

(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2013-542453

(P2013-542453A)

(43) 公表日 平成25年11月21日(2013.11.21)

(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	2 GO 4 5
GO 1 N 30/88 (2006.01)	GO 1 N 30/88	J
GO 1 N 27/62 (2006.01)	GO 1 N 27/62	V

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 33 頁)

(21) 出願番号 特願2013-538980 (P2013-538980)  
 (86) (22) 出願日 平成23年11月14日 (2011.11.14)  
 (85) 翻訳文提出日 平成25年7月16日 (2013.7.16)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2011/060642  
 (87) 国際公開番号 WO2012/065178  
 (87) 国際公開日 平成24年5月18日 (2012.5.18)  
 (31) 優先権主張番号 61/412, 931  
 (32) 優先日 平成22年11月12日 (2010.11.12)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 398076227  
 ザ・ジョンズ・ホプキンス・ユニバーシテ  
 イー  
 アメリカ合衆国、メリーランド州 212  
 18、ボルチモア、ノース・チャールズ・  
 ストリート 3400  
 (74) 代理人 100108855  
 弁理士 蔵田 昌俊  
 (74) 代理人 100109830  
 弁理士 福原 淑弘  
 (74) 代理人 100088683  
 弁理士 中村 誠  
 (74) 代理人 100103034  
 弁理士 野河 信久

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 疾患のバイオマーカーとしてのアルブミン結合タンパク質/ペプチド複合体

(57) 【要約】

方法およびキットは、アルブミン結合タンパク質/ペ  
 プチド複合体 (ABPPC) を含むバイオマーカーを使用  
 することによる虚血の診断または予後診断を提供する

【選択図】 図 4

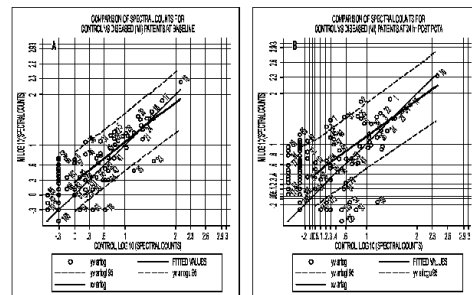


Figure 4

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

対象の虚血を診断する方法であって、

( a ) 前記対象から得られる生物学的試料中の、表 2 のリストから選択される、アルブミン結合タンパク質 / ペプチド複合体 ( A B P P C ) を含む少なくとも 1 つのバイオマーカーのレベルを決定すること、および

( b ) 前記生物学的試料中の決定されたレベルを正常対象集団における対照レベルに対して定量し、対照レベルと比較したレベルの増加または減少が虚血を示すことを含む、方法。

## 【請求項 2】

診断アッセイである、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

予後診断またはモニタリングアッセイである、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 4】

虚血が、心筋虚血、臓器虚血、腎虚血および脳虚血からなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 5】

前記 A B P P C が、アネキシン A 2、プラコグロビンおよびセルピン B 3 からなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 6】

前記対象試料が、血液、血漿または体液に由来する、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 7】

前記バイオマーカーが、質量分析法を使用して検出される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 8】

前記バイオマーカーが、S E C、H P L C、アフィニティークロマトグラフィー、ゲル方法および / またはイムノアッセイを使用して検出される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 9】

前記対象が哺乳動物である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 10】

前記対象がヒトである、請求項 9 に記載の方法。

## 【請求項 11】

診断または予後診断キットであって、

生物学的試料中のアルブミンを特異的に捕捉または富化する抗体または化学的部分；

表 2 のリストから選択されるアルブミンに結合した 1 つ以上の特定の修飾または非修飾タンパク質またはペプチドに対する二次抗体または化学的部分；および

結合した二次抗体の量の検出および / または定量のための少なくとも 1 つの成分を含むキット。

## 【請求項 12】

複数の二次抗体を含む、請求項 11 に記載のキット。

## 【請求項 13】

表 2 のリストから選択されるタンパク質またはタンパク質断片に対する少なくとも 1 つの抗体；および

質量分析標識された内部タンパク質標準を含む質量分析キット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【政府の権利についての記述】

## 【0001】

本発明は、米国国立衛生研究所 ( N a t i o n a l I n s t i t u t e s o f H e a l t h ) によって与えられた、NHLBIのプロテオミクス助成の政府支援によりなされた。政府は本発明において一定の権利を有する。

10

20

30

40

50

## 【関連出願への相互参照】

## 【0002】

本出願は、2010年11月12日出願の米国仮出願番号61/412,931に基づく優先権を主張し、その全体の内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

## 【技術分野】

## 【0003】

本発明は、独特のアルブミン結合タンパク質/ペプチド複合体 (ABPPC; albumin-bound protein/peptide complex) を含むバイオマーカーを使用した診断方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0004】

血清アルブミンは、血清および血漿中で最も量の多いタンパク質であり、典型的には45~50mg/mlで存在する。アルブミンは、細胞内空間においてタンパク質、脂質および小分子に結合する「分子スポンジ」として機能し (Millea, K., Krull, I. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* 2003, 26, 2195~2224; Anderson, N.L., Anderson, N.G. *Mol Cell Proteomics* 2002, 1, 845~867; Carter, D.C., Ho, J.X. *Adv Protein Chem* 1994, 45, 153~203)、ペプチドホルモン、血清アミロイドA、インターフェロン、グルカゴン、ブラジキニン、インスリンおよび連鎖球菌のプロテインGと会合を形成することが見出されているが (Peters, T. Jr., *All About Albumin*; Academic Press: San Diego, 1996; Baczynskyj, L., Bronson, G.E., Kubiak, T.M. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1994, 8, 280~286; Carter, W.A. *Methods Enzymol* 1981, 78, 576~582; Sjobring, U., Bjorck, L., Kastern, W. *J Biol Chem* 1991, 266, 399~405)、結合パートナーの広範囲のリスト、およびこれらのパートナーが疾患によって変化するかどうかは調査されてこなかった。以前の研究では、変性条件下で高分子量種を除去したときに、低分子量種の高い回収率が示されており、アルブミンなどのより大きなタンパク質がペプチドと結合していることがさらに確認されている (Tirumalai, R.S., Chan, K.C., Prieto, D.A., Issaq, H.J., Conrads, T.P., Veenstra, T.D. *Mol Cell Proteomics* 2003, 2, 1096~1103)。さらに、アルブミンは、血清中のパラオキシナーゼ1 (Ortigoza-Ferado, J., Richter, R.J., Hornung, S.K., Motulsky, A.G., Furlong, C.E. *Am J Hum Genet* 1984, 36, 295~305)、-1-酸性糖タンパク質 (Krauss, E., Polnaszek, C.F., Scheeler, D.A., Hall, H.B., Eckfeldt, J.H., Holtzman, J.L. *J Pharmacol Exp Ther* 1986, 239, 754~759)、クラステリン (Kelso, G.J., Stuart, W.D., Richter, R.J., Furlong, C.E., Jordan-Starck, T.C., Harmony, J.A. *Biochemistry* 1994, 33, 832~839) (パラオキシナーゼ1を介した間接的相互作用) およびアポリポタンパク質Eなどの少数の特定のタンパク質に結合することが報告されている。血清中のアルブミン結合ペプチド (30kDa未満) が研究されてきたが、その結合の程度は現在も不明である (Zhou, M., Lucas, D.A., Chan, K.C.; Issaq, H.J., Petricoin, E.F., 3rd, Liotta, L.A., Veenstra, T.D., Conrads, T.P. *Electrophoresis* 2004, 25, 1289~1298)。現在まで、虚血性疾患においてアルブミンに結合したタンパク質/ペプチドの包括的な研究

10

20

30

40

50

は行われていない。

【0005】

アルブミンは、その金属への結合を変更させる疾患によって変化することが見出されており、現在、虚血に対するバイオマーカーとして機能している。以前に心筋虚血に対するバイオマーカーとして特定されているアルブミンの修飾は、アルブミンのN末端N-アセチル化であり、これは、コバルトおよびニッケルに対してアルブミンの結合親和性を減少させる(Bar-Or, D., Curtis, G., Rao, N., Bampos, N., Lau, E. Eur J Biochem 2001, 268, 42~47; Takahashi, N., Takahashi, Y., Putnam, F.W. Proc Natl Acad Sci U S A 1987, 84, 7403~7407; Chan, B., Dodsworth, N., Woodrow, J., Tucker, A., Harris, R. Eur J Biochem 1995, 227, 524~528)。現時点での特許出願は(PCT国際出願のCrosby, P.A.M., Deborah L: USA, 2002; Bar-or, D.L., Edward; PCT国際のWinkler, James V: US, 2004)、虚血のためのアルブミンのこのN末端修飾の使用法を開示しており、アルブミンコバルト結合のための臨床アッセイ(ACBアッセイ)につなげている。N末端修飾に加えて、アルブミンの酸化が酸化ストレスのマーカーとして提案されている(Mera, K., Anraku, M., Kitamura, K., Nakajou, K., Maruyama, T., Tomita, K., Otagiri, M. Hypertens Res 2005, 28, 973~980)。腎障害および末期腎疾患の患者におけるアルブミンのMALDI-TOF分析(マトリックス支援レーザー脱離/イオン化飛行時間型)は、疾患に伴ってアルブミンの分子量(MW)の増加を示す(Thornalley, P.J., Argirova, M., Ahmed, N., Mann, V.M., Argirov, O., Dawnay, A. Kidney Int 2000, 58, 2228~2234)。最後に、アルブミンの脂肪酸輸送機能は、アテローム性動脈硬化症および糖尿病において修飾される(Muravskaya, E.V., Lapko, A.G., Muravskii, V.A. Bull Exp Biol Med 2003, 135, 433~435)。糖尿病患者において、アルブミンの脂肪酸に対する結合能力は増加しており、アテローム性動脈硬化症患者においてこの能力は減少している。結論として、アルブミンが疾患に伴って変化しているという証拠は明らかである。虚血性疾患におけるアルブミンと特定のタンパク質/ペプチド複合体(ABPPC)との結合の変更は特定されていない。虚血性疾患におけるそのような新規なABPPC複合体の特定は、虚血性疾患を診断する方法のための新たなバイオマーカーをもたらすであろう。

【0006】

虚血性イベントにおける血清、血漿または他の体液中のアルブミンに対するタンパク質および/またはペプチドの結合の変更は、虚血性疾患を診断するために使用されていない。この取り組みは、虚血患者において質量範囲を排除することなく、インタクトなタンパク質、分解されたタンパク質およびペプチドの分析を含むという理由から独特なものである。さらにこの取り組みは、虚血性疾患状態における、アルブミンに結合するタンパク質およびペプチドの変化に焦点を当てる。

【発明の概要】

【0007】

虚血が疑われる対象における特定のアルブミン結合タンパク質/ペプチド複合体(ABPPC)のレベルを決定すること、および正常対象集団の対照レベルに対して決定されたレベルを定量することを含む、虚血を診断する方法が提供される。特定のABPPCのレベルの変動、およびABPPCのプロファイルの変動は虚血を示すことが見出された。

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1】表に列挙された分子量および保持時間(分)を有する標準タンパク質についての

10

20

30

40

50

サイズ排除クロマトグラム。赤色のトレースは、ベースラインで対照患者から採取されたアルブミン (albumin) 試料のものである。

【図2】PTCAを受けた患者についてのABPPCのサイズ排除クロマトグラム。

【図3A】対照および罹患患者から採取されたアルブミンのSEC画分についての一次元SDS-PAGE。

【図3B】対照および罹患患者から採取されたアルブミンのSEC画分についての一次元SDS-PAGE。

【図3C】対照および罹患患者から採取されたアルブミンのSEC画分についての一次元SDS-PAGE。

【図3D】対照および罹患患者から採取されたアルブミンのSEC画分についての一次元SDS-PAGE。

【図4】A) 時点1、ベースラインでの対照および罹患群におけるタンパク質のlog10スペクトルカウムの比較。B) 時点8、PTCA後24時間での対照および罹患群におけるタンパク質のlog10スペクトルカウムの比較。分析はStataソフトウェアを使用して行った。

【発明の詳細な説明】

【0009】

本発明者らは、健康な個体および罹患した個体におけるアルブミン結合タンパク質を決定するために、ヒト血清のアルブミンを富化した画分を試験した。

【0010】

したがって、心筋虚血を有すると疑われる対象における特定のアルブミン結合タンパク質/ペプチド複合体 (ABPPC) のレベルを決定すること、および決定されたレベルを正常対象集団の対照レベルに対して定量することを含む、虚血を診断する方法が提供される。特定のABPPCのレベルの変動、およびABPPCプロファイルの変動は虚血を示すことが見出された。

【0011】

目的は、虚血患者および健康な受診者におけるアルブミンへ示差的に結合するタンパク質/タンパク質断片/ペプチドを、現在の血液採取プロトコールに適合した、費用対効果の高い迅速かつ高感度な方法で特徴付けることである。本発明者らはいかなる特定の仮説にも拘束されないが、これは、アルブミンが疾患に伴って変化し、その結果、アルブミンとその結合タンパク質およびペプチドとの複合体が変化するという仮説に基づく。ABPPCアッセイは、アルブミンの修飾またはABPPC組成の変化 (すなわち1以上のタンパク質の存在または非存在)、1以上のタンパク質の変更した濃度 (または化学量論比もしくははモル比)、タンパク質のPTM (翻訳後修飾) の変化 (たとえば、タンパク質分解断片対アルブミンを含むインタクトなタンパク質) を測定することができる。翻訳後修飾は、酸化、シトルリン化、リン酸化およびグリコシル化を含み得る。

