



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102300877 B

(45) 授权公告日 2014. 12. 10

(21) 申请号 201080005751. 2

G01N 33/53 (2006. 01)

(22) 申请日 2010. 01. 27

G01N 33/573 (2006. 01)

(30) 优先权数据

G01N 33/68 (2006. 01)

61/147, 778 2009. 01. 28 US

C07K 14/81 (2006. 01)

C07K 14/47 (2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2011. 07. 28

(56) 对比文件

US 2006286602 A1, 2006. 12. 21,

WO 2007056587 A2, 2007. 05. 18,

WO 03019193 A1, 2003. 03. 06,

PATURI V. RAO, et al. Proteomic

identification of urinary biomarkers of

diabetic nephropathy. 《DIABETES CARE》. 2007,

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/CA2010/000097 2010. 01. 27

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2010/085879 EN 2010. 08. 05

(73) 专利权人 财团法人工业技术研究院

地址 中国台湾新竹县

审查员 靳春鹏

(72) 发明人 林微雅 叶亚平 曾镗翎 郑平福

徐采薇 李泓毅 陈怡婷 林裕峰

陈金顺 李彦朋

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 封新琴

(51) Int. Cl.

C07K 16/38 (2006. 01)

C07K 16/18 (2006. 01)

C40B 30/00 (2006. 01)

权利要求书4页 说明书28页

序列表3页 附图2页

(54) 发明名称

与糖尿病肾病相关的尿及血清的生物标记

(57) 摘要

尿液及血清中生物标记在诊断糖尿病肾病、评估糖尿病肾病阶段、监测糖尿病肾病发展及评估糖尿病肾病的治疗有效性中的用途。该生物标记包括尿中  $\alpha$ -2-HS-糖蛋白前体、尿中  $\alpha$ -1 抗胰蛋白酶、尿中  $\alpha$ -1 酸性糖蛋白、尿中骨桥蛋白、血清中骨桥蛋白、前述之片段及前述之组合。

1. 生物标记用于制备试剂盒的用途,其中该生物标记为  $\alpha$ -1 抗胰蛋白酶的片段,其中该  $\alpha$ -1 抗胰蛋白酶的片段为 KGKWERPFVEKDTTEEDF (SEQ ID NO:3) 所示的氨基酸序列,所述试剂盒用于诊断个体中糖尿病肾病,包括:

确认怀疑为患有糖尿病肾病的个体中所述生物标记的程度;

以及根据该生物标记的程度评估该个体是否患有糖尿病肾病;

其中,相较于未患有糖尿病肾病个体,该生物标记的程度增加时,表示该个体患有糖尿病肾病。

2. 如权利要求 1 所述的用途,还包括在该评估步骤之后,依据该生物标记的程度评估糖尿病肾病的阶段,其中,相较于未患有糖尿病肾病个体,该生物标记的程度增加时,表示该个体为糖尿病肾病晚期。

3. 如权利要求 1 所述的用途,其中该生物标记由所述  $\alpha$ -1 抗胰蛋白酶的片段和择自下列至少一氨基酸序列 VVSLGSPSGEVSHPRKT (SEQ ID NO:1) 及 MGVVSLGSPSGEVSHPRKT (SEQ ID NO:2) 所示的  $\alpha$ -2-HS- 糖蛋白前体的片段所组成。

4. 如权利要求 3 所述的用途,还包括在该评估步骤之后,依据该生物标记的程度评估糖尿病肾病的阶段,其中,相较于未患有糖尿病肾病个体,该生物标记的程度增加时,表示该个体为糖尿病肾病晚期。

5. 如权利要求 1 所述的用途,其中该生物标记由所述  $\alpha$ -1 抗胰蛋白酶的片段和下列氨基酸序列 GQEHFAHLLILRDTKTYMLAFDVNDEKNWGLS (SEQ ID NO:7) 所示的尿中  $\alpha$ -1 酸性糖蛋白 ( $\alpha$ -acid glycoprotein) 片段所组成。

6. 如权利要求 5 所述的用途,还包括在该评估步骤后,依据该生物标记的程度评估糖尿病肾病的阶段。

7. 如权利要求 1 所述的用途,其中该生物标记由所述  $\alpha$ -1 抗胰蛋白酶的片段和择自下列至少一氨基酸序列 YPDAVATWLNPDPSQKQKQNLAPQNAVSSSEETNDFKQETLPSK (SEQ ID NO:8) 及 KYPDAVATWLNPDPSQKQKQNLAPQTLPSK (SEQ ID NO:9) 所示的血清中的骨桥蛋白的片段所组成。

8. 如权利要求 7 所述的用途,还包括在该评估步骤后,依据该生物标记的程度评估糖尿病肾病的阶段,其中,相较于未患有糖尿病肾病个体,该生物标记的程度增加时,表示该个体为糖尿病肾病晚期。

9. 生物标记用于制备试剂盒的用途,其中该生物标记为  $\alpha$ -1 抗胰蛋白酶的片段,其中该  $\alpha$ -1 抗胰蛋白酶的片段为 KGKWERPFVEKDTTEEDF (SEQ ID NO:3) 所示的氨基酸序列,

所述试剂盒用于评估个体中糖尿病肾病的治疗有效性,包括:确认该个体中所述生物标记的治疗前程度,

确认该个体中该生物标记的治疗后程度,以及

根据该生物标记的程度在治疗后的改变,评估该治疗的有效性,

其中,当该生物标记的治疗后程度与该生物标记的治疗前程度相同或较低时,表示该治疗为有效。

10. 如权利要求 9 所述的用途,其中该生物标记由所述  $\alpha$ -1 抗胰蛋白酶的片段和择自下列至少一氨基酸序列所组成:如氨基酸序列 VVSLGSPSGEVSHPRKT (SEQ ID NO:1) 或 MGVVSLGSPSGEVSHPRKT (SEQ ID NO:2) 所示的  $\alpha$ -2-HS- 糖蛋白前体的片段;

如氨基酸序列 GQEHFAHLLILRDTKTYMLAFDVNDEKNWGLS (SEQ ID NO:7) 所示的尿中  $\alpha$ -1

酸性糖蛋白 ( $\alpha$ -acid glycoprotein);及

如氨基酸序列 YPDAVATWLNPDPSQKQNLAPQNAVSSSEETNDFKQETLPSK (SEQ ID NO:8) 或 KYPDAVATWLNPDPSQKQNLAPQTLPSK (SEQ ID NO:9) 所示的血清中的骨桥蛋白的片段。

11. 如权利要求 9 所述的用途,其中该个体为人。

12. 如权利要求 9 所述的用途,其中该个体为实验室动物。

13. 蛋白质分子用于制备试剂盒的用途,其中该蛋白质分子为  $\alpha$ -1 抗胰蛋白酶的片段,其中该  $\alpha$ -1 抗胰蛋白酶的片段为 KGKWERPFVKDTEEDF (SEQ ID NO:3) 所示的氨基酸序列,

所述试剂盒用于确认个体中糖尿病肾病阶段,包括:

从怀疑患有糖尿病肾病个体中获得尿液样本及任选地取得血清样本;

确认该样本中由所述蛋白质分子所构成的生物标记的程度,及任选地采用一个或多个的临床因子,该临床因子选自年龄、性别、HbA1c、白蛋白 (albumin)/肌酸酐 (creatinine) 比例、及肾小球过滤率 (glomerular filtration rate);

根据该生物标记的程度计算疾病级数;及

根据该疾病级数与表示不同糖尿病肾病阶段的预定截取值 (cutoff value) 的比较,评估该个体的糖尿病肾病阶段。

14. 如权利要求 13 所述的用途,其中该疾病级数由选自岭回归分析法 (ridge regression analysis)、因素分析法 (factor analysis)、鉴别函数分析法 (discriminant function analysis)、及逻辑回归分析法 (logistic regression analysis) 的分析法所计算。

15. 如权利要求 13 所述的用途,其中该蛋白质分子由所述  $\alpha$ -1 抗胰蛋白酶的片段和择自下列至少一氨基酸序列所组成:如氨基酸序列 VVSLGSPSGEVSHPRKT (SEQ ID NO:1) 或 MGVVSLGSPSGEVSHPRKT (SEQ ID NO:2) 所示的尿中  $\alpha$ -2-HS-糖蛋白前体的片段;

如氨基酸序列 GQEHFAHLLILRDTKTYMLAFDVNDEKNWGLS (SEQ ID NO:7) 所示的尿中  $\alpha$ -1 酸性糖蛋白 ( $\alpha$ -acid glycoprotein) 片段;及如氨基酸序列 YPDAVATWLNPDPSQKQNLAPQNAVSSSEETNDFKQETLPSK (SEQ ID NO:8) 或 KYPDAVATWLNPDPSQKQNLAPQTLPSK (SEQ ID NO:9) 所示的血清中或尿中的骨桥蛋白的片段。

16. 如权利要求 15 所述的用途,其中该取得步骤由收集尿液样本及血清样本而进行并且所述生物标记由所述尿中  $\alpha$ -1 抗胰蛋白酶的片段、所述  $\alpha$ -2-HS-糖蛋白前体的片段、所述尿中  $\alpha$ -1 酸性糖蛋白 ( $\alpha$ -acid glycoprotein) 片段及所述血清中及尿中的骨桥蛋白的片段所组成。

17. 如权利要求 15 所述的用途,其中该取得步骤由收集尿液样本而进行并且所述生物标记由所述尿中  $\alpha$ -1 抗胰蛋白酶的片段和至少一种选自所述尿中  $\alpha$ -2-HS-糖蛋白前体的片段、所述尿中  $\alpha$ -1 酸性糖蛋白 ( $\alpha$ -acid glycoprotein) 片段及所述尿中的骨桥蛋白的片段的蛋白质分子所组成。

18. 蛋白质分子用于制备试剂盒的用途,其中该蛋白质分子为  $\alpha$ -1 抗胰蛋白酶的片段,其中该  $\alpha$ -1 抗胰蛋白酶的片段为 KGKWERPFVKDTEEDF (SEQ ID NO:3) 所示的氨基酸序列,

所述试剂盒用于监测个体中糖尿病肾病发展,包括:

从怀疑患有糖尿病肾病个体中获得第一尿液样本及任选地取得第一血清样本；  
在 2 星期至 12 个月之后，从该个体中取得第二尿液样本及任选地取得第二血清样本；  
确认第一及第二样本中由所述蛋白质分子所组成的生物标记的程度，及任选地采用一个或多个的临床因子，该临床因子选自年龄、性别、HbA1c、白蛋白 (albumin)/ 肌酸酐 (creatinine) 比例、及肾小球过滤率 (glomerular filtration rate)；

根据第一及第二样本中的该生物标记的程度，分别计算第一疾病级数及第二疾病级数；及

评估该个体中的疾病发展；

其中，当第二疾病级数高于第一疾病级数时，表示糖尿病肾病恶化。

19. 如权利要求 18 所述的用途，其中该疾病级数由选自岭回归分析法 (ridge regression analysis)、因素分析法 (factor analysis)、鉴别函数分析法 (discriminant function analysis)、及逻辑回归分析法 (logistic regression analysis) 中的分析法所计算。

20. 如权利要求 18 所述的用途，其中该蛋白质分子由所述  $\alpha$ -1 抗胰蛋白酶的片段和择自下列至少一氨基酸序列所组成：如氨基酸序列 VVSLGSPSGEVSHPRKT (SEQ ID NO:1) 或 MGVVSLGSPSGEVSHPRKT (SEQ ID NO:2) 所示的  $\alpha$ -2-HS- 糖蛋白前体的片段；

如氨基酸序列 GQEHFAHLLILRDTKTYMLAFDVNDEKNWGLS (SEQ ID NO:7) 所示的尿中  $\alpha$ -1 酸性糖蛋白 ( $\alpha$ -1acid glycoprotein) 片段；及

如氨基酸序列 YPDAVATWLNPDPSQKQNLAPQNAVSSSEETNDFKQETLPSK (SEQ ID NO:8) 或 KYP DAVATWLNPDPSQKQNLAPQTLPSK (SEQ ID NO:9) 所示的血清中或尿中的骨桥蛋白的片段。

21. 如权利要求 20 所述的用途，其中该取得步骤由收集尿液样本及血清样本而进行并且所述生物标记由所述尿中  $\alpha$ -1 抗胰蛋白酶的片段、所述  $\alpha$ -2-HS- 糖蛋白前体的片段、所述尿中  $\alpha$ -1 酸性糖蛋白 ( $\alpha$ -1acid glycoprotein) 片段及所述血清中及尿中的骨桥蛋白的片段所组成。

22. 如权利要求 20 所述的用途，其中该取得步骤由收集尿液样本而进行并且所述生物标记由所述尿中  $\alpha$ -1 抗胰蛋白酶的片段和至少一种选自所述尿中  $\alpha$ -2-HS- 糖蛋白前体的片段、所述尿中  $\alpha$ -1 酸性糖蛋白 ( $\alpha$ -1acid glycoprotein) 片段及所述尿中的骨桥蛋白的片段的片段所组成。

23. 蛋白质分子用于制备试剂盒的用途，其中该蛋白质分子为  $\alpha$ -1 抗胰蛋白酶的片段，其中该  $\alpha$ -1 抗胰蛋白酶的片段为 KGKWERPFVEVKDTEEEDF (SEQ ID NO:3) 所示的氨基酸序列，

所述试剂盒用于评估个体中糖尿病肾病的治疗有效性，包括：

在治疗前从个体中获得第一尿液样本及任选地取得第一血清样本；

在治疗后从该个体中获得第二尿液样本及任选地取得第二血清样本；

确认该样本中由所述蛋白质分子所组成的生物标记的程度，及任选地采用一个或多个的临床因子，该临床因子选自年龄、性别、HbA1c、白蛋白 (albumin)/ 肌酸酐 (creatinine) 比例、及肾小球过滤率 (glomerular filtration rate)；

根据第一及第二样本中该生物标记的程度，分别计算第一疾病级数及第二疾病级数；  
及

评估该个体中的治疗有效性；

其中,当该第二疾病级数相等于或低于该第一疾病级数时,表示该治疗为有效。

24. 如权利要求 23 所述的用途,其中该疾病级数由选自岭回归分析法 (ridge regression analysis)、因素分析法 (factor analysis)、鉴别函数分析法 (discriminant function analysis)、及逻辑回归分析法 (logistic regression analysis) 中的分析法所计算。

