



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107406501 A

(43)申请公布日 2017. 11. 28

(21)申请号 201680019114.8

基姆·亨里克森

(22)申请日 2016.03.31

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

(30)优先权数据

1505654.2 2015.04.01 GB

代理人 郑斌 刘振佳

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.09.27

(51)Int.Cl.

C07K 16/18(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2016/057127 2016.03.31

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/156526 EN 2016.10.06

(71)申请人 北欧生物科技公司

地址 丹麦海莱乌

(72)发明人 安德斯·内德尔高

詹尼·玛丽·桑德 孙舒

戴安娜·朱利·利明

权利要求书2页 说明书30页

序列表2页 附图12页

(54)发明名称

用于VI型胶原序列的免疫测定

(57)摘要

本发明提供了与6型胶原 α 3链C5结构域的C端表位具有反应性的免疫结合配偶体,以及使用所述免疫结合配偶体来检测和量化所述C端表位的免疫测定方法。本发明还提供了研究细胞外基质的形成速率的方法以及用于鉴定适合于用胰岛素增敏剂进行治疗的对象的方法。

1. 免疫结合配偶体,其与6型胶原 $\alpha 3$ 链C5结构域的C端表位具有反应性。
2. 如权利要求1所述的免疫结合配偶体,其中所述免疫结合配偶体与包含在C端氨基酸序列...KPGVISVMGT-COOH中的所述C端表位特异性结合。
3. 如权利要求1或2所述的免疫结合配偶体,其中所述免疫结合配偶体是单克隆抗体或多克隆抗体。
4. 如前述权利要求中任一项所述的免疫结合配偶体,其中所述免疫结合配偶体不识别或特异性结合所述C端氨基酸序列的延长形式,所述延长形式为...KPGVISVMGTA-COOH。
5. 如前述权利要求中任一项所述的免疫结合配偶体,其中所述免疫结合配偶体对氨基酸序列...KPGVISVMGT-COOH的亲合力与所述免疫结合配偶体对延长的氨基酸序列...KPGVISVMGTA-COOH的亲合力的比例大于10:1。
6. 如前述权利要求中任一项所述的免疫结合配偶体,其中所述免疫结合配偶体不识别或特异性结合所述C端氨基酸序列的截短形式,所述截短形式为...KPGVISVMG-COOH。
7. 如前述权利要求中任一项所述的免疫结合配偶体,其中所述免疫结合配偶体对氨基酸序列...KPGVISVMGT-COOH的亲合力与所述免疫结合配偶体对截短的氨基酸序列...KPGVISVMG-COOH的亲合力的比例大于10:1。
8. 用于在样品中检测VI型胶原 $\alpha 3$ 链C5结构域的C端表位的免疫测定方法,其中所述方法包括使包含VI型胶原 $\alpha 3$ 链的所述C端表位的样品与如前述权利要求中任一项所述的免疫结合配偶体接触,以及确定所述免疫结合配偶体的结合量。
9. 如权利要求8所述的方法,其中所述C端表位包含在C端氨基酸序列...KPGVISVMGT-COOH中。
10. 如权利要求8或权利要求9所述的方法,其中所述方法用于量化生物流体中VI型胶原 $\alpha 3$ 链的所述C端表位的量。
11. 如权利要求10所述的方法,其中所述生物流体是血清、血浆、尿或羊水。
12. 如权利要求8至11中任一项所述的方法,其中所述免疫测定是竞争测定或夹心测定。
13. 如权利要求12所述的方法,其中所述免疫测定是放射免疫测定或酶联免疫吸附测定。
14. 如权利要求8至14中任一项所述的方法,其还包括将通过所述方法确定的VI型胶原 $\alpha 3$ 链的所述C端表位的量与VI型胶原 $\alpha 3$ 链的所述C端表位的标准正常值相关联,以评价所述量相对于正常水平的变化。
15. 研究细胞外基质形成速率的方法,其包括通过如权利要求10至13中任一项所述的方法来进行测定以获得生物流体样品中包含如权利要求9所限定表位的VI型胶原 $\alpha 3$ 片段的水平的测量结果。
16. 如权利要求15所述的方法,其还包括形成将VI型胶原 $\alpha 3$ 片段的所述测量水平与同一样品中VI型胶原降解生物标志物的测量水平进行比较的指数。
17. 用于鉴定适合于用胰岛素增敏剂进行治疗的对象的方法,所述方法包括以下步骤:
 - i) 按照权利要求10所述的方法来量化从对象获得的生物流体中VI型胶原 $\alpha 3$ 链C5结构域的C端表位的量;以及
 - ii) 将通过步骤i)确定的升高值与适合于用胰岛素增敏剂进行治疗的对象相关联。

18. 如权利要求17所述的方法,其中所述胰岛素增敏剂是噻唑烷二酮类。

19. 如权利要求17或18所述的方法,其中所述C端表位包含在C端氨基酸序列...KPGVISVMGT-COOH中。

20. 如权利要求17至19所述的方法,其中步骤ii)的所述升高值对应于落入第二或第三三分位组内的值。

21. 如权利要求17至20所述的方法,其中步骤ii)的所述升高值对应于6.3ng/mL或更高的VI型胶原 $\alpha 3$ 链C端表位。

22. 用于确定生物样品中VI型胶原 $\alpha 3$ 链C5结构域的C端表位的量的测定试剂盒,其包含本发明的免疫结合配偶体和以下至少一种:

- 经链霉亲和素包被的96孔板;

- 与所述抗体具有反应性的肽,其可以是生物素化肽生物素-L-KPGVISVMGT-COOH,其中L为任选的接头;

- 用于夹心免疫测定的任选生物素化的二抗;

- 包含C端序列...KPGVISVMGT-COOH的校准肽;

- 抗体HRP标记试剂盒;

- 抗体放射性标记试剂盒;

- 测定可视化试剂盒。

23. 如权利要求22所述的测定试剂盒,其中所述C端表位包含在C端氨基酸序列...KPGVISVMGT-COOH中。

用于VI型胶原序列的免疫测定

[0001] 本发明涉及与存在于VI型胶原 $\alpha 3$ 链的C端的表位结合的抗体,以及检测所述表位的免疫测定。

[0002] 肌肉重量(muscle mass)和功能随年龄、一系列的病理状况和不活动,并且频繁地由于这三者的组合而损失。据报道,个体从50岁起每年损失1%至2%的骨骼肌(Hughes);在固定不动(immobilization)期间每周损失2%至3%的肌肉重量(Hortobagyi等2000),对于恶病质(cachexia)则甚至更快。老年或住院个体中受损的肌肉功能与(共)发病率和死亡率相关(Cruz-Jentoft)。随着工业化世界中提高的人口年龄,维持功能独立性因此变得日益重要。用于肌肉损失的诊断和管理方法仍依赖于成像检查,例如磁共振成像(magnetic resonance imaging,MRI)、计算机断层显像(computed tomography,CT)和双能X射线吸收测定法(dual-energy X-ray absorptiometry,DXA)(Cruz-Jentoft)。然而,这样的检查昂贵或不方便用于常规的临床实践。尿和血清生物标志物(例如肌酐和3-甲基组氨酸)也用于辅助肌肉损失的管理。然而,这些测定的高变化和差有效性限制了其应用(Nedergaard 2013)。总之,急切需要可用于对肌肉功能进行诊断和预后以及监测抗分解代谢治疗结果的生物标志物(Sharf)。

[0003] 肌肉重量的损失是由肌肉细胞外蛋白的失衡周转驱动(Rennie 2010和Weile 2002)。由于(特别是细胞外蛋白的)蛋白质周转可使蛋白水解片段逃脱到循环中,因此蛋白质代谢的定量或定性变化可产生可用于监测肌肉重量或功能的生物标志物谱(Nedergaard 2013)。

[0004] 胶原是骨骼肌的重要细胞外蛋白,其可有助于肌肉的被动张力(Granzier)。

[0005] III型胶原在除骨之外的大多数含I型胶原的组织中表达,并且是结缔组织、肌肉组织和皮肤等的重要组分(Gelise)。PIIINP是III型胶原的N端前肽(N-terminal propeptide),其在成熟III型胶原合成期间被移除(NiemeIa)。已报道PIIINP与激素治疗的合成代谢应答相关(Bhasin 2009和Chen 2011)。最近,通过应用靶向N端前胶原的N-蛋白酶切割位点的单克隆抗体开发了新的ELISA试剂盒,其可评估III型胶原的真实合成(Nielsen 2013)。

[0006] VI型胶原是独特的细胞外胶原,其可在细胞的基膜中形成独立的微原纤维网络(microfibrillar network)。其可与包括胶原、双糖链蛋白聚糖(biglycan)和蛋白聚糖的其他基质蛋白相互作用(Kuo 1997;Bidanset 1992;和Stallcup 1990)。在肌肉中,VI型胶原是肌膜的一部分并且参与使肌纤维锚定到肌肉内的细胞外基质中,并且如此参与力传递(Bonafido 1990和Keene 1988)。此外,VI型胶原的突变可引起Bethlem肌病(Bethlem myopathy)和Ullrich先天性肌营养不良(Ullrich congenital muscular dystrophy)(Lampe)。已报道,在分泌之后,VI型胶原 $\alpha 3$ 链的C端被从成熟VI型微原纤维切下(Aigner 2002和Lamande 2006)。

[0007] 然而,VI型胶原不只参与肌肉和肌肉损失。

[0008] 慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease,COPD)是异质的、进程缓慢的疾病,其特征在于由慢性炎症、结构变化和小气道变窄引起的持续气流受限

(Global initiative...)。肺的细胞外基质(extracellular matrix,ECM)的主要结构蛋白是胶原、弹性蛋白和蛋白聚糖。ECM重塑是健康组织维持的一部分,其中旧蛋白质被降解并且形成新蛋白质(Cox)。然而,过度的ECM重塑驱使COPD中的结构变化,促使肺功能损失。COPD中的关键挑战是疾病进展生物标志物的鉴定(Vestbo)。通过肺结构蛋白的评估进行的ECM研究可提供疾病活性和预后的生物标志物。

[0009] 恶化是疾病活性提高的时期,其通过加速肺功能损失(DonaIdson 2002)、降低生命质量(Seemungal)、以及引起死亡(Sofer-Cataluna)来驱动COPD进展。在所有COPD阶段中的患者均可能经历恶化,但是随着疾病严重程度的提高,其变得更加频繁(Hurst)。难以预测其发生并且未来恶化的最佳预测因子(predictor)是恶化史(Hurst 2010和DonaIdson 2006)。尽管恶化是COPD发病机制中的关键事件,但是关于在这些事件期间肺组织中的结构变化知之甚少。已知与稳定的COPD相比,在恶化时在COPD患者的痰中,基质金属蛋白酶9(matrix metalloproteinase 9,MMP-9)的水平升高,同时金属蛋白酶1的组织抑制剂(tissue inhibitor of metalloproteinase 1,TIMP-1)的水平降低(Mercer),表明破坏性环境。

[0010] 最近的研究已表明,ECM具有内分泌器官的特性,其中其结构蛋白产生可调节远端部位的细胞过程(包括细胞迁移、分化和血管生成)的信号传导分子。这些分子包括来自于XVIII型胶原的强效抗血管生成肽内皮细胞抑制素(endostatin),以及分别由IV、VII和XV型胶原释放的肿瘤抑素(tumstatin)、内皮生长抑制蛋白(vastatin)和休眠蛋白(restin)(Karsdal,2015)。

[0011] 微丝间质VI型胶原(由 $\alpha 1$ (VI)、 $\alpha 2$ (VI)和 $\alpha 3$ (VI)构成链构成的三螺旋分子)在大多数结缔组织中并且显著地在脂肪组织中表达(Park,2012),其中其通过与其他ECM蛋白的相互连接来锚定细胞(Mak,2012)。在微丝形成期间,其三螺旋核心从其前肽中蛋白水解释放(Aigner,2002;Lamande,2006)。在此, $\alpha 3$ (VI)链的C端前肽的进一步切割产生内促素(endotrophin,在本文中称为“Pro-C6”),其为新鉴定的脂肪因子因子(adipokine)。内促素显著地由脂肪组织产生且诱导转化生长因子- β (transforming growth factor beta,TGF- β)的上调、脂肪组织纤维化、血管生成、炎症,并且在动物模型中已显示不利地调节数种代谢功能,例如胰岛素敏感性、食物摄入、能量平衡和脂肪组织炎症(Sun,2014;DankeI,2014;Park,2013;Khan,2009;Pasarica,2009)。这些发现表明,血液中内促素水平可用于对具有代谢功能障碍的患者(尤其是患有2型糖尿病的那些)进行分类和/或监测。

[0012] 噻唑烷二酮类(thiazolidinedione,TZD)是过氧化物酶体增植物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma,PPAR γ)激动剂,并且由于其提高胰岛素敏感性、降低葡萄糖水平和降低胰岛素需求的能力而已被广泛地用于治疗2型糖尿病(Cho,2008;Charbonnel,2010)。然而,例如吡格列酮的TZD的使用由于例如心力衰竭(Home,2009)、体重增长(Takada,2007)、外周水肿(Karaliiedde,2007)和女性中骨损失(Soroceanu,2004)的相关不良作用(adverse effect,AE)而受到显著限制。为了使PPAR γ 激动剂的AE最小化,已开发了仅触发PPAR γ 下游信号的子集的PPAR γ 的部分激活剂,例如巴格列酮(baloglitazone)(Berger,2005;Agrawal,2012)。这样的部分激动剂在具有降低的AE的情况下实现良好的血糖控制(Larsen,2008)。最佳地限定治疗响应者的血清生物标志物可进一步提高这样的格列酮类的效力和安全性。

[0013] 我们现已开发了靶向 $\alpha 3$ 链的C端的单克隆抗体和ELISA试剂盒。在本文中,我们将该试剂盒和用其测量的反应性称为“Pro-C6”。

[0014] 我们已确立,Pro-C6的水平反映肌肉周转的速率,而且通过蛋白质重塑片段的生物标志物系统地评估的ECM重塑在疾病活性高的COPD恶化期间加速。

[0015] 我们还已确立,升高的血清内促素(即“Pro-C6”)水平预示针对两种胰岛素增敏剂(巴格列酮和吡格列酮)的响应和较低的副作用,从而鉴定那些得益于PPAR γ 激动剂治疗的患有II型糖尿病的患者。

[0016] 本发明现在提供了与VI型胶原 $\alpha 3$ 链C5结构域的C端表位具有反应性(reactive with)的免疫结合配偶体(immunological binding partner)。

[0017] 优选地,所述免疫结合配偶体与包含在C端氨基酸序列...KPGVISVMGT-COOH中的所述C端表位特异性结合。

[0018] 所述免疫结合配偶体是单克隆抗体或多克隆抗体。如下文中进一步说明的,免疫结合配偶体可以是具有结合特异性的抗体片段。

[0019] 优选地,所述免疫结合配偶体不识别或结合所述C端氨基酸序列的延长形式(elongated version),所述延长形式为...KPGVISVMGTA-COOH。

[0020] 优选地,所述免疫结合配偶体不识别或结合(或者还不识别或结合)所述C端氨基酸序列的截短形式(truncated version),所述截短形式为...KPGVISVMG-COOH。

[0021] 还优选地,所述抗体对氨基酸序列...KPGVISVMGT-COOH的亲力和所述抗体对延长的氨基酸序列(elongated amino acid sequence)...KPGVISVMGTA-COOH和/或对截短的氨基酸序列(truncated amino acid sequence)...KPGVISVMG-COOH的亲力的比例大于10:1。

[0022] 更一般地,所述免疫结合配偶体对氨基酸序列...KPGVISVMGT-COOH的亲力和所述免疫结合配偶体对所述延长的氨基酸序列的亲力的比例优选大于10:1,优选大于50:1,优选大于100:1,优选大于500:1,优选大于1000:1,并且最优选大于10,000:1。

[0023] 还优选的是,所述免疫结合配偶体对氨基酸序列...KPGVISVMGT-COOH的亲力和所述免疫结合配偶体对所述截短的氨基酸序列的亲力的比例大于10:1,优选大于50:1,优选大于100:1,优选大于500:1,优选大于1000:1,并且最优选大于10,000:1。

[0024] 本发明包括用于在样品中检测VI型胶原 $\alpha 3$ 链的C端表位的免疫测定方法,其中所述方法包括使包含VI型胶原 $\alpha 3$ 链的所述C端表位的样品与上述免疫结合配偶体接触,以及确定所述免疫结合配偶体的结合量。

[0025] 优选地,所述C端表位包含在C端氨基酸序列...KPGVISVMGT-COOH中。

[0026] 所述方法可用于量化生物流体中VI型胶原 $\alpha 3$ 链的所述C端表位的量。

[0027] 所述生物流体可以是例如血清、血浆、尿或羊水。

[0028] 所述免疫测定可以是竞争测定(competition assay)或夹心测定(sandwich assay),例如放射免疫测定(radioimmunoassay)或酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA)。

