

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



[12] 发明专利申请公布说明书

G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/537 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/566 (2006.01)

[21] 申请号 200680009798.X

[43] 公开日 2008年6月25日

[11] 公开号 CN 101208601A

[22] 申请日 2006.1.24
[21] 申请号 200680009798.X
[30] 优先权
 [32] 2005. 1. 25 [33] US [31] 60/646,762
[86] 国际申请 PCT/US2006/002306 2006. 1. 24
[87] 国际公布 WO2006/081188 英 2006. 8. 3
[85] 进入国家阶段日期 2007. 9. 25
[71] 申请人 CIS 生物科技公司
 地址 美国乔治亚州
[72] 发明人 S·A·达姆比诺瓦

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
 代理人 刘冬 黄可峻

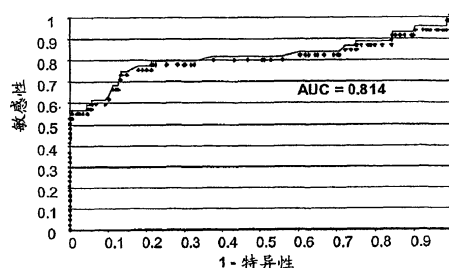
权利要求书 3 页 说明书 19 页 附图 2 页

[54] 发明名称

局部缺血生物标记物及其在预测手术造成的不良神经事件中的应用

[57] 摘要

本发明提供了预测手术造成的不良神经事件发生率的方法。这类不良事件包括,如中风、谵妄和短暂性脑缺血发作(TIA)。本方法基于这一发现:循环脑 NMDA 受体肽和抗体可用来鉴别易患不良神经事件的患者。本发明还提供了实践本发明预测方法的诊断方法,以及减少手术造成的不良神经事件风险的干预策略(图1)。



术前 NR2 抗体的 ROC 与术后神经不良事件的对比

1. 一种在手术前帮助评价表观健康的人受试者中风风险的方法，包括：

- a) 从受试者获得测试样品；
- b) 分析获得的测试样品，确定 NMDA 受体肽或抗体，或其组合的存在或初始水平；
- c) 将步骤(b)的结果与 NMDA 受体肽或抗体，或其组合的相应参考量进行比较，其中的相应参考量得自表观健康的人受试者群体。

2. 权利要求 1 的方法，进一步包括：

- a) 评价所述患者不良神经事件的一种或多种额外风险系数的有无；和
- b) 将一种或多种额外风险系数的有无与所述的患手术造成的不良神经事件的风险联系起来。

3. 权利要求 1 的方法，如果所述患者有患手术造成的不良神经事件的风险，则所述方法进一步包括：(i)对所述患者进行神经保护治疗，或(ii)实施一项监控计划，监控不良神经事件的风险或发生。

4. 权利要求 1 的方法，如果所述患者有患手术造成的不良神经事件的风险，则所述方法进一步包括：分析所述患者通过 MRI 界定的新的梗塞面积，并对所述患者进行神经手术。

5. 权利要求 1 的方法，其中所述的不良神经事件为局灶性缺血神经事件。

6. 权利要求 1 的方法，其中所述的不良神经事件的特征为精神错乱、TIA 或局部缺血性中风。

7. 权利要求 1 的方法，其中所述的不良神经事件发生于所述的手术中，或手术 72 小时内。

8. 权利要求1的方法,其中所述的NMDA受体肽包括脑NMDA受体NR2亚基的片段。

9. 权利要求1的方法,其中所述的NMDA受体肽包括脑NMDA受体NR2A亚基的片段、脑NMDA受体NR2B亚基的片段,或其组合。

10. 权利要求1的方法,其中所述的NMDA受体肽包括脑NMDA受体NR2A亚基的N-末端结构域或其片段、脑NMDA受体NR2B亚基的N-末端结构域或其片段,或其组合。

11. 权利要求1的方法,其中:

- a) 所述的生物体液为血清;
- b) 在所述的生物体液中,对应于NR2A/B N末端结构域抗体的抗体初始水平高于2.0、1.8、1.5或1.0ng/ml,或对应于NR2A/B N末端结构域循环肽的NMDA肽水平高于200、100或50pg/ml,与患所述神经事件的风险相关;
- c) 在所述的生物体液中,对应于NR2A/B N末端结构域抗体的抗体初始水平低于2.0、1.8、1.5或1.0ng/ml,或对应于NR2A/B N末端结构域循环肽的NMDA肽水平低于200、100或50pg/ml,与患所述神经事件的风险不相关。

12. 权利要求1的方法,进一步包括:

- a) 在所述手术后,测定所述患者NMDA受体肽或抗体的后继水平;
- b) 确定所述的初始水平和后继水平之间是否有实质性差异;
- c) 将所述初始水平和后继水平的实质性差异与不良神经事件关联起来; 和
- d) 将所述初始水平和后继水平的无实质性差异与无不良神经事件关联起来。

13. 权利要求1的方法,其中所述的手术包括麻醉。

14. 权利要求1的方法,其中所述的手术包括心肺分流术。

15. 权利要求 1 的方法，其中所述的患者为有患神经后遗症风险的新生儿或婴儿。

16. 权利要求 1 的方法，其中进行所述的测试前，所述患者被诊断为患有糖尿病、动脉硬化症，或先前怀疑的中风或 TIA。

17. 权利要求 1 的方法，其中所述的生物液体包括包括血液、尿液、血浆、血清、脑脊液、唾液、汗液或脑组织。

18. 权利要求 1 的方法，其中：

- a) 用诊断试剂盒检测所述生物体液中 NMDA 受体抗体水平；
- b) 所述的诊断试剂盒包含结合的 NMDA 受体肽；和
- c) 针对抗体标准品生产所述试剂盒，所述抗体标准品包括从人血中纯化的免疫球蛋白 G 组分。

19. 权利要求 1 的方法，通过直接或间接 ELISA、RIA、免疫斑点、免疫印记、胶乳凝集、侧流、荧光偏振分析或微阵列法加以实施。

局部缺血生物标记物及其在预测手术造成的不良神经事件中的应用

与在先申请的关系

本申请根据 35 U.S.C. § 119(e)要求 2005 年 1 月 25 日提交的美国临时申请 60/646,762 的优先权。在先申请的全部内容通过引用并入本文，如同在此整体提出。

发明领域

本发明涉及预测术后不良神经事件风险的方法，特别涉及预定进行手术患者血液中 NR2 肽和抗体的检测方法，及利用该测试结果预测术后病人发生中风、短暂性脑缺血发作(TIA)或其它局部缺血引起的事件的可能性的方法。该测试特别有益于患有预先存在心血管疾病、脑血管疾病、高血压、糖尿病或颈动脉血管杂音等可能患手术造成的不良神经事件的，但其术后风险尚未完全明了的患者。该测试的诊断和预后功能有望降低手术室发病率和死亡率，改善对预定进行手术的心脑血管患者的管理。

