(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104198735 B
(45)授权公告日 2018.01.30

(21)申请号 201410442798.5
(22)申请日 2007.11.08
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104198735 A
(43)申请公布日 2014.12.10
(30)优先权数据
102006052916.2 2006.11.08 DE
(62)分案原申请数据
200780041709.4 2007.11.08
(73)专利权人 布拉姆斯有限公司
地址 德国亨宁斯多夫
(72)发明人 A·博格曼 N·莫根塔勒
J·帕帕索提里奥 J·斯塔克
(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 11038
代理人 韩威威
(51)Int.Cl.
G01N 33/68(2006.01)
G01N 33/74(2006.01)
审查员 赵晓明

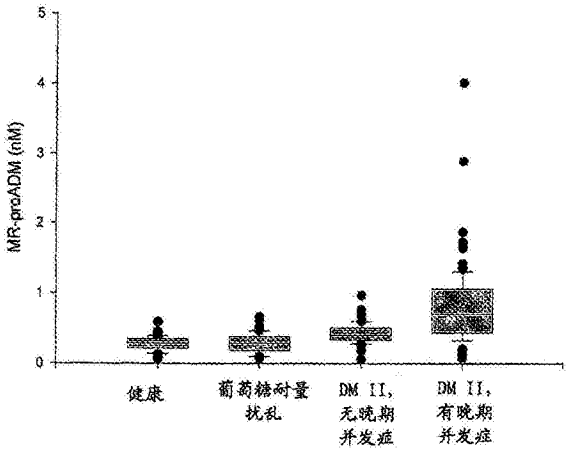
权利要求书1页 说明书5页
序列表2页 附图2页

(54)发明名称

使用MR-proADM的糖尿病诊断和风险分级

(57)摘要

本发明涉及使用MR-proADM的糖尿病诊断和风险分级。具体而言，本发明涉及糖尿病，特别是糖尿病继发病的诊断和/或风险分级方法，其中在待研究的患者中进行标志物中央区肾上腺髓质素原(MR-proADM:SEQ ID No.2)或其部分肽或片段的测定，或如果其包含在标志物组合(标志物组，标志物簇)中进行测定。此外，本发明涉及用于进行所述方法的诊断设备和试剂盒。



CN 104198735 B

1.用于测定SEQ ID No.2所示的中央区肾上腺髓质素原的检测试剂的用途，所述用途为用于制备用于在待研究的患者中进行II型糖尿病继发病的体外诊断的诊断剂。

2.根据权利要求1的用途，其特征在于：所述继发病选自内皮功能障碍、高脂蛋白血症、高血压性循环调节障碍、糖尿病性视网膜病、肾病、神经病、糖尿病性足部综合征和心血管并发症。

3.根据权利要求1的用途，其特征在于：在待研究的患者中，另外还对选自炎性标志物、血管标志物和/或糖尿病标志物/因子的至少一种其它标志物进行测定，其中所述血管标志物选自下列至少一种标志物：肌酸激酶，髓过氧化物酶，肌红蛋白，利尿钠蛋白，或调节循环的激素或激素原。

4.根据权利要求3的用途，其特征在于：利尿钠蛋白为ANP或ANF、proANP、NT-proANP、BNP、proBNP、或NT-proBNP。

5.根据权利要求2的用途，其特征在于：所述肾病是肾功能不全。

6.根据权利要求3的用途，其特征在于：所述炎性标志物选自下列至少一种标志物：C-反应蛋白，细胞因子，降钙素原1-116或降钙素原3-116，血管紧张素II，内皮素-1。

