

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2015-79000

(P2015-79000A)

(43) 公開日 平成27年4月23日(2015.4.23)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	D
GO 1 N 37/00 (2006.01)	GO 1 N 37/00	1 O 2
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543	5 O 1 A
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	C 1 2 Q 1/04	

審査請求 有 請求項の数 17 O L 外国語出願 (全 91 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-244355 (P2014-244355)	(71) 出願人	501305844
(22) 出願日	平成26年12月2日 (2014.12.2)		ザ・キュレーターズ・オブ・ザ・ユニバー
(62) 分割の表示	特願2012-556266 (P2012-556266)		シティ・オブ・ミズーリ
	の分割		THE CURATORS OF THE
原出願日	平成23年3月4日 (2011.3.4)		UNIVERSITY OF MISS
(31) 優先権主張番号	61/339,511		OURI
(32) 優先日	平成22年3月5日 (2010.3.5)		アメリカ合衆国65211ミズーリ州コロ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		ンビア、ユニバーシティ・ホール316
		(74) 代理人	100100158
			弁理士 鮫島 睦
		(74) 代理人	100068526
			弁理士 田村 恭生
		(74) 代理人	100138900
			弁理士 新田 昌宏

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 変形性関節症のバイオマーカー

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 疾患のバイオマーカーに関し、より具体的には、変形性関節症を診断、病期分類、および監視するための、複数のバイオマーカー、関連する方法、およびキットを提供する。

【解決手段】 MCP 1、IL 8、KC、MMP 2、MMP 3、IL 6、MMP 1、RAN TES、MMP 9、IL 1 B、アポリタンパク質 A 1、アポリタンパク質 E、DCN、CILP、およびCOMPを含む、対象由来の試験試料中の特定のポリペプチドの発現レベルの測定を使用する、変形性関節症(OA)を診断するためのバイオマーカー、バイオマーカーパネル、および方法、関連するOA治療の有効性を監視するための方法、診断試薬、およびキットを含む。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

対象の変形性関節症を診断、病期分類、または監視するための方法であって、前記対象由来の生物学的試料中の、MCP 1、IL 8、KC、MMP 2、MMP 3、MMP 9、IL 6、MMP 1、RANTES、IL 1B、アポリタンパク質 A 1、アポリタンパク質 E、DCN、CILP、COMP、および任意のそれらの断片、ならびにそれらの任意の組み合わせから成る群から選択される、少なくとも 2 つのポリペプチドの発現レベルを測定することを含み、前記生物学的試料中の前記少なくとも 2 つのポリペプチドまたはそれらの断片の発現レベルは、前記対象における変形性関節症の有無、程度、重篤性、型、または病期を示す、試料タンパク質発現プロファイルを提供する、方法。

10

## 【請求項 2】

前記生物学的試料は、滑液、全血、血漿、血清、尿、および唾液のうちのいずれか 1 つを含む、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記生物学的試料は、滑液を含む、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 4】

少なくとも 4 つのポリペプチドの発現レベルが測定される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 5】

前記対象は、ヒトである、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 6】

前記対象は、イヌである、請求項 1 に記載の方法。

20

## 【請求項 7】

前記対象由来の生物学的試料中の、MCP 1、IL 8、KC、MMP 2、および MMP 3、またはそれらの断片の発現レベルを測定することを含み、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 8】

前記対象は、イヌである、請求項 7 に記載の方法。

## 【請求項 9】

前記対象由来の生物学的試料中の、MCP 1、IL 6、IL 8、KC、および MMP 1、またはそれらの断片の発現レベルを測定することを含み、請求項 1 に記載の方法。

30

## 【請求項 10】

前記対象は、ヒトである、請求項 9 に記載の方法。

## 【請求項 11】

前記生物学的試料中の、RANTES またはその断片の発現レベルを測定することをさらに含む、請求項 10 に記載の方法。

## 【請求項 12】

前記試料タンパク質発現プロファイルを、対照タンパク質発現プロファイルと比較することをさらに含み、前記試料タンパク質発現プロファイルと、前記対照タンパク質発現プロファイルとの間の差は、前記対象における変形性関節症の有無、程度、重篤性、型、または病期を示す、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 13】

前記対象は、変形性関節症を有する危険性があるか、または有する疑いがある、請求項 1 に記載の方法。

40

## 【請求項 14】

前記生物学的試料中の前記少なくとも 2 つのポリペプチドの発現レベルは、LUMINEX、ELISA、免疫測定法、質量分析法、高速液体クロマトグラフィ、二次元電気泳動法、qPCR、RT-PCR、核酸マイクロアレイ、インサイトハイブリッド形成、SAGE、ウエスタンブロット法、タンパク質マイクロアレイ、および抗体マイクロアレイから成る群から選択される方法を使用して測定される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 15】

前記生物学的試料中の前記少なくとも 2 つのポリペプチドの発現レベルは、DNA 増幅

50

、DNAメチル化/脱メチル化から成る群から選択される過程、および一塩基多型に起因するDNAの変化を検出することによって測定される、請求項1に記載の方法。

【請求項16】

変形性関節症を有する疑いがある対象由来の生物学的試料から得られる、MCP1、IL8、KC、MMP2、MMP3、IL6、MMP1、RANTES、MMP9、IL1B、アポリタンパク質A1、アポリタンパク質E、DCN、CILP、COMP、および任意のそれらの断片、ならびにそれらの任意の組み合わせから成る群から選択される、2つ以上のポリペプチドのポリペプチド発現レベル情報を含む、OAバイオマーカー発現プロファイル。

【請求項17】

少なくとも1つの健康な対象から得られる、少なくとも1つの生物学的試料のポリペプチド発現レベル情報をさらに含む、請求項15に記載のOA発現プロファイル。

【請求項18】

前記変形性関節症を有する疑いのある対象および前記健康な単数または複数の対象由来の前記生物学的試料は、どちらも、滑液の試料、全血の試料、血漿の試料、血清の試料、尿の試料および唾液の試料を含む、請求項16に記載のOA発現プロファイル。

【請求項19】

前記変形性関節症を有する疑いのある対象および前記健康な単数または複数の対象由来の前記生物学的試料は、どちらも、滑液の試料を含む、請求項16に記載のOA発現プロファイル。

【請求項20】

MCP1、IL8、KC、MMP2、MMP3、IL6、MMP1、RANTES、MMP9、IL1B、アポリタンパク質A1、アポリタンパク質E、DCN、CILP、およびCOMP、ならびに任意のそれらの断片から成る群から選択される、任意の2つ以上のOAバイオマーカーまたはそれらの断片に対する2つ以上の抗体を含む、変形性関節症の診断試薬。

【請求項21】

請求項19に記載の診断試薬を含む、キット。

【請求項22】

対象の変形性関節症を診断するためのキットであって、前記キットは、MCP1、IL8、KC、MMP2、MMP3、IL6、MMP1、RANTES、MMP9、IL1B、アポリタンパク質A1、アポリタンパク質E、DCN、CILP、およびCOMP、ならびに任意のそれらの断片から成る群から選択される、OAポリペプチドにそれぞれが特異的に結合する、少なくとも2つのOAバイオマーカー検出試薬、または前記OAポリペプチドの少なくとも2つをコードするポリヌクレオチド配列の少なくとも一部にそれぞれが特異的に結合する、少なくとも2つのOAバイオマーカー検出試薬を含み、前記試薬の前記特異的結合は、対象由来の生物学的試料中の少なくとも1つのOAポリペプチドの発現レベルを示す、キット。

【請求項23】

少なくとも1つのバイオマーカーの発現を特異的に検出する、前記少なくとも1つの試薬は、前記ポリペプチドの1つをコードするポリヌクレオチド配列の少なくとも一部に対して相補的な核酸プローブを含む、請求項21に記載のキット。

【請求項24】

前記核酸プローブは、cDNAであるか、またはオリゴヌクレオチドである、請求項22に記載のキット。

【請求項25】

前記少なくとも1つのOAバイオマーカー検出試薬は、基材表面に固定化される、請求項21に記載のキット。

【請求項26】

前記基材表面に配列される少なくとも2つのバイオマーカー検出試薬を含む、請求項2

10

20

30

40

50

4に記載のキット。

【請求項27】

前記少なくとも2つのバイオマーカー試薬は、マイクロアレイを構成するように前記基材表面に配列される、請求項25に記載のキット。

【請求項28】

変形性関節症を治療するための治療薬として前記候補物質を特定するための方法であって、a)前記候補物質を、自然発症変形性関節症であると診断された対象に投与することと、b)前記対象由来の生物学的試料中の、MCP1、IL8、KC、MMP2、MMP3、IL6、MMP1、RANTES、MMP9、IL1B、アポリタンパク質A1、アポリタンパク質E、DCN、CILP、およびCOMPから成る群から選択される、2つ以上のOAポリペプチドの発現レベルを測定することと、c)前記生物学的試料中の前記2つ以上のOAポリペプチドのそれぞれの発現レベルが、前記試験物質を投与していない対照対象由来の生物学的試料中の前記選択された2つ以上のOAポリペプチドの発現レベル以下である場合に、変形性関節症を治療するための候補治療薬として、前記候補物質を選択することと、を含む、方法。

10

【請求項29】

前記生物学的試料は、滑液、全血、血漿、血清、尿、および唾液のうちのいずれか1つを含む、請求項27に記載の方法。

【請求項30】

前記生物学的試料は、滑液を含む、請求項27に記載の方法。

20

【請求項31】

少なくとも4つのポリペプチドの発現レベルが測定される、請求項27に記載の方法。

【請求項32】

前記対象は、ヒトである、請求項27に記載の方法。

【請求項33】

前記対象は、イヌである、請求項27に記載の方法。

【請求項34】

前記対象由来の生物学的試料中の、MCP1、IL8、KC、MMP2、およびMMP3、またはそれらの断片の発現レベルを測定することを含む、請求項27に記載の方法。

30

【請求項35】

前記対象は、イヌである、請求項34に記載の方法。

【請求項36】

前記対象由来の生物学的試料中の、MCP1、IL6、IL8、KC、およびMMP1、またはそれらの断片の発現レベルを測定することを含む、請求項27に記載の方法。

【請求項37】

前記対象は、ヒトである、請求項36に記載の方法。

【請求項38】

前記対象由来の前記生物学的試料中の前記少なくとも2つのポリペプチドのそれぞれの発現レベルは、LUMINEX、ELISA、免疫測定法、質量分析法、高速液体クロマトグラフィ、二次元電気泳動法、qPCR、RT-PCR、核酸マイクロアレイ、インサイツハイブリッド形成、SAGE、ウエスタンブロット法、タンパク質マイクロアレイ、および抗体マイクロアレイから成る群から選択される方法を使用して測定される、請求項27に記載の方法。

40

【請求項39】

対象の変形性関節症の治療の効果を監視するための方法であって、a)前記変形性関節症の治療が前記対象に施される前に、前記対象から得られる第1の生物学的試料中の、MCP1、IL8、KC、MMP2、MMP3、IL6、MMP1、RANTES、MMP9、IL1B、アポリタンパク質A1、アポリタンパク質E、DCN、CILP、およびCOMPから成る群から選択される2つ以上のOAポリペプチドの発現レベルを測定することを含む、第1のOAバイオマーカー発現プロファイルを得ることと、b)前記変

50

形性関節症の治療が前記対象に施された後またはその間に、前記対象から得られる第2の生物学的試料中の、(a)で選択された前記2つ以上のOAポリペプチドの発現レベルを測定することを含む、第2のOAバイオマーカー発現プロファイルを得ることと、c)前記第1のOAバイオマーカー発現プロファイルと前記第2のOAバイオマーカー発現プロファイルとを比較することと、を含み、前記第1のOAバイオマーカー発現プロファイルにおける前記2つ以上の選択されたOAポリペプチドのそれぞれの発現レベルが、前記対象由来の前記第2の生物学的試料中の前記選択された2つ以上のOAポリペプチドの発現レベル以下である場合は、前記対象における前記変形性関節症治療の治療効果を示す、方法。

【請求項40】

前記生物学的試料は、滑液、全血、血漿、血清、尿、および唾液のうちのいずれか1つを含む、請求項38に記載の方法。

【請求項41】

前記生物学的試料は、滑液を含む、請求項38に記載の方法。

【請求項42】

少なくとも4つのポリペプチドの発現レベルが測定される、請求項38に記載の方法。

【請求項43】

前記対象は、ヒトである、請求項38に記載の方法。

【請求項44】

前記対象は、イヌである、請求項38に記載の方法。

【請求項45】

前記対象由来の生物学的試料中の、MCP1、IL8、KC、MMP2、およびMMP3、またはそれらの断片の発現レベルを測定することを含む、請求項38に記載の方法。

【請求項46】

前記対象は、イヌである、請求項45に記載の方法。

【請求項47】

前記対象由来の生物学的試料中の、MCP1、IL6、IL8、KC、およびMMP1、またはそれらの断片の発現レベルを測定することを含む、請求項38に記載の方法。

【請求項48】

前記対象は、ヒトである、請求項47に記載の方法。

【請求項49】

前記対象由来の前記生物学的試料中の前記少なくとも2つのポリペプチドの発現レベルは、LUMINEX、ELISA、免疫測定法、質量分析法、高速液体クロマトグラフィ、二次元電気泳動法、qPCR、RT-PCR、核酸マイクロアレイ、インサイツハイブリッド形成、SAGE、ウエスタンブロット法、タンパク質マイクロアレイ、および抗体マイクロアレイから成る群から選択される方法を使用して測定される、請求項38に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願の参照)

本出願は、2010年3月5日に出願の米国仮出願第61/339,511号の利益を主張するものであり、参照によりその内容全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

本発明は、疾患のバイオマーカーに関し、より具体的には、変形性関節症を診断、病期分類、および監視するための、複数のバイオマーカー、関連する方法、およびキットに関する。

【背景技術】

【0003】

変形性関節症(OA)は、ヒトおよび家畜(特にイヌ)の患者に影響を及ぼす、消耗性

10

20

30

40

50

疾患である。OAは、一般的に、十分早期に診断して疾患の臨床的進行を阻止することができないので、早期OAバイオマーカーの開発は、診断スクリーニング、疾患の病期分類、治療計画、および監視に対して重要な効果を有する。

イヌでは、OAを実験的に誘発させた時に、特定のタンパク質が滑液の差次的発現レベルを呈する。これらは、単球走化性タンパク質1(MCP1)、インターロイキン8(IL8)、およびケラチン細胞由来の化学誘引物質(KC)、特定のアポリポタンパク質、ならびにマトリクスメタロプロテイナーゼ(MMP)である。しかしながら、これらのまたは他のタンパク質が、イヌまたはヒトを含む他の種において自発的に発生するOAの潜在的なバイオマーカーとして有用であり得るかどうかは知られていない。

【発明の概要】

10

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

プロテオミクス法を、OA疾患の診断および予後診断、治療の監視、ならびにOA疾患の機構の解明に適用することが可能であるという高い潜在的価値を考えれば、OAが存在する個人とOAが存在しない個人とを好都合かつ確実に区別する能力、ならびに疾患負荷の型および重篤性を判定する能力を伴う、新しいバイオマーカーおよびバイオマーカーの組み合わせを特定することが有用である。

【課題を解決するための手段】

【0005】

一態様において、本開示は、対象の変形性関節症を診断、病期分類、または監視するための方法であって、対象由来の生物学的試料中の、MCP1、IL8、KC、MMP2、MMP3、MMP9、IL6、MMP1、RANTES、IL1B、アポリポタンパク質A1、アポリポタンパク質E、DCN、CILP、COMP、および任意のそれらの断片、ならびにそれらの任意の組み合わせから成る群から選択される、少なくとも2つのポリペプチドの発現レベルを測定することを含み、生物学的試料中の少なくとも2つのポリペプチドまたはそれらの断片の発現レベルは、対象における変形性関節症の有無、程度、重篤性、型、または病期を示す、試料タンパク質発現プロファイルを提供する、方法を提供する。本方法は、試料タンパク質発現プロファイルを、対照タンパク質発現プロファイルと比較することをさらに含んでもよく、試料タンパク質発現プロファイルと、対照タンパク質発現プロファイルとの間の差は、対象における変形性関節症の有無、程度、重篤性、型、または病期を示す。本方法において、対象は、変形性関節症を有する危険性があり得るか、または有する疑いがある。生物学的試料中の少なくとも2つのポリペプチドの発現レベルは、DNA増幅、DNAメチル化/脱メチル化から成る群から選択される過程、および一塩基多型に起因するDNAの変化を検出することが挙げられるが、これに限定されない、下記で詳述されるような数多くの方法によって測定することができる。

20

30

【0006】

別の態様において、本開示は、変形性関節症を有する疑いがある対象由来の生物学的試料から得られる、MCP1、IL8、KC、MMP2、MMP3、IL6、MMP1、RANTES、MMP9、IL1B、アポリポタンパク質A1、アポリポタンパク質E、DCN、CILP、COMP、および任意のそれらの断片、ならびにそれらの任意の組み合わせから成る群から選択される、2つ以上のポリペプチドのポリペプチド発現レベル情報を含む、OAバイオマーカー発現プロファイルを提供する。OA発現プロファイルは、少なくとも1つの健康な対象から得られる、少なくとも1つの生物学的試料のポリペプチド発現レベル情報をさらに含んでもよい。変形性関節症を有する疑いのある対象および健康な単数または複数の対象由来の生物学的試料は、それぞれ、滑液の試料、全血の試料、血漿の試料、血清の試料、尿の試料および唾液の試料を含んでもよい。好ましくは、生物学的試料は、滑液の試料である。同一であるかまたは異なる種類の複数の生物学的試料が各対象から得られてもよく、OA発現レベル情報が各試料から得られてもよく、また、結果が単一のOA発現プロファイルに組み合わせられてもよい。

40

【0007】

50

別の態様において、本開示は、MCP1、IL8、KC、MMP2、MMP3、IL6、MMP1、RANTES、MMP9、IL1B、アポリタンパク質A1、アポリタンパク質E、DCN、CILP、およびCOMP、ならびに任意のそれらの断片から成る群から選択される、任意の2つ以上のOAバイオマーカまたはそれらの断片に対する2つ以上の抗体を含む、変形性関節症の診断試薬を提供する。診断試薬は、キットで提供されてもよい。

**【0008】**

別の態様において、本開示は、対象の変形性関節症を診断するためのキットであって、このキットは、MCP1、IL8、KC、MMP2、MMP3、IL6、MMP1、RANTES、MMP9、IL1B、アポリタンパク質A1、アポリタンパク質E、DCN、CILP、およびCOMP、ならびに任意のそれらの断片から成る群から選択される、OAポリペプチドにそれぞれが特異的に結合する、少なくとも2つのOAバイオマーカ検出試薬、またはOAポリペプチドの少なくとも2つをコードするポリヌクレオチド配列の少なくとも一部にそれぞれが特異的に結合する、少なくとも2つのOAバイオマーカ検出試薬を含み、試薬の特異的結合は、対象由来の生物学的試料中の少なくとも1つのOAポリペプチドの発現レベルを示す、キットを提供する。本キットにおいて、少なくとも1つのバイオマーカの発現を特異的に検出する、少なくとも1つの試薬は、ポリペプチドの1つをコードするポリヌクレオチド配列の少なくとも一部に対して相補的な核酸プローブを含んでもよい。核酸プローブは、cDNAとするか、またはオリゴヌクレオチドとすることができる。少なくとも1つのOAバイオマーカ検出試薬は、基材表面に固定化することができる。本キットは、基材表面に配列される少なくとも2つのバイオマーカ検出試薬を含んでもよい。本キットにおいて、少なくとも2つのバイオマーカ試薬は、マイクロアレイを構成するように基材表面に配列することができる。

10

20

**【0009】**

別の態様において、本開示は、変形性関節症を治療するための治療薬として前記候補物質を特定するための方法であって、a) 候補物質を、自然発症変形性関節症であると診断された対象に投与することと、b) 対象由来の生物学的試料中の、MCP1、IL8、KC、MMP2、MMP3、IL6、MMP1、RANTES、MMP9、IL1B、アポリタンパク質A1、アポリタンパク質E、DCN、CILP、およびCOMPから成る群から選択される、2つ以上のOAポリペプチドの発現レベルを測定することと、c) 生物学的試料中の2つ以上のOAポリペプチドのそれぞれの発現レベルが、試験物質を投与していない対照対象由来の生物学的試料中の選択された2つ以上のOAポリペプチドの発現レベル以下である場合に、変形性関節症を治療するための候補治療薬として、候補物質を選択することと、を含む、方法を提供する。

30

**【0010】**

別の態様において、本開示は、対象における変形性関節症の治療効果を監視する方法であって、a) 変形性関節症の治療が対象に施される前に、対象から得られる第1の生物学的試料中の、MCP1、IL8、KC、MMP2、MMP3、IL6、MMP1、RANTES、MMP9、IL1B、アポリタンパク質A1、アポリタンパク質E、DCN、CILP、およびCOMPから成る群から選択される2つ以上のOAポリペプチドの発現レベルを測定することを含む、第1のOAバイオマーカ発現プロファイルを得ることと、b) 変形性関節症の治療が対象に施された後またはその間に、対象から得られる第2の生物学的試料中の、(a)で選択された2つ以上のOAポリペプチドの発現レベルを測定することを含む、第2のOAバイオマーカ発現プロファイルを得ることと、c) 第1のOAバイオマーカ発現プロファイルと第2のOAバイオマーカ発現プロファイルとを比較することと、を含み、第1のOAバイオマーカ発現プロファイルにおける2つ以上の選択されたOAポリペプチドのそれぞれの発現レベルが、対象由来の第2の生物学的試料中の選択された2つ以上のOAポリペプチドの発現レベル以下である場合は、対象における変形性関節症の治療効果を示す、方法を提供する。

40

**【0011】**

50

前述の方法のいずれかにおいて、単数または複数の生物学的試料は、滑液、全血、血漿、血清、尿、および唾液のうちいずれか1つを含んでもよい。例示的な方法において、生物学的試料は、滑液を含む。好ましくは、少なくとも4つのポリペプチドの発現レベルが測定される。いずれかの方法において、対象は、哺乳動物であってもよい。好ましくは、対象は、ヒトまたはイヌである。前述の方法のいずれかの例示的实施形態において、対象は、イヌであり、本方法は、対象由来の生物学的試料中の、MCP1、IL8、KC、MMP2、およびMMP3またはそれらの断片の発現レベルを測定することを含んでもよい。前述の方法のいずれかの別の例示的实施形態において、対象は、ヒトであり、本方法は、対象由来の生物学的試料中の、MCP1、IL6、IL8、KC、およびMMP1、またはそれらの断片の発現レベルを測定することを含んでもよい。そのような方法は、生物学的試料中の、RANTESまたはその断片の発現レベルを測定することをさらに含んでもよい。前述の方法のいずれかにおいて、対象由来の生物学的試料中の少なくとも2つのポリペプチドのそれぞれの発現レベルは、LUMINEX、ELISA、免疫測定法、質量分析法、高速液体クロマトグラフィ、二次元電気泳動法、qPCR、RT-PCR、核酸マイクロアレイ、インサイトハイブリッド形成、SAGE、ウエスタンブロット法、タンパク質マイクロアレイ、および抗体マイクロアレイから成る群から選択される方法を使用して測定される。

10

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【0012】

【図1A】図1Aは垂臨床OAを伴うイヌ、および高存在量タンパク質の除去後の臨床OAを伴うイヌにおける、軟骨中間層タンパク質(CILP)、デコリン、およびCOMPのレベル(平均±SE濃度(pg/mL))を示す棒グラフである。

20

【図1B】図1Bは垂臨床OAを伴うイヌ、および高存在量タンパク質の除去後の臨床OAを伴うイヌにおける、アポリタンパク質A1およびアポリタンパク質Eのレベル(平均±SE濃度(pg/mL))を示す棒グラフである。

【図2A】図2Aは正常なイヌ、ならびに術前および術後の自然発症膝関節の変形性関節症を伴うイヌにおける、IL8、KC、MCP1、およびMMP3のレベル(平均±SE濃度(pg/mL))を示す棒グラフである。

【図2B】図2Bは正常なイヌ、ならびに術前および術後の自然発症膝関節の変形性関節症を伴うイヌにおける、MMP2のレベル(平均±SE濃度(pg/mL))を示す棒グラフである。

30

【図3】図3は正常な患者由来の、および膝関節全置換術の直前のOAを伴う患者由来の滑液試料中のMMP/サイトカインlog(pg/mL)レベルを要約(平均±SE)した、一組の棒グラフである。

#### 【発明を実施するための形態】

##### 【0013】

###### A. 定義

この節および本明細書の開示全体で使用される節の見出しは、限定することを意図していない。

##### 【0014】

文脈が明確に指示しない限り、本明細書で使用される単数形「a」、「an」、および「the」は、複数の指示対象を含む。本明細書で数値範囲が列挙された場合、同じ精度でそれらの間に介在する各数が、明示的に企図される。例えば、範囲が6~9の場合、6および9に加えて数7および8が企図され、6.0~7.0の範囲の場合、数6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、および7.0が明示的に企図される。

40

##### 【0015】

###### a) 抗体

本明細書で使用される「抗体」という用語は、免疫グロブリン遺伝子または免疫グロブリン遺伝子の断片によって実質的にコードされる、1つ以上のポリペプチドから成るタン

50

パク質を指し、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、およびそれらの断片、ならびに免疫グロブリン遺伝子配列からエンジニアリングされる分子を包含する。認識される免疫グロブリン遺伝子としては、カッパ、ラムダ、アルファ、ガンマ、デルタ、イプシロン、およびミューの定常領域遺伝子、ならびに無数の免疫グロブリン可変領域遺伝子が挙げられる。軽鎖は、カッパまたはラムダに分類される。重鎖は、ガンマ、ミュー、アルファ、デルタ、またはイプシロンに分類され、これらはそれぞれ、免疫グロブリンクラスである I g G、I g M、I g A、I g D、および I g E を定義する。

【 0 0 1 6 】

b) 検出可能な標識

本明細書で使用される「検出可能な標識」という用語は、任意の部分に連結された単数または複数の分子の状態の変化の光学的、電気的、または他の物理的指示を介して、測定可能な信号を生成する、その部分を指す。そのような物理的指標は、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、電磁的、放射化学、およびこれらに限定されないが、蛍光、化学蛍光、化学発光等の化学的手段を包含する。

10

【 0 0 1 7 】

c) マーカー

本明細書で同じ意味で使用される「マーカー」または「バイオマーカー」という用語は、対象から得られる試験試料を分析するための標的として使用される任意の分子を指し、試験試料中に存在し得る、タンパク質またはポリペプチド自体、ならびにそれらに対する抗体を包含する。マーカーとして使用されるタンパク質またはポリペプチドは、任意の変異体およびその断片、特に、免疫学的に検出可能な断片を含む。例えば、マーカーポリペプチドの変異体は、同じ遺伝子によってコードされるが、選択的スプライシングおよび/または翻訳後修飾（例えば、グリコシル化、アシル化、および/またはリン酸化）における差等の選択的処理の結果として、それらの等電点または分子量、もしくはどちらも異なる可能性があることを理解されたい。さらに、細胞タンパク質は、疾患過程の結果として炎症等の損傷を受ける可能性があり、また断片化してもよく、したがって、本開示に従ってマーカーとして使用されるタンパク質またはポリペプチドが、それらの断片を含むことが理解されるであろう。加えて、特定のマーカーを、その後タンパク質分解によって活性形態に変換される不活性形態に合成できることが理解されるであろう。タンパク質またはその断片はまた、錯体の一部として発生する可能性がある。本開示に従ってマーカーとして使用されるタンパク質またはポリペプチドは、そのような錯体を含む。「バイオマーカー」および「マーカー」という用語はまた、マーカータンパク質をコードする、ヌクレオチド配列を含む核酸分子、およびストリンジェントな条件下でそのような核酸分子の一部とハイブリッド形成することができる、ポリヌクレオチドを包含する。本明細書で同じ意味で使用される「O A バイオマーカー」および「O A マーカー」は、対象由来の試験試料中に存在し得、かつ本明細書で説明されるように、対象におけるO A の存在を示すことが分かっている発現レベルを有する、タンパク質、ポリペプチド、それに対する抗体、およびそれらの任意の断片を指し、これらの用語はまた、O A マーカータンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む任意の核酸分子を包含する。

20

30

【 0 0 1 8 】

d) 対象

本明細書で使用される「対象」および「患者」という用語は、対象が任意の形態の治療を受けたか、または現在受けているかどうかに関わらず、同じ意味で使用される。本明細書で使用される単数または複数の「対象」という用語は、哺乳動物（例えば、ウシ、ブタ、ラクダ、ラマ、ウマ、ヤギ、ウサギ、ヒツジ、ハムスター、モルモット、ネコ、イヌ、ラット、およびマウス）、非ヒト霊長類（例えば、カニクイザル、チンパンジー等のサル）、およびヒトが挙げられるが、これらに限定されない、任意の脊椎動物を指す。好ましくは、対象は、イヌまたはヒトである。

40

【 0 0 1 9 】

e) 試験試料

50

本明細書で使用される「試験試料」という用語は、概して、目的とする分析物について試験が行われている、および/またはそれを含有する疑いがある、生物学的材料を指す。生物学的材料は、任意の生物学的源に由来してもよいが、好ましくは、目的とする分析物を含有する可能性が高い生物学的流体である。生物学的材料の例としては、排泄物、全血、血清、原形質、赤血球、血小板、間質液、唾液、眼球レンズ液、脳髄液、汗、尿、腹水液、粘膜、鼻液、痰、滑液、腹水、膿液、月経、羊水、精液、汚物等が挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは、試験試料は、滑膜液状試料である。

#### 【0020】

試験試料は、生物学的源から得られた時に、または試料のキャラクタを修飾するための前処理に続いて、直接使用されてもよい。例えば、そのような前処理は、血液から原形質を調製すること、粘性流体を希釈すること等を含んでもよい。前処理の方法はまた、濾過、沈殿、希釈、蒸留、混合、濃縮、妨害成分の不活性化、試薬の添加、溶解等を伴ってもよい。そのような前処理方法が試験試料に対して用いられる場合に、そのような前処理方法は、目的とする分析物が、未処理の試験試料（例えば、すなわち、いかなるそのような前処理方法も受けない試験試料）の濃度に比例する濃度で、試験試料中に残るように成される。

