

(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2014-501926

(P2014-501926A)

(43) 公表日 平成26年1月23日(2014.1.23)

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53	S	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/54	(2006.01)	C 1 2 Q 1/54		

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 38 頁)

(21) 出願番号	特願2013-545621 (P2013-545621)	(71) 出願人	511012983
(86) (22) 出願日	平成23年12月23日 (2011.12.23)		メタノミクス ヘルス ゲーエムペーハー
(85) 翻訳文提出日	平成25年8月12日 (2013.8.12)		ドイツ連邦共和国 10589 ベルリン
(86) 国際出願番号	PCT/IB2011/055935		, テゲラー ヴェーク 33
(87) 国際公開番号	W02012/085890	(74) 代理人	100091096
(87) 国際公開日	平成24年6月28日 (2012.6.28)		弁理士 平木 祐輔
(31) 優先権主張番号	10196869.1	(74) 代理人	100118773
(32) 優先日	平成22年12月23日 (2010.12.23)		弁理士 藤田 節
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100122389
(31) 優先権主張番号	61/426,549		弁理士 新井 栄一
(32) 優先日	平成22年12月23日 (2010.12.23)	(74) 代理人	100111741
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 田中 夏夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 糖尿病を予測する手段及び方法

(57) 【要約】

糖尿病又は糖尿病の素因を診断する方法が提供され、その方法は、糖尿病に罹患している又は糖尿病の素因を有することが疑われる対象の試験試料におけるグリオキシレートの量を決定する工程及び前記量を参照と比較し、それによって糖尿病又は糖尿病の素因が診断される工程を含む。更に、糖尿病又は糖尿病の素因を診断するための、グリオキシレート又はグリオキシレートの検出剤の使用が提供される。更に、糖尿病又は糖尿病の素因を診断するための装置及びキットも提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

糖尿病又はその素因を診断する方法であって、

(a) 糖尿病に罹患している又はその素因を有していることが疑われる対象の試験試料におけるグリオキシレートの量を決定する工程;及び

(b) 工程(a)において決定された量を参照と比較し、それによって糖尿病又はその素因が診断される工程を含む方法。

【請求項 2】

前記参照が、糖尿病に罹患している又はその素因を有することが知られている対象又は対象の群に由来する、請求項1に記載の方法。 10

【請求項 3】

試験試料において参照と比較して同一の若しくは増加したグリオキシレートの量が、糖尿病若しくはその素因の存在を示し、又は試験試料において参照と比較して減少したグリオキシレートの量が、糖尿病若しくはその素因の不在を示す、請求項2に記載の方法。

【請求項 4】

前記参照が、糖尿病に罹患していない又はその素因を有していないことが知られている対象又は対象の群に由来する、請求項1に記載の方法。

【請求項 5】

試験試料において参照と比較して増加したグリオキシレートの量が、糖尿病若しくはその素因の存在を示し、又は試験試料において参照と比較して同一の若しくは減少したグリオキシレートの量が、糖尿病若しくはその素因の不在を示す、請求項4に記載の方法。 20

【請求項 6】

糖尿病の前記素因が、上昇した長期の血中グルコース、耐糖能障害(IGT)、空腹時グルコース障害(IFG)又はIFGと組み合わされたIGTを伴う、請求項1~5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

工程b)で確立された診断に基づいて、糖尿病又はその素因を治療又は予防する療法を推奨する工程を更に含む、請求項1~6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記試料が、前記対象の体液の試料である、請求項1~7のいずれか一項に記載の方法。 30

【請求項 9】

前記対象がヒトである、請求項1~8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

糖尿病又はその素因の少なくとも一つの更なるバイオマーカーが決定され、前記少なくとも一つの更なるバイオマーカーが、クリプトキサンチン、2-ヒドロキシ-パルミチン酸、トリアシルグリセリド(C16:0、C18:1、C18:2)、ゴンド酸、トリコサン酸、5-オキシプロリン、グルコース、ヘモグロビンHbA1C、1,5-アンヒドロソルビトール、2-ヒドロキシブチレート及びマンノースからなる群より選択される、請求項1~9のいずれか一項に記載の方法。 40

【請求項 11】

併存疾患を伴う糖尿病又はその素因を診断する方法であって、

(a) 併存疾患を伴う糖尿病に罹患している又はその素因を有することが疑われる対象の試験試料におけるグリオキシレートの量を決定する工程であって、前記試料が、試験開始の約2時間後のOGTTの際に対象から得られている工程;及び

(b) 工程(a)において決定された量を参照と比較し、それによって併存疾患を伴う糖尿病又はその素因が診断される工程を含む方法。

【請求項 12】

対象の試料において糖尿病又はその素因を診断するための、グリオキシレート又はグリ 50

オキシレートの検出剤の使用。

【請求項 13】

糖尿病に罹患していることが疑われる対象の試料において糖尿病又はその素因を診断するための装置であって、

(a) 試料に存在するグリオキシレートの量の決定を可能にするグリオキシレートの検出剤を含む分析ユニット;並びにこれに作動的に連結している、

(b) 記憶された参照、及び分析ユニットにより決定されたグリオキシレートの量と記憶された参照との比較を可能にし、それにより糖尿病又はその素因が診断されるデータプロセッサ、を含む評価ユニット

を含む装置。

10

【請求項 14】

前記記憶された参照が、糖尿病に罹患している又はその素因を有することが知られている対象又は対象の群に由来する参照であり、前記データプロセッサが、分析ユニットにより決定されたグリオキシレートの量を記憶された参照と比較する指示を実行し、試験試料において参照と比較して同一の若しくは増加したグリオキシレートの量が、糖尿病若しくはその素因の存在を示し、又は試験試料において参照と比較して減少したグリオキシレートの量が、糖尿病若しくはその素因の不在を示す、請求項13に記載の装置。

【請求項 15】

前記記憶された参照が、糖尿病に罹患していない又はその素因を有していないことが知られている対象又は対象の群に由来する参照であり、前記データプロセッサが、分析ユニットにより決定されたグリオキシレートの量を記憶された参照と比較する指示を実行し、試験試料において参照と比較して増加したグリオキシレートの量が、糖尿病若しくはその素因の存在を示し、又は試験試料において参照と比較して同一の若しくは減少したグリオキシレートの量が、糖尿病若しくはその素因の不在を示す、請求項13に記載の装置。

20

【請求項 16】

グリオキシレートの検出剤及びグリオキシレート標準を含む、糖尿病又はその素因を診断するためのキットであって、グリオキシレート標準の濃度が糖尿病に罹患している若しくはその素因を有することが知られている対象若しくは対象の群に由来する又は糖尿病に罹患していない若しくはその素因を有していないことが知られている対象若しくは対象の群に由来する、キット。

30

【請求項 17】

前記検出剤が、グリオキシレートに特異的に結合する抗体又はグリオキシレートに特異的に結合するアプタマーである、請求項12に記載の使用、請求項13~15のいずれか一項に記載の装置又は請求項16に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、糖尿病診断の分野に関する。特に、糖尿病又は糖尿病の素因を診断する方法であって、糖尿病に罹患している又は糖尿病の素因を有することが疑われる対象の試験試料におけるグリオキシレートの量を決定する工程及び前記量を参照と比較し、それによって糖尿病又は糖尿病の素因が診断される工程を含む方法に関する。更に本発明は、対象の試料において糖尿病又はその素因を診断するための、グリオキシレート又はグリオキシレートの検出剤の使用に関する。更に、本発明は、糖尿病又はその素因を診断するための装置及びキットを包含する。

40

【背景技術】

【0002】

真性糖尿病の蔓延は、工業化社会では約6%に達し、2030年には罹患人口が世界中で3億6600万人まで増加する。世界の糖尿病の最も頻繁な原因(型)(約90%)は2型糖尿病が占め、これは多因子性病原を有する。2型糖尿病の病原性の道筋は多くの要因を伴う。現在不十分にしか理解されていない遺伝的素因を有することが必須であると考えられる。糖尿病

50

表現型が次いで生じるかどうかは、インスリン抵抗性を引き起こす若しくは悪化させること又はインスリン分泌を損なうことのいずれかによりグルコースホメオスタシス系にストレスを与える能力を共有する多くの環境因子によって影響を受ける。当然のことながら、多くのホルモンがグルコース代謝の調節に参加しているが、主要なホルモンはインスリンである。正常血糖は、インスリン作用とインスリン分泌の平衡のとれた相互作用により維持される。インスリンは、異なるグルコース需要を非常に素早く調節することができる膵臓細胞により産生される。2型糖尿病の主な原因は、インスリン抵抗性の増加である。したがって、インスリン作用は通常減少するが、最初は、系が細胞機能の増加によりこれを補うことができる。この時点では、おそらく、OGTTにより空腹時グルコース障害又は糖耐能障害だけを測定することができる。しかし、時がたつと、細胞はインスリン抵抗性及びグルコース毒性の増加により過剰なストレスを受けて、2型糖尿病が診断されうる。

10

【0003】

高又は低血糖による直接的な医学的問題の他に、疾患の主な医学的及び社会経済的な負担は、関連する合併症によりもたらされる。真性糖尿病の破滅的な合併症は、大部分は慢性腎不全、網膜症、末梢及び自律神経障害又は心筋梗塞のような大血管及び微小血管の疾患である。したがって、2型糖尿病の患者における心血管罹患率は、非糖尿病の人よりも2~4倍大きい(Stumvoll et al., Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and the rapy, Lancet 2005)。

20

【0004】

この機構を考慮して、糖尿病の治療は、現在、血糖レベルをモニタリングすること及び上昇した血糖レベルを外来インスリンの投与により正常なレベルに低減することに基づいている。このため、外来インスリンが血中に注射される。あるいは、血中のグルコースレベルを、栄養食事制限により、並びに喫煙、運動不足、高いコレステロールレベル及び不安定な体重などの生活習慣危険因子の排除により調節することができる。

【0005】

ADA(米国糖尿病協会)の専門委員会は、グルコースレベルが、糖尿病の基準を満たしていないが、そうであっても正常と考慮されるには高すぎる中間群の対象がいることを認めた。この群は、 $>100\text{mg/dl}$ (5.6mmol/l)であるが $<126\text{mg/dl}$ (7.0mmol/l)の空腹時血漿グルコース(FPG)レベルを有する又は $>140\text{mg/dl}$ (7.8mmol/l)であるが $<200\text{mg/dl}$ (11.1mmol/l)の経口グルコース負荷試験(OGTT)での2時間値を有する、と定義される。したがって、FPG値の分類は以下のとおりである：

30

- FPG $<100\text{mg/dl}$ (5.6mmol/l)=正常な空腹時グルコース；
- FPG $100 \sim 125\text{mg/dl}$ ($5.6 \sim 6.9\text{mmol/l}$)=IFG(空腹時グルコース障害)；
- FPG $>126\text{mg/dl}$ (7.0mmol/l)=糖尿病の暫定診断(診断は、下に記載されているように確認されなければならない)。

【0006】

OGTTが使用されるとき、対応する分類は以下のとおりである：

- グルコース負荷の2時間後 $<140\text{mg/dl}$ (7.8mmol/l)=正常な耐糖能
- グルコース負荷の2時間後 $140 \sim 199\text{mg/dl}$ ($7.8 \sim 11.1\text{mmol/l}$)=IGT(耐糖能障害)
- グルコース負荷の2時間後 $>200\text{mg/dl}$ (11.1mmol/l)=糖尿病の暫定診断(診断は、下に記載されているように確認されなければならない)。

40

【0007】

2型真性糖尿病の診断:糖尿病の症状+随時血漿グルコース濃度 $>200\text{mg/dl}$ (11.1mmol/l)。随時は、最後の食事からの時間を考慮することなく日中の任意の時点と定義される。糖尿病の伝統的な症状には、多尿症、多飲症及び不明な体重減少が含まれる。代替例:2.FPG $>126\text{mg/dl}$ (7.0mmol/l)。空腹時は、少なくとも8時間にわたってカロリー摂取がないこと、と定義される。代替例:3.OGTTによるグルコース負荷の2時間後 $>200\text{mg/dl}$ (11.1mmol/l)。試験は、水に溶解した75gの無水グルコースの同等物を含むグルコース負荷を使用し、WHOにより記載されたように実施するべきである。

50

【 0 0 0 8 】

明確な高血糖症が不在のとき、これらの基準は、異なる日において反復試験により確認されるべきである。第三の手段(OGTT)は、日常的な臨床使用には推奨されない。(American Diabetes Association, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, Diabetes Care 2006)。しかし、血中糖レベルの増加又は利用可能なインスリンの減少は、糖尿病の発生及び進行において、どちらかと言えば下流事象の発生である。

【 0 0 0 9 】

糖尿病の診断バイオマーカーが近年報告されている(WO2007/110357;WO2007/110358;WO2009/14639及びWO2010/114897を参照すること)。尿ではグリオキシレートの分泌の増加が報告されている(Yamaguchi 1968, Journal of Osaka City Medical Center 17(9-10): 383-389)。

10

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 1 0 】

【 特許文献 1 】 WO2007/110357

【 特許文献 2 】 WO2007/110358

【 特許文献 3 】 WO2009/14639

【 特許文献 4 】 WO2010/114897

【 非特許文献 】

【 0 0 1 1 】

20

【 非特許文献 1 】 Stumvoll et al., Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy, Lancet 2005

【 非特許文献 2 】 Yamaguchi 1968, Journal of Osaka City Medical Center 17(9-10): 383-389

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 1 2 】

しかし、疾患の早期発症の前又は少なくとも初期段階の危険性のある個体を同定することに使用できる信頼性のあるバイオマーカーの必要性が、依然として存在する。

【 0 0 1 3 】

30

したがって、本発明の根底にある技術的な問題は、糖尿病又は糖尿病の素因を効率的及び信頼性を持って診断する手段及び方法の提供とみなすべきである。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 1 4 】

技術的な問題は、特許請求の範囲において特徴決定され、本明細書において下に記載されている実施形態によって解決される。

【 0 0 1 5 】

本発明は、糖尿病又はその素因を診断する方法であって、

(a)糖尿病に罹患している又はその素因を有していることが疑われる対象の試験試料におけるグリオキシレートの量を決定する工程;及び

40

(b)工程(a)において決定された量を参照と比較し、それによって糖尿病又はその素因が診断される工程

を含む方法に関する。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 1 6 】

本発明により参照される方法は、前述の工程から実質的になりうる又は更なる工程を含むことができる。更なる工程は、試料の前処理又は方法により得られる診断結果の評価に関連しうる。好ましい更なる評価工程は、本明細書の他の部分に記載されている。方法は、自動化により部分的又は全体的に補助されうる。例えば、工程a)をロボット化及び自動化読み取り装置により自動化することができる。工程b)を、実行されたときに比較を自動