25. 如权利要求 23 所述的用途,其中该蛋白质分子由所述  $\alpha$ -1 抗胰蛋白酶的片段和择自下列至少一氨基酸序列所组成:如氨基酸序列 VVSLGSPSGEVSHPRKT (SEQ ID NO:1) 或 MGVVSLGSPSGEVSHPRKT (SEQ ID NO:2) 所示的尿中  $\alpha$ -2-HS- 糖蛋白前体的片段;

如氨基酸序列 GQEHFAHLLILRDTKTYMLAFDVNDEKNWGLS (SEQ ID NO:7) 所示的尿中  $\alpha$ -1 酸性糖蛋白 ( $\alpha$ -1acid glycoprotein) 片段;及

如氨基酸序列 YPDAVATWLNPDPSQKQNLAPQNAVSSSEETNDFKQETLPSK (SEQ ID NO:8) 或 KYP DAVATWLNPDPSQKQNLAPQTLPSK (SEQ ID NO:9) 所示的血清中或尿中的骨桥蛋白的片段。

26. 如权利要求 25 所述的用途,其中该取得步骤由收集尿液样本及血清样本而进行并且所述生物标记由所述尿中  $\alpha$ -1 抗胰蛋白酶的片段、所述  $\alpha$ -2-HS- 糖蛋白前体的片段、所述尿中  $\alpha$ -1 酸性糖蛋白 ( $\alpha$ -1acid glycoprotein) 片段及所述血清中及尿中的骨桥蛋白的片段所组成。

27. 如权利要求 25 所述的用途,其中该取得步骤由收集尿液样本而进行并且所述生物标记由所述尿中  $\alpha$ -1 抗胰蛋白酶的片段和至少一种选自所述尿中  $\alpha$ -2-HS- 糖蛋白前体的片段、所述尿中  $\alpha$ -1 酸性糖蛋白 ( $\alpha$ -1acid glycoprotein) 片段及所述尿中的骨桥蛋白的片段的片段所组成。

## 与糖尿病肾病相关的尿及血清的生物标记

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求 2009 年 1 月 28 日提交的美国临时申请 No. 61/147778 的优先权, 将该申请的内容通过提述以其整体并入本文。

[0003] 发明背景

[0004] 糖尿病肾病 (diabetic nephropathy ;DN) 是伴随长期糖尿病而发展的肾脏疾病。糖尿病肾病造成异常的液体滤过及尿中白蛋白分泌增加, 最终导致肾衰竭。

[0005] 糖尿病肾病在早期并无症状。因此, 难以侦测此疾病的开始。事实上, 糖尿病肾病目前的诊断是根据微量白蛋白尿 (microalbuminuria) 的发展, 当肾脏伤害已经发生时, 微量白蛋白尿才发生。缺乏早期诊断检测, 使得无法有效治疗早期阶段的糖尿病肾病。

[0006] 因此, 鉴定出有效诊断早期糖尿病肾病的可信赖生物标记是非常重要的。

### 发明内容

[0007] 本发明基于非预期的发现, 数个尿及血清中蛋白质及其片段, 不论单独或组合, 相较于未患有糖尿病肾病者, 在糖尿病肾病患者中有不同表现。这些蛋白质分子因此为诊断早期糖尿病肾病的有效生物标记。

[0008] 因此, 本发明的一发明方面特征在于诊断个体中糖尿病肾病的方法。该方法包括至少两步骤: (i) 确认怀疑患有糖尿病肾病的个体中生物标记的程度; 及 (ii) 根据该生物标记的程度, 评估该个体是否患有糖尿病肾病。相较于未患有糖尿病肾病者, 该生物标记的程度增加表示该个体患有糖尿病肾病。

[0009] 该诊断方法所使用的生物标记为下列的四种蛋白质分子的其中之一:

[0010] (i) 第一尿中蛋白质分子, 为尿中  $\alpha$ -2-HS-糖蛋白前体 (precursor  $\alpha$ -2-HS-glycoprotein) 或其具有至少 10 个氨基酸的片段, 例如: 成熟的尿中  $\alpha$ -2-HS-糖蛋白前体 VVSLGSPSGEVSHPRKT (SEQ ID NO:1) 或 MGV VSLGSPSGEVSHPRKT (SEQ ID NO:2);

[0011] (ii) 第二尿中蛋白质分子, 为尿中  $\alpha$ -1 抗胰蛋白酶 ( $\alpha$ -1antitrypsin) 或其具有至少 10 个氨基酸的片段, 例如 KGKWERPFVKDTEEDF (SEQ ID NO:3), MIEQNTKSPLFMGKVVNPTQK (SEQ ID NO:4), EDPQGDAQKTDTSHHDDHPTFNKITPNLAE (SEQ ID NO:5), 或 EDPQGDAQKTDTSHHDDHPTFNKITPNLAEFA (SEQ ID NO:6);

[0012] (iii) 第三尿中蛋白质分子, 为尿中  $\alpha$ -1 酸性糖蛋白 ( $\alpha$ -1acid glycoprotein) 或其具有至少 10 个氨基酸的片段, 例如 GQEHFAHLLILRDTKTYMLAFDVNDEKNWGLS (SEQ ID NO:7); 及

[0013] (iv) 血清中蛋白质分子, 为骨桥蛋白 (osteopontin) 或其具有至少 10 个氨基酸的片段, 例如 YPDAVATWLNPDPSQKQNLAPQNAVS SEETNDFKQETLPSK (SEQ ID NO:8) 或 KYPDAVATWLNPDPSQKQNLAPQTLPSK (SEQ ID NO:9)。

[0014] 上述之诊断方法可还包括, 在前述评估步骤之后, 使该生物标记程度与糖尿病肾病状态 (是否为早期或晚期) 形成关联的步骤。当该生物标记为 (i) 或 (iv) 蛋白质分子

时,相对于未患有糖尿病肾病个体,该生物标记的程度增加表示为糖尿病肾病的晚期。对于该生物标记为(ii)或(iii)蛋白质分子,当与表示糖尿病肾病早期及晚期的生物标记预测参考程度相比,该生物标记的程度可显示糖尿病肾病的状态。

[0015] 另一发明方面,本发明特征在于一种评估个体(例如:人患者或实验室动物)糖尿病肾病的治疗有效性的方法。该方法包括确认个体中治疗前及治疗后的(i)、(ii)、(iii)或(iv)蛋白质分子程度,基于治疗后该生物标记的程度变化,评估该治疗的有效性。假设相较于治疗前的生物标记程度,该生物标记在治疗后的程度维持相同或下降,则表示该治疗为有效。

[0016] 另一发明方面,本发明特征在于一种确认糖尿病肾病阶段的方法,包括至少4个步骤:(i)取得来自怀疑患有糖尿病肾病的个体的尿液样本及任选地取得其血清样本;(ii)确认前述生物标记之一的程度;(iii)基于该生物标记的程度,计算疾病级数(score);及(iv)基于该疾病级数与预定为不同糖尿病肾病阶段的截取值(cutoff value)之比较,评估该个体的糖尿病肾病阶段。该方法中,上述计算步骤可藉由岭回归分析法(ridge regression analysis)、因素分析法(factor analysis)、鉴别函数分析法(discriminant function analysis)、及逻辑回归分析法(logistic regression analysis)进行。

[0017] 前述确认糖尿病肾病阶段的方法中使用的生物标记,由下列5种蛋白质分子中的至少两种所构成:前述的(i)~(iv)蛋白质分子,及蛋白质分子(v),为前述的尿中骨桥蛋白或其片段。在一实施例中,该生物标记由前述5种蛋白质分子所组成。在另一实施例中,该生物标记由前述(i)~(iii)及(v)蛋白质分子中的至少2种所组成。

[0018] 或者,该生物标记由上述5种蛋白质分子中的至少两种以及一种或多种的临床因子所组成,临床因子例如:年龄、性别、HbA1c、白蛋白/肌酐比例(ACR)、及肾小球过滤率(GFR)。

[0019] 另一发明方面,本发明提供一种监测糖尿病肾病发展的方法,基于上述任一种生物标记的程度。该方法包括在2星期至12个月的期间(例如:2-24个星期或3-12个月),从怀疑患有糖尿病肾病的个体中取得前后2次尿液样本及任选地取得前后2次血清样本,确认样本中该生物标记之一的程度,根据该生物标记程度计算疾病级数(disease score),及基于该疾病级数,评估该个体中糖尿病肾病的发展。当较晚获得的样本之疾病级数高于较早获得的样本之疾病级数时,表示糖尿病肾病恶化。

[0020] 上述之生物标记也可用于评估糖尿病肾病的治疗有效性。如果该生物标记之一的治疗后程度,相较于相同生物标记在治疗前的程度,维持不变或降低时,则该治疗为有效。

[0021] 本发明更进一步提供试剂盒,于前述之方法使用。本发明的试剂盒包括2、3或4种具有不同抗原特异性的抗体。此述抗体可与(I)  $\alpha$ -2-HS-糖蛋白( $\alpha$ -2-HS-glycoprotein)、(ii)  $\alpha$ -1抗胰蛋白酶( $\alpha$ -1-antitrypsin)、(iii)  $\alpha$ -1酸性糖蛋白( $\alpha$ -1-acid glycoprotein)及(iv)骨桥蛋白(osteopontin)的任一种结合。在一实施例中,该试剂盒仅包含与欲侦测的抗原(例如与糖尿病肾病相关的生物标记)特异性结合的抗体,以实施前述之任一种方法。因此,该试剂盒基本上由上述抗体所组成。

[0022] 本发明之范围也包括与下列肽其中之一特异性结合的分离的抗体:

[0023] MGVVSLGSPSGEVSHPRKT (SEQ ID NO :2)、

- [0024] KGKWERPFEVKDTEEDF (SEQ ID NO :3)、  
[0025] MIEQNTKSPLFMGKVVNPTQK (SEQ ID NO :4)、  
[0026] EDPQGDAQKTDTSHHDQDHPFNKITPNLAEFA (SEQ ID NO :6)、  
[0027] GQEHFAHLLILRDTKTYMLADVNDKKNWGLS (SEQ ID NO :7)、  
[0028] YPDAVATWLNPDPSQKQ NLLAPQNAVSSSEETNDFKQETLPSK (SEQ ID NO :8)、及  
[0029] KYPDAVATWLNPDPSQKQ NLLAPQTLPSK (SEQ ID NO :9)。

[0030] 此述“分离的抗体”大体上为不含有天然相关分子的抗体。更特定地说,在该抗体的制备中,天然相关分子最多占干重的 20%,则该抗体被认为是“分离的抗体”。纯度可以任何适当方法测量,例如:柱层析法、聚丙烯酰胺胶电泳法及高效液相层析法 (HPLC)。

[0031] 此述的任何抗体皆可用于制造用于实施本发明之方法的试剂盒。

[0032] 本发明之一或多个实施方案的详细说明如下所述。本发明之其它特征或优点将由后附的图式及数个实施方案的详细说明以及后附的权利要求书而清楚了解。

[0033] 附图简述

[0034] 图 1 显示不同糖尿病肾病患者群的尿中  $\alpha$ -2-HS-糖蛋白 (uDN2 ;图 1A)、尿中  $\alpha$ -1 抗胰蛋白酶 (uDN5 ;图 1B)、尿中  $\alpha$ -1 酸性糖蛋白 (uGR3 ;图 1C) 及血清中骨桥蛋白 (sDN0 ;图 1D) 的箱线图 (boxplots)。图中的箱型 (boxes) 的上限及下限及该箱型中的横线分别标示为 25%数值、75%数值及 50%数值 (中位数)。上方虚线标示上围篱值 (upper fence) 以下的最大值,其为 75%数值加 1.5 四分位距 (interquartile range),而下方虚线标示下围篱值 (lower fence) 以上的最小值,其为 25%数值减 1.5 四分位距。

[0035] 发明详述

[0036] 糖尿病肾病 (DN) 为糖尿病相关的肾疾病,具有 5 个发展期:

[0037] 第 1 阶段:特征为具正常的肾小球过滤率 (GFR) 及正常的白蛋白尿 (albuminuria) ( $ACR < 30\text{mg/g}$ ) 的糖尿病;

[0038] 第 2 阶段:特征为肾小球高过滤率 (glomerular hyperfiltration) (超过  $120\text{mL/min}/1.73\text{m}^2$ ) 或是肾肥大 (renal enlargement) 伴随正常 GFR 及正常的白蛋白尿 (albuminuria) ( $ACR < 30\text{mg/g}$ );

[0039] 第 3 阶段:特征为微量白蛋白尿 (microalbuminuria);

[0040] 第 4 阶段:特征为严重的白蛋白尿 (albuminuria) 及 GFR 累进地降低;

[0041] 第 5 阶段:特征为 GFR 低于  $15\text{mL/min}/1.73\text{m}^2$ 。

[0042] 一般认为第 1 ~ 3 阶段是早期阶段,第 4 ~ 5 阶段为晚期。

[0043] 本发明人鉴定出多个与糖尿病肾病相关的生物标记,特别是不同阶段的糖尿病肾病。该生物标记由下列的 4 种蛋白质及其片段中的一种或多种所组成,不论是在尿液或血清中:(a)  $\alpha$ -2-HS-糖蛋白 (GenBank 登录号 NP\_001613 ;2010 年 1 月 10 日);(b)  $\alpha$ -1 抗胰蛋白酶 (GenBank 登录号 AAB59495 ;2010 年 1 月 10 日);(c)  $\alpha$ -1 酸糖蛋白 (GenBank 登录号 EAW87416 ;2010 年 1 月 10 日);及

[0044] (d) 骨桥蛋白,包括两个同型异构物 (isoform),已知为分泌型磷酸化蛋白 1a (GenBank 登录号 NP\_001035147 ;2010 年 1 月 17 日) 及分泌型磷酸化蛋白 1b (GenBank 登录号 NP\_000573 ;2010 年 1 月 10 日)。

[0045] 此述 4 种蛋白质的片段具有 10 个氨基酸的最小长度,优选为 190 ~ 410 个氨基酸

的最大长度。例如：蛋白质 (a)、(b)、(c) 及 (d) 的片段可分别为 357、408、191 及 290 个氨基酸。

[0046] 本发明人也发现由上述蛋白质及其片段之一种或多种所构成的生物标记,及一种或多种的临床因子(例如:年龄、性别、HbA1c、ACR 及 GFR)也与不同阶段的糖尿病肾病有关。

[0047] 因此,本发明之一方面是关于使用任一个前述之生物标记于糖尿病肾病的诊断方法。为实施此方法,从怀疑患有糖尿病肾病的个体采集尿液样本,及视需要采集血清样本,以常见的方法,例如:质谱及免疫分析,测定上述之 4 种蛋白质中一种或多种或其片段的尿液及血清程度。如果需要,则以常见的方法测定临床因子程度。

