



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103403548 A

(43) 申请公布日 2013. 11. 20

(21) 申请号 201180068295. 0 (51) Int. Cl.
(22) 申请日 2011. 12. 23 *G01N 33/53* (2006. 01)
(30) 优先权数据 *G01N 33/58* (2006. 01)
10196869. 1 2010. 12. 23 EP *G01N 33/62* (2006. 01)
61/426, 549 2010. 12. 23 US *G01N 33/64* (2006. 01)
G01N 33/66 (2006. 01)
(85) PCT申请进入国家阶段日
2013. 08. 22
(86) PCT申请的申请数据
PCT/IB2011/055935 2011. 12. 23
(87) PCT申请的公布数据
W02012/085890 EN 2012. 06. 28
(71) 申请人 梅坦诺米克斯保健有限公司
地址 德国柏林
(72) 发明人 J·维默尔 D·雷恩 I·帕德伯格
O·施米茨 V·里本伯格
V·尼基弗洛瓦
(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所
11247
代理人 凌立 黄革生

权利要求书2页 说明书24页

(54) 发明名称
用于预测糖尿病的工具和方法

(57) 摘要

本发明提供用于诊断糖尿病或糖尿病诱因的方法,其包括测定疑似患有糖尿病或具有糖尿病诱因的个体的测试样品中乙醛酸盐的量,并将该量与参考比较,由此诊断糖尿病或糖尿病诱因。此外,本发明提供乙醛酸盐或乙醛酸盐的检测剂在诊断糖尿病或其诱因中的用途。另外,本发明还提供用于诊断糖尿病或糖尿病诱因的装置和试剂盒。

1. 用于诊断糖尿病或其诱因的方法,其包括:
 - (a) 测定疑似患有糖尿病或具有其诱因的个体的测试样品中乙醛酸盐的量;和
 - (b) 将步骤(a)中测定的量与参考相比较,由此诊断糖尿病或其诱因。
2. 权利要求1的方法,其中所述参考衍生自己知患有糖尿病或具有其诱因的个体或个体组。
3. 权利要求2的方法,其中与所述参考相比,所述测试样品中提高的乙醛酸盐的量指示糖尿病或其诱因的存在,或其中与所述参考相比,所述测试样品中降低的乙醛酸盐的量指示糖尿病或其诱因的缺乏。
4. 权利要求1的方法,其中所述参考衍生自己知未患糖尿病或不具有其诱因的个体或个体组。
5. 权利要求4的方法,其中与所述参考相比,所述测试样品中提高的乙醛酸盐的量指示糖尿病或其诱因的存在,或其中与所述参考相比,所述测试样品中相同或降低的乙醛酸盐的量指示糖尿病或其诱因的缺乏。
6. 权利要求1至5中任一项的方法,其中所述糖尿病诱因伴随提高的长期血糖、受损的葡糖耐量(IGT)、受损的空腹葡萄糖(IFG)或与IFG组合的IGT。
7. 权利要求1至6中任一项的方法,其中所述方法进一步包括根据步骤b)中确立的诊断建议用于治疗或预防糖尿病或其诱因的疗法的步骤。
8. 权利要求1至7中任一项的方法,其中所述样品是所述个体的体液的样品。
9. 权利要求1至8中任一项的方法,其中所述个体是人类。
10. 权利要求1至9中任一项的方法,其中测定糖尿病或其诱因的至少一个其他生物标志,其中所述至少一个其他生物标志选自玉米黄质、2-羟基-棕榈酸、三酰甘油酯(C16:0、C18:1、C18:2)、二十碳-11-烯酸、二十三烷酸、5-羟脯氨酸、葡萄糖、血红蛋白HbA1C、1,5-失水山梨糖醇、2-羟基丁酸和甘露糖。
11. 用于诊断伴随共发病的糖尿病或其诱因的方法,所述方法包括:
 - (a) 测定疑似患有伴随共发病的糖尿病或具有其诱因的个体的测试样品中乙醛酸盐的量,其中所述样品在OGTT期间在起始测试后约2小时从所述个体获得;和
 - (b) 将步骤(a)中测定的量与参考相比较,由此诊断伴随共发病的糖尿病或其诱因。
12. 乙醛酸盐或乙醛酸盐的检测剂的用途,用于在个体的样品中诊断糖尿病或其诱因。
13. 用于在疑似患有糖尿病或其诱因的个体的样品中诊断糖尿病或其诱因的装置,其包括:
 - (a) 包含乙醛酸盐的检测剂的分析单元,其允许测定存在于所述样品中的乙醛酸盐的量;及与之有效连接的
 - (b) 包含存储的参考和数据处理器的评价单元,其允许将通过所述分析单元测定的乙醛酸盐的量与所述存储的参考相比较,由此诊断糖尿病或其诱因。
14. 权利要求13的装置,其中所述存储的参考是衍生自己知患有糖尿病或具有其诱因的个体或个体组的参考,且所述数据处理器执行用于将通过所述分析单元测定的乙醛酸盐的量与所述存储的参考相比较的指令,其中与所述参考相比,所述测试样品中相同或提高的乙醛酸盐的量指示糖尿病或其诱因的存在,或其中与所述参考相比,所述测试样品中降低的乙醛酸盐的量指示糖尿病或其诱因的缺乏。

15. 权利要求 13 的装置,其中所述存储的参考是衍生自己知未患糖尿病或不具有其诱因的个体或个体组的参考,且所述数据处理器执行用于将通过所述分析单元测定的乙醛酸盐的量与所述存储的参考相比较的指令,其中与所述参考相比,所述测试样品中提高的乙醛酸盐的量指示糖尿病或其诱因的存在,或其中与所述参考相比,所述测试样品中相同或降低的乙醛酸盐的量指示糖尿病或其诱因的缺乏。

16. 用于诊断糖尿病或其诱因的试剂盒,其包含乙醛酸盐的检测剂和乙醛酸盐标准物,所述乙醛酸盐标准物的浓度衍生自己知患有糖尿病或具有其诱因的个体或个体组,或衍生自己知未患糖尿病或不具有其诱因的个体或个体组。

17. 权利要求 12、权利要求 13 至 15 中任一项的装置或权利要求 16 的试剂盒的用途,其中所述检测剂是特异性结合乙醛酸盐的抗体或特异性结合乙醛酸盐的适体。

用于预测糖尿病的工具和方法

[0001] 本发明涉及糖尿病诊断领域。具体而言,它涉及用于诊断糖尿病或糖尿病诱因的方法,其包括测定疑似患有糖尿病或具有糖尿病诱因的个体的测试样品中乙醛酸盐(glyoxylate)的量,并将该量与参考相比较,由此诊断糖尿病或糖尿病诱因。此外,本发明还涉及乙醛酸盐或乙醛酸盐的检测剂在在个体的样品中诊断糖尿病或其诱因中的用途。此外,本发明涵盖用于诊断糖尿病或其诱因的装置和试剂盒。

[0002] 糖尿病在工业化国家的流行率已达到约 6%,世界范围内受影响的人将于 2030 年增加至三亿六千六百万。世界上最常见的糖尿病原因(类型)(约 90%)导致具有多因子病理的 2 型糖尿病。2 型糖尿病的病理顺序需要许多要素。认为具有目前知之甚少的遗传诱因是强制性的。后来是否出现糖尿病表型受许多环境因素影响,这些环境因素共有通过引起或恶化胰岛素抗性或损害胰岛素分泌来对葡萄糖稳态系统施压的能力。当然,许多激素参与葡萄糖代谢的调节,但关键激素是胰岛素。胰岛素作用和胰岛素分泌之间的平衡相互作用维持血糖量正常。胰岛素由能够针对不同葡萄糖需要非常快地调节的胰腺 β -细胞产生。2 型糖尿病的主要原因是提高的胰岛素抗性。因此,胰岛素作用通常降低,但最初系统能够通过提高的 β -细胞功能来抵消此降低。此时在 OGTT 中可能仅可测量受损的空腹葡萄糖或受损的葡萄糖耐量。但随着时间的推移,逐渐提高的胰岛素抗性将对 β -细胞过度施压,可以诊断出葡萄糖毒性和 2 型糖尿病。

[0003] 除高血糖或低血糖引起的直接医学问题外,该疾病主要的医学和社会经济学负担由相关的并发症引起。糖尿病的毁灭性并发症主要是大血管和微血管疾病,如慢性肾衰竭、视网膜病、外周及自主神经病或心肌梗塞。因此,2 型糖尿病患者中的心血管发病率比非糖尿病人类的发病率高 2 至 4 倍(Stumvoll 等, Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy, Lancet 2005)。

[0004] 鉴于此机制,糖尿病的治疗目前基于监测血糖水平,并通过施用外源胰岛素来将提高的血糖水平降回正常水平。为此,将外源胰岛素注射入血液。备选地,可以通过营养饮食及排除生活方式风险因子(如抽烟、缺乏锻炼、高胆固醇水平和不稳定的体重)来调节血液中的葡萄糖水平。

[0005] ADA (美国糖尿病协会(American Diabetes Association))的专家委员会认可中间组的个体,虽然其葡萄糖水平不符合糖尿病的标准,但是该水平仍然过高而不能认为正常。将此组定义为具有 $>100\text{mg/dl}$ (5.6mmol/l) 但 $<126\text{mg/dl}$ (7.0mmol/l) 的空腹血浆葡萄糖(FPG)水平,或口服葡萄糖耐量测试(OGTT)中 $>140\text{mg/dl}$ (7.8mmol/l) 但 $<200\text{mg/dl}$ (11.1mmol/l) 的 2 小时值。因此,FPG 值的分类如下:

[0006] $\text{-FPG} < 100\text{mg/dl}$ (5.6mmol/l) = 正常空腹葡萄糖;

[0007] $\text{-FPG} 100\text{--}125\text{mg/dl}$ ($5.6\text{--}6.9\text{mmol/l}$) = IFG (受损的空腹葡萄糖);

[0008] $\text{-FPG} > 126\text{mg/dl}$ (7.0mmol/l) = 糖尿病的临时诊断(必须按下文所述确认该诊断)。

[0009] 使用 OGTT 时,对应的分类如下:

[0010] $\text{- 负荷后 2 小时葡萄糖} < 140\text{mg/dl}$ (7.8mmol/l) = 正常葡萄糖耐量;

[0011] $\text{- 负荷后 2 小时葡萄糖} 140\text{--}199\text{mg/dl}$ ($7.8\text{--}11.1\text{mmol/l}$) = IGT (受损的葡萄糖耐量);

[0012] - 负荷后 2 小时葡萄糖 $>200\text{mg/dl}$ (11.1mmol/l) = 糖尿病的临时诊断(必须按下文所述确认该诊断)。

[0013] 2 型糖尿病的诊断: 糖尿病的症状加上偶尔血浆葡萄糖浓度 $>200\text{mg/dl}$ (11.1mmol/l)。偶尔定义为一天中的任意时间, 而不考虑距离最后一餐的时间。糖尿病的经典症状包括多尿症、烦渴和原因不明的体重减轻。备选地: 2. FPG $>126\text{mg/dl}$ (7.0mmol/l)。空腹定义为至少 8 小时无热量摄入。备选地: 3. OGTT 期间负荷后 2 小时葡萄糖 $>200\text{mg/dl}$ (11.1mmol/l)。应按 WHO 所述, 用含有溶解在水中的 75g 无水葡萄糖当量的葡萄糖负荷进行测试。

[0014] 在缺乏明确的高血糖的情况下, 应通过在另一天重复测试来确认这些标准。对于日常临床使用, 不建议第三次测量(OGTT)。(American Diabetes Association, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, Diabetes Care 2006)。但是, 血糖水平的提高或可用胰岛素的减少是动态 (developments), 其是糖尿病的发展和进展中非常下游的事件。

