

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-506108

(P2008-506108A)

(43) 公表日 平成20年2月28日(2008.2.28)

(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	Z N A N	4 B O 5 O
C 1 2 N 9/88	(2006.01)	C 1 2 N 9/88		4 H O 4 5
C O 7 K 14/47	(2006.01)	C O 7 K 14/47		

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 18 頁)

(21) 出願番号 特願2007-520231 (P2007-520231)
 (86) (22) 出願日 平成17年7月6日(2005.7.6)
 (85) 翻訳文提出日 平成19年2月14日(2007.2.14)
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2005/002171
 (87) 国際公開番号 W02006/004380
 (87) 国際公開日 平成18年1月12日(2006.1.12)
 (31) 優先権主張番号 10-2004-0052385
 (32) 優先日 平成16年7月6日(2004.7.6)
 (33) 優先権主張国 韓国(KR)

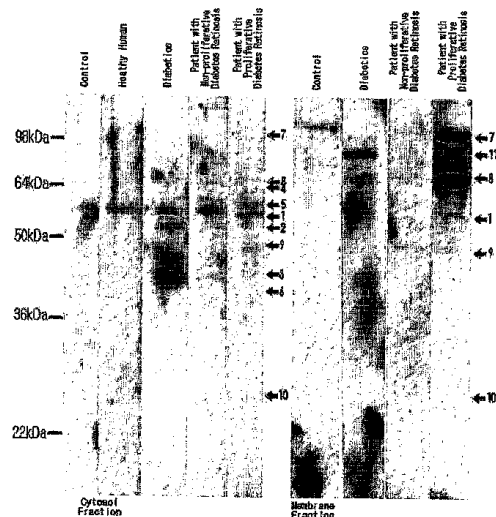
(71) 出願人 505020271
 アイジーン インコーポレイテッド
 大韓民国, 120-113 ソウル, ソデ
 ムン-グ, ヨンヒ-3-ドン, #187-
 114
 (74) 代理人 110000338
 特許業務法人原謙三国際特許事務所
 (72) 発明者 チョ, ヤン-ジェ
 大韓民国, ソウル 140-748, ヨン
 サン-グ, ドゥワン-ドン, サムスン
 レ
 ミアン アパートメント, #106-20
 4

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 糖尿病及び/または網膜血管疾患診断用組成物及びその診断方法

(57) 【要約】

本発明は、糖尿病及び網膜血管疾患診断用組成物、前記タンパク質を含む網膜血管疾患診断用キット、これをコーディングする遺伝子並びにこれを用いて糖尿病及び/または網膜血管疾患で生成された抗体を分析する方法に関する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 ないし 2 2 のアミノ酸配列に記載されたタンパク質から構成された群より選択された 1 つ以上のタンパク質またはその切片を含む糖尿病診断用組成物。

【請求項 2】

配列番号 1 ないし 9 及び配列番号 1 1 ないし 2 2 のアミノ酸配列に記載されたタンパク質から構成された群より選択された 1 つ以上のタンパク質またはその切片を含む血管疾患診断用組成物。

【請求項 3】

前記組成物は配列番号 4 のアミノ酸配列に記載されたタンパク質またはその切片を含むことを特徴とする請求項 1 または請求項 2 に記載の糖尿病または血管疾患診断用組成物。

10

【請求項 4】

前記網膜血管疾患は糖尿網膜症、網膜浮腫及び老人性黄斑変性からなる群より選択された疾患であることを特徴とする請求項 2 に記載の網膜血管疾患診断用組成物。

【請求項 5】

請求項 1 のタンパク質またはその切片を含む糖尿病診断用キット。

【請求項 6】

請求項 2 のタンパク質またはその切片を含む血管疾患診断用キット。

【請求項 7】

前記キットは標識された抗免疫グロブリン G 抗体タンパク質をさらに含むことを特徴とする請求項 5 または請求項 6 に記載のキット。

20

【請求項 8】

請求項 1 または請求項 2 の 1 つ以上のタンパク質を血液と接触させる段階を含む、糖尿病または網膜血管疾患で生成された抗体を分析する方法。

【請求項 9】

前記抗体を分析する方法は標識された抗免疫グロブリン G 抗体タンパク質を添加する段階をさらに含むことを特徴とする請求項 8 に記載の網膜血管疾患で生成された抗体を分析する方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

30

【0001】

(技術分野)

本発明は、糖尿病及び網膜血管疾患診断用組成物、該タンパク質を含む網膜血管疾患診断用キット、これをコーディングする遺伝子及びこれを用いて糖尿病及び/または網膜血管疾患で生成された抗体を分析する方法に関する。

【0002】

(背景技術)

一般に、糖尿病は微細血管系に病変を起こす複雑な代謝性疾患である。これは、全身の組織に広範囲にわたる障害を引き起し、特に目に影響を及ぼす全身疾患のうち最も重要な一つである(リ・テヒ、チェ・ヨンギル、糖尿病性血管合併症、ソウル、高麗医学、1993)。その中、糖尿網膜症は最もひどい合併症に属し、生活水準の向上と治療水準の発展によって糖尿病患者の寿命と有病期間が長くなるに従って重要な問題となってきた(Klein R. et al., Arch Ophthalmol., 102, 520-532, 1984)。糖尿網膜症は、血管障害による網膜の病変が網膜内に限られている非増殖性糖尿網膜症(non-proliferative diabetes retinosis, NPDR)と、網膜から硝子体腔へ新生血管組織が浸透していく増殖性糖尿網膜症(proliferative diabetes retinosis, PDR)とに区分する(Green, In: Spencer WH, ed., Ophthalmic Pathology: an atlas and textbook, 4th ed., Philadelphia: WB Saunders; 1124-1129, 1996)。糖尿網

