

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/53 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680029355.7

[43] 公开日 2008 年 9 月 17 日

[11] 公开号 CN 101268370A

[22] 申请日 2006.6.13

[21] 申请号 200680029355.7

[30] 优先权

[32] 2005. 6. 13 [33] US [31] 60/689,806

[86] 国际申请 PCT/US2006/023020 2006. 6. 13

[87] 国际公布 WO2006/135893 英 2006. 12. 21

[85] 进入国家阶段日期 2008. 2. 13

[71] 申请人 CIS 生物科技公司

地址 美国乔治亚洲

[72] 发明人 S·A·丹比诺瓦

[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 5 页 说明书 29 页 附图 4 页

[54] 发明名称

基于 NR2 肽诊断和治疗脑血管事件的方法

[57] 摘要

本发明提供用于诊断和治疗脑血管事件和用于界定事件的时间和解剖定位的方法和试剂盒，其基于在生物流体中检测和定量结合 NR2 肽或总 NR2 肽和未结合 NR2 肽。所述方法任选与神经病学评分和神经成像联合实施，其涉及在急诊室急救基础上对 TIA 和卒中的风险评估、预后、诊断和治疗。

1. 用于测定神经功能障碍的病理起源的方法，其包括：
 - a) 提供患有神经功能障碍的患者；
 - b) 检测和定量来自所述患者的生物流体中结合 NR2 肽或总 NR2 肽，以得到结合 NR2 肽或总 NR2 肽的量；和
 - c) 将所述结合 NR2 肽或总 NR2 肽的量与明显健康的人类对象的所述生物流体中结合 NR2 肽或总 NR2 肽的群体标准比较。
2. 权利要求 1 的方法，其中血液中所述总 NR2 肽的所述群体标准为约 2.0ng/ml 或更低。
3. 权利要求 1 的方法，其进一步包括：
 - a) 检测和定量来自所述患者的生物流体中未结合 NR2 肽，以得到未结合 NR2 肽的量；和
 - b) 将所述未结合 NR2 肽的量与明显健康的人类对象的所述生物流体中未结合 NR2 肽的群体标准比较。
4. 权利要求 3 的方法，其中血液中所述未结合 NR2 肽的所述群体标准小于约 1.0ng/ml。
5. 权利要求 3 的方法，其进一步包括：
 - a) 通过用所述总 NR2 肽的所述量除以所述未结合 NR2 肽的所述量，来计算总 NR2 肽:未结合 NR2 肽的比率；
 - b) 使总 NR2 肽:未结合 NR2 肽的比率小于 2:1 并且未结合 NR2 肽的量大于 1.0ng/ml 与原发性神经血管事件相关联；和
 - c) 使总 NR2 肽:未结合 NR2 肽的比率大于 2:1 并且总 NR2 肽的量大于 2.0ng/ml 与复发性神经血管事件相关联。
6. 权利要求 3 的方法，其进一步包括：使小于 2.0ng/ml 的总 NR2 肽的量和小于 1.0ng/ml 的未结合 NR2 肽的量与脑血管系统中不存在缺血性事件相关联。
7. 权利要求 3 的方法，其进一步包括：再实施一次或多次实施

步骤(b)和(c), 并且将所述未结合 NR2 肽的量的变化与神经病学事件之间相关联, 将稳定在低于所述群体标准水平的未结合 NR2 肽的量与不存在神经病学事件相关联。

8. 权利要求 1 的方法, 其进一步包括通过计算机断层成像技术或磁共振/弥散加权成像对所述患者大脑进行神经成像。

9. 权利要求 1 的方法, 其中所述生物流体为血液、尿液、血浆、血清、脑脊髓液、唾液、汗液或脑组织或其衍生物。

10. 用于预测脑血管事件或然性的方法, 其包括:

- a) 提供有患脑血管事件风险的患者;
- b) 检测和定量来自所述患者的生物流体中结合 NR2 肽或总 NR2 肽, 以得到结合 NR2 肽或总 NR2 肽的量; 和
- c) 将所述结合 NR2 肽或总 NR2 肽的量与明显健康的人类对象的所述生物流体中结合 NR2 肽或总 NR2 肽的群体标准比较。

11. 权利要求 10 的方法, 其中血液中的所述总 NR2 肽的所述群体标准为约 2.0ng/ml 或更低。

12. 权利要求 10 的方法, 其进一步包括:

- a) 检测和定量来自所述患者的生物流体中的未结合 NR2 肽, 以得到未结合 NR2 肽的量; 和
- b) 将未结合 NR2 肽的所述量与明显健康的人类对象的所述生物流体中未结合 NR2 肽的群体标准比较。

13. 权利要求 12 的方法, 其中血液中所述未结合 NR2 肽的所述群体标准小于约 1.0ng/ml。

14. 权利要求 10 的方法, 其中所述患者预定进行外科手术。

15. 用于检测和定量生物样品中结合 NR2 肽或总 NR2 肽的检测试剂盒, 其包括:

- a) 包含能特异性结合测试样品中 NR2 肽的抗体的抗体试剂;
- b) 蛋白去垢剂; 和
- c) 指示剂试剂。

16. 权利要求 15 的检测试剂盒, 其进一步包括作为对照或校准物的合成 NR2 肽。

17. 用于检测和定量生物样品中结合 NR2 肽或总 NR2 肽的方法, 其包括:

a) 让生物样品与蛋白去垢剂接触, 以得到变性的生物样品;

b) 让所述变性的生物样品与包含能特异性结合测试样品中 NR2 肽的抗体的抗体试剂接触足够时间, 以使所述 NR2 肽和所述抗体之间形成结合复合物; 和

c) 检测和定量所述结合复合物。

18. 权利要求 17 的方法, 其中所述生物样品为稀释到约 1:50 比率的血浆。

19. 权利要求 17 的方法, 其中所述去垢剂为 0.1-0.5% 的十二烷基硫酸钠或 KCl。

20. 权利要求 17 的方法, 其中:

a) 所述抗体试剂包含缀合有凝集载体的抗体; 和

b) 基于凝集程度检测和测量所述复合物。

21. 权利要求 17 的方法, 其中所述足够时间为 5 分钟或更短。

22. 权利要求 17 的方法, 其通过直接 ELISA、RIA、免疫斑点、免疫印迹法、胶乳凝集、侧流免疫层析法、荧光偏振测定法或微阵列来实施。

23. 权利要求 17 的方法, 其中所述检测和定量包括:

a) 通过以下方法由信号产生化合物产生信号:

i) 让所述复合物与包含连接有所述信号产生试剂的 IgG 的第二抗体试剂接触, 以形成第二复合物, 或

ii) 让所述复合物与包含 IgG 的第二抗体试剂接触, 形成第二复合物, 随后将所述信号产生试剂连接到所述 IgG; 和

b) 测量所产生的信号; 其中所测量的信号量与所述样品中所述 NR2 的存在情况有相关性。

24. 权利要求 17 的方法，其中所述 IgG 包含鸡抗人 IgG 或抗人 IgG，所述指示剂试剂包含辣根过氧化物酶。

25. 诊断和治疗脑缺血的方法，其包括：

a) 提供患有神经功能障碍的患者；

b) 检测和定量来自所述患者的生物流体中的 NR2 肽，以得到 NR2 肽的第一量；

c) 将 NR2 肽的所述第一量与明显健康的人类对象的所述生物流体中 NR2 肽的群体标准比较；

d) 若所述 NR2 肽的所述第一量高于明显健康的人类对象的所述生物流体中 NR2 肽的群体标准，则将 tPA 给予所述患者；

e) 若所述 NR2 肽的所述量低于明显健康的人类对象的所述生物流体中 NR2 肽的群体标准，则不将 tPA 给予所述患者。

26. 权利要求 25 的方法，其中分别检测和定量结合 NR2 肽和未结合 NR2 肽，以得到结合 NR2 肽或总 NR2 肽和未结合 NR2 肽的量，并将所述结合 NR2 肽或总 NR2 肽和未结合 NR2 肽的所述量与明显健康的人类对象的所述生物流体中结合 NR2 肽或总 NR2 肽和未结合 NR2 肽的群体标准比较。

27. 权利要求 25 的方法，其中血液中所述结合 NR2 肽的所述群体标准小于约 2.0ng/ml。

28. 权利要求 25 的方法，其中血液中所述未结合 NR2 肽的所述群体标准小于约 1.0ng/ml。

29. 权利要求 25 的方法，其进一步包括：

a) 评估所述患者的急性面瘫、上肢下移或言语功能障碍；

b) 若观察到所述急性面瘫、上肢下移或言语功能障碍，并且所述 NR2 肽的所述量高于明显健康的人类对象的所述生物流体中 NR2 肽的群体标准，则将 tPA 给予所述患者；和

c) 若未观察到所述急性面瘫、上肢下移或言语功能障碍，并且所述 NR2 肽的所述量低于明显健康的人类对象的所述生物流体中 NR2

肽的群体标准，则不将 tPA 给予所述患者。

30. 权利要求 25 的方法，其进一步包括：

a) 第二次检测和定量来自所述患者的生物流体中的 NR2 肽，以得到 NR2 肽的第二量；

b) 将所述 NR2 肽的第二量与所述第一量比较；和

c) 若所述第二量大于所述第一量，则将 tPA 第二次给予所述患者；和

d) 若所述第二量不大于所述第一量，则不将 tPA 第二次给予所述患者。

基于 NR2 肽诊断和治疗脑血管事件的方法

与在先申请的关系

根据 35 U.S.C. § 119(e), 本申请要求于 2005 年 6 月 13 日提出的美国专利临时申请第 60/689,806 号的优先权。

发明领域

本发明涉及基于在生物流体中结合 NR2 肽或总 NR2 肽和未结合 NR2 肽的检测和定量, 诊断和治疗脑血管事件和用于界定事件的时间和解剖定位的方法和试剂盒。所述方法任选与神经病学评分和神经成像联合实施, 其涉及在急诊室和初级监护设置的急救基础上对 TIA 和卒中的风险评估、预后、诊断和治疗。