[0015] 最近报道了糖尿病的诊断生物标志(见 W02007/110357; W02007/110358; W02009/14639; 和 W02010/114897)。在尿液中, 报道了乙醛酸盐排泄的增加 (Yamaguchi 1968, Journal of Osaka City Medical Center 17(9-10):383-389)。但是, 仍存在对可靠的生物标志的需要, 该生物标志可以用来在该疾病的早期发病之前或至少在早期阶段鉴定处于风险的个体。

[0016] 因此, 本发明潜在的技术问题必须视为提供用于有效和可靠地诊断糖尿病或糖尿病诱因的工具和方法。通过权利要求中表征及下文描述的实施方案来解决该技术问题。

[0017] 本发明涉及用于诊断糖尿病或其诱因的方法, 其包括:

[0018] (a) 测定疑似患有糖尿病或具有其诱因的个体的测试样品中乙醛酸盐的量; 和

[0019] (b) 将步骤(a)中测定的量与参考相比较, 由此诊断糖尿病或其诱因。

[0020] 本发明提到的方法可以基本上由前述步骤组成, 或可以包括其他步骤。其他步骤可以涉及样品预处理或通过该方法获得的诊断结果的评价。优选的其他评价步骤在本文中其他地方描述。该方法可以部分或完全由自动化辅助。例如, 步骤 a) 可以通过机器人和自动阅读装置来自动化。步骤 b) 可以通过适宜的数据处理装置(如计算机)来自动化, 该装置包含程序代码, 在执行该代码时自动进行比较。在这种情况下, 将从存储的参考(例如从数据库)提供参考。应理解, 该方法优选是在个体的样品上离体进行的方法, 即不在人或动物体上实施。

[0021] 本文所用的术语“诊断”指评估个体患有糖尿病或具有糖尿病诱因的概率。诱因的诊断有时可以称为个体将发展该疾病的可能性的预后或预测。如本领域技术人员将理解, 这种评估虽然优选对要诊断的个体 100% 正确, 但通常并非对要诊断的个体 100% 正确。但是, 该术语要求可以将个体的统计上显著的部分鉴定为患有糖尿病或具有糖尿病诱因。本领域技术人员可以不费周折地用多种公知的统计学评价工具来确定部分是否在统计上显著, 例如置信区间的确定、p- 值确定、斯氏 t 检验、Mann-Whitney 检验等。详细说明见于 Dowdy 和 Wearden, Statistics for Research, John Wiley & Sons, New York 1983 中。优选的置信区间是至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90% 或至少 95%。优选地, p- 值为 0.2、0.1、0.05。

[0022] 本发明的诊断还包括糖尿病或它的症状及其诱因的监测、确认和分类。监测指跟踪已诊断的糖尿病或诱因。监测涵盖例如在具有诱因的个体中测定疾病或诱因的进展、测定具体治疗对疾病的进展的影响或诸如预防性治疗或饮食的预防措施对疾病发展的影响。确认涉及强化或证实已经用其他指示物或标志进行的糖尿病或糖尿病诱因的诊断。分类涉及将疾病分入例如对应于伴随疾病的症状的强度或在不同阶段或医疗条件之间区分的不同疾病种类。可以根据风险程度(即个体以后将发展该疾病的概率)来分类疾病诱因。此外,该方法还可以涵盖发展某种共发病(如提高的血压)或处于这类共发病(co-morbidities)的风险的个体的鉴定。

[0023] 优选地,可以通过本发明的方法来根据作为生物标志的乙醛酸盐分类个体,并分入不同风险组(见下文表格)。具体而言,乙醛酸盐指示具有提高的糖尿病风险,并落入下文表格中所示的受损的空腹葡萄糖(IFG)、受损的葡糖耐量(IGT)或二者(IFG&IGT)的风险组中的个体。因此,优选地,本发明的方法是用于根据乙醛酸盐的测量结果来诊断个体是否具有糖尿病诱因或患有 IFG、IGT 或 IFG&IGT 的方法。

[0024] 本文所用的术语“糖尿病(“diabetes”或“diabetes mellitus”)”指葡萄糖代谢受损的疾病病症。该受损导致高血糖。根据世界卫生组织(WHO),糖尿病可以细分为四类。1型糖尿病由胰岛素的缺乏引起。胰岛素由所谓的胰岛细胞产生。在1型糖尿病(1a型)中,自身免疫反应可以破坏该细胞。此外,1型糖尿病还涵盖自发性变型(1b型)。2型糖尿病由胰岛素抗性引起。根据目前的分类,3型糖尿病包括所有其他具体的糖尿病类型。例如, β 细胞可以具有影响胰岛素产生的遗传缺陷,胰岛素抗性可以由遗传引起,或胰腺同样可以受破坏或受损。此外,激素下调或药物也可以引起3型糖尿病。4型糖尿病可以发生在怀孕期间。优选地,本文所用的糖尿病指2型糖尿病。根据德国糖尿病协会(German Society for Diabetes),通过空腹状态下血浆葡萄糖水平高于110mg/dl或餐后高于220mg/dl来诊断糖尿病。其他优选的诊断技术在本说明书中其他地方公开。糖尿病的其他症状为本领域公知,并描述于标准医学教科书(如 Stedman 或 Pschyrembl)中。

[0025] 本文所用的术语“诱因”意指个体尚未发展该疾病或任意前述疾病症状或其他诊断标准,但将以某种可能性在将来的限定时窗(预测窗)内发展该疾病。预测窗是个体将按照预测的概率发展该疾病或病症的间隔。通过本发明的方法分析时,预测窗可以是个体的全部剩余寿命。但是,优选地,预测窗是获得将通过本发明的方法分析的样品后1个月、6个月或1年、2年、3年、4年、5年或10年的间隔。对于具有诱因的个体,发展本文中提到的疾病的可能性将显著大于给定的个体群组内糖尿病的统计学出现(statistical appearance)的可能性。优选地,对于单个个体,与给定群组的个体发展糖尿病的平均可能性相比,与发展糖尿病的诱因相关的可能性提高至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或100%、或至少1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍或10倍。本文提到的个体的群组意指多个单个体,其属于相同的物种,且优选具有相同或遗传背景或人种群,且更优选还具有相同的年龄和性别。

[0026] 优选地,本文中提高的该糖尿病诱因伴随提高的长期血糖、受损的葡糖耐量(IGT)、受损的空腹葡萄糖(IFG)和/或与IFG组合的IGT。

[0027] 本文提到的术语“乙醛酸盐”指天然存在的乙醛酸盐或其人工产生的衍生物。天然存在的衍生物是通过代谢转化来从乙醛酸盐获得的衍生物。人工产生的衍生物是在通过

本发明的方法进行分析期间从乙醛酸盐产生的衍生物,例如 GCMS 分析等所需的衍生物。应理解,上文提到的衍生物将反映见于个体中的代谢物的量,即从个体的样品测定的衍生物的量将与采集该样品时见于该个体中的代谢物的量相关。将以下命名用作乙醛酸盐的同义词:乙醛酸(glyoxylic acid)、甲酰甲酸盐(formylformate)、甲酰甲酸(formylformic acid)、乙醛酸盐(glyoxalate)、乙二醛酸盐(oxalaldehydate)、乙二醛酸(oxalaldehydic acid)、氧代乙酸盐(oxoacetate)、氧代乙酸(oxoacetic acid)、氧代乙酸盐(oxoethanoate)、氧代乙酸(oxoethanoic acid)、 α -酮基乙酸盐(alpha-ketoacetate)或 α -酮基乙酸(alpha-ketoacetic acid)。

[0028] 在本发明的方法中,除乙醛酸盐外,可以测定糖尿病或其诱因的至少一个其他生物标志。优选地,该至少一个其他生物标志选自玉米黄质、2-羟基-棕榈酸、三酰甘油酯(C16:0、C18:1、C18:2)、二十碳-11-烯酸、二十三烷酸、5-羟脯氨酸、葡萄糖、血红蛋白HbA1C、1,5-失水山梨糖醇、2-羟基丁酸和甘露糖。将与乙醛酸盐一起(即同时或连续)测定的其他优选的代谢物是分别由 W02007/110357 和 W02007/110358 公开的指示糖尿病或其诱因的代谢物生物标志。

[0029] 本文所用的术语“测试样品”指将用于通过本发明的方法诊断糖尿病或糖尿病诱因的样品。该测试样品是生物样品。来自生物来源的样品(即生物样品)通常包含多种代谢物。将用于本发明的方法的优选生物样品是来自体液(优选血液、血浆、血清、淋巴、汗液、唾液、泪液、精液、阴道液、粪便、尿液或脑脊液)的样品,或例如通过活组织检查衍生自细胞、组织或器官的样品。这还涵盖含有亚细胞区室或细胞器(如线粒体、高尔基体网络或过氧化物酶体)的样品。此外,生物样品还涵盖气态样品,如生物的挥发性物质。生物样品衍生自本文中其他地方所述的个体。用于获得前述不同类型的生物样品的技术为本领域公知。例如,血液样品可以通过采血获得,而组织或器官样品将例如通过活组织检查获得。最优选地,本文提到的测试样品是血液、血浆或血清样品。

[0030] 优选地,在将前述样品用于本发明的方法之前预处理该前述样品。如下文更详细地描述,该预处理可以包括释放或分开化合物或去除过量的物质或废物所需的处理。适宜的技术包括离心、提取、分级分离、纯化和/或化合物的富集。此外,为了以适合用于化合物分析的形式或浓度提供化合物,进行其他预处理。例如,如果在本发明的方法中使用气相层析偶联质谱分析法,则将需要在该气相层析之前衍生化合物。适宜和必要的预处理取决于用来进行本发明的方法的工具,且为本领域技术人员公知。前述预处理的样品也为在本发明所用的术语“样品”所包含。

[0031] 本文所用的术语“个体”指动物,优选指哺乳动物,如小鼠、大鼠、绵羊、狗、猫、马、猴或牛,还优选指人类。可以用本发明的方法诊断的其他动物是鸟类或爬行类。疑似患有糖尿病的个体指优选显示指示糖尿病的症状或临床病征或参数的个体。具有糖尿病诱因的个体优选不显示指示糖尿病的明显的症状或临床病征或参数,即就糖尿病而言表观上健康的个体。作为预防性治疗的措施或为了群体筛查的目的,也可以通过本发明的方法来考查表观上健康的个体。优选地,该个体在将要获取测试样品时是非空腹个体。

[0032] 本文所用的术语“测定”指测定本文提到的样品所包含的乙醛酸盐的至少一种特有特征。本发明的特有特征是表征乙醛酸盐的物理和/或化学性质(包括生物化学性质)的特征。这类性质包括例如分子量、黏度、密度、电荷、自旋、光活性、元素组成、化学结构、与其

他化合物反应的能力、在生物读出系统中引起反应的能力等。该性质的值可以作为特有特征,且可以通过本领域公知的技术来测定。此外,该特有特征可以通过标准操作(例如数学计算,如乘、除或对数演算)衍生自乙醛酸盐的物理和/或化学性质的值的任意特征。最优选地,该至少一种特有特征允许乙醛酸盐的测定和/或化学鉴定。

[0033] 可以按照本发明定量或定性地测定测试样品所包含的乙醛酸盐。对于定性测定,将通过适宜的技术来确定乙醛酸盐的存在或缺乏。此外,定性测定可以优选包括测定化学结构或组成。对于定量测定,将优选根据针对上文提到的一种或多种特有特征测定的值来确定存在于样品中的乙醛酸盐的精确量,或确定其相对量。在不能或不应测定乙醛酸盐的精确量的情况下,可以测定相对量。在这种情况下,可以测定存在的乙醛酸盐的量就以第二量包含乙醛酸盐的第二样品而言是扩大还是减小。因此,定量分析乙醛酸盐也包括有时称为半定量分析的分析。

