



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103308670 B

(45)授权公告日 2017.06.09

(21)申请号 201210509621.3

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2012.10.08

G01N 33/50(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

审查员 李进进

申请公布号 CN 103308670 A

(43)申请公布日 2013.09.18

(30)优先权数据

12158680.4 2012.03.08 EP

12165062.6 2012.04.20 EP

61/608,350 2012.03.08 US

(73)专利权人 思芬构技术有限公司

地址 德国诺因多夫

(72)发明人 安德里斯·贝格曼 欧勒·米兰德

(74)专利代理机构 中原信达知识产权代理有限
责任公司 11219

代理人 张颖 谢丽娜

权利要求书2页 说明书18页 附图2页

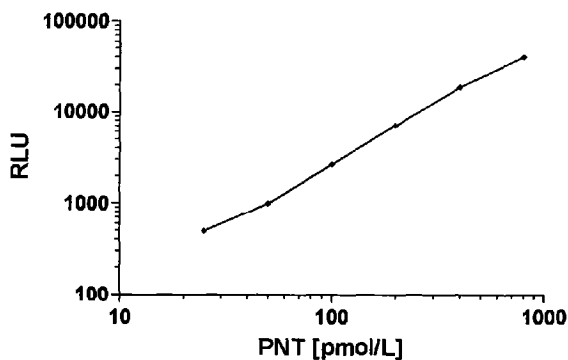
(54)发明名称

用于预测对象患糖尿病和/或代谢综合征的
风险的方法

(57)摘要

本发明的主题是用于预测对象患糖尿病和/或代谢综合征的风险或用于诊断对象中的代谢综合征的方法,其中所述对象未患糖尿病,所述方法包括以下步骤:确定神经降压素原或其至少5个氨基酸的片段在从所述对象获得的体液中的水平;和将神经降压素原或其片段的所述水平与所述对象患糖尿病和/或代谢综合征的风险相关联,其中水平升高预示患糖尿病和/或代谢综合征的风险增加,或者其中水平升高与对象中代谢综合征的诊断相关,其中所述对象未患糖尿病。

校准曲线PNT



1. 结合物在制备用于预测对象患糖尿病和/或代谢综合征的风险的装置或试剂中的应用,其中所述对象未患糖尿病,所述应用包括以下步骤:

● 确定神经降压素原或其至少5个氨基酸的片段在从所述对象获得的体液中的水平;
和

● 将神经降压素原或其片段的所述水平与所述对象患糖尿病和/或代谢综合征的风险相关联,其中水平升高预示患糖尿病和/或代谢综合征的风险增加,

其中所述至少5个氨基酸的片段选自如SEQ ID NO:1所示的神经降压素原1-147、如SEQ ID NO:2所示的神经降压素原1-125、如SEQ ID NO:3所示的神经调节肽N、如SEQ ID NO:4所示的神经降压素、如SEQ ID NO:5所示的神经降压素原1-117、如SEQ ID NO:6所示的神经降压素原1-132、如SEQ ID NO:7所示的神经降压素原1-125、如SEQ ID NO:8所示的神经降压素原120-140、如SEQ ID NO:9所示的神经降压素原120-147、和如SEQ ID NO:10所示的神经降压素原128-147。

2. 权利要求1的结合物在制备用于预测对象患糖尿病和/或代谢综合征的风险的装置或试剂中的应用,其中所述对象是非前驱糖尿病(非IFG)的对象。

3. 权利要求1的结合物在制备用于预测对象患糖尿病和/或代谢综合征的风险的装置或试剂中的应用,其中确定神经降压素原的空腹水平。

4. 权利要求1的结合物在制备用于预测对象患糖尿病和/或代谢综合征的风险的装置或试剂中的应用,其中确定如SEQ ID NO:5所示的神经降压素原1-117的水平。

5. 权利要求1的结合物在制备用于预测对象患糖尿病和/或代谢综合征的风险的装置或试剂中的应用,其中所述对象未患糖尿病且空腹血糖小于6.1mmol/l但大于5.4mmol/l。

6. 权利要求1的结合物在制备用于预测对象患糖尿病和/或代谢综合征的风险的装置或试剂中的应用,其中所述对象的空腹血糖小于5.4mmol/l。

7. 权利要求1的结合物在制备用于预测对象患糖尿病和/或代谢综合征的风险的装置或试剂中的应用,其中确定对象患II型糖尿病的风险。

8. 权利要求1的结合物在制备用于预测对象患糖尿病和/或代谢综合征的风险的装置或试剂中的应用,其中另外确定了至少一种临床参数,所述临床参数选自:年龄、性别、收缩压、舒张压、抗高血压治疗(AHT)、体质指数、腰围、腰臀比、目前为吸烟者、糖尿病遗传性、以及先前的心血管疾病(CVD)。

9. 权利要求1的结合物在制备用于预测对象患糖尿病和/或代谢综合征的风险的装置或试剂中的应用,其中样品选自:血液样品、血清样品和血浆样品,或任一种前述样品的提取物。

10. 权利要求1的结合物在制备用于预测对象患糖尿病和/或代谢综合征的风险的装置或试剂中的应用,其中通过诊断检测法确定神经降压素原或其至少5个氨基酸长度的片段的水平。

11. 权利要求1的结合物在制备用于预测对象患糖尿病和/或代谢综合征的风险的装置或试剂中的应用,其中权利要求1的步骤被执行超过一次,以便监测患糖尿病和/或代谢综合征的风险,或以便监测对象中的代谢综合征的治疗过程,其中所述对象未患糖尿病。

12. 权利要求11的结合物在制备用于预测对象患糖尿病和/或代谢综合征的风险的装置或试剂中的应用,其中执行所述监测以便评估所述对象对所采取的预防性和/或治疗性

措施的响应。

13. 权利要求1的结合物在制备用于预测对象患糖尿病和/或代谢综合征的风险的装置或试剂中的应用,以便将所述对象分级成风险组。

14. 权利要求1的结合物在制备用于预测对象患糖尿病和/或代谢综合征的风险的装置或试剂中的应用,其特征在于所述装置或试剂提供用于预测对象患糖尿病和/或代谢综合征的风险的现场即时测试。

15. 权利要求10的结合物在制备用于预测对象患糖尿病和/或代谢综合征的风险的装置或试剂中的应用,其中所述诊断检测法是免疫检测法。

16. 权利要求1-15任一项的结合物在制备用于预测对象患糖尿病和/或代谢综合征的风险的装置或试剂中的应用,其中所述装置是试剂盒。

用于预测对象患糖尿病和/或代谢综合征的风险的方法

技术领域

[0001] 本发明的主题是用于预测对象患糖尿病和/或代谢综合征的风险或用于诊断对象中的代谢综合征的方法,其中所述对象未患糖尿病,所述方法包括以下步骤:

[0002] ●确定神经降压素原或其至少5个氨基酸的片段在从所述对象获得的体液中的水平;和

[0003] ●将神经降压素原或其片段的所述水平与所述对象患糖尿病和/或代谢综合征的风险相关联,其中水平升高预示患糖尿病和/或代谢综合征的风险增加,或者其中水平升高与对象中代谢综合征的诊断相关,其中所述对象未患糖尿病。