#### 【0021】

##### f) 変形性関節症

本明細書で使用される「変形性関節症」（「OA」と略記される）という用語は、任意の単数または複数の関節の軟骨の炎症、および損傷、またはその喪失、ならびに関節痛を特徴とする、骨関節症および退行性骨関節疾患としても知られている疾患を指す。イヌおよびヒト等の哺乳類の対象を含む、対象の変形性関節症を診断するための臨床的標準は、よく知られており、例えば、関節の腫れまたは腫張、関節の圧痛または疼痛、減少した関節の可動域、骨の成長などの可視的な関節の変形、および捻髪音が挙げられる。症状は、臨床的観察および履歴、MRIおよびX線を含む撮像によって特定することができる。OAの有無、およびOAの重篤性または程度を診断するための基準としては、膝OAのACR基準（R. Altman et al., Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis: Classification of osteoarthritis of the knee: Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association. *ARTHRITIS RHEUM.* Aug 29 (8): 1039 - 1049 (1986)）、WOMACに従った機能的状態の基準（N. Bellamy et al., 1988, Validation study of WOMAC: a health status instrument for measuring clinically important patient relevant outcomes to antirheumatic drug therapy in patients with osteoarthritis of the hip or knee. *J RHEUMATOL* 15: 1833 - 1840）、および膝OAのためのKellgren - Lawrence法に従った、OA疾患の重篤性を評価するための放射線基準（Kellgren, J. H. and J. S. Lawrence, *Radiological assessment of osteo - arthrosis.* *ANN RHEUM DIS* 16: 494 - 502）が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0022】

##### g) 発現

本明細書で使用される「発現」という用語は、DNA配列情報のメッセンジャーRNA（mRNA）またはタンパク質への変換を指す。発現は、完全長mRNA、mRNA断片、完全長タンパク質、またはタンパク質断片のレベルを測定することによって監視してもよい。発現はまた、対照状態に対するDNAの変化を評価することによって推定してもよ

10

20

30

40

50

い。発現に影響を及ぼすDNAの変化としては、DNAの増幅（コピー数の増加）、遺伝子の調節領域のメチル化状態の変化、または遺伝子の調節領域中の一塩基多型が挙げられる。

#### 【0023】

##### h) ハイブリッド形成

本明細書で使用される「ハイブリッド形成」という用語は、2つの相補的1本鎖核酸間の特異的水素結合を介したアニーリングまたは塩基対合の過程を指す。「ハイブリッド形成のストリンジェンシー」は、温度およびイオン強度の条件によって決定される。核酸ハイブリッドの安定性は、融解温度または $T_m$ で表され、この温度は、既定の条件下でハイブリッドが50%変性する温度である。所与のハイブリッドの $T_m$ を推定するための式が導出されており、この式は、核酸のG+C含量、ハイブリッド形成プローブの長さ等を考慮している（例えば、Sambrook et al, 1989, chapter 9）。プローブのその標的とのアニーリング速度を最大化するために、ハイブリッド形成は、概して、 $T_m$ よりも低い約20~25の温度の、高イオン強度の溶液（6×SSCまたは6×SSPE）中で行われる。ハイブリッド形成される配列が同一でない場合は、ハイブリッド形成温度を、1%の不整合毎に1~1.5下げる。概して、洗浄条件は、できる限りストリンジェントである（すなわち、計算した $T_m$ よりも低い約12~20の温度の、低イオン強度）。一例として、高度にストリンジェントな条件は、一般的に、6×SSC/5×デンハルト溶液/1.0%のSDS中で、68でハイブリッド形成することと、0.2×SSC/0.1%のSDS中で、65で洗浄することとを伴う。最適なハイブリッド形成条件は、概して、溶液中で行われるハイブリッド形成と、固定化した核酸を使用したハイブリッド形成とで異なる。当業者は、パラメータを操作してハイブリッド形成を最適化することを理解するであろう。

10

20

#### 【0024】

##### i) 核酸分子

本明細書で同じ意味で使用される「核酸分子」および「ポリヌクレオチド」という用語は、連結されたヌクレオチドの配列を指す。ヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドであってもよく、標準または非標準ヌクレオチドであってもよく、修飾または誘導体化ヌクレオチドであってもよく、合成類似体であってもよい。ヌクレオチドは、リン酸ジエステル結合または非加水分解性結合によって連結されてもよい。核酸は、少数のヌクレオチド（すなわち、オリゴヌクレオチド）を含んでもよく、または多数のヌクレオチド（すなわち、ポリヌクレオチド）を含んでもよい。核酸は、1本鎖または2本鎖であってもよい。

30

#### 【0025】

##### j) タンパク質およびタンパク質断片

本明細書で同じ意味で使用される「タンパク質」、「ポリペプチド」、および「ペプチド」という用語は、完全長天然タンパク質または完全長タンパク質のより短い断片を含む種々の長さの酸の配列を有する、複数のアミノ酸から成る分子を指す。これらは、中性の形態であるか、または塩として存在してもよく、修飾されないか、またはグリコシル化、側鎖酸化、およびリン酸化を含む過程によって、もしくはグリコシル単位、脂質、および無機イオン（リン酸塩等）が挙げられるがこれらに限定されない、アミノ酸側鎖に取り付けられる他の部分の付加によって、修飾されてもよい。修飾はまた、スルフヒドリル基の酸化等の、アミノ酸側鎖の化学的変換を含んでもよい。修飾がその特異性を変化させないのであれば、そのような修飾を伴う分子は、この用語に包含される。本明細書で使用される「タンパク質」という用語およびその同義語は、pIまたはMW、もしくはどちらも異なり得る同じ遺伝子によってコードされるタンパク質アイソフォームを包含することを理解されたい。そのようなアイソフォームは、例えば選択的スプライシングまたは翻訳後修飾等の差別的処理に起因する、異なるアミノ酸配列を有してもよい。本明細書で使用される「タンパク質断片」という用語は、第2のポリペプチドのアミノ酸配列の少なくとも5個のアミノ酸残基（好ましくは、少なくとも10個のアミノ酸残基、少なくとも15個の

40

50

アミノ酸残基、少なくとも20個のアミノ酸残基、少なくとも25個のアミノ酸残基、少なくとも40個のアミノ酸残基、少なくとも50個のアミノ酸残基、少なくとも60個のアミノ酸残基、少なくとも70個のアミノ酸残基、少なくとも80個のアミノ酸残基、少なくとも90個のアミノ酸残基、少なくとも100個のアミノ酸残基、少なくとも125個のアミノ酸残基、少なくとも150個のアミノ酸残基、少なくとも175個のアミノ酸残基、少なくとも200個のアミノ酸残基、または少なくとも250個のアミノ酸残基)のアミノ酸配列を含むポリペプチドを指す。マーカータンパク質の断片は、完全長天然タンパク質の機能活性を保有する場合もあれば、保有しない場合もある。

#### 【0026】

##### B. 変形性関節症バイオマーカーおよびアレイ

本明細書で説明される方法、および診断試薬、キット、ならびに本明細書で開示される関連する発明は、複数の分子マーカーの驚くべき発見に基づいており、その発現レベルは、健康な対象とOAを伴う対象との間で確実に差異が認められる。同じ複数のマーカーは、術前および術後のOA対象を判別することが可能であり、したがって、OA治療の有効性をこれらのマーカーで評価できることも示す。分子マーカーは、対象から容易に得られた生物学的試料から測定した時に、対象における発現の変化が対象にOAが存在することを示す遺伝子である。また、本明細書では、分子マーカーを使用して、OAの治療のための治療物質としての候補物質を特定する方法、対象におけるOA治療の有効性を判定するための方法、ならびにOAの診断試薬およびキットも提供する。

#### 【0027】

本明細書で使用される「OAバイオマーカー」は、バイオマーカーの発現レベルもしくは数または構造が、OAを伴わない、または同じ程度、重篤性、型、もしくは病期のOAを有する対象よりも、OAが存在する、または同じ程度、重篤性、型、もしくは病期のOAを有する対象において著しく頻繁に見られる時の、OAを示す。対照と比較した時のOAマーカーの発現レベル、数、または構造の有意性は、許容される信頼性のレベル(例えば、最低で95%)を適用することによって、通常の方法を使用して判定される。例えば、各OAバイオマーカーの発現レベルのカットオフまたは閾値を、発現レベルの臨床的または亜臨床OA指標との相関度を含む、多数の因子に従って設定してもよい。例えば、OAを示すバイオマーカーの発現レベルは、例えば、疾患を有する患者の少なくとも60%で見ることができ、疾患を有しない対象では10%未満でしか見られない。より好ましくは、発現レベルは、疾患を有する患者の少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%以上で見られた場合にOAを示し、疾患を有しない対象では20%未満、10%未満、8%未満、5%未満、2.5%未満、または1%未満でしか見られない。

#### 【0028】

「OA発現プロファイル」は、OAを有することが分かっている、特定の型(亜型Iまたは亜型II)のOAを有することが分かっている、特定の病期(初期、末期)のOAを有することが分かっている、またはOAのないことが分かっている、1つ以上の対象由来の1つ以上の生物学的試料から判定した時に、一組の2つ以上の選択されたOAマーカーの発現レベルの任意の物理的表現である。特定の対象または対象群のプロファイルは、OAマーカー発現レベルを別々に分析した複数種類の生物学的試料からの発現レベル情報を含んでもよい。例えば、対象のOA発現プロファイルは、対象由来の尿試料および血液試料からのOAマーカー発現レベル情報、ならびに両方の試料からのOAマーカー発現レベルを表す単一のプロファイルに組み合わせた結果を含んでもよい。単一の発現プロファイルは、滑液、全血、血漿、血清、尿、および唾液から選択される任意の2つ以上の生物学的試料からの発現レベル情報を含んでもよく、また完全なプロファイルは、滑液、尿、唾液、および全血、血漿、または血清から選択される任意の3つまたは4つの生物学的試料からの発現レベル情報を含んでもよい。

#### 【0029】

10

20

30

40

50

当業者は、検査される対象からの試料が多くなるにつれて、対象のOAの有無、程度、重篤性、型、または病期の判定の信頼性が高まることを理解するであろう。プロファイルは、視覚的グラフィック形態で、例えば紙の上もしくはコンピュータディスプレイ上に表示してもよく、アレイ等の三次元形態で表示してもよく、および/またはコンピュータが読み取り可能な媒体に記憶させてもよい。発現プロファイルは、OAの特定の状態（例えば、OA疾患の有無、重篤性（臨床的または亜臨床的））、型（亜型Iまたは亜型IIのOA）、程度（軟骨損傷の程度）、病期（初期のOAまたは末期のOA）に対応してもよく、したがって、患者試料に対する比較のためのテンプレートを提供する。対照プロファイルは、少なくとも1つの正常/健康な対象由来の生物学的試料、もしくは正常/健康な対象群から得られる複数の試料、または重篤性、型、もしくは病期に関して相当するOA疾患を有すると特定される1つ以上の対象から得られる複数の試料を分析することによって得ることができる。同様に、相当するプロファイルを、年齢、性別、および肥満指数が整合する対象について得ることができる。

10

#### 【0030】

本明細書で同じ意味で使用される「正常」および「健康」という用語は、関節の疼痛、炎症、または機能の低下等のOAの症状を示さず、いかなる履歴もなく、かつOAを有すると診断されたことがない単数または複数の対象を指す。「正常」または「健康」な試料は、正常/健康な対象から得られる試料を指す。「OAを有する疑いがある対象」とは、関節の疼痛、関節の腫れ、および捻髪音が挙げられるが、これらに限定されない、対象におけるOAの存在を示す1つ以上の症状を呈する対象、またはOAが存在する危険性があり得る、もしくは単純にスクリーニングされている対象を指す。OAを発達させる危険因子は、概してよく知られており、例えば、年齢、過体重すなわち肥満、外傷、人種、および/または家族歴を含む。

20

#### 【0031】

OAバイオマーカー発現プロファイルは、例えば、変形性関節症を有する疑いがある対象由来の生物学的試料から得られる、MCP1、IL8、KC、MMP2、MMP3、IL6、MMP1、RANTES、MMP9、IL1、アポリポタンパク質A1、アポリポタンパク質E、および任意のそれらの断片、ならびにそれらの任意の組み合わせから成る群から選択される、2つ以上のポリペプチドのポリペプチド発現レベル情報を含んでもよい。より具体的には、健康な患者から、および初期のOAまたは末期のOAを伴う患者から得られる滑液の試料を分析することによって、表1に列記されるポリペプチドが、正常な対象とOAを伴う対象とを区別することを発見した。したがって、対象に関するOAの有無、程度、重篤性、型、または病期を示すために、対象由来の生物学的試料で測定した時の、対象におけるこれらのマーカー遺伝子の発現レベルの変化を使用してもよい。マーカーのパネル（表1を参照のこと）は、MCP1、IL8、KC、MMP2、MMP3、IL6、MMP1、RANTES、MMP9、IL1B、アポリポタンパク質A1、アポリポタンパク質E、DCN、CILP、およびCOMPを含む。これらのタンパク質は、正常な個人の滑液試料と比較して、初期の変形性関節症を伴う対象の滑液試料において上方制御されることが分かっている。

30

#### 【0032】

例えば、1つ以上の対象におけるOAの有無、程度、重篤性、型、または病期を判定するために、本明細書で説明される任意の1つ以上の、好ましくは2つ以上のOAマーカーの発現レベルの変化を使用してもよい。1つ以上の対象におけるOAの有無、程度、重篤性、型、または病期を判定するために、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、11、12、またはそれ以上の分子マーカーの発現の変化を使用してもよい。当業者は、概して、より多くのマーカーを検査するにつれて、1つ以上の対象におけるOAの有無、程度、重篤性、型、または病期の判定がより正確になることを理解するであろう。

40

表1：OAマーカー

【表 1 - 1】

正式名	遺伝子名	GenBank 受託番号
単球走化性タンパク質-1 (MCP-1/CCL2)	CCL2	ヒト G: NM_002982 ヒト P: NP_002973 イヌ G: NM_001003297 イヌ P: NP_001003297.1
インターロイキン-8	IL8	ヒト G: NM_00584 ヒト P: NP_00575 イヌ G: NM_001003200 イヌ P: NP_001003200
ケラチン細胞化学誘引物質 / GRO-アルファ(CXCL1)	CXCL1	ヒト G: NM_001511 ヒト P: NP_001502 イヌ G: イヌ P:
マトリクスメタロプロテイ ナーゼ-2	MMP2	ヒト G: NM_004530 ヒト P: NP_004521 イヌ G: XM_535300 イヌ P: XP_535300
マトリクスメタロプロテイ ナーゼ-3	MMP3	ヒト G: NM_002422 ヒト P: NP_002413 イヌ G: NM_001002967 イヌ P: NP_001002967
インターロイキン-6	IL6	ヒト G: NM_000600 ヒト P: NP_000591 イヌ G: XM_850499 イヌ P: XP_855592
マトリクスメタロプロテイ ナーゼ-1	MMP1	ヒト G: NM_002421 ヒト P: NP_002412 イヌ G: XM_546546 イヌ P: XP_546546

10

20

30

40

【表 1 - 2】

正式名	遺伝子名	GenBank 受託番号
RANTES, ケモカイン(C-C モチーフ) リガンド5 (CCL5)	CCL5	ヒト G: NM_002985 ヒト P: NP_002976 イヌ G: NM_001003010 イヌ P: NP_001003010
マトリクスメタロプロテ ナーゼ-9	MMP9	ヒト G: NM_004994 ヒト P: NP_004985 イヌ G: NM_001003219 イヌ P: NP_001003219
インターロイキン-1 $\beta$	IL1B	ヒト G: NM_000576 ヒト P: NP_000567 イヌ G: NM_001037971 イヌ P: NP_001033060
アポリポタンパク質 A1	APOA1	ヒト G: NM_000039 ヒト P: NP_000030 イヌ G: NM_001197048 イヌ P: XP_536564
アポリポタンパク質 E	APOE	ヒト G: NM_000041 ヒト P: NP_000032 イヌ G: XM_533644 イヌ P: XP_533644
デコリン	DCN	ヒト G: NM_001920 ヒト P: NP_001911 イヌ G: NM_001003228 イヌ P: NP_001003228
軟骨中間層タンパク質	CILP	ヒト G: NM_003613 ヒト P: NP_003604 イヌ G: XM_544728 イヌ P: XP_544728
軟骨オリゴマーマトリクス タンパク質	COMP	ヒト G: NM_000095 ヒト P: NP_000086 イヌ G: XM_860228 イヌ P: XP_865321

10

20

30

40

## 【 0 0 3 3 】

任意の O A マーカーまたは複数の O A マーカーの発現を測定することは、当技術分野でよく知られている種々の手法によって達成されてもよい。発現は、O A マーカー遺伝子（すなわち、mRNA またはタンパク質）の産物を検出することによって直接監視されてもよく、または O A マーカー遺伝子の発現に影響を及ぼす DNA の変化（例えば、増幅、メチル化等）を検出することによって間接的に評価されてもよい。RNA、タンパク質、または DNA は、当技術分野でよく知られている手法、および Ausubel et al., (2003) CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR B

50

IOLOGY, John Wiley & Sons, New York, NY等の、標準的な分子生物学の参考文献で説明されている手法を使用して目的とする細胞から単離してもよい。

#### 【0034】

OAマーカー遺伝子のRNA産物の検出は、種々の方法によって達成されてもよい。定量的であり、OA試料と対照試料との間でRNAの元のレベルの評価を可能にする方法もあれば、単に質的な方法もある。下記で示される方法に関する付加的な情報は、例えば、Ausubel et al., (2003) CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York, NY、または Sambrook et al. (1989) MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NYで見出され得る。当業者は、目的とするmRNAの検出を最適化するためにパラメータが操作され得ることを理解するであろう。

10

#### 【0035】

OA試料および対照試料中の任意のOAマーカーの差次的発現を測定するために、定量的リアルタイムPCR (QRT-PCR) を使用してもよい。QRT-PCRにおいて、RNAテンプレートは、概して、cDNAに逆転写され、cDNAは、次いで、PCR反応を介して増幅される。PCR増幅過程は、耐熱性DNAポリメラーゼによって触媒される。適切な耐熱性DNAポリメラーゼの限定的でない例としては、Taq DNAポリメラーゼ、Pfu DNAポリメラーゼ、Tli (Ventとしても知られる) DNAポリメラーゼ、Tfl DNAポリメラーゼ、およびTth DNAポリメラーゼが挙げられる。PCR過程は、3つのステップ(すなわち、変性、アニーリング、および伸長)、または2つのステップ(すなわち、変性、およびアニーリング/伸長)を含んでもよい。アニーリングまたはアニーリング/伸長ステップの温度は、増幅プライマー(すなわち、それらのヌクレオチド配列、融解温度、および/または濃度)に応じて変化させることができ、また、変化することになる。アニーリングまたはアニーリング/伸長ステップの温度は、約50 ~ 約75 の範囲であってもよい。PCR産物の量は、リアルタイムでサイクル毎に追跡され、mRNAの初期濃度の判定を可能にする。反応は、SYBR Green等の2本鎖DNAに結合する色素の存在下で行われてもよい。反応はまた、PCR伸長サイクル中にクエンチャが取り除かれた時に蛍光を発する、TaqMan (登録商標) プロンプ (Applied Biosystems, Foster City, CA) 等の、蛍光レポータープロンプを用いて行われてもよい。蛍光値は、各サイクル中に記録され、増幅反応の時点まで増幅された産物の量を表す。統計的に有意な蛍光信号が最初に記録された時のサイクルが、閾値サイクル(Ct)である。誤差を最小化して、任意の試料間のばらつきを低減するために、QRT-PCRは、一般的に、内部標準を使用して行われる。理想的な内部標準は、異なる組織の間で一定のレベルで表され、実験的な治療の影響を受けない。適切な内部標準は、ハウスキーピング遺伝子であるグリセルアルデヒド-3-リン酸-デヒドロゲナーゼ(GAPDH)およびベータアクチンのmRNAが挙げられるが、これらに限定されない。

20

30

40

#### 【0036】

また、OAマーカーの差次的発現を測定するために、逆転写酵素PCR (RT-PCR) を使用してもよい。前述のように、RNAテンプレートは、cDNAに逆転写され、次いで、cDNAは、典型的なPCR反応を介して増幅される。所定数のサイクルの後、増幅されたDNA産物は、一般的に、ゲル電気泳動によって分離される。異なる細胞において増幅されるPCR産物の相対量の比較は、OA試料中で分子マーカーが差次的に発現したかどうかを明らかにする。

#### 【0037】

OAマーカーの差次的発現はまた、核酸マイクロアレイを使用して測定してもよい。この方法では、1本鎖核酸(例えば、cDNA、オリゴヌクレオチド等)が、固体支持体上

50

でプレート化またはアレイ化される。固体支持体は、ガラス、シリカ系、シリコン系、合成ポリマー、生物学的ポリマー、共重合体、金属、または膜等の材料であってもよい。固体支持体の形態または形状は、用途に応じて変化する可能性がある。適切な例としては、スライド、帯、プレート、ウェル、微粒子、繊維（光学繊維等）、ゲル、およびそれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。アレイ化されて固定化された配列は、概して、目的とする細胞由来の特異的DNAプローブでハイブリッド形成される。蛍光標識したcDNAプローブは、目的とする細胞から抽出されるRNAの逆転写によって、蛍光標識したデオキシヌクレオチドの組み込みを通して生成してもよい。プローブは、高度にストリンジентな条件下で、マイクロチップ上で、固定化した核酸にハイブリッド形成される。ストリンジент洗浄し、非特異的に結合したプローブを取り除いた後に、チップを、共焦点レーザー顕微鏡によって、またはCCDカメラ等の別の検出方法によって走査する。各アレイ化した要素のハイブリッド形成の定量化は、対応するmRNAの存在量の評価を可能にする。2色蛍光法により、2つのRNA源から生成した、別々に標識したcDNAプローブが、アレイに一对にハイブリッド形成される。したがって、各規定の分子マーカに対応する2つの源からの転写物の相対存在量が、同時に特定される。マイクロアレイ分析は、Affymetrix社のGenChip技術、またはIncyte社のマイクロアレイ技術等を使用することによって、製造業者のプロトコルに従って、市販の機器によって行ってもよい。

10

#### 【0038】

OAマーカの差次的発現はまた、ノーザンブロット法を使用して測定してもよい。このために、最初に、変性状態下で、アガロースゲル中での電気泳動を介して、RNA試料をサイズによって分類する。次いで、RNAを、膜に移し、架橋し、そして高度にストリンジентな条件下で、標識したDNAプローブにハイブリッド形成する。洗浄して非特異的に結合したプローブを取り除いた後に、ハイブリッド形成した標識した種を、当技術分野でよく知られている手法を使用して検出する。プローブは、放射性元素、紫外線光に暴露された時に蛍光を発する化学物質、抗体で検出されるタグ、または有色もしくは蛍光産物の形成を触媒する酵素で標識されてもよい。対照試料および試験試料中で検出されるRNAの相対量の比較は、試験試料中の単数または複数のOAマーカの発現が変化するかどうかを明らかにする。

20

#### 【0039】

また、OA試料および対照試料中のOAマーカの差次的発現を監視するために、ヌクレアーゼ保護アッセイを使用してもよい。ヌクレアーゼ保護アッセイでは、アンチセンスプローブを、溶液中でRNA試料にハイブリッド形成する。アンチセンスプローブは、同位元素、フルオロフォア、酵素、または別のタグで標識されてもよい。ハイブリッド形成に続いて、ヌクレアーゼを加えて、1本鎖のハイブリッド形成していないプローブおよびRNAに分解する。残りの保護された2本鎖断片を分離するために、アクリルアミドゲルを使用し、次いで、この断片を、当技術分野でよく知られている手法を使用して検出する。再度、発現の質的な差を検出してもよい。

30

#### 【0040】

また、OAマーカの差次的発現は、インサイトハイブリッド形成を使用して測定してもよい。この種のハイブリッド形成は、標識したアンチセンスプローブを使用して、組織切片の細胞中の特定のmRNAを限局する。ハイブリッド形成および洗浄ステップは、概して、高度にストリンジентな条件下で行われる。プローブは、標識したハイブリッドが顕微鏡下で視覚化され得るように、別のタンパク質または抗体によって検出され得る、フルオロフォアまたは小さいタグ（ビオチンまたはジゴキシゲニン等）で標識されてもよい。OAマーカの転写物は、細胞の核、細胞質、または原形質膜に限局されてもよい。

40

#### 【0041】

OAマーカのタンパク質産物の検出は、複数の異なる手法によって達成されてもよく、その多くは抗体に基づいている。下記で論じられる方法に関する付加的な情報は、A u s b e l e t a l . , ( 2 0 0 3 ) C U R R E N T P R O T O C O L S I N

50

MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York, NY、または Sambrook et al. (1989) MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NYで見出され得る。当業者は、目的とするタンパク質の検出を最適化するためにパラメータが操作されてもよいことを理解するであろう。

【0042】

タンパク質レベルを検出して定量化するために、酵素結合抗体免疫吸着アッセイ (ELISA) を使用してもよい。この方法は、抗原 (すなわち、目的とするタンパク質) を調製することと、マイクロタイタープレートのウェルを抗原で被覆することと、抗原を認識する抗体でインキュベートすることと、結合していない抗体を洗浄することと、抗体-抗原錯体を検出することとを含む。抗体は、概して、西洋わさびペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼ等の酵素に共役され、比色産物、蛍光産物、または化学発光産物を生成する。ELISAはまた、2つの抗体を使用する場合があります、その1つは、目的とするタンパク質に対して特異的であり、もう1つは、第1の抗体を認識し、検出のための酵素に連結される。さらに、ウェルを抗原で被覆する代わりに、抗体をウェル上に被覆してもよい。この場合、被覆したウェルに目的とする抗原を加えることに続いて、検出可能な化合物に共役させる第2の抗体を加える。

10

【0043】

異なる最高100組に微小球ビーズを色素で色分けした、取り込みビーズシステムに基づく多重アッセイを使用して、タンパク質レベルを検出して、定量化するために、Luminexプラットフォーム (Luminex Corp. Austin, Texasから入手可能) を使用することができる。各色分けしたビーズ組は、選択したタンパク質マーカーに特異的な抗体等の特異的結合試薬で被覆され、極めて少量 (例えば、1滴の流体) の原形質、血清、溶解物、または滑液等の生物学的試料由来の特異的タンパク質分析物の取り込みおよび検出を可能にする。どの分析物がスクリーニングされているか応じて、分析物を取り込むために、少なくとも1つまたは複数のビーズ組を試料とともにインキュベートしてもよい。Luminex小型分析器は、レーザを使用して、各微小球ビーズ、さらにはアッセイ中に取り込んだ任意のレポーター色素を識別する内部色素を励起する。各ビーズ組に関して、複数の読み取りを行うことができる。各ビーズが特別な色素比率を組み込んでいるので、取り込み後に各ビーズ集団を別々に分析することができる。例示的な複合免疫測定法プラットフォームはまた、Qiagen Inc. から入手可能なxMAPプラットフォームである。

20

30

【0044】

相対タンパク質レベルはまた、ウエスタンブロット法で測定してもよい。ウエスタンブロット法は、概して、タンパク質試料を調製することと、ゲル電気泳動を使用して変性タンパク質を質量によって分離することと、目的とするタンパク質に特異的な抗体でブロットをプローブすることとを含む。検出は、通常、2つの抗体を使用して達成され、第2のものは、検出のための酵素、または別のレポーター分子に共役される。タンパク質レベルの差を検出するために使用する方法としては、比色検出法、化学発光検出法、蛍光検出法、および放射能検出法が挙げられる。

40

【0045】

タンパク質レベルの測定はまた、タンパク質マイクロアレイまたは抗体マイクロアレイを使用して行ってもよい。これらの方法では、タンパク質または抗体を、マイクロアレイまたはバイオチップの表面に共有結合的に取り付ける。目的とするタンパク質は、抗体との相互作用によって検出され、抗体-抗原錯体は、概して、抗体上の蛍光タグを介して検出される。

【0046】

相対タンパク質レベルは、免疫組織化学によって評価されてもよく、タンパク質は、その特異的抗体との相互作用によって組織切片の細胞に局限される。抗原-抗体錯体は、種

50

々の方法によって視覚化してもよい。ELISAについて前述したように、1つまたは2つ抗体を使用してもよい。検出抗体は、フルオロフォアでタグ付けしてもよく、または検出可能な産物の産生を触媒する酵素に共役してもよい。標識した錯体は、一般的に、顕微鏡下で視覚化される。

#### 【0047】

任意の1つ以上のOAマーカ-の発現の変化はまた、各OAマーカ-遺伝子をコードするDNAの変化を検出することによって評価してもよい。DNAは増幅してもよく、これは、DNAまたは遺伝子の領域のコピー数が増加する過程である。通常、DNAの付加的なコピー数に比例して、RNA産物の量も増加する。DNAの増幅は、当技術分野でよく知られている、PCR手法によって検出してもよい。DNAの増幅はまた、サザンプロット法によって検出してもよく、その方法において、DNAは、高度にストリンジェントな条件下で、標識したプローブにハイブリッド形成され、標識したハイブリッドは、ノーザンプロット法について前述したように検出してもよい。

10

#### 【0048】

DNAのメチル化状態の変化はまた、任意のOAマーカ-の発現の変化を示し得る。遺伝子の調節領域をメチル化してもよく、これは、CpGジヌクレオチド中のシトシンの5-炭素へのメチル基の付加を伴う。転写的にサイレントである遺伝子は、メチル化または高メチル化した調節領域を有する傾向がある。したがって、OAマーカ-遺伝子の脱メチル反応は、組織または細胞における発現の増加につながり得、これは、対象から得られる生物学的試料から検出可能である。同様に、OAマーカ-遺伝子のメチル化は、組織または細胞における発現の減少につながり得、これは、対象から得られる生物学的試料から検出可能である。1つ以上の対照対象由来の単数または複数の試料に対する、OAを伴う1つ以上の対象由来の単数または複数の試料中のOAマーカ-遺伝子のメチル化状態の変化は、サザン法の検出またはPCR増幅に続いて、メチル化感受性制限酵素を使用してDNAを消化して評価してもよい。OAマーカ-のメチル化状態の変化はまた、重亜硫酸反応に基づく方法を使用して検出してもよい。このために、メチル化されていないシトシンをウラシルに変換するために重亜硫酸ナトリウムを使用し、次いで、メチル化されたシトシンを、メチル化特異的PCR(MSP)法によって検出する。

