

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **046888**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.05.07

(21) Номер заявки
202192466

(22) Дата подачи заявки
2020.03.30

(51) Int. Cl. **G01N 33/66** (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
G01N 33/72 (2006.01)

(54) ПРИМЕНЕНИЕ ФОЛЛИСТАТИНА ДЛЯ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ РИСКА ДИАБЕТА 2 ТИПА

(31) 1950381-2

(32) 2019.03.28

(33) SE

(43) 2022.02.16

(86) PCT/EP2020/058971

(87) WO 2020/193808 2020.10.01

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЛУНДОХ ДИАГНОСТИКС АБ (SE)

(72) Изобретатель:
Де Маринис Янг (SE)

(74) Представитель:
Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнагьев
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В.,
Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)

(56) WO-A1-2006066263
WO-A2-2010057135

J. HANSEN ET AL. "Plasma follistatin is elevated in patients with type 2 diabetes:relationship to hyperglycemia, hyperinsulinemia, and systemic low-grade inflammation: Plasma Follistatin and Type 2 Diabetes", DIABETES/METABOLISM RESEARCH AND REVIEWS, vol. 29, no. 6, 1 September 2013 (2013-09-01), pages 463-472, XP055704173, GB ISSN: 1520-7552, DOI: 10.1002/dmrr.2415, abstract
CHUNXIA ZHAO ET AL. "Overcoming Insulin Insufficiency by Forced Follistatin Expression in [beta]-cells of db/db Mice", MOLECULAR THERAPY: THE JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF GENE THERAPY, vol. 23, no. 5, 1 May 2015 (2015-05-01), pages 866-874, XP055525294, US ISSN: 1525-0016, DOI: 10.1038/mt.2015.29, abstract

JAKOB S. HANSEN ET AL. "Circulating Follistatin Is Liver-Derived and Regulated by the Glucagon-to-Insulin Ratio", JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM, vol. 101, no. 2, 1 February 2016 (2016-02-01), pages 550-560, XP055704179, US ISSN: 0021-972X, DOI: 10.1210/jc.2015-3668, abstract

(57) В изобретении подробно описано применение фоллистатина в качестве биомаркера для ранней диагностики и/или прогнозирования диабета 2 типа, причем секреция фоллистатина в печени регулируется GSKR, применение которого предусматривается в изобретении. Кроме того, в изобретении раскрыт способ составления профиля биомаркеров для раннего прогнозирования диабета 2 типа у человека.

B1

046888

046888

B1

Область техники

В изобретении представлены новые средства для оценки риска диабета 2 типа с хорошей прогностической значимостью за четыре года до начала заболевания с применением фоллистатина в качестве маркера в модели, включающей три известных биомаркера крови для диабета 2 типа, включая HbA_{1c}, проинсулин и С-пептид.

Предпосылки изобретения

Абсолютное глобальное экономическое бремя диабета по оценкам увеличится с 1,3 триллиона долларов США в 2015 году до 2,5 триллиона долларов (2,4-2,6) к 2030 году, что составляет 2,2% мирового ВВП^[1]. Только в США средние медицинские расходы пациента с диагностированным диабетом составляют 16752 доллара, что в приблизительно 2,3 раза выше, чем расходы в отсутствие диабета. В некоторых системах здравоохранения уход за пациентами с диабетом составляет 25% всех затрат.

Диабет 2 типа (T2D) можно предотвратить посредством изменения образа жизни, если выявить риск заболевания на достаточно ранней стадии^[2]. В настоящее время для оценки рисков диабета используются пероральный тест в отношении толерантности к глюкозе (OGTT) и определение уровня глюкозы в плазме крови натощак (FPG). Однако к моменту выявления аномальных уровней глюкозы диабет и даже его осложнения могут уже развиться. Кроме того, диабет является системным заболеванием и может приводить к изменениям нескольких показателей крови, что делает сомнительной оценку риска диабета, основанную только на определении уровня глюкозы. Тем не менее, в современной клинической практике потенциальный диагноз диабета оценивается исключительно по измерениям уровня глюкозы: у пациента либо высокие уровни глюкозы в крови (диабетик), либо нормальные уровни глюкозы (не диабетик). Однако среди "недиабетиков" каждый индивид может характеризоваться разными уровнями риска развития диабета в будущем, которые в настоящее время нельзя эффективно оценить посредством доступных методов и измерений уровня биологических маркеров. Поэтому было сочтено целесообразным оценивать риск диабета 2 типа с помощью многомерных индивидуализированных шкал риска.

В настоящем отчете и исследовании автор настоящего изобретения сообщает о разработке средств для кластеризации индивидуумов без диабета в разные группы риска, включая различные биомаркеры. Кроме того, автор настоящего изобретения создал математическую модель, с помощью которой можно точно предсказывать риски диабета.

Было обнаружено, что фоллистатин можно использовать в качестве биомаркера для ранней диагностики диабета 2 типа, применение которого предусматривается в данном документе. Кроме того, в данном документе раскрыт способ составления профиля биомаркеров для раннего прогнозирования диабета 2 типа у человека.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1. Секреция фоллистатина клетками печени контролируется комплексом GCKR-GCK.

Фиг. 2. Кластеризация по когортам прогрессирования диабета.

Фиг. 3. Важность пяти переменных (фоллистатин плазмы крови, проинсулин, инсулин, С-пептид, исходный уровень HbA_{1c}) и выбор переменных (фиг. 3А, 3В, 3С).

Фиг. 4. Эффективность и валидация четырех моделей для оценки риска заболеваемости диабетом 2 типа в когорте в течение 4 лет.

Фиг. 5. Кривая ROC выбранной модели (NNET) с четырьмя биомаркерами 10-проходной перекрестной валидации.

Таблица 1. AUC ROC 10-проходной перекрестной валидации с разными переменными разными способами.

Таблица 2. Эффективность каждого кластера с 10-проходной перекрестной валидацией.

Таблица 3. Сравнение моделей AUC с фоллистатином и без него для каждого класса.

Подробное описание

Настоящее изобретение основано на осознании автором изобретения того факта, что фоллистатин является биомаркером высокого риска краткосрочного развития диабета 2 типа у человека.

Настоящее изобретение, соответственно, относится к диагностике и/или прогнозированию высокого риска развития диабета 2 типа для отдельного человека в течение короткого периода времени, составляющего менее чем 10 лет, например, менее чем 9 лет, менее чем 8 лет, менее чем 7 лет, менее чем 6 лет, менее чем 5 лет или менее чем 4 года, если его или ее состояние остается без лечения. Особым преимуществом ранней диагностики и/или прогнозирования является возможность предотвратить возникновение заболевания посредством профилактического лечения.

Следовательно, в первом варианте осуществления и аспекте настоящего изобретения подробно описано применение фоллистатина в качестве биомаркера в способе диагностики высокого риска краткосрочного развития диабета 2 типа у человека.

В другом аспекте первого варианта осуществления и аспекта настоящего изобретения подробно описано применение фоллистатина в качестве биомаркера в способе прогнозирования высокого риска краткосрочного развития диабета 2 типа у человека.

В одном варианте осуществления первого аспекта подробно описано применение фоллистатина в соответствии с первым вариантом осуществления, где способ диагностики и/или прогнозирования высо-

кого риска краткосрочного развития диабета 2 типа у человека предусматривает высокий риск развития диабета 2 типа через менее чем 10 лет, предпочтительно через менее чем 9 лет, менее чем 8 лет, менее чем 7 лет, менее чем 6 лет, менее чем 5 лет или менее чем 4 года.

В одном варианте осуществления первого аспекта подробно описано применение фоллистатина в соответствии с любым предыдущим вариантом осуществления, где способ диагностики и/или прогнозирования высокого риска краткосрочного развития диабета 2 типа у человека включает кластеризацию методом k-средних для оценки уровней риска прогрессирования диабета 2 типа с применением по меньшей мере одного дополнительного биомаркера, выбранного из исходного уровня HbA_{1C}, проинсулина, С-пептида или HbA_{1C} через 48 месяцев, предпочтительно по меньшей мере двух, по меньшей мере 3 или по меньшей мере 4 дополнительных биомаркеров, выбранных из исходного уровня HbA_{1C}, проинсулина, С-пептида или HbA_{1C} через 48 месяцев.

