

(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2015-522817

(P2015-522817A)

(43) 公表日 平成27年8月6日(2015.8.6)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	4 B 0 6 4
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 O 1 A	4 H 0 4 5
CO 7 K 14/78 (2006.01)	CO 7 K 14/78 Z N A	
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02 C	
CO 7 K 16/18 (2006.01)	CO 7 K 16/18	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 43 頁)

(21) 出願番号 特願2015-520122 (P2015-520122)
 (86) (22) 出願日 平成25年6月27日 (2013. 6. 27)
 (85) 翻訳文提出日 平成27年2月24日 (2015. 2. 24)
 (86) 国際出願番号 PCT/SE2013/050809
 (87) 国際公開番号 W02014/003679
 (87) 国際公開日 平成26年1月3日 (2014. 1. 3)
 (31) 優先権主張番号 61/690, 525
 (32) 優先日 平成24年6月28日 (2012. 6. 28)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 509234515
 アナマー エービー
 スウェーデン国 イェーテボリ エスイー
 - 4 1 1 3 6 クングスボルツアベニン
 2 2
 (74) 代理人 110000855
 特許業務法人浅村特許事務所
 (72) 発明者 ロレンゾ、ピラル
 スウェーデン国、ルンド、カムナルスヴェ
 ーゲン 7 ジー：1 1 4
 (72) 発明者 エネルフヨルド、パトリック
 スウェーデン国、ルンド、ヨルダバルクス
 ヴェーゲン 6 3

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 病的な軟骨代謝回転の決定

(57) 【要約】

本実施形態は、体液にも放出され、組織中にも存在する軟骨オリゴマートリックスタンパク質 (COMP) ネオエピトープの検出により、病的な軟骨代謝回転を決定又は検出する方法に関する。さらに本実施形態は、COMP ネオエピトープに対する抗体、並びにこのような抗体を作製するためのCOMP ネオエピトープを含有するフラグメント及びペプチドに関する。

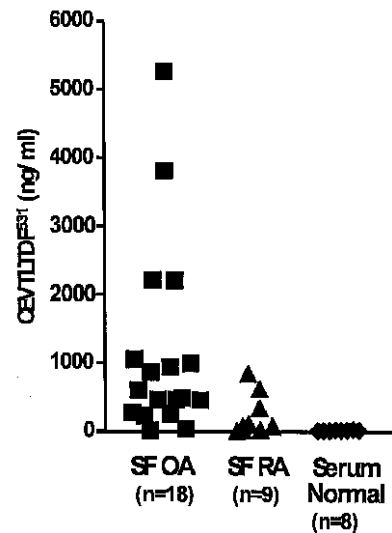


Fig. 2

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

病的な軟骨代謝回転を決定する方法であって、

a) サンプル中で、哺乳動物軟骨オリゴマーマトリックスタンパク質COMPの少なくとも1種のネオエピトープの存在を検出するステップであって、前記少なくとも1種のネオエピトープが、配列番号1で定義された前記哺乳動物COMPのアミノ酸配列の77位(S⁷⁷)~78位(V⁷⁸); 88位(L⁸⁸)~89位(L⁸⁹); 90位(H⁹⁰)~91位(C⁹¹); 104位(Q¹⁰⁴)~105位(T¹⁰⁵); 190位(N¹⁹⁰)~191位(C¹⁹¹); 194位(N¹⁹⁴)~195位(S¹⁹⁵); 226位(Q²²⁶)~227位(R²²⁷); 531位(F⁵³¹)~532位(R⁵³²); 554位(L⁵⁵⁴)~555位(N⁵⁵⁵); 574位(Y⁵⁷⁴)~575位(T⁵⁷⁵); 577位(F⁵⁷⁷)~578位(N⁵⁷⁸); 657位(T⁶⁵⁷)~658位(G⁶⁵⁸); 691位(Q⁶⁹¹)~692位(V⁶⁹²); 710位(N⁷¹⁰)~711位(V⁷¹¹); 及び725位(F⁷²⁵)~726位(C⁷²⁶)からなる群から選択される少なくとも1つの切断部位又はそれらの任意の組み合わせで前記哺乳動物COMPを切断することによって形成されるステップと、

b) a)において前記サンプル中で前記少なくとも1種のネオエピトープが検出される場合、病的な軟骨代謝回転の存在を決定するステップとを含む上記方法。

【請求項 2】

a)において前記サンプル中で検出された前記少なくとも1種のネオエピトープに基づいて、病的な軟骨代謝回転と良性の軟骨代謝回転とを区別するステップをさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記病的な軟骨代謝回転が、変形性関節症、関節リウマチ、反応性関節炎、乾癬性関節炎、若年性慢性関節炎、心臓血管疾患、腱の疾患、骨粗鬆症、骨軟化症、骨折修復、動脈硬化症、強皮症、線維症の皮膚、及び関節の外傷のような外傷からなる群から選択される疾患によって引き起こされる、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項 4】

前記サンプルが、軟骨サンプル、並びに滑液サンプル、血清サンプル、血漿サンプル、及び尿サンプルのような体液サンプルからなる群から選択される、請求項1から3までのいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記少なくとも1種のネオエピトープを検出するステップが、多重反応モニタリング、MRMによって、前記サンプル中で前記少なくとも1種のネオエピトープを検出するステップを含む、請求項1から4までのいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記少なくとも1種のネオエピトープを検出するステップが、請求項16に記載の単離された抗体を使用して、酵素結合免疫吸着検査法、ELISAによって、前記サンプル中で前記少なくとも1種のネオエピトープを検出するステップを含む、請求項1から4までのいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記少なくとも1種のネオエピトープの存在を検出するステップが、前記サンプルと請求項16に記載の単離された抗体とを接触させるステップと、前記単離された抗体に基づいて、前記サンプル中で、前記少なくとも1種のネオエピトープの存在を検出するステップとを含む、

前記病的な軟骨代謝回転の存在を決定するステップが、前記サンプル中で前記検出された前記少なくとも1種のネオエピトープの存在に基づいて、前記病的な軟骨代謝回転の存在を決定するステップを含む、請求項1から6までのいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

哺乳動物軟骨オリゴマーマトリックスタンパク質COMPの単離されたC末端短縮フラ

10

20

30

40

50

グメントであって、

前記フラグメントの C 末端が、配列番号 1 のアミノ酸 77 であり、前記フラグメントが、配列番号 18 の C 末端から始まり配列番号 18 の N 末端に向かって伸長する配列番号 18 の少なくとも 3 個の連続したアミノ酸を含み、

前記フラグメントの C 末端が、配列番号 1 のアミノ酸 88 であり、前記フラグメントが、配列番号 19 の C 末端から始まり配列番号 19 の N 末端に向かって伸長する配列番号 19 の少なくとも 3 個の連続したアミノ酸を含み、

前記フラグメントの C 末端が、配列番号 1 のアミノ酸 90 であり、前記フラグメントが、配列番号 20 の C 末端から始まり配列番号 20 の N 末端に向かって伸長する配列番号 20 の少なくとも 3 個の連続したアミノ酸を含み、

10

前記フラグメントの C 末端が、配列番号 1 のアミノ酸 104 であり、前記フラグメントが、配列番号 21 の C 末端から始まり配列番号 21 の N 末端に向かって伸長する配列番号 21 の少なくとも 3 個の連続したアミノ酸を含み、

前記フラグメントの C 末端が、配列番号 1 のアミノ酸 190 であり、前記フラグメントが、配列番号 22 の C 末端から始まり配列番号 22 の N 末端に向かって伸長する配列番号 22 の少なくとも 3 個の連続したアミノ酸を含み、

前記フラグメントの C 末端が、配列番号 1 のアミノ酸 194 であり、前記フラグメントが、配列番号 23 の C 末端から始まり配列番号 23 の N 末端に向かって伸長する配列番号 23 の少なくとも 3 個の連続したアミノ酸を含み、

前記フラグメントの C 末端が、配列番号 1 のアミノ酸 226 であり、前記フラグメントが、配列番号 24 の C 末端から始まり配列番号 24 の N 末端に向かって伸長する配列番号 24 の少なくとも 3 個の連続したアミノ酸を含み、

20

前記フラグメントの C 末端が、配列番号 1 のアミノ酸 531 であり、前記フラグメントが、配列番号 25 の C 末端から始まり配列番号 25 の N 末端に向かって伸長する配列番号 25 の少なくとも 3 個の連続したアミノ酸を含み、

前記フラグメントの C 末端が、配列番号 1 のアミノ酸 554 であり、前記フラグメントが、配列番号 26 の C 末端から始まり配列番号 26 の N 末端に向かって伸長する配列番号 26 の少なくとも 3 個の連続したアミノ酸を含み、

前記フラグメントの C 末端が、配列番号 1 のアミノ酸 574 であり、前記フラグメントが、配列番号 27 の C 末端から始まり配列番号 27 の N 末端に向かって伸長する配列番号 27 の少なくとも 3 個の連続したアミノ酸を含み、

30

前記フラグメントの C 末端が、配列番号 1 のアミノ酸 577 であり、前記フラグメントが、配列番号 28 の C 末端から始まり配列番号 28 の N 末端に向かって伸長する配列番号 28 の少なくとも 3 個の連続したアミノ酸を含み、

前記フラグメントの C 末端が、配列番号 1 のアミノ酸 657 であり、前記フラグメントが、配列番号 29 の C 末端から始まり配列番号 29 の N 末端に向かって伸長する配列番号 29 の少なくとも 3 個の連続したアミノ酸を含み、

前記フラグメントの C 末端が、配列番号 1 のアミノ酸 691 であり、前記フラグメントが、配列番号 30 の C 末端から始まり配列番号 30 の N 末端に向かって伸長する配列番号 30 の少なくとも 3 個の連続したアミノ酸を含み、

40

前記フラグメントの C 末端が、配列番号 1 のアミノ酸 710 であり、前記フラグメントが、配列番号 31 の C 末端から始まり配列番号 31 の N 末端に向かって伸長する配列番号 31 の少なくとも 3 個の連続したアミノ酸を含み、又は

前記フラグメントの C 末端が、配列番号 1 のアミノ酸 725 であり、前記フラグメントが、配列番号 32 の C 末端から始まり配列番号 32 の N 末端に向かって伸長する配列番号 32 の少なくとも 3 個の連続したアミノ酸を含む上記単離された C 末端短縮フラグメント

【請求項 9】

配列番号 18 ~ 32 のいずれかで定義されたアミノ配列を有する、請求項 8 に記載の単離された C 末端短縮フラグメント。

50

【請求項 10】

哺乳動物軟骨オリゴマーマトリックスタンパク質COMPの単離されたN末端短縮フラグメントであって、

前記フラグメントのN末端が、配列番号1のアミノ酸78であり、前記フラグメントが、配列番号33のN末端から始まり配列番号33のC末端に向かって伸長する配列番号33の少なくとも3個の連続したアミノ酸を含み、

前記フラグメントのN末端が、配列番号1のアミノ酸89であり、前記フラグメントが、配列番号34のN末端から始まり配列番号34のC末端に向かって伸長する配列番号34の少なくとも3個の連続したアミノ酸を含み、

前記フラグメントのN末端が、配列番号1のアミノ酸91であり、前記フラグメントが、配列番号35のN末端から始まり配列番号35のC末端に向かって伸長する配列番号35の少なくとも3個の連続したアミノ酸を含み、

前記フラグメントのN末端が、配列番号1のアミノ酸105であり、前記フラグメントが、配列番号36のN末端から始まり配列番号36のC末端に向かって伸長する配列番号36の少なくとも3個の連続したアミノ酸を含み、

前記フラグメントのN末端が、配列番号1のアミノ酸191であり、前記フラグメントが、配列番号37のN末端から始まり配列番号37のC末端に向かって伸長する配列番号37の少なくとも3個の連続したアミノ酸を含み、

前記フラグメントのN末端が、配列番号1のアミノ酸195であり、前記フラグメントが、配列番号38のN末端から始まり配列番号38のC末端に向かって伸長する配列番号38の少なくとも3個の連続したアミノ酸を含み、

前記フラグメントのN末端が、配列番号1のアミノ酸227であり、前記フラグメントが、配列番号39のN末端から始まり配列番号39のC末端に向かって伸長する配列番号39の少なくとも3個の連続したアミノ酸を含み、

前記フラグメントのN末端が、配列番号1のアミノ酸532であり、前記フラグメントが、配列番号40のN末端から始まり配列番号40のC末端に向かって伸長する配列番号40の少なくとも3個の連続したアミノ酸を含み、

前記フラグメントのN末端が、配列番号1のアミノ酸555であり、前記フラグメントが、配列番号41のN末端から始まり配列番号41のC末端に向かって伸長する配列番号41の少なくとも3個の連続したアミノ酸を含み、

前記フラグメントのN末端が、配列番号1のアミノ酸575であり、前記フラグメントが、配列番号42のN末端から始まり配列番号42のC末端に向かって伸長する配列番号42の少なくとも3個の連続したアミノ酸を含み、

前記フラグメントのN末端が、配列番号1のアミノ酸578であり、前記フラグメントが、配列番号43のN末端から始まり配列番号43のC末端に向かって伸長する配列番号43の少なくとも3個の連続したアミノ酸を含み、

前記フラグメントのN末端が、配列番号1のアミノ酸658であり、前記フラグメントが、配列番号44のN末端から始まり配列番号44のC末端に向かって伸長する配列番号44の少なくとも3個の連続したアミノ酸を含み、

前記フラグメントのN末端が、配列番号1のアミノ酸692であり、前記フラグメントが、配列番号45のN末端から始まり配列番号45のC末端に向かって伸長する配列番号45の少なくとも3個の連続したアミノ酸を含み、

前記フラグメントのN末端が、配列番号1のアミノ酸711であり、前記フラグメントが、配列番号46のN末端から始まり配列番号46のC末端に向かって伸長する配列番号46の少なくとも3個の連続したアミノ酸を含み、又は

前記フラグメントのN末端が、配列番号1のアミノ酸726であり、前記フラグメントが、配列番号47のN末端から始まり配列番号47のC末端に向かって伸長する配列番号47の少なくとも3個の連続したアミノ酸を含む上記単離されたN末端短縮フラグメント

【請求項 11】

10

20

30

40

50

配列番号 33 ~ 47 のいずれかで定義されたアミノ配列を有する、請求項 10 に記載の単離された N 末端短縮フラグメント。

【請求項 12】

哺乳動物軟骨オリゴマーマトリックスタンパク質COMPの少なくとも1種のネオエピトープに対する抗体の産生に使用されるように構成されたコンジュゲートであって、前記少なくとも1種のネオエピトープが、配列番号1で定義された前記哺乳動物COMPのアミノ酸配列の77位(S⁷⁷)~78位(V⁷⁸);88位(L⁸⁸)~89位(L⁸⁹);90位(H⁹⁰)~91位(C⁹¹);104位(Q¹⁰⁴)~105位(T¹⁰⁵);190位(N¹⁹⁰)~191位(C¹⁹¹);194位(N¹⁹⁴)~195位(S¹⁹⁵);226位(Q²²⁶)~227位(R²²⁷);531位(F⁵³¹)~532位(R⁵³²);554位(L⁵⁵⁴)~555位(N⁵⁵⁵);574位(Y⁵⁷⁴)~575位(T⁵⁷⁵);577位(F⁵⁷⁷)~578位(N⁵⁷⁸);657位(T⁶⁵⁷)~658位(G⁶⁵⁸);691位(Q⁶⁹¹)~692位(V⁶⁹²);710位(N⁷¹⁰)~711位(V⁷¹¹);及び725位(F⁷²⁵)~726位(C⁷²⁶)からなる群から選択される少なくとも1つの切断部位又はそれらの組み合わせで前記哺乳動物COMPを切断することによって形成され、前記コンジュゲートが、請求項8若しくは9に記載の少なくとも1つの単離されたC末端短縮フラグメント、及び/又はペプチド担体にカップリングした、若しくはペプチド担体と混合した請求項10若しくは11に記載の少なくとも1つの単離されたN末端短縮フラグメントを含む上記コンジュゲート。

【請求項 13】

前記少なくとも1つの単離されたC末端短縮フラグメントが、そのN末端を介して前記ペプチド担体にカップリングし、前記少なくとも1つの単離されたN末端短縮フラグメントが、そのC末端を介して前記ペプチド担体にカップリングしている、請求項12に記載のコンジュゲート。

【請求項 14】

配列番号1で定義された前記哺乳動物COMPのアミノ酸配列の77位(S⁷⁷)~78位(V⁷⁸);88位(L⁸⁸)~89位(L⁸⁹);90位(H⁹⁰)~91位(C⁹¹);104位(Q¹⁰⁴)~105位(T¹⁰⁵);190位(N¹⁹⁰)~191位(C¹⁹¹);194位(N¹⁹⁴)~195位(S¹⁹⁵);226位(Q²²⁶)~227位(R²²⁷);531位(F⁵³¹)~532位(R⁵³²);554位(L⁵⁵⁴)~555位(N⁵⁵⁵);574位(Y⁵⁷⁴)~575位(T⁵⁷⁵);577位(F⁵⁷⁷)~578位(N⁵⁷⁸);657位(T⁶⁵⁷)~658位(G⁶⁵⁸);691位(Q⁶⁹¹)~692位(V⁶⁹²);710位(N⁷¹⁰)~711位(V⁷¹¹);及び725位(F⁷²⁵)~726位(C⁷²⁶)からなる群から選択される少なくとも1つの切断部位又はそれらの組み合わせで哺乳動物軟骨オリゴマーマトリックスタンパク質COMPを切断することによって形成された少なくとも1種のネオエピトープに特異的に結合する抗体を産生するための、請求項8若しくは9に記載の単離されたC末端短縮フラグメント、請求項10若しくは11に記載の単離されたN末端短縮フラグメント、及び/又は請求項12若しくは13に記載のコンジュゲートの使用。