【0012】

ABPPCは、心筋虚血 (細胞壊死前) および心筋梗塞の患者において変更し、ABPPCは、血管炎患者および虚血、心筋梗塞患者および健康な個体において異なることが発見された。しかし、関与する実際のタンパク質およびペプチドは、以前には特定されていない。実際のタンパク質およびペプチドの特定は、特定のタンパク質/ペプチドを考慮してアルブミン結合タンパク質/ペプチド複合体についてアッセイすることによって、虚血の診断を改善するであろう。虚血診断の分野における進歩はこの点にある。

【0013】

本発明者らは、安定した狭心症の患者 (SA、対照群) および血管形成を受けた (ある程度の心筋虚血を含む) 心筋壊死または心筋梗塞の患者 (MI、罹患群、細胞壊死および血液中のcTnIまたはcTnTの検出に基づく) から得たABPPCを分析した。ABPPCタンパク質は、質量分析法を使用して定量した。全スペクトルカウムが決定され、SA患者とMI患者との間で比較された。ある特定のタンパク質またはペプチドは、SA患者と比較してMI患者において増加または減少し、これらのタンパク質は、ABPP

10

20

30

40

50

Cを変化させる虚血性ならびに非虚血性疾患のための潜在的なバイオマーカーである。結果は表1に示される。

【表1-1】

表1:アルブミン結合タンパク質/ペプチド複合体において検出されるタンパク質

タンパク質 #	受託番号	タンパク質名称	MW	SA-平均 スペクトルカウント			虚血-平均 スペクトルカウント		
				TP1	TP7	TP8	TP1	TP7	TP8
1	IPI00027462	タンパク質S100-A9 #	13 kDa	20.0	31.7	29.3	31.0	19.0	75.7
3	IPI00007047	タンパク質S100-A8 #	11 kDa	11.3	14.3	16.3	15.0	9.7	34.0
4	IPI00025753	デスマグレイン-1 #	114 kDa	13.7	14.3	12.3	12.7	13.7	25.7
5	IPI00795257	グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ #	32 kDa	6.3	9.0	7.7	10.0	4.7	31.7
6	IPI00219806	タンパク質S100-A7 #	11 kDa	8.3	8.7	9.0	9.0	8.7	25.3
7	IPI00455315	アネキシンA2 #	39 kDa	3.3	10.2	2.2	6.8	4.3	29.5
8	IPI00554711	プラコグロビン #	82 kDa	1.2	6.8	1.8	5.3	1.0	22.0
9	IPI00031564	γ-グルタミルシクロトランスフェラーゼ* <sup>@</sup>	21 kDa	1.3	1.5	0.7	2.5	4.0	6.0
10	IPI00017987	コーニフィン-A <sup>@</sup>	10 kDa	0.5	0.5	1.2	0.8	2.0	4.3
11	IPI00000874	ペルオキシレドキシシン-1 #	22 kDa	0.5	0.5	0.7	1.0	0.5	3.2
12	IPI00646687	タンパク質POF1B* #	68 kDa	0.5	0.5	0.5	1.3	0.5	5.8
13	IPI00218528	プラコフィリン-1* #	80 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	4.2
14	IPI00162735	アトラクチン* <sup>α</sup>	141 kDa	3.0	4.0	7.7	5.5	8.5	9.5
15	IPI00465436	カタラーゼ #	60 kDa	0.7	0.5	0.7	0.5	0.5	2.5
17	IPI00022463	セロトランスフェリン	77 kDa	54.3	67.0	73.3	74.7	74.0	59.3
20	IPI00784985	IGK@タンパク質	26 kDa	18.0	31.0	44.7	36.3	30.0	46.3
22	IPI00013885	カスパーゼ-14 #	28 kDa	21.0	22.0	19.3	24.3	29.7	40.0
23	IPI00478003	α-2-マクログロブリン	163 kDa	36.8	28.3	36.7	5.0	18.2	31.2
25	IPI00021440	アクチン、細胞質2%	42 kDa	6.0	18.0	6.8	17.7	5.8	34.3
26	IPI00009650	リポカリン-1	19 kDa	15.0	16.0	15.3	17.0	16.3	12.3
27	IPI00978930	Ig α-1鎖C領域	53 kDa	9.0	14.7	19.0	14.7	16.0	18.3
29	IPI00019038	リゾチームC	17 kDa	10.3	7.7	11.3	16.3	12.0	12.3
30	IPI00032325	シスタチン-A	11 kDa	11.7	13.3	11.3	11.3	13.0	13.0
31	IPI00022204	セリンプロテアーゼ阻害剤B3* %	45 kDa	3.3	9.0	3.7	11.7	3.7	34.0
32	IPI00027547	ダームシジン	11 kDa	7.3	11.3	12.3	12.0	13.7	9.3
36	IPI00456429	ユビキチンおよびリボソームタンパク質L40プレカーサー	15 kDa	10.3	11.0	11.7	10.7	10.3	11.0
37	IPI00397801	フィラグリン-2	248 kDa	9.7	11.3	12.0	8.7	9.0	14.3
38	IPI00022974	プロラクチン誘導性タンパク質	17 kDa	10.7	10.7	10.7	8.7	10.3	8.3
39	IPI00423463	推定の未同定タンパク質DKFZp686O01196 @	53 kDa	1.7	2.8	12.7	11.0	7.0	24.3
42	IPI00007797	脂肪酸結合タンパク質、表皮	15 kDa	3.0	4.3	4.0	4.3	4.3	5.3
44	IPI00871372	E3ユビキチン-タンパク質リガーゼHECTD1	289 kDa	4.0	1.5	2.0	2.0	2.7	2.0

10

20

30

40

【表 1 - 2】

タンパク質 #	受託番号	タンパク質名称	MW	SA-平均 スペクトルカウント			虚血-平均 スペクトルカウント		
				TP1	TP7	TP8	TP1	TP7	TP8
45	IPI00021536	カルモジュリン様 タンパク質5 #	16 kDa	4.5	5.7	2.2	7.7	3.7	13.5
46	IPI00219221	ガレクチン-7 #	15 kDa	1.8	6.7	2.3	6.3	4.3	12.3
47	IPI00300376	タンパク質-グルタミン γ-グルタミルトランス フェラーゼEα	77 kDa	4.3	3.7	5.0	5.2	7.3	5.7
48	IPI00552749	ダイニン重鎖8、軸糸	478 kDa	3.0	3.0	3.2	6.2	4.2	6.2
49	IPI00396485	伸長因子1-α1%	50 kDa	4.5	6.0	1.0	6.0	1.7	11.0
50	IPI00219217	L-乳酸デヒドロゲナーゼ β鎖 @	37 kDa	3.5	3.3	3.0	6.2	6.7	7.5
51	IPI00006662	アポリポタンパク質Dα	21 kDa	1.2	2.7	2.0	1.2	6.3	2.3
52	IPI00291866	血漿プロテアーゼC1 阻害剤β	55 kDa	0.7	3.8	4.7	1.0	1.7	0.8
53	IPI00216298	チオレドキシシン	12 kDa	4.0	3.3	5.0	3.3	5.3	5.0
55	IPI00908330	興奮性アミノ酸 トランスポーター1	54 kDa	2.8	2.7	1.7	2.5	3.7	2.0
56	IPI00643202	SERPINB12タンパク質	48 kDa	3.7	4.0	3.0	2.2	3.5	5.0
57	IPI00453473	ヒストンH4%	11 kDa	1.3	5.5	2.7	4.5	0.5	9.7
58	IPI00008290	エフリンA型受容体5α	115 kDa	0.5	0.7	1.5	5.2	4.8	2.2
59	IPI00903112	ラクトランスフェリンδ	77 kDa	0.8	0.5	16.8	1.5	1.0	0.8
61	IPI00383347	PRO2194α	14 kDa	0.8	1.5	2.0	2.3	3.3	2.3
62	IPI00154742	IGL@タンパク質	25 kDa	1.3	2.0	2.8	2.5	3.2	5.0
65	IPI00019502	ミオシン-9* #	227 kDa	0.5	0.5	0.5	1.0	0.5	15.7
66	IPI00011692	インボルクリン #	70 kDa	0.5	0.5	0.5	4.3	0.5	12.3
67	IPI00218343	チューブリンα-1C鎖 #	50 kDa	0.5	0.7	0.5	1.3	0.5	12.3
68	IPI00411765	14-3-3タンパク質σ* %	24 kDa	0.5	4.0	0.5	5.7	1.3	5.8
69	IPI00026256	フィラグリン #	435 kDa	0.5	2.2	0.5	2.0	1.2	7.3
70	IPI00019884	α-アクチニン-2%	104 kDa	0.5	12.3	0.5	0.5	0.5	2.3
71	IPI00303476	ATP合成酵素サブ ユニットβ、ミトコンドリア%	57 kDa	0.7	8.7	0.5	0.5	0.5	5.3
72	IPI00008964	Ras関連タンパク質 Rab-1B #	22 kDa	0.5	0.5	0.5	5.7	0.5	8.3
74	IPI00291560	アルギナーゼ-1* %	35 kDa	0.5	2.0	0.5	0.5	0.5	10.2
75	IPI00217966	L-乳酸デヒドロゲナーゼ #	40 kDa	0.5	0.7	0.5	3.3	0.5	9.3
77	IPI00291467	ADP/ATP トランスロカーゼ3%	33 kDa	1.5	4.0	0.7	0.5	1.0	3.8
78	IPI00514201	ミオシン-6γ	224 kDa	4.3	8.0	0.5	0.5	0.5	0.5
79	IPI00025512	ヒートショックタンパク質 β-1%	23 kDa	0.5	1.8	0.5	2.0	0.5	4.3
80	IPI00216984	カルモジュリン様 タンパク質3 @	17 kDa	0.5	0.5	0.5	3.7	2.0	6.3
81	IPI00013895	タンパク質S100-A11%	12 kDa	0.5	1.7	0.7	3.0	0.5	6.0
82	IPI00011654	チューブリンβ鎖 #	50 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	11.0
83	IPI00032294	シスタチン-S #	16 kDa	1.2	2.5	0.7	1.5	2.2	1.5
84	IPI00908963	ATP合成酵素 サブユニットα%	58 kDa	0.5	6.7	0.5	0.5	0.5	4.7
85	IPI00479186	ピルビン酸キナーゼ アイソザイムM1/M2* #	58 kDa	0.7	1.3	0.7	1.3	0.5	6.0

10

20

30

40

【表 1 - 3】

タンパク質 #	受託番号	タンパク質名称	MW	SA-平均 スペクトルカウント			虚血-平均 スペクトルカウント		
				TP1	TP7	TP8	TP1	TP7	TP8
86	IPI00216952	ラミン-A/G-(プロジェリン)* #	65 kDa	0.5	0.5	0.7	1.0	0.5	7.5
87	IPI00304621	ジンクフィンガータンパク質518B #	120 kDa	0.5	0.5	0.7	1.2	2.0	2.2
88	IPI00218918	アネキシンA1%	39 kDa	0.5	4.5	0.8	0.7	2.0	2.3
89	IPI00419215	$\alpha$ -2-マクログロブリン様 タンパク質1 #	161 kDa	0.5	0.5	0.7	0.5	0.5	8.8
90	IPI00011229	カテプシンD #	45 kDa	0.5	1.0	1.0	1.3	1.3	5.2
91	IPI00796333	フルクトース-ビスリン酸 アルドラーゼA%	45 kDa	0.5	2.2	0.5	3.0	0.5	2.3
92	IPI00020101	ヒストンH2B%	14 kDa	0.5	1.5	1.0	0.5	0.5	7.0
93	IPI00004573	多量体免疫 グロブリン受容体 $\delta$	83 kDa	0.5	0.5	6.7	0.5	1.3	0.5
94	IPI00386975	デスモコリン-1*	94 kDa	1.5	1.0	1.3	0.5	1.5	1.7
95	IPI00022426	タンパク質AMBP	39 kDa	0.5	2.0	3.0	0.5	1.5	2.8
96	IPI00017992	スモールプロリンリッチ プロテイン2B @	8 kDa	2.0	0.7	0.5	2.2	1.5	1.0
97	IPI00023006	アクチン、 $\alpha$ 心筋1%	42 kDa	0.5	2.8	1.3	1.3	0.5	3.0
98	IPI00930072	推定の未同定タンパク質 DKFZp686E23209	52 kDa	0.5	0.5	2.3	1.3	0.7	3.8
99	IPI00465248	$\alpha$ -エノラーゼ* #	47 kDa	0.5	0.7	0.5	2.7	0.5	3.7
100	IPI00414676	ヒートショックタンパク質 HSP90- $\beta$ #	83 kDa	0.5	0.5	0.5	1.7	0.5	6.0
101	IPI00296039	トロポミオシン $\alpha$ -1鎖* $\gamma$	33 kDa	0.5	5.7	0.5	0.5	0.5	1.0
102	IPI00909570	伸長因子2 #	63 kDa	0.5	0.5	0.5	1.0	0.5	6.0
103	IPI00013808	$\alpha$ -アクチニン-4 #	105 kDa	0.5	0.5	0.5	1.7	0.5	5.0
104	IPI00643623	好中球ゼラチナーゼ 関連リポカリン #	23 kDa	0.5	0.5	2.0	0.5	0.5	5.0
105	IPI00305622	タンパク質-グルタミン $\gamma$ -グルタミルトランス フェラーゼK #	90 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	6.0
106	IPI00216798	ミオシン制御軽鎖2、心室/ 心筋アイソフォーム* $\gamma$	19 kDa	0.5	5.7	0.5	0.5	0.5	0.5
107	IPI00335168	ミオシン軽鎖ポリペプチド6 の非筋アイソフォーム* $\gamma$	17 kDa	0.5	2.3	0.5	0.5	0.5	2.7
108	IPI00790739	アコニターゼ2、 ミトコンドリア $\gamma$	88 kDa	0.5	6.3	0.5	0.5	0.5	0.5
109	IPI00848226	グアニンヌクレオチド結合 タンパク質サブユニット $\beta$ - 2様1 #	35 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	6.0
110	IPI00003362	78kDaグルコース制御 タンパク質 #	72 kDa	0.5	0.5	0.5	1.3	0.5	4.7
111	IPI00412407	セルピンB4%	42 kDa	0.5	2.0	0.5	1.0	0.5	3.0
112	IPI00877726	クレアチンキナーゼ $\mu$ 型、 ミトコンドリア* #	50 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	5.0
113	IPI00426051	推定の未同定タンパク質 DKFZp686C15213 #	51 kDa	0.5	0.5	1.0	1.7	0.5	2.7