В одном варианте осуществления первого аспекта подробно описано применение фоллистатина по любому из предыдущих вариантов осуществления, где способ диагностики и/или прогнозирования высокого риска краткосрочного развития диабета 2 типа у человека включает оценку доступных биомаркеров посредством рекурсивного исключения признаков для построения модели прогнозирования риска.

В одном варианте осуществления первого аспекта подробно описано применение фоллистатина по любому из предыдущих вариантов осуществления, где способ диагностики и/или прогнозирования высокого риска краткосрочного развития диабета 2 типа у человека включает измерение уровней фоллистатина в крови указанного человека и по меньшей мере одного дополнительного биомаркера, выбранного из исходного уровня HbA_{1C}, проинсулина, С-пептида или HbA_{1C} через 48 месяцев, и сравнение измеренных уровней в крови с модельным значением, основанным на усредненных значениях уровня в крови для группы людей, характеризующихся высоким риском развития диабета 2 типа через менее чем 10 лет, предпочтительно через менее чем 5 лет или более предпочтительно через менее чем 4 года.

В одном варианте осуществления первого аспекта подробно описано применение фоллистатина по любому из предыдущих вариантов осуществления, где способ диагностики и/или прогнозирования высокого риска краткосрочного развития диабета 2 типа у человека включает измерение уровней в крови по меньшей мере двух, по меньшей мере 3 или по меньшей мере 4 дополнительных биомаркеров, выбранных из исходного уровня HbA_{1C}, проинсулина, С-пептида или HbA_{1C} через 48 месяцев.

В одном варианте осуществления первого аспекта подробно описано применение фоллистатина по любому из предыдущих вариантов осуществления, где способ диагностики и/или прогнозирования высокого риска краткосрочного развития диабета 2 типа у человека представляет собой способ прогнозирования высокого риска краткосрочного развития диабета 2 типа у человека.

Во втором аспекте настоящего изобретения подробно описан способ составления профиля биомаркеров для раннего прогнозирования диабета 2 типа у человека, предусматривающий измерение уровней фоллистатина в крови указанного человека и по меньшей мере одного дополнительного биомаркера, выбранного из исходного уровня HbA_{1C}, проинсулина, С-пептида или HbA_{1C} через 48 месяцев, и сравнение измеренных уровней в крови с модельным значением, основанным на усредненных значениях уровня в крови для группы людей, характеризующихся высоким риском развития диабета 2 типа через менее чем 10 лет, предпочтительно через менее чем 5 лет или более предпочтительно через менее чем 4 года.

В одном варианте осуществления второго аспекта измеряются в крови уровни по меньшей мере двух, по меньшей мере 3 или по меньшей мере 4 дополнительных биомаркеров, выбранных из исходного уровня HbA_{1C}, проинсулина, С-пептида или HbA_{1C} через 48 месяцев.

Подобным образом в данном документе подробно описан фоллистатин для применения в качестве биомаркера для диагностики и/или прогнозирования высокого риска краткосрочного развития диабета 2 типа у человека.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения подробно описан фоллистатин для применения в качестве биомаркера для диагностики и/или прогнозирования высокого риска краткосрочного развития диабета 2 типа у человека, где высокий риск краткосрочного развития диабета 2 типа у человека предусматривает высокий риск развития диабета 2 типа через менее чем 10 лет, предпочтительно через менее чем 9 лет, менее чем 8 лет, менее чем 7 лет, менее чем 6 лет, менее чем 5 лет или менее чем 4 года.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения подробно описан фоллистатин для применения в качестве биомаркера для диагностики и/или прогнозирования высокого риска краткосрочного развития диабета 2 типа у человека, где диагностика высокого риска краткосрочного развития диабета 2 типа у человека включает кластеризацию k-средних для оценки уровней риска прогрессирования диабета 2 типа с применением по меньшей мере одного дополнительного биомаркера, выбранного из исходного уровня HbA_{1C}, проинсулина, С-пептида или HbA_{1C} через 48 месяцев, предпочтительно по меньшей мере двух, по меньшей мере 3 или по меньшей мере 4 дополнительных биомаркеров, выбранных из исходного уровня HbA_{1C}, проинсулина, С-пептида или HbA_{1C} через 48 месяцев.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения подробно описан фоллистатин для применения в качестве биомаркера для диагностики и/или прогнозирования высокого риска краткосрочного развития диабета 2 типа у человека, где диагностика высокого риска краткосрочного развития диабета 2

типа у человека включает оценку доступных биомаркеров посредством рекурсивного исключения признаков в модели прогнозирования риска.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения подробно описан фоллистатин для применения в качестве биомаркера для диагностики и/или прогнозирования высокого риска краткосрочного развития диабета 2 типа у человека, предусматривающий составление профиля биомаркеров для раннего прогнозирования диабета 2 типа у человека, включая измерение уровней фоллистатина в крови и по меньшей мере одного дополнительного биомаркера, выбранного из исходного уровня HbA_{1c}, проинсулина, С-пептида или HbA_{1c} через 48 месяцев, и сравнение измеренных уровней в крови с модельным значением, основанным на усредненных значениях уровня в крови для группы людей, характеризующихся высоким риском развития диабета 2 типа через менее чем 10 лет, предпочтительно через менее чем 5 лет или более предпочтительно через менее чем 4 года.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения подробно описан фоллистатин для применения в качестве биомаркера для диагностики и/или прогнозирования высокого риска краткосрочного развития диабета 2 типа у человека, дополнительно предусматривающий измерение уровней в крови по меньшей мере двух, по меньшей мере 3 или по меньшей мере 4 дополнительных биомаркеров, выбранных из исходного уровня HbA_{1c}, проинсулина, С-пептида или HbA_{1c} через 48 месяцев.

Настоящее изобретение относится к диагностике и идентификации индивидуума, характеризующегося высоким риском развития диабета 2 типа в течение короткого периода времени, составляющего менее чем 10 лет, например, менее чем 9 лет, менее чем 8 лет, менее чем 7 лет, менее чем 6 лет, менее чем 5 лет или менее чем 4 года, если его или ее состояние остается без лечения. Особым преимуществом ранней диагностики является возможность предотвратить возникновение заболевания посредством профилактического лечения.

В соответствии с настоящим изобретением настоящее изобретение в вариантах осуществления относится к диагностике и/или прогнозированию риска развития диабета 2 типа у человека через менее чем 10 лет, например, через менее чем 9 лет, менее чем 8 лет, менее чем 7 лет, менее чем 6 лет, менее чем 5 лет или менее чем 4 года, если его или ее состояние остается без лечения.

В одном варианте осуществления существует высокий риск развития диабета 2 типа в течение короткого периода времени, если у индивидуума в сыворотке крови присутствует фоллистатин в концентрации, составляющей по меньшей мере 2000 пг/мл.

В одном варианте осуществления существует высокий риск развития диабета 2 типа в течение короткого периода времени, если у индивидуума в сыворотке крови дополнительно присутствует проинсулин в концентрации, составляющей по меньшей мере 20 пмоль/л.

В одном варианте осуществления существует высокий риск развития диабета 2 типа в течение короткого периода времени, если у индивидуума в сыворотке крови дополнительно присутствует С-пептид в концентрации, составляющей по меньшей мере 5 нг/мл.

В одном варианте осуществления существует высокий риск развития диабета 2 типа в течение короткого периода времени, если у индивидуума в сыворотке крови дополнительно присутствует инсулин в концентрации, составляющей по меньшей мере 800 пг/мл.