50

的に実施するプログラムコードを含むコンピューターなどの適切なデータ処理装置により、自動化することができる。そのような場合の参照は、記憶された参照として例えばデータベースから提供される。方法は、好ましくは対象の試料においてエキソピボで実施される方法、すなわちヒト又は動物の体内で実施されない方法であることが理解されるべきである。

【0017】

用語「診断する」は、本明細書で使用されるとき、対象が糖尿病に罹患している又は糖尿病の素因を有する確率について評価することを意味する。素因の診断は、時々、対象が疾患を発生する可能性の予後又は予測を意味することができる。当業者には理解されるように、そのような評価は正確であることが好ましいが、通常は、診断される対象の100% 10
について正確ではないことがある。しかし、その用語は、対象の統計的に有意な部分が糖尿病に罹患している又は糖尿病の素因を有すると同定されうることが必要とする。部分が統計的に有意であるかは、当業者によって、多様な周知の統計評価ツール、例えば信頼区間の決定、p値決定、スチューデントt検定、マンホイットニー検定などを使用して難しいことなく決定されうる。詳細は、Dowdy and Wearden, *Statistics for Research*, John Wiley & Sons, New York 1983において見出される。好ましい信頼区間は、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%又は少なくとも95%である。p値は、好ましくは0.2、0.1、0.05である。

【0018】

本発明による診断には、糖尿病又はその症状、並びにその素因のモニタリング、確認及び分類も含まれる。モニタリングは、既に診断された糖尿病又は素因の経過を追うことを意味する。モニタリングは、例えば、疾患又は素因の進行を決定すること、疾患の進行に対する特定の治療の影響を決定すること又は素因を有する対象における疾患の発生に対する予防的処置若しくは食事制限などの予防措置の影響を決定することを包含する。確認は、既に実施された糖尿病又は糖尿病の素因の診断を、他の指標又はマーカーを使用して強化又は実証することに関連する。分類は、疾患を、例えば、疾患に伴う症状の強さに応じて又は異なる病期若しくは医学的状态により区別して、異なる疾患の部類に割り当てることに関連する。疾患の素因は、危険性の程度に基づいて、すなわち対象が後に疾患を発生する確率に基づいて分類することができる。更に、方法は、血圧の増加などの特定の併存疾患を発生する又はそのような併存疾患の危険性のある対象の同定も包含することができる。 20
30

【0019】

好ましくは、対象を、本発明の方法により、バイオマーカーとしてのグリオキシレートに基づいて異なる危険群に分類及び割り当てることができる(下記の表を参照すること)。特に、グリオキシレートは、増加した糖尿病の危険性を有し、下記の表に示されているように、空腹時グルコース障害(IFG)、糖耐能障害(IGT)又は両方(IFG&IGT)の危険群に入る対象の指標である。したがって、本発明の方法は、対象が糖尿病の素因を有する又はIFG、IGT若しくはIFG&IGTに罹患しているかをグリオキシレートの測定に基づいて診断する方法である。 40

【0020】

用語「糖尿病」又は「真性糖尿病」は、本明細書で使用されるとき、グルコース代謝が損なわれている疾患状態を意味する。前記障害は高血糖症をもたらす。世界保健機関(WHO)によると、糖尿病を四つの部類に細分化することができる。1型糖尿病はインスリンの不足により引き起こされる。インスリンは、いわゆる膵島細胞により産生される。前記細胞は、1型糖尿病(1a型)による自己免疫反応により破壊されうる。更に、1型糖尿病は突発性の変種(1b型)も包含する。2型糖尿病はインスリン抵抗性により引き起こされる。3型糖尿病は、現行の分類によると、真性糖尿病の他の特定の型を全て含む。例えば、ベータ細胞が、インスリン産生に影響を与える遺伝子欠陥を有することがある、インスリン抵抗性が遺伝的に引き起こされることがある又は膵臓それ自体が破壊若しくは損なわれていることがある。更に、ホルモン調節解除又は薬剤も3型糖尿病を引き起こすことがある。4型糖尿 50

病は妊娠の際に生じうる。好ましくは、糖尿病は、本明細書で使用されるとき2型糖尿病を意味する。ドイツ国糖尿病協会(German Society for Diabetes)によると、糖尿病は、血漿グルコースレベルが空腹状態で110mg/dlよりも高いこと又は食後に220mg/dlよりも高いことのいずれかによって診断される。更なる好ましい診断技術は、本明細書の他の部分に開示されている。糖尿病の更なる症状は当該技術において良く知られており、Stedman又はPschyremblなどの標準的な医学教科書に記載されている。

【0021】

用語「素因」は、本明細書で使用されるとき、対象が、疾患又は前述の疾患症状若しくは他の診断基準のいずれかを未だ発生していないが、そうであっても、特定の可能性で将来の確定される時間範囲(予測範囲)内で疾患を発生することを意味する。予測範囲は、対象が予測される確率で疾患又は状態を発生する間隔である。予測範囲は、本発明の方法による分析に付される対象の残り寿命全体でありうる。しかし好ましくは、予測範囲は、本発明の方法により分析される試料が得られた後の1か月、6か月又は1、2、3、4、5若しくは10年の間隔である。本明細書において参照される疾患を発生する可能性は、所定の対象コホート内の真性糖尿病の統計的出現の可能性よりも、素因を有する対象のほうが有意に大きい。好ましくは、個別の対象において、糖尿病を発生する素因に関連する可能性は、糖尿病を発生する所定のコホートの対象の平均的な可能性と比較して、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%若しくは100%又は少なくとも1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍若しくは10倍増加している。対象コホートは、本明細書で参照されるとき、同じ種族の、好ましくは同じ又は遺伝的背景又は人種的な群、またより好ましくは同じ年齢及び性別の複数の個別の対象を意味する。

10

20

【0022】

好ましくは、糖尿病の前記素因は、本明細書において参照されるとき、上昇した長期の血中グルコース、耐糖能障害(IGT)、空腹時グルコース障害(IFG)及び/又はIFGと組み合わせられたIGTを伴う。

【0023】

用語「グリオキシレート」は、本明細書で参照されるとき、天然に生じる又は人工的に生成されるその誘導体としてのグリオキシレートを意味する。天然に生じる誘導体は、代謝変換によりグリオキシレートから得られる誘導体である。人工的に生成された誘導体は、本発明の方法により実施される分析の際にグリオキシレートから生成され、例えばGCMS分析などに必要な誘導体である。本明細書において上に参照された誘導体は、対象において見出される代謝産物の量を反映すること、すなわち、対象の試料から決定される誘導体の量は、試料が採取された時点で対象に見出される代謝産物の量と相関することが理解される。以下の名称はグリオキシレートと同義的に使用される:グリオキシル酸、ホルミルホルメート(formylformate)、ホルミルギ酸、グリオキサレート、オキサールアルデヒデート(oxalaldehyde)、オキサールアルデヒド酸、オキソアセテート、オキソ酢酸(oxoacetic acid)、オキソエタノエート(oxoethanoate)、オキソエタノール酸、アルファ-ケトアセテート又はアルファ-ケト酢酸。

30

40

【0024】

本発明の方法において、糖尿病又はその素因の少なくとも一つの更なるバイオマーカーを、グリオキシレートに加えて決定することができる。好ましくは、前記追加的な少なくとも一つのバイオマーカーは、クリプトキサンチン、2-ヒドロキシ-バルミチン酸、トリアシルグリセリド(C16:0、C18:1、C18:2)、ゴンド酸、トリコサン酸、5-オキソプロリン、グルコース、ヘモグロビンHbA1C、1,5-アンヒドロソルビトール、2-ヒドロキシブチレート及びマンノースからなる群より選択される。グリオキシレートと一緒に、すなわち同時に又は連続的に決定される他の好ましい代謝産物は、それぞれWO2007/110357及びWO2007/110358に開示されている糖尿病又はその素因を示す代謝産物バイオマーカーである。

【0025】

用語「試験試料」は、本明細書で使用されるとき、本発明の方法による糖尿病又は糖尿

50

病の素因の診断に使用される試料を意味する。前記試験試料は生物学的試料である。生物学的供給源の試料(すなわち、生物学的試料)は、通常、複数の代謝産物を含む。本発明の方法に使用される好ましい生物学的試料は、体液、好ましくは血液、血漿、血清、リンパ液、汗、唾液、涙、精液、膣液、糞便、尿若しくは脳脊髄液の試料又は例えば生検による、細胞、組織若しくは臓器由来の試料である。これは、細胞内コンパートメント又はミトコンドリア、ゴルジネットワーク若しくはペルオキシソームなどのオルガネラを含む試料も包含する。更に、生物学的試料は、生物体の揮発物などの気体試料も包含する。生物学的試料は、本明細書の他の部分に特定されているように、対象に由来する。前述の異なる種類の生物学的試料を得る技術は、当該技術において良く知られている。例えば、血液試料は採血により得ることができ、一方、組織又は臓器試料は、例えば生検により得られる。最も好ましくは、本明細書において参照される試験試料は、血液、血漿又は血清試料である。

10

【0026】

前述の試料は、好ましくは、本発明の方法に使用される前に前処理される。下に詳細に記載されるように、前記前処理には、化合物を放出若しくは分離する又は過剰材料若しくは廃棄物を除去するために必要な処理が含まれる。適切な技術は、化合物の遠心分離、抽出、分画、精製及び/又は濃縮を含む。更に他の前処理が、化合物分析に適した形態又は濃度で化合物を提供するために実施される。例えば、ガスクロマトグラフィー結合質量分析が本発明の方法に使用される場合、前記ガスクロマトグラフィーの前に化合物を誘導体化する必要がある。適切に必要な前処理は、本発明の方法を実施するのに使用される手段に応じて決まり、当業者には良く知られている。前に記載された前処理試料も、本発明に使用される用語「試料」に含まれる。

20

【0027】

用語「対象」は、本明細書で使用されるとき、動物、好ましくはマウス、ラット、ヒツジ、イヌ、ネコ、ウマ、サル又はウシなどの哺乳動物、また好ましくはヒトに関する。本発明の方法を適用して診断することができる他の動物は、トリ又はは虫類である。糖尿病に罹患していることが疑われる対象は、好ましくは、糖尿病を示す症状又は臨床徴候若しくはパラメータを示す対象を意味する。糖尿病の素因を有する対象は、好ましくは、糖尿病を示す明らかな症状又は臨床徴候若しくはパラメータを示さず、すなわち糖尿病に関して外見上は健康な対象である。外見上は健康な対象を、予防措置の手段として又は人口スクリーニングの目的においても、本発明の方法により調査することができる。対象は、好ましくは、試験試料が得られる時点で非空腹対象である。

30

【0028】

用語「決定する」は、本明細書で使用されるとき、本明細書において参照される試料に含まれるグリオキシレートの少なくとも一つの特徴的な特質を決定することを意味する。本発明における特徴的な特質は、グリオキシレートの生化学的特性を含む物理的及び/又は化学的特性を特徴決定する特質である。そのような特性には、例えば、分子量、粘度、密度、電荷、スピン、光学活性、元素組成、化学構造、他の化合物と反応する能力、生物学的読み取り系に応答を誘発する能力などが含まれる。前記特性の値は、特徴的性質として役立つことができ、当該技術において周知の技術により決定することができる。更に、特徴的性質は、標準的な操作、例えば乗法、除法又は対数微積分法などの数学の計算により、グリオキシレートの物理的及び/又は化学的特性の値から引き出される任意の特質でありうる。最も好ましくは、少なくとも一つの特徴的性質がグリオキシレートの決定及び/又は化学的同定を可能にする。

40

【0029】

試験試料に含まれるグリオキシレートを、本発明により定量的又は定性的に決定することができる。定性的決定では、グリオキシレートの存在又は不在が適切な技術により決定される。更に、定性的決定には、好ましくは化学構造又は組成の決定が含まれる。定量的決定では、好ましくは本明細書において上に参照された特徴的性質(複数可)について決定された値に基づいて、試料に存在するグリオキシレートの正確な量が決定される又はそ

50

の相対的な量が決定される。相対量は、グリオキシレートの正確な量が決定できない又はされない場合に決定することができる。前記の場合では、グリオキシレートが存在する量が、グリオキシレートを第2の量で含む第2試料に対して増大又は減少しているかを決定することができる。したがって、グリオキシレートを定量的に分析することには、時々半定量分析と呼ばれるものも含まれる。

【0030】

更に、決定には、本発明による方法で使用されるとき、好ましくは前記の分析工程の前に化合物分離工程を使用することが含まれる。好ましくは、前記化合物分離工程は、試料に含まれる代謝産物の時間分解分離をもたらす。したがって、本発明により好ましく使用される分離に適した技術には、液体クロマトグラフィー(LC)、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)、ガスクロマトグラフィー(GC)、薄層クロマトグラフィー、サイズ排除又はアフィニティークロマトグラフィーなどの全てのクロマトグラフィー分離技術が含まれる。これらの技術は、当該技術において良く知られており、当業者により難しいことなく適用されうる。最も好ましくは、LC及び/又はGCが本発明の方法により想定されるクロマトグラフィー技術である。そのようなグリオキシレートなどの代謝産物の決定に適した装置は、当該技術において良く知られている。好ましくは、質量分析、特にガスクロマトグラフィー質量分析(GC-MS)、液体クロマトグラフィー質量分析(LC-MS)、直接注入質量分析若しくはフーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析(FT-ICR-MS)、キャピラリー電気泳動質量分析(CE-MS)、高速液体クロマトグラフィー結合質量分析(HPLC-MS)、四重極質量分析、MS-MS若しくはMS-MS-MSなどの任意の順次結合質量分析、誘導結合プラズマ質量分析(ICP-MS)、熱分解質量分析(Py-MS)、イオン移動度質量分析又は飛行時間型質量分析(TOF)が使用される。最も好ましくはLC-MS及び/又はGC-MSが使用され、下に詳細に記載される。前記技術は、例えばNissen, Journal of Chromatography A, 703, 1995: 37-57、米国特許第4,540,884号又は米国特許第5,397,894号に開示されており、その開示された内容は参照により本明細書に組み込まれる。質量分析技術の代替案又は追加として、以下の技術を化合物決定に使用することができる:核磁気共鳴(NMR)、磁気共鳴画像化法(MRI)、フーリエ変換赤外線分析法(FT-IR)、紫外線(UV)分光法、屈折率(RI)、蛍光検出、放射化学的検出、電気化学的検出、光散乱(LS)、分散ラマン分光法又は水素炎イオン検出(FID)。これらの技術は、当業者に良く知られており、難しいことなく適用することができる。本発明の方法は、好ましくは自動化により補助される。例えば、試料加工又は前処理をロボットにより自動化することができる。データ処理及び比較は、好ましくは適切なコンピュータープログラム及びデータベースにより補助される。本明細書において前に記載された自動化は、本発明の方法をハイスループット手法に使用することを可能にする。