20

#### 【0049】

OAマーカ-遺伝子の調節領域の一塩基多型(SNP)もまた、その発現レベルに影響を及ぼし得る。例えば、変化したヌクレオチドは、転写因子の結合に影響を及ぼし得、よって、転写が上方制御または下方制御される。特定のSNPの存在は、DNAの配列決定によって検出してもよい。SNPはまた、オリゴヌクレオチドプローブへの選択的ハイブリッド形成(すなわち、SNPを伴わない配列ではなく、特定のSNPを含有する配列にハイブリッド形成する)によって検出してもよい。特定のSNPはまた、PCRに基づく手法、またはオリゴヌクレオチドマイクロアレイに基づくアッセイを使用して検出してもよい。

30

#### 【0050】

OAマーカ-の任意の1つ以上の発現は、対照試料に対するOA試料で測定することができる。OA細胞は、概して、認められた臨床的指標に基づいて、OAを有することが分かっている対象から単離してもよく、任意のOAマーカ-の発現は、インビトロで検査してもよい。単離した細胞に使用される生検の種類は、OAの場所および性質に応じて変えることができ、また、変わることになる。細胞、組織、または生物学的流体(滑液等)の試料は、針吸引生検によって取り除いてもよい。このために、注射器に取り付けた細針を、皮膚を通して、目的とする臓器、組織、または関節包の中に挿入する。針は、超音波またはコンピュータ断層撮影法(CT)撮像を使用して、目的とする領域に誘導してもよい。針が組織の中に挿入されると、注射器で真空が作られ、よって、細胞または流体を、針を通して吸引して注射器の中に採取することができる。細胞または組織の試料は、切開生検またはコア生検によって取り除いてもよい。このために、円錐、円筒、または微小な組織を、目的とする領域から取り出してもよい。この種の生検は、概して、CT撮像、超音

40

50

波、または内視鏡によって誘導される。

【0051】

RNA、タンパク質、またはDNAは、任意の生物学的試料含有細胞または組織から抽出して、前述の本明細書で説明される方法を使用して、任意の1つ以上のOAマーカの単数または複数の発現レベルの分析ができるようにしてもよい。生検を行った細胞または組織は、プラスチックまたはパラフィンに埋め込んでもよく、そこから、核酸を単離してもよい。OAマーカの発現はまた、インサイツ（例えば、インサイツハイブリッド形成、免疫組織化学）で、生検を行った細胞または組織で行ってもよい。

【0052】

OAマーカの発現はまた、対象においてインビボで検査してもよい。特定のmRNAまたはタンパク質は、蛍光色素、生物発光マーカ、蛍光半導体ナノ結晶、または半減期の短い放射性同位元素で標識し、次いで、対象を、標識の種類に応じて種々の手法を使用して撮像または走査してもよい。

10

【0053】

C. 方法

変形性関節症を診断、病期分類、または監視するための方法は、例えば、対象由来の生物学的試料中の、MCP1、IL8、KC、MMP2、MMP3、MMP9、IL6、MMP1、RANTES、IL1B、アポリタンパク質A1、アポリタンパク質E、DCN、CILP、COMP、および任意のそれらの断片、ならびにそれらの任意の組み合わせから成る群から選択される、少なくとも2つのポリペプチドの発現レベルを測定することを含むことができ、生物学的試料中の少なくとも2つのポリペプチドまたはそれらの断片の発現レベルは、対象における変形性関節症の有無、程度、重篤性、型、または病期を示す、試料タンパク質発現プロファイルを提供する。少なくとも2つのポリペプチドの発現レベルは、DNA増幅、DNAメチル化/脱メチル化から成る群から選択される過程、および一塩基多型に起因するDNAの変化を検出することが挙げられるが、それに限定されない、前述のタンパク質または核酸の定量化手法のいずれかを使用して測定される。本方法は、試料タンパク質発現プロファイルを、対照タンパク質発現プロファイルと比較することをさらに含み、試料タンパク質発現プロファイルと、対照タンパク質発現プロファイルとの間の差は、対象における変形性関節症の有無、程度、重篤性、型、または病期を示す。

20

30

【0054】

したがって、本明細書で説明されるOAバイオマーカは、対象のOAの存在を検出するための、OAの発生に関して対象の集団を研究するための、およびOA治療の有効性を評価するための方法で使用される。故に、本開示は、OAを有することが疑われる対象から得られる試験試料を特徴付け、対象のOAを診断し、OAの亜型を特定し、また、対象のOAの発達を評価するための方法を提供する。そのような方法では、対象から得られる生物学的試料について判定されるバイオマーカの発現レベルを、1つ以上の対照試料のレベルと比較する。対照試料は、健康な対象（または一群の健康な対象）から、OAを伴う対象（または対象群）から、亜型IのOAまたは亜型IIのOAを伴う対象（または対象群）から、および/または疾患の特定の病期（例えば、初期のOAまたは末期のOA）を伴う対象（または対象群）から得てもよい。前述のように、目的とするバイオマーカの対照発現レベルは、好ましくは、多数の個人から判定して、平均を得る。一定の好ましい実施形態では、調査中の生物学的試料について判定される発現レベルを、前述のように、少なくとも1つのOAの発現プロファイルと比較する。

40

【0055】

OAの有無、OAの程度、重篤性、型、または病期と相関する発現レベルを有するOAバイオマーカは、新しい治療薬を特定する（例えば、スクリーニングを使用して、これらのバイオマーカの発現を抑えるか、または高める化合物または物質を検出する）ための魅力的な標的である。故に、本開示はまた、効果的にOAを治療するか、またはOAの進行を遅らせる潜在性のある化合物または物質を特定するための方法を提供する。

50

## 【0056】

OAバイオマーカーは、例えば変形性関節症を治療するための治療薬として候補物質を特定するための、種々のスクリーニング方法に容易に適用することができる。そのような方法は、例えば、a) 候補物質を、自然発症変形性関節症であると診断された対象に投与することと、b) 対象由来の生物学的試料中の、MCP1、IL8、KC、MMP2、MMP3、IL6、MMP1、RANTES、MMP9、IL1B、アポリタンパク質A1、アポリタンパク質E、DCN、CILP、およびCOMPから成る群から選択される、2つ以上のOAポリペプチドの発現レベルを測定することと、c) 生物学的試料中の2つ以上のOAポリペプチドのそれぞれの発現レベルが、試験物質を投与していない対照対象由来の生物学的試料中の選択された2つ以上のOAポリペプチドの発現レベル以下である場合に、変形性関節症を治療するための候補治療薬として、前記候補物質を選択することと、を含んでもよい。

10

## 【0057】

本方法は、例えば、少なくとも1つのOAバイオマーカーを発現する生物学的系を、しばらくの間、候補物質に十分な条件下で、候補(試験)物質と接触させて、少なくとも1つのOAバイオマーカーの発現を変化させることと、第1のOAバイオマーカー発現レベルを測定することとをさらに含んでもよい。本方法は、候補物質の非存在下で同じ時間にわたって同じ条件で生物学的系を維持して、または生物学的系を対照物質と接触させた後に、第2のOAバイオマーカー発現レベルを測定することと、第1および第2のOAバイオマーカー発現レベルを比較することとをさらに含み、第2のOAバイオマーカー発現レベル未満である、またはそれを超える第1のOAバイオマーカー発現レベルは、その候補物質が、OAを治療するための候補治療薬であることを示す。合成物質および天然物質、ならびに自然発生物質および合成物質の任意の組み合わせが挙げられるが、それらに限定されない、任意の候補物質または複数の物質(例えば、ライブラリ)をスクリーニングすることができる。そのようなスクリーニングは、複数のOAバイオマーカーを同時に使用して行うことができ、容易に商業的に入手可能な多数の多重アッセイのいずれかを使用して促進され得ることを理解されたい。本方法は、評価している1つ以上のOAバイオマーカーのOA発現プロファイルを生成することをさらに含んでもよく、このプロファイルは、例えば、試験および対照条件下の各バイオマーカーの発現情報を含むことができる。

20

## 【0058】

そのようなスクリーニング方法は、単数または複数の細胞、生物学的流体、生物学的組織、または動物が挙げられるが、これらに限定されない、任意の種類生物学的系を使用して行ってもよい。方法は、動物モデルの膝、股関節、もしくは肘等の身体の部分の全部またはその一部分が挙げられるが、これに限定されない、誘発されたOAまたは自発的に発生するOAの存在にตอบสนองして、軟骨退化を示すことが可能な任意のシステムを使用して行うことができる。アッセイおよびスクリーニング法は、標準的な組織培養で成長させた細胞を使用して行うことができる。好ましくは、そのような細胞は、哺乳類起源であり、より好ましくは、イヌまたはヒト起源である。細胞は、選択した遺伝子を含む、初代細胞、第二代細胞、または不死化した細胞であってもよく、当技術分野でよく知られている手法によって調製することができ、またはAmerican Type Culture Collection, Manassas, Va等のよく知られている商業的供給源から入手可能である。当業者は、アッセイの目的、OAマーカーの型および数、試験される薬物等の、一般的に認識されている原則に従って、細胞型および細胞系を選択することができる。細胞は、成長させて37の滅菌環境に維持すること等の、標準的な細胞培養手法、媒体、および規格を使用して培養してもよい。

30

40

## 【0059】

スクリーニング方法によって特定される任意の候補物質は、インビボで化合物の性質の判定を可能にするアッセイで、さらに試験を行うことができる。変形性関節症の適切な動物モデルは、当技術分野でよく知られており、自発的に発生するOA、および外科的不安

50

定性または遺伝的修飾によって誘発されるOAのモデルを含む。動物モデルの自然発生的なOAは、モルモット、マウス、およびシリアンハムスターの膝関節で発生する。外科的不安定性によって誘発されるOAのモデルは、モルモットおよびラットにおける内側半月板断裂、ウサギにおける内側または外側部分半月板切除術、およびイヌにおける内側部分もしくは総半月板切除術または前方十字離断を含む。トランスジェニックマウスモデルが知られている。潜在的なOA治療剤として特定される候補物質を検証するために使用することができる他のOAの動物モデルは、当業者に知られている文献で詳細に説明されている他の数多くのものを含む。

#### 【0060】

代替として、OAバイオマーカーは、対象の変形性関節症の治療の効果を監視するための方法に適用することができる。そのような方法は、例えば、a)変形性関節症の治療が対象に施される前に、対象から得られる第1の生物学的試料中の、MCP1、IL8、KCC、MMP2、MMP3、IL6、MMP1、RANTES、MMP9、IL1B、アポリタンパク質A1、アポリタンパク質E、DCN、CILP、およびCOMPから成る群から選択される2つ以上のOAポリペプチドの発現レベルを測定することを含む、第1のOAバイオマーカー発現プロファイルを得ることと、b)変形性関節症の治療が対象に施された後またはその間に、対象から得られる第2の生物学的試料中の、(a)で選択された2つ以上のOAポリペプチドの発現レベルを測定することを含む、第2のOAバイオマーカー発現プロファイルを得ることと、c)第1のOAバイオマーカー発現プロファイルと第2のOAバイオマーカー発現プロファイルとを比較することと、を含んでもよく、第1のOAバイオマーカー発現レベルにおける2つ以上の選択されたOAポリペプチドのそれぞれの発現レベルが、対象由来の第2の生物学的試料中の選択された2つ以上のOAポリペプチドの発現レベル以下である場合は、対象における変形性関節症治療の治療効果を示す。

#### 【0061】

本明細書で同じ意味で使用される「OA治療」および「変形性関節症治療」という用語は、本明細書で説明されるOAバイオマーカーの2つ以上の任意の組み合わせの対象における発現レベルを低減する、および/または対象におけるOAの臨床的症状を低減または排除する、任意の治療用デバイスまたは薬剤を適用すること、または施すことを指す。

#### 【0062】

特定のOA治療に対する対象の反応が判定されると、OAを伴う対象を治療するための効果的な治療が選択され得る。例えば、OAが特定の医薬品に反応すると判定された場合、その薬剤を含む治療を対象に提供してもよい。しかしながら、OAがその薬剤に反応しないと判定された場合、対象に対して別の治療を選択してもよい。したがって、治療計画を施す前に対象の反応性を判定することは、潜在的に有害であるか、または役に立たない治療を省くことになる。OAを治療するための候補物質である任意の薬剤の投与経路は、薬剤の性質を含む因子に応じて変化する。投与経路は、皮内、経皮、非経口、静脈内、筋肉内、鼻腔内、皮下、経皮、気管内、腹膜内、腫瘍内、経口、灌流、洗浄、または直接注射であってもよい。治療計画は、OAの型、その場所、その病期、ならびに対象の健康状態および年齢に応じて変化させることができ、また、変化することになる。

#### 【0063】

##### D. 試薬およびキット

本開示によるキットは、少なくとも1つのOAマーカーの発現を測定するための1つ以上の試薬を含んでもよく、対照対象に対する、対象の1つ以上のOAの発現の変化は、OAの有無、病期、重篤性、または亜型を示す。OAマーカーは、表1に列記されるものを含む。診断キットは、本明細書で説明される少なくとも1つのOAマーカーに特異的に結合することが可能である、少なくとも1つの試薬を含み、それによって、OAマーカーの1つ以上の発現レベルが検出され得る。

#### 【0064】

各キットは、1つ以上の特異的結合試薬を含んでもよく、各結合試薬は、選択されたO

10

20

30

40

50

A マーカーまたはその断片に特異的である。特異的結合試薬は、それぞれ、タンパク質マーカーに特異的に結合する抗体またはその断片等の、そのような特異的結合が可能な任意の分子、またはcDNAもしくはオリゴヌクレオチド等のポリヌクレオチド配列に対して相補的な核酸プローブを含んでもよい。「特異的結合」は、試薬が、検出可能な産物を産生するようにポリペプチドと反応するが、無関係な配列を有する他のポリペプチドとは検出可能な程度に反応しないことを意味する。OAマーカーの発現の測定で使用される特異的結合試薬は、使用する手法の種類に応じて変えることができ、また、変わることになる。例えば、キットは、QRT-PCRのためのオリゴヌクレオチドプライマーを含んでもよい。含有する核酸プローブは、キットに含まれてもよく、また随意に、ビーズ、チップ、プレート、およびマイクロアレイが挙げられるが、これらに限定されない、固体基質とともに提供される。核酸プローブは、随意に、そのような基質の表面に固定化される。キットは、蛍光レポータープローブを含んでもよい。キットはまた、逆転写酵素、Taqポリメラーゼ、ならびに適切な緩衝液および塩をさらにも含む。

10

20

30

40

50

**【0065】**

キットは、免疫測定法（例えば、ELISA）に使用することができる抗体を含んでもよい。キットは、酵素共役抗体の検出のための基質をさらにも含む。本方法で使用することができる、キットに含むことができる抗体としては、モノクローナルおよびポリクローナル抗体、免疫学的に活性な断片（例えば、Fabまたは(Fab)<sub>2</sub>断片）、抗体重鎖、ヒト化抗体、抗体軽鎖、ならびにキメラ抗体が挙げられる。モノクローナルおよびポリクローナル抗体、断片、ならびにキメラを含む抗体は、当技術分野でよく知られている方法を使用して調製および精製してもよく、または科学的または商業的供給源から得てもよい。

**【0066】**

任意の結合剤を、検出可能な標識で直接的または間接的に標識することができる。好ましくは、検出可能な標識は、測定することができ、かつ相関され、例えば、分析されている試料中に存在するタンパク質マーカーの量に比例する、信号を生成する。検出可能な標識、ポリペプチドを含む分子に標識するための方法、抗体、およびオリゴヌクレオチドは、当技術分野でよく知られている。

**【0067】**

生物学的試料を分析する（例えば、対象のOAの有無、程度、重篤性、型、病期を判定する）のに有用なさらなる試薬を、キットに提供してもよい。手法または手技に応じて、キットは、抽出緩衝液、増幅緩衝液、ハイブリッド形成緩衝液、免疫検出緩衝液、標識緩衝液等の緩衝液、または任意の同等の試薬が挙げられるが、これらに限定されない、1つ以上の付加的な試薬をさらにも含む。試薬は、固体（例えば、凍結乾燥）または液体の形態で供給されてもよく、これらは、随意に、個々の試薬について、バイアル、パッケージ、瓶等の容器を使用して個別の包装で提供してもよい。各成分は、例えば、直接的な使用に適切な量で提供することができ、または再構成することができる還元形態または濃縮形態で提供してもよい。

**【0068】**

診断および治療監視キットは、本開示に従って診断および監視方法を行うのに有用な材料およびツールをさらにも備えることができる。キットは、例えば診断用実験室、臨床的環境、または研究環境で使用することができる。キットは、例えば任意の手続きプロトコル、および異なる過程のステップを行うためのキットで種々の試薬を使用するための説明書を含む、使用説明書をさらにも含む。本発明の1つ以上の方法に従ってキットを使用するための説明書は、対象から得られる生物学的試料を処理するための、および/または試験を行うための説明書、および結果を分析または解釈するための説明書を含んでもよい。説明書は、印刷形態で提供してもよく、またはDVD、CD、ハードディスクドライブ、磁気テープ、およびコンピュータネットワークを通じて通信することが可能なサーバが挙げられるが、これらに限定されない、任意のコンピュータが読み取り可能な媒体に記憶してもよい。

## 【0069】

キットは、1つ以上の対照試料をさらに含んでもよい。キットは、比較テンプレートとして使用するための、本明細書で説明されるOA、OA亜型、および/またはOA進行に対する少なくとも1つの発現プロファイルを含んでもよい。好ましくは、発現プロファイルは、コンピュータが読み取り可能な媒体に記憶したデジタル情報として提供される。

## 【0070】

概して、キットの構成要素は、商品流通および販売の際の取り扱いを容易にするために、都合よく包装されるか、または束ねられる。

## 【0071】

D. 本開示の方法の適応

以下、一例であり、限定するものではない、本開示の実施例を提供する。

## 【実施例】

## 【0072】

実施例1：インビトロで培養した正常な、およびOAの関節軟骨外植片由来の媒体中のタンパク質の評価

関節軟骨は、慢性的なOAに起因する股関節全置換術を受けるイヌ ( $n = 6$ ) の大腿骨骨頭、およびいかなるOA臨床的徴候も伴わず、現在の研究とは無関係な理由で安楽死させたイヌ ( $n = 6$ ) から採取した。各動物の組織から2つの4mmの外植片を作成して、7日間にわたって、500  $\mu$ LのDMEM中でインキュベートした。各個体からの培養媒体は、xMAPプラットフォームに基づいて、MCP1、IL-8、およびKC (Milipore) について、イヌサイトカインおよびケモカイン免疫測定法を使用して分析した。第2のアリコートは、イヌの試料と交差反応することが分かっている、MMP2、MMP3、およびMMP13 (R&D Systems) について、多重ヒトMMP免疫測定法を使用して分析した。次いで、臨床的に関連する亜群を、OA状態に基づいて作成し、そして、各亜群由来の媒体を、プロテオミクス分析のためにプールした。各媒体プールは、アセトン沈殿させて定量化し、還元状態での一次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (1D-PAGE) のための同等のタンパク質負荷を確保した。不十分な容積および正常な培養媒体の非常に低いタンパク質濃度のため、正常な群のゲル分離を続けることができなかった。残りのプールした試料のゲル分離に続いて、各レーンを8つの等しい断片 (総  $n = 24$ ) に切断し、ゲル内トリプシン消化を行った。各消化は、LTQ Orbitrap測定器を使用して、LC-MS/MSによって分析した。結果は、有意性を  $p < 0.05$  に設定した、対応のないt-検定で統計的に評価した。初期分析に続いて、高存在量血液タンパク質を計器から「隠して」、亜臨床OAおよび臨床OAの再分析を行った。これらの2つの群間の比率は、Scaffold2 Viewer Proteomeソフトウェアを使用して決定した。

## 【0073】

亜臨床OA対臨床OA (軽度および重度) : 亜臨床OA群と臨床OA群との間で、57のタンパク質の変化を媒体中で特定したが、多数の高存在量血液タンパク質 (血清アルブミン) および複数の細胞外マトリクス (ECM) タンパク質を含んでいた。亜臨床OA群の軟骨オリゴマーマトリクスタンパク質 (COMP) は、臨床OA群と比較して、極めて高かった ( $p = 0.0033$ ) 。

## 【0074】

亜臨床OA対重篤な臨床OA (図1) : 棒グラフは、高存在量血液タンパク質の除去後に、亜臨床OA群および臨床OA (高) 群から選択したタンパク質の質量分析によって得られた、定量値を示す。高存在量タンパク質をマスキングすると、亜臨床OA群と重篤な臨床OA群との間で、155のタンパク質の変化を媒体中で特定した。軟骨中間層タンパク質 (CILP)、デコリン、およびCOMPはどれも、重篤な臨床OA群において低かった [それぞれ、4.2分の1、4.0分の1、および1.4分の1] (図1A)。アポリタンパク質A1およびEは、重篤な臨床OA群において、それぞれ9.1倍および2.6倍高かった (図1B) 。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 7 5 】

この研究において、アルブミン等の高存在量タンパク質の除去は、低存在量タンパク質の検出を大幅に増加させた。COMPは、現在、関節疾患において最も研究されているバイオマーカーの1つであり、OAの初期段階の間に大幅に増加し、その後、疾患の後期で減少することが分かっている。この研究において、COMPは、垂臨床OA群のイヌでより高く、したがって、この新しいバイオマーカーパネルの初期OAの診断への使用に対するさらなる裏付けを提供する。目的とする別のタンパク質は、アポリポタンパク質A1 (ApoA1)である。ApoA1は、正常なものと比較して、変形性関節症のイヌおよびヒトの滑液、ならびにヒトの関節軟骨でより高いことが分かっているが、発明者らの知る限りでは、発明者らが最初に、イヌの関節軟骨からApoA1を放出することを確認している。これらの結果は、ヒトのOAのトランスレーショナルリサーチにおけるイヌの組織の使用に対する変わらない裏付け、およびバイオマーカーパネルの初期OAの診断および病期分類への使用に対するさらなる裏付けを提供する。

10

## 【 0 0 7 6 】

さらなる研究を、1) 関節炎および非関節炎における膝関節の滑液中のサイトカインおよびケモカイン濃度の変化を描写するために、および2) 受信者動作特性 (ROC) 曲線の分析を用いて、任意のサイトカインおよびケモカインの変動がOAを識別するかどうかを判定するために行った。この研究には、21匹の無傷なメスのハウンドドッグの成犬 (> 20 kg) を含めた。各イヌには、4つの関節鏡手技、すなわち、前十字靭帯の切断 (ACL-T)、半月版の切断 (MR)、大腿骨内側顆の軟骨における2つの全層溝の作成 (Groove)、または障害のない全ての関節のランドマークのプロブ操作 (SHAM)、のうちの1つを受けさせた。非術の反対側の後肢は、各イヌの内部対照として使用した。滑液は、術側の肢および反対側の対照肢の双方から、術側の肢への手術直前に、および手術後12週目に採取した。これらは、xMAPプラットフォームに基づいて、IL-2、IL-4、IL-7、IL-8、IL-15、IL-18、IP-10、INF-、TNF-、MCP1、KC、およびGM-CSFについて、多重イヌサイトカインおよび免疫測定法 (Millipore) を使用して分析した。結果は、有意性を  $p < 0.05$  に設定した、対応のない t-検定または Mann-Whitney Rank Sum 試験で統計的に評価した。画像研究 (超音波および磁気共鳴画像を含む)、関節鏡検査、および組織病理データも収集して、全ての関節組織の病理を完全に特徴付けた。

20

30

## 【 0 0 7 7 】

滑液において、単球走化性タンパク質1 (MCP1) は、0日目 ( $n = 21$ ;  $p < 0.001$ ) および12週目のSHAM関節 ( $n = 5$ ;  $p < 0.009$ ) と比較して、術後12週目のACL-T関節 ( $n = 5$ ) において大幅に増加した。増加したMCP1はまた、0日目と比較して、12週目のGroove群 ( $n = 6$ ) およびMR群 ( $n = 5$ ) でも観察されたが、統計的な有意性は認められなかった。ACL-TおよびMRのイヌにおいて、インターロイキン-8 (IL-8) は、0日目 ( $n = 21$ ; A:  $p = 0.001$ 、M:  $p = 0.018$ )、12週目の非術側の肢 ( $n = 21$ ; A:  $p = 0.002$ 、M:  $p = 0.018$ )、および12週目のSHAM群 ( $n = 3$ ; A:  $p = 0.019$ 、M:  $p = 0.049$ ) と比較して、12週目に大幅に増加した。Groove群 ( $n = 6$ ) において、ケラチン細胞由来の化学誘引物質 (KC) は、0日目 ( $n = 21$ ;  $p = 0.009$ ) と比較して、12週目に大幅に減少した。残りのサイトカインおよびケモカインは、これらの動物の滑液において検出可能なレベルよりも低かった。IL-8、MCP1、およびKCについて個々に、ならびに組み合わせパネルとして、KC受信者動作特性曲線を使用して曲線下面積 (AUC) を計算した (表2)。

40

表2: IL-8、KC、またはMCP1の曲線下面積 (AUC)  $\pm$  SE

【表 2】

	ACL-T 対 SHAM	OA 対 SHAM
IL-8	1	0.86 ± 0.07
MCP1	0.67 ± 0.17	0.59 ± 0.17
KC	0.74 ± 0.17	0.62 ± 0.17
組み合わせ		0.88 ± .11

10

## 【0078】

したがって、OAのイヌモデルにおいて、サイトカインおよびケモカインレベルの変化は、OA誘発後に滑液中で発生する。正常なものとOAとを完全に区別する診断試験のROC曲線は、AUC = 1.0を有する。結果は、単球走化性タンパク質1 (MCP1 / CCL2)、インターロイキン-8 (IL-8 / CXCL8)、およびケラチン細胞由来の化学誘引物質 (KC / CXCL1) を含むバイオマーカーパネルが、正常なイヌからOAのイヌを判別するための強力な区別能力を示すことを実証した。

## 【0079】

実施例 2：自発的に発生するOAを伴うイヌにおける滑液、血清サイトカイン、ケモカイン、およびマトリクスメタロプロテイナーゼ (MMP) の評価

方法：この研究に含まれる各イヌについて、クライアントのインフォームドコンセントを得た。血液および滑液は、10匹の中型種および大型種の成犬から得て、片側の膝関節 (膝) OA (術前OA; n = 10) の外科的介入のためにUMC - VMTHに提出した。これらのイヌは、3 ~ 8歳の範囲であった (平均5.15歳という中央値の方がよいかもかもしれない)。滑液は、通常の無菌関節穿刺を介して、罹患した膝関節から得て、血液は、頸静脈静脈穿刺を介して採取した。臨床膝OAは、有資格の獣医学的整形外科医が各イヌにおいて確認した。OAの放射線学的証拠は、有資格の獣医学的放射線科医が確認した。全てのイヌは、膝の十字靭帯不全手術を受けて、問題なく回復した。8 ~ 12週間後に、術後の再確認のためにイヌを返し、再度血液および滑液を採取して、外科的介入後のマーカーの変化を評価した。対照群は、2 ~ 5歳の範囲 (平均2.9歳) の9匹の中型種および大型種の成犬で構成した。これらのイヌは、いかなる関節外傷の病歴もなく、足が不自由でなく、また、有資格の獣医学的整形外科医によって臨床OAを含まないとみなされた。肩、膝、および股関節の放射線学的評価は、OAがないことを検証した。血液および滑液は、クライアントに都合のよい時間でOAのイヌと同じような様式で採取した。滑液試料は、製造業者の指示を通じて、IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-8、IL-10、IL-15、IL-18、IP-10、INF-、TNF-、MCP1、KC、およびGM-CSFについて、xMAPプラットフォーム (Qiagen, Inc.) に基づいて、多重イヌサイトカインおよびケモカイン免疫測定法 (Millipore Corp. St. Louis, MO, USA) を使用して、二重に分析した。別の25 μLを、MMP1、MMP2、MMP3、MMP9、およびMMP13について、xMAPプラットフォーム (Qiagen, Inc.) に基づいて、多重ヒトマトリクスメタロプロテイナーゼ (MMP) 免疫測定法 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) を使用して、二重に分析した。このアッセイは、発明者らの実験室によって、イヌ起源の試料と交差反応することが以前に示されている。結果を、有意性をp < 0.05に設定した、対応のないt-検定またはMann-Whitney Rank Sum試験 (SigmaStat 3.5; Systat Software, Incorporated, San Jose, CA, USA) で統計的に評価した。

20

30

40

## 【0080】

結果：前述した方法に従って得られた結果を、図2Aおよび図2B、ならびに表3 (下

50

記)に要約する。

表3：正常なイヌおよびOAのイヌの膝から採集した滑液間で発現に差を呈するタンパク質

【表3】

滑液	比率
特定したタンパク質	正常: OA
アグリカンコアタンパク質	2.08
クラステリン	0.3
アルファ-2-マクログロブリン	0.22
アンジオテンシノーゲン	0.41
アポリポタンパク質 B-100	0.13
補体 C3	0.4
補体因子 J	0.43
フィブロネクチン 1 アイソフォーム 1 プレプロタン パク質	0.32
トランスチレチン	3.25
亜鉛-アルファ-2-糖タンパク質	0.21

【0081】

滑液において、IL8およびKCは、正常なイヌと比較して、術前のOAのイヌにおいて、大幅に高く ( $p < 0.001$ ;  $p = 0.01$ )、また、正常なイヌと比較して、術後のOAのイヌにおいて、大幅に高かった ( $p = 0.002$ ;  $p = 0.03$ )。どちらの分析も、術前のOAのイヌと比較して、術後のOAのイヌにおいて低かったが、この減少は、統計的に有意ではなかった。MCP-1は、正常なイヌと比較して、術前のOAのイヌおよび術後のOAのイヌにおいて、大幅に高く ( $p < 0.001$ ;  $P = 0.009$ )、また、術前の値と比較して、術後のMCP-1が大幅に減少した ( $p = 0.01$ )。IL8は、正常なイヌと比較して、術前のOAのイヌにおいて、大幅に高かったが ( $p = 0.02$ )、残りのサイトカインおよびケモカインは、検出限度よりも低かった。MMP2は、術後のOAのイヌにおいて最も高く、これは、正常なイヌよりも大幅に高かった ( $p = 0.010$ )。MMP3は、術前のOAのイヌにおいて最も高く、術後のOAのイヌにおいて最も低かったが、これらの変化に統計的有意性は認められなかった (図2Aおよび図2B)。

