

(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2009-531712
(P2009-531712A)

(43) 公表日 平成21年9月3日(2009.9.3)

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

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 19 頁)

(21) 出願番号	特願2009-502905 (P2009-502905)	(71) 出願人	508287286 プレイヤー、エメリタ デ グスマン アメリカ合衆国 30084 ジョージア 、タッカー、 リブジー トレイル 28 40
(86) (22) 出願日	平成19年3月23日 (2007. 3. 23)	(74) 代理人	110000855 特許業務法人浅村特許事務所
(85) 翻訳文提出日	平成20年11月25日 (2008. 11. 25)	(74) 代理人	100066692 弁理士 浅村 皓
(86) 国際出願番号	PCT/US2007/007359	(74) 代理人	100072040 弁理士 浅村 肇
(87) 国際公開番号	W02007/112055	(74) 代理人	100102897 弁理士 池田 幸弘
(87) 国際公開日	平成19年10月4日 (2007. 10. 4)	(74) 代理人	100088926 弁理士 長沼 暉夫
(31) 優先権主張番号	60/743, 678		
(32) 優先日	平成18年3月23日 (2006. 3. 23)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アポリポタンパク質フィンガープリント技術

(57) 【要約】

患者から試料を得、特定の容積の内部標準物質を試料に加え、試料を表面増強、プロテインGコーティング、抗体結合チップに添加し、結合しなかった試料成分を除去し、質量分析によって試料を分析し、内部標準物質の値を使用してアポリポタンパク質の濃度を測定し、糖尿病、脳卒中、ストレス、アルツハイマー病、及び心臓血管疾患(例えば脂質障害、メタボリックシンドローム、肥満、アテローム性動脈硬化症など)を診断するためのツールとして使用するアポリポタンパク質、そのアイソタイプの濃度、アミノ酸の置換及び修飾を評価することによって、血漿、血清、及びリポタンパク質分画を含む生体試料中のアポリポタンパク質の濃度及び修飾を測定する方法。

Plasma CIII Isoform Profile at Different Plasma Dilutions

Trial	CIII-0 pk1	CIII-0 pk2	CIII-0 pk3	CIII-0 pk4	CIII-1	CIII-2
Chip 1	8790.7	8820.3	8831.1	9146.3	9436.4	9726.1
Chip 2	8790.8	8820.3	8831.3	9147.7	9436.8	9726.8
Chip 3	8778.7	8826.1	8829.7	9145.3	9434.8	9724.8
Chip 4	8778.8	8823.8	8828.7	9146.2	9433.4	9723.0
Average	8788.0	8826.4	8830.2	9146.1	9435.1	9725.8
Std Dev	0.888	1.148	1.227	1.162	1.330	1.386
Expected	8764.4				9420	9712

Advantages of the currently developed anti-CIII PS 20 chip for CIII isoform assay

- > Detection for the first time of several forms of CIII-0 isoform in plasma.
- > Direct plasma identification of the different CIII isoforms.
- > Potential for accurate quantitation of these isoforms.

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

生体試料中の少なくとも 1 つの選択されたアポリポタンパク質バイオマーカーのプロファイルを得る方法であって、

- a) 試料を提供するステップと、
- b) 試料を表面に添加し結合しなかった試料成分を除去することによって、少なくとも 1 つの選択されたアポリポタンパク質バイオマーカーを測定するステップと、
- c) 分光分析によって試料を分析するステップと、
- d) 分析を使用してプロファイルを作成するステップとを含み、それによって少なくとも 1 つの疾患を診断することができる上記方法。

10

【請求項 2】

少なくとも 1 つの選択されたアポリポタンパク質バイオマーカーが、ApoC I、ApoC II、ApoC III、ApoC IV、ApoA I、ApoA II、ApoA IV、ApoA V、ApoB 48、ApoB 100、ApoD、ApoE、ApoF、ApoG、ApoH、ApoJ、ApoL、ApoM、それらのアイソタイプ、及びそれらの組合せ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 3】

試料を表面増強、抗体捕捉タンパク質コーティング、抗体結合表面に添加し結合させ、結合しなかった試料成分を洗浄除去する、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

少なくとも 1 つの選択されたアポリポタンパク質バイオマーカーを、レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析又は他の適切な質量分析法によって検出する、請求項 2 に記載の方法。

20

【請求項 5】

試料がヒト血漿、血清、及びヒトリポタンパク質分画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】

少なくとも 1 つの疾患が糖尿病、脳卒中、ストレス、アルツハイマー病、心臓血管疾患、脂質障害、メタボリックシンドローム、肥満、及びアテローム性動脈硬化症からなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 7】

生体試料中の特異的アポリポタンパク質の濃度及び修飾を測定する方法であって、試料が患者から得られ、試料が血漿、血清、及びリポタンパク質分画を含み、

- a) 特定の容積の内部標準物質を試料に加えるステップと、
 - b) 試料を表面増強、プロテイン G コーティング、抗体結合チップに添加し、結合しなかった試料成分を除去するステップと、
 - c) 質量分析によって試料を分析するステップと、
 - d) 内部標準物質の値を使用してアポリポタンパク質の濃度を測定するステップと
- を含み、この方法の適用が、糖尿病、脳卒中、ストレス、アルツハイマー病、心臓血管疾患、脂質障害、メタボリックシンドローム、肥満、及びアテローム性動脈硬化症を検出するための診断ツールとして使用するアポリポタンパク質のアイソタイプの濃度を評価するためである上記方法。

40

【請求項 8】

特異的アポリポタンパク質が特異的抗体と結合している、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

特異的抗体が抗体捕捉タンパク質コーティング表面上に固定化されている、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

試料を抗体捕捉タンパク質コーティング表面に添加し結合させ、結合しなかった試料成分を洗浄除去する、請求項 9 に記載の方法。

50

【請求項 1 1】

アポリポタンパク質をレーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析又は他の適切な質量分析法によって検出する、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 1 2】

アポリポタンパク質が Apo C I、Apo C II、Apo C III、Apo C IV、Apo A I、Apo A II、Apo A IV、Apo A V、Apo B 4 8、Apo B 1 0 0、Apo D、Apo E、Apo F、Apo G、Apo H、Apo J、Apo L 及び Apo M からなる群から選択され、特異的抗体が Apo C I、Apo C II、Apo C III、Apo C IV、Apo A I、Apo A II、Apo A IV、Apo A V、Apo B 4 8、Apo B 1 0 0、Apo D、Apo E、Apo F、Apo G、Apo H、Apo J、Apo L 及び Apo M に対する抗体からなる群から選択される、請求項 9 に記載の方法。

10

【請求項 1 3】

試料がヒト血漿、血清、及びヒトリポタンパク質分画から選択される、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

試料中の特異的アポリポタンパク質に関する濃度値が、選択された精製タンパク質を修飾し高分解能質量分析を使用して基準値を設定することによって開発した内部標準物質に基づく、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 1 5】

修飾が糖化、シアリル化、断片化、及びアミノ酸溶解からなる群から選択される、請求項 7 に記載の方法。

20

【請求項 1 6】

薬理遺伝学の分野において危険因子、疾患状態、薬剤治療及び応答を評価する際に使用する方法。

【請求項 1 7】

対象由来の生体試料中の少なくとも 1 つの選択されたアポリポタンパク質バイオマーカのプロファイルを得る方法であって、

a) 対象由来の生体試料を提供するステップと、

b) 少なくとも 1 つのアポリポタンパク質バイオマーカを特異的に捕捉する捕捉試薬の表面に生体試料を添加し、少なくとも 1 つのアポリポタンパク質バイオマーカを捕捉試薬と結合させ、結合しなかった試料成分を除去するステップと、