[0029] 这样的方法还可包括将通过所述方法确定的VI型胶原 $\alpha 3$ 链的所述C端表位的量与VI型胶原 $\alpha 3$ 链的所述C端表位的标准正常值相关联,以评价所述量相对于正常水平的变化。

[0030] 本发明包括研究细胞外基质的形成速率的方法,其包括通过上述方法进行测定以

获得生物流体样品中VI型胶原 $\alpha 3$ 片段的水平的测量结果(measure),所述片段含有包含在C端氨基酸序列...KPGVISVMGT-COOH中的表位。

[0031] 这样的方法还可包括形成将VI型胶原 $\alpha 3$ 片段的所述测量水平与同一样品中VI型胶原降解生物标志物的测量水平进行比较的指数。这样的降解生物标志物可以是经MMP降解的VI型胶原的片段。如VeidaI 2011和W02010/115749中所述,这样的测定可基于与N端序列YRGPEGPQGP...的抗体反应性。

[0032] 我们现已研究了响应于卧床休息(bed rest)形式的长期卸荷(unloading)和随后重新负载(reloading)的血清学胶原肽生物标志物调节,并且我们已类似地研究了在COPD恶化事件中的这些生物标志物。

[0033] 在卧床休息研究中,通过在具有或不具有振动装置措施下卧床休息使对象固定不动8周,随后通过习惯性身体活动重新活动。在固定不动期间两组均损失肌肉重量和强度,其中在对照组中损失略大于休息组中。在重新活动期间,两组均重新获得肌肉重量和强度。

[0034] 在固定不动期间,III型胶原前肽(PRO-C3)生物标志物和本发明的VI型胶原生物标志物(PRO-C6)显示出在一定程度上类似的时间模式(temporal pattern)。虽然在固定不动开始之后,本发明的生物标志物初始略有下降,但是PRO-C3和PRO-C6二者在固定不动下均最终随时间而提高。在重新活动时,可再次观察到轻微的初始下降,随后提高(在PRO-C6部分,提高在CTRL中大于RVE组中),随后两种生物标志物均返回基线。

[0035] C6M生物标志物对卧床休息卸荷基本上无响应,但是响应于重新负载而短暂地迅速上升(spike),在组之间无显著差异。

[0036] 因此,PRO-C6可被视为与身体活动变化和LBM(瘦体重(lean body mass))变化相关的重塑生物标志物。在基线的低PRO-C6与更倾向于LBM变化(增长和损失二者)的表型相关。因此,用于该序列的测定可用于在经受非自愿固定不动(例如由于住院)的个体中鉴定肌肉损失风险提高的那些,并因此限定对抗LBM损失的治疗决策。

[0037] 此外,该测定可用于监测结缔组织重塑、特别是肌肉周转的速率,以及用于提供关于候选治疗用于调节该速率的有效性的信息。

[0038] 该生物标志物可用于辅助COPD恶化事件的诊断,或者用于提供关于哪些患者可能遭受其病症的更迅速恶化的预后,这可使他们成为更相关的患者以纳入临床试验之中。

[0039] 该生物标志物还可用于预测针对例如噻唑烷二酮化合物类(例如,巴格列酮或吡格列酮)的胰岛素增敏剂的响应。这允许鉴定和监测将对胰岛素增敏剂作出最佳响应的患者,这提高PPAR γ 激动剂在治疗2型糖尿病和/或非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)中的效益/风险比。就这一点而言,本发明还提供了用于鉴定适合于用胰岛素增敏剂进行治疗的对象的方法,所述方法包括以下步骤:

[0040] i) 使用本发明的Pro-C6测定方法来量化从对象获得的生物流体中VI型胶原 $\alpha 3$ 链C5结构域的C端表位的量;以及

[0041] ii) 将通过步骤i)确定的升高值(elevated value)与适合于用胰岛素增敏剂进行治疗的对象相关联。

[0042] 本发明的另一个方面提供了测定试剂盒,其用于确定生物样品中VI型胶原 $\alpha 3$ 链C5结构域的C端表位,优选包含在C端氨基酸序列...KPGVISVMGT-COOH中的C端表位的量,所述测定试剂盒包含本发明的免疫结合配偶体和以下至少一种:

[0043] -经链霉亲和素包被的96孔板;

[0044] -与所述抗体具有反应性的肽,其可以是生物素化肽生物素-L-KPGVISVMGT-COOH,其中L为任选的接头;

[0045] -用于夹心免疫测定的任选生物素化的二抗(secondary antibody);

[0046] -包含C端序列...KPGVISVMGT-COOH的校准肽(calibrator peptide);

[0047] -抗体HRP标记试剂盒(antibody HRP labeling kit);

[0048] -抗体放射性标记试剂盒(antibody radioLabeling kit);

[0049] -测定可视化试剂盒(assay visualization kit)。

[0050] 本文中使用的术语“免疫结合配偶体”包含多克隆抗体和单克隆抗体,以及抗体的特异性结合片段,例如Fab或F(ab')₂。因此,所述免疫结合配偶体可以是单克隆抗体或具有特异性结合亲和力的单克隆抗体片段。

[0051] 附图

[0052] 图1示出了来自单克隆抗体10A3的肽特异性测试的作为通过标准肽、延长肽和截短肽的连续2倍稀释产生的OD信号的结果。STD肽=KPGVISVMGT,延长肽=KPGVISVMGTA,截短肽=KPGVISVMG。由于ELISA的性质,较低的OD对应于较强的反应性。

[0053] 图2示出了来自单克隆抗体10A3与人血清和羊水的反应性测试的结果。图A示出了在竞争性ELISA中作为OD测量的抗体结合,其被人血清和人羊水部分抑制。图B示出了Western印迹,其示出了在人血清(第1、2泳道)和羊水(第3、4泳道)中的特异性条带,并且显示所述条带在标准肽(第6至9泳道)存在下可被封闭。

[0054] 图3示出了来自对三种不同血浆相对于血清测量的Pro-C6水平的线性回归分析的结果,其显示血清水平与每种血浆之间的强相关性($P < 0.0001$)。

[0055] 图4在三个递减图中示出了卧床休息和重新活动(BBR)研究中随时间的PRO-C3、PRO-C6和C6M水平。

[0056] 图5在递减图A、B和C中示出了在实施例3中测量的生物标志物水平。

[0057] 图6在图A、B和C中示出了在实施例3中测量的III型胶原、IV型胶原和VI型胶原的降解/形成标志物的比值的水平。

[0058] 图7示出了对空腹血清葡萄糖和血液HbA1c的作用。根据基线血清Pro-C6的亚组(三分位组(tertile))中空腹血清葡萄糖(左图)和血液HbA1c(右图)从基线到治疗结束(第26周)随时间的绝对变化。

[0059] 图8示出了相对于基线Pro-C6在26周的治疗期间空腹血清葡萄糖(左图)和血液HbA1c(右图)的平均绝对变化。在26周治疗期之前(X')和结束('X)时治疗相对于安慰剂的经Dunnett调整的显著性水平。na:不适用;ns:不显著;*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$ 。

[0060] 图9示出了较高的两个内促素三分位组($> 7.7 \text{ ng/mL}$)相对于较低三分位组($\leq 7.7 \text{ ng/mL}$)中在第26周时响应者的比值比(odds ratio)。HbA1c中临床显著性变化的比值比为1% (3.83, 95% CI (1.62; 9.04), $p < 0.002$), 或0.5% (3.85, 95% CI (1.94; 7.61), $p < 0.0001$)。

[0061] 图10示出了在26周治疗期期间HOMA-IR的平均绝对变化。在26周治疗期之前(X')和结束时('X)治疗相对于安慰剂的经Dunnett调整的显著性水平。na:不适用;ns:不显

著; * : $p < 0.05$; * * : $p < 0.01$; * * * : $p < 0.001$ 。

[0062] 图11,左图:治疗对血清Pro-C6水平的作用。血清Pro-C6表示为根据基线Pro-C6的三分位组直至治疗结束(第26周)相对于基线的变化百分比。图中示出了最小二乘法估计值($\pm$ 标准误差)。

[0063] 图11,右图:使用在26周治疗期之前(X/)和结束时(/X)治疗相对于安慰剂的经Dunnett调整的显著性水平相对于基线的平均Pro-C6变化。na:不适用;ns:不显著; * : $p < 0.05$; * * : $p < 0.01$; * * * : $p < 0.001$ 。

[0064] 图12示出了在26周治疗期期间小腿体积的平均绝对变化。在26周治疗期之前(X/)和结束时(/X)治疗相对于安慰剂的经Dunnett调整的显著性水平。na:不适用;ns:不显著; * : $p < 0.05$; * * : $p < 0.01$; * * * : $p < 0.001$ 。

实施例

[0065] 实施例1:Pro-C6的抗体开发

[0066] 我们使用VI型胶原 $\alpha 3$ 链的最后10个氨基酸(3168 'KPGVISVMGT' 3177)作为免疫原性肽产生特异性表位单克隆抗体。用于单克隆抗体开发的方法如先前所述(Barascuk)。简言之,用具有60 μ g免疫原性肽的200 μ I乳化抗原对4至6周大的BaIb/C小鼠进行皮下免疫接种。在弗氏不完全佐剂(Freund's incomplete adjuvant)中以2周的时间间隔进行连续免疫接种,直至达到稳定的血清效价水平,并从第二次免疫接种开始对小鼠取血。在每次取血时,检测血清效价并选择具有最高抗血清效价和最佳天然反应性的小鼠用于融合。让所选择的小鼠休息1个月,随后在分离脾用于细胞融合前3天用在100 μ I 0.9%氯化钠溶液中的50 μ g免疫原性肽静脉内加强。

[0067] 融合操作已在别处进行描述(Gefter)。简言之,将小鼠脾细胞与SP2/0骨髓瘤融合配偶体细胞进行融合。将融合细胞在96孔板中培养并在CO₂培养箱中孵育。在此,使用标准的有限稀释以促进单克隆生长。选择对选择肽具有特异性并且与延长肽(KPGVISVMGTA, Chinese Peptide Company, China)或截短肽(KPGVISVMG, American Peptide Company, USA)均无交叉反应性的细胞系并进行亚克隆。最后,使用IgG柱来纯化抗体。

[0068] Pro-C6测定方案:

[0069] 用于测定开发的ELISA板是经链霉亲和素包被的,来自Roch (cat.:11940279)。所有的ELISA板均用来自Molecular Devices, SpectraMax M (CA, USA)的ELISA阅读器进行分析。我们使用Lightning Link HRP标记试剂盒根据制造商(Innovabioscience, Babraham, Cambridge, UK)的说明书用辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)对所选择的单克隆抗体进行标记。用溶解在包被缓冲液(40mM Na₂HPO₄, 7mM KH₂PO₄, 137mM NaCl, 2.7mM KCl, 0.1% Tween 20, 1% BSA, pH 7.4)中的生物素化的合成肽生物素-KPGVISVMGT (Chinese Peptide Company, China)包被96孔链霉亲和素板,并在20℃下孵育30分钟。将20 μ L标准肽或经在孵育缓冲液(40mM Na₂HPO₄, 7mM KH₂PO₄, 137mM NaCl, 2.7mM KCl, 0.1% Tween 20, 1% BSA, 5% Liquid II, pH 7.4)中稀释的样品添加至合适的孔中,随后添加100 μ L HRP缀合的单克隆抗体10A3,并在4℃下孵育21小时。最后,添加100 μ L四甲基联苯胺(tetramethylbenzidine, TMB) (Kem-En-Tec cat.4380H)并将板在暗处在20℃下孵育15分钟。所有以上孵育步骤均包括在300rpm下摇动。在每个孵育步骤之后,将板在洗涤缓冲液

(20mM Tris, 50mM NaCl) 中洗涤5次。通过添加100μL终止溶液 (1% H₂SO₄) 来终止TMB反应, 并在450nm下测量, 用650nm作为参考。

[0070] Pro-C6技术评价:

[0071] 由21个零样品 (zero sample) (即缓冲液) 来确定检测下限 (Lowest Limit of detection, LLOD), 并计算为平均值+3x标准偏差。通过8个QC样品的12个单独实验来确定测定内变异 (intra-assay variation) 和测定间变异 (interassay variation), 其中每次进行由样品的双重确定组成。在4个血清样品和4个肝素血浆样品中确定稀释回收率, 并将其作为从100%样品回收经稀释样品的百分比计算。

[0072] 实施例2: 肌肉损失研究中的PRO-C6

[0073] 柏林卧床休息研究 (Berlin Bed rest study) 中Pro-C3、C6M测定的测量:

[0074] 预期α3链的C端水平反映新形成的成熟VI型胶原的水平。为了研究VI型胶原的合成, 我们开发了靶向α3链的C端的上述Pro-C6 ELISA试剂盒。此外, VI型胶原还是MMP的底物 (VeidaI 2011)。先前的研究显示MMP-2和MMP-9二者均与肌肉萎缩相关 (Reznick 2003和Giannelli 2005)。因此, 在这样的过程中, 目标是通过MMP-2和MMP-9产生的VI型胶原降解片段。

[0075] 在该研究中, 我们测量了三种生物标志物: Pro-C6 (测量C端α3 (VI) 链) 和C6M (测量被MMP-2和MMP-9降解的VI型胶原片段) (VeidaI 2011), 以及Pro-C3 (测量III型胶原的真实合成) (NieIsen), 其在柏林卧床休息研究中直接测量III型和VI型胶原的周转, 所述柏林卧床休息研究使用卧床休息固定不动和重新活动作为人肌肉萎缩或肥大模型。

[0076] 柏林卧床休息研究已在别处进行描述 (Rittweger 2006和BeIavy 2009)。简言之, 招募20名健康的年轻男性并使其经历严格的8周卧床休息研究。然后, 将20名年轻男性随机地分成两组。每周向阻力振动运动 (resistive vibration exercise, RVE) 组布置阻力振动运动11次。通过在床端的振动运动设备并用使对象将自身推向板的腰带和肩带以及手柄将对象推向振动板来进行阻力振动运动。对照组 (CTRL) 在8周卧床休息期间不允许进行任何运动。在该研究前2天 (BDC-2)、在卧床休息期间 (BR+) 和在随后恢复期间 (R+) 获得血清样品。将血清样品储存在-80℃直至进行进一步测量。在该三个时期期间, 通过MRI和DXA来评估这两组的肌肉重量。

[0077] Pro-C3和C6M测定的方案已在别处进行描述 (NieIsen 2013和Kuo 1997)。Pro-C3测定测量III型胶原的前肽片段的水平。C6M测定测量成熟VI型胶原的MMP降解片段。简言之, 在Pro-C3测定中, 用生物素化的合成肽包被96孔链霉亲和素板并在20℃下孵育30分钟。将20μL标准肽或经1:2稀释的血清样品添加至适当的孔中, 随后添加100μL HRP缀合的单克隆抗体NB61N-62, 并在4℃下孵育20小时。最后, 添加100μL TMB并将板在暗处在20℃下孵育15分钟。通过添加100μL终止溶液 (1% H₂SO₄) 来终止TMB反应, 并在450nm下测量, 用650nm作为参考。在C6M测定中, 将生物素化的合成肽包被至96孔链霉亲和素板。添加20μL标准肽或经1:2稀释的血清样品, 随后添加100μL HRP缀合的单克隆抗体, 并在20℃下孵育1小时。在通过TMB显色之后对板进行读数。

[0078] 结果:

[0079] 所选择的抗体10A3特异性地识别C端COL6A3的最后10个氨基酸3168'KPGVISVMGT' 3177, 但是不识别延长肽KPGVISVMGTA或截短肽KPGVISVMG (图1)。使用人血清库和人羊水库

来评估所选择抗体的天然反应性。在竞争性ELISA中,信号被血清和羊水二者部分地抑制(图2,图A)。该结果通过western印迹得到确认:抗体识别约10kD的条带,同时信号在标准肽存在下被完全封闭(图2,图B)。

[0080] Pro-C6竞争性ELISA的测量范围通过LLOD和ULOD来确定,提供了0.15ng/mL至58.39ng/mL的范围。测定间和测定内变异率分别为15.2%和4.8%。人血清和肝素血浆的稀释回收率均在100±20%内(表1)。人血清与肝素血浆、柠檬酸盐血浆和EDTA血浆各自之间的相关性是相对高的(图3, $p<0.0001$),这表明尽管血液制备方法不同,Pro-C6水平恒定。

[0081] 表1:描述稀释回收率的表

[0082]

血清样品	稀释回收率	肝素血浆样品	稀释回收率
未经稀释	100	未经稀释	100
稀释度1:2	91	稀释度1:2	105
稀释度1:4	91	稀释度1:4	100
稀释度1:8	80	稀释度1:8	109

