

(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2018-520338
(P2018-520338A)

(43) 公表日 平成30年7月26日(2018.7.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/68	2 GO 4 1
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	2 GO 4 5
GO 1 N 27/62 (2006.01)	GO 1 N 27/62 V	
	GO 1 N 27/62 X	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 23 頁)

(21) 出願番号 特願2017-556934 (P2017-556934)
 (86) (22) 出願日 平成27年8月19日 (2015. 8. 19)
 (85) 翻訳文提出日 平成29年10月30日 (2017. 10. 30)
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2015/008642
 (87) 国際公開番号 W02016/175393
 (87) 国際公開日 平成28年11月3日 (2016. 11. 3)
 (31) 優先権主張番号 10-2015-0061981
 (32) 優先日 平成27年4月30日 (2015. 4. 30)
 (33) 優先権主張国 韓国 (KR)

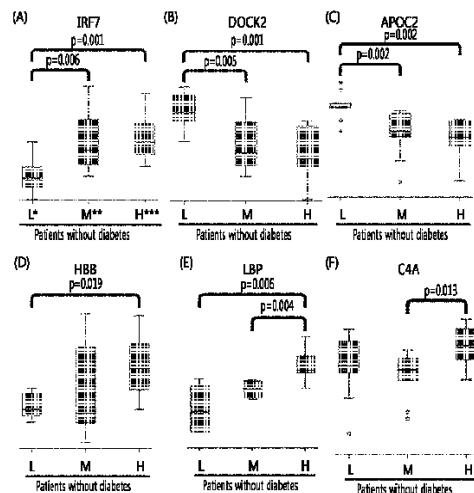
(71) 出願人 512139102
 ユニバーシティ-インダストリー コーオ
 ペレイション グループ オブ キョンヒ
 ユニバーシティ
 UNIVERSITY-INDUSTRY
 COOPERATION GROUP
 OF KYUNG HEE UNIVER
 SITY
 大韓民国キョンギード、ヨンイン-シ、キ
 フン-グ、トギョン-デロ、1732、キ
 ャンヒ、ユニバーシティ、グローバル、キ
 ャンパス

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血管狭窄疾患診断用マーカー及びその用途

(57) 【要約】

本発明はポリ(ADP リボース)ポリメラーゼ4 (Poly(ADP-ribose) polymerase 4、PARP4)、ビタミンD結合タンパク質 (Vitamin D-binding protein、VDB) 及びラミニンサブユニットベータ1 (Laminin subunit beta-1、LAMB1) からなる群から選択された一つ以上のタンパク質レベルを測定する製剤を含む、非糖尿病性血管狭窄疾患の診断用組成物、インターフェロン調節因子7 (Interferon regulatory factor 7、IRF7)、細胞質分裂タンパク質のデディケーター2 (Dedicator of cytokinesis protein 2、DOCK2) 及びヘモグロビンサブユニットベータ (Hemoglobin subunit beta、HBB) からなる群から選択された一つ以上のタンパク質レベルを測定する製剤を含む、糖尿病性血管狭窄疾患の診断用組成物、及び前記組成物を含む、血管狭窄疾患の診断用キット、前記非糖尿病性血管狭窄疾患診断のための情報提供方法及び前記非糖尿病



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

ポリ(ADP リボース)ポリメラーゼ4 (Poly (ADP - ribose) polymerase 4、PARP4)、ビタミンD結合タンパク質 (Vitamin D-binding protein、VDB) 及びラミニンサブユニットベータ1 (Laminin subunit beta-1、LAMB1) からなる群から選択された一つ以上のタンパク質レベルを測定する製剤を含む、非糖尿病性血管狭窄疾患の診断用組成物。

【請求項 2】

インターフェロン調節因子7 (Interferon regulatory factor 7、IRF7)、細胞質分裂タンパク質のデディケーター2 (Dedicator of cytokinesis protein 2、DOCK2) 及びヘモグロビンサブユニットベータ (Hemoglobin subunit beta、HBB) からなる群から選択された一つ以上のタンパク質レベルを測定する製剤を含む、糖尿病性血管狭窄疾患の診断用組成物。

10

【請求項 3】

前記タンパク質レベルを測定する製剤が、前記タンパク質に特異的に結合する抗体を含むものである、請求項 1 または 2 に記載の血管狭窄疾患の診断用組成物。

【請求項 4】

前記血管狭窄疾患が、脳卒中、アテローム性動脈硬化症、血管再狭窄 (in-stent restenosis)、心筋梗塞または動脈硬化症である、請求項 1 または 2 に記載の血管狭窄疾患の診断用組成物。

20

【請求項 5】

請求項 1 または 2 に記載の組成物を含む、血管狭窄疾患の診断用キット。

【請求項 6】

前記キットが、ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) キット、タンパク質チップキット、ラピッド (rapid) キットまたは MRM (Multiple reaction monitoring) キットである、請求項 5 に記載の血管狭窄疾患の診断用キット。

【請求項 7】

(a) 生物学的試料からポリ(ADP リボース)ポリメラーゼ4 (Poly (ADP - ribose) polymerase 4、PARP4)、ビタミンD結合タンパク質 (Vitamin D-binding protein、VDB) 及びラミニンサブユニットベータ1 (Laminin subunit beta-1、LAMB1) からなる群から選択された一つ以上のタンパク質の発現レベルを測定する段階；及び

30

(b) 前記 (a) 段階で測定されたタンパク質の発現レベルを正常対照区試料と比較する段階を含む、非糖尿病性血管狭窄疾患診断のための情報提供方法。

【請求項 8】

(a) 生物学的試料からインターフェロン調節因子7 (Interferon regulatory factor 7、IRF7)、細胞質分裂タンパク質のデディケーター2 (Dedicator of cytokinesis protein 2、DOCK2) 及びヘモグロビンサブユニットベータ (Hemoglobin subunit beta、HBB) からなる群から選択された一つ以上のタンパク質の発現レベルを測定する段階；及び

40

(b) 前記 (a) 段階で測定されたタンパク質の発現レベルを正常対照区試料と比較する段階を含む、糖尿病性血管狭窄疾患診断のための情報提供方法。

【請求項 9】

血管狭窄疾患が疑われる個体から分離された試料の前記タンパク質の発現レベルが正常対照群試料のタンパク質の発現レベルより高いか低い場合、血管狭窄疾患と判断することを特徴とする、請求項 7 または 8 に記載の血管狭窄疾患診断のための情報提供方法。

50

【請求項10】

前記血管狭窄疾患が、脳卒中、アテローム性動脈硬化症、血管再狭窄 (in-stent restenosis)、心筋梗塞または動脈硬化症である、請求項7または8に記載の血管狭窄疾患診断のための情報提供方法。

【請求項11】

前記タンパク質発現レベルの測定が、該当タンパク質に特異的に結合する抗体を利用するものである、請求項7または8に記載の血管狭窄疾患診断のための情報提供方法。

【請求項12】

前記タンパク質発現レベルの測定または比較が、タンパク質チップ分析、免疫測定法、リガンド結合アッセイ、MALDI-TOF (Matrix Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) 分析、放射線免疫分析、放射免疫拡散法、オクタロニー免疫拡散法、ロケット免疫電気泳動、組織免疫染色、補体固定分析法、2次元電気泳動分析、液状クロマトグラフィー質量分析 (liquid chromatography - Mass Spectrometry、LC-MS)、LC-MS/MS (liquid chromatography - Mass Spectrometry / Mass Spectrometry)、ウエスタンブロット及びELISA (enzyme linked immunosorbent assay) で構成された群から選択されたものを用いて行うことを特徴とする、請求項7または8に記載の血管狭窄疾患診断のための情報提供方法。

10

20

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は非糖尿病性血管狭窄疾患の診断用組成物、糖尿病性血管狭窄疾患の診断用組成物、及び前記組成物を含む血管狭窄疾患の診断用キット、非糖尿病性血管狭窄疾患診断のための情報提供方法及び糖尿病性血管狭窄疾患診断のための情報提供方法を提供する。

【背景技術】**【0002】**

最近になって、生活環境の都市化、過度の栄養摂取などが原因で様々な疾患が複合的に現れる代謝性症候群の患者が急増している傾向である。全世界的に代謝性疾患である糖尿病と肥満のリスクが増加していて、糖尿病の有病率が人口の10%を越え始めた。

