

(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2008-538812

(P2008-538812A)

(43) 公表日 平成20年11月6日(2008.11.6)

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
GO 1 N 27/62	(2006.01)	GO 1 N 27/62	V	2 GO 4 1
GO 1 N 33/68	(2006.01)	GO 1 N 33/68		2 GO 4 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 29 頁)

(21) 出願番号 特願2008-506405 (P2008-506405) (86) (22) 出願日 平成18年4月10日 (2006.4.10) (85) 翻訳文提出日 平成19年12月11日 (2007.12.11) (86) 国際出願番号 PCT/SE2006/000425 (87) 国際公開番号 W02006/110082 (87) 国際公開日 平成18年10月19日 (2006.10.19) (31) 優先権主張番号 0500808-1 (32) 優先日 平成17年4月11日 (2005.4.11) (33) 優先権主張国 スウェーデン (SE)	(71) 出願人 300022641 アストラゼネカ アクチボラグ スウェーデン国 1 5 1 8 5 セーデル テルイエ (無番地) (74) 代理人 100089705 弁理士 社本 一夫 (74) 代理人 100140109 弁理士 小野 新次郎 (74) 代理人 100075270 弁理士 小林 泰 (74) 代理人 100080137 弁理士 千葉 昭男 (74) 代理人 100096013 弁理士 富田 博行 最終頁に続く
---	---

(54) 【発明の名称】 方法

(57) 【要約】

被験者における2型糖尿病、代謝症候群、準臨床的アテローム性動脈硬化症、心筋梗塞、卒中または糖尿病の臨床症状を発症する感受性を診断するまたは予知する方法およびキット。該方法は、その被験者からの血液試料中の小型稠密低密度リボタンパク質 (s d L D L) 粒子上の一つまたは複数の結合したタンパク質 (アポ C I I I、アポ C I、アポ A I またはアポ E) の量を検出し且つ定量することを含む。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被験者における 2 型糖尿病、代謝症候群、準臨床的アテローム性動脈硬化症、心筋梗塞、卒中または糖尿病の臨床症状を発症する感受性を診断するまたは予知する方法であって、該被験者からの血液試料中の小型稠密低密度リボタンパク質 (s d L D L) 粒子上の一つまたは複数の結合したタンパク質の量を検出し且つ定量することを含む方法。

【請求項 2】

疾患状態が、s d L D L に結合したタンパク質の量およびタイプによって被験者について決定されている、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記方法を、前記血液試料から分離された血清について行う、請求項 1 または請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

s d L D L 粒子を含有する画分を、前記血清から分離する、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

s d L D L 粒子上の一つまたは複数の結合したタンパク質の量を、健康な対照被験者から定量された量と比較する、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6】

s d L D L 粒子上の一つまたは複数の結合したタンパク質の量の検出および定量化を、表面増強レーザー脱離イオン化 (Surface Enhanced Laser Desorption Ionization) (S E L D I) 分析によって行う、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

s d L D L 粒子を、密度勾配超遠心分離を行うことによって血液または血清から単離する、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

密度勾配超遠心分離を、D₂O 中で調製された緩衝液で行う、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

s d L D L 粒子を、動脈血プロテオグリカン溶液での血清からの s d L D L 粒子の沈殿によって分離する、請求項 3 ~ 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 10】

前記結合したタンパク質が、アポリポタンパク質 C III、アポリポタンパク質 C I、アポリポタンパク質 A 1 およびアポリポタンパク質 E から成る群より選択される、請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 11】

s d L D L 粒子に結合した一つまたはそれを超えるタンパク質の、対照被験者の場合に相対して増大した量が、被験者が 2 型糖尿病に罹患しているかどうかを示している、請求項 5 ~ 10 のいずれかに記載の方法。

【請求項 12】

s d L D L 粒子に結合した一つまたはそれを超えるタンパク質の、対照被験者の場合に相対して低下した量が、被験者が 2 型糖尿病に罹患しているかどうかを示している、請求項 5 ~ 10 のいずれかに記載の方法。

【請求項 13】

s d L D L 粒子に結合したアポリポタンパク質 C I および / またはアポリポタンパク質 A 1 および / またはアポリポタンパク質 E の量を、健康な対照被験者と比較して低下させ、そして s d L D L 粒子に結合したアポ C III の量を増大させる、請求項 1 ~ 12 のいずれかに記載の方法。

【請求項 14】

臨床試験のために患者を選択するためのバイオマーカーとしての、s d L D L 粒子上に結合した一つまたは複数のタンパク質のタイプおよび量のプロフィール作成方法の使用。

【請求項 15】

10

20

30

40

50

被験者の薬理的介入の結果の評価用のバイオマーカーとしての、該被験者の s d L D L 粒子上に結合した一つまたは複数のタンパク質のタイプおよび量のプロフィール作成方法の使用。

【請求項 1 6】

アポタンパク質 C I およびアポタンパク質 C I I I の組合せを用いる、請求項 1 4 または請求項 1 5 に記載の使用。

【請求項 1 7】

アポタンパク質 C I、アポリポタンパク質 A 1、アポリポタンパク質 E およびアポタンパク質 C I I I の組合せを用いる、請求項 1 4 または請求項 1 5 に記載の使用。

【請求項 1 8】

健康な対照被験者と比較して、s d L D L 粒子に結合したアポ C I の量を減少させ、そして s d L D L 粒子に結合したアポ C I I I の量を増加させる、請求項 1 4 ~ 1 5 のいずれかに記載の使用。

【請求項 1 9】

健康な対照被験者と比較して、s d L D L 粒子に結合したアポリポタンパク質 C I および / またはアポリポタンパク質 A 1 および / またはアポリポタンパク質 E の量を減少させ、そして s d L D L 粒子に結合したアポ C I I I の量を増加させる、請求項 1 8 に記載の使用。

【請求項 2 0】

被験者における 2 型糖尿病、代謝症候群、準臨床的アテローム性動脈硬化症、心筋梗塞、卒中または糖尿病の臨床症状を発症する感受性を診断するまたは予知する診断用キットであって、s d L D L 粒子上に結合したタンパク質を検出し且つ定量することが可能なタンパク質チップを含むキット。

【請求項 2 1】

前記チップを、カップリングした動脈血プロテオグリカンと一緒に提供する、請求項 2 0 に記載のキット。

【請求項 2 2】

前記チップを、s d L D L に結合したタンパク質の直接的決定に用いる、請求項 2 0 ~ 2 1 に記載のキット。

【請求項 2 3】

動脈内膜中間厚み (arterial intima media thickness) を予測する方法であって、被験者からの血液試料中の小型稠密低密度リポタンパク質 (s d L D L) 粒子上の一つまたは複数の結合したタンパク質の量を検出し且つ定量することを含む方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、被験者における 2 型糖尿病、代謝症候群、準臨床的アテローム性動脈硬化症、心筋梗塞、卒中または糖尿病の臨床症状を発症する感受性を診断するまたは予知する方法に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

血管内膜のプロテオグリカン層中の L D L (低密度リポタンパク質) 粒子の閉じ込めおよび修飾は、アテローム発生における臨界的初期段階であると考えられる。L D L と、アテローム発生性の原因となるものを含めた他の巨大分子および細胞との大部分の相互作用は、粒子表面において暴露される交換不能なアポ B 1 0 0 のセグメントによって制御される。(Chan L, J Biol Chem 1992;267:25621-25624; Camejo G, et al, Pathological significance 1998;139:205-222)。交換可能なアポリポタンパク質およびタンパク質は、L D L 表面に吸着した時に、若干のこれら相互作用をモジュレーションすることができると考えられる。1 . 0 1 9 ~ 1 . 0 6 3 の密度を有する操作上定義されたりポタンパク質クラスは、サイズ、脂質およびアポリポタンパク質組成が異なる粒子の集合である (Alau

10

20

30

40

50

povioc P, Methods Enzymol 1996;263:32-60)。増大したレベルの低分子稠密LDL (small dense LDL: sdLDL) サブクラスは、冠状動脈疾患進行に強く関連しているので、これは、インスリン抵抗性および2型糖尿病のアテローム発生性異常脂肪血症のマーカールとして考えられてきた (Krauss RM, World Rev Nutr Diet 1997;80:22-43; Taskinen MR, Diabetologia, 2003;46:733-749)。更に、sdLDLの有病率は、症状発現前の大腿および頸動脈のアテローム性動脈硬化症を有する被験者において高い (Hulthe J, et al, Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology 2000;20:2140-2147)。いくつかの仮説が、sdLDLのアテローム発生性を説明するために考えられた。これら粒子は、in vitro の動脈血プロテオグリカン (PG) への増加した親和性を有するので、いったんそれらと会合すると、より大きい一層浮遊性のLDLよりも、酵素的および酸化的過程によって容易に修飾可能になる (Camejo G, et al, Pathological significance 1998; 139:205-222; Hurt-Camejo E, et al, Journal of Lipid Research 1990;31:1387-1398)。

