

(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2008-529524

(P2008-529524A)

(43) 公表日 平成20年8月7日(2008.8.7)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 2 4
<b>C 1 2 Q 1/68 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	4 B O 2 9
<b>C 1 2 M 1/00 (2006.01)</b>	C 1 2 M 1/00 A	4 B O 6 3
<b>G O 1 N 33/53 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 F	
<b>G O 1 N 37/00 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/53 M	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 24 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2007-555031 (P2007-555031)  
 (86) (22) 出願日 平成18年2月15日 (2006.2.15)  
 (85) 翻訳文提出日 平成19年10月15日 (2007.10.15)  
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2006/000522  
 (87) 国際公開番号 W02006/088308  
 (87) 国際公開日 平成18年8月24日 (2006.8.24)  
 (31) 優先権主張番号 10-2005-0012418  
 (32) 優先日 平成17年2月15日 (2005.2.15)  
 (33) 優先権主張国 韓国 (KR)  
 (31) 優先権主張番号 10-2005-0032739  
 (32) 優先日 平成17年4月20日 (2005.4.20)  
 (33) 優先権主張国 韓国 (KR)

(71) 出願人 503447036  
 サムスン エレクトロニクス カンパニー  
 リミテッド  
 大韓民国キョンギード, スウォン-シ, ヨ  
 ントン-ク, マエタン-ドン 416  
 (74) 代理人 110000671  
 八田国際特許業務法人  
 (72) 発明者 キム, ジャエ-ヒュー  
 大韓民国, 445-774, キョンギード  
 , ファション-シ, タエアン-ユ- , ビョ  
 ンジェオム-リ, シンチャン 2-チャ  
 アパート 204-601

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 多座マーカを利用した2型糖尿病の診断方法、2型糖尿病に関連したマーカを含むポリヌクレオチド、それを含むマイクロアレイ及び2型糖尿病診断用キット

## (57) 【要約】

本発明は、2型糖尿病に関連したマーカを含むポリヌクレオチド及び、被検体において、下記表1に表示された1以上核酸の多型部位の塩基配列を決定するステップを含む2型糖尿病の診断方法を提供する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

下記の表に示されるNCBI ジーンバンク許可番号で表されたポリヌクレオチドから選択される少なくとも一つのポリヌクレオチド多型部位のヌクレオチドを決定する2型糖尿病の診断方法：

【表 1】

NCBI ジーンバンク許可番号	多型部位
rs502612	配列番号 1 の 101 番
rs1394720	配列番号 2 の 101 番
rs488115	配列番号 3 の 101 番
rs2051672	配列番号 4 の 101 番
rs1038308	配列番号 5 の 101 番
rs1943317	配列番号 6 の 101 番
rs929476	配列番号 7 の 101 番
rs1984388	配列番号 8 の 101 番
rs752139	配列番号 9 の 101 番
rs2058501	配列番号 10 の 101 番
rs1059033	配列番号 11 の 101 番
rs492220	配列番号 12 の 101 番
rs1461986	配列番号 13 の 101 番
rs607209	配列番号 14 の 101 番
rs197367	配列番号 15 の 101 番
rs1340266	配列番号 16 の 101 番
rs1316909	配列番号 17 の 101 番
rs1377188	配列番号 18 の 101 番

10

20

30

## 【請求項 2】

配列番号 1 ないし 18 の前記多型部位におけるヌクレオチドが下記多座マーカ(1)ないし(7)のうち一つ以上に該当する場合、検体を2型糖尿病患者または2型糖尿病にかかる危険性が高いと判定する、請求項 1 に記載の方法：

(1) rs488115 の多型部位の遺伝子型が AA または AG であり、rs1984388 の多型部位の遺伝子型が TT である、

(2) rs2051672 の多型部位の遺伝子型が CC であり、rs1943317 の多型部位の遺伝子型が AA であり、rs752139 の多型部位の遺伝子型が AG または GG である、

40

(3) rs1943317 の多型部位の遺伝子型が TA または AA であり、rs929476 の多型部位の遺伝子型が TT または TC であり、rs1377188 の多型部位の遺伝子型が AT または TT である、

(4) rs502612 の多型部位の遺伝子型が TT であり、rs2051672 の多型部位の遺伝子型が CC であり、rs2058501 の多型部位の遺伝子型が CC または CT であり、rs1461986 の多型部位の遺伝子型が TT または TC である、

(5) rs1394720 の多型部位の遺伝子型が TT または TG であり、rs1316909 の多型部位の遺伝子型が AT または TT であり、rs197367 の多型部位の遺伝子型が AG または GG である、

(6) rs2051672 の多型部位の遺伝子型が CC であり、rs1340266 の

50

多型部位の遺伝子型が A A であり、rs 4 9 2 2 2 0 の多型部位の遺伝子型が T C または C C である、

(7) rs 1 0 3 8 3 0 8 の多型部位の遺伝子型が C C であり、rs 1 0 5 9 0 3 3 の多型部位の遺伝子型が T T であり、rs 6 0 7 2 0 9 の多型部位の遺伝子型が A A または A C である。

【請求項 3】

前記多型部位におけるヌクレオチドを決定する操作は、直接的なヌクレオチド配列の分析またはハイブリダイゼーションによって行われる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記多型部位におけるヌクレオチドを決定する操作は、配列番号 1 ないし 1 8 の一つ以上のポリヌクレオチドの多型部位を含むポリヌクレオチドプローブ、またはその相補的ポリヌクレオチドプローブが固定化されているマイクロアレイ上に、検体から得られた核酸試料をハイブリダイズさせて、かつ当該ハイブリダイゼーションの結果を検出する、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

下記の表に示される多型配列からなる群から選択された 1 以上のポリヌクレオチド配列から由来の 1 0 個以上の連続ヌクレオチドを含むポリヌクレオチドであって、それぞれ多型部位 (1 0 1 番目) を含むポリヌクレオチド、またはその相補的なポリヌクレオチド：