30

【0003】

韓国でも、2005～2007年国民健康栄養調査の結果によると、成人人口の10%が糖尿病患者であり、30%以上が肥満患者で、これらの糖尿病の爆発的な増加は世界的な傾向である。また、代謝性症候群に属する脳血管疾患、心臓病、糖尿病、高血圧疾患による死亡者数は、がんによる死亡者数を越えている。

【0004】

糖尿病患者の主な死亡原因は心血管系疾患で、全体の糖尿病患者の死亡原因の40%を心筋梗塞と脳梗塞が占めている。特に、糖尿病性心血管疾患の場合、無症状の場合が多く、胸痛、めまい、頭痛、しびれなどの症状を感じる場合は、既に血管狭窄がかなり進行された状態であるため、発見時には重症疾患で死亡する可能性が大きい。そのため、血管狭窄を早期発見することと、疾患に対する予防が非常に重要であると言える。

40

【0005】

現在使用されている血管狭窄を早期発見する方法は、間接的に動脈硬化の程度を予想する診断方法であって、頸動脈超音波検査 (carotid artery Doppler ultrasound)、脈波伝達速度の測定 (pulse wave velocity)、血流依存性血管拡張反応 (flow mediated dilatation) などがある。最近開発され臨床に適用されているマルチチャンネル冠動脈断層撮影 (multi-detector coronary computed tomography; MDCT) は、まだ高価な造影剤を使用し、機能検査を伴うなどの限界がある。

50

【0006】

韓国人の最も重要な慢性疾患である糖尿病と、糖尿病患者で第1の死亡原因と明らかになった心血管系疾患は、早期に診断することができるバイオマーカの開発が何よりも急がれる。現在まで、脂肪細胞から分泌されるアディポネクチン(adiponectin)の低下や動脈硬化などの全身的な炎症反応(system inflammation)に關与するCRP、TNF- α 、IL-6などの増加など、一部の血清タンパク質の変化が知られているが、まだ確実に糖尿病患者における心血管系疾患、特に血管狭窄疾患の程度及び疾患状態を予測することができる確立されたバイオマーカはない状況である。

【0007】

韓国でも爆発的に増加している肥満、糖尿病、代謝症候群などの代謝性疾患の有病率を考慮し、前記疾患群はすべて虚血性心血管系合併症が主な死亡原因であるだけに、血管狭窄の進行程度を予測することができるタンパク質バイオマーカの発掘が急がれる実情である。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明者らは血管狭窄の進行を早期診断するために、プロテオミクス技法を導入してバイオマーカを発掘した。特に血管狭窄の高危険群である糖尿と関連した炎症タンパク質の変化に対する報告はたくさんあるが、糖尿と血管狭窄間の全体血液タンパク質の変化は報告されたことがなく、本発明では糖尿の存在有無、血管狭窄の進行程度による患者グループでの血液全体タンパク質をプロテオミクス技法により分析して、糖尿の有無、血管狭窄の程度により変化するタンパク質をバイオマーカとして使用しうることを確認し、これを通じて糖尿患者または非糖尿患者での血管狭窄進行状況をモニタリングできることを確認し、本発明を完成した。

20

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明の一つの目的は、非糖尿病性血管狭窄疾患の診断用組成物を提供することにある。

本発明の他の目的は、糖尿病性血管狭窄疾患の診断用組成物を提供することにある。

30

【0010】

本発明のまた他の目的は、前記組成物を含む、血管狭窄疾患の診断用キットを提供することにある。

本発明のまた他の目的は、非糖尿病性血管狭窄疾患診断のための情報提供方法を提供することにある。

【0011】

本発明のまた他の目的は、糖尿病性血管狭窄疾患診断のための情報提供方法を提供することにある。

【発明の効果】

【0012】

本発明は、血管狭窄疾患の診断用組成物を提供することにより、非糖尿病性または糖尿病性血管狭窄疾患の患者における発現が変化するタンパク質の発現レベルを測定及び比較することにより、血管狭窄疾患の早期診断及び疾病程度を有意的に予測または把握することができる。

40

【0013】

また、本発明の診断用組成物は非侵襲性診断を可能にして血液、尿検査などにより簡単に有効な血管狭窄疾患の初期診断を行うことができる。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】非糖尿患者における血管狭窄によって有意に発現量の差があるタンパク質を示したものである。

50

【図2】糖尿患者における血管狭窄によって有意に発現量の差があるタンパク質を示したものである。

【発明を実施するための形態】

【0015】

前記目的を達成するために、本発明は一つの様態として、血管狭窄疾患の診断用組成物を提供する。

一様態で、前記血管狭窄疾患の診断用組成物は、ポリ(ADP リボース)ポリメラーゼ4 (Poly (ADP - ribose) polymerase 4、PARP4)、ビタミンD結合タンパク質 (Vitamin D - binding protein、VDB) 及びラミニンサブユニットベータ1 (Laminin subunit beta - 1、LAMB1) からなる群から選択された一つ以上のタンパク質レベルを測定する製剤を含む、非糖尿病性血管狭窄疾患の診断用組成物であってもよい。

10

【0016】

本発明で用語、「血管狭窄疾患」は、血管が狭くなる疾患であり、狭窄になると血流量が減少され狭窄が発生した血管が分布する部位に虚血が起こることになったり、表面の粗い動脈硬化で血栓や硬化のピースが離れていく塞栓が発生して症状を引き起こす疾患を制限なく含む。本発明の血管狭窄疾患に該当する場合、前記した血管内膜の肥厚が進行されるにつれて、血管の狭窄が起こることがあり、血管壁の弾力が減って血管破裂による出血が発生しうる。本発明で血管狭窄疾患は、脳卒中、アテローム性動脈硬化症、血管再狭窄 (in - stent restenosis)、心筋梗塞または動脈硬化症であってもよいが、これに制限されない。

20

【0017】

本発明で使用された用語、「診断」は、病理状態の存在または特徴を確認することを意味する。本発明の目的上、診断は血管狭窄疾患の発病の有無を確認することであって、糖尿病患者から血管狭窄疾患の発病有無を早期に確認することができる。

【0018】

本発明で前記ポリ(ADP リボース)ポリメラーゼ4 (Poly (ADP - ribose) polymerase 4、PARP4) は、ポリ(ADP - リボシル) 化反応を触媒するポリ(ADP - リボシル) トランスフェラーゼ様1タンパク質をコードするものとして知られており、血管狭窄疾患との関連性に関して本発明者らが最初に究明した。

30

【0019】

前記ビタミンD結合タンパク質 (Vitamin D - binding protein、VDB) は、VDB - グロブリン (群特異的成分) として知られており、アルブミン遺伝子ファミリーに属し、ビタミンDに結合してビタミンDをターゲット組織に伝達するものと知られており、血管狭窄疾患との関連性に関して本発明者らが最初に究明した。

【0020】

前記ラミニンサブユニットベータ1 (Laminin subunit beta - 1、LAMB1) は細胞外基質構成成分であって、他の細胞外マトリックス成分と相互作用し、細胞の付着、移動などに関与するものとして知られており、血管狭窄疾患との関連性に関して本発明者らが最初に究明した。

40

【0021】

また、他の一様態として、本発明の血管狭窄疾患の診断用組成物は、インターフェロン調節因子7 (Interferon regulatory factor 7、IRF7)、細胞質分裂タンパク質のデディケーター2 (Dedicator of cytokinesis protein 2、DOCK2) 及びヘモグロビンサブユニットベータ (Hemoglobin subunit beta、HBB) からなる群から選択された一つ以上のタンパク質のレベルを測定する製剤を含む、糖尿病性血管狭窄疾患の診断用組成物であってもよい。

【0022】

前記インターフェロン調節因子7 (Interferon regulatory f

50

actor 7、IRF7)は、インターフェロン調節転写因子ファミリーに属し、ウイルスが誘導された細胞遺伝子の転写を活性化させるものとして知られており、糖尿患者での血管狭窄疾患との関連性に関して本発明者らが最初に究明した。

【0023】

前記細胞質分裂タンパク質のデディケーター2 (Dedicator of cytokinesis protein 2、DOCK2)は、Gタンパク質であるRacを活性化させて細胞内シグナル伝達に関与するものとして知られており、糖尿患者での血管狭窄疾患との関連性に関して本発明者らが最初に究明した。

【0024】

前記ヘモグロビンサブユニットベータ (Hemoglobin subunit beta、HBB)は、ヘモグロビンAを形成するヘモグロビンアルファ1 (HBA1)と相互作用するものとして知られており、糖尿患者での血管狭窄疾患との関連性に関して本発明者らが最初に究明した。