【請求項 15】

配列番号1で定義された前記哺乳動物COMPのアミノ酸配列の77位(S⁷⁷)~78位(V⁷⁸);88位(L⁸⁸)~89位(L⁸⁹);90位(H⁹⁰)~91位(C⁹¹);104位(Q¹⁰⁴)~105位(T¹⁰⁵);190位(N¹⁹⁰)~191位(C¹⁹¹);194位(N¹⁹⁴)~195位(S¹⁹⁵);226位(Q²²⁶)~227位(R²²⁷);531位(F⁵³¹)~532位(R⁵³²);554位(L⁵⁵⁴)~555位(N⁵⁵⁵);574位(Y⁵⁷⁴)~575位(T⁵⁷⁵);577位(F⁵⁷⁷)~578位(N⁵⁷⁸);657位(T⁶⁵⁷)~658位(G⁶⁵⁸);691位(Q⁶⁹¹)~692位(V⁶⁹²);710位(N⁷¹⁰)~711位(V⁷¹¹);及び725位(F⁷²⁵)~726位(C⁷²⁶)からなる群から選択される少なくとも1つの切断部位又はそれらの組み合わせで哺乳動物軟骨オリゴマーマトリックスタンパク質COMPを切断することにより形成された少なくとも1種のネオエピトープに特異的に結合する抗体の産生方法であって、

請求項8若しくは9に記載の単離されたC末端短縮フラグメント、請求項10若しくは11に記載の単離されたN末端短縮フラグメント、及び/又は請求項12若しくは13に記載のコンジュゲートに対する抗体を発生させるステップと、

前記抗体を単離するステップと

10

20

30

40

50

を含む上記方法。

【請求項 16】

請求項 8 若しくは 9 に記載の単離された C 末端短縮フラグメント、請求項 10 若しくは 11 に記載の単離された N 末端短縮フラグメント、及び / 又は請求項 12 若しくは 13 に記載のコンジュゲートに対する単離された抗体であって、配列番号 1 で定義された前記哺乳動物 COMP のアミノ酸配列の 77 位 (S⁷⁷) ~ 78 位 (V⁷⁸) ; 88 位 (L⁸⁸) ~ 89 位 (L⁸⁹) ; 90 位 (H⁹⁰) ~ 91 位 (C⁹¹) ; 104 位 (Q¹⁰⁴) ~ 105 位 (T¹⁰⁵) ; 190 位 (N¹⁹⁰) ~ 191 位 (C¹⁹¹) ; 194 位 (N¹⁹⁴) ~ 195 位 (S¹⁹⁵) ; 226 位 (Q²²⁶) ~ 227 位 (R²²⁷) ; 531 位 (F⁵³¹) ~ 532 位 (R⁵³²) ; 554 位 (L⁵⁵⁴) ~ 555 位 (N⁵⁵⁵) ; 574 位 (Y⁵⁷⁴) ~ 575 位 (T⁵⁷⁵) ; 577 位 (F⁵⁷⁷) ~ 578 位 (N⁵⁷⁸) ; 657 位 (T⁶⁵⁷) ~ 658 位 (G⁶⁵⁸) ; 691 位 (Q⁶⁹¹) ~ 692 位 (V⁶⁹²)、710 位 (N⁷¹⁰) ~ 711 位 (V⁷¹¹) ; 及び 725 位 (F⁷²⁵) ~ 726 位 (C⁷²⁶) からなる群から選択される少なくとも 1 つの切断部位又はそれらの組み合わせで哺乳動物軟骨オリゴマーマトリックスタンパク質 COMP を切断することにより形成された少なくとも 1 種のネオエピトープに特異的に結合する上記単離された抗体。

10

【請求項 17】

病的な軟骨代謝回転の決定で使用するための、請求項 16 に記載の単離された抗体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本実施形態は、一般的に、病的な軟骨代謝回転を決定、検出又はモニターすることに関し、特に、病的な軟骨代謝回転と良性の又は正常な軟骨代謝回転とを区別できる選択された軟骨オリゴマーマトリックスタンパク質 (COMP) の断片化ネオエピトープの使用に関する。

20

【背景技術】

【0002】

例えば軟骨分解などの組織分解を引き起こす病的状態が、主な医学的、社会的、及び経済的な問題となっている。65歳を超える高齢者のうち、西欧諸国ではその人口の約50%が関節炎を有する。組織分解過程は、その構成成分の破壊による組織の破壊を特徴とする。組織の構成成分は、ほとんどの場合はプロテアーゼなどの酵素により分解されるか、又は毒性化合物によって分解される。この理由のために、診断、疾患のモニター、処置などの目的での組織分解過程の決定は、多数の方法によって行うことができる。例えば関節炎の状態、動脈硬化症、変性性の関節の状態などの結合組織疾患における分解過程を決定する1つの方法は、結合組織成分の分解産物の形成及び存在の検出である。これは、例えば関節炎の状態などの関節病の診断で広く採用されている例えば組織の損失、炎症、自己免疫性の自己抗体の増加及び存在などの間接的な方法と比較して、分解過程の直接的な検出を可能にする。

30

【0003】

従来、関節炎の臨床診断は、患者の病歴、身体検査、放射線写真、及び自己抗体を誘発する炎症の測定に基づいている。関節炎を有する患者の予後、処置、及び臨床転帰は、連続的な判断により査定される。しかしながら、軟骨変性を含む病的状態によって引き起こされる永続的な組織の損傷を最小化するためには、このような状態を初期段階で診断できるようにすることが重要である。したがって、この10年間、病的な軟骨変性の早期発見を可能にする好適な生物学的なマーカーを発見しようとする努力がなされてきた。

40

【0004】

これまでに、COMPの高い血清レベルが、関節リウマチにおける進行中の関節破壊と関連付けられている (Manssonら、J. Clin. Invest (1995)、95巻、1077~1077頁; Wollheimら、British Journal of Rheumatology (1997)、36巻、847~849頁; Peterssonら、British Journal of Rheumatology (1998)、37巻、46~50頁)。関節リウマチ及び他の形態の炎症性関節炎を有する患

50

者からの滑液において、有意な量のCOMPのフラグメントが見出されている (Neidhardtら、British Journal of Rheumatology (1997)、36巻、1151~1160頁)。

【0005】

また、哺乳動物において関節炎の状態を予防及び/又は処置する医薬組成物を調製するためのCOMP若しくはCOMPをコードする核酸配列を使用することも示唆されている (WO98/46253)。したがって、COMPは、様々な形態の関節炎を診断及び/又は処置する際の主要な化合物とみなすことができる。

【0006】

COMPは、これまで軟骨代謝回転のマーカーとしてとして使用されてきた (Saxneら、British Journal of Rheumatology (1992)、31巻、583~591頁)。Laiら (Osteoarthritis Cartilage (2012)、20巻、854~862頁) は、関節炎の進行をモニターするために血清COMPフラグメントを使用したサンドイッチELISAを開発した。彼らは、関節炎患者と関節炎ではない対照の対象との間に血清COMPレベルの差があることを示している。

10

【0007】

ネオエピトープの検出により組織分解過程を決定する方法は、WO2005/116658に開示されており、それによれば、COMPのアミノ酸配列の625~626のCOMPの切断後に出現するネオエピトープを使用している。

20

【0008】

Soderlin M. (2003)の博士論文「スウェーデン南部における初期関節炎の集団ベースの研究。発生率、先に起こる感染、診断マーカー、及び経済的負担。(A population-based study on early arthritis in southern Sweden. Incidence, preceding infections, diagnostic markers and economic burden.)」、リンシェーピング大学分子臨床医学部 (Linköping University, Department of Molecular and Clinical Medicine) において、COMPはマーカーとして使用されているが、異なる診断グループ間の統計学的差異をまったく示すことができず、患者の対照グループにおいてさえも18%が高いCOMPレベルを有していた。

30

【0009】

例えば関節炎などの疾患を診断及びモニターするために今日使用されている方法の結果は、正常な組織代謝回転に起因する高いバックグラウンドの結果として、疾患を有する患者と疾患ではない患者との間にかなりのオーバーラップを示す。

【0010】

先行の方法及び技術に関する主な欠点は、これらは、正常な軟骨代謝回転に起因するバックグラウンドレベルが高いために、病的な軟骨代謝回転と正常な代謝回転とを区別できないことである。したがって、当技術分野においてなお向上の余地がある。

【発明の概要】

40

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

全般的な目的は、サンプル中の病的な軟骨代謝回転を決定することである。

【0012】

特定の目的は、病的な軟骨代謝回転と正常な又は良性の軟骨代謝回転との区別を可能にする方法及びツールを提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0013】

これら及び他の目的は、本明細書において定義される実施形態によって満たされる。

【0014】

50

本実施形態の態様は、病的な軟骨代謝回転を決定する方法に関する。本方法は、サンプル中で、哺乳動物軟骨オリゴマートリックスタンパク質（COMP）の少なくとも1種のネオエピトープの存在を検出するステップを含む。少なくとも1種のネオエピトープは、配列番号1で定義された前記哺乳動物COMPのアミノ酸配列の77位（S⁷⁷）～78位（V⁷⁸）；88位（L⁸⁸）～89位（L⁸⁹）；90位（H⁹⁰）～91位（C⁹¹）；104位（Q¹⁰⁴）～105位（T¹⁰⁵）；190位（N¹⁹⁰）～191位（C¹⁹¹）；194位（N¹⁹⁴）～195位（S¹⁹⁵）；226位（Q²²⁶）～227位（R²²⁷）；531位（F⁵³¹）～532位（R⁵³²）；554位（L⁵⁵⁴）～555位（N⁵⁵⁵）；574位（Y⁵⁷⁴）～575位（T⁵⁷⁵）；577位（F⁵⁷⁷）～578位（N⁵⁷⁸）；657位（T⁶⁵⁷）～658位（G⁶⁵⁸）；691位（Q⁶⁹¹）～692位（V⁶⁹²）、710位（N⁷¹⁰）～711位（V⁷¹¹）；及び725位（F⁷²⁵）～726位（C⁷²⁶）からなる群から選択される少なくとも1つの切断部位又はそれらの任意の組み合わせで哺乳動物COMPを切断することによって形成される。本方法はまた、サンプル中で少なくとも1種のネオエピトープが検出される場合、病的な軟骨代謝回転の存在を決定するステップも含む。

10

【0015】

本実施形態の他の態様は、哺乳動物COMPの単離されたC末端短縮フラグメントに関する。この態様において、

フラグメントのC末端は、配列番号1のアミノ酸77であり、フラグメントは、配列番号18のC末端から始まり配列番号18のN末端に向かって伸長する配列番号18の少なくとも3個の連続したアミノ酸を含み、

フラグメントのC末端は、配列番号1のアミノ酸88であり、フラグメントは、配列番号19のC末端から始まり配列番号19のN末端に向かって伸長する配列番号19の少なくとも3個の連続したアミノ酸を含み、

20

フラグメントのC末端は、配列番号1のアミノ酸90であり、フラグメントは、配列番号20のC末端から始まり配列番号20のN末端に向かって伸長する配列番号20の少なくとも3個の連続したアミノ酸を含み、

フラグメントのC末端は、配列番号1のアミノ酸104であり、フラグメントは、配列番号21のC末端から始まり配列番号21のN末端に向かって伸長する配列番号21の少なくとも3個の連続したアミノ酸を含み、

フラグメントのC末端は、配列番号1のアミノ酸190であり、フラグメントは、配列番号22のC末端から始まり配列番号22のN末端に向かって伸長する配列番号22の少なくとも3個の連続したアミノ酸を含み、

30

フラグメントのC末端は、配列番号1のアミノ酸194であり、フラグメントは、配列番号23のC末端から始まり配列番号23のN末端に向かって伸長する配列番号23の少なくとも3個の連続したアミノ酸を含み、

フラグメントのC末端は、配列番号1のアミノ酸226であり、フラグメントは、配列番号24のC末端から始まり配列番号24のN末端に向かって伸長する配列番号24の少なくとも3個の連続したアミノ酸を含み、

フラグメントのC末端は、配列番号1のアミノ酸531であり、フラグメントは、配列番号25のC末端から始まり配列番号25のN末端に向かって伸長する配列番号25の少なくとも3個の連続したアミノ酸を含み、

40

フラグメントのC末端は、配列番号1のアミノ酸554であり、フラグメントは、配列番号26のC末端から始まり配列番号26のN末端に向かって伸長する配列番号26の少なくとも3個の連続したアミノ酸を含み、

フラグメントのC末端は、配列番号1のアミノ酸574であり、フラグメントは、配列番号27のC末端から始まり配列番号27のN末端に向かって伸長する配列番号27の少なくとも3個の連続したアミノ酸を含み、

フラグメントのC末端は、配列番号1のアミノ酸577であり、フラグメントは、配列番号28のC末端から始まり配列番号28のN末端に向かって伸長する配列番号28の少なくとも3個の連続したアミノ酸を含み、

フラグメントのC末端は、配列番号1のアミノ酸657であり、フラグメントは、配列

50

番号 29 の C 末端から始まり配列番号 29 の N 末端に向かって伸長する配列番号 29 の少なくとも 3 個の連続したアミノ酸を含み、

フラグメントの C 末端は、配列番号 1 のアミノ酸 691 であり、フラグメントは、配列番号 30 の C 末端から始まり配列番号 30 の N 末端に向かって伸長する配列番号 30 の少なくとも 3 個の連続したアミノ酸を含み、

フラグメントの C 末端は、配列番号 1 のアミノ酸 710 であり、フラグメントは、配列番号 31 の C 末端から始まり配列番号 31 の N 末端に向かって伸長する配列番号 31 の少なくとも 3 個の連続したアミノ酸を含み、又は

フラグメントの C 末端は、配列番号 1 のアミノ酸 725 であり、フラグメントは、配列番号 32 の C 末端から始まり配列番号 32 の N 末端に向かって伸長する配列番号 32 の少なくとも 3 個の連続したアミノ酸を含む。

【 0 0 1 6 】

本実施形態のさらなる態様は、哺乳動物 COMP の単離された N 末端短縮フラグメントに関する。この態様において、

フラグメントの N 末端は、配列番号 1 のアミノ酸 78 であり、フラグメントは、配列番号 33 の N 末端から始まり配列番号 33 の C 末端に向かって伸長する配列番号 33 の少なくとも 3 個の連続したアミノ酸を含み、

フラグメントの N 末端は、配列番号 1 のアミノ酸 89 であり、フラグメントは、配列番号 34 の N 末端から始まり配列番号 34 の C 末端に向かって伸長する配列番号 34 の少なくとも 3 個の連続したアミノ酸を含み、

フラグメントの N 末端は、配列番号 1 のアミノ酸 91 であり、フラグメントは、配列番号 35 の N 末端から始まり配列番号 35 の C 末端に向かって伸長する配列番号 35 の少なくとも 3 個の連続したアミノ酸を含み、

フラグメントの N 末端は、配列番号 1 のアミノ酸 105 であり、フラグメントは、配列番号 36 の N 末端から始まり配列番号 36 の C 末端に向かって伸長する配列番号 36 の少なくとも 3 個の連続したアミノ酸を含み、

フラグメントの N 末端は、配列番号 1 のアミノ酸 191 であり、フラグメントは、配列番号 37 の N 末端から始まり配列番号 37 の C 末端に向かって伸長する配列番号 37 の少なくとも 3 個の連続したアミノ酸を含み、

フラグメントの N 末端は、配列番号 1 のアミノ酸 195 であり、フラグメントは、配列番号 38 の N 末端から始まり配列番号 38 の C 末端に向かって伸長する配列番号 38 の少なくとも 3 個の連続したアミノ酸を含み、

フラグメントの N 末端は、配列番号 1 のアミノ酸 227 であり、フラグメントは、配列番号 39 の N 末端から始まり配列番号 39 の C 末端に向かって伸長する配列番号 39 の少なくとも 3 個の連続したアミノ酸を含み、

フラグメントの N 末端は、配列番号 1 のアミノ酸 532 であり、フラグメントは、配列番号 40 の N 末端から始まり配列番号 40 の C 末端に向かって伸長する配列番号 40 の少なくとも 3 個の連続したアミノ酸を含み、

フラグメントの N 末端は、配列番号 1 のアミノ酸 555 であり、フラグメントは、配列番号 41 の N 末端から始まり配列番号 41 の C 末端に向かって伸長する配列番号 41 の少なくとも 3 個の連続したアミノ酸を含み、

フラグメントの N 末端は、配列番号 1 のアミノ酸 575 であり、フラグメントは、配列番号 42 の N 末端から始まり配列番号 42 の C 末端に向かって伸長する配列番号 42 の少なくとも 3 個の連続したアミノ酸を含み、

フラグメントの N 末端は、配列番号 1 のアミノ酸 578 であり、フラグメントは、配列番号 43 の N 末端から始まり配列番号 43 の C 末端に向かって伸長する配列番号 43 の少なくとも 3 個の連続したアミノ酸を含み、

フラグメントの N 末端は、配列番号 1 のアミノ酸 658 であり、フラグメントは、配列番号 44 の N 末端から始まり配列番号 44 の C 末端に向かって伸長する配列番号 44 の少なくとも 3 個の連続したアミノ酸を含み、

10

20

30

40

50

フラグメントのN末端は、配列番号1のアミノ酸692であり、フラグメントは、配列番号45のN末端から始まり配列番号45のC末端に向かって伸長する配列番号45の少なくとも3個の連続したアミノ酸を含み、

フラグメントのN末端は、配列番号1のアミノ酸711であり、フラグメントは、配列番号46のN末端から始まり配列番号46のC末端に向かって伸長する配列番号46の少なくとも3個の連続したアミノ酸を含み、又は