40

50

膜症による視力低下は、増殖性糖尿病網膜症における硝子体の出血、黄斑の牽引網膜剥離とともに黄斑変症のためであるが、これに対して手術治療とともにレーザー治療の効用性が広く知られている(Diabetic Retinopathy Study Report Number 14、Int Ophthalmol Clin.、27、239-253、1987)。このような治療は適切な段階において施すことで、副作用を最小化しながら視力喪失を前もって防止することができる。したがって、糖尿病網膜症の診断は適切な手術時期を確保するため、頻りに検査を通じて行われなければならない。

【0003】

糖尿病の診断は、小便または血液中の糖の量を測定することで行われるが、食事等によってその量の変化があり、病気の進行を診断するには無理がある。

10

【0004】

糖尿病網膜症の診断は、眼底における特徴的な構造変化を観察して行われるが、現在までの診断方法としては、眼科で行われる眼底撮影による検査だけが可能である。したがって、糖尿病患者が自覚症状で視力の異常を感じることなく、定期的な眼科検査を受けない状況においては、早期診断は不可能である。これによって、早期の診断が難しく、予防及び手術時期を逃す場合が多い。

【0005】

(発明の開示)

したがって、本発明の目的は前記問題点を解決するために案出されたものであって、本発明は配列番号1ないし22のアミノ酸配列に記載されたタンパク質から構成された群より選択された1つ以上のタンパク質またはその切片を含む糖尿病診断用組成物を提供する。

20

【0006】

また、本発明は配列番号1ないし9及び配列番号11ないし22のアミノ酸配列に記載されたタンパク質から構成された群より選択された1つ以上のタンパク質またはその切片を含む血管疾患診断用組成物を提供する。

【0007】

本発明の組成物は、配列番号4のアミノ酸配列に記載されたタンパク質またはその切片を含むことが望ましい。

【0008】

本発明において、前記網膜血管疾患は糖尿病網膜症、網膜浮腫または老人性黄斑変性を含むが、これに限定されない。

30

【0009】

さらに、本発明は本発明のタンパク質またはその切片を含む糖尿病または網膜血管疾患診断用キットを提供する。

【0010】

また、本発明は本発明のタンパク質またはその切片を含む網膜血管疾患診断用キットを提供する。本発明においては、前記キットは標識された抗免疫グロブリンG抗体タンパク質をさらに含むことが望ましい。

【0011】

また、本発明は配列番号1ないし9及び配列番号11ないし22のアミノ酸配列に記載されたタンパク質から構成された群より選択された1つ以上のタンパク質を血液と接触させる段階を含む、網膜血管疾患で生成された抗体を分析する方法を提供する。本発明の方法において、前記抗体を分析する方法は標識された抗免疫グロブリンG抗体タンパク質を添加する段階をさらに含むことが望ましい。

40

【0012】

以下、本発明を説明する。

【0013】

本発明は、前述した必要性を満たす糖尿病あるいは網膜血管疾患診断用タンパク質及びその切片、これを含む網膜血管疾患診断用キット、これをコーディングする遺伝子並びに

50

これを用いて網膜血管疾患で生成された抗体を分析する方法を提供するものである。前記目的を達成するため、糖尿病または疾患診断用タンパク質及びその切片、これを含む診断用キット、これをコーディングする遺伝子並びにこれを用いて網膜血管疾患で生成された抗体を分析する方法を提供する。

【0014】

本発明者らは、眼球内の血管に血液 - 眼膜 (blood - ocular barrier) が存在し、これによって網膜のタンパク質は正常な状況では免疫系に露出しないが、糖尿病のような血管の疾患においては網膜タンパク質が免疫系に露出して自己抗体 (autoantibody) が生成できることを確認した。本発明者らは、このような自己抗体を用いて血液から網膜血管疾患を診断し易くするための診断用タンパク質及びその切片、これを含むキット、これをコーディングする遺伝子並びにこれを用いて糖尿病で生成された抗体を分析する方法に想到した。

10

【0015】

以下、本発明を具体的に説明する。

【0016】

本発明の一態様は、前記目的を達成するための配列番号1ないし9及び11ないし22のアミノ酸配列でなる網膜血管疾患診断用タンパク質及びその切片を提供する。本発明者らは、本発明のタンパク質及びその切片が網膜血管疾患を持った患者の網膜血管から流出されて血液で自己抗体を誘導し、この自己抗体の増加が本発明のタンパク質及びその切片を用いて測定できることに想到した。

20

【0017】

本発明者らは、1次元及び2次元ウエスタン免疫ブロット法 (immunoblotting) の実験を施して前記事実を確認した。また、自己抗体を生成できる多くのタンパク質のうち一部を用いた酵素リンク免疫学的分析法 (enzyme linked immunosorbent assay、以下「ELISA」とする) で実際患者の血液に対する評価実験を行った結果、本発明が網膜血管疾患を効果的に診断することができることを確認した。

【0018】

前記タンパク質は人間のみならず、動物のタンパク質も含まれる。

【0019】

本発明タンパク質のアミノ酸配列において、タンパク質の機能に影響を及ぼさない範囲内でアミノ酸の置換、付加または欠失が可能であり、目的によってタンパク質の一部だけが用いられることもできる。そのような変形されたアミノ酸配列もまた本発明の範囲に含まれる。よって、本発明は網膜血管疾患タンパク質と実質的に同じアミノ酸配列を有するポリペプチドも含む。実質的に同じポリペプチドとは、80%以上、望ましくは90%以上、最も望ましくは95%以上の配列相同性を有するものなどを意味する。