【0031】

上に記載されたように、本発明の方法の好ましい実施形態において、グリオキシレートの前記決定は質量分析(MS)を含む。

【0032】

質量分析は、本明細書で使用されるとき、本発明により決定される化合物、すなわち代謝産物に対応する分子量(すなわち、質量)又は質量変動の決定を可能にする全ての技術を包含する。好ましくは、質量分析は、本明細書で使用されるとき、GC-MS、LC-MS、直接注入質量分析、FT-ICR-MS、CE-MS、HPLC-MS、四重極質量分析、MS-MS若しくはMS-MS-MSなどの任意の順次結合質量分析、ICP-MS、Py-MS、TOF又は前述の技術を使用した任意の組み合わせ手法に関する。これらの技術をどのように適用するかは、当業者に良く知られている。更に、適切な装置は市販されている。より好ましくは、質量分析は、本明細書で使用されるとき、LC-MS及び/又はGC-MS、すなわち前のクロマトグラフィー分離工程に作動的に連結している質量分析に関する。より好ましくは、質量分析は、本明細書で使用されるとき、四重極MSを包含する。最も好ましくは、前記四重極MSは以下のように実施される:a)質量分析計の最初の分析四重極のイオン化により作り出されたイオンの質量/電荷比(m/z)の選択、b)衝突ガスで充填され、衝突室として作用する追加の続く四重極に加速電圧を適

用することによる、工程a)において選択されたイオンのフラグメンテーション、追加の続く四重極における、工程b)のフラグメンテーションプロセスにより作り出されたイオンの質量/電荷比の選択(ここで方法の工程a)~c)は、少なくとも一回実施される)、イオン化プロセスの結果として物質の混合物に存在する全てのイオンの質量/電荷比の分析(ここで、四重極は衝突ガスで充填されているが、加速電圧は分析の際には適用されない)。本発明に使用される前記最も好ましい質量分析についての詳細は、W003/073464において見出すことができる。

【0033】

より好ましくは、前記質量分析は、液体クロマトグラフィー(LC)MS及び/又はガスクロマトグラフィー(GC)MSである。

10

【0034】

液体クロマトグラフィーは、本明細書で使用されるとき、液体又は超臨界相において化合物(すなわち、グリオキシレートを含む代謝産物)の分離を可能にする全ての技術を意味する。液体クロマトグラフィーは、移動相の化合物が固定相を通過することを特徴とする。化合物が固定相を異なる速度で通過するとき、それぞれ個別の化合物は特定の滞留時間(すなわち、化合物が系を通過するのに必要な時間)を有するので、やがて分離する。液体クロマトグラフィーには、本明細書で使用されるとき、HPLCも含まれる。液体クロマトグラフィーの装置は、例えばAgilent Technologies, USAから市販されている。ガスクロマトグラフィーは、本発明により適用されるとき、原則的に液体クロマトグラフィーと同等に稼働する。しかし、固定相を通過する化合物を液体移動相に有する代わりに、化合物は気体体積中に存在する。化合物は、固定相として固体支持材料を含有しうるカラム又は壁が固定相として機能しうる若しくは固定相に被覆されているカラムを通過する。ここでも、それぞれの化合物は、カラムを通過するのに必要な特定の時間を有する。更に、ガスクロマトグラフィーの場合では、化合物がガスクロマトグラフィーの前に誘導体化されることが好ましく想定される。誘導体化に適した技術は当該技術において良く知られている。好ましくは、本発明の誘導体化は、好ましくは極性化合物のメトキシ化(methoxymation)及びトリメチルシリル化、並びに好ましくは非極性(すなわち、親油性)化合物のトランスメチル化、メトキシ化及びトロメチルシリル化に関する。

20

【0035】

更に、グリオキシレートは、特定の化学又は生物学的アッセイにより決定することもできる。前記アッセイは、試料においてグリオキシレートを特異的に検出することを可能にする手段を含む。好ましくは、前記手段は、グリオキシレートの化学構造を特異的に認識することができる又は他の化合物と反応する能力若しくは生物学的読み取り系に応答を誘発する能力(例えば、レポーター遺伝子の誘導)に基づいてグリオキシレートを特異的に同定することができる。グリオキシレートの化学構造を特異的に認識することができる手段は、グリオキシレートの検出剤、好ましくは、グリオキシレートに特異的に結合する抗体、タンパク質又はアプタマーである。特異的な抗体は、例えば、グリオキシレートを抗原として使用して得ることができる又は当該技術に周知の方法によりファージ抗体ライブラリーから得ることができる。抗体には、本明細書に参照されるとき、抗原又はハプテンに結合することができるポリクローナル及びモノクローナルの両方の抗体、並びにFv、Fab及びF(ab)₂フラグメントなどのそのフラグメントが含まれる。更に、包含されるものは、一本鎖抗体及び全ての種類のキメラ抗体である。グリオキシレートを特異的に認識することができる適切なタンパク質は、好ましくは、前記代謝産物の代謝変換に関わる酵素である。前記酵素は、グリオキシレートを基質として使用することができる又は基質を代謝産物に変換することができる。グリオキシレートに特異的に結合するアプタマーは、当該技術において周知の方法により生成することができる(Ellington 1990, Nature 346:818-822; Vater 2003, Curr Opin Drug Discov Devel 6(2): 253-261)。適切な抗体及び/又は酵素に基づいたアッセイは、RIA(ラジオイムノアッセイ)、ELISA(酵素結合免疫吸着アッセイ)、サンドイッチ酵素免疫試験、電気化学発光サンドイッチイムノアッセイ(ECLIA)、解離増強ランタニドフルオロイムノアッセイ(DELFIA)又は固相免疫試験でありうる。更に、

30

40

50

グリオキシレートは、他の化合物と反応する能力に基づいて、すなわち特定の化学反応によって同定することもできる。キャピラリー電気泳動(Hubert 2001, Clinical Chemistry 47: 1319-1321)及び比色方法(Kyaw 1978, Clin Chim Acta 86(2):153-7)などの更なる検出方法を、使用することができる。更に、グリオキシレートを、生物学的読み取り系に応答を誘発する能力によって、試料において決定することができる。生物学的応答は、試料に含まれるグリオキシレートの存在及び/又は量を示す読み取りとして検出される。生物学的応答は、例えば、細胞又は生物体の遺伝子発現又は表現型応答の誘発でありうる。

【0036】

更に、グリオキシレートを決定するのに使用される技術に応じて、検出される分析物は、生理学的に生じるグリオキシレートの、すなわち対象の体内に存在する代謝産物の誘導体でありうるということが理解されるべきである。そのような分析物は、試料調製又は検出手段の結果として生成されうる。本明細書において参照される化合物は、分析物であると認められる。しかし、上に記載されているように、これらの分析物は、定性的及び定量的にグリオキシレートを表す。

10

【0037】

用語「参照」は、糖尿病又は糖尿病の素因に相関しうるグリオキシレートの量を意味する。そのような参照は、好ましくは、糖尿病に罹患している又は糖尿病の素因を有することが知られている対象の試料から得られる。参照は、本発明の方法を適用することにより得ることができる。あるいは、参照は、糖尿病に罹患していない又は糖尿病の素因を有していないことが知られている対象の試料から得ることができるが、この場合も好ましい。更に、参照は計算された参照でありうることも好ましく、最も好ましくは、白人の代表的なコホートなど調査される対象を含む個体集団におけるグリオキシレートの相対又は絶対量の平均又は中央値でありうる。前記個体集団のグリオキシレートの絶対又は相対量は、本明細書の他の部分に特定されているように決定することができる。適切な参照、好ましくは平均又は中央値をどのように計算するかは、当該技術において良く知られている。適切な参照を計算する他の技術には、当該技術においても周知であり、所定の対象コホートに基づいて所定の特異度及び感度を有するアッセイ系について難しいことなく実施することができる受信者動作特性(ROC)曲線計算を使用する最適化が含まれる。前記の対象の集団は、複数の対象、好ましくは少なくとも5、10、50、100、1,000又は10,000の対象を含む。本発明の方法により診断される対象及び前記複数の対象のうちの対象は、同じ種であることが理解されるべきである。

20

30

【0038】

より好ましくは、参照は、データベースなどの適切なデータ記憶媒体に記憶され、したがって、将来の診断にも利用可能である。このことは、疾患の素因を効率的に診断することも可能にし、それは、対応する参照試料が得られる対象が、実際に糖尿病を発生したことが将来確認されると、適切な参照をデータベースにおいて同定することができるからである。ヒトの糖尿病又はその素因に関連する好ましい参照は、添付の実施例における表に示されている。

【0039】

用語「比較する」は、グリオキシレートの定性的又は定量的に決定された量が参照と同一であるか又は異なっているかを評価することを意味する。

40

【0040】

参照が糖尿病に罹患している又は糖尿病の素因を有することが知られている対象又は対象の群から得られる場合、前記疾患又は素因を、試験試料及び前述の参照から得た量の同一又は類似の程度に基づいて、すなわち、グリオキシレートに関する定性的又は定量的な組成の同一性又は類似性に基づいて診断することができる。特徴的特質の値が、定量的決定の場合では強度値が、グリオキシレートについて同一の場合、試験試料及び参照の量は同一である。特徴的特質の値が同一であるが、強度値が異なっている場合、前記結果は類似している。そのような差は、好ましくは有意ではなく、強度の値が参照値の少なくとも1~99百分位数、5~95百分位数、10~90百分位数、20~80百分位数、30~70百分位数、40

50

~60百分位数の間隔内、最も好ましくは参照値の50、60、70、80、90又は95百分位数であることを特徴とする。

【0041】

参照が糖尿病に罹患していない又は糖尿病の素因を有していないことが知られている対象又は対象の群から得られる場合、前記素因を、試験試料及び前述の参照から得た量の差に基づいて、すなわち、グリオキシレートに関する定性的又は定量的な組成の差に基づいて診断することができる。同じことは、上に特定された計算された参照が使用される場合に当てはまる。差は、代謝産物の絶対又は相対量の増加(時々、上方制御と呼ばれる;実施例も参照すること)又は前記量のいずれかの減少若しくは代謝産物の検出可能な量の不在(時々、代謝産物の上方制御と呼ばれる;実施例も参照すること)でありうる。好ましくは、相対又は絶対量の差は有意であり、すなわち、参照値の45~55百分位数、40~60百分位数、30~70百分位数、20~80百分位数、10~90百分位数、5~95百分位数、1~99百分位数の間隔の外側である。グリオキシレートでは、相対量における変化の好ましい値(すなわち、「倍」変化)又は変化の種類(すなわち、より高い若しくは低い相対及び/若しくは絶対量をもたらす「上方」若しくは「下方」制御)が、下記の添付表に示されている。グリオキシレートが対象において「上方制御」されると前記表に示されている場合、相対及び/又は絶対量は増加し、「下方制御」される場合、グリオキシレートの相対及び/又は絶対量は減少する。更に、「倍」変化は、増加又は減少の程度を示し、例えば、2倍増加は、量が参照と比較して2倍の量であることを意味する。

10

【0042】

本発明の方法の好ましい実施形態において、前記参照は、このように、糖尿病に罹患している又はその素因を有することが知られている対象又は対象の群に由来する。より好ましくは、試験試料において参照と比較して同一の若しくは増加したグリオキシレートの量は、糖尿病若しくはその素因の存在を示し、又は試験試料において参照と比較して減少したグリオキシレートの量は、糖尿病若しくはその素因の不在を示す。

20

【0043】

本発明の方法の別の好ましい実施形態において、前記参照は、糖尿病に罹患していない又はその素因を有していないことが知られている対象又は対象の群に由来する。より好ましくは、試験試料において参照と比較して増加したグリオキシレートの量は、糖尿病若しくはその素因の存在を示し、又は試験試料において参照と比較して同一の若しくは減少したグリオキシレートの量は、糖尿病若しくはその素因の不在を示す。

30

【0044】

更に、別の好ましい実施形態における本発明の方法を使用して、糖尿病とその素因を識別すること及び/又は糖尿病の素因、特にIGT若しくはIFGを有する対象内において異なる医学的条件を識別することができる。そのような場合、参照を、IGT若しくはIFGを示すことが知られている対象若しくは対象の群から又は糖尿病に罹患していることが知られている対象若しくは対象の群から誘導することができることが理解される。IGT又はIFGに罹患していることが知られている対象又は対象の群に由来する参照が使用される場合、グリオキシレートの増加は、糖尿病の存在を示し、一方、同一の量は、糖尿病の不在及び糖尿病の素因の存在を示す。しかしグリオキシレートの量が参照と比べて低減される場合、健康な対象と糖尿病の素因を有する対象とを識別することができる参照との更なる比較が実施される。適切な更なる参照は、本明細書の他の部分に開示されている。糖尿病に罹患していることが知られている対象又は対象の群に由来する参照が使用される場合、グリオキシレートの減少は、糖尿病の不在を示し、一方、同一の又は増加した量は、糖尿病の存在を示す。しかし、糖尿病の素因の存在についての診断は、健康な対象と糖尿病の素因を有する対象とを識別することができる参照との更なる比較が必要である。適切な更なる参照は、本明細書の他の部分に開示されている。

40

【0045】

比較は、好ましくは自動化により補助される。例えば、二つの異なるデータセット(例えば、特徴的特質(複数可)の値を含むデータセット)の比較についてのアルゴリズムを含

50

む適切なコンピュータープログラムを使用することができる。そのようなコンピュータープログラム及びアルゴリズムは、当該技術において良く知られている。上記にもかかわらず、比較を手作業で実施することもできる。

【0046】

このように、本発明の方法の工程b)において実施される比較の結果、最終診断の助けが提供される。最終診断は、更なるパラメーター及び対象個体の病歴を考慮する必要がありうることが理解される。しかし、本発明の方法は、最終診断の確立を大きく促進し、したがって糖尿病の治療を全般的に改善する。

