

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-507877

(P2005-507877A)

(43) 公表日 平成17年3月24日(2005.3.24)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C07K 14/78	C07K 14/78 ZNA	2G045
C07K 7/04	C07K 7/04	4B063
C07K 16/18	C07K 16/18	4H045
C12Q 1/37	C12Q 1/37	
G01N 30/86	G01N 30/86 J	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 182 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2003-525259 (P2003-525259)
 (86) (22) 出願日 平成14年8月30日 (2002.8.30)
 (85) 翻訳文提出日 平成16年2月27日 (2004.2.27)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2002/027816
 (87) 国際公開番号 W02003/021226
 (87) 国際公開日 平成15年3月13日 (2003.3.13)
 (31) 優先権主張番号 60/316,554
 (32) 優先日 平成13年8月31日 (2001.8.31)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 503351788
 ファーマシア コーポレイション
 アメリカ合衆国 ミズーリ州 63167
 セント・ルイス ノース・リンドバーグ
 ・ブルヴァード 800 コーポレート・
 パテント・デパートメント
 (74) 代理人 100089266
 弁理士 大島 陽一
 (72) 発明者 ウェルシュ、ディーン・ジェイ
 アメリカ合衆国ミズーリ州63376・セ
 ントピーターズ・レイチェルマーキンコ
 ート 23

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ペプチド生体マーカー及び同定方法

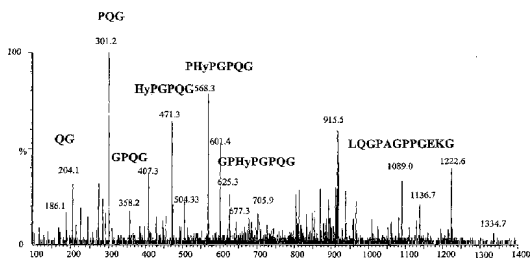
(57) 【要約】

タイプIIコラーゲンの酵素分解により生成されるペプチドの同定及び定量化を行うための方法であって、既知の質量電荷比を有するカルボキシ末端の特徴付けられたペプチド断片を質量分析することにより、カルボキシ末端を有するペプチドを同定する。生体サンプル内のペプチドの同定及び定量化は、例えば変形性関節症や関節リウマチなどの病気又は生理的状態における、タンパク質分解酵素の活性、及び酵素抑制剤の有効性を評価するのに使用される。

MS/MS Spectrum of Collagen Type II Peptide in Human OA Urine

LQGPAGPPGKEKGEHYPGDDGPSGAEGPHYPGPQG

Precursor Ion: m/z 914.4 for 3+



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

コラーゲンの酵素的タンパク質分解を検出するための方法であって、生体サンプル又は生体抽出物内に存在するコラーゲンにおける特定ペプチドのタンパク質分解生成物の同定及び定量化を行うステップを含むことを特徴とする方法。

【請求項 2】

前記コラーゲンはタイプ I I コラーゲンであり、前記特定ペプチドは、Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 1)によって表わされる C 末端、及びその翻訳後修飾を有することを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記コラーゲンはタイプ I コラーゲンであり、前記特定ペプチドは、Gly-Thr-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 12)によって表わされる C 末端、及びその翻訳後修飾を有することを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記コラーゲンはタイプ I I I コラーゲンであり、前記特定ペプチドは、Gly-Ala-Pro-Gly-Pro-Leu-Gly(SEQ ID NO: 13)によって表わされる C 末端、及びその翻訳後修飾を有することを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記コラーゲンの酵素的タンパク質分解は、コラゲナーゼ活性の成果であることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記コラゲナーゼは、マトリックス・メタロプロテイナーゼ - 13 であることを特徴とする請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

薬に起因するコラゲナーゼ活性の変化をモニタリングするステップを含むことを特徴とする請求項 5 に記載の方法。

【請求項 8】

生体サンプル又は生体抽出物内に存在する、1つ以上の特定ペプチドの同定及び定量化を行うステップを含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

生体サンプル又は生体抽出物内に存在するコラーゲンのタンパク質分解生成物は、滑液、全血、血漿及び尿から成る群より選択されることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記特定ペプチドのタンパク質分解生成物は、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 33、SEQ ID NO: 34、SEQ ID NO: 35、SEQ ID NO: 36、SEQ ID NO: 37、SEQ ID NO: 38、SEQ ID NO: 39、SEQ ID NO: 40、SEQ ID NO: 41、SEQ ID NO: 42、SEQ ID NO: 43、

及びSEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 33、SEQ ID NO: 34、SEQ ID NO: 35、SEQ ID NO: 36、SEQ ID NO: 37、SEQ ID NO: 38、SEQ ID NO: 39、SEQ ID NO: 40、SEQ ID NO: 41、SEQ ID NO: 42、SEQ ID NO: 43の翻訳後修飾の類似物、から成る群より選択されることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 1 1】

前記生体サンプル又は生体抽出物はヒトの被検体からのものであり、
生体サンプル又は生体抽出物内の、ペプチドLeu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ala-Glu-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 2)、又はその翻訳後修飾の類似物の同定及び定量化を行うステップを含むことを特徴とする請求項 1 0 に記載の方法。

【請求項 1 2】

前記生体サンプル又は生体抽出物はヒトの被検体からのものであり、
前記生体サンプル又は生体抽出物内の、ペプチドLeu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ala-Glu-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 15)、又はその翻訳後修飾の類似物の同定及び定量化を行うステップを含むことを特徴とする請求項 1 0 に記載の方法。

10

【請求項 1 3】

前記生体サンプル又は生体抽出物はヒトの被検体からのものであり、
前記生体サンプル又は生体抽出物内の、ペプチドAla-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Glu-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ala-Glu-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 16)、又はその翻訳後修飾の類似物の同定及び定量化を行うステップを含むことを特徴とする請求項 1 0 に記載の方法。

20

【請求項 1 4】

前記生体サンプル又は生体抽出物はヒトの被検体からのものであり、
前記生体サンプル又は生体抽出物内の、ペプチド配列Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ala-Glu-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 17)、又はその翻訳後修飾の類似物の同定及び定量化を行うステップを含むことを特徴とする請求項 1 0 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記生体サンプル又は生体抽出物はウシの被検体からのものであり、
前記生体サンプル又は生体抽出物内のペプチドの同定及び定量化を行うステップを含み、
前記ペプチドは、
Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 3)とその翻訳後修飾の類似物、
Lys-Gly-Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 34)とその翻訳後修飾の類似物、
Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 35)とその翻訳後修飾の類似物、
Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 36)とその翻訳後修飾の類似物、
Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 37)とその翻訳後修飾の類似物、
及びGlu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 38)とその翻訳後修飾の類似物、から成る群より選択されることを特徴とする請求項 1 0 に記載の方法。

30

40

【請求項 1 6】

前記生体サンプル又は生体抽出物はイヌの被検体からのものであり、
前記生体サンプル又は生体抽出物内のペプチドの同定及び定量化を行うステップを含み、
前記ペプチドは、
Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 4)とその翻訳後修飾の類似物、

50

Lys-Gly-Ala-Arg-GlyAsp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 18)とその翻訳後修飾の類似物、
 Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-AspGly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 19)とその翻訳後修飾の類似物、
 Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 20)とその翻訳後修飾の類似物、
 Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 21)とその翻訳後修飾の類似物、
 及びGlu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 22)とその翻訳後修飾の類似物、 から成る群より選択されることを特徴とする請求項10に記載の方法。

10

【請求項17】

前記生体サンプル又は生体抽出物はウマの被検体からのものであり、
 前記生体サンプル又は生体抽出物内のペプチドの同定及び定量化を行うステップを含み、
 前記ペプチドは、
 Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 11)とその翻訳後修飾の類似物、
 Lys-Gly-Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 29)とその翻訳後修飾の類似物、
 Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 30)とその翻訳後修飾の類似物、
 Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 31)とその翻訳後修飾の類似物、
 Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 32)とその翻訳後修飾の類似物、
 及びGlu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 33)とその翻訳後修飾の類似物、 から成る群より選択されることを特徴とする請求項10に記載の方法。

20

30

【請求項18】

前記生体サンプル又は生体抽出物はネズミの被検体からのものであり、
 前記生体サンプル又は生体抽出物内のペプチドの同定及び定量化を行うステップを含み、
 前記ペプチドは、
 Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Ala-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ser-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 8)とその翻訳後修飾の類似物、
 Ala-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ser-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 39)とその翻訳後修飾の類似物、
 Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ser-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 40)とその翻訳後修飾の類似物、
 Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ser-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 41)とその翻訳後修飾の類似物、
 及びAsp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ser-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 42)とその翻訳後修飾の類似物、 から成る群より選択されることを特徴とする請求項10に記載の方法。

40

【請求項19】

前記生体サンプル又は生体抽出物はネコの被検体からのものであり、
 前記生体サンプル又は生体抽出物内のペプチドの同定及び定量化を行うステップを含み、

50

前記ペプチドは、

Lys-Gly-Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 23)とその翻訳後修飾の類似物、

Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 24)とその翻訳後修飾の類似物、

Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 25)とその翻訳後修飾の類似物、

Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 26)とその翻訳後修飾の類似物、

Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 27)とその翻訳後修飾の類似物、

及びGlu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 28)とその翻訳後修飾の類似物、から成る群より選択されることを特徴とする請求項10に記載の方法。

【請求項20】

前記生体サンプル又は生体抽出物はモルモットの被検体からのものであり、

生体サンプル又は生体抽出物内の、ペプチドVal-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Val-Ser-Gly-Ala-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 43)、又はその翻訳後修飾の類似物の同定及び定量化を行うステップを含むことを特徴とする請求項10に記載の方法。

【請求項21】

前記ペプチドの同定及び定量化を行うステップの前に、前記サンプル又は抽出物内に存在する前記特定ペプチドのタンパク質分解生成物の派生物又は修飾を作成するステップをさらに含むことを特徴とする請求項10に記載の方法。

【請求項22】

前記ペプチドの同定及び定量化を行うステップの前に、前記サンプル又は抽出物内に存在する前記特定ペプチドのタンパク質分解生成物の派生物又は修飾を作成するステップをさらに含むことを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項23】

生体サンプル内のコラーゲン分解ペプチドのアミノ酸配列を同定するための方法であって、

前記ペプチドの相対分子量を測定するステップ、

前記ペプチドのC末端の特性診断配列を生成するべく、前記ペプチドを衝突活性化により断片化するステップ、

前記ペプチドのC末端を、既知の質量電荷比を有する前記特性診断配列により同定するステップ、

及び前記ペプチドのN末端配列を、前記ペプチドの相対分子量を有する同定されたC末端配列と結合したときに、アミノ酸配列を測定することにより同定し、それによってコラーゲン分解ペプチドを同定するステップを含むことを特徴とする方法。

【請求項24】

前記C末端は、Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 1)及びその翻訳後修飾であることを特徴とする請求項23に記載の方法。

【請求項25】

前記C末端は、Gly-Thr-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 12)及びその翻訳後修飾であることを特徴とする請求項23に記載の方法。

【請求項26】

前記C末端は、Gly-Ala-Pro-Gly-Pro-Leu-Gly(SEQ ID NO: 13)及びその翻訳後修飾である

ことを特徴とする請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記ペプチドの N 末端配列を、前記ペプチドの相対分子量を有する同定された C 末端配列と結合したときに、アミノ酸配列を測定することにより同定するステップは、同定された C 末端配列と結合したときに、既知のペプチドを含むデータベースのペプチドの質量を有するアミノ酸配列を測定するステップをさらに含むことを特徴とする請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 8】

特有の診断用配列を同定することにより、ペプチドの C 末端を同定するステップは、配列 Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 5)、Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ. ID NO: 6)、及び Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 7) と、その配列の翻訳後修飾を有する 3 つの診断用配列を同定するステップをさらに含むことを特徴とする請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 9】

前記 3 つの診断用配列は、それぞれ、約 3 0 1、約 4 7 1、及び約 5 6 8 の質量電荷比を有することを特徴とする請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 0】

前記 3 つの診断用配列は、それぞれ、約 3 0 1、約 4 5 5、及び約 5 5 2 の質量電荷比を有することを特徴とする請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 1】

既知の配列のタンパク質の N 末端部分及びカルボキシル末端 (C 末端) を有するコラーゲン分解ペプチドのアミノ酸配列を同定するための方法であって、

前記ペプチドの相対分子量を測定するステップ、

フラグメントイオンを作成するべく、前記ペプチドを断片化するステップ、

前記ペプチドの前記 C 末端の断片から、既知のフラグメントイオンを同定するステップ、

同定された前記ペプチドの C 末端の前記フラグメントイオンから、前記 C 末端のアミノ酸配列を同定するステップ、

及び前記 C 末端のアミノ酸配列と前記ペプチドの質量電荷比とから、前記ペプチドの N 末端のアミノ酸配列を同定するステップ、

及び前記 N 末端のアミノ酸配列と前記 C 末端のアミノ酸配列とから、前記ペプチドのアミノ酸配列を決定するステップを含むことを特徴とする方法。

するステップを含むことを特徴とする方法。

【請求項 3 2】

前記コラーゲン診断用ペプチドは、タンパク質分解酵素分解産物を含むことを特徴とする請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記ペプチドの前記フラグメントイオンを同定することにより、前記ペプチドの翻訳後修飾における少なくとも 1 つの部位及び種類を決定するステップをさらに含むことを特徴とする請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記タンパク質分解酵素は、コラーゲナーゼ又はマトリックス・メタロプロテイナーゼであることを特徴とする請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記コラーゲン分解ペプチドは、タイプ I コラーゲンの分解ペプチドであることを特徴とする請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記コラーゲン分解ペプチドは、タイプ I I I コラーゲンの分解ペプチドであることを特徴とする請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 7】

前記マトリックス・メタロプロテイナーゼは、マトリックス・メタロプロテイナーゼ - 1 3 であることを特徴とする請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 38】

前記ペプチドの相対分子量を測定するステップ、前記ペプチドを断片化するステップ、及び前記ペプチドのC末端から既知のペプチドのフラグメントイオンを同定するステップは、タンデム質量分析により行われることを特徴とする請求項 31 に記載の方法。

【請求項 39】

分離ペプチドLeu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ala-Glu-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 2)とその翻訳後修飾の類似物、

分離ペプチドLys-Gly-Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Glu-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ala-Glu-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 15)とその翻訳後修飾の類似物、 10

分離ペプチドAla-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Glu-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ala-Glu-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 16)とその翻訳後修飾の類似物、

分離ペプチドGly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ala-Glu-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 17)とその翻訳後修飾の類似物、

分離ペプチドLeu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 3)とその翻訳後修飾の類似物、 20

分離ペプチドLeu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 8)とその翻訳後修飾の類似物、

分離ペプチドLeu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 11)とその翻訳後修飾の類似物、

分離ペプチドLeu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 3)とその翻訳後修飾の類似物、

分離ペプチドLys-Gly-Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 34)とその翻訳後修飾の類似物、 30

分離ペプチドAla-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 35)とその翻訳後修飾の類似物、

分離ペプチドGly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 36)とその翻訳後修飾の類似物、

分離ペプチドPro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 37)とその翻訳後修飾の類似物、 40

分離ペプチドGlu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 38)とその翻訳後修飾の類似物、

分離ペプチドLys-Gly-Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 18)とその翻訳後修飾の類似物、

分離ペプチドAla-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 19)とその翻訳後修飾の類似物、

分離ペプチドAla-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly- 50

Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 20)とその翻訳後修飾の類似物、
 分離ペプチドPro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-
 Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 21)とその翻訳後修飾の類似物、
 分離ペプチドGlu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-
 Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 22)とその翻訳後修飾の類似物、
 分離ペプチドLys-Gly-Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-
 Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-
 Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 23)とその翻訳後修飾の類似物
 、
 分離ペプチドAla-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln- 10
 Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-
 Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 24)とその翻訳後修飾の類似物、
 分離ペプチドLeu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-
 Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 25)とその翻訳後
 修飾の類似物、
 分離ペプチドAla-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-
 Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 26)とその翻訳後修飾の類似物、
 分離ペプチドPro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-
 Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 27)とその翻訳後修飾の類似物、
 分離ペプチドGlu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro- 20
 Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 28)とその翻訳後修飾の類似物、
 分離ペプチドLys-Gly-Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-
 Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-
 Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 29)とその翻訳後修飾の類似物
 、
 分離ペプチドAla-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-
 Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-
 Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 30)とその翻訳後修飾の類似物、
 分離ペプチドAla-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-
 Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 31)とその翻訳後修飾の類似物、 30
 分離ペプチドPro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-
 Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 32)とその翻訳後修飾の類似物、
 分離ペプチドGlu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-
 Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 33)とその翻訳後修飾の類似物、
 分離ペプチドAla-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ser-Asp-
 Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 39)とその翻訳後修飾の類似物、
 分離ペプチドGlu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ser-Asp-Gly-Pro-Pro-
 Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 40)とその翻訳後修飾の類似物、
 分離ペプチドGly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ser-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-
 Gln-Gly (SEQ ID NO: 41)とその翻訳後修飾の類似物、 40
 分離ペプチドVal-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-
 Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Val-Ser-Gly-Ala-
 Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 43)とその翻訳後修飾の類似物、
 分離ペプチドAsp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ser-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 4
 2)とその翻訳後修飾の類似物、 から成る群より選択されることを特徴とする分離ペプチド
 。

【請求項40】

前記ペプチドは、Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-
 Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 3)、又はその
 翻訳後修飾の類似物であることを特徴とする請求項39に記載の分離ペプチド。

【請求項 4 1】

前記ペプチドは、Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 8)、又はその翻訳後修飾の類似物であることを特徴とする請求項 3 9 に記載の分離ペプチド。

【請求項 4 2】

前記分離は、Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 11)、又はその翻訳後修飾の類似物であることを特徴とする請求項 3 9 に記載の分離ペプチド。

【請求項 4 3】

合成ペプチドVal-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ala-Glu-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 14)、又はその翻訳後修飾の類似物。 10

【請求項 4 4】

前記ペプチドは、Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 3)、又はその翻訳後修飾の類似物であることを特徴とする請求項 3 9 に記載の分離ペプチド。

【請求項 4 5】

前記ペプチドは、Lys-Gly-Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 34)、又はその翻訳後修飾の類似物であることを特徴とする請求項 3 9 に記載の分離ペプチド。 20

【請求項 4 6】

前記ペプチドは、Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO35)、又はその翻訳後修飾の類似物であることを特徴とする請求項 3 9 に記載の分離ペプチド。

【請求項 4 7】

前記ペプチドは、Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 36)、又はその翻訳後修飾の類似物であることを特徴とする請求項 3 9 に記載の分離ペプチド。 30

【請求項 4 8】

前記ペプチドは、Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 37)、又はその翻訳後修飾の類似物であることを特徴とする請求項 3 9 に記載の分離ペプチド。

【請求項 4 9】

前記ペプチドは、Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 38)、又はその翻訳後修飾の類似物であることを特徴とする請求項 3 9 に記載の分離ペプチド。

【請求項 5 0】

前記ペプチドは、Lys-Gly-Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 18)、又はその翻訳後修飾の類似物であることを特徴とする請求項 3 9 に記載の分離ペプチド。 40

【請求項 5 1】

前記ペプチドは、Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 19)、又はその翻訳後修飾の類似物であることを特徴とする請求項 3 9 に記載の分離ペプチド。

【請求項 5 2】

前記ペプチドは、Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser- 50

Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 20)、又はその翻訳後修飾の類似物であることを特徴とする請求項 39 に記載の分離ペプチド。

【請求項 53】

前記ペプチドは、Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 21)、又はその翻訳後修飾の類似物であることを特徴とする請求項 39 に記載の分離ペプチド。

【請求項 54】

前記ペプチドは、Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 22)、又はその翻訳後修飾の類似物であることを特徴とする請求項 39 に記載の分離ペプチド。

10

【請求項 55】

前記ペプチドは、Lys-Gly-Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 23)、又はその翻訳後修飾の類似物であることを特徴とする請求項 39 に記載の分離ペプチド。

【請求項 56】

前記ペプチドは、Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 24)、又はその翻訳後修飾の類似物であることを特徴とする請求項 39 に記載の分離ペプチド。

20

【請求項 57】

前記ペプチドは、Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 25)、又はその翻訳後修飾の類似物であることを特徴とする請求項 39 に記載の分離ペプチド。

【請求項 58】

前記ペプチドは、Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 26)、又はその翻訳後修飾の類似物であることを特徴とする請求項 39 に記載の分離ペプチド。

【請求項 59】

前記ペプチドは、Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 27)、又はその翻訳後修飾の類似物であることを特徴とする請求項 39 に記載の分離ペプチド。

30

【請求項 60】

前記ペプチドは、Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 28)、又はその翻訳後修飾の類似物であることを特徴とする請求項 39 に記載の分離ペプチド。

【請求項 61】

前記ペプチドは、Lys-Gly-Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 29)、又はその翻訳後修飾の類似物であることを特徴とする請求項 39 に記載の分離ペプチド。

40

【請求項 62】

前記ペプチドは、Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 30)、又はその翻訳後修飾の類似物であることを特徴とする請求項 39 に記載の分離ペプチド。

【請求項 63】

前記ペプチドは、Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 31)、又はその翻訳後修飾の類似物であることを特徴とする請求項 39 に記載の分離ペプチド。

50

【請求項 6 4】

前記ペプチドは、Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 32)、又はその翻訳後修飾の類似物であることを特徴とする請求項 3 9 に記載の分離ペプチド。

【請求項 6 5】

前記ペプチドは、Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 33)、又はその翻訳後修飾の類似物であることを特徴とする請求項 3 9 に記載の分離ペプチド。

【請求項 6 6】

前記ペプチドは、Ala-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ser-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 39)、又はその翻訳後修飾の類似物であることを特徴とする請求項 3 9 に記載の分離ペプチド。 10

【請求項 6 7】

前記ペプチドは、Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ser-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 40)、又はその翻訳後修飾の類似物であることを特徴とする請求項 3 9 に記載の分離ペプチド。

【請求項 6 8】

前記ペプチドは、Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ser-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 41)、又はその翻訳後修飾の類似物であることを特徴とする請求項 3 9 に記載の分離ペプチド。 20

【請求項 6 9】

前記ペプチドは、Val-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Val-Ser-Gly-Ala-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 43)、又はその翻訳後修飾の類似物であることを特徴とする請求項 3 9 に記載の分離ペプチド。

【請求項 7 0】

前記ペプチドは、Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ser-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 42)、又はその翻訳後修飾の類似物であることを特徴とする請求項 3 9 に記載の分離ペプチド。

【請求項 7 1】

前記ペプチドは、Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ala-Glu-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 2)、又はその翻訳後修飾の類似物であることを特徴とする請求項 3 9 に記載の分離ペプチド。 30

【請求項 7 2】

前記ペプチドは、Lys-Gly-Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Glu-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ala-Glu-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 15)、又はその翻訳後修飾の類似物であることを特徴とする請求項 3 9 に記載の分離ペプチド。

【請求項 7 3】

前記ペプチドは、Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Glu-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ala-Glu-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 16)、又はその翻訳後修飾の類似物であることを特徴とする請求項 3 9 に記載の分離ペプチド。 40

【請求項 7 4】

前記ペプチドは、Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ala-Glu-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 17)、又はその翻訳後修飾の類似物であることを特徴とする請求項 3 9 に記載の分離ペプチド。

【請求項 7 5】

合成ペプチドVal-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ala-Glu-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 14)、又はそ 50

の翻訳後修飾の類似物。

【請求項 7 6】

SEQ ID NO: 2、 SEQ ID NO: 3、 SEQ ID NO: 4、 SEQ ID NO: 8、 SEQ ID NO: 9、 SEQ ID NO: 10、 SEQ ID NO: 11、 SEQ ID NO: 15、 SEQ ID NO: 16、 SEQ ID NO: 17、 SEQ ID NO: 18、 SEQ ID NO: 19、 SEQ ID NO: 20、 SEQ ID NO: 21、 SEQ ID NO: 22、 SEQ ID NO: 23、 SEQ ID NO: 24、 SEQ ID NO: 25、 SEQ ID NO: 26、 SEQ ID NO: 27、 SEQ ID NO: 28、 SEQ ID NO: 29、 SEQ ID NO: 30、 SEQ ID NO: 31、 SEQ ID NO: 32、 SEQ ID NO: 33、 SEQ ID NO: 34、 SEQ ID NO: 35、 SEQ ID NO: 36、 SEQ ID NO: 37、 SEQ ID NO: 38、 SEQ ID NO: 39、 SEQ ID NO: 40、 SEQ ID NO: 41、 SEQ ID NO: 42、 SEQ ID NO: 43、

10

及びSEQ ID NO: 2、 SEQ ID NO: 3、 SEQ ID NO: 4、 SEQ ID NO: 8、 SEQ ID NO: 9、 SEQ ID NO: 10、 SEQ ID NO: 11、 SEQ ID NO: 15、 SEQ ID NO: 16、 SEQ ID NO: 17、 SEQ ID NO: 18、 SEQ ID NO: 19、 SEQ ID NO: 20、 SEQ ID NO: 21、 SEQ ID NO: 22、 SEQ ID NO: 23、 SEQ ID NO: 24、 SEQ ID NO: 25、 SEQ ID NO: 26、 SEQ ID NO: 27、 SEQ ID NO: 28、 SEQ ID NO: 29、 SEQ ID NO: 30、 SEQ ID NO: 31、 SEQ ID NO: 32、 SEQ ID NO: 33、 SEQ ID NO: 34、 SEQ ID NO: 35、 SEQ ID NO: 36、 SEQ ID NO: 37、 SEQ ID NO: 38、 SEQ ID NO: 39、 SEQ ID NO: 40、 SEQ ID NO: 41、 SEQ ID NO: 42、 SEQ ID NO: 43の翻訳後修飾の類似物、 から成る群より選択されるペプチドを含んでいる、 コラゲナーゼ酵素活性の生体マーカー。

【請求項 7 7】

前記生体マーカーを定量化するための前記ペプチドを特定可能な派生物又は修飾を作成するべく、前記ペプチドは派生化又は修飾されていることを特徴とする請求項 7 6 に記載の生体マーカー。

20

【請求項 7 8】

SEQ ID NO: 2、 SEQ ID NO: 3、 SEQ ID NO: 4、 SEQ ID NO: 8、 SEQ ID NO: 9、 SEQ ID NO: 10、 SEQ ID NO: 11、 SEQ ID NO: 15、 SEQ ID NO: 16、 SEQ ID NO: 17、 SEQ ID NO: 18、 SEQ ID NO: 19、 SEQ ID NO: 20、 SEQ ID NO: 21、 SEQ ID NO: 22、 SEQ ID NO: 23、 SEQ ID NO: 24、 SEQ ID NO: 25、 SEQ ID NO: 26、 SEQ ID NO: 27、 SEQ ID NO: 28、 SEQ ID NO: 29、 SEQ ID NO: 30、 SEQ ID NO: 31、 SEQ ID NO: 32、 SEQ ID NO: 33、 SEQ ID NO: 34、 SEQ ID NO: 35、 SEQ ID NO: 36、 SEQ ID NO: 37、 SEQ ID NO: 38、 SEQ ID NO: 39、 SEQ ID NO: 40、 SEQ ID NO: 41、 SEQ ID NO: 42、 SEQ ID NO: 43、

30

及びSEQ ID NO: 2、 SEQ ID NO: 3、 SEQ ID NO: 4、 SEQ ID NO: 8、 SEQ ID NO: 9、 SEQ ID NO: 10、 SEQ ID NO: 11、 SEQ ID NO: 15、 SEQ ID NO: 16、 SEQ ID NO: 17、 SEQ ID NO: 18、 SEQ ID NO: 19、 SEQ ID NO: 20、 SEQ ID NO: 21、 SEQ ID NO: 22、 SEQ ID NO: 23、 SEQ ID NO: 24、 SEQ ID NO: 25、 SEQ ID NO: 26、 SEQ ID NO: 27、 SEQ ID NO: 28、 SEQ ID NO: 29、 SEQ ID NO: 30、 SEQ ID NO: 31、 SEQ ID NO: 32、 SEQ ID NO: 33、 SEQ ID NO: 34、 SEQ ID NO: 35、 SEQ ID NO: 36、 SEQ ID NO: 37、 SEQ ID NO: 38、 SEQ ID NO: 39、 SEQ ID NO: 40、 SEQ ID NO: 41、 SEQ ID NO: 42、 SEQ ID NO: 43の翻訳後修飾の類似物、 から成る群より選択されるペプチドの少なくとも7つのアミノ酸のN末端配列と直接的に接触する抗体。

40

【請求項 7 9】

SEQ ID NO: 2、 SEQ ID NO: 3、 SEQ ID NO: 4、 SEQ ID NO: 8、 SEQ ID NO: 9、 SEQ ID NO: 10、 SEQ ID NO: 11、 SEQ ID NO: 15、 SEQ ID NO: 16、 SEQ ID NO: 17、 SEQ ID NO: 18、 SEQ ID NO: 19、 SEQ ID NO: 20、 SEQ ID NO: 21、 SEQ ID NO: 22、 SEQ ID NO: 23、 SEQ ID NO: 24、 SEQ ID NO: 25、 SEQ ID NO: 26、 SEQ ID NO: 27、 SEQ ID NO: 28、 SEQ ID NO: 29、 SEQ ID NO: 30、 SEQ ID NO: 31、 SEQ ID NO: 32、 SEQ ID NO: 33、 SEQ ID NO: 34、 SEQ ID NO: 35、 SEQ ID NO: 36、 SEQ ID NO: 37、 SEQ ID NO: 38、 SEQ ID NO: 39、 SEQ ID NO: 40、 SEQ ID NO: 41、 SEQ ID NO: 42、 SEQ ID NO: 43

50

及びSEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 33、SEQ ID NO: 34、SEQ ID NO: 35、SEQ ID NO: 36、SEQ ID NO: 37、SEQ ID NO: 38、SEQ ID NO: 39、SEQ ID NO: 40、SEQ ID NO: 41、SEQ ID NO: 42、SEQ ID NO: 43の翻訳後修飾の類似物、から成る群より選択されるペプチドを含んでいるコラゲナーゼ酵素抑制の生体マーカー。

【請求項 8 0】

10

前記生体マーカーを定量化するための前記ペプチドを特定可能な派生物又は修飾を作成するべく、前記ペプチドは派生化又は修飾されていることを特徴とする請求項 7 9 に記載の生体マーカー。

【請求項 8 1】

コラゲナーゼ酵素のタンパク質分解活性を減少させるのに使用される薬又は物質の有効性を測定するための方法であって、

生体流動体サンプル内のタイプ I I コラーゲン分解断片の同定及び定量化を行うステップを含み、

前記サンプルは、

SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 33、SEQ ID NO: 34、SEQ ID NO: 35、SEQ ID NO: 36、SEQ ID NO: 37、SEQ ID NO: 38、SEQ ID NO: 39、SEQ ID NO: 40、SEQ ID NO: 41、SEQ ID NO: 42、SEQ ID NO: 43、

20

及びSEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 33、SEQ ID NO: 34、SEQ ID NO: 35、SEQ ID NO: 36、SEQ ID NO: 37、SEQ ID NO: 38、SEQ ID NO: 39、SEQ ID NO: 40、SEQ ID NO: 41、SEQ ID NO: 42、SEQ ID NO: 43の翻訳後修飾の類似物、から成る群より選択される配列を有することを特徴とする方法。

30

【請求項 8 2】

前記分解断片の同定及び定量化を行うステップの前に、前記サンプル又は抽出物内のタイプ I I コラーゲン分解断片の派生物又は修飾を作成するステップをさらに含むことを特徴とする請求項 8 1 に記載の方法。

40

【請求項 8 3】

タイプ I I コラーゲン分解により特徴付けられた被検体の病気又は状態を診断するための方法であって、

生体サンプル内のペプチドの同定及び定量化を行うステップを含み、

前記ペプチドは、

SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 33、SEQ ID NO: 34、SEQ ID NO: 35、SEQ ID NO: 36、SEQ ID NO: 37、SEQ ID NO: 38、SEQ ID NO: 39、SEQ ID NO: 40、SEQ ID NO: 41、SEQ ID NO: 42、SEQ ID NO: 43、

50

ID NO: 33、 SEQ ID NO: 34、 SEQ ID NO: 35、 SEQ ID NO: 36、 SEQ ID NO: 37、 SEQ ID NO: 38、 SEQ ID NO: 39、 SEQ ID NO: 40、 SEQ ID NO: 41、 SEQ ID NO: 42、 SEQ ID NO: 43、

及びSEQ ID NO: 2、 SEQ ID NO: 3、 SEQ ID NO: 4、 SEQ ID NO: 8、 SEQ ID NO: 9、 SEQ ID NO: 10、 SEQ ID NO: 11、 SEQ ID NO: 15、 SEQ ID NO: 16、 SEQ ID NO: 17、 SEQ ID NO: 18、 SEQ ID NO: 19、 SEQ ID NO: 20、 SEQ ID NO: 21、 SEQ ID NO: 22、 SEQ ID NO: 23、 SEQ ID NO: 24、 SEQ ID NO: 25、 SEQ ID NO: 26、 SEQ ID NO: 27、 SEQ ID NO: 28、 SEQ ID NO: 29、 SEQ ID NO: 30、 SEQ ID NO: 31、 SEQ ID NO: 32、 SEQ ID NO: 33、 SEQ ID NO: 34、 SEQ ID NO: 35、 SEQ ID NO: 36、 SEQ ID NO: 37、 SEQ ID NO: 38、 SEQ ID NO: 39、 SEQ ID NO: 40、 SEQ ID NO: 41、 SEQ ID NO: 42、 SEQ ID NO: 43の翻訳後修飾の類似物、 から成る群より選択されることを特徴とする方法。 10

【請求項 8 4】

前記ペプチドの同定及び定量化を行うステップの前に、前記サンプル又は抽出物内の前記ペプチドの派生物又は修飾を作成するステップをさらに含むことを特徴とする請求項 8 3 に記載の方法。

【請求項 8 5】

タイプ I I コラーゲン分解により特徴付けられた被検体の病気又は状態は、変形性関節症及び関節リウマチから成る群より選択されることを特徴とする請求項 8 3 に記載の方法。

【請求項 8 6】

前記生体サンプルは、尿、血、血漿及び滑液から成る群より選択されることを特徴とする請求項 8 3 に記載の方法。 20

【請求項 8 7】

タイプ I I コラーゲン分解により特徴付けられた被検体の病気又は状態でのコラゲナーゼ酵素のタンパク質分解活性を、ヒト又は動物の被験体内で、減少させる又は無くするのに使用される薬又は物質の有効性を測定するための方法であって、

前記被験体からの生体サンプル内のタイプ I I コラーゲン分解ペプチドの同定及び定量化を行うステップを含み、

前記タイプ I I コラーゲン分解ペプチドは、

SEQ ID NO: 2、 SEQ ID NO: 3、 SEQ ID NO: 4、 SEQ ID NO: 15、 SEQ ID NO: 16、 SEQ ID NO: 17、 SEQ ID NO: 18、 SEQ ID NO: 19、 SEQ ID NO: 20、 SEQ ID NO: 21、 SEQ ID NO: 22、 SEQ ID NO: 23、 SEQ ID NO: 24、 SEQ ID NO: 25、 SEQ ID NO: 26、 SEQ ID NO: 27、 SEQ ID NO: 28、 SEQ ID NO: 29、 SEQ ID NO: 30、 SEQ ID NO: 31、 SEQ ID NO: 32、 SEQ ID NO: 33、 SEQ ID NO: 34、 SEQ ID NO: 35、 SEQ ID NO: 36、 SEQ ID NO: 37、 SEQ ID NO: 38、 SEQ ID NO: 39、 SEQ ID NO: 40、 SEQ ID NO: 41、 SEQ ID NO: 42、 SEQ ID NO: 43、 30