10

20

30

40

【表 1 - 4】

タンパク質 #	受託番号	タンパク質名称	MW	SA-平均 スペクトルカウント			虚血-平均 スペクトルカウント		
				TP1	TP7	TP8	TP1	TP7	TP8
114	IPI00419585	ペプチジル-プロリルシス- トランスイソメラーゼA #	18 kDa	0.5	0.7	0.5	1.3	0.5	3.3
115	IPI00893099	ヒートショック70kDa タンパク質1様変異体 #	70 kDa	0.5	0.5	0.5	1.7	0.5	3.3
116	IPI00794543	カルモジュリン #	17 kDa	0.5	0.5	0.5	1.0	0.5	4.3
117	IPI00219757	グルタチオンS-トランス フェラーゼP #	23 kDa	0.5	0.5	0.5	1.7	0.5	3.3
118	IPI00021828	シスタチン-B%	11 kDa	0.5	1.7	0.5	0.5	0.5	3.0
119	IPI00291922	プロテアソーム サブユニットα5型 #	26 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	4.0
120	IPI00021812	神経芽細胞分化関連 タンパク質 #	629 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	3.3
121	IPI00060800	チモーゲン顆粒タンパク質 16ホモログBδ	23 kDa	0.5	0.5	2.0	2.0	0.5	0.5
123	IPI00291006	リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、 ミトコンドリア%	36 kDa	0.5	2.0	0.5	0.5	0.5	1.0
124	IPI00215917	ADP-リボシル化因子3 #	21 kDa	0.7	0.5	0.5	0.5	0.5	3.7
125	IPI00009856	タンパク質Plunc	27 kDa	0.5	0.5	3.7	0.5	0.5	0.7
126	IPI00215965	ヘテロ核内リボ核 タンパク質A1* #	39 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	3.3
127	IPI00216026	電位依存性アニオン選択 性チャネルタンパク質2* #	32 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	3.3
128	IPI00873099	タンパク質S100A2 #	11 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	2.3
129	IPI00414684	セメノジェリン-1*δ	45 kDa	0.5	0.5	3.7	0.5	0.5	0.5
130	IPI00797270	トリオースリン酸 イソメラーゼ%	27 kDa	0.5	1.5	0.5	1.7	0.5	1.3
131	IPI00022990	スタセリン	7 kDa	2.0	0.5	0.5	1.7	0.5	0.5
132	IPI00022774	移行型小胞体ATPアーゼ #	89 kDa	0.5	0.5	0.5	0.7	0.5	2.3
134	IPI00879238	40Sリボソームタンパク質 S9 #	17 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	2.3
136	IPI00216975	トロポミオシンα-4鎖* #	33 kDa	0.5	0.5	0.7	0.5	0.5	2.0
137	IPI00232492	3要素モチーフ含有 タンパク質29* #	64 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	3.0
138	IPI00017672	プリンヌクレオシド ホスホリラーゼ #	33 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	3.0
139	IPI00007188	ADP/ATPトランスロカーゼ2 #	33 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	3.0
140	IPI00243742	ミオシン軽鎖3γ	22 kDa	0.5	2.7	0.5	0.5	0.5	0.5
141	IPI00291410	Long口腔、肺および鼻粘膜 上皮癌関連タンパク質1*δ	52 kDa	0.5	0.5	1.7	1.0	0.7	0.5
143	IPI00216691	プロフィリン-1δ	15 kDa	0.5	0.5	2.3	0.7	0.5	0.5
144	IPI00790304	電位依存性アニオン選択 性チャネルタンパク質1 #	20 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	2.7
145	IPI00015141	クレアチンキナーゼ、 サルコメアミトコンドリアγ	48 kDa	0.5	2.7	0.5	0.5	0.5	0.5

10

20

30

40

【表 1 - 5】

タンパク質 #	受託番号	タンパク質名称	MW	SA-平均 スペクトルカウント			虚血-平均 スペクトルカウント		
				TP1	TP7	TP8	TP1	TP7	TP8
146	IPI00244346	トロポニンI、心筋 $\gamma$	24 kDa	0.5	2.7	0.5	0.5	0.5	0.5
147	IPI00556485	60S酸性リボソーム タンパク質P0 #	27 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	2.7
148	IPI00012011	コフィリン-1 #	19 kDa	0.5	0.5	0.5	0.7	0.5	2.0
149	IPI00915941	60kDaヒートショック タンパク質、ミトコンドリア #	25 kDa	0.5	0.7	0.5	0.5	0.5	1.7
150	IPI00186711	プレクチン-1* #	518 kDa	0.5	0.5	0.7	0.5	0.5	1.7
151	IPI00455383	クラスリン重鎖1* #	188 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	2.0
152	IPI00328328	真核生物翻訳開始因子 4A-II* #	46 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	2.3
153	IPI00479306	プロテアソームサブ ユニット $\beta$ 5型 #	28 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	2.3
154	IPI00926685	チュープリン $\beta$ -4鎖 #	41 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	2.0
155	IPI00010214	タンパク質S100-A14 #	12 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	2.3
156	IPI00382482	Ig重鎖V-III領域CAM #	14 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.8	1.2
157	IPI00219575	プレオマイシンヒドロラーゼ #	53 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1.7
158	IPI00798035	ミオシン結合タンパク質C、 心臓型 $\gamma$	141 kDa	0.5	2.3	0.5	0.5	0.5	0.5
159	IPI00025491	真核生物翻訳開始因子 4A-I #	46 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1.7
160	IPI00329389	60Sリボソームタンパク質L6#	33 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1.7
161	IPI00645201	リボソームタンパク質S8 #	22 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1.7
162	IPI00289983	前立腺酸性 ホスファターゼ* #	48 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1.3
163	IPI00925023	NADH-ユビキノンオキシド レダクターゼ75kDaサブ ユニット、ミトコンドリア $\gamma$	74 kDa	0.5	2.0	0.5	0.5	0.5	0.5
164	IPI00473011	ヘモグロビン サブユニット $\delta$ #	16 kDa	0.5	0.7	0.5	0.5	0.5	1.7
165	IPI00018146	14-3-3タンパク質 $\theta$ #	28 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	2.0
166	IPI00154509	プロテアソーム サブユニット $\alpha$ 7型様 #	29 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	2.0
167	IPI00759776	アクチニン、 $\alpha$ 1 $\gamma$ #	106 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	2.0
168	IPI00909534	伸長因子1- $\gamma$ #	24 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	2.0
169	IPI00414696	ヘテロ核内リボ核 タンパク質A2/B1* #	36 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1.8
170	IPI00916818	ホスホグリセリン酸サキナーゼ	35 kDa	0.5	0.7	0.5	1.7	0.5	0.5
172	IPI00216318	14-3-3タンパク質 $\beta$ / $\alpha$ * #	28 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1.3
173	IPI00550363	トランスジェリン-2 #	22 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1.7
174	IPI00301021	トランスコロン関連タン パク質サブユニット $\alpha$ * #	32 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1.7
175	IPI00871956	40Sリボソームタンパク質 S2に類似 #	20 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1.7
177	IPI00220740	ヌクレオフォスミン* #	29 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1.7
178	IPI00023635	イノシトールモノホス ファターゼ2* #	31 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1.3
179	IPI00031549	デスマコリン-3* #	100 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1.0

10

20

30

40

【表 1 - 6】

タンパク質 #	受託番号	タンパク質名称	MW	SA-平均 スペクトルカウント			虚血-平均 スペクトルカウント		
				TP1	TP7	TP8	TP1	TP7	TP8
180	IPI00555956	プロテアソーム サブユニットβ4型 #	29 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1.0
181	IPI00478287	推定の未同定タンパク質 ENSP00000352132 #	22 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1.3
182	IPI00219038	ヒストンH3.3 #	15 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1.0
184	IPI00941747	カルネキシン #	68 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1.0
185	IPI00219622	プロテアソーム サブユニットα2型 #	26 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1.0
186	IPI00873506	グアニンアミノ ヒドロラーゼ #	53 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1.0

10

脚注-アスタリスク(\*)の印を付けたタンパク質について、すべてのアイソフォームが含まれる  
 TP1-手術前のベースライン  
 TP7-PTCA後1時間  
 TP8-PTCA後24時間

20

太字のタンパク質は罹患群においてTP7またはTP8のいずれかにおいて上昇する  
 イタリック体のタンパク質は罹患群においてTP7またはTP8のいずれかに基づいて減少する  
 # 罹患においてTP8のみにおいて少なくとも2倍上昇する  
 @ 罹患においてTP7において少なくとも2倍上昇し、TP8において上昇したままである  
 α-罹患においてTP7において少なくとも2倍上昇し、TP8においてベースラインに戻る  
 % 罹患においてTP7において少なくとも2分の1減少し、罹患においてTP8において少なくとも2倍増加する  
 β-罹患においてTP7において少なくとも2分の1減少し、TP8において減少したままである  
 γ-罹患においてTP7において少なくとも2分の1減少し、TP8においてベースラインに戻る  
 δ-罹患においてTP8のみにおいて少なくとも2分の1減少する

30

【 0 0 1 4 】

虚血群において、増加または減少した特定のタンパク質 / ペプチドを表 2 に示す。

【表 2 - 1】

表2:罹患個体におけるタンパク質の変化

タンパク質 #	受託番号	タンパク質名称	MW	SA-平均 スペクトルカウント			虚血-平均 スペクトルカウント		
				TP1	TP7	TP8	TP1	TP7	TP8
1	IPI00027462	タンパク質S100-A9 #	13 kDa	20.0	31.7	29.3	31.0	19.0	75.7
3	IPI00007047	タンパク質S100-A8 #	11 kDa	11.3	14.3	16.3	15.0	9.7	34.0
4	IPI00025753	デスモグレイン-1 #	114 kDa	13.7	14.3	12.3	12.7	13.7	25.7
5	IPI00795257	グリセルアルデヒド-3- リン酸デヒドロゲナーゼ #	32 kDa	6.3	9.0	7.7	10.0	4.7	31.7
6	IPI00219806	タンパク質S100-A7 #	11 kDa	8.3	8.7	9.0	9.0	8.7	25.3
7	IPI00455315	アネキシンA2 #	39 kDa	3.3	10.2	2.2	6.8	4.3	29.5
8	IPI00554711	ブラयोगロビン #	82 kDa	1.2	6.8	1.8	5.3	1.0	22.0
9	IPI00031564	γ-グルタミルシクロ トランスフェラーゼ* @	21 kDa	1.3	1.5	0.7	2.5	4.0	6.0