【表 2】

NCBI ジーンバンク許可番号	多型部位	配列
rs502612	配列番号 1 の 101 番	C または T
rs1394720	配列番号 2 の 101 番	T または G
rs488115	配列番号 3 の 101 番	A または G
rs2051672	配列番号 4 の 101 番	C または A
rs1038308	配列番号 5 の 101 番	C または T
rs1943317	配列番号 6 の 101 番	T または A
rs929476	配列番号 7 の 101 番	T または C
rs1984388	配列番号 8 の 101 番	A または T
rs752139	配列番号 9 の 101 番	A または G
rs2058501	配列番号 1 0 の 101 番	C または T
rs1059033	配列番号 1 1 の 101 番	T または C
rs492220	配列番号 1 2 の 101 番	T または C
rs1461986	配列番号 1 3 の 101 番	T または C
rs607209	配列番号 1 4 の 101 番	A または C
rs197367	配列番号 1 5 の 101 番	A または G
rs1340266	配列番号 1 6 の 101 番	A または G
rs1316909	配列番号 1 7 の 101 番	A または T
rs1377188	配列番号 1 8 の 101 番	A または T

【請求項 6】

前記ポリヌクレオチドは、下記 (1) ないし (7) からなるポリヌクレオチドセットからなる群から選択された一つ以上のポリヌクレオチドセットである、請求項 5 に記載のポリヌクレオチド：

(1) rs 4 8 8 1 1 5 及び rs 1 9 8 4 3 8 8、

- (2) rs2051672、rs1943317及びrs752139、  
 (3) rs1943317、rs929476及びrs1377188、  
 (4) rs502612、rs2051672、rs2058501及びrs1461986、  
 (5) rs1394720、rs1316909及びrs197367、  
 (6) rs2051672、rs1340266及びrs492220、  
 (7) rs1038308、rs1059033及びrs607209。

【請求項7】

請求項5または6に記載のポリヌクレオチドを含む、マイクロアレイ。

【請求項8】

請求項5または6に記載のポリヌクレオチドを含む、2型糖尿病を検出するための診断用キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、多座マーカを利用した2型糖尿病の診断方法、2型糖尿病に関連したマーカを含むポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含むマイクロアレイ及び診断キットに関する。

【背景技術】

【0002】

全ての生物のゲノムは、継続的進化の過程で祖先の核酸配列の変異形態を発生させる自然発生的突然変異を経験してきている(Gusella, Ann. Rev. Biochem. 55, 831-854 (1986))。変異形態は、祖先の形態に比べて、進化的に利益または不利益を与えるか、または中間の場合もありうる。ある場合には、変異形態が致命的な不利益を与えて子孫に伝えられない場合もある。他の場合には、変位形態が種に進化上の利益を与え、ついには、その種のほとんどの個体のDNAに変異形態が組み込まれ有利な先祖形態となる。多くの場合、この先祖形態及び変異形態は生き残って、種集団中に共存する。複数形態の配列の共存によって、多型が発生する。

【0003】

このような多型には、RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism: 制限断片長多型)、STR (Short Tandem Repeats)、SNP (Single Nucleotide Polymorphism: 一塩基多型)が知られている。これらのうち、SNPは、同一の種の個体間における単一ヌクレオチドの変異形態を取る。一塩基多型は、コーディング領域の配列中に発生すると、多型形態の何れによっても欠陥蛋白質または変位蛋白質が発現されることもある。他の場合には、非コーディング領域の配列に一塩基多型が発生しうる。これらのうち一部は、欠陥蛋白質または変異蛋白質の発現を招くこともある(例えば、欠陥のあるスプライシングの結果として)。ある一塩基多型は、表現型に何らの影響を及ぼさないこともある。

【0004】

一塩基多型は、人間の場合、約300-1,000bpごとに1回の頻度で発生するものと知られている。これらの一塩基多型が疾病のような表現型に影響を及ぼす場合、前記一塩基多型を含むポリヌクレオチドは、このような疾病の診断にプライマーまたはプローブとして使用されうる。現在、色々な研究機関で一塩基多型の分析及びその機能の分析に関する研究を行っている。このように発見された一塩基多型の塩基配列及びその他の実験結果をデータベース化して公開することで、誰でも接近して研究に利用可能にしている。

【0005】

しかし、このような一塩基多型は、単純に人間のゲノムまたはcDNA上に一塩基多型が存在するということを発見しただけであって、これらが表現型に及ぼす影響を明らかにしたものではなかった。これらの発見された一塩基うちのほんの一部については、その機

10

20

30

40

50

能が知られたものもあるが、ほとんどは、知られていない。

【0006】

2型糖尿病 (Type 2 Diabetes Mellitus) は、糖尿病患者全体の90~95%を占めるものと知られている。2型糖尿病は、体内で生産されるインシュリンの量が異常であったり、またはインシュリンに対して低い応答性を示す結果血液中のグルコースレベルの変移が大きくなるような症状である。インシュリン分泌物の疾患が、2型糖尿病を招くと、血液中のグルコースが体内細胞内に輸送させられないため、食物からエネルギーへと変換が得難いと知られている。2型糖尿病の発病には、遺伝的要因があると知られており、その他の2型糖尿病の危険因子としては、45歳以上の年齢、糖尿病の家系、過体重、高血圧及びコレステロールレベルが挙げられる。現在、糖尿病の診断は、主に空腹時の血糖値 (FSB: Fasting Blood Glucose) 試験及び経口ブドウ糖負荷試験 (OGTT: Oral Glucose Tolerance Test) を通じて疾病による表現型の変化、すなわち血糖量 (血液中のグルコース量) を測定する方法でなされている (National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases of the National Institutes of Health, <http://www.niddk.nih.gov>, 2003)。2型糖尿病の場合、診断となれば、運動及び食生活習慣の変化、体重調節、及び各種の薬物治療を通じて治療または糖尿病の進行速度を遅らせるため、早期診断の必要性が非常に高い疾病といえる。Millenium Pharmaceuticals社でHNF1遺伝子にある遺伝子型の変異を探知することによって、2型糖尿病の診断及び予測が可能であると発表した (PR Newswire, Sept 1, 1998)、Sequenom社では、FOX A2 (HNF3) 遺伝子が2型糖尿病の発病と高い関連性があると発表した (PR Newswire, Oct 28, 2003)。このように、幾つかの遺伝子が2型糖尿病の発病と関連性があると報告されているが、特定の人口集団のうちの少数の染色体における特定の遺伝子にのみ研究が集中している。これにより、対象とする人種によって他の結果が現れる可能性がある。さらには、2型糖尿病の原因遺伝子が何れも明らかになったことではなく、このような分子生物学的方法を利用して、2型糖尿病を診断する場合は多くないのが現在の診断レベルである。それと共に、2型糖尿病の発病前の早期診断は、現在なされていない。したがって、全体ヒトゲノムを対象として2型糖尿病との関連性の高い新たなSNP及び関連遺伝子を探し出して、早期診断に活用せねばならないという必要性がある。

