



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103988080 A

(43) 申请公布日 2014. 08. 13

(21) 申请号 201280060568. 1

代理人 容春霞

(22) 申请日 2012. 10. 11

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

G01N 33/53(2006. 01)

61/545, 975 2011. 10. 11 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 06. 09

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/059805 2012. 10. 11

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/055954 EN 2013. 04. 18

(71) 申请人 加利福尼亚大学董事会

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 才华

(74) 专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限

责任公司 11287

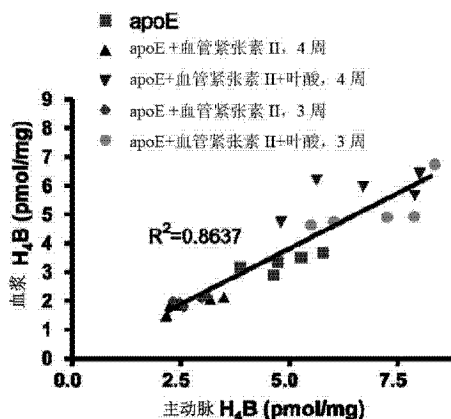
权利要求书2页 说明书16页 附图13页

(54) 发明名称

用于腹主动脉瘤的生物标记物

(57) 摘要

本发明涉及检测个体的腹主动脉瘤 AAA 或对 AAA 的易感性的方法、监测个体的 AAA 的治疗功效的方法和评估个体的 AAA 的严重程度或 AAA 的风险的方法,所述方法涉及测量测试样品中存在的四氢生物喋呤 H4B 的量并且将其与标准物或先前测试样品中存在的 H4B 的量进行比较。所述测试样品中存在的 H4B 的量与所述标准物相比降低指示 AAA 或对 AAA 的易感性。可在第二时间点之前向所述个体投与治疗,且第二测试样品中存在的 H4B 的量与所述第一测试样品相比增加指示 AAA 的有效治疗。可鉴别出候选者用于进一步测试或监测 AAA 和 / 或治疗 AAA。



1. 一种检测个体的腹主动脉瘤 AAA 或对 AAA 的易感性的方法,所述方法包含:
 - (a) 使来自所述个体的测试样品与能够测量所述测试样品中存在的四氢生物喋呤 (H_4B) 的量的分析装置接触;和
 - (b) 比较所述测试样品中存在的 H_4B 的测得量与 H_4B 的标准量;其中所述测试样品中存在的 H_4B 的量与所述标准物相比降低指示 AAA 或对 AAA 的易感性。
2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述分析装置包含高效液相色谱 HPLC 柱。
3. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述分析装置包含免疫分析试剂盒。
4. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述测试样品中存在的 H_4B 的所述量与所述标准物相比降低 20% 指示 AAA 或对 AAA 的易感性。
5. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述测试样品中存在的 H_4B 的所述量与所述标准物相比降低 50% 指示 AAA 或对 AAA 的易感性。
6. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述样品包含血清或全血。
7. 根据权利要求 1 所述的方法,其进一步包含规定 H_4B 与所述标准物相比降低的所述个体进行 AAA 的治疗。
8. 根据权利要求 7 所述的方法,其中所述治疗包含叶酸疗法。
9. 一种监测个体的 AAA 的治疗功效的方法,所述方法包含:
 - (a) 使于第一时间点获得的来自所述个体的第一测试样品与能够测量所述测试样品中存在的四氢生物喋呤 H_4B 的量的分析装置接触;
 - (b) 使于第二时间点获得的来自所述个体的第二测试样品与能够测量所述测试样品中存在的四氢生物喋呤 H_4B 的量的分析装置接触;
 - (c) 比较所述第一和第二测试样品中存在的四氢生物喋呤 H_4B 的测得量;其中在所述第二时间点之前向所述个体投与治疗,且其中所述第二测试样品中存在的 H_4B 的量与所述第一测试样品相比增加指示 AAA 的有效治疗。
10. 根据权利要求 9 所述的方法,其中所述分析装置包含高效液相色谱 HPLC 柱。
11. 根据权利要求 9 所述的方法,其中所述分析装置包含免疫分析试剂盒。
12. 根据权利要求 9 所述的方法,其中所述第二测试样品中存在的 H_4B 的所述量与所述第一测试样品相比增加 20% 指示 AAA 的有效治疗。
13. 根据权利要求 9 所述的方法,其中所述样品包含血清或全血。
14. 根据权利要求 9 所述的方法,其进一步包含规定 H_4B 与所述标准物相比降低或增加的所述个体进行 AAA 的改良治疗。
15. 一种评估个体的腹主动脉瘤 AAA 的严重程度或 AAA 的风险的方法,所述方法包含:
 - (a) 使来自所述个体的测试样品与能够测量所述测试样品中存在的四氢生物喋呤 H_4B 的量的分析装置接触;和
 - (b) 测量所述测试样品中存在的四氢生物喋呤 H_4B 的所述量;
 - (c) 比较所述测试样品中存在的 H_4B 的所述测得量与标准物中存在的 H_4B 的测得量;其中所述测试样品中存在的 H_4B 的所述量与所述标准物相比降低的程度指示所述个体的 AAA 的严重程度或风险。
16. 根据权利要求 15 所述的方法,其中所述分析装置包含高效液相色谱 HPLC 柱。

17. 根据权利要求 15 所述的方法,其中所述分析装置包含免疫分析试剂盒。
18. 根据权利要求 15 所述的方法,其中所述样品包含血清或全血。
19. 根据权利要求 15 所述的方法,其进一步包含规定 H₄B 与所述标准物相比降低的所述个体进行 AAA 的治疗。
20. 根据权利要求 15 所述的方法,其中所述测试样品中存在的 H₄B 的所述量与所述标准物相比降低 50%指示严重 AAA。

用于腹主动脉瘤的生物标记物

[0001] 相关申请案交叉参考

[0002] 本申请案主张于 2011 年 10 月 11 日提出申请的美国临时专利申请案第 61/545,975 号的权益,所述申请案的全部内容以引用方式并入本文中。在此申请案中引用了各种出版物。这些出版物的全部揭示内容均以引用方式并入本申请案中以更全面地描述本发明所涉及领域的现有技术状态。

[0003] 关于联邦资助研究的声明

[0004] 本发明是在由国立卫生研究院 (National Institutes of Health) 授予的批准号 HL077440 的政府支持下完成。政府拥有本发明中的某些权利。

技术领域

[0005] 本发明一般来说涉及腹主动脉瘤的新颖生物标记物和使用此生物标记物检测和监测患者的动脉瘤风险的方法。

背景技术

[0006] 腹主动脉瘤 (AAA) 是分子机理尚不清楚的严重人类血管疾病。它是由主动脉壁内与渐进性主动脉扩张和最终破裂相关的组织病理学重塑来界定。男性和吸烟是 AAA 的唯一已知风险因素。年龄超过 50 岁的每 250 人中约有一人将死于 AAA 破裂。然而,对于这种盛行且危及生命的疾病来说,由于其疾病机理缺乏了解,因此目前为止唯一疗法是手术矫治。此外,手术只推荐用于大于 5.5cm 的 AAA;且没有症状的较小 AAA 经常无法诊断出,从而导致静默生长和令人惊讶的致死性破裂。因此增进我们对于 AAA 病原学的理解具有公共卫生重要性,此可能促成创新的治疗性和预防性策略。

[0007] 业内仍需要 AAA 生物标记物。具体来说,仍需要可用于筛选、检测和监测 AAA 以及鉴别那些倾向于产生 AAA 的生物标记物。

发明内容

[0008] 本发明提供检测个体的腹主动脉瘤 (AAA) 或对 AAA 的易感性的方法。所述方法包含 (a) 使来自个体的测试样品与能够测量测试样品中存在的四氢生物喋呤 (H_4B) 的量的分析装置接触;和 (b) 比较测试样品中存在的 H_4B 的测得量与 H_4B 的标准量。在本发明的典型实施例中,样品包含血清或全血。测试样品中存在的 H_4B 的量与标准物相比降低指示 AAA 或对 AAA 的易感性。在一些实施例中,测试样品中存在的 H_4B 的量与标准物相比统计学显著降低指示 AAA 或对 AAA 的易感性。在其它实施例中, H_4B 的降低与所述标准物相比降低至少约 10% 或降低至少 20%、30%、40%、50% 或 60%、70%、80% 或 90%。较小降低通常指示对 AAA 的易感性,而较大降低更可能指示 AAA 的存在。

[0009] 因此,所述方法可进一步包含例如通过超声或通过在一或多个指定间隔后重复测试 H_4B 将个体鉴别为候选者用于进一步测试或监测 AAA。所述方法还可进一步包含规定 H_4B 与所述标准物相比降低的个体进行 AAA 的治疗。治疗的实例包含叶酸疗法和 / 或 DHFR 疗

法,包括基因疗法。

[0010] 还提供监测治疗个体的 AAA 的功效的方法。在一个实施例中,所述方法包含 (a) 使于第一时间点获得的来自个体的第一测试样品与能够测量测试样品中存在的 H₄B 的量的分析装置接触;(b) 使于第二时间点获得的来自个体的第二测试样品与能够测量测试样品中存在的 H₄B 的量的分析装置接触;和 (c) 比较第一和第二测试样品中存在的 H₄B 的测得量。在第二时间点之前向所述个体投与治疗,且第二测试样品中存在的 H₄B 的量与所述第一测试样品相比增加指示 AAA 的有效治疗。此方法可在治疗开始时或在治疗计划已经进行后起始。在一些实施例中,第二样品中存在的 H₄B 的量与第一样品相比统计学显著增加指示 AAA 的有效治疗。在其它实施例中, H₄B 的增加与第一样品相比增加至少约 10% 或增加至少 20%、30%、40%、50% 或 60%、70%、80%、90%、100%、150%、200% 或更大。所述方法任选地进一步包含规定 H₄B 与第一样品相比或与标准物相比降低或增加的个体进行 AAA 的改良治疗。

[0011] 本发明另外提供评估个体的腹主动脉瘤 (AAA) 的严重程度或 AAA 的风险的方法。在一个实施例中,所述方法包含 (a) 使来自个体的测试样品与能够测量测试样品中存在的 H₄B 的量的分析装置接触;(b) 测量测试样品中存在的 H₄B 的量;和 (c) 所述测试样品中存在的 H₄B 的测得量与标准物中存在的 H₄B 的测得量。测试样品中存在的 H₄B 的量与标准物相比降低的程度指示所述个体的 AAA 的严重程度或风险。在一些实施例中,测试样品中存在的 H₄B 的量与标准物相比统计学显著降低指示 AAA 或对 AAA 的易感性。在其它实施例中, H₄B 的降低与所述标准物相比降低至少约 10% 或降低至少 20%、30%、40%、50% 或 60%、70%、80% 或 90%。较小降低通常指示对 AAA 的易感性或 AAA 的较温和情形,而较大降低更可能指示 AAA 的存在或 AAA 的更严重情形。根据测试样品中存在的 H₄B 的量,可如本文所述监测或治疗个体。

[0012] 在典型实施例中,分析装置包含高效液相色谱 (HPLC) 柱或免疫分析试剂盒,例如酶联免疫吸附分析 (ELISA) 试剂盒、化学发光分析试剂盒或其它常规分析试剂盒。因此,本发明进一步提供包含用于检测 H₄B 的试剂和 / 或分析装置的试剂盒。

附图说明

[0013] 图 1A-C 显示血管紧张素 II (Ang II) 诱导高苯丙氨酸血症 (hph)-1 小鼠形成腹主动脉瘤 (AAA)。向野生型 (WT) 小鼠和 hph-1 小鼠输注 Ang II (0.7mg/kg/天) 达 14 天。图 1A 是数字照片,其中数字显微照片的插图显示在 WT、WT/Ang II、hph-1 和 hph-1/Ang II 的不同实验组中腹主动脉到第 14 天时的代表性外观。只有输注 Ang II 的 hph-1 小鼠产生 AAA,具有可见的出血迹象。对 AAA 区段的苏木精-曙红染色 (箭头) 显示血栓形成。图 1B 是显示输注 Ang II 的 hph-1 小鼠的分别为 21%、65% 和 14% 的 AAA 发病率和死亡率 (无 AAA 对非致死性 AAA 对致死性 AAA) 的饼形图。图 1C 是描绘输注 Ang II 的 hph-1 小鼠的平均血压 (MBP) 变化的图。通过颈动脉内遥测方法 (国际数据科学 (Data Sciences International)) 连续监测 MBP 14 天。

[0014] 图 2A-C 是柱状图,其显示血管紧张素 II (Ang II) 输注增大四氢生物喋呤 (H₄B) 和 NO[•] 的缺乏,并且加剧高苯丙氨酸血症 (hph)-1 小鼠的内皮 NO 合成酶 (eNOS) 解偶联。向野生型小鼠和 hph-1 小鼠输注 Ang II (0.7mg/kg/天) 达 14 天,此后收获主动脉用于以下目

的:图 2A 显示主动脉 H_4B 含量;图 2B 显示主动脉 NO^{\cdot} 的产生量;且图 2C 显示在存在或不存在的 L-NG- 硝基-L- 精氨酸甲酯 (L-NAME) 时主动脉超氧化物 ($O_2^{\cdot-}$) 的产生量。 $P < 0.05$ 。

[0015] 图 3A-C 显示叶酸 (FA) 通过恢复内皮二氢叶酸还原酶 (DHFR) 表达来阻止输注血管紧张素 II (Ang II) 的高苯丙氨酸血症 (hph)-1 小鼠的内皮 NO 合成酶 (eNOS) 解偶联。在 Ang II 输注 (0.7mg/kg/天) 前 2 天开始向野生型小鼠和 hph-1 小鼠经口投与 FA (15mg/kg/天) 并且在整个 14 天研究期内进行治疗,此后,收获主动脉用于以下目的:图 3A 显示主动脉制备物中的内皮和非内皮 DHFR 表达;图 3B 显示主动脉四氢生物喋呤 (H_4B) 含量;且图 3C 显示主动脉 eNOS 解偶联活性 (通过 NG- 硝基-L- 精氨酸甲酯 [L-NAME] 敏感性 $O_2^{\cdot-}$ 的产生量来指示)。 * $P < 0.01$ 。

[0016] 图 4A-F 显示叶酸 (FA) 阻止输注血管紧张素 II (Ang II) 的高苯丙氨酸血症 (hph)-1 小鼠的腹主动脉瘤 (AAA) 形成并使血压正常化。在 Ang II 输注 (0.7mg/kg/天) 前 2 天开始向野生型 (WT) 小鼠和 hph-1 小鼠经口投与 FA (15mg/kg/天) 并且在整个 14 天研究期内进行治疗。在第 0 天和第 14 天,执行腹部超声 (维尔沃 (Veivo) 770 高分辨率回声系统,维索尼克 (Visualsonics)) 以评价利用或不利用 FA 治疗的输注 Ang II 的野生型小鼠和 hph-1 小鼠的腹主动脉 (AA) 尺寸 (图 4A-D)。主动脉横截面区域由蓝色圆描绘,并且将计算面积列示于每一图像下方。在研究过程期间通过遥测来评价平均血压 (MBP) (图 4E 和 4F),如图 1 中所述。