フラグメントのN末端は、配列番号1のアミノ酸726であり、フラグメントは、配列番号47のN末端から始まり配列番号47のC末端に向かって伸長する配列番号47の少なくとも3個の連続したアミノ酸を含む。

【0017】

本実施形態のさらなる他の態様は、少なくとも1種の哺乳動物COMPのネオエピトープに対する抗体の産生に使用されるように構成されたコンジュゲートに関する。少なくとも1種のネオエピトープは、配列番号1で定義された哺乳動物COMPのアミノ酸配列の77位(S⁷⁷)~78位(V⁷⁸)；88位(L⁸⁸)~89位(L⁸⁹)；90位(H⁹⁰)~91位(C⁹¹)；104位(Q¹⁰⁴)~105位(T¹⁰⁵)；190位(N¹⁹⁰)~191位(C¹⁹¹)；194位(N¹⁹⁴)~195位(S¹⁹⁵)；226位(Q²²⁶)~227位(R²²⁷)；531位(F⁵³¹)~532位(R⁵³²)；554位(L⁵⁵⁴)~555位(N⁵⁵⁵)；574位(Y⁵⁷⁴)~575位(T⁵⁷⁵)；577位(F⁵⁷⁷)~578位(N⁵⁷⁸)；657位(T⁶⁵⁷)~658位(G⁶⁵⁸)；691位(Q⁶⁹¹)~692位(V⁶⁹²)、710位(N⁷¹⁰)~711位(V⁷¹¹)；及び725位(F⁷²⁵)~726位(C⁷²⁶)からなる群から選択される少なくとも1つの切断部位又はそれらの組み合わせで哺乳動物COMPを切断することによって形成される。本コンジュゲートは、ペプチド担体にカップリングした、又はペプチド担体と混合した、上記に係る少なくとも1つの単離されたC末端短縮フラグメント、及び/又は上記に係る少なくとも1つの単離されたN末端短縮フラグメントを含む。

【0018】

本実施形態のさらなる態様は、配列番号1で定義された哺乳動物COMPのアミノ酸配列の77位(S⁷⁷)~78位(V⁷⁸)；88位(L⁸⁸)~89位(L⁸⁹)；90位(H⁹⁰)~91位(C⁹¹)；104位(Q¹⁰⁴)~105位(T¹⁰⁵)；190位(N¹⁹⁰)~191位(C¹⁹¹)；194位(N¹⁹⁴)~195位(S¹⁹⁵)；226位(Q²²⁶)~227位(R²²⁷)；531位(F⁵³¹)~532位(R⁵³²)；554位(L⁵⁵⁴)~555位(N⁵⁵⁵)；574位(Y⁵⁷⁴)~575位(T⁵⁷⁵)；577位(F⁵⁷⁷)~578位(N⁵⁷⁸)；657位(T⁶⁵⁷)~658位(G⁶⁵⁸)；691位(Q⁶⁹¹)~692位(V⁶⁹²)、710位(N⁷¹⁰)~711位(V⁷¹¹)；及び725位(F⁷²⁵)~726位(C⁷²⁶)からなる群から選択される少なくとも1つの切断部位又はそれらの組み合わせで哺乳動物COMPを切断することにより形成された少なくとも1種のネオエピトープに特異的に結合する抗体を産生するための、上記に係る単離されたC末端短縮フラグメント、上記に係る単離されたN末端短縮フラグメント、及び/又は上記に係るコンジュゲートの使用に関する。

【0019】

本実施形態のさらにその他の態様は、配列番号1で定義された哺乳動物COMPのアミノ酸配列の77位(S⁷⁷)~78位(V⁷⁸)；88位(L⁸⁸)~89位(L⁸⁹)；90位(H⁹⁰)~91位(C⁹¹)；104位(Q¹⁰⁴)~105位(T¹⁰⁵)；190位(N¹⁹⁰)~191位(C¹⁹¹)；194位(N¹⁹⁴)~195位(S¹⁹⁵)；226位(Q²²⁶)~227位(R²²⁷)；531位(F⁵³¹)~532位(R⁵³²)；554位(L⁵⁵⁴)~555位(N⁵⁵⁵)；574位(Y⁵⁷⁴)~575位(T⁵⁷⁵)；577位(F⁵⁷⁷)~578位(N⁵⁷⁸)；657位(T⁶⁵⁷)~658位(G⁶⁵⁸)；691位(Q⁶⁹¹)~692位(V⁶⁹²)、710位(N⁷¹⁰)~711位(V⁷¹¹)；及び725位(F⁷²⁵)~726位(C⁷²⁶)からなる群から選択される少なくとも1つの切断部位又はそれらの組み合わせで哺乳動物COMPを切断することにより形成された少なくとも1種のネオエピトープに特異的に結合する抗体の産生方法に関する。本方法は、上記に係る単離されたC末端短縮フラグメント、上記に係る単離されたN末端短縮フラグメント、及び/又は上記に係るコンジュゲートに対する抗体を発生させるステップと、抗体を単離するステップとを含む。

【0020】

本実施形態のさらなる態様は、上記に係る単離されたC末端短縮フラグメント、上記に

10

20

30

40

50

係る単離されたN末端短縮フラグメント、及び/又は上記に係るコンジュゲートに対する単離された抗体に関する。単離された抗体は、配列番号1で定義された哺乳動物COMPのアミノ酸配列の77位(S⁷⁷)~78位(V⁷⁸)；88位(L⁸⁸)~89位(L⁸⁹)；90位(H⁹⁰)~91位(C⁹¹)；104位(Q¹⁰⁴)~105位(T¹⁰⁵)；190位(N¹⁹⁰)~191位(C¹⁹¹)；194位(N¹⁹⁴)~195位(S¹⁹⁵)；226位(Q²²⁶)~227位(R²²⁷)；531位(F⁵³¹)~532位(R⁵³²)；554位(L⁵⁵⁴)~555位(N⁵⁵⁵)；574位(Y⁵⁷⁴)~575位(T⁵⁷⁵)；577位(F⁵⁷⁷)~578位(N⁵⁷⁸)；657位(T⁶⁵⁷)~658位(G⁶⁵⁸)；691位(Q⁶⁹¹)~692位(V⁶⁹²)、710位(N⁷¹⁰)~711位(V⁷¹¹)；及び725位(F⁷²⁵)~726位(C⁷²⁶)からなる群から選択される少なくとも1つの切断部位又はそれらの組み合わせで哺乳動物COMPを切断することにより形成された少なくとも1種のネオエピトープに特異的に結合する。

10

【0021】

本実施形態の関連する態様は、病的な軟骨代謝回転の決定で使用するための上記に係る単離された抗体を定義する。

【0022】

本実施形態は、哺乳動物対象、好ましくはヒト対象からのサンプル中の病的な軟骨代謝回転の存在を決定したり、又は検出したりすることができる。より詳細には、本実施形態は、正常で健康な個体と、病的な軟骨を有する個体からの正常な軟骨代謝回転及び疾患によって引き起こされるCOMP代謝回転とを区別するのに使用できる。

【0023】

本実施形態は、添付の図面と一緒に以下の説明を参照することにより、それらのさらなる目的及び利点と共に最もよく理解することが可能である。

20

【図面の簡単な説明】

【0024】

【図1】COMPの切断抗体の力価を示す図である。

【図2】切断ネオエピトープを含有する滑液に放出されたCOMPフラグメントのアクセシビリティの結果を示す図である。

【図3】検出のためにネオエピトープ抗体を使用した、PEG6000で沈殿した滑液サンプルのウェスタンブロットによる分析を示す図である。

【図4】PEG6000で沈殿した滑液のMRM分析を使用したネオエピトープの検出を示す図である。

30

【発明を実施するための形態】

【0025】

本実施形態は、一般的に、病的な軟骨代謝回転を決定、検出又はモニターすることに関する。本実施形態は、特に、病的な軟骨又は病原性の軟骨代謝回転に特異的な哺乳動物軟骨オリゴマーマトリックスタンパク質(COMP)の特殊なネオエピトープの使用に関する。

【0026】

したがって、本実施形態のネオエピトープは、病的な軟骨代謝回転を引き起こす疾患に罹患した対象、好ましくは哺乳動物対象、より好ましくはヒト対象と、正常な軟骨代謝回転を有する対象とを区別できる。

40

【0027】

また正常な軟骨代謝回転は、本明細書では、良性又はバックグラウンドの軟骨代謝回転とも称される。このような良性の軟骨代謝回転は、一般的には全ての軟骨組織で起こっており、負荷及び環境に対するこれらの組織の正常な適応の一環である。したがって、この良性の軟骨代謝回転は、有害な組織破壊又は疾患に起因するのではなく、むしろ対象において起こる自然の過程である。

【0028】

背景の章で論じられたCOMP及びCOMPネオエピトープを使用する従来技術は、正常な良性の軟骨代謝回転と病的な軟骨代謝回転とを区別できないことに関する短所を有する。例えば、Saxneら、British Journal of Rheumatology

50

logy (1992)、31巻、583～591頁、及びLaiら、Osteoarthritis Cartilage (2012)、20巻、854～862頁は、対照の対象においてさえもバックグラウンドシグナルを検出している。これらの従来技術とは明らかに異なり、本実施形態は、正常な軟骨破壊中に存在しない所定のネオエピトープを利用する。したがって、これらの固有なネオエピトープは、病的な軟骨代謝回転又は破壊を検出又はモニターするための極めて優れたツールを提供する。さらに、WO2005/116658は、組織分解過程を決定するために、COMPのアミノ酸配列の625～626のCOMPの切断後に出現するネオエピトープを使用している。しかしながら、WO2005/116658に記載のネオエピトープは、正常なCOMP又は軟骨代謝回転と病的なCOMP又は軟骨代謝回転とを区別するのに使用できない。したがって、WO2005/116658に記載のネオエピトープは、一般的には組織分解を決定するのに使用され、病的な軟骨代謝回転の特定のモニターには使用できない。

【0029】

関節病及び組織破壊を診断及びモニターするための一般的なエピトープを標的とする体液中のCOMPの近年におけるアッセイに関連する1つの問題は、とりわけ全ての軟骨組織において負荷及び環境に対するこれらの組織の正常な適応の一環であるバックグラウンドの代謝回転が存在することである。結果として、疾患において特定の関節軟骨で起こる破壊の増加は、正常な代謝回転をバックグラウンドとしてしか観察することができない。したがって、このような増加は、既存のレベルよりも上の部分だけである。しかしながら、病的なものと正常に存在するものとを区別するフラグメントを同定することが望ましい。

【0030】

したがって、本発明者らは、驚くべきことに、病的な軟骨代謝回転中に、正常な軟骨代謝回転中には存在しない特異的な切断部位が存在することを示した。これは、正常な場合にはCOMP上に露出しない新しいエピトープが、病的な軟骨代謝回転を引き起こす疾患に罹患した対象においてタンパク質切断後に出現することを意味する。しかしながら、これらの新しいエピトープ又はネオエピトープは、良性の軟骨代謝回転しか示さない健康な対象では形成されない。それゆえに、本実施形態のこれらの新しいネオエピトープは、疾患における病的な軟骨代謝回転を決定、検出、及びモニターするために改善された方法及び技術で使用することが可能である。

【0031】

本明細書において、病的な/良性の軟骨代謝回転及び病的な/良性のCOMPは同じ意味で使用され、どちらも軟骨が破壊されてCOMPの血清レベルの増加を引き起こす病的/正常な過程を伴う。

【0032】

本実施形態は、病的な軟骨又はCOMP代謝回転を決定、測定又はモニターする方法を開示する。検出、測定又はモニターされた特異的な断片化からのネオエピトープは、正常な代謝回転の結果として存在しないことが本実施形態の特徴であり、この特徴により、正常な代謝回転と疾患における代謝回転とを区別することが可能になる。これは、これらに限定されないが、変形性関節症(OA)、関節リウマチ(RA)、反応性関節炎(ReA)、乾癬性関節炎、若年性慢性関節炎、心臓血管疾患、腱の疾患、骨粗鬆症、骨軟化症、骨折修復、動脈硬化症、強皮症、線維症の皮膚、又は関節の外傷のような外傷等の疾患を診断する場合、有用なツールである。

【0033】

本実施形態のネオエピトープは、正常な非疾患個体に実質的に存在しないため、これは、疾患経過の新規の初期の診断を可能にすると予想される。それゆえに、本実施形態は、病的な軟骨代謝回転を検出又はモニターする方法に関し、さらにこの方法を、病的な代謝回転を有する患者と、正常な軟骨代謝回転を有する非罹患個体とを区別するのに使用することにも関する。本方法は、サンプル中で、特異的なCOMP断片化ネオエピトープの存

在を検出又はモニターするステップを含む。これは、患者内の疾患の進行を長期的に追跡するのに使用できる疾患の経過の新規の初期の診断をもたらすと予想される。また本実施形態は、考えられる様々な処置に対する有効性を追跡するのににも使用できる。

【 0 0 3 4 】

したがって、病的な軟骨代謝回転を引き起こす疾患に罹患した対象において、本実施形態のネオエピトープは、特異的な位置でCOMPのアミノ酸配列（配列番号1）を切断することにより形成される。本明細書で使用されるネオエピトープ（Neopetiope）は、正常にはCOMP上に露出しないがタンパク質切断によるタンパク質変化の後に出現するエピトープである。ネオエピトープ（neopitope）は、例えば、切断後に出現したCOMPフラグメントの一次、二次及び/又は三次構造によって形成できる。

10

【 0 0 3 5 】

以下に示す配列はヒトCOMPからの配列であるが、本実施形態はまた、例えばウマ、イヌ、マウス、ラット、モルモット、及び霊長類などのヒト以外の哺乳動物対象も包含する。これらのヒト以外の哺乳動物からのCOMP配列はヒトCOMPと類似しているため、ヒトCOMP中のネオエピトープに対する抗体は、ヒト以外の哺乳動物COMP中の対応するネオエピトープと交差反応する可能性があり、逆もまた同様である。

【 0 0 3 6 】

ヒトCOMPの配列を以下に示すが、配列番号1でも確認できる。

【 化 1 】

MVPDTACVLL LTLAALGASG QGQSPLGSDL GPQMLRELQE TNAALQDVRE
 LLRQQVREIT FLKNTVMECD ACGMQQSVRT GLPSVRPLLH CAPGFCFPGV
 ACIQTESGAR CGPCPAGFTG NGSHCTDVNE CNAHPCFPRV RCINTSPGFR
 CEACPPGYSG PTHQGVGLAF AKANKQVCTD INECETGQHN CVPNSVCINT
 RGSFQCGPCQ PGFVGDQASG CQRRARFCP DGSPSECHEH ADCVLERDGS
 RSCVCAVGWA GNGILCGRDT DLDGFPDEKL RCPERQCRKD NCVTVPNSSGQ
 EDVDRDGIGD ACDPDADGDG VPNEKDNCPL VRNPDQRNTD EDKWGDACDN
 CRSQKNDDQK DTDQDGRGDA CDDIDGDRI RNQADNCPRV PNSDQKDSGD
 DGIGDACDNC PQKSNPDQAD VDHFVGDAC DSDQDQDGDG HQDSRDNCPT
 VPNSAQEDSD HDGQGDACDD DDDNDGVPDS RDNCRLVPPN GQEDADRDGV
 GDVCQDDFDA DKVVDKIDVC PENAEVTLTD FRAFQTVVLD PEGDAQIDPN
 WVVLNQGREI VQTMNSDPGL AVGYTAFNGV DFEGTFHVNT VTDDDYAGFI
 FGYQDSSSFY VVMWKQMEQT YWQANPFRAV AEPGIQLKAV KSSTGPGEQL
 RNALWHTGDT ESQVRLWLD PRNVGWKDKK SYRWFLQHRP QVGYIRVRFY
 EGPELVADSN VVLDTTMRGG RLGVFCFSQE NIIWANLRYR CNDTIPEDYE
 THQLRQA

20

30

40

【 0 0 3 7 】

本実施形態は、サンプル中で、本明細書で示された特異的なCOMP断片化ネオエピトープの存在を検出又はモニターするステップを含む、病的な代謝回転と正常な軟骨代謝回転とを区別する方法を開示する。これらのネオエピトープを検出又はモニターするために、これらに限定されないが、例えば多重反応モニタリング（MRM）、ELISA又は当業界で知られているその他の任意の好適なイムノアッセイなどの可能性のある任意の方法を使用できる。

【 0 0 3 8 】

50

本実施形態はさらに、切断によって作製された特異的なネオエピトープ及びこれらの新規のネオエピトープに対する抗体を開示する。

【0039】

本発明者らは、驚くべきことに正常な軟骨破壊ではネオエピトープが存在しないか又は有意に低いレベルでしか検出されないというCOMPの新しい切断部位（配列番号1）を開示する。これは、実際に疾患と非疾患とを区別するための固有なツールを提供する。

【0040】

病的な軟骨代謝回転中に存在するが正常な軟骨代謝回転中には存在しないCOMPの特異的な切断ネオエピトープは、77位(S⁷⁷)~78位(V⁷⁸)；88位(L⁸⁸)~89位(L⁸⁹)；90位(H⁹⁰)~91位(C⁹¹)；104位(Q¹⁰⁴)~105位(T¹⁰⁵)；190位(N¹⁹⁰)~191位(C¹⁹¹)；194位(N¹⁹⁴)~195位(S¹⁹⁵)；226位(Q²²⁶)~227位(R²²⁷)；531位(F⁵³¹)~532位(R⁵³²)；554位(L⁵⁵⁴)~555位(N⁵⁵⁵)；574位(Y⁵⁷⁴)~575位(T⁵⁷⁵)；577位(F⁵⁷⁷)~578位(N⁵⁷⁸)；657位(T⁶⁵⁷)~658位(G⁶⁵⁸)；691位(Q⁶⁹¹)~692位(V⁶⁹²)；710位(N⁷¹⁰)~711位(V⁷¹¹)及び725位(F⁷²⁵)~726位(C⁷²⁶)からなる群から選択される少なくとも1つの切断部位でCOMPを切断することにより形成される。

