



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101687023 B

(45) 授权公告日 2016. 04. 20

(21) 申请号 200880019915. X

(22) 申请日 2008. 06. 12

(30) 优先权数据

0711327. 7 2007. 06. 12 GB

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2009. 12. 11

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2008/004743 2008. 06. 12

(87) PCT国际申请的公布数据

W02008/151808 EN 2008. 12. 18

(73) 专利权人 汉莎医药有限公司

地址 瑞典隆德

(72) 发明人 L·博乔克 贝蒂尔·克里斯汀森

海科·赫沃尔德 亚当·林德

波尔·艾克森

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理

有限公司 11262

代理人 陶贻丰 郑霞

(51) Int. Cl.

A61K 39/00(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

(56) 对比文件

WO 2005028512 A1, 2005. 03. 31,

CN 1146724 A, 1997. 04. 02,

US 2003170745 A1, 2003. 09. 11,

赵明辉等. 原发性小血管炎和抗中性粒细胞胞浆抗体靶抗原的系列研究.《北京大学学报(医学版)》. 2002, 第 34 卷(第 1 期),

辛岗等. 抗中性粒细胞胞质抗体的检出率及其靶抗原研究.《中华风湿病学杂志》. 2003, 第 7 卷(第 1 期),

郭晓蕙等. 抗甲状腺药物引起抗中性粒细胞胞质抗体相关血管炎的临床分析.《中华医学杂志》. 2003, 第 83 卷(第 11 期),

审查员 李煦颖

权利要求书1页 说明书13页

序列表2页 附图7页

(54) 发明名称

诊断方法

(57) 摘要

已证明 HBP 水平在随后发展严重败血症的个体中增加。因此,在个体中的 HBP 水平、HBP/WBC 比或 HBP/NC 比可用于确定个体是否处于发展严重败血症的危险中。

1. 用于检测肝素结合蛋白 (HBP) 的试剂在鉴定个体是否处于发展严重败血症的危险中的方法中使用的测试试剂盒的制备中的用途, 所述方法包括测量取自所述个体的血液、血浆或血清的样品中的 HBP, 其中用于检测 HBP 的所述试剂是结合 HBP 的抗体或其片段。

2. 如权利要求 1 所述的用途, 其中用于检测 HBP 的所述试剂是 HBP 特异性抗体。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的用途, 其中所述方法还包括测量所述个体的白细胞计数 (WBC) 或嗜中性粒细胞计数 (NC), 分别计算 HBP/WBC 比或 HBP/NC 比, 并由此确定所述个体是否处于发展严重败血症的危险中。

4. 如权利要求 3 所述的用途, 其中在所述方法中所述 WBC 或 NC 是在取自所述个体的血样中测量的。

5. 如权利要求 1 所述的用途, 其中确定所述个体是否处于发展严重败血症的危险中包括确定所述样品中的 HBP 浓度是否大于 15ng/ml 或 20ng/ml。

6. 如权利要求 1 所述的用途, 其中所述体液样品中的 HBP 水平或浓度相对于 HBP 的基线水平或浓度增加至少 2.5 倍。

7. 如权利要求 4 所述的用途, 其中, 当所述样品中的 HBP 浓度是以 ng/ml 测量并且所述血样中的 WBC 是以细胞数 $\times 10^9/l$ 测量时, 确定所述个体是否处于发展严重败血症的危险中包括确定 HBP/WBC 比是否大于 2。

8. 如权利要求 4 所述的用途, 其中所述血样中的 HBP/WBC 比或 HBP/NC 比分别相对于基线 HBP/WBC 比或 HBP/NC 比增加至少 2.5 倍。

9. 如前述权利要求中任一项所述的用途, 其中所述个体被怀疑处于发展严重败血症的危险中。

10. 如权利要求 9 所述的用途, 其中所述个体具有证实的或怀疑的感染和 / 或显示 SIRS 标准的一种或更多种。

11. 如权利要求 9 所述的用途, 其中所述个体具有证实的或怀疑的感染和 / 或显示 SIRS 标准的两种或更多种。

12. 如权利要求 10 或 11 所述的用途, 其中所述证实的或怀疑的感染影响: 肺; 呼吸道; 肝; 肾; 泌尿道; 皮肤; 心脏; 胃; 肠; 血液; 骨; 关节或其任意组合。

13. 如权利要求 9 所述的用途, 其中所述个体是: 无免疫应答的患者; 糖尿病患者; 具有静脉内导管、手术伤口、外科引流或褥疮的住院治疗的患者; 或其任意组合。