[0048] 当生物标记包含单一蛋白质分子时,在个体中的程度可与参考值比较,确认该个体是否患有糖尿病肾病。参考值表示在未患有糖尿病肾病个体中相同生物标记的程度,参考值可根据糖尿病肾病者群及非糖尿病肾病者群中该生物标记的程度而订定。例如:参考值可以是上述两患者群的平均程度之间的中间值。该生物标记的程度高于参考值则表示为糖尿病肾病。

[0049] 当生物标记包含至少两种蛋白质分子,及任选地包含至少一个临床因子时,该蛋白质分子的程度及临床因子的值可经适当分析,产生以该生物标记程度为特征的疾病级数(disease score)(例如:以数字表示)。此述的分析包括例如:鉴别函数分析法(discriminant function analysis)、逻辑回归分析法(logistic regression analysis)、岭回归分析法(ridge regression analysis)、主成分分析法(principal component analysis)、因素分析法(factor analysis)、及广义线性模式(generalized linear model),但不限于此。疾病级数可与代表未患有糖尿病肾病个体中相同生物标记程度之参考值比较。参考值可以常见的方法订定。例如:疾病级数参考值可获自分析未患有糖尿病肾病个体中该蛋白质分子及视需要分析的临床因子之平均值。疾病级数高于参考值则表示患有糖尿病肾病。

[0050] 本发明另一方面涉及一种根据上述任一生物标记,确认糖尿病肾病阶段的方法。为了实施此方法,将糖尿病肾病患者的生物标记程度(最好以疾病级数表示),与一组预定的可区分不同糖尿病肾病阶段的截取值(cutoff value)比较,以确定患者的糖尿病肾病阶段。该截取值可利用相同方法分析不同阶段的糖尿病肾病患者中相同生物标记的值而订定。

[0051] 下列描述为根据不同阶段的糖尿病肾病相关的生物标记,订定前述截取值的例示过程:

[0052] (1) 根据患者的疾病状态(例如:糖尿病肾病阶段及危险因子),将该患者分成不同群;

[0053] (2) 确定每一患者群中构成该生物标记的蛋白质分子及临床因子的程度或值;

[0054] (3) 将该蛋白质程度及临床因子值进行适当分析,建立计算疾病级数的模式(例如:公式);及

[0055] (4) 根据代表各患者群的疾病级数(例如:平均值)及其它相关因子,例如:敏感度(sensitivity)、特异性(specificity)、阳性预测值(positive predictive value;PPV)及阴性预测值(negative predictive value;NPV),以决定每一疾病阶段的截取值。

[0056] 任何由上述所产生的模式可经由接受器操作特征 (receiver-operating characteristic ;ROC) 分析法产生 ROC 曲线, 评估其诊断价值。在 ROC 分析中理想的多变量模式 (multivariable model) 将可得到最大的曲线下面积 (Area under Curve, AUC)。该模式可见下述实施例 1-3。

[0057] 在另一发明方面, 本发明关于一种监测个体中糖尿病肾病发展的方法, 根据前述的任一种生物标记。更具体地说, 来自个体的 2 个尿液样本及 / 或血清样本可在适当期间内 (例如 :2 个星期至 12 个月) 取得及检查, 以测定前述任一生物标记的程度, 之后如上述决定其疾病级数。如果在较晚取得的样本中代表生物标记程度的疾病级数高于较早取得的样本时, 表示该个体的糖尿病肾病恶化。

[0058] 上述监测方法可应用于罹患或具有风险罹患糖尿病肾病的人体。当该个体为具有风险罹患糖尿病肾病或为糖尿病肾病早期阶段时, 可在每 6 ~ 12 个月监测一次该生物标记的程度, 以监测糖尿病肾病的发展。当该个体已为糖尿病肾病晚期阶段时, 最好于每 3 ~ 6 个月检查一次该生物标记的程度。

[0059] 上述的监测方法也可根据一般方法应用于实验室动物, 以研究糖尿病肾病。此述“实验室动物”为通常用于动物试验的脊椎动物, 例如 :小鼠、大鼠、兔、猫、狗、猪、及非人的灵长类动物。实验室动物最好于每 2 ~ 24 个星期检查一次, 确认生物标记的程度。

[0060] 任一个上述的生物标记可用于评估个体 (即人糖尿病肾病患者或患有糖尿病肾病的实验室动物) 的糖尿病肾病治疗的有效性。此方法中, 测定在治疗前、治疗中及治疗后其代表前述生物标记程度的疾病级数。如果在治疗过程中疾病级数维持相同或降低, 表示该治疗为有效。

[0061] 在此亦公开有效于实施任一前述方法的试剂盒。该试剂盒包括 2、3 或 4 种具有不同抗原特异性的抗体。每一种该抗体可结合至 (i)  $\alpha$ -2-HS- 糖蛋白、(ii)  $\alpha$ -1 抗胰蛋白酶、(iii)  $\alpha$ -1 酸性糖蛋白、或 (iv) 骨桥蛋白之其一。与蛋白质 (i)、(ii)、(iii) 及 (iv) 具有特异性结合的抗体可结合至该蛋白质的片段 :MGVVSLGSPSGEVSHPRKT (SEQ ID NO :2), KGKWERPFVEKDTTEEDF (SEQ ID NO :3), MIEQNTKSPLFMGKVVNPTQK (SEQ ID NO :4), EDPQGDAAQKTDTSHHDQDHPTFNKITPNLAEFA (SEQ ID NO :6), GQEHFAHLLILRDTKYMLAFDVNDEKNWGL S (SEQ ID NO :7), YPDAVATWLNPDPSQKQNLAPQNAVS SEETNDFKQETLPSK (SEQ ID NO :8), 或 KYPDAVATWLNPDPSQKQNLAPQTLPSK (SEQ ID NO :9), 亦即对于这些片段中包含的任何抗体表位是特异性的。在一实施例中, 该试剂盒只包含与欲侦测的抗原 (例如 :与糖尿病肾病相关的蛋白质分子) 具有特异性的抗体, 以实施前述的方法。亦即, 该试剂盒基本上由该抗体所组成。

[0062] 前述试剂盒可包括结合于相同抗原的两种不同抗体 (亦即涂布抗体 (coating antibody) 及侦测抗体 (detecting antibody))。一般而言, 侦测抗体藉由自体或连接其它试剂而结合可发出侦测讯号的分子。此述“抗体”为一完整的免疫球蛋白或其片段, 例如 :保留抗原结合活性的 Fab 或 F(ab')<sub>2</sub>。该抗体可自然发生或以基因工程产生 (例如 :单链抗体 (single-chain antibody)、嵌合抗体 (chimeric antibody)、或人源化抗体 (humanized antibody))。

[0063] 本发明试剂盒所含的抗体可获自商业贩售, 或者可由一般方法制造 (例如 :参考 Harlow and Lane, (1988)Antibodies :A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.)。为了制造上列生物标记的抗体, 该生物标记 (marker) 可视需要

连接于携带蛋白（例如：KLH），并与佐剂混合，注射于宿主动物。动物体内产生的抗体之后可经亲和性层析法纯化。通常使用的宿主动物包括兔、小鼠、豚鼠、及大鼠。可用以增加免疫反应的多种佐剂根据宿主种类而选择，可包括弗氏佐剂（Freund's adjuvant）（完全及不完全）；矿物胶，例如氢氧化铝、CpG；表面活性物质，例如溶血卵磷脂（lysolecithin）、多聚醇（Pluronic polyols）、聚阴离子（polyanions）、肽、油乳化剂、匙孔血蓝蛋白（keyhole limpet hemocyanin）及二硝基酚（dinitrophenol）。有用的人用佐剂包括 BCG（分枝杆菌（bacille Calmette-Guerin））及短小棒状杆菌（Corynebacterium parvum）。多克隆抗体，亦即存在于经免疫的动物血清中的异质抗体分子群体。

[0064] 单克隆抗体，亦即同质抗体分子群体，可使用标准的杂交瘤技术制造（例如：参考 Kohler 等（1975）Nature 256,495；Kohler 等（1976）Eur. J. Immunol. 6,511；Kohler 等（1976）Eur J Immunol 6,292；和 Hammerling 等（1981）Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas, Elsevier, N. Y.）。特别是，单克隆抗体可获自培养连续细胞系而生产抗体分子的任何技术，如 Kohler 等（1975）Nature 256,495 及美国专利号 4,376,110 所述；以人 B- 细胞的杂交瘤技术生产者，如 Kosbor 等（1983）Immunol Today 4,72；Cole 等（1983）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80,2026；以 EBV- 杂交瘤生产者，如 Cole 等（1983）Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96。前述抗体可为任何免疫球蛋白族群，包括 IgG, IgM, IgE, IgA, IgD 及其任何的亚类（subclass）。生产本发明的单克隆抗体的杂交瘤可在体外或体内培养。由于杂交瘤具有在体内生产高效价的单克隆抗体的能力，为特别有效的生产方法。

[0065] 而且，抗体片段可由已知方法产生。例如该片段可包含 F(ab)'<sub>2</sub> 片段，可由抗体分子经胃蛋白酶作用而产生，及 Fab 片段，可由还原 F(ab)'<sub>2</sub> 片段的二硫键而产生，但不限于此。

[0066] 没有进一步的阐述，相信本领域技术人员基于前述之说明可利用本发明至最大程度。以下之特定实施例因此仅为说明，不以任何方式限制本文的公开。所有此处引述之公开信息在此并入作为参考。

[0067] 实施例 1：以尿中  $\alpha$ -2-HS- 糖蛋白、尿中  $\alpha$ -1 抗胰蛋白酶、尿中  $\alpha$ -1 酸性糖蛋白、或血清中骨桥蛋白，诊断糖尿病肾病（DN）

[0068] 材料及方法

[0069] (i) 个体

[0070] 由台北三军总医院根据美国糖尿病协会（American Diabetic Association）设立的标准，征募 83 位糖尿病患者（称为 DM 个体）及 82 位糖尿病肾病患者（称为 DN 个体）：

[0071] DM：罹患糖尿病但未罹患糖尿病肾病（标准如下述）；

[0072] DN：罹患糖尿病及尿中蛋白的分泌浓度高于每日 1g、由切片检查确定患有糖尿病肾病、或患有尿毒症。

[0073] 所有个体被分派为训练群（training group）及测试群（testing group），比例为 7：3。

[0074] (ii) 样本收集及处理

[0075] 收集来自上述个体的早晨第一次排出的尿液样本及血清样本。尿液样本中的肽以尿液基质辅助激光解吸 / 电离飞行时间质谱仪（MALDI-TOF-MS）及同重元素相对与绝对定

量标记法 (iTRAQ) 检查。

[0076] 包括  $\alpha$ -2-HS- 糖蛋白 (DN2)、 $\alpha$ -1 抗胰蛋白酶 (DN5)、骨桥蛋白 (DNO)、及  $\alpha$ -1 酸性糖蛋白 (GR3) 的蛋白质分子, 以 ELISA 测量, 确认其在尿液及血清样本中的程度。简单地说, 将尿液样本与蛋白酶抑制剂混合, 与稀释缓冲液稀释为 1 : 100, 血清样本则稀释为 1 : 10。将稀释的样本置于 ELISA 板中进行一式三份重复实验。DNO、DN2、DN5 及 GR3 的程度各以其标准的三明治 ELISA 方法测量。

[0077] 程度的计算使用 4- 参数标准曲线。只纳入包含 CV(%) 低于 15 的标准品及样本, 未符合标准者则重复上述步骤。尿液中的蛋白质浓度以在相同尿液样本中肌酸酐 (creatinine) 浓度校正, 肌酸酐以 Quantichrom Creatinine Assay (BioAssay Systems, (Hayward) California, USA) 测量。(iii) 统计分析

[0078] 测量前述蛋白质分子于尿中及血清中的程度, 经统计分析, 显示其独立的区分 DN 个体及 DM 个体的能力, 其 auROC 范围为 0.44 ~ 0.87。

[0079] 对于每个个体, 各值间的校正根据常态的侦测结果, 以 Spearman 或 Pearson 分析法确认。群间的平均值或中间值的比较以 Student T-test 或非参数的 Mann-Whitney Test 适当比较。当  $p < 0.05$  时为统计学上具显著性。统计上呈现平均值  $\pm$  平均标准差 (SEM) 或作为带有 [25%, 75%] 的中位值。

[0080] 结果

[0081] (i) 患者特征

[0082] 表 1 及表 2 显示训练群及测试群中的患者特征及 DM、DN 群的患者特征。

[0083]

表1. 训练群及测试群的患者特征

|                         | 训练群<br>(n=118)           | 测试群<br>(n=47)             | P 值    |
|-------------------------|--------------------------|---------------------------|--------|
| 年龄, 平均值(SD)             | 59.94 ( 9.37 )           | 60.28 ( 9.48 )            | 0.8362 |
| 女性, n (%)               | 83 (70)                  | 27 (57)                   | 0.16   |
| MDRD_S_GFR, 平均值(SD)     | 86.56 ( 33.11 )          | 83.05 ( 43.96 )           | 0.5785 |
| ACR(ug/mg), 平均值(SD)     | 737.82 ( 1465.47 )       | 1084.18 ( 2030.98 )       | 0.2239 |
| 尿中TP/Cr(mg/mg), 平均值(SD) | 1.01 ( 2.01 )            | 1 ( 1.78 )                | 0.9963 |
| 血清中肌酸酐(mg/dL), 平均值(SD)  | 1.02 ( 0.87 )            | 1.34 ( 1.44 )             | 0.0903 |
| HbA1c (%), 平均值(SD)      | 8.49 ( 1.5 )             | 8.29 ( 2.19 )             | 0.5356 |
| 标记(经肌酸酐调整), 平均值(SD)     |                          |                           |        |
| uDNO(ng/mg)             | 1452.71<br>( 1416.7 )    | 1488.77<br>( 1222.2 )     | 0.8687 |
| sDNO(ng/ml)             | 40.65<br>( 34.52 )       | 38.35<br>( 34.13 )        | 0.6926 |
| uDN2(ng/mg)             | 4225.77<br>( 9279.63 )   | 5999.64<br>( 10305.95 )   | 0.2983 |
| uDN5(ng/mg)             | 15951.12<br>( 94956.78 ) | 45479.82<br>( 199827.84 ) | 0.3228 |
| uGR3(ng/mg)             | 32823.47<br>( 62290.96 ) | 42709.23<br>( 103787.54 ) | 0.5333 |

[0084]