[0017] 图 5A-B 是显示叶酸 (FA) 阻止输注血管紧张素 II (Ang II) 的高苯丙氨酸血症 (hph)-1 小鼠的内皮 NO 合成酶 (eNOS) 的渐进性解偶联的柱状图。在 Ang II 输注 (0.7mg/kg/天) 前 2 天开始向野生型 (WT) 小鼠和 hph-1 小鼠经口投与 FA (15mg/kg/天) 并且在整个 14 天研究期内进行治疗。在第 0 天、第 4 天或第 8 天收获主动脉用于分析 (图 5A) WT 小鼠和 (图 5B) hph-1 小鼠在存在或不存在的 NG- 硝基-L- 精氨酸甲酯 (L-NAME) 时 $O_2^{\cdot-}$ 的产生量。 * $P < 0.05$, 相对于 L-NAME; # $P < 0.05$, 相对于 WT sham; + $P < 0.05$, 相对于 4 天。

[0018] 图 6A-C 是显示叶酸 (FA) 阻止输注血管紧张素 II (Ang II) 的高苯丙氨酸血症 (hph)-1 小鼠的血管重塑的显微照片。在 Ang II (0.7mg/kg/天) 或媒介输注前 2 天开始利用或不利用 FA (15mg/kg/天) 治疗野生型小鼠和 hph-1 小鼠并且在整个 14 天研究期内进行治疗,此后,收获主动脉用于 (图 6A) 苏木精-曙红 (H&E) 染色 (黑色箭头和红色箭头分别指示 FA 诱导的中膜和外膜变化); (图 6B) 伟郝夫-范吉森 (Verhoeff-Van Gieson) (VVG) 染色 (黑色箭头显示弹性蛋白变化);和 (图 6C) 指示巨噬细胞浸润的巨噬细胞染色。

[0019] 图 7A-C 显示叶酸 (FA) 阻止高苯丙氨酸血症 (hph)-1 小鼠的由血管紧张素 II (Ang II) 诱导的基质金属蛋白酶 (MMP) 2 和 MMP9 活化。在 Ang II (0.7mg/kg/天) 或媒介 (sham) 输注前 2 天开始利用或不利用 FA (15mg/kg/天) 治疗野生型小鼠和 hph-1 小鼠。在 14 天研究期后,收获主动脉以评价 MMP 活性。图 7A 是显示 MMP2 和 MMP9 活性的代表性酶谱。图 7B 是 MMP2 活性的定量数据。图 7C 是 MMP9 活性的定量数据。 * $P < 0.05$, 相对于 sham。

[0020] 图 8A-B 二氢叶酸还原酶 (DHFR) 过表达使输注血管紧张素 II (Ang II) 的高苯丙氨酸血症 (hph)-1 小鼠的内皮 NO 合成酶 (eNOS) 再偶联。在 Ang II 输注前 2 天开始每隔一天向野生型 (WT) 小鼠和 hph-1 小鼠的尾静脉转染来自阿特津生物系统 (Altogen Biosystems) 的基于脂质的试剂中的 DHFR 表达载体 (pcDNA3.1-DHFR) 达 14 天。在 14 天输注结束时,收获主动脉用于 (图 8A) 通过蛋白质印迹 (Western blotting) 测定主动脉制备物中的内皮

DHFR 表达和 (图 8B) 在存在或不存在 NG-硝基-L-精氨酸甲酯 (L-NAME) 时主动脉超氧化物的产生量。*P < 0.05, 相对于野生型 (WT) sham; #P < 0.05, 相对于 L-NAME; +P < 0.05, 相对于 hph-1 sham。

[0021] 图 9A-B 是显示在两种不同的腹主动脉瘤 (AAA) 模型中在存在或不存在叶酸 (FA) 疗法时 H₄B 的主动脉和血浆水平的柱状图。图 9A 显示从输注血管紧张素 II (Ang II) 的 hph-1 小鼠 (n = 3-4) 进行的测量, 而图 9B 显示从输注 Ang II 的 apoE 缺失小鼠 (n = 5-6) 进行的测量。输注 Ang II 的 apoE 小鼠通常到第 4 周时检查到的 AAA 发生率为约 92%, 并且血管在第 3 周时经历了严重的重塑和 AAA 产生。循环的 H₄B 和主动脉 H₄B 的相关下降进一步证明循环的 H₄B 可用作 AAA 的预测和诊断标记物。

[0022] 图 10A-B 显示在两种不同的腹主动脉瘤 (AAA) 模型中在存在或不存在叶酸 (FA) 疗法时 H₄B 水平的主动脉水平与血浆水平之间的相关性。图 10A 显示从 hph-1 动物 (n = 3-4) 进行的测量, 而图 10B 显示从 apoE 动物 (n = 5-6) 进行的测量。在两种 AAA 模型中, 循环 / 血浆 H₄B 与 H₄B 的主动脉水平很好地相关, 从而确认循环 / 血浆 H₄B 用于 AAA 形成的生物标记物作用, 已经将 AAA 形成与 H₄B 的主动脉缺乏关联。

[0023] 图 11 是显示经口投与叶酸 (FA) 阻止输注 Ang II 的 apoE 缺失小鼠的腹主动脉瘤 (AAA) 形成的柱状图。Ang II 输注诱导 92% 的研究小鼠发生 AAA, 且通过经口投与 FA 使其实质上衰减到 17%。在输注 Ang II 的 hph-1 小鼠 (79% 发生率在 2 周内出现, 而 apoE 缺失小鼠是在 4 周内出现) 中, 投与 FA 完全阻止 AAA 发生 (0%)。

[0024] 图 12 是显示经口投与叶酸 (FA) 恢复输注 Ang II 的 apoE 缺失小鼠的 eNOS 功能的柱状图。在基线下, eNOS 抑制剂 L-NAME 最低程度地减少超氧化物的产生量, 从而暗示 eNOS 的微小解偶联 / 功能失调。Ang II 输注显著地增加 L-NAME 敏感性超氧化物的产生量, 所述产生量可通过经口投与 FA 完全消除。这些数据指示 FA 在恢复输注 Ang II 的 apoE 缺失小鼠的 eNOS 功能 / 使 eNOS 再偶联方面高度有效, 这类似于在输注 Ang II 的 hph-1 小鼠中所观察到的。

[0025] 图 13A-B 图解说明通过经口投与叶酸 (FA) 恢复输注 Ang II 的 apoE 缺失小鼠的主动脉一氧化氮 (NO) 生物利用性。通过电子自旋共振 (ESR) 定量地且选择性地测量主动脉生物可利用的一氧化氮 (NO) 自由基。与 FA 使输注 Ang II 的 apoE 缺失小鼠的 eNOS 完全再偶联的发现一致, 通过 FA 治疗也显著改进了主动脉一氧化氮 (NO) 生物利用性。图 13A 显示 NO 的代表性 ESR 谱。图 13B 显示主动脉 NO 水平 (n = 6) 的分组数据。

具体实施方式

[0026] 本发明基于以下发现: 四氢生物喋呤 (H₄B) 的血浆水平与 H₄B 的组织水平相关, 且因此可用作 AAA 产生的新颖生物标记物, 且用作治疗功效的指示物。使用两种不同的 AAA 模型, 也就是说输注血管紧张素 II 的 hph-1 和 apoE 缺失小鼠, 下文所述的实例证明 H₄B 的血浆水平与 H₄B 的组织水平密切相关, 这两者在 AAA 中均降低并且通过叶酸治疗予以恢复。本发明由此提供筛选个体的血液、血浆或其它体液样品的 H₄B 的方法, 从而提供创新、方便且有利的 AAA 产生预测物。此筛选对具有 AAA 风险的群体 (例如年长吸烟男性) 使用时特别有价值。此外, 本发明的筛选方法对 AAA 的预测性远高于当前所鉴别的风险因素, 例如吸烟、年龄和性别。

[0027] 经口投与叶酸使 eNOS 再偶联并且随后使氧化应激降低并改进一氧化氮生物利用性,此进而阻止先于 AAA 的血管重塑。这源于叶酸对 eNOS 辅因子补救酶二氢叶酸还原酶 (DHFR) 的上调。因此,根据本发明通过 H₄B 测试鉴别的个体可利用叶酸或促进 DHFR 的其它疗法(例如 DHFR 基因疗法)进行治疗。此早期检测可减少或消除对于手术修复的需要和破裂风险。

[0028] 定义

[0029] 除非另有指明,否则本申请案中所用的所有科学和技术术语都具有业内通常所用的含义。如本申请案中所用,以下用语或片语具有所指明的含义。

[0030] 如本文所用,“分析装置”是指通常用于分析、测量和/或检测化学物质的存在的分析仪器或设备。所述仪器的典型实例是高效液相色谱 (HPLC) 柱。可使用其它色谱仪器,以及免疫分析或其它常规检测分析。免疫分析的典型实例是 ELISA。

[0031] 如所属领域的技术人员所理解,从个体获得的样品可直接与分析仪器接触或在首先与溶剂或其它预备介质接触后再与分析仪器接触。

[0032] 如本文所用,“对照”样品通常是从一或多个正常、健康个体获得,或在合适时,从同一个体但在已知个体处于健康状态时获得。可接受的正常水平的参考分析物(在本文中称作“标准物”)也适合作为比较用对照。

[0033] 如本文所用,“医药上可接受的载剂”或“赋形剂”包括在与活性成份组合时,允许所述成份保留生物活性并且不与个体免疫系统反应的任何材料。实例包括但不限于标准医药载剂,例如磷酸盐缓冲盐水溶液、水、乳液(例如油/水乳液)和各种类型的润湿剂。用于气溶胶或不经肠投与的优选稀释剂是磷酸盐缓冲盐水或生理(0.9%)盐水。

[0034] 包含所述载剂的组合物是通过熟知的常规方法来调配(例如,参见雷明顿药科学 (Remington's Pharmaceutical Sciences),第 18 版,A. 真纳罗 (A. Gennaro) 编辑,马克出版公司 (Mack Publishing Co.),宾夕法尼亚州伊斯顿市 (Easton, PA),1990)。

[0035] 如本文所用,除非另有明确说明,否则“一 (a、an)”意指至少一者。

[0036] 方法

[0037] 本发明提供检测个体的腹主动脉瘤 (AAA) 或对 AAA 的易感性的方法。所述方法包含 (a) 使来自个体的测试样品与能够测量测试样品中存在的四氢生物喋呤 (H₄B) 的量的分析装置接触;和 (b) 比较测试样品中存在的 H₄B 的测得量与 H₄B 的标准量。测试样品中存在的 H₄B 的量与标准物相比降低指示 AAA 或对 AAA 的易感性。在一些实施例中,测试样品中存在的 H₄B 的量与标准物相比统计学显著降低指示 AAA 或对 AAA 的易感性。可检测在约 1pmol/mg 到 6pmol/mg 范围内的循环 H₄B 水平差异。在一些实施例中,H₄B 水平降低到小于约 3pmol/mg 指示 AAA,并且低于约 2pmol/mg 的水平指示严重 AAA。在其它实施例中,H₄B 的降低与所述标准物相比降低至少约 10%或降低至少 20%、30%、40%、50%或 60%、70%、80%或 90%。较小降低,例如降低到约 2.9-2.0pmol/mg 范围,通常指示指示对 AAA 的易感性,而较大降低,例如降低到小于约 1.9pmol/mg,更可能指示 AAA 的存在。循环 H₄B 的量与动脉瘤的大小相关。

[0038] 在一些实施例中,用于参考的标准 H₄B 量是根据所属领域的技术人员认为对于无 AAA 的健康个体来说正常的水平来采用,这将根据年龄和性别而变化。在其它实施例中,在所述方法中用于比较的标准物是从正常、健康对照个体获得的样品。在另外其它实施例中,

用于比较的标准物是在已知所述个体无疾病时预先取自同一个体的测试样品。用于比较的参考水平的额外可用来源包括在 AAA 开放修复手术期间常规收集的动脉瘤组织和相邻组织,以及在手术前收集的血液、血浆或其它体液样品。因此,在一些实施例中,比较从个体获得的测试样品中的 H_4B 水平与正常的标准 H_4B 水平和从 AAA 样品获得的已知异常水平两者。

[0039] 任选地,所述方法可进一步包含例如通过超声或通过在一或多个指定间隔后重复测试 H_4B 将个体鉴别为候选者用于进一步测试或监测 AAA。例如,具有较严重病情的个体可每月监测一次,而具有轻微病情的那些可每三个月监测一次。治疗医师将能够基于个别患者的需要和风险来调节此计划。因此,可重复所述方法且可比较 H_4B 的测得量与标准物或与来自同一个体的先前测量值。初始监测可包含重复测试 H_4B ,且在 H_4B 测试指示朝 AAA 的显著进展后,可指引个体进行治疗和 / 或超声评估。测量 H_4B 水平的变化可在可通过超声检测 AAA 之前对其进行检测。对 AAA 的早期检测使得可进行侵袭性较小的治疗并避免手术。例如,如果个体表现出初始 5-10% 降低,随后在随访期后观察到显示 15% 降低,那么所述个体需要比随时间不显示任何降低或 < 10% 稳定水平的小量降低的那些受到更频繁地监测。

[0040] 所述方法可进一步包含规定 H_4B 与标准物相比降低的个体进行 AAA 的治疗。所述治疗的实例包含叶酸疗法和 / 或二氢叶酸还原酶 (DHFR) - 靶向疗法,包括基因疗法和有效改进 DHFR 功能的任何药理学或其它疗法,此将改进 H_4B 水平并预防、延迟或改善 AAA。同样,治疗可包含针对 eNOS 解偶联的其它对策。

[0041] 还提供监测治疗个体的 AAA 的功效的方法。在一个实施例中,所述方法包含 (a) 使于第一时间点获得的来自个体的第一测试样品与能够测量测试样品中存在的 H_4B 的量的分析装置接触 ; (b) 使于第二时间点获得的来自个体的第二测试样品与能够测量测试样品中存在的 H_4B 的量的分析装置接触 ; 和 (c) 比较第一和第二测试样品中存在的 H_4B 的测得量。优选地,使用相同或接近相同的分析装置和条件来获得第一和第二测试样品。在第二时间点之前向所述个体投与治疗,且第二测试样品中存在的 H_4B 的量与所述第一测试样品相比增加指示 AAA 的有效治疗。