10

20

30

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明の目的は、多座マーカを利用して2型糖尿病を診断する方法を提供することである。

【0008】

本発明の他の目的は、2型糖尿病に関連したマーカを含むポリヌクレオチドを提供することである。

40

【0009】

本発明のさらに他の目的は、前記ポリヌクレオチドが固定化されている基板を備えるマイクロアレイを提供することである。

【0010】

本発明のさらに他の目的は、前記ポリヌクレオチドを含む2型糖尿病診断用キットを提供することである。

【0011】

本発明は、下記の表1に示されるNCBIデータベース許可番号で表されたポリヌクレオチドから選択される少なくとも一つのポリヌクレオチド多型部位のヌクレオチドを決定する、2型糖尿病の診断方法を提供する。

50

【 0 0 1 2 】

【 表 1 】

表 1

NCBI ジーンバンク許可番号	多型部位
rs502612	配列番号 1 の 101 番
rs1394720	配列番号 2 の 101 番
rs488115	配列番号 3 の 101 番
rs2051672	配列番号 4 の 101 番
rs1038308	配列番号 5 の 101 番
rs1943317	配列番号 6 の 101 番
rs929476	配列番号 7 の 101 番
rs1984388	配列番号 8 の 101 番
rs752139	配列番号 9 の 101 番
rs2058501	配列番号 10 の 101 番
rs1059033	配列番号 11 の 101 番
rs492220	配列番号 12 の 101 番
rs1461986	配列番号 13 の 101 番
rs607209	配列番号 14 の 101 番
rs197367	配列番号 15 の 101 番
rs1340266	配列番号 16 の 101 番
rs1316909	配列番号 17 の 101 番
rs1377188	配列番号 18 の 101 番

10

20

【 0 0 1 3 】

配列番号 1 ないし 18 は、前記 rs502612、rs1394720、rs488115、rs2051672、rs1038308、rs1943317、rs929476、rs1984388、rs752139、rs2058501、rs1059033、rs492220、rs1461986、rs607209、rs197367、rs1340266、rs1316909、及び rs1377188 の一塩基多型部位（101 番位置）のヌクレオチドを含む 201 bp の核酸断片である。前記配列番号 1 ないし 18 のポリヌクレオチド配列及び各一塩基多型（SNPs）の特性については、下記表 2 及び表 3 に示した通りである。

30

【 0 0 1 4 】

前記配列番号 1 ないし 18 のポリヌクレオチドは、多型配列である。多型配列とは、ヌクレオチド配列のうち一塩基多型を表す多型部位を含む配列を称す。多型部位とは、多型配列のうち一塩基多型が起きる部位を称す。前記ポリヌクレオチドは、DNA または RNA となりうる。

40

【 0 0 1 5 】

本発明は、配列番号 1 ないし 18 の多型配列のうち 1 以上の多型部位（101 番）が 2 型糖尿病と関連性のある多座マーカを利用する 2 型糖尿病を診断する方法を提供する。前記多座マーカは、2 型糖尿病患者及び正常人から由来した血液試料から得られた DNA を配列分析した結果を通じて確認できた。表 2 及び表 3 は、配列番号 1 ないし 18 の多型配列の特性を表したものである。

【 0 0 1 6 】

50

【表 2 - 1】

表 2

ASSAY _ID	SNP		SNP 含 む配 列(配 列番 号)	対立因子頻度			遺伝子型の数					
	A1	A2		cas_ A2	con_ A2	Delta	cas_ A1A1	cas_ A1A2	cas_ A2A2	con_ A1A1	con_ A1A2	con_ A2A2
DMX_001	C	T	1	0.592	0.492	0.1	54	136	109	77	151	72
DMX_009	T	G	2	0.664	0.737	0.073	31	138	129	19	119	161
DMX_011	A	G	3	0.866	0.931	0.065	7	66	225	1	39	258
DMX_029	C	A	4	0.057	0.104	0.047	268	28	3	241	52	5
DMX_030	C	T	5	0.077	0.129	0.052	251	41	2	221	70	3
DMX_032	T	A	6	0.718	0.593	0.125	26	117	157	51	142	107
DMX_033	T	C	7	0.816	0.9	0.084	10	89	198	4	51	239
DMX_044	A	T	8	0.846	0.787	0.059	7	78	213	15	93	181
DMX_056	A	G	9	0.362	0.273	0.089	123	137	40	160	116	24
DMX_062	C	T	10	0.421	0.508	0.087	106	133	59	72	146	77
DMX_069	T	C	11	0.44	0.498	0.058	96	143	60	66	164	65
DMX_104	T	C	12	0.274	0.204	0.07	158	115	24	184	95	12
DMX_116	T	C	13	0.6	0.668	0.068	41	157	101	29	139	129
DMX_152	A	C	14	0.562	0.64	0.078	62	136	99	41	129	123
DMX_154	A	G	15	0.269	0.199	0.07	153	131	15	187	100	9
DMX_058	A	G	16	0.315	0.382	0.067	138	131	28	111	144	41
DMX_101	A	T	17	0.38	0.316	0.064	118	136	46	138	133	28
DMX_131	A	T	18	0.441	0.376	0.065	97	139	62	118	136	44

10

20

30

【 0 0 1 7 】

【表 2 - 2】

(表 2 の続き)

df=2		オッズ比率 (多重比率)		HWE 状態		サンプルコール 比率	
Chi_ square value	Chi_exact _p-Value	OR	CI	con_HW	cas_HW	cas_call _rate	con_call _rate
12.384	2.05E-03	0.67	(0.53, 0.838)	.027, HWE	1.195, HWE	1	1
7.814	2.01E-02	1.42	(1.106, 1.82)	.195, HWE	.424, HWE	0.99	1
13.698	1.06E-03	2.10	(1.414, 3.115)	.026, HWE	.948, HWE	0.99	0.99
9.131	1.04E-02	1.93	(1.247, 2.975)	1.514, HWE	13.034, HWD	1	0.99
9.683	7.89E-03	1.79	(1.215, 2.64)	.51, HWE	1.004, HWE	0.98	0.98
20	4.54E-05	0.57	(0.449, 0.728)	.148, HWE	.582, HWE	1	1
16.718	2.34E-04	2.02	(1.434, 2.831)	2.023, HWE	.005, HWE	0.99	0.98
6.687	3.53E-02	0.68	(0.501, 0.91)	.452, HWE	.013, HWE	0.99	0.96
10.581	5.04E-03	0.66	(0.52, 0.848)	.283, HWE	.041, HWE	1	1
9.468	8.79E-03	1.42	(1.131, 1.788)	.034, HWE	2.43, HWE	0.99	0.98
7.165	2.78E-02	1.27	(1.007, 1.59)	3.708, HWE	.364, HWE	1	0.98
7.821	2.00E-02	0.68	(0.519, 0.891)	.011, HWE	.284, HWE	0.99	0.97
6.554	3.77E-02	1.34	(1.059, 1.7)	.838, HWE	2.473, HWE	1	0.99
7.034	2.97E-02	1.38	(1.095, 1.748)	.774, HWE	1.715, HWE	0.99	0.98

