



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02802866. X

[43] 公开日 2005 年 6 月 22 日

[11] 公开号 CN 1630818A

[22] 申请日 2002. 9. 16 [21] 申请号 02802866. X

[30] 优先权

[32] 2001. 9. 14 [33] US [31] 60/322,523

[32] 2002. 9. 13 [33] US [31] 10/243,566

[86] 国际申请 PCT/US2002/029477 2002. 9. 16

[87] 国际公布 WO2003/025571 英 2003. 3. 27

[85] 进入国家阶段日期 2003. 5. 12

[71] 申请人 艾伦·克莱费尔德

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 艾伦·克莱费尔德

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司
代理人 程金山

权利要求书 6 页 说明书 19 页 附图 5 页

[54] 发明名称 局部缺血的诊断标志

[57] 摘要

本发明涉及通过测量分子浓度来诊断和监测包括但不限于心肌缺血和脑缺血的局部缺血，所述分子并非是来自缺血组织，但其在血液和其它流体中的浓度由于局部缺血状态而改变。

- 1、一种检测在哺乳动物中表现出局部缺血的疾病的方法，其包括下列步骤：
- 5 (a) 测量来自所述哺乳动物的流体的测试样品中的缺血标志的水平；
和
- (b) 确定是否在所述测试样品中测量到的所述缺血标志的水平与所述哺乳动物中的局部缺血相关。
- 10 2、根据权利要求 1 的方法，其中的哺乳动物是人。
- 3、根据权利要求 2 的方法，其中的流体选自血液、血清、血浆、唾液、胆汁、胃液、脑脊液、淋巴液、间质液和尿液。
- 4、根据权利要求 3 的方法，其中的流体是血液。
- 5、根据权利要求 3 的方法，其中的缺血标志是脂类。
- 15 6、根据权利要求 5 的方法，其中的脂类是脂肪酸。
- 7、根据权利要求 5 的方法，其中的脂类选自鞘脂类、溶脂类、糖脂、类固醇、和类花生酸。
- 8、根据权利要求 5 的方法，其中的脂类选自鞘氨醇、神经酰胺、鞘氨醇-1-磷酸酯、鞘氨基磷酸胆碱、和二氢鞘氨醇。
- 20 9、根据权利要求 1 的方法，其中心脏是局部缺血的。
- 10、根据权利要求 1 的方法，其中脑是局部缺血的。
- 11、根据权利要求 1 的方法，其中肾脏是局部缺血的。
- 12、根据权利要求 1 的方法，其中肢是局部缺血的。
- 13、根据权利要求 1 的方法，其中所测量的缺血标志是溶于含水缓冲液
- 25 液的。
- 14、根据权利要求 1 的方法，其中所测量的缺血标志是不溶于含水缓冲液的。
- 15、根据权利要求 1 的方法，其中通过 UV/VIS、红外线、微波、射线、吸收或者发射分光镜来检测缺血标志。
- 30 16、根据权利要求 1 的方法，其中使用色谱分析程序来检测缺血标志。

17、根据权利要求 16 的方法，其中的色谱分析程序选自 HPLC、低压色谱法、中压色谱法、和气相色谱法。

18、根据权利要求 1 的方法，其中通过使用自旋标记物的电子自旋共振来检测缺血标志。

5 19、根据权利要求 1 的方法，其中通过抗体或者受体分子、免疫分析或者酶分析来检测缺血标志。

20、权利要求 1 的方法，其还包括对呈现局部缺血症状的哺乳动物进行选择这一初始步骤。

10 21、权利要求 1 的方法，其还包括这一步骤：如果缺血标志的水平与所述哺乳动物的局部缺血相关，则给予抗缺血治疗。

22、权利要求 21 的方法，其中的抗缺血治疗包含一种降低血清脂肪酸水平的方法。

23、权利要求 21 的方法，其中的抗缺血治疗是再灌注治疗、抗溶血栓治疗、血管生成治疗或者外科手术。

15 24、根据权利要求 1 的方法，其中所述的确步骤是：比较所述缺血标志的所测水平与所述标记水平的预定值。

25、根据权利要求 24 的方法，其中所述标志的水平的所述预定值表现出非缺血疾病。

20 26、根据权利要求 25 的确定局部缺血的方法，其中的缺血标志是未结合的或者溶于水的游离脂肪酸。

27、根据权利要求 26 的方法，其中通过使用结合脂肪酸的蛋白质来检测未结合的或者溶于水的游离脂肪酸。

25 28、根据权利要求 27 的方法，其中所述的结合未结合或者溶于水的游离脂肪酸的蛋白是发荧光的，而且在脂肪酸被结合时与脂肪酸未被结合时表现出不同的荧光。

29、根据权利要求 28 的方法，其中的蛋白质是细胞内脂肪酸结合蛋白（FABPs）家族中的一种，该家族蛋白质的分子量在约 13,000 和 16,000 道尔顿之间。

30、根据权利要求 29 的方法，其中的 FABP 是大鼠肠 FABP。

30 31、根据权利要求 30 的方法，其中使用阿奎罗丹在位置 27 共价标记

FABP。

32、根据权利要求 31 的方法，其中阿奎罗丹标记的 FABP 是亮氨酸 72 到丙氨酸的突变体。

5 33、根据权利要求 26 的方法，其中比从非缺血群体中确定的未结合或者溶于水的游离脂肪酸的水平的平均值高出 2 个标准差单位的未结合或者溶于水的游离脂肪酸的水平表现出缺血疾病。

34、根据权利要求 26 的方法，其中比从非缺血群体中确定的未结合或者溶于水的游离脂肪酸的水平的平均值高大约 2 倍的未结合或者溶于水的游离脂肪酸的水平表现出缺血疾病。

10 35、根据权利要求 26 的方法，其中大于大约 5 nM 的未结合或者溶于水的游离脂肪酸的水平表现出缺血疾病。

36、根据权利要求 27 的方法，其中的蛋白质是白蛋白。

37、根据权利要求 36 的方法，其中用 7-羟基香豆素或者氨基酰来共价标记白蛋白。

15 38、根据权利要求 25 的确定局部缺血的方法，其中的缺血标志是全部游离脂肪酸。

39、根据权利要求 38 的方法，其中比从非缺血群体中确定的全部游离脂肪酸的水平的平均值高出 2 个标准差单位的全部游离脂肪酸的水平表现出缺血疾病。

20 40、根据权利要求 38 的方法，其中比从非缺血群体中确定的全部游离脂肪酸的水平的平均值高大约 2 倍的全部游离脂肪酸的水平表现出缺血疾病。

41、根据权利要求 25 的方法，其中的缺血标志是全部脂肪酸对白蛋白的比率。

25 42、根据权利要求 41 的方法，其中比从非缺血群体中确定的全部游离脂肪酸对白蛋白的比率的平均值高出 2 个标准差单位的全部游离脂肪酸对白蛋白的比率表现出缺血疾病。