[0042] 监测治疗功效的方法可在治疗开始时或在治疗计划已经进行后起始。在一些实施例中,第二样品中存在的 H_4B 的量与第一样品相比统计学显著增加指示 AAA 的有效治疗。在其它实施例中, H_4B 的增加与第一样品相比增加至少约 10% 或增加至少 20%、30%、40%、50% 或 60%、70%、80%、90%、100%、150%、200% 或更大。所述方法任选地进一步包含规定 H_4B 与第一样品相比或与标准物相比降低或增加的个体进行 AAA 的改良治疗。例如,可通过增加或降低投与个体的叶酸或另一治疗剂的量来改良治疗。

[0043] 本发明另外提供评估个体的腹主动脉瘤 (AAA) 的严重程度或 AAA 的风险的方法。在一个实施例中,所述方法包含 (a) 使来自个体的测试样品与能够测量测试样品中存在的 H_4B 的量的分析装置接触 ; (b) 测量测试样品中存在的 H_4B 的量 ; 和 (c) 比较所述测试样品中存在的 H_4B 的测得量与标准物中存在的 H_4B 的测得量。测试样品中存在的 H_4B 的量与标准物相比降低的程度指示所述个体的 AAA 的严重程度或风险。在一些实施例中,测试样品中存在的 H_4B 的量与标准物相比统计学显著降低指示 AAA 或对 AAA 的易感性。在其它实施例中, H_4B 的降低与所述标准物相比降低至少约 10% 或降低至少 20%、30%、40%、50% 或 60%、70%、80% 或 90%。较小降低通常指示对 AAA 的易感性或 AAA 的较温和情形,而较大降低更可能指示 AAA 的存在或 AAA 的较严重情形。根据测试样品中存在的 H_4B 的量,可如

本文所述监测或治疗个体。

[0044] 在本发明的典型实施例中,样品包含血清或全血,但其可为任何体液。在典型实施例中,从个体抽出 2ml 全血,但小于约 0.5ml 可足够。样品可在多种条件下收集,包括在收集时利用或不利用旋转减慢。样品可使用例如多种收集管处理,所述收集管包括不含补充物、含 EDTA、含肝素和业内已知的其它条件。同样,样品可收集并储存在多种条件下,包括例如在液氮中快速冷冻;在 -20°C 下冷冻几周且随后转移到 -70°C 或 -80°C ;或样品在 -70°C 或 -80°C 下冷冻并储存在此处。

[0045] 分析装置和试剂盒

[0046] 在典型实施例中,分析装置包含高效液相色谱 (HPLC) 柱或免疫分析试剂盒,例如酶联免疫吸附分析 (ELISA) 试剂盒、化学发光分析试剂盒或其它常规分析试剂盒。在典型实施例中,HPLC 装配有荧光或电化学检测器和 C-18 柱。

[0047] 用于本文所述方法中的试剂盒也在本发明范围内。所述试剂盒可包含载剂、包装或间隔化成可容纳一或多个容器(例如小瓶、管等)的容器,每一容器包含一个待用于所述方法中的单独元件。例如,容器可包含一或多种用于检测 H_4B 的试剂,所述试剂任选地以可检测方式标记。试剂盒还可包括一或多个用于报告工具 (reporter-means) (例如生物素结合蛋白,例如抗生物素蛋白或抗生蛋白链菌素) 的容器,所述报告手段结合到用于检测 H_4B 的可检测标记,例如酶、荧光或放射性同位素标记。

[0048] 本发明试剂盒通常将包含上述容器和一或多个其它容器,所述其它容器包含从商业和用户角度来看需要的材料,包括缓冲剂、稀释剂、过滤器、针、注射器和带有使用说明书的包装插页。另外,标签可提供于容器上以指示所述组合物用于特定应用,且还可指示使用说明。也可在试剂盒所包括的插页上包括说明和/或其它信息。

[0049] 投与和剂量

[0050] 组合物是以任何合适的方式经常与医药上可接受的载剂、赋形剂一起投与或以医药上可接受的盐形式投与。可利用在本发明上下文中向个体投与治疗的合适方法,且尽管超过一种途径可用于投与特定组合物,但特定途径经常可提供比另一途径更直接且更有效的反应。

[0051] 在本发明上下文中,投与患者的剂量应足以随时间在患者中实现有益治疗反应,或抑制疾病进展。因此,将组合物以足以诱发有效反应和/或减轻、减少、治愈或至少部分地阻止疾病的症状和/或并发症的量投与个体。将足以实现此目的的量定义为“治疗有效剂量”。一般来说,对于包含叶酸的医药组合物来说,剂量中存在的量在每千克个体体重约 1mg 到约 100mg 和更高范围内。代表性量包括但不限于 1mg/kg 体重、5mg/kg 体重、15mg/kg 体重、30mg/kg 体重、100mg/kg 体重或更高 mg/kg 体重。合适量将随着患者的大小而改变,但通常将在约 1-20mg/片剂或 0.1mL 到约 5mL 范围内。

[0052] 本文所揭示的治疗组合物的投与途径和频率以及剂量将随个体不同而改变,且可使用标准技术容易地确定。一般来说,医药组合物可经口或通过注射(例如,皮内、瘤内、肌内、静脉内或皮下)、经鼻内(例如,通过抽吸)投与。通常,至少 1 到 10 次剂量可经 52 周时期投与。优选地,以 1 个月间隔投与 6 次剂量,且此后可周期性地给予额外补充物。交替方案可能适合个别患者。在一个实施例中,间隔 10 天投与 2 种或更多种口服补充物。当用叶酸治疗时,其通常最好每天服用一次。

[0053] 一般来说,适当的给药和治疗方案以足以提供治疗和 / 或预防益处的量提供活性剂。所述反应可通过确定治疗患者与非治疗患者相比临床结果的改进来监测。

[0054] 治疗包括预防和治疗。预防或治疗可通过于单个时间点或多个时间点单次投与到单个或多个部位来实现。也可接近同时投与到多个部位。患者或个体包括哺乳动物,例如人类、牛科动物、马科动物、犬科动物、猫科动物、猪科动物和羊科动物。个体优选人类。

[0055] 实例

[0056] 呈现以下实例来说明本发明并帮助所属领域的技术人员实现和使用本发明。所述实例并不打算以任何方式在其它方面限制本发明范围。

[0057] 实例 1:解偶联的内皮一氧化氮合成酶在 AAA 形成中的作用

[0058] 本实例证明 eNOS 解偶联 / 四氢生物喋呤缺乏在 AAA 形成中的成因性作用。因此,经口投与叶酸、内皮靶向性二氢叶酸还原酶基因疗法和可能针对 eNOS 解偶联的其它对策可用作 AAA 的新疗法。

[0059] 通过产生一氧化氮 (NO^\cdot) 来快速地使超氧化物 ($\text{O}_2^{\cdot-}$) 和其它活性氧 (ROS) 不活化,内皮 NO 合成酶 (eNOS) 保护血管细胞免于氧化损害。积累的证据证明,当 eNOS 辅因子四氢生物喋呤 (H_4B) 缺乏时, eNOS 变得功能失调而产生 $\text{O}_2^{\cdot-}$,而非 NO^\cdot ¹⁻¹³。此 eNOS 的解偶联可使内皮功能失调恶化,使得极难矫正。一种能够将 eNOS 转变成解偶联态的重要病理性激动剂是血管紧张素 II (Ang II)^{1,2,5}。如前文所示, Ang II 通过 NADPH 氧化酶的暂时性活化和随后 H_4B 补救酶二氢叶酸还原酶 (DHFR) 的过氧化氢依赖性、内皮特异性缺乏使 eNOS 解偶联^{1,5}。

[0060] Ang II 在血管疾病 (例如高血压和动脉粥样硬化) 的发病机理中起到重要作用,其是通过充分表征的机理起作用,例如血管收缩、血管 NADPH 氧化酶的活化和 ROS 依赖的炎症性和肥大性信号传导¹⁴⁻¹⁸。然而, eNOS 的解偶联代表 Ang II 使氧化应激延长的新颖机理^{1,2,5}。然而,仍不清楚解偶联的 eNOS 是否直接参与血管疾病的发病机理。继 GTP 环水解酶 1 (GTPCH1) 突变后的四氢生物喋呤 (H_4B) 缺乏诱导小鼠的高苯丙氨酸血症^{19,20}。在基线下,高苯丙氨酸血症 (hph)-1 小鼠的 NO^\cdot 生物利用性降低,但因过氧化氢依赖性补偿而保持血管舒张¹⁹。在与 C57BL6 小鼠杂交 > 10 代后,对 hph-1 小鼠进行基因分型并使用电子自旋共振进行表征用于检测 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的产生量。尽管在野生型 (WT) 动物中, NG-硝基-L-精氨酸甲酯 (L-NAME) 因 NO^\cdot 损失而增加 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的产生量,但 L-NAME 衰减 hph-1 小鼠的 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的产生量,从而暗示 eNOS 的解偶联。因此, hph-1 小鼠可用作极佳模型系统以研究解偶联的 eNOS/ H_4B 缺乏对于血管发病机理的作用。

[0061] 为了检查解偶联的 eNOS 是否放大了 Ang II 在扩大高血压或增大血管重塑方面的病理学效应,向 WT 小鼠和 hph-1 小鼠输注 Ang II,并保持 14 天。发现截至第 6 天到第 7 天通过颈动脉内遥测方法监测的平均血压 (MBP) 在两组中均增加。尽管 WT 小鼠的 MBP 继续上升,但 hph-1 小鼠的 MBP 开始下降,这与猝死 (13.9%; n = 72) 相关。立即尸体检查显示破裂性腹主动脉瘤 (AAA)。约 65% 的存活 hph-1 小鼠产生 AAA,总发病率为 79% (n = 72)。对 AAA 进行进一步表征且显示输注 Ang II 的 hph-1 小鼠的渐进性 DHFR 缺乏和 eNOS 的解偶联广泛血管重塑、炎症和 AAA 形成的基础。有趣的是,通过经口投与叶酸 (FA) 恢复 DHFR 表达或 DHFR 的过表达完全阻止输注 Ang II 的 hph-1 小鼠的 AAA 形成。这些治疗也钝化了 eNOS 的渐进性解偶联,以及特征在于基质金属蛋白酶 (MMP) 活化、弹性蛋白分解、胶原重塑

和巨噬细胞浸润的血管重塑和炎症。因此这些创新发现代表 eNOS 解偶联 /H₄B 缺乏在 AAA 形成中起到成因性作用且经口投与 FA、DHFR 靶向疗法和可能针对 eNOS 解偶联的其它对策可用作新颖且有力的 AAA 治疗方案的第一证据,所述 AAA 是当前无法获得药理学治疗的严重且盛行的人类疾病。

[0062] 方法

[0063] 动物、Ang II 输注和血压测量

[0064] 基于邱 (Khoo) 等人²¹的方案将 hph-1 小鼠 (最初在 CBA 背景下)¹⁹与 C57BL6 小鼠回交 > 10 代并进行基因分型。只将 C57BL6 背景下的纯合子 hph-1 小鼠用于实验。使用皮下植入的渗透泵 (杜瑞克 (Durect) 公司) 向 24 周龄 WT 和 hph-1 雄性小鼠输注 Ang II (0.7mg/kg/天)。在 14 天输注期间,通过遥测方法监测血压。在植入渗透泵前 10 天将无线血压探针植入动物中。将血压探针导管插入左颈动脉中,而将探针主体插入右侧腹部中。

[0065] 使动物从手术中恢复 1 周。这段时期后,测量血压 3 天以获得基线。然后在手术后第 10 天植入渗透泵。每天从 9:00AM 到 4:00PM 以 250-Hz 取样速率进行测量。每天计算平均血压作为整个记录期的平均值。动物和实验程序的使用经洛杉矶加利福尼亚大学实验动物照护与使用委员会 (the institutional animal care and usage committee at the University of California Los Angeles) 批准。主动脉 NO 和超氧化物产生量的电子自旋共振测定、主动脉 H₄B 含量的高效液相色谱测定和内皮 DHFR 表达的蛋白质印迹测定如先前所公开来执行^{1,2,5}。

[0066] 从小鼠主动脉分离内皮细胞

[0067] 收获后,将完整主动脉纵向切开且随后在 37°C 下用胶原酶 (0.6mg/mL) 消化 20 分钟,然后利用卷棉子轻轻去除内皮细胞。将含有内皮细胞的上清液离心且裂解用于蛋白质印迹分析。

[0068] FA 的经口投与和 DHFR 过表达

[0069] 开始向 WT 小鼠和 hph-1 小鼠连续经口投与 FA (15mg/kg/天) 或在 Ang II 输注前 2 天开始每隔一天尾静脉转染来自阿特津生物系统的基于脂质的试剂中的 DHFR 表达载体 (pcDNA3.1-DHFR) 5 达 14 天。在 2 周输注时期期间每天监测小鼠两次,且收获主动脉用于评价到第 14 天时的 AAA 形成、内皮 DHFR 表达和 eNOS 解偶联活性。立即检查在 14 天输注时期期间猝死的动物的动脉瘤且新收获主动脉用于实验。

[0070] 腹主动脉大小的超声检测

[0071] 用异氟烷将动物麻醉且置于温度控制桌上,所述温度控制桌还测量 ECG 的心率。在整个实验内调节异氟烷水平以维持心率在 400bpm 与 500bpm 之间,同时使动物充分麻醉。使用毛发去除乳膏从腹部去除毛发,且将预热超声传导凝胶施用到腹部区域上。将超声探针 (维尔沃 770,维索尼克) 置于凝胶上以使主动脉横向地可视化。使用多普勒 (Doppler) 测量来鉴别主动脉中脉动流的存在。通过在所有动物中使紧接左肾动脉分支上方的主动脉可视化来确保图像获取的一致定位。记录图像且将其保存到 PC 计算机上用于离线面积分析。依照标准组织学方案进行苏木精 - 曙红和伟郝夫 - 范吉森染色。

[0072] 巨噬细胞染色

[0073] 将福尔马林固定和石蜡包埋的组织以 5 μm 切片。通过用二甲苯洗涤去除石蜡且

然后利用递减浓度的乙醇使其再水化。通过将切片在 98.5°C 抗原修复缓冲液 (10 μ mol/L 柠檬酸、0.01% 吐温 (Tween) 20) 中浸渍 20 分钟来执行抗原修复。在 PBS+0.1% 曲通 (triton) (PBS-T) 中洗涤切片且然后在室温下用于 PBS-T 中的 2% 正常山羊血清将其封阻 3 小时。然后在 4°C 下将切片与一级抗体 (Mac-3, BD 法明津 (Pharmingen), 2% 于 PBS-T 中) 一起培育过夜。在用 PBS-T 洗涤 1 小时后, 在室温下在黑暗中将切片与二级抗体 (阿乐萨福陆 (Alexa fluor) 488, 2% 于 PBS-T 中) 一起培育 2 小时。在用 PBS-T 洗涤 1 小时后, 依次用递增等级的乙醇和二甲苯将切片脱水。用普芒特 (Permount) 介质将切片封固并利用共焦显微镜 (莱卡 (Leica), SP1 倒置) 拍照。如先前所公开来执行 MMP 活性分析²²。