10

20

30

40

【 0 0 1 8 】

【表 2 - 3】  
 (表 2 の続き)

9.045	1.09E-02	0.68	(0.515, 0.886)	.768, HWE	3.616, HWE	1	0.99
5.99	5.00E-02	1.34	(1.057, 1.708)	0.308, HWE	0.112, HWE	0.99	0.99
5.973	5.05E-02	0.75	(0.594, 0.957)	0.166, HWE	0.465, HWE	1	1
5.14	7.65E-02	0.76	(0.605, 0.961)	0.194, HWE	0.946, HWE	0.99	0.99

10

【 0 0 1 9 】

【表 3 - 1】

表 3

ASSAY _ID	rs	SNP		配列 番号	染色体 番号	位置	バンド	遺伝子
		A1	A2					
DMX_001	rs502612	C	T	1	1	167373461	1q24.2	PRRX1
DMX_009	rs1394720	T	G	2	11	4533242	11p15.4	遺伝子の間
DMX_011	rs488115	A	G	3	11	74409538	11q13.4	遺伝子の間
DMX_029	rs2051672	C	A	4	17	5847149	17p13.2	遺伝子の間
DMX_030	rs1038308	C	T	5	18	44538585	18q21.1	K1AA0427
DMX_032	rs1943317	T	A	6	18	62419479	18q22.1	遺伝子の間
DMX_033	rs929476	T	C	7	19	33499519	19q12	遺伝子の間
DMX_044	rs1984388	A	T	8	22	30658575	22q12.3	遺伝子の間
DMX_056	rs752139	A	G	9	5	175943870	5q35.2	PC-LKC
DMX_062	rs2058501	C	T	10	7	120274187	7q31.31	FLJ21986
DMX_069	rs1059033	T	C	11	9	77736025	9q21.2	GNAQ
DMX_104	rs492220	T	C	12	1	94254590	1p22.1	ABCA4
DMX_116	rs1461986	T	C	13	13	75506683	13q22.2	遺伝子の間
DMX_152	rs607209	A	C	14	4	16808165	4p15.32	遺伝子の間
DMX_154	rs197367	A	G	15	7	36219096	7p14.2	ANLN
DMX_058	rs1340266	A	G	16	6	102381236	6q16.3	GRK2: GRK2
DMX_101	rs1316909	A	T	17	1	156770438	1q23.2	
DMX_131	rs1377188	A	T	18	18	29732602	18q12.1	NOL4: NOL4

20

30

40

【 0 0 2 0 】

【表 3 - 2】

(表 3 の続き)

ASSAY_ID	説明	SNP 役割	アミノ酸変化
DMX_001	ペアド関連ホメオボックス 1	イントロン	無
DMX_009	-	遺伝子の間	無
DMX_011	-	遺伝子の間	無
DMX_029	-	遺伝子の間	無
DMX_030	KIAA0427	coding-synon	無
DMX_032	-	遺伝子の間	無
DMX_033	-	遺伝子の間	無
DMX_044	-	遺伝子の間	無
DMX_056	protocadherin LKC	イントロン	無
DMX_062	仮想蛋白質	イントロン	無
DMX_069	グアニンヌクレオチド結合蛋白質 (G protein), q ポリペプチド	イントロン	無
DMX_104	ATP45; 結合カセット, sub45; ファミリ A (ABC1), member 4	イントロン	無
DMX_116	-	遺伝子の間	無
DMX_152	-	遺伝子の間	無
DMX_154	アニリン, アクチン結合蛋白質 (scraps ホモログ, 超グルタメート受 容体)	coding-nonsynon	無
DMX_058	ionotropic, kainate 2	イントロン	K→R
DMX_101	-	-	無
DMX_131	核小体蛋白 4	イントロン	無

## 【 0 0 2 1 】

表 2 及び表 3 において、各カラムが意味するところは、次の通りである。

## 【 0 0 2 2 】

\* Assay\_ID は、マーカの名称を表す。

## 【 0 0 2 3 】

\* SNP は、一塩基多型部位で観察される塩基を表したものであって、ここで、A1 及び A2 は、Sequenom 社の均質的 MassEXTEND (homogeneous MassEXTEND: 以下、hME ともいう) 技法によって配列分析の結果として質量の小さい対立因子を A1 と、質量の大きい対立因子を A2 と任意的に実験の便宜上命名した。

## 【 0 0 2 4 】

\* SNP を含む配列は、各 SNP 部位を含む配列の配列番号を表すものであって、それぞれ 101 番目の位置に A1 及び A2 対立因子を含む配列を表した。

## 【 0 0 2 5 】

\* 対立因子頻度の欄で、cas\_A2、con\_A2 及び Delta は、それぞれ疾病群における A2 対立因子の頻度、正常群における A2 対立因子の頻度及び、前記 cas\_A2 と con\_A2 との差の絶対値を表す。ここで、cas\_A2 は、疾病群で (A2

10

20

30

40

50

A 2 遺伝子型の頻度  $\times 2 + A 1 A 2$  遺伝子型の頻度) / ( 疾病群のサンプル数  $\times 2$  ) であり、con\_\_A 2 は、正常群で ( A 2 A 2 遺伝子型の頻度  $\times 2 + A 1 A 2$  遺伝子型の頻度 ) / ( 正常群のサンプル数  $\times 2$  ) である。

【0026】

\* 遺伝子型の頻度は、各遺伝子型の頻度を表すものであって、cas\_\_A 1 A 1、cas\_\_A 1 A 2 及び cas\_\_A 2 A 2 及び con\_\_A 1 A 1、con\_\_A 1 A 2 及び con\_\_A 2 A 2 は、それぞれ疾病群及び正常群で A 1 A 1、A 1 A 2 及び A 2 A 2 遺伝子型を有する人間の数を表す。