[0083] 在连续2倍稀释步骤中稀释样品,在这些连续稀释中测量浓度。通过使所测量的浓度与稀释因子相乘来获得稀释回收率,并表示为未经稀释(起始)样品的浓度的百分比。该表显示,在8倍稀释范围内,信号线性地稀释并保持在+/-20%内。

[0084] 柏林卧床休息研究中的生物标志物谱:

[0085] 在柏林卧床休息研究(Berlin Bed rest study, BBR)中测量的上述三种生物标志物的水平见于图4中。“BR”时间点表示卧床休息固定不动时间点,以及“R”时间点表示重新活动时间点。数字后缀表示进入卧床休息或重新活动期的天数。“a”表示与基线的显著性差异,且“b”表示与固定不动期的最后的时间点的显著性差异。数据表示为平均值+/-SEM。

[0086] 如图4所示,PRO-C3以如下形式展现显著的时间效应:在固定不动之后初始降低约20%(从BR3至BR12与基线具有显著性差异,对于所有的时间点而言, $p<0.004$),随后在固定不动结束时提高(BR40与基线具有显著性差异, $p=0.05$)。有趣地,在重新活动开始时,可观察到类似的模式:初始降低随后提高(时间点R3至R28显著高于基线,对于所有的时间点而言, $p<0.03$,并且R3显著高于固定不动的最后时间点BR56, $p=0.02$)。在最后的两个时间点,在固定不动开始后13周,生物标志物水平返回基线。不存在显著的组间差异,或者显著的时间*治疗相互作用效应。

[0087] 当我们将PRO-C3的单独生物标志物水平与LBM及其中的变化进行比较时,我们发现,在基线,PRO-C3的单独水平与LBM显著相关($R^2=0.2869$, $R=0.536$, $p=0.0149$)。此外,我们发现,其在BR47的峰值生物标志物水平与在固定不动期间损失的LBM量显著相关($R^2=0.2056$, $R=0.453$, $p=0.0447$)。

[0088] 在固定不动的过程期间,PRO-C6生物标志物以如下形式随时间变化(显著的时间效应, $p<0.0001$):在约一周的固定不动之后提高,在固定不动的最后两周期间,达到比基线高约30%的峰值水平(从BR19至R28显著高于基线,峰值在BR47, $p=0.0002$)。在固定不动期间,不存在组间差异(无显著的治疗效应或治疗*时间相互作用)。

[0089] 在重新活动期间,时间和时间*治疗相互作用效应二者均显现。这为以下形式:进入重新活动一周提高达到峰值(相对于固定不动的最后一天BR56,提高20%, $p=0.011$),随

后逐渐返回基线值。在任何事后检验中均没有显现相互作用效应,这是由于在R7时间点的高变异。

[0090] 当我们将PRO-C6的单独生物标志物水平与LBM及其中的变化进行比较时,我们发现PRO-C6的水平与LBM完全不相干,但是在固定不动期间与LBM的变化正相关($R^2=0.2794$, $R=0.529$, $p=0.0166$),意味着较高的PRO-C6水平与较低的LBM损失相关。我们还发现,在重新活动期间PRO-C6与(重新)获得的LBM量负相关($R^2=0.3365$, $R=0.580$, $p=0.0073$),意味着在重新活动期间较高的水平与较小的LBM(重新)获得相关。

[0091] C6M生物标志物基本上不受固定不动影响(在固定不动时期内无时间效应),但在重新活动时短暂地提高30%至40%(在固定不动期期间显著的时间效应, $p<0.0001$)。在固定不动期间不存在治疗效应,且尽管可显示C6M信号的提高在CTRL组中大于RVE组中,但这未达到显著性(时间*治疗相互作用未达到显著性并且因此未进行事后检验)。不存在组间差异。

[0092] 当我们将PRO-C6的单独生物标志物水平与LBM及其中的变化进行比较时,我们发现PRO-C6的水平与LBM完全不相干,但是在固定不动期间与肌肉损失正相关($R^2=0.2794$, $R=0.529$, $p=0.0166$),并且在重新活动期间与(重新)获得的肌肉量负相关($R^2=0.3365$, $R=0.580$, $p=0.0073$)。

[0093] 表2:生物标志物相对于人体测量变量(anthropometric variable)的相关矩阵。BioM(生物标志物)、瘦体重(LBM)、腿肌体积(Leg Muscle Volume, LMV, 来自MRI),损失是在固定不动期间的绝对LBM变化,即负性越高等于损失越大;获得是在重新活动期间的总LBM重新获得。

[0094]

	PRO-C3		PRO-C6		C6M	
	R	p	R	p	R	p
BioM _{基线} 相对于LBM _{基线}	0.536	0.0149*	0.022	0.9270	0.595	0.0057*
BioM _{BR47} 相对于腿LBM _{损失}	0.453	0.0447*	0.529	0.0166*	0.102	0.6684
BioM _{R3} 相对于腿LBM _{获得}	-0.171	0.4705	-0.580	0.0073*	-0.269	0.2509

[0095] PRO-C6被视为与身体活动变化和LBM变化相关的重塑生物标志物。在基线的低PRO-C6与更倾向于LBM变化(获得和损失二者)的表型相关。

[0096] 实施例3: COPD中的PRO-C6

[0097] 研究设计:

[0098] 在入院24小时内招募在2011年和2012年期间被医疗顾问认为是COPD恶化的住院患者。在恶化时和在恢复时收集血液样品:在入院后进行4周的随访,中值30(IQR 28-34)天。在随访时,使患者经历标准的支气管扩张剂后肺量测定,并进行6分钟步行距离(six minute walking distance, 6MWD)。患者报告的测量结果包括在随访时使用医学研究委员会(Medical Research Council, MRC)呼吸困难量表的呼吸困难评估和吸烟史。

[0099] 纳入标准是在入院时由顾问医生做出的急性COPD恶化的临床诊断。肺炎的医生诊断或放射学证据是排除标准。该研究包括具有成对样品并且在随访时确认具有气流阻塞(一秒内用力呼气量(forced expiratory volume in one second, FEV1)与用力肺活量(forced vital capacity, FVC)的比例 <0.7)的69名患者。

[0100] ECM重塑生物标志物:

[0101] 将血清和肝素血浆样品在 -80°C 下储存直至分析。在血清中测量C3M、C4M、Pro-C3、P4NP 7S、ELM7和EL-NE,而在肝素血浆中测量C6M、Pro-C6和VCANM。在该研究中用于评估细胞外基质重塑的测定概述见于表4中。

[0102] 表4

[0103]

测定	靶标	检测范围 (ng/ml)	测定内和 测定间变异 (%)	参考水平 (ng/ml) 平均值 (SD)	参考文献
C3M	被MMP降解的III型胶原	5.52 - 177	3.4 和 9.8	15.3 (3.8)	[28]
C4M	被MMP降解的IV型胶原	22.8 - 748	4.2 和 18.5	55.4 (17.8)	[29]
C6M	被MMP降解的VI型胶原	4.88 - 420	8.0 和 11.0	8.85 (5.1)	[30]
ELM7	被MMP-7降解的弹性蛋白	1.16 - 36.6	8.1 和 9.1	2.23 (0.74)	初始数据
EL-NE	被嗜中性粒细胞弹性蛋白酶降解的弹性蛋白	1.76 - 167	8.6 和 12.9	4.09 (2.24)	初始数据
VCANM	被MMP降解的多能蛋白聚糖(versican)	0.78 - 7.13	3.0 和 7.6	1.20 (0.23)	[31]
Pro-C3	III型胶原前肽(N端)	5.32 - 96.4	6.5 和 12.4	12.3 (4.4)	[32]
P4NP 7S	IV型胶原7S结构域(内部)	32.9 - 3460	9.4 和 14.2	263 (91.3)	[33]
Pro-C6	VI型胶原前肽(C端)	2.81 - 117	4.8 和 15.2	4.37 (0.69)	初始数据

[0104] 参考水平由制造商 (Nordic Bioscience) 提供, 并且是指健康群体的相关基质中的生物标志物水平, 即血清 (C3M、C4M、Pro-C3、P4NP 7S、ELM7、EL-NE) 或肝素血浆 (C6M、Pro-C6、VCANM)。SD, 标准偏差; MMP, 基质金属蛋白酶。

[0105] 患者人口统计学和临床特征总结在表5中。患者大部分是男性 (71%) 和曾吸烟者 (55%)。他们住院中值 [IQR] 3 [2-6] 天, 并且在入院后以 30 [28-34] 天进行随访。

[0106] 表5: 在恶化发生后4周的随访时COPD群体的基本特征

[0107]

变量	患者 (n=69)
年龄 (岁), 中值 (IQR)	67 (61-75)
女性, n (%)	20 (29)
BMI (kg/m ²)	25.7 (6.3)
目前吸烟者, n (%)	31 (45)
吸烟包年 (年)	52 (26)
住院时长 (天), 中值 (IQR)	3 (2-6)
FEV ₁ (升)	1.19 (0.50)
FEV ₁ (预测的 %)	45.8 (16.1)
FVC (升)	2.55 (0.81)
FVC (预测的 %)	77.5 (19.0)
FEV ₁ /FVC 比例	0.46 (0.11)
6MWD (米)	166 (119)
MRC 呼吸困难评分, 中值 (IQR)	4 (3-4)

[0108] 除非另外说明, 否则变量作为平均值 (标准偏差) 列出。IQR, 四分位数间距 (interquartile range); BMI, 体重指数; FEV₁, 一秒内用力呼气量; FVC, 用力肺活量; 6MWD, 6分钟步行距离; MRC, 医学研究委员会。

[0109] 表6中示出了在恶化时和在30天随访的临床稳定疾病期时释放的蛋白质片段的循环水平。

[0110] 表6: 在恶化和30天随访时循环蛋白质片的水平

[0111]

	恶化 (ng/ml)	随访 (ng/ml)	P值
C3M	29.24 [26.32 - 32.49]	22.64 [20.78 - 24.67]	< 0.0001
C4M	95.96 [85.83 - 107.28]	73.30 [66.59 - 80.69]	< 0.0001
C6M	19.78 [16.82 - 23.27]	13.27 [11.56 - 15.23]	< 0.0001
ELM7	4.50 [3.91 - 5.17]	3.79 [3.37 - 4.27]	< 0.0001
EL-NE	7.79 [6.30 - 9.63]	5.23 [4.41 - 6.21]	< 0.0001
VCANM	1.69 [1.58 - 1.80]	1.87 [1.78 - 1.97]	0.0001
Pro-C3	12.10 [10.60 - 13.81]	12.79 [11.35 - 14.42]	0.2549
P4NP 7S	510.99 [440.91 - 592.21]	359.20 [312.28 - 413.17]	< 0.0001
Pro-C6	5.36 [4.81 - 5.99]	6.38 [5.71 - 7.14]	< 0.0001

[0112] 结果以几何平均值[95%置信区间]和相应的P值(比较恶化与随访时蛋白质片段的循环水平)来表示。

[0113] 与随访相比,在恶化时III型胶原(C3M)、IV型胶原(C4M)、VI型胶原(C6M)和弹性蛋白(ELM7和EL-NE)的降解片段显著升高(所有 $P < 0.0001$;图5:图A和B)。相比之下,多能蛋白聚糖(versican)降解片段(VCANM)在恶化时显示出显著降低的平均水平($P < 0.0001$;图5:图B)。与随访相比,在恶化时,与蛋白质形成相关的片段的水平对于III胶原没有显著变化,但是对于IV型胶原提高($P < 0.0001$),并且对于VI型胶原降低($P < 0.0001$) (图5,图C)。为了研究吸烟对蛋白质片段的循环水平的影响,单独地对当前吸烟者和曾吸烟者进行分析,具有类似的结果(数据未示出)。

[0114] 通过计算III、IV和VI型胶原的降解与形成片段之间的比例对胶原的降解与形成之间的平衡进行研究(图6)。在恶化时,对于III型胶原(2.33[2.03-2.66]相对于1.72[1.51-1.96], $P < 0.0001$)和VI型胶原(3.61[2.86-4.56]相对于2.00[1.64-2.44], $P < 0.0001$)而言,平均降解/形成比[95%CI]显著升高。相比之下,IV型胶原降解/形成比在恶化时为0.18[0.17-0.20],且在随访时提高至0.20[0.19-0.22] ($P = 0.0008$)。

[0115] 在随访时,BMI与C3M($\rho = -0.271$, $P = 0.029$)、Pro-C3($\rho = -0.357$, $P = 0.010$)和Pro-C6($\rho = -0.338$, $P = 0.017$)负相关。年龄与C6M($\rho = -0.249$, $P = 0.039$)和Pro-C6($\rho = -0.310$, $P = 0.026$)负相关。对于吸烟包年(smoking pack year)、MRC评分、住院时长、痰产生或白细胞计数未观察到关联。Pro-C3水平与FEV1预测值%(预测%)和FVC预测%正相关,并且这些在根据年龄、性别、BMI、吸烟包年和吸烟状态校正之后仍保持显著(表4)。6MWD与C3M、C4M、C6M和P4NP 7S负相关(表4)。在根据年龄、性别、BMI、吸烟包年和吸烟状态校正之后,与C3M和C6M的关联仍保持显著,而C4M临界显著(borderline significant)并且P4NP 7S不显著(表7)。

[0116] 表7:循环蛋白质片段的水平与临床参数之间的关联

[0117]

	FEV1预测%	FVC预测%	6MWD
C3M	0.020	-0.182	-0.370 * * (-0.311 *)
C4M	-0.002	-0.148	-0.313 * (-0.252 £)
C6M	-0.012	-0.224	-0.354 * * (-0.354 * *)
ELM7	-0.041	-0.175	-0.125
EL-NE	-0.016	-0.125	-0.189
VCANM	0.021	-0.084	-0.096
Pro-C3	0.391 * * (0.320 *)	0.312 * (0.305 *)	-0.009
P4NP 7S	0.042	-0.186	-0.278 * (-0.230)
Pro-C6	0.058	-0.013	-0.188

[0118] 结果表示为每种标志物的斯皮尔曼相关系数(Spearman correlation coefficient) (ρ)。在括号中给出了标志物的多变量相关系数,其显示为显著性 ρ 。多变量线性回归分析包括年龄、性别、BMI、吸烟包年和吸烟状态作为另外的解释变量。显著性水平: £ $P < 0.07$, * $P < 0.05$, * * $P < 0.01$ 。FEV1,一秒内用力呼气量;预测%,预测值的百分比;FVC,用力肺活量;6MWD,6分钟步行距离。

[0119] 所有的测定均使用针对在降解或形成期间通过MMP切割产生的蛋白质片段或内部蛋白质序列的单克隆抗体。本研究使用的测定及其技术说明的概述在表4中给出。所有样品均在每个测定的量化范围内进行测量,并且向值低于检测下限(LLOD)的任何样品分配LLOD值。

[0120] 以上结果表明,在疾病活性高的COPD恶化期间,通过蛋白质重塑片段的生物标志物系统性地评估的ECM重塑加快。

[0121] 实施例4:II型糖尿病中的Pro-C6

[0122] 用过氧化物酶体增植物激活受体 γ (PPAR γ)的完全激动剂治疗糖尿病患者提高胰岛素敏感性,但是与提高体重增长、心力衰竭、外周水肿和骨损失相关。内促素,VI型前胶原 $\alpha 3$ 链的C端片段(也称为Pro-C6),参与脂肪组织基质重塑和代谢控制二者。我们建立了内促素的血清测定以评估这种新脂肪因子是否可鉴定对PPAR γ 激动剂作出最佳响应的2型糖尿病(DM2)患者,从而提高风险/效益比例。

[0123] 研究设计

[0124] BALLETS(Birmingham和Lambeth肝评价测试策略(Birmingham and Lambeth Liver Evaluation Testing Strategy))研究是III期、随机化、双盲、平行组、安慰剂和活性比较物对照临床研究,以确定在患有2型糖尿病的对象中进行6个月巴格列酮或吡格列酮治疗对稳定胰岛素治疗的效力和安全性。先前已公开了基线人口统计学、CONSORT图以及效力和安全性数据(Henriksen,2011)。在目前的研究中,我们使用BALLETS研究的符合方案群体,其如先前所述由平均分布在四个组的299个对象组成(安慰剂、2个剂量的巴格列酮和1个剂量的吡格列酮)(Henriksen,2011),所有均具有基线以及与在治疗下血糖控制和Pro-C6确定相关的多至6个随访参数。

[0125] 统计学分析

[0126] 分析包括具有血清Pro-C6的基线测量值的来自符合方案群体的对象。基于对象的

基线Pro-C6值,将所述对象分入3个三分位组之一。三分位组1包括基线血清Pro-C6为6.2ng/mL或更低的对象;三分位组2具有6.3ng/mL至7.7ng/mL的基线血清Pro-C6,且三分位组3具有7.8ng/mL或更高的基线血清Pro-C6。通过方差分析(ANOVA)来比较这三个亚组之间的基线特征,并通过Fisher精确检验来比较每个三分位组中性别比例的比较。

