

(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2007-526449

(P2007-526449A)

(43) 公表日 平成19年9月13日(2007.9.13)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53 D	4 B O 2 4
<b>GO 1 N 37/00 (2006.01)</b>	GO 1 N 37/00 1 O 2	4 B O 6 3
<b>GO 1 N 30/72 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53 M	
<b>GO 1 N 30/88 (2006.01)</b>	GO 1 N 30/72 C	
<b>C 1 2 Q 1/68 (2006.01)</b>	GO 1 N 30/88 J	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 41 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2006-517476 (P2006-517476)	(71) 出願人	501318833
(86) (22) 出願日	平成16年6月21日 (2004.6.21)		ユニバーシティ オブ フロリダ
(85) 翻訳文提出日	平成18年2月16日 (2006.2.16)		アメリカ合衆国、フロリダ、ゲインズビル、ポスト オフィス ボックス 115 500
(86) 国際出願番号	PCT/US2004/019748	(74) 代理人	100068755
(87) 国際公開番号	W02005/094200		弁理士 恩田 博宣
(87) 国際公開日	平成17年10月13日 (2005.10.13)	(74) 代理人	100105957
(31) 優先権主張番号	60/480,041		弁理士 恩田 誠
(32) 優先日	平成15年6月20日 (2003.6.20)	(72) 発明者	エリス、タミー エム、
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国 32605 フロリダ州 ゲインズビル エヌダブリュ トゥエン ティフォース ストリート 2005

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 1型糖尿病と2型糖尿病を識別するためのバイオマーカー

## (57) 【要約】

1型糖尿病、2型糖尿病、および/または糖尿疾患を診断するバイオマーカーを同定する。本発明の種々のバイオマーカーの検出により、1型糖尿病、2型糖尿病、および/または糖尿疾患の重症度の診断も行える。分析には、BMIおよびタナーステージを合わせるためのパラメータが含まれる。バイオマーカーと疾患との関連を調べるために、受診者動作特性(ROC)曲線を構築した。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

被験者における 1 型糖尿病と 2 型糖尿病を識別する方法であって、

( a ) 被験者から試料を得る工程と、

( b ) 試料中の少なくとも 1 つのバイオマーカーの量を測定する工程と、

( c ) 試料中の前記バイオマーカーの量を、被験者における 1 型糖尿病および 2 型糖尿病のいずれかの存在と関連づける工程とを含む方法。

**【請求項 2】**

試料中の少なくとも 2 つのバイオマーカーのレベルを測定して比を求め、該比を被験者における 1 型糖尿病および 2 型糖尿病のいずれかの存在と関連づけることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。 10

**【請求項 3】**

前記比を、バイオマーカーのレベルを身体測定パラメータおよび病状と関連づける多変数分析によって算出することを特徴とする請求項 2 に記載の方法。

**【請求項 4】**

多変数分析は、BMI およびタナーステージを合わせることをさらに含むことを特徴とする請求項 3 に記載の方法。

**【請求項 5】**

バイオマーカーの比を、受診者動作特性 ( ROC ) 曲線における差異によって決定することを特徴とする請求項 2 に記載の方法。 20

**【請求項 6】**

受診者動作特性 ( ROC ) 曲線の曲線下面積の計算によって、バイオマーカーの比を決定することを特徴とする請求項 5 に記載の方法。

**【請求項 7】**

バイオマーカーの比の特異的検出が健常な被験者と比べて約 70 % であることを特徴とする請求項 6 に記載の方法。

**【請求項 8】**

バイオマーカーの比の特異的検出が健常な被験者と比べて約 90 % であることを特徴とする請求項 6 に記載の方法。

**【請求項 9】**

バイオマーカーの比の特異的検出が健常な被験者と比べて最大 100 % に達することを特徴とする請求項 6 に記載の方法。 30

**【請求項 10】**

バイオマーカーの比の検出感度は、健常な被験者と比べて約 70 % であることを特徴とする請求項 6 に記載の方法。

**【請求項 11】**

バイオマーカーの比の検出感度は、健常な被験者と比べて約 90 % であることを特徴とする請求項 6 に記載の方法。

**【請求項 12】**

バイオマーカー比の検出の感度は、健常な被験者と比べて最大 100 % に達することを特徴とする請求項 6 に記載の方法。 40

**【請求項 13】**

前記比によって被験者における 1 型糖尿病と 2 型糖尿病とが識別されることを特徴とする請求項 2 に記載の方法。

**【請求項 14】**

被験者における 1 型糖尿病と 2 型糖尿病を識別する方法であって、

( a ) 被験者から試料を得る工程と、

( b ) 試料中のアディポネクチンまたはレプチンの量を決定する工程と、

( c ) 試料中のアディポネクチンまたはレプチンの量を、被験者における 1 型糖尿病および 2 型糖尿病のいずれかの存在と関連づける工程とを含む方法。 50

## 【請求項 15】

試料中のアディポネクチンおよびレプチンのレベルを決定し、アディポネクチン：レプチン比またはレプチン：アディポネクチン比のうち少なくともいずれかを求め、該比を被験者における1型糖尿病および2型糖尿病のいずれかの存在と関連づけることを特徴とする請求項14に記載の方法。

## 【請求項 16】

前記比を、アディポネクチンおよびレプチンの血清中レベルを身体測定パラメータおよび病状と関連づける多変数分析によって算出することを特徴とする請求項15に記載の方法。

## 【請求項 17】

多変数分析は、BMIおよびタナーステージを合わせることをさらに含むことを特徴とする請求項16に記載の方法。

## 【請求項 18】

アディポネクチンおよびレプチンの比を、受診者動作特性(ROC)曲線における差異によって決定することを特徴とする請求項14～17のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 19】

受診者動作特性(ROC)曲線の曲線下面積の計算によって、アディポネクチンおよびレプチンの比を決定することを特徴とする請求項18に記載の方法。

## 【請求項 20】

アディポネクチンおよびレプチンの比の特異的検出が健常な被験者と比べて約70%であることを特徴とする請求項19に記載の方法。

## 【請求項 21】

アディポネクチンおよびレプチンの比の特異的検出が健常な被験者と比べて約90%であることを特徴とする請求項19に記載の方法。

## 【請求項 22】

アディポネクチンおよびレプチンの比の特異的検出が健常な被験者と比べて最大100%に達することを特徴とする請求項19に記載の方法。

## 【請求項 23】

アディポネクチンおよびレプチンの比の検出感度は、健常な被験者と比べて約70%であることを特徴とする請求項19に記載の方法。

## 【請求項 24】

アディポネクチンおよびレプチンの比の検出感度は、健常な被験者と比べて約90%であることを特徴とする請求項19に記載の方法。

## 【請求項 25】

アディポネクチンおよびレプチンの比の検出感度は、健常な被験者と比べて最大100%に達することを特徴とする請求項19に記載の方法。

## 【請求項 26】

アディポネクチンおよびレプチンの比によって被験者における1型糖尿病と2型糖尿病とが識別されることを特徴とする請求項19に記載の方法。

## 【請求項 27】

1型糖尿病、2型糖尿病および糖尿疾患のうち少なくともいずれかの検出および診断方法であって、該方法は、

被験者試料中の少なくとも1つ以上のタンパク質バイオマーカーを検出することと；1つ以上のタンパク質バイオマーカーの検出を、1型糖尿病、2型糖尿病および糖尿疾患のうち少なくともいずれかの診断と関連づけ、該関連づけでは、各診断において、正常な被験者と比較した1つ以上のバイオマーカーの検出を考慮に入れることと、

前記1つ以上のタンパク質マーカーが、アディポネクチン、レプチン、グレリン、レスチン、インスリンに対する自己抗体、グルタミン酸デカルボキシラーゼに対する自己抗体、IL-2に対する自己抗体、IA-2に対する自己抗体、インクレチン、TNF- $\alpha$ およびIL-6から選択されることと；

10

20

30

40

50

1つ以上のタンパク質バイオマーカーの検出を、1型糖尿病、2型糖尿病および糖尿疾患のうち少なくともいずれかの診断と関連づけ、該関連づけでは、各診断において、正常な被験者と比較した1つ以上のバイオマーカーの検出を考慮に入れることとを含んでなる方法。

【請求項28】

1つ以上のタンパク質バイオマーカーは、1型糖尿病、2型糖尿病および糖尿疾患のうち少なくともいずれかを診断するために用いられることを特徴とする請求項27に記載の方法。

【請求項29】

バイオマーカーの検出によって、1型糖尿病、2型糖尿病および糖尿疾患のうち少なくともいずれかを識別することを特徴とする請求項27に記載の方法。

10

【請求項30】

複数のバイオマーカーを検出することを特徴とする請求項29に記載の方法。

【請求項31】

少なくとも2つのバイオマーカーを検出することを特徴とする請求項29に記載の方法。

【請求項32】

少なくとも3つのバイオマーカーを検出することを特徴とする請求項29に記載の方法。

【請求項33】

少なくとも4つのバイオマーカーを検出することを特徴とする請求項29に記載の方法。

20

【請求項34】

タンパク質、ペプチド、またはそれらの誘導体を検出することを特徴とする請求項29に記載の方法。

【請求項35】

1型糖尿病、2型糖尿病および糖尿疾患のうち少なくともいずれかを診断するために少なくとも2つのバイオマーカーの任意の組み合わせを使用することを特徴とする請求項29に記載の方法。

【請求項36】

1型糖尿病、2型糖尿病および糖尿疾患のうち少なくともいずれかを診断するために複数のマーカーを組み合わせることを特徴とする請求項29に記載の方法。

30

【請求項37】

試料は、血液、血漿、血清、尿、組織、細胞および臓器からなる群より選択されることを特徴とする請求項27に記載の方法。

【請求項38】

1型糖尿病、2型糖尿病および糖尿疾患のうち少なくともいずれかに罹患しているかまたはその疑いのある患者からのタンパク質プロファイルを正常な被験者と比較することにより、1つ以上のタンパク質バイオマーカーを検出することを特徴とする請求項27に記載の方法。

40

【請求項39】

イムノアッセイを用いて1つ以上のタンパク質バイオマーカーを検出することを特徴とする請求項29に記載の方法。

【請求項40】

イムノアッセイはELISAであることを特徴とする請求項39に記載の方法。

【請求項41】

バイオチップアレイを用いて1つ以上のタンパク質バイオマーカーを検出することを特徴とする請求項27に記載の方法。

【請求項42】

バイオチップアレイはタンパク質チップアレイであることを特徴とする請求項41に記載

50

載の方法。

【請求項 4 3】

バイオチップアレイは核酸アレイであることを特徴とする請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 4】

バイオチップアレイ上に 1 つ以上のマーカーが固定化されていることを特徴とする請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 5】

固定化された 1 つ以上のマーカーをレーザーイオン化処理して、該マーカーの分子量を検出することを特徴とする請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 6】

1 つ以上のマーカーの分子量は、全イオン流に対して正規化された閾値強度に対して分析されることを特徴とする請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 4 7】

ピーク強度範囲を狭めて検出されるマーカーの数を制限するために、対数変換を用いることを特徴とする請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 4 8】

バイオチップアレイをレーザーイオン処理に供し、質量/電荷比に対するシグナル強度を検出することにより、バイオチップアレイ上に固定化した被験試料についてのデータを得る工程と、

前記データをコンピュータで読み取り可能な形態に変換する工程と、

1 型糖尿病、2 型糖尿病および糖尿疾患のうち少なくともいずれかに罹患している患者に存在するマーカーを示すシグナルであるが正常な被験対照中には欠如しているシグナルを検出するために、ユーザ入力パラメータに従って前記データを分類するアルゴリズムを実行する工程と

を含む請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 4 9】

バイオチップアレイの表面が 1 つ以上の抗体を備えていることを特徴とする請求項 4 8 に記載の方法。

【請求項 5 0】

バイオチップアレイの表面が一本鎖または二本鎖核酸を備えていることを特徴とする請求項 4 8 に記載の方法。

【請求項 5 1】

バイオチップアレイの表面が、タンパク質、ペプチドまたはその断片を備えていることを特徴とする請求項 4 8 に記載の方法。

【請求項 5 2】

バイオチップアレイの表面がアミノ酸プローブを備えていることを特徴とする請求項 4 8 に記載の方法。

【請求項 5 3】

バイオチップアレイの表面がファージ提示ライブラリーを備えていることを特徴とする請求項 4 8 に記載の方法。

【請求項 5 4】

1 つ以上のマーカーがレーザー脱離/イオン化質量分析によって検出されることを特徴とする請求項 4 8 に記載の方法であって、

質量分析計とともに用いるように構成された、吸着剤が結合しているプローブを提供する工程と、

被験試料を前記吸着剤と接触させる工程と、

マーカーをプローブから脱離してイオン化し、脱離/イオン化マーカーを、質量分析計を用いて検出する工程と

を含む方法。

【請求項 5 5】

10

20

30

40

50

レーザー脱離/イオン化質量分析は、  
 吸着剤が結合している基材を提供する工程と、  
 被験試料を吸着剤と接触させる工程と、  
 質量分析計とともに用いるように構成された、吸着剤が結合しているプローブ上に、前記基材を配置する工程と、

プローブからマーカを脱離およびイオン化し、脱離/イオン化マーカを質量分析計によって検出する工程と

を含む、請求項54に記載の方法。

【請求項56】

吸着剤は、抗体、一本鎖または二本鎖オリゴヌクレオチド、アミノ酸、タンパク質、ペプチド、またはその断片であることを特徴とする請求項54に記載の方法。

10

【請求項57】

1つ以上のマーカの検出は、1型糖尿病、2型糖尿病および糖尿疾患のうち少なくともいずれかの重症度を診断するものであることを特徴とする請求項55に記載の方法。

【請求項58】

1型糖尿病、2型糖尿病および糖尿疾患のうち少なくともいずれかの検出および診断方法であって、該方法は、

被験者試料中の少なくとも1つ以上のタンパク質バイオマーカを検出することと；  
 1つ以上のタンパク質バイオマーカの検出を、1型糖尿病、2型糖尿病および糖尿疾患のうち少なくともいずれかの診断と関連づけ、該関連づけでは、各診断において、正常な被験者と比較した1つ以上のバイオマーカの検出を考慮に入れることと、

20

前記1つ以上のタンパク質マーカが、アディポネクチン、レプチン、グレリン、レスチン、インスリンに対する自己抗体、グルタミン酸デカルボキシラーゼに対する自己抗体、IL-2に対する自己抗体、IA-2に対する自己抗体、インクレチン、TNF- $\alpha$ およびIL-6、それらの断片またはバリエーションから選択されることと；

1つ以上のタンパク質バイオマーカの検出を、1型糖尿病、2型糖尿病および糖尿疾患のうち少なくともいずれかの診断と関連づけ、該関連づけでは、各診断において、正常な被験者と比較した1つ以上のバイオマーカの検出を考慮に入れることとを含む方法。

【請求項59】

30

1つ以上のタンパク質バイオマーカを用いて、1型糖尿病、2型糖尿病および糖尿疾患のうち少なくともいずれかを診断することを特徴とする請求項58に記載の方法。

【請求項60】

1つ以上のタンパク質バイオマーカを用いて、1型糖尿病、2型糖尿病および糖尿疾患のうち少なくともいずれかを診断することを特徴とする請求項58に記載の方法。

【請求項61】

少なくとも2つのバイオマーカの任意の組み合わせを用いて、1型糖尿病、2型糖尿病および糖尿疾患のうち少なくともいずれかを診断することを特徴とする請求項58に記載の方法。

【請求項62】

40

被験者における1型糖尿病、2型糖尿病および糖尿疾患のうち少なくともいずれかを診断するためのキットであって、

(a) 1型糖尿病、2型糖尿病および糖尿疾患のうち少なくともいずれかである疑いのあるヒト被験者から単離した生物試料を保持するための基材と、

(b) 少なくとも1つ以上の糖尿病タンパク質と特異的に結合する試薬と、

(c) 前記試薬を、生物試料または生物試料の一部と反応させて、前記生物試料中の少なくとも1つのマーカの存在または量を検出するための印刷した説明書とを含むキット。

【請求項63】

基材が、疎水性であるか、親水性であるか、荷電しているか、または極性を有すること

50

を特徴とする請求項 6 2 に記載のキット。

【請求項 6 4】

吸着剤は、抗体、一本鎖または二本鎖オリゴヌクレオチド、アミノ酸、タンパク質、ペプチド、またはその断片であることを特徴とする請求項 6 2 に記載のキット。

【請求項 6 5】

1 つ以上のタンパク質バイオマーカーを、イムノアッセイを用いて検出することを特徴とする請求項 6 2 に記載のキット。

【請求項 6 6】

イムノアッセイは、E L I S Aであることを特徴とする請求項 6 2 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

本発明は、1 型糖尿病、2 型糖尿病および糖尿疾患のうち少なくともいずれかの診断と予後診断に重要なバイオマーカーの、信頼性の高い検出および同定を提供する。より詳細には、本発明は、アディポネクチンおよびレプチンの濃度を測定することによって、1 型糖尿病と 2 型糖尿病とを識別するための組成物および方法に関する。

【背景技術】

【0002】

本願は、その全体を参照により本明細書に組み込む 2003 年 6 月 20 日提出の米国特許出願第 60 / 480, 041 号「1 型糖尿病と 2 型糖尿病との識別 (Differentiating

20

Between Type 1 and Type 2 Diabetes)」の利益を主張する。

【0003】

主として肥満の増加に伴い、糖尿病が世界的に蔓延している。最近の研究から、脂肪組織は、ホルモンとサイトカインを分泌する内分泌器官であることが確証された。アディポネクチンは、脂肪組織のみで合成される抗炎症性および抗動脈硬化性ホルモンである。アディポネクチンの血清中濃度は、2 型糖尿病 (T 2 D) 患者を含む肥満成人においては低下しており、減量またはチアゾリジンジオンによる治療を行う間に増加する。実際に、アディポネクチンは、単独で T 2 D に対して有効であることが提唱されている。アディポネクチンは、グルコースおよび脂質の代謝を調整することによってインスリン感受性を高めるようである。実際に、アディポネクチンの主たる効果には、肝臓におけるインスリン

30

作用を高め、これにより、肝臓のグルコース放出を高めることが含まれる。

【0004】

別の肥満関連ホルモンであるレプチンは、エネルギーバランスや体重の調整において重要である。アディポネクチンと同様に、レプチンもまた主として脂肪細胞によって分泌される。しかしながら、アディポネクチンとは違って、血清中のレプチン濃度は、T 2 D 患者を含む肥満成人において減少する。レプチン濃度は全体脂肪と直接的相関を有する。