30

【0020】

本発明によって診断が可能な疾患は、糖尿病及び糖尿網膜症 (diabetic retinopathy)、老人性黄斑変性 (age-related macular degeneration)、網膜浮腫などのように眼球内の血管に網膜タンパク質が露出した疾患が望ましく、特に糖尿網膜症がさらに望ましいが、これに限定されることではない。

40

【0021】

本発明の他の態様は、前記タンパク質またはその切片を含む診断用キットを提供する。本発明のキットは前記タンパク質またはその切片を含むELISA方法に利用できるキットであり、当業者に公知の様々な添加剤が本発明のキットに含まれることができる。望ましくは、本発明のキットは前記タンパク質またはその切片が付着したウェルプレートを含む。

【0022】

また望ましくは、本発明の診断用キットは前記タンパク質またはその切片によって患者

50

の血液内で生成された自己抗体に結合することができる抗抗体タンパク質を含み、さらに望ましくは、前記抗抗体タンパク質は吸光度を測定するための標識を含んでいる。前記標識としては、ペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、ビオチンなどのように当業者に公知の、E L I S A方法に利用できる様々な酵素で標識されることができる。

【0023】

本発明のさらに他の態様は、配列番号1ないし9及び11ないし22のアミノ酸配列からなる糖尿疾患診断用タンパク質をコーディングする遺伝子を提供する。コドンの縮退性 (d e g e n e r a c y) によって、または前記タンパク質を発現させようとする生物で選好されるコドン considering して、本発明の遺伝子はコーディング領域から発現する、目的とする糖尿性疾患診断用タンパク質のアミノ酸配列を変化させない範囲内で、コーディング領域に多様な変形ができ、コーディング領域を除いた部分においても、遺伝子の発現に影響を及ぼさない範囲内で多様な変形または修飾が可能であり、そのような変形遺伝子もまた本発明の範囲に含まれる。よって、本発明は前記タンパク質をコーディングする遺伝子と実質的に同じ塩基配列を有するポリヌクレオチドを含む。実質的に同じポリヌクレオチドとは、80%以上、望ましくは90%以上、最も望ましくは95%以上の塩基配列相同性を有するものなどを意味する。

10

【0024】

本発明のさらに他の態様は、前記診断用タンパク質を採取された血液と接触させる段階を含む、糖尿性疾患で生成された抗体を分析する方法を提供する。望ましくは、前記抗体を分析する方法は標識された抗抗体タンパク質を添加する段階をさらに含み、より望ましくは前記抗抗体タンパク質は抗免疫グロブリンG抗体タンパク質である。

20

【0025】

また、前記抗体を分析する方法の標識は吸光度を用いることが望ましく、この標識としては、ペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、ビオチンなどのように当業者に公知の、E L I S A方法に利用できる様々な酵素が含まれることができる。

【0026】

(図面の簡単な説明)

図1は、ヒト網膜タンパク質に対する正常人、糖尿患者、非増殖性糖尿網膜症患者、増殖性糖尿網膜症患者の細胞質分画及び膜分画に対する血清ウエスタンブロット (w e s t e r n b l o t) の結果である。

30

【0027】

図2は、ヒト網膜タンパク質に対する2次元電気泳動の結果である。

【0028】

図3は、図2の電気泳動したゲルを健康な男性の血清を用いて4部分に分け、ウエスタンブロットした結果である。

【0029】

図4は、図2の電気泳動したゲルを非増殖性糖尿網膜症患者の血清を用いて4部分に分け、ウエスタンブロットした結果である。

【0030】

図5は、図2の電気泳動したゲルを増殖性糖尿網膜症患者の血清を用いて4部分に分け、ウエスタンブロットした結果である。

40

【0031】

図6は、クレアチンキナーゼ (c r e a t i n e k i n a s e) Bを用いた正常人、糖尿患者、非増殖性糖尿網膜症患者、増殖性糖尿網膜症患者の血清に対するE L I S A診断の結果である。

【0032】

図7は、アルドラーゼ (a l d o l a s e) を用いた正常人、糖尿患者、非増殖性糖尿網膜症患者、増殖性糖尿網膜症患者の血清に対するE L I S A診断の結果である。

【0033】

(発明を実施するための最良の形態)

50

以下、本発明を実施例に挙げてより詳しく説明する。但し、下記の実施例は本発明を具体的に例示するために提供されるものであって、本発明の範囲を限定するものと解釈されてはならない。

【0034】

(実施例1：ウエスタンブロットを利用したヒト網膜タンパク質に対する自己抗体分析)

<ヒト網膜タンパク質の分離>

眼球から網膜だけを引き剥がした後、食塩水で数回拭き取った。ProteoPrep Universal Extraction Kit (Sigma S2813)を用いて細胞質分画(cytosol fraction)と膜分画(membrane fraction)を分離した後、Pierce BCA Protein Assay Kit 23227 (Pierce、米国)を用いて定量した。

【0035】

<正常人及び患者血清に対する網膜タンパク質ウエスタンブロッティング>

網膜タンパク質30 μ gを12%アクリルアミド・ゲルで電気泳動してからニトロセルロース膜に移した後、正常人、糖尿患者、非増殖性糖尿網膜症患者及び増殖性糖尿網膜症患者の血清を用いてブロッティングし、自己抗体の存在を確認した。その結果を図1及び表1にまとめて示した。