[0074] 统计学分析

[0075] 通过 ANOVA 执行不同治疗组之间的比较。当指示差异时, 使用邓奈特事后测试 (Dunnet post hoc test)。将 $P < 0.05$ 设定为统计学显著性。附图中所示所有分组数据均呈现为平均值 \pm SEM。

[0076] 结果

[0077] 向 hph-1 小鼠输注 Ang II 诱导 AAA 形成

[0078] 向 24 周龄雄性 WT 小鼠 ($n = 72$) 和 hph-1 小鼠 ($n = 72$) 输注 Ang II (0.7mg/kg/天) 14 天。约 14% 的输注 Ang II 的 hph-1 小鼠在 14 天内突然死于 AAA 破裂 (图 1B)。在存活者中, 65% 产生 AAA, 总发病率为 79% (图 1A-1B)。相比之下, 输注 Ang II 的 WT 小鼠或未治疗 hph-1 小鼠均未死亡或产生 AAA (图 1A)。通过颈动脉内遥测方法监测 MBP 且发现 hph-1 小鼠与 WT 小鼠相比在基线下略高 (即, 第 0 天 Ang II 输注; 图 1C)。在 Ang II 输注期间, 截至第 6 天, MBP 在两种基因型中均增加 (WT: 101 ± 3 - 140 ± 2 mm Hg; hph-1: 112 ± 3 - 140 ± 2 mm Hg; 图 1C)。此后, MBP 在 hph-1 小鼠中下降, 而其在 WT 小鼠中继续上升 (图 1C)。

[0079] Ang II 输注在 hph-1 小鼠中增大 H₄B 和 NO[•] 的缺乏并加剧 eNOS 解偶联

[0080] 对从输注 Ang II 的 WT 小鼠和 hph-1 小鼠新分离的主动脉进行 H₄B 含量的高效液相色谱测定以及 NO[•] 和 O₂^{•-} 的产生量的电子自旋共振测定^{1,2}。与 WT 小鼠相比, hph-1 小鼠表现降低的主动脉 H₄B 生物利用性 (图 2A), 所述主动脉 H₄B 生物利用性因 Ang II 输注而进一步降低 (1.9 ± 0.2 - 1.0 ± 0.1 pmol/mg 蛋白质; 图 2A)。Ang II 输注也显著地降低 WT 小鼠的主动脉 H₄B 生物利用性 (5.1 ± 0.2 - 3.8 ± 0.4 pmol/mg 蛋白质)。值得注意的是, 主动脉 NO[•] 的产生量反映了输注 Ang II 的 WT 小鼠和 hph-1 小鼠的这些变化 (图 2B)。主动脉 O₂^{•-} 的产生量在存在或不存在 L-NAME 时测定。hph-1 小鼠的基础 O₂^{•-} 的产生量是 WT 小鼠的两倍 (图 2C, 比较 sham hph-1 对 sham WT)。尽管 L-NAME 在未治疗 WT 小鼠中因抑制 eNOS 偶联而增加 O₂^{•-} 产生量 (图 2C), 但 L-NAME 降低输注 Ang II 的 WT 小鼠的 O₂^{•-} 产生量, 这与响应 Ang II 的 eNOS 解偶联一致, 如先前所报道^{1,5} (图 2C)。在 hph-1 小鼠中, L-NAME 降低未治疗小鼠的 O₂^{•-} 产生量, 这与在不存在 Ang II 输注时 eNOS 在基线下的解偶联一致 (图 2C)。重要的是, Ang II 输注使 hph-1 小鼠的 eNOS 进一步解偶联, 如通过受 L-NAME 完全抑制的 O₂^{•-} 的实质上更高的产生量所证明 (图 2C)。

[0081] FA 在输注 Ang II 的 hph-1 小鼠中恢复内皮 DHFR 表达和 H₄B 生物利用性并阻止 eNOS 解偶联

[0082] 在 Ang II 输注 (0.7mg/kg/天) 前 2 天开始向 WT 小鼠和 hph-1 小鼠经口投与

FA(15mg/kg/天)并且在整个14天研究期内进行治疗。分析内皮细胞(从主动脉消化,参见方法部分)和内皮细胞剥离的主动脉两者的DHFR表达。如所显示,hph-1小鼠表现降低的内皮DHFR表达,这因Ang II输注而进一步降低。FA治疗将hph-1小鼠的内皮DHFR表达恢复到接近WT水平(图3A)。同样通过FA治疗阻止由Ang II在WT小鼠与hph-1小鼠两者中诱导的H₄B缺乏,使两组中的H₄B水平甚至高于基线(图3B)。此外,FA阻止输注Ang II的WT小鼠和hph-1小鼠两者的eNOS解偶联,如通过L-NAME敏感性O₂^{·-}产生量的完全衰减所证明(图3C)。

[0083] FA治疗在输注Ang II的hph-1小鼠中阻止AAA形成并使血压正常化

[0084] 关于此研究,使用总共21只经FA治疗的输注Ang II的hph-1小鼠,且这些动物均未产生AAA。使用2×2列联表的统计学分析显示此AAA产生的降低是显著的(P<0.0001)。在第0天和第14天,使用超声(装配有45MHz换能器的维尔沃770高分辨率回声系统,维索尼克)监测腹主动脉尺寸。Ang II输注诱导hph-1小鼠的腹主动脉的显著扩大(0.37-1.96mm²),这是通过FA治疗来防止(0.39-0.52mm²;图4A到4D)。相反,在WT小鼠中,Ang II诱导腹主动脉大小的最小增加(0.53-0.66mm²)。另外,FA在衰减WT小鼠的Ang II诱导的高血压方面高度有效(图4E),并且其还阻止输注Ang II的hph-1小鼠的MBP下降(图4F)。这些数据表明,在输注Ang II的WT小鼠中,eNOS的解偶联导致MBP升高,这最有可能是因为NO[·]生物利用性降低所致,而在表现更大程度的eNOS解偶联的hph-1小鼠中,ROS的过量产生自相矛盾地降低MBP,或MBP的降低是通过独立于ROS的机理介导。

[0085] FA阻止输注Ang II的hph-1小鼠的eNOS的渐进性解偶联和血管重塑

[0086] 为了检查在AAA产生期间的不同时间点处FA对eNOS解偶联的影响,在起始AngII输注后第4天和第8天关注O₂^{·-}产生量。收获主动脉且在存在或不存在L-NAME时进行O₂^{·-}的电子自旋共振检测。在WT小鼠中,对于两个检查时间点,eNOS解偶联活性均保持响应Ang II而稳定。如图5A中显而易见,反映eNOS解偶联活性的L-NAME敏感性O₂^{·-}产生量在第4天和第8天类似。相比之下,Ang II诱导hph-1小鼠的eNOS的渐进性解偶联。如图5B中所显示,L-NAME可抑制份数的O₂^{·-}产生量在第8天与第4天所观察到的相比增大。重要的是,在两个时间点,FA均一致地抑制hph-1小鼠的eNOS解偶联活性。在额外实验中,发现FA还阻止hph-1小鼠的Ang II诱导的血管重塑。如通过苏木精-曙红染色所指示,FA消除了输注Ang II的hph-1小鼠的中膜退化和外膜炎症细胞募集(图6A)。更具体来说,FA衰减了中膜弹性蛋白的扁平化和弹性蛋白纤维的稀疏化,如通过伟郝夫-范吉森(VVG)染色所显示(图6B)。对于输注Ang II的小鼠,浸润性巨噬细胞(包括MMP9在内的基质降解酶的一个主要来源)也受到显著上调,这经FA治疗完全衰减(图6C)。此外,FA衰减了hph-1小鼠的由Ang II诱导的MMP2活化和MMP9活化的增大,而其也抑制了WT小鼠的由Ang II诱导的MMP2活化(图7)。

[0087] DHFR基因疗法在输注Ang II的hph-1小鼠中使eNOS再偶联并阻止AAA形成

[0088] 如先前所显示,DHFR基因疗法在使输注Ang II的WT小鼠的eNOS再偶联方面有效¹。为了测试DHFR基因疗法是否足以克服其在输注Ang II的hph-1小鼠中在对于AAA形成至关重要方面的不足,在起始Ang II输注之前且在整个输注期内用DHFR转染WT小鼠或hph-1小鼠。在成功地活体内转染含有DHFR的表达载体后,内皮DHFR表达显著增强(图8A)⁵,且这在完全衰减输注Ang II的hph-1小鼠的eNOS解偶联增大(L-NAME)而非如

WT 对照中的 $O_2^{\cdot-}$ 产生量增加方面有效 (图 8B)。过表达 DHFR 的输注 Ang II 的 hph-1 小鼠均未产生 AAA。

[0089] 讨论

[0090] 本研究的最重大发现是首次证明 eNOS 解偶联 /H₂O₂ 缺乏在 AAA 形成中的成因性作用和 eNOS 再偶联的治疗潜力。在 eNOS 在基线下解偶联的 hph-1 小鼠中, Ang II 输注诱导 AAA 形成与 eNOS 的进一步解偶联。利用经口投与 FA 进行治疗有效地同时阻止 hph-1 小鼠的 eNOS 解偶联与 AAA 形成。此外, FA 衰减 hph-1 小鼠与 WT 小鼠两者的由 Ang II 诱导的血管重塑, 并差别地调节两组动物的血压对 Ang II 的反应。这些发现表明 eNOS 解偶联使得易于形成 AAA 且针对 eNOS 再偶联的策略可在治疗这一血管病症中有益。

[0091] 已在人类 AAA 中全身性地与局部地检测到氧化应激参数升高^{23,24}。此外, 已结合在动物模型中以实验方式诱导的 AAA 报道了主动脉氧化应激增加, 且针对氧化应激的对策已证明在阻止输注 Ang II 的小鼠的 AAA 形成方面有效, 但在人类中无效²⁵⁻²⁷。尽管先前已确定血管平滑肌的作用, 但是否还有氧化应激的其它细胞或酶来源参与 AAA 的发病机理仍有待全面理解。这是首次在鼠类模型中报道解偶联的 eNOS 可造成氧化应激, 从而导致严重血管重塑和 AAA 形成。AAA 的肾下模式非常类似于在人类中所发现的。另外, 在具有解偶联的 eNOS 的小鼠中观察到的病理学特征类似于在人类 AAA 中所观察到的那些, 包括外膜炎症、MMP 活化和基质降解 (图 6 和 7)。此外, AAA 易于破裂, 从而导致猝死, 如通过这些输注 Ang II 的 hph-1 小鼠的 14% 死亡率所证明 (图 1B)。值得注意的是, 解偶联过程使 eNOS 成为过氧亚硝酸盐生成物, 从而暗示了过氧亚硝酸盐而非其它 ROS 可能用作 AAA 形成的重要氧化还原信号传导介体。喂养高脂肪的载脂蛋白 E 缺失小鼠缺失 eNOS 导致自发 AAA 形成, 但发生率得低得多, 为 25%^{28,29}。值得注意的是, 也已在载脂蛋白 E- 缺乏小鼠中在基线下观察到 eNOS 解偶联^{7,30}。缺乏 eNOS 的小鼠表现随 NO[·] 产生量损失而发生的氧化应激增加。然而, 这些小鼠并未产生 eNOS 解偶联, 因为其缺乏功能 eNOS 蛋白质。总之, 这些数据表明血管系统中的 eNOS 解偶联依赖性 NO[·]/ROS 失衡而非 NO[·] 产生量损失本身更深刻地诱导了 AAA 形成。所述数据也表明内皮细胞在参与促进 AAA 形成的氧化物生成中的新颖作用。

[0092] Ang II 输注诱导 hph-1 小鼠的血压的快速上升, 这类似于在 WT 小鼠中所观察到的。然而, 在 hph-1 小鼠中, 在第 6 天 Ang II 输注后, 血压开始渐进性地下降, 截至第 11 天达到预治疗值。相比之下, 在 WT 小鼠中, 血压在整个 Ang II 输注过程中不断上升。利用已证明使 eNOS 再偶联^{1,31,32} 的 FA 进行治疗同时衰减源于 Ang II 输注的 WT 小鼠的血压上升与 hph-1 小鼠的血压下降, 表明 eNOS 解偶联参与这两种反应。在 WT 动物的情况下, 由 Ang II 诱导的 eNOS 解偶联可能通过降低 NO[·] 生物利用性而导致高血压。NO[·] 生物利用性降低还可能造成 hph-1 小鼠在基线下的血压增加以及对 Ang II 输注的初始升压反应 (图 1C)。输注 Ang II 的 hph-1 小鼠的血压的随后下降也似乎源于 eNOS 解偶联, 但确切机理仍有待确定。可能是生长的动脉瘤影响血液动力学, 因而影响血压。氧化应激对血压的调节是复杂的且依赖于可具有血管收缩或血管舒张效应的 NO[·] 的破坏与 ROS 的产生之间的平衡。例如, 过氧化氢已显示介导高血压动物的补偿性血管舒张⁶。那么通过 eNOS 的再偶联清除 eNOS 源过氧化氢可增加血管收缩性 (vasocontractility) 和血压。考虑到 WT 小鼠响应 Ang II 输注而产生持续高血压, 但没有 AAA 形成, 而 hph-1 小鼠产生 AAA 形成, 但仅有暂时性高血压, 所述数据与高血压并非 AAA 产生的决定性风险因素但其可促进疾病过程的先前观点一

致^{28,29,33}。

[0093] 也很重要,注意 eNOS 在输注 Ang II 的 hph-1 小鼠中渐进性地解偶联,但在 WT 小鼠中则不会(图 6),这与通过 FA 治疗完全矫正的 hph-1 小鼠的渐进性 DHFR 缺乏一致(图 3A)。这些数据指示内皮 DHFR 缺乏在介导 eNOS 解偶联和 AAA 形成中的关键作用。DHFR 在血管细胞而非内皮细胞中表达;然而,只有内皮 DHFR 丰度与主动脉 H₂O₂ 和 NO[·] 生物利用性相关(图 3A)^{1,5}。