及びSEQ ID NO: 2、 SEQ ID NO: 3、 SEQ ID NO: 4、 SEQ ID NO: 15、 SEQ ID NO: 16、 SEQ ID NO: 17、 SEQ ID NO: 18、 SEQ ID NO: 19、 SEQ ID NO: 20、 SEQ ID NO: 21、 SEQ ID NO: 22、 SEQ ID NO: 23、 SEQ ID NO: 24、 SEQ ID NO: 25、 SEQ ID NO: 26、 SEQ ID NO: 27、 SEQ ID NO: 28、 SEQ ID NO: 29、 SEQ ID NO: 30、 SEQ ID NO: 31、 SEQ ID NO: 32、 SEQ ID NO: 33、 SEQ ID NO: 34、 SEQ ID NO: 35、 SEQ ID NO: 36、 SEQ ID NO: 37、 SEQ ID NO: 38、 SEQ ID NO: 39、 SEQ ID NO: 40、 SEQ ID NO: 41、 SEQ ID NO: 42、 SEQ ID NO: 43の翻訳後修飾の類似物から成る群より選択されることを特徴とする方法。 40

【請求項 8 8】

前記コラゲナーゼ酵素は、マトリックス・メタロプロテイナーゼであることを特徴とする請求項 8 7 に記載の方法。

【請求項 8 9】

前記マトリックス・メタロプロテイナーゼは、マトリックス・メタロプロテイナーゼ - 1、マトリックス・メタロプロテイナーゼ - 8、及びマトリックス・メタロプロテイナーゼ - 13 から成る群より選択されることを特徴とする請求項 8 8 に記載の方法。 50

【請求項 9 0】

前記コラゲナーゼ酵素のタンパク質分解活性を減少させるのに使用される薬又は物質は、マトリックス・メタロプロテイナーゼ抑制剤であることを特徴とする請求項 8 8 に記載の方法。

【請求項 9 1】

軟骨組織の損傷により部分的に特徴付けられた哺乳類における軟骨組織の損傷の生理的状態を測定するための方法であって、

マーカーペプチドの量を測定するべく、哺乳類の生体サンプルを分析するステップを含み、

前記マーカーペプチドは、

SEQ ID NO: 2、 SEQ ID NO: 3、 SEQ ID NO: 4、 SEQ ID NO: 15、 SEQ ID NO: 16、 SEQ ID NO: 17、 SEQ ID NO: 18、 SEQ ID NO: 19、 SEQ ID NO: 20、 SEQ ID NO: 21、 SEQ ID NO: 22、 SEQ ID NO: 23、 SEQ ID NO: 24、 SEQ ID NO: 25、 SEQ ID NO: 26、 SEQ ID NO: 27、 SEQ ID NO: 28、 SEQ ID NO: 29、 SEQ ID NO: 30、 SEQ ID NO: 31、 SEQ ID NO: 32、 SEQ ID NO: 33、 SEQ ID NO: 34、 SEQ ID NO: 35、 SEQ ID NO: 36、 SEQ ID NO: 37、 SEQ ID NO: 38、 SEQ ID NO: 39、 SEQ ID NO: 40、 SEQ ID NO: 41、 SEQ ID NO: 42、 SEQ ID NO: 43、

及び SEQ ID NO: 2、 SEQ ID NO: 3、 SEQ ID NO: 4、 SEQ ID NO: 15、 SEQ ID NO: 16、 SEQ ID NO: 17、 SEQ ID NO: 18、 SEQ ID NO: 19、 SEQ ID NO: 20、 SEQ ID NO: 21、

SEQ ID NO: 22、 SEQ ID NO: 23、 SEQ ID NO: 24、 SEQ ID NO: 25、 SEQ ID NO: 26、 SEQ ID NO: 27、 SEQ ID NO: 28、 SEQ ID NO: 29、 SEQ ID NO: 30、 SEQ ID NO: 31、

SEQ ID NO: 32、 SEQ ID NO: 33、 SEQ ID NO: 34、 SEQ ID NO: 35、 SEQ ID NO: 36、 SEQ ID NO: 37、 SEQ ID NO: 38、 SEQ ID NO: 39、 SEQ ID NO: 40、 SEQ ID NO: 41、

SEQ ID NO: 42、 SEQ ID NO: 43 の翻訳後修飾の類似物、から成る群より選択される配列を有することを特徴とする方法。

【請求項 9 2】

前記マーカーペプチドを同定及び定量化するステップは、

前記マーカーペプチドの質量を測定するステップ、

衝突活性化により前記マーカーペプチドを断片化するステップ、

前記マーカーペプチドの断片を既知の質量電荷比に基づき同定することにより、C末端配列 Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID. NO: 1) 及びその翻訳後修飾の類似物を同定するステップ、

マーカーペプチドの質量が測定されているC末端配列 Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID. NO: 1) 及びその翻訳後修飾の類似物と結合したときに、ペプチドのN末端配列を同定し、それによってマーカーペプチドを同定するステップ、

及び体液内のマーカーペプチドの相対分子量を測定するステップ

をさらに含むことを特徴とする請求項 9 1 に記載の方法。

【請求項 9 3】

前記生体サンプルは、尿、血、血漿及び滑液から成る生体流動体の群より選択されることを特徴とする請求項 9 2 に記載の方法。

【請求項 9 4】

前記既知の質量電荷比を有する断片は、

約 3 0 1 の質量電荷比を有する断片 SEQ ID NO: 5、約 4 5 5 の質量電荷比を有する断片 SEQ ID NO: 6、及び約 5 5 2 の質量電荷比を有する断片 SEQ ID NO: 7、であることを特徴とする請求項 9 2 に記載の方法。

【請求項 9 5】

前記既知の質量電荷比を有する断片は、

約 3 0 1 の質量電荷比を有する断片 SEQ ID NO: 5、約 4 7 1 の質量電荷比を有する断片 SEQ ID NO: 6、及び約 5 6 8 の質量電荷比を有する断片 SEQ ID NO: 7、であることを特徴とする請求項 9 1 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 9 6】

前記軟骨組織の損傷により部分的に特徴付けられた、哺乳類の軟骨組織の生理的状态は、変形性関節症であることを特徴とする請求項 9 1 に記載の方法。

【請求項 9 7】

前記軟骨組織の損傷により部分的に特徴付けられた、哺乳類の軟骨組織の生理的状态は、関節リウマチであることを特徴とする請求項 9 1 に記載の方法。

【請求項 9 8】

前記生体サンプル内の前記マーカペプチドの相対分子量を測定するステップは、前記生体サンプル内に、既知の量の標準ペプチドを添加するステップ、前記標準ペプチドの存在量 / 応答のグラフ曲線を得るべく、前記生体サンプル内の前記標準ペプチドの存在量を、分析応答に対してプロットするステップ、前記マーカペプチドの存在量のグラフ曲線を得るべく、前記生体サンプル内のマーカペプチドの存在量をプロットするステップ、前記マーカペプチドの存在量のグラフ曲線における下側の領域を測定するステップ、及び前記生体サンプル内における前記マーカペプチドの相対存在量を得るべく、前記マーカペプチドの存在量のグラフ曲線における下側の領域と、前記標準ペプチドの存在量のグラフ曲線における下側の領域とを比較するステップをさらに含むことを特徴とする請求項 9 2 に記載の方法。

【請求項 9 9】

前記生体サンプル内のマーカペプチドの規定量を測定するべく、前記マーカペプチドと内的標準ペプチドとの分析に基づく反応を比較するステップをさらに含むことを特徴とする請求項 9 8 に記載の方法。

【請求項 1 0 0】

前記内的標準ペプチドは、前記マーカペプチドの同位体的に標識化された同族体であることを特徴とする請求項 9 8 に記載の方法。

【請求項 1 0 1】

前記内的標準ペプチドは、前記マーカペプチドと構造又は生物学的性質が類似しているペプチドであることを特徴とする請求項 9 2 に記載の方法。

【請求項 1 0 2】

コラーゲン分解により部分的に特徴付けられた哺乳類における生理的状态のコラーゲン分解を測定するための方法であって、SEQ ID NO: 13断片及びその翻訳後修飾の類似物を含んでいるペプチドの量を同定するべく、哺乳類の生体サンプルを分析するステップを含むことを特徴とする方法。

【請求項 1 0 3】

コラーゲン分解により部分的に特徴付けられた哺乳類における生理的状态のコラーゲン分解を測定するための方法であって、断片SEQ ID NO: 12及びSEQ ID NO: 12の翻訳後修飾の類似物を含んでいるペプチドの量を同定するべく、哺乳類の生体サンプルを分析するステップを含むことを特徴とする方法。

【請求項 1 0 4】

生体サンプル内の標的コラーゲン分解ペプチドの同定及び定量化を行うための方法であって、生体サンプルを取得するステップ、前記生体サンプルを内的標準と混合させるステップ、未知のサンプルを内的標準と混合させるステップ、各サンプルを遠心分離するステップ、ギ酸を添加しつつ各サンプルの溶解溶液を保持するステップ、規定の量の溶解溶液が残るまで遠心分離するステップ、前記溶解溶液を反応容器に移すステップ、窒素下で前記溶解溶液を乾燥させるステップ、各乾燥させたサンプルを、ギ酸を含んでいる水中に溶解させるステップ、

各乾燥させたサンプルを、オートサンプラー容器に移すステップ、
 オートサンプラー容器からのサンプルのアリコート、MS/MSインターフェース分光
 計に接続されたカラムに注入するステップ、
 サンプルのアリコートを溶出させるステップ、
 約2分間保持するステップ、
 前記カラムを再平衡させるステップ、
 標的ペプチド及び内的標準ペプチドのイオン対をモニタするステップ、
 各標的ペプチドのイオン対のピーク領域を統合するステップ、
 前記標的ペプチドの統合されたピーク領域を標準化するステップ、
 各未知のサンプルにおいて、前記標準ペプチドの量を測定すべく、前記標的ペプチドの標
 準化された統合領域と標準検定曲線とを比較するステップとを含むことを特徴とする方法
 。

10

【請求項105】

前記標的コラーゲン分解ペプチドは、
 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 11、SEQ
 ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 19、SEQ
 ID NO: 20、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 24、SEQ
 ID NO: 25、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29、SEQ
 ID NO: 30、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 33、SEQ ID NO: 34、SEQ
 ID NO: 35、SEQ ID NO: 36、SEQ ID NO: 37、SEQ ID NO: 38、SEQ ID NO: 39、SE
 Q ID NO: 40、SEQ ID NO: 41、SEQ ID NO: 42、SEQ ID NO: 43、
 及びSEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 11、
 SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 19、
 SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 24、
 SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29、
 SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 33、SEQ ID NO: 34、
 SEQ ID NO: 35、SEQ ID NO: 36、SEQ ID NO: 37、SEQ ID NO: 38、SEQ ID NO: 39、
 SEQ ID NO: 40、SEQ ID NO: 41、SEQ ID NO: 42、SEQ ID NO: 43の翻訳後修飾の類似
 物、から成る群より選択されることを特徴とする請求項104に記載の方法。

20

【請求項106】

前記生体サンプルは尿であることを特徴とする請求項104に記載の方法。

30

【請求項107】

ペプチドGly-Ala-Pro-Gly-Pro-Leu-Gly(SEQ ID NO: 13)、又はその翻訳後修飾の類似物。

【請求項108】

ペプチドGly-Ala-Pro-Gly-Pro-Leu-Gly (SEQ ID NO: 13)、又はその翻訳後修飾の類似物

。ペプチドVal-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-
 Gly-Pro-Ser-Gly-Ala-Glu-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 14)、又はその翻訳
 後修飾の類似物。

40

【請求項109】

被験体からタイプIIコラーゲンの酵素的分解を検出するための方法であって、
 3つの診断的配列の同定及び定量化を行うステップを含み、
 前記診断的配列は、配列Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 5)、Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO
 : 6)、及びPro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 7)と、その翻訳後修飾の類似物を有し
 ていることを特徴とする方法。

【請求項110】

前記3つの診断的配列は、それぞれ、約301、約471、及び約568の質量電荷比を
 有していることを特徴とする請求項109に記載の方法。

【請求項111】

前記3つの診断的配列は、それぞれ、約301、約455、及び約552の質量電荷比を

50

有していることを特徴とする請求項109に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、概してペプチドの同定及び定量化の方法に関するものである。詳しくは、コラゲナーゼによるコラーゲンの酵素分解により生成される分解ペプチドの同定及び定量化の方法に関するものである。また、本発明は、人間及び動物のタイプIIコラーゲンのコラーゲンの酵素分解により生成される特定ペプチドに関する。また、それらのペプチドを、生体サンプル内でのコラーゲンの酵素分解により特徴付けられた変形性関節症や関節リウマチのような病気又は生理条件における、コラゲナーゼ活性のマーカーとして認識する方法に関するものである。また、病気又は生理条件を治療又は調整するために用いられる物質及び薬の、酵素を抑制する効果を評価するためのペプチドの同定及び定量化の方法に関する。

10

【背景技術】

【0002】

概して、活性及び多数のコラーゲンのターンオーバーは、健康な成人では顕著な特性とは見なされていない。関節コラーゲンの成分であるタイプIIコラーゲンのターンオーバーは、概して、関節リウマチ、変形性関節症、又は分解コラーゲンが要因である他の病気又は生理条件などの病気が発生する。

【0003】

タイプIIコラーゲンの破壊は、マトリックス・メタロプロテイナーゼ・ファミリーの特定の酵素であるコラゲナーゼにより行われると考えられていた。コラゲナーゼは、3つのペプチド・ストランドから成っている。例えば、タイプIIコラーゲンは、アルファ1：タイプIIコラーゲン(SEQ ID NO: 44)と呼ばれる3つの同一ペプチド・ストランドの三重螺旋から成っている。コラーゲンがコラゲナーゼにより分解又は分解させられたときは、前記分解は特定のヘリカル内で行われる。このとき、ペプチドは、さらなる分解又は分解を受けやすい状態に置かれたままである。いずれにせよ、コラーゲン断片における初めの分解結果は、最終的にはタンパク質分解により決定される。例えば、タイプIIコラーゲンのコラゲナーゼ分解は、結果として、末尾がG P X G P Q G (Xはプロリン又はヒドロキシプロリン)であるC末端配列を有するペプチド断片を生じさせる。Billinghurstら

20

30

【0004】

Otternessらによる米国特許第6,030,792号では、コラーゲン断片を検出するための抗体は、結果として、タイプIIコラーゲンのコラゲナーゼ分解を生じさせると開示している。Pooleらによる米国特許第6,132,976号では、タイプIIコラーゲンの免疫学的検定測量により軟骨組織の分解を評価する方法について開示している。いずれにせよ、従来の、ペプチド断片の存在を検出することによりタイプIIコラーゲン酵素分解を検出する方法では、単に、標的C末端部分とすぐ隣のペプチド配列の存在を、それら配列部位に対して特異的な抗体を使用して測定するだけであった。

40

【発明の開示】

【発明の効果】

【0005】

本発明のある実施形態は、コラーゲンの酵素によるタンパク質分解を検出するための方法であって、生体サンプル又は生体抽出物内に存在するコラーゲンの特定ペプチドタンパク質分解生成物の同定及び定量化を行うステップを含んでいる。ある実施形態では、前記コラーゲンはタイプIIコラーゲンであり、前記特定ペプチドは、Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 1)によって表わされるC末端、及びその翻訳後修飾を有している。他の実施形態では、前記コラーゲンはタイプIコラーゲンであり、前記特定ペプチドは、GI

50

y-Thr-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 12)によって表わされるC末端、及びその翻訳後修飾を有している。他の実施形態では、前記コラーゲンはタイプIIIコラーゲンであり、前記特定ペプチドは、Gly-Ala-Pro-Gly-Pro-Leu-Gly(SEQ ID NO: 13)によって表わされるC末端、及びその翻訳後修飾を有している。

【0006】

好ましい実施形態では、前記コラーゲンの酵素によるタンパク質分解は、コラゲナーゼ活性の成果である。前記コラゲナーゼは、具体的には、マトリックス・メタロプロテイナーゼ-13である。

【0007】

また、ある実施形態は、薬(特にコラゲナーゼに対する薬)、により引き起こされるコラゲナーゼ活性の変化を、素早くかつ精度高くモニターすることを可能にする方法である。ある実施形態では、前記方法は、生体サンプル又は生体抽出物内に存在する、1つ以上の特定ペプチドの同定及び定量化を行うステップを含んでいる。前記生体サンプルは、具体的には、滑液、全血、血漿、又は尿である。

【0008】

本発明のある実施形態は、タンパク質分解酵素によるタンパク質分解により生じるペプチドのアミノ酸配列を同定する方法を提供している。

【0009】

本発明の他の実施形態は、ペプチドの質量を測定すべく、断片化されたペプチドの特徴付けられた又は診断用のカルボキシル末端アミノ酸配列を同定すべく、及び添加されたペプチドのフラグメントイオン及び無傷のペプチドの測定された分子量とに基づいて、前記ペプチドのN末端配列を同定すべく、生体流動体サンプル又は生体抽出物内のペプチドをタンデム質量分析により同定する方法である。

【0010】

本発明の他の実施形態は、生体流動体サンプル又は生体抽出物内の、特定C末端配列Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 1)及びその翻訳後修飾を有するペプチドを、既知の質量電荷比を有する前記C末端配列のフラグメントイオンを同定することにより、検出するための方法である。

【0011】

本発明の他の実施形態は、コラゲナーゼ酵素により分解したタイプIIIコラーゲンのペプチド断片の存在を確認すべく、生体流動体サンプル又は生体抽出物内の、特定C末端配列Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 1)及びその翻訳後修飾を有するペプチドを検出するための方法である。

【0012】

本発明の他の実施形態は、生体サンプル又は生体抽出物内の、ペプチド配列Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ala-Glu-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 2)、又はその翻訳後修飾を有するペプチドを検出するための方法である。

【0013】

本発明の他の実施形態は、生体サンプル又は生体抽出物内の、ペプチド配列Leu-Lys-Gly-Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Glu-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ala-Glu-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 15)、又はその翻訳後修飾を有するペプチドを検出するための方法である。

【0014】

本発明の他の実施形態は、生体サンプル又は生体抽出物内の、ペプチド配列Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Glu-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ala-Glu-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 16)、又はその翻訳後修飾を有するペプチドを検出するための方法である。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 5 】

本発明の他の実施形態は、生体サンプル又は生体抽出物内の、ペプチド配列Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ala-Glu-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 17)、又はその翻訳後修飾を有するペプチドを検出するための方法である。

【 0 0 1 6 】

本発明の他の実施形態は、生体サンプル又は生体抽出物内の、ペプチド配列Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 3)、又はその翻訳後修飾を有するペプチドを検出するための方法である。

10

【 0 0 1 7 】

本発明の他の実施形態は、生体サンプル又は生体抽出物内の、ペプチド配列Lys-Gly-Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 34)、又はその翻訳後修飾を有するペプチドを検出するための方法である。

【 0 0 1 8 】

本発明の他の実施形態は、生体サンプル又は生体抽出物内の、ペプチド配列Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 35)、又はその翻訳後修飾を有するペプチドを検出するための方法である。

20

【 0 0 1 9 】

本発明の他の実施形態は、生体サンプル又は生体抽出物内の、ペプチド配列Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 36)、又はその翻訳後修飾を有するペプチドを検出するための方法である。

【 0 0 2 0 】

本発明の他の実施形態は、生体サンプル又は生体抽出物内の、ペプチド配列Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 37)、又はその翻訳後修飾を有するペプチドを検出するための方法である。

30

【 0 0 2 1 】

本発明の他の実施形態は、生体サンプル又は生体抽出物内の、ペプチド配列Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 38)、又はその翻訳後修飾を有するペプチドを検出するための方法である。

【 0 0 2 2 】

本発明の他の実施形態は、生体サンプル又は生体抽出物内の、ペプチド配列Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 4)、又はその翻訳後修飾の同定及び定量化を行うための方法である。

40

【 0 0 2 3 】

本発明の他の実施形態は、生体サンプル又は生体抽出物内の、ペプチド配列Lys-Gly-Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 18)、又はその翻訳後修飾の同定及び定量化を行うための方法である。

【 0 0 2 4 】

本発明の他の実施形態は、生体サンプル又は生体抽出物内の、ペプチド配列Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-G

50

In-Gly(SEQ ID NO: 19)、又はその翻訳後修飾の同定及び定量化を行うための方法である。

【0025】

本発明の他の実施形態は、生体サンプル又は生体抽出物内の、ペプチド配列Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 20)、又はその翻訳後修飾の同定及び定量化を行うための方法である。

【0026】

本発明の他の実施形態は、生体サンプル又は生体抽出物内の、ペプチド配列Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 21)、又はその翻訳後修飾の同定及び定量化を行うための方法である。 10

【0027】

本発明の他の実施形態は、生体サンプル又は生体抽出物内の、ペプチド配列Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 22)、又はその翻訳後修飾の同定及び定量化を行うための方法である。

【0028】

本発明の他の実施形態は、生体サンプル又は生体抽出物内の、ペプチド配列Lys-Gly-Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 23)、又はその翻訳後修飾の同定及び定量化を行うための方法である。 20

【0029】

本発明の他の実施形態は、生体サンプル又は生体抽出物内の、ペプチド配列Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 24)、又はその翻訳後修飾の同定及び定量化を行うための方法である。

【0030】

本発明の他の実施形態は、生体サンプル又は生体抽出物内の、ペプチド配列Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 25)、又はその翻訳後修飾の同定及び定量化を行うための方法である。 30

【0031】

本発明の他の実施形態は、生体サンプル又は生体抽出物内の、ペプチド配列Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 26)、又はその翻訳後修飾の同定及び定量化を行うための方法である。

【0032】

本発明の他の実施形態は、生体サンプル又は生体抽出物内の、ペプチド配列Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 27)、又はその翻訳後修飾の同定及び定量化を行うための方法である。 40

【0033】

本発明の他の実施形態は、生体サンプル又は生体抽出物内の、ペプチド配列Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly(SEQ ID NO: 28)、又はその翻訳後修飾の同定及び定量化を行うための方法である。

【0034】

本発明の他の実施形態は、生体サンプル又は生体抽出物内の、ペプチド配列Lys-Gly-Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 29)、又はその翻訳後修飾の同定及び定量化を行うための 50

方法である。

【0035】

本発明の他の実施形態は、生体サンプル又は生体抽出物内の、ペプチド配列Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 11)、又はその翻訳後修飾の同定及び定量化を行うための方法である。

【0036】

本発明の他の実施形態は、生体サンプル又は生体抽出物内の、ペプチド配列Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 30)、又はその翻訳後修飾の同定及び定量化を行うための方法である。

10

【0037】

本発明の他の実施形態は、生体サンプル又は生体抽出物内の、ペプチド配列Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 31)、又はその翻訳後修飾の同定及び定量化を行うための方法である。

【0038】

本発明の他の実施形態は、生体サンプル又は生体抽出物内の、ペプチド配列Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 32)、又はその翻訳後修飾の同定及び定量化を行うための方法である。

20

【0039】

本発明の他の実施形態は、生体サンプル又は生体抽出物内の、ペプチド配列Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 33)、又はその翻訳後修飾の同定及び定量化を行うための方法である。

【0040】

本発明の他の実施形態は、生体サンプル又は生体抽出物内の、ペプチド配列Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Ala-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ser-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 8)、又はその翻訳後修飾の同定及び定量化を行うための方法である。

30

【0041】

本発明の他の実施形態は、生体サンプル又は生体抽出物内の、ペプチド配列Ala-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ser-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 39)、又はその翻訳後修飾の同定及び定量化を行うための方法である。

【0042】

本発明の他の実施形態は、生体サンプル又は生体抽出物内の、ペプチド配列Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ser-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 40)、又はその翻訳後修飾の同定及び定量化を行うための方法である。

【0043】

本発明の他の実施形態は、生体サンプル又は生体抽出物内の、ペプチド配列Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ser-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 41)、又はその翻訳後修飾の同定及び定量化を行うための方法である。

40

【0044】

本発明の他の実施形態は、生体サンプル又は生体抽出物内の、ペプチド配列Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ser-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 42)、又はその翻訳後修飾の同定及び定量化を行うための方法である。

【0045】

本発明の他の実施形態は、生体サンプル又は生体抽出物内の、ペプチド配列Val-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Val-Ser-Gly-Ala-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-

50

Gln-Gly (SEQ ID NO: 43)、又はその翻訳後修飾の同定及び定量化を行うための方法である。

【0046】

本発明の他の実施形態は、生体サンプル内の、ペプチドSEQ ID NO: 2、ペプチド SEQ ID NO: 3、又はペプチド SEQ ID NO: 4を、タンパク質分解酵素活性のマーカーとして、同定及び定量化を行うための方法である。

【0047】

本発明の他の実施形態は、生体サンプル内の、ペプチド SEQ ID NO: 8、ペプチド SEQ ID NO: 11、ペプチド SEQ ID NO: 15、ペプチド SEQ ID NO: 16、ペプチド SEQ ID NO: 17、ペプチド SEQ ID NO: 18、ペプチド SEQ ID NO: 19、ペプチド SEQ ID NO: 20、ペプチド SEQ ID NO: 21、ペプチド SEQ ID NO: 22、ペプチド SEQ ID NO: 23、ペプチド SEQ ID NO: 24、ペプチド SEQ ID NO: 25、ペプチド SEQ ID NO: 26、ペプチド SEQ ID NO: 27、ペプチド SEQ ID NO: 28、ペプチド SEQ ID NO: 29、ペプチド SEQ ID NO: 30、ペプチド SEQ ID NO: 31、ペプチド SEQ ID NO: 32、ペプチド SEQ ID NO: 33、ペプチド SEQ ID NO: 34、ペプチド SEQ ID NO: 35、ペプチド SEQ ID NO: 36、ペプチド SEQ ID NO: 37、ペプチド SEQ ID NO: 38、ペプチド SEQ ID NO: 39、ペプチド SEQ ID NO: 40、ペプチド SEQ ID NO: 41、ペプチド SEQ ID NO: 42、及びペプチドSEQ ID NO: 43を、タンパク質分解酵素活性のマーカーとして、同定及び定量化を行うための方法である。

10

【0048】

本発明の他の実施形態は、生体サンプル内の、ペプチドSEQ ID NO: 2、ペプチド SEQ ID NO: 3、又はペプチドSEQ ID NO: 4を、タイプI Iコラーゲンの分解により特徴付けられた被験体の損傷の存在又は生理的状態のマーカーとして、同定及び定量化を行うための方法である。なお、前記損傷又は生理的状態としては、変形性関節症や関節リウマチが挙げられる(ただし、これに限定されるものではない)。

20

【0049】

本発明の他の実施形態は、生体サンプル内の、ペプチド SEQ ID NO: 8、ペプチド SEQ ID NO: 11、ペプチド SEQ ID NO: 15、ペプチド SEQ ID NO: 16、ペプチド SEQ ID NO: 17、ペプチド SEQ ID NO: 18、ペプチド SEQ ID NO: 19、ペプチド SEQ ID NO: 20、ペプチド SEQ ID NO: 21、ペプチド SEQ ID NO: 22、ペプチド SEQ ID NO: 23、ペプチド SEQ ID NO: 24、ペプチド SEQ ID NO: 25、ペプチド SEQ ID NO: 26、ペプチド SEQ ID NO: 27、ペプチド SEQ ID NO: 28、ペプチド SEQ ID NO: 29、ペプチド SEQ ID NO: 30、ペプチド SEQ ID NO: 31、ペプチド SEQ ID NO: 32、ペプチド SEQ ID NO: 33、ペプチド SEQ ID NO: 34、ペプチド SEQ ID NO: 35、ペプチド SEQ ID NO: 36、ペプチド SEQ ID NO: 37、ペプチド SEQ ID NO: 38、ペプチド SEQ ID NO: 39、ペプチド SEQ ID NO: 40、ペプチド SEQ ID NO: 41、ペプチド SEQ ID NO: 42、及びペプチド SEQ ID NO: 43を、タイプI Iコラーゲンの分解により特徴付けられた被験体の損傷の存在又は生理的状態のマーカーとして、同定及び定量化を行うための方法である。なお、前記損傷又は生理的状態としては、変形性関節症や関節リウマチが挙げられる(ただし、これに限定されるものではない)。

30

【0050】

本発明の他の実施形態は、生体サンプル内の、ペプチドSEQ ID NO: 2、ペプチド SEQ ID NO: 3、又はペプチドSEQ ID NO: 4を、コラーゲンのタンパク質分解により特徴付けられた病気又は生理的状態の治療又はコントロールに使用される薬又は物質の有効性を評価又はモニターするべく、同定及び定量化を行うための方法である。

40

【0051】

本発明の他の実施形態は、生体サンプル内の、ペプチド SEQ ID NO: 8、ペプチド SEQ ID NO: 11、ペプチド SEQ ID NO: 15、ペプチド SEQ ID NO: 16、ペプチド SEQ ID NO: 17、ペプチド SEQ ID NO: 18、ペプチド SEQ ID NO: 19、ペプチド SEQ ID NO: 20、ペプチド SEQ ID NO: 21、ペプチド SEQ ID NO: 22、ペプチド SEQ ID NO: 23、ペプチド SEQ ID NO: 24、ペプチド SEQ ID NO: 25、ペプチド SEQ ID NO: 26、ペプチド SEQ ID NO: 27

50

、ペプチド SEQ ID NO: 28、ペプチド SEQ ID NO: 29、ペプチド SEQ ID NO: 30、ペプチド SEQ ID NO: 31、ペプチド SEQ ID NO: 32、ペプチド SEQ ID NO: 33、ペプチド SEQ ID NO: 34、ペプチド SEQ ID NO: 35、ペプチド SEQ ID NO: 36、ペプチド SEQ ID NO: 37、ペプチド SEQ ID NO: 38、ペプチド SEQ ID NO: 39、ペプチド SEQ ID NO: 40、ペプチド SEQ ID NO: 41、ペプチド SEQ ID NO: 42、及びペプチド SEQ ID NO: 43を、コラーゲンのタンパク質分解により特徴付けられた病気又は生理的状态の治療又はコントロールに使用される薬又は物質の有効性を評価又はモニターするべく、同定及び定量化を行うための方法である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0052】

本発明のある実施形態は、人間又は動物の生体サンプル内に存在するコラーゲンのペプチドの同定及び定量化を行う方法である。「生体サンプル」は、体液又は生体抽出物から得られたサンプルを示す。また、本発明は、特定コラゲナーゼ酵素活性生成物の存在の測定、及び構造の同定を行う方法を含んでいる。

10

【0053】

本発明は、タンパク質分解酵素（例えば、マトリックスメタロプロテイナーゼ-1、8、13）による分解の検出に使用することができる。前記分解は、特徴付けられたフラグメントイオンを有するアミノ酸配列のC末端を衝突活性化により断片化することによる生じる。本発明によれば、軟骨組織の損傷により特徴付けられた生理的な状態の診断及び予測を、コラーゲン分解ペプチドの同定及び定量化により行うことができる。このことにより、被験体の生体サンプルの軟骨組織の分解により特徴付けられた病気（例えば、変形性関節症や関節リウマチ）の症状及び徴候が明らかになる。本発明は、特に、ペプチドの翻訳後修飾の類似物の同定及び定量化を行うのに有効である。なお、本発明は、新しく発見されたペプチド及びその翻訳後修飾の類似物を含む。

20

【0054】

本発明のある実施形態は、タンパク質分解生成物（特にタンパク質分解酵素により分解されたタンパク質）の検出及び測定をするべく、生体流動体サンプル又は生体抽出物内のペプチド断片を質量分析する方法に関する。タンパク質分解酵素によるタンパク質の分解により、特徴付けられたC末端アミノ配列を有する分解ペプチドが生じる。本発明のある実施形態では、生体サンプル内の質量が既知であるコラーゲン分解ペプチドを、クロマトグラフ法により分離させる。そして、その後、従来の手法を用いて、質量分析計内で、衝突活性化により断片化する。衝突活性化のときに、ペプチドは特徴のある質量電荷比を有する断片を生成する。例えばC末端に特徴のあるペプチド断片の存在を検出することにより、C末端の配列を確認することができる。C末端の配列と分解ペプチドの質量を確認することにより、ペプチドのN末端を推定することができる。

30

【0055】

ペプチドのタンデム質量分析により決定されたペプチドとフラグメントイオン分子の重量と、既知のタンパク質配列（及びその仮定される翻訳後修飾）から予期されるそれらと比較して、全体のアミノ酸配列（ペプチドの翻訳後修飾を含んでいる）を決定する。また、本発明の同定方法によれば、C末端及びN末端配列を同定することができ、その結果、分解ペプチド全体のアミノ酸配列（ペプチド内に存在するプロリンアミノ酸の可能性のある水酸化を含む）が分かる。ペプチドの同定は、ペプチドの合成及び合成ペプチドが同様の分析データを示すことにより、さらに有効になる。ペプチドが一度同定されると、同じ又は類似した配列の標準ペプチドを、生体サンプル内の酵素的に分解されたペプチドの相対分子量を決定するのに使用することができる。この定量化は、タンパク質分解酵素の活性を評価するのに使用することができる。また、病気の診断又は予測、及びタンパク質分解酵素の活性を変更する薬又は物質の評価に使用することができる。

40

【0056】

本発明のある実施形態は、コラーゲン分解生成物の同定及び定量化の方法を提供する。例えば、本発明のある実施形態は、タイプI、II、及びIIIコラーゲンの分解生成物の

50

同定及び定量化の方法を提供する。また、本発明の好ましい実施形態は、生体サンプル内のタイプIIコラーゲンの、特定の、新しく発見されたペプチド分解生成物の検出及び定量化の方法を提供する。本発明は、酵素によるタイプIIコラーゲンの分解により生じた、例えばマトリックス・メタロプロテイナーゼ（特にマトリックス・メタロプロテイナーゼ1、8、及び13）のような、タンパク質分解酵素分解生成物の存在を検出するのに使用することができる。

【0057】

人間の尿サンプル内に存在するタイプIIコラーゲンのペプチド断片の同定及び定量化は、最初に、ペプチドLeu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ala-Glu-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 2)の翻訳後修飾の類似物（最も多い形成位置14, 26は、4-ヒドロキシプロリンである）が、関節炎の症状及び徴候を示すと医学的に診断された人間の被験体に発見可能な量で存在することを示す。また、次のペプチドLys-Gly-Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Glu-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ala-Glu-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 15)（最も多い形成位置10、16、25、31及び42は、4-ヒドロキシプロリンである）、ペプチドAla-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Glu-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ala-Glu-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 16)（最も多い形成位置8、14、23、29及び41は、4-ヒドロキシプロリンである）、及びペプチドGly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ala-Glu-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 17)（最も多い形成位置12及び24は、4-ヒドロキシプロリンである）も、関節炎の症状及び徴候を示すと医学的に診断された人間の被験体に発見可能な量で存在する。

【0058】

ペプチドSEQ ID NO: 16は、人間の尿から最も多く検出された、タイプIIコラーゲン・ネオエピトープ（neoepitope）ペプチドである。

【0059】

ウシの尿サンプル内に存在するタイプIIコラーゲンのペプチド断片の同定は、最初は、Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 3)の翻訳後修飾の類似物（最も多い形成位置14及び26は、4-ヒドロキシプロリンである）が、関節炎の症状及び徴候を示すウシの被験体に発見可能な量で存在することを示す。次のペプチドも同様である。ペプチドLys-Gly-Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 34)（最も多い形成位置10、16、25、28及び43は4-ヒドロキシプロリンであり、位置43はヒドロキシリジンである）、ペプチドAla-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 35)（最も多い形成位置8、14、23、29及び41は4-ヒドロキシプロリンであり、位置26はヒドロキシリジンである）、ペプチドGly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 36)（最も多い形成位置4、10及び22は4-ヒドロキシプロリンであり、位置7はヒドロキシリジンである）、ペプチドPro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 37)（最も多い形成位置4、10及び20は4-ヒドロキシプロリンであり、位置5はヒドロキシリジンである）、及びペプチドGlu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 38)（最も多い形成位置2はヒドロキシリジンであり、位置5及び17は4-ヒドロキシプロリンである）。