【0082】

個々の、および組み合わせパネルとしてのこれらのマーカーの性能は、統計ソフトウェア (SAS Institute) を使用して、ROC曲線分析によって評価した。具体的には、ROC曲線は、JMP7.0.2ソフトウェア (SAS Institute) を使用して生成し、種々のバイオマーカーの組み合わせの区別的能力を判定するために使用した。複数のバイオマーカーパネルは、群と群との完全な区別に至った ( $AUC = 1.0$ ) (表4)。表4において、「Cytomarker」はIL8、MCP1、およびKCであり、「CytおよびMMP」は、IL8、MCP1、KC、MMP2、およびMMP3を指す。

10

20

30

40

50

表 4 : 完全な A U C をもたらす分析物パネル

【表 4】

比較	曲線下面積	
	Cyto マーカー	Cyto および MMP
正常対術前の OA	1	1
正常対術後の OA	1	1
術前の OA 対術後の OA		1
正常対 OA	1	

10

## 【0083】

残りの血清および SF は、1 D - P A G E で分離して、液体クロマトグラフィ質量分析法 ( L C - M S / M S ) によって分析した。イヌだけに限定した、米バイオテクノロジー情報センター ( N C B I ) の非重複データベース分類法に対して、一致を検索した。  $p < 0.05$  および比率  $> 2.0$  によって、群と群との間でかなりの差が表された。

## 【0084】

血清において、MMP 2 および MMP 3 は、正常なイヌにおいて最も高く、術前の OA のイヌにおいて最も低かった。MMP 2 は、術前の OA のイヌと比較して、正常なイヌおよび術後の OA のイヌにおいて大幅に高かったが (  $p = 0.003$  ;  $p = 0.03$  )、正常なイヌと術後の OA のイヌの間には大きな差はなかった。MMP 3 は、術前の OA のイヌと比較して、正常なイヌおよび術後の OA のイヌにおいて大幅に高かったが (  $p = 0.002$  ;  $p = 0.03$  )、OA のイヌの術前と術後との間には大きな差はなかった。IL 8、KC、MCP 1、IL 18、IL 2、IL 7、または GM - C S F について、群と群との間には大きな差は検出されず、残りの分析物は、アッセイの検出限度よりも低かった。

20

## 【0085】

したがって、ROC 曲線分析は、骨液を測定するバイオマーカーパネル MCP 1、IL 8、KC、MMP 2、および MMP 3 が、自発的に発生する臨床 OA を伴うイヌの膝から正常で健康な膝を一貫して区別する能力を有することを初めて実証している。加えて、MCP 1 は、それらの術前の OA の値と比較して、術後の OA のイヌにおいて大幅に低く、IL 8 および KC は、治療後も減少し、これは、この新しいバイオマーカーパネルが、診断および治療監視の両応用において臨床的使用に対して大きな潜在性を有することを示している。3つのサイトカインは、それらを滑液で測定した時に、単独の術前の OA と術後の OA との間で繰り返し判別することが可能であるが (  $AUC = 0.9$  )、パネルへの MMP 2 および MMP 3 の添加は、性能を向上させ (  $AUC = 1.0$  )、これは、このパネルまたは任意の診断バイオマーカーパネルへの MMP の添加が、治療の監視または予後に有用となり得ることを示している。したがって、この結果は、滑液バイオマーカーの使用が、試料を得る際の相対的な容易さ、関連するコスト、これらの評価の関節固有の性質に基づいて、重要な臨床応用を有することを示している。バイオマーカーパネルへの MMP の添加は、特に治療の監視に関してその能力を高める。

30

40

## 【0086】

実施例 3 : ヒト患者の滑液中の OA バイオマーカー

ヒト患者の滑液中の OA バイオマーカーを調査した。1) 正常な患者および膝関節全置換を受けている OA 患者の滑液に放出される特定の MMP および炎症性サイトカインの濃度を特定し、測定すること、および 2) これらの炎症性バイオマーカーの産生を、疾患の放射線学的重篤性と関連させること、を特定の目標とした。全ての手技は、IRB ( IRB # 1042248 ) の承認を得て行った。滑液は、これまでにいかなる膝の損傷もない、膝の疼痛または OA といった臨床症状もない、または手術手技も行っていない、3人の「真の正常な」患者 ( 23、27、28 歳 ) から吸引した。滑液は、OA を伴う 18 人の

50

患者（21の膝）から、膝関節全置換術の直前に吸引した（年齢範囲 = 44 ~ 86歳）。等容積のヒアルロニダーゼ処理済みの滑液試料を、Fluorokine MAPヒトMMP（MMP - 1、- 2、- 9、および013）、およびサイトカイン（インターロイキン1（IL - 1）、IL - 6、IL - 8、腫瘍壊死因子 - （TNF - ）、マクロファージ炎症性タンパク質1（MIP - 1）、MIP - 1、単球走化性タンパク質1（MCP - 1）、RANTES）多重パネル（R&D Systems）を使用して分析した。ログ形質転換を行って、統計分析のためのデータを正規化した。正常な群およびOA群からの結果は、対応のないt - 検定を使用して、またピアソンの積率相関を使用した分析物間で評価した。有意性は、 $p < 0.05$ に設定した。最終的にTKAを受けた各患者には、術前評価中に、立位AP放射線撮影を行った。改良型のKellgren - Lawrenceスコアリングシステムを、内側および外側区画に適用し、次いで、合計した。放射線学的スコアは、有意性を $p < 0.05$ に設定した、Spearmanの順位相関を使用して、ログ形質転換したMMP / サイトカインデータと相関させた。

10

## 【0087】

正常対OA：図3に示されるように、試験を行った12のバイオマーカーのうち、MMP - 1、IL - 6、IL - 8、およびRANTESは、正常な患者と比較して、OA患者の滑液において大幅に高かった。12のうちの3つ、すなわち、MIP - 1、MCP - 1、およびMMP - 2は、有意性を示していた（図3には示さず、 $p = 0.105$ ）。MMP - 9、MMP - 13、IL - 1、TNF - 、およびMIP - 1は、全ての患者に対してこのアッセイの検出限界よりも低かった。

20

## 【0088】

分析物間の相関性：MMP - 1は、MMP - 2（ $r = 0.43$ ）、IL - 6（ $r = 0.52$ ）、IL - 8（ $r = 0.43$ ）、およびRANTES（ $r = 0.58$ ）との適度な正の相関を有した。IL - 6は、IL - 8との強い（ $r = 0.79$ ）正の相関を有し、MMP - 2との適度な（ $r = 0.44$ ）正の相関を有した。MCP - 1は、IL - 6との適度な（ $r = 0.56$ ）正の相関を有し、IL - 8との強い（ $r = 0.70$ ）正の相関を有した。

## 【0089】

放射線学的スコアリングとの相関性：放射線学的スコアリングシステムは、IL - 6（ $r = 0.71$ ）およびIL - 8（ $r = 0.82$ ）との強い正の相関を有し、MMP - 1（ $r = 0.353$ ）およびMCP - 1（ $r = 0.483$ ）との適度な正の相関を有した。

30

## 【0090】

このデータは、初めて、ヒト患者のOAに対する滑液バイオマーカーの指示を提供するものと考えている。重要なことに、真の正常な対照をこの研究に使用したが、これは珍しいことであり、したがって、ヒトの臨床研究における重大な制限因子ではない。この研究の結果は、IL - 6およびIL - 8がOA患者においてかなりの増加を示し、これらの2つの間で強い相関性を示し、また、放射線学的変化の重篤性に対して強い相関性を示したので、これらの2つのサイトカインが、潜在的なバイオマーカーとして特に興味深いことを示唆している。また、放射線学的変化の重篤性とMMP - 1およびMCP - 1のレベルとの間に、顕著な適度に強い相関性も示した。放射線学的重篤性に対する相関性は、密接な臨床的関連性をこれらのタンパク質のOAバイオマーカーとしての調査に対して提供するので、特に重要である。IL - 6、IL - 8、MMP - 1、およびMCP - 1は、市販のアッセイを使用して、滑液の小容積試料中のパネルとして、容易に評価することができる。

40

## 【0091】

実施例1および2の結果とともに、この実施例の結果は、IL - 6、IL - 8、MMP、KCおよびMCP - 1が、イヌおよびヒトの患者の双方における疾患の存在および重篤性、ならびに治療監視の双方に対するバイオマーカーパネルを提供することを示している。

## 【0092】

50

実施例 4 : イヌの関節炎の種々の形態の重篤性を判別し、判定するための、新しい O A バイオマーカーパネルの検証

イヌの関節炎の種々の形態の重篤性を判別および判定するための新しい O A バイオマーカーパネルを検証するために、さらなる研究を用いることができる。最初に、この新しい O A バイオマーカーパネルが、イヌ患者の臨床コホートにおいて O A の存在および重篤性を判定することに対して、高い感受性および特異性 ( $> 0.9$ )、ならびに R O C データ ( $> 0.8$ ) を有することができると仮定する。

【 0 0 9 3 】

臨床イヌ患者の診断および疾患の病期分類のための新しい O A バイオマーカーパネルを検証するために、発明者らの Veterinary Medical Teaching Hospital (V M T H) に提出した時点で、正常な膝関節(膝)、感染性関節炎を罹患した膝関節、発達障害(膝蓋骨脱臼)を罹患した膝関節、および変性障害(十字靭帯疾患)を罹患した膝関節を伴うイヌ(最小で 1 群あたり  $n = 20$ ) から、通常の間節穿刺、膀胱穿刺、および頸静脈穿刺を介して、それぞれ、滑液、尿、および血液を採取する。ミズーリ大学の V M T H は、毎年、これらのコホートにおいて、100 をはるかに超える症例を受け入れている。各症例について、疫学的データを得て、医療記録に記録する。

10

【 0 0 9 4 】

臨床的評価 - 臨床的評価 - 確立されたスコアリングシステム (10) を使用して、視覚的な歩行検査に基づいて、臨床的跛行スコアを判定して、スコアを 2 人の獣医学的整形外科医によって盲検方式で振り分ける。各膝関節の快適な可動域 (C R O M) は、角度計の一方の腕が大腿骨と整合し、もう一方の腕が、接合線の中央にある回転点で脛骨と整合するように、角度計を各肢に配置することによって判定する。各膝関節は、イヌからの明確な抵抗または疼痛の徴候を伴わない許容可能な位置まで屈曲および伸長させる。最大屈曲および伸長角度を記録する。この手技を 3 回繰り返す。C R O M を、各膝関節について、平均伸長角度から平均屈曲角度を減算することによって判定する。

20

【 0 0 9 5 】

放射線学的評価 - イヌを沈静させて、罹患した膝関節の頭尾側および中外側の放射線学的デジタル写真を得る。放射線写真は、主観的なスコアリングシステムを利用して、患者コホートおよび臨床的徴候に関する情報を隠して、1 人の調査者によってスコアリングされる (13、31)。このスコアリング方法については、膝関節の 9 つの領域を評価し、イヌの臨床 O A と関連する二次的な放射線学的変化の重篤性に基づいて、0 ~ 3 のスコアを与える。したがって、各膝関節は、0 ~ 27 の範囲のスコアを受ける。0 ~ 4 にスコアリングされた膝関節は、正常であるとみなされる。5 ~ 9 にスコアリングされた膝関節は、軽度の O A を有するものとみなされる。10 ~ 18 にスコアリングされた膝関節は、中程度の O A を有するものとみなされ、19 ~ 27 にスコアリングされた膝関節は、重度の O A を有するものとみなされる。

30

【 0 0 9 6 】

関節鏡評価 - 上外側および頭内側の入口を使用して、罹患した膝関節の関節鏡の評価を行う。膝蓋骨、大腿、骨および脛骨の全ての関節表面を、関節軟骨損傷の程度に関して検査し、記録する (I C R S システム)。半月板、靭帯、および滑膜の病理学を、性質、程度、および場所に関して関節鏡的に評価し、説明する。正常な膝関節群のイヌは、関節鏡検査を受けない。

40

【 0 0 9 7 】

バイオマーカー - 各試料から少量のアリコート (25  $\mu$  L) を解凍する。尿および滑液については、試料を、14,000 rpm で 10 分間ペレット細片に遠心分離し、上清を取り除く。滑液試料は、ヒアルロニダーゼ (M P B i o m e d i c a l s , L L C , S o l o n , O h i o) で、37 で 60 分間インキュベートして、粘度を低下させる。滑液、尿、および血清の各アリコートは、製造業者の指示に従って、I L - 1、I L - 2、I L - 4、I L - 6、I L - 7、I L - 8、I L - 10、I L - 15、I L - 18、I P - 10、I N F -、T N F -、M C P 1、K C、G M - C S F、C O M P、A p o

50

1、Apo2、MIP-1、MIP-1、MMP1、MMP2、MMP3、MMP9、およびMMP13について、xMAPプラットフォーム(Qiagen Inc., Valencia, CA)に基づいて、多重免疫アッセイを使用して、二重に分析する。簡潔には、試料のそれぞれを、96-ウエルプレートで、モノクローナル抗体を充填した小さい(5.6ミクロン)ポリスチレン微小球と混合する。4で一晚インキュベーションした後に、ポリクローナル二次抗体、ならびにストレプトアビジン-フィコエリトリンを加える。各試料について中央蛍光強度(MFI)を判定し、検量線から濃度(pg/mL)を得る。

#### 【0098】

統計的分析 - ピアソン相関を使用して、疾患の存在および病期を検出するために、各バイオマーカーとバイオマーカーの組み合わせとの間の相関強度を分析する。用いた全ての結果測度に基づいて、感受性、特異性、および受信者動作特性曲線(ROC)データを、各バイオマーカーおよびバイオマーカーの組み合わせについて計算して、種々のコホートについて疾患の存在と、型と、重篤性との間の区別的な可能性を判定する。

10

#### 【0099】

実施例5：ヒトの関節炎の種々の形態の重篤性を判別し、判定するための、新しいOAバイオマーカーパネルの検証

臨床ヒト患者の診断および疾患の病期分類のための新しいOAバイオマーカーパネルを検証するために、さらなる研究を用いることもできる。IRBの承認を受けた患者のインフォームドコンセントにより、The University of Missouri Hospitals and Clinics(UMHC)で、正常な膝、関節リウマチを伴う膝、半月板断裂および1~2級の関節軟骨病理を伴う膝、外傷後OAを伴う膝、および膝関節全置換を受ける末期OAを伴う膝を有する患者(最小で1群あたりn=20)から、通常関節穿刺、フリーキャッチの採尿、および末梢静脈穿刺を介して、それぞれ、滑液、尿、および血液を採取する。UMHCは、毎年、これらのコホートのそれぞれにおいて、200をはるかに超える症例を受け入れている。各症例について、疫学的データを得て、医療記録に記録する。

20

#### 【0100】

臨床的評価 - 全ての当事者に関して膝の検査を行い、調査結果を記録する。36項目の短文式健康調査(SF-36)を使用して、患者の生活の質を評価する(2)。これは、自己申告の多領域アンケートであり、患者の疼痛、強度、およびそれらの疾患に対する二次的な影響を反映する。Western Ontario McMaster Universities Osteoarthritis Index(WOMAC)を介して、機能的結果測度を評価する(34)。

30

#### 【0101】

放射線学的評価 - 放射線学的評価 - 膝の放射線写真を、改良型のKellgren-Lawrenceスコアリングシステム(21)を使用して評価する。内側および外側区画を調査し、変化の重篤性をスコアリングし、次いで、スコアを合計する。

#### 【0102】

関節全体の外科的評価 - 手術(関節切開または関節鏡検査)時に、膝蓋骨、大腿骨および脛骨の全ての関節表面を、関節軟骨損傷の程度に関して検査し、記録する(ICRSシステム)。半月板、靭帯、および滑膜の病理学を、性質、程度、および場所に関して評価し、説明する。正常群の患者は、外科的評価を受けない。

40

#### 【0103】

バイオマーカー - 各試料から少量のアリコート(25μL)を解凍する。尿および滑液については、試料を、14,000rpmで10分間ペレット細片に遠心分離し、上清を取り除く。滑液試料は、ヒアルロニダーゼ(MP Biomedicals, LLC, Solon, Ohio)で、37で60分間インキュベートして、粘度を低下させる。滑液、尿、および血清の各アリコートは、製造業者の指示に従って、IL-1、IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-8、IL-10、IL-15、IL-18、I

50

P-10、INF-、TNF-、MCP1、KC、GM-CSF、COMP、Apo1、Apo2、MIP-1、MIP-1、MMP1、MMP2、MMP3、MMP9、およびMMP13について、xMAPプラットフォーム(Qiagen Inc., Valencia, CA)に基づいて、多重免疫アッセイを使用して、二重に分析する。簡潔には、試料のそれぞれを、96-ウェルプレートで、モノクローナル抗体を充填した小さい(5.6ミクロン)ポリスチレン微小球と混合する。4で一晚インキュベーションした後に、ポリクローナル二次抗体、ならびにストレプトアビジン-フィコエリトリンを加える。各試料について中央蛍光強度(MFI)を判定し、検量線から濃度(pg/mL)を得る。

#### 【0104】

統計的分析-ピアソン相関を使用して、疾患の存在および病期を検出するために、各バイオマーカーとバイオマーカーの組み合わせとの間の相関強度を分析する。用いた全ての結果測度に基づいて、感受性、特異性、および受信者動作特性曲線(ROC)データを、各バイオマーカーおよびバイオマーカーの組み合わせについて計算して、種々のコホートについて疾患の存在と、型と、重篤性との間の区別的な可能性を判定する。

#### 【0105】

本明細書で適切に例証的に説明される本開示は、本明細書では具体的に開示されていない任意の単数または複数の要素、単数または複数の限定の非存在下で実践することができる。したがって、例えば、本明細書の各例において、「含む」、「本質的に成る」、および「成る」という用語のいずれも、他の2つの用語のいずれかと置き換えてもよい。用いられた用語および表現は、限定の用語ではなく説明の用語として使用されており、そのような用語および表現の使用において、図示および説明される特徴またはその一部のあらゆる同等物を排除するいかなる意図もなく、請求される本開示の範囲内で種々の修正が可能であることを認識されたい。したがって、本開示は、好ましい実施形態および随意的な特徴によって具体的に開示されているが、本明細書で開示される概念の修正および変更は、当業者に頼ってもよく、そのような修正および変更が、添付の特許請求の範囲によって定義される本発明の範囲内にあるとみなされることを理解されたい。

#### 【0106】

本明細書において言及される全ての特許および公報は、本開示が属する技術分野の当業者の水準を示す。全ての特許および公報は、それぞれの公報が参照により組み込まれるように具体的かつ個々に示される場合と同程度に、参照により本明細書に組み込まれる。

#### 【0107】

##### 参考文献

1. Andersson MLE, Thorstensson CA, Roos EM, Petersson IF, Heinegaerd D, Saxne T. Serum levels of Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP) increase temporarily after physical exercise in patients with knee osteoarthritis. BMC Musculoskeletal Disorders. 2006;7.
2. Angst F, Aeschlimann A, Steiner W, Stucki G. Responsiveness of the WOMAC osteoarthritis index as compared with the SF-36 in patients with osteoarthritis of the legs undergoing a comprehensive rehabilitation intervention. Annals of the Rheumatic Diseases. 2001;60(9):834-840.
3. Bay-Jensen AC, Andersen TL, Charni-Ben Tabassi N, Kristensen PW, Kjaersgaard-Andersen P, Sandell L, Garner P, Delais

10

20

30

40

50

- se JM. Biochemical markers of type II collagen breakdown and synthesis are positioned at specific sites in human osteoarthritic knee cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2008;16(5):615-623.
4. Blackburn Jr WD, Chivers S, Bernreuter W. Cartilage imaging in osteoarthritis. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. 1996;25(4):273-281.
5. Chan WP, Lang P, Stevens MP, Sack K, Majumdar S, Stoller DW, Basch C, Genant HK. Osteoarthritis of the knee: Comparison of radiography, CT, and MR imaging to assess extent and severity. *American Journal of Roentgenology*. 1991;157(4):799-806. 10
6. Chua Jr SD, Messier SP, Legault C, Lenz ME, Thonar EJMA, Loeser RF. Effect of an exercise and dietary intervention on serum biomarkers in overweight and obese adults with osteoarthritis of the knee. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2008;16(9):1047-1053. 20
7. Cook JL, Fox DB, Malaviya P, Tomlinson JL, Farr J, Kuroki K, Cook CR. Evaluation of small intestinal submucosa grafts for meniscal regeneration in a clinically relevant posterior meniscectomy model in dogs. *The journal of knee surgery*. 2006;19(3):159-167. 30
8. Cook JL, Kuroki K, Kenter K, Marberry K, Brawner T, Geiger T, Jayabalan P, Bal BS. Bipolar and monopolar radiofrequency treatment of osteoarthritic knee articular cartilage: acute and temporal effects on cartilage compressive stiffness, permeability, cell synthesis, and extracellular matrix composition. *The journal of knee surgery*. 2004;17(2):99-108.
9. Cook JL, Tomlinson JL, Arnoczky SP, Fox DB, Reeves Cook C, Kreeger JM. Kinetic study of the replacement of porcine small intestinal submucosa grafts and the regeneration of meniscal-like tissue in large avascular meniscal defects in dogs. *Tissue Engineering*. 2001;7(3):321-334. 40
10. Cook JL, Tomlinson JL, Kreeger JM, Cook CR. Induction of meniscal regeneration in dogs using a novel biomaterial. *American Journal of Sports Medicine*. 1999; 50

27 (5) : 658 - 665 .

11. Cook JL, Williams N, Kreeger JM, Peacock JT, Tomlinson JL. Biocompatibility of three-dimensional chondrocyte grafts in large tibial defects of rabbits. American Journal of Veterinary Research. 2003;64(1):12-20.

12. Dvorak LD, Cook JL, Kreeger JM, Kuroki K, Tomlinson JL. Effects of carprofen and dexamethasone on canine chondrocytes in a three-dimensional culture model of osteoarthritis. American Journal of Veterinary Research. 2002;63(10):1363-1369.

13. Fetting AA, Rand WM, Sato AF, Solano M, McCarthy RJ, Boudrieau RJ. Observer Variability of Tibial Plateau Slope Measurement in 40 Dogs with Cranial Cruciate Ligament-Deficient Stifle Joints. Veterinary Surgery. 2003;32(5):471-478.

14. Fox DB, Cook JL. Synovial fluid markers of osteoarthritis in dogs. Journal of the American Veterinary Medical Association. 2001;219(6):756-761.

15. Garcia-Seco E, Wilson DA, Cook JL, Kuroki K, Kreeger JM, Keegan KG. Measurement of articular cartilage stiffness of the femoropatellar, tarsocrural, and metatarsophalangeal joints in horses and comparison with biochemical data. Veterinary Surgery. 2005;34(6):571-578.

16. Garner BC SA, Cook JL. Change in cytokine and chemokine levels in the synovial fluid, serum and urine of dogs with surgically induced osteoarthritis. 56th Annual Orthopaedic Research Society Meeting. 2010.

17. Garner P, Aronstein WS, Cohen SB, Conaghan PG, Cline GA, Christiansen C, Bery JF, Meyer JM, Bingham Iii CO. Relationships between biochemical markers of bone and cartilage degradation with radiological progression in patients with knee osteoarthritis receiving risdronate: the Knee Osteoarthritis Structural Arthritis randomized clinical trial. Osteoarthritis and Cartilage. 2008;16(6):660-666.

18. Greenberg DD, Stoker A, Kane S, Cockrell M, Cook JL. Biochemical effects of

10

20

30

40

50

- two different hyaluronic acid products in a co-culture model of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2006;14(8):814-822.
19. Henrotin Y, Addison S, Kraus V, Deberg M. Type II collagen markers in osteoarthritis: What do they indicate? *Current Opinion in Rheumatology*. 2007;19(5):444-450.
20. Hou Y, Wang Y, Lust G, Zhu L, Zhang Z, Todhunter RJ. Retrospective analysis for genetic improvement of hip joints of cohort labrador retrievers in the United States: 1970-2007. *PLoS ONE*. 5(2).
21. Kellgren JH, Lawrence JS. Radiological assessment of osteo-arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 1957;16(4):494-502.
22. Kuroki K, Cook JL, Kreeger JM. Mechanisms of action and potential uses of hyaluronan in dogs with osteoarthritis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2002;221(7):944-950.
23. Kuroki K, Cook JL, Kreeger JM, Tomlinson JL. The effects of TIMP-1 and -2 on canine chondrocytes cultured in three-dimensional agarose culture system. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2003;11(9):625-635.
24. Kuroki K, Cook JL, Stoker AM, Turnquist SE, Kreeger JM, Tomlinson JL. Characterizing osteochondrosis in the dog: Potential roles for matrix metalloproteinases and mechanical load in pathogenesis and disease progression. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2005;13(3):225-234.
25. Lawrence RC, Felson DT, Helmick CG, Arnold LM, Choi H, Deyo RA, Gabriel S, Hirsch R, Hochberg MC, Hunder GG, Jordan JM, Katz JN, Kremers HM, Wolfe F. Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part II. *Arthritis and Rheumatism*. 2008;58(1):26-35.
26. Mazieres B, Garnerio P, Gueguen A, Abbal M, Berdah L, Lequesne M, Nguyen M, Sallés JP, Vignon E, Dougados M. Molecular markers of cartilage breakdown and synovitis at baseline as predictors of structural progression of hip osteoarthritis.

- The ECHODIAH\* cohort. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2006; 65(3): 354 - 359.
27. Mazzuca SA, Brandt KD, Eyre DR, Katz BP, Askew J, Lane KA. Urinary levels of type II collagen C-telopeptide crosslink are unrelated to joint space narrowing in patients with knee osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2006; 65(8): 1055 - 1059.
28. Nganvongpanit K, Pothacharoen P, Chaochird P, Klunklin K, Warrit K, Settakorn J, Pattamapaspong N, Luevitonvechkijs S, Arpornchayanon O, Kongtawelert P, Pruksakorn D. Prospective evaluation of serum biomarker levels and cartilage repair by autologous chondrocyte transplantation and subchondral drilling in a canine model. *Arthritis Research and Therapy*. 2009; 11(3).
29. Poole AR. Biochemical/immunochemical biomarkers of osteoarthritis: Utility for prediction of incident or progressive osteoarthritis. *Rheumatic Disease Clinics of North America*. 2003; 29(4): 803 - 818.
30. Ray A, Kuroki K, Cook JL, Bal BS, Kenter K, Aust G, Ray BK. Induction of matrix metalloproteinase 1 gene expression is regulated by inflammation-responsive transcription factor SAF-1 in osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism*. 2003; 48(1): 134 - 145.
31. Roy RG, Wallace LJ, Johnston GR, Wickstrom SL. A retrospective evaluation of stifle osteoarthritis in dogs with bilateral medial patellar luxation and unilateral surgical repair. *Veterinary surgery: the official journal of the American College of Veterinary Surgeons*. 1992; 21(6): 475 - 479.
32. Stoker AM, Cook JL, Kuroki K, Fox DB. Site-specific analysis of gene expression in early osteoarthritis using the Pond-Nuki model in dogs. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*. 2006; 1(1).
33. van Spil WE, DeGroot J, Lems WF, Oostveen JCM, Lafeber FPJG. Serum and urinary biochemical markers for knee and hip-osteoarthritis: A systematic review applying the consensus BIPED criteria. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2010; 18(5): 605

- 612 .

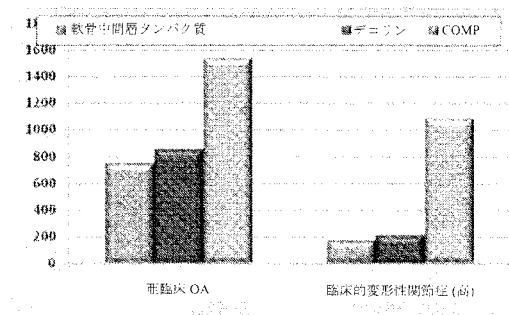
34. Ware Jr JE, Sherbourne CD. The MOS 36-item short-form health survey (SF-36). I. Conceptual framework and item selection. Medical Care. 1992; 30(6):473-483.

35. Wilke VL, Robinson DA, Evans RB, Rothschild MF, Conzemius MG. Estimate of the annual economic impact of treatment of cranial cruciate ligament injury in dogs in the United States. Journal of the American Veterinary Medical Association. 2005; 227(10):1604-1607.

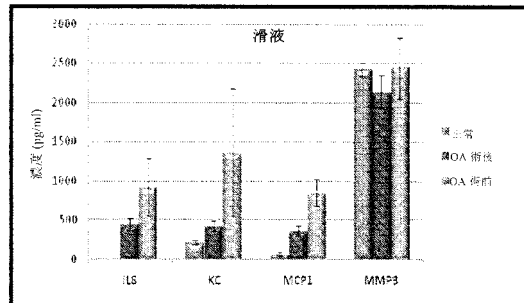
36. Yoshimura M, Sakamoto K, Tsuruta A, Yamamoto T, Ishida K, Yamaguchi H, Nagao I. Evaluation of the effect of glucosamine administration on biomarkers for cartilage and bone metabolism in soccer players. International Journal of Molecular Medicine. 2009; 24(4):487-494.