[0034] 此外,用于本发明的方法中的测定优选包括在之前提到的分析步骤之前使用化合物分离步骤。优选地,该化合物分离步骤产生样品所包含的代谢物的时间分辨分离。因此,将优选用于本发明的适宜的分选技术包括所有层析分离技术,如液相层析(LC)、高效液相层析(HPLC)、气相层析(GC)、薄层层析、大小排阻或亲和力层析。这些技术为本领域公知,且本领域技术人员可以不费周折地应用。最优选地,LC和/或GC是本发明的方法所设想的层析技术。适合用于代谢物(如乙醛酸盐)的这种测定的装置为本领域公知。优选地,使用质谱分析法,尤其是气相层析质谱分析法(GC-MS)、液相层析质谱分析法(LC-MS)、直接进样质谱分析法或傅里叶变换离子回旋共振质谱分析法(FT-ICR-MS)、毛细管电泳质谱分析法(CE-MS)、高效液相层析偶联质谱分析法(HPLC-MS)、四极质谱分析法、任意连续偶联的质谱分析法(如MS-MS或MS-MS-MS)、电感耦合等离子体质谱分析法(ICP-MS)、热解质谱分析法(Py-MS)、离子迁移质谱分析法或飞行时间质谱分析法(TOF)。最优选地,按下文详述使用LC-MS和/或GC-MS。该技术公开于例如Nissen, Journal of Chromatography A, 703, 1995:37-57、US4,540,884或US5,397,894中,其公开内容在此引入作为参考。作为质谱分析技术的备选,或除质谱分析技术外,以下技术可以用于化合物测定:核磁共振(NMR)、磁共振成像(MRI)、傅里叶变换红外分析(FT-IR)、紫外(UV)光谱、折射率(RI)、荧光检测、放射化学检测、电化学检测、光散射(LS)、色散型拉曼光谱或火焰离子化检测(FID)。这些技术为本领域技术人员公知,且可以不费周折地应用。优选地,将通过自动化来辅助本发明的方法。例如,可以通过机器人来自动化样品处理或预处理。数据处理和比较优选通过适宜的计算机程序和数据库来辅助。前文所述的自动化允许将本发明的方法用于高通量方法。

[0035] 如上文所述,在本发明的方法的优选实施方案中,该乙醛酸盐的测定包括质谱分析法(MS)。

[0036] 本文所用的质谱分析法涵盖允许测定对应于将按本发明测定的化合物(即代谢物)的分子量(即质量)或质量变量的所有技术。优选地,本文所用的质谱分析法涉及GC-MS、LC-MS、直接进样质谱分析法、FT-ICR-MS、CE-MS、HPLC-MS、四极质谱分析法、任意连续偶联的质谱分析法(如MS-MS或MS-MS-MS)、ICP-MS、Py-MS、TOF或使用前述技术的任意组合方法。如何应用这些技术为本领域技术人员公知。此外,适宜的装置可商购。更优选地,本文所用的质谱分析法涉及LC-MS和/或GC-MS,即涉及与之前的层析分离步骤有效连接的质

谱分析法。更优选地,本文所用的质谱分析法涵盖四级杆 MS。最优选地,按以下进行该四级杆 MS :a) 选择通过在质谱仪的第一分析四级杆中离子化产生的离子的质量 / 电荷比(m/z);b) 通过在充满碰撞气体并作为碰撞室的另一随后的四级杆中施加加速电压来片段化步骤 a) 中选择的离子 ;c) 选择通过步骤 b) 中的片段化过程在另一随后的四级杆中产生的离子的质量 / 电荷比 ;由此进行该方法的步骤 a) 至 c) 至少一次,并分析由于离子化过程而存在于物质的混合物中的所有离子的质量 / 电荷比,由此四级杆在分析期间充满碰撞气体但不施加加速电压。关于将用于本发明的该最优选的质谱分析法的详细说明可以见于 WO 03/073464 中。

[0037] 更优选地,该质谱分析法是液相层析(LC)MS 和 / 或气相层析(GC)MS。

[0038] 本文所用的液相层析指允许在液相或超临界相中分离化合物(即包括乙醛酸盐的代谢物)的所有技术。液相层析的特征在于流动相中的化合物穿过固定相。在化合物以不同速率穿过固定相时,它们按时间分开,因为每一单种化合物具有其特定的保留时间(即化合物穿过系统所需的时间)。本文所用的液相层析还包括 HPLC。用于液相层析的装置可以例如从 Agilent Technologies, USA 购得。本发明所应用的气相层析基本上与液相层析相当运行。但是,化合物将存在于气态体积中,而不是使化合物处在穿过固定相的液体流动相中。化合物穿过柱子,该柱子可以包含固体支持材料作为固定相,或该柱子的壁可以作为固定相或用固定相包被。同样,每种化合物具有穿过柱子所需的特定时间。此外,在气相层析的情况下,优选设想在气相层析之前衍生化合物。适合用于衍生的技术为本领域公知。优选地,本发明的衍生涉及优选极性化合物的甲氧基化(methoxymation)和三甲硅烷基化及优选非极性(即亲脂性)化合物的甲基转移、甲氧基化和三甲硅烷基化。

[0039] 此外,还可以通过特异性化学或生物学测定来测定乙醛酸盐。该测定将包括允许特异性检测样品中的乙醛酸盐的工具。优选地,该工具能够特异性识别乙醛酸盐的化学结构,或能够根据其与其他化合物反应的能力或其生物读出系统中引起反应(例如诱导报道基因)的能力特异性鉴定乙醛酸盐。能够特异性识别乙醛酸盐的化学结构的工具是乙醛酸盐的检测剂,优选与乙醛酸盐特异性结合的抗体、蛋白质或适体。特异性抗体例如可以通过本领域公知的方法用乙醛酸盐作为抗原来获得或从噬菌体抗体文库获得。本文提到的抗体包括多克隆抗体和单克隆抗体二者及其片段,如能够结合抗原或半抗原的 Fv、Fab 和 F(ab)₂ 片段。此外,涵盖单链抗体和所有类型的嵌合抗体。能够特异性识别乙醛酸盐的适宜的蛋白质优选是涉及该代谢物的代谢转化的酶。该酶可以用乙醛酸盐作为底物或可以将底物转化为该代谢物。与乙醛酸盐特异性结合的适体可以通过本领域公知的方法(Ellington 1990, Nature 346:818-822 ;Vater 2003, Curr Opin Drug Discov Devel 6(2):253-261)来产生。适宜的基于抗体和 / 或酶的测定可以是 RIA(放射免疫测定)、ELISA(酶联免疫吸附测定)、夹心法酶免疫测试、电化学发光夹心法免疫测定(ECLIA)、解离增强镧系元素荧光免疫测定(DELFIA)或固相免疫测试。此外,还可以根据其与其他化合物反应的能力(即通过特异性化学反应)来鉴定乙醛酸盐。可以使用其他检测方法,如毛细管电泳(Hubert2001, Clinical Chemistry 47:1319-1321)和比色法(Kyaw 1978, Clin Chim Acta 86(2):153-7)。此外,由于其在生物读出系统中引起反应的能力而可以在样品中测定乙醛酸盐。该生物反应将检测为显示样品所包含的乙醛酸盐的存在和 / 或量的读出。该生物反应可以是例如基因表达的诱导或细胞或生物的表型反应。

[0040] 此外,应理解,取决于用来测定乙醛酸盐的技术,将要检测的分析物可以是生理存在的乙醛酸盐(即存在于个体内的代谢物)的衍生物。这类分析物可以由于样品制备或检测工具而产生。将本文提到的化合物视为分析物。但是,如上文所述,这些分析物将以定性和定量的方式代表乙醛酸盐。

[0041] 术语“参考”指乙醛酸盐的量,其可以与糖尿病或糖尿病诱因相关。这种参考优选获自来自自己已知患有糖尿病或具有糖尿病诱因的个体的样品。可以通过应用本发明的方法来获得参考。备选地,但也是优选地,该参考可以获自己知未患糖尿病或不具有糖尿病诱因的个体的样品。此外,该参考还优选可以是计算的参考,最优选包含待考查的个体的一群个体(如白种人的代表性群组)的乙醛酸盐的相对量或绝对量的平均值或中位数。可以按本文中其他地方所述测定该群体的个体的乙醛酸盐的绝对量或相对量。如何计算适宜的参考(优选平均值或中位数)为本领域公知。用于计算适宜的参考的其他技术包括使用接受者操作特征(ROC)曲线计算的优化,其也为本领域公知,且可以不费周折地针对基于给定的个体群组的具有给定的特异性和灵敏度的测定系统进行。之前提到的个体的群体将包含多个个体,优选至少 5、10、50、100、1,000 或 10,000 个个体。应理解,将通过本发明的方法诊断的个体和该多个个体的个体属于同一物种。

[0042] 更优选地,该参考将存储在适宜的数据存储介质(如数据库)中,因此也可用于将来的诊断。这还允许有效地诊断疾病诱因,因为一旦将来确认对应的参考样品所来自的个体确实发展了糖尿病,即可以在数据库中鉴定适宜的参考。优选的与人类中的糖尿病或其诱因相关的参考是所附实施例的表格中所示的那些。

[0043] 术语“比较”指评估定性或定量测定的乙醛酸盐的量是否与参考相同或与之不同。

[0044] 在参考获自己知患有糖尿病或具有糖尿病诱因的个体或个体组的情况下,可以根据获自测试样品的量与前述参考之间相同或相似的程度(即根据就乙醛酸盐而言相同或相似的定性或定量组成)来诊断该疾病或诱因。如果乙醛酸盐的特有特征的值和(在定量测定的情况下)强度值相同,则测试样品的量和参考相同。如果特有特征的值相同而强度值不同,则该结果相似。这种差异优选不显著,且将表征为强度值至少在参考值的第 1 至第 99 百分位数值、第 5 至第 95 百分位数值、第 10 至第 90 百分位数值、第 20 至第 80 百分位数值、第 30 至第 70 百分位数值、第 40 至第 60 百分位数值之间的区间,最优选参考值的第 50、60、70、80、90 或 95 百分位数值。

[0045] 在参考获自己知未患糖尿病或不具有糖尿病诱因的个体或个体组的情况下,可以根据获自测试样品的量与前述参考之间的差异(即就乙醛酸盐而言的定性或定量组成的差异)来诊断该诱因。如果使用上述计算的参考,则相同的情况也适用。差异可以是代谢物的绝对量或相对量的提高(有时称为上调;还见实施例),或两种量中任一种的降低或缺乏可检测的代谢物量(有时称为代谢物的上调;还见实施例)。优选地,相对量或绝对量的差异显著,即在参考值的第 45 至第 55 百分位数值、第 40 至第 60 百分位数值、第 30 至第 70 百分位数值、第 20 至第 80 百分位数值、第 10 至第 90 百分位数值、第 5 至第 95 百分位数值、第 1 至第 99 百分位数值之间的区间以外。对于乙醛酸盐,优选的相对量变化值(即“倍数”变化)或变化的种类(即导致更高或更低的相对量和/或绝对量的“上调”或“下调”)在下文附表中显示。如果该表格中显示个体中的乙醛酸盐“上调”,则乙醛酸盐的相对量和/或绝对量将提高,如果“下调”,则乙醛酸盐的相对量和/或绝对量将降低。此外,“倍数”变化显示

提高或降低的程度,例如,提高 2 倍意指该量是参考量的两倍。

[0046] 在本发明的方法的优选实施方案中,该参考因此衍生自己知患有糖尿病或具有其诱因的个体或个体组。更优选地,与参考相比,测试样品中相同或提高的乙醛酸盐的量指示糖尿病或其诱因的存在,或其中与参考相比,测试样品中降低的乙醛酸盐的量指示糖尿病或其诱因的缺乏。

[0047] 在本发明的方法的另一优选实施方案中,该参考衍生自己知未患糖尿病或不具有其诱因的个体或个体组。更优选地,与参考相比,测试样品中提高的乙醛酸盐的量指示糖尿病或其诱因的存在,或其中与参考相比,测试样品中相同或降低的乙醛酸盐的量指示糖尿病或其诱因的缺乏。