7.根据权利要求6的用途，其特征在于：所述细胞因子是TNF-α或白细胞介素。

8.根据权利要求7的用途，其特征在于：所述白细胞介素是IL-6或白细胞介素-1β。

9.根据权利要求3的用途，其特征在于：所述调节循环的激素或激素原是胃泌素释放肽原、内皮素-1原、瘦蛋白原、神经肽-Y原、生长抑素原、神经肽-YY原、阿黑皮素原。

10.根据权利要求3的用途，其特征在于：进行所述标志物的平行或同时测定。

11.根据权利要求10的用途，其特征在于：所述测定在至少一个患者样品上进行。

12.根据权利要求10的用途，其特征在于：所述测定在自动分析设备上来进行。

13.根据权利要求10的用途，其特征在于：所述测定通过快速测试来进行。

14.根据权利要求13的用途，其特征在于：所述测定以单参数或多参数测定来进行。

15.根据权利要求1的用途，其特征在于：所述II型糖尿病继发病的体外诊断的实施用于对II型糖尿病继发病进行预后、预防、鉴别诊断性发现、严重程度评估、和伴随治疗的进程评估。

16.根据权利要求15的用途，其中所述鉴别诊断性发现为鉴别诊断性早期发现。

使用MR-proADM的糖尿病诊断和风险分级

[0001] 本申请为申请号为200780041709.4、申请日为2007年11月8日、发明名称为“使用MR-proADM的糖尿病诊断和风险分级”的发明专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及糖尿病，特别是糖尿病继发病的诊断和/或风险分级方法，其中在待研究的患者中进行标志物中央区肾上腺髓质素原(midregional proadrenomedullin，MR-proADM:SEQ ID No.2)或其部分肽或片段的测定，或包含在标志物组合(标志物组，标志物簇)中进行测定。此外，本发明涉及用于进行所述方法的诊断设备和试剂盒。

背景技术

[0003] 糖尿病的诊断以肾上腺髓质素而众所周知(Garcia-Unzueta MT,Montalban C,Pesquera C,Berrazueta JR,Amado JA.Plasma adrenomedullin levels in type 1diabetes.Relationship with clinical parameters.Diabetes Care.21:999-1003,1998和Turk HM,Buyukberber S,Sevinc A,Ak G,Ates M,Sari R,Savli H,Cigli A.Relationship between plasma adrenomedullin levels and metabolic control,risk factors,and diabetic microangiopathy in patients with type2diabetes.Diabetes Care 23:864-7,2000)。然而，它的缺点在于由于肾上腺髓质素缺乏稳定性，以及其在血浆中短暂的寿命(Lewis LK,Smith MW,Yandle TG,Richards AM,Nicholls MG.Adrenomedullin(1-52)measured in human plasma by radioimmunoassay:plasma concentration,adsorption,and storage.Clin Chem.44:571-7,1998)，无法进行可靠的诊断。但是，需要提供糖尿病可靠的诊断，或进行(风险)分级，特别是关于进一步的临床决策，和特别是关于糖尿病或糖尿病继发病的严重程度。

[0004] 此外，在诊断中进行肾上腺髓质素原(proADM)检测在本领域中被描述(EP0622458B1)，特别是关于脓毒症的研究(EP1121600B1)。而且，肾上腺髓质素原的另一片段，即，被称为中央区肾上腺髓质素原(MR-proADM:SEQ ID No.2，也是SEQ ID No.1中preproADM的氨基酸45-92(图1))，在EP1488209B1中被公开用于诊断目的。然而，中央区肾上腺髓质素原(MR-proADM:SEQ ID No.2)对糖尿病诊断的适合性没有被公开。

发明内容

[0005] 本发明的任务是得到用于糖尿病，特别是糖尿病继发病的诊断和/或风险分级的改进方法。

[0006] 该任务通过用于糖尿病体外诊断和/或风险分级的方法的手段完成，其中在待研究的患者中进行标志物中央区肾上腺髓质素原(MR-proADM:SEQ ID No.2)或其部分肽或片段的测定，或其包含在标志物组合(标志物组，标志物簇)中进行测定(下文称为依据本发明的方法)。

