mu\text{g}/\text{l}$ MMP - 8 (14 $\mu\text{l} \times 5440 \mu\text{g} \cdot \text{l}$)
 /well
 レーン 7 # 13、210 $\mu\text{g}/\text{l}$ MMP - 8
 レーン 8 # 13、2000 $\mu\text{g}/\text{l}$ MMP - 8
 レーン 9 # 13、40000 $\mu\text{g}/\text{l}$ MMP - 8
 レーン 10 # 13、186088 $\mu\text{g}/\text{l}$ MMP - 8 (14 $\mu\text{l} \times 13292 \mu\text{g}$
 $\cdot \text{l}$) /well
 レーン 11 # 19、210 $\mu\text{g}/\text{l}$ MMP - 8
 レーン 12 # 19、2000 $\mu\text{g}/\text{l}$ MMP - 8
 レーン 13 # 19、40000 $\mu\text{g}/\text{l}$ MMP - 8
 レーン 14 # 19、127666 $\mu\text{g}/\text{l}$ MMP - 8 (14 $\mu\text{l} \times 9119 \mu\text{g} \cdot$
 l) /well

10

【0111】

実施例 4

SDS - PAGE (10%) 解析を Kiili Mら (2002年) に準じて実施した。
 組み換えヒト MMP - 8 (Proteaimmun) を APMA で活性化した。rh MMP - 8
 の量と培養時間を次に示す。シークエンシングに使用したバンドを図 6 に示す。

【0112】

レーン 1 1.5 μL 分子量基準 (Bio - Rad)
 レーン 2 2 μl 分子量基準 (Bio - Rad)
 レーン 3 1 μl MMP - 8 (0.15 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) + 3 μl TNC 緩衝剤 (50
 mM Tris - HCl、pH7.8 : 0.2 M NaCl : 0.75 mM CaCl_2)

レーン 4 空

レーン 5 1 μl MMP - 8 (0.15 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) + 4 μl 2 mM APMA +
 3 μl TNC 緩衝剤、培養時間 2 時間 (37)

レーン 6 空

レーン 7 1 μl MMP - 8 (0.15 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) + 4 μl 2 mM APMA +
 3 μl TNC 緩衝剤、培養時間 5.5 時間 (37)

【0113】

シークエンシングは、上述のシークエンシング法に準じて実施した。図 6 のゲルバンド
 1 ~ 8 にシークエンシングを施した。バンドのサイズは次のとおりであった。

【0114】

バンド 2 = 32 kDa

バンド 3 = 25 kDa

バンド 4 = 21 kDa

バンド 5 = 25 kDa

バンド 6 = 21 kDa

バンド 7 = 12 kDa

バンド 8 = 5 kDa

【0115】

バンド 3、4、5、及び 8 は配列番号 1 を含み、バンド 2、3、4、5、及び 6 は配列
 番号 2 を含む。バンド 7 は MMP - 8 のその他のフラグメントを特定した。バンド 1 には
 いずれの MMP - 8 フラグメントも特定されなかった。バンド 3、4、及び 5 の MMP -
 8 活性化物質は配列番号 1 及び配列番号 2 の双方を含む。配列番号 1 のアミノ酸 119 ~
 132 と配列番号 2 のアミノ酸 151 ~ 165 は全体 MMP - 8 配列の中間領域ドメイン
 からであった。

【0116】

50

実施例 5

実施例 2 及び実施例 3 でフラグメントを示すのに使用した単クローン性抗体により、ヒトの胎盤から抽出した精製ヒト aMMP - 8 に SDS - PAGE 解析及びウェスタンブロット解析を実施した。

【0117】

アフィニティークロマトグラフィーカラム (30 ml セファロースカラム (Bio Rad) 用) に anti - hMMP - 8 - Ab (マウス anti - hMMP 8 MoAb 1491 - E6 - F7 (Medix Biochemica) を NHS - セファロース (NHS - 活性化セファロース 4 Fast Flow (GE Healthcare)) に結合した。胎盤素材 (ヒトの MMP - 8 - 胎盤抽出物 (in . vent . Diagnostica)) の濃縮は、遠心濃縮器 (Vivaspin (登録商標) Turbo 15 及び Vivaspin (登録商標) 2 (Sartorius)) により実施した。アフィニティークロマトグラフィーは、各ラン (ゲル電気泳動「Mini Protean 3 cell」及びブロットング機器「Mini Trans - Blot cell」 (Bio Rad)) につき 10 ml の濃縮素材胎盤抽出物を使用して実施した。酸性溶出は、pH 2.2 のクエン酸緩衝剤によって実施した。5 ml の画分を回収した。画分をプールし、遠心濃縮器で濃縮した。緩衝剤塑性を調整して (ミニダイアライザー MD1000 (Scientova)) 精製ヒト aMMP - 8 を得た。SDS - PAGE (Pierce Silver Stain Kit (Thermo Scientific)) 及びウェスタンブロット (Protein - standards Precision Plus Protein Dual Extra (Bio Rad) を使用した immun - Blot PVDF 膜 0, 2 µm、7 x 8, 4 cm (Bio Rad)) を実施した。SDS - PAGE 及び WB には、分離ゲル 12% 及び回収ゲル 4% の SDS ゲルを利用した。