[0127] 对基线血清Pro-C6水平、空腹血清葡萄糖(fasting serum glucose,FSG)、血液HbA1c、体重指数(BMI)、胰岛素抵抗的推导参数(HOMA-1R)和脂肪肝指数(fatty liver index,FLI)进行斯皮尔曼等级相关(Spearman's ranked correlation)。根据包括血清葡萄糖和胰岛素的稳态模型评估计算HOMA-1R(Feigh,2011),并使用下式计算FLI(如Bedogni等,2006所述):

$$[0128] \quad FLI = \frac{e^{0.953 \cdot \log_e(\text{甘油三酯}) + 0.139 \cdot BMI + 0.718 \cdot \log_e(ggt) + 0.083 \cdot \text{腰围} - 15.745}}{(1 + e^{0.953 \cdot \log_e(\text{甘油三酯}) + 0.139 \cdot BMI + 0.718 \cdot \log_e(ggt) + 0.083 \cdot \text{腰围} - 15.745})} \times 100$$

[0129] 在3个三分位组的每个中研究了FSG、血液HbA1c和血清Pro-C6从基线的变化作为时间和治疗的函数。用以从基线的变化作为因变量;基线水平、访视(治疗12周后)和治疗结束(26周后),以及基线水平相对于访视和治疗结束相对于访视相互作用作为固定效应,以及对象的非结构化协方差结构从混合效应重复测量模型估计最小二乘法平均值(LS平均值)和标准误差。

[0130] 对于每个对象而言,通过梯形法(trapezoidal method)作为曲线下面积计算相对于基线的平均变化,并用平均变化作为因变量、基线水平作为协变量以及治疗作为固定不动效应由协方差分析模型(ANCOVA)来估算LS平均值和标准误差。通过Dunnett法比较每个活性治疗组中的每个三分位组与安慰剂组,其中显著性水平针对多重比较进行调整。相对于基线的平均变化是否与0不同的评估基于LS平均值的标准误差。

[0131] 使用SAS软件包来进行所有的统计学计算。本研究已用ClinicalTrials.gov标识符NCT00515632注册。

[0132] 结果

[0133] 血清内促素与代谢参数相关联。

[0134] 先前已公开了BALLEET试验中通过代谢参数评估的治疗效力和安全性数据(Henriksen,2011)。内促素与代谢综合征相关的参数的基线相关性示于表8中。

[0135]

表8: 基线PRO-C6的亚组中的人口统计学和基线特征				
	内促素 (2.4-6.2 ng/mL) n=96	内促素 (6.3-7.7 ng/mL) n=101	内促素 (7.8-16 ng/mL) n=100	P值
治疗	巴格列酮10 mg: n=27 巴格列酮20 mg: n=22 吡格列酮45 mg: n=24 安慰剂 n= 23	巴格列酮10 mg: n=21 巴格列酮20 mg: n=21 吡格列酮45 mg: n=29 安慰剂 n= 30	巴格列酮10 mg: n=25 巴格列酮20 mg: n=25 吡格列酮45 mg: n=31 安慰剂 n= 19	-
年龄 (岁)	57.6 (8.1)	60.6 (8.3)	63.4 (8.0)	<0.0001
性别	女性: 21	女性: 32	女性: 43	p=0.007

[0136]

	(22%) 男性: 75 (78%)	(32%) 男性: 69 (68%)	(43%) 男性: 57 (57%)	
BMI (kg/m ²)	32.0 (3.9)	33.6 (4.7)	34.9 (6.3)	0.0005
腰围 (cm)	110 (10)	114 (12)	117 (14)	0.001
臀围 (cm)	109 (8)	111 (10)	115 (12)	0.0002
DXA全身脂肪量 (kg)	30.8 (8.4)	33.86 (8.9)	36.1 (9.8)	0.0006
DXA躯干脂肪量 (kg)	18.3 (5.2)	20.0 (5.0)	21.7 (5.6)	0.0001
血液HbA1C (%)	8.7 (1.4)	8.4 (1.3)	8.8 (1.5)	ns
血清葡萄糖 (mmol/L)	9.4 (3.3)	9.2 (3.2)	9.8 (3.4)	Ns
血清AST (U/L)	28 (12)	32 (13)	32 (12)	Ns
血清ALT (U/L)	31 (15)	34 (19)	33 (17)	Ns
血清GGT (U/L)	45 (38)	55 (56)	54 (47)	Ns
血清ALP (U/L)	163 (49)	172 (46)	187 (56)	0.004
血清胆红素 (μmol/L)	9 (3.3)	9 (5.1)	9 (3.7)	Ns
血清甘油三脂 (mmol/L)	1.52 (0.94)	1.85 (1.16)	2.05 (1.07)	0.002

[0137]

血清胆固醇 (mmol/L)	4.34 (0.96)	4.28 (0.85)	4.45 (1.04)	Ns
血清HDL胆固醇 (mmol/L)	1.31 (0.35)	1.23 (0.29)	1.25 (0.27)	Ns
血清LDL胆固醇 (mmol/L)	2.61 (0.90)	2.54 (0.76)	2.61 (0.97)	Ns

[0138] 内促素水平与HOMA-1R、FLI、甘油三酯和BMI显著相关联,但与FSG和HbA1c不相关联,支持内促素的确是脂肪细胞功能、脂肪量、以及胰岛素敏感性的一些方面相关的脂肪因子。内促素水平与胆固醇水平或肝酶不相关联。

[0139] 在6个月的治疗期结束时,在安慰剂组中,保持内促素与这些代谢参数的相关性(表9、10A)。然而,在用任一种PPAR γ 激动剂治疗的那些中,HOMA-1R与内促素之间的相关性消除,而内促素与BMI或FLI之间的相关性持续并且甚至表现出变强的趋势(表10B至10C)。

[0140]

表9: 在基线的斯皮尔曼相关系数 (Rho)						
	内促素	血清葡萄糖	基线HbA1c	HOMA-1R	FLI	BMI
PRO-C6	1	0.07	0.06	0.16**	0.32** *	0.24***
血清葡萄糖	-	1	0.47***	0.27***	0.20***	0.17**
基线-HbA1c	-	-	1	0.15**	0.17**	0.10
HOMA-1R	-	-	-	1	0.42** *	0.33***
FLI	-	-	-	-	1	0.86***
BMI	-	-	-	-	-	1

表10A: 在第26周时的斯皮尔曼相关系数-安慰剂组

	内促素	血清葡萄糖	HbA1c	HOMA-IR	FLI	BMI
PRO-C6	1	0.05	-0.07	0.28*	0.34* *	0.26*
血清葡萄糖	-	1	0.24*	0.23*	0.18	0.26*
HbA1c	-	-	1	0.12	0.16	0.11
HOMA-IR	-	-	-	1	0.35* *	0.23
FLI	-	-	-	-	1	0.87***
BMI	-	-	-	-	-	1

[0141]

表10B: 在26周时的斯皮尔曼相关系数-吡格列酮45 mg

	内促素	血清葡萄糖	HbA1c	HOMA-IR	FLI	BMI
PRO-C6	1	-0.21	- 0.31**	0.02	0.39** *	0.31**
血清葡萄糖	-	1	0.48** *	0.02	-0.11	-0.14
HbA1c	-	-	1	-0.06	-0.13	-0.12
HOMA-IR	-	-	-	1	0.30**	0.25*
FLI	-	-	-	-	1	0.84***
BMI	-	-	-	-	-	1

[0142]

[0143] 内促素鉴定格列酮类治疗的响应者

[0144] 在所有的4个治疗组中,体重和BMI在较高的三分位组中高于在较低的三分位组中(表1)。在治疗组之间未观察到葡萄糖稳态的差异。

[0145] 与安慰剂相比,在所有三个治疗组中FSG和HbA1c的绝对水平均降低,但与研究期间设置为零的基线相比仅在内促素的两个较高三分位组中降低(图7A至7F)。

[0146] 当评估FSG从基线到治疗结束(第26周)随时间的平均绝对变化时(图8,左图),FSG的降低较大(约2.5mM),并且当与较低的三分位组相比时在两个较高的三分位组中统计学

显著,其中与基线相比的降低在所有治疗组之间不显著。类似地,对于HbA1c (图8,右图),当均与安慰剂和基线水平相比时,在26周治疗期期间内促素水平的平均绝对变化仅在两个较高的三分位组中显著,而在较低的三分位组中不显著。当研究针对治疗的响应时,在基线血清内促素的两个较高三分位组中的患者显著地更可能表现出针对格列酮类治疗的临床上显著响应。在这些患者中,HbA1c降低超过1%和0.5%的比值比分别为4.1 ($p<0.001$)和4.3 ($p<0.001$) (图9)。当评估在治疗下胰岛素敏感性的变化(通过HOMA-1R)时,在较高的内促素三分位组中的对象再次表现出最佳的改善(图10A至10C),其中最高三分位组临界失去统计学显著性。有趣的是,尽管治疗效力不同,但在内促素水平的三分位组之间在体重增长方面不存在显著差异。

[0147] 图11中示出了血清内促素作为治疗和时间(以研究治疗的中点和结束)的函数的效应,其表示为相对于基线的变化百分比。对于两个最低三分位组而言,在安慰剂和治疗组二者中内促素水平提高,但在最高三分位组中不提高。

[0148] 不良事件

[0149] 当作为由于水移位(water displacement)引起的体积增大测量时,小腿水肿与基线血清内促素三分位数相关联。在较低和中间的三分位组中,格列酮类治疗导致小腿体积增大;而在较高的三分位组中,在治疗和安慰剂组之间不存在差异(图12)。在血清内促素的不同三分位组中的AE和严重AE (SAE)示于表11中。当根据内促素水平进行分层时,在三个不同治疗组中AE或SAE的发生不存在显著性差异。表11中SAE之间的差异以及图12中报告的小腿水肿是作为定量量度的小腿体积的函数,并且报告水肿是患者报告的输出(图10)。

[0150] 表11:每个治疗组中基线内促素亚组中的不良事件谱

[0151]

N (%) E	安慰剂	巴格列酮10 mg	巴格列酮20 mg	吡格列酮45 mg
三分位组1: AE				
#对象	n=23	n=27	n=22	n=24
所有AE	16 (70%) 30	20 (74%) 38	17 (77%) 33	19 (79%) 45
严重AE	0 (0%) 0	1 (4%) 1	1 (5%) 1	1 (4%) 1
三分位组2: AE				
#对象	n=30	n=21	n=21	n=29
所有AE	23 (77%) 51	17 (81%) 35	15 (71%) 36	17 (59%) 37
严重AE	3 (10%) 3	1 (5%) 1	0 (0%) 0	2 (6%) 3
三分位组3: AE				
#对象	n=19	n=25	n=25	n=31
所有AE	14 (74%) 41	20 (60%) 55	20 (60%) 43	25 (81%) 66
严重AE	0 (0%) 0	1 (4%) 1	6 (24%) 6	4 (13%) 6
三分位组1: 严重AE				
心力衰竭	0 (0%) 0	0 (0%) 0	0 (0%) 0	0 (0%) 0
心肌缺血	1 (4%) 1	0 (0%) 0	2 (9%) 2	0 (0%) 0

[0152]

外周水肿	0 (0%) 0	2 (7%) 2	2 (9%) 2	5 (21%) 5
总严重AE	1 (4%) 1	2 (7%) 2	4 (18%) 4	5 (21%) 5
三分位组2: 严重AE				
心力衰竭	0 (0%) 0	0 (0%) 0	0 (0%) 0	0 (0%) 0
心肌缺血	1 (3%) 1	1 (5%) 1	0 (0%) 0	1 (3%) 1
外周水肿	1 (3%) 1	3 (14%) 3	2 (10%) 2	5 (17%) 5
总严重AE	2 (7%) 2	4 (19%) 4	2 (10%) 2	5 (17%) 6
三分位组3: 严重AE				
心力衰竭	0 (0%) 0	0 (0%) 0	0 (0%) 0	1 (3%) 1
心肌缺血	1 (5%) 1	0 (0%) 0	1 (4%) 1	3 (10%) 4
外周水肿	1 (5%) 2	1 (8%) 1	1 (4%) 1	2 (6%) 2
总严重AE	2 (11%) 3	1 (8%) 1	2 (8%) 2	6 (19%) 7

[0153] 讨论

[0154] 血清内促素 (Pro-C6) 对患有2型糖尿病的患者中针对胰岛素增敏剂吡格列酮和巴格列酮的响应具有预测性。因此,当与较低三分位组中的患者相比时,Pro-C6血清水平在两个较高三分位组中的患者具有治疗响应的可能性高4倍。由于格列酮类与例如非致命性心力衰竭和骨折的安全性问题相关,因此鉴定将获得最大治疗效益且具有最少AE的最佳响应者对仍被认为是高度有效胰岛素增敏剂的这些药物的持续使用是关键的。直接一致地,以FPG和HbA1c三分位数减小响应的基线Pro-C6的较高三分位组中的患者未发生小腿水肿(用格列酮类治疗的主要AE之一)提高。这些组合的效力和安全性数据对经格列酮类治疗患者的改善的效益与副作用预测高度相关;当考虑其对其他适应证(尤其是非酒精性脂肪肝炎(NASH)的治疗)的再利用时,这也应适用。

[0155] 肥胖中内促素介导的代谢功能障碍可能通过诱导促炎状态和脂肪组织中纤维化偶联有能量消耗降低来诱导。因此,其抑制提高胰岛素敏感性并减轻脂肪组织炎症(Sun, 2014),这与我们升高的血清内促素水平指示针对PPAR γ 激动剂的响应的发现很好地相关联。此外,内促素前体前胶原 $\alpha 3$ (V1)的mRNA水平在肥胖脂肪组织中上调,再次与脂肪组织炎症和纤维化并行,支持在一般情况下V1型前胶原作为脂肪细胞和脂肪组织的调节物的重要作用(Dankel, 2014)。ECM并且尤其是V1型前胶原和内促素在脂肪肝疾病及其严重表现形式

NASH (表现出与2型糖尿病至少部分重叠的代谢性-纤维变性肝病) 中可特别相关。因此, 我们期望这种新生物标志物将还有助于NASH患者的诊断和管理, 其中胰岛素增敏剂对亚群 (胰岛素抵抗和肝纤维化的治疗二者) 可以是有益的。在此, 需要进一步研究ECM (特别是胶原/V1型胶原) 及其在脂肪肝向明显纤维变性NASH的转变中的功能作用。一致地, 在目前的研究中, 我们观察到与血清甘油三脂和FLI指数的强相关性, 且FLI指数与NASH炎性活性相关并且预测更严重的肝纤维化 (Bedogni, 2006)。支持V1型胶原在NASH相关性纤维化中的作用, 现有的研究表明其在活跃疤痕形成区域中显著表达 (Burt, 1990; Griffiths, 1992), 并且已表明升高的V1胶原核心结构 (其缺乏内促素结构域) 血清水平与啮齿动物 (Veidal, 2011) 和患者 (Lebensztejn, 2006; Stickel, 2001) 中的晚期肝纤维化以及升高的门压力 (Leeming, 2013) 相关。PPAR γ 调节前胶原 $\alpha 3$ (V1) 的表达, 这与我们的发现直接一致。事实上, 前胶原 $\alpha 3$ (V1) mRNA被PPAR γ 抑制, 如在经针对PPAR γ 的siRNA处理的脂肪细胞培养物中其mRNA提高, 以及在经PPAR γ 激动剂吡格列酮治疗的2型糖尿病患者 (尤其是前胶原 $\alpha 3$ (V1) mRNA的基线组织水平高的患者中) 的皮下脂肪组织中其转录物降低所证明的。这些数据可部分地解释从基线到治疗结束, 内促素/Pro-C6血清水平与HbA1c或HOMA-1R之间的相关性变化, 特别是在格列酮类治疗后内促素与代谢参数之间相关性的缺乏。因此, 内促素前体在外周脂肪组织中的表达 (如通过前胶原 $\alpha 3$ (V1) mRNA测量的) 在严重肥胖的、胰岛素抵抗的患者中不依赖于BMI或总脂肪量。在另一临床研究中, 肥胖对象中的组织内促素水平与慢性炎症和全身性胰岛素抵抗相关联 (Park, 2013)。在ob/ob小鼠 (缺乏功能性瘦素基因) 中在白脂肪组织中不存在V1胶原的情况下的研究提供了V1前胶原、脂肪组织纤维化和葡萄糖敏感性受损之间直接联系的其他证据。在不存在脂肪组织纤维化和炎症的情况下, 这些小鼠的胰岛素敏感性显著提高 (Khan, 2009)。在第一观点中, 这些数据显示与如我们的研究中所发现的血清内促素与BMI、FLI和HOMA-1R之间的强相关性相矛盾。然而, 对脂肪因子内促素的蛋白水解产生而言, V1前胶原的存在仅是必需的而不是充分的先决条件。因此, 目标将是鉴定产生内促素的蛋白酶并表征其上游调控。此外, 瘦素诱导V1型前胶原表达, 这进一步支持了瘦素抗性、代谢功能障碍和内促素之间的联系。