发明背景

手术对神经系统带来的损害是对神经元直接的毒性效应和因全身性低氧和局部缺血引起的继发性损害的组合。中风或是闭塞性的(由于血管的堵塞)，或是出血性的(由于血管出血)，但两种情形都引起脑血液供应不足，导致被称为局部缺血的病症。

灶性脑损害与常发生于心搏停止或低灌注状态下的全脑缺氧性损害不同(Graham SH, Chen J. J Cereb Blood Flow 2001; 21:99-109)。当灶性脑损害发生时，局部缺血中心形成，特征性地被半影区的存活细胞所环绕，这些存活细胞阻止了(至少是延迟了)梗塞的扩张和脑损害的程度(Deshpande J, et al. Exp Brain Res 1992; 88: 91-105; Matsui T, et al. J Cereb Blood Flow Metab 2002; 22:711-722)。而当全脑缺血

发生时，最易损区位于顶叶皮质和基底神经节，在该区域可以观察到凋亡事件的发生(Kjos BO, Brant-Zawadzki M, Young RG. *Am J Roentgenol* 1983; 141:1227-1232)。

在过去 10 年中，已提出了几种预测和诊断脑损害的生物标记物。有关 S100B 与中风、创伤性脑损害和心博停止后引发的脑损害具有相关性的报道激发了人们对心外科手术中以血清 S100B 做为神经学和神经认知结果评价的生物标记物的巨大兴趣(Abraha HD, et al. *Ann Clin Biochem* 1997; 34: 366-370; Buttner T, et al. *Stroke* 1997; 28: 1961-1965; Lynch JR, et al. *Stroke* 2004;35:57-63)。S100B 为一主要发现于神经胶质细胞和 Schwann 细胞的钙调节蛋白。另一心脏手术后脑血管事件的可能生物标记物为 C-反应蛋白(CRP)，CRP 为一种急性期反应物和潜在系统炎症的指示物。CRP 为新型的动脉粥样硬化血栓形成性疾病血浆标记物和心血管疾病的预示物(RostNS, et al. *Stroke* 2001; 32:2575-79)。

最近，N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体肽及其抗体被提议做为潜在的脑局部缺血和中风的神经毒性的标记物(Dambinova SA, et al. *Stroke* 2002; 33:1181-1182; Dambinova SA, et al. *Clin Chem* 2003; 49: 1752-1762)。NMDA 受体是脑特异性的。如神经元死亡或脑局部缺血，NMDA 受体肽片段断裂，出现在血流中，并引发抗体响应，在血样中可同时检测到肽片段和抗体(Dambinova SA, et al. *Stroke* 2002)。患急性局部缺血性中风的成年患者 NMDA 肽或抗体，或其组合水平升高，并与脑扫描仪 (MRI)确定的脑损害程度和患者神经认知状态相关(Dambinova SA, et al. *Clin Chem* 2003; 49:1752-1762)。

常规应用具有潜在诊断或预后能力的特异性生物标记物能大大提高手术中心脑血管患者的管理和治疗效果，特别是心脏手术包括心肺分流术患者(CPB)。脑部并发症为伴心肺分流术心脏手术后死亡或残废的主要因素。在手术期内，中风的发生率在 1% 和 5% 之间(Gardner TJ, et al. *Ann Thorac Surg* 1985; 40:574-581; Murkin JM, et al.

J Thorac Cardiovasc Surg 1995; 110:349-362; Roach GW, et al. N Engl J Med 1996; 335:1857-1863; Libman RB, et al. Arch Neurol 1997; 54:83-87; Carrascal Y, et al. Eur Neurol 1999; 41 : 128-134), 并且其发生率与升高的死亡率相关(Roach GW, et al. N Engl J Med 1996; 335:1857-1863; Carrascal Y, et al. Eur Neurol 1999; 41:128- 134)。尽管中风为明显的并发症, 神经认知紊乱和精神错乱为更微妙的并发症, 神经认知紊乱对术后护理和因此延长住院治疗相关费用的影响是巨大的。

全脑局部缺血与心血管系统疾病有关, 并造成神经认知能力的恶化和神经学并发症。多项研究采用一系列的神经认知测试技术, 报道了心脏手术后常发生轻度神经心理损伤(Murkin JM, et al. J Thorac Cardiovasc Surg 1995; 110:349- 362; Shaw PJ, et al. Q J Med 1987; 239:259-268; McKhann GM, et al. Ann Thorac Surg 1997; 63: 510-515; McKhann et al. Lancet 1997; 349:1282-1284)。但单独的神经认知测试并不能预测术后不良神经事件。

基于外科手术前风险系数和与手术方法有关机制, 定义心脏手术相关的脑部功能紊乱决定因素, 对降低源于该方法的风险和提高患者治疗效果非常重要。当前可以通过比较手术前和手术后临床和神经心理学评价, 或采用成像技术(CT 或 MRI)检测形态学改变, 回顾性评价因心脏手术导致的脑损害。遗憾的是, 神经心理学评价需要时间, 专家工作人员与患者的配合。另外, 神经影像(特别是 MRI)非常昂贵, 并且可能对术后患者造成压力或风险。因此, 获得一种能检测脑损害和预测进一步脑损害的生物标记物具有相当大的实际价值。

发明目的

本发明的一个目的是通过手术前测定患者血液或其它生物体液中的生物标记物, 准确预测预定进行手术患者不良神经事件, 包括短暂性脑缺血发作(TIA)、中风和神经认知功能紊乱的风险。

本发明另一目的是在具有上述不良事件特别风险的预定进行手术患者中，包括具有预先存在心脑血管损害或急性局部缺血应激，或糖尿病患者中，评价局部缺血诱导的不良神经事件的风险。

另外，本发明的另一目的是在手术前，手术中和手术后更有效选择介入策略，包括监控方案和进行神经保护治疗以阻止脑局部缺血引起的损害，以降低术后不良神经事件风险。

发明简述

提供了方法和试剂盒，可根据患者血流中 NMDA 受体肽和抗体的存在及数量，评价术后患者患不良神经事件的风险。在成年患者中手术前临床预测定的 NMDA 受体肽和抗体的截断值使我们能够阐释该肽和抗体测试在评价神经不良事件(包括 TIA 和中风)中的高效特性和临床应用。分析手术前后 NMDA 肽和抗体的分布表明，当单独和结合 MMSE(简易精神状态检查)成分评分时，这些标记物对神经并发症都具有较高的预测价值。已经建立了基于该测试结果的规避和降低风险的诊断和治疗方法。

