

(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2015-512048

(P2015-512048A)

(43) 公表日 平成27年4月23日(2015.4.23)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/68	2 G O 4 5
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 B	4 B O 2 4
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 B O 6 4
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	4 C O 8 4
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	4 C O 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 26 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-560405 (P2014-560405)  
 (86) (22) 出願日 平成25年3月8日 (2013.3.8)  
 (85) 翻訳文提出日 平成26年11月4日 (2014.11.4)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2013/054801  
 (87) 国際公開番号 W02013/132090  
 (87) 国際公開日 平成25年9月12日 (2013.9.12)  
 (31) 優先権主張番号 12158680.4  
 (32) 優先日 平成24年3月8日 (2012.3.8)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)  
 (31) 優先権主張番号 61/608,350  
 (32) 優先日 平成24年3月8日 (2012.3.8)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 12165062.6  
 (32) 優先日 平成24年4月20日 (2012.4.20)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 514122524  
 シュピーニングテック ゲゼルシャフト ミ  
 ット ベシュレンクテル ハフツング  
 ドイツ連邦共和国, 16761 ヘニッヒ  
 スドルフ, ノイエンドルフシュトラーセ  
 15アー  
 (74) 代理人 100099759  
 弁理士 青木 篤  
 (74) 代理人 100077517  
 弁理士 石田 敬  
 (74) 代理人 100087871  
 弁理士 福本 積  
 (74) 代理人 100087413  
 弁理士 古賀 哲次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 対象が糖尿病及び/又はメタボリックシンドロームに罹患するリスクを予測する方法、あるいは対象のメタボリックシンドロームを診断する方法

(57) 【要約】

本発明の内容は、糖尿病に罹患していない対象が糖尿病及び/又はメタボリックシンドロームに罹患するリスクを予測する方法、あるいは糖尿病に罹患していない対象のメタボリックシンドロームを診断する方法であって、以下のステップ：前記対象から得た体液中のプロニューロテンシン又は少なくとも5つのアミノ酸から成るその断片のレベルを測定し、そして、前記対象が糖尿病及び/又はメタボリックシンドロームに罹患するリスクと、前記プロニューロテンシン又はその断片のレベルとを、高いレベルが、糖尿病及び/又はメタボリックシンドロームに罹患する高いリスクの予測となるか、又は高いレベルが、糖尿病に罹患していない対象のメタボリックシンドロームの診断に相関するように関連付けること、を含む前記方法である。

【選択図】なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

糖尿病に罹患していない対象が糖尿病及び／又はメタボリックシンドロームに罹患するリスクを予測する方法、あるいは、糖尿病に罹患していない対象のメタボリックシンドロームを診断する方法であって、以下のステップ：

・前記対象から得た体液中のプロニューロテンシン 1 - 1 1 7 若しくは少なくとも 5 つのアミノ酸から成るその断片、又はプロニューロテンシン 1 - 1 1 7 含有ペプチドのレベルを測定し、そして

・糖尿病に罹患していない対象が糖尿病及び／又はメタボリックシンドロームに罹患するリスクと、前記プロニューロテンシン 1 - 1 1 7 若しくはその断片、又はプロニューロテンシン 1 - 1 1 7 含有ペプチドのレベルとを、高いレベルが、糖尿病及び／又はメタボリックシンドロームに罹患する高いリスクの予測となるか、又は高いレベルが、糖尿病に罹患していない対象のメタボリックシンドロームの診断に相関するように関連付けること、を含む前記方法。

10

**【請求項 2】**

前記対象が、前糖尿病に罹患していない（非 I F G）対象である、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 3】**

プロニューロテンシン 1 - 1 1 7 若しくはその断片、又はプロニューロテンシン 1 - 1 1 7 含有ペプチドの空腹時レベルを測定する、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

20

**【請求項 4】**

プロニューロテンシン 1 - 1 1 7 のレベルを測定する、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 5】**

前記対象が、6.1 mmol / l 未満だが、5.4 mmol / l より高い空腹時血糖を有する糖尿病に罹患していない対象である、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 6】**

前記対象が、5.4 mmol / l と同等又はそれ未満の空腹時血糖を有する糖尿病に罹患していない対象である、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

**【請求項 7】**

前記対象が、I I 型糖尿病を発症するリスクを判定する、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 8】**

年齢、性別、収縮期血圧、拡張期血圧、抗高血圧療法（A H T）、ボディーマスインデックス、胴囲、ウエスト - ヒップ比、現在の喫煙者、糖尿病遺伝、及び心血管疾患（C V D）の既往歴を含む群から選択される少なくとも 1 つの臨床パラメーターがさらに測定される、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 9】**

前記サンプルが、血液サンプル、血清サンプル、血漿サンプル、脳脊髄液サンプル、唾液サンプル及び尿サンプル又は前述のサンプルのいずれかの抽出物を含む群から選択される、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

**【請求項 10】**

プロニューロテンシン若しくは少なくとも 5 アミノ酸の長さを有するその断片のレベルが、診断アッセイ、好ましくは免疫学的アッセイによって測定される、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 11】**

前記方法が、糖尿病に罹患していない対象において、糖尿病及び／又はメタボリックシンドロームに罹患するリスクを観察するために、又はメタボリックシンドロームの一連の治療を観察するために複数回実施される、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

50

## 【請求項 1 2】

前記観察が、与えられた予防的及び/又は治療的対策に対する前記対象の応答を評価するために実施される、請求項 1 1 に記載の方法。

## 【請求項 1 3】

前記対象をリスク群に階層化するための、請求項 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 1 4】

請求項 1 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載の方法を実施するためのポイントオブケアデバイス。

## 【請求項 1 5】

対象の糖尿病及び/又はメタボリックシンドロームの予防又は治療における使用のための、ニューロテンシン又はニューロテンシン受容体に対する結合剤。

## 【請求項 1 6】

ニューロテンシンの生理活性を 70% 以下に低減する、請求項 1 5 に記載の結合剤。

## 【請求項 1 7】

抗体、例えば I g G、典型的な完全長免疫グロブリン、又は、例えば F a b ミニボディ、一本鎖 F a b 抗体、エピトープタグを有する一価の F a b 抗体、例えば F a b - V 5 S x 2 を含めた F a b 断片を、これだけに限定されることなく含む、例えば化学的に結合された抗体のような重鎖及び/又は軽鎖の F 可変ドメインを少なくとも含む抗体断片（断片抗原結合）； C H 3 ドメインで二量化された二価の F a b（ミニ抗体）；例えば d H L X ドメインの二量化を介して異種のドメインを用いた多量体化により形成された二価の F a b 又は多価の F a b、例えば F a b - d H L X - F S x 2；F（a b'）<sub>2</sub>断片、s c F v 断片、多量体化した多価及び/又は多特異性 s c F v 断片、二価及び/又は二重特異性ダイアボディ、B I T E（登録商標）（二重特異性 T 細胞エンゲイジャー）、三官能性抗体、例えば G と別のクラスからの多価抗体；単一ドメイン抗体、例えばラクダ科の動物又は魚類の免疫グロブリンから得られたナノボディから成る群から選択される、請求項 1 5 に記載のニューロテンシンに対する結合剤。

## 【請求項 1 8】

抗体、例えば I g G、典型的な完全長免疫グロブリン、又は、例えば F a b ミニボディ、一本鎖 F a b 抗体、エピトープタグを有する一価の F a b 抗体、例えば F a b - V 5 S x 2 を含めた F a b 断片を、これだけに限定されることなく含む、例えば化学的に結合された抗体のような重鎖及び/又は軽鎖の F 可変ドメインを少なくとも含む抗体断片（断片抗原結合）； C H 3 ドメインで二量化された二価の F a b（ミニ抗体）；例えば d H L X ドメインの二量化を介して異種のドメインを用いた多量体化により形成された二価の F a b 又は多価の F a b、例えば F a b - d H L X - F S x 2；F（a b'）<sub>2</sub>断片、s c F v 断片、多量体化した多価及び/又は多特異性 s c F v 断片、二価及び/又は二重特異性ダイアボディ、B I T E（登録商標）（二重特異性 T 細胞エンゲイジャー）、三官能性抗体、例えば G と別のクラスからの多価抗体；単一ドメイン抗体、例えばラクダ科の動物又は魚類の免疫グロブリンから得られたナノボディ、あるいは、ペプチド拮抗薬、例えば [ D - T r p <sup>1 1</sup> ] - ニューロテンシン、[ T y r（M e）<sup>1 1</sup> ] - ニューロテンシン、又は非ペプチド拮抗薬、例えば L e v o c a b a s t i n e、S R - 4 8 6 9 2（N T S 1 選択性）、S R - 1 4 2 9 4 8（非選択性）、S R - 1 4 2 9 4 8 A、C P 9 6 3 4 5、[ 3 H ] S R - 4 8 6 9 2、S R - 4 8 5 2 7 及び S R - 4 9 7 1 1、あるいは、結合剤足場、例えばテトラネクチンベースの非 I g 足場、フィブロネクチン足場；リポカリンベースの足場；ユビキチン足場、移動足場、プロテイン A 足場、アンキリン反復ベースの足場、マイクロタンパク質、好ましくはシスチンノット）足場を形成するマイクロタンパク質、F y n S H 3 ドメインベースの足場、E G F R - A ドメインベースの足場及び K u n i t z ドメインベースの足場から成る群から選択される、請求項 1 5 に記載のニューロテンシン受容体に対する結合剤。