30 43、根据权利要求 41 的方法，比从非缺血群体中确定的全部游离脂肪酸对白蛋白的比率的平均值高大约 2 倍的全部游离脂肪酸对白蛋白的比率表现出缺血疾病。

44、一种方法，该方法通过检测如在权利要求 26 中的局部缺血并且确定所述缺血标志的水平是否趋向于所述标志在非缺血疾病中的水平来确定患者对局部缺血治疗的反应。

45、权利要求 44 的方法，其中所述的治疗是再灌注治疗。

5 46、权利要求 45 的方法，其中所述的再灌注治疗包含血管成形术。

47、权利要求 45 的方法，其中所述的再灌注治疗包含给予血栓溶解剂。

48、一种在接受再灌注治疗以后，鉴定患者高风险出血的方法，该方法包括下列步骤：

10 测定来自所述患者的体液样品中的一种脂类组分的水平；

将所测的来自所述患者的脂类组分水平与一个脂类组分的阈值水平相比较，其中的所述阈值水平由测定没有局部缺血的正常群体体液中的一种脂类组分而确定；

确定所测得的来自所述患者的脂类组分水平与所述阈值水平的比率；

15 和

使所述的比率与再灌注治疗后出血的相对风险相关联，使高比率指征高风险。

49、一种鉴定在缺血事件以后，患者在 3 年内高风险死亡率的方法，该方法包括下列步骤：

20 测定来自所述患者的体液样品中的脂类组分水平；

将所测的来自所述患者的脂类组分水平与一个脂类组分的阈值水平相比较，其中的所述阈值水平由测定没有局部缺血的正常群体体液中的脂类组分而确定；

确定所测得的来自所述患者的脂类组分水平与阈值水平的比率；和

25 使所述的比率与缺血事件以后 3 年内的死亡率的相对风险相关联，使高比率指征高风险。

50、一种鉴定患者高风险出血的方法，该方法包括下列步骤：

测定来自所述患者的体液样品中的一种脂类组分；

30 将所测的来自所述患者的脂类组分水平与一种脂类组分的阈值水平相比较，其中的所述阈值水平由测定没有局部缺血的正常群体体液中的一种

脂类组分而确定；

确定所测得的来自所述患者的脂类组分水平与所述阈值水平的比率；

和

使所述的比率与出血的相对风险相关联，使高比率指征高风险。

5 51、权利要求 48 的方法，其中的所述脂类组分选自未结合的游离脂肪酸、全部游离脂肪酸和全部游离脂肪酸对白蛋白的比率。

52、权利要求 49 的方法，其中的所述脂类组分选自未结合的游离脂肪酸、全部游离脂肪酸和全部游离脂肪酸对白蛋白的比率。

10 53、权利要求 50 的方法，其中的所述脂类组分选自未结合的游离脂肪酸、全部游离脂肪酸和全部游离脂肪酸对白蛋白的比率。

54、一种治疗在接受了再灌注治疗后，患者高风险出血的方法，该方法包括下列步骤：

使用权利要求 48 的方法，鉴定再灌注治疗后患者高风险出血；和
用一种抗缺血治疗来治疗所述的高风险患者。

15 55、一种治疗在缺血事件以后，在 3 年内患者高风险死亡率的方法，该方法包括下列步骤：

使用权利要求 49 的方法，鉴定缺血事件后 3 年内患者高风险死亡率；
和

用一种抗缺血治疗来治疗所述的高风险患者。

20 56、一种治疗患者高风险出血的方法，该方法包括下列步骤：

使用权利要求 50 的方法，鉴定患者高风险出血；和
用一种抗缺血治疗来治疗所述的高风险患者。

57、权利要求 54 的方法，其中所述的抗缺血治疗选自葡萄糖—胰岛素—钾组合物和白蛋白组合物。

25 58、权利要求 55 的方法，其中所述的抗缺血治疗选自葡萄糖—胰岛素—钾组合物和白蛋白组合物。

59、权利要求 56 的方法，其中所述的抗缺血治疗选自葡萄糖—胰岛素—钾组合物和白蛋白组合物。

30 60、一种在非急性患者中评价长期风险的方法，该方法包括下列步骤：
测定来自所述患者的一种体液样品中的一种脂类组分水平；

将所测的来自所述患者的脂类组分水平与一种脂类组分的阈值水平相比较，其中的所述阈值水平由测定没有局部缺血的正常群体体液中的一种脂类组分而确定；

确定所测得的来自所述患者的脂类组分水平与所述阈值水平的比率；

5 和

使所述的比率与死亡率的相对风险相关联，使高比率指征高风险。

61、权利要求 60 的方法，其中所述的脂类组分选自未结合的游离脂肪酸和全部游离脂肪酸对白蛋白的比率。

局部缺血的诊断标志

5 发明领域

本发明涉及通过测量分子浓度来诊断和监测包括但不限于心肌缺血和脑缺血的局部缺血，所述分子并非是来自缺血组织，但其在血液和其它流体中的浓度由于局部缺血状态而改变。

10 相关领域的描述

局部缺血是血流量的减少。这种减少的出现可能由多个原因引起，包括但不限于血栓症、栓塞、动脉瘤、痉挛、或者因恶化作用导致的血管破裂。由于血流量的减少，本应被提供养分的组织可能将不再会得到用来维持细胞完整的充足营养，同样可能无法清除足够数量的细胞废物，而且可能还会引起血液气体如氧气和二氧化碳交换不充分。无法将充足的氧气输送到细胞（缺氧）可能具有许多同局部缺血类似的后果，其也可以通过本

15 发明要求保护的相同方法检测出来。

如果局部缺血持续到了足够长的时间，即，如果氧合的血流没有被恢复，那么由血流正常灌注的组织细胞将开始死亡。这种情况可能会随着时间流逝而逐渐出现，而且在直到因足够的细胞破坏而引起有机体机能被显著破坏之前，这种情况可能会被忽视。一个实例可以是：在糖尿病中出现的四肢或者身体其它部分循环的逐步恶化。同样可能更急性地出现对血流的破坏作用。这种破坏包括但不限于导致通过冠状动脉的血流减少的血栓形成、脑缺血中的栓塞沉积、和在肾脏和肢中的类似事件。

20

对于渐进的或者急性的时间过程，越早检测出局部缺血的/含氧量低的情况，就可以越快地进行姑息治疗，对组织或者有机体的结果也就越好。例如，对糖尿病介导的四肢局部缺血的早期检测可以避免截肢，对心脏或脑急性阻塞的早期检测和缓解明显地降低了死亡率和发病率。

25

令人遗憾的是，局部缺血/缺氧的早期检测通常是不可能的。例如，

用于急性冠状动脉综合征的主要早期诊断工具——ECG，其灵敏性小于 40 %。对于中风患者，可用的工具仅为 CT 扫描或者 MRI，这两种工具都只能确定患者是否在症状开始后的最初几个小时有出血。只有在很晚以后，在晚得无法给予缺血发作的唯一治疗——溶栓治疗的时候，这些图像方法
5 才能够确定是否已经发生了缺血性发作。溶栓治疗必须要在症状出现的 3 个小时内给予。对于其它器官，尚没有充分制定用于早期检测局部缺血的完善方法。因此，对于患者的诊断和治疗，需要一种灵敏、准确和快速的局部缺血测试方法。

在局部缺血的最后阶段，当细胞开始死亡（坏死）时，它们可能将它们的一些组分释放到血液中。这些组分主要是细胞内蛋白，它们被释放出来的原因是因为与死亡相关的生化改变破坏了容纳其的正常屏障——细胞膜。这些分子通常是组织特异的，例如对心脏而言是心肌钙蛋白。虽然这些分子准确地反映出疾病的存在，但是它们却通常在症状出现后需要几个小时才能达到在血液中有意义的水平，并且它们只从死亡或者濒死的细胞中被释放出来。因此，除了灵敏性和准确性以外，局部缺血测试的另一个重要特征是其早在坏死之前检测局部缺血状态的能力。
10

除了从缺血组织中释放作为坏死标志的分子，缺血事件还可能产生一系列生化变化，这些变化可以引起并非源自缺血组织中的血液和其它流体中的分子浓度发生变化。在本发明中，这些分子被称作缺血标志。缺血标志在例如下面的情况下发生：当缺血组织产生这样的分子时：此分子随后被非缺血组织转换成不同的分子；或者当缺血组织产生这样的分子时：此分子激活非缺血组织的不同分子，使其释放入体液。这些情况的实例是通过缺血的心脏或脑组织产生去甲肾上腺素、 TNF_{α} 和促尿钠排泄肽。如此产生的去甲肾上腺素、 TNF_{α} 和促尿钠排泄肽在脂肪组织中激活脂解作用，
20 导致血液中游离脂肪酸升高。在另一个实例中，从缺血心肌中释放出来的鞘氨醇在血小板中被转换成鞘氨醇-1-磷酸酯，并且可以随后在血液检测出来(Yatomi, 等. (1997) Journ. Biol. Chem. 272 卷: 5291-5297 页;美国专利号 6,210,976)。