10

20

【0118】

その結果を、SDS - PAGE については図 7 に、ウェスタンブロットについては図 8 に示す。

【0119】

SDS - PAGE の銀色染色ゲルは、全試料の比較バンドを表示しており、これまで知られていた 35 kDa 超のフラグメントとともに、10 ~ 15 kDa のフラグメント及び 20 ~ 35 kDa のフラグメントを顕著に示している。丸で囲んだウェスタンブロットバンドは比較的弱いものの、本来のプロット上に観察することができた。「*」マークを付した分子量マーカーの 75 kDa 及び 25 kDa バンドは、赤色であり、本来のプロット内に明らかに見ることができる。免疫学的染色では、10 ~ 15 kDa を増幅し、より高度に濃縮された試料中では 20 ~ 35 kDa フラグメントもマークする。

30

【0120】

結果を実施例 2 及び 3 で示した結果と相互に関連づけ、確認する。

【0121】

・参照文献

・Dejonckheere E. ら「マトリクスメタロプロテアーゼ - 8 は炎症及び癌進行の中心的役割を果たす」Cytokine & Growth Factor Reviews 22 : 73 ~ 81、2011 年

40

・Hanemaaijer ら、「マトリクスメタロプロテアーゼ - 8 はリウマチ滑膜線維芽細胞及び内皮細胞に発現する。腫瘍壊死因子 - 及びドキシサイクリンによる調節」J . Biol . Chem . 278 : 40967 ~ 40972、1997 年

・Hemmila ら「時間分解免疫蛍光分析検定におけるラベルとしてのユーロピウム」Anal Biochem 137 : 335 ~ 343、1984 年

・Holtfreter B. ら「ドイツ歯科調査 (DMSIV) に基づく歯周病有病率及び治療必要性」Journal of Clinical Periodontology、第 37 巻、第 3 版、211 ~ 219 頁、2010 年 3 月

・Kiili M ら「成人歯周病におけるコラゲナーゼ - 2 (MMP - 8) 及びコラゲ

50

ナーゼ - 3 (MMP - 13)。分子が歯肉組織の歯肉溝浸出貯留液及び免疫学的局在決定を形成及び水平化する」J. Clin. Periodontol、29:224~232、2002年

・ Lauhi O 氏ら「急性反応性関節炎のドキシサイクリン及び非ステロイド系抗炎症薬 (NSAID) による長期併用治療中のヒト好中球コラゲナーゼ (MMP - 8) 活性の生体内の阻害」Clin. Exp. Immunol.、98:21~28、1994年

・ Leppilähti JM 氏ら「口濯ぎ液による MMP - 8 ポイントオブケア免疫検査により高度歯周組織炎症負荷下にある患者を特定する」Oral Dis. 17:115~122、2011年

・ Lindy O 氏ら「スタチン使用が歯肉病変抑制に関連する」BMC Oral Health 15;8:16、2008年

・ Ma J 氏ら「異なるカテゴリーのインプラント周囲上下骨喪失におけるコラゲナーゼ」J Dent Res;79:1870~1873、2000年

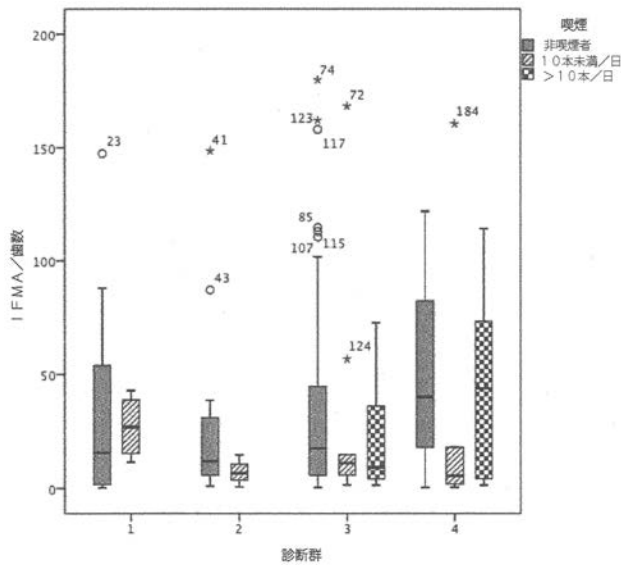
・ Turunen 氏ら「マロンジアルデヒド修飾低密度リポタンパク質への天然 IgM 結合によるポリフィロモナスジンギルバリスジンジパインエピトープの認識」PloS ONE 7(4):e34910. Doi:10.1371/journal.pone.0034910、2012年

・ Xu L 氏ら「歯周炎及びインプラント周囲炎の患者における歯肉溝滲出液及びインプラント周囲内縁流体から得たコラゲナーゼ - 2 の特性」Acta Odont Scand;66:219-224、2008年