## 【発明の詳細な説明】

10

20

30

40

50

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明の内容は、糖尿病に罹患していない対象が糖尿病及び/又はメタボリックシンドロームに罹患するリスクを予測する方法、あるいは糖尿病に罹患していない対象のメタボリックシンドロームを診断する方法であって、以下のステップ：

・前記対象から得た体液中のプロニューロテンシン又は少なくとも5つのアミノ酸から成るその断片のレベルを測定し、そして

・前記対象が糖尿病及び/又はメタボリックシンドロームに罹患するリスクと、前記プロニューロテンシン又はその断片のレベルとを、高いレベルが、糖尿病及び/又はメタボリックシンドロームに罹患する高いリスクの予測となるか、又は高いレベルが、糖尿病に罹患していない対象のメタボリックシンドロームの診断に相関するように関連付けること

10

を含む前記方法である。

## 【0002】

「高いレベル」という用語は、特定の閾値レベルを上回るレベルを意味する。

ニューロテンシンは、プレプロニューロテンシン前駆体由来の13アミノ酸神経ペプチドであって、安定した117アミノ酸ペプチドであるプロニューロテンシン(P-NT)と一緒に化学量論的に放出され、そして、その成熟ホルモンは、3種類の異なった受容体、Gタンパク質共役受容体であるニューロテンシン受容体1と2(Ntsr1とNtsr2)及び非Gタンパク質共役受容体であり、且つ、Sortillin-1(SORT1)としても知られているニューロテンシン受容体3(Ntsr3)に結合する。

20

## 【0003】

ニューロテンシンは、小腸から末梢部に放出され、並びに視床下部から中枢部に放出される。ニューロテンシンの末梢分泌は、食物摂取、特に脂肪によって刺激され、消化管運動、並びに膵液分泌及び胆汁分泌を調整することが知られている。興味深いことに、ニューロテンシンは、ラットにおける中枢(脳室内)及び末梢(腹腔内)注射の後に、急性的に食物摂取を低減させたので、食欲抑制ホルモンとして食欲制御に関係し、そして、その効果は、ニューロテンシン1受容体(Ntsr1)を通して主に媒介されるようである。

## 【0004】

正常体重ヒト対象と比較した肥満では、食後血漿ニューロテンシン濃度は、液状脂肪食の後に低下し(Widen et al 1992, Reg peptides; Plasma concentrations of regulatory peptides in obesity following modified sham feeding (MSF) and a liquid test meal)、ニューロテンシン分泌の調整が、肥満では乱されていることを示唆した。しかしながら、ニューロテンシンが肥満の程度に相関しているのか、そして、どのように相関しているのか、大規模な研究が全く調査されていない。興味深いことに、P-NTは、肥満のII型糖尿病患者の大部分で正常血糖につながる手がかりが示されている手術である胃バイパス(Roux-Y)後に有意に増加するが、ニューロテンシンが通常、糖尿病の発症に関わるかどうか知られていない。さらに、Ntsr3(SORT1)遺伝子の変異型は、ヒトで知られている最も一般的な冠動脈障害感受性遺伝子の1つなので、ニューロテンシン系は、冠動脈障害や心筋梗塞の発症に関与した。

30

40

## 【0005】

肥満と癌との機構的なつながりは大部分が未知であるが、しかしながら、支配的な理論の1つは、過剰な脂肪沈着が末梢組織におけるアンドロゲンの高い芳香族化をもたらし、そしてそれが、高い循環エストロゲンレベルをもたらすというものである。加えて、肥満の顕著な特徴の1つである高インスリン血症が、性ホルモン結合グロブリン(SHBG)の肝臓での産生を阻害し、これによりエストロゲンとアンドロゲンの両方の生物学的に利用可能レベルを増強することが示され、肥満が、それを通じて乳癌や前立腺癌などの癌の性ホルモン駆動形態の一般的な形態のリスクを高め得る形を示唆した。興味深いことに、

50

ニューロテンシンと N t s r 1 発現の両方が悪性乳管癌腫においてよく見られ、そして、N T S R 1 の実験的な薬理的遮断又は R N A サイレンシングが、マウスにおける腫瘍増殖を低減する。

【 0 0 0 6 】

乳癌細胞におけるニューロテンシン受容体 1 ( N T S R 1 ) の発現レベルは、乳癌に罹患している対象の予後を判断するために使用された ( U S 2 0 1 1 / 0 3 0 5 6 3 3 ) 。さらに、同じ著者らによって、おそらく肝臓による急速なクリアランスにより、循環ニューロテンシンと、膵臓、前立腺、又は髄様甲状腺腫瘍の病期との明らかな相関が、現在、説明されていないことが記載されている。興味深いことに、浸潤性乳管癌を患っている一連の 5 1 人の患者において、すべての腫瘍のうちの 9 1 % がニューロテンシン受容体 1 ( N T S R 1 ) に関して陽性であったが、すべての腫瘍のうちの 3 1 % だけが前記組織中でニューロテンシンに関して陽性であることがわかった ( S o u a z e e t . a l . C a n c e r R e s e a r c h 2 0 0 6 ; 6 6 : ( 1 2 ) p a g e s 6 2 4 3 - 6 2 4 9 ) 。

10

【 0 0 0 7 】

癌の増殖、特に肺癌、膵臓癌、及び結腸癌にニューロテンシンとニューロテンシン受容体が関与するいくつかの徴候が存在する ( C a r r a w a y e t a l . ; P e p t i d e s 2 7 ( 2 0 0 6 ) 2 4 4 5 - 2 4 6 0 ) 。膵臓癌を患っている患者の血清の N T レベルが有意に上昇することが報告された ( P i c h e o n e t a l , A n t i c a n c e r R e s e a r c h 1 9 9 9 ; 1 9 ; 1 4 4 5 - 5 0 ) 。興味深いことに、このグループは、膵臓癌において両方の前立腺に対する疾患の進行により N T レベルが低下することを見出した。それとは対照的に、M e g g i a t o r a ; T u m o r i 1 9 9 6 ; 8 2 ; 5 9 2 - 5 ; は、血漿 N T レベルが、膵臓癌では正常であったが、膵炎と診断された場合には、高かったことを見出した。

20

糖尿病の予測のためのコペプチンの使用は、E n h o r n i n g e t a l , C i r c u l a t i o n . 2 0 1 0 ; 1 2 1 : 2 1 0 2 - 2 1 0 8 によって報告された。

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 8 】

本発明の対象は、糖尿病に罹患していない対象が糖尿病及び / 又はメタボリックシンドロームに罹患するリスクを予測するための、あるいは、糖尿病に罹患していない対象のメタボリックシンドロームを診断するための N T の予測及び診断能力を調査することであった。

30

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 9 】

この問題に対処するために、我々は、前記スウェーデンの前向きコホート研究 ( M a l m o D i e t a n d C a n c e r S t u d y ) における空腹時血漿中のプロニューロテンシンの安定な断片を評価して、15年間の経過観察中の糖尿病発症に対して、このバイオマーカーの基準濃度を関連付けた。

40

【 0 0 1 0 】

本発明の内容は、糖尿病に罹患していない対象が糖尿病及び / 又はメタボリックシンドロームに罹患するリスクを予測する方法、あるいは、糖尿病に罹患していない対象のメタボリックシンドロームを診断する方法であって、以下のステップ：