表2. DM群及DN群的患者特征

[0085]

|                          | 训练群(n=118)          |                        |        | 测试群(n=47)          |                        |        |
|--------------------------|---------------------|------------------------|--------|--------------------|------------------------|--------|
|                          | DM (n=61)           | DN (n=57)              | P值     | DM(n=22)           | DN(n=25)               | P 值    |
| 年龄, 平均值(SD)              | 57.11<br>( 8.05 )   | 62.96<br>( 9.8 )       | 0.0006 | 59.09<br>( 8.82 )  | 61.32<br>( 10.09 )     | 0.4230 |
| 女性, n (%)                | 43 (70)             | 40 (70)                | 1.00   | 12 (55)            | 15 (60)                | 0.93   |
| MDRD_S_GFR, 平均值(SD)      | 111.21<br>( 15.75 ) | 60.18<br>( 25.59 )     | <.0001 | 115.6<br>( 33.66 ) | 54.41<br>( 29.79 )     | <.0001 |
| ACR(ug/mg), 平均值(SD)      | 11.35<br>( 6.81 )   | 1515.26<br>( 1815.72 ) | <.0001 | 9.63<br>( 5.61 )   | 2029.78<br>( 2432.31 ) | 0.0004 |
| 尿中 TP/Cr(mg/mg), 平均值(SD) | 0.17<br>( 0.51 )    | 1.9<br>( 2.56 )        | <.0001 | 0.17<br>( 0.32 )   | 1.7<br>( 2.18 )        | 0.0019 |
| 血清中肌酸酐(mg/dL), 平均值(SD)   | 0.66<br>( 0.12 )    | 1.42<br>( 1.12 )       | <.0001 | 0.67<br>( 0.15 )   | 1.92<br>( 1.79 )       | 0.0019 |
| HbA1c (%),平均值(SD)        | 8.34<br>( 1.48 )    | 8.7<br>( 1.53 )        | 0.2311 | 8.37<br>( 1.61 )   | 8.22<br>( 2.66 )       | 0.8238 |

标记(经肌酸酐调整), 平均值(SD)

|             |                      |                         |        |                      |                         |        |
|-------------|----------------------|-------------------------|--------|----------------------|-------------------------|--------|
| uDNO(ng/mg) | 1422.18<br>(1105.46) | 1366.77<br>(1347.92)    | 0.8083 | 1769.54<br>(1260.15) | 1516.44<br>( 1945.7 )   | 0.5953 |
| sDNO(ng/ml) | 29.03<br>(19.32)     | 46.17 ( 37.32)          | 0.0026 | 26.2<br>( 11.53 )    | 64.52<br>( 50.47 )      | 0.0010 |
| uDN2(ng/mg) | 1968.47<br>(4218.58) | 8084.87<br>(13101.68)   | 0.0013 | 968.79<br>(1144.47)  | 7348.69<br>(10865.95)   | 0.0074 |
| uDN5(ng/mg) | 390.24<br>(1327.63)  | 40036.86<br>(147186.58) | 0.0467 | 336.21<br>( 568.08 ) | 71802.69<br>(264863.27) | 0.1899 |
| uGR3(ng/mg) | 3576.06<br>(13562.8) | 67470.92<br>(105208.28) | <.0001 | 2447.77<br>(2742.38) | 71693.1<br>(82996.86)   | 0.0003 |

[0086] 在 DN 个体及 DM 个体中观察到, GFR、ACR、蛋白质及血清中肌酸酐程度在统计学上具显著差异, 性别分布没有差异。

[0087] (ii) DN 相关的蛋白质分子

[0088] 经过尿液蛋白质组 (proteomic) 分析, 下表 3 所列的肽被发现在来自 DM 个体及 DN 个体的尿液样本中为有差异性表现 (differentially presented)。

[0089] 表 3 尿液 / 血清中有差异性表现的肽及蛋白质表列如下

[0090]

| 肽序列                               | 对应的蛋白质                  |
|-----------------------------------|-------------------------|
| VVSLGSPSGEVSHPRKT (SEQ ID NO:1)   | $\alpha$ -2-HS-糖蛋白(DN2) |
| MGVVSLGSPSGEVSHPRKT (SEQ ID NO:2) |                         |

[0091]

|  |               |
|--|---------------|
| KGKWERPFEVKDTEEDF (SEQ ID NO:3)                            | α-1抗胰蛋白酶(DN5) |
| MIEQNTKSPLFMGKVVNPTQK (SEQ ID NO:4)                        |               |
| EDPQGDAQAQKTDTSHHDQDHPTFNKITPNLAE (SEQ ID NO:5)            |               |
| EDPQGDAQAQKTDTSHHDQDHPTFNKITPNLAEFA (SEQ ID NO:6)          |               |
| YPDAVATWLNPDPSQKQ NLLAPQNAVSSSEETNDFKQETLPSK (SEQ ID NO:8) | 骨桥蛋白(DNO)     |
| GQEHFAHLLLRDTKTYMLAFDVNDEKNWGLS (SEQ ID NO:7)              | α-1酸性糖蛋白(GR3) |

[0092] 经过 ELISA 分析,三种尿中蛋白质分子,即 uDN2、uGR3 及 uDN5,及一种血清中蛋白质分子 sDNO,被发现与 DN 有关。如图 1 的图 1A ~ 1D 及上列表 2 所示。更具体地说,相较于 DM 个体(未患 DN 者),DN 个体中 uDN2、uGR3、uDN5 及 sDNO 的程度升高,表示该蛋白质分子为可信赖的 DN 生物标记。而且在具巨量白蛋白尿(macroalbumiuria)(ACR > 300mg/g)现象的 DN 个体中,uDN5 及 uGR3 的程度高于在微量白蛋白尿(microalbumiuria)(ACR30mg/g ~ 300mg/g)现象的 DN 个体的程度。巨量白蛋白尿为 DN 晚期的指标,微量白蛋白尿为 DN 早期的指标。

[0093] 实施例 2 :以 uDN2、uDN5、uGR3、uDNO 及 sDNO 的组合,确认 DN 阶段

[0094] 组合两个蛋白质模式

[0095] 将 DM 个体及 DN 个体中的 uDN2、uDN5、uGR3、uDNO 及 sDNO 之中任两个的程度组合,进行鉴别函数分析法(discriminant function analysis)、逻辑回归分析法(logistic regression analysis)及岭回归分析法(ridge regression analysis)。这些研究中所取得的结果表示,前述五种蛋白质或其片段任两者组合可作为确认 DN 阶段的可靠标记。

[0096] 以下显示为例示的组合两个蛋白质模式,即 uDN5 及 uGR3,包括以此两种蛋白质分子的程度组合计算疾病级数的算式。下表 4 ~ 9 列出截取值、敏感度、特异性、阳性预测值(PPV)及阴性预测值(NPV)、及 ROC 曲线下面积(AUROC)。

[0097] 鉴别函数分析法(discriminant function analysis)疾病级数 =  $0.3303 \times \log_2[uDN5](ng/mg) + 0.2732 \times \log_2[uGR3](ng/mg) + 5$

表4. 以尿中白蛋白程度表示DN早期及晚期的截取值

| [0098]         | 训练组 (n=118) |                       | 测试组 (n=47) |                       |
|----------------|-------------|-----------------------|------------|-----------------------|
|                | DM vs. DN   | DM, 微量白蛋白尿 vs. 巨量白蛋白尿 | DM vs. DN  | DM, 微量白蛋白尿 vs. 巨量白蛋白尿 |
| 截取值            | 11.227      | 11.691                | 11.227     | 11.691                |
| 敏感度(%)         | 93          | 93                    | 96         | 100                   |
| 特异性(%)         | 90          | 90                    | 77         | 83                    |
| [0099] PPV (%) | 90          | 83                    | 83         | 78                    |
| NPV (%)        | 93          | 96                    | 94         | 100                   |
| AUROC          | 0.95        | 0.96                  | 0.98       | 0.96                  |

[0100]

表5. 表示DN阶段1-5的截取值

| DN-阶段   | 训练组 (n=118) |            |            |           | 测试组 (n=47) |            |            |           |
|---------|-------------|------------|------------|-----------|------------|------------|------------|-----------|
|         | 1 vs. 2-5   | 1-2 vs.3-5 | 1-3 vs.4-5 | 1-4 vs. 5 | 1 vs. 2-5  | 1-2 vs.3-5 | 1-3 vs.4-5 | 1-4 vs. 5 |
| 截取值     | 11.066      | 11.227     | 11.691     | 14.017    | 11.066     | 11.227     | 11.691     | 14.017    |
| 敏感度(%)  | 75          | 93         | 93         | 75        | 84         | 96         | 100        | 100       |
| 特异性(%)  | 89          | 90         | 90         | 90        | 75         | 77         | 83         | 80        |
| PPV (%) | 92          | 90         | 83         | 21        | 87         | 83         | 78         | 18        |
| NPV (%) | 69          | 93         | 96         | 99        | 71         | 94         | 100        | 100       |
| AUROC   | 0.86        | 0.95       | 0.96       | 0.95      | 0.9        | 0.98       | 0.96       | 0.91      |

[0101] 逻辑回归分析法 (logistic regression analysis)

[0102] 疾病级数 =  $\exp(\text{Logit\_value}) / (1 + \exp(\text{Logit\_value}))$ , 其中[0103]  $\text{Logit\_value} = -12.5332 + 0.7197 \times \log_2[\text{uDN5}] (\text{ng/mg}) + 0.4941 \times \log_2[\text{uGR3}] (\text{ng/mg})$ 

[0104]

表6. 以尿中白蛋白程度表示DN 早期及晚期的截取值

|         | 训练组 (n=118) |                       | 测试组 (n=47) |                       |
|---------|-------------|-----------------------|------------|-----------------------|
|         | DM vs. DN   | DM, 微量白蛋白尿 vs. 巨量白蛋白尿 | DM vs. DN  | DM, 微量白蛋白尿 vs. 巨量白蛋白尿 |
| 截取值     | 0.445       | 0.676                 | 0.445      | 0.676                 |
| 敏感度(%)  | 93          | 93                    | 100        | 100                   |
| 特异性(%)  | 90          | 90                    | 82         | 83                    |
| PPV (%) | 90          | 83                    | 86         | 78                    |
| [0105]  |             |                       |            |                       |
| NPV (%) | 93          | 96                    | 100        | 100                   |
| AUROC   | 0.95        | 0.96                  | 0.98       | 0.97                  |

[0106]

表7. 表示DN阶段1-5的截取值

| DN-阶段   | 训练组 (n=118) |            |            |           | 测试组 (n=47) |            |            |           |
|---------|-------------|------------|------------|-----------|------------|------------|------------|-----------|
|         | 1 vs. 2-5   | 1-2 vs.3-5 | 1-3 vs.4-5 | 1-4 vs. 5 | 1 vs. 2-5  | 1-2 vs.3-5 | 1-3 vs.4-5 | 1-4 vs. 5 |
| 截取值     | 0.383       | 0.445      | 0.676      | 0.996     | 0.383      | 0.445      | 0.676      | 0.996     |
| 敏感度(%)  | 75          | 93         | 93         | 75        | 84         | 100        | 100        | 50        |
| 特异性(%)  | 89          | 90         | 90         | 90        | 75         | 82         | 83         | 80        |
| PPV (%) | 92          | 90         | 83         | 21        | 87         | 86         | 78         | 10        |
| NPV (%) | 69          | 93         | 96         | 99        | 71         | 100        | 100        | 97        |
| AUROC   | 0.86        | 0.95       | 0.96       | 0.95      | 0.9        | 0.98       | 0.97       | 0.88      |

[0107] 岭回归分析法 (ridge regression analysis) :

[0108] 疾病级数 =  $-1.7697 + 0.1520 \times \log_2[\text{uDN5}] (\text{ng/mg}) + 0.2254 \times \log_2[\text{uGR3}] (\text{ng/mg})$

表8. 以尿中白蛋白程度表示DN 早期及晚期的截取值

|            | 训练组 (n=118) |                       | 测试组 (n=47) |                       |
|------------|-------------|-----------------------|------------|-----------------------|
|            | DM vs. DN   | DM, 微量白蛋白尿 vs. 巨量白蛋白尿 | DM vs. DN  | DM, 微量白蛋白尿 vs. 巨量白蛋白尿 |
| [0109] 截取值 | 2.254       | 2.606                 | 2.254      | 2.606                 |
| 敏感度(%)     | 93          | 93                    | 100        | 94                    |
| 特异性(%)     | 90          | 90                    | 77         | 79                    |
| PPV (%)    | 90          | 83                    | 83         | 74                    |
| NPV (%)    | 93          | 96                    | 100        | 96                    |
| AUROC      | 0.94        | 0.96                  | 0.98       | 0.96                  |

[0110]

表9. 表示DN阶段1-5的截取值

|  | 训练组 (n=118) | 测试组 (n=47) |
|--|-------------|------------|
|--|-------------|------------|

[0111]

| DN-阶段   |           |            |            |           |           |            |            |           |
|---------|-----------|------------|------------|-----------|-----------|------------|------------|-----------|
|         | 1 vs. 2-5 | 1-2 vs.3-5 | 1-3 vs.4-5 | 1-4 vs. 5 | 1 vs. 2-5 | 1-2 vs.3-5 | 1-3 vs.4-5 | 1-4 vs. 5 |
| 截取值     | 2.185     | 2.254      | 2.606      | 4.016     | 2.185     | 2.254      | 2.606      | 4.016     |
| 敏感度(%)  | 75        | 93         | 93         | 75        | 84        | 100        | 94         | 100       |
| 特异性(%)  | 89        | 90         | 90         | 90        | 75        | 77         | 79         | 84        |
| PPV (%) | 92        | 90         | 83         | 21        | 87        | 83         | 74         | 22        |
| NPV (%) | 69        | 93         | 96         | 99        | 71        | 100        | 96         | 100       |
| AUROC   | 0.86      | 0.94       | 0.96       | 0.95      | 0.89      | 0.98       | 0.96       | 0.91      |

[0112] 组合三种蛋白质模式

[0113] 将 DM 个体及 DN 个体中的 uDN2、uDN5、uGR3、uDN0 及 sDN0 之中的任三种蛋白质分子的度组合,进行鉴别函数分析法 (discriminant function analysis)、逻辑回归分析法 (logistic regression analysis)、因素分析法 (factor analysis) 及岭回归分析法 (ridge regression analysis)。这些研究中所得的结果表示,任三种前述蛋白质的组合可作为确认 DN 阶段的可靠标记。

[0114] 以下显示为例示的组合三种蛋白质模式,即 uDN2、uDN5 及 uGR3,包括以此三种蛋白质分子的度组合计算疾病级数的算式。下表 10 ~ 17 列出截取值、敏感度、特异性、PPV、NPV、及 AUROC。