[0156] 如先前讨论的, ECM至今主要被认为是被动性支架。已经通过编码其三个构成链的基因COL6A1、COL6A2和COL6A3的突变对V1型胶原进行充分认识, 所述突变引起肌肉病症, 例如Bethlem肌病、Ullrich先天性肌营养不良、肢带型肌营养不良 (limb-girdle muscular dystrophy) 和常染色体隐性肌硬化。 (Lampe, 2005; Bonaldo, 1998; Bushby, 2014)。由于肌肉代表胰岛素抵抗的重要调节物, 因此这提供了与代谢功能障碍的令人感兴趣的关联。因此, 所有可获得的证据强烈地表明, V1型胶原不仅是被动性ECM组分, 而且是与胰岛素抵抗、2型糖尿病和NASH相关的脂肪 (和肝) 代谢功能障碍的重要介质。

[0157] 总之, 主要来自于脂肪细胞和脂肪组织的循环内促素与胰岛素抵抗相关地升高并且预测针对胰岛素增敏剂的响应。这允许鉴定和监测将对胰岛素增敏剂作出最佳响应的患者, 这提高PPAR γ 激动剂在治疗2型糖尿病和可能地NASH中的效益/风险比。

[0158] 在本说明书中, 除非另有明确说明, 否则在运算符的意义上使用词语“或/或者”, 当满足所述条件中的任一个或两个时, 返回真实值, 这与要求满足仅一个条件的运算符“异或 (exclusive or)”相对。词语“包含/含有”以“包括”的含义使用, 而不表示“由.....组成”。以上认可的所有现有教导均在此通过引用并入。本文中任何在先公开文献的认可不应

被视为承认或表示其教导在澳大利亚或其他地方在本日期是公知常识。参考文献

- [0159] 1. Agrawal R, Jain P, Dikshit SN. Balaglitazone: a second generation peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma (gamma) agonist. *Mini Rev Med Chem* 2012 February;12(2):87-97.
- [0160] 2. Aigner T, Hambach L, Soder S, Schlotzer-Schrehardt U, Poschl E. The C5 domain of Col6A3 is cleaved off from the Col6 fibrils immediately after secretion. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;290:743-8.
- [0161] 3. Armbrecht G, Belavý DL, Gast U, et al. (2010) Resistive vibration exercise attenuates bone and muscle atrophy in 56 days of bed rest: biochemical markers of bone metabolism. *Osteoporos Int* 21:597-607. doi:10.1007/s00198-009-0985-z
- [0162] 4. Atkinson JC, Ruhl M, Becket J, Ackermann R, Schuppan D. Collagen VI regulates normal and transformed mesenchymal cell proliferation in vitro. *Exp Cell Res* 1996 Nov 1;228:283-291.
- [0163] 5. Barascuk N, Genovese F, Larsen L, Byrjalsen I, Zheng Q, Sun S, Hosbond S, Poulsen TS, Diederichsen A, Jensen JM, Mickley H, Register TC, Rasmussen LM, Leeming DJ, Christiansen C, Karsdal MA. A MMP derived versican neo-epitope is elevated in plasma from patients with atherosclerotic heart disease. *Int J Clin Exp Med* 2013;6:174-184.
- [0164] 6. Barascuk N, Veidal SS, Larsen L, et al. A novel assay for extracellular matrix remodeling associated with liver fibrosis: An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for a MMP-9 proteolytically revealed neo-epitope of type III collagen. *Clin Biochem* 2010;43:899-904.
- [0165] 7. Bedogni G, Bellentani S, Miglioli L, Masutti F, Passalacqua M, Castiglione A et al. The Fatty Liver Index: a simple and accurate predictor of hepatic steatosis in the general population. *BMC Gastroenterol* 2006;6:33.
- [0166] 8. Belavý DL, Miokovic T, Armbrecht G, et al. (2009) Resistive vibration exercise reduces lower limb muscle atrophy during 56-day bed-rest. *Journal of musculoskeletal&neuronal interactions* 9:225-235.
- [0167] 9. Berger JP, Akiyama TE, Meinke PT. PPARs: therapeutic targets for metabolic disease. *Trends Pharmacol Sci* 2005 May;26(5):244-51.
- [0168] 10. Bhasin S, He EJ, Kawakubo M, et al. (2009) N-terminal propeptide of type III procollagen as a biomarker of anabolic response to recombinant human GH and testosterone. *J Clin Endocrinol Metab* 94:4224-4233. doi:10.1210/jc.2009-1434
- [0169] 11. Bidanset DJ, Guidry C, Rosenberg LC, et al. Binding of the proteoglycan decorin to collagen type VI. *J Biol Chem* 1992;267:5250-6.
- [0170] 12. Bonaldo P, Russo V, Bucciotti F, Doliana R, Colombatti A. Structural and functional features of the alpha 3 chain indicate a bridging role for

chicken collagen VI in connective tissues. *Biochemistry* 1990;29:1245-54.

[0171] 13. Bonaldo P, Sandri M (2012) Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *Dis Model Mech* 6:25-39. doi:10.1242/dmm.010389

[0172] 14. Burt AD, Griffiths MR, Schuppan D, Voss B, MacSween RN. Ultrastructural localization of extracellular matrix proteins in liver biopsies using ultracryomicrotomy and immuno-gold labelling. *Histopathology* 1990 January;16 (1):53-8.

[0173] 15. Bushby KM, Collins J, Hicks D. Collagen type VI myopathies. *Adv Exp Med Biol* 2014;802:185-99

[0174] 16. Carter RI, Ungurs MJ, Mumford RA, Stockley RA. Aalpha-Val360: a marker of neutrophil elastase and COPD disease activity. *Eur Respir J* 2013 Jan;41:31-38.

[0175] 17. Charbonnel B, DeFronzo R, Davidson J, Schmitz O, Birkeland K, Pirags V et al. Pioglitazone use in combination with insulin in the prospective pioglitazone clinical trial in macrovascular events study (PROactive19). *J Clin Endocrinol Metab* 2010 May;95 (5):2163-71.

[0176] 18. Chen F, Lam R, Shaywitz D, et al. Evaluation of early biomarkers of muscle anabolic response to testosterone. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2011;2:45-56.

[0177] 19. Cho N, Momose Y. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists as insulin sensitizers: from the discovery to recent progress. *Curr Top Med Chem* 2008;8 (17):1483-507.

[0178] 20. Corhay JL, Moermans C, Henket M, Nguyen DD, Duysinx B, Louis R. Increased of exhaled breath condensate neutrophil chemotaxis in acute exacerbation of COPD. *Respir Res* 2014;15:115.

[0179] 21. Cox TR, Erler JT. Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: implications for fibrotic diseases and cancer. *Dis Model Mech* 2011 Mar;4:165-178.

[0180] 22. Cruz-Jentoft AJ, Baeyens JP, Bauer JM, et al. Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People. *Age Ageing* 2010;39:412-23.

[0181] 23. Dankel SN, Svard J, Mattha S, Claussnitzer M, Kloting N, Glunk V et al. COL6A3 expression in adipocytes associates with insulin resistance and depends on PPARgamma and adipocyte size. *Obesity (Silver Spring)* 2014 August;22 (8):1807-13.

[0182] 24. Donaldson GC, Seemungal TA, Bhowmik A, Wedzicha JA. Relationship between exacerbation frequency and lung function decline in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2002 Oct;57:847-852.

[0183] 25. Donaldson GC, Wedzicha JA. COPD exacerbations. 1: Epidemiology. *Thorax*

2006 Feb;61:164-168.

[0184] 26.Engvall E,Hessle H,Klier G.Molecular assembly,secretion,and matrix deposition of type VI collagen.J Cell Biol 1986 Mar;102:703-710.

[0185] 27.Feigh M,Henriksen K,Andreassen KV,Hansen C,Henriksen JE,Beck-Nielsen H et al.A novel oral form of salmon calcitonin improves glucose homeostasis and reduces body weight in diet-induced obese rats.Diabetes Obes Metab 2011 October;13(10):911-20.

[0186] 28.Gefter ML,Margulies DH,Scharff MD.A simple method for polyethylene glycol-promoted hybridization of mouse myeloma cells.Somatic Cell Genet 1977; 3:231-6.

[0187] 29.Gelse K,Poschl E,Aigner T.Collagens--structure,function,and biosynthesis.Adv Drug Deliv Rev 2003;55:1531-46.

[0188] 30.Giannelli G,De MA,Marinosci F,Antonaci S.Matrix metalloproteinase imbalance in muscle disuse atrophy.Histol Histopathol 2005;20:99-106.

[0189] 31.Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD).Global Strategy for the Diagnosis,Management and Prevention of COPD.www.goldcopd.org.Date last updated:January 2014.Date last accessed: October 222014.

[0190] 32.Granzier HL,Irving TC.Passive tension in cardiac muscle: contribution of collagen,titin,microtubules,and intermediate filaments.Biophys J 1995;68:1027-44.

[0191] 33.Griffiths MR,Shepherd M,Ferrier R,Schuppan D,James OF,Burt AD.Light microscopic and ultrastructural distribution of type VI collagen in human liver:alterations in chronic biliary disease.Histopathology 1992 October;21(4):335-44.

[0192] 34.Hallgren O,Nihlberg K,Dahlback M,Bjerner L,Eriksson LT,Erjefalt JS,Lofdahl CG,Westergren-Thorsson G.Altered fibroblast proteoglycan production in COPD.Respir Res 2010;11:55.

[0193] 35.Heinemeier KM,Olesen JL,Haddad F,et al.(2009)Effect of unloading followed by reloading on expression of collagen and related growth factors in rat tendon and muscle.J Appl Physiol 106:178-186.doi:10.1152/jappphysiol.91092.2008

[0194] 36.Henriksen K,Byrjalsen I,Qvist P,Beck-Nielsen H,Hansen G,Riis BJ et al.Efficacy and safety of the PPARgamma partial agonist balaglitazone compared with pioglitazone and placebo:a phase III,randomized,parallel-group study in patients with type 2 diabetes on stable insulin therapy.Diabetes Metab Res Rev 2011 May;27(4):392-401.

[0195] 37.Home PD,Pocock SJ,Beck-Nielsen H,Curtis PS,Gomis R,Hanefeld M et al.Rosiglitazone evaluated for cardiovascular outcomes in oral agent

combination therapy for type 2 diabetes (RECORD): a multicentre, randomised, open-label trial. *Lancet* 2009 June 20;373(9681):2125-35.

[0196] 38. Hortobagyi T, Dempsey L, Fraser D, et al. (2000) Changes in muscle strength, muscle fibre size and myofibrillar gene expression after immobilization and retraining in humans. *J Physiol* 524 Pt 1:293-304.

[0197] 39. Huang R, Merrilees MJ, Braun K, Beaumont B, Lemire J, Clowes AW, Hinek A, Wight TN. Inhibition of versican synthesis by antisense alters smooth muscle cell phenotype and induces elastic fiber formation in vitro and in neointima after vessel injury. *Circ Res* 2006 Feb 17;98:370-377.

[0198] 40. Hughes VA, Frontera WR, Roubenoff R, Evans WJ, Singh MA. Longitudinal changes in body composition in older men and women: role of body weight change and physical activity. *Am J Clin Nutr* 2002;76:473-81.

[0199] 41. Hurst JR, Vestbo J, Anzueto A, Locantore N, Mullerova H, Tal-Singer R, Miller B, Lomas DA, Agusti A, Macnee W, Calverley P, Rennard S, Wouters EF, Wedzicha JA. Susceptibility to exacerbation in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2010 Sep 16;363:1128-1138.

[0200] 42. Karalliedde J, Buckingham RE. Thiazolidinediones and their fluid-related adverse effects: facts, fiction and putative management strategies. *Drug Saf* 2007;30(9):741-53.

[0201] 43. Karsdal MA, Delvin E, Christiansen C. Protein fingerprints—relying on and understanding the information of serological protein measurements. *Clin Biochem* 2011 Nov;44:1278-1279.

[0202] 44. Karsdal MA, Manon-Jensen T, Genovese F, Kristensen JH, Nielsen MJ, Sand JM et al. Novel insights into the function and dynamics of extracellular matrix in liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2015 May 15;308(10):G807-G830.

[0203] 45. Karsdal MA, Nielsen MJ, Sand JM, Henriksen K, Genovese F, Bay-Jensen AC, Smith V, Adamkewicz JI, Christiansen C, Leeming DJ. Extracellular matrix remodeling: the common denominator in connective tissue diseases. Possibilities for evaluation and current understanding of the matrix as more than a passive architecture, but a key player in tissue failure. *Assay Drug Dev Technol* 2013 Mar;11:70-92.

[0204] 46. Keene DR, Engvall E, Glanville RW. Ultrastructure of type VI collagen in human skin and cartilage suggests an anchoring function for this filamentous network. *J Cell Biol* 1988;107:1995-2006.

[0205] 47. Kenagy RD, Plaas AH, Wight TN. Versican degradation and vascular disease. *Trends Cardiovasc Med* 2006 Aug;16:209-215.

[0206] 48. Khan T, Muise ES, Iyengar P, Wang ZV, Chandalia M, Abate N et al. Metabolic dysregulation and adipose tissue fibrosis: role of collagen

VI.Mol Cell Biol 2009 March;29(6):1575-91.

[0207] 49.Kuo HJ,Maslen CL,Keene DR,Glanville RW.Type VI collagen anchors endothelial basement membranes by interacting with type IV collagen.J Biol Chem 1997;272:26522-9.

[0208] 50.Lamande SR,Morgelin M,Adams NE,Selan C,Allen JM.The C5 domain of the collagen VI alpha3(VI) chain is critical for extracellular microfibril formation and is present in the extracellular matrix of cultured cells.J Biol Chem 2006;281:16607-14.

[0209] 51.Lampe AK,Bushby KMD(2005) Collagen VI related muscle disorders.J Med Genet 42:673-685.doi:10.1136/jmg.2002.002311

[0210] 52.Larsen PJ,Lykkegaard K,Larsen LK,Fleckner J,Sauerberg P,Wassermann K et al.Dissociation of antihyperglycaemic and adverse effects of partial peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR-gamma) agonist balaglitazone.Eur J Pharmacol 2008 October 31;596(1-3):173-9.

[0211] 53.Lebensztejn DM,Sobaniec-Lotowska ME,Kaczmariski M,Voelker M,Schuppan D.Matrix-derived serum markers in monitoring liver fibrosis in children with chronic hepatitis B treated with interferon alpha.World J Gastroenterol 2006 June 7;12(21):3338-43.

[0212] 54.Leeming DJ,Nielsen MJ,Dai Y,Veidal SS,Vassiliadis E,Zhang C,He Y,Vainer B,Zheng Q,Karsdal MA.Enzyme-linked immunosorbent serum assay specific for the 7S domain of Collagen Type IV(P4NP 7S):A marker related to the extracellular matrix remodeling during liver fibrogenesis.Hepatol Res 2012 May;42:482-493.

[0213] 55.Leeming DJ,Sand JM,Nielsen MJ,Genovese F,Martinez FJ,Hogaboam CM,Han MK,Klickstein LB,Karsdal MA.Serological investigation of the collagen degradation profile of patients with chronic obstructive pulmonary disease or idiopathic pulmonary fibrosis.Biomark Insights 2012;7:119-126.

[0214] 56.Leeming DJ,Karsdal MA,Byrjalsen I,Bendtsen F,Trebicka J,Nielsen MJ et al.Novel serological neo-epitope markers of extracellular matrix proteins for the detection of portal hypertension.Aliment Pharmacol Ther 2013 November;38(9):1086-96.

[0215] 57.Mak KM,Sehgal P,Harris CK.Type VI Collagen:Its Biology and Value as a Biomarker of Hepatic Fibrosis.Austin Biomark Diagn.1[2],9.2014.

[0216] 58.Mercer PF,Shute JK,Bhowmik A,Donaldson GC,Wedzicha JA,Warner JA.MMP-9,TIMP-1 and inflammatory cells in sputum from COPD patients during exacerbation.Respir Res 2005;6:151.

[0217] 59.Merrilees MJ,Ching PS,Beaumont B,Hinek A,Wight TN,Black PN.Changes in elastin,elastin binding protein and versican in alveoli in chronic obstructive pulmonary disease.Respir Res 2008;9:41.