- ・前記対象から得た体液中のプロニューロテンシン又は少なくとも 5 つのアミノ酸から成るその断片のレベルを測定し、そして

- ・前記対象が糖尿病及び / 又はメタボリックシンドロームに罹患するリスクと、前記プロニューロテンシン又はその断片のレベルとを、高いレベルが、糖尿病及び / 又はメタボリックシンドロームに罹患する高いリスクの予測となるか、又は高いレベルが、糖尿病に罹患していない対象のメタボリックシンドロームの診断に相関するように関連付けること

50

、  
を含む前記方法である。

【0011】

本発明の内容は、糖尿病に罹患していない対象が糖尿病及び/又はメタボリックシンドロームに罹患するを予測する方法、あるいは、糖尿病に罹患していない対象のメタボリックシンドロームを診断する方法であって、以下のステップ：

・前記対象から得た体液中のプロニューロテンシン1-117若しくは少なくとも5つのアミノ酸から成るその断片、又はプロニューロテンシン1-117含有ペプチドのレベルを測定し、そして

・糖尿病に罹患していない対象が糖尿病及び/又はメタボリックシンドロームに罹患するリスクと、前記プロニューロテンシン1-117若しくはその断片、又はプロニューロテンシン1-117含有ペプチドのレベルとを、高いレベルが、糖尿病及び/又はメタボリックシンドロームに罹患する高いリスクの予測となるか、又は高いレベルが、糖尿病に罹患していない対象のメタボリックシンドロームの診断に相関するように関連付けること

10

、  
を含む前記方法である。

【0012】

「対象」という用語は、本明細書中で使用される場合、生きているヒト又はヒト以外の生物を指す。好ましくは、本明細書中では、対象はヒト対象である。本発明の具体的な実施形態において、前記対象は、女性の対象である。本発明の具体的な実施形態において、前記対象は、非IFG（非前糖尿病）対象である。

20

本発明の一実施形態において、体液中のプロニューロテンシン若しくは少なくとも5つのアミノ酸から成るその断片、又はプロニューロテンシン1-117含有ペプチドのレベルは、プロニューロテンシン若しくは少なくとも5つのアミノ酸から成るその断片、又はプロニューロテンシン1-117含有ペプチドの空腹時レベルである。空腹時レベルとは、血液採取の12時間前から食物摂取がないことを意味する。

【0013】

糖尿病及び/又はメタボリックシンドロームに罹患するリスクが予測される前記女性対象から得た体液中のプロニューロテンシン1-117若しくは少なくとも5つのアミノ酸から成るその断片、又はプロニューロテンシン1-117含有ペプチドのレベルは、小腸から放出される。小腸からのニューロテンシンの放出は、食物摂取、特に脂肪によって刺激され、消化管運動及び膵液や胆汁分泌を調整することが知られている。プロニューロテンシン1-117及びその断片又はプロニューロテンシン1-117含有ペプチドは、ニューロテンシン及びプロニューロテンシン1-117とその断片又はプロニューロテンシン1-117含有ペプチドは、プロニューロテンシンから等モル量で放出されるので、放出されたニューロテンシンの代用マーカーとして使用される。

30

【0014】

ニューロテンシン/プロニューロテンシン1-117若しくは少なくとも5つのアミノ酸から成るその断片、又はプロニューロテンシン1-117含有ペプチドの末梢組織における分泌が、糖尿病及び/又はメタボリックシンドロームに罹患することに対する女性対象の感受性について暗示していることは、本発明の驚くべき知見である。これにより、脂肪摂取の削減としての食事療法は、前記対象の前記リスクを軽減し得る。

40

前記対象から得た体液中のプロニューロテンシン若しくは少なくとも5つのアミノ酸から成るその断片、又はPNT1-117含有ペプチドのレベルと、糖尿病及び/又はメタボリックシンドロームに罹患するリスクとの相関は連続的である、すなわち、レベルが高ければ高いほど、リスクもより高い。

【0015】

実用性のために、当業者は（単数若しくは複数の）閾値を使用してもよい。

これにより、「高いレベル」という用語は、閾値レベルを上回るレベルを意味し得る。

体液は、血液、血清、血漿、尿、csf、及び唾液を含む群から選択され得る。

50

本データは、プロニューロテンシン又はその断片、特にプロニューロテンシン1-117若しくはその断片、又はプロニューロテンシン1-117含有ペプチドのレベルと、特に糖尿病の既往歴のない対象における糖尿病との間に強い相関関係を示唆している。

本データはまた、プロニューロテンシン又はその断片、特にプロニューロテンシン1-117若しくはその断片、又はプロニューロテンシン1-117含有ペプチドのレベルと、心血管疾患及び/又は糖尿病の一般的なハイリスク群である高血圧患者における糖尿病との間にも強い相関関係を示唆している。

【0016】

体液中で測定され得るプロニューロテンシンの断片は、例えば以下のものであり得る。  
配列番号1 (プロニューロテンシン1-147)

10

【化1】

SDSEEEMKAL EADFLTNMHT SKISKAHVPS WKMTLLNVCS LVNNLNPAE  
ETGEVHEEEL VARRKLPTAL DGFSLEAMLT IYQLHKICHS RAFQHWELIQ  
EDILDTGNDK NGKEEVIK RK IPYILKRQLY ENKPRRPYIL KRDSYYY

【0017】

配列番号2 (プロニューロテンシン1-125 (長いニューロメジンN))

20

【化2】

SDSEEEMKAL EADFLTNMHT SKISKAHVPS WKMTLLNVCS LVNNLNPAE  
ETGEVHEEEL VARRKLPTAL DGFSLEAMLT IYQLHKICHS RAFQHWELIQ  
EDILDTGNDK NGKEEVI KR KIPYIL

30

【0018】

配列番号3 (ニューロメジンN : )

【化3】

KIPYIL

【0019】

配列番号4 (ニューロテンシン)

【化4】

40

pyroQLYENKPRRP YIL

【0020】

配列番号5 (プロニューロテンシン1-117)

【化5】

SDSEEEMKAL EADFLTNMHT SKISKAHVPS WKMTLLNVCS LVNNLNPAE  
 ETGEVHEEEL VARRKLPTAL DGFSLEAMLT IYQLHKICHS RAFQHWELIQ  
 EDILDTGNDK NGKEEVI

【0021】

配列番号6 (プロニューロテンシン1-132)

10

【化6】

SDSEEEMKAL EADFLTNMHT SKISKAHVPS WKMTLLNVCS LVNNLNPAE  
 ETGEVHEEEL VARRKLPTAL DGFSLEAMLT IYQLHKICHS RAFQHWELIQ  
 EDILDTGNDK NGKEEVIK RK IPYILKRQLY EN

【0022】

配列番号7 : (プロニューロテンシン1-125)

20

【化7】

SDSEEEMKAL EADFLTNMHT SKISKAHVPS WKMTLLNVCS LVNNLNPAE  
 ETGEVHEEEL VARRKLPTAL DGFSLEAMLT IYQLHKICHS RAFQHWELIQ  
 EDILDTGNDK NGKEEVIK RK IPYIL

【0023】

配列番号8 (プロニューロテンシン120-140)

30

【化8】

KIPYILKRQL YENKPRRPYIL

【0024】

配列番号9 (プロニューロテンシン120-147)

【化9】

40

KIPYILKRQL YENKPRRPYIL KRDSYYY

【0025】

配列番号10 (プロニューロテンシン128-147)

【化10】

QLYENKPRRP YILKRDSYYY

【0026】

50

本発明による方法のより具体的な実施形態において、プロニューロテンシン 1 - 1 1 7 のレベルが測定される。

具体的な実施形態において、プロニューロテンシン、特にプロニューロテンシン 1 - 1 1 7 若しくはその断片、又はプロニューロテンシン 1 - 1 1 7 含有ペプチドのレベルは、免疫学的アッセイで計測される。

より詳しく述べると、免疫学的アッセイは、Ernst et al. Peptides 27 (2006) 1787 - 1793に記載されているように使用される。

#### 【0027】

プロニューロテンシン若しくは少なくとも5つのアミノ酸から成るその断片、又はプロニューロテンシン 1 - 1 1 7 含有ペプチドのレベルを測定するのに有用である免疫学的アッセイは、実施例2の概要のステップを含み得る。すべての閾値及び値は、実施例2に従って使用される試験及び校正の観点から理解されるべきである。当業者は、閾値の絶対値が使用される校正によって影響を受けるであろうことを知っている可能性もある。このことは、本明細書中に与えられるすべての値及び閾値が、本明細書中で使用される校正に照らして理解されるべきであることを意味している（実施例2）。ヒトP - NT校正物質は、ICI - Diagnostics, Berlin, Germanyで入手可能である。あるいは、アッセイは、合成又は遺伝子組み換えP - NT 1 - 1 1 7 若しくはその断片によって校正されてもよい（Ernst et al., 2006もまた参照のこと）。