10

【0041】

したがって、本実施形態の態様は、病的な軟骨代謝回転を決定する方法に関する。本方法は、サンプル中で、少なくとも1種の哺乳動物COMP、好ましくはヒトCOMPのネオエピトープの存在を検出するステップを含む。少なくとも1種のネオエピトープは、配列番号1で定義された哺乳動物COMPの、好ましくはヒトCOMPのアミノ酸配列の77位(S⁷⁷)~78位(V⁷⁸)；88位(L⁸⁸)~89位(L⁸⁹)；90位(H⁹⁰)~91位(C⁹¹)；104位(Q¹⁰⁴)~105位(T¹⁰⁵)；190位(N¹⁹⁰)~191位(C¹⁹¹)；194位(N¹⁹⁴)~195位(S¹⁹⁵)；226位(Q²²⁶)~227位(R²²⁷)；531位(F⁵³¹)~532位(R⁵³²)；554位(L⁵⁵⁴)~555位(N⁵⁵⁵)；574位(Y⁵⁷⁴)~575位(T⁵⁷⁵)；577位(F⁵⁷⁷)~578位(N⁵⁷⁸)；657位(T⁶⁵⁷)~658位(G⁶⁵⁸)；691位(Q⁶⁹¹)~692位(V⁶⁹²)、710位(N⁷¹⁰)~711位(V⁷¹¹)；及び725位(F⁷²⁵)~726位(C⁷²⁶)からなる群から選択される少なくとも1つの切断部位及びそれらの任意の組み合わせで哺乳動物COMP、好ましくはヒトCOMPを切断することによって形成される。本方法はまた、サンプル中で少なくとも1種のネオエピトープが検出される場合、病的な軟骨代謝回転の存在を決定するステップも含む。

20

【0042】

したがって、上記で定義したCOMPを特異的な切断部位で切断することにより形成される少なくとも1つのネオエピトープ(neoepitope)の存在は、サンプル中における病的な軟骨及びCOMP代謝回転のインジケータである。

30

【0043】

この態様の変形は、哺乳動物対象、好ましくはヒト対象において病的な軟骨代謝回転を検出する方法に関する。本方法は、哺乳動物対象からのサンプルを、本実施形態に係る哺乳動物COMPの少なくとも1種のネオエピトープ(neoepitope)に特異的に結合する少なくとも1種の抗体と接触させるステップを含む。本方法はまた、サンプル中で、少なくとも1種の抗体に基づいて、少なくとも1種のネオエピトープの存在を検出するステップも含む。この方法において、少なくとも1種のネオエピトープの存在は、哺乳動物対象が、軟骨代謝回転を有するか、又は軟骨代謝回転に罹患していることを指し示す。

40

【0044】

この態様の他の変形は、哺乳動物対象、好ましくはヒト対象において病的な軟骨代謝回転を検出する方法に関する。本方法は、哺乳動物対象からのサンプルを、本明細書において定義される哺乳動物COMPの単離されたC末端短縮フラグメント若しくは本明細書において定義される哺乳動物COMPの単離されたN末端短縮フラグメントに対する少なくとも1種の抗体、本明細書において定義されるコンジュゲート、又はそれらの任意の組み合わせと接触させるステップを含む。本方法はまた、サンプル中で、及び少なくとも1種の抗体に基づいて、本明細書において定義される哺乳動物COMPを切断することにより

50

形成された少なくとも1種のフラグメントの存在を検出するステップも含む。この方法において、少なくとも1種のフラグメントの存在は、哺乳動物対象が、軟骨代謝回転を有するか、又は軟骨代謝回転に罹患していることを指し示す。

【0045】

この態様のさらに他の態様は、哺乳動物対象、好ましくはヒト対象において病的な軟骨代謝回転を検出する方法に関する。本方法は、哺乳動物対象からのサンプルを、哺乳動物COMPのネオエピトープに対する少なくとも1種の抗体と接触させるステップを含む。ネオエピトープは、配列番号1で定義された哺乳動物COMPの、好ましくはヒトCOMPのアミノ酸配列の77位(S⁷⁷)~78位(V⁷⁸);88位(L⁸⁸)~89位(L⁸⁹);90位(H⁹⁰)~91位(C⁹¹);104位(Q¹⁰⁴)~105位(T¹⁰⁵);190位(N¹⁹⁰)~191位(C¹⁹¹);194位(N¹⁹⁴)~195位(S¹⁹⁵);226位(Q²²⁶)~227位(R²²⁷);531位(F⁵³¹)~532位(R⁵³²);554位(L⁵⁵⁴)~555位(N⁵⁵⁵);574位(Y⁵⁷⁴)~575位(T⁵⁷⁵);577位(F⁵⁷⁷)~578位(N⁵⁷⁸);657位(T⁶⁵⁷)~658位(G⁶⁵⁸);691位(Q⁶⁹¹)~692位(V⁶⁹²);710位(N⁷¹⁰)~711位(V⁷¹¹);及び725位(F⁷²⁵)~726位(C⁷²⁶)からなる群から選択される少なくとも1つの切断部位又はそれらの任意の組み合わせで哺乳動物COMP、好ましくはヒトCOMPを切断することによって形成される。本方法はまた、サンプル中で、及び少なくとも1種の抗体に基づいて、ネオエピトープの存在を検出するステップも含む。この方法において、ネオエピトープの存在は、哺乳動物対象が、軟骨代謝回転を有するか、又は軟骨代謝回転に罹患していることを指し示す。

10

【0046】

一実施形態において、検出ステップは、イムノアッセイによって実行される。このイムノアッセイは、好ましくは多重反応モニタリング(MRM)及び/又は酵素結合免疫吸着検査法(ELISA)である。

20

【0047】

特定の実施形態において、本方法はまた、サンプル中で検出された少なくとも1つのネオエピトープ(neoepitope)に基づいて、病的な軟骨代謝回転と良性の軟骨代謝回転とを区別するステップも含む。したがって、サンプル中で少なくとも1種のネオエピトープが検出される場合、又は閾値を超える量若しくは濃度で検出される場合、そのような軟骨代謝回転はいずれも、病的な軟骨代謝回転に起因すると決定される。それに対応して、サンプル中で本実施形態のネオエピトープが検出されない場合、又は極めて低い量若しくは濃度、すなわち閾値未満の量若しくは濃度でしか検出されない場合、そのような軟骨代謝回転はいずれも、良性の軟骨代謝回転に起因すると決定される。

30

【0048】

したがって、病的な軟骨代謝回転と良性の軟骨代謝回転とを区別することは、一実施形態において、サンプル中で検出された少なくとも1種のネオエピトープの量が閾値を超える場合、病的な軟骨代謝回転の存在を決定することを含む。それに対応して、少なくとも1種のネオエピトープの量が閾値を超えない場合、又はサンプル中でこのようなネオエピトープが検出されない場合、良性の軟骨代謝回転の存在が決定される。

【0049】

上記に係る特定の実施形態で使用される閾値は、病的な軟骨代謝回転を引き起こす疾患と診断された患者グループ中の少なくとも1種のネオエピトープ(neoepitope)の量を測定すること、及び任意選択で健康な対象を含む対照グループ中の少なくとも1種のネオエピトープの量も測定することによって決定できる。

40

【0050】

一実施形態において、病的な軟骨代謝回転は、変形性関節症、関節リウマチ、反応性関節炎、乾癬性関節炎、若年性慢性関節炎、心臓血管疾患、腱の疾患、骨粗鬆症、骨軟化症、骨折修復、動脈硬化症、強皮症、線維症の皮膚、及び関節の外傷のような外傷からなる群から選択される疾患によって引き起こされる。

【0051】

本方法で使用されるサンプルは、好ましくは、軟骨サンプル、並びに滑液サンプル、血

50

清サンプル、血漿サンプル、及び尿サンプルのような体液サンプルからなる群から選択される。

【0052】

一実施形態において、少なくとも1種のネオエピトープの存在を検出するステップは、サンプルと本実施形態に係る抗体とを接触させるステップを含み、これは、本明細書においてさらに説明される。サンプル中の少なくとも1種のネオエピトープの存在は、抗体に基づいて検出される。この実施形態において、病的な軟骨代謝回転の存在を決定するステップは、サンプル中で検出された少なくとも1種のネオエピトープの存在に基づいて、病的な軟骨代謝回転の存在を決定するステップを含む。

【0053】

本実施形態の任意のネオエピトープの存在は、タンパク質フラグメントを検出することに関する分野において公知の様々な技術に従って決定できる。非限定的な、ただし好ましいこのような技術としては、本実施形態に係るネオエピトープ(neoepitope)に特異的に結合する抗体を使用して、多重反応モニタリング(MRM)又は酵素結合免疫吸着検査法(ELISA)によって、サンプル中で、少なくとも1種のネオエピトープを検出することが挙げられる。

【0054】

特定の実施形態において、本方法はまた、サンプルから哺乳動物COMPを単離するステップも含む。これは、例えば本明細書でさらに開示されている技術などの様々な技術に従って行うことができる。したがって、例えばCOMPの親和性の強化は、アフィニティ

【0055】

本方法は、特定の実施形態において、本実施形態のいずれかのネオエピトープ(neopeptide)の存在を検出する前に、消化酵素により単離されたCOMPを処置するステップをさらに含む。単離されたCOMPを処理するのに使用される消化酵素は、好ましくは、トリプシン、キモトリプシン、及びエンドプロテイナーゼAsp-Nからなる群から選択される。消化酵素により単離されたCOMPを処理して、COMPフラグメントのサンプルを産生する。次いでネオエピトープの検出は、好ましくは、COMPフラグメントのサンプルで行われる。

【0056】

以下に、本実施形態に係るCOMP中のネオエピトープの同定に関する議論を記載する。

【0057】

COMP中のネオエピトープの同定

軟骨サンプル及び滑液サンプルの両方に対して、COMP(配列番号1)中のネオエピトープの同定を以下で説明するようにして行った。また例えば血液、血清などの他のサンプル源でもよい。本実施形態の目的は疾患と非疾患とを区別することであるため、正常な軟骨代謝回転中に存在するネオエピトープを除外した。

【0058】

軟骨サンプル

この例では、3つの患者グループ及び1つの参照グループからの軟骨を研究した：

グループ1：関節リウマチ(RA)を有する患者であり、その関節軟骨組織は、関節置換(臀部及び膝)のための外科手術のときに入手し、以下このような患者をRA患者と呼ぶ。

【0059】

グループ2：変形性関節症(OA)を有する患者であり、その軟骨は、主に臀部軟骨の関節置換(後期OA)のための外科手術のときに入手し、以下このような患者をOA患者と呼ぶ。

【0060】

グループ3：臨床的に健康な関節を有するが、脚の一部の近位に癌があるために膝の上

10

20

30

40

50

で切断しなければならない患者である。膝は、腫瘍の影響を受けていない。55～75歳の範囲の数人の患者は、肉眼での調査では（場合によっては顕微鏡で検証）正常な膝関節軟骨を有する。同じ年齢範囲のうち数人の個体は、単一の線維化領域を有する。以前のこれらの関節からの軟骨の研究において、本発明者らは、この軟骨においてマトリックスタンパク質合成及び全体の組成に極めて明らかな変化がみられたこと、さらにこれらの変化は、大規模な組織破壊を起こすOA後期に特徴的な変化と同じ特徴を有すること、それゆえにこれらの変化は、過程の初期段階の典型であることを示してきた。そこで本発明者らは、細胞外マトリックス分子の分解に的を絞って分子の変化を同定するために、このような軟骨中の部位からのサンプルを使用した。

【0061】

参照グループ：個体が健康障害ではなく他の理由で死亡した司法解剖のケースから、正常な軟骨を入手した。正常な軟骨を、OAが普及する年齢よりも十分に低い年齢の、膝と脛骨との間、臀部と大腿骨との間、肩と上腕骨との間、半月板、線維輪、並びに髄核（年齢範囲は36～51歳）、加えて気管及び肋骨（年齢は24～36歳）から得た。それゆえにこれらの情報から、正常な組織代謝回転過程によって形成されて組織に保持されたフラグメントに関する情報が得られる。

【0062】

例えばアグリカンの一部の断片化並びにI型及びII型コラーゲンの破壊における第一のステップは、病的な代謝回転と正常な代謝回転とで同じであるが、レベルが異なっていることが予想できる。この例において、本発明者らは、正常組織と病的組織とを比較することにより、どの固有な切断が病的過程の結果であるかを推定することを可能にした。

【0063】

データ検索は、COMPに存在するアミノ酸配列を示し、どちらかの末端でトリプシンに典型的な切断を示すが、他方の末端が抽出前に組織中でプロテイナーゼ活性によって達成される不規則な切断を示し、さらに進行中の破壊的な過程を反映するペプチドに的を絞った。トリプシンによる切断を示さない部位をネオエピトープと称する。

【0064】

正常な軟骨でも見出されるネオエピトープは正常な軟骨代謝回転を示すと予想されることから、それらをさらなる分析から排除した。

【0065】

軟骨サンプルの調製

切開、粉碎、及び抽出：

全体厚さがおよそ1×1cmの軟骨断片を各組織から解剖で取り出した。目で見ても正常な関節軟骨サンプルを底から採取した。関節軟骨の同じ部分（負荷をかけた領域）をそれぞれの個体において解剖で取り出した。正常な対照については、以下の軟骨組織：関節軟骨（大腿骨骨頭（F）、上腕骨頭（H）、及び脛骨内側顆（knee medial tibial condyle）（K））、椎間板（線維輪（AF）及び髄核（NP））、及び最後に半月板（M）（36～51歳）をそれぞれ5人の個体から抽出した。上記で説明した個体とは異なる個体（24～36歳）から気管（T）及び肋骨（R）の軟骨サンプル（n=6）を得た。

【0066】

進行中の変形性関節症からの臀部関節軟骨サンプルを関節置換術で得て、同様に関節リウマチからのサンプルも得た。これらのサンプルは合計約3～7mgであった。

【0067】

タイプ301のミキサーミル（Retzsch, Haan, Germany）を備えた冷却した金属製チューブ中で、解剖し凍結した清潔な軟骨サンプルを液体窒素中で粉碎した。形成された粒子の目視検査を光学顕微鏡で行い、ステップ間に30分の冷却を行って設定（25Hzで3×60秒）を最適化することにより、組織1つあたり100mg前後の均一な粉末を得た。凍結したサンプルの重さを量り、15体積（v/w）のカオトロピック抽出緩衝液（4MのGuHCl、50mMのNaAc、100mMの6-アミノカプロ

10

20

30

40

50

ン酸、5 mMのベンズアミジン、5 mMのN - エチルマレイミド、pH 5.8) を使用して、オービタルシェーカーで+ 4 で24時間にわたり抽出した。13200 rpm及び+ 4 で30分遠心分離した後に抽出物を収集した。

【0068】

初期の変形性関節症を有する個体の大腿骨顆からの、限定された病変部位を境界とした軟骨サンプルは、下肢の上部における骨肉腫のために外科的切断で得られた単一の線維領域を示すサンプルであった。抽出のために、- 20 のクライオスタットで組織を分断して20 μmの切片にし、これを5 mlのステライリンチューブ(Bibby Steril Lin Ltd、Stone、Staffs、UK)中に収集し、10 mMのEDTA、5 mMのベンズアミジン塩酸塩、0.1 Mの6 - アミノヘキサン酸、及び5 mMのN - エチルマレイミドも含有する5 mlの4 Mのグアニジン - HCl、0.05 Mの酢酸ナトリウム(pH 5.8)を用いて4 で24時間抽出した。ガラス繊維フィルターでのろ過により残留物から抽出物を分離した。

10

【0069】

定量用サンプルの調製：

典型的には、体積200 μlの抽出物を2 mlのチューブに移し、4 mMのDTTで還元し(+ 56 で30分振盪)、16 mMのIAAでアルキル化した(暗所で室温で1時間)。抽出物をエタノール(9:1)により+ 4 で一晚沈殿させ、その後、遠心分離(13200 rpm、+ 4 で30分)を行い、続いて- 20 で4時間エタノール洗浄を行うことにより、残留したGuHCl及び他の塩を除去した。サンプルをSpeed Vacで乾燥させ、100 μlの0.1 Mの炭酸水素トリエチルアンモニウム(pH 8.5)に懸濁し、その後、振盪機で、2 μgのトリプシンゴールドにより+ 37 で約16時間消化した。50 μlのアリコート乾燥させ、iTRAQでの標識付けに使用した。