【0027】

\* カイ二乗 (  $df = 2$  ) は、自由度が 2 であるカイ二乗値を表したものであって、Chi - value は、カイ二乗の結果値であって、p - value 計算の基準となる値である。chi - exact - p - value は、p - value of Fisher ' s exact test of chi - square test を表すものであって、遺伝子型の数の値が 5 より小さい値が含まれる場合、一般のカイ二乗の検定結果が不正確であるので、Fisher ' s exact test を通じてさらに正確な統計的有意性 ( p - value ) の検定に使われる変数である。本発明では、p - value 0 . 05 である場合、疾病群と正常群との遺伝子型が同一ではない。すなわち、有意であると判断した。

10

【0028】

\* オッズ比率は、正常群のうち対立因子 A 1 を有する確率に対する疾病群のうち対立因子 A 1 を有する確率の比率を表す。本発明では、Mantel - Haenszel odds ratio 方法を使用した。CI ( Confidence Interval ) は、オッズ比率の 95 % の信頼区間を表すものであって、( 下限信頼区間、上限信頼区間 ) を表す。信頼区間は、1 を含む場合には、疾病との関連性を有意であると判断できない。

20

【0029】

\* HWE 状態は、ハーディ - ワインベルグ平衡の状態を表すものであって、con\_\_HWE 及び cas\_\_HWE は、正常群及び疾病群でハーディ - ワインベルグ平衡如何を表すものである。カイ二乗 (  $df = 1$  ) の検定で chi - value = 6 . 63 ( p - value = 0 . 01、 $df = 1$  ) を基準に、6 . 63 より大きい場合には、ハーディ - ワインベルグ非平衡 ( HWD : Hardy - Weinberg Disequilibrium ) と、6 . 63 より小さい場合には、ハーディ - ワインベルグ平衡 ( HWE : Hardy - Weinberg Equilibrium ) と判断した。

30

【0030】

\* 試料コール比率は、元来、実験に投入した全体試料数に対する遺伝子型が成功的に実験された試料の数を表すものであって、cas\_\_call\_\_rate 及び con\_\_call\_\_rate は、それぞれ疾病群及び正常群の実験に使われた総試料 ( 300 名 ) のうち、遺伝子型が成功的に分析された比率を表すものである。

【0031】

表 2 及び表 3 は、NCBI build 123 を基準に各 SNP マーカに関連した特性を記載したものである。

40

【0032】

本発明の方法の一具体例は、rs502612、rs1394720、rs488115、rs2051672、rs1038308、rs1943317、rs929476、rs1984388、rs752139、rs2058501、rs1059033、rs492220、rs1461986、rs607209、rs197367、rs1340266、rs1316909、及び rs1377188 の一塩基多型部位のヌクレオチドが、下記 ( 1 ) ないし ( 7 ) の多座マーカのうちの一つ以上に該当する場合には、検体を 2 型糖尿病患者または 2 型糖尿病にかかる危険性の高いと判定することを特徴とする方法を提供する；

50

(1) rs488115の多型部位の遺伝子型がAAまたはAGであり、rs1984388の多型部位の遺伝子型がTTである、

(2) rs2051672の多型部位の遺伝子型がCCであり、rs1943317の多型部位の遺伝子型がAAであり、rs752139の多型部位の遺伝子型がAGまたはGGである、

(3) rs1943317の多型部位の遺伝子型がTAまたはAAであり、rs929476の多型部位の遺伝子型がTTまたはTCであり、rs1377188の多型部位の遺伝子型がATまたはTTである、

(4) rs502612の多型部位の遺伝子型がTTであり、rs2051672の多型部位の遺伝子型がCCであり、rs2058501の多型部位の遺伝子型がCCまたはCTであり、rs1461986の多型部位の遺伝子型がTTまたはTCである、

(5) rs1394720の多型部位の遺伝子型がTTまたはTGであり、rs1316909の多型部位の遺伝子型がATまたはTTであり、rs197367の多型成部位の遺伝子型がAGまたはGGである、

(6) rs2051672の多型部位の遺伝子型がCCであり、rs1340266の多型部位の遺伝子型がAAであり、rs492220の多型部位の遺伝子型がTCまたはCCである、

(7) rs1038308の多型部位の遺伝子型がCCであり、rs1059033の多型部位の遺伝子型がTTであり、rs607209の多型部位の遺伝子型がAAまたはACである。

【0033】

前記(1)ないし(7)に該当する多座マーカにおける遺伝子型は、患者群と正常人群とでその出現頻度を比較することによって、有意に2型糖尿病と関連性があると判明されたものである。前記多座マーカの出現頻度に対する結果は、下記表4に表した通りである。

【0034】

10

20

【表 4】

表 4

マーカ 名称	遺伝子型	患者群 頻度	正常人群 頻度	オッズ 比率	95% 信頼区間
1	DMX_011=AA or AG and DMX_044=TT	59	19	3.62	(2.1, 6.24)
2	DMX_029=CC, DMX_032=AA, and DMX_056=AG or GG	94	31	3.96	(2.54, 6.18)
3	DMX_032=TA or AA, DMX_033=TT or TC, and DMX_131=AT or TT	70	23	3.67	(2.22, 6.06)
4	DMX_001=TT, DMX_029=CC, DMX_062=CC or CT, and DMX_116=TT or TC	63	19	3.93	(2.29, 6.76)
5	DMX_009=TT or TG, DMX_101=AT or TT, and DMX_154=AG or GG	62	17	4.34	(2.47, 7.62)
6	DMX_029=CC, DMX_058=AA, and DMX_104=TC or CC	71	23	3.73	(2.26, 6.17)
7	DMX_030=CC, DMX_069=TT, and DMX_152=AA or AC	63	19	3.93	(2.29, 6.76)

10

20

30

## 【 0 0 3 5 】

表 4 で、マーカ名称に対応する N C B I ジーンバンク許可番号は、表 3 に示した通りである。表 4 の結果は、それぞれ 3 0 0 人の 2 型糖尿病患者及び正常人での各多座マーカの遺伝子型の出現頻度を比較したものであって、前記 ( 1 ) ないし ( 7 ) の多座遺伝子型のうち一つ以上を満足する場合は、3 0 0 人の患者のうち、2 4 7 人であった ( 8 2 % ) 。また、表 4 で、オッズ比率は、正常人群での前記多重座遺伝子型の出現確率に対する患者群での前記多座遺伝子型の出現確率の比を表す。表 4 に示すように、オッズ比率値の何れもが 3 . 5 以上を超えるものである。この結果は、前記多座マーカ ( 1 ) ないし ( 7 ) の出現頻度が、2 型糖尿病が陽性であることと非常に密接に関連されているということを表す。