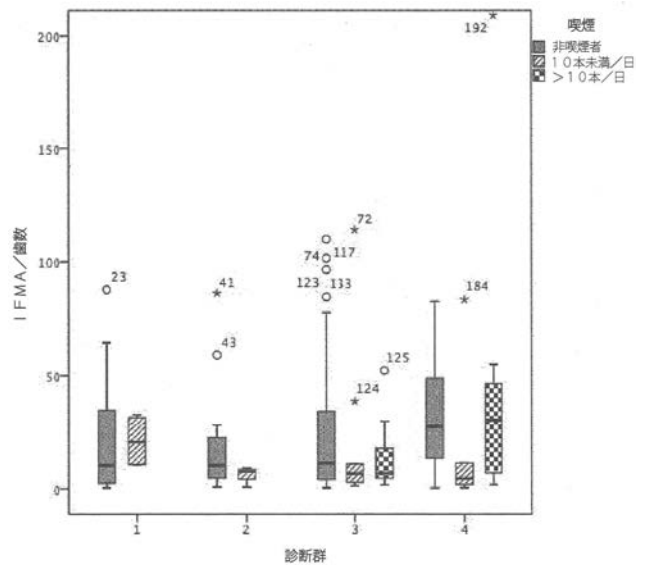
10

20

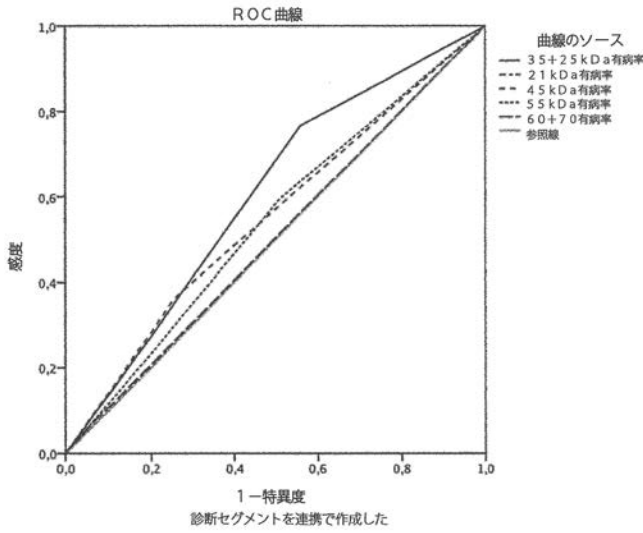
【図 1 A】



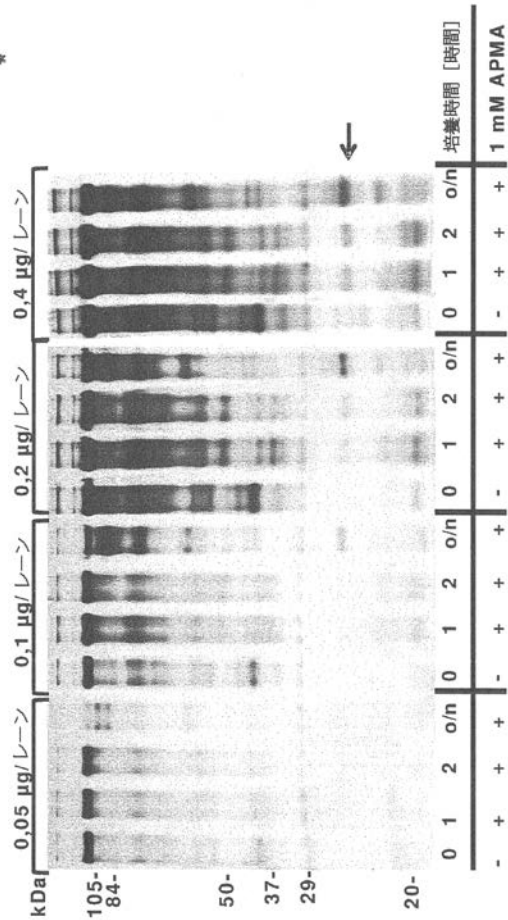
【図 1 B】



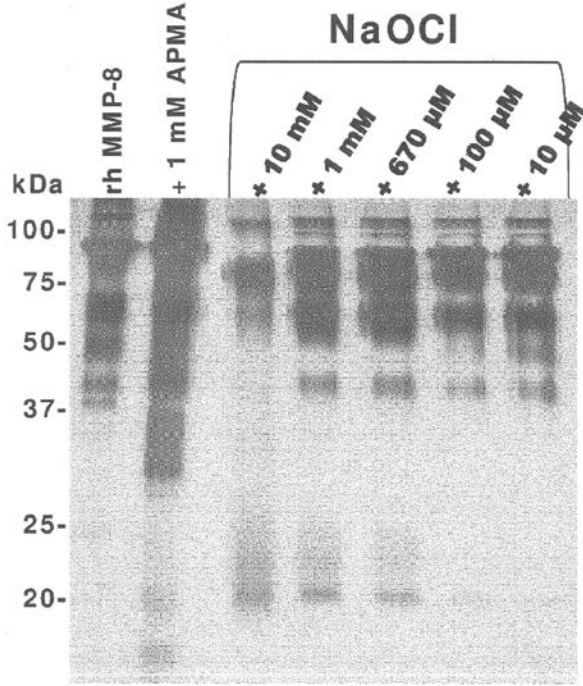
【 図 3 B 】



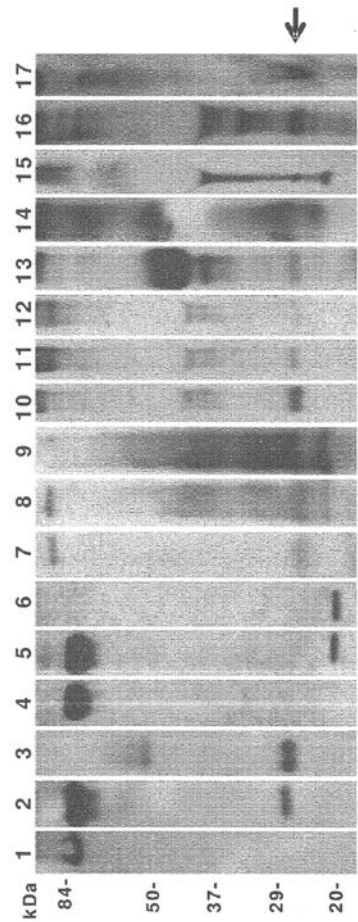
【 図 4 A 】



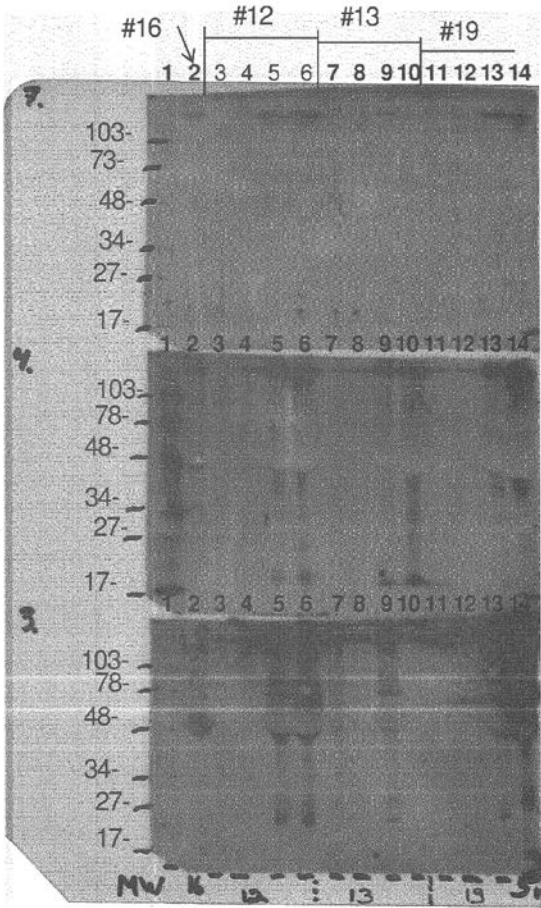
【 図 4 B 】



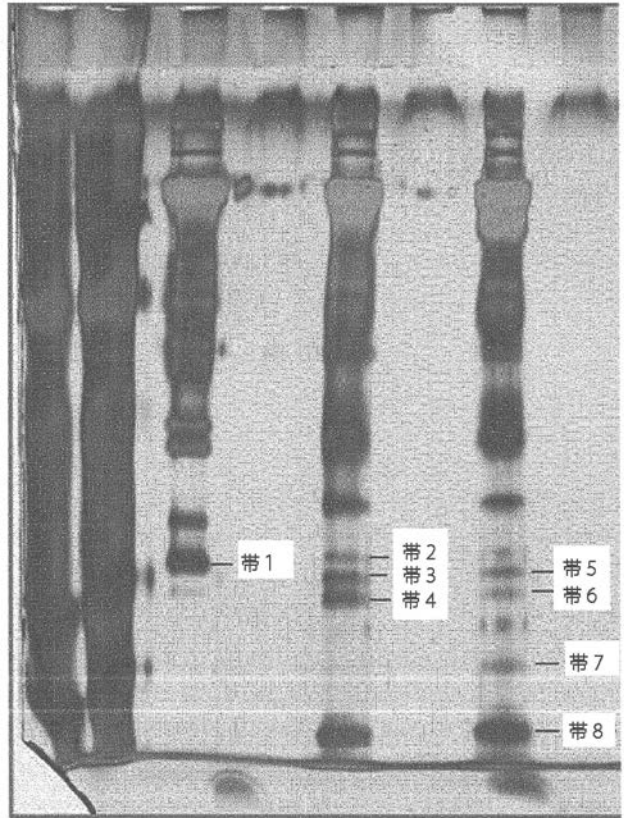
【 図 4 C 】



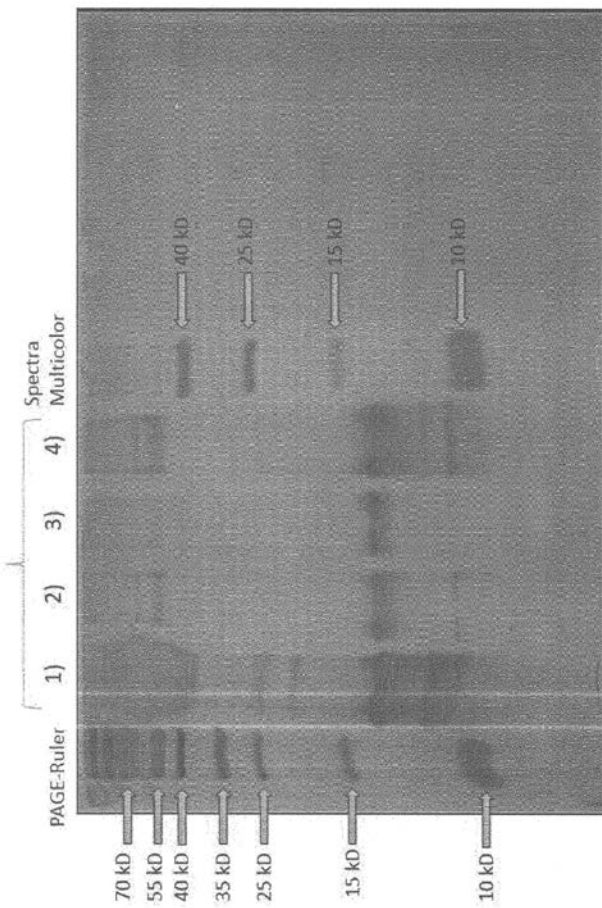
【 図 5 】



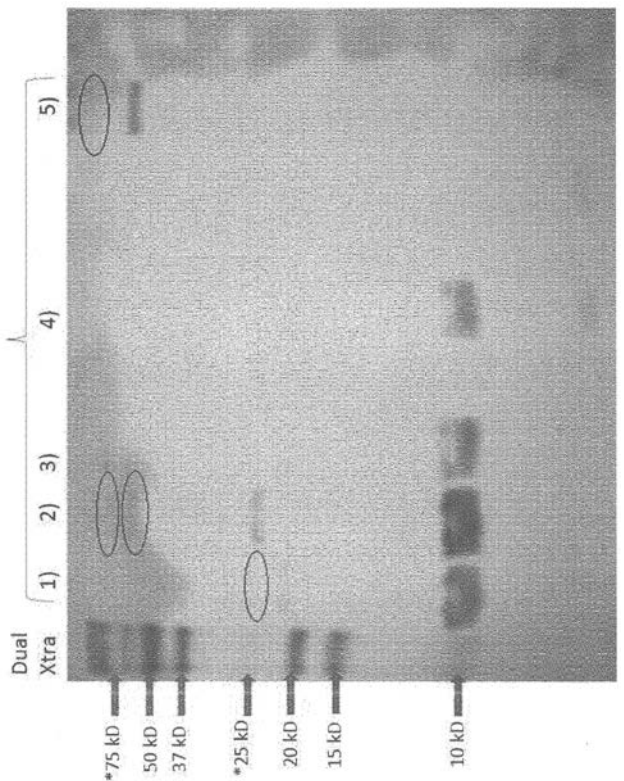
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



【配列表】

2017507659000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成27年12月23日(2015.12.23)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