【0047】

更に、本発明の方法の好ましい実施形態において、前記方法は、工程b)で確立された診断に基づいて、糖尿病又はその素因を治療又は予防する療法を推奨する工程を更に含む。

10

【0048】

糖尿病又はその素因を治療又は予防する療法を推奨することは、本明細書で使用される時、糖尿病を治療又は予防するのに成功しうる又は所定の対象において糖尿病の症状を改善しうる診断結果に基づいた療法を示唆することを意味する。診断結果が、例えば、糖尿病の存在の決定である場合、方法は、抗糖尿病療法又は食事制限などの生活習慣の推奨を対象に推奨することを含むことができる。診断結果が、例えば、糖尿病の素因の存在の決定である場合、方法は、糖尿病予防療法又は糖尿病の発生を予防するための生活習慣の推奨を推奨することを含むことができる。糖尿病を治療又は予防するのに適した療法は、薬剤に基づいた療法又は肥満外科手術などの外科的介入であり得、好ましくは、インスリン投与、インクレチン模倣物投与、特にエクセナチド、グルコゴン(glucagon)様ペプチド1投与、ジペプチジルペプチダーゼ4(DPP IV)インヒビター投与、特にシタグリブチン、グリベンクラミド又はグリメピリド投与、グリタゾン投与、特にロシグリタゾン又はピオグリトゾン(pioglitazone)、アカルボース投与、グリニド投与、グルコセイダーゼ(glucose idase)インヒビター投与、メトホルミン投与、フェンレチニド投与及び肥満外科手術、特にルーワイ手法に基づいた胃バイパス手術からなる群より選択される。適切な療法は、食事制限、身体運動の推奨などの生活習慣の推奨でもありうる。

20

【0049】

好ましくは、前記推奨は、自動的に提供されることが想定される。このことは、好ましくは、異なる診断結果に割り当てられた推奨を含むデータベースを提供することによって達成されうる。次にデータベースは、所定の診断、すなわち本発明の方法の工程b)において確立された診断結果により検索して、適合させることができる。続いて所定の診断結果について提供される推奨は、データベース適合した診断結果に割り当てられたものである。そのようなデータベース問い合わせシステムを、本発明により想定される方法を支持する情報を提供する自動化エキスパートシステムとして使用することができる。特に、本発明の方法を、調査した対象に特定の種類の療法を推奨する又はしないため、コンパニオン診断の文脈で適用することができる。したがって本発明の方法を、好ましくは、対象が、工程b)で確立された診断結果に基づいて本明細書の他の部分において参照されている糖尿病を治療又は予防する療法に感受性があるかを決定することに使用できる。結果が糖尿病又はその素因の存在の決定である場合、対象は、糖尿病を治療又は予防する前記療法に感受性があると認められることが理解される。

30

40

【0050】

有利には、グリオキシレートは糖尿病又は糖尿病の素因を診断するのに適したバイオマーカーであることが、本発明によって見出されている。このことは、迅速で信頼性があり費用効果の高い糖尿病又は糖尿病素因の診断を可能にする。更に、方法を、本明細書の他の部分に記載されているように自動化により補助することができ、したがって、糖尿病に罹患する危険性のある対象のハイスループットスクリーニングを可能にする。驚くべきことに、グリオキシレートは、空腹ではない定期的な献血者において、糖尿病又は糖尿病の素因のバイオマーカーとして役立つことができる(空腹状態と無関係の糖尿病のマーカーであるHbA1Cと類似している)。具体的には、グリオキシレートは、他のバイオマーカーと

50

異なり、非空腹対象において糖尿病又はその素因を決定することに特に良好に使用できることが見出されている。それによって、本発明の方法は、糖尿病予防の健康プログラムを補助することができ、糖尿病の予防療法の成功又は栄養食事制限を含む糖尿病の予防の他の手段をモニターするために使用することができる。更に、グリオキシレートと本明細書に参照される他の代謝産物との組み合わせを、本明細書に記載されている代謝プロファイル技術により時間内に費用効果の高い方法で同時に決定することができる。更に、本発明の方法は、特定の糖尿病危険群、すなわちIFG、IGT又はIFG&IGTのメンバーである又はメンバーになる対象の危険性の評価を可能にする。報告されているIFG及びIGTの罹患率は、人種群、年齢及び性別の分布に応じて5~26%に大きく変動する。IFG及びIGTの両方の危険群は、近い将来増加することが予測される。両方、IFG又はIGTの危険群では、25%が進行して糖尿病を発病することが、3~5年以内に報告されており、50%が異常な血糖状態を維持し、25%が正常なグルコースレベルに戻る。より長期的な観察では、IFG又はIGTを有する個体の大部分が糖尿病を発生すると思われる。IFG及びIGTの両方(IFG&IGT)を有する個体は、IFG又はIGTのいずれかを有する対象と比較して、糖尿病を発生する比率がおよそ2倍である(Nathan 2007, Diabetes Care 30(3): 753-759)。

【0051】

更に、本発明は、併存疾患を伴う糖尿病又はその素因を診断する方法であって、

(a)併存疾患を伴う糖尿病に罹患している又はその素因を有することが疑われる対象の試験試料におけるグリオキシレートの量を決定する工程であって、前記試料が、試験開始の約2時間後のOGTTの際に対象から得られている工程;及び

(b)工程(a)において決定された量を参照と比較し、それによって併存疾患を伴う糖尿病又はその素因が診断される工程を含む方法を考慮する。

【0052】

用語「併存疾患」は、本明細書で使用されるとき、糖尿病に付随する障害、疾患又は症状を意味する。そのような障害又は疾患は、例えば、糖尿病の直接的若しくは間接的な原因でありうる又は糖尿病により直接的若しくは間接的に引き起こされうる。糖尿病に付随する好ましい併存疾患は、高血圧症などの心臓血管障害若しくは疾患又は糖尿病性腎障害などの腎臓合併症である。最も好ましくは、本明細書において参照される糖尿病に付随する併存疾患は、高血圧症、すなわち血圧の増加である。高血圧症は、当該技術において良く知られており、140/90mmHgを超える血圧により特徴付けられる。

【0053】

試料は、OGTTの開始の約2時間後に得られる。この文脈における用語「約」は、+/-30分、+/-15分、+/-10分若しくは+/-5分又は開始の正確に2時間後を意味する。

【0054】

前述の方法の文脈において参照される用語「参照」は、対象が併存疾患を伴う糖尿病に罹患している又はその危険性があるかを決定することを可能にする参照である。したがってそのような参照は、併存疾患若しくはその素因を伴う糖尿病に罹患していることが知られている対象若しくは対象の群又は併存疾患若しくはその素因を伴う糖尿病に罹患していないことが知られている対象若しくは対象の群のいずれかに由来する。

【0055】

参照が併存疾患又はその素因を伴う糖尿病に罹患していることが知られている対象又は対象の群に由来する場合、参照と比較したとき、試験試料において決定された同一の又は増加したグリオキシレートの量は、併存疾患又はその素因を伴う糖尿病を示す。更に、減少した量は、好ましくは、併存疾患又はその素因を伴う糖尿病に罹患していない対象を示す。

【0056】

参照が、併存疾患又はその素因を伴う糖尿病に罹患していないことが知られている対象又は対象の群に由来する場合、増加したグリオキシレートの量は、併存疾患又はその素因を伴う糖尿病を示す。更に、参照と比較したとき、試験試料において決定された同一の又

は減少したグリオキシレートの量は、好ましくは、併存疾患又はその素因を伴う糖尿病に罹患していない対象を示す。

【0057】

有利には、OGTTの開始の約2時間後に得られた対象の試料において決定されたとき、グリオキシレートは高血圧症などの併存疾患を伴う糖尿病又はその素因を示すバイオマーカーでもあることが、本発明の基礎となる研究において見出されている。グリオキシレートの特に高い量は、そのような場合では、前記併存疾患又はその素因を示す。したがって、前述の方法は、併存疾患又はその素因を診断すること、前記併存疾患の発生に関して対象をモニタリングすること、並びに/又は療法が前記併存疾患を予防及び/若しくは改善するのに有効であるかを決定することを可能にする。

10

【0058】

更に、可能性のある成功する薬剤候補は、薬剤候補が投与されている試験対象においてOGTTの開始の約2時間後に見出されるグリオキシレートの量にも影響を及ぼすので、前述の方法を、糖尿病及び/又は併存疾患に影響を与える薬剤の開発に使用することができる。したがってそのような方法を、薬剤候補の臨床試験の文脈に適用することができる。

【0059】

前述の方法の好ましい実施形態において、前記方法は、併存疾患を伴う糖尿病又はその素因が工程b)において診断される場合、併存疾患に対する療法を推奨する更なる工程c)を含む。

【0060】

併存疾患に対する療法は、本明細書で参照されるとき、好ましくは高血圧症に対する療法である。そのような療法は、薬剤に基づいた療法、食事制限でありうる又は身体運動の推奨などの生活習慣適応の推奨でありうる。

20

【0061】

更に、本発明は、糖尿病を治療又は予防する療法を同定する方法であって、

a)糖尿病又はその素因に対して有効であると思われる療法に付されている糖尿病に罹患している又はその素因を有する対象の試料において、グリオキシレートの量を決定する工程;及び

b)前記量を参照と比較し、それによって、糖尿病又はその素因に対して有効な療法が同定される工程

30

を含む方法に関する。

【0062】

用語「療法」は、本明細書で使用されるとき、糖尿病又は糖尿病に付随する症状を治療する、予防する又は改善することができる治療手段を意味する。好ましくは、前記療法は、薬剤に基づいた療法、栄養食事制限、栄養補助食品療法、肥満外科手術などの手術に基づいた療法、身体的活動の支援、生活習慣の推奨及びこれらの組み合わせからなる群より選択される。

【0063】

治療は、前述の方法において参照されるとき、治療される全ての対象に有効である必要はないことが理解される。しかし、方法により同定されるべき治療は、対象の集団の統計的に有意な部分に対して少なくとも有効である。そのような対象の部分が統計的に有意であるかは、本明細書の他の部分に詳細に記載されている技術により決定することができる。

40

【0064】

更に、用語「対象」は、本発明の前述の方法により使用されるとき、治療が適用される前に糖尿病及び/又は肥満に罹患している対象を意味する。

【0065】

本発明の前述の方法の文脈における用語「参照」は、糖尿病の治療又は予防の成功を示すグリオキシレートの参照量を意味する。そのような参照は、好ましくは、糖尿病若しくは付随の症状が成功裏に治療若しくは改善された又は糖尿病の発生が予防されたことが知

50

られている対象又は対象の群の試料から得られる。更に、本発明のこの方法の文脈に使用される参照は、本明細書の他の部分で参照される糖尿病又はその素因の存在又は不在を示すものである。したがって、参照は、糖尿病若しくはその素因に罹患していないことが知られている対象若しくは対象の群の試料から、すなわち、糖尿病若しくは糖尿病の素因に関して健康な対象から、又は糖尿病若しくはその素因を罹患していないことが知られている対象若しくは対象の群の試料から得ることができる。参照は計算された参照でありうることも好ましく、最も好ましくは、調査される対象を含む個体集団におけるグリオキシレートの相対又は絶対量の平均又は中央値でありうる。

【0066】

参照が、成功裏に治療されたことが知られている対象若しくは群又は糖尿病若しくは糖尿病の素因に罹患していないことが知られている群から得られる場合、有効な療法を、試験試料及び前述の参照から得たグリオキシレートの決定量の同一性又は類似性の程度に基づいて同定することができる。参照が、糖尿病又は糖尿病の素因に罹患していないことが知られている対象又は群から得られる場合、有効な療法を、試験試料及び前述の参照から得たグリオキシレートの決定量の同一性又は類似性の程度に基づいて同定することができる。参照が、糖尿病に罹患している又はその素因を有することが知られている対象又は群から得られる場合、有効な療法は、前述の参照と比較した試験試料におけるグリオキシレート量の減少に基づいて同定することができる。

【0067】

有利には、糖尿病又はその素因のバイオマーカーとしてのグリオキシレートは糖尿病治療又は予防に有効な療法を同定するのに特に有用であることが、本発明の基礎となる研究において見出されている。したがって、本発明の前述の方法を、例えば臨床前動物研究、並びに臨床研究における糖尿病の薬剤に基づいた療法の開発のみならず、所定の対象への個別の有効な療法を同定するためにコンパニオン診断レベルにおいても適用することができる。本発明のおかげで、糖尿病療法を高い信頼性で効率的に同定することができる。更に、治療が有効であるか又はないかを個別に評価することもできる。

【0068】

本発明は、対象において糖尿病療法をモニタリングする方法であって、
 (a)前記対象の第1試料におけるグリオキシレートの量を決定する工程；
 (b)前記対象の第2試料におけるグリオキシレートの量を決定する工程；及び
 (c)第1試料において決定された量を、第2試料において決定された量と比較し、それによって前記対象における糖尿病療法がモニターされる工程
 を含む方法にも関する。

【0069】

前述の方法は、好ましくはインピトロ方法である。更に、上に明確に記述されたものに加えて、工程を含むことができる。例えば、更なる工程は、試料の前処理又は方法により得られる結果の評価に関連しうる。好ましくは、工程(a)、(b)及び/又は(c)を自動化により、例えば工程(a)及び(b)における決定は適切なロボット若しくはセンサー設備又は工程(c)はコンピューター実行比較により、全体的又は部分的に補助することができる。

【0070】

前述の方法により試験される対象は、好ましくは糖尿病、特に2型糖尿病に罹患している。しかし、対象が糖尿病の素因に罹患していることも想定される(この用語の定義は、他を参照すること)。

【0071】

用語「糖尿病療法をモニタリングする」は、前述の方法の文脈において本明細書で使用されるとき、好ましくは、対象が前記療法に応答するか又はしないかを評価することに関する。したがって、対象が前記療法から利益を受けるか又は受けないかを評価する。好ましくは、第1試料の量と比較した第2試料のグリオキシレートの量の減少は、糖尿病療法に
 応答する対象を示す。対照的に、第1試料の量と比較した第2試料のグリオキシレートの量の増加(又は不変の量、特に実質的に不変の量)は、糖尿病療法に
 応答しない対象を示す。

好ましくは、前述の方法を実施することによって、前記対象における糖尿病療法を継続する、停止する又は変更するかの決定を行うことができる。

【0072】

好ましくは、前記療法が糖尿病に関して対象の状態を改善する場合(例えば、血糖管理が改善される場合)、対象は糖尿病療法に应答している。好ましくは、前記療法が糖尿病及び/又は任意の糖尿病併存疾患に関して対象の状態を改善しない場合、対象は前記療法に应答していない。この場合、療法は、対象に有意な利益をもたらすことなく、前記対象を有害な副作用の危険にさらすことになる(これにより不要な医療費を生じる)。