[0007] 依据本发明，术语“风险分级(risk stratification)”，包含发现糖尿病患者，特

别是预后较差的具有糖尿病继发病的那些患者，用于糖尿病(继发病)的深入诊断和疗法/处理目的，其目标是使糖尿病的病程尽可能地有利。

[0008] 由于这个原因，特别有利的是，可靠的诊断和/或风险分级可以通过依据本发明方法的方式进行。依据本发明的方法允许得到更迅速诊断的临床决策，特别是对于糖尿病继发病。这样的临床决策也包括使用药物进一步治疗，用于糖尿病的处理或治疗。

[0009] 在依据本发明方法的另一优选实施方式中，进行所述诊断和/或风险分级，以用于对糖尿病进行预后、预防、鉴别诊断性早期发现和发现、严重程度评估、和伴随治疗的进程评估。

[0010] 在依据本发明方法的另一优选实施方式中，体液样品，特别是血液，任选全血、血清或可用血浆，从待研究患者收集，并且诊断在体外/离体(ex vivo)进行，即在人或动物体外。诊断和/或风险分级可以在下列测定基础上进行：标志物中央区肾上腺髓质素原(MR-proADM:SEQ ID No.2)或其部分肽或片段，及其存在的量，或与参考值相比量的变化，所述测定在至少一个患者的样品中进行。

[0011] 在本发明的范围内，术语“糖尿病”，特别是II型糖尿病(胰岛素抵抗)，被理解为指代慢性代谢疾病，其中胰岛素在胰腺胰岛β细胞中的产生被打乱，或胰岛素存在但不能在其靶位点——细胞膜——正确地发挥作用。这种扰乱的胰岛素产生和作用的结果是升高的血糖值(高血糖)。在糖尿病进程中，在前驱糖尿病和实际明显的糖尿病之间作出区分，在前驱糖尿病中，“葡萄糖耐量扰乱(disturbed)”——其可通过实验室化学方法检测——仅发生在末期。胰岛素抵抗发生在前驱糖尿病病程的开始。几乎同时，内皮功能障碍已经发生，伴随心血管系统的高脂蛋白血症和高血压。这种风险集合的结果是血管壁进一步动脉粥样硬化改变(微管血管病变和大血管病变)，以及作为微循环问题结果的血管并发症。其它继发病和伴随疾病是糖尿病性视网膜病直至失明，以及肾病直至肾机能不全，神经病，糖尿病性足部综合征，和心血管并发症。

[0012] 由于这种原因，本发明涉及II型糖尿病，及其继发病和并发病，特别是内皮功能障碍、高脂蛋白血症、高血压性循环调节障碍、糖尿病性视网膜病、肾病、肾机能不全、神经病、糖尿病性足部综合征和心血管并发症的诊断和/或风险分级。

[0013] 所有前述适应症都在例如Pschyrembel,De Gruyter,Berlin 2004中进一步描述。

[0014] 在本发明的范围内，“中央区肾上腺髓质素原(MR-proADM:SEQ ID No.2)”被理解为人类蛋白或多肽，其具有：具有前肾上腺髓质素原SEQ ID No.1(图1)(Kitamura K,Sakata J,Kangawa K,Kojima M,Matsuo H,Eto T.Cloning and characterization of cDNA encoding a precursor for human adrenomedullin.Biochem Biophys Res Commun 1993:194:720-725)的氨基酸序列45-92(45位是Glu,92位是Val)，和/或具有SEQ ID No.2(图2)的氨基酸序列1-48。肾上腺髓质素原的这一片段被称为“中央区肾上腺髓质素原(MR-proADM)”(EP1488209B1)，并且显示出强的血浆稳定性，这是特别有利的。

[0015] 此外，“中央区肾上腺髓质素原”依据本发明可以显示出修饰，如糖基化、脂化或衍生化。

[0016] 在另一实施方式中，中央区肾上腺髓质素原(MR-proADM:SEQ ID No.2)的测定可以另外连同其它标志物一起进行，其中中央区肾上腺髓质素原(MR-proADM:SEQ ID No.2)被包含在标志物组合(标志物组，标志物簇)中，特别优选已经表明糖尿病的那些标志物。在