[0115] 鉴别函数分析法 (discriminant function analysis)

[0116] 疾病级数 =  $0.3340 \times \log_2[\text{uDN5}] (\text{ng/mg}) - 0.0142 \times \log_2[\text{uDN2}] (\text{ng/mg}) + 0.2784 \times \log_2[\text{uGR3}] (\text{ng/mg}) + 5$

表10. 以尿中白蛋白程度表示DN早期及晚期的截取值

|                | 训练组 (n=118) |                       | 测试组 (n=47) |                       |
|----------------|-------------|-----------------------|------------|-----------------------|
|                | DM vs. DN   | DM, 微量白蛋白尿 vs. 巨量白蛋白尿 | DM vs. DN  | DM, 微量白蛋白尿 vs. 巨量白蛋白尿 |
| [0117] 截取值     | 11.190      | 11.663                | 11.190     | 11.663                |
| 敏感度(%)         | 93          | 93                    | 96         | 100                   |
| 特异性(%)         | 90          | 90                    | 77         | 83                    |
| PPV (%)        | 90          | 83                    | 83         | 78                    |
| [0118] NPV (%) | 93          | 96                    | 94         | 100                   |
| AUROC          | 0.95        | 0.96                  | 0.98       | 0.96                  |

[0119]

表11. 表示DN阶段1-5的截取值

| DN-阶段   | 训练组 (n=118) |            |            |           | 测试组 (n=47) |            |            |           |
|---------|-------------|------------|------------|-----------|------------|------------|------------|-----------|
|         | 1 vs. 2-5   | 1-2 vs.3-5 | 1-3 vs.4-5 | 1-4 vs. 5 | 1 vs. 2-5  | 1-2 vs.3-5 | 1-3 vs.4-5 | 1-4 vs. 5 |
| 截取值     | 11.064      | 11.190     | 11.663     | 13.986    | 11.064     | 11.190     | 11.663     | 13.986    |
| 敏感度(%)  | 75          | 93         | 93         | 75        | 84         | 96         | 100        | 100       |
| 特异性(%)  | 89          | 90         | 90         | 90        | 75         | 77         | 83         | 82        |
| PPV (%) | 92          | 90         | 83         | 21        | 87         | 83         | 78         | 20        |
| NPV (%) | 69          | 93         | 96         | 99        | 71         | 94         | 100        | 100       |
| AUROC   | 0.87        | 0.95       | 0.96       | 0.95      | 0.9        | 0.98       | 0.96       | 0.91      |

[0120] 因素分析 (factor analysis)

[0121] 疾病级数 =  $0.9190 \times \log_2[\text{uDN5}] (\text{ng/mg}) + 0.6997 \times \log_2[\text{uDN2}] (\text{ng/mg}) + 0.9003 \times \log_2[\text{uGR3}] (\text{ng/mg})$

表12. 以尿中白蛋白程度表示DN 早期及晚期的截取值

|            | 训练组 (n=118) |                       | 测试组 (n=47) |                       |
|------------|-------------|-----------------------|------------|-----------------------|
|            | DM vs. DN   | DM, 微量白蛋白尿 vs. 巨量白蛋白尿 | DM vs. DN  | DM, 微量白蛋白尿 vs. 巨量白蛋白尿 |
| [0122] 截取值 | 26.356      | 28.057                | 26.356     | 28.057                |
| 敏感度(%)     | 84          | 93                    | 88         | 100                   |
| 特异性(%)     | 90          | 90                    | 91         | 86                    |
| PPV (%)    | 89          | 83                    | 92         | 82                    |
| NPV (%)    | 86          | 96                    | 87         | 100                   |
| AUROC      | 0.93        | 0.95                  | 0.99       | 0.97                  |

[0123]

表13. 表示DN阶段1-5的截取值

| DN-阶段   | 训练组 (n=118) |            |            |           | 测试组 (n=47) |            |            |           |
|---------|-------------|------------|------------|-----------|------------|------------|------------|-----------|
|         | 1 vs. 2-5   | 1-2 vs.3-5 | 1-3 vs.4-5 | 1-4 vs. 5 | 1 vs. 2-5  | 1-2 vs.3-5 | 1-3 vs.4-5 | 1-4 vs. 5 |
| 截取值     | 25.669      | 26.356     | 28.057     | 36.464    | 25.669     | 26.356     | 28.057     | 36.464    |
| 敏感度(%)  | 68          | 84         | 93         | 75        | 84         | 88         | 100        | 50        |
| 特异性(%)  | 89          | 90         | 90         | 90        | 88         | 91         | 86         | 84        |
| PPV (%) | 91          | 89         | 83         | 21        | 93         | 92         | 82         | 12        |
| NPV (%) | 63          | 86         | 96         | 99        | 74         | 87         | 100        | 97        |
| AUROC   | 0.83        | 0.93       | 0.95       | 0.95      | 0.91       | 0.99       | 0.97       | 0.86      |

[0124] 逻辑回归分析法 (logistic regression analysis)

[0125] 疾病级数 =  $\exp(\text{Logit\_value}) / (1 + \exp(\text{Logit\_value}))$ , 其中

[0126]  $\text{Logit\_value} = -11.2820 + 0.8810 \times \log_2[\text{uDN5}] (\text{ng/mg}) - 0.3478 \times \log_2[\text{uDN2}] (\text{ng/mg}) + 0.5576 \times \log_2[\text{uGR3}] (\text{ng/mg})$

表14. 以尿中白蛋白程度表示DN 早期及晚期的截取值

|            | 训练组 (n=118) |                       | 测试组 (n=47) |                       |
|------------|-------------|-----------------------|------------|-----------------------|
|            | DM vs. DN   | DM, 微量白蛋白尿 vs. 巨量白蛋白尿 | DM vs. DN  | DM, 微量白蛋白尿 vs. 巨量白蛋白尿 |
| [0127] 截取值 | 0.462       | 0.798                 | 0.462      | 0.798                 |
| 敏感度(%)     | 91          | 88                    | 96         | 94                    |
| 特异性(%)     | 90          | 90                    | 82         | 83                    |
| PPV (%)    | 90          | 82                    | 86         | 77                    |
| NPV (%)    | 92          | 93                    | 95         | 96                    |
| AUROC      | 0.95        | 0.96                  | 0.97       | 0.95                  |

[0128]

表15. 表示DN阶段1-5的截取值

| DN-阶段 | 训练组 (n=118) |            |            |           | 测试组 (n=47) |            |            |           |
|-------|-------------|------------|------------|-----------|------------|------------|------------|-----------|
|       | 1 vs. 2-5   | 1-2 vs.3-5 | 1-3 vs.4-5 | 1-4 vs. 5 | 1 vs. 2-5  | 1-2 vs.3-5 | 1-3 vs.4-5 | 1-4 vs. 5 |

[0129]

|         |       |       |       |       |       |       |       |       |
|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 截取值     | 0.361 | 0.462 | 0.798 | 0.997 | 0.361 | 0.462 | 0.798 | 0.997 |
| 敏感度(%)  | 75    | 91    | 88    | 75    | 90    | 96    | 94    | 100   |
| 特异性(%)  | 89    | 90    | 90    | 90    | 75    | 82    | 83    | 82    |
| PPV (%) | 92    | 90    | 82    | 21    | 88    | 86    | 77    | 20    |
| NPV (%) | 69    | 92    | 93    | 99    | 80    | 95    | 96    | 100   |
| AUROC   | 0.88  | 0.95  | 0.96  | 0.95  | 0.89  | 0.97  | 0.95  | 0.93  |

[0130] 岭回归分析法 (ridge regression analysis) :

[0131] 疾病级数 =  $-1.2900 + 0.1800 \times \log_2[\text{uDN5}] (\text{ng/mg}) - 0.1013 \times \log_2[\text{uDN2}] (\text{ng/mg}) + 0.2505 \times \log_2[\text{uGR3}] (\text{ng/mg})$

表16. 以尿中白蛋白程度表示DN 早期及晚期的截取值

|               | 训练组 (n=118) |                       | 测试组 (n=47) |                       |
|---------------|-------------|-----------------------|------------|-----------------------|
|               | DM vs. DN   | DM, 微量白蛋白尿 vs. 巨量白蛋白尿 | DM vs. DN  | DM, 微量白蛋白尿 vs. 巨量白蛋白尿 |
| 截取值           | 2.122       | 2.831                 | 2.122      | 2.831                 |
| [0132] 敏感度(%) | 95          | 85                    | 100        | 94                    |
| 特异性(%)        | 90          | 90                    | 68         | 86                    |
| PPV (%)       | 90          | 81                    | 78         | 81                    |
| NPV (%)       | 95          | 92                    | 100        | 96                    |
| AUROC         | 0.95        | 0.95                  | 0.97       | 0.95                  |

[0133]

表17. 表示DN阶段1-5的截取值

| DN-阶段  | 训练组 (n=118) |            |            |           | 测试组 (n=47) |            |            |           |
|--------|-------------|------------|------------|-----------|------------|------------|------------|-----------|
|        | 1 vs. 2-5   | 1-2 vs.3-5 | 1-3 vs.4-5 | 1-4 vs. 5 | 1 vs. 2-5  | 1-2 vs.3-5 | 1-3 vs.4-5 | 1-4 vs. 5 |
| 截取值    | 2.083       | 2.122      | 2.831      | 3.943     | 2.083      | 2.122      | 2.831      | 3.943     |
| 敏感度(%) | 78          | 95         | 85         | 75        | 87         | 100        | 94         | 100       |
| 特异性(%) | 89          | 90         | 90         | 90        | 69         | 68         | 86         | 82        |

[0134]

|         |      |      |      |      |      |      |      |      |
|---------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| PPV (%) | 92   | 90   | 81   | 21   | 84   | 78   | 81   | 20   |
| NPV (%) | 71   | 95   | 92   | 99   | 73   | 100  | 96   | 100  |
| AUROC   | 0.88 | 0.95 | 0.95 | 0.95 | 0.89 | 0.97 | 0.95 | 0.93 |

[0135] 组合四种蛋白质模式

[0136] 将DM个体及DN个体中的uDN2、uDN5、uGR3、uDN0及sDN0之中的任四种蛋白质分子的程度组合,进行鉴别函数分析法(discriminant function analysis)、逻辑回归分析法(logistic regression analysis)、因素分析法(factor analysis)及岭回归分析法(ridge regression analysis)。这些研究中所得的结果表示,前述五种蛋白质或其片段的任四种组合可作为确认DN阶段的可信赖标记。

[0137] 以下显示为例示的组合四种蛋白质模式,即uDN2、uDN5、uGR3及sDN0,包括以此四种蛋白质分子的程度组合计算疾病级数的算式。下表18~25列出截取值、敏感度、特异性、PPV、NPV、及AUROC。

[0138] 鉴别函数分析法(discriminant function analysis)

[0139] 疾病级数 =  $0.2972 \times \log_2[\text{uDN5}] (\text{ng/mg}) + 0.0159 \times \log_2[\text{uDN2}] (\text{ng/mg}) + 0.2014 \times \log_2[\text{uGR3}] (\text{ng/mg}) + 0.5688 \times \log_2[\text{sDN0}] (\text{ng/ml}) + 5$

表18. 以尿中白蛋白程度表示DN早期及晚期的截取值

|               | 训练组 (n=118) |                       | 测试组 (n=47) |                       |
|---------------|-------------|-----------------------|------------|-----------------------|
|               | DM vs. DN   | DM, 微量白蛋白尿 vs. 巨量白蛋白尿 | DM vs. DN  | DM, 微量白蛋白尿 vs. 巨量白蛋白尿 |
| 截取值           | 12.945      | 13.520                | 12.945     | 13.520                |
| [0140] 敏感度(%) | 88          | 95                    | 96         | 100                   |
| 特异性(%)        | 90          | 90                    | 82         | 86                    |
| PPV (%)       | 89          | 83                    | 86         | 82                    |
| NPV (%)       | 89          | 97                    | 95         | 100                   |
| AUROC         | 0.94        | 0.96                  | 0.97       | 0.97                  |

[0141]

表19. 表示DN阶段1-5的截取值

| DN-阶段   | 训练组 (n=118) |            |            |           | 测试组 (n=47) |            |            |           |
|---------|-------------|------------|------------|-----------|------------|------------|------------|-----------|
|         | 1 vs. 2-5   | 1-2 vs.3-5 | 1-3 vs.4-5 | 1-4 vs. 5 | 1 vs. 2-5  | 1-2 vs.3-5 | 1-3 vs.4-5 | 1-4 vs. 5 |
| 截取值     | 12.887      | 12.945     | 13.520     | 15.560    | 12.887     | 12.945     | 13.520     | 15.560    |
| 敏感度(%)  | 73          | 88         | 95         | 100       | 81         | 96         | 100        | 100       |
| 特异性(%)  | 89          | 90         | 90         | 90        | 81         | 82         | 86         | 82        |
| PPV (%) | 91          | 89         | 83         | 27        | 89         | 86         | 82         | 20        |
| NPV (%) | 67          | 89         | 97         | 100       | 68         | 95         | 100        | 100       |
| AUROC   | 0.87        | 0.94       | 0.96       | 0.97      | 0.93       | 0.97       | 0.97       | 0.89      |

[0142] 因素分析 (factor analysis)

[0143] 疾病级数 =  $0.9132 \times \log_2[\text{uDN5}] (\text{ng/mg}) + 0.6950 \times \log_2[\text{uDN2}] (\text{ng/mg}) + 0.9080 \times \log_2[\text{uGR3}] (\text{ng/mg}) + 0.4549 \times \log_2[\text{sDNO}] (\text{ng/ml})$

表20. 以尿中白蛋白程度表示DN 早期及晚期的截取值

|               | 训练组 (n=118) |                       | 测试组 (n=47) |                       |
|---------------|-------------|-----------------------|------------|-----------------------|
|               | DM vs. DN   | DM, 微量白蛋白尿 vs. 巨量白蛋白尿 | DM vs. DN  | DM, 微量白蛋白尿 vs. 巨量白蛋白尿 |
| 截取值           | 28.459      | 30.095                | 28.459     | 30.095                |
| [0144] 敏感度(%) | 82          | 93                    | 92         | 100                   |
| 特异性(%)        | 90          | 90                    | 91         | 83                    |
| PPV (%)       | 89          | 83                    | 92         | 78                    |
| NPV (%)       | 85          | 96                    | 91         | 100                   |
| AUROC         | 0.93        | 0.96                  | 0.99       | 0.98                  |

[0145]

