



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107533064 B

(45)授权公告日 2020.01.17

(21)申请号 201580079529.X

(22)申请日 2015.08.19

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 107533064 A

(43)申请公布日 2018.01.02

(30)优先权数据

10-2015-0061981 2015.04.30 KR

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.10.27

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2015/008642 2015.08.19

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/175393 KO 2016.11.03

(73)专利权人 庆熙大学校产学协力团

地址 韩国京畿道

专利权人 首尔大学校产学协力团

嘉泉大学校产学协力团 (续)

(72)发明人 金光杓 崔诚希 李厚槿 李祥原

(74)专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314

代理人 程伟 韩文华

(51)Int.Cl.

C07K 16/00(2006.01) (续)

(56)对比文件

CN 102272325 A, 2011.12.07,

审查员 李倩

权利要求书1页 说明书15页 附图2页

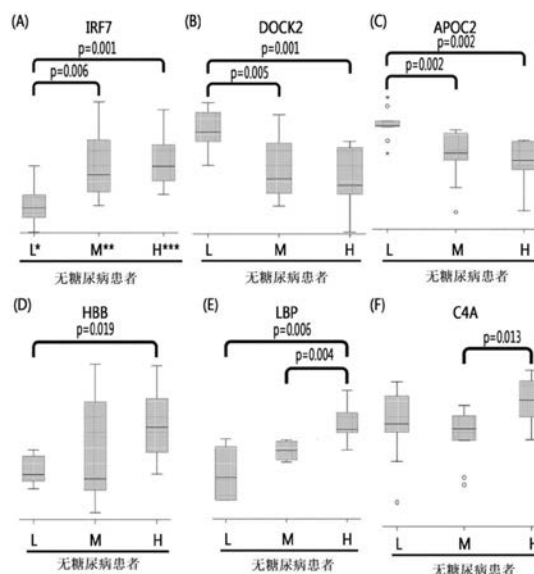
(54)发明名称

用于诊断血管狭窄疾病的生物标志物及其用途

(57)摘要

本发明提供一种用于诊断非糖尿病性血管狭窄疾病的组合物,其包含测定选自多聚ADP-核糖聚合酶4(Poly(ADP-ribose)polymerase4, PARP4)、维生素D-结合蛋白(Vitamin D-binding protein, VDB)及层粘连蛋白亚基 β -1(Laminin subunit beta-1, LAMB1)所组成的族群中的一种以上的蛋白水平的制剂;用于诊断糖尿病性血管狭窄疾病的组合物,其包含测定选自干扰素调节因子7(Interferon regulatory factor 7, IRF7)、胞质分裂作用因子蛋白2(Dedicator of cytokinesis protein 2, DOCK2)及血红蛋白 β (Hemoglobin subunit beta, HBB)所组成的族群中的一种以上的蛋白水平的制剂;用于诊断血管狭窄疾病的试剂盒,其包含所述组合物;用于提供诊断非糖尿病性血管狭窄疾病的信息的方法及用于提供诊断非糖尿病性血管狭窄疾病的信息的方法。本发明提供一种用于诊断血管狭窄疾病的组合物,通过对非糖尿病性或糖尿病性血管

狭窄疾病患者测定及比较表达发生变化的蛋白质的表达水平,可早期诊断血管狭窄疾病,且显著性推测或掌握发病程度。而且,本发明的诊断用组合物可实现非侵入性诊断,因此可通过血检、尿检等而简单且有效地进行血管狭窄疾病的早期诊断。



[转续页]

[接上页]

(73)专利权人 高丽大学校产学协力团

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

1.测定选自由多聚ADP-核糖聚合酶4 (Poly (ADP-ribose) polymerase 4,PARP4)、维生素D-结合蛋白 (Vitamin D-binding protein,VDB) 及层粘连蛋白亚基 β -1 (Laminin subunit beta-1,LAMB1) 所组成的族群中的一种以上的蛋白水平的制剂在制备用于诊断非糖尿病性血管狭窄疾病的组合物中的用途。

2.根据权利要求1所述的用途,其中测定所述蛋白水平的制剂包含特异性地结合到所述蛋白质的抗体。

3.根据权利要求1所述的用途,其中所述血管狭窄疾病为脑中风、支架内再狭窄 (in-stent restenosis)、心肌梗塞或动脉硬化症。

4.测定选自由多聚ADP-核糖聚合酶4 (Poly (ADP-ribose) polymerase 4,PARP4)、维生素D-结合蛋白 (Vitamin D-binding protein,VDB) 及层粘连蛋白亚基 β -1 (Laminin subunit beta-1,LAMB1) 所组成的族群中的一种以上的蛋白水平的制剂在制备用于诊断非糖尿病性血管狭窄疾病的试剂盒中的用途。

5.根据权利要求4所述的用途,其中所述试剂盒为ELISA (酶联免疫吸附试验) 试剂盒、蛋白质芯片试剂盒或MRM (多反应监测) 试剂盒。

用于诊断血管狭窄疾病的生物标志物及其用途

技术领域

[0001] 本发明提供一种用于诊断非糖尿病性血管狭窄疾病的组合物、用于诊断糖尿病性血管狭窄疾病的组合物、包含所述组合物的用于诊断血管狭窄疾病的试剂盒、提供用于诊断非糖尿病性血管狭窄疾病的信息的方法及提供用于诊断糖尿病性血管狭窄疾病的信息的方法。

背景技术

[0002] 最近,呈现出因生活环境的城市化、过度的营养摄取等而复合性地表现出多种疾病的代谢症候群患者剧增的趋势。从全球来看,作为代谢疾病的糖尿病与肥胖的风险度增加,糖尿病的患病率已开始超过人口的10%。

[0003] 根据2005~2007年的韩国国民健康营养调查结果,韩国成人中的10%为糖尿病患者,30%以上为肥胖患者,这种糖尿病的暴增为全球性的趋势。另外,属于代谢症候群的脑血管疾病、心脏病、糖尿病、高血压疾病的死亡人数已超过癌症死亡人数。

[0004] 糖尿病患者的主要死亡原因为心血管类疾病,其中心肌梗塞及脑梗塞占据所有糖尿病患者的死亡原因的40%。尤其,糖尿病性心血管疾病大多无症状,因此出现胸痛、眩晕、头痛、麻木等症状时为血管狭窄已发展较大程度的状态,故在发现时即为重症疾病而死亡的可能性较大。因此,早期发现血管狭窄、及对疾病的预防非常重要。