发明背景

脑血管意外和短暂缺血性发作

短暂缺血性发作预示着显著的未来卒中风险和其关联的发病率和死亡率。需要进一步评估短暂缺血性发作患者以评定任何可能可逆的潜在疾病进程。尽管该疾病进程有显著影响, 但关于对在急诊科就诊的这样的患者的早期评估和处理仍没有权威性的指导。美国心脏学会卒中委员会声明, 关于 TIA 患者转为住院病人的评价理由没有预期的数据。他们议定: “关于患者是否住院的决定应视该患者的个体详情而定。” 在初步评价这样的患者为住院病人还是门诊病人的基本原则方面, 存在相当多的地方实践变化。对住院病人护理的基本原则是迅速得到诊断研究、评估未来事件的风险、监控患者复发或恶化的症状并开始任何所需的干预, 包括手术治疗。目前对 TIA 患者的评估和治疗建议已有充分阐述。工作指南提出了一套实验室检测和辐射学研究, 连同关于医药治疗和手术治疗的建议。

出现在急诊科、具有提示 TIA 的症状的某些患者亚群似乎在短期内有很大的完全性卒中风险。在最近基于急诊科、包括 1707 位出现提示 TIA 的症状的患者的群组观察研究中, 10.5% 的患者在 90 天内发生卒中。值得注意的是, 那些患者中有一半是在最初 2 天内发生卒中。Johnston 等回顾性地确定了 90 天内卒中的 5 个独立的风险因子(年龄 >60、糖尿病、症状持续时间 >10 分钟、肢体无力、言语功能障碍(speech impairment))。通过综合所述独立的风险因子, 确定了在短期内卒中的最低(0%)到最高(34%)风险亚群。

作为门诊病人, 这样的高风险患者不可能在短于 48 小时内受到完全的诊断评估并执行合适的治疗方案(医药或手术)。另外, 对疑似 TIA 的病人的诊断确定性的程度使决定过程进一步复杂。短暂缺血性发作是一种临床诊断, 关于该诊断的观察者间可靠性通常很差。因此, 在很多医疗机构的现行实践模式设置中, 某些没有真正神经科疾病的患者和其他可能应当接受门诊病人评估的患者一起被纳入。哨兵 TIA (sentinel TIA) 的辨别在数天内发生完全性卒中之患者的一系列风险因子的预测性确认, 将使得可得出临床预测标准。这使得可以辨别在近期内处于高风险需要入院的患者, 以及可安全放走以作为门诊病人评估的患者。这样的“卒中风险分层”将允许对有最高短期风险的患者进行更强的干预。

目前可选择的卒中诊断方法

医疗界有几种技术来诊断卒中。尽管有很多技术, 但这些技术中没有一个能够预测卒中或直接诊断心脑血管异常或 TIA/卒中。在卒中治疗领域, 所有医师赖以生存的格言是“时间就是大脑”。

美国国家神经疾病和卒中研究院(The National Institute of Neurological Disorders and Stroke, NINDS)推荐以下用于管理缺血性卒中的时间工作指南:

从进门到医师	10 分钟
从进门到神经科会诊	15 分钟
从进门到 CT 完成/解释	45 分钟
从进门到溶血栓治疗	60 分钟
从进门到神经外科会诊	2 小时

大医院急诊科有多种用于诊断卒中的选择。超过 90%的拥有 200 个床位以上的医院能够使用 CT 扫描仪，使其能够快速(<15 分钟)评价潜在的卒中患者以排除出血性卒中和类卒中(stroke mimics)。理论上 CT 能够肯定地确定 100%的软组织和 85-97%的蛛网膜下出血，然而，识别缺血性和出血性的总准确度被诠释为 67 - 83%。

大部分医院现在都有磁共振成像(MRI)能力。然而，MRI 扫描需要较长的时间窗成像。目前 MRI 并不能在 6 小时之前很容易地辨别出血性卒中，因此并不被认为是主要的诊断形式。一种相对新的技术 - 弥散加权磁共振成像(DWI)，可迅速检测高 TIA 风险患者的灌注降低。初始数据发现 DWI 预测短于 10 分钟的缺血性变化。在 30 - 60 秒的扫描仪时间内可得到扫描结果。尽管这些成像技术很有效，但每一种都受到高资本成本和高保养需求的限制。另外，它们需要经过专门训练的技术人员来操作和解释结果。

其它技术，包括多普勒超声诊断仪、单光子发射计算机断层成像技术、氩计算机断层成像技术、CT 血管造影和 MR 灌注成像，因其缺乏整体诊断方法或由于其为当前技术的早期阶段而一直被忽略。

在急诊科，目前没有通过诊断急性脑血管意外、TIA 和缺血性卒中和排除类卒中来符合这些未满足的诊断需求的可用的血液检测。

作为 TIA/卒中的生物标志物的脑 NR2 肽和抗体

大部分涉及中枢神经系统标记物的研究来自脑损伤或心胸文献。然而，脑局部缺血最重要的标记物是 NMDA 受体，其涉及成为脑缺血基础的神经毒性级联。

兴奋性氨基酸(EAA)在卒中期间起着重要作用。脑缺血诱导谷氨酸释放,并激活 EAA 受体。业已报道阻断谷氨酸释放或阻断其与 EAA 受体的相互作用可减轻脑损伤。N-甲基-D-天冬氨酸受体(NMDAR)是配体-门控 EAA 离子通道复合物的成员,其含有 NR1、NR2 和 NR3 亚单位。在这些亚单位中,业已报道 NR2 涉及几种神经疾病,包括局部缺血和缺氧。NR2 亚单位由 4 个不同亚型(NR2A-2D)组成,其由不同基因编码。在大脑皮层和海马中发现 NR2A 和 NR2B 二者,而 NR1 在位于大脑和周围器官的所有 NMDAR 复合物中普遍存在。

在局部缺血期间过度刺激谷氨酸受体诱导过多的 Ca^{2+} 流入,激活凝血酶活化的丝氨酸蛋白酶,其促进细胞膜上的 NMDAR 的外部 N-末端区裂解。通过受损的血脑屏障转运到血流的 NMDAR 之 N-末端肽片段,可能起“外源”抗原的作用,从而启动免疫应答,在血液中产生抗体。然而,血液中 NR2 肽/抗体的时程和脑中 NR2 mRNA 表达之间的相互作用尚不清楚。

最近,业已提议将 NMDAR 肽和其抗体用于治疗卒中和癫痫症(During 等, *Science*, 2000, 287: 1453-60), 并作为构成脑缺血和卒中基础的神经毒性的生物标志物(Dambinova SA 等, *Stroke* 2002; 33: 1181-1182; Dambinova SA 等, *Clin Chem* 2003; 49: 1752-1762)。随着神经元死亡或局部缺血, NMDA 受体的 NR2 肽片段脱落并出现在血流中,产生抗体应答。Dambinova 等业已报道在血液样品中可检测到所述肽片段和抗体二者(Dambinova SA 等, *Stroke* 2002)。他们进一步报道,已患急性缺血性卒中的成年患者具有高血液 NR2 肽/Ab 水平,该水平与通过脑扫描(MRI)和神经认知检测所显示的脑损伤程度相关(Dambinova SA 等, *Clin Chem* 2003; 49: 1752-1762)。

在急性管理脑血管意外、TIA 和卒中患者中, NR2 肽和抗体可具有诊断以及预测效用。评估在急性环境中是否存在这样的标记物可改进诊断/预后的准确度以及确定继发卒中风险增加的患者。

发明目的

在全面卒中管理中，医疗界面临几种主要的诊断挑战，包括将缺血性脑发作与出血和卒中样疾病区别开，以及评估卒中或其它并发因子的风险。在本发明中，开发了用于检测结合 NR2 肽或总 NR2 肽和未结合 NR2 肽的血液测定法，其用于将脑血管意外(例如 TIA 和卒中)与脑出血和类卒中区分开。

因此，本发明的目的是检测未结合 NR2 肽，以评估如 DWI/MRI 所界定的急性脑血管意外和 TIA/卒中，以便更好地诊断、管理和治疗。

本发明的另一目的是检测结合 NR2 肽或总 NR2 肽，以便结合 NIHSS 评价和神经成像，准确诊断慢性 TIA 和卒中，排除卒中样病症。

本发明的再一目的是通过测量高于群体标准的结合 NR2 肽或总 NR2 肽和未结合 NR2 肽的增加浓度，来区别由 DWI 界定的新旧脑病变区和腔隙性卒中。

本发明的再一目的是基于未结合 NR2 肽和结合 NR2 肽或总 NR2 肽的浓度，帮助预测导致进展为完全性卒中的继发脑血管意外是否可能发生。

本发明的再一目的是根据未结合 NR2 肽和结合 NR2 肽或总 NR2 肽的浓度，帮助评估潜在 TIA 提示症状的严重程度。

本发明的另一目的是基于 DWI/MRI 和未结合 NR2 肽和结合 NR2 肽或总 NR2 肽的浓度/比率评价梗死区。

本发明的另一目的是提供用于实时评估 NR2 肽和抗体和比率的方法，以及用于确定及时神经保护治疗在患有脑血管意外或 TIA/卒中的患者中的治疗窗的方法。

本发明的再一目的是提供在鉴别处于近期内继发完全性卒中的高风险的患者中作为除神经观察和神经成像外的另外工具的诊断测定，其用于检测未结合 NR2 肽和结合 NR2 肽或总 NR2 肽。