10

#### 【0028】

本発明の方法に従って、糖尿病に罹患していない対象が糖尿病及び/又はメタボリックシンドロームに罹患するリスクを決定するため、あるいは糖尿病に罹患していない対象のメタボリックシンドロームを診断するための閾値は、78 pmol / l 超のPNTであり、好ましい閾値は100 pmol / l 超、さらに好ましい閾値は150 pmol / l 超である。具体的な実施形態において、前記閾値は約100 pmol / l である。これらの閾値は、先に触れた較正法に関係している。前記閾値を上回るプロNT値は、対象が糖尿病及び/又はメタボリックシンドロームに罹患する高いリスクを有していることを意味する。

20

#### 【0029】

糖尿病の定義は、以下のとおりである：

医師による診断の履歴、抗糖尿病薬薬物療法をおこなっていること、又は基準検査において空腹時全血グルコース  $> / = 6.1 \text{ mmol / l}$  であること（これが血漿中では  $= 7.0 \text{ mmol / l}$  であることに留意する）。

前糖尿病、空腹時血糖異常（IFG）： $IFG = 6.1 \sim 6.9 \text{ mmol / l}$  の空腹時血漿グルコース。

30

#### 【0030】

正常血圧/高血圧（HBP）の定義は、以下のとおりである：

HBP：収縮期BP  $> / = 140 \text{ mmHg}$  若しくは拡張期BP  $> / = 90 \text{ mmHg}$ 、又は降圧薬薬物療法をおこなっていること。

正常血圧（BP）の対象は、その他のすべての対象である、すなわち、収縮期BP  $< 140 \text{ mmHg}$  若しくは拡張期BP  $< 90 \text{ mmHg}$  を有するか、又は降圧薬薬物療法をおこなっていない対象である。

40

#### 【0031】

本発明による方法の具体的な実施形態において、前記対象は、 $6.1 \text{ mmol / l}$  未満だが、 $5.4 \text{ mmol / l}$  より高い空腹時血糖を有する糖尿病に罹患していない対象である。

本発明による方法の具体的な実施形態において、前記対象は、 $5.4 \text{ mmol / l}$  と同等又はそれ未満の空腹時血糖を有する糖尿病に罹患していない対象である。

本発明による方法の具体的な実施形態において、前記の対象がI I型糖尿病を発症するリスクが、判定される。

50

## 【0032】

本発明による方法の具体的な実施形態において、対象が糖尿病及び/又はメタボリックシンドロームに罹患するリスクの予測、あるいは、メタボリックシンドロームの診断は、さらに、空腹時血糖又は血漿グルコース、トリグリセリド、HDLコレステロール又はその副画分、LDLコレステロール又はその副画分、シスタチンC、インスリン、CRP、バソプレッシン又はその前駆体若しくは断片、及びBNP又はその前駆体若しくはその断片を含む群から選択される少なくとも1つの検査パラメーター又は更なるマーカーのレベルをさらに測定し、使用することによって改善される。

## 【0033】

本発明による方法の具体的な実施形態において、さらに、年齢、性別、収縮期血圧、拡張期血圧、抗高血圧療法(AHT)、ボディーマスインデックス、胴囲、ウエスト・ヒップ比、現在の喫煙者、糖尿病遺伝、及び心血管疾患(CVD)の既往歴を含む群から選択される少なくとも1つの臨床パラメーターが、測定される。

10

## 【0034】

本発明の更なる実施形態は、先の請求項に従い、糖尿病に罹患していない対象が糖尿病及び/又はメタボリックシンドロームに罹患するリスクを予測する方法、あるいは、糖尿病に罹患していない対象のメタボリックシンドロームを診断する方法であって、前記のプロニューロテンシン又はその断片のレベルは単独で、又は他の予測に有用な検査パラメーター又は臨床のパラメーターと組み合わせて、以下の選択肢から選択され得る方法によって、対象が糖尿病及び/又はメタボリックシンドロームに罹患するリスクの予測のため、又はメタボリックシンドロームの診断のために使用される：

20

## 【0035】

- 見掛けが健康そうな対象集団における所定のサンプル式のプロニューロテンシン若しくはその断片、又はニューロテンシン1-117含有ペプチドのレベルの中央値との比較、

- 見掛けが健康そうな対象集団における所定のサンプル式のプロニューロテンシン若しくはその断片、又はニューロテンシン1-117含有ペプチドのレベルの変位値との比較、

- コックス比例ハザード解析に基づく計算、又はNRI(純再分類指数)若しくはIDI(統合判別指数)などのRisk指数計算を使用することによる計算。

30

## 【0036】

本発明の一実施形態において、サンプルは、血液サンプル、血清サンプル、血漿サンプル、脳脊髄液サンプル、唾液サンプル及び尿サンプル又は前述のサンプルのいずれかの抽出物を含む群から選択される。本発明による方法の具体的な実施形態において、プロニューロテンシン若しくはその断片、又は少なくとも5アミノ酸の長さを有するプロニューロテンシン1-117含有ペプチドのレベルは、診断アッセイ、好ましくは免疫学的アッセイによって測定される。

## 【0037】

本発明による方法の具体的な実施形態において、前記方法は、糖尿病に罹患していない対象において、糖尿病及び/又はメタボリックシンドロームに罹患するリスクを観察するために、又はメタボリックシンドロームの一連の治療を観察するために複数回実施される。

40

本発明による方法の具体的な実施形態において、前記観察は、与えられた予防的及び/又は治療的対策に対する前記対象の応答を評価するために実施される。

本発明による方法の具体的な実施形態において、前記方法は、前記対象をリスク群に階層化するために使用される。

本発明による方法を実施するためのポイントオブケアデバイスもまた、本発明によって包含される。

## 【0038】

本発明による方法を実施するためのアッセイ及び/又はキットもまた、本発明によって

50

包含される。

本発明の内容はまた、対象の糖尿病及び／又はメタボリックシンドロームの予防又は治療における使用のための、ニューロテンシン又はニューロテンシン受容体に対する結合剤である。

本発明の一実施形態において、結合剤は、ニューロテンシンの生理活性を70%以下に低減する。

【0039】

本発明によると、ニューロテンシンに対する結合剤は、抗体、例えばIgG、典型的な完全長免疫グロブリン、又は、例えばFabミニボディ、一本鎖Fab抗体、エピトープタグを有する一価のFab抗体、例えばFab-V5Sx2を含めたFab断片を、これだけに限定されることなく含む、例えば化学的に結合された抗体のような重鎖及び／又は軽鎖のF可変ドメインを少なくとも含む抗体断片（断片抗原結合）；CH3ドメインで二量化された二価のFab（ミニ抗体）；例えばdHLXドメインの二量化を介して異種のドメインを用いた多量体化により形成された二価のFab又は多価のFab、例えばFab-dHLX-FSx2；F(ab')<sub>2</sub>断片、scFv断片、多量体化した多価及び／又は多特異性scFv断片、二価及び／又は二重特異性ダイアボディ（diabodies）、BITE（登録商標）（二重特異性T細胞エンゲイジャー（bispecific T-cell engager））、三官能性抗体、例えばGと別のクラスからの多価抗体；単ドメイン抗体、例えばラクダ科の動物又は魚類の免疫グロブリンから得られたナノボディから成る群から選択される。