MMP-8 活性化物質であって、全体MMP-8配列の中間領域ドメインから1つ以上のMMP-8 活性フラグメントを含み、20~35kDa、好ましくは約20kDa、25kDa、30kDa、又は35kDaのサイズを有することを特徴とするMMP-8 活性化物質。

【請求項2】

前記活性化物質は、配列番号1の配列を含む請求項1に記載のMMP-8 活性化物質。

【請求項3】

前記活性化物質は、配列番号2の配列を含む請求項1に記載のMMP-8 活性化物質。

【請求項4】

試料中のMMP-8 活性の判定方法であって、

a) 被験者からの生体試料を提供するステップと、

b) 前記生体試料において、好ましくは全体MMP-8配列の中間領域ドメインから1つ以上のMMP-8 活性フラグメントを含み、10~35kDa、好ましくは20~30kDa、より好ましくは約10kDa、15kDa、20kDa、25kDa、30kDa、又は35kDaのサイズを有する1つ以上のMMP-8 活性化物質の存在を検出するステップと、

c) 選択的に、MMP-8 活性化物質の存在を前記試料中の活性型MMP-8の存在と相互に関連付けるステップと、及び/又は、

d) 選択的に、MMP-8 活性化物質の存在を前記試料中の活性型MMP-8のその他の多くの部分を占める存在と相互に関連付けるステップを備え、

前記生体試料中のMMP-8 活性化物質の存在は、前記試料中の活性型MMP-8の存在を表示、確認、及び/又は予測するものである方法。

【請求項5】