另一特定的实施方式中，这也可以是血管标志物，其能够表明伴随糖尿病的心血管系统内皮功能障碍。

[0017] 为此，本发明涉及依据本发明方法的实施方式，其中在待研究患者中，另外还连同选自炎性标志物、血管标志物的至少一种其它标志物一起进行所述测定。

[0018] 依据本发明，炎性标志物可以选自下列至少一种标志物：C-反应蛋白(CRP)，细胞因子例如TNF-α，白细胞介素，例如IL-6、白细胞介素-1β，降钙素原(1-116，3-116)，血管紧张素II，内皮素-1，和粘附分子如VCAM或ICAM，并且血管标志物可以选自下列至少一种标志物：肌酸激酶，髓过氧化物酶，肌红蛋白，利尿钠蛋白(natriuretic protein)，特别是ANP(或ANF)、proANP、NT-proANP、BNP、proBNP、NT-proBNP或在每一情况下其部分序列，CRP。此外，该术语也被理解为指代调节循环的激素(原)，特别是例如胃泌素释放肽原(proGRP)、内皮素-1原、瘦蛋白原、神经肽-Y原、生长抑素原、神经肽-YY原、阿黑皮素原或它们各自的部分序列。

[0019] 在另一种实施方式中，至少一种糖尿病标志物/因子可以被额外地测定。根据本发明，糖尿病标志物/因子特别是诸如脂连蛋白，碳水化合物，脂肪，如胆固醇(LDH)和其它，体重指数(BMI)，年龄，血压，HOMA-IR(稳态模型评估-胰岛素抵抗指数，其检测参见：Matthews DR,Hosker JP,Rudenski AS,Naylor BA,Treacher DF,Turner RC,Homeostasis Model Assessment:Insulin Resistance and B-cell Function from Fasting Plasma Glucose and Insulin Concentrations in Man.Diabetologia 28:412-419.1985)的那些。

[0020] 在本发明的另一实施方式中，依据本发明的方法可以通过标志物的平行测定或同时测定(如，有96孔或更多孔的多重滴定板)的方式进行，其中所述测定在至少一个患者样品上进行。

[0021] 此外，依据本发明的方法及其测定可以在自动分析设备上，特别是借助于Kryptor(http://www.kryptor.net/)来进行。

[0022] 在另一实施方式中，依据本发明的方法及其测定可以通过快速测试(如横向流动测试)来进行，不论是使用单参数或多参数测定。

[0023] 此外，本发明涉及中央区肾上腺髓质素原(MR-proADM:SEQ ID No.2)或其部分肽或片段，或其包含在标志物组合(标志物组，标志物簇)中的用途，用于糖尿病特别是II型糖尿病、及其继发病和并发病的体外诊断和/或风险分级，并且，特别地，将前述实施方式纳入考虑。如果必要，所述标志物组合可以含有另一种合适的标志物。

[0024] 另一任务是得到相应的诊断设备，或应用这种设备进行依据本发明的方法。

[0025] 在本发明的范围内，这样的诊断设备特别地被理解为阵列或测试(如免疫测试、ELISA等)，在最宽泛的意义中，是用于实施依据本发明方法的设备。

[0026] 本发明进一步涉及用于糖尿病特别是II型糖尿病、及其继发病和并发病的体外诊断或风险分级的试剂盒，或这种试剂盒的应用，其中，在待研究的患者中进行中央区肾上腺髓质素原(MR-proADM:SEQ ID No.2)或其部分肽或片段的测定，或包含在标志物组合(标志物组，标志物簇)中的测定，特别地将前述实施方式纳入考虑。例如，这样的检测试剂包括抗体等。