Как задокументировано в приведенных ниже примерах, у индивидуумов, характеризующихся уровнями фоллистатина или фоллистатина и одного или нескольких указанных выше биологических маркеров в сыворотке крови натошак, приведенными выше и в примерах, наблюдали развитие диабета 2 типа, как измерено с применением HbA_{1c} и HbA_{1c} в течение 48 месяцев, со статистической значимостью по сравнению с контрольной популяцией, содержащей индивидуумов с преддиабетом без прогрессирования и индивидуумов, не страдающих диабетом, и, следовательно, эти индивиды представляют собой популяцию, характеризующуюся высоким риском развития диабета 2 типа. Все маркеры как таковые, за исключением фоллистатина, были статистически неразличимы между популяциями, но комбинация маркеров обеспечивала точную идентификацию. Для фоллистатина уровни в сыворотке крови выше 2500 пг/мл, предпочтительно выше 3000 пг/мл, как таковые были значительными, что указывает на высокий риск развития диабета 2 типа у обследуемого индивидуума.

Примеры

Цель отчетного исследования

Целью этого исследования была разработка модели прогнозирования для оценки риска диабета 2 типа (T2D) по профилю биомаркеров крови.

Дизайн и способы исследования

Исследуемые индивидуумы принадлежат к лонгитудинальной когорте, которая включает 152 участника без диабета с четырехлетним наблюдением прогрессирования T2D. Когорту кластеризовали посредством k-средних с оценкой уровней риска прогрессирования T2D с применением исходного уровня HbA_{1c}, проинсулина, С-пептида, фоллистатина и HbA_{1c} через 48 месяцев. Доступные биомаркеры оценивали посредством рекурсивного исключения признаков с построением модели прогнозирования риска. Четырехлетнее прогнозирование T2D, основанное на кластеризации рисков, тестировали посредством способов машинного обучения, представляющих собой нейросеть (NNET), машину опорных векторов (SVM), алгоритм случайного леса (RF) и обобщенную логистическую регрессию (GLM). Эффективность

четырёх кандидатных моделей риска оценивали с применением 10-проходной перекрестной валидации.

Общие результаты

Когорту кластеризовали на три группы риска: высокий риск, средний риск и низкий риск. Исходный уровень HbA_{1c}, проинсулин, С-пептид и фоллистатин были выбраны после валидации биомаркера. Оптимальную модель для оценки 4-летнего риска развития T2D у индивидуума разрабатывали посредством способа машинного обучения NNET с применением этих четырех биомаркеров. Значения площади под кривой (AUC) для кривой рабочих характеристик приемника (ROC) для прогнозирования в каждой группе риска составляют 0,9 (высокий риск), 0,96 (средний риск) и 0,99 (низкий риск) соответственно (10-проходная перекрестная валидация). Среднее значение AUC для трех групп риска составляет 0,97.

Соответственно, в данном документе представлены новые средства для оценки риска диабета 2 типа за четыре года до начала заболевания с помощью модели, включающей четыре биомаркера крови, включая HbA_{1c}, проинсулин, С-пептид и фоллистатин.

Способы

Участники когорт

Когорта представляла собой многоцентровое рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое клиническое испытание, проведенное в США. Измеряли уровень HbA_{1c} и документировали сопутствующие лекарственные препараты у пациентов на исходном уровне, через 1 год, 2 года и 4 года. Подкогорту с прогрессированием T2D, состоящую из примерно 400 пациентов, выбирали из когорты на основании изменения уровня HbA_{1c} у пациента по сравнению с исходным уровнем в течение 4-летнего испытательного периода и при отсутствии введения лекарственных средств для лечения диабета этим пациентам.

Измерения уровня биомаркеров, представляющих собой белки плазмы крови

Уровень инсулина, проинсулина, С-пептида и фоллистатина натощак измеряли посредством твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) в исходных образцах плазмы крови с ЭДТА, полученных от 314 пациентов, отобранных для включения в когорт прогрессирования диабета 2 типа. Во всех анализах, за исключением анализа в отношении С-пептида, образцы измеряли в технических повторностях и вычисляли последующий средний коэффициент вариации внутри анализа (%CV). %CV между анализами рассчитывали с применением внутренних контролей. Значения концентрации инсулина определяли с применением специально разработанного электрохемилюминесцентного иммуноанализа и MESO QuickPlex SQ 120 (Meso Scale Discovery (MSD), Гейтерсберг, Мэриленд) в соответствии с внутренним оптимизированным протоколом^[3-5]. CV внутри анализа составлял 10,9%, а CV между анализами составлял 3,1% для анализов в отношении инсулина. Уровни С-пептида количественно определяли посредством электрохемилюминесцентного иммуноанализа с применением Cobas e411 (Roche Diagnostics, Мангейм, Германия). Уровень интактного проинсулина измеряли после 4-кратного разбавления в буфере для образцов с применением колориметрического ELISA с калибраторами по 1-му международному стандарту ВОЗ для проинсулина в соответствии с инструкциями производителя (IRP) 84/611; № в каталоге IV2-102E, Immuno-Biological Laboratories, Inc., Миннеаполис, Миннесота). Оптическую плотность измеряли с применением PHERAstar FSX (BMG Labtech Inc., Кэри, Северная Каролина). CV внутри анализа составлял 6,6%, а CV между анализами составлял 10% для анализов в отношении проинсулина. Уровни фоллистатина в плазме крови измеряли после 2-кратного разбавления в разбавителе для образцов с помощью колориметрического ELISA в соответствии с инструкциями производителя (№ по каталогу DFN00, R&D Systems, Миннеаполис, Миннесота). Оптическую плотность измеряли с применением PHERAstar FSX (BMG Labtech Inc., Кэри, Северная Каролина). CV внутри анализа составлял 2,1%, а CV между анализами составлял 10% для анализов в отношении фоллистатина.

Процесс разработки модели: применение машинного обучения для определения 4-летнего риска диабета 2 типа

Все статистические анализы выполняли с применением пакета программного обеспечения для статистического анализа, инструментария для машинного обучения (пакет Caret^[6]) и среды для статистических вычислений R^[7]. Значимость для результатов устанавливали на уровне $p \leq 0,05$.

Выбор характеристик выполняли посредством способа рекурсивного исключения признаков, реализованного в пакете Caret R для машинного обучения (например, rfe, rfefilter), с идентификацией параметров крови с наилучшей эффективностью прогнозирования. Оценивали пять кандидатных биомаркеров для включения в многомаркерные модели. Поскольку методики прогнозирования могут характеризоваться различной производительностью с данными, авторы настоящего изобретения решили использовать четыре различных типа моделей прогнозирования с применением пакета Caret^[6] в среде R^[7]. Были включены четыре машинных подхода, включая NNET (нейросеть), SVM (машины опорных векторов), RF (способы на основе алгоритма случайного леса) и GLM (обобщенная логистическая регрессия). Многофакторный анализ данных (NNET, SVM, RF и GLM) использовали для исследования того, позволяет ли панель биомаркеров на основе показателей крови прогнозировать риск развития диабета 2 типа. Модель NNET с наилучшей производительностью оценивали посредством процедуры 10-проходной перекрестной валидации, чтобы гарантировать надежность результатов.

Рассчитывали следующие характеристические числа: AUC, точность, чувствительность и специ-

фичность.

Наконец, строили кривые рабочих характеристик приемника (ROC). Проводили тест Делонга с применением ROC-теста библиотеки R $pROC^{[8]}$ для двух коррелирующих кривых ROC (т.е. кривых ROC высокого риска по NNET и NNET без фоллистатина). Р-значения $< 0,05$ считались значимыми.

Результаты продемонстрировали, что конечный результат прогнозирования высокого риска краткосрочного развития не зависел от модели и, следовательно, отражает реальные биологические процессы, лежащие в основе статистики изучаемых групп.

Результаты

Чтобы идентифицировать генетические факторы, которые влияют на уровни фоллистатина в плазме крови, авторы настоящего изобретения выполняли GWAS на двух дополнительных разных когортах.

Регуляторный белок глюкокиназа (GCKR) был идентифицирован как генетический регулятор уровня фоллистатина в плазме крови. В данном документе показано, что GCKR регулирует секрецию фоллистатина в печени вместе с глюкагоном и инсулином в линии клеток гепатоцитов человека HepG2. Предыдущие исследования продемонстрировали, что GCKR образует плотный комплекс с GCK в ядре, и диссоциация связывания GCK-GCKR приводит к усилению транслокации GCK из ядра в цитоплазму, что регулирует захват глюкозы клетками печени и гликолиз.