前記試料は、口腔、歯肉溝滲出液、インプラント周囲内縁流体、オーラルプラーク、歯垢、口濯ぎ液、口洗浄液、唾液、根管流体、傷からの滲出液、PUS、オーラルバイオフィルム、組織バイオプシー、口腔スワップ、口腔病斑からの血液より得られる請求項4に記載の方法。

【請求項6】

前記試料は、羊水、血清、血漿、膣洗浄、鼻洗浄、副鼻腔、耳腔、尿、関節液、脳脊髄液、排泄物、スワップ、涙液、洗浄(肺)、組織バイオプシー、及び/又は汗より得られる請求項4に記載の方法。

【請求項7】

前記活性化物質は、配列番号1の配列を含む請求項4~6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項8】

前記活性化物質は、配列番号2の配列を含む請求項4~7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項9】

前記MMP-8 活性化物質の存在は、前記生体試料中のMMP-8フラグメントの検出

を行うリガンドシステムを使用して判定される請求項4～8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項10】

前記リガンドシステムは、1つ以上の抗体、抗体対、及び/又は抗体フラグメントからなり、検定は、好ましくはウェスタンブロッティング、IFMA、EIA、EMA、ELISA、ラテラルフロー検定、表面プラズモン共鳴検定、及び電気化学検定からなる群より選択される定量的、半定量的、又は定性的な免疫学的測定法である請求項9に記載の方法。