[0004] 术语“水平升高”的意思是在一定的阈值水平之上的水平。

背景技术

[0005] 神经降压素是源自于前神经降压素原前体的13个氨基酸的神经肽,并与稳定的117个氨基酸的肽神经降压素原(P-NT)一起按化学计量比例释放,成熟的激素与3种不同的受体结合,分别是神经降压素受体1和2(Ntsr1和Ntsr2)以及神经降压素受体3(Ntsr3),其中神经降压素受体1和2是G蛋白偶联受体,神经降压素受体3是非G蛋白偶联受体并且也被称为Sortillin-1(SORT1)。

[0006] 神经降压素由小肠在外周释放,也由下丘脑在中央释放。神经降压素的外周分泌受到食物摄取、尤其是脂肪的刺激,并且已知其能够调节胃肠蠕动以及胰腺和胆汁的分泌。有趣的是,神经降压素作为抑制食欲的激素而参与食欲控制,因为它经中央(脑室内)和外周(腹腔内)注入大鼠之后,能够严重减少食物的摄取,这种效应似乎主要是通过神经降压素-1受体(Ntsr1)介导的。在与正常体重人类对象相比而言的肥胖者中,在液体脂肪餐后,餐后血浆神经降压素浓度降低(Widen等,1992,Reg Peptides;在改良的假饲(MSF)和液体试验餐后肥胖者中调节肽的血浆浓度(Plasma concentrations of regulatory peptides in obesity following modified sham feeding(MSF) and a liquid test meal)),这说明肥胖者中的神经降压素分泌调节失常。但是,还没有大规模的研究探讨过神神经降压素是否以及如何与肥胖程度相关。有趣的是,P-NT在胃旁路手术(Roux-en-Y)后显著增加,据显示,这是在大多数肥胖的II型糖尿病患者中能导致血糖正常的手术,但是尚不知道神经降压素总的来说是否参与糖尿病的发展。此外,神经降压素系统参与冠状动脉疾病和心肌梗死的发展,因为Ntsr3(SORT1)基因的变异是人类中已知的最强的冠状动脉疾病常见易感基因之一。

[0007] 肥胖和癌症之间在机制上的联系基本上是未知的,但是,主流理论之一是过多的脂肪沉积会导致外周雄激素的芳构化增加,并由此导致循环的雌激素水平升高。另外,据显示,肥胖的特征之一高胰岛素血症会抑制肝脏产生性激素结合球蛋白(SHBG),进而使雌激素和雄激素两者的可生物利用的水平升高,这揭示了肥胖使常见形式的由性激素引起的癌症形式例如乳腺癌和前列腺癌的风险增加的途径。有趣的是,神经降压素和Ntsr1两者的表达在恶性乳腺导管癌肿瘤中都很常见,并且实验性地药理阻断或RNA沉默NTSR1能够使小鼠

中的肿瘤生长降低。

[0008] 乳腺癌细胞中神经降压素受体1 (NTSR1) 的表达水平已被用于确定患有乳腺癌的对象的预后 (US 2011/0305633)。另外,同一作者指出,当前尚未描述出循环的神经降压素与胰腺、前列腺、或髓样甲状腺肿瘤的分期之间的明确的关联性,这可能是由于肝脏对神经降压素的快速清除。有趣的是,已发现,在一组51名患侵袭性乳腺导管癌的患者中,所有肿瘤中有91%肿瘤的神经营降压素受体1 (NTSR1) 为阳性,但所有肿瘤中只有31%肿瘤在所述组织中的神经降压素为阳性 (Souaze等, *Cancer Research* 2006;66; (12) pages 6243-6249)。

[0009] 有一些证据可表明神经降压素和神经降压素受体参与了癌的生长,尤其是参与肺癌、胰腺癌和结肠癌的生长 (Carraway等; *Peptides* 27 (2006) 2445-2460)。据报道,胰腺癌患者血清中的NT水平显著升高 (Picheon等, *Anticancer Research* 1999;19;1445-50)。有趣的是,该组发现,对于胰腺癌和前列腺癌两者而言,NT水平随着疾病的进展而降低。相反地,对此, Meggiato等; *Tumori* 1996;82;592~5;发现NT的血浆水平在胰腺癌中是正常的,但在诊断为胰腺炎的病例中却是升高的。

[0010] 和肽素用于预测糖尿病的应用已经被 **Enhörning** 等, *Circulation*, 2010;121: 2102-2108报道。

发明内容

[0011] 本发明的主题是研究用于预测对象患糖尿病和/或代谢综合征的风险或用于诊断对象中的代谢综合征的NT的预测和诊断能力,其中所述对象未患糖尿病。为了解决这个问题,我们在所述瑞典前瞻性世代研究 (马尔默饮食与癌症研究) 中测定了空腹血浆中神经降压素原的稳定的片段,并将该生物标志物的基线水平与15年随访期间的糖尿病发生率相关联。

[0012] 本发明的主题是用于预测对象患糖尿病和/或代谢综合征的风险或用于诊断对象中的代谢综合征的方法,其中所述对象未患糖尿病,所述方法包括以下步骤:

[0013] ●确定神经降压素原或其至少5个氨基酸的片段在从所述对象获得的体液中的水平;和

[0014] ●将神经降压素原或其片段的所述水平与所述对象患糖尿病和/或代谢综合征的风险相关联,其中水平升高预示患糖尿病和/或代谢综合征的风险增加,或者其中水平升高与对象中代谢综合征的诊断相关,其中所述对象未患糖尿病。

附图说明

[0015] 图1示出了典型的P-NT剂量/信号曲线。

[0016] 图2:糖尿病预测的Kaplan Meier分析:

[0017] 2a) 所有未患糖尿病的对象采用中位数截止值 (cut off) (104.6pmol/l)

[0018] 2b) 所有未患糖尿病和前驱糖尿病 (IFG) 的对象,截止值, (104.6pmol/l)。

具体实施方式

[0019] 此处使用的术语“对象”指有生命的人类或非人类的生物体。在本文中,优选地,所

述对象是人类对象。在本发明的具体实施方案中,所述对象是雌性对象。在本发明的具体实施方案中,所述对象是非IFG(非前驱糖尿病)的对象。

[0020] 在本发明的一个实施方案中,神经降压素原或其至少5个氨基酸的片段在体液中的水平是神经降压素原或其至少5个氨基酸的片段的空腹水平。空腹水平的意思是采取血样前12小时没有摄取食物。

[0021] 体液可以选自血液、血清、血浆、尿液、脑脊液、和唾液。

[0022] 目前的数据表明,在神经降压素原或其片段的水平与糖尿病之间存在着强关联性,尤其在是未患有普遍的糖尿病的对象中。

[0023] 目前的数据还表明,在高血压对象中,在神经降压素原或其片段的水平与糖尿病之间存在着强关联性,所述高血压对象是心血管疾病和/或糖尿病的常见高危群体。

[0024] 体液中可能检测到的神经降压素原片段可以为,例如:

[0025] SEQ ID NO:1(神经降压素原1-147)

[0026] SESEEEKAL EADFLTNMHT SKISKAHVPS WKMTLLNVCSLVNNLNSPAE ETGEVHEEEL
VARRKLPTAL DFGSLEAMLTIIYQLHKICHS RAFQHWELIQ EDILDTGNDK NGKEEVIKRPYILKRQLY
ENKPRRRYIL KRDSYYY