[0005] 目前使用的早期发现血管狭窄的方法为间接性地推测动脉硬化程度的诊断方法,有颈动脉超声波检查(carotid artery Doppler ultrasound)、脉搏波传播速度测定(pulse wave velocity)、血流依赖性血管扩张反应(flow mediated dilatation)等。最近开发而临床应用的冠状动脉多层电脑断层摄影(multi-detector coronary computed tomography, MDCT)具有仍使用高价造影剂、进行功能检查等界限。

[0006] 对于作为韩国人最重要的慢性疾病的糖尿病、与揭露为糖尿病患者的第一死亡原因的心血管类疾病,急需开发一种可早期进行诊断的生物标志物。迄今为止,作为所述生物标志物,已知有从脂肪细胞分泌的脂联素(adiponectin)的减少、与参与动脉硬化症等全身性炎症反应(system inflammation)的CRP、TNF- α 、IL-6等的增加等一部分血清蛋白的变化,但实情为至今为止仍无可确实地推测糖尿病患者的血管类疾病、尤其是血管狭窄疾病的程度及疾病状态的确切的生物标志物。

[0007] 韩国的实情也为考虑暴增的肥胖、糖尿病、代谢症候群等代谢疾病的患病率,所述疾病群的主要死亡原因均为缺血性心血管类并发症,从而急需开发一种可推测血管狭窄的发展程度的蛋白质生物标志物。

发明内容

[0008] [发明要解决的问题]

[0009] 本发明者等人为了早期诊断血管狭窄的发展程度,导入蛋白质组学技术而探寻生物标志物。尤其,关于与作为血管狭窄的高危群的糖尿病相关的炎症蛋白质的变化的报告

较多,但未对糖尿病与血管狭窄间的整体血液蛋白质的变化进行报告,在本发明中,利用蛋白质组学技术而对患者群分析与有无糖尿病、血管狭窄的发展程度对应的整体血液蛋白质,从而确认到可根据有无糖尿病、血管狭窄程度而发生变化的蛋白质用作生物标志物,由此确认到可监控糖尿病患者或非糖尿病患者的血管狭窄发展情况而完成了本发明。

[0010] [解决问题的手段]

[0011] 本发明的一目的在于提供一种用于诊断非糖尿病性血管狭窄疾病的组合物。

[0012] 本发明的另一目的在于提供一种用于诊断糖尿病性血管狭窄疾病的组合物。

[0013] 本发明的又一目的在于提供一种包含所述组合物的用于诊断血管狭窄疾病的试剂盒。

[0014] 本发明的又一目的在于提供一种提供用于诊断非糖尿病性血管狭窄疾病的信息的方法。

[0015] 本发明的又一目的在于提供一种提供用于诊断糖尿病性血管狭窄疾病的信息的方法。

[0016] [发明的效果]

[0017] 本发明提供一种用于诊断血管狭窄疾病的组合物,通过对非糖尿病性或糖尿病性血管狭窄疾病患者测定及比较表达发生变化的蛋白质的表达水平,可早期诊断血管狭窄疾病,且显著性推测或掌握发病程度。

[0018] 而且,本发明的诊断用组合物可实现非侵入性诊断,因此可通过血检、尿检等而简单且有效地进行血管狭窄疾病的早期诊断。

附图说明

[0019] 图1是表示因非糖尿病患者的血管狭窄而表达量产生显著差异的蛋白质的图。

[0020] 图2是表示因糖尿病患者的血管狭窄而表达量产生显著差异的蛋白质的图。

具体实施方式

[0021] 为了达成所述目的,本发明的一实施方案提供一种用于诊断血管狭窄疾病的组合物。

[0022] 在一实施方案中,所述用于诊断血管狭窄疾病的组合物可为用于诊断非糖尿病性血管狭窄疾病的组合物,其包含测定选自由多聚ADP-核糖聚合酶4 (Poly (ADP-ribose) polymerase 4,PARP4)、维生素D-结合蛋白 (Vitamin D-binding protein,VDB) 及层粘连蛋白亚基 β -1 (Laminin subunit beta-1,LAMB1) 所组成的族群中的一种以上的蛋白水平的制剂。

[0023] 在本发明中,术语“血管狭窄疾病”为血管变窄的疾病,包含如下疾病,但并不限于此:如果血管变窄,则血流量减少,从而在分布有发生狭窄的血管的部位引起缺血、或在表面粗糙的动脉硬化发生血栓或硬块脱落引起的栓塞而引发症状。本发明的血管狭窄疾病因所述血管内膜增厚而引起血管狭窄,血管壁的弹力变小而发生因血管破裂引起的出血。在本发明中,血管狭窄疾病可为脑中风、动脉粥样硬化症、支架内再狭窄 (in-stent restenosis)、心肌梗塞或动脉硬化症,但并不限于此。

[0024] 本发明中所使用的术语“诊断”是指确认病理状态的存在或特征。就本发明的目的

而言,诊断用于确认是否发生血管狭窄疾病,可在早期确认糖尿病患者是否发生血管狭窄疾病。

[0025] 在本发明中,已知所述多聚ADP-核糖聚合酶4 (Poly (ADP-ribose) polymerase 4, PARP4) 对促进聚 (ADP-核糖基) 作用 (poly (ADP-ribosyl) ation) 反应的聚 (ADP-核糖基) 转移酶样1蛋白 (poly (ADP-ribosyl) transferase-like 1protein) 进行编码,由本发明者等人首次查明其与血管狭窄疾病的相关性。

[0026] 已知所述维生素D-结合蛋白 (Vitamin D-binding protein,VDB) 为VDB-球蛋白 (组特异性成分),属于白蛋白基因家族,且已知其结合到维生素D而将维生素D传递到靶组织,由本发明者等人首次查明其与血管狭窄疾病的相关性。

[0027] 已知所述层粘连蛋白亚基 β -1 (Laminin subunit beta-1,LAMB1) 为细胞外基质构成成分,与其他细胞外基质成分进行相互作用而参与到细胞的附着、移动等,由本发明者等人首次查明其与血管狭窄疾病的相关性。

[0028] 另外,在另一实施方案中,本发明的用于诊断血管狭窄疾病的组合物可为用于诊断糖尿病性血管狭窄疾病的组合物,其包含测定选自干扰素调节因子7 (Interferon regulatory factor 7,IRF7)、胞质分裂作用因子蛋白2 (Dedicator of cytokinesis protein 2,DOCK2) 及血红蛋白 β (Hemoglobin subunit beta,HBB) 所组成的族群中的一种以上的蛋白水平的制剂。