- [0218] 60. Miller BF, Olesen JL, Hansen M, et al. (2005) Coordinated collagen and muscle protein synthesis in human patella tendon and quadriceps muscle after exercise. *J Physiol (Lond)* 567:1021-1033. doi:10.1113/jphysiol.2005.093690
- [0219] 61. Miller TA, Lesniewski LA, Muller-Delp JM, et al. (2001) Hindlimb unloading induces a collagen isoform shift in the soleus muscle of the rat. *AJP:Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 281:R1710-R1717.
- [0220] 62. Nedergaard A, Karsdal MA, Sun S, Henriksen K. Serological muscle loss biomarkers: an overview of current concepts and future possibilities. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2013;4:1-17.
- [0221] 63. Nedergaard A, Sun S, Karsdal MA, et al. (2013) Type VI collagen turnover-related peptides—novel serological biomarkers of muscle mass and anabolic response to loading in young men. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 4:267-275. doi:10.1007/s13539-013-0114-x
- [0222] 64. Nielsen MJ, Nedergaard AF, Sun S, et al. (2013) The neo-epitope specific PRO-C3 ELISA measures true formation of type III collagen associated with liver and muscle parameters. *Am J Transl Res* 5:303-315.
- [0223] 65. Niemela O, Risteli L, Parkkinen J, Risteli J. Purification and characterization of the N-terminal propeptide of human type III procollagen. *Biochem J* 1985;232:145-50.
- [0224] 66. O'Reilly PJ, Jackson PL, Wells JM, Dransfield MT, Scanlon PD, Blalock JE. Sputum PGP is reduced by azithromycin treatment in patients with COPD and correlates with exacerbations. *BMJ Open* 2013;3:e004140.
- [0225] 67. Orkin RW, Gehron P, McGoodwin EB, Martin GR, Valentine T, Swarm R. A murine tumor producing a matrix of basement membrane. *J Exp Med* 1977 Jan 1; 145:204-220.
- [0226] 68. Pasarica M, Gowronska-Kozak B, Burk D, Remedios I, Hymel D, Gimble J et al. Adipose tissue collagen VI in obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2009 December;94(12):5155-62.
- [0227] 69. Park J, Scherer PE. Adipocyte-derived endotrophin promotes malignant tumor progression. *J Clin Invest* 2012 November;122(11):4243-56.
- [0228] 70. Park J, Scherer PE. Endotrophin in the tumor stroma: a new therapeutic target for breast cancer? *Expert Rev Anticancer Ther* 2013 February;13(2):111-3.
- [0229] 71. Pfister RR, Haddox JL, Sommers Cl, Lam KW. Identification and synthesis of chemotactic tripeptides from alkali-degraded whole cornea. A study of N-acetyl-proline-glycine-proline and N-methyl-proline-glycine-proline. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995 Jun;36:1306-1316.
- [0230] 72. Rennie MJ, Selby A, Atherton P, et al. Facts, noise and wishful thinking: muscle protein turnover in aging and human disuse atrophy. *Scand J*

Med Sci Sports 2010;20:5-9.

[0231] 73.Reznick AZ,Menashe O,Bar-Shai M,Coleman R,Carmeli E.Expression of matrix metalloproteinases,inhibitor,and acid phosphatase in muscles of immobilized hindlimbs of rats.Muscle Nerve 2003;27:51-9.

[0232] 74.Rittweger J,Belavy D,Hunek P,et al.Highly demanding resistive vibration exercise program is tolerated during 56 days of strict bed-rest.Int J Sports Med 2006;27:553-9.

[0233] 75.Ruhl M,Johannsen M,Atkinson J,Manski D,Sahin E,Somasundaram R,Riecken EO,Schuppan D.Soluble collagen VI induces tyrosine phosphorylation of paxillin and focal adhesion kinase and activates the MAP kinase erk2 in fibroblasts.Exp Cell Res 1999 Aug 1;250:548-557.

[0234] 76.Ruhl M,Sahin E,Johannsen M,Somasundaram R,Manski D,Riecken EO,Schuppan D.Soluble collagen VI drives serum-starved fibroblasts through S phase and prevents apoptosis via down-regulation of Bax.J Biol Chem 1999 Nov 26;274:34361-34368.

[0235] 77.Sand JM,Larsen L,Hogaboam C,Martinez F,Han M,Rossel LM,Nawrocki A,Zheng Q,Karsdal MA,Leeming DJ.MMP mediated degradation of type IV collagen alpha 1 and alpha 3 chains reflects basement membrane remodeling in experimental and clinical fibrosis--validation of two novel biomarker assays.PLoS One 2013;8:e84934.

[0236] 78.Savolainen J,Vaananen K,Vihko V,et al.(1987)Effect of immobilization on collagen synthesis in rat skeletal muscles.American Journal of Physiology-Regulatory,Integrative and Comparative Physiology 252:R883-R888.

[0237] 79.Scharf G,Heineke J.Finding good biomarkers for sarcopenia.J Cachexia Sarcopenia Muscle 2012;3:145-8.

[0238] 80.Seemungal TA,Donaldson GC,Paul EA,Bestall JC,Jeffries DJ,Wedzicha JA.Effect of exacerbation on quality of life in patients with chronic obstructive pulmonary disease.Am J Respir Crit Care Med 1998 May;157:1418-1422.

[0239] 81.Soler-Cataluna JJ,Martinez-Garcia MA,Roman SP,Salcedo E,Navarro M,Ochando R.Severe acute exacerbations and mortality in patients with chronic obstructive pulmonary disease.Thorax 2005 Nov;60:925-931.

[0240] 82.Soroceanu MA,Miao D,Bai XY,Su H,Goltzman D,Karaplis AC.Rosiglitazone impacts negatively on bone by promoting osteoblast/osteocyte apoptosis.J Endocrinol 2004 October;183(1):203-16.

[0241] 83.Stallcup WB,Dahlin K,Healy P.Interaction of the NG2 chondroitin sulfate proteoglycan with type VI collagen.J Cell Biol 1990;111:3177-88.

[0242] 84.Stickel F,Urbaschek R,Schuppan D,Poeschl G,Oesterling C,Conradt C

et al. Serum collagen type VI and XIV and hyaluronic acid as early indicators for altered connective tissue turnover in alcoholic liver disease. *Dig Dis Sci* 2001 September;46 (9):2025-32.

[0243] 85. Sun K, Park J, Gupta OT, Holland WL, Auerbach P, Zhang N et al. Endotrophin triggers adipose tissue fibrosis and metabolic dysfunction. *Nat Commun* 2014;5:3485.

[0244] 86. Takada I, Suzawa M, Matsumoto K, Kato S. Suppression of PPAR transactivation switches cell fate of bone marrow stem cells from adipocytes into osteoblasts. *Ann N Y Acad Sci* 2007 November;1116:182-95.

[0245] 87. Takamatsu S, Nakabayashi H, Okamoto Y, Nakano H. Noninvasive determination of liver collagen content in chronic hepatitis. Multivariate regression modeling with blood chemical parameters as variables. *J Gastroenterol* 1997 Jun;32:355-360.

[0246] 88. Tapanainen P, Knip M, Risteli L, et al. (1997) Collagen metabolites in the prediction of response to GH therapy in short children. *Eur J Endocrinol* 137:621-625.

[0247] 89. Tetley TD. Inflammatory cells and chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2005 Dec;4:607-618.

[0248] 90. Urciuolo A, Quarta M, Morbidoni V, et al. (2013) Collagen VI regulates satellite cell self-renewal and muscle regeneration. *Nat Commun* 4:1964. doi: 10.1038/ncomms2964

[0249] 91. Veidal SS, Karsdal MA, Vassiliadis E, et al. MMP mediated degradation of type VI collagen is highly associated with liver fibrosis--identification and validation of a novel biochemical marker assay. *PLoS One* 2011;6:e24753.

[0250] 92. Vestbo J, Rennard S. Chronic obstructive pulmonary disease biomarker (s) for disease activity needed--urgently. *Am J Respir Crit Care Med* 2010 Oct 1;182:863-864.

[0251] 93. Welle S. Cellular and molecular basis of age-related sarcopenia. *Can J Appl Physiol* 2002;27:19-41.

[0252] 94. Williams P, Goldspink G (1981) Connective tissue changes in surgically overloaded muscle. *Cell Tissue Res* 221:465-470. doi:10.1007/BF00216749

序列表

<110> 北欧生物科技公司

<120> 用于V1型胶原序列的免疫测定

<150> GB1505654.2

<151> 2015-04-01

<160> 4

<170> BiSSAP 1.2

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> 人

<220>

<223> V1型胶原的C端表位

<400> 1

Lys Pro Gly Val Ile Ser Val Met Gly Thr

1 5 10

<210> 2

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 延长的序列

<400> 2

Lys Pro Gly Val Ile Ser Val Met Gly Thr Ala

1 5 10

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 截短的序列

<400> 3

Lys Pro Gly Val Ile Ser Val Met Gly

1 5

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 具有任选接头的生物素化的

<220>

<221> SITE

<222> 1

<223> 具有任选接头的生物素化的

<400> 4

Lys Pro Gly Val Ile Ser Val Met Gly Thr

1

5

10

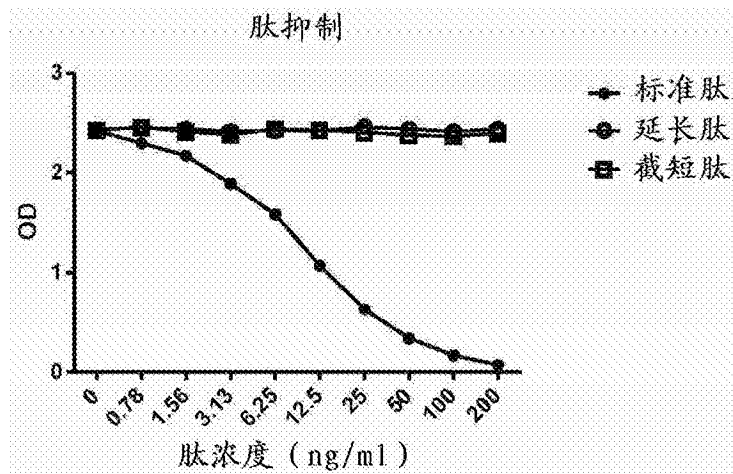


图1

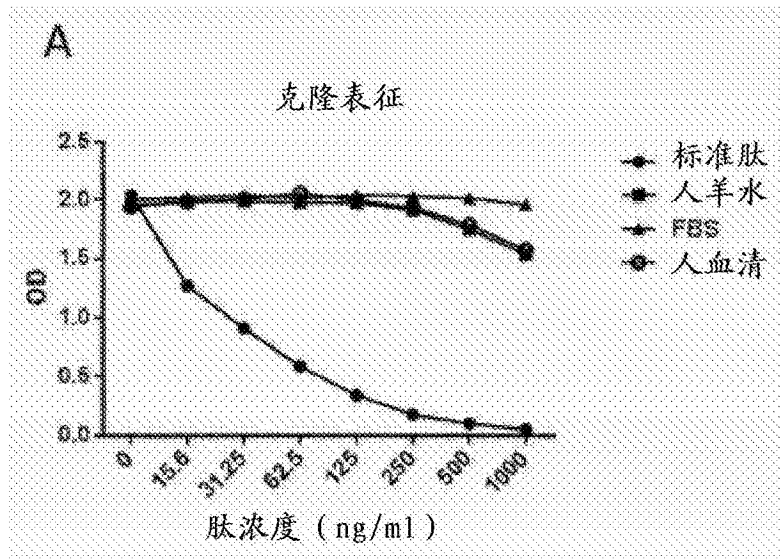


图2

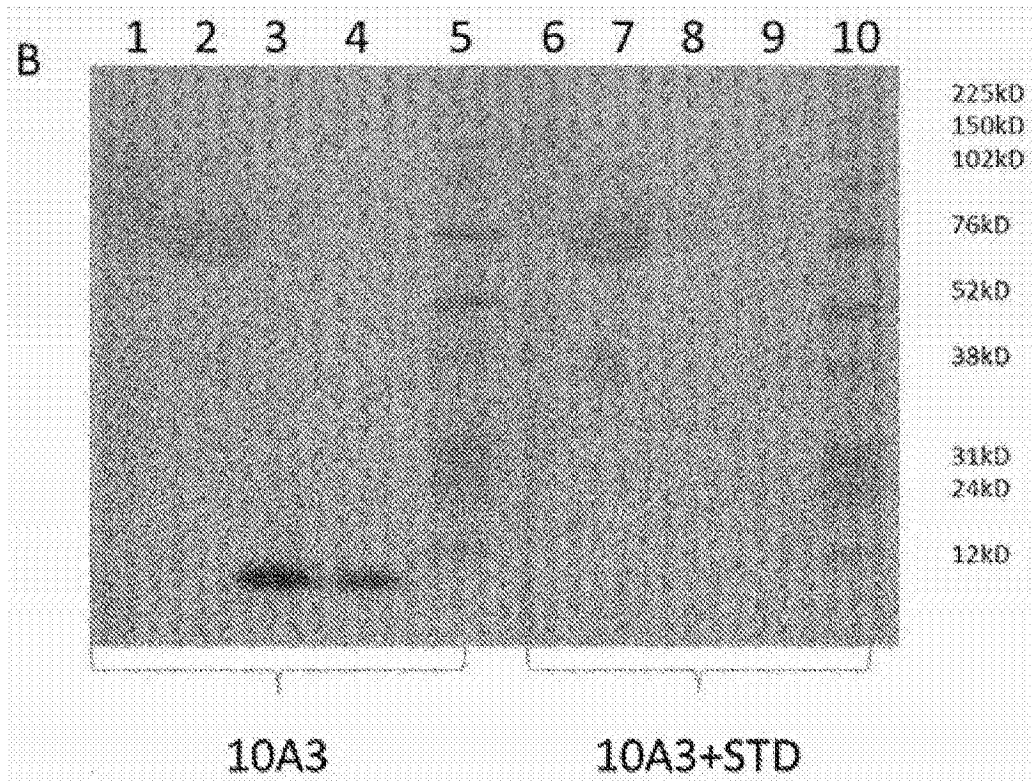


图2(续)