【0073】

前述の方法の文脈における用語「糖尿病療法」には、好ましくは、糖尿病又はその素因を治療する任意の療法が含まれる。好ましい療法は、薬剤に基づいた療法であり、好ましくは、インスリン投与、インクレチン模倣物投与、特にエクセナチド、グルコゴン様ペプチド1投与、ジペプチジルペプチダーゼ4(DPP IV)インヒビター投与、特にシタグリプチン、グリベンクラミド又はグリメピリド投与、グリタゾン投与、特にロシグリタゾン又はピオグリタゾン、アカルボース投与、グリニド投与、グルコセイダーゼインヒビター投与、メトホルミン投与及びフェンレチニド投与からなる群より選択される。別の好ましい実施形態において、糖尿病療法は、栄養療法及び生活習慣の変化を含む。好ましい生活習慣の変化は、身体運動の増加である。好ましい栄養療法は、当該技術において良く知られており、カロリー摂取の低減、栄養素が豊富であるが、脂肪が低い、特に飽和脂肪酸が(不飽和脂肪酸と比較して)低い食事制限が含まれる。

10

20

【0074】

好ましい実施形態において、糖尿病療法には、インスリン感受性改善薬の投与が含まれる。好ましいインスリン感受性改善薬は、メトホルミン及びチアゾリジンジオンである。メトホルミン及びチアゾリジンジオンは当該技術において良く知られている。メトホルミン(IUPAC名称:N,N-ジメチルイミドジカルボンイミド酸ジアミド)は、ピグアナイドの部類の経口抗糖尿病薬である。好ましいチアゾリジンジオンは、ロシグリタゾン(IUPAC名称:5-((4-(2-(メチル-2-ピリジニルアミノ)エトキシ)フェニル)メチル)-2,4-チアゾリジンジオン)、ピオグリタゾン(IUPAC名称:5-((4-(2-(5-エチル-2-ピリジニル)エトキシ)フェニル)メチル)-, (+)-2,4-チアゾリジンジオン)、トログリタゾン(IUPAC名称:5-(4-((6-ヒドロキシ-2,5,7,8-テトラメチルクロマン-2-イル-メトキシ)ベンジル)-2,4-チアゾリジンジオン)からなる群より選択される。最も好ましいチアゾリジンジオンは、ロシグリタゾンである。

30

【0075】

用語「試料」は、本明細書の他の部分に記載されている。定義はそれに応じて適用される。前述の方法の文脈において、本明細書において参照されるバイオマーカーの量は、第1及び第2試料において得られる。好ましくは、第1試料は、糖尿病療法の開始前又はより好ましくは糖尿病療法の開始後に得られる。

【0076】

第1試料が糖尿病療法の開始前に得られる場合、前記開始の少し前に得られることが好ましい。好ましくは、試料は、糖尿病療法を開始する前の1週間未満以内、より好ましくは3日未満以内、最も好ましくは1日未満以内に得られる場合、糖尿病療法を開始する少し前に得られると考慮される。

40

【0077】

「第2試料」は、第1試料と比較して、本明細書において参照されるマーカーのレベルの変化を反映するために得られる試料として、特に理解される。したがって第2試料は、好ましくは第1試料の後に得られる。当然のことながら、第2試料は、糖尿病療法の開始後に得られる。第2試料は、糖尿病療法のモニタリングを可能にするのに十分に有意な変化を観察するため、第1試料の後のあまり早すぎない時点で得られることが理解されるべきである。したがって第2試料は、好ましくは、第1試料が得られてから少なくとも1週間、より好ましくは少なくとも2週間、さらにより好ましくは少なくとも1か月又は2か月、最も

50

好ましくは少なくとも3か月の後に得られる。また好ましくは、第2試料は、第1試料の後の1週間から3か月の期間内に得られることが考慮される。

【0078】

第1試料が糖尿病療法の開始前に得られる場合、第2試料は、好ましくは、糖尿病療法の開始から少なくとも1週間、より好ましくは少なくとも2週間、さらにより好ましくは少なくとも1か月又は2か月、最も好ましくは少なくとも3か月の後に得られる。

【0079】

工程(a)で参照された第1試料におけるグリオキシレートの量の決定を、工程(b)で参照された前記第2試料におけるグリオキシレートの量の決定の数日又は数週間前に実施できることが上記から明らかである。したがって、糖尿病をモニタリングする方法の工程(a)、(b)及び(c)は限定された時間枠内で次々に実施する必要がなく、数日間、数週間又は数か月間もの長期間にわたって分散していてもよい。このように、前述の方法は、二つの試料を得る間隔に応じて、短期、中期及び長期のモニタリングも可能にすることが理解されるべきである。したがって、第2試料を第1試料の後の1日から2年又はそれ以上の期間内で得ることができる。一つの好ましい実施形態において、第2試料は、第1試料の後の1日又は2日、特に1~2日の期間内に得られる(このことは短期モニタリングを可能にする)。一つの別の好ましい実施形態において、第2試料は、第1試料の後の1か月又は2か月、特に1~2か月の期間内に得られる(このことは中期モニタリングを可能にする)。更に好ましい実施形態において、第2試料は、第1試料の後の6か月又は12か月、特に6~12か月又はそれ以上の期間内に得られる(このことは長期モニタリングを可能にする)。

10

20

【0080】

モニターされる対象の試料におけるグリオキシレートの量を経時的に評価することも、想定される。したがって、前述の方法は、前記対象からの少なくとも一つの更なる試料(すなわち、第3試料、第4試料、第5試料など)における前記マーカの量を決定する及びこのように決定された量を、前記第1試料及び/又は前記第2試料及び/又は前記少なくとも一つの更なる試料が得られる前に得られた任意の試料におけるマーカの量と比較する、追加の工程を含むことができる。試料を得るために好ましい時間間隔については、上記を参照すること。

【0081】

好ましくは、対象が糖尿病療法に应答するか又はしないかの評価は、対象の第1試料におけるグリオキシレートの量と、前記対象の第2試料における各マーカの量との比較に基づいている。

30

【0082】

好ましくは、第1試料と比較した第2試料におけるグリオキシレートの量の減少、より好ましくは有意な減少、最も好ましくは統計的に有意な減少は、糖尿病療法に应答する対象を示す。

【0083】

有意な減少は、好ましくは、糖尿病をモニタリングするのに有意であると考慮される大きさの減少である。特に、前記減少は統計的に有意であると考慮される。用語「有意」及び「統計的に有意」は、当業者に知られている。したがって、減少が有意又は統計的に有意であるかは、多様な周知の統計評価ツールを使用して当業者により難しいことなく決定することができる。糖尿病療法に应答する対象を示すグリオキシレートの量の好ましい有意な減少を、本明細書において下に示す。

40

【0084】

好ましくは、第1試料の量と比較した第2試料におけるグリオキシレートの量の好ましくは少なくとも5%、少なくとも10%、より好ましくは少なくとも20%、さらにより好ましくは少なくとも30%、最も好ましくは少なくとも40%の減少が有意であると考慮され、したがって、糖尿病療法に应答する対象を示すと考慮される。

【0085】

上に記載されているように、第1試料と比較した第2試料におけるグリオキシレートの量

50

の増加(又は特に、第1試料と比較した第2試料におけるグリオキシレートの量の実質的に不変の量)は、糖尿病療法に応答しない対象を示す。

【0086】

好ましい実施形態において、前述の方法は、(a1)第1試料において決定された量を参照量と比較する工程及び(b1)第2試料において決定された量を参照量と比較する工程を更に含む。

【0087】

本発明は、対象において糖尿病療法をモニタリングする方法であって、
(a)前記対象の第1試料におけるグリオキシレートの量を決定する工程；
(a1)工程(a)において決定された量を参照と比較する工程、
(b)前記対象の第2試料におけるグリオキシレートの量を決定する工程；
(b1)工程(b)において決定された量を参照と比較する工程、及び
(c)第1試料において決定された量を、第2試料において決定された量と比較し、それによって前記対象における糖尿病療法がモニターされる工程を含む方法にも関する。

10

【0088】

工程(a1)及び(b1)において実施される比較に適した参照は、好ましくは本明細書の他の部分に特定されている参照である。好ましい実施形態において、参照を健康な対象から誘導することができる。しかし好ましくは、参照は、糖尿病に罹患している又はその素因を有する対象に由来する。工程(a1)及び(b1)において実施される比較は、更なる診断情報を提供する。例えば、更なる工程を実施することにより、糖尿病の重篤度を評価することができる。

20

【0089】

上になされた用語の説明及び解釈は、好ましくは本明細書において下に特定される他の実施形態に当てはまる。

【0090】

一般に本発明は、糖尿病又はその素因を診断するための、対象の試料におけるグリオキシレート又はグリオキシレートの検出剤の使用に関する。好ましくは、検出剤は、グリオキシレートに特異的に結合する抗体又はグリオキシレートに特異的に結合するアプタマーであり、本明細書の他の部分に詳細に特定されている。

30

【0091】

更に本発明は、一般に、対象が糖尿病を治療又は予防する療法に感受性があることを同定するための、対象の試料におけるグリオキシレート又はグリオキシレートの検出剤の使用を考慮する。好ましくは、検出剤は、グリオキシレートに特異的に結合する抗体又はグリオキシレートに特異的に結合するアプタマーであり、本明細書の他の部分に詳細に特定されている。

【0092】

更に本発明は、一般に、糖尿病療法をモニタリングするための、対象の第1及び第2試料におけるグリオキシレート又はグリオキシレートの検出剤の使用を考慮する。好ましくは、検出剤は、グリオキシレートに特異的に結合する抗体又はグリオキシレートに特異的に結合するアプタマーであり、本明細書の他の部分に詳細に特定されている。

40

【0093】

また本発明は、糖尿病に罹患していることが疑われる対象の試料において糖尿病又はその素因を診断するための装置であって、

(a)試料に存在するグリオキシレートの量の決定を可能にするグリオキシレートの検出剤を含む分析ユニット；並びにこれに作動的に連結している、

(b)記憶された参照、及び分析ユニットにより決定されたグリオキシレートの量と記憶された参照との比較を可能にし、それにより糖尿病又はその素因が診断されるデータプロセッサ、を含む評価ユニットを含む装置に関する。

50

【0094】

本発明の方法を、前述の装置により実施することができる。装置は、本明細書で使用される時、少なくとも前述のユニットを含む。装置のユニットは相互に作動的に連結している。ユニットがどのように作動的に連結しているかは、装置に含まれるユニットの種類によって決まる。例えば、自動的にグリオキシレートを定性的又は定量的に決定する手段が分析ユニットに適用される場合、前記自動的に稼働するユニットにより得られるデータを、診断を促進するため、評価ユニットにより、例えばデータプロセッサであるコンピューターで実行されるコンピュータープログラムにより処理することができる。好ましくは、ユニットは、そのような場合では単一の装置に含まれる。しかし、分析ユニット及び評価ユニットを物理的に分離することもできる。そのような場合、作動的連結は、データ転送を可能にするユニット間の有線又は無線接続を介して達成することができる。無線接続は、無線LAN(WLAN)又はインターネットを使用することができる。有線接続は、ユニット間の光及び非光ケーブル接続を介して達成することができる。有線接続に使用されるケーブルは、好ましくはハイスループットデータ伝送に適している。

10

【0095】

グリオキシレートを決定するのに好ましい分析ユニットは、本明細書の他の部分に特定されているように、グリオキシレートを特異的に認識する抗体、タンパク質又はアプタマーなどの検出剤、並びに前記検出剤を、試験される試料と接触させる区画を含む。検出剤を、接触のために区画に固定することができる又は試料が装填された後に前記区画に適用することができる。分析ユニットは、好ましくは、検出剤とグリオキシレートの複合体の量を定性的及び/又は定量的に決定するように適合される。検出剤がグリオキシレートに結合する際に、グリオキシレート、検出剤のいずれか又は両方の少なくとも一つの測定可能な物理的又は化学的特性が変更され、それによって前記変更を、好ましくは分析ユニットに含まれる検出器により測定できることが理解される。しかし、試験ストリップなどの分析ユニットが使用される場合、検出器及び分析ユニットは、測定するときだけ一緒になる別々の構成要素でありうる。少なくとも一つの測定可能な物理的又は化学的特性における検出された変更に基づいて、分析ユニットは、本明細書の他の部分に特定されているように、グリオキシレートの強度値を計算することができる。次に前記強度値を、更なる処理及び評価のために評価ユニットに転送することができる。あるいは分析ユニットは、本明細書において参照されるように、好ましくは、クロマトグラフィー装置などの代謝産物を分離する手段及び分光装置などの代謝産物決定の手段を含む。適切な装置は、上記に詳細に記載されている。本発明の系に使用することが好ましい化合物分離手段には、クロマトグラフィー装置、より好ましくは液体クロマトグラフィー、HPLC及び/又はガスクロマトグラフィーの装置が含まれる。化合物決定に好ましい装置は、質量分析装置、より好ましくはGC-MS、LC-MS、直接注入質量分析、FT-ICR-MS、CE-MS、HPLC-MS、四重極質量分析、順次結合質量分析(MS-MS若しくはMS-MS-MSを含む)、ICP-MS、Py-MS又はTOFを含む。分離及び決定手段は、好ましくは互いに結合している。最も好ましくは、LC-MS及び/又はGC-MSが、本発明において参照される分析ユニットに使用される。

20

30

【0096】

本発明の装置の評価ユニットは、好ましくは、本明細書の他の部分に特定されているように、比較を実施するルールを実行するように適合されているデータ処理装置又はコンピューターを含む。更に評価ユニットは、好ましくは、記憶された参照を有するデータベースを含む。データベースは、本明細書で使用される時、適切な記憶媒体にデータ収集を含む。更にデータベースは、好ましくは、データベース管理システムを更に含む。データベース管理システムは、好ましくは、ネットワークに基づいた階層型又はオブジェクト指向データベース管理システムである。更に、データベースは連邦又は統合データベースでありうる。より好ましくは、データベースは分散型(連邦)システムとして、例えばクライアントサーバーシステムとして実行される。より好ましくは、データベースは、試験データセットを、データ収集に含まれるデータセットと比較する検索アルゴリズムを可能にするように構築されている。具体的には、そのようなアルゴリズムを使用することによって