30

c) レーザー脱離/イオン化質量分析によって捕捉した少なくとも 1 つのアポリポタンパク質を分析するステップと、

d) 分析を使用してプロファイルを作成するステップと

を含み、少なくとも 1 つの選択されたアポリポタンパク質バイオマーカが、Apo C I、Apo C II、Apo C III、Apo C IV、Apo A I、Apo A II、Apo A IV、Apo A V、Apo B 4 8、Apo B 1 0 0、Apo D、Apo E、Apo F、Apo G、Apo H、Apo J、Apo L、Apo M、それらのアイソタイプ、及びそれらの組合せからなる群から選択される上記方法。

【請求項 1 8】

40

a) プロファイルを使用して対象における疾患を診断するステップをさらに含む、請求項 1 7 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本書をもって以下を証する、我々、2840 Livesey Trail、Tucker、GA 30084 に居住し米国国民である EMELITA DE GUZMAN BREYER、及び 3649 Cherry Hill Place、Decatur、GA 30034 に居住し米国国民である MARY K. ROBINSON は、「アポリポタ

50

ンパク質フィンガープリント技術 (A P O L I P O P R O T E I N F I N G E R P R I N T I N G T E C H N I Q U E) 」において幾つかの新規且つ有用な改良を發明しており、以下はその明細書である。

【 0 0 0 2 】

特許協力条約に基づく本出願は、本發明者 Emelita De Guzman Breyer 及び Mary K. Robinson の利益のために、シリアル番号 60 / 743, 678 を有する 2006 年 3 月 23 日に 出 願 され た 「アポリポタンパク質フィンガープリント技術 (A P O L I P O P R O T E I N F I N G E R P R I N T I N G T E C H N I Q U E) 」 という 表 題 の 米 国 仮 特 許 出 願 対 する 優 先 権 及 び 利 益 を 主 張 す る も の で あ る。

10

【 0 0 0 3 】

本發明は、生体及び臨床試料中のアポリポタンパク質の組成、分析及び定量化の分野に関する。より詳細には、本發明は、ヒト血漿、血清、及びリポタンパク質分画の試料中に存在するアポリポタンパク質のフィンガープリント、プロファイル作成、測定、及び/又は定量化のための方法、技術、及びプロトコルに関する。

【 背景 技 術 】

【 0 0 0 4 】

アポリポタンパク質というリポタンパク質のタンパク質成分は疎水性脂質を溶解し、細胞の標的化及び輸送を容易にすることができる。肝臓及び腸内で合成されるこれらの成分は、リポタンパク質粒子の完全性を維持し、リポタンパク質に作用する酵素の補助因子として働き、及び循環から脂質を除去する受容体媒介相互作用を促進するのに不可欠である。

20

【 0 0 0 5 】

数群のアポリポタンパク質：A (A p o A)、B (A p o B)、C (A p o C) 及び E (A p o E) が存在する。3つの群A、B及びCのそれぞれが、2つ以上の異なるタンパク質からなる。これらは、A p o A に関して A p o A 1、A p o A 1 1、A p o A I V、及び A V；A p o B に関して A p o B 1 0 0 及び A p o B 4 8；及び A p o C に関して A p o C I、A p o C 1 i、A p o C I I I、及び A p o C I V である。A p o C I、C I I I、C I V 及び A p o E はそれぞれ、2つ以上のアイソタイプからなる。アポリポタンパク質は疾患及び健康において様々な役割を有する。

30

【 0 0 0 6 】

アポリポタンパク質 C I I I は、スレオニン - 74 におけるグリコシル化が異なる3つのアイソタイプとしてヒト中に存在する79アミノ酸のタンパク質である。C I I I - 0 アイソタイプはシアリダーゼ酵素反応の最終産物であり、シアル酸、ガラクトース及びガラクトースアミン残基を有しておらず、全てのアイソタイプの14%を占める。C I I I - 0 アイソタイプは脂肪分解刺激受容体との超低密度リポタンパク質 (V L D L) の結合の阻害剤であり、それは血漿中の高トリグリセリドリポタンパク質のクリアランスの重要な経路である。C I I I - 0 アイソタイプは V L D L に対して最も低い親和性を有する。C I I I - 1 アイソタイプは1モルのシアル酸を有しており、全てのアイソタイプの51%を占める。C I I I - 2 アイソタイプは肝臓中で合成され分泌される C I I I の初期形態であり、2モルのシアル酸を有しており、全てのアイソタイプの35%を占める。C I I I - 2 アイソタイプは V L D L に対して高い親和性を有しており、脂肪分解刺激受容体との V L D L の結合の微弱な阻害剤である。

40

【 0 0 0 7 】

C I I I アイソタイプを同定及び定量化するための現在の方法は、血漿からのリポタンパク質分画の単離、この分画の脱脂、及びアポリポタンパク質の水溶性分画からの C I I I の精製を含む。異なる精製したアイソタイプは、等電点ゲル電気泳動、質量分析、並びに蛍光及び吸光分光法によって検出することができる。現在の方法の幾つかの欠点は、それらが血漿からの C I I I の単離において時間がかかり、わずかに 60 ~ 80 % のタンパク質回収率しか有さないこと、及び E L I S A 及び免疫比濁アッセイなどの、血漿中の C I

50

IIに関する臨床診断のための現在の方法は、全CIIIを検出することのみ可能であることである。

【0008】

CIIIアイソタイプは幾つかの理由で臨床上重要である。アイソタイプのレベルは、糖尿病患者ではグルコース調節のレベルと共に変化する。例えば、高いHbA1Cは高いCIII-0レベルと直接相関している。高トリグリセリド血症の対象は、VLDLにおけるCIII-2アイソタイプとして高い割合のCIIIを有する。重度のカロリー制限を受けた女性では、正常な全CIIIレベルにもかかわらずCIII-2レベルは増大する。CIII-2の変動はVLDLトリグリセリドの変化と正に相関しているが、一方CIII-1の変動は逆相関している。CIIIアイソタイプの正確な定量化及び検出にお

10

【0009】

文献又は従来技術は、様々なアポリタンパク質と疾患の間の様々な特徴及び相関関係を報告している。例えば、ApoDはマルチリガンド、多機能性輸送体であり、アルツハイマー病では再生する末梢神経の特定部位に蓄積することが知られている。さらに、ApoJはこれまでに、精子成熟、脂質輸送、補体阻害、組織再構築、膜循環、細胞-細胞及び細胞-基層相互作用、フォールディング受容状態におけるストレスタンパク質の安定化、及びアポトーシスの促進又は阻害などの幾つかの多様な生理的プロセスと関係があることが報告されてきている。さらにApoHは、負に帯電した表面と強く結合し、血液凝固の固有経路の活性化及び活性化血小板のプロトロンビナーゼ活性を、両方の活性に必要な負に帯電した表面を覆うことによって阻害することが知られている。ApoFはLDLと結合し、コレステロールエステル輸送タンパク質(CETP)活性を阻害し、コレステロール輸送の重要な制御物質であるようである。ApoFはより低い程度でVLDL、ApoA1及びApoA1と結合する。ApoMは脂質輸送に関与することが提唱された。ApoCIVはCI及びCIIと同じ遺伝子座の14.5kDの大きさのアポリタンパク質であり、文献中では如何なる機能も報告されていないようである。

20

【0010】

さらに、心臓血管疾患とコレステロールレベルの間の疫学的相関関係に基づいて、臨床医は長年コレステロールレベルの測定値を測定及び標準化して、心臓疾患のリスクを評価してきている。リポタンパク質粒子(LDL及びHDL)及びそれらと結合するコレステロールも、心臓血管のリスクの評価において使用されてきている。多くの試験研究が実施されて健康への影響とリポタンパク質粒子の大きさ及び密度が関連付けられているが、これらの試験からの結論は一貫していない。

30

【0011】

最近数年間で、アポリタンパク質レベルは様々な状態と関係があるという相当な証拠が存在しており、近年National Heart、Lung、and Blood Institute(NHLBI)は、Centers for Disease Control and Preventionとの先日のミーティングにおいて、アポリタンパク質Bの測定を近い将来標準化に含めることを勧めた。アポリタンパク質は心臓血管疾患、糖尿病、脳卒中、肥満、アルツハイマー病、HIV及び他の疾患と関係している。脂質の輸送及び代謝におけるアポリタンパク質の主な役割を考慮すると、これらの関係は驚くべきことではない。アポリタンパク質の精製、検出、及び定量化の難しさによって、これらの化合物のレベルと健康への影響の間の調査を実施することは容易なことになっていない。

