

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00811583.4

[43]公开日 2002年9月18日

[11]公开号 CN 1370277A

[22]申请日 2000.6.29 [21]申请号 00811583.4

[30]优先权

[32]1999.7.8 [33]GB [31]9915881.8

[32]1999.7.8 [33]US [31]60/142,775

[86]国际申请 PCT/GB00/02521 2000.6.29

[87]国际公布 WO01/03573 英 2001.1.18

[85]进入国家阶段日期 2002.2.9

[71]申请人 马特里克斯医疗有限公司

地址 英国诺丁汉

[72]发明人 安东尼·M·黑格蒂

[74]专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 魏晓刚 李晓舒

权利要求书2页 说明书8页 附图页数0页

[54]发明名称 诊断方法

[57]摘要

本发明涉及诊断或检测心肌肥厚易感者的方法,它包括体外分析人体液样品中促心肌激素-1(CT-1)的水平及所述方法的应用。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

权 利 要 求 书

1.一种用于诊断或检测心肌肥厚易感者的方法，包括在体外分析人体体液样品中所含的促心肌激素-1(CT-1)的水平。

5 2.按照权利要求 1 所述方法，其中通过对未受心肌肥厚影响的个体体液样品中的 CT-1 的基本水平和被检个体体液样品中的 CT-1 的水平进行比较来诊断或检测心肌肥厚易感者。

10 3.按照权利要求 1 所述的方法，其中通过对被检个体先前体液样品中的 CT-1 基本水平和当前同一被检个体体液样品中的 CT-1 的水平进行比较来诊断或检测心肌肥厚易感者。

4.按照权利要求 1 或 2 所述的方法，其中 CT-1 的水平的升高是心肌肥厚开始或产生的指征。

5.按照权利要求 3 所述的方法，CT-1 的水平的升高是心肌肥厚发展的指征。

15 6.按照上述任一项权利要求所述的方法，其中所述人体体液样品包括全血，血浆，血清，尿液，眼泪，唾液，痰或滑液。

7.按照上述任一项权利要求所述的方法，其中所述体外分析是用于检测 CT-1 蛋白或其片断。

20 8.按照权利要求 7 所述的方法，其中体外分析包含放射免疫分析或酶联免疫吸附分析。

9.按照权利要求 1-5 任一项所述的方法，其中所述体外分析是用于检测 CT-1 核酸或其片断。

10.按照权利要求 9 所述的方法，其体外分析包括杂交、测序或扩增技术。

25 11.按照上述任一项权利要求所述的方法，进一步包括对于附加标记物的体外分析。

12.按照权利要求 11 所述的方法，其附加标记物选自于 ANF, 制瘤素-M, 睫状神经营养因子和白血病抑制因子。

30 13.一种用于诊断或检测心肌肥厚易感者的试剂盒，该试剂盒包括适用于测定人体体液样品中 CT-1 水平的容器和试剂。

14.按照权利要求 1 所述的方法的应用，其用于确定应当进行高血压治

疗的病人。

15.按照权利要求3所述的方法的应用，其用于确定治疗高血压的疗效。

16.用于诊断或检测心肌肥厚易感者的方法，其基本如以上所述。

说明书

诊断方法

5

技术领域

本发明涉及一种方法，它包括用于诊断或检测心肌肥厚易感者 (predisposition) 和监控心肌肥厚的进展和疗效以及所述方法的试剂盒。

10

背景技术

心肌肥厚是心脏对损害或需增加心脏供血或当血流阻力增大时的一个重要代偿性的反应。经过长期高血压之后，心脏通过通常在胎儿心脏发育过程中表现出的基因复能作用(reactivation of gene)的反应，产生心肌细胞的肥大和在缺乏细胞分裂的情况下以肌纤维蛋白(sarcomeric protein)积累为特征的心肌肥厚。