10

【0003】

浮遊性LDL (大型) ~ より稠密なLDL (低分子) へと、粒子の脂質組成および表面特性が徐々に変化している。粒子表面におけるリン脂質およびフリーコレステロールの減少は、アポB - 100のアポB/E受容体への親和性を修飾するそのセグメントの暴露の変化に関連している。このような変化は、プロテオグリカン結合に参与している3359 ~ 3369 (B部位) および3145 ~ 3157 (A部位) の配列が、受容体結合にも関与していることから (Chan L, J Biol Chem 1992;267:25621-25624)、プロテオグリカンへのsdLDLの一層大きい親和性を部分的に説明することもできる。これは、表面におけるこれら正の配列が、一層接近し且つ一層暴露された状態になることから、sdLDLは、PGへのより高い親和性を有するという仮説を導いた (Camejo G, et al, Pathological significance 1998;139:205-222; Hurt-Camejo E, et al, Journal of Lipid Research 1990;31:1387-1398)。

20

【0004】

LDL中の高いアポリポタンパク質CIII (アポCIII) 含有率は、この表現型を有する被験者が、LDL - コレステロール値とは無関係に、低いLDL中アポCIII含有率を有する被験者よりもはるかに高い心臓血管イベントのリスクがあることから、多くの注意が払われている (Lee S-J, et al, Arterioscler Thromb Vasc Biol 2003;23(5):853-858; Lee S-J, et al., Am J Cardiol 2003;92(2):121-124)。アポCIIIは、超低密度リポタンパク質 (VLDL) 中のトリグリセリドの加水分解を阻害することにより、高トリグリセリド血症を引き起こすが、それが、LDLのアテローム発生性を増加させなければならない理由は不明である。最近になって、LDLと会合した時のアポCIIIは、動脈血プロテオグリカンへのリポタンパク質親和性を増加させるということが分かった (Olin-Lewis K, et al, J Lipid Research 2002;43(11):1969-1977)。

30

【0005】

WO2004/085996号は、被験者が心臓血管性、代謝性または加齢性の疾患を発症する可能性を決定するために、被験者の血漿からの高密度HDLおよびLDLのサイズおよびレベルを使用する方法を開示している。

40

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明の目的は、被験者における2型糖尿病、代謝症候群、準臨床的アテローム性動脈硬化症、心筋梗塞、卒中または糖尿病の臨床症状を発症する可能性を容易に決定できるまたは予測できることである。

【課題を解決するための手段】

【0007】

この目的は、被験者における2型糖尿病、代謝症候群、準臨床的アテローム性動脈硬化症、心筋梗塞、卒中または糖尿病の臨床症状を発症する感受性を診断するまたは予知する

50

方法であって、その被験者からの血液試料中の小型稠密低密度リポタンパク質 (s d L D L) 粒子上の一つまたは複数の結合したタンパク質の量を検出し且つ定量することを含む方法を提供することで解決された。

本発明の別の側面により、臨床試験のために患者を選択するためのバイオマーカーとしての、 s d L D L 粒子上に結合した一つまたは複数のタンパク質のタイプおよび量のプロフィール作成方法の使用を提供する。

【 0 0 0 8 】

本発明の更に別の側面により、被験者の薬理的介入の結果の評価用のバイオマーカーとしての、その被験者の s d L D L 粒子上に結合した一つまたは複数のタンパク質のタイプおよび量のプロフィール作成方法の使用を提供する。

10

【 0 0 0 9 】

本発明のもう一つの側面により、被験者における 2 型糖尿病、代謝症候群、準臨床的アテローム性動脈硬化症、心筋梗塞、卒中または糖尿病の臨床症状を発症する感受性を診断するまたは予知する診断用キットであって、 s d L D L 粒子上に結合したタンパク質を検出し且つ定量することが可能なタンパク質チップを含むキットを提供する。

【 0 0 1 0 】

本発明の別の側面により、動脈内膜中間厚み (arterial intima media thickness) を予測する方法であって、被験者からの血液試料中の小型稠密低密度リポタンパク質 (s d L D L) 粒子上の一つまたは複数の結合したタンパク質の量を検出し且つ定量することを含む方法を提供する。

20

【 発明の効果 】

【 0 0 1 1 】

本発明による方法は、追加の情報を伴うことなく、2 型糖尿病の患者の約 8 0 % を識別するのに用いることができる。2 型糖尿病の患者からの低分子稠密 L D L と会合したタンパク質について記載された具体的なプロフィールは、サイズ評価単独によって与えられるもの以上に、この疾患に関連したアテローム発生性 L D L の生化学的特徴についての追加の情報を与える。これらバイオマーカーは、異常脂肪血症 / 糖尿病 / アテローム性動脈硬化症の患者における I ~ III 相試験の患者選択に、そして更には、薬理的介入の結果の

30

【 発明を実施するための最良の形態 】

【 0 0 1 2 】

本発明は、被験者における 2 型糖尿病、代謝症候群、準臨床的アテローム性動脈硬化症、心筋梗塞、卒中または糖尿病の臨床症状を発症する感受性を診断するまたは予知する方法であって、その被験者からの血液試料中の小型稠密低密度リポタンパク質 (s d L D L) 粒子上の一つまたは複数の結合したタンパク質の量を検出し且つ定量することを含む方法を提供する。

【 0 0 1 3 】

好ましくは、その方法は、その血液試料から分離された血清について行われる。場合により、 s d L D L 粒子を含有する画分を、最初に血清から分離後、一つまたは複数の結合したタンパク質の量の検出および定量化を行う。

40

【 0 0 1 4 】

小型稠密低密度リポタンパク質 (s d L D L) 粒子上の一つまたは複数の結合したタンパク質の量を、健康な対照被験者から定量された量と比較する。これは、試験被験者と同時に対照被験者について行われうるし、またはそれは、病歴対照データでありうる。

【 0 0 1 5 】

一つの態様において、被験者における 2 型糖尿病の診断または 2 型糖尿病を獲得する予測 ; 代謝症候群、準臨床的アテローム性動脈硬化症、糖尿病の臨床症状またはアテローム性動脈硬化症の臨床症状 (すなわち、心筋梗塞および卒中) の診断のための方法であって

50

、

- (a) その被験者から血液試料を採取し、その試料の血清を集め、
 - (b) 小型稠密低密度リポタンパク質 (s d L D L 粒子) を含有する画分を分離し、
 - (c) 工程 (b) より得られた分離された s d L D L 粒子上の一つまたは複数の結合したタンパク質のレベルを検出し且つ定量し、
 - (d) その一つまたは複数のタンパク質を識別し、そして
 - (e) 健康な対照被験者からのレベルと比較する
- という工程を含む方法を提供する。

【0016】

血液試料は、上の測定の直前に採取されうるが、それは、ずっと以前に問題の被験者から採取され且つ上の測定の前に適当な方法で貯蔵された血液試料でもありうる。

小型稠密低密度リポタンパク質 (s d L D L 粒子) を含有する画分の分離は、他の血液成分からの s d L D L 粒子の分離について当業者に知られているいずれかの技法を用いて行いうる。それは、例えば、 D_2O 中で調製されたものなどの適する緩衝液での密度勾配超遠心分離を行うことによって、または動脈血プロテオグリカン溶液での血清からの s d L D L 粒子の沈殿によって行いうる。

【0017】

検出は、1 D ゲル電気泳動を用いて行うことができる。検出および定量化は、免疫検定法によって行うことができる。好ましくは、s d L D L 粒子上の一つまたは複数の結合したタンパク質の量の検出および定量化は、表面増強レーザー脱離イオン化 (Surface Enhanced Laser Desorption Ionization) (S E L D I) 分析によって行われる。

【0018】

本明細書中で用いられる「結合した」という用語は、水素結合、疎水性相互作用、ファンデルワールス力、イオン相互作用などのいずれかの種類の非共有結合方式で s d L D L 粒子に結合したタンパク質を包含すると解釈されることを意味する。それらタンパク質は、リポタンパク質粒子の表面上に異なった親和性で保持され、フリープールとのまたは他のリポタンパク質クラスと会合したものとの平衡状態にありうる。

【0019】

s d L D L 粒子に結合したタンパク質は、アポリポタンパク質 C III (アポ C III)、アポリポタンパク質 C I (アポ C I)、アポリポタンパク質 A 1 (アポ A I) およびアポリポタンパク質 E (アポ E) から成る群より選択される一つまたはそれを超えるものでありうるが、ここにおいて、アポ C III は、3 種類のイソ型として存在し、そしてアポ C I は、2 種類のイソ型として存在する (Pullinger et al., 1997)。

【0020】

上の方法で推定されるような s d L D L 粒子に結合した若干のタンパク質について、s d L D L 粒子に結合した一つまたはそれを超えるタンパク質の、対照被験者の場合に相対して増大した量は、被験者が、2 型糖尿病、代謝症候群、準臨床的アテローム性動脈硬化症、糖尿病の臨床症状またはアテローム性動脈硬化症の臨床症状 (すなわち、心筋梗塞および卒中) に罹患しているおよび / またはそれを発症するリスクがあるかどうかを示している。例えば、アポ C III のレベルは、健康な被験者と比較して増加する。