40

【0012】

従来技術の方法を使用すると、アポリタンパク質の定量化及び測定は現在、分析又は連続超遠心分離、カラムクロマトグラフィー、電気泳動、又は沈降によるリポタンパク質粒子の分離のステップを必要とする。これらの技術は現在、通常の臨床用途には高価で時間を浪費しすぎである。他の有用な技術は高速液体クロマトグラフィーであり、これは迅

50

速であるが一層より複雑で高価である。ApoA及びBの含有量の測定に使用される他の技術には、酵素イムノアッセイ(ELISA)、ラジオイムノアッセイ、蛍光イムノアッセイ、放射免疫拡散、ネフェロメトリー、比濁法及びエレクトロイムノアッセイがある。近年、表面増強レーザー脱離イオン化質量分析(SELDI又はSELDITOF-MS、TOFは飛行時間を意味し、MSは質量分析を意味する)は、血漿、血清、及びリポタンパク質分画中のアポリポタンパク質を測定するための幾つかの新たな選択肢を提供している。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

したがって、アポリポタンパク質を分離、同定、及び定量化するための正確で、迅速で、再現可能なアッセイに関する必要性が常に存在する。ヒト血漿、血清、及びリポタンパク質分画の試料中に存在するアポリポタンパク質のフィンガープリント、プロファイル作成、測定、及び/又は定量化のための改善された技術に関する必要性が存在する。本発明が対象とするのは、特にこれらの必要性である。

【課題を解決するための手段】

【0014】

簡単に言うと、本発明の技術は、免疫学的技術と表面増強レーザー脱離/イオン化、SELDIを組合せて、非分画血漿又は血清中、又はリポタンパク質分画中の多数のアポリポタンパク質を直接検出及び測定する。内部標準物質の定量化のために、当該のタンパク質と抗体結合性が非常に類似しているが、明らかに異なる分子質量を有する既知のタンパク質の検出及び測定が必要とされるはずである。質量分析によって測定される未知のポリペプチドの質量は、既知の特性及び濃度の参照ポリペプチドの質量と比較することが可能である。

【0015】

全血漿又は血清のプロファイルは、正常で健康な個体の試料における差を検出するために、精巧なクラスタリング及びパターン認識技術を必要とする。SELDI技術における特異的抗体の使用は、一層単純な分析法をもたらす。SELDI技術の特徴の他の単純化は、保持物クロマトグラフィーである。当該のタンパク質は、そのタンパク質を特異的表面と結合させることによって保持し、一方他の検体は洗浄除去する。吸収及び脱離は、pH、塩濃度又は有機溶媒を調節することによって変えることができる。シナピン酸又は他の適切なマトリクスを、新たに調製した溶液中でテトラフルオロ酢酸と混合させ、それをいわゆるチップに添加し、乾燥後、マトリクスが組み込まれた検体分子はレーザーによって脱離され、固相からイオン化し、完全な分子イオンとして加速する。

【0016】

本発明の好ましい技術の一実施形態は、プロテインGを介して表面増強チップと結合した特異的抗体を使用して、血漿試料から直接アポリポタンパク質を選択的に吸収する。プロテインGは抗体のFc部分と結合し、それによって生体試料中の当該の特異的抗原と抗体の結合が増大する。表面増強チップの表面は特異的アポリポタンパク質を保持し、一方他の試料成分は洗浄除去する。EAM溶液マトリクスは、アポリポタンパク質のレーザー脱離イオン化を容易にする。イオン化したアポリポタンパク質は、それらの飛行時間に基づいてわずかに異なる時間で検出器に到達し、その時間差は質量に変換され得る。ピークの強度はそれぞれのタンパク質の量と関係がある。

【0017】

血漿中及びリポタンパク質分画中のアポリポタンパク質の組成、レベル、及びアイソタイプは、心臓血管疾患、及び脳卒中、メタボリックシンドローム、糖尿病、アルツハイマー病、プロテアーゼ阻害剤下のHIV及びHIV患者(高トリグリセリド血症)、及び様々な型のリポタンパク質血症などの他の慢性障害と関係がある幾つかの障害又は状態の決定要因である。したがって、本発明などのCIEIアイソタイプに関する臨床診断アッセイから利益を受け得る障害には、前述の障害がある。脂質低下薬を使用する臨床試験は本

10

20

30

40

50

発明のアポリポタンパク質フィンガープリント技術から利益を受けるはずであり、本発明の技術は、血漿中及び異なるリポタンパク質分画中のアポリポタンパク質及びそれらのアイソタイプのレベル及び分布を見て、これらのパラメータが異なる障害及び治療でどのように変化するかを示すことができるはずである。本発明の技術は、新生児中のアポリポタンパク質の状態を見極め、加齢、栄養状態、環境暴露、及びライフスタイルの変化によって生じるアポリポタンパク質の修飾を評価するのにも理想的である。

【0018】

本発明の例示的特徴には、疾患特異的アポリポタンパク質バイオマーカー又はプロファイルを定義すること、及び1つ又は複数の疾患又は状態を診断又は分類するための迅速且つ有用である定量アッセイを開発することがある。本発明のこれらの特徴、及び他の特徴及び利点は、添付の図面と共に以下の好ましい実施形態の詳細な説明を読むと、当業者にはより明らかになるはずである。

10

【0019】

添付の図面を参照しながら好ましい実施形態及び代替実施形態の詳細な説明を読むことによって、本発明はよりよく理解されるはずであり、図面は本発明に関する代表的なアイソタイプ標準及びプロファイルの再現性を例証し、その中で同様の参照符号は、全体を通じて類似の構造を示し同様の要素を指す：

【発明を実施するための最良の形態】

【0020】

特許協力条約に基づく本出願は、本発明者 Emelita De Guzman Breyer 及び Mary K. Robinson の利益のために、シリアル番号 60/743,678 を有する 2006年3月23日に出願された「アポリポタンパク質フィンガープリント技術 (A POLIPOP RO TE IN F IN G E R P R I N T I N G T E C H N I Q U E)」という表題の米国仮特許出願に対する優先権及び利益を主張するものである。

20

【0021】

本発明は、アポリポタンパク質を含むプロファイルを使用して診断することができる心臓血管疾患（例えば、脂質障害、メタボリックシンドローム、及びアテローム性動脈硬化症）、アルツハイマー病、ストレス、脳卒中、糖尿病にアクセスする際に有用であり得る高感度且つ迅速な方法を提供する。このプロファイルは疾患状態と相関関係があり、したがって患者における疾患状態は、本発明を使用して高感度且つ迅速に決定することができる。したがって、本発明の能力は、疾患特異的アポリポタンパク質バイオマーカー又はプロファイルを定義すること、及び1つ又は複数の疾患又は状態を診断又は分類するための迅速且つ有用である定量アッセイを開発することである。

30

【0022】

より詳細には、例示的な一実施形態において、本発明は、対象における疾患状態を定性化する方法であって、

(1) 対象由来の試料中の少なくとも1つのバイオマーカーを測定するステップであって、バイオマーカーが Ap o C I、Ap o C I I、Ap o C I I I、Ap o C I V、Ap o A I、Ap o A I I、Ap o A I V、Ap o A V、Ap o B 1 0 0、Ap o B 4 8、Ap o E、Ap o D、Ap o H、Ap o G、Ap o F、Ap o J、Ap o L、Ap o M、それらのアイソタイプ、及びそれらの組合せからなる群から選択されるステップと、