本发明的方法特别优选 NMDA 受体 NR2A 和 NR2B 亚基的血液水平，特别是源自 NR2A 和 NR2B 亚基 N-末端结构域的肽片段的水平，非常准确预测手术后不良神经事件。在一项预期的、盲法的、多中心、量度心肺分流术患者中风或 TIA 发生率的临床研究中，当患者血清中抗体高于 2.0 ng/ml 时，该方法能预测 96.2%患者将患中风或 TIA，当患者血清中抗体低于 2.0 ng/ml 时，该方法能预测 95.6%患者将不患中风或 TIA。相比之下，钙调节蛋白 S100B，被广泛研究用于心脏手术神经学预后的潜在生物标记物，却不能预测患者是否将患 TIA 或中风。CRP(C-反应蛋白)，也被报道做为一种血栓形成疾病的标记物和脑血管疾病的预示物，同样不能预测患者是否将患 TIA 或中风。

因此，在本发明的一个实施方案中，提供了一种在手术前帮助评价表观健康的人受试者中风风险的方法，包括：(a)从受试者中获

得测试样品; (b)分析测试样品中 NR2 抗原或 NR2 抗体, 或其组合的有无或含量; 将步骤(b)的结果与 NR2 抗原或 NR2 抗体, 或其组合的相应参考量进行比较, 其中 NR2 抗原或 NR2 抗体, 或其组合的相应参考量来自表观健康的人受试者群体。

当发现不能接受的 TIA 或中风风险时, 本发明进一步包括提供监控方案和神经保护治疗以规避(managing)或降低该风险。例如, 当观察到 NMDA 受体肽或抗体达到危险水平时, 该患者可以服用各种已知的有益于心血管系统的药物, 降低中风风险, 包括各种抗血小板药物、抗凝血剂、降脂药、血压调节药物(如果观察到高血压的情况)和手术干预。另外, 应制定严格的监控方案, 其中应一次或多次监测 NR2 水平, 包括手术前, 手术中或手术后立即测定。

本发明的另一优点将在随后的描述中做部分阐明, 而另外部分从描述来看可以说是显而易见的, 或可以从实践本发明中获知。通过在所附权利要求中特别提出的要点和组合, 可以认识和获知本发明的优点。需理解的是, 如权利要求所主张, 前述的一般简述和随后的详述仅作为示范和说明之用, 并非对本发明的限制。

发明详述

通过参考本发明优选实施方案和本文包含的实施例的详述可更容易的理解本发明。

术语的定义和应用

如随后的专利说明书和权利要求中所使用的单数形式的“一个”和“那个”也包括复数指示物, 除非上下文中已清楚的指明。因此, 例如, 提及的“一个片段”包括了片段混合物, 提及的“一种 cDNA 寡核苷酸”包括了多于一种寡核苷酸, 依此类推。

NMDA 受体是一种配基门控离子通道家族成员之一, 可优先结合 N-甲基-D-天冬氨酸, 并调节脑中多数兴奋性神经传递(Dingledine R. et al., Pharmacol Rev. 1999 Mar;51(1):7-61)。文献报道该受体包括几种亚基如 NR1、NR2A、NR2B、NR2C、NR2D 和 NR3A, 它们可

完成截然不同的药理学功能。NR1 (X58633)、 NR2A (U09002)和 NR2B (U28861) 的 GenEMBL 检索号已有报道, Dambinova 在专利 WO 02/12892 中对其进行了描述。“脑” NMDA 受体是指存在于脑部的受体, 与仅出现于脑外人体器官中的 NMDA 受体不同。

NMDA 受体肽是指全长的 NMDA 受体蛋白、天然的全长 NMDA 受体片段肽片段或其类似物、衍生物、片段或其重组的多元片段 (a/k/a 重组体)。NR2 肽包括全长的 NR2A、NR2B、NR2C 和 NR2D 亚基, 还包括其片段、类似物、衍生物或重组片段。NR2A、NR2B、NR2C 或 NR2D 肽是指全长天然 NR2A、NR2B、NR2C 或 NR2D 肽亚基、或其片段、类似物、衍生物或重组片段。如 Dambinova 的专利 WO 02/12892 中所描述, NR2A 和 NR2B 肽 N-端结构域是指全长 NR2A 和 NR2B 亚基, 或其片段、类似物、衍生物或重组片段的氨基酸 N-末端结构域片段。

循环 NMDA 受体肽是指穿过血脑屏障进入全身血液循环的 NMDA 受体肽, 及其在血流中产生的片段。特别优选的循环 NMDA 受体肽是指包含一段或多段 NR2A 和 NR2B 亚基共有片段序列的 NMDA 受体肽。该肽可以包含一个, 或两个, 或多个离散存在于天然 NR2 肽骨架上的上述序列, 并或于体内或体外重组成连续片段。

肽“类似物”是指含有一个或多个氨基酸取代、缺失、插入或重排的肽。例如, 众所周知, 在蛋白质生物化学领域中, 每种氨基酸属于某一具有特定尺寸或特征(如电荷、疏水性和亲水性)的氨基酸组, 可经常被另外氨基酸取代而不改变蛋白的活性, 特别是在与生物学活性无直接关系区域的取代。因此, 如果一 NMDA 肽类似物包含了某位点的氨基酸取代、缺失、插入或重排, 而激发的抗类似物的抗体仍特异性抗 NMDA 肽, 该类似物对本发明是有益的。

除非有相反的声明, 本文中应用的 NMDA 肽类似物是指至少具有与天然 NMDA 肽氨基酸 80%一致性的肽序列, 尽管也包括含有至少 85%、90%或 95%一致性的肽序列。通过比较类似物和天然

NMDA 确定氨基酸的一致性。排列两条氨基酸序列使得沿序列长度方向共有氨基酸数目最大化，在排列中，单条或两条序列中的缺口是允许的，以使共有氨基酸数目最大化。氨基酸一致性百分数取下面两个数字中较大的那个数字(1)两种肽在排列中共有的氨基酸数目除以 NMDA 类似物氨基酸数目，乘以 100%，或(2)两种肽在排列中共有的氨基酸数目除以天然 NMDA 氨基酸数目，乘以 100%。

NMDA 衍生物包括天然的 NMDA 和通过化学法或酶法对一个或多个组成氨基酸衍生化得到的 NMDA 类似物及其片段，所述的衍生化包括侧链修饰、骨架修饰、N-或 C-末端修饰，修饰方法例如乙酰化、羟基化、甲基化、氨基化、磷酸化或糖基化。该术语还包括 NMDA 盐，例如 NMDA 锌和 NMDA 铵。

蛋白或肽的“直接”测定意味着对生物样品中该蛋白或肽自身进行测定，这与其它非直接测定蛋白或肽的方法相反，如测定蛋白或肽的自身抗体，来自该肽或亚基的其它肽片段，或与表达该蛋白或肽相关的 cDNA。

术语“抗体”同义于“免疫球蛋白”。如本文所用的术语“抗体”包括天然抗体、单克隆抗体、多克隆抗体、重组 DNA 抗体和具有生物活性的抗体衍生物，例如 Fab'、F(ab')₂ 或 Fv，还有单结构域和单链抗体。具有生物活性的抗体衍生物只要保持结合特异性抗原的能力，也包含在该定义中。所以，NR2 抗体至少具有结合一种 NR2 肽的能力。