14. 如权利要求 9 所述的用途, 其中所述个体是哺乳动物。

15. 如权利要求 14 所述的用途, 其中所述哺乳动物是人。

诊断方法

发明领域

[0001] 本发明涉及对发展严重败血症的易感性诊断和预防。

[0002] 发明背景

[0003] 败血症是对感染的全身炎症反应,在严重情况下造成器官衰竭和死亡。它是发病和死亡的日益常见的原因,特别是在老年、无免疫应答和病危个体中。已报道败血症在非冠脉重病监护病房中是最常见的死亡原因 (Bone RC 等人 ;Chest. 1992 年 6 月 ;101(6) : 1644-55)。它以所有住院治疗的 1% -2% 发生并且死亡率范围从败血症的 20% 至严重败血症的 40% 至败血症性休克 (严重败血症的一个亚类) 的 > 60% (Leibovici ;Ann Intern Med 1991 ;114(8) :703, Martin 等人 ;N Engl J Med. 2003 年 4 月 17 日 ;348(16) :1546-54)。

[0004] 败血症的临床定义为出现两种或更多种以下的状况,同时具有确认的或怀疑的感染 :

[0005] (1) 发烧 (温度 > 38℃) 或体温过低 (温度 < 36℃) ;

[0006] (2) 心率 > 90 次每分钟 ;

[0007] (3) 呼吸率 > 20 次呼吸每分钟或 PaCO₂ < 32mm Hg ;和

[0008] (4) 白细胞计数 > 12 (×10⁹ 细胞 /L) 或 < 4 (×10⁹ 细胞 /L)。

[0009] 已知状况 (1) 至 (4) 为 SIRS (严重炎症反应综合征) 标准 (Bone RC 等人 ; Chest. 1992 Jun ;101(6) :1644-55) 并且被承认是诊断严重炎症的国际标准。表现出 SIRS 标准的两种或更多种而没有证实的或怀疑的感染的个体被归类为具有非感染相关的 SIRS。

[0010] 严重败血症的临床定义为如上定义的败血症,伴有败血症诱导的低血压、器官功能障碍或灌注异常。败血症诱导的低血压定义为收缩压 < 90mmHg 或从不存在其他低血压原因下的基线处降低 < 40mm Hg。灌注异常可包括,但不限于灌注不足、乳酸性酸中毒、少尿或精神状况的急性改变。严重败血症包括作为亚类的败血症性休克状况。该状况由败血症诱导的低血压的存在而特别定义,尽管足够的体液复苏 (Fluid resuscitation) 连同存在灌注异常。接受收缩性药或血管加压药的个体可能在测量灌注异常时不是低血压。

[0011] 为了治疗严重败血症,在更严重的症状 (低血压、器官功能异常或灌注不足) 发作前诊断以建立充分的治疗对成功的结果是极其重要的 (RiversE 等人 .N Engl J Med 2001 ; 345(19) :1368-77)。例如, Kumar 等人表明死亡与在进行第一次治疗前、败血症诱导的低血压发作后所经过的小时数相关 (Kumar 等人 .Crit Care Med 2006 ;34(6) :1589-96)。需要可靠的生物学或临床标志物以尽早确定个体是否处于发展严重败血症的危险而最小化在治疗建立前的延迟。

[0012] 发明概述

[0013] 肝素结合蛋白 (HBP, CAP37, Azurocidin) 是糖基化的、单链、带负电的 37kDa 无活性的丝氨酸蛋白酶同源物,显示与人中性粒细胞弹性蛋白酶 44% 的序列同一性。已发表了 HBP 的三维结构 (Iversen 等人 Nat Struct Biol. 1997 年 4 月 ;4(4) :265-8)。它包含在人中性粒细胞的嗜天青颗粒 (azurophilic granulae) 中 (Lindmark 等人, J Leukoc Biol 1999 ;66(4) :634-43)。它是多功能蛋白,已显示通过改变血管细胞骨架的 Ca²⁺ 平衡而诱导

血管渗漏 (Gautam 等人, Nature Medicine 2001 ;7(10) :1123-7)。与纤维蛋白原复合的 A 族链球菌 (GAS) 的 M 蛋白已显示通过刺激嗜中性粒细胞的 B2- 整联蛋白受体而诱导 HBP 的释放 (Herwald 等人, Cell 2004 ;116(3) :367-79)。LPS 还可通过未知的机理诱导 HBP 释放 (Rasmussen 等人, FEBS Lett 1996 ;390(1) :10912)。HBP 的序列是公开可用的 (例如作为 NCBI 登录号 NP_001691 区域 :27..248) 并在下面再现为序列识别号 1。

[0014] 序列识别号 1

[0015] IVGGRKARPRQFPFLASIQNQGRHFCGGALIHARFVMTAASCFQSQNPGVSTVVLGAYDLRRRERQSRQ
TFSISSMSENGYDPQQNLNDLMLLQLDREANLTSSVTILPLPLQNATVEAGTRCQVAGWGSQRSGGRLSRFPRFVNV
TVTPEDQCRPNNVCTGVLTRRGICNGDGGTPLVCEGLAHGVASFSLGPCGRGPDDFFTRVALFRDW IDGVLNPNPGP