[0048] 此外,在另一优选实施方案中,本发明的方法可以用来在糖尿病和糖尿病诱因之间和/或在具有糖尿病诱因(尤其是 IGT 或 IFG)的个体内的不同医学病症之间区分。应理解,在这种情况下,参考可以衍生自己知显示 IGT 或 IFG 的个体或个体组,或已知患有糖尿病的个体或个体组。如果使用衍生自己知患有 IGT 或 IFG 的个体或个体组的参考,则乙醛酸盐的提高将指示糖尿病的存在,而相同的量将指示糖尿病的缺乏和糖尿病诱因的存在。但是,如果就参考而言,乙醛酸盐的量降低,则将进行与能够在健康个体和具有糖尿病诱因的个体之间区分的参考的进一步比较。适宜的其他参考在本文中其他地方公开。如果使用衍生自己知患有糖尿病的个体或个体组的参考,则乙醛酸盐的降低将指示糖尿病的缺乏,而相同或提高的量将指示糖尿病的存在。但是,存在糖尿病诱因的诊断需要与能够在健康个体和具有糖尿病诱因的个体之间区分的参考进一步比较。适宜的其他参考在本文中其他地方公开。

[0049] 优选通过自动化来辅助比较。例如,可以使用包含用于比较两个不同数据集(例如包含一种或多种特有特征的值的的数据集)的算法的适宜的计算机程序。这类计算机程序和算法为本领域公知。尽管可以使用以上比较,但也可以手动进行比较。

[0050] 因此,由于在本发明的方法的步骤 b) 中进行的比较,提供最终诊断的辅助。应理解,最终诊断可以需要其他参数和个人的个人病史。但是,本发明的方法极大地便于最终诊断的确立,因此通常改善糖尿病治疗。

[0051] 此外,在本发明的方法的优选实施方案中,该方法进一步包括根据步骤 b) 中确立的诊断来建议用于治疗或预防糖尿病或其诱因的疗法。

[0052] 本文所用的建议用于治疗或预防糖尿病或其诱因的疗法意指根据诊断结果来为给定个体提出可以成功治疗或预防糖尿病或可以缓解糖尿病的症状的疗法。如果诊断结果是例如确定糖尿病的存在,则该方法可以包括为个体建议抗糖尿病疗法或生活方式建议(如饮食)。如果诊断结果是例如确定糖尿病诱因的存在,则该方法可以包括建议糖尿病预防疗法或预防糖尿病的发展的生活方式建议。适合用于治疗或预防糖尿病的疗法可以是基于药物的疗法或手术干预(如减肥手术),且优选选自:胰岛素施用;肠降血糖素模拟物施用,尤其是 exenatid、胰高血糖素样肽 1 施用;二肽基肽酶 4 (DPP IV) 抑制剂施用,尤其是西他列汀、格列苯脲 (glibenclamide) 或格列美脲施用;格列酮施用,尤其是罗格列酮或吡格列酮(pioglitazone)、阿卡波糖施用;glinide 施用;葡萄糖苷酶 (glucoseidase) 抑制剂施用;二甲双胍施用;维甲酰酚胺(fenretinid) 施用;及减肥手术,尤其是基于 Roux en-Y 流程的胃旁路手术。适宜的疗法还可以是生活方式建议,如饮食、体育锻炼建议等。

[0053] 优选地,设想自动提供该建议。这可以优选通过提供包含分配至不同诊断结果的建议的数据库来达到。然后可以通过给定的诊断(即在本发明的方法的步骤 b)中确立的诊断结果)搜索数据库来匹配。随后针对给定的诊断结果提供的建议是在数据库中分配至匹配的诊断结果的那些。这种数据库查询系统可以用作自动化专家系统,其按照本发明所设想的方法提供支持信息。具体而言,本发明的方法可以在伴随诊断(companion diagnostics)的背景中应用,以为所考察的个体建议某类疗法,或不建议。因此,本发明的方法可以优选用于根据步骤 b)中确立的诊断结果来确定个体是否易受本文中其他地方提到的用于治疗或预防糖尿病的疗法影响。应理解,如果结果是确定糖尿病或其诱因的存在,则认为该个体易受该用于治疗或预防糖尿病的疗法影响。

[0054] 有利地,本发明已发现,乙醛酸盐是适合用于诊断糖尿病或糖尿病诱因的生物标志。这允许快速、可靠和低成本地诊断糖尿病或糖尿病诱因。此外,该方法可以通过本说明书中其他地方所述的自动化来辅助,因此允许高通量筛查处于罹患糖尿病的风险的个体。令人惊奇地,乙醛酸盐可以在未空腹的定期献血者中用作糖尿病或糖尿病诱因的生物标志(类似于HbA1C,其是不依赖于空腹状态的糖尿病标志)。具体而言,已发现,与其他生物标志不同,乙醛酸盐尤其可以良好地用于在非空腹个体中确定糖尿病或其诱因。因此,本发明的方法可以辅助糖尿病预防健康计划,且可以用来监测糖尿病的预防性疗法或其他用于预防糖尿病的措施(包括营养饮食)的成功。此外,可以通过本说明书中所述的代谢谱分析技术来以节约时间和成本的方式同时测定乙醛酸盐和本文中提高的其他代谢物的组合。此外,本发明的方法允许评估个体是或成为某个糖尿病风险组(即 IFG、IGT 或 IFG&IGT)的成员的风险。取决于种族、年龄和性别分布,报道的 IFG 和 IGT 流行率在 5% 至 26% 之间广泛变动。预期 IFG 和 IGT 两个风险组都在不久的将来增加。对于 IFG 或 IGT 两个风险组,报道了 25% 在 3-5 年内进展至糖尿病,50% 保持其异常血糖状态,25% 回复至正常葡萄糖水平。随着更长的观察,大部分具有 IFG 或 IGT 的个体似乎发展糖尿病。与具有 IFG 或 IGT 的个体相比,具有 IFG 和 IGT (IFG&IGT) 二者的个体具有约两倍的发展糖尿病的比例(Nathan2007, Diabetes Care 30(3):753-759)。

[0055] 此外,本发明考虑用于诊断伴随共发病的糖尿病或其诱因的方法,该方法包括:

[0056] (a) 测定疑似患有伴随共发病的糖尿病或具有其诱因的个体的测试样品中乙醛酸盐的量,其中该样品在 OGTT 期间在起始测试后约 2 小时从该个体获得;和

[0057] (b) 将步骤(a)中测定的量与参考比较,由此诊断伴随共发病的糖尿病或其诱因。

[0058] 本文所用的术语“共发病”指伴随糖尿病的障碍、疾病或症状。这类障碍或疾病可以例如是糖尿病的直接原因,或者可以直接或间接由糖尿病引起的障碍或疾病。优选的伴随糖尿病的共发病是心血管障碍或疾病(如高血压)或肾并发症(如糖尿病性肾病)。最优选地,本文提到的伴随糖尿病的共发病是高血压,即提高的血压。高血压为本领域公知,且表征为超过 140/90mmHg 的血压。

[0059] 应在起始 OGTT 后约 2 小时获得样品。在此背景中,术语“约”意指 +/-30 分钟、+/-15 分钟、+/-1 分钟或 +/-5 分钟或起始后精确地 2 小时。

[0060] 在前述方法的背景中提到的“参考”是允许确定个体是否患有伴随共发病的糖尿病或处于其风险的参考。因此,这种参考获自己知患有伴随共发病的糖尿病或其诱因的个体或个体组,或已知未患伴随共发病的糖尿病或其诱因的个体或个体组。

[0061] 如果该参考衍生自己已知患有伴随共发病的糖尿病或其诱因的个体或个体组,则与参考相比,在测试样品中测定的相同或提高的乙醛酸盐的量指示伴随共发病的糖尿病或其诱因。此外,降低的量优选指示未患伴随共发病的糖尿病或其诱因的个体。

[0062] 如果该参考衍生自己已知未患伴随共发病的糖尿病或其诱因的个体或个体组,则提高的乙醛酸盐的量指示伴随共发病的糖尿病或其诱因。此外,当与参考相比时,在测试样品中测定的相同或降低的乙醛酸盐的量优选指示未患伴随共发病的糖尿病或其诱因的个体。

[0063] 有利地,已在本发明的基础研究发现,在起始 OGTT 后约 2 小时获得的个体样品中测定时,乙醛酸盐还是指示伴随糖尿病的共发病(如高血压)或其诱因的生物标志。在这种情况下,尤其高的乙醛酸盐的量指示该共发病或其诱因。因此,前述方法允许诊断共发病或其诱因,就该共发病的发展监测个体,和/或确定疗法是否在预防和/或缓解该共发病中有效。

[0064] 此外,前述方法可以用来研发影响糖尿病和/或共发病的药物,因为可能成功的候选药物还将影响施用该候选药物的测试个体中起始 OGTT 后约 2 小时的乙醛酸盐量。因此,这种方法可以在候选药物的临床试验的背景中应用。

[0065] 在前述方法的优选实施方案中,该方法包括其他步骤:c)如果在步骤 b)中诊断出伴随共发病的糖尿病或其诱因,则建议针对该共发病的疗法。

[0066] 本文提到的针对共发病的疗法优选是针对高血压的疗法。这种疗法可以是基于药物的疗法、饮食,或可以是生活方式适应性改变的(如建议体育锻炼)。

[0067] 此外,本发明涉及用于鉴定用于治疗或预防糖尿病的疗法的方法,其包括:

[0068] a)测定患有糖尿病或具有其诱因的个体的样品中乙醛酸盐的量,该个体已接受了疑似对糖尿病或其诱因有效的疗法;和

[0069] b)将该量与参考相比较,由此鉴定对糖尿病或其诱因有效的疗法。

[0070] 本文所用的术语“疗法”指能够治疗、预防或缓解糖尿病或伴随该疾病的症状的治疗措施。优选地,该疗法选自基于药物的疗法、营养饮食、食品添加剂疗法、基于外科手术的疗法(如减肥手术)、支持体育活动、生活方式建议及其组合。

[0071] 应理解,前述方法提到的治疗并非必将对所有待治疗的个体都有效。但是,待通过该方法鉴定的治疗将至少对群体的统计上显著的个体的部分有效。可以通过本说明书中其他地方详细描述的技术来测定这种个体的部分是否在统计上显著。

[0072] 此外,本发明的前述方法所用的术语“个体”指在所应用的治疗之前患有糖尿病和/或肥胖的个体。

[0073] 本发明的前述方法的背景中的术语“参考”指乙醛酸盐的参考量,其指示糖尿病的成功治疗或预防。这种参考优选获自来自这样的个体或个体组的样品,已知该个体或个体组已成功治疗或缓解糖尿病或伴随症状或预防发展糖尿病。此外,将在本发明的此方法的背景中使用的参考是指示本文中其他地方提到的糖尿病或其诱因的存在或缺乏的那些。因此,该参考可以获自己已知未患糖尿病或其诱因的个体或个体组(即就糖尿病或糖尿病诱因而言的健康个体)的样品,或已知未患糖尿病或其诱因的个体或个体组。该参考还优选可以是计算的参考,最优选包含待考察的个体的个体群中乙醛酸盐的相对量或绝对量的平均值或中位数。

[0074] 在参考获自己已知已成功治疗的个体或组或已知未患糖尿病或糖尿病诱因的组的

情况下,可以根据获自测试样品的测定的乙醛酸盐的量与前述参考之间相同或相似的程度来鉴定有效疗法。在参考获自己知未患糖尿病或糖尿病诱因的个体或组的情况下,可以根据获自测试样品的测定的乙醛酸盐的量与前述参考之间相同或相似的程度来鉴定有效疗法。在参考获自己知患有糖尿病或具有其诱因的个体或组的情况下,可以根据测试样品中乙醛酸盐的量与前述参考相比的降低来鉴定有效疗法。