讨论

在一个实施方案中，本发明提供了在手术前帮助评价表观健康的人受试者中风风险的方法，包括：(a)从受试者中得到测试样品；(b)分析测试样品中 NR2 抗原或抗体及其结合物的有无或含量。将步骤(b)的结果与 NR2 抗原和 NR2 抗体，或其组合的相应参考量进行比较，其中 NR2 抗原和 NR2 抗体，或其组合的相应参考量来自表观健康的人受试者群体。用另一种方式陈述，本发明提供了一种预测

术后的不良神经事件的方法，包括：(a)提供预定进行手术的患者；(b)测定所述患者生物体液中循环的脑 NMDA 受体肽初始水平；和(c)将所述 NMDA 受体肽水平与患手术造成的不良神经事件的风险关联起来。

当患者被测试在其血流中含有危险水平的 NMDA 受体肽或抗体时，最好在手术前和手术期间对患者进行多次测试。另外，因为患者经常直到手术后不久才患不良神经事件，最好于手术后下述一个或多个时间段：1 小时、3 小时、6 小时、12 小时、24 小时、3 天、7 天或 30 天时，对患者进行一次或多次附加测试。所以，在一个实施方案中，本发明进一步包括(a)所述患者进行所述手术后，测定其 NMDA 受体肽的后继水平；(b)确定所述的初始水平和后继水平是否具有差异；和(c)将所述的初始水平和继发水平的差异与或正在发生的或在近期可能发生不良神经事件关联起来。

可以在预定进行手术的成年人或儿童中实施该方法，在一项特别重要的实施方案中，在具有特高风险患神经后遗症的新生儿患者或婴儿中实施了本方法。该方法特别有益于评价已有患神经事件倾向的患者，例如患有糖尿病、动脉硬化症、高血压或先前怀疑或确定的 TIA 或中风等病史的患者。该方法还可以与 MMSA 测试联合，手术前预测不良神经事件的风险。手术前方位、注意力和回忆的 MMSA 组成得分的降低与手术后不久的精神错乱和脑血管事件相关。

本发明可预测的各类型神经事件总体上可以被脑部局部缺血所诱导，特别是被脑氧供应不足引起的脑局部缺血事件所诱导(不同于脑部血管破裂而引起的失血事件)。这些事件或集中在脑部一特定区域，发生于中风或 TIA；或分散于全脑，发生于谵妄。不良神经事件的特征为精神错乱或被诊断为 TIA 或局部缺血性中风。供氧有可能被打折扣，可归因于患者身体状况(这见于某种血液病如贫血症)，但更通常是由手术事件所引发。如果不良神经事件于手术中，或手

术完成后 30 天内发生，尽管如果需要，发生的该不良事件可以被确定在一个时间框中，如 7 天、3 天、2 天或 1 天，该不良事件可以被称为“源自手术的”或“手术造成的(from surgery)”。

本发明的预后方法可以预测源自任何种类手术的不良神经事件的风险，尽管临时减缓或中止脑部供氧的创伤外科手术将获益最大。例如，该方法应于任何闭塞或阻断正常血液循环的，导致手术期间发生微栓子或大栓子、异常脑灌注、灌注性损伤或炎症或神经体液反应的肝脏手术前实施。本发明特别用于预测实施了心肺分流术患者不良神经事件的发生率。

本测试方法的实施基于对任何循环的 NMDA 受体肽的测定，可以用任何直接或间接的测定方法实施本方法。因此，例如，可间接测定肽抗体水平，编码肽的 cDNA 表达水平，或测定肽本身的方法的确定循环肽的水平。因此，在一实施方案中，本发明提供了一种方法，其中通过将所述生物体液与一固定的抗体或其片段(例如结合到载体如微孔板或珠上或小颗粒上的抗体或其片段)进行接触，直接测定循环中一种或多种循环的脑 NMDA 受体肽，确定所述肽水平。在另一实施方案中，本发明提供了一种方法，其中通过将所述生物体液与固定的脑 NMDA 受体肽接触，测定结合到固定化肽上的抗体水平，确定所述抗体水平。

另外，最好还要测定 NMDA 受体的各种亚基和片段。例如，优选通过测定 NR2A 肽或 NR2B 肽实施该方法，进一步优选二者同时测定。在一优选的实施方案中，通过测定一个或多个与天然 NR2A 和 NR2B 序列共有的肽序列，一个或多个与 NR2A 和 NR2B N 末端结构域序列共有的肽序列，或其抗体实施本方法。在另一优选的实施方案中，本发明的方法中测定了包含脑 NMDA 受体 NR2A 和 NR2B 亚基 N-末端 2、7 和 14KD 片段的循环肽。

可以利用几乎(practically)任何表达或含有循环脑 NMDA 受体或这种受体标记物的生物体液实施本方法，包括血液、尿液、血浆、

血清、脑脊液、唾液、汗液或脑组织。在一优选的实施方案中，生物体液为血浆或血清，在一更加优选的实施方案中，血浆或血清按约 1: 50 进行稀释。

在一优选的实施方案中，基于预先确定的肽水平截断值，对风险进行了评价。因此，例如，实验方法和临床都表明，血浆或血清中 NR2A/B N-末端结构域抗体水平大于 2.0、1.8、1.5 或 1.0 ng/ml，或相当于 NR2A/B N-末端结构域循环肽的 NMDA 水平大于 200、100 或 50 pg/ml，对正在进行手术的患者而言，这非常明确的预示了神经不良事件。相反，血浆或血清中 NR2A/B N-末端结构域抗体水平小于 2.0、1.8、1.5 或 1.0 ng/ml，或相当于 NR2A/B N-末端结构域循环肽的 NMDA 水平小于 200、100、或 50 pg/ml，这非常明确的预测了手术期间不良神经事情不会发生。优选的抗体截断值为 2.0 ng/ml。

至今为止，在实施例中报道的一项有前景的临床研究中，手术前肽/抗体测试阳性的患者(分别 $>200\text{pg/ml}$ 和 $\geq 2.0\text{ ng/ml}$)较测试阴性患者($<2.0\text{ ng/ml}$)患手术造成的神经事件的可能性高 18 倍。根据临床测试结果，女性神经并发症风险率高于男性，而不良神经事件在老年患者中(>70 岁)更是常见。另外，NIHSS 评分增加合并 NR2 抗体和肽浓度的升高(分别 $>2.0\text{ ng/m}$ 和 $>200\text{pg/ml}$)预示正在进行手术患者发生 TIA/中风。但是手术前仅用 NIHSS 不能预测不良神经事件。

基于测试结果，可采用各种方案降低不良神经事件的风险，使手术如期进行。例如，如患者有患手术造成的不良事件风险时，该方法进一步包括(i)对所述患者进行神经保护治疗，或(ii)执行一项监控计划，监控不良神经事件发生的风险或发生率。神经保护治疗包括药物方案，例如抗血小板剂、抗凝血剂、降脂药和降血压药物。另外，如患者有患手术造成的不良事件风险时，该方法进一步包括，任选(optionally)分析所述患者由 MRI 界定的新的梗塞面积，对所述患者进行神经手术或血管手术，例如，颈动脉内膜切除术、直接动