40

(2) 分光分析によって10個の試料中の少なくとも1つのバイオマーカーを分析又は定量化又は測定するステップと、

(3) 分析、定量化、又は測定を使用して少なくとも1つのバイオマーカーのプロファイルを作成するステップと、

(4) 少なくとも1つのバイオマーカーと疾患を示す標準プロファイルと比較するステップと

を含み、試料中の少なくとも1つのバイオマーカーの存在又は不在から疾患が示される方法を提供する。

50

【0023】

関連する例示的な実施形態において、本発明は、対象における疾患状態を定性化する方法であって、

(1) 対象由来の試料中の複数のバイオマーカーを測定するステップであって、20個のバイオマーカーが ApocI、ApocII、ApocIII、ApocIV、ApocA1、ApocA11、ApocAIV、ApocAV、ApocB100、ApocB48、ApocE、ApocD、ApocH、ApocG、ApocF、ApocJ、ApocL、ApocM、それらのアイソタイプ、及びそれらの組合せからなる群から選択されるステップと、

(2) 分光分析によって試料中のバイオマーカーを分析又は定量化又は測定するステップと、

(3) 分析、定量化、又は測定を使用してバイオマーカーのプロファイルを作成するステップと、

(4) バイオマーカーと疾患を示す標準プロファイルと比較するステップとを含み、試料中のバイオマーカーの存在又は不在から1つ又は複数の疾患が示される方法を提供する。

【0024】

他の例示的な実施形態では、測定するステップは、試料中の少なくとも1つのバイオマーカー又は複数のバイオマーカーの量を定量化するステップを含む。さらなる例示的な実施形態では、本発明は、SELDI質量分析の使用を含む少なくとも1つのバイオマーカー又は複数のバイオマーカーの分離を含む。

【0025】

バイオインフォマティクスツールの有効な使用と組合せた高スループットのタンパク質プロファイル作成は、バイオマーカーをスクリーニングするための有用な手法をもたらす。本発明中で使用するシステムは、クロマトグラフィー用PROTEINCHIPO実験装置、即ち、試料をスクリーニングし、試料中の検体の存在を検出し、試料の型を同定しパターンを測定するための機器、及び分子アレイを作製しスクリーニングして、SELDIを使用して試料をアッセイするための装置を利用することが好ましい。アレイと結合したタンパク質は、飛行時間型質量分析計であるPROTEINCHIPOアレイリーダーで読みとる。

【0026】

さらに、本発明の方法は、修飾タンパク質(グリコシル化タンパク質など)及び分解タンパク質を検出するチップの能力を利用する。この方法は、翻訳前及び/又は翻訳後修飾を有するアポリタンパク質を検出する能力を利用することもできる。翻訳前修飾形態には、対立遺伝子変異体、スライス変異体及びRNA編集形態がある。翻訳後修飾形態には、切断、タンパク質分解による切断(例えば、親タンパク質の断片)、グリコシル化、脂質化、システイニル化、グルタチオニル化、リン酸化、プレニル化、アシル化、アセチル化、メチル化、硫酸化、スルホン化、ヒドロキシル化、ミリストイル化、ファルネシル化、酸化及びユビキチン化から生じる形態がある。本発明の任意のバイオマーカーの修飾形態も、それ自体をバイオマーカーとして使用することができる。

【0027】

理解することができるように、プロファイルは血漿及びリボタンパク質分画中から抽出したアポリタンパク質の組成、レベル、及びアイソタイプを含むことができ、それらは幾つかの疾患、障害又は状態の決定要因である。本明細書で使用するように、疾患という用語は障害及び状態を含み、具体的には心臓血管疾患、及び脳卒中、メタボリックシンドローム、糖尿病、アルツハイマー病、HIVや様々な型のリボタンパク質血症などの他の慢性障害に関して使用する。例えば、疾患に関して実施され脂質低下薬を使用する臨床試験は、本発明のアポリタンパク質フィンガープリント技術から利益を受けるはずである。他の例では、本発明のフィンガープリント技術を使用することによって、血漿中及び異なるリボタンパク質分画中のアポリタンパク質及びそれらのアイソタイプのレベル及び分布を見て、これらのパラメータが異なる疾患及びそれらの治療でどのように変化するか

10

20

30

40

50

を示すことができるはずである。さらに他の例では、本発明の技術は、新生児中のアポリポタンパク質の状態を見極め、加齢、栄養状態、環境暴露、及びライフスタイルの変化によって生じるアポリポタンパク質の修飾を評価するのに理想的である可能性がある。

【0028】

さらに他の例では、本発明は疾患状態を定性化するためのキットを提供し、キットを使用して本発明のバイオマーカーを測定することができる。例えば、キットを使用して本明細書に記載する任意の1つ又は複数のバイオマーカーを測定ことができ、これらのバイオマーカーは疾患状態の患者及び正常な対象の試料中に別個に存在する。他の例では、キットを使用して治療過程に対する患者の応答性をモニタリングすることもでき、医師は試験の結果に基づいて治療を修正することができる。さらに他の例では、キットを使用して、*in vitro*又は*in vivo*において疾患状態の動物モデルの1つ又は複数のバイオマーカーの発現を調節する化合物を同定することができる。

10

【0029】

本発明の好ましい技術の一実施形態は、プロテインGを介して表面増強チップと結合した特異的抗体を使用して、血漿試料から直接アポリポタンパク質を選択的に吸収する。プロテインGは抗体のFc部分と結合し、それによって生体試料中の当該の特異的抗原と抗体の結合が増大する。表面増強チップの表面は特異的アポリポタンパク質を保持し、一方他の試料成分は洗浄除去する。EAM溶液マトリクスは、アポリポタンパク質のレーザー脱離イオン化を容易にする。イオン化したアポリポタンパク質は、それらの飛行時間に基づいてわずかに異なる時間で検出器に到達し、その時間差は質量に変換され得る。ピークの強度はそれぞれのタンパク質の量と関係がある。本明細書で使用するように、1つ及び複数の抗体という用語は、抗体の断片、免疫グロブリン、アフィボディ (affibodies) などを含む。

20

【0030】

バイオマーカーを測定する好ましい方法は、バイオチップアレイの使用を含む。本発明中で有用なバイオチップアレイは、タンパク質及び核酸アレイを含む。1つ又は複数のバイオマーカーをバイオチップアレイ上に捕捉し、レーザーイオン化にさらして、バイオマーカーの分子量を検出する。バイオマーカーの分析は、例えば全体のイオン電流に対して標準化した閾値強度に対する、1つ又は複数のバイオマーカーの分子量による。ピーク強度の範囲を縮小して検出するバイオマーカーの数を限定するために、対数変換を使用することが好ましい。

30

【0031】

本発明の好ましい方法では、バイオマーカーのプロファイルを作成しそのバイオマーカーを疾患状態と比較するステップは、ソフトウェア分類アルゴリズムによって実施する。(1) バイオチップアレイをレーザーイオン化にさらし、質量/電荷比用にシグナルの強度を検出すること、(2) コンピュータ可読形態にデータを変換すること、及び(3) 疾患状態の患者中に存在し非疾患状態の対象の対照群には欠けているバイオマーカーを表すシグナルを検出するために、ユーザ入力パラメータに従いデータを分類するアルゴリズムを実行することによって、バイオチップアレイ上に固定化された対象試料に関するデータを作成することが好ましい。ステップ(1)はSELDI-TOF-MSを使用することが好ましく、これは一般的に言うと、(a) 質量分析計と共に使用するのに適した結合吸着剤を含むプローブを提供すること、(b) 対象試料を吸着剤と接触させること、(c) プローブから1つ又は複数のバイオマーカーを脱離及びイオン化すること、及び(d) 質量分析計を用いてイオン化バイオマーカーを検出することを含む。

40

【0032】

一例では、CIPHERGEN PROTEINCHIP (登録商標) アレイプラットフォーム質量分析計、及びタンパク質の特性及び構造を決定するために使用する化学合成装置から誘導したSELDI質量スペクトルデータセットの管理分類用のソフトウェアパッケージである、CIPHERGEN BIOMARKER PATTERNSTMソフトウェアを使用して、生成するスペクトルのパターンを検出する。分類モデルを使用するバ