【0025】

本発明の一実施例では、非糖尿患者らは血管狭窄の程度によって低危険群(0%)、中危険群(0~50%)、高危険群(50%以上)に分類し、糖尿患者らを血管狭窄の程度によって低危険群、中危険群、高危険群患者に分類した。以後、これら患者の血液試料を採取して血管狭窄の程度によって差があるタンパク質をTMT(Tandem Mass Tag)による相対定量法を利用して血管狭窄危険群グループ間のタンパク質発現様相を観察し、その中でその差が有意な(p値<0.05)タンパク質100個を1次バイオマーカー候補群と選定した。前記選定された1次バイオマーカー候補群を検証するために、各グループ当り10名の患者試料を用いて1次バイオマーカー候補群に対する検証を行い、最終的に非糖尿患者群では6種のタンパク質であるPARP4、VDB、LAMB1、C4A、LBP、APOC2が血管狭窄の危険度によって有意性のある変化する様相を確認し、これらタンパク質が血管狭窄疾患の診断用マーカーとして活用しうることを確認した。また、糖尿患者からも6種のタンパク質であるIRF7、DOCK2、HBB、C4A、LBP、APOC2が血管狭窄の危険度によって有意性のあるように変化する様相を確認し、これらタンパク質が血管狭窄疾患の診断用マーカーとして活用しうることを確認した。

【0026】

特に非糖尿患者から確認されたバイオマーカーのうち、PARP4は血管狭窄低危険群に比べて中危険群でPARP4タンパク質の発現が減少し、C4Aは低危険群に比べて高危険群でC4Aタンパク質発現が減少し、APOC2は低危険群に比べて中危険群、高危険群いずれもAPOC2タンパク質発現が増加し、VDBは低危険群に比べて中危険群、高危険群いずれもVDBタンパク質発現が減少し、LAMB1は低危険群に比べて中危険群、高危険群いずれもVDBタンパク質発現が増加し、LBPは中危険群に比べて高危険群でLBPタンパク質発現が増加したことを確認した。

【0027】

また、糖尿患者から確認されたバイオマーカーのうち、IRF7は低危険群に比べて中危険群、高危険群いずれもIRF7タンパク質発現が増加し、DOCK2は低危険群に比べて中危険群、高危険群いずれもDOCK2タンパク質発現が減少し、APOC2は低危険群に比べて中危険群、高危険群いずれもAPOC2タンパク質発現が減少し、HBBは低危険群に比べて高危険群でHBBタンパク質発現が増加し、LBPは低危険群に比べて中危険群、高危険群いずれもLBPタンパク質発現が増加し、C4Aは中危険群に比べて高危険群でC4Aタンパク質発現が増加したことを確認した。

【0028】

したがって、前記PARP4、VDB、LAMB1、C4A、LBP、APOC2はすべて正常対照群(糖尿病と血管狭窄疾患がない個体)と比較して、糖尿病はないが血管狭窄疾患がある個体で該当タンパク質の発現レベルが変化する特徴を有するため、非糖尿病性血管狭窄疾患診断のためのマーカーとして使用されうる。

10

20

30

40

50

【0029】

また、前記 I R F 7、D O C K 2、H B B、C 4 A、L B P、A P O C 2 はすべて対照群（糖尿病はあるが、血管狭窄疾患がない個体）と比較して、糖尿病と血管狭窄疾患がある個体で該当タンパク質の発現レベルが変化する特徴を有するため、糖尿病性血管狭窄疾患診断のためのマーカーと使用されうる。

【0030】

本発明で用語、「マーカー (m a r k e r) 」とは、正常群個体と血管狭窄疾患を有する個体とを区分して診断することができる物質であり、本発明の血管狭窄疾患を有する個体で増加または減少を示すポリペプチド、タンパク質、糖タンパク質などのような有機生体分子をすべて含む。特に、本発明では、本発明の非糖尿病性血管狭窄疾患を有する個体または糖尿病性血管狭窄疾患を有する個体で変化されるタンパク質であってもよいが、これに制限されない。

10

【0031】

本発明で使用された用語、「タンパク質レベル測定」とは、血管狭窄疾患の診断のために生物学的試料で血管狭窄疾患の診断用マーカータンパク質の存在有無と発現程度を確認する過程である。前記マーカータンパク質に対して特異的に結合する抗体を用いてタンパク質の量を確認することができ、または抗体を利用せずタンパク質発現のレベル自体を測定することもできる。

【0032】

前記タンパク質レベル測定または比較分析方法としては、タンパク質チップ分析、免疫測定法、リガンド結合アッセイ、M A L D I - T O F (M a t r i x D e s c r i p t i o n / I o n i z a t i o n T i m e o f F l i g h t M a s s S p e c t r o m e t r y) 分析、放射線免疫分析、放射免疫拡散法、オクタロニー免疫拡散法、ロケット免疫電気泳動、組織免疫染色、補体固定分析法、2次元電気泳動分析、液状クロマトグラフィー質量分析 (l i q u i d c h r o m a t o g r a p h y - M a s s S p e c t r o m e t r y 、 L C - M S) 、 ウ エ ス タ ン プ ロ ッ ト 及 び E L I S A (e n z y m e l i n k e d i m m u n o s o r b e n t a s s a y) などがあがるが、これに制限されるものではない。

20

【0033】

非糖尿病性血管狭窄疾患の診断のため、前記タンパク質レベルを測定する製剤は P A R P 4、V D B 及び L A M B 1 から選択されるタンパク質に特異的に結合する抗体を含んでもよい。

30

【0034】

また、糖尿病性血管狭窄疾患の診断のため、前記タンパク質レベルを測定する製剤は I R F 7、D O C K 2 及び H B B から選択されるタンパク質に特異的に結合する抗体を含んでもよい。

【0035】

本発明で使用された用語、「抗体」は、抗原性部位に対して指示される特異的なタンパク質分子を意味する。本発明の目的上、抗体は前記 P A R P 4、V D B、L A M B 1、I R F 7、D O C K 2 及び H B B の中で選択される1つ以上のタンパク質に対して特異的に結合する抗体を意味し、多クローン抗体、単クローン抗体及び組換え抗体をすべて含む。抗体を生成することは当業界で広く公知された技術を利用して容易に製造することができる。

40

【0036】

また、本発明の抗体は2つの全長軽鎖及び2つの全長重鎖を有する完全な形態だけでなく、抗体分子の機能的な断片を含む。抗体分子の機能的な断片とは、少なくとも抗原結合機能を保有している断片を意味し、F a b、F (a b ')、F (a b ') 2 及び F v などがある。

【0037】

本発明の他の様態として、前記血管狭窄疾患の診断用組成物を含む血管狭窄疾患の診断

50

用キットを提供する。好ましくは、前記キットは、E L I S A (E n z y m e - l i n k e d i m m u n o s o r b e n t a s s a y) キット、タンパク質チップキット、ラピッド (r a p i d) キットまたは M R M (M u l t i p l e r e a c t i o n m o n i t o r i n g) キットであってもよい。

【 0 0 3 8 】

また、好ましくは、前記血管狭窄疾患の診断用キットは分析方法に適合する一種またはそれ以上の他の構成成分組成物、溶液または装置をさらに含んで構成されてもよい。

また好ましくは、E L I S A を行うために必要な必須要素を含むことを特徴とする診断キットであってもよい。E L I S A キットは前記タンパク質に対する特異的な抗体を含む。前記抗体は各マーカータンパク質に対する特異性及び親和性が高く、他のタンパク質に対する交差反応性がほとんどない抗体で、単クローン抗体、多クローン抗体または組換え抗体である。また、E L I S A キットは対照群タンパク質に特異的な抗体を含むことができる。その他、E L I S A キットは結合された抗体を検出することができる試薬、例えば、標識された2次抗体、発色団 (c h r o m o p h o r e s) 、酵素 (例 : 抗体とコンジュゲートされる) 及びその基質または抗体と結合することができる他の物質を含んでもよい。

10

【 0 0 3 9 】

また、好ましくは、5分以内に分析結果を知ることができる迅速なテストを行うために必要な必須要素を含むことを特徴とするラピッド (r a p i d) キットであってもよい。ラピッドキットはタンパク質に対する特異的な抗体を含む。前記抗体は各マーカータンパク質に対する特異性及び親和性が高く、他のタンパク質に対する交差反応性がほとんどない抗体で、単クローン抗体、多クローン抗体または組換え抗体である。また、ラピッドキットは対照群タンパク質に特異的な抗体を含むことができる。その他、ラピッドキットは結合された抗体を検出することができる試薬、例えば、特異抗体と2次抗体が固定されたニトロセルロースメンブレン、抗体が結合されたビーズに結合されたメンブレン、吸収パッドとサンプルパッドなどの他の物質などを含むことができる。