脉内膜切除术、血管形成术和支架植入术、颅内外血管搭桥术和椎动脉移位术。

可以通过应用任何已知的诊断技术实施本方法，包括免疫沉淀反应(IP)、间接免疫荧光法(IIF)、免疫斑点和免疫印记(IB) (Western Blot)、直接和间接酶联免疫吸附分析法(ELISA)、放射免疫分析(RIA)、对流免疫电泳(CIE)、流式细胞术(FC)、胶乳凝集、侧流、荧光偏振分析或微阵列。在一特定的实施方案中，利用固定化的固相支持物俘获、测量 NMDA 肽标记物实施本发明。因而，本发明提供一种预测术后不良神经事件的方法，包括：(a)提供预定进行手术的患者；(b)将来自所述患者的生物样品与包含 NR2 肽或 NR2 抗体的固定化固相支持物接触足够时间，以使所述生物样品中的所述 NR2 肽或所述 NR2 抗体和所述 NR2 抗体与所述 NR2 肽之间形成一种复合物；(c)将所述的复合物与连接到信号产生化合物上的指示剂接触以产生信号；(d)测定产生的信号；(e)将产生的信号与所述样品中的所述 NR2 肽或 NR2 抗体水平联系起来；和(f)将所述样品中的所述 NR2 肽或 NR2 抗体水平与所述不良神经事件的风险联系起来。在一优选的实施方案中，指示剂包括连接到辣根过氧化物酶的鸡抗人或(兔或马等)抗人 IgG。

在一优选的实施方案中，固相支持物为一聚合物基体。该聚合物基体更优选为聚丙烯酸酯、聚苯乙烯或聚丙烯。在一优选的实施方案中，固相支持物为一微孔板。在另一优选的实施方案中，固相支持物为一硝化纤维膜或带电荷的尼龙膜。

在另一实施方案中，采用凝集法实施本方法。在该实施方案中，本发明提供了一种预测手术造成的不良神经事件的方法，包括：(a)提供预定进行手术的患者；(b)将来自所述患者的生物样品与包含 NR2 肽或 NR2 抗体的凝集载体接触足够时间，以使所述生物样品中的所述 NR2 肽或所述 NR2 抗体与所述 NR2 抗体或所述 NR2 肽之间形成凝集复合物；(c)使凝集复合物产生信号；(d)将所述的信号与一种或

多种 NR2 肽标记物联系起来；和(e) 将所述样品中的所述 NR2 肽或 NR2 抗体水平与所述不良神经事件的风险联系起来。在一优选的实施方案中，所述的“足够时间”少于 30、20、15min 或甚至 10min。

Beltz, G. A. 等在《分子探针：技术和医学应用》中(Molecular Probes: Techniques and Medical Applications, A. Albertini et al., eds., Raven Press, New York, 1989,)，描述了乳胶凝集分析，通过引用并入本文中。在乳胶凝集分析中，将激发的抗特定生物标记物抗体固定到乳胶颗粒上。在待测定的适当稀释的血清中加入一滴乳胶颗粒，轻轻摇动卡片加以混合。如样品无足够水平的生物标记物，乳胶颗粒仍保持悬浮，保持平静的、乳状外观。但如果生物标记物与存在的抗体发生了反应，乳胶颗粒丛聚成可见的聚集物。

可用聚集分析法检测生物标记物，其中将相应的抗体固定在除乳胶珠外的合适的颗粒上，例如，白明胶、红细胞、尼龙、脂质体、金颗粒等等。与沉淀反应相似，抗体的存在将会引起凝集，可用如散射比浊法、浊度法、红外分光光度法、目视检验法和比色法等等进行检测。

在本文中一般应用的术语“乳胶凝集”，是指任何基于形成可检测凝集物的方法，而限于应用乳胶做为免疫吸附基质。优选的凝集法用基质是以乳胶为基础的，例如聚苯乙烯和聚丙烯，特别是聚苯乙烯，其它已知的基底包括玻璃、纸、右旋糖苷和尼龙形成的珠子。固定化的抗体可以通过例如酰胺和酯连接的共价键、离子吸引或吸附技术，共价的、离子的或物理的结合到固相免疫吸附剂上。本领域技术人员利用常规实验方法将知道很多其它适合结合抗体的载体，或能够利用常规实验探知该类载体。

可以用传统方法制备本发明使用的抗体。例如用 NMDA 蛋白的肽，采用标准方法制备多克隆抗血清或单克隆抗体。以免疫原形式的肽(最优为 NR2A 和/或 NR2B 受体，NR2A 和/或 NR2B 受体的抗原决定簇，或其类似物或衍生物)免疫哺乳动物(例如小鼠、仓鼠或

兔), 引发抗体响应。能赋予肽免疫原性的技术包括将肽与载体偶联或其它技术是本领域公知的。例如, 肽可以在佐剂的存在下给药。可以测定血浆或血清中抗体的滴度监控免疫的进程。可以采用标准的 ELISA 或其它免疫分析方法, 以免疫原为抗原, 评价抗体水平。免疫后, 收集抗血清, 如果需要, 可以从血清中分离多克隆抗体。

要生产单克隆抗体, 从免疫动物中收集抗体产生细胞(淋巴细胞), 采用标准的体细胞融合程序与骨髓瘤细胞进行融合, 使这些细胞得以永生, 得到杂交瘤细胞。该技术(例如, 杂交瘤技术最早由 Kohler and Milstein (Nature 256, 495-497 (1975)建立)还包括其它技术, 例如人 B 细胞杂交瘤技术(Kozbor et al., Immunol. Today 4, 72 (1983)), 产生人单克隆抗体的 EBV-杂交瘤技术(Cole et al. Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy (1985) Allen R. Bliss, Inc., pages 77-96), 组合抗体库的筛选技术(Huse et al., Science 246, 1275 (1989))是该技术领域所共知的。采用免疫化学法筛选杂交瘤细胞, 生产可与肽发生特异性反应的抗体, 并分离单克隆抗体。因此, 本发明还专注于可分泌对本文描述的 NR2A 或 NR2B NMDA 肽及其片段具有特异性的单克隆抗体的杂交瘤细胞。

在一实施方案中, 采用一试剂盒实施本方法, 该试剂盒在工厂里以人血液中纯化的抗体或肽加以校准。因此, 在另一实施方案中, 在如下条件下实施本方法:(a)用诊断试剂盒测定所述生物体液中 NR2 抗体或肽水平; (b)所述试剂盒包括结合的 NR2 肽或抗体; 和(c)针对抗体或肽标准品生产所述试剂盒, 所述抗体或肽标准品包括从人血液中纯化的免疫球蛋白 G 或肽的片段。