20

【0070】

同重核の4単位のiTRAQ標識を使用して、サンプルセット1つあたり最大3サンプル及び参照サンプルの混合を可能にした。相対的な定量化で可能な限り多くのタンパク質を提示させるため、参照サンプルは大腿骨骨頭、肋骨、半月板、及び髓核に由来する軟骨抽出物の混合物であった。全てのサンプルをこの参照サンプルと比較し、サンプルと参照との比率を計算した。標識付けステップを以下のようにして実行した：サンプルを30 μlの0.5 Mの炭酸水素トリエチルアンモニウム(pH 8.5)中に再溶解させた。iTRAQ試薬を室温にして、70 μlのエタノール中に再溶解させ、ボルテックスで混合し、サンプルに添加する直前に遠心分離した。室温で1時間インキュベーションを行った。100 μlの水を添加することにより反応を止めた。標識付けの効率を調べるために、標識されたサンプルのアリコート(0.5%)をイオントラップLC - MSに注入した。データベース検索において可変性のiTRAQ修飾を使用することにより、得られたデータを不完全な標識付けに関してチェックした。標識された消化物をSpeed Vacで乾燥させ、塩を除去するために500 μlの0.1%のギ酸中の50%アセトニトリルで2回洗浄し、次いで再度乾燥させた。標識されたサンプルを100 μlの2%ギ酸中に再溶解させた。サンプルを1:1:1の比率で参照サンプルと共に混合し、イオン交換カラムに注入する前に陽イオン交換開始緩衝液で500 μlになるまで希釈した。全ての分析で同じ参照を使用したため、参照に対して標準化することにより全てのサンプルデータを比較することができた。本発明者らは、関節軟骨(大腿骨骨頭、上腕骨頭、及び脛骨内側顆)はほとんど類似していると予想されることから、それらを1つの混合物(FHK)として分析することを選択した。他の混合物(MAN)は、円板構造の線維輪及び髓核と共に含む半月板であり、最後の混合物は、肋骨と気管とを様々に組み合わせたものであった。他のサンプルセットでは、それぞれ各患者の代表的な(初期OAの軟骨 - 1、初期OAの軟骨 - 2、初期OAの軟骨 - 3、初期OAの軟骨 - 4、初期OAの軟骨 - 5、初期OAの軟骨 - 6、後期OAの軟骨 - 7、初期OAの軟骨 - 8、RAの軟骨 - 1、RAの軟骨 - 2、RAの軟骨 - 3、RAの軟骨 - 4)、RAの軟骨 - 5、RAの軟骨 - 6、及び正常な軟骨のサンプルを分析した。異なるiTRAQレポーターでタグ付けされた3つのサンプルを

30

40

50

参照サンプルと混合し、これを4番目のI T R A Qレポーターでタグ付けした。全ての分析セットで同じ参照サンプルを使用することにより、全てのサンプル間の定量的な比較が可能になると予想される。

【0071】

オフラインの陽イオン交換クロマトグラフィー

強陽イオン交換 (S C X) カラム (内径 2.1 mm × 100 mm、5 μm のポリスルホエチルアスパルトアミド、孔サイズ 300、ポリ LC、C o l u m b i a、M D、U S A) を使用したマイクロ-LC システム (S M A R T、P h a r m a c i a、U p p s a l a S w e d e n) で最初のイオン交換分離を行った。溶出は、99.5% の溶媒 A (10 mM のリン酸カリウム、20% のアセトニトリル、pH 2.8) 及び 0.5% の溶媒 B (1 M の K C l、10 mM のリン酸カリウム、20% のアセトニトリル、pH 2.8) の均一濃度を用いて 13 分、続いて塩濃度を 130 mM に増加させる直線的な濃度勾配で 60 分で行われた。その後、濃度勾配を 15 分かけて 385 mM の K C l まで高めて、最後に 6 分かけて 1 M の塩まで高めた。300 ~ 500 μl の画分を、0.5 ml のエペンドルフチューブ (S a f e l o c k (商標)、E p p e n d o r f A G、H a m b u r g、G e r m a n y) に集めた。

10

【0072】

マススペクトロメトリー

オフライン S C X 分離からの画分を乾燥させ、60 μl の 0.2% のギ酸中に再溶解させ、そのうち 10 μl を精製し、厚さ 4 ディスク分の自社製逆相チップを使用して濃縮した (R a p p s i l b e r g、A n a l . C h e m . (2003)、75 巻、663 ~ 670 頁)。0.1% のギ酸中の 50% のアセトニトリル 10 μl を使用して保持されたペプチドをオートサンプラー用ガラスバイアル (Q s e r t、W a t e r s、M i l f o r d、M A、U S A) に溶出させた。S p e e d V a c を使用して有機溶媒を蒸発させ、ペプチドを 10 μl の 0.2% ギ酸中に再溶解させ、その後、様々な LC - M S システム上に注入した。サンプルをサンプルセットに混合する前に各サンプルの少量のアリコートでイオントラップ LC - M S システムに注入することによって標識付けの効率を試験した。

20

【0073】

Q - T O F L C - M S

Q - t o f M S (Q - T O F マイクロ、W a t e r s) を、上記で説明したのと同じタイプのプレカラム及び W a t e r s の S y m m e t r y、C 1 8、3.5 μm の粒子、長さ 150 mm × 内径 75 μm の分析カラムを備えた C a p L C (W a t e r s) に連結した。分析カラムを P i c o T i p (商標) ニードル (N e w O b j e c t i v e、W o b u r n、M A、U S A) と組み合わせた。約 250 nl / 分の流速、及び 5% の B (イオントラップ LC - M S の場合と同様の移動相) から 51% の B の 60 分での直線的な濃度勾配、続いて 95% の B での 6 分の洗浄、及び 12 分の初期条件への再調節を使用して、オンラインの逆相分離を行った。画分間の交差汚染を最小化するために、以前と同様にしてブランクの試行を行った。それらが多価である場合と同等の長さの時間にわたり (M S M S の場合は 2 秒以内に) 最も強いイオン 4 種を選択することによるデータ依存性取得を使用して、機器を操作した。

30

40

【0074】

データベース検索

P r o t e i n L y n x 2.1 (W a t e r s) 及び校正物質として 716.45 Da におけるエリスロマイシンのピークを使用したナノロックスプレーによる補正を使用して、マススペクトロメトリーの生データを加工した。加工済みファイルを、M A S C O T を以下の検索パラメーター: i T R A Q (N - ターム)、i T R A Q (K) 及び固定された修飾としてカルバミドメチル化 (C) を使用して検索した。一方で、可変の修飾としてマンノシル化 (W)、i T R A Q (Y)、脱アミド (N、Q)、酸化 (M、P) を考慮した。他の M A S C O T 検索パラメーターは: モノアイソトピック質量、± 0.2 Da のペプチド質量許容差、± 0.2 Da の M S M S フラグメント質量許容差、2 の最大切断ミス

50

、対象となるイオンスコア > 20 であり、最高位のペプチドのみが一致し、分類学的にヒットであった。使用される酵素から予測される一方の末端にだけ部位を含有する半様式的な切断を、単離の前に起こる内因性の（生物学的な）切断を含有するペプチドを同定するための検索基準に適用した。

【0075】

データ分析

iTRAQ 定量化パラメーターは、有意な閾値が $p < 0.05$ であり、重みつき比率、標準化なし、ペプチドの最小数 1、最小の前駆体の電荷 2、少なくとも 0.05 の相同性であり、各レポーターのソフトウェアの補正係数も包含した。

【0076】

滑液サンプル

アフィニティーカラム：

親和性を強化するために、1 mg の COMP 抗体 P2D3 又は 0.75 mg の COMP 抗体 12a11 を Mini Leak (KemEnTec, Denmark) のゲルアリコートに添加し、4 で一晩インキュベートした。未結合抗体を 0.15 M の NaCl で洗浄して落とした。未反応の部位をブロックするために、ゲルを 0.2 M のエタノールアミンと共に室温で 3 時間インキュベートした。カップリング効率は、抗体 P2D3 の場合、39% (結合した抗体が 390 μ g であることに対して) 及び抗体 12a11 の場合、76% (結合した抗体が 570 μ g であることに対して) と決定された。

【0077】

滑液からの COMP の親和性の強化

RA と診断された患者 (罹患期間 9 ヶ月) からの滑液 (8 ml) 及び OA と診断された患者からの滑液 (5 ml) を 5 mM の NEM (N-エチルマレイミド (ethylmaleimide)) と共にインキュベートし、その後、1000 g、室温で 20 分遠心分離した。急性外傷を有する患者からの滑液を、20 mM のホスファート、150 mM の NaCl、0.8% w/v の SDS で 2 倍の体積に希釈し、室温で 2 時間インキュベートした。1 倍量の 4% トリトン-X100 の PBS 溶液の添加により過量の SDS を中和し、室温で一晩インキュベートした。まず、非特異的な結合物質を除去するために、抗体を用いずに Mini Leak カラムにサンプルを通過させた。次いで未結合のサンプルを P2D3 カラムに入れて、P2D3 カラムからのフローを直接 12a11 カラムに入れた。両方のカラムを 15 ml の HBS (10 mM の HEPES、150 mM の NaCl、pH 7.4) で洗浄し、続いて 2 ml の高塩濃度緩衝液 (10 mM の HEPES、650 mM の NaCl、pH 7.4) で洗浄し、最後に 5 ml の HBS で洗浄した。溶出させるために、800 μ l の 0.1 M シトラート (pH 3) の画分をカラムに添加した。排水画分を 200 μ l の 1.5 M の トリス (pH 8.8) で即座に中和した。

【0078】

SDS-PAGE 及びマススペクトロメトリー用のサンプル調製

SDS-PAGE の前に、溶出したサンプルをエタノール (9:1) を用いて +4 で一晩沈殿させ、その後、遠心分離 (13200 rpm、+4 で 30 分) し、続いて -20 で 4 時間エタノール洗浄を行った。沈殿したペレットを、還元剤を用いずに SDS-PAGE サンプル緩衝液 (Laemmli, Nature (1970)、227 巻、680~685 頁) に溶解させ、濃度勾配 4~16% の SDS-ポリアクリルアミドゲルで分離した。各バンドを 3 種の異なる酵素で消化できるように、各サンプルを 3 連で実験した。ブルーシルバー染色で一晩染色した後 (Candiano ら、Electrophoresis (2004)、25 巻 (9)、1327~33 頁)、対象のバンドを切り出し、10 mM の DTT (Sigma) で 56 で 30 分還元し、50 mM の ヨードアセトアミド (Sigma) を用いて室温で 30 分アルキル化した。25 mM の NH_4HCO_3 中の 20 ng/ μ l の トリプシン (Promega)、25 mM の NH_4HCO_3 中の 50 ng/ μ l の キモトリプシン (Roche)、又は 50 mM の ホスファート (pH 8) 中の 40 ng/ μ l の Asp-N (Roche) のいずれかを用いてバンドを 37 で一晩消

10

20

30

40

50

化した。1% TFA、0.1% TFA中の50%アセトニトリルで2回、及び100%のアセトニトリルでペプチドを連続的に抽出した。乾燥後、抽出したペプチドを10 μ lの0.1% TFAに溶解させ、上記で説明したC18ステージチップで精製した。

【0079】

マススペクトロメトリー

精製したペプチドサンプルを10 μ lの0.2%のギ酸に溶解させ、サンプル(8 μ l)をEsquire HCTイオントラップ(Bruker Daltonik GmbH)に注入した。このイオントラップには、Pepmap(商標)ナノ-プレカラム(LC Packings、C18、内径300 μ m及び長さ5mm)及びAtlantis(商標)分析カラム(Waters、C18、3 μ mの粒子、内径150 μ m \times 長さ150mm)を有するアルティメットHPLCシステム(LC Packings)が備えられていた。分析カラムを、マイクロフローネブライザーを介してMS機器に組み合わせた。前の章で説明したようにしてオンラインの逆相分離を行った。データベース検索設定は、ITRAQ修飾以外はこれまでに述べた設定と同じであった。ペプチド及びフラグメントの質量許容差は ± 0.4 Daに設定した。

10

【0080】

使用される酵素から予測される一方の末端にだけ部位を含有する半様式的な切断を、単離の前に起こる内因性の(生物学的な)切断を含有するペプチドを同定するための検索基準に適用した。

【0081】

結果

以下の表2に、病的なCOMP代謝回転で同定された切断部位を示す同定されたネオエピトープを列挙する。表2において、太字で表示される切断部位の一部は、MSによって同定された配列に属し、(切断位置を示す)ネオエピトープの末端アミノ酸を包含する。

20

【表 1 - 1】

表2-ネオエピトープ

MSで同定されたペプチドフラグメント	サンプル (酵素)	ネオエピトープ及び 切断部位	切断位置
NTVMECDACGMQQS (配列番号:2)	SF (トリプシン)	GMQQS (配列番号:18)/ VRTGL (配列番号:33)	S ⁷⁷ /V ⁷⁸
LHCAPGFCFPGVACIQTESGAR (配列番号:3)	軟骨 (トリプシン)	SVRPL (配列番号:19)/ LHCAP (配列番号:34)	L ⁸⁸ /L ⁸⁹
CAPGFCFPGVACIQTESGAR (配列番号:4)	SF (トリプシン)	RPLLH (配列番号:20)/ CAPGF (配列番号:35)	H ⁹⁰ /C ⁹¹
TESGARCGPCPAGF (配列番号:10)	SF(CT)	VACIQ (配列番号:21)/ TESGA (配列番号:36)	Q ¹⁰⁴ /T ¹⁰⁵
CVPNSVCINTR (配列番号:5)	軟骨 (トリプシン)	TGQHN (配列番号:22)/ CVPNS (配列番号:37)	N ¹⁹⁰ /C ¹⁹¹
QVCTDINECETGQHNCVPN (配列番号:6)+ SVCINTRGSF (配列番号:7)	軟骨 (トリプシン)+ SF(CT)	NCVPN (配列番号:23)/ SVCIN (配列番号:38)	N ¹⁹⁴ /S ¹⁹⁵
QCGPCQPGFVGDQASGCQRRRAQ (配列番号:8)	SF(CT)	QRRRAQ (配列番号:24)/ RFCPD (配列番号:39)	Q ²²⁶ /R ²²⁷
IDVCPENAEVTLTDF (配列番号:9)	SF (トリプシン)	TLTDF (配列番号:25)/ RAFQT (配列番号:40)	F ⁵³¹ /R ⁵³²

10

20

30

40

【表 1 - 2】

NQGREIVQTMNS (配列番号:11)	SF (AspN)	NWVVL (配列番号:26)/ NQGRE (配列番号:41)	L ⁵⁵⁴ / N ⁵⁵⁵	
EIVQTMNSDPGLAVGY (配列番号:12)	軟骨 (トリプシン) + SF (トリプシン)	LAVGY (配列番号:27)/ TAFNG (配列番号:42)	Y ⁵⁷⁴ / T ⁵⁷⁵	10
EIVQTMNSDPGLAVGYTAF (配列番号:13)	軟骨 + SF (トリプシン)	GYTAF (配列番号:28)/ NGVDF (配列番号:43)	F ⁵⁷⁷ / N ⁵⁷⁸	
GDTESQVRLWK (配列番号:14)	SF (AspN)	ALWHT (配列番号:29)/ GDTES (配列番号:44)	T ⁶⁵⁷ / G ⁶⁵⁸	
WFLQHRPQ (配列番号:15)	軟骨 (トリプシン)	QHRPQ (配列番号:30)/ VGYIR (配列番号:45)	Q ⁶⁹¹ / V ⁶⁹²	20
FYEGPELVADSN (配列番号:16)	軟骨 (トリプシン)	VADSN (配列番号:31)/ VVLDT (配列番号:46)	N ⁷¹⁰ / V ⁷¹¹	
CFSQENIIWANLR (配列番号:17)	軟骨 (トリプシン)	RLGVF (配列番号:32)/ CFSQE (配列番号:47)	F ⁷²⁵ / C ⁷²⁶	30

【 0 0 8 2 】

結果から、病的な軟骨代謝回転中に存在する固有なネオエピトープが示される。

【 0 0 8 3 】

固有なネオエピトープの検出又はモニターは、病的な軟骨破壊を検出する新しい方法の一例である。この方法は、これらに限定されないが、RA、OA、ReA、乾癬性関節炎、若年性慢性関節炎、心臓血管疾患、腱の疾患、骨粗鬆症、骨軟化症、骨折修復、動脈硬化症、強皮症、線維症の皮膚、又は関節の外傷のような外傷等の疾患に罹患した患者を診断するのに使用できる。この方法は特にこのような疾患の早期診断において有用である。

【 0 0 8 4 】

本明細書で開示した方法は、疾患における病的な軟骨及びCOMP代謝回転を検出及びモニターすると予想される。これは、病的な軟骨破壊に固有な特異的COMPネオエピトープが同定されたことにより可能になる。

【 0 0 8 5 】

本実施形態の他の態様は、哺乳動物COMP、好ましくはヒトCOMPの単離されたC末端短縮フラグメントに関する。この態様によれば、

フラグメントのC末端は、配列番号1のアミノ酸77であり、フラグメントは、配列番号18のC末端から始まり配列番号18のN末端に向かって伸長する配列番号18の少な

10

20

30

40

50

くとも3個の連続したアミノ酸を含み、

フラグメントのC末端は、配列番号1のアミノ酸88であり、フラグメントは、配列番号19のC末端から始まり配列番号19のN末端に向かって伸長する配列番号19の少なくとも3個の連続したアミノ酸を含み、

フラグメントのC末端は、配列番号1のアミノ酸90であり、フラグメントは、配列番号20のC末端から始まり配列番号20のN末端に向かって伸長する配列番号20の少なくとも3個の連続したアミノ酸を含み、

フラグメントのC末端は、配列番号1のアミノ酸104であり、フラグメントは、配列番号21のC末端から始まり配列番号21のN末端に向かって伸長する配列番号21の少なくとも3個の連続したアミノ酸を含み、

フラグメントのC末端は、配列番号1のアミノ酸190であり、フラグメントは、配列番号22のC末端から始まり配列番号22のN末端に向かって伸長する配列番号22の少なくとも3個の連続したアミノ酸を含み、

フラグメントのC末端は、配列番号1のアミノ酸194であり、フラグメントは、配列番号23のC末端から始まり配列番号23のN末端に向かって伸長する配列番号23の少なくとも3個の連続したアミノ酸を含み、

フラグメントのC末端は、配列番号1のアミノ酸226であり、フラグメントは、配列番号24のC末端から始まり配列番号24のN末端に向かって伸長する配列番号24の少なくとも3個の連続したアミノ酸を含み、

フラグメントのC末端は、配列番号1のアミノ酸531であり、フラグメントは、配列番号25のC末端から始まり配列番号25のN末端に向かって伸長する配列番号25の少なくとも3個の連続したアミノ酸を含み、