发明概述

业已出乎意料地发现，与免疫球蛋白、白蛋白和血液中其它肽载体结合的循环 NR2 肽(下文为“结合 NR2 肽”)的水平(其不能用常规 NR2 检测试剂盒或检测方案检测)，提供供临床医生评估 TIA 和卒中和卒中样病症和作为这些脑血管事件之基础的脑损伤的有用诊断信息。这些结合 NR2 肽的检测和定量可用于诊断由血液循环不足或微栓子事件产生的脑病变的存在，可大大提高诊断的准确性和随后治疗的有效性，尤其是当其与其它诊断检测例如对未结合 NR2 肽的检测、NIHSS 评分和神经成像联合使用时。

在急诊室环境快速评估这些脑标记物将大大提高医师识别正患有急性脑血管事件例如 TIA 或卒中的患者的能力，帮助医师确定脑血管事件为缺血性事件、出血性卒中还是卒中样病症。在急诊室和每位医生的办公室里，应用脑标记物将有助于识别有缺血性卒中风险的患者，并帮助制定出神经保护方案。

业已用经实验确定，大于约 2.0ng/ml 的总 NR2 肽浓度(即结合的和未结合的肽)高于健康个体标准，预示不健康的脑血管状态，尤其是当其高于健康个体标准的未结合 NR2 肽水平(即大于约 0.5-0.6ng/ml)结合时。当评估患有神经功能障碍(neurological deficit)的患者时，比较总肽浓度和未结合肽浓度具有显著的诊断能力，确定作为基础的局部缺血是复发还是慢性病突发，或患者是否正在经历原发性脑血管意外。特别是，(1)总肽浓度大于约 2.0ng/ml 和(2)总肽:未结合肽比率大于约 2:1 的组合，与复发事件有很好的关联性，尤其是当与未结合肽浓度小于约 2.0、1.0、0.8、0.6 或 0.5ng/ml 组合时。相比之下，(1)未结合肽浓度大于约 1.0 ng/ml 和(2)总肽:未结合肽比率小于约 2:1 的组合，与原发事件有很好的关联性，尤其是当与总肽浓度小于约 3.0 或 2.0ng/ml 组合时。

再者，这些相关性可广泛用于选择急救治疗，例如在短时间期限内抗血小板治疗或神经保护治疗。所述生物标志物分布型(profile)提供

实时脑血管意外证据,循环总 NR2 肽浓度的降低与所选治疗的积极效果有很好的相关性。当评估脑血管意外或 TIA 时以及在识别近期内有继发 TIA 或完全性卒中的高风险的患者时,在初级监护环境中也可采用本发明方法。另外,可基于显示患 TIA 或卒中风险增加的结果,给予预防治疗,并用本发明方法监测治疗的效力。

本发明另外的优势将部分在以下的说明中提出,部分根据所述说明中将显而易见,或可通过实行本发明而得知。借助在所附权利要求书中具体指出的要素和组合,将实现并获得本发明优势。应该理解,前文的概述和下文的详述皆仅为举例和解释性的,并非限制所要求保护的发明。

附图说明

和说明书结合在一起并构成本说明书部分的附图阐明了本发明的几种实施方案,其连同说明用于解释本发明的原理。

图 1 为本发明实施例中所研究患者(n=40)的血浆中未结合 NR2 肽的分布图示。

图 2 为本发明实施例中所研究患者(n=40)的血浆中总 NR2 肽的分布图示。

图 3 为用图解法表示在急诊室环境中对出现 TIA 和/或卒中症状的患者建议的标准护理的流程图。

图 4 为当诊断卒中发生和严重程度时用美国国立卫生研究院卒中量表(the National Institutes of Health Stroke Scale, “NIHSS”)得到的各种因素和神经功能障碍的图表。

发明详述

通过参考以下对本发明优选实施方案和其中包括的实施例的详细说明,可更容易地理解本发明。

定义和术语使用

除非上下文另外明确指出，否则在本说明书和以下权利要求书中所用的单数形式“一个”、“一种”和“该”包括复数指示物。因此，举例而言，提及“一个片段”时包括片段的混合物，提及“一种 cDNA 寡核苷酸”时包括不止一种寡核苷酸，等等。

“多肽”、“蛋白质”和“肽”在本文可互换使用，其包括通过肽键连接的氨基酸分子链。该等术语并不指特定长度的产物。因此，“肽”、“寡肽”和“蛋白质”包括在多肽定义范围内。该等术语包括多肽的翻译后修饰物(同种型(isoform))，例如糖基化物、乙酰化物、磷酸化物、螯合物等等。另外，蛋白片段、类似物、突变型或变异型蛋白、嵌合肽等等包括在多肽含义内。多肽、蛋白质和肽可呈环状形式，或其可呈线状形式。

NMDA 受体或 NMDAR 为配体门控离子通道家族的一员，其优先结合 N-甲基-D-天冬氨酸并在脑中中介导绝大部分兴奋性神经传递(Dingledine R.等 Pharmacol Rev. 1999 Mar; 51(1): 7-6L)。受体包括在文献中报道为 NR1、NR2A、NR2B、NR2C、NR2D、NR3A 和 NR3B 的亚单位，执行独特的药理学功能。业已报道 NR1 (X58633)、NR2A (U09002)和 NR2B (U28861)的 GenEMBL 登记号，其阐述于 Dambinova 的 WO 02/12892 中。

NMDA 受体肽指全长 NMDA 受体蛋白、天然存在或合成的全长 NMDA 受体的肽片段、或其类似物或同种型。因此，除了其片段、类似物和衍生物外，NR2 肽还包括全长 NR2A、NR2B、NR2C 和 NR2D 亚单位。同样地，NR2A、NR2B、NR2C 或 NR2D 肽意即全长天然存在的 NR2A、NR2B、NR2C 或 NR2D 亚单位或其片段、其类似物或其衍生物。NMDA 肽的 N-末端区指全长肽的氨基酸 N-末端区片段或其片段、其类似物或其衍生物，通常长约 40 或 50 个氨基酸，但可长达 150、200 或 300 个氨基酸，如 Dambinova 的 WO 02/12892 所阐述。

肽的“类似物”意即含有一个或多个氨基酸取代、缺失、添加或

重排的肽。举例而言，在蛋白质生物化学领域众所周知，属于一组具有特定大小或特性(例如电荷、疏水性和亲水性)的氨基酸的一种氨基酸通常可被取代为另一种氨基酸，而不改变该蛋白质的活性，尤其是在该蛋白质中与生物活性的不直接相关的区域中。因此，若 NMDA 肽类似物在多个位点包括氨基酸取代、缺失、添加或重排而使得针对该类似物所产生的抗体仍特异性针对 NMDAR 肽，则该 NMDA 肽类似物可用于本发明。

除非指出与此相反，否则本文所用的 NMDAR 类似物或突变体指与天然存在的 NMDA 有至少 80%氨基酸同一性的序列，尽管也可含有至少 85%、90%或 95%的同一性。通过在类似物或突变体和天然存在的 NMDA 之间进行类似物比较来确定氨基酸同一性。将两种氨基酸序列进行比对，使沿其序列长度的共有氨基酸数目最大化；在序列比对时允许在任一个或二个序列中出现空位，以便使共有氨基酸数目最大化。氨基酸同一性百分比为以下两个数字中较大的一个：(1)所述两种肽比对时共有的氨基酸数目除以 NMDA 类似物中的氨基酸数目，再乘以 100；或(2)两种肽比对时共有的氨基酸数目除以天然 NMDA 肽中的氨基酸数目，再乘以 100。不考虑在分析中添加到末端的氨基酸。

NMDA 衍生物包括可于一个或多个组成氨基酸被化学或酶促衍化的天然 NMDA 和 NMDA 类似物和其片段，包括侧链修饰物、主链修饰物和 N-末端修饰物和 C-末端修饰物，所述衍化例如通过乙酰化、羟基化、甲基化、氨基化、磷酸化或糖基化来进行。术语也包括 NMDA 盐例如 NMDA 锌和 NMDA 铵。

术语“抗体”与“免疫球蛋白”同义。本文所用术语“抗体”既包括天然抗体、单克隆产生的抗体、多克隆产生的抗体、重组 DNA 抗体又包括抗体的生物活性衍生物，例如 Fab'、F(ab')₂ 或 Fv 以及单结构域(single-domain)和单链抗体。只要抗体的生物活性衍生物保留结合指定抗原的能力，其就包括在该定义范围内。因此，特异性结合 NR2

肽的 NR2 抗体具有结合至少一种 NR2 肽的能力。

术语“NR2”肽指所表达的 NMDA 受体的 NR2 亚家族中的任何肽，包括全长 NR2A、NR2B、NR2C 和 NR2D 亚单位、其片段和其重组片段。用于实行本发明的优选 NR2 肽由 NR2A 和 NR2B 亚单位或其类似物中的序列重组。所述序列优选自身抗原，并优选来源于所述 NMDA 受体亚型的 N 末端域。所述肽优选长度小于约 40 个氨基酸并大于约 15 个氨基酸。当然，不言而喻，这样的序列的类似物也可以重组肽出现。

