

(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2010-502946

(P2010-502946A)

(43) 公表日 平成22年1月28日(2010.1.28)

| (51) Int. Cl. | F I | テーマコード (参考) |
|-----------------------------|----------------------|-------------|
| G01N 33/53 (2006.01) | G O 1 N 33/53 D | 4 B 0 6 3 |
| C12Q 1/68 (2006.01) | G O 1 N 33/53 M | 4 C 0 8 4 |
| A61K 38/00 (2006.01) | C 1 2 Q 1/68 Z N A A | 4 C 0 8 6 |
| A61P 3/10 (2006.01) | A 6 1 K 37/02 | 4 C 2 0 6 |
| A61K 31/64 (2006.01) | A 6 1 P 3/10 | |

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 87 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2009-526587 (P2009-526587)
 (86) (22) 出願日 平成19年3月28日 (2007. 3. 28)
 (85) 翻訳文提出日 平成21年4月17日 (2009. 4. 17)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2007/007875
 (87) 国際公開番号 W02008/030273
 (87) 国際公開日 平成20年3月13日 (2008. 3. 13)
 (31) 優先権主張番号 60/841, 717
 (32) 優先日 平成18年9月1日 (2006. 9. 1)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

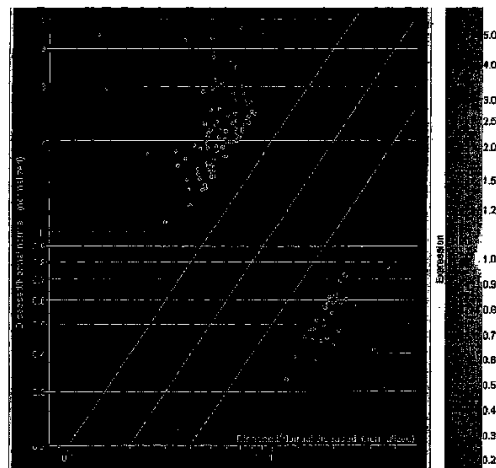
(71) 出願人 507038216
 アメリカン タイプ カルチャー コレクション
 アメリカ合衆国、バージニア州 2011
 O-2209、マナッサス、ユニバーシテ
 ィ ブルバード 10801番地
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100062409
 弁理士 安村 高明
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 2型糖尿病を診断および処置するための組成物および方法

(57) 【要約】

本発明は一般に、糖尿病を発症するリスクの上昇に関連する生物学的マーカーの同定はもちろんのこと、このような生物学的マーカーを糖尿病の診断および予後に使用する方法にも関するものである。本発明の生物学的マーカーは療法のための新たな標的を示し、糖尿病の治療または予防のための新たな治療薬を構成しうる(図21)。一局面において、本発明は、対象における2型糖尿病または前糖尿病状態を診断または同定する方法を提供し、この方法は、a. 該対象からのサンプルにおける1つ以上のDBMARKERまたはその代謝産物の有効量を測定するステップと; b. 該量を基準値と比較するステップであって、該基準値に対する1つ以上のDBMARKERの量の増加または減少は、該対象が該2型糖尿病または該前糖尿病状態に罹患していることを示す、ステップとを含む。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

対象における 2 型糖尿病または前糖尿病状態を診断または同定する方法であって：

a . 該対象からのサンプルにおける 1 つ以上の D B M A R K E R またはその代謝産物の有効量を測定するステップと；

b . 該量を基準値と比較するステップであって、該基準値に対する 1 つ以上の D B M A R K E R の量の増加または減少は、該対象が該 2 型糖尿病または該前糖尿病状態に罹患していることを示す、ステップと；

を含む方法。

【請求項 2】

前記基準値が、指数値、1 つ以上の糖尿病リスク予測アルゴリズムまたは算出指数から導出した値、2 型糖尿病または前糖尿病状態に罹患していない対象から導出した値、あるいは 2 型糖尿病または前糖尿病状態と診断された、もしくは 2 型糖尿病または前糖尿病状態に罹患しているとして同定された対象から導出した値を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記減少が前記基準値よりも少なくとも 10 % 大きい、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記増加が前記基準値よりも少なくとも 10 % 大きい、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記サンプルが尿、血清、血漿、血球、内皮細胞、組織生検、腓液、腹水、骨髄、間質液、涙、痰、または唾液である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記 D B M A R K E R が電気泳動によって、免疫化学的に、プロテオミクス技術によって、またはゲノム解析によって検出される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記免疫化学検出がラジオイムノアッセイ、免疫沈降、免疫プロットティング、免疫蛍光アッセイ、あるいは酵素結合イムノソルベント検定法を含む、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記プロテオミクス技術が S E L D I、M A L D I、L C / M S、タンデム L C / M S / M S、タンパク質 / ペプチドアレイ、または抗体アレイを含む、請求項 6 に記載の方法

。

【請求項 9】

前記ゲノム解析がポリメラーゼ連鎖反応 (P C R)、リアルタイム P C R、マイクロアレイ解析、ノザンプロットティング、またはサザンプロットティングを含む、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 10】

前記対象が 2 型糖尿病または前糖尿病状態を有すると以前に診断されていない、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記対象が 2 型糖尿病または前糖尿病状態を有すると以前に診断されている、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

前記対象が前記 2 型糖尿病または前記前糖尿病状態について無症候性である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

対象における 2 型糖尿病または前糖尿病状態の進行を監視するための方法であって：

a . 第 1 期間に該対象からの第 1 サンプル中の 1 つ以上の D B M A R K E R の有効量を検出するステップと；

b . 第 2 期間に該対象からの第 2 サンプル中の 1 つ以上の D B M A R K E R の有効量を検出するステップと；

10

20

30

40

50

c. ステップ (a) で検出された 1 つ以上の D B M A R K E R の量をステップ (b) で検出された量と、または基準値と比較するステップと；
を含む方法。

【請求項 1 4】

前記対象が前記 2 型糖尿病または前記前糖尿病状態について以前に治療されている、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記第 1 サンプルが前記 2 型糖尿病または前記前糖尿病状態を治療する前に前記対象から採取される、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記第 2 サンプルが前記 2 型糖尿病または前記前糖尿病状態を治療した後に前記対象から採取される、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記 2 型糖尿病または前記前糖尿病状態の治療が運動レジメン、食事補充物、外科的介入、糖尿病調節剤、またはそれらの組合せを含む、請求項 1 4 ~ 1 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記進行がボディマス指数 (B M I)、インスリンレベル、血糖レベル、H D L レベル、収縮期および / または拡張期血圧、あるいはそれらの組合せの変化を検出することによってさらに監視される、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記サンプルが尿、血清、血漿、血球、内皮細胞、組織生検、腓液、腹水、骨髄、間質液、涙、痰、または唾液である、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記基準値が、指数値、1 つ以上の糖尿病リスク予測アルゴリズムまたは算出指数から導出した値、2 型糖尿病または前糖尿病状態に罹患していない対象から導出した値、あるいは 2 型糖尿病または前糖尿病状態と診断された、もしくは 2 型糖尿病または前糖尿病状態に罹患しているとして同定された対象から導出した値を含む、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 2 1】

対象における 2 型糖尿病または糖尿病状態の処置レジメンの有効性を監視する方法であって：

a. 該 2 型糖尿病または該前糖尿病状態の治療前に該対象からの第 1 サンプル中の 1 つ以上の D B M A R K E R の有効量を検出するステップと；

b. 該 2 型糖尿病または該前糖尿病状態の治療後に該対象からの第 2 サンプル中の 1 つ以上の D B M A R K E R の有効量を検出するステップと；

c. ステップ (a) で検出された 1 つ以上の D B M A R K E R の量をステップ (b) で検出された量と、または基準値と比較するステップと；
を含む方法。

【請求項 2 2】

2 型糖尿病または前糖尿病状態の前記処置レジメンが運動レジメン、食事補充物、外科的介入、糖尿病調節剤、またはそれらの組合せを含む、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記有効性がボディマス指数 (B M I)、インスリンレベル、血糖レベル、H D L レベル、収縮期および / または拡張期血圧、あるいはそれらの組合せの変化を検出することによってさらに監視される、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 4】

血糖レベルの変化が経口耐糖能試験によって検出される、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記サンプルが尿、血清、血漿、血球、内皮細胞、組織生検、腓液、腹水、骨髄、間質

10

20

30

40

50

液、涙、痰、または唾液である、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記対象が前記 2 型糖尿病または前記前糖尿病状態について以前に治療されている、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記基準値が、指数値、1 つ以上の糖尿病リスク予測アルゴリズムまたは算出指数から導出した値、2 型糖尿病または前糖尿病状態に罹患していない対象から導出した値、あるいは 2 型糖尿病または前糖尿病状態と診断された、もしくは 2 型糖尿病または前糖尿病状態に罹患しているとして同定された対象から導出した値を含む、請求項 2 1 に記載の方法。

10

【請求項 2 8】

2 型糖尿病または前糖尿病状態と診断された、あるいは 2 型糖尿病または前糖尿病状態に罹患しているとして同定された対象を治療する方法であって：

a . 第 1 期間に該対象からの第 1 サンプル中に存在する 1 つ以上の D B M A R K E R またはその代謝産物の有効量を検出するステップと；

b . 該 1 つ以上の D B M A R K E R またはその代謝産物の量が、2 型糖尿病または前糖尿病状態を発症するリスクの低い 1 つ以上の対象で測定した基準値、あるいは 1 つ以上の糖尿病調節剤による治療の結果として糖尿病リスク因子の改善を示す 1 つ以上の対象で測定した基準値に戻るまで、該対象を該 1 つ以上の糖尿病調節剤によって治療するステップと；

20

を含む、方法。

【請求項 2 9】

前記 1 つ以上の糖尿病調節剤がスルホニル尿素、ピグアナイド、インスリン、インスリン類似物質、ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 - (P P A R -) アゴニスト、二重作用性 P P A R アゴニスト、インスリン分泌促進物質、グルカゴン様ペプチド - 1 (G L P - 1) の類似物質、ジペプチジルペプチダーゼ I V の阻害薬、膵臓リパーゼ阻害薬、- グルコシダーゼ阻害薬、またはそれらの組合せを含む、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 0】

1 つ以上の糖尿病調節剤による治療の結果としての糖尿病リスク因子の改善が、ボディマス指数 (B M I) の低下、血糖レベルの低下、インスリンレベルの上昇、H D L レベルの上昇、収縮期および / または拡張期血圧の低下、あるいはそれらの組合せを含む、請求項 2 8 に記載の方法。

30

【請求項 3 1】

2 型糖尿病または前糖尿病状態と診断された、あるいは 2 型糖尿病または前糖尿病状態に罹患しているとして同定された対象のための処置レジメンを選択する方法であって：

a . 第 1 期間に該対象からの第 1 サンプル中の 1 つ以上の D B M A R K E R の有効量を検出するステップと；

b . 第 2 期間に該対象からの第 2 サンプル中の 1 つ以上の D B M A R K E R の有効量を検出するステップと；

c . ステップ (a) で検出された 1 つ以上の D B M A R K E R の量をステップ (b) で検出された量と、または基準値と比較するステップと；

40

を含む方法。

【請求項 3 2】

前記対象が 2 型糖尿病または前糖尿病状態に罹患している、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記対象が 2 型糖尿病または前糖尿病状態について以前に治療されている、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記対象が以前に 2 型糖尿病または前糖尿病状態と診断されていない、あるいは 2 型糖尿病または前糖尿病状態に罹患しているとして同定されていない、請求項 3 1 に記載の方

50

法。

【請求項 3 5】

前記第 1 サンプルが 2 型糖尿病または前糖尿病状態を治療する前に前記対象から採取される、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記第 2 サンプルが 2 型糖尿病または前糖尿病状態を治療した後に前記対象から採取される、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 7】

2 型糖尿病または前糖尿病状態の前記治療が運動レジメン、食事補充物、外科的介入、糖尿病調節剤、またはそれらの組合せを含む、請求項 3 1 に記載の方法。

10

【請求項 3 8】

前記基準値が 2 型糖尿病または前記前糖尿病状態の 1 つ以上の治療の結果として糖尿病リスク因子の改善を示す 1 つ以上の対象から導出される、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記糖尿病リスク因子の改善がボディマス指数 (BMI) の低下、血糖レベルの低下、インスリンレベルの上昇、HDL レベルの上昇、収縮期および / または拡張期血圧の低下、あるいはそれらの組合せを含む、請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 4 0】

前記血糖レベルの低下が経口耐糖能試験によって測定される、請求項 3 9 に記載の方法。

20

【請求項 4 1】

対象における 2 型糖尿病または前糖尿病状態を発症するリスクの変化を評価する方法であって：

a . 第 1 期間に該対象からの第 1 サンプル中の 1 つ以上の DBMARKER の有効量を検出するステップと；

b . 第 2 期間に該対象からの第 2 サンプル中の 1 つ以上の DBMARKER の有効量を検出するステップと；

c . ステップ (a) で検出された 1 つ以上の DBMARKER の量をステップ (b) で検出された量と、または基準値と比較するステップと；

を含む、方法。

30

【請求項 4 2】

前記対象が 2 型糖尿病または前糖尿病状態に罹患している、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 3】

前記対象が 2 型糖尿病または前糖尿病状態について以前に治療されている、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 4】

前記対象が以前に 2 型糖尿病または前糖尿病状態と診断されていない、あるいは 2 型糖尿病または前糖尿病状態に罹患しているとして同定されていない、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記対象が 2 型糖尿病または前糖尿病状態について無症候性である、請求項 4 1 に記載の方法。

40

【請求項 4 6】

前記第 1 サンプルが 2 型糖尿病または前糖尿病状態を治療する前に前記対象から採取される、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 7】

前記第 2 サンプルが前記前糖尿病状態を治療した後に前記対象から採取される、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 8】

2 型糖尿病または前糖尿病状態の前記治療が運動レジメン、食事補充物、外科的介入、

50

糖尿病調節剤、またはその組合せを含む、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 9】

前記基準値が、指数値、1つ以上の糖尿病リスク予測アルゴリズムまたは算出指数から導出した値、2型糖尿病または前糖尿病状態に罹患していない対象から導出した値、あるいは2型糖尿病または前糖尿病状態と診断された、もしくは2型糖尿病または前糖尿病状態に罹患しているとして同定された対象から導出した値を含む、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 5 0】

対象において2型糖尿病に関連する1つ以上の合併症を同定する方法であって：

a. 該対象からのサンプルにおける1つ以上のDBMARKERまたはその代謝産物の有効量を測定するステップと；

b. 該量を基準値と比較するステップであって、該基準量に対する該1つ以上のDBMARKERの量の増加または減少は、該対象が2型糖尿病に関連する合併症に罹患していること、または2型糖尿病に関連する合併症を発症するリスクに瀕していることを示す、

ステップと；

を含む方法。

【請求項 5 1】

前記合併症が網膜症、失明、記憶喪失、腎症、腎不全、心血管疾患、神経障害、自律神経機能障害、高血糖性高浸透圧性昏睡、またはそれらの組合せを含む、請求項 5 0 に記載の方法。

【請求項 5 2】

前記基準値が指数値、1つ以上の糖尿病リスク予測アルゴリズムまたは算出指数から導出した値、2型糖尿病と診断された、または2型糖尿病に罹患しているとして同定された対象から導出した値あるいは2型糖尿病に関連する1つ以上の合併症を有するとして以前に同定された対象から導出した値を含む、請求項 5 0 に記載の方法。

【請求項 5 3】

前記減少が前記基準値よりも少なくとも10%大きい、請求項 5 0 に記載の方法。

【請求項 5 4】

前記増加が前記基準値よりも少なくとも10%大きい、請求項 5 0 に記載の方法。

【請求項 5 5】

前記サンプルが尿、血清、血漿、血球、内皮細胞、組織生検、腓液、腹水、骨髄、間質液、涙、痰、または唾液である、請求項 5 0 に記載の方法。

【請求項 5 6】

前記DBMARKERが電気泳動によって、免疫化学的に、プロテオミクス技術によって、またはゲノム解析によって検出される、請求項 5 0 に記載の方法。

【請求項 5 7】

前記免疫化学検出がラジオイムノアッセイ、免疫沈降、免疫プロットティング、免疫蛍光アッセイ、あるいは酵素結合イムノソルベント検定法を含む、請求項 5 6 に記載の方法。

【請求項 5 8】

前記プロテオミクス技術がSELDI、MALDI、LC/MS、タンデムLC/MS/M S、タンパク質/ペプチドアレイ、または抗体アレイを含む、請求項 5 6 に記載の方法。

【請求項 5 9】

前記ゲノム解析がポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、リアルタイムPCR、マイクロアレイ解析、ノザンプロットティング、またはサザンプロットティングを含む、請求項 5 6 に記載の方法。

【請求項 6 0】

前記対象が2型糖尿病を有するとして以前に同定されていない、請求項 5 0 に記載の方法。

【請求項 6 1】

10

20

30

40

50

前記対象が2型糖尿病を有するとして以前に同定されている、請求項50に記載の方法。

【請求項62】

前記対象が2型糖尿病に関連する1つ以上の合併症を有するとして以前に同定されていない、請求項50に記載の方法。

【請求項63】

前記対象が2型糖尿病に関連する1つ以上の合併症を有するとして以前に同定されている、請求項50に記載の方法。

【請求項64】

2型糖尿病と診断されていない、または2型糖尿病に罹患しているとして同定されていない1つ以上の対象で検出された1つ以上のDBMARKERの発現レベルのパターンを含む、2型糖尿病基準発現プロファイル。

10

【請求項65】

前糖尿病状態と診断されていない、または前糖尿病状態に罹患しているとして同定されていない1つ以上の対象で検出された1つ以上のDBMARKERの発現レベルのパターンを含む、前糖尿病状態基準発現プロファイル。

【請求項66】

2型糖尿病と診断された、または2型糖尿病に罹患しているとして同定された、2型糖尿病を発症するリスクに瀕した、あるいは2型糖尿病について治療されている1つ以上の対象で検出された発現レベルのパターンを含む、2型糖尿病対象発現プロファイル。

20

【請求項67】

前糖尿病状態と診断された、また前糖尿病状態に罹患しているとして同定された、前糖尿病状態を発症するリスクに瀕した、あるいは前糖尿病状態について治療されている1つ以上の対象で検出された発現レベルのパターンを含む、前糖尿病状態対象発現プロファイル。

【請求項68】

1つ以上のDBMARKERを検出するDBMARKER検出試薬と、正常血糖レベルを有する対象から導出したサンプルと、任意に請求項64～67のいずれか一項に記載の発現プロファイルを生成する試薬を使用するための説明書とを含むキット。

【請求項69】

前記検出試薬が1つ以上の抗体またはその断片、1つ以上のアプタマー、1つ以上のオリゴヌクレオチド、あるいはそれらの組合せを含む、請求項68に記載のキット。

30

【請求項70】

1つ以上のDBMARKERまたはその代謝産物の治療的有効量と、製薬的に許容される担体または希釈剤とを含む、対象における2型糖尿病または前糖尿病状態を治療するための製薬組成物。

【請求項71】

前記DBMARKER代謝産物が配列番号1を含む、請求項70に記載の製薬組成物。

【請求項72】

前記DBMARKER代謝産物が配列番号1の少なくとも5個の連続アミノ酸残基を含む、請求項70に記載の製薬組成物。

40

【請求項73】

前記DBMARKER代謝産物が配列番号1の少なくとも10個の連続アミノ酸残基を含む、請求項70に記載の製薬組成物。

【請求項74】

前記DBMARKER代謝産物が配列番号1の少なくとも15個の連続アミノ酸残基を含む、請求項70に記載の製薬組成物。

【請求項75】

前記DBMARKER代謝産物が配列番号1の少なくとも20個の連続アミノ酸残基を含む、請求項70に記載の製薬組成物。

50

【請求項 76】

前記 D B M A R K E R 代謝産物が配列番号 1 と少なくとも 90% 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 70 に記載の製薬組成物。

【請求項 77】

配列番号 1 および製薬的に許容される担体または希釈剤より本質的に成る製薬組成物。

【請求項 78】

対象に請求項 70 または請求項 77 に記載の製薬組成物の治療的有効量を投与するステップを含む、治療を必要とする該対象において 2 型糖尿病または前糖尿病状態を治療する方法。

【請求項 79】

前記対象が前記 2 型糖尿病または前記前糖尿病状態について以前に治療されている、請求項 78 に記載の方法。

【請求項 80】

前記対象が前記 2 型糖尿病または前記前糖尿病状態について以前に治療されていない、請求項 78 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は一般に、糖尿病を発症するリスクの上昇に関連する生物学的マーカーの同定はもちろんのこと、このような生物学的マーカーを糖尿病の診断および予後に使用方法にも関するものである。さらに本発明の選択された生物学的マーカーは、療法のための新たな標的を与え、糖尿病の治療または予防のための新たな治療薬を構成する。

【背景技術】

【0002】

真性糖尿病は、代謝において重要な役割を果たす、膵臓で細胞によって産生されるホルモンであるインスリンを人体が産生および/または使用できないことから生じる、慢性の高血糖によって識別される一群の疾患を含む。症状としては、喉の渇きおよび排尿の増加、空腹、体重減少、慢性感染症、創傷治癒遅延、疲労、および不鮮明な視界が挙げられる。しかしながら、しばしば症状は重篤でなく、認識されないか、または症状がない。糖尿病は、失明に至る網膜症、記憶喪失、腎不全に至りうる腎症、心血管疾患、神経障害、自律神経機能障害、および手足切断を含む、消耗性の、および生命を脅かす合併症に至ることがある。これに限定されるわけではないが、インスリン分泌細胞を破壊して、結果的なインスリン欠乏を伴うプロセス、ならびにインスリン取り込みに対して抵抗性を生じる肝臓および平滑筋細胞における変化を含む、複数の病原性プロセスが糖尿病の発症に関与している。糖尿病は、インスリン非感受性またはインスリン欠乏から生じる標的組織に対する不十分なインスリン作用に起因する炭水化物、脂質およびタンパク質代謝の異常も含みうる。

【0003】

2 型糖尿病は糖尿病の最も一般的な形であり、通例は、体がインスリンを適正に使用できないこと(当分野では「インスリン抵抗性」としても公知)に伴う、絶対的というよりは相対的なインスリン欠乏の結果として発症する。2 型糖尿病は、小児を含めて過体重の人に現れることが多い;他のリスク因子としては、高コレステロール、高血圧、民族性、および遺伝因子、たとえば糖尿病の家族歴が挙げられる。2 型糖尿病の患者の大多数が肥満であり、肥満自体がインスリン抵抗性を引き起こしうるか、または悪化させうる。成人は別として、ますます多くの小児も 2 型糖尿病と診断されている。疾患の進行性性質のために、糖尿病合併症はこれらの小児が成人になるときまでに発現することが多い。American Diabetes Association (ADA) による研究は、17 歳以前に糖尿病と診断された小児 51 つを含んでいた。これらの小児がその 30 代初めに達するときまでに、3 名が腎不全を有し、1 つが盲目であり、2 名が透析中に心臓発作で死亡した。本研究は、該疾患の重症度、糖尿病合併症によって与えられた深刻な損傷、お

10

20

30

40

50

よび該疾患の早期診断の必要性を強調している。

【0004】

糖尿病の発生率は、警戒すべき数値まで急激に上昇してきた。糖尿病は現在、世界中で約1億7000万人が罹患しており、World Health Organization (WHO) は2025年までに3億人の糖尿病患者を予測している。米国だけで、糖尿病に罹患している人々が2080万人いる(人口の約6%で、6番目に最も多く見られる死亡原因)。20~79歳の年齢層の人々に対する世界中の糖尿病の年間直接医療費は約1530~2860億ドルと見積もられ、2025年には2130~3960億ドルまで上昇すると予想されている。

【0005】

糖尿病と診断された人口の増加と共に、主として2型糖尿病がその早期には無症候性であることが多いため、または高血糖が糖尿病の目立った症状を誘発するほど深刻でないことが多いため、診断未確定の糖尿病人口も引き続き増加している。米国における糖尿病患者2080万人の約33%が診断未確定のままであると考えられる。診断の遅れのために、糖尿病合併症はすでに進行しており、それゆえさらなる合併症および脱線の将来のリスクが大幅に上昇する。複数の臓器への合併症および可逆的損傷を防ぐために、糖尿病管理ガイドラインは、疾患の予後の早期における治療的介入の開始を提唱している。

【0006】

この現代の流行は、2型糖尿病が深刻で回復不能な損傷を引き起こす前に、2型糖尿病の早期検知のための新たなツールを必要としている。加えて、患者の健康における重度の悪化を停止、遅延、または改善するための、理想的には疾患の経過を部分または完全治癒まで逆行させる新たな治療パラダイムが、疾患症状の慢性的管理に対処するに過ぎない現在の治療の代替または代用として必要とされている。糖尿病性高血糖は、体重減少、身体活動の向上、および/または治療的処置様式によって低下させられうる。複数の生物学的機構が、高血糖、たとえばインスリン抵抗性、インスリン分泌、および糖新生に関連しており、これらの機構の1つ以上に作用する複数の薬剤、たとえばこれに限定されるわけではないが、メトホルミン、アカルボース、およびロシグリタゾンがある。

【0007】

前糖尿病状態が糖尿病などの血糖障害の検知前に10年以上存在しうることが文書に十分に記録されている。前糖尿病の治療剤による治療は糖尿病を遅延または予防できる；しかし同定および治療される前糖尿病はほとんどない。主な理由は上記のように、糖尿病を発症する個体の実際のリスクを判定する簡単な実験室試験が存在しないことである。それゆえ当分野には、まだ糖尿病ではないが、糖尿病を発症する重大なリスクに瀕している個体を同定および診断する方法への要求が残存している。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明は、明白な疾患が明らかになるずっと前に、疾患関連バイオマーカーが血清または他の体液中で同定されうるという発見を前提としている。2型糖尿病に罹患している患者の血清フットプリントからのこれらのバイオマーカーの存在または非存在は、血糖制御の混乱に先行して、早期診断ツールとして使用可能であり、このことのために非可逆性臓器損傷を予防、遅延、改善、または逆行させるための治療方法が考案され、投与されうる。本発明の疾患関連バイオマーカーの1つまたは複数が、2型糖尿病または関連疾患に罹患している対象を診断するために、または好都合には2型糖尿病または関連疾患について無症候性である対象を診断するために使用されうる。本発明のバイオマーカーは、新しい治療薬の設計にも使用されうる。たとえば糖尿病患者には非存在であり、健常個体に見出されるバイオマーカーは、患者への投与時に症状を緩和する、または疾患を逆行することさえある新たな予防剤または治療剤を構成しうる。

【0009】

したがって一態様において、本発明は、対象からのサンプル中の1つ以上のDBMAR

10

20

30

40

50

K E Rまたはその代謝産物の有効量を測定するステップと、該量を基準値と比較するステップであって、基準値に対する1つ以上のD B M A R K E Rの量の増加または減少が、2型糖尿病または前糖尿病状態に対象が罹患していることを示す、ステップとを含む、対象における2型糖尿病または前糖尿病状態を診断または同定する方法を提供する。

【0010】

一実施形態において、基準値は、指数値、1つ以上の糖尿病リスク予測アルゴリズムまたは算出指数から導出した値、2型糖尿病または前糖尿病状態に罹患していない対象から導出した値、あるいは2型糖尿病または前糖尿病状態と診断された、もしくは2型糖尿病または前糖尿病状態に罹患しているとして同定された対象から導出した値を含む。

【0011】

別の実施形態において、減少は基準値よりも少なくとも10%大きい。別の実施形態において、増加は基準値よりも少なくとも10%大きい。

【0012】

サンプルは、尿、血清、血漿、血球、内皮細胞、組織生検、腓液、腹水、骨髄、間質液、涙、痰、または唾液でありうる。

【0013】

本発明のD B M A R K E Rは、電気泳動によって、免疫化学的に、プロテオミクス技術によって、またはゲノム解析によって検出されうる。免疫化学検出は、ラジオイムノアッセイ、免疫沈降、免疫プロットティング、免疫蛍光アッセイ、または酵素結合イムノソルベント検定法でありうる。プロテオミクス技術は、S E L D I、M A L D I、L C / M S、タンデムL C / M S / M S、タンパク質/ペプチドアレイ、または抗体アレイを含みうる。ゲノム解析は、ポリメラーゼ連鎖反応(P C R)、リアルタイムP C R、マイクロアレイ解析、ノザンプロットティング、またはサザンプロットティングを含みうる。

【0014】

別の実施形態において、対象は2型糖尿病または前糖尿病状態を有すると以前に診断されていない。対象は、2型糖尿病または前糖尿病状態を有すると以前に診断されている対象でもありうる。あるいは対象は2型糖尿病または前糖尿病状態について無症候性でもありうる。

【0015】

本発明の別の態様は、(a)第1期間に対象からの第1サンプル中の1つ以上のD B M A R K E Rの有効量を検出するステップと、(b)第2期間に対象からの第2サンプル中の1つ以上のD B M A R K E Rの有効量を検出するステップと、(c)ステップ(a)で検出した1つ以上のD B M A R K E Rの量を、ステップ(b)で検出した量または基準値と比較するステップとを含む、対象における2型糖尿病または前糖尿病状態の進行を監視する方法を提供する。

【0016】

一実施形態において、対象は2型糖尿病または前糖尿病状態について以前に治療されている。別の実施形態において、第1サンプルは2型糖尿病または前糖尿病状態について治療される前に対象から採取される。第2サンプルは、2型糖尿病または前糖尿病状態について治療された後に対象から採取されうる。他の実施形態において、2型糖尿病または前糖尿病状態の治療は、運動レジメン(exercise regimen)、食事補充物、外科的介入、糖尿病調節剤(diabetes-modulating agent)、またはそれらの組合せを含む。2型糖尿病または前糖尿病状態の進行は、ボディマス指数(BMI)、インスリンレベル、血糖レベル、HDLレベル、収縮期および/または拡張期血圧、あるいはそれらの組合せの変化を検出することによってさらに監視されうる。

【0017】

本発明の別の態様において、(a)2型糖尿病または前糖尿病状態の治療前に対象からの第1サンプル中の1つ以上のD B M A R K E Rの有効量を検出するステップと、(b)2型糖尿病または前糖尿病状態の治療後に対象からの第2サンプル中の1つ以上のD B M A R K E Rの有効量を検出するステップと、(c)ステップ(a)で検出した1つ以上の

10

20

30

40

50

DBMARKERの量を、ステップ(b)で検出した量または基準値と比較するステップとを含む、対象において2型糖尿病または前糖尿病状態の処置レジメンの有効性を監視する方法が提供される。一実施形態において、血糖レベルの変化は、経口耐糖能試験によって検出されうる。

【0018】

本発明のなお別の態様は、第1期間に対象からの第1サンプル中に存在する1つ以上のDBMARKERまたはその代謝産物の有効量を検出するステップと、1つ以上のDBMARKERまたはその代謝産物の量が、2型糖尿病または前糖尿病状態を発症するリスクの低い1つ以上の対象で測定した基準値、あるいは1つ以上の糖尿病調節剤による治療の結果として糖尿病リスク因子の改善を示す1つ以上の対象で測定した基準値に戻るまで、対象を1つ以上の糖尿病調節剤によって治療するステップとを含む、2型糖尿病または前糖尿病状態として診断された、または罹患しているとして同定された対象を治療する方法を提供する。

10

【0019】

一実施形態において、1つ以上の糖尿病調節剤としては、スルホニル尿素、ビッグアニド、インスリン、インスリン類似物質、ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体-(PPAR-)アゴニスト、二重作用性PPARアゴニスト、インスリン分泌促進物質、グルカゴン様ペプチド-1(GLP-1)の類似物質、ジペプチジルペプチダーゼIVの、膵臓リパーゼ阻害薬、-グルコシダーゼ阻害薬、またはそれらの組合せが挙げられる。別の実施形態において、1つ以上の糖尿病調節剤による治療の結果としての糖尿病リスク因子の改善としては、ボディマス指数(BMI)の低下、血糖レベルの低下、インスリンレベルの上昇、HDLレベルの上昇、収縮期および/または拡張期血圧の低下、あるいはそれらの組合せが挙げられる。

20

【0020】

本発明の別の態様は、(a)第1期間に対象からの第1サンプル中の1つ以上のDBMARKERの有効量を検出するステップと、(b)第2期間に対象からの第2サンプル中の1つ以上のDBMARKERの有効量を検出するステップと、(c)ステップ(a)で検出した1つ以上のDBMARKERの量を、ステップ(b)で検出した量または基準値と比較するステップとを含む、2型糖尿病または前糖尿病状態と診断された、あるいは2型糖尿病または前糖尿病状態に罹患しているとして同定された対象のための処置レジメンを選択する方法を提供する。一実施形態において、基準値は、2型糖尿病または前糖尿病状態の1つ以上の治療の結果として糖尿病リスク因子の改善を示す1つ以上の対象から導出される。

30

【0021】

本発明の別の態様は、(a)第1期間に対象からの第1サンプル中の1つ以上のDBMARKERの有効量を検出するステップと、(b)第2期間に対象からの第2サンプル中の1つ以上のDBMARKERの有効量を検出するステップと、ステップ(a)で検出した1つ以上のDBMARKERの量を、ステップ(b)で検出した量または基準値と比較するステップとを含む、対象において2型糖尿病または前糖尿病状態を発症するリスクの変化を評価する方法を提供する。

40

【0022】

別の態様において、対象からのサンプル中の1つ以上のDBMARKERまたはその代謝産物の有効量を測定するステップと、該量を基準値と比較するステップであって、基準値に対する1つ以上のDBMARKERの量の増加または減少が、2型糖尿病または前糖尿病状態に対象が罹患していること、または2型糖尿病に関連する合併症を発症するリスクに瀕していることを示す、ステップとを含む、対象における2型糖尿病に関連する1つ以上の合併症を同定する方法が提供される。

【0023】

一実施形態において、合併症としては、網膜症、失明、記憶喪失、腎症、腎不全、心血管疾患、神経障害、自律神経機能障害、高血糖性高浸透圧性昏睡、またはそれらの組合せ

50

が挙げられる。別の実施形態において、基準値としては、指数値、1つ以上の糖尿病リスク予測アルゴリズムまたは算出指数から導出した値、2型糖尿病と診断された、または2型糖尿病に罹患しているとして同定された対象から導出した値あるいは2型糖尿病に関連する1つ以上の合併症を有するとして以前に同定された対象から導出した値が挙げられる。

【0024】

本発明の別の態様は、2型糖尿病と診断されていない、または2型糖尿病に罹患しているとして同定されていない1つ以上の対象で検出された1つ以上のDBMARKERの発現レベルのパターンを含む、2型糖尿病基準発現プロファイルを提供する。別の態様において、本発明は、前糖尿病状態と診断されていない、前糖尿病状態に罹患しているとして同定されていない1つ以上の対象で検出された1つ以上のDBMARKERの発現レベルのパターンを含む、前糖尿病状態基準発現プロファイルを提供する。本発明は、2型糖尿病と診断された、または2型糖尿病に罹患しているとして同定された、2型糖尿病を発症するリスクに瀕した、あるいは2型糖尿病について治療されている1つ以上の対象で検出された発現レベルのパターンを含む、2型糖尿病対象発現プロファイルも提供する。別の態様において、本発明は、前糖尿病状態と診断された、また前糖尿病状態に罹患しているとして同定された、前糖尿病状態を発症するリスクに瀕した、あるいは前糖尿病状態について治療されている1つ以上の対象で検出された発現レベルのパターンを含む、前糖尿病状態対象発現プロファイルも提供する。

10

【0025】

本発明は、1つ以上のDBMARKERを検出するDBMARKER検出試薬と、正常血糖レベルを有する対象から得たサンプルと、任意に本明細書で開示した発現プロファイルを生成する試薬を使用するための説明書とを含むキットも提供する。検出試薬はたとえば、1つ以上の抗体またはその断片、1つ以上のアプタマー、1つ以上のオリゴヌクレオチド、あるいはその組合せでありうる。

20

【0026】

本発明の別の態様において、1つ以上のDBMARKERまたはその代謝産物の治療的有効量と、製薬的に許容される担体または希釈剤とを含む、対象における2型糖尿病または前糖尿病状態を治療する製薬組成物が提供される。一部の実施形態において、DBMARKER代謝産物は、配列番号1を含む。他の実施形態において、DBMARKER代謝産物は、配列番号1の少なくとも5個の、少なくとも10個の、少なくとも15個の、または少なくとも20個の連続アミノ酸残基を含む。あるいはDBMARKER代謝産物は、配列番号1に少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含みうる。

30

【0027】

本発明は、配列番号1および製薬的に許容される担体または希釈剤より本質的に成る製薬組成物も提供する。

【0028】

また別の態様において、対象に本発明の製薬組成物の治療的有効量を投与するステップを含む、2型糖尿病または前糖尿病状態を治療を必要とする対象において治療する方法が提供される。

40

【0029】

別途定義しない限り、本明細書で使用するすべての技術的および科学的用語は、本発明が関連する分野の当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に記載するのと同様または等価の方法および材料が本発明の実施で使用されうるが、適切な方法および材料が以下で説明される。本明細書で言及するすべての刊行物、特許出願、特許および他の参考文献は、参照によりその全体が明示的に本明細書に組み入れられている。矛盾がある場合には、定義を含めて本明細書が優先される。加えて、本明細書に記載する材料、方法、および実施例は例証のためのみであり、限定するものではない。

【0030】

本発明の他の特徴および利点は、以下の詳細な説明および請求項から明らかとなり、そ

50

れらに含まれる。

【0031】

一例として与えられ、本発明を記載した特定の実施形態に限定するものではない以下の詳細な説明は、参照により本明細書に組み入れられる添付図と併せて理解されうる。

【図面の簡単な説明】

【0032】

【図1】通常飼料(RD)または銅欠乏高シヨ糖飼料(HSD)を与えられたCohen糖尿病抵抗性(CDr)および感受性(CDs)ラットからの膵臓抽出物のタンパク質現プロファイルを示す。総タンパク質抽出物(5 μ g)を還元条件下で調製して、4~12%ポリアクリルアミドゲルに流下させた。