除了诊断疾病的出现，缺血标的水平志还可以预测未来有害事件的风

险。另外，这些分子在足够的水平时，本身可以介导引起有害结果的细胞反应。例如，对外表健康的人进行大量长期研究，研究结果揭示：尽管在正常范围内，但是增加总血清游离脂肪酸（FFA）的水平与 22 年后猝死的风险增加相关。据推测，这种死亡增加率是 FFA 诱导的心律失常的结果。在另一个实例中，对患有急性心肌梗塞的患者使用葡萄糖—胰岛素—钾合剂（GIK），相对于没有接受 GIK 的患者，使用 GIK 的患者的死亡率显著降低。此有益效果的一个原理是 GIK 引起血清总 FFA 降低。因此，存在这样的需要：能够监测缺血标志以评价疾病的较长期风险，并且能够帮助确定治疗干预的类型以降低增加的风险，该风险与可能是慢性缺血状态相关。

发明概述

本发明描述了测量并非源自缺血组织的分子在血液和/或其它流体中的浓度在局部缺血的诊断和监测中的应用。这些分子被称作缺血标志。相对于非缺血疾病，这些缺血标志在浓度上的变化表现出某些缺血类型。

在一个实施方案中，本发明涉及一种检测在哺乳动物中表现出局部缺血的疾病的方法，该方法包括下列步骤：

- (a) 测量来自哺乳动物流体的测试样品中的缺血标志的水平。
- (b) 确定测试样品中所测的缺血标志的水平与哺乳动物中局部缺血之间是否存在关联。在一个优选的实施方案中，哺乳动物是人。测试样品所用的流体可以选自但不限于血液、血清、血浆、唾液、胆汁、胃液、脑脊液、淋巴液、间质液或者尿液。在一个优选的实施方案中，用于测试样品的流体是血液。

在一个实施方案中，缺血标志是脂类。脂类可以选自但不限于鞘脂类、溶脂类（lysolipid）、糖脂、类固醇、和类花生酸，其包括白细胞三烯、前列环素、前列腺素和血栓烷。在一个实施方案中，被用作缺血标志的鞘脂可以是鞘氨醇，或者其代谢物，其代谢物例如包括神经酰胺（Cer, N-酰基鞘氨醇）、鞘氨醇-1-磷酸酯、鞘氨基磷酸胆碱（sphingosylphosphorylcholine）、或者二氢鞘氨醇。在一个更优选的实施

方案中，脂类是脂肪酸。

本发明公开的方法可以用于在任何器官或者组织中检测局部缺血，这些器官和组织包括但不限于心脏、脑、肾脏或者肢。

在本发明的一个实施方案中，检测溶于含水缓冲液中的缺血标志的组分。在一个备选的实施方案中，检测不溶于含水缓冲液中的缺血标志的组分。

可以用分光镜方法检测缺血标志，包括但不限于 UV/VIS、红外线、微波、射线、吸收或者发射分光镜。本发明同样包括色谱分析程序，包括但不限于 HPLC、低压色谱法、中压色谱法、和气相色谱法。本发明还包括通过使用自旋标记的电子自旋共振来检测缺血标志。在一个备选实施方案中，可以用抗体或者受体分子、免疫测定或者酶测定来检测缺血标志。

在一个优选的实施方案中，所述的方法可以包括一个筛选出现缺血症状的哺乳动物的初始步骤。在一些实施方案中，如果缺血标志的水平与所述哺乳动物中的局部缺血相关联，所述的方法还可以包括给予抗缺血治疗的步骤。抗缺血治疗包括一种降低血清脂肪酸水平的方法。在一些实施方案中，抗缺血治疗是在再灌注治疗、抗溶血栓治疗、血管生成治疗（angiogenic therapy）或者外科手术。

在一些实施方案中，在所述缺血标志的所述测量水平与所述标志水平的预定值之间的比较，是决定步骤。在一些实施方案中，标志水平的预定值表现出非缺血疾病。

在一个实施方案中，缺血标志是未结合的或者水溶性游离脂肪酸。在一个优选的实施方案中，通过使用结合脂肪酸的蛋白质来检测未结合的或者水溶性游离脂肪酸。在一个优选的实施方案中，结合未结合的或者水溶性游离脂肪酸的蛋白质是发荧光的，而且其结合和未结合脂肪酸的时候显示出不同的荧光。在一些实施方案中，此蛋白是细胞内脂肪酸结合蛋白（FABPs）家族中的一种，该家族具有的分子量在 13,000 和 16,000 道尔顿之间。在一个优选的实施方案中，FABP 是大鼠肠 FABP。在一个优选的实施方案中，用阿奎罗丹（acrylodan）在 FABP 的 27 位进行共价标记。在一个更优选的实施方案中，阿奎罗丹标记的 FABP 是亮氨酸 72 到丙氨酸

酸的突变体。

在一些实施方案中，比从非缺血群体中确定的未结合或者水溶性游离脂肪酸的水平平均值高出 2 个标准差单位的未结合或者水溶性游离脂肪酸的水平表现出缺血疾病。在一些实施方案中，比从非缺血群体中确定的未结合或者水溶性游离脂肪酸的水平平均值高大约 2 倍的未结合或者水溶性游离脂肪酸的水平表现出缺血疾病。在一些实施方案中，大于大约 5 nM 的未结合或者水溶性游离脂肪酸的水平表现出缺血疾病。

在一个备选实施方案中，结合未结合或者水溶性游离脂肪酸的蛋白质是白蛋白。在一个优选的实施方案中，用 7-羟基香豆素或者氨基酰来共价标记白蛋白。

在一个备选的实施方案中，缺血标志是全部游离脂肪酸。在一个备选的优选实施方案中，比从非缺血群体中确定的全部游离脂肪酸水平的平均值高出 2 个标准差单位的全部游离脂肪酸的水平表现出缺血疾病。在一个备选的优选实施方案中，比从非缺血群体中确定的全部游离脂肪酸水平的平均值高大约 2 倍的全部游离脂肪酸的水平表现出缺血疾病。在另一个实施方案中，缺血标志是全部游离脂肪酸对白蛋白的比率。

在一些实施方案中，比从非缺血群体中确定的全部游离脂肪酸对白蛋白的比率的平均值高出 2 个标准差单位的全部游离脂肪酸对白蛋白的比率表现出缺血疾病。在一些实施方案中，比从非缺血群体中确定的全部游离脂肪酸对白蛋白的比率的平均值高大约 2 倍的全部游离脂肪酸对白蛋白的比率表现出缺血疾病。

在一个实施方案中，描述了一种确定患者对缺血治疗的反应的方法，该方法包括上述的检测局部缺血的步骤，以及确定缺血标志是否趋向于在非缺血疾病中的标志水平的步骤。在一个实施方案中，治疗方法是再灌注治疗，其包括但不限于血管成形术或者给予血栓溶解剂。

在一个实施方案中，描述了一种在接受再灌注治疗后鉴定高危出血患者的方法，该方法包括下列步骤：

测定来自患者的体液样品中的脂类组分水平；

将所测得的来自患者的脂类组分水平与脂类组分的阈值水平相比较，

其中的阈值水平由测定没有局部缺血的正常群体体液中的脂类组分而确定；

确定所测得的来自患者的脂类组分水平与阈值水平的比率；和
使所述的比率与再灌注治疗后出血的相对风险相关联，使高比率指征
5 高风险。在一个优选的实施方案中，脂类组分选自未结合的游离脂肪酸、
全部游离脂肪酸、和全部游离脂肪酸对白蛋白的比率。

在一个实施方案中，描述了一种鉴定在缺血事件以后，3年内患者高风险死亡率的方法，该方法包括下列步骤：

测定来自患者的体液样品中的脂类组分水平；

10 将所测得的来自患者的脂类组分水平与脂类组分的阈值水平相比较，
其中的阈值水平由测定没有局部缺血的正常群体体液中的脂类组分而确定；

确定所测得的来自患者的脂类组分水平与阈值水平的比率；和
使所述的比率与缺血事件以后3年内的死亡率的相对风险相关联，使
15 高比率指征高风险。在一个优选的实施方案中，脂类组分选自未结合的游
离脂肪酸、全部游离脂肪酸、和全部游离脂肪酸对白蛋白的比率。