优选的 NR2 肽为重组 NR2A/NR2B 肽，具有以下核苷酸序列：

NGMIGEVVYQRAVMAVGS�TIKRIVTEKTD 31

“蛋白去垢剂”指能够在人血流中让 NR2 肽从循环复合物释放的任何化合物，包括通常为本领域所知的各种离子型表面活性剂和两性分子。实例包括十二烷基硫酸钠(也称为月桂基硫酸钠)、牛黄胆酸钠、胆酸钠、CTAB、LDAO、CHAPS、Tween 20、Thesit、Triton X-100、NP40、正辛基蔗糖、正十二烷基蔗糖、正十二烷基麦芽糖苷、辛基葡萄糖苷、辛基硫葡萄糖苷、正己基葡萄糖苷和正十二烷基葡萄糖苷。

总论

本申请的公开内容阐述了因脑中 NMDA 受体合成的遗传性或偶然增加反映了缺血性神经功能障碍这一认识而产生的诊断和治疗应用，其可用于快速诊断卒中或 TIA 并与其它卒中样疾病相区别。在脑中异常表达的 NMDA 受体很快代谢，在渗透血脑屏障后，这些代谢破坏的产物进入循环系统。免疫系统将这些肽和蛋白片段认作外来抗原，通过产生抗体和免疫复合物而应答。这些肽一旦结合到这些免疫复合物和血流中的其它凝聚物例如白蛋白复合物中，则在常规检验方案中多半检测不到这些肽。在本发明中，当评估脑血管意外、TIA 和卒中以及未来脑血管意外、TIA 和卒中的风险时，评估结合 NR2 肽(结合的抗原)或总 NR2 肽和任选未结合 NR2 肽(游离的抗原)的含量，作

为用于其预后/诊断值的脑生物标志物。

因此，本发明一方面提供用于诊断中枢神经系统疾病的方法，其包括测量生物样品中结合 NR2 肽或总 NR2 肽或 NMDA 受体片段的量和任选测量未结合 NR2 肽。在另外的实施方案中，本发明提供用于测定神经功能障碍的病理起源的方法，其包括：(a)提供患有神经功能障碍的患者；(b)检测和定量来自所述患者的生物流体中结合 NR2 肽或总 NR2 肽，以得到结合 NR2 肽或总 NR2 肽的量；和(c)将所述结合 NR2 肽或总 NR2 肽的量与明显健康的(apparently healthy)人类对象的所述生物流体中的结合 NR2 肽或总 NR2 肽的群体标准比较。在特别优选的实施方案中，所述方法进一步包括：(a)检测和定量来自所述患者的生物流体中的未结合 NR2 肽，以得到未结合 NR2 肽的量；和(b)将所述未结合 NR2 肽的量与明显健康的人类对象的所述生物流体中的未结合 NR2 肽的群体标准比较。

升高水平的 NR2 肽对于脑损伤而言是特异性的，其以高于其它 NMDA 受体的速率在缺血性脑组织中表达，并因此独特地适于评估脑缺血性卒中、TIA 和卒中。用于测定所测量的未结合 NR2 肽和结合 NR2 肽或总 NR2 肽的浓度是否升高并由此指示中枢神经系统疾病的基线水平，可从群体标准获得，或优选来自患者自己的检验史。

尽管本领域技术人员已知的其它分析技术例如 HPLC 也可用到，但免疫测定技术通常优选用于测量本发明蛋白或肽。然而，当用免疫测定法时，业已发现抗原决定簇集中于 NR2 型 NMDA 受体的 N-末端区，为了最佳检验结果，应该采用针对 N-末端区和其片段产生的抗体。

优选通过用免疫测定技术，采用针对生物标志物产生的抗体，通过直接 ELISA，或通过定量技术例如 HPLC，直接测量所选生物样品中的未结合 NR2 肽和结合 NR2 肽或总 NR2 肽的浓度，来实施本发明方法。若测量未结合 NR2 肽和结合 NR2 肽或总 NR2 肽，优选用 NR2 肽的一种或多种抗原片段作为抗体的靶子，而不是用整个 NR2 型 NMDA 受体，来测量所述 NR2 肽。健康人通常具有小于约 2.0、1.0、

0.8、0.6 或 0.5ng/ml 的未结合 NR2 肽血液浓度和小于约 3.0、2.0 或 1.5ng/ml 的总 NR2 肽血液浓度。

可用其中表达或发现循环脑 NMDA 受体或这种受体标记物的几乎任何生物流体实施本发明方法，所述生物流体包括血液、尿液、血浆、血清、脑脊髓液、唾液、汗液或脑组织。在优选实施方案中，生物流体为血浆或血清，在甚至更优选的实施方案中，将血浆或血清稀释到约 1:50 的比率。

急诊室诊断和康复预后

如上所述，本发明方法尤其很好地适于在急诊室环境中使用，因为 NR2 肽或 NMDA 受体片段水平在缺血性事件的早期很快升高，因此提供了对脑损伤的实时指示，尤其是当与 NIHSS 和 CT 或 DWI/MRI 联合测量时。在优选实施方案中，当缺血性事件正在发生时对患者进行评估，优选及时进行神经保护治疗干预。因此，例如可当正经历神经功能障碍时，对患者进行评估。或者，可在卒中样症状初始发作后约 6、5、4、3、2 小时或更短时间内对患者进行评估。因此，在一个实施方案中，本发明提供用于通过血液检验评估脑状况或通过卒中样症状发作 3 小时内从人体取生物样品来评估中枢神经系统疾病例如脑血管意外、TIA 或卒中是否存在的方法。

当适合胶乳凝集测定时，本发明方法在急诊室环境也尤其有用，因为利用本发明方法，可快速而方便地使用胶乳凝集方法。在床边用胶乳凝集法，护理者通常在不到 10 分钟内可得到血液检验结果。因此，使用本发明方法，即使是在运送患者期间在“战场”上也可得到实时数据，其将提供更大的用于神经保护治疗的时间窗。因此，在本发明的再一实施方案中，在从受治疗者取出生物样品与检测或测量未结合 NR2 肽和结合 NR2 肽或总 NR2 肽或 NMDA 受体片段是否存在或量之间流逝的时间不到 30 分钟。

本发明最显著的优势之一是能够将缺血性卒中例如卒中与其它

卒中样疾病，例如脑肿瘤、外伤性脑损伤、脓肿、气栓塞、巨细胞性动脉炎、胶原血管病性疾病、代谢异常、贝尔麻痹(Bell's palsy)、迷路炎或脱髓鞘疾病区别开。无论所检测的肽是结合的还是未结合的，该优势都可得到，无论所检测的肽是结合的或未结合的，或是否检测两种肽，都可应用本发明该方面。特别是，若怀疑卒中，则该方法将帮助诊断卒中是缺血性损害还是出血性损害，并指导从业者采用适于所诊断的卒中类型的神经保护治疗。因此，在另外的实施方案中，本发明提供用于诊断脑血管病、TIA 或卒中是否存在的方法，当诊断确认为卒中时，所述方法进一步根据未结合 NR2 肽和/或结合 NR2 肽或总 NR2 肽或 NMDA 受体片段的浓度评估该卒中是缺血性还是出血性，并在合适时给予缺血性或出血性卒中治疗。

在一个实施方案中，所考虑的治疗为组织纤溶酶原激活剂(tPA)，本发明提供用于诊断和治疗脑缺血的方法，其包括：(a)提供患有神经功能障碍的患者；(b)检测和定量来自所述患者的生物流体中的 NR2 肽(结合的和/或未结合的)，以得到 NR2 肽的第一量；和(c)将所述 NR2 肽的第一量与明显健康的人类对象的所述生物流体中 NR2 肽的群体标准比较；(d)若所述 NR2 肽的所述第一量高于明显健康的人类对象的所述生物流体中 NR2 肽的群体标准，则将 tPA 给予所述患者；和(e)若所述 NR2 肽的所述的量低于明显健康的人类对象的所述生物流体中 NR2 肽的群体标准，则不将 tPA 给予所述患者。在优选实施方案中，分别检测和定量结合 NR2 肽或总 NR2 肽和未结合 NR2 肽，以得到结合 NR2 肽或总 NR2 肽和未结合 NR2 肽的量，将所述结合 NR2 肽或总 NR2 肽和未结合 NR2 肽的所述量与明显健康的人类对象的所述生物流体中结合 NR2 肽或总 NR2 肽和未结合 NR2 肽的群体标准比较。

在另外的实施方案中，通过以下步骤来实施所述方法：(a)评估所述患者的急性面瘫、上肢下移(arm drift)、谈话(speech)异常或其它神经功能障碍；(b)若观察到所述急性面瘫、上肢下移或言语功能障碍，并所述 NR2 肽的所述量高于明显健康的人类对象的所述生物流体中

NR2 肽的群体标准, 则将 tPA 给予所述患者; 和(c)若未观察到所述急性面瘫、上肢下移或言语功能障碍, 并所述 NR2 肽的所述量低于明显健康的人类对象的所述生物流体中 NR2 肽的群体标准, 则不将 tPA 给予所述患者。