[0075] 有利地,已在本发明的基础研究发现,乙醛酸盐作为糖尿病或其诱因的生物标志对鉴定用于糖尿病治疗或预防的有效疗法尤其有用。因此,本发明的前述方法可以应用于在临床前动物研究以及临床试验中研发例如基于药物的糖尿病疗法,以及伴随诊断水平,以鉴定对给定的个体单独有效的疗法。由于本发明,可以可靠和有效地鉴定糖尿病疗法。此外,甚至可以以个体为基础来评估治疗是否将有效。

[0076] 本发明还涉及用于在个体中监测糖尿病疗法的方法,其包括:

[0077] (a) 测定该个体的第一样品中乙醛酸盐的量;

[0078] (b) 测定该个体的第二样品中乙醛酸盐的量;和

[0079] (c) 将在第一样品中测定的量与在第二样品中测定的量相比较,由此在该个体中监测糖尿病疗法。

[0080] 前述方法优选是体外方法。此外,它可以包括上文明确提到的那些之外的步骤。例如,其他步骤可以涉及样品预处理或评价通过该方法获得的结果。优选地,步骤(a)、(b)和/或(c)可以完全或部分通过自动化来辅助,例如,通过用于步骤(a)和(b)中的测定的适宜的机器人和传感装置,或步骤(c)中的计算机执行的比较。

[0081] 将按照前述方法测试的个体优选患有糖尿病,尤其是患有2型糖尿病。但是,还设想该个体患有糖尿病诱因(此术语的定义见其他地方)。

[0082] 本文在前述方法的背景中使用的术语“监测糖尿病疗法”优选涉及评估个体是否响应该疗法。因此,评估个体是否从该疗法受益。优选地,与第一样品中乙醛酸盐的量相比,第二样品中乙醛酸盐的量的降低将指示响应糖尿病疗法的个体。相反,与第一样品中乙醛酸盐的量相比,第二样品中乙醛酸盐的量的提高(或未改变的量,尤其是基本未改变的量)将指示未响应糖尿病疗法的个体。优选地,通过进行前述方法,可以作出是否将继续、终止或修改该个体中的糖尿病疗法的决定。

[0083] 优选地,如果该疗法就糖尿病而能言改善个体的病症(例如,如果血糖控制(glycemic control)改善),则个体响应糖尿病疗法。优选地,如果该疗法就糖尿病和/或任意糖尿病共发病而言未改善个体的病症,则个体未响应该疗法。在这种情况下,该疗法可以将个体置于不良副作用的风险而对该个体没有任何显著的益处(从而产生无用的健康护理费用)。

[0084] 前述方法的背景中的术语“糖尿病疗法”优选包括用于治疗糖尿病或其诱因的任意疗法。优选的疗法是基于药物的疗法,且优选选自:胰岛素施用;肠降血糖素模拟物施用,尤其是 exenatid、胰高血糖素样肽 1 施用;二肽基肽酶 4 (DPP IV) 抑制剂施用,尤其是西他列汀、格列苯脲或格列美脲施用;格列酮施用,尤其是罗格列酮或吡格列酮、阿卡波糖施用;glinide 施用;葡糖苷酶抑制剂施用;二甲双胍施用;及维甲酰胺施用。在另一优选实施方案中,该糖尿病疗法包括营养疗法和生活方式改变。优选的生活方式改变是增加体育锻炼。优选的营养疗法为本领域公知,且包括降低的卡路里摄入,及富含营养物但脂肪含

量低,尤其是饱和脂肪酸含量低(与不饱和脂肪酸相比)的饮食。

[0085] 在优选实施方案中,糖尿病疗法包括施用胰岛素致敏物。优选的胰岛素致敏物是二甲双胍和噻唑烷二酮。二甲双胍和噻唑烷二酮为本领域公知。二甲双胍(IUPAC名称:N,N-二甲双胍)是来自双胍类的口服抗糖尿病药物。优选的噻唑烷二酮选自罗格列酮(rosiglitazone, IUPAC名称:5-((4-(2-(甲基-2-吡啶基氨基)乙氧基)苯基)甲基)-2,4-噻唑烷二酮)、吡格列酮(IUPAC名称:5-((4-(2-(5-乙基-2-吡啶基)乙氧基)苯基)甲基)-, (+)-2,4-噻唑烷二酮)、曲格列酮(IUPAC名称:5-(4-((6-羟基-2,5,7,8-四甲基苯并二氢吡喃-2-基-甲氧基)苄基)-2,4-噻唑烷二酮)。最优的噻唑烷二酮是罗格列酮。

[0086] 本文中其他地方已描述了术语“样品”。该定义相应地适用。在前述方法的背景中,将在第一和第二样品中获得本文中提到的生物标志的量。优选地,在起始糖尿病疗法之前,或更优选地,在起始糖尿病疗法之后获得第一样品。

[0087] 如果在起始糖尿病疗法之前获得第一样品,则优选在该起始之前不久获得它。优选地,如果在起始糖尿病疗法之前一周内、或更优选三天内、或最优选一天内获得样品,则认为它在起始糖尿病疗法之前不久获得。

[0088] “第二样品”尤其理解为为了反映本文中提到的标志的水平与第一样品相比的变化而获得的样品。因此,第二样品优选将在第一样品之后获得。当然,第二样品将在起始糖尿病疗法之后获得。应理解,为了观察到足够显著的变化,以允许监测糖尿病疗法,在第一样品后不太早的时候获得第二样品。因此,优选在获得第一样品后至少一周、或更优选至少两周、或甚至更优选至少一个月或两个月、或最优选至少三个月获得第二样品。还优选地,考虑在第一样品后一周至三个月的时期内获得第二样品。

[0089] 如果在起始糖尿病疗法之前获得第一样品,则优选在起始糖尿病疗法后至少一周、或更优选至少两周、或甚至更优选至少一个月或两个月、或最优选至少三个月获得第二样品。

[0090] 从上文显而易见,步骤(a)中提到的第一样品中乙醛酸盐的量的测定可以发生在步骤(b)中提到该第二样品中乙醛酸盐的量的测定之前几天或几周。因此,用于监测糖尿病的方法的步骤(a)、(b)和(c)无需在有限的时间范围内逐一进行,而可以在几天、几周或甚至几个月的更长时期内展开。因此,应理解,取决于获得两个样品之间的间隔,前述方法允许短期、中期以及长期监测。因此,可以在第一样品后一天至两年或更长的时期内获得第二样品。在一个优选实施方案中,在第一样品后一天或两天,尤其是一天至两天的时期内获得第二样品(其允许短期监测)。在另一优选实施方案中,在第一样品后一个月或两个月,尤其是一个月至两个月的时期内获得第二样品(其允许中期监测)。在另一优选实施方案中,在第一样品后六个月或十二个月,尤其是六个月至十二个月或更长的时期内获得第二样品(其允许长期监测)。

[0091] 还设想评估来自待监测的个体的样品中乙醛酸盐的量的时程。因此,前述方法可以包括以下附加步骤:测定来自该个体的至少一个其他样品中(因此在第三样品中、第四样品中、第五样品中等)该标志的量,并将这样测定的量与该第一样品中和/或该第二样品中和/或在获得该至少一个其他样品之前获得的任意样品中该标志的量相比较。获得样品的优选的时间间隔请参见上文。

[0092] 优选地,个体是否响应糖尿病疗法的评估基于来自该个体的第一样品中乙醛酸盐的量与来自该个体的第二样品中各标志的量的比较。

[0093] 优选地,与第一样品相比,第二样品中乙醛酸盐的量的降低、更优选显著降低、最优选统计上显著的降低指示响应糖尿病疗法的个体。

[0094] 优选地,显著降低是对监测糖尿病而言认为显著的降低幅度。尤其是认为该降低在统计上显著。术语“显著”和“统计上显著”为本领域技术人员已知。因此,本领域技术人员可以用多种公知的统计学评价工具不费周折地确定降低是否显著或在统计上显著。指示响应糖尿病疗法的个体的乙醛酸盐的量的优选的显著降低在下文中提供。

[0095] 优选地,认为与第一样品中乙醛酸盐的量相比,第二样品中乙醛酸盐的量优选至少 5%、至少 10%、更优选至少 20%、甚至更优选至少 30%、最优选至少 40% 的降低是显著的,因此指示响应糖尿病疗法的个体。

[0096] 如上文所述,与第一样品相比,第二样品中乙醛酸盐的量的提高(或者,尤其是,与第一样品相比,第二样品中乙醛酸盐的量的基本未改变的量)指示未响应糖尿病疗法的个体。

[0097] 在优选实施方案中,前述方法进一步包括步骤:(a1)将在第一样品中测定的量与参考量相比较;和(b1)将在第二样品中测定的量与参考量相比较。

[0098] 本发明还涉及用于在个体中监测糖尿病疗法的方法,其包括:

[0099] (a) 测定该个体的第一样品中乙醛酸盐的量;

[0100] (a1) 将步骤(a)中测定的量与参考相比较;

[0101] (b) 测定该个体的第二样品中乙醛酸盐的量;

[0102] (b1) 将步骤(b)中测定的量与参考相比较;和

[0103] (c) 将在第一样品中测定的量与在第二样品中测定的量相比较,由此监测该个体中的糖尿病疗法。

[0104] 适合用于步骤(a1)和(b1)中进行的比较的参考优选是本文中其他地方所述的参考。在优选实施方案中,该参考可以衍生自健康个体。但是,优选地,该参考衍生自患有糖尿病或具有其诱因的个体。步骤(a1)和(b1)中进行的比较提供进一步的诊断信息。例如,通过进行该其他步骤,可以评估糖尿病的严重度。

[0105] 上文所作的术语的解释和说明优选相应地适用于下文所述的其他实施方案。

[0106] 一般而言,本发明涉及个体的样品中的乙醛酸盐或乙醛酸盐的检测剂在诊断糖尿病或其诱因中的用途。优选地,该检测剂是本文中其他地方详细描述的特异性结合乙醛酸盐的抗体或特异性结合乙醛酸盐的适体。

[0107] 此外,一般而言,本发明考虑个体的样品中的乙醛酸盐或乙醛酸盐的检测剂在鉴定易受用于治疗或预防糖尿病的疗法影响的个体中的用途。优选地,该检测剂是本文中其他地方详细描述的特异性结合乙醛酸盐的抗体或特异性结合乙醛酸盐的适体。

[0108] 此外,一般而言,本发明考虑个体的第一和第二样品中的乙醛酸盐或乙醛酸盐的检测剂在监测糖尿病疗法中的用途。优选地,该检测剂是本文中其他地方详细描述的特异性结合乙醛酸盐的抗体或特异性结合乙醛酸盐的适体。

[0109] 本发明还涉及用于在疑似患有糖尿病或其诱因的个体的样品中诊断糖尿病或其诱因的装置,其包括:

[0110] (a) 包含乙醛酸盐的检测剂的分析单元,其允许测定存在于样品中的乙醛酸盐的量;及与之有效连接的:

[0111] (b) 包含存储的参考和数据处理器的评价单元,其允许将通过分析单元测定的乙醛酸盐的量与存储的参考相比较,由此诊断糖尿病或其诱因。

[0112] 可以通过前述装置来执行本发明的方法。本文所用的装置将包括至少一个前述单元。装置的单元相互有效连接。如何以运行方式连接单元将取决于包含在装置中的单元的类型。例如,在将自动定性或定量测定乙醛酸盐的工具应用于分析单元时,可以通过评价单元(例如通过在作为数据处理器的计算机上运行的计算机程序)来处理通过该自动运行单元获得的数据,以便于诊断。优选地,在这种情况下,单元包含在单个装置中。但是,分析单元和评价单元也可以在物理上分开。在这种情况下,可以通过单元之间允许数据转移的有线和无线连接来达到有效连接。无线连接可以使用无线 LAN (WLAN) 或因特网。可以通过单元之间的光缆和非光缆连接来达到有线连接。用于有线连接的电缆优选适合用于高通量数据传输。