在一个实施方案中，描述了一种鉴定患者高风险出血的方法，该方法包括下列步骤：

测定来自患者的体液样品中的脂类组分；

20 将所测得的来自患者的脂类组分水平与脂类组分的阈值水平相比较，
其中的阈值水平由测定没有局部缺血的正常群体体液中的脂类组分而确定；

确定所测得的来自患者的脂类组分水平与阈值水平的比率；和
使所述的比率与出血的相对风险相关联，使高比率指征高风险。在一
25 个优选的实施方案中，脂类组分选自未结合的游离脂肪酸、全部游离脂肪
酸、和全部游离脂肪酸对白蛋白的比率。

在本发明的另一个实施方案中，描述了一种在接受了再灌注治疗后，治疗患者高风险出血的方法，该方法包括下列步骤：

使用上述的方法，鉴定再灌注治疗后患者高风险出血；和

用抗缺血治疗来治疗所述的高风险患者。在一个实施方案中，抗缺血治疗选自葡萄糖—胰岛素—钾组合物和白蛋白组合物。

在另一个实施方案中，描述了一种在缺血事件以后，3年内患者高风险死亡率的的治疗方法，该方法包括下列步骤：

- 5 使用上述的方法，鉴定缺血事件后，3年内患者的高风险死亡率；和
 用抗缺血治疗来治疗所述的高风险患者。在一个实施方案中，抗缺血治疗选自葡萄糖—胰岛素—钾组合物和白蛋白组合物。

在另一个实施方案中，描述了一种治疗患者高风险出血的方法，该方法包括下列步骤：

- 10 使用上述的方法，鉴定患者高风险出血；和
 用抗缺血治疗来治疗所述的高风险患者。在一个实施方案中，抗缺血治疗选自葡萄糖—胰岛素—钾组合物和白蛋白组合物。

在一个实施方案中，描述了一种在非急性患者中评价长期风险的方法，该方法包括下列步骤：

- 15 测定来自患者的体液样品中的脂类组分；
 将所测得的来自患者的脂类组分水平与脂类组分的阈值水平相比较，其中的阈值水平由测定没有局部缺血的正常群体体液中的脂类组分而确定；
 确定所测得的来自患者的脂类组分水平与阈值水平的比率；和
20 使所述的比率与死亡率的相对风险相关联，使高比率指征高风险。在一个优选的实施方案中，脂类组分选自未结合的游离脂肪酸和全部游离脂肪酸对白蛋白的比率。

从下面优选实施方案的详细描述中，本发明的另一些方面、特征和优点将会更加清楚。

25

附图说明

现在参照优选实施方案的附图对本发明的这些和其它的特点进行描述，其目的是为了阐明而不是为了限制本发明。

图1显示了血液样品中未结合的游离脂肪酸的水平，这些血液样品来

自对 AMI 患者的心肌梗塞溶栓疗法 II (TIMI II) 的研究。将此研究中包括的患者在症状出现后的 4 小时内送入急诊室。柱形示意图显示了首批 250 位患者中每一位患者的血液中[FFA_u]测量的结果，血液是在时间 0（进入急诊室的时间）、50 分钟、5 小时和 8 小时抽取的，用 ADIFAB2 测定。

5 图 2 显示了对 AMI 患者的 TIMI II 研究中的 FFA_u 结果。柱形示意图显示了使用 ADIFAB2 测量的第二组 250 位患者的测量结果。这些结果实际上与图 1 的首批 250 位患者的结果相同。

图 3 显示了在 TIMI II 患者中的在下列时间点时的肌酸激酶 (CK) 水平：时间 0（入院时）（实心方块■）、4 小时（实心三角▲）。由 TIMI 研究者来确定相应于组群 (shipment) 1 和组群 2 的患者的数值。确定每天
10 的测量和每个研究点的正常上限（空心方块□）。

图 4 显示了 TIMI II 患者在入院时的死亡率随[FFA_u]值增加。在入院时对这组 500 位患者中大约 400 位抽取血液。对 FFA_u 水平进行分类并且确定每个四分值的死亡数目。结果产生了正相关，该正相关从最低到最高
15 四分值增加了超过 2 倍 ($p < 0.042$)。每个四分值的中值[FFA_u]显示在条块中。

图 5 显示了 TIMI II 患者在入院时的[FFA_u]与严重出血事件之间的关联。显示了 FFA_u 水平的严重出血事件数目/四分值。条块中的数目是以 nM 计的中值[FFA_u]。结果显示从最低到最高四分值增加了超过 3 倍的风险，
20 $p < 0.01$ 。

发明详述

尽管被描述的实施方案代表了本发明的优选实施方案，但是应当理解，对于本领域的技术人员可以在不离开本发明精神的情况下进行修改。
25 因此仅通过后附的权利要求来确定本发明的范围。

本发明描述了测量并非源自缺血组织的分子在血液和/或其它流体中的浓度在局部缺血的诊断和监测中的应用。这些分子被称作缺血标志。相对于非缺血疾病，这些缺血标志的浓度上的变化表现出某些缺血类型。标记被认为并非源自缺血组织，即使某部分可能有如此的起源，只要该部分

代表出现在样品中的标志的仅一小部分，例如 20%，10%，5%，2%，1% 或者更少。

在一个实施方案中，缺血标志是脂类组分例如脂肪酸。可以通过本领域中熟知的方法，例如在下面专利中教导的方法来确定全部脂肪酸：美国
5 专利号 4,071,413，美国专利号 5,512,429，美国专利号 5,449,607，和美国专利号 4,369, 250。所有这些专利文献通过参考结合于此。可以将通过这些方法获得的全部脂肪酸水平，与从正常个体中获得的全部脂肪酸水平相比较，以检测个体中的缺血疾病。在一个优选的实施方案中，确定全部脂肪酸对白蛋白的比率并将其与正常群体作比较。

10 在另一个实施方案中，使用下面描述的方法在体液中测定未结合的游离脂肪酸水平。未结合的游离脂肪酸 (FFA_u) 是溶于水相的游离脂肪酸部分。在多数体液中，游离脂肪酸 (FFA) 主要与蛋白质例如白蛋白和膜相结合，很少数是未结合 (FFA_u) 和溶于水相的。 FFA_u 也被称作水溶性游离脂肪酸。

15 体液可以选自脑脊液、血液、血清、血浆、尿液、唾液、淋巴液、胃液、间质液或者胆汁。在优选的实施方案中，用于测试样品的体液来自血液。

在一个实施方案中，在检测缺血疾病的诊断方法中，可以使用任何这样的分析手段，这些分析手段提供了相对于无症状群体，体液中的未结合
20 游离脂肪酸 (FFA_u) 水平的指征。优选地，从没有缺血疾病的正常群体中确定阈值。在一个实施方案中，阈值是体液中的 FFA_u 浓度，该体液中的 FFA_u 浓度明显高于没有缺血疾病的对照群体的体液中的 FFA_u 浓度。在一个实施方案中，阈值是在比没有缺血疾病的对照群体体液中的 FFA_u 平均浓度至少高出 2 个标准差的体液中的 FFA_u 浓度。在另一个实施方案中，
25 FFA_u 在体液中的阈值浓度至少是 5 nM。在另一个实施方案中， FFA_u 在体液中的阈值浓度是没有缺血疾病的对照群体体液中 FFA_u 平均浓度的至少 2 倍。

当应用于被选择的患者群体时，本发明的方法特别有价值。因此，在一个实施方案中，将方法应用于来自局部缺血风险个体的样品，这些风险

个体例如糖尿病患者、或者手术患者、或者具有家族或生活方式危险因素的患者。在另一个实施方案中，将方法应用于表现符合局部缺血或缺血事件症状学的患者，或者局部缺血疑似患者。可以选择的具体患者亚群包括：具有符合心脏缺血、脑缺血、肾脏缺血、肢缺血、或者其它临床意义上的缺血的5 症状学的患者。可以将方法选择性地应用于呈现出与一种具体类型局部缺血相符合或者不相符合的症状学的患者。非限制性的实例可以选自具有除了心脏缺血以外缺血症状的患者，或者具有除了脑缺血以外症状的患者，或者具有除了周围或糖尿病相关的局部缺血以外症状的患者。通过选择适当的患者群体，可以将本发明的方法类似地用于检测无心肌梗塞的10 心脏病患者体内的局部缺血。在本发明任何方法的实施方案中，患者是哺乳动物，在具体实施方案中，患者是人。