【請求項11】

前記MMP-8活性化物質の存在は、前記全体MMP-8配列の中間領域ドメインからの1つ以上のMMP-8活性化フラグメントを前記生体試料中に検出する直接的タンパク質検出技術を使用して判定される請求項4～10のいずれか一項に記載の方法。

【請求項12】

前記方法はさらに、ステップb)で得られた結果を参照試料と比較することにより、疾患又は疾患進行の素因又はリスクを診断するステップをさらに備え、

a)前記参照試料は、現在通常レベルのMMP-8を有することが分かっている被験者群又は患者群より得て、前記生体試料と前記参照試料とで結果が類似していた場合、前記被験者が罹患していない、又は罹患しにくいこと、若しくは疾患が進展又は進行するリスクを有していない、又はそのリスクが生じにくいことを示し、前記生体試料中のMMP-8活性化物質のレベルが前記参照試料に比して上昇している場合、前記被験者が罹患している、又は罹患し易いこと、若しくは疾患が進展又は進行するリスクが増加し易いことを示し、又は、

b)前記参照試料は、現在罹患している、又は罹患し易いことが分かっている被験者群又は患者群より得て、前記生体試料と前記参照試料とで結果が類似していた場合、前記被験者が罹患している、又は罹患し易いこと、若しくは疾患が進展又は進行するリスクを有している、又はそのリスクが生じ易いことを示す請求項4～11のいずれか一項に記載の方法。

【請求項13】

前記疾患は、歯周組織炎症、歯周組織喪失(劣化)、歯肉炎、歯周炎、インプラント周囲炎、インプラント周囲粘膜炎、歯の喪失、歯科インプラント寛解、歯槽骨喪失、粘膜炎、粘膜の変化、根尖性歯周組織炎、歯根管炎症、虫歯、上下顎骨断裂、歯の矯正移動、アレルギー性炎症反応、及び/又は口腔内細菌によって発生する菌血症である請求項12に記載の方法。

【請求項14】

前記MMP-8活性化物質の存在は、慢性又は急性の歯周炎又はインプラント周囲炎症等の歯周病を表示又は予測するものであり、これらの口腔内疾患は、糖尿病I、糖尿病II、COPD(慢性閉塞性肺疾患)、リウマチ疾患、関節炎疾患、骨粗鬆症、整形外科的疾患、自己免疫疾患、組織移植疾患、脳卒中、心筋梗塞、動脈硬化等のエンドプロテアーゼ心血管疾患、早期産、低出生体重等の妊娠関連リスク、勃起障害、精子数の減少、及び精子細胞の可動性低下等の生殖リスク等の全身性の疾患又は障害の表示、増強、または既知のリスク因子である請求項12又は13に記載の方法。

【請求項15】

前記疾患は、羊膜内炎症、母体炎症、新生児疾患、早期分娩、低出生体重、羊膜病理等の婦人科疾患、悪性腫瘍、乳癌、白血病等の癌性疾患、リウマチ関節炎、関節症等の関節炎/リウマチ疾患、あらゆる形態の糖尿病、腎症疾患、腎疾患、難治性糖尿病性創傷等の糖尿病性疾患、円錐角膜、角膜のペルーシド角膜変性等の眼球疾患、耳鼻咽喉科的疾患(例えば、耳、副鼻腔からの疾患)、ポリレオ症、敗血症、全身性炎症反応症候群(SIRS)、HIV、ヘリコバクターピロリ感染症、全身性炎症、全身性軽度炎症等の感染症又は炎症、気管支炎、気管支拡張症、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、小児感染症/炎症等の肺感染症及び炎症、髄膜炎、クローン病等の神経系感染症、炎症、及び疾患、血管疾患

、動脈内プラーク炎症等のアテローム性動脈硬化、塞栓症、及び脳卒中等の心血管疾患、重症、難治性創傷、及び皮膚熱傷等の創傷、腸管疾患（糞便検査から）、トラウマ又は事故後の疾患、及び／又は、メタボリック症候群及び肥満である請求項 1 2 に記載の方法。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/FI2015/050121		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER				
See extra sheet				
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
B. FIELDS SEARCHED				
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)				
IPC: C12N, G01N				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched				
FI, SE, NO, DK				
Electronic data base consulted during the international search (name of data base, and, where practicable, search terms used)				
EPO-internal, WPI, BIOSIS, COMPDX, EMBASE, MEDLINE, XPESP, XPOAC, XPRD, SEQUENCE SEARCHES, STN: DGENE, USGENE, PCTGEN, REGISTRY				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
X	Reynaud af Geijersstam, A. et al. Effect of <i>E. faecalis</i> on the release of serine proteases elastase and cathepsin G, and collagenase-2 (MMP-8) by human polymorphonuclear leukocytes (PMNs). International Endodontic Journal, September 2005, Vol. 38, No. 9, pages 667-677 abstract; pages 670 - 671, section "Release of MMP-8 by PMN cells after interaction with <i>E. faecalis</i> "; figure 4	1		
X	Kivelä-Rajamäki M. et al. Levels and molecular forms of MMP-7 (matrilysin-1) and MMP-8 (collagenase-2) in diseased human peri-implant sulcular fluid. Journal of Periodontal Research, December 2003, Vol. 38, No. 6, pages 583-590 abstract; page 585, section "Results", lines 23-33; page 586, figure 1	1		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.				
* Special categories of cited documents: <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; border: none;"> "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed </td> <td style="width: 50%; border: none;"> "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family </td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search 11 June 2015 (11.06.2015)		Date of mailing of the international search report 11 June 2015 (11.06.2015)		
Name and mailing address of the ISA/FI Finnish Patent and Registration Office P.O. Box 1160, FI-00101 HELSINKI, Finland Facsimile No. +358 9 6939 5328		Authorized officer Stiina Kaikkonen Telephone No. +358 9 6939 500		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/FI2015/050121