20

【 0 0 4 0 】

また、好ましくは質量分析を行うために必要な必須要素を含むことを特徴とする、M S / M S モードである M R M (M u l t i p l e r e a c t i o n m o n i t o r i n g) キットであってもよい。S I M (S e l e c t e d I o n M o n i t o r i n g) が質量分析機のソース部分で一度衝突して生じたイオンを利用する方法であるのに対し、M R M は前記で一度割れたイオンの中で特定イオンをもう一度選択して連続的に連結されたまた別の M S のソースをもう一回通過して衝突させた後、この中で得られたイオンを利用する方法である。より具体的に、S I M では選択した定量イオンが血漿からも検出されるイオンである場合、定量するのに邪魔されるという問題点がある。反面、M R M を利用する場合、同様の質量を有するイオンであっても、もう一回割れば分子構造が異なるように差別化された傾向を示すため、これを定量イオンとして使用すればバックグラウンドで邪魔されるピークが除去されて、より一層きれいなベースラインを得ることができる。したがって、質量分析の時に M R M モードを使用して、より優れた分析感度で希望物質を同時に分析することができる。前記 M R M (M u l t i p l e r e a c t i o n m o n i t o r i n g) 分析方法を介して、非糖尿患者から正常対照群でのタンパク質発現レベルと血管狭窄疾患がある個体でのタンパク質発現レベルを比較することができ、また、糖尿患者で血管狭窄がない個体のタンパク質発現レベルと血管狭窄がある個体でのタンパク質発現レベルを比較して、血管狭窄疾患の発病有無を診断することができる。

30

40

【 0 0 4 1 】

本発明の他の様態として、血管狭窄疾患診断のための情報提供方法を提供する。

好ましくは、本発明の方法は、(a) 生物学的試料からポリ (A D P リボース) ポリメラーゼ 4 (P o l y (A D P - r i b o s e) p o l y m e r a s e 4 、 P A R P 4) 、ビタミン D 結合タンパク質 (V i t a m i n D - b i n d i n g p r o t e i n 、 V D B) 及びラミニンサブユニットベータ 1 (L a m i n i n s u b u n i t b e

50

t a - 1、L A M B 1) からなる群から選択された一つ以上のタンパク質の発現レベルを測定する段階；及び

(b) 前記 (a) 段階で測定されたタンパク質の発現レベルを正常対照区試料と比較する段階を含む、非糖尿病性血管狭窄疾患診断のための情報提供方法であってもよい。

【 0 0 4 2 】

また、好ましくは、本発明の方法は、(前記 (a) 生物学的試料からインターフェロン調節因子 7 (Interferon regulatory factor 7、I R F 7)、細胞質分裂タンパク質のデディケーター 2 (Dedicator of cytokinesis protein 2、D O C K 2) 及びヘモグロビンサブユニットベータ (Hemoglobin subunit beta、H B B) からなる群から選択された一つ以上のタンパク質の発現レベルを測定する段階；及び

10

(b) 前記 (a) 段階で測定されたタンパク質の発現レベルを正常対照区試料と比較する段階を含む、糖尿病性血管狭窄疾患診断のための情報提供方法であってもよい。

【 0 0 4 3 】

本発明で使用された用語、「生物学的試料」とは、血管狭窄疾患発病によりタンパク質発現レベルが相異なる全血、血清、血漿、唾液、脳脊髄液または尿のような試料などを含むが、これに限定されない。

【 0 0 4 4 】

前記 P A R P 4、V D B 及び L A M B 1 はすべて正常対照群 (糖尿病と血管狭窄疾患がない個体) と比較して、糖尿病はないが血管狭窄疾患がある個体でタンパク質の発現レベルが変化する特徴を有するため、前記レベルが変化すると非糖尿病性血管狭窄疾患と診断することができる。

20

【 0 0 4 5 】

前記 I R F 7、D O C K 2 及び H B B はすべて対照群 (糖尿病はあるが、血管狭窄疾患がない個体) と比較して、糖尿病と血管狭窄疾患がある個体でタンパク質の発現レベルが変化する特徴を有するため、前記レベルが変化すると糖尿病性血管狭窄疾患と診断することができる。

【 0 0 4 6 】

したがって、血管狭窄疾患が疑われる個体から分離された試料のタンパク質の発現レベルが正常対照群試料のタンパク質の発現レベルより高いか低い場合、血管狭窄疾患と判断することができる。

30

【 0 0 4 7 】

好ましくは、本発明の前記タンパク質の発現レベルは該当タンパク質に特異的に結合する抗体を利用して測定及び比較することができる。前記抗体と生物学的試料内の該当タンパク質が抗原 - 抗体複合体を形成するようにして、これを検出する方法を利用する。

【 0 0 4 8 】

本発明で使用された用語、「抗原 - 抗体複合体」は、生物学的試料中の該当タンパク質抗原とこれを認知する抗体の結合物を意味する。前記抗原 - 抗体複合体の検出は当業界に公知となったような方法、例えば、分光学的、光化学的、生物化学的、免疫化学的、電気的、吸光的、化学的及びその他の方法を利用して検出することができる。

40

【 0 0 4 9 】

本発明の目的上、前記タンパク質発現レベルの測定または比較分析方法としては、タンパク質チップ分析、免疫測定法、リガンド結合アッセイ、M A L D I - T O F (Matrix Desorption / Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) 分析、放射線免疫分析、放射免疫拡散法、オクタロニー免疫拡散法、ロケット免疫電気泳動、組織免疫染色、補体固定分析法、2次元電気泳動分析、液状クロマトグラフィー質量分析 (liquid chromatography - Mass Spectrometry、L C - M S)、L C - M S / M S (liquid chromatography - Mass Spectrometry / Mass Spectrometry)、ウエスタンブロット及び E L I S A (enzyme

50

linked immunosorbent assay) などがあるが、これに制限されるものではない。

【0050】

本発明の具体的な実施例では、PARP4、VDB、LAMB1、IRF7、DOCK2、HBB、C4A、LBP及びAPOC2のタンパク質発現のレベル自体を測定及び比較するために、LC-MS/MS方法を使用した。

【0051】

(実施例)

以下、本発明を実施例を通じてより詳細に説明する。しかし、これらの実施例は、本発明を例示的に説明するためのもので、本発明の範囲がこれらの実施例に限定されるものではない。

10

【0052】

実施例1．患者の血液試料準備

非糖尿患者らの中で血管狭窄詰まりの程度によって低危険群(0%)、中危険群(0~50%)、高危険群(50%以上)に分類し、糖尿患者らの中で血管狭窄の詰まりの程度によって低危険群、中危険群、高危険群患者に分類した。以後、これら患者から血液試料を採取した。

【0053】

実施例2．患者血液試料の豊富な(abundant)タンパク質除去

前記実施例1で採取した血液試料内のタンパク質のうち、14個の高豊富(high-abundant)タンパク質(アルブミン、IgG、抗トリプシン、IgA、トランスフェリン、ハプトグロビン、フィブリノーゲン、アルファ2-マクログロブリン、アルファ1-酸性糖タンパク質、IgM、アポリポタンパク質AI、アポリポタンパク質AII、補体C3、トランスサイレチン)が占める割合は全体タンパク質の95%に達している。したがって、これら14個の高豊富タンパク質により、興味のある低豊富(low-abundant)タンパク質を分析するにおいて、敏感度の減少が相当するため、前記14個のタンパク質をMARS(Multiple Affinity Removal System)カラム(P/N5188-6558、Agilent)を介して除去し、残ったタンパク質だけを後に分析に使用した。

20

【0054】

具体的にMARS(Multiple Affinity Removal System)カラム(P/N5188-6558、Agilent)を利用して、高豊富タンパク質を除去する過程は次のとおりである。

30

【0055】

実施例1で準備された血液試料40μlに50xプロテアーゼ阻害剤(Roche)2μlを入れ緩衝液A60μlを入れて混ぜた。以後、0.22μmフィルター(Agilent、P/N5185-5990)に前記プロテアーゼ阻害剤と緩衝液Aを混ぜた試料を入れ遠心分離器を利用して(14400g、1分、4)、サイズが大きいパーティクルを除去した。以後、HPLCにMARSカラムを連結して移動相A(緩衝液A)、B(緩衝液B)を流した。

