



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101568833 B

(45) 授权公告日 2014. 09. 10

(21) 申请号 200780041709. 4

(22) 申请日 2007. 11. 08

(30) 优先权数据

102006052916. 2 2006. 11. 08 DE

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2009. 05. 08

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/DE2007/002018 2007. 11. 08

(87) PCT国际申请的公布数据

W02008/055491 DE 2008. 05. 15

(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 罗菊华

(51) Int. Cl.

G01N 33/50 (2006. 01)

G01N 33/66 (2006. 01)

(56) 对比文件

WO 9707214 A1, 1997. 02. 27, 全文.

Jerzy Beltowski ET AL.. ADRENOMEDULLIN
- WHAT DO WE KNOW 10 YEARS SINCE
ITS DISCOVERY?. 《POLISH JOURNAL OF
PHARMACOLOGY》. 2004, 第 56 卷第 5-27 页.

NILS G. MORGENTHALER ET AL.. Measurement
of Midregional Proadrenomedullin in Plasma
with an Immunoluminometric Assay. 《CLINICAL
CHEMISTRY》. 2005, 第 51 卷 (第 10 期), 第 1824
页.

审查员 沈晶晶

权利要求书1页 说明书4页

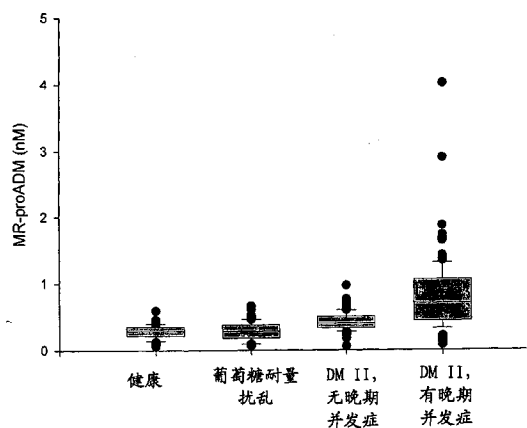
序列表2页 附图2页

(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。



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 型糖尿病体外诊断和 / 或风险分级的诊断剂。

2. 根据权利要求 1 的用途,其特征在于:所述检测试剂是抗体。

3. 根据权利要求 1 或 2 的用途,其特征在于:所述测定在至少一个患者样品上进行。

4. 根据权利要求 1 或 2 的用途,其特征在于:所述测定在自动分析设备上来进行。

5. 根据权利要求 1 或 2 的用途,其特征在于:所述测定通过快速测试来进行。

6. 根据权利要求 5 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。

7. 根据权利要求 1 或 2 的用途,其特征在于:所述诊断用于对患者进行分级以进行临床决策。

8. 根据权利要求 7 的用途,其特征在于:所述临床决策是用药物进行进一步处理,所述药物用于处理或治疗 II 型糖尿病。

9. 根据权利要求 1 或 2 的用途,其特征在于:进行所述诊断和 / 或风险分级,以用于对 II 型糖尿病进行预后、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。

10. 根据权利要求 9 的用途,其特征在于: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。

[0002] 糖尿病的诊断以肾上腺髓质素而众所周知 (Garcia-UnzuetaMT, Montalban C, Pesquera C, Berrazueta JR, Amado JA. Plasmaadrenomedullin levels in type 1 diabetes. Relationship withclinical parameters. Diabetes Care. 21 :999-1003, 1998 和 TurkHM, Buyukberber S, Sevinc A, Ak G, Ates M, Sari R, SavliH, CigliA. Relationship between plasma adrenomedullin levels andmetabolic control, risk factors, and diabetic microangiopathy inpatients with type 2 diabetes. 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, NichollsMG. Adrenomedullin (1-52) measured in human plasma byradioimmunoassay :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。

[0003] 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。

[0004] 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。

[0005] 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)。

[0006] 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。

[0007] 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。

[0008] 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。

[0009] 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。

[0010] 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),被理解为指导慢性代谢疾病,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,以及肾病直至肾功能不全,神经病,糖尿病性足部综合征,和心血管并发症。

[0011] 由于这种原因,本发明涉及 II 型糖尿病,及其继发病和并发症,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、肾功能不全、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。

[0012] 所有前述适应症都在例如 Pschyrembel, De Gruyter, Berlin 2004 中进一步描述。

[0013] 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)”(EP 1488209B1),并且显示出强的血浆稳定性,这是特别有利的。

[0014] 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。

[0015] 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。

[0016] 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,另外还连同选自炎症标志物、血管标志物的至少一种其它标志物一起进行所述测定。

[0017] 依据本发明,炎症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-1 β , 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。

[0018] 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:MatthewsDR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC, Homeostasis Model Assessment:Insulin Resistance and B-cellFunction from Fasting Plasma Glucose and Insulin Concentrationsin Man. Diabetologia 28:412-419. 1985)的那些。

[0019] 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。

[0020] 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。

[0021] 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。

[0022] 此外,本发明涉及中央区肾上腺髓质素原(MR-proADM;SEQID 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。

[0023] 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。

[0024] 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。

[0025] 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;SEQID 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。