50

ターン認識法を使用してデータを分類する。一般にスペクトルは、分類アルゴリズムが検索する少なくとも2つの異なる群由来の試料を表すはずである。例えば群は、病的群対非病的群（例えば、癌対非癌）、薬剤応答群対薬剤非応答群、毒性応答群対毒性非応答群、疾患状態進行群対疾患状態非進行群、又は表現型条件存在群対表現型条件不在群であってよい。

【0033】

本発明の実施形態のステップ(1)において生じるスペクトルは、分類モデルを使用するパターン認識法を使用して分類することができる。幾つかの実施形態では、「知られている試料」などの試料を使用して生じるスペクトル（例えば、質量スペクトル又は飛行時間型スペクトル）から誘導したデータを次いで使用して、分類モデルを「トレーニングする」ことができる。「知られている試料」は、事前に分類されている試料である（例えば、癌又は非癌）。「知られている試料」などの試料を使用して生じるスペクトル（例えば、質量スペクトル又は飛行時間型スペクトル）から誘導したデータを次いで使用して、分類モデルを「トレーニングする」ことができる。「知られている試料」は、事前に分類されている試料である。スペクトルから誘導し分類モデルを形成するために使用されるデータは「トレーニングデータセット」と呼ぶことができる。ひとたびトレーニングすると、分類モデルは未知の試料を使用して生じるスペクトルから誘導したデータのパターンを認識することができる。したがって分類モデルを使用して、未知の試料を幾つかのクラスに分類することができる。これは例えば、個々の生体試料が特定の生物学的状態（例えば、疾患対非疾患）と関係があるかどうか予想する際に有用である可能性がある。

10

20

【0034】

分類モデルを形成するために使用されるトレーニングデータセットは、生データ又は事前処理データを含み得る。幾つかの実施形態では、生データは飛行時間型スペクトル又は質量スペクトルから直接得ることができ、次いで場合によっては任意の適切な方法で「事前処理」することができる。例えば、所定のシグナル対ノイズ比を超えるシグナルを、スペクトル中の全てのピークが選択されるのではなく、スペクトル中のピークの一部が選択されるように選択することができる。他の例では、共通の値（例えば、特定の飛行時間値又は質量対電荷比の値）における所定数のピーク「クラスター」を使用してピークを選択することができる。例示的には、所与の質量対電荷比でのピークが質量スペクトル群中の質量スペクトルの50%未満である場合、したがってその質量対電荷比におけるピークは、トレーニングデータセットから除去することができる。これらのステップなどの事前処理ステップを使用して、分類モデルをトレーニングするために使用されるデータの量を減らすことができる。

30

【0035】

データ中に存在する目的パラメータに基づいてデータのボディを幾つかのクラスに分けることを試みる任意の適切な統計分類（又は「学習」）法を使用して、分類モデルを形成することができる。分類法は監視型又は非監視型のいずれかであってよい。監視型及び非監視型分類法の例は、参照としてその全容が本明細書に組み込まれる、Jain、「統計パターン認識：総説、パターン分析及び人工知能に対するIEEEトランザクション（Statistical Pattern Recognition: A Review, IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence）」、Vol. 22, No. 1, January 2000中に記載されている。

40

【0036】

監視型分類では、知られているカテゴリーの例を含むトレーニングデータを、知られているクラスの各々を定義するもう一組の関係を学習する学習メカニズムに提示する。次いで新しいデータを学習メカニズムに適用することができ、これによって学習した関係を使用して新しいデータを次いで分類する。監視型分類法の例には、線形回帰法（例えば、多重線形回帰（MLR）、部分最小二乗（PLS）回帰及び主成分回帰（PCR））、二分決定木（例えば、CART-分類及び回帰ツリーなどの再帰分割法）、誤差逆伝搬ネット

50

ワークなどの人工ニューラルネットワーク、判別分析（例えば、ベイズ識別器又はフィッシャー分析）、ロジスティック識別器、及びサポートベクター識別器（サポートベクターマシン）がある。

【0037】

基質、例えばバイオチップ又は抗体上で捕捉した後、任意の適切な方法を使用して、試料中の1つ又は複数のバイオマーカーを測定することができる。例えば、気相イオン分光分析法、光学法、電気化学法、原子間力顕微鏡法及び高周波法を例えば含む様々な検出法によって、バイオマーカーを検出及び/又は測定することができる。これらの方法を使用して、試料中の1つ又は複数のバイオマーカーを検出することができる。

【0038】

本発明の好ましい方法では、多数のバイオマーカーを測定する。多数のバイオマーカーの使用は試験の予想値を増大させ、診断、毒物学、患者の層別化及び患者のモニタリングにおいて多大な有用性を与える。「パターン認識」と呼ばれる方法は多数のバイオマーカーによって形成されるパターンを検出し、予測医療の臨床プロテオミクスの感度及び特異性を大幅に改善する。例えばSELDIを使用して得た臨床試料からのデータの微妙な変化は、タンパク質発現の特定のパターンによって、特定の疾患の存在又は不在などの表現型、疾患進行の個々の段階、或いは薬剤治療に対する正又は負の応答性を予測することができることを示す。

【0039】

質量分析におけるデータ生成は、前に記載したようにイオン検出器によるイオンの検出で始まる。検出器に衝突するイオンは、アナログシグナルをデジタル方式で捕捉する高速時間-アレイ記録デバイスによってデジタル化される電位を生成する。CIPHERGEN PROTEINCHIP（登録商標）アレイシステムは、アナログデジタルコンバータ（ADC）を利用してこれを実施する。ADCは検出器の出力を規則的間隔の時間間隔で時間依存性値域に統合する。時間間隔は典型的には1~4ナノ秒の長さである。さらに、最終的に分析する飛行時間型スペクトルは、試料に対する電離エネルギーの単一パルスからのシグナルを典型的には表さず、むしろ幾つかのパルスからのシグナルの合計を表す。これはノイズを低下させダイナミックレンジを増大させる。次いでこの飛行時間型データにデータ処理を施す。CIPHERGEN PROTEINCHIPソフトウェアにおいて、データ処理はTOFからM/Zの変換、ベースラインサブトラクション、及び高周波ノイズフィルタリングを典型的には含む。このステップでは、シグナルは時間領域から質量領域に変換される。

【0040】

ベースラインサブトラクションは、スペクトルを乱す人工的、再現的な装置におけるオフセットを排除することによってデータ定量化を改善する。ベースラインサブトラクションは、ピーク幅などのパラメータを組み込んだアルゴリズムを使用してスペクトルのベースラインを計算すること、次いで質量スペクトルからベースラインを差し引くことを含む。1つ又は複数のスペクトルからのピークのデータは、例えばそれぞれの列が個々の質量スペクトルを表し、それぞれの行が質量によって定義されるスペクトル中のピークを表し、それぞれのセルがその個々のスペクトル中のピークの強度を含むスプレッドシートを作成することによって他の分析を施すことができる。様々な統計又はパターン認識手法をデータに適用することができる。前に開示したように、CIPHERGEN BIOMARKER PATTERNS TMソフトウェアを使用して、生成するスペクトルのパターンを検出する。分類モデルを使用するパターン認識法を使用してデータを分類する。一般にスペクトルは、分類アルゴリズムが検索する少なくとも2つの異なる群からの試料を表すはずである。

【0041】

試料は様々な疾患状態を確定することを望む患者又は他の対象から収集することができる。対象は、例えばその病歴から、特定の型の疾患に関する高いリスクがあるか、或いはその可能性があると考えられる特定のヒトであってよい。他の対象は、特定の疾患を有し