在本发明的另一个实施方案中，本发明的方法还包括一个治疗步骤。这样，首先测试患者的缺血疾病，其表现为此处所讨论的一种标志的升高。随后用任何适当类型的抗缺血治疗来治疗具有升高水平标志的患者，例如15 使用再灌注治疗、抗溶血栓治疗、血管生成治疗、外科手术或者类似方法。例如，可以有利地在缺血事件或者症状的 10, 7, 5, 或者 3 小时内对患者进行测试，并且可以随后在测试的 3, 2, 或者优选 1 小时之内接受抗缺血治疗。

在一个实施方案中，本发明使用荧光标记的脂肪酸结合蛋白 (FABP) 20 来测量与缺血疾病相关的体液样品中增加量的未结合游离脂肪酸 (FFAu)，其方法是通过定量检测荧光变化进行的，这种变化与 FFA₀ 分子同荧光标记 FABP 的结合相关。在血清中，游离脂肪酸 (FFA) 大部分与白蛋白结合，但是很少数是未结合 (FFA₀) 和溶于水相的。本发明使用的方法主要描述于美国专利号 5,470,714 中，该专利文献通过参考结合于此。25 可以使用各种 FABP 和荧光标记来检测体液如血液中的 FFA₀ 水平。它们包括但不限于，大鼠肠 FABP(I-FABP)、人脂肪细胞 FABP(A-FABP) 和大鼠心脏 FABP (H-FABP)。这些 FABP 的位点特异的突变体类型在所述方法中同样有用，在这些所述的突变体类型中有一个或者多个氨基酸残基已经发生改变 (插入、缺失、和/或取代)，包括例如在 I-FABP 的 27, 81, 82,

84 位置的 Cys 取代, 在 I-FABP 的残基 72 的 Ala 取代, 和在 H-FABP 的残基 27 的 Lys 取代。FABP 分子可以通过使用多种已知的标记物进行荧光标记, 这些标记物包括但不限于阿奎罗丹, 丹子基 氮丙啶 (danzylaziridine), 4-[N-[(2-碘乙酰氧基)乙基]-N-甲氨基]-7-硝基苯-2-噁-1,3-二唑酯(IANBDE), 和 4-[N-[(2-碘乙酰氧基)乙基]-N-甲氨基]-7-硝基苯-2-噁-1,3-二唑 (IANBDA)。可以在本发明的实践中使用任何标记物, 只要其能够在与游离脂肪酸结合的时候检测到可以测量得到的差别。例如, 可以监测在波长、信号强度、或者极化、或者寿命上的差别。可以使用的标记物的另外实例包括但不限于产生吸光度或者旋光性改变的生色团, 和其变化可以通过电子自旋共振检测到的自旋标记物。在一个优选的实施方案中, 荧光标记的 FABP 是阿奎罗丹源的重组大鼠肠脂肪酸结合蛋白(被称为 ADIFAB)。主要使用在先前描述过的方法(美国专利号 5,470,714 & Richieri, G. V, 等., J. Biol. Chem., (1992) 276: 23495-23501)进行阿奎罗丹的衍生作用, 而且 ADIFAB 可以商购(FFA Sciences LLC, San Diego, CA.)。可以通过 FFA_n 与荧光标记的脂肪酸结合蛋白 (FABP) 的结合来确定 FFA_n 的浓度。当没有 FFA 结合荧光标记的 FFAB 时, 显示出不同的荧光。可以从荧光的差别确定 FFA_n 的浓度。荧光标记的 FABP 发出的波长, 取决于所使用的标记物和蛋白质。在一个实施方案中, 蛋白质是 I-FABP 或者在其位置 72 处 Ala 取代 Leu 的 I-FABP, 标记物是阿奎罗丹。这些种类分别被称为 ADIFAB 和 ADIFAB2。

简而言之, 用如下方法获得 ADIFAB2。首先, 用携带 Ala⁷² 突变和合适互补末端的限制性酶切片段来替代野生型限制性酶切片段, 此片段跨越 I-FABP cDNA 序列 211 位置的 *Sa*I 位点 (Alpers, 等. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A. 81: 313-317) 和 291 位置的 *Pme*I 位点, 通过定点特异诱变来将其引入。此突变的限制性酶切片段是通过退火部分互补的、携带所需序列的合成寡核苷酸, 用 DNA 聚合酶 Klenow 片段“填补”单链区, 和用 *Sa*I 与 *Pme*I 消化以得到适当末端而构建的。将 Ala⁷² 取代的 I-FABP cDNA 插入 pET11 载体中并且在 BL21 (DE3) 株系中表达。基本使用 Lowe 等的方法(Lowe, 等. (1987) J. Biol. Chem. 262: 5931-5937 页)纯化突变的 I-FABP

并且每公升大肠杆菌培养物生产出大约 100 mg 的纯化蛋白质。如前所述 (见 美国专利号 5,470,714, 通过参考结合于此)对 ADIFAB 进行阿奎罗丹的衍生作用。使用 Lipidex-5000 色谱法来去除游离的阿奎罗丹。

已经发现 ADIFAB2 的结合亲和力大约比 ADIFAB 大 10 倍。这些荧光标记的 FABP 发出的波长是大约 420—470 nm。结合到荧光标记的 FABP 的 FFA 的发射波长是大约 495—580 nm。应该理解本领域的技术人员可以容易地在本发明公开的分析方法中使用其它荧光标记的 FABP。

用于确定含水样品中 FFA_u 水平的测定方法, 测量从第一波长到第二波长的荧光中的变化强度, 其中在第一波长时衍生的 FABP 在没有 FFA 结合的时候发荧光, 在第二波长时 FABP 在 FFA 的分子被结合时发荧光; 而后从两种荧光波长强度的比率 (“R” 值) 来确定 FFA_u 的浓度, 如 美国专利号 5,470,714 和 Richieri, 等. (1995) J. Lipid Research, 36 卷: 229-240 页中所述, 这两篇文献通过参考结合于此。简单的说, 用下面的公式来计算比率:

$$R = \frac{I(1) - I(1) \text{ 空白}}{I(2) - I(2) \text{ 空白}}$$

其中, $I(1)$ 和 $I(1)$ 空白分别是在波长“1”时, 对含有 ADIFAB 或 ADIFAB2 的样品和含有除了 ADIFAB 或 ADIFAB2 之外所有试剂的空白样品所测的荧光强度; $I(2)$ 和 $I(2)$ 空白分别是在波长“2”时的相应的荧光强度。对于 ADIFAB, 波长“1”优选 (不是绝对的) 范围在 495—515nm, 波长“2”在 422—442 nm。使用标准的技术来实现荧光强度的测定。本领域的技术人员可以认识到, 在适当的条件下, 所述方程式中的 I 空白强度可以忽略不计。

对高过在正常健康个体中发现的体液 FFA_u 水平的体液 FFA_u 水平的定量检测, 可以被用于诊断缺血疾病。在一个实施方案中, 用体液样品中未结合或水溶的游离脂肪酸的浓度来指征缺血疾病, 此浓度明显地高于在没

有缺血疾病的对照群体的体液样品中的未结合或水溶的游离脂肪酸的浓度。在一个实施方案中，用体液样品中未结合或者水溶的游离脂肪酸的水平来检测缺血疾病，此水平超出体液样品中的未结合或者水溶的游离脂肪酸平均正常水平大约 2 个标准差。在另一个实施方案中，超过约 5 nM 的未结合或者水溶的游离脂肪酸水平表现出缺血疾病。在另一个实施方案中，超过从非缺血群体体液样品中确定的未结合或者水溶的游离脂肪酸的平均值大约两倍的体液样品中的未结合或者水溶的游离脂肪酸水平表现出缺血疾病。体液样品中非结合或者水溶的游离脂肪酸的升高的水平也可以被检测到，这些水平是相当高的。

10 本发明的诊断方法基于这样的发现：经历缺血疾病的患者，与健康个体中正常的体液 FFA₀ 水平相比，在体液如血液中具有升高的脂类例如 FFA₀ 水平。虽然诊断方法可以在任何时间进行，但是优选地，在缺血事件的 24 小时内进行测试。更优选地，在缺血事件的 10 小时内进行测试。最优选地，在缺血事件的 3 小时内进行测试，这样可以启动治疗。为了有效，许多缺血疾病如心脏缺血的治疗必须要快速启动（数小时之内）。没有正确
15 诊断的治疗可能对患者是最有害的。能够快速诊断缺血疾病是此处描述的本发明的一个优势。