[0094] 先前研究已显示 MMP(特别是 MMP-2 和 MMP-9) 是 AAA 产生的主要参与者(player)³⁴⁻³⁶。在此研究中,观察到这些酶在输注 Ang II 的 hph-1 动物中的活性均增加(图 7B 和 7C),这与那些早期观察结果非常匹配。有趣的是,MMP-2 活性在并未产生 AAA 的输注 Ang II 的 WT 动物中也增加。这似乎表明单独 MMP2 活化不足以实现 AAA 产生。值得注意的是,仅在输注 Ang II 的 hph-1 小鼠中发现 MMP-9 活性增加。此外,这些动物的巨噬细胞染色(图 6C) 丰度显著高于输注 Ang II 的 WT 动物。这些发现与 AAA 中的 MMP-9 的来源一般为巨噬细胞的先前观察结果一致³⁶。总之,所述数据表明 Ang II 输注导致 WT 动物与 hph-1 动物两者的主动脉中 MMP-2 的产生增加,很有可能来自血管平滑肌细胞^{34,36,37} 和内皮细胞^{38,39}。然而,来自受刺激血管细胞和浸润性巨噬细胞的 MMP-9 的增加是发生 AAA 所必需的。

[0095] 这些数据创新性地表明 eNOS 解偶联/H₂O₂ 缺乏在 AAA 形成中的成因性作用并且提高了经口投与 FA、DHFR 基因疗法和可能针对 eNOS 解偶联的其它对策可在治疗 AAA 中具有益处的可能性。

[0096] 参考文献

[0097] 实例 1 中所提供的参考文献引文的完整列表可在高(Gao) 等人,2012,高血压(Hypertension)59:158-166 中找到。

[0098] 实例 2:通过饮食叶酸阻止腹主动脉瘤形成

[0099] 本实例证明补充 FA 的饮食可通过改进组织 H₂O₂ 水平和 eNOS 的再偶联来阻止输注 Ang II 的 apoE 缺失小鼠产生 AAA。实例 1 中呈现的数据显示 FA 在输注 Ang II 的 hph-1 动物模型中消除 AAA 产生方面有效。在此实例中,在另一 AAA 模型中测试所述治疗而显示 FA 的保护作用扩展到其它模型。此外,本实例测试了 FA 是否通过 H₂O₂ 和 eNOS 的再偶联来发挥其保护作用。

[0100] 使用植入式阿泽特(Alzet) 渗透泵向 3 到 5 月龄 apoE 缺失小鼠输注 Ang II(1000ng/kg/min) 达 4 周。在 Ang II 输注前两天且在整个 4 周研究期内向动物进给正常饲料或定制的 FA 饲料(15mg/kg/天)。值得注意的是,26 只食用正常饲料的输注 Ang II 的 apoE 缺失小鼠中有 24 只(92.3%) 产生 AAA(图 11)。利用 FA 治疗,AAA 的发生率下降到 24 只中的 4 只(16.7%)。通过电子自旋共振测定的主动脉超氧化物产生量显示 apoE 缺失小鼠经 Ang II 处理而增加 2.67±0.15 倍,这通过投与 FA 而衰减到 1.75±0.01 倍(各自为 n=6)。也对反映 eNOS 解偶联活性的 L-NAME 敏感性超氧化物产生量进行了测量。经 Ang II 处理的 apoE 缺失小鼠大大增加了 eNOS 功能失调,其中 L-NAME 敏感性超氧化物产生量增加 2.22±0.2 倍,从 apoE 缺失小鼠在 1.17±0.06 倍的基线下的 eNOS 适度解偶联显著放大。用 FA 进行治疗恢复了 eNOS 功能,导致 L-NAME 敏感性超氧化物的 -1.22±0.4 倍变化,这指示没有来自 eNOS 的超氧化物产生量。这些数据证明,经口 FA 治疗在输注 Ang II 的 apoE 缺失小鼠的第二 AAA 模型中降低 AAA 发生率方面极为有效。所述数据进一步表明,

FA 的这种保护作用至少部分地归因于 eNOS 功能的恢复。

[0101] 实验设计：

[0102] 关于此研究，向 apoE 缺失雄性动物输注 Ang II 达 4 周，这已在文献中显示在 90-100% 动物中可靠地产生 AAA。向一组动物进给混合有 FA 的饲料。在输注期使用非侵袭性超声技术监测 AAA 产生。在 4 周结束时，收获来自动物的主动脉并执行组织学或生物化学分析以评价 AAA 的各种标记物和 eNOS 功能状态。

[0103] 将含有 Ang II (1000ng/kg/min) 或媒剂的渗透泵（阿泽特，2004 型）皮下植入动物中。向动物给予在室内制备的混合有 FA (15mg/kg/天) 的定期饲料或食物颗粒。在无痛处死后从动物小心地切开主动脉并清洁掉结缔组织。每周且在无痛处死后从每一动物收集血液样品（约 0.1mL）。

[0104] 在 Ang II 输注期通过超声成像系统（维沃 (Vevo) 770, 维索尼克）来非侵袭性地监测 AAA 的产生。使腹主动脉横向地成像并通过多普勒测量来鉴别主要脉动流的存在。通过使紧接左肾动脉分支上方的主动脉可视化来维持动物之间沿主动脉的一致定位。随后从所捕获的图像离线测量主动脉大小。在 Ang II 输注后每周进行两次测量，并且在 Ang II 输注（用于对照）前进行两次测量。AAA 定义为腹主动脉肿大至少 50% 并且稍后在实验端点处确认。还通过在收获时直接检查腹主动脉或对那些死于突然破裂的动物进行尸体检查来评价此模型的 AAA 发生率。

[0105] 使用组织学和生物化学分析（例如 MMP 酶谱法）来评价 FA 针对 AAA 的保护的有效性。将进行所收获主动脉的切片的组织学分析以使腹主动脉的细节可视化。组织固定于甲醛中，包埋于石蜡中，并且以 5 μ m 切片。执行标准 H&E 染色、梅森三色 (Mason's trichrome) 染色和 VVG 染色。

[0106] MMP 活性的增加是 AAA 产生的标志之一。因此，MMP 活性可使用其它研究中所详细描述酶谱法技术测量。简单来说，将主动脉裂解物加载到输注明胶的 SDS-PAGE 凝胶上。在电泳后，通过在 37°C 下将凝胶培育过夜通过所加载样品中的 MMP 消化凝胶中的明胶。然后利用标准考马斯蓝 (Coomassie blue) 染色使裂解带可视化。

[0107] 如先前所述使用 HPLC 系统测量 H₄B 水平。简单来说，用三氯乙酸和 DTT 裂解主动脉样品，使其经受酸性或碱性氧化，且在 HPLC 系统（岛津 (Shimadzu)）中分离后利用荧光检测器检测 H₄B 和其氧化物。

[0108] 通过在存在或不存在 L-NAME 时使用电子自旋共振 (ESR, 来自布鲁克 (Bruker)) 测量超氧化物产生来评价裂解的主动脉样品中 eNOS 的功能状态。在其中 eNOS 偶联的正常条件下，添加 eNOS 抑制剂 L-NAME 将增加超氧化物产生量，因为 eNOS 通常产生 NO 来清除超氧化物。然而，在其中 eNOS 正在产生超氧化物的 eNOS 解偶联条件下，添加 L-NAME 将降低超氧化物产生量。超氧化物产生量的这种变化方向将允许对 eNOS 在动物主动脉中的功能进行精确评价。

[0109] 实例 3：作为 hph-1 小鼠和 apoE 缺失小鼠的 AAA 生物标记物的循环 H₄B 水平

[0110] 本实例证明 H₄B 水平可用作 AAA 生物标记物。在此研究中，对 hph-1 小鼠和输注 Ang II 的 apoE 缺失小鼠的另一确定的 AAA 模型两者进行了研究。在 apoE 缺失小鼠中，使用 HPLC 测量的 H₄B 显示在主动脉中，H₄B 水平随着 Ang II 输注而降低 (4.86 ± 0.32 到 2.72 ± 0.26 pmol/mg, 各自为 n = 6)，并且随着经口投与 FA 而增加 (6.60 ± 0.62 pmol/mg, n

= 6)。当从血浆测量 H₄B 时,观察到类似趋势 (3.31 ± 0.13、1.87 ± 0.11、5.80 ± 0.30 pmol/mg, 分别对应于媒介剂、Ang II、FA, 各自为 n = 6)。同样在 hph-1 小鼠中, H₄B 的主动脉水平显现为 1.87 ± 0.25、0.99 ± 0.11、3.00 ± 0.64, 且血浆水平为 1.37 ± 0.05、0.92 ± 0.06 和 2.36 ± 0.25 pmol/mg (分别对于媒介剂、Ang II 和 AngII/FA, 各自为 n = 3)。更完全且更新的数据呈现于图 9A-B 和 11 中。

[0111] 此外, 对于 apoE 缺失小鼠以及对于 hph-1 来说, 血浆与主动脉 H₄B 水平之间的线性相关显示 0.86 的 R², 表明两次测量之间的线性关系。此两次测量之间的线性关系极其重要, 因为这将允许测量局部血管 H₄B 生物利用性的较小侵袭性方法, 相信这对于预测 AAA 产生必不可少。更完全且更新的数据呈现于图 10A-B 中。

[0112] 这些数据指示降低的 H₄B 生物利用性与 AAA 形成相关, 而恢复的 H₄B 生物利用性与 AAA 产生的阻止相关。此外, 主动脉 H₄B 值的变化在血浆中得到反映。总之, 这些数据表明循环 H₄B 水平可用作 AAA 产生的生物标记物以及治疗功效的预测物。

[0113] 实验设计:

[0114] 从输注 Ang II 的 apoE 缺失动物和 hph-1 动物收集血液样品。每周从每只动物的尾静脉收集约 0.1 mL 血液。如上文所概述使用 HPLC 来测定血液样品中 H₄B 的浓度。

[0115] 还研究了如上文所用的 FA 补充是否改进 H₄B 在循环和血管组织两者中的可利用性。利用补充 FA 的饮食治疗输注 Ang II 的 apoE 缺失小鼠或 hph-1 小鼠, 并于 1 周、2 周、3 周和 4 周的不同时间点使用 HPLC 测定循环和主动脉 H₄B 含量。使这些数据与 AAA 的产生相关以检查作为生物标记物的 H₄B 的实际改进是如何与 AAA 的阻止关联的。确定了输注 Ang II 的 apoE 缺失小鼠产生 AAA 需要 3-4 周, 且在这些时间点, 循环和组织 H₄B 水平实际上降低, 但通过 FA 治疗得到恢复 (图 9-10)。

[0116] 实例 4: 经口投与叶酸恢复输注 Ang II 的 apoE 缺失小鼠的 eNOS 功能和主动脉 NO 生物利用性

[0117] 本实例证明 FA 在恢复 eNOS 功能方面高度有效。向小鼠输注 Ang II 达 4 周 (n = 6), 而在 Ang II 输注前 2 天且在整个研究期内用叶酸以 15mg/kg/天经口治疗平行组 (n = 6)。还包括一组未治疗的 apoE 缺失小鼠 (n = 6)。在基线下, eNOS 抑制剂 L-NAME 最低程度地减少超氧化物产生量, 从而暗示 eNOS 的微小解偶联 / 功能障碍。Ang II 输注显著地增加 L-NAME 敏感性超氧化物产生量, 所述产生量可通过经口投与 FA 完全消除。总之, 这些数据指示 FA 在通过恢复主动脉和循环 H₄B 水平来恢复 eNOS 功能方面高度有效, 如图 9 和 10 中所示, 且通过这些机理, FA 阻止输注 Ang II 的 apoE 缺失小鼠 (广泛认可的经典 AAA 模型) 形成 AAA (图 11)。图 13 一致地证明通过 FA 治疗因恢复 eNOS 功能也显著地改进一氧化氮 (NO) 生物利用性。

[0118] 表: 动脉瘤在 apoE 缺失小鼠中的发生率

[0119]

	AAA	AAA 数	总数	发生率
apoE+Ang II	24	2	26	92.3%
apoE+Ang II+FA	4	20	24	16.7%

[0120] 通过电子自旋共振 (ESR) 定量地且选择性地测量主动脉生物可利用的一氧化氮 (NO) 自由基。与 FA 使输注 Ang II 的 apoE 缺失小鼠的 eNOS 完全再偶联的发现一致 (图 12), 通过 FA 治疗也显著改进主动脉一氧化氮 (NO) 生物利用性。上图 (图 12A) 显示 NO 的代表性 ESR 谱。下图 (图 12B) 显示主动脉 NO 水平的分组数据 (n = 6)。这些数据进一步支持 H₄B 的循环 / 血浆水平的升高实际上不仅与主动脉 H₄B 水平 (图 9 和 10) 相关, 而且还与 AAA 发生率的降低 (图 11) 以及 eNOS 功能和 NO 生物利用性的改进 (图 12 和 13) 相关。

[0121] 根据上文应了解, 尽管本文已出于说明目的描述了本发明的具体实施例, 但可以在不脱离本发明的精神和范围的前提下做出各种修改。因此, 本发明不受除所附权利要求书以外的任何限制。