10

20

【表 2 - 2】

タンパク質 #	受託番号	タンパク質名称	MW	SA-平均 スペクトルカウント			虚血-平均 スペクトルカウント		
				TP1	TP7	TP8	TP1	TP7	TP8
10	IPI00017987	コーニフィン-A @	10 kDa	0.5	0.5	1.2	0.8	2.0	4.3
11	IPI00000874	ペルオキシレドキシニン-1 #	22 kDa	0.5	0.5	0.7	1.0	0.5	3.2
12	IPI00646687	タンパク質POF1B* #	68 kDa	0.5	0.5	0.5	1.3	0.5	5.8
13	IPI00218528	ブラコフィリン-1* #	80 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	4.2
14	IPI00162735	アトラクチン* $\alpha$	141 kDa	3.0	4.0	7.7	5.5	8.5	9.5
15	IPI00465436	カタラーゼ #	60 kDa	0.7	0.5	0.7	0.5	0.5	2.5
22	IPI00013885	カスパーゼ-14 #	28 kDa	21.0	22.0	19.3	24.3	29.7	40.0
25	IPI00021440	アクチン、細胞質2%	42 kDa	6.0	18.0	6.8	17.7	5.8	34.3
31	IPI00022204	セリンプロテアーゼ 阻害剤B3* %	45 kDa	3.3	9.0	3.7	11.7	3.7	34.0
39	IPI00423463	推定の未同定タンパク質 DKFZp686O01196 @	53 kDa	1.7	2.8	12.7	11.0	7.0	24.3
45	IPI00021536	カルモジュリン様 タンパク質5 #	16 kDa	4.5	5.7	2.2	7.7	3.7	13.5
46	IPI00219221	ガレクチン-7 #	15 kDa	1.8	6.7	2.3	6.3	4.3	12.3
47	IPI00300376	タンパク質-グルタミン $\gamma$ -グルタミルトランス フェラーゼE $\alpha$	77 kDa	4.3	3.7	5.0	5.2	7.3	5.7
48	IPI00552749	ダイニン重鎖 $\beta$ 、軸糸	478 kDa	3.0	3.0	3.2	6.2	4.2	6.2
49	IPI00396485	伸長因子1- $\alpha$ 1%	50 kDa	4.5	6.0	1.0	6.0	1.7	11.0
50	IPI00219217	L-乳酸デヒドロゲナーゼ B鎖 @	37 kDa	3.5	3.3	3.0	6.2	6.7	7.5
51	IPI00006662	アポリポタンパク質D $\alpha$	21 kDa	1.2	2.7	2.0	1.2	6.3	2.3
52	IPI00291866	血漿プロテアーゼC1 阻害剤 $\beta$	55 kDa	0.7	3.8	4.7	1.0	1.7	0.8
57	IPI00453473	ヒストンH4%	11 kDa	1.3	5.5	2.7	4.5	0.5	9.7
58	IPI00008290	エフリンA型受容体5 $\alpha$	115 kDa	0.5	0.7	1.5	5.2	4.8	2.2
59	IPI00903112	ラクトランスフェリン $\delta$	77 kDa	0.8	0.5	16.8	1.5	1.0	0.8
61	IPI00383347	PRO2194 $\alpha$	14 kDa	0.8	1.5	2.0	2.3	3.3	2.3
65	IPI00019502	ミオシン-9* #	227 kDa	0.5	0.5	0.5	1.0	0.5	15.7
66	IPI00011692	インボルクリン #	70 kDa	0.5	0.5	0.5	4.3	0.5	12.3
67	IPI00218343	チュープリン $\alpha$ -1C鎖 #	50 kDa	0.5	0.7	0.5	1.3	0.5	12.3
68	IPI00411765	14-3-3タンパク質 $\sigma$ * %	24 kDa	0.5	4.0	0.5	5.7	1.3	5.8
69	IPI00026256	フィラグリン #	435 kDa	0.5	2.2	0.5	2.0	1.2	7.3
70	IPI00019884	$\alpha$ -アクチニン-2%	104 kDa	0.5	12.3	0.5	0.5	0.5	2.3
71	IPI00303476	ATP合成酵素サブ ユニット $\beta$ 、ミトコンドリア%	57 kDa	0.7	8.7	0.5	0.5	0.5	5.3
72	IPI00008964	Ras関連タンパク質 Rab-1B #	22 kDa	0.5	0.5	0.5	5.7	0.5	8.3
74	IPI00291560	アルギナーゼ-1* %	35 kDa	0.5	2.0	0.5	0.5	0.5	10.2
75	IPI00217966	L-乳酸デヒドロゲナーゼ #	40 kDa	0.5	0.7	0.5	3.3	0.5	9.3
77	IPI00291467	ADP/ATPトランス ロカーゼ3%	33 kDa	1.5	4.0	0.7	0.5	1.0	3.8
78	IPI00514201	ミオシン-6 $\gamma$	224 kDa	4.3	8.0	0.5	0.5	0.5	0.5
79	IPI00025512	ヒートショックタンパク質 $\beta$ -1%	23 kDa	0.5	1.8	0.5	2.0	0.5	4.3

10

20

30

40

【表 2 - 3】

タンパク質 #	受託番号	タンパク質名称	MW	SA-平均 スペクトルカウント			虚血-平均 スペクトルカウント		
				TP1	TP7	TP8	TP1	TP7	TP8
80	IPI00216984	カルモジュリン様 タンパク質3 @	17 kDa	0.5	0.5	0.5	3.7	2.0	6.3
81	IPI00013895	タンパク質S100-A11%	12 kDa	0.5	1.7	0.7	3.0	0.5	6.0
82	IPI00011654	チューブリンβ鎖 #	50 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	11.0
83	IPI00032294	シスタチン-S #	16 kDa	1.2	2.5	0.7	1.5	2.2	1.5
84	IPI00908963	ATP合成酵素 サブユニットα%	58 kDa	0.5	6.7	0.5	0.5	0.5	4.7
85	IPI00479186	ピルビン酸キナーゼ アイソザイムM1/M2* #	58 kDa	0.7	1.3	0.7	1.3	0.5	6.0
86	IPI00216952	ラミン-A/G- (プロジェリン)* #	65 kDa	0.5	0.5	0.7	1.0	0.5	7.5
87	IPI00304621	ジンクフィンガータンパク質518B #	120 kDa	0.5	0.5	0.7	1.2	2.0	2.2
88	IPI00218918	アネキシンA1%	39 kDa	0.5	4.5	0.8	0.7	2.0	2.3
89	IPI00419215	α-2-マクログロブリン様 タンパク質1 #	161 kDa	0.5	0.5	0.7	0.5	0.5	8.8
90	IPI00011229	カテプシンD #	45 kDa	0.5	1.0	1.0	1.3	1.3	5.2
91	IPI00796333	フルクトース-ビスリン酸 アルドラーゼA%	45 kDa	0.5	2.2	0.5	3.0	0.5	2.3
92	IPI00020101	ヒストンH2B%	14 kDa	0.5	1.5	1.0	0.5	0.5	7.0
93	IPI00004573	多量体免疫 グロブリン受容体δ	83 kDa	0.5	0.5	6.7	0.5	1.3	0.5
94	IPI00386975	デスモコリン-1*	94 kDa	1.5	1.0	1.3	0.5	1.5	1.7
95	IPI00022426	タンパク質AMBP	39 kDa	0.5	2.0	3.0	0.5	1.5	2.8
96	IPI00017992	スモールプロリンリッチ プロテイン2B @	8 kDa	2.0	0.7	0.5	2.2	1.5	1.0
97	IPI00023006	アクチン、α心筋1%	42 kDa	0.5	2.8	1.3	1.3	0.5	3.0
99	IPI00465248	α-エノラーゼ* #	47 kDa	0.5	0.7	0.5	2.7	0.5	3.7
100	IPI00414676	ヒートショックタンパク質 HSP90-β #	83 kDa	0.5	0.5	0.5	1.7	0.5	6.0
101	IPI00296039	トロポミオシンα-1鎖*γ	33 kDa	0.5	5.7	0.5	0.5	0.5	1.0
102	IPI00909570	伸長因子2 #	63 kDa	0.5	0.5	0.5	1.0	0.5	6.0
103	IPI00013808	α-アクチニン-4 #	105 kDa	0.5	0.5	0.5	1.7	0.5	5.0
104	IPI00643623	好中球ゼラチナーゼ 関連リポカリン #	23 kDa	0.5	0.5	2.0	0.5	0.5	5.0
105	IPI00305622	タンパク質-グルタミン γ-グルタミルトランス フェラーゼK #	90 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	6.0
106	IPI00216798	ミオシン制御軽鎖2、心室/ 心筋アイソフォーム*γ	19 kDa	0.5	5.7	0.5	0.5	0.5	0.5
107	IPI00335168	ミオシン軽鎖ポリペプチド6 の非筋アイソフォーム* %	17 kDa	0.5	2.3	0.5	0.5	0.5	2.7
108	IPI00790739	アコニターゼ2、 ミトコンドリアγ	88 kDa	0.5	6.3	0.5	0.5	0.5	0.5
109	IPI00848226	グアニンヌクレオチド 結合タンパク質サブ ユニットβ-2様1 #	35 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	6.0
110	IPI00003362	78kDaグルコース 制御タンパク質 #	72 kDa	0.5	0.5	0.5	1.3	0.5	4.7

10

20

30

40

【表 2 - 4】

タンパク質 #	受託番号	タンパク質名称	MW	SA-平均 スペクトルカウント			虚血-平均 スペクトルカウント		
				TP1	TP7	TP8	TP1	TP7	TP8
111	IPI00412407	セルピンB4%	42 kDa	0.5	2.0	0.5	1.0	0.5	3.0
112	IPI00877726	クレアチンキナーゼ $\mu$ 型、 ミトコンドリア* #	50 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	5.0
113	IPI00426051	推定の未同定タンパク質 DKFZp686C15213 #	51 kDa	0.5	0.5	1.0	1.7	0.5	2.7
114	IPI00419585	ペプチジル-プロリルシス- トランスイソメラーゼA #	18 kDa	0.5	0.7	0.5	1.3	0.5	3.3
115	IPI00893099	ヒートショック70kDa タンパク質1様変異体 #	70 kDa	0.5	0.5	0.5	1.7	0.5	3.3
116	IPI00794543	カルモジュリン #	17 kDa	0.5	0.5	0.5	1.0	0.5	4.3
117	IPI00219757	グルタチオンS-トランス フェラーゼP #	23 kDa	0.5	0.5	0.5	1.7	0.5	3.3
118	IPI00021828	シスタチン-B%	11 kDa	0.5	1.7	0.5	0.5	0.5	3.0
119	IPI00291922	プロテアソーム サブユニット $\alpha$ 5型 #	26 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	4.0
120	IPI00021812	神経芽細胞分化関連 タンパク質 #	629 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	3.3
121	IPI00060800	チモーゲン顆粒タンパク質 16ホモログB $\delta$	23 kDa	0.5	0.5	2.0	2.0	0.5	0.5
123	IPI00291006	リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、 ミトコンドリア%	36 kDa	0.5	2.0	0.5	0.5	0.5	1.0
124	IPI00215917	ADP-リボシル化因子3 #	21 kDa	0.7	0.5	0.5	0.5	0.5	3.7
125	IPI00009856	タンパク質Plunc	27 kDa	0.5	0.5	3.7	0.5	0.5	0.7
126	IPI00215965	ヘテロ核内リボ核 タンパク質A1* #	39 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	3.3
127	IPI00216026	電位依存性アニオン選択性 チャネルタンパク質2* #	32 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	3.3
128	IPI00873099	タンパク質S100A2 #	11 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	2.3
129	IPI00414684	セメノジェリン-1* $\delta$	45 kDa	0.5	0.5	3.7	0.5	0.5	0.5
130	IPI00797270	トリオースリン酸 イソメラーゼ%	27 kDa	0.5	1.5	0.5	1.7	0.5	1.3
132	IPI00022774	移行型小胞体ATPアーゼ #	89 kDa	0.5	0.5	0.5	0.7	0.5	2.3
134	IPI00879238	40Sリボソームタンパク質 S9 #	17 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	2.3
136	IPI00216975	トロポミオシン $\alpha$ -4鎖* #	33 kDa	0.5	0.5	0.7	0.5	0.5	2.0
137	IPI00232492	3要素モチーフ含有 タンパク質29* #	64 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	3.0
138	IPI00017672	プリンスクレオシド ホスホリラーゼ #	33 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	3.0
139	IPI00007188	ADP/ATPトランスロカーゼ2 #	33 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	3.0
140	IPI00243742	ミオシン軽鎖3 $\gamma$	22 kDa	0.5	2.7	0.5	0.5	0.5	0.5
141	IPI00291410	Long口腔、肺および鼻粘膜 上皮癌関連タンパク質1* $\delta$	52 kDa	0.5	0.5	1.7	1.0	0.7	0.5