【 0 0 6 0 】

ペプチドSEQ ID NO: 35は、ウシの尿から最も多く検出された、タイプIIコラーゲン・ネオエピトープ (neoepitope) ペプチドである。

【 0 0 6 1 】

同様に、イヌの尿サンプル内に存在するタイプIIコラーゲンのペプチド断片の同定及び定量化により、Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 4) (最も多い形成位置14及び26は、4-ヒドロキシプロリンである)が、関節炎の症状及び徴候を示すイヌの被験体に発見可能な量で存在することを示す。次のペプチドも同様である。ペプチドLys-Gly-Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 18) (最も多い形成位置10、16、25、31及び43は4-ヒドロキシプロリンであり、位置28はヒドロキシリジンである)、ペプチドAla-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 19) (最も多い形成位置8、14、23、29及び41は4-ヒドロキシプロリンであり、位置26はヒドロキシリジンである)、ペプチドAla-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 20) (最も多い形成位置4、10及び22は4-ヒドロキシプロリンであり、位置10はヒドロキシリジンである)、ペプチドPro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 21) (最も多い形成位置2、8及び20は2,3又は4-ヒドロキシプロリンであり、位置5は4-ヒドロキシリジンである)、及びペプチドGlu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 22) (最も多い形成位置2はヒドロキシリジンであり、位置5及び17は4-ヒドロキシプロリンである)。

10

20

【 0 0 6 2 】

ペプチドSEQ ID NO: 19は、イヌの尿から最も多く検出された、タイプIIコラーゲン・ネオエピトープ (neoepitope) ペプチドである。

【 0 0 6 3 】

次のペプチドは、関節炎の症状及び徴候を示すネコの尿から最も多く検出された、ペプチドである。ペプチドLys-Gly-Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 23) (最も多い形成位置10、16、25、31及び43は4-ヒドロキシプロリンであり、位置28はヒドロキシリジンである)、ペプチドAla-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 24) (最も多い形成位置8、14、23、29及び41は4-ヒドロキシプロリンであり、位置26はヒドロキシリジンである)、ペプチドLeu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 25) (最も多い形成位置8、14及び26は、4-ヒドロキシプロリンであり、位置11はヒドロキシリジンである)、ペプチドAla-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 26) (最も多い形成位置4、10及び22は、4-ヒドロキシプロリンであり、位置7はヒドロキシリジンである)、ペプチドPro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 27) (最も多い形成位置2、8及び20は4-ヒドロキシプロリンであり、位置5はヒドロキシリジンである)、及びペプチドGlu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 28) (最も多い形成位置2はヒドロキシリジンであり、位置5及び17

30

40

50

は 4 - ヒドロキシプロリンである)。

【 0 0 6 4 】

ペプチドSEQ ID NO: 24は、ネコの尿から最も多く検出された、タイプ I I コラーゲン・ネオエピトープ (neoepitope) ペプチドである。

【 0 0 6 5 】

次のペプチドは、関節炎の症状及び徴候を示すウマの尿から最も多く検出された、ペプチドである。ペプチドLeu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 11) (最も多い形成位置 8、14 及び 26 は、4 - ヒドロキシプロリンであり、位置 11 はヒドロキシリジンである)、ペプチドLys-Gly-Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 29) (最も多い形成位置 10、16、25 及び 31 は、4 - ヒドロキシプロリンであり、位置 28 はヒドロキシリジンである)、ペプチドAla-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 30) (最も多い形成位置 8、14、23、29 及び 41 は、4 - ヒドロキシプロリンであり、位置 26 はヒドロキシリジンである)、ペプチドAla-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 31) (最も多い形成位置 4、10 及び 22 は 4 - ヒドロキシプロリンであり、位置 7 はヒドロキシリジンである)、ペプチドPro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 32) (最も多い形成位置 2、8 及び 20 は 4 - ヒドロキシプロリンであり、位置 26 はヒドロキシリジンである)、及びペプチドGlu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 33) (最も多い形成位置 2 はヒドロキシリジンであり、位置 5 及び 17 は 4 - ヒドロキシプロリンである)。

10

20

【 0 0 6 6 】

ペプチドSEQ ID NO: 30は、ウマの尿から最も多く検出された、タイプ I I コラーゲン・ネオエピトープ (neoepitope) ペプチドである。

【 0 0 6 7 】

次のペプチドは、アジュバント関節炎の症状及び徴候を示すネズミの尿から最も多く検出されたペプチドである。ペプチドLeu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Ala-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ser-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 8) (最も多い形成位置 8、14 及び 26 は 4 - ヒドロキシプロリンであり、位置 11 はヒドロキシリジンである)、ペプチドAla-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ser-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 39) (最も多い形成位置 2、8 及び 20 は、4 - ヒドロキシプロリンであり、位置 5 はヒドロキシリジンである)、ペプチドGlu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ser-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 40) (最も多い形成位置 2 はヒドロキシリジンであり、位置 5、17 及び 4 は 4 - ヒドロキシプロリンである)、ペプチドGly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ser-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 41) (最も多い形成位置 3 及び 15 は 4 - ヒドロキシプロリンである)、及びペプチドAsp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ser-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 42) (位置 10 は 4 - ヒドロキシプロリンである)。

30

40

【 0 0 6 8 】

次のペプチドは、関節炎の症状及び徴候を示すモルモット (guinea pig: モルモット) から最も多く検出された、タイプ I I コラーゲンのペプチドである。Val-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Val-Ser-Gly-Ala-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 43) (最も多い形成位置 8、14、23、20 及び 41 は 4 - ヒドロキシプロ

50

ロリンであり、位置 26 はヒドロキシリジンである)。

【0069】

翻訳後修飾、4 - ヒドロキシプロリン、及びリジンの水酸化は、異なった種類で様々なレベルで現われる、ということが知られている。当初の翻訳されたペプチドは、翻訳後修飾の置換と同様に、被験体の尿から発見されるであろう。また、それらは、本発明の実施形態に含まれるであろう。

【0070】

これらの分解ペプチドは、タイプ I コラーゲンのコラゲナーゼ (特にマトリックス・メタロプロテイナーゼ、さらにはマトリックス・メタロプロテイナーゼ - 13 (NMP13)) による分解の結果であると考えられる。したがって、ペプチド SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 33、SEQ ID NO: 34、SEQ ID NO: 35、SEQ ID NO: 36、SEQ ID NO: 37、SEQ ID NO: 38、SEQ ID NO: 39、SEQ ID NO: 40、SEQ ID NO: 41、SEQ ID NO: 42、SEQ ID NO: 43、及び特にそれらの翻訳後修飾は、酵素活性及び/又はタイプ I コラーゲン破壊により特徴付けられる病気又は状態のマーカーとして、生体サンプルから検出される。ペプチドの特定可能な派生物又は修飾も同様に、マーカーとして機能する。また、本発明の範囲に含まれる。

10

20

【0071】

ペプチド SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 33、SEQ ID NO: 34、SEQ ID NO: 35、SEQ ID NO: 36、SEQ ID NO: 37、SEQ ID NO: 38、SEQ ID NO: 39、SEQ ID NO: 40、SEQ ID NO: 41、SEQ ID NO: 42、SEQ ID NO: 43、及びそれらの翻訳後修飾は、一般に、下記の分析的な検出方法により検出される。

30

【0072】

生体サンプル (尿、血漿、全血、滑液) は、被験体から集められる。

【0073】

サンプル内のペプチドの相対分子量は第 1 段階の質量分析により測定され、その後、ペプチドは断片化され、フラグメントイオンは第 2 段階のタンデム質量分析により測定される。詳細については後記する。例としては、関節炎の症状及び徴候を示す被験体の生体サンプル内でピコモルからナノモル量で検出されるペプチド SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3 及び SEQ ID NO: 4 の翻訳後修飾の類似物は、約 900 から約 1000 の範囲の質量電荷比を有する。また、この範囲のプロリン (他の例ではリジン) の翻訳後修飾に応じた質量電荷比の既知のバリエーションを含む。これらのペプチドの電荷は +3 である。下記の実施例でさらに詳しく説明するが、ペプチド SEQ ID NO: 2 から最も多く検出された翻訳後修飾の類似物の相対質量 / 電荷は、914.4 であり、電荷は +3 である。ペプチド SEQ ID NO: 3 から最も多く検出された翻訳後修飾の類似物の相対質量 / 電荷は、918.7 であり、ペプチド SEQ ID NO: 4 から最も多く検出された翻訳後修飾の類似物の相対質量 / 電荷は、913.4 である。

40

【0074】

ペプチドは、サンプルの生体基質成分から従来の手法により分離することができる。例えば、クロマトグラフ又は電気泳動の分離を使用することができる。他の従来の分離又はクリーンアップ方法は、本発明により提供される。液体クロマトグラフ分離では、標的集団のペプチドを含んでいる溶離剤は、従来の液体クロマトグラフィ質量分析インターフェースを介して、質量分析計に導入される。

50

【0075】

ペプチドは、従来の手法を用いて、衝突細胞内の中性ガスによる衝突活性化により断片化される。結果として、対応するフラグメントイオンを作成するための、ペプチドの衝突誘起解離が生じる。フラグメントイオンのスペクトラルを分析する。ペプチドは、C末端配列Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 1) (第3の位置にあるプロリンは翻訳後修飾されており、ヒドロキシプロリンは質量電荷比により特徴付けられたイオンを生成するために断片化されている)を有する。例としては、SEQ ID NO: 1の第3の位置にあるプロリンは4 - ヒドロキシプロリンであり、特徴付けられた断片の各質量は、約 m/z 301、471及び568である。これらのC末端配列の特徴付けられた断片は、プロリンのN末端側のペプチド結合の顕著な分解の結果である。C末端配列Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 1)を有するペプチド、即ち、非修飾形態は、下記の配列のフラグメントイオンを作成するために、断片化される。配列Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 5) (約301の質量を有する)、配列Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 6) (約455の質量を有する)、及び配列Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 7) (約552の質量を有する)。

10

【0076】

特徴付けられた生成イオンの同定は、C末端配列Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 1)又はその翻訳後修飾の存在を強く示すものである。したがって、同様に、ペプチドSEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、及びSEQ ID NO: 7は、それら自体が、タイプI Iコラーゲン分解のマーカーである。

【0077】

後記するように、生体サンプル内の断片化されたペプチドのさらなる同定により、関節症の症状及び徴候があると医学的に診断されたヒト被験体では、主な分解ペプチドは、Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ala-Glu-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 2) (位置14及び26のプロリンは4 - ヒドロキシプロリンである)、及びAla-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Glu-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ala-Glu-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 16) (位置8、14、23及び41は4 - ヒドロキシプロリンである)である。ペプチドSEQ ID NO: 16は、その2つの中で最も多く検出される。

20

【0078】

翻訳後修飾されたペプチドSEQ ID NO: 3及びSEQ ID NO: 19は、イヌから最も多く検出されるペプチドである (ペプチドSEQ ID NO: 19の方がより多く検出される)。翻訳後修飾されたペプチドSEQ ID NO: 4及びSEQ ID NO: 35は、ウシから検出される主な分解ペプチドである (ペプチドSEQ ID NO: 35の方がより多く検出される)。翻訳後修飾されたペプチドSEQ ID NO: 24は、ネコから最も多く検出されるペプチドであり、翻訳後修飾されたペプチドSEQ ID NO: 30は、ウマから最も多く検出されるペプチドであり、翻訳後修飾されたペプチドSEQ ID NO: 42は、ネズミから最も多く検出されるペプチドであり、翻訳後修飾されたペプチドSEQ ID NO: 42は、モルモット (guinea pig) から検出される主なペプチドである。なお、これらの被験体は、全て、軟骨組織の悪化又は関節症の症状及び徴候を示している。

30

【0079】

また、これらの列挙したペプチドは、前記した各動物のサンプルから検出された主なものであり、より好ましい生体マーカーとしての役割を果たす。ここで列挙された全ての発見されたペプチド配列は、後記するような有用性を有する。

40

【0080】

任意のタンパク質分解酵素がタンパク質やペプチドを分解させると、結果として、特徴付けられたC末端、N末端及びそれらの起こり得る翻訳後修飾が発生する。これは、アミノ酸配列内では、特定の酵素がタンパク質を特定の位置で分解させるという事実のためである。特定のC末端を有するペプチドの断片化は、特定の質量電荷比を有する特徴付けられた断片の衝突活性化を引き起こす。つまり、断片化により、各C末端はそれぞれ自身の指

50

紋を持つことができる。したがって、前記した方法は、タンパク質分解の結果生じた、特徴付けられた生成イオンに断片化される既知のC末端を残している、任意のペプチドのアミノ酸配列を測定するために使用することができる。

【0081】

本発明に係る方法は、タイプIIコラーゲンから生じるペプチド、又は明細書中で配列識別番号により記載されている他の特定ペプチドの同定及び定量化に限定されるものではない。本発明に係る分析方法は、タイプIIコラーゲン以外のタンパク質の分解、又はコラーゲナーゼ（特にメタロプロテイナーゼ-13：MMP-13）以外の酵素により生成される、タンパク質分解酵素分解生成物の存在を検出するために使用することができる。一例としては、本発明に係る方法は、マトリックス・メタロプロテイナーゼ-1：（MMP-1）やマトリックス・メタロプロテイナーゼ-8：（MMP-8）のような他のマトリックス・メタロプロテイナーゼによる分解により生成されるタンパク質分解生成物の同定に使用することができる。

10

【0082】

本発明に係る方法によりペプチドを発見するいくつかの実施例を以下に示す。

【実施例】

【0083】

《実施例1》

（ウシ亜科のタイプIIコラーゲンのペプチド断片の同定）

変形性関節症の症状及び徴候を示すウシの尿の中に存在するペプチドSEQ ID NO: 3の翻訳後修飾を、次の手順により測定する。

20

1. 変形性関節症の症状及び徴候を示すと認められた被験体から、尿を収集する。
2. 酢酸アンモニウムにより、尿のpHを7.1に調整する。
3. 予備の混合モードのイオン交換逆相カラムクロマトグラフィ・カラムを使用して、サンプルを断片化する。
4. カラムからサンプルを溶出させる。
5. サンプルを乾燥させる。
6. 適したカラムクロマトグラフィ・バッファ内で、水を加えてサンプルを元に戻す。
7. 下記のような液体クロマトグラフィタンデム質量分析（LC-MS-MS）により、サンプルを分析する。

30

（a）サンプルペプチドを衝突活性化により断片化する。

（b） m/z 301、471及び568の特徴付けられたペプチド断片を、主な断片として特定する。

（c） m/z 301、471及び568の断片化されたペプチドを、Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly（SEQ ID NO: 3）（位置14及び26のプロリンは4-ヒドロキシプロリンである）の翻訳後修飾として同定する。

【0084】

Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly（SEQ ID NO: 1）C末端（位置3のプロリンは水酸化されている）を有する、タイプIIコラーゲンのペプチドの断片（SEQ ID NO: 3）を図1に示す。垂直線（Y軸）は、特定の質量電荷比が検出されたフラグメントイオンの量（強度）を示し、検出された全てのイオン全体のパーセントとして表されている。水平線（X軸）は、検出されたフラグメントイオンの質量電荷比を示す。尿サンプル内の主な断片生成物は、 m/z 301、471及び568であると同定される。

40

【0085】

タンパク質データベース内の全てのタンパク質を、全てのペプチド結合について分解させることにより（酵素の特異性はない）、ペプチドのMS/MSスペクトラル内のフラグメントイオンを、シリコン内で生成された理論的配列イオンと一致させるために、ソフトウェアが使用される。ソフトウェアは、各アミノ酸間で、期待されるペプチドの分解に基づく、無傷なペプチド及びそのフラグメントイオンの観測された理論的な分子量を一致させ

50

る。ソフトウェアは、観測されたデータを、既知の哺乳類のタンパク質の広範囲なタンパク質データベースにおける全てのタンパク質に由来する全ての可能性のあるペプチドと一致させる。

【0086】

プログラムは、質量 m/z 918.7、電荷 3+ を有するペプチド（その断片は、 m/z 301、471 及び 568 においてイオンを生成する）は、Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 3)（位置 14 及び 26 のプロリンは 4 - ヒドロキシプロリンである）の翻訳後修飾であることを決定する。

【0087】

ソフトウェアが正しいペプチドを決定することを証明するために、標準となるペプチドを合成し、その LC 残留時間と MS/MS スペクトルを、尿内で検出されたペプチドのそれと一致させる。こうして、分析データは一致する。

【0088】

《実施例 2》

（ヒトのタイプ II コラーゲンのペプチド断片の同定及び定量化）

変形性関節症の症状及び徴候を示すと診断されたヒト被験体の尿サンプル内におけるペプチド SEQ ID NO: 2 の存在を確認するために、実施例 1 で用いられた手法が使用される。

【0089】

図 2 はヒト被験体に由来するサンプル内のペプチドの断片を示す。図 2 に示すように、ペプチドは、ペプチド Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 2)（位置 14 及び 26 のプロリンは 4 - ヒドロキシプロリンである）の翻訳後修飾である。ペプチド SEQ ID NO: 2 は、質量/電荷が、914.4 / 3+ である。断片は、 m/z 301、471 及び 568 において、それぞれ SEQ. ID NO: 5、SEQ ID NO: 6 及び SEQ ID NO: 7 に対応する、特徴付けられた生成イオンを生成する。

【0090】

《実施例 3》

（イヌの尿サンプルのタイプ II コラーゲンの同定及び定量化）

変形性関節症の症状及び徴候を示すと診断されたイヌ被験体から得られた尿サンプル内におけるペプチド Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 4)（位置 26 のプロリンは 4 - ヒドロキシプロリンである）の存在を確認するために、実施例 1 で用いられた手法が使用される。

【0091】

図 3 はサンプル内のペプチドの断片を示す。図 3 に示すように、ペプチドは、ペプチド Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 4)（位置 14 及び 26 のプロリンは 4 - ヒドロキシプロリンである）の翻訳後修飾である。ペプチド SEQ ID NO: 4 は、質量/電荷が、913.4 / 3+ である。断片は、 m/z 301、471 又は 455、及び 568 又は 552 において、それぞれ SEQ. ID NO: 5、SEQ ID NO: 6 及び SEQ ID NO: 7 に対応する、特徴付けられた生成イオンを生成する。イヌの尿内の少なくとも 2 つの翻訳後修飾形態に、同一のペプチド配列が存在する。第 1 の形態では、上側の質量分析スペクトルに示すように、プロリン - 14 が水酸化されている。そして、第 2 の形態では、下側の質量分析スペクトルに示すように、プロリン - 26 が水酸化されている。

【0092】

実施例 1 は、ウシに関して、タンパク質分解酵素によって分解することにより、ウシの尿内におけるタイプ II コラーゲン由来の特定の及び主なペプチド断片の検出について説明している。ウシは、アミノ配列 Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 4) の翻訳後修飾であることを決定する。

10

20

30

40

50

3)及び特にそれらの翻訳後修飾を有している。実施例2は、ヒトに関して、タンパク質分解酵素によって分解することにより、ヒトの尿内におけるタイプIIコラーゲン由来の特定の及び主なペプチド配列Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 2)の検出について説明している。実施例3は、イヌに関して、タンパク質分解酵素によって分解することにより、イヌの尿内におけるタイプIIコラーゲン由来の特定の及び主なペプチド断片の検出について説明している。イヌは、アミノ配列Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 4)又はそれらの翻訳後修飾を有している。全ての3つのペプチドは、位置8、14及び26でプロリンが4-ヒドロキシプロリンである、及び位置11でリジンが4-ヒドロキシリジンである修飾を含むことができる。動物の種ごとに独立して、主なペプチドの断片化により、約301、471及び568の質量電荷比を有するフラグメントイオンが生じることが知られている。もともとの転写ペプチドの断片化により、約301、455及び552の質量電荷比を有する特徴付けられたフラグメントイオンが生じる。このことは、本発明の範囲に含まれる。

10

【0093】

他の特徴付けられたフラグメントイオンは、与えられた種で診断される。一例として、図1は、396及び1219の質量電荷比を有する特徴付けられたフラグメントイオンは、ウシのサンプル内で検出されたペプチドSEQ ID NO: 3の断片化により生じることを示す。また、図2は、407及び1222の質量電荷比を有する特徴付けられたフラグメントイオンは、ヒトのサンプル内で検出されたペプチドSEQ ID NO: 2の断片化により生じることを示す。また、図3は、301、471及び568の質量電荷比を有するフラグメントイオンは、本発明の好ましい実施形態である。また、他の特定のフラグメントイオンは、その種からのサンプルを分析する際の有用性を有している。このことは、本発明の範囲に含まれる。

20

【0094】

ペプチドSEQ ID NO: 11及びその翻訳後修飾が、ウマ由来の試料内で検出されることが予測される。このことは実施例10において詳述する。また、ペプチドSEQ ID NO: 9が、ウサギ由来の試料内で検出されることが予測される。また、ペプチドSEQ ID NO: 10が、ネズミ由来の試料内で検出されることが予測される。それらのペプチドの翻訳後修飾も同様である。なお、これは、これらの種が、タンパク質分解の症状及び徴候を示す、及び関節症の病気の症状及び徴候を示す前の状態の場合である。

30

【0095】

例えば、Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 2)のような特定ペプチドが、ヒトの生体流動体サンプル内で、タイプIIコラーゲン分解ペプチドとして同定されることが分かっているので、与えられたサンプルのペプチドの相対存在量は、被験体内に存在するタイプIIコラーゲン分解の範囲を示す。

【0096】

ペプチドSEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 9、及びSEQ ID NO: 10は、下記の手法により同定及び定量化される。

40

【0097】

生体サンプル、例えば尿を、被験体より収集する。m/zが(M+3H)に対して約918.7、3+(SEQ ID NO: 3)の質量を有するペプチド(前記した標的ペプチド)を、従来の手法を用いてサンプルから抽出する。下記の実施例4を参照されたい。サンプルを量が分かっている合成ペプチド(内的標準として知られている)と混合させる。合成ペプチドは、標的ペプチドの配列と非常に良く似た配列を有している。例えば、ペプチドVal-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 14)を内的標準として用いることができる。代わりに、同一の配列の安定同位体標識ペプチド、又は非類似の構造の化合物

50

を、従来技術を用いて、生体サンプルと混合させ、内的標準として使用する。分析のため、サンプルを準備し、LC-MS-MSに導入する。標的ペプチドの存在は、3つの基準により確認される。1) 適当な時間でLCカラムから溶出する。2) 正しい分子量である。3) 衝突活性化により、 m/z が約301、471及び568である特徴付けられた断片、又は他の既知であるペプチドのフラグメントイオンを生成する。図5は、代表的な、標的ペプチド及び内的標準の溶出像を表すクロマトグラムである。標的ペプチドの量と、標準ペプチドの量との比較は、サンプル内の標的ペプチドの相対存在量を示す内的標準の量により規格化される。さらに、サンプル内での標的ペプチドの相対存在量を得るために、標準ペプチドの量を意味する曲線の下側の領域と、標的ペプチドの量を意味する曲線の下側の領域とを比較する。標準及び標的ペプチドの領域は、サンプル間における抽出効率、検出、及び他の可能性のある変量のばらつきを調整するために、内的標準ペプチドの領域と比較して標準化される。もちろん、生体サンプル内の標的ペプチドを定量化するための許容範囲な方法は、本発明の範囲に含まれる。人の尿内に存在するタイプIIコラーゲンのペプチド生体マーカーの一般的な計量手法は、代表的な手法として下記の実施例4で詳述する。

10

【0098】

《実施例4》

(人の尿内に存在するタイプIIコラーゲンのペプチド生体マーカーの一般的な計量手法)

1. まず、ポリプロピレン・チューブ内に、尿を収集する。サンプルは使用されるまで、摂氏-80度に冷凍される。
2. 従来技術の標準的な手法を用いて、クレアチニン計量のために、100mLの尿をアリコートする。
3. 合成ペプチド標準を使用して30ng/mL~100ng/mLの標準液を用意する。
4. 内的標準(類似ペプチド)を各尿サンプル30mLに混合させて、最終濃度が1.0nMとなるように標準化する。
5. 尿溶液を、混合相(RP及びAEX)の予備クロマトグラフィにより抽出する。
 - (a) 10mLのMeOHによりカートリッジを平衡させる
 - (b) カートリッジを10mLの50mM NH₄OAc pH7により条件付ける。
 - (c) サンプルを入れる(pH7)
 - (d) 10mLの50mM NH₄OAc pH7で洗浄する。
 - (e) 10mLの5% MeOHで洗浄する。
 - (f) 1mLの5% ギ酸、95% MeOHで溶出させる
6. 溶離液を乾燥させた後、100mLの2%ギ酸溶液により戻す。
7. 溶液をLC/MS/MSにより分析する。
8. サンプル内のコラーゲン・ペプチドを、それらの標準と対応して、関連LC/MS/MSにより定量化し、内的標準の対応のために標準化する。
9. 最終的なペプチド濃度をクレアチニン・レベルとなるように標準化する。

30

40

【0099】

(標準曲線の作成)

1. コラーゲンIIペプチドの原液の作成: 10ng/mL、100ng/mL、1μg/mL、及び10μg/mL
2. 内的標準の原液の作成: 3μg/mL
3. 30mLの尿に100μLの内的標準を添加する
4. 100pg/mL、1ng/mL、10ng/mL、及び100ng/mL標準を得るために、それぞれ、300μLの10ng/mL、100ng/mL、1μg/mL、及び10μg/mLを、30mLの尿に添加する。30pg/mLの標準を得るために、90μLの10ng/mLの原液を、30mLの尿に添加する。

【0100】

50

図6は、タイプIIコラーゲン・ペプチド (SEQ ID NO: 2) を測定するために使用される、914/568イオン対に対する抽出イオンクロマトグラムの比較を示す図である。下側のスキャンは、関節症の症状及び徴候を示さないヒト被験体の尿からは、5.7分で溶出するペプチドは検出されないことを示す。真ん中のスキャンはペプチドの検出レベルを示し、上側のスキャンはこのペプチドの合成類似化合物が同時に溶出することを示す。図7は、30pg/mL ~ 100ng/mLの範囲での様々な濃度の対照としてのヒトの尿に混合されたタイプIIコラーゲンの標準曲線を示す。正確な定量化のために、反応はこの濃度の範囲を超えて直線状に延びる。

【0101】

図8は、異なる4頭のウシの尿におけるペプチドSEQ. ID. NO: 3 (位置14及び26は4 - ヒドロキシプロリンを有する) の翻訳後修飾の相対存在量を示す棒グラフである。ペプチドの相対存在量は、図4に示したグラフと略類似となるように図示した。曲線の下側の測定された領域により決定される標的ペプチドの相対存在量は棒グラフと対比される。ウシ1は関節症の症状及び徴候を示す。ウシ2は関節症の初期症状及び徴候を示す。ウシ3及び4は関節症の症状及び徴候を示さない。標的ペプチドの相対存在量は、ウシ1はウシ2よりも約5倍大きい。ウシ2のペプチドSEQ. ID. NO: 3の翻訳後修飾は、ウシ3及び4のそれよりも相対存在量が多い。

【0102】

図9は、ヒトの尿におけるペプチドSEQ. ID. NO: 2 (位置14及び26は4 - ヒドロキシプロリンを有する) の翻訳後修飾の相対存在量を示す棒グラフである。図9に示すように、通常のヒトの尿におけるペプチドの相対存在量は検出されない(0で示す)。また、変形性関節症の症状及び徴候を示すヒト被験体の尿におけるペプチドの相対存在量は8000である。

【0103】

図10は、変形性関節症の症状及び徴候を示すヒト被験体の尿におけるタイプIIコラーゲン・ペプチド (SEQ ID NO: 2) の経時的なレベルを示す棒グラフである。ペプチドのレベルは、14日間で、60 ~ 200pmol/mLで変化する。また、対照としてのヒトの尿サンプルよりも、数値が高い。グラフにプロットされた結果は、生体マーカーとしてのペプチドの有効性と有用性を示す。生体マーカーのレベルの経時的な測定は、病気の進行は又は回復を示すであろう。生体マーカーのレベルの変化は、治療の有効性の評価に使用することが可能である。例えば、図9を参照して、MMP-13抑制剤による被験体の成功した治療は、結果として、患者から採取した生体サンプルにおけるタイプIIコラーゲン・ペプチドの相対レベルを減少させるであろう。当然のことながら、これらの新規である生体マーカーの使用は、生体マーカーの有用性の実例となる。任意の生体マーカーの有用な用途と、ここに記載した同定及び定量化の方法は、本発明の範囲に含まれる。

【0104】

また、当然のことながら、当業者であれば、認められた技術を用いて、特徴付けられた及び特定可能な本発明の新規である生体マーカーの派生物及び修正物を生成することが可能であろう。例えば、SEQ ID NO: 2 ~ SEQ ID NO: 43で表される任意のペプチド又はそれらの翻訳後類似物は、容易に特定可能な1つ以上の派生物を生成させるために、酵素的に又は化学的に分解させることができる。そのような派生物は、結果として、生体マーカーとして機能することができる。同様に、例えば、SEQ ID NO: 2 ~ SEQ ID NO: 43で表される任意のペプチド又はそれらの翻訳後類似物は、例えば、置換、添加又は1つ以上のアミノ酸残基を除去して変化させることにより、修飾することができる。その結果として、特定可能な修飾されたペプチドは、生体マーカーとして機能することができる。

【0105】

また、ペプチドの物理的性質(例えば、疎水性や分子量など)を変更することにより、標的ペプチドの精製又は検出を助長することができることは、当業者にとっては容易に理解できることであろう。それらの変更は、標的ペプチドの特定アミノ酸を修飾するべく、生体流動体(尿や血を含む)又は生体流動体の抽出物の誘導体化により行うことができる。

修飾される位置は、ヒドロキシプロリン又はセリン上の水酸基；リジン又は標的ペプチドのN末端上のアミノ基；アルギニン上のグアニジル（guanidyl）基；グルタミン上のカルボキサミジル（carboxamidyl）基；アスパラギン酸、グルタミン酸、及び標的ペプチドのN末端上のカルボキシル基を持つアミノ基；それらの修飾における任意の組み合わせ、である。ただし、これらに限定されるものではない。

【0106】

化学誘導体化によるアミノ酸側鎖の修飾の例は、参考文献「D. Knapp, Handbook of Analytical Derivatization Reactions, John Wiley and Sons, Inc. (1979)」に記載されており、当業者に知られている。なお、この参考文献は引用することをもって本発明の一部とする。アミノ酸側鎖の化学誘導体化に使用される試薬は、市販されている。試薬の製造者と知られている一例としては、「Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois」がある。

10

【0107】

本発明のペプチドを含むアミノ酸は、生体流動体又は抽出物内で、科学的不安定性に起因して、修飾される。修飾の例としては、アスパラギン酸をイソアスパラギン酸に変換することや、グルタミンの環化が挙げられる。これらの科学的な変換により修飾されたペプチドに対する、本発明の定量化は、本発明の範囲に含まれる。

【0108】

本発明のペプチドは、短鎖ペプチド（その後、精製又は検出される）を生成するべく、科学的又は酵素的な手法により加水分解される。一例としては、アミノ・ペプチダーゼ、カルボキシ・ペプチダーゼ、arg-Cプロテイナーゼ（例えば、クロストリパイン（Clostridioprotease B）、asp-Nエンドペプチターゼ、キモトリプシン、lys-Cプロテイナーゼ、パパン・ペプシン、プロリン・エンドペプチターゼ、プロテイナーゼ・K、ブドウ球菌性のペプチダーゼI、サーモリシン、トロンピン、及びトリプシンを含んでいるプロテアーゼが、短い形態（その後検出され、インビボでコラゲナーゼ活性のマーカースとして定量化される）を生成するべく、標的ペプチドを加水分解するのに使用される。参考文献「B. Keil, Specificity of proteolysis. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-NewYork, pp. 335. (1992)」を参照されたい。なお、この参考文献は引用することをもって本発明の一部とする。また、一例としては、alys-Cプロテイナーゼが、その後定量化される2つの短鎖ペプチドを生成するべく、リジンのC末端側の標的ペプチドを加水分解するのに使用される。また、グルタミル・エンドペプチターゼ（Glu-C又はV8）が、その後定量化することができる2つの短鎖ペプチドを生成するべく、グルタミン酸又はアスパラギン酸のC末端側で標的ペプチドを分解させるのに使用される。参考文献「J. Birktoft and K. Breddan, Glutamyl endopeptidases, Methods of Enzymology, 244: 114-126 (1994)」、「J. Houmard and G. Drapeau, Staphylococcal protease: a proteolytic enzyme specific for glutamoyl bonds, Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 69: 3506-3509 (1972)」を参照されたい。なお、この参考文献は引用することをもって本発明の一部とする。本発明は、標的ペプチドの加水分解生成物の検出及び定量化（本明細書では上記のプロテアーゼの使用により具現化された）、を含むが、それに限定されるものではない。さらに、定量化するための短鎖ペプチドを生成するべく、アスパラギン酸の残基に隣接した標的ペプチドを分解させるのにギ酸を使用することができる。参考文献「Li, A. et al., CAeemical cleavage at aspartyl residues for proteir identification, Anal. Chem, 73: 5395-402 (2001)」を参照されたい。なお、この参考文献は引用することをもって本発明の一部とする。

20

30

40

【0109】

以上、本発明に係るペプチドの修飾及び派生物について説明した。なお、ここでは、当業者にとっては自明な全ての可能性のある修飾及び派生物は挙げてはいないが、本発明は、これらの検出及び/又は定量化、及び本発明に係るペプチドの他の任意の修飾及び派生物を含む。また、本発明は、生体マーカースとしての定量化されるべく使用される、それらの派生又は修飾されたペプチドを含む。

50

【0110】

本発明での分析方法は、タイプIIコラーゲン以外のコラーゲンの破壊の生体マーカーとしての役割を果たすペプチドの、同定及び定量化に使用することができる。ペプチド配列 Gly-Thr-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 12)は、ペプチド・データベースによる分析に基づく、タイプIIコラーゲンのメタロプロテイナーゼ分解の結果として得られる、予期される生体マーカー・ペプチドのC末端配列である。図11は、合成されたSEQ ID NO: 12の衝突活性化により得られるフラグメントイオンの特性を示す。タイプIIコラーゲン破壊ペプチドは、生体サンプル内で、特徴付けられたフラグメントイオン（非水酸化形態ではm/z 301及び455、水酸化形態ではm/z 301及び471）に基づく、本発明に係る方法を用いて同定することができる。同様に、図12は、タイプIIIコラーゲンの酵素分解により得られるペプチドC末端配列Gly-Ala-Pro-Gly-Pro-Leu-Gly (SEQ ID NO: 13)により、本発明に係る方法により分析した際に、同定可能な特徴付けられたフラグメントイオンを生成することを示している。タイプIIIコラーゲンのフィンガープリント・フラグメントイオンは、非水酸化形態ではm/z 286及び440であり、水酸化形態ではm/z 286及び471である。図12では、特にタイプIIコラーゲン及びタイプIIIコラーゲン由来の破壊ペプチドをそれぞれ同定するのに用いられる特徴付けられたフラグメントイオンだけを同定するのではなく、本発明に係る方法を任意のコラーゲンの特徴付けられた分解生成物の同定に広く用いることができるという事実を実証する。

10

【0111】

《実施例5》

20

(タイプIIコラーゲン・生体マーカー・ペプチドの同定及び定量化方法の他の実施例) サンプル作成

1. 標準検定曲線を作成するため、標準的なヒトの女性(30歳)の尿2mLを、50ngの内的標準に混合させる。内的標準は、5ng~100ngのタイプIIコラーゲン・30アミノ酸ペプチドSEQ ID NO: 2(2ヒドロキシプロリン)、及び45アミノ酸ペプチドSEQ ID NO: 16(5ヒドロキシプロリン)ペプチド(N=2)を含んでいる、重水素で置換された30アミノ酸ペプチドSEQ ID NO: 2及び45アミノ酸ペプチドSEQ ID NO: 16)である。

2. 未知の尿サンプル(2mL)を内的標準50ngに混合させる。標準尿及び未知の尿を、Centricon細胞膜遠心分離フィルタ装置(YM-3, 2mL capacity with 3000 MW cut off, Millipore Co., Bedford, MA)にセットする。そして、Speedfugea(HSC, 10KA, Savant Instruments, Farmingdale, NY)を使用して、水冷しつつ、5000rpm(5000g)で遠心分離する。尿をろ過する前に、各Centriconを、50uLの1%ギ酸溶液により、予め湿らす。