[0027] 以下实施例和附图用于更详细地解释本发明，而非将本发明限制于这些实施例和附图。

附图说明：

[0028] 图1示出带有相关部分序列的preproADM的SEQ ID No.1。

[0029] 图2示出MR-proADM的SEQ ID No.2。

[0030] 图3示出健康受试者，葡萄糖耐量扰乱的患者、没有晚期并发症(SK)(同义词：继发病)的II型糖尿病(DM II)患者、和具有晚期并发症(同义词：继发病)的DM II患者中的MR-proADM。

实施例：

[0031] 实施例1

[0032] MR-proADM测试依据Morgenthaler等人(Morgenthaler NG,Struck J,Alonso C,Bergmann A.Measurement of midregional proadrenomedullin in plasma with an immunoluminometric assay.Clin Chem.20050ct;51(10):1823-9)所述进行。

[0033] 在葡萄糖耐量未扰乱的100位健康受试者、葡萄糖耐量已扰乱的60位患者和患有明显II型糖尿病(简写为“DM II”)的200位患者中检测MR-proADM。这200位患者被分为未患任何继发病的100名糖尿病患者，和已经患有诸如糖尿病肾病和糖尿病性视网膜病的继发病的100名糖尿病患者。

[0034] 图3显示。随着DM II的严重程度增加，MR-proADM值显著升高。两组DM II患者尤其与健康对照和葡萄糖耐量扰乱的患者不同。令人吃惊地，最高MR-proADM值在已显示糖尿病继发病的DM II患者中被发现。

[0035] 表1不仅示出MR-proADM，也示出在每种情况下各组中与糖尿病相关的参数，如葡萄糖和HbA1c。

[0036] 表1.(晚期并发症(SK)(同义词：继发病))

[0037]

	健康的 (n=100)	葡萄糖耐量扰乱(n=60)	无 SK 的 DM II (n=100)	有 DK 的 DM II (n=100)	*p* 值 (趋势)
性别 (% 男性)	50	32	58	55	0.007
年龄 (岁)	40 (14)	44 (11)	58 (10)	61 (10)	<0.001
患病时间 (年)	-	-	16 (7)	17 (9)	0.55
体重指数 (kg/m^2)	22.9 (3.7)	24.1 (4.2)	25.8 (4.2)	26.1 (4.5)	<0.001
收缩压 (mmHg)	121 (14)	126 (22)	136 (17)	147 (21)	<0.001
舒张压 (mmHg)	77 (8)	78 (12)	81 (8)	81 (11)	0.02
空腹血糖 (mmol/L)	4.9 (0.3)	5.9 (0.4)	7.0 (1.2)	8.5 (3.5)	<0.001
HBA1c (%)	-	-	7.8 (1.3)	8.1 (1.6)	0.07
中央区肾上腺髓质素原 (mmol/L)	0.27 (0.09)	0.29 (0.13)	0.42 (0.13)	0.81 (0.54)	<0.001

[0038] 已经存在的受限微循环与MR-proADM值之间的关系也通过患有DM II的50名患者的MR-proADM值和测定为静止前臂皮肤微循环灌流的循环流之间的显著相关性(r＝0.43,P

＝0.002)显示。(RCMP:A Enrique Caballero,Rola Saouaf,Subodh Arora,Su C Lim, Frank W LoGerfo,Edward S Horton,Aristidis Veves.Reactivity of the micro-and macro-circulation is impaired in those at risk for type 2diabetes.Diabetes 48:1856-1862,1999)。

序列表

<110> Brahms Aktiengesellschaft

<120> 使用MR-proADM的糖尿病诊断和风险分级

<130> BRAHMS 0029WO 06/11

<140> PCT/DE2007 not yet known
<141> 2007-11-08

<160> 2

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 185
<212> PRT
<213> 人

<400> 1

Met Lys Leu Val Ser Val Ala Leu Met Tyr Leu Gly Ser Leu Ala Phe
1 5 10 15

Leu Gly Ala Asp Thr Ala Arg Leu Asp Val Ala Ser Glu Phe Arg Lys
20 25 30

Lys Trp Asn Lys Trp Ala Leu Ser Arg Gly Lys Arg Glu Leu Arg Met
35 40 45

Ser Ser Ser Tyr Pro Thr Gly Leu Ala Asp Val Lys Ala Gly Pro Ala
50 55 60

[0001]