40

【0056】

移動相Aを利用して30分ほどカラムを安定化させた後、以下の表1のような条件の移動相勾配を使用して、試料を分離し、フロースルー(9~17分)、溶出(21~23分)時間台の試料を2mlチューブに移し入れた。前記フロースルーから得られた試料は、10Kフィルターチューブに入れ、遠心分離器を用いて(14400g、30分、4)、2mlの試料量を50μlまで濃縮を行った。

【0057】

【表 1】

HPLC使用の移動相勾配

LC時間表

	時間	%B	流速	最高圧力
1	0.00	0.00	0.125	60
2	18.00	0.00	0.125	60
3	18.01	0.00	1.000	60
4	20.00	0.00	1.000	60
5	20.01	100.00	1.000	60
6	27.00	100.00	1.000	60
7	27.01	0.00	1.000	60
8	38.00	0.00	1.000	60

10

20

【0058】

実施例 3 . タンパク質試料のペプチド化

質量分析器を介した分析のためにタンパク質を酵素（トリプシン）を用いてペプチド単位で切片化する過程が先行される必要があるため、次のような過程を利用してタンパク質のペプチド切片化を実施した。

30

【0059】

豊富なタンパク質が除去された 60 μg の濃度に対応する血液試料 50 μl に 150 μl の DTT 溶液（最終濃度 6 M ウレア、10 mM DTT、50 mM トリス）を入れて、37 °C で 1 時間反応（Reduction）した。前記 200 μl の反応された（reduced）サンプルに 20 μl の IAA 溶液（最終濃度：5 . 45 M ウレア、50 M IAA、50 mM トリス）を処理した後、暗所で 30 分間室温で反応（アルキレーション）させた後、1 ml トリス溶液（50 mM pH 8）（最終濃度；1 M ウレア、50 mM トリス最終量 1 . 2 ml）を試料に入れた。以後、トリプシン溶液 5 μl ずつ分注して、37 °C で 12 時間反応させた。

40

【0060】

実施例 4 . ペプチド試料の TMT（Tandem Mass Tag）6plex 試料を用いた標識

質量分析器で相対的定量のために、一般的に使用される TMT - 6plex 試薬を使用して、合計 6 つの試料グループにそれぞれ異なる質量のレポーターイオン（reporter ion）を有する TMT 試薬を反応させた（表 2）。表 2 は、グループごとに標識したレポーターイオンの種類を示す。

【0061】

【表 2】

血管狭窄(%)	正常	糖尿
低危険群0%	126	127
中危険群0-50%	128	129
高危険群50%以上	130	131

10

【0062】

実施例3でペプチド化された試料に200mM TEAB 50 μ Lを入れてボルテクス(vortexing)とスピンドウン(spin down)を実施した。TMT試薬チューブに試料名を書いてTMT試薬に100%ACN 41 μ Lを入れてボルテクス(vortexing)とスピンドウン(spin down)を実施した(キットに入ったACN量は定められており、ペプチド25~100 μ gにACN 41 μ Lが入る)。以後、TMT試薬41 μ Lをサンプルチューブ(ペプチド)に入れた後、ボルテクス(vortexing)とスピンドウン(spin down)した後、室温で1時間反応させた。5%ヒドロキシルアミンをサンプルチューブにそれぞれ8 μ Lずつ入れボルテクス(vortexing)とスピンドウン(spin down)した後、15分間室温でクエンチング(quenching)した。この後、定量、同量の標識したサンプル99 μ Lをそれぞれ取って一つの新しいe-チューブに集めた。

20

【0063】

実施例5. ペプチド分画化、LC-MS/MS分析及びデータ分析遂行

ペプチド試料が有している高いレベルの複雑性(complexity)を減らすためにペプチドが有している固有のPI値を利用して分画化を行った。

【0064】

まず、TMT試薬が標識されたペプチドを、オフジェル希釈緩衝液(offgel dilution buffer)に溶かした。オフゲルフラクショネーター(Offgel fractionators)(3100 offgel fractionator, Agilent)にIPGストリップ(strip)とコム(comb)を結合した後、前記緩衝液に溶解しているサンプルを分注して、4000Vで24時間ランニング(running)した。各分画区間での試料をチューブに移した後、乾燥し、試料に残っている試薬除去のために脱塩(desalting)過程を実施した。

30

【0065】

得られたペプチドは高い分離能と高い再現性を有するUPLCシステムのEasy-nLC(Thermo)にRP(reverse-phase)カラムを利用してペプチドが有する疎水性(hydrophobicity)によって分離した。UPLCによって分離されたペプチドは高解像度、高精度(High resolution/high accuracy)を有する質量分析器であるQ-exactive(登録商標)(Thermo)によりリアルタイムで分析を実行した。Q-exactive(登録商標)によって得られた生データはProteome Discovererソフトウェア(Thermo)のSEQUESTアルゴリズムによってスペクトルを分析し、ペプチドとタンパク質を同定した。Scaffold Q+(Proteome ソフトウェア)を利用して同定されたタンパク質の検証を行い、また、TMTで得られた定量情報を抽出した。RパッケージのいずれかであるIsobarを利用して、統計的な分析を行い各グループ間で有意に発現量の差があるタンパク質を選定した。(p値<0.05)

40

表3は非糖尿患者群/糖尿患者群のグループで、血管狭窄の差により発現量が有意に差があるタンパク質の100個の候補群を示す。

50

【 0 0 6 6 】

【 表 3 - 1 】

番号	遺伝子名	タンパク質名
1	C4A	補体 C4A (Complement C4-A)
2	APOC2	アポリポタンパク質 C-II (Apolipoprotein C-II)
3	LAMB1	ラミニンサブユニットβ-1 (Laminin subunit beta-1)
4	PPBP	血小板基本タンパク質 (Platelet basic protein)
5	LBP	リポポリサッカライド 結合タンパク質 (Lipopolysaccharide-binding protein)
6	IRF7	インターフェロン調節因子7 (Interferon regulatory factor 7)
7	CA1	炭酸脱水酵素 1 (Carbonic anhydrase 1)
8	SERPINA1	α-1 抗トリプシン (Alpha-1-antitrypsin)
9	HBB	ヘモグロビンサブユニットβ (Hemoglobin subunit beta)
10	HP	ハプトグロビン (Haptoglobin)
11	DNAH9	ダイニン重鎖 9、軸系 (Dynein heavy chain 9, axonemal)
12	FLNA	フィラミン-A (Filamin-A)
13	HBA1	ヘモグロビンサブユニットα (Hemoglobin subunit alpha)
14	HPR	ハプトグロビン関連タンパク質 (Haptoglobin-related protein)
15	JHDM1D	リジン特異的デメチラーゼ7 (Lysine-specific demethylase 7)
16	SYNE1	ネスプリン-1 (Nesprin-1)
17	DNAH6	ダイニン重鎖 6、軸系 (Dynein heavy chain 6, axonemal)
18	FGA	フィブリノーゲンα鎖 (Fibrinogen alpha chain)
19	FGB	フィブリノーゲンβ鎖 (Fibrinogen beta chain)
20	FGG	フィブリノーゲン鎖のアイソフォームγ-A (Isoform Gamma-A of Fibrinogen gamma chain)
21	CRP	C反応性タンパク質 (C-reactive protein)
22	CCDC164	多重コイルドメイン含有タンパク質 164 (Coiled-coil domain-containing protein 164)
23	COG6	保存オリゴマーゴルジ複合体サブユニット 6 (Conserved oligomeric Golgi complex subunit 6)
24	FAM179A	配列類似性を有するファミリー179、メンバーA (Family with sequence similarity 179, member A)
25	ICA1L	膵島細胞自己抗原1様タンパク質 (Islet cell autoantigen 1-like protein)
26	TTC40	テトラトリコペプチドリピートタンパク質 40 (Tetratricopeptide repeat protein 40)
27	HSPA4	熱ショック70kDa タンパク質 4 (Heat shock 70 kDa protein 4)
28	S100A9	タンパク質 S100-A9 (Protein S100-A9)
29	S100A8	タンパク質 S100-A8 (Protein S100-A8)
30	NOTCH2	神経原性ノッチホモログタンパク質 2 (Neurogenic locus notch homolog protein 2)