【0021】

上の方法で推定されるような s d L D L 粒子に結合した若干のタンパク質について、s d L D L 粒子に結合した一つまたはそれを超えるタンパク質の、対照被験者の場合に相対して低下した量は、被験者が、2 型糖尿病、代謝症候群、準臨床的アテローム性動脈硬化症、糖尿病の臨床症状またはアテローム性動脈硬化症の臨床症状 (すなわち、心筋梗塞および卒中) に罹患しているおよび / またはそれを発症するリスクがあるかどうかを示している。例えば、アポ C I、アポ A I およびアポ E の量は、健康な被験者と比較して減少する。

【0022】

一つの態様において、s d L D L 粒子に結合したアポ C III およびアポ C I の組合せを

10

20

30

40

50

測定し、そして s d L D L 粒子に結合した一つまたはそれを超えるタンパク質の、対照被験者の場合に相対して増大した量は、被験者が、2 型糖尿病、代謝症候群、準臨床的アテローム性動脈硬化症、糖尿病の臨床症状またはアテローム性動脈硬化症の臨床症状（すなわち、心筋梗塞および卒中）に罹患しているおよび / またはそれを発症するリスクがあるかどうかを示しているということを明らかにする。

【 0 0 2 3 】

別の態様において、s d L D L 粒子に結合したアポ C I I I および / またはアポ A I および / またはアポ E および / またはアポ C I の組合せを測定し、そして 2 型糖尿病、代謝症候群、準臨床的アテローム性動脈硬化症、糖尿病の臨床症状またはアテローム性動脈硬化症の臨床症状（すなわち、心筋梗塞および卒中）を有するおよび / またはそれを発症するリスクがある被験者において、健康な対照被験者と比較したところ、s d L D L 粒子に結合したアポ C I および / またはアポ A 1 および / またはアポ E の量はして低下し、そして s d L D L 粒子に結合したアポ C I I I の量は増大するということを明らかにする。

10

【 0 0 2 4 】

本発明による方法を用いることにより、s d L D L 粒子に結合したアポ C I I I、アポ C I、アポ A 1、アポ E またはこれらタンパク質の組合せの検出および定量化は、臨床試験のために患者を選択するための一つまたは複数のバイオマーカーとして用いることができる。

【 0 0 2 5 】

バイオマーカーは、正常な生物学的過程、病原性過程の測定可能な且つ評価可能な指標として、または例えば、治療薬の投与による治療的介入への薬理的応答として定義することができる。したがって、s d L D L 粒子に結合したそれらタンパク質各々のまたはそれらタンパク質組合せの推定レベルは、異常脂肪血症および / または糖尿病および / またはアテローム性動脈硬化症の患者においてバイオマーカーとして機能するであろうし、したがって、I ~ I I I 相試験に適する被験者の選択のための優れた手段を与える。s d L D L 粒子に結合した上のタンパク質の推定レベルは、その被験者の薬理的介入の結果の評価のために患者を選択するのに用いることもできる。

20

【 0 0 2 6 】

したがって、被験者の s d L D L 粒子上に結合した一つまたは複数のタンパク質のタイプおよび量のプロフィール作成方法の使用は、その被験者の薬理的介入の結果の評価のためにまたは臨床試験のために患者を選択するためのバイオマーカーとして用いることができる。アポ C I およびアポ C I I I の組合せを用いることができる。一つの態様において、s d L D L 粒子に結合したアポ C I の量は、健康な対照被験者と比較して減少し、そして s d L D L 粒子に結合したアポ C I I I の量は増加する。更に、アポ C I および / またはアポ A 1 および / またはアポ E および / またはアポ C I I I の組合せを用いることができる。一つの態様において、s d L D L 粒子に結合したアポ C I、アポ A 1 およびアポ E の量は、健康な対照被験者と比較して減少し、そして s d L D L 粒子に結合したアポ C I I I の量は増加する。

30

【 0 0 2 7 】

本発明は、更に、被験者における 2 型糖尿病、代謝症候群、準臨床的アテローム性動脈硬化症、心筋梗塞、卒中または糖尿病の臨床症状を発症する感受性を診断するまたは予知する診断用キットであって、s d L D L 粒子上に結合したタンパク質を検出し且つ定量することが可能なタンパク質チップを含むキットに関する。そのチップは、カップリングした動脈血プロテオグリカンと一緒に提供することができる。そのチップは、s d L D L に結合したタンパク質の直接的決定にも用いうる。そのキットは、被験者の状態に関して血液試料から情報を得るために、本発明の方法を実施する容易で且つ迅速な方法を提供するであろう。

40

【 0 0 2 8 】

本発明は、更に、被験者の動脈内膜中間厚み (arterial intima media thickness) を予測する方法であって (実施例 8 を参照されたい)、その被験者からの血液試料中の小型

50

稠密低密度リポタンパク質 (s d L D L) 粒子上の一つまたは複数の結合したタンパク質の量を検出し且つ定量することを含む方法に関する。

【 0 0 2 9 】

1 . 0 1 9 g / m l ~ 1 . 0 6 3 g / m l の密度を有する血漿または血清のリポタンパク質は、超遠心分離手順を用いて、低密度リポタンパク質 (L D L) として操作上定義された (de Lalla, O., and J. Gofman, 1954, p. 459-478, in D. Glick ed., Methods in Biochemical Analysis, vol. 1. Wiley, Interscience, New York)。その L D L は、1 . 0 1 9 ~ 1 . 0 6 3 g / m l の範囲内の増加する密度を有する重複するサブクラスに部分分別することができる。電気泳動、光散乱、電子顕微鏡法または核磁気共鳴によって評価される、増加する密度と減少するサイズとの間には、強い相関がある (Krauss, R. M., 2004, Diabetes Care 27:1496-1504)。しばしば、1 . 0 1 9 ~ 1 . 0 3 0 g / m l の密度を有する L D L 粒子は、大型で且つ浮遊性であるとみなされるが、1 . 0 3 0 ~ 1 . 0 6 3 g / m l の密度を有するものは、低分子で且つ稠密と称される。現在の研究では、プロテオーム (proteomic) アプローチを用いて、B 表現型を有する二つのタイプの患者と、健康対照における、低分子稠密および大型の L D L 粒子と会合した交換可能なアポリポタンパク質を比較した。一つの患者群は、末梢アテローム性動脈硬化症の準臨床的根拠および多くの代謝症候群の特徴を有した。研究された第二群は、2 型糖尿病を有した。プロテオーム評価を、生理的塩類濃度を有する D₂O 密度勾配での超遠心分離によって単離された L D L サブクラスに行った。用いられたプロテオーム法は、L D L サブクラスに結合したタンパク質の、表面増強レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析 (surface enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry) (S E L D I T O F M S) を用いたプロファイル作成、および引き続きの変化したタンパク質の質量分析 (M S) およびイムノプロットングによる識別を伴った。得られた結果は、L D L 密度サブクラスに結合しているアポリポタンパク質アポ C I I I、アポ C I、A p o A I およびアポ E を識別した。

10

20

【 0 0 3 0 】

この研究の目的は、準臨床的アテローム性動脈硬化症および L D L 表現型 B を有する患者と、2 型糖尿病および表現型 B を有する患者における、L D L の浮遊性サブクラスおよび稠密サブクラスが、対合した健康対照の場合とは異なることがありうる結合したアポリポタンパク質の特異的パターンを有するかどうかを調べることであった。第一研究における患者は、L D L B 表現型を有する他に、対照よりも有意に太いウエスト、高い空腹時インスリン、高い空腹時血糖、高いトリグリセリドおよび低い H D L コレステロールを有した (表 1)。したがって、それら患者は、代謝症候群のいくつかの成分を共有していた。代謝症候群は、Grundy, et al., 2004, Arterioscler Thromb Vasc Biol, 24:13e-18 かまたは Isomaa, B., et al., 2001, Diabetes Care 24:683-9 にしたがって定義することができる。

30

【 0 0 3 1 】

この研究における患者は全て、小または中頸動脈アテローム性動脈硬化症を示し、そしてその内の 3 人は、大腿斑も示した。対合した対照で、B 表現型を示したものはいなかった (表 1)。第二研究における 2 型糖尿病の患者は、B 表現型の他に、対合した対照よりも太いウエスト、低い H D L コレステロール、高いトリグリセリド、およびはるかに高い頸動脈斑および大腿斑の有病率も有した (表 2)。

40

【 0 0 3 2 】

二つの L D L サブクラスに結合した交換可能なアポリポタンパク質を分析するために、生理的塩類濃度および p H においてそれらリポタンパク質を維持した超遠心分離手順を用いた。この手順は、高塩類濃度において超遠心分離で行われるので、循環中の L D L 粒子に結合した交換可能なタンパク質およびアポリポタンパク質の分布を変化させる可能性を最小限にする (MacConathy WM, Koren K, Wieland H et al, Journal of Chromatography 1985;342:47-66)。更に、二つの L D L サブクラスの結合したタンパク質の S E L D I 分析によるプロファイル作成、および引き続きの変化したタンパク質ピークの M S および