[0029] 已知所述干扰素调节因子7 (Interferon regulatory factor 7,IRF7) 属于干扰素调节转录因子家族,激活病毒诱导的细胞基因的转录,由本发明者等人首次查明其与糖尿病患者的血管狭窄疾病的相关性。

[0030] 已知所述胞质分裂作用因子蛋白2 (Dedicator of cytokinesis protein 2, DOCK2) 激活作为G蛋白的Rac而参与细胞内的信号传输,由本发明者等人首次查明其与糖尿病患者的血管狭窄疾病的相关性。

[0031] 已知所述血红蛋白 β (Hemoglobin subunit beta,HBB) 与形成血红蛋白A的血红蛋白 α 1 (HBA1) 进行相互作用,由本发明者等人首次查明其与糖尿病患者的血管狭窄疾病的相关性。

[0032] 在本发明的一实施例中,按照血管狭窄程度将非糖尿病患者分为低危群患者 (0%)、中危群患者 (0~50%)、高危群患者 (50%以上),按照血管狭窄程度将糖尿病患者分为低危群患者、中危群患者、高危群患者。此后,采集这些患者的血液试样,通过利用TMT (串联质量标签 (Tandem Mass Tag)) 的相对定量法对根据血管狭窄程度而存在差异的蛋白质观察血管狭窄风险群组间的蛋白质表达模式,其中将100个所述差异有意义的 (p 值 <0.05) 蛋白质选作一次生物标志物候选群。为了验证所选定的所述一次生物标志物候选群,各组利用10名患者的试料对一次生物标志物候选群执行验证,最终确认到非糖尿病患者群的6种蛋白质即PARP4、VDB、LAMB1、C4A、LBP、APOC2根据血管狭窄的风险度而显著地发生变化的模式,从而确认到这些蛋白质可作用于诊断血管狭窄疾病的标志物。另外,也确认到糖尿病患者的6种蛋白质即IRF7、DOCK2、HBB、C4A、LBP、APOC2根据血管狭窄的风险度而显著地发生变化的模式,从而确认到这些蛋白质可用作可在早期对糖尿病患者诊断血管狭窄疾病的标志物。

[0033] 尤其,确认到如下情况:在非糖尿病患者中确认到的生物标志物中,PARP4是血管

狭窄中危群的PARP4蛋白的表达较低危群减少,C4A是高危群的C4A蛋白的表达较低危群减少,APOC2是中危群、高危群的APOC2蛋白的表达均较低危群增加,VDB是中危群、高危群的VDB蛋白的表达均较低危群减少,LAMB1是中危群、高危群的LAMB1蛋白的表达均较低危群减少,LBP是高危群的LBP蛋白的表达较中危群增加。

[0034] 另外,确认到如下情况:在糖尿病患者中确认到的生物标志物中,IRF7是中危群、高危群的IRF7蛋白的表达均较低危群增加,DOCK2是中危群、高危群的DOCK2蛋白的表达均较低危群减少,APOC2是中危群、高危群的APOC2蛋白的表达均较低危群减少,HBB是高危群的HBB蛋白的表达较低危群增加,LBP是中危群、高危群的LBP蛋白的表达均较低危群增加,C4A是高危群的C4A蛋白的表达较中危群增加。

[0035] 因此,与正常对照组(无糖尿病与血管狭窄疾病的个体)相比,所述PARP4、VDB、LAMB1、C4A、LBP、APOC2均具有在无糖尿病但患有血管狭窄疾病的个体中相应的蛋白质的表达水平发生变化的特征,因此可用作用以诊断非糖尿病性血管狭窄疾病的标志物。

[0036] 另外,与对照组(患有糖尿病,但无血管狭窄疾病的个体)相比,所述IRF7、DOCK2、HBB、C4A、LBP、APOC2均具有在患有糖尿病与血管狭窄疾病的个体中相应的蛋白质的表达水平发生变化的特征,因此可用作用以诊断糖尿病性血管狭窄疾病的标志物。

[0037] 在本发明中,术语“标志物(marker)”是可区分正常组个体与具有血管狭窄疾病的个体而进行诊断的物质,包含在本发明的具有血管狭窄疾病的个体中表现出增加或减少的如多肽、蛋白质、糖蛋白等的有机生物分子。尤其,在本发明中,可为在本发明的具有非糖尿病性血管狭窄疾病的个体或具有糖尿病性血管狭窄疾病的个体中发生变化的蛋白质,但并不限制于此。

[0038] 本发明中所使用的术语“蛋白水平测定”为如下过程:为了诊断血管狭窄疾病而对生物学试料确认是否存在用于诊断血管狭窄疾病的标志蛋白质及其表达程度。可利用特异性地结合到所述标志蛋白质的抗体确认蛋白质的量,或者也可不利用抗体而测定蛋白质表达水平。

[0039] 作为所述蛋白水平的测定或比较分析方法,有蛋白质芯片分析、免疫测定法、配体结合分析、MALDI-TOF(基质解吸/电离飞行时间质谱)分析、放射线免疫分析、放射免疫扩散法、双向免疫扩散法、火箭免疫电泳、组织免疫染色、补体固定分析法、二维电泳分析、液相色谱-质谱分析(liquid chromatography-Mass Spectrometry,LC-MS)、LC-MS/MS(液相色谱-质谱/质谱)、免疫印迹及ELISA(酶联免疫吸附试验)等,但并不限制于此。

[0040] 为了诊断非糖尿病性血管狭窄疾病而测定所述蛋白水平的制剂可包含特异性地结合到选自PARP4、VDB及LAMB1中的蛋白质的抗体。

[0041] 另外,为了诊断糖尿病性血管狭窄疾病而测定所述蛋白水平的制剂可包含特异性地结合到选自IRF7、DOCK2及HBB中的蛋白质的抗体。

[0042] 本发明中所使用的术语“抗体”是指对抗原性部位进行指示的特异性的蛋白质分子。就本发明的目的而言,抗体是指特异性地结合到选自所述PARP4、VDB、LAMB1、IRF7、DOCK2及HBB中的1种以上的蛋白质的抗体,包含多克隆抗体、单克隆抗体及重组抗体。可利用在本技术领域内广泛公知的技术容易地制造抗体。

[0043] 另外,本发明的抗体不仅呈具有两个全长轻链及两个全长重链的完整形态,而且包含抗体分子的功能性片段。抗体分子的功能性片段是指至少具有抗原结合功能的片段,