[0027] SEQ ID NO:2(神经降压素原1-125(大的神经调节肽N))

[0028] SDSEEEKAL EADFLTNMHT SKISKAHVPS WKMTLLNVCSLVNNLNSPAE ETGEVHEEEL
VARRKLPTAL DFGSLEAMLTIIYQLHKICHS RAFQHWELIQ EDILDTGNDK NGKEEVIKRPYIL

[0029] SEQ ID NO:3(神经调节肽N:)

[0030] KIPYIL

[0031] SEQ ID NO:4(神经降压素)

[0032] pyroQLYENKPRRP YIL

[0033] SEQ ID NO:5(神经降压素原1-117)

[0034] SDSEEEKAL EADFLTNMHT SKISKAHVPS WKMTLLNVCSLVNNLNSPAE ETGEVHEEEL
VARRKLPTAL DFGSLEAMLTIIYQLHKICHS RAFQHWELIQ EDILDTGNDK NGKEEVI

[0035] SEQ ID NO:6(神经降压素原1-132)

[0036] SDSEEEKAL EADFLTNMHT SKISKAHVPS WKMTLLNVCSLVNNLNSPAE ETGEVHEEEL
VARRKLPTAL DFGSLEAMLTIIYQLHKICHS RAFQHWELIQ EDILDTGNDK NGKEEVIKRPYILKRQLY EN

[0037] SEQ ID NO:7(神经降压素原1-125)

[0038] SDSEEEKAL EADFLTNMHTSKISKAHVPS WKMTLLNVCSLVNNLNSPAE ETGEVHEEEL
VARRKLPTAL DFGSLEAMLTIIYQLHKICHS RAFQHWELIQ EDILDTGNDK NGKEEVIKRPYIL

[0039] SEQ ID NO:8(神经降压素原120-140)

[0040] KIPYILKRQL YENKPRRPYI L

[0041] SEQ ID NO:9(神经降压素原120-147)

[0042] KIPYILKRQL YENKPRRPYIL KRDSYYY

[0043] SEQ ID NO:10(神经降压素原128-147)

[0044] QLYENKPRRP YILKRDSYYY

[0045] 在本发明方法的更具体的实施方案中,确定神经降压素原1-117的水平。

[0046] 在具体的实施方案中,神经降压素原的水平是用免疫检测法测定的。更具体地,免

疫检测法是按照Ernst等Peptides 27 (2006) 1787-1793中的描述使用的。

[0047] 可用于确定神经降压素原或其至少5个氨基酸的片段的水平的免疫检测法是基于本发明的结合物,所述结合物用于在雌性对象的离体体液中,选择性测定针对根据SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:10所述的任何神经降压素原序列中的至少一种的免疫反应性。

[0048] 在本发明的另一个实施方案中,可用于确定神经降压素原或其至少5个氨基酸的片段的水平的免疫检测法是基于本发明的两种不同的结合物,所述结合物用于在雌性对象的离体体液中,选择性测定针对根据SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:10所述的任何神经降压素原序列中的两种不同的部分序列的免疫反应性。因此,在根据SEQ ID NO:1至 SEQ ID NO:10中任一个所述的神经降压素原的同一部分中,两种结合物靶向不同的序列。

[0049] 在本发明的具体实施方案中,免疫检测法可用于确定神经降压素原或其至少5个氨基酸的片段的水平,其中两种不同的结合物特异性地指向根据SEQ ID NO:5所述的神经降压素原的N端部分1-117以选择性测定针对该序列的免疫反应性,所述免疫检测法的特征在于所述免疫反应性不是神经降压素(NT)(SEQ ID NO:4)或神经调节肽N(NMN)(SEQ ID NO:3)的免疫反应性。由此,通过使用两种不同的结合物进行的夹心免疫检测法,免疫检测法仅特异性地识别神经降压素原的N端肽,所述两种不同的结合物与所述N端序列的不同的部分序列发生特异性结合,所述不同的部分序列含有完整的前神经降压素原的第67-85位氨基酸和第121-140位氨基酸两者(如Ernst等(2006)中的图1所示)。(对此,参见US2008/0280306——用于测定释放进入到循环中的神经降压素的免疫检测法(Immunoassay for determining the release of neurotensin into the circulation);以及Ernst等,神经降压素原1-117:在人体循环中鉴定到的稳定的神经降压素前体片段(Proneurotensin 1-117, a stable neurotensin precursor fragment identified in human circulation), Peptides (27), 1787-1793 (2006))。

[0050] 在另一个具体实施方案中,上述免疫检测法的特征还可以在于,在结合物是抗体的情况下,结合物是特异性的单抗隆抗体和/或亲和纯化的多克隆抗体。其中的一种抗体可以以与固相结合的形式使用,该固相优选地是各自的试管壁,并且第二抗体是标记的或可选择性标记的抗体。可以用放射性同位素或通过化学发光、生物发光、荧光、或通过本领域技术人员已知的酶标记进行所述标记。优选地,所述第二抗体是通过化学发光标记的。

[0051] 由于标记了两种抗体中的至少一种,因此,在将两种抗体结合到根据SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:10中任一个所述的神经降压素原之后,产生了可测定的信号,这使得所产生的夹心复合物能够在测定溶液中被检测到。(对此,参见US2008/0280306——用于测定释放进入到循环中的神经降压素的免疫检测法(Immunoassay for determining the release of neurotensin into the circulation);以及Ernst等,神经降压素原1-117:在人体循环中鉴定到的稳定的神经降压素前体片段(Proneurotensin 1-117, a stable neurotensin precursor fragment identified in human circulation), Peptides (27), 1787-1793 (2006))。

[0052] 上述免疫检测法在实施例2中有更详细的概述。应当根据实施例2所使用的测试和校准来看待所有的阈值和值。本领域技术人员可能知道,阈值的绝对值可能受到所使用的校准的影响。这意味着,应当在本文(实施例2)所使用的校准的背景下理解本文中给出的所有值和阈值。人P-NT校准品可得自ICI-Diagnostics, Berlin, Germany。或者,该检测法可以

用合成或重组的P-NT 1-117或其片段进行校准(同样参见Ernst等,2006)。

[0053] 根据本发明的方法,用于确定对象患糖尿病和/或代谢综合征的风险或用于诊断对象中的代谢综合征的阈值为高于78pmol/l PNT,优选为100pmol/l,更优选为150pmol/l,其中所述对象未患糖尿病。在具体实施方案中,所述阈值为约100pmol/l。这些阈值与上面提到的校准方法相关。神经降压素原的值超过所述阈值,意味着该对象患糖尿病和/或代谢综合征的风险增加。

[0054] 糖尿病的定义如下:在基线检查时具有内科医生诊断的病史、或在服用抗糖尿病药物、或空腹全血血糖 ≥ 6.1 mmol/l(注意,这相当于血浆中的7.0mmol/l)。

[0055] 前驱糖尿病,空腹血糖异常(IFG):IFG=空腹血浆葡萄糖为6.1-6.9mmol/l

[0056] 血压正常/高血压(HBP)的定义如下:

[0057] HBP:收缩压 ≥ 140 mmHg或舒张压 ≥ 90 mmHg或在服用抗高血压药物。具有正常血压(BP)的对象是所有其他对象,即收缩压 < 140 mmHg或舒张压 < 90 mmHg或没有服用抗高血压药物的对象。