30

3. 尿の90%が遠心分離によりろ過された後、200uLの残留溶解溶液が保存容器内に残る。容器に、1%(v/v)のギ酸を含んでいる1mLの水を添加した後、さらに、約200uLの溶解溶液が残るまで遠心分離する。

4. 保存容器内の溶解溶液を反応容器に移し、窒素下で、乾燥させる。各乾燥したサンプルを、1%(v/v)のギ酸を含んでいる100uLの水に溶解させる。そして、HPオートサンプラー容器に移す。ろ過されたものは廃棄される。

40

【0112】

(HPLC/MS/MS)

1. オートサンプラー容器由来のアリコート・サンプル(20uL)を、Betasil C-18カラム(ThermoHypersil-Keystone Co., Bellefonte, PA, 5 micron particle size, 200x2mm)に注入する。前記カラムは、Rheas 2000 HPLCシステム(Leap Technologies, Carrboro, NC)に接続されており、ABI Sciex 4000 MS/MSスペクトロメータとインターフェースで接続されている。

2. 移動相(A=水/1%ギ酸; B=アセトニトリル/1%ギ酸)のBを、5%から35%にランピングする(5分で行い、その後2分保つ)ことにより、溶出物が得られる。

3. 次のサンプルを注入する前に、カラムを、ランピングによりBの勾配を5%戻すこと

50

で、再び平衡にする（0.5分で行い、その後4.5分保つ）。

4. 3つのイオン対（1039/301、1039/471、1039/568；1040/306、1040/476、1040/573；914/301、914/471、914/568；916/306、916/476、916/573）は、それぞれ、4つのペプチド（45mer (50H) (SEQ ID NO: 16)、d5-45mer (50H) (SEQ ID NO: 16)、30mer (20H) (SEQ ID NO: 2)、及び d5-30mer (20H) (SEQ ID NO: 2) 内の標準）を、200msの滞留時間で、低解像モードでモニタする。

5. 各ペプチドにおける3つのイオン対の合成ピーク領域は、Sciex Analyst 1.2ソフトウェアにより測定され、合計される。2つの分析ペプチドの合成ピーク領域は、重水素で置換された内の標準ペプチドの合計された合成ピーク領域により標準化される。そして、未知のサンプルにおける30mer (SEQ ID NO: 2) 及び45mer (SEQ ID NO: 16) タイプI I コラーゲン・ペプチドの量を測定すべく、標準検定曲線と比較される 10

【0113】

HPLC / MS / MS 分析による各サンプルの分析は重複して行う。

【0114】

実施例5において説明した方法は、ヒトの尿サンプルを用いて説明されたが、その結果は、実施例6で詳述される。この方法は、下記の実施例7～12で説明される他の種の尿におけるペプチド・生体マーカーの同定及び定量化に使用することができる。また、特定の種の標準ペプチドが、他の種のペプチド・生体マーカーの存在を試験する際に用いることができるのは、当業者にとって自明のことである。

【0115】

《実施例6》

（ヒトの尿内に存在するタイプI I コラーゲン・ペプチドの同定及び定量化）
ヒトの尿内に存在するさらなるタイプI I コラーゲン・ペプチド断片の同定及び定量化は、実施例5で説明した手法により行われる。下記のペプチドは、関節症の症状及び徴候を示すと医学的に診断されたヒト被験体から、検出可能な量が検出される。

【0116】

Lys-Gly-Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Glu-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ala-Glu-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 15) (最も多い形成位置10、16、25、31及び42は4-ヒドロキシプロリンである)、 30

Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Glu-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ala-Glu-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 16) (最も多い形成位置8、14、23、29及び41は4-ヒドロキシプロリンである)、

及びGly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ala-Glu-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 17) (最も多い形成位置12及び24は4-ヒドロキシプロリンである)。

【0117】

ペプチドSEQ ID NO: 16は、ヒトの尿から最も多く検出された、タイプI I コラーゲン・ネオエピトープ・ペプチドである。 40

【0118】

《実施例7》

（ウシの尿内に存在するタイプI I コラーゲン・ペプチドの同定及び定量化）
ウシの尿内に存在するさらなるタイプI I コラーゲン・ペプチド断片の同定及び定量化は、実施例5で説明した手法により行われる。下記のペプチドは、関節症の症状及び徴候を示すと医学的に診断されたウシ被験体から、検出可能な量が検出される。

【0119】

Lys-Gly-Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 34) (最も多い形成位置10、16、25、 50

28及び43は4 - ヒドロキシプロリンであり、位置43はヒドロキシリジンである)、及びAla-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 35) (最も多い形成位置8、14、23、29及び41は4 - ヒドロキシプロリンであり、位置26はヒドロキシリジンである)、ペプチドSEQ ID NO: 35は、ウシの尿から最も多く検出された、タイプIIコラーゲン・ネオエピトープ・ペプチドである。

【0120】

《実施例8》

(イヌの尿内に存在するタイプIIコラーゲン・ペプチドの同定及び定量化) 10
イヌの尿内に存在するタイプIIコラーゲン・ペプチド断片の同定及び定量化は、実施例5で説明した手法により行われる。下記のペプチドは、関節症の症状及び徴候を示すと医学的に診断されたイヌ被験体から、検出可能な量が検出される。

【0121】

Lys-Gly-Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 18) (最も多い形成位置10、16、25、31及び43は4 - ヒドロキシプロリンであり、位置28はヒドロキシリジンである)、Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 19) (最も多い形成位置8、14、23、29及び41は4 - ヒドロキシプロリンであり、位置26はヒドロキシリジンである)、Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 20) (最も多い形成位置4、10及び22は4 - ヒドロキシプロリンであり、位置10はヒドロキシリジンである)、Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 21) (最も多い形成位置2、8及び20は3又は4 - ヒドロキシプロリンであり、位置5は4 - ヒドロキシリジンである)、及びGlu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 22) (最も多い形成位置2はヒドロキシリジンであり、位置5及び17は4 - ヒドロキシプロリンである)。

【0122】

ペプチドSEQ ID NO: 19は、イヌの尿から最も多く検出された、タイプIIコラーゲン・ネオエピトープ・ペプチドである。

【0123】

《実施例9》

(ネコの尿内に存在するタイプIIコラーゲン・ペプチドの同定及び定量化) 40
ネコの尿内に存在するタイプIIコラーゲン・ペプチド断片の同定及び定量化は、実施例5で説明した手法により行われる。下記のペプチドは、関節症の症状及び徴候を示すと医学的に診断されたネコ被験体から、検出可能な量が検出される。

【0124】

Lys-Gly-Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 23) (最も多い形成位置10、16、25、31及び43は4 - ヒドロキシプロリンであり、位置28はヒドロキシリジンである)、Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 24) (最も多い形成位置8、14、23、29及び41は4 - ヒドロキシプロリンであり、位置26はヒドロキシリジンである)、Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-

Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 25) (最も多い形成位置 8、14 及び 26 は 4 - ヒドロキシプロリンであり、位置 11 はヒドロキシリジンである)、
 Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 26) (最も多い形成位置 4、10 及び 22 は 4 - ヒドロキシプロリンであり、位置 7 はヒドロキシリジンである)、
 Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 27) (最も多い形成位置 2、8 及び 20 は 4 - ヒドロキシプロリンであり、位置 5 はヒドロキシリジンである)、
 及び Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 28) (最も多い形成位置 2 はヒドロキシリジンであり、位置 5 及び 17 は 4 - ヒドロキシプロリンである)。

【0125】

ペプチドSEQ ID NO: 24は、ネコの尿から最も多く検出された、タイプIIコラーゲン・ネオエピトープ・ペプチドである。

【0126】

《実施例10》

(ウマの尿内に存在するタイプIIコラーゲン・ペプチドの同定及び定量化)
 ウマの尿内に存在するタイプIIコラーゲン・ペプチドSEQ ID NO: 11の存在の確認、及びさらなるタイプIIコラーゲン・ペプチド断片の同定及び定量化は、実施例5で説明した手法により行われる。下記のペプチドは、関節症の症状及び徴候を示すと医学的に診断されたウマ被験体から、検出可能な量が検出される。

【0127】

Lys-Gly-Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 29) (最も多い形成位置 10、16、25、31 及び 43 は 4 - ヒドロキシプロリンであり、位置 28 はヒドロキシリジンである)、
 Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 30) (最も多い形成位置 8、14、23、29 及び 41 は 4 - ヒドロキシプロリンであり、位置 26 はヒドロキシリジンである)、
 Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 31) (最も多い形成位置 4、10 及び 22 は 4 - ヒドロキシプロリンであり、位置 7 はヒドロキシリジンである)、
 Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 32) (最も多い形成位置 2、8 及び 20 は 4 - ヒドロキシプロリンであり、位置 26 はヒドロキシリジンである)、
 及び Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 33) (最も多い形成位置 2 はヒドロキシリジンであり、位置 5 及び 17 は 4 - ヒドロキシプロリンである)。

【0128】

ペプチドSEQ ID NO: 30は、ウマの尿から最も多く検出された、タイプIIコラーゲン・ネオエピトープ・ペプチドである。

【0129】

《実施例11》

(ネズミの尿内に存在するタイプIIコラーゲン・ペプチドの同定及び定量化)
 下記のペプチドは、関節症の症状及び徴候を示すと医学的に診断されたネズミ被験体から、検出可能な量が検出される。

【0130】

Ala-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ser-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 39) (最も多い形成位置 2、8 及び 20 は 4 - ヒドロキシ

プロリンであり、位置 5 はヒドロキシリジンである)、
 Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ser-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 40) (最も多い形成位置 2 はヒドロキシリジンであり、位置 5 及び 17 は 4 - ヒドロキシプロリンである)、
 Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ser-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 41) (位置 3 及び 15 は 4 - ヒドロキシプロリンである)、
 及び Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ser-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 42) (最も多い形成位置 10 は 4 - ヒドロキシプロリンである)。

【0131】

ペプチドSEQ ID NO: 42は、ネズミの尿から最も多く検出された、タイプIIコラーゲン・ネオエピトープ・ペプチドである。 10

【0132】

《実施例12》

(モルモットの尿内に存在するタイプIIコラーゲン・ペプチドの同定及び定量化)
 モルモットの尿内に存在するタイプIIコラーゲン・ペプチド断片の同定及び定量化は、実施例5で説明した一般的な手法により行われる。下記のペプチドは、関節症の症状及び徴候を示すと医学的に診断されたモルモット被験体から、検出可能な量が検出される。

【0133】

Val-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Val-Ser-Gly-Ala-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 43) (最も多い形成位置 8、14、23、20 及び 41 は 4 - ヒドロキシプロリンであり、位置 26 はヒドロキシリジンである)。 20

【0134】

以上説明したように、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 33、SEQ ID NO: 34、SEQ ID NO: 35、SEQ ID NO: 36、SEQ ID NO: 37、SEQ ID NO: 38、SEQ ID NO: 39、SEQ ID NO: 40、SEQ ID NO: 41、SEQ ID NO: 42、及びSEQ ID NO: 43で 30
 表される、特定のタンパク質分解ペプチド及びその翻訳後修飾のアミノ酸配列を分離及び測定した。

【0135】

ある動物のタイプIIコラーゲンのタンパク質分解により形成された特定の種の完全なアミノ酸配列は、本発明に係る方法により測定できるので、また、他のコラーゲンのタンパク質分解により形成された他の特定のペプチドを測定するのに一般的に適用される方法は開示されているので、なので、生体サンプル又は生体抽出物内における特定のペプチドを同定又は定量化するには、多くの方法を使用することができる。

【0136】

ここで開示した特定ペプチドの検出に使用されるタンデム質量分析方法は、他の特定タンパク質分解ペプチドの同定又は定量化に用いることもできる。この方法は、既存の方法により検出される通常のC末端を共有しているペプチド・ファミリーだけではなく、タンパク質分解により形成されたペプチドの同定又は定量化をすることができるという点で、従来の免疫学よりも優れている。そして、この方法は、ペプチドの翻訳後修飾の同定又は定量化を確実に行うことができる。また、異なる哺乳類の分離された抗体を作成する必要は無い。分光分析方法は、サンプルを処理又は抽出することにより、上記した派生物及び修飾を使用して、ペプチドの派生物又は修飾を生成するべく(又は、それらを標準として使用するべく)、ペプチドの同定及び定量化を行うことができる。 40

【0137】

他のペプチドの同定及び定量化方法が、本発明の範囲に含まれる。例えば、クロマトグラ 50

フィを使用して又は使用しないで行われる、紫外分光法、電気化学分析、又は蛍光による方法が、本発明の範囲に含まれる。既知の順序付け法も、本発明の範囲に含まれる。また、特定ペプチドの配列又はそれらの翻訳後修飾を認識することができる、免疫特定抗体（E L I S A）又は他の放射免疫測定技術を使用することもできる。例えば、捕獲抗体を使用して又は使用しないで行われる、ペプチドのN末端に対するネオエピトープ・抗体は、配列の一部に接触するC末端ネオエピトープ・抗体及び捕獲抗体を使用する現在のE L I S A方法よりも、優れた検出感度及び選択性を提供する。一例として、1つのペプチドのN末端に接触するネオエピトープ・抗体は、ペプチドの同定及び定量化を行うのに用意され使用される。抗体が、7つのヒトのペプチドのアミノ酸N末端配列に対して接触する場合は、又はヒトのペプチド（SEQ ID NO: 2を有する）のアミノ酸N末端配列に対して接触する場合は、その配列を有するペプチドの一意的な同定を提供することができる。その理由は、ネコのペプチド（SEQ ID NO: 23及びSEQ ID NO: 25）、イヌのペプチド（SEQ ID NO: 18及びSEQ ID NO: 4）、ウマのペプチド（SEQ ID NO: 29及びSEQ ID NO: 11）、ウシのペプチド（SEQ ID NO: 34及びSEQ ID NO: 3）、に対応するそれらの末端部分は保存されているので、生体サンプル又は生体抽出物のソースが既知である限り、これらのペプチドを明確に同定することができる。抗体を短鎖N末端配列と直接接触させる場合、ペプチドの積極的な同定は、例えば第2の抗体をC末端に直接接触させる方法や、サンドイッチE L I S A方法などの他の技術を使用する必要がある。必要な抗体を作成する技術は、従来技術において良く知られている。例えば、らにより使用された、分解ペプチドのC末端に抗体（N末端に抗体を形成するのに利用される）を直接形成する方法がある（Otterness et al, supra）。

【0138】

ここで開示したタンデム質量分析を使用することにより、他のコラーゲン（他の動物のコラーゲンを含む。また、タイプI及びタイプIIIを含む）のタンパク質分解により生成した特定のペプチドを容易に確定することができる。そして、これらの特定ペプチドは任意の従来方法により同定することができる。

【0139】

また、前記した実施例は、尿サンプル内のペプチドの同定及び定量化を含む。ペプチドは、血、血漿又は滑液などの他の生体流動体サンプル又は抽出物において、検出することができる。また、組織のサンプル（例えば関節の周囲の組織）を生検などにより取得し、従来技術によりペプチドを分離させることもできる。本発明に係る方法による生体マーカーの同定及び定量化は、組織サンプルの同定及び定量化に適用することもできる。したがって、ここで使用されたように、生体サンプルは、生体マーカーの同定又は定量化をすることができる任意の体液や体内組織のサンプルを含むことができる。

【0140】

このペプチドの定量化は、変形性関節症や関節リウマチなどの病気の診断及び予測に使用することができる。また、コラゲナーゼ活性により特徴付けられた病気のコラゲナーゼ酵素活性又は生理的状態のモニタと、コラーゲン分解を抑制するための薬又は物質（例えばマトリックス・メタロプロテイナーゼ抑制剤。特に、コラーゲン分解を抑制するの薬又は物質）の評価に使用することができる。したがって、生体サンプル内の、ペプチドSEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 33、SEQ ID NO: 34、SEQ ID NO: 35、SEQ ID NO: 36、SEQ ID NO: 37、SEQ ID NO: 38、SEQ ID NO: 39、SEQ ID NO: 40、SEQ ID NO: 41、SEQ ID NO: 42、SEQ ID NO: 43及びその翻訳後修飾は、タイプIIコラーゲンのタンパク質分解が特徴付けられた病気又は状態の生体マーカーである。生体マーカー・ペプチドの同定及び定量化は、タイプIIコラーゲン分解により特徴付けられた病気又は状態の診断又は予測に用いることができる。

【 0 1 4 1 】

さらに、生体サンプル内の、生体マーカー・ペプチドSEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 33、SEQ ID NO: 34、SEQ ID NO: 35、SEQ ID NO: 36、SEQ ID NO: 37、SEQ ID NO: 38、SEQ ID NO: 39、SEQ ID NO: 40、SEQ ID NO: 41、SEQ ID NO: 42、SEQ ID NO: 43及びその翻訳後修飾は、タンパク質分解酵素の活性及び/又は量を阻害する薬又は他の物質の有効性をモニタ又は評価をするのに使用することができる。前記タンパク質分解酵素は、分解生成物であるペプチドSEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 33、SEQ ID NO: 34、SEQ ID NO: 35、SEQ ID NO: 36、SEQ ID NO: 37、SEQ ID NO: 38、SEQ ID NO: 39、SEQ ID NO: 40、SEQ ID NO: 41、SEQ ID NO: 42、SEQ ID NO: 43及びその翻訳後修飾を生成する。

10

【 0 1 4 2 】

本発明に係る生体マーカーの典型的な使用は、マトリックス・メタロプロテイナーゼ抑制剤 (MMPi) の活性のモニタ又は評価をするのに使用することである。生体流動体サンプル内の、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 33、SEQ ID NO: 34、SEQ ID NO: 35、SEQ ID NO: 36、SEQ ID NO: 37、SEQ ID NO: 38、SEQ ID NO: 39、SEQ ID NO: 40、SEQ ID NO: 41、SEQ ID NO: 42、SEQ ID NO: 43で表されるペプチド及びその翻訳後修飾の同定及び定量化は、タイプIIコラーゲン分解及びインビボでのコラーゲナーゼ酵素 (例えばMMP-13) の相対的な活性を指し示すことができる。タイプIIコラーゲン分解物の病気又は生理的状态 (病理学的性質、MMP抑制剤 (例えば、MMP-13抑制剤) の効果的な量の薬理的な投与) は、例えばヒト被験体の生体流動体サンプル内で、ペプチドLeu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 2) の減少又は除去をもたらす。

20

30

【 図面の簡単な説明 】

【 0 1 4 3 】

【 図 1 】 関節症の症状及び徴候を示すウシ被験体の尿のタンデム質量分析により生成された、C末端配列 (SEQ ID NO: 1) を有するペプチドSEQ ID NO: 3のフラグメントイオンを示す。

40

【 図 2 】 変形性関節症の症状及び徴候を示すと医学的に診断されたヒト被験体の尿のタンデム質量分析により生成された、ペプチドSEQ ID NO: 2のフラグメントイオンを示す。

【 図 3 】 関節症の症状及び徴候を示すイヌ被験体の尿のタンデム質量分析により生成された、ペプチドSEQ ID NO: 4のフラグメントイオンを示す。

【 図 4 】 タンデム質量分析により生成された、ヒトのタイプIIコラーゲン合成標準ペプチドのフラグメントイオンを示す。

【 図 5 】 変形性関節症の症状及び徴候を示すと医学的に診断されたヒト被験体の尿のタンデム質量分析により測定された、内的標準ペプチドSEQ ID NO: 14と、タイプIIコラーゲンの標的ペプチドSEQ ID NO: 2との抽出イオンクロマトグラフィの比較を示す。

【 図 6 】 変形性関節症の症状及び徴候を示すと医学的に診断されたヒト被験体の尿のタン

50

デム質量分析により測定された、変形性関節症 (bottom) の症状及び徴候を示さない医学的に診断されたヒト被験体の尿のタンデム質量分析により測定された、及びタイプ I I コラーゲンの合成標準ペプチドに混合された変形性関節症 (middle) の症状及び徴候を示さない医学的に診断されたヒト被験体の尿のタンデム質量分析により測定された、タイプ I I コラーゲンの標的ペプチド SEQ ID NO: 2 の抽出イオンクロマトグラフィの比較を示す。

【図 7】 30 pg/mL ~ 100 ng/mL の濃度で標準的なヒトの尿に混合された、ヒトのタイプ I I コラーゲン合成ペプチドの標準曲線を示す。

【図 8】 ウシの尿内のタイプ I I コラーゲン標的ペプチド SEQ. ID. NO: 3 の相対存在量を表した棒グラフである。

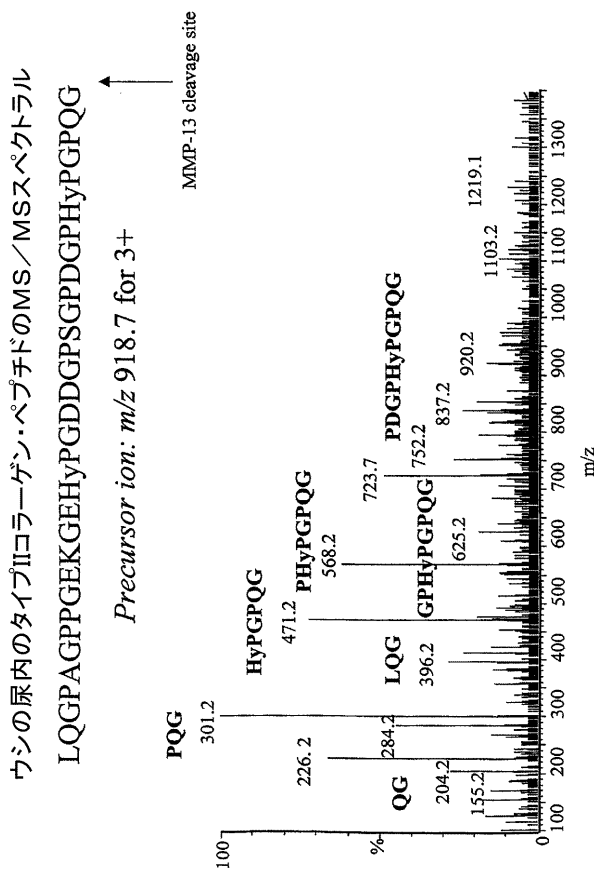
【図 9】 ヒトの尿内のタイプ I I コラーゲン標的ペプチド SEQ. ID. NO: 2 の相対存在量を表した棒グラフである。

【図 10】 ヒトの尿内のタイプ I I コラーゲン標的ペプチド SEQ. ID. NO: 2 の相対存在量を表した棒グラフである。

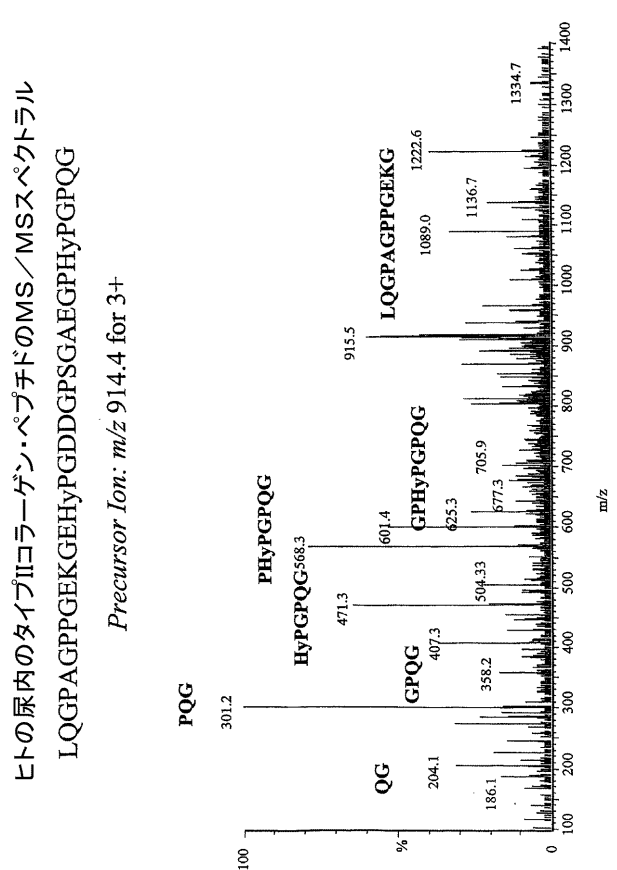
【図 11】 タンデム質量分析により生成された、タイプ I コラーゲン合成ペプチド SEQ ID NO: 12 のフラグメントイオンを示す。

【図 12】 タンデム質量分析により生成された、タイプ I I I コラーゲン合成ペプチド SEQ ID NO: 13 のフラグメントイオンを示す。

【 図 1 】



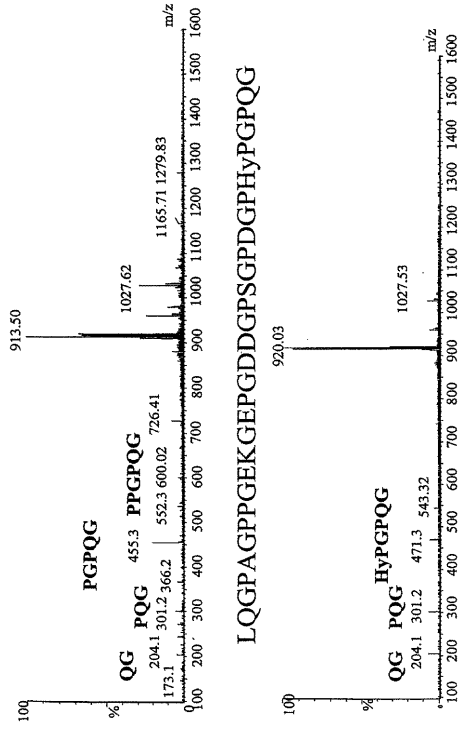
【 図 2 】



【 図 3 】

イヌの尿内のタイプIIコラーゲン・ペプチドのMS/MSスペクトラル
LQGPAGPPGKEKGEHyPGDDGSPSGPDGPPGPPQG

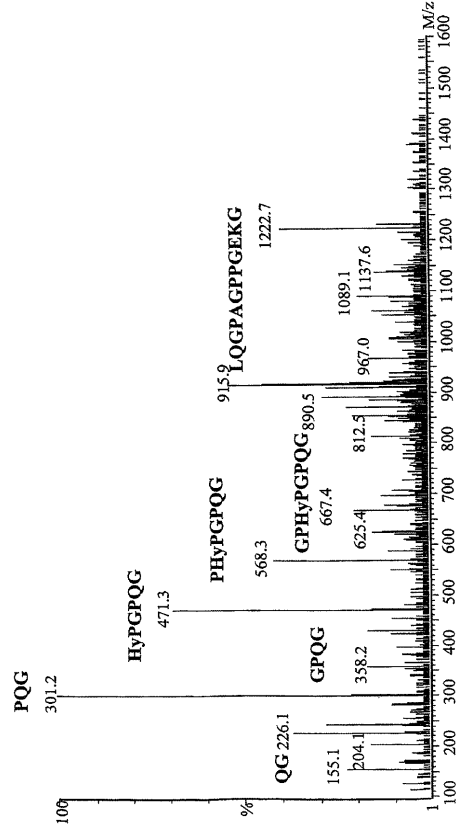
Precursor ion: m/z 913.3 for 3+



【 図 4 】

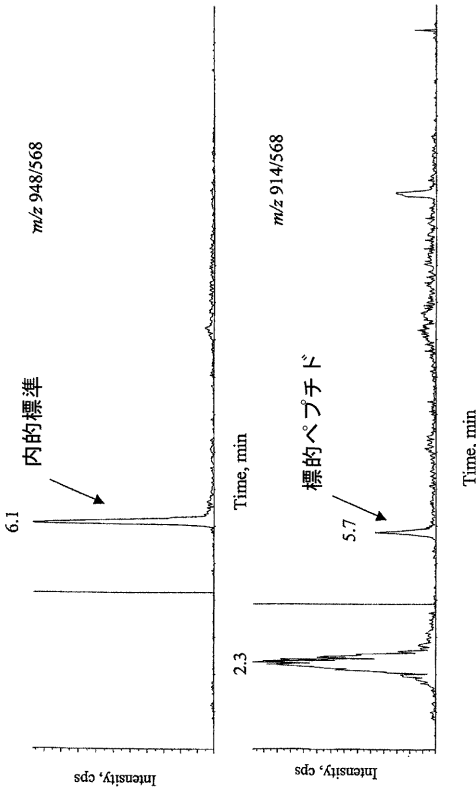
ヒトのタイプIIコラーゲン・合成標準ペプチドのMS/MSスペクトラル
LQGPAGPPGKEKGEHyPGDDGSPSGAEGPHyPGPPQG

Precursor ion: m/z 914.4 for 3+



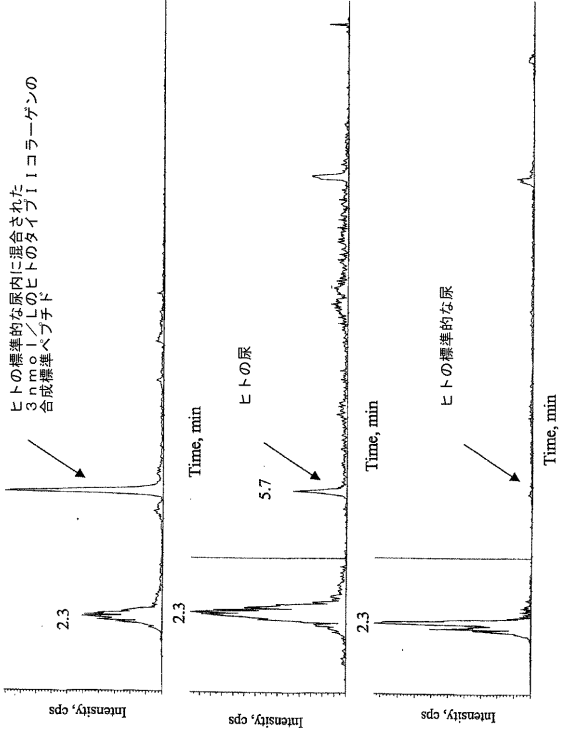
【 図 5 】

内的標準 (948/568) 及び標的ペプチド (914/568) の
抽出イオンクロマトグラム



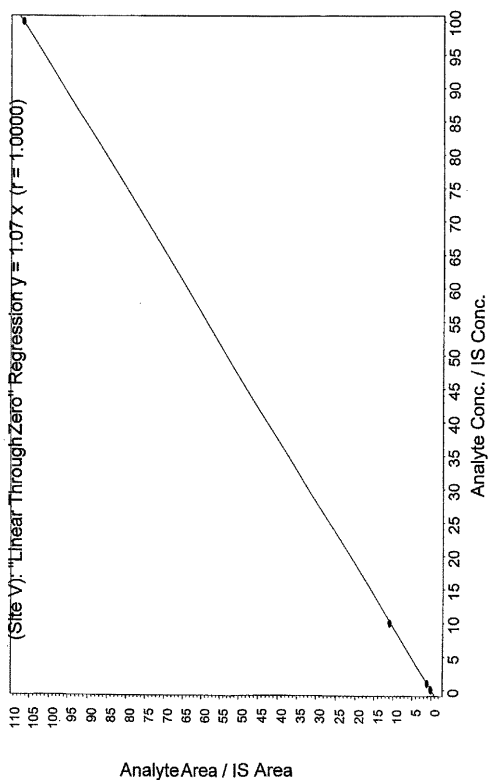
【 図 6 】

m/z 914/568イオン対の抽出イオンクロマトグラム

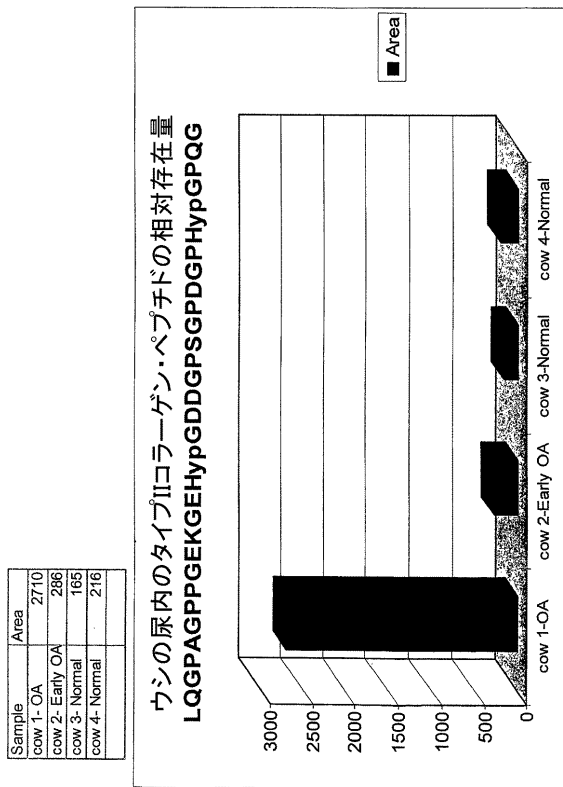


【 図 7 】

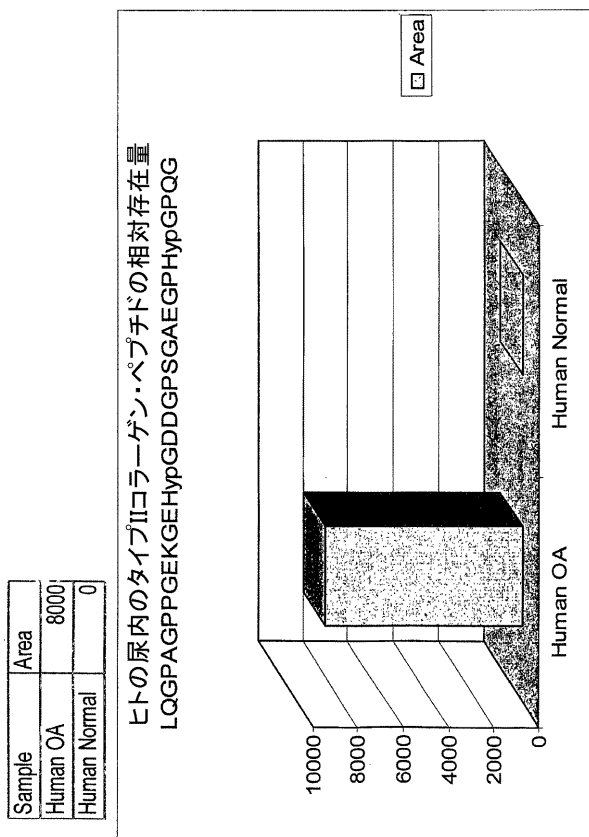
標準的なヒトの尿に混合されたタイプIIコラーゲンの標準曲線



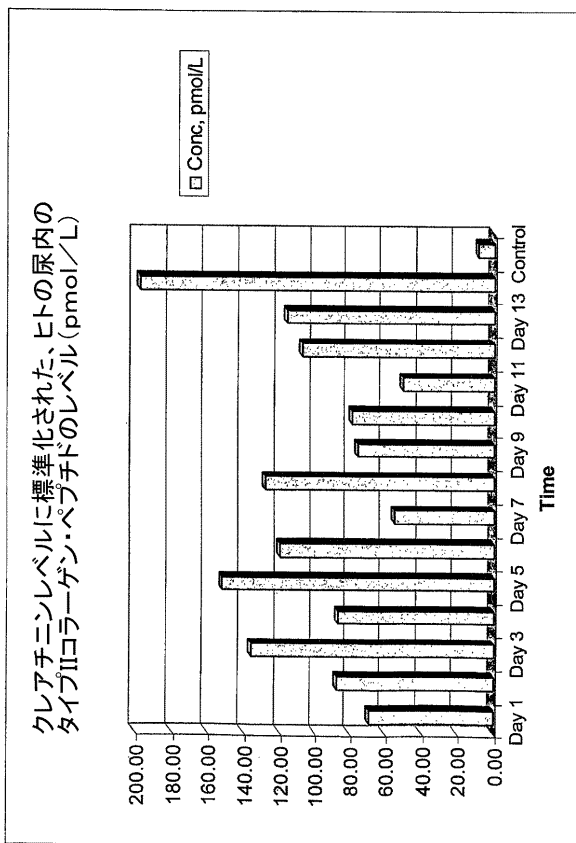
【 図 8 】



【 図 9 】

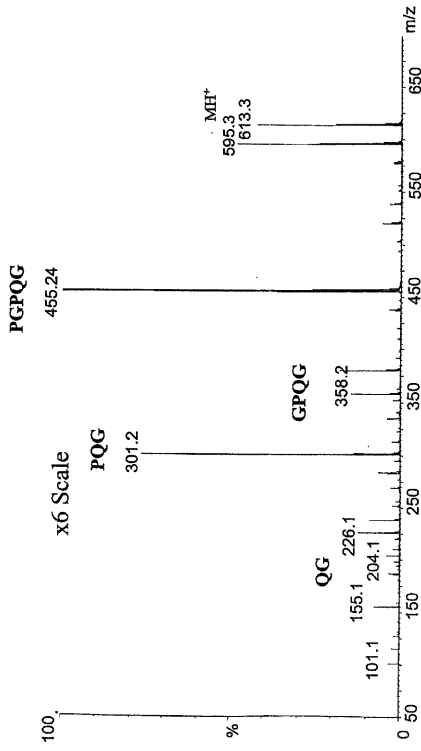


【 図 10 】



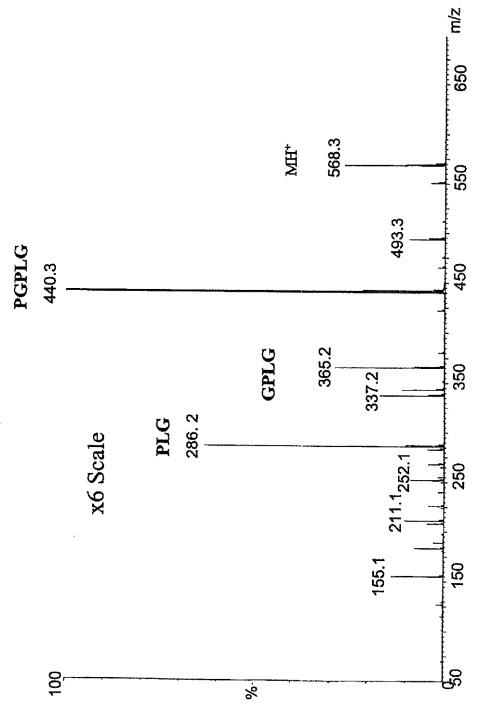
【 図 1 1 】

タイプIIコラーゲン・合成標準ペプチドのMS/MSSスペクトラル
GTPGPQG, m/z 613.3 for 1+



【 図 1 2 】

タイプIIIコラーゲン・合成標準ペプチドのMS/MSSスペクトラル
GAPGPLG, m/z 613.3 for 1+



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
13 March 2003 (13.03.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/021226 A2

- (51) International Patent Classification⁷: G01N 17146 LAIAYETTE TRAILS DRIVE, WILDWOOD, MO 63038 (US). **DUFIELD, Dawn, R.** [US/US]; 3021 SPACIOUS SKY DRIVE, O'FAHILLON, MO 63366 (US). **SUNYER, Teresa** [US/US]; 264 TURNBERRY PLACE DRIVE, WILDWOOD, MO 63011 (US). **HOWARD, Carol Pearce** [US/US]; 35 WORTHY COURT, HENTON, MO 63026-2751 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US02/27816
- (22) International Filing Date: 30 August 2002 (30.08.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 50/316,554 31 August 2001 (31.08.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): **PHARMACIA CORPORATION** [US/US]; 800 NORTH LINDBERGH BOULEVARD, ST. LOUIS, MO 63167 (US).
- (72) Inventors: and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): **WELSCH, Dean, J.** [US/US]; 23 RACIEL MARKLYNN COURT, ST. PETERS, MO 63376 (US). **DUFFIN, Kevin, L.** [US/US]; 1323 PARKVIEW VALLEY DRIVE, MANCHESTER, MO 63011 (US). **NEMIROVSKIY, Olga, V.** [US/US];
- (74) Agent: **POLSTER, J. Philip**; POLSTER, LIBBER, WOODRUFF & LUCCHESI, L.C., 763 SOUTH NEW BALLAD ROAD, ST. LOUIS, MO 63141 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GR, HU, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM).