另外, 可以用市售的化学发光技术实施本方法。例如, 该方法可以采用双位点夹心免疫分析, 该方法利用直接化学发光技术, 所用 2 个单克隆抗体为恒定量。液体试剂中的一抗可以为吡啶酯标记的对肽的第一部分具特异性的单克隆鼠抗人 NMDA 受体肽 BNP 的 F(ab')₂ 片段。固相支持物上二抗可以为生物素标记的对肽另一部分

具特异性的单克隆鼠抗人抗体，该抗体可以连接到链酶亲和素功能化的磁性微粒上。混合患者样品和两种抗体可形成免疫复合物。冲洗去除任何未结合的抗体缀合物，然后利用照度计测定免疫复合物的化学发光。

可用如下方法生产本发明用以测定自身抗体水平的免疫吸收剂。将受体蛋白的一个片段固定在合适的载体如聚苯乙烯或硝化纤维素上，优选通过共价键或离子键。如果采用免疫学检验的标准的聚苯乙烯多孔板，首先对其进行硝化处理，从而在板表面形成游离硝基，然后被还原为氨基，用戊二醛做为连接剂激活。然后，为化学固定各受体蛋白的免疫原片段，将激活的板与 2~50nM 的目的肽在一定温度下孵育一定时间(即 4°C 约 16h)以确保固定化。

通过离子相互作用，将各受体蛋白的片段固定在硝化纤维素条上来生产免疫吸附剂也是可行的。将从哺乳动物脑中分离的各受体蛋白片段点样到硝化纤维素上，于 37°C 保温 15min。用 0.5%的 Tween-20 溶液洗涤硝化纤维素，在室温下干燥生成的免疫吸附剂，在干燥的条件下保存 1 年。

实施例

提出下述实施例的目的是向本领域的普通技术人员充分公开并描述如何制备和评价本文要求保护的化合物。这些实施例仅做为本发明示范之用，并非限制发明者视其为他们的发明的范围。尽管已付出较多努力确保数字(如数量，温度等)的准确性，但一些错误和偏差还是应考虑到的。除非特别指出，份是指重量份，温度单位为°C 或在室温下，压力等于或接近大气压。

实施例 1: NMDA 肽测试

优选的 NR2 肽检验方法是用胶乳凝集免疫分析法定量测定血液中的 NR2 肽。将血样与偶联到乳胶珠上的抗体混合，10min 内目检可见凝集现象。将血样加入到检测设备的样品孔道中，通过过滤器将红细胞与血浆分离。通过毛细管作用将预先定量的血浆转移到反

应室中，在此与乳胶试剂(抗体包裹的乳胶珠)反应形成复合物，该复合物是肉眼可见的。在此报道的实施例中，采用的一组校准物浓度为 100-5000 pg/ml，采用的标准中 NR2 肽的"低"和"高"值分别为 (<200pg/ml)和(1000 pg/ml)。

实施例 2

NR2 抗体分析快速测试法(CIS-LA 抗体测试)是以胶乳凝集技术为基础的。CIS-LA 抗体分析法应用具有内嵌放大设备的三倍凹载片以肉眼检测反应，提供快速的“是”或“否”回答。在该分析中，血清样品与偶联到有色乳胶颗粒上的 NR2 肽混合，2~5 分钟内从内置的放大设备中可以肉眼观察到凝集形成或用浊度计指示凝集形成。患者样品中的 IgG 浓度以 ng/ml 表示，根据一组 0-100ng/ml 的校准物绘制的校准曲线以及 NR2 肽的"低"和"高"值分别为 (<200pg/ml)和(1000 pg/ml)的标准而定。

实施例 3: 成年手术患者中 NR2 抗体评价

评价了 30 名安排进行 CPB 手术成年患者手术前，手术后 24h 和 48h 血清中 NR2 抗体水平，记录不良事件。结果见下面表 1。

表 1

No.	NR2 抗体, 平均值±SD, ng/ml			手术类型	不良事件
	术前	术后 24h	术后 48h		
1	1.70±0.14	1.58±0.12	1.55±0.13	瓣膜	1 st 术后出血
2	1.79±0.10	1.64±0.03	2.76±0.08	CABG	1 st -3 rd 术后, C
3	2.25±0.02	1.81	2.14±0.03	CABG+瓣膜	2 nd 术后, C (hr)
4	2.00±0.04	3.23±0.09	3.34±0.15	CABG	3 rd -5 th 术后, C
5	3.9±0.08	2.32±0.06	2.70±0.15	CABG	2 nd 术后, IS
6	5.4±0.12	4.65±0.09	4.60±0.25	CABG+瓣膜	2 nd 术后, C&D, DM
7	2.29±0.09	2.05±0.02	2.20±0.02	CABG	术前, *C
8	1.69±0.02	1.35±0.004	1.22±0.07	CABG+瓣膜	3 rd 术后, C (hr)
9	1.94±0.03	1.69±0.005	1.38±0.03	瓣膜	2 nd 术后, C (4hr)
10	1.78±0.14	1.89±0.04	1.65	CABG+瓣膜	1 st 术后, **, DM
11	1.70±0.03	2.00±0.006	2.35±0.24	CABG+瓣膜	2 nd 术后, C&D, DM
12	1.40±0.03	1.38±0.03	1.39±0.06	CABG+瓣膜	-
13	2.11±0.03	1.81±0.02	1.93±0.16	CABG	-
14	1.79±0.03	1.40±0.07	1.39±0.02	CABG	1 st 术后, C (24hr)
15	1.47±0.02	1.30±0.08	1.31±0.07	CABG+瓣膜	25 th 术后抑郁
16	0.70±0.09	0.69±0.06	0.60±0.03	CABG	2-3 rd 术后癫痫发作
17	1.16±0.09	1.09±0.06	1.14±0.06	CABG	2 nd 术后, D
18	1.16±0.004	0.78±0.03	0.60±0.01	CABG	1 st 术后焦虑, C
19	1.35±0.05	1.10±0.015	1.16±0.04	CABG	2 nd 术后, C
20	1.21±0.005	0.92±0.09	0.82±0.05	CABG	2 nd 术后, C
21	2.5±0.08	1.86±0.04	1.73±0.03	CABG	术前激动
22	0.99±0.01	0.78±0.07	0.80±0.06	CABG	1 st 术后激动并失眠
23	1.00	0.92±0.02	0.82	CABG	3 rd 术后, C
24	1.10±0.18	1.15±0.05	0.98±0.004	CABG	1 st 术后焦虑
25	1.04±0.02	0.64±0.03	0.61±0.02	CABG	1 st 术后焦虑
26	0.98±0.03	0.81±0.05	0.70±0.004	CABG	7 th 术后焦虑
27	0.91±0.005	0.82±0.08	0.79±0.01	CABG	2 nd 术后, C
28	0.92±0.03	1.15±0.09	0.69±0.01	CABG	1 st 术后, C
29	1.04±0.03	0.90±0.01	0.79±0.03	CABG+瓣膜	术前激动
30	1.10±0.11	0.82±0.09	无样品	CABG+瓣膜	1 st 术后激动
31	0.72±0.004	0.73±0.004	0.68±0.01	CABG+瓣膜	1-4 th 术后癫痫发作
32	0.73±0.04	0.68±0.02	0.70±0.04	瓣膜	术前激动, 5-11 th 脑