[0113] 优选的用于测定乙醛酸盐的分析单元包含检测剂(如本文中其他地方所述的特异性识别乙醛酸盐的抗体、蛋白质或适体)及用于使该检测剂与待测试的样品接触的区域。检测剂可以固定在用于接触的区域,或者可以在装载样品后加至该区域。分析单元将优选适于定性和/或定量测定检测剂和乙醛酸盐的复合体的量。应理解,通过检测剂与乙醛酸盐的结合,将改变乙醛酸盐、检测剂或二者的至少一种可测量的物理或化学性质,使得可以通过优选包含在分析单元内的检测器来测量该改变。但是,在使用诸如测试条的分析单元时,检测器和分析单元可以是仅为测量而集合在一起的分开的组件。基于检测到的至少一种可测量的物理或化学性质的改变,分析单元可以计算本文中其他地方所述的乙醛酸盐的强度值。然后将该强度值转移至评价单元进行进一步的处理和评价。备选地,本文中提到的分析单元优选包含用于分开代谢物的工具(如层析装置)和用于代谢物测定的工具(如光谱测定装置)。上文已详细描述了适宜的装置。将在本发明的系统中使用的用于化合物分开的优选工具包括层析装置,更优选用于液相层析、HPLC 和/或气相层析的装置。用于化合物测定的优选装置包括质谱分析装置,更优选 GC-MS、LC-MS、直接进样质谱分析、FT-ICR-MS、CE-MS、HPLC-MS、四级杆质谱分析、连续偶联质谱分析(包括 MS-MS 或 MS-MS-MS)、ICP-MS、Py-MS 或 TOF。分开和测定工具优选相互偶联。最优选地,将 LC-MS 和/或 GC-MS 用于本发明提到的分析单元。

[0114] 本发明的装置的评价单元优选包含数据处理装置或计算机,其适于执行用于进行本文中其他地方所述的比较的规则。此外,评价单元优选包含具有存储的参考的数据库。本文所用的数据库在适宜的存储介质上包含数据汇编。此外,数据库优选进一步包含数据库管理系统。数据库管理系统优选是基于网络、分层或面向对象的数据库管理系统。此外,数据库可以是联邦或集成数据库。更优选地,数据库将作为分散(联邦)系统(例如客户端-服务器系统)执行。更优选地,将数据库构建为允许搜索算法,以将测试数据集与该数据汇编所包含的数据集相比较。具体而言,通过使用这种算法,可以针对指示糖尿病或其诱因的相似或相同的数据集搜索数据库(例如查询搜索)。因此,如果可以在该数据汇编中鉴定出相同或相似的数据集,则该测试数据集将与糖尿病或糖尿病诱因相关。评价单元还可以优选包含其他数据库或与其他数据库有效连接,该其他数据库具有基于已确立的糖尿病或其诱

因的诊断的治疗性或预防性干预或生活方式适应的建议。可以优选通过评价单元获得的诊断结果自动搜索该其他数据库,以鉴定适合用于为了治疗或预防糖尿病而从其获得该测试样品的个体的建议。

[0115] 在本发明的装置的优选实施方案中,该存储的参考是衍生自己知患有糖尿病或具有其诱因的个体或个体组的参考,且该数据处理器执行用于将通过分析单元测定的乙醛酸盐的量与该存储的参考相比较的指令,其中与参考相比,测试样品中提高的乙醛酸盐的量指示糖尿病或其诱因的存在,或其中与参考相比,测试样品中降低的乙醛酸盐的量指示糖尿病或其诱因的缺乏。

[0116] 在本发明的装置的另一优选实施方案中,该存储的参考是衍生自己知未患糖尿病或不具有其诱因的个体或个体组的参考,且该数据处理器执行用于将通过分析单元测定的乙醛酸盐的量与该存储的参考相比较的指令,其中与参考相比,测试样品中提高的乙醛酸盐的量指示糖尿病或其诱因的存在,或其中与参考相比,测试样品中相同或降低的乙醛酸盐的量指示糖尿病或其诱因的缺乏。

[0117] 有利地,本发明的装置允许自动诊断糖尿病或糖尿病诱因。因此,尤其是在包含上述给出建议的专家系统时,该装置还可以由不具备专业医学知识的医务人员或患者使用。该装置还适合用于患者身旁的应用,因为该装置可以改为便携形式。

[0118] 本发明还涵盖用于诊断糖尿病或其诱因的试剂盒,其包含乙醛酸盐的检测剂,优选还以衍生自己知患有糖尿病或具有其诱因的个体或个体组的浓度包含乙醛酸盐标准物,或优选还以衍生自己知未患糖尿病或不具有其诱因的个体或个体组的浓度包含乙醛酸盐标准物。优选地,该检测剂是本文中其他地方详细描述的特异性结合乙醛酸盐的抗体或特异性结合乙醛酸盐的适体。

[0119] 本文提到的“标准物(standard)”是乙醛酸盐的量,在存在于溶液中或溶解在预定体积的溶液中时,其模拟存在于已知患有糖尿病或具有其诱因的个体或个体组中的乙醛酸盐的量,或模拟衍生自己知未患糖尿病或不具有其诱因的个体或个体组中的乙醛酸盐的量。

[0120] 术语“试剂盒”指优选分开或在单个容器内提供的前述成分的汇集。该容器还包含进行本发明的方法的说明。这些说明可以是手册的形式,或者可以通过计算机程序代码来提供,该代码可以进行本发明的方法中提到的比较,并在在计算机或数据处理装置上执行时相应地确立诊断。计算机程序代码可以提供在数据存储介质或装置上,如光或磁存储介质(例如光盘(CD)、CD-ROM、硬盘、光存储介质或磁盘),或直接存储在计算机或数据处理装置上。

[0121] 上文提到的所有参考文献在此以其整体公开内容及其在以上描述中明确提到的具体公开内容引入作为参考。

实施例

[0122] 现将通过以下实施例来说明本发明,该实施例并非旨在限定或限制本发明的范围。

[0123] 实施例 1:总体研究目标和设计

[0124] 为了鉴定这种生物标志或生物标志的组合,从 Bavarian Red Cross 血库的 87033

名定期和长期献血者的群组选择,设计了糖尿病筛查研究。将研究分为两个部分。前瞻性糖尿病筛查部分包括用于分类研究参与者的口服葡萄糖耐量测试(OGTT)评估(前瞻性部分)及基于空腹血糖(fasting plasma glucose, FPG)和 OGTT 的发现的糖尿病类别之间的代谢区分。回顾性部分允许评价诊断前至多六年发展糖尿病的过程中的早期代谢变化。在整个献血者群组中,60859 名献血者参与了糖尿病筛查研究,其中 60656 名献血者完成了称为“Findrisk”(Martin 2007, Dtsch Med Wochenschr. 132(24):1315-1320)的糖尿病风险得分评估。在那些参与者中,16.1% 显示 ≥ 12 的提高了的糖尿病风险。在根据 Findrisk 得分具有提高了的糖尿病风险的那些参与者中,如通过 $\geq 5.6\%$ 的血红蛋白 A1C (HbA1C) 值所显示,鉴定出总计 4241 名具有发展提高的长期血糖水平的附加风险的献血者。研究还包括 Findrisk 得分低于 12 且 HbA1C 值 $< 5.6\%$ 的个体作为对照。

[0125] 实施例 2:前瞻性研究

[0126] 从志愿参加 OGTT 评估的总计 789 名参与者选择个体用于前瞻性研究部分。选择之前,按照他们的空腹血浆葡萄糖(OGTT 之前)及按照他们的 OGTT 分类来分组参与者。

[0127] 应用标准 WHO 糖尿病分类(WHO2006):

[0128] 糖尿病: $FPG \geq 7.0\text{mmol/L}$ 或 $2HPG \geq 11.1\text{mmol/L}$;

[0129] IGT: $FPG < 7.0\text{mmol/L}$, $2HPG \geq 7.8$ 且 $< 11.1\text{mmol/L}$;

[0130] IFG: $FPG 6.1$ 至 6.9mmol/L , 且 $2HPG < 7.8\text{mmol/L}$;

[0131] 健康: $FPG \leq 6.0\text{mmol/L}$, 且 $2HPG < 7.8\text{mmol/L}$ 。

[0132] $2HPG =$ 标准化 75g 口服葡萄糖挑战后 2 小时的血浆。

[0133] 针对糖尿病种类以及诸如发源地(center)、性别、体重指数和年龄的潜在混杂因素的最佳匹配来进行选择。最后,将 478 名研究参与者纳入前瞻性研究部分。

[0134] 表 1A:前瞻性研究部分中的 478 名参与者在空腹血浆葡萄糖测量和 OGTT 评估后的糖尿病分类

[0135]

仅通过 2HPG 而不通过 FPG 鉴定的糖尿病患者	仅通过或额外通过 FPG 鉴定的糖尿病患者	IFG+IGT	IGT	IFG	健康
28	30	77	39	127	177

[0136] 表 1B:在 OGTT 120 用 SIM 法测量的上述个体的亚组

[0137]

仅通过 2HPG 而不通过 FPG 鉴定的糖尿病患者	仅通过或额外通过 FPG 鉴定的糖尿病患者	IFG+IGT	IGT	IFG	健康
23	23	55	36	98	50

[0138] 对在 OGTT 之前直接从研究参与者获得的空腹血浆样品以及标准口服葡萄糖大丸剂(75g)后 120 分钟的血浆样品进行了代谢物谱分析。通过标准流程处理血浆,并在约 60 分钟内从血液分离。立即冷冻血浆样品,并保存在 -80°C 。在干冰上进行样品从取样地点至生化分析地点的运输。

[0139] 实施例 3:回顾性研究

[0140] 对来自研究参与者的长期保存的档案样品进行了回顾性研究部分,该研究参与者在前瞻性研究中根据空腹血浆和 OGTT 葡萄糖水平分入糖尿病种类。从 Bavarian Red Cross

的受控保存设施获得每个个体的四个回顾性样品。四个样品包括来自(1)OGTT 前最后一次定期献血的血浆样品,且通常是来自(2)最后一次献血前 18 个月、(3)最后一次献血前 36 个月及(4)最后一次献血前 72 个月的血浆样品。按照血库严格的标准操作流程取样、处理和保存用于回顾性研究部分的所有样品。

[0141] 表 2A :回顾性研究部分中的 243 名参与者在空腹血浆葡萄糖测量和 OGTT 评估后的糖尿病分类

[0142]

仅通过 2HPG 而不通过 FPG 鉴定的糖尿病患者	仅通过或额外通过 FPG 鉴定的糖尿病患者	IFG+IGT	IGT	IFG	健康
27	28	50	10	32	96

[0143] 表 2B :用 SIM 法测量的上述个体的亚组

[0144]

仅通过 2HPG 而不通过 FPG 鉴定的糖尿病患者	仅通过或额外通过 FPG 鉴定的糖尿病患者	健康
24	23	51

[0145] 对后来成为研究参与者的定期献血者的血浆样品进行了代谢物谱分析。在献血之前,鼓励献血者进食。献血后立即分离血浆。然后将血浆样品保存在约 4°C 约 24 小时,直至制备整分试样,并转入 -42°C 的长期保存。在干冰上进行样品从长期保存地点至生化分析地点的运输。

[0146] 实施例 4 :来自研究的血浆样品的分析

[0147] 根据来自 FPG 和 OGTT 的结果将前瞻性和回顾性血浆样品分入不连续的糖尿病风险组,随后通过广泛的谱分析和代谢物组表征来分析。按下文所述制备样品并进行 LC-MS/MS、GC-MS 和 SPE-LC-MS/MS (激素)分析。半定量或定量分析了几组代谢物,包括氨基酸、糖类、脂肪酸、甘油单酯、二酯和三酯、其他脂类、有机酸、辅酶、维生素、次级代谢物、类固醇激素和儿茶酚胺。还针对选定的类十二烷酸分析了前瞻性样品。