В данном исследовании клетки HepG2 трансфицировали с помощью GCK или котрансфицировали плазидами, экспрессирующими GCK и GCKR (молярное соотношение 1:3). Кроме того, клетки обрабатывали или не обрабатывали с помощью AMG-3669, молекулы, разрушающей комплекс GCK-GCKR, которая способствует усилению транслокации диссоциированных GCK из ядра в цитоплазму. Клетки инкубировали с глюкагоном (1 мкг/мл) и внутриклеточным активатором cAMP форсколином (20 мкМ) в среде DMEM с низким содержанием глюкозы (5,5 мМ) в условиях, ранее продемонстрированных как стимулирующие секрецию фоллистатина в клетках печени^[11]. В присутствии комплекса GCK-GCKR и разрушающего его AMG-3969 секреция фоллистатина повышалась на 40% по сравнению с контролем (фиг. 4A), что было обращено посредством совместной инкубации с инсулином (фиг. 4B). Трансфекция с помощью только GCK или совместная трансфекция с помощью GCK-GCKR без AMG-3969, которая не влияет на транслокацию GCKR из ядра в цитоплазму, не влияла на секрецию фоллистатина (фиг. 1).

Фиг. 1. Секреция фоллистатина клетками печени контролируется комплексом GCKR-GCK. А. Клетки HepG2, полученные из карциномы печени человека, трансфицировали указанными плазидами: i) контроль (pCMV-XL4, незакрашенные столбцы); ii) GCK:GCKR (1:0; без GCKR, серые столбцы); iii) GCK:GCKR (1:3, черные полосы). Через сорок восемь часов после трансфекции клетки выдерживали в сыворотке крови в среде DMEM в условиях голодания с низким содержанием глюкозы (5,5 мМ) в течение 3 ч и на 30 мин добавляли в среду молекулу AMG-3969 (0,7 мкМ), разрушающую комплекс GCKR-GCK. Затем клетки инкубировали в среде DMEM без сыворотки крови с низким содержанием глюкозы (5,5 мМ), содержащей глюкагон (1 мкг/мл) и форсколин (20 мкМ), и в соответствующие лунки добавляли AMG-3969 (0,7 мкМ). Через 4 ч инкубации средю собирали для анализа в отношении фоллистатина посредством ELISA. Уровни фоллистатина нормализовывали относительно концентрации белка в каждом образце. Два независимых эксперимента с 3 техническими повторами для каждого условия выполняли в разные дни с применением разных препаратов плазмид и количеств пассажей клеток. В. Клетки HepG2 обрабатывали, как описано на панели А, но в присутствии инсулина (100 нМ). * $p < 0,05$ и ** $p < 0,01$, как указано.

Чтобы лучше охарактеризовать риски диабета 2 типа среди индивидуумов без диабета участников когорты из США кластеризовали с применением фоллистатина и других переменных, которые, как ранее было показано, ассоциированы с диабетом или будущими рисками диабета. Кластеризация k-средних с применением исходного уровня HbA_{1C} , проинсулина, С-пептида, фоллистатина и HbA_{1C} через 48 месяцев позволила идентифицировать три группы риска: группы высокого риска, среднего и низкого риска (фиг. 2). Группа высокого риска в кластере 1 прогрессировала с отсутствия диабета до диабета через 48 месяцев, при этом медианное значение уровня HbA_{1C} увеличилось с 5,6% на исходном уровне до 6,8% через 48 месяцев; группа среднего риска в кластере 2 представляет собой преддиабет без прогрессирования (медианное значение уровня HbA_{1C} повысилось с исходного уровня 6,2% до уровня HbA_{1C} , составляющего 6,3%, через 48 месяцев), и группа низкого риска в кластере 3 включала индивидуумов без диабета без прогрессирования (медианное значение уровня HbA_{1C} повысилось с исходного уровня 5,4% до уровня HbA_{1C} , составляющего 5,5%, в течение 48 месяцев) (фиг. 2A). Пациенты из кластера 1 характеризовались значительно более высокими исходными уровнями фоллистатина в плазме крови за 48 месяцев до начала диабета, чем в других кластерах (фиг. 2B), а также более высокими исходными уровнями проинсулина (фиг. 2C), С-пептида (фиг. 2D) и инсулина (фиг. 2E) в плазме крови.

Фиг. 2. Кластеризация по когортам прогрессирования диабета.

Индивидуумов из когорты США ($n=152$) кластеризовали с применением k-средних без обучения с применением исходного уровня HbA_{1C} , фоллистатина в плазме крови, проинсулина, С-пептида и HbA_{1C} в течение 48 месяцев. А. Кластер 1: прогрессирование с отсутствия диабета до диабета (незакрашенные столбцы; медианное значение уровня HbA_{1C} повысилось с исходного уровня 5,6% до HbA_{1C} 6,8% через 48 месяцев; $n=20$); кластер 2: отсутствие прогрессирования преддиабета (серые столбцы; медианное зна-

чение уровня HbA_{1C} повысилось с исходного уровня 6,2% до HbA_{1C} 6,3% через 48 месяцев; $n=62$); кластер 3: отсутствие прогрессирования без диабета (черные столбцы; медианное значения уровня HbA_{1C} повысилось с исходного уровня 5,4% до HbA_{1C} 5,5% через 48 месяцев; $n=70$). В-Е. Кластерное распределение исходного уровня фоллистатина (пг/мл, В), проинсулина (пмоль/л, С), С-пептида (нг/мл, D) и инсулина (пг/мл, Е). VL: исходный уровень; 48M: HbA_{1C} в течение 48 месяцев. **** $p<0,0001$, *** $p<0,001$, ** $p<0,01$, * $p<0,05$, как указано.

Чтобы проверить эффективность прогнозирования каждой базовой переменной (HbA_{1C} , проинсулина, С-пептида, инсулина и фоллистатина) и их комбинации авторы настоящего изобретения выполняли рекурсивное исключение признаков с применением способов машинного обучения, представляющих собой gfe-функцию $Carot^{[6]}$ посредством нейросети (NNET), машину опорных векторов (SVM), алгоритм случайного леса (RF) и обобщенную логистическую регрессию (GLM) (табл. 1). При прогнозировании диабета 2 типа для каждой из групп риска в течении четырех лет наибольшее значение для группы высокого риска имеют проинсулин и фоллистатин, а для групп среднего и низкого риска - HbA_{1C} и фоллистатин (фиг. 3В). Общая важность для трех групп риска представлена максимальной операцией (фиг. 3С). Комбинация четырех переменных дает наивысшую точность определения (10-проходная перекрестная валидация, фиг. 3А). Наконец, четыре основных фактора риска (исходный уровень HbA_{1C} , фоллистатин, проинсулин и С-пептид) были выбраны в качестве кандидатных биомаркеров.

Фиг. 3. Важность пяти переменных (фоллистатин плазмы крови, проинсулин, инсулин, С-пептид, исходный уровень HbA_{1C}) и выбор переменных.

Точность с разными переменными с применением рекурсивного исключения признаков (3А), вклад каждой переменной в разные уровни риска (3В) и максимальный показатель трех уровней риска для каждой переменной (3С).

Различные способы машинного обучения сравнивали с эффективностью предсказания рисков диабета 2 типа по результатам исследования в течение 4 лет с включением выбранных биомаркеров. Способы машинного обучения NNET, SVM, RF и GLM оценивали посредством 10-проходной перекрестной валидации (табл. 1). Диапазоны чувствительности, специфичности, точности, AUC (фиг. 4А) и доверительные интервалы (фиг. 4В) сравнивали между четырьмя моделями. NNET оставался стабильным и был значительно более эффективен по чувствительности и специфичности, чем другие три модели. Среднее значение чувствительности и специфичности больше чем 0,84 (табл. 2). Кроме того, при сравнении точности и AUC среди четырех моделей NNET показал более высокую производительность. Кривая рабочих характеристик приемника (ROC) и площадь под кривой (AUC) составляют 0,9 для группы высокого риска, 0,96 для группы среднего риска и 0,99 для группы низкого риска составляют 0,9, 0,96 и 0,99 соответственно (10-проходная перекрестная валидация). Добавление фоллистатина в данную модель NNET значительно улучшило значение AUC в группе высокого риска (AUC 0,9 <с фоллистатином> по сравнению с 0,75 <без фоллистатина>, $P=4e-04$, тест Делонга). Для среднего риска значения AUC улучшились (AUC 0,99 <с фоллистатином> по сравнению с 0,96 <без фоллистатина>, $P=1e-02$, тест Делонга), тогда как для низкого риска оно составило (AUC 0,96 <с фоллистатином> по сравнению с 0,95 <без фоллистатина>, $P=1e-01$, тест Делонга) соответственно (табл. 3 и фиг. 5).