有Fab、F(ab')、F(ab')₂及Fv等。

[0044] 本发明的另一实施方案提供一种包含所述用于诊断血管狭窄疾病的组合物的用于诊断血管狭窄疾病的试剂盒。优选地,所述试剂盒可为ELISA(酶联免疫吸附试验)试剂盒、蛋白质芯片试剂盒、快速(rapid)试剂盒或MRM(多反应监测)试剂盒。

[0045] 另外,优选地,所述用于诊断血管狭窄疾病的试剂盒还可包含适于分析方法的一种或一种以上的其他构成成分组合、溶液或装置而构成。

[0046] 另外,优选地,可为特征在于包含为了执行ELISA而所需的必须要素的诊断试剂盒。ELISA试剂盒包含对所述蛋白质具有特异性的抗体。所述抗体是对各标志蛋白质的特异性及亲和性较高且对其他蛋白质几乎无交叉反应性的抗体,其为单克隆抗体、多克隆抗体或重组抗体。另外,ELISA试剂盒可包含对于对照组蛋白质具有特异性的抗体。除此之外,ELISA试剂盒可包含可检测所结合的抗体的试剂、例如经标记的二次抗体、发色团(chromophores)、酶(例如,与抗体共轭)及其基质或可与抗体结合的其他物质等。

[0047] 另外,优选地,可为特征在于包含为了执行可在5分钟内获知分析结果的快速测试而所需的必须要素的快速(rapid)试剂盒。快速试剂盒包含对蛋白质具有特异性的抗体。所述抗体是对各标志蛋白质的特异性及亲和性较高且对其他蛋白质几乎无交叉反应性的抗体,其为单克隆抗体、多克隆抗体或重组抗体。另外,快速试剂盒可包含对于对照组蛋白质具有特异性的抗体。除此之外,快速试剂盒可包含可检测所结合的抗体的试剂、例如特异抗体与二次抗体固定的硝酸纤维素膜、结合在结合有抗体的珠粒的膜、吸收垫及样品垫等其他物质等。

[0048] 另外,优选地,可为特征在于包含为了执行质谱分析而所需的必须要素的MS/MS模式的MRM(多反应监测)试剂盒。SIM(选择性离子探测)为利用在质谱分析仪的源极部分碰撞一次而产生的离子的方法,相反地,MRM为如下方法:从碎裂一次的所述离子中再次选择特定离子,使其再次通过连续地连接的另一MS的源极而碰撞,之后利用由此获得的离子。更具体而言,SIM存在如下问题:在选择定量离子为也可在血浆中检测出的离子的情况下会阻碍定量。相反地,在利用MRM的情况下,即便为具有相同质谱的离子,如果再次碎裂,则分子结构也发生变化而呈现出差别化的倾向,因此如果将其用作定量离子,则可从背景去除成为阻碍的峰值而获得更加整齐的基线。因此,可通过在进行质谱分析时使用MRM模式而在更优异的分析感度下同时对所期望的物质进行分析。可通过所述MRM(多反应监测)分析方法对非糖尿病患者进行正常对照组的蛋白质表达水平与患有血管狭窄疾病的个体的蛋白质表达水平的比较,另外,可对糖尿病患者进行无血管狭窄的个体的蛋白质表达水平与患有血管狭窄的个体的蛋白质表达水平的比较而诊断是否患得血管狭窄疾病。

[0049] 本发明的另一实施方案提供一种用以诊断血管狭窄疾病的信息的提供方法。

[0050] 优选地,本发明的方法可为用以诊断非糖尿病性血管狭窄疾病的信息的提供方法,其包含如下步骤:

[0051] (a) 从生物学试料中测定选自由多聚ADP-核糖聚合酶4(Poly(ADP-ribose) polymerase 4,PARP4)、维生素D-结合蛋白(Vitamin D-binding protein,VDB)及层粘连蛋白亚基β-1(Laminin subunit beta-1,LAMB1)所组成的族群中的一种以上的蛋白质表达水平的步骤;以及

[0052] (b) 对在所述(a)步骤中测定出的蛋白质表达水平与正常对照组试料进行比较的

步骤。

[0053] 或者,优选地,本发明的方法可为用以诊断糖尿病性血管狭窄疾病的信息的提供方法,其包含如下步骤:

[0054] (a) 从生物学试料中测定选自由干扰素调节因子7 (Interferon regulatory factor 7, IRF7)、胞质分裂作用因子蛋白2 (Dedicator of cytokinesis protein 2, DOCK2) 及血红蛋白 β (Hemoglobin subunit beta, HBB) 所组成的族群中的一种以上的蛋白质表达水平的步骤;以及

[0055] (b) 对在所述 (a) 步骤中测定出的蛋白质表达水平与正常对照组试料进行比较的步骤。

[0056] 本发明中所使用的术语“生物学试料”包含因患有血管狭窄疾病而蛋白质表达水平存在差异的如全血、血清、血浆、唾液、脑脊液或尿的试料等,但并不限制于此。

[0057] 与正常对照组(无糖尿病与血管狭窄疾病的个体)相比,所述PARP4、VDB及LAMB1均具有在无糖尿病但患有血管狭窄疾病的个体中蛋白质的表达水平发生变化的特征,因此如果所述水平发生变化,则可诊断为非糖尿病性血管狭窄疾病。

[0058] 与对照组(患有糖尿病,但无血管狭窄疾病的个体)相比,所述IRF7、DOCK2及HBB均具有在患有糖尿病与血管狭窄疾病的个体中蛋白质的表达水平发生变化的特征,因此如果所述水平发生变化,则可诊断为糖尿病性血管狭窄疾病。

[0059] 因此,在从血管狭窄疾病疑似个体分离出的试料的蛋白质表达水平高于或低于正常对照组试料的蛋白质表达水平的情况下,可判断为血管狭窄疾病。

[0060] 优选地,本发明的所述蛋白质表达水平可利用特异性地结合到相应的蛋白的抗体进行测定及比较。使所述抗体与生物学试料中的相应的蛋白质形成抗原-抗体复合体,并利用对所述抗原-抗体复合体进行检测的方法。

[0061] 本发明中所使用的术语“抗原-抗体复合体”是指生物学试料中的相应的蛋白质抗原与识别所述蛋白质抗原的抗体的结合物。可利用在本技术领域内公知的方法、例如分光光学方法、光化学方法、生物化学方法、免疫化学方法、电气方法、吸光方法、化学方法及其他方法检测所述抗原-抗体复合体。