此外, 可以定期重复该程序, 以提供对患者状态的连续监测, 作为对所述治疗的随访, 或监测特定治疗方案的功效。在该实施方案中, 优选所述哺乳动物同时进行该疾病的治疗。更优选以约 20 分钟到约 1 个月的间隔采集样品。甚至更优选间隔为约 20 分钟到约 2 小时。最优选以约 30 分钟的间隔采集样品。因此, 在再一实施方案中, 本发明提供用于诊断脑血管病、TIA 或卒中进展的方法, 其包括以小于约 6 小时的频率再一次或多次测量生物样品中未结合 NR2 肽和结合 NR2 肽或总 NR2 肽和/或 NMDA 受体片段的存在和量。再者, 该检测优选与 NIHSS 评估和神经成像联合实施。换句话说, 在再一实施方案中, 第二次检测和定量来自所述患者的生物流体中的 NR2 肽, 以得到 NR2 肽的第二量; 将 NR2 肽的所述第二量与所述第一量比较; 若第二量大于第一量, 则将 tPA 第二次给予所述患者; 若第二量不大于第一量, 则不将 tPA 第二次给予所述患者。

初级护理医生环境

在另外的应用中, 所述方法可用于临床环境, 以识别近期有患有卒中高风险的个体, 或监测风险降低治疗的效力。可采用多种疗法来降低个体卒中的风险。对于有卒中风险的患者, 使用抗血小板药物尤其是阿司匹林是一种标准的治疗。可给心房颤动(不规则的心跳)的人开抗凝血剂药方。当开治疗药方时, 所述方法提供用于测定治疗功效的新颖的方法。

因此, 在一个实施方案中, 本发明提供评估个体的 TIA 或卒中风险的方法, 其包括测量来自所述个体的生物样品中结合 NR2 肽或总(和任选未结合的) NR2 肽和/或其 NMDA 受体片段的水平, 并将所测

浓度与基线水平比较。在一个实施方案中，基线水平得自群体平均值。在另外的实施方案中，基线水平根据个体自己的医疗史并结合 NIHSS 和 DWL/MRI 数据而得到。

在另外的实施方案中，不止一次实施所述方法，以监测卒中或 TIA 风险的降低或增加，任选联合给予降风险治疗(神经保护策略)。在一个实施方案中，以每周一次到约 6 个月一次的频率实施所述方法。在另外的实施方案中，以每月一次到约 3 个月一次的频率实施所述方法。

手术前风险评估

在再一实施方案中，本发明提供用于帮助在手术前评估表面健康的受治疗者卒中风险的方法。当对患者进行检验并发现在其血流中有危险水平的结合 NR2 肽或总 NR2 肽时，优选在手术前和手术期间多次对患者进行检验。另外，因为患者通常到手术后不久才遭受不利的神经病学事件，所以优选在手术后的一个或多个以下时间周期内对这些患者再进行一次或多次检验：1 小时、3 小时、6 小时、12 小时、24 小时、3 天、7 天或 30 天。

可在计划手术的成人或儿童中实施所述方法，当评估已有患神经病学事件倾向的患者(例如有糖尿病病史、动脉粥样硬化病史、高血压病史或过去怀疑或确诊 TIA 或卒中病史的患者)时尤其有用。该等方法也可在手术前与 MMSA 检验联合应用，以预测不利的神经病学事件的风险。术前方位感、注意力和回忆等 MMSA 组成评分降低业已与术后不久的意识混浊和脑血管事件相关联。

可用本发明预测的神经病学事件的类型通常为由脑缺血引起的事件，尤其是因对脑供氧不足引起的缺血性事件(与当脑中血管破裂时发生的出血性事件相反)。这些事件可集中于脑的特定区域(如在卒中或 TIA 中发生的)或全部脑(如在精神错乱中发生的)。因此，不利的神经病学事件的特征可为意识混浊(confusion)，或可被诊断为 TIA 或缺血性卒中。氧供应可能因患者的健康状态(如在某些血液病例如贫血症

中)而受损,但更常见的应是由手术事件引起。若在手术期间或手术完成后30天内(尽管若需要,产生的不利事件也可在7天、3天、2天或1天期限内确定)发生不利的神经病学事件,则说其“来自”手术。

尽管一过性减慢或中断供脑氧气流的创伤性手术受益最大,但本发明预后方法可预测来自任何类型手术的不利的神经病学事件。举例而言,所述方法应该在闭塞或阻滞正常血液循环的任何心脏血管手术之前实施,这样的手术导致手术中微栓子或大栓子、异常脑血流灌注、再灌注损伤或炎性反应或神经体液反应。当实施心肺旁路时,本发明在预测不利的神经病学事件发生方面尤其有用。

诊断平台

测量结合 NR2 肽或总 NR2 肽的诊断方法通常需要将结合肽从血流中所述肽存在于其中的任何复合物(例如免疫球蛋白和白蛋白复合物)上剥离下来。这种剥离通常通过使用蛋白去垢剂来完成。因此,在一个实施方案中,本发明提供用于检测和定量生物样品中结合 NR2 肽或总 NR2 肽的检验试剂盒,其包括:(a)包含能特异性结合受试样品中的 NR2 肽的抗体的抗体试剂;(b)蛋白去垢剂;和(c)指示剂试剂。在另外的实施方案中,本发明提供用于检测和定量生物样品中结合 NR2 肽或总 NR2 肽的方法,其包括:(a)让生物样品与蛋白去垢剂接触,得到变性的生物样品;(b)让所述变性的生物样品与包含能特异性结合受试样品中的 NR2 肽的抗体的抗体试剂接触足够的时间,以使所述 NR2 肽和所述抗体之间形成结合复合物;和(c)检测和定量所述结合复合物。

可用任何数量的已知诊断技术来实施本发明诊断方法,所述诊断技术包括直接或间接 ELISA、RIA、免疫斑点、免疫印迹法、胶乳凝集、侧流免疫层析法(lateral flow)、荧光偏振和微阵列。在一个特定实施方案中,本发明用捕获和测量 NMDAR 肽标记物用的固定化固相来实施。因此,在一个实施方案中,本发明方法包括:(a)让来自患者的

生物样品与包含 NMDAR 肽或抗体的固定化固相接触足够的时间，以在所述 NMDAR 肽或抗体与所述生物样品中的 NMDAR 抗体或肽之间形成复合物；(c)让所述复合物与连接有产生信号的化合物的指示剂试剂接触，以产生信号；和(d)测量所产生的信号。在优选实施方案中，指示剂试剂包含连接有辣根过氧化物酶的鸡抗人或抗人 IgG。

在优选实施方案中，固相为聚合物基质。更优选聚合物基质为聚丙烯酸酯、聚苯乙烯或聚丙烯。在一个优选实施方案中，固相为微孔板。在其它优选实施方案中，固相为硝酸纤维素膜或带电荷的尼龙膜。

在另外的实施方案中，用凝集来实施所述方法。因此，在再一实施方案中，本发明包括：(a)让来自患者的生物样品与包含 NMDAR 肽或抗体的凝集载体接触足够的时间，以在所述 NMDAR 肽或抗体与所述生物样品中的 NMDAR 抗体或肽之间形成凝集复合物；(c)从凝集产生信号；(d)在所述信号与 NMDAR 肽或抗体的一种或多种标记物的所述水平之间建立关联性。在优选实施方案中，所述“足够时间”为小于 30、20、15 或甚至 10 分钟。

胶乳凝集测定法业已阐述于 Beltz, G. A.等 *Molecular Probes: Techniques and Medical Applications*, A. Albertini 等编辑, Raven Press, New York, 1989 中，其在此引作参考。在胶乳凝集测定中，将针对特定生物标志物产生的抗体固定在胶乳微粒上。将一滴胶乳微粒加入到适当稀释的待检血清中，通过轻轻摇动卡片来混合。对于缺乏足够水平的生物标志物的样品，胶乳微粒保持悬浮，保持光滑乳白色的外观。然而，若存在与抗体反应的生物标志物，则胶乳微粒凝集为肉眼可检测的凝集物。

也可使用凝集测定来检测生物标志物，其中相应的抗体固定在除胶乳珠粒以外的合适微粒上，例如固定在明胶、红细胞、尼龙、脂质体、金粒等等上。测定中存在抗体则引起与沉淀反应相似的凝集，然后可通过诸如比浊法、浑浊度、红外光谱、目测检测、比色法等等技术来检测。

本文通常采用术语胶乳凝集来指基于形成可检测的凝集的任何方法，其不限于使用胶乳作为免疫吸附基质。尽管用于凝集的优选基质为基于胶乳的，例如聚苯乙烯和聚丙烯，尤其是聚苯乙烯，但其它众所周知的基质包括由玻璃、纸、右旋糖酐和尼龙制成的珠粒。通过例如经由酰胺键或酯键的共价结合、离子吸引或通过吸附等技术，可将固定化抗体共价结合、离子结合或物理结合到固相免疫吸附剂。本领域技术人员应知晓很多用于结合抗体的其它合适载体，或应该能够用常规实验来确定这样的载体。

可使用常规方法制备用于本发明的抗体。举例而言，通过使用 NMDA 蛋白的肽，用标准方法可制备多克隆抗血清或单克隆抗体。可在哺乳动物中引发抗体应答的免疫原性形式的肽来免疫该哺乳动物(例如小鼠、仓鼠或兔子)。使肽具有免疫原性的技术包括与载体缀合或为本领域所熟知的其它技术。例如，可在佐剂存在下给予肽。通过检测血浆或血清中的抗体效价可监测免疫进展。以免疫原为抗原可使用 ELISA 或其它免疫测定方法来评估抗体水平。免疫后，可给予抗血清，若需要可从血清分离多克隆抗体。