フラグメントのC末端は、配列番号1のアミノ酸554であり、フラグメントは、配列番号26のC末端から始まり配列番号26のN末端に向かって伸長する配列番号26の少なくとも3個の連続したアミノ酸を含み、

フラグメントのC末端は、配列番号1のアミノ酸574であり、フラグメントは、配列番号27のC末端から始まり配列番号27のN末端に向かって伸長する配列番号27の少なくとも3個の連続したアミノ酸を含み、

フラグメントのC末端は、配列番号1のアミノ酸577であり、フラグメントは、配列番号28のC末端から始まり配列番号28のN末端に向かって伸長する配列番号28の少なくとも3個の連続したアミノ酸を含み、

フラグメントのC末端は、配列番号1のアミノ酸657であり、フラグメントは、配列番号29のC末端から始まり配列番号29のN末端に向かって伸長する配列番号29の少なくとも3個の連続したアミノ酸を含み、

フラグメントのC末端は、配列番号1のアミノ酸691であり、フラグメントは、配列番号30のC末端から始まり配列番号30のN末端に向かって伸長する配列番号30の少なくとも3個の連続したアミノ酸を含み、

フラグメントのC末端は、配列番号1のアミノ酸710であり、フラグメントは、配列番号31のC末端から始まり配列番号31のN末端に向かって伸長する配列番号31の少なくとも3個の連続したアミノ酸を含み、又は

フラグメントのC末端は、配列番号1のアミノ酸725であり、フラグメントは、配列番号32のC末端から始まり配列番号32のN末端に向かって伸長する配列番号32の少なくとも3個の連続したアミノ酸を含む。

【0086】

「所定のアミノ酸配列のC末端から始まり所定のアミノ酸配列のN末端に向かって伸長する所定のアミノ酸配列の少なくとも3個の連続したアミノ酸を含むフラグメント」は、本明細書で使用される場合、そのフラグメントが、少なくとも所定のアミノ酸配列のC末端におけるアミノ酸と；所定のアミノ酸配列のN末端方向に向かって、所定のアミノ酸配列のC末端から1つ手前のアミノ酸と、所定のアミノ酸配列のC末端から2つ手前のアミノ酸とを含むことを意味する。例えば、所定のアミノ酸配列が、配列番号18、すなわち

10

20

30

40

50

GMQQSであると仮定する。このような場合、フラグメントは少なくともQQSを含む。

【0087】

特定の実施形態において、フラグメントは、配列番号18～32のいずれかのC末端から始まり（表2の第4列を参照）配列番号18～32のいずれかのN末端に向かって伸長する、配列番号18～32のいずれかにおけるアミノ酸配列の少なくとも4個の連続したアミノ酸を含む。

【0088】

他の特定の実施形態において、フラグメントは、配列番号18～32のいずれかのC末端から始まり（表2の第4列を参照）配列番号18～32のいずれかのN末端に向かって伸長する配列番号18～32のいずれかにおけるアミノ酸配列の少なくとも5個の連続したアミノ酸を含む。したがって、この実施形態において、フラグメントは、配列番号18～32のいずれかにおけるアミノ酸配列を含む。特定の実施形態において、フラグメントは、配列番号18～32のいずれかにおけるアミノ酸配列からなる。

10

【0089】

他の変形は、5つより多くのアミノ酸、例えば6、7、8、9、10、11又は12個のアミノ酸を含む、単離されたC末端短縮フラグメントであり得る。このような場合において、C末端短縮フラグメントは、配列番号1のアミノ酸77、88、90、104、190、194、226、531、554、574、577、657、691、710又は725であるC末端を有し、さらに、配列番号1のアミノ酸77、88、90、104、190、194、226、531、554、574、577、657、691、710又は725から始まり配列番号1のN末端に向かって伸長する、配列番号1中の6、7、8、9、10、11又は12個のアミノ酸に対応するアミノ酸配列を有する。

20

【0090】

特定の実施形態において、単離されたC末端短縮フラグメントは、配列番号2、6、8、9、12、13、15、16、18～32のいずれかで定義されたアミノ酸配列を有し、好ましくは配列番号18～32のいずれかで定義されたアミノ酸配列を有する。

【0091】

本実施形態の他の態様は、哺乳動物COMP、好ましくはヒトCOMPの単離されたN末端短縮フラグメントに関する。この態様によれば、

30

フラグメントのN末端は、配列番号1のアミノ酸78であり、フラグメントは、配列番号33のN末端から始まり配列番号33のC末端に向かって伸長する配列番号33の少なくとも3個の連続したアミノ酸を含み、

フラグメントのN末端は、配列番号1のアミノ酸89であり、フラグメントは、配列番号34のN末端から始まり配列番号34のC末端に向かって伸長する配列番号34の少なくとも3個の連続したアミノ酸を含み、

フラグメントのN末端は、配列番号1のアミノ酸91であり、フラグメントは、配列番号35のN末端から始まり配列番号35のC末端に向かって伸長する配列番号35の少なくとも3個の連続したアミノ酸を含み、

フラグメントのN末端は、配列番号1のアミノ酸105であり、フラグメントは、配列番号36のN末端から始まり配列番号36のC末端に向かって伸長する配列番号36の少なくとも3個の連続したアミノ酸を含み、

40

フラグメントのN末端は、配列番号1のアミノ酸191であり、フラグメントは、配列番号37のN末端から始まり配列番号37のC末端に向かって伸長する配列番号37の少なくとも3個の連続したアミノ酸を含み、

フラグメントのN末端は、配列番号1のアミノ酸195であり、フラグメントは、配列番号38のN末端から始まり配列番号38のC末端に向かって伸長する配列番号38の少なくとも3個の連続したアミノ酸を含み、

フラグメントのN末端は、配列番号1のアミノ酸227であり、フラグメントは、配列番号39のN末端から始まり配列番号39のC末端に向かって伸長する配列番号39の少

50

なくとも 3 個の連続したアミノ酸を含み、

フラグメントの N 末端は、配列番号 1 のアミノ酸 5 3 2 であり、フラグメントは、配列番号 4 0 の N 末端から始まり配列番号 4 0 の C 末端に向かって伸長する配列番号 4 0 の少なくとも 3 個の連続したアミノ酸を含み、

フラグメントの N 末端は、配列番号 1 のアミノ酸 5 5 5 であり、フラグメントは、配列番号 4 1 の N 末端から始まり配列番号 4 1 の C 末端に向かって伸長する配列番号 4 1 の少なくとも 3 個の連続したアミノ酸を含み、

フラグメントの N 末端は、配列番号 1 のアミノ酸 5 7 5 であり、フラグメントは、配列番号 4 2 の N 末端から始まり配列番号 4 2 の C 末端に向かって伸長する配列番号 4 2 の少なくとも 3 個の連続したアミノ酸を含み、

フラグメントの N 末端は、配列番号 1 のアミノ酸 5 7 8 であり、フラグメントは、配列番号 4 3 の N 末端から始まり配列番号 4 3 の C 末端に向かって伸長する配列番号 4 3 の少なくとも 3 個の連続したアミノ酸を含み、

フラグメントの N 末端は、配列番号 1 のアミノ酸 6 5 8 であり、フラグメントは、配列番号 4 4 の N 末端から始まり配列番号 4 4 の C 末端に向かって伸長する配列番号 4 4 の少なくとも 3 個の連続したアミノ酸を含み、

フラグメントの N 末端は、配列番号 1 のアミノ酸 6 9 2 であり、フラグメントは、配列番号 4 5 の N 末端から始まり配列番号 4 5 の C 末端に向かって伸長する配列番号 4 5 の少なくとも 3 個の連続したアミノ酸を含み、

フラグメントの N 末端は、配列番号 1 のアミノ酸 7 1 1 であり、フラグメントは、配列番号 4 6 の N 末端から始まり配列番号 4 6 の C 末端に向かって伸長する配列番号 4 6 の少なくとも 3 個の連続したアミノ酸を含み、又は

フラグメントの N 末端は、配列番号 1 のアミノ酸 7 2 6 であり、フラグメントは、配列番号 4 7 の N 末端から始まり配列番号 4 7 の C 末端に向かって伸長する配列番号 4 7 の少なくとも 3 個の連続したアミノ酸を含む。

【 0 0 9 2 】

本明細書で使用される場合、「所定のアミノ酸配列の N 末端から始まり所定のアミノ酸配列の C 末端に向かって伸長する所定のアミノ酸配列の少なくとも 3 個の連続したアミノ酸を含むフラグメント」は、そのフラグメントが、少なくとも所定のアミノ酸配列の N 末端におけるアミノ酸と；所定のアミノ酸配列の C 末端方向に向かって、所定のアミノ酸配列の N 末端の次のアミノ酸と、所定のアミノ酸配列の N 末端から 2 番目のアミノ酸とを含むことを意味する。例えば、所定のアミノ酸配列が、配列番号 3 3、すなわち V R T G L であると仮定する。このような場合、フラグメントは、少なくとも V R T を含む。

【 0 0 9 3 】

特定の実施形態において、フラグメントは、配列番号 3 3 ~ 4 7 のいずれかの N 末端から始まり（表 2 の第 4 列を参照）配列番号 3 3 ~ 4 7 のいずれかの C 末端に向かって伸長する配列番号 3 3 ~ 4 7 のいずれかにおけるアミノ酸配列の少なくとも 4 個の連続したアミノ酸を含む。

【 0 0 9 4 】

他の特定の実施形態において、フラグメントは、配列番号 3 3 ~ 4 7 のいずれかの N 末端から始まり（表 2 の第 4 列を参照）配列番号 3 3 ~ 4 7 のいずれかの C 末端に向かって伸長する配列番号 3 3 ~ 4 7 のいずれかにおけるアミノ酸配列の少なくとも 5 個の連続したアミノ酸を含む。したがって、この実施形態において、フラグメントは、配列番号 3 3 ~ 4 7 のいずれかにおけるアミノ酸配列を含む。特定の実施形態において、フラグメントは、配列番号 3 3 ~ 4 7 のいずれかにおけるアミノ酸配列からなる。

【 0 0 9 5 】

他の変形は、5 つより多くのアミノ酸、例えば 6、7、8、9、10、11 又は 12 個のアミノ酸を含む、単離された N 末端短縮フラグメントであり得る。このような場合において、N 末端短縮フラグメントは、配列番号 1 のアミノ酸 7 8、8 9、9 1、1 0 5、1 9 1、1 9 5、2 2 7、5 3 2、5 5 5、5 7 5、5 7 8、6 5 8、6 9 2、7 1 1 又は

10

20

30

40

50

726であるN末端を有し、さらに、配列番号1のアミノ酸78、89、91、105、191、195、227、532、555、575、578、658、692、711又は726から始まり配列番号1のC末端に向かって伸長する配列番号1中の6、7、8、9、10、11又は12個のアミノ酸に対応するアミノ酸配列を有する。

【0096】

特定の実施形態において、単離されたN末端短縮フラグメントは、配列番号3～5、7、10、11、14、17、33～47のいずれかで定義されたアミノ配列、好ましくは配列番号33～47のいずれかで定義されたアミノ配列を有する。

【0097】

またより長いフラグメントも、末端アミノ酸が表2に記載のペプチド(表2の「位置」の下のアミノ酸で示される)の末端アミノ酸と同一である限りは使用が可能である。

10

【0098】

ペプチドは、それ自体が抗原性ではない場合がある。それゆえに、ペプチドは、外来タンパク質又はペプチド担体とカップリングすることが多く、それによってハプテンとして作用する。通常、このようなペプチド担体は、調査される任意の種で発生しないでこのペプチド担体への抗体の反応が回避されるように選ばれる。この方式では、反応性は、短いペプチド上のネオエピトープに限定されると予想される。

【0099】

本実施形態のさらなる態様は、少なくとも1種の哺乳動物COMP、好ましくはヒトCOMPのネオエピトープに対する抗体の産生に使用されるように構成されたコンジュゲートに関する。少なくとも1種のネオエピトープは、配列番号1で定義された前記哺乳動物COMPのアミノ酸配列の77位(S⁷⁷)～78位(V⁷⁸)；88位(L⁸⁸)～89位(L⁸⁹)；90位(H⁹⁰)～91位(C⁹¹)；104位(Q¹⁰⁴)～105位(T¹⁰⁵)；190位(N¹⁹⁰)～191位(C¹⁹¹)；194位(N¹⁹⁴)～195位(S¹⁹⁵)；226位(Q²²⁶)～227位(R²²⁷)；531位(F⁵³¹)～532位(R⁵³²)；554位(L⁵⁵⁴)～555位(N⁵⁵⁵)；574位(Y⁵⁷⁴)～575位(T⁵⁷⁵)；577位(F⁵⁷⁷)～578位(N⁵⁷⁸)；657位(T⁶⁵⁷)～658位(G⁶⁵⁸)；691位(Q⁶⁹¹)～692位(V⁶⁹²)、710位(N⁷¹⁰)～711位(V⁷¹¹)；及び725位(F⁷²⁵)～726位(C⁷²⁶)からなる群から選択される少なくとも1つの切断部位又はそれらの組み合わせで哺乳動物COMPを切断することによって形成される。本コンジュゲートは、ペプチド担体にカップリングした、又はペプチド担体と混合した、上記に係る少なくとも1つの単離されたC末端短縮フラグメント、及び/又は上記に係る少なくとも1つの単離されたN末端短縮フラグメントを含む。

20

30

【0100】

一実施形態において、少なくとも1つの単離されたC末端短縮フラグメントは、そのN末端を介してペプチド担体にカップリングし、少なくとも1つの単離されたN末端短縮フラグメントは、そのC末端を介してペプチド担体にカップリングしている。

【0101】

特定の実施形態において、ペプチド担体は、キーホールリンペットヘモシニアン(KLH)及びオバルブミンからなる群から選択される。

【0102】

またペプチド担体は、ペプチド又はフラグメントに共有結合でカップリングさせないで使用することもでき、すなわちフラグメントと混合して提供されてもよい。

40

【0103】

インビトロでの単離されたC末端短縮及び/又はN末端短縮フラグメントの調製は、発現させようとするフラグメントをコードするポリヌクレオチド配列を含む組換えDNA発現ベクターを使用してフラグメントを発現させる方法によって行うことができる。次いで、宿主細胞によりフラグメントが発現されるように、適合性のある原核性又は真核性の宿主細胞を発現ベクターで形質転換する。フラグメントを産生するのに好適な増殖培地中で形質転換宿主細胞を培養する。

【0104】

50

本実施形態のさらなる態様は、上記に係る単離されたC末端短縮フラグメント、及び/又は上記に係る単離されたN末端短縮フラグメントをコードする単離されたポリヌクレオチド配列、このような単離されたポリヌクレオチド配列を含む組換え発現ベクター、及びこのような組換え発現ベクターで形質転換された宿主細胞に関する。

【0105】

本実施形態のさらなる態様は、配列番号1で定義された哺乳動物COMPのアミノ酸配列の77位(S⁷⁷)~78位(V⁷⁸);88位(L⁸⁸)~89位(L⁸⁹);90位(H⁹⁰)~91位(C⁹¹);104位(Q¹⁰⁴)~105位(T¹⁰⁵);190位(N¹⁹⁰)~191位(C¹⁹¹);194位(N¹⁹⁴)~195位(S¹⁹⁵);226位(Q²²⁶)~227位(R²²⁷);531位(F⁵³¹)~532位(R⁵³²);554位(L⁵⁵⁴)~555位(N⁵⁵⁵);574位(Y⁵⁷⁴)~575位(T⁵⁷⁵);577位(F⁵⁷⁷)~578位(N⁵⁷⁸);657位(T⁶⁵⁷)~658位(G⁶⁵⁸);691位(Q⁶⁹¹)~692位(V⁶⁹²);710位(N⁷¹⁰)~711位(V⁷¹¹);及び725位(F⁷²⁵)~726位(C⁷²⁶)からなる群から選択される少なくとも1つの切断部位又はそれらの組み合わせで哺乳動物COMPを切断することにより形成された少なくとも1種のネオエピトープに特異的に結合する抗体を産生するための、上記に係る単離されたC末端短縮フラグメント、上記に係る単離されたN末端短縮フラグメント、及び/又は上記に係るコンジュゲートの使用に関する。

10

【0106】

本実施形態の関連する態様は、配列番号1で定義された哺乳動物COMPのアミノ酸配列の77位(S⁷⁷)~78位(V⁷⁸);88位(L⁸⁸)~89位(L⁸⁹);90位(H⁹⁰)~91位(C⁹¹);104位(Q¹⁰⁴)~105位(T¹⁰⁵);190位(N¹⁹⁰)~191位(C¹⁹¹);194位(N¹⁹⁴)~195位(S¹⁹⁵);226位(Q²²⁶)~227位(R²²⁷);531位(F⁵³¹)~532位(R⁵³²);554位(L⁵⁵⁴)~555位(N⁵⁵⁵);574位(Y⁵⁷⁴)~575位(T⁵⁷⁵);577位(F⁵⁷⁷)~578位(N⁵⁷⁸);657位(T⁶⁵⁷)~658位(G⁶⁵⁸);691位(Q⁶⁹¹)~692位(V⁶⁹²);710位(N⁷¹⁰)~711位(V⁷¹¹);及び725位(F⁷²⁵)~726位(C⁷²⁶)からなる群から選択される少なくとも1つの切断部位又はそれらの組み合わせで哺乳動物COMPを切断することにより形成された少なくとも1種のネオエピトープに特異的に結合する抗体の産生方法を定義する。本方法は、上記に係る単離されたC末端短縮フラグメント、上記に係る単離されたN末端短縮フラグメント、及び/又は上記に係るコンジュゲートに対する抗体を発生させるステップと、抗体を単離するステップとを含む。