10

20

30

40

【表 2 - 5】

タンパク質 #	受託番号	タンパク質名称	MW	SA-平均 スペクトルカウント			虚血-平均 スペクトルカウント		
				TP1	TP7	TP8	TP1	TP7	TP8
143	IPI00216691	プロフィリン-1 $\delta$	15 kDa	0.5	0.5	2.3	0.7	0.5	0.5
144	IPI00790304	電位依存性アニオン選択性 チャンネルタンパク質1 #	20 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	2.7
145	IPI00015141	クレアチンキナーゼ、 サルコメアミトコンドリア $\gamma$	48 kDa	0.5	2.7	0.5	0.5	0.5	0.5
146	IPI00244346	トロポニンI、心筋 $\gamma$	24 kDa	0.5	2.7	0.5	0.5	0.5	0.5
147	IPI00556485	60S酸性リボソーム タンパク質P0 #	27 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	2.7
148	IPI00012011	コフィリン-1 #	19 kDa	0.5	0.5	0.5	0.7	0.5	2.0
149	IPI00915941	60kDaヒートショック タンパク質、ミトコンドリア #	25 kDa	0.5	0.7	0.5	0.5	0.5	1.7
150	IPI00186711	プレクチン-1* #	518 kDa	0.5	0.5	0.7	0.5	0.5	1.7
151	IPI00455383	クラスリン重鎖1* #	188 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	2.0
152	IPI00328328	真核生物翻訳開始因子 4A-II* #	46 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	2.3
153	IPI00479306	プロテアソーム サブユニット $\beta$ 5型 #	28 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	2.3
154	IPI00926685	チューブリン $\beta$ -4鎖 #	41 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	2.0
155	IPI00010214	タンパク質S100-A14 #	12 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	2.3
156	IPI00382482	Ig重鎖V-III領域CAM #	14 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.8	1.2
157	IPI00219575	プレオマイシンヒドロラーゼ #	53 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1.7
158	IPI00798035	ミオシン結合タンパク質C、 心臓型 $\gamma$	141 kDa	0.5	2.3	0.5	0.5	0.5	0.5
159	IPI00025491	真核生物翻訳開始因子 4A-I #	46 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1.7
160	IPI00329389	60Sリボソームタンパク質L6#	33 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1.7
161	IPI00645201	リボソームタンパク質S8 #	22 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1.7
162	IPI00289983	前立腺酸性 ホスファターゼ* #	48 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1.3
163	IPI00925023	NADH-ユビキノノキシド レダクターゼ75kDaサブ ユニット、ミトコンドリア $\gamma$	74 kDa	0.5	2.0	0.5	0.5	0.5	0.5
164	IPI00473011	ヘモグロビン サブユニット $\delta$ #	16 kDa	0.5	0.7	0.5	0.5	0.5	1.7
165	IPI00018146	14-3-3タンパク質 $\theta$ #	28 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	2.0
166	IPI00154509	プロテアソーム サブユニット $\alpha$ 7型様 #	29 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	2.0
167	IPI00759776	アクチニン、 $\alpha$ 1* i #	106 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	2.0
168	IPI00909534	伸長因子1- $\gamma$ #	24 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	2.0
169	IPI00414696	ヘテロ核内リボ核 タンパク質A2/B1* #	36 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1.8
172	IPI00216318	14-3-3タンパク質 $\beta$ / $\alpha$ * #	28 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1.3
173	IPI00550363	トランスジェリン-2 #	22 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1.7
174	IPI00301021	トランスコロン関連タンパク 質サブユニット $\alpha$ * #	32 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1.7
175	IPI00871956	40Sリボソームタンパク質 S2に類似 #	20 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1.7

10

20

30

40

【表 2 - 6】

タンパク質 #	受託番号	タンパク質名称	MW	SA-平均 スペクトルカウント			虚血-平均 スペクトルカウント		
				TP1	TP7	TP8	TP1	TP7	TP8
177	IPI00220740	ヌクレオフォスミン* #	29 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1.7
178	IPI00023635	イノシトールモノホス ファターゼ2* #	31 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1.3
179	IPI00031549	デスモコリン-3* #	100 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1.0
180	IPI00555956	プロテアソーム サブユニットβ4型 #	29 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1.0
181	IPI00478287	推定の未同定タンパク質 ENSP00000352132 #	22 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1.3
182	IPI00219038	ヒストンH3.3 #	15 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1.0
184	IPI00941747	カルネキシン #	68 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1.0
185	IPI00219622	プロテアソーム サブユニットα2型 #	26 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1.0
186	IPI00873506	グアニンアミノ ヒドロラーゼ #	53 kDa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1.0

脚注-アスタリスク(\*)の印を付けたタンパク質について、すべてのアイソフォームが含まれる  
 TP1-手術前のベースライン  
 TP7-PTCA後1時間  
 TP8-PTCA後24時間

太字のタンパク質は罹患群においてTP7またはTP8のいずれかにおいて上昇する  
 イタリック体のタンパク質は罹患群においてTP7またはTP8のいずれかに基づいて減少する  
 # 罹患においてTP8のみにおいて少なくとも2倍上昇する  
 @ 罹患においてTP7において少なくとも2倍上昇し、TP8において上昇したままである  
 α-罹患においてTP7において少なくとも2倍上昇し、TP8においてベースラインに戻る  
 % 罹患においてTP7において少なくとも2分の1減少し、罹患においてTP8において少なくとも2倍増加する  
 β-罹患においてTP7において少なくとも2分の1減少し、TP8において減少したままである  
 γ-罹患においてTP7において少なくとも2分の1減少し、TP8においてベースラインに戻る  
 δ-罹患においてTP8のみにおいて少なくとも2分の1減少する

## 【0015】

ここに開示された方法は、単独で、または他の診断試験と組み合わせて使用して、診断の精度と特異性を向上させることができる。これらは、cTnI、cTnT、ミオグロビン、CKMBのような一般的に用いられている心筋損傷バイオマーカを含む。方法はまた、スクリーニング目的で使用して、この手段または他の手段によるさらなる試験のための「リスクがある」と思われる個体を特定することもできる。

## 【0016】

したがって、一形態において、方法は、(a)前記対象から得られる生物学的試料中の、表2において特定されているタンパク質またはペプチドを含む少なくとも1つのバイオマーカのレベルを決定すること、および(b)ある特定のタンパク質またはペプチドの対照レベルと比較したバイオマーカのレベルの上昇または減少が、疾患または障害を示すことを含む。一態様において、疾患は虚血である。他の態様において、疾患は心筋虚血である。他の態様において、疾患は腎虚血である。他の態様において、疾患は骨格筋虚血である。他の態様において、疾患は脳虚血である。他の態様において、疾患は臓器虚血である。

## 【0017】

10

20

30

40

50

他の形態において、方法は、表2のタンパク質/ペプチドを含む少なくとも1つのバイオマーカーの存在について対象試料をアッセイすることを含み；前記バイオマーカーの検出は疾患または障害の診断と関連しており、関連は、正常対象と比較した対象試料中のバイオマーカーの存在およびレベルを考慮している。

【0018】

バイオマーカーは、当業者に知られている任意の適した手段によって、たとえば、タンパク質またはペプチドアッセイ、結合アッセイまたはイムノアッセイを使用して検出することができる。バイオマーカーはまた、任意選択でA B B P Cの単離後の試料の適切な初期の処理の後に、質量分析(MS)を使用してインタクトなまたは消化されたペプチドのピークとして、または、たとえばサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)を使用してゲルバンドとして、特定することができる。陽性診断では、バイオマーカーは、健康な対照の値と比較して上昇または減少し、または経時的な同じ個体における変化を使用することができる。多重反応モニタリング(MRM)は、他の態様において有用な、選択されたイオンのモニタリングを可能とする質量分析技術である。この技術を使うことにより、非常に特異的な化学的または生物学的な種をモニタリングすることができ、絶対的な定量値を得ることができる。たとえば、あるタンパク質の濃度を、そのタンパク質に独特の1以上のペプチドのモニタリングにより決定することができる。

10

【0019】

対象試料は、たとえば、血液、血漿、血清または他の体液からなる群から選択することができる。好ましくは、試料は、アルブミンが富化された血清または血漿である。

20

【0020】

この診断アッセイは、たとえば、緊急処置室に居る患者を評価するため、または病院内での長期継続ケアのため、または開業医の診察室において、または緊急移送(たとえば救急車)において、手術または治療上の処置の間またはその後(たとえば、血管形成または血栓溶解処置の間またはその後)に使用することができる。アッセイは、アルブミンが血清中に非常に豊富であるため(40~50mg/ml)、個体から容易かつ再現可能に得ることができるという利点を有する。アルブミンに対する特異的抗体が利用可能であり、A B P P Cは複雑なアッセイの必要なく、容易に富化または捕捉される。液体クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーおよびゲルに基づく方法を含む他の生化学的方法も同様に使用することができる。この天然に存在するサブプロテオームの捕捉は、試料の複雑性を低減させ、低いタンパク質濃度でのアッセイ感度に付随する問題を回避する。A B P P C中のいくつかのタンパク質は、アルブミンを枯渇させた血清中では観察されていないので、いくつかのバイオマーカーは、A B P P Cに独特であるようである。

30

【0021】

本明細書に記載されている方法を実施するためのキットも提供される。一態様において、キットは、以下のいずれかを含んでよい：内因性のアルブミンを特異的に捕捉または富化するための抗体(または化学的成分)、アルブミンに結合した1以上の特定のタンパク質(またはペプチドもしくは修飾タンパク質)に対する二次抗体(または化学的成分)、および結合している二次抗体の量の検出および/または定量のための成分。一態様において、二次抗体は、虚血において特定のタンパク質と共に変化することによってA B P P Cのタンパク質含有量の変化を定量する、表1または表2に列挙されたタンパク質(複数可)に対するものであり得る。

40

【0022】

ある態様において、内因性のA B P P Cは(抗体または化学的部分により)捕捉され、続いて、インタクトなまたは酵素分解されたタンパク質の質量分析(MS)を使用して、目的のタンパク質を直接検出する。この態様において、キットは、A B P P Cが、インタクトな質量についてはMS中への溶出後に富化され、または消化およびその後の(分析物についてのすべてのペプチドまたは特定の特徴的ペプチドの)MS分析については溶出されるであろうマトリックスにカップリングした抗アルブミン抗体(たとえば、小型カラム中のまたはピペットチップの先端に充填された)を含有してもよい。キットは、標識され

50

た内部タンパク質標準をさらに含んでもよい。本発明のキットは、複数のA B P P C成分が同時に評価できるように、複数の抗体を含有してもよい。

【0023】

結合しているA B P P Cと遊離している（循環している）A B P P Cとの比も重要であり得ると考えられる。方法およびキットは、特定のタンパク質が、血清アルブミンに結合しているか遊離していると測定されるように修飾されてもよい。たとえば、いくつかのタンパク質は、ともにアルブミンに結合していることが観察されたが、血清のアルブミン枯濁画分においても観察され、遊離形態で存在し得ることを示している。これらのタンパク質の例は、アンチトロンピンI I I、アポリポタンパク質、A I I、A I V、C I I、クラステリン、トランスサイレチンおよびビタミンD結合タンパク質を含む。実践者は、常法通りの実験により、特定の疾患状態においてその比がどのように変更するのかを決定することができる。

10

【0024】

本発明の方法および組成物が有用であることが予期される疾患または障害は、虚血を含む。心筋虚血、臓器虚血、腎虚血および脳虚血を含む、異なる形態の虚血が検出可能であってよい。

【0025】

定義

以下の用語は、ほかに示されていない限り、この出願において、以下に定義されるように用いられる。

20

【0026】

「マーカー」または「バイオマーカー」は、本明細書において互換的に使用され、本発明との関連において、対照値と比較して特定の疾患または障害を有する患者から採取される試料中に示差的に存在する、（特に特定の同一性または見かけの分子量の）A B P P Cを指し、対照値は、たとえば、対照対象（たとえば、陰性診断を有する人、正常なまたは健康な対象）から採取される、比較可能な試料における平均または算術平均値からなる。バイオマーカーは、アルブミンと現在結合しているまたはそれから切断された特定のペプチドまたはタンパク質（表1または表2）として、または質量分析、サイズ排除クロマトグラフィー、もしくは他の分離プロセスまたは抗体検出における特定のピーク、バンド、画分などとして決定されてもよい。いくつかの適用において、たとえば、質量分析もしくは他のプロファイルまたは複数の抗体を使用して、複数のバイオマーカーを決定してもよく、個々のバイオマーカー間の差異および/または部分的なもしくは完全なプロファイルを、診断のために使用してもよい。

30

【0027】

「示差的に存在する（*differentially present*）」という句は、対照対象と比較した特定の疾患または障害を有する患者から採取した試料中に存在するマーカーの量および/または頻度の差異を指す。たとえば、マーカーは、疾患または障害を有する患者の試料中の、対照値（たとえば、対照対象の試料により決定された値）と比較して上昇したレベルまたは減少したレベルで存在するA B P P Cとすることができる。代替として、マーカーは、対照対象の試料と比較して、患者の試料中に高頻度または低頻度で検出されるA B P P Cとすることができる。マーカーは、量、頻度またはその両方の観点から示差的に存在していればよい。マーカーは、単なる存在/検出量の増減ではなく、マーカーであるタンパク質の物理的な変化/修飾であってもよい。たとえば、それは、変化しているタンパク質の翻訳後修飾、切断、またはアイソフォームであってよく、アッセイによって検出されるのはこの変化である。これは、疾患対対照の異なる量の決定とは区別される。

40

【0028】

試料中のマーカー、化合物、組成物または物質の量が、他の試料におけるマーカー、化合物、組成物または物質の量と、または対照値と統計的に有意に異なる場合、試料中のマーカー、化合物、組成物または物質は、試料中に示差的に存在している。たとえば、化合