【0005】

糖尿病の検出と診断は、子供や若年者において行うことが難しいことが知られている。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

40

【0006】

したがって、1 型および 2 型糖尿病ならびに代謝疾患の間の識別を行うマーカーを同定することが当技術分野において緊急に求められている。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明は、1 型糖尿病、2 型糖尿病および糖尿疾患のうち少なくともいずれかに罹患した患者の試料中に、対照被験者の試料と比べて示差的に存在するタンパク質マーカーを同定する。本発明は、前記マーカーを検出することによる 1 型糖尿病、2 型糖尿病および糖尿疾患のうち少なくともいずれかの診断を支援するために用いることのできる高感度かつ迅速な方法およびキットも提供する。患者の試料中の前記マーカーを単独または組み合わ

50

せて測定することにより、診断医が、1型糖尿病、2型糖尿病および糖尿疾患のうち少なくともいずれかの程度を予想する診断と関連づけることのできる情報が提供される。

【0008】

好ましい実施形態において、本発明は、小児被験者において1型糖尿病と2型糖尿病とを識別するための方法を提供する。好ましくは、本方法は、被験者から血清試料を得る工程と、試料中のバイオマーカの量を測定する工程と、試料中の少なくとも1つのバイオマーカの量を被験者における1型糖尿病および2型糖尿病のいずれかの存在と関連づける工程とを含む。

【0009】

別の好ましい実施形態において、試料中の少なくとも2つのバイオマーカのレベルを測定し、比を求め、該比を被験者における1型糖尿病および2型糖尿病のいずれかの存在と関連づける。好ましくは、前記比は、バイオマーカのレベルを身体測定パラメータおよび病状と関連づける多変数分析によって算出する。

10

【0010】

別の好ましい実施形態において、多変数分析は、BMIおよびタナーステージ（思春期発達度）を合わせることさらに含む。好ましくは、バイオマーカの比は、受診者動作特性（ROC）曲線の差異によって決定する。本発明によれば、受診者動作特性（ROC）曲線の曲線下面積を計算して、バイオマーカの比を決定する。

【0011】

別の好ましい実施形態において、バイオマーカ比を計算することにより、1型または2型糖尿病に対する特異度を決定する。好ましくは、バイオマーカ比の特異的検出が健常な被験者と比べて約70%であり、より好ましくは、バイオマーカ比の特異的検出が健常な被験者と比べて約90%であり、より好ましくは、バイオマーカ比の特異的検出が健常な被験者と比べて最大100%に達する。

20

【0012】

別の好ましい実施形態において、バイオマーカの比を計算することで、1型または2型糖尿病バイオマーカについての感度を決定する。好ましくは、バイオマーカ比の検出感度は、健常な被験者と比べて約70%であり、より好ましくは、バイオマーカ比の検出感度は、健常な被験者と比べて約90%であり、より好ましくは、バイオマーカ比の検出感度は、健常な被験者と比べて最大100%に達する。

30

【0013】

別の好ましい実施形態においては、少なくとも2つのバイオマーカの比によって、被験者における1型糖尿病と2型糖尿病とが識別される。

好ましい実施形態において、本発明は、小児被験者における1型糖尿病と2型糖尿病とを識別する方法を提供する。好ましくは、本方法は、被験者から血清試料を得る工程と、試料中のアディポネクチンまたはレプチンの量を測定する工程と、試料中のアディポネクチンまたはレプチンの量を、被験者中に1型および2型糖尿病のいずれかが存在することと関連づける工程とを含む。好ましくは、他のバイオマーカとしては、限定はされないが、たとえば、グレリン、レシスチン、インスリンに対する自己抗体、グルタミン酸デカルボキシラーゼに対する自己抗体、IL-2に対する自己抗体、IA-2に対する自己抗体、インクレチン、TNF- $\alpha$  およびIL-6が挙げられる。

40

【0014】

別の好ましい実施形態において、試料中のアディポネクチンおよびレプチンの両者の量を測定し、比（アディポネクチン：レプチンまたはレプチン：アディポネクチン）を求めるか、または、特に限定されないが、グレリン、レシスチン、インスリンに対する自己抗体、グルタミン酸デカルボキシラーゼに対する自己抗体、IL-2に対する自己抗体、IA-2に対する自己抗体、インクレチン、TNF- $\alpha$  およびIL-6などのうち任意の組み合わせについて量を測定し、比を求め、該比を、被験者中に1型および2型糖尿病のいずれかが存在することと関連づける。

【0015】

50

別の好ましい実施形態において、前記比は、アディポネクチンおよびレプチンの血清中濃度を身体測定パラメータおよび病状と関連づける多変数分析によって計算される。好ましくは、多変数分析は、BMIおよびタナーステージを合わせることをさらに含む。

【0016】

別の好ましい実施形態において、アディポネクチンおよびレプチンの両バイオマーカーの比は、受診者動作特性(ROC)曲線の差異から決定される。本発明によれば、受診者動作特性(ROC)曲線の曲線下面積を計算して、アディポネクチンとレプチンの両バイオマーカーの比を決定する。

【0017】

別の好ましい実施形態において、アディポネクチンとレプチンの比を計算することにより、1型または2型糖尿病に対する特異度を決定する。アディポネクチンとレプチンの両バイオマーカーの比の特異的検出が健常な被験者と比べて約70%である場合が好ましく、アディポネクチンとレプチンバイオマーカーの比の特異的検出が健常な被験者と比べて約90%である場合がさらに好ましく、アディポネクチンとレプチンバイオマーカーの比の特異的検出が健常な被験者と比べて100%までである場合がさらに好ましい。

10

【0018】

別の好ましい実施形態において、アディポネクチンとレプチンの比を計算することにより、1型または2型糖尿病に対する感度を決定する。好ましくは、アディポネクチンバイオマーカーとレプチンバイオマーカーの比の検出感度は、健常な被験者と比べて約70%であり、より好ましくは、アディポネクチンバイオマーカーとレプチンバイオマーカーの比の検出感度は、健常な被験者と比べて約90%であり、より好ましくは、アディポネクチンバイオマーカーとレプチンバイオマーカーの比の検出感度は、健常な被験者と比べて最大100%に達する。

20

【0019】

別の態様において、1型糖尿病、2型糖尿病および糖尿疾患のうち少なくともいずれかならびに病気の進行を診断するために、1つのバイオマーカーを、正常な健常者に由来する1つ以上のバイオマーカーと組み合わせて用いることが好ましく、より好ましくは、1型糖尿病、2型糖尿病および糖尿疾患のうち少なくともいずれかならびに病気の進行を診断するために、複数のバイオマーカーを、正常な健常者に由来する1つ以上のバイオマーカーと組み合わせて用いる。1型糖尿病、2型糖尿病および糖尿疾患のうち少なくともいずれかを患っているかもしくはその疑いのある患者由来のタンパク質プロファイルを、正常な被験者と比較するために、1つ以上のタンパク質バイオマーカーを用いることが好ましい。たとえば、アディポネクチン、レプチン、グレリン、レシスチン、インスリンに対する自己抗体、グルタミン酸デカルボキシラーゼに対する自己抗体、IL-2に対する自己抗体、IA-2に対する自己抗体、インクレチン、TNF- $\alpha$  およびIL-6、これらの断片、バリエーションまたは任意の組み合わせである。

30

【0020】

別の好ましい実施形態において、検出方法は、バイオチップアレイの使用を含む。本発明において有用なバイオチップアレイとしては、タンパク質アレイおよび核酸アレイが挙げられる。1つ以上のマーカーをバイオチップアレイに固定化し、該マーカーの分子量を検出するためにレーザーイオン化処理に供する。マーカーの分析は、たとえば、全イオン流に対して正規化した閾値強度に対する、1つ以上のマーカーの分子量によるものである。ピーク強度範囲を狭めて検出されるマーカーの数を制限するために、対数変換を用いることが好ましい。

40

【0021】

別の好ましい方法において、バイオチップ上に固定化された被験試料についてのデータは、前記バイオチップアレイをレーザーイオン化処理して質量対電荷比についてのシグナル強度を検出し；該データをコンピュータで読み取り可能な形態に変換し；ユーザ入力パラメータに従ってデータを分類するアルゴリズムを実行して、1型糖尿病、2型糖尿病および糖尿疾患のうち少なくともいずれかの患者に存在するマーカーを示すシグナルである

50

が、糖尿病以外の疾患であるか疾患ではないかのうち少なくともいずれかである対照被験者においては欠如しているシグナルを検出することによって得られる。

【0022】

好ましくは、バイオチップ表面は、たとえば、固定化ニッケルイオン、陽イオンと陰イオンの混合物、1種類以上の抗体、一本鎖または二本鎖核酸、タンパク質、ペプチドまたはその断片、アミノ酸プローブ、ファージ提示ライブラリーなどからなる、イオン性、アニオン性のものである。

【0023】

他の好ましい方法において、1つ以上のマーカーはレーザー脱離/イオン化質量分析法を用いて検出されるが、同方法は、吸着剤が結合している、質量分析計とともに用いるように構成されたプローブを供給する工程と、被験試料を該吸着剤に接触させる工程と、プローブ由来のマーカーを脱離およびイオン化して、脱イオン化/イオン化マーカーを質量分析計によって検出する工程とを含む。

10

【0024】

好ましくは、レーザー脱離/イオン化質量分析法は、吸着剤が結合している基材を提供する工程と、被験試料を吸着剤に接触させる工程と、吸着剤が結合している、質量分析計とともに用いるように構成されたプローブ上に基材を配置する工程と、該プローブ由来のマーカーを脱離およびイオン化して、脱イオン化/イオン化マーカーを質量分析計によって検出する工程とを含む。

【0025】

吸着剤は、たとえば、疎水性、親水性、イオン性または金属キレート吸着剤、たとえば、ニッケルまたは抗体、一本鎖または二本鎖オリゴヌクレオチド、アミノ酸、タンパク質、ペプチドまたはその断片であってよい。

20

【0026】

別の実施形態において、バイオマーカーの精製方法は、1つ以上のタンパク質バイオマーカーを含む試料をサイズ排除クロマトグラフィによって分画し、前記1つ以上のバイオマーカーを含む画分を回収する工程、および/または1つ以上のタンパク質バイオマーカーを含む試料をアニオン交換クロマトグラフィによって分画し、前記1つ以上のバイオマーカーを含む画分を回収する工程を含む。分画処理では、正常相および固定化ニッケルアレイ上での純度についてモニタする。アレイ上に固定化されたマーカー画分に対するデータの作成は、前記アレイをレーザーイオン化処理に供し、質量対電荷比についてのシグナル強度を検出すること、およびデータをコンピュータで読み取り可能な形態に変換すること、およびユーザ入力パラメータに従ってデータを分類するアルゴリズムを実行して、1型糖尿病、2型糖尿病および糖尿疾患のうち少なくともいずれかの患者に存在するマーカーを示すシグナルであるが、糖尿病以外の疾患であるか疾患ではないかのうち少なくともいずれかである対照被験者においては欠如しているシグナルを検出することによって実施される。好ましくは、画分をゲル電気泳動処理し、質量分析のデータと関連づける。1つの状態において、潜在的マーカーの代表的なバンドをゲルから切り出し、酵素処理してペプチドマッピング用のバイオチップアレイに供する。

30

【0027】

別の好ましい実施形態において、特定のバイオマーカーの存在が、1型糖尿病、2型糖尿病、および糖尿疾患のうち少なくともいずれかの程度の指標となる。たとえば、1つ以上のバイオマーカーが検出されれば、1型糖尿病、2型糖尿病、および糖尿疾患のうち少なくともいずれかの指標となり、1つ以上が存在すれば、1型糖尿病、2型糖尿病、および糖尿疾患の程度の指標となる。バイオマーカーは、インスリン濃度など、糖尿病の指標となる既知のタンパク質と比較可能であることが好ましい。

40

【0028】

1型糖尿病、2型糖尿病、および糖尿疾患のうち少なくともいずれかの好ましい検出および診断方法は、被験試料中の少なくとも1つ以上のタンパク質バイオマーカーを検出する工程と、1つ以上のタンパク質バイオマーカーの検出を、1型糖尿病、2型糖尿病、お

50

よび糖尿疾患のうち少なくともいずれかの診断と関連づける工程とを含み、関連づけにおいては、各診断について1つ以上のバイオマーカの検出が正常な被験者と比較して考慮され、前記1つ以上のタンパク質マーカは、たとえば、アディポネクチン、レクチンおよびインスリンを含む。

【0029】

別の好ましい実施形態において、本発明は、被験者における1型糖尿病、2型糖尿病、および糖尿疾患のうち少なくともいずれかを分析するためのキットを提供する。本発明のキットは、好ましくは、(a)1型糖尿病、2型糖尿病、および糖尿疾患のうち少なくともいずれかを有する疑いのあるヒト被験者から単離した生物試料を保持するための基材と、(b)少なくとも1つ以上の糖尿病タンパク質と特異的に結合する薬剤と、(c)前記物質を生物試料または生物試料の一部と反応させて、生物試料中の少なくとも1つのマーカの存在または量を検出するための印刷された説明書とを含む。

10

【0030】

好ましくは、生物試料は流体、たとえば、血液または血清であり、薬剤は、抗体、アプタマー、または少なくとも1つ以上の糖尿病タンパク質に特異的に結合する他の分子であってよい。キットは、検出可能なラベルを含んでいてもよく、該ラベルは、例えば、薬剤に連結されていてもよいし、該薬剤に特異的に結合する物質(たとえば、二次抗体)に連結されていてもよい。

【0031】

以下に本発明の他の態様を記載する。

20

【発明を実施するための最良の形態】

【0032】

本発明は、糖尿病の子供および若年者が上記ホルモンを生産するかどうかの調査を、導かれ得るさらなる機的情報を得るためだけでなく、当該年齢群における識別が困難な場合がある上記疾患の識別において上記マーカが提供しうる診断上の価値を特定するために行った、本発明に至る研究について説明する。

【0033】

[定義]

本発明について説明する前に、理解の一助となるように、以降使用する特定の用語の定義について説明しておく。

30

【0034】

本発明における「マーカ」は、対照被験者(たとえば、陰性の診断を受けた人、正常または健常な被験者)から採取した対比試料と比べて、糖尿疾患の患者から採取した試料において示差的に存在するポリペプチド(特定の見かけの分子量を有するもの)のことをいう。

【0035】

本発明における「補完的」とは、一緒に検出されると、1つのバイオマーカのみが検出される場合と比べて感度と特異度が向上するような、少なくとも2つのバイオマーカの検出のことをいう。

【0036】

「示差的に存在する」とは、対照被験者と比べて、たとえば糖尿病の患者から採取した試料中に存在するマーカの量および/または頻度の差があることをいう。たとえば、マーカは、対照被験者の試料と比べて、糖尿病患者の試料中において、高レベルまたは低レベルで存在するポリペプチドであってもよい。あるいは、マーカは、対照被験者の試料と比べて、患者の試料中において、高頻度または低頻度で存在するポリペプチドであってもよい。マーカは、量、頻度またはその両方に関して示差的に存在するものであってよい。

40

【0037】

一方の試料中のポリペプチドの量が、他の試料中の該ポリペプチドの量と統計的に有意に差がある場合、該ポリペプチドは2つの試料中で示差的に存在する。たとえば、ポリペ

50

プチドが、他の試料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%多く存在する場合、または一方の試料中では検出可能であり、他の試料中では検出可能でない場合に、当該2つの試料間で示差的に存在している。

#### 【0038】

別例または追加として、ポリペプチドは、糖尿疾患患者の試料中で該ポリペプチドが検出される頻度が、対照試料中と比べて統計的に有意に高いかまたは低い場合には、該2組の試料の間で示差的に存在する。たとえば、ポリペプチドは、一方の試料群中で観察される頻度が、他方の試料群中で観察される頻度よりも、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%高いかまたは低い場合には、当該2組の試料群間で示差的に存在している。

10

#### 【0039】

「診断(的)」とは、病的状態の存在または性質を同定することを意味する。診断方法の感度および特異度は様々である。診断アッセイの「感度」とは、試験結果が陽性の罹患者の割合(%) (「真陽性」の割合)である。アッセイで検出されない罹患者は「偽陰性」である。罹患しておらず、試験結果が陰性である被験者は、「真陰性」とよぶ。診断アッセイの「特異度」は、1から、偽陽性率を引いたものであり、「偽陽性」とは、試験結果が陽性であるが罹患していない被験者の割合として定義される。診断方法によっては、状態が明確に診断されないものもあるが、該方法が診断の助けとなる明白な目安を与えれば十分である。

20

#### 【0040】

マーカの「試験量」とは、試験される試料中に存在するマーカの量をいう。試験量は、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)のいずれであってもよい。

#### 【0041】

マーカの「診断量」とは、1型または2型糖尿病および/または糖尿疾患の診断と矛盾のない被験者試料中のマーカ量をいう。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)のいずれであってもよい。

30

#### 【0042】

マーカの「対照量」は、マーカの試験量に対して比較される任意の量または任意の範囲の量であってもよい。たとえば、マーカの対照量は、糖尿病ではない人におけるマーカ量としてもよい。対照量は、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)のいずれであってもよい。

#### 【0043】

本明細書中でいう「糖尿病タンパク質」とは、1型または2型糖尿病を有する個人において検出可能な任意のタンパク質、たとえば、アディポネクチン、レプチン、インスリン、グレリン、レスチン、インスリンに対する自己抗体、グルタミン酸デカルボキシラーゼに対する自己抗体、IL-2に対する自己抗体、IA-2に対する自己抗体、インクレチン、TNF- $\alpha$  およびIL-6、これらの断片、バリエーションまたは任意の組み合わせのことである。

40

#### 【0044】

本明細書中でいう「薬学的に許容される」成分とは、適度な対危険便益比に相応して、過度の有害な副作用(毒性、刺激、およびアレルギー反応など)を及ぼさずにヒトおよび/または動物に対して用いるのに適した成分をいう。