10

【図2A】SELDIQ10アニオン交換表面チップでのCDr-RD、CDs-RD、CDr-HSD、およびCDs-HSDからの血清サンプルのグラフによる比較である。中央値ピークはCDr-RDおよびCDr-HSD(矢印によってマークする)に存在するが、CDs-RDおよびCDs-HSDには存在しない。この異なって発現されたピークからのタンパク質断片は、セルピナ3MのC末端断片として同定された。

【図2B】SELDIによって同定された4.2キロダルトン断片のMS/MSスペクトルである。

【図3A】38アミノ酸セルピナ3M(「D3」とも呼ばれる)ペプチドおよび同様の配列同一性を有するとして同定されたタンパク質のBLAST配列比較を示す。

【図3B】38アミノ酸セルピナ3Mペプチドおよび3Aで同定されたタンパク質をコードする核酸配列のBLAST配列比較を示す。

20

【図3C】図3Aおよび3BのBLAST配列比較で見出された保存アミノ酸モチーフを検出するように設計された変性プライマーを使用するRT-PCR実験の結果を示すアゲロースゲルの写真である。

【図4A】2D/LC分画システムによって解析されたCDr-RD、CDs-RD、CDr-HSDおよびCDs-HSD血清サンプルの2次元マップの写真である。青色バンドの強度は、UV吸収によって214nmにて検出された相対タンパク質量を表す。

【図4B】選択した1次元等電点分画(画分31)のCDr-RD(赤色)対CDs-RD(緑色)の示差2次元逆相HPLC溶離プロファイルを示す。CDs-RDサンプルで独自に同定されたタンパク質を本グラフの下に挙げる。

30

【図5A】2次元ゲル電気泳動(2DE)を使用するCDラット血清サンプルの示差タンパク質プロファイリングを表すタンパク質ゲルの写真である。1次元目のクロマトフォーカシングのpHはpH5~8であり、2次元目の分離は4~20% Tris-HCl SDS-PAGEゲルを使用した。ゲルは視覚化のためにBioSafe Coomassie Staining(Bio-Rad)によって染色した。

【図5B】図5Aで同定したスポットの拡大図である。

【図6】2DEを使用するCohen糖尿病ラットモデルで見出される、異なって発現されたタンパク質を示すグラフ表現を示す。

【図7】2DEによって同定された、異なって発現されたCohen糖尿病ラット血清タンパク質を示すヒストグラムである。

40

【図8】D3超免疫ウサギ血清の、CDr-RDおよびCDr-HSDラット血清に存在する約4kDタンパク質断片との反応性を示したウェスタンプロットの写真である。左の写真では、より高い分子量の二重鎖(49~62kDの範囲における)も超免疫血清と反応して、親タンパク質(およびタンパク質複合体)がRDおよびHSD治療様式の両方の下ですべての系統によって発現されることを示すが、これに対してより小さいサイズの誘導体はCDr系統においてのみ異なって発現される。負の対照として、右の写真は、D3超免疫ウサギ血清の非存在下でインキュベートしたウェスタンプロット膜を示す。

【図9】SELDI解析から算出したCDrラット血清におけるD3ペプチドの濃度を示す。

【図10】一次抗D3血清抗体(1:200希釈)の存在(右パネル)または非存在(左

50

パネル)下での、ホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)にコンジュゲートされた二次ヤギ抗ウサギIgG(1:25000希釈)によってプローブされた、肝臓抽出物(10μg)を含有するゲルの写真である。

【図11】ウサギからのD3超免疫血清を使用した、ヒト血清を解析するウェスタンブロットの写真である。レーン1は分子量マーカーに相当する。レーン2~7は、正常个体(3045NGT)からの単一の血清サンプルの画分を表す。レーン10~14は、2型糖尿病患者(291)からの単一の血清サンプルの画分を表す。

【図12A】CDr-HSDおよびCDs-HSD膵臓抽出物100μgそれぞれを流下させた分取ゲルを示す。正の対照は抗アクチン抗体20μgによって染色して、サブクロンレーンを調節培養上清600μlによって染色した。

【図12B】CDr-HSDおよびCDs-HSD膵臓抽出物100μgそれぞれを流下させた分取ゲルを示す。正の対照は抗アクチン抗体20μgによって染色して、サブクロンレーンを調節培養上清600μlによって染色した。

【図13】SELDIによってアニオン性Q10タンパク質チップ上でプロファイルした全ヒト血清の結果を示す。

【図14】13個のT2Dサンプルおよび16個の正常ヒト血清サンプルで同定された、異なって発現されたタンパク質ピークを示すシュードゲルの写真である。M/Z15.2kDマーカーでは、T2Dサンプルの平均ピーク強度が2.6であったが、これに対して正常サンプルでは、平均ピーク強度は22.2であった。2つのサンプルの差は約9倍であった。M/Z14.8kDマーカーでは、T2Dサンプルの平均強度が4.4であり、正常サンプルでは、平均強度は3.3であった。相対強度比は1.47であった。

【図15】13個のT2Dサンプルおよび16個の正常ヒト血清サンプルで同定された、異なって発現されたタンパク質ピークを示すシュードゲルの写真である。T2Dサンプルの平均ピーク強度は118であったが、これに対して正常サンプルでは、平均ピーク強度は182であった。相対強度の比は0.65であった。各点は個々のサンプルで測定したタンパク質ピークの強度を表す。

【図16】肥満T2D対象(Dr. Cheathamのサンプル)対非肥満T2D対象(Dr. Danknerのサンプル)から取得したサンプルにおける示差アルブミンプロファイリングを示すグラフである。

【図17A】O.D.450nmの吸光度によって測定されたCDs-HSDおよびCDr-HSD特異的ハイブリドーマコロニーのELISA反応性のグラフ表現である。

【図17B】O.D.450nmの吸光度によって測定されたCDs-HSDおよびCDr-HSD特異的ハイブリドーマコロニーのELISA反応性のグラフ表現である。

【図18A】CDs-HSDおよびCDr-HSD特異的ハイブリドーマクロンP2-10-B8-KA8、P1-14-A2-E-H8、P2-4-H5-K-B4、P1-20-B7-F-C1、P2-13-A9-P-A8、およびP1-5-F11-XF5の反応性を示すウェスタンブロットの写真である。

【図18B】CDs-HSDおよびCDr-HSD特異的ハイブリドーマクロンP2-10-B8-KA8、P1-14-A2-E-H8、P2-4-H5-K-B4、P1-20-B7-F-C1、P2-13-A9-P-A8、およびP1-5-F11-XF5の反応性を示すウェスタンブロットの写真である。

【図18C】CDs-HSDおよびCDr-HSD特異的ハイブリドーマクロンP2-10-B8-KA8、P1-14-A2-E-H8、P2-4-H5-K-B4、P1-20-B7-F-C1、P2-13-A9-P-A8、およびP1-5-F11-XF5の反応性を示すウェスタンブロットの写真である。

【図19】CDs-HSDおよびCDr-HSDに由来する特異的ハイブリドーマクロンによる免疫沈降後のクマシー染色SDSポリアクリルアミドゲルの写真である。

【図20A】図18のSDS-PAGEゲルから切除した下バンドのMSスペクトル解析のスクリーンショットである。下バンドのカルネキシンとしての確実な同定が行われた。

【図20B】図18のSDS-PAGEゲルから切除した下バンドのMSスペクトル解析

10

20

30

40

50

のスクリーンショットである。下バンドのカルネキシンとしての確実な同定が行われた。

【図21】Cohen 2型糖尿病ラット膵臓における137個の異なって発現された遺伝子の散布図を示す。アップレギュレートおよびダウンレギュレートされた遺伝子の両方がプロットに示されている。

【図22A】Cohen 2型糖尿病ラット膵臓に存在する12,729個の遺伝子の遺伝子系統樹マイクロアレイ解析を示す。

【図22B】Cohen 2型糖尿病ラット膵臓において、発現が2倍の変化を有することが判明した820個の遺伝子、および発現が3倍の変化を有することを示した137個の遺伝子の、遺伝子系統樹マイクロアレイ解析を示す。

【図22C】K平均クラスタリングによって分類されたような、発現が3倍の変化を示す137個の遺伝子のセット1~5を示す。

【発明を実施するための形態】

【0033】

本発明は、糖尿病または前糖尿病状態を有する、あるいは糖尿病または前糖尿病状態を発症する素因のある対象に関連付けられたバイオマーカーの同定に関する。したがって本発明は、本明細書で開示するバイオマーカーの検出により、糖尿病または前糖尿病状態について無症候性である対象を含めて、糖尿病または前糖尿病状態の素因がある対象を同定する診断および予後方法の特徴とする。バイオマーカーは、2型糖尿病に関する合併症を有する、または発症するリスクに瀕した対象を同定するためにも好都合に使用される。これらのバイオマーカーは、糖尿病または前糖尿病状態の治療および療法を受けている対象を監視するのに、そして糖尿病または前糖尿病状態を有する対象において有効である療法および治療を選択するのに有用であり、このような治療および療法の選択および使用は、糖尿病または前糖尿病状態の進行を低速化させるか、あるいはその発病を実質的に遅延または予防する。本発明のバイオマーカーは、2型糖尿病または関連状態を有する対象を治療するために使用される製薬組成物の形でありうる。

【0034】

本明細書で使用する場合、「a」、「an」および「the」は、文脈が別途明確に示さない限り、単数形および複数形の指示物を含む。それゆえたとえば「an active agent (1つの活性剤)」または「a pharmacologically active agent (1つの薬理的活性剤)」とは、単数の活性剤はもちろんのこと、2つ以上の別の活性剤の組み合わせも含み、「a carrier (1つの担体)」とは、2つ以上の担体の混合物はもちろんのこと、単数の担体も含む。

【0035】

「真性糖尿病」は本発明の文脈において、自己免疫性および特発性の両方の1型糖尿病ならびに2型糖尿病(合せて「糖尿病」)を含む。World Health Organizationは、真性糖尿病について空腹時血漿血糖濃度 7.0 mmol/L (126 mg/dl)以上(全血 6.1 mmol/L または 110 mg/dl)、または2時間血糖レベル 11.1 mmol/L (200 mg/dL)の診断値を定義している。真性糖尿病に対する高いリスクを示す他の値としては、高い動脈圧 $140/90 \text{ mmHg}$; 高い血漿トリグリセリド(1.7 mmol/L ; 150 mg/dL)および/または低いHDLコレステロール(男性では $< 0.9 \text{ mmol/L}$ 、 35 mg/dl ; 女性では $< 1.0 \text{ mmol/L}$ 、 39 mg/dL); 中心性肥満(男性: 腹囲対臀囲比 > 0.90 ; 女性: 腹囲対臀囲比 > 0.85)および/または 30 kg/m^2 を超えるボディマス指数; ミクロアルブミン尿症、尿中アルブミン排泄率 $> 20 \mu\text{g/分}$ またはアルブミン:クレアチニン比 30 mg/g の場合)が挙げられる。

【0036】

「前糖尿病状態」は、正常グルコース恒常性および代謝と、明白な真性糖尿病で見られる状況との中間である代謝状況を指す。前糖尿病状態としては制限なく、メタボリックシンドローム(シンドロームX)、耐糖能異常(IGT)、および空腹時血糖異常(IFG)が挙げられる。IGTは、グルコース調節の食後異常を指すが、IFGは空腹状態で測

10

20

30

40

50

定される異常を指す。World Health Organizationは、IFGの値を 6.1 mmol/L (100 mg/dL)以上(全血 5.6 mmol/L ; 100 mg/dL)であるが、 7.0 mmol/L (126 mg/dL)未満(全血 6.1 mmol/L ; 110 mg/dL)の空腹時血漿血糖濃度として定義している。全米コレステロール教育プログラム(NCEP)基準によるメタボリックシンドロームは、次：血圧 $130/85 \text{ mmHg}$; 空腹時血漿血糖 6.1 mmol/L ; 胴囲 $>102 \text{ cm}$ (男性)または $>88 \text{ cm}$ (女性); トリグリセリド 1.7 mmol/L ; およびHDLコレステロール $<1.0 \text{ mmol/L}$ (男性)または 1.3 mmol/L (女性)の少なくとも3つを有するとして定義される。

【0037】

「耐糖能異常」(IGT)は、通常よりは高いが、真性糖尿病として分類されるほど高くない血糖レベルを有するとして定義される。IGTを有する対象は、 75 g 経口耐糖能試験で $140 \sim 199 \text{ mg/dL}$ ($7.8 \sim 11.0 \text{ mmol}$)の2時間血糖レベルを有するであろう。これらの血糖レベルは、正常より上であるが、糖尿病と診断されるレベルよりは低い。耐糖能異常または空腹時血糖異常を持つ対象は、糖尿病を発症する重大なリスクを有し、それゆえ一次予防の重要な標的群である。

【0038】

「インスリン抵抗性」は、体の細胞がインスリンの効果に対して抵抗性となる、すなわち所与の量のインスリンに対する正常な応答が低下する状態を指す。結果として、インスリンがその効果を発揮するために、より高いレベルのインスリンが必要とされる。

【0039】

「2型糖尿病に関連する合併症」または「前糖尿病状態に関連する合併症」としては、制限なく、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症、盲目、記憶喪失、腎不全、心血管疾患(冠動脈疾患、末梢動脈疾患、脳血管疾患、アテローム性動脈硬化、および高血圧を含む)、神経障害、自律神経機能障害、高血糖性高浸透圧性昏睡、またはそれらの組合せが挙げられる。

【0040】

「正常血糖レベル」は、「血糖正常の」という用語と互換的に使用され、 6.1 mmol/L (110 mg/dL)未満の空腹時静脈血漿血糖濃度を指す。この量は任意であるが、このような値は正常耐糖能が証明された対象にて観察されており、しかし一部は経口耐糖能試験(OGTT)によって測定されるようにIGTを有することがある。本発明の文脈での、そして本明細書で定義されるベースライン値、指数値、または基準値としてはたとえば、「正常血糖レベル」が挙げられる。

【0041】

158のバイオマーカーが、糖尿病を有する、または前糖尿病状態に特徴的な症状を示す対象、たとえばインスリン抵抗性である、変化したベータ細胞機能を有する、あるいは公知の臨床パラメータまたはリスク因子、たとえば糖尿病の家族歴、低い活動レベル、質の悪い食事、過体重(特に胴囲付近)、45歳を超えた年齢、高血圧、高レベルのトリグリセリド、35未満のHDLコレステロール、以前に同定された耐糖能異常、以前の妊娠中の糖尿病(「妊娠真性糖尿病」)または体重が9ポンド超の新生児の出産、および民族性に基いて糖尿病を発症するリスクに瀕している対象において、変更または調節された存在または濃度レベルを有するとして同定されている。

【0042】

本発明のバイオマーカーおよび方法は、当業者が、糖尿病または前糖尿病状態のいずれの症状も示さないが、それにもかかわらず糖尿病を発症するリスクに瀕した、または前糖尿病状態に特徴的な症状を経験している対象を同定、診断、またはそうでなければ評価できるようにする。

【0043】

本発明の文脈における「バイオマーカー」という用語は、制限なく、タンパク質、ペプチド、核酸、タンパク質および核酸の多型、スプライス変異体、タンパク質または核酸の

10

20

30

40

50

断片、元素、代謝産物、および他の検体を含む。バイオマーカーは、変異タンパク質または変異核酸も含みうる。「検体」という用語は本明細書で使用する場合、測定されるいずれの物質も意味して、電解質および元素、たとえばカルシウムを含みうる。最後にバイオマーカーは、他の臨床的特徴、たとえば制限なく、年齢、民族性、拡張期および収縮期血圧、ボディマス指数、および安定時心拍数を含む健康状況の非検体生理学的マーカーも指しうる。

【0044】

糖尿病または前糖尿病状態を有する、あるいは糖尿病または前糖尿病状態を発症する素因のある対象においてレベルが変化するタンパク質、ペプチド、核酸、多型、および代謝産物は、表1にまとめられており、本明細書では集合的に、特に「糖尿病関連タンパク質」、「DBMARKERポリペプチド」、または「DBMARKERタンパク質」と呼ばれる。ポリペプチドをコードする対応する核酸は、「糖尿病関連核酸」、「糖尿病関連遺伝子」、「DBMARKER核酸」、または「DBMARKER遺伝子」と呼ばれる。別途指示しない限り、「DBMARKER」、「糖尿病関連タンパク質」、「糖尿病関連核酸」は、本明細書で開示する配列のいずれも指すものとする。本明細書では「DBMARKER代謝産物」と呼ばれる、DBMARKERタンパク質または核酸の対応する代謝産物も測定されうる。1つ以上の、好ましくは2つ以上の上述のクラスのDBMARKERの数学的組合せ測定から生成された算出指数は、「DBMARKER指数」と呼ばれる。タンパク質、核酸、多型、変異タンパク質および変異核酸、代謝産物、および他の検体は、先の実体のいずれかから構築された一般的な生理学的測定値および指数と同様に、「DBMARKER」の広義の分類に含まれる。

10

20

【0045】

興味のある1つのDBMARKERは、約4.2kDの分子量を有し、セリンプロテアーゼ阻害薬である、セルピナ3MのC末端断片としてさらに同定された。本マーカーはCDr-RDおよびCDr-HSDラットにおいてアップレギュレートされることが示された。本断片のアミノ酸配列決定は、本断片がアミノ酸配列：SGRPPMIVWFNRPFLLI AVSHTHGQTILFMAKVINPVGA（配列番号1）を含むことを明らかにした。

【0046】

本発明の文脈におけるDBMARKER「代謝産物」は、全長ポリペプチドの一部を含む。「部分」という用語によって特定の長さは示されない。DBMARKER代謝産物は、長さがアミノ酸500個未満、たとえば長さがアミノ酸400、350、300、250、200、150、100、75、50、35、26、25、15、または10個以下でありうる。例示的なDBMARKER代謝産物としては、配列番号1の配列（全部または一部）を含みうるペプチドが挙げられる。好ましくはDBMARKER代謝産物は、配列番号1の少なくとも5、10、15、20、25個またはそれ以上の連続アミノ酸を含む。

30

【0047】

「対象」は本発明の文脈において、好ましくは哺乳類である。哺乳類は、ヒト、非ヒト霊長類、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウマ、またはウシでありうるが、これらの例に限定されない。ヒト以外の哺乳類は、真性糖尿病または前糖尿病状態の動物モデルとなる対象として好都合に使用されうる。対象はオスまたはメスでありうる。対象は、以前に糖尿病または前糖尿病状態と診断された、もしくは糖尿病または前糖尿病状態に罹患している、あるいは糖尿病または前糖尿病状態を有するとして同定されたが、任意に糖尿病または前糖尿病状態の治療を受ける必要がなかった対象でありうる。対象は、2型糖尿病または前糖尿病状態に罹患していない対象でもありうる。対象は、2型糖尿病または前糖尿病状態と診断された、あるいは2型糖尿病または前糖尿病状態に罹患しているとして同定されたが、2型糖尿病または前糖尿病状態に対する1つ以上の治療を受けた結果として公知の糖尿病リスク因子の改善を示している対象でもありうる。あるいは対象は、糖尿病または前糖尿病状態を有するとして以前に診断されていない対象でもありうる。たとえば対象は

40

50

、糖尿病または前糖尿病状態の1つ以上のリスク因子を示す対象、あるいは糖尿病リスク因子を示さない対象、あるいは糖尿病または前糖尿病状態について無症候性である対象でありうる。対象は、糖尿病または前糖尿病状態に罹患している、あるいは糖尿病または前糖尿病状態を発症するリスクに瀕している対象でもありうる。対象は、本明細書で定義するような2型糖尿病または前糖尿病状態に関連する1つ以上の合併症と診断された、あるいは合併症を有する同定された対象でもありうるか、もしくは対象は、以前に2型糖尿病または前糖尿病状態に関連する1つ以上の合併症と診断されていない、あるいは合併症を有するとして同定されていない対象でありうる。

【0048】

「サンプル」は本明細書の文脈において、対象から単離された生物学的サンプルであり、たとえば血清、血漿、血球、内皮細胞、組織生検、リンパ液、腓液、腹水、間質液（「細胞外液」としても公知であり、特に歯肉溝滲出液を含む、細胞間の空間に見出される液を含む）、骨髄、痰、唾液、涙または尿が挙げられる。

【0049】

1つ以上の、好ましくは2つ以上のDBMARKERが本発明の実施で検出されうる。たとえば1、2、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155個またはそれ以上のDBMARKERが検出されうる。一部の態様において、本明細書で開示される全158個のDBMARKERが検出されうる。多数のDBMARKERが検出されうる好ましい範囲としては、公知の全DBMARKERまでのいずれかの最大数と対になった、1~158、特に2、5、10、15、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150から選択されるいずれかの最小数、特に1、2、5、10、20、および25によって制限された範囲を含みうる。特に好ましい範囲としては、1~2、1~5、1~10、1~15、1~20、1~25、1~30、1~35、1~40、1~45、1~50、1~55、1~60、1~65、1~70、1~75、1~80、1~85、1~90、1~95、1~100、1~120、1~125、1~130、1~140、1~150、1~158、2~5、2~10、2~15、2~20、2~25、2~30、2~35、2~40、2~45、2~50、2~55、2~60、2~65、2~70、2~75、2~80、2~85、2~90、2~95、2~100、2~120、2~125、2~130、2~140、2~150、2~158、5~10、5~15、5~20、5~25、5~30、5~35、5~40、5~45、5~50、5~55、5~60、5~65、5~70、5~75、5~80、5~85、5~90、5~95、5~100、5~120、5~125、5~130、5~140、5~150、5~158、10~15、10~20、10~25、10~30、10~35、10~40、10~45、10~50、10~55、10~60、10~65、10~70、10~75、10~80、10~85、10~90、10~95、10~100、10~120、10~125、10~130、10~140、10~150、10~158、20~50、20~75、20~100、20~120、20~125、20~130、20~140、20~150、20~158、50~75、50~100、50~120、50~125、50~130、50~140、50~150、50~158、100~125、125~150、および150~158が挙げられる。

診断および予後方法

糖尿病または前糖尿病状態を発症するリスクは、試験サンプル（たとえば対象由来サンプル）中のDBMARKERタンパク質、ペプチド、核酸、多型、代謝産物、および他の検体の「有効量」を検査することと、有効量を基準値または指数値と比較することによって検出されうる。「有効量」は、サンプル中で検出されるDBMARKERの総量またはレベルでありうるか、あるいは「正規化量」、たとえばサンプル中で検出されたDBMARKERとバックグラウンドノイズとの差でありうる。正規化方法および正規化値は、検出方法に応じて異なるであろう。好ましくは、数学的アルゴリズムを使用して複数の個

10

20

30

40

50

々のDBMARKERの結果からの情報を単一の測定値または指数に合成することができる。糖尿病または前糖尿病状態のリスク上昇を有するとして識別された対象は任意に、処置レジメン、たとえば本明細書で定義するような「糖尿病調節剤」などの予防または治療化合物の投与、あるいは糖尿病または前糖尿病状態の発病を予防または遅延するための運動計画または食事補充物の実施を受け入れることが選択されうる。対象から単離されたサンプルはたとえば血液、血漿、血球、内皮細胞、組織生検、リンパ液、腓液、血清、骨髓、腹水、間質液（たとえば歯肉溝滲出液を含む）、尿、痰、唾液、涙または他の体液を含みうる。

【0050】

DBMARKERタンパク質、ペプチド、核酸、多型、代謝産物、または他の検体の量は試験サンプル中で測定されて、正常対照レベルと比較されうる。「正常対照レベル」という用語は、たとえば高齢まで監視され、糖尿病または前糖尿病状態を発症しないことが見出された若年対象の長期研究から採取されたサンプルと比較して、糖尿病または前糖尿病状態に罹患しておらず、糖尿病または前糖尿病状態を有さないと思われる対象で通例見出される、1つ以上のDBMARKERタンパク質、核酸、多型、代謝産物、または他の検体のレベル、あるいはDBMARKER指数を意味する。「正常対照レベル」は、本明細書で定義したような「正常血糖レベル」または「血糖正常レベル」を有する対象から導出した値を含みうる。あるいは正常対照レベルは、糖尿病または前糖尿病状態に罹患している患者に通例見出される1つ以上のDBMARKERタンパク質、ペプチド、核酸、多形、代謝産物、または他の検体のレベルを意味しうる。正常対照レベルは、範囲または指数でありうる。あるいは正常対照レベルは、以前に試験された対象からのパターンのデータベースでありうる。正常対照レベルと比較された1つ以上のDBMARKERタンパク質、核酸、多形、代謝産物、または他の検体の対象由来サンプル中でのレベルの変化は、対象が糖尿病または前糖尿病状態に罹患している、あるいは糖尿病または前糖尿病状態を発症するリスクに瀕していることを示しうる。対照的に、該方法が予防的に利用されるとき、1つ以上のDBMARKERタンパク質、核酸、多型、代謝産物、または他の検体の対象由来サンプルにおける正常対照レベルと比較された同様のレベルは、対象が糖尿病または前糖尿病状態に罹患していない、糖尿病または前糖尿病状態を発症するリスクに瀕していない、あるいは発症するリスクが低いことを示しうる。

【0051】

基準値は、糖尿病状態が既知である（すなわち2型糖尿病または前糖尿病状態と診断された、あるいは2型糖尿病または前糖尿病状態に罹患していると同定された、あるいは2型糖尿病または前糖尿病状態と診断されていない、もしくは2型糖尿病または前糖尿病状態に罹患していると同定されていない）対照対象または集団から導出した値を指しうる、もしくは指数値またはベースライン値でありうる。基準サンプルあるいは指数値またはベースライン値は、治療を受けた1つ以上の対象から取得または導出されうるか、あるいは糖尿病または前糖尿病状態を発症するリスクが低い1つ以上の対象から取得または導出されうるか、あるいは治療受診の結果として糖尿病リスク因子の改善を示している対象から取得または導出されうる。あるいは基準サンプルあるいは指数値またはベースライン値は、治療を受診していない1つ以上の対象から取得または導出されうる。たとえばサンプルは、治療の進展を監視するために、糖尿病または前糖尿病状態の初期治療および糖尿病または前糖尿病状態のその後の治療を受診した対象から採取されうる。基準値は、リスク予測アルゴリズムまたは本明細書で開示したような集団研究による算出指数から導出した値も含みうる。基準値は、2型糖尿病または前糖尿病状態に関連する1つ以上の合併症を有するとして以前に同定された対象から導出した値、あるいは合併症を発症していない、もしくは以前に2型糖尿病または前糖尿病状態に関連する合併症と診断されていない、または合併症を有するとして同定されていない対象から導出した値でもありうる。基準値は、正常対照レベルに対応する、または本明細書で定義した「正常血糖レベル」を有する1つ以上の対象に由来する値も含みうる。

【0052】

10

20

30

40

50

本発明の方法で測定したDBMARKERの(「有効量」でありうる)レベルまたは量の相違は、DBMARKERのレベルまたは量の増加または減少を含みうる。基準値に対するDBMARKERの量の増加または減少は、2型糖尿病または前糖尿病状態の進行、2型糖尿病または前糖尿病状態に関連する合併症の遅延、進行、発症または軽減、2型糖尿病または前糖尿病状態、あるいはそれに関連する合併症を発症するリスクの上昇または下降を示す。増加または減少は、2型糖尿病または前糖尿病状態に対する1つ以上の処置レジメンの成功を示しうるか、あるいは糖尿病リスク因子の改善または逆行を示しうる。増加または減少はたとえば、基準値または正常対照レベルの少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、または、少なくとも50%でありうる。

10

【0053】

DBMARKERのレベル(または量)の差は、好ましくは統計的に有意である。「統計的に有意である」とは、変化が偶然だけで起こると予想されるものより大きいことを意味する。統計的有意性は、当業界で公知のいずれの方法によっても決定されうる。たとえば統計的有意性は、p値によって決定されうる。p値は、実験中の群間の差が偶然によって起こった確率の指標である。(P(z > z_{observed}))。たとえば0.01のp値は、結果が偶然起こった確率が100分の1であることを意味する。p値が小さくなればなるほど、群間の差が治療によって引き起こされた可能性がより高くなる。p値が少なくとも0.05である場合に、変化は統計的に有意である。好ましくはp値は、0.04、0.03、0.02、0.01、0.005、0.001またはそれ以下である。下記のように、本発明の制限なしに、統計的有意性を達成することは、必ずではないが一般に、いくつかのDBMARKERの組合せがパネルで共に使用されて、統計的に有意なDBMARKER指数を達成するために数学的アルゴリズムと併用されることが必要である。

20

【0054】

試験、アッセイ、または方法の「診断精度」は、試験、アッセイ、または方法の、糖尿病または前糖尿病状態を有する、あるいは糖尿病または前糖尿病状態のリスクに瀕した対象を区別する能力が、対象が1つ以上のDBMARKERのレベルにおける「臨床的に有意な存在」または「臨床的に有意な変化」を有するかどうかに基づくことに関与している。「臨床的に有意な存在」または「臨床的に有意な変化」とは、対象(通例は対象からのサンプル)におけるDBMARKERの存在(たとえばミリグラム、ナノグラムなどの質量、またはデシリットル当たりのミリグラムなどの体積当たりの質量または単位体積当たりの転写のコピー数)あるいはDBMARKERの存在の変化が、そのDBMARKERの所定のカットオフ点(または閾値)よりも高く、したがってそのタンパク質、ペプチド、核酸、多型、代謝産物または検体の十分に高い存在がマーカーである糖尿病または前糖尿病状態を対象が有するとを示すことを意味する。

30

【0055】

本発明は、2型糖尿病への転換のリスクの分類的または連続的測定を行うために使用され得、それゆえ前糖尿病と定義された対象の分類を診断する。

40

【0056】

分類的計画では、本発明の方法は正常対象コホートと前糖尿病状態対象コホートを区別するために使用されうる。本発明のこの分類的使用において、「高度の診断精度」および「非常に高度の診断精度」という用語は、前糖尿病状態の存在または非存在を正しく(精密に)示す所定のカットオフ点を持つそのDBMARKER(またはDBMARKER指数; DBMARKER値が、単一のDBMARKERからの、またはDBMARKERの指数から導出されたいずれかの個々の測定値を含む場合)についての試験またはアッセイを指す。完璧な試験は完璧な精度を有する。それゆえ前糖尿病状態を有する対象では、該試験は陽性試験結果のみ示し、「陰性」とされる対象のいずれも報告しない(「偽陰性」はない)。言い換えれば、試験の「感度」(真の陽性率)は100%であろう。他方、そ

50

れゆえ前糖尿病状態を有さなかった対象では、該試験は陰性試験結果のみ示し、「陽性」とされる対象のいずれも報告しない（「偽陽性」はない）。言い換えれば「特異性」（真の陰性率）は100%であろう。試験、たとえば臨床診断試験の特異性、感度、ならびに陽性および陰性予測値について議論している、たとえばO' Mar caigh AS, J acobson RM, " Estimating The Predictive Value Of A Diagnostic Test, How To Prevent Misleading Or Confusing Results, " Clin. Ped. 1993, 32 (8) : 485 - 491を参照。他の実施形態において、本発明は前糖尿病状態を糖尿病から、または糖尿病を正常から区別するために使用されうる。このような使用は、DBMARKERの異なるサブセット（表1に開示したような全DBMARKERからの）、数学的アルゴリズム、および/またはカットオフ点を必要とするが、所期の用途のために診断精度の同じ上述の測定を受ける。

10

【0057】

疾患の分類的診断において、試験（またはアッセイ）のカット点または閾値を変更することは通常、感度および特異性を、ただし定性的に反比例関係で変化させる。たとえばカット点が低くされると、試験された集団内のさらなる対象が通例、カット点または閾値を超える試験結果を有するであろう。カット点を超える試験結果を有する対象は、試験が実施される疾患、状態、または症候群を有するとして報告されるので、カット点を低くすることは、より多くの対象が陽性結果（対象が糖尿病または前糖尿病状態を有すること）を有するとして報告されるようになるだろう。それゆえ糖尿病または前糖尿病状態を有する対象のより高い割合が試験によって、それを有することが示されるであろう。したがって試験の感度（真の陽性率）が上昇するであろう。しかしながら同時に、疾患、状態、または症候群を持たないより多くの人々（たとえば真に「陰性」である人々）が試験によって、カット点を超えたDBMARKER値を有することが示され、したがって試験によって陰性であると正しく示されるのではなく、むしろ陽性として（すなわち疾患、状態、または症候群を有するとして）報告されるので、さらなる偽陽性があるであろう。したがって試験の特異性（真の陰性率）が低下されるであろう。同様にカット点を上昇させることは、感度を低下させて、特異性を上昇させる傾向がある。したがって対象の状態を評価するための提案された医学的試験、アッセイまたは方法の精度および有用性を評価する場合、感度と特異性の両方を常に考慮すべきであり、感度および特異性がカット点の範囲にわたって著しく変化するので感度および特異性が報告されるカット点がどれであるか注意すべきである。

20

30

【0058】

しかしながら試験（またはアッセイ）のカット点の範囲全体にわたって、試験、アッセイ、または方法の感度および特異性の表現を単一の値のみによって可能にする指標がある。その指標は、問題の試験、アッセイまたは方法の受信者動作特性（「ROC」）曲線から導出される。たとえばShultz, " Clinical Interpretation Of Laboratory Procedures, " chapter 14 in Teitz, Fundamentals of Clinical Chemistry, Burtis and Ashwood (eds.), 4th edition 1996, W.B. Saunders Company, pages 192 - 199 ; およびZweigら、" ROC Curve Analysis: An Example Showing The Relationships Among Serum Lipid And Apolipoprotein Concentrations In Identifying Subjects With Coronary Artery Disease, " Clin. Chem., 1992, 38 (8) : 1425 - 1428を参照。

40

【0059】

ROC曲線は、0から1のスケール（たとえば100%）のx軸上の1マイナス特異性に等しい値に対する、0から1のスケール（たとえば100%）のy軸上の感度のx - y

50

プロットである。言い換えれば、それはその試験、アッセイ、または方法での偽陽性率に対する真の陽性率のプロットである。問題の試験、アッセイ、または方法のROC曲線を構築するには、対象は、対象が疾患、状態、または症候群について真に陽性または陰性であるかどうかを判定するために、たとえば問題の試験、アッセイ、または方法とは独立している完全に精密な、または「基準」方法を使用して評価されうる（たとえば冠動脈造影は、冠動脈アテローム性動脈硬化の存在についての基準試験である）。対象はまた、問題の試験、アッセイまたは方法を使用して、各種のカット点について試験され、対象は試験、アッセイ、または方法に従って陽性または陰性として報告される。感度（真の陽性率）および1マイナス特異性に等しい値（偽陽性値と等しい値）が各カット点について決定され、 $x - y$ 値の各対が $x - y$ 図に1つの点としてプロットされる。これらの点を連結する「曲線」がROC曲線である。

10

【0060】

ROC曲線は、感度および特異性が最大化される最適な単一の臨床カットオフまたは治療閾値を決定するためにしばしば使用される；このような状況は、曲線の下に描かれうる1個の最大の長方形の左上角を描くROC曲線上の点を表す。

【0061】

曲線下面積（「AUC」）全体は、試験のカット点の範囲全体にわたって、試験、アッセイ、または方法の感度および特異性の表現を単一の値のみによって可能にする指標である。最大AUCは1であり（完全な試験）、最小面積は2分の1である（たとえば正常対疾患の区別がない面積）。AUCが1に近づけば近づくほど、試験の精度はより良好である。すべてのROCおよびAUCにおいて、問題の疾患および試験後時間水平の定義が暗黙であることに注目すべきである。

20

【0062】

「高度の診断精度」とは、AUC（試験またはアッセイのROC曲線下面積）が少なくとも0.70、望ましくは少なくとも0.75、さらに望ましくは少なくとも0.80、好ましくは少なくとも0.85、さらに好ましくは少なくとも0.90、最も好ましくは少なくとも0.95である試験またはアッセイを意味する。

【0063】

「非常に高度の診断精度」とは、AUC（試験またはアッセイのROC曲線下面積）が少なくとも0.80、望ましくは少なくとも0.85、さらに望ましくは少なくとも0.875、好ましくは少なくとも0.90、さらに好ましくは少なくとも0.925、最も好ましくは少なくとも0.95である試験またはアッセイを意味する。

30

【0064】

あるいは低い罹患率の試験済み集団（1年につき1%未満の発生率の集団として定義される）において、ROCおよびAUCは、試験の臨床有用性に関して誤解を招くおそれがあり、診断精度の程度を判定するために本開示の別の箇所で定義される絶対および相対リスク比が利用されうる。試験される対象の集団も四分位へ分類可能であり、上位四分の一（集団の25%）は、糖尿病または前糖尿病状態を発症または罹患する最も高い相対リスクを持つ対象の群を含み、下位四分の一は、糖尿病または前糖尿病状態を発症する最も低い相対リスクを有する対象の群を含む。一般に低い罹患率の集団における上位四分の一から下位四分の一の2.5倍を超える相対リスクを有する試験またはアッセイから導出された値は、「高度の診断精度」を有すると見なされ、各四分位について5~7倍の相対リスクを有するそれらは非常に高度の診断精度を有すると見なされる。それにもかかわらず各四分位についてわずか1.2~2.5倍の相対リスクを有する試験またはアッセイから導出された値は、臨床的に有用なままであり、疾患のリスク因子として広範に使用される；そのようなことは、そして将来の2型糖尿病の予測に関するインスリンレベルまたは血糖レベルの場合である。