20

【0107】

本実施形態の他の関連する態様は、上記に係る単離されたC末端短縮フラグメント、上記に係る単離されたN末端短縮フラグメント、及び/又は上記に係るコンジュゲートに対する単離された抗体を定義する。単離された抗体は、配列番号1で定義された哺乳動物COMPのアミノ酸配列の77位(S⁷⁷)~78位(V⁷⁸);88位(L⁸⁸)~89位(L⁸⁹);90位(H⁹⁰)~91位(C⁹¹);104位(Q¹⁰⁴)~105位(T¹⁰⁵);190位(N¹⁹⁰)~191位(C¹⁹¹);194位(N¹⁹⁴)~195位(S¹⁹⁵);226位(Q²²⁶)~227位(R²²⁷);531位(F⁵³¹)~532位(R⁵³²);554位(L⁵⁵⁴)~555位(N⁵⁵⁵);574位(Y⁵⁷⁴)~575位(T⁵⁷⁵);577位(F⁵⁷⁷)~578位(N⁵⁷⁸);657位(T⁶⁵⁷)~658位(G⁶⁵⁸);691位(Q⁶⁹¹)~692位(V⁶⁹²);710位(N⁷¹⁰)~711位(V⁷¹¹);及び725位(F⁷²⁵)~726位(C⁷²⁶)からなる群から選択される少なくとも1つの切断部位又はそれらの組み合わせで哺乳動物COMPを切断することにより形成された少なくとも1種のネオエピトープに特異的に結合する。

30

40

【0108】

本実施形態のさらなる関連する態様は、病的な軟骨代謝回転の決定で使用するための、上記に係る単離された抗体を定義する。

【0109】

フラグメント又はコンジュゲートに対する抗体は、本実施形態に係る1種若しくは複数のフラグメント、1種若しくは複数のペプチド、及び/又は1種若しくは複数のコンジュゲートで動物を免疫化することにより得てもよい。免疫動物は、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ヒト以外の霊長類、ヤギ、ウマ、及びトリからなる群から選択できる。

【0110】

50

また本実施形態に係る抗体は、本実施形態に係る1種若しくは複数のフラグメント、1種若しくは複数のペプチド、及び/又は1種若しくは複数のコンジュゲートを使用するインビトロでの免疫化方法により得てもよい。

【0111】

本発明に係る抗体は、ポリクローナル抗体であってもよいし、又はモノクローナル抗体であってもよい。

【0112】

本発明に係る抗体の産生は、ファージディスプレイアプローチを含んでいてもよい。ファージディスプレイアプローチで抗体を生成する場合、抗体は、リガンド、抗体の1種若しくは複数のフラグメント、例えばFab(フラグメント抗原結合)フラグメント若しくはF(ab)'₂フラグメント(2つのFabを含有するフラグメント)、又は無傷の抗体である可能性がある。

10

【0113】

本発明に係る抗体は、本実施形態のネオエピトープの検出に使用することができ、したがって例えば、哺乳動物対象が、病的な軟骨代謝回転を有するか、又は病的な軟骨代謝回転に罹患しているかどうかを決定する目的のために、サンプル中でこのようなネオエピトープ(neoepitopes)を検出することに使用できる。

【0114】

本実施形態のさらにその他の態様は、サンプル中で、上記に係る哺乳動物COMPの単離されたC末端短縮フラグメント、上記に係る哺乳動物COMPの単離されたN末端短縮フラグメント、上記に係るコンジュゲート、又はそれらの任意の組み合わせの存在を検出する方法に関する。本方法は、試薬が、哺乳動物COMPの単離されたC末端短縮フラグメント、哺乳動物COMPの単離されたN末端短縮フラグメント、及び/又はコンジュゲートと選択的に相互作用すると予想される条件下で、サンプルと、哺乳動物COMPの単離されたC末端短縮フラグメント、哺乳動物COMPの単離されたN末端短縮フラグメント、及び/又はコンジュゲートと選択的に相互作用する好適な試薬とを接触させるステップを含む。本方法はまた、試薬と、哺乳動物COMPの単離されたC末端短縮フラグメント、哺乳動物COMPの単離されたN末端短縮フラグメント、及び/又はコンジュゲートとの相互作用を検出し、それによってサンプル中の哺乳動物COMPの単離されたC末端短縮フラグメント、哺乳動物COMPの単離されたN末端短縮フラグメント、及び/又はコンジュゲートを検出するステップも含む。

20

30

【0115】

一実施形態において、哺乳動物COMPの単離されたC末端短縮フラグメント、哺乳動物COMPの単離されたN末端短縮フラグメント、及び/又はコンジュゲートと選択的に相互作用する試薬は、哺乳動物COMPの単離されたC末端短縮フラグメント、哺乳動物COMPの単離されたN末端短縮フラグメント、及び/又はコンジュゲートに特異的に結合する抗体若しくはそれらのフラグメントである。

【0116】

さらなる態様は、哺乳動物対象、好ましくはヒト対象からのサンプル中で、上記に係る哺乳動物COMPの単離されたC末端短縮フラグメント、上記に係る哺乳動物COMPの単離されたN末端短縮フラグメント、及び/又は上記に係るコンジュゲートの存在を検出する方法に関する。本方法は、サンプルと、哺乳動物COMPの単離されたC末端短縮フラグメント、哺乳動物COMPの単離されたN末端短縮フラグメント、及び/又はコンジュゲートに特異的に結合する抗体若しくはそれらのフラグメントとを接触させるステップを含む。本方法はまた、抗体又はそれらのフラグメントと、哺乳動物COMPの単離されたC末端短縮フラグメント、哺乳動物COMPの単離されたN末端短縮フラグメント、及び/又はコンジュゲートとの複合体を検出し、それによってサンプル中の哺乳動物COMPの単離されたC末端短縮フラグメント、哺乳動物COMPの単離されたN末端短縮フラグメント、及び/又はコンジュゲートを検出するステップも含む。

40

【0117】

50

実施形態において、サンプルは、軟骨サンプル、体液サンプル、又はそれらの任意の組み合わせである。特定の実施形態において、体液サンプルは、滑液サンプル、血清サンプル、血漿サンプル、尿サンプル、又はそれらの任意の組み合わせである。

【0118】

一実施形態において、サンプルは、病的な軟骨代謝回転を有する疑いのある対象からのサンプルである。

【0119】

一実施形態において、サンプル中で哺乳動物COMPの単離されたC末端短縮フラグメント、哺乳動物COMPの単離されたN末端短縮フラグメント、及び又はコンジュゲートの存在を検出する場合、対象は、病的な軟骨代謝回転を有すると診断される。

10

【実施例】

【0120】

(例1)

表2に表示された、COMP(配列番号1)の病的な切断によって生成したネオエピトープを示すペプチドを合成し、標準的なプロトコールに従ってウサギを免疫化するのに使用する。配列中のその番号で表示される切断部位によって切り離された最も末端にある非置換アミノ酸と、3つのグリシン残基の配列と、続いて逆の末端にシステインとを含む、表2(第3列)に表示された5つの末端アミノ酸を含有するペプチドを合成した。これらのペプチドをそれらの末端のシステインを介してキーホールリンペットヘモシニアン(Key Limpet Hemocyanin)に連結し、標準的なプロトコールによってウサギを免疫化するのに使用する。ペプチド合成及び抗体産生は、Genscript Ltd(Hong Kong)によって提供される標準的な方法を使用する顧客サービスである。

20

【0121】

産生された抗体の力価を固相アッセイにより評価した。切断部位に相当する末端アミノ酸を有し、タンパク質の天然配列の隣接する7つのアミノ酸を包含するペプチドを使用して、PBS緩衝液中1 μ g/mlでポリスチレン製マイクロタイタープレート(Nunc、Maxisorp)をコーティングした。コーティングしたペプチドそれぞれに抗血清を様々な希釈率(5段階で1:200から1:25000)で添加し、当業界で知られている標準的な方法に従って、ブタ抗ウサギアルカリホスファターゼコンジュゲート抗体により結合した抗体を検出した。

30

【0122】

図1に力価曲線を示す。

【0123】

(例2)

関節の吸引により滑液を収集して、即座に遠心分離して細胞や任意の粒子を除去する。滑液を、血清サンプルのようなサンプル希釈剤で1:10に希釈する。

【0124】

競合ELISAアッセイをネオエピトープ用を開発し、これを適用して、RA又はOAを有する患者からの滑液サンプル及び健康なドナーからの対照血液サンプル中のそれぞれのCOMPフラグメントを定量した。

40

【0125】

湿潤したチャンパー中で、96ウェルのマイクロタイタープレート(Nunc-Immuno plates、Maxisorp、Nunc Intermed Ltd、Copenhagen、Denmark)を、PBS(pH7)中25ng/mlの8アミノ酸のCOMPペプチドCEVTLTDF⁵³¹(50 μ l)と共に室温で一晩コーティングした。プレートを0.15Mの塩化ナトリウム及び0.05%(w/v)トウイーン20ですすいだ後、PBS(pH7.5)中2mg/mlのウシ血清アルブミン(Sigma-Aldrich)120 μ lでポリスチレン表面の遊離の結合部位を室温で1時間ブロックした。

50

【0126】

COMPペプチドCEVTLTDFを標準として使用して検量線を作成した。0.5% BSA、0.8% (w/v) SDS、0.1M塩化ナトリウム中10mMのEDTA、0.05Mのリン酸ナトリウム (pH 7.5) の溶液で標準を希釈した (0.244 ng/ml から 250 ng/ml に)。滑液及び血清のサンプルを、0.8% (w/v) SDS、10mMのEDTA、0.1Mの塩化ナトリウム、0.05Mのリン酸ナトリウム (pH 7.5) で10倍に希釈した。湿潤したチャンバーで、30マイクロリットルの希釈した標準及びサンプルを、ステライリンプレート (Bibby Sterilin Ltd.、UK) 中で室温で一晩インキュベートした。次の日、ステライリンプレートに、10mMのリン酸塩 (NaH₂PO₄) (pH 7.5) 中の4%トリトンで希釈した抗体 (1:15000の抗CEVTLTDF) 30µlを添加した。室温で1時間ブレインキュベートした後、50µlのこの混合物をヌクプレートのコーティング済みウェルに添加した。室温で1時間インキュベートした後、プレートを上述したようにしてすすぎ、2mg/mlのウシ血清アルブミン、0.1Mの塩化ナトリウム、0.05Mのリン酸ナトリウム (pH 7.5) 中のアルカリホスファターゼとコンジュゲートしたブタ抗ウサギIgG (DAKOA/S、Denmark) の1:1000希釈液50µlを添加することによって結合した抗体を検出した。室温で1時間インキュベートした後、プレートを上述したようにしてすすぎ、100µlの基質 (0.5MのMgCl₂を含有する1Mジエタノールアミン (pH 9.8) 中の1mg/ml p-ニトロフェニルホスファート) を添加した。405nmで各サンプル及び標準の吸光度をマイクロプレートリーダー (Expert 96、AsysHitech、Austria) により二連で測定した。Mikrowin 200ソフトウェアプログラム (AsysHitech、Austria) を使用して、検量線をプロットして、分析したサンプル中のCOMPネオエピトープの含量を計算した。図2に、RA及びOAそれぞれからの滑液中の測定されたCOMPフラグメントのレベルを示す。

【0127】

(例3)

滑液サンプル (50µl) を、1倍量の100mMのリン酸ナトリウム (pH 7.5)、20mMのEDTA、及び1MのNaClで希釈した。希釈した滑液に、50mMのリン酸ナトリウム (pH 7.5)、10mMのEDTA、及び0.5MのNaCl中の50% (w/v) ポリエチレン-グリコール6000 (Merck KGaA、Germany) 35µlを添加した。この混合物を室温で60分インキュベートし、次いで1200g、4で15分遠心分離した。収集されたペレットを200µlの20mMのトリス、150mMのNaCl (pH 7.4) に再懸濁し、75µlのプロテインAセファロースを含有するチューブに移した。この混合物を15分インキュベートし、チューブを300gで2分遠心分離した。上清を収集し、9倍量の95%エタノールで沈殿させた。沈殿したタンパク質を、還元のための10%の2-メルカプトエタノール含有又は非含有の電気泳動サンプル緩衝液 (2% SDS、0.125Mのトリス-HCl (pH 6.8)、0.002% ブロモフェノールブルー、及び20%グリセロール) に溶解させ、100で4分沸騰させ、4%スタッキングゲルを含む濃度勾配ポリアクリルアミド (4~16%) スラブゲル上で分離した。分離したタンパク質をニトロセルロースメンブレン (Millipore) に移した。免疫プロットング用に、メンブレンを、0.05% トウイン20含有トリス緩衝食塩水 (pH 7.2) 中の3% ウシ血清アルブミン中で4で一晩ブロックし、次いでトリス緩衝食塩水 (pH 7.2) 中3%のウシ血清アルブミンで1:2000に希釈した抗体と共に室温で1時間インキュベートした。0.05% トウイン20含有トリス緩衝食塩水 (pH 7.2) で3回洗浄した後、一次抗体として同じ溶液で1:25000に希釈した抗ウサギIgGホースラディッシュペルオキシダーゼ二次抗体 (Jackson Laboratories、USA) を添加し、室温で1時間インキュベートした。洗浄後、ECLウェスタンプロットング検出システム (Thermo Scientific) でシグナルを発生させ、Agfa Cronex 5フィルムを使用

して検出した。図3に、ネオエピトープ抗体のうち1種を用いたウェスタンブロットを示す。

【0128】

(例4)

プロテインAセファロースステップの後に12.5%のPEG6000を用いて2回目の沈殿ステップを行いサンプル体積を少なくしたことを除いては、例3で説明されているようにして滑液サンプルを調製した。ペレットをトリス緩衝液食塩水(pH7.2)に再懸濁して、滑液の元の体積にした。サンプルのアリコート還元し(10mMのジチオスレイトール、DTT)、アルキル化し(50mMのヨードアセトアミド、IAA)、その後、トリプシン(Promega)を用いて37°Cで一晩消化した。トリプシン処理したサンプルを、脱塩のために30kDaのスピンフィルター(Nanosep 30k、PALL life sciences)、続いてC₁₈スピンフィルター(SS18V、Nest Group, Inc., USA)に通過させてろ過した。1.25μlの滑液サンプルに相当する注人体積を、トリプル四重極型質量分析計(TSQ Vantage、Thermo Scientific, USA)に注入し、ネオエピトープペプチド(S¹⁹⁵VCINTR)に関して多重反応モニタリング(MRM)実験を行った。ペプチド前駆体(425.22、2+)からフラグメントイオンy₄、y₅、及びy₆が測定された。図4に示されたこれらのフラグメントのシグナル(転位)の合計によれば、二重の注入(a、b)は、それぞれ2つの急性外傷サンプル及び2つの関節リウマチサンプルに関してなされた。急性外傷サンプルは、RAサンプルよりも高いレベルのネオエピトープを含有していたが、それでもなお試験された全てのサンプルでネオエピトープが検出された。この例におけるサンプルは、ネオエピトープを発見するためのサンプルとは異なることに留意されたい。加えて、実際の切断部位の相補側は、初期OAの組織からの組織サンプル(上述したように、グループ3)で検出された。

10

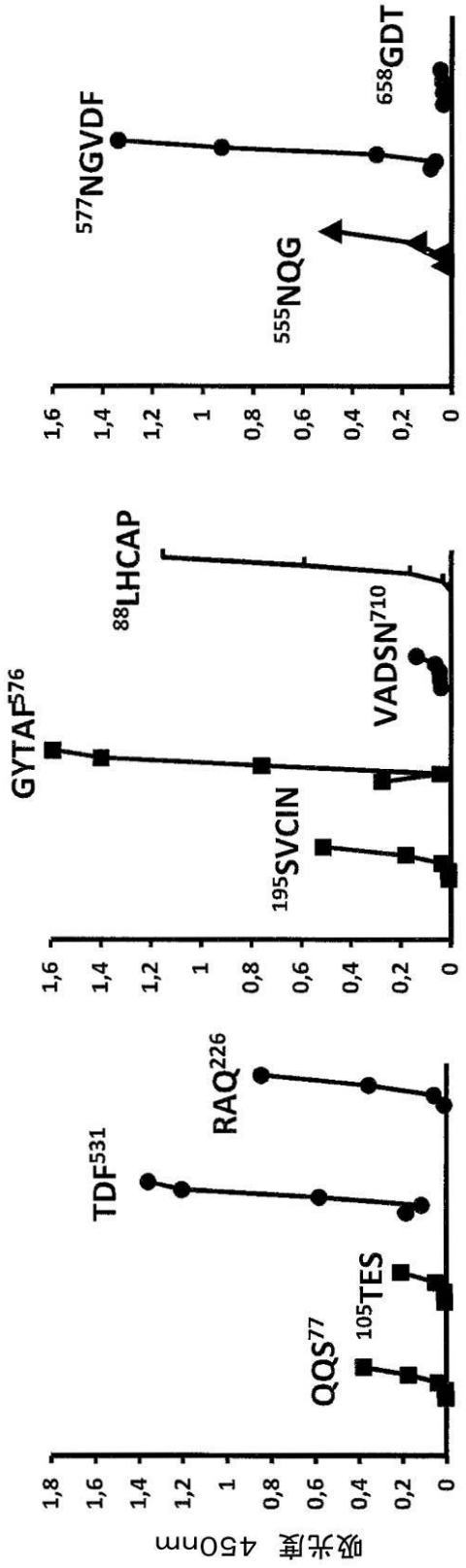
20

【0129】

上記で説明した実施形態は、本発明の説明に役立ついくつかの例として理解されるものとする。本発明の範囲から逸脱することなく本実施形態に様々な改変、組み合わせ、及び変化をなすことができることが当業者であれば理解できるであろう。特に、技術的に可能であれば、異なる実施形態における異なる部分の溶液を他の構成で組み合わせてもよい。しかしながら、本発明の範囲は添付の特許請求の範囲によって定義される。