[0148] 通过沉淀来从血浆分离蛋白质。加入水及乙醇和二氯甲烷的混合物后,将剩余样品分级分离入极性水相和亲脂性有机相。

[0149] 对于脂类提取物(亲脂相)的 transmethanolysis,向蒸发的提取物中加入 140 μ l 氯仿、37 μ l 盐酸(含 37wt%HCl 的水)、320 μ l 甲醇和 20 μ l 甲苯的混合物。紧紧密封容器,并在 100°C 摇动加热 2 小时。然后蒸发溶液至干燥。将残留物彻底干燥。

[0150] 通过在紧紧密封的容器中与甲氧基胺盐酸盐(20mg/ml 在吡啶中,100 μ l 在 60°C 反应 1.5 小时)反应来进行羰基的甲氧基化(methoximation)。加入 20 μ l 奇数直链脂肪酸的溶液(3/7 (v/v) 的吡啶 / 甲苯中 7 至 25 个碳原子的脂肪酸各 0.3mg/mL 及 27、29 和 31 个碳原子的脂肪酸各 0.6mg/mL 的溶液)作为时间标准。最后,同样在紧紧密封的容器中,在 60°C 用 100 μ l N-甲基-N-(三甲代甲硅烷基)-2,2,2-三氟乙酰胺(MSTFA)进行 30 分钟的衍生化。注入 GC 前的终体积为 220 μ l。

[0151] 对于极性相,按以下方式进行衍生化:通过在紧紧密封的容器中与甲氧基胺盐酸盐(20mg/ml 于吡啶中,50 μ l 在 60°C 反应 1.5 小时)反应来进行羰基的甲氧基化。加入 10 μ l 奇数直链脂肪酸的溶液(3/7 (v/v) 的吡啶 / 甲苯中 7 至 25 个碳原子的脂肪酸各

0.3mg/mL 及 27、29 和 31 个碳原子的脂肪酸各 0.6mg/mL 的溶液)作为时间标准。最后,同样在紧紧密封的容器中,在 60°C 用 50 μ l N-甲基-N-(三甲代甲硅烷基)-2,2,2-三氟乙酰胺(MSTFA)进行 30 分钟的衍生化。注入 GC 前的终体积为 110 μ l。GC-MS 系统由与 Agilent 5973 MSD 偶联的 Agilent 6890 GC 组成。自动进样器是来自 CTC 的 CompiPal 或 GCPal。

[0152] 对于分析,取决于所分析的样品材料和来自相分离步骤的级分,使用常用的市售毛细管分离柱(30mx0, 25mmx0, 25 μ m),该分离柱具有含 0% 至 35% 芳香部分的不同的聚甲基硅氧烷固定相(例如:DB-1ms、HP-5ms、DB-XLB、DB-35ms, Agilent Technologies)。取决于样品材料和来自相分离步骤的级分,一次性注入至多 1 μ L 的终体积,且烘箱温度程序以不同加热速率起始于 70°C 并终止于 340°C,以在各分析物峰内达到充分的层析分离和扫描数。此外,用 RTL(保留时间锁定, Agilent Technologies)进行分析,并应用常用的 GC-MS 标准条件,例如标称 1 至 1.7ml/分钟的恒定流速及氦作为流动相气体,通过 70eV 电子碰撞来进行离子化,以 2.5 至 3 次扫描/秒的扫描速率和标准调谐条件在 15 至 600 的 m/z 范围内扫描。

[0153] HPLC-MS 系统由与 API 4000 质谱仪(Applied Biosystem/MDSSCIEX, 多伦多, 加拿大)偶联的 Agilent 1100 LC 系统(Agilent Technologies, Waldbronn, 德国)组成。在具有 C18 固定相的市售反相分离柱(例如:GROM ODS 7pH, Thermo Betasil C18)上进行 HPLC 分析。注入蒸发并重建的极性相和亲脂相的至多 10 μ L 最终样品体积,并按 200 μ L/分钟的流速使用使用甲醇/水/甲酸或乙腈/水/甲酸梯度的梯度洗脱来进行分离。使用多重反应监测(MRM)模式和 100-1000amu 的全扫描,以用于非极性级分的正模式和用于极性级分的负模式通过电喷雾离子化来进行质谱分析。

[0154] 实施例 5:数据分析和统计学评价

[0155] 用从各样品的整分试样产生的混合样品(所谓的“库(pool)”)以随机化的分析顺序设计分析血浆样品。广泛的分析验证步骤之后,按分析顺序对库的中位数归一化各分析物的原始峰数据来解释方法变异性(所谓的“库归一化比值”)。如果可得,则用代谢物的绝对浓度进行统计学分析。在所有其他情况下,使用库归一化比值。

[0156] 将所有数据 \log_{10} 转为来达到大致正态分布。校正混杂因素(样品保存时间、中心、性别、体重指数(BMI)、个体年龄)的数据并估计获自口服葡萄糖耐量测试(OGTT)的糖尿病诊断结果,计算混合作用模型。除 FPG 外,在 OGTT 期间在葡萄糖负荷后 120 分钟的时间点获得结果。根据之前的抗高血压治疗(针对高血压的治疗)和在这些亚组间比较的谱分析模式来区分个体。从统计上显著的 t 统计的 p 值读出生物标志重要性。通过将估计的作用从 \log_{10} 比值量表转化回乘积比值量表来以更好的人可读的形式获得调节的方向和强度。为了鉴定糖尿病或糖尿病风险的早期生物标志,针对糖尿病诊断 OGTT 结果之前至多六年的所有可用时间点读出作用。

[0157] 在上述研究中鉴定的乙醛酸盐作为生物标志的结果总结在下文的表格中。

[0158] 表 3:乙醛酸盐在前瞻性数据集中作为糖尿病或糖尿病风险的预测因子的表现;在几个糖尿病风险组中从 OGTT 之前的空腹血浆样品进行比较。p 值对应于混杂因素校正的固定作用 ANOVA 模型的 t 统计,比值对应于转化为乘积比值量表(比值 = 10^{\wedge} (对数比值量表上估计的作用))的对数比值量表上估计的作用。方向对应于阳性个体(糖尿病和 / 或风险个体)对阴性个体(健康对照)的调节方向。

[0159]

诊断问题	方向	p 值	比值
糖尿病对健康	上调	0.011	1.23
非健康个体 (风险和糖尿病) 对健康个体	上调	0.017	1.13
OGTT 确定的风险对健康	上调	0.024	1.16
所有风险个体对健康	上调	0.052	1.11
基于葡萄糖的比较阳性 (糖尿病和风险个体) 对阴性 (健康对照, (具有葡萄糖浓度缺口的分位点阈值))	上调	0.0026	1.19
与数值 HbA1c 的相关性	上调	0.056	1.05¹
基于 HbA1c 的比较阳性对阴性 (具有缺口的标准阈值)	上调	0.036	1.15
基于 HbA1c 的比较阳性对阴性 (具有缺口的分位点阈值)	上调	0.039	1.13
糖尿病对 IFG	上调	0.095	1.15
IFG+IGT 对健康	上调	0.0043	1.23
糖尿病对 IGT	上调	0.095	1.20
可通过空腹葡萄糖检测的糖尿病对健康	上调	0.0082	1.32

[0160] ¹ 比值对应于当前数据集中通过 HbA1c 的一个标准差变化估计的乙醛酸盐的变化 ($sd(HbA1c)=0.34$)。

[0161] 可以通过乙醛酸盐与诸如葡萄糖、HbA1C、1,5- 失水山梨糖醇、2- 羟基丁酸或甘露糖的已知糖尿病标志的组合测量和分析来改善乙醛酸盐在前瞻性数据集中作为糖尿病或糖尿病风险的预测因子的表现 (见上表)。

[0162] 在糖尿病风险组中随时间进行了以下比较 (暂时比较)：

[0163] A) 最后一次献血前的中位数时间点 2.6 年 (y) 的糖尿病或风险组对健康个体 (时间点之间的线性插值)

[0164] B) 时间点 0 年的糖尿病或风险组对健康个体 (最后一次献血)

[0165] C) 最后一次献血前 1.5 年的糖尿病或风险组对健康个体

[0166] D) 最后一次献血前 3 年的糖尿病或风险组对健康个体

[0167] E) 最后一次献血前 6 年的糖尿病或风险组对健康个体

[0168] F) 比较来自糖尿病或风险组对健康个体的斜率的线性斜率的偏差 (ANOVA 因素糖尿病状态和时间之间的相互作用)

[0169] 表 4: 乙醛酸盐在回顾性数据集中作为糖尿病或糖尿病风险的预测因子的表现; 在糖尿病风险组中随时间进行比较。p 值对应于混杂因素校正的固定作用 ANOVA 模型的 t 统计。比值对应于转化为乘积比值量表 (比值 = 10^{\wedge} (对数比值量表上估计的作用)) 的对数比值量表上估计的作用。方向对应于阳性个体 (糖尿病和 / 或风险个体) 对阴性个体 (健康对照) 的调节方向。调节方向在 p 值 < 0.05 的显著性水平比较糖尿病或风险组和健康对照个体。

[0170]

诊断问题	方向	P 值	比值
最后一次献血前的中位数时间点 2.6 年的糖尿病对健康个体 (时间点之间的线性插值)	上调	0.0027	1.21
时间点 0 年的糖尿病对健康个体 (最后一次献血)	上调	0.0015	1.44
最后一次献血前 3 年的糖尿病对健康个体	上调	0.0084	1.35
糖尿病和健康个体之间乙醛酸盐随时间提高的差异 (线性时间估计的斜率的比较)	上调	0.0093	1.16¹
最后一次献血前的中位数时间点 2.6 年的受损的葡糖耐量对健康个体 (时间点之间的线性插值)	上调	0.026	1.51
最后一次献血前 3 年的受损的葡糖耐量对健康个体	上调	0.0036	2.00
最后一次献血前的中位数时间点 2.6 年的来自糖尿病和所有风险组的个体对健康个体 (时间点之间的线性插值)	上调	0.0039	1.15
时间点 0 年的来自糖尿病和所有风险组的个体对健康个体 (最后一次献血)	上调	0.036	1.21
最后一次献血前 3 年的来自糖尿病和所有风险组的个体对健康个体	上调	0.034	1.21

[0171]

[0172] ¹ 比值对应于当前数据集中通过 0 年、1.5 年、3 年、6 年的等距步进时间 =0、1、2、3 的时间量表上一个标准差的变化估计的乙醛酸盐的变化。

[0173] 表 5 :乙醛酸盐与数值 HbA1C 测量结果的相关性 ;在 p 值 <0.05 的显著性水平在糖尿病风险组中随时间进行比较。p 值对应于混杂因素校正的固定作用 ANOVA 模型的 t 统计。比值对应于转化为乘积比值量表 (比值 =10[^] (对数比值量表上估计的作用)) 的对数比值量表上估计的作用。

[0174]

糖尿病风险比较	P 值	比值
与数值 HbA1c 的相关性; 2.6 年; 男性和女性	0.011	1.06
与数值 HbA1c 的相关性; 2.6 年; 男性	0.022	1.06
与数值 HbA1c 的相关性; 0 年; 男性和女性	0.013	1.12
与数值 HbA1c 的相关性; 3 年; 男性和女性	0.016	1.11
乙醛酸盐和 HbA1c 之间的相关性随时间的提高 (两个数值因素 HbA1c 和时间的相互作用, 两个因素都标准化用于 ANOVA)	0.026	1.05

[0175] 表 6:乙醛酸盐在通过 SIM 测量的前瞻性数据集中作为口服葡萄糖挑战后 120 分钟与提高的血压相关的糖尿病并发症的预测因子的表现。p 值对应于混杂因素校正的固定作用 ANOVA 模型的 t 统计。比值对应于转化为乘积比值量表(比值 = 10^{\wedge} (对数比值量表上估计的作用))的对数比值量表上估计的作用。方向对应于阳性个体(糖尿病和 / 或风险个体)对阴性个体(健康对照)的调节方向。