表21. 表示DN阶段1-5的截取值

| DN-阶段 | 训练组 (n=118) |            |            |           | 测试组 (n=47) |            |            |           |
|-------|-------------|------------|------------|-----------|------------|------------|------------|-----------|
|       | 1 vs. 2-5   | 1-2 vs.3-5 | 1-3 vs.4-5 | 1-4 vs. 5 | 1 vs. 2-5  | 1-2 vs.3-5 | 1-3 vs.4-5 | 1-4 vs. 5 |
| 截取值   | 28.347      | 28.459     | 30.095     | 38.624    | 28.347     | 28.459     | 30.095     | 38.624    |

[0146]

|         |      |      |      |      |      |      |      |      |
|---------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 敏感度(%)  | 67   | 82   | 93   | 75   | 81   | 92   | 100  | 50   |
| 特异性(%)  | 89   | 90   | 90   | 90   | 94   | 91   | 83   | 84   |
| PPV (%) | 91   | 89   | 83   | 21   | 96   | 92   | 78   | 12   |
| NPV (%) | 62   | 85   | 96   | 99   | 71   | 91   | 100  | 97   |
| AUROC   | 0.84 | 0.93 | 0.96 | 0.95 | 0.92 | 0.99 | 0.98 | 0.86 |

[0147] 逻辑回归分析法 (logistic regression analysis)

[0148] 疾病级数 =  $\exp(\text{Logit\_value}) / (1 + \exp(\text{Logit\_value}))$ , 其中

[0149]  $\text{Logit\_value} = -13.7529 + 0.9460 \times \log_2[\text{uDN5}] (\text{ng/mg}) - 0.3110 \times \log_2[\text{uDN2}] (\text{ng/mg}) + 0.4957 \times \log_2[\text{uGR3}] (\text{ng/mg}) + 0.4787 \times \log_2[\text{sDN0}] (\text{ng/ml})$

表22. 以尿中白蛋白程度表示DN 早期及晚期的截取值

|               | 训练组 (n=118) |                       | 测试组 (n=47) |                       |
|---------------|-------------|-----------------------|------------|-----------------------|
|               | DM vs. DN   | DM, 微量白蛋白尿 vs. 巨量白蛋白尿 | DM vs. DN  | DM, 微量白蛋白尿 vs. 巨量白蛋白尿 |
| 截取值           | 0.423       | 0.804                 | 0.423      | 0.804                 |
| [0150] 敏感度(%) | 91          | 88                    | 96         | 100                   |
| 特异性(%)        | 90          | 90                    | 77         | 86                    |
| PPV (%)       | 90          | 82                    | 83         | 82                    |
| NPV (%)       | 92          | 93                    | 94         | 100                   |
| AUROC         | 0.96        | 0.96                  | 0.97       | 0.96                  |

[0151]

表23. 表示DN阶段1-5的截取值

| DN-阶段   | 训练组 (n=118) |             |             |           | 测试组 (n=47) |             |             |           |
|---------|-------------|-------------|-------------|-----------|------------|-------------|-------------|-----------|
|         | 1 vs. 2-5   | 1-2 vs. 3-5 | 1-3 vs. 4-5 | 1-4 vs. 5 | 1 vs. 2-5  | 1-2 vs. 3-5 | 1-3 vs. 4-5 | 1-4 vs. 5 |
| 截取值     | 0.341       | 0.423       | 0.804       | 0.998     | 0.341      | 0.423       | 0.804       | 0.998     |
| 敏感度(%)  | 75          | 91          | 88          | 75        | 90         | 96          | 100         | 100       |
| 特异性(%)  | 89          | 90          | 90          | 90        | 75         | 77          | 86          | 82        |
| PPV (%) | 92          | 90          | 82          | 21        | 88         | 83          | 82          | 20        |
| NPV (%) | 69          | 92          | 93          | 99        | 80         | 94          | 100         | 100       |

[0152]

|       |      |      |      |      |      |      |      |     |
|-------|------|------|------|------|------|------|------|-----|
| AUROC | 0.89 | 0.96 | 0.96 | 0.96 | 0.91 | 0.97 | 0.96 | 0.9 |
|-------|------|------|------|------|------|------|------|-----|

[0153] 岭回归分析法 (ridge regression analysis) :

[0154] 疾病级数 =  $-1.7588 + 0.1729 \times \log_2[\text{uDN5}] (\text{ng/mg}) - 0.0971 \times \log_2[\text{uDN2}] (\text{ng/mg}) + 0.2381 \times \log_2[\text{uGR3}] (\text{ng/mg}) + 0.1312 \times \log_2[\text{sDN0}] (\text{ng/ml})$

[0155]

表24. 以尿中白蛋白程度表示DN 早期及晚期的截取值

|         | 训练组 (n=118) |                       | 测试组 (n=47) |                       |
|---------|-------------|-----------------------|------------|-----------------------|
|         | DM vs. DN   | DM, 微量白蛋白尿 vs. 巨量白蛋白尿 | DM vs. DN  | DM, 微量白蛋白尿 vs. 巨量白蛋白尿 |
| 截取值     | 2.261       | 2.854                 | 2.261      | 2.854                 |
| 敏感度(%)  | 91          | 85                    | 96         | 94                    |
| 特异性(%)  | 90          | 90                    | 77         | 90                    |
| PPV (%) | 90          | 81                    | 83         | 85                    |
| NPV (%) | 92          | 92                    | 94         | 96                    |
| AUROC   | 0.95        | 0.95                  | 0.97       | 0.95                  |

[0156]

表25. 表示DN阶段1-5的截取值

| DN-阶段   | 训练组 (n=118) |            |            |           | 测试组 (n=47) |            |            |           |
|---------|-------------|------------|------------|-----------|------------|------------|------------|-----------|
|         | 1 vs. 2-5   | 1-2 vs.3-5 | 1-3 vs.4-5 | 1-4 vs. 5 | 1 vs. 2-5  | 1-2 vs.3-5 | 1-3 vs.4-5 | 1-4 vs. 5 |
| 截取值     | 2.079       | 2.261      | 2.854      | 3.950     | 2.079      | 2.261      | 2.854      | 3.950     |
| 敏感度(%)  | 77          | 91         | 85         | 75        | 87         | 96         | 94         | 100       |
| 特异性(%)  | 89          | 90         | 90         | 90        | 69         | 77         | 90         | 82        |
| PPV (%) | 92          | 90         | 81         | 21        | 84         | 83         | 85         | 20        |
| NPV (%) | 70          | 92         | 92         | 99        | 73         | 94         | 96         | 100       |
| AUROC   | 0.89        | 0.95       | 0.95       | 0.95      | 0.89       | 0.97       | 0.95       | 0.93      |

[0157] 组合五种蛋白质模式

[0158] 将DM个体及DN个体中的uDN2、uDN5、uGR3、uDN0及sDN0的程度组合,进行鉴别函数分析法(discriminant function analysis)、逻辑回归分析法(logistic regression analysis)、因素分析法(factor analysis)及岭回归分析法(ridge regression

analysis)。这些研究中所获得的结果表示,前述五种蛋白质或其片段的组合可作为确认 DN 阶段的可靠标记。

[0159] 以下显示以前述的五种蛋白质分子的程度组合计算疾病级数的算式,及下表 26 ~ 33 列出截取值、敏感度、特异性、PPV、NPV、及 AUROC,作为组合五种蛋白质模式。

[0160] 鉴别函数分析法 (discriminant function analysis)

[0161] 疾病级数 =  $0.2780 \times \log_2[\text{uDN5}] (\text{ng/mg}) + 0.0231 \times \log_2[\text{uDN2}] (\text{ng/mg}) + 0.2236 \times \log_2[\text{uGR3}] (\text{ng/mg}) + 0.6043 \times \log_2[\text{sdNO}] (\text{ng/ml}) - 0.1513 \times \log_2[\text{uDN0}] (\text{ng/mg}) + 5$

表26. 以尿中白蛋白程度表示DN早期及晚期的截取值

|               | 训练组 (n=118) |                       | 测试组 (n=47) |                       |
|---------------|-------------|-----------------------|------------|-----------------------|
|               | DM vs. DN   | DM, 微量白蛋白尿 vs. 巨量白蛋白尿 | DM vs. DN  | DM, 微量白蛋白尿 vs. 巨量白蛋白尿 |
| 截取值           | 11.818      | 12.164                | 11.818     | 12.164                |
| [0162] 敏感度(%) | 86          | 98                    | 96         | 100                   |
| 特异性(%)        | 90          | 90                    | 86         | 86                    |
| PPV (%)       | 89          | 83                    | 89         | 82                    |
| NPV (%)       | 87          | 99                    | 95         | 100                   |
| AUROC         | 0.94        | 0.97                  | 0.98       | 0.98                  |

[0163]

表27. 表示DN阶段1-5的截取值

| DN-阶段  | 训练组 (n=118) |            |            |           | 测试组 (n=47) |            |            |           |
|--------|-------------|------------|------------|-----------|------------|------------|------------|-----------|
|        | 1 vs. 2-5   | 1-2 vs.3-5 | 1-3 vs.4-5 | 1-4 vs. 5 | 1 vs. 2-5  | 1-2 vs.3-5 | 1-3 vs.4-5 | 1-4 vs. 5 |
| 截取值    | 11.766      | 11.818     | 12.164     | 14.432    | 11.766     | 11.818     | 12.164     | 14.432    |
| 敏感度(%) | 73          | 86         | 98         | 100       | 81         | 96         | 100        | 100       |

[0164]

|         |      |      |      |      |      |      |      |      |
|---------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 特异性(%)  | 89   | 90   | 90   | 90   | 88   | 86   | 86   | 82   |
| PPV (%) | 91   | 89   | 83   | 27   | 93   | 89   | 82   | 20   |
| NPV (%) | 67   | 87   | 99   | 100  | 70   | 95   | 100  | 100  |
| AUROC   | 0.86 | 0.94 | 0.97 | 0.98 | 0.94 | 0.98 | 0.98 | 0.91 |

[0165] 因素分析 (factor analysis)

[0166] 疾病级数 =  $0.9117 \times \log_2[\text{uDN5}] (\text{ng/mg}) + 0.6949 \times \log_2[\text{uDN2}] (\text{ng/mg}) + 0.9095 \times \log_2[\text{uGR3}] (\text{ng/mg}) + 0.4554 \times \log_2[\text{sDN0}] (\text{ng/ml}) + 0.0384 \times \log_2[\text{uDN0}] (\text{ng/mg})$

表28. 以尿中白蛋白程度表示DN 早期及晚期的截取值

|               | 训练组 (n=118) |                       | 测试组 (n=47) |                       |
|---------------|-------------|-----------------------|------------|-----------------------|
|               | DM vs. DN   | DM, 微量白蛋白尿 vs. 巨量白蛋白尿 | DM vs. DN  | DM, 微量白蛋白尿 vs. 巨量白蛋白尿 |
| 截取值           | 29.475      | 30.541                | 29.475     | 30.541                |
| [0167] 敏感度(%) | 81          | 93                    | 88         | 100                   |
| 特异性(%)        | 90          | 90                    | 91         | 83                    |
| PPV (%)       | 88          | 83                    | 92         | 78                    |
| NPV (%)       | 83          | 96                    | 87         | 100                   |
| AUROC         | 0.93        | 0.96                  | 0.99       | 0.98                  |

[0168]

表29. 表示DN阶段1-5的截取值

| DN-阶段   | 训练组 (n=118) |            |            |           | 测试组 (n=47) |            |            |           |
|---------|-------------|------------|------------|-----------|------------|------------|------------|-----------|
|         | 1 vs. 2-5   | 1-2 vs.3-5 | 1-3 vs.4-5 | 1-4 vs. 5 | 1 vs. 2-5  | 1-2 vs.3-5 | 1-3 vs.4-5 | 1-4 vs. 5 |
| 截取值     | 28.740      | 29.475     | 30.541     | 39.042    | 28.740     | 29.475     | 30.541     | 39.042    |
| 敏感度(%)  | 67          | 81         | 93         | 75        | 81         | 88         | 100        | 50        |
| 特异性(%)  | 89          | 90         | 90         | 90        | 94         | 91         | 83         | 84        |
| PPV (%) | 91          | 88         | 83         | 21        | 96         | 92         | 78         | 12        |
| NPV (%) | 62          | 83         | 96         | 99        | 71         | 87         | 100        | 97        |

[0169]

|       |      |      |      |      |      |      |      |      |
|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| AUROC | 0.84 | 0.93 | 0.96 | 0.95 | 0.92 | 0.99 | 0.98 | 0.86 |
|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|

[0170] 逻辑回归分析法 (logistic regression analysis)

[0171] 疾病级数 =  $\exp(\text{Logit value}) / (1 + \exp(\text{Logit\_value}))$ , 其中

[0172]  $\text{Logit\_value} = -11.4318 + 0.8188 \times \log_2[\text{uDN5}] (\text{ng/mg}) - 0.5376 \times \log_2[\text{uDN2}] (\text{ng/mg}) + 0.7561 \times \log_2[\text{uGR3}] (\text{ng/mg}) + 0.3940 \times \log_2[\text{sDN0}] (\text{ng/ml}) - 0.1741 \times \log_2[\text{uDN0}] (\text{ng/mg})$

表30. 以尿中白蛋白程度表示DN 早期及晚期的截取值

|               | 训练组 (n=118) |                       | 测试组 (n=47) |                       |
|---------------|-------------|-----------------------|------------|-----------------------|
|               | DM vs. DN   | DM, 微量白蛋白尿 vs. 巨量白蛋白尿 | DM vs. DN  | DM, 微量白蛋白尿 vs. 巨量白蛋白尿 |
| 截取值           | 0.436       | 0.780                 | 0.436      | 0.780                 |
| [0173] 敏感度(%) | 91          | 93                    | 96         | 100                   |
| 特异性(%)        | 90          | 90                    | 77         | 86                    |
| PPV (%)       | 90          | 83                    | 83         | 82                    |
| NPV (%)       | 92          | 96                    | 94         | 100                   |
| AUROC         | 0.96        | 0.96                  | 0.97       | 0.96                  |

[0174]