10

20

【0040】

本発明によると、ニューロテンシン受容体に対する結合剤は、抗体、例えばIgG、典型的な完全長免疫グロブリン、又は、例えばFabミニボディ、一本鎖Fab抗体、エピトープタグを有する一価のFab抗体、例えばFab-V5Sx2を含めたFab断片を、これだけに限定されることなく含む、例えば化学的に結合された抗体のような重鎖及び／又は軽鎖のF可変ドメインを少なくとも含む抗体断片（断片抗原結合）；CH3ドメインで二量化された二価のFab（ミニ抗体）；例えばdHLXドメインの二量化を介して異種のドメインを用いた多量体化により形成された二価のFab又は多価のFab、例えばFab-dHLX-FSx2；F(ab')<sub>2</sub>断片、scFv断片、多量体化した多価及び／又は多特異性scFv断片、二価及び／又は二重特異性ダイアボディ（diabodies）、BITE（登録商標）（二重特異性T細胞エンゲイジャー）、三官能性抗体、例えばGと別のクラスからの多価抗体；単ドメイン抗体、例えばラクダ科の動物又は魚類の免疫グロブリンから得られたナノボディ、あるいは、ペプチド拮抗薬、例えば[D-Trp<sup>11</sup>]-ニューロテンシン、[Tyr(Me)<sup>11</sup>]-ニューロテンシン（例えば、Quironらによって記載された）、又は非ペプチド拮抗薬、例えばLevocabastine、SR-48692（NTS1選択性）、SR-142948（非選択性）、SR-142948A、CP96345、[3H]SR-48692、SR48692、SR-48527及びSR-49711、あるいは、結合剤足場、例えばテトラネクチンベースの非Ig足場（例えば、US2010/0028995に記載）、フィブロネクチン足場（EP1266025に記載）；リポカリンベースの足場（例えば、WO2011/154420に記載）；ユビキチン足場（例えば、WO2011/073214に記載）、移動足場（例えば、US2004/0023334に記載）、プロテインA足場（例えば、EP2231860に記載）、アンキリン反復ベースの足場（例えば、WO2010/060748に記載）、マイクロタンパク質、好ましくはシスチンノット（knot）足場を形成するマイクロタンパク質（例えば、EP2314308に記載）、Fyn SH3ドメインベースの足場（例えば、WO2011/023685に記載）、EGFR-Aドメインベースの足場（例えば、WO2005/040229に記載）及びKunitzドメインベースの足場（例えば、EP1941867に記載）から成る群から選択される。

30

40

【図面の簡単な説明】

50

## 【0041】

【図1】典型的なP-NT用量/シグナルカーブを示す。

【図2a】糖尿病予測のカプランマイヤー解析 中央値を使用した糖尿病を患っていないすべての対象のカットオフ(104.6 pmol/l)

【図2b】糖尿病予測のカプランマイヤー解析 糖尿病及び前糖尿病(IFG)を患っていないすべての対象、カットオフ(104.6 pmol/l)

## 【実施例】

## 【0042】

## 実施例1

## 抗体の開発

10

免疫化のためのペプチド/複合体:

免疫化のためのペプチドを、ウシ血清アルブミン(BSA)へのペプチドの結合のために、追加のN末端システイン残基を用いて合成した(JPT Technologies, Berlin, Germany)。そのペプチドを、Sulfo-SMCC(Perbio-science, Bonn, Germany)を使用することによってBSAに共有結合で連結した。カップリング手順を、Perbioのマニュアルに従って実施した。

## 【0043】

標識抗体(LA)ペプチド(P-NT1-19):

## 【化11】

20

## H-CSDSEEEMKALEADFLTNMH-NH2

## 【0044】

固相抗体(SPA)ペプチド(P-NT44-62):

## 【化12】

## H-CNLNSPAEETGEVHEEELVA-NH2

30

## 【0045】

前記抗体を、以下の方法に従って作製した:

BALB/cマウスを、0及び14日目に100µgのペプチド-BSA複合体(100µlの完全フロイントアジュバント中に乳化)、そして21及び28日目に50µg(100µlの不完全フロイントアジュバント中)で免疫した。

細胞融合実験を実施する3日前に、動物に、1回の腹腔内注射及び1回の静脈内注射として与えられる、100µlの生理食塩水中に溶解した50µgの複合体を与えた。

## 【0046】

免疫したマウスからの脾細胞と、骨髓腫細胞株SP2/0の細胞とを、37℃にて30分間、1mlの50%ポリエチレングリコールを用いて融合した。洗浄後に、その細胞を、96ウェル細胞培養プレートに播種した。ハイブリッドクローンを、HAT培地中での成長によって選択した[20%のウシ胎仔血清及びHATサプリメントを補ったRPMI 1640培地]。2週間後に、HAT培地を、3回の継代の間、HT培地に置き換え、それに続いて正常細胞培養培地に置き換えた。

40

## 【0047】

融合の3週間後に、細胞培養上清を、抗原に特異的なIgG抗体について一次スクリーニングした。陽性の試験微量培養を、繁殖のために24ウェルプレートに移した。再試験後に、選択した培養物をクローニングし、限界希釈を使用することで再びクローニングし、そして、アイソタイプを決定した。

50

## 【0048】

(Lane, R.D. "A short-duration polyethylene glycol fusion technique for increasing production of monoclonal antibody-secreting hybridomas", J. Immunol. Meth. 81: 223-228; (1985), Ziegler, B. et al. "Glutamate decarboxylase (GAD) is not detectable on the surface of rat islet cells examined by cytofluorometry and complement-dependent antibody-mediated cytotoxicity of monoclonal GAD antibodies", Horm. Metab. Res. 28: 11-15, (1996))

## 【0049】

## モノクローナル抗体産生

抗体を、標準的な抗体製造法によって産生させ (Marx et al, Monoclonal Antibody Production, ATLA 25, 121, 1997)、Protein A-クロマトグラフィーによって精製した。抗体純度は、SDSゲル電気泳動分析に基づき > 95%であった。

## 【0050】

## 実施例 2

## ヒトプロニューロテンシンの定量化のための免疫学的アッセイ

使用される技術は、Akridiniumエステル標識に基づいたサンドイッチコートしたチューブの発光イムノアッセイであった。

## 【0051】

化標識化合物 (トレーサー) : 100 µg (100 µl) LA (PBS中に 1 mg/ml、pH 7.4) を、10 µl の Akridinium NHS-エステル (アセトニトリル中に 1 mg/ml、InVent GmbH, Germany) (EP0353971) と混合し、室温で 20 分間インキュベートした。標識した LA を、Bio-Sil SEC400-5 (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) によるゲル濾過 HPLC によって精製した。精製した LA を、(300 mmol/l のリン酸カリウム、100 mmol/l の NaCl、10 mmol/l の Na-EDTA、5 g/l のウシ血清アルブミン、pH 7.0) 中に希釈した。終濃度は、200 µl あたり約 800,000 相対発酵単位 (RLU) の標識化合物 (約 20 ng の標識抗体) であった。アクリジニウムエステル化学発光を、AutoLumat LB953 (Berthold Technologies GmbH & Co. KG) を使用することによって評価した。

## 【0052】

固相: ポリスチレンチューブ (Greiner Bio-One International AG, Austria) を、SPA (1.5 µg の SPA / 0.3 ml の 100 mmol/l NaCl、50 mmol/l の TRIS/HCl、pH 7.8) で被覆した (室温にて 18 時間)。5% のウシ血清アルブミンでブロッキングした後に、そのチューブを、PBS、pH 7.4 で洗浄し、そして、真空乾燥水した。

## 【0053】

## 較正:

P-NT 含有ヒト血清の希釈物を使用して、アッセイを較正した。高い P-NT 免疫反応性を有するヒト血清プール (InVent Diagnostika, Hennigsdorf, Germany) を、ウマ血清 (Biochrom AG, Deutschland) で希釈した (アッセイ基準物質)。

標準物質を、ヒト P-NT 較正物資 (ICI-Diagnostics, Berlin, Germany) の使用によって較正した。あるいは、アッセイは、合成又は遺伝

子組み換え P - NT 1 - 1 1 7 又はその断片によっても較正され得る ( Ernst et al , 2 0 0 6 もまた参照のこと ) 。

【 0 0 5 4 】

P - NT 免疫学的アッセイ :

5 0 μ l のサンプル ( 又は較正物資 ) を S P A コートチューブ内にピペットで計り取り、標識した L A ( 2 0 0 μ l ) を加えた後に、そのチューブを 1 8 ~ 2 5 ° C で 1 6 ~ 2 2 時間インキュベートした。洗浄液 ( 2 0 m M の P B S 、 p H 7 . 4 、 0 . 1 % の T r i t o n X - 1 0 0 ) で 5 回 ( 各 1 m l ) 洗浄することによって、結合していないトレーサーを取り除いた。