IS - 局部缺血性中风; C - 精神错乱; D - 定向知觉的迷失; DM - 糖尿病 * 吞咽困难; ** 精神状态改变

实施例 4 : 手术中和手术后 NR2 肽水平和抗体的评价

在美国每年有超过 32000 个婴儿出生时患有先天性心脏缺陷(每 125 到 150 个就有 1 个)。患者 JT(出生日期 06/25/04)于 2004 年 12 月 7 日用 CPB 进行了手术修复先天性心脏缺陷。对衡量精神状态和运动能力的神经发育评分(关于早期学习的 Mullen 量表(Mullen Scales of Early Learning), MSEL)进行手术前评价, 结果见下表 2。该婴儿表现出较低评分和衰退的视觉、语言能力和运动缺陷。

表 2

量度标准	得分	百分比
早期学习综合	标准得分 80	9
总体运动	t-得分 28	1
视觉接受	t-得分 45	31
精确运动能力	t-得分 34	5
接受语言	t-得分 37	10
表达语言	t-得分 42	21

患者 JT 血液中 NR2 肽/抗体监测结果见表 3。从插管直到 CPB 结束，都可检测到异常高水平的肽和抗体。手术前 NR2 肽/抗体高于正常水平的数据与手术前 MSEL 评分表现出良好的相关性，并确认了因 CPB 导致的脑损害和不良神经事件。年龄相当的无先天性心脏缺陷的对照组婴儿中(n=7)，NR2 肽水平为 0.2-0.4 ng/ml，NR2 抗体为 0.4-0.8 ng/ml。

表 3

日期	时间	手术	NR2 肽, ng/ml	NR2 抗体 ng/ml
12/7/2004	7:55	插管	9.5 ± 0.07	1.4 ± 0.12
12/7/2004	10:14	CPB	10.0 ± 0.01	3.1 ± 1.02
12/7/2004	11:53	CPB 开始 1h	7.0 ± 0.33	1.2 ± 0.27
12/7/2004	14:35	CPB 结束时	2.7 ± 0.09	1.0 ± 0.02
12/8/2004	11:30	术后 24h	2.5 ± 0.15	1.2 ± 0.01
12/9/2004	9:30	术后 48h	4.6 ± 0.05	1.7 ± 0.07

实施例 5 : CIS-LA 抗体测试的性能特征

表 4 为列出了 CPB 患者中进行的研究结果,用以评价手术前 NR2 抗体水平预测不良神经事件可能性的能力。该结果按患者血清中 NR2 Ab 不同的截断值提供,并根据有无术后不良事件再进行细分。如果在 CPB 术后 28 天内,发现患者患精神错乱、TIA 和中风,基于 NIHSS 评分大于 9,该患者被认为患不良反应事件。如果患者并未患任何不良神经事件,被分配到“无不良神经事件”组。

表 4

手术前 NR2 抗体	神经不良事件 n/N (%)	无神经不良事件 n/N (%)
< 1.5 ng/mL	7/213 (3.3%)	206/213 (96.7%)
1.5 to < 2.0 ng/mL	12/159 (7.6%)	147/159 (92.5%)
≥ 2.0 ng/mL	25/26 (96.2%)	1/26 (3.9%)

表 5 提供了 NR2 抗体浓度从 1.5 ~ 2.0 ng/ml 六个不同截断值的详细分析，阐明了各截断值在预测不良神经事件中的效果。尽管对两组而言，截断值从 1.5 到 2.0 ng/ml，事件率都有所增加，但在“神经不良事件”组中增加的更快。因此，在分析范围内，风险率增加显著，最大风险率对应为 2.0 ng/mL (ClinChem, 2003)。96.0% (24/25) 的外科手术前 NR2 抗体浓度 ≥ 2.0 ng/ml 的患者在 CPB 后 48h 内发生了神经并发症，形成对比的是 NR2 抗体浓度 < 2.0 ng/ml 的患者仅为 5.4%，这使该标记物预测术后神经不良事件的能力增加 17.9 倍 (95% CI, 11.6-27.6)。

表 5

手术前 NR2 抗体	神经不良事件 n/N (%)	无神经不良事件 n/N (%)	风险率 ¹ (风险率 单侧 95% 置信下限) ²
< 1.5 ng/mL	8/214 (3.7%)	206/214 (96.3%)	5.2
≥ 1.5 ng/mL	36/184 (19.6%)	148/184 (80.0%)	(2.8)
< 1.6 ng/mL	10/288 (3.5%)	278/288 (96.5%)	8.9
≥ 1.6 ng/mL	34/110 (30.9%)	76/110 (69.1%)	(5.1)
< 1.7 ng/mL	12/319 (3.8%)	307/319 (96.2%)	10.8
≥ 1.7 ng/mL	32/79 (40.5%)	47/79 (59.5%)	(6.4)
< 1.8 ng/mL	17/351 (4.8%)	334/351 (95.2%)	11.9
≥ 1.8 ng/mL	27/47 (57.5%)	20/47 (42.6%)	(7.6)
< 1.9 ng/mL	19/364 (5.2%)	345/364 (94.8%)	14.1
≥ 1.9 ng/mL	25/34 (73.5%)	9/34 (26.5%)	(9.4)
< 2.0 ng/mL	20/373 (5.4%)	353/373 (94.6%)	17.9
≥ 2.0 ng/mL	24/25 (96.0%)	1/25 (4.0%)	(12.4)

¹: 手术前 NR2 抗体阳性患者的事件率与手术前 NR2 抗体阴性患者事件率比值

²: 风险率单侧 95% 置信下限

当前, 至少 30% 经历心脏手术患者术后患有神经认知缺陷。基于获得的神经事件可能性比 17.9, 手术前测定的 NR2 抗体浓度大于 2.0ng/ml, 将预测 89% 患者手术后的神经并发症。

图 1 为三条基于 NR2 测试数据的 ROC 曲线。手术后 NR2 抗体的曲线下面积(AUC=0.814)表明 NR2 抗体标记物具有较高的手术前预测神经不良事件的能力。

实施例 6 : 手术前和手术后 NR2 抗体分布(分类)的分析

图 2 显示了 CPB 前 NR2 抗体标记物对 TIA/中风较高的预测价值。在整个研究过程中所有时间点, 无神经不良事件(神经代码 0)患者血清样品中 NR2 抗体浓度保持在截断值 2.0 ng/ml 之下。相反, 具有神经不良事件(NHSS 评分>9)的多数患者在手术前, 手术后 24h 和 48h, NR2 抗体值升高, 在截断值 2.0 ng/ml 之上。