10

20

30

40

【 0 0 6 7 】

【表 3 - 2】

31	TF	セロトランスフェリン (Serotransferrin)	
32	ZG16B	チモーゲン顆粒タンパク質 16B (Zymogen granule protein 16B)	
33	JARID2	タンパク質ジュモンジ (Protein Jumongi)	
34	ATP2B3	ATPase、Ca ⁺⁺ 輸送、原形質膜 3 (ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, plasma membrane 3)	
35	CCDC88B	多重コイル (coiled coil)ドメイン含有タンパク質 88Bのアイソフォーム 4 (Isoform 4 of Coiled-coil domain-containing protein 88B)	
36	SPRR1A	小さなプロリンリッチプロテイン 1A (Small proline-rich protein 1A)	10
37	HRNR	ホルネリン (Hornerin)	
38	DCD	Dermcidin	
39	NRP1	ニューロピリン-1 (Neuropilin-1)	
40	CNTRL	セントリオリンのアイソフォーム 5 (Isoform 5 of Centriolin)	
41	LYZ	リゾチーム C (Lysozyme C)	
42	IGHG3	免疫グロブリン重鎖不変γ 3 (immunoglobulin heavy constant gamma 3)	
43	RPS27A	ユビキチン-40sリボソームタンパク質 S27a (Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a)	
44	KIAA0196	WASH複合サブユニットストランペリン (WASH complex subunit strumpellin)	20
45	MMP9	マトリックスメタロペプチダーゼ 9 (matrix metalloproteinase 9)	
46	PIP	プロラクチン誘発タンパク質 (prolactin-induced protein)	
47	PPFIA2	リプリン - α-2 (Liprin-alpha-2)	
48	URB2	不健全なリボソーム生合成タンパク質 2ホモログ (Unhealthy ribosome biogenesis protein 2 homolog)	
49	SF3A1	スプライシング因子 3A サブユニット 1 (Splicing factor 3A subunit 1)	
50	FAH	フマリルアセトアセターゼ (Fumarylacetoacetase)	
51	FSIP2	繊維鞘 - 相互作用タンパク質 2 (Fibrous sheath-interaction protein 2)	30
52	MYOM2	ミオメシン-2 (Myomesin-2)	
53	PARP4	ポリ[ADP-リボース]ポリメラーゼ 4 (Poly [ADP-ribose] polymerase 4)	
54	PLEKHA6	プレクストリン相同ドメイン含有ファミリー Aメンバ-6 (Pleckstrin homology domain-containing family A member 6)	
55	PPIG	ペプチジル-プロリルシス-トランスイソメラーゼ G (Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase G)	
56	WAC	多重コイルを有するWWドメイン含有アダプタータンパク質 (WW domain-containing adapter protein with coiled-coil)	
57	CNGA3	環状ヌクレオチド依存性カチオンチャンネル α-3 (Cyclic nucleotide-gated cation channel alpha-3)	
58	ARID5B	ATリッチな相互作用ドメイン含有タンパク質 5B (AT-rich interactive domain-containing protein 5B)	
59	MED23	RNAポリメラーゼ II転写サブユニット 23のメディエーター (Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 23)	40
60	CUL5	cullin-5	
61	KANK1	KNモチーフおよびアンキリンリピートドメイン含有タンパク質 1 (KN motif and ankyrin repeat domain-containing protein 1)	
62	RAB3A	Ras関連タンパク質 Rab-3A (Ras-related protein Rab-3A)	

【 0 0 6 8 】

【表 3 - 3】

63	GDI2	Rab GDP 解離阻害因子 β (Rab GDP dissociation inhibitor beta)
64	ZAR1L	ZAR1 様タンパク質 (ZAR1-like protein)
65	DOCK2	サイトキネシスタンパク質2のディケーター (Didicator of cytokinesis protein 2)
66	PZP	妊娠域タンパク質 (pregnancy zone protein)
67	BPIFA1	BPI折り畳み含有ファミリー Aメンバー1 (BPI fold-containing family A member 1)
68	CEP250	セントロソーム関連タンパク質 CEP250 (Centrosome-associated protein CEP250)
69	ATP13A3	可能性のある陽イオン輸送ATPアーゼ13A3 (Probable cation-transporting ATPase 13A3)
70	DENND6A	6A含有DENN / MADDドメイン (DENN/MADD domain containing 6A)
71	TOP2A	DNAトポイソメラーゼ2- α のアイソフォーム4 (Isoform 4 of DNA topoisomerase 2-alpha)
72	CACNA1C	電圧依存性L型カルシウムチャネルサブユニット α -1C (Voltage-dependent L-type calcium channel subunit alpha-1C)
73	KIAA1551	特徴付けられていないタンパク質KIAA1551 (Uncharacterized protein KIAA1551)
74	NCOR1	核受容体コリプレッサー1 (Nuclear receptor corepressor 1)
75	C18orf8	特徴付けられていないタンパク質C18orf8 (Uncharacterized protein C18orf8)
76	MOSPD2	運動性精子ドメイン含有タンパク質2 (Motile sperm domain-containing protein 2)
77	LTF	カリオシン-1(断片) (Kaliocin-1 (Fragment))
78	MBL2	マンノース結合タンパク質 C (Mannose-binding protein C)
79	TPM4	トロポミオシン α -4鎖のアイソフォーム2 (Isoform 2 of Tropomyosin alpha-4 chain)
80	TSC1	ハマチン (Hamartin)
81	RHOBTB1	Rho関連BTBドメイン含有タンパク質1 (Rho-related BTB domain-containing protein 1)
82	SAA1	血清アミロイド A-1タンパク質 (Serum amyloid A-1 protein)
83	PHEX	リン酸調節中性エンドペプチダーゼ (Phosphate-regulating neutral endopeptidase)
84	DSP	デスモプラキン (Desmoplakin)
85	NINL	ninein様タンパク質 (Ninein-like protein)
86	ARL6IP4	ADPリボシル化因子様タンパク質6相互作用タンパク質4 (ADP-ribosylation factor-like protein 6-interacting protein 4)
87	KIAA1522	未同定タンパク質KIAA1522のアイソフォーム2 (Isoform 2 of Uncharacterized protein KIAA1522)
88	SAA2	血清アミロイド A2 (serum amyloid A2)
89	HEG1	タンパク質HEG相同体1 (Protein HEG homolog 1)
90	ABCA13	ATP結合カセットサブファミリーAメンバー13 (ATP-binding cassette sub-family A member 13)
91	AKR7A2	アフラトキシンB1アルデヒドレダクターゼメンバー2 (Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 2)
92	GTF3C1	一般的な転写因子3Cポリペプチド1 (General transcription factor 3C polypeptide 1)
93	SUMF2	スルファターゼ修飾因子 2 (G) (Sulfatase-modifying factor 2)
94	ABCC1	多剤耐性関連タンパク質 1 (Multidrug resistance-associated protein 1)

【 0 0 6 9 】

【表 3 - 4】

95	GTF3C3	一般的な転写因子3Cポリペプチド 3 (General transcription factor 3C polypeptide 3)
96	SCUBE2	シグナルペプチド、CUBおよびEGF様ドメイン含有タンパク質2 (Signal peptide, CUB and EGF-like domain-containing protein 2)
97	FNIP1	フォリクリン相互作用タンパク質 1 (Folliculin-interaction protein 1)
98	OSBPL6	オキシステロール結合タンパク質関連タンパク質6のアイソフォーム 3 (Isoform 3 of Oxysterol-binding protein-related protein 6)
99	RUSC2	iporin
100	GC	ビタミンD結合タンパク質 (Vitamin D-binding protein)

10

【0070】

実施例 6 : MRM (Multiple Reaction Monitoring) を通じたバイオマーカー候補検証

バイオマーカー候補の検証のために、1次バイオマーカー候補群のMRMトランジションを選定した。タンパク質一つ当たり最大3つのペプチドを選定し、ペプチドごとに3つのトランジションリストを選定した。MRMトランジションの選定は、スカイラインソフトウェア (<https://skylines.gs.washington.edu/labkey/project/home/software/Skyline/begin.view>) を使用し、NISTが提供するMRMトランジションデータベースを使用してトランジションを選定した。この時の選択基準は、次のとおりである。

20

【0071】

1. 長さ 20
2. 充電状態 = +2 または +3
3. No M、W (酸化)
4. NTT = 2
5. NMC = 0
6. 近隣KR = 0

選定されたペプチドトランジションは血液試料を用いてMRM分析を先行して行い、そのトランジションの適合性を確認した。トランジションの確認条件は、以下のとおりである。

30

【0072】

1. スカイラインが提供するドットプロダクトスコアが 0.8 以上
2. 同じMS1から派生した3種のトランジションピークが同様な保持時間から共溶出の有無
3. 3回繰り返しを通じて再現性のある保持時間を持つか否か
4. S/N > 10 以上のピーク面積強度を持つか否か