チューブに結合した L A を、 L B 9 5 3 を使用することによって計測した。

10

図 1 には、典型的な P - NT 用量 / シグナルカーブを示す。

【 0 0 5 5 】

実施例 3

集団調査

我々は、1991~1994年のMalmo Diet and Cancer Study 基準試験ベースの集団 ( 人々の年齢 5 8 ± 6 歳、そして 5 9 % が女性 ) の 4 3 6 2 人の参加者からの空腹時血漿中の P - NT を計測した。我々は、12年を超える平均経過観察期間中の最初の事象の試験終点のそれぞれに対する、基準 P - NT ( 対数変換 P - NT の標準偏差増大毎あたりのハザード比 ) を関連付けるために、多変数補正された ( すべての従来 of 心疾患リスク因子、糖尿病リスク因子、そして、癌の分析において癌の遺伝も同様である ) コックス比例ハザードモデルを使用した。終点は、Swedish National Hospital Discharge Registry , the Swedish Myocardial Infarction Registry , the Stroke in Malmo Registry and the Swedish Cancer Registry を通じて検索した。これらの登録簿を通じた終点の検索は、正当性が立証され、且つ、正確であることがわかっていた。

20

【 0 0 5 6 】

表 1

全調査対象集団の臨床的特徴

記述統計学

30

【 表 1 】

	N	平均	標準偏差
MDCSスクリーニング時の年齢	4362	57.643	5.9797
収縮期血圧 (mmHg)	4362	141.91	19.158
拡張期血圧 (mmHg)	4362	87.02	9.501
ボディーマスインデックス (体重/kg x kg)	4362	25.7642	3.91173
胴囲 (cm)	4361	83.56	12.791
グルコース (mmol/l)	4362	5.1826	1.33736
トリグリセリド (mmol/l)	4362	1.3142	.63660
高密度リポタンパク質 (mmol/l)	4362	1.3908	.37068
低密度リポタンパク質 (mmol/l)	4362	4.1632	.98774
P-インスリン	4280	7.889	7.6975
PNT [pmol/l]	4362	123.01743	76.746549
有効なN (リストワイズ)	4279		

40

【 0 0 5 7 】

表 2

性別

50

【表 2】

	頻度	パーセント	有効なパーセント	累積パーセント
有効な男性	1803	41.3	41.3	41.3
女性	2559	58.7	58.7	100.0
合計	4362	100.0	100.0	

【0058】

表 3

10

Q + 日誌 : アンケート又は日誌による基準での抗高血圧治療 ( C 0 2、C 0 3、C 0 7、C 0 8、C 0 9 )

【表 3】

	頻度	パーセント	有効なパーセント	累積パーセント
有効ないいえ	3684	84.5	84.5	84.5
はい	678	15.5	15.5	100.0
合計	4362	100.0	100.0	

20

【0059】

表 4

D I A B M E L L ( f b > 6 . 0 又は p o s Q D M )

【表 4】

	頻度	パーセント	有効なパーセント	累積パーセント
有効ないいえ	3993	91.5	91.5	91.5
はい	369	8.5	8.5	100.0
合計	4362	100.0	100.0	

30

【0060】

表 5

現在の喫煙者 0

【表 5】

	頻度	パーセント	有効なパーセント	累積パーセント
有効な .00	3212	73.6	73.6	73.6
1.00	1150	26.4	26.4	100.0
合計	4362	100.0	100.0	

40

【0061】

表 6

試験における女性の臨床的特徴

記述統計学

【表 6】

	N	平均	標準偏差
MDCSスクリーニング時の年齢	2559	57.554	5.9403
収縮期血圧 (mmHg)	2559	140.50	19.311
拡張期血圧 (mmHg)	2559	85.65	9.117
ボディーマスインデックス (体重/kg x kg)	2559	25.5196	4.19083
胸囲 (cm)	2559	76.99	10.245
グルコース (mmol/l)	2559	5.0418	1.21798
トリグリセリド (mmol/l)	2559	1.2245	.58404
高密度リポタンパク質 (mmol/l)	2559	1.5123	.36949
低密度リポタンパク質 (mmol/l)	2559	4.2016	1.04762
P-インスリン	2512	7.223	5.4223
PNT [pmol/l]	2559	125.60633	77.681673
有効なN (リストワイズ)	2512		

10

【0062】

表 7

Q + 日誌 : アンケート又は日誌による基準での抗高血圧治療 (C02、C03、C07、C08、C09)

20

【表 7】

	頻度	パーセント	有効なパーセント	累積パーセント
有効ないいえ	2173	84.9	84.9	84.9
はい	386	15.1	15.1	100.0
合計	2559	100.0	100.0	

【0063】

表 8

DIAB MELL (fb > 6.0又はpos Q DM)

【表 8】

	頻度	パーセント	有効なパーセント	累積パーセント
有効ないいえ	2396	93.6	93.6	93.6
はい	163	6.4	6.4	100.0
合計	2559	100.0	100.0	

30

【0064】

表 9

現在の喫煙者 0

40

【表 9】

	頻度	パーセント	有効なパーセント	累積パーセント
有効な .00	1906	74.5	74.5	74.5
1.00	653	25.5	25.5	100.0
合計	2559	100.0	100.0	

【0065】

表 10

試験における男性の臨床的特徴  
記述統計学

10

【表 10】

	N	平均	標準偏差
MDCSスクリーニング時の年齢	1803	57.769	6.0345
収縮期血圧 (mmHg)	1803	143.90	18.766
拡張期血圧 (mmHg)	1803	88.95	9.698
ボディーマスインデックス (体重/kg x kg)	1803	26.1113	3.44882
胸囲 (cm)	1802	92.89	9.932
グルコース (mmol/l)	1803	5.3825	1.46780
トリグリセリド (mmol/l)	1803	1.4416	.68477
高密度リポタンパク質 (mmol/l)	1803	1.2183	.29669
低密度リポタンパク質 (mmol/l)	1803	4.1087	.89336
P-インスリン	1768	8.835	10.0090
PNT [pmol/l]	1803	119.34300	75.268054
有効なN (リストワイズ)	1767		

20

【0066】

表 11

Q + 日誌 : アンケート又は日誌による基準での抗高血圧治療 (C02、C03、C07、C08、C09)

30

【表 11】

	頻度	パーセント	有効なパーセント	累積パーセント
有効ないいえ	1511	83.8	83.8	83.8
はい	292	16.2	16.2	100.0
合計	1803	100.0	100.0	

40

【0067】

表 12

DIAB MEL L (fb > 6.0又はpos Q DM)

【表 1 2】

	頻度	パーセント	有効なパーセント	累積パーセント
有効ないいえ	1597	88.6	88.6	88.6
はい	206	11.4	11.4	100.0
合計	1803	100.0	100.0	

【0068】

表 1 3

現在の喫煙者 0

【表 1 3】

	頻度	パーセント	有効なパーセント	累積パーセント
有効な .00	1306	72.4	72.4	72.4
1.00	497	27.6	27.6	100.0
合計	1803	100.0	100.0	

【0069】

表 1 4

全体の P N T の四分位数：

P N T ( p m o l / l )

【表 1 4】

PNTのパーセンタイル群 (pmol/l)	N	中央値	最小	最大
1	1091	60.22000	3.270	75.740
2	1090	89.29000	75.790	104.600
3	1092	122.67000	104.640	147.610
4	1089	190.03000	147.660	1154.520
合計	4362	104.62000	3.270	1154.520

【0070】

表 1 5

女性の P N T の四分位数：

P N T ( p m o l / l )

10

20

30

40

【表 15】

PNTのパーセンタイル群 (pmol/l)	N	中央値	最小	最大
1	639	62.37000	5.100	78.580
2	639	92.07000	78.610	108.770
3	641	125.07000	108.960	150.000
4	640	194.38500	150.050	1154.520
合計	2559	108.96000	5.100	1154.520

10

四分位数濃度は、示されている女性サブグループ分析のすべてでほとんど同一であった。

【0071】

表 16

男性のPNTの四分位数：

PNT (pmol/l)

【表 16】

PNTのパーセンタイル群 (pmol/l)	N	中央値	最小	最大
1	450	58.02000	3.270	70.800
2	451	85.88000	70.970	98.820
3	451	118.18000	98.880	143.940
4	451	186.39000	144.180	1057.360
合計	1803	98.88000	3.270	1057.360