对患者手术前, 手术后 24h 和 48h NR2 抗体分布的详细分析表明, NR2 抗体能可靠的在手术前无神经并发症但 NR2 值低于截断值患者中揭示具有神经并发症患者。NR2 抗体生物标记物对手术后 24h NIHSS 评分的降低(即恶化)非常敏感。

结论

在整个申请中, 参考了各种出版物。将这些出版物的公开内容通过引用作为一个整体并入本申请中, 以更充分描述本发明所属技术的发展水平。很显然, 对本领域技术人员而言, 对本发明进行的各种修改和变化, 都包含在本发明的范围和精神之内。本发明的其它实施方案, 通过思考公开说明书和本发明的实践, 对本领域技术人员而言, 都是显而易见的。本发明的说明书和实施例其用意是仅做为示范, 本发明真正的范围和精神通过如下权利要求指出。

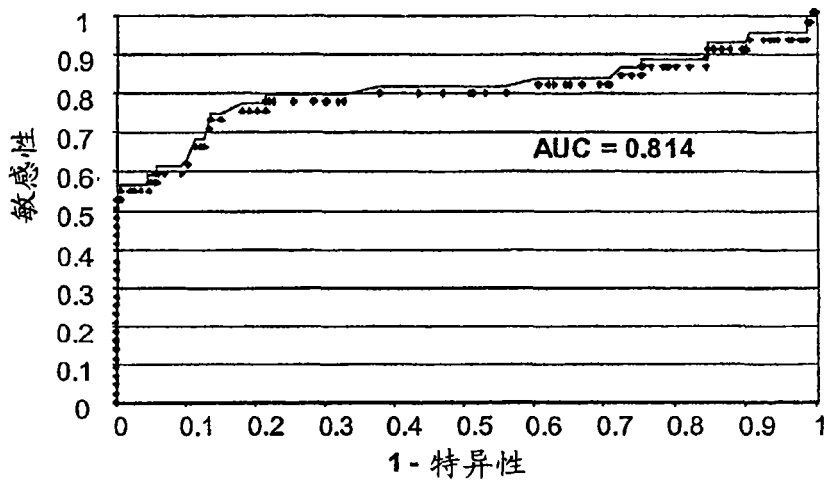


图 1 术前 NR2 抗体的 ROC 与术后神经不良事件的对比

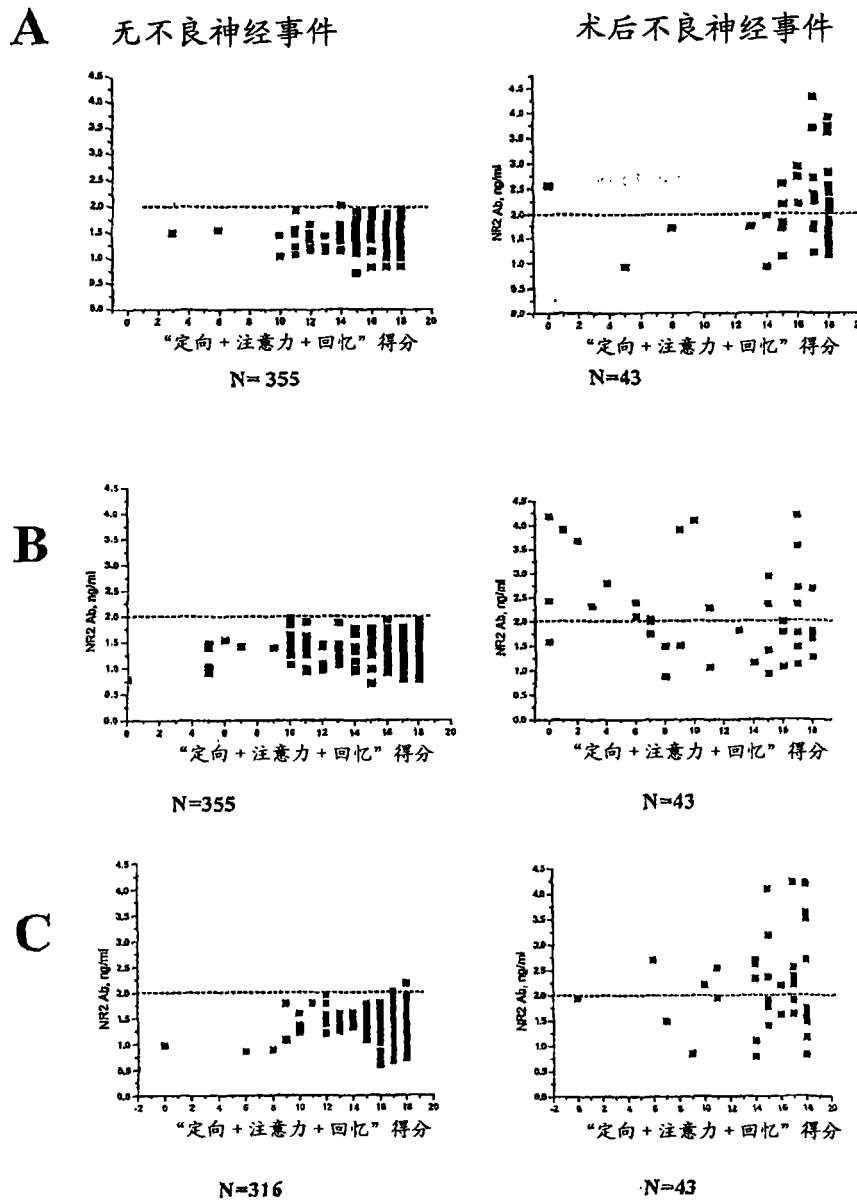


图 2
无神经不良事件的患者与术前(A)、术后 24 小时(B)及术后 48 小时(C)检测到神经并发症的患者的血清样品中 NR2 抗体的分布。数据以 NR2 抗体的术前值对 MMSE 组分：定向+注意力+回忆的综合分值形式表示。点线表示 2.0ng/ml 的截断值。

专利名称(译)	局部缺血生物标记物及其在预测手术造成的不良神经事件中的应用		
公开(公告)号	CN101208601A	公开(公告)日	2008-06-25
申请号	CN200680009798.X	申请日	2006-01-24
[标]发明人	SA达姆比诺瓦		
发明人	S· A· 达姆比诺瓦		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/537 G01N33/543 G01N33/566		
CPC分类号	G01N2800/32 G01N33/6893 G01N33/6896 G01N2800/2871		
代理人(译)	刘冬		
优先权	60/646762 2005-01-25 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了预测手术造成的不良神经事件发生率的方法。这类不良事件包括，如中风、谵妄和短暂性脑缺血发作(TIA)。本方法基于这一发现：循环脑NMDA受体肽和抗体可用于鉴别易患不良神经事件的患者。本发明还提供了实践本发明预测方法的诊断方法，以及减少手术造成的不良神经事件风险的干预策略(图1)。