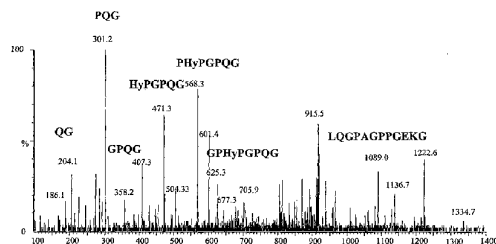
[Continued on next page]

(54) Title: PEPTIDE BIOMARKER AND METHOD OF IDENTIFICATION

MS/MS Spectrum of Collagen Type II Peptide in Human OA Urine

LQGPAGPPGEGEHYPGDDGSPGAEGPHYGPQG

Precursor Ion: m/z 914.4 for 3+



WO 03/021226 A2

(57) Abstract: A method for identifying and quantifying peptides resulting from enzyme cleavage of collagen type II by mass spectrometric analysis to detect characteristic peptide fragments of a carboxy-terminus having known mass to charge ratios to identify the peptide having that carboxy-terminus. Identification and quantification of the peptides in a biological sample is used to assess activity of proteolytic enzymes in diseases or physiological conditions such as osteoarthritis and rheumatoid arthritis and to assess the efficacy of enzyme blocking agents.

WO 03/021226 A2 

European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IL, IU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

Published:
without international search report and to be republished upon receipt of that report

WO 03/021226

PCT/US02/27816

PEPTIDE BIOMARKER AND METHOD OF IDENTIFICATIONTechnical Field

The invention relates generally to methods for identifying and quantifying peptides and, more particularly, to a method for identifying and quantifying degradation peptides resulting from enzyme cleavage of collagen by collagenases. The invention also relates to the specific peptides that result from enzymatic cleavage of collagen type II in humans and animals and the recognition of these peptides as markers in biological samples of the activity of proteolytic enzymes, namely collagenases, in diseases or physiological conditions characterized by enzymatic degradation of collagen, such as osteoarthritis and rheumatoid arthritis, and the identification and quantification of the peptides to assess the efficacy of enzyme inhibiting agents and drugs used to treat or control such diseases or physiological conditions.

Background Art

Generally, active and extensive collagen turnover is not considered a prominent feature in healthy adults. Turnover of collagen type II, a component of articular collagen, generally occurs in diseases, such as rheumatoid arthritis, osteoarthritis or other diseases or physiological conditions in which collagen degradation is a factor.

The breakdown of collagen type II is believed to be initiated by specific members of the matrix metalloproteinase family of enzymes, the collagenases. Collagens are comprised of three peptide strands wound in a helix formation. For example, collagen type II is comprised of a triple helix of three identical peptide strands referred to as peptide alpha 1, collagen type II (SEQ ID NO: 44). When collagen is degraded or cleaved by a collagenase, the cleavage takes place at a specific intra-helical site leaving the peptides vulnerable to further degradation or cleavage. In any event, the initial cleavage results in the generation of collagen fragments having an end defined by the proteolytic cleavage. For example, collagenase degradation of collagen type II results in a peptide fragment having the C-terminal sequence ending with: GPXGPQG, where X is proline or hydroxyproline. Billingham et al described this primary

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-2-

collagenase cleavage site and developed antibodies reactive to both the carboxy-terminal and amino-terminal "neoepitopes" generated by cleavage of native human collagen type II. (J. Clin. Invest. 99:1534-1545 (1997)). Otterness et al have described production of a monoclonal antibody directed against this
5 carboxy-terminal "neoepitope" (Matrix Biology 18: 331-341 (1999)).

U.S. Patent No. 6,030,792 to Otterness et. al. discloses antibodies for detecting collagen fragments resulting from collagenase cleavage of type II collagen. Poole et al. U.S. Patent No. 6,132,976 provides a method for
10 evaluating cartilage degradation by immunoassay measurement of type II collagen cleavage. In any event, the prior art methods for the detection of collagen type II enzymatic cleavage by detecting the presence of peptide fragments only determine the presence of the target C-terminus portion and immediately adjacent peptide sequence using antibodies specific for these
15 sequence regions.

15 Summary of the Invention

One embodiment of the present invention comprises a method of detecting enzymatic proteolysis of a collagen, the method comprising identifying and quantifying a specific peptide proteolysis product of the collagen occurring in a biological sample or biological extract. In one
20 embodiment, the collagen is type II collagen and the specific peptide has a C-terminus represented by Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 1) and post-translational modifications thereof. In another embodiment, the collagen is type I collagen and the specific peptide has a C-terminus represented by Gly-Thr-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 12) and post-translational
25 modifications thereof. In another embodiment, the collagen is type III collagen and the specific peptide has a C-terminus represented by Gly-Ala-Pro-Gly-Pro-Leu-Gly (SEQ ID NO: 13) and post-translational modifications thereof.

In a preferred embodiment, the enzymatic proteolysis of a collagen is the result of collagenase activity, illustratively matrix metalloproteinase-13.

30 The method permits rapid and highly accurate monitoring of changes in collagenase activity caused by a drug, particularly a drug directed against the

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-3-

collagenase. In one embodiment, the method comprises identifying and quantifying more than one specific peptide occurring in the biological sample or biological extract. The biological sample is illustratively synovial fluid, whole blood, plasma or urine.

5 Another embodiment of the invention provides a method for identifying the amino acid sequence of a peptide resulting from protein degradation by a proteolytic enzyme.

Another embodiment of the invention includes a method of identifying and quantifying a peptide in a biological fluid sample or biological extract by
10 tandem mass spectrometric analysis to determine the mass of the peptide, to identify a characteristic or diagnostic carboxy-terminal amino acid sequence of the peptide upon fragmentation, and to determine the N-terminal sequence of the peptide based on additional peptide fragment ions and the observed molecular weight of the intact peptide.

15 Another embodiment of the invention provides a method of detecting a peptide having the specific C-terminal sequence Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 1) and post-translational modifications thereof in a biological fluid sample or biological extract by identifying fragment ions of the C-terminal sequence Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 1) and post-translational
20 modifications thereof having known mass to charge ratios.

Another embodiment of the invention provides a method of detecting a peptide having the specific C-terminal sequence Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 1) and post-translational modifications thereof in a biological fluid sample or biological extract to confirm the presence of peptide fragments
25 of collagen type II that have been cleaved by a collagenase enzyme.

Another embodiment of the invention provides a method of identification and quantification of peptide sequence Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ala-Glu-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 2) or post-translational
30 modifications thereof in a biological sample or biological extract.

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-4-

Another embodiment of the invention is the identification and quantification of peptide sequence Lys-Gly-Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Glu-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ala-Glu-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 15), or post-translational modifications thereof in a biological sample or biological extract.

Another embodiment of the invention is the identification and quantification of peptide sequence Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Glu-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ala-Glu-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 16), or post-translational modifications thereof in a biological sample or biological extract.

Another embodiment of the invention is the identification and quantification of peptide sequence Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ala-Glu-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 17), or post-translational modifications thereof in a biological sample or biological extract.

Another embodiment of the invention is identification and quantification of peptide sequence Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 3) and post-translational modifications thereof in a biological sample.

Another embodiment of the invention is identification and quantification of peptide sequence Lys-Gly-Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 34), or post-translational modifications thereof in a biological sample or biological extract.

Another embodiment of the invention is identification and quantification of peptide sequence Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-5-

NO: 35), or post-translational modifications thereof in a biological sample or biological extract.

Another embodiment of the invention is identification and quantification of peptide sequence Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-
5 Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 36) or post-translational modifications thereof in a biological sample or biological extract.

Another embodiment of the invention is identification and quantification of peptide sequence Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-
10 Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 37) or post-translational modifications thereof in a biological sample or biological extract.

Another embodiment of the invention is identification and quantification of peptide sequence Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-
15 Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 38) or post-translational modifications thereof in a biological sample or biological extract.

Another embodiment of the invention is identification and quantification of peptide sequence Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-
18 Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 4) and its post-translational modifications thereof in a biological sample.

Another embodiment of the invention is identification and quantification of peptide sequence Lys-Gly-Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-
20 Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly
(SEQ ID NO: 18), or post-translational modifications thereof in a biological sample or biological extract.

Another embodiment of the invention is identification and quantification of peptide sequence Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-
25 Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID
NO: 19), or post-translational modifications thereof in a biological sample or
30 biological extract.

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-6-

Another embodiment of the invention is identification and quantification of peptide sequence Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 20), or post-translational modifications thereof in a biological sample or biological extract.

Another embodiment of the invention is identification and quantification of peptide sequence Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 21), or post-translational modifications thereof in a biological sample or biological extract.

Another embodiment of the invention is identification and quantification of peptide sequence Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 22), or post-translational modifications thereof in a biological sample or biological extract.

Another embodiment of the invention is identification and quantification of peptide sequence Lys-Gly-Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 23), or post-translational modifications thereof in a biological sample or biological extract.

Another embodiment of the invention is identification and quantification of peptide sequence Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 24), or post-translational modifications thereof in a biological sample or biological extract.

Another embodiment of the invention is identification and quantification of peptide sequence Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 25), or post-translational modifications thereof in a biological sample or biological extract.

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-7-

Another embodiment of the invention is identification and quantification of peptide sequence Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 26), or post-translational modifications thereof in a biological sample or biological extract.

Another embodiment of the invention is identification and quantification of peptide sequence Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 27), or post-translational modifications thereof in a biological sample or biological extract.

Another embodiment of the invention is identification and quantification of peptide sequence Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 28), or post-translational modifications thereof in a biological sample or biological extract.

Another embodiment of the invention is identification and quantification of peptide sequence Lys-Gly-Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 29), or post-translational modifications thereof in a biological sample or biological extract.

Another embodiment of the invention is identification and quantification of peptide sequence Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 11), or post-translational modifications thereof in a biological sample or biological extract.

Another embodiment of the invention is identification and quantification of peptide sequence Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 30), or post-translational modifications thereof in a biological sample or biological extract.

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-8-

Another embodiment of the invention is identification and quantification of peptide sequence Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 31), or post-translational modifications thereof in a biological sample or biological extract.

Another embodiment of the invention is identification and quantification of peptide sequence Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 32), or post-translational modifications thereof in a biological sample or biological extract.

Another embodiment of the invention is identification and quantification of peptide sequence Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 33), or post-translational modifications thereof in a biological sample or biological extract.

Another embodiment of the invention is identification and quantification of peptide sequence Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Ala-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ser-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 8), or post-translational modifications thereof in a biological sample or biological extract.

Another embodiment of the invention is identification and quantification of peptide sequence Ala-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ser-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 39), or post-translational modifications thereof in a biological sample or biological extract.

Another embodiment of the invention is identification and quantification of peptide sequence Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ser-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 40), or post-translational modifications thereof in a biological sample or biological extract.

Another embodiment of the invention is identification and quantification of peptide sequence Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ser-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 41), or post-translational modifications thereof in a biological sample or biological extract.

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-9-

Another embodiment of the invention is identification and quantification of peptide sequence Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ser-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 42), or post-translational modifications thereof in a biological sample or biological extract.

5 Another embodiment of the invention is identification and quantification of peptide sequence Val-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Val-Ser-Gly-Ala-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 43), or post-translational modifications thereof in a biological sample or
10 biological extract.

Another embodiment of the invention is the identification and quantification of SEQ ID NO: 2, peptide SEQ ID NO: 3, or peptide SEQ ID NO: 4 in a biological sample as a marker of proteolytic enzyme activity.

Another embodiment of the invention is the identification and quantification
15 of peptide SEQ ID NO: 8, peptide SEQ ID NO: 11, peptide SEQ ID NO: 15, peptide SEQ ID NO: 16, peptide SEQ ID NO: 17, peptide SEQ ID NO: 18, peptide SEQ ID NO: 19, peptide SEQ ID NO: 20, peptide SEQ ID NO: 21, peptide SEQ ID NO: 22, peptide SEQ ID NO: 23, peptide SEQ ID NO: 24, peptide SEQ ID NO: 25, peptide SEQ ID NO: 26, peptide SEQ ID NO: 27, peptide SEQ ID NO: 28, peptide SEQ ID
20 NO: 29, peptide SEQ ID NO: 30, peptide SEQ ID NO: 31, peptide SEQ ID NO: 32, peptide SEQ ID NO: 33, peptide SEQ ID NO: 34, peptide SEQ ID NO: 35, peptide SEQ ID NO: 36, peptide SEQ ID NO: 37, peptide SEQ ID NO: 38, peptide SEQ ID NO: 39, peptide SEQ ID NO: 40, peptide SEQ ID NO: 41, peptide SEQ ID NO: 42 and SEQ ID NO: 43 in a biological sample as a marker of proteolytic enzyme
25 activity.

Another embodiment of the invention is the identification and quantification of peptide SEQ ID NO: 2, peptide SEQ ID NO: 3, or peptide SEQ ID NO: 4 in a biological sample as a marker of the presence of a disease or physiological condition in subjects characterized by the degradation of collagen type II; such disease or
30 physiological conditions include, but are not limited to osteoarthritis and rheumatoid arthritis.

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-10-

Another embodiment of the invention is the identification and quantification of peptide SEQ ID NO: 8, peptide SEQ ID NO: 11, peptide SEQ ID NO: 15, peptide SEQ ID NO: 16, peptide SEQ ID NO: 17, peptide SEQ ID NO: 18, peptide SEQ ID NO: 19, peptide SEQ ID NO: 20, peptide SEQ ID NO: 21, peptide SEQ ID NO: 22, 5 peptide SEQ ID NO: 23, peptide SEQ ID NO: 24, peptide SEQ ID NO: 25, peptide SEQ ID NO: 26, peptide SEQ ID NO: 27, peptide SEQ ID NO: 28, peptide SEQ ID NO: 29, peptide SEQ ID NO: 30, peptide SEQ ID NO: 31, peptide SEQ ID NO: 32, peptide SEQ ID NO: 33, peptide SEQ ID NO: 34, peptide SEQ ID NO: 35, peptide SEQ ID NO: 36, peptide SEQ ID NO: 37, peptide SEQ ID NO: 38, peptide SEQ ID NO: 39, peptide SEQ ID NO: 40, peptide SEQ ID NO: 41, peptide SEQ ID NO: 42 10 and SEQ ID NO: 43 in a biological sample as a marker of the presence of a disease or physiological condition in subjects characterized by the degradation of collagen type II, such disease or physiological conditions include, but are not limited to osteoarthritis and rheumatoid arthritis.

15 Another embodiment of the invention is identification and quantification of peptide SEQ ID NO: 2, peptide SEQ ID NO: 3 or peptide SEQ ID NO: 4 in a biological sample to evaluate or monitor the effectiveness of drugs or agents used to treat or control a disease or physiological condition characterized by proteolytic degradation of collagen.

20 Another embodiment of the invention is identification and quantification of the peptide SEQ ID NO: 8, peptide SEQ ID NO: 11, peptide SEQ ID NO: 15, peptide SEQ ID NO: 16, peptide SEQ ID NO: 17, peptide SEQ ID NO: 18, peptide SEQ ID NO: 19, peptide SEQ ID NO: 20, peptide SEQ ID NO: 21, peptide SEQ ID NO: 22, peptide SEQ ID NO: 23, peptide SEQ ID NO: 24, 25 peptide SEQ ID NO: 25, peptide SEQ ID NO: 26, peptide SEQ ID NO: 27, peptide SEQ ID NO: 28, peptide SEQ ID NO: 29, peptide SEQ ID NO: 30, peptide SEQ ID NO: 31, peptide SEQ ID NO: 32, peptide SEQ ID NO: 33, peptide SEQ ID NO: 34, peptide SEQ ID NO: 35, peptide SEQ ID NO: 36, peptide SEQ ID NO: 37, peptide SEQ ID NO: 38, peptide SEQ ID NO: 39, 30 peptide SEQ ID NO: 40, peptide SEQ ID NO: 41, peptide SEQ ID NO: 42 and SEQ ID NO: 43 in a biological sample to evaluate or monitor the effectiveness

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-11-

of drugs or agents used to treat or control a disease or physiological condition characterized by proteolytic degradation of collagen.

These and other objects, advantages and features of the invention will become apparent to those persons skilled in the art upon reading the details of the methods and the peptides fully described below.

Brief Description of Drawings

FIG. 1 illustrates the fragment ions of peptide SEQ ID NO: 3, having a C-terminal sequence (SEQ ID NO: 1) produced by tandem mass spectrometric analysis of urine from a bovine subject exhibiting signs and symptoms of arthritis;

FIG. 2 illustrates the fragment ions of a peptide SEQ ID NO: 2, produced by tandem mass spectrometric analysis of urine from a human subject medically diagnosed with and exhibiting signs and symptoms of osteoarthritis;

FIG. 3 illustrates the fragment ions of a peptide SEQ ID NO: 4, produced by tandem mass spectrometric analysis of urine from a canine subject exhibiting signs and symptoms of arthritis;

FIG. 4 illustrates the fragment ions of a human collagen type II synthetic peptide standard produced by tandem mass spectrometric analysis;

FIG. 5 shows the comparison of the extracted ion chromatograms for an internal standard peptide SEQ ID NO: 14 and collagen type II target peptide SEQ ID NO: 2, determined by tandem mass spectrometric quantification of the peptides in urine from a human subject medically diagnosed with, and exhibiting the signs and symptoms of osteoarthritis

FIG. 6 is a comparison of the extracted ion chromatograms for the collagen type II target peptide SEQ ID NO: 2 determined by tandem mass spectrometric quantification of urine from a human subject that did not exhibit signs and symptoms of arthritis (bottom), from urine of a human subject that was medically diagnosed with and exhibited signs and symptoms of osteoarthritis (middle), and from urine of a human subject that did not exhibit signs and symptoms of arthritis that was spiked with a synthetic standard of the collagen II peptide;

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-12-

Fig. 7 shows the standard curve of the human collagen type II synthetic peptide spiked into normal human urine at concentrations ranging from 30 pg/mL to 100 ng/mL.

FIG. 8 is a bar graph illustrating the relative abundance of the collagen type II target peptide SEQ. ID. NO: 3 in cow urine;

FIG. 9 is a bar graph illustrating the relative abundance of the collagen type II target peptide SEQ. ID. NO: 2 in human urine;

FIG. 10 is a bar graph illustrating the relative abundance of the collagen type II target peptide SEQ ID NO: 2 in human urine; First pass urine was collected daily over a period of 14 days to test the day-to-day variation of the peptide abundance, normalized for creatinine levels;

FIG. 11 illustrates the fragment ions of a synthetic collagen type I peptide SEQ ID NO: 12 produced by tandem mass spectrometry; and

FIG. 12 illustrates the fragment ions of a synthetic collagen type III peptide SEQ ID NO: 13 produced by tandem mass spectrometry.

Best Mode for Carrying Out the Invention

One embodiment of the invention is directed to the identification and quantification of collagen peptides, particularly in biological samples from humans or animals. The term "biological sample" includes a sample from any body fluid or tissue. The invention includes a method of determining the presence of, and identifying the structure of, peptide degradation products of specific collagenase enzyme activity.

The present invention can be used to detect cleavage by proteolytic enzymes, such as matrix metalloproteinases -1, -8, and -13, that results in peptides with C-terminal amino acid sequences having characteristic fragment ions upon collisional activation by tandem mass spectrometry that can be identified by the methods of the present invention. The present invention allows the diagnosis and prognosis of physiological conditions characterized by cartilage degradation through the identification and quantification of collagen degradation peptides discovered to be present in biological samples of subjects exhibiting signs and symptoms of diseases characterized by cartilage

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-13-

degradation, such as osteoarthritis and rheumatoid arthritis. The invention is particularly useful in that it allows the detection and quantification of post-translational analogs of the peptides. The present invention also includes those newly discovered peptides and the post-translational analogs thereof.

5 One method of the invention relates to mass spectrometric analysis of peptide fragments in biological fluid samples or biological extracts to detect and measure protein degradation products, particularly proteins degraded by proteolytic enzymes. The proteolytic enzyme cleavage of a protein yields degradation peptides having a characteristic C-terminal amino sequence,
10 depending upon the species, the source of the protein, and the involved enzyme. In one embodiment of the invention collagen degradation peptides of a known mass in a biological sample are separated by chromatographic techniques and then fragmented by collisional activation in the mass spectrometer using techniques known in the art. Upon collisional activation, the peptides yield
15 fragments having characteristic mass to charge ratios. By detecting the presence of the characteristic peptide fragments of the C-terminus, for example, the sequence of the C-terminus is confirmed. Confirming the C-terminus sequence and the mass of the degradation peptide allows the deduction of the N-terminus of the peptide.

20 The peptide and fragment ion molecular weights determined in the tandem mass spectrum of the peptide are compared to those expected from known protein sequences, with postulated post-translational modifications, found in a protein database to determine the entire amino acid sequence including post-translational modifications of the peptide. The identification
25 methods of the present invention allow identification of the C-terminal and the N-terminal sequences and, therefore, the amino acid sequence of the entire degradation peptide, including potential hydroxylation of proline amino acids present in the peptide. The peptide identity is further validated by synthesizing the peptide and demonstrating that the synthetic peptide provides the same
30 analytical data, including liquid chromatographic elution time and mass spectrometric fragmentation as the peptide identified from biological sample.

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-14-

Once the peptide is identified, a standard peptide with the same or similar sequence can be used to determine the relative amount of the enzymatically cleaved peptide in the biological sample. This quantification can be used to assess proteolytic enzyme activity, for diagnosis or prognosis of diseases, and to evaluate drugs or agents used to modify proteolytic enzyme activity.

One embodiment of the invention provides for the identification and quantification of collagen cleavage products. For example, one embodiment of the invention provides for the identification and quantification of collagen types I, II and III breakdown products. A preferred embodiment of the present invention provides detection and quantification of specific, newly discovered protein cleavage products of collagen type II in a biological sample. The invention can be used to detect the presence of proteolytic enzyme degradation products resulting from the degradation of collagen type II by enzymes, such as matrix metalloproteinases, particularly matrix metalloproteinases -1, -8, and -13.

Identification and quantification of collagen type II peptide fragments in urine samples of humans initially indicated that post-translationally modified analog peptides of Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ala-Glu-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 2), where in the most abundant form position 14 and 26 are 4-hydroxyproline, are present in detectable amounts in human subjects medically diagnosed with and displaying signs and symptoms of arthritis. The following peptides are also present in detectable amounts in human subjects medically diagnosed with and displaying signs and symptoms of arthritis: Lys-Gly-Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Glu-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ala-Glu-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 15), where in the most abundant form positions 10, 16, 25, 31 and 42 are 4-hydroxyproline; Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Glu-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ala-Glu-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 16), where in the most abundant form positions 8, 14, 23, 29 and 41 are 4-hydroxyproline; and Gly-

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-15-

Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ala-Glu-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 17), where in the most abundant form positions 12 and 24 are 4-hydroxyproline.

Peptide SEQ ID NO: 16 has been found to be the most abundant collagen II neopeptide peptide measured in human urine.

Identification of collagen type II peptide fragments in urine samples of cattle initially indicated that post-translationally modified analog peptides of Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 3), where in the most abundant form position 14 and 26 are 4-hydroxyproline, are present in detectable amounts in bovine subjects displaying signs and symptoms of arthritis. The following peptides also are present in detectable amounts in bovine subjects displaying signs and symptoms of arthritis. : Lys-Gly-Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 34), where in the most abundant form positions 10, 16, 25, 28, and 43 are 4-hydroxyproline and position 43 is hydroxylysine; and Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 35), where in the most abundant form positions 8,14,23,29 and 41 are 4-hydroxyproline and position 26 is hydroxylysine. Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 36), where in the most abundant form positions 4, 10 and 22 are 4-hydroxyproline and position 7 is hydroxylysine; Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 37), where in the most abundant form positions 4, 8 and 20 are 4-hydroxyproline and position 5 is hydroxylysine; and Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 38), where in the most abundant form positions 2 is hydroxylysine and positions 5 and 17 are 4-hydroxyproline.

Peptide SEQ ID NO: 35 is the most abundant collagen II neopeptide peptide measured in bovine urine

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-16-

Likewise, identification and quantification of collagen type II peptide fragments in urine samples of dogs indicated post-translationally-modified analog peptides of Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 4),
 5 where in the most abundant form position 14 or 26 is 4-hydroxyproline, are present in detectable amounts in canine subjects displaying signs and symptoms of arthritis. The following peptides also are found in detectable amounts in canine subjects displaying signs and symptoms of arthritis: Lys-Gly-Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-
 10 Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 18), where in the most abundant form positions 10, 16, 25, 31 and 43 are 4-hydroxyproline and position 28 is hydroxylysine; Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-
 15 Gly (SEQ ID NO: 19), where in the most abundant form positions 8, 14, 23, 29, and 41 are 4-hydroxyproline and position 26 is hydroxylysine; Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 20), where in the most abundant form positions 4, 10 and 22 are 4-hydroxyproline and position 10 is hydroxylysine; Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-
 20 Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 21), where in the most abundant form positions 2, 8 and 20 are 2-, 3- or 4-hydroxyproline and position 5 is 4-hydroxylysine; and Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 22), where in the most abundant form position 2 is hydroxylysine and
 25 positions 5 and 17 are 4-hydroxyproline.

Peptide SEQ ID NO: 19 is the most abundant collagen II neoepitope peptide measured in canine urine.

The following are the most abundant peptides found in urine of cats exhibiting signs and symptoms of arthritis: Lys-Gly-Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-
 30 Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-17-

(SEQ ID NO: 23), where in the most abundant form positions 10, 16, 25, 31 and 43 are 4-hydroxyproline and position 28 is hydroxylysine; Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 24), where in the most abundant form positions 8, 14, 23, 29 and 41 are 4-hydroxyproline and position 26 is hydroxylysine; Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 25), where in the most abundant form positions 8, 14 and 26 are 4-hydroxyproline and position 11 is -hydroxylysine; Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 26), where in the most abundant form positions 4, 10 and 22 are 4-hydroxyproline and position 7 is hydroxylysine; Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 27), where in the most abundant form positions 2, 8, and 20 are 4-hydroxyproline and position 5 is hydroxylysine; and Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 28), where in the most abundant form position 2 is hydroxylysine and positions 5 and 17 are 4-hydroxyproline.

Peptide SEQ ID NO: 24 is the most abundant peptide neoepitope found in urine of feline subjects.

The following are the most abundant collagen II peptides found in the urine of horses exhibiting signs and symptoms of arthritis: Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 11), where in the most abundant form positions 8, 14 and 26 are 4-hydroxyproline and position 11 is hydroxylysine; Lys-Gly-Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 29), where in the most abundant form positions 10, 16, 25, 31 and 43 are 4-hydroxyproline and position 28 is -hydroxylysine; Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-18-

Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 30), where in the most abundant form positions 8, 14, 23, 29 and 41 are 4-hydroxyproline and position 26 is hydroxylysine; Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 31), where in the most abundant form positions 4, 10 and 22 are 4-hydroxyproline and position 7 is hydroxylysine; Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 32), where in the most abundant form positions 2, 8, and 20 are 4-hydroxyproline and positions 26 is hydroxylysine; and Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 33), where in the most abundant form position 2 is hydroxylysine and positions 5 and 17 are 4-hydroxyproline.

Peptide SEQ ID NO: 30 is the most abundant collagen II neopeptide found in equine urine.

The following are the most abundant collagen type II peptides found in urine of adjuvant arthritic rat subjects: Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Ala-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ser-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 8), where in the most abundant form positions 8, 14 and 26 are 4-hydroxyproline and position 11 is hydroxylysine; Ala-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ser-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 39), where in the most abundant form positions 2, 8 and 20 are 4-hydroxyproline and position 5 is hydroxylysine; Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ser-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 40), where in the most abundant form position 2 is hydroxylysine and positions 5 and 17 are 4-hydroxyproline; Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ser-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 41), where in the most abundant form positions 3 and 15 are 4-hydroxyprolines; and Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ser-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 42), wherein position 10 is 4-hydroxyproline.

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-19-

Peptide SEQ ID NO: 42 is the most abundant collagen II neopeptide peptide measured in rat urine.

The following is an abundant collagen type II peptide found in urine of cavia porcellus (guinea pig) subject exhibiting signs and symptoms of arthritis: Val-Arg-
5 Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-
Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Val-Ser-Gly-Ala-Asp-Gly-Pro-
Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 43), where in the most abundant form positions
8, 14, 23, 20 and 41 are 4-hydroxyprolines and position 26 is hydroxylysine.

10 It is noted that the post-translational modifications, 4-hydroxylation of
proline and hydroxylation of lysine, appear in varying levels in different
species. The originally translated peptides themselves, as well as permutations
of the post-translational modifications, may be found in urine of subjects and
are included among the embodiments of the invention.

15 It is believed these degradation peptides are a result of cleavage of
collagen type II by collagenase, particularly matrix metalloproteinases, and
more particularly matrix metalloproteinase-13 (MMP-13). Thus, the peptides
SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO:
11, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ
19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23,
20 SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID
NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32,
SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID
NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41,
SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 and particularly the post-translational analogs
25 thereof, found in biological samples function as markers of enzyme activity
and/or markers of diseases or conditions characterized by collagen type II
breakdown, such as osteoarthritis and rheumatoid arthritis. Identifiable
derivatives or modifications of the peptides also can function as markers and are
included within the scope of the invention.

30 The identification and quantification of the peptides SEQ ID NO: 2,
SEQ ID NO: 3 or SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO:

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-20-

15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, 5 SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, and SEQ ID NO: 43 and their post-translationally modified analog peptides, in general, is performed by the following illustrative analytical detection method:

10 A biological sample, such as urine, plasma, blood or synovial fluid is collected from the subject.

The relative molecular mass of peptides in the sample is determined by a first stage mass spectrometry and then the peptides are fragmented and fragment ions analyzed by second stage of the tandem mass spectrometer, as will be further explained below. As way of example, the post-translational analogs of 15 peptides SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 and SEQ ID NO: 4 found in picomolar to nanomolar amounts in the biological samples of subjects exhibiting signs and symptoms of arthritis have a mass/charge ratio in the range of approximately 900 to approximately 1000 with known variations of the mass/charge ratio within this range depending upon the post-translational modifications of proline 20 and in some examples, lysine. The charge for these peptides is +3. As will be discussed more specifically in the examples below, the relative mass/charge of the abundant post-translation analog of peptide SEQ ID NO: 2 was determined to be 914.4 and the charge was +3. The mass/charge of the abundant post-translation analog of peptide SEQ ID NO: 3 was shown to be 918.7 and, the 25 relative mass/charge of the abundant post-translation analog of peptide SEQ ID NO: 4 was shown to be 913.4, as described in the examples below.

The peptides can be separated from the biological matrix components of the sample by an appropriate separation method known to the art. For example, chromatographic or electrophoretic separation can be used in this step. Other 30 appropriate separation or "clean up" methods are contemplated by the invention. In liquid chromatographic separation the eluant containing the

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-21-

peptides of the target mass are introduced to a mass spectrometer through an appropriate liquid chromatography/mass spectrometry interface.

The peptides are fragmented by collisional activation by a neutral gas in a collision cell using collision energies and methods known to the art resulting in collision-induced dissociation of the peptide to create corresponding fragment ions. The spectrum of the fragment ions is analyzed. Peptides having the C-terminal sequence Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 1), where proline at the third position may be in the post-translationally modified form, hydroxyproline, fragment to yield product ions having characteristic mass to charge ratios. As demonstrated, where the proline at position 3 of SEQ ID NO: 1 is 4-hydroxyproline, the respective masses of the characteristic fragments are approximately m/z 301, 471 and 568. These characteristic fragments of C-terminal sequences are a result of the dominant cleavage of the peptide bonds on the N-terminal side of proline. The peptides having a C-terminus of Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 1), i.e., the non-modified form, will fragment to form fragment ions of the sequence Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 5) having a mass of approximately 301, sequence Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 6) having a mass of approximately 455 and sequence Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 7) having a mass of approximately 552.

Identification of the characteristic product ions is a strong indication of the presence of the C-terminal sequence Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 1) or post-translation modifications thereof. Consequently, peptides SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, and SEQ ID NO: 7 also are markers of collagen II degradation in their own right.