20

四分位数濃度は、示されている男性サブグループ分析のすべてでほとんど同一であった。

【0072】

P-NTと糖尿病の予測

30

基準にて糖尿病に罹患していない対象の中で、142人が、 $12.7 \pm 2.2$ 年の平均経過観察期間の間に新たに発現した糖尿病を発症した。すべての糖尿病リスク因子（年齢、性別、抗高血圧療法、収縮期血圧、ボディーマスインデックス、胴囲、喫煙、心血管疾患の既往歴、及び空腹時の血糖、トリグリセリド、インスリン、HDL、及びLDL濃度）の基準レベルの調節後、それぞれの標準偏差（SD）は、新たに発現する糖尿病のリスクに関して1.28（1.09 - 1.50）（ $P = 0.003$ ）のハザード比（95%の信頼区間）を与える基準P-NTが上昇した。前糖尿病（空腹時血糖値の異常、IFG）のない対象のサブグループでは、P-NTに関して1SD上昇するにつき付随している糖尿病のハザード比はさらに上昇した：1.48（1.17 - 1.86）（ $P = 0.001$ ）。

40

P-NTは、新たに発現した糖尿病と独立に相関していた。

【0073】

表 17 集団全体（男性及び女性）

【表 17】

方程式中の変数								
	B	SE	Wald	df	Sig.	Exp (B)	Exp (B) に関する 95.0%のC I	
							最小	最大
性別	.748	.296	6.404	1	.011	2.112	1.184	3.770
年齢	.004	.015	.058	1	.809	1.004	.974	1.034
AHT_B	.385	.197	3.807	1	.051	1.470	.998	2.165
SBP_B	.003	.005	.297	1	.586	1.003	.993	1.012
WAIST_B	.036	.016	4.937	1	.026	1.037	1.004	1.071
BMI_B	-.010	.041	.053	1	.817	.991	.914	1.074
GLUCOS_B	2.330	.223	109.419	1	.000	10.273	6.640	15.895
HDL_B	-.625	.310	4.063	1	.044	.535	.292	.983
LDL_B	-.020	.089	.051	1	.821	.980	.823	1.167
LNINS	.023	.185	.016	1	.900	1.024	.712	1.471
現在の喫煙者0	.311	.190	2.692	1	.101	1.365	.941	1.981
pr_cv_2008	.062	.450	.019	1	.891	1.063	.440	2.570
ZLN_PNT	.239	.081	8.705	1	.003	1.270	1.083	1.488

10

20

【0074】

表 18

女性のみ

方程式 b 中の変数

【表 18 - 1】

	B	SE	Wald	df	Sig.	Exp (B)	Exp (B) に関する 95.0%のC I	
							最小	最大
性別				0a				
年齢	.007	.022	.102	1	.750	1.007	.965	1.051
AHT_B	.208	.276	.568	1	.451	1.232	.717	2.117
SBP_B	-.001	.007	.011	1	.918	.999	.986	1.013
WAIST_B	.057	.021	7.100	1	.008	1.059	1.015	1.104
BMI_B	-.062	.055	1.269	1	.260	.940	.845	1.047
GLUCOS_B	2.359	.296	63.676	1	.000	10.578	5.927	18.881
HDL_B	-.318	.378	.707	1	.400	.728	.347	1.526
LDL_B	-.078	.117	.443	1	.506	.925	.736	1.163
LNINS	-.119	.254	.220	1	.639	.888	.540	1.460
現在の喫煙者0	.225	.264	.727	1	.394	1.253	.746	2.103
pr_cv_2008	-.414	.979	.179	1	.672	.661	.097	4.502
ZLN_PNT	.315	.114	7.703	1	.006	1.371	1.097	1.713

30

40

【0075】

方程式 b 中の変数

【表 18 - 2】

	B	SE	Wald	df	Sig.	Exp (B)	Exp (B) に関する 95.0%の C I	
							最小	最大
性別				0a				
年齢	.007	.022	.102	1	.750	1.007	.965	1.051
AHT_B	.208	.276	.568	1	.451	1.232	.717	2.117
SBP_B	-.001	.007	.011	1	.918	.999	.986	1.013
WAIST_B	.057	.021	7.100	1	.008	1.059	1.015	1.104
BMI_B	-.062	.055	1.269	1	.260	.940	.845	1.047
GLUCOS_B	2.359	.296	63.676	1	.000	10.578	5.927	18.881
HDL_B	-.318	.378	.707	1	.400	.728	.347	1.526
LDL_B	-.078	.117	.443	1	.506	.925	.736	1.163
LNINS	-.119	.254	.220	1	.639	.888	.540	1.460
現在の喫煙者 0	.225	.264	.727	1	.394	1.253	.746	2.103
pr_cv_2008	-.414	.979	.179	1	.672	.661	.097	4.502
ZLN_PNT	.315	.114	7.703	1	.006	1.371	1.097	1.713

a. 一定又は直線的に依存する共変量のため、自由度が低下した

b. 一定又は直線的に依存する共変量 性別 = 2

## 【0076】

基準にて空腹時血糖異常及び糖尿病を患っていない対象の中で、68人の対象が経過観察中に新たに発現した糖尿病を発症し、そして、糖尿病リスク因子の完全な調節後に、P - NTに関する各SDは、集団全体の新たに発現する糖尿病のリスクに関して1.48 (1.17 - 1.87) (P = 0.001)、女性での1.47 (1.08 - 2.00) (P = 0.014)、そして男性では1.56 (1.08 - 2.27) (P = 0.019)のハザード比に相関した。多変量コックス回帰モデルへのすべての糖尿病リスク因子の入力により、P - NTに比べて、空腹時血糖の基準レベルだけが新たに出現する糖尿病と強い統計的関係を有していた。

## 【0077】

図2：糖尿病予測のカプランマイヤー解析

2 a) 中央値を使用した糖尿病を患っていないすべての対象のカットオフ (104.6 pmol / l)

2 b) 糖尿病及び前糖尿病 (IFG) を患っていないすべての対象、カットオフ (104.6 pmol / l)

## 【0078】

サブグループの分析

方程式中に同じ変数を使用して、我々は、糖尿病の予測のために異なったサブグループを調査し、基準にて糖尿病を患っている対象は除外した。

## 【0079】

表 19

【表 19】

サブグループ	対象数	事象数	PNTの1SDあたりの ハザードリスク	有意性 (p 値)
全体	3704	142	27, 8%	0, 003
全体の中で空腹時血糖 異常を患っているもの	3102	64	47, 9	0, 001
空腹時血糖異常を患っ ている女性	1950	38	47%	0, 014
空腹時血糖異常 (IFG) を患っている男性	1152	26	56, 5%	0, 019
HBPの女性	1318	53	52, 5%	0, 002
IFGを患っているHBPの 女性	1119	25	58, 4%	0, 02
正常血圧の女性	1014	46	40, 1%	0, 014
IFGを患っている正常 血圧の女性	1014	12	125%	0, 001

10

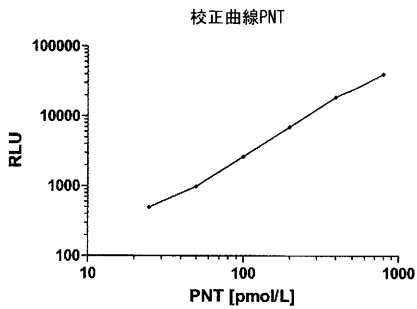
20

【 0 0 8 0 】

P - N T は、糖尿病発症に関して有意に予測となる。P - N T の予測力は、I F G (前糖尿病) を患っていない対象でより強かった。

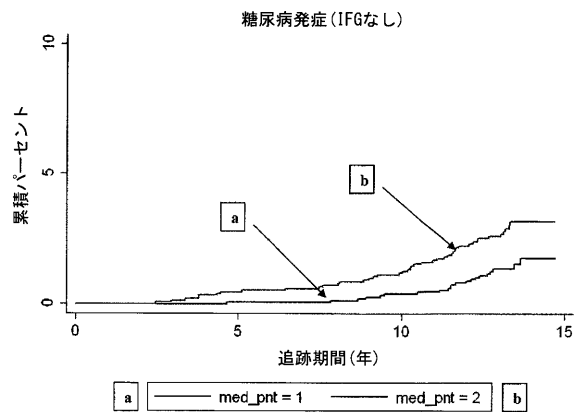
【 図 1 】

Figure 1



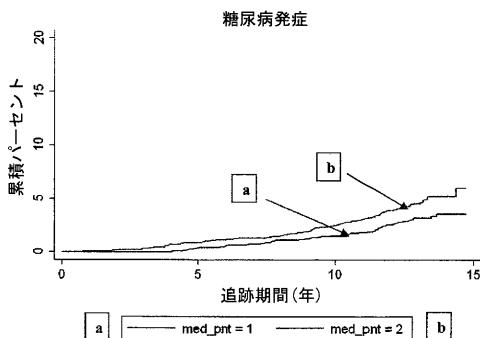
【 図 2 b 】

Figure 2b



【 図 2 a 】

Figure 2a



## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2013/054801
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. G01N33/68 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
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) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ERNST A ET AL: "Proneurotensin 1-117, a stable neurotensin precursor fragment identified in human circulation", PEPTIDES, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 27, no. 7, 1 July 2006 (2006-07-01), pages 1787-1793, XP027957440, ISSN: 0196-9781 [retrieved on 2006-07-01] (p 1788, col 2, first full para) -----	15-18
Y	CARRAWAY ET AL: "Radioimmunoassay for neurotensin, a hypothalamic peptide.", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 251, no. 22, 1 November 1976 (1976-11-01), pages 7035-7044, XP055071491, ISSN: 0021-9258 abstract ----- -/--	15-18
<input checked="" 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  19 July 2013		Date of mailing of the international search report  26/07/2013
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Bigot-Maucher, Cora