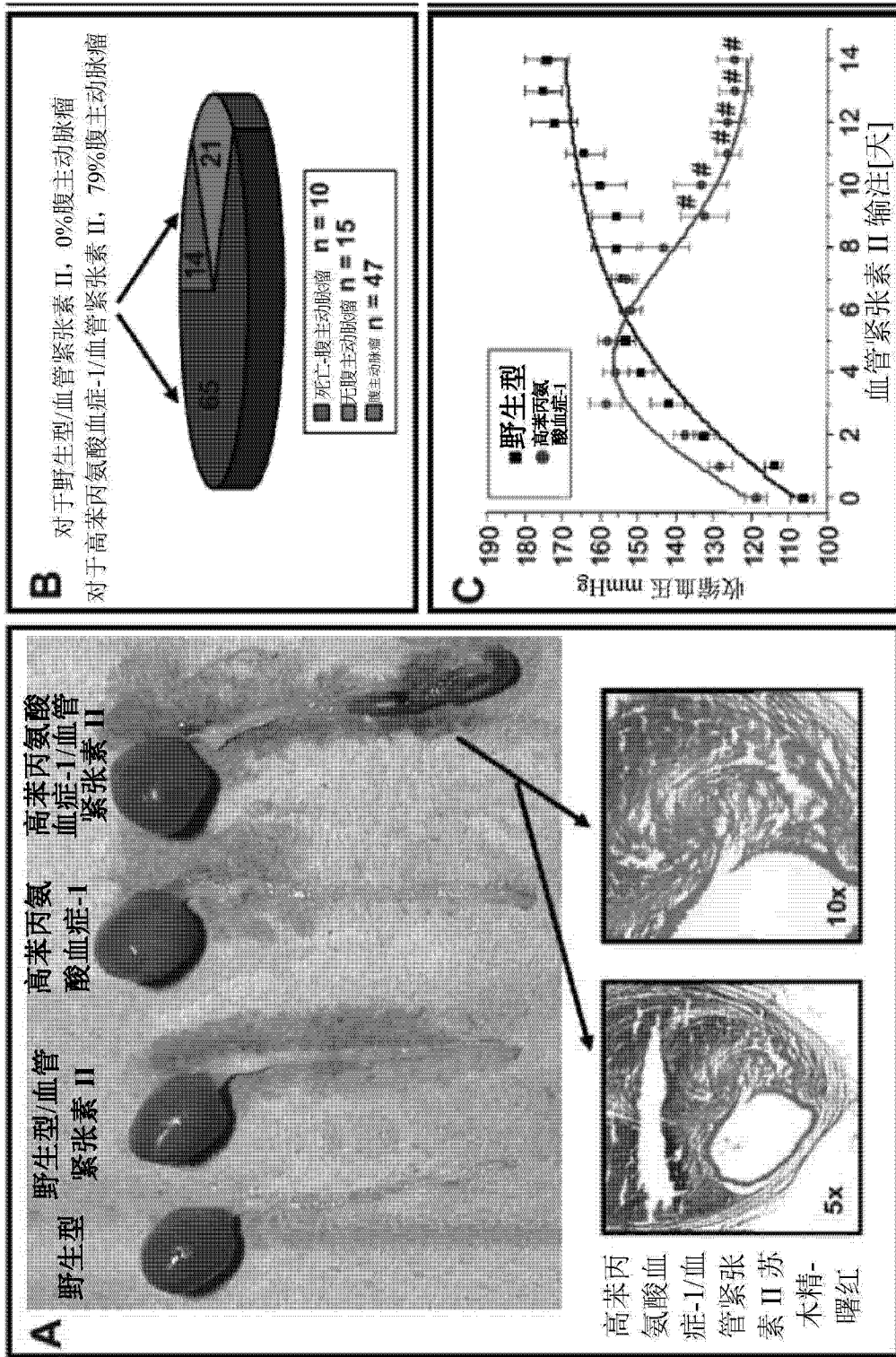


图 1A-1C

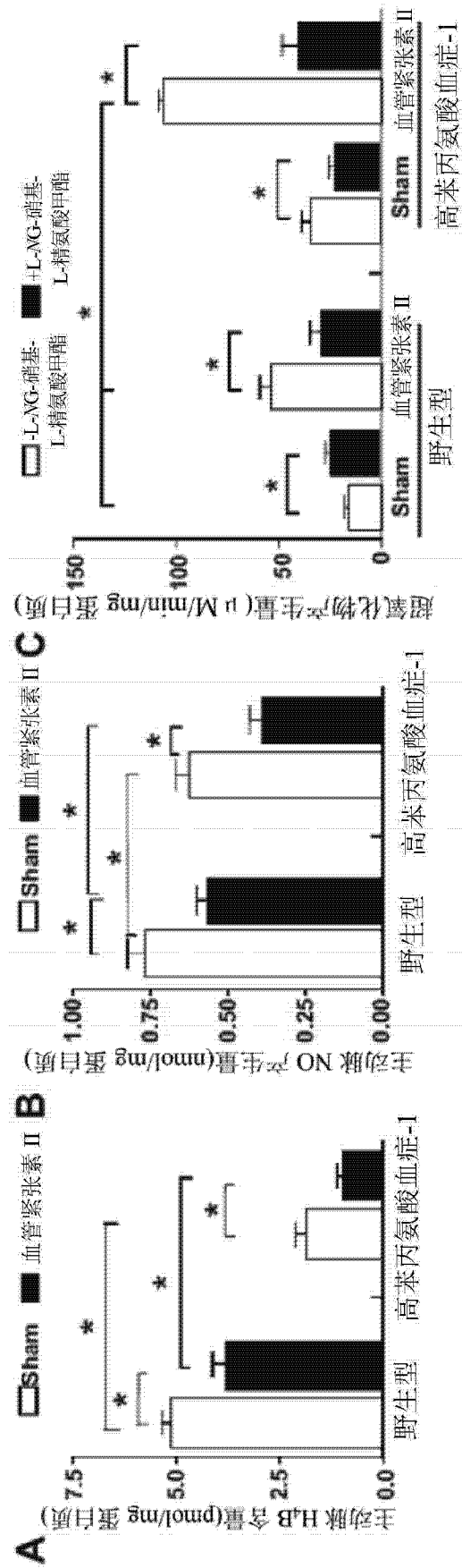


图 2A-2C

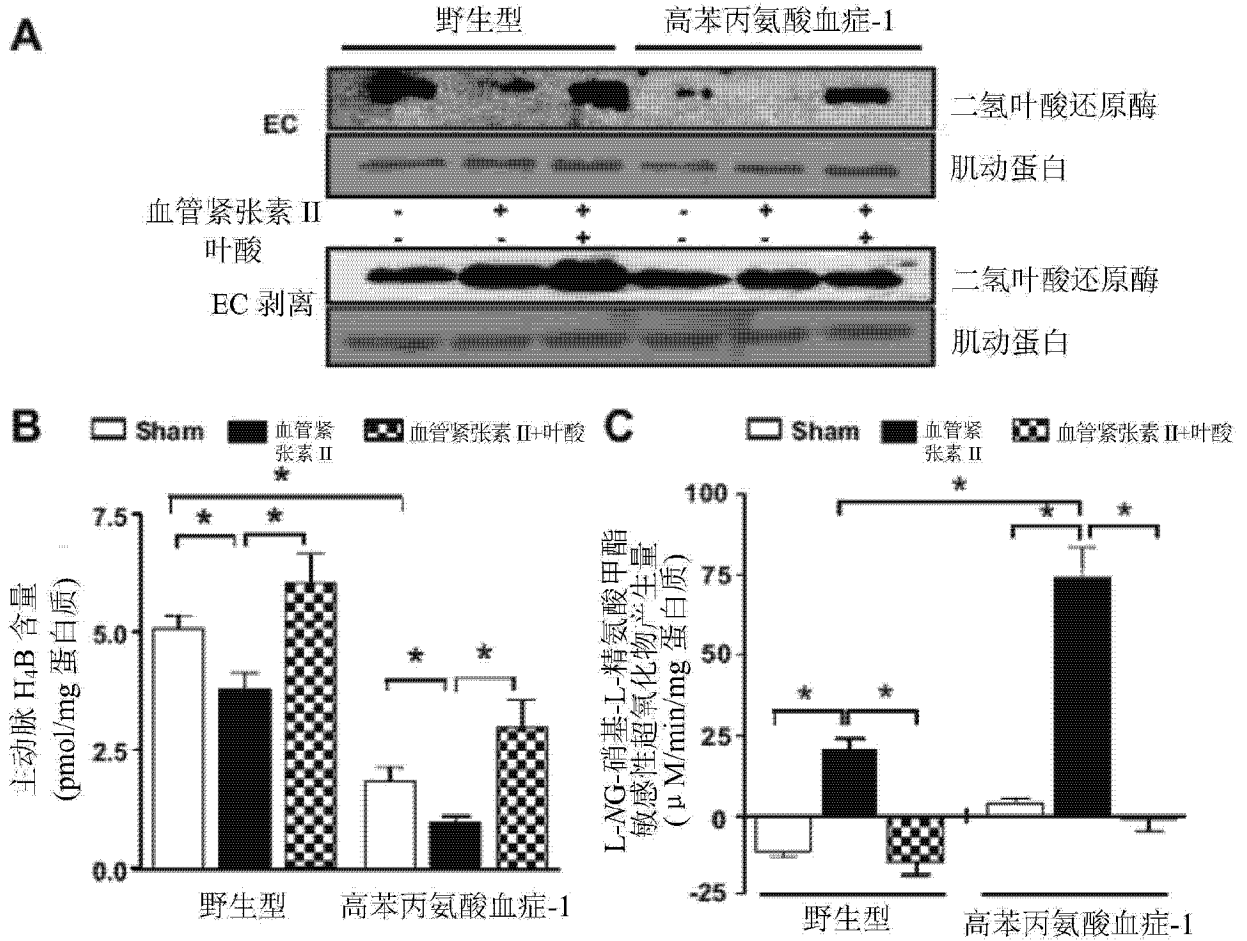


图 3A-3C

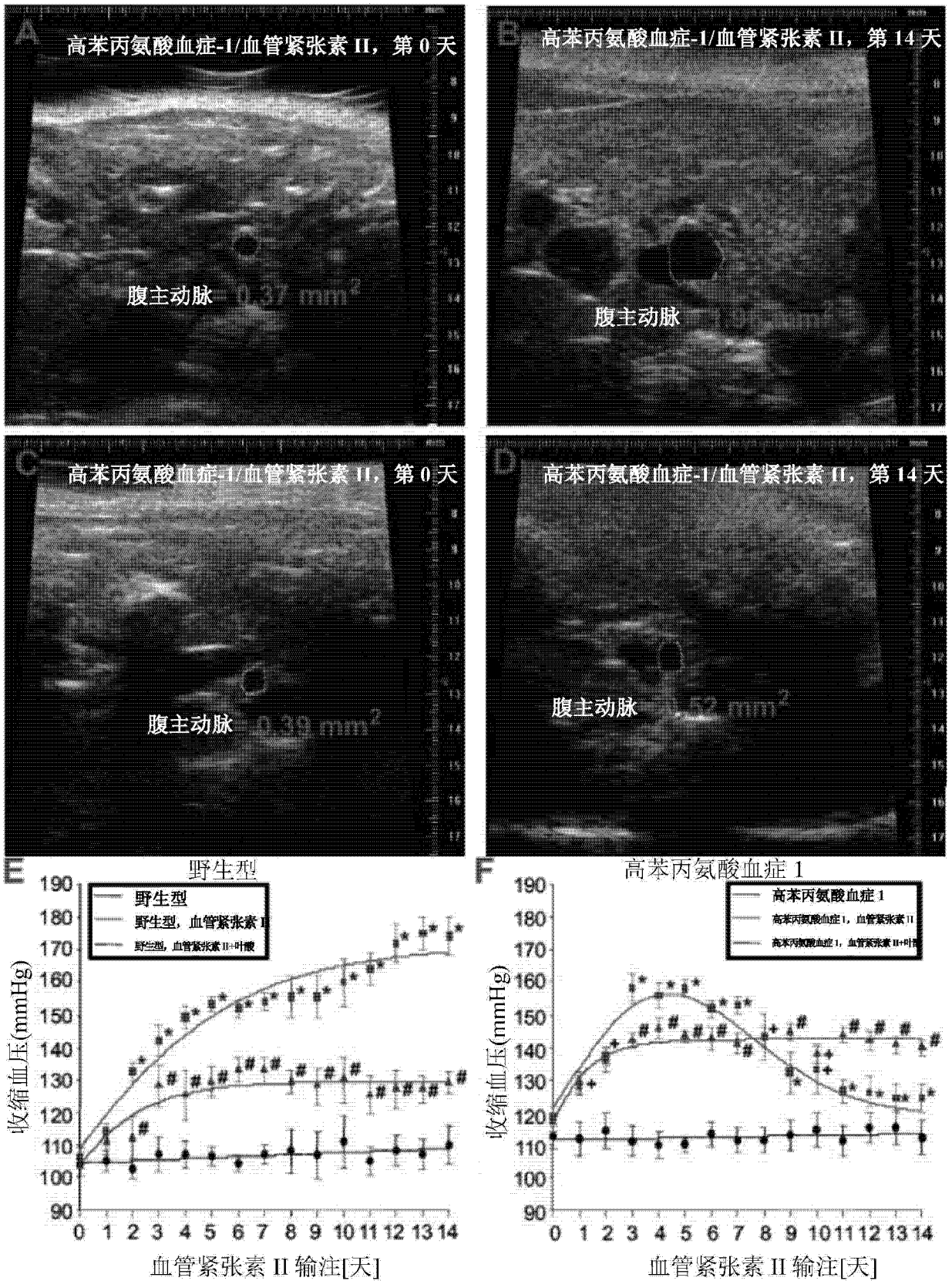


图 4A-4F

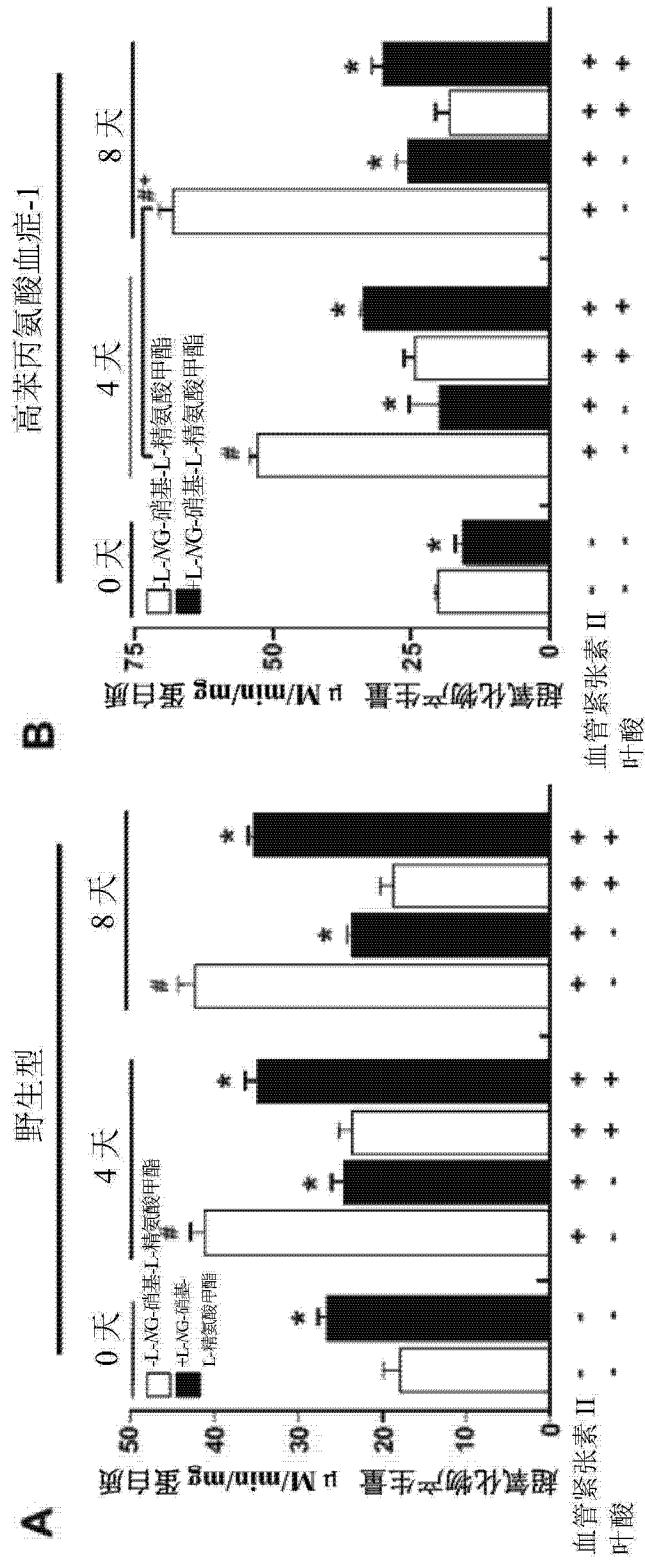


图 5A-5B

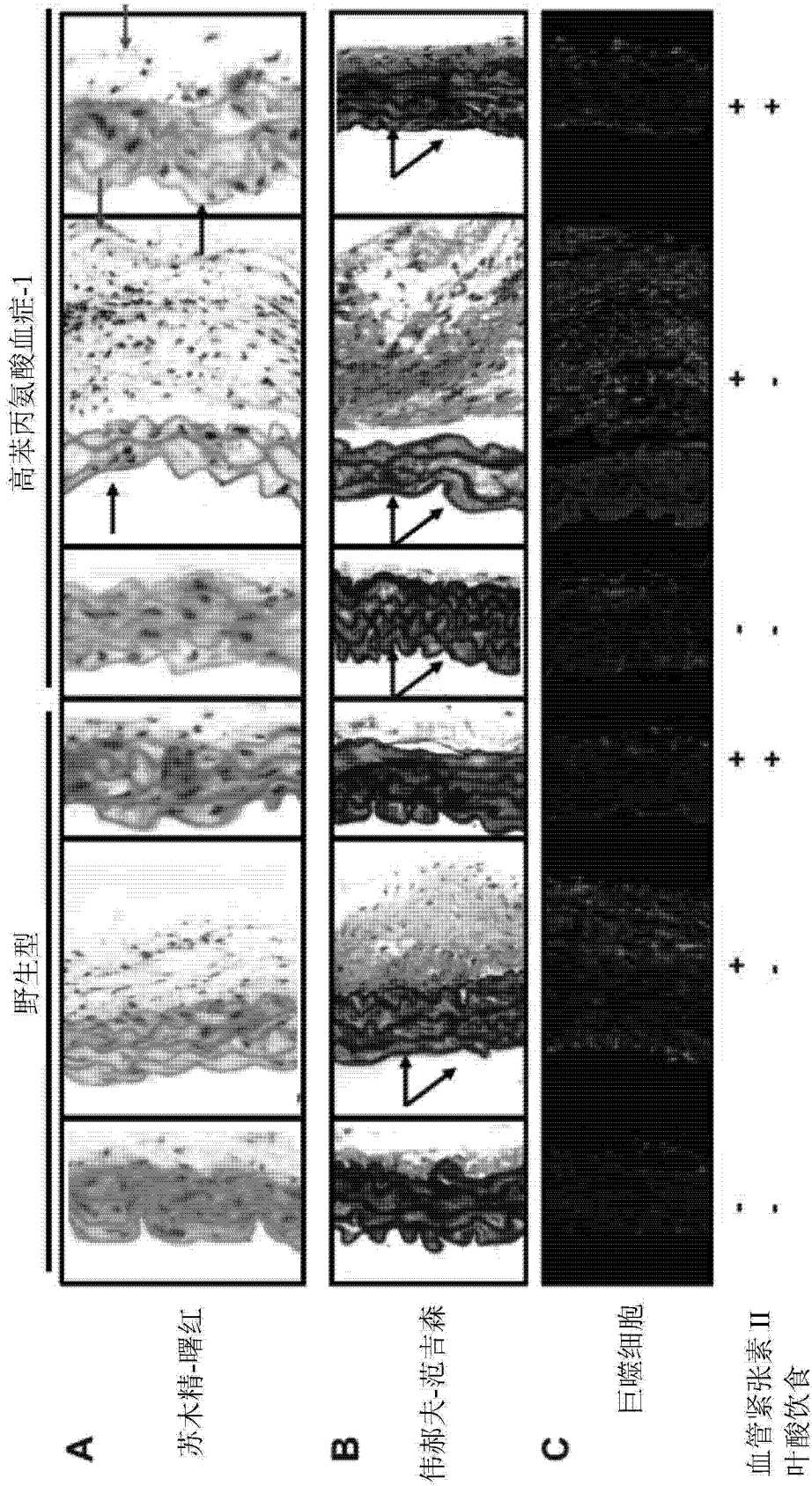


图 6A-6C

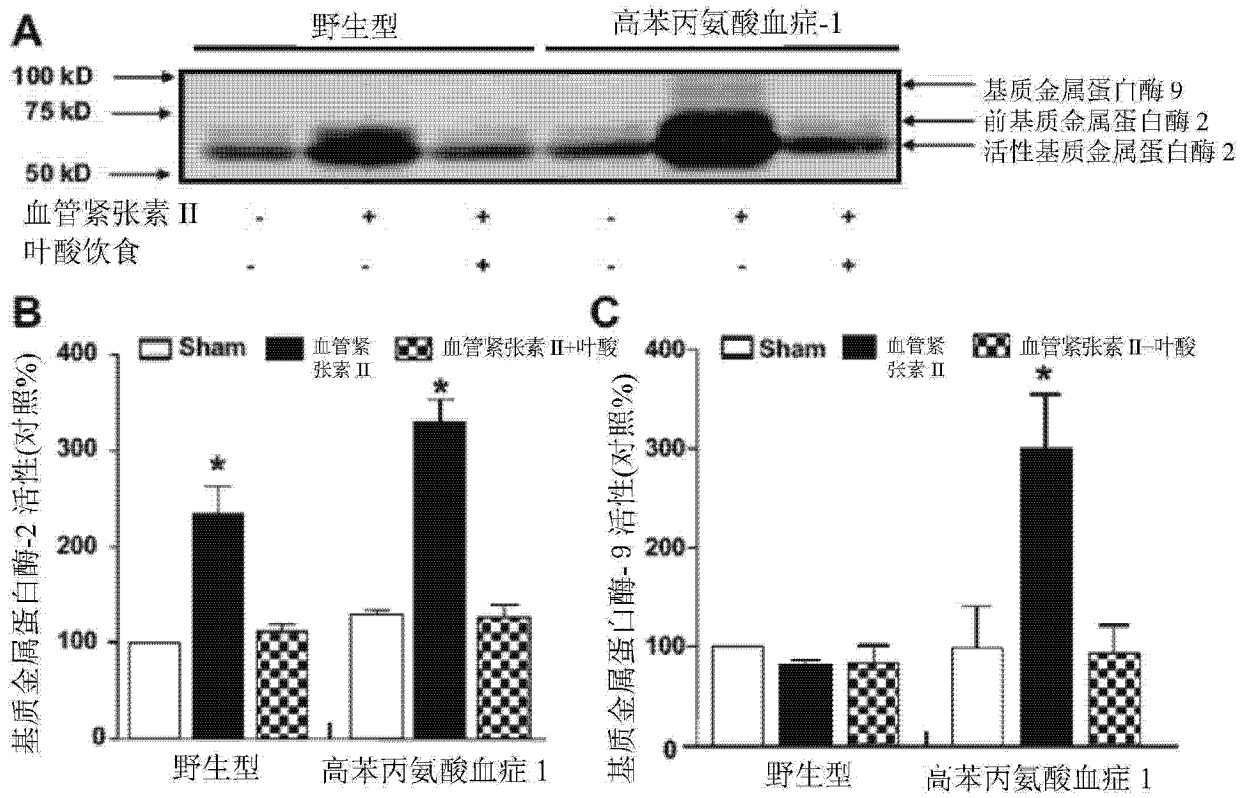


图 7A-7C

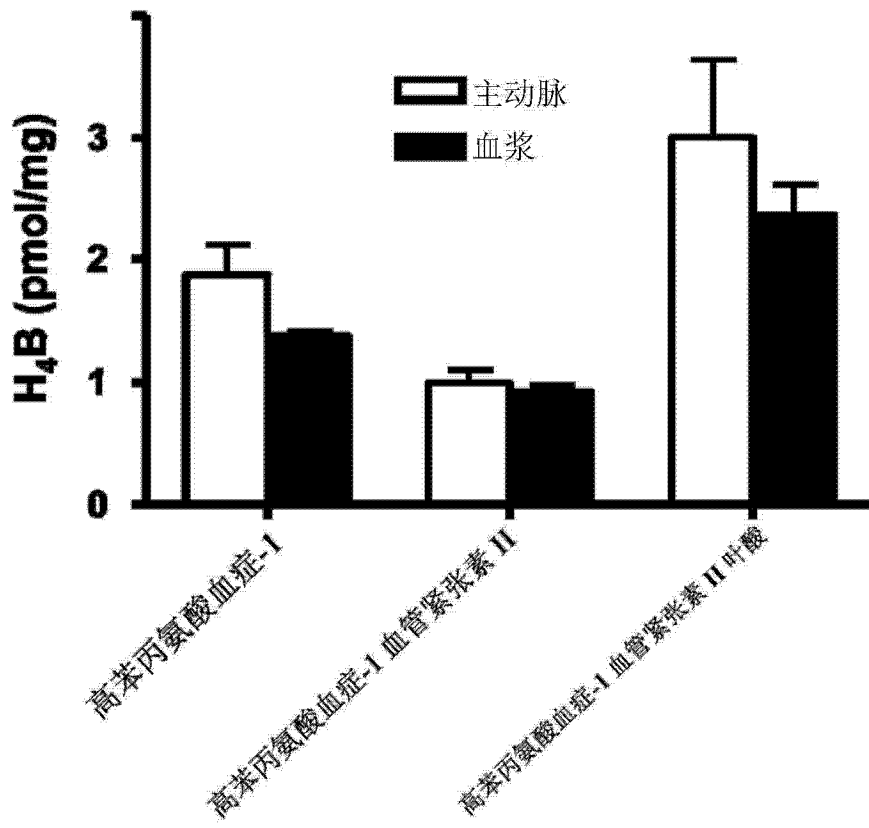


图 9A

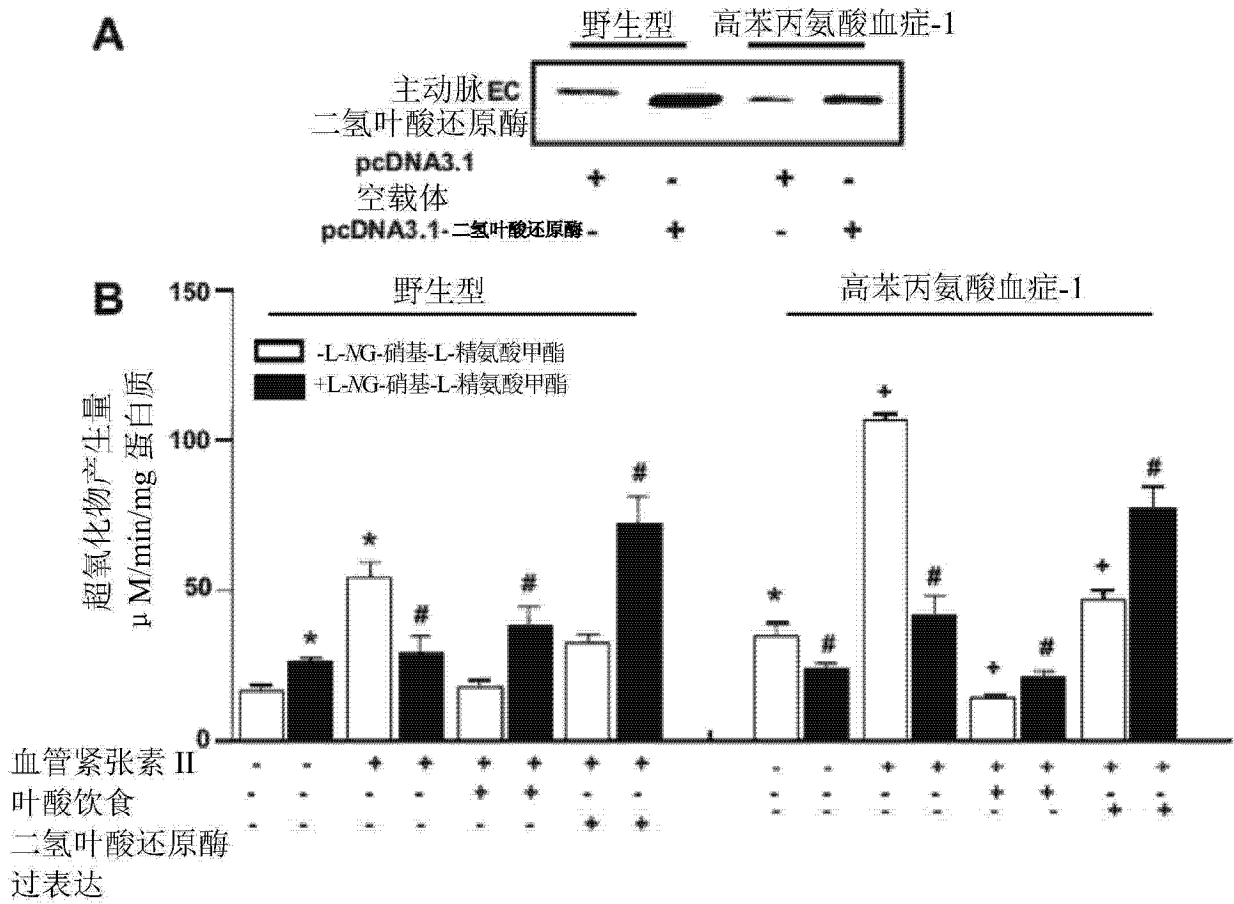


图 8A-8B

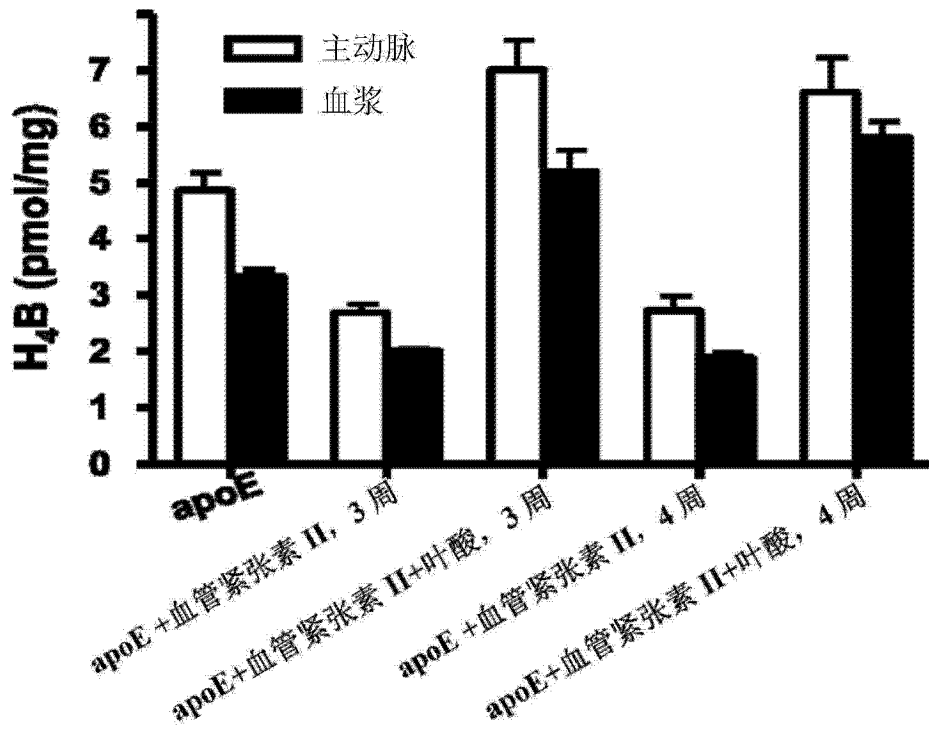