#### 【0045】

「患者」または「個人」という用語は、本明細書中では互換的に用いられ、治療すべき哺乳動物を意味し、ヒト患者が好ましい。場合によっては、本発明の方法は、実験動物に

50

おける用途、獣医学的用途、および、限定はされないが、マウス、ラットおよびハムスターなど齧歯類、および霊長類などの、疾患に対する動物モデルの開発に用いられる。

【0046】

本明細書中でいう「改善された」または「治療」とは、平常値に近づく兆候のことをいい、たとえば、常套的な統計学的検定を用いて判定した場合に、平常値からの差異が50%未満、好ましくは平常値からの差異が約25%未満、より好ましくは、平常値からの差異が10%未満、さらに好ましくは、平常値との有意差がないということである。

【0047】

「プローブ」とは、気相イオン分析器中に脱着可能なデバイスのことをいい、検出用のマーカ-を提示するための表面を有する基材を備えている。プローブは、1つの基材を備えていてもよいし、複数の基材を備えていてもよい。

10

【0048】

「基材」または「プローブ基材」とは、その上に吸着剤を（たとえば、付加、蒸着などによって）提供することのできる固相をいう。

「吸着剤」とは、マーカ-を吸着することが可能な任意の材料をいう。本明細書中で用いる「吸着剤」とは、マーカ-が曝露される単一の材料（「モノプレックス吸着剤」）（たとえば、化合物または官能基）と、マーカ-が曝露される複数の異なる材料（「マルチプレックス吸着剤」）のどちらのこともさす。マルチプレックス吸着剤中の吸着性材料は、「吸着剤種」と呼ばれる。たとえば、プローブ基材上の位置指定可能な位置に、異なる結合特性を有した多くの異なる吸着剤種（たとえば、アニオン交換材料、金属キレート剤、または抗体）によって特徴づけられるマルチプレックス吸着剤が備えられていてもよい。基材の材料自体がマーカ-の吸着に寄与していてもよく、「吸着剤」の一部と見なすこともできる。

20

【0049】

「吸着」または「保持」とは、溶離剤（選択性閾値調整剤）または洗浄液による洗浄の前後いずれかにおける、吸着剤とマーカ-の間の検出可能な結合のことをいう。

「溶離剤」または「洗浄液」とは、吸着剤へのマーカ-の吸着を仲介するために用いることのできる薬剤のことをいう。溶離剤および洗浄液は、「選択性閾値調整剤」とも呼ばれる。溶離剤および洗浄液は、結合していない物質をプローブ基材表面から洗浄および除去するために用いることができる。

30

【0050】

「解析する」、「解析」または「マーカ-の解析」とは、試料中の少なくとも1つのマーカ-の検出をいう。解析には、分離とその後の示差的検出による、試料中の複数のマーカ-の検出が含まれる。解析では、混合物中の他のすべての生物分子から1つ以上のマーカ-を完全に分離する必要はなく、少なくとも1つのマーカ-と他の生物分子を区別することができるように分離すれば十分である。

【0051】

「気相イオン分析器」とは、試料が揮発されイオン化されて形成されるイオンの質量対電荷比に変換可能なパラメータを測定する装置のことをいう。一般に、目的のイオンは1つの電荷しか持たず、質量対電荷比は単に質量として表せる場合が多い。気相イオン分析器には、たとえば、質量分析計、イオン移動度スペクトル検出器、および全イオン流を測定する装置が含まれる。

40

【0052】

「質量分析計」とは、注入装置と、イオン化源と、イオン光学アセンブリと、質量分析器と、検出器とを備えた気相イオン分析器のことをいう。

「レーザー脱離質量分析計」とは、検体の脱離、揮発およびイオン化を行う手段としてレーザーを用いる質量分析計のことをいう。

【0053】

「検出する」とは、検出対象物の有無または量を同定することをいう。

「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」という用語は、アミノ酸残基の

50

ポリマーを表し本明細書中では互換的に使用される。これらの用語は、天然のアミノ酸ポリマーだけでなく、1つ以上のアミノ酸残基が対応する天然アミノ酸のアナログまたは類似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、炭水化物の付加により修飾されて糖タンパク質を形成してもよい。「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」という用語は、非糖タンパク質だけでなく、糖タンパク質も含む。

#### 【0054】

「検出可能な部分」または「ラベル」とは、分光学的、光化学的、生化学的、免疫学的または化学的手段によって検出可能な組成物のことをいう。たとえば、有用なラベルとしては、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、蛍光染料、高電子密度の試薬、酵素（たとえば、ELISAにおいて一般に用いられるもの）、ビオチン-スト렙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入手可能なタンパク質、または標的と相補的な配列を有する核酸分子が挙げられる。検出可能な部分は、試料中の検出可能な部分の結合量を定量するために用いることのできる、放射性、発色性、または蛍光性のシグナルなどの測定可能なシグナルを発生するものが多い。シグナルの定量は、たとえば、シンチレーション計測、デンストメトリー、またはフローサイトメトリーによって行う。

10

#### 【0055】

「抗体」とは、エピトープ（例えば、抗原）に特異的に結合してこれを認識する、免疫グロブリン遺伝子またはその断片によって実質的にコードされるポリペプチドリガンドのことをいう。周知の免疫グロブリン遺伝子には、および軽鎖定常領域の遺伝子、アルファ（ $\alpha$ ）、ガンマ（ $\gamma$ ）、デルタ（ $\delta$ ）、イプシロン（ $\epsilon$ ）およびミュー（ $\mu$ ）重鎖定常領域の遺伝子、および無数の免疫グロブリン可変領域の遺伝子が含まれる。抗体は、たとえば、完全な免疫グロブリンとして存在することもあれば、様々なペプチダーゼによる消化によって生じる複数のよく特性解析された断片として存在することもある。この断片には、たとえば、Fab' および F(ab)'<sub>2</sub> 断片が含まれる。本明細書中で用いる「抗体」という用語には、抗体全体の修飾によって発生したもの、組換えDNA法を用いて *de novo* 合成したもののいずれかの抗体断片も含まれる。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まれる。抗体の「Fc」部分とは、1つ以上の重鎖定常領域ドメイン CH<sub>1</sub>、CH<sub>2</sub> および CH<sub>3</sub> を含むが、重鎖可変領域は含まない、免疫グロブリン重鎖の一部をいう。

20

#### 【0056】

「イムノアッセイ」とは、抗原（たとえば、マーカー）に特異的に結合する抗体を用いるアッセイである。イムノアッセイは、抗原を単離し、標的とし、かつ/または定量するために、特定の抗体の特異的特性を利用することを特徴とする。

30

#### 【0057】

抗体に「特異的（または選択的）に結合する」、またはタンパク質またはペプチドに言及する際の「～に対して特異的（または選択的）に免疫反応性を有する」という表現は、該タンパク質の存在を複数のタンパク質および他の生体物質の混成集団において決定するような、結合反応のことをいう。したがって、指定されたイムノアッセイ条件において、指定の抗体は少なくともバックグラウンドの2倍は特定のタンパク質に結合し、試料中に存在する他のタンパク質には実質的には有意な量では結合しない。このような条件における抗体への特異的結合には、特定のタンパク質に対する特異性に関して選択された抗体が必要であろう。たとえば、マーカー「X」に対して、ラット、マウスまたはヒトなどの特定の生物種から得られたポリクローナル抗体は、マーカー「X」に対して特異的な免疫反応性を有し、マーカー「X」の多型バリエーションや対立遺伝子を除く他のタンパク質に対しては特異的免疫反応性を持たないポリクローナル抗体だけを得るように選択されてもよい。この選択は、他の生物種由来のマーカー「X」分子と交差反応する抗体を取り除くことによって行ってよい。特定のタンパク質に対する特異的免疫反応性を有する抗体を選ぶためには、様々なイムノアッセイ様式を用いることができる。たとえば、固相ELISAイムノアッセイは、タンパク質に対して特異的免疫反応性を有する抗体を選択するために常套的に用いられている（特異的免疫反応性を判定するために用いることのできるイムノ

40

50

アッセイの様式と条件の説明については、たとえば、Harlow & Laneの「Antibodies, A Laboratory Manual」(1988)を参照のこと)。典型的には、特異的または選択的反応は、バックグラウンドシグナルまたはノイズの少なくとも2倍であり、より典型的にはバックグラウンドの10~100倍を超える。

【0058】

「エネルギー吸収分子」または「EAM」とは、質量分析計のイオン化源からのエネルギーを吸収することにより、検体、たとえばマーカのプローブ表面からの脱離を助ける分子のことをいう。検体の大きさと性質に応じて、エネルギー吸収分子を任意選択で用いるとよい。MALDIにおいて用いられるエネルギー吸収分子は、「マトリックス」と呼ばれる場合も多い。ケイ皮酸誘導体、シナピン酸(「SPA」)、シアノヒドロキシケイ皮酸(「CHCA」)およびジヒドロキシ安息香酸が、生物有機分子のレーザー脱離におけるエネルギー吸収分子として頻繁に用いられる。

10

【0059】

本明細書中において「試料」は、その最も広い意味で用いる。ポリヌクレオチド、ポリペプチド、ペプチド、抗体などを含む試料には、体液、細胞調製物の可溶画分、または細胞の培養培地、細胞から単離または抽出された染色体、オルガネラまたは膜、溶液状態または基質に結合したゲノムDNA、RNA、またはcDNA、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、皮膚または毛髪などを含んでもよい。

【0060】

「実質的に精製された」とは、核酸分子またはタンパク質がその天然の環境から取り出され、単離または分離されて、天然状態で関連のある他の成分が少なくとも約60%、好ましくは約75%、および最も好ましくは約90%除去されていることをいう。

20

【0061】

「基材」とは、核酸分子またはタンパク質を結合させる任意の剛性または半剛性の支持体のことをいい、膜、フィルター、チップ、スライド、ウェハ、繊維、磁気ビーズまたは非磁気ビーズ、ゲル、キャピラリーまたは他の管状物、プレート、ポリマー、ならびに微粒子であって、ウェル、溝、ピン、管路および孔を含む様々な表面形態を備えたものが挙げられる。

【0062】

本明細書中で用いる「糖尿疾患」とは、糖尿病による合併症のことをいう。たとえば、網膜症、腎症および神経症などの合併症は、糖尿病患者における主要素としての血管障害とともに発症する。

30

【0063】

本明細書中で用いる「糖尿病」とは、1型および2型糖尿病をいう。糖尿病は、疾患のタイプによって、インスリン依存性糖尿病(IDDM; 1型糖尿病)と、インスリン非依存性糖尿病(NIDDM; 2型糖尿病)に分類される。

【0064】

好ましい実施形態において、1つ以上のバイオマーカの検出を、1型および2型糖尿病および/または糖尿疾患の診断に用いる。たとえば、アディポネクチンおよび/またはレプチン、グレリン、レシスチン、インスリンに対する自己抗体、グルタミン酸デカルボキシラーゼに対する自己抗体、IL-2に対する自己抗体、IA-2に対する自己抗体、インクレチン、TNF- $\alpha$  およびIL-6、それらの断片、ペプチドまたはバリエーションを検出する。本発明によれば、BMIおよび思春期に関する調整を行うと、アディポネクチンレベルはT1Dにおいて上昇し、T2Dにおいては低下した。一方、小児T2Dの場合では、レプチン濃度の上昇が観察された。

40

【0065】

別の好ましい実施形態において、個体内で示差的に存在する複数のバイオマーカを検出することで、1型糖尿病、2型糖尿病および/または糖尿疾患の診断を行う。たとえば、アディポネクチン/レプチン比は、健常な子供(11.8 [95% CI 4.8~18

50

．7] ) と、T1Dの子供( 6．1 [ 3．8 ~ 8．3 ] ) またはT2Dの子供( 0．4 [ 0．3 - 0．5 ] ) の間で劇的に異なる(  $p < 0．0001$  ) 。他の組み合わせとしては、たとえば、アディポネクチン、レプチン、グレリン、レシスチン、インスリンに対する自己抗体、グルタミン酸デカルボキシラーゼに対する自己抗体、IL - 2に対する自己抗体、IA - 2に対する自己抗体、インクレチン、TNF - およびIL - 6、それらの断片、バリエーション、または任意の組み合わせが挙げられる。

#### 【0066】

別の好ましい実施形態において、本発明は、1型および2型糖尿病および/または糖尿病疾患を診断するバイオマーカーの定量的検出を提供する。病気のタイプと程度に応じて、バイオマーカーは示差的に存在し、これらのバイオマーカーの比が糖尿病および/または糖尿病疾患の指標となる。たとえば、健常な個人と比べた、レプチンに対するアディポネクチンの比などである。

10

#### 【0067】

別の好ましい実施形態において、特定のバイオマーカーの検出により、糖尿病の具体的なタイプを診断する。たとえば、アディポネクチンおよびレプチンのタンパク質、ペプチド、その断片および誘導体を検出することで、1型または2型のいずれの糖尿病であるかを診断する。

#### 【0068】

別の好ましい実施形態において、被験者における1型、2型および/または糖尿病疾患は、( a ) 糖尿病の疑いのある被験者から単離した生物試料を提供することと、( b ) 前記試料中の、1つ以上のバイオマーカータンパク質から選択された少なくとも1つのマーカーの存在またはその量を検出することと、( c ) マーカーの存在または量を、被験者における糖尿病の存在またはタイプと関連づけることとによって分析する。糖尿病患者から得た血清、脂肪細胞、膵臓細胞などの試料、*in vitro* 培養または被験動物の *in situ* の試料において、非糖尿病患者と比べて糖尿病タンパク質が高濃度に発現することが好ましい。好ましくは、試料は細胞を含むもの、例えば脂肪細胞組織のバイオプシーなどであるが、本発明において使用するのに適した生物試料は膵臓である。さらに、アディポネクチン/レクチンを、循環血液および他の体液(たとえば、尿、汗、唾液など)について検出する。他の適切な生物試料としては、特に限定はされないが、このような細胞や、当該細胞から分泌される流体が挙げられる。被験者から、血液、血漿、血清、唾液および尿などの体液を得ることは、一般に、固体組織のバイオプシーを得るよりはるかに非侵襲的で損傷を与えにくい。したがって、体液試料が本発明において使用するのに好ましい。

20

30

#### 【0069】

生物試料は、従来技術によって被験者より得ることができる。血液は静脈穿刺により得ることが可能であり、また血漿と血清は、全血を既知の方法によって分画することによって得られる。固体組織試料を得るための外科技術も当該技術分野において周知である。

#### 【0070】

たとえばアディポネクチン、レプチンなどの糖尿病バイオマーカータンパク質を発現する任意の動物を、生物試料を採取するための被験者として用いることもできる。好ましくは、被験者は、たとえばヒト、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ニワトリ、霊長類、ラットまたはマウスなどの哺乳動物である。より好ましくは、被験者はヒトである。特に好ましいのは、1型、2型の糖尿病および関連糖尿病疾患を有する疑いがあるか、発症のおそれのある被験者である。

40

#### 【0071】

好ましい実施形態において、試料は、1型糖尿病(  $n = 41$  )、2型糖尿病(  $n = 17$  ) の子供および若年者、および一般集団からの類似の年齢の非糖尿病患者(  $n = 43$  ) から採取し、調べた。分析には、BMIおよびタナーステージを合わせるためのパラメータを含めた。受診者動作特性(ROC) 曲線を、これらの検体の疾患との関係性を評価するために作製した。

50

## 【0072】

本発明のバイオマーカーは、任意の手段により試料中で検出することができる。バイオマーカーの検出方法については、後述の材料と方法および実施例において詳細に記載する。たとえば、イムノアッセイとしては、限定はされないが、ウェスタンブロット法、ラジオイムノアッセイ、ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)、*「サンドイッチ」*イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、沈降反応、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散アッセイ、蛍光イムノアッセイなどの技術を用いる、競合的および非競合的アッセイ系が挙げられる。このようなアッセイは、常套的であり、当該技術分野において周知である（たとえば、その全体を参照により本明細書に組み込む、Ausubelら編、*「Current Protocols in Molecular Biology」*、1994年、第1巻、ニューヨーク所在のジョンワイリーアンドサンズインコーポレイテッド社 (John Wiley & Sons, Inc.) を参照のこと)。例示的イムノアッセイを、以下に簡単に説明する（ただし、これは限定を意図したものではない）。

10

## 【0073】

免疫沈降法は一般に次の工程を含む。すなわち、タンパク質ホスファターゼおよび/またはプロテアーゼのインヒビター（たとえばEDTA, PMSF, アプロチニン、パナジウム酸ナトリウム）を添加したRIPAバッファ（1% NP-40またはTriton X-100, 1% デオキシコール酸ナトリウム、0.1% SDS、0.15M NaCl、0.01M リン酸ナトリウム、pH 7.2, 1% Trasyol (登録商標)）などの溶解バッファ中で、細胞集団を溶解する工程と、この細胞溶解物に目的の抗体を加える工程と、4 で一定時間（たとえば、1~4時間）インキュベートする工程と、プロテインAおよび/またはプロテインGセファロースビーズを細胞溶解物に加える工程と、約1時間以上4 でインキュベートする工程と、溶解バッファ中でビーズを洗浄する工程と、前記ビーズをSDS/サンプルバッファ中に懸濁する工程を含む。抗体が特定の抗原を免疫沈降させる能力は、たとえば、ウェスタンブロット分析によって評価することができる。当業者であれば、抗体の抗原への結合を高め、バックグラウンドを低減するために変更しうるパラメータについて知っているであろう（たとえば、予めセファロースビーズで細胞溶解物から不要物を除去しておくことなど）。免疫沈降法に関するさらなる議論については、たとえば、Ausubelら編 *「Current Protocols in Molecular Biology」*、1994年、第1巻（ニューヨーク所在のジョンワイリーアンドサンズインコーポレイテッド社）の10.16.1を参照のこと。

20

30

## 【0074】

ウェスタンブロット分析は一般に次の工程を含む。すなわち、タンパク質試料を調製する工程と、ポリアクリルアミドゲル（たとえば、抗原の分子量に応じて8%~20%のSDS-PAGE）中でタンパク質試料を電気泳動する工程と、タンパク質試料をポリアクリルアミドゲルから、ニトロセルロース、PVDFまたはナイロンなどの膜に移す工程と、膜をブロッキング溶液（たとえば、3%のBSAまたは無脂肪乳を含むPBS）中でブロッキングする工程と、洗浄バッファ（たとえば、PBS-Tween 20）中で膜を洗浄する工程と、膜をブロッキングバッファで希釈した一次抗体（目的の抗体）でブロッキングする工程と、膜を洗浄バッファ中で洗浄する工程と、膜を、酵素基質（たとえば、セイヨウワサビペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼ）または放射性分子（たとえば<sup>32</sup>Pまたは<sup>125</sup>I）に連結された二次抗体（一次抗体を認識する抗体、たとえば抗ヒト抗体）をブロッキングバッファで希釈したものでブロッキングする工程と、膜を洗浄バッファ中で洗浄する工程と、抗原の存在を検出する工程とを含む。当業者であれば、検出されるシグナルを高め、バックグラウンドノイズを低減するために変更しうるパラメータについて知っているであろう。ウェスタンブロット法についてのさらなる議論については、たとえば、Ausubelら編 *「Current Protocols in Molecular Biology」*、1994年、第1巻（ニューヨーク所在のジョンワイリーアンドサンズインコーポレイテッド社）の10.8.1を参照のこと。