[0058] 在本发明方法的具体实施方案中,所述对象未患糖尿病且空腹血糖低于6.1mmol/l但高于5.4mmol/l。

[0059] 在本发明方法的具体实施方案中,所述对象的空腹血糖低于5.4mmol/l。

[0060] 在本发明方法的具体实施方案中,确定所述的对象患II型糖尿病的风险。

[0061] 在本发明方法的具体实施方案中,通过另外确定并使用至少一种实验室参数或其他标志物的水平来改进对对象患糖尿病和/或代谢综合征的风险的预测或对代谢综合征的诊断,所述实验室参数或其他标记物选自空腹血糖或空腹血浆葡萄糖、甘油三酯、HDL胆固醇或其亚组分、LDL胆固醇或其亚组分、胱抑素C、胰岛素、CRP、血管升压素或其前体或其片段、以及BNP或其前体或其片段。

[0062] 在本发明方法的具体实施方案中,另外确定了至少一种临床参数,所述临床参数选自年龄、性别、收缩压、舒张压、抗高血压治疗(AHT)、体质指数、腰围、腰臀比、目前为吸烟者、糖尿病遗传性、以及先前的心血管疾病(CVD)。

[0063] 本发明的其他实施方案是根据前述权利要求任一项所述的用于预测对象患糖尿病和/或代谢综合征的风险或用于诊断对象中的代谢综合征的方法,其中所述对象未患糖尿病,其中神经降压素原或其片段的水平被单独或与其他有预测用途的实验室或临床参数联合用于预测对象患糖尿病和/或代谢综合征的风险或用于诊断代谢综合征,这是通过选自以下备选方案的方法实现的:

[0064] -与明显健康对象人群中全部预先确定的样品中的神经降压素原或其片段水平的中位数进行比较,

[0065] -与明显健康对象人群中全部预先确定的样品中的神经降压素原或其片段水平的四分位数进行比较,

[0066] -基于Cox比例风险分析进行计算,或通过使用风险指数计算例如NRI(净重新分类指数)或IDI(综合鉴别指数)进行计算。

[0067] 在本发明的一个实施方案中,样品选自血液样品、血清样品、血浆样品、脑脊液样品、唾液样品、和尿液样品,或任一种前述样品的提取物。在本发明方法的具体实施方案中,通过诊断检测法、优选通过免疫检测法确定神经降压素原或其至少5个氨基酸长度的片段

的水平。

[0068] 在本发明方法的具体实施方案中,所述方法被执行超过一次,以便监测患糖尿病和/或代谢综合征的风险,或以便监测对象中的代谢综合征的治疗过程,其中所述对象未患糖尿病。

[0069] 在本发明方法的具体实施方案中,执行所述监测以便评估所述对象对所采取的预防性和/或治疗性措施的响应。

[0070] 在本发明方法的具体实施方案中,使用所述方法以便将所述对象分级成风险组。

[0071] 本发明还包括用于执行本发明的方法的装置。因此,在该装置中实施上文所述的检测法。所述装置是一种自动装置,该装置使得能够测定所施加的生物发光和化学发光,正如上文中为本发明的检测法所描述的。优选地,所述装置使得能够进行报告基因检测、ATP 监测、发光免疫检测(LIA)、酶测定、和细胞发光/氧化爆发。因此,按照本发明,该装置可被称为多模式光度计。该装置的特征还在于,优选被置于试管中的一种或多种样品能够以链式测定一次或连续测定多次,甚至能够在很长的一段测试时间内进行测定。此外,本发明的装置的特征在于珀尔帖冷却检测器、容积可变的注射器、管室中的温度控制、以及还有控制所述装置的软件单元,所述软件优选地是TubeMaster。这样的装置的一个实例是Autolumat LB953多管光度计(BertholdTechnologies GmbH&Co.KG,Bad Wildbad,Germany)。

[0072] 本发明还包括用于执行本发明的方法的现场即时测试(point-of-care)装置。在所述现场即时测试装置中实施如前所述的检测法。现场即时测试是通过使用可运输、便携、且手持的仪器来完成的,所述仪器能够执行本发明的方法。因此,能够在非常短的时间内、在待检查的对象所在位置处或附近进行测定和各自的分析。本发明的现场即时测试装置的特征在于免疫层析测量仪,该测量仪能够检测检测法中所使用的结合物的至少一种可光学检测的标签(标记)。

[0073] 本发明还包括用于执行本发明的方法的检测法和/或试剂盒。检测法如前所述,而用于执行免疫检测法的各自的试剂盒除了检测法本身以外,还可以由本领域技术人员已知的惯用的辅助试剂例如缓冲液和洗涤液组成。

[0074] 在具体的实施方案中,除了本领域技术人员已知的惯用的辅助试剂例如缓冲液和洗涤液以外,用于执行本发明的检测法的试剂盒还可以由以下成分组成,特别是

[0075] i) 第一免疫试剂,其包括被固定在固相(优选为试管壁)上的针对人神经降压素原的部分序列的第一种特异性的结合物,在特定的实施方案中,所述第一种结合物是针对序列SEQ ID NO:1至SEQ IDNO:10中的任一个,

[0076] ii) 第二免疫试剂,其包括溶解和标记形式(优选地,第二抗体是通过化学发光标记的)的针对人神经降压素原的部分序列的第二种特异性的结合物,在特定的实施方案中,所述第二种结合物是针对SEQ IDNO:1至SEQ ID NO:10中的任一个,条件是第二种结合物靶向与第一种结合物的靶向序列不同的序列,和

[0077] iii) 标准和校准溶液,其含有确定的量的肽制品,所述肽制品具有所述第一和第二特异性抗体的结合位点。

[0078] 在本发明的另一个实施方案中,用于执行前述检测法的装置或试剂盒可以提供基于所述检测法的现场即时测试,以预测患糖尿病和/或代谢综合征的风险或诊断对象中的代谢综合征。

[0079] 本发明的主题也是神经降压素或神经降压素受体的结合物,所述结合物可用于预防或治疗对象中的糖尿病和/或代谢综合征。

[0080] 因此,在另一个实施方案中,本发明提供了神经降压素或神经降压素受体的结合物,所述结合物可用于制备用于预防或治疗对象中的糖尿病和/或代谢综合征的药物。

[0081] 在本发明的一个实施方案中,所述结合物使神经降压素的生物活性降低至70%或更低。

[0082] 根据本发明,神经降压素的结合物选自抗体例如典型的全长免疫球蛋白IgG、或包含至少重链和/或轻链的F可变结构域的抗体片段例如化学偶联的抗体(抗原结合片段),包括但不限于Fab片段,包括Fab小型抗体、单链Fab抗体、带有表位标签的单价Fab抗体例如Fab-V5Sx2;用CH3结构域二聚化的双价Fab(小型抗体);双价Fab或多价Fab,例如通过借助于异源结构域多聚化而形成的,例如通过dHLX结构域的二聚化而形成的,例如Fab-dHLX-FSx2;F(ab')₂片段,scFv片段,多聚化的多价或/和多特异性scFv片段,双价和/或双特异性双抗体,**BITE®**(双特异性T细胞桥联抗体),三官能抗体,多价抗体,例如来自与G不同的类型;单结构域抗体,例如源自于骆驼或鱼的免疫球蛋白的纳米抗体。