高血压，或系统性高血压，在动物和人类作为一个主要的发病和死亡的原因已在很久以前就被人们所认识。人类长期系统性的动脉高血压已被阐明是与一个较宽范围内的非致命和致命的病症有关，如心梗(心脏急症)，脑血管意外(脑中风)，心衰和肾衰(肾脏损害)(Perea, G, 1955, J. Chronic Dis. 1: 33-42)。未得到治疗的高血压可增加心脑血管的发病率许多年来是很清楚的 (MacMahon, S.等, 1990, Lancet 335: 765-74)。最近二十多年对可降低血压药物的种类研究已经表明减少了脑中风和心脏病的发病率和死亡率。

一些流行病学的调查研究，如 Framingham Study(Levy, D.等, 1990, N. Eng. J. Medicine 322: 1561-6 和 Kannel, W.B. 1991, J. Hypertension 9(2):53-9) 表明，由持久性的高血压引起的心肌肥厚的存在与预后不好相关，目前更多的研究强调左心室肥厚预后不好。下面表 1 总结了一些可引发心梗的已知因素及其危险分布。

表 1 心血管疾病的危险率

年龄修正危险率	男	女
高胆固醇	1.7	1.4
高血压	2.2	2.5
糖尿病	2.2	3.7
左心室肥厚	4.7	7.4
吸烟	1.7	1.2

Kannel, W.B. 1991 同上

并不是每个高血压患者都会发生心脑血管问题。对不伴有任何其他危险因素

5 的轻、中度高血压病人的治疗和费用比是一个问题。可以确实预期的是不列颠治疗指南(British Treatment Guideline)将会被修订,从而只有那些伴有其他危险因素的轻、中度高血压病或存在明显器官损害的患者才接受治疗。

现在人们意识到一个或多个其他危险因素,如左心室肥厚的存在可确定应当治疗的高血压患者。最终地治疗目的是降低与高血压病相关的发病率

10 和死亡率,这可通过针对性地减少一些危险因素的方式取得。因而,戒烟的重要性作为部分控制生活方式(intervention regime)获得更大的重视,并且事实已证明吸烟是高血压病第二大危险因素(危害比)。再者,最近十年已看到了可减低血胆固醇的高效及抗耐药剂的发展,对心肌梗塞的主要和辅助(primary and secondary)的预防的研究表明降低血清胆固醇在治疗上有重

15 要的意义。这是除以抗高血压药控制血压升高以外的另一种治疗措施。

按照 Kannel, W.B. 1991(同上)报道,存在左心室肥厚(LVH)是最危险的因素。因此,需要对所有轻度高血压患者进行定期随访以预测和评估左心室肥厚的发展,从而确定治疗的需要以避免心脑血管问题的发生。

与心肌肥厚有关的其他疾病包括一系列如肺动脉高压、囊泡纤维化和

20 慢性呼吸道阻塞性疾病等等的心肺病,这些疾病可引起右心房和右心室肥厚。当右心室肥厚时,上述肺动脉高压、囊泡纤维化和慢性呼吸道阻塞性疾病的大部分患者的发病率和死亡率也随之显著升高。因此,人们期望能监测右心室肥厚的发展以便能评估控制其易于产生的条件的适当性。

当前可用的检测心肌肥厚的方法包括应用心电图和影像学技术如超声

25 心动图(echocardiography)、核磁共振扫描等。这些技术有其相应的缺点,

心电图在严重的心肌肥厚时才可发现，而超声心动图和核磁共振比较昂贵不适于立即对所有高血压病人的普查体检。

研究表明(JAMA 1979, 242:2562-71)心电图在诊断高血压时仅确认 3-8% 左右的患者患有心肌肥厚，这样该技术不能提供有效的诊断。而在诊断高
5 血压时，超声心动图和核磁共振扫描显示出左心室肥厚发生率占未特意选择的高血压病人的 20-60%左右(Savage, D.D.等, 1979, Circulation 59:623-32)。

然而，在大多数情况下，这些影像学技术费用昂贵和需要病人去医院，而大部分高血压病人在社区中得到治疗。另一个影像学技术的缺点是仅能
10 鉴别已形成的肥厚而不能鉴别病人的是否正在发生导致肥厚的改变。