40

50

、データベースを、糖尿病又はその素因を示す類似又は同一データセットについて検索することができる(例えば、問い合わせ検索)。したがって、同一又は類似データセットをデータ収集において同定することができる場合、試験データセットは糖尿病又は糖尿病の素因と関連付けられる。評価ユニットは、好ましくは、糖尿病又はその素因の確立された診断に基づいて治療的若しくは予防的介入又は生活習慣適合の推奨を有する更なるデータベースを含む又はデータベースと作動的に連結することもできる。前記更なるデータベースは、好ましくは、糖尿病を治療又は予防するために試験試料が得られた対象に適切な推奨を同定するため、評価ユニットにより得られた診断結果により自動的に検索されうる。

【0097】

本発明の装置の好ましい実施形態において、前記記憶された参照は、糖尿病に罹患している又はその素因を有することが知られている対象又は対象の群に由来する参照であり、前記データプロセッサは、分析ユニットにより決定されたグリオキシレートの量を記憶された参照と比較する指示を実行し、試験試料において参照と比較して同一の若しくは増加したグリオキシレートの量は、糖尿病若しくはその素因の存在を示し、又は試験試料において参照と比較して減少したグリオキシレートの量は、糖尿病若しくはその素因の不在を示す。

10

【0098】

本発明の装置の別の好ましい実施形態において、前記記憶された参照は、糖尿病に罹患していない又はその素因を有していないことが知られている対象又は対象の群に由来する参照であり、前記データプロセッサは、分析ユニットにより決定されたグリオキシレートの量を記憶された参照と比較する指示を実行し、試験試料において参照と比較して増加したグリオキシレートの量は、糖尿病若しくはその素因の存在を示し、又は試験試料において参照と比較して同一の若しくは減少したグリオキシレートの量は、糖尿病若しくはその素因の不在を示す。

20

【0099】

有利には、本発明の装置は、糖尿病又は糖尿病の素因の自動診断を可能にする。したがって、装置は、特に上に特定された推奨を行うエキスパートシステムが含まれる場合、特別な医学知識を有することなく医療関係者又は患者により使用することもできる。装置は、患者の近くで適用することにも適しており、それは装置を携帯型に適合できるからである。

30

【0100】

本発明は、グリオキシレートの検出剤、及び糖尿病に罹患している若しくはその素因を有することが知られている対象若しくは対象の群に由来する又は糖尿病に罹患していない若しくはその素因を有していないことが知られている対象若しくは対象の群に由来する濃度で好ましくはまたグリオキシレート標準を含む、糖尿病又はその素因を診断するためのキットも包含する。好ましくは、検出剤は、グリオキシレートに特異的に結合する抗体又はグリオキシレートに特異的に結合するアプタマーであり、本明細書の他の部分に詳細に特定されている。

【0101】

「標準」は、本明細書において参照されるとき、溶液に存在する又は予め定義された体積の溶液に溶解されている場合、糖尿病に罹患している若しくはその素因を有することが知られている対象若しくは対象の群に存在する又は糖尿病に罹患していない若しくはその素因を有していないことが知られている対象若しくは対象の群に由来するグリオキシレートの量と類似している量のグリオキシレートである。

40

【0102】

用語「キット」は、好ましくは別々に又は単一の容器内に提供される前述の構成要素の集まりを意味する。容器は、本発明の方法を実施するための使用説明書も含む。これらの使用説明書は、マニュアルの形態でありうる、又はコンピューター若しくはデータ処理装置により実行されたとき、本発明の方法において参照された比較を実施し、それによって診断を確立することができるコンピュータープログラムコードにより提供されうる。コンピ

50

ュータープログラムコードは、データ記憶媒体又は光学若しくは磁気記憶媒体(例えば、コンパクトディスク(CD)、CD-ROM、ハードディスク、光学記憶媒体若しくはディスクレット)などの装置により、又は直接コンピューター若しくはデータ処理装置により提供される。

【0103】

上に参照された全ての参考文献は、それらの全ての開示内容、並びに上の記載において明確に参照される特定の開示内容に関して参照により本明細書に組み込まれる。

【実施例】

【0104】

ここで本発明を以下の実施例により例示し、これらは本発明の範囲を限定又は制限することを意図していない。

10

【0105】

実施例1:一般的な研究目的及び設計

そのようなバイオマーカー又はバイオマーカーの組み合わせを同定するため、バイエル州赤十字の血液銀行の87033人の定期的及び長期的な献血者のコホートから選択して、糖尿病スクリーニング研究を設計した。研究を二つの部分に細分化した。前向き糖尿病スクリーニング部分は、研究の参加者の分類のための経口グルコース負荷試験(OGTT)評価(前向き部分)、並びに空腹時血漿グルコース(FPG)及びOGTTの結果に基づいた糖尿病分類間の代謝の差を含んだ。後向き部分は、糖尿病発生の経過における初期代謝変化を診断の6年前まで評価することを可能にした。全献血者コホートのうち、60859人が糖尿病スクリーニング研究に参加し、これらのうち60656人が「Findrisk」と呼ばれる糖尿病危険度スコア評価を完了した(Martin 2007, Dtsch Med Wochenschr. 132(24): 1315-1320)。参加者のうち、16.1%が12の糖尿病の高い危険性を示した。Findriskスコアに基づいた糖尿病の高い危険性を有する参加者のうち、合計4241人の献血者は、ヘモグロビンA1C(HbA1C)値の5.6%により示されるように、長期の高い血中グルコースレベルを発生する追加的な危険性があると同定された。研究は、12未満のFindriskスコアを有する対象及び対照として機能する<5.6%のHbA1C値を有する対象も含んだ。

20

【0106】

実施例2:前向き研究

OGTT評価に参加することを志願した合計789人の参加者から、前向き研究部分のために対象を選択した。選択の前に、参加者を空腹時血漿グルコース(OGTTの前)及びOGTT分類に従って群に分けた。

30

【0107】

標準WHO糖尿病分類を適用した(WHO 2006):

糖尿病:FPG 7.0mmol/L又は2HPG 11.1mmol/L;

IGT:FPG<7.0mmol/L及び2HPG 7.8且つ<11.1mmol/L;

IFG:FPG6.1~6.9mmol/L及び2HPG<7.8mmol/L、

健康:FPG 6.0mmol/L及び2HPG<7.8mmol/L)

2HPG=標準75g経口グルコース投入の2時間後の血漿

【0108】

選択は、糖尿病の分類、並びに施設、性別、肥満指数及び年齢などの潜在的交絡要因の最適な適合のために実施した。最終的に478人の研究参加者を前向き研究部分に含めた。

40

【表 1 A】

表1A:前向き研究部分において478人の参加者の空腹時血漿グルコース及びOGTT評価の測定後の糖尿病分類

2HPGによってのみ同定され、FPGでは同定されなかった糖尿病患者	FPGによってのみ又は追加的に同定された糖尿病患者	IFG+IGT	IGT	IFG	健康
28	30	77	39	127	177

10

【表 1 B】

表1B:OGTTの120でSIM法により測定された、上に記載された対象のサブセット

2HPGによってのみ同定され、FPGでは同定されなかった糖尿病患者	FPGによってのみ又は追加的に同定された糖尿病患者	IFG+IGT	IGT	IFG	健康
23	23	55	36	98	50

20

【0109】

代謝産物プロファイリングは、OGTTの直前に研究参加者から得た空腹時血漿試料、並びに標準的経口グルコースボラス(75g)の120分後の血漿試料において実施した。血漿は、標準的プロトコールにより処理し、およそ60分以内に血液から分離した。血漿試料を直ぐに凍結し、-80 で保存した。試料採取した場所から生化学分析の場所への試料の移動は、ドライアイスの上で行った。

【0110】

実施例3:後向き研究

後向き研究部分は、空腹時血漿及びOGTTグルコースレベルに基づいて前向き研究部分で糖尿病分類に分類された研究参加者からの長期保存記録試料で実施した。対象1人あたり四つの後向き試料を、バイエル州赤十字の管理保存施設から得た。四つの試料は、(1)OGTTの前の最後の定期的な献血からの血漿試料、並びに典型的には(2)最後の献血の18か月前、(3)最後の献血の36か月前及び(4)最後の献血の72か月前の血漿試料を含んだ。後向き試験部分の全ての試料を、血液銀行の厳格な標準操作手順に従って試料採取、処理及び保存した。

30

【表 2 A】

表2A:後向き研究部分において243人の参加者の空腹時血漿グルコース及びOGTT評価の測定後の糖尿病分類

2HPGによってのみ同定され、FPGでは同定されなかった糖尿病患者	FPGによってのみ又は追加的に同定された糖尿病患者	IFG+IGT	IGT	IFG	健康
27	28	50	10	32	96

40

【表 2 B】

表2B:SIM法により測定された、上に記載された対象のサブセット

2HPGによってのみ同定され、FPGでは同定されなかった糖尿病患者	FPGによってのみ又は追加的に同定された糖尿病患者	健康
24	23	51

【0111】

代謝産物プロファイリングは、後に研究参加者になる定期的な献血者の血漿試料において実施した。献血の前に、献血者に食事を勧めた。血漿を献血の直後に分離した。次に血漿試料を、アリコート調製するまでおよそ4で約24時間保存し、-42で長期保存庫に移した。長期保存庫から生化学分析の場所への試料の移動は、ドライアイスの上で実施した。

10

【0112】

実施例4: 研究の血漿試料の分析

前向き及び後向き血漿試料を、FPG及びOGTTの結果に従って別個の糖尿病危険群に分類し、続いて広範囲なプロファイリング及びメタボロミック(metabolomic)特徴決定により分析した。試料を調製し、下に記載されているように、LC-MS/MS、GC-MS及びSPE-LC-MS/MS(ホルモン)分析に付した。アミノ酸、炭水化物、脂肪酸、モノ-、ジ-及びトリグリセリド、他の脂質、有機酸、補酵素、ビタミン、二次代謝産物、ステロイドホルモン及びカテコールアミンを含む代謝産物の幾つかの群を、半定量的又は定量的に分析した。前向き試料は、選択されたエイコサノイドについても分析した。

20

【0113】

タンパク質を血漿から沈殿により分離した。水及びエタノールとジクロロメタンの混合物を添加した後、残りの試料を水性極性相及び有機親油相に分けた。

【0114】

脂質抽出物(親油相)のトランスメタノリシス(transmethanolysis)では、140µlのクロロホルム、37µlの塩酸(水中37重量%のHCl)、320µlのメタノール及び20µlのトルエンの混合物を、蒸発抽出物に加えた。容器を密封し、振とうしながら100で2時間加熱した。続いて溶液を蒸発乾固した。残渣を完全に乾燥した。

30

【0115】

カルボニル基のメトキシ化は、密封容器においてメトキシアミン塩酸塩との反応(ピリジン中20mg/ml、100µlを60で1.5時間)により実施した。奇数直鎖脂肪酸の20µlの溶液(炭素原子7~25個の脂肪酸の各0.3mg/mLと27、29及び31個の炭素原子の脂肪酸の各0.6mg/mLとの3/7(v/v)ピリジン/トルエン中の溶液)を時間基準として加えた。最後に、100µlのN-メチル-N-(トリメチルシリル)-2,2,2-トリフルオロアセトアミド(MSTFA)による誘導体化を、ここでも密封容器において60で30分間実施した。GCへの注入前の最終体積は220µlであった。

【0116】

極性相では、誘導体化は以下のように実施した:カルボニル基のメトキシ化は、密封容器においてメトキシアミン塩酸塩との反応(ピリジン中20mg/ml、50µlを60で1.5時間)により実施した。奇数直鎖脂肪酸の10µlの溶液(炭素原子7~25個の脂肪酸の各0.3mg/mLと27、29及び31個の炭素原子の脂肪酸の各0.6mg/mLとの3/7(v/v)ピリジン/トルエン中の溶液)を時間基準として加えた。最後に、50µlのN-メチル-N-(トリメチルシリル)-2,2,2-トリフルオロアセトアミド(MSTFA)による誘導体化を、ここでも密封容器において60で30分間実施した。GCへの注入前の最終体積は110µlであった。GC-MS系は、Agilent 5973 MSDに結合したAgilent 6890 GCから構成される。オートサンプラーは、CTCのCompiPal又はGCPalであった。

40

【0117】

50

分析には、分析される試料材料及び相分離工程からの画分に応じて、0% ~ 35%の芳香族部分を含有する異なるポリ-メチル-シロキサン固定相を有する、通常の市販のキャピラリー分離カラム(30m x 0.25mm x 0.25 μm)を使用した(例えば:DB-1ms、HP-5ms、DB-XLB、DB-35ms、Agilent Technologies)。1 μLまでの最終体積をスプリットレス注入し、オープン温度プログラムを、十分なクロマトグラフィー分離及び各分析物のピーク内の走査の数を達成するため、試料材料及び相分離工程からの画分に応じて異なる加熱速度により70 で開始し、340 で終了した。更に、RTL(Retention Time Locking, Agilent Technologies)を分析に使用し、通常のGC-MS標準条件は、例えば公称1 ~ 1.7ml/分の一定流及び移動相ガスとしてヘリウムであり、イオン化は70eVの電子衝撃で実施し、2.5 ~ 3走査/秒の走査速度で15 ~ 600のm/z範囲内で走査し、標準調整条件であった。

10

【 0 1 1 8 】

HPLC-MS系は、API 4000質量分析計(Applied Biosystem/MDS SCIEX, Toronto, Canada)と結合したAgilent 1100 LC系(Agilent Technologies, Waldbronn, Germany)から構成された。HPLC分析は、C18固定相(例えば、GROM ODS 7 pH, Thermo Betasil C18)を有する市販の逆相分離カラムで実施した。蒸発及び再構成された極性及び親油相の10 μLまでの最終試料体積を注入し、分離を、メタノール/水/ギ酸又はアセトニトリル/水/ギ酸の勾配を200 μL/分の流速で使用する勾配溶出で実施した。質量分析は、多重反応モニタリング(MRM)モード及び100 ~ 1000amuのフルスキャンを使用して、非極性画分では陽性モード及び極性画分では陰性モードでエレクトロスプレーイオン化により実施した。

20

【 0 1 1 9 】**実施例5: データ分析及び統計的評価**

血漿試料を、各試料のアリコートから生じたプールした試料(いわゆる、「プール」)による無作為化分析順序設計で分析した。包括的分析確認工程に続いて、各分析物の生ピークデータを、分析順序あたりのプールの中央値に正規化して、プロセス変動に対処した(いわゆる、「プール正規化比」)。利用可能な場合、代謝産物の絶対濃度を統計的分析に使用した。他の場合は、全て、プール正規化比を使用した。