40

【0065】

いずれの試験の予測値も、試験の感度および特異性に、そして試験される集団における状態の罹患率に依存する。この概念は、ベイズ定理に基づいて、スクリーニングされる状

50

態が対象または集団に存在する可能性（試験前確率）が大きければ大きいほど、陽性試験の妥当性はより大きく、結果が真の陽性である可能性がより大きいことを規定する。それゆえ状態が存在する可能性が低いいずれかの集団において試験を使用することについての問題は、陽性結果が限定された値を有する（すなわち偽陽性となりやすい）ことである。同様に非常に高いリスクの集団では、陰性試験結果が偽陰性となりやすい。診断精度、すなわちROC曲線上のカット点を定義することによって、許容されるAUC値を定義することおよび本発明のDBMARKERの有効量を構成するものの相対濃度の許容される範囲を決定することは、当業者がDBMARKERを使用して所定の予測性レベルによって対象を診断または同定できるようにする。

【0066】

診断精度を決定する代わりに方法は、疾患分類またはリスク分類（たとえば前糖尿病状態）が関連する医学会および医学慣行によってなお明確に定義されていないときに一般に使用される、リスクの連続的測定と共に使用されねばならない。

【0067】

「リスク」は本発明の文脈において、特定の期間にわたって事象が発生する確率パーセンテージを指す、「絶対」リスクを意味しうる。絶対リスクは、関連時間コホートの測定後実見に関連して、または関連する期間にわたって追跡された統計的に妥当な歴史的コホートから発生させた指数値に関連してのどちらかで測定されうる。「相対」リスクは、低リスクコホートまたは平均集団リスクのどちらかと比較した対象のリスクの絶対リスクの比であり、臨床リスク因子が評価される方法によって変化しうる。オッズ比、所与の試験結果で陰性事象に対する陽性事象の比も、無転換に対して一般に使用される（オッズは式： $p / (1 - p)$ ）により、式中、 p は事象の確率であり、 $(1 - p)$ は事象なしの確率である。本発明の文脈で評価されうる代わりにの連続尺度としては、糖尿病転換までの時間および治療的糖尿病転換リスク軽減比が挙げられる。

【0068】

このような連続尺度では、算出指数の診断精度の尺度は通例、予測された連続値と実際の観察値（または歴史的指数算出値）との間の線形回帰曲線当てはめに基づいており、 R^2 乗、 p 値および信頼区間などの尺度を利用する。Genomic Health (Redwood City, California)によって商品化された将来の乳癌再発のリスクに関する試験におけるように、歴史的な観察されたコホートの予測に基づく信頼区間（通常、90%または95% CI）を含む、このようなアルゴリズムを使用する予測値が報告されることは珍しくはない。

【0069】

糖尿病への真のリスク転換の最終的な決定因子および基準は、十分に大きい集団内での実際の転換であり、特定の時間長にわたって観察される。しかしながらこのことは、必然的に遡及的視点であり、予防的介入のいずれの機会の後から起こるので問題がある。結果として、糖尿病または前糖尿病状態に罹患している、または糖尿病または前糖尿病状態を発症するリスクに瀕した対象は一般に、当分野で公知の方法によって診断または同定され、将来のリスクは歴史的経験および登録機関の研究に基づいて概算される。このような方法としては、これに限定されるわけではないが、収縮期および拡張期血圧の測定、ボディマス指数の測定、血液サンプルからの総コレステロール、LDL、HDL、インスリンおよび血糖レベルの試験管内決定、経口耐糖能試験、ストレス試験、ヒト血清C反応性タンパク質（hsCRP）の測定、心電図（ECG）、c-ペプチドレベル、抗インスリン抗体、抗ベータ細胞抗体、およびグリコシル化ヘモグロビン（HbA1c）が挙げられる。加えて上記の方法のいずれも、対象が「糖尿病リスク因子の改善」を示したかどうかを評価するために別個にまたは組合せて使用されうる。このような改善としては、制限なく、ボディマス指数（BMI）の低下、血糖レベルの低下、HDLレベルの上昇、収縮期および/または拡張期血圧の低下、インスリンレベルの上昇、あるいはその組合せが挙げられる。

【0070】

10

20

30

40

50

経口耐糖能試験 (OGTT) は主に、妊娠中に、または疫学研究において血糖レベルが疑わしいときに、真性糖尿病または前糖尿病状態の診断に使用される (Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications, Part 1, World Health Organization, 1999)。OGTTは、少なくとも3日間の制限されない食事 (炭水化物1日当たり150g超) および通常 of 身体活動後の朝に実施すべきである。試験前の晩には、合理的な (30~50g) 炭水化物を含有する食事を摂取すべきである。試験の前に8~14時間の一晚絶食を行うべきであり、その間に水は摂取してもよい。空腹時血液サンプルの採取後に、対象は水250~300ml中の無水グルコース75gまたはグルコース-水和物82.5gを5分間のうちに飲むべきである。小児の場合、試験負荷は体重1kg当たりグルコース1.75gで、グルコース総量は75である。試験のタイミングは、飲用開始からである。血液サンプルは試験負荷の2時間後に採取する必要がある。先に記載したように、耐糖能異常 (IGT) は、WHOのカットオフ点を使用したときの7.5年間での糖尿病への転換の場合、わずか50%の感度で、>10%の偽陽性であると記載されている。比較的高リスクの民族群でさえ、他のリスク因子によって補強されない限り、このような期間にわたって糖尿病への10%の変換率を有するだけなので、このことは試験の臨床有用性にとって重大な問題である；選択されなかった一般集団では、このような期間にわたる変換率は通例、1年に付き5~6%または1%未満として概算される。

【0071】

血中のグルコースを測定する他の方法としては、当分野で公知の還元測定法、たとえばこれに限定されるわけではないが、ソモギ-ネルソン法、ヘキソキナーゼおよびグルコースデヒドロゲナーゼを使用する方法、固定化グルコースオキシダーゼ電極、o-トルイジン法、フェリシアニド法およびネオクプロイン自動分析法が挙げられる。全血グルコース値は通常、正常ヘマトクリット読取値を持つ患者の対応する血漿値よりも約15%低く、動脈値は対応する静脈値よりも約7%高い。インスリンを摂取する対象は、1日のうち所定の時刻における血糖の自己測定によって「血糖プロフィール」を構築することを頻繁に要求される。各食事の前および90分後、そして就寝直前にサンプルを採取する「7点プロフィール」が有用である。

【0072】

糖尿病または前糖尿病状態に罹患している、または糖尿病または前糖尿病状態を発症するリスクに瀕している対象は、心血管疾患、高血圧または肥満にも罹患しているか、または心血管疾患、高血圧または肥満を発症するリスクにも瀕していることがある。特に2型糖尿病および心血管疾患は共通のリスク因子を多く有し、これらのリスク因子の多くは相互に高度に相関している。これらのリスク因子間の関係は、少数の生理学的現象、おそらく単一の現象にさえ起因しうる。本発明の1つ以上のDBMARKERのレベルの検出に加えて、糖尿病、心血管疾患、高血圧または肥満に罹患している、または糖尿病、心血管疾患、高血圧または肥満を発症するリスクに瀕している対象は当分野で公知の方法によって同定されうる。たとえば糖尿病は、空腹時血糖レベルまたはインスリンを測定することによって頻繁に診断される。正常な成人血糖レベルは60~126mg/dlである。正常なインスリンレベルは7mU/ml ± 3mUである。高血圧は、常に140/90以上の血圧によって診断される。心血管疾患のリスクは、コレステロールレベルを測定することによっても診断されうる。たとえば137を超えるLDLコレステロールまたは200を超える総コレステロールは、心血管疾患のリスク向上を示す。肥満はたとえば、ボディマス指数によって診断される。ボディマス指数 (BMI) は測定される (kg/m² (またはlb/in² × 704.5))。あるいは胴囲 (脂肪分布を推定)、腹囲対臀囲比 (脂肪分布を推定)、皮下脂肪厚 (複数部位で測定される場合、脂肪分布を推定)、または生体インピーダンス (除脂肪量は脂肪量よりも良好に電流を伝導する (すなわち脂肪量は電流を妨害する) という原理に基づき、脂肪%を推定) が測定されうる。正常、過体重、または肥満個体のパラメータは次の通りである：体重不足：BMI < 18.5；正常：B

MI 18.5 ~ 24.9 ; 過体重 : BMI = 25 ~ 29.9。過体重個体は、胸囲 > 94 cm (男性) または > 80 cm (女性) および腹囲対臀囲比 0.95 (男性) および 0.80 (女性) を有するとして特徴付けられる。肥満個体は、身長に対する「正常」体重より 20% 超である BMI 30 ~ 34.9 を有し、体脂肪パーセンテージ > 30% (女性) および 25% (男性) を有し、胸囲 > 102 cm (40 インチ) (男性) または 88 cm (35 インチ) (女性) を有するとして特徴付けられる。重症または病的肥満の個体は、BMI 35 を有するとして特徴付けられる。糖尿病と心血管疾患との相互関係のために、本発明の個々の DB MARKER および DB MARKER 発現プロファイルの一部または全部が重複するか、または心血管疾患のバイオマーカーに含まれることがあり、実際に心血管疾患のリスクの診断に有用でありうる。

10

【0073】

真性糖尿病または前糖尿病状態のリスク予測は、対象が歴史的コホートに関連して糖尿病または前糖尿病状態を発症する絶対リスクを評価および概算する、リスク予測アルゴリズムおよび算出指数も含みうる。このような予測的数学的アルゴリズムおよび算出指数を使用するリスク評価は、診断試験および治療のガイドライン内にますます含まれるようになり、特に代表的集団からの多段階層化サンプルから得られ、それにより検証された指数を含む。複数の在来の糖尿病リスク因子が予測モデルに包含される。このようなアルゴリズムの著名な例としては、Framingham Heart Study (Kannel, W. B. ら、(1976) Am. J. Cardiol. 38: 46 - 51) および Framingham 研究の改良、たとえば NCEP / ATP III としても公知である National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) が挙げられ、NCEP / ATP III は、真性糖尿病、または前糖尿病状態に罹患している、または真性糖尿病、または前糖尿病状態を発症するリスクに瀕している対象で一般に見出される心血管疾患を発症するヒトの 10 年リスクを概算するために、患者の年齢、総コレステロール濃度、HDL コレステロール濃度、喫煙状況、および収縮期血圧を包含する。Framingham アルゴリズムは、真性糖尿病、または前糖尿病状態を発症するリスクを適度に予測することが見出されている。

20

30

【0074】

他の糖尿病リスク予測アルゴリズムとしては、制限なく、San Antonio Heart Study (Stern, M. P. ら、(1984) Am. J. Epidemiol. 120: 834 - 851 ; Stern, M. P. ら、(1993) Diabetes 42: 706 - 714 ; Burke, J. P. ら、(1999) Arch. Intern. Med. 159: 1450 - 1456), Archimedes (Eddy, D. M. and Schlessinger, L. (2003) Diabetes Care 26 (11): 3093 - 3101 ; Eddy, D. M. and Schlessinger, L. (2003) Diabetes Care 26 (11): 3102 - 3110), the Finnish-based Diabetes Risk Score (Lindstrom, J. and Tuomilehto, J. (2003) Diabetes Care 26 (3): 725 - 731)、および the Ely Study (Griffin, S. J. ら、(2000) Diabetes Metab. Res. Rev. 16: 164 - 171) が挙げられ、その内容は参照により本明細書に明示的に組み入れられている。

40

【0075】

Archimedes は、ヒトごとに、目的ごとに疾患状況をシミュレートする糖尿病の数学モデルであり、実際に連続している生物学的詳細事項、たとえば関係する臓器系、50 を超える連続的に相互作用する生物学的変数、ならびに糖尿病に一般に関連する主要な症状、試験、治療、および結果を含む。

50

【0076】

Archimedesは、単一の統合された生理学の中に多くの疾患を同時および相互作用的に含み、共存症、症候群、治療および他の複数の効果などの特徴に対処することを可能にしている。Archimedesモデルは、糖尿病およびその合併症、たとえば冠動脈疾患、うっ血性心不全、および喘息などを含む。該モデルは、オブジェクト指向プログラミングおよび「特徴」と呼ばれるコンストラクトを使用して各種の式で表される。該モデルは、対象の構造（シミュレートされた対象はすべて、臓器、たとえば心臓、肝臓、膵臓、消化管、脂肪、筋肉、腎臓、目、肢、循環系、脳、皮膚、および末梢神経系を有する）、疾患の経過を決定して、実際の身体現象を示す「特徴」（たとえば血漿1デシリットル中のグルコースのミリグラム数、行動的現象、または概念的現象（たとえば疾患の「進行」）、疾患のリスク因子、発生率、および進行、グルコース代謝、徴候および試験、診断、症状、グルコース代謝の健康上の結果、治療、合併症、糖尿病およびその合併症による死、他の原因による死、治療プロセスおよび医療システム資源を含む。該モデルの代表的な利用では、数千名のシミュレートされた対象があり、それぞれシミュレートされた構造および生理学を備え、シミュレートされた疾患を得て、シミュレートされた医療施設での治療を求めることが可能であり、シミュレートされた施設でシミュレートされた医療従事者に面会して、シミュレートされた試験および治療を受けて、シミュレートされた結果を得るであろう。実際と同様に、シミュレートされた患者はそれぞれ異なっており、異なる特質、生理学、行動、および治療に対する応答を備え、すべて実際に見られる個別の変化に適合するように設計されている。

10

20

【0077】

該モデルは、現在の情報で最も良好に理解されるような、関連する生物学および病理学の非定量的または概念的記述 - 変数および関係 - の開発により構築される。次に変数および関係に関する研究が識別され、通例、当分野の専門家が疾患についての独自の知識の基礎として認識する基礎研究、疫学、および臨床研究を含む。その情報は、変数を関連付ける各種の式を開発するために使用される。Archimedesモデルのいずれかの特定の式の開発は、変数に関して入手可能な情報に最良に適合する形および係数を見出すことを含み、その後にはオブジェクト指向言語へプログラミングされる。この後にモデルの部分が、最初は1回に1つずつ、次に適切な組合せで、公知の出力を有する入力を使用して試験およびデバッグされる、一連の演習が続く。次にモデル全体を使用して、モデルの個々の部分だけでなく、すべての部分間の連結も実証する複合試験をシミュレートすることができる。Archimedes計算は、分散コンピューティング技法を使用して実施される。Archimedesは、糖尿病およびその合併症に関連する構造、病態生理学、治療および結果の実際的な表現として検証されてきた (Eddy, D. M. and Schlessinger, L. (2003) Diabetes Care 26(11) 3102-3110)。

30

【0078】

フィンランドを拠点とする糖尿病リスクスコアは、集団内の高リスク対象を同定するための、そして改善可能なリスク因子および健康的なライフスタイルへの認識を向上させるためにスクリーニングツールとして設計されている。糖尿病リスクスコアは、ベースラインにて抗糖尿病薬治療を受けていない35~64歳のフィンランドの男女のランダム集団サンプルから決定して、10年間追跡した。多変量ロジスティック回帰モデル係数を使用して各変数カテゴリにスコアを割り当てた。糖尿病リスクスコアは、これらの個々のスコアの合計を含み、5年間の前向き追跡調査を伴う1992年に実施された独立集団調査で検証された。年齢、BMI、胴囲、降圧薬治療および高血糖の履歴、身体活動、果実、液果、または野菜の日常消費が分類変数として選択された。

40

【0079】

フィンランドを拠点とする糖尿病リスクスコア値は、それらを5つの種類に分類することによってロジスティックモデルの係数から導出された。リスク因子のいずれかの組合せについての10年間の期間にわたる薬物治療糖尿病の概算確率(p)は、次の係数から計

50

算できる：

【 0 0 8 0 】

【 数 1 】

$$P(\text{糖尿病}) = \frac{e^{(\beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots)}}{1 + e^{(\beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots)}}$$

式中、 β_0 は切片であり、 β_1 、 β_2 などは、リスク因子 x_1 、 x_2 などの各種の分類の回帰係数を表す。

【 0 0 8 1 】

感度は、試験が将来薬物治療糖尿病に罹患する対象に対して陽性である確率に関連しており、特異性は、試験が薬物治療糖尿病でない対象に対して陰性である確率を反映する。95%信頼区間(CI)の感度および特異性は、薬物治療糖尿病を発症した対象を発症しなかった対象から区別するとき、各糖尿病リスクスコアレベルについて計算された。ROC曲線は糖尿病リスクスコアについてプロットされ、感度はy軸上にプロットされ、偽陽性率(1 - 特異性)はx軸上にプロットされた。試験がより精密に識別的であればあるほど、ROC曲線の上昇部分がより鋭くなり、AUCがより高くなり、最適カット点は曲線のピークである。

10

【 0 0 8 2 】

糖尿病リスクスコアにおける将来の薬物治療糖尿病の統計的に有意な独立した前兆は、年齢、BMI、胸囲、降圧薬治療、および高い血糖レベルの履歴である。糖尿病リスクスコアモデルには、これらの統計的に有意な変数のみを含む簡易モデルと、身体活動ならびに果実および野菜消費を含むフルモデルがある。

20

【 0 0 8 3 】

San Antonio Heart Studyは、メキシコ系アメリカ人および非ヒスパニック白人における糖尿病および心血管疾患の長期にわたるコミュニティを拠点とする前向き観察研究である。試験は当初、メキシコ系アメリカ人3,301つおよび非ヒスパニック白人男性および非妊婦1,857名を1979~1988年の2回の時期に登録した。参加者は登録時に25~64歳であり、テキサス州サンアントニオで低所得、中所得、高所得地区からランダムに選択した。7~8年間の追跡試験は、試験に当初登録した生存個体の約73%を追跡した。糖尿病の病歴、年齢、性別、民族性、BMI、収縮期および拡張期血圧、空腹時および2時間血漿血糖レベル、空腹時血清総コレステロール、LDL、およびHDLコレステロールレベルはもちろんのこと、トリグリセリドレベルなどのベースライン特質を収集および評価した。従属変数としての糖尿病新規発症を用いた多重ロジスティック回帰モデルおよび上述ベースライン特質は、独立変数として利用した。このモデルを使用すると、単変量オッズ比を男性および女性について別個に、そして両方の性別で合せて、潜在的各リスク因子について計算できる。連続的なリスク因子では、オッズ比は1-SD増分について示されうる。両方の性別を合せた多変量予測モデルは、個別に調査したときに統計的に有意なオッズ比を示した変数をモデルに入れることが許容される段階的ロジスティック回帰手順を使用して開発できる。多変量モデルは次に、ROC曲線およびDeLongによって記載されたような(DeLong E.R.ら、(1988) Biometrics 44: 837-45)ノンパラメトリックアルゴリズムによって概算されたROC曲線下面積の95%CIによって解析される。San Antonio Heart Studyの結果は、前糖尿病対象がリスク因子のアテローム発生パターン(おそらく肥満、高血糖、および特に高インスリン血症によって生じる)を有し、それが多年にわたって存在することがあり、臨床的糖尿病自体の期間と同じだけ大血管疾患のリスクの原因となりうることを示している。

30

40

【 0 0 8 4 】

糖尿病および前糖尿病状態のリスクを評価するために使用されてきた多くの研究およびアルゴリズムにもかかわらず、証拠に基づく多リスク因子評価手法は、無症候性個体またはそうでなければ健常被験者において糖尿病または前糖尿病状態を顕在化させる短期およ

50

び長期リスクの予測のために、きわめて適度に精密である。このようなリスク予測アルゴリズムは、興味のある集団内の対象を区別して糖尿病または前糖尿病状態を発症するリスク層別化を決定するために、本発明のDBMARKERと組合せて好都合に使用されうる。本明細書で開示するDBMARKERおよび使用方法は、無症候性であり、在来のリスク因子を示さない対象を評価、識別、または診断するために、このようなリスク予測アルゴリズムと組合せて使用されうるツールを提供する。

【0085】

リスク予測アルゴリズムから、そして本発明の方法から導出されたデータは、線形回帰によって比較されうる。線形回帰解析は、線形式を観察されたデータに当てはめることによって2つの変数間の関係をモデル化する。1つの変数は説明変数と見なされ、他方は従属変数と見なされる。たとえばArchimedesまたはSan Antonio Heart解析から取得した値は、算出されたアルゴリズムスコアに潜在する基礎を成す生物学をさらに十分に定義する目的で、従属変数として使用され、説明変数としての1つ以上のDBMARKERのレベルに対して解析されうる（実施例を参照）。あるいはこのようなリスク予測アルゴリズム、または一般にDBMARKER自体であるその個々の入力、本発明の実施に直接包含され、組合せられたアルゴリズムは、歴史的コホートにおける実際の観察結果と比較される。

【0086】

線形回帰直線は $Y = a + bX$ という形の式を有し、式中、 X は説明変数であり、 Y は従属変数である。線の傾きは b であり、 a は切片（ $x = 0$ のときの y の値）である。2つの変数の間の関連の数値尺度は、「相関係数」、すなわち R であり、2つの変数について観察されたデータの関連の強度を示す $-1 \sim 1$ の値である。これはしばしば、「決定係数」、すなわち R^2 としての、相関係数の2乗としても報告される；この形では、それは直線を適合させることによって説明される Y の全変動の割合である。回帰直線を適合させる最も一般的な方法は、最小2乗法である。この方法は、各データ点から線までの垂直偏差（点が適合線上に正確に存在する場合、その垂直偏差は0である）の2乗の合計を最小化することによって、観察されたデータについて最良適合線を計算する。偏差が最初に2乗されて、次に合計されるので、正と負の値の間に相殺はない。

【0087】

データ群について回帰直線が算出された後に、ラインから離れて位置する（それゆえ大きい残差値を有する）点は異常値として公知である。このような点は誤データとなりうるか、または不適合回帰線を示しうる。点が水平方向で他のデータから離れている場合、それは影響を及ぼす観測値として公知である。この区別の理由は、これらの点が回帰直線の傾きに重大な影響を有しうることである。回帰モデルがデータ群にいったん適合されると、残差（適合直線から観測値までの偏差）の検定によって当業者は、線形関係が存在するという仮定の妥当性を調査できる。 x 軸上の説明変数に対して残差を y 軸上にプロットすることは、変数間の考えられるいずれかの非線形関係を明らかにするか、または当業者に「潜在変数」を調査するように警告しうる。「潜在変数」は、2つの変数間の関係が、モデル化作業に含まれていなかった第3の変数の存在によって著しく影響されるときに存在する。

【0088】

線形回帰解析は特に、対象からのサンプル中の1つ以上のDBMARKERのレベルを、その対象の実際の観測された臨床結果と相関させることに基づいて、あるいはたとえば算出されたArchimedesリスクスコア、San Antonio Heartリスクスコア、または糖尿病または前糖尿病状態の罹患率を診断または予測する他の公知の方法と組合せて、糖尿病または前糖尿病状態を発症するリスクを予測するために使用されうる。しかしながら特に有用なのは、糖尿病の公知の予測モデルと対象サンプル中で検出されたDBMARKERのレベルとの間の関係を決定するための非線形式および解析である。特に興味深いのは、構造および共同分類アルゴリズム、ならびにK最近傍法、ブースティング、意志決定樹図、ニューラルネットワーク、ベイジアンネットワーク、サポー

10

20

30

40

50

トベクタマシン、および隠れマルコフモデルなどの確立された技法を含む、パターン認識機能の特徴を利用するリスク指数構築の方法である。最も一般的に使用されるのは、Framingham、Finnish、およびSan Antonio Heartリスクスコアの基礎であるロジスティック回帰を使用する分類アルゴリズムであろう。さらにこのような技法の複数のDBMARKERのパネルへの応用は、複数のDBMARKER入力からの情報を含む単一数値「リスク指数」または「リスクスコア」を生成するためのこのような組合せの使用と同様に、本発明の範囲によって、または範囲内に含まれている。

【0089】

因子分析は、多数の相関変数（たとえば糖尿病リスク因子）が、元の変数の分散の大部分を説明する各種の属性を表すより少ない「因子」まで減少されうる数学的技法である（Hanson, R. L.ら、(2002) Diabetes 51: 3120-3127）。それゆえ因子分析は、真性糖尿病および前糖尿病状態の成分、たとえばIGT、IFG、およびメタボリックシンドロームを同定するのに大変適している。これらの解析による因子「スコア」の疫学研究は、メタボリックシンドロームの成分と糖尿病の発症との関係をさらに決定しうる。因子分析の基礎を成す前提は、1組の変数で観測された相関が少数の独自の未測定変数、すなわち「因子」によって説明されうるということである。因子分析は2つの手順を含む：1) 因子の数を推定するための因子抽出、2) 元の変数に関する各因子の構成物を決定するための因子回転。

【0090】

因子抽出は、主成分の方法によって実施されうる。これらの成分は、構築される元の変数の線形組合せであるので、各成分は他の各成分それぞれとゼロの相関を有する。各主成分は、その成分によって説明される元の変数における分散を表す「固有値」と関連付けられる（各元の変数は分散1を有するように標準化される）。構築されうる主成分の数は、元の変数の数と等しい。因子分析では、因子の数は慣習的に、いずれの単一の元の変数よりも全分散のより多くを説明する成分（すなわち > 1 の固有値を持つ成分）のみの保持によって決定される。

【0091】

因子の数がいったん確定されると、次に元の変数に関して最も節減された解釈を有する因子の組成を決定するための因子回転が実施される。因子回転において、各因子と元の変数との相関を表す「因子負荷量」が変更されるので、これらの因子負荷量はできるだけ0または1に近づけられる（因子によって説明される分散の総量が未変化のままであるという制約を伴う）。因子回転のための多数の方法が開発されており、それらが最後の因子の組に相互に非相関のままであることを要求するかどうか（「直交法」）によって、またはそれらが因子を相関させるかどうか（斜交法）によって区別されうる。因子解析の解釈では、元の変数のどれが各因子の主構成要素を表すかを決定するために、因子負荷量のパターンが調査される。慣習的には、 > 0.4 （または -0.4 未満）の因子負荷量を特定の因子と共に有する変数とその主構成要素と見なされる。因子分析は、DBMARKERパネルをその構成要素から構築するのに、そしてマーカーの代用可能な群をグループ化するのに非常に有用でありうる。

【0092】

比較は、同時にまたは時間的に別個の時点で測定した試験（「対象」）サンプルおよび基準（「対照」）サンプルに対して実施されうる。後者の例は、収集された発現情報、たとえばDBMARKERの発現レベルに関する情報を集める配列データベースの使用である。基準サンプル、たとえば対照サンプルが糖尿病を有さない対象からである場合、対象試験サンプルおよび対照基準サンプル中のDBMARKERの量の類似は、治療が有効であることを示している。しかしながら試験サンプルおよび基準サンプル中の1つ以上のDBMARKERの量の変化は、あまり好ましくない臨床結果または予後を反映しうる。「有効な」または「効果的な」とは、治療が1つ以上のDBMARKERの減少または増加、あるいは対象における血清インスリンレベルまたは血糖レベルの低下につながることを意味する。血清インスリンまたは血糖レベルの評価は、標準臨床プロトコルを使用して解

10

20

30

40

50

析されうる。有効性は、糖尿病を診断または治療するいずれかの公知の方法と併せて決定されうる。

【0093】

DBMARKERタンパク質、ペプチド、核酸、多型、代謝産物、または他の検体の有効量のレベルも、糖尿病または前糖尿病状態の治療の経過が監視できるようにする。本方法では、糖尿病の処置レジメン、たとえば薬物治療を受けている対象から生体サンプルが供給されうる。このような処置レジメンとしては、これに限定されるわけではないが、運動計画、食事補給（制限なく、アルファリポ酸、クロム、コエンザイムQ10、ニンニク、マグネシウム、およびオメガ-3脂肪酸を含む）、外科的介入（これに限定されるわけではないが、たとえば胃バイパス、血管形成術など）、糖尿病または前糖尿病状態と診断または同定された対象で使用される治療薬または予防薬、たとえば本明細書で定義するような糖尿病調節剤による治療が挙げられる。所望される場合生体サンプルは、対象から治療前、治療中、または治療後の各種の時点にて採取される。DBMARKERタンパク質、ペプチド、核酸、多型、代謝産物、または他の検体の有効量のレベルは次に決定されて、基準値、たとえばその糖尿病状況が既知である対照対象または集団あるいは指数値またはベースライン値と比較されうる。基準サンプルあるいは指数値またはベースライン値は、治療を受けた1つ以上の対象から取得または導出されうるか、あるいは糖尿病または前糖尿病状態を発症するリスクが低い1つ以上の対象から取得または導出されうるか、あるいは治療受診の結果として糖尿病リスク因子の改善を示している対象から取得または導出されうる。あるいは基準サンプルあるいは指数値またはベースライン値は、治療を受診していない1つ以上の対象から取得または導出されうる。たとえばサンプルは、治療の進展を監視するために、糖尿病または前糖尿病状態の初期治療および糖尿病または前糖尿病状態のその後の治療を受診した対象から採取されうる。基準値は、リスク予測アルゴリズムまたは本明細書で開示したような集団研究による算出指数から導出された値も含みうる。

10

20

【0094】

本発明のDBMARKERはそれゆえ、糖尿病または耐糖能異常などの前糖尿病状態を持たない、そして糖尿病または前糖尿病状態を発症することが予想されない対象にて検出されるDBMARKERの発現レベルのパターンを含む「基準発現プロファイル」を生成するために使用されうる。本明細書で開示するDBMARKERは、糖尿病または耐糖能異常などの前糖尿病状態を有する対象から取得したDBMARKERの発現レベルのパターンを含む「対象発現プロファイル」を生成するためにも使用されうる。対象発現プロファイルは、糖尿病または前糖尿病状態を発症するリスクに瀕した対象を診断または同定するために、疾患の進行はもちろんのこと、2型糖尿病または前糖尿病状態に関連する合併症の発症または発症のリスクを含む、疾患の進行速度も監視するために、そして糖尿病または前糖尿病状態の治療様式の有効性を監視するために、基準発現プロファイルと比較されうる。本発明の基準および対象発現プロファイルは、これに限定されるわけではないが、特にVCRによって読み取り可能なものなどのアナログテープまたはデジタルメディア、CD-ROM、DVD-ROM、USBフラッシュメディアなどの機械読み取り式媒体に含有されうる。このような機械読み取り式媒体は、制限なく、収縮期および拡張期血圧、血糖レベル、インスリンレベル、BMI指数、およびコレステロール（LDLおよびHDL）レベルなどの在来の糖尿病リスク因子の測定値などの追加の試験結果も含有しうる。あるいは、または加えて機械読み取り式媒体は、病歴およびいずれかの関連する家族歴などの対象情報も含みうる。機械読み取り式媒体は、本明細書で開示されているものなどの他の糖尿病リスクアルゴリズムおよび算出指数に関連する情報も含有しうる。

30

40

【0095】

対象の遺伝子構造の相違は、糖尿病または前糖尿病状態の症状またはリスク因子を調節しうる各種の薬剤を代謝するその相対的能力の相違を生じうる。糖尿病または前糖尿病状態を有する、あるいは糖尿病または前糖尿病状態を発症するリスクに瀕した対象は、年齢、民族性、ボディマス指数（BMI）、総コレステロールレベル、血糖レベル、血圧、LDLおよびHDLレベル、ならびに他のパラメータが異なりうる。したがって本明細書で

50

開示したDBMARKERの使用は、選択された対象において試験される推定治療薬または予防薬が対象において糖尿病または前糖尿病状態、あるいはその合併症を治療または予防するのに適するであろうという、所定の予測性レベルを見込んでいる。

【0096】

特定の対象に適切である治療薬または薬剤を同定するために、対象からの試験サンプルを治療薬または薬剤に暴露させて、DBMARKERタンパク質、核酸、多形、代謝産物、または他の検体の1つ以上のレベルを決定できる。1つ以上のDBMARKERのレベルは、治療あるいは治療剤または薬物への暴露前の第1期間および曝露後の第2期間にて対象に由来するサンプルと比較可能であるか、あるいはこのような結果または曝露の結果として糖尿病または前糖尿病状態リスク因子の改善を示した1つ以上の対象に由来するサンプルと比較可能である。糖尿病治療で頻繁に使用され、糖尿病の症状またはリスク因子を調節しうるこのような治療薬または薬剤の例としては、これに限定されるわけではないが、スルホニル尿素、たとえばグリメピリド、グリブリド（当分野でグリベンクラミドとしても公知）、グリピジド、グリクラジド；ピグアナイド、たとえばメトホルミン；インスリン（エクスペラなどの吸入製剤を含む）、およびインスリン類似物質、たとえばインスリンリスプロ（ヒューマログ）、インスリングルギン（ランタス）、インスリンデテミル、およびインスリングルリジン；ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体（PPAR-）アゴニスト、たとえばトログリタゾン（リズリン）、ピオグリタゾン（アクトス）、ロシグリタゾン（アバンディア）、およびイサグリタゾン（ネトグリタゾンとしても公知）を含むチアゾリジンジオン；二重作用性PPARアゴニスト、たとえばBMS-298585およびテサグリタザル；レパグリニドおよびナテグリニドなどのメトグリチニドを含むインスリン分泌促進物質；グルカゴン様ペプチド-1（GLP-1）の類似物質、たとえばエクセナチド（AC-2993）およびリラグルチド（インスリノトロピン）；ジペプチジルペプチダーゼIV（DPP4）の阻害薬、たとえばLAF-237；膵臓リパーゼ阻害薬、たとえばオルリスタット； α -グルコシダーゼ阻害薬、たとえばアカルボース、ミグリトール、およびボグリボース；ならびにそれらの組合せ、特にメトホルミンおよびグリブリド（グルコパンス）、メトホルミンおよびロシグリタゾン（アバンダメット）、ならびにメトホルミンおよびグリピザイド（メタグリップ）が挙げられる。このような治療薬または薬剤は、糖尿病または前糖尿病状態と診断された対象に処方されており、糖尿病または前糖尿病状態の症状またはリスク因子を調節しうる（本明細書では「糖尿病調節剤」）。

10

20

30

【0097】

対象サンプルは候補剤の存在下でインキュベートさせることができ、試験サンプル中のDBMARKER発現のパターンは測定されて、基準プロファイル、たとえば糖尿病基準発現プロファイルまたは非糖尿病基準発現プロファイルあるいは指数値またはベースライン値と比較される。試験剤は、いずれかの化合物または組成物あるいはその組合せでありうる。たとえば試験剤は、糖尿病処置レジメンで頻繁に使用され、本明細書に記載されている薬剤である。

【0098】

表1は、本発明の158のDBMARKERを含む。当業者は、本明細書で示すDBMARKERが、これに限定されるわけではないが、多形、アイソフォーム、突然変異体、誘導体、核酸を含む前駆体、受容体（溶解性および膜貫通受容体を含む）、リガンド、および翻訳後修飾変異体はもちろんのこと、完全構築構造の構成要素サブユニットとしてのDBMARKERのいずれかより成る多ユニット核酸、タンパク質および糖タンパク質構造も含む、すべての形および変異体を含むことを認識するであろう。

40

【0099】

表1：DBMARKER

【0100】

【表 1 - 1】

| DBMARKER | 一般名 | 別名 |
|----------|--------------------------------|--------------------------------------------------|
| 1 | セルピナ 3M | セリンプロテアーゼインヒター-2. 4に類似した、予測タンパク質のC末端断片 |
| 2 | スピン2a | |
| 3 | フェツインベータ | フェタプ; フェツインβ; フェツインB |
| 4 | アポリポタンパク質C-III 前駆物質 | ApoC3 |
| 5 | アポリポタンパク質C2に類似した、予測タンパク質 | ApoC2, 予測 |
| 6 | アルファ-2-HS-糖タンパク質 | α-2-HS-糖タンパク質; Ahsg; フェツインα; フェツインA; Aa2-066 |
| 7 | T-キニンノーゲンII前駆物質 | |
| 8 | アルファ-1-マクログロブリン | α-1-マクログロブリン; A2MG; Pzp; 妊娠域タンパク質 |
| 9 | セルピン C1 | セリン/システインプロテイナーゼインヒター、クレドC、メンバ1(予測) |
| 10 | 凝固因子 2 | F2 |
| 11 | インター-アルファインヒター-H4重鎖 | ITI4 |
| 12 | ビタミンD結合タンパク質 フルベプチド | Gc; VTDB |
| 13 | 低分子量T-キニンノーゲンI前駆物質 | キニンノーゲン; LMW T-キニンノーゲンI前駆物質; 主急性期アルファ-1タンパク質前駆物質 |
| 14 | アポリポタンパク質 A-1 | プレアポリポタンパク質 A-1; ApoA1 |
| 15 | アポリポタンパク質C-II前駆物質に類似した、予測タンパク質 | ApoC2 |
| 16 | トロンピン | プロトロンピン前駆物質; THRB |
| 17 | アポリポタンパク質 E | ApoE |
| 18 | 肝臓再生関連タンパク質 LRRG03 | Tf |
| 19 | アポリポタンパク質 A-IV | ApoA4 |
| 20 | アルファ-1-インヒター-3 前駆物質 | LOC297568 |
| 21 | XP_579384 | |
| 22 | ヒスチジンリッチ糖タンパク質 | Hrg |
| 23 | XP_579477 | |
| 24 | 補体成分C9前駆物質 | C9 |
| 25 | アポリポタンパク質 H | ApoH |
| 26 | B因子、プロパージン | Cfb |
| 27 | ヘモベキシン | Hpx |
| 28 | カルネキシン | Ca(2+)-結合リンタンパク質 p90 |
| 29 | Reg3a | Rn.i1222; 再生臍島由来3アルファ |
| 30 | LOC680945 | Rn.i1414; 間質細胞由来因子2様1に類似 |
| 31 | Pap | Rn.9727; 膵炎関連タンパク質 |
| 32 | Ptfla | Rn.i0536; 膵臓特異的転写因子、 1a |
| 33 | Mat1a | Rn.i0418; メチオニンアデニルトランスフェラーゼI、アルファ |
| 34 | Nupr1 | Rn.i1182; 核タンパク質1 |
| 35 | Rn.i28013 | |
| 36 | Chacl(予測) | Rn.23367; ChaC; カチオン輸送レギュレーター様1 |