发明内容

本发明的目的是提供一种方法，鉴别那些伴有心肌肥厚的病人和有可能
15 能发展为心肌肥厚的病人，并可使这些病人得到早期的治疗。

本发明第一个方面提供的一种方法，该方法用于诊断和检测心肌肥厚易感者，它包括在体外测定人类体液样品中含有的促心肌激素-1 (cardiotrophin-1)的水平。

本发明是根据发明者的发现，在利用传统的方法如心电图和超声心动
20 图所表明的心肌肥厚的患者比没有心肌肥厚患者血液样品中促心肌激素-1的水平升高。

促心肌激素-1(CT-1)是一个细胞因子家族包括白细胞介素-6(IL-6)、白血
病抑制因子(LIF)、睫状神经营养因子(CNTF)、制癌蛋白-M(OSM)和白细
胞介素-11(IL-11)。CT-1 在很多，但并不是所有成熟小鼠心脏、肾脏和肝脏
25 组织中表达。体外研究表明来自于小鼠组织样品中的 CT-1 的水平由于心肌细胞心肌肥厚反应而升高，它暗示了 CT-1 激活心肌细胞肥大(Wollert, K.C.等, J. Biol. Chem. Vol. 271, No. 16, pp9535-45, 1996)。更近一点的研究(Ishikawa, M.等, J. Hypertension 1999, 17:807-16)推论出 CT-1 mRNA 的表达在心室肥厚的早期(大鼠)增加及肥厚后维持升高。这项研究的进一步结论是
30 CT-1 在大鼠的 LVH 的进展和维持方面未必起了一个机械的作用。

对于适宜作为对疾病或对疾病的易感性的标记的基因或基因产物来

说，重要的是在疾病的开始和进程的整个周期中产生此基因产物，并且此基因产物水平没有大的波动。已经知道，在心肌肥厚中，表达出 α -肾上腺素传递介质(α -adrenergic transmitters)和内皮缩血管素(endothelin)。然而，当在短时期内其血浆水平相应整个因子范围内变化非常大时，应用它们作为心肌肥厚的指标是不可行的。同样重要的是标记物仅相应所研究的疾病的产生和发展而增加或减少，而与其他条件无关。例如，一种建议的心肌肥厚标记物是心钠素(atrial natriuretic)因子(ANF 心房利钠因子)。而用 ANF 作为心肌肥厚的标记物的问题是 ANF 在许多其他条件下也升高，如心衰。总之，ANF 作为心肌肥厚的确切标记物是有缺陷的。

10 现有技术几乎不包含 CT-1 在心肌肥厚中起作用的证据、没有证据表明 CT-1 涉及到人的心肌肥厚，也没有暗示假如存在人体组织可释放此细胞因子和在人体体液样品中提供一个合适的心肌肥厚标记物。

15 进一步，人的心室肥厚涉及一定数量的包含激素如肾上腺素和血管紧张素 II 在内的体液因子的与血压无关的营养因素影响。这些激素对人类的影响不仅在病理学上表现为高血压性心肌肥厚而且还表现肥厚的程度。这与在高血压动物模型中看到的变化如 SHRsp(Pennica, 等, 1995, PNAS 92:1142-6)相反，并提示在人和其他动物，如现有技术中的大鼠和小鼠模型之间的心室肥厚的发生和发展具有不同的机制。

20 具体实施方式

本发明的优选实施例是通过比较未受心肌肥厚影响的人体液样品中的 CT-1 基本水平(basal level)和被检个体体液样品中的 CT-1 水平可诊断或检测出易患心肌肥厚的人。

25 CT-1 在未受心肌肥厚影响的人体液样品中保持在一个基本水平。这是个基础。这个基本水平可与被测人体体液中的 CT-1 的水平进行比较。当 CT-1 的水平比基础数值增高时表明该个体易患心肌肥厚或心肌肥厚易正在发生和发展。然后，心肌肥厚可由现有技术如心电图和影像学技术确定。

30 本发明的方法与现有技术相比，它具有某些优点：该方法可被用来诊断或检测容易发生左和/或右心室肥厚(right ventricular hypertrophy-RVH or left ventricular hypertrophy-LVH)在内的心肌肥厚的患者。