10

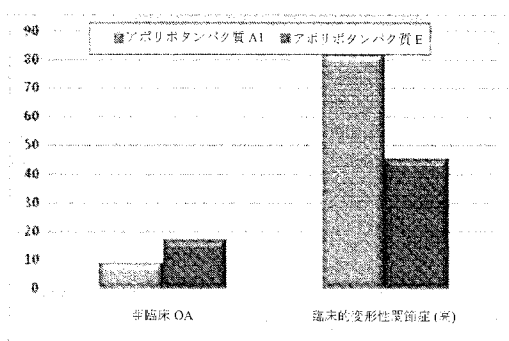
【 図 1 A 】



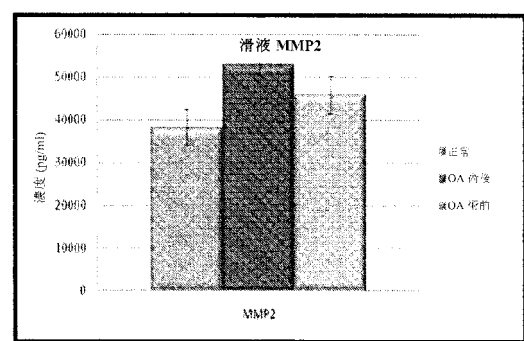
【 図 2 A 】



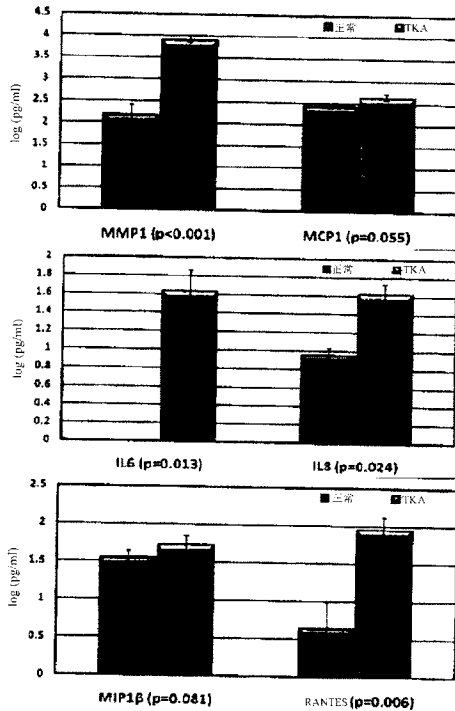
【 図 1 B 】



【 図 2 B 】



【 図 3 】



## 【 手続補正書 】

【 提出日 】平成26年12月19日 (2014.12.19)

## 【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】全文

【 補正方法 】変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

ヒト対象の変形性関節症を監視するための方法であって、前記ヒト対象由来の生物学的流体試料中の、IL6、MMP1、IL8およびRANTES、またはそれらの任意の断片の発現レベルを測定することを含み、前記生物学的流体試料中の前記ポリペプチドまたはそれらの少なくとも5つのアミノ酸を有する断片の発現レベルは、特定の型または病期の変形性関節症を有することが分かっているか、または変形性関節症でないヒトの単数または複数の対象からのタンパク質発現プロファイルと比較した場合に、前記ヒト対象における変形性関節症の有無、程度、重篤性、型、または病期を示す、試料タンパク質発現プロファイルを提供する、方法。

【 請求項 2 】

ヒトの変形性関節症を治療するための治療薬として前記候補物質を特定するための方法であって、a)前記候補物質を、自然発症変形性関節症であると診断されたヒト対象に投与することと、b)前記ヒト対象由来の生物学的流体試料中の、IL6、MMP1、IL8およびRANTESの発現レベルを測定することと、c)前記生物学的流体試料中の前記変形性関節症(OA)ポリペプチドの発現レベルが、前記試験物質を投与していない対照ヒト対象由来の生物学的流体試料中の前記OAポリペプチドの発現レベルより低い場合に、変形性関節症を治療するための候補治療薬として、前記候補物質を選択することと、

を含む、方法。

【請求項 3】

ヒトの変形性関節症の治療の効果を監視するための方法であって、a)前記変形性関節症の治療が前記ヒト対象に施される前に、前記ヒト対象から得られる第1の生物学的流体試料中の、IL6、MMP1、IL8およびRANTESの発現レベルを測定することを含む、第1のOAバイオマーカー発現プロファイルを得ることと、b)前記変形性関節症の治療が前記ヒト対象に施された後またはその間に、前記ヒト対象から得られる第2の生物学的流体試料中の、(a)の前記OAポリペプチドの発現レベルを測定することを含む、第2のOAバイオマーカー発現プロファイルを得ることと、c)前記第1のOAバイオマーカー発現プロファイルと前記第2のOAバイオマーカー発現プロファイルとを比較することと、を含み、前記第1のOAバイオマーカー発現プロファイルにおける前記OAポリペプチドの発現レベルが、前記ヒト対象由来の前記第2の生物学的流体試料中の前記OAポリペプチドの発現レベルより低い場合は、前記ヒト対象における前記変形性関節症治療の治療効果を示す、方法。

【請求項 4】

前記生物学的流体試料は、滑液、全血、血漿、血清、尿、および唾液のうちのいずれか1つを含む、請求項1~3のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 5】

前記生物学的流体試料は、滑液、血清および尿のうちのいずれか1つを含む、請求項1~3のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 6】

MCP1、KC、MMP2、MMP3、MIP1、アポリタンパク質A1、アポリタンパク質E、DCN、CILPおよびCOMP、またはそれらの少なくとも5つのアミノ酸を有する任意の断片、ならびにそれらの任意の組み合わせから成る群から選択される、少なくとも1つのポリペプチドの発現レベルを測定することをさらに含む、請求項1~3のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 7】

ヒト対象由来の生物学的流体試料中の、MCP1、KC、MMP2、MMP3およびMIP1、またはそれらの少なくとも5つのアミノ酸を有する断片の発現レベルを測定することをさらに含む、請求項1~3のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 8】

前記試料タンパク質発現プロファイルを、対照タンパク質発現プロファイルと比較するステップをさらに含む、前記試料タンパク質発現プロファイルと、前記対照タンパク質発現プロファイルとの間の差は、前記ヒト対象における変形性関節症の有無、程度、重篤性、型、または病期を示す、請求項1~3のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 9】

前記ヒト対象は、変形性関節症を有する危険性があるか、または有する疑いがある、請求項1~3のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 10】

前記生物学的流体試料中の前記ポリペプチドの発現レベルは、LUMINEX、ELISA、免疫測定法、質量分析法、高速液体クロマトグラフィ、二次元電気泳動法、qPCR、RT-PCR、核酸マイクロアレイ、インサイトハイブリッド形成、SAGE、ウエスタンブロット法、タンパク質マイクロアレイ、および抗体マイクロアレイから成る群から選択される方法を使用して測定される、請求項1~3のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 11】

前記生物学的流体試料中の前記ポリペプチドの発現レベルは、DNA増幅、DNAメチル化/脱メチル化から成る群から選択される過程、および一塩基多型に起因するDNAの変化を検出することによって測定される、請求項1~3のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 12】

ヒト対象の変形性関節症を診断するための複数の診断試薬を含むキットであって、IL

6、MMP1、IL8およびRANTES、およびそれらの少なくとも5つのアミノ酸を有する断片の1つに特異的に結合しうる抗体を含む、キット。

【請求項13】

ヒト対象の変形性関節症を診断するためのキットであって、前記キットは、複数のOAバイオマーカー検出試薬を含み、該バイオマーカー検出試薬のそれぞれは、IL6、MMP1、IL8およびRANTES、またはそれらの少なくとも5つのアミノ酸を有する断片の1つに特異的に結合することができ、またはOAポリペプチドであるIL6、MMP1、IL8およびRANTESの1つをコードするポリヌクレオチド配列の少なくとも一部に特異的に結合することができ、各試薬の前記特異的結合は、ヒト対象由来の生物学的流体試料中の各OAポリペプチドの発現レベルを示す、キット。

【請求項14】

OAポリペプチドであるIL6、MMP1、IL8およびRANTESをコードするポリヌクレオチド配列の少なくとも一部にそれぞれが特異的に結合しうる複数のバイオマーカー検出試薬を含み、各バイオマーカー検出試薬は、前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列の少なくとも一部に対して相補的な核酸プローブを含む、請求項13に記載のキット。

【請求項15】

前記核酸プローブは、cDNAであるか、またはオリゴヌクレオチドである、請求項14に記載のキット。

【請求項16】

前記少なくとも1つのOAバイオマーカー検出試薬は、基材表面に固定化される、請求項13に記載のキット。

【請求項17】

前記基材表面に配列される少なくとも3つのバイオマーカー検出試薬を含む、請求項16に記載のキット。

## フロントページの続き

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 16/24 (2006.01)	C 0 7 K 16/24	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	C 1 2 M 1/00	A
C 1 2 M 1/34 (2006.01)	C 1 2 M 1/34	F
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 1 2 M 1/34	Z
	C 0 7 K 16/18	

(74)代理人 100162684

弁理士 呉 英燦

(72)発明者 ジェイムズ・エル・クック

アメリカ合衆国 6 5 2 1 1 - 7 3 1 0 ミズーリ州コロンビア、イースト・ローリンズ・ロード 1 2 0 1 番、クリストファー・エス・ボンド・ライフ・サイエンシーズ・センター 3 4 0 エイ

(72)発明者 クリスティ・アール・クック

アメリカ合衆国 6 5 2 1 1 - 7 3 1 0 ミズーリ州コロンビア、イースト・ローリンズ・ロード 1 2 0 1 番、クリストファー・エス・ボンド・ライフ・サイエンシーズ・センター 3 4 0 エイ

(72)発明者 アーロン・エム・ストーカー

アメリカ合衆国 6 5 2 1 1 - 7 3 1 0 ミズーリ州コロンビア、イースト・ローリンズ・ロード 1 2 0 1 番、クリストファー・エス・ボンド・ライフ・サイエンシーズ・センター 3 4 0 エイ

(72)発明者 黒木 圭一

アメリカ合衆国 6 5 2 1 1 - 7 3 1 0 ミズーリ州コロンビア、イースト・ローリンズ・ロード 1 2 0 1 番、クリストファー・エス・ボンド・ライフ・サイエンシーズ・センター 3 4 0 エイ

(72)発明者 ブリジット・コリーン・ガーナー

アメリカ合衆国 6 5 2 1 1 - 7 3 1 0 ミズーリ州コロンビア、イースト・ローリンズ・ロード 1 2 0 1 番、クリストファー・エス・ボンド・ライフ・サイエンシーズ・センター 3 4 0 エイ

(72)発明者 リチャード・エバンズ

アメリカ合衆国 6 5 2 1 1 - 7 3 1 0 ミズーリ州コロンビア、イースト・ローリンズ・ロード 1 2 0 1 番、クリストファー・エス・ボンド・ライフ・サイエンシーズ・センター 3 4 0 エイ

(72)発明者 ブランドン・リー・ローラー

アメリカ合衆国 6 5 2 1 1 - 7 3 1 0 ミズーリ州コロンビア、イースト・ローリンズ・ロード 1 2 0 1 番、クリストファー・エス・ボンド・ライフ・サイエンシーズ・センター 3 4 0 エイ

(72)発明者 ブラカシュ・シダ・ジャヤバラ

アメリカ合衆国 6 5 2 1 1 - 7 3 1 0 ミズーリ州コロンビア、イースト・ローリンズ・ロード 1 2 0 1 番、クリストファー・エス・ボンド・ライフ・サイエンシーズ・センター 3 4 0 エイ

## 【 外国語明細書 】

WO 2011/109738

PCT/US2011/027242

*Atty Docket No.: 051810-10UMC030  
Filed via EFS Web*

**BIOMARKERS OF OSTEOARTHRITIS****Reference to Related Applications**

This application claims the benefit of U.S. provisional application 61/339,511, filed March 5, 2010, the entire contents of which is hereby incorporated by reference.

5 **Field of the Invention**

The present disclosure relates to biomarkers of disease and more particularly to a plurality of biomarkers, related methods and kits for diagnosing, staging, and monitoring osteoarthritis.

**Background**

10 Osteoarthritis (OA) is a debilitating disease that affects human and veterinary, particularly canine patients. Because OA is not typically diagnosed early enough to prevent the clinical progression of disease, development of early OA biomarkers has profound ramifications for diagnostic screening, disease staging, treatment planning and monitoring.

In dogs, certain proteins exhibit differential expression levels in synovial fluid when OA  
15 is experimentally induced. These are monocyte chemoattractant protein 1 (MCP1), interleukin 8 (IL8) and keratinocyte derived chemoattractant (KC), certain Apolipoproteins, and matrix metalloproteinases (MMPs). It is unknown however whether these or other proteins might be useful as potential biomarkers in spontaneously occurring OA in dogs or in other species including humans. Given the high potential value in being able to apply proteomics methods to  
20 diagnosis and prognosis of OA disease, and treatment monitoring and elucidation of OA disease mechanisms, it would be useful to identify new OA biomarkers and biomarker combinations with the ability to conveniently and reliably discriminate between individuals in which OA is present and those in which OA is not present, and determine the type and severity of disease burden.

25 **Summary of the Invention**

In one aspect, the present disclosure provides a method for diagnosing, staging, or monitoring osteoarthritis in a subject comprising: measuring in a biological sample from the subject the level of expression of at least two polypeptides selected from the group consisting of: MCP1, IL8, KC, MMP2, MMP3, MMP9, IL6, MMP1, RANTES, IL1B, Apolipoprotein A1,  
30 Apolipoprotein E, DCN, CILP and COMP, and fragments of any thereof, and any combination

WO 2011/109738

PCT/US2011/027242

*Atty Docket No.: 051810-10UMC030  
Filed via EFS Web*

thereof, wherein the expression levels of the at least two polypeptides or fragments thereof in the biological sample provide a sample protein expression profile indicative of the presence or absence, degree, severity, type or stage of osteoarthritis in the subject. The method may further comprise comparing the sample protein expression profile to a control protein expression profile, 5 wherein a difference between the sample protein expression profile and the control protein expression profile is indicative of the presence or absence, degree, severity, type or stage of osteoarthritis in the subject. In the method, the subject can be at risk of having or is suspected of having osteoarthritis. The level of expression of the at least two polypeptides in the biological sample can be measured by many methods as detailed further herein below, including but not 10 limited to detecting alterations in DNA due to a process selected from the group consisting of DNA amplification, DNA methylation/demethylation, and single nucleotide polymorphisms.

In another aspect, the present disclosure provides an OA biomarker expression profile comprising polypeptide expression level information for two or more polypeptides selected from the group consisting of: MCP1, IL8, KC, MMP2, MMP3, IL6, MMP1, RANTES, MMP9, IL1B, 15 Apolipoprotein A1, Apolipoprotein E, DCN, CILP and COMP and fragments of any thereof, and any combination thereof, obtained from a biological sample from a subject suspected of having osteoarthritis. An OA expression profile may further comprise polypeptide expression level information for at least one biological sample obtained from at least one healthy subject. Biological samples from the subject suspected of having osteoarthritis and the healthy subject or 20 subjects may each comprise a sample of synovial fluid, a sample of whole blood, a sample of blood plasma, a sample of serum, a sample of urine, or a sample of saliva. Preferably, the biological samples are samples of synovial fluid. Multiple biological samples of the same or different type may be obtained from each subject, OA expression level information obtained from each sample, and the results combined in a single OA expression profile.

25 In another aspect, the present disclosure provides a diagnostic reagent for osteoarthritis comprising two or more antibodies against any two or more OA biomarkers or fragments thereof selected from the group consisting of: MCP1, IL8, KC, MMP2, MMP3, IL6, MMP1, RANTES, MMP9, IL1B, Apolipoprotein A1, Apolipoprotein E, DCN, CILP and COMP and fragments of any thereof. The diagnostic reagent may be provided in a kit.

30 In another aspect, the present disclosure provides a kit for diagnosing osteoarthritis in a subject, the kit comprising: at least two OA biomarker detection reagents that each specifically

WO 2011/109738

PCT/US2011/027242

*Att. Docket No.: 051810-10/UMC030  
Filed via EFS Web*

bind to an OA polypeptide selected from the group consisting of MCP1, IL8, KC, MMP2, MMP3, IL6, MMP1, RANTES, MMP9, IL1B, Apolipoprotein A1, Apolipoprotein E, DCN, CILP and COMP and fragments of any thereof, or at least two OA biomarker detection reagents that each specifically bind to at least part of a polynucleotide sequence coding for at least two of  
5 the OA polypeptides, wherein the specific binding of the reagent is indicative of the expression level of at least one OA polypeptide in a biological sample from a subject. In the kit, the at least one reagent that specifically detects expression of at least one biomarker may comprise a nucleic acid probe complementary to at least part of a polynucleotide sequence coding for one of the polypeptides. A nucleic acid probe can be a cDNA or an oligonucleotide. The at least one OA  
10 biomarker detection reagent can be immobilized on a substrate surface. The kit may comprise at least two biomarker detection reagents arranged on the substrate surface. In the kit, at least two biomarker reagents can be arranged on a substrate surface to comprise a microarray.

In another aspect, the present disclosure provides a method for identifying a candidate substance as a therapeutic agent for treating osteoarthritis, comprising: a) administering the  
15 candidate substance to a subject diagnosed with spontaneous osteoarthritis; b) measuring the expression level of two or more OA polypeptides selected from the group consisting of MCP1, IL8, KC, MMP2, MMP3, IL6, MMP1, RANTES, MMP9, IL1B, Apolipoprotein A1, Apolipoprotein E, DCN, CILP and COMP in a biological sample from the subject; and c)  
20 selecting the candidate substance as a candidate therapeutic agent for treating osteoarthritis if the expression level of each of the two or more OA polypeptides in the biological sample is lower than or equal to the expression level for the selected two or more OA polypeptides in a biological sample from a control subject not administered the test substance.

In another aspect, the present disclosure provides a method for monitoring the effect of a treatment of osteoarthritis in a subject comprising: a) obtaining a first OA biomarker expression  
25 profile comprising measuring the expression level of two or more OA polypeptides selected from the group consisting of MCP1, IL8, KC, MMP2, MMP3, IL6, MMP1, RANTES, MMP9, IL1B, Apolipoprotein A1, Apolipoprotein E, DCN, CILP and COMP in a first biological sample obtained from the subject before the osteoarthritis treatment is administered to the subject; b)  
30 obtaining a second OA biomarker expression profile comprising measuring the expression level of the two or more OA polypeptides selected in (a), in a second biological sample obtained from the subject after or while the osteoarthritis treatment is administered to the subject; and c)

WO 2011/109738

PCT/US2011/027242

*Atty Docket No.: 051810-10/UMC030  
Filed via EFS Web*

comparing the first OA biomarker expression profile with the second OA biomarker expression profile, wherein if the expression level of each of the two or more selected OA polypeptides in the first OA biomarker expression profile is lower than or equal to the expression level for the selected two or more OA polypeptides in the second biological sample from the subject is  
5 indicative of a therapeutic effect of the osteoarthritis treatment in the subject.

In any of the above methods, the biological sample or samples may comprise any one of synovial fluid, whole blood, blood plasma, serum, urine, and saliva. In an exemplary method, the biological sample(s) comprise synovial fluid. Preferably, the level of expression of at least four polypeptides is measured. In any of the methods, the subject may be a mammal. Preferably  
10 the subject is a human or a canine. In an exemplary embodiment of any of the above methods, the subject is a canine and the method may comprise measuring in a biological sample from the subject the level of expression of MCP1, IL8, KC, MMP2 and MMP3, or fragments thereof. In another exemplary embodiment of any of the above methods, the subject is a human and the method may comprise measuring in a biological sample from the subject the level of expression  
15 of MCP1, IL6, IL8, KC and MMP1, or fragments thereof. Such a method may further comprise measuring in the biological sample the level of expression of RANTES, or fragments thereof. In any of the above methods, the expression level of each of the at least two polypeptides in the biological sample from the subject is measured using a method selected from the group consisting of: LUMINEX, ELISA, immunoassay, mass spectrometry, high performance liquid  
20 chromatography, two-dimensional electrophoresis, qPCR, RT-PCR, nucleic acid microarray, *in situ* hybridization, SAGE, Western blotting, protein microarray, and antibody microarray.

#### **Brief Description of the Drawings**

**FIG. 1A** is a bar graph showing levels (Mean  $\pm$  SE concentrations (pg/ml)), of Cartilage Intermediate Layer Protein (CILP), Decorin and COMP in dogs with subclinical OA and in dogs with  
25 clinical OA following removal of high abundance proteins.

**FIG. 1B** is a bar graph showing levels (Mean  $\pm$  SE concentrations (pg/ml)), of Apolipoprotein A1 and Apolipoprotein E in dogs with subclinical OA and in dogs with clinical OA following removal of high abundance proteins.

WO 2011/109738

PCT/US2011/027242

*Atty Docket No.: 051810-10/UMC030  
Filed via EFS Web*

**FIG. 2A** is a bar graph showing levels (Mean  $\pm$  SE concentrations (pg/ml)), of IL8, KC, MCP1 and MMP3 in normal dogs and in dogs with spontaneous knee OA before and after surgery.

**FIG. 2B** is a bar graph showing levels (Mean  $\pm$  SE concentrations (pg/ml)), of MMP2 in  
5 normal dogs and in dogs with spontaneous knee OA before and after surgery.

**FIG. 3** is a set of bar graphs summarizing (Mean  $\pm$  SE) MMP/cytokine log (pg/ml) levels in synovial fluid samples from normal patients and from patients with OA immediately preceding a total knee arthroplasty procedure.

### **Detailed Description of the Invention**

10

#### **A. Definitions**

Section headings as used in this section and the entire disclosure herein are not intended to be limiting.

As used herein, the singular forms "a," "an" and "the" include plural referents unless the context clearly dictates otherwise. For the recitation of numeric ranges herein, each intervening  
15 number there between with the same degree of precision is explicitly contemplated. For example, for the range 6-9, the numbers 7 and 8 are contemplated in addition to 6 and 9, and for the range 6.0-7.0, the numbers 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9 and 7.0 are explicitly contemplated.

##### **a) Antibody**

As used herein, the term "antibody" refers to a protein consisting of one or more polypeptides substantially encoded by immunoglobulin genes or fragments of immunoglobulin genes, and encompasses polyclonal antibodies, monoclonal antibodies, and fragments thereof, as well as molecules engineered from immunoglobulin gene sequences. The recognized immunoglobulin genes include the kappa, lambda, alpha, gamma, delta, epsilon and mu constant  
25 region genes, as well as myriad immunoglobulin variable region genes. Light chains are classified as either kappa or lambda. Heavy chains are classified as gamma, mu, alpha, delta, or epsilon, which in turn define the immunoglobulin classes, IgG, IgM, IgA, IgD and IgE, respectively.

WO 2011/109738

PCT/US2011/027242

*Atty Docket No.: 051810-10UMC030  
Filed via EFS Web*

**b) Detectable Label**

As used herein the term “detectable label” refers to any moiety that generates a measurable signal via optical, electrical, or other physical indication of a change of state of a molecule or molecules coupled to the moiety. Such physical indicators encompass spectroscopic, photochemical, biochemical, immunochemical, electromagnetic, radiochemical, and chemical means, such as but not limited to fluorescence, chemifluorescence, chemiluminescence, and the like.

**c) Marker**

The terms “marker ” or “biomarker ” as used interchangeably herein refer to any molecule used as a target for analyzing test samples obtained from subjects, and encompass proteins or polypeptides themselves as well as antibodies against same that may be present in a test sample. Proteins or polypeptides used as a marker include any variants and fragments thereof, and in particular, immunologically detectable fragments. For example, it is appreciated that variants of a marker polypeptide are encoded by the same gene, but can differ in their isoelectric point or molecular weight or both as a result of alternative processing such as alternative splicing and/or differences in post-translational modification (*e.g.*, glycosylation, acylation, and/or phosphorylation). It will further be appreciated that cellular proteins can be damaged as a result of a disease process such as inflammation and may fragment and thus that proteins or polypeptides used as a marker according to the present disclosure include fragments thereof. Additionally it will be recognized that certain markers can be synthesized in an inactive form that is subsequently converted to an active form by proteolysis. Proteins or fragments thereof can also occur as part of a complex. Proteins or polypeptides used as markers according to the present disclosure also include such complexes. The terms “biomarker” and “marker” also encompass nucleic acid molecules comprising a nucleotide sequence that codes for a marker protein, and also polynucleotides that can hybridize under stringent conditions with a part of such nucleic acid molecules. An “OA biomarker” and “OA marker” as used interchangeably herein, refer to a protein, polypeptide, antibodies against same and any fragment thereof, that may be present in a test sample from a subject, and has an expression level that has been found to be indicative of the presence of OA in the subject as described herein, and these terms also encompass any nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence that codes for an OA marker protein.

WO 2011/109738

PCT/US2011/027242

*Atty Docket No.: 051810-10UMC030  
Filed via EFS Web*

**d) Subject**

As used herein, the terms "subject" and "patient" are used interchangeably irrespective of whether the subject has or is currently undergoing any form of treatment. As used herein, the terms "subject" and "subjects" refer to any vertebrate, including, but not limited to, a mammal  
5 (e.g., cow, pig, camel, llama, horse, goat, rabbit, sheep, hamsters, guinea pig, cat, dog, rat, and mouse, a non-human primate (for example, a monkey, such as a cynomolgous monkey, chimpanzee, etc) and a human). Preferably, the subject is a canine or a human.

**e) Test Sample**

As used herein, the term "test sample" generally refers to a biological material being  
10 tested for and/or suspected of containing an analyte of interest. The biological material may be derived from any biological source but preferably is a biological fluid likely to contain the analyte of interest. Examples of biological materials include, but are not limited to, stool, whole blood, serum, plasma, red blood cells, platelets, interstitial fluid, saliva, ocular lens fluid, cerebral spinal fluid, sweat, urine, ascites fluid, mucous, nasal fluid, sputum, synovial fluid,  
15 peritoneal fluid, vaginal fluid, menses, amniotic fluid, semen, soil, etc. Preferably, the test sample is a synovial fluid sample.

The test sample may be used directly as obtained from the biological source or following a pretreatment to modify the character of the sample. For example, such pretreatment may include preparing plasma from blood, diluting viscous fluids and so forth. Methods of  
20 pretreatment may also involve filtration, precipitation, dilution, distillation, mixing, concentration, inactivation of interfering components, the addition of reagents, lysing, etc. If such methods of pretreatment are employed with respect to the test sample, such pretreatment methods are such that the analyte of interest remains in the test sample at a concentration proportional to that in an untreated test sample (e.g., namely, a test sample that is not subjected  
25 to any such pretreatment method(s)).

**f) Osteoarthritis**

As used herein, the term "osteoarthritis" (abbreviated as "OA"), refers to the disease also known as osteoarthrosis and degenerative joint disease, characterized by inflammation and damage to, or loss of cartilage in any joint or joints, and joint pain. Clinical standards for  
30 diagnosing osteoarthritis in subjects including mammalian subjects such as canines and humans are well known and include for example swelling or enlargement of joints, joint tenderness or

WO 2011/109738

PCT/US2011/027242

*Atty Docket No.: 051810-10UMC030  
Filed via EFS Web*

pain, decreased range of motion in joints, visible joint deformities such as bony growths, and crepitus. Symptoms can be identified by clinical observation and history, or imaging including MRI and X-ray. Criteria for diagnosing the presence or absence of OA and severity or degree of OA include but are not limited to the ACR Criteria for knee OA (R. Altman et al., Development  
5 of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis: Classification of osteoarthritis of the knee: Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association. *ARTHRITIS RHEUM.* Aug 29(8):1039-1049(1986)), functional status criteria according to WOMAC (N. Bellamy et al., 1988, Validation study of WOMAC: a health status instrument for measuring clinically important patient relevant outcomes to antirheumatic drug  
10 therapy in patients with osteoarthritis of the hip or knee. *J RHEUMATOL* 15:1833-1840), and radiological standards for evaluating OA disease severity according to the Kellgren and Lawrence method for knee OA (Kellgren, J. H. and J. S. Lawrence, Radiological assessment of osteo-arthrosis. *ANN RHEUM DIS* 16:494-502).

**g) Expression**

15 The term "expression," as used herein, refers to the conversion of the DNA sequence information into messenger RNA (mRNA) or protein. Expression may be monitored by measuring the levels of full-length mRNA, mRNA fragments, full-length protein, or protein fragments. Expression may also be inferred by assessing alterations in the DNA relative to a control state. Alterations in DNA that affect expression include amplification (increased copy  
20 number) of the DNA, changes in the methylation status of the regulatory region of a gene, or single nucleotide polymorphisms in the regulatory region of a gene.

**h) Hybridization**

The term "hybridization," as used herein, refers to the process of annealing or base-pairing via specific hydrogen bonds between two complementary single-stranded nucleic acids.  
25 The "stringency of hybridization" is determined by the conditions of temperature and ionic strength. Nucleic acid hybrid stability is expressed as the melting temperature or  $T_m$ , which is the temperature at which the hybrid is 50% denatured under defined conditions. Equations have been derived to estimate the  $T_m$  of a given hybrid; the equations take into account the G+C content of the nucleic acid, the length of the hybridization probe, etc. (*e.g.*, Sambrook et al, 1989,  
30 chapter 9). To maximize the rate of annealing of the probe with its target, hybridizations are generally carried out in solutions of high ionic strength (6x SSC or 6x SSPE) at a temperature

WO 2011/109738

PCT/US2011/027242

*Atty Docket No.: 051810-10/UMC030  
Filed via EFS Web*

that is about 20-25°C below the  $T_m$ . If the sequences to be hybridized are not identical, then the hybridization temperature is reduced 1-1.5°C for every 1% of mismatch. In general, the washing conditions are as stringent as possible (*i.e.*, low ionic strength at a temperature about 12-20°C below the calculated  $T_m$ ). As an example, highly stringent conditions typically involve

5 hybridizing at 68°C in 6x SSC/5x Denhardt's solution/1.0% SDS and washing in 0.2x SSC/0.1% SDS at 65°C. The optimal hybridization conditions generally differ between hybridizations performed in solution and hybridizations using immobilized nucleic acids. One skilled in the art will appreciate which parameters to manipulate to optimize hybridization.

**i) Nucleic acid molecule**

10 The term "nucleic acid molecule" and "polynucleotide" as used interchangeably herein, refer to sequences of linked nucleotides. The nucleotides may be deoxyribonucleotides or ribonucleotides, they may be standard or non-standard nucleotides; they may be modified or derivatized nucleotides; they may be synthetic analogs. The nucleotides may be linked by phosphodiester bonds or non-hydrolyzable bonds. The nucleic acid may comprise a few

15 nucleotides (*i.e.*, oligonucleotide), or it may comprise many nucleotides (*i.e.*, polynucleotide). The nucleic acid may be single-stranded or double-stranded.