为了生产单克隆抗体，可从免疫动物收获抗体生成细胞(淋巴细胞)，并通过标准的体细胞融合方法与骨髓瘤细胞融合，由此使这些细胞无限增殖化并产生杂交瘤细胞。这样的技术在本领域众所周知，例如最初由 Kohler 和 Milstein (Nature 256, 495-497(1975))开发的杂交瘤技术以及其它技术例如人 B 细胞杂交瘤技术(Kozbor 等 Immunol. Today 4, 72(1983))、生产人单克隆抗体的 EBV 杂交瘤技术(Cole 等 Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy (1985) Allen R. Bliss, Inc., pages 77-96)和组合抗体库筛选(Huse 等 Science 246, 1275(1989))。为了生产特异性与所述肽反应的抗体，可经免疫化学法筛选杂交瘤细胞，并可分离单克隆抗体。因此，本发明也涵盖分泌对本文所述 NMDAR 蛋白或片段有特异性的单克隆抗体的杂交瘤细胞。

在一个实施方案中，用已在生产厂校准了的试剂盒基于从人血液

纯化的抗体实施所述方法。因此，在另外的实施方案中，本发明在以下条件下实施：(a)用诊断试剂盒测量所述生物流体中 NMDAR 抗体水平；(b)所述诊断试剂盒包含结合 NMDAR 肽；和(c)所述试剂盒针对包含从人血液纯化的免疫球蛋白 G 的级分的抗体标准来制备。

另外，该方法可用市购化学发光技术来实施。举例而言，该方法可采用用直接化学发光技术、用恒定量的两种单克隆抗体的双位点夹心免疫测定法。在流体试剂中的第一抗体可为对该肽的第一部分有特异性的吡啶鎓酯标记的单克隆小鼠抗人 NMDA 受体肽 BNP (F(ab')₂) 片段。固相中的第二抗体可为对该肽的另一部分有特异性的生物素化单克隆小鼠抗人抗体，其可偶联到链亲合素磁性微粒。通过将患者样品与这两种抗体混合可形成免疫复合物。在洗掉所有未结合的抗体缀合物后，可用发光计测量免疫复合物信号的化学发光。

当通过测量 NMDA 受体的 cDNA 表达可间接检测 NMDA 受体时，通过常规 PCR 测定，例如 cDNA 杂交、RNA 印迹或 DNA 印迹，可实施本发明中的测量步骤。用编码本发明多肽抗原的寡核苷酸可实施这些方法。因此，在一个实施方案中，本发明方法包括通过让从生物样品中分离的总 DNA 与连接到固相的寡核苷酸引物接触足够的时间，来测量 NMDAR cDNA 表达的增加。在另外的优选实施方案，通过让结合到固态基质的总 DNA 阵列与现成可用的含有寡核苷酸引物的试剂混合物接触足够的时间，来测量 NMDAR cDNA 表达。所述 cDNA 与指示剂试剂(其包含连接到信号产生化合物的所述 cDNA 的寡核苷酸配对物)复合，则揭示表达的 NMDAR cDNA。优选信号产生化合物选自辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、尿激酶(urinase)和非酶试剂。最优选信号产生化合物为非酶试剂。

用于测量自身抗体水平的本发明免疫吸附剂可如下产生。将受体蛋白片段固定(优选通过共价键或离子键固定)到合适的载体例如聚苯乙烯或硝酸纤维素。若采用免疫检测用的标准聚苯乙烯板，则首先要对其进行硝化处理，藉此在板表面形成游离硝基，将其还原为氨基并

用戊二醛作为连接子活化。为了化学固定受体蛋白的相应免疫原性片段,接下来让由此活化的板在足以确保固定的时间和温度(即 4°C 约 16 小时)下与约 2-50 nM 的目标肽温育。

其也可如下实施:通过借助离子作用使受体蛋白的相应片段固定在硝酸纤维素条上来产生免疫吸附剂。将从哺乳动物脑分离的受体蛋白质的相应片段上样到硝酸纤维素上,于 37°C 温育 15 分钟。然后用 0.5 % Tween-20 溶液洗涤硝酸纤维素,将得到的免疫吸附剂在室温晾干,在干燥处存贮一年。

实施例

提出以下实施例是为了给本领域普通技术人员提供有关如何制备和评价本文所要求保护的化合物的全面的内容和说明,其意欲仅仅举例说明本发明,并非意欲限制本发明人认作其发明的范围。关于数字(例如量、温度等等)业已努力确保准确,但应该说明可能有某些错误和偏差。除非另有所指,否则份数为重量份,温度为°C或室温,压力为大气压或接近大气压。

实施例 1. 所研究的患者群

评估了 41 名具有提示可能短暂缺血性卒中的症状和处于近期完全性卒中高风险(表 1)中的成年患者。排除标准包括用葡萄糖治疗后症状消除和可能患有低血糖症的那些患者。

在患者常规评估期间,评估医师核实了 5 种因素的存在与否,其包括:年龄>60、糖尿病、TIA 症状>10 分钟、肢体无力、言语功能障碍。在经告知同意后,于入院当天从所有受治疗者采集血液样品。就诊(presentation)后通过电话、私人会面或回顾病历对患者进行大约 90 天的随访,以评估复发性 TIA 或卒中。若在初次评估后 90 天内患者发展为持久性神经功能障碍,或出现与患者症状发作有关的中枢神经系统梗死的新 X 光照相术(CT 或 MRI)证据,则定义为已发生卒中。

在症状发作后 24 小时内作为一个时期(as a single session)实施多顺序 MR 成像方案, 包括 DWI、T2WI 和 MRA。记录以下 CT 成像数据: 出血位置、出血量和心室内血液或质量影响的存在。测定上述患者和年龄相配的健康志愿者组(n=10)血浆中未结合 NR2 肽的量。

在显示出基底神经节发育和诊断为脑肿瘤后排除了一名患者(表 1)。42%患者在症状发作后 3 小时内经受 MRI 检查, 79%患者在症状发作后 3 小时内经受 CT 扫描。

表 1. 患者的人口统计学特征

特征	基线
年龄中值(y)	65.0
男性(n)	20
机体左侧事件(n)	13
初始血糖中值(mg/dL)	15.1

实施例 2. 未结合 NR2 肽作为新的脑病变的标记物

通过直接 ELISA 得到血液中未结合 NR2 肽的浓度, 如表 2 所示。图 1 中所描绘的未结合 NR2 肽的分布显示, 未结合 NR2 肽值低于 1.0ng/ml 的患者(n=16)没有经 CT/MRI 确定的损伤区域(表 1)。健康人群血浆的未结合 NR2 肽浓度范围为 0.3-0.5ng/ml。

表 2. 所研究患者血浆中的未结合 NR2 肽

受治疗者 N	未结合 NR2 肽 范围(最小, 最大) ng/ml	诊断	神经成像形式: CT/MRI/DWI
16	0.3-1.0	CVA、桡神经麻痹和贝尔麻痹、ICH	CT 阴性或出血
14	1.0-44.0	基于 NIHSS: TIA、卒中	在脑皮层、皮层下区域、小脑、丘脑中腔隙性新损伤

在脑皮层、基底神经节、小脑和丘脑中有经 DWI/MRI 确定的新的缺血性损伤的患者(n=14)血浆中，检测到高于 1.0ng/ml 的未结合 NR2 肽浓度(表 2)。在三名缺血性卒中(IS)患者中未结合 NR2 肽浓度异常升高，因此诊断为腔隙性梗死，并随后经 DWI 确定。

实施例 3. 总 NR2 肽作为旧的脑病变的标记物

分析了来自 40 名提示 TIA 的患者的血清样品中的总 NR2 肽量(表 3)。

表 3. 研究的患者血清中总 NR2 肽的量

受治疗者 N	总 NR2 肽范围(最小, 最大) ng/ml	诊断	神经成像形式: CT/MRI/DWI
17	0.9-2.0	CVA、桡神经麻痹和贝尔麻痹、ICH	CT 阴性或出血
14	2.4-24.0	基于 NIHSS: TIA、卒中	旧的顶叶 (parietal) 梗死、中白质、侧脑室、MCA 面积

数据的统计学分析显示，大部分患者的总 NR2 肽浓度低于 2.0ng/ml (图 2)。健康人群的总 NR2 肽浓度为 1.0-1.5ng/ml。患者的神经成像表明除了 ICH 外没有异常。有脑缺血先前病史和经 MRI 确定有旧梗死区的患者的总 NR2 肽浓度为 >2.4ng/ml (表 3)。40 名患者中有 9 名临床诊断为具有复发性 TIA 或卒中。

实施例 4. TIA/卒中(原发性和复发性症状)患者的未结合 NR2 肽和总 NR2 肽

同时检测未结合 NR2 肽和总 NR2 肽使得可以将复发性 TIA/卒中患者与有新的梗死区的患者区别开来。表 3 的结果基于 CT/MRI/DWI 并比较其总 NR2 肽水平和未结合 NR2 肽水平为患者给出临床诊断。MRI/DWI 上有梗死区的患者(n=14)具有“旧”病变区，其未结合肽:

总肽比率小于 1:2 (表 3 中的病例 3、13、16、21)。

表 3. 所研究患者的未结合 NR2 肽/总 NR2 肽

病例	NR2 肽, ng/ml			CT/MRI/DWI
	未结合的	总的	比率	
3	1.1	2.85	1:2.6	CT 和 MRI 上右侧旧 MCA 卒中
13	1.22	2.4	1:2.0	脑桥中脑(Pontomidcephalic)区中小梗死
16	1.30	8.8	1:6.8	MRI 显示腔隙性梗死
21	1.11	2.35	1:2.0	DWI 上旧顶叶梗死和某些腔隙性梗死
32	8.3	0.8	10:1	急性左侧小脑梗死(新)
35	24.5	1.2	20:1	急性左侧脑桥上部病变(新)

对于在血浆中未结合 NR2 肽显著增加的患者,其总肽浓度都低于 2.0mg/ml, 都患有经 MRI/DWI 确定的具新病变区的急性卒中(表 3 中的病例 32、35)。在这两名患者中未结合 NR2 肽:总 NR2 肽的比率都大于 2:1。

实施例 5. 未结合 NR2 肽/总 NR2 肽与 NIHSS 的相关性

入院时在 40 名患者中评估 NIHSS 评分, 这 40 名患者然后被再分为两个组 - NIHSS 评分低于或等于 3 的组和 NIHSS 评分大于 3 的组(表 4)。在所有患者中完成 MRA; 40 名患者中的 24 名有血流异常证据。在 NIHSS \leq 3 和 NIHSS >3 组别之间, 在 3 小时内有 CT 或 MRI 症状发作的患者比例方面或卒中半球方面没有统计学差别。

表 4. NIHSS \leq 3 与 NIHSS>3 组别的人口统计学特点

	NIHSS \leq 3 (n=26)	NIHSS>3 (n=14)
年龄中值(y)	64.3	65.5
NIHSS 中值	3	16
男性(n)	11	9
机体左侧事件(n)	3	10
MR 不匹配(n)	2	6 (n=11)

24名患者中仅5名患者的NIHSS评分小于或等于3。这5名患者中没有一个有提示腔隙综合征的症状。这5名患者中的4名有DWI变化证据。在3名患者血浆中检测到高于1.0ng/ml截止值的未结合NR2肽(表5)，而诊断有TIA的所有人的总NR2肽保持低于2.0ng/ml的截止值。

表 5. NIHSS≤3+原发性 TIA 的 5 名患者的细目分类

病例	NR2 肽, ng/ml		NIHSS 基线	半球
	未结合的	总的		
19	0.79	0.9	3	右
38	1.50	2.0	2	左
7	1.85	1.7	2	左
9	2.85	1.1	3	右
36	0.79	1.8	3	左

24名患者中的其余19名的NIHSS大于3，且在基线时有DWI病变证据。在该组内5名患者诊断患有慢性TIA，余下的14名患者诊断为患有急性IS。在NIHSS评分和未结合NR2肽/总NR2肽值之间有显著的相关性($r_s=0.92$)。后来被诊断为急性IS且NIHSS评分为11-20的患者($n=9$)的未结合NR2肽水平，是在对照对象中观察到的水平的大约3-44倍。对于患有慢性TIA和复发性IS的患者($n=14$)，总NR2肽水平和NIHSS评分中值具有显著的相关性($r_s=0.89$)。

实施例 6. 患卒中样疾病的患者的未结合 NR2 肽/总 NR2 肽

在经评价表示出TIA样症状的人群组($n=16$)中，2名患者被诊断为贝尔麻痹和桡神经麻痹，3名患者被诊断为脑内出血(ICH)。在那些患者中，未结合NR2肽低于1.0ng/ml截止值，总NR2肽低于2.0ng/ml截止值(表6)。病例34被初步诊断为脑血管疾病，但在NR2肽检验和另外的CT测定之后，该诊断被改变为脑内出血。

表 6. 患卒中样疾病患者中的未结合 NR2 肽/总 NR2 肽

病例	NR2 肽, ng/ml		诊断	CT/MRI/DWI
	未结合的	总的		
15	0.66	1.9	贝尔麻痹	阴性
17	0.45	2.0	ICH	CT: ICH
24	0.67	1.3	ICH	CT: ICH
33	0.30	1.0	桡神经麻痹	阴性
34	0.28	1.2	ICH	CT: ICH
27	1.21	0.8	贝尔麻痹改为 TIA	左丘脑腔隙性梗死
8	0.68	24.0	偏头痛改为 IS	腔隙性梗死

病例 27 显示出未结合 NR2 肽/总 NR2 肽低于对应截止值, 但在 DWI 显示丘脑腔隙性梗死区后将初步诊断“贝尔麻痹”改变为“TIA”。病例 8 最初鉴别为严重偏头痛, 但基于总 NR2 肽和未结合 NR2 肽的检验结果改为缺血性卒中。DWI 成像检测到脑内腔隙性病变更, 确证急性 IS 的诊断。

实施例 7. 纤溶酶原激活剂治疗

在入院后 24 小时内用纤溶酶原激活剂(tPA)治疗总共 13 名患有原发性/慢性 TIA 和新的/复发性卒中的患者(表 7)。2 名患者的 NIHSS 评分小于 3, 诊断为原发性 TIA, 在入院后 24 小时内没有接受溶栓治疗就恢复了。3 名患者在最初 24 小时内其 NIHSS 评分恶化 1-2 分后接受 66mg 剂量的 tPA (病例 19、36、38)。

在 tPA 治疗后未结合 NR2 肽水平显著降低(表 8)。以下评估表明在 3 个月时改良 Rankin 量表上为自主性(independency)(表 7)。

表 7. 用 tPA 治疗的患者

N	病例	NIHSS		诊断	3 个月 Rankin 量表评分
		基线	24 小时		
1	19	3	3	原发性 TIA	自主性
2	38	2	4		自主性
3	36	5	7		自主性
4	11	7	5	复发性 TIA	症状复发
5	12	5	3		自主性
6	13	9	4		自主性
7	32	15	12	新的脑缺血	自主性
8	35	18	14		自主性
9	3	11	7	复发性 IS	自主性
10	8	20	16		自主性
11	10	17	14		2 个月时精神错乱
12	16	19	16		自主性
13	25	16	12		自主性

经 DWI 确定具有病变区并在入院 3 小时内未显示症状改善的慢性 TIA 患者,接受静脉内 tPA (66mg), 该给予促进 NIHSS 评分改善(表 7)。临床改善伴随总 NR2 肽和未结合 NR2 肽的浓度降低(表 8)。NIHSS 评分的最显著改善与总 NR2 肽浓度降低的关联性比与未结合 NR2 肽浓度降低的关联性更大。病例 11 在 3 个月内症状复发。

表 8. 给予 tPA 后未结合 NR2 肽/总 NR2 肽的变化

N	病例	未结合 NR2 肽, ng/ml		总 NR2 肽, ng/ml	
		基线	24 小时	基线	24 小时
1	19	0.79	0.53	0.9	1.1
2	38	0.79	0.50	1.8	1.9
3	36	2.85	1.75	1.1	1.4
4	11	1.22	1.1	2.4	2.0
5	12	0.58	0.50	2.5	1.6
6	13	1.61	1.0	5.5	3.4
7	32	8.3	4.4	0.8	1.0
8	35	24.5	11.2	1.2	1.4
9	3	1.0	0.5	2.85	1.5
10	8	0.68	0.44	24	5.5
11	10	0.68	0.50	4.5	4.0
12	16	1.30	0.6	8.8	4.3
13	25	44.0	8.5	4.1	2.8

在新卒中患者(病例 32、35)中及时给予(在症状出现后 3 小时内) tPA 显著降低了未结合 NR2 肽(38-47%)，患者在 3 个月改良 Rankin 量表上为自主性(表 7)。对于病例 10，尽管在入院后 6 小时内给予 tPA (69mg)其 NIHSS 评分最初有改进，并且未结合 NR2 肽/总 NR2 肽的浓度略有降低，但该患者随后在接下来的 2 个月内恶化(表 7、8)。在病例 25 中溶栓治疗使未结合 NR2 肽浓度降低了高达 90%。

实施例 8. 总 NR2 肽和未结合 NR2 肽的检测测定和性能特性

ELISA 板的包被：用存于 100 μ L 15mM 碳酸钠、35mM 碳酸氢钠(pH 9.6)中的 0.2 μ g 鸡抗 NR2 IgY 包被 Nunc MaxiSorp 板(Fisher Sci)。让板温育过夜，然后用 200 μ L 1 M 乙醇胺(pH 8-9)处理 1 小时。用 PBS 缓冲液漂洗后，将板贮存于+4 $^{\circ}$ C。

血液样品的制备：用无菌一次性试管从各个个体通过静脉穿刺采集血液(1ml)。应将每个 1ml 血液样品平均分到 EDTA 试管(血浆)和促凝结(clot-activator)试管(血清)中。对于血浆，让试管于 4 $^{\circ}$ C 以 4000g

离心 5 分钟。对于血清,使血液在试管中凝结 20 分钟,然后以 1000rpm 离心 10 分钟。收集的血浆和血清应贮存于-70℃。

样品预稀释: 精确吸取 20 μ L 各个血清样品到 2-3ml 体积的试管中,加入 980 μ L 含有 0.05 % Tween 20、pH 7.4 的 50 mM 磷酸盐缓冲液(PBS-T)(用于测定未结合肽)或用 PBS-T 制备的 0.1-0.5%的十二烷基硫酸钠溶液(或 KCl)(用于测定总肽),充分混合 10-30 分钟。