As described below, through further identification of peptide fragments in biological samples it was discovered that in human subjects medically diagnosed and exhibiting arthritic signs and symptoms, the predominant degradation peptides are the post-translational modifications of Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ala-Glu-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 2), where prolines at positions 14 and 26 are 4-hydroxyproline and Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-22-

Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Glu-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-
Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ala-Glu-Gly-Pro-Pro-
Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 16), where in the most abundant form positions
8, 14, 23, 29 and 41 are 4-hydroxyproline; Peptide SEQ ID NO: 16 being the
5 more abundant of the two.

The post-translationally-modified peptides SEQ ID NO: 3 and SEQ ID
NO: 19 were discovered to be the most abundant in dogs, with peptide SEQ ID
NO: 19 being more abundant. The post-translationally-modified peptides SEQ
ID NO: 4 and SEQ ID NO: 35 were discovered to be the predominant
10 degradation peptides in cattle, with peptide SEQ ID NO: 35 being more
abundant. The post-translationally-modified peptide SEQ ID NO: 24 was
discovered to be the most abundant peptide found in cats; the post-
translationally-modified peptide SEQ ID NO: 30 was discovered to be the most
abundant peptide found in horses; the post-translationally-modified peptide
15 SEQ ID NO.42 was discovered to be the most abundant peptide found in rats;
and the post-translationally-modified peptide SEQ ID NO: 42 was found to be
the most abundant peptide found in guinea pigs, all which also exhibited signs
and symptoms of cartilage degradation or arthritis.

Although these specifically recited peptides have been found to be most
20 predominant in the sample taken from a recited species of animal and may serve
as the more preferable biomarkers, all the discovered peptides sequences recited
herein have utility as well, as discussed below.

It will be noted that when any proteolytic enzyme cleaves a protein or
peptide, there is a resulting characteristic C-terminus, N-terminus, and potential
25 post-translational modifications thereof. This is due to the fact that specific
enzymes cleave proteins at specific sites in the amino acid sequence.
Fragmentation of a peptide having a specific C-terminus will yield characteristic
fragments upon collisional activation having specific mass to charge ratios.
That is, upon fragmentation each C-terminus will have its own fingerprint.
30 Consequently, the described method can be used to determine the amino acid

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-23-

sequence of any peptide that results from proteolytic cleavage leaving a known C-terminus that fragments into characteristic product ions.

The method of the present invention is not limited to identification and quantification of peptides resulting from the degradation of type II collagen or the specific peptides described herein by sequence identification numbers. The analytical methods of the present invention can be used to detect the presence of proteolytic enzyme degradation products resulting from the degradation of proteins other than the illustrated collagen type II or by enzymes other than collagenases, specifically, metalloproteinase-13 (MMP-13). By way of example only, the method of the present invention can be used to identify proteolytic degradation products resulting from cleavage by other matrix metalloproteinases such as matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) and matrix metalloproteinase-8 (MMP-8).

Specific examples of how the method of the present invention was employed in the discovery of the described peptides follow:

Example 1

Identification of a Bovine Collagen Type II Peptide Fragment

The following procedures were employed to determine that the post-translationally modified peptide of SEQ ID NO: 3 is present in the urine of cows exhibiting signs and symptoms of osteoarthritis:

- Urine was collected from the subject identified as exhibiting the signs and symptoms of osteoarthritis
- pH of the urine was adjusted to 7.1 with ammonium acetate
- Sample was fractionated using a mixed-mode ion exchange reversed phase preparatory chromatography column
- Sample was eluted from the column
- Sample was evaporated to dryness
- Sample was reconstituted in an appropriate chromatography buffer
- Sample was analyzed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS-MS) as follows:

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-24-

- Sample peptides were fragmented by collisional activation
- Characteristic peptide fragments at m/z 301, 471, and 568 were identified as predominant fragments
- 5 ○ Peptides that fragmented to m/z 301, 471, and 568 were identified as post-translational modifications of Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 3), wherein the Pro at positions 14 and 26 are 4-hydroxyproline, as discussed below.

15 A fragmentation of a collagen type II peptide (SEQ ID NO: 3) having the Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 1) C-terminus wherein the proline at position 3 is hydroxylated is illustrated in FIG. 1. The vertical (Y-axis) represents the fragment ion abundance (intensity) detected for a specific mass to charge ratio expressed as a percent of the total ions detected. The horizontal (X-axis) represents the mass to charge ratio of the detected fragment ions. The predominant fragmentation products of the peptides in the urine sample were identified as m/z 301, 471, and 568.

20 Software was used to match the fragment ions in an MS/MS spectrum of the peptide to the theoretical sequence ions produced in silico by cleaving all proteins in a protein database at every peptide bond (no enzyme specificity). The software matched the observed and theoretical molecular weights of an intact peptide and its fragment ions based on expected cleavages of the peptide between each of the amino acids. The software was employed to match the observed data to all possible peptides derived from all the proteins in a global protein database of known mammalian proteins. The program determined that the peptide having the mass m/z 918.7 for 3+, which fragments to yield ions at m/z 301, 471, and 568 was the post-translational modification of Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-

25

30

-25-

Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Glu-Gly (SEQ ID NO: 3), wherein the prolines at positions 14 and 26 are 4-hydroxyproline.

To prove that the software determined the correct peptide, a standard of the peptide was synthesized and its LC retention time and MS/MS spectrum was
5 matched to that of the peptide found in urine. The analytical data matched.

Example 2

Identification and Quantification of Human Collagen Type II Peptide Fragment

The procedures used in Example 1 were used to identify the presence of peptide SEQ ID NO: 2 in urine samples obtained from a human subject
10 diagnosed with and exhibiting the signs and symptoms of osteoarthritis.

Fig. 2 shows the fragmentation of a peptide in the sample from a human subject. As shown, the peptide is the post-translationally modified peptide Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ala-Glu-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 2) wherein
15 prolines at positions 14 and 26 are hydroxylated to 4-hydroxyproline. The peptide SEQ ID NO: 2 has the identified mass/charge of 914.4 with a charge of 3+. Fragmentation yielded the characteristic product ions of 301, 471, and 568 corresponding to SEQ. ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, and SEQ ID NO: 7, respectively.

20

Example 3

Identification and Quantification of Collagen Type II In Dog Urine Samples

The procedures used in Example 1 were used to identify the presence of peptide Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 4),
25 wherein the proline at position 26 is 4-hydroxyproline in urine samples obtained from canine subjects diagnosed with, and exhibiting signs and symptoms of osteoarthritis.

Fig. 3 shows the fragmentation of a peptide in the sample. As shown, the peptide is the post- translational modification of peptide Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 4), wherein the proline at
30

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-26-

position 14 or 26 is hydroxylated to 4-hydroxyproline. The peptide SEQ ID NO: 4 has the mass/charge of 913.4 with a charge of 3+. Fragmentation yielded the characteristic product ions at m/z 301, 471 or 455, and 568 or 552, corresponding to SEQ. ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, and SEQ ID NO: 7, respectively. The same peptide sequence is present in at least two post-translationally-modified forms in canine urine: one form where proline-14 is hydroxylated as shown in the top tandem mass spectrum and a second form where proline-26 is hydroxylated as shown in the bottom tandem mass spectrum;

10 Example 1 describes the discovery of the specific and predominant peptide fragment in urine derived from collagen type II degradation by proteolytic enzymes in cattle having the following amino acid sequence: Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 3), and particularly the post-translational modifications thereof. Example 2 describes the discovery of the specific and predominant peptide sequence Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ala-Glu-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 2) in urine derived from collagen type II degradation by proteolytic enzymes in humans. Example 20 3 describes the discovery of a specific and predominant peptide fragment in urine derived from collagen type II degradation by proteolytic enzymes in dogs, which has the following amino acid sequence: Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 4) or post-translational modifications thereof. All three peptides can include modifications of proline to 4 hydroxyproline at positions 8, 14 and 26 and lysine to 4 hydroxylysine at position 11. It will be noted that independent of the species of animal, upon fragmentation the predominant peptide yielded fragment ions having mass to charge ratios of approximately 301, 471 and 568. Fragmentation of the originally transcribed peptide (without post-translational conversion of the proline at position 26 to 4-hydroxyproline) would yield characteristic fragment 30

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-27-

ions having mass to charge ratios of approximately 301, 455 and 552 and are included within the scope of the invention.

Other characteristic fragment ions may be diagnostic within a given species. By way of example, Fig. 1 indicates that characteristic fragment ions having mass to charge ratios of 396 and 1219 are produced upon fragmentation of peptide SEQ ID NO: 3, found in samples from cattle. Also, as an example, Fig. 2 indicates that fragment ions having mass to charge ratios of 407 and 1222 are produced upon fragmentation of peptide SEQ ID NO: 2, found in samples from humans. Although the fragment ions having mass to charge ratios of approximately 301, 471 and 568 represent a preferred embodiment of the invention, other specific fragment ions may have utility when analyzing samples from that species and are included within the scope of the invention

It was predicted that peptide SEQ ID NO: 11 and post-translational modifications would be found in specimens from horses, which was confirmed as set out in Example 10. It is predicted that peptide SEQ ID NO: 9 will be found in specimens from rabbits and SEQ ID NO: 10 will be found in specimens from mice; and as well as post-translational modifications of these peptides when these species exhibit signs and symptoms of collagen degradation, and likely even prior to manifestation of the signs and symptoms of arthritic disease.

Since it is now known that a specific peptide, for example, Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ala-Glu-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 2), has been identified as a collagen type II degradation peptide in the biological fluid sample of humans, the relative quantity of that peptide in a given sample provides an indication of the extent of collagen II degradation occurring in the subject.

The peptides SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, or SEQ ID NO: 4 and likely SEQ ID NO: 9 and SEQ ID NO: 10, were identified and quantified by the following general, illustrative procedure:

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-28-

A biological specimen, for example urine, is collected from the subject. The peptide, which can be referred to as the subject or target peptide, having the appropriate mass, for example m/z 918.7 for $(M+3H)^{3+}$ (SEQ ID NO: 3) is extracted from the sample using procedures known to the art. See Example 4, 5 below. The sample is spiked with a known quantity of a synthetic peptide (known as the internal standard) having a sequence very similar to the target peptide sequence. For example, peptide Val-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ala-Glu-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO. 14), may be used as an internal 10 standard. Alternatively, stable-isotope labeled peptides with the identical sequence or compounds with dissimilar molecular structure may be spiked into the biological sample and used as an internal standards according to protocols known to the art. The sample is prepared and introduced to the LC-MS-MS for analysis. The presence of the target peptides is confirmed by three criteria: 1) it 15 elutes from the LC column at the proper time, 2) it is the correct molecular weight, and, 3) upon collisional activation, yields the characteristic fragments of approximately m/z 301, 471 and 568 (shown in Fig. 4), or other known fragment ions of the peptide. Fig. 5 is a chromatogram showing the elution 20 profile of the target peptide and an internal standard as a representative example. Comparison of the abundance of the target peptide (area under peak) to the abundance of a standard, normalized by the abundance of an internal standard indicates a relative quantity of target peptide in the sample. More particularly, the area under the curve representing the abundance of the standard peptide is compared to the area under the curve representing the abundance of 25 the target peptide to obtain a relative quantity of target peptide in a sample. The areas of the standard and target peptides are normalized relative to the area of an internal standard peptide to adjust for sample-to-sample variability in extraction efficiency, detection, and other potential variables. Of course, acceptable methods of quantifying the target peptide in a biological sample are 30 encompassed by the scope of the invention. A general quantitation procedure

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-29-

for collagen type II peptide biomarker in human urine is set out below in Example 4 as a representative procedure.

Example 4

General Quantitation Procedure For Collagen Type II Peptide Biomarker

5 In Human Urine

1. First pass urine is collected in polypropylene tubes. Samples are frozen at -80C until sample workup
2. 100 microliters of urine is aliquoted for creatinine quantitation, which is performed using standard procedures known in the art
- 10 3. Standard solutions ranging from 30 pg/mL to 100 ng/mL are prepared using a synthetic peptide standard
4. An internal standard (similar peptide) is spiked into 30 mL of each urine sample and standard to a final concentration of 1.0 nM
5. Urine solutions are extracted by mixed-phase (RP and AEX) preparatory
15 chromatography:
 - a. Equilibrate cartridge with 10 mL of MeOH
 - b. Condition cartridge with 10 mL of 50 mM NH₄OAc, pH
7
 - c. Load Sample (pH 7)
 - 20 d. Wash with 10 mL of 50 mM NH₄OAc, pH 7
 - e. Wash with 10 mL 5 % MeOH
 - f. Elute with 1 mL 5 % Formic Acid, 95 % MeOH
6. Eluant is evaporated to dryness and reconstituted in 100 microliters of 2% formic acid solution
- 25 7. Solutions are analyzed by LC/MS/MS
8. The collagen peptide in samples is quantified by correlating LC/MS/MS responses to those of the standards, normalized for the internal standard responses
9. Final peptide concentrations are normalized to creatinine levels

30 Preparation of Standard Curve

1. Prepare Stock Solutions of Collagen II Peptide:

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-30-

10 ng/mL, 100 ng/mL, 1 µg/mL, and 10 µg/mL.

2. Prepare Stock Solution of Internal Standard: 3 µg/mL
3. Add 100 µL of Internal Standard (3 µg/mL) to 30 mL of urine
4. Add 300 µL of 10 ng/mL, 100 ng/mL, 1 µg/mL, and 10 µg/mL to 30 mL
- 5 of urine to get 100 pg/mL, 1 ng/mL, 10 ng/mL, and 100 ng/mL standards, respectively. To get 30 pg/mL standard add 90 µL of 10 ng/mL stock solution to 30 mL of urine.

FIG. 6 graphically illustrates a comparison of extracted ion chromatograms for the 914/568 ion pair, which was used to measure the collagen type II peptide (SEQ ID NO: 2). The bottom scan shows that the peptide eluting at 5.7 minutes was not detected in human urine of a subject without signs and symptoms of arthritis. The middle scan shows detectable levels of the peptide, and the top scan shows that the synthetic analog of this peptide elutes at the same time. FIG. 7 illustrates a standard curve of the collagen type II peptide spiked into control human urine at various concentrations ranging from 30 pg/mL to 100 ng/mL. The response is linear over this concentration range for accurate quantification.

FIG. 8 is a bar graph illustrating the relative abundance of a post-translational modification of peptide SEQ. ID. NO: 3 in the urine from four different cows as determined by analytical methods of the present invention. The relative abundance of the peptide was graphed in a manner similar to the graph shown in FIG. 4. The relative abundance of the target peptides, as determined by its measured areas under the curves was compared in the bar graph. Cow-1 exhibited signs and symptoms of arthritis; cow-2 exhibited early signs and symptoms of arthritis; cow-3 and cow-4 did not exhibit signs and symptoms of arthritis. The relative abundance of the target peptide was nearly five (5) times greater in the urine from cow-1 than cow-2. The relative abundance of the post-translationally-modified peptide SEQ ID NO: 3, having 4-hydroxyproline at positions 14 and 26, in cow-2 exhibiting early signs and symptoms of arthritis is greater than that of cow-3 and cow-4, normal cows having no detectable signs and symptoms of arthritis.

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-31-

FIG 9 is a bar graph illustrating the relative abundance of the post-translation analog of peptide SEQ ID NO: 2, having 4-hydroxyproline at positions 14 and 26, in human urine. As shown, the relative abundance of the peptide in urine from normal humans was not detected and is shown to be 0; the relative abundance of the peptide in the urine of the human subject diagnosed with and demonstrating signs and symptoms of osteoarthritis is 8000.

FIG. 10 is a bar graph illustrating temporal levels of collagen type II peptide (SEQ ID NO: 2) in the urine of a human medically diagnosed with and exhibiting signs and symptoms of osteoarthritis. The peptide level varies from 60-200 pmol/mL over a 14 day period, and is much higher in abundance than the level in a control human urine sample. The results plotted on the graph indicate the validity and usefulness of the peptide as a biomarker. Determination of the biomarker level over time can indicate a progression or regression of disease. Changes in the biomarker level can be used to evaluate the effectiveness of treatments. For example, with reference to FIG. 9, successful treatment of the subject with an MMP-13 inhibitor would result in a reduction in the relative level of collagen type II peptide in a biological sample taken from the patient. It will be appreciated that these uses of the novel biomarkers are illustrative of the usefulness of the biomarker. Any useful applications of the biomarkers and methods of identification and quantification described herein, are intended to be included within the scope of the invention.

It will be appreciated by those skilled in the art that characteristic and identifiable derivatives or modifications of the novel biomarkers of the present invention can be produced using recognized techniques. For example, any of the peptides represented by SEQ ID NO: 2 through SEQ ID NO: 43 or their post-translational analogs could be enzymatically or chemically cleaved to yield one or more derivatives that would be readily identifiable. Such a derivative consequently could function as a biomarker. Likewise, for example, any of the peptides represented by SEQ ID NO: 2 through SEQ ID NO: 43 or their post-translational analogs could be modified, for example by changing, substituting,

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-32-

adding, or deleting one or more amino acid residues, resulting in an identifiable modified peptide that could function as a biomarker.

It also will be understood by those skilled in the art that there are other potential modifications to the peptides of the present invention that could change their physical properties (e.g., hydrophobicity, molecular weight, etc.) and thereby impart advantages to purification or detection of the target peptides. These modifications could result from derivatization of biological fluids, including urine and blood, or extracts of biological fluids to modify specific amino acid residues on the target peptides. Directed sites of modification may include, without limitation: a hydroxyl group on hydroxyproline or serine; an amino group on lysine or at a target peptide N-terminus; a guanidyl group on arginine; a carboxamidyl group on glutamine; a carboxylic acid group on aspartic acid or glutamic acid or at a target peptide C-terminus; and any combination of such modifications.

Examples of modifications of amino acid side chains by chemical derivatization have been described in references and are known to persons skilled in the art (D. Knapp, Handbook of Analytical Derivatization Reactions, John Wiley and Sons, Inc. (1979), incorporated herein by reference). Reagents used for chemical derivatization of amino acid side chains are commercially available. An example of one known commercial provider of these reagents is Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois.

Amino acids that comprise the peptides of the present invention may be modified due to chemical instability in the biological fluid or extract. Examples of modifications include conversion of aspartic acid to isoaspartic acid and cyclization of glutamine. Quantification of peptides of the present invention that have been modified by these chemical conversions is included within the scope of the invention.

Peptides of the present invention may be hydrolyzed by chemical or enzymatic methods to produce shorter peptides that are then purified and/or detected. By way of example, proteases including amino-peptidases, carboxy-peptidases, arg-C proteinase such as, for example clostripain

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-33-

(Clostridiopeptidase B), asp-N endopeptidase, chymotrypsin, lys-C proteinase, papain, pepsin, proline-endopeptidase, proteinase K, staphylococcal peptidase I, thermolysin, thrombin, and trypsin may be used to hydrolyze the target peptides to shorter forms, which may then be detected and quantified as a marker of in vivo collagenase activity. (B. Keil, Specificity of proteolysis, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-NewYork, pp.335. (1992), incorporated herein by reference). By way of example, a lys-C proteinase may be used to hydrolyze the target peptides on the C-terminal side of lysine to generate two shorter peptides, which can then be quantified. Glutamyl endopeptidases (Glu-C or V8) also may be used to cleave the target peptide at the C-terminal side of glutamic acid or aspartic acid to generate two or more shorter peptides, which then can be quantified. (J. Birkoft and K. Breddan, Glutamyl endopeptidases, Methods of Enzymology, 244:114-126 (1994); J. Houmar and G. Drapeau, Staphylococcal protease: a proteolytic enzyme specific for glutamoyl bonds, Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 69:3506-3509 (1972), incorporated herein by reference). The present invention includes but is not limited to detection and quantification of hydrolysis products of the target peptides embodied in this document through use of the aforementioned proteases. Also for the purposes of further example, formic acid can be used to cleave target peptides adjacent to aspartic acid residues to generate shorter peptides for quantification. (Li, A. et al., Chemical cleavage at aspartyl residues for protein identification, Anal. Chem., 73: 5395-402 (2001), incorporated herein by reference).

The foregoing are provided as examples of modifications and derivatives of peptides of the present invention and do not include all potential modifications or derivatives of the peptides of the present invention that would be recognized by one skilled in the art. Consequently, the present invention includes detection and/or quantification of these, and any other modifications and derivatives of the peptides of the present invention, as well as those derived or modified peptides themselves when used for the purpose of quantifying the biomarkers of the present invention.

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-34-

The analytic principles of the present invention also can be used to identify and quantify peptides which may serve as biomarkers of breakdown of collagens other than collagen type II. The peptide sequence Gly-Thr-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 12) is the expected C-terminus sequence of a biomarker peptide resulting from metalloproteinase cleavage of collagen type I, based upon an analysis of the peptide database. FIG. 11 illustrates the characteristic fragment ions resulting from the collisional activation of synthesized SEQ ID NO: 12. Collagen type I breakdown peptides can be identified in a biological sample using the methods of the present invention based upon the identification of characteristic fragment ions of m/z 301 and 455 for the non-hydroxylated form and m/z 301 and 471 for the hydroxylated form. Likewise, FIG. 12 illustrates that the peptide C-terminal sequence Gly-Ala-Pro-Gly-Pro-Leu-Gly (SEQ ID NO: 13) expected from the enzymatic cleavage of collagen type III will also yield identifiable, characteristic fragment ions when analyzed by methods of the present invention. The collagen type III fingerprint fragment ions are m/z 286 and 440 for the non-hydroxylated form and would be m/z 286 and 471 for the hydroxylated form. FIGS. 12 and 13 not only identify characteristic fragment ions that can be used to identify breakdown peptides specifically from collagen types I and III, respectively, but also substantiate the fact that the methods of the present invention can be employed more broadly to identify characteristic cleavage products of any collagen.

Example 5

Alternative Embodiment Of Method of Identifying and Quantifying

Collagen Type II Biomarker Peptides

25

Sample Preparation

1. For standard calibration curve generation, two mL of normal female (30 years old) human urine was spiked with 50 ng internal standard (deuterated 30 amino acid peptide SEQ ID NO: 2 and 45 amino acid peptide SEQ ID NO: 16, containing from 5ng to 100 ng of collagen type II 30 amino acid peptide SEQ ID NO: 2 (2 hydroxyprolines)

30

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-35-

and 45 amino acid peptide SEQ ID NO: 16 (5 hydroxyprolines) peptides (N=2).

2. Unknown urine samples (two mL) were spiked with 50 ng internal standard. Each urine standard and unknown was placed into a *Centricon* membrane centrifugal filter device (YM-3, 2mL capacity with 3000 MW cut off, Millipore Co., Bedford, MA) and was centrifuged at 5,000 rpm (5,000g) using a Speedfuge[®] (HSC, 10KA, Savant Instruments, Farmingdale, NY) with water cooling. Prior to the urine filtration, each *Centricon* was pre-wetted with 50 uL of 1% formic acid solution.
3. After 90% of the urine was filtered by centrifugation, about 200 uL of the retained solute solution (concentrated solute) remained in the retentate vial. One mL of water containing 1% (v/v) formic acid was added to the retentate and it was further centrifuged until approximately 200 uL of the solute solution remained.
4. The solute solution (retentate) was then transferred to a reaction-vial and evaporated to dryness under nitrogen. Each dried sample was dissolved in 100 uL of water containing 1% (v/v) formic acid and transferred to an HP autosampler vial with an insert. The filtrate was discarded.

HPLC/MS/MS

1. A sample aliquot (20 uL) from the autosampler vial was injected onto a Betasil C-18 column (ThermoHypersil-Keystone Co., Bellefonte, PA, 5 micron particle size, 200 x 2 mm) that was connected to a Rheas 2000 HPLC system (Leap Technologies, Carrboro, NC) interfaced with an ABI Sciex 4000 MS/MS spectrometer.
2. Elution was accomplished by ramping the mobile phases (A=water/1% formic acid; B=acetonitrile/1% formic acid) from 5% B to 35% B in 5 minutes and

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-36-

holding for 2 minutes. The column was re-equilibrated by ramping the gradient back to 5% B in 0.5 minutes and holding for 4.5 minutes before injection of the next sample. 4. Three MRM ion pairs (1039/301, 1039/471, and 1039/568; 1040/306, 1040/476, 1040/573; 914/301, 914/471, and 914/568; 916/306, 916/476, 916/573) were monitored for each of the four peptides (45mer (5OH) (SEQ ID NO: 16, d5-45mer (5OH) (SEQ ID NO: 16) internal standard, 30mer (2OH) (SEQ ID NO: 2), and d5-30mer (2OH) (SEQ ID NO: 2) internal standard), respectively, with a 200 ms dwell time for each ion pair at low resolution modes for parent and product ions.

5. The integrated peak areas of the three ion pairs for each peptide were determined by Sciex *Analyst* 1.2 software, and the summed, integrated peak areas of the two analyte peptides were normalized by the summed, integrated peak areas of the deuterated internal standard peptides and compared to the standard calibration curve to determine the quantities of 30mer (SEQ ID NO: 2) and 45mer (SEQ ID NO: 16) collagen II peptides in each unknown sample.

The HPLC/MS/MS analysis assay for each sample was performed in duplicate.

It will be appreciated that the method described in Example 5 was illustrated using human urine samples and the results set out in Example 6. The method can be used to identify and quantify peptide biomarkers in the urine of other species, as shown by Examples 7 through 12, below. One skilled in the art will note that appropriate, species-specific standard peptides will be employed when testing for the presence of peptide biomarkers in other species.

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-37-

Example 6Identification and Quantification Of Collagen II Peptides In Human Urine

Identification and quantification of additional collagen type II peptide fragments in urine samples of humans was performed according to the method described in Example 5. The following peptides were found in detectable amounts in human subjects medically diagnosed with and displaying signs and symptoms of arthritis:

Lys-Gly-Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Glu-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ala-Glu-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 15), where in the most abundant form positions 10, 16, 25, 31 and 42 are 4-hydroxyproline;

Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Glu-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ala-Glu-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 16), where in the most abundant form positions 8, 14, 23, 29 and 41 are 4-hydroxyproline; and

Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ala-Glu-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 17), where in the most abundant form positions 12 and 24 are 4-hydroxyproline.

Peptide SEQ ID NO.: 16 has been found to be the most abundant collagen II neopeptide peptide measured in human urine.

Example 7Identification and Quantification Of Collagen II Peptides In Bovine Urine

Identification and quantification of additional collagen type II peptide fragments in urine samples of cattle was performed according to the method described in Example 5. The following peptides were found in detectable amounts in bovine subjects medically diagnosed displaying signs and symptoms of arthritis:

Lys-Gly-Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 34), where in the most abundant form positions 10, 16, 25, 28, and 43 are 4-hydroxyproline and position 43 is hydroxylysine; and

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-38-

Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 35), where in the most abundant form positions 8,14,23,29 and 41 are 4-hydroxyproline and position 26 is hydroxylysine. Peptide SE ID NO: 35 is the most abundant collagen II neopeptide peptide measured in bovine urine.

Example 8

Identification and Quantification Of Collagen II Peptides In Canine Urine

Identification and quantification of collagen type II peptide fragments in urine samples of dogs was performed according to the method described in Example 5. The following peptides were found in detectable amounts in canine subjects displaying signs and symptoms of arthritis:

Lys-Gly-Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 18), where in the most abundant form positions 10, 16, 25, 31 and 43 are 4-hydroxyproline and position 28 is hydroxylysine;

Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 19), where in the most abundant form positions 8, 14, 23, 29, and 41 are 4-hydroxyproline and position 26 is hydroxylysine;

Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 20), where in the most abundant form positions 4, 10 and 22 are 4-hydroxyproline and position 10 is hydroxylysine;

Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 21), where in the most abundant form positions 2, 8 and 20 are 2-, 3- or 4-hydroxyproline and position and position 5 is 4-hydroxylysine; and

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-39-

Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 22), where in the most abundant form position 2 is hydroxylysine and positions 5 and 17 are 4-hydroxyproline. Peptide SEQ ID NO: 19 is the most abundant collagen II neopeptide peptide measured in canine urine.

5

Example 9Identification and Quantification Of Collagen II Peptides In Feline Urine

Identification and quantification of collagen type II peptide fragments in urine samples of cats was performed according to the method described in Example 5. The following peptides were found in detectable amounts in feline subjects displaying signs and symptoms of arthritis:

10

Lys-Gly-Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 23), where in the most abundant form positions 10, 16, 25, 31 and 43 are 4-hydroxyproline and position 28 is hydroxylysine;

15

Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 24), where in the most abundant form positions 8, 14, 23, 29 and 41 are 4-hydroxyproline and position 26 is hydroxylysine;

20

Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 25), where in the most abundant form positions 8, 14 and 26 are 4-hydroxyproline and position 11 is -hydroxylysine;

25

Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 26), where in the most abundant form positions 4, 10 and 22 are 4-hydroxyproline and position 7 is hydroxylysine; and

30

Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 27), where in the most abundant form

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-40-

positions 2, 8, and 20 are 4-hydroxyproline and position 5 is hydroxylysine; and Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 28), where in the most abundant form position 2 is hydroxylysine and positions 5 and 17 are 4-hydroxyproline.

- 5 Peptide SEQ ID NO: 24 is the most abundant peptide neopeptide found in urine of feline subjects.

Example 10

Identification and Quantification Of Collagen II Peptides In Equine Urine

- The presence of collagen type II peptide SEQ ID NO: 11 was confirmed and
10 identification and quantification of additional collagen type II peptide fragments in urine samples of horses was performed according to the method described in Example 5. The following peptides also were found in detectable amounts in equine subjects displaying signs and symptoms of arthritis:

- Lys-Gly-Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-
15 Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 29), where in the most abundant form positions 10, 16, 25, 31 and 43 are 4-hydroxyproline and position 28 is -hydroxylysine;

- Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-
20 Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 30), where in the most abundant form positions 8, 14, 23, 29 and 41 are 4-hydroxyproline and position 26 is hydroxylysine;

- Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-
25 Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 31), where in the most abundant form positions 4, 10 and 22 are 4-hydroxyproline and position 7 is hydroxylysine;

- Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-
30 Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 32), where in the most abundant form positions 2, 8, and 20 are 4-hydroxyproline and positions 26 is hydroxylysine; and

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-41-

Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 33), where in the most abundant form position 2 is hydroxylysine and positions 5 and 17 are 4-hydroxyproline.

Peptide SEQ ID NO: 30 is the most abundant collagen II neoepitope peptide found in equine urine.

Example 11

Identification and Quantification Of Collagen II Peptides In Rat Urine

The following peptides also were found in detectable amounts in rats displaying signs and symptoms of arthritis:

Ala-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ser-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 39), where in the most abundant form positions 2, 8 and 20 are 4-hydroxyproline and position 5 is hydroxylysine;

Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ser-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 40), where in the most abundant form position 2 is hydroxylysine and positions 5 and 17 are 4-hydroxyproline;

Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ser-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 41), wherein positions 3 and 15 are 4-hydroxyprolines; and

Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ser-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 42), where in the most abundant form position 10 is 4-hydroxyproline.

Peptide SEQ ID NO: 42 is the most abundant collagen II neoepitope peptide measured in rat urine.

Example 12

Identification and Quantification Of Collagen II Peptides In Guinea Pig Urine

Identification and quantification of collagen type II peptide fragments in urine samples of guinea pigs was performed according to the general method described in Example 5. The following peptide was found in detectable amounts in guinea pigs displaying signs and symptoms of arthritis:

Val-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Val-Ser-Gly-Ala-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 43), where in the most

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-42-

abundant form positions 8, 14, 23, 20 and 41 are 4-hydroxyprolines and position 26 is hydroxylysine.

From the foregoing disclosure, it will be seen that we have isolated and determined the amino acid sequences of specific proteolytic cleavage peptides represented by SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, and SEQ ID NO: 43 and post-translational modifications thereof.

It will be appreciated by those skilled in the art that because the complete amino acid sequences of specific peptides formed by proteolytic cleavage of type II collagen of several animals have been determined in accordance with the present invention, and because a method of general applicability has been disclosed for determining other specific peptides formed by proteolytic cleavage of other collagens, numerous methods may now be used to identify and quantify these specific peptides in biological samples or biological extracts.

The tandem mass spectrometric method used in the discovery of the specific peptides disclosed herein may of course be used to identify and quantify them and other specific proteolytic cleavage peptides. This method has the advantages over present immunological methods that it can identify and quantify the specific peptides formed by proteolytic cleavage, not just the family of peptides sharing a common C-terminus found by existing methods; that it reliably identifies and quantifies post-translational modifications of the peptides; and that it does not require preparation of separate antibodies for different mammalian species. The spectrometric methods may, of course, identify and quantify the peptides by the use of derivatives and modifications as

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-43-

discussed above, either by treating the sample or extract to produce a derivative or modification of the peptide or peptides, or else by using them as standards.

Those skilled in the art will recognize other methods, within the scope of the invention, of identifying and quantifying the peptides. For example, known ultraviolet spectroscopy, electrochemical, or fluorescent methods may be employed with or without chromatography within the scope of the invention. Known sequencing methods are also included within the scope of the invention. Also, immuno-specific antigen (ELISA) or other radioimmunoassay techniques that recognize specific peptide sequences or post-translational modifications thereof may be employed. For example, a neopeptide antibody to the N-terminus of the peptide, with or without a capture antibody, may provide greater sensitivity and specificity than current ELISA methods that use a C-terminal neopeptide antibody and a capture antibody to a portion of the sequence. By way of example, a neopeptide antibody directed against the N-terminus of one of the peptides may be prepared and utilized for identifying and quantifying the peptide. If the antibody is directed against the seven amino acid N-terminal sequence of the human peptide having SEQ ID NO: 16, or against the eight amino acid N-terminal sequence of the human peptide having SEQ ID NO: 2, it will provide unique identification of the peptide having that sequence. Because those terminal portions of the corresponding cat peptides (SEQ ID NO: 23 and SEQ ID NO: 25), dog peptides (SEQ ID NO: 18 and SEQ ID NO: 4), horse peptides (SEQ ID NO: 29 and SEQ ID NO: 11), and cow peptides (SEQ ID NO: 34 and SEQ ID NO: 3) are conserved, these peptides can also be specifically identified so long as the source of the biological sample or biological extract is known. If the antibody is directed against a shorter N-terminal sequence, positive identification of the peptide will require the use of some other technique, such as the use of a second antibody directed against the C-terminus or against an intermediate "capture region" as in a sandwich ELISA method. The methods for producing the needed antibodies are well known in the art. For example, the methods used by Otterness et al, *supra*, to form antibodies directed

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-44-

to the C-terminus of the degradation peptides may be utilized to form antibodies to the N-terminus.

By using the tandem mass spectrometric methods disclosed herein, the specific peptides produced by proteolytic cleavage of other collagens (including collagens from other animals, as well as type I and type III collagens) can easily be ascertained, and these specific peptides can then be identified by any of the foregoing methods.

Although the illustrative examples involved the identification and quantification of the peptides in urine samples, the peptides may be detected in other biological fluid samples or extracts, such as blood, plasma, or synovial fluid. Also, samples of tissues, such as tissue around a joint, may be obtained by biopsy or the like, and the peptides isolated through techniques known to the art. Identification and quantification of the biomarkers carried out by methods of the present invention then may be employed to identify and quantify the biomarkers in the tissue sample. Consequently, as used herein, the term biological sample is intended to include any sample of a body fluid or body tissue in which the biomarkers can be identified and quantified.

This quantification of the peptides can be used for diagnosis or prognosis of diseases such as osteoarthritis or rheumatoid arthritis, to monitor collagenase enzyme activity in disease or physiological conditions characterized by collagenase activity, and to evaluate drugs or agents used to inhibit collagen degradation, such as matrix metalloproteinase inhibitors, or the levels of active collagenase, particularly those drugs or agents that result in the inhibition of collagen degradation. Consequently, the peptides SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-45-

NO: 41, SEQ ID NO: 42, and SEQ ID NO: 43 and their post-translational modifications in biological samples are biomarkers of disease or conditions in which collagen type II proteolysis is characteristic. The identification and quantification of the biomarker peptides can be used in diagnosis and prognosis
5 of diseases or conditions characterized by collagen II degradation.