简而言之，如下进行 FFA₀ 的分析和确定。将血样在缓冲液中(20 mM N-2-羟乙基-哌嗪-N'-2-乙烷磺酸 (HEPES), 150 mM NaCl, 5 mM KCl 和 1
20 mM Na₂HPO₄, 调节到 pH=7.4)稀释 100 倍，产生大约 6 μM 的血清白蛋白浓度。将加上 ADIFAB 或 ADIFAB2 的不含脂肪酸的白蛋白溶液作为阴性对照。对于每个供体，制备两等分试样的血清：一个是 1% 血清的“背景”或者“空白”样品，一个是 1% 血清加上 ADIFAB 或者 ADIFAB2 的“实验”样品。在 22°C 或者 37°C 测量阴性对照，空白和实验样品。

25 对每个样品，对 ADIFAB 在大约 432 nm 和 505 nm、对 ADIFAB2 在大约 450 nm 和 550 nm 收集强度对的多次测量，在减去空白样品的强度以后确定 R 值。在不同的日子对每个血清样品至少进行两次分别的测定，确定 FFA₀ 浓度的平均值和标准差。为了确定测量组之间的差别的概率，使用标准试验者测试 (Student's test) 评价平均差值，其中小于 0.05 的 p

值被认为是有意义的。

本发明公开的用于检测局部缺血的方法还可以包括采取措施以降低缺血标志水平的步骤。本发明还包括一种方法，该方法通过检测本发明所公开的局部缺血来确定局部缺血治疗以后患者的预后，并且确定缺血标志的水平是否趋向于在非缺血疾病中的水平。所公开的方法还包括与升高的缺血标志相关的风险，或者因为这些标记的升高反映了潜在的病理状态和/或因为这些缺血标记本身是有害的。

10 实施例 1：在患有不同类型心肌缺血的、呈送到急诊室（ED）的患者中， $[FFA_0]$ 先于肌钙蛋白 I 升高

为了确定患者体内未结合游离脂肪酸 $[FFA_0]$ 的浓度，我们对送到 Hennepin 县医疗中心（明尼阿波利斯，明尼苏达州）急诊室的患者的 FFA_0 水平进行了测量，所述的患者患有大范围的“天然”缺血损伤。对 29 位患者在入院时和后来若干次抽取样品。主要通过 ST 段变化，这些患者中每个人都诊断为具有心脏缺血。对这些患者的诊断包括：急性心肌梗塞（AMI），充血性心力衰竭（CHF），不稳定型心绞痛、心脏挫伤、心脏手术，高血压和可卡因诱导的局部缺血。在每一个诊断为患有心脏缺血的患者中， FFA_0 显著升高，平均比正常高 20 倍（此研究还包括 48 位“正常”患者，这些患者的平均 FFA_0 水平是 3 nM）。

20 在每位患者中， FFA_0 水平在最早抽取（进入急诊室）时升高，在此研究中包括 9 位 AMI 患者（表）。相反，这 9 位 AMI 患者中的 7 位显示：心脏标志肌钙蛋白 I（TnI）在入院时没有升高。在这 7 位患者中，TnI 升高发生在入院后 4—32 小时。此外，多数非 AMI 患者没有显示出升高的 TnI 水平，这与 $[FFA_0]$ 在坏死前作为缺血标志相符合。

25 这些结果的另一个值得注意的特点是没有再灌注治疗，在最初的缺血事件后， FFA_0 水平长时期（达数天）保持上升（表）。这样， FFA_0 对缺血事件响应迅速但是缓慢地（可能由于局部缺血消退）回到基线，从而提供了独特广泛的诊断窗口。

表: TnI 和[FFA _u]在 AMI ^a 中的时程			
患者	时间	TnI	[FFA _u]
	(小时)	(ng/ml)	(nM)
1	0	0.3	314
	4	0.8	27
2	0	0.3	23
	54	7.1	463
	62	15.9	797
3	0	0.3	22
	5	0.3	282
	29	5.2	14
	36	4.5	19
4	0	0.3	12
	5	0.3	19
	9	0.3	9
		2.7	14
5	0	0.3	22
	16	2.1	29
	22	2.5	54
6	0		9
	7	0.6	22
7	0	2.	8
	10	3.1	112
8	0	0.4	18
	13	1	19
9	0	10.6	7
	7	6.3	11
	21	6.9	36

	27	5.4	25
	38	4.2	26
	50	2.1	10

^a: Hennepin AMI 患者。时间是从入院时间的小时数。基线 TnI 值是 0.3 ng/ml, 正常[FFA₀]是 3 nM。对每位患者进行 2 次或者更多次连续测定 (由粗线分开)。

这些结果显示了 FFA₀ 分析的潜能; 其在当前的心脏标志指征疾病之前数小时到数天, 可以检测出严重的缺血事件, 提高了早期干预的可能性和患者结果的显著改善。

5

实施例 2. 来自心肌梗塞溶栓疗法 II (TIMI-II) 试验中的结果显示了使用 [FFA₀] 测量对 AMI 检测的高度灵敏性和高度特异性

为了获得有关在急性心肌梗塞中 FFA₀ 响应的更详细的信息, 我们使用了来自 TIMI II 试验 (TIMI 研究组, New England Journal of Medicine (1989) 320 卷, 618-625 页) 的血液标本。这些血液标本已经由国立心肺血液研究院 (National Heart Lung Blood Institute) 保存, 并且被制成可以用于我们对局部缺血中 FFA₀ 水平的调查研究。如果胸痛患者在初始症状 4 小时之内被送到急诊室而且他们表现出 ST 片段升高, 就将它们登记在 TIMI II 试验中。在登记后的约 10 分钟内, 开始用 100 mg (3262 位患者中的 90.5% 用此剂量治疗) 或者 150 mg (3262 位患者中的 9.5% 用此剂量治疗) t-PA 静脉内治疗每一位患者 6 个小时。血液样品在下列时间抽取: 入院 (就在 t-PA 之前)、t-PA 之后 50 分钟、开始 t-PA 治疗后 5 小时和 8 小时。将大约 2500 位患者中每一位的一组 4 个这种样品储存在 -70°C。对每位患者, TIMI 研究者纪录了大约 825 个临床、物理和化学观察。

对首批 500 位患者的研究结果, 为判断急性心脏缺血和 FFA₀ 水平之间的关系提供了重要的判据。[样品来自 1000 个样品 (250 名患者) 的个体组群。图 1 和 2 分别显示了组群 1 和 2 的结果] (Kleinfeld, 等. (2002) J. Am. Coll. Cardiol. 39: 312A)。

入院时的平均 FFA₀ (ADIFAB2) 是 13 nM, 超过正常值 (2.8±0.7 nM) 14

个标准差。该结果清楚地证实 $[FFA_u]$ 在缺血事件初期高度升高。使用 5 nM 的截断，在入院时使用 FFA_u ，AMI 检测的预测的灵敏度是 91%（在入院和 50 分钟时使用 FFA_u ，灵敏度增加到 >98%）。结果显示，当包括前两个时间点（只有第一个时间点时大于 91%）在内时，大于 98% 的患者的 FFA_u 水平比正常水平高大于 3 标准差。

同时，在时间 0 的 CK 值通常小于正常上限（图 3）。入院时的肌酸激酶水平在小于 19% 的患者中升高而且即使是在这些患者中，也只是适度的增加，平均起来以小于 50% 的幅度超过测试正常上限。直到入院 4 小时以后，肌酸激酶水平才在大多数患者中充分升高。