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC
C12N 9/64 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FI2015/050121

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Kiili, M. et al. Collagenase-2 (MMP-8) and collagenase-3 (MMP-13) in adult periodontitis: molecular forms and levels in gingival crevicular fluid and immunolocalisation in gingival tissue. <i>Journal of Clinical Periodontology</i> , March 2002, Vol. 29, No. 3, pages 224-232 abstract; page 226, section "Results"; page 227, figure 1	1
X	WO 2010047938 A2 (UNIVERSITY OF PITTSBURGH-OF THE COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER EDUCATION) 29 April 2010 (29.04.2010) page 1, line 26 – page 2, line 23; page 5, lines 1-3; page 7, lines 22-27; page 11, lines 1-16 and table 1; page 12, table 2; claims 1, 12, 13 and 16; figure 3	6-8, 13-19
A	EP 0777859 B1 (MEDIX BIOCHEMICA AB OY [FI]) 04 December 2002 (04.12.2002) paragraphs [0056], [0071], [0072], [0132], [151]-[158]; claims 2-6)	1, 4-8, 11-19
A	WO 0063698 A1 (MEDIX BIOCHEMICA AB OY [FI]) 26 October 2000 (26.10.2000) abstract, pages 50-51, example 17; figure 19	1, 4-8, 11-19
A	DATABASE UNIPROTKB/SWISS-PROT [online] 19 February 2014 (19.2.2014) 'MMP8_HUMAN', Accession no. P22894, [retrieved on 10.8.2015], retrieved from the Internet: <URL: http://www.uniprot.org/uniprot/P22894.txd?version=152 Field SQ	1, 4-8, 11-19

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)	
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1. <input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. <input checked="" type="checkbox"/>	Claims Nos.: 2, 3, 9, 10 because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically: See Extra Sheet
3. <input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:	
<p>1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.</p> <p>2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.</p> <p>3. <input type="checkbox"/> 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.:</p> <p>4. <input type="checkbox"/> 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.:</p>	
Remark on Protest	<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee. <input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/FI2015/050121

Extra Sheet

Dependent claims 2 and 3 relate to the MMP-8 activation product according to claim 1, wherein the size of the activation product corresponds to the activation product obtained by activating native MMP-8 with AMPA (claim 2) or by proteolytic removal or by chemical modification with oxidative activation (claim 3).

Dependent claim 9 relates to the method according to any one of claims 6 to 8, wherein the size of the activation product corresponds to the activation product obtained by activating native MMP-8 with APMA. Dependent claim 10 relates to the method according to any one of claims 6 to 9, wherein the size of the activation product corresponds to the activation product obtained by activating native MMP-8 by proteolytic removal or by chemical modification with oxidative activation.

The definitions used in claims 2, 3, 9 and 10 cannot be considered a clear and concise statement of the subject matter. The size of the products obtained by activating native MMP-8 by the methods according to claims 2, 3, 9 or 10 has no standard meaning for a skilled person and may vary depending on the applied activation methods, conditions or, for example, on differences in MMP-8 glycosylation. Thus, the definitions used in claims 2, 3, 9 and 10 lack clarity to such an extent that a meaningful comparison between the subject matter of these claims and the prior art is not possible (Article 6 PCT).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on Patent Family Members

International application No.
PCT/FI2015/050121

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family members(s)	Publication date
WO 2010047938 A2	29/04/2010	US 2011212473 A1	01/09/2011
		US 8568996 B2	29/10/2013
EP 0777859 B1	04/12/2002	EP 0777859 B1	04/12/2002
		AT 229184 T	15/12/2002
		AU 3225195 A	22/03/1996
		AU 690316 B2	23/04/1998
		CA 2197452 A1	07/03/1996
		DE 69529076 D1	16/01/2003
		DE 69529076 T2	10/07/2003
		ES 2185712 T3	01/05/2003
		FI 943939 A	27/02/1996
		FI 98961 B	30/05/1997
		FI 98961 C	10/09/1997
		JP H10501070 A	27/01/1998
		JP 3083325 B2	04/09/2000
		KR 100255086 B1	01/06/2000
		NO 970827 D0	24/02/1997
NO 970827 A	14/04/1997		
US 5736341 A	07/04/1998		
WO 9607103 A1	07/03/1996		
WO 0063698 A1	26/10/2000	AU 4121900 A	02/11/2000
		CA 2370418 A1	26/10/2000
		EP 1171770 A1	16/01/2002
		JP 2002542485 A	10/12/2002