[0083] 根据本发明,神经降压素受体的结合物选自抗体例如典型的全长免疫球蛋白IgG、或包含至少重链和/或轻链的F可变结构域的抗体片段例如化学偶联的抗体(抗原结合片段),包括但不限于Fab片段,包括Fab小型抗体、单链Fab抗体、带有表位标签的单价Fab抗体例如Fab-V5Sx2;用CH3结构域二聚化的双价Fab(小型抗体);双价Fab或多价Fab,例如通过借助于异源结构域多聚化而形成的,例如通过dHLX结构域的二聚化而形成的,例如Fab-dHLX-FSx2;F(ab')₂片段,scFv片段,多聚化的多价或/和多特异性scFv片段,双价和/或双特异性双抗体,**BITE®**(双特异性T细胞桥联抗体),三官能抗体,多价抗体,例如来自与G不同的类型;单结构域抗体,例如源自于骆驼或鱼的免疫球蛋白的纳米抗体,或肽类拮抗剂例如[D-Trp¹¹]-神经降压素、[Tyr(Me)¹¹]-神经降压素(例如由Quiron等描述的),或非肽类拮抗剂,例如左卡巴斯汀、SR-48692(NTS1选择性)、SR-142948(非选择性)、SR-142948A、CP 96345、[3H]SR-48692、SR 48692、SR-48527和SR-49711,或结合物骨架(scaffold)例如基于四连接素的非Ig骨架(例如US2010/0028995中所描述的)、纤连蛋白骨架(例如EP1266025中所描述的)、基于脂质运载蛋白的骨架(例如WO2011/154420中所描述的)、泛素骨架(例如WO 2011/073214中所描述的)、转移骨架(transferring scaffold)(例如US 2004/0023334中所描述的)、蛋白A骨架(例如EP 2231860中所描述的)、基于锚蛋白重复域的骨架(例如WO 2010/060748中所描述的)、微量蛋白(microprotein)(优选为形成半胱氨酸结的微量蛋白)骨架(例如EP 2314308中所描述的)、基于Fyn SH3结构域的骨架(例如WO 2011/023685中所描述的)、基于EGFR-A结构域的骨架(例如WO 2005/040229中所描述的)和基于Kunitz结构域的骨架(例如EP 1941867中所描述的)。

[0084] 实施例

[0085] 实施例1

[0086] 抗体的制备

[0087] 用于免疫的肽/偶合物

[0088] 合成了用于免疫的肽(JPT Technologies,Berlin,Germany),所述肽具有额外的N端半胱氨酸残基以将所述肽与牛血清白蛋白(BSA)偶合。通过使用Sulfo-SMCC(Perbio-

science, Bonn, Germany) 将所述肽与BSA共价偶联。根据Perbio的手册执行偶联步骤。

[0089] 标记的抗体(LA)肽(P-NT 1-19):

[0090] H-CSDSEEEMKALEADFLTNMH-NH₂

[0091] 固相抗体(SPA)肽(P-NT 44-62):

[0092] H-CNLNSPAEETGEVHEEELVA-NH₂

[0093] 按照如下方法生成抗体:

[0094] 将BALB/c小鼠用100 μ g肽-BSA偶合物于第0天和第14天进行免疫(被乳化在100 μ l完全弗氏佐剂中),并用50 μ g于第21天和第28天进行免疫(在100 μ l不完全弗氏佐剂中)。在执行融合实验前3天,通过一次腹腔内注射和一次静脉内注射给予,动物接受50 μ g溶解在100 μ l盐水中的偶合物。

[0095] 用1mL 50%聚乙二醇将来自免疫后小鼠的脾细胞和骨髓瘤细胞系SP2/0的细胞在37 $^{\circ}$ C下融合30秒。在洗涤后,将细胞接种于96孔细胞培养板中。通过在HAT培养基(补充有20%胎牛血清和HAT补充物的RPMI1640培养基)中生长来选择杂交克隆。在两周之后,HAT培养基被替换成HT培养基用于传代3次,然后返回到正常的细胞培养基中。

[0096] 在融合后3周时,对细胞培养上清中的抗原特异性IgG抗体进行初次筛选。测试为阳性的微量培养物被转移到24孔板中进行增殖。在再次测试之后,用有限稀释技术将所选择的培养物克隆化和再克隆化,并确定亚型。

[0097] (Lane, R.D. “用于提高分泌单克隆体的杂交瘤的生产的短时间聚乙二醇融合技术(A short-duration polyethylene glycol fusion technique for increasing production of monoclonal antibody-secreting hybridomas)”, J. Immunol. Meth. 81: 223-228; (1985); Ziegler, B.等“通过细胞荧光计和单克隆GAD抗体的补体依赖性抗体介导的细胞毒性进行检验时,不能在大鼠胰岛细胞的表面上检测到谷氨酸脱羧酶(GAD) (Glutamate decarboxylase (GAD) is not detectable on the surface of rat islet cells examined by cytofluorometry and complement-dependent antibody-mediated cytotoxicity of monoclonal GAD antibodies)”, Horm. Metab. Res. 28: 11-15, (1996))。

[0098] 单克隆抗体的产生

[0099] 通过标准抗体生产方法(Marx等, Monoclonal Antibody Production, ATLA 25, 121, 1997)产生抗体,并通过蛋白质A-层析法进行纯化。根据SDS凝胶电泳分析,抗体的纯度为>95%。

[0100] 实施例2

[0101] 用于定量人神经降压素原的免疫检测法

[0102] 使用的技术是基于吡啶酯标记的夹心包被管发光免疫检测法。

[0103] 标记的复合物(示踪剂): 将100 μ g (100 μ l) LA (1mg/ml溶于PBS, pH 7.4) 与10 μ l吡啶NHS酯(1mg/ml溶于乙腈, InVent GmbH, Germany) (EP 0353971) 混合并在室温下孵育20分钟。将标记的LA在Bio-Sil SEC 400-5 (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) 上通过凝胶过滤HPLC进行纯化。纯化的LA被稀释在(300mmol/l磷酸钾、100mmol/l NaCl、10mmol/l Na-EDTA、5g/l牛血清白蛋白, pH 7.0) 中。终浓度约为每200 μ l含800,000相对光单位(RLU)的标记的复合物(约20ng 标记的抗体)。用AutoLumat LB 953 (Berthold Technologies GmbH & Co. KG) 测定吡啶酯化学发光。

[0104] 固相:用SPA (1.5 μ g SPA/0.3ml 100mmol/l NaCl、50mmol/l Tris-HCl, pH 7.8) 包被聚苯乙烯管 (Greiner Bio-One International AG, Austria) (室温下18小时)。在用5%牛血清白蛋白封闭之后,将所述管用pH 7.4的PBS洗涤并真空干燥。

[0105] 校准

[0106] 用含P-NT的人血清稀释液对检测法进行校准。将所集中的具有高P-NT免疫反应性的人血清 (InVent Diagnostika, Henningsdorf, Germany) 用马血清 (Biochrom AG, Deutschland) 进行稀释 (检测标准品)。