【0036】

【表1】

IgG 重鎖 番号	分子量 (kDa)	細胞質分画				膜分画				
		コントロール	正常人	DM	NPDR	PD R	コントロール	DM	NP DR	PD R
1	56.1	+	+	+	+	+				+
2	53.4			++	+	+				
3	44.4	+	+	+++	++	+				
4	63.5				+					
5	58.9				+	+				
6	40.7					+				
7	79.2					+				+
8	65.0					+		+	+	+
9	49.6			+		++			+	+
10	26.1					+				+
11	73.6							+++		

【0037】

表1において、DMは糖尿患者、NPDRは非増殖性糖尿網膜症患者、PDRは増殖性糖尿網膜症患者を意味する。+は陽性バンドが現われたことを意味し、その数はバンドの強度を示す。

【0038】

(実施例2：ヒト網膜タンパク質の2次元ゲルウエスタンブロッティング)

<2次元ゲル電気泳動>

網膜タンパク質を2種の異なる特性を利用する段階的分離法である2次元電気泳動で分離した。第1過程はタンパク質に電氣的刺激を加えてタンパク質要素が有するpHによるタンパク質移動(pH3~10)、第2過程はタンパク質が有するそれぞれの分子量によってアクリルアミド・ゲル(8~18%)上でタンパク質の移動を行った。1次元電気移動(pHによるタンパク質移動)は、ゲル当り50mAの電流で12時間移動させ、2次元電気移動(分子量によるタンパク質移動)はポリアクリルアミド上でゲル当り50mAで6時間電気移動させた。このように移動したタンパク質をCoomassie Bri

l l i a n t B l u e - 2 5 0 染料及び銀染色法で染色して存在を確認した。このようなゲルは同じ方法で4枚が作られ、1枚は正常人が持っているタンパク質の2次元ゲル上の分布を確認し、残りの3枚はそれぞれ4部分に切ってウエスタン免疫ブロッティングに使われた。その結果を図2に示した。図2に表示された数字は後述する表2のスポット番号を示す。

【0039】

<ウエスタン免疫プロット>

2次元ゲル電気泳動されたゲルを正常人、非増殖性糖尿病網膜症患者及び増殖性糖尿病網膜症患者の血清を用いてブロッティングし、自己抗体の位置を確認した。その結果をそれぞれ図3、図4及び図5に示した。

10

【0040】

正常人が持っている抗体と糖尿病網膜症患者の血液内抗体との差をコンピューターでイメージ分析ソフトウェアのPhoretix (Nonlinear dynamics、英国)を用いて分析した。この2つの群間の分析結果を2次元ゲルに代入して得たスポット (spot) をMALDI-TOFを用いて分析し、糖尿病網膜症患者の血液に表1のタンパク質に対する自己抗体が形成されることを確認した。糖尿病網膜症患者から現われる自己抗体に対する抗原タンパク質を表1にまとめて示した。

【0041】

【表 2】

スポット番号	タンパク質名
1 (配列番号 1)	アルファエノラーゼ (Alpha enolase、non-neural enolase)
2 (配列番号 2)	タンパク質 KIAA0193 (protein KIAA0193)
3 (配列番号 3)	名称の定まっていないタンパク質プロダクト甲状腺ホルモン結合タンパク質前駆体 (unnamed protein product thyroid hormone binding protein precursor)
4 (配列番号 4)	クレアチンキナーゼ-B (creatine kinase-B)
5 (配列番号 5)	DDAH1 タンパク質
6 (配列番号 6)	乳酸脱水素酵素B (Lactate dehydrogenase B)
7 (配列番号 7)	キャッピングタンパク質 (Capping protein (actin filament)) muscle z-line, beta
8 (配列番号 8)	ジヒドロピリミジナーゼ (dihydropyrimidinase)-like 2
9 (配列番号 9)	2-ホスホピルビン酸-ヒドラーゼ アルファ-エノラーゼ (2-phosphopyruvate-hydratase alpha-enolase)
10 (配列番号 10)	アルドラーゼC (aldolase C)
11 (配列番号 11)	グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)
12 (配列番号 12)	ホスホグリセリン酸キナーゼ1 (プライマー認識タンパク質2) (phosphoglycerate kinase 1 (primer recognition protein 2)、(PRP2))
13 (配列番号 13)	乳酸脱水素酵素A (lactate dehydrogenase A)
14 (配列番号 14)	カルボニックアンヒドラーゼII (carbonic anhydrase II)
15 (配列番号 15)	グルコシダーゼII ベータサブユニット (glucosidase II beta subunit)
16 (配列番号 16)	HS24/P52
17 (配列番号 17)	カルレティキュリン (calreticulin)
18 (配列番号 18)	チューブリンベータ-4qチェーン (Tubulin beta-4q chain)
19 (配列番号 19)	ベータ-チューブリン (beta-tubulin)
20 (配列番号 20)	グアニン・ヌクレオチド-結合タンパク質、ベータ-4 (guanine nucleotide-binding protein, beta-4)
21 (配列番号 21)	グアニン・ヌクレオチド-結合タンパク質 (Gタンパク質)、ベータポリペプチド1 (guanine nucleotide-binding protein (G protein)、beta polypeptide 1)
22 (配列番号 22)	前立腺結合タンパク質; ホスファチジル・エタノールアミン結合タンパク質 (prostatic binding protein; phosphatidylethanolamine binding protein)

10

20

30

40

【0042】

(実施例 3 : クレアチンキナーゼ B を利用した ELISA 方法による糖尿網膜症の診断)

クレアチンキナーゼ B を利用して ELISA 方法で糖尿患者のうちの糖尿網膜症患者の血清を識別できるか否かを調べるため、本実験を行った。病院から得た 3 人の正常人、1