10

20

30

40

50

ており、その治療の有効性をモニタリングすることを望む人間であってよい。さらに、通常の実験の一部として対象から試料を得ることが可能である。

【0042】

任意のバイオマーカーは個々に、疾患状態の決定を支援する際に有用である。最初に、本明細書に記載する方法、例えばSELDIバイオチップ上での捕捉、次に質量分析による検出を使用して、対象試料において選択したバイオマーカーを測定する。次いで、測定値を診断量又は対照と比較し、これによって疾患状態と非疾患状態を区別する。診断量は、非疾患状態と比較して疾患状態において、個々のバイオマーカーが上方制御又は下方制御されていることを表すはずである。当技術分野でよく理解されているように、使用する個々の診断量を調整して、診断医の好みに応じて診断アッセイの感度又は特異性を高めることができる。したがって、診断量と比較した試験量は疾患状態を示す。

10

【実施例】

【0043】

実施例の方法

以下に開示する実施例の方法は、本発明の好ましい実施形態を使用するための代表的な方法である。これらの方法では、血清試料を患者から収集し、次いでアニオン交換樹脂を使用して分画化することができる。試料中のバイオマーカーは、IMAC銅PROTEINCHIP（登録商標）アレイを使用して捕捉する。次いでSELDIを使用してバイオマーカーを検出する。次いで結果を、本来バイオマーカーを測定するための学習アルゴリズム及び分類アルゴリズムにおいて使用した同じパラメータを使用して設計したアルゴリズムを含む、コンピュータシステムに入力する。アルゴリズムによって、各バイオマーカーに関して得たデータに基づく診断値が生じる。CIIIアイソタイプと心臓血管疾患の間の相関関係に関する実験データに関する図1～9を参照。前に論じたように、様々なアポリタンパク質と疾患の間の例示的な相関関係を文献中で確認した。

20

【0044】

バイオマーカーを使用して開発される分類アルゴリズムを用いたSELDI試験から生成したデータを調べることによって、診断値を決定することができる。分類アルゴリズムは、バイオマーカーを検出するために使用する試験プロトコルの項目に依存する。これらの項目は、例えば試料調製、チップ型及び質量分析パラメータを含む。試験パラメータが変わる場合、アルゴリズムは変わるはずである。同様に、アルゴリズムが変わる場合、試験プロトコルが変わる可能性がある。

30

【0045】

本発明では、精製アポリタンパク質、正常対象からの血漿試料、及び糖尿病対象からの血漿試料を、PG-20タンパク質チップ表面を使用して分析した。本発明の方法によって分析した特異的なアポリタンパク質は、様々なレベルで血漿、血清、及びアポリタンパク質分画中に存在する。それぞれのアポリタンパク質の存在は、そのそれぞれのアポリタンパク質に特異的な抗体を使用して決定する。以下に開示するプロトコルは、現在のMS技術によって分析することができる分子量範囲に限られる。最初に、B100（500kD）及びB48（約250kD）を、MS分析の前に抗体表面と結合させ、切り離し、次いで化学的或いは酵素によって断片化することによって、又は以下のプロトコルを使用してPG20チップとの結合中に直接消化することによって最初に単離する。

40

【0046】

1. 試料調製

SELDI-TOF-MS手順の前に、血漿試料を緩衝液5で希釈し、抗体は以下のようPROTEINCHIP（登録商標）と結合させた：

血漿試料の調製：

(1) U9バッファ（9Mの尿素、50mMのHEPES、0.5%のCHAPS、pH7）を調製する、

(2) U9バッファで血漿試料を希釈し（1：2）、30分間冷気中で攪拌する。

抗体とPROTEINCHIP（登録商標）アレイの結合

50

- (1) 抗体を 0.2 mg/ml に希釈し、アレイ上のスポットに 2 µl 加える、
- (2) アレイを湿度チャンバーに移し、室温で 1 時間インキュベートする、
- (3) スポットの表面に触れずに抗体を吸引する、
- (4) 8 mL の洗浄バッファーを用いて 10 分間、15 mL の円錐管中でチップを洗浄する、
- (5) 中身を空にして 8 mL のリン酸緩衝生理食塩水で 5 分間洗浄し、繰り返す、
- (6) チップの表面から過剰な PBS を除く。

【0047】

2. SELDI-TOF-MS 手順

- (1) 2 µl の血漿試料を各スポットに加える、
- (2) アレイを湿度チャンバーに移し、室温で 1 時間インキュベートする、
- (3) 8 mL の洗浄バッファーを用いて 10 分間、15 mL の円錐管中でチップを洗浄する、
- (4) 中身を空にして 8 mL のリン酸緩衝生理食塩水で 5 分間洗浄し、繰り返す、
- (5) 中身を空にして 8 mL の 1 mM の HEPES で 1 分間洗浄し、繰り返す、
- (6) 管からチップを除去し、液体を払い落とし、及び 10 分間空気乾燥させる、
- (7) 1 パリアル (10 mg) のシナピン酸粉末に 100 µl の 99.8% アセトニトリル及び 100 µl の 1.0% トリフルオロ酢酸を加えることによって EAM 溶液を調製し、5 分間攪拌して粉末を溶解する、
- (8) 5 µl の EAM 溶液を各スポットに加え、5 分間空気乾燥させ、繰り返す、10 分間空気乾燥させる。

【0048】

試料及び試薬のより大きな容量及び自動添加を可能にするバイオプロセッサーと共に使用するために、手順を修正することができる。陽性対照と陰性対照の両方を、通常実験中に含める。この目的のために TNF-α 抗体及び抗原をキット中に含める。

【0049】

3. フィンガープリントの作成

血漿試料及び精製アポリポタンパク質に関するアポリポタンパク質フィンガープリントを作成するための手順を、以下に記載する：

- (1) PROTEINCHIP (登録商標) アレイリーダー及びソフトウェア (Ciphergen Biosystems, Inc.) を使用して、プロファイルを作成する。
- (2) スポットプロトコルを作成しそれらを使用してチップをマッピングする。
- (3) データ収集パラメータはそれぞれの抗原に関して調節しなければならない、それらは分子量に基づく。Ciphergen Biosystems, Inc. によって供給される PROTEINCHIP (登録商標) アレイ抗体捕捉キット中には使用説明書が含まれている。
- (4) データを分析し、アポリポタンパク質フィンガープリントは、例えばデータを自身と内的に比較すること、及びデータを例えば対照の対象などの基準と外的に比較することによって作成した。

【0050】

或いは、抗体とビーズを結合させ、ビーズ上のアポリポタンパク質を捕捉し、ビーズから精製タンパク質を溶出させ、次いでマトリクス支援レーザー脱離イオン化 (MALDI) 及びエレクトロスプレー法を含めた任意の型の質量分析法により検出することによって、本発明を実施することができる。抗体とビーズを結合させる方法は当技術分野でよく知られており、このような方法は本発明に適している。MALDI はレーザーベースのソフトイオン化法であり、その方法では試料を化学マトリクス中に組み込み、これによってタンパク質、オリゴヌクレオチド、合成ポリマー、及び大きな無機化合物などの大きな、不揮発性且つ熱不安定性の化合物からの完全な気相イオンの生成を非常に容易にする。レーザー光エネルギーを吸収し、わずかな割合の標的基質を気化させることによって、マトリ

クスはこの技術において重要な役割を果たす。

【0051】

前述の好ましい実施形態の詳細な説明及び添付の図面は、単なる例示及び説明的な目的で提示するに過ぎず、本発明の範囲及び趣旨を包括又は制限することを目的とするものではない。本発明の原理及びその実際の適用例を最もよく説明するために、実施形態を選択し記載した。当業者は、本発明の範囲及び趣旨から逸脱せずに、本明細書に開示した本発明に対して多くの変形形態を作り出すことができることを理解しているはずである。

【図面の簡単な説明】

【0052】

【図1】異なるC I I Iアイソタイプ標準の報告された質量スペクトル及び分子量を示す図である。 10

【図2】C I P H E R G E N Q 1 0チップのプールしたアポリボタンパク質C I I I (C I I I - 0、C I I I - 1、及びC I I I - 2アイソタイプ)のプロファイルを示す図である。

【図3】C I P H E R G E N C M 1 0チップのプールしたアポリボタンパク質C I I I (C I I I - 0、C I I I - 1、及びC I I I - 2アイソタイプ)のプロファイルを示す図である。