【 0 1 2 0 】

全てのデータをlog10変換して、ほぼ正規分布を達成した。交絡要因(試料保存時間、施設、性別、肥満指数(BMI)、対象の年齢)のデータを修正する及び経口グルコース負荷試験(OGTT)から得た糖尿病の診断結果を推定する混合効果モデルを計算した。FPGに加えて、結果を、グルコース負荷時点の120分後のOGTTで得た。対象を以前の抗高血圧治療(高血圧に対する治療)に基づいて分け、プロファイリングパターンは、これらの下位集団で比較した。バイオマーカーの重要度は、t統計の統計的に有意なp値から読み取った。制御の方向及び強さは、推定される効果をlog10比例尺度から乗法比例尺度に戻して変換して、人間が読めるより良好な様式で得た。糖尿病又は糖尿病の危険性の初期バイオマーカーを同定するため、効果を、糖尿病診断OGTT結果の6年前までの全ての利用可能な時点で読み取った。

30

【 0 1 2 1 】

上に記載された研究において同定されたバイオマーカーとしてのグリオキシレートの結果を、以下の表にまとめる。

40

【表3】

表3:前向きデータセットにおける糖尿病又は糖尿病の危険性の予測子としてのグリオキシレートの性能;比較は、幾つかの糖尿病危険群のうちOGTTの前の空腹時血漿試料において行った。p値は、交絡要因修正固定効果ANOVAモデルのt統計に対応する。比は、乗法比例尺度に変換されたlog比例尺度で推定された効果に対応する(比= $10^{(\log\text{比例尺度の推定効果})}$)。方向は、陽性対象(糖尿病及び/又は危険性のある対象)対陰性対象(健康な対照)における制御の方向に対応する。

診断の質問	方向	p値	比
糖尿病対健康	上方	0.011	1.23
非健康(危険性及び糖尿病)対健康な対象	上方	0.017	1.13
OGTTによる危険性対健康	上方	0.024	1.16
危険性のある全対象対健康	上方	0.052	1.11
グルコースに基づいた陽性(糖尿病及び危険性のある対象)対陰性(健康な対照)の比較(グルコース濃度における間隔の分位閾値)	上方	0.0026	1.19
数値HbA1cとの相関関係	上方	0.056	1.05 ¹
HbA1cに基づいた陽性対陰性の比較(間隔の標準閾値)	上方	0.036	1.15
HbA1cに基づいた陽性対陰性の比較(間隔の分位閾値)	上方	0.039	1.13
糖尿病対IFG	上方	0.095	1.15
IFG+IGT対健康	上方	0.0043	1.23
糖尿病対IGT	上方	0.095	1.20
空腹時グルコースにより検出可能な糖尿病対健康	上方	0.0082	1.32

¹比は、現行のデータセットにおけるHbA1cの一つの標準偏差の変化(sd(HbA1c)=0.34)によるグリオキシレートの推定変化に対応する

【0122】

前向きデータセットにおける糖尿病又は糖尿病の危険性の予測子としてのグリオキシレートの性能(上の表を参照すること)は、グリオキシレートの測定及び分析を、グルコース、HbA1C、1,5アンヒドロソルビトール、2-ヒドロキシブチレート又はマンノースなどの既知の糖尿病マーカーと組み合わせることにより改善することができる。

【0123】

以下の比較を糖尿病危険群において経時的に行った(時間的比較):

A)最後の献血の中央値時点2.6年前での糖尿病又は危険群対健康な対象(時点間の直線補間)

B)0年(最後の献血)の時点での糖尿病又は危険群対健康な対象

C)最後の献血の1.5年前での糖尿病又は危険群対健康な対象

D)最後の献血の3年前での糖尿病又は危険群対健康な対象

E)最後の献血の6年前での糖尿病又は危険群対健康な対象

F)糖尿病又は危険群対健康な対象の傾斜を比較する線形傾斜の偏差(ANOVA要因糖尿病状態及び時間の相互作用)

【表4】

表4:後向きデータセットにおける糖尿病又は糖尿病の危険性の予測子としてのグリオキシレートのパフォーマンス;比較は、糖尿病危険群において経時的に行った。p値は、交絡要因修正固定効果ANOVAモデルのt統計に対応する。比は、乗法比例尺度に変換されたlog比例尺度で推定された効果に対応する(比= $10^{(\log \text{比例尺度の推定効果})}$)。方向は、陽性対象(糖尿病及び/又は危険性のある対象)対陰性対象(健康な対照)における制御の方向に対応する。制御の方向は、p値<0.05の有意なレベルで糖尿病又は危険性のある群を健康な対照対象と比較する。

診断の質問	方向	p値	比
最後の献血の中央値時点2.6年前での糖尿病対健康な対象(時点間の直線補間)	上方	0.0027	1.21
0年(最後の献血)の時点での糖尿病対健康な対象	上方	0.0015	1.44
最後の献血の3年前での糖尿病対健康な対象	上方	0.0084	1.35
糖尿病及び健康な対象のグリオキシレート増加の経時的な差(線形時間推定の傾斜の比較)	上方	0.0093	1.16 ¹
最後の献血の中央値時点2.6年前での耐糖能障害対健康な対象(時点間の直線補間)	上方	0.026	1.51
最後の献血の3年前での耐糖能障害対健康な対象	上方	0.0036	2.00
最後の献血の中央値時点2.6年前での糖尿病及び全ての危険群の対象対健康な対象(時点間の直線補間)	上方	0.0039	1.15
0年(最後の献血)の時点での糖尿病及び全ての危険群の対象対健康な対象	上方	0.036	1.21
最後の献血の3年前での糖尿病及び全ての危険群の対象対健康な対象	上方	0.034	1.21

¹比は、現行のデータセットにおける等距離工程時間=0年、1.5年、3年、6年で0、1、2、3の時間尺度での一つの標準偏差の変化によるグリオキシレートの推定変化に対応する。

【表5】

表5:グリオキシレートと数値HbA1c測定との相関関係;比較は、p値<0.05の有意なレベルで糖尿病危険群において経時的に行った。p値は、交絡要因修正固定効果ANOVAモデルのt統計に対応する。比は、乗法比例尺度に変換されたlog比例尺度で推定された効果に対応する(比= $10^{(\log \text{比例尺度の推定効果})}$)。

糖尿病危険度比較	p値	比
数値HbA1cとの相関関係; 2.6年; 男性及び女性	0.011	1.06
数値HbA1cとの相関関係; 2.6年; 男性	0.022	1.06
数値HbA1cとの相関関係; 0年; 男性及び女性	0.013	1.12
数値HbA1cとの相関関係; 3年; 男性及び女性	0.016	1.11
グリオキシレートとHbA1cの経時的な相関関係の増加(二つの数値要因HbA1c及び時間の相互作用、両方の要因はANOVAで標準化されている)	0.026	1.05

【表 6】

表6:SIMにより測定された前向きデータセットにおける経口グルコース投入の120分後の血圧増加関連糖尿病合併症の予測子としてのグリオキシレートの性能。p値は、交絡要因修正固定効果ANOVAモデルのt統計に対応する。比は、乗法比例尺度に変換されたlog比例尺度で推定された効果に対応する(比=10^{^(log比例尺度の推定効果)})。方向は、陽性対象(糖尿病及び/又は危険性のある対象)対陰性対象(健康な対照)における制御の方向に対応する。

診断の質問	方向	p値	比
120分のOGTT時点での糖尿病対健康の比較における、以前に抗高血圧治療を有する及び有さない対象における差	上方	0.0043	1.72

10

【表 7】

表7:SIM測定の後後向きデータセットにおけるOGTTにより診断された糖尿病又は糖尿病の危険性の予測子としてのグリオキシレートの性能;比較は、糖尿病危険群において経時的に行った。p値は、交絡要因修正固定効果ANOVAモデルのt統計に対応する。比は、乗法比例尺度に変換されたlog比例尺度で推定された効果に対応する(比=10^{^(log比例尺度の推定効果)})。方向は、陽性対象(糖尿病及び/又は危険性のある対象)対陰性対象(健康な対照)における制御の方向に対応する。制御の方向は、p値<0.05の有意なレベルで糖尿病患者又は危険性のある群を健康な対照対象と比較する。

20

診断の質問	方向	p値	比
最後の献血の中央値時点2.6年前でのOGTTのみ(上昇した空腹時グルコースではなく)により分類された糖尿病対健康な対象(時点間の直線補間)	上方	0.0407	1.1096
0年(最後の献血)の時点でのOGTTのみ(上昇した空腹時グルコースではなく)により分類された糖尿病対健康な対象	上方	0.0139	1.2097
最後の献血の6年前でのOGTTのみ(上昇した空腹時グルコースではなく)により分類された糖尿病対健康な対象	上方	0.0463	1.1665

30

【 0 1 2 4】

実施例6:SIM法の記載

前向き及び後向き血漿試料を、FPG及びOGTTの結果に従って別個の糖尿病危険群に分類し、続いて広範囲なプロファイリング及びメタボロミック特徴決定により分析した。試料を調製し、下に記載されているように、LC-MS/MS、GC-MS及びSPE-LC-MS/MS(ホルモン)分析に付した。アミノ酸、炭水化物、脂肪酸、モノ-、ジ-及びトリグリセリド、他の脂質、有機酸、補酵素、ビタミン、二次代謝産物、ステロイドホルモン及びカテコールアミンを含む代謝産物の幾つかの群を、半定量的又は定量的に分析した。

40

【 0 1 2 5】

タンパク質を血漿から沈殿により分離した。水及びエタノールとジクロロメタンの混合物を添加した後、残りの試料を水性極性相及び有機親油相に分けた。

【 0 1 2 6】

脂質抽出物(親油相)のトランスメタノリシスでは、140 µlのクロロホルム、37 µlの塩酸(水中37重量%のHCl)、320 µlのメタノール及び20 µlのトルエンの混合物を、蒸発抽出物に加えた。容器を密封し、振とうしながら100 で2時間加熱した。続いて溶液を蒸発乾

50

固した。残渣を完全に乾燥した。

【0127】

カルボニル基のメトキシ化は、密封容器においてメトキシアミン塩酸塩との反応(ピリジン中20mg/ml、100lを60 で1.5時間)により実施した。奇数直鎖脂肪酸の20 µlの溶液(炭素原子7~25個の脂肪酸の各0.3mg/mLと炭素原子27、29及び31個の脂肪酸の各0.6mg/mLとの3/7(v/v)ピリジン/トルエン中の溶液)を時間基準として加えた。最後に、100 µlのN-メチル-N-(トリメチルシリル)-2,2,2-トリフルオロアセトアミド(MSTFA)による誘導体化を、ここでも密封容器において60 で30分間実施した。GCへの注入前の最終体積は100 µlであった。

【0128】

極性相では、誘導体化は以下のように実施した:カルボニル基のメトキシ化は、密封容器においてメトキシアミン塩酸塩との反応(ピリジン中20mg/ml、50lを60 で1.5時間)により実施した。奇数直鎖脂肪酸の10 µlの溶液(炭素原子7~25個の脂肪酸の各0.3mg/mLと炭素原子27、29及び31個の脂肪酸の各0.6mg/mLとの3/7(v/v)ピリジン/トルエン中の溶液)を時間基準として加えた。最後に、50 µlのN-メチル-N-(トリメチルシリル)-2,2,2-トリフルオロアセトアミド(MSTFA)による誘導体化を、ここでも密封容器において60 で30分間実施した。GCへの注入前の最終体積は100 µlであった。GC-MS系は、Agilent 5973 MSDに結合したAgilent 6890 GCから構成される。オートサンプラーは、CTCのCompiPal又はGC Palであった。

【0129】

分析には、分析される試料材料及び相分離工程からの画分に応じて、0%~35%の芳香族部分を含有する異なるポリ-メチル-シロキサン固定相を有する、通常の市販のキャピラリー分離カラム(30m x 0.25mm x 0.25 µm)を使用した(例えば:DB-1ms、HP-5ms、DB-XLB、DB-35ms、Agilent Technologies)。1 µLまでの最終体積をスプリットレス注入し、オープン温度プログラムを、十分なクロマトグラフィー分離及び各分析物のピーク内の走査の数を達成するため、試料材料及び相分離工程からの画分に応じて異なる加熱速度により70 で開始し、340 で終了した。更に、RTL(Retention Time Locking, Agilent Technologies)を分析に使用し、通常のGC-MS標準条件、例えば、公称1~1.7ml/分の一定流及び移動相ガスとしてヘリウム、並びに標準調整条件を適用した。イオン化は、2~13イオン質量からなる適切な時間範囲内で各分析物の2~3個の特徴的なマスフラグメントを走査する、70eVの電子衝撃で実施した。走査速度は、それぞれの時間範囲内で走査される質量の数に応じて、3~14走査/秒の範囲であった。

【0130】

実施例7:抗糖尿病薬のメトホルミンで治療したラット

それぞれ5匹の雄及び雌ラットの2群に、指示された化合物を群あたり異なる用量(下記を参照すること)で1日1回、28日間にわたって投与した。

【0131】

研究の各用量群は、性別あたり5匹のラットから構成された。それぞれ15匹の雄及び15匹の雌の動物の追加の群は対照として機能した。治療期間を開始する前に、供給されたとき62~64日齢であった動物を、収容及び環境条件に7日間順化させた。動物集団における全ての動物を同じ一定温度(20~24±3)及び同じ湿度(30~70%)に保持した。動物集団における動物には食餌を適宜与えた。使用した食物は、実質的に化学物質又は微生物の汚染物質を含有しなかった。飲料水も適宜供給した。したがって、水はヨーロッパ飲料水指令(European Drinking Water Directive)98/83/EGに記載されている化学物質及び微生物の汚染物質を含有しなかった。照明時間は、12時間の光であり、続いて12時間の暗黒であった(12時間の光は6:00~18:00、12時間の暗黒は18:00~6:00)。研究は、ドイツ国動物保護法(German Animal Welfare Act)及び欧州理事会指令86/609/EEに従って、AAALAC認可実験室において実施した。試験系は、齧歯類における反復用量28日間経口毒性研究における化学薬品の試験のためのOECD407指針に従って配置した。試験物質は、以下のように投与した:

10

20

30

40

50

メトホルミン塩酸塩は、0.5%のカルボキシメチルセルロースを含有する飲料水(Tylose CB30000)(投与体積:10ml/kg体重)で胃管栄養法により投与した(高用量群は1g/kg体重、低用量群は0.2g/kg体重)。

【0132】

7、14及び28日目の朝、血液を、麻酔をかけた空腹動物の眼窩後静脈叢から取った。それぞれの動物では、1mlの血液を、抗凝血薬としてEDTAと共に収集した。試料を遠心分離して、血漿を生成した。全ての血漿試料をN₂雰囲気下で覆い、次に分析するまで-80℃で保存した。