**j) Protein and Protein Fragment**

The terms "protein", "polypeptide", and "peptide" as interchangeably herein, refer to molecules composed of multiple amino acids having sequences of a variety of lengths acid

20 including the full-length native protein or a shorter fragment of the full-length protein. These may be in neutral forms or as salts, either unmodified or modified by processes including glycosylation, side chain oxidation, and phosphorylation, or by the addition of other moieties attached to amino acid side chains, including but not limited to glycosyl units, lipids, and inorganic ions such as phosphates. Modifications may also include chemical conversion of

25 amino acid side chains, such as oxidation of sulfhydryl groups. Molecules with such modifications are encompassed by the terms, provided that the modification(s) do not change its specific properties. It should be understood that the term "protein", and its equivalents as used herein, encompasses protein isoforms encoded by the same gene that may differ in pI, MW, or both. Such isoforms may have different amino acid sequences resulting, for example, from

30 differential processing such as alternative splicing, or post-translational modification(s). The term "protein fragment", as used herein, refers to a polypeptide comprising an amino acid

WO 2011/109738

PCT/US2011/027242

*Atty Docket No.: 051810-10UMC030  
Filed via EFS Web*

sequence of at least 5 amino acid residues (preferably, at least 10 amino acid residues, at least 15 amino acid residues, at least 20 amino acid residues, at least 25 amino acid residues, at least 40 amino acid residues, at least 50 amino acid residues, at least 60 amino acid residues, at least 70 amino acid residues, at least 80 amino acid residues, at least 90 amino acid residues, at least 100 amino acid residues, at least 125 amino acid residues, at least 150 amino acid residues, at least 175 amino acid residues, at least 200 amino acid residues, or at least 250 amino acid residues) of the amino acid sequence of a second polypeptide. The fragment of a marker protein may or may not possess a functional activity of the full-length native protein.

### **B. Osteoarthritis Biomarkers and Arrays**

10 The methods described herein, and diagnostic reagents, kits and related inventions disclosed herein are based in part on the surprising discovery of a plurality of molecular markers, the expression levels of which consistently differentiate between healthy subjects and subjects with OA. The same plurality of markers is able to distinguish between pre- and post-surgical OA subjects, thus also indicating that OA treatment efficacy can be evaluated with these markers. The molecular markers are genes whose altered expression in subject, as measured from a readily obtained biological sample from the subject, is indicative of the presence of OA in the subject. Also provided herein are methods of using the molecular markers to identify a candidate substance as a therapeutic substance for OA treatment, methods for determining OA treatment efficacy in a subject, and OA diagnostic reagents and kits.

20 As used herein, an "OA biomarker" is indicative of OA when the expression level or quantity or structure of the biomarker is found significantly more often in subjects with OA present, or having OA of the same degree, severity, type or stage, than in subjects without OA, or lacking OA of the same degree, severity, type or stage. Significance of an expression level, quantity or structure of the OA marker, as compared to a control, is determined using routine statistical methods by applying accepted confidence levels, e.g. at a minimum of 95%. It will be understood, for example, that cut-off or threshold expression levels for each OA biomarker may set according to many factors including the degree of correlation of expression level with clinical or subclinical OA indicators. For example, an expression level of a biomarker that is indicative of OA can be, for example, that found in at least 60% of patients who have the disease and is found in less than 10% of subjects who do not have the disease. More preferably, an expression level is indicative of OA if found in at least 70%, at least 75%, at least 80%, at least 85%, at least

WO 2011/109738

PCT/US2011/027242

*Atty Docket No.: 051810-10/UMC030  
Filed via EFS Web*

90%, at least 95%, at least 97%, at least 98%, at least 99% or more in subjects who have the disease and is found in less than 20%, less than 10%, less than 8%, less than 5%, less than 2.5%, or less than 1% of subjects who do not have the disease.

An "OA expression profile" is any physical representation of the expression levels of a set of two or more selected OA markers, as determined from one or more biological samples from one or more subjects known to have OA, known to have OA of a particular type (subtype I or subtype II), known to have OA of a particular stage (early or late), or known to be free of OA. A profile for a particular subject or group of subjects may include expression level information from multiple types of biological samples that have been analyzed separately for OA marker expression levels. For example, an OA expression profile for a subject may include OA marker expression level information from a urine sample and a blood sample from the subject, and the results combined in a single profile representing the OA marker expression levels from both samples. A single expression profile may include expression level information from any two or more biological samples selected from synovial fluid, whole blood, blood plasma, serum, urine, and saliva, and a complete profile may include expression level information from any three or four biological samples selected from synovial fluid, urine, saliva, and whole blood, blood plasma or serum.

One skilled in the art will appreciate that the more samples from a subject that are examined, the more reliable the determination of the presence or absence, degree, severity, type or stage of OA in the subject. The profile may be represented in visual graphical form, for example on paper or on a computer display; in a three dimensional form such as an array; and/or stored in a computer-readable medium. An expression profile may correspond to a particular status of OA (e.g., presence or absence of OA disease, severity (clinical or subclinical)), type (subtype I or subtype II OA), degree (degree of cartilage damage) or stage (early OA or late OA), and thus provides a template for comparison to a patient sample. Control profiles can be obtained by analyzing a biological sample from at least one normal/healthy subject, or multiple samples obtained from a group of normal/healthy subjects, or from one or more subjects identified as having comparable OA disease in terms of severity, type or stage. Similarly, comparable profiles can be obtained for age-, sex- and body mass index-matched subjects.

The terms "normal" and "healthy" are used herein interchangeably to refer to a subject or subjects who do not display and have no history of OA symptoms such as joint pain,

WO 2011/109738

PCT/US2011/027242

*Att. Docket No.: 051810-10/UMC030  
Filed via EFS Web*

inflammation, or decrease in function, and have not been diagnosed with OA. A “normal” or “healthy” sample refers to a sample or samples obtained from a normal/healthy subject. A “subject suspected of having OA” is a subject that exhibits one or more symptoms indicative of the presence of OA in the subject, such as but not limited to joint pain, joint swelling, and crepitus, or a subject that may be at risk of, or simply being screened for the presence of OA. Risk factors for developing OA are generally well known and include, for example, age, overweight or obesity, traumatic injury, breed, and/or family history.

An OA biomarker expression profile may for example comprise polypeptide expression level information for two or more polypeptides selected from the group consisting of: MCP1, IL8, KC, MMP2, MMP3, IL6, MMP1, RANTES, MMP9, IL1, Apolipoprotein A1, Apolipoprotein E and fragments of any thereof, and any combination thereof, obtained from a biological sample from a subject suspected of having osteoarthritis. More specifically, by analyzing samples of synovial fluid obtained from healthy patients and from patients with early OA or late OA, it has been discovered that the polypeptides listed in Table 1 discriminate between normal subjects and subjects with OA. Changes in the expression levels of these marker genes in a subject, as measured in a biological sample from subject, thus may be used to indicate the presence or absence, degree, severity, type or stage of OA on the subject. The panel of markers (see Table 1) comprises MCP1, IL8, KC, MMP2, MMP3, IL6, MMP1, RANTES, MMP9, IL1B, Apolipoprotein A1, Apolipoprotein E, DCN, CILP and COMP. These proteins are found to be up-regulated in synovial fluid samples of subjects with early osteoarthritis compared to synovial fluid samples of normal individuals.

For example, altered expression levels of any one or more, preferably two or more of the OA markers described herein may be used to determine the presence or absence, degree, severity, type or stage of OA in one or more subjects. Altered expression of any 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 or more of the molecular markers may be used to determine the presence or absence, degree, severity, type or stage of OA in one or more subjects. One skilled in the art will appreciate that, generally, the more markers examined, the more accurate the determination of the presence or absence, degree, severity, type or stage of OA in the one or more subjects.

WO 2011/109738

PCT/US2011/027242

Atty Docket No.: 051810-10UMC030  
Filed via EFS Web

Table 1: OA Markers

Official Name	Gene Name	GenBank Accession Number
Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1/CCL2)	CCL2	Human G: NM_002982 Human P: NP_002973 Canine G: NM_001003297 Canine P: NP_001003297.1
Interleukin-8	IL8	Human G: NM_00584 Human P: NP_00575 Canine G: NM_001003200 Canine P: NP_001003200
Keratinocyte Chemoattractant/ GRO-alpha (CXCL1)	CXCL1	Human G: NM_001511 Human P: NP_001502 Canine G: Canine P:
Matrix Metalloproteinase-2	MMP2	Human G: NM_004530 Human P: NP_004521 Canine G: XM_535300 Canine P: XP_535300
Matrix Metalloproteinase-3	MMP3	Human G: NM_002422 Human P: NP_002413 Canine G: NM_001002967 Canine P: NP_001002967
Interleukin-6	IL6	Human G: NM_000600 Human P: NP_000591 Canine G: XM_850499 Canine P: XP_855592
Matrix Metalloproteinase-1	MMP1	Human G: NM_002421 Human P: NP_002412 Canine G: XM_546546 Canine P: XP_546546
RANTES, Chemokine (C-C motif) ligand 5 (CCL5)	CCL5	Human G: NM_002985 Human P: NP_002976 Canine G: NM_001003010 Canine P: NP_001003010
Matrix Metalloproteinase-9	MMP9	Human G: NM_004994 Human P: NP_004985 Canine G: NM_001003219 Canine P: NP_001003219
Interleukin-1 $\beta$	IL1B	Human G: NM_000576 Human P: NP_000567 Canine G: NM_001037971 Canine P: NP_001033060

WO 2011/109738

PCT/US2011/027242

Atty Docket No.: 051810-10UMC030  
Filed via EFS Web

Apolipoprotein A1	APOA1	Human G: NM_000039 Human P: NP_000030 Canine G: NM_001197048 Canine P: XP_536564
Apolipoprotein E	APOE	Human G: NM_000041 Human P: NP_000032 Canine G: XM_533644 Canine P: XP_533644
Decorin	DCN	Human G: NM_001920 Human P: NP_001911 Canine G: NM_001003228 Canine P: NP_001003228
Cartilage Intermediate Layer Protein	CILP	Human G: NM_003613 Human P: NP_003604 Canine G: XM_544728 Canine P: XP_544728
Cartilage oligomeric matrix protein	COMP	Human G: NM_000095 Human P: NP_000086 Canine G: XM_860228 Canine P: XP_865321

Measuring the expression of any OA markers or a plurality of the OA markers may be accomplished by a variety of techniques that are well known in the art. Expression may be monitored directly by detecting products of the OA marker genes (*i.e.*, mRNA or protein), or it may be assessed indirectly by detecting alterations in the DNA (*e.g.*, amplification, methylation, etc.) that affect expression of the OA marker genes. RNA, protein, or DNA may be isolated from cells of interest using techniques well known in the art and disclosed in standard molecular biology reference books, such as Ausubel et al., (2003) CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York, NY.

Detection of the RNA products of the OA marker genes may be accomplished by a variety of methods. Some methods are quantitative and allow estimation of the original levels of RNA between the OA sample and control sample, whereas other methods are merely qualitative. Additional information regarding the methods presented below may be found for example in Ausubel et al., (2003) CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York, NY, or Sambrook et al. (1989) MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY. A person skilled in the art will know which parameters may be manipulated to optimize detection of the mRNA of interest.

WO 2011/109738

PCT/US2011/027242

*Atty Docket No.: 051810-10/UMC030  
Filed via EFS Web*

Quantitative real-time PCR (QRT-PCR) may be used to measure the differential expression of any OA marker in an OA sample and control sample. In QRT-PCR, the RNA template is generally reverse transcribed into cDNA, which is then amplified via a PCR reaction. The PCR amplification process is catalyzed by a thermostable DNA polymerase. Non-limiting  
5 examples of suitable thermostable DNA polymerases include Taq DNA polymerase, Pfu DNA polymerase, Tli (also known as Vent) DNA polymerase, Tfl DNA polymerase, and Tth DNA polymerase. The PCR process may comprise three steps (*i.e.*, denaturation, annealing, and extension) or two steps (*i.e.*, denaturation and annealing/extension). The temperature of the annealing or annealing/extension step can and will vary, depending upon the amplification  
10 primers. That is, their nucleotide sequences, melting temperatures, and/or concentrations. The temperature of the annealing or annealing/extending step may range from about 50°C to about 75°C. The amount of PCR product is followed cycle-by-cycle in real time, which allows for determination of the initial concentrations of mRNA. The reaction may be performed in the presence of a dye that binds to double-stranded DNA, such as SYBR Green. The reaction may  
15 also be performed with fluorescent reporter probes, such as TAQMAN® probes (Applied Biosystems, Foster City, CA) that fluoresce when the quencher is removed during the PCR extension cycle. Fluorescence values are recorded during each cycle and represent the amount of product amplified to that point in the amplification reaction. The cycle when the fluorescent signal is first recorded as statistically significant is the threshold cycle (Ct). To minimize errors  
20 and reduce any sample-to-sample variation, QRT-PCR is typically performed using an internal standard. The ideal internal standard is expressed at a constant level among different tissues, and is unaffected by the experimental treatment. Suitable internal standards include, but are not limited to, mRNAs for the housekeeping genes glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH) and beta-actin.

25 Reverse-transcriptase PCR (RT-PCR) may also be used to measure the differential expression of an OA marker. As described above, the RNA template is reverse transcribed into cDNA, which is then amplified via a typical PCR reaction. After a set number of cycles the amplified DNA products are typically separated by gel electrophoresis. Comparison of the relative amount of PCR product amplified in the different cells will reveal whether the molecular  
30 marker is differentially expressed in an OA sample.

WO 2011/109738

PCT/US2011/027242

*Atty Docket No.: 051810-10UMC030*  
*Filed via EFS Web*

Differential expression of an OA marker may also be measured using a nucleic acid microarray. In this method, single-stranded nucleic acids (*e.g.*, cDNAs, oligonucleotides, etc.) are plated, or arrayed, on a solid support. The solid support may be a material such as glass, silica-based, silicon-based, a synthetic polymer, a biological polymer, a copolymer, a metal, or a membrane. The form or shape of the solid support may vary, depending on the application. Suitable examples include, but are not limited to, slides, strips, plates, wells, microparticles, fibers (such as optical fibers), gels, and combinations thereof. The arrayed immobilized sequences are generally hybridized with specific DNA probes from the cells of interest. Fluorescently labeled cDNA probes may be generated through incorporation of fluorescently labeled deoxynucleotides by reverse transcription of RNA extracted from the cells of interest. The probes are hybridized to the immobilized nucleic acids on the microchip under highly stringent conditions. After stringent washing to remove non-specifically bound probes, the chip is scanned by confocal laser microscopy or by another detection method, such as a CCD camera. Quantitation of hybridization of each arrayed element allows for assessment of corresponding mRNA abundance. With dual color fluorescence, separately labeled cDNA probes generated from two sources of RNA are hybridized pairwise to the array. The relative abundance of the transcripts from the two sources corresponding to each specified molecular marker is thus determined simultaneously. Microarray analysis may be performed by commercially available equipment, following manufacturer's protocols, such as by using the Affymetrix GenChip technology, or Incyte's microarray technology.

Differential expression of an OA marker may also be measured using Northern blotting. For this, RNA samples are first separated by size via electrophoresis in an agarose gel under denaturing conditions. The RNA is then transferred to a membrane, crosslinked, and hybridized, under highly stringent conditions, to a labeled DNA probe. After washing to remove the non-specifically bound probe, the hybridized labeled species are detected using techniques well known in the art. The probe may be labeled with a radioactive element, a chemical that fluoresces when exposed to ultraviolet light, a tag that is detected with an antibody, or an enzyme that catalyses the formation of a colored or a fluorescent product. A comparison of the relative amounts of RNA detected in a control sample and a test sample will reveal whether the expression of the OA marker or OA markers is changed in the test sample.

WO 2011/109738

PCT/US2011/027242

*Atty Docket No.: 051810-10UMC030*  
*Filed via EFS Web*

Nuclease protection assays may also be used to monitor the differential expression of an OA marker in an OA sample and control sample. In nuclease protection assays, an antisense probe hybridizes in solution to an RNA sample. The antisense probe may be labeled with an isotope, a fluorophore, an enzyme, or another tag. Following hybridization, nucleases are added  
5 to degrade the single-stranded, unhybridized probe and RNA. An acrylamide gel is used to separate the remaining protected double-stranded fragments, which are then detected using techniques well known in the art. Again, qualitative differences in expression may be detected.

Differential expression of an OA marker may also be measured using *in situ* hybridization. This type of hybridization uses a labeled antisense probe to localize a particular  
10 mRNA in cells of a tissue section. The hybridization and washing steps are generally performed under highly stringent conditions. The probe may be labeled with a fluorophore or a small tag (such as biotin or digoxigenin) that may be detected by another protein or antibody, such that the labeled hybrid may be visualized under a microscope. The transcripts of an OA marker may be localized to the nucleus, the cytoplasm, or the plasma membrane of a cell.

15 Detection of the protein products of the OA markers may be accomplished by several different techniques, many of which are antibody-based. Additional information regarding the methods discussed below may be found in Ausubel et al., (2003) CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York, NY, or Sambrook et al. (1989) MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring  
20 Harbor, NY. One skilled in the art will know which parameters may be manipulated to optimize detection of the protein of interest.

An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) may be used to detect and quantify protein levels. This method comprises preparing the antigen (*i.e.*, protein of interest), coating the wells of a microtiter plate with the antigen, incubating with an antibody that recognizes the  
25 antigen, washing away the unbound antibody, and detecting the antibody-antigen complex. The antibody is generally conjugated to an enzyme, such as horseradish peroxidase or alkaline phosphatase, which generate colorimetric, fluorescent, or chemiluminescent products. An ELISA may also use two antibodies, one of which is specific to the protein of interest and the other of which recognizes the first antibody and is coupled to an enzyme for detection. Further,  
30 instead of coating the well with the antigen, the antibody may be coated on the well. In this case,

WO 2011/109738

PCT/US2011/027242

*Atty Docket No.: 051810-10UMC030  
Filed via EFS Web*

a second antibody conjugated to a detectable compound is added following the addition of the antigen of interest to the coated well.

The Luminex platform (available from Luminex Corp., Austin, Texas) can be used to detect and quantify protein levels using multiplexed assays based on a capture bead system in which microsphere beads are color-coded with dyes into up to one hundred distinct sets. Each color-coded bead set is coated with a specific binding reagent such as an antibody specific to a selected protein marker, allowing the capture and detection of specific protein analytes from a very small amount, e.g a drop of fluid, from a biological sample such as plasma, serum, lysates or synovial fluid. Depending upon which analyte(s) are being screened, at least one or several bead sets may be incubated with the sample in order to capture the analytes. A Luminex compact analyzer uses lasers to excite the internal dyes that identify each microsphere beads, and also any reporter dye captured during the assay. Multiple readings can be made on each bead set. Because of the special dye ratio incorporated each bead, each unique bead population can be analyzed separately after acquisition. An exemplary multiplex immunoassay platform is also the xMAP platform available from Qiagen Inc.

Relative protein levels may also be measured by Western blotting. Western blotting generally comprises preparing protein samples, using gel electrophoresis to separate the denatured proteins by mass, and probing the blot with antibodies specific to the protein of interest. Detection is usually accomplished using two antibodies, the second of which is conjugated to an enzyme for detection or another reporter molecule. Methods used to detect differences in protein levels include colorimetric detection, chemiluminescent detection, fluorescent detection, and radioactive detection.

Measurement of protein levels may also be performed using a protein microarray or an antibody microarray. In these methods, the proteins or antibodies are covalently attached to the surface of the microarray or biochip. The protein of interest is detected by interaction with an antibody, and the antibody/antigen complexes are generally detected via fluorescent tags on the antibody.

Relative protein levels may also be assessed by immunohistochemistry, in which a protein is localized in cells of a tissue section by its interaction with a specific antibody. The antigen/antibody complex may be visualized by a variety of methods. One or two antibodies may be used, as described above for ELISA. The detection antibody may be tagged with a

WO 2011/109738

PCT/US2011/027242

*Atty Docket No.: 051810-10UMC030*  
*Filed via EFS Web*

fluorophore, or it may be conjugated to an enzyme that catalyzes the production of a detectable product. The labeled complex is typically visualized under a microscope.

Changes in the expression of any one or more OA markers may also be assessed by detecting alterations in the DNA encoding each OA marker gene. The DNA may be amplified, which is a process whereby the number of copies of a region of DNA or a gene is increased. Usually, the amount of RNA product is also increased, in proportion to the number of additional copies of DNA. Amplification of DNA may be detected by PCR techniques, which are well known in the art. Amplification of DNA may also be detected by Southern blotting, in which genomic DNA is hybridized to labeled probes under highly stringent conditions, and the labeled hybrids may be detected as described above for Northern blotting.

Changes in the methylation status of DNA may also indicate changes in expression of any OA marker. The regulatory region of a gene may be methylated, which entails the addition of a methyl group to the 5-carbon of cytosine in a CpG dinucleotide. Genes that are transcriptionally silent tend to have methylated or hypermethylated regulatory regions. Thus, demethylation of an OA marker gene may lead to increased expression in tissue or cells, which is detectable from a biological sample obtained from a subject. Likewise, methylation of an OA marker gene may lead to decreased expression in tissue or cells, which is detectable from a biological sample obtained from a subject. Changes in the methylation status of an OA marker gene in a sample or samples from one or more subjects with OA, relative to a sample or samples from one or more control subjects, may be assessed using methylation-sensitive restriction enzymes to digest DNA followed by Southern detection or PCR amplification. Changes in the methylation status of an OA marker may also be detected using a bisulfite reaction based method. For this, sodium bisulfite is used to convert unmethylated cytosines to uracils, and then the methylated cytosines are detected by methylation specific PCR (MSP).

Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the regulatory region of an OA marker gene may also affect its level of expression. For example, an altered nucleotide may affect the binding of a transcription factor such that transcription is up-regulated or down-regulated. The presence of a particular SNP may be detected by DNA sequencing. A SNP may also be detected by selective hybridization to an oligonucleotide probe (i. e., it hybridizes to a sequence containing a particular SNP, but not to sequences without the SNP). A particular SNP may also be detected using a PCR based technique or an oligonucleotide microarray based assay.

WO 2011/109738

PCT/US2011/027242

*Atty Docket No.: 051810-10/UMC030  
Filed via EFS Web*

Expression of any one or more of the OA markers can be measured in an OA sample relative to a control sample. The OA cell may be isolated from a subject known to have OA based on generally accepted clinical indicators, and expression of any OA marker may be examined *in vitro*. The type of biopsy used to isolated cells can and will vary, depending upon  
5 the location and nature of the OA. A sample of cells, tissue, or biological fluid such as synovial fluid, may be removed by needle aspiration biopsy. For this, a fine needle attached to a syringe is inserted through the skin and into the organ, tissue or joint capsule of interest. The needle may be guided to the region of interest using ultrasound or computed tomography (CT) imaging. Once the needle is inserted into the tissue, a vacuum is created with the syringe such that cells or  
10 fluid may be sucked through the needle and collected in the syringe. A sample of cells or tissue may also be removed by incisional or core biopsy. For this, a cone, a cylinder, or a tiny bit of tissue is removed from the region of interest. This type of biopsy is generally guided by CT imaging, ultrasound, or an endoscope.

RNA, protein, or DNA may be extracted from any biological sample containing cells or  
15 tissue, to permit analysis of the expression level or levels of any one or more OA markers using methods described herein above. Biopsied cells or tissue may also be embedded in plastic or paraffin, from which nucleic acids may be isolated. The expression of an OA marker may also be performed in the biopsied cells or tissue *in situ* (e.g., *in situ* hybridization, immunohistochemistry).

20 Expression of an OA marker may also be examined *in vivo* in a subject. A particular mRNA or protein may be labeled with fluorescent dye, a bioluminescent marker, a fluorescent semiconductor nanocrystal, or a short-lived radioisotope, and then the subject may be imaged or scanned using a variety of techniques, depending upon the type of label.

### C. Methods

25 A method for diagnosing, staging, or monitoring osteoarthritis can include, for example, measuring in a biological sample from the subject the level of expression of at least two polypeptides selected from the group consisting of: MCP1, IL8, KC, MMP2, MMP3, MMP9, IL6, MMP1, RANTES, IL1B, Apolipoprotein A1, Apolipoprotein E, DCN, CILP and COMP, and fragments of any thereof, and any combination thereof, wherein the expression levels of the  
30 at least two polypeptides or fragments thereof in the biological sample provide a sample protein expression profile indicative of the presence or absence, degree, severity, type or stage of

WO 2011/109738

PCT/US2011/027242

*Atty Docket No.: 051810-10UMC030  
Filed via EFS Web*

osteoarthritis in the subject. The level of expression of the at least two polypeptides is measured using any of the above protein or nucleic acid quantification techniques, including but not limited to by detecting alterations in DNA due to a process selected from the group consisting of DNA amplification, DNA methylation/demethylation, and single nucleotide polymorphisms.

5 The method may further comprise comparing the sample protein expression profile to a control protein expression profile, wherein a difference between the sample protein expression profile and the control protein expression profile is indicative of the presence or absence, degree, severity, type or stage of osteoarthritis in the subject.

The OA biomarkers described herein are thus used in methods to detect the presence of  
10 OA in a subject, to study populations of subjects as to the occurrence of OA, and to evaluate OA treatment efficacy. Accordingly, the present disclosure provides methods for characterizing test samples obtained from a subject suspected of having OA, for diagnosing OA in a subject, for identifying the subtype of OA, and for assessing the advancement of OA in a subject. In such methods, the biomarkers' expression levels determined for a biological sample obtained from the  
15 subject are compared to the levels in one or more control samples. The control samples may be obtained from a healthy subject (or a group of healthy subjects), from a subject (or group of subjects) with OA, from a subject (or group of subjects) with subtype I OA or subtype II OA, and/or from an subject (or group of subjects) with a specific stage of the disease (*e.g.*, early OA or late OA). As mentioned above, the control expression levels of the biomarkers of interest are  
20 preferably determined from a significant number of individuals, and an average or mean is obtained. In certain preferred embodiments, the expression levels determined for the biological sample under investigation are compared to at least one expression profile for OA, as described above.

The OA biomarkers having expression levels that correlate with the presence or absence  
25 of OA, or OA degree, severity, type or stage, are attractive targets for the identification of new therapeutic agents (*e.g.*, using screens to detect compounds or substances that inhibit or enhance the expression of these biomarkers). Accordingly, the present disclosure also provides methods for the identification of compounds or substances with the potential for effectively treating OA, or slowing OA progression.

30 The OA biomarkers can be readily applied in various screening methods, for example for identifying a candidate substance as a therapeutic agent for treating osteoarthritis. Such a

WO 2011/109738

PCT/US2011/027242

*Atty Docket No.: 051810-10/UMC030  
Filed via EFS Web*

method may comprise, for example, a) administering the candidate substance to a subject diagnosed with spontaneous osteoarthritis; b) measuring the expression level of two or more OA polypeptides selected from the group consisting of MCP1, IL8, KC, MMP2, MMP3, IL6, MMP1, RANTES, MMP9, IL1B, Apolipoprotein A1, Apolipoprotein E, DCN, CILP and COMP  
5 in a biological sample from the subject; and c) selecting the candidate substance as a candidate therapeutic agent for treating osteoarthritis if the expression level of each of the two or more OA polypeptides in the biological sample is lower than or equal to the expression level for the selected two or more OA polypeptides in a biological sample from a control subject not administered the test substance.

10 The methods may further include, for example, contacting a biological system that expresses at least one OA biomarker, with a candidate (test) substance for a time and under conditions sufficient for the candidate substance to change the expression of the at least one OA biomarker, and measuring a first OA biomarker expression level. The method may further comprise maintaining the biological system for the same time and under the same conditions in  
15 the absence of the candidate substance, or after contacting the biological system with a control substance, then measuring a second OA biomarker expression level; and comparing the first and second OA biomarker expression levels, wherein a first OA biomarker expression level that is less than or greater than the second OA biomarker expression level is indicative that the candidate substance is a candidate therapeutic agent for treating OA. Any candidate substance or  
20 a plurality of substances (e.g. a library) can be screened, including but not limited to synthetic and natural substances, and any combination of naturally occurring and synthetic substances. It should be understood that such screening can be performed using multiple OA biomarkers in parallel, which may be facilitated using any of many readily commercially available multiplex assays. The method may further include generating an OA expression profile for the one or  
25 more OA biomarkers being evaluated, which can include for example expression information for each OA biomarker under the test and control conditions.

Such screening methods may be carried out using any type of biological system, such as but not limited to a cell or cells, a biological fluid, a biological tissue, or an animal. Methods can be carried out using any system capable of showing cartilage degeneration in response to the  
30 presence of induced or spontaneously occurring OA, including but not limited to an animal model, a whole body part such as a knee, hip or elbow, or a portion thereof. Assay and screening

WO 2011/109738

PCT/US2011/027242

*Atty Docket No.: 051810-10/UMC030*  
*Filed via EFS Web*

methods can be performed using cells grown in standard tissue culture. Preferably, such cells are mammalian, and more preferably of canine or human origin. Cells may be primary cells, secondary cells, or immortalized cells and can be prepared by techniques well known in the art, including cells that are genetically engineered to contain or knock out a selected gene, or are  
5 available from well known commercial sources such as the American Type Culture Collection, Manassas, Va. Those of routine skill in the art can select a cell type or cell line according to generally recognized principles such as the objective of the assay, type and number of OA marker, drug being tested, and the like. Cells may be cultured using standard cell culture techniques, media and standards, such as growing and maintaining in a sterile environment at  
10 37° C.

Any candidate substance identified by the screening methods can be further tested in assays that allow for the determination of the compound's properties *in vivo*. Suitable animal models of osteoarthritis are well known in the art, including models of spontaneously occurring OA and OA induced by surgical instability or genetic modification. Animal models of naturally  
15 occurring OA occur in knee joints of guinea pigs, mice, and Syrian hamsters. Models of OA induced by surgical instability include medial meniscal tear in guinea pigs and rats, medial or lateral partial meniscectomy in rabbits, and medial partial or total meniscectomy or anterior cruciate transection in dogs. Transgenic mouse models are known. Other animal models of OA that can be used for validating a candidate substance identified as a potential OA therapeutic  
20 agents include many others described in detail in the literature known to those in the art.

Alternatively, the OA biomarkers can be applied in a method for monitoring the effect of a treatment of osteoarthritis in a subject. Such a method may comprise, for example, a) obtaining a first OA biomarker expression profile comprising measuring the expression level of two or more OA polypeptides selected from the group consisting of MCP1, IL8, KC, MMP2,  
25 MMP3, IL6, MMP1, RANTES, MMP9, IL1B, Apolipoprotein A1, Apolipoprotein E, DCN, CILP and COMP in a first biological sample obtained from the subject before the osteoarthritis treatment is administered to the subject; b) obtaining a second OA biomarker expression profile comprising measuring the expression level of the two or more OA polypeptides selected in (a), in a second biological sample obtained from the subject after or while the osteoarthritis treatment is administered to the subject; and c) comparing the first OA biomarker expression profile with the  
30 second OA biomarker expression profile, wherein if the expression level of each of the two or

WO 2011/109738

PCT/US2011/027242

*Atty Docket No.: 051810-10/UMC030  
Filed via EFS Web*

more selected OA polypeptides in the first OA biomarker expression profile is lower than or equal to the expression level for the selected two or more OA polypeptides in the second biological sample from the subject is indicative of a therapeutic effect of the osteoarthritis treatment in the subject.