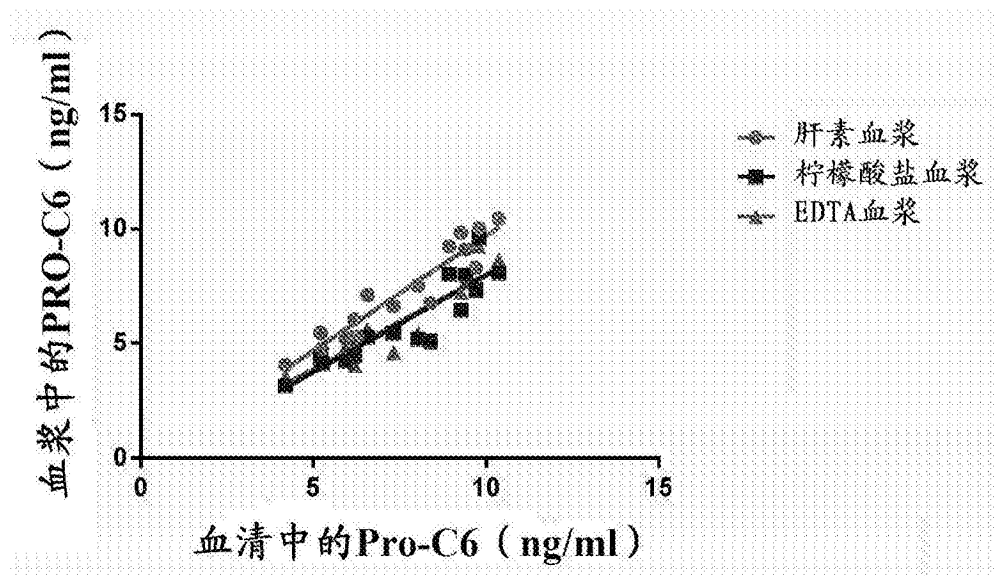


图3

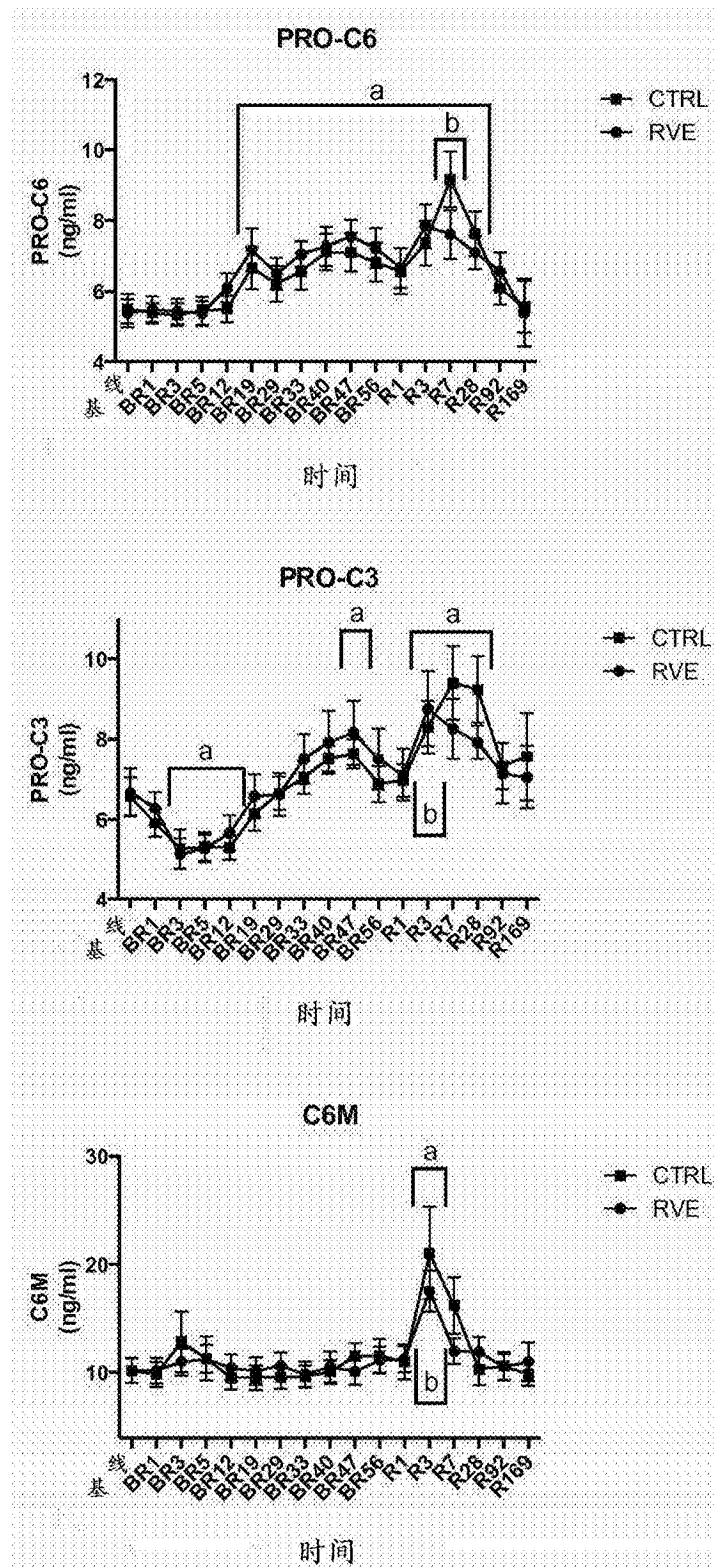


图4

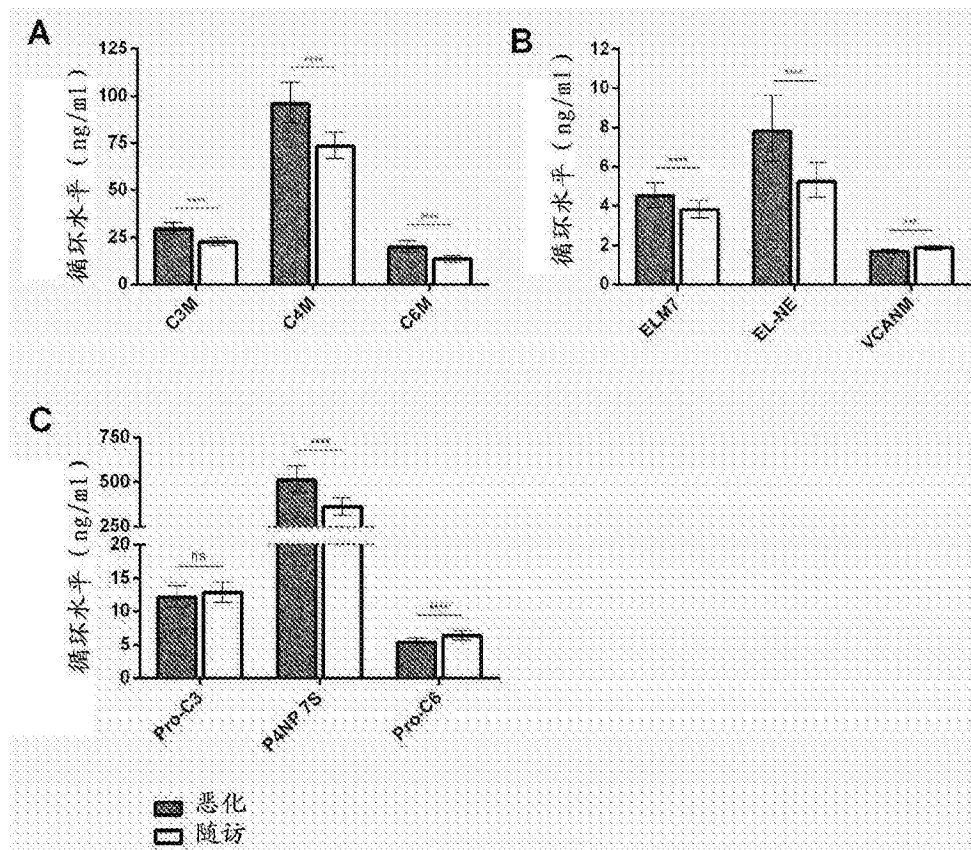


图5

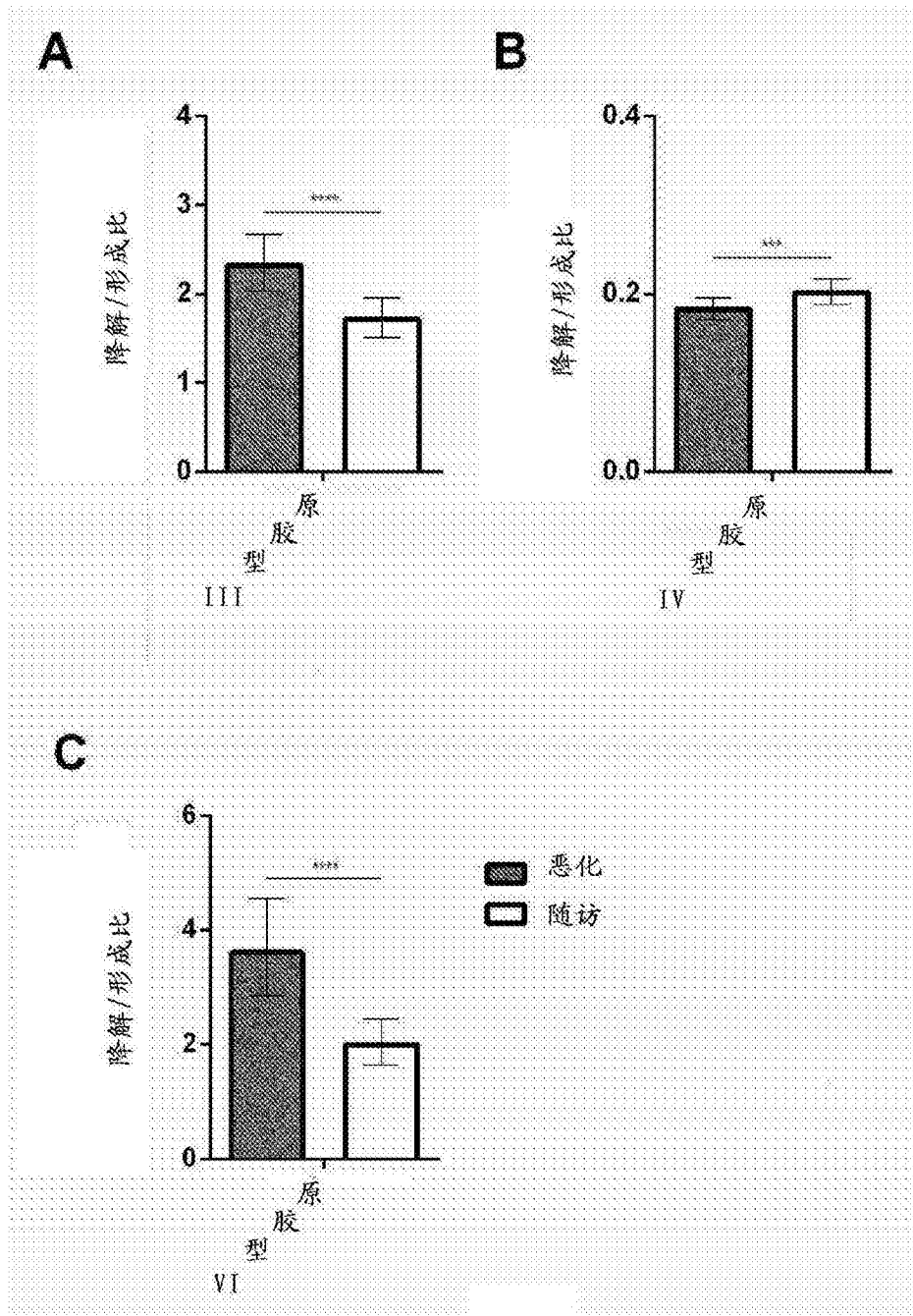


图6

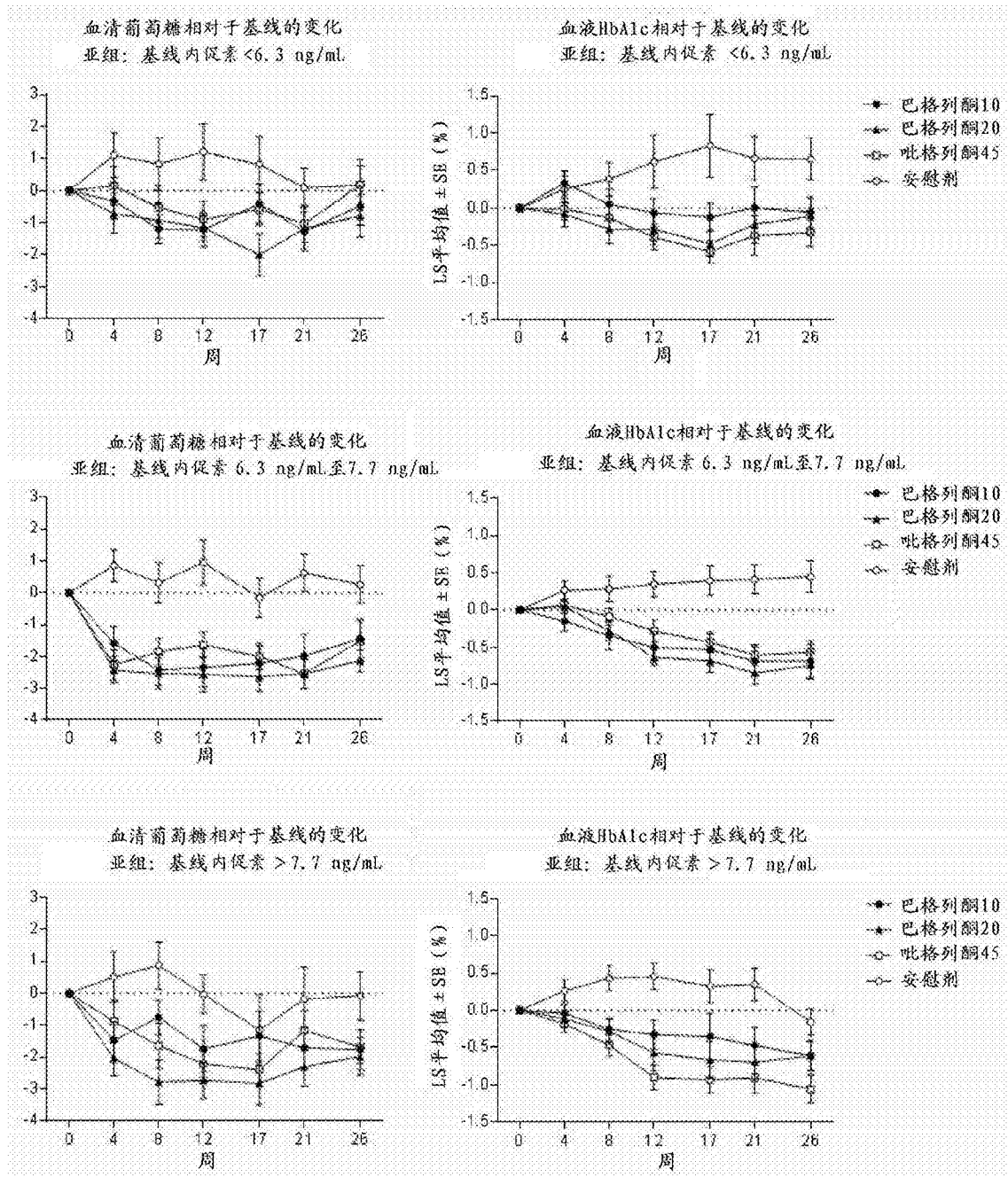


图7

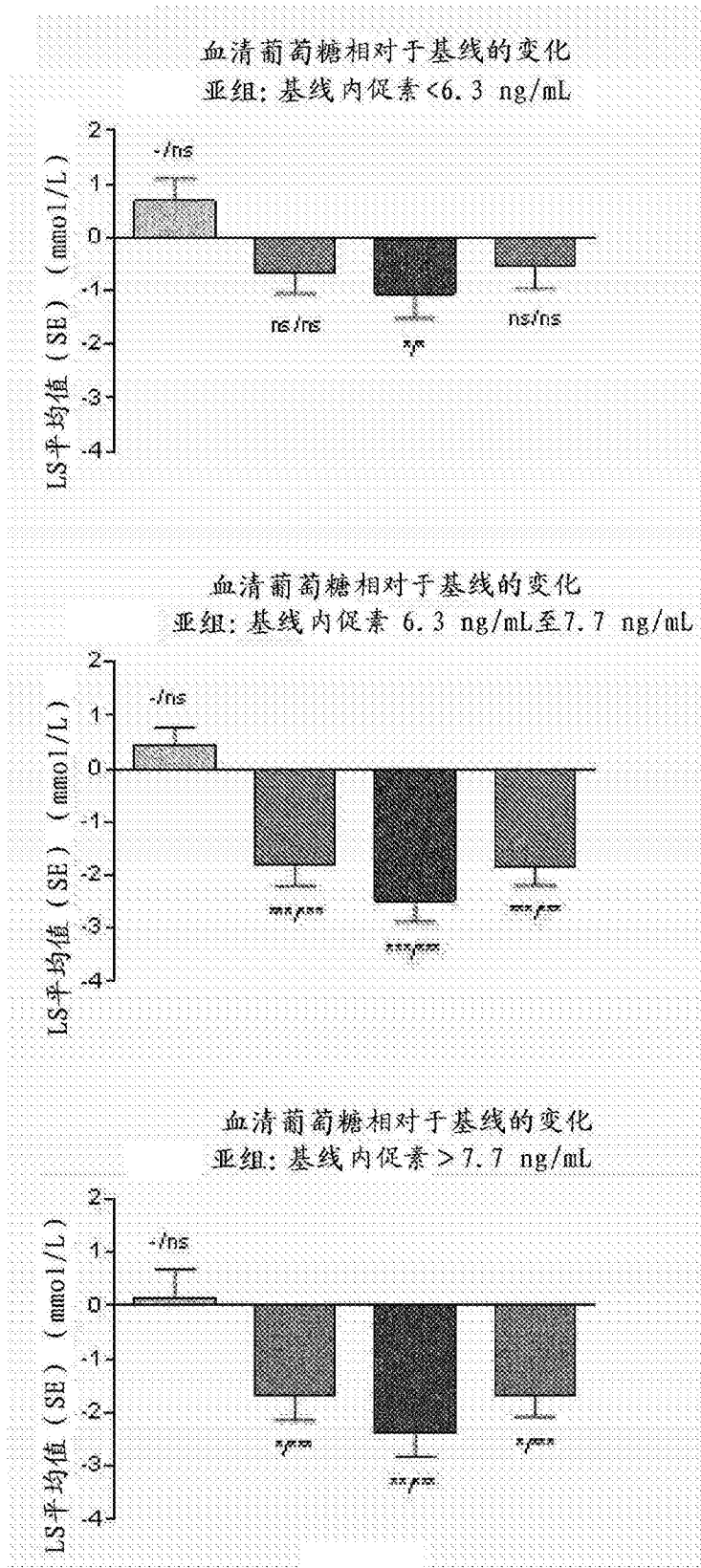


图8

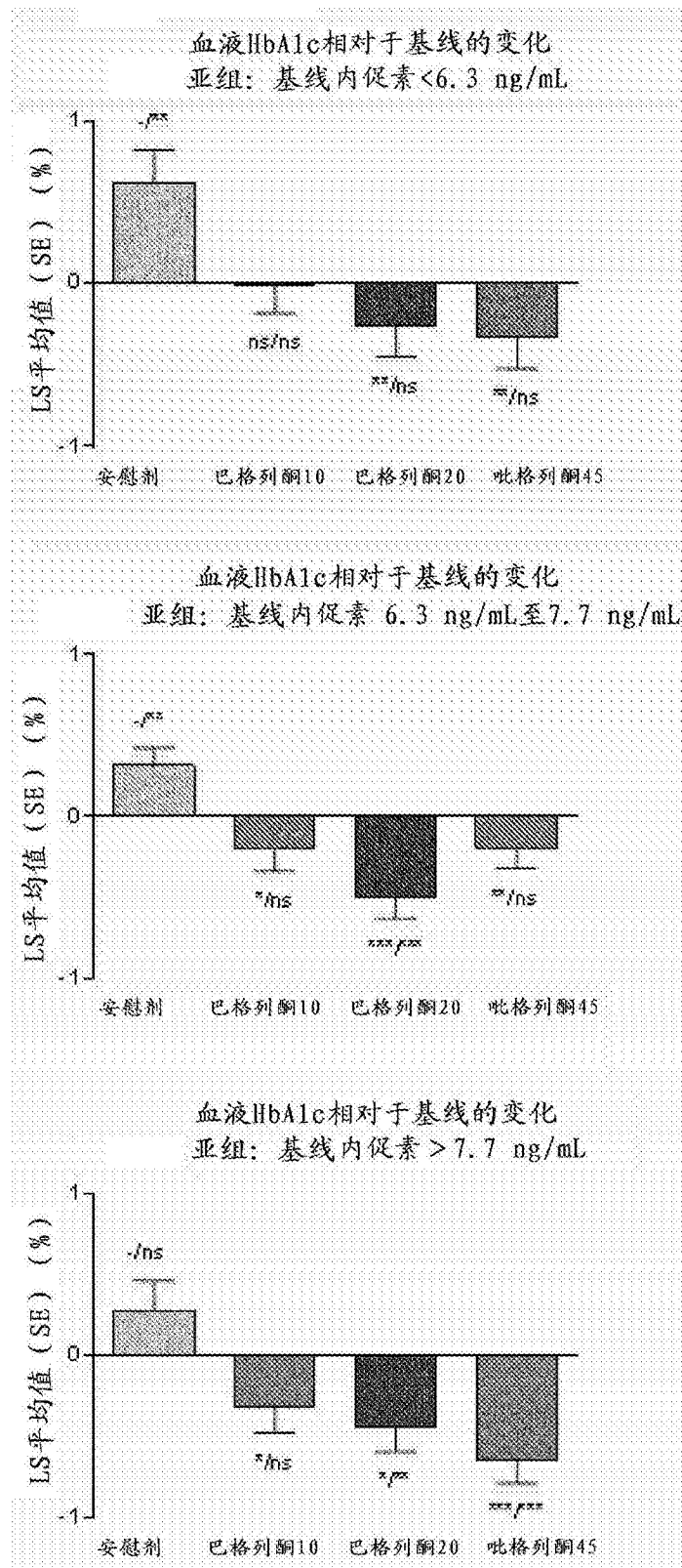


图8(续)

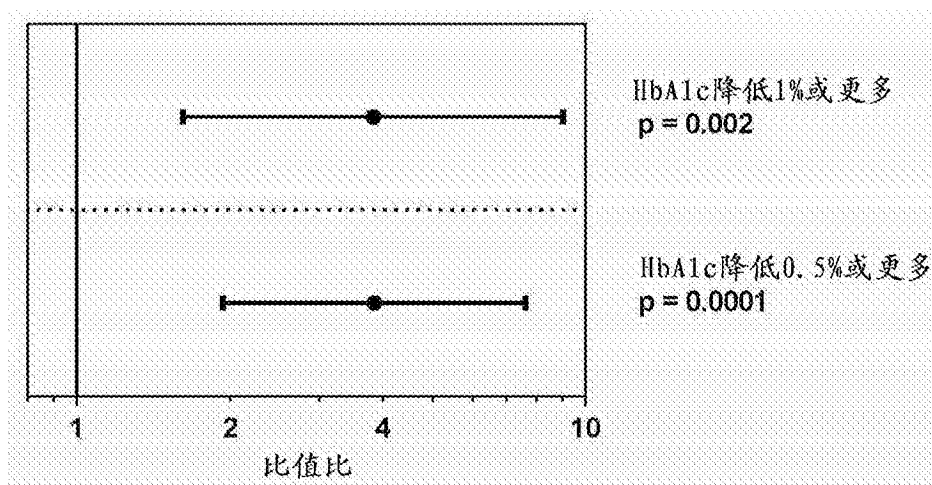


图9

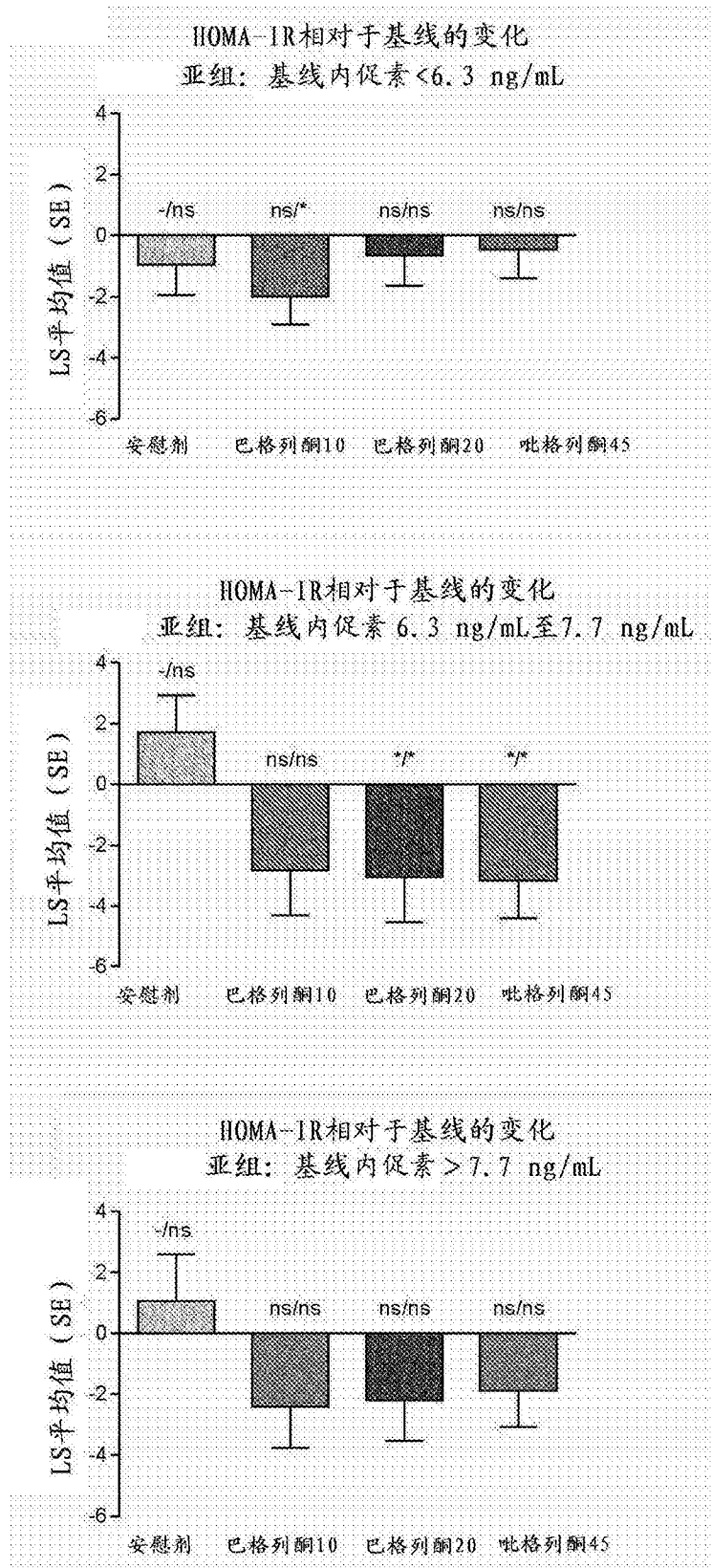


图10

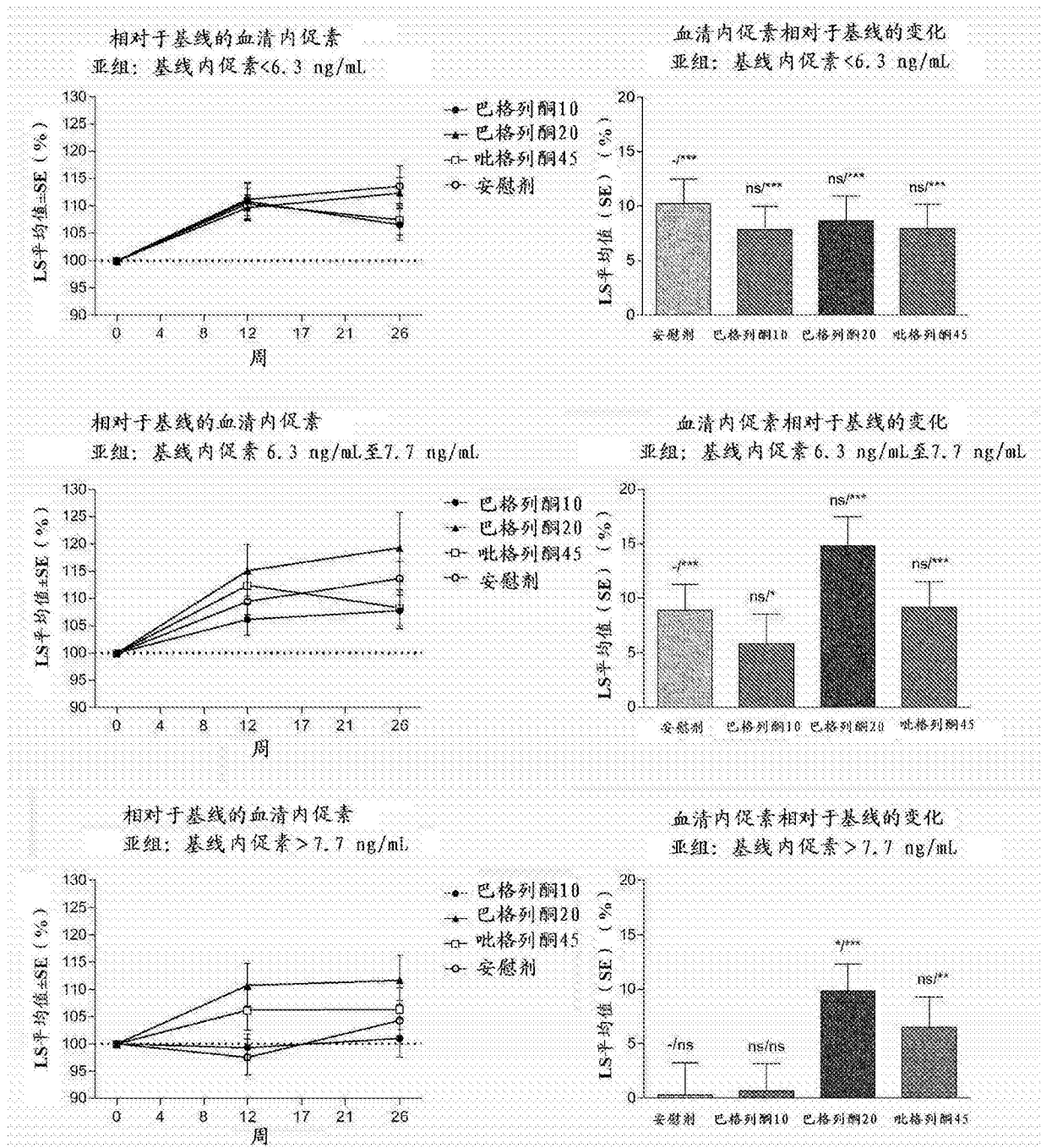


图11

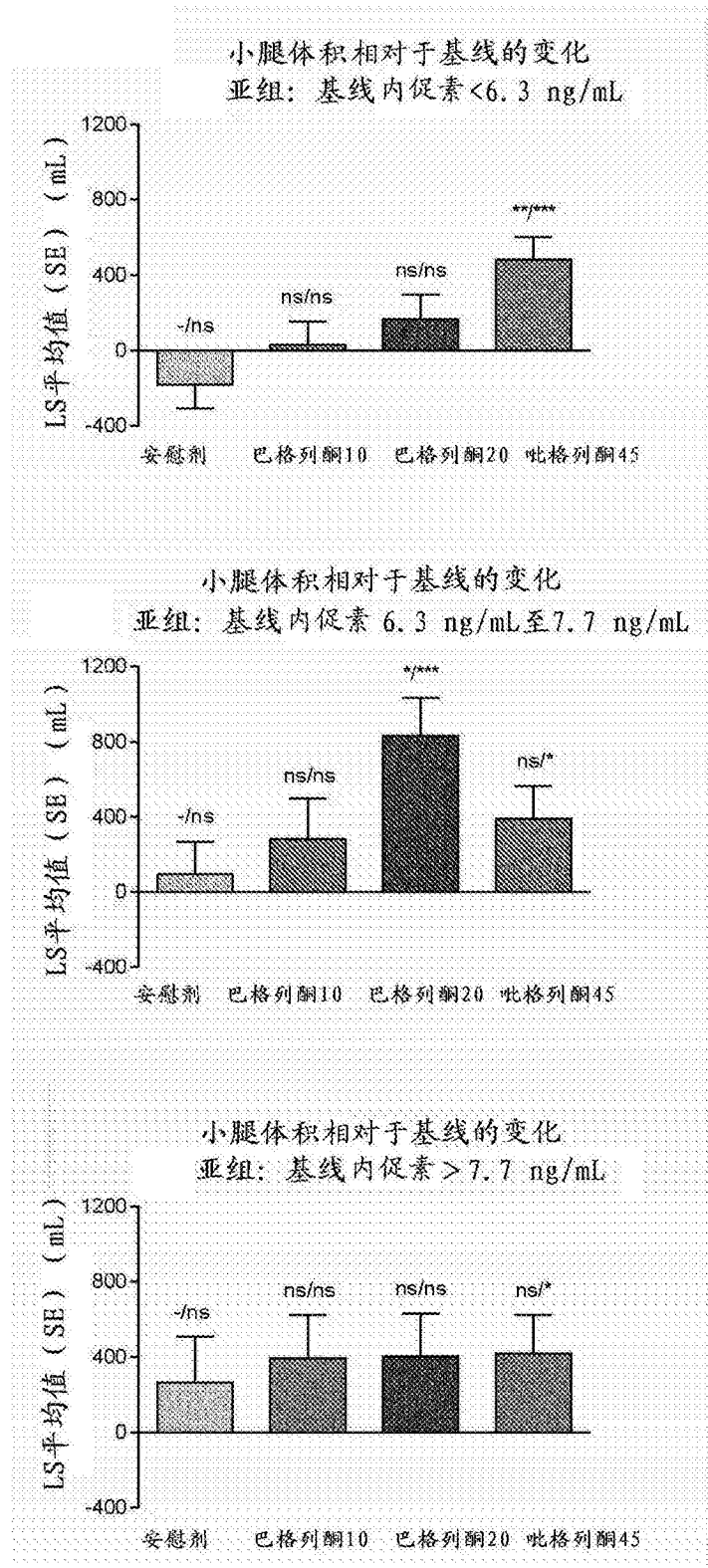


图12

专利名称(译)	用于VI型胶原序列的免疫测定		
公开(公告)号	CN107406501A	公开(公告)日	2017-11-28
申请号	CN201680019114.8	申请日	2016-03-31
申请(专利权)人(译)	北欧生物科技公司		
当前申请(专利权)人(译)	北欧生物科技公司		