50

0人の糖尿網膜症のない糖尿患者、20人の糖尿網膜症患者の血清を使用した。まず、EIA96穴プレートに各ウェル(well)当りコーティングバッファ(50 mM NaHCO₃、pH 9.0)に10 µg/mlの濃度に溶解されたクレアチンキナーゼB(Sigma、C6638)100 µl(各ウェル当り1 µgのタンパク質)を常温で1時間反応させてコーティングし、400 µlのPBST(phosphate buffer saline、0.05% Tween 20)で2回それぞれ10分間洗浄した後、1%BSA(bovine serum albumin)を含むPBSで後コーティングした。PBSTで希釈された患者の血清100 µlを入れて1時間反応させた後、PBSで5回洗浄してペルオキシダーゼで標識された抗ヒトイミノグロブリンG抗体(KOMA Biotech Inc.、韓国)を希釈して100 µlを入れて1時間反応させた。反応後、PBSで3回洗浄した後1 mg/ml OPD(o-フェニレンジアミン二塩酸塩)及び0.03% H₂O₂が含有された0.1 Mリン酸クエン酸塩バッファ(pH 4.9)100 µlを入れて室温で30分反応させてから、3 M硫酸100 µlを入れて反応を停止させてELISAリーダーを用いて450 nmで吸光度を測定した。その結果を図6に示した。ELISA測定結果、正常人の血清内クレアチンキナーゼBの平均値は、正常の場合0.04、糖尿のみの患者の場合0.06、糖尿網膜症のうち非増殖性患者の場合0.08、増殖性の場合0.08であった。この結果から、非増殖性と増殖性糖尿網膜症患者の血清内クレアチンキナーゼBの量が増加していることが確認できた。

10

【0043】

(実施例4：クレアチンキナーゼBを利用したELISA方法による糖尿病の診断)

20

さらに、病院から得た30の正常人、60人の糖尿患者の血清を使用し、実施例3と同様にELISA方法によって表3のような結果を得た。このような結果はクレアチンキナーゼBを利用して糖尿病を診断できることを示す。

【0044】

【表3】

	正常人	糖尿患者
0.05以上	5	55
0.05以下	25	5

30

【0045】

(実施例5：アルドラーゼを利用したELISA方法による糖尿網膜症の診断)

アルドラーゼを利用してELISA方法で糖尿患者のうち糖尿網膜症患者の血清を識別できるか否かを調べるため、本研究を行った。病院から得た3人の正常人、10人の糖尿網膜症のない糖尿患者、20人の糖尿網膜症患者の血清を使用した。まず、EIA96穴プレートに各ウェル当りコーティングバッファ(50 mM NaHCO₃、pH 9.0)に10 µg/mlの濃度に溶解されたアルドラーゼ(Sigma、A2714)100 µl(各ウェル当り1 µgのタンパク質)を常温で1時間反応させてコーティングし、400 µlのPBSTで2回それぞれ10分間洗浄した後、1%BSAを含むPBSで後コーティングした。PBSTバッファで希釈された患者の血清100 µlを入れて1時間反応させた後、PBSで5回洗浄してペルオキシダーゼで標識された抗ヒトイミノグロブリンG抗体(KOMA Biotech Inc.、韓国)を希釈して100 µlを入れて1時間反応させた。反応後、PBSで3回洗浄した後1 mg/ml OPD及び0.03% H₂O₂が含有された0.1 Mリン酸クエン酸塩バッファ(pH 4.9)100 µlを入れて室温で30分反応させてから、3 M硫酸100 µlを入れて反応を停止させてELISAリーダーを用いて450 nmで吸光度を測定した。その結果を図7に示した。ELISA測定結果、正常人の血清内アルドラーゼの平均値は、正常の場合0.78、糖尿のみの患者の場合0.84、糖尿網膜症のうち非増殖性患者の場合0.98、増殖性の場合1.0

40

50

であった。この結果から、非増殖性と増殖性糖尿網膜症患者の血清内アルドラーゼの量が増加していることが確認できた。

【0046】

実施例3及び実施例5の結果から分かるように、正常人と比べて前記クレアチンキナーゼB及びアルドラーゼCの量が、クレアチンキナーゼBの場合、正常人対比50%ずつ増加したが、アルドラーゼCの場合はそれぞれ25%、28%増加した。

【0047】

このような場合、増加した血清を持った患者は糖尿網膜症があることを確認できる。

【0048】

(実施例6：アルドラーゼCを利用したELISA方法による糖尿病の診断)

さらに、病院から得た30の正常人、60人の糖尿患者の血清を使用して実施例5と同様にELISA方法によって表4のような結果を得た。このような結果はアルドラーゼCを利用して糖尿病を診断できることを示す。

【0049】

【表4】

	正常人	糖尿患者
0.8以上	6	56
0.8以下	24	4

10

20

【0050】

<産業上の利用可能性>

本発明の糖尿及び血管疾患診断用タンパク質、これを含むキット及びこれを利用した分析方法を使用し、前記疾患を簡単かつ迅速に診断できるだけでなく、従来の検査方法と比べて免疫学的方法を使うため、正確性及び精密性に優れる。また、本発明の糖尿及び血管疾患診断用キット及びこれを利用した分析方法は非常に経済的である。

【図面の簡単な説明】

【0051】

【図1】図1は、ヒト網膜タンパク質に対する正常人、糖尿患者、非増殖性糖尿網膜症患者、増殖性糖尿網膜症患者の細胞質分画及び膜分画に対する血清ウエスタンブロット(western blot)の結果である。