10

20

30

【 0 1 0 1 】

【表 1 - 2】

| DBMARKER | 一般名 | 別名 |
|----------|------------|-----------------------------------------------------|
| 37 | Slc7a3 | Rn.9804;溶質担体ファミリー7(カチオン性アミノ酸トランスポーター、y+系)、メンバ3 |
| 38 | LOC312273 | Rn.13006;トリプシン V-A |
| 39 | Rn.47821 | |
| 40 | Ptger3 | Rn.10361;プロスタグランジンE受容体(サブタイプEP3) |
| 41 | RGD1562451 | Rn.199400;Pabpc4予測タンパク質 |
| 42 | RGD1566242 | Rn.24858;RIKEN cDNA 1500009M05に類似 |
| 43 | Cyp2d26 | Rn.91355;チトクロームP450、ファミリー2、サブファミリーd、ポリペプチド26 |
| 44 | Rn.17900 | アルデヒドデヒドロゲナーゼ1ファミリー、メンバL2に類似 |
| 45 | LOC286960 | Rn.10387;プレプロトリプシノーゲンIV |
| 46 | Gls2 | Rn.10202;グルタミナーゼ2(肝臓、ミトコンドリア) |
| 47 | Nme2 | Rn.927;非転移細胞2にて発現 |
| 48 | Rn.165714 | |
| 49 | P2rx1 | Rn.91176;プリン受容体PX2、リガンドゲートイオンチャンネル、1 |
| 50 | Pdk4 | Rn.30070;ピルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ、アインエンザイム4 |
| 51 | Amy1 | Rn.116361;アミラーゼ1;唾液 |
| 52 | Cbs | Rn.87853;シスタチオニンペーダーゼ |
| 53 | Mte1 | Rn.37524;ミトコンドリアアシル-CoAチオエステラーゼ1 |
| 54 | Spink1 | Rn.9767;セリンプロテアーゼインヒビター、Kazal型1 |
| 55 | Gatm | Rn.17661;グリシンアミジトランスフェラーゼ(L-アルギニン:グリシンアミジトランスフェラーゼ) |
| 56 | Tmed6_予測 | Rn.19837;6を含有する膜貫通emp24タンパク質輸送ドメイン |
| 57 | Tff2 | Rn.34367;トレフォイル因子2(鎮座タンパク質1) |
| 58 | Hsd17b13 | Rn.25104;ヒドロキシステロイド(17-ペーダー)デヒドロゲナーゼ13 |
| 60 | Rn.11766 | LRRGT00012に類似 |
| 61 | Gnmt | Rn.11142;グリシンN-メチルトランスフェラーゼ |
| 62 | Pah | Rn.1652;フェニルアラニンヒドロキシラーゼ |
| 63 | セルピニ2 | Rn.54500;セリン/システインプロテイナーゼインヒビター、クレード1、メンバ2 |
| 64 | RGD1309615 | Rn.167687 |
| 65 | LOC691307 | Rn.79735;39アインフォーム2を含有するロイシンリッチ反復と類似 |
| 66 | Eprs | Rn.21240;グルタミル-プロリル-tRNAシターゼ |
| 67 | Pck2_予測 | Rn.35508;ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ2(ミトコンドリア) |
| 68 | Chd2_予測 | Rn.162437;クロモドメインヘリカーゼDNA結合タンパク質2 |
| 69 | Rn.53085 | |
| 70 | Rn.12530 | |
| 71 | NIPK | Rn.22325;トリプルズホモログ; cDNA クローン、RPCAG66 3'末端、mRNA配列 |
| 72 | Slc30a2 | Rn.11135;溶質担体ファミリー30(亜鉛トランスポーター)、メンバ2 |
| 73 | セルピナ10 | Rn.10502;セリン/システインペプチダーゼインヒビター、クレードA、メンバ10 |
| 74 | Cfi | Rn.7424;補体因子1 |
| 75 | Cckar | Rn.10184;コレシストキニンA受容体 |

10

20

30

【 0 1 0 2 】

【表 1 - 3】

| DBMARKER | 一般名 | 別名 |
|----------|-------------|-------------------------------------------------------------|
| 76 | LOC689755 | Rn.151728; LOC689755 |
| 77 | Bhlhb8 | Rn.9897; クラスB、8を含有する塩基性らせん-ループ-らせんドメイン |
| 78 | Anpep | Rn.11132; アラニル(膜)アミノペプチダーゼ |
| 79 | Asns | Rn.11172; アスパラギンシントナーゼ |
| 80 | Slc7a5 | Rn.32261; 溶質担体ファミリー7(カチオン性アミノ酸トランスポーター、y+系)、メンバ5 |
| 81 | Usp43 予測 | Rn.12678; ユビキチン特異的プロテアーゼ43 |
| 82 | Csnk1a1 | Rn.23810; カゼインキナーゼ1、アルファ |
| 83 | Cml2 | Rn.160578; camello様2 |
| 84 | Pabpc4 | Rn.199602 |
| 85 | Gjb2 | Rn.198991; ギャップ結合膜チャンネルタンパク質ベータ2 |
| 86 | Ngfg | Rn.11331; 神経成長因子、ガンマ |
| 87 | Clea2 予測 | Rn.48629 |
| 88 | RGD1565381 | Rn.16083; RIKEN cDNA 181003M07 に類似 |
| 89 | Qscn6 | Rn.44920; quiescin Q6 |
| 90 | Cldn10 予測 | Rn.99994; claudin 10 |
| 91 | Spink3 | Rn.144683; セリンプロテアーゼインヒビター、Kazal型3 |
| 92 | LOC498174 | Rn.163210; NipSnap2タンパク質(神経膠芽腫増幅配列)に類似 |
| 93 | Rn.140163 | メチオニン-tRNAシントナーゼに類似 |
| 94 | Cyr61 | Rn.22129; システインリッチタンパク質61 |
| 95 | RGD1307736 | Rn.162140; KIAA0152 に類似 |
| 96 | Ddit3 | Rn.11183; DNA損傷誘発性転写物3 |
| 97 | Reg1 | Rn.11332; 再生豚島由来1 |
| 98 | Eif4b | Rn.95954; 真核生物翻訳開始因子4B |
| 99 | Rnase4 | Rn.1742; リボヌクレアーゼ、RNase Aファミリー4 |
| 100 | Cebpg | Rn.10332; CCAAT/エンハンサ結合タンパク質(C/EBP)、ガンマ |
| 101 | siat7D | Rn.195322; アルファ-2, 6-シリアルトランスフェラーゼ ST6GalNAc IV |
| 102 | Herpud1 | Rn.4028; ホモシステイン誘発性、ユビキチン様ドメインメンバ1 |
| 103 | 未知のラット cDNA | |
| 104 | Gcat | Rn.43940; グリシンC-アセチルトランスフェラーゼ(2-アミノ-3-オクトチアラート-コエンザイムA)リガーゼ |
| 105 | RGD1562860 | Rn.75246; RIKEN cDNA 2310045A20 に類似 |
| 106 | Hspa9a 予測 | Rn.7535; 熱ショック70kDタンパク質9A |
| 107 | Dbt | Rn.198610; ジヒドロリポアミド分枝鎖トランスアンラーゼE2 |
| 108 | Bspry | Rn.53996; B-boxおよびSPRYドメイン含有 |
| 109 | Fut1 | Rn.11382; フコシルトランスフェラーゼ1 |
| 110 | Rpl3 | Rn.107726; リボソームタンパク質 L3 |
| 111 | Rn.22481 | Similar to NP_083520.1 アシルホスファターゼ 2, 筋肉型 |
| 112 | 未知のラット cDNA | |
| 113 | Vldlr | Rn.9975; 超低密度リポタンパク質受容体 |
| 114 | RGD1311937 | Rn.33652; MGC17299 に類似 |
| 115 | RGD1563144 | Rn.14702; EMeg32 タンパク質に類似 |
| 116 | Rn.43268 | |
| 117 | pre-mtHSP70 | Rn.7535; 70 kD 熱ショックタンパク質前駆物質 |
| 118 | Ddah1 | Rn.7398; シメチルアルギニン |

10

20

30

【 0 1 0 3 】

【表 1 - 4】

| DBMARKER | 一般名 | 別名 |
|----------|-------------|-------------------------------------------|
| | | ジメチルアミノヒドロラーゼ1 |
| 119 | RAMP4 | Rn.21119; リボソーム結合膜タンパク質4 |
| 120 | Rn.169405 | |
| 121 | Ccbl1_予測 | Rn.199045; コラーゲンおよびカルシウム結合EGFドメイン1 |
| 122 | Dnajc3 | Rn.162234; DnaJ (Hsp40) ホモログ、サブファミリー、メンバ3 |
| 123 | Mtac2d1 | Rn.43919; 膜標的(タンデム)C2ドメイン含有1 |
| 124 | RGD1563461 | Rn.199308 |
| 125 | Gimap4 | Rn.198155; GTPase, IMAP ファミリメンバ4 |
| 126 | S100b | Rn.8937; S100タンパク質、ペータバポリペプチド |
| 127 | Klf2_予測 | Rn.92653; Kruppel 様因子2(肺) |
| 128 | RGD1309561 | Rn.102005; FLH31951に類似 |
| 129 | NAP22 | Rn.163581 |
| 130 | Sfrs3_予測 | Rn.9002; スプライシング因子、アルギニン/セリンリッチ3 (SRp30) |
| 131 | Rn.6731 | |
| 132 | Cd53 | Rn.31988; CD53 抗原 |
| 133 | RGD1561419 | Rn.131539; RIKEN cDNA 6030405P05 遺伝子に類似 |
| 134 | Il2rg | Rn.14508; インターロイキン2受容体、ガンマ |
| 135 | LOC361346 | Rn.31250; 染色体18読み取り枠54に類似 |
| 136 | Cd38 | Rn.11414; CD38 抗原 |
| 137 | Plac8_予測 | Rn.2649; プラセンタ特異的8 |
| 138 | LOC498335 | Rn.6917; 小型誘発性サイトカインB13前駆物質 (CXCL13)に類似 |
| 139 | Igfbp3 | Rn.26369; インスリン様成長因子結合タンパク質3 |
| 140 | Ptprc | Rn.90166; タンパク質チロシンホスファターゼ、受容体タイプC |
| 141 | RT1-Aw2 | Rn.40130; RTIクラスIb、位置 Aw2 |
| 142 | Rac2 | Rn.2863; RAS関連C3ボツリヌス基質2 |
| 143 | Rn.9461 | |
| 144 | Fos | Rn.103750; FBJマウス骨肉腫ウイルス癌遺伝子ホモログ |
| 145 | Arhgdib | Rn.15842; Rho, GDP解離インヒビター (CDI) ベータ |
| 146 | Sgnel | Rn.6173; 分泌顆粒神経内分泌タンパク質1 |
| 147 | Lek_マップ済み | Rn.22791; リンパ球タンパク質チロシンキナーゼ (マップ済み) |
| 148 | Fcgr2b | Rn.33323; Fc受容体、IgG、低親和性 IIb |
| 149 | Slnf8 | Rn.137139; Schlafen 8 |
| 150 | Rab8b | Rn.10995; RAB8B, メンバ RAS 癌遺伝子ファミリー |
| 151 | Rn.4287 | |
| 152 | RGD1306939 | Rn.95357; mKIAA0386タンパク質に類似 |
| 153 | Tnfrsf26_予測 | Rn.162508; 腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバ 26 |
| 154 | Ythdf2_予測 | Rn.21737; YTHドメインファミリー2 |
| 155 | RGD1359202 | Rn.10956; 免疫グロブリン重鎖6(Igh-6)に類似 |

10

20

30

【 0 1 0 4】

【表 1 - 5】

| DBMARKER | 一般名 | 別名 |
|----------|------------|------------------------------------------|
| 156 | RGD1562855 | Rn.117926; Igカッパ鎖に類似 |
| 157 | Igha_マップ済み | Rn.109625; 免疫グロブリン重鎖(アルファポリペプチド) (マップ済み) |
| 158 | Ccl21b | Rn.39658; ケモカイン(C-Cモチーフ)リガンド 21b(セリン) |

40

DBMARKERのレベルは、当分野で公知のいずれかの方法を使用して、タンパク質または核酸レベルで決定できる。DBMARKER量は特に、電気泳動によって(たとえばアガロースゲル電気泳動、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)、Tris-HClポリアクリルアミドゲル、非変性タンパク質ゲル、2次元ゲル電気泳動(2DE)などによって)、免疫化学的に(すなわちラジオイムノアッセイ、免疫プロットティング、免疫沈降、免疫蛍光、酵素結合イムノソルベント検定

50

法)、 「プロテオミクス技術」によって、または「ゲノム解析」によって検出されうる。たとえば核酸レベルでは、ノザンおよびサザンハイブリダイゼーション分析はもちろんのこと、これらの配列の1つ以上を特異的に認識するプローブを使用するリボヌクレアーゼ保護アッセイも遺伝子発現を決定するために使用できる。あるいは発現は、たとえば遺伝子の差次的発現配列に特異的なプライマーを使用する逆転写ベースPCRアッセイ(RT-PCR)を使用して測定されうる。発現は、たとえば本明細書に記載する遺伝子産物によってコードされるペプチドのレベル、またはその活性を測定することによってタンパク質レベルで決定されうる。このような方法は当業者に周知であり、たとえば遺伝子、アプタマーまたは分子インプリントによってコードされたタンパク質に対する抗体をベースとするイムノアッセイを含む。いずれの生体物質もタンパク質またはその活性の検出/定量化に使用されうる。あるいは分析された各タンパク質の活性に従って、マーカー遺伝子によってコードされたタンパク質の活性を決定するための適切な方法が選択されうる。

10

【0105】

「プロテオミクス技術」としては、これに限定されるわけではないが、表面増強レーザー脱離イオン化(SELDI)、マトリクス支援レーザー脱離イオン化飛行時間(MALDI-TOF)、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)、質量分析法を用いたまたは用いない液体クロマトグラフィー(LC/MS)、タンデムLC/MS、タンパク質アレイ、ペプチドアレイ、および抗体アレイが挙げられる。

【0106】

「ゲノム解析」は、たとえばポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、リアルタイムPCR(たとえばRoche Applied Sciencesより入手できるLight Cycler(登録商標))、遺伝子発現の連続解析(SAGE)、ノザンプロット解析、およびサザンプロット解析を含む。

20

【0107】

マイクロアレイ技術は、小型の膜または固体支持体(たとえばこれに限定されるわけではないが、顕微鏡スライドガラス、プラスチック支持体、光ファイバ検出手段を用いたまたは用いないシリコンチップまたはウェファ、およびニトロセルロース、ナイロン、またはポリフッ化ビニリデンを含む膜)を含む、遺伝子またはタンパク質発現を解析するツールとして使用されうる。固体支持体は、化学的(たとえばシラン、ストレプトアビジン、および他の多くの例)または物理的(たとえばフォトリソグラフィー)に誘導体化して、興味のある検体、通常は核酸、タンパク質、あるいはその代謝産物または断片の結合を可能にできる。核酸またはタンパク質は、印刷(すなわちインクジェット印刷)、スポット、またはインサイチュー合成されうる。興味のある核酸またはタンパク質の被着は、アレイに正確で再現可能なスポットを与えるピン技術と併せて、x、y、およびz軸に対する非常に精密な移動制御手段を備えた自動スポット機器を利用する、xyzロボットマイクロアレイによって達成されうる。興味のある検体は、特に所望の検体の容易な同定を促進するために、固体支持体上に規則的にまたは固定した配置で位置してある。多数のマイクロアレイフォーマットが特に、Affymetrix、ArrayIt、Agilent Technologies、Asper Biotech、BioMicro、CombiMatrix、GenePix、Nanogen、およびRoche Diagnosticsより市販されている。

30

40

【0108】

興味のある核酸またはタンパク質は、1つ以上の検出可能な標識を用いて標識されたヌクレオチドまたはアミノ酸の存在下で合成されうる。このような標識としては、たとえば蛍光染料および化学発光標識が挙げられる。特にマイクロアレイ検出では、蛍光染料、たとえばこれに限定されるわけではないが、ローダミン、フルオレセイン、フィコエリトリン、Cy3およびCy5などのシアニン染料、ならびにストレプトアビジン-フィコエリトリンなどのコンジュゲート(核酸またはタンパク質がビオチンによって標識されるとき)が頻繁に使用される。

【0109】

50

蛍光信号の検出および画像取り込みは通例、アレイ上に表された相対蛍光強度および検体量の核酸またはタンパク質に対する比を与える、蛍光共焦点レーザー走査または光電管を使用して達成される。多岐にわたる各種の走査装置が利用可能であり、組合された選択基準の数値評価が最適走査条件、たとえば中央値、四分位間範囲（IQR）、飽和スポットのカウント、および対走査間の線形回帰（ r^2 および P ）を定義できるようにする、多数の画像取り込みおよび定量化パッケージがそれらに関連付けられている。走査の再現性は、走査条件の最適化、バックグラウンド補正、および正規化と同様に、データ解析前に評価される。

【0110】

正規化は、アレイ、サブアレイ（またはプリントチップグループ）、および染料 - 標識チャンネル間の系統的な非生物学的相違から生じる影響について、データ平均または変動を調整するために使用される一連のプロセスを指す。アレイは、チップまたは固体支持体上の標的プローブのセット全体として定義される。サブアレイまたはプリントチップグループは、完全アレイ内でプローブの別個のより小規模なアレイとして同定されうる、同じプリントチップによって被着されたこれらの標的プローブのサブセットを指す。染料 - 標識チャンネルは、チップにハイブリダイズされた標的サンプルの蛍光周波数を指す。2つの異なる染料標識サンプルが混合されて、同じチップにハイブリダイズされる実験は、当分野で「二重染料実験」と呼ばれ、「赤色」チャンネルと「緑色」チャンネルとの間の比の対数として表されることが多い、アレイ上の各標的に対して、絶対的ではなく相対的な発現値を生じる。正規化は、レシオメトリックまたは絶対値法に従って実施されうる。レシオメトリック解析は主に、1つのチャンネルまたはアレイが共通基準に関連して考慮される二重染料実験で利用される。各標的プローブの発現の比を試験と基準サンプルの間で計算して、相対的な変化を対称的に表現するために比の \log_2 （比）への変換を続ける。絶対値方法は、チャンネルまたはアレイの適切な基準がない単一染料実験または二重染料実験で頻繁に使用される。関連する「ヒット」は、特定の実験条件を特徴付ける発現レベルまたは量として定義される。通常、発現レベルが、通常、各種の実験条件下での核酸またはタンパク質の発現レベルの比較と、核酸またはタンパク質の相対発現（「倍数変化」）およびサンプル1セットにおけるその発現レベルと、別のセットにおけるその発現との比を解析することによって、各種の実験条件間で著しく異なる核酸またはタンパク質がある。

【0111】

マイクロアレイ実験から取得したデータは、多数の統計解析、たとえばクラスタリング法およびスコアリング法のいずれか1つによって解析されうる。クラスタリング法は、一連の条件またはサンプルにわたって同様に挙動する標的（たとえば核酸および/またはタンパク質）の同定を試みる。このような標的を発見しようとする動機付けは、同様の発現パターンを示す標的が共通の特徴、たとえば共通の調節要素、共通機能、または共通細胞起源を共有しているという仮定によって駆り立てられる。

【0112】

階層的クラスタリングは、単一メンバクラスタがますます大きなクラスタに融合する凝塊形成プロセスである。該手順は、すべての標的分子間の対の距離マトリクスを計算することによって開始し、距離マトリクスは最も近い遺伝子で探索され、それらはクラスタとして定義される。新しいクラスタが2つのクラスタの凝塊形成によって形成された後に、距離マトリクスは他のすべてのクラスタからのその距離を反映するように更新される。次に該手順は、凝塊形成する最も近いクラスタの対を検索する、などである。本手順は、複数のクラスタがその類似性にしたがってノードに融合して、単一の階層的木を生じる、階層的樹状図を生じる。階層的クラスタリングソフトウェアアルゴリズムとしては、ClusterおよびTreeviewが挙げられる。

【0113】

K平均クラスタリングは、その「中心」点または平均によって定義されるクラスタを検索する反復手順である。クラスタ中心のセットがいったん定義されると、各標的分子はそれが最も近接しているクラスタに割り当てられる。クラスタリングアルゴリズムは次に、

遺伝子の各クラスタの中心を調整して、各クラスタにおける標的分子の中心までの距離の和を最小化する。これはクラスタ中心の新たな選択をもたらし、標的分子はクラスタに再度割り当てられる。このような繰り返しは、収束が観察されるまで適用される。自己組織化マップ (SOM) は、データが所定のクラスタのセットに割り当てられるという点で、一部はk平均手順に関連付けられる。しかしながらk平均とは異なり、次に続くのは、各クラスタにおける遺伝子発現ベクターが異なるクラスタ間で最良の差異を見出すように「訓練」されている反復プロセスである。言い換えれば、部分構造がデータに課されて、次に本構造がデータに従って繰り返し調節される。SOMは、たとえばGeneClusterなどの多くのソフトウェアパッケージに含まれる。他のクラスタリング法としては、グラフ理論的および統計的技法を利用して、同じ真のクラスタに属することが多い高度に類似した要素 (カーネル) の密着した群を同定するための、グラフ理論的クラスタリングが挙げられる。複数の発見的手順を次に使用して、カーネルをクラスタリング全体に拡張する。グラフ理論的クラスタリングを利用するソフトウェアの例としては、Expander描出ツールと組合されたCLICKが挙げられる。

10

20

30

40

50

【0114】

高スループット発現解析から取得したデータは、パラメトリックおよび非パラメトリック方法などの統計的方法を使用して評価されうる。パラメトリック手法は、パラメトリック表現内で発現プロファイルモデル化して、実験群のパラメータがどのように異なっているかを問い合わせる。パラメトリック方法の例としては制限なく、t検定、分離スコア、およびベイズt検定が挙げられる。非パラメトリック方法は、データにおける発現プロファイルの分布に関する非アприオリ仮定が行われ、発現測定 of 2つの群が識別される程度が直接検査される、データの解析を含む。別の方法は、発現値に対する単純閾値による、分離連続のサンプル2群を測定する、TNOM、すなわち誤分類の閾値数を使用する。

【0115】

SAGE (遺伝子発現の連続解析) も、遺伝子発現のレベルを系統的に決定するために使用される。SAGEにおいて、転写物を一意的に同定するための十分な情報を含む定義された部分の中の短い配列タグが使用され、連続方式でのタグの連結が続く。たとえばVelculescu V. E.ら (1995) Science 270: 484-487を参照。ポリアデニル化RNAは、オリゴ-dTプライミングによって単離され、cDNAは次にピオチン標識プライマーを使用して合成される。cDNAは次に係留制限エンドヌクレアーゼによって開裂され、3'末端cDNA断片がストレプトアビジンコーティングビーズに結合される。標識酵素の認識部位を含むオリゴヌクレオチドリンカが、結合されたcDNAに結合される。標識酵素は、塩基の定数にて認識部位の3'側でDNAを開裂して、酵素による消化後にビーズからの短いタグおよびリンカの放出を引き起こす、クラスII制限エンドヌクレアーゼでありうる。リンカを備えた放出されたタグの3'末端は次に平滑末端とされて、相互に結合されて、長さが約100塩基対である結合ジタグ (ditag) を形成する。ジタグは次にPCR増幅を受け、その後、リンカおよびタグは係留制限エンドヌクレアーゼを用いた消化によって放出される。その後、タグ (通常はサイズが25~35マーの範囲である) がゲル精製され、連結され、配列ベクター内にクローニングされる。コンカテマーの配列決定によって、個々のタグが同定されるようになり、所与の細胞または組織タイプの転写物の量が決定されうる。

【0116】

DBMARKERタンパク質、ポリペプチド、変異、およびその多型は、当業者に公知のいずれの方法によっても検出されうる。特に有用なのは、タンパク質の混合物 (血清などの生体サンプルに見出されるような) を等電点 (たとえば5~8のpH範囲) によって1次元に、そして分子量によって2次元に分離する2次元ゲル電気泳動である。2次元液体クロマトグラフィーも本発明のDBMARKERタンパク質、ポリペプチド、変異、および多型を同定または検出するのに好都合に使用され、1つの具体的な例である、ProteomeLab PF 2Dタンパク質分画システムを実施例で詳説する。PF 2Dシステムはタンパク質を等電点によって1次元に、そして疎水性によって2次元に分解す

る。タンパク質、ポリペプチド、変異、および多型を検出する別の好都合な方法としては、SELDI（本明細書で開示）および他の高スループットプロテオミックアレイが挙げられる。

【0117】

DBMARKERタンパク質、ポリペプチド、変異、および多形は、通例は対象からのサンプルにDBMARKERタンパク質、ポリペプチド、変異、または多形に結合する抗体を接触させて、次に反応生成物の存在または非存在を検出することによって検出される。抗体は、上で詳細に議論したように、モノクローナル、ポリクローナル、キメラまたは上記の断片であり、反応生成物を検出するステップはいずれの適切なイムノアッセイによっても実施される。対象からのサンプルは通例、上記のような生体液であり、上記の方法を実施するのに使用した生体液の同じサンプルでもよい。

10

【0118】

本発明に従って実施されるイムノアッセイは、同種アッセイまたは異種アッセイでもよい。同種アッセイでは、免疫反応は通常、特異性抗体（たとえば抗DBMARKERタンパク質抗体）、標識検体、および興味のあるサンプルを含む。標識から生じるシグナルは、抗体の標識検体への結合時に直接または間接的に修飾される。免疫反応およびその程度の検出はどちらも均質溶液中で実施される。利用される免疫化学標識としては、フリーラジカル、放射性同位体、蛍光染料、酵素、バクテリオファージ、または補酵素が挙げられる。

20

【0119】

異種アッセイ手法では、試薬は通例サンプル、抗体、および検出可能なシグナルを生成する手段である。上記のようなサンプルが使用される。抗体は、支持体、たとえばビーズ（たとえばタンパク質Aアガロース、タンパク質Gアガロース、ラテックス、ポリスチレン、磁性または常磁性ビーズ）、プレートまたはスライドに固定されて、抗原を含有することが疑われる試料と液相中で接触される。支持体を次に液相から分離して、支持相または液相のどちらかを検出可能なシグナルについてこのようなシグナルを生成する手段を使用して検査する。シグナルはサンプル中の検体の存在に関連付けられる。検出可能な信号を生成する手段としては、放射性標識、蛍光標識、または酵素標識の使用が挙げられる。たとえば検出される抗原が第2結合部位を含有する場合、その部位に結合する抗体は検出可能な基にコンジュゲートされて、分離ステップの前に液相反応溶液に添加される。固体支持体での検出可能な基の存在は、試験サンプル中の抗原の存在を示す。適切なイムノアッセイの例は、オリゴヌクレオチド、免疫プロットイング、免疫沈降、免疫蛍光法、化学発光法、電気化学発光または酵素結合イムノアッセイである。

30

【0120】

当業者は、本明細書で開示した方法を実施するのに有用でありうる多数の特異的イムノアッセイ形式およびその変形に精通するであろう。一般にE. Maggio, *Enzyme-Immunoassay*, (1980) (CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.)を参照; また“*Methods for Modulating Ligand-Receptor Interactions and their Application*”という名称のSkoldらへの米国特許第4,727,022、“*Immunoassay of Antigens*”という名称のForrestらへの米国特許第4,659,678、“*Immuno-metric Assays Using Monoclonal Antibodies*”という名称のDavidらへの米国特許第4,376,110、“*Macromolecular Environment Control in Specific Receptor Assays*”という名称のLitmanらへの米国特許第4,275,149、“*Reagents and Method Employing Channeling*”という名称のMaggioらへの米国特許第4,233,402、“*Heterogenous Specific Binding Assay Employing a Coenzyme as Label*”という名称のBoguslaskiらへの米国特許第4,230,7

40

50

67も参照。

【0121】

抗体は、公知の技法、たとえば受動的結合に従って、診断アッセイに適切な固体支持体（たとえばタンパク質Aまたはタンパク質Gアガロースなどのビーズ、マイクロスフェア、プレート、スライドあるいはラテックスまたはポリスチレンなどの材料から形成されたウェル）にコンジュゲートされうる。本明細書に記載する抗体は、公知の技法に従って同様に、検出可能な標識または基、たとえば放射性標識（たとえば³⁵S、¹²⁵I、¹³¹I）、酵素レベル（たとえばホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ）、および蛍光標識（たとえばフルオレセイン、アレクサ、緑色蛍光タンパク質）にコンジュゲートされうる。

10

【0122】

抗体は、DBMARKERタンパク質、ポリペプチド、突然変異、および多形の翻訳後修飾、たとえばチロシンホスホリル化、トレオニンホスホリル化、セリンホスホリル化、グリコシル化（たとえばO-GlcNAc）を検出するのにも有用でありうる。このような抗体は、興味のある1つまたは複数のタンパク質中のホスホリル化アミノ酸を特異的に検出して、本明細書で記載する免疫プロットング、免疫蛍光法、およびELISAアッセイで使用されうる。これらの抗体は当業者に周知であり、市販されている。翻訳後修飾は、リフレクタマトリクス支援レーザ脱離イオン化飛行時間質量分析(MALDI-TOF)で準安定イオンを使用しても決定されうる(Wirth, U.S. (2002) Proteomics 2(10):1445-51)。

20

【0123】

酵素活性を有することが公知であるDBMARKERタンパク質、ポリペプチド、突然変異、および多形では、活性は当分野で公知の酵素アッセイを使用して試験管内で決定されうる。このようなアッセイとしては制限なく、他の多くのアッセイの中でキナーゼアッセイ、ホスファターゼアッセイ、レダクターゼアッセイが挙げられる。酵素活性の動態の調節は、公知のアルゴリズム、たとえばヒルプロット、ミカエリスメンテン式、線形回帰プロット、たとえばラインウィーバー・パーク解析、およびスキャッチャードプロットを使用して速度定数 K_M を測定することによって判定できる。

【0124】

DBMARKER配列のデータベースエントリーによって与えられる配列情報を使用して、DBMARKER配列の発現は（存在する場合に）、当業者に周知の技法を使用して検出および測定される。たとえばDBMARKER配列に相当する配列データベースエントリー内の、または本明細書で開示する配列内の配列は、たとえばノザンプロットハイブリダイゼーション解析または特異的に、そして好ましくは定量的に特異的核酸配列を増幅する方法で、DBMARKER RNA配列を検出するためのプローブを構築するために使用されうる。別の例として、配列を使用して、たとえば逆転写ベースのポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)などの増幅ベース検出方法においてDBMARKER配列を特異的に増幅するためのプライマーを構築できる。遺伝子発現の改変が遺伝子増幅、欠失、多形、および突然変異に関連付けられるとき、試験および基準細胞集団内の調査されたDNA配列の相対量を比較することによって、試験および基準集団における配列比較を行うことができる。

30

40

【0125】

本明細書で開示した遺伝子の発現は、当分野で公知のいずれかの方法を使用してRNAレベルで測定されうる。たとえばこれらの配列の1つ以上を特異的に認識するプローブを使用するノザンハイブリダイゼーション解析を使用して、遺伝子発現を判定できる。あるいは発現は、たとえば差次的発現配列に特異的なプライマーを使用する逆転写ベースPCRアッセイ(RT-PCR)を使用して測定されうる。

【0126】

あるいはDBMARKERタンパク質および核酸代謝産物または断片が測定されうる。「代謝産物」という用語は、代謝プロセスのいずれの化学または生化学生成物、たとえば

50

生体分子（たとえばタンパク質、核酸、炭水化物、または脂質）の処理、開裂または消費によって生成されたいずれの化合物も含む。代謝産物は、屈折率分光法（R I）、紫外線分光法（U V）、蛍光分析、放射化学分析、近赤外分光法（近 I R）、核磁気共鳴分光法（N M R）、光散乱分析（L S）、質量分析、熱分解質量分析、比濁法、分散ラマン分光法、質量分析と組合されたガスクロマトグラフィー、質量分析と組合された液体クロマトグラフィー、質量分析と組合された飛行時間型マトリクス支援レーザー脱離イオン化（M A L D I - T O F）、表面増強レーザー脱離イオン化（S E L D I）、質量分析と組合されたイオンスプレー分光法、キャピラリー電気泳動、N M RおよびI R検出を含む、当業者に公知の各種方法で検出されうる。（W O 0 4 / 0 5 6 4 5 6およびW O 0 4 / 0 8 8 3 0 9を参照、それぞれその全体が参照により本明細書に組み入れられている）。この点

10

キット

本発明は、D B M A R K E R検出試薬、たとえばD B M A R K E R核酸の一部に相補性である、オリゴヌクレオチド配列などの相同核酸配列、またはD B M A R K E R核酸によってコードされたタンパク質に対する抗体をキットの形で共にパッケージすることによって、1つ以上のD B M A R K E R核酸を特異的に同定する核酸も含む。オリゴヌクレオチドは、D B M A R K E R遺伝子の断片でありうる。たとえばオリゴヌクレオチドは、長さが200、150、100、50、25、10個の、またはそれ以下のヌクレオチドでありうる。

20

【0127】

D B M A R K E R検出試薬は特に、抗体または抗体の断片、およびアプタマーも含みうる。キットは個別の容器内に核酸または抗体（固体マトリクスにすでに結合されているか、またはそれらをマトリクスに結合するための試薬と共に個別に包装されているかのどちらかである）、対照調合物（陽性および/または陰性）、および/または検出可能な標識を含有する。アッセイを実施するための説明書（たとえば書面、テープ、V C R、C D - R O Mなど）がキットに含まれる。アッセイはたとえば、当分野で公知であるようなノザンプロットハイブリダイゼーションまたはサンドイッチE L I S Aの形でありうる。あるいはキットは、当分野で公知であるようなマイクロアレイの形でありうる。

【0128】

本明細書に記載した方法を実施するための診断キットは、多数の方法で作製される。好ましくは、本発明のキットは、正常血糖レベルを有する対象から得た対照（または基準）サンプルを含む。あるいはキットは、2型糖尿病または前糖尿病状態と診断された、または2型糖尿病または前糖尿病状態に罹患しているとして同定された対象から得た対照サンプルを含みうる。一実施形態において、診断キットは（a）固体支持体にコンジュゲートされた抗体（たとえばフィブリノゲン Cドメインペプチド）および（b）検出可能な基にコンジュゲートされた本発明の第2抗体を含む。試薬としては、緩衝剤などの補助剤およびタンパク質安定剤、たとえばポリサッカライドなども挙げられうる。診断キットとしてはさらに、必要な場合は、検出可能な基がメンバ（たとえば酵素基質）であるシグナル生成システムの他のメンバ、試験でのバックグラウンド干渉を低下させる薬剤、対照試薬

30

40

【0129】

たとえばD B M A R K E R検出試薬は、少なくとも1個のD B M A R K E R検出部位を形成するために多孔性ストリップなどの固体マトリクスに固定化されうる。多孔性ストリップの測定または検出領域は、核酸を含有する複数の部位を含みうる。試験ストリップは、陰性および/または陽性対照の部位も含有しうる。あるいは対照部位は試験ストリップとは別のストリップに位置しうる。任意に各種の検出部位は、異なる量の、たとえば第1

50

検出部位により多い量の、そして次の部位により少ない量の固定化核酸を含有しうる。試験サンプルの添加時に、検出可能なシグナルを提示する多数の部位がサンプル中に存在するDBMARKERの量の定量的表示を与える。検出部位はいずれかの適切に検出可能な形状で構成され、通例は試験ストリップの幅に及ぶ棒または点の形状である。

【0130】

あるいはキットは、1つ以上の核酸配列を含む核酸基質アレイを含有する。アレイ上の核酸は、DBMARKER 1~158で表される1つ以上の核酸配列を特異的に同定する。各種の実施形態において、DBMARKER 1~158で表される2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50個またはそれ以上の発現は、アレイへの結合により同定されうる。基質アレイはたとえば固体基質上に、たとえば米国特許第5,744,305に記載されているように「チップ」上にありうる。あるいは基質アレイは、溶液アレイ、たとえばxMAP(Luminex, オースティン、テキサス州)、Cyvera(Illumina, サンディエゴ、カリフォルニア州)、CellCard(Vitro Bioscience, マウンテンビュー、カリフォルニア州)およびQuantum Dots' Mosaic(Invitrogen, カールスバッド、カリフォルニア州)でありうる。

10

【0131】

当業者は、表1のDBMARKERのいずれに対しても、抗体、核酸プローブ、たとえばオリオヌクレオチド、アプタマー、siRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチドを日常的に作製できる。本明細書で示す実施例は、マウスにおけるモノクローナル抗体の産生はもちろんのこと、ウサギからのポリクローナル超免疫血清の産生も説明している。このような技法は当業者に周知である。

20

製薬組成物および治療方法

「治療する」という用語は、本発明に関連したその各種の文法形において、疾患状態、疾患進行、疾患原因因子(たとえば細菌またはウイルス)または他の異常状態の悪影響を予防(すなわち化学的予防)、治癒、逆行、減弱、緩和、最小化、抑制または停止することを指す。たとえば治療は、疾患の1つの症状(すなわち必ずしもすべての症状ではない)を緩和すること、または疾患の進行を減弱することを含みうる。

【0132】

本明細書で使用するように、「治療的有効量」とは、DBMARKERまたは所望の生物学的応答を達成する他の糖尿病調節剤の量を制限することを意味する。本発明の文脈において、所望の生物応答は、対象、たとえばヒトにおける、2型糖尿病、前糖尿病状態、および2型糖尿病または前糖尿病状態に関連する合併症の進行の部分または完全抑制、遅延または予防; 2型糖尿病、前糖尿病状態、もしくは2型糖尿病または前糖尿病状態に関連する合併症の再発の抑制、遅延または予防; あるいは2型糖尿病、前糖尿病状態、もしくは2型糖尿病または前糖尿病状態に関連する合併症の発病または進行の予防(化学的予防)でありうる。