表31. 表示DN阶段1-5的截取值

| DN-阶段   | 训练组 (n=118) |            |            |           | 测试组 (n=47) |            |            |           |
|---------|-------------|------------|------------|-----------|------------|------------|------------|-----------|
|         | 1 vs. 2-5   | 1-2 vs.3-5 | 1-3 vs.4-5 | 1-4 vs. 5 | 1 vs. 2-5  | 1-2 vs.3-5 | 1-3 vs.4-5 | 1-4 vs. 5 |
| 截取值     | 0.329       | 0.436      | 0.780      | 0.997     | 0.329      | 0.436      | 0.780      | 0.997     |
| 敏感度(%)  | 75          | 91         | 93         | 100       | 90         | 96         | 100        | 100       |
| 特异性(%)  | 89          | 90         | 90         | 90        | 75         | 77         | 86         | 80        |
| PPV (%) | 92          | 90         | 83         | 27        | 88         | 83         | 82         | 18        |
| NPV (%) | 69          | 92         | 96         | 100       | 80         | 94         | 100        | 100       |
| AUROC   | 0.89        | 0.96       | 0.96       | 0.96      | 0.91       | 0.97       | 0.96       | 0.91      |

[0175] 岭回归分析法 (ridge regression analysis) :

[0176] 疾病级数 =  $-1.3112 + 0.1648 \times \log_2[\text{uDN5}] (\text{ng/mg}) - 0.0968 \times \log_2[\text{uDN2}] (\text{ng/mg}) + 0.2468 \times \log_2[\text{uGR3}] (\text{ng/mg}) + 0.1426 \times \log_2[\text{sDN0}] (\text{ng/ml}) - 0.0552 \times \log_2[\text{uDN0}] (\text{ng/mg})$

表32. 以尿中白蛋白程度表示DN 早期及晚期的截取值

|               | 训练组 (n=118) |                       | 测试组 (n=47) |                       |
|---------------|-------------|-----------------------|------------|-----------------------|
|               | DM vs. DN   | DM, 微量白蛋白尿 vs. 巨量白蛋白尿 | DM vs. DN  | DM, 微量白蛋白尿 vs. 巨量白蛋白尿 |
| 截取值           | 2.244       | 2.729                 | 2.244      | 2.729                 |
| [0177] 敏感度(%) | 91          | 88                    | 96         | 100                   |
| 特异性(%)        | 90          | 90                    | 82         | 90                    |
| PPV (%)       | 90          | 82                    | 86         | 86                    |
| NPV (%)       | 92          | 93                    | 95         | 100                   |
| AUROC         | 0.95        | 0.95                  | 0.98       | 0.97                  |

[0178]

表33. 表示DN阶段1-5的截取值

| DN-阶段   | 训练组 (n=118) |            |            |           | 测试组 (n=47) |            |            |           |
|---------|-------------|------------|------------|-----------|------------|------------|------------|-----------|
|         | 1 vs. 2-5   | 1-2 vs.3-5 | 1-3 vs.4-5 | 1-4 vs. 5 | 1 vs. 2-5  | 1-2 vs.3-5 | 1-3 vs.4-5 | 1-4 vs. 5 |
| 截取值     | 2.043       | 2.244      | 2.729      | 3.913     | 2.043      | 2.244      | 2.729      | 3.913     |
| 敏感度(%)  | 77          | 91         | 88         | 100       | 87         | 96         | 100        | 100       |
| 特异性(%)  | 89          | 90         | 90         | 90        | 69         | 82         | 90         | 80        |
| PPV (%) | 92          | 90         | 82         | 27        | 84         | 86         | 86         | 18        |
| NPV (%) | 70          | 92         | 93         | 100       | 73         | 95         | 100        | 100       |
| AUROC   | 0.89        | 0.95       | 0.95       | 0.96      | 0.9        | 0.98       | 0.97       | 0.93      |

[0179] 实施例 3 :以 uDN2、uDN5、uGR3、及年龄的组合确认 DN 阶段

[0180] 以下根据三种蛋白质分子 uDN2、uDN5 及 uGR3 的生物标记程度, 及一个临床因子 (年龄) 的组合, 以鉴别函数分析法 (discriminant function analysis)、逻辑回归分析法 (logistic regression analysis)、因素分析法 (factor analysis) 及岭回归分析法 (ridge regression analysis) 及下列算式计算疾病级数。下表 34 ~ 41 列出此模式的截取值、敏感度、特异性、PPV、NPV、及 AUROC。

[0181] 鉴别函数分析法 (discriminant function analysis)

[0182] 疾病级数 =  $0.3342 \times \log_2[\text{uDN5}] (\text{ng/mg}) - 0.0201 \times \log_2[\text{uDN2}] (\text{ng/mg}) + 0.2826 \times \log_2[\text{uGR3}] (\text{ng/mg}) + 0.0059 \times \text{年龄} (\text{岁}) + 5$

表34. 以尿中白蛋白程度表示DN早期及晚期的截取值

|               | 训练组 (n=118) |                       | 测试组 (n=47) |                       |
|---------------|-------------|-----------------------|------------|-----------------------|
|               | DM vs. DN   | DM, 微量白蛋白尿 vs. 巨量白蛋白尿 | DM vs. DN  | DM, 微量白蛋白尿 vs. 巨量白蛋白尿 |
| 截取值           | 11.515      | 12.088                | 11.515     | 12.088                |
| [0183] 敏感度(%) | 93          | 93                    | 100        | 100                   |
| 特异性(%)        | 90          | 90                    | 77         | 79                    |
| PPV (%)       | 90          | 83                    | 83         | 75                    |
| NPV (%)       | 93          | 96                    | 100        | 100                   |
| AUROC         | 0.95        | 0.96                  | 0.98       | 0.97                  |

[0184]

表35. 表示DN阶段1-5的截取值

| DN-阶段   | 训练组 (n=118) |            |            |           | 测试组 (n=47) |            |            |           |
|---------|-------------|------------|------------|-----------|------------|------------|------------|-----------|
|         | 1 vs. 2-5   | 1-2 vs.3-5 | 1-3 vs.4-5 | 1-4 vs. 5 | 1 vs. 2-5  | 1-2 vs.3-5 | 1-3 vs.4-5 | 1-4 vs. 5 |
| 截取值     | 11.353      | 11.515     | 12.088     | 14.343    | 11.353     | 11.515     | 12.088     | 14.343    |
| 敏感度(%)  | 75          | 93         | 93         | 75        | 84         | 100        | 100        | 100       |
| 特异性(%)  | 89          | 90         | 90         | 90        | 75         | 77         | 79         | 80        |
| PPV (%) | 92          | 90         | 83         | 21        | 87         | 83         | 75         | 18        |
| NPV (%) | 69          | 93         | 96         | 99        | 71         | 100        | 100        | 100       |
| AUROC   | 0.87        | 0.95       | 0.96       | 0.95      | 0.9        | 0.98       | 0.97       | 0.9       |

[0185] 因素分析 (factor analysis)

[0186] 疾病级数 =  $0.9184 \times \log_2[\text{uDN5}] (\text{ng/mg}) + 0.7006 \times \log_2[\text{uDN2}] (\text{ng/mg}) + 0.9005 \times \log_2[\text{uGR3}] (\text{ng/mg}) + 0.1863 \times \text{年龄} (\text{岁})$

[0187]

表36. 以尿中白蛋白程度表示DN 早期及晚期的截取值

|         | 训练组 (n=118) |                       | 测试组 (n=47) |                       |
|---------|-------------|-----------------------|------------|-----------------------|
|         | DM vs. DN   | DM, 微量白蛋白尿 vs. 巨量白蛋白尿 | DM vs. DN  | DM, 微量白蛋白尿 vs. 巨量白蛋白尿 |
| 截取值     | 38.341      | 40.075                | 38.341     | 40.075                |
| 敏感度 (%) | 82          | 85                    | 96         | 100                   |
| 特异性(%)  | 90          | 90                    | 86         | 83                    |
| PPV (%) | 89          | 81                    | 89         | 78                    |
| NPV (%) | 85          | 92                    | 95         | 100                   |
| AUROC   | 0.93        | 0.94                  | 0.99       | 0.98                  |

[0188]

表37. 表示DN阶段1-5的截取值

| DN-阶段   | 训练组 (n=118) |            |            |           | 测试组 (n=47) |            |            |           |
|---------|-------------|------------|------------|-----------|------------|------------|------------|-----------|
|         | 1 vs. 2-5   | 1-2 vs.3-5 | 1-3 vs.4-5 | 1-4 vs. 5 | 1 vs. 2-5  | 1-2 vs.3-5 | 1-3 vs.4-5 | 1-4 vs. 5 |
| 患者数(%)  | 73 (62)     | 57 (48)    | 41 (35)    | 4 (3)     | 31 (66)    | 25 (53)    | 18 (38)    | 2 (4)     |
| 截取值     | 38.341      | 38.341     | 40.075     | 48.538    | 38.341     | 38.341     | 40.075     | 48.538    |
| 敏感度(%)  | 66          | 82         | 85         | 50        | 81         | 96         | 100        | 50        |
| 特异性(%)  | 89          | 90         | 90         | 90        | 88         | 86         | 83         | 89        |
| PPV (%) | 91          | 89         | 81         | 15        | 93         | 89         | 78         | 17        |
| NPV (%) | 62          | 85         | 92         | 98        | 70         | 95         | 100        | 98        |
| AUROC   | 0.82        | 0.93       | 0.94       | 0.91      | 0.9        | 0.99       | 0.98       | 0.77      |

[0189] 逻辑回归分析法 (logistic regression analysis)

[0190] 疾病级数 =  $\exp(\text{Logit\_value}) / (1 + \exp(\text{Logit\_value}))$ , 其中[0191]  $\text{Logit\_value} = -15.9748 + 0.8688 \times \log_2[\text{uDN5}] (\text{ng/mg}) - 0.4966 \times \log_2[\text{uDN2}] (\text{ng/mg}) + 0.6436 \times \log_2[\text{uGR3}] (\text{ng/mg}) + 0.0879 \times \text{年龄} (\text{岁})$ 

[0192] 表38. 以尿中白蛋白程度表示DN 早期及晚期的截取值

|               | 训练组 (n=118) |                       | 测试组 (n=47) |                       |
|---------------|-------------|-----------------------|------------|-----------------------|
|               | DM vs. DN   | DM, 微量白蛋白尿 vs. 巨量白蛋白尿 | DM vs. DN  | DM, 微量白蛋白尿 vs. 巨量白蛋白尿 |
| 截取值           | 0.321       | 0.889                 | 0.321      | 0.889                 |
| [0193] 敏感度(%) | 93          | 80                    | 100        | 94                    |
| 特异性(%)        | 90          | 90                    | 77         | 83                    |
| PPV (%)       | 90          | 80                    | 83         | 77                    |
| NPV (%)       | 93          | 90                    | 100        | 96                    |
| AUROC         | 0.96        | 0.95                  | 0.97       | 0.95                  |

[0194]

表39. 表示DN阶段1-5的截取值

| DN-阶段   | 训练组 (n=118) |            |            |           | 测试组 (n=47) |            |            |           |
|---------|-------------|------------|------------|-----------|------------|------------|------------|-----------|
|         | 1 vs. 2-5   | 1-2 vs.3-5 | 1-3 vs.4-5 | 1-4 vs. 5 | 1 vs. 2-5  | 1-2 vs.3-5 | 1-3 vs.4-5 | 1-4 vs. 5 |
| 截取值     | 0.301       | 0.321      | 0.889      | 0.997     | 0.301      | 0.321      | 0.889      | 0.997     |
| 敏感度(%)  | 75          | 93         | 80         | 75        | 87         | 100        | 94         | 100       |
| 特异性(%)  | 89          | 90         | 90         | 90        | 75         | 77         | 83         | 89        |
| PPV (%) | 92          | 90         | 80         | 21        | 87         | 83         | 77         | 29        |
| NPV (%) | 69          | 93         | 90         | 99        | 75         | 100        | 96         | 100       |
| AUROC   | 0.89        | 0.96       | 0.95       | 0.92      | 0.88       | 0.97       | 0.95       | 0.91      |

[0195] 岭回归分析法 (ridge regression analysis) :

[0196] 疾病级数 =  $-2.1690 + 0.1771 \times \log_2[\text{uDN5}] (\text{ng/mg}) - 0.1074 \times \log_2[\text{uDN2}] (\text{ng/mg}) + 0.2474 \times \log_2[\text{uGR3}] (\text{ng/mg}) + 0.0168 \times \text{年龄} (\text{岁})$

[0197]

表40. 以尿中白蛋白程度表示DN 早期及晚期的截取值

|        | 训练组 (n=118) |                       | 测试组 (n=47) |                       |
|--------|-------------|-----------------------|------------|-----------------------|
|        | DM vs. DN   | DM, 微量白蛋白尿 vs. 巨量白蛋白尿 | DM vs. DN  | DM, 微量白蛋白尿 vs. 巨量白蛋白尿 |
| 截取值    | 2.139       | 2.880                 | 2.139      | 2.880                 |
| 敏感度(%) | 93          | 85                    | 100        | 89                    |

[0198]

|         |      |      |      |      |
|---------|------|------|------|------|
| 特异性(%)  | 90   | 90   | 73   | 83   |
| PPV (%) | 90   | 81   | 81   | 76   |
| NPV (%) | 93   | 92   | 100  | 92   |
| AUROC   | 0.96 | 0.95 | 0.98 | 0.96 |

表41. 表示DN阶段1-5的截取值

| DN-阶段   | 训练组 (n=118) |            |            |           | 测试组 (n=47) |            |            |           |
|---------|-------------|------------|------------|-----------|------------|------------|------------|-----------|
|         | 1 vs. 2-5   | 1-2 vs.3-5 | 1-3 vs.4-5 | 1-4 vs. 5 | 1 vs. 2-5  | 1-2 vs.3-5 | 1-3 vs.4-5 | 1-4 vs. 5 |
| 截取值     | 2.128       | 2.139      | 2.880      | 4.051     | 2.128      | 2.139      | 2.880      | 4.051     |
| 敏感度(%)  | 75          | 93         | 85         | 75        | 84         | 100        | 89         | 100       |
| 特异性(%)  | 89          | 90         | 90         | 90        | 69         | 73         | 83         | 89        |
| PPV (%) | 92          | 90         | 81         | 21        | 84         | 81         | 76         | 29        |
| NPV (%) | 69          | 93         | 92         | 99        | 69         | 100        | 92         | 100       |
| AUROC   | 0.89        | 0.96       | 0.95       | 0.92      | 0.89       | 0.98       | 0.96       | 0.92      |

[0199] 其它实施方案

[0200] 本说明书所公开之所有特征可以任何组合方式而组合在一起。本说明书公开的每一特征可由产生相同、相等或相似的目的之特征所替代。因此,除非有明确地说明,此述的所有特征仅为相等或相似特征的例示。

[0201] 从上述说明,本领域技术人员可容易了解本发明的必要特征,且在不偏离本发明之精神及范围下,可对本发明作出多种变化及改良,以调整为各种用途及条件。因此,其它实施方案亦包含于权利要求中。

[0001]