【図2】図2は、ヒト網膜タンパク質に対する2次元電気泳動の結果である。

【図3】図3は、図2の電気泳動したゲルを健康な男性の血清を用いて4部分に分け、ウエスタンブロットした結果である。

【図4】図4は、図2の電気泳動したゲルを非増殖性糖尿網膜症患者の血清を用いて4部分に分け、ウエスタンブロットした結果である。

【図5】図5は、図2の電気泳動したゲルを増殖性糖尿網膜症患者の血清を用いて4部分に分け、ウエスタンブロットした結果である。

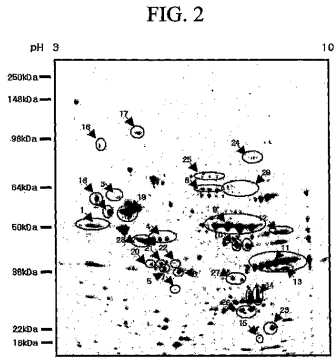
【図6】図6は、クレアチンキナーゼ(creatin kinase)Bを用いた正常人、糖尿患者、非増殖性糖尿網膜症患者、増殖性糖尿網膜症患者の血清に対するELISA診断の結果である。

【図7】図7は、アルドラーゼ(aldoase)を用いた正常人、糖尿患者、非増殖性糖尿網膜症患者、増殖性糖尿網膜症患者の血清に対するELISA診断の結果である。

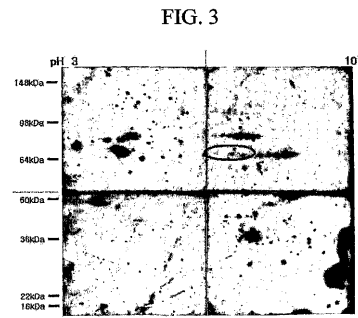
30

40

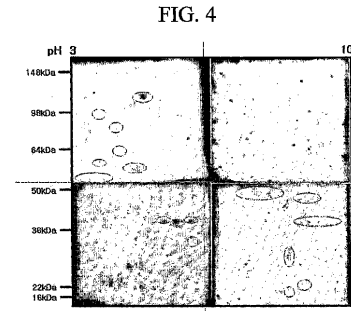
【 図 2 】



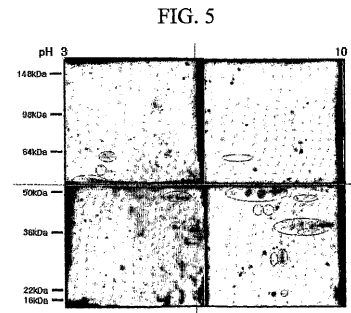
【 図 3 】



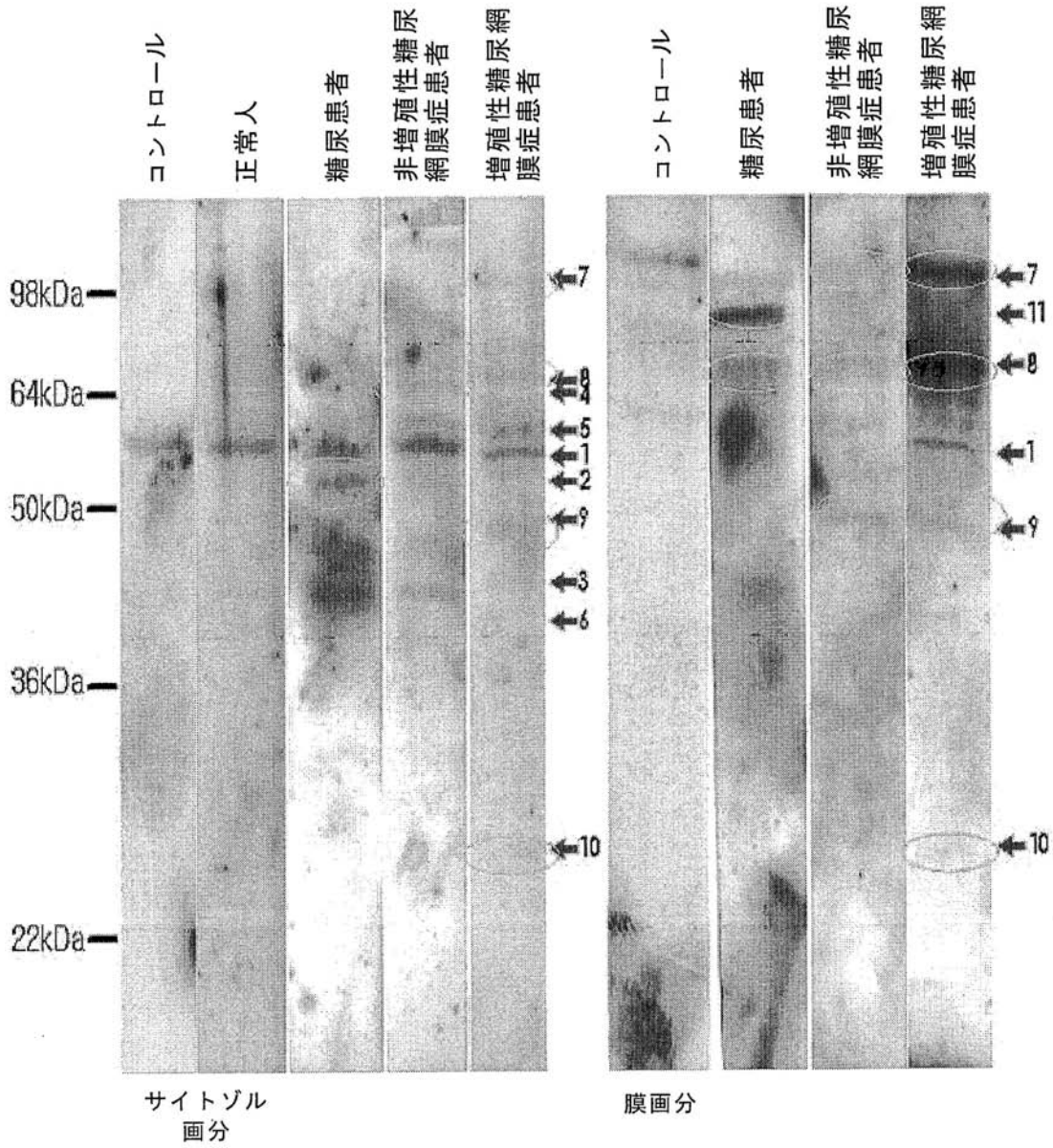
【 図 4 】



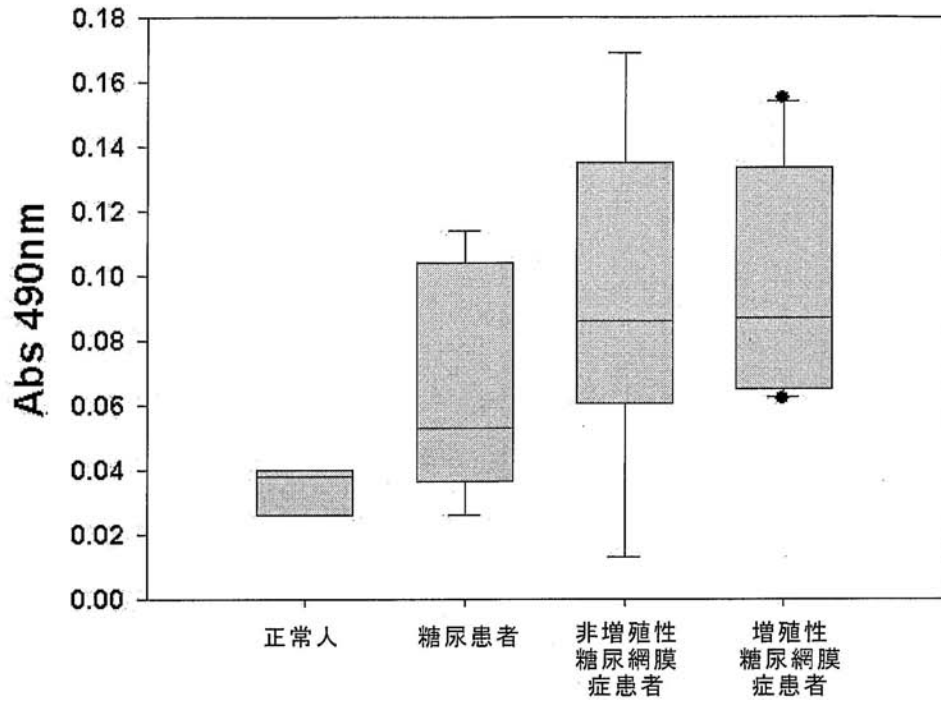
【 図 5 】



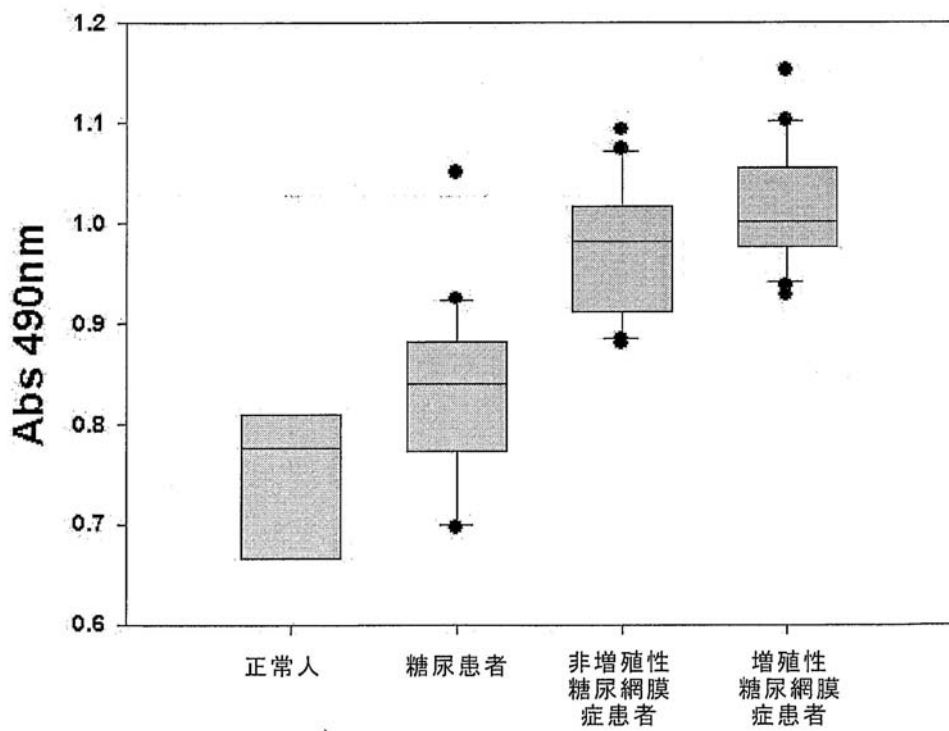
【 図 1 】



【 図 6 】



【 図 7 】





【 配列表 】

200850610800001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2005/002171

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER	
IPC7 G01N 33/543	
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC	
B. FIELDS SEARCHED	
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC7 G01N 33/543	
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched	
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Genbank, PubMed, Delphion, CA "(creatine kinas) AND (diabetic mellitus OR vascular) AND (diagno* OR marker)	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages
Y	NCBI Accession # CAG47064, 29 Jun. 2004
Y	WO 03/020963 (Syddansk Univ.) 13 Mar. 2003
Y	WO 02/097434 (Syddansk Univ.) 5 Dec. 2002
Y	Am. J. Physiol., Vol.257, Oct. 1989, pages E573-E577, B. K. Popovich et al. : "Diabetes Decreases Creatine kinase Enzyme Activity and mRNA Level in the Rat Heart"
Y	Am. J. Cardiol. Vol.85, Apr. 2000, pages 801-805, L. K. Newby et al. : "Comparisons of Cardiac Troponin T versus Creatine Kinase-MB for Risk Stratification in a Chest Pain Evaluation Unit"