[0107] 用人P-NT校准品 (ICI-Diagnostics, Berlin, Germany) 对该标准品进行校准。或者,该检测法可以用合成或重组的p-NT 1-117或其片段进行校准 (同样参见Ernst等, 2006)。

[0108] P-NT免疫检测法:

[0109] 用移液器将50 μ l样品 (或校准品) 吸到SPA包被的管中,在加入标记的LA (200 μ l) 之后,将所述管在18-25 $^{\circ}$ C下孵育16-22小时。通过用洗涤液 (20mM PBS, pH 7.4, 0.1% Triton X-100) 洗涤5次 (每次1ml) 以去除未结合的示踪剂。

[0110] 用LB 953测定管结合的LA。

[0111] 图1示出了典型的P-NT剂量/信号曲线。

[0112] 实施例3

[0113] 群体研究

[0114] 我们测定了来自4362名参与者 (平均年龄58 \pm 6岁,女性占59%) 的空腹血浆中的P-NT,这些参与者属于于1991-1994年接受马尔默饮食与癌症研究的基线检查的人群。我们用多变量调整 (所有传统的心血管危险因素,糖尿病危险因素,并且在癌症分析中还有癌症的遗传性) 后的Cox比例风险模型来将基线P-NT (与log转换后的P-NT每增加一个标准偏差对应的风险比率) 与发生每个研究终点的第一次事件的时间相关联,中位随访时间超过12年。终点是通过瑞典国家医院出院登记处、瑞典心肌梗死登记处、马尔默卒中登记处和瑞典癌症登记处检索到的。通过这些登记处检索到的终点是经过验证的并发现是准确的。

[0115] 表1

[0116] 总研究人群的临床特征

[0117] 描述性统计

	N	平均值	标准偏差
MDCS 筛选时的年龄	4362	57.643	5.9797
收缩压 (mmHg)	4362	141.91	19.158
舒张压 (mmHg)	4362	87.02	9.501
体质指数 (体重/kgxkg)	4362	25.7642	3.91173
腰围 (cm)	4361	83.56	12.791
[0118] 葡萄糖 (mmol/l)	4362	5.1826	1.33736
甘油三酯 (mmol/l)	4362	1.3142	.63660
高密度脂蛋白 (mmol/l)	4362	1.3908	.37068
低密度脂蛋白 (mmol/l)	4362	4.1632	.98774
P-胰岛素	4280	7.889	7.6975
PNT (pmol/l)	4362	123.01743	76.746549
有效的 N (成列删除)	4279		

[0119] 表2

[0120] 性别

	频率	百分比	有效百分比	累积百分比
[0121] 有效 男性	1803	41.3	41.3	41.3
女性	2559	58.7	58.7	100.0
总计	4362	100.0	100.0	

[0122] 表3

[0123] 问卷+日记记录:根据问卷或日记记录本得到的基线时的抗高血压治疗 (C02、C03、C07、C08、C09)

	频率	百分比	有效百分比	累积百分比
[0124] 有效 否	3684	84.5	84.5	84.5
是	678	15.5	15.5	100.0
总计	4362	100.0	100.0	

[0125] 表4

[0126] 糖尿病 (空腹血糖 > 6.0 或者问卷调查后为糖尿病)

	频率	百分比	有效百分比	累积百分比
[0127] 有效 否	3993	91.5	91.5	91.5
是	369	8.5	8.5	100.0
总计	4362	100.0	100.0	

[0128] 表5

[0129] 目前为吸烟者

	频率	百分比	有效百分比	累积百分比
[0130] 有效 .00	3212	73.6	73.6	73.6
1.00	1150	26.4	26.4	100.0
总计	4362	100.0	100.0	

[0131] 表6

[0132] 研究中女性的临床特征

[0133] 描述性统计

	N	平均值	标准偏差
MDCS 筛选时的年龄	2559	57.554	5.9403
收缩压 (mmHg)	2559	140.50	19.311
舒张压 (mmHg)	2559	85.65	9.117
体质指数 (体重/kgxkg)	2559	25.5196	4.19083
腰围 (cm)	2559	76.99	10.245
[0134] 葡萄糖 (mmol/l)	2559	5.0418	1.21798
甘油三酯 (mmol/l)	2559	1.2245	.58404
高密度脂蛋白 (mmol/l)	2559	1.5123	.36949
低密度脂蛋白 (mmol/l)	2559	4.2016	1.04762
P-胰岛素	2512	7.223	5.4223
PNT (pmol/l)	2559	125.60633	77.681673
有效的 N (成列删除)	2512		

[0135] 表7

[0136] 问卷+日记记录:根据问卷或日记记录本得到的基线时的抗高血压治疗 (C02、C03、C07、C08、C09)

	频率	百分比	有效百分比	累积百分比
[0137] 有效 否	2173	84.9	84.9	84.9
是	386	15.1	15.1	100.0
总计	2559	100.0	100.0	

[0138] 表8

[0139] 糖尿病(空腹血糖>6.0或者问卷调查后为糖尿病)

	频率	百分比	有效百分比	累积百分比
[0140] 有效 否	2396	93.6	93.6	93.6
是	163	6.4	6.4	100.0
总计	2559	100.0	100.0	

[0141] 表9

[0142] 目前为吸烟者

	频率	百分比	有效百分比	累积百分比
[0143] 有效 .00	1906	74.5	74.5	74.5
1.00	653	25.5	25.5	100.0
总计	2559	100.0	100.0	

[0144] 表10

[0145] 研究中男性的临床特征

[0146] 描述性统计

	N	平均值	标准偏差
MDCS 筛选时的年龄	1803	57.769	6.0345
收缩压 (mmHg)	1803	143.90	18.766
舒张压 (mmHg)	1803	88.95	9.698
体质指数 (体重/kgxkg)	1803	26.1113	3.44882
腰围 (cm)	1802	92.89	9.932
[0147] 葡萄糖 (mmol/l)	1803	5.3825	1.46780
甘油三酯 (mmol/l)	1803	1.4416	.68477
高密度脂蛋白 (mmol/l)	1803	1.2183	.29669
低密度脂蛋白 (mmol/l)	1803	4.1087	.89336
P-胰岛素	1768	8.835	10.0090
PNT (pmol/l)	1803	119.34300	75.268054
有效的 N (成列删除)	1767		

[0148] 表11

[0149] 问卷+日记记录:根据问卷或日记记录本得到的基线时的抗高血压治疗 (C02、C03、C07、C08、C09)

	频率	百分比	有效百分比	累积百分比
[0150] 有效 否	1511	83.8	83.8	83.8
是	292	16.2	16.2	100.0
总计	1803	100.0	100.0	

[0151] 表12

[0152] 糖尿病 (空腹血糖>6.0或者问卷调查后为糖尿病)

	频率	百分比	有效百分比	累积百分比
[0153] 有效 否	1597	88.6	88.6	88.6
是	206	11.4	11.4	100.0
总计	1803	100.0	100.0	

[0154] 表13

[0155] 目前为吸烟者

	频率	百分比	有效百分比	累积百分比
[0156] 有效 .00	1306	72.4	72.4	72.4
1.00	497	27.6	27.6	100.0
总计	1803	100.0	100.0	

[0157] 表14

[0158] 所有人中PNT的四分位数:

[0159] PNT (pmol/l)