30

【0133】

製薬組成物の一部として好ましく含まれるDBMARKERは、当業者に公知のいずれの公知の投与方法によっても投与されうる。投与経路の例としては、これに限定されるわけではないが、経口、非経口、腹腔内、静脈内、動脈内、経皮、局所、舌下、筋肉内、経直腸、経頬側、経鼻、リポソーム、吸入、経膈、眼内、カテーテルまたはステントによる局所送達、皮下、脂肪内、関節内、髄腔内、または徐放投薬形が挙げられる。DBMARKERまたはDBMARKERを含む製薬組成物は、疾患を治療するのに有効な用量を達成するいずれかの用量または投薬スケジュールに従って投与されうる。

40

【0134】

一例として、本発明のDBMARKERまたはDBMARKERを含む製薬組成物は、経口形、たとえば錠剤、カプセル剤(そのそれぞれが持続放出または徐放調合物を含む)、丸剤、粉剤、顆粒剤、エリキシル剤、チンキ剤、懸濁剤、シロップ剤、およびエマルジョン剤で投与されうる。同様に、DBMARKERまたはDBMARKERを含む製薬組

50

成物は、静脈内（たとえばボラスまたは輸液）、腹腔内、皮下、筋肉内、または製薬分野の当業者に公知の形を使用する他の経路によって投与されうる。

【0135】

DBMARKERまたはDBMARKERを含む製薬組成物は、活性成分の持続放出を可能にするような方法で調合されうるデポ注射またはインプラント調製物の形でも投与されうる。活性成分は、ペレットまたは小型円筒形に圧縮されて、デポ注射またはインプラントとして皮下または筋肉内に植え込まれうる。インプラントは、生分解性ポリマーまたは合成シリコン、たとえばDow-Corning Corporationが製造するSilastic、シリコンゴムまたは他のポリマーなどの不活性材料を利用しうる。

10

【0136】

DBMARKERまたはDBMARKERを含む製薬組成物は、リポソーム送達系、たとえば小型単層ベシクル、大型単層ベシクルおよび多層ベシクルの形でも投与されうる。リポソームは、各種のリン脂質、たとえばコレステロール、ステアリルアミン、またはホスファチジルコリンから形成されうる。糖尿病調節剤のリポソーム調製物は、本発明の方法でも使用されうる。

【0137】

DBMARKERまたはDBMARKERを含む製薬組成物は、化合物分子が結合される個別の担体としてのモノクローナル抗体の使用によっても送達されうる。

【0138】

DBMARKERまたはDBMARKERを含む製薬組成物は、標的化薬物担体として溶解性ポリマーを用いて調製されうる。このようなポリマーとしては、ポリビニルピロリドン、ピランコポリマー、ポリヒドロキシ-プロピル-メタクリルアミド-フェノール、ポリヒドロキシエチル-アスパルトアミド-フェノール、またはバルミトイル残基によって置換されたポリエチレンオキシド-ポリリジンが挙げられうる。さらに、DBMARKERまたはDBMARKERを含む製薬組成物は、薬物の制御放出を達成するのに有用な生分解性ポリマー、たとえばポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリ乳酸およびポリグリコール酸のコポリマー、ポリイプシロンカプロラクトン、ポリヒドロキシ酪酸、ポリオルトエステル、ポリアセタール、ポリジヒドロピラン、ポリシアノアクリレートおよびハイドロゲルの架橋または両親媒性ブロックコポリマーを用いて調製されうる。

20

30

【0139】

DBMARKERまたはDBMARKERを含む製薬組成物は、適切な経鼻ベシクルの局所使用による経鼻形、または当業者に周知の経皮スキンパッチの形を使用する経皮経路によって投与されうる。経皮送達システムの形で投与されるために、投薬量の投与はもちろぬ、投薬計画を通じて間欠的というよりも連続的であろう。

【0140】

本明細書に記載され、本発明の方法での使用に適切な薬剤の、適切な製薬的に許容される塩は従来非毒性塩であり、塩基による塩または酸添加塩、たとえば無機塩基による塩、たとえばアルカリ金属塩（たとえばリチウム塩、ナトリウム塩、カリウム塩など）、アルカリ土類金属塩（カルシウム塩、マグネシウム塩など）、アンモニウム塩；有機塩基による塩、たとえば有機アミン塩（たとえばトリエチルアミン塩、ピリジン塩、ピコリン塩、エタノールアミン塩、トリエタノールアミン塩、ジシクロヘキシルアミン塩、N,N'-ジベンジルエチレンジアミン塩など）など；無機酸添加塩（たとえば塩酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、リン酸塩など）；有機カルボン酸およびスルホン酸塩（たとえばギ酸塩、酢酸塩、トリフルオロ酢酸塩、マレイン酸塩、酒石酸塩、メタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩など）；塩基性または酸性アミノ酸による塩（たとえばアルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸など）などが挙げられうる。

40

【0141】

加えて本発明は、本発明の1つ以上のDBMARKERのいずれの固体または液体物理形を含む製薬組成物も含む。たとえばDBMARKERは、結晶形、アモルファス形であ

50

り、いずれの粒径も有しうる。DBMARKER粒子は微粉化されうるか、または凝集形成されうるか、微粒子、顆粒、粉末、油、油性懸濁物ありは固体または液体物理形の他のいずれかの形でありうる。

【0142】

経口投与では、製薬組成物は液体または固体でありうる。適切な固体経口調合物としては、錠剤、カプセル剤、丸剤、顆粒剤、ペレット剤などが挙げられる。適切な液体経口調合物としては、液剤、懸濁剤、分散剤、エマルジョン剤、油剤などが挙げられる。

【0143】

担体または希釈剤として一般に使用されるいずれの不活性賦形剤、たとえばガム、デンプン、糖、セルロース性物質、アクリル酸塩、またはそれらの混合物も本発明の調合物で使用されうる。組成物は崩壊剤および潤滑剤をさらに含み、加えて結合剤、緩衝剤、プロテアーゼ阻害薬、界面活性剤、可溶化剤、可塑剤、乳化剤、安定剤、増粘剤、甘味料、膜形成剤、またはそれらのいずれかの組合せより選択される1つ以上の添加剤を含みうる。さらに本発明の組成物は、制御放出または即時放出調合物の形でありうる。

10

【0144】

DBMARKERは、目的の投与形に関して適切に選択された適切な製薬的希釈剤、賦形剤または担体（本明細書では集合的に「担体」材料または「製薬的に許容される担体」と呼ばれる）と混合された活性成分として投与されうる。本明細書で使用するように、「製薬的に許容される担体または希釈剤」は、製薬投与に適合する、ありとあらゆる溶媒、分散媒、コーティング、抗菌および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などを含むものとする。適切な担体は、参照により本明細書に組み入れられている当分野の標準参照テキストであるRemington's Pharmaceutical Sciencesの最新版に記載されている。

20

【0145】

液体調合物では、製薬的に許容される担体は水性または非水性溶液、懸濁物、エマルジョンまたは油でありうる。非水性溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、および注射用有機エステル、たとえばオレイン酸エチルである。水性担体としては、生理食塩水および緩衝溶媒を含む、水、アルコール性/水性溶液、エマルジョン、または懸濁物でありうる。油の例は、石油、動物、植物、または合成起源の油、たとえばラッカセイ油、ダイズ油、鉱油、オリーブ油、ヒマワリ油、および魚肝油である。溶液または懸濁物としては、次の成分：滅菌希釈剤、たとえば注射用水、生理食塩溶液、固定油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたは他の合成溶媒；抗菌剤、たとえばベンジルアルコールまたはメチルパラベン；抗酸化剤、たとえばアスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウム；キレート剤、たとえばエチレンジアミンテトラ酢酸(EDTA)；緩衝剤、たとえば酢酸塩、クエン酸塩またはリン酸塩、および張度調整剤、たとえば塩化ナトリウムまたはデキストロースも挙げられうる。pHは、酸または塩基、たとえば塩酸または水酸化ナトリウムによって調整されうる。

30

【0146】

リポソームおよび非水性ビヒクル、たとえば固定油も使用されうる。製薬活性物質へのこのような媒体または薬剤の使用は、当分野で周知である。いずれの従来媒体または薬剤が活性化化合物と不適合である場合を除いて、組成物でのその使用が考慮される。補助活性成分も組成物中に包含されうる。

40

【0147】

固体担体/希釈剤としては、これに限定されるわけではないが、ガム、デンプン（たとえばコーンスターチ、アルファ化でんぷん）、糖（たとえばラクトース、マンニトール、スクロース、デキストロース）、セルロース性物質（微結晶性セルロース）、アクリル酸塩（たとえばポリメチルアクリル酸塩）、炭酸カルシウム、酸化マグネシウム、タルク、またはそれらの混合物が挙げられる。

【0148】

加えて、組成物はさらに、結合剤（たとえばアラビアゴム、コーンスターチ、ゼラチン

50

、カルボマー、エチルセルロース、グアーガム、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポビドン)、崩壊剤(たとえばコーンスターチ、ジャガイモデンプン、アルギン酸、二酸化ケイ素、クロスカルメロースナトリウム、クロスポビドン、グアーガム、デンプングリコール酸ナトリウム、プリモゲル)、各種のpHおよびイオン強度の緩衝剤(たとえばtris-HCl、酢酸塩、リン酸塩)、表面への吸収を防止するアルブミンまたはゼラチンなどの添加剤、洗剤(たとえばTween 20、Tween 80、Pluronic F68、胆汁酸塩)、プロテアーゼ阻害薬、界面活性剤(たとえばラウリル硫酸ナトリウム)、浸透促進剤、可溶化剤(たとえばグリセロール、ポリエチレングリセロール)、流動促進剤(たとえばコロイド状二酸化ケイ素)、抗酸化剤(たとえばアスコルビン酸、メタ重亜硫酸ナトリウム、ブチル化ヒドロキシアニソール)、安定剤(たとえばヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース)、増粘剤(たとえばカルボマー、コロイド状二酸化ケイ素、エチルセルロース、グアーガム)、甘味料(たとえばスクロース、アスパルテム、クエン酸)、着香料(たとえばペパーミント、サリチル酸メチル、またはオレンジ香料)、保存料(たとえばチメロサル、ベンジルアルコール、パラベン)、潤滑剤(たとえばステアリン酸、ステアリン酸マグネシウム、ポリエチレングリコール、ラウリル硫酸ナトリウム)、流動助剤(コロイド状二酸化ケイ素)、可塑剤(たとえばジエチルフタレート、クエン酸トリエチル)、乳化剤(たとえばカルボマー、ヒドロキシプロピルセルロース、ラウリル硫酸ナトリウム)、ポリマーコーティング(たとえばポロキサマーまたはポロキサミン)、コーティングおよび膜形成剤(たとえばエチルセルロース、アクリレート、ポリメタクリレート)および/またはアジュバントを含みうる。

【0149】

一実施形態において、活性化合物は、体による迅速な排除から化合物を保護する担体、たとえばインプラントおよびマイクロカプセル化送達システムを含む制御放出調合物を用いて調製される。生分解性、生体適合性ポリマー、たとえばエチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸が使用される。このような調合物の調製方法は、当業者に明らかになるであろう。該物質はAlza CorporationおよびNova Pharmaceuticals, Inc. から購入することもできる。リポソーム懸濁物(ウイルス抗原に対するモノクローナル抗体を用いて感染細胞に標的化されたりポソームを含む)も、製薬的に許容される担体として使用される。これらはたとえば米国特許第4,522,811に記載されているように、当業者に公知の方法に従って調製される。

【0150】

投与の容易性および投薬の一樣性のために、経口組成物を投薬単位で調合することが特に好都合である。投薬単位形は本明細書で使用する場合、治療される対象への単位投薬量として適した物理的に別個の単位であり;各単位は所望の治療効果を生成するように計算された活性化合物の所定の量を必要な製薬担体と共に含有する。本発明の投薬単位形の詳細は、活性化合物の独自の特徴および達成される特定の治療効果、ならびに固体の治療のための活性化合物などの配合の分野に固有の制限によって決定され、それらに直接依存する。製薬組成物は、投与のための説明書と共に容器、パック、またはディスペンサに含まれる。

【0151】

活性成分を含有する製薬組成物の調製、たとえば混合、造粒、または錠剤形成プロセスは、当分野で十分に理解されている。活性治療用成分は、製薬的に許容され、活性成分と適合性である賦形剤と混合されることが多い。経口投与では、活性成分はこの目的に慣習的な添加剤、たとえばビヒクル、安定剤、または不活性希釈剤と混合されて、慣習的な方法によって投与に適切な形、たとえば上で詳説したような錠剤、コーティング錠、硬および軟ゼラチンカプセル、水性、アルコール性、または油性液剤などに変換される。

【0152】

静脈内投与では、グルクロン酸、L-乳酸、酢酸、クエン酸または静脈内投与に許容さ

10

20

30

40

50

れる pH 範囲において合理的な緩衝能力を備えたいずれの製薬的に許容される酸/コンジュゲート塩基が緩衝剤として使用されうる。pH が酸または塩基のどちらか、たとえば塩酸または水酸化ナトリウムによって所望の範囲に調整された塩化ナトリウム溶液も利用されうる。通例、静脈内調合物の pH 範囲は、約 5 ~ 約 12 の範囲内にありうる。ヒドロキサム酸部分を有する HDAC 阻害薬を含む静脈内調合物の詳細な pH 範囲は、約 9 ~ 約 12 でありうる。

【0153】

皮下調合物は、約 5 ~ 約 12 の範囲の pH にて当分野で周知の手順に従って調製可能であり、適切な緩衝剤および等張剤を含む。それらは、1 回以上の 1 日皮下投与にて活性剤の 1 日用量を送達するように調合されうる。調合物の適切な緩衝液および pH の選択は、投与される 1 つ以上の DBMARKER の溶解度に応じて、当業者によって容易に行われる。pH が酸または塩基のどちらか、たとえば塩酸または水酸化ナトリウムによって所望の範囲に調整された塩化ナトリウム溶液も皮下調合物で利用されうる。通例、皮下調合物の pH 範囲は、約 5 ~ 約 12 の範囲内にありうる。

10

【0154】

本発明の組成物は、適切な経鼻ピヒクルの局所使用による経鼻形、または当業者に周知の経皮スキンパッチの形を使用する経皮経路によっても投与されうる。経皮送達システムの形で投与されるために、投薬量の投与はもちろん、投薬計画を通じて間欠的というよりも連続的であろう。

20

【実施例】

【0155】

(実施例 1)

2 型糖尿病の Cohen ラットモデルにおけるバイオマーカー同定

Cohen 糖尿病 (CD) ラットは、周知で多用途の 2 型糖尿病動物モデルであり、ヒトにおける 2 型糖尿病 (T2D) の一般的な特徴の多くが現れる 2 つのげっ歯類系統より成る。感受性系統 (CDs) は高スクロス/銅欠乏飼料 (HSD) で維持されると 30 日以内に糖尿病を発症し、これに対して抵抗性系統 (CDr) は正常血糖レベルを維持する。通常のげっ歯類飼料 (RD) で無制限に維持されるときには、どちらの系統も T2D の症状を発症しない。

30

【0156】

サンプルの調製

血清、尿、および組織サンプル (脾臓組織、膵臓組織、および肝臓組織を含む) を、RD または HSD を 30 日間与えた CDr および CDs ラットの両方から取得した。サンプルを急速凍結させて、-80 にて貯蔵した。

【0157】

全タンパク質抽出物は、グループ当たり 10 個体の臓器を利用して、4 つの実験条件それぞれについて調製した。膵臓組織は、機械式剪断装置 (Polytron) を使用して処理した。処理サンプル中のタンパク質完全性を保存するために、処理を開始するまで組織をドライアイス上で保持して、すべての緩衝液および装置を事前に冷却しておいた。サンプルもホモジネーション処理の間に氷上で維持した。

40

【0158】

T-Per 緩衝液 (Pierce) を氷上で事前に冷却して、使用前の緩衝液 50 ml に付き完全プロテアーゼ阻害薬錠 (Roche Applied Science) 2 個を添加した。プロテアーゼ阻害薬を添加したら、未使用の緩衝液はすべて廃棄した。組織 1 グラムにつき、T-per 緩衝液 20 ml を使用した。各グループについて、膵臓サンプルを秤量して、必要な溶解緩衝液の量を計算し、50 ml 管内の各組織サンプルに添加した。各サンプルを氷上で 10 秒間をホモジナイズし、続いて 30 秒間の静止期間でサンプルを冷却させた。大きい破片がなお見える場合、ホモジネートが滑らかになるまでサイクルを反復した。ホモジネーションプローブをサンプル中に、発泡を最小限に抑えるために管底部から約 1 cm まで挿入した。ホモジネーションが完了したときに、抽出物を 10

50

、000 × gにて15分間、4にて遠心分離にかけた。

【0159】

遠心分離の後、上清を回収して、総タンパク質含有量を決定するためにピシンコニン酸（BCA）アッセイを実施した。表2は、RDまたはHSDのどちらかを与えられたCDラット、およびRDまたはHSDのどちらかを与えられたCDsラットに相当するサンプルの平均タンパク質含有量を示す。

【0160】

表2：Cohen糖尿病ラットからの膵臓抽出物の総タンパク質含有量

【0161】

【表2】

| 組織 | 平均タンパク質含有量 (μg/ml) | | | |
|----|--------------------|---------|--------|---------|
| | CDr-RD | CDr-HSD | CDs-RD | CDs-HSD |
| 膵臓 | 7969.2 | 6061.9 | 6876.4 | 3387.8 |

10

上清を分配して分割量として、-80にて貯蔵した。ペレット化した物質も-80で維持および貯蔵した。

【0162】

CDrおよびCDs表現型のタンパク質発現プロファイリングを膵臓抽出物に対して、1次元SDS-PAGEを使用して実施した。総タンパク質6μgを含有する各抽出物のサンプルをサンプル緩衝液中で調製して、4~12%アクリルアミドゲルに添加した。電気泳動運転の完了後、ゲルをクマシーステインに1時間浸漬して、蒸留水で一晩脱染色した。得られたタンパク質発現プロファイルによって、各抽出物の経験的な視覚比較が可能となった（図1）。これらの膵臓抽出物は次に、本明細書で開示する2方向免疫学的対比に使用した。

20

【0163】

アルブミン、免疫グロブリンおよび他の豊富なタンパク質は血清中の総タンパク質の約95~97%を構成し、少量タンパク質およびペプチドマーカの検出は、全血清が直接分析された場合には遮蔽される。したがって血清サンプルの分画は、少量タンパク質の遮蔽を低下させて、解析に利用できるピークの数を増加させるために必要であった。

【0164】

多数のピークの検出を増加させるのはもちろんのこと、非常に豊富なタンパク質、たとえばアルブミン、免疫グロブリンなどからの少量タンパク質に対するシグナル抑制効果を軽減するために、RDまたはHSDを与えたCDrおよびCDsラットからの粗血清サンプルを6つの画分に分画した。Ciphergen（フレモント、カリフォルニア州）より購入したキットアニオン交換ビーズベースの血清分画キットを使用して、分画を実施した。簡潔には、血清サンプルを9M尿素変性剤溶液で希釈した；希釈したサンプルを次に、アニオン交換吸収剤を予め充填した96ウェルフィルタマイクロプレートに装填した。本処理を使用して、サンプルをビーズの活性表面に結合させて、4でのインキュベーションの30分後、段階的なpH勾配緩衝液を使用してサンプルを溶離させた。処理は、pH9、pH7、pH5、pH4、pH3および有機溶離液を含む6つの画分の収集を可能にした。分画の後、血清サンプルをSELDIチップ上の次の形式で解析した。

30

40

【0165】

SELDI（表面増強レーザ脱離イオン化）

SELDI ProteinChip（登録商標）Technology（Ciphergen）は、クロマトグラフィーチップ表面上に保持されたタンパク質混合物の質量分光解析を実施するように設計されている。SELDI質量分析計は、混合物中のタンパク質の質量/電荷比およびチップ表面へのその結合親和性に基づいて、複合タンパク質混合物のスペクトルを生成する。ピーク強度を比較することによって、これらのタンパク質プロファイルから異なって発現されたタンパク質が決定される。本技法は、化学修飾表面（親水性、疎水性、事前活性化、順相、固定化金属親和性、カチオン性またはアニオン性）、または生物学的（抗体、抗原結合断片（たとえばscFv）、DNA、酵素、または受

50

容体) ベイト表面によって操作された、アルミニウムベース支持体、またはチップを利用する。これらの多様な化学的および生物学的表面は、タンパク質自体の固有の特性に基づいたタンパク質の各種の捕捉を可能にする。体積がわずか $1 \mu\text{l}$ の組織抽出物または体液をこれらの表面に直接塗布すると、ベイト表面への親和性を持つタンパク質は結合するであろう。非特異的にまたは弱く結合したタンパク質を除去するための一連の洗浄の後に、結合したタンパク質は、MS解析のためにレーザ脱離およびイオン化させる。小型ペプチドからタンパク質までに及ぶ (1000 ダルトン ~ 200 kD) タンパク質の分子量が測定される。次にこれらのマススペクトルパターンを使用して、1つのサンプルを別のサンプルから区別して、さらなる解析のためのリード候補マーカーを同定する。候補マーカーは、条件対条件幹細胞培地のタンパク質プロファイルと比較することによって同定した。候補マーカーが同定されたら、それらを精製して配列決定する。

10

【0166】

分画した血清サンプルは各種の化学修飾表面チップ(カチオン交換、アニオン交換、金属親和性結合、疎水性および順相)に塗布して、SELDI、2次元PAGE(2DE)および2次元液体クロマトグラフィー(2D/LC)によってプロファイルした。

【0167】

2次元液体クロマトグラフィー(2D/LC)

ProteomeLab PF 2Dタンパク質分画システムは、1次元目は等電点(pI)によって、2次元目は疎水性によってタンパク質を分解および収集する、完全自動化2次元分画システム(液層における)である。システムは、異なるサンプル間のタンパク質プロファイリングの直接比較を可能にする、2次元タンパク質マップによって複雑なパターンを視覚化する。すべての成分が液相で単離および収集されるので、それは質量分析法を使用する下流タンパク質同定および/または抗体産生のためのタンパク質抽出に理想的である。

20

【0168】

PF 2Dシステムは、従来のプロテオミクス研究に関連する問題の多く、たとえば少量タンパク質の検出、実験間の再現性、膜または疎水性タンパク質の定量、検出、塩基性タンパク質の検出、非常に低分子量および非常に高分子量のタンパク質の検出に対処する。血清中のタンパク質の動的範囲は10桁超に及び、比較的少量のタンパク質が総タンパク質含有量の95%超を構成しているので、このことは候補マーカーである少量タンパク質の検出を非常に困難にしている。少量タンパク質を濃縮および同定するために、IgY-R7げっ歯類最適化分画カラムを使用して血清サンプルを分画し、少量タンパク質から7つの豊富なタンパク質(アルブミン、IgG、トランスフェリン、フィブリノゲン、IgM、1-アンチトリプシン、ハプトグロビン)を分離した。

30

【0169】

分画された血清をPF-2Dに塗布した。1次元目のクロマトフォーカシングは、開始緩衝液(pH 8.5)および溶離緩衝液(pH 4.0)を使用して産生された線形pH勾配を用いてHPCFカラムで実施した。タンパク質をpIに基づいて分離した。画分を収集して、2次元目の分離のために逆相HPRPカラムに塗布した。各サンプルから生成された2Dマップを次に比較して、示差的なピークパターンを同定した。続いて画分を選択して、トリプシン消化を受けさせた。消化したサンプルは、タンパク質同定のためにLC/MSを使用して配列決定した。

40

【0170】

2Dゲル電気泳動

2次元電気泳動は、単一のゲルにおいて数千のタンパク質の複雑な混合物を同時に分解する能力を有する。1次元目ではタンパク質はpIによって分離され、2次元目ではタンパク質はMWによって分離される。2Dゲル電気泳動の利用としては、プロテオーム解析、細胞分化、疾患マーカーの検出、治療に対する応答の監視などが挙げられる。

【0171】

IgY分画血清サンプルを、各種のpH勾配、pH 3~10、pH 3~6およびpH 5

50

～ 8 を持つ固定 pH 勾配 (I P G) ストリップに塗布した。1次元目の実験後、2次元目の分離のために I P G ストリップを 8 ～ 16 % または 4 ～ 20 % S D S - P A G E 勾配ゲルの上に載せた。

【 0 1 7 2 】

結果

図 2 A に示すように、C D r - R D および C D r - H S D の血清中には約 4 2 0 0 ダルトンのピークタンパク質が存在したが、C D s - R D または C D s - H S D の血清中には存在しなかった。図 2 B は、4 2 0 0 ダルトン断片の M S / M S スペクトルである。本タンパク質は配列決定され、広範囲に及ぶデータベース検索後に新規なたんぱく質であることが判明した。ペプチドは設計された「D3」であり、その配列は S G R P P M T V W F N R P F L I A V S H T H G Q T I L F M A K V I N P V G A (配列番号 1) であることが判明した。D3 ペプチドは、C o h e n 糖尿病ラットで発見された最初のバイオマーカーに相当する 38 マーペプチド配列である。N a t i o n a l C e n t e r f o r B i o t e c h n o l o g y I n f o r m a t i o n (N C B I) より入手できる B L A S T アルゴリズムを使用する配列の配列比較を実施して、38 アミノ酸の断片が少なくとも 10 の各種のアミノ酸配列との配列同一性を有することが見出された。特に B L A S T 配列比較は、38 アミノ酸 D3 ペプチドが「FNR PFL」および「FMS / GKVT / VNP」に相当する保存モチーフを含有することを明らかにした。図 3 A は、D3 ペプチド断片に関連するアミノ酸配列の B L A S T 配列の結果を示し、図 3 B は、D3 ペプチドおよびタンパク質 B L A S T によって同定されたペプチドをコードする核酸配列の B L A S T 配列比較の結果を示す。変性プライマーは保存モチーフを標的とするように設計され、次の配列を含む：

フォワードプライマー (アミノ酸配列 “ F N R P F L ” を含有する標的領域 : 5 ' - T T C A A C M R R C C Y T T Y S T - 3 ' (配列番号 2) およびリバースプライマー (配列 “ F M S / G K V T / V N P ” を含有する標的領域) : 5 ' - Y V A C Y T T K C Y M A K R A A G A - 3 ' (配列番号 3) ; ここで M = A または C ; R = A または G ; Y = C または T ; S = C または G ; K = G または T ; および V = A 、 C 、または G である。これらの変性プライマーは、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (R T - P C R) において使用し、肝臓および膵臓におけるヒト S E R P I N A 3 を増幅した。図 3 C に示すように、ヒト肝臓および膵臓において 1 . 3 k b 断片が同定された。

【 0 1 7 3 】

表 3 は、S E L D I 解析によって同定された、追加の同定候補マーカーを表す。

【 0 1 7 4 】

10

20

30

【表 3 - 1】

| アレイ 種類 | CM10 (アニオン交換) | | | |
|-----------|------------------|------------|---------|---------|
| サンプル | 分画血清 F1 | | | |
| M/Z | CDr-RD | CDs- RD | CDr-HSD | CDs-HSD |
| ~2156 | + | + | - | - |
| ~2270 | + | + | - | + |
| ~3875 | + | - | + | - |
| サンプル | 分画血清 F3 | | | |
| M/Z | CDr-RD | CDs- RD | CDr-HSD | CDs-HSD |
| ~3408 | - | + | - | + |
| ~3422 | + | - | + | - |
| ~3848 | - | + | - | + |
| ~3861 | + | - | + | - |
| サンプル | 分画血清 F4 | | | |
| M/Z | CDr-RD | CDs- RD | CDr-HSD | CDs-HSD |
| ~4202 | + | - | + | - |
| ~4423 | + | - | + | - |
| サンプル | 分画血清 F5 | | | |
| M/Z | CDr-RD | CDs- RD | CDr-HSD | CDs-HSD |
| ~5377 | ++ | ++ | ++ | + |
| ~5790 | +/- | +/- | - | + |
| ~8813 | +/- | +/- | +/- | + |
| サンプル | 分画血清 F6 | | | |
| M/Z | CDr-RD | CDs- RD | CDr-HSD | CDs-HSD |

10

20

【 0 1 7 5 】

30

【表 3 - 2】

| | | | | |
|-------|---------|--------|---------|---------|
| ~4200 | + | - | + .. | - |
| サンプル | 全血清 | | | |
| M/Z | CDr-RD | CDs-RD | CDr-HSD | CDs-HSD |
| ~6631 | - | + | - | - |
| ~7013 | - | - | + | + |
| ~7027 | + | + | - | - |
| ~7811 | - | + | - | - |
| アレイ種類 | Q10 | | | |
| サンプル | 分画血清 F1 | | | |
| M/Z | CDr-RD | CDs-RD | CDr-HSD | CDs-HSD |
| ~2627 | + | - | + | - |
| ~2705 | + | - | + | - |
| ~4290 | + | + | ++ | + |
| ~5058 | - | - | + | - |
| ~5220 | + | ++ | + | + |
| ~5789 | - | - | + | - |
| ~8818 | + | +/- | ++ | ++ |
| サンプル | 分画血清 F2 | | | |
| M/Z | CDr-RD | CDs-RD | CDr-HSD | CDs-HSD |
| ~2359 | + | +/- | - | - |
| ~2587 | + | + | - | +/- |
| ~2879 | + | + | - | +/- |
| ~2298 | - | + | - | - |
| サンプル | 分画血清 F4 | | | |
| M/Z | CDr-RD | CDs-RD | CDr-HSD | CDs-HSD |
| ~4200 | + | - | + | - |
| ~2067 | - | - | + | + |
| ~2092 | - | - | + | + |
| ~2042 | - | - | + | + |
| ~8810 | - | - | + | + |
| ~8850 | + | + | - | - |
| サンプル | 分画血清 F5 | | | |

10

20

30

【 0 1 7 6 】

【表 3 - 3】

| M/Z | CDr-RD | CDs-RD | CDr-HSD | CDs-HSD |
|------------|---------|--------|---------|---------|
| ~3977 | + | - | + | - |
| ~4200 | + | - | + | - |
| ~2102 | + | - | + | - |
| ~4030 | + | ++ | + | ++ |
| サンプル | 分画血清 F6 | | | |
| M/Z | CDr-RD | CDs-RD | CDr-HSD | CDs-HSD |
| ~4200 | + | - | + | - |
| ~17645 | + | - | + | - |
| サンプル | 全血清 | | | |
| M/Z | CDr-RD | CDs-RD | CDr-HSD | CDs-HSD |
| ~6632 | - | + | - | - |
| ~3419 | + | + | - | - |
| ~3435 | + | + | - | - |
| ~4074 | + | + | - | - |
| ~4090 | + | + | - | - |
| ~4200 | + | - | + | - |
| ~5152 | + | + | - | - |
| ~8915 | + | + | - | - |
| アレイ種類 | H50 | | | |
| サンプル | 分画血清 F2 | | | |
| M/Z | CDr-RD | CDs-RD | CDr-HSD | CDs-HSD |
| ~5521 | - | + | - | - |
| サンプル | 分画血清 F5 | | | |
| M/Z | CDr-RD | CDs-RD | CDr-HSD | CDs-HSD |
| ~34224 | - | - | - | + |
| Array Type | IMAC | | | |
| サンプル | 全血清 | | | |
| M/Z | CDr-RD | CDs-RD | CDr-HSD | CDs-HSD |
| ~2714 | + | + | - | + |
| ~4330 | - | + | + | + |

Cohen糖尿病ラット間の相違を図4Aおよび図4Bに示し、図4Aおよび図4Bは、LC/MS技術によって同定されたバイオマーカーを示すゲルと、示差2次元逆相HPLCまたは選択された1次元pI画分(画分31)のCDr-RD(赤色)対CDs-RD(緑色)によって取得した溶出プロファイルを示すグラフとを表す。図5Aは4つのCohen糖尿病ラットモデルそれぞれから得たサンプルの2DEゲルを表すが、図5Bは、アポリタンパク質E、肝臓再生関連タンパク質、および先に同定されなかったタンパク質として同定された、図4Aで同定されたスポットの拡大図である。図6は、2DE技術を使用して4つのCohen糖尿病ラットモデルで見出される、異なって発現されたタンパク質を示すグラフ表現である。図7は、2DEによって同定された、異なって発現されたCohen糖尿病ラット血清タンパク質を示すヒストグラムである。

【0177】

D3ペプチドは、ウサギでの超免疫血清の生成に使用された。図8は、D3超免疫血清と、CDr-RDおよびCDr-HSDラット血清画分6から単離した約4kDタンパク

10

20

30

40

50

質との反応性を示すウェスタンブロットを示す。分画されたCDラット血清サンプルを10% SDS-PAGEゲルに流下させて、次にPVDF膜に移した。高分子量二重項(49~62kDの範囲における)も超免疫血清と反応して、親タンパク質がすべての系統によって治療様式RDまたはHSDの下で発現されるが、D3断片に相当するより小さいサイズの誘導体(約4kD)はCDr系統においてのみ異なって発現されることを示している。これらの結果は、SELDIプロファイリングによって取得した結果と一致している。CDrラット血清中のD3断片の濃度を次に、SELDIによって分析する。一連の合成D3ペプチド標準(0.1、0.033、0.011、0.0037、0.0012および0mg/ml)および10倍希釈CDr血清をQ10タンパク質チップアレイに2通りスポットした。ピーク強度をD3ペプチド標準の濃度に対してプロットした。プロット(図9)に基づいて、濃度決定の線形範囲は0~0.01mg/mlである。したがって、CDr-RD血清のD3の濃度は、CDr-RD血清サンプルのピーク強度に基づいて約0.04mg/mlである。

10

【0178】

ウェスタンブロット解析によるセルピナ発現の解析は、抗D3ウサギ血清(1:200)およびHRPにコンジュゲートした2次ヤギ抗ウサギIgG(1:25,000希釈)を使用して、Cohenラット肝臓抽出物で実施した。肝臓抽出物(10μg)およびHRPにコンジュゲートした2次ヤギ抗ウサギIgG抗体(1:25,000希釈)を含有するが、1次抗体は含有しない対照も解析した(図10)。肝臓抽出物とD3超免疫血清との反応後に、タンパク質のクラスター(41、45および47kD)が視覚化された。41および45kDタンパク質はほぼ同じレベルで発現されたが、47kDタンパク質は糖尿病ラット、すなわちCDs-HSD(糖尿病)では検出されなかった。

20

【0179】

表4は、CDラット血清サンプルから取得したバイオマーカーデータのまとめを含む。

【0180】

【表 4 - 1】

表4: T2DMバイオマーカーデータのまとめ

| No. | タンパク質 | 遺伝子 | Gi | MW (KD) | 計算 pI | Cohen糖尿病アット血清における示差プロファイル | | | | プロファイリング技術 | ヒトホモログ |
|-----|--------------------------------------|----------|----------|---------|-------|---------------------------|--------|---------|---------|------------|-------------------|
| | | | | | | CDs-RD | CDs-RD | CDs-HSD | CDs-HSD | | |
| 1 | セリンプロテアーゼインヒター-2.4に類似の、予測タンパク質のC末端断片 | セルピナ3M | 34867677 | 4.2 | 12.01 | + | - | + | - | SELDI | セルピナ3 |
| 2 | 未命名タンパク質性疎物 | スピニン2a | 57231 | 45 | 5.48 | + | - | - | - | PF-2D | |
| | またはスピニン2aタンパク質 | | 56789860 | 46 | 5.48 | | | | | | |
| 3 | フェチユインペーター | フェータブ | 17865327 | 42 | 6.71 | + | * | - | TBD | PF-2D 結果 | フェータブ ヒト |
| | またはフェータブタンパク質 | | 47682636 | 44 | 7.47 | | | | | | |
| 4 | アポリポタンパク質 C-III前駆物質 | Apoc 3 | 91990 | 11 | 4.65 | + | + | + | TBD | PF-2D | Apoc3 ヒト |
| 5 | アポリポタンパク質 C2に類似した予測タンパク質 | Apoc2 予測 | 27676424 | 11 | 4.57 | + | + | + | - | PF-2D | Apoc2 ヒト |
| 6 | Aa2-066 | なし | 33086518 | 61 | 4.39 | + | - | + | + | PF-2D | アルファ-2-HS-糖タンパク質 |
| | またはアルファ-2-HS-糖タンパク質 | Absg | 6978477 | 39 | 6.05 | | | | | | |
| | またはアルファ-2-HS-糖タンパク質 | | 60552688 | 39 | 6.05 | | | | | | |
| 7 | T-キニンノーゲンII 前駆物質 | なし | 57526868 | 49 | 5.94 | - | + | - | TBD | PF-2D | |
| | アルファ-1-マクログロブリン | Pzp | 202857 | 168 | 6.46 | TBD | + | TBD | TBD | | |
| 8 | または妊娠域タンパク質 | Pzp | 21955142 | | | + | - | - | - | PF-2D 結果 | PZP ヒトおよび A2MG_ヒト |
| | | | | | | + | - | - | - | 2DE 結果 | |