5           The terms "OA treatment" and "osteoarthritis treatment" as used interchangeably herein, refer to the application of, or administration of any therapeutic device or agent that reduces the expression levels in a subject of any combination of two or more of the OA biomarkers described herein, and/or that reduces or eliminates clinical symptoms of OA in a subject.

          Once the responsiveness of a subject to a particular OA treatment has been determined,  
10 an effective treatment may be selected for treating a subject with OA. If for example the OA is determined to be responsive to a particular pharmaceutical agent, then a treatment comprising the agent may be given to the subject. If, however, the OA is determined to be non-responsive to the agent, then another treatment may be selected for the subject. Thus, determining the responsiveness of a subject before administering a treatment regime would spare subjects from  
15 potentially toxic or unhelpful treatments. Route of administration for any agent that is a candidate substance for treating OA will vary depending upon factors including the nature of the agent. The route of administration may be intradermal, transdermal, parenteral, intravenous, intramuscular, intranasal, subcutaneous, percutaneous, intratracheal, intraperitoneal, intratumoral, oral, perfusion, lavage, or direct injection. The treatment regimen can and will  
20 vary, depending on the type of OA, its location, its stage, and the health and age of the subject.

#### **D. Reagents and Kits**

          Kits according to the present disclosure may comprise one or more reagents for measuring the expression of at least one OA marker, wherein changes in the expression of the one or more OA in a subject relative to a control subject are indicative of the presence or  
25 absence, stage, severity or subtype of OA. OA markers comprise those listed in Table 1. A diagnostic kit may include at least one reagent that is capable of specifically binding to at least one OA marker as described herein, to thereby detect the expression level of one or more of the OA markers.

          Each kit may comprise one or more specific binding reagents, each binding reagent  
30 specific to a selected OA marker or fragment thereof. The specific binding reagents may each comprise any molecule capable of such specific binding, such as an antibody that specifically

WO 2011/109738

PCT/US2011/027242

*Atty Docket No.: 051810-10/UMC030  
Filed via EFS Web*

binds to the protein marker, or fragment thereof, or a nucleic acid probe complementary to a polynucleotide sequence such as a cDNA or oligonucleotide. By "specific binding" is meant the reaction of the reagent with the polypeptide to produce a detectable product, while not reacting detectably with other polypeptides having unrelated sequences. Specific binding reagents to be  
5 used in the measurement of the expression of the OA markers can and will vary, depending upon the type of technique to be used. For example, the kit may comprise oligonucleotide primers for QRT-PCR. Nucleic acid probes contained may be included in a kit and are optionally provided together with a solid substrate, such as but not limited to beads, a chip, a plate, and a microarray. Nucleic acid probes are optionally immobilized on the surface of such a substrate. The kit may  
10 comprise fluorescent reporter probes. The kit may also further comprise a reverse transcriptase, a Taq polymerase, and appropriate buffers and salts.

A kit may comprise antibodies that can be used for an immunoassay, *e.g.* for an ELISA. The kit may further comprise a substrate for detection of enzyme-conjugated antibodies. Antibodies that can be used in the methods and included in kits include monoclonal and  
15 polyclonal antibodies, immunologically active fragments (*e.g.*, Fab or (Fab) 2 fragments), antibody heavy chains, humanized antibodies, antibody light chains, and chimeric antibodies. Antibodies, including monoclonal and polyclonal antibodies, fragments and chimeras, may be prepared and purified using methods well known in the art, or obtained from scientific or commercial sources.

20 Any binding agent can be directly or indirectly labeled with a detectable label. Preferably, the detectable label generates a signal that can be measured and is correlated, *e.g.* proportional to the amount of protein marker present in the sample being analyzed. Detectable labels, methods for labeling molecules including polypeptides, antibodies and oligonucleotides are well-known in the art.

25 Additional reagents useful for analyzing biological samples, for example determining the presence or absence, degree, severity, type or stage of OA in a subject, may be provided in a kit. Depending on the technique or procedure, the kit may further comprise one or more additional reagents such as, but not limited to, buffers such as extraction buffers, amplification buffers, hybridization buffers, immunodetection buffers, labeling buffers, or any equivalent reagent.  
30 Reagents may be supplied in solid (*e.g.*, lyophilized) or liquid form, and these may optionally be provided in individual packages using containers such as vials, packets, bottles and the like, for

WO 2011/109738

PCT/US2011/027242

*Atty Docket No.: 051810-10/UMC030  
Filed via EFS Web*

each individual reagent. Each component can for example be provided in an amount appropriate for direct use or may be provided in a reduced or concentrated form that can be reconstituted.

Diagnostic and treatment monitoring kits can further comprise materials and tools useful for carrying out diagnostic and monitoring methods according to the present disclosure. The kits  
5 can be used for example in diagnostic laboratories, clinical or research settings. The kit may further comprise instructions for use, including for example any procedural protocols and instructions for using the various reagents in the kit for performing different steps of the process. Instructions for using the kit according to one or more methods of the invention may comprise instructions for processing the biological sample obtained from the subject and/or for performing  
10 the test, and instructions for analyzing or interpreting the results. Instructions may be provided in printed form or stored on any computer readable medium including but not limited to DVDs, CDs, hard disk drives, magnetic tape and servers capable of communicating over computer networks.

A kit may further comprise one or more control samples. A kit may comprise at least one  
15 expression profile for OA, OA subtype, and/or OA progression as described herein for use as comparison template. Preferably, the expression profile is provided as digital information stored on a computer-readable medium.

It will be understood that generally, components of a kit are conveniently packaged or bound together for ease of handling in commercial distribution and sale.

#### 20 **D. Adaptations of the Methods of the Present Disclosure**

By way of example, and not of limitation, examples of the present disclosures shall now be given.

##### **Example 1: Assessment of proteins in media from in vitro cultured normal and OA articular cartilage explants**

25 Articular cartilage was harvested from the femoral head of dogs (n=6) undergoing total hip replacement due to chronic OA and from dogs (n=6) with no overt clinical signs of OA and euthanized for reasons unrelated to the present study. Two 4mm explants were created from the tissue of each animal and incubated in 500ul of DMEM with supplemental nutrients for 7 days. Culture media from each individual was analyzed using a canine cytokine and chemokine  
30 immunoassay for MCP1, IL-8 and KC (Millipore) based on the xMAP platform. A second aliquot was analyzed using a multiplex human MMP immunoassay for MMPs 2, 3 and 13 (R&D

WO 2011/109738

PCT/US2011/027242

*Atty Docket No.: 051810-10/UMC030  
Filed via EFS Web*

Systems) that has been shown to cross react with canine samples. Clinically relevant subgroups were then created based on OA-status and the media from each subgroup was pooled for proteomics analysis. Each media pool was acetone precipitated and quantified to ensure equivalent protein loading for one-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (1D-PAGE) with reducing conditions. Gel separation of the normal group could not be pursued due to insufficient volume and very low protein concentration of the normal culture media. Following gel separation of the remaining pooled samples, each lane was cut into 8 equal sections (total n=24) and in-gel trypsin digests were performed. Each digest was analyzed by LC-MS/MS using LTQ Orbitrap instrumentation. Results were statistically evaluated with the unpaired t-test with significance set at  $p < 0.05$ . Following initial analysis, high abundance blood proteins were "hidden" from the instrument and re-analysis of the subclinical OA and clinical OA was performed. Fold changes between these two groups were determined using the Scaffold 2 Viewer Proteome software.

Subclinical OA versus Clinical OA (mild and severe): Alterations of 57 proteins were identified in media between subclinical OA and clinical OA groups, including numerous high abundance blood proteins (serum albumin) and several extracellular matrix (ECM) proteins. Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP) was significantly higher in the subclinical OA group compared to clinical OA groups ( $p=0.0033$ ).

Subclinical OA versus Severe Clinical OA (Figure 1): The bar graphs show quantitative values obtained by Mass-Spec for select proteins from subclinical OA and clinical OA (high) groups following the removal of high abundance blood proteins. Alterations of 155 proteins were identified in media between subclinical OA and severe clinical OA groups once high abundance proteins were masked. Cartilage Intermediate Layer Protein (CILP), Decorin and COMP were all lower in the severe clinical OA group [4.2x, 4.0x and 1.4x respectively] (Fig. 1A). Apolipoproteins A1 and E were 9.1x and 2.6x higher in the severe clinical OA group, respectively (Fig. 1B).

Removal of high abundance proteins, such as albumin, greatly increased the detection of lower abundance proteins in this study. COMP is currently one of the most studied biomarkers in joint disease, and it has been shown to be significantly increased during the initial stages of OA followed by a decline in the later stages of disease. COMP was higher in the dogs in the subclinical OA group in this study, thus providing additional support for the use of this novel

WO 2011/109738

PCT/US2011/027242

*Atty Docket No.: 051810-10/UMC030  
Filed via EFS Web*

biomarker panel for the diagnosis of early OA. Another protein of interest is Apolipoprotein A1 (ApoA1). ApoA1 has been shown to be higher in osteoarthritic canine and human synovial fluid and human articular cartilage compared to normals, but to our knowledge we are the first to confirm the release of ApoA1 from canine articular cartilage. These results provide continued  
5 support for the use of canine tissues in translational research for human OA, and additional support for the use of a biomarker panel for diagnosis and staging of early OA.

Further study was undertaken to: 1) delineate the alterations of cytokine and chemokine concentrations in synovial fluid in osteoarthritic and non-osteoarthritic knee joints and 2) determine if any cytokine and chemokine fluctuations discern OA using receiver operating  
10 characteristic (ROC) curve analysis. Twenty-one adult, intact female, hound dogs >20kg were included in this study. Each dog underwent one of four arthroscopic procedures: transection of the anterior cruciate ligament (ACL-T), transection of the meniscus (MR), creation of two full-thickness grooves in the cartilage of the medial femoral condyle (Groove) or probe manipulation of all joint landmarks without insult (SHAM). The non-operated, contralateral hind limb served  
15 as an internal control for each dog. Synovial fluid was collected immediately prior to surgery on the operated limb, and 12 weeks post-operatively from both the operated and contralateral control limbs. These were analyzed using a multiplex canine cytokine and chemokine immunoassay (Millipore) for IL-2, IL-4, IL-7, IL-8, IL-15, IL-18, IP-10, INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , MCP1, KC, and GM-CSF based on the xMAP platform. Results were statistically evaluated with the  
20 unpaired t-test or the Mann-Whitney Rank Sum test with significance set at  $p < 0.05$ . Imaging studies (including ultrasound and magnetic resonance imaging), arthroscopy and histopathologic data were also collected to fully characterize the pathology of all joint tissues.

In the synovial fluid, monocyte chemoattractant protein 1 (MCP1) was significantly increased in ACL-T joints (n=5) 12 weeks after surgery compared to day 0 (n=21;  $p < 0.001$ ) and  
25 the SHAM joints at 12 weeks (n=5;  $p < 0.009$ ). Increased MCP1 was also observed in the Groove (n=6) and MR groups (n=5) at 12 weeks compared to day 0, but statistical significance was not reached. Interleukin-8 (IL-8) was significantly increased at 12 weeks in the ACL-T and MR dogs compared to day 0 (n=21; A:  $p = 0.001$ , M:  $p = 0.018$ ), the non-operated limb at 12 weeks (n=21; A:  $p = 0.002$ , M:  $p = 0.018$ ), and the SHAM group (n=3; A:  $p = 0.019$ , M:  $p = 0.049$ ) at 12 weeks.  
30 Keratinocyte-derived chemoattractant (KC) was significantly decreased in the Groove group at 12 weeks (n=6) compared to day 0 (n=21;  $p = 0.009$ ). The remaining cytokines and chemokines

WO 2011/109738

PCT/US2011/027242

*Atty Docket No.: 051810-10/UMC030  
Filed via EFS Web*

were below detectable levels in the synovial fluid of these animals. Using receiver operating characteristic curves, areas under the curve (AUC) were calculated for IL-8, MCP1 and KC individually and as a combined panel (Table 2).

**Table 2:** Areas under the curve (AUC)  $\pm$  SE for IL-8, KC or MCP1

	ACL-T vs SHAM	OA vs SHAM
IL-8	1	0.86 $\pm$ 0.07
MCP1	0.67 $\pm$ 0.17	0.59 $\pm$ 0.17
KC	0.74 $\pm$ 0.17	0.62 $\pm$ 0.17
Combined		0.88 $\pm$ .11

5

Thus in canine models of OA, changes in cytokine and chemokine levels occur within the synovial fluid after OA induction. ROC curves for diagnostic tests with perfect discrimination between normal and OA have an AUC=1.0. The results demonstrated that a biomarker panel including monocyte chemoattractant protein 1 (MCP1/CCL2), interleukin-8 (IL-8/CXCL8) and keratinocyte-derived chemoattractant (KC/CXCL1) demonstrates strong discriminatory ability for distinguishing OA dogs from normal dogs.

**Example 2: Assessment of synovial fluid and serum cytokines, chemokines and matrix metalloproteinases (MMPs) in dogs with spontaneously occurring OA**

15

*Methods:* Informed client consent was obtained for each dog included in this study.

Blood and synovial fluid were obtained from 10 adult medium and large breed dogs presenting to the UMC-VMTH for surgical intervention of unilateral stifle (knee) OA (Pre-Op OA; n=10). These dogs ranged from 3-8 years old (mean 5.15 years median might be better). Synovial fluid was obtained from the affected stifle via routine aseptic arthrocentesis, and blood was collected via jugular venipuncture. Clinical knee OA was confirmed in each dog by a board-certified veterinary orthopaedic surgeon. Radiographic evidence of OA was confirmed by a board-certified veterinary radiologist. All dogs underwent knee surgery for cruciate ligament deficiency and recovered uneventfully. Eight to 12 weeks later, the dogs returned for a post-operative re-check, and blood and synovial fluid were collected again to assess changes in markers after surgical intervention. The control group was comprised of nine medium and large breed adult dogs ranging from 2-5 years old (mean 2.9 years). These dogs had no clinical history

20

25

WO 2011/109738

PCT/US2011/027242

*Atty Docket No.: 051810-10/UMC030  
Filed via EFS Web*

of joint trauma, were not lame and were deemed to be free of clinical OA by a board certified veterinary orthopaedic surgeon. Radiographic evaluation of the shoulders, knees and hips verified the absence of OA. Blood and synovial fluid were collected in a similar manner to the OA dogs at a time convenient to the clients. The synovial fluid samples were analyzed in duplicate using a multiplex canine cytokine and chemokine immunoassay (Millipore Corp. St. Louis, MO, USA) based on the xMAP platform (Qiagen Inc.) for IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-15, IL-18, IP-10, INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , MCP1, KC, and GM-CSF per manufacturers' instructions. Another 25 $\mu$ ls was analyzed in duplicate using a multiplex human matrix metalloproteinase (MMP) immunoassay (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) based on the xMAP platform (Qiagen, Inc) for MMP1, MMP2, MMP3, MMP9 and MMP13. This assay has been previously shown by our laboratory to cross-react with samples of canine origin. Results were statistically evaluated with an unpaired t-test or Mann-Whitney Rank Sum test (SigmaStat 3.5; Systat Software, Incorporated, San Jose, CA, USA) with significance set at  $p < 0.05$ .

*Results:* Results obtained following the methods described above are summarized in Figures 2A and 2B and Table 3 (below).

**Table 3:** Proteins exhibiting differences in expression between synovial fluid collected from normal and OA canine knees

SYNOVIAL FLUID	FOLD CHANGE
Identified Protein	Normal: OA
Aggrecan core protein	2.08
Clusterin	0.3
Alpha-2-macroglobulin	0.22
Angiotensinogen	0.41
Apolipoprotein B-100	0.13
Complement C3	0.4
Complement factor J	0.43
Fibronectin I isoform I preproprotein	0.32
Transthyretin	3.25
Zinc-alpha-2-glycoprotein	0.21

In synovial fluid, IL8 and KC were significantly higher in the Pre-Op OA dogs compared to normal dogs ( $p < 0.001$ ;  $p = 0.01$ ) and in the Post-Op OA dogs compared to normal dogs

WO 2011/109738

PCT/US2011/027242

*Atty Docket No.: 051810-10UMC030*  
*Filed via EFS Web*

- ( $p=0.002$ ;  $p=0.03$ ). Both analytes were lower in Post-Op OA dogs compared to Pre-Op OA dogs, but this decrease was not statistically significant. MCP-1 was significantly higher in the Pre-Op OA dogs and Post-Op OA dogs compared to normal dogs ( $p<0.001$ ;  $P=0.009$ ), and there was a significant decrease in MCP-1 following surgery compared to pre-surgery values ( $p=0.01$ ).
- 5 IL8 was significantly higher in the Pre-Op OA dogs compared to normal dogs ( $p=0.02$ ), but the remaining cytokines and chemokines were below the limit of detection. MMP2 was highest in the Post-Op OA dogs, and this was significantly higher than the normal dogs ( $p=0.010$ ). MMP3 was highest in the Pre-Op OA dogs and lowest in the Post-Op OA dogs, but these changes did not reach statistical significance. (Figs. 2A and 2B).
- 10 The performances of these markers as individuals and as a combined panel were evaluated through ROC curve analysis using statistical software (SAS Institute). Specifically, ROC curves were generated using JMP 7.0.2 software (SAS Institute) and used to determine the discriminatory abilities of the various biomarker combinations. Several biomarker panels led to perfect discrimination (AUC=1.0) between groups (Table 4). In Table 4, "Cyto Markers" are
- 15 IL8, MCP1 and KC, and "Cyto and MMP" refers to IL8, MCP1, KC, MMP2 and MMP3.

**Table 4:** Analyte panels that lead to perfect AUCs

Comparison	Area Under the Curves	
	Cyto markers	Cyto and MMP
Normal vs Pre-surgical OA	1	1
Normal vs Post-surgical OA	1	1
Pre-surgical vs Post-surgical OA		1
Normal vs OA	1	

- The remaining serum and SF were separated with 1D-PAGE and analyzed by liquid
- 20 chromatography mass spectrometry (LC-MS/MS). Matches were searched against the National Center for Biotechnology Information (NCBI) non-redundant database taxonomy-limited to dogs only. Significant differences between groups were represented by a  $p<0.05$  and a fold change  $>2.0$ .

- In serum, MMP2 and MMP3 were highest in the normal dogs and lowest in the Pre-Op
- 25 OA dogs. MMP2 was significantly higher in normal dogs and Post-Op OA dogs compared to

WO 2011/109738

PCT/US2011/027242

*Atty Docket No.: 051810-10/UMC030  
Filed via EFS Web*

Pre-Op OA dogs ( $p=0.003$ ;  $p=0.03$ ), but there was not a significant difference between normal and Post-Op OA dogs. MMP3 was significantly higher in normal dogs and Post-Op OA dogs compared to Pre-Op OA dogs ( $p=0.002$ ,  $p=0.03$ ), but there was not a significant difference between Pre-Op and Post-Op OA dogs. Significant differences were not detected between  
5 groups for IL8, KC, MCP1, IL18, IL2, IL7 or GMCSF, and the remaining analytes were below the limit of detection for the assay.

Thus, ROC curve analysis demonstrates for the first time that a biomarker panel measuring synovial fluid MCP1, IL8, KC, MMP2 and MMP3 has the ability to consistently differentiate normal healthy knees from knees in dogs with spontaneously occurring OA.  
10 In addition, MCP1 was significantly lower in the Post-Op OA dogs compared to their Pre-Op OA values, and IL8 and KC declined after treatment as well, indicating that this novel biomarker panel has great potential for clinical use in both diagnostic and treatment monitoring applications. The three cytokines were able to repeatedly distinguish between Pre-Op OA and Post-Op OA individuals ( $AUC=0.9$ ) when they were measured in the synovial fluid, but the  
15 addition of MMP2 and MMP3 to the panel improved the performance ( $AUC=1.0$ ), indicating that the addition of MMPs to this or any diagnostic biomarker panel would be useful for treatment monitoring or prognosis. Thus the results show that use of synovial fluid biomarkers has important clinical application based on the relative ease in obtaining samples, the associated costs, and the joint specific nature of these evaluations. Addition of MMPs to the biomarker  
20 panel enhances its capabilities, especially with respect to treatment monitoring.

### **Example 3: OA biomarkers in synovial fluid of human patients**

OA biomarkers in the synovial fluid of human patients were investigated. Specific goals were 1) to identify and measure the concentration of specific MMPs and inflammatory cytokines released to the synovial fluid of normal and OA patients undergoing total knee arthroplasty; and  
25 2) to correlate the production of these inflammatory biomarkers with radiographic severity of disease. All procedures were performed with IRB (IRB#1042248) approval. Synovial fluid was aspirated from three "true normal" patients (23, 27, 28 y/o) with no previous knee injury, clinical symptoms of knee pain or OA, or operative procedures performed. Synovial fluid was aspirated from 18 patients (21 knees) with OA immediately preceding their total knee arthroplasty  
30 procedure (age range = 44-86 y/o). Equal volumes of hyaluronidase treated synovial fluid samples were analyzed using the Fluorokine MAP human MMP (MMP-1, -2, -9, and 013) and

WO 2011/109738

PCT/US2011/027242

*Atty Docket No.: 051810-10/UMC030  
Filed via EFS Web*

cytokine (Interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6, IL-8, Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ), MIP-1 $\beta$ , Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), RANTES) multiplex panels (R&D Systems). A log transformation was performed to normalize the data for statistical analysis. Results from the normal and OA groups were evaluated using an unpaired t-test and between analytes using a Pearson product moment correlation. Significance was set at  $p < 0.05$ . Each patient eventually undergoing TKA had a standing AP radiograph performed during the pre-operative evaluation. The Modified Kellgren and Lawrence scoring system was applied to both the medial and lateral compartments and then totaled. The radiographic scores were correlated with the log transformed MMP/cytokine data using Spearman rank order correlation with significance set at  $p < 0.05$ .

*Normal vs. OA:* Of the 12 biomarkers tested, MMP-1, IL-6, IL-8, and RANTES were significantly higher in the synovial fluid of OA patients compared to normal patients, as shown in Figure 3. Three of the twelve were trending toward significance: MIP-1 $\beta$ , MCP-1, and MMP-2 (not represented in Fig. 3,  $p = 0.105$ ). MMP-9, MMP-13, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and MIP-1 $\alpha$  were below the detection limits of this assay for all patients.

*Correlation between Analytes:* MMP-1 had a moderate positive correlation with MMP-2 ( $r = 0.43$ ), IL-6 ( $r = 0.52$ ), IL-8 ( $r = 0.43$ ), and RANTES (0.58). IL-6 had a strong ( $r = 0.79$ ) positive correlation with IL-8 and a moderate ( $r = 0.44$ ) positive correlation with MMP-2. MCP-1 had a moderate ( $r = 0.56$ ) positive correlation with IL-6 and strong ( $r = 0.70$ ) positive correlation with IL-8.

*Correlation with Radiographic Scoring:* The radiographic scoring system had strong positive correlations with IL-6 ( $r = 0.71$ ) and IL-8 ( $r = 0.82$ ), and moderate positive correlations with MMP-1 ( $r = 0.353$ ) and MCP-1 ( $r = 0.483$ ).

It is believed this data provides for the first time an indication of synovial fluid biomarkers for OA in human patients. Importantly, true normal controls were used for this study, which is not often the case and thus a major limiting factor in human clinical studies. The results from this study suggest that IL-6 and IL-8 are particularly intriguing as potential biomarkers as a significant increase in these two cytokines was shown in OA patients, and also a strong correlation between the two, and strong correlations to severity of radiographic change. Also shown was a moderately strong correlation noted between severity of radiographic change and MMP-1 and MCP-1 levels. The correlations to radiographic severity are particularly important as

WO 2011/109738

PCT/US2011/027242

*Atty Docket No.: 051810-10/UMC030  
Filed via EFS Web*

it provides an immediate clinical relevance to the investigation of these proteins as OA biomarkers. IL-6, IL-8, MMP-1, and MCP-1 can readily be assessed as a panel in small volume samples of synovial fluid using a commercially available assay.

The results from this Example together with the results of Examples 1 and 2 show that  
5 IL-6, IL-8, MMPs, KC, and MCP-1 provide a biomarker panel for both presence and severity of disease and treatment monitoring in both canine and human patients.

**Example 4: Validation of novel OA biomarker panels for distinguishing and determining the severity of various forms of arthritis in dogs**

Further study can be used to validate the novel OA biomarker panels for distinguishing  
10 and determining the severity of various forms of arthritis in dogs. A starting hypothesis is that the novel OA biomarker panel can have high sensitivity and specificity (>0.9) and ROC data (>0.8) for determining the presence and severity of OA in clinical cohorts of canine patients.

To validate a novel OA biomarker panel for diagnosis and disease staging in clinical canine patients, synovial fluid, urine, and blood is collected via routine arthrocentesis,  
15 cystocentesis, and jugular venipuncture, respectively, from dogs (n = 20 per group minimum) with normal stifles (knees), stifles affected by infectious arthritis, stifles affected by a developmental disorder (patellar luxation), and stifles affected by a degenerative disorder (cruciate ligament disease) upon presentation to our Veterinary Medical Teaching Hospital (VMTH). The University of Missouri's VMTH admits well over 100 cases in each of these  
20 cohorts each year. Epidemiologic data is obtained and recorded in the medical record for each case.

*Clinical Assessments* - Clinical lameness scores are determined and scores assigned in blinded fashion by two veterinary orthopaedic surgeons based on visual examination of gait using an established scoring system (10). Comfortable range of motion (CROM) in each stifle is  
25 determined by placing a goniometer on each limb such that one arm of the goniometer is aligned with the femur and one arm is aligned with the tibia with the rotation point centered at the joint line. Each stifle is flexed and extended to the point allowable without definitive resistance or signs of pain from the dog. The maximal flexion and extension angles is recorded. This procedure is repeated 3 times. The CROM is determined by subtracting the mean flexion angle  
30 from the mean extension angle for each stifle.

WO 2011/109738

PCT/US2011/027242

*Atty Docket No.: 051810-10/UMC030  
Filed via EFS Web*

*Radiographic Assessment* - The dogs are sedated to obtain craniocaudal and mediolateral digital radiographic views of affected stifles. The radiographs are scored by one investigator blinded to information regarding patient cohort and clinical signs, utilizing a subjective scoring system. (13, 31). For this scoring methodology, nine regions of the stifle are evaluated and  
5 given a score from 0-3 based on severity of secondary radiographic changes associated with clinical OA in dogs. Therefore, each stifle receives a score ranging from 0-27. Stifles scored from 0 to 4 are considered normal. Stifles scored from 5 to 9 are considered to have mild OA. Stifles scored from 10-18 are considered to have moderate OA, and stifles scored 19-27 are considered to have severe OA.

10 *Arthroscopic Assessment* - Arthroscopic evaluation of affected stifles are performed using craniolateral and craniomedial portals. All articular surfaces of the patella, femur and tibia are examined and scored with respect to degree of articular cartilage damage (ICRS system). Meniscal, ligamentous, and synovial pathology are arthroscopically assessed and described in terms of nature, extent, and location. Dogs in the normal stifle group do not undergo  
15 arthroscopy.

*Biomarkers* - A small aliquot (25 $\mu$ l) from each sample is thawed. For urine and synovial fluid, samples are centrifuged at 14,000 rpm for 10 minutes to pellet debris, and the supernatant removed. Synovial fluid samples are incubated with hyaluronidase (MP Biomedicals, LLC, Solon, Ohio) at 37°C for 60 minutes to decrease viscosity. Each aliquot of synovial fluid, urine,  
20 and serum is analyzed in duplicate using multiplex immunoassays based on the xMAP platform (Qiagen Inc., Valencia, CA) for IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-15, IL-18, IP-10, INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , MCP1, KC, GM-CSF, COMP, Apo1, Apo2, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MMP1, MMP2, MMP3, MMP9 and MMP13 according to the manufacturers' directions. Briefly, each of the samples is admixed with monoclonal antibody-charged, small (5.6 micron), polystyrene  
25 microspheres in a 96-well plate. Following an overnight incubation at 4°C, a polyclonal secondary antibody is added, as well as streptavidin-phycoerythrin. The median fluorescence intensity (MFI) is determined for each sample, and concentrations (pg/ml) obtained from a standard curve.

*Statistical Analyses* - Strength of correlations between each biomarker and combinations  
30 of biomarkers to detect presence and stage of disease is analyzed using a Pearson's Correlation. Sensitivity, specificity, and receiver operating characteristic curve (ROC) data is calculated for

WO 2011/109738

PCT/US2011/027242

*Atty Docket No.: 051810-10/UMC030  
Filed via EFS Web*

each biomarker and combinations of biomarkers to determine discriminatory potential between presence, type, and severity of disease for the various cohorts based on all outcome measures employed.

5 **Example 5: Validation of novel OA biomarker panels for distinguishing and determining the severity of various forms of arthritis in humans**

Further study can also be used to validate the novel OA biomarker panels for diagnosis and disease staging in clinical human patients. With informed patient consent under IRB approval, synovial fluid, urine, and blood is collected via routine arthrocentesis, free catch urine collection, and peripheral venipuncture, respectively, from patients (n=20 per group minimum) with normal knees, knees with rheumatoid arthritis, knees with meniscal tears and grade 1-2 articular cartilage pathology, knees with post-traumatic OA, and knees with endstage OA undergoing total knee arthroplasty at The University of Missouri Hospitals and Clinics (UMHC). The UMHC admits well over 200 cases in each of these cohorts each year. Epidemiologic data is obtained and recorded in the medical record for each case.

15 *Clinical Assessments* – Knee examination is performed on all participants and findings recorded. The 36-Item Short-Form Health Survey (SF-36) is used to assess the patient quality of life.<sup>2</sup> This is a self-reported multidomain questionnaire, reflecting the patient's pain, strength, and affect secondary to their disease. Functional outcome measures is assessed via the Western Ontario McMaster Universities Osteoarthritis Index (WOMAC)(34).