前記候補タンパク質の100個のうち、非糖尿病患者で血管狭窄の有無に応じて有意に発現量の差があるタンパク質と検証されたのは、PARP4、C4A、APOC2、LBP、VDB、LAMB1に該当する6つのタンパク質であった(図1参照)。具体的に、検証されたタンパク質の中で、PARP4は血管狭窄低危険群に比べて中危険群でPARP4タンパク質の発現が減少し、C4Aは低危険群に比べて高危険群でC4Aタンパク質発現が減少し、APOC2は低危険群に比べて中危険群、高危険群いずれもAPOC2タンパク質の発現が増加し、VDBは低危険群に比べて中危険群、高危険群いずれもVDBタンパク質の発現が減少し、LAMB1低危険群に比べて中危険群、高危険群いずれもLAMB1タンパク質の発現が減少し、LBPは中危険群に比べて高危険群でLBPタンパク質の発現が増加したことを確認した。

40

【0073】

また、前記候補タンパク質の100個のうち、糖尿病患者で血管狭窄の有無に応じて有意に発現量の差があるタンパク質と検証されたのは、DOCK2、C4A、APOC2、

50

IRF7、HBB、LBPに該当する6つのタンパク質であった(図2参照)。具体的に、検証されたタンパク質の中で、IRF7は低危険群に比べて中危険群、高危険群いずれもIRF7タンパク質の発現が増加し、DOCK2は低危険群に比べて中危険群、高危険群いずれもDOCK2タンパク質の発現が減少し、APOC2は低危険群に比べて中危険群、高危険群いずれもAPOC2タンパク質の発現が減少し、HBBは低危険群に比べて高危険群でHBBタンパク質の発現が増加し、LBPは低危険群に比べて中危険群、高危険群いずれもLBPタンパク質の発現が増加し、C4Aは中危険群に比べて高危険群でC4Aタンパク質の発現が増加したことを確認した。

【0074】

表4はMRM(Multiple Reaction Monitoring)に使用されたペプチド配列を示したもので、非糖尿病性/糖尿病性血管狭窄を診断することができるタンパク質のペプチド配列を示したものである。

【0075】

【表4】

非糖尿病性血管狭窄診断マーカータンパク質					
インデックス アクセッション番号	タンパク質名	ペプチド配列	ターゲットイオン	Q1/Q3	
1	Q9UUK3	PARP4	NGETAQLQK	y7	559.6/818.0
2	B4DDH0	C4A	VDFTLSSER	y7	527.6/591.6
3	K7ER74	APOC2	TYLPAVDEK	y6	518.6/658.7
4	P02774	VDB	VLEPTLK	y5	400.5/587.7
5	G3XAI2	LAMB1	ISGVIGPYR	y5	481.6/605.7
6	P18428	LBP	ITLPDFTGDLR	y8	626.1/923.4

糖尿病性血管狭窄診断マーカータンパク質					
インデックス アクセッション番号	タンパク質名	ペプチド配列	ターゲットイオン	Q1/Q3	
1	Q92608	DOCK2	DILLPVITK	y5	506.6/557.7
2	B4DDH0	C4A	VDFTLSSER	y7	527.6/591.6
3	K7ER74	APOC2	TYLPAVDEK	y6	518.6/658.7
4	Q92985	IRF7	ATDPQQVAFPSAELPDQK	y9	680.3/984.5
5	P68871	HBB	EFTPPVQAAYQK	y9	690.2/501.6
6	P18428	LBP	ITLPDFTGDLR	y8	626.1/923.4

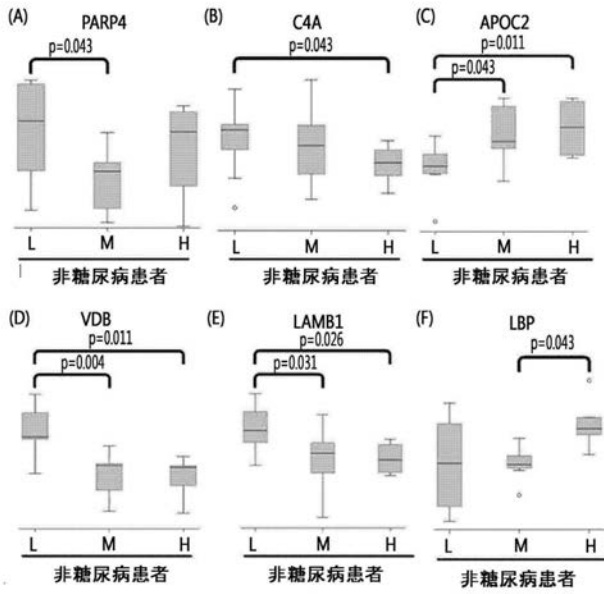
10

20

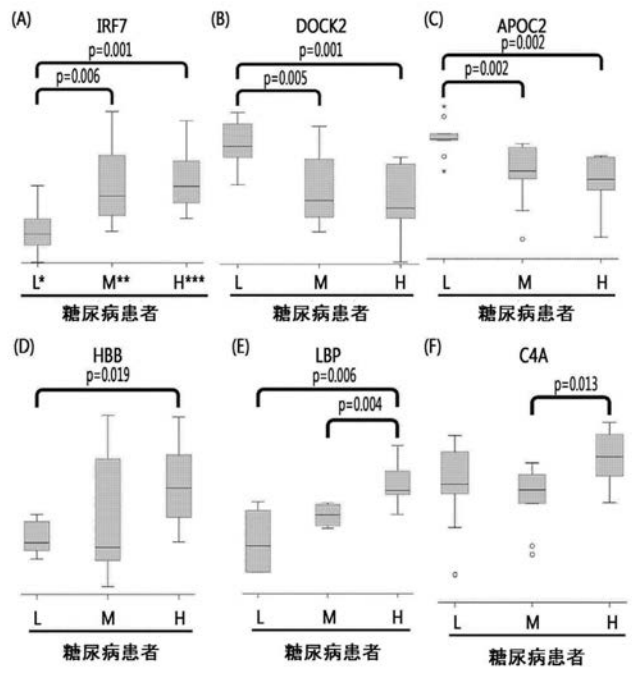
30

40


【 图 1 】



【 图 2 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/KR2015/008642
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N 33/68(2006.01)i, C12Q 1/68(2006.01)i 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) G01N 33/68; C07H 19/10; C12Q 1/60; C12Q 1/54; G01N 33/53; C12Q 1/68 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: angiostenosis, stroke, arteriosclerosis, diabetes mellitus, nondiabetic, biomarker, diagnosis marker		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2009-143519 A2 (THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY) 26 November 2009 See abstract; pages 3, 33, 56; and claims 1, 2 and 5.	1-12
A	LEE et al., "Senescence of Cultured Porcine Coronary Arterial Endothelial Cells is Associated with Accelerated Oxidative Stress and Activation of NF κB", Journal of Vascular Research, vol. 47, no. 4, pages 287-298 (2010) See abstract; page 287; figure 3.	1-12
A	YAN et al., "A Pro-Atherogenic HDL Profile in Coronary Heart Disease Patients: An iTRAQ Labelling-based Proteomic Approach", PLoS One, vol. 9, no. 5, paper no. e98368, inner pages 1-10 (2014) See abstract; and pages 3-5.	1-12
A	WO 2012-009567 A2 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 19 January 2012 See abstract; and claims 1-24.	1-12
A	WO 2009-014639 A2 (METABOLON, INC.) 29 January 2009 See abstract; and claims 27-34.	1-12
<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 another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 10 NOVEMBER 2015 (10.11.2015)		Date of mailing of the international search report 10 NOVEMBER 2015 (10.11.2015)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korea Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2015/008642

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 2009-143519 A2	26/11/2009	EP 2294425 A2	16/03/2011
		EP 2294425 B1	22/05/2013
		US 2012-0009174 A1	12/01/2012
		US 2014-186852 A1	03/07/2014
		US 8497078 B2	30/07/2013
		US 9039994 B2	26/05/2015
		WO 2009-143519 A3	18/03/2010
WO 2012-009567 A2	19/01/2012	EP 2593567 A2	22/05/2013
		EP 2593567 A4	11/12/2013
		US 2012-065087 A1	15/03/2012
		WO 2012-009567 A3	09/08/2012
WO 2009-014639 A2	29/01/2009	EP 2164977 A2	24/03/2010
		EP 2164977 A4	27/07/2011
		EP 2164977 B1	30/10/2013
		JP 2010-537157 A	02/12/2010
		JP 2015-064362 A	09/04/2015
		JP 5701601 B2	15/04/2015
		US 2009-0155826 A1	18/06/2009
		US 2012-208215 A1	16/08/2012
		US 2013-338031 A1	19/12/2013
		US 2015-005195 A1	01/01/2015
		US 8187830 B2	29/05/2012
		US 8546098 B2	01/10/2013
		US 8809008 B2	19/08/2014
		WO 2009-014639 A3	19/03/2009