用于检测肽的直接 ELISA: 对于每一种测定,应该用 PBS-T 洗涤板 5 分钟。然后一式两份加入校准物、对照或样品(100 μ L),在室温(RT)温育 60 分钟。在将板洗涤 3 次 15 分钟后,应该加入 100 μ L 人 IgG (6 μ g/孔),在 RT 再温育 60 分钟。用缓冲液洗涤后,加入蛋白 A-HRP (100 μ l; 1:1,000 稀释)达 1 小时。

在加入另外的洗涤后,通过四甲基联苯胺(TMB)底物溶液来显示反应物。显色反应进行 5 分钟,用酸溶液(50 μ l)终止,在酶标仪(microplate reader)上以双波长 450nm/630nm 监测。每个测定也包括样品缓冲液作为空白以计算零单位值。用微孔板孔中的 NR2 肽吸光度单位对浓度作校准曲线来确定血清中的 NR2 肽浓度。

实施例 9. 未结合 NR2 肽/总 NR2 肽测定的性能特性

未结合 NR2 肽

在表 9 中以 2x2 格式来描绘未结合 NR2 肽的工作特性。在 1.0ng/ml 截止值时计算出敏感度和特异性为 90%和 95%。选择特定截止值点的预测值和或然率以接近敏感度 90%。用于 TIA/卒中诊断的 1.0ng/ml 截止值时,达到 95%的阳性预测值,其导致高水平 NR2 肽患者的 TIA 后神经并发症增加至 18 倍(95% CI, 10.8-25.4)。90%的阴性预测值和 0.05 的阴性或然率使得仅在 5%的卒中样症状病例中误诊为 TIA/卒中。将未结合 NR2 肽值与 DWI/MRI 数据结合起来,应该可以 100%确定脑缺血。

表 9. 未结合 NR2 肽的性能

真阳性	19	1	假阴性
假阳性	2	19	真阴性
	21	20	

总 NR2 肽

表 10 中以 2x2 版式给出总 NR2 肽的工作特性。与未结合肽测试比较，对于总 NR2 测定，在 2.0ng/ml 截止值时计算出敏感度较低 (82%)，特异性大约相同 (约 96%)。在对于 TIA/卒中诊断最佳的 2.0ng/ml 截止值时，达到 93% 的阳性预测值，其导致具高水平总 NR2 肽的患者的神经并发症提高至 20.5 倍。88% 的阴性预测值和 0.18 的阴性或然率使得仅在 18% 的卒中样症状病例中误诊为 TIA/卒中。将同时检测未结合 NR2 肽和总 NR2 肽与 DWI/MRI 数据结合起来，应该可以 100% 确定脑缺血，并将病例细分为新的和复发性的缺血性事件病例。

表 10. 总 NR2 肽的性能

真阳性	14	1	假阴性
假阳性	3	23	真阴性
	17	24	

在本申请全文中引用了各种出版物。这些出版物的内容以其整体在此引入本申请作为参考，以更全面地阐述本发明所属领域的技术状况。对于本领域技术人员显而易见的是，在不偏离本发明范围或精神的情况下在本发明内可进行各种修改和改变。从本文揭示的本发明说明书和实施来考虑，本发明的其它实施方案对于本领域技术人员是显而易见的。本说明书和实施例意欲仅作为例示来考虑，本发明真正的范围和精神由以下所附的权利要求书来指出。

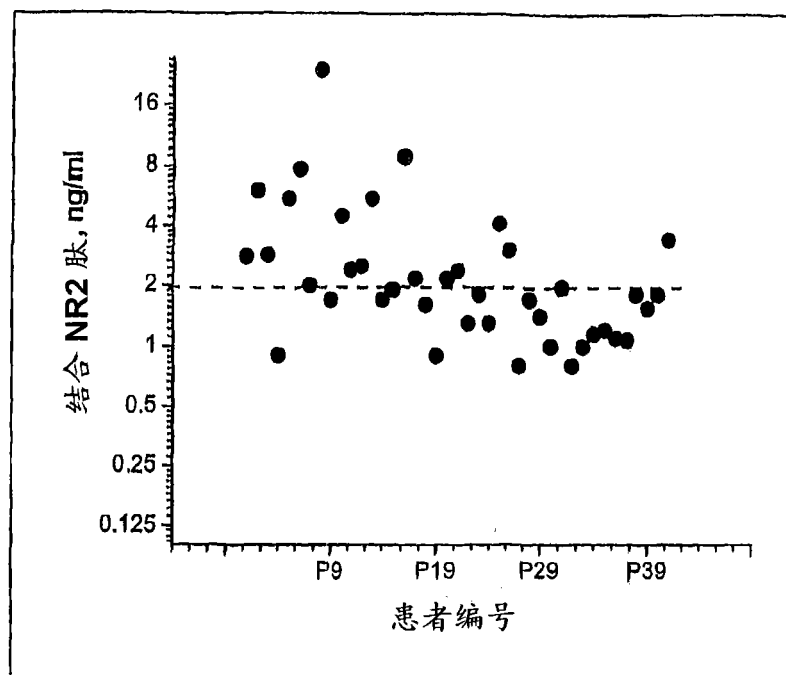


图 2. 所研究患者(n=40)的血清中结合 NR2 肽的分布

入院前(pre-hospital)标准护理中 TIA/卒中的 风险评估和诊断/预后

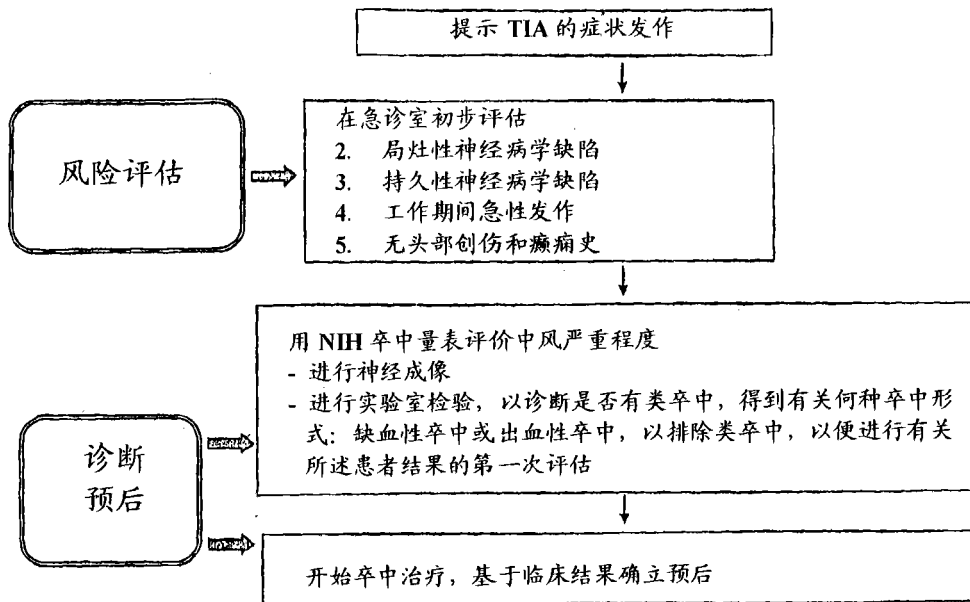


图 3

用 NIH 卒中量表评估卒中严重程度

项目	反应
1a. 意识水平	0=警觉(alert) 1=不警觉 2=迟钝 3=无反应
1b. 意识问答水平	0=正确回答两个问题 0=正确回答一个问题 1=答案都不正确
1c. 意识水平	0=正确执行两个指令(task) 1=正确执行一个指令 2=不能执行任何指令
2. 凝视	0=正常 1=部分凝视麻痹 2=完全凝视麻痹
3. 视野	0=无视觉缺失 1=部分偏盲 2=完全偏盲 3=双侧偏盲
4. 面瘫	0=正常 1=微小麻痹 2=部分麻痹 3=完全麻痹
5. 上肢肌力 a. 左臂 b. 右臂	0=无下移 1=5s 前下移 2=10 s 前跌倒 3=能进行不抗地心引力的活性 4=毫无动作
6. 下肢肌力 a. 左腿 b. 右腿	0=无下移 1=5s 前下移 2=10 s 前跌倒 3=能进行不抗地心引力的活性 4=毫无动作
7. 共济失调	0=无 1=单肢 2=两肢
8. 感觉	0=正常 1=轻度缺失 2=严重缺失
9. 言语	0=正常 1=轻度失语 2=重度失语 3=哑或完全失语
10. 构音困难	0=正常 1=轻度 2=重度
11. 消退/ 注意力缺失	0=正常 1=轻度 2=重度

有关该量表使用的详细说明可得自：
http://www.ninds.nih.gov/doctors/NIH_Stroke_Scale.pdf.
 供应者教育在线课程可得自：
<http://asa.trainingcampus.net/usa/modules/trees/index.aspx>

图 4

专利名称(译)	基于NR2肽诊断和治疗脑血管事件的方法		
公开(公告)号	CN101268370A	公开(公告)日	2008-09-17
申请号	CN200680029355.7	申请日	2006-06-13
发明人	S·A·丹比诺瓦		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/6896 G01N2800/2871 G01N33/9406 A61P25/00		
代理人(译)	刘冬		
优先权	60/689806 2005-06-13 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供用于诊断和治疗脑血管事件和用于界定事件的时间和解剖定位的方法和试剂盒，其基于在生物流体中检测和定量结合NR2肽或总NR2肽和未结合NR2肽。所述方法任选与神经病学评分和神经成像联合实施，其涉及在急诊室急救基础上对TIA和卒中的风险评估、预后、诊断和治疗。