Gln Thr Leu Ile Arg Pro Gln Asp Met Lys Gly Ala Ser Arg Ser Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ser Ser Pro Asp Ala Ala Arg Ile Arg Val Lys Arg Tyr Arg
85 90 95

Gln Ser Met Asn Asn Phe Gln Gly Leu Arg Ser Phe Gly Cys Arg Phe
100 105 110

Gly Thr Cys Thr Val Gln Lys Leu Ala His Gln Ile Tyr Gln Phe Thr
115 120 125

Asp Lys Asp Lys Asp Asn Val Ala Pro Arg Ser Lys Ile Ser Pro Gln
130 135 140

Gly Tyr Gly Arg Arg Arg Arg Arg Ser Leu Pro Glu Ala Gly Pro Gly
145 150 155 160

Arg Thr Leu Val Ser Ser Lys Pro Gln Ala His Gly Ala Pro Ala Pro
165 170 175

Pro Ser Gly Ser Ala Pro His Phe Leu
180 185

<210> 2
<211> 47
<212> PRT
<213> 人

<400> 2

Glu Leu Arg Met Ser Ser Ser Tyr Pro Thr Gly Leu Ala Asp Val Lys
1 5 10 15

[0002]

Ala Gly Pro Ala Gln Thr Leu Ile Arg Pro Gln Asp Met Lys Gly Ala
20 25 30

Ser Arg Ser Pro Glu Asp Ser Ser Pro Asp Ala Ala Arg Ile Arg
35 40 45

SEQ ID No. 1:

```
Met Lys Leu Val Ser Val Ala Leu Met Tyr Leu Gly Ser Leu Ala Phe
1               5                  10                  15

Leu Gly Ala Asp Thr Ala Arg Leu Asp Val Ala Ser Glu Phe Arg Lys
            20                  25                  30

Lys Trp Asn Lys Trp Ala Leu Ser Arg Gly Lys Arg Glu Leu Arg Met
        35                  40                  45

Ser Ser Ser Tyr Pro Thr Gly Leu Ala Asp Val Lys Ala Gly Pro Ala
    50                  55                  60

Gln Thr Leu Ile Arg Pro Gln Asp Met Lys Gly Ala Ser Arg Ser Pro
65                  70                  75                  80

Glu Asp Ser Ser Pro Asp Ala Ala Arg Ile Arg Val Lys Arg Tyr Arg
                85                  90                  95

Gln Ser Met Asn Asn Phe Gln Gly Leu Arg Ser Phe Gly Cys Arg Phe
            100                 105                 110

Gly Thr Cys Thr Val Gln Lys Leu Ala His Gln Ile Tyr Gln Phe Thr
        115                 120                 125

Asp Lys Asp Lys Asp Asn Val Ala Pro Arg Ser Lys Ile Ser Pro Gln
    130                 135                 140

Gly Tyr Gly Arg Arg Arg Arg Arg Ser Leu Pro Glu Ala Gly Pro Gly
145                 150                 155                 160

Arg Thr Leu Val Ser Ser Lys Pro Gln Ala His Gly Ala Pro Ala Pro
                165                 170                 175

Pro Ser Gly Ser Ala Pro His Phe Leu
            180                 185
```

1-185 preproADM (185 AS)

22-185 proADM (164 AS)

95-146 ADM (52 AS)