图 9B

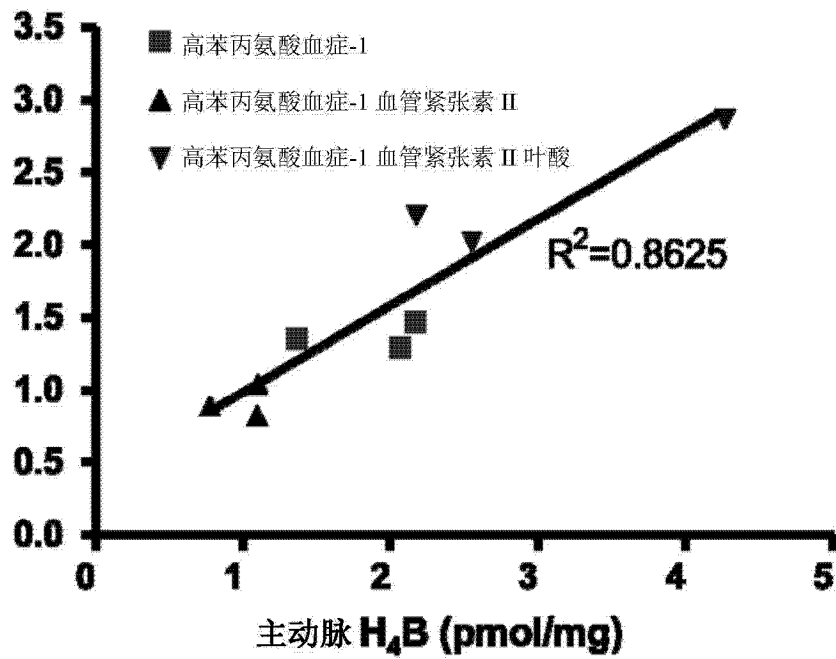


图 10A

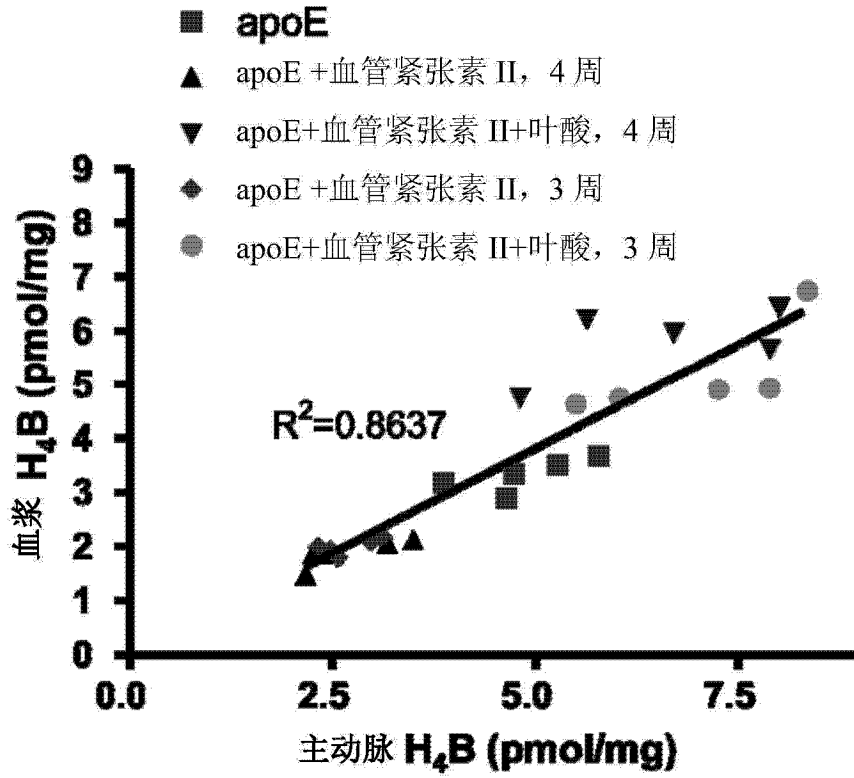


图 10B

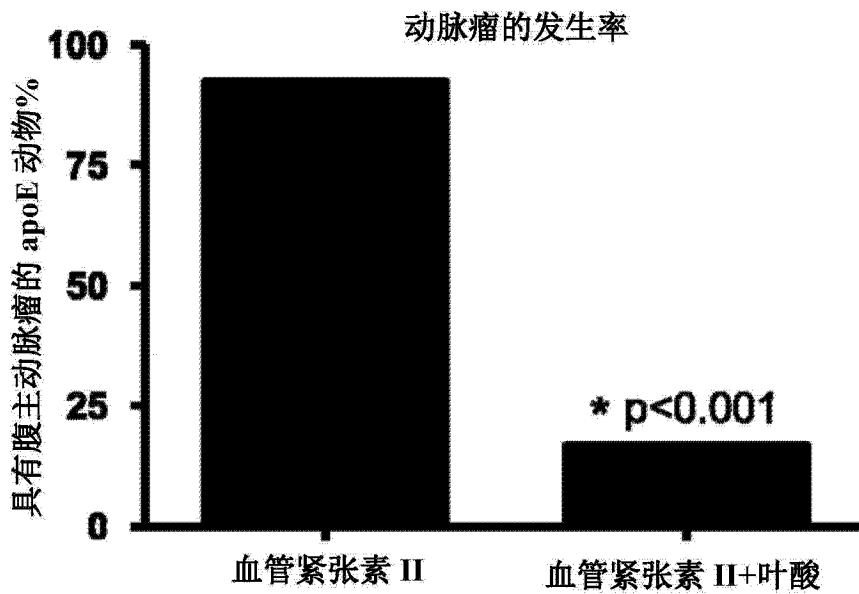


图 11

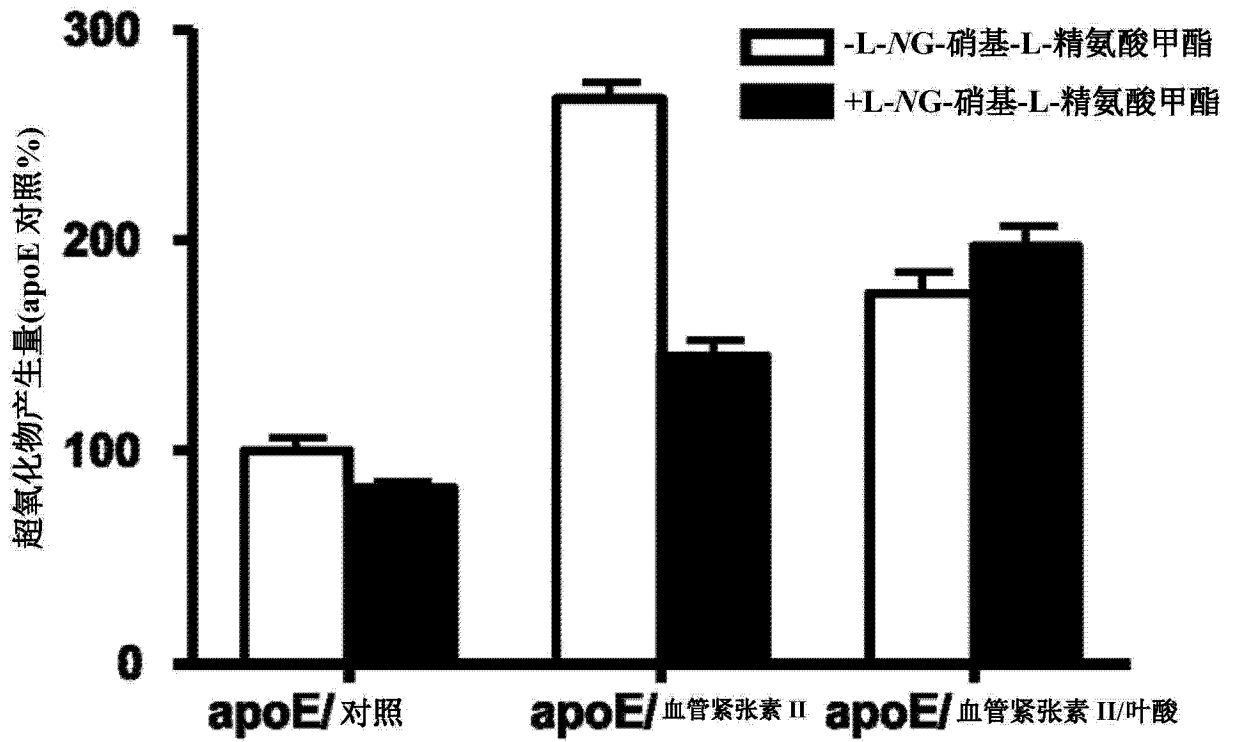


图 12

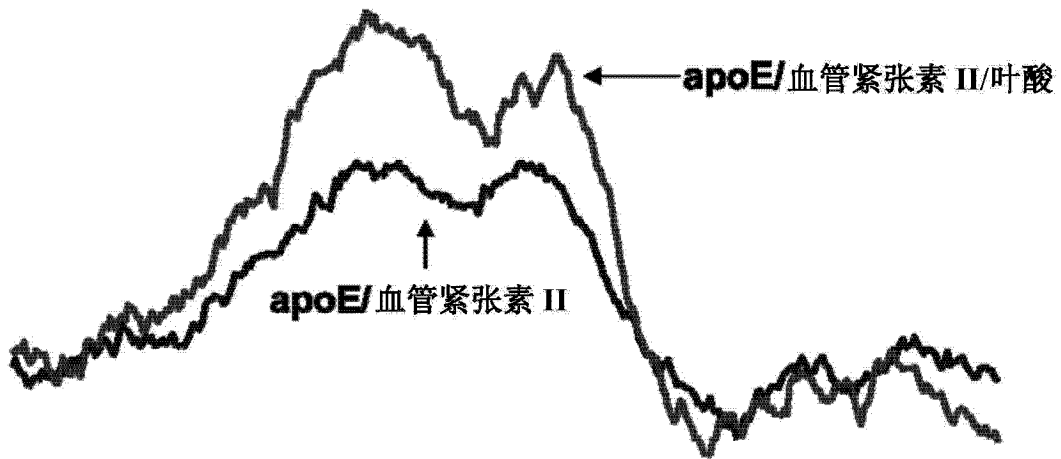


图 13A

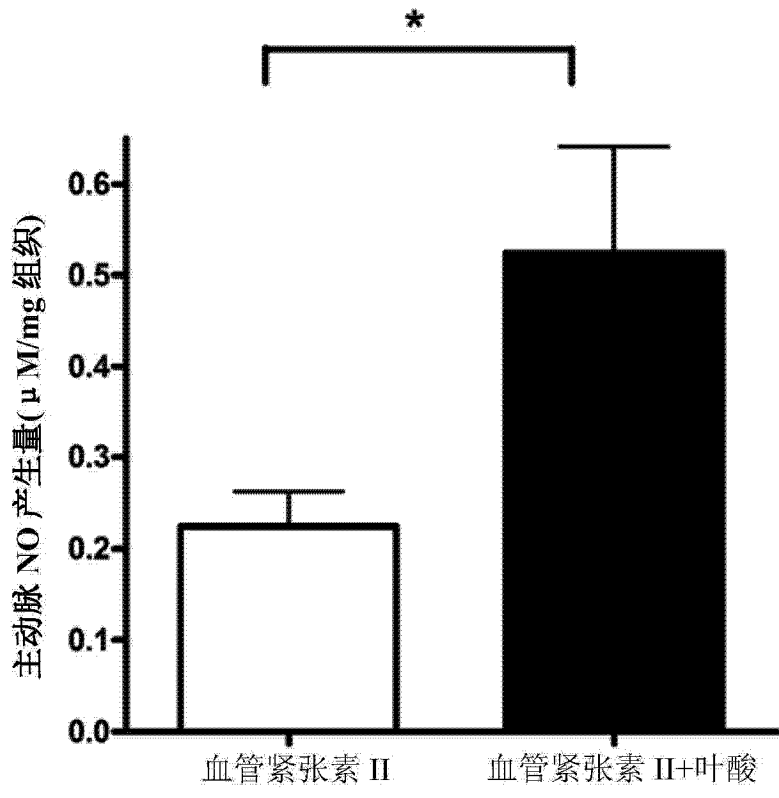


图 13B

专利名称(译)	用于腹主动脉瘤的生物标记物		
公开(公告)号	CN103988080A	公开(公告)日	2014-08-13
申请号	CN201280060568.1	申请日	2012-10-11
[标]申请(专利权)人(译)	加利福尼亚大学董事会		
申请(专利权)人(译)	加利福尼亚大学董事会		
当前申请(专利权)人(译)	加利福尼亚大学董事会		
[标]发明人	才华		
发明人	才华		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N2800/50 G01N2800/56 G01N2800/329 G01N33/6893 C12Q1/008 G01N33/5735 C12Q1/37 Y10T436/147777		
优先权	61/545975 2011-10-11 US		
其他公开文献	CN103988080B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及检测个体的腹主动脉瘤AAA或对AAA的易感性的方法、监测个体的AAA的治疗功效的方法和评估个体的AAA的严重程度或AAA的风险的方法，所述方法涉及测量测试样品中存在的四氢生物喋呤H4B的量并且将其与标准物或先前测试样品中存在的H4B的量进行比较。所述测试样品中存在的H4B的量与所述标准物相比降低指示AAA或对AAA的易感性。可在第二时间点之前向所述个体投与治疗，且第二测试样品中存在的H4B的量与所述第一测试样品相比增加指示AAA的有效治疗。可鉴别出候选者用于进一步测试或监测AAA和/或治疗AAA。