4

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2013/054801

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	FERNSTROM M H ET AL: "Immunoreactive neurotensin levels in pancreas: Elevation in diabetic rats and mice", METABOLISM, CLINICAL AND EXPERIMENTAL, W.B. SAUNDERS CO., PHILADELPHIA, PA, US, vol. 30, no. 9, 1 September 1981 (1981-09-01), pages 853-855, XP026313131, ISSN: 0026-0495, DOI: 10.1016/0026-0495(81)90063-9 [retrieved on 1981-09-01] (abstr; p 853, col 1, para 1 and 3; fig 1)(p 853, col 1-2, bridging para) -----	1-14
Y	US 5 430 047 A (JOHNSON STEPHEN J [US] ET AL) 4 July 1995 (1995-07-04) column 1, paragraph 1 -----	15-18
Y	SUMIO WATANABE ET AL: "Metabolic syndrome and gastrointestinal diseases", JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY, SPRINGER-VERLAG, TO, vol. 42, no. 4, 26 April 2007 (2007-04-26) , pages 267-274, XP019518750, ISSN: 1435-5922, DOI: 10.1007/S00535-007-2033-0 abstract -----	15-18
X	WOLOSIN JAMES D ET AL: "Diabetes and the gastrointestinal tract", CLINICAL DIABETES, vol. 18, no. 4, October 2000 (2000-10), pages 148-151, XP002703335, ISSN: 0891-8929 para's 1-3 of the first page -----	15-18
Y	EP 0 289 287 A2 (AMYLIN CORP [US] AMYLIN PHARMACEUTICALS INC [US]) 2 November 1988 (1988-11-02) abstract; claim 30 -----	1-14
X,P	MELANDER OLLE ET AL: "Plasma Proneurotensin and Incidence of Diabetes, Cardiovascular Disease, Breast Cancer, and Mortality", JAMA (JOURNAL OF THE AMERICAN MEDICAL ASSOCIATION), vol. 308, no. 14, October 2012 (2012-10), pages 1469-1475, XP9165659, the whole document -----	1-18

4

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2013/054801

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5430047	A	04-07-1995	NONE
-----			
EP 0289287	A2	02-11-1988	AT 162802 T 15-02-1998
			CA 1341333 C 22-01-2002
			DE 3856121 D1 05-03-1998
			DE 3856121 T2 23-07-1998
			EP 0289287 A2 02-11-1988
			ES 2114522 T3 01-06-1998
			GR 3026640 T3 31-07-1998
			HK 1003033 A1 30-09-1998
			JP 2766647 B2 18-06-1998
			JP S6463594 A 09-03-1989
			JP H09133679 A 20-05-1997
			JP H10168099 A 23-06-1998
-----			

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N 4 C 0 8 6
A 6 1 K 38/22 (2006.01)	A 6 1 K 37/24	4 H 0 4 5
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 K 31/451 (2006.01)	A 6 1 K 31/451	
A 6 1 K 31/415 (2006.01)	A 6 1 K 31/415	
A 6 1 K 31/4709 (2006.01)	A 6 1 K 31/4709	
A 6 1 K 31/439 (2006.01)	A 6 1 K 31/439	
C 0 7 K 16/26 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/26	Z N A
C 1 2 N 15/02 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	C
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 0 7 K 16/46	
	C 1 2 P 21/08	

(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, RU, TJ, T M), 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, RO, R S, 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, BN, 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, PA, 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

(74)代理人 100117019  
弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100150810  
弁理士 武居 良太郎

(74)代理人 100182730  
弁理士 大島 浩明

(72)発明者 アンドレアス ベルクマン  
ドイツ連邦共和国, 1 3 6 4 5 ベルリン, アム ローゼナンガー 7 8

(72)発明者 ウッレ メランデル  
スウェーデン国, エス - 2 0 5 8 0 2 マルメ, ビルディング 9 1, エントランス 7 2, フロ  
ア 1 2, セーノウー スカネ ユニバーシティ ホスピタル, クリニカル リサーチ センター

Fターム(参考) 2G045 AA25 CA25 CA26 CB03 CB07 DA36 DA54 FB03  
4B024 AA11 BA44 DA02 GA05 HA15  
4B064 AG27 CA20 CC24 DA13  
4C084 AA02 AA17 BA44 DB13 DC50 NA14 ZC351 ZC411 ZC412 ZC421  
ZC422  
4C085 AA13 AA14 BB36 BB41 BB43 BB50 CC23 EE01  
4C086 AA01 BC21 BC36 CB17 GA07 MA01 MA04 NA14 ZC35 ZC41  
ZC42  
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA76 EA50 FA72

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2015512048A5</a>	公开(公告)日	2015-11-05
申请号	JP2014560405	申请日	2013-03-08
[标]申请(专利权)人(译)	思芬构技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	格哈德·戈尔抛丸科技GESELLSCHAFT手套Beshurenkuteru有限公司		
[标]发明人	アンドレアスベルクマン ウツレメランデル		
发明人	アンドレアスベルクマン ウツレメランデル		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/53 A61K45/00 A61P3/10 A61P43/00 A61K39/395 A61K38/22 A61K38/00 A61K31/451 A61K31/415 A61K31/4709 A61K31/439 C07K16/26 C07K16/28 C12N15/02 C07K16/46 C12P21/08		
CPC分类号	G01N33/6893 G01N2800/042 G01N33/00 G01N33/68 G01N2333/4706		
FI分类号	G01N33/68 G01N33/53.B A61K45/00 A61P3/10 A61P43/00.111 A61K39/395.N A61K37/24 A61K37/02 A61K31/451 A61K31/415 A61K31/4709 A61K31/439 A61K39/395.D C07K16/26.ZNA C07K16/28 C12N15/00.C C07K16/46 C12P21/08		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/CB03 2G045/CB07 2G045/DA36 2G045/DA54 2G045/FB03 4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/DA02 4B024/GA05 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4C084/AA02 4C084/AA17 4C084/BA44 4C084/DB13 4C084/DC50 4C084/NA14 4C084/ZC351 4C084/ZC411 4C084/ZC412 4C084/ZC421 4C084/ZC422 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB36 4C085/BB41 4C085/BB43 4C085/BB50 4C085/CC23 4C085/EE01 4C086/AA01 4C086/BC21 4C086/BC36 4C086/CB17 4C086/GA07 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZC35 4C086/ZC41 4C086/ZC42 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA72		
代理人(译)	青木 笃 石田 敬 渡边洋一 武井良太郎		
优先权	2012158680 2012-03-08 EP 61/608350 2012-03-08 US 2012165062 2012-04-20 EP		
其他公开文献	JP2015512048A JP6262669B2		

#### 摘要(译)

本发明的内容是诊断受试者的代谢综合征的不从患有或方法糖尿病，预测受试者不会从与糖尿病和/或代谢综合征，以下患糖尿病的风险的方法步骤：由亲神经降压素的在从受试者获得体液的至少五个氨基酸的片段，或的电平被测量，并且所述的风险从糖尿病和/或代谢综合征，亲神经降压素或患有该片的水平，作为高电平或糖尿病和/或患有代谢综合征的预测的高风险，或高水平的代谢综合征的受试者中的不患糖尿病诊断相关一个相关联，所述方法包括。【选择图】无