40

## 【0075】

50

ELISA法は、抗原（すなわち糖尿病バイオマーカー）を調製する工程と、96ウェルマイクロタイプレートウェルを該抗原でコーティングする工程と、酵素基質（たとえば、セイヨウワサビペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼ）などの検出可能な化合物に連結された目的の抗体をウェルに加えて、一定時間インキュベートする工程と、抗原の存在を検出する工程とを含む。ELISAにおいて、目的の抗体は必ずしも検出可能な化合物に連結されている必要はなく、かわりに、検出可能な化合物に連結された二次抗体（目的の抗体を認識するもの）をウェルに加えてもよい。さらに、ウェルを抗原でコーティングする代わりに、抗体をウェルにコーティングしてもよい。この場合、コーティングされたウェルに目的の抗原を加えた後に、検出可能な化合物に連結された二次抗体を加えるとよい。当業者であれば、当該技術分野で知られるELISAの他の変法だけでなく、検出されるシグナルを高めるために変更しうるパラメータについて知っているであろう。ELISAについてのさらなる議論については、たとえば、Ausubelら編「Current Protocols in Molecular Biology」、1994年、第1巻（ニューヨーク所在のジョンワイリーアンドサンズインコーポレイテッド社）の11.2.1を参照のこと。

10

## 【0076】

## [新しいマーカーの同定]

好ましい実施形態において、生物試料は、糖尿病に罹患しているかまたはその疑いのある患者から得る。他の患者および対照被験者（すなわち、類似の年齢、性別、体格の健常人）からのバイオマーカーを含む生物試料を、対照として用いる。生物試料は上述のようにして抽出する。好ましくは、試料は、バイオマーカーの検出前に調製する。典型的には、調製には、試料の分画と、バイオマーカーを含有すると判定された画分の回収とが含まれる。予備的な分画の方法としては、たとえば、サイズ排除クロマトグラフィ、イオン交換クロマトグラフィ、ヘパリンクロマトグラフィ、アフィニティクロマトグラフィ、逐次抽出、ゲル電気泳動および液体クロマトグラフィが挙げられる。検体を、検出の前に修飾してもよい。これらの方法は、さらなる分析のために試料を簡素化するために有用である。たとえば、分析前に、アルブミンなどの多量に含まれるタンパク質を血液から除去することが有用であるかもしれない。

20

## 【0077】

1つの実施形態において、試料は、サイズ排除クロマトグラフィを用いて試料中のタンパク質のサイズによって予め分画しておいてもよい。利用可能な試料量が少ない生物試料に対しては、好ましくはサイズ選択スピンカラムが用いられる。一般に、該カラムから溶出される最初の画分（「画分1」）は高分子量のタンパク質を最も高率で含み、画分2は高分子量のタンパク質をそれより低率で含み、画分3は高分子量のタンパク質をさらに低率で含み、画分4が含む大きいタンパク質の量は最も少ない、などとなる。次に各画分について、マーカーを検出するために、イムノアッセイ、気相イオンスペクトル分析などによって分析することができる。

30

## 【0078】

別の実施形態において、試料を、アニオン交換クロマトグラフィを用いて予め分画してもよい。アニオン交換クロマトグラフィにより、試料中のタンパク質を、その荷電特性によって大まかに予備分画してもよい。たとえば、Qアニオン交換樹脂を用いることもでき（たとえば、Q HyperD（登録商標）F、バイオセプラ（Biosepra））、試料を、異なるpHを有する溶離剤を用いて順次溶出させてもよい。アニオン交換クロマトグラフィにより、他のタイプのバイオマーカーから、試料中のより負に荷電したバイオマーカーを分離することができる。高いpHの溶離剤によって溶出するタンパク質は、弱く負に帯電している可能性が高く、低いpHの溶離剤によって溶出する画分は、強く負に帯電している可能性が高い。このように、試料の複雑性を低減することに加えて、アニオン交換クロマトグラフィはタンパク質をその結合特性によっても分離する。

40

## 【0079】

さらに別の実施形態において、試料を、ヘパリンクロマトグラフィによって予め分画し

50

てもよい。ヘパリンクロマトグラフィにより、ヘパリンとのアフィニティ相互作用および荷電特性に基づいて試料中のマーカの予備分画を行うことができる。硫酸ムコ多糖類であるヘパリンは、正に帯電した部分を有するマーカに結合し、試料を、異なるpHまたは塩濃度の溶離剤によって順次溶出させることができる。低pHの溶離剤によって溶出するマーカは、弱く正に帯電している可能性がより高い。高pHの溶離剤によって溶出するマーカは、強く正に帯電している可能性がより高い。このように、ヘパリンクロマトグラフィもまた、試料の複雑さを低減するとともに、マーカをその結合特性によって分離する。

#### 【0080】

さらに別の実施形態において、試料を、たとえばグリコシル化されているなど、特定の特性を有するタンパク質を単離することによって、予め分画してもよい。たとえば、血液、または血清試料を、試料をレクチンクロマトグラフィカラム（糖に対して高い親和性を有する）に通すことによって分画してもよい。グリコシル化タンパク質はレクチンカラムに結合し、非グリコシル化タンパク質は通り抜けて通過画分になる。次に、グリコシル化タンパク質を、糖、たとえばN-アセチルグルコサミンを含む溶離剤を用いてレクチンカラムから溶出させて、さらなる分析に利用できるようにする。

10

#### 【0081】

このように、試料中のタンパク質の結合特性、または試料中のタンパク質の特性に基づいて試料の複雑さを低減する多くの方法がある。

さらに別の実施形態において、試料を、逐次抽出法を用いて分画してもよい。逐次抽出においては、異なるタイプのバイオマーカを試料から抽出するために、試料を一連の吸着剤に曝露する。たとえば、特定のタンパク質を抽出するために試料を第1の吸着剤に曝露し、非吸着タンパク質（すなわち、第1の吸着剤に結合しなかったタンパク質）を含んだ溶離液を回収する。次に、該画分を第2の吸着剤に曝露する。これにより、該画分から様々なタンパク質をさらに抽出する。この第2の画分を次に第3の吸着剤に曝露するといった具合である。

20

#### 【0082】

試料の逐次抽出を行うために任意の適切な材料および方法を用いることができる。たとえば、種々の吸着剤からなる一連のスピнкаラムを用いてもよい。別例において、底部に種々の吸着剤を含んだマルチウェルを用いてもよい。別例において、逐次抽出は、気相イオン分析器での使用に適合したプローブ上で行ってもよく、この場合、プローブ表面が、バイオマーカを結合するための吸着剤を備えている。この実施形態においては、試料をプローブ上の第1の吸着剤に曝露し、これを次に溶離剤で洗浄する。第1の吸着剤に結合しないマーカは溶離剤によって除去される。該画分内にあるマーカを、プローブ上の第2の吸着剤に曝露するといった具合である。気相イオン分析器のプローブ上で逐次抽出を行う利点は、逐次抽出法の各段階で様々な吸着剤に結合するマーカを、気相イオン分析器を用いて直接分析できることにある。

30

#### 【0083】

さらに別の実施形態において、試料中のバイオマーカを、たとえば一次元または二次元ゲル電気泳動などの高解像度の電気泳動によって分離してもよい。マーカを含んだ画分を単離して、気相イオン分光法によってさらに分析することもできる。好ましくは、二次元ゲル電気泳動を用いて、1つ以上のマーカを含むバイオマーカのスポットの二次元アレイを作成する。たとえば、JungblutとThiede, Mass Spec tr. Rev. 16: 145~162 (1997)を参照のこと。

40

#### 【0084】

二次元ゲル電気泳動は、当該技術分野において周知の方法を用いて行うとよい。たとえば、Deutscher編「Methods In Enzymology」第182巻を参照のこと。典型的には、試料中のバイオマーカを、たとえば、等電点分離によって分離するが、この場合、試料中のバイオマーカは、その正味荷電がゼロになるスポット（すなわち、等電点）に至るまで、pH勾配中で分離される。この第1の分離工程によっ

50

て、バイオマーカーの一次元アレイが得られる。一次元アレイ中のバイオマーカーは、第1の分離工程において用いられる技術とは一般に異なる技術を用いてさらに分離される。たとえば、二次元においては、等電点分離によって分離されたバイオマーカーは、ドデシル硫酸ナトリウム存在下でのポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)など、ポリアクリルアミドゲルを用いてさらに分離される。SDS-PAGEゲルにより、バイオマーカーの分子量に基づいたさらなる分離が行える。典型的には、二次元ゲル電気泳動は、複合混合物中の分子量範囲1000~200,000Daの化学的に異なるバイオマーカーを分離することができる。

#### 【0085】

二次元アレイ中のバイオマーカーは、当該技術分野において知られる任意の適切な方法を用いて検出することができる。たとえば、ゲル中のバイオマーカーを標識または染色(たとえばクマシーブルー染色または銀染色)してもよい。ゲル電気泳動によって、本発明の1つ以上のマーカーの分子量に対応するスポットが生じた場合には、そのスポットをデンストメトリー分析または気相イオン分光法によってさらに分析してもよい。たとえば、スポットをゲルから切り出して、気相イオン分光法によって分析してもよい。あるいは、電界をかけることにより、バイオマーカーを含んだゲルを不活性膜に移しとつてもよい。次に、あるマーカーの分子量にほぼ対応する膜上のスポットを気相イオン分光法によって分析してもよい。気相イオン分光法において、スポットは、MALDIまたはSELDIなどの任意の適切な技術を用いて分析することができる。

10

#### 【0086】

気相イオン分光法に先だって、スポット内のバイオマーカーをプロテアーゼ(たとえばトリプシン)などの切断試薬を用いてより小さな断片に切断することが望ましいかもしれない。バイオマーカーをより小断片に消化することにより、スポット内のバイオマーカーの質量フィンガープリントが得られ、これを必要に応じてマーカーを同定するために用いることができる。

20

#### 【0087】

さらに別の実施形態において、高速液体クロマトグラフィ(HPLC)を用いて、試料中のバイオマーカーの混合物を、様々な物理的特性、たとえば、極性、電荷およびサイズに基づいて分離してもよい。HPLC機器は、典型的には、移動相のリザーバーと、ポンプと、インジェクタと、分離カラムと、検出器とで構成される。試料中のバイオマーカーは、試料のアリコートのカラムに注入することによって分離される。混合物中の種々のバイオマーカーは、移動液相と固定相の間での分配挙動の違いによって、カラムを異なる速度で通過する。1つ以上のマーカーの分子量および/または物理的特性に対応する画分を回収することができる。この画分を気相イオン分光法によって分析して、マーカーを検出することができる。

30

#### 【0088】

任意選択で、マーカーの解像度を高め、同一性を確定するために、分析前にマーカーを修飾してもよい。たとえば、分析前にマーカーをタンパク質分解により消化してもよい。任意のプロテアーゼを用いることができる。マーカーを別個の複数の断片に切断すると思われるトリプシンなどのプロテアーゼが特に有用である。消化によって得られる断片は、マーカーのフィンガープリントとして機能することにより、間接的にマーカーの検出を可能にする。このことは、問題とするマーカーにとって紛らわしい類似の分子量を有するマーカーが存在する場合に特に有用である。また、タンパク質分解による断片化は、高分子量のマーカーに対して有用であるが、これは、小さいマーカーほど質量分析により解析し易いためである。別例において、バイオマーカーを、検出解像度を高めるために修飾してもよい。たとえば、ノイラミニダーゼを用いて糖タンパク質から末端のシアル酸を除去して、アニオン性吸着剤への結合を高め、検出の解像度を高めるようにしてもよい。別例において、マーカーを、マーカー分子に特異的に結合してさらに目立たせる特定の分子量のタグを付加することによって修飾してもよい。任意選択で、このような修飾マーカーを検出した後、該修飾マーカーの物理的および化学的特性をタンパク質データベース(たとえ

40

50

ば、SwissProt)にマッチングさせることにより、マーカーの同一性をさらに確定してもよい。

#### 【0089】

調製後、試料中のバイオマーカーは、一般的には検出のために基材上に捕捉される。伝統的な基材には、抗体でコーティングした96ウェルプレートまたはニトロセルロース膜があり、該プレートまたは膜について、その後タンパク質の有無を調べる。好ましくは、バイオマーカーは、上述のようなイムノアッセイを用いて同定される。しかしながら、好ましい方法には、バイオチップの使用も含まれる。好ましくは、バイオチップは、タンパク質の捕捉および検出のためのタンパク質バイオチップである。多くのタンパク質バイオチップが、当該技術分野において報告されている。そのようなものとして、たとえば、パ  
10 ッカードバイオサイエンスカンパニー(Packard BioScience Company)(米国コネチカ  
ット州メリデン)、ザイオミクス(Zyomyx)(米国カリフォルニア州ヘイワード)およびフ  
ィロス(Phylos)(米国マサチューセッツ州レキシントン)製のタンパク質バイオチップ  
がある。一般に、タンパク質バイオチップは、表面を有した基材を含む。捕捉試薬または  
吸着剤は、この基材表面に付加される。表面は、複数の位置指定可能な場所を含むことも  
多く、そのそれぞれの場所に捕捉試薬が結合している。捕捉試薬は、ポリペプチドまたは  
核酸などの生物分子であって特異的な様式で他のバイオマーカーを捕捉するものであつて  
もよい。あるいは、捕捉試薬は、アニオン交換材料または親水性材料などのクロマトグラ  
フィ材料であつてもよい。このようなタンパク質バイオチップの例が、以下の特許または  
特許出願明細書に記載されている。すなわち、米国特許第6,225,047号(Hut  
20 chensおよびYip,「Use of retentate chromatography to generate difference maps」、2001年5  
月1日)、国際出願公開公報第99/51773号(KuimelisとWagner,「Addressable protein arrays」、1999年10月14日)、  
国際出願公開公報第00/04389号(Wagnerら、「Arrays of  
protein-capture agents and methods of use  
thereof」、2000年7月27日)、国際出願公開公報第00/56934  
号(Englertら、「Continuous porous matrix arrays」、2000年9月28日)である。

#### 【0090】

一般に、バイオマーカーを含んだ試料は、バイオチップの作用面に結合させるのに十分  
な時間おかれる。次に、結合していない分子を適切な溶離剤を用いて表面から洗い流す。  
一般に、溶離剤がストリンジェント(厳密)であればあるほど、より緊密に結合したタン  
パク質が洗浄後も保持されることになる。このようにして保持されたタンパク質バイオマ  
ーカーを、適切な手段によって検出できることになる。

#### 【0091】

タンパク質バイオチップの表面上に捕捉された検体は、当該技術分野において知られる  
任意の方法によって検出することができる。該方法には、たとえば、質量分析、蛍光法、  
表面プラスモン共鳴、偏光解析法、および原子間力顕微鏡法が含まれる。質量分析、およ  
び特にSELDI質量分析は、本発明のバイオマーカーの検出に特に有用な方法である。  
40

#### 【0092】

好ましくは、レーザー脱離飛行時間型質量分析計を本発明の実施形態において用いる。  
レーザー脱離質量分析においては、マーカーを含んだ基材またはプローブを注入系に導入  
する。マーカーは、イオン化源からのレーザーによって脱離され、イオン化されて気相に  
入る。発生したイオンは、イオン光学アセンブリによって回収され、次に飛行時間型質量  
分析計において、短い高圧電界を通してイオンが加速され、高真空チャンバ内に流れ込む。  
高真空チャンバの遠端において、加速されたイオンが、異なる時間に、高感度検出器の  
表面に衝突する。飛行時間は、イオンの質量の関数であるので、イオン形成とイオン検出  
器への衝突との間の経過時間を用いて、特定の質量対電荷比を有するマーカーの有無を確  
認することができる。

10

20

30

40

50

## 【0093】

マトリックス支援レーザー脱離/イオン化質量分析、すなわちMALDI-MSは、プローブ表面からタンパク質を無傷で脱離させるためのエネルギー吸収分子(マトリックスと呼ばれることも多い)を用いることを伴う質量分析法である。MALDIは、たとえば、米国特許第5,118,937号(Hillenkampら)および米国特許第5,045,694号(BeavisとChait)に記載されている。MALDI-MSにおいて、試料は典型的には、マトリックス材料と混合されてから、不活性プローブの表面に置かれる。エネルギー吸収分子としては、たとえば、ケイ皮酸誘導体、シナピン酸(「SPA」)、シアノヒドロキシケイ皮酸(「CHCA」)およびジヒドロキシ安息香酸などが挙げられる。他の適切なエネルギー吸収分子は、当業者には周知である。マトリックスが乾燥すると、検体分子を内包した結晶が形成される。次に、検体分子をレーザー脱離/イオン化質量分析によって検出する。MALDI-MSは、上述の調製方法を用いて試料の複雑性が実質的に低減されている場合には、本発明のバイオマーカーの検出に有用である。

10

## 【0094】

表面増強レーザー脱離/イオン化質量分析、すなわちSELDI-MSは、MALDIに比べて、複合混合物中のタンパク質などの生物分子の分画および検出に関して改良されている。SELDIは、捕捉試薬を結合させたタンパク質バイオチップの表面上に、タンパク質などの生物分子を捕捉する質量分析法である。典型的には、結合しなかった分子は、検査の前にプローブ表面から洗い流される。SELDIは、たとえば、米国特許第5,719,060号(「Method and Apparatus for Desorption and Ionization of Analytes」、HutchensとYip、1998年2月17日)、米国特許第6,225,047号(「Use of Retentate Chromatography to Generate Difference Maps」、HutchensとYip、2001年5月1日)およびR.A.Meyers編「Encyclopedia of Analytical Chemistry」の中のWeinbergerらの「Time-of-flight mass spectrometry」、11915~11918頁、ジョンワイリーアンドサンズ、Chichester、2000年に記載されている。