50

物は、それが、他の試料（たとえば対照）中に存在するよりも少なくとも約120%、少なくとも約130%、少なくとも約150%、少なくとも約180%、少なくとも約200%、少なくとも約300%、少なくとも約500%、少なくとも約700%、少なくとも約900%、または少なくとも約1000%多くまたは少なく存在している場合、または、1つの試料においては検出できるが他の試料では検出できないという場合、示差的に存在している。

【0029】

代替としてまたはさらに、マーカー、化合物、組成物または物質は、たとえば特定の疾患または障害を有する患者の試料におけるマーカー等の検出の頻度が、健康な個体から得られる対照試料または対照値よりも統計的に有意に高いまたは低い場合、試料間で示差的に存在している。たとえば、バイオマーカーは、一方の試料が他の試料よりも少なくとも約120%、少なくとも約130%、少なくとも約150%、少なくとも約180%、少なくとも約200%、少なくとも約300%、少なくとも約500%、少なくとも約700%、少なくとも約900%、または少なくとも約1000%高頻度または低頻度で観察される場合、2セットの試料間で示差的に存在している。これらの例示的な値にもかかわらず、当業者は、マーカーが示差的に存在しているか否かを決定する統計的に有意な差異を現すカットオフポイント等を決定できることが予期される。

10

【0030】

「診断的」とは、病的状態の存在または性質を特定することを意味し、特定の疾患または障害を発症するリスクのある患者を特定することを含む。診断方法は、その感度および特異性において異なる。診断アッセイの「感度」とは、試験で陽性となった者のうちの患者のパーセントである（「真陽性」のパーセント）。アッセイによって検出されない罹患個体は、「偽陰性」である。罹患しておらずアッセイにおいて陰性である対象は、「真陰性」と呼ばれる。診断アッセイの「特異性」は、1 - 偽陽性率であり、「偽陽性」率は、試験で陽性であり疾患を有さない対象の比率と定義される。特定の診断方法は、状態の確定診断を提供しないが、方法が診断に役立つ陽性を示すものであれば十分である。

20

【0031】

「検出」、「検出する」等の用語は、バイオマーカーの検出、または疾患または障害の検出（たとえば、陽性のアッセイ結果が得られたとき）との関連において使用されてよい。後者の関連では、「検出」および「診断」は同義語とみなされる。

30

【0032】

「のリスクがある」は、正常な対象と比較してまたは対照群、たとえば患者集団と比較して増加したリスクがあることを意味することが意図されている。したがって、特定のマーカーを保有する対象は、特定の疾患または障害について増加したリスクを有してもよく、さらなる試験を必要とすると特定されてもよい。「増加したリスク」または「上昇したリスク」は、たとえばその対象がその障害を有するという、確率の統計学的に有意な増加を意味する。リスクは、好ましくは、比較している対照群に対して少なくとも10%、より好ましくは少なくとも20%、さらにより好ましくは少なくとも50%増加する。

【0033】

マーカーの「試験量」は、試験されている試料中に存在するマーカーの量を指す。試験量は、絶対的な量（たとえば、 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）または相対的な量（たとえば、シグナルの相対強度）のいずれかとすることができる。

40

【0034】

マーカーの「診断量」とは、特定の疾患または障害の診断と一致する対象の試料中のマーカーの量を指す。診断量は、絶対量（たとえば、 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）または相対量（たとえば、シグナルの相対強度）のいずれかとすることができる。

【0035】

マーカーの「対照量」は、マーカーの試験量に対して比較される任意の量または量の範囲とすることができる。たとえば、マーカーの対照量は、診断される疾患または障害に罹患していない人におけるマーカーの量とすることができる。対照量は、絶対量（たとえば

50

、 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) または相対量 (たとえば、シグナルの相対強度) のいずれかとすることができる。

【0036】

「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」という用語は、本明細書において互換的に使用されて、 $\alpha$ -アミノ酸残基の、特に天然に存在する  $\alpha$ -アミノ酸のポリマーを指す。この用語は、天然に存在するアミノ酸ポリマーと同様に、1以上のアミノ酸残基が、天然に存在するアミノ酸に対応する類似体または模倣物であるアミノ酸ポリマーにも適用される。ポリペプチドは、たとえば、炭水化物残基の付加による糖タンパク質の形成、リンタンパク質を形成するリン酸化、および多くの化学的修飾 (たとえば、酸化、脱アミド、アミド化、メチル化、ホルミル化、ヒドロキシメチル化、グアニジン化) により修飾されていても、ならびに分解、還元、架橋されていてもよい。「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」という用語は、タンパク質のすべての非修飾および修飾形態を含む。

10

【0037】

「検出可能な部分」または「標識」は、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、または化学的手段により検出可能な組成物を指す。たとえば、有用な標識は、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、蛍光色素、高電子密度試薬、酵素 (たとえば、ELISAで一般的に使用されるような)、ビオチン-ストレプトアビジン、ジゴキシゲニン、ハプテンおよび抗血清またはモノクローナル抗体が利用可能なタンパク質、または標的に相補的な配列を有する核酸分子である。検出可能な部分は、しばしば、試料における結合している検出可能な部分の量を定量するために使用することができる、測定可能なシグナル、たとえば放射線、色素、または蛍光シグナルなどを発生する。シグナルの定量は、たとえば、シンチレーション計数、デンストメトリー、フローサイトメトリー、またはインタクトなもしくはその後消化されたペプチド (1つ以上のペプチドを評価することができる) の質量分析による直接分析によって達成される。

20

【0038】

「抗体」とは、エピトープ (たとえば抗原) に特異的に結合および認識する1つもしくは複数の免疫グロブリン遺伝子、またはそれらの断片により実質的にコードされるポリペプチドリガンドを指す。認識された免疫グロブリン遺伝子は、 $\kappa$  および  $\lambda$  軽鎖の定常領域遺伝子、 $\mu$  および  $\delta$  重鎖定常領域遺伝子、および無数の免疫グロブリン可変領域遺伝子を含む。抗体は、たとえば、インタクトな免疫グロブリンまたは種々のペプチダーゼによる消化により生成される多くのよく特徴付けられたその断片として存在する。これは、たとえば、 $\text{Fab}'$  および  $\text{F}(\text{ab})'_2$  断片を含む。「抗体」という用語は、本明細書において使用される場合、抗体全体の修飾、または組み換えDNA手法を使用してデノボ合成されたもののいずれかによって生成された抗体断片も含む。それはまた、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体または一本鎖抗体も含む。抗体の「Fc」部分は、1以上の重鎖定常領域ドメイン、 $\text{CH}_1$ 、 $\text{CH}_2$  および  $\text{CH}_3$  を含むが、重鎖可変領域を含まない、免疫グロブリン重鎖の部分の部分を指す。

30

【0039】

「結合アッセイ」は、バイオマーカーが、作用物質、たとえば抗体などへの結合によって検出され、それにより検出プロセスが実施される生化学的アッセイを意味する。検出プロセスは、放射性または蛍光標識などを含んでもよい。アッセイは、バイオマーカーの固定を含んでもよく、溶液中で行われてもよい。

40

【0040】

「イムノアッセイ」は、抗原 (たとえば、マーカー) に特異的に結合する抗体を使用するアッセイである。イムノアッセイは、抗原を単離、補足および/または定量するために、特定の抗体の特異的結合特性を利用することによって特徴付けられる。

【0041】

タンパク質またはペプチドを指すときの、抗体「に特異的に (または選択的に) 結合する」またはそれ「と特異的に (または選択的に) 免疫反応性の」という句は、タンパク質

50

および他の生物製剤の不均一な集団におけるタンパク質の存在を決定する結合反応を指す。したがって、指定されたイムノアッセイ条件下で、指定の抗体は特定のタンパク質にバックグラウンドで少なくとも2回結合し、試料中に存在する他のタンパク質には有意な量では実質的に結合しない。そのような条件下での抗体への特異的な結合は、特定のタンパク質についてのその特異性のために選択される抗体を必要としてもよい。種々のイムノアッセイフォーマットが、特定のタンパク質と特異的に免疫反応性の抗体を選択するために使用されてもよい。たとえば、固相ELISAイムノアッセイは、タンパク質と特異的に免疫反応性の抗体を選択するために常法として使用されている（たとえば、特定の免疫反応性を決定するために使用することができるイムノアッセイフォーマットおよび条件の説明については、Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (1988)を参照されたい)。

10

## 【0042】

「対象」、「患者」または「個体」という用語は一般にヒトを指すが、本発明の方法はヒトに限定されず、アルブミンは種間で相同であるため、他の動物（たとえば、鳥類、爬虫類、両生類、哺乳類）において、特に哺乳動物において有用であるべきである。

## 【0043】

「試料」は、その最も広い意味で、本明細書において使用される。試料は、血液、血清、血漿、涙液、房水および硝子体液、髄液を含む体液；細胞もしくは組織調製物の可溶性画分、または細胞を増殖させた培地；細胞小器官、または細胞もしくは組織から単離もしくは抽出された膜；溶液中のまたは基板に結合しているポリペプチド、またはペプチド；細胞；組織；組織プリント；フィンガープリント、皮膚または毛髪；その断片および誘導体を含んでいてもよい。対象試料は通常、血液、血漿および血清を含む血液製剤の誘導体を含む。

20

## 【0044】

「アルブミン富化された血清または血漿」は、処理されて、アルブミン以外の成分ならびにそれに結合している関連ペプチドおよびタンパク質を低減または除去された血清または血漿を意味する。

## 【実施例】

## 【0045】

血清または血漿からアルブミンを単離するための利用可能な2つの主な方法：親和性ベースの（たとえば、抗体、Cibacronブルー）および化学物質ベースの方法（たとえば、NaCl/EtOH (Fu, Q., Garnham, C.P., Elliott, S.T., Bovenkamp, D.E.ら、*Proteomics* 2005、5、2656~2664; Colantonio, D.A., Dunkinson, C., Bovenkamp, D.E., Van Eyk, J.E., *Proteomics* 2005、5、3831~3835.) TCA/アセトン (Chen, Y.Y., Lin, S.Y., Yeh, Y.Y., Hsiao, H.H.ら、*Electrophoresis* 2005、26、2117~2127))がある。親和性ベースの方法の多くが比較されており、アルブミンを効率的に除去することが示されている (Zolotarjova, N., Martosella, J., Nicol, G., Bailey, J.ら、*Proteomics* 2005、5、3304~3313; Bjorhall, K., Miliotis, T., Davidsson, P., *Proteomics* 2005、5、307~317; Chromy, B.A., Gonzales, A.D., Perkins, J., Choi, M.W.ら、*J. Proteome Res.* 2004、3、1120~1127)。しかしながら、これらの方法は、LCカラムの場合、タンパク質/ペプチドのリガンドおよびカラム材料に対する非特異的結合ならびに実験間のキャリアーに対して弱い (Zolotarjova, N., Martosella, J., Nicol, G., Bailey, J.ら、*Proteomics* 2005、5、3304~3313; Colantonio, D.A., Dunkinson, C., Bovenkamp, D.E., Van Eyk, J.E., *Proteomics* 2005、5

30

40

50

、3831~3835; Bjorhall, K., Miliotis, T., Davidsson, P., Proteomics 2005, 5, 307~317; Chromy, B. A., Gonzales, A. D., Perkins, J., Choi, M. W. 5、J. Proteome Res. 2004, 3, 1120~1127; Steel, L. F., Trotter, M. G., Nakajima, P. B., Mattu, T. S. 5、Mol. Cell. Proteomics 2003, 2, 262~270; Stanley, B. A., Gundry, R. L., Cotter, R. J., Van Eyk, J. E., Dis. Markers 2004, 20, 167~178)。代替として、アルブミンは、1940年代からNaCl/EtOH沈殿を使用して精製されており(Cohn, E. J., Strong, L. E., Hughes, W. L., Mulford, D. J. 5、J. Am. Chem. Soc. 1946, 68, 459~475)、この方法は、医薬品グレードのアルブミンを単離するために常法として使用されている。最近、このプロセスが、アルブミンの効率的な精製および除去のために必要とされるステップを最小化するために、プロテオミクス分野で最適化されたが(Fu, Q., Garnham, C. P., Elliott, S. T., Bovenkamp, D. E. 5、Proteomics 2005, 5, 2656~2664)、他のタンパク質の同時精製は依然として問題になり得る。

#### 【0046】

##### 例1

コホート：ヒト血清を、待機的な血管形成術(PTCA)を受けている患者から得た。血清を、手順の全体にわたって様々な時点で大腿動脈から取り出した。患者試料を、心臓トロポニンI(cTnI)の非存在または存在にそれぞれ基づいて非罹患(対照)または罹患(心筋梗塞、MI)に分類した。分析のために、各群から3つの時点、T<sub>0</sub>-ベースライン、T<sub>7</sub>-PTCA後1時間、およびT<sub>8</sub>-PTCA後24時間を選んだ。