图1

SEQ ID No. 2

```
Glu Leu Arg Met Ser Ser Ser Tyr Pro Thr Gly Leu Ala Asp Val Lys
1               5                  10                  15

Ala Gly Pro Ala Gln Thr Leu Ile Arg Pro Gln Asp Met Lys Gly Ala
            20                  25                  30

Ser Arg Ser Pro Glu Asp Ser Ser Pro Asp Ala Ala Arg Ile Arg
        35                  40                  45
```

1-48 MR-proADM = preproADM 的氨基酸 45-92（48 个氨基酸）

图2

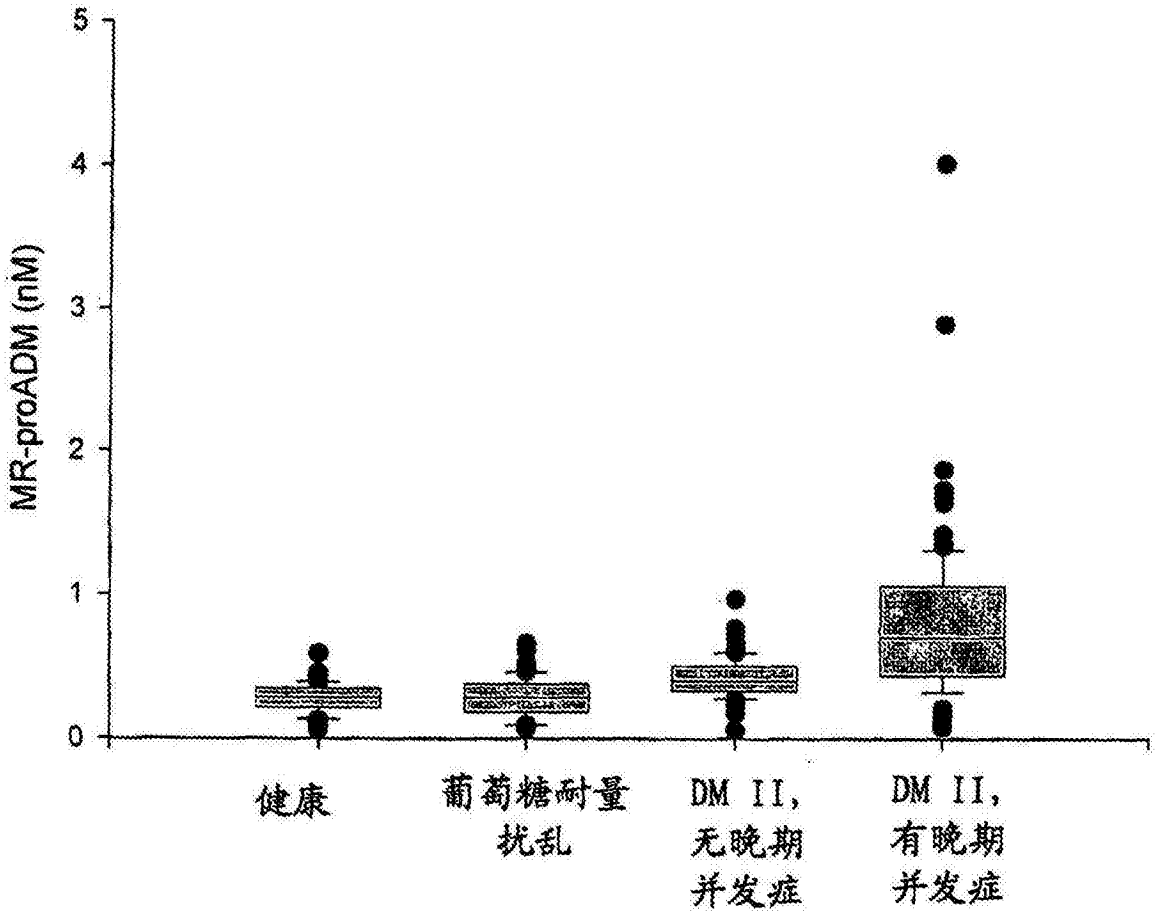


图3