40

## 【 0 0 3 6 】

本発明に係る 2 型糖尿病の診断方法は、検体から核酸を単離させて ; 、かつ配列番号 1 ないし 1 8 のポリヌクレオチドまたはその相補的ポリヌクレオチドのうち 1 以上の多型部位 ( 1 0 1 番目 ) のヌクレオチドを決定することを含むことが好ましい。

## 【 0 0 3 7 】

本発明の方法において、まず検体から核酸を単離させる操作は、通常の DNA 分離方法用いられる方法によって行われる。例えば、標的核酸を P C R ( P o l y m e r a s e C h a i n R e a c t i o n ) を通じて増幅し、これを精製して得られる。その他にリ

50

ガーゼ連鎖反応 (LCR: Ligase Chain Reaction) (Wu及びWallace, Genomics 4, 560 (1989)、Landegrenら, Science 241, 1077 (1988))、転写増幅 (Kwohら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 1173 (1989))及び自己維持配列複製 (Guatelliら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 1874 (1990))及び核酸に基づいた配列増幅 (NASBA: Nucleic Acid Sequence Based Amplification)が使われる。最後の2つの方法は、等温転写に基づいた等温反応に関連するものであって、増幅産物として30または100倍の単一鎖RNA及び二重鎖DNAを生産する。

【0038】

本発明の方法において、前記多型部位のヌクレオチドを決定する操作は、当業界に知られた任意の方法が使用される。例えば、ジデオキシ法のように、直接的に核酸の塩基配列を分析する方法が用いられ、また、ハイブリダイゼーション法のように、間接的にヌクレオチド配列を決定する方法、が使用される。後者のハイブリダイゼーション方法を利用する場合、多様な方法が使われる。例えば、核酸マイクロアレイが使われる。すなわち、本発明の配列番号1ないし18からなる群から由来の10個以上の連続ヌクレオチドを含むポリヌクレオチドであって、101番目のヌクレオチドを含む2型糖尿病の診断または治療用ポリヌクレオチドまたはその相補的ポリヌクレオチドが1個以上固定化されているマイクロアレイに前記核酸試料をハイブリダイゼーションする操作と、前記ハイブリダイゼーションの結果を検出する操作と、を含みうる。

10

20

【0039】

マイクロアレイ及びプローブポリヌクレオチドを基板上に固定化してマイクロアレイを製造する方法は、当業界に公知されている。本発明の2型糖尿病に関連したプローブポリヌクレオチドの基板上に固定化する過程もまた、このような従来技術を使用して容易に製造しうる。また、マイクロアレイ上での核酸のハイブリダイゼーション及びハイブリダイゼーション結果の検出は、当業界に公知されている。前記検出は、例えば、核酸試料を蛍光物質、例えば、Cy3及びCy5のような物質を含む検出可能な信号を発生させる標識物質で標識した後、マイクロアレイ上に混成化し、前記標識物質から発生する信号を検出することによって、ハイブリダイゼーションの結果を検出しうる。

30

【0040】

本発明はまた、下記に示す表5の多型配列からなる群から選択された1以上のポリヌクレオチドから由来の10個以上の連続ヌクレオチドを含むポリヌクレオチドであって、前記ポリヌクレオチドは、それぞれ多型部位(101番目)を含むポリヌクレオチドまたはその相補的なポリヌクレオチドであるポリヌクレオチドを提供する。

【0041】

## 【表 5】

表 5

NCBI ジーンバンク許可番号	多型部位	配列
rs502612	配列番号 1 の 101 番	C または T
rs1394720	配列番号 2 の 101 番	T または G
rs488115	配列番号 3 の 101 番	A または G
rs2051672	配列番号 4 の 101 番	C または A
rs1038308	配列番号 5 の 101 番	C または T
rs1943317	配列番号 6 の 101 番	T または A
rs929476	配列番号 7 の 101 番	T または C
rs1984388	配列番号 8 の 101 番	A または T
rs752139	配列番号 9 の 101 番	A または G
rs2058501	配列番号 10 の 101 番	C または T
rs1059033	配列番号 11 の 101 番	T または C
rs492220	配列番号 12 の 101 番	T または C
rs1461986	配列番号 13 の 101 番	T または C
rs607209	配列番号 14 の 101 番	A または C
rs197367	配列番号 15 の 101 番	A または G
rs1340266	配列番号 16 の 101 番	A または G
rs1316909	配列番号 17 の 101 番	A または T
rs1377188	配列番号 18 の 101 番	A または T

10

20

## 【0042】

本発明の前記ポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチドセットであることが好ましく、当該ポリヌクレオチドは、下記(1)ないし(7)のポリヌクレオチドセットからなる群から選択された一つ以上のポリヌクレオチドであることが好ましい；

30

- (1) rs488115 及び rs1984388、
- (2) rs2051672、rs1943317 及び rs752139、
- (3) rs1943317、rs929476 及び rs1377188、
- (4) rs502612、rs2051672、rs2058501 及び rs1461986、
- (5) rs1394720、rs1316909 及び rs197367、
- (6) rs2051672、rs1340266 及び rs492220、
- (7) rs1038308、rs1059033 及び rs607209。

40

## 【0043】

本発明の前記ポリヌクレオチドセットは、プライマーまたはプローブとして使われる。前記ポリヌクレオチドセットは、溶液中でだけでなく、固体基板上に固定化されて、すなわちマイクロアレイ上に固定化されて使われる。本発明の前記ポリヌクレオチドは、2型糖尿病に特異的な配列であるため、2型糖尿病を診断または治療するなどの2型糖尿病に関連した用途として使われる。

## 【0044】

本発明はまた、前記本発明のポリヌクレオチドが固定化されているマイクロアレイを提供する。前記ポリヌクレオチド及びマイクロアレイについては、前記の通りである。

## 【0045】

50

本発明はまた、前記本発明のヌクレオチドを含む2型糖尿病診断用キットを提供する。望ましくは、前記キットは、一つ以上の多座マーカのポリヌクレオチドを含むキットである。