【 0 1 8 1 】

10

20

30

【表 4 - 2】

| | | Cohen-糖尿病ラット血清における示差プロファイルリンク | | | | | | | | | | |
|----|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|-----------|-----|------|-----|-----|-----|------|-----|-----------|----------|
| 9 | セリン/システインプロテイナーゼインヒビター-クレートC、メンバ1(予測) | セルピン1 | 56789738 | 53 | 6.18 | + | - | + | - | - | PF-2D | |
| 10 | 凝固因子2 | F2 | 12621076 | 72 | 6.28 | + | - | TBD | TBD | TBD | PF-2D | |
| 11 | インター-アルファインヒビター-H4重鎖 | ITIH4 | 9506819 | 104 | 6.08 | + | - | + | TBD | TBD | PF-2D | ITIH4 ヒト |
| | | | 59808074 | | | + | - | + | TBD | TBD | | |
| 12 | ビタミンD結合タンパク質プレバプテド | Gc | 203927 | 55 | 5.65 | + | - | TBD | TBD | TBD | PF-2D | VTDB ヒト |
| 13 | LAW T-キナーゼ前駆物質 またはキナーゼ または急性期アルファ-1タンパク質前駆物質 | マップ1 | 205085 | 49 | 6.29 | + | - | + | +++ | + | PF-2D/2DE | |
| | | | 56270334 | | | + | - | + | + | | | |
| | | | 68791 | | | | | | | | | |
| 14 | アポリポタンパク質 A-I またはアポリポタンパク質 A-II | ApoA1 | 55747 | 30 | 5.52 | + | + | + | - | + | PF-2D | ApoA1 ヒト |
| 15 | アポリポタンパク質C-II前駆物質に類似した予測タンパク質 | ApoC2 | 109461385 | 11 | 4.57 | TBD | TBD | + | - | - | PF-2D | |
| | | | 207304 | 28 | 9.38 | TBD | TBD | + | TBD | TBD | | |
| 16 | トロニン またはプロトロニン前駆物質 アポリポタンパク質E またはアポリポタンパク質E またはアポリポタンパク質E または ORE2 | | 56970 | 72 | | TBD | TBD | + | TBD | + | PF-2D | THR8 ヒト |
| | | | 37805241 | 36 | 5.23 | + | - | - | - | | | |
| | | | 55824759 | 36 | 5.53 | + | - | - | - | | | |
| | | | 20301954 | 36 | | + | - | - | - | | | |
| 17 | 肝臓再生関連タンパク質 LRRG03 | Tf | 202959 | 38 | | + | - | + | ++ | + | 2DE | |
| | | | | | | + | - | + | + | ++ | | |
| 18 | アポリポタンパク質 A-IV | | 33187764 | 78 | 7.14 | + | + | +++ | ++ | + | 2DE | |
| 19 | アポリポタンパク質 | ApoA4 | 60552712 | 44 | 5.12 | + | - | - | - | - | 2DE | |
| 20 | LOC297568タンパク質 | | 71051724 | 79 | 5.45 | + | + | + | ++++ | + | 2DE | |

【 0 1 8 2 】

10

20

30

【表 4 - 3】

| No. | タンパク質名 | 抗体 | 分子量 (kD) | Cohen-糖尿病フラット血清における示差プロファイリング | | | | 備考 |
|-----|-------------------------------------------------|-----------|------------------|-------------------------------|----|-----|------|-------------------|
| | | | | + | ++ | +++ | ++++ | |
| 21 | またはアルファ-1-インヒビター-8前駆物質 仮定的タンパク質 XP_579384 | | 165 | + | ++ | + | ++++ | 2DE |
| 22 | ヒスチジンリッチ糖タンパク質 未命名タンパク質生成物 | Hrb なし | 188 59 167 | + | ++ | ++ | +++ | 2DE 2DE 2DE |
| 23 | または予測: 仮定的タンパク質 XP_579477 | | 167 | +++ | ++ | | + | 2DE |
| 24 | 補体成分C9前駆物質 | C9 | 63 | +++ | ++ | ++ | + | PF/2DE |
| 25 | アポリポタンパク質H | ApoH | 40 | - | + | + | + | 2DE |
| 26 | B因子、プロペルジン | Cfb | 86 | - | + | + | + | 2DE |
| 27 | ヘモペキシン | Hpx | 52 | + | ++ | + | +++ | 2DE |

(実施例 2)

ヒト血清におけるバイオマーカー同定

ヒト血清の解析は、D3超免疫系(ウサギ; 図11)を使用して実施した。使用した1次抗体は、D3ペプチドによる免疫化の後に生成されたウサギポリクローナル抗体であった。20kD(14kD~28kDマーカー)の分子量を備えたタンパク質はヒト血清中で、2型糖尿病患者と比較した正常個体においてより高い強度で発現される。60~80kDのMWを有するタンパク質の対は、両方(正常および糖尿病)のサンプル中に存在するように思われる。興味深いことに、二重項のタンパク質の強度は反転されるように思われた;モノクローナル抗体を使用して行った観察は、CDr-HSDおよびCDs-HSD脾臓を用いたサブトラクティブ免疫化より得られた。図12Aおよび12Bは、CDr-HSDまたはCDs-HSD脾臓抽出物100µgを含有する分取ゲルを示す。正の対照は抗アクチン抗体20µgによって染色して、サブクローンレーンを調節培養上清600µlによって染色した(本開示の別の箇所に記載)。

10

20

30

40

50

【0183】

正常な糖尿病およびインスリン抵抗性対象より採取したサンプルに相当するヒト血清サンプルを3つの別の源より得て、SELDI解析にかけた：Dr. Itamar Raz、Dr. Wendell Cheatham、およびDr. Rachel Dankner。Dr. Razのサンプル（以下「Razサンプル」）は11個のT2Dヒト血清および血漿サンプルと、9個の正常ヒト血清および血漿サンプルを含んでいた。Cheathamサンプルは合計51個の血清および尿サンプルを含み、そのうち12個は1型糖尿病個体から、13個はT2D個体から、10個はインスリン抵抗性対象から、16個は正常対象から得られた。Danknerサンプルは、23個のT2Dヒト血清サンプルおよび25個の正常ヒト血清サンプルを含んでいた。SELDI解析は、下の表5および6に示す、RazおよびDanknerサンプルからの有意なピークを明らかにした。図13は、SELDIによってアニオン性Q10チップでプロファイルされたヒト全血清の例である。

10

【0184】

表5：Razサンプルに存在する選択された有意なピーク

【0185】

【表5】

| サンプル番号 | ピーク (M/Z) | P 値 | 倍数変化 (T2D/N) |
|--------|-----------|----------|--------------|
| 1 | 12900 | 9.90E-07 | 3.24 |
| 2 | 134500 | 4.75E-06 | 0.55 |
| 3 | 44500 | 1.75E-05 | 2.21 |
| 4 | 4260 | 1.84E-05 | 0.4 |
| 5 | 4260 | 2.13E-05 | 0.49 |
| 6 | 56500 | 2.84E-05 | 0.55 |
| 7 | 6640 | 8.08E-05 | 2.14 |
| 8 | 12600 | 1.96E-04 | 2.64 |
| 9 | 2505 | 2.09E-04 | 1.71 |
| 10 | 29000 | 2.46E-04 | 0.63 |
| 11 | 3300 | 3.44E-04 | 0.65 |
| 12 | 14070 | 3.58E-04 | 0.69 |
| 13 | 11750 | 5.22E-04 | 2.81 |
| 14 | 6875 | 7.49E-04 | 2.2 |
| 15 | 13750 | 1.05E-03 | 0.66 |
| 16 | 9715 | 2.69E-03 | 1.89 |
| 17 | 9375 | 3.88E-03 | 1.61 |
| 18 | 6440 | 6.04E-03 | 2.1 |

20

30

表6：Danknerサンプルに存在する選択された有意なピーク

【0186】

【表6】

| サンプル番号 | ピーク (M/Z) | P 値 | 倍数変化 (T2D/N) |
|--------|-----------|----------|--------------|
| 1 | 10075 | 4.81E-04 | 3.63 |
| 2 | 9310 | 1.87E-03 | 1.9 |
| 3 | 4160 | 3.68E-03 | 1.74 |
| 4 | 6450 | 1.59E-04 | 0.76 |
| 5 | 9310 | 8.25E-04 | 1.36 |
| 6 | 7770 | 8.25E-04 | 0.66 |
| 7 | 6430 | 1.32E-05 | 0.7 |
| 8 | 10650 | 2.25E-04 | 2.58 |

40

SELDI解析は、13個のT2Dヒトサンプルおよび16個の正常ヒトサンプルで同

50

定された、異なって発現されたタンパク質ピークを明らかにした。図14は、サンプルの画分1のSELDI解析のシュードゲルの図を示す。各レーンは、M/Z 14.0 kD ~ 16.0 kDからの個体サンプルのスペクトルを示す。タンパク質バンドのM/Zはそれぞれ、約15.2、14.8、および14.5 kDである。図15は、Q10タンパク質チップでプロファイルした、13個のT2Dおよび16個の正常分画血清サンプル(画分3)に対して実施したSELDI解析の別のシュードゲルの図である。各レーンは、M/Z 8.0 kD ~ 10.0 kDからの個体サンプルのスペクトルを示す。タンパク質マーカーのM/Zは約9.3 kDである。下の図15のグラフは、T2Dサンプルでダウンレギュレートされるマーカー(M/Z約6430)のクラスタ図である。アルブミンのレベルは、CheathamサンプルにSELDIを使用してプロファイルして、図16に示すようにDanknerサンプルと比較した。

10

【0187】

(実施例3)

2方向免疫学的対比およびモノクローナル抗体の産生

SDS-PAGEによって取得した膵臓抽出物タンパク質プロファイルから、CDr-HSDおよびCDs-HSDサンプル間でバンド形成パターンに明白な相違が認められた(図1)。2方向免疫学的対比をこれらの2つのサンプル間で実施した。本技法は、対比されるCohen糖尿病ラットからの2つの膵臓抽出物を実験動物(たとえばBalb/cマウス)の足蹠に別個に注射することを含む。抗原提示細胞(APC)による注射部位での抗原の摂取および処理の後、活性化APCは局所リンパ節(膝窩)へ移動して免疫応答を開始する。これらのリンパ節は各脚に位置するので、それらは相互から解剖学的に分離されて、それによりこの箇所での抗原特異的リンパ球の混合を防止する。免疫応答の後期に、これらの活性化リンパ球は局所リンパ節から脾臓に移動して、脾臓にてそれらが混合されて、そこから全身に循環しうる。

20

【0188】

足蹠注射の2週間後、各足蹠に前と同じ抗原を注射することによって動物をブーストした。本ブーストは抗原特異的リンパ球を注射部位に復帰させて、次に再び膝窩リンパ節へ流出させる。本技法は、自然増殖および細胞移動プロセスをフィルタリング機構として使用して、特異的リンパ球を各リンパ節にて分離および濃縮し、リンパ節にてそれらは解剖学的に分離されて、抽出物のうち1つのみで発現された抗原(単数または複数)に特異的である細胞の混合を最小限に抑える。ブーストの3日後、膝窩リンパ節を除去して、動物の各側から得たプールに分離した。ブースト時には抗原性物質を切り換えないことが絶対必要なのは、このことが特異的リンパ球の両方の膝窩リンパ節の組への移動と、特定の細胞の解剖学的分離を引き起こすためであり、それゆえ該技法の利点は失われるであろう。

30

【0189】

6~8週齢のメスBalb/cマウス15匹をHarlanに注文した。各動物は、左後足蹠にCDr-HSD膵臓抽出物25 µgを、右後足蹠にCDs-HSD膵臓抽出物25 µgを注射した。抗原は次のように、20% Ribiaアジュバントで最終体積50 µlに調製した。

40

【0190】

表7:

【0191】

【表7】

| | 右足蹠 | 左足蹠 |
|-------------------|--------|--------|
| 375 mg of CDs-HSD | 110 µl | ----- |
| 375 mg of CDr-HSD | ----- | 62 µl |
| PBS | 490 µl | 538 µl |
| Ribiaアジュバント | 150 µl | 150 µl |

Ribiaアジュバントを37 °Cまで加温して、滅菌PBS 1 mlによって再構成した。瓶を少なくとも1分間ボルテックスにかけて、該物質を完全に再構成した。次に正確な体

50

積の R i b i アジュバントを抗原調製物に添加して、混合物を再び1分間ボルテックスにかけた。いずれの未使用調合物質も廃棄して、いずれの未使用 R i b i アジュバントも4で貯蔵して、ブースタ注射を調合するのに使用した。動物を第1日に予備刺激して、第14日にブーストした。第17日に動物を安楽死させて、そこで死後に膝窩リンパ節を切除して、処理のために実験室に戻した。

【0192】

ハイブリドーマの産生

ハイブリドーマ細胞系は本質的に、Kohler and Milstein (1975) によって記載されたように作製した。ポリエチレングリコール (PEG) を用いたインキュベーションによって、免疫化動物から得たリンパ球にマウス骨髄腫細胞系 (Sp2/0) を融合させた。融合後、ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含有する選択培地 (HAT培地) で細胞を維持して、キメラ融合細胞の増殖のみを促進する。

10

【0193】

融合の前日に、融合パートナー (生存率95%超の分裂期における Sp2/0 x Ag14細胞) を、融合24時間前に 1×10^5 生細胞/ml で分裂させた。融合日にマウスを殺処分して、リンパ節を切除して、10%ウシ胎仔血清 (FBS) を添加した、事前に加温した室温の DMEM を含有するペトリ皿に入れた。滅菌顕微鏡スライドを使用して、リンパ節をスライドの2枚の曇り側の間に置き、粉碎して単一の細胞懸濁物とした。次に細胞懸濁物を15ml管に移し、1000rpmにて1分間遠心分離した。上清を吸引によって除去して、細胞ペレットを無血清 DMEM 12ml に静かに再懸濁させて、その後、1000rpmにて10分間、再度遠心分離にかけた。プロセスをさらに2回反復して、血清が完全に除去されるようにした。洗浄後、細胞を無血清 DMEM 5ml に再懸濁させて、顕微鏡下でカウントした。

20

【0194】

遠心分離で1000rpmにて10分間回転させることによって、融合パートナーを収集した。細胞を無血清 DMEM で3回洗浄して、最後に無血清 DMEM に再懸濁させ、カウントした。融合パートナー細胞の数をリンパ節細胞の数に基づいて計算した。各骨髄腫細胞 (融合パートナー) に、2個のリンパ節細胞が必要である (骨髄腫細胞対リンパ節細胞の比1:2; たとえば 10×10^6 個のリンパ節細胞には、 5×10^6 個の融合パートナー細胞が必要である。リンパ節細胞に対する適切な数の骨髄腫細胞を添加して、無血清 DMEM を使用して細胞の総体積を25mlに調整し、3%デキストラン25mlを次に細胞に添加した。混合物を1000rpmにて10分間回転させて、細胞ペレットから上清を可能な限り吸引した。細胞を含有した管に蓋をしたら、管の底を静かに叩いて細胞を再懸濁させて、事前に加温した50% (v/v) PEG 1mlを管に添加した。凝集した細胞を1分間静置して、その後、無血清 DMEM 20mlを添加して、続いて25mM HEPESを含む20% FBS、DMEM 25mlを添加した。管を1回反転させて混合し、次に1000rpmで10分間遠心分離した。培地を吸引して、叩くことによって細胞を静かに再懸濁させた。細胞懸濁物が 0.125×10^6 細胞/ml または 0.0625×10^6 細胞/ml のどちらかとなるように、HAT選択培地を添加した。ウェル当たり細胞100 μ lを96ウェル平底プレートに添加して、37℃にて8.5%のCO₂を用いてインキュベートした。2日後、細胞に新しいHAT選択培地100 μ lを加えた。7日後に細胞をコロニー増殖について点検した。

30

40

【0195】

ハイブリドーマのスクリーニング

目に見えるコロニーが96ウェルプレートに観察されたら、ELISAによるスクリーニングのために調整した上清100 μ lを各コロニーから収集した。上清は、CDr-HSDおよびCDs-HSD抽出物両方に対して検出可能なレベルの抗原特異的IgGの存在についてスクリーニングした。2つの抽出物の一方に対して、少なくとも2倍の差で陽性ELISA反応を示すコロニーのみを、増殖およびさらなる特性化のために選択した。

【0196】

50

25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度の試験される膵臓抽出物を炭酸塩 - 重炭酸塩緩衝液で希釈した (炭酸塩 - 重炭酸塩 1 カプセルを脱イオン水 100 ml に溶解させた)。96 ウェルプレートのうち正の対照用の余分のウェル 2 個および負の対照用の余分のウェル 2 個を準備した。次に接着フィルムを使用してプレートを被覆して、4 にて一晚インキュベートした。

【0197】

プレートを PBS / Tween 200 μl で 1 回洗浄した。プレートをシンク内へはじいてウェルの中身を除去して、次にプレートを吸い取り紙に対して軽く叩くことによって残りの液体を除去した。先に記載したように、洗浄緩衝液 (PBS / Tween) 約 200 μl を添加して、次に廃棄した。次にプレート全体を 5% 粉乳 / PBS / Tween 200 μl 中で 37 にて 1 時間遮断した。次に先に記載したように、PBS / Tween を使用してプレートを 3 回洗浄した。

10

【0198】

融合培養物上清を 0.5% 乳 / PBS / Tween 中で 1 : 1 で希釈して、各サンプルを、抗アクチン Ab (Sigma) 50 μl を含むウェル (50 μl ; 最終体積はウェル当たり 100 μl) に、緩衝液 50 μl を含有するウェルに対して 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で添加した。緩衝液 50 μl を負の対照ウェルに添加した。プレートを被覆して、4 にて一晚インキュベートした。先に記載したように PBS / Tween を使用してプレートを 3 回洗浄して、1 : 20000 (10 μl) の、0.5% 乳 / PBS / Tween 中の抗 HRP 抗マウス IgG を各ウェルに添加した。プレートを被覆して、37 にて 2 時間インキュベートした。

20

【0199】

2 次抗体によるインキュベーションの後、先に記載したようにプレートを 4 ~ 5 回洗浄した。最後の洗浄時に、洗浄緩衝液を廃棄する前に、プレート上に 2、3 分間残した。事前に加温した室温の TMB 100 μl (VWR; 暗所で貯蔵) を、発色するまで (20 ~ 30 分) 気泡の導入を最小限にしながら、各ウェルに添加した。2 M 硫酸 50 μl を添加することによって反応を停止させた。分光光度計を 450 nm で使用してプレートを読み取った。

【0200】

13 個のクローンが、CDs - HSD に対して 9 個の、CDr - HSD に対して 4 個の、上で概説した実験基準を満足するモノクローナル抗体 (mAb) を生成した。これらのコロニーに対する ELISA データを表 5 にまとめ、図 17 A および 17 B でグラフに表現する。表 8 は、単一特異的 CDr - HSD および CDs - HSD ハイブリドーマの ELISA スクリーニングデータを示す。絶対吸光度、そして OD 450 nm における倍数差が各コロニーについて示されている。一次スクリーニングデータを検証するために、増殖中に一部のクローンを再試験して、初期スクリーンからの実験観察を確認した。

30

【0201】

表 8

【0202】

【表 8】

| クローンID | 一次スクリーン | | | 確認スクリーン | | |
|-----------|---------|---------|--------|---------|---------|-------|
| | CDR-HSD | CDS-HSD | 倍数差 | CDR-HSD | CDS-HSD | 倍数差 |
| P1-5-F11 | 0.021 | 0.426 | 20.29 | 0.013 | 0.192 | 14.77 |
| P1-14-A2 | 0.363 | 0.714 | 1.97 | NT | NT | - |
| P1-17-E4 | 0.042 | 0.398 | 9.48 | NT | NT | - |
| P1-18-C12 | 0.021 | 0.183 | 8.71 | NT | NT | - |
| P1-20-B7 | 0.065 | 0.192 | 2.95 | 0.025 | 0.110 | 4.40 |
| P1-23-F7 | 0.039 | 0.912 | 23.38 | 0.046 | 0.547 | 11.89 |
| P2-1-E8 | 0.001 | 0.139 | 139.00 | 0.019 | 0.252 | 13.26 |
| P2-10-E3 | 0.007 | 0.249 | 35.57 | 0.017 | 0.153 | 9.00 |
| P2-14-C6 | 0.006 | 0.353 | 58.8 | 0.054 | 0.143 | 2.65 |
| P2-4-H5 | 0.214 | 0.058 | 3.69 | 0.217 | 0.065 | 3.34 |
| P2-8-A3 | 0.184 | 0.095 | 1.94 | 0.227 | 0.065 | 3.49 |
| P2-10-B8 | 0.101 | 0.055 | 1.84 | 0.121 | 0.029 | 4.17 |
| P2-13-A9 | 0.114 | 0.004 | 28.5 | 0.213 | 0.035 | 6.09 |

モノクローナルハイブリドーマ系統を得るために、各コロニーを限界希釈によってサブクローニングした。各親コロニーから得たクローン系統を再スクリーニングして、OD 450 nmにて順位付けし、最良のクローンを決定した。上位10個の抗体分泌クローンを増殖させて、液体窒素貯蔵庫に保存した。細胞をカウントして、生存率が少なくとも80%であることを確認した。細胞を、DMEM中に10% FBSおよび10% ハイブリドーマクローニング因子 (bioVeris) を含有するサブクローニング培地中で5細胞/ml (3プレートに対して約60ml) にて調製した。同じ細胞の別のセットを約1.6細胞/ml (3プレートに対して約60ml) の濃度にて調製した。96ウェル丸底プレートでウェル当たり細胞200 μ lを平板培養した。3プレートの1つのセットが1細胞/ウェルを含有しており、別のセットは平均で3ウェルごとに1細胞を含有していた。10日後、細胞は目に見え、サブクローンを特異性について試験した。興味のある細胞を、24ウェルプレートにてハイブリドーマクローニング因子5%を含有する10% FBS DMEM中で増殖させた。

【0203】

各mAbの組成を、重鎖および軽鎖のクラスはもちろんのこと、各成分の分子量も決定することによって定義した。アイソタイピングは、Immunopureモノクローナル抗体アイソタイピングキットI (Pierce) を製造者の説明書に従って使用して実施した。重鎖および軽鎖の分子量は、Bio-RadによるExperion自動電気泳動システムを使用して決定した。Experionシステムは、ゲルベース電気泳動の複数のステップ：分離、染色、脱染色、バンド検出、撮像、およびデータ解析を自動的に実施する。これらの解析結果は、CDR-HSDおよびCDS-HSD特異的モノクローナル抗体の物理的特性化を示す表9に示されている。重鎖および軽鎖両方の同定は、Immunopureモノクローナル抗体アイソタイピングキットI (Pierce) を使用して実施し、Experion自動電気泳動システム (Bio-Rad) を使用して分子量 (kD) を決定した。

【0204】

表9

【0205】

10

20

30

40

【表 9】

| クローン ID | 軽鎖 | | 重鎖 | | 全 IgG |
|-----------|---------|---------|-------|---------|---------|
| | サブタイプ | Mol.Wt. | サブクラス | Mol.Wt. | Mol.Wt. |
| P1-5-F11 | カッパ | - | IgG2b | - | - |
| P1-14-A2 | カッパ/ラムダ | - | IgG1 | - | - |
| P1-17-E4 | カッパ | - | IgG1 | - | - |
| P1-18-C12 | カッパ | - | IgG2b | - | - |
| P1-20-B7 | カッパ | - | IgG1 | - | - |
| P1-23-F7 | カッパ | - | IgG2b | - | - |
| P2-1-E8 | カッパ | - | IgG1 | - | - |
| P2-10-E3 | カッパ | - | IgG2a | - | - |
| P2-14-C6 | カッパ | - | IgG1 | - | - |
| P2-4-H5 | カッパ | - | IgG2b | - | - |
| P2-8-A3 | カッパ | - | IgG2b | - | - |
| P2-10-B8 | カッパ | - | IgG2b | - | - |
| P2-13-A9 | カッパ | - | IgG1 | - | - |

10

各クローンの特異的抗原を決定するために、各 mAb をウェスタンブロッティングによって試験して、対応する抗原の分子量を確認した。反応性クローンより取得したデータを図 18A ~ 18C に示す。

【0206】

P2-10-B8-KA8 に特異的な抗原を精製するために、免疫沈降を実施した。特異的抗体をタンパク質 G ビーズに結合させて、総タンパク質 6 mg を含有する CDr-HSD 脾臓抽出物からの抗原をパニングするために使用した。エッペンドルフ管で CDr-HSD 脾臓抽出物を 13,000 rpm で 5 分間遠心分離にかけて、抽出物上部の析出物を除去した。いずれのペレットも除去せずに、抽出物 6 mg を清浄な遠心管 3 本に移し、T-per 緩衝液の添加により体積を 1 ml に調整した。管 1 には精製 P2-10-B8-KA8 100 μg を希釈サンプルに添加して、精製 P2-10-B8-KA8 200 μg を管 2 に添加し、精製 P2-10-B8-KA8 300 μg を管 3 に添加した。管を 4 にて一晩回転させた。

20

【0207】

タンパク質 G ビーズスラリー (1 ml) をエッペンドルフ遠心分離で 500 × g にて 3 分間遠心分離し、事前に冷却した T-per 緩衝液を用いて、ビーズを緩衝液によって 1 : 1 に希釈することによって 2 回洗浄した。スラリー (200 μl) を、抗体-抗原混合物を含有する各管に移した。対照管は、T-per 緩衝液 1 ml 中のスラリー 200 μl および抗体 300 μg を用いて管を調製することによって準備した。管を 4 にて 2 時間回転させた。その後、事前に冷却した T-per 緩衝液を使用してビーズを 2 回洗浄して (500 × g にて 3 分間遠心分離)、上清を保持した。冷 PBS での 1 回の最終洗浄の後、上清をできるだけ多く除去して 2 × サンプル緩衝液 (Pierce 5 × 添加緩衝液 : 添加緩衝液 200 μl、還元剤 100 μl、水 200 μl で完成) 100 μl を添加した。サンプルを 95 にて 5 分間煮沸させて、次に氷で 5 分間冷却した。サンプルを 3 分間回転させた後に、電気泳動のために各サンプルを 4 ~ 12 % SDS-PAGE ミニゲルの各レーンに 20 μl の量を添加した。

30

40

【0208】

沈殿後、クマシーを用いた総タンパク質の染色後に複数のバンドがゲル上で見られた。かすかな二重項バンドが 70 ~ 80 kD の分子量範囲で観察された (図 19 を参照)。同様のゲルから調製したウェスタンブロットを同じ mAb によってプローブすることによって、二重項が興味のあるバンドであることを確認した (データは示さず)。二重項バンドを SDS-PAGE ゲルから個別に切除して、質量分析法による同定を受けさせた。下バンドのカルネキシンとしての確実な同定が行われた。カルネキシンは、小胞体に関連する分子シャペロンである。

【0209】

カルネキシンは、小胞体 (ER) の 90 kD 内在性タンパクである。カルネキシンは、

50

大きい(50 kD) N末端カルシウム結合内腔ドメインと、単一の膜貫通らせんと、短い(90 残基) 酸性細胞質側末端とから成る。カルネキシンは「シャペロン」として公知のタンパク質のファミリーに属し、シャペロンは、正しく折り畳まれ構築されたタンパク質のみが分泌経路に沿ってさらに進行させるように、タンパク質折り畳みおよび品質管理を補助するその主な機能の特徴とする。カルネキシンの機能は、小胞体において折り畳まれていないまたは構築されていないN結合糖タンパク質を維持することである。カルネキシンは、GlcNAc2Man9Glc1オリゴサッカライドを有するこのようなN-糖タンパク質のみ結合する。3個の連続グルコース残基を備えたオリゴサッカライドが、ER中の新生タンパク質のアスパラギン残基に付加される。カルネキシンによって認識されるモノグルコシル化オリゴサッカライドは、2つのグルコシダーゼ、IおよびIIの連続作用による2つのグルコース残基のトリミングから生じる。グルコシダーゼIIも、第3および最後のグルコース残基を除去できる。糖タンパク質が正しく折り畳まれない場合、UGGTと呼ばれる酵素がグルコース残基をオリゴサッカライドに再び付加して、それゆえ糖タンパク質がカルネキシンに結合する能力を再生させるであろう。糖タンパク質鎖は何らかの理由で正しく折り畳むことが困難であり、それゆえER中で停滞して、MNS1(-マンノシダーゼ)と遭遇する危険を冒し、結局、期待以下の性能の糖タンパク質を、そのマンノース残基を除去することによって分解へ追いやる。ATPおよびCa²⁺は、カルネキシンの基質結合に関与する補因子のうち2つである。図20Aおよび20Bは、興味のあるタンパク質をカルネキシンとして同定するMSスペクトル写真の読み取り値を示すスクリーンショットである。

10

20

【0210】

(実施例2)

Cohen 2型糖尿病ラットからの組織における遺伝子発現のマイクロアレイ解析

マイクロアレイデータは第I相および第II相解析によって解析した。第I相は、Gene Logicからの処理データに基づく。第II相は、GeneSpring GXを使用するデータ解析に相当する。統計、シグナリング経路およびクラスタリングを含む追加の基準を解析に使用した。

【0211】

Cohen 2型糖尿病ラット(CDs-HSD、CDr-HSD)の膵臓全RNAの比較から導出したGene Logicからのマイクロアレイ結果(第I相)は、Affymetrix, Inc.からのMAS5.0ソフトウェアを使用して解析した。全体的な遺伝子発現解析は、CDsHSDと比較して、CDs-HSDは1178の遺伝子がアップレギュレートされ、803の遺伝子がダウンレギュレートされた。これらの多くの転写物は、2型糖尿病に関連する複数のシグナリング経路、たとえばインスリンシグナル伝達、ベータ細胞機能不全ならびに脂質およびグルコース代謝に関与する。また複数のセルピンファミリーメンバ(セリンプロテイナーゼ阻害薬)が2つのモデルにて異なって発現される。

30

【0212】

表10には、3倍を超える変化が認められた、Gene Logicからのデータのまとめを与える。

40

【0213】

【表 10】

| シグナリング経路 | アップレギュレートされた遺伝子 CDR-HS 対 CDS- HS | ダウンレギュレートされた遺伝子 CDR-HS 対 CDS-HS |
|-------------------------|----------------------------------------|------------------------------------|
| インスリンシグナリング | 39 | 41 |
| β細胞機能不全(アポトーシス、生存) | 17 | 6 |
| 炎症および免疫系 | 5 | 92 |
| ミトコンドリア機能不全および活性酸素種 | 20 | 8 |
| 脂質およびグルコース代謝 | 17 | 13 |
| プロテイナーゼおよびプロテイナーゼインヒビター | 28 | 17 |
| アミノ酸、核酸トランスポーターおよび代謝 | 13 | 9 |
| カリウムチャンネル | 3 | 6 |
| ERおよびゴルジ体関連遺伝子 | 8 | 8 |
| 他の未分類遺伝子 | 1028 | 603 |
| 合計 | 1178 | 803 |

10

第 I I 相データ解析は、クロスチップ比較を改善するために正規化データ（比 = 転写シグナル / 対照シグナル）を使用した GeneSpring GX を使用して実施した。GeneSpring GX は、発現レベルで 2 倍または 3 倍の変化を示す遺伝子に従ってフィルタリングされる遺伝子リストを考慮する。GeneSpring GX は、統計的アルゴリズム、たとえば ANOVA、事後検定および Gross - Gene Error Modeling はもちろんのこと、Gene Tree、K 平均クラスタリング、および Self - Organization Map (SOM) クラスタリングなどのクラスタリングアルゴリズムも含む。GeneSpring GX は、当分野で公開されている経路、たとえば Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (「KEGG 経路」) および Gen Map Annotator and Pathway Profiler (GenMAP) と統合する能力も有する。

20

【0214】

GeneSpring GX によって解析したマイクロアレイ結果は、2 つの群において 3 倍を超える変化をもつ転写物のうち、137 の転写物が 0.05 未満の p 値を有することを示している。これらの遺伝子は、複数のシグナリング経路、たとえばインスリンシグナリング経路、セルピタンパク質ファミリー、基礎代謝、膵臓機能および炎症に参与している。図 2 1 は、異なって発現された遺伝子の散布図である。レベルが 3 倍以上の変化を示す 137 の転写物は図 2 2 B に示され、また表 1 1 および 1 2 にグループ化されている。

30

【0215】

表 1 1 アップレギュレートされた遺伝子（合計 = 101 の転写物）

【0216】

【表 1 1 - 1】

| 一般名 | UniGene | 説明 |
|---------------|-----------|--------------------------------------------|
| Reg3a | Rn.11222 | 再生臍島由来3アルファ |
| LOC680945 | Rn.1414 | 間質細胞由来因子2様1に類似 |
| Pap | Rn.9727 | 肺炎関連タンパク質 |
| Ptf1a | Rn.10536 | 膵臓特異的転写因子、1a |
| Mat1a | Rn.10418 | メチオニンアデノシルトランスフェラーゼI、アルファ |
| Nuprl | Rn.11182 | 核タンパク質1 |
| | Rn.128013 | 未知のcDNA |
| Cha1 予測 | Rn.23367 | ChaC、カチオン輸送レギュレーター様1 (E. coli) (予測) |
| Slc7a3 | Rn.9804 | 溶質担体ファミリー7(カチオン性アミノ酸トランスポータ、y+系)、メンバ3 |
| LOC312273 | Rn.13006 | トリプシン V-A |
| | Rn.47821 | 転写位置 |
| Ptger3 | Rn.10361 | プロスタグランジンE受容体3(サブタイプEP3) |
| RGD1562451 予測 | Rn.199400 | Pabpc4_predictedタンパク質(予測)に類似 |
| RGD1566242 予測 | Rn.24858 | RIKEN cDNA 1500009M05 (予測)に類似 |
| Cyp2d26 | Rn.91355 | チトクロームP450、ファミリー2、サブファミリーd、ポリペプチド26 |
| | Rn.17900 | アルデヒドデヒドロゲナーゼ1ファミリー、メンバL2に類似 |
| LOC286960 | Rn.10387 | プレプロトリプシノーゲンIV |
| Gls2 | Rn.10202 | グルタミナーゼ2(肝臓、ミトコンドリア) |
| Nme2 | Rn.927 | 非転移細胞2にて発現 |
| | Rn.165714 | 転写位置 |
| P2rx1 | Rn.91176 | プリン受容体P2X、リガンドゲートイオンチャネル、1 |
| Pdk4 | Rn.30070 | ピルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ、アイソエンザイム4 |
| Amy1 | Rn.116361 | アミラーゼ1;唾液 |
| Cbs | Rn.87853 | シスタチオンベータシクターゼ |
| Mtei | Rn.37524 | ミトコンドリアアシル-CoAチオエステラーゼ1 |
| Spink1 | Rn.9767 | セリンプロテアーゼインヒビター、Kazal型1 |
| Gatm | Rn.17661 | グリシンアミジトランスフェラーゼ(L-アルギニン:グリシンアミジトランスフェラーゼ) |
| | | 6を含有する膜貫通emp24タンパク質輸送ドメイン(予測) |
| Tmed6 予測 | Rn.19837 | |
| Tff2 | Rn.34367 | トレフォイル因子2(鎮痙タンパク質1) |
| Hsd17b13 | Rn.25104 | ヒドロキシステロイド(17-β)デヒドロゲナーゼ13 |
| | Rn.11766 | LRRGT00012に類似[ラット] |
| Gnmt | Rn.11142 | グリシンN-メチルトランスフェラーゼ |
| Pah | Rn.1652 | フェニルアラニンヒドロキシラーゼ |
| セルピニ2 | Rn.54500 | セリン(またはシステイン)プロテイナーゼインヒビター、クレード1、メンバ2 |
| RGD1309615 | Rn.167687 | 未知のcDNA |
| LOC691307 | Rn.79735 | 39アイソフォーム2を含有するロイシンリッチ反復に類似 |
| Eprs | Rn.21240 | グルタミル-プロリル-tRNAシクターゼ |
| | | ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ2(ミトコンドリア)(予測) |
| Pck2 予測 | Rn.35508 | |
| Chd2 予測 | Rn.162437 | クロモドメインヘリカーゼDNA結合タンパク質2(予測) |

10

20

30

【 0 2 1 7 】

【表 1 1 - 2】

| 一般名 | UniGene | 説明 |
|---------------|-----------|--------------------------------------------------|
| | Rn.53085 | 転写位置 |
| | Rn.12530 | 転写位置 |
| NIPK | Rn.22325 | トリプルズホモログ3(ショウジョウバエ) |
| Slc30a2 | Rn.11135 | 溶質担体ファミリー30(亜鉛トランスポータ)、メンバ2 |
| セルピナ10 | Rn.10502 | セリン(またはシステイン)ペプチダーゼインヒビター、クレードA、メンバ10 |
| Cfi | Rn.7424 | 補体因子1 |
| Cckar | Rn.10184 | コレシストキニンA受容体 |
| LOC689755 | Rn.151728 | 仮定的タンパク質 LOC689755 |
| Bhlhb8 | Rn.9897 | クラスB、8を含有する塩基性らせんループ-らせんドメイン |
| Anpep | Rn.11132 | アラニル(膜)アミノペプチダーゼ |
| Asns | Rn.11172 | アスパラギンシンテターゼ |
| Slc7a5 | Rn.32261 | 溶質担体ファミリー7(カチオン性アミノ酸トランスポータ、y+系)、メンバ5 |
| Usp43 予測 | Rn.12678 | ユビキチン特異的プロテアーゼ43(予測) |
| Csnk1a1 | Rn.23810 | カゼインキナーゼ1、アルファ1 |
| Pck2 予測 | Rn.35508 | ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ2(ミトコンドリア)(予測) |
| スピック1 | Rn.9767 | セリンプロテアーゼインヒビター、Kazal型1 |
| Cml2 | Rn.160578 | Camello様2 |
| Pabpc4 | Rn.199602 | 転写位置 |
| Gjb2 | Rn.198991 | ギャップ結合膜チャンネルタンパク質ベータ2 |
| Ngfg | Rn.11331 | 神経成長因子、ガンマ |
| Cica2 予測 | Rn.48629 | 転写位置 |
| RGD1565381 予測 | Rn.16083 | RIKEN cDNA 1810033M07(予測)に類似 |
| Qscn6 | Rn.44920 | キエスシンQ6 |
| Cldn10 予測 | Rn.99994 | クラウジン10(予測) |
| スピック3 | Rn.144683 | セリンプロテアーゼインヒビター、Kazal型3 |
| LOC498174 | Rn.163210 | NipSnap2タンパク質(神経膠芽腫増幅配列)に類似 |
| | Rn.140163 | メチオニン-tRNAシンテターゼ[ラット]に類似 |
| Cyr61 | Rn.22129 | システインリッチタンパク質61 |
| RGD1307736 | Rn.162140 | 仮定的タンパク質 KIAA0152に類似 |
| Ddit3 | Rn.11183 | DNA損傷誘発性転写物3 |
| Reg1 | Rn.11332 | 再生豚島由来1 |
| Eprs | Rn.21240 | グルタミル-プロリル-tRNA-シンテターゼ |
| NIPK | Rn.22325 | cDNAクローンRPCAG66 3'末端、mRNA配列 |
| Eif4b | Rn.95954 | 真核細胞翻訳開始因子4B |
| スピック1 | Rn.9767 | セリンプロテアーゼインヒビター、Kazal型1 |
| Rnase4 | Rn.1742 | リボヌクレアーゼ、RNase Aファミリー4 |
| Cebpg | Rn.10332 | CCAAT/エンハンサ結合タンパク質(C/EBP),ガンマ |
| siat7D | Rn.195322 | アルファ-2,6-シアリルトランスフェラーゼ ST6GalNAc IV |
| Herpud1 | Rn.4028 | ホモシステイン誘発性、ユビキチン様ドメインメンバ1 |
| | | 未知のラット cDNA |
| Gcat | Rn.43940 | グリシンC-アセチルトランスフェラーゼ(2-アミノ-3-ケトブチラート-コエンザイムAリガーゼ) |
| RGD1562860 予測 | Rn.75246 | RIKEN cDNA 2310045A20(予測)に類似 |
| Hspa9a 予測 | Rn.7535 | 熱ショック70kDタンパク質9A(予測) |
| Dbt | Rn.198610 | ジヒドロリポアミド分枝鎖トランスアシラーゼ E2 |