50

イムノブロットングでの識別を含めたプロテオーム手順を行った。このアプローチは、いくつかのアポリポタンパク質の定量的評価および識別を、許容しうる変動係数（14～24%）で可能にした。それら結果は、準臨床的末梢アテローム性動脈硬化症を有する患者、B表現型を有する患者、および2型糖尿病およびB表現型を有する患者における、 $1.040 \sim 1.060 \pm 0.005 \text{ g/ml}$ の密度を有するsdLDLサブクラスは、健康対照の同等の画分と比較した場合、アポCIII（3種類のイソ型）が豊富で、そしてアポCI（2種類のイソ型）、アポAIおよびアポEが激減しているということを示している。更に、高アポCIIIおよび低アポCIを有するsdLDL粒子のパターンは、人体計測法によるまたは臨床的な化学パラメーターについてのいずれか他の補足的情報を必要とすることなく、研究された患者の80%を識別することを可能にした。

10

【0033】

全血漿アポCIIIおよびそのアポB100含有粒子と会合したものは、特に、代謝症候群に罹患した女性および男性の冠状動脈リスクの強い予兆である（Onat A, et al, Atherosclerosis 2003/5 2003;168(1):81-89）。更に、2型糖尿病および冠状動脈疾患を有する患者の場合、最高のアポCIIIを有するLDLの四分位数は、新たな冠状動脈イベントの相対リスクを、最低のアポCIII含有率での四分位数に相対して6倍を超えて増加させる（Lee S-J, et al, Arterioscler Thromb Vasc Biol 2003;23(5):853-858）。本発明者の結果は、代謝症候群のマーカーを有する患者および2型糖尿病を有する患者の場合、アテローム発生性sdLDLは、アポCIIIが特に多く、そしてアポCI、アポAIおよびアポEが不足しているということを示している。

20

【0034】

低分子で且つ稠密なLDLサブクラスは、トリグリセリドの多い大型VLDLの主な異化作用産物であり、最近の根拠は、そのアポCIII含有率が、その生産速度に関係しているということを示している（Marcoux C, et al, Metabolism 2001;50(1):112-119）。更に、内臓肥満被験者での速度論研究は、トリグリセリドの多いVLDL中の高アポCIII含有率が、その混合過剰生産および低下した異化作用に関係しているということを示した（Chan DC, et al, Metabolism 2002;51(8):1041-1046）。これら結果は、代謝症候群および2型糖尿病を有する研究された患者において、アポCIIIの豊富な稠密LDLを生じることができる機構を示唆している。しかしながら、現在の研究では、このような患者の稠密LDLサブクラス中で認められたアポCI、アポAIおよびアポEの減少した含有率について説明されない。一つの可能性は、大型VLDL中のアポEについて示されたように、これが、インスリン耐性患者の血漿中のこれらアポリポタンパク質の減少した利用可能性、およびアポCIIIの多い低分子稠密LDL粒子表面のそれらを保持する減少した能力を反映しているということである（Breyer ED, et al, J Lipid Research 1999;40(10):1875-1882）。しかしながら、同様に推論すると、健康対照の稠密LDLの場合、アポリポタンパク質、すなわち、アポAI、アポEおよびアポCIの高含有率は、粒子LDL表面からアポCIIIを置き換えるということが考えられうる。

30

【0035】

sdLDLが、浮遊性粒子よりもアテローム発生性である理由は未だ不明であるが、動脈血プロテオグリカンへのその高親和性は、アテローム発生における重要な第一段階である、動脈内膜中のその保持を増加させうる（Camejo G, et al, Pathological significance 1998;139:205-222）。本発明者の結果は、B表現型を有するインスリン耐性で且つ2型糖尿病の患者が、アポCIIIの多いsdLDLの高循環レベルを有し、それが、動脈内膜のプロテオグリカンとのその相互作用を増加させうるし、したがって、その現場の酸化的小および酵素的修飾を容易にしうるということを示唆している。更に、本発明者の結果は、動脈壁中のLDLをアテローム発生性修飾から保護すると仮定されたアポAIについて、このような粒子が不足しているということを示している（Rohrer L, et al, Current Opinion on Lipidology 2004;15(3):269-278）。これら考察に基づいて、インスリン耐性の異常脂肪血症に一般的なLDLのこのクラスは、斑発生の原因の一つでありうるということが考えられうる。このような役割は、LDL中の増加したアポCIIIと、インスリン

40

50

耐性および2型糖尿病における心臓血管疾患への増大したリスクとの顕著な関連を一部分説明しうる。

【実施例】

【0036】

ここで、本発明を、次の非制限実施例によってより詳細に強調する。実施例において、対照と患者との間の相違の評価は、両側スチューデントt検定で行ったし、そして $p < 0.05$ を有意とみなした。

【0037】

実施例1

被験者の選択

第一研究において、s d L D L（パターンB表現型）と、頸動脈の準臨床的アテローム性動脈硬化症を有するが、同時投薬を受けていない10人の被験者を、代謝症候群のリスク因子（インスリン耐性の指標としての、高インスリン血症を追加したN C E P定義）の無い、 $< 6.5 \text{ mmol/l}$ の全コレステロールを有する、臨床的心臓血管疾患の無い、準臨床的アテローム性動脈硬化症の無い（頸動脈または大腿動脈中に斑が存在）、そして投薬を受けていないし且つ臨床的に健康である、年齢・性別が対合した10人の健康対照と比較した（表1）。

【0038】

第二研究では、アテローム性動脈硬化症・インスリン耐性研究（Atherosclerosis and Insulin Resistance study）（A I R）において、74人の利用可能な患者より無作為に選択された21人の2型糖尿病患者を、N C E Pガイドラインおよびインスリン耐性の指標としての高インスリン血症の追加によって定義の代謝症候群のリスク因子の無い、年齢が対合した23人の健康対照と比較した（表2）。被験者は全て、3年追跡試験でのA I R研究より採用した。この研究は、以前にきわめて十分に記載された（Hulthe J, et al, Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology 2000;20:2140-2147; Sigurdardottir V, et al., Diabetes Care 2004;27(4):880-884）。参加者全員のL D L表現型を、以前に記載されたようなゲル勾配電気泳動によって確かめた（Hulthe J, et al, Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology 2000;20:2140-2147）。Sahlgrenska University 病院の倫理委員会が、それら研究を承認した。

【0039】

10

20

30

【表 1】

表1

	対照	表現型B	P 値	
ウェスト (cm)	87	97	0.029	
LDL (mmol/L)	3.81	3.55	>0.30	
HDL (mmol/L)	1.44	0.96	<0.001	10
Tg (mmol/L)	0.85	2.35	<0.001	
空腹時血糖	4.7	5.2	0.029	
血漿インスリン	29.0	74.5	0.007	
HsCRP	0.78	1.88	0.043	
頸動脈斑				
無し	10	0		20
小形	0	6		
中／大形	0	4		
大腿動脈斑				
無し	10	7		
小形	0	1		30
中／大形	0	2		

研究1における被験者である、10人の健康対照と、表現型Bおよび末梢アテローム性動脈硬化症を有する10人の患者の特徴。

【0040】

【表 2】

表2

	対照	表現型B	P値	
ウェスト (cm)			<0.001	
LDL (mmol/L)	3.57	3.40	>0.30	
HDL (mmol/L)	1.55	1.10	<0.001	10
Tg (mmol/L)	0.87	2.08	<0.001	
空腹時血糖	4.64	9.2	<0.001	
血漿インスリン	65.1	95.6	0.004	
HsCRP	0.78	1.88	0.043	
頸動脈斑				
無し	15	5		20
小形	0	6		
中/大形	3	8		
大腿動脈斑				
無し	18	11		
小形	1	0		30
中/大形	3	9		

研究2における被験者である、23人の健康対照と、2型糖尿病、表現型Bおよび末梢アテローム性動脈硬化症を有する21人の患者の特徴。

【0041】

実施例2

LDL画分

LDL密度サブクラスを、血清試料(1.0~1.35ml)から、以前に記載されたような(Hallberg C, et al., Journal of Lipid Research 1994;35:1-9)異なった量の酸化ジウテリウム(D₂O)で調製された、140mM NaCl、10mM Na₂-EDTA、10mM HEPESを含有するpH7.2緩衝液の予め形成された勾配中の超遠心分離によって単離した。勾配の上方置換によって画分を集めた。LDL画分の全タンパク質含有率は、DC Protein Assay(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)を製造者の指示にしたがって用いて、ウシ血清アルブミンを標準として決定した。アポBは、LDL画分において、濁度測定法により、抗ヒトアポB抗体(Dakopatts, Denmark)を用いて決定した。全コレステロールは、比色定量によって測定した(Roche Diagnostics, RmBH, Mannheim, Germany)。用いられた溶液および遠心分離後の勾配の密度は、重量測定によって決定した(Hallberg C, et al., Journal of Lipid Research 1994;35:1-9)。LDLサブ

クラスの直径は、勾配ゲル電気泳動により、本質的には、Krauss and Burke (Krauss RM, et al., Journal of Lipid Research 1982;23:97-104) によって記載のように評価した。