【0046】

本発明の診断用キットにおいて、診断用キットに含まれるポリヌクレオチドについては、前記の通りである。また、本発明の診断用キットには、使用指針書を含みうる。前記使用指針書は、使用目的によって当業者が理解できるように使用過程及び成分が記載されたものである。前記キットは、例えば、検体から分離された核酸試料に前記ポリヌクレオチドをプローブとしてハイブリダイズさせ、それから発生する信号を利用してハイブリダイズの程度を測定することによって、多型部位に特定の対立因子の有無を判別するのに使われる。前記特定の対立因子の有無または遺伝子型の有無に基づいて、検体が2型糖尿病にかかる危険性または2型糖尿病患者であるか否かを判別しうる。

10

【発明の効果】

【0047】

本発明の2型糖尿病の診断方法によれば、2型糖尿病の存在または危険の有無を効果的に診断しうる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0048】

以下、本発明を実施例を通じてさらに詳細に説明する。しかし、これらの実施例は、本発明を例示的に説明するためのものであって、本発明の範囲がこれらの実施例に限定されるものではない。

20

【実施例】

【0049】

実施例1

本実施例では、韓国人のうち2型糖尿病患者と判明されて治療中である患者群(300人)と、患者群と同一年齢帯に該当しつつ、まだ2型糖尿病の症状のない正常人(300人)との血液からDNAを分離し、特定の一塩基多型の出現頻度を分析した。本実施例に選択された一塩基多型は、公開されたデータベース(NCBI dbSNP: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>)またはSequenom社のreal SNP.com(<http://www.realSNP.com/>)から選択し、選択された一塩基多型周辺の配列を利用したプライマーを利用して、試料のうち一塩基配列を分析した。

30

【0050】

1. DNA試料の準備

2型糖尿病患者及び正常人から収集した血液からDNAを抽出した。DNA抽出は、公知の抽出方法(Molecular cloning: A Laboratory Manual, p 392, Sambrook, Fritsch and Maniatis, 2nd edition, Cold Spring Harbor Press, 1989)及び商業用キット(Gentrasystem, D-50K)の説明書によってなされた。抽出されたDNAのうち、純度がUV測定値(260/280nm)最小1.7以上となるものだけを選別して使用した。

40

【0051】

2. 標的DNAの増幅

分析しようとする一塩基多型が含まれた一定のDNA領域である標的DNAを、PCRを利用して増幅した。PCR方法は、通常的な方法で進め、その条件は、次の通りであった。まず、標的ゲノムDNAを2.5ng/mlで準備した。次いで、次のPCR反応液を準備した。

水(HPLC級)

2.24 μl 10×バッファ(15mM MgCl<sub>2</sub>, 25mM MgCl<sub>2</sub>含有)

0.5 μl

50

d N T P ミックス ( G I B C O ) ( 2 5 m M / 各 )	0 . 0 4 μ l
T a q p o l ( H o t S t a r ) ( 5 U / μ l )	0 . 0 2 μ l
フォワード / リバースプライマーミックス ( 1 μ M / 各 )	0 . 0 2 μ l
D N A	1 . 0 0 μ l
総反応体積	5 . 0 0 μ l

ここで、前記フォワード及びリバースプライマーは、公知のデータベースの一塩基多型の上流及び下流から適当な位置で選択した。前記プライマーを表4に整理した。

#### 【0052】

熱循環反応は、95 で15分間維持し、95 で30秒、56 で30秒、72 で1分を45回反復し、72 で3分間維持した後、4 に保管した。その結果、200個のヌクレオチド以下の長さを有する標的DNA断片を得た。

#### 【0053】

##### 3. 増幅された標的DNAのうち一塩基多型の分析

標的DNA断片のうち一塩基多型の分析は、Sequenom社製の均質的Mass Extension (hME) 技法を利用した。前記Mass Extension技法の原理は、次の通りである。まず、標的DNA断片のうち一塩基多型直前までの塩基に相補的なプライマー（延長用プライマーともいう。）を製作する。次いで、前記プライマーを標的DNA断片に混成化させ、DNA重合反応を起こす。このとき、反応液中に、対象の一塩基多型対立因子のうち第1対立因子塩基（例えば、A対立因子）に相補的な塩基が添加された後に反応を停止させる試薬（例えば、ddTTP）を含める。その結果、標的DNA断片に第1対立因子（例えば、A対立因子）が存在する場合には、前記第1対立因子に相補的な塩基（例えば、T）が一つのみ添加された産物が得られる。一方、標的DNA断片に第2対立因子（例えば、G対立因子）が存在する場合には、前記第2対立因子に相補的な塩基（例えば、C）が添加された最も近接した第1対立因子塩基（例えば、A）まで延びた産物を得る。このように得られた前記プライマーから延びた産物の長さを質量分析を通じて決定することによって、標的DNAに存在する対立因子の種類を決定しうる。具体的な実験条件は、次の通りであった。

#### 【0054】

まず、前記PCR産物から結合されていないdNTPを除去した。このために純水1.53 μ l、HMEバッファ0.17 μ l、SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) 0.30 μ lを1.5 mlのチューブに入れて混合して、SAP酵素溶液を準備した。前記チューブを5,000 rpmで10秒間遠心分離した。その後、PCR産物を前記SAP溶液のチューブに入れて密封した後、37 で20分、85 で5分間維持した後、4 に保管した。

#### 【0055】

次いで、前記標的DNA産物をテンプレートとして均質的延長反応を実施した。反応液は、次の通りであった。

水 (ナノ級純水)	1 . 7 2 8 μ l
hME延長ミックス ( 2 . 2 5 m M d / d d N T P s を含む 1 0 x バッファ )	0 . 2 0 0 μ l
延長プライマー ( 各 1 μ M )	0 . 0 5 4 μ l
T h e r m o s e q u e n a s e ( 3 2 U / μ l )	0 . 0 1 8 μ l
総体積	2 . 0 0 μ l

前記反応液をよく混合した後、スピンドウン遠心分離した。前記反応液が含まれたチューブまたはプレートをよく密封した後、94 で2分間維持した後、94 で5秒、52 で5秒、72 で5秒を40回反復した後、4 に保管した。このように得られた均質的延長反応産物を樹脂 (SpectroCLEAN<sup>TM</sup>, Sequenom社製の#10053) を使用して洗浄した。延長反応に使われた延長プライマーは、下記表6に表した。