Y	J. Am. Coll. Cardiol., Vol.39, No.1, 2002, pages 22-29, S. Savonitto et al. : "The Prognostic Value of Creatine Kinase Elevations Extends across the Whole Spectrum of Acute Coronary Syndromes"
Y	J. Am. Coll. Cardiol., Vol.43, No.9, May 2004, pages 1511-1514, S. D. Solomon et al. : "Angina Pectoris Prior to Myocardial Infarction Protects against Subsequent Left Ventricular Remodelling"
	Relevant to claim No.
	1-7
	1-7
	1, 3, 5, 7
	1, 3, 5, 7
	2, 6, 7
	2, 6, 7
	2, 6, 7
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.	
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 21 NOVEMBER 2005 (21.11.2005)	Date of mailing of the international search report 21 NOVEMBER 2005 (21.11.2005)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office 920 Dunsan-dong, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140	Authorized officer CHANG, Je Hwan Telephone No. 82-42-481-8158 

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2005/002171

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. type of material

- a sequence listing
 table(s) related to the sequence listing

b. format of material

- on paper
 in electronic form

c. time of filing/furnishing

- contained in the international application as filed
 filed together with the international application in electronic form
 furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2005/002171

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

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

1. Claims Nos.: 8 and 9
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The subject matter of claim 8 and claim 9 relates to a method for diagnosis.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 5.4(a).

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

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

The subject matter of Claims 1-9 is divided into 22 groups. For example, the subject matter of claim 1 relates to composition for diagnosing a diabetes mellitus, comprising at least one protein selected from the group consisting of amino acid sequences of SEQ ID NOs:1 to 22 representing different proteins, respectively.