【0042】

B 表現型を有する被験者および健康対照からの血清の D_2O 緩衝液中の密度勾配分別プロファイルは、図 1 に示されている。アポ B プロファイルは、0.5 ml 画分を集めて得たが、しかしながら、プロテオーム分析には、引き続きの分析を処理しうる数の範囲内で維持するために、1.0 ml の画分を用いた。図 1 に示されるように、この手順での画分 4 は、研究 1 における全ての対照被験者からの最も豊富な LDL サブクラスである、1.030 ~ 1.040 ± 0.005 g/ml の密度を有する LDL を含有した。このような画分は、サイズ範囲が、Krauss (Krauss RM, Diabetes Care 2004;27(6):1496-1504) の LDL 2b ~ LDL 3a の範囲のそれにほぼ相当する。画分 5 は、Krauss (Krauss RM, Diabetes Care 2004;27(6):1496-1504) の LDL 3b ~ 4b の画分のサイズ範囲にほぼ相当する 1.040 ~ 1.060 ± 0.005 g/ml の密度を有する LDL を含有した (図 1)。この画分は、研究 1 で研究された B 表現型を有する 10 人の被験者の内の 8 人において、最も豊富なクラスであった。第二研究において、23 人の対照の内の 20 人は、画分 4 で最大値を示したが、21 人の 2 型糖尿病患者の内の 19 人は、画分 5 で最大値を示した。これら結果は、 D_2O 密度勾配が、ゲル電気泳動手順を用いた LDL 表現型分類と相関し、そして双方のタイプの患者において sdLDL の高い有病率を示すということを示している (Hulthe J, et al, Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology 2000;20:2140-2147)。

10

20

【0043】

実施例 3

LDL に結合したタンパク質の SELDI 分析

二つの研究において、全被験者からの 1.020 ~ 1.040 g/ml の密度の LDL 画分 4 と、1.040 ~ 1.060 g/ml の密度の画分 5 を、二つのタイプのタンパク質チップ表面上で分析した。50 mM 酢酸アンモニウム、pH 6.0 および 50 mM Tris-HCl、pH 9.0 をそれぞれ用いたカチオン (CM10) およびアニオン (Q10) タンパク質チップ。試料は全て、タンパク質チップアレイバイオプロセッサ (Ciphergen Biosystems) を使用するように変更された Biomek Laboratory ワークステーション (Beckman-Coulter) を用いて処理した。各 20 μ l の LDL 画分を、80 μ l の結合用緩衝液と混合し、その混合物をチップ表面に加え、30 分間インキュベートした。次に、それらスポットをそれぞれ、100 μ l の結合用緩衝液で 3 回 5 分間洗浄して、非特異的結合を減少させ、そして最後に、100 μ l の脱イオン水で 2 回洗浄した。シナピン酸 (sinapinic acid) (SPA) (Aldrich Chem Co, Milw, WI) および α -シアノ-4-OH-ケイ皮酸 (CHCA) (Bruker Daltonics, Germany) を含めた二つの異なったタイプのマトリックスを用いた。0.5% TFA を含有する 50% アセトニトリルを含む SPA (1:2 v/v に希釈される) または CHCA (1:5 v/v に希釈される) の飽和溶液を、各々の乾燥した試料スポットに 2 回加えて、結晶を形成させた。

30

40

【0044】

次に、それらアレイを、SELDI 分析用のタンパク質チップリーダーシステム (PB SII, Ciphergen Biosystems) で読み取った。そのリーダーは、SPA/CHCA マトリックス中で希釈された全て込みのタンパク質/ペプチド標準を用いて外部的に検量し、そして順相タンパク質チップ (NP-20 タンパク質チップアレイ) のスポット上に直接的に適用した。タンパク質プロファイル比較は、一つの実験で集められた全てのスペクトルの全イオン電流の規格化後に行った。有意性閾値は、 $p < 0.05$ に設定した。

【0045】

LDL サブクラスに結合したタンパク質を、SELDI により、Q10 (アニオン) および CM10 (カチオン) タンパク質チップアレイ上において、二重の実験について 14 ~ 24% の変動係数で分析した。図 2 は、研究 2 における患者および対照からの sdLDL

50

L の、S E L D I を用いた Q 1 0 タンパク質チップアレイ上の分析による 4 0 0 0 ~ 1 0 0 0 0 D a の分子量範囲の代表的なプロフィールを示す。患者からの s d L D L の 8 9 2 0 D a 、 9 4 2 0 D a 、 および 9 7 2 0 D a の質量を有するバンドについて、対照と比較して明らかに高い強度が認められた。これら三つのバンドは全て、1 - D ゲルおよび電気溶離 (electro elution) によって精製後、S E L D I 分析を行い、そして引き続き、M S / M S 分析により、それらの対合したペプチドイオンによってヒトアポ C I I I として識別した。それら 3 種類の多形の分子量の差は、それらが、異なった状態のシアリデーション (sialidation) を示すということを示唆する (Pullinger et al., 1997)。図 3 は、研究 2 による患者および対照の、S E L D I を用いた C M 1 0 タンパク質チップアレイ上で分析された 3 0 0 0 ~ 8 0 0 0 D a の分子量範囲のプロフィールを示す。6 4 2 0 D a および 6 6 2 0 D a にある二つのバンドは、患者の場合よりも対照の s d L D L において明らかに顕著であった。これら二つのバンドを、1 - D ゲル分析および電気溶離によって更に精製後、S E L D I を行い、そして次に、イムノプロットングによってアポ C I として識別した。アポ C I のそれら二つのバンドは、おそらくは、異なった状態のグリケーションを示す。更に、1 0 0 0 0 ~ 5 0 0 0 0 D a の質量範囲の S E L D I 分析は、二つの L D L サブクラス中のアポ A I およびアポ E の識別および評価を可能にした。アポ A 1 およびアポ E は、患者の場合と比較して、対照の s d L D L において最も顕著であった (データは示されていない)。

10

【 0 0 4 6 】

表 3 は、双方の研究におけるアポ B 1 0 0 含有率の補正後の、s d L D L (画分 5) 中で識別されたアポリポタンパク質の相対含有率を示している。患者からの s d L D L は、研究 1 における対合した対照からの同等の密度画分と比較した場合、アポ C I I I の三つのイソ型について有意に一層高い含有率を有する。もう一方において、それら患者は、その s d L D L クラス中のアポ C I 、アポ A I およびアポ E について、対照より有意に低い含有率を示した。研究 2 では、2 型糖尿病患者および対合した対照の L D L サブクラスも分析したが、その s d L D L は、対合した対照の密度画分よりも有意に多いアポ C I I I の 3 種類のイソ型と、アポ C I 、アポ A I およびアポ E の低い含有率を示した。

20

【 0 0 4 7 】

更に、それら対照では、s d L D L 中のアポ C I I I およびアポ C I の含有率が、浮遊性粒子の場合よりも有意に高かった (図 4)。患者では、更に、s d L D L は、浮遊性 L D L より高いアポ C I I I 含有率を有したが、アポ C I 含有率は高くなかった (図 4)。

30

【 0 0 4 8 】

【表 3】

表3 双方の研究におけるLDL表現型Bを有する患者および対合した対照の
s d LDL (F r 5) 中の交換可能なアポリポタンパク質。

アポリポタンパク質	研究1		研究2	
	対照 (n=10)	患者 (n=10)	対照 (n=23)	患者 (n=22)
CIII-1 (8920)	4.29±2.76	6.89±4.71***	3.48±1.54	6.40±2.43***
CIII-2 (9420)	7.30±5.16	11.84±6.14***	6.23±2.78	11.00±4.19***
CIII-3 (9720)	3.83±2.84	5.38±2.09***	3.36±1.22	5.28±1.87***
CI-1 (6430)	7.57±1.46	6.64±2.76*	7.24±3.09	4.30±2.79**
CI-2 (6630)	6.20±1.59	4.57±1.65*	11.33±5.66	6.95±4.64**
AI (28130)	0.40±0.44	0.29±0.26*	1.22±1.29	0.57±0.58**
E (33570)	0.85±0.59	0.42±0.35*	1.49±0.64	1.13±0.53*

値は、双方の研究による患者および対照における低分子稠密LDLのアポB100含有率によって補正された強度任意単位の平均±標準偏差である。括弧内の値は、Daでの分子量である。稠密LDLクラス画分(f r 5)と対照からの同じ画分との中のアポリポタンパク質含有率の差の統計的有意性レベル(p)は、t検定で評価した。