[0062] 就本发明的目的而言,作为所述蛋白质表达水平的测定或比较分析方法,有蛋白质芯片分析、免疫测定法、配体结合分析、MALDI-TOF (基质解吸/电离飞行时间质谱) 分析、放射线免疫分析、放射免疫扩散法、双向免疫扩散法、火箭免疫电泳、组织免疫染色、补体固定分析法、二维电泳分析、液相色谱-质谱分析 (liquid chromatography-Mass Spectrometry, LCMS)、LC-MS/MS (液相色谱-质谱/质谱)、免疫印迹及ELISA (酶联免疫吸附试验) 等,但并不限制于此。

[0063] 在本发明的具体实施例中,为了对PARP4、VDB、LAMB1、IRF7、DOCK2、HBB、C4A、LBP及APOC2的蛋白质表达水平进行测定及比较而使用LC-MS/MS方法。

[0064] 为发明实施的形态

[0065] 以下,根据实施例,更详细地对本发明进行说明。然而,这些实施例仅用以例示性地说明本发明,本发明的范围并不限定于这些实施例。

[0066] 实施例1: 患者血液试料的准备

[0067] 根据血管狭窄的堵塞程度,将非糖尿病患者分为低危群患者 (0%)、中危群患者 (0

~50%)、高危群患者(50%以上),根据血管狭窄的堵塞程度,将糖尿病患者分为低危群患者、中危群患者、高危群患者。此后,从这些患者采集血液试样。

[0068] 实施例2:患者血液试料的丰度(abundant)蛋白质的去除

[0069] 在所述实施例1中采集的血液试料的蛋白质中,14个高丰度蛋白质(白蛋白、IgG、抗胰蛋白酶、IgA、转铁蛋白、触珠蛋白、纤维蛋白原、 α 2-巨球蛋白、 α 1酸性糖蛋白、IgM、载脂蛋白AI、载脂蛋白AII、补体C3、甲状腺素运载蛋白)所占据的比重达到整体蛋白质的95%。因此,在对关注的低丰度蛋白质进行分析时,因这些14个高丰度蛋白质而敏感度大幅下降,故而通过MARS(多重亲和去除系统(Multiple Affinity Removal System))柱(P/N 5188-6558,Agilent)去除所述14个蛋白质,仅将剩余的蛋白质使用于之后的分析。

[0070] 具体而言,利用MARS(多重亲和去除系统)柱(P/N 5188-6558,Agilent)去除高丰度蛋白质的过程如下。

[0071] 向在实施例1中所准备的血液试料40 μ l中加入2 μ l的50x蛋白酶抑制剂(Roche),并加入60 μ l的缓冲液A而进行混合。此后,在0.22 μ m的过滤器(Agilent,P/N 5185-5990)中加入混合有所述蛋白酶抑制剂与缓冲液A的试料,利用离心分离机(14400g、1min、4 $^{\circ}$ C)去除尺寸较大的颗粒。此后,在HPLC连接MARS柱而使流动相A(缓冲液A)、B(缓冲液B)流出。

[0072] 利用流动相A进行30分钟左右的管柱稳定化,之后利用如下述表1所示的条件的流动相梯度分离试料,将流经(flow-through)(9~17min)、洗脱(elution)(21~23min)时段的试料移至2ml的管中。将在流经(flow-through)获得的所述试料加入到10K过滤管,利用离心分离机(14400g、30min、4 $^{\circ}$ C)将2ml的试料量浓缩至50 μ l。

[0073] [表1]

[0074] HPLC使用的流动相梯度

[0075] LC时间表

[0076]

	时间	%B	流速	最大压力
1	0.00	0.00	0.125	60
2	18.00	0.00	0.125	60
3	18.01	0.00	1.000	60
4	20.00	0.00	1.000	60
5	20.01	100.00	1.000	60
6	27.00	100.00	1.000	60
7	27.01	0.00	1.000	60
8	38.00	0.00	1.000	60

[0077] 实施例3:蛋白质试料的肽化

[0078] 为了利用质谱分析仪进行分析,需先进行利用酶(胰蛋白酶)以肽单位断裂蛋白质的过程,因此利用如下过程实施蛋白质的肽断裂化。

[0079] 在去除丰度蛋白质的浓度为60 μ g的血液试样50 μ l中加入150 μ l的DTT溶液(最终浓度为6M的尿素、10mM的DTT、50mM的tris),在37 $^{\circ}$ C下反应(还原)1小时。在经反应(还原)的200 μ l的所述样品中处理20 μ l的IAA溶液(最终浓度:5.45M的尿素、50M的IAA、50mM的tris)后,在暗处以室温反应(烷基化)30分钟,之后将1ml的Tris溶液(50mM、pH值8)(最终浓度:1M的urea、50mM的tris、最终volume为1.2ml)加入到试料。此后,以5 μ l为单位分注胰蛋白酶溶液而在37 $^{\circ}$ C下反应12小时。

[0080] 实施例4:利用TMT(Tandem Mass Tag)6plex试剂对肽试料进行的标记

[0081] 在质谱分析仪中,为了进行相对定量而使用通常使用的TMT-6plex试剂,共6个试料组各自与具有不同的质量报告离子(reporter ion)的TMT试剂反应(表2)。表2表示按照各组标记的报告离子的种类。

[0082] [表2]

[0083]	血管狭窄(%)	正常	糖尿病
	低危群 0%	126	127
	中危群 0~50%	128	129
	高危群 50%以上	130	131

[0084] 向在实施例3中肽化的试料中加入200mM的TEAB 50μL而实施涡旋(vortexing)与短暂离心(spin down)。在TMT试剂管上书写试料名,在TMT试剂中加入41μL的100%ACN而实施涡旋(vortexing)与短暂离心(spin down)(已设定进入到各kit的ACN量,在25~100μg的肽中加入41μL的ACN)。此后,在将41μL的TMT试剂加入到样品管(Peptide)后进行涡旋(vortexing)与短暂离心(spin down),之后在室温下反应1小时。将5%羟胺以8μL为单位分别加入到样品管而进行涡旋(vortexing)与短暂离心(spin down),之后在室温下淬灭(quenching)15分钟。此后,分别将定量、同量的99μL的标记样品集中到一个崭新的e-管。