30

【 図 1 】



抗体の希釈率 1 / 25000 ~ 1 / 200

図 1

【 図 2 】

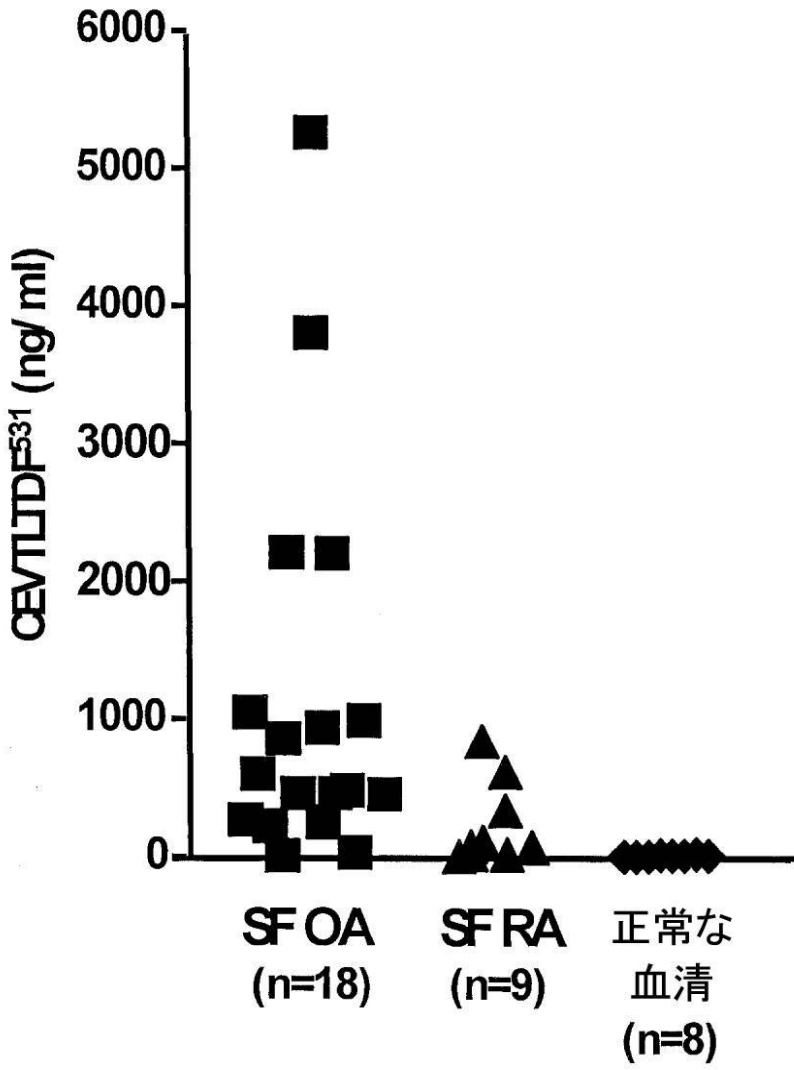


図 2

【 图 3 】

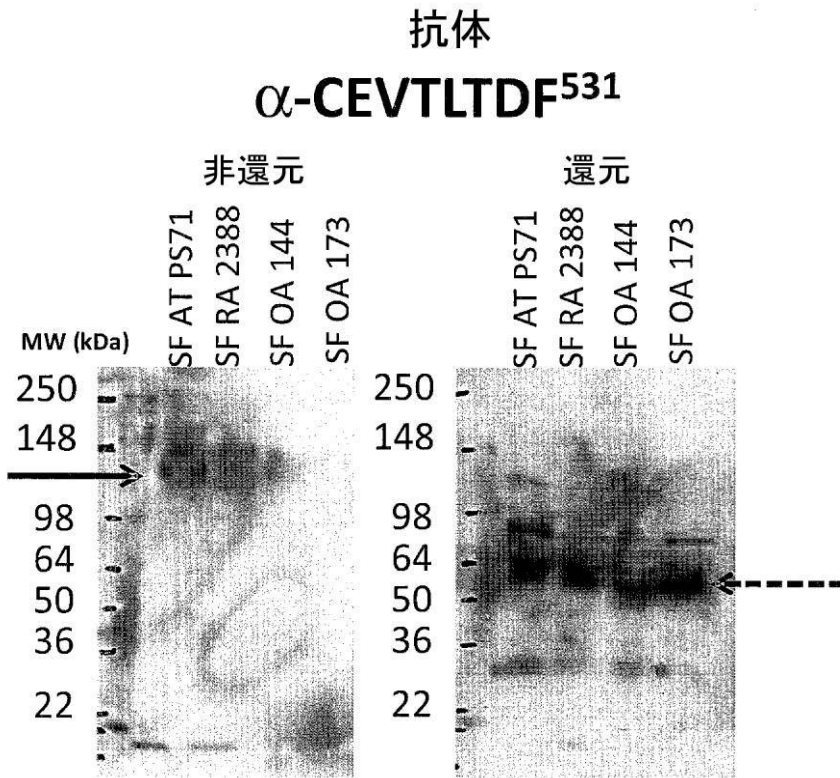


图 3

【 図 4 】

強度
ピークエリア

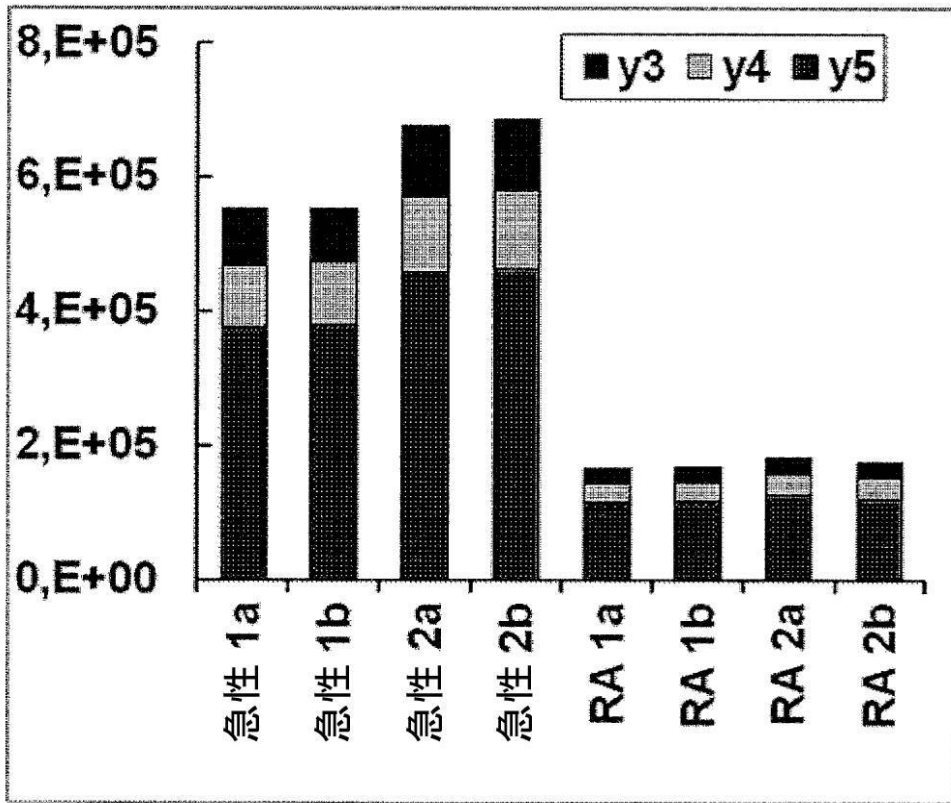


図 4

【 配列表 】

2015522817000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/SE2013/050809

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: see extra sheet According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC: C07K, G01N Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched SE, DK, FI, NO classes as above Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, PAJ, WPI data, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, INSPEC, MEDLINE, Registry		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Tenson T. et al., Erythromycin Resistance Peptides Selected from Random Peptide Libraries, 1997, J. Biol. Chem., Vol. 272, No. 28, pages 17425-17430; figure 3C --	8, 12-17
X	WO 2012078760 A1 (ADVANCED TECHNOLOGIES AND REGENERATIVE MEDICINE, LLC), 14 June 2012 (2012-06-14); SEQ. ID. NO. 28 --	8, 12-17
A	WO 2005116658 A2 (ANAMAR MEDICAL AB), 8 December 2005 (2005-12-08) --	1-9, 12-17
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 29-11-2013		Date of mailing of the international search report 29-11-2013
Name and mailing address of the ISA/SE Patent- och registreringsverket Box 5055 S-102 42 STOCKHOLM Facsimile No. + 46 8 668 02 86		Authorized officer Anna Björklund Telephone No. + 46 8 782 25 00

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/SE2013/050809

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Fosang A. J. et al., Neopeptides as biomarkers of cartilage catabolism, 2003, Inflammation Research, Vol. 52, pages 277-282 --	1-9, 12-17
A	Lai Y., et al., Enhanced COMP catabolism detected in serum of patients with arthritis and animal disease models through a novel capture ELISA, 2012, Osteoarthritis and Cartilage, Vol. 20, pages 854-862 --	1-9, 12-17
A	Neidhart M. et al., Small fragments of Cartilage Oligomeric Matrix Protein in synovial fluid and serum as markers for cartilage degradation, 1997, British Journal of Rheumatology, Vol. 36, pages 1151-1160 --	1-9, 12-17
A	WO 9807035 A1 (CIBA GEIGY AG ET AL), 19 February 1998 (1998-02-19) --	1-9, 12-17
A	WO 2011109738 A1 (UNIV MISSOURI ET AL), 9 September 2011 (2011-09-09) --	1-9, 12-17
A	WO 2011102908 A2 (UNIV DUKE ET AL), 25 August 2011 (2011-08-25) -- -----	1-9, 12-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/SE2013/050809

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

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 No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

1: Claims 1-9 and 12-17 (all partially) directed to a method of determining pathological cartilage turnover comprising detecting the presence of a neoepitope on the C-terminally truncated fragment formed by cleavage of mammalian COMP at the cleavage site between positions 77 and 78; directed to C-terminally truncated fragments of COMP wherein a C-terminal of said fragment is amino acid 77 of SEQ ID NO:1 and said fragment comprises at least three consecutive amino acids of SEQ ID NO:18 starting from a C-terminal of SEQ ID NO:18 and extending towards an N-terminal of SEQ ID NO:18, or a fragment having the
.../...

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-9, 12-17 (all partially)

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/SE2013/050809**Continuation of:** Box No. III

amino acid sequence as defined in SEQ ID NO:18; directed to conjugates comprising a fragment according to the above, or to the use of such a fragment for the production of antibodies that specifically bind to the neoepitope; directed to an isolated antibody against a fragment according to the above wherein the antibody specifically binds to the neoepitope.

2-15: Claims 1-9 and 12-17 (all partially) directed to a method of determining pathological cartilage turnover comprising detecting the presence of a neoepitope on the C-terminally truncated fragment formed by cleavage of COMP at a cleavage site between positions 90 and 91, between positions 104 and 105... or between positions 725 and 726, respectively; directed to C-terminally truncated fragments of COMP wherein a C-terminal of said fragment is amino acid 90, 104... or 725 of SEQ ID NO:1, respectively and said fragment comprises at least three consecutive amino acids of SEQ ID NO:20, 21... or 32, respectively starting from a C-terminal of SEQ ID NO:20, 21... or 32, respectively and extending towards an N-terminal of SEQ ID NO:20, 21... or 32, respectively or a fragment having the amino acid sequence as defined in SEQ ID NO:20, 21... or 32, respectively; directed to conjugates comprising a fragment according to the above, or to the use of such a fragment for the production of antibodies that specifically bind to the neoepitope; directed to an isolated antibody against a fragment according to the above wherein the antibody specifically binds to the neoepitope.

16: Claims 1-7 and 10-17 (all partially) directed to a method of determining pathological cartilage turnover comprising detecting the presence of a neoepitope on the N-terminally truncated fragment formed by cleavage of mammalian COMP at a cleavage site between positions 77 and 78; directed to N-terminally truncated fragments of COMP wherein an N-terminal of said fragment is amino acid 78 of SEQ ID NO:1 and said fragments comprise at least three consecutive amino acids of SEQ ID NO:33 starting from an N-terminal of SEQ ID NO:33 and extending towards a C-terminal of SEQ ID NO:33, or a fragment having the amino acid sequence as defined in SEQ ID NO:33; directed to conjugates comprising a fragment according to the above, or to the use of such a fragment for the production of antibodies that specifically bind to the neoepitope; directed to an isolated antibody against a fragment according to the above wherein the antibody specifically binds to the neoepitope.

17-30: Claims 1-7 and 10-17 (all partially) directed to a method of determining pathological cartilage turnover comprising detecting the presence of a neoepitope on the N-terminally truncated fragment formed by cleavage of COMP at a cleavage site between positions 90 and 91, between positions 104 and 105... or between positions 725 and 726, respectively; directed to N-terminally truncated fragments of COMP wherein an N-terminal of said fragments is amino acid 89, 91... or 726 of SEQ ID NO:1, respectively and said fragment comprises at least three consecutive amino acids of SEQ ID NO:34, 35... or 47, respectively starting from an N-terminal of SEQ ID NO:34, 35... or 47, respectively and extending towards a C-terminal of SEQ ID NO:34, 35... or 47, respectively or a fragment having the amino acid sequence as defined in SEQ ID NO:34, 235... or 47, respectively; directed to conjugates comprising a fragment according to the above, or to the use of such a fragment for the production of antibodies that specifically bind to the neoepitope; directed to an isolated antibody against a fragment according to the above wherein the antibody specifically binds to the neoepitope.

Thus, each C-terminally or N-terminally truncated fragment comprising a neoepitope is considered to be a separate invention.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/SE2013/050809

Continuation of: second sheet
International Patent Classification (IPC)
G01N 33/68 (2006.01)
C07K 14/78 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/SE2013/050809

WO	2012078760 A1	14/06/2012	US	8546338 B2	01/10/2013
			US	20130129712 A1	23/05/2013
			US	20120148674 A1	14/06/2012
WO	2005116658 A2	08/12/2005	AT	499614 T	15/03/2011
			DE	602005026525 D1	07/04/2011
			EP	1766411 B1	23/02/2011
			ES	2360804 T3	09/06/2011
			US	20080318337 A1	25/12/2008
WO	9807035 A1	19/02/1998	AT	259505 T	15/02/2004
			AU	4298297 A	06/03/1998
			DE	69727582 T2	23/12/2004
			EP	0922225 B1	11/02/2004
			JP	2000517418 A	26/12/2000
			JP	4189033 B2	03/12/2008
			US	6589755 B1	08/07/2003
WO	2011109738 A1	09/09/2011	AU	2011222558 A1	18/10/2012
			CA	2792163 A1	09/09/2011
			EP	2542701 A1	09/01/2013
			JP	2013521505 A	10/06/2013
			US	20110218116 A1	08/09/2011
WO	2011102908 A2	25/08/2011	AU	2011218465 A1	27/09/2012
			CA	2790684 A1	25/08/2011
			EP	2539714 A4	06/11/2013
			US	20120315655 A1	13/12/2012

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, 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, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(72)発明者 オールマン、エンマ
スウェーデン国、ロンマ、クリンググレンド 2 ビー

(72)発明者 ハイネゴルド、ディック
スウェーデン国、ルンド、プロトコールグレンド 1 1

Fターム(参考) 4B064 AG26 CC30 DA13

4H045 AA10 AA11 AA20 BA10 BA21 CA40 DA76 EA50 FA71

专利名称(译)	病理性软骨周转的测定		
公开(公告)号	JP2015522817A	公开(公告)日	2015-08-06
申请号	JP2015520122	申请日	2013-06-27
[标]申请(专利权)人(译)	安娜三月AB		
申请(专利权)人(译)	排雷署AB		
[标]发明人	ロレンゾピラール エンネルフヨルドパトリック オールマンエンマ ハイネゴルドディック		
发明人	ロレンゾ、ピラール エンネルフヨルド、パトリック オールマン、エンマ ハイネゴルド、ディック		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 C07K14/78 C12P21/02 C07K16/18		
CPC分类号	G01N33/6887 C07K14/47 C07K14/78 C07K16/18 C07K16/28 C07K2317/34 G01N27/62 G01N33/6878 G01N2333/47 G01N2800/105		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/543.501.A C07K14/78.ZNA C12P21/02.C C07K16/18		
F-TERM分类号	4B064/AG26 4B064/CC30 4B064/DA13 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/BA10 4H045/BA21 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA71		
优先权	61/690525 2012-06-28 US		
其他公开文献	JP6389168B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本实施方案涉及通过检测释放到体液中并存在于组织中的软骨寡聚基质蛋白 (COMP) 新表位来确定或检测病理性软骨更新的方法。此外, 实施方案涉及针对COMP新表位的抗体和含有COMP新表位的片段和肽, 用于产生这种抗体。

(21) 出願番号	特願2015-520122 (P2015-520122)	(71) 出願人	509234515 アナマー ユービー
(86) (22) 出願日	平成25年6月27日 (2013. 6. 27)		
(85) 翻訳文提出日	平成27年2月24日 (2015. 2. 24)		
(86) 国際出願番号	PCT/SE2013/050809		スウェーデン国 イェーテボリ エスイー -411 36 クングスボルツアベニン 22
(87) 国際公開番号	W02014/003679		
(87) 国際公開日	平成26年1月3日 (2014. 1. 3)	(74) 代理人	110000855 特許業務法人浅村特許事務所
(31) 優先権主張番号	61/690, 525		
(32) 優先日	平成24年6月28日 (2012. 6. 28)	(72) 発明者	ロレンゾ、ピラール スウェーデン国、ルンド、カムナルスヴェ ーゲン 7ジ-114
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	エンネルフヨルド、パトリック スウェーデン国、ルンド、ヨルダバルクス ヴェーゲン 63