有意性レベル* p<0.05、** p<0.01、*** p<0.001。

【0049】

実施例4

示差的に発現されたタンパク質ピークの精製

B 表現型を有する被験者からの LDL 画分 5 のアリコートをつールし、真空遠心分離によって濃縮し、200 μ L の NuPAGE 試料緩衝液 (10% グリセロール、2% LDL、3% DTT を含有する、0.14 M トリス、0.10 M トリス-HCl、0.4 mM EDTA pH 8.5) 中に溶解させ、3 分間沸騰させた後、NuPAGE システム (Novex (プレキャストゲル), San Diego, CA, USA) により、4~12% Bis-Tris ゲル (1 ウェル) を用いて分離した。NuPAGE (2 - (N - モルホリノ) エタンスルホン酸) MES 緩衝系 (1 M MES、1 M トリス、69 mM SDS、20 mM EDTA) を、実験用緩衝液として用いた。小型全ゲルエルーター (mini whole gel eluter) (Bio-Rad) を、製造者の指示にしたがって電気溶離に用いた。溶離緩衝液 (25 mM ヒスチジン、30 mM 3 - (N - モルホリノ) プロパンスルホン酸 (MOPS)、pH 6.5) を用い、そして溶離は、100 mA で 30 分間行った。約 0.5 mL ずつの 14 個の画分を採取し、そして 250 μ L / 画分のアリコートを濃縮し、NuPAGE システムで分析後、引き続きの MS でのタンパク質バンド識別のために、SYPRO Ruby 染色を行った。残り部分のゲルエルーター画分を、氷冷エタノールと 1:4 v/v の比率で混合し、-20 で 2 時間沈殿させ、10000 x g で 4 において 10 分間遠心分離し、10 μ L の 25 mM NH_4HCO_3 中に溶解させた後、SELDI 分析による精製戦略を追跡するために、NP20 タンパク質チップアレイ上で分析した。

10

【0050】

実施例 5

LDL に結合したタンパク質 (アポ CIII、アポ AI、アポ E) の MS 分析

20

引き続きの MS 分析のために、1 - ゲル中で検出されたバンドをトリプシン処理し、前に記載されたように MS で分析した (Bjorhall K, Proteomics 2004;5(1):307-317)。簡単にいうと、それらゲル片を、連続してグレード変更されたトリプシン (Promega, Madison, WI, USA) で消化し、それらペプチドを、ギ酸およびアセトニトリルで抽出した。ペプチドイオンシグナルを MS 方式で増加させ且つ MS / MS 分析を可能にするために、脱塩および濃縮を、POROS 20 樹脂 (Perseptive Biosystems, Framingham, MA, USA) を製造者の指示にしたがって用いて行った。それらペプチドを、2 μ L の 70% ACN、0.1% TFA で、MALDI 100 位置標的プレート上に直接的に溶離した。それらスポットを乾燥させた後、1.25 μ L のマトリックス溶液 CHCA (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany、50% アセトニトリル、0.1% トリフルオロ酢酸および 0.2 mg/mL の最終濃度のクエン酸ジアンモニウムで 1:1 に希釈される) を適用した。次に、分析を、Applied Biosystem 4700 Proteomics Analyzer MALDI-TOF / TOF 質量分析計 (AB, Framingham, MA, USA) において反射器方式で行った。MS および MS / MS データ分析は、Mascot ペプチド質量フィンガープリントおよび MS / MS イオン探索ソフトウェア (Matrix sciences, London, UK) を利用する GPS Explorer™ Software (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA) を用いて行った。識別は、95% の信頼レベルで正とみなした。8920 Da、9420 Da および 9720 Da の質量を有するピークは、1 - D ゲルおよび電気溶離での精製および引き続きの MS / MS 分析のようなそれらの対合したペプチドイオンの識別後に、アポ CIII と識別した。精製手順の後、SELDI 分析を行った。28130 Da および 33570 Da にあるピークは、アポ CIII の場合のように記載された工程配列で、それぞれアポ A1 およびアポ E として識別した。

30

40

【0051】

実施例 6

アポ CI のイムノプロットング分析

SELDI によって分析された 6420 Da および 6620 Da それぞれにバンドを含有するエレクトロエルーター画分の 1 - D ゲル分析後、それらタンパク質を、半乾燥プロットング法を用いて、ゲルから PVDf メンブラン (Millipore, Bedford, MA, USA) 上に移した。そのメンブランを、アポ C1 に対する抗体 (Biosciences) と一緒にインキュベートし、1:2000 に希釈した (0.02 μ g/mL)。イムノプロットング手

50

順には、Western Breeze キット (Invitrogen) を用いた。それらバンドは、アポ C 1 免疫反応性を示した。

【 0 0 5 2 】

実施例 7

動脈血プロテオグリカンへの LDL の結合

プロテオグリカンへの血清 LDL の結合は、記載のように、ブタ大動脈内膜中間から微量修飾で単離された精製ベルシカン (versican) を用いて行った (Linden T, et al, Eur J Clin Invest 1989;19:38-44)。簡単にいうと、50 μ l の血清を、10 μ g/ml のヘキサロネートベルシカン、20 mM NaCl、10 mM CaCl_2 、2 mM MgCl_2 および 5 mM HEPES 緩衝液 pH 7.0 を含有する 1.0 ml の緩衝液 A に加えた。ベルシカン不含の緩衝液 A が入っているブランク試験管にも、血清を加えた。それら試験管を、4℃ で 1 時間インキュベートし、12000 \times g で 4℃ において 10 分間遠心分離し、そしてペレットを 1.0 ml の緩衝液 A で洗浄し、上澄みを捨てた。最終ペレットを、140 mM NaCl、5 mM Na_2EDTA および 10 mM Tris 塩基、pH 10.5 を含有する 100 μ l の緩衝液 B 中に溶解させた。その溶液のアリコートをし、プロテオグリカンによって血清から沈殿した LDL と会合した交換可能なアポリポタンパク質の SELDI 分析およびコレステロール決定に用いた。

10

【 0 0 5 3 】

記載のように行われた動脈血ベルシカンとの血清のインキュベーションは、主に LDL の沈殿を引き起こす (Linden T, et al, Eur J Clin Invest 1989;19:38-44)。アポ B 100 相違について補正された場合、研究 2 による患者血清のプロテオグリカンに結合した LDL コレステロール (PG-LDL) の量は、予想されるように、対照血清によるものより約 32% 高く、PG に結合したコレステロール / mg アポ B は、患者について $115 \pm 15 \mu\text{g}$ 対対照の 80.0 ± 9 、 $p < 0.05$ であった。更に、PG-LDL 複合体の SELDI 分析は、患者からの不溶化した LDL が、対照からの複合体よりもそれぞれ 57%、65% および 58% 多いアポ C III - 1、アポ C III - 2 およびアポ C III - 3 を含有し、例えば、アポ C III - 3 の任意の単位は、患者の 0.70 ± 0.38 対対照の 0.30 ± 0.10 、 $p < 0.001$ であった (図 5)。アポ C I およびアポ E それぞれのレベルは ($p < 0.05$)、患者と対照との間で有意に変化した。アポ A I のレベルには、統計的有意差が見出されなかった。これら知見に沿って、研究 2 における患者からの sd LDL の全アポ C III 含有率と、血清からの PG で複合体形成した LDL コレステロールの量との間には、有意の相関が見出された (図 6)。対照の sd LDL 中のアポ C III 含有率と、動脈血ベルシカンで不溶化した LDL コレステロールとの間には、有意の相関がなかった。

20

30

【 0 0 5 4 】

実施例 8

アポ B レベルについて調整された sd LDL に結合したタンパク質と、心臓血管リスク因子およびアテローム性動脈硬化症との間の関連

sd LDL 中の交換可能なアポリポタンパク質の相違についての仮説を証明した後の目的は、このタンパク質の組成が、心臓血管リスク因子、炎症および準臨床的アテローム性動脈硬化症に関連しているかどうかを調べることであった。統計学は全て、Windows 10.0 用の SPSS (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) を用いることによって分析した。それら結果を、数字 (%)、平均値および SD として示す。

40

【 0 0 5 5 】

アポ C - III は、伝統的リスク因子に、更には、血清中の炎症およびマトリックスメタロプロテイナーゼ - 9 のマーカーに一貫して且つ確実に関連していた。アポ A - I 並びにアポ E およびアポ C - I は、上述のマーカーへの逆関係を示した (表 4)。

【 0 0 5 6 】

アポ C III は、総頸動脈の内膜中間厚みに確実に関連していた ($r = 0.35$, $p = 0.02$)。アポ C I、アポ E およびアポ A 1 は、大腿動脈 (-0.34 , $p = 0.03$)

50

、頸動脈球 ($r = -0.43$, $p = 0.01$) および総頸動脈 ($r = -0.38$, $p = 0.01$) それぞれの平均 I M T に逆に関連していた。アポ C I I I / アポ C I の比率は、頸動脈球および大腿動脈 (それぞれ、 $r = 0.31$, $p = 0.049$; $r = 0.38$, $p = 0.02$) の I M T に有意に関連していた。更に、その比率も、総頸動脈の I M T に関連している傾向があった ($r = 0.29$, $p = 0.06$)。

【 0 0 5 7 】

【表 4】

表4 f r 5 中のアポBについて調整された低分子稠密LDLに結合したタンパク質（f r 5）と、Spearman's 相関係数で示される心臓血管危険因子との間の関係。

	アポC-III	アポA-I	アポE	アポC-I
アポC-III（血漿）	0.52	-0.31	-0.31	
アポA-I（血漿）		0.33	0.56	
SBP	0.58	-0.37		-0.31
WHR	0.57	-0.38		-0.42
fB-グルコース	0.38			
プロインスリン	0.57	-0.40		-0.44
トリグリセリド	0.71	-0.69	-0.39	-0.32
HDL	-0.47	0.63	0.58	0.31
LDL			-0.46	
OxLDL	0.43	-0.46	-0.48	
フィブリノーゲン				-0.40
CRP	0.52		-0.30	-0.39
IL-18	0.45			
MMP-9	0.32	-0.49	-0.33	-0.38