在发现肥厚之前，心室肥厚的原因就可能是明确的，或者在病人存在问题时心室肥厚将被发现。

LVH 对高血压患者导致心脏问题是个高风险因素。高血压患者易发生 LVH 的诊断或检测使得对这类患者进行高血压治疗以预防 LVH 的产生、发展和发生心脏问题的危险。

RVH 发生在一系列的心肺疾病中，包括肺动脉高血压、囊泡纤维化和慢性呼吸道阻塞性疾病。因此，对 RVH 的诊断可指明上述病变的严重程度。

由于在导致心肌肥厚的生物化学变化的开始 CT-1 的表达就升高，这个方法可用来检测任何不可逆发生损害之前如心肌肥厚产生之前的心肌肥厚发生的危险。

进行体液样品的检测是很容易的，不需病人为了检查是否患有心肌肥厚去医院进行一些影像学的检查。这个检测也可在外科手术中由护理师进行，甚至设想这个检测进一步地可被生产为一种试剂盒，这种试剂盒足够简单可使患有心肌肥厚危险的人在家中进行检测。这种方法对心肌肥厚病人诊断或检测比目前正在应用的传统技术，其价格便宜、快捷。

本发明方法的主要优点是它的准确性。心电图对高血压伴有心肌肥厚病人的正确诊断率仅为 3-8%，所以该技术不能提供有效的诊断。而心动超声和核磁共振扫描已经表明高血压伴左心室肥厚率为 20-60%。所以认为本发明可提高心肌肥厚的病人诊断率甚至在病情发展之前即可作出明确诊断。

本发明的方法可被用作检测心肌肥厚的发生和进展情况。与正常相比 CT-1 水平升高表明开始产生心肌肥厚。

本发明的方法也可在同一个体中比较先前和现在待测体液样品中 CT-1 的水平，并确定心肌肥厚的进展情况。现在样品较先前样品中 CT-1 的水平升高表明心肌肥厚在进展。反之，则预示心肌肥厚好转或治疗有效。

按照本发明的方法可用来检测心肌肥厚的治疗效果。如重复性测定 CT-1 的水平即可确定 CT-1 的变化情况。CT-1 水平逐渐减少可证实治疗效果。

用该方法测定 CT-1 水平优选一年一次，较优选六个月一次，更优选每季度一次以及最优选每六周一次。每年测定的次数决定于个体间心肌肥厚发生危险度和以前检测的结果而定。

按照本发明的方法可对全血，血浆，血清，尿液，眼泪，唾液，痰或滑液样品进行。

按照本发明的优选实施例，所述方法包括体外分析以检测 CT-1 蛋白或其特殊片断。优选地，体外分析方法包括放射免疫测定或酶联免疫吸附测定(ELISA)。优选地，特定的 CT-1 或其断片的结合配体(bonding partner)可
5 被用来定量样品中 CT-1 的水平。这个特定的结合配体更优选具有产生标记的功能或连有表明 CT-1 水平存在的标记。尽管对业内人士来说其他合适的特定结合配体是显而易见的，CT-1 特定的结合配体的例子包括 CT-1 受体和抗-CT-1 抗体。

10 优选地，针对整个 CT-1 蛋白或其特定断片抗体可在进行免疫检测中作为 CT-1 的特定结合配体。在检测中所应用的适合的抗体是全长人类 CT-1 抗体：兔子 IgG。

测定在样品中 CT-1 蛋白水平的其他方式是分子重量或电荷。在一个多孔载体上进行层析或十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS PAGE)由于
15 样品内容物在载体上运行距离的不同可用来表明样品中的 CT-1 的水平。由于 CT-1 的电荷，通过等电聚焦方法也可用来鉴定 CT-1 的水平。

按照本发明的另一个实施例，所述方法包括体外分析用于检测 CT-1 核酸或其片断。优选地，体外分析包括杂交(hybridisation)、测序(sequencing)或扩增(amplification)技术如 PCR。