在 50 分钟，平均 FFA_u （22 nM）充分高于已经升高的初始值。在给予 t-PA 大约 50 分钟后获得这些样品（图 1 和 2）。这些显著较高的平均 FFA_u 水平可能反映了再灌注效应和局部缺血介导的 $[FFA_u]$ 随时间增加而增加。无论在何种事件中，此时间进程似乎由于 t-PA 治疗而发生突然变化，因为在 5 和 8 小时的 FFA_u 水平再灌注后显示了明显的降低；在 8 小时时的平均值显著（ $p < 0.05$ ）低于入院时的 FFA_u 水平。这种两相响应似乎与再灌注相关，因为在 Hennepin 研究中的、没有接受再灌注治疗的 AMI 患者，显示出 $[FFA_u]$ 保持升高超过 24 小时（数据未显示）。这些发现—— FFA_u 可能响应于再灌注而升高并且在随后的 5 小时内降低——表明： FFA_u 水平可以被用于评价再灌注治疗的成果。

这些患者的 $[FFA_u]$ 响应似乎是内在的和独立的病理学特性。图 1 和图 2 揭示了在 4 个不同取样时间的 $[FFA_u]$ 分布测量，对 250 位患者的 2 组不同的分布产生了实际上相同的参数；组群 1 和组群 2 中的样品对应两组不同的患者。而且，基本上所有被证实有 MIs 的患者显示 FFA_u （50 分钟） $> [FFA_u]$ （入院时），而多数没有证实 MI 的大约 3.3% 的患者显示 $[FFA_u]$ （50 分钟） $\leq [FFA_u]$ （入院时）。

实施例 3 入院时在 TIMI-II 试验样品中高水平的 $[FFA_u]$ 与入院后 3 年较高的死亡率相关

入院时的 $[FFA_u]$ 值与超过 2 倍的死亡率增加相关。对在入院时间的抽取标本的 $[FFA_u]$ 值（500 位患者中大约 400 位）进行分类并分成四等份。计算每个四分值在入院大约 3 年后死亡的数量，不管是什么死亡原因。死

亡的主要原因是心血管疾病（75%）。结果显示死亡率从最低到最高四分值的增加超过两倍， p 值 <0.025 （图 4）。相反，在大多数这些患者中（ $>80\%$ ），作为心脏标志的肌酸激酶在入院时间是正常的（图 3）。此外， $[FFA_u]$ 值与年龄、性别、种族、重量、其它疾病、药疗方法或者入院时的收缩期
5 血压不相关。这些结果显示：除了它们的其它诊断特性，在进入急诊室时测量的 FFA_u 水平，可以依照患者的致死性风险将其用于患者的划分（Kleinfeld, 等. (2002) *J. Am. Coll. Cardiol.* 39: 312A）。

实施例 4. 在入院时 TIMI-II 试验样品中高水平的 $[FFA_u]$ 与 t-PA 治疗后严重
10 重出血率的增加相关

入院时的 $[FFA_u]$ 同时还能预测 t-PA 治疗以后增加的严重出血事件率。对严重出血事件所进行的分析与对死亡率所进行的分析（实施例 3）类似。对每个四分值确定经历严重出血事件的患者数目（图 5）。结果显示在入院时（t-PA 开始给予之前），从最低到最高 $[FFA_u]$ 值分布的四分值，严重
15 重出血事件率的增加超过 3 倍， $p<0.01$ 。这些结果引起的一个最大可能性是：如果降低 FFA_u 水平，可能会降低 t-PA 介导的出血率。

虽然图4和5的结果没有显示是否升高的 FFA_u 水平会直接、独立地导致死亡率和出血率的增加，充分的体外研究工作证实：升高的 FFA 是许多细胞功能的有效干扰物。另外，许多研究工作强烈提示了 FFA 直接作用的
20 临床证据，这些研究工作针对其致心律失常作用及其在心血管疾病中的潜在作用。来自我们TIMI II试验中的结果同时提示： $[FFA_u]$ 是不利结果的强独立因素。因此， $[FFA_u]$ 并不是简单地反应这个患者群体的人口统计学；没有观察到例如年龄、性别、种族或者重量的相关性。而且， $[FFA_u]$ 在入院时与死亡率和出血事件的相关性似乎是独立的；尽管经历过严重缺血事件的患者死亡率较高（对所有患者：22%比11%），但是只有15%的死亡
25 是由出血引起的。

实施例5. 缺血患者的 FFA 血液水平不源自缺血组织

人体中的脑缺血和心肌缺血，引起血浆 FFA 的水平增加超过正常的7
30 倍（Kleinfeld, 等. (1996) *Amer. J. Cardiol.* 78: 1350-1354; Kurien, 等. (1966) *The Lancet* 16:122-127; Oliver, 等. (1994) *The Lancet* 343:155-158）。同样

众所周知, FFA在缺血组织的细胞内累积, 至少在分离出来的器官中累积 (Bazan, 等. (1970) *Biochim. Biophys Acta* 218:1-10; Van der Vusse, 等. (1997) *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 57: 85-93)。但是缺血组织产生的FFA不是在局部缺血中观察到的血浆FFA增加的原因。这是因为缺血组织产生的FFA的量与正常血浆FFA水平相比, 即使是在整个器官完全缺血的条件下也是可以忽略不计的, 更不要说在缺血患者中观察到超过7倍的增加。例如, 在正常条件下, 血浆FFA的每两分钟更新一次, 在(正常)血浆中大约500 μM 的全部[FFA] 每分钟转化成为大约0.2 g的FFA。缺血组织中产生的FFA源自磷脂(Bazan, 等. (1970) *Biochim. Biophys Acta* 218: 1-10; Goto, 等. (1988) *Stroke* 19: 728-735; Jones 等. (1989) *Am. J. Pathol.* 135: 541-556), 其含有小于1%典型(非脂肪)细胞(湿)重量。因此, 在全部FFA高于正常水平2-7倍的缺血疾病情况下, 超过20 g/分钟的组织将被用于维持观察水平的FFA。这与生命现象不符合而且表明血浆FFA的增加源自非缺血组织。

在完全脑缺血(断头处理)的具体实例中, 经30分钟时间累积在大鼠脑中的全部FFA量是大约0.8微摩尔(Ikeda, 等. (1986) *J. Neurochem.* 47:123-132)。在300 g大鼠中的血浆FFA总量超过5微摩尔(>500 μM FFA的10 ml血浆)。在可逆大脑中动脉局部缺血的大鼠模型中(比断头处理的缺血损伤程度轻得多), 总血浆FFA增加了大约2倍, 并为此每2分钟向血浆中加入额外的5微摩尔FFA或者在30分钟内加入额外的大约75微摩尔FFA。这样, 与将血浆水平提高到局部缺血中观察到的水平所需的FFA量相比较, 完全局部缺血在30分钟内产生的这0.8微摩尔FFA是可以忽略的。具有足够能力产生在脑缺血中观察到的大量FFA的最可能的组织来源是脂肪组织。我们已经发现, 在脑缺血增加的数分钟内观察到了血浆水平的TNF α ——一种有效的脂肪溶解活化剂(Ryden, 等. (2002) *J. Biol. Chem.* 277:1085-1091)而且TNF α 与FFA_v在血浆中的增加非常相关。

本发明的技术人员应该理解, 在不离开本发明的精神的情况下可以作出大量且不同的修改。因此, 应该清楚地理解, 本发明的形式仅仅是说明性的并且不是为了限制本发明的范围。