【図4】C I P H E R G E N抗C I I I P S 2 0チップのC I I Iアイソタイプのプロファイルの再現性を示す図である。

【図5】C I P H E R G E N抗C I I I P S 2 0チップのC I I Iアイソタイプのプロファイルの再現性を示す図である。 20

【図6】血漿のC I I Iアイソタイプのプロファイルの再現性を示す図である。

【図7】異なる血漿希釈での血漿のC I I Iアイソタイプのプロファイルを示す図である。

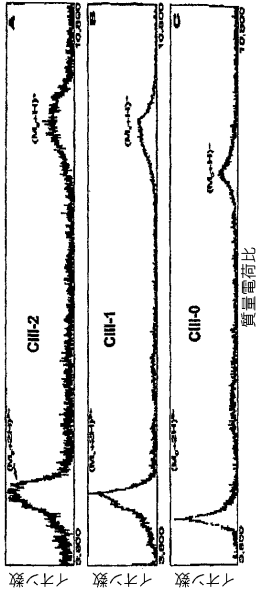
【図8】異なる血漿希釈での血漿のC I I Iアイソタイプのプロファイルを示す図である。

【図9】C I P H E R G E N抗C I I I P S 2 0チップの正常対象と糖尿病対象のC I I Iアイソタイプのプロファイルの比較を示す図である。

異なるCIIIアイソタイプ標準の報告された質量スペクトル及び分子量

表1.apo-CIIIの計算及び測定分子量 (ダルトン)

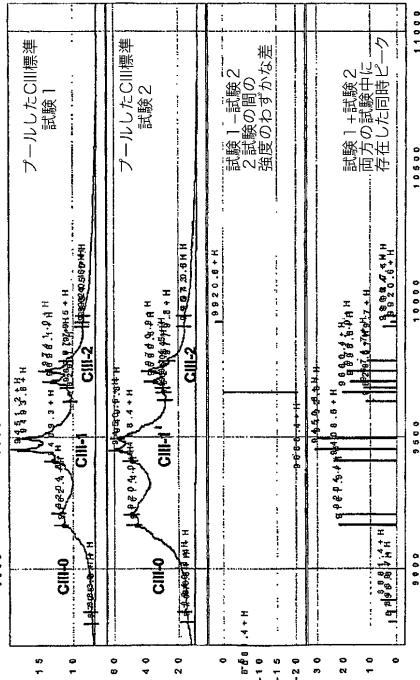
計算分子量	対象1	対象2	対象3
ApoC-III ₁ 8765.2	8765.9 (-0.3)	8764.9 (+0.7)	8765.3 (+1.3)
ApoC-III ₂ 9420.8	9420.6 (-0.2)	9420.0 (-0.8)	9422.2 (+1.4)
ApoC-III ₃ 9712.1	9700.2 (-11.9)		