[0026] 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。实施例:实施例 1

[0027] MR-proADM 测试依据 Morgenthaler 等人(Morgenthaler NG, Struck J, Alonso C, Bergmann A. Measurement of midregionalproadrenomedullin in plasma with an immunoluminometric assay. Clin Chem. 2005 Oct ;51(10):1823-9)所述进行。

[0028] 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(简称为“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。

[0029] 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。

[0030] 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。表 1。(晚期并发症 (SK)(同义词:继发病))

	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

[0031] 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, FrankW LoGerfo, Edward S Horton, Aristidis Veves. Reactivity of themicro-and macro-circulation is impaired in those at risk for type2diabetes. Diabetes 48 : 1856-1862,1999)。附图:

[0032] 图 1 示出带有相关部分序列的 preproADM 的 SEQ ID No. 1。

[0033] 图 2 示出 MR-proADM 的 SEQ ID No. 2。

[0034] 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。

序列表

<110>Brahms Aktiengesellschaft

<120> 使用 MR-proADM 的糖尿病诊断和风险分级

<130>BRAHMS 0029W0 06/11

<140>PCT/DE2007not 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
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
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

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

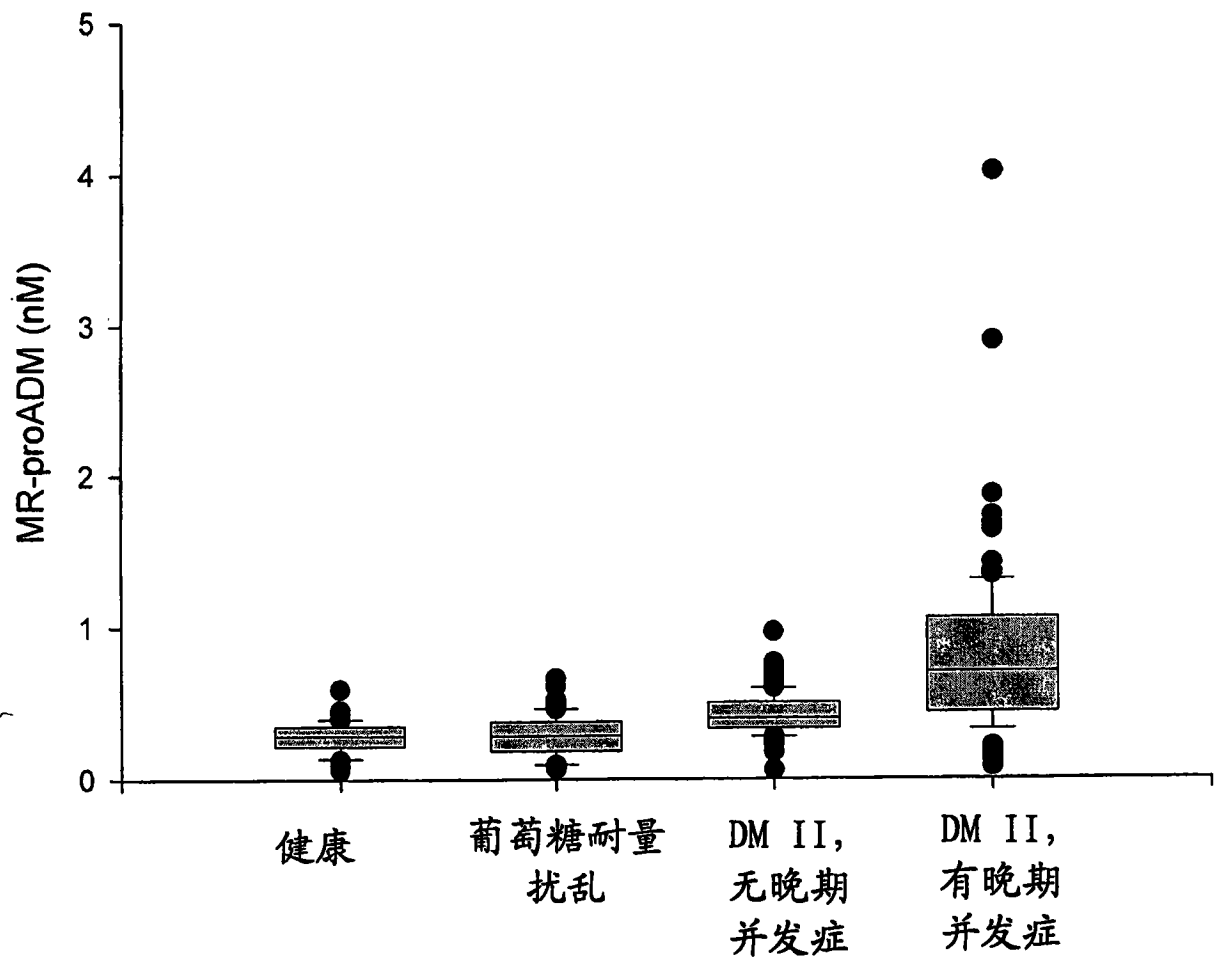


图 3