20

## 【0095】

基材表面上のマーカーは、気相イオン分光法を用いて脱離およびイオン化することができる。基材上のマーカーを解析しうるあらゆる適切な気相イオン分析器を用いることができる。気相イオン分析器が、マーカーの定量も可能であることが好ましい。

30

## 【0096】

一実施形態において、気相イオン分析器は質量分析計である。典型的な質量分析計において、表面にマーカーを有する基材またはプローブを、質量分析計の注入系に導入する。次にマーカーを、レーザー、高速原子衝撃、高エネルギープラズマ、エレクトロスプレーイオン化、サーモスプレーイオン化、液体二次イオン質量分析、電界脱離などの脱離源によって脱離させる。発生した、脱離し揮発した分子種は、脱離事象の直接的結果としてイオン化された既成のイオンまたは中性粒子からなる。発生したイオンはイオン光学アセンブリによって回収され、質量分析計によって通過するイオンが分散され分析される。質量分析計を退出するイオンを検出器によって検出する。次に検出器は、検出したイオンの情報を、質量対電荷比に変換する。マーカーまたは他の物質の存在の検出には、典型的には、シグナル強度の検出が伴うことになる。このことが、ひいては、基材に結合したマーカーの量と特性を反映しうることになる。質量分析計のあらゆる部品(たとえば、脱離源、質量分析器、検出器など)は、本発明の実施形態においては、本明細書中に記載の適切な他の部品または当該技術分野において知られる他のものと組み合わせることができる。

40

## 【0097】

別の実施形態において、試料中のマーカーを検出して分析するためにイムノアッセイを用いてもよい。この方法は、(a)マーカーに特異的に結合する抗体を提供する工程と、

50

(b) 試料を前記抗体と接触させる工程と、(c) 抗体が試料中のマーカ-に結合した複合体の存在を検出する工程とを含む。

【0098】

マーカ-に特異的に結合する抗体を調製するために、精製したマーカ-またはその核酸配列を用いてもよい。マーカ-の核酸配列およびアミノ酸配列は、当該マーカ-のさらなる解析によって得ることができる。たとえば、各マーカ-を、複数の酵素(たとえば、トリプシン、V8プロテアーゼなど)でペプチドマッピング解析してもよい。各マーカ-からの消化断片の分子量を用いて、SwissProtデータベースなどのデータベースから、様々な酵素によって生じた消化断片の分子量と一致する配列を検索してもよい。この方法を用いて、他のマーカ-の核酸およびアミノ酸配列についても、これらのマーカ-がデータベース中の既知のタンパク質である場合には、同定することが可能である。

10

【0099】

あるいは、プロテインラダーシーケンシング法を用いてタンパク質を配列決定してもよい。タンパク質のラダーは、たとえば、該タンパク質分子を断片化し、該断片を酵素消化するか、または断片の端部からアミノ酸を順次一つずつ除去していく他の方法を行うことによって生成させることができる。タンパク質ラダーの調製方法は、たとえば、国際出願公開公報第93/24834号(Chaitら)および米国特許第5,792,664号(Chaitら)に記載されている。次にラダーを質量分析によって分析する。ラダー断片の質量の違いから、分子の端部から除去されたアミノ酸を同定する。

【0100】

マーカ-がデータベース中で知られていないタンパク質である場合には、該マーカ-のアミノ酸配列の少なくとも一部の情報を用いて、核酸およびアミノ酸配列を決定することができる。たとえば、マーカ-のN末端アミノ酸配列に基づいて縮重プローブを作成してもよい。これらのプローブを用いて、マーカ-が最初に検出された試料から作成したゲノムライブラリーまたはcDNAライブラリーをスクリーニングするとよい。陽性のクローンを同定し、増幅し、該クローンの組換えDNA配列を周知の技術を用いてサブクローニングしてもよい。たとえば、「Current Protocols for Molecular Biology」(Ausubelら, Green Publishing Assoc. and Wiley-Interscience, 1989年)および「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」第3版(Sambrookら, Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 2001年)を参照のこと。

20

30

【0101】

精製マーカ-またはその核酸配列を用いて、マーカ-に特異的に結合する抗体を、当該技術分野において知られる任意の適切な方法を用いて作成してもよい。たとえば、Coligan著「Current Protocols in Immunology」(1991年); Harlow & Lane著「Antibodies: A Laboratory Manual」(1988年); Goding著「Monoclonal Antibodies: Principles and Practice」(第2版、1986年); およびKohler & Milstein, Nature 第256巻、p. 495~497(1975年)を参照のこと。このような技術としては、限定はされないが、たとえば、ファージまたは類似のベクター中の組換え抗体ライブラリーから抗体を選択することによる抗体調製法、ならびに、ウサギまたはマウスを免疫することによるポリクローナルおよびモノクローナル抗体の調製法(たとえば、Huseら, Science 第246巻、p. 1275~1281(1989年); Wardら, Nature 第341巻、p. 544~546(1989年)を参照)が挙げられる。

40

【0102】

抗体が用意された後に、当該技術分野において知られる任意の適切な免疫学的結合アッセイを用いてマーカ-を検出および/または定量してもよい(たとえば、米国特許第4,366,241号; 同第4,376,110号; 同第4,517,288号、および同第

50

4, 837, 168号)。有用なアッセイとしては、たとえば、酵素結合免疫反応吸着測定法(ELISA)などの酵素イムノアッセイ(EIA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)、ウェスタンブロット分析、またはスロットブロット分析が挙げられる。これらの方法は、たとえば、「Methods in Cell Biology: Antibodies in Cell Biology」第37巻(Asai編、1993年)；「Basic and Clinical Immunology」(Stites & Terr編、第7版、1991年)；および前掲のHarlow & Laneにも記載されている。

#### 【0103】

一般に、被験者から得た試料を、マーカーに特異的に結合する抗体と接触させるとよい。任意選択で、試料に接触させる前に抗体を固体支持体に固定して、複合体の洗浄とそれに続く単離をし易くしてもよい。固体支持体の例としては、たとえば、マイクロタイタープレート、スティック、ビーズまたはマイクロビーズなどの形態のガラスまたはプラスチックが挙げられる。抗体を、上述のようなプローブ基材またはProtein Chip(商標)アレイに結合させてもよい。試料は好ましくは、被験者から採取した体液試料である。体液試料の例としては、たとえば、脳脊髄液、血液、血清、血漿、尿、涙、唾液などが挙げられる。好ましい実施形態において、体液は血清からなる。試料は、試料を抗体に接触させる前に適切な溶離剤で希釈してもよい。

10

#### 【0104】

試料を抗体とともにインキュベートした後、混合物を洗浄し、形成された抗体マーカー複合体を検出することができる。検出は、洗浄した混合物を検出試薬とともにインキュベートすることによって行ってもよい。検出試薬は、たとえば、検出可能なラベルで標識した二次抗体であってもよい。検出可能なラベルとしては、たとえば、磁気ビーズ(たとえばDYNABEADS(商標))、蛍光色素、放射性ラベル、酵素(たとえば、セイヨウウワサビエルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼおよびELISAにおいて一般に用いられる他のもの)、および金コロイドや着色されたガラスまたはプラスチックのビーズなどの発色性ラベルが挙げられる。あるいは、試料中のマーカーは、間接アッセイを用いて検出してもよいし、かつ/または競合アッセイもしくは阻害アッセイで検出してもよい。間接アッセイは、第2の標識抗体を用いて、結合したマーカー-特異抗体を検出し、競合または阻害アッセイにおいては、たとえば、マーカーの明確なエピトープと結合するモノクローナル抗体を混合物と同時にインキュベートする。

20

30

#### 【0105】

アッセイ全体を通して、各試薬を混合した後インキュベーション、および/または洗浄工程が必要であるかもしれない。インキュベーション工程は、約5秒~数時間、好ましくは約5分~約24時間の間で変えることができる。しかしながら、インキュベーション時間は、アッセイの様式、マーカー、溶液の体積、濃度などに依存して変化しうる。アッセイは、10~40などのある一定温度範囲で行えるが、通常は周囲温度において実施される。

#### 【0106】

イムノアッセイは、試料中のマーカーの有無ならびに試料中のマーカーの量を調べるために用いることができる。最初に、試料中のマーカーの試験量を、上述のイムノアッセイ法を用いて検出することができる。マーカーが試料中に存在する場合は、マーカーは、上述の適切なインキュベーション条件下において該マーカーに特異的に結合する抗体とともに、抗体-マーカー複合体を形成する。抗体-マーカー複合体の量は、標準品と比較することによって決定することができる。標準品は、たとえば、既知の化合物または試料中に存在することが分かっている別のタンパク質とすることができる。上述したように、マーカーの試験量は、測定単位量を対照と比較することができさえすれば、絶対単位で測定する必要はない。

40

#### 【0107】

試料中のこれらのマーカーの検出方法は、多くの用途を有している。たとえば、糖尿病

50

および/または糖尿疾患の診断を補助するために、1つ以上のマーカーを測定してもよい。別例において、マーカーの検出方法を、治療に対する被験者の反応をモニタするために用いてもよい。別例において、マーカーの検出方法を、*in vivo*または*in vitro*における上記マーカーの発現を調節する化合物をアッセイまたは同定するために用いることもできる。

【0108】

マーカーの脱離および検出によって生成するデータは、任意の適切な手段を用いて解析することができる。一実施形態では、データを、プログラム可能なデジタルコンピュータを用いて解析する。コンピュータプログラムは一般に、コードを格納する読み取り可能な媒体を含んでいる。あるコードを、プローブ上の各フィーチャの場所と、当該フィーチャにおける吸着剤の正体と、吸着剤を洗浄するために用いる溶出条件とを記憶するように割り当ててもよい。コンピュータは、入力として、プローブ上の特定の位置指定可能な場所から受信した様々な分子量におけるシグナルの強度に関するデータを受信するコードを含んでいる。このデータは、各マーカーによって生じたシグナルの強度を含めて、検出されるマーカーの数を表すものであってもよい。

10

【0109】

データ解析は、検出されたマーカーのシグナル強度（たとえば、ピークの高さ）を測定することと、「異常値」（所定の統計的分布から外れたデータ）を除去することを含んでもよい。観測ピークを正規化、すなわち、何らかの基準に対する各ピークの高さを計算する処理を行ってもよい。たとえば、基準を、機器および化学物質（たとえば、エネルギー吸収分子）によって生じるバックグラウンドノイズとして、これを目盛りのゼロに設定してもよい。そして、各マーカーまたは他の生物分子に対して検出されたシグナル強度を、所望の目盛り（たとえば100）における相対強度の形で表すことができる。あるいは、標準品（たとえば、血清タンパク質）を試料とともに含め、該標準品からのピークを基準として各マーカーまたは他の検出されたマーカーについて観測されたシグナルの相対強度を計算してもよい。

20

【0110】

コンピュータは、得られたデータを表示ための様々なフォーマットに変換することができる。「スペクトル図または保持物マップ」と呼ばれる1つのフォーマットにおいて、標準スペクトル図を表示することができるが、この図は、それぞれの特定の分子量で検出器に達するマーカーの量を表すものである。「ピークマップ」と呼ばれる別のフォーマットにおいては、ピークの高さと質量の情報のみがスペクトル図から留保されてより明確な像を与え、ほぼ同一の分子量を有するマーカーをより見やすくしている。「ゲル図」と呼ばれるさらに別のフォーマットにおいては、ピーク図からの各質量は、各ピークの高さに基づいたグレースケール画像に変換することができ、電気泳動ゲル上のバンドと類似した様相が得られる。「3Dオーバーレイ」と呼ばれるさらに別のフォーマットにおいては、いくつかのスペクトルを重ねて、相対ピーク高の微妙な変化を調べることもできる。「差異マップ図」と呼ばれるさらに別のフォーマットにおいて、2つ以上のスペクトルを比較して、ユニークなマーカーおよび試料間でアップレギュレートまたはダウンレギュレートされているマーカーを都合よく強調するようにしてもよい。任意の2つの試料からのマーカーのプロファイル（スペクトル）を視覚的に比較してもよい。さらに別のフォーマットにおいて、検出されたマーカーをプロット図の点としてプロットし、プロットの一方の軸が検出されたマーカーの見かけの分子量を表し、他方の軸が検出されたマーカーのシグナル強度を表すようなSpotfire（登録商標）Scatter Plotを用いてもよい。各試料に対して、検出されたマーカーと、試料中に存在するマーカーの量とをコンピュータ読み取り可能な媒体中に保存するとよい。このデータを対照（たとえば、糖尿病による害が検出されない健常な被験者などの対照において検出されたマーカーのプロファイルまたは量）と比較するとよい。

30

40

【0111】

[1型糖尿病と2型糖尿病の診断と差異]

50

別の態様において、本発明は、1つ以上のマーカーを用いて、1型糖尿病、2型糖尿病および/または糖尿疾患の診断を助ける方法を提供する。たとえば、表1に示した患者から同定したタンパク質、そのペプチド、断片または誘導体である。これらのマーカーは、単独で用いてもよいし、他のマーカーと一緒に任意の組として組み合わせて用いてもよい。マーカーは、たとえば1型患者などのヒト患者の試料中と、糖尿病が検出されない正常な被験者の試料中とで示差的に存在する。たとえば、マーカーのいくつかは、正常な被験者と比べて、1型糖尿病、2型糖尿病および/または糖尿疾患を有するヒト患者において高レベルで発現されるか、該患者において高頻度で存在するかのうち少なくともいずれかである。したがって、1つ以上の上記マーカーをヒトにおいて検出することによって、その人が1型糖尿病か2型糖尿病か、かつ/または糖尿疾患に罹患している可能性に関する有用な情報が提供されると考えられる。糖尿病のバイオマーカーの例としては、限定はされないが、アディポネクチン、レプチン、グレリン、レシチン、インスリンに対する自己抗体、グルタミン酸デカルボキシラーゼに対する自己抗体、IL-2に対する自己抗体、IA-2に対する自己抗体、インクレチン、TNF- $\alpha$  およびIL-6、それらの断片、バリエーション、または任意の組み合わせが挙げられる。

10

#### 【0112】

好ましい実施形態において、アディポネクチンおよびレプチンの血清濃度を、身体測定パラメータおよび病状と関連づける多変数分析を行う。たとえば、表1を参照のこと。具体的には、1型糖尿病は複数の因子の臨床評価によって診断したが、該因子には、病状履歴（たとえば、多飲症、多食症、多尿症）、体重減少、BMI、ケトアシドーシス、および1型糖尿病関連自己抗体（後述）の存在が含まれる。小児2型糖尿病の場合には、履歴（たとえば、2型糖尿病の家族歴）、病状履歴、身体データ（たとえば、BMI、家系、黒色表皮症）、および、1型糖尿病関連自己抗体が無いことなどの実験室データによって、診断を行った（Kaufman F. Rev Endocr. Metab. Disord. 4: 33~42, 2003）。すべての健常な対照被験者も自己抗体について陰性であった。

20

#### 【0113】

好ましい実施形態において、統計学的解析は、GraphPad Prism（商品名）4.0（カリフォルニア州サンディエゴ所在のGraphPad）を用いて、Fisherの抽出試験、受診者動作特性（ROC）解析、直線回帰、t検定、またはDunnの事後検定を伴うANOVA（Kruskal-Wallis）分析によって行った。P<0.05を有意とした。ROCプロットは、1型糖尿病被験者を2型糖尿病被験者と比較して作成し（すなわち、ROC曲線下面積0.969 [95%CI 0.93~1.00]；P<0.0001）、アディポネクチン対レプチン比に対する適切なカットオフ値を決定した（図5）。カットオフ比<0.9において、感度は100%（範囲80~100%）であり、1型糖尿病とは対照的に2型糖尿病の特異度は80%（65~91%）であった。カットオフ比<0.7においては、感度は88%（64~99%）であり、特異度は90%（77~97%）であった。

30

#### 【0114】

したがって、本発明の実施形態は、1つ以上のマーカーを用いて1型糖尿病、2型糖尿病および/または糖尿疾患の診断を助けるための方法を含み、該方法は、(a)試料中の少なくとも1つのマーカーを検出する工程と、該マーカーはアディポネクチン、レプチン、そのペプチド、断片および誘導体であることと、(b)マーカーの検出を1型糖尿病、2型糖尿病および/または糖尿疾患の推定診断と関連づけることとを含む。この関連づけでは、試料中のマーカーの量を、（たとえば、糖尿病が検出されない正常な被験者中の）マーカーの対照量と比較して（マーカーのアプレギュレーションまたはダウンレギュレーションを）考慮してもよい。この関連づけでは、試験試料中のマーカーの有無ならびに対照における同じマーカーの検出頻度を考慮してもよい。この関連づけでは、被験者が1型糖尿病、2型糖尿病および/または糖尿疾患を有するかどうか、ならびに病気の重症度の判定を容易にするために、上記の両方の因子を考慮してもよい。

40

50

## 【0115】

マーカーを検出するために、被験者から任意の適切な試料を得ることができる。好ましくは、試料は被験者からの血清試料である。必要ならば、試料を、上述のように、マーカーの検出能を強化するように調製してもよい。たとえば、マーカーの検出能を高めるためには、被験者からの血液血清試料を、たとえば、Cibacron（登録商標）ブルーアガロスクロマトグラフィおよび一本鎖DNAアフィニティークロマトグラフィ、アニオン交換クロマトグラフィなどによって、分画することが好ましいかもしれない。予備的分画法などの試料の調製は、任意選択可能であり、使用する検出方法によっては、マーカーの検出能を高めるためには必要でないこともある。たとえば、マーカーに特異的に結合する抗体を用いて、試料中にマーカーが存在することを検出する場合には、試料の調製は必要でないかもしれない。

10

## 【0116】

試料中のマーカーを検出するためには、任意の適切な方法を用いることができる。たとえば、イムノアッセイまたは気相イオン分光法を上述のように用いることができる。これらの方法を用いて、1つ以上のマーカーを検出することができる。好ましくは、複数のマーカーが存在するかどうかについて試料を調べる。単一のマーカーよりも、複数のマーカーの存在が検出されるほうが、診断者により多くの情報が提供されることになる。具体的には、試料中で複数のマーカーを検出することにより、真陽性と真陰性の診断の比率（%）が上がり、偽陽性または偽陰性の診断の比率が下がることになると思われる。