#### 【0047】

材料：すべての試薬および溶媒は、利用可能な最高グレードであった。サイズ排除標準はすべて、Sigma Aldrichから購入し、少なくとも90%純粋であった。

#### 【0048】

サイズ排除クロマトグラフィー：ヒト血清アルブミン(HSA)を、NaCl/EtOH溶媒系を使用して非HSA関連タンパク質を沈殿させ、HSAおよびその関連タンパク質/ペプチドは上清中にとどまる化学的枯渇によって、血清試料から除去した。次いでHSAを含有する上清を、BioSep-SEC-S2000 300x7.8mmカラム(Phenomenex, Torrance, CA, 米国)を使用してProteome Lab PF2D HPLCシステム(Beckman Coulter, Fullerton, CA, 米国)において実施される非変性サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)に供した。移動相は、50mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH6.8であり、これをアイソクラティックで0.25mL/minの流速で流した。各試料について、200μgの全タンパク質をSECカラム上に2回ロードし、両方のランの画分を合わせた。画分を0.5分毎に回収し、関連タンパク質/ペプチドが結合しているHSAを含有する画分を集め、10分間にわたって2分間の画分プールずつ一緒にプールした(画分はAとラベルした)。次いで画分AおよびBを合わせて画分ABとし、これにより、各試料について4つの全プールSEC画分が存在した。各プールした画分(AB、C、DおよびE)についての全タンパク質濃度を、製造業者のプロトコールに従ってマイクロBCAアッセイキット(Sigma Aldrich, St. Louis, MO, 米国)を使用して決定した。6つの分子量標準もまた、同じ実験条件を使用して流した(アスペルギルス・オリゼ(Aspergillus oryzae)由来 - ガラクトシダーゼ116.3kDa、ヒト血清アルブミン67kDa、ニワトリのオボアルブミン45kDa、ウシ赤血球由来炭酸脱水酵素30kDa、ウマ心臓由来ミオグロビン16.7kDaおよびウシ酸化インスリン - 鎖3.5kDa)。

#### 【0049】

1 - D SDS - PAGEおよびトリプシン消化：次いで、各画分プールの375ナノグラムの全タンパク質を凍結乾燥し、タンパク質を、20mM DTT：4×Invitrogenローディング緩衝液の3：1混合物中に再懸濁した。次いで試料を95で5分間沸騰させ、Invitrogen 4～12% Bis-Trisゲル上にロードした。ゲルを、1×MESランニング緩衝液中で、140Vで20分間、次いで200Vで追跡色素がゲルの底部に到達するまで流した。Shevchenkoらのプロトコールに従ってゲルを銀染色した(Shevchenkoら Analytical Chemistry 1996、68：850～858)。アルブミンおよびアルブミン二量体に対応するバンドをゲルから切り取り、廃棄した。次いで、各レーンの残っているゲルを2.0mL エピペンドルフチューブ中に入れ、トリプシンで消化した。

10

**【0050】**

質量分析：各プールした画分について、製造業者のプロトコールに従ってOmixon C18 Zip Tips (Varian, Santa Clara, CA, 米国) を使用してペプチド溶液を脱塩し、30μlの70%アセトニトリル(MeCN)、0.1%ギ酸(FA)で溶出した。LC-MS/MS分析の前に、2マイクロリットルの画分AおよびCを合わせ、2μlの画分DおよびEを合わせた。各組合せの2つのテクニカルレプリケートを、ナノエレクトロスプレーイオン源を備えたLTQ-Orbitrap質量分析計(Thermo, Waltham, MA, 米国)に接続されたAgilent 1200ナノ-LCシステム(Agilent, Santa Clara, CA, 米国)において分析した。ペプチドを、移動相Aが水中0.1%v/vギ酸であり、移動相Bが水中90%アセトニトリル、0.1%ギ酸であるC<sub>18</sub> RP-HPLCカラム(5μm、200 Magic C18を自己充填した75μm×10cm; Michrom BioResources, Auburn, CA, 米国)において、300nl/minの流速で分離した。直線勾配は、40分間で10～45%のBとした。各MS1スキンの後に、7つの最も豊富なプレカーサーイオンの衝突誘起解離(CID、LTQ部分において取得した)を24秒間の動的排除で行った。MS1シグナルが1000カウントを超える場合のみ、MS2スキンを開始した。MS1では、500msの最大時間にわたって2×10<sup>5</sup>イオンをOrbitrap中に蓄積し、60,000 FWHM(375～2000 m/z)の分解能でスキンした。MS2スペクトル(衝突誘起解離(CID)を介した)を、LTQにおいて通常のスキャンモードで、10<sup>4</sup>イオンの標的設定および30msの蓄積時間で取得した。正規化された衝突エネルギーは、35%に設定し、各スペクトルについて1つのマイクロスキンを取得した。ヒト血清アルブミンおよびウシ膵臓トリプシンペプチドに対応する134 m/z値の排除リストを以前のMSランに基づいて作成し、これによりこれらの値がMS2分析のために選択されることを排除した。

20

30

**【0051】**

データベース検索。生のMSデータをInternational Protein Indexヒトv.3.62データベースに対して検索し、これは、Sorcerer 2(商標)-SEQUEST(登録商標)(Sage-N Research, Milpitas, CA, 米国)を使用して実施し、検索後分析は、Scaffold3(Proteome Software, Inc., Portland, OR, 米国)を使用して実施した。すべての生データピーク抽出は、Sorcerer 2-SEQUESTデフォルト設定を使用して実施した。データベース検索パラメータは以下の通りであった：切断失敗が最大で2回までのトリプシン(LysまたはArgの後)での半酵素消化；400～4500 amuのモノアイソトピックプレカーサー質量範囲；メチオニンの示差的な酸化およびシステインの静的なカルボアミドメチル化は許容された。ペプチド質量許容誤差は50ppmに設定し、断片質量タイプはモノアイソトピックに設定し、修飾の最大数はペプチド1つ当たり4個に設定した。可能にした高度な検索オプションは、以下を含んでいた：1.5のXCORRスコアカットオフ；1.003355 amuの質量シフトを使用した同位体チェック；最終的なスコアリングのために上位2000の予備段階の結果を保持しておく；結果ファイルで最大200個までのペプチドの結果を表示する；結果ファ

40

50

イルで最大5個までの完全なタンパク質の説明を表示する；結果ファイルで最大1個までの二重測定タンパク質参照を表示する。エラー率（偽発見率）およびタンパク質確率（ $p$ ）はScaffoldによって計算した。各試料についての各A B - CおよびD - E二重測定の生データを、単一のデータベース検索に組み合わせた。

#### 【0052】

##### 結果

待機的な血管形成術（PTCA）を受けている6人の患者（3対照、3罹患）の血清を、上述した通り3つの時点で集めた。これらの試料のそれぞれのABPPCを、サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）、1-D電気泳動およびLC-MS/MSによって分析した。分子量標準を、ABPPC試料の分析の前にSECカラム上に流し、クロマトグラムを図1に示している。各ABPPC試料についてのサイズ排除クロマトグラムを、図2に示している。

10

#### 【0053】

図2のSECクロマトグラムを見ると、ABPPCが個体間で実際に異なることが明白であり、これは、患者間でABPPCの生物学的変動が存在することを示す。加えて、ABPPCはまた、一部の患者についての22分から28分間の小さいピークの変化によって分かるように、患者内でも変化している。SEC画分についての1-DEゲルプロファイルもまた、特に、それぞれ22.5~26および26.5~28分間に集めたABおよびC画分において、患者間で異なる（図3）。これらの画分は、図1において示されているように、66kDaより大きいMW範囲で溶出する小さいピークに対応する。SECのこの領域は、ABPPCの大部分が位置している可能性が最も高く、そのためこのことは、個体間で生物学的変動が存在するというさらなる証拠である。

20

#### 【0054】

SECクロマトグラムのいくつかにおいて見られる45~50分間の大きいピーク（MW標準のクロマトグラムから決定される約3,500DaのMWに対応する）はまだ特定されていない。44~50分の範囲の画分を集め、これらのプールした画分はBCA方法によってアッセイした場合595nmの吸光度を報告したが、1-DE SDS-PAGEは、銀染色した場合この画分についてバンドを示さなかった（結果は示さず）。加えて、これらの画分のトリプシン消化およびLC-MS/MS分析は、ヒトタンパク質またはペプチドの存在を示さなかった。

30

#### 【0055】

各画分についてゲル片（アルブミンを引いたもの）をトリプシンで消化し、LC-MS/MSによって分析した。ヒトIPIデータベースの検索は、試料全体にわたって分布している187の全タンパク質を返した。これらのタンパク質の大部分は、疾患#2のPTCA後24時間の試料にのみ存在していた。ゼロのスペクトルカウントを報告したタンパク質は、0.5の値を任意に割り当てた。データ分析のために、各群の患者についてすべての3つの時点で各タンパク質について平均スペクトルカウントを使用した。次いで、対照群における各タンパク質についての平均スペクトルカウントの $\log_{10}$ を計算し、罹患群における各タンパク質についての平均スペクトルカウントの $\log_{10}$ に対して、時点1および8についてプロットした（それぞれ図4aおよび4b）。上部の赤色破線より上にあるタンパク質は、罹患群において上昇するタンパク質であり、下部の赤色破線より下にあるタンパク質は、対照群において上昇するタンパク質である。2つの赤色破線の間にあるタンパク質は、2つの群間で顕著に異ならないが、この領域にあるタンパク質はさらなる評価において依然として興味深いものである可能性がある。

40

#### 【0056】

図4Aを見ると、破線の外側にあるタンパク質は多くなく、このことは、これがベースライン時点であるため予期することができる。しかしながら、図4bを見ると、破線の外側のタンパク質の数は劇的に増加する。「非常に興味深いタンパク質」と考えられる、時点8で罹患群において増加する3つのタンパク質が存在し、それらはタンパク質7、8および31であり、これは、それぞれアネキシンA2、プラコグロビンおよびセルピンB3

50

に対応する。これらのタンパク質は、表1においてボールド体である。時点8で罹患群において減少するタンパク質もまた興味深いタンパク質であり、それらは表1においてイタリック体である。ボールド体またはイタリック体でないタンパク質は、さらなる調査から排除されず、重要である可能性がある。特に、タンパク質1、3および6は、それらが血清中で遊離していることが分かったため興味深く、これらのタンパク質について、ならびに列挙されている他のタンパク質のいずれかについて、遊離対結合の比が疾患プロセスを示す可能性がある。最終的に、補遺の表において列挙されているいずれかのタンパク質は、潜在的な臨床用途を有し得るタンパク質である可能性がある。

#### 【0057】

「非常に興味深い」3つのタンパク質は、それらが既知の疾患に関与しており、時点8で罹患患者において上昇するため、特に興味を引く。プラコグロビンは、それが、中間フィラメントを原形質膜にアンカーしている主要な細胞内接着ジャンクションであるデスモソームの成分であるため興味を引く (Greenら Nature Reviews Molecular Cell Biology 2000、1:208~216)。心臓のデスモソームタンパク質をコードしている遺伝子中の突然変異は、不整脈を伴う右心室異形成症/心筋症 (ARVD/C)、特定の電氣的、機能的および構造的な右心室の異常の存在によって臨床的に、および線維または線維脂肪組織による心筋細胞の置換によって組織学的に定義される遺伝性の心疾患を有する患者に多い (Bassoら、Lancet 2009、373:1289~1300; McKennaら、British Heart Journal 1994、71:215~218)。過去10年間にわたる取り組みは、ARVCが、デスモソーム内で見出される重要な構造タンパク質をコードする遺伝子中の突然変異によって頻繁に引き起こされる常染色体優性の形質であることを示している (Awadら、Nat Clin Pract Cardiovasc Med 2008、5:258~267)。最近の取り組みは、デスモソームタンパク質をコードしている遺伝子中の突然変異はまた、拡張型心筋症患者にも多いことを示している (Elliottら、Circulation Cardiovascular Genetics 2010、3:314~322)。

#### 【0058】

罹患患者においてABPPCに結合しているプラコグロビンの量の増加が観察されるという事実は、これらの患者においてデスモソームの分解が存在すること、したがって心筋内の細胞間相互作用の構造完全性の喪失を示し、このことは、この群における患者は上昇したレベルのcTnIを示しているため、非常にもったもらしい。アルブミンは、分解されたデスモソームから放出されるこれらのタンパク質を結合するためのスポンジとして機能し得る。そうであるなら、また、これらのならびに他のデスモソームタンパク質、たとえば、プラコフィリン、デスモグレインおよびデスモコリン (そのすべてはABPPCにおいて提示される) が心筋虚血の結果としてABPPCにおいて上昇するなら、それらがまた、他の心臓障害を有する患者についてもABPPCにおいて上昇し、心血管医学において強力なバイオマーカーとして使用することができることは当然考えられる。

#### 【0059】

セルピンB3は、TGF- $\beta$ のそのモジュレーション (Turatoら、Laboratory Investigation 2010、90:1016~1023) によって、扁平上皮癌細胞の生存 (Ahmedら、Biochem Biophys Res Commun 2009、378:821~825) および慢性肝臓疾患に関与するペプチダーゼ阻害剤である。アネキシンA2は、細胞増殖の制御においておよびシグナル伝達経路において役割を果たすカルシウム依存性リン脂質結合タンパク質のファミリーであるアネキシンファミリーのメンバーである。アネキシンは、小胞のトラフィッキングおよび組織化、エキソおよびエンドサイトーシスを含む様々な細胞プロセスに、ならびにカルシウムイオンチャネル形成に関与することが示されており (Gerkeら、Nat Rev Mol Cell Biol 2005、6:449~461)、アネキシンA2は、肝細胞腫瘍の示差的な診断マーカーとして提案されている (Jiら、Inter J Mo