** 血液由来の精製CIIIアイソタイプの質量スペクトル

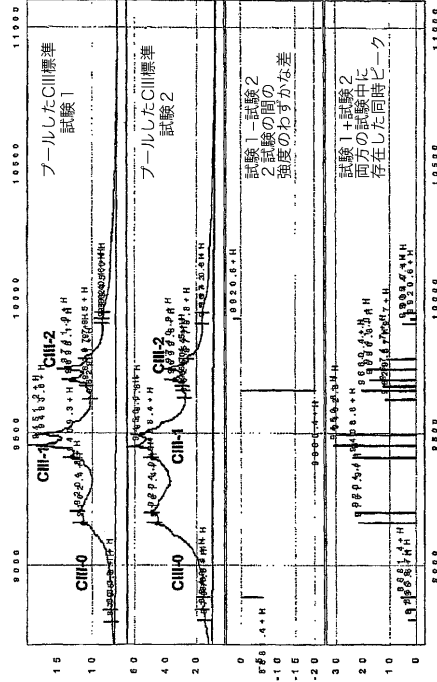
【 図 3 】

Ciphergen CM10チップのブールしたアポリポタンパク質CIII (CIII-0, CIII-1, 及びCIII-2アイソタイプ) のプロファイル



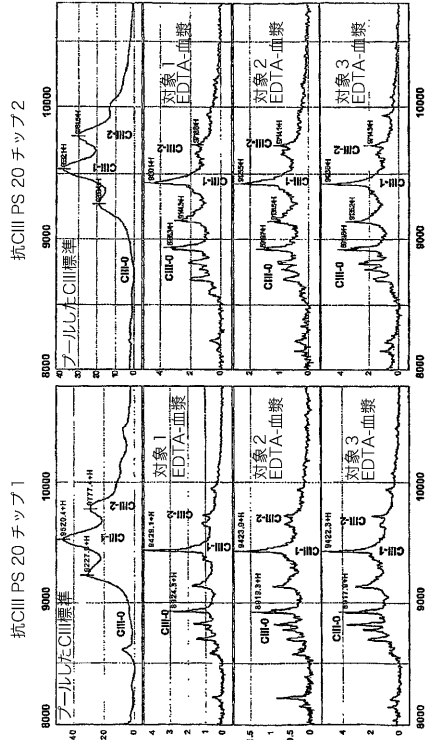
【 図 2 】

Ciphergen Q10チップのブールしたアポリポタンパク質CIII (CIII-0, CIII-1, 及びCIII-2アイソタイプ) のプロファイル



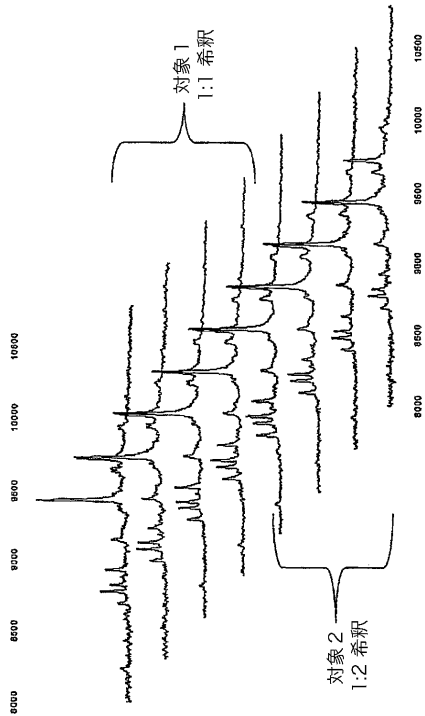
【 図 4 】

Ciphergen 抗CIII PS 20 チップの CIIIアイソタイプのプロファイルの再現性



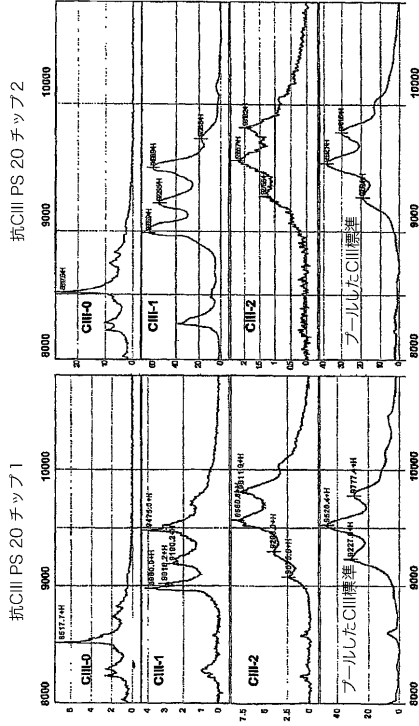
【 図 7 】

異なる血漿希釈での血漿のCIIIアイソタイプのプロファイル



【 図 5 】

Ciphergen 抗CIII PS 20 チップの CIIIアイソタイプのプロファイルの再現性



【 図 8 】

異なる血漿希釈での血漿のCIIIアイソタイプのプロファイル

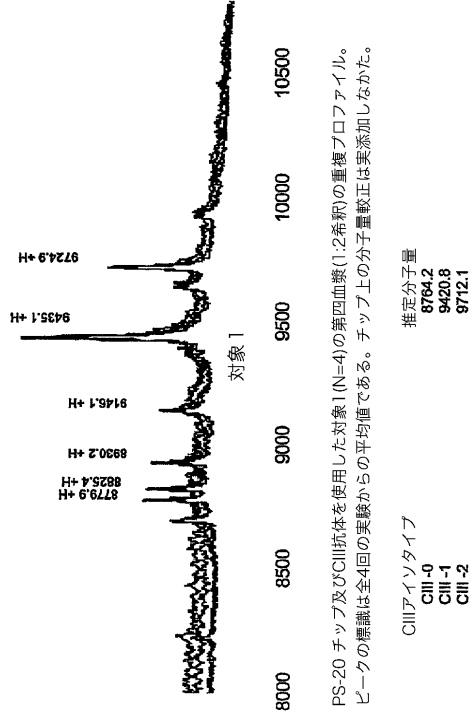
試験	CIII-0 pk1	CIII-0 pk2	CIII-0 pk3	CIII-0 pk4	CIII-1	CIII-2
チップ1	8780.7	8826.3	8931.1	9146.3	9436.4	9726.1
チップ2	8780.6	8826.3	8931.3	9147.7	9435.9	9725.8
チップ3	8779.7	8825.1	8929.7	9145.3	9434.8	9724.9
チップ4	8778.8	8823.9	8928.7	9145.2	9433.4	9723.0
平均値	8780.0	8825.4	8930.2	9146.1	9435.1	9725.0
標準偏差	0.889	1.149	1.227	1.162	1.330	1.396
予想値	8764.4				9420	9712

CIIIアイソタイプアクセスに関するこれまで開発した抗CIIIPSチップの利点

- 血漿中の幾つかの形態のCIII-0アイソタイプの初めての検出
- 異なるCIIIアイソタイプの直接的な血漿の同定
- これらのアイソタイプの正確な定量化の可能性

【 図 6 】

血漿のCIIIアイソタイプのプロファイルの再現性

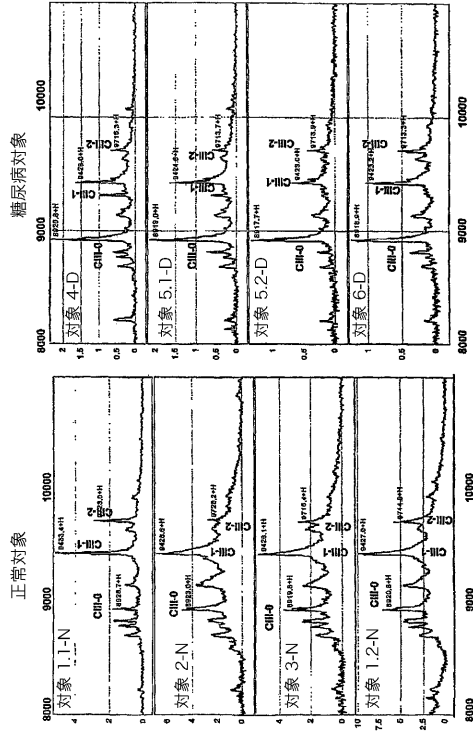


PS-20 チップ及びCIII抗体を使用した対象1(N=4)の第四血数(1:2希釈)の重複プロファイル。ピークの標識は全4回の実験からの平均値である。チップ上の分子置換正は実添加しなかつた。

CIIIアイソタイプ
 推定分子量
 CIII-0 8764.2
 CIII-1 9420.8
 CIII-2 9712.1

【 図 9 】

Ciphergen 抗CIII PS 20 チップの正常対象と糖尿病対象のCIIIアイソタイプの
プロファイルの比較



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US07/07359
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: G01N 33/53(2006.01) USPC: 435/7.1 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) U.S. : 435/7.1 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	TYSOE et al. Apo E and Apo C1 loci are associated with dementia in younger but not older late-onset cases. Dement Geriatr Cogn Disord. 1998, Vol. 9, page 191-198, whole document.	1-2, 4-6 and 16-18
Y	US 2005/0048547 A1 (ZHAO et al.) 3 March 2005 (03.03.2005), whole document.	1-2, 4-6 and 16-18
Y	US 2005/0064511 A1 (BUECHLER et al.) 24 March 2005 (24.03.2005), whole document.	3, 16-18
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input 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 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 03 January 2008 (03.01.2008)		Date of mailing of the international search report 28 JAN 2008
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201		Authorized officer Jacob Cheu <i>Felicia D. Roberts</i> Telephone No. 703-305-3399 <i>for</i>

フロントページの続き

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

(74)代理人 100097870

弁理士 梶原 齋子

(74)代理人 100140556

弁理士 新村 守男

(74)代理人 100114719

弁理士 金森 久司

(74)代理人 100143258

弁理士 長瀬 裕子

(74)代理人 100124969

弁理士 井上 洋一

(72)発明者 ブレイヤー、エメリタ デ グスマン

アメリカ合衆国 3 0 0 8 4 ジョージア、タッカー、 リブジー トレイル 2 8 4 0

(72)発明者 ロビンソン、マリー、ケイ .

アメリカ合衆国 3 0 0 3 4 ジョージア、ディケーター、 チェリー ヒル プレース 3 6 4
9

Fターム(参考) 2G041 CA01 DA03 DA04 EA03 FA10 GA06 JA07 LA07 LA08

专利名称(译)	载脂蛋白指纹技术		
公开(公告)号	JP2009531712A	公开(公告)日	2009-09-03
申请号	JP2009502905	申请日	2007-03-23
[标]申请(专利权)人(译)	布雷耶等梅利塔·古斯曼		
申请(专利权)人(译)	布雷耶, 荣誉退休·古斯曼		
[标]发明人	プレイヤーエメリタデグスマン ロビンソンマリーケイ		
发明人	プレイヤー、エメリタ デグスマン ロビンソン、マリー、ケイ.		
IPC分类号	G01N33/53 G01N27/62		
CPC分类号	G01N33/5091 G01N2333/775		
FI分类号	G01N33/53.W G01N27/62.V		
F-TERM分类号	2G041/CA01 2G041/DA03 2G041/DA04 2G041/EA03 2G041/FA10 2G041/GA06 2G041/JA07 2G041/LA07 2G041/LA08		
代理人(译)	池田幸 新村守男 井上洋一		
优先权	60/743678 2006-03-23 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

从患者获取样本, 向样本中添加特定体积的内标, 将样品添加到表面增强, 蛋白G涂层, 抗体结合芯片, 去除未结合的样品组分, 通过质谱分析样品并使用内标值, 糖尿病, 中风, 压力, 阿尔茨海默病和心血管疾病(如脂质紊乱, 代谢综合征, 肥胖, 动脉粥样硬化等)测量载脂蛋白的浓度通过评估载脂蛋白作为诊断工具, 同种型浓度, 氨基酸替代和修饰, 确定血浆, 血清和脂蛋白组分等生物样品中载脂蛋白的浓度和修饰怎么做

Plasma CIII Isoform Profile at Different Plasma Dilutions

Trial	CIII-0 pk1	CIII-0 pk2	CIII-0 pk3	CIII-0 pk4	CIII-1	CIII-2
Chip 1	8780.7	8826.3	8831.1	8146.3	8436.4	8726.1
Chip 2	8780.8	8826.3	8831.3	8147.7	8435.8	8725.8
Chip 3	8779.7	8826.1	8828.7	8146.3	8434.8	8724.0
Chip 4	8778.8	8825.0	8828.7	8146.2	8433.4	8723.0
Average	8780.0	8826.4	8830.2	8146.1	8435.1	8725.0
Std Dev	0.888	1.148	1.227	1.182	1.330	1.308
Expected	8764.4				8420	8712

Advantages of the currently developed anti-CIII PS 20 chip for CIII Isoform assay

- > Detection for the first time of several forms of CIII-0 isoform in plasma.
- > Direct plasma identification of the different CIII isoforms.
- > Potential for accurate quantitation of these isoforms.