PNT 的百分位组 pmol/l	N	中位数	最小值	最大值
[0160] 1	1091	60.22000	3.270	75.740
2	1090	89.29000	75.790	104.600
3	1092	122.67000	104.640	147.610
4	1089	190.03000	147.660	1154.520
总计	4362	104.62000	3.270	1154.520

[0161] 表15

[0162] 女性中PNT的四分位数:

[0163] PNT (pmol/l)

PNT的百分位组pmol/l	N	中位数	最小值	最大值
[0164] 1	639	62.37000	5.100	78.580
2	639	92.07000	78.610	108.770
3	641	125.07000	108.960	150.000
4	640	194.38500	150.050	1154.520
总计	2559	108.96000	5.100	1154.520

[0165] 在示出的所有女性亚组分析中,四分位数浓度几乎相同。

[0166] 表16

[0167] 男性中PNT的四分位数:

[0168] PNT (pmol/l)

PNT的百分位组pmol/l	N	中位数	最小值	最大值
1	450	58.02000	3.270	70.800
2	451	85.88000	70.970	98.820
3	451	118.18000	98.880	143.940
4	451	186.39000	144.180	1057.360
总计	1803	98.88000	3.270	1057.360

[0170] 在示出的所有男性亚组分析中,四分位数浓度几乎相同。

[0171] P-NT和糖尿病的预测

[0172] 在基线时未患有糖尿病的对象中,142人在平均随访时间为 12.7 ± 2.2 年的过程中患上新发糖尿病。在调整了所有糖尿病危险因素(年龄,性别,抗高血压治疗,收缩压,体质指数,腰围,吸烟,先前的心血管疾病,以及血液葡萄糖、甘油三酯、胰岛素、HDL和LDL的空腹浓度)的基线水平后,对于新发糖尿病的风险而言,基线P-NT每增加一个标准偏差(SD)就赋予风险比率(95%可信区间)1.28(1.09-1.50)($P=0.003$)。在未患前驱糖尿病(空腹血糖异常,IFG)的对象的亚组中,P-NT每增加1SD,糖尿病事件的风险比率进一步增加1.48(1.17-1.86)($P=0.001$)。

[0173] P-NT独立地与新发糖尿病相关。

[0174] 表17总人群(男性和女性)

[0175]

方程中的变量								
	B	SE	Wald	df	Sig.	Exp(B)	Exp(B)95.0% CI	
							下限	上限
性别	.748	.296	6.404	1	.011	2.112	1.184	3.770
年龄	.004	.015	.058	1	.809	1.004	.974	1.034
AHT_B	.385	.197	3.807	1	.051	1.470	.998	2.165
SBP_B	.003	.005	.297	1	.586	1.003	.993	1.012
腰围_B	.036	.016	4.937	1	.026	1.037	1.004	1.071
BMI_B	-.010	.041	.053	1	.817	.991	.914	1.074
葡萄糖_B	2.330	.223	109.419	1	.000	10.273	6.640	15.895
HDL_B	-.625	.310	4.063	1	.044	.535	.292	.983
LDL_B	-.020	.089	.051	1	.821	.980	.823	1.167
LNINS	.023	.185	.016	1	.900	1.024	.712	1.471
目前为吸烟者	.311	.190	2.692	1	.101	1.365	.941	1.981
pr_cv_2008	.062	.450	.019	1	.891	1.063	.440	2.570
ZLN_PNT	.239	.081	8.705	1	.003	1.270	1.083	1.488

[0176] 表18

[0177] 仅女性

[0178] 方程中的变量b

[0179]

	B	SE	Wald	df	Sig.	Exp(B)	Exp(B) 95.0% CI	
							下限	上限
性别			.	0a	.			
年龄	.007	.022	.102	1	.750	1.007	.965	1.051
AHT_B	.208	.276	.568	1	.451	1.232	.717	2.117
SBP_B	-.001	.007	.011	1	.918	.999	.986	1.013
腰围_B	.057	.021	7.100	1	.008	1.059	1.015	1.104
BMI_B	-.062	.055	1.269	1	.260	.940	.845	1.047
葡萄糖_B	2.359	.296	63.676	1	.000	10.578	5.927	18.881
HDL_B	-.318	.378	.707	1	.400	.728	.347	1.526
LDL_B	-.078	.117	.443	1	.506	.925	.736	1.163
LNINS	-.119	.254	.220	1	.639	.888	.540	1.460
目前为吸烟者	.225	.264	.727	1	.394	1.253	.746	2.103
pr_cv_2008	-.414	.979	.179	1	.672	.661	.097	4.502
ZLN_PNT	.315	.114	7.703	1	.006	1.371	1.097	1.713

[0180] a. 由于常量或线性相关的协变量,自由度降低

[0181] b. 常量或线性相关的协变量性别=2;

[0182] 在基线时没有空腹血糖异常和糖尿病的对象中,68人在随访期间患上新发糖尿病,在全面调整了糖尿病危险因素后,对于在整个人群中的新发糖尿病风险而言,P-NT每增加一个SD就伴有1.48 (1.17-1.87) (P=0.001) 的风险比率,在女性中为1.47 (1.08-2.00) (P=0.014),而在男性中为1.56 (1.08-2.27) (P=0.019)。当将所有糖尿病危险因素输入到多变量Cox回归模型中时,只有空腹血糖的基线水平具有比P-NT更强的与新发糖尿病的统计学相关性。

[0183] 图2:糖尿病预测的Kaplan Meier分析

[0184] 2a) 所有未患糖尿病的对象采用中位数截止值 (cut off) (104.6pmol/l)

[0185] 2b) 所有未患糖尿病和前驱糖尿病 (IFG) 的对象,截止值, (104.6pmol/l)

[0186] 亚组分析

[0187] 在方程中使用相同的变量,我们研究了用于预测糖尿病的不同的亚组,在基线时患有糖尿病的对象被排除。

[0188] 表19

[0189]

亚组	对象数量	事件数量	每1SD PNT 的风险	显著性 (p值)
全部	3704	142	27,8%	0,003
没有空腹血糖异常的所有对象	3102	64	47,9	0,001
没有空腹血糖异常的女性	1950	38	47%	0,014
没有空腹血糖异常 (IFG) 的男性	1152	26	56,5%	0,019
HBP女性	1318	53	52,5%	0,002
没有非IFG的HBP女性	1119	25	58,4%	0,02
血压正常女性	1014	46	40,1%	0,014
没有非IFG的血压正常女性	1014	12	125%	0,001