Because biomarker for diagnosing diabetic mellitus are already known, the subject matter of claim 1 comprises 22 groups of invention.

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

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2005/002171

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2003020963A2	13.03.2003	CN 1571848A	26.01.2005
		EP 01430155A2	23.06.2004
		EP 1430155A2	23.06.2004
WO 02/097434	05.12.2002	EP 01402257A1	31.03.2004
		EP 01421390A2	26.05.2004
		EP 1402257A1	31.03.2004
		EP 1421390A2	26.05.2004
		US 2005118151AA	02.06.2005
		WO 02097441A2	05.12.2002
		WO 2002097441A2	05.12.2002
		WO 2002097441A3	25.03.2004

フロントページの続き

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

(72)発明者 アン, ブ - ヨン

大韓民国, ソウル 1 2 0 - 1 3 2 , ソデムン - グ, プガジャ 2 - ドン, 8 0 - 1 3 5

(72)発明者 ユー, ウォン - イル

大韓民国, キョンギ - ド 4 6 3 - 0 2 0 , ソンナム - シ, ブンダン - グ, ソーネ - ドン, 3 6 , ヤンジ マウル, # 2 1 2 - 1 0 0 5

(72)発明者 クォン, オウ - ウン

大韓民国, キョンギ - ド 4 1 1 - 3 7 0 , コヤン - シ, イルサン - グ ジュイウプ - ドン, カンサン - マウル, ウーソン アpartment, # 1 9 0 6 - 1 3 0 2

Fターム(参考) 4B050 CC10 DD11 LL03

4H045 BA10 CA40 EA50

专利名称(译)	用于糖尿病和/或视网膜血管疾病诊断及其诊断方法的组合物		
公开(公告)号	JP2008506108A	公开(公告)日	2008-02-28
申请号	JP2007520231	申请日	2005-07-06
[标]申请(专利权)人(译)	爱吉恩公司		
申请(专利权)人(译)	Aijin公司		
[标]发明人	チヨヤンジエ アンブヨン ユーウォンイル クオンオウウン		
发明人	チヨ,ヤン-ジエ アン,ブ-ヨン ユー,ウォン-イル クオン,オウ-ウン		
IPC分类号	G01N33/53 C12N9/88 C07K14/47		
CPC分类号	G01N33/6893 C12Q1/527 G01N33/564 G01N2800/164		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.N C12N9/88 C07K14/47		
F-TERM分类号	4B050/CC10 4B050/DD11 4B050/LL03 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/EA50		
优先权	1020040052385 2004-07-06 KR		
其他公开文献	JP5014126B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明中，糖尿病和视网膜血管疾病的诊断组合物，含有该蛋白质的视网膜血管疾病的诊断试剂盒，以分析使用基因由糖尿病和/或视网膜血管疾病所产生的抗体和此编码它一种方法。