10

20

30

【 0 2 1 8 】

【表 1 1 - 3】

| 一般名 | UniGene | 説明 |
|---------------|-----------|---------------------------------------------------|
| Bspry | Rn.53996 | B-box および SPRYドメイン含有 |
| Fut1 | Rn.11382 | フコシルトランスフェラーゼ1 |
| Rpl3 | Rn.107726 | リボソームタンパク質L3 |
| | Rn.22481 | NP_083620.1アシルホスファターゼ2、筋肉型[マウス]に類似 未知のラット cDNA |
| Vldlr | Rn.9975 | 超低密度リポタンパク質受容体 |
| RGD1311937_予測 | Rn.33652 | 仮定的タンパク質 MGC17299 (予測) に類似 |
| RGD1563144_予測 | Rn.14702 | EMeg32タンパク質(予測) に類似 |
| | Rn.43268 | 転写位置 |
| pre-mtHSP70 | Rn.7535 | 70 kD 熱ショックタンパク質前駆物質 |
| Ddah1 | Rn.7398 | ジメチルアルギニンジメチルアミノヒドロラーゼ1 |
| RGD1307736 | Rn.162140 | 仮定的タンパク質 KIAA0152 に類似 |
| RAMP4 | Rn.2119 | リボソーム結合膜タンパク質4 |
| Ptger3 | Rn.10361 | プロスタグランジンE受容体3(サブタイプEP3) |
| | Rn.169405 | 転写位置 |
| Ccbe1_予測 | Rn.199045 | コラーゲンおよびカルシウム結合EGFドメイン1(予測) |
| Dnajc3 | Rn.162234 | DnaJ (Hsp40)ホモログ、サブファミリC、メンバ3 |
| Mtae2d1 | Rn.43919 | 膜標的(タンデム)C2ドメイン含有1 |

表 1 2 : ダウンレギュレートされた遺伝子 (合計 = 36 転写物)

【 0 2 1 9 】

【表 1 2】

| 一般名 | UniGene | 説明 |
|---------------|-----------|--------------------------------------|
| RGD1563461_予測 | Rn.199308 | 転写位置 |
| Gimap4 | Rn.198155 | GTPase, IMAF ファミリメンバ4 |
| S100b | Rn.8937 | S100タンパク質、ベータポリペプチド |
| Klf2_予測 | Rn.92653 | Kruppel 様因子2(肺) (予測) |
| RGD1309561_予測 | Rn.102005 | 仮定的タンパク質 FLJ31951 (予測) に類似 |
| NAP22 | Rn.163581 | 転写位置 |
| Sfrs3_予測 | Rn.9002 | スプライシング因子、アルギニン/セリンリッチ3 (SRp20) (予測) |
| | Rn.6731 | 転写位置 |
| Cd53 | Rn.31988 | CD53 抗原 |
| RGD1561419_予測 | Rn.131539 | RIKEN cDNA 6030405P05 遺伝子(予測) に類似 |
| Il2rg | Rn.14508 | インターロイキン2受容体、ガンマ |
| LOC361346 | Rn.31250 | 染色体18読み取り枠54に類似 |
| Cd38 | Rn.11414 | CD38 抗原 |
| Klf2_予測 | Rn.92653 | Kruppel 様因子2(肺) 予測 |
| Plac8_予測 | Rn.2649 | 胎盤特異的8(予測) |
| LOC498335 | Rn.6917 | 小型誘発性サイトカインB13前駆物質 (CXCL13) に類似 |
| Igfbp3 | Rn.26369 | インスリン様成長因子結合タンパク質3 |
| Ptprc | Rn.90166 | タンパク質チロシンホスファターゼ、受容体タイプC |
| RT1-Aw2 | Rn.40130 | RT1クラスIb、位置Aw2 |
| Rac2 | Rn.2863 | RAS関連C3ボツリヌス基質2 |
| | Rn.9461 | 転写位置 |
| Fos | Rn.103750 | FBJ マウス骨肉腫ウイルス癌遺伝子ホモログ |
| Arhgdib | Rn.15842 | Rho, GDP 解離インヒビター (GDI) ベータ |
| Sgnel | Rn.6173 | 分泌顆粒神経内分泌タンパク質1 |
| Lck_マップ済み | Rn.22791 | リンパ球タンパク質チロシンキナーゼ(マップ済み) |
| Fcgr2b | Rn.33323 | Fc受容体、IgG、低親和性Ib |
| Sifn8 | Rn.137139 | Schlafen 8 |
| Rab8b | Rn.10995 | RAB8B, メンバRAS癌遺伝子ファミリ |
| | Rn.4287 | 未知の cDNA |
| RGD1306939 | Rn.95357 | mKIAA0386タンパク質に類似 |
| Tnfrsf26_予測 | Rn.162508 | 腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリ、メンバ26(予測) |
| Ythdf2_予測 | Rn.21737 | YTHドメインファミリ2(予測) |
| RGD1359202 | Rn.10956 | 免疫グロブリン重鎖 (Igh-6) に類似 |
| RGD1562855_予測 | Rn.117926 | Ig カップ鎖(予測) に類似 |
| Igha_マップ済み | Rn.109625 | 免疫グロブリン重鎖(アルファポリペプチド) (マップ済み) |
| Ccl21b | Rn.39658 | ケモカイン(C-Cモチーフ)リガンド21b(セリン) |

図 2 2 A に示した Gene Tree 遺伝子クラスタリング解析は、6つすべてのサンプルに存在する 12,729 の遺伝子を示す。上述したように、820 の遺伝子は発現で

10

20

30

40

50

2倍の変化を示したが、137の遺伝子は発現で3倍の変化を示し、Gene Tree表現は図22Bに示されている。3倍の変化を示した137の遺伝子のうち、K平均クラスタリング解析は、セット内の遺伝子間の最大の類似性に基づいて、これらの137の遺伝子をさらに5つのセットに分割した(図21C)。これら5セットは、「Up-1」、「Up-2」、「Up-3」、「Up-4」、および「Up-5」と呼ばれ、下の表13~17にまとめる。

【0220】

表13: Up-1

【0221】

【表13】

10

| 全遺伝子: 91 | | 倍数 |
|---------------|----------------------------------------|-------|
| 一般名 | 説明 | 変化 |
| Reg3a | 再生肝島由来3アルファ | 75.08 |
| LOC680945 | 間質細胞由来因子2種1に類似 | 32.31 |
| Pap | 肺炎関連タンパク質 | 19.53 |
| Ptfr1a | 肺臓特異的転写因子、1a | 11.59 |
| Mat1a | メチオニンアデニルトランスフェラーゼI、アルファ | 8.67 |
| Nupr1 | 核タンパク質1 | 7.53 |
| | 未知のcDNA | 7.52 |
| Chac1_予測 | ChaC、カチオン輸送レギュレーター様1(E. coli)(予測) | 7.41 |
| Stc7a3 | 溶質担体ファミリー7(カチオン性アミノ酸トランスポーター、y+系)、メンバ3 | 6.68 |
| LOC312273 | トリプシンV-A | 6.38 |
| | 転写部位 | 6.08 |
| Ptger3 | プロスタグランジンE受容体3(サブタイプEP3) | 6.01 |
| RGD1562451_予測 | Pabpc4_predictedタンパク質(予測)に類似 | 5.88 |
| RGD1566242_予測 | Riken cDNA 1500009M05(予測)に類似 | 5.62 |
| Cyp2d26 | チトクロームP450、ファミリー2、サブファミリーd、ポリペプチド26 | 5.59 |
| | アルデヒドデヒドロゲナーゼ1ファミリー、メンバ12[イヌ]に類似 | 5.37 |
| LOC286960 | プレプロトリプシノーゲンIV | 5.19 |
| Gls2 | グルタミナーゼ2(肝臓、ミトコンドリア) | 5.10 |

20

表14: Up-2

【0222】

【表14】

| 全遺伝子: 91 | | 倍数 |
|------------|--------------------------------------------|------|
| 一般名 | 説明 | 変化 |
| | 転写部位 | 4.92 |
| P2rx1 | プリン受容体P2X、リガンドゲートイオンチャンネル1 | 4.85 |
| Pdk4 | ピルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ、アイソエンザイム4 | 4.72 |
| Amy1 | アミラーゼ1、唾液 | 4.70 |
| Cbs | シスタチオニンペーダシクターゼ | 4.67 |
| Mte1 | ミトコンドリアアシル-CoAチオエステラーゼ1 | 4.49 |
| Spink1 | セリンプロテアーゼインヒビター、Kazal型1 | 4.43 |
| Gatm | グリシンアミジトランスフェラーゼ(L-アルギニン:グリシンアミジトランスフェラーゼ) | 4.40 |
| Tmed6_予測 | 6を含有する膜貫通emp24タンパク質輸送ドメイン(予測) | 4.38 |
| Tff2 | トリフォイル因子2(鎮痙タンパク質1) | 4.36 |
| Hsd17b13 | ヒドロキシステロイド(17-β)デヒドロゲナーゼ13 | 4.34 |
| | LRRGT00012[ラット]に類似 | 4.30 |
| Gnmt | グリシンN-メチルトランスフェラーゼ | 4.30 |
| Pah | フェニルアラニンヒドロキシラーゼ | 4.29 |
| セルピニ2 | セリン(またはシステイン)プロテイナーゼインヒビター、クレード1、メンバ2 | 4.28 |
| RGD1309615 | 未知のcDNA | 4.16 |
| LOC691307 | 39アイソフォーム2を含有するロイシンリッチ反復と類似 | 4.12 |
| Eprs | グルタミル-プロリル-tRNAシントターゼ | 4.03 |
| Pck2_予測 | ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ2(ミトコンドリア)(予測) | 4.01 |

30

表15: Up-3

【0223】

40

【表 15】

| 全遺伝子: 91 | | 倍数 |
|---------------|----------------------------------------|------|
| 一般名 | 説明 | 変化 |
| | 転写位置 | 3.97 |
| | 転写位置 | 3.96 |
| Slc30a2 | 溶質担体ファミリー30(亜鉛トランスポーター)、メンバ2 | 3.77 |
| セルピナ10 | ゼリン(またはシステイン)ペプチダーゼインヒビター、クレードA、メンバ10 | 3.77 |
| Cfi | 補体因子1 | 3.69 |
| Cckar | コレシストキニンA受容体 | 3.68 |
| LOC689755 | 仮定的タンパク質 LOC689755 | 3.68 |
| Bhlhb8 | クラスB、8を含有する塩基性らせん-ループ-らせんドメイン | 3.66 |
| Anpep | アラニル(膜)アミノペプチダーゼ | 3.65 |
| Asns | アスパラギンシテターゼ | 3.65 |
| Usp43_予測 | ユビキチン特異的プロテアーゼ43(予測) | 3.62 |
| Slc7a5 | 溶質担体ファミリー7(カチオン性アミノ酸トランスポーター、y+系)、メンバ5 | 3.62 |
| Csnk1a1 | カゼインキナーゼ1、アルファ1 | 3.58 |
| Cml2 | Camello様2 | 3.51 |
| Pabpc4 | 転写位置 | 3.50 |
| Gjb2 | ギャップ結合膜チャネルタンパク質ベータ2 | 3.49 |
| Ngfg | 神経成長因子、ガンマ | 3.47 |
| Ctca2_予測 | 転写位置 | 3.46 |
| RGD1565381_予測 | RIKEN cDNA 1810033M07(予測)に類似 | 3.42 |
| Qscn6 | キエスチンQ6 | 3.41 |

10

表 16 : U p - 4

【 0 2 2 4 】

【表 16】

| 全遺伝子: 91 | | 倍数 |
|---------------|--------------------------------------------------|------|
| 一般名 | 説明 | 変化 |
| Cldn10_予測 | クラウジン10(予測) | 3.40 |
| スピック3 | ゼリンプロテアーゼインヒビター、Kazal型3 | 3.38 |
| LOC498174 | NipSnap2タンパク質(神経膠芽腫増幅配列)に類似 | 3.36 |
| | メチオニン-tRNAシテターゼ[ラット]に類似 | 3.35 |
| Cyr61 | システインリッチタンパク質61 | 3.33 |
| RGD1307736 | 仮定的タンパク質 KIAA0152に類似 | 3.32 |
| Ddit3 | DNA損傷誘発性転写物3 | 3.32 |
| Reg1 | 再生腫瘍由来1 | 3.22 |
| NIPK | 未知の cDNA | 3.19 |
| Eif4b | 真核生物翻訳開始因子4B | 3.17 |
| Rnase4 | リボヌクレアーゼ、RNase Aファミリー4 | 3.16 |
| Cebpg | CCAAT/エンハンサ結合タンパク質(C/EBP)、ガンマ | 3.16 |
| siat7D | アルファ-2,6-シリアルトランスフェラーゼ ST6GalNAc IV | 3.15 |
| Hespad1 | ホモシステイン誘発性、ユビキチン様ドメインメンバ1 | 3.15 |
| Goat | グリシンC-アセチルトランスフェラーゼ(2-アミノ-3-ケトブチレート-コエンザイムAリガーゼ) | 3.13 |
| RGD1562860_予測 | RIKEN cDNA 2310045A20(予測)に類似 | 3.11 |
| Hspa9a_予測 | 熱ショック70kDタンパク質9A(予測) | 3.10 |
| Dbt | ジヒドロリボアミド分枝鎖トランスアミラーゼE2 | 3.10 |
| Bsply | B-boxおよびSPRYドメイン含有 | 3.10 |

20

30

表 17 : U p - 5

【 0 2 2 5 】

【表 17】

| 全遺伝子: 91 | | 倍数 |
|---------------|----------------------------------------|------|
| 一般名 | 説明 | 変化 |
| Fut1 | フコシルトランスフェラーゼ1 | 3.09 |
| Rpl3 | リボソームタンパク質L3 | 3.08 |
| | NP_083620.1 アシルホスファターゼ2、筋肉型に非常に類似[マウス] | 3.08 |
| Vldlr | 超低密度リボタンパク質受容体 | 3.07 |
| RGD1311937_予測 | 仮定的タンパク質 MGC17299(予測)に類似 | 3.04 |
| RGD1563144_予測 | EMeg32タンパク質(予測)に類似 | 3.04 |
| | 転写位置 | 3.04 |
| Ddah1 | ジメチルアルギニンジメチルアミドヒドロラーゼ1 | 3.03 |
| RAMP4 | リボソーム結合膜タンパク質4 | 3.01 |
| | 転写位置 | 3.01 |
| Ccbe1_予測 | コラーゲンおよびカルシウム結合EGFドメイン1(予測) | 3.01 |
| Dnajc3 | DnaJ(Hsp40)ホモログ、サブファミリーC、メンバ3 | 3.00 |
| Mfac2d1 | 1を含有する膜標的(タンデム)C2ドメイン | 3.00 |

40

「Down - 1」および「Down - 2」という名称の追加の2セットは、Cohen糖尿病ラットサンプルでダウンレギュレートされた、GeneSpring GX解析によって見出された遺伝子を表す。次の表18および19に、「Down - 1」および「Down - 2」セットで得られた結果をまとめる。

【 0 2 2 6 】

表 18 : Down - 1

50

【 0 2 2 7 】

【 表 1 8 】

| 全遺伝子: 35 遺伝子 | | 倍数 |
|---------------|------------------------------|-------|
| 一般名 | 説明 | 変化 |
| Ccl21b | ケモカイン(C-Cモチーフ)リガンド21b(セリン) | 11.33 |
| Igha マップ済み | 免疫グロブリン重鎖(アルファポリペプチド)(マップ済み) | 7.63 |
| RGD1562855_予測 | Ig カップ鎖に類似(予測) | 4.98 |
| RGD1359202 | 免疫グロブリン重鎖6(Igh-6)に類似 | 4.78 |
| Ythdf2_予測 | YTHドメインファミリー2(予測) | 4.63 |
| Tnfrsf26_予測 | 腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバ26(予測) | 4.37 |
| RGD1306939 | mKIAA0386 タンパク質に類似 | 4.33 |
| | 未知の cDNA | 4.24 |
| Rab8b | RAB8B, メンバRAS癌遺伝子ファミリー | 4.10 |
| Slfn8 | Schlafen 8 | 3.91 |
| Fcgr2b | Fc受容体、IgG、低親和性Iib | 3.79 |
| Lck マップ済み | リンパ球タンパク質ロシキナーゼ(マップ済み) | 3.66 |
| Sgnc1 | 分泌顆粒神経内分泌タンパク質1 | 3.56 |
| Fos | FBJ マウス骨肉腫ウイルス癌遺伝子ホモログ | 3.55 |
| Arhgd1b | Rho, GDP解離インヒビター-(GDI)ベータ | 3.55 |
| | Transcribed locus | 3.51 |
| Rac2 | RAS関連Gボツリヌス基質2 | 3.42 |

表 1 9 : D o w n - 2

【 0 2 2 8 】

【 表 1 9 】

| 全遺伝子: 35 遺伝子 | | 倍数 |
|---------------|------------------------------------|------|
| 一般名 | 説明 | 変化 |
| RT1-Aw2 | RT1クラスIb, 位置Aw2 | 3.39 |
| Ptprc | タンパク質ロシホスファターゼ, 受容体タイプC | 3.39 |
| Igf1p3 | インスリン様成長因子結合タンパク質3 | 3.37 |
| LOC498335 | 小型誘発性サイトカインB13前駆物質 (CXCL13) に類似 | 3.27 |
| Plac8_予測 | プラセンタ特異的8(予測) | 3.25 |
| Cd38 | CD38 抗原 | 3.24 |
| LOC351346 | 染色体18読み取り枠54に類似 | 3.24 |
| RGD1561419_予測 | RIKEN cDNA 6030405P05 遺伝子(予測)に類似 | 3.19 |
| Il2rg | インターロイキン2受容体、ガンマ(重症複合免疫不全症) | 3.19 |
| Cd53 | CD53 抗原 | 3.18 |
| | 転写位置 | 3.16 |
| Sfrs3_予測 | スプライシング因子、アルギニン/セリンリッチ3(SRp20)(予測) | 3.15 |
| RGD1309561_予測 | 仮定的タンパク質 FLJ31951 (予測)に類似 | 3.13 |
| NAP22 | 転写位置 | 3.13 |
| Klf2_予測 | Kruppel様因子2(肺)(予測) | 3.11 |
| S100b | S100 タンパク質, ベータポリペプチド | 3.08 |
| Gimap4 | GTPase, IMAP ファミリアメンバ4 | 3.07 |
| RGD1563461_予測 | 転写位置 | 3.07 |

最後に、マイクロアレイによって取得した遺伝子発現解析は、標準方法による定量的 RT-PCRを使用して確認した。下の表は、マイクロアレイ解析によって同定され、その発現の倍数変化が Q-RT-PCR を使用して検証された、興味のある遺伝子のまとめを与える。

【 0 2 2 9 】

表 2 0 : 選択した遺伝子に対する定量的 RT-PCR 解析

【 0 2 3 0 】

【表 20】

| 一般名 | Genbank | UniGene | 説明 | ダウンレギュレート | |
|-------------|-----------|-----------|----------------------------------------|-----------|---------|
| | | | | 倍数変化 | ABI, \$ |
| Ccl21b | BI282920 | Rn.39658 | ケモカイン(C-Cモチーフ)リガンド21b(セリン) | 11.33 | 250 |
| Tnfrsf26_予測 | BE098317 | Rn.162508 | 腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバ26(予測) | 4.37 | 250 |
| Igf3 | NM_012588 | Rn.26369 | インスリン様成長因子結合タンパク質3 | 3.37 | 150 |
| Il2rg | AI178808 | Rn.14508 | インターロイキン2受容体、ガンマ(重症複合免疫不全症) | 3.19 | 250 |
| | | | | | |
| 一般名 | Genbank | UniGene | 説明 | アップレギュレート | |
| | | | | 倍数変化 | ABI, \$ |
| Reg3a | L10229 | Rn.11222 | 再生腫瘍由来3アルファ | 75.08 | 250 |
| LOC680945 | BI275923 | Rn.1414 | 間質細胞由来因子2様1に類似 | 32.31 | 250 |
| Pif1a | NM_053964 | Rn.10536 | 腫瘍特異的転写因子、1a | 11.58 | 150 |
| LOC312273 | AI178581 | Rn.13006 | トリプシンV-A | 6.38 | 250 |
| LOC286960 | X15679 | Rn.10387 | プレプロトリプシノーゲンIV | 5.19 | 250 |
| スピック1 | NM_012874 | Rn.9767 | セリンプロテアーゼインヒビター、Kazal型1 | 4.43 | 150 |
| セルピニ2 | NM_133612 | Rn.54500 | セリン(またはシステイン)プロテイナーゼインヒビター、クレーフI、メンバ2 | 4.28 | 250 |
| セルピニ10 | NM_133617 | Rn.10502 | セリン(またはシステイン)プロテイナーゼインヒビター、クレーフA、メンバ10 | 3.77 | 250 |
| スピック3 | M27883 | Rn.144683 | セリンプロテアーゼインヒビター、Kazal型3 | 3.38 | 150 |
| Reg1 | NM_012841 | Rn.11332 | 再生腫瘍由来1 | 3.22 | 250 |
| Eif4b | BI278814 | Rn.95954 | 真核細胞翻訳開始因子4B | 3.17 | 250 |
| Rpl3 | BG057530 | Rn.107726 | リボソームタンパク質L3 | 3.08 | 250 |
| RAMP4 | AI103695 | Rn.2119 | リボソーム結合膜タンパク質4 | 3.01 | 250 |
| | | | | | |
| ラット 対照 | 4352338E | | GAPDH | | 450 |
| | 4352340E | | アクチン、ベータ | | 450 |
| | | | | | 4750 |

C D 5 3 遺伝子によってコードされたタンパク質は、テトラスパニンファミリーとしても公知の膜貫通 4 スーパーファミリーのメンバである。これらのメンバの大半は、4つの疎水性ドメインの存在によって特徴付けられる細胞表面タンパク質である。細胞表面タンパク質は、細胞の発生、活性化、増殖および運動性の調節に重要な役割を果たすシグナル伝達イベントを媒介する。このコードされたタンパク質は、インテグリンと複合体を形成することが公知である細胞表面糖タンパク質である。それはT細胞およびナチュラルキラー細胞におけるC D 2 産生シグナルの伝達に寄与し、増殖調節における役割を果たすことが示唆されている。本遺伝子の家族性欠損症は、細菌、真菌およびウイルスによって引き起こされた再発性感染症に関連する免疫不全症に結びつけられてきた。代替りのスプライシングは、同じタンパク質をコードする複数の転写変種をもたらす。C D 3 8 は、細胞および組織、特に白血球で広範に発現される新規な多機能性エクトエンザイムである。C D 3 8 は、細胞接着、シグナル伝達およびカルシウムシグナリングで機能を果たす。

【0231】

本発明をその詳細な説明と併せて記載してきたが、上記の説明は例示であり、添付の請求の範囲によって定義される本発明の範囲を制限するものではないことが理解されるはずである。他の態様、利点、および修正形態は、次の請求項の範囲内である。

【 1 】

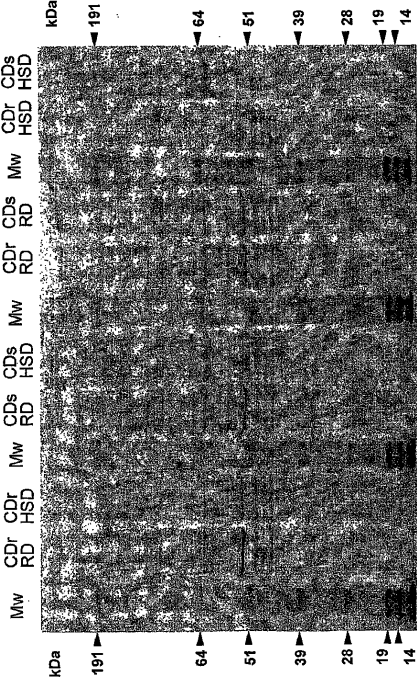


Figure 1

【 2 A 】

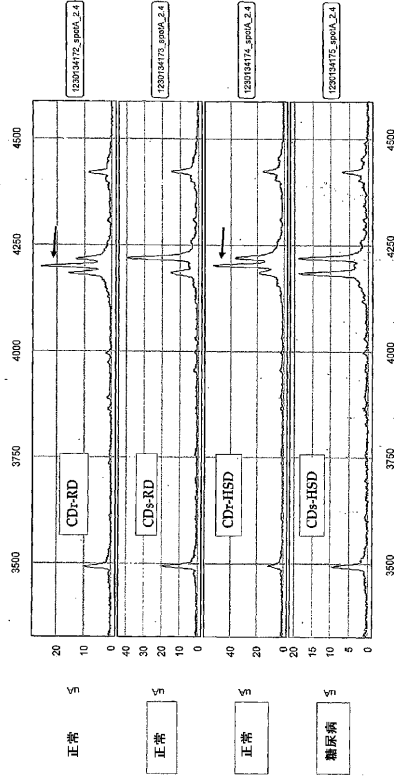


Figure 2A

【 2 B 】

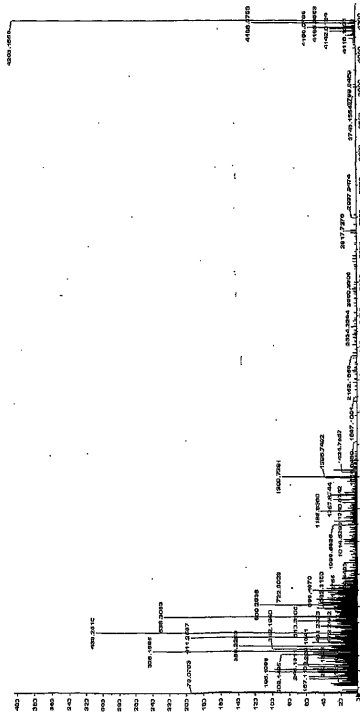


Figure 2B

【 3 A 】

| アクセシオン番号 | 同一性 |
|-----------|---------------|
| AAH03559 | 39/38 (100%) |
| AAH08029 | 17/38 (44.7%) |
| CAA25459 | 17/38 (44.7%) |
| AAA51546 | 15/38 (39.5%) |
| AAA59454 | 13/38 (34.2%) |
| CAD66567 | 13/38 (34.2%) |
| AF113676 | 13/38 (34.2%) |
| XP_945471 | 12/38 (31.6%) |
| CAD66587 | 12/38 (31.6%) |
| EW90971 | 12/38 (31.6%) |

Figure 3A

【図 5 A】

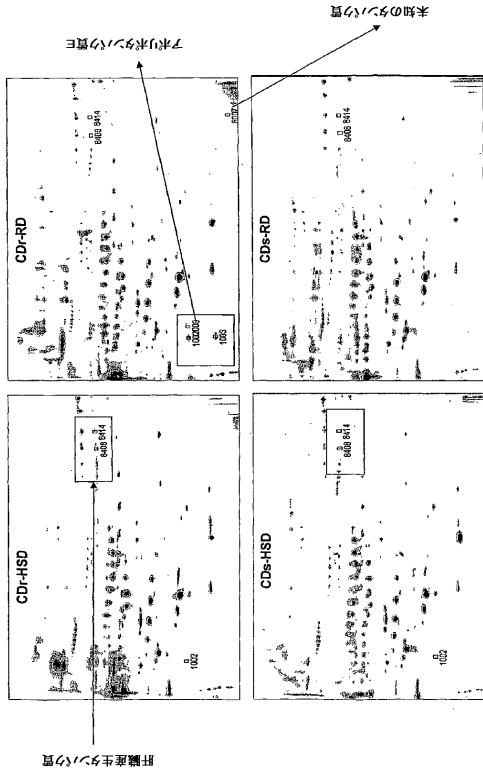


Figure 5A

【図 5 B】

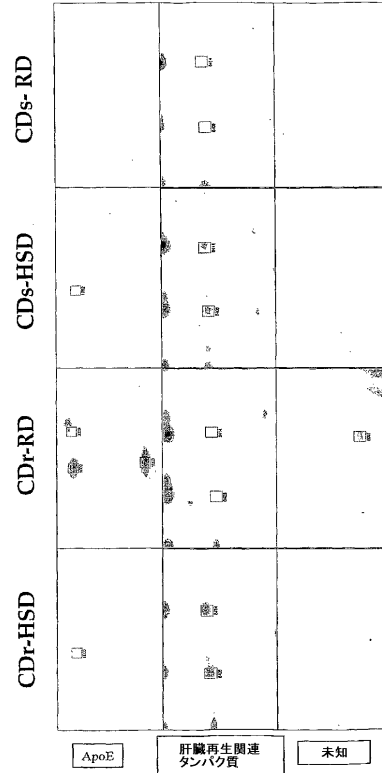


Figure 5B

【図 6】

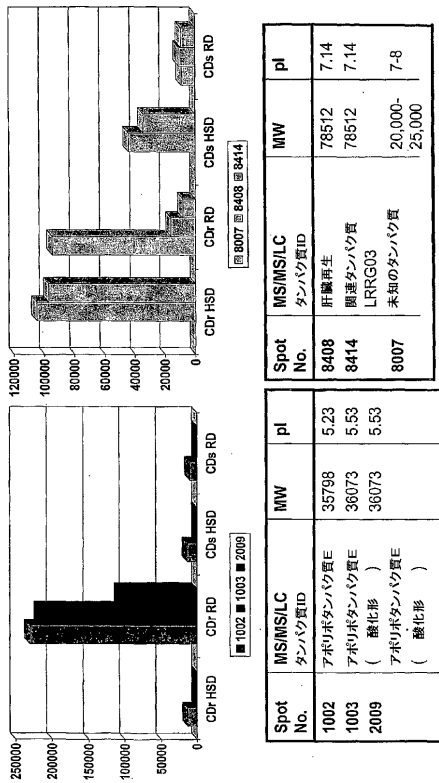


Figure 6

【図 7】

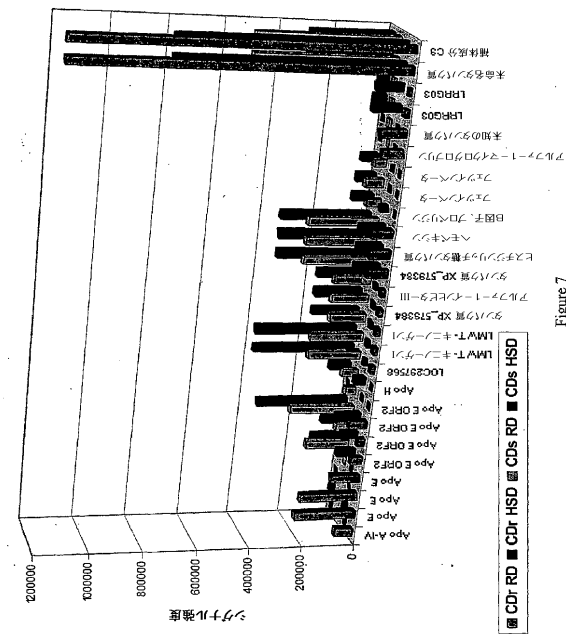
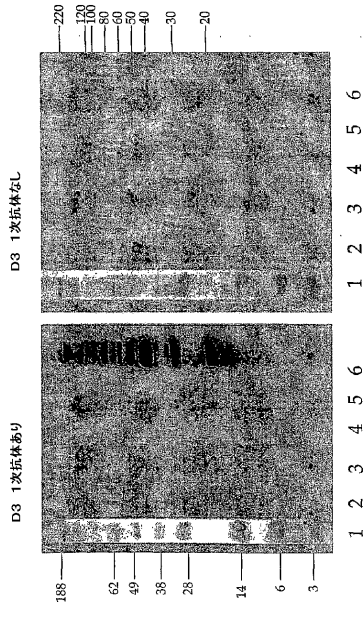


Figure 7

【 図 8 】



レーン1: Seeblue マーカー
 レーン2: CD8-HSD (画分6)
 レーン3: CD8-RD (画分6)
 レーン4: CD7-HSD (画分6)
 レーン5: CD7-RD (画分6)
 レーン6: マジックマーカー

Figure 8

【 図 9 】

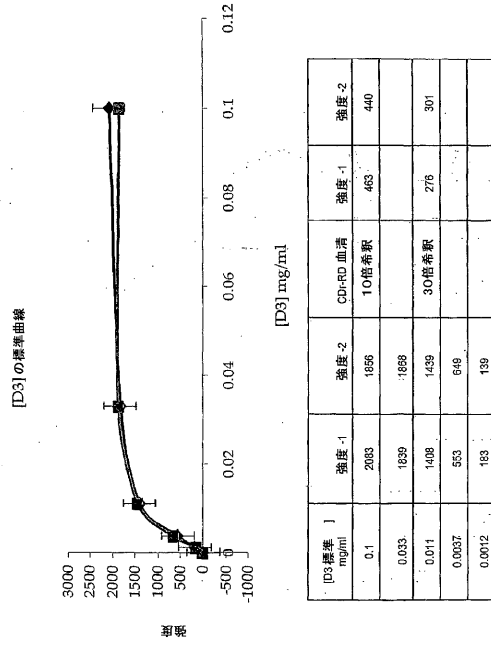


Figure 9

【 図 10 】

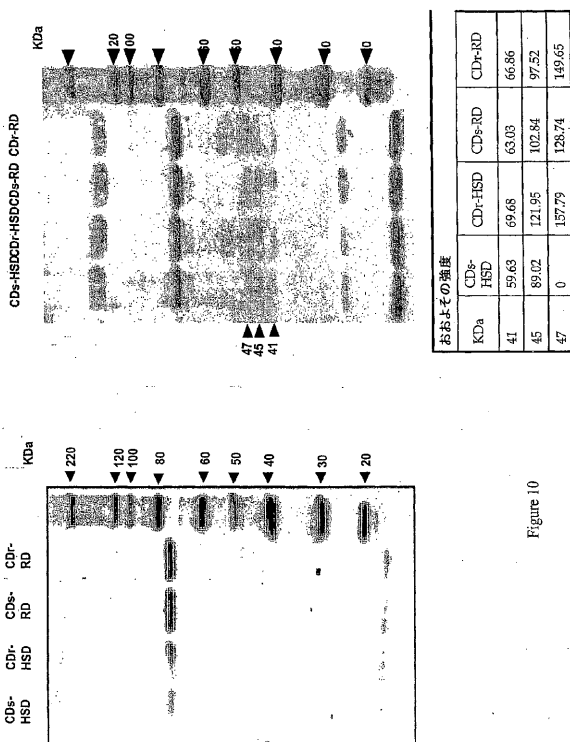


Figure 10

【 図 11 】

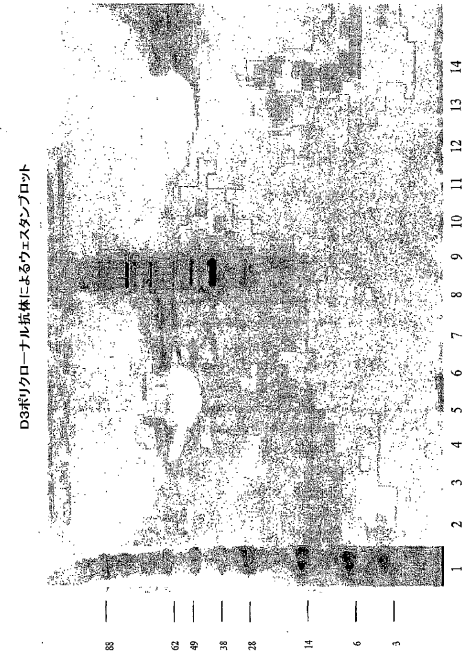


Figure 11

【 図 1 2 A 】

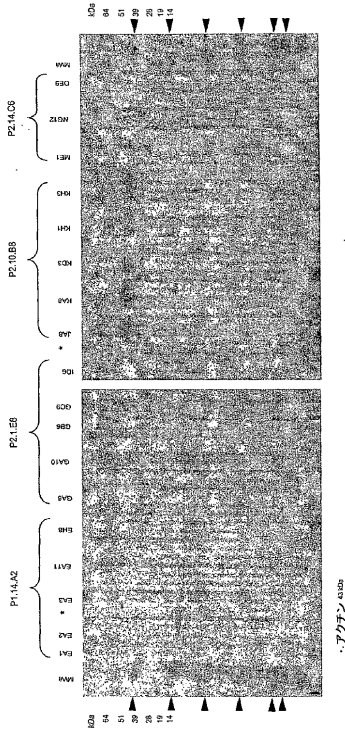


Figure 12A

【 図 1 2 B 】

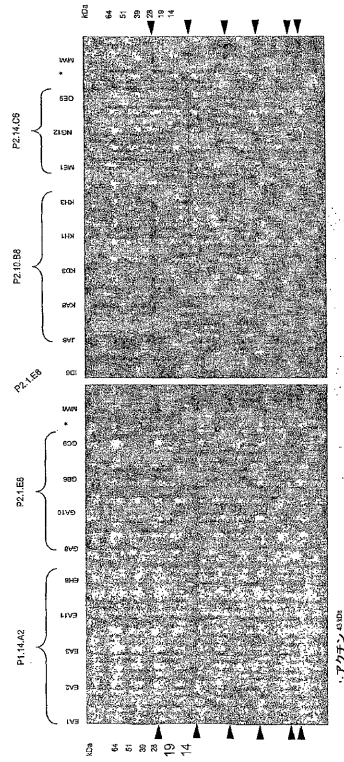
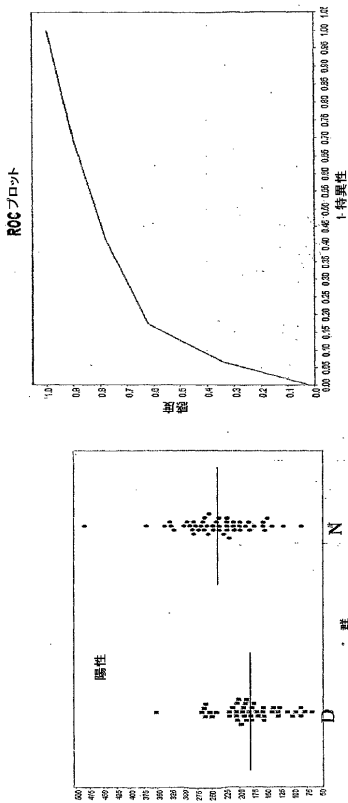