Фиг. 4. Эффективность и валидация четырех моделей для оценки риска заболеваемости диабетом 2 типа в когорте в течение 4 лет.

Для четырех моделей показаны диапазоны чувствительности, специфичности, точности, AUC (4А) и доверительные уровни (4В).

Фиг. 5. Кривая ROC выбранной модели (NNET) с четырьмя биомаркерами 10-проходной перекрестной валидации. Кривые ROC представлены для модели NNET, включающей четыре биомаркера (исходный уровень HbA_{1C} , фоллистатин, проинсулин и С-пептид), в группах риска диабета (высокий, средний и низкий риск) в наборе данных по когорте (10-проходная перекрестная валидация). Тест Делонга для кривых ROC профиля с фоллистатином и без него составляет $p=4e-04$ для группы высокого риска, $p=0,01$ для группы среднего риска и $p=0,1$ для группы низкого риска.

Обсуждение

Основываясь на результатах "кластерного анализа рисков" авторы настоящего изобретения для прогнозирования будущего диабета использовали четыре переменные для составления профиля биомаркеров: исходный уровень фоллистатина, HbA_{1C} , проинсулин и С-пептид.

Многмаркерную модель разрабатывали для оценки риска диабета 2 типа по четырем биомаркерам крови b с применением нескольких статистических подходов. Эффективность модели NNET лучше, чем любого другого базового измерения риска. Данная модель NNET обеспечивает более удобную альтернативу для осуществления оценки риска: в лаборатории измеряют значения концентрации биомаркеров в образце крови натошак и определяют вычисленный уровень риска. Данная модель NNET не зависит от антропометрических факторов или факторов риска по сообщениям самих пациентов (таких как семейный анамнез или употребление табака).

Четыре биомаркера, выбранные для модели NNET, участвуют в различных биологических путях. Проинсулин представляет собой важные индикаторы метаболических нарушений, включая диабет и ожирение. Было показано, что непропорциональная секреция предшественника инсулина проинсулина

может быть не только специфическим индикатором инсулинорезистентности, но и отличительным признаком дисфункции бета-клеток^[9]. Фоллистатин представляет собой секретируемый белок, который экспрессируется почти во всех основных тканях, и, как продемонстрировали исследования, фоллистатин связан с метаболическими заболеваниями^[10,11] с повышенными уровнями в плазме крови у пациентов с диабетом 2 типа^[10]. Циркулирующий фоллистатин оказывает непосредственное влияние на метаболизм глюкозы у людей посредством повышения уровня инсулина и подавления секреции глюкагона поджелудочной железой^[12]. Но ранее было неизвестно, позволяет ли фоллистатин предсказать заболеваемость диабетом 2 типа до начала диабета 2 типа, как показано в настоящем раскрытии.

Локальная сверхэкспрессия фоллистатина в поджелудочной железе мышей с диабетом приводила к повышению уровней инсулина в сыворотке крови^[13]. В недавнем исследовании Tao et al. идентифицировали фоллистатин как медиатор системной метаболической дисрегуляции, ассоциированной с диабетом^[14]. У мышей с гипергликемией и мышей с ожирением, получавших пищу с высоким содержанием жиров, нокадаун фоллистатина восстановил толерантность к глюкозе, передачу сигнала инсулина в белой жировой ткани и подавление инсулином продуцирования глюкозы в печени. Ранее было неизвестно, что секреция фоллистатина печенью регулируется GSKR вместе с глюкагоном и инсулином, как показано в настоящем раскрытии (фиг. 1).

У индивидов с ожирением и диабетом, перенесших операцию шунтирования желудка, уровень фоллистатина в сыворотке крови снижался параллельно с уровнями HbA_{1c}. Уровень HbA_{1c} измеряется в первую очередь для идентификации средней концентрации глюкозы в плазме крови в течение трех месяцев и, таким образом, его можно использовать в качестве диагностического теста в отношении диабета.

Обнаружена положительная связь между уровнями С-пептида в сыворотке крови и рисками диабета и преддиабета среди китайских женщин с гестационным диабетом в анамнезе.

Преыдущие открытия свидетельствуют о том, что повышенные уровни С-пептида могут представлять собой средство для прогнозирования диабета и преддиабета^[15].

Переменные анализировали в нескольких математических моделях с применением способов машинного обучения: SVM, NNET, RF и GLM. Среди всех протестированных способов наибольшую эффективность продемонстрировал NNET. Используя выбранный профиль биомаркеров, NNET с очень высокой специфичностью и чувствительностью предсказывает, характеризуется ли индивидум низким, средним или высоким риском развития диабета через четыре года. AUC составляет 0,9 (10-проходная перекрестная валидация) для прогнозирования высокого риска, 0,99 для прогнозирования среднего риска и 0,96 для прогнозирования низкого риска (фиг. 3). Сравнение AUC между моделями с фоллистатином и без него продемонстрировало, что несколько биомаркеров характеризовались лучшей эффективностью, чем один биомаркер и биомаркеры без фоллистатина.

Таким образом, применяя различные статистические способы для выбора биомаркеров, авторы настоящего изобретения разработали модель NNET, которая включает до четырех циркулирующих биомаркеров. NNET обеспечивает лучшую оценку риска диабета по сравнению с одним биомаркером и моделью без фоллистатина. Текущие результаты свидетельствуют о том, что данная модель NNET может быть важным инструментом для идентификации индивидумов с самым высоким риском развития диабета 2 типа, группы, для которой следует рассматривать наиболее всесторонние стратегии профилактики. Улучшенная эффективность данной модели по сравнению с отдельными маркерами демонстрирует ценность моделей оценки риска, которые включают несколько биомаркеров из различных патофизиологических путей, ассоциированных с диабетом 2 типа, включая фоллистатин.

Перечень использованных источников

- [1] Bommer, C. et al. Global Economic Burden of Diabetes in Adults: Projections from 2015 to 2030. *Diabetes Care* 41, 963-970, doi:10.2337/dc17-1962 (2018).
- [2] Knowler, W. C. et al. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med* 346, 393-403, doi:10.1056/NEJMoa012512 (2002).
- [3] Lin, H. V. et al. GPR142 Controls Tryptophan-Induced Insulin and Incretin Hormone Secretion to Improve Glucose Metabolism. *PLoS One* 11, e0157298, doi:10.1371/journal.pone.0157298 (2016).
- [4] Bueno, A. B. et al. Positive Allosteric Modulation of the Glucagon-like Peptide-1 Receptor by Diverse Electrophiles. *J Biol Chem* 291, 10700-10715, doi:10.1074/jbc.M115.696039 (2016).
- [5] Farb, T. B. et al. Regulation of Endogenous (Male) Rodent GLP-1 Secretion and Human Islet Insulin Secretion by Antagonism of Somatostatin Receptor 5. *Endocrinology* 158, 3859-3873, doi:10.1210/en.2017-00639 (2017).
- [6] Kuhn, M. Caret: classification and regression training. *Astrophysics Source Code Library* (2015).
- [7] Team, R. C. R: A Language and Environment for Statistical Computing, *dim* (ca533) 1, 34 (2018).
- [8] Robin, X. et al. pROC: an open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves. *BMC bioinformatics* 12, 77 (2011).
- [9] Russo, G. T. et al. Factors associated with beta-cell dysfunction in type 2 diabetes: the BETADECLINE study. *PLoS One* 9, e109702 (2014).
- [10] Hansen, J. et al. Plasma follistatin is elevated in patients with type 2 diabetes: relationship to hyperglycemia, hyperinsulinemia, and systemic low-grade inflammation. *Diabetes Metab Res Rev* 29, 463-472, doi:10.1002/dmrr.2415 (2013).
- [11] Yndestad, A. et al. A complex role of activin A in non-alcoholic fatty liver disease. *Am J Gastroenterol* 104, 2196-2205, doi:10.1038/ajg.2009.318 (2009).
- [12] Hansen, J. S. et al. Circulating Follistatin Is Liver-Derived and Regulated by the Glucagon-to-Insulin Ratio. *J Clin Endocrinol Metab* 101, 550-560, doi:10.1210/jc.2015-3668 (2016).
- [13] Zhao, C. et al. Overcoming Insulin Insufficiency by Forced Follistatin Expression in beta-cells of db/db Mice. *Mol. Ther.* 23, 866-874, doi:10.1038/mt.2015.29 (2015).
- [14] Tao, R. et al. Inactivating hepatic follistatin alleviates hyperglycemia. *Nat Med* 24, 1058-1069, doi:10.1038/s41591-018-0048-0 (2018).
- [15] Yin, P. et al. C-peptide levels and the risk of diabetes and pre-diabetes among Chinese women with gestational diabetes. *Journal of diabetes and its complications* 31, 1658-1662 (2017).