## 【0117】

次にマーカーの検出を、1型糖尿病、2型糖尿病および/または糖尿疾患の推定診断と関連づける。いくつかの実施形態において、マーカーの定量を行わずにマーカーの有無を検出するだけで有用であり、1型糖尿病、2型糖尿病および/または糖尿疾患の推定診断と関連づけることができる。たとえば、アディポネクチン、レプチン、そのタンパク質、断片または誘導体が、正常な被験者よりも、1型糖尿病、2型糖尿病および/または糖尿疾患の患者においてより頻繁に検出されるかもしれない。

20

## 【0118】

別の実施形態において、マーカーの検出には、1型糖尿病、2型糖尿病および/または糖尿疾患の推定診断、1型糖尿病、2型糖尿病および/または糖尿疾患の重症度などとマーカーの検出とを関連づけるためのマーカーの定量を含んでもよい。したがって、被験者において検出されるマーカーの量が対照量よりも高ければ、当該被験者は1型糖尿病、2型糖尿病および/または糖尿疾患を有する可能性が高いことになる。

30

## 【0119】

同様に、別の実施形態において、マーカーの検出には、1型糖尿病、2型糖尿病および/または糖尿疾患の推定診断、1型糖尿病、2型糖尿病および/または糖尿疾患の重症度などとマーカーの検出とを関連づけるために、マーカーを定量することをさらに伴ってもよく、この場合、該マーカーは正常な被験者の血清試料中よりも、患者の血清試料中において存在する量が少ない。したがって、被験者において検出されたマーカーの量が対照量よりも少なければ、該被験者は1型糖尿病、2型糖尿病および/または糖尿疾患を有している可能性がより高いことになる。

40

## 【0120】

マーカーを定量する場合、対照と比較するとよい。対照は、たとえば、1型糖尿病、2型糖尿病および/または糖尿疾患が検出されない正常な被験者の同等の試料中に存在するマーカーの平均量または中間量などとして行うことができる。対照量は、試験量を測定する際と同一または実質的に同じ実験条件下で測定する。たとえば、試験試料を被験者の血清試料から得、マーカーを特定のプローブを用いて検出する場合には、該マーカーの対照量は、同じプローブを用いて患者の血清試料から測定することが好ましい。マーカーの対照量は、集団内におけるマーカー量の変動を反映するように、1型糖尿病、2型糖尿病および/または糖尿疾患を有しない正常な被験者由来のかなりの数の試料に基づいて決定することが好ましい。

50

## 【0121】

質量分析によって生成されるデータを、コンピュータソフトウェアによって解析してもよい。ソフトウェアは、質量分析計からのシグナルをコンピュータで読み取り可能な形態に変換するコードを含んでいてもよい。ソフトウェアは、シグナルが、本発明のマーカ―または他の有用なマーカ―に対応するシグナル中の「ピーク」を表すかどうかを判定するために、シグナルの解析にアルゴリズムを適用するコードを含んでいてもよい。ソフトウェアは、試験試料からのシグナルを、「正常」およびヒト1型糖尿病、2型糖尿病および/または糖尿疾患に特徴的な典型的シグナルと比較し、2つのシグナル間の一致の度合を判定するアルゴリズムを実行するコードを含んでいてもよい。ソフトウェアは、試験試料が最も近いものを示し、推定診断を与えるコードを含んでいてもよい。

10

## 【0122】

[1型糖尿病および2型糖尿病のバイオマ―を検出するための抗体の作製]

1型糖尿病、2型糖尿病および/または糖尿疾患の患者における試料から得られるバイオマ―は、上述のように調製することができる。さらに、糖尿病のバイオマ―を酵素的に消化して、ペプチドがタンパク質全体かに存在しうる異なる抗原エピトープに対する抗体を産生するために、バイオマ―の断片またはペプチドを得てもよい。抗原エピトープは、たとえば、エピトープに特異的に結合するモノクローナル抗体などの抗体を産生させるために有用である。抗原エピトープは、イムノアッセイにおける標的分子として使用することができる(たとえば、Wilsonら, Cell 37:767~778 (1984); Sutcliffeら, Science 219:660~666 (1983)を参照のこと)。

20

## 【0123】

糖尿病バイオマ―のエピトープは、たとえば、当該技術分野において周知の方法によって抗体を誘導するために用いることができる(たとえば、前掲のSutcliffeらの文献;前掲のWilsonらの文献;Chowら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:910~914;およびBittleら, J. Gen. Virol. 66:2347~2354 (1985)を参照のこと)。1つ以上の免疫原性エピトープを含む糖尿病ポリペプチドは、アルブミンなどのキャリアタンパク質とともに、動物系(ウサギまたはマウスなど)に対して抗体反応を誘発するように提供してもよいし、または、ポリペプチドが十分な長さである場合(少なくとも約25アミノ酸)、該ポリペプチドをキャリアなしで提供してもよい。しかしながら、わずか8~10アミノ酸からなる免疫原性エピトープでも、最低限、変性したポリペプチド内の線状に伸びたエピトープ(たとえば、ウエスタンブロッティング)に結合できる抗体を産生させるのには十分であることがわかっている。

30

## 【0124】

本発明のエピトープ担持ポリペプチドを用いて、限定するものではないが、例えばin vivo免疫化、in vitro免疫化、およびファージ提示法などの当該技術分野において周知の方法に従って抗体を誘導してもよい。たとえば、前掲のSutcliffeらの文献;前掲のWilsonらの文献、およびBittleら, J. Gen. Virol., 66:2347~2354 (1985)を参照のこと。in vivo免疫化を用いる場合、動物を遊離のペプチドで免疫してもよいが、該ペプチドをキーホールリンペットヘマシアニン(KLH)または破傷風トキソイドなどのマクロ分子担体にカップリングすることによって、抗ペプチド抗体の力価を高めてもよい。たとえば、システイン残基を含むペプチドを、マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(MBS)などのリンカーを用いて担体にカップリングしてもよいし、他のペプチドを、グルタルアルデヒドなどのより一般的な連結剤を用いて担体にカップリングしてもよい。たとえば、ウサギ、ラット、およびマウスなどの動物を、遊離ペプチドまたは担体にカップリングしたペプチドのいずれかを用いて、約100 $\mu$ gのペプチドまたは担体タンパク質と、フロイントアジュバントまたは免疫応答を刺激することが知られている他の任意のアジュバントとを含むエマルジョンを、腹腔内および/または皮内注射することにより免疫す

40

50

る。たとえば固体表面に吸着された遊離のペプチドを用いたELISAアッセイによる検出が可能な、有用な抗ペプチド抗体力価を得るために、たとえば、約2週間間隔などで、何度かのブースター注射が必要かもしれない。免疫した動物からの血清中の抗ペプチド抗体の力価は、抗ペプチド抗体の選択によって、たとえば、当該分野において周知の方法で固体支持体上にペプチドを吸着して選択された抗体を溶出することによって高めてもよい。

#### 【0125】

糖尿病バイオマーカーのエピトープの核酸を、エピトープタグ（たとえば、ヘマグルチニン（「HA」）タグまたはフラッグタグ）として関心の高い遺伝子に組換えにより結合して、発現したポリペプチドの検出および精製を助けるようにしてもよい。たとえば、Janknechtらによって報告された系は、ヒト細胞株において発現された非変性の融合タンパク質の即時精製を可能にする（Janknechtら、1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 8972~897）。この系においては、目的遺伝子のオープンリーディングフレームが6つのヒスチジン残基からなるアミノ末端タグに翻訳可能な状態で融合されるように、該遺伝子をワクシニア組換えプラスミドにサブクローニングする。上記タグは、該融合タンパク質のマトリックス結合ドメインとして機能する。組換えワクシニアウイルスに感染した細胞からの抽出物を $Ni^{2+}$  ニトリロ酢酸-アガロースカラムに流すと、ヒスチジントグを有したタンパク質をイミダゾール含有バッファによって選択的に溶出することができる。

#### 【0126】

本発明の抗体は、当該技術分野において知られる任意の適切な方法によって作製することができる。本発明の抗体は、ポリクローナル抗体を含んでなるものであってよい。ポリクローナル抗体の調製方法は、当業者にとって周知である（Harlow, 著「Antibodies: A Laboratory Manual」第2版（1988年）、コールドスプリングハーバースプレス（Cold Spring Harbor Laboratory Press）（その全体を参照により本願に組み込む）。たとえば、本発明のポリペプチドを、限定はされないが、ウサギ、マウス、ラットなどを含む様々な宿主動物に投与して、該抗原に特異的なポリクローナル抗体を含んだ血清の産生を誘導することができる。本発明のポリペプチドの投与には、免疫剤と、必要であればアジュバントとを1回以上注射することを伴うものであってよい。宿主生物種に応じて、免疫応答を高めるために様々なアジュバントを用いることが可能であり、アジュバントには、限定はされないが、フロイントの（完全または不完全）アジュバント、水酸化アルミニウムなどのミネラルゲル、リゾレシチンなどの表面活性物質、ブルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、オイルエマルジョン、キーホールリンペットヘモシアニン、ジニトロフェノール、ならびに、BCG（カルメット・ゲラン桿菌）およびコリネバクテリウム・パルバム（*Corynebacterium parvum*）などの潜在的に有用なヒトアジュバントが含まれる。このようなアジュバントも当該技術分野において周知である。本発明の目的のために、「免疫剤」は、本発明のポリペプチドとして定義することができ、免疫剤には、本発明のポリペプチドの断片、バリエーションおよび/または誘導體、ならびに、本発明のポリペプチドの異種ポリペプチドとの融合体や本明細書にも記載するような他の形態も含まれる。

#### 【0127】

典型的には、免疫剤および/またはアジュバントを、複数回の皮下または腹腔内注射によって哺乳動物に注射するが、筋肉内および/または静脈内に投与してもよい。免疫剤は、本発明のポリペプチドまたはその融合体またはバリエーションを含んでいてもよい。ポリペプチドの性質（すなわち、疎水性率、親水性率、安定性、正味電荷、等電点など）に応じて、免疫剤を、免疫する哺乳動物中で免疫原性を有することが知られているタンパク質と結合させることが有用であるかもしれない。このような結合には、共有結合が形成されるように、本発明のポリペプチドと免疫原性タンパク質との両方に活性な化学官能基を導入する化学結合、または融合タンパク質に基づく方法による結合、または当業者に周知の他の方法による結合が含まれる。このような免疫原性タンパク質としては、限定はされない

10

20

30

40

50

が、たとえば、キーホールリンペットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシチログロブリン、および大豆トリブシンインヒビターなどが挙げられる。宿主生物種に応じて、免疫応答を高めるために様々なアジュバントを用いてもよく、そのようなアジュバントとしては、限定はされないが、フロイントの（完全または不完全）アジュバント、水酸化アルミニウムなどのミネラルゲル、リゾレシチンなどの表面活性物質、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、オイルエマルジョン、キーホールリンペットヘモシアニン、ジニトロフェノール、ならびに、BCG（カルメット・ゲラン桿菌）およびコリネバクテリウム・パルバム（*Corynebacterium parvum*）などの潜在的に有用なヒトアジュバントが挙げられる。利用できるアジュバントのさらなる例としては、MPL-TDMアジュバント（モノホスホリルリピドA、合成トレハロースジコリノマイコレート）が挙げられる。免疫化プロトコールは、当業者であれば過度の実験を行うことなく選択できるものである。

#### 【0128】

本発明の抗体は、モノクローナル抗体を含んでなるものであってもよい。モノクローナル抗体は、KohlerとMilstein, Nature, 256:495 (1975) および米国特許第4,376,110号、Harlow,らによる「Antibodies: A Laboratory Manual」第2版(1988年)(コールドスプリングハーバースプレス)、Hammerlingらによる「Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas」(米国ニューヨーク所在のエルゼビア(Elsevier)、1981年)に記載されているようなハイブリドーマ法、または当業者によって知られる他の方法によって調製することができる。モノクローナル抗体を生産するために利用できる他の例としては、限定はされないが、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術(Kosborら, 1983, Immunology Today 4:72; Coleら, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2026~2030)、およびEBVハイブリドーマ技術(Coleら著「Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy」、1985年、アラン・アール・リス・インコーポレイテッド(Alan R. Liss, Inc.), pp. 77~96)が挙げられる。このような抗体は、IgG, IgM, IgE, IgA, IgDおよびその任意のサブクラスを含む任意の免疫グロブリンクラスの抗体であってよい。本発明のmAbを産生するハイブリドーマは、*in vitro*または*in vivo*のいずれで培養してもよい。*in vivo*において高力価のmAbを産生できれば、現行で好ましい生産方法となる。

#### 【0129】

ハイブリドーマ法においては、マウス、ヒト化マウス、ヒト免疫系を有するマウス、ハムスターまたは他の適当な宿主動物を、典型的には、免疫剤によって免疫して、免疫剤と特異的に結合する抗体を産生するか、産生可能なリンパ球を誘発させる。あるいは、リンパ球を*in vitro*で免疫してもよい。

#### 【0130】

免疫剤には、典型的には、糖尿病患者において同定されたポリペプチド、その断片または融合タンパク質が挙げられることになる。一般には、ヒト起源の細胞が望ましい場合には、末梢血リンパ球(「PBL」)が用いられ、ヒト以外の哺乳動物起源であることが望ましい場合には、脾臓細胞またはリンパ節細胞が用いられる。次に、ポリエチレングリコールなどの適切な融合剤を用いてリンパ球を不死化細胞と融合して、ハイブリドーマ細胞を作成する(Goding著「Monoclonal Antibodies: Principles and Practice」、アカデミック・プレス(Academic Press)、1986年、pp. 59~103)。不死化細胞株は、通常は形質転換された哺乳類細胞、特に齧歯類、ウシおよびヒトを起源とする骨髄腫細胞である。通常は、ラットまたはマウスの骨髄腫細胞が用いられる。ハイブリドーマ細胞を、好ましくは融合していない不死化細胞が増殖または生き残ることを阻害する1つ以上の物質を含む適切な培地中で培養するとよい。たとえば、親細胞が、ヒポキサンチンアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ酵素(HGPRTまたはHPRT)を欠いている場合には、ハイブリドーマ用の培

地は、典型的には、ヒポキサンチン、アミノプテリン、およびチミジンを含み（「HAT培地」）、これらの物質がHGPRT欠失細胞の増殖を阻害することになる。

【0131】

好ましい不死化細胞株は、効率よく融合し、選択された抗体産生細胞による抗体の発現を安定かつ高レベルとし、HAT培地などの培地に感受性であるものである。より好ましい不死化細胞株は、たとえば、米国カリフォルニア州サンディエゴ所在のソーグ研究所細胞販売センター（Salk Institute Cell Distribution Center）および米国ヴァージニア州マナサス所在の米国微生物系統保存機関（American Type Culture Collection）から得られる、ネズミの骨髄腫細胞株である。明細書全体から推測できるように、ヒト骨髄腫細胞株およびマウスとヒトのヘテロ骨髄腫細胞株については、ヒトモノクローナル抗体産生 10  
に対しての報告がある（Kozbor, J. Immunol., 133: 3001 (1984); Brodeurら著「Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications」、米国ニューヨーク所在のマルセルデカー・インコーポレイテッド（Marcel Dekker, Inc.）、1987年、pp. 51~63）。

【0132】

次にハイブリドーマ細胞を培養する培地について、本発明のアディポネクチンポリペプチドおよび/またはレクチンポリペプチドに対するモノクローナル抗体が存在するかどうかを調べることができる。好ましくは、ハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体の結合特異性を、免疫沈殿、またはラジオイムノアッセイ（RIA）や酵素結合免疫反応吸着測定法（ELISA）などのin vitro結合アッセイによって決定 20  
する。このような技術は当該技術分野において周知であり、当業者の知識の範囲内にある。モノクローナル抗体の結合親和性は、たとえば、MunsonとPollart, Anal. Biochem., 107: 220 (1980)のスキッチャード分析によって判定することができる。

【0133】

所望のハイブリドーマ細胞を同定した後に、該クローンを、限界希釈法と標準法による増殖とによりサブクロニングしてもよい（前掲のGodingの文献）。本目的のための適切な培地としては、たとえば、ダルベッコの改変イーグル培地、およびRPMI-1640が挙げられる。あるいは、ハイブリドーマ細胞は、哺乳動物中の腹水などin vivo 30  
で増殖させてもよい。

【0134】

サブクロンによって分泌されたモノクローナル抗体を、従来の免疫グロブリン精製手法、たとえばプロテインA-セファロース、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィ、ゲル排除クロマトグラフィ、ゲル電気泳動、透析、またはアフィニティクロマトグラフィによって培地または腹水液から単離または精製してもよい。

【0135】

当業者であれば、モノクローナル抗体生産のための様々な方法が当該技術分野において知られていること、したがって、本発明はハイブリドーマにおける生産だけには限らないことを理解するであろう。たとえば、モノクローナル抗体は、たとえば、米国特許第4, 816, 567号に記載されるような組換えDNA法によって作製されてもよい。この場合、「モノクローナル抗体」という用語は、真核細胞、ファージまたは原核細胞の単クローンに由来する抗体のことをいう。本発明のモノクローナル抗体をコードするDNAは、従来の手順を用いて（たとえば、ネズミ抗体の重鎖および軽鎖、またはヒト抗体、ヒト化抗体もしくは他の起源の抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することのできるオリゴヌクレオチドを用いることにより）容易に単離および配列決定することができる。本発明のハイブリドーマ細胞は、このようなDNAの好ましい供給源として機能する。単離した後、該DNAを発現ベクター中に挿入し、該発現ベクターで、元来は免疫グロブリンタンパク質を産生しないサルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、または骨髄腫細胞を形質転換して、組換え宿主細胞中でモノクローナル抗 40  
40

体を合成してもよい。

【0136】

ハイブリドーマ技術を用いた特定の抗体の生産およびスクリーニング方法は、当該技術分野では常套かつ周知である。非限定的な例において、マウスをバイオマーカーポリペプチドまたは当該ペプチドを発現している細胞で免疫してもよい。抗原に特異的な抗体がマウス血清中で検出されるなど、免疫応答が検出されたところで、マウスの脾臓を採取して脾細胞を単離する。脾細胞を周知の技術によって任意の適切な骨髓腫細胞、たとえばATCCより入手可能な細胞株SP20由来の細胞に融合する。ハイブリドーマを選択し、限界希釈法によってクローニングする。ハイブリドーマクローンを、当該技術分野において既知の方法によって、本発明のポリペプチドに結合できる抗体を分泌する細胞について調べる。一般には高濃度の抗体を含む腹水液は、マウスを陽性ハイブリドーマクローンで免疫することによって生成させることができる。