10

20

30

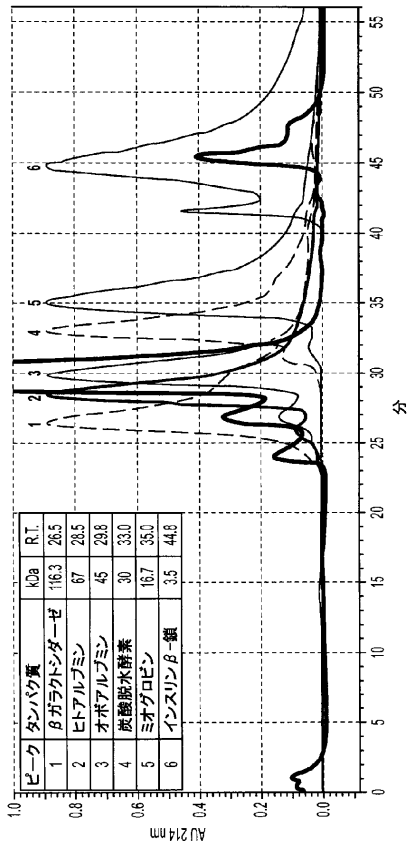
40

50

l Med 2009、24:765~771; Longrichら、Pathol Res Pract 2010、Article in Press doi:10.1016/j.prp.2010.09.007)。疾患におけるこれらのタンパク質の遊離形態の潜在的的重要性により、それらがABPPCにおいて観察されるという事実は非常に興味を引くものであり、これらのタンパク質のABPPCに結合している形態(またはABPPCにおいて観察されるタンパク質のいずれか)は、大きな診断の潜在能力を有し得る。

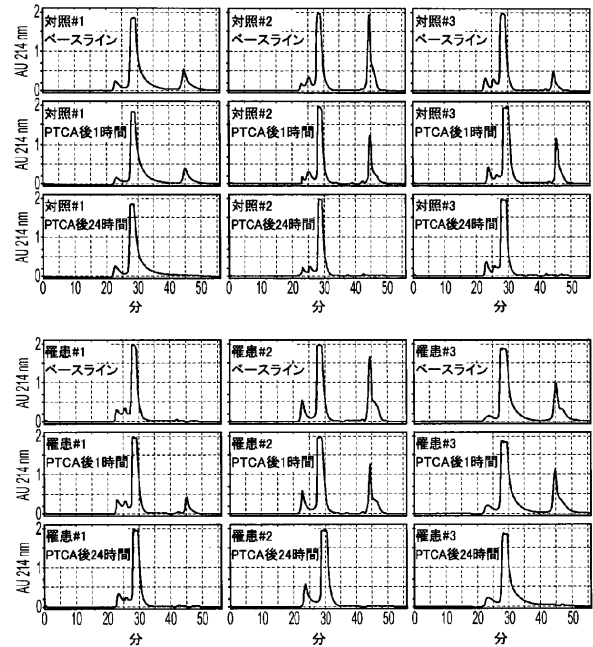
【図1】

図1



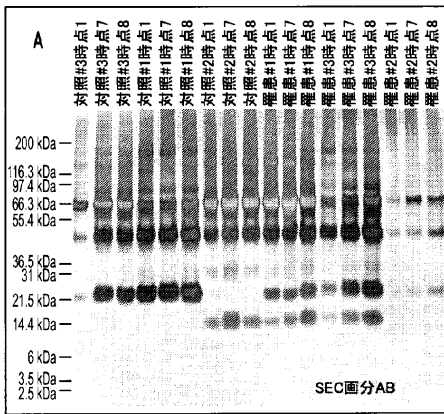
【図2】

図2



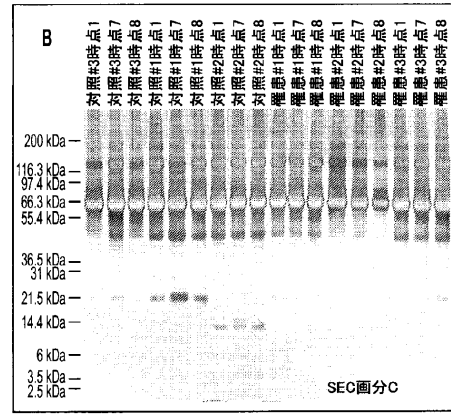
【 图 3 A 】

图 3A



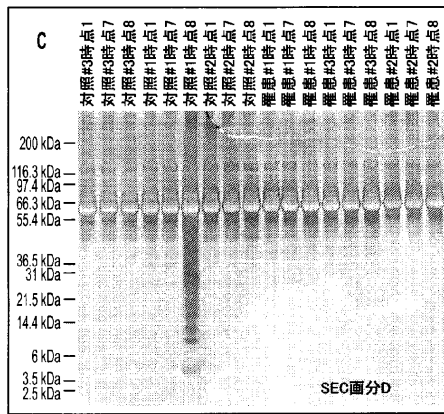
【 图 3 B 】

图 3B



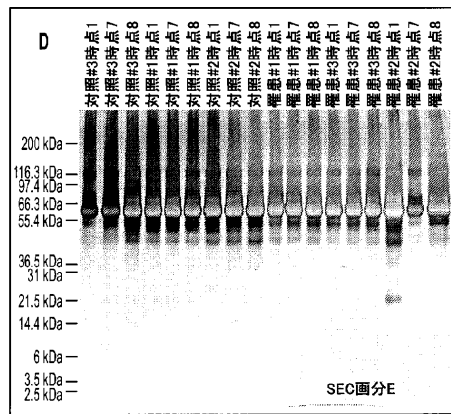
【 图 3 C 】

图 3C



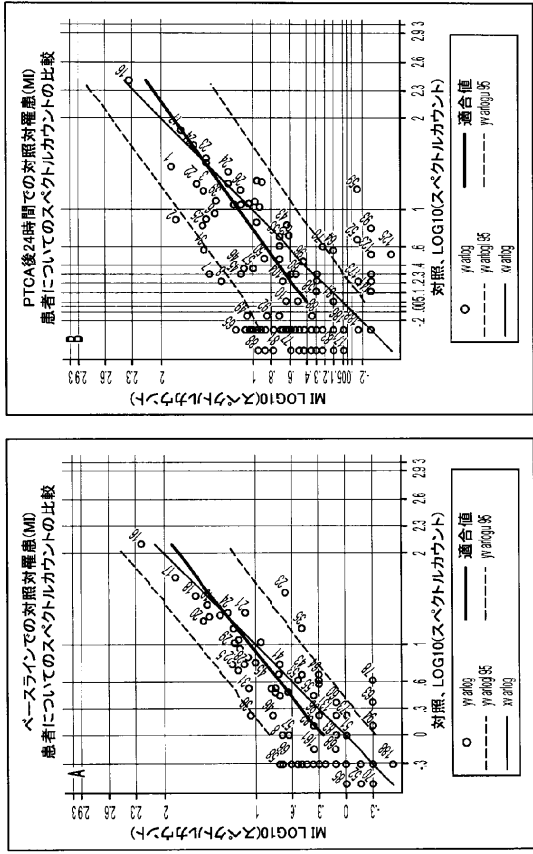
【 图 3 D 】

图 3D





【 図 4 】

図 4



## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. <b>PCT/US2011/060642</b>
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
<i>G01N 33/68(2006.01)i, G01N 33/53(2006.01)i, G01N 30/02(2006.01)i</i>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N 33/68; A61K 39/395; G01N 33/53		
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 Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) cKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: albumin-binding protein, antibody, diagnosis, marker, ischemia, mass spectroscopy.		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2007146385 A2(JOHNS HOPKINS UNIV.) 21 Dec. 2007	11,12
A	See the whole document, especially claims 18-19 and Table. 1.	13
X	Anderson, N. L. et al. Mass spectrometric quantitation of peptides and proteins using stable isotope standards and capture by anti-peptide antibodies(SISCAPA).	13
A	J. Proteome Res., 2004, Vol. 3, pp. 235-244. See abstract.	11,12
X	HUANG, H-L. et al. Proteomic profiling of neuromas reveals alterations in protein composition and local protein synthesis in hyper-excitable nerves.	13
A	Molecular Pain, 12 August 2008, Vol. 4, No. 33, pp. 1-14. See page 3, right column and Table. 2.	11,12
A	GAZE, D. C. Ischemia modified albumin: a novel biomarker for the detection of cardiac ischemia. Drug Metab. Pharmacokinet., 2009, Vol. 24, No. 4, pp. 333-341. See abstract.	11-13
A	US 20100124552 A1(KLEIN, J. et al.) 20 May 2010 See abstract and claims 1-38.	11-13
<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 12 JULY 2012 (12.07.2012)		Date of mailing of the international search report <b>12 JULY 2012 (12.07.2012)</b>
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon Metropolitan City, 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer KIM, YUN-KYUNG Telephone No. 82-42-481-5605 

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2011/060642

**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.: 1-10  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claims 1-10 pertain to a method of treatment of the human body, thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

The present invention can be divided into 140 groups based on their technical features.

Groups 1-140: Claims 11-13(in part) directed to a diagnostic or prognostic or mass spectroscopy kit comprising antibody directed against a protein or peptide selected from the listing of Table 2.

As each claimed invention deals with a different protein or a peptide as a biomarker, the present invention does not form a single general inventive concept, thus, lacks unity(PCT Rules 13.1 and 13.2).

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.: 11-13(in part)

**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/US2011/060642**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007-146385 A2	21.12.2007	CA 2655420 A1	21.12.2007
		EP 2035830 A2	18.03.2009
		EP 2035830 A4	21.07.2010
		JP 2009-540335 A	19.11.2009
		JP 2009-540335 T	19.11.2009
		US 2011-0143453 A1	16.06.2011
		WO 2007-146385 A3	13.11.2008
		WO 2007-146385 A9	14.02.2008
		US 2010-0124552 A1	20.05.2010
WO 2008-131261 A3	29.01.2009		

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, T J, 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, R O, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, H U, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI , NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN

(74)代理人 100095441  
弁理士 白根 俊郎

(74)代理人 100075672  
弁理士 峰 隆司

(74)代理人 100140176  
弁理士 砂川 克

(72)発明者 ファン・アイク、ジェニファー・イー .  
アメリカ合衆国、メリーランド州 2 1 2 3 9、バルティモア、ローク・ラベン・ブルバード  
6 6 0 4

(72)発明者 ホールウィンスキー、ロナルド・ジョセフ  
アメリカ合衆国、メリーランド州 2 1 2 3 7、バルティモア、キング・アーサー・サークル 5  
4 0 9

Fターム(参考) 2G041 CA01 EA04 EA12 FA12 GA09 HA01 JA03 KA01 LA07  
2G045 AA25 CA25 CA26 DA36

专利名称(译)	白蛋白结合蛋白/肽复合物作为疾病的生物标志物		
公开(公告)号	<a href="#">JP2013542453A</a>	公开(公告)日	2013-11-21
申请号	JP2013538980	申请日	2011-11-14
[标]申请(专利权)人(译)	约翰霍普金斯大学		
申请(专利权)人(译)	约翰·霍普金斯大学		
[标]发明人	ファンアイクジェニファーイー ホールウィンスキーロナルドジョセフ		
发明人	ファン・アイク、ジェニファー・イー、 ホールウィンスキー、ロナルド・ジョセフ		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/53 G01N30/88 G01N27/62		
CPC分类号	G01N33/6893 G01N2800/324 G01N2800/7019		
FI分类号	G01N33/68 G01N33/53.D G01N30/88.J G01N27/62.V		
F-TERM分类号	2G041/CA01 2G041/EA04 2G041/EA12 2G041/FA12 2G041/GA09 2G041/HA01 2G041/JA03 2G041/KA01 2G041/LA07 2G045/AA25 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/DA36		
代理人(译)	中村 诚		
优先权	61/412931 2010-11-12 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

所述方法和试剂盒通过使用包括白蛋白结合蛋白/肽复合物 ( ABPPC ) 在内的生物标记物来提供缺血性的诊断或预后。 [选择图]图4

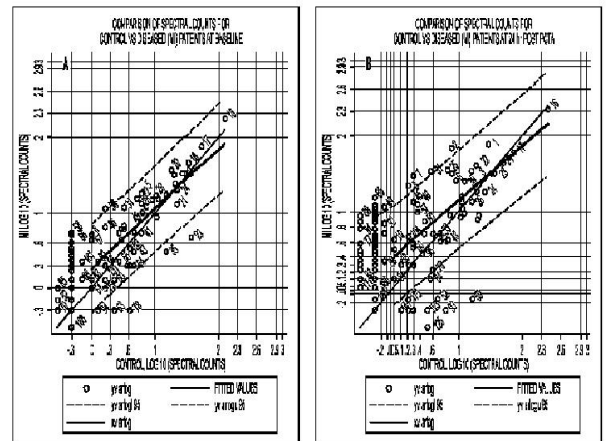


Figure 4