Заключительные комментарии

Термин "содержащий", используемый в формуле изобретения, не исключает других элементов или стадий. Формы единственного числа, используемые в формуле изобретения, не исключают множественное число. Хотя настоящее изобретение было подробно описано с целью иллюстрации, понятно, что такие детали предназначены исключительно для этой цели, и специалисты в данной области техники могут вносить в них изменения, не выходящие за пределы объема настоящего изобретения.

Таблица 1

AUC ROC 10-проходной перекрестной валидации с разными переменными разными способами

Исходный уровень HVA _{1c}	Фоллистатин	Пронинсулин	C-пептид	Инсулин	NNET	SVM	RF	GLM
U	U	U	U	N	0,97	0,95	0,93	0,94
U	U	U	U	U	0,96	0,94	0,94	0,94
U	U	U	N	U	0,96	0,94	0,94	0,94
U	U	U	N	N	0,96	0,95	0,93	0,94
U	U	N	N	U	0,94	0,9	0,93	0,95
U	U	N	U	U	0,93	0,92	0,93	0,94
U	U	N	U	N	0,93	0,92	0,9	0,93
U	U	N	N	N	0,92	0,86	0,88	0,92
U	N	U	U	U	0,91	0,86	0,86	0,85
U	N	U	U	N	0,9	0,87	0,87	0,85
U	N	U	N	N	0,89	0,89	0,89	0,85
N	U	N	N	N	0,89	0,62	0,6	0,65
U	N	U	N	U	0,88	0,87	0,87	0,84
U	N	N	U	U	0,87	0,84	0,83	0,81
U	N	N	U	N	0,85	0,81	0,8	0,81
U	N	N	N	U	0,82	0,86	0,83	0,82
U	N	N	N	N	0,77	0,78	0,75	0,77
N	U	U	U	U	0,75	0,68	0,75	0,68
N	U	U	U	N	0,75	0,68	0,72	0,69
N	U	U	N	N	0,74	0,71	0,67	0,69
N	U	N	U	N	0,72	0,69	0,7	0,67
N	U	U	N	U	0,71	0,67	0,72	0,68
N	U	N	U	U	0,7	0,68	0,76	0,67
N	U	N	N	U	0,7	0,66	0,69	0,65
N	N	U	U	U	0,69	0,63	0,67	0,63
N	N	U	U	N	0,69	0,65	0,64	0,65
N	N	U	N	N	0,67	0,57	0,58	0,64
N	N	N	U	U	0,66	0,7	0,67	0,61
N	N	U	N	U	0,65	0,65	0,66	0,6
N	N	N	U	N	0,62	0,65	0,59	0,61
N	N	N	N	U	0,59	0,62	0,56	0,55

Таблица 2

Эффективность каждого кластера с 10-проходной перекрестной валидацией

	Чувствительность	Специфичность	Точность	AUC
Высокий риск	0,7	0,97	0,835	0,9
Средний риск	0,919	0,944	0,932	0,96
Низкий риск	0,914	0,902	0,908	0,99
Общий	0,845	0,939	0,889	0,969

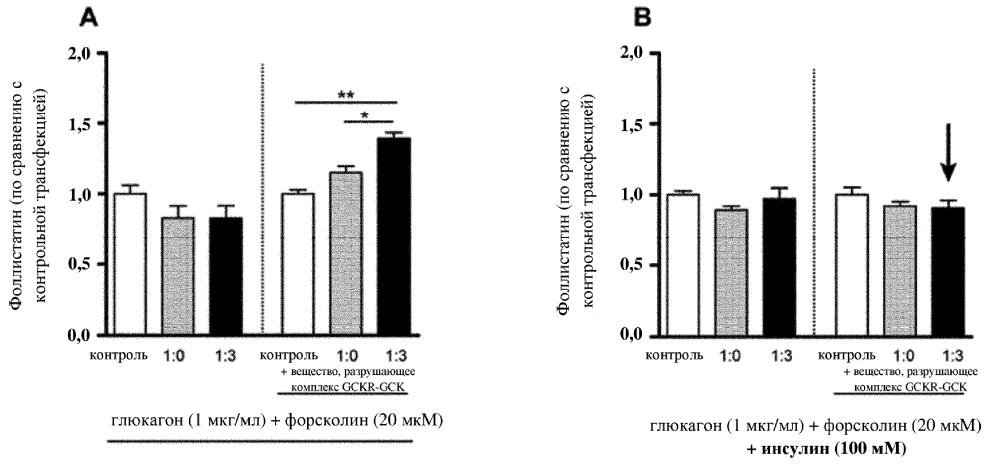
Таблица 3

Сравнение моделей AUC с фоллистатином и без него для каждого класса

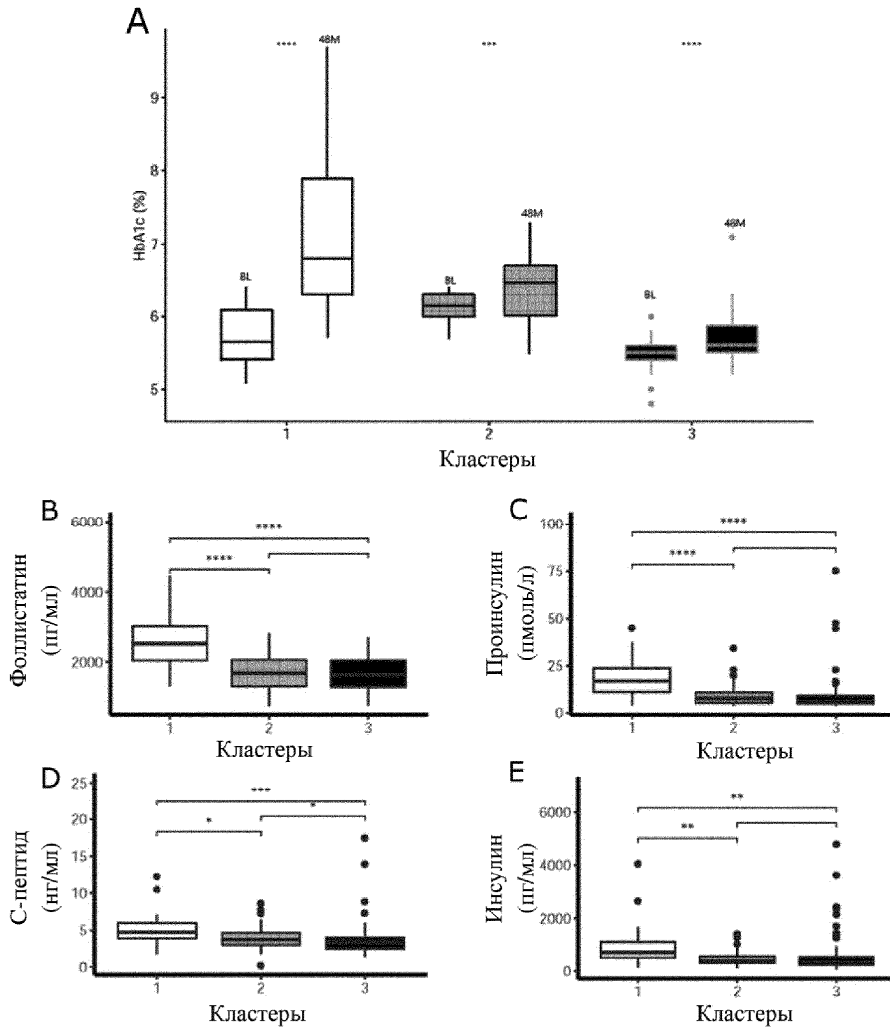
Способ	Высокий риск	Средний риск	Низкий риск
NNET	0,9	0,99	0,96
NNET_без FST	0,75	0,96	0,95
P-значение	4e-04	0,01	0,1