Figure 12B

【 図 1 3 】

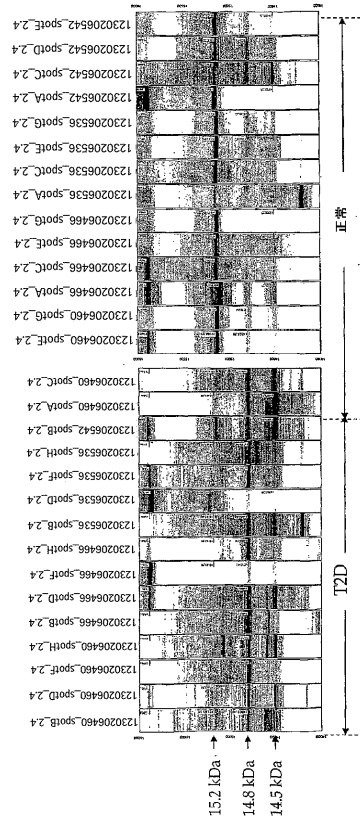


AUC = 0.758

M/Z = 6436±5
P-値 = 0.00001

Figure 13

【 図 1 4 】



15.2 kDa
14.8 kDa
14.5 kDa

正常

T2D

【 15 】

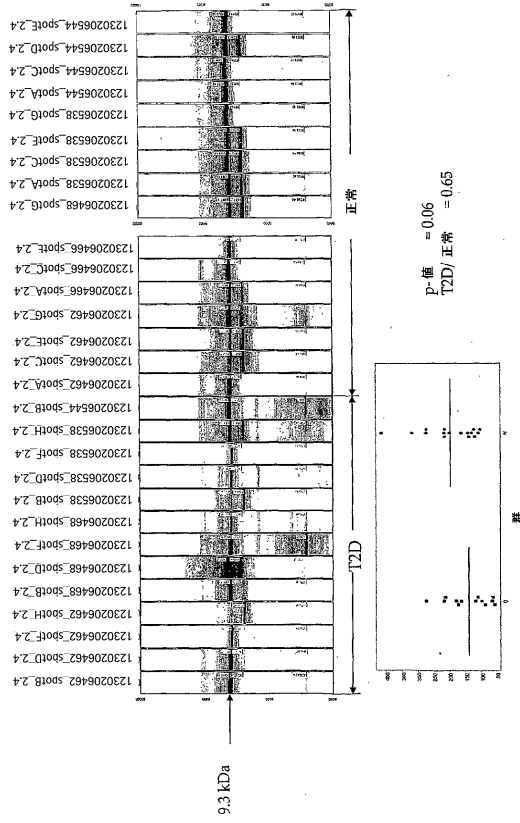


Figure 15

【 16 】

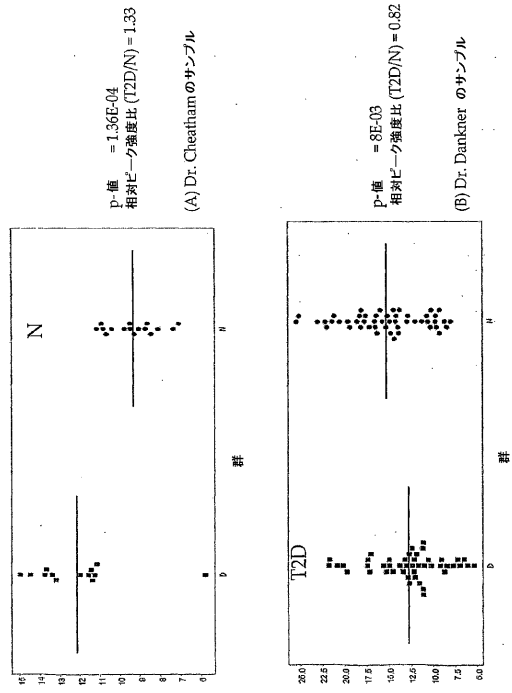


Figure 16

【 17 A 】

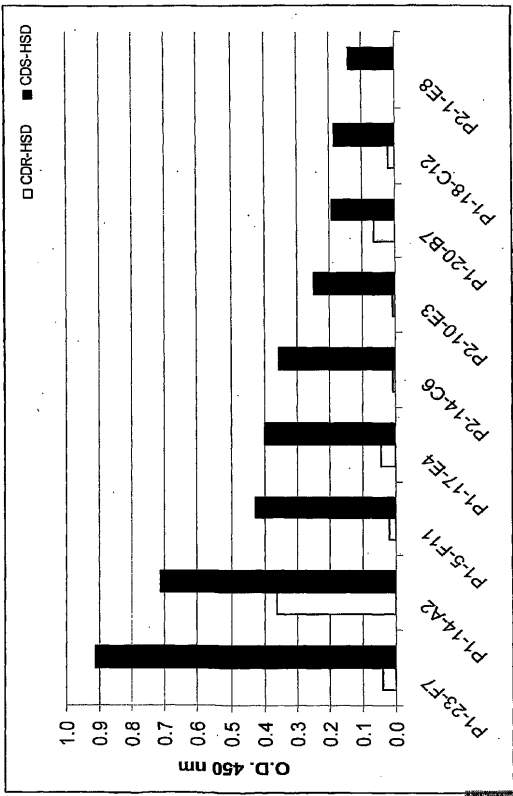


Figure 17A

【 17 B 】

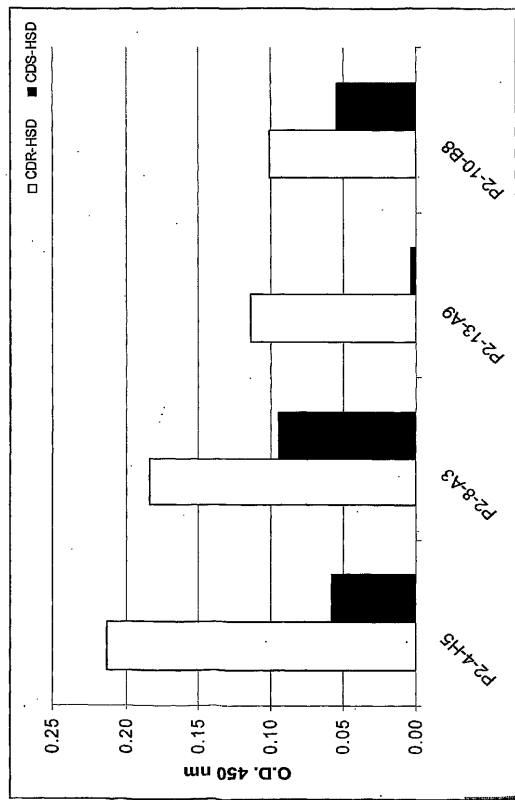


Figure 17B

【 18 A 】

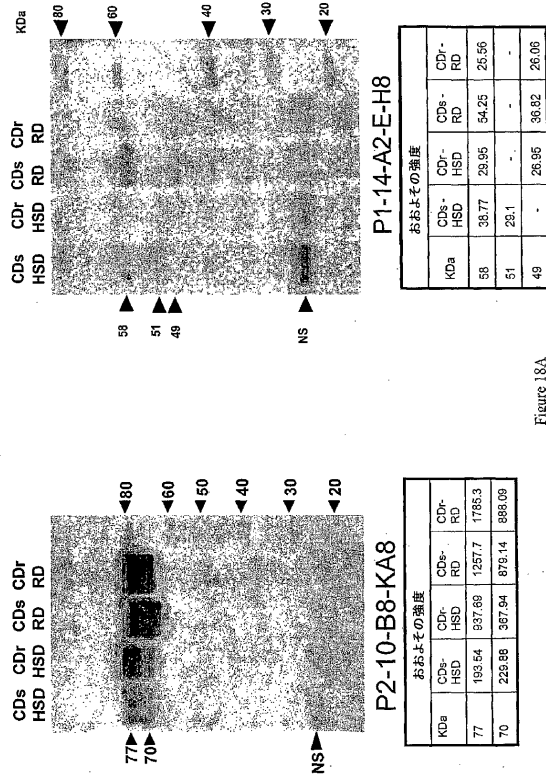


Figure 18A

【 18 B 】

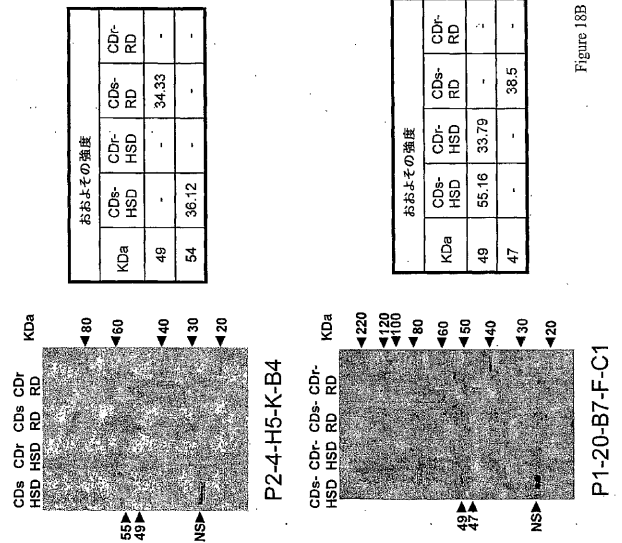


Figure 18B

【 18 C 】

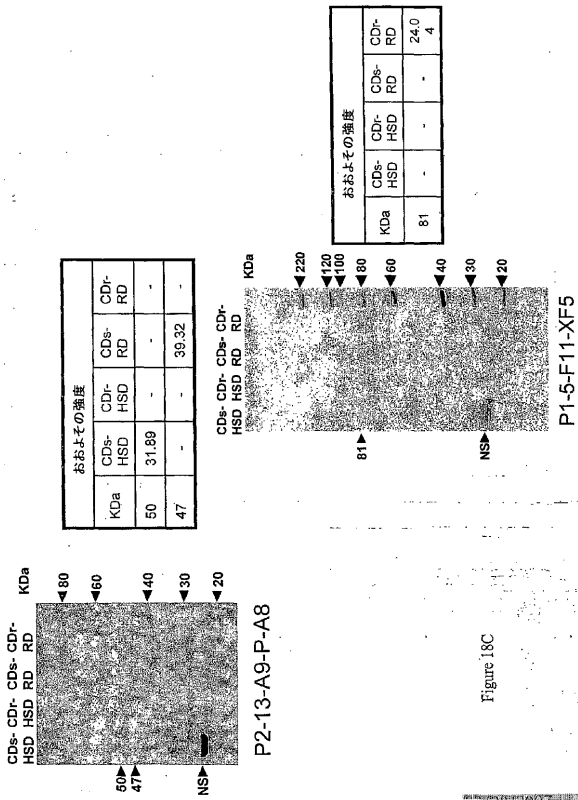


Figure 18C

【 19 】

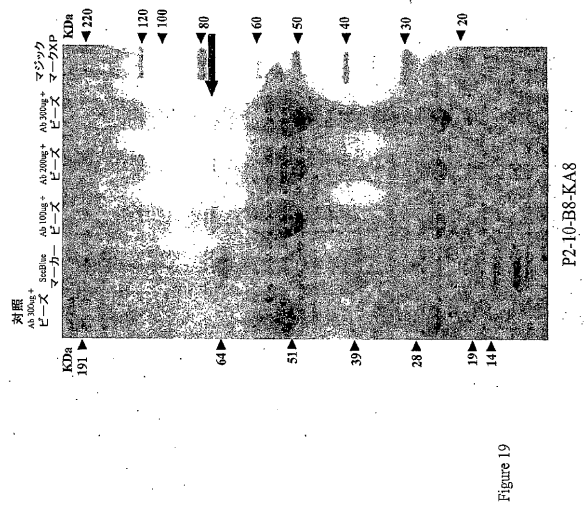


Figure 19

【図 20 A】

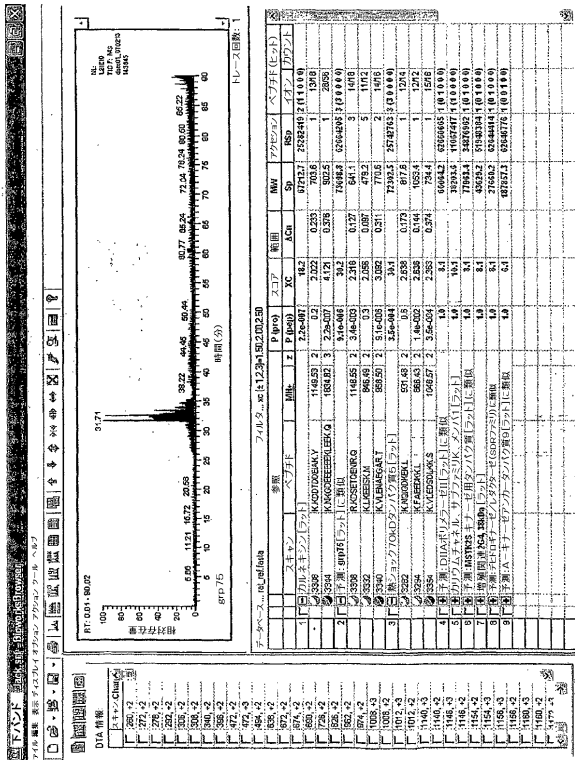


Figure 20A

【図 20 B】

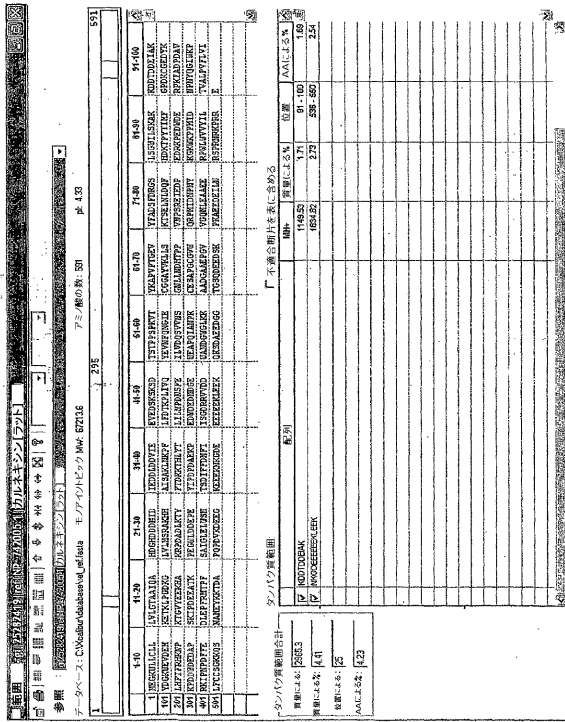


Figure 20B

【図 2 1】

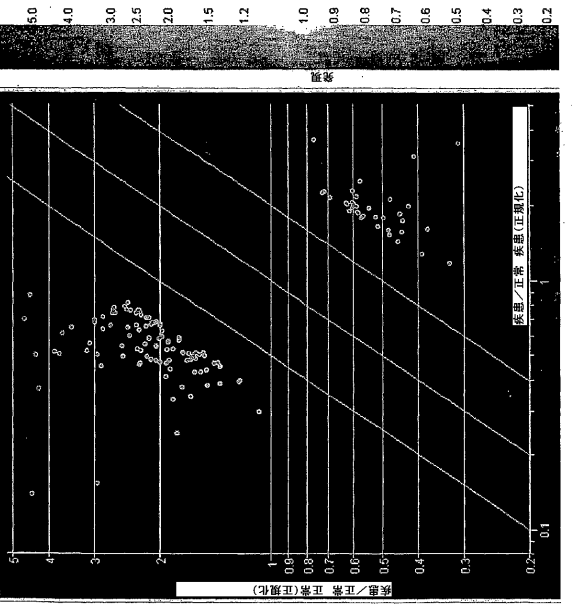


Figure 21

【図 2 2 A】

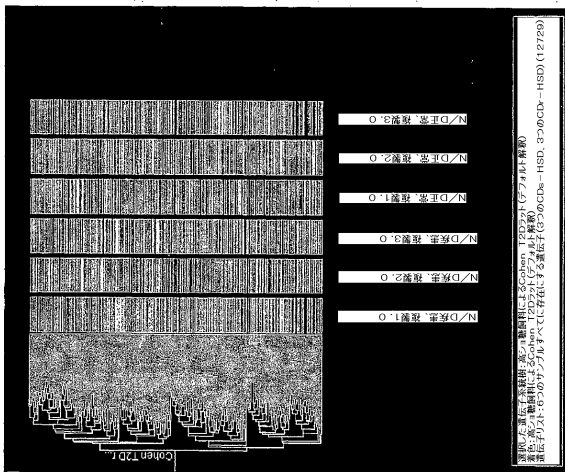


Figure 22A

【 図 2 2 B 】

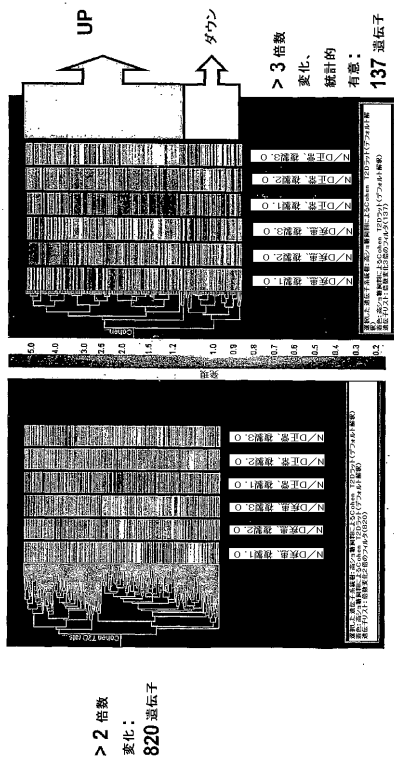


Figure 22B

【 図 2 2 C 】

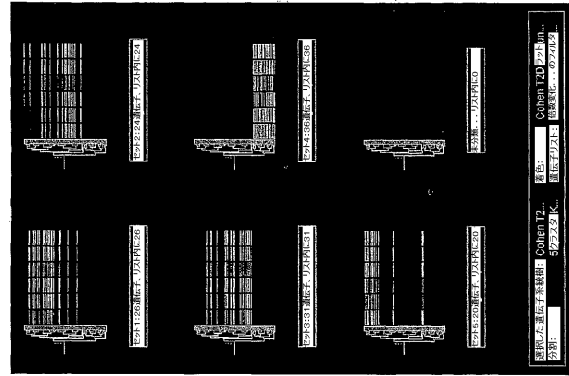


Figure 22C

【 手続補正書 】

【 提出日 】 平成21年5月13日 (2009.5.13)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 0 0 3 2

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 0 0 3 2 】

【 図 1 】 通常飼料 (R D) または銅欠乏高シヨ糖飼料 (H S D) を与えられた C o h e n 糖尿病抵抗性 (C D r) および感受性 (C D s) ラットからの膵臓抽出物のタンパク質発現プロファイルを示す。総タンパク質抽出物 (5 μ g) を還元条件下で調製して、 4 ~ 1 2 % ポリアクリルアミドゲルに流下させた。

【 図 2 A 】 S E L D I Q 1 0 アニオン交換表面チップでの C D r - R D 、 C D s - R D 、 C D r - H S D 、 および C D s - H S D からの血清サンプルのグラフによる比較である。中央値ピークは C D r - R D および C D r - H S D (矢印によってマークする) に存在するが、 C D s - R D および C D s - H S D には存在しない。この異なって発現されたピークからのタンパク質断片は、セルピナ 3 M の C 末端断片として同定された。

【 図 2 B 】 S E L D I によって同定された 4 . 2 キロダルトン断片の M S / M S スペクトルである。

【 図 3 A 】 3 8 アミノ酸セルピナ 3 M (「 D 3 」 と呼ばれる) ペプチドおよび同様の配列同一性を有するとして同定されたタンパク質の B L A S T 配列比較を示す (配列番号 1 および 6 ~ 1 5) 。

【 図 3 B 】 3 8 アミノ酸セルピナ 3 M ペプチドおよび 3 A で同定されたタンパク質をコードする核酸配列の B L A S T 配列比較を示す (配列番号 1 6 ~ 2 4) 。

【 図 3 C 】 図 3 A および 3 B の B L A S T 配列比較で見出された保存アミノ酸モチーフを

検出するように設計された変性プライマーを使用する R T - P C R 実験の結果を示すアガロースゲルの写真である。

【図 4 A】2 D / L C 分画システムによって解析された C D r - R D、C D s - R D、C D r - H S D および C D s - H S D 血清サンプルの 2 次元マップの写真である。青色バンドの強度は、U V 吸収によって 2 1 4 n m にて検出された相対タンパク質量を表す。

【図 4 B】選択した 1 次元等電点分画 (画分 3 1) の C D r - R D (赤色) 対 C D s - R D (緑色) の示差 2 次元逆相 H P L C 溶離プロファイルを示す。C D s - R D サンプルで独自に同定されたタンパク質を本グラフの下に挙げる。

【図 5 A】2 次元ゲル電気泳動 (2 D E) を使用する C D ラット血清サンプルの示差タンパク質プロファイリングを表すタンパク質ゲルの写真である。1 次元目のクロマトフォーカシングの p H は p H 5 ~ 8 であり、2 次元目の分離は 4 ~ 2 0 % T r i s - H C l S D S - P A G E ゲルを使用した。ゲルは視覚化のために B i o S a f e C o o m a s s i e S t a i n i n g (B i o - R a d) によって染色した。

【図 5 B】図 5 A で同定したスポットの拡大図である。

【図 6】2 D E を使用する C o h e n 糖尿病ラットモデルで見出される、異なって発現されたタンパク質を示すグラフ表現を示す。

【図 7】2 D E によって同定された、異なって発現された C o h e n 糖尿病ラット血清タンパク質を示すヒストグラムである。

【図 8】D 3 超免疫ウサギ血清の、C D r - R D および C D r - H S D ラット血清に存在する約 4 k D タンパク質断片との反応性を示したウェスタンブロットの写真である。左の写真では、より高い分子量の二重鎖 (4 9 ~ 6 2 k D の範囲における) も超免疫血清と反応して、親タンパク質 (およびタンパク質複合体) が R D および H S D 治療様式の両方の下ですべての系統によって発現されることを示すが、これに対してより小さいサイズの誘導体は C D r 系統においてのみ異なって発現される。負の対照として、右の写真は、D 3 超免疫ウサギ血清の非存在下でインキュベートしたウェスタンブロット膜を示す。

【図 9】S E L D I 解析から算出した C D r ラット血清における D 3 ペプチドの濃度を示す。

【図 1 0】一次抗 D 3 血清抗体 (1 : 2 0 0 希釈) の存在 (右パネル) または非存在 (左パネル) 下での、ホースラディッシュペルオキシダーゼ (H R P) にコンジュゲートされた二次ヤギ抗ウサギ I g G (1 : 2 5 0 0 0 希釈) によってプローブされた、肝臓抽出物 (1 0 μ g) を含有するゲルの写真である。

【図 1 1】ウサギからの D 3 超免疫血清を使用した、ヒト血清を解析するウェスタンブロットの写真である。レーン 1 は分子量マーカーに相当する。レーン 2 ~ 7 は、正常個体 (3 0 4 5 N G T) からの単一の血清サンプルの画分を表す。レーン 1 0 ~ 1 4 は、2 型糖尿病患者 (2 9 1) からの単一の血清サンプルの画分を表す。

【図 1 2 A】C D r - H S D および C D s - H S D 膵臓抽出物 1 0 0 μ g それぞれを流下させた分取ゲルを示す。正の対照は抗アクチン抗体 2 0 μ g によって染色して、サブクローンレーンを調節培養上清 6 0 0 μ l によって染色した。

【図 1 2 B】C D r - H S D および C D s - H S D 膵臓抽出物 1 0 0 μ g それぞれを流下させた分取ゲルを示す。正の対照は抗アクチン抗体 2 0 μ g によって染色して、サブクローンレーンを調節培養上清 6 0 0 μ l によって染色した。

【図 1 3】S E L D I によってアニオン性 Q 1 0 タンパク質チップ上でプロファイルした全ヒト血清の結果を示す。

【図 1 4】1 3 個の T 2 D サンプルおよび 1 6 個の正常ヒト血清サンプルで同定された、異なって発現されたタンパク質ピークを示すシュードゲルの写真である。M / Z 1 5 . 2 k D マーカーでは、T 2 D サンプルの平均ピーク強度が 2 . 6 であったが、これに対して正常サンプルでは、平均ピーク強度は 2 2 . 2 であった。2 つのサンプルの差は約 9 倍であった。M / Z 1 4 . 8 k D マーカーでは、T 2 D サンプルの平均強度が 4 . 4 であり、正常サンプルでは、平均強度は 3 . 3 であった。相対強度比は 1 . 4 7 であった。

【図 1 5】1 3 個の T 2 D サンプルおよび 1 6 個の正常ヒト血清サンプルで同定された、

異なって発現されたタンパク質ピークを示すシュードゲルの写真である。T2Dサンプルの平均ピーク強度は118であったが、これに対して正常サンプルでは、平均ピーク強度は182であった。相対強度の比は0.65であった。各点は個々のサンプルで測定したタンパク質ピークの強度を表す。

【図16】肥満T2D対象(Dr. Cheathamのサンプル)対非肥満T2D対象(Dr. Danknerのサンプル)から取得したサンプルにおける示差アルブミンプロファイリングを示すグラフである。

【図17A】O.D. 450nmの吸光度によって測定されたCDs-HSDおよびCDr-HSD特異的ハイブリドーマコロニーのELISA反応性のグラフ表現である。

【図17B】O.D. 450nmの吸光度によって測定されたCDs-HSDおよびCDr-HSD特異的ハイブリドーマコロニーのELISA反応性のグラフ表現である。

【図18A】CDs-HSDおよびCDr-HSD特異的ハイブリドーマクローンP2-10-B8-KA8、P1-14-A2-E-H8、P2-4-H5-K-B4、P1-20-B7-F-C1、P2-13-A9-P-A8、およびP1-5-F11-XF5の反応性を示すウェスタンプロットの写真である。

【図18B】CDs-HSDおよびCDr-HSD特異的ハイブリドーマクローンP2-10-B8-KA8、P1-14-A2-E-H8、P2-4-H5-K-B4、P1-20-B7-F-C1、P2-13-A9-P-A8、およびP1-5-F11-XF5の反応性を示すウェスタンプロットの写真である。

【図18C】CDs-HSDおよびCDr-HSD特異的ハイブリドーマクローンP2-10-B8-KA8、P1-14-A2-E-H8、P2-4-H5-K-B4、P1-20-B7-F-C1、P2-13-A9-P-A8、およびP1-5-F11-XF5の反応性を示すウェスタンプロットの写真である。

【図19】CDs-HSDおよびCDr-HSDに由来する特異的ハイブリドーマクローンによる免疫沈降後のクマシー染色SDSポリアクリルアミドゲルの写真である。

【図20A】図18のSDS-PAGEゲルから切除した下バンドのMSスペクトル解析のスクリーンショットである。下バンドのカルネキシンとしての確実な同定が行われた。図20Aの配列番号25~32は、切除した下バンドから同定された配列(これらは、カルネキシンおよび他の既知のタンパク質と同一であるかまたはそれらに類似する)に対応する。

【図20B】図18のSDS-PAGEゲルから切除した下バンドのMSスペクトル解析のスクリーンショットである。下バンドのカルネキシンとしての確実な同定が行われた。図20Bの配列番号33~35は、切除した下バンドから、カルネキシンとして同定された配列である。

【図21】Cohen2型糖尿病ラット膵臓における137個の異なって発現された遺伝子の散布図を示す。アップレギュレートおよびダウンレギュレートされた遺伝子の両方がプロットに示されている。

【図22A】Cohen2型糖尿病ラット膵臓に存在する12,729個の遺伝子の遺伝子系統樹マイクロアレイ解析を示す。

【図22B】Cohen2型糖尿病ラット膵臓において、発現が2倍の変化を有することが判明した820個の遺伝子、および発現が3倍の変化を有することを示した137個の遺伝子の、遺伝子系統樹マイクロアレイ解析を示す。

【図22C】K平均クラスタリングによって分類されたような、発現が3倍の変化を示す137個の遺伝子のセット1~5を示す。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0172

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0172】

結果

図2Aに示すように、CDr-RDおよびCDr-HSDの血清中には約4200ダルトンのピークタンパク質が存在したが、CDs-RDまたはCDs-HSDの血清中には存在しなかった。図2Bは、4200ダルトン断片のMS/MSスペクトルである。本タンパク質は配列決定され、広範囲に及ぶデータベース検索後に新規なたんぱく質であることが判明した。ペプチドは設計された「D3」であり、その配列はSGRPPMTVWFNRPFLLIAVSHTHGQTILFMAKVINPVGA（配列番号1）であることが判明した。D3ペプチドは、Cohen糖尿病ラットで発見された最初のバイオマーカーに相当する38マーペプチド配列である。National Center for Biotechnology Information (NCBI)より入手できるBLASTアルゴリズムを使用する配列の配列比較を実施して、38アミノ酸の断片が少なくとも10の各種のアミノ酸配列との配列同一性を有することが見出された。特にBLAST配列比較は、38アミノ酸D3ペプチドが「FNRPFLL」（配列番号4）および「FMS/GKVT/VNP」（配列番号5）に相当する保存モチーフを含有することを明らかにした。図3Aは、D3ペプチド断片に関連するアミノ酸配列のBLAST配列の結果を示し、図3Bは、D3ペプチドおよびタンパク質BLASTによって同定されたペプチドをコードする核酸配列のBLAST配列比較の結果を示す。変性プライマーは保存モチーフを標的とするように設計され、次の配列を含む：

フォワードプライマー（アミノ酸配列“FNRPFLL”を含有する標的領域：5'-TTCAACMRRCCYT TYST-3'（配列番号2）およびリバースプライマー（配列“FMS/GKVT/VNP”を含有する標的領域）：5'-YVA CYTTKC YMA KRA AGA-3'（配列番号3）；ここでM=AまたはC；R=AまたはG；Y=CまたはT；S=CまたはG；K=GまたはT；およびV=A、C、またはGである。これらの変性プライマーは、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）において使用し、肝臓および膵臓におけるヒトSERPINA3を増幅した。図3Cに示すように、ヒト肝臓および膵臓において1.3kb断片が同定された。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2010502946000001.app

【 国際調査報告 】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International application No. PCT/US07/07875 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: G01N 24/00(2006.01),33/00(2006.01),33/53(2006.01),33/543(2006.01),33/551(2006.01) G01N 21/00(2006.01) USPC: 435/7.1,7.92,7.93,7.94;436/173,518,524 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. : 435/7.1,7.92,7.93,7.94;436/173,518,524 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) BIOSIS, EMBASE, PUBMED, MEDLINE, SCISEARCH, CAPLUS | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | US 2005/0054005 A1 (ELLIS et al) 10 March 2005 (10.03.2005), see entire document. | 1-70 |
| A | EP 1615035 A1 (FHOFFMANN-LA ROCHE AG) 05 July 2005 (05.07.2005), see entire document. | 1-70 |
| A | Budde et al., Peptidomics Biomarker Discovery in Mouse Models of Obesity and Type 2 Diabetes, Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening, 2005, 8, pgs 775-781, see entire document. | 1-70 |
| A | Stefan et al., Alpha2-Heremans-Schmid Glycoprotein/ Fetuin-A is Associated with Insulin in the Liver in Humans, Diabetes Care, Vol 29, No. 4, April 2006, pgs 853-857, see entire document. | 1-70 |
| A | US 2004/0224304 A1 (BERGGREN) 11 November 2004 (11.11.2004), see entire document. | 1-70 |
| <input checked="" 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 | "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 |
| "E" | earlier application or patent published on or after the international filing date | "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 |
| "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) | "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 |
| "O" | document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means | "&" document member of the same patent family |
| "P" | document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | |
| Date of the actual completion of the international search 07 May 2008 (07.05.2008) | | Date of mailing of the international search report 03 JUN 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 Gary Counts Telephone No. (571)272-1600 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US07/07875

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

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

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. Claims Nos.: 71-80
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
because no computer readable form of the sequence listing was furnished
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
- Remark on Protest**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US07/07875

| C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|-------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | Mischák et al., Proteomic analysis for the assessment of diabetic renal damage in humans, Clinical Science (2004) 107, pgs 485-495, see entire document | 1-70 |
| A | Hu et al., Inflammatory Markers and Risk of Developing Type 2 Diabetes in Women, Diabetes, vol 53, March 2004; pgs 693-700, see entire document. | 1-70 |
| A | Meigs et al., Biomarkers of Endothelial Dysfunction and risk of Type 2 Diabetes Mellitus, JAMA, April 2004, Vol 291, No. 16, pgs 1978-1986, see entire document. | 1-70 |

フロントページの続き

| (51) Int.Cl. | | F I | テーマコード(参考) |
|----------------|-----------|----------------|------------|
| A 6 1 K 45/00 | (2006.01) | A 6 1 K 31/64 | |
| A 6 1 K 31/155 | (2006.01) | A 6 1 K 45/00 | |
| A 6 1 K 38/28 | (2006.01) | A 6 1 K 31/155 | |
| A 6 1 K 38/26 | (2006.01) | A 6 1 K 37/26 | |
| | | A 6 1 K 37/28 | |

(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

(72) 発明者 ゲルバー, コハバ
 アメリカ合衆国 バージニア 20109, マナッサス, ランチ サークル 10330 ナンバー 303

(72) 発明者 リュー, リビン
 アメリカ合衆国 バージニア 20112, マナッサス, デン ホロー コート 13560

F ターム(参考) 4B063 QA01 QA18 QQ42 QQ52 QR08 QR42 QR55 QR62 QS25 QS36
 QX02
 4C084 AA02 AA19 BA14 BA15 BA16 BA17 BA18 BA19 BA20 BA21
 BA22 BA23 BA44 DB34 DB35 DC50 NA14 ZC201 ZC351
 4C086 AA01 AA02 DA21 MA01 MA04 NA14 ZC20 ZC35
 4C206 AA01 AA02 HA31 MA01 MA04 NA14 ZC20 ZC35

| | | | |
|-------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译) | 用于诊断和治疗2型糖尿病的组合物和方法 | | |
| 公开(公告)号 | JP2010502946A | 公开(公告)日 | 2010-01-28 |
| 申请号 | JP2009526587 | 申请日 | 2007-03-28 |
| 申请(专利权)人(译) | 美国典型培养物保藏中心 | | |
| [标]发明人 | ゲルバーコハバ リュウリピン | | |
| 发明人 | ゲルバー, コハバ リュウ, リピン | | |
| IPC分类号 | G01N33/53 C12Q1/68 A61K38/00 A61P3/10 A61K31/64 A61K45/00 A61K31/155 A61K38/28 A61K38/26 | | |
| CPC分类号 | C12Q1/6883 C12Q2600/158 | | |
| FI分类号 | G01N33/53.D G01N33/53.M C12Q1/68.ZNA.A A61K37/02 A61P3/10 A61K31/64 A61K45/00 A61K31/155 A61K37/26 A61K37/28 | | |
| F-TERM分类号 | 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR08 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS36 4B063/QX02 4C084/AA02 4C084/AA19 4C084/BA14 4C084/BA15 4C084/BA16 4C084/BA17 4C084/BA18 4C084/BA19 4C084/BA20 4C084/BA21 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/BA44 4C084/DB34 4C084/DB35 4C084/DC50 4C084/NA14 4C084/ZC201 4C084/ZC351 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/DA21 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZC20 4C086/ZC35 4C206/AA01 4C206/AA02 4C206/HA31 4C206/MA01 4C206/MA04 4C206/NA14 4C206/ZC20 4C206/ZC35 | | |
| 代理人(译) | 夏木森下 | | |
| 优先权 | 60/841717 2006-09-01 US | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

本发明一般涉及一种具有显影当然糖尿病的风险增加相关的生物学标记的鉴定，还涉及使用在糖尿病的诊断和预后，例如生物标记物的方法。本发明的生物学标记物代表治疗的新靶标，并且可以构成用于治疗或预防糖尿病的新治疗剂（图21）。在一个方面，本发明提供了诊断或鉴定受试者中的2型糖尿病或前糖尿病病症的方法，该方法中，一个。有效用于一个或多个DBMARKER或其来自所述受试者的样品中的代谢物测量；比较b A参考值的步骤，用在一个或多个DBMARKER的量的增加或减少量与所述基准值时，类型2所述受试者所述糖尿病或前糖尿病表明它患有病症。