10

【0137】

したがって、本発明は、モノクローナル抗体の作製方法、ならびに本発明の抗体を分泌するハイブリドーマ細胞を培養する工程を含む方法によって産生される抗体を提供する。該ハイブリドーマは、好ましくは、本発明の抗原で免疫したマウスから単離した脾細胞を骨髓腫細胞と融合し、該融合によって得られたハイブリドーマを、本発明のポリペプチドに結合可能な抗体を分泌するハイブリドーマクローンについてスクリーニングすることによって作製される。糖尿病バイオマーカー、そのペプチドおよび誘導体を検出する抗体は、免疫アッセイおよび他の方法において、新しい糖尿病バイオマーカーを同定するために、および1型糖尿病、2型糖尿病および/または糖尿疾患の診断に使用するために用いることができる。

20

【0138】

糖尿病バイオマーカー特異抗体の大量生産のために他の方法を用いてもよい。たとえば、抗体は、当該技術分野において知られる様々なファージ提示法を用いて作成することができる。ファージ提示法においては、抗体の機能的ドメインが、該ドメインをコードするポリヌクレオチド配列を有したファージ粒子の表面に提示される。特定の実施形態において、このようなファージを用いて、レパートリーまたはコンビナトリアル抗体ライブラリー（たとえば、ヒトまたはネズミ）から発現される抗原結合ドメインを提示することができる。標的抗原に結合する抗原結合ドメインを発現するファージは、たとえば、標識された抗原または固体表面もしくはビーズに結合または捕捉された抗原を用いて、抗原によって選択または同定することができる。上記の方法に用いられるファージは、典型的には、ファージ遺伝子IIIまたは遺伝子VIIのタンパク質のいずれかに組換えによって融合されたFab、Fv、またはジスルフィド安定化Fv抗体ドメインを有するファージから発現されたfdおよびM13結合ドメインを含む繊維状ファージである。本発明の抗体を作製するために使用できるファージ提示法の例は、たとえばBrinkmanら、J. Immunol. Methods 182:41~50(1995); Amesら、J. Immunol. Methods 184:177~186(1995); Kettleboroughら、Eur. J. Immunol. 24:952~958(1994); Persicら、Gene 187:9~18(1997); Burtonら、Advances in Immunology 57:191~280(1994); 国際出願番号第PCT/GB91/01134号; 国際出願国際公開公報第90/02809号; 同第91/10737号; 同第92/01047号; 同第92/18619号; 同第93/11236号; 同第95/15982号; 同第95/20401号; および米国特許第5,698,426号; 同第5,223,409号; 同第5,403,484号; 同第5,580,717号; 同第5,427,908号; 同第5,750,753号; 同第5,821,047号; 同第5,571,698号; 同第5,427,908号; 同第5,516,637号; 同第5,780,225号; 同第5,658,727号; 同第5,733,743号および同第5,969,108号に開示されているようなものが挙げられるが、前記の各文献は、上述の文中で引用した理由により、参照によって関連部分に組み込

30

40

50

まれる。

【0139】

本発明の抗体は、さまざまな利用性を有している。たとえば、当該抗体を、試料中の本発明のポリペプチドの存在または量を検出するための診断アッセイにおいて用いてもよい。当該診断アッセイは、少なくとも2つの工程からなるものであってよい。最初の工程は、試料を抗体に供することであり、この場合の試料は、組織（たとえば、ヒト、動物など）、体液（たとえば、血液、尿、痰、精液、羊水、唾液など）、生体抽出液（たとえば、組織または細胞ホモジネートなど）、タンパク質マイクロチップ（たとえば、Arenkov P, *ら*, *Anal Biochem.*, 278(2): 123~131(2000)を参照のこと）、またはクロマトグラフィカラムなどである。第2の工程は、基材に結合した抗体の定量を実施する。あるいは、前記方法は、共有結合、静電結合もしくは可逆結合により抗体を固体支持体に結合させる第1の工程と、上述および本明細書中の他所で定義したようにして、結合した抗体を試料に供する第2の工程とをさらに含んでもよい。

10

【0140】

競合的結合アッセイ、直接的または間接的サンドイッチアッセイ、および不均一相または均一相のいずれかで行われる免疫沈殿アッセイなどの、様々な診断アッセイ技術が当該技術分野において知られている（Zola著「*Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*」、シーアールシープレス・インコーポレイテッド（CRC Press, Inc.）、1987年、pp147~158）。診断アッセイにおいて用いられる抗体を、検出可能な部分によって標識してもよい。検出可能な部分は、検出可能なシグナルを直接的または間接的に生じるものでなければならない。たとえば、検出可能な部分は、 $^2\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{32}\text{P}$ , または  $^{125}\text{I}$  などの放射性同位体、蛍光化合物もしくは化学発光化合物、たとえばフルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、もしくはルシフェリン、または酵素、たとえば、アルカリホスファターゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、緑色蛍光タンパク質、もしくはセイヨウワサビペルオキシダーゼなどであってよい。抗体を検出可能な部分に連結させるために、当該技術分野において知られる任意の方法を用いることが可能であり、該方法には、Hunter *ら*, *Nature*, 144: 945(1962); David *ら*, *Biochem.*, 13: 1014(1974); Pain *ら*, *J. Immunol. Methods*, 40: 219(1981); および Nygren, *J. Histochem. and Cytochem.*, 30: 407(1982)によって記載される方法が含まれる。

20

30

【0141】

[キット]

さらに別の態様において、本発明は、1型糖尿病、2型糖尿病および/または糖尿疾患の診断、ならびに1型糖尿病、2型糖尿病および/または糖尿疾患の重症度の診断を補助するキットを提供し、該キットは、本発明のマーカーを検出するために用いることができる。たとえば、本発明のキットは、患者と正常な被験者の試料の間で示差的に存在する本明細書中に記載のマーカーのうち任意の1つ以上を検出するために用いることができる。たとえば、アディポネクチン、レプチン、インスリン、グレリン、レシスチン、インスリンに対する自己抗体、グルタミン酸デカルボキシラーゼに対する自己抗体、IL-2に対する自己抗体、IA-2に対する自己抗体、インクレチン、TNF- $\alpha$  および IL-6、それらの断片、バリエーション、または任意の組み合わせである。本発明のキットは、多くの用途を有している。たとえば、該キットを、被験者が1型、2型のいずれの糖尿病を有するか、あるいは診断が陰性であるかを識別して、1型糖尿病、2型糖尿病および/または糖尿疾患の診断を補助するために用いることができる。別例としては、本発明のキットを、*in vitro* または *in vivo* 動物モデルにおいて1つ以上のマーカーの発現を調節する化合物を同定して、治療の有効性を判定するために用いることができる。

40

【0142】

一実施形態において、キットは、(a) マーカーに特異的に結合する抗体と、(b) 検

50

出試薬とを備える。このようなキットは、上述の材料から準備することができ、前述の材料（たとえば、抗体、検出試薬、固定化支持体など）に関する検討のすべてをこの段落においても適用できるので、繰り返して記載はしない。任意選択で、キットは、予備分画用のスピンカラムをさらに備えていてもよい。いくつかの実施形態において、キットは、ラベルまたは別個の挿入物の形態の、適切な操作パラメータについての説明書をさらに備えていてもよい。

【0143】

さらなる実施形態において、本発明は、本発明のポリペプチドの抗原を含む血清のスクリーニングに用いる診断キットを含む。該診断キットは、ポリペプチドまたはポリヌクレオチド抗原に対して特異的免疫反応性を示す実質的に単離された抗体と、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド抗原の抗体への結合を検出する手段とを含む。一実施形態において、抗体は固体支持体に結合される。特定の実施形態において、抗体はモノクローナル抗体であってもよい。キットの検出手段は、第2の標識されたモノクローナル抗体を含んでいてもよい。代替として、または付加的に、検出手段は、競合する標識抗原を含んでいてもよい。

10

【0144】

診断の一構成では、試験血清を、本発明の方法によって得た、抗原が表面に結合している固相試薬と反応させる。抗体が特異的抗原を介して該試薬に結合し、結合していない血清成分が洗浄により除去された後、該試薬をレポーターで標識した抗ヒト抗体と反応させて、該固体支持体上に結合した抗原に対する抗体の量に比例してレポーターが試薬に結合するようにする。試薬を再度洗浄して、結合していない標識抗体を除去し、試薬に結合したレポーターの量を測定する。レポーターは、一般に、適切な蛍光分析用基質、発光性基質または発色性基質（米国ミズーリ州セントルイス所在のシグマ（Sigma））の存在下で固相をインキュベートすることによって検出される酵素である。

20

【0145】

上記アッセイにおける固相試薬は、タンパク質材料を、高分子ビーズ、ディップスティック、96ウェルプレートまたはフィルター材料などの固体支持体材料に結合させるための既知の技術によって調製される。上記結合方法には、一般に、タンパク質を支持体に非特異的に吸着させること、または通常は遊離のアミノ基を介して固体支持体上の活性化カルボキシル、ヒドロキシルまたはアルデヒド基などの化学的に活性な基にタンパク質を共有結合させることが挙げられる。あるいは、ストレプトアビジンでコーティングしたプレートをビオチン化した抗原と併せて用いてもよい。

30

【0146】

任意選択で、本発明のキットが標準または対照についての情報をさらに含み、試験試料を該対照情報の標準と比較して、試料中で検出されたマーカの試験量が1型糖尿病、2型糖尿病および/または糖尿疾患とされる診断量であるか、1型糖尿病、2型糖尿病および/または糖尿疾患の重症度の診断に見合った診断量であるか、および/または患者に対する治療効果に見合った診断量であるかどうかを判定できるようにしてもよい。

【0147】

別の実施形態において、キットは、（a）マーカとの結合に適した吸着剤をその上に有してなる基材と、（b）試料を吸着剤と接触させ、吸着剤によって保持されたマーカを検出することによってマーカを検出するため説明書とを含む。いくつかの実施形態において、キットは、溶離剤（説明書の代わりに、または説明書とともに）または溶離剤を作製するための説明書を含んでいてもよく、この場合、吸着剤と溶離剤とを組み合わせることにより、気相イオン分光法を用いたマーカの検出が可能になる。このようなキットは、上述の材料から準備することが可能であり、前述の材料（たとえば、プローブ基材、吸着剤、洗浄液など）についての検討をそのままここでも適用することができるので、繰り返しては記載しない。

40

【0148】

別の実施形態において、本発明のキットは、その上に吸着剤を含んでなる第1の基材（

50

たとえば、吸着剤で官能化した粒子)と、第1の基材をその上に配して気相イオン分析器に脱着自在に挿入可能なプローブを形成することのできる第2の基材とを含んでいてもよい。他の実施形態において、キットは、その上に吸着剤を備え脱着自在に挿入可能なプローブの形態の単一の基材からなるものであってもよい。さらに別の実施形態において、キットは、予備分画用のスピカラム(たとえば、Cibacron(登録商標)ブルーアガロースカラム、抗HSAアガロースカラム、サイズ排除カラム、Qアニオン交換スピカラム、一本鎖DNAカラム、レクチンカラムなど)をさらに含んでいてもよい。

#### 【0149】

任意選択で、本発明のキットは、ラベルまたは別個の挿入物の形態の、適切な操作パラメータについて説明書をさらに含んでいてもよい。たとえば、キットは、試料をプローブ上に接触させた後に、どのようにしてプローブを洗浄するかについて使用者に教示する標準説明書を有していてもよい。別例において、キットは、試料中のタンパク質の複雑度を低減するために試料を予備的に分画するための説明書を有していてもよい。別例において、キットは、分画または他の処理を自動化するための説明書を有していてもよい。

#### 【0150】

以下の実施例は、限定のためではなく、説明のために提供するものである。具体的な例について述べてきたが、上記の記載は説明のためのものであり限定的なものではない。前述の実施形態の1つ以上の特徴のいずれについても、本発明の他の任意の実施形態の1つ以上の特徴と任意の様式で組み合わせることができる。さらに、本発明についての多数の変形形態が、本明細書を再検討することにより、当業者には明らかとなるであろう。したがって、本発明の範囲は、上記の説明を参照して決まるのではなく、添付の特許請求の範囲を参照しつつその均等物の全範囲とともに定まるものとする。

#### 【0151】

本願において引用するすべての出版物および特許文献は、あらゆる目的について各出版物または特許文献が1つ1つ記載されているとの同じ程度に、全体が参照により援用される。本書において様々な引用文献を挙げることについては、出願人はその個々の引用文献を本発明に対する「先行技術」であると認めるものではない。

#### 【実施例】

#### 【0152】

##### [材料と方法]

1型糖尿病( $n = 41$ )、2型糖尿病( $n = 17$ )の子供および若年者、ならびに一般集団( $n = 43$ )からの類似年代の糖尿病でない個人からの試料について調べた。分析には、BMIおよびタナーステージを合わせるためのパラメータを含めた。上記の検体の疾患との関連を調べるために、受診者動作特性(ROC)曲線を作成した。

#### 【0153】

1型糖尿病、2型糖尿病の子供および若年者、ならびに一般集団(表1の説明中の人種分布)からの類似年代の糖尿病でない個人に由来する、単一の血清試料(非空腹時、 $-80$ で保存)について、アディポネクチンおよびレプチン濃度を測定した。1型および2型糖尿病は、米国糖尿病協会(American Diabetes Association)の基準(「糖尿病の診断および分類に関する専門委員会:糖尿病の診断および分類に関する専門委員会報告(Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus: Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus.)」、Diabetes Care 26(追補1):S5~S20、2003年)に従って診断した。

#### 【0154】

具体的には、1型糖尿病は症状履歴(たとえば、多飲症、多食症、多尿症)、体重減少、BMI、ケトアシドーシス、および1型糖尿病関連自己抗体(後述)の存在を含む複数の因子の臨床的評価によって診断した。小児2型糖尿病の場合には、履歴(たとえば、2型糖尿病の家族歴)、病状履歴、身体データ(たとえば、BMI、家系、黒色表皮症)、および、1型糖尿病関連自己抗体が無いことを含む実験室データによって、診断を行った

10

20

30

40

50

(Kaufman F. Rev Endocr. Metab. Disord. 4:33~42, 2003)。すべての健常な対照被験者についても自己抗体は陰性であった。

【0155】

[血清検体と自己抗体の検出]

LINCOplex (商標) (米国ミズーリ州セントルイス所在のリンコリサーチ (Linco Research)) キットを用いて、ヒトレプチン (感度  $0.01 \text{ ng/mL}$ ; アッセイ間変動係数 [CV]  $5.0\%$ ) を測定し、ビーブリッジインターナショナル (B-Bridge International) (米国カリフォルニア州サンノゼ所在) のヒトアディポネクチン ELISA キットを用いて、アディポネクチンの血清中濃度 (下限  $0.02 \text{ ng/mL}$ ; アッセイ間 CV  $3.2\%$ ) をモニタした。異好抗体または天然の抗体による干渉の可能性を低減するために、アッセイキットの製造者によって血清マトリックス希釈剤が提供されていた。すべての実験参加者について、抗インスリン自己抗体、抗GAD抗体、およびインスリンノーマ関連タンパク質2抗原に対するものを含めた、3つの1型糖尿病関連自己抗原に対する自己抗体についての試験を行った。アッセイは前述のように行った (She J. S., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:8116~8119, 1999年)。

10

【0156】

[統計]

すべての統計的分析は、GraphPad Prism (商品名) 4.0 (カリフォルニア州サンディエゴ所在のGraphPad) を用いて、Fisherの抽出試験、受診者動作特性 (ROC) 解析、直線回帰、t検定、またはDunnの事後検定を伴うANOVA (Kruskal-Wallis) 分析によって行った。  $P < 0.05$  を有意とした。

20

【0157】

[実施例1: in vivoのアディポネクチンおよびレプチンレベルの測定]

アディポネクチンおよびレプチンのレベルを、18人のT2Dの子供 (男11/女12; 年齢中央値14歳、範囲10~20歳)、一般集団からの20人の同等の糖尿病でない個人 (男11/女9; 年齢中央値12.0歳、範囲5~21歳)、ならびに、44人のT1D患者 (男22/女22; 年齢中央値14.0歳、範囲6~20歳) について測定した。署名入り (IRB認可済) インフォームド Consent および同意書を、子供とその親から得た。LINCOplex (商標) (米国ミズーリ州セントルイス所在のリンコリサーチ) キットを用いて、ヒトレプチンを測定し (感度  $23.4 \text{ pg/mL}$ ; アッセイ範囲  $0.375 \text{ ng/mL} \sim 12 \text{ ng/mL}$ ; アッセイ内 CV =  $4.6 \sim 5.8\%$ ; アッセイ間 CV =  $3.2 \sim 7.4\%$ )、ビーブリッジインターナショナル (米国カリフォルニア州サンノゼ所在) のヒトアディポネクチン ELISA キットを用いて、アディポネクチンの血清中濃度をモニタした (感度  $23.4 \text{ pg/mL}$ ; アッセイ範囲  $0.375 \text{ ng/mL} \sim 12 \text{ ng/mL}$ ; アッセイ内 CV =  $4.6 \sim 5.8\%$ ; アッセイ間 CV =  $3.2 \sim 7.4\%$ )。T1D関連自己抗体アッセイを、抗インスリン自己抗体 (IAA)、抗グルタミン酸デカルボキシラーゼ自己抗体 (GADA)、および抗IA2自己抗体 (IA-2A) に対して行った。すべての放射性結合アッセイは、事前に調べておいた対照集団に基づいて陽性結果の指標となるカットオフを利用して行った。すべての統計学的分析は、GraphPad Prismを用いて行った。

30

40

【0158】

レプチンのレベルは、調べた小児集団全体に対するBMIと直接相関していた ( $r = 0.62$ ;  $p < 0.0001$ )。この関連は、病状の関数として解析した場合にも観察された。BMIのパーセンタイル値が85以上の対象の分析に調整した後では、T2Dの子供は健常な子供よりも有意に高いレプチンレベルを示し (図1のB;  $p < 0.003$ )、T1Dの子供では健常な子供に比べてレベルが低下していることがわかった (図1のB;  $p < 0.001$ )。BMIについて調整を行わずとも、平均レプチンレベルがT2D群 ( $23.1 \text{ ng/mL}$  ( $15.6 \sim 30.6$ )) ではすべての健常な対照 ( $7.4 \text{ ng/mL}$