[0176]

诊断问题	方向	P 值	比值
在 120 分钟 OGTT 时间点的糖尿病对健康的比较中, 有和无之前的抗高血压治疗的个体间的差异	上调	0.0043	1.72

[0177] 表 7:乙醛酸盐在 SIM 测量后的回顾性数据集中作为通过 OGTT 诊断的糖尿病或糖尿病风险的预测因子的表现;在糖尿病风险组中随时间进行比较。p 值对应于混杂因素校正的固定作用 ANOVA 模型的 t 统计。比值对应于转化为乘积比值量表(比值 = 10^{\wedge} (对数比值量表上估计的作用))的对数比值量表上估计的作用。方向对应于阳性个体(糖尿病和 / 或风险个体)对阴性个体(健康对照)的调节方向。调节方向在 p 值 < 0.05 的显著性水平比较糖尿病或风险组和健康对照个体。

[0178]

诊断问题	方向	P 值	比值
最后一次献血前的中位数时间点 2.6 年的仅通过 OGTT(不通过提高的空腹葡萄糖)分类的糖尿病对健康个体(时间点之间的线性插值)	上调	0.0407	1.1096
时间点 0 年的仅通过 OGTT(不通过提高的空腹葡萄糖)分类的糖尿病对健康个体(最后一次献血)	上调	0.0139	1.2097
最后一次献血前 6 年的仅通过 OGTT(不通过提高的空腹葡萄糖)分类的糖尿病对健康个体	上调	0.0463	1.1665

[0179] 实施例 6 :SIM 法描述

[0180] 根据来自 FPG 和 OGTT 的结果将前瞻性和回顾性血浆样品分入不连续的糖尿病风险组,随后通过广泛的谱分析和代谢物组表征来分析。按下文所述制备样品并进行 LC-MS/MS、GC-MS 和 SPE-LC-MS/MS (激素)分析。半定量或定量分析了几组代谢物,包括氨基酸、糖类、脂肪酸、甘油单酯、二酯和三酯、其他脂类、有机酸、辅酶、维生素、次级代谢物、类固醇激素和儿茶酚胺。

[0181] 通过沉淀来从血浆分离蛋白质。加入水及乙醇和二氯甲烷的混合物后,将剩余样品分级分离入极性水相和亲脂性有机相。

[0182] 对于脂类提取物(亲脂相)的 transmethanolysis,向蒸发的提取物中加入 140 μ l 氯仿、37 μ l 盐酸(含 37wt%HCl 的水)、320 μ l 甲醇和 20 μ l 甲苯的混合物。紧紧密封容器,并在 100 $^{\circ}$ C 摇动加热 2 小时。然后蒸发溶液至干燥。将残留物彻底干燥。

[0183] 通过在紧紧密封的容器中与甲氧基胺盐酸盐(20mg/ml 在吡啶中,100l 在 60 $^{\circ}$ C 反应 1.5 小时)反应来进行羰基的甲氧基化。加入 20 μ l 奇数直链脂肪酸的溶液(3/7 (v/v) 的吡啶/甲苯中 7 至 25 个碳原子的脂肪酸各 0.3mg/mL 及 27、29 和 31 个碳原子的脂肪酸各 0.6mg/mL 的溶液)作为时间标准。最后,同样在紧紧密封的容器中,在 60 $^{\circ}$ C 用 100 μ l N-甲基-N-(三甲代甲硅烷基)-2,2,2-三氟乙酰胺(MSTFA)进行 30 分钟的衍生化。注入 GC 前的终体积为 100 μ l。

[0184] 对于极性相,按以下方式进行衍生化:通过在紧紧密封的容器中与甲氧基胺盐酸盐(20mg/ml 于吡啶中,50l 在 60 $^{\circ}$ C 反应 1.5 小时)反应来进行羰基的甲氧基化。加入 10 μ l 奇数直链脂肪酸的溶液(3/7 (v/v) 的吡啶/甲苯中 7 至 25 个碳原子的脂肪酸各 0.3mg/mL 及 27、29 和 31 个碳原子的脂肪酸各 0.6mg/mL 的溶液)作为时间标准物。最后,同样在紧紧密封的容器中,在 60 $^{\circ}$ C 用 50 μ l N-甲基-N-(三甲代甲硅烷基)-2,2,2-三氟乙酰胺(MSTFA)进行 30 分钟的衍生化。注入 GC 前的终体积为 100 μ l。GC-MS 系统由与 Agilent 5973 MSD 偶联的 Agilent 6890 GC 组成。自动进样器是来自 CTC 的 CompPal 或 GCPal。

[0185] 对于分析,取决于所分析的样品材料和来自相分离步骤的级分,使用常用的市售毛细管分离柱(30m \times 0.25mm \times 0.25 μ m),该分离柱具有含 0%至 35%芳香部分的不同的聚甲基硅氧烷固定相(例如:DB-1ms、HP-5ms、DB-XLB、DB-35ms, Agilent Technologies)。取决于样品材料和来自相分离步骤的级分,一次性注入至多 1 μ L 的终体积,且烘箱温度程序以不同加热速率起始于 70 $^{\circ}$ C 并终止于 340 $^{\circ}$ C,以在各分析物峰内达到充分的层析分离和扫描次数。此外,用 RTL (保留时间锁定, Agilent Technologies) 进行分析,并应用常用的 GC-MS 标准条件,例如标称 1 至 1.7ml/分钟的恒定流速、氦作为流动相气体及标准调谐条件。通过 70eV 电子碰撞来进行离子化,在由 2 至 13 个离子质量组成的适当时窗内扫描各分析物的 2-3 个特征性质量片段。取决于各时窗内扫描的质量的数目,扫描速率在 3 至 14 次扫描/秒的范围内。

[0186] 实施例 7 :用抗糖尿病药物二甲双胍治疗的大鼠

[0187] 在 28 天内用所示化合物按每组不同的剂量(见下文)对各 5 只雄性和雌性大鼠的两个组每日给药一次。

[0188] 研究中的每个剂量组由每种性别 5 只大鼠组成。各 15 只雄性动物和 15 只雌性动物的另一组作为对照。在开始治疗期之前,使动物(提供时为 62-64 日龄)适应居住及环境

条件 7 天。在相同的恒定温度 (20-24±3℃) 和相同的恒定湿度 (30-70%) 下饲养动物群体的所有动物。动物群体的动物随意取食。所用的食物基本上不含化学或微生物污染物。饮用水也随意提供。因此,如欧洲饮用水指令 98/83/EG 中所主张,饮用水不含化学和微生物污染物。照明期为 12 小时光照后 12 小时黑暗 (12 小时的光照从 6:00 至 18:00, 12 小时的黑暗从 18:00 至 6:00)。按照德国动物福利法案和欧洲理事会指令 86/609/EE 在 AAALAC 批准的实验室中进行研究。对于啮齿类中的重复剂量 28 天口服毒性研究,按照化学药品测试的 OECD407 指导安排测试系统。按以下给药和施用测试物质:

[0189] 通过含 0.5% 羧甲基纤维素 (Tylose CB30000) 的饮用水中的管饲法 (高剂量组按 1g/kg 体重, 低剂量组按 0.2g/kg 体重) 来施用盐酸二甲双胍 (施用体积: 10ml/kg 体重)。

[0190] 在第 7、14 和 28 天的上午,从空腹麻醉动物的眶后静脉丛采血。对于每只动物,用 EDTA 作为抗凝剂收集 1ml 血液。离心样品来产生血浆。用氮气覆盖所有血浆样品,然后保存在 -80℃,直至分析。

[0191] 对于基于质谱分析的代谢物谱分析,提取血浆样品并获得极性和非极性 (脂类) 级分。对于 GC-MS 分析,在酸性条件下用甲醇处理非极性级分来产生脂肪酸甲酯。用 O-甲基-羟胺盐酸盐和吡啶进一步衍生两种级分来将氧代基转化为 O-甲基肟,然后在分析前用甲硅烷基化剂衍生。在 LC-MS 分析中,将两种级分都重建在适当的溶剂混合物中。通过反相分离柱上的梯度洗脱来进行 HPLC。按 W02003073464 中所述应用质谱分析检测,其允许与全筛查分析并行的靶向和高灵敏度 MRM (多重反应监测) 谱分析。

[0192] 通过在线 SPE-LC-MS (固相提取 -LC-MS) 来测量类固醇及其代谢物。通过 Yamada 等. (Yamada 2002, Journal of Analytical Toxicology, 26(1):17-22) 所述的在线 SPE-LC-MS 来测量儿茶酚胺及其代谢物。

[0193] 广泛的分析验证步骤后,对来自库样品的数据归一化各分析物的数据。在整个过程中平行运行这些样品来解释方法变异性。通过用 WELCH 检验比较治疗组的平均值和各未治疗对照组的平均值来确定对性别、治疗持续时间和代谢物特异的治疗组值的显著性,并用治疗对对照的比值和 p 值来定量。

[0194] 表 8:二甲双胍对健康大鼠血浆乙醛酸盐浓度的作用。f7、f14 和 f28 分别指开始给药后 7、14 和 28 天从雌性大鼠采集的大鼠血浆。同样,m7、m14 和 m28 分别指开始给药后 7、14 和 28 天从雄性大鼠采集的大鼠血浆。

[0195]

高剂量	盐酸二甲双胍					
	f7	f14	f28	m7	m14	m28
比值 治疗/对照	0.82	0.58	0.52	0.22	0.29	0.58
P 值	0.24	0.01	0.08	0.00	0.00	0.10

[0196]

低剂量	盐酸二甲双胍					
	f7	f14	f28	m7	m14	m28
比值 治疗/对照	1.01	0.72	0.64	0.59	0.65	0.44
P 值	0.54	0.23	0.01	0.06	0.35	0.02

[0197] 如从以上表 8 显而易见,二甲双胍能够降低见于大鼠模型系统中的乙醛酸盐浓度。因此,可以假定,二甲双胍作为已知的抗糖尿病药物还将降低通过二甲双胍治疗的糖尿病患者中生物标志乙醛酸盐的水平。因此,乙醛酸盐可以用作用于监测糖尿病患者对二甲双胍疗法的反应的生物标志。

专利名称(译)	用于预测糖尿病的工具和方法		
公开(公告)号	CN103403548A	公开(公告)日	2013-11-20
申请号	CN201180068295.0	申请日	2011-12-23
[标]申请(专利权)人(译)	梅坦诺米克斯保健有限公司		
申请(专利权)人(译)	梅坦诺米克斯保健有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	梅坦诺米克斯保健有限公司		
[标]发明人	J·维默尔 D·雷恩 I·帕德伯格 O·施米茨 V·里本伯格 V·尼基弗洛瓦		
发明人	J·维默尔 D·雷恩 I·帕德伯格 O·施米茨 V·里本伯格 V·尼基弗洛瓦		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/58 G01N33/62 G01N33/64 G01N33/66		
CPC分类号	G01N2800/042 G01N33/6893 G01N33/53		
代理人(译)	凌立		
优先权	2010196869 2010-12-23 EP 61/426549 2010-12-23 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供用于诊断糖尿病或糖尿病诱因的方法，其包括测定疑似患有糖尿病或具有糖尿病诱因的个体的测试样品中乙醛酸盐的量，并将该量与参考比较，由此诊断糖尿病或糖尿病诱因。此外，本发明提供乙醛酸盐或乙醛酸盐的检测剂在诊断糖尿病或其诱因中的用途。另外，本发明还提供用于诊断糖尿病或糖尿病诱因的装置和试剂盒。

仅通过 2HPG 而不通过 FPG 鉴定的糖尿病患者	仅通过或额外通过 FPG 鉴定的糖尿病患者	IFG+IGT	IGT	IFG	健康
28	30	77	39	127	177