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

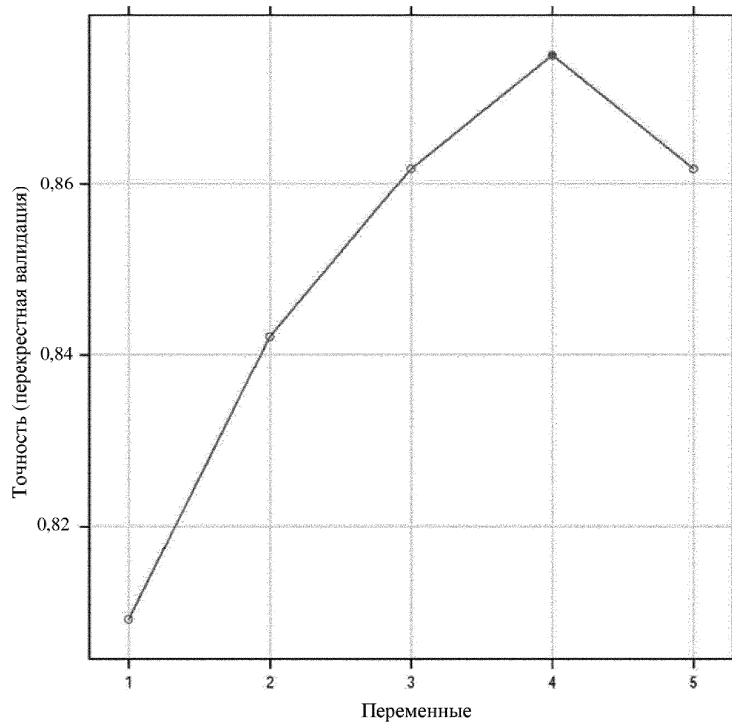
1. Способ диагностики и/или прогнозирования высокого риска краткосрочного развития диабета 2 типа у человека, включающий измерение в крови указанного человека уровней фоллистатина и биомаркеров, представляющих собой исходный уровень HbA_{1C} , проинсулин и С-пептид, и сравнение измеренных уровней в крови с модельным значением, основанным на усредненных значениях уровня в крови для группы людей, характеризующихся высоким риском краткосрочного развития диабета 2 типа, где краткосрочное развитие составляет менее чем 10 лет.
2. Способ по п.1, где указанный способ предусматривает высокий риск развития диабета 2 типа через менее чем 5 лет, предпочтительно через менее чем 4 года.
3. Способ по п.1 или 2, где указанный способ включает кластеризацию k-средних для оценки уровня риска прогрессирования диабета 2 типа.
4. Способ по любому из пп.1-3, где указанный способ включает оценку указанных биомаркеров посредством рекурсивного исключения признаков для построения модели прогнозирования риска.
5. Способ по любому из пп.1-4, где измеренные уровни в крови сравнивают с модельным значением, основанным на усредненных значениях уровня в крови для группы людей, характеризующихся высоким риском развития диабета 2 типа через менее чем 5 лет, предпочтительно через менее чем 4 года.
6. Способ по любому из пп.1-5, где указанный способ представляет собой способ диагностики высокого риска краткосрочного развития диабета 2 типа у человека.
7. Способ по любому из пп.1-5, где указанный способ представляет собой способ прогнозирования высокого риска краткосрочного развития диабета 2 типа у человека.
8. Способ составления профиля биомаркеров для раннего прогнозирования диабета 2 типа у человека, предусматривающий измерение в крови указанного человека уровней фоллистатина и биомаркеров, представляющих собой исходный уровень HbA_{1C} , проинсулин и С-пептид, и сравнение измеренных уровней в крови с модельным значением, основанным на усредненных значениях уровня в крови для группы людей, характеризующихся высоким риском развития диабета 2 типа через менее чем 10 лет, предпочтительно через менее чем 5 лет или более предпочтительно через менее чем 4 года.
9. Применение фоллистатина в качестве биомаркера в комбинации с дополнительными биомаркерами, представляющими собой исходный уровень HbA_{1C} , проинсулин и С-пептид, для диагностики и/или прогнозирования высокого риска краткосрочного развития диабета 2 типа у человека, где краткосрочное развитие составляет менее чем 10 лет.
10. Применение по п.9, где высокий риск краткосрочного развития диабета 2 типа у человека предусматривает высокий риск развития диабета 2 типа через менее чем 9 лет, менее чем 8 лет, менее чем 7 лет, менее чем 6 лет, менее чем 5 лет или менее чем 4 года.
11. Применение по любому из пп.9 или 10, где диагностика высокого риска краткосрочного развития диабета 2 типа у человека включает кластеризацию k-средних для оценки уровня риска прогрессирования диабета 2 типа.
12. Применение по любому из пп.9 или 10, где диагностика высокого риска краткосрочного развития диабета 2 типа у человека включает оценку указанных биомаркеров посредством рекурсивного исключения признаков в модели прогнозирования риска.
13. Применение по любому из пп.9-12, предусматривающее составление профиля биомаркеров для раннего прогнозирования диабета 2 типа у человека, предусматривающее измерение в крови указанного человека уровней фоллистатина и биомаркеров, представляющих собой исходный уровень HbA_{1C} , проинсулин и С-пептид, и сравнение измеренных уровней в крови с модельным значением, основанным на усредненных значениях уровня в крови для группы людей, характеризующихся высоким риском развития диабета 2 типа через менее чем 10 лет, предпочтительно через менее чем 5 лет или более предпочтительно через менее чем 4 года.
14. Применение по любому из пп.9-13 для диагностики высокого риска краткосрочного развития диабета 2 типа у человека.
15. Применение по любому из пп.9-13 для прогнозирования высокого риска краткосрочного развития диабета 2 типа у человека.