Further, the identification and quantification of the biomarkers peptides
SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9,
SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID
NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21,
10 SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID
NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30,
SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID
NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39,
SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, and SEQ ID NO: 43 and
15 their post-translational modifications, for example, in a biological sample can be
used to monitor or evaluate the efficacy of a drug or other agent used to block
the activity and/or abundances of the proteolytic enzyme(s) that yields the
degradation products, peptides SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4,
SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO:
20 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ
ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24,
SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID
NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33,
SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID
25 NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42,
and SEQ ID NO: 43 and their post-translational modifications.

One exemplary use of the biomarker of the present invention is to
monitor and evaluate the activity of a matrix metalloproteinase inhibitor
(MMPi). The identification and quantification of peptides represented by SEQ
30 ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ
ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17,

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-46-

SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID
NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26,
SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID
NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35,
5 SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID
NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, and SEQ ID NO: 43 or post-
translational modifications, in biological fluid samples can indicate collagen
type II degradation and the relative *in vivo* activity of a collagenase enzyme, for
example MMP-13. In diseases or physiologic conditions in which collagen type
10 II degradation is a pathological characteristic, administration of a
pharmacologically effective amount of an MMP inhibitor, for example, an
MMP-13 inhibitor, should result in the reduction or elimination of peptide Leu-
Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-
Pro-Ser-Gly-Ala-Glu-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 2), for
15 example, in a human subject's biological fluid sample.

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-47-

SEQUENCE LISTING

<110> Welsch, Dean J.
Duffin, Kevin L.
Dufield, Dawn R.
Nemirovskiy, Olga
Sunyer, Teresa
Howard, Carol P.
Pharmacia Corporation

<120> Biomarker Peptide and Method

<130> PHAR 8023 (3555)

<160> 44

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 7
<212> PRT
<213> homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> Pro or 4Hyp

<400> 1

Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly
1 5

<210> 2
<211> 30
<212> PRT

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-48-

<213> homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> Pro or 4Hyp

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Lys or Hyl

<220>

<221> MOD_RES

<222> (14)..(14)

<223> Pro or 4Hyp

<220>

<221> MOD_RES

<222> (26)..(26)

<223> Pro or 4Hyp

<400> 2

Leu	Gln	Gly	Pro	Ala	Gly	Pro	Pro	Gly	Glu	Lys	Gly	Glu	Pro	Gly	Asp
1			5					10						15	

Asp	Gly	Pro	Ser	Gly	Ala	Glu	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Gln	Gly
			20					25					30

<210> 3

<211> 30

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-49-

<212> PRT
<213> bos taurus

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> Pro or 4Hyp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> Lys or Hyl

<220>
<221> MOD_RES
<222> (14)..(14)
<223> Pro or 4Hyp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (26)..(26)
<223> Pro or 4Hyp

<400> 3

Leu Gln Gly Pro Ala Gly Pro Pro Gly Glu Lys Gly Glu Pro Gly Asp
1 5 10 15

Asp Gly Pro Ser Gly Pro Asp Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly
 20 25 30

<210> 4

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-50-

<211> 30
 <212> PRT
 <213> canis familiaris

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> Pro or 4Hyp

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (11)..(11)
 <223> Lys or Hyl

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (14)..(14)
 <223> Pro or 4Hyp

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (26)..(26)
 <223> Pro or 4Hyp

<400> 4

Leu Gln Gly Pro Ala Gly Pro Pro Gly Glu Lys Gly Glu Pro Gly Asp
 1 5 10 15

Asp Gly Pro Ser Gly Pro Asp Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly
 20 25 30

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-51-

<210> 5
<211> 3
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 5

Pro Gln Gly
1

<210> 6
<211> 5
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 6

Pro Gly Pro Gln Gly
1 5

<210> 7
<211> 6
<212> PRT
<213> homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Pro or 4Eyp

<400> 7

Pro Pro Gly Pro Gln Gly
1 5

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-52-

<210> 8
<211> 30
<212> PRT
<213> rattus sp.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> Pro or 4Hyp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> Lys or Hy1

<220>
<221> MOD_RES
<222> (14)..(14)
<223> Pro or 4Hyp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (26)..(26)
<223> Pro or 4Hyp

<400> 8

Leu Gln Gly Pro Ala Gly Ala Pro Gly Glu Lys Gly Glu Pro Gly Asp
1 5 10 15

Asp Gly Pro Ser Gly Ser Asp Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly
 20 25 30

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-53-

<210> 9
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> Pro or 4Hyp

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (11)..(11)
 <223> Lys or Hyl

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (14)..(14)
 <223> Pro or 4Hyp

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (26)..(26)
 <223> Pro or 4Hyp

<400> 9

Leu Gln Gly Pro Ala Gly Pro Pro Gly Leu Lys Gly Glu Pro Gly Asp
 1 5 10 15

Ser Gly Pro Ser Gly Ala Asp Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-54-

20

25

30

<210> 10
<211> 30
<212> PRT
<213> mus sp.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> Pro or 4Hyp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> Lys or Hyl

<220>
<221> MOD_RES
<222> (14)..(14)
<223> Pro or 4Hyp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (26)..(26)
<223> Pro or 4Hyp

<400> 10

Leu Glu Gly Pro Ala Gly Ala Pro Gly Glu Lys Gly Glu Pro Gly Asp
1 5 10 15

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-55-

Asp Gly Pro Ser Gly Leu Asp Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly
20 25 30

<210> 11
<211> 30
<212> PPT
<213> equus sp.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> Pro or 4Hyp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> Lys or Hyl

<220>
<221> MOD_RES
<222> (14)..(14)
<223> Pro or 4Hyp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (26)..(26)
<223> Pro or 4Hyp

<400> 11

Leu Gln Gly Pro Ala Gly Pro Pro Gly Glu Lys Gly Glu Pro Gly Asp
1 5 10 15

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-56-

Asp Gly Pro Ser Gly Pro Asp Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly
 20 25 30

<210> 12
<211> 7
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Synthetic peptide collagent type I fragment

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> Pro or 4Hyp

<400> 12

Gly Thr Pro Gly Pro Gln Gly
1 5

<210> 13
<211> 7
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Synthetic peptide collagen type III fragment

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> Pro or 4Hyp

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-57-

<400> 13

Gly Ala Pro Gly Pro Leu Gly
1 5

<210> 14

<211> 31

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Synthetic peptide collagen type II fragment

<220>

<221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> Pro or 4Hyp

<220>

<221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

<223> Lys or Hyl

<220>

<221> MOD_RES

<222> (15)..(15)

<223> Pro or 4Hyp

<220>

<221> MOD_RES

<222> (27)..(27)

<223> Pro or 4Hyp

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-58-

<400> 14

Val Leu Gln Gly Pro Ala Gly Pro Pro Gly Glu Lys Gly Glu Pro Gly
1 5 10 15

Asp Asp Gly Pro Ser Gly Ala Glu Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly
 20 25 30

<210> 15

<211> 47

<212> PRT

<213> homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

<222> (10)..(10)

<223> Pro or 4Hyp

<220>

<221> MOD_RES

<222> (16)..(16)

<223> Pro or 4Hyp

<220>

<221> MOD_RES

<222> (25)..(25)

<223> Pro or 4Hyp

<220>

<221> MOD_RES

<222> (31)..(31)

<223> Pro or 4Hyp

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-59-

<220>
<221> MOD_RES
<222> (43)..(43)
<223> Pro or 4Hyp

<400> 15

Lys Gly Ala Arg Gly Asp Ser Gly Pro Pro Gly Arg Ala Gly Glu Pro
1 5 10 15

Gly Leu Gln Gly Pro Ala Gly Pro Pro Gly Glu Lys Gly Glu Pro Gly
 20 25 30

Asp Asp;Gly Pro Ser Gly Ala Glu Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly
 35 40 45

<210> 16
<211> 45
<212> PRT
<213> homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> Pro or 4Hyp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (14)..(14)
<223> Pro or 4Hyp

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-60-

<220>
<221> MOD_RES
<222> (23)..(23)
<223> Pro or 4Hyp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (29)..(29)
<223> Pro or 4Hyp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (41)..(41)
<223> Pro or 4Hyp

<400> 16

Ala Arg Gly Asp Ser Gly Pro Pro Gly Arg Ala Gly Glu Pro Gly Leu
1 5 10 15

Gln Gly Pro Ala Gly Pro Pro Gly Glu Lys Gly Glu Pro Gly Asp Asp
 20 25 30

Gly Pro Ser Gly Ala Glu Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly
 35 40 45

<210> 17
<211> 28
<212> PRT
<213> homo sapiens

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-61-

<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> Pro or 4Hyp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (24)..(24)
<223> Pro or 4Hyp

<400> 17

Gly Pro Ala Gly Pro Pro Gly Glu Lys Gly Glu Pro Gly Asp Asp Gly
1 5 10 15

Pro Ser Gly Ala Glu Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly
 20 25

<210> 18
<211> 47
<212> PRT
<213> canis familiaris

<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> Pro or 4Hyp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (16)..(16)
<223> Pro or 4Hyp

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-62-

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (25)..(25)
 <223> Pro or 4Hyp

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (28)..(28)
 <223> Lys or Hyl

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (31)..(31)
 <223> Pro or 4Hyp

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (43)..(43)
 <223> Pro or 4Hyp

<400> 18

Lys Gly Ala Arg Gly Asp Ser Gly Pro Pro Gly Arg Ala Gly Asp Pro
 1 5 10 15

Gly Leu Gln Gly Pro Ala Gly Pro Pro Gly Glu Lys Gly Glu Pro Gly
 20 25 30

Asp Asp Gly Pro Ser Gly Pro Asp Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly
 35 40 45

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-63-

<210> 19
<211> 45
<212> PRT
<213> *canis familiaris*

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> Pro or 4Hyp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (14)..(14)
<223> Pro or 4Hyp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (23)..(23)
<223> Pro or 4Hyp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (26)..(26)
<223> Lys or Hy1

<220>
<221> MOD_RES
<222> (29)..(29)
<223> Pro or 4Hyp

<220>
<221> MOD_RES

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-64-

<222> (41)..(41)
 <223> Pro or 4Hyp

<400> 19

Ala Arg Gly Asp Ser Gly Pro Pro Gly Arg Ala Gly Asp Pro Gly Leu
 1 5 10 15

Gln Gly Pro Ala Gly Pro Pro Gly Glu Lys Gly Glu Pro Gly Asp Asp
 20 25 30

Gly Pro Ser Gly Pro Asp Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly
 35 40 45

<210> 20
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> canis familiaris

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> Pro or 4Hyp

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> Lys or Hyl

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10)..(10)

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-65-

<223> Pro or 4Hyp

<220>

<221> MOD_RES

<222> (22)..(22)

<223> Pro or 4Hyp

<400> 20

Ala Gly Pro Pro Gly Glu Lys Gly Glu Pro Gly Asp Asp Gly Pro Ser
1 5 10 15

Gly Pro Asp Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly
 20 25

<210> 21

<211> 24

<212> PRT

<213> canis familiaris

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Pro or 4Hyp

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> Lys or Hyl

<220>

<221> MOD_RES

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-66-

<222> (8)..(8)
<223> Pro or 4Hyp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (20)..(20)
<223> Pro or 4Hyp

<400> 21

Pro Pro Gly Glu Lys Gly Glu Pro Gly Asp Asp Gly Pro Ser Gly Pro
1 5 10 15

Asp Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly
20

<210> 22
<211> 21
<212> PRT
<213> canis familiaris

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Lys or Hyl

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> Pro or 4Hyp

<220>

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-68-

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (28)..(28)
 <223> Lys or Hy1

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (31)..(31)
 <223> Pro or 4Hyp

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (43)..(43)
 <223> Pro or 4Hyp

<400> 23

Lys Gly Ala Arg Gly Asp Ser Gly Pro Pro Gly Arg Ala Gly Asp Pro
 1 5 10 15

Gly Leu Gln Gly Pro Ala Gly Pro Pro Gly Glu Lys Gly Glu Pro Gly
 20 25 30

Asp Asp Gly Pro Ser Gly Pro Asp Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly
 35 40 45

<210> 24
 <211> 45
 <212> PRT
 <213> felis catus
 <220>

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-69-

<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> Pro or 4Hyp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (14)..(14)
<223> Pro or 4Hyp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (23)..(23)
<223> Pro or 4Hyp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (26)..(26)
<223> Lys or Hy1

<220>
<221> MOD_RES
<222> (29)..(29)
<223> Pro or 4Hyp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (41)..(41)
<223> Pro or 4Hyp

<400> 24

Ala Arg Gly Asp Ser Gly Pro Pro Gly Arg Ala Gly Asp Pro Gly Leu

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-71-

<400> 25

Leu Gln Gly Pro Ala Gly Pro Pro Gly Glu Lys Gly Glu Pro Gly Asp
1 5 10 15

Asp Gly Pro Ser Gly Pro Asp Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly
 20 25 30

<210> 26

<211> 26

<212> PRT

<213> felis catus

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> Pro or 4Hyp

<220>

<221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> Lys or Hyl

<220>

<221> MOD_RES

<222> (10)..(10)

<223> Pro or 4Byp

<220>

<221> MOD_RES

<222> (22)..(22)

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-72-

<223> Pro or 4Hyp

<400> 26

Ala Gly Pro Pro Gly Glu Lys Gly Glu Pro Gly Asp Asp Gly Pro Ser
1 5 10 15

Gly Pro Asp Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly
 20 25

<210> 27

<211> 24

<212> PRT

<213> felis catus

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Pro or 4Hyp

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> Lys or Hyl

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> Pro or 4Hyp

<220>

<221> MOD_RES

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-73-

<222> (20)..(20)
<223> Pro or 4Hyp

<400> 27

Pro Pro Gly Glu Lys Gly Glu Pro Gly Asp Asp Gly Pro Ser Gly Pro
1 5 10 15

Asp Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly
20

<210> 28
<211> 21
<212> PRT
<213> felis catus

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Lys or Hyl

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> Pro or 4Hyp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (17)..(17)
<223> Pro or 4Hyp

<400> 28

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-74-

Glu Lys Gly Glu Pro Gly Asp Asp Gly Pro Ser Gly Pro Asp Gly Pro
 1 5 10 15

Pro Gly Pro Gln Gly
 20

<210> 29

<211> 47

<212> PRT

<213> equus sp.

<220>

<221> MOD_RES

<222> (10)..(10)

<223> Pro or 4Hyp

<220>

<221> MOD_RES

<222> (16)..(16)

<223> Pro or 4Hyp

<220>

<221> MOD_RES

<222> (25)..(25)

<223> Pro or 4Hyp

<220>

<221> MOD_RES

<222> (28)..(28)

<223> Lys or Hy1

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-75-

<220>
<221> MOD_RES
<222> (31)..(31)
<223> Pro or 4Hyp

<230>
<221> MOD_RES
<222> (43)..(43)
<223> Pro or 4Hyp

<400> 29

Lys Gly Ala Arg Gly Asp Ser Gly Pro Pro Gly Arg Ala Gly Asp Pro
1 5 10 15

Gly Leu Gln Gly Pro Ala Gly Pro Pro Gly Glu Lys Gly Glu Pro Gly
20 25 30

Asp Asp Gly Pro Ser Gly Pro Asp Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly
35 40 45

<210> 30
<211> 45
<212> PRT
<213> equus sp.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> Pro or 4Hyp

<220>

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-76-

<221> MOD_RES
 <222> (14)..(14)
 <223> Pro or 4Hyp

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (23)..(23)
 <223> Pro or 4Hyp

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (26)..(26)
 <223> Lys or Hy1

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (29)..(29)
 <223> Pro or 4Hyp

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (41)..(41)
 <223> Pro or 4Hyp

<400> 30

Ala Arg Gly Asp Ser Gly Pro Pro Gly Arg Ala Gly Asp Pro Gly Leu
 1 5 10 15

Gln Gly Pro Ala Gly Pro Pro Gly Glu Lys Gly Glu Pro Gly Asp Asp
 20 25 30

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-77-

Gly Pro Ser Gly Pro Asp Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly
 35 40 45

<210> 31
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> equus sp.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> Pro or 4Hyp

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> Lys or Hy1

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10)..(10)
 <223> Pro or 4Hyp

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (22)..(22)
 <223> Pro or 4Hyp

<400> 31

Ala Gly Pro Pro Gly Glu Lys Gly Glu Pro Gly Asp Asp Gly Pro Ser
 1 5 10 15

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-78-

Gly Pro Asp Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly
 20 25

<210> 32

<211> 24

<212> PRT

<213> equus sp.

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Pro or 4Hyp

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> Lys or Hyl

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> Pro or 4Hyp

<220>

<221> MOD_RES

<222> (20)..(20)

<223> Pro or 4Hyp

<400> 32

Pro Pro Gly Glu Lys Gly Glu Pro Gly Asp Asp Gly Pro Ser Gly Pro

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-79-

1 5 10 15

Asp Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly
20

<210> 33
<211> 21
<212> PPT
<213> equus sp.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Lys or Hyl

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> Pro or 4Hyp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (17)..(17)
<223> Pro or 4Hyp

<400> 33

Glu Lys Gly Glu Pro Gly Asp Asp Gly Pro Ser Gly Pro Asp Gly Pro
1 5 10 15

Pro Gly Pro Gln Gly
20

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-80-

<210> 34
<211> 47
<212> PRT
<213> bos taurus

<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> Pro or 4Hyp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (16)..(16)
<223> Pro or 4Hyp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (25)..(25)
<223> Pro or 4Hyp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (28)..(28)
<223> Lys or Hyl

<220>
<221> MOD_RES
<222> (31)..(31)
<223> Pro or 4Hyp

<220>

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-81-

<221> MOD_RES
<222> (43)..(43)
<223> Pro or 4Hyp

<400> 34

Lys Gly Ala Arg Gly Asp Ser Gly Pro Pro Gly Arg Ala Gly Asp Pro
1 5 10 15

Gly Leu Gln Gly Pro Ala Gly Pro Pro Gly Glu Lys Gly Glu Pro Gly
20 25 30

Asp Asp Gly Pro Ser Gly Pro Asp Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly
35 40 45

<210> 35
<211> 45
<212> PRT
<213> bos taurus

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> Pro or 4Hyp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (14)..(14)
<223> Pro or 4Hyp

<220>
<221> MOD_RES

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-82-

<222> (23)..(23)
<223> Pro or 4Hyp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (26)..(26)
<223> Lys or Hyl

<220>
<221> MOD_RES
<222> (29)..(29)
<223> Pro or 4Hyp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (41)..(41)
<223> Pro or 4Hyp

<400> 35

Ala Arg Gly Asp Ser Gly Pro Pro Gly Arg Ala Gly Asp Pro Gly Leu
1 5 10 15

Gln Gly Pro Ala Gly Pro Pro Gly Glu Lys Gly Glu Pro Gly Asp Asp
 20 25 30

Gly Pro Ser Gly Pro Asp Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly
 35 40 45

<210> 36
<211> 26

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-83-

<212> PRT
<213> bos taurus

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> Pro or 4Hyp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> Lys or Hy1

<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> Pro or 4Hyp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (22)..(22)
<223> Pro or 4Hyp

<400> 36

Ala Gly Pro Pro Gly Glu Lys Gly Glu Pro Gly Asp Asp Gly Pro Ser
1 5 10 15

Gly Pro Asp Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly
20 25

<210> 37

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-84-

<211> 24
<212> PRT
<213> bos taurus

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Pro or 4Hyp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> Lys or Hyl

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> Pro or 4Hyp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (20)..(20)
<223> Pro or 4Hyp

<400> 37

Pro Pro Gly Glu Lys Gly Glu Pro Gly Asp Asp Gly Pro Ser Gly Pro
1 5 10 15

Asp Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly
20

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-85-

<210> 38
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> bos taurus

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Lys or Hyl

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> Pro or 4Hyp

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (17)..(17)
 <223> Pro or 4Hyp

<400> 38

Glu Lys Gly Glu Pro Gly Asp Asp Gly Pro Ser Gly Pro Asp Gly Pro
 1 5 10 15

Pro Gly Pro Gln Gly
 20

<210> 39
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> rattus sp.

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-86-

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Pro or 4Hyp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> Lys or Hy1

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> Pro or 4Hyp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (20)..(20)
<223> Pro or 4Hyp

<400> 39

Ala Pro Gly Glu Lys Gly Glu Pro Gly Asp Asp Gly Pro Ser Gly Ser
1 5 10 15

Asp Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly
20

<210> 40
<211> 21
<212> PRT
<213> rattus sp.

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-87-

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Lys or Hy1

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> Pro or 4Hyp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (17)..(17)
<223> Pro or 4Hyp

<400> 40

Glu Lys Gly Glu Pro Gly Asp Asp Gly Pro Ser Gly Ser Asp Gly Pro
1 5 10 15

Pro Gly Pro Gln Gly
20

<210> 41
<211> 19
<212> PRT
<213> rattus sp.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> Pro or 4Hyp

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-88-

<220>
<221> MOD_RES
<222> (15)..(15)
<223> Pro or 4Hyp

<400> 41

Gly Glu Pro Gly Asp Asp Gly Pro Ser Gly Ser Asp Gly Pro Pro Gly
1 5 10 15

Pro Gln Gly

<210> 42
<211> 14
<212> PRT
<213> rattus sp.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> Pro or 4Hyp

<400> 42

Asp Gly Pro Ser Gly Ser Asp Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly
1 5 10

<210> 43
<211> 45
<212> PRT

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-89-

<213> cavia porcellus

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> Pro or 4Hyp

<220>

<221> MOD_RES

<222> (14)..(14)

<223> Pro or 4Hyp

<220>

<221> MOD_RES

<222> (23)..(23)

<223> Pro or 4Hyp

<220>

<221> MOD_RES

<222> (26)..(26)

<223> Lys or Hy1

<320>

<221> MOD_RES

<222> (29)..(29)

<223> Pro or 4Hyp

<220>

<221> MOD_RES

<222> (41)..(41)

<223> Pro or 4Hyp

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-90-

<400> 43

Val	Arg	Gly	Asp	Ser	Gly	Pro	Pro	Gly	Arg	Ala	Gly	Asp	Pro	Gly	Leu
1				5					10					15	

Gln	Gly	Pro	Ala	Gly	Pro	Pro	Gly	Glu	Lys	Gly	Glu	Pro	Gly	Asp	Asp
		20						25						30	

Gly	Val	Ser	Gly	Ala	Asp	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Gln	Gly
		35					40					45

<210> 44

<211> 714

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 44

Gly	Pro	Ile	Gly	Pro	Pro	Gly	Glu	Arg	Gly	Ala	Pro	Gly	Asn	Arg	Gly
1				5					10					15	

Phe	Pro	Gly	Gln	Asp	Gly	Leu	Ala	Gly	Pro	Lys	Gly	Ala	Pro	Gly	Glu
			20						25					30	

Arg	Gly	Pro	Ser	Gly	Leu	Ala	Gly	Pro	Lys	Gly	Ala	Asn	Gly	Asp	Pro
		35							40				45		

Gly	Arg	Pro	Gly	Glu	Pro	Gly	Leu	Pro	Gly	Ala	Arg	Gly	Leu	Thr	Gly
		50					55						60		

Arg Pro Gly Asp Ala Gly Pro Gln Gly Lys Val Gly Pro Ser Gly Ala

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-92-

Pro Gly Thr Asp Gly Pro Lys Gly Ala Ser Gly Pro Ala Gly Pro Pro
225 230 235 240

Gly Ala Gln Gly Pro Pro Gly Leu Gln Gly Met Pro Gly Glu Arg Gly
 245 250 255

Ala Ala Gly Ile Ala Gly Pro Lys Gly Asp Arg Gly Asp Val Gly Glu
 260 265 270

Lys Gly Pro Glu Gly Ala Pro Gly Lys Asp Gly Ala Arg Gly Leu Thr
 275 280 285

Gly Pro Ile Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Ala Asn Gly Glu Lys Gly
 290 295 300

Glu Val Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Ser Ala Gly Ala Arg Gly Ala
305 310 315 320

Pro Gly Glu Arg Gly Glu Thr Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Phe Ala
 325 330 335

Gly Pro Pro Gly Ala Asp Gly Gln Pro Gly Ala Lys Gly Glu Gln Gly
 340 345 350

Glu Ala Gly Gln Lys Gly Asp Ala Gly Ala Pro Gly Pro Gln Gly Pro
 355 360 365

Ser Gly Ala Pro Gly Pro Gln Gly Pro Thr Gly Val Thr Gly Pro Lys

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-93-

370 375 380

Gly Ala Arg Gly Ala Gln Gly Pro Pro Gly Ala Thr Gly Phe Pro Gly
 385 390 395 400

Ala Ala Gly Arg Val Gly Pro Pro Gly Ser Asn Gly Asn Pro Gly Pro
 405 410 415

Pro Gly Pro Pro Gly Pro Ser Gly Lys Asp Gly Pro Lys Gly Ala Arg
 420 425 430

Gly Asp Ser Gly Pro Pro Gly Arg Ala Gly Glu Pro Gly Leu Gln Gly
 435 440 445

Pro Ala Gly Pro Pro Gly Glu Lys Gly Glu Pro Gly Asp Asp Gly Pro
 450 455 460

Ser Gly Ala Glu Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly Leu Ala Gly Gln Arg
 465 470 475 480

Gly Ile Val Gly Leu Pro Gly Gln Arg Gly Glu Arg Gly Phe Pro Gly
 485 490 495

Leu Pro Gly Pro Ser Gly Glu Pro Gly Gln Gln Gly Ala Pro Gly Ala
 500 505 510

Ser Gly Asp Arg Gly Pro Pro Gly Pro Val Gly Pro Pro Gly Leu Thr
 515 520 525

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-94-

Gly Pro Ala Gly Glu Pro Gly Arg Glu Gly Ser Pro Gly Ala Asp Gly
530 535 540

Pro Pro Gly Arg Asp Gly Ala Ala Gly Val Lys Gly Asp Arg Gly Glu
545 550 555 560

Thr Gly Ala Val Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Pro Pro Gly Ser Pro
565 570 575

Gly Pro Ala Gly Pro Thr Gly Lys Gln Gly Asp Arg Gly Glu Ala Gly
580 585 590

Ala Gln Gly Pro Met Gly Pro Ser Gly Pro Ala Gly Ala Arg Gly Ile
595 600 605

Gln Gly Pro Gln Gly Pro Arg Gly Asp Lys Gly Glu Ala Gly Glu Pro
610 615 620

Gly Glu Arg Gly Leu Lys Gly His Arg Gly Phe Thr Gly Leu Gln Gly
625 630 635 640

Leu Pro Gly Pro Pro Gly Pro Ser Gly Asp Gln Gly Ala Ser Gly Pro
645 650 655

Ala Gly Pro Ser Gly Pro Arg Gly Pro Pro Gly Pro Val Gly Pro Ser
660 665 670

Gly Lys Asp Gly Ala Asn Gly Ile Pro Gly Pro Ile Gly Pro Pro Gly

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-95-

675

680

685

Pro Arg Gly Arg Ser Gly Glu Thr Gly Pro Ala Gly Pro Pro Gly Asn
690 695 700

Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro
705 710

Claims

1. A method of detecting enzymatic proteolysis of a collagen, the method comprising identifying and quantifying a specific peptide proteolysis product of the collagen occurring in a biological sample or biological extract.
2. The method of claim 1 wherein the collagen is type II collagen and the specific peptide has a C-terminus represented by Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 1) and post-translational modifications thereof.
3. The method of claim 1 wherein the collagen is type I collagen and the specific peptide has a C-terminus represented by Gly-Thr-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 12) and post-translational modifications thereof.
4. The method of claim 1 wherein the collagen is type III collagen and the specific peptide has a C-terminus represented by Gly-Ala-Pro-Gly-Pro-Leu-Gly (SEQ ID NO: 13) and post-translational modifications thereof.
5. The method of claim 1 wherein the enzymatic proteolysis of a collagen is the result of collagenase activity.
6. The method of claim 5 wherein the collagenase is matrix metalloproteinase-13.
7. The method of claim 5 wherein the method comprises monitoring changes in collagenase activity caused by a drug.
8. The method of claim 1 comprising identifying and quantifying more than one specific peptide occurring in the biological sample or biological extract.
9. The method of claim 1 wherein the proteolysis product of the collagen occurs in a biological sample selected from the group consisting of synovial fluid, whole blood, plasma and urine.
10. The method of claim 1 wherein the specific peptide proteolysis product is selected from the group consisting of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28,

SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, and post-translationally modified analogs of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43.

11. The method of claim 10 wherein the biological specimen or biological extract is from a human subject, the method comprising the identification and quantification of the peptide Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ala-Glu-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 2) or its post-translationally-modified analogs in a biological sample or biological extract.

12. The method of claim 10 wherein the biological specimen or biological extract is from a human subject, the method comprising the identification and quantification of the peptide Leu-Lys-Gly-Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Glu-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ala-Glu-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 15) or post-translational modifications thereof in a biological sample or biological extract.

13. The method of claim 10 wherein the biological specimen or biological extract is from a human subject, the method comprising the identification and quantification of the peptide Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Glu-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ala-Glu-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly

(SEQ ID NO: 16) or post-translational modifications thereof in a biological sample or biological extract.

14. The method of claim 10 wherein the biological specimen or biological extract is from a human subject, the method comprising the identification and quantification of the peptide Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ala-Glu-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 17) or post-translational modifications thereof in a biological sample or biological extract.

15. The method of claim 10 wherein the biological specimen or biological extract is from a bovine subject, the method comprising the identification and quantification of a peptide in a biological sample or biological extract, the peptide being selected from the group consisting of Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 3) and post-translational modifications thereof, Lys-Gly-Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 34) and post-translational modifications thereof, Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 35) and post-translational modifications thereof, Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 36) and post-translational modifications thereof, Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 37) and post-translational modifications thereof, and Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 38) and post-translational modifications thereof.

16. The method of claim 10 wherein the biological specimen or biological extract is from a canine subject, the method comprising the identification and quantification of a peptide in a biological sample or biological extract, the peptide being selected

from the group consisting of Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 4) and post-translational modifications thereof, Lys-Gly-Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 18) and post-translational modifications thereof, Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 19) and post-translational modifications thereof, Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 20) and post-translational modifications thereof, Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 21) and post-translational modifications thereof, and Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 22) and post-translational modifications thereof.

17. The method of claim 10 wherein the biological specimen or biological extract is from an equine subject, the method comprising the identification and quantification of a peptide in a biological sample or biological extract, the peptide being selected from the group consisting of Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 11) and post-translational modifications thereof, Lys-Gly-Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 29) and post-translational modifications thereof, Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 30) and post-translational modifications thereof, Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 31)

-100-

and post-translational modifications thereof, Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 32) and post-translational modifications thereof, and Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 33) and post-translational modifications thereof.

18. The method of claim 10 wherein the biological specimen or biological extract is from a rat, the method comprising the identification and quantification of a peptide in a biological sample or biological extract, the peptide being selected from the group consisting of Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Ala-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ser-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 8) and post-translational modifications thereof, Ala-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ser-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 39) and post-translational modifications thereof, Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ser-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 40) and post-translational modifications thereof, Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ser-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 41) and post-translational modifications thereof, and Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ser-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 42) and post-translational modifications thereof.

19. The method of claim 10 wherein the biological specimen or biological extract is from a feline subject, the method comprising the identification and quantification of a peptide in a biological sample or biological extract, the peptide being selected from the group consisting of Lys-Gly-Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 23) and post-translational modifications thereof, Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 24) and post-translational modifications thereof, Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-

-101-

Asp-Gly-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 25) and post-translational modifications thereof, Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 26) and post-translational modifications thereof, Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 27) and post-translational modifications thereof, and Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 28) and post-translational modifications thereof.

20. The method of claim 10 wherein the biological specimen or biological extract is from a guinea pig, the method comprising the identification and quantification of the peptide Val-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Val-Ser-Gly-Ala-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 43) or post-translational modifications thereof in a biological sample or biological extract.

21. The method of claim 10 further comprising forming a derivative or modification of the specific peptide proteolysis product in the sample or extract before identifying and quantifying the peptide.

22. The method of claim 1 further comprising forming a derivative or modification of the specific peptide proteolysis product in the sample or extract before identifying and quantifying the peptide.

23. A method of identifying the amino acid sequence of a collagen degradation peptide in a biological sample comprising:

determining a relative molecular mass of the peptide;

fragmenting the peptide by collisional activation to create characteristic diagnostic sequences of a C-terminus of the peptide;

identifying the C-terminus of the peptide by identification of the characteristic diagnostic sequences, said diagnostic sequences having known mass to charge ratios; and

identifying an N-terminal sequence of the peptide by determining an amino acid sequence that when combined with the identified C-terminal

sequence has the relative molecular mass of the peptide, thereby identifying the collagen degradation peptide.

24. The method of claim 23 wherein the C-terminus is Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 1) and post-translational modifications thereof.

25. The method of claim 23 wherein the C-terminus is Gly-Thr-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 12) and post-translational modifications thereof.

26. The method of claim 23 wherein the C-terminus is Gly-Ala-Pro-Gly-Pro-Leu-Gly (SEQ ID NO: 13) and post-translational modifications thereof.

27. The method of claim 23 wherein the step of identifying an N-terminal sequence of the peptide by determining an amino sequence that when combined with the identified C-terminal sequence has the relative molecular mass of the peptide further comprises determining an amino acid sequence that when combined with the identified C-terminal sequence has the mass of a peptide in a data base comprising known peptides.

28. The method of claim 23 wherein the step of identifying a C-terminus of the peptide by identification of characteristic diagnostic sequences further comprises identifying three diagnostic sequences having the sequences Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 5), Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 6) and Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 7) and post-translational modifications of the sequences.

29. The method of claim 28 wherein the three diagnostic sequences have a mass to charge ratio of approximately 301, approximately 471 and approximately 568, respectively.

30. The method of claim 28 wherein the three diagnostic sequences have a mass to charge ratio of approximately 301, approximately 455 and approximately 552, respectively.

31. A method of identifying the amino acid sequence of a collagen degradation peptide having an N-terminal segment and a carboxy-terminus (C-terminus) from a protein of known sequence comprising the steps of:

- determining a relative molecular mass of the peptide;
- fragmenting the peptide to produce fragment ions;

identifying known fragment ions from the fragmentation of the C-terminus of the peptide;

identifying an amino acid sequence of the C-terminus from the identified ion fragments from the C-terminus of the peptide;

determining an amino acid sequence of an N-terminus of the peptide from the amino acid sequence of the C-terminus and the relative molecular mass of the peptide;

determining an amino acid sequence of the peptide from the amino acid sequence of the N-terminus and the amino acid sequence of the C-terminus.

32. The method of claim 31 wherein the collagen degradation peptide comprises a proteolytic enzyme cleavage product.

33. The method of claim 31 comprising a further step of determining at least one site and type of post-translational modification to the peptide from the identified ion fragments from the peptide.

34. The method of claim 31 wherein the proteolytic enzyme is a collagenase or matrix metalloproteinase.

35. The method of claim 31 wherein the collagen degradation peptide is a collagen type I degradation peptide.

36. The method of claim 31 wherein the collagen degradation peptide is a collagen type III degradation peptide.

37. The method of claim 22 wherein the matrix metalloproteinase is matrix metalloproteinase-13.

38. The method of claim 17 wherein the steps of determining a relative molecular mass of the peptide, fragmenting the peptide and identifying known peptide ion fragments from the C-terminus of the peptide are performed by tandem mass spectrometry.