#### 【0056】

【表 6】

表 6

標的DNA増幅に使われたプライマー及び均質延長反応に使われた延長プライマー

マーカ名称	標的DNA増幅用プライマー(配列番号)		延長プライマー (配列番号)
	フォワードプライマー	リバースプライマー	
DMX_001	19	20	21
DMX_009	22	23	24
DMX_011	25	26	27
DMX_029	28	29	30
DMX_030	31	32	33
DMX_032	34	35	36
DMX_033	37	38	39
DMX_044	40	41	42
DMX_056	43	44	45
DMX_062	46	47	48
DMX_069	49	50	51
DMX_104	52	53	54
DMX_116	55	56	57
DMX_152	58	59	60
DMX_154	61	62	63
DMX_058	64	65	66
DMX_101	67	68	69
DMX_131	70	71	72

10

20

30

## 【0057】

得られた延長反応産物を、質量分析方法のうちMALDI-TOF(Matrix Assisted Laser Desorption and Ionization-Time of Flight)を利用して多型部位の配列を分析した。前記MALDI-TOFは、分析しようとする物質がレーザービームを受ければ、イオン化されたマトリックスと共に飛行して真空状態で反対側にある検出器まで飛行するのにかかる時間を計算して、質量を分析する原理によって作動する。質量の小さい物質は、検出器に速く到達するが、このように得られる質量の差と公知の一塩基多型の配列とを根拠として標的DNAの一塩基多型の配列を決定しうる。

40

## 【0058】

前記のようなMALDI-TOFを使用した標的DNAの多型部位の配列を決定した結果は、表2及び表3に表した。このとき、各対立因子は、各個体において、同型接合子または異型接合子の形態で存在しうる。メンデルの遺伝法則とハーディ-ワインベルグ法則とによれば、集団を構成する対立因子の組成は、一定頻度に維持され、統計的に有意な場合、生物学的機能上の意味を付与しうる。本発明の一塩基多型は、表2及び表3に示したように、2型糖尿病患者から統計的に有意なレベルに出現されて、2型糖尿病の診断に使われるということが分かった。

50



## 【 0 0 5 9 】

また、表 4 に示したように、表 2 及び表 3 から得られる一塩基多型部位の塩基配列を組合せた遺伝子型、すなわち、多座遺伝子型と 2 型糖尿病との関連性を分析した結果、2 型糖尿病との関連性がとても高いと確認された。

## 【 配 列 表 】

2008529524000001.app

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/KR2006/000522
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
<i>C12Q 1/68(2006.01)i</i>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC8 C07H 21/04, C12Q 1/68		
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) eKIPASS, NCBI PubMed "diabetes, type II, polymorphism, etc."		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 6562574 B2 (Whitehead Institute for Biomedical Research; The General Hospital Corporation, US) 13 May 2003 - see the whole document	1 - 8
A	US 6783942 B2 (USB Research Foundation, US) 31 Aug. 2004 - see the whole document	1 - 8
A	US 2004/0072230 A1 (Chao Agnes Hsiung, et al., TW) 15 Apr. 2004 - see the whole document	1 - 8
A	JP 2004/344039 A (Sutaagen Kabushiki Kaisha, JP) 09 Dec. 2004 - see the whole document	1 - 8
A	Daimon, Makoto et al., 'Large-scale search of SNPs for type 2 DM susceptibility genes in a Japanese population', In: Biochemical and Biophysical Research Communications, 2003, Vol.302(4), pp.751-758 - see the whole document	1 - 8
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 25 MAY 2006 (25.05.2006)		Date of mailing of the international search report <b>26 MAY 2006 (26.05.2006)</b>
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office 920 Dunsan-dong, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer SHIN, Kyeong A Telephone No. 82-42-481-5589 

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2006/000522

**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. type of material

- a sequence listing  
 table(s) related to the sequence listing

b. format of material

- on paper  
 in electronic form

c. time of filing/furnishing

- contained in the international application as filed  
 filed together with the international application in electronic form  
 furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/KR2006/000522
--

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

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

1.  Claims Nos.: 1-4  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 1-4 are directed to a method of diagnosing under Rule 39. I(iv), the search has been carried out and based on the alleged effects of the method.

2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on Protest**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2006/000522

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6562574 B2	13. 05. 2003	US 2002137048 AA US 2003175797 A1	26. 09. 2002 18. 09. 2003
US 6783942 B2	31. 08. 2004	AU 2002367638 AA CA 2465192 AA EP 1461354 A2 US 2002137079 A1 US 2004265876 A1 WO 2003079747 A2	08. 10. 2003 02. 10. 2003 29. 09. 2004 26. 09. 2002 30. 12. 2004 02. 10. 2003
US 20040072230 A1	15. 04. 2004	None	
JP 2004344039 A	09. 12. 2004	None	

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)  
G 0 1 N 37/00 1 0 2

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

(72)発明者 チョ, ション - ハク  
大韓民国, 4 6 3 - 7 3 8 , キョンギ - ド, ションナム - シ, プンダン - グ, グミ - ドン, カチ  
マウル サンキュン アパート 4 0 3 - 1 0 0 4

(72)発明者 ナム, ユン - サン  
大韓民国, 4 6 1 - 7 6 0 , キョンギ - ド, ションナム - シ, スジェオン - グ, シンヒュン - ドン  
シンヒュン アパート 1 2 4 - 1 0 2

(72)発明者 リ, ヨン - ス  
大韓民国, 4 1 1 - 7 0 4 , キョンギ - ド, ゴーヤン - シ, イルサン - グ, ダエヒャ - ドン 2 0  
0 0 , ションジェオ マウル クンヤン ビラ 1 0 0 3 - 1 0 2

(72)発明者 ファン, ユン - ジュ  
大韓民国, 4 4 3 - 7 6 9 , キョンギ - ド, スウォン - シ, ヨントン - グ, マンポ - ドン, ドンス  
ウォン エルジー ビラージュ 2 - チャ 2 0 6 - 1 5 0 4

(72)発明者 リ, キュ - サン  
大韓民国, 4 4 3 - 7 0 6 , キョンギ - ド, スウォン - シ, ヨントン - グ, マンポ - ドン 6 8 6  
ドンスウォン エルジー ビラージュ 1 - チャ 1 0 2 - 1 7 0 2

F ターム(参考) 4B024 AA11 CA01 CA12 DA02 HA12  
4B029 AA07 AA23 BB20 CC03 FA15  
4B063 QA17 QA19 QQ08 QQ12 QQ42 QQ53 QR08 QR32 QR55 QR62  
QR82 QS25 QS34 QS39