20 *Radiographic Assessment* - Knee radiographs are assessed using the Modified Kellgren-Lawrence scoring system (21) where the medial and lateral compartments is reviewed, scored for the severity of changes and then scores totaled.

25 *Whole-joint Surgical Assessment* – At the time of surgery (arthrotomy or arthroscopy), all articular surfaces of the patella, femur and tibia are examined and scored with respect to degree of articular cartilage damage (ICRS system). Meniscal, ligamentous, and synovial pathology are assessed and described in terms of nature, extent, and location. Patients in the normal group do not undergo surgical assessment.

30 *Biomarkers* – A small aliquot (25µl) from each sample is thawed. For urine and synovial fluid, samples are centrifuged at 14,000 rpm for 10 minutes to pellet debris, and the supernatant removed. Synovial fluid samples are incubated with hyaluronidase (MP Biomedicals, LLC, Solon, Ohio) at 37°C for 60 minutes to decrease viscosity. Each aliquot of synovial fluid, urine,

WO 2011/109738

PCT/US2011/027242

*Atty Docket No.: 051810-10/UMC030  
Filed via EFS Web*

and serum is analyzed in duplicate using multiplex immunoassays based on the xMAP platform (Qiagen Inc., Valencia, CA) for IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-15, IL-18, IP-10, INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , MCP1, KC, GM-CSF, COMP, Apo1, Apo2, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  MMP1, MMP2, MMP3, MMP9 and MMP13 according to the manufacturers' directions. Briefly, each of the  
5 samples is admixed with monoclonal antibody-charged, small (5.6 micron), polystyrene microspheres in a 96-well plate. Following an overnight incubation at 4°C, a polyclonal secondary antibody is added, as well as streptavidin-phycoerythrin. The median fluorescence intensity (MFI) is determined for each sample, and concentrations (pg/ml) obtained from a standard curve.

10 *Statistical Analyses* - Strength of correlations between each biomarker and combinations of biomarkers to detect presence and stage of disease is analyzed using a Pearson's Correlation. Sensitivity, specificity, and receiver operating characteristic curve (ROC) data is calculated for each biomarker and combinations of biomarkers to determine discriminatory potential between presence, type, and severity of disease for the various cohorts based on all outcome measures  
15 employed.

The present disclosure illustratively described herein suitably may be practiced in the absence of any element or elements, limitation or limitations which are not specifically disclosed herein. Thus, for example, in each instance herein any of the terms "comprising," "consisting essentially of" and "consisting of" may be replaced with either of the other two terms. The terms  
20 and expressions which have been employed are used as terms of description and not of limitation, and there is no intention that in the use of such terms and expressions of excluding any equivalents of the features shown and described or portions thereof, but it is recognized that various modifications are possible within the scope of the present disclosure claimed. Thus, it should be understood that although the present disclosure has been specifically disclosed by  
25 preferred embodiments and optional features, modification and variation of the concepts herein disclosed may be resorted to by those skilled in the art, and that such modifications and variations are considered to be within the scope of this invention as defined by the appended claims.

All patents and publications mentioned in the specification are indicative of the levels of  
30 those skilled in the art to which the present disclosure pertains. All patents and publications are

WO 2011/109738

PCT/US2011/027242

*Atty Docket No.: 051810-10UMC030  
Filed via EFS Web*

herein incorporated by reference to the same extent as if each individual publication was specifically and individually indicated to be incorporated by reference.

#### REFERENCES

- 5           1.       Andersson MLE, Thorstensson CA, Roos EM, Petersson IF, Heinegård D, Saxne T. Serum levels of Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP) increase temporarily after physical exercise in patients with knee osteoarthritis. *BMC Musculoskeletal Disorders*. 2006;7.
2.       Angst F, Aeschlimann A, Steiner W, Stucki G. Responsiveness of the WOMAC osteoarthritis index as compared with the SF-36 in patients with osteoarthritis of the legs  
10       undergoing a comprehensive rehabilitation intervention. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2001;60(9):834-840.
3.       Bay-Jensen AC, Andersen TL, Charni-Ben Tabassi N, Kristensen PW, Kjaersgaard-Andersen P, Sandell L, Garnero P, Delaissé JM. Biochemical markers of type II  
15       collagen breakdown and synthesis are positioned at specific sites in human osteoarthritic knee cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2008;16(5):615-623.
4.       Blackburn Jr WD, Chivers S, Bernreuter W. Cartilage imaging in osteoarthritis. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. 1996;25(4):273-281.
5.       Chan WP, Lang P, Stevens MP, Sack K, Majumdar S, Stoller DW, Basch C, Genant HK. Osteoarthritis of the knee: Comparison of radiography, CT, and MR imaging to  
20       assess extent and severity. *American Journal of Roentgenology*. 1991;157(4):799-806.
6.       Chua Jr SD, Messier SP, Legault C, Lenz ME, Thonar EJMA, Loeser RF. Effect of an exercise and dietary intervention on serum biomarkers in overweight and obese adults with osteoarthritis of the knee. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2008;16(9):1047-1053.
7.       Cook JL, Fox DB, Malaviya P, Tomlinson JL, Farr J, Kuroki K, Cook CR.  
25       Evaluation of small intestinal submucosa grafts for meniscal regeneration in a clinically relevant posterior meniscectomy model in dogs. *The journal of knee surgery*. 2006;19(3):159-167.
8.       Cook JL, Kuroki K, Kenter K, Marberry K, Brawner T, Geiger T, Jayabalan P, Bal BS. Bipolar and monopolar radiofrequency treatment of osteoarthritic knee articular

WO 2011/109738

PCT/US2011/027242

*Att. Docket No.: 051810-10UMC030*  
*Filed via EFS Web*

cartilage: acute and temporal effects on cartilage compressive stiffness, permeability, cell synthesis, and extracellular matrix composition. *The journal of knee surgery*. 2004;17(2):99-108.

9. Cook JL, Tomlinson JL, Arnoczky SP, Fox DB, Reeves Cook C, Kreeger JM. Kinetic study of the replacement of porcine small intestinal submucosa grafts and the  
5 regeneration of meniscal-like tissue in large avascular meniscal defects in dogs. *Tissue Engineering*. 2001;7(3):321-334.
10. 10. Cook JL, Tomlinson JL, Kreeger JM, Cook CR. Induction of meniscal regeneration in dogs using a novel biomaterial. *American Journal of Sports Medicine*. 1999;27(5):658-665.
11. 11. Cook JL, Williams N, Kreeger JM, Peacock JT, Tomlinson JL. Biocompatibility of three-dimensional chondrocyte grafts in large tibial defects of rabbits. *American Journal of Veterinary Research*. 2003;64(1):12-20.
15. 12. Dvorak LD, Cook JL, Kreeger JM, Kuroki K, Tomlinson JL. Effects of carprofen and dexamethasone on canine chondrocytes in a three-dimensional culture model of osteoarthritis. *American Journal of Veterinary Research*. 2002;63(10):1363-1369.
13. 13. Fetting AA, Rand WM, Sato AF, Solano M, McCarthy RJ, Boudricau RJ. Observer Variability of Tibial Plateau Slope Measurement in 40 Dogs with Cranial Cruciate Ligament-Deficient Stifle Joints. *Veterinary Surgery*. 2003;32(5):471-478.
20. 14. Fox DB, Cook JL. Synovial fluid markers of osteoarthritis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2001; 219(6):756-761.
25. 15. Garcia-Seco F, Wilson DA, Cook JL, Kuroki K, Kreeger JM, Keegan KG. Measurement of articular cartilage stiffness of the femoropatellar, tarsocrural, and metatarsophalangeal joints in horses and comparison with biochemical data. *Veterinary Surgery*. 2005; 34(6):571-578.
16. 16. Garner BC SA, Cook JL. Change in cytokine and chemokine levels in the synovial fluid, serum and urine of dogs with surgically induced osteoarthritis. 56th Annual Orthopaedic Research Society Meeting. 2010.

WO 2011/109738

PCT/US2011/027242

*Atty Docket No.: 051810-10UMC030  
Filed via EFS Web*

17. Garnero P, Aronstein WS, Cohen SB, Conaghan PG, Cline GA, Christiansen C, Beary JF, Meyer JM, Bingham Iii CO. Relationships between biochemical markers of bone and cartilage degradation with radiological progression in patients with knee osteoarthritis receiving risedronate: the Knee Osteoarthritis Structural Arthritis randomized clinical trial. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2008; 16(6):660-666.
18. Greenberg DD, Stoker A, Kane S, Cockrell M, Cook JL. Biochemical effects of two different hyaluronic acid products in a co-culture model of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2006;14(8):814-822.
19. Henrotin Y, Addison S, Kraus V, Deberg M. Type II collagen markers in osteoarthritis: What do they indicate? *Current Opinion in Rheumatology*. 2007;19(5):444-450.
20. Hou Y, Wang Y, Lust G, Zhu L, Zhang Z, Todhunter RJ. Retrospective analysis for genetic improvement of hip joints of cohort labrador retrievers in the United States: 1970-2007. *PLoS ONE*.5(2).
21. Kellgren JH, Lawrence JS. Radiological assessment of osteo-arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 1957;16(4):494-502.
22. Kuroki K, Cook JL, Kreeger JM. Mechanisms of action and potential uses of hyaluronan in dogs with osteoarthritis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2002;221(7):944-950.
23. Kuroki K, Cook JL, Kreeger JM, Tomlinson JL. The effects of TIMP-1 and -2 on canine chondrocytes cultured in three-dimensional agarose culture system. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2003;11(9):625-635.
24. Kuroki K, Cook JL, Stoker AM, Turnquist SE, Kreeger JM, Tomlinson JL. Characterizing osteochondrosis in the dog: Potential roles for matrix metalloproteinases and mechanical load in pathogenesis and disease progression. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2005;13(3):225-234.
25. Lawrence RC, Felson DT, Helmick CG, Arnold LM, Choi H, Deyo RA, Gabriel S, Hirsch R, Hochberg MC, Hunder GG, Jordan JM, Katz JN, Kremers HM, Wolfe F. Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part II. *Arthritis and Rheumatism*. 2008;58(1):26-35.

WO 2011/109738

PCT/US2011/027242

*Atty Docket No.: 051810-10UMC030  
Filed via EFS Web*

26. Mazières B, Garnero P, Guéguen A, Abbal M, Berdah L, Lequesne M, Nguyen M, Salles JP, Vignon E, Dougados M. Molecular markers of cartilage breakdown and synovitis at baseline as predictors of structural progression of hip osteoarthritis. The ECHODIAH\* cohort. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2006;65(3):354-359.
- 5 27. Mazzuca SA, Brandt KD, Eyre DR, Katz BP, Askew J, Lane KA. Urinary levels of type II collagen C-telopeptide crosslink are unrelated to joint space narrowing in patients with knee osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2006;65(8):1055-1059.
28. Nganvongpanit K, Pothacharoen P, Chaochird P, Klunklin K, Warrit K, Settakorn J, Pattamapasong N, Luevitoonvechkij S, Arpornchayanon O, Kongtawclert P, Pruksakorn D.  
10 Prospective evaluation of serum biomarker levels and cartilage repair by autologous chondrocyte transplantation and subchondral drilling in a canine model. *Arthritis Research and Therapy*. 2009;11(3).
29. Poole AR. Biochemical/immunochemical biomarkers of osteoarthritis: Utility for prediction of incident or progressive osteoarthritis. *Rheumatic Disease Clinics of North America*.  
15 2003;29(4):803-818.
30. Ray A, Kuroki K, Cook JL, Bal BS, Kenter K, Aust G, Ray BK. Induction of matrix metalloproteinase 1 gene expression is regulated by inflammation-responsive transcription factor SAF-1 in osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism*. 2003;48(1):134-145.
31. Roy RG, Wallace LJ, Johnston GR, Wickstrom SL. A retrospective evaluation of  
20 stifle osteoarthritis in dogs with bilateral medial patellar luxation and unilateral surgical repair. *Veterinary surgery : VS : the official journal of the American College of Veterinary Surgeons*. 1992; 21(6):475-479.
32. Stoker AM, Cook JL, Kuroki K, Fox DB. Site-specific analysis of gene  
expression in early osteoarthritis using the Pond-Nuki model in dogs. *Journal of Orthopaedic  
25 Surgery and Research*. 2006; 1(1).
33. van Spil WE, DeGroot J, Lems WF, Oostveen JCM, Lafcber FPJG. Serum and urinary biochemical markers for knee and hip-osteoarthritis: A systematic review applying the consensus BIPED criteria. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2010; 18(5):605-612.

WO 2011/109738

PCT/US2011/027242

*Atty Docket No.: 051810-10UMC030*  
*Filed via EFS Web*

34. Ware Jr JE, Sherbourne CD. The MOS 36-item short-form health survey (SF-36).  
I. Conceptual framework and item selection. *Medical Care*. 1992; 30(6):473-483.
35. Wilke VL, Robinson DA, Evans RB, Rothschild MF, Conzemius MG. Estimate  
of the annual economic impact of treatment of cranial cruciate ligament injury in dogs in the  
5 United States. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2005; 227(10):1604-  
1607.
36. Yoshimura M, Sakamoto K, Tsuruta A, Yamamoto T, Ishida K, Yamaguchi H,  
Nagaoka I. Evaluation of the effect of glucosamine administration on biomarkers for cartilage  
and bone metabolism in soccer players. *International Journal of Molecular Medicine*.  
10 2009;24(4):487-494.

WO 2011/109738

PCT/US2011/027242

*Att. Docket No.: 051810-10UMC030  
Filed via EFS Web*

## WHAT IS CLAIMED IS:

1. A method for diagnosing, staging, or monitoring osteoarthritis in a subject comprising:  
measuring in a biological sample from the subject the level of expression of at least two  
5 polypeptides selected from the group consisting of: MCP1, IL8, KC, MMP2, MMP3, MMP9,  
IL6, MMP1, RANTES, IL1B, Apolipoprotein A1, Apolipoprotein E, DCN, CILP and COMP,  
and fragments of any thereof, and any combination thereof, wherein the expression levels of the  
at least two polypeptides or fragments thereof in the biological sample provide a sample protein  
expression profile indicative of the presence or absence, degree, severity, type or stage of  
10 osteoarthritis in the subject.
2. The method of claim 1, wherein the biological sample comprises any one of synovial  
fluid, whole blood, blood plasma, serum, urine, and saliva.
3. The method of claim 1, wherein the biological sample comprises synovial fluid.
4. The method of claim 1, wherein the level of expression of at least four polypeptides is  
15 measured.
5. The method of claim 1, wherein the subject is a human.
6. The method of claim 1, wherein the subject is a canine.
7. The method of claim 1, comprising measuring in a biological sample from the subject the  
level of expression of MCP1, IL8, KC, MMP2 and MMP3, or fragments thereof.
- 20 8. The method of claim 7, wherein the subject is a canine.
9. The method of claim 1, comprising measuring in a biological sample from the subject the  
level of expression of MCP1, IL6, IL8, KC and MMP1, or fragments thereof.
10. The method of claim 9, wherein the subject is a human.
11. The method of claim 10, further comprising measuring in the biological sample the level  
25 of expression of RANTES, or fragments thereof.

WO 2011/109738

PCT/US2011/027242

*Atty Docket No.: 051810-10UMC030*  
*Filed via EFS Web*

12. The method of claim 1, further comprising: comparing the sample protein expression profile to a control protein expression profile, wherein a difference between the sample protein expression profile and the control protein expression profile is indicative of the presence or absence, degree, severity, type or stage of osteoarthritis in the subject.
- 5 13. The method of claim 1, wherein the subject is at risk of having or is suspected of having osteoarthritis.
14. The method according to claim 1, wherein the level of expression of the at least two polypeptides in the biological sample is measured using a method selected from the group consisting of: LUMINEX, ELISA, immunoassay, mass spectrometry, high performance liquid  
10 chromatography, two-dimensional electrophoresis, qPCR, RT-PCR, nucleic acid microarray, *in situ* hybridization, SAGE, Western blotting, protein microarray, and antibody microarray.
15. The method of claim 1, wherein the level of expression of the at least two polypeptides in the biological sample is measured by detecting alterations in DNA due to a process selected from the group consisting of DNA amplification, DNA methylation/demethylation, and single  
15 nucleotide polymorphisms.
16. An OA biomarker expression profile comprising polypeptide expression level information for two or more polypeptides selected from the group consisting of: MCP1, IL8, KC, MMP2, MMP3, IL6, MMP1, RANTES, MMP9, IL1B, Apolipoprotein A1, Apolipoprotein E, DCN, CILP and COMP and fragments of any thereof, and any combination thereof, obtained  
20 from a biological sample from a subject suspected of having osteoarthritis.
17. The OA expression profile of claim 15, further comprising polypeptide expression level information for at least one biological sample obtained from at least one healthy subject.
18. The OA expression profile of claim 16, wherein the biological samples from the subject suspected of having osteoarthritis and the healthy subject or subjects both comprise a sample of  
25 synovial fluid, a sample of whole blood, a sample of blood plasma, a sample of serum, a sample of urine, and a sample of saliva.

WO 2011/109738

PCT/US2011/027242

*Att. Docket No.: 051810-10UMC030*  
*Filed via EFS Web*

19. The OA expression profile of claim 16, wherein the biological samples from the subject suspected of having osteoarthritis and the healthy subject or subjects both comprise a sample of synovial fluid.
20. A diagnostic reagent for osteoarthritis comprising two or more antibodies against any two  
5 or more OA biomarkers or fragments thereof selected from the group consisting of: MCP1, IL8, KC, MMP2, MMP3, IL6, MMP1, RANTES, MMP9, IL1B, Apolipoprotein A1, Apolipoprotein E, DCN, CILP and COMP and fragments of any thereof.
21. A kit comprising the diagnostic reagent of claim 19.
22. A kit for diagnosing osteoarthritis in a subject, the kit comprising: at least two OA  
10 biomarker detection reagents that each specifically bind to an OA polypeptide selected from the group consisting of MCP1, IL8, KC, MMP2, MMP3, IL6, MMP1, RANTES, MMP9, IL1B, Apolipoprotein A1, Apolipoprotein E, DCN, CILP and COMP and fragments of any thereof, or at least two OA biomarker detection reagents that each specifically bind to at least part of a polynucleotide sequence coding for at least two of the OA polypeptides, wherein the specific  
15 binding of the reagent is indicative of the expression level of at least one OA polypeptide in a biological sample from a subject.
23. The kit of claim 21, wherein said at least one reagent that specifically detects expression of at least one biomarker comprises a nucleic acid probe complementary to at least part of a polynucleotide sequence coding for one of the polypeptides.
- 20 24. The kit of claim 22, wherein the nucleic acid probe is a cDNA or is an oligonucleotide.
25. The kit of claim 21, wherein the at least one OA biomarker detection reagent is immobilized on a substrate surface.
26. The kit of claim 24, comprising at least two biomarker detection reagents arranged on the substrate surface.
- 25 27. The kit of claim 25, wherein the at least two biomarker reagents arranged on the substrate surface comprise a microarray.

WO 2011/109738

PCT/US2011/027242

*Atty Docket No.: 051810-10/UMC030  
Filed via EFS Web*

28. A method for identifying a candidate substance as a therapeutic agent for treating osteoarthritis, comprising: a) administering the candidate substance to a subject diagnosed with spontaneous osteoarthritis; b) measuring the expression level of two or more OA polypeptides selected from the group consisting of MCP1, IL8, KC, MMP2, MMP3, IL6, MMP1, RANTES,  
5 MMP9, IL1B, Apolipoprotein A1, Apolipoprotein E, DCN, CHP and COMP in a biological sample from the subject; and c) selecting the candidate substance as a candidate therapeutic agent for treating osteoarthritis if the expression level of each of the two or more OA polypeptides in the biological sample is lower than or equal to the expression level for the selected two or more OA polypeptides in a biological sample from a control subject not  
10 administered the test substance.
29. The method of claim 27, wherein the biological sample comprises any one of synovial fluid, whole blood, blood plasma, serum, urine, and saliva.
30. The method of claim 27, wherein the biological sample comprises synovial fluid.
31. The method of claim 27, wherein the level of expression of at least four polypeptides is  
15 measured.
32. The method of claim 27, wherein the subject is a human.
33. The method of claim 27, wherein the subject is a canine.
34. The method of claim 27, comprising measuring in a biological sample from the subject the level of expression of MCP1, IL8, KC, MMP2 and MMP3, or fragments thereof.
- 20 35. The method of claim 34, wherein the subject is a canine.
36. The method of claim 27, comprising measuring in a biological sample from the subject the level of expression of MCP1, IL6, IL8, KC and MMP1, or fragments thereof.
37. The method of claim 36, wherein the subject is a human.
38. The method of claim 27, wherein the expression level of each of the at least two  
25 polypeptides in the biological sample from the subject is measured using a method selected from

WO 2011/109738

PCT/US2011/027242

*Atty Docket No.: 051810-10/UMC030*  
*Filed via EFS Web*

the group consisting of: LUMINEX, ELISA, immunoassay, mass spectrometry, high performance liquid chromatography, two-dimensional electrophoresis, qPCR, RT-PCR, nucleic acid microarray, *in situ* hybridization, SAGE, Western blotting, protein microarray, and antibody microarray.

- 5 39. A method for monitoring the effect of a treatment of osteoarthritis in a subject comprising: a) obtaining a first OA biomarker expression profile comprising measuring the expression level of two or more OA polypeptides selected from the group consisting of MCP1, IL8, KC, MMP2, MMP3, IL6, MMP1, RANTES, MMP9, IL1B, Apolipoprotein A1, Apolipoprotein E, DCN, CILP and COMP in a first biological sample obtained from the subject
- 10 before the osteoarthritis treatment is administered to the subject; b) obtaining a second OA biomarker expression profile comprising measuring the expression level of the two or more OA polypeptides selected in (a), in a second biological sample obtained from the subject after or while the osteoarthritis treatment is administered to the subject; and c) comparing the first OA biomarker expression profile with the second OA biomarker expression profile, wherein if the
- 15 expression level of each of the two or more selected OA polypeptides in the first OA biomarker expression profile is lower than or equal to the expression level for the selected two or more OA polypeptides in the second biological sample from the subject is indicative of a therapeutic effect of the osteoarthritis treatment in the subject.
40. The method of claim 38, wherein the biological sample comprises any one of synovial
- 20 fluid, whole blood, blood plasma, serum, urine, and saliva.
41. The method of claim 38, wherein the biological sample comprises synovial fluid.
42. The method of claim 38, wherein the level of expression of at least four polypeptides is measured.
43. The method of claim 38, wherein the subject is a human.
- 25 44. The method of claim 38, wherein the subject is a canine.
45. The method of claim 38, comprising measuring in a biological sample from the subject the level of expression of MCP1, IL8, KC, MMP2 and MMP3, or fragments thereof.

WO 2011/109738

PCT/US2011/027242

*Atty Docket No.: 051810-10UMC030*  
*Filed via EFS Web*

46. The method of claim 45, wherein the subject is a canine.
47. The method of claim 38, comprising measuring in a biological sample from the subject the level of expression of MCP1, IL6, IL8, KC and MMP1, or fragments thereof.
48. The method of claim 47, wherein the subject is a human.
- 5 49. The method of claim 38, wherein the expression level of the at least two polypeptides in the biological sample from the subject is measured using a method selected from the group consisting of: LUMINEX, ELISA, immunoassay, mass spectrometry, high performance liquid chromatography, two-dimensional electrophoresis, qPCR, RT-PCR, nucleic acid microarray, *in situ* hybridization, SAGE, Western blotting, protein microarray, and antibody microarray.

Biomarkers, biomarker panels and methods for diagnosing osteoarthritis (OA) are disclosed, using measurement of the expression level of certain polypeptides in a test sample from a subject, including MCP1, IL8, KC, MMP2, MMP3, IL6, MMP1, RANTES, MMP9, IL1B, Apolipoprotein A1, Apolipoprotein E, DCN, CILP and COMP. Related methods for monitoring OA treatment efficacy, diagnostic reagents, and kits are also described.

WO 2011/09738

PCT/US2011/027242

1/3

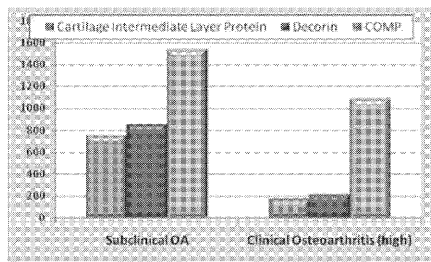


FIG. 1A

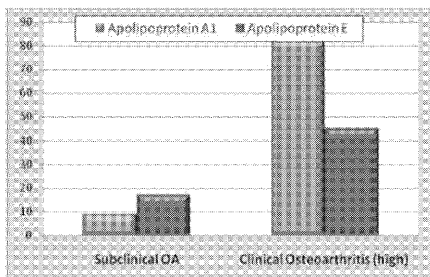


FIG. 1B

WO 2011/09738

PCT/US2011/027242

2/3

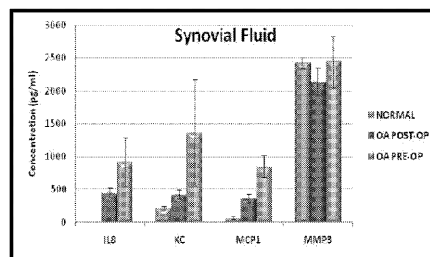


FIG. 2A

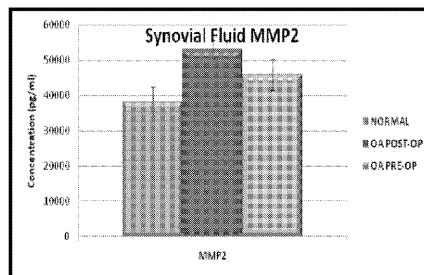


FIG. 2B

WO 2011/109738

PCT/US2011/027242

3/3

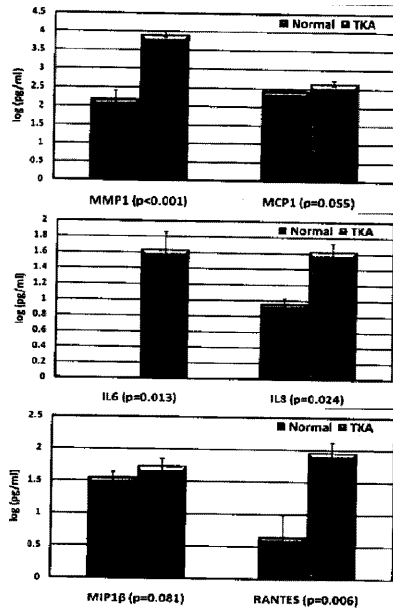


FIG. 3

专利名称(译)	骨关节炎的生物标志物		
公开(公告)号	<a href="#">JP2015079000A</a>	公开(公告)日	2015-04-23
申请号	JP2014244355	申请日	2014-12-02
[标]申请(专利权)人(译)	密苏里大学		
申请(专利权)人(译)	策展人大学密苏里		
[标]发明人	ジェイムズエルクック クリスティアールクック アーロンエムストーカー 黒木圭一 ブリジットコリーンガーナー リチャードエバンズ ブランドンリーローラー プラカシュシダジャヤバラ		
发明人	ジェイムズ・エル・クック クリスティ・アール・クック アーロン・エム・ストーカー 黒木 圭一 ブリジット・コリーン・ガーナー リチャード・エバンズ ブランドン・リー・ローラー プラカシュ・シダ・ジャヤバラ		
IPC分类号	G01N33/53 G01N37/00 G01N33/543 C12Q1/68 C12Q1/04 C07K16/24 C12N15/09 C12M1/00 C12M1/34 C07K16/18		
CPC分类号	G01N33/6887 C12Q1/6883 C12Q2600/112 C12Q2600/136 G01N33/5308 G01N2333/52 G01N2333/5421 G01N2800/105 G01N2800/56		
FI分类号	G01N33/53.D G01N37/00.102 G01N33/543.501.A C12Q1/68.A C12Q1/04 C07K16/24 C12N15/00.A C12M1/00.A C12M1/34.F C12M1/34.Z C07K16/18 C12Q1/6883.C C12Q1/6883.Z		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/CA01 4B024/CA12 4B024/DA03 4B024/HA14 4B024/HA15 4B029/AA07 4B029/BB11 4B029/BB17 4B029/BB20 4B029/CC02 4B029/CC08 4B029/FA12 4B063/QA13 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ42 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR36 4B063/QR48 4B063/QR62 4B063/QR72 4B063/QS02 4B063/QS07 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QX01 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA50 4H045/FA71		
代理人(译)	新田正弘		
优先权	61/339511 2010-03-05 US		
其他公开文献	JP5980299B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

公开了用于诊断骨关节炎 ( OA ) 和确定治疗的生物标志物, 生物标志物组和方法, 其使用测量来自受试者的测试样品中的某些多肽的表达水平, 包括MCP1, IL8, KC, MMP2, MMP3, 载脂蛋白A1和载脂蛋白E.还描述了用于监测OA治疗功效的相关方法, 诊断试剂和试剂盒。

【表 1 - 2】

正式名	遺伝子名	GenBank 登録番号
RANTES, ケモカイン(C-Cモチーフ) リガンド5 (CCL5)	CCL5	EトG: NM_002985 EトP: NP_002976 イヌG: NM_001003010 イヌP: NP_001003010
マトリクスメタロプロテイナーゼ9	MMP9	EトG: NM_004994 EトP: NP_004985 イヌG: NM_001003219 イヌP: NP_001003219
インターロイキン1β	IL1B	EトG: NM_000576 EトP: NP_000567 イヌG: NM_001037971 イヌP: NP_001033060
アポリポタンパク質 A1	APOA1	EトG: NM_000039 EトP: NP_000030 イヌG: NM_001197048 イヌP: XP_536564
アポリポタンパク質 E	APOE	EトG: NM_000041 EトP: NP_000032 イヌG: XM_533644 イヌP: XP_533644
デコリン	DCN	EトG: NM_001920 EトP: NP_001911 イヌG: NM_001003228 イヌP: NP_001003228
軟骨中間層タンパク質	CILP	EトG: NM_003613 EトP: NP_003604 イヌG: XM_544728 イヌP: XP_544728
軟骨オリゴマーマトリクスタンパク質	COMP	EトG: NM_000095 EトP: NP_000086 イヌG: XM_860228 イヌP: XP_865321