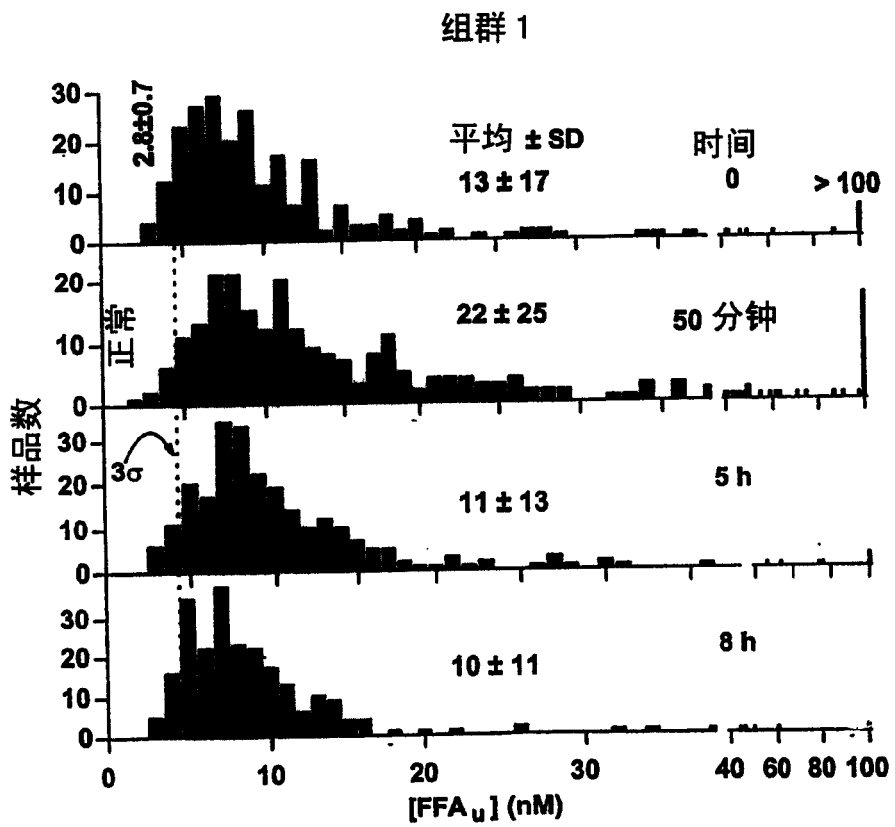


图 1

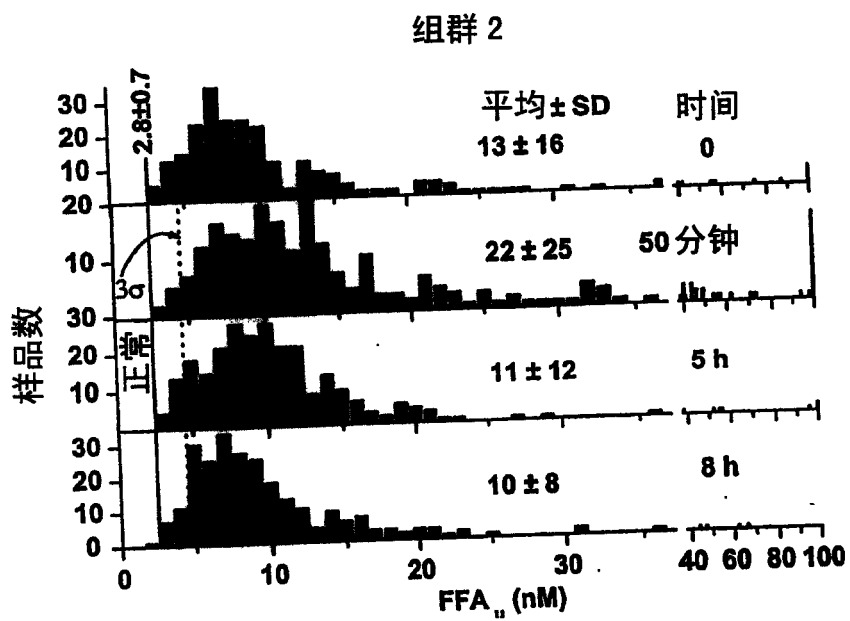


图 2

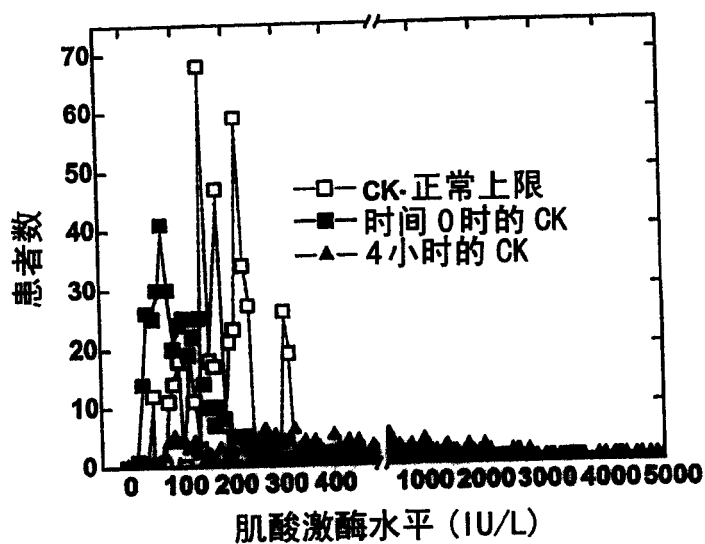


图 3

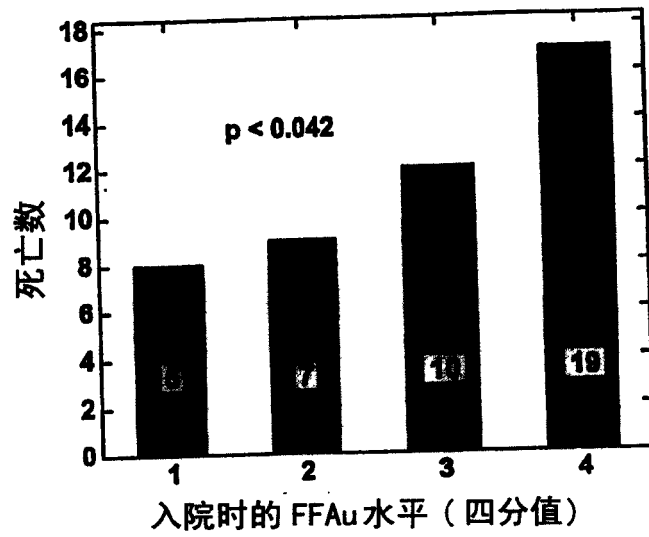


图 4

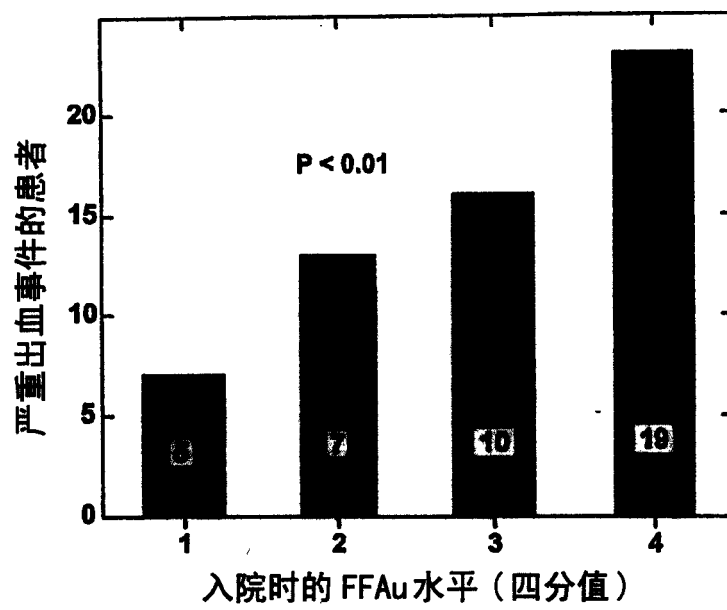


图 5

专利名称(译)	局部缺血的诊断标志		
公开(公告)号	CN1630818A	公开(公告)日	2005-06-22
申请号	CN02802866.X	申请日	2002-09-16
[标]发明人	艾伦克莱费尔德		
发明人	艾伦·克莱费尔德		
IPC分类号	G01N33/53 A61K31/7004 A61K33/00 A61K38/00 A61K38/28 G01N21/78 G01N33/566 G01N33/68 G01N33/92		
CPC分类号	G01N33/6893 G01N33/92 G01N2800/2871 G01N2800/324 G01N2800/52 Y10S436/805 Y10S436/815		
代理人(译)	程金山		
优先权	60/322523 2001-09-14 US 10/243566 2002-09-13 US		
其他公开文献	CN100554963C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及通过测量分子浓度来诊断和监测包括但不限于心肌缺血和脑缺血的局部缺血，所述分子并非是来自缺血组织，但其在血液和其它流体中的浓度由于局部缺血状态而改变。

I (1) - I (1) 空白

R= _____

I (2) - I (2) 空白