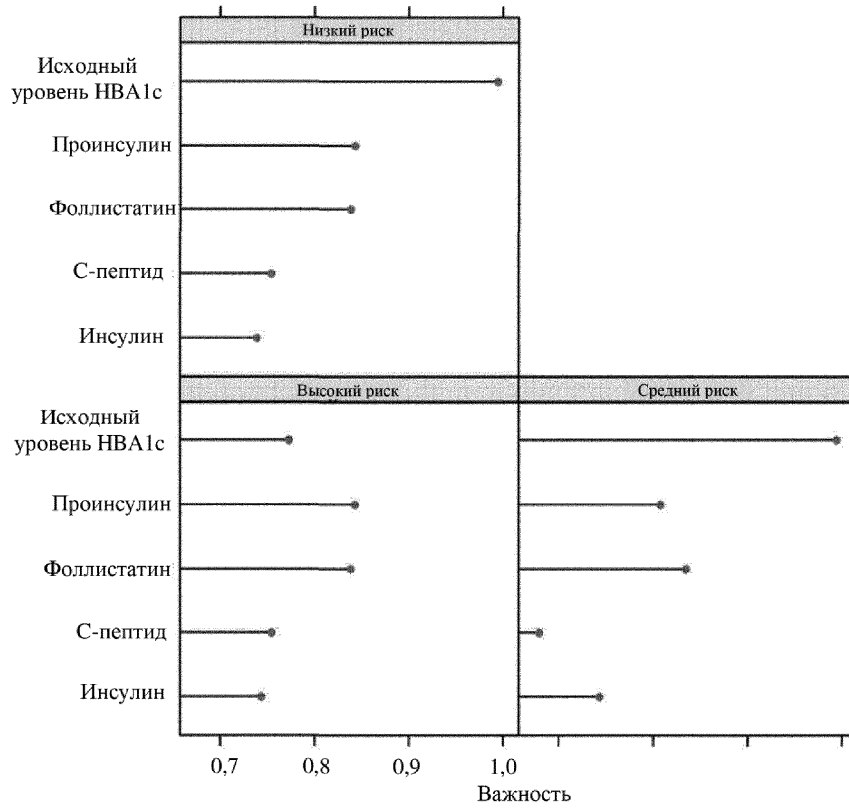
Фиг. 1



Фиг. 2

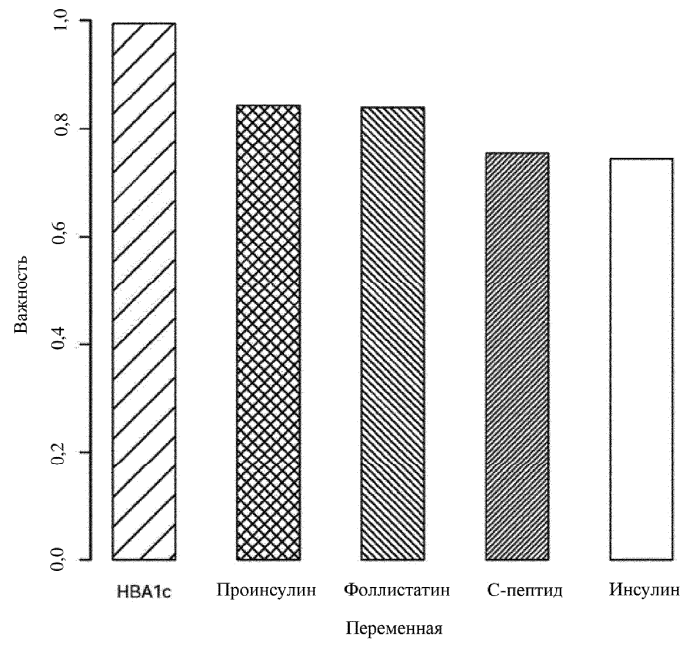


Фиг. 3А

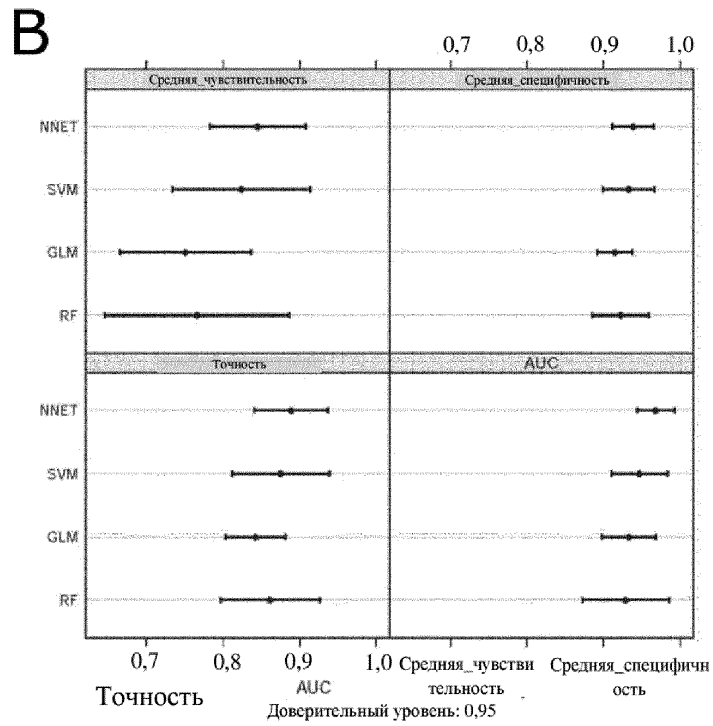
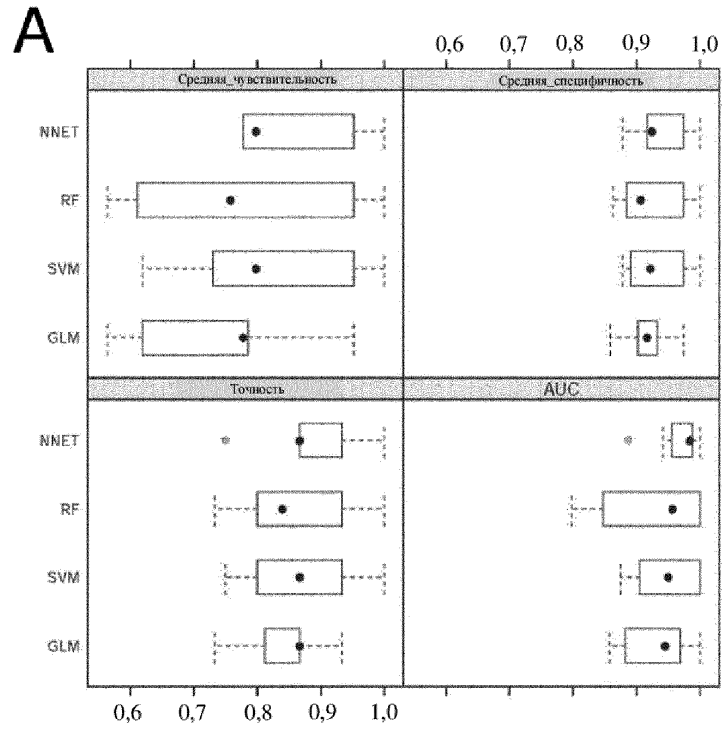


Фиг. 3В

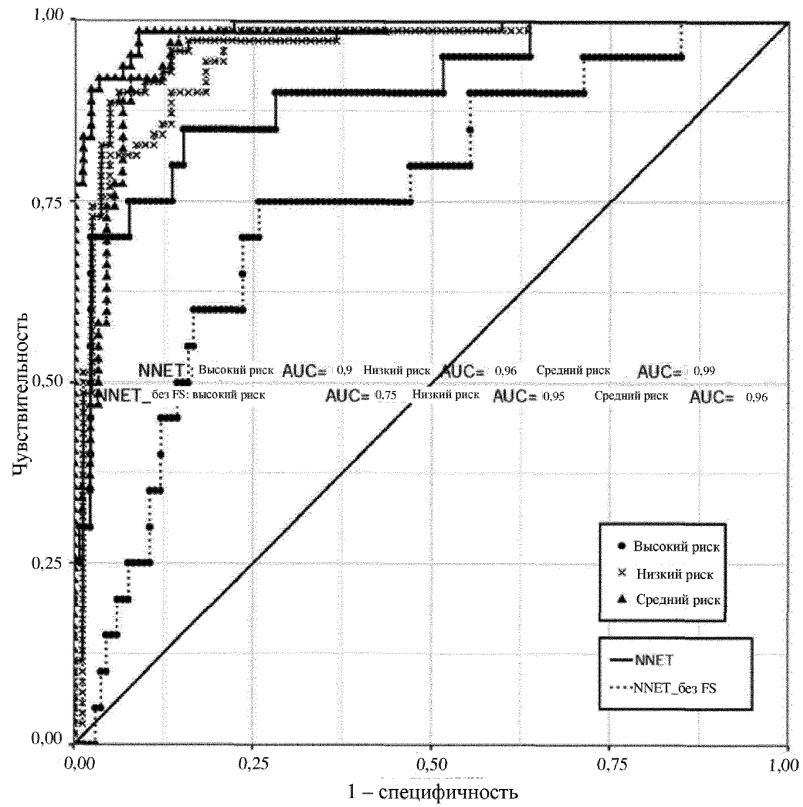
С



Фиг. 3С



Фиг. 4



Фиг. 5