[0190] P-NT显著地预示着糖尿病的发展。P-NT的预测能力在没有IFG (前驱糖尿病) 的对象中更强。

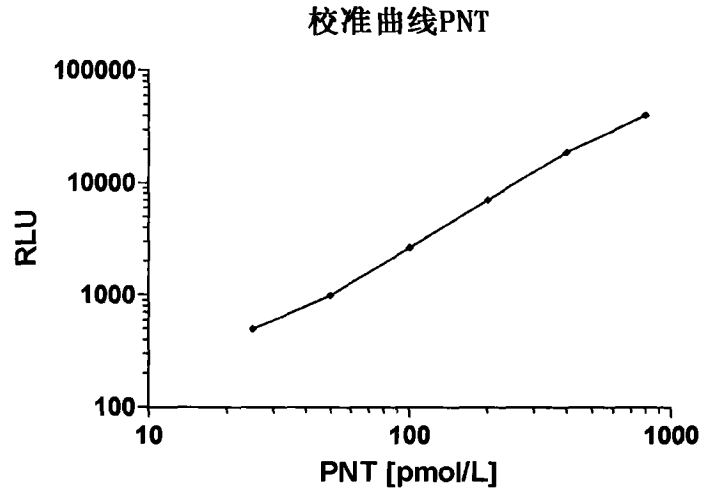


图1

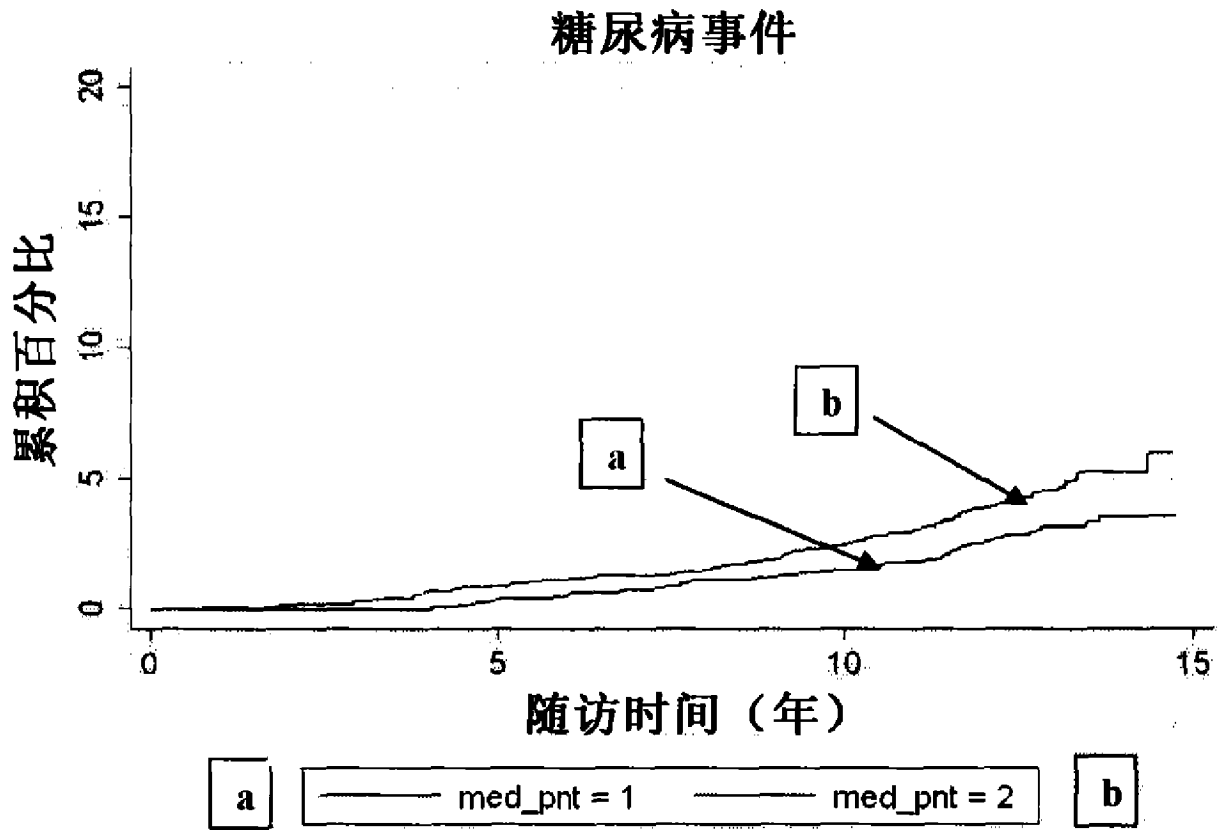


图2a

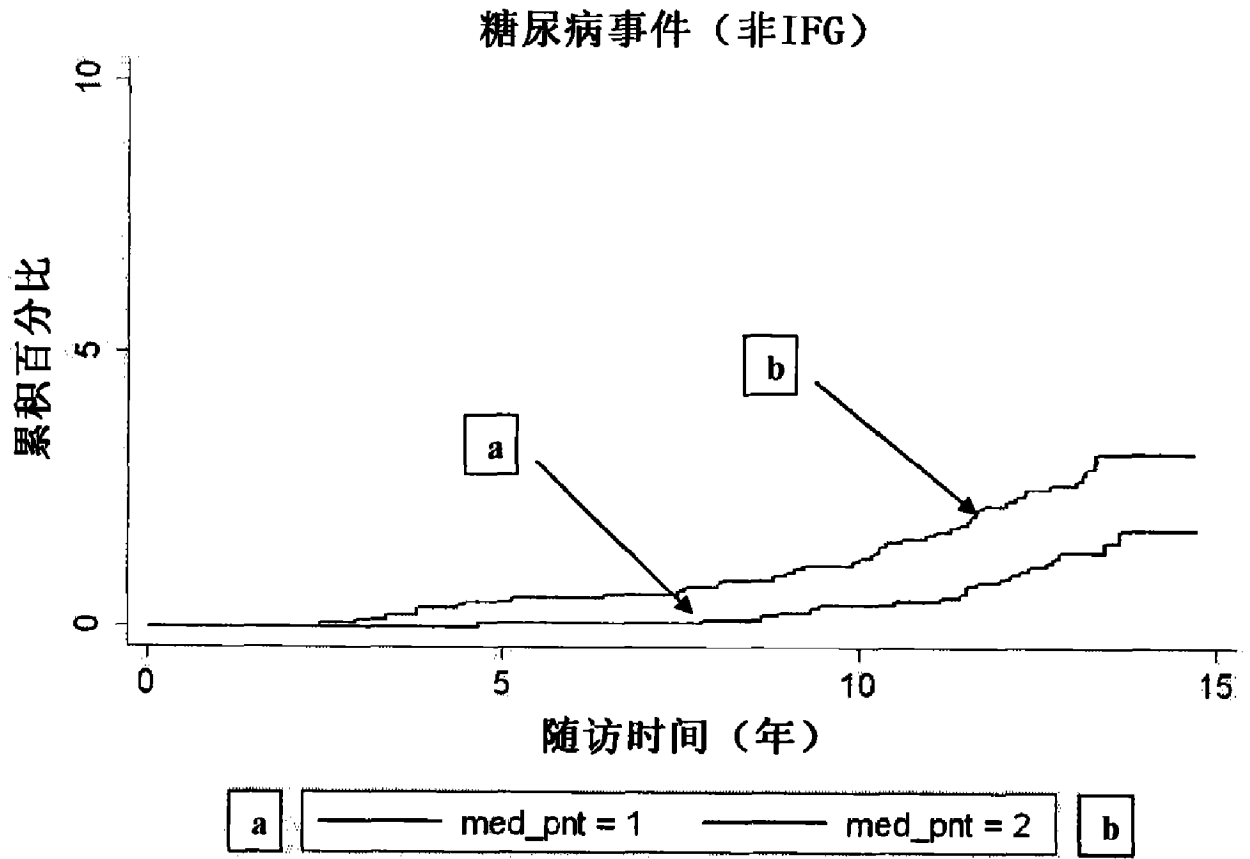


图2b