【0133】

質量分析に基づいた代謝プロファイリング分析では、血漿試料を抽出し、極性及び非極性(脂質)画分を得た。GC-MS分析では、非極性画分を酸性条件下でメタノールにより処理して、脂肪酸メチルエステルを生じた。分析の前に、両方の画分を、更に、O-メチル-ヒドロキシアミン塩酸塩及びピリジンで誘導体化して、オキシ基をO-メチルオキシムに変換し、続いてシリル化剤で誘導体化した。LC-MS分析では、両方の画分を適切な溶媒混合物において再構成した。HPLCは、逆相分離カラムにおいて勾配溶出により実施した。フルスクリーン分析と並行した標的及び高感度MRM(多重反応モニタリング)プロファイリングを可能にする質量分析検出は、WO2003073464に記載されたように適用した。

【0134】

ステロイド及び他の代謝産物は、オンラインSPE-LC-MS(固相抽出-LC-MS)により測定した。カテコールアミン及びこれらの代謝産物は、Yamada et al. (Yamada 2002, Journal of Analytical Toxicology, 26(1): 17-22)に記載されたようにオンラインSPE-LC-MSにより測定した。

【0135】

包括的な分析確認工程に続いて、各分析物のデータをプール試料のデータに正規化した。これらの試料は、全過程にわたって並行して処理して、方法の変動性に対処した。性別、治療期間及び代謝産物に特異的な治療群値の有意性は、WELCH試験を使用して、治療群の平均を対応する未治療対照群の平均と比較することによって決定し、対照に対する治療比及びp値で定量化した。

【表8】

表8:健康なラットの血漿グリオキシレート濃度に対するメトホルミンの効果。f7、f14及びf28は、投与開始の7、14及28日後にそれぞれ雌ラットから取ったラット血漿を意味する。同様に、m7、m14及びm28は、投与開始の7、14及28日後にそれぞれ雄ラットから取ったラット血漿を意味する。

高用量	メトホルミン塩酸塩					
	f7	f14	f28	m7	m14	m28
治療/対照の比	0.82	0.58	0.52	0.22	0.29	0.58
P値	0.24	0.01	0.08	0.00	0.00	0.10

低用量	メトホルミン塩酸塩					
	f7	f14	f28	m7	m14	m28
治療/対照の比	1.01	0.72	0.64	0.59	0.65	0.44
P値	0.54	0.23	0.01	0.06	0.35	0.02

【0136】

上の表8から明白なように、メトホルミンは、ラットモデル系において見出されるグリオキシレートの濃度を低減することができる。したがって、既知の抗糖尿病薬であるメトホルミンは、メトホルミンで治療された糖尿病患者においてバイオマーカーのグリオキシレートのレベルを減少することも想定される。したがって、グリオキシレートを、メトホルミン療法に対する糖尿病患者の応答をモニタリングするバイオマーカーとして使用する

ることができる」と推測される。

【手続補正書】

【提出日】平成25年8月22日(2013.8.22)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

糖尿病又はその素因を決定する方法であって、

(a)糖尿病に罹患している又はその素因を有していることが疑われる対象の試験試料におけるグリオキシレートの量を決定する工程;及び

(b)工程(a)において決定された量を参照と比較し、それによって糖尿病又はその素因が決定される工程を含む方法。

【請求項2】

前記参照が、糖尿病に罹患している又はその素因を有することが知られている対象又は対象の群に由来する、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

試験試料において参照と比較して同一の若しくは増加したグリオキシレートの量が、糖尿病若しくはその素因の存在を示し、又は試験試料において参照と比較して減少したグリオキシレートの量が、糖尿病若しくはその素因の不在を示す、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

前記参照が、糖尿病に罹患していない又はその素因を有していないことが知られている対象又は対象の群に由来する、請求項1に記載の方法。

【請求項5】

試験試料において参照と比較して増加したグリオキシレートの量が、糖尿病若しくはその素因の存在を示し、又は試験試料において参照と比較して同一の若しくは減少したグリオキシレートの量が、糖尿病若しくはその素因の不在を示す、請求項4に記載の方法。

【請求項6】

糖尿病の前記素因が、上昇した長期の血中グルコース、耐糖能障害(IGT)、空腹時グルコース障害(IFG)又はIFGと組み合わせられたIGTを伴う、請求項1~5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

工程b)で確立された診断に基づいて、糖尿病又はその素因を治療又は予防する療法を推奨する工程を更に含む、請求項1~6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項8】

前記試料が、前記対象の体液の試料である、請求項1~7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項9】

前記対象がヒトである、請求項1~8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項10】

糖尿病又はその素因の少なくとも一つの更なるバイオマーカーが決定され、前記少なくとも一つの更なるバイオマーカーが、クリプトキサンチン、2-ヒドロキシ-パルミチン酸、トリアシルグリセリド(C16:0、C18:1、C18:2)、ゴンド酸、トリコサン酸、5-オキソプロリン、グルコース、ヘモグロビンHbA1C、1,5-アンヒドロソルビトール、2-ヒドロキシブチレート及びマンノースからなる群より選択される、請求項1~9のいずれか一項に記載の方法。

【請求項11】

併存疾患を伴う糖尿病又はその素因を決定する方法であって、

(a) 併存疾患を伴う糖尿病に罹患している又はその素因を有することが疑われる対象の試験試料におけるグリオキシレートの量を決定する工程であって、前記試料が、試験開始の約2時間後のOGTTの際に対象から得られている工程；及び

(b) 工程(a)において決定された量を参照と比較し、それによって併存疾患を伴う糖尿病又はその素因が決定される工程を含む方法。

【請求項12】

対象の試料において糖尿病又はその素因を決定するための、グリオキシレート又はグリオキシレートの検出剤の使用。

【請求項13】

糖尿病に罹患していることが疑われる対象の試料において糖尿病又はその素因を決定するための装置であって、

(a) 試料に存在するグリオキシレートの量の決定を可能にするグリオキシレートの検出剤を含む分析ユニット；並びにこれに作動的に連結している、

(b) 記憶された参照、及び分析ユニットにより決定されたグリオキシレートの量と記憶された参照との比較を可能にし、それにより糖尿病又はその素因が決定されるデータプロセッサ、を含む評価ユニットを含む装置。

【請求項14】

前記記憶された参照が、糖尿病に罹患している又はその素因を有することが知られている対象又は対象の群に由来する参照であり、前記データプロセッサが、分析ユニットにより決定されたグリオキシレートの量を記憶された参照と比較する指示を実行し、試験試料において参照と比較して同一の若しくは増加したグリオキシレートの量が、糖尿病若しくはその素因の存在を示し、又は試験試料において参照と比較して減少したグリオキシレートの量が、糖尿病若しくはその素因の不在を示す、請求項13に記載の装置。

【請求項15】

前記記憶された参照が、糖尿病に罹患していない又はその素因を有していないことが知られている対象又は対象の群に由来する参照であり、前記データプロセッサが、分析ユニットにより決定されたグリオキシレートの量を記憶された参照と比較する指示を実行し、試験試料において参照と比較して増加したグリオキシレートの量が、糖尿病若しくはその素因の存在を示し、又は試験試料において参照と比較して同一の若しくは減少したグリオキシレートの量が、糖尿病若しくはその素因の不在を示す、請求項13に記載の装置。

【請求項16】

グリオキシレートの検出剤及びグリオキシレート標準を含む、糖尿病又はその素因を決定するためのキットであって、グリオキシレート標準の濃度が糖尿病に罹患している若しくはその素因を有することが知られている対象若しくは対象の群に由来する又は糖尿病に罹患していない若しくはその素因を有していないことが知られている対象若しくは対象の群に由来する、キット。

【請求項17】

前記検出剤が、グリオキシレートに特異的に結合する抗体又はグリオキシレートに特異的に結合するアプタマーである、請求項12に記載の使用、請求項13～15のいずれか一項に記載の装置又は請求項16に記載のキット。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/IB2011/055935
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
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: G01N33/53, G01N33/58, G01N33/62, G01N33/64, G01N33/66		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
WPI, EPODOC, CNPAT, CNKI, CAPLUS, CA: glyoxylate, glyoxalic acid, glyoxylic acid, ethanal acid, oxoacetic acid, diabetes, diagnos+, biomarker		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO2009/014639A2 (METABOLON, INC., et al.) 29 Jan. 2009(29.01.2009) Claim 1 and Table 4, 5, 6, 7, 8, 9A, 9B	1-17
A	CN101438168A (METANOMICS GmbH) 20 May 2009(20.05.2009) Claim 1	1-17
A	CN101443663A (METANOMICS GmbH) 27 May 2009(27.05.2009) Claim 1	1-17
A	CN1502043A (DAIICHI PURE CHEMICALS CO., LTD., et al.) 02 Jun. 2004(02.06.2004) Claims 1-2	1-17
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 "E" 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 12 Apr. 2012 (12. 04. 2012)	Date of mailing of the international search report 03 May 2012 (03.05.2012)	
Name and mailing address of the ISA/CN The State Intellectual Property Office, the P.R.China 6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China 100088 Facsimile No. 86-10-62019451	Authorized officer DAI, Nianzhen Telephone No. (86-10)82246703	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2011/055935

Continuation of: CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:

G01N33/53(2006.01)i

G01N33/58(2006.01)i

G01N33/62(2006.01)i

G01N33/64(2006.01)i

G01N33/66(2006.01)i

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2011/055935

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: Claims 1-12, 17(referring to claim 12)
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 1-12, 17 (referring to claim 12) are directed to the methods for diagnosing diabetes or a predisposition therefor. But the search has been carried out and based on the following subject matter: the use of glyoxylate or a detection agent for glyoxylate in the preparation of medicaments for diagnosing diabetes or a predisposition therefor.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on protest**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
 - The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
 - No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/IB2011/055935

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO2009/014639A2	29.01.2009	WO2009/014639A3	19.03.2009
		US2009155826A1	18.06.2009
		AU2008279778A1	29.01.2009
		EP2164977A2	24.03.2010
		CA2690541A1	29.01.2009
		MXPA10000414A	30.04.2010
		JP2010537157A	02.12.2010
CN101438168A	20.05.2009	WO2007/110358A3	15.11.2007
		EP2008108A2	31.12.2008
		WO2007/110358A2	04.10.2007
		CA2647197A1	04.10.2007
		JP2009530627A	27.08.2009
		US2010236321A1	23.09.2010
		EP2008108B1	29.12.2010
		DE602007011592E	10.02.2011
CN101443663A	27.05.2009	WO2007/110357A3	15.11.2007
		EP2005189A2	24.12.2008
		WO2007/110357A2	04.10.2007
		JP2009530626A	27.08.2009
		US2010163720A1	01.07.2010
		EP2005189B1	29.12.2010
		DE602007011588E	10.02.2011
		EP2330423A1	08.06.2011
		EP2336782A1	22.06.2011
		EP2339346A2	29.06.2011
		EP2369346A2	28.09.2011
		EP2339346A3	19.10.2011
EP2369346A3	02.11.2011		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/IB2011/055935

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN1502043A	02.06.2004	WO02/075315A1	26.09.2002
		JP2002277473A	25.09.2002
		NO20034059A	14.10.2003
		EP1376133A1	02.01.2004
		KR20030086305A	07.11.2003
		US2004110246A1	10.06.2004
		CN1211660C	20.07.2005
		US7198905B2	03.04.2007
		KR100811726B1	11.03.2008
		EP1376133B1	08.10.2008
		DE60229223E	20.11.2008
		JP4602577B2	22.12.2010

フロントページの続き

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, T J, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, R O, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, H U, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI , NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN

- (72) 発明者 ヴィーマー, ヤン セー
ドイツ連邦共和国 1 3 5 0 3 ベルリン, ヘニングスドルファー シュトラーセ 1 3 9 アー
- (72) 発明者 ライン, ディートリッヒ
ドイツ連邦共和国 1 0 7 8 5 ベルリン, フロットヴェルシュトラーセ 3 アー
- (72) 発明者 パドヴェルグ, インケン
ドイツ連邦共和国 1 0 4 3 7 ベルリン, ゾンネンブルガー シュトラーセ 7 2
- (72) 発明者 シュミッツ, オリヴァー
ドイツ連邦共和国 1 4 6 2 4 ダルゴウ - デーベリッツ, ヨハネス - ブラームス - シュトラーセ
1 6
- (72) 発明者 リーベンベルグ, フォルカー
ドイツ連邦共和国 1 0 7 1 9 ベルリン, プファルツブルガーシュトラーセ 1 1
- (72) 発明者 ニキフォロヴァ, ヴィクトリア
ドイツ連邦共和国 1 4 5 4 2 ヴェルダー, ディッケ アイヒエ 9
- Fターム(参考) 4B063 QA19 QQ03 QQ67 QQ79 QR43 QR48 QR72 QS33 QX01

专利名称(译)	用于预测糖尿病的手段和方法		
公开(公告)号	JP2014501926A	公开(公告)日	2014-01-23
申请号	JP2013545621	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)	Metanomikusu保健有限公司		
[标]发明人	ヴィーマーヤンセー ラインディートリッヒ パドヴェルグインケン シュミッツオリヴァー リーベンベルグフォルカー ニキフォロヴァヴィクトリア		
发明人	ヴィーマー, ヤン セー ライン, ディートリッヒ パドヴェルグ, インケン シュミッツ, オリヴァー リーベンベルグ, フォルカー ニキフォロヴァ, ヴィクトリア		
IPC分类号	G01N33/53 C12Q1/54		
CPC分类号	G01N33/53 G01N33/6893 G01N2800/042		
FI分类号	G01N33/53.S C12Q1/54		
F-TERM分类号	4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ67 4B063/QQ79 4B063/QR43 4B063/QR48 4B063/QR72 4B063/QS33 4B063/QX01		
代理人(译)	荒井英一		
优先权	2010196869 2010-12-23 EP 61/426549 2010-12-23 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了一种用于诊断糖尿病或糖尿病倾向的方法，其包括确定怀疑患有糖尿病或具有糖尿病倾向的受试者的测试样品中的乙醛酸的量，并将所述量与参照物进行比较，由此糖尿病或要诊断出糖尿病的易感性。此外，提供了乙醛酸盐或乙醛酸检测剂用于诊断糖尿病或糖尿病易感性的用途。此外，还提供了用于诊断糖尿病或糖尿病易感性的装置和试剂盒。

2HPGによってのみ 同定され、FPGでは 同定されなかった糖 尿病患者	FPGによって のみ又は追加 的に同定され た糖尿病患者	IFG+IGT	IGT	IFG	健康
23	23	55	36	98	50