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2015/008642

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) G01N 33/68(2006.01)i, C12Q 1/68(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) G01N 33/68; C07H 19/10; C12Q 1/60; C12Q 1/54; G01N 33/53; C12Q 1/68		
조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC		
국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 혈관 협착, 뇌졸중, 동맥경화, 당뇨병, 비당뇨병, 바이오마커, 진단마커		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	WO 2009-143519 A2 (THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY) 2009.11.26 요약; 페이지 3, 33, 56; 및 청구항 1, 2 및 5 참조.	1-12
A	LEE 등, 'Senescence of cultured porcine coronary arterial endothelial cells is associated with accelerated oxidative stress and activation of NFκB' Journal of Vascular Research, 47권, 4호, 페이지 287-298 (2010) 요약; 페이지 287; 도면 3 참조.	1-12
A	YAN 등, 'A pro-atherogenic HDL profile in coronary heart disease patients: an iTRAQ labelling-based proteomic approach' PLoS One, 9권, 5호, 논문번호 e98368, 내부페이지 1-10 (2014) 요약; 및 페이지 3-5 참조.	1-12
A	WO 2012-009567 A2 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 2012.01.19 요약; 및 청구항 1-24 참조.	1-12
A	WO 2009-014639 A2 (METABOLON, INC.) 2009.01.29 요약; 및 청구항 27-34 참조.	1-12
<input type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2015년 11월 10일 (10.11.2015)	국제조사보고서 발송일 2015년 11월 10일 (10.11.2015)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-472-7140	심사관 김승범 전화번호 +82-42-481-3371	

서식 PCT/ISA/210 (두 번째 용지) (2015년 1월)

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2015/008642

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2009-143519 A2	2009/11/26	EP 2294425 A2 EP 2294425 B1 US 2012-0009174 A1 US 2014-186852 A1 US 8497078 B2 US 9039994 B2 WO 2009-143519 A3	2011/03/16 2013/05/22 2012/01/12 2014/07/03 2013/07/30 2015/05/26 2010/03/18
WO 2012-009567 A2	2012/01/19	EP 2593567 A2 EP 2593567 A4 US 2012-065087 A1 WO 2012-009567 A3	2013/05/22 2013/12/11 2012/03/15 2012/08/09
WO 2009-014639 A2	2009/01/29	EP 2164977 A2 EP 2164977 A4 EP 2164977 B1 JP 2010-537157 A JP 2015-064362 A JP 5701601 B2 US 2009-0155826 A1 US 2012-208215 A1 US 2013-338031 A1 US 2015-005195 A1 US 8187830 B2 US 8546098 B2 US 8809008 B2 WO 2009-014639 A3	2010/03/24 2011/07/27 2013/10/30 2010/12/02 2015/04/09 2015/04/15 2009/06/18 2012/08/16 2013/12/19 2015/01/01 2012/05/29 2013/10/01 2014/08/19 2009/03/19

フロントページの続き

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

(71) 出願人 513110089

ソウル ナショナル ユニバーシティ アールアンドディービー ファウンデーション
大韓民国, ソウル, クワナク - ク, クワナク - ロ, 1

(71) 出願人 514140698

カチョン ユニバーシティ オブ インダストリー - アカデミック コーオペレーション ファウンデーション
大韓民国 13120 キョンギ - ド ソンナム - シ スジョン - グ ソンナム - デロ 1342

(71) 出願人 510273880

コリア ユニバーシティ リサーチ アンド ビジネス ファウンデーション
KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION
大韓民国、136 - 701 ソウル、ソンプク - グ、アナム - ロ 145

(74) 代理人 100105957

弁理士 恩田 誠

(74) 代理人 100068755

弁理士 恩田 博宣

(74) 代理人 100142907

弁理士 本田 淳

(74) 代理人 100152489

弁理士 中村 美樹

(72) 発明者 キム、グァン ピョ

大韓民国 01868 ソウル ノウォン - グ チョアンサン - ロ 5 - ギル 22 106 - 402

(72) 発明者 チェ、ソン ヒ

大韓民国 13620 キョンギ - ド ソンナム - シ プンダン - グ クミ - ロ 173ボン - ギル 82

(72) 発明者 イ、フ グン

大韓民国 22000 インチョン ヨンス - グ ヘソン - ロ 143 116 - 301

(72) 発明者 イ、サン ウォン

大韓民国 02841 ソウル ソンプク - グ アンナム - ロ 145 コリア ユニバーシティ

Fターム(参考) 2G041 CA01 DA04 EA04 FA12 GA06 GA09 HA01 JA04 LA12

2G045 AA25 CA26 DA36 FA40 FB03 FB20

【要約の続き】

性血管狭窄疾患診断のための情報提供方法を提供する。本発明は血管狭窄疾患診断用の組成物を提供することにより、非糖尿病性または糖尿病性血管狭窄疾患の患者における発現が変化するタンパク質の発現レベルを測定及び比較することにより、血管狭窄疾患の早期診断及び疾病程度を有意的に予測または把握することができる。また、本発明の診断用組成物は非侵襲性診断を可能にして血液、尿検査などにより簡単に有効な血管狭窄疾患の初期診断を行うことができる。

专利名称(译)	用于诊断血管狭窄疾病的标志物及其用途		
公开(公告)号	JP2018520338A	公开(公告)日	2018-07-26
申请号	JP2017556934	申请日	2015-08-19
[标]申请(专利权)人(译)	庆熙大学产业合作社雷化集团 庆熙大学校产学协力团 首尔大学校产学协力团 蚊子涌工业大学学术合作社雷化基金会 高丽大学校产学协力团		
申请(专利权)人(译)	大学 - 庆熙大学的工业合作社雷化集团 首尔国立大学的研发蜜蜂基金会 工业Kachon大学 - 学术合作社雷化基金会 高丽大学研究和商业基金会		
[标]发明人	キムグアンピョ チェソンヒ イフグン イサンウォン		
发明人	キム、グアンピョ チェ、ソンヒ イ、フグン イ、サンウォン		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/53 G01N27/62		
CPC分类号	C12Q1/68 G01N33/68		
FI分类号	G01N33/68 G01N33/53.D G01N27/62.V G01N27/62.X		
F-TERM分类号	2G041/CA01 2G041/DA04 2G041/EA04 2G041/FA12 2G041/GA06 2G041/GA09 2G041/HA01 2G041/JA04 2G041/LA12 2G045/AA25 2G045/CA26 2G045/DA36 2G045/FA40 2G045/FB03 2G045/FB20		
代理人(译)	昂达诚 本田 淳 中村美纪		
优先权	1020150061981 2015-04-30 KR		
其他公开文献	JP6441504B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明是聚(ADP-核糖)聚合酶4(聚(ADP-核糖)聚合酶4, PARP4), 维生素D结合蛋白(维生素D-结合蛋白, VDB)和层粘连蛋白亚基 β 1(层粘连蛋白亚基 β -1, LAMB1), 其包含用于测量一种或多种选自以下的蛋白质的水平的制剂: 非糖尿病性血管狭窄的诊断组合物, 干扰素调节因子7, IRF7, 胞质分裂蛋白 糖尿病性血管狭窄疾病, 包括用于测量一种或多种选自细胞分裂蛋白2(DOCK2)和血红蛋白亚基(HBB)的蛋白质的水平的制剂 以及用于诊断血管狭窄的试剂盒, 提供用于诊断非糖尿病性血管狭窄的信息的方法以及非糖 提供了提供用于疾病血管狭窄的疾病诊断方法的信息。 本发明提供了一种用于诊断血管狭窄的组合物, 从而在非糖尿病或糖尿病性血管狭窄的患者中测量和比较其表达改变的蛋白质的表达水平, 从而能够及早发现血管狭窄。 可以显著预测或掌握疾病的诊断和程度。 另外, 本发明的诊断组合物能够进行非侵入性诊断, 并且能够通过血液和尿液检查对血管狭窄进行简单而有效的初始诊断。