10

20

30

40

【0058】

実施例 9

s d L D L 中のアポ A I、アポ C I、アポ C I I I またはアポ E、および血漿中のアポ A - 1 およびアポ C - I I I の中央値による糖尿病を有するオッズ比

50

低分子稠密LDLに結合したタンパク質の濃度を、画分5中のアポBについて調整した。単一変量分析において、血漿中のアポA - IおよびアポC - III、並びに画分5中のアポCIII、アポA - IおよびアポC - Iは全て、糖尿病患者であるリスクに有意に関連していた（表5）。アポEは、糖尿病への統計的に有意の関連を示さなかった。アポC - IIIの血漿レベルも、LDLに結合したアポC - IIIレベルも、糖尿病を有するリスクに関連していたので、これら変数は双方とも、多重ロジスティック回帰分析に包含した。この分析の結果は、sdLDL中のアポC - IIIだけが、糖尿病の独立した予兆であったということを示した（表6）。同じ多変量ロジスティック回帰モデルにおいて糖尿病を有するリスクに単一変量で関連していたsdLDLに結合した全てのタンパク質を包含した場合、アポC - IIIおよびアポC - Iは（逆に）、糖尿病の独立した予兆であることが判明した（表7）。

【0059】

患者および対照の臨床的特徴についての追加の情報が全くなくても、中央値より上および下それぞれのsdLDLに結合したアポC - IIIは、患者の76%および対照の74%を、糖尿病を有するまたは有していないと正確に分類した。低および高アポC - Iについても、同様の数値を得た（データは示されていない）。

【0060】

【表5】

表5 高レベルおよび低レベル（それぞれ、中央値より上および下）を有する被験者における糖尿病を有する単一変量オッズ比。低分子稠密LDLに会合したタンパク質（fr5）の値は、fr5中のアポBについて調整される。

	オッズ比	P-値
アポCIII 血漿	3.8	0.038
アポCIII fr 5	9.0	0.002
アポAI 血漿	0.16	0.009
アポAI fr 5	0.27	0.038
アポE fr 5	0.40	0.135
アポCI fr 5	0.11	0.002

【0061】

【表6】

表6 血漿中および低分子稠密LDL上のアポCIIIの高いおよび低い（それぞれ、中央値より上および下の）値を有する被験者における糖尿病を有する多変量オッズ比。低分子稠密LDLに会合したアポC - III（fr5）の値は、fr5中のアポBについて調整される。

	オッズ比	P-値
アポCIII 血漿	2.2	0.270
アポCIII fr 5	7.3	0.006

10

20

30

40

50

【 0 0 6 2 】

【 表 7 】

表7 低分子稠密LDLに会合したタンパク質の高いおよび低い（それぞれ、中央値より上および下の）値を有する被験者における糖尿病を有する多変量オッズ比。低分子稠密LDLに会合したタンパク質（f r 5）の値は、f r 5中のアポBについて調整される。

	オッズ比	P-値
アポCIII fr 5	10.4	0.009
アポAI fr 5	0.772	>0.300
アポC1 fr 5	0.09	0.008
アポE fr 5	0.603	>0.300

10

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 6 3 】

【 図 1 】 図 1。D₂OおよびH₂Oの混合物中に140 mM NaClを含有する、予め形成された勾配の緩衝液中で分離された血清LDLのアポB 100プロフィール。プロフィールAは、健康な対照被験者による。プロフィールBは、2型糖尿病およびLDL B表現型を有する患者による。

20

【 図 2 】 図 2。Q10タンパク質チップアレイで分析された（研究2）、23人の対照の内の10人および22人の糖尿病患者の内の10人からのsdLDLのSELDI-TOF-MSタンパク質プロフィール。

【 図 3 】 図 3。CM10タンパク質チップアレイで分析された（研究2）、23人の対照の内の10人および22人の糖尿病患者の内の10人からのsdLDLのSELDI-TOF-MSタンパク質プロフィール。

【 図 4 a 】 図 4 a。対照（被験者1～23）および患者（被験者24～45）における、（Fr 5）sdLDL粒子と比較した浮遊性（Fr 4）のa / アポCIII / アポBの個々の値。

30

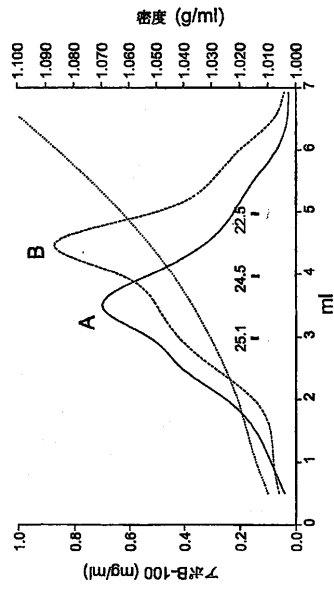
【 図 4 b 】 図 4 b。対照（被験者1～23）および患者（被験者24～45）における、（Fr 5）sdLDL粒子と比較した浮遊性（Fr 4）のb / アポCI / アポBの個々の値。

【 図 5 】 図 5。Q10タンパク質チップアレイで分析された（研究2）、23人の対照の内の1人および22人の糖尿病患者の内の1人からの、ジュウテリウム分別後のsdLDL上およびPG-LDL複合体上それぞれのSELDI-TOF-MSタンパク質プロフィールの比較。8920 Da、9420 Daおよび9720 Daの分子質量を有する三つのバンドは、それぞれ、対照と比較して患者のsdLDLにおいて増加し（p < 0.001）、更には、対照の場合よりも患者のPG-LDL複合体において増加した（p < 0.001）。

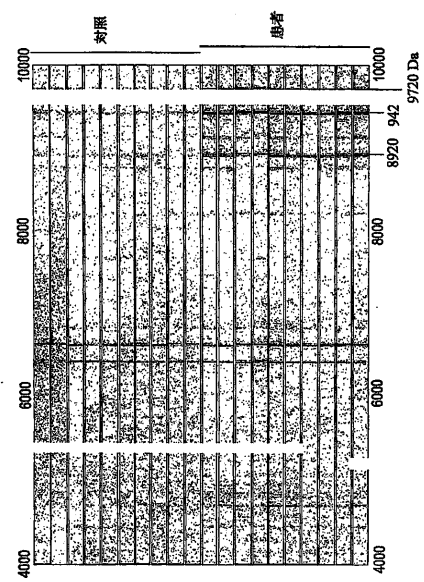
40

【 図 6 】 図 6。2型糖尿病患者のsdLDL中の全アポCIII含有率と、in vitroの大動脈 versican との会合によって不溶化したLDLコレステロールの量との相関。