[0085] 实施例5:执行肽断裂化、LC-MS/MS分析及数据分析

[0086] 为了减少肽试料具有的高水平的复杂性(complexity),利用肽固有的PI值执行断裂化。

[0087] 首先,将TMT试剂标记的肽溶解到胶分馏稀释缓冲液(offgel dilution buffer)。在胶分馏器(Offgel fractionators)(3100offgel fractionator,Agilent)结合IPG strip与comb后,将溶解在所述缓冲液的样品分注而在4000V下运行(running)24小时。在将各断裂区间的试料移至管后进行干燥,为了去除残留在试料的试剂而执行脱盐(desalting)过程。

[0088] 利用RP(反相)柱而通过肽具有的疏水性(hydrophobicity)将所获得的肽分离到作为具有较高的分离能力与较高的再现性的UPLC系统的Easy-nLC(Thermo)。利用作为具有高解析度、高准确性(High resolution/high accuracy)的质谱分析仪的Q-exactive(Thermo)实时对通过UPLC而分离的肽执行分析。利用Proteome Discoverer软件(Thermo)的SEQUEST演算法对通过Q-exactive获得的原始数据分析光谱而鉴定肽与蛋白质。对利用Scaffold Q+(Proteome软件)鉴定的蛋白质执行验证,另外,提取在TMT获得的定量信息。利用作为R包装中的一个的Isobar执行统计分析,在各组间选定表达量存在显著差异的蛋白质(p值<0.05)。

[0089] 表3表示因非糖尿病患者群组/糖尿病患者群组的血管狭窄的差异而表达量存在显著差异的100个蛋白质的候选群。

[0090] [表3]

[0091]

序号	基因名称	蛋白名称
1	C4A	补充 C4-A
2	APOC2	载脂蛋白 C-II
3	LAMB1	层粘连蛋白亚基 β -1
4	PPBP	血小板基础蛋白
5	LBP	脂多糖结合蛋白
6	IRF7	干扰素调节因子 7
7	CAI	碳酸酐酶 I
8	SERPINA1	α 1-抗胰蛋白酶
9	HBB	血红蛋白亚基 β
10	HP	触珠蛋白

[0092]

11	DNAH9	动力蛋白重链 9, 轴索
12	FLNA	细丝蛋白-A
13	HBAI	血红蛋白亚基 α
14	HPR	触珠蛋白相关蛋白
15	JHDM1D	赖氨酸特异性脱甲基酶 7
16	SYNE1	Nesprin-1
17	DNAH6	动力蛋白重链 6, 轴索
18	FGA	纤维蛋白原 α 链
19	FGB	纤维蛋白原 β 链
20	FGG	纤维蛋白原 γ 链的 γ -A 同种型
21	CRP	C-反应蛋白
22	CCDC164	含卷曲螺旋结构域的蛋白 164
23	COG6	保守寡聚高尔基复合体亚基 6
24	FAM179A	具有序列相似性的家族 179, 成员 A
25	ICA1L	胰岛细胞自身抗原 1 样蛋白
26	TTC40	四肽多肽重复蛋白 40(Tetratricopeptide repeat protein 40)
27	HSPA4	热休克 70 kDa 蛋白 4
28	S100A9	蛋白 S100-A9
29	S100A8	蛋白 S100-A8
30	NOTCH2	神经原性基因型同型蛋白 2
31	TF	血清铁传递蛋白
32	ZG16B	酶原颗粒蛋白 16B
33	JARID2	蛋白 Jumonji
34	ATP2B3	ATP 酶, Ca^{++} 转运, 质膜 3
35	CCDC88B	含卷曲螺旋结构域的蛋白 88B 的同种型 4
36	SPRRIA	小脯氨酸丰富的蛋白质 1A
37	HRNR	Hornerin
38	IXD	皮离蛋白 (Dermcidin)
39	NRP1	神经纤毛蛋白-1
40	CNTRL	Centriolin 的同种型 5
41	LYZ	溶菌酶 C
42	IGHG3	免疫球蛋白重恒定 γ 3
43	RPS27A	泛素-40S 核糖体蛋白 S27a
44	KIAA0196	WASH 复合体亚基 strumpellin

[0093]

45	MMP9	基质金属肽酶 9
46	PIP	催乳素诱导蛋白
47	PPFIA2	Liprin- α -2
48	URB2	不健康的核糖体生物发生蛋白 2 同系物
49	SF3A1	剪接因子 3A 亚基 1
50	FAH	延胡索二酰乙酰
51	FSIP2	纤维鞘相互作用蛋白 2
52	MYOM2	肌间蛋白-2
53	PARP4	多聚 ADP-核糖聚合酶 4
54	PLEKHA6	含普列克底物蛋白同源结构域的家庭成员 6
55	PPIG	肽基脯氨酰顺反异构酶 G
56	WAC	具有卷曲螺旋的含 WW 结构域的适配蛋白
57	CNGA3	环核苷酸门控阳离子通道 α -3
58	ARID5B	含富含 AT 的交互作用结构域的蛋白 58
59	MED23	RNA 聚合酶 II 转录亚基 23 的调节子
60	CUL5	Cullin-5
61	KANK1	含 KN 基序和锚蛋白重复域的蛋白质 1
62	RAB3A	Ras 相关蛋白 Rab-3A
63	GDI2	Rab GDP 解离抑制剂 β
64	ZAR1L	ZAR1-样蛋白
65	DOCK2	胞质分裂作用因子蛋白 2
66	PZP	妊娠区蛋白
67	BPIFA1	含 BPI 折叠的家庭 A 成员 1
68	CEP250	中心体相关蛋白 CEP250
69	ATP13A3	可能的阳离子转运 ATP 酶 13A3
70	DENND6A	包含 DENN/MADD 域的 6A
71	TOP2A	DNA 拓扑异构酶 2- α 的同种型 4
72	CACNA1C	电压依赖性 L 型钙通道亚基 α -1C
73	KIAA1551	未表征的蛋白质 KIAA1551
74	NCOR1	核受体共抑制因子 1
75	C18orf8	未表征的蛋白 C18orf8
76	MOSPD2	含有活动精子结构域的蛋白质 2
77	LTF	Kaliocin-I (片段)

[0094]