39. An isolated peptide selected from the group consisting of the isolated peptide Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Gln-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ala-Glu-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 2) and post-translationally modified analogs thereof, the isolated peptide Lys-Gly-Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Glu-Pro-Gly-Leu-Gln-

Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ala-Glu-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 15) and post-translationally modified analogs thereof, the isolated peptide Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Glu-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ala-Glu-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 16) and post-translationally modified analogs thereof, the isolated peptide Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ala-Glu-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 17) and post-translationally modified analogs thereof, the isolated peptide Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 3) and post-translationally modified analogs thereof, the isolated peptide Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 8) and post-translationally modified analogs thereof, the isolated peptide Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 11) and post-translationally modified analogs thereof, the isolated peptide Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 3) and post-translationally modified analogs thereof, the isolated peptide Lys-Gly-Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 34) and post-translationally modified analogs thereof, the isolated peptide Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 35) and post-translationally modified analogs thereof, the isolated peptide Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 36) and post-translationally modified analogs thereof, the isolated peptide

Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 37) and post-translationally modified analogs thereof, the isolated peptide Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 38) and post-translationally modified analogs thereof, the isolated peptide Lys-Gly-Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 18) and post-translationally modified analogs thereof, the isolated peptide Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 19) and post-translationally modified analogs thereof, the isolated peptide Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 20) and post-translationally modified analogs thereof, the isolated peptide Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 21) and post-translationally modified analogs thereof, the isolated peptide Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 22) and post-translationally modified analogs thereof, the isolated peptide Lys-Gly-Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 23) and post-translationally modified analogs thereof, the isolated peptide Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 24) and post-translationally modified analogs thereof, the isolated peptide Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 25) and post-translationally modified analogs thereof, the isolated peptide Ala-Gly-Pro-Pro-

Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 26) and post-translationally modified analogs thereof, the isolated peptide Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 27) and post-translationally modified analogs thereof, the isolated peptide Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 28) and post-translationally modified analogs thereof, the isolated peptide Lys-Gly-Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 29) and post-translationally modified analogs thereof, the isolated peptide Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 30) and post-translationally modified analogs thereof, the isolated peptide Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 31) and post-translationally modified analogs thereof, the isolated peptide Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 32) and post-translationally modified analogs thereof, the isolated peptide Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 33) and post-translationally modified analogs thereof, the isolated peptide Ala-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ser-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 39) and post-translationally modified analogs thereof, the isolated peptide Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ser-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 40) and post-translationally modified analogs thereof, the isolated peptide Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ser-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 41) and post-translationally modified analogs thereof, the isolated peptide Val-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-107-

Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Val-Ser-Gly-Ala-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 43) and post-translationally modified analogs thereof, the isolated peptide Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ser-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 42) and post-translationally modified analogs thereof.

40. The isolated peptide of claim 39 wherein the peptide is Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 3) or a post-translationally modified analog thereof.

41. The isolated peptide of claim 39 wherein the peptide is Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 8) or a post-translationally modified analog thereof.

42. The isolated peptide of claim 39 wherein the peptide is Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 11) or a post-translationally modified analog thereof.

43. The artificial peptide Val-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ala-Glu-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 14) or a post-translationally modified analog thereof.

44. The isolated peptide of claim 39 wherein the peptide is Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 3) or a post-translationally modified analog thereof.

45. The isolated peptide of claim 39 wherein the peptide is Lys-Gly-Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 34) or a post-translationally modified analog thereof.

46. The isolated peptide of claim 39 wherein the peptide is Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 35) or a post-translationally modified analog thereof.
47. The isolated peptide of claim 39 wherein the peptide is Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 36) or a post-translationally modified analog thereof.
48. The isolated peptide of claim 39 wherein the peptide is Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 37) or a post-translationally modified analog thereof.
49. The isolated peptide of claim 39 wherein the peptide is Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 38) or a post-translationally modified analog thereof.
50. The isolated peptide of claim 39 wherein the peptide is Lys-Gly-Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 18) or a post-translationally modified analog thereof.
51. The isolated peptide of claim 39 wherein the peptide is Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 19) or a post-translationally modified analog thereof.
52. The isolated peptide of claim 39 wherein the peptide is Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 20) or a post-translationally modified analog thereof.
53. The isolated peptide of claim 39 wherein the peptide is Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-

Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 21) or a post-translationally modified analog thereof.

54. The isolated peptide of claim 39 wherein the peptide is Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 22) or a post-translationally modified analog thereof.

55. The isolated peptide of claim 39 wherein the peptide is Lys-Gly-Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 23) or a post-translationally modified analog thereof.

56. The isolated peptide of claim 39 wherein the peptide is Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 24) or a post-translationally modified analog thereof.

57. The isolated peptide of claim 39 wherein the peptide is Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 25) or a post-translationally modified analog thereof.

58. The isolated peptide of claim 39 wherein the peptide is Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 26) or a post-translationally modified analog thereof.

59. The isolated peptide of claim 39 wherein the peptide is Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 27) or a post-translationally modified analog thereof.

60. The isolated peptide of claim 39 wherein the peptide is Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 28) or a post-translationally modified analog thereof.

61. The isolated peptide of claim 39 wherein the peptide is Lys-Gly-Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 29) or a post-translationally modified analog thereof.

62. The isolated peptide of claim 39 wherein the peptide is Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 30) or a post-translationally modified analog thereof.

63. The isolated peptide of claim 39 wherein the peptide is Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 31) or a post-translationally modified analog thereof.

64. The isolated peptide of claim 39 wherein the peptide is Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 32) or a post-translationally modified analog thereof.

65. The isolated peptide of claim 39 wherein the peptide is Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 33) or a post-translationally modified analog thereof.

66. The isolated peptide of claim 39 wherein the peptide is Ala-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ser-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 39) or a post-translationally modified analog thereof.

67. The isolated peptide of claim 39 wherein the peptide is Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ser-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 40) or a post-translationally modified analog thereof.

68. The isolated peptide of claim 39 wherein the peptide is Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ser-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 41) or a post-translationally modified analog thereof.

-111-

69. The isolated peptide of claim 39 wherein the peptide is Val-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Val-Ser-Gly-Ala-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 43) or a post-translationally modified analog thereof.

70. The isolated peptide of claim 39 wherein the peptide is Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ser-Asp-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 42) or a post-translationally modified analog thereof.

71. The isolated peptide of claim 39 wherein the peptide is Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ala-Glu-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 2) or a post-translationally modified analog thereof.

72. The isolated peptide of claim 39 wherein the peptide is Lys-Gly-Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Glu-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ala-Glu-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 15) or a post-translationally modified analog thereof.

73. The isolated peptide of claim 39 wherein the peptide is Ala-Arg-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Arg-Ala-Gly-Glu-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ala-Glu-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 16) or a post-translationally modified analog thereof.

74. The isolated peptide of claim 39 wherein the peptide is Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ala-Glu-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 17) or a post-translationally modified analog thereof.

75. The artificial peptide Val-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ala-Glu-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 14) or a post-translationally modified analog thereof.

76. A biomarker of collagenase enzyme activity comprising a peptide selected from the group consisting of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, and post-translationally modified analogs of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43.

77. The biomarker of claim 71 wherein the peptide has been derivatized or modified to form an identifiable derivative or modification thereof for quantifying the biomarker.

78. An antibody directed against an N-terminus sequence of at least seven amino acids of a peptide selected from the group consisting of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, and post-translationally

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-113-

modified analogs of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43.

79. A biomarker of collagenase enzyme inhibition comprising a peptide selected from the group consisting of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 and post-translationally modified analogs of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43.

80. The biomarker of claim 79 wherein the peptide has been derivatized or modified to form an identifiable derivative or modification thereof for quantifying the biomarker.

81. A method of determining the efficacy of a drug or agent used to reduce the proteolytic activity of a collagenase enzyme comprising the identification and quantification of a collagen II degradation fragment in a biological fluid sample having a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 and post-translationally modified analogs of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43.

82. The method of claim 81, further comprising forming a derivative or modification of the collagen II degradation fragment in the sample or extract before identifying and quantifying the degradation fragment.

83. A method of diagnosing a disease or condition in a subject characterized by collagen type II degradation comprising identifying and quantifying a peptide in a biological sample, the peptide being selected from the group consisting of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID

NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 and post-translationally modified analogs of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43.

84. The method of claim 83 further comprising forming a derivative or modification of the peptide in the sample or extract before identifying and quantifying the peptide.

85. The method of claim 83 wherein the disease or condition characterized by collagen type II degradation is selected from the group consisting of osteoarthritis and rheumatoid arthritis.

86. The method of claim 83 wherein the biological sample is selected from the group consisting of urine, blood, plasma and synovial fluid.

87. A method of determining the efficacy of a drug or agent in a human or animal subject used to reduce or eliminate the proteolytic activity of a collagenase enzyme in a disease or condition characterized by collagen type II degradation comprising the identification and quantification of a collagen type II degradation peptide in a biological sample from the subject, the collagen type II degradation peptide being selected from the group consisting of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30,

SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, and SEQ ID NO: 43, and post-translational analogs of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 and SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, and SEQ ID NO: 43.

88. The method of claim 87 wherein the collagenase enzyme is a matrix metalloproteinase.

89. The method of claim 88 wherein the matrix metalloproteinase is selected from the group consisting of matrix metalloproteinase-1, matrix metalloproteinase-8 and matrix metalloproteinase-13.

90. The method of claim 88 wherein the drug or agent used to reduce the proteolytic activity of a collagenase enzyme is a matrix metalloproteinase inhibitor.

91. A method for determining cartilage damage in a physiological condition in a mammal characterized in part by cartilage damage comprising analyzing a biological sample of the mammal to determine the quantity of a marker peptide having sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, and post-translational analogs of SEQ ID NO: 2, of SEQ ID NO: 3 and SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO:

15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, and SEQ ID NO: 43.

92. The method of claim 90 wherein the identification and quantification of the marker peptide further comprises the following steps:

determining a mass of the marker peptide;

fragmenting the marker peptide by collisional activation;

identifying a C-terminal sequence Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 1) and a post-translationally modified analog thereof by identification of fragments of the marker peptide, said fragments identified by known mass to charge ratios;

identifying an N-terminal sequence of a peptide that when combined with the a C-terminal sequence Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 1) and the post-translationally modified analogs thereof has the determined mass of the marker peptide, thereby identifying the marker peptide; and

determining a relative amount of the marker peptide in the body fluid.

93. The method of claim 92 wherein the biological sample is selected from the group of biological fluids consisting of urine, blood, plasma and synovial fluid.

94. The method of claim 92 wherein the fragments with known mass to charge ratios are fragment SEQ ID NO: 5 having a mass to charge ratio of approximately 301, the fragment sequence SEQ ID NO: 6 having a mass to charge ratio of approximately 455, and the fragment SEQ ID NO: 7 having a mass to charge ratio of approximately 552.

95. The method of claim 91 wherein the fragments with known mass to charge ratios are fragment SEQ ID NO: 5 having a mass to charge ratio of approximately 301, the fragment sequence SEQ ID NO: 6 having a mass to

charge ratio of approximately 471, and the fragment SEQ ID NO: 7 having a mass to charge ratio of approximately 568.

96. The method of claim 91 wherein the physiological condition in a mammal characterized in part by cartilage damage is osteoarthritis.

97. The method of claim 91 wherein the physiological condition in a mammal characterized in part by cartilage damage is rheumatoid arthritis.

98. The method of claim 97 wherein the steps of determining the relative amount of the marker peptide in the biological sample further comprises:

adding known quantities of a standard peptide to the biological sample;

plotting an abundance of the standard peptide in the biological sample versus an analytical response to obtain a graphic curve of the abundance/response of the standard peptide;

plotting an abundance of the marker peptide in the biological sample to obtain a graphic curve of the abundance of the marker peptide;

determining an area under the graphic curve of the abundance of the marker peptide; and

comparing the area under the graphic curve of the abundance of the marker peptide to the area under the graphic curve of the abundance of the standard peptide to obtain a relative abundance of the marker peptide in the biological sample.

99. The method of claim 98 further comprising comparing the analytical response of the marker peptide to an internal standard peptide to determine a predetermined quantity of marker peptide in the biological sample.

100. The method of claim 98 wherein the internal standard peptide is an isotopically-labelled homolog of the marker peptide.

101. The method of claim 92 wherein the internal standard peptide is a peptide having a similar structure to, or biological properties as, the marker peptide.

102. A method for determining collagen degradation in a physiological condition in a mammal characterized in part by collagen degradation comprising analyzing a biological sample of the mammal to determine a

-119-

quantity of peptide comprising fragment SEQ ID NO: 13 and post-translational analogs of SEQ ID NO: 13.

103. A method for determining collagen degradation in a physiological condition in a mammal characterized in part by collagen degradation comprising analyzing a biological sample of the mammal to determine a quantity of peptide comprising fragment SEQ ID NO: 12 and post-translational analogs of SEQ ID NO: 12.

104. A method of identifying and quantifying target collagen degradation peptides in a biological sample, comprising:

- obtaining a biological sample;
- spiking the biological sample with internal standard;
- spiking unknown samples with internal standard;
- centrifuging each sample;
- retaining solute solution from each sample
- adding formic acid to the retentate;
- centrifuging until a predetermine volume of the solute solution remains;
- transferring the solute solution to a reaction-vial;
- evaporating the solute solution to dryness under nitrogen;
- dissolving each dried sample in water containing formic acid;
- transferring each dried sample to an autosampler vial ;
- injecting a sample aliquot from the autosampler vial onto a column connected to a MS/MS interfaced spectrometer;
- eluting the sample aliquot;
- holding for approximately 2 minutes;
- re-equilibrating the column;
- monitoring ion pairs for the target peptides and internal standard peptides;
- integrating peak areas of the ion pairs for each target peptide;
- normalizing the integrated peak areas of the target peptides; and

comparing the normalized integrated peaks for the target peptides to a standard calibration curve to determine the quantities of the target peptides in each unknown sample.

105. The method of claim 104 wherein the target collagen degradation peptides are selected from the group consisting of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, and post-translational analogs of SEQ ID NO: 2, of SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, and SEQ ID NO: 43.

106. The method of claim 104 wherein the biological sample is urine.

107. The peptide Gly-Ala-Pro-Gly-Pro-Leu-Gly (SEQ ID NO: 13), or a post-translationally-modified analog thereof.

108. The peptide Val-Leu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Glu-Pro-Gly-Asp-Asp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ala-Glu-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 14) or a post-translationally modified analog thereof.

109. A method of detecting the enzymatic degradation of collagen type II from a subject, the method comprising the identification and quantification of identifying three diagnostic sequences having the sequences Pro-Gln-Gly (SEQ

WO 03/021226

PCT/US02/27816

-121-

ID NO: 5), Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ.ID NO: 6) and Pro-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly (SEQ ID NO: 7) and post-translational modifications of the sequences.

110. The method of claim 109 wherein the three diagnostic sequences have a mass to charge ratio of approximately 301, approximately 471 and approximately 568, respectively.

111. The method of claim 109 wherein the three diagnostic sequences have a mass to charge ratio of approximately 301, approximately 455 and approximately 552, respectively.

WO 03/021226

PCT/US02/27816

1/12

MS/MS Spectrum of Collagen Type II Peptide in Cow Urine

LQGPAGPPGEKGEHyPGDDGSPGPDGPHyPGPQG

Precursor ion: m/z 918.7 for 3+

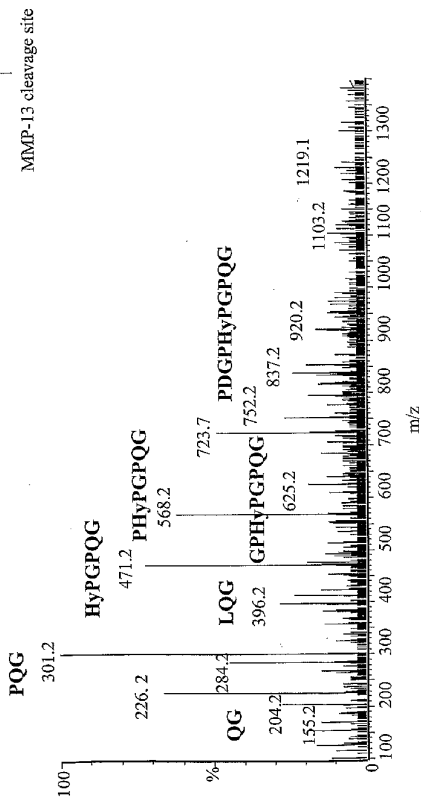


Figure 1

WO 03/021226

PCT/US02/27816

2/12

MS/MS Spectrum of Collagen Type II Peptide in Human OA Urine

LQGPAGPPGKEKGEHyPGDDGPGSGAEGPHyPGPQ

Precursor Ion: m/z 914.4 for 3+

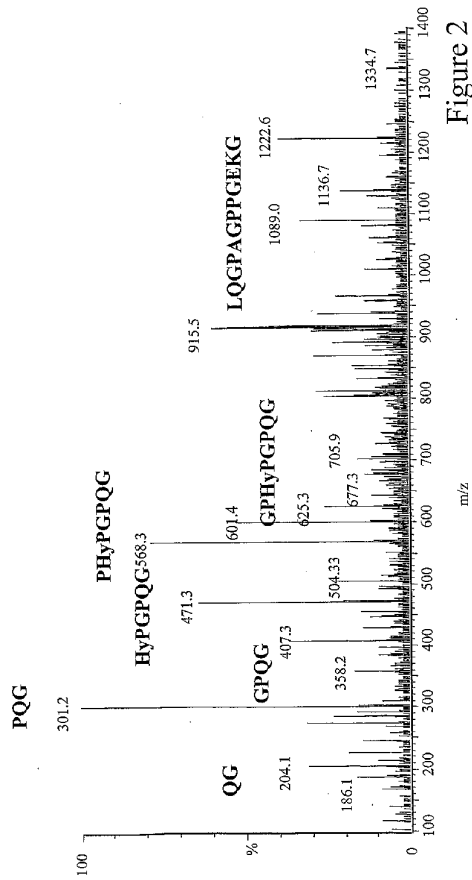


Figure 2

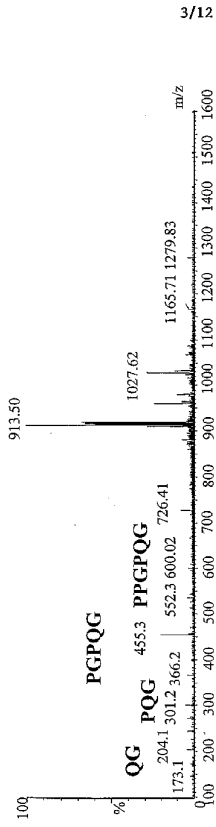
WO 03/021226

PCT/US02/27816

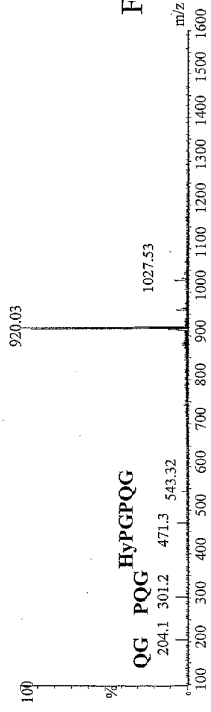
MS/MS Spectrum of Collagen Type II Peptide in Canine Urine

LQGPAGPPGKEGHEYPGDDDGPSGPDGPPGPPQG

Precursor ion: m/z 913.3 for 3+



LQGPAGPPGKEGEPGDDDGPSGPDGPHYPGPPQG



WO 03/021226

PCT/US02/27816

4/12

MS/MS Spectrum of Human Collagen Type II Synthetic Peptide Standard

LQGPAGPPGEGEHyPGDDGSPSGAEGPHyPGPQGG

Precursor ion: m/z 914.4 for 3+

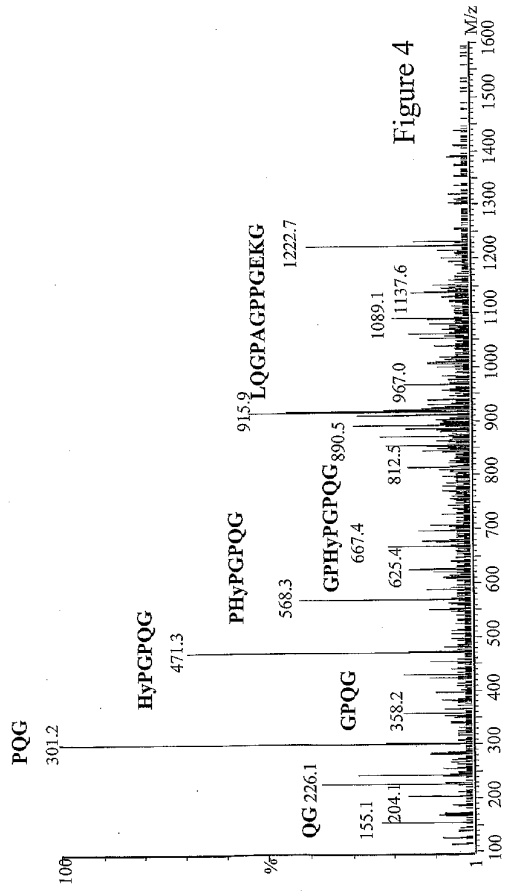


Figure 4

Extracted Ion Chromatograms for Internal Standard
(948/568) and Target Peptide (914/568)

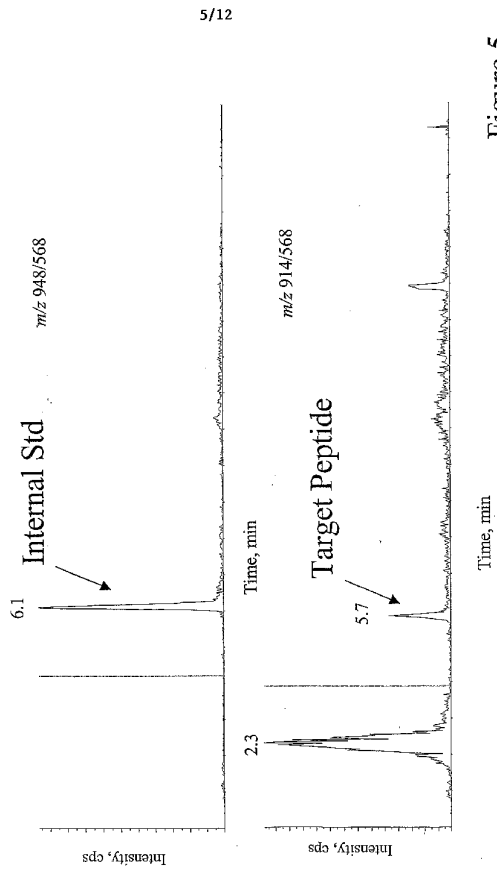


Figure 5

WO 03/021226

PCT/US02/27816

6/12

Extracted Ion Chromatograms for m/z 914/568 Ion Pair

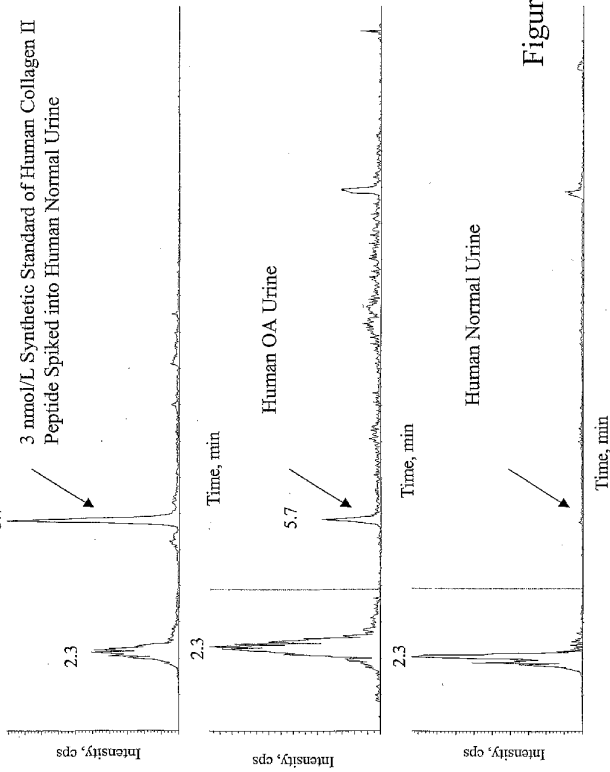


Figure 6

Standard Curve for Collagen Type II Peptide Spiked into Normal Human Urine

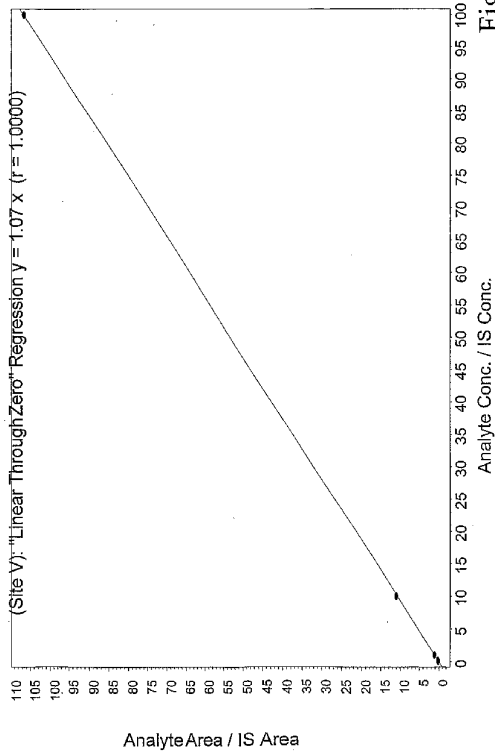
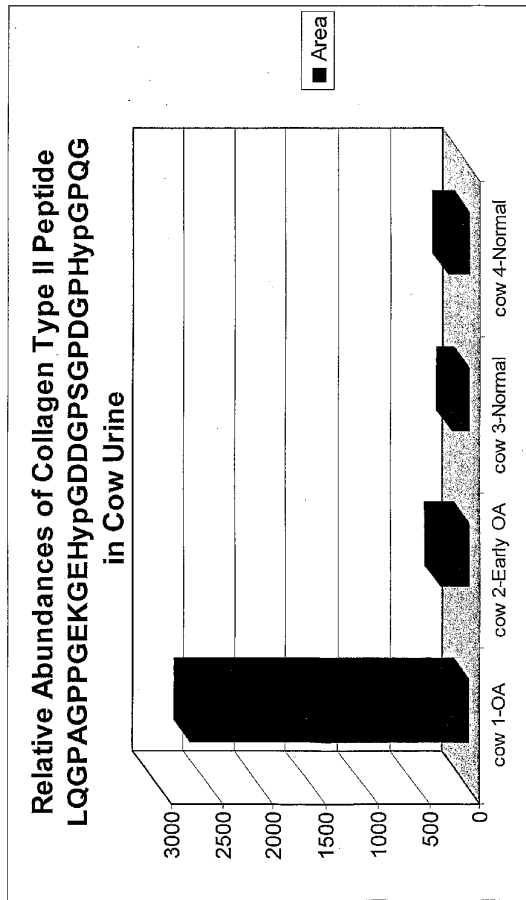


Figure 7

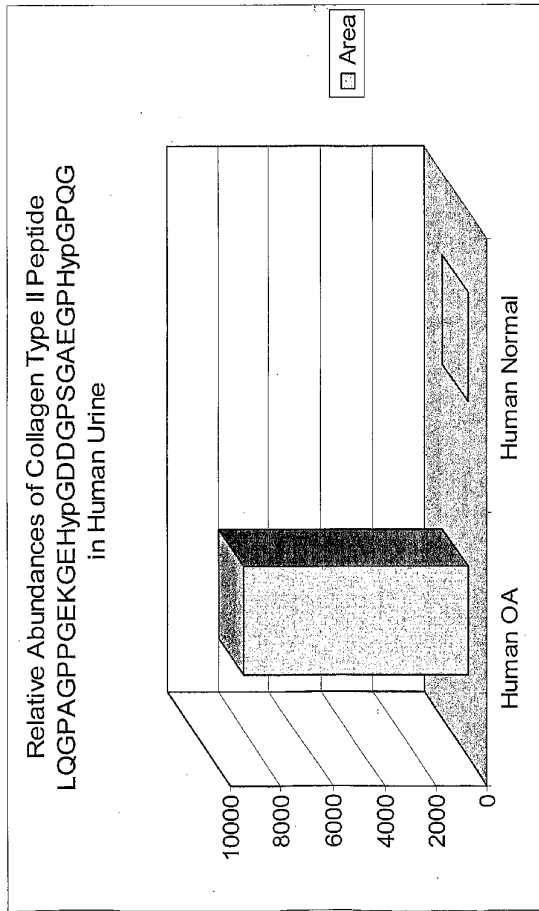
Sample	Area
cow 1- OA	2710
cow 2- Early OA	286
cow 3- Normal	165
cow 4- Normal	216

Figure 8



Sample	Area
Human OA	8000
Human Normal	0

Figure 9



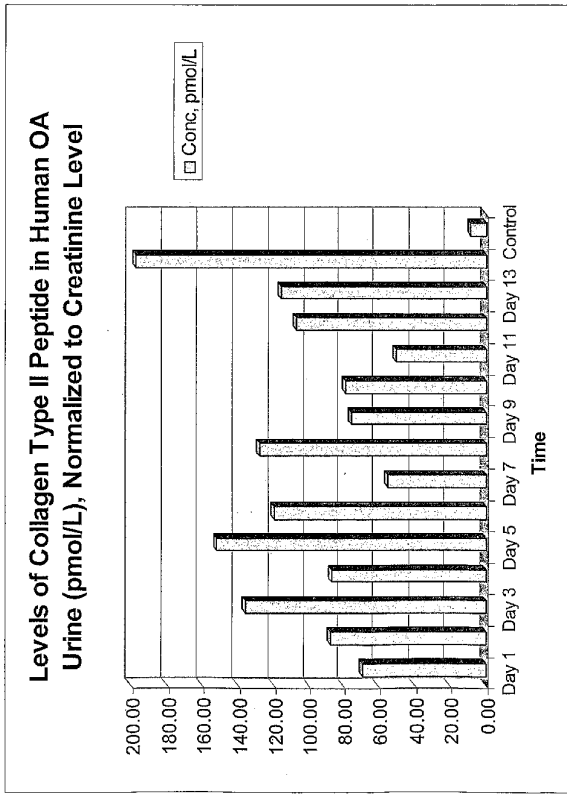


Figure 10

WO 03/021226

PCT/US02/27816

MS/MS Spectrum of Collagen Type I Synthetic Standard Peptide
GTPGPQG, m/z 613.3 for 1+

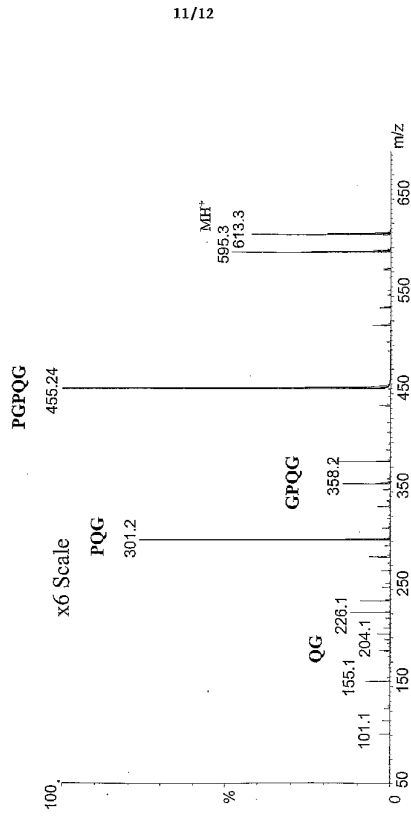


Figure 11

WO 03/021226

PCT/US02/27816

MS/MS Spectrum of Collagen Type III Synthetic Standard Peptide
GAPGPLG, m/z 613.3 for 1+

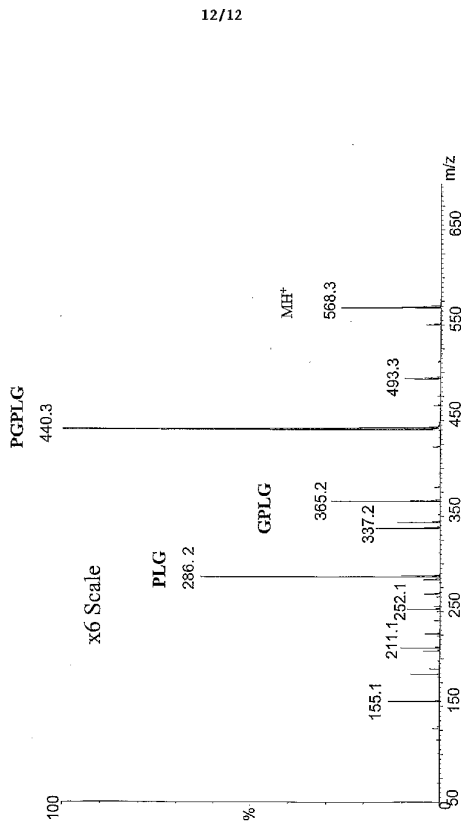


Figure 12

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/68	G 0 1 N 33/68	

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, N O, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 ダフィン、ケビン・エル
アメリカ合衆国ミズーリ州 6 3 0 1 1 ・マンチェスター・パークビューバレードドライブ 1 3 2 3

(72) 発明者 ネミロフスキー、オルガ・ブイ
アメリカ合衆国ミズーリ州 6 3 0 3 8 ・ワイルドウッド・ラファイエットトレイルズドライブ 1
7 1 4 6

(72) 発明者 デュフィールド、ドーン・アール
アメリカ合衆国ミズーリ州 6 3 3 6 6 ・オフアロン・スペーシャススカイドライブ 3 0 2 1

(72) 発明者 サンヤー、テレサ
アメリカ合衆国ミズーリ州 6 3 0 1 1 ・ワイルドウッド・ターンベリーブレイスドライブ 2 6 4

(72) 発明者 ハワード、キャロル、ピアシー
アメリカ合衆国ミズーリ州 6 3 0 2 6 - 2 7 5 1 ・フェントン・ワーシーコート 3 5

F ターム(参考) 2G045 AA40 BB02 BB03 BB10 BB48 CA25 CA26 CB01 CB03 CB13
DA36 FB01 FB06 JA01
4B063 QA01 QA19 QQ03 QQ79 QR16 QS02 QX02 QX10
4H045 AA10 AA11 AA30 BA14 BA18 CA40 DA75 EA20 EA50 FA70

专利名称(译)	肽生物标志物和鉴定方法		
公开(公告)号	JP2005507877A	公开(公告)日	2005-03-24
申请号	JP2003525259	申请日	2002-08-30
[标]申请(专利权)人(译)	法马西亚公司		
申请(专利权)人(译)	法玛西亚公司		
[标]发明人	ウエルシュディーンジェイ ダフィンケビンエル ネミロフスキーオルガブイ デュフィールドドーンアール サンヤーテレサ ハワードキャロルピアシー		
发明人	ウエルシュ、ディーン・ジェイ ダフィン、ケビン・エル ネミロフスキー、オルガ・ブイ デュフィールド、ドーン・アール サンヤー、テレサ ハワード、キャロル、ピアシー		
IPC分类号	G01N33/50 C07K7/00 C07K7/04 C07K14/00 C07K14/78 C07K16/18 C12Q1/37 G01N30/86 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/537 G01N33/543 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/6842 C07K14/78 C07K16/18 C12Q1/37 G01N33/6821 G01N33/6887 G01N2333/78 G01N2333/96486 G01N2500/02 G01N2800/102 G01N2800/105 G01N2800/52 Y10T436/105831		
FI分类号	C07K14/78.ZNA C07K7/04 C07K16/18 C12Q1/37 G01N30/86.J G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/68		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BB02 2G045/BB03 2G045/BB10 2G045/BB48 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/CB01 2G045/CB03 2G045/CB13 2G045/DA36 2G045/FB01 2G045/FB06 2G045/JA01 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ79 4B063/QR16 4B063/QS02 4B063/QX02 4B063/QX10 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA14 4H045/BA18 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA70		
优先权	60/316554 2001-08-31 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

一种鉴定和定量由II型胶原的酶降解产生的肽的方法，该方法包括具有已知质荷比的羧基封端的鉴定的肽片段的质谱分析，宇识别多肽。生物样品中肽的鉴定和定量用于评估蛋白水解酶的活性和酶抑制剂在疾病或生理条件如骨关节炎和类风湿性关节炎中的功效。

MS/MS Spectrum of Collagen Type II Peptide in Human OA Urine

LQGPAGPPGEGKEGHyPGDDGPSGAEGPhyPGPQG

Precursor Ion: m/z 914.4 for 3+