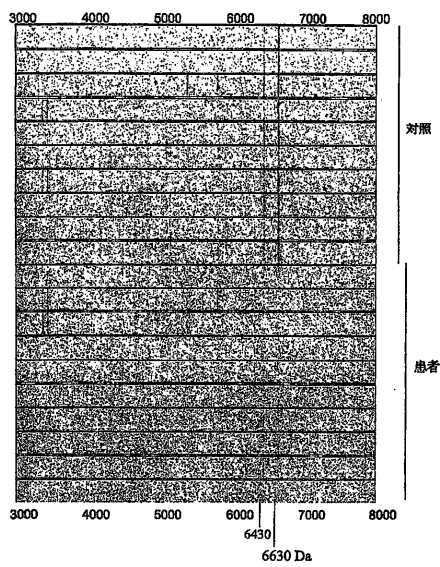
【図 1】



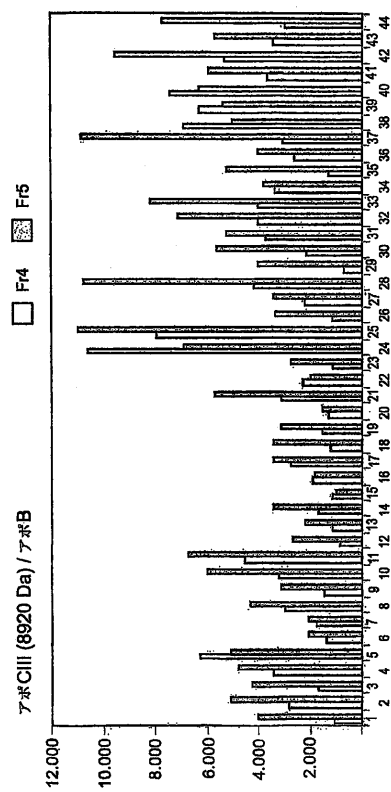
【図 2】



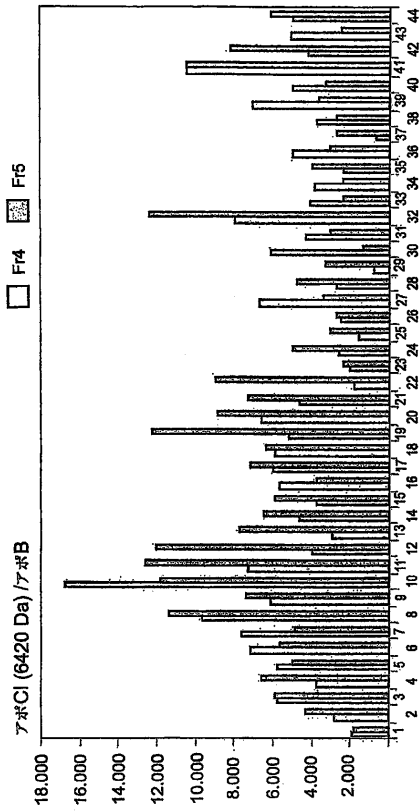
【図 3】



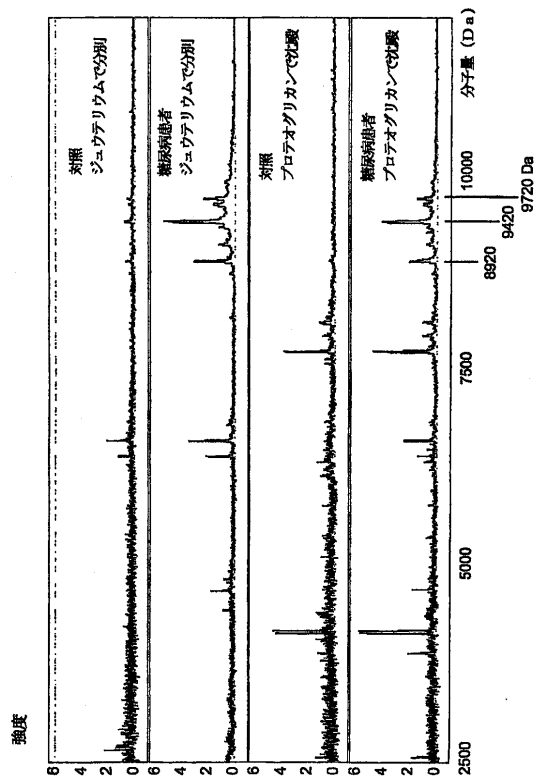
【図 4 a】



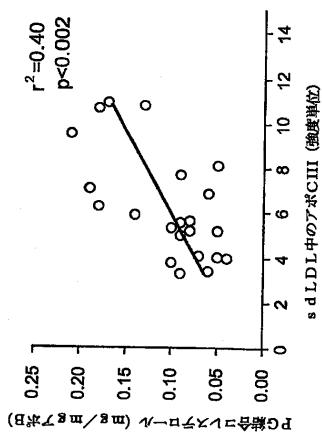
【図 4 b】



【図 5】



【図 6】



【 国際調査報告 】

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 101719-1 SE	FOR FURTHER ACTION <small>see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.</small>	
International application No. PCT/SE2006/000425	International filing date (day/month/year) 10 April 2006	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 11 April 2005
Applicant AstraZeneca AB et al		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 5 sheets.

☐ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed
☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ Certain claims were found unsearchable (see Box No. II)

3. ☐ Unity of invention is lacking (see Box No. III)

4. With regard to the title,

- ☐ the text is approved as submitted by the applicant.
☒ the text has been established by this Authority to read as follows:

A method and a kit for diagnosing type 2 diabetes, metabolic syndrome, sub clinical atherosclerosis, myocardial infarct, stroke or clinical manifestations of diabetes.

5. With regard to the abstract,

- ☐ the text is approved as submitted by the applicant.
☒ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. With regard to the drawings,

- a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. _____
☐ as suggested by the applicant.
☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.
☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.
b. ☒ none of the figures is to be published with the abstract.

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/SE2006/000425

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC: see extra sheet

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)

IPC: G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

SE,DK,FI,NO classes as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-INTERNAL, WPI DATA, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CHEM. ABS DATA

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	EP 1571452 A1 (DENKA SEIKEN CO., LTD.), 7 Sept 2005 (07.09.2005), claim 14, paragraph 0016 --	1-2,23
X	DATABASE WPI Week 200559 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN-2004-517271 & EP 1571452 A1 (DENKA SEIKEN KK), 7 September 2005 (2005-09-07) abstract, see also paragraph 0016 and claim 14 in EP1571452	1-2,23
Y	--	3-22

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ 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

"B" 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 another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 July 2006

Date of mailing of the international search report

11-07-2006

Name and mailing address of the ISA/

Swedish Patent Office

Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM

Facsimile No. +46 8 666 02 86

Authorized officer

Carolina Palmcrantz/Els

Telephone No. +46 8 782 23 00

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/SE2006/000425

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>GEORGIEVA, A.M. ET AL, "Subclasses of Low-Density Lipoprotein and Very Low-Density Lipoprotein in Familial Combined Hyperlipidemia: Relationship to Multiple Lipoprotein Phenotype", Arterioscler Thromb Vasc Biol., 2004, vol. 24, page 744 - page 749, page 744, right column; page 745, left column, first paragraph, lines 2-5 from below; page 745, right column, last line - page 746, left column, first line; page 748, right column, lines</p> <p>---</p>	3-22
X	<p>BISHAMBAR DAYAL et al, "ProteinChip Technology: A New and Facile Method for the identification and Measurement of High-Density Lipoproteins apoA-I and apoAII and Their Glycosylated Products in Patients with Diabetes and Cardiovascular Disease" Journal of Proteome Research, 2002, vol. 1, pages 375-380</p> <p>---</p>	20-22
A	<p>WO 02098919 A (GENFIT), 12 December 2002 (12.12.2002), claim 10</p> <p>---</p>	1-23
A	<p>SUNG-JOON LEE et al, "LDL Containing Apolipoprotein CIII Is an Independent Risk Factor for Coronary Events in Diabetic Patients", Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2003, vol. 23, pages 853-858</p> <p>---</p>	1-23
A	<p>KRAUSS, RONALD M. ET AL, "Dense Low Density Lipoproteins and Coronary Artery Disease", Am J Cardiol, 1995, vol. 75, page 53B - page 57B, page 55B, left column, second paragraph</p> <p>---</p>	21,23
A	<p>PACKARD, C.J., "LDL subfractions and atherogenicity: an hypothesis from the University of Glasgow", Current Medical Research and Opinion, 1996, vol. 13, no. 7, page 379 - page 390, page 380, "LDL size and coronary risk"</p> <p>---</p>	1-23

3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/SE2006/000425

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 6753185 B2 (RONALD D. MACFARLANE ET AL), 22 June 2004 (22.06.2004), page 2, lines 40-48, 65; examples 5 and 6 --	1-23
A	WO 0164008 A2 (SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S.A.), 7 Sept 2001 (07.09.2001), page 3, line 15 - line 18 ---	1-23
A	DATABASE WPI Week 200345 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 2003-473139 & JP 20 03028882 A (EIKEN KAGAKU KK), 29 January 2003 (2003-01-29) abstract -----	1-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
 Information on patent family members

04/03/2006

International application No.

PCT/SE2006/000425

EP	1571452	A1	07/09/2005	AU	2003289224	A	30/06/2004
				CA	2508674	A	24/06/2004
				CN	1745303	A	08/03/2006
				WO	2004053500	A	24/06/2004
WO	02098919	A	12/12/2002	CA	2449393	A	12/12/2002
				EP	1392732	A	03/03/2004
				JP	2005502029	T	20/01/2005
				US	20040137521	A	15/07/2004
US	6753185	B2	22/06/2004	US	20030087310	A	08/05/2003
				US	20040171078	A	02/09/2004
				WO	03029829	A	10/04/2003
WO	0164008	A2	07/09/2001	AU	4649301	A	12/09/2001
				BR	0108924	A	29/04/2003
				CA	2401755	A	07/09/2001
				CN	1418106	A,T	14/05/2003
				CZ	20022971	A	12/02/2003
				DE	60103137	D,T	25/05/2005
				EP	1267908	A	02/01/2003
				ES	2219517	T	01/12/2004
				GB	0005240	D	00/00/0000
				HU	0300099	A	28/05/2003
				IL	151355	D	00/00/0000
				JP	2003525883	T	02/09/2003
				MX	PA02008616	A	24/02/2003
				NO	20024172	A	01/11/2002
				PL	365424	A	10/01/2005
				US	20030165503	A	04/09/2003
				ZA	200207001	A	01/12/2003
				GB	0022005	D	00/00/0000

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, 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, KR, 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, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. WINDOWS

(72)発明者 カメジヨ, ゲルマン
スウェーデン国エス - 4 3 1 8 3 メルンダル, アストラゼネカ・アール・アンド・ディー・メルンダル

(72)発明者 ダヴィッドソン, ピア
スウェーデン国エス - 4 3 1 8 3 メルンダル, アストラゼネカ・アール・アンド・ディー・メルンダル

(72)発明者 ハルゼ, ヨハネス
スウェーデン国エス - 4 3 1 8 3 メルンダル, アストラゼネカ・アール・アンド・ディー・メルンダル

Fターム(参考) 2G041 DA04

2G045 AA25 CA25 DA36 DA62 FA36