フロントページの続き

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

(74) 代理人 100136629

弁理士 鎌田 光宜

(74) 代理人 100121212

弁理士 田村 弥栄子

(74) 代理人 100163658

弁理士 小池 順造

(74) 代理人 100174296

弁理士 當麻 博文

(74) 代理人 100137729

弁理士 赤井 厚子

(74) 代理人 100151301

弁理士 戸崎 富哉

(72) 発明者 ソルサ、ティモ

フィンランド国、エフアイ - 0 0 0 1 4 ヘルシンキ、ピーエル 4 1、インスティテュート オブ デンティストリー

(72) 発明者 ジーゼルマン、ディルク - ロルフ

スイス国、シーエイチ - 8 0 4 4 チューリッヒ、クラフトシュトラッセ 3 3

(72) 発明者 コルヴォ、アーミ

フィンランド国、エフアイ - 0 5 4 6 0 ヒュヴィンカー、ローカレティエ 1 9

(72) 発明者 マイヤー、クルト

ドイツ国、ディーイー - 1 2 1 5 9 ベルリン、シュボンホルツシュトラッセ 5

(72) 発明者 マンティラ、パイヴィ

フィンランド国、エフアイ - 0 0 0 1 4 ヘルシンキ、ピーエル 4 1、インスティテュート オブ デンティストリー

(72) 発明者 ラマン、イスモ

フィンランド国、エフアイ - 0 2 7 1 0 エスポー、カンディダーティンクヤ 1 2 エー

(72) 発明者 ティーサラ、シニッカ

フィンランド国、エフアイ - 0 0 1 8 0 ヘルシンキ、ラピンラデンカトゥ 2 3 ビー 3 5

F ターム(参考) 4B050 CC02 DD11 GG01 HH01 KK01 LL03

4B063 QA01 QA19 QQ02 QQ08 QQ36 QQ89 QR16 QR50 QR67 QR72

QR77 QS36 QX01

专利名称(译)	MMP-8活化物质和相同物质的测定和使用		
公开(公告)号	JP2017507659A	公开(公告)日	2017-03-23
申请号	JP2016554676	申请日	2015-02-27
[标]申请(专利权)人(译)	梅蒂克斯生物化学有限公司 DENTOGNOSTICS		
申请(专利权)人(译)	Oy公司MEDIX Baiokemika AB 登特诊断各国箱门EM根据她的		
[标]发明人	ソルサティモ ジーゼルマンディルクロルフ コルヴォアーミ マイヤークルト マンティラパイヴィ ラマンイスモ ティーサラシニッカ		
发明人	ソルサ、ティモ ジーゼルマン、ディルク-ロルフ コルヴォ、アーミ マイヤー、クルト マンティラ、パイヴィ ラマン、イスモ ティーサラ、シニッカ		
IPC分类号	C12N9/64 G01N33/53 G01N33/543 C12Q1/37		
CPC分类号	C07K14/8146 C12N9/64 C12N9/6491 C12Y304/24034 G01N33/573 G01N2333/96494 G01N2800/18 G01N33/68 G01N2800/50		
FI分类号	C12N9/64.ZNA.Z G01N33/53.D G01N33/543.501.A C12Q1/37		
F-TERM分类号	4B050/CC02 4B050/DD11 4B050/GG01 4B050/HH01 4B050/KK01 4B050/LL03 4B063/QA01 4B063 /QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ36 4B063/QQ89 4B063/QR16 4B063/QR50 4B063/QR67 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS36 4B063/QX01		
代理人(译)	高岛肇 当麻 博文		
优先权	2014005192 2014-02-27 FI		
其他公开文献	JP6613241B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及新颖的MMP-8活化剂，例如MMP-8中间部分活化剂。本发明还涉及在从受试者获得的生物样品中检测MMP-8激活剂或活性MMP-8片段，并将其用于诊断与活性MMP-8的异常水平或升高有关的疾病。有关。[选择图]无

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 9/64 (2006.01)	C 1 2 N 9/64	Z N A Z 4 B 0 5 0
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53	D 4 B 0 6 3
G O 1 N 33/543 (2006.01)	G O 1 N 33/543	5 O 1 A
C 1 2 Q 1/37 (2006.01)	C 1 2 Q 1/37	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 47 頁)

(21) 出願番号	特願2016-554676 (P2016-554676)	(71) 出願人	516257305
(86) (22) 出願日	平成27年2月27日(2015.2.27)		オイ メディックス ハイオケミカ エービー
(85) 翻訳文提出日	平成28年8月25日(2016.8.25)		フィンランド国、エフアイー02180
(86) 国際出願番号	PCT/FI2015/050121		エスポー、クロヴィンペッロンティエ 3
(87) 国際公開番号	W02015/128549	(71) 出願人	510256609
(87) 国際公開日	平成27年9月3日(2015.9.3)		デントグノステイツクス・ゲー・エム・バー・ハー
(31) 優先権主張番号	20145192		ドイツ国、07745・イエーナ、タツツ
(32) 優先日	平成26年2月27日(2014.2.27)		エントプロムナーデ・2
(33) 優先権主張国	フィンランド(FI)	(74) 代理人	100080791
			弁理士 高島 一
		(74) 代理人	100125070
			弁理士 土井 京子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 MMP-8 活性化物質及び同物質の判定並びに使用