78	MBL2	甘露糖结合蛋白 C
79	TPM4	原肌球蛋白 α -4 链的同种型 2
80	TSC1	错构瘤蛋白
81	RHOBTB1	含 Rho 相关 BTB 结构域的蛋白 1
82	SAA1	血清淀粉样 A-1 蛋白
83	PHEX	磷酸盐调节中性内肽酶
84	DSP	桥粒斑蛋白
85	NINL	Ninein-样蛋白
86	ARL6IP4	ADP-核糖基化因子样蛋白 6 相互作用的蛋白 4
87	KIAA1522	未表征的蛋白 KIAA1522 的异构体 2
88	SAA2	血清淀粉样蛋白 A2
89	HEGI	蛋白 HEG 同系物 1
90	ABCA13	ATP 结合盒亚族 A 成员 13
91	AKR7A2	黄曲霉素 81 醛还原酶 2
92	GTF3C1	一般转录因子 3C 多肽 1
93	SUMF2	硫酸酯酶修饰因子 2
94	ABCC1	多中药物耐药性相关蛋白 1
95	GTF3C3	一般转录因子 3C 多肽 3
96	SCUBE2	信号肽, 含 CUB 和 EGF-样结构域的蛋白 2
97	FNIP1	卵巢滤泡激素相互作用蛋白 1
98	OSBPL6	氧甾酮结合蛋白相关蛋白 6 的同种型 3
99	RUSC2	Iporin
100	GC	维生素 D 结合蛋白

[0095] 实施例6:通过MRM(多反应监测)进行的候选生物标志物的验证

[0096] 为了验证候选生物标志物,选定一次生物标志物候选群的MRM转换。对各蛋白质最多选定3个肽,对各肽选定3个转换列表。MRM转换的选定使用skyline软件(<https://skyline.gs.washington.edu/labkey/project/home/software/Skyline/begin.view>),使用由NIST提供的MRM转换数据库选定转换。此时,选定基准如下。

[0097] 1. $6 \leq \text{长度} \leq 20$

[0098] 2. 电荷状态 = +2 或 +3

[0099] 3. No M, W (Oxidation)

[0100] 4. NTT = 2

[0101] 5. NMC = 0

[0102] 6. 临近的KR = 0

[0103] 首先利用血液试料对所选定的肽转换执行MRM分析而确认其转换的适宜性。转换的确认条件如下。

[0104] 1.由skyline提供的点产品得分(dot-product score)为0.8以上。

[0105] 2.从同一MS1衍生的3种转换峰是否在同一保留时间内产生共析。

[0106] 3.是否存在通过反复进行3次而具有再现性的保留时间。

[0107] 4.是否具有S/N>10以上的峰面积强度。

[0108] 在100个所述候选蛋白质中,验证为根据非糖尿病患者有无血管狭窄而表达量存在显著差异的蛋白质的是PARP4、C4A、APOC2、LBP、VDB、LAMB1等6个蛋白质(参照图1)。具体而言,确认到如下情况:在所验证的蛋白质中,PARP4是血管狭窄中危群的PARP4蛋白的表达较低危群减少,C4A是高危群的C4A蛋白的表达较低危群减少,APOC2是中危群、高危群的APOC2蛋白的表达均较低危群增加,VDB是中危群、高危群的VDB蛋白的表达均较低危群减少,LAMB1是中危群、高危群的LAMB1蛋白的表达均较低危群较少,LBP是高危群的LBP蛋白的表达较中危群增加。

[0109] 另外,在100个所述候选蛋白质中,验证为根据糖尿病患者有无血管狭窄而表达量存在显著差异的蛋白质的是DOCK2、C4A、APOC2、IRF7、HBB、LBP等6个蛋白质(参照图2)。具体而言,确认到如下情况:在所验证的蛋白质中,IRF7是中危群、高危群的IRF7蛋白的表达均较低危群增加,DOCK2是中危群、高危群的DOCK2蛋白的表达均较低危群减少,APOC2是中危群、高危群的APOC2蛋白的表达均较低危群减少,HBB是高危群的HBB蛋白的表达较低危群增加,LBP是中危群、高危群的LBP蛋白的表达均较低危群增加,C4A是高危群的C4A蛋白的表达较中危群增加。

[0110] 表4表示使用在MRM(多反应监测)的肽序列,且表示可诊断非糖尿病性/糖尿病性血管狭窄的蛋白质的肽序列。

[0111] [表4]

非糖尿病性血管狭窄诊断标志蛋白质					
索引	登记号	蛋白名称	肽序列	靶离子	Q1/Q3
[0112]	1	Q9UKK3	PARP4	NGETAQLQK	y7 559.6/818.0
	2	B4DDH0	C4A	VDFTLSSER	y7 527.6/591.6
	3	K7ER74	APOC2	TYLPAVDEK	y6 518.6/658.7
	4	P02774	VDB	VLEPTLK	y5 400.5/587.7
	5	G3XAI2	LAMB1	ISGVIGPYR	y5 481.6/605.7
	6	P18428	LBP	ITLPDFTGDLR	y8 626.1/923.4

[0113]

糖尿病性血管狭窄诊断标志物					
索引	登记号	蛋白名称	肽序列	靶离子	Q1/Q3
1	Q92608	DOCK2	DILLPVITK	y5	506.6/557.7
2	B4DDH0	C4A	VDFTLSSER	y7	527.6/591.6
3	K7ER74	APOC2	TYLPAVDEK	y6	518.6/658.7
4	Q92985	IRF7	ATDPQQVAFPSAELPDQK	y9	680.3/984.5
5	P68871	HBB	EFTPPVQAAYQK	y9	690.2/501.6
6	P18428	LBP	ITLPDFTGDLR	y8	626.1/923.4