## 序列表

- <110> 财团法人工业技术研究院  
Lin, Wei-Ya  
Yeh, Mary Ya-Ping  
Tseng, Tzu-Ling  
Cheng, Ping-Fu  
Iisu, Tsai-Wei  
Li, Hung-Yi  
Chen, Yi-Ting  
Lin, Yuh-Feng  
Chen, Giien-Shuen  
Li, Yen Peng
- <120> 与糖尿病肾病相关的尿及血清的生物标记
- <130> 70006-008001
- <150> 61/147, 778  
<151> 2009-01-28
- <160> 9
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> 人工序列
- <220>  
<223>  $\alpha$ -2-HS-糖蛋白的片段
- <400> 1
- Val Val Ser Leu Gly Ser Pro Ser Gly Glu Val Ser His Pro Arg Lys  
1                   5                   10                   15
- Thr
- <210> 2  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> 人工序列
- <220>  
<223>  $\alpha$ -2-HS-糖蛋白的片段
- <400> 2
- Met Gly Val Val Ser Leu Gly Ser Pro Ser Gly Glu Val Ser His Pro  
1                   5                   10                   15
- Arg Lys Thr
- <210> 3  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> 人工序列
- <220>  
<223>  $\alpha$ -1 抗胰蛋白酶的片段

[0002]

<400> 3

Lys Gly Lys Trp Glu Arg Pro Phe Glu Val Lys Asp Thr Glu Glu Glu  
1 5 10 15

Asp Phe

<210> 4

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>  $\alpha$ -1 抗胰蛋白酶的片段

<400> 4

Met Ile Glu Gln Asn Thr Lys Ser Pro Leu Phe Met Gly Lys Val Val  
1 5 10 15

Asn Pro Thr Gln Lys  
20

<210> 5

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>  $\alpha$ -1 抗胰蛋白酶的片段

<400> 5

Glu Asp Pro Gln Gly Asp Ala Ala Gln Lys Thr Asp Thr Ser His His  
1 5 10 15

Asp Gln Asp His Pro Thr Phe Asn Lys Ile Thr Pro Asn Leu Ala Glu  
20 25 30

<210> 6

<211> 34

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>  $\alpha$ -1 抗胰蛋白酶的片段

<400> 6

Glu Asp Pro Gln Gly Asp Ala Ala Gln Lys Thr Asp Thr Ser His His  
1 5 10 15

Asp Gln Asp His Pro Thr Phe Asn Lys Ile Thr Pro Asn Leu Ala Glu  
20 25 30

Phe Ala

<210> 7

[0003]

<211> 32  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223>  $\alpha$ -1 酸性糖蛋白的片段

<400> 7

Gly Gln Glu His Phe Ala His Leu Leu Ile Leu Arg Asp Thr Lys Thr  
 1                   5                   10                   15

Tyr Met Leu Ala Phe Asp Val Asn Asp Glu Lys Asn Trp Gly Leu Ser  
                   20                   25                   30

<210> 8  
 <211> 42  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 骨桥蛋白的片段

<400> 8

Tyr Pro Asp Ala Val Ala Thr Trp Leu Asn Pro Asp Pro Ser Gln Lys  
 1                   5                   10                   15

Gln Asn Leu Leu Ala Pro Gln Asn Ala Val Ser Ser Glu Glu Thr Asn  
                   20                   25                   30

Asp Phe Lys Gln Glu Thr Leu Pro Ser Lys  
                   35                   40

<210> 9  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 骨桥蛋白的片段

<400> 9

Lys Tyr Pro Asp Ala Val Ala Thr Trp Leu Asn Pro Asp Pro Ser Gln  
 1                   5                   10                   15

Lys Gln Asn Leu Leu Ala Pro Gln Thr Leu Pro Ser Lys  
                   20                   25

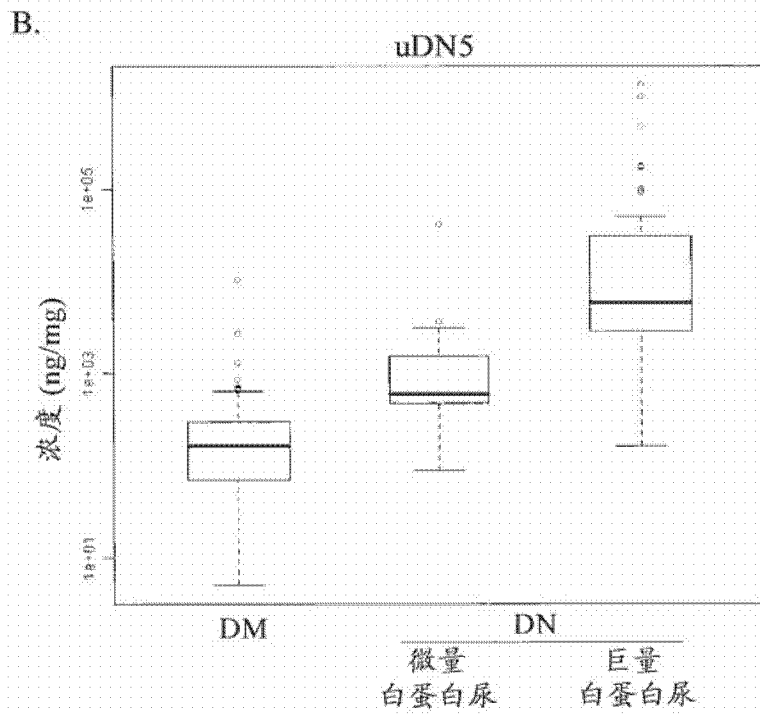
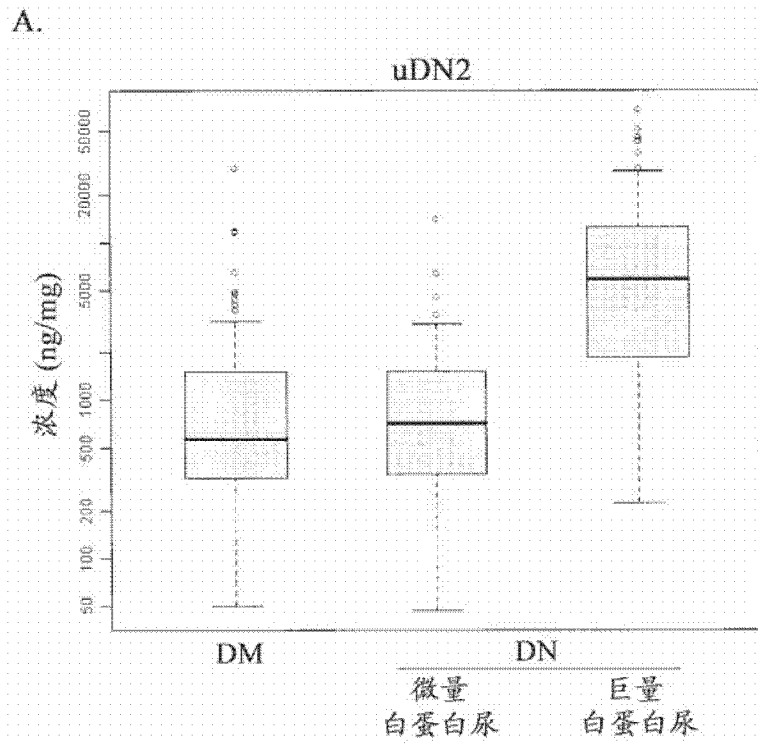
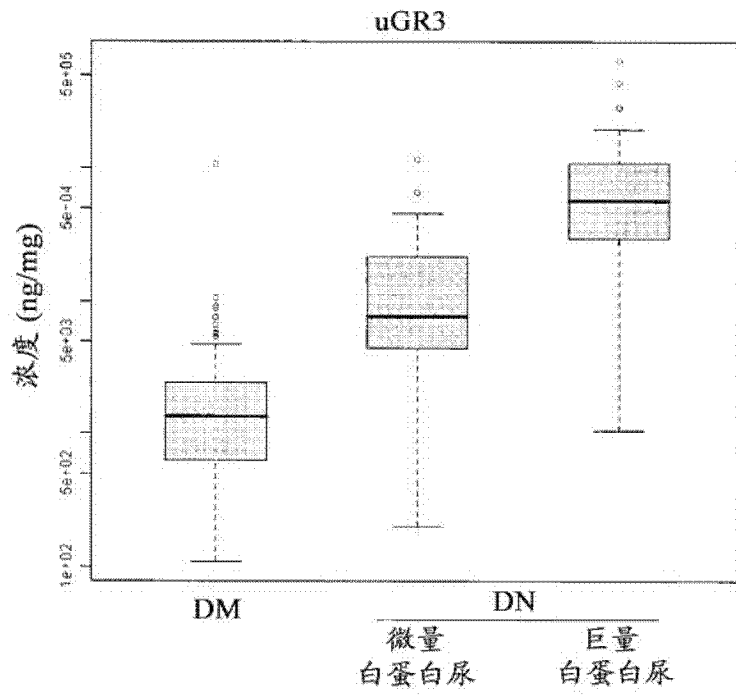


图 1

C.



D.

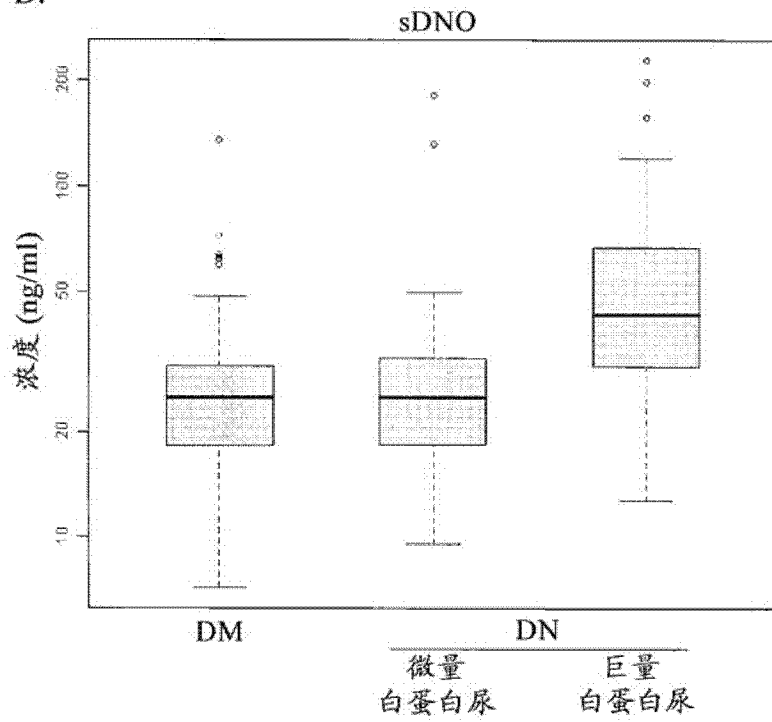


图1(续)

|                |  |         |            |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 与糖尿病肾病相关的尿及血清的生物标记   |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN102300877B</a>   | 公开(公告)日 | 2014-12-10 |
| 申请号            | CN201080005751.2   | 申请日     | 2010-01-27 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 财团法人工业技术研究院  |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 财团法人工业技术研究院  |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 财团法人工业技术研究院  |         |            |
| [标]发明人         | 林微雅<br>叶亚平<br>曾镛翎<br>郑平福<br>徐采薇<br>李泓毅<br>陈怡婷<br>林裕峰<br>陈金顺<br>李彦朋                                   |         |            |
| 发明人            | 林微雅<br>叶亚平<br>曾镛翎<br>郑平福<br>徐采薇<br>李泓毅<br>陈怡婷<br>林裕峰<br>陈金顺<br>李彦朋                                   |         |            |
| IPC分类号         | C07K16/38 C07K16/18 C40B30/00 G01N33/53 G01N33/573 G01N33/68 C07K14/81 C07K14/47                     |         |            |
| CPC分类号         | G01N2333/4728 G01N2800/56 G01N2333/8125 G01N33/6893 G01N2333/52 G01N2800/52 G01N2333/71 G01N2800/347 |         |            |
| 优先权            | 61/147778 2009-01-28 US  |         |            |
| 其他公开文献         | CN102300877A   |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>   |         |            |

#### 摘要(译)

尿液及血清中生物标记在诊断糖尿病肾病、评估糖尿病肾病阶段、监测糖尿病肾病发展及评估糖尿病肾病的治疗有效性中的用途。该生物标记包括尿中 $\alpha$ -2-HS-糖蛋白前体、尿中 $\alpha$ -1抗胰蛋白酶、尿中 $\alpha$ -1酸性糖蛋白、尿中骨桥蛋白、血清中骨桥蛋白、前述之片段及前述之组合。

表1. 训练群及测试群的患者特征

|                         | 训练群<br>(n=118)           | 测试群<br>(n=47)             | P 值    |
|-------------------------|--------------------------|---------------------------|--------|
| 年龄, 平均值(SD)             | 59.94 ( 9.37 )           | 60.28 ( 9.48 )            | 0.8362 |
| 女性, n (%)               | 83 ( 70 )                | 27 ( 57 )                 | 0.16   |
| MDRD_S_GFR, 平均值(SD)     | 86.56 ( 33.11 )          | 83.05 ( 43.96 )           | 0.5785 |
| ACR(ug/mg), 平均值(SD)     | 737.82 ( 1465.47 )       | 1084.18 ( 2030.98 )       | 0.2239 |
| 尿中TP/Cr(mg/mg), 平均值(SD) | 1.01 ( 2.01 )            | 1 ( 1.78 )                | 0.9963 |
| 血清中肌酐(mg/dL), 平均值(SD)   | 1.02 ( 0.87 )            | 1.34 ( 1.44 )             | 0.0903 |
| HbA1c (%), 平均值(SD)      | 8.49 ( 1.5 )             | 8.29 ( 2.19 )             | 0.5356 |
| 标记(经肌酐调整), 平均值(SD)      |                          |                           |        |
| uDNO(ng/mg)             | 1452.71<br>( 1416.7 )    | 1488.77<br>( 1222.2 )     | 0.8687 |
| sDNO(ng/ml)             | 40.65<br>( 34.52 )       | 38.35<br>( 34.13 )        | 0.6926 |
| uDN2(ng/mg)             | 4225.77<br>( 9279.63 )   | 5999.64<br>( 10305.95 )   | 0.2983 |
| uDN5(ng/mg)             | 15951.12<br>( 94956.78 ) | 45479.82<br>( 199827.84 ) | 0.3228 |
| uGR3(ng/mg)             | 32823.47<br>( 62290.96 ) | 42709.23<br>( 103787.54 ) | 0.5333 |