[标]发明人	安德斯内德尔高 詹尼玛丽桑德 孙舒 戴安娜朱利利明 基姆亨里克森		
发明人	安德斯·内德尔高 詹尼·玛丽·桑德 孙舒 戴安娜·朱利·利明 基姆·亨里克森		
IPC分类号	C07K16/18 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/6887 C07K16/18 C07K2317/34 G01N2333/78 G01N2800/042 G01N2800/52 G01N33/53		
代理人(译)	郑斌		
优先权	2015005654 2015-04-01 GB		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了与6型胶原α3链C5结构域的C端表位具有反应性的免疫结合配偶体，以及使用所述免疫结合配偶体来检测和量化所述C端表位的免疫测定方法。本发明还提供了研究细胞外基质的形成速率的方法以及用于鉴定适合于用胰岛素增敏剂进行治疗的对象的方法。

	PRO-C3		PRO-C6		C6M	
	R	p	R	p	R	p
BioM _{基线} 相对于LBM _{基线}	0.536	0.0149*	0.022	0.9270	0.595	0.0057*
BioM _{BR47} 相对于腿LBM _{损失}	0.453	0.0447*	0.529	0.0166*	0.102	0.6684
BioM _{R3} 相对于腿LBM _{获得}	- 0.171	0.4705	- 0.580	0.0073*	- 0.269	0.2509