20 由于当测定 CT-1 的蛋白和核酸时重要的是表明 CT-1 的水平，所以优选地体外分析是定量的。试剂盒可提供为测定 CT-1 水平所必须的试剂和容器。

人们知道 CT-1 的表达不仅仅局限在小鼠的心脏也可在小鼠的其他组织表达，包括肾脏和肝脏。为了提高按照本发明的第一部分所述方法的精确
25 度，进一步对一种附加标记物进行体外分析。

适用于心脏功能的标记物包括 ANF，制瘤素(oncostatin)-M，睫状神经营养因子和白血病抑制因子。

心肌肥厚诊断的重要性是由于除高血压外 LVH 可导致心脑血管问题。

因而本发明的第二方面提供了本发明的第一方面方法的应用以便决定
30 应当进行高血压治疗的患者。

高血压伴 LVH 对心脏来说是一个高危险因素，因此假如当体液样品中

CT-1 水平增高时, 应当对高血压进行治疗以预防心脏问题的发生。

按照本发明的第三部分, 对高血压的治疗效果可通过测定同一个体先前和现在的 CT-1 水平并比较其变化来监视。当随着时间 CT-1 水平下降时表明治疗有效果。

5 现在参照以下非限定性例子来进一步说明本发明。

实例

进行本发明的第一方面方法的方案包括竞争性 ELISA。

10 简单地说, 竞争性 ELISA 包括通过被动吸附结合抗原过夜(纯化人 CT-1)。血浆样品中可加入竞争性的抗体, 对人 CT-1 来说是兔子 IgG, 或在加入抗体之前将血浆样品进行一段时间的温育。然后加入一种酶标的抗体使其显色(color development)。

该检测应用单克隆抗体可进一步提高测定的灵敏性和减少步骤。

步骤总结:

- | | | |
|----|--------------------------|----------------------|
| 15 | (i) 抗原的被动吸附 | -在平板里加入纯化的 CT-1 放置过夜 |
| | (ii) 漂洗 | |
| | (iii) 添加样品/标准(standards) | -加入血浆 |
| | (iv) 加入竞争性抗体 | -添加人 CT-1 的抗体兔子 IgG |
| | (v) 漂洗 | |
| 20 | (vi) 添加酶标的抗体 | -添加抗兔偶联的 IgG |
| | (vii) 漂洗 | |
| | (viii) 添加底物 | -添加显色系统 |
| | (ix) 鉴别颜色的变化 | -测定吸光值 |

25 测定人体血浆中 CT-1 水平的进一步分析由 Talwar, S.等在 Biochem. & Biophys. Res. Comms. 261 567-571(1999)有描述。这个分析方法已在本申请的优先权日后被公开。Talwar 等描述了用于 CT-1 的灵敏和特定的方法, 即基于竞争性配体结合原理的无放射性免疫发光法(non-radioactive immunoluminometric)。

30 化学发光标记氟磺酸 4-(2-琥珀酰亚胺-氧羰乙基)苯基-10-甲基-吡啶鎓(acridinium)-9-羧化物被用来标记表示 CT-1 的中间部分的区域的肽。对心衰病人 CT-1(氨基酸 105-120)此区域的检测揭示了 CT-1 的值较正常对照值升

高。

根据 Talwar, S. 等人的对 CT-1 分析被认为可应用在本发明的优选实施例中。

专利名称(译)	诊断方法		
公开(公告)号	CN1370277A	公开(公告)日	2002-09-18
申请号	CN00811583.4	申请日	2000-06-29
[标]发明人	安东尼M黑格蒂		
发明人	安东尼·M·黑格蒂		
IPC分类号	G01N33/50 C12Q1/68 G01N33/49 G01N33/493 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/68 G01N33/74		
CPC分类号	G01N33/74 G01N33/6893 G01N2800/32 G01N2800/52		
代理人(译)	魏晓刚 李晓舒		
优先权	1999015881 1999-07-08 GB 60/142775 1999-07-08 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及诊断或检测心肌肥厚易感者的方法,它包括体外分析人体液样品中促心肌激素 - 1(CT - 1)的水平及所述方法的应用。