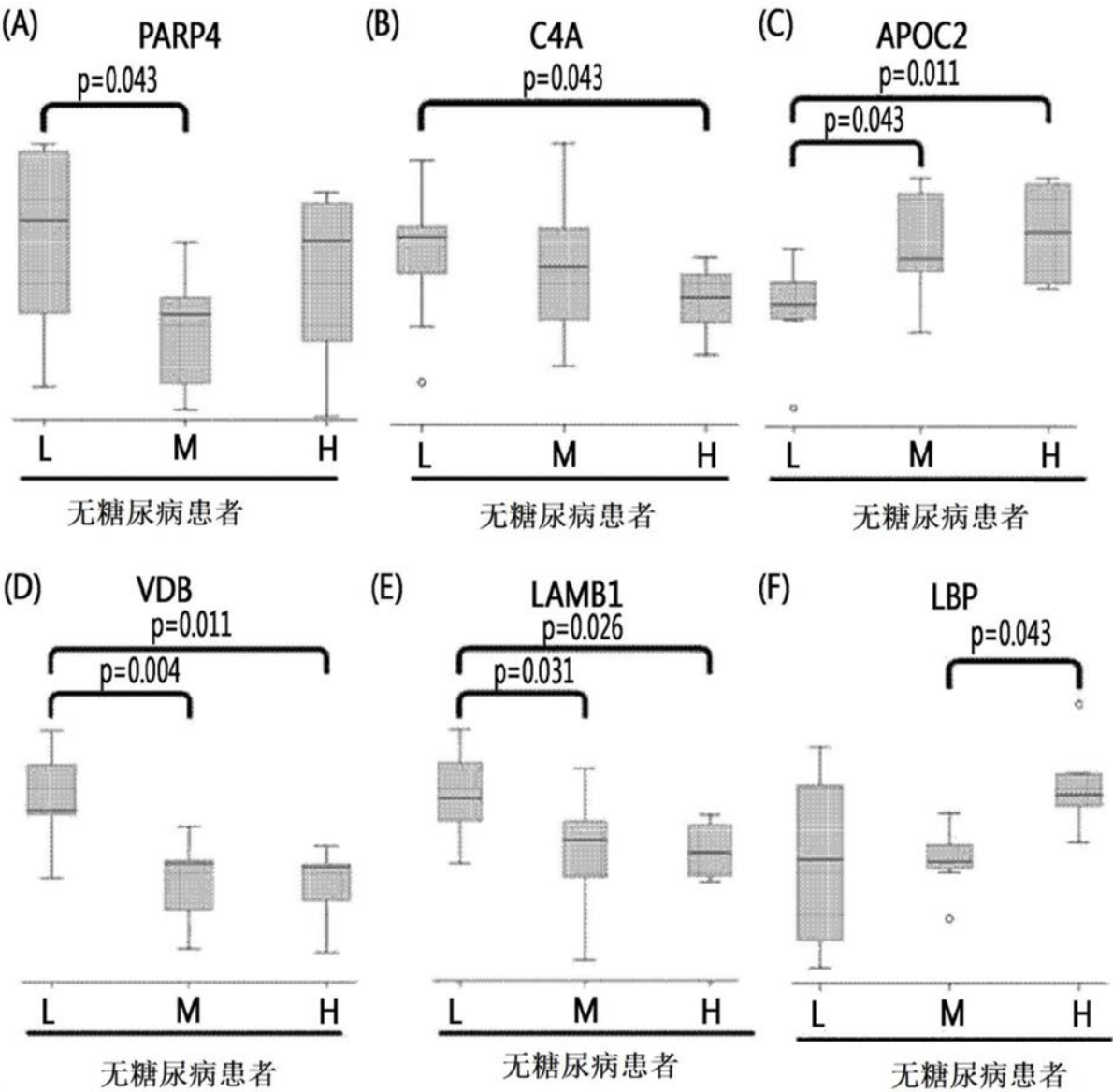


图1

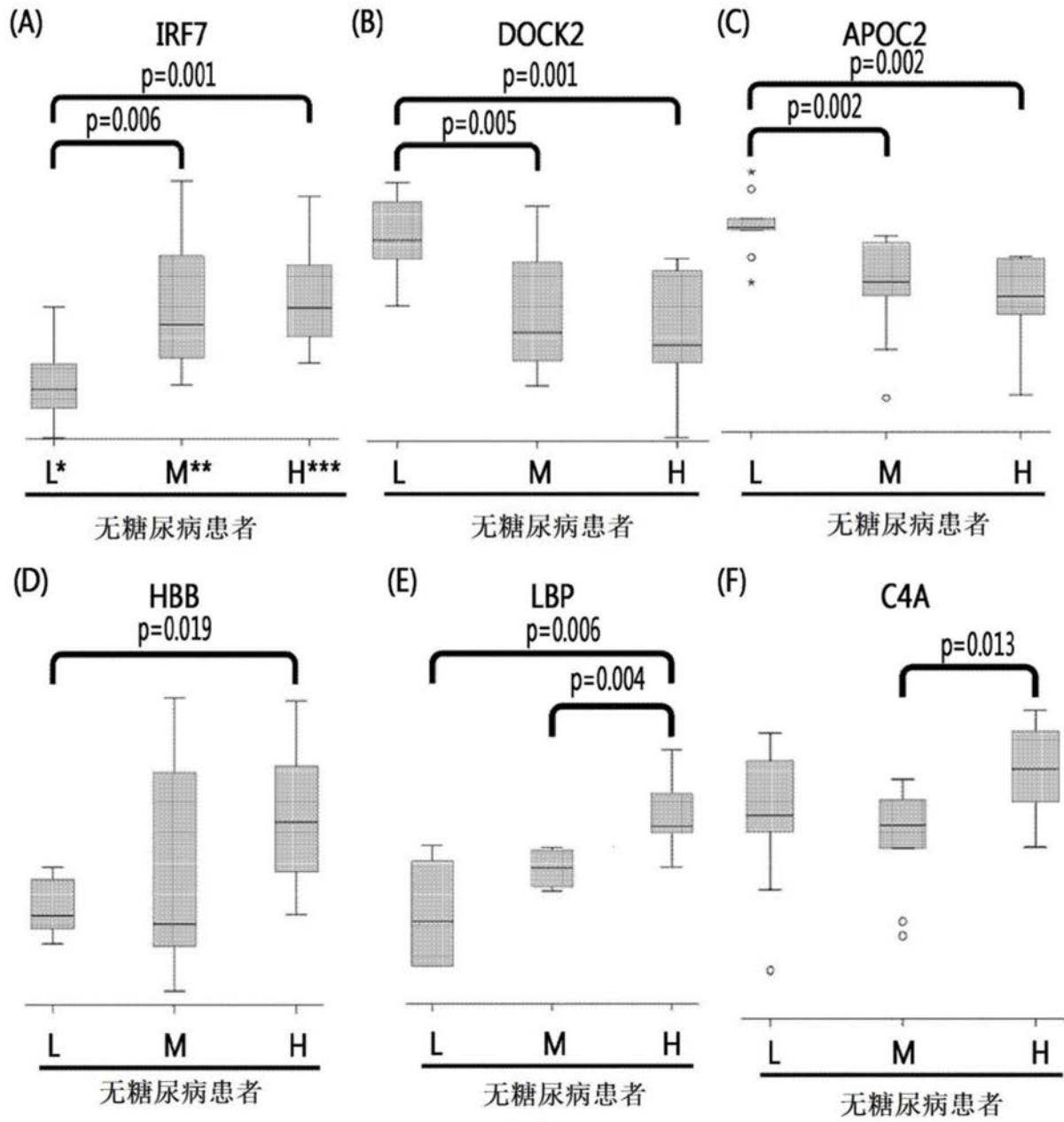


图2