50

(2.8 ~ 12) ;  $p < 0.0004$ ) または T1D 群 (4.5 ng/mL (3.3 ~ 5.7) ;  $p < 0.001$ ) と比べて高いという同様の傾向が観察された。レプチン濃度は性別に依存し、診断および BMI に関係なく、女性 (11.4 ng/mL (7.6 ~ 15.1) ) では男性 (6.3 ng/mL (3.2 ~ 9.4) ;  $p < 0.003$ ) よりも高かった。

#### 【0159】

レプチンに対するアディポネクチンの比は、T1D および T2D の子供の間でさらに著しい違いを見せた。アディポネクチン/レプチン比は、健常な子供 (11.8 (4.8 ~ 18.7) ) と、T1D の子供 (6.1 (3.8 ~ 8.3) ) または T2D の子供 (0.4 (0.3 ~ 0.5) ) との間で劇的に異なっていた (図1の C ;  $p < 0.0001$ ) 。予想通り、BMI が 85 パーセント以上 (図1の D) またはタナーが 4 ~ 5 の対象に限って分析を行った場合、比は減少するが、これは BMI がレプチンの増加または思春期の進行、およびアディポネクチンの減少と正に相関するためである。このことにも関わらず、T1D についてアディポネクチン/レプチン比は、T2D 群に比べて著しく高まっていた ( $p < 0.0001$ ) 。

10

#### 【0160】

[ 実施例 2 : 子供および若年者におけるアディポネクチンレベル ]

アディポネクチンレベルは、調査した小児集団全体に関して BMI と逆相関していた ( $r^2 = 0.60$  ;  $P < 0.0001$ ) 。BMI のパーセンタイル値が 85 以上の対象について行った分析の結果、対照群は、2型糖尿病群に比べて、高いアディポネクチンレベルを有することがわかった (図2の A ; 対照群対 2型糖尿病群、 $P < 0.01$ ) 。1型糖尿病群は、健常対照群とは有意差はなかった ( $P = NS$ ) が、1型糖尿病群の方が、2型糖尿病群より高かった ( $P < 0.01$ ) 。アディポネクチンレベルと性別の間には何ら相関はなかったが、タナーステージが 4 または 5 の 2型糖尿病群においてはレベルが低かった (図2の B ; 対照群対 1型糖尿病群、 $P = NS$  ; 対照群対 2型糖尿病群、 $P < 0.01$  ; および 1型糖尿病群対 2型糖尿病群、 $P < 0.01$ ) 。小児 1型糖尿病群におけるアディポネクチンレベル (図2の C ; 10.2  $\mu\text{g/mL}$  [ 95% CI 8.6 ~ 11.7 ] ) は、健常な対照群と差はなかった (10.6  $\mu\text{g/mL}$  [ 9.2 ~ 12.0 ] ;  $P = NS$ ) 。2型糖尿病の子供 (5.5  $\mu\text{g/mL}$  [ 4.8 ~ 6.2 ] ) は、上記両群に比べて有意に低いアディポネクチンレベルを有していた (対照群対 2型糖尿病群、 $P < 0.001$  ; 1型糖尿病群対 2型糖尿病群、 $P < 0.01$ ) 。

20

30

#### 【0161】

[ 実施例 3 : 子供および若年者のレプチンレベル ]

レプチンレベルは、調査した小児集団全体について BMI と直接相関していた ( $r^2 = 0.60$  ;  $p < 0.0001$ ) 。この関連は、病状の関数として解析した場合にも観察された。BMI のパーセンタイル値が 85 以上の群の分析 (図2の D ; 対照群対 2型糖尿病群、 $P < 0.001$  ; 1型糖尿病群対 2型糖尿病群、 $P < 0.01$ ) または、タナーステージが 4 または 5 の群の分析 (図2の E ; 対照群対 2型糖尿病群、 $P < 0.001$  ; 1型糖尿病群対 2型糖尿病群、 $P < 0.001$ ) から、2型糖尿病の子供では、健常な子供および 1型糖尿病の子供に比べてレプチンレベルが有意に高いことが示された。しかしながら、1型糖尿病群と対照群のあいだでは、パーセンタイル値が 85 を超える被験者 (対照群対 1型糖尿病群 ;  $P = NS$ ) またはタナーステージが 4 および 5 の被験者 (対照群対 1型糖尿病群 ;  $P = NS$ ) を評価した場合には、レプチンレベルに違いは無かった。レプチン濃度は、診断や BMI に関係なく、女性 (7.1 ng/mL [ 95% CI 5.5 ~ 8.7 ] ) のほうが男性よりも (5.2 ng/mL [ 3.8 ~ 6.6 ] ;  $P = 0.061$ ) (統計学的には有意でないにせよ) 幾分高かった。BMI を考慮しない場合 (すなわち全被験者では) 、2型糖尿病群 (図2の F ; 24.3 ng/mL [ 17.1 ~ 31.5 ] ) における平均レプチンレベルがすべての健常群 (2.7 ng/mL [ 1.3 ~ 4.1 ] ;  $P < 0.001$ ) または 1型糖尿病群 (5.1 ng/mL [ 3.5 ~ 6.7 ] ;  $P < 0.001$ ) と比べて高いという傾向が観察された。レプチンレベルは、1型糖尿病群におい

40

50

ても対照群に比べて若干上昇していた ( P < 0 . 0 5 ) 。

【 0 1 6 2 】

[ 実施例 4 : アディポネクチン対レプチン比 ]

アディポネクチン対レプチン比を調べることにより、1型および2型の糖尿病の子供の間でさらに際立った違いが明らかになった。アディポネクチン対レプチン比は、健常な子供 ( 2 0 . 2 [ 9 5 % C I 1 1 . 3 ~ 2 9 . 0 ] ) および1型糖尿病の子供 ( 6 . 3 [ 3 . 8 ~ 8 . 8 ] ) と2型糖尿病の子供 ( 0 . 3 [ 0 . 2 ~ 0 . 5 ] ) とのあいだで、著しく異なっていた ( 図 3 ; 対照群対1型糖尿病群, P = N S ; 対照群対2型糖尿病群, P < 0 . 0 0 1 ; 1型糖尿病群対2型糖尿病群, P < 0 . 0 0 1 ) 。 B M I のパーセントイル値が85を超える被験者のみの限定的解析 ( 対照群対1型糖尿病群, P ~ N S ; 対照群対2型糖尿病群, P < 0 . 0 0 1 ; 1型糖尿病群対2型糖尿病群, P < 0 . 0 1 ) またはタナーステージ4および5の被験者のみの限定的解析 ( 対照群対1型糖尿病群, P < N S ; 対照群対2型糖尿病群, P < 0 . 0 0 1 ; 1型糖尿病群対2型糖尿病群, P < 0 . 0 0 1 ) の場合、比は減少するが、これはB M I がレプチンの増加または思春期の進行およびアディポネクチンの減少に正に相関するためである。これに関わらず、1型糖尿病群および対照群についてのアディポネクチン対レプチン比は、2型糖尿病群に比べて有意に上昇していた ( p < 0 . 0 0 1 ) 。 民族性の影響の可能性について確かめるために、アディポネクチン対レプチン比を、人種の関数として比較する分析を行った ( 図 4 ) 。 同じ疾病群において白色人種とアフリカ系アメリカ人の被験者を比較した場合に、この比にいかなる

10

20

【 0 1 6 3 】

[ 実施例 5 : 診断的価値 ]

アディポネクチン対レプチン比に関する適当なカットオフ値を決定するために、1型糖尿病群を2型糖尿病群と比較したROCプロットを構築した ( すなわち、ROC曲線の曲線下面積 0 . 9 6 9 [ 9 5 % C I 0 . 9 3 ~ 1 . 0 0 ] ; P < 0 . 0 0 0 1 ) ( 図 5 ) 。 比のカットオフ値が < 0 . 9 のところでは、感度は 1 0 0 % ( 範囲 8 0 ~ 1 0 0 % ) であり、1型糖尿病と比べた2型糖尿病に対する特異度は 8 0 % ( 6 5 ~ 9 1 % ) であった。比のカットオフ値が < 0 . 7 のところでは、感度は 8 8 % ( 6 4 ~ 9 9 % ) であり、特異度は 9 0 % ( 7 7 ~ 9 7 % ) であった。

30

【 0 1 6 4 】

【 表 1 】

表1 実験集団における身体測定上の変数および人種間変数

	2型糖尿病	1型糖尿病	健常な対照群
n	17	4	43
年齢(歳)	144 (10-20)	13.2 (9-20)	13.7 (6-21)
男性/女性	4/13	21/20	22/21
タナー	4.4 (2-5)	3.9 (1-5)	3.3 (1-5)
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	36 (32.6-39.4)	21.7 (20.4-23.1)	20.5 (18.8-22.3)
疾患継続期間(年)	2.4 (0.1-7)	3.9 (0.1-10)	NA
民族性(%)			
白色人種	18	7	62
アフリカ系アメリカ人	75	2	33
ラテン	6	7	5
治療	経口血糖降下剤、または経口血糖降下剤とインスリンの組合せ	インスリン	NA

40

特に記載のない限り、データは平均値(範囲)である。BMIデータは、平均(95%CI)である。健常な対照群(または示差的診断による全ての2型糖尿病群)については、3つの1型糖尿病関連自己抗体のいずれも確認されなかった。これに対し、1型糖尿病群においては、これらの自己抗体に対して50~70%の頻度で陽性であることが観察された。NAは、「該当無し」を意味する。

【 0 1 6 5 】

50

本明細書中で挙げるすべての出版物、特許出願、特許、および他の引用文献は、上記の文中で挙げた理由により、参照によりその関連部分を本願に組み込む。

【図面の簡単な説明】

【0166】

【図1】 対照（非糖尿病）小児群、T1D小児群およびT2D小児群の血清中のアディポネクチンレベル（A）、レプチン（レベル）、およびアディポネクチン/レプチン比を示すグラフ。

【図2】 健常小児群および糖尿病小児群におけるアディポネクチンおよびレプチンのレベルを示すグラフ。BMIのパーセンタイル値が85を超える被験群（A）、タナーステージ4または5の被験群（B）またはすべての試験参加者（C）についての図中に示した被験者群のアディポネクチンの血清中レベル。BMIのパーセンタイル値が85を超える被験群（D）、タナーステージ4または5の被験群（E）またはすべての試験参加者（F）についての試験群のレプチンの血清中レベル。バーは平均値を表す。T1D（1型糖尿病）；T2D（2型糖尿病）。

10

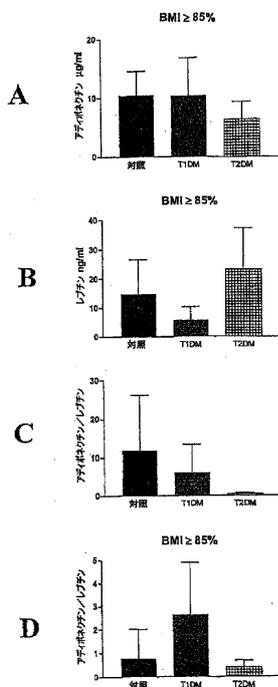
【図3】 健常小児群および糖尿病小児群におけるアディポネクチンおよびレプチンのレベルを示すグラフ。図中に示した被験群における血清中アディポネクチン対レプチン比。バーは平均値を表し、y軸はlog<sub>2</sub>スケールである。T1D（1型糖尿病）；T2D（2型糖尿病）。

【図4】 健常小児群および糖尿病小児群におけるアディポネクチンとレプチンの比を民族の関数として示したグラフ。バーは平均値を表し、y軸はlog<sub>2</sub>スケールである。AA（アフリカ系アメリカ人）；C（白色人種）；T1D（1型糖尿病）；T2D（2型糖尿病）。

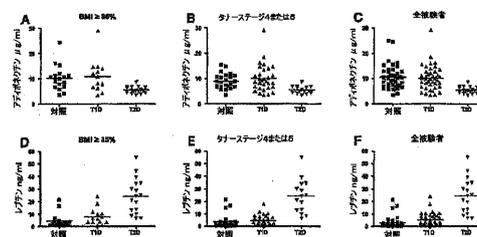
20

【図5】 1型糖尿病（T1D）群対2型糖尿病（T2D）群における、アディポネクチン対レプチン比の特異度および感度に関するROC曲線を示すグラフ。

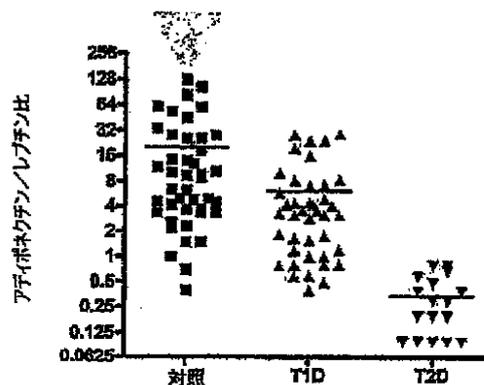
【図1】



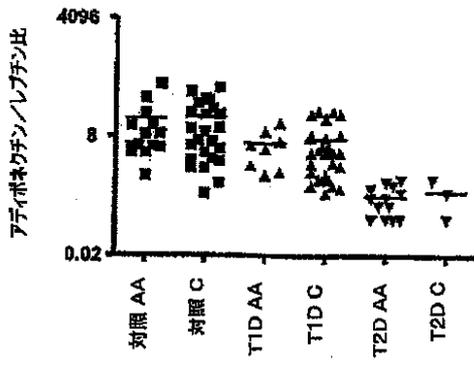
【図2】



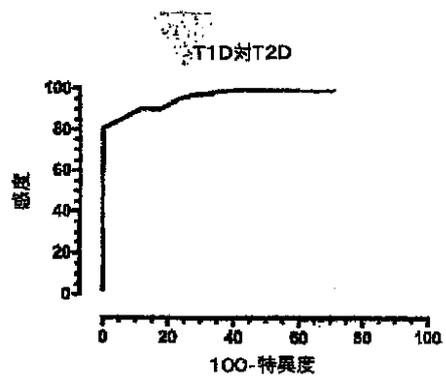
【図3】



【 図 4 】



【 図 5 】



## フロントページの続き

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	G 0 1 N 30/88	D
	C 1 2 Q 1/68	A
	C 1 2 N 15/00	A

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

(72) 発明者 モラーレス、アルバ エスター

アメリカ合衆国 7 2 1 1 3 アーカンソー州 モーメル ノーフォーク ドライブ 2 2

(72) 発明者 アトキンソン、マーク エイ .

アメリカ合衆国 3 2 6 0 8 フロリダ州 ゲインズビル エスタブリュ エイティシックス  
ウェイ 4 3 0 4

(72) 発明者 ワッサーフォール、クライブ ヘンリー

アメリカ合衆国 3 2 6 0 8 フロリダ州 ゲインズビル エスタブリュ サーティシックス  
プレイス 1 9 2 8

F ターム(参考) 4B024 AA11 CA01 CA09 CA11 HA11

4B063 QA01 QA19 QQ03 QR32 QR35 QR48 QR49 QR55 QS22 QS32

QX01

专利名称(译)	用于区分1型糖尿病和2型糖尿病的生物标志物		
公开(公告)号	<a href="#">JP2007526449A</a>	公开(公告)日	2007-09-13
申请号	JP2006517476	申请日	2004-06-21
[标]申请(专利权)人(译)	佛罗里达大学		
申请(专利权)人(译)	佛罗里达大学		
[标]发明人	エリスタミーエム モラーレスアルバエスター アトキンソンマークエイ ワッサーフォールクライブヘンリー		
发明人	エリス、タミー エム. モラーレス、アルバ エスター アトキンソン、マーク エイ. ワッサーフォール、クライブ ヘンリー		
IPC分类号	G01N33/53 G01N37/00 G01N30/72 G01N30/88 C12Q1/68 C12N15/09 G01N33/564 G01N33/68 G01N33/74 G01N33/92		
CPC分类号	G01N33/6863 G01N33/564 G01N33/6893 G01N33/74 G01N33/92 G01N2800/042 Y10S436/811 Y10T436/145555 Y10T436/24		
FI分类号	G01N33/53.D G01N37/00.102 G01N33/53.M G01N30/72.C G01N30/88.J G01N30/88.D C12Q1/68.A C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/HA11 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063 /QQ03 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR48 4B063/QR49 4B063/QR55 4B063/QS22 4B063/QS32 4B063/QX01		
代理人(译)	昂达诚		
优先权	60/480041 2003-06-20 US		
其他公开文献	JP4717810B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

鉴定了诊断1型糖尿病，2型糖尿病和/或糖尿病病症的生物标志物。检测本发明的不同生物标志物还可诊断1型糖尿病，2型糖尿病和/或糖尿病病症的严重程度。分析包括BMI和Tanner阶段的匹配参数。建立接受者 - 操作者特征 ( ROC ) 曲线以评估生物标志物与疾病的关联。

		(43) 公表日 平成19年9月13日 (2007.10.13)	
(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)	
<b>G01N 33/53 (2006.01)</b>	G01N 33/53 D	4B024	
<b>G01N 37/00 (2006.01)</b>	G01N 37/00 I O 2	4B063	
<b>G01N 30/72 (2006.01)</b>	G01N 33/53 M		
<b>G01N 30/88 (2006.01)</b>	G01N 30/72 C		
<b>C12Q 1/68 (2006.01)</b>	G01N 30/88 J		
		審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 41 頁) 最終頁1	
(21) 出願番号	特願2006-517476 (P2006-517476)	(71) 出願人	501318833
(86) (22) 出願日	平成16年6月21日 (2004. 6. 21)		ユニバーシティ オフ フロリダ
(85) 翻訳文提出日	平成18年2月16日 (2006. 2. 16)		アメリカ合衆国、フロリダ、 ゲイン
(86) 国際出願番号	PCT/US2004/019748		ル、ポスト オフィス ボックス 1
(87) 国際公開番号	W02005/094200		500
(87) 国際公開日	平成17年10月13日 (2005. 10. 13)	(74) 代理人	100068755
(31) 優先権主張番号	60/480, 041		弁理士 恩田 博宣
(32) 優先日	平成15年6月20日 (2003. 6. 20)	(74) 代理人	100105957
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 恩田 誠
		(72) 発明者	エリス、タミー エム. アメリカ合衆国 32605 フロリ ゲインズビル エヌダブリュー トゥ ティフォース ストリート 2005