[0016] 先前还未对表现出一种或多种 SIRS 标准的个体中的 HBP 水平进行研究。本发明人首次表明, HBP 水平在随后发展严重败血症的个体中增加。HBP 水平在记录败血症诱导的低血压之前达 12 小时升高, 但如果建立治疗则迅速降低。本发明人还首次表明, HBP/ 白细胞计数 (WBC) 比在随后发展严重败血症的个体中升高。

[0017] 因此根据本发明, 提供了一种鉴定个体是否处于发展严重败血症的危险中的方法, 该方法包括测量个体中的 HBP 并由此确定该个体是否处于发展严重败血症的危险中。

[0018] 本发明方法还可包括测量个体中的 WBC 或嗜中性粒细胞计数 (NC)、分别计算 HBP/ WBC 比或 HBP/NC 比并由此确定该个体是否处于发展严重败血症的危险中。

[0019] 因此, 本发明方法可包括测量个体中的 HBP 并计算个体中的 HBP/WBC 水平或 HBP/ NC 比, 并由此确定该个体是否处于发展严重败血症的危险中。

[0020] 本发明还提供:

[0021] - 用于检测 HBP 的试剂, 用来确定个体是否处于发展严重败血症的危险中;

[0022] - 用于确定个体是否处于发展严重败血症的危险中的方法的测试试剂盒, 所述测试试剂盒包括用于检测个体中的 HBP 的试剂;

[0023] - 降低个体发展严重败血症的危险的方法, 其包括:

[0024] (i) 使用本发明方法确定个体是否处于发展严重败血症的危险中; 和

[0025] (ii) 将治疗有效量的适于治疗感染的药剂和/或静脉注射液施用于在 (i) 中被鉴定为处于危险中的个体。

附图说明

[0026] 图 1 显示在严重败血症组 (n = 51)、败血症组 (n = 95)、感染而没有 SIRS 组 (n = 44) 和 SIRS 而没有感染组 (n = 12) 中的 HBP 浓度 (图 1a)、HBP/WBC 比 (图 1b)、CRP 水平 (图 1c)、IL-6 水平 (图 1d) 和乳酸盐水平 (图 1e)。在方框内的线: 中值; 方框边缘: 四分位数 (Q1、Q3); 触须线: 数值范围; * 和 o: 由患者数确定的超偏值。图 1a 和图 1b 的直线分别表示 HBP 水平为 20ng/ml 的截断值和 HBP/WBC 比为 2 的截断值。

[0027] 图 2 显示 HBP 水平和/或 HBP/WBC 比、HBP 水平、HBP/WBC 比、乳酸盐、白细胞计数、CRP 和 IL-6 的 ROC 曲线。从 0,0 至 1,1 的直线是参考线。连接产生对角线部分。

[0028] 图 3 显示在严重败血症组的每个个体 (n = 51) 的 HBP/WBC 比 (图 3a) 或 HBP 浓度 (图 3b), 依据相对于最低测量的血压的时间 (由在 0 小时处的箭头表示) 从收集第一个血浆样品的时间作图。在图 3a 中的空心圆表示落在 HBP/WBC 比截断水平以下但得分在 HBP

浓度截断水平以上的患者。在图 3b 中的空心圆表示落在 HBP 浓度截断水平以下但得分在 HBP/WBC 比截断水平以上的患者。

[0029] 图 4 显示在取自 16 个患有严重败血症的患者的连续的血浆样品中经 96 小时的 HBP/WBC 比变化 (图 4a) 和在取自 7 个患有败血症、感染而没有 SIRS 或没有感染的患者的连续血浆样品中经 72 小时的 HBP/WBC 比变化 (图 4b)。每条线表示单独的患者。

[0030] 发明详述

[0031] 诊断

[0032] 本发明涉及鉴定受治疗者是否处于发展严重败血症的危险中的方法。因此本发明涉及个体对于严重败血症的易感性诊断。在测试下的个体通常被怀疑处于发展严重败血症的危险中。所述个体通常是哺乳动物。所述哺乳动物通常是人类或诸如马、母牛、羊、狗或猫的家养哺乳动物。所述个体优选人类。

[0033] 个体因为其具有证实的或怀疑的感染和 / 或显示出 SIRS 标准的一种或多种或者两种或更多种而可能被怀疑处于发展严重败血症的危险中。所述 SIRS 标准是：

[0034] (1) 发烧 (温度 $> 38^{\circ}\text{C}$) 或体温过低 (温度 $< 36^{\circ}\text{C}$) ;

[0035] (2) 心率 > 90 次每分钟 ;

[0036] (3) 呼吸率 > 20 次呼吸每分钟或 $\text{PaCO}_2 < 32\text{mm Hg}$;和

[0037] (4) 白细胞计数 $> 12 (\times 10^9 \text{细胞} / \text{L})$ 或 $< 4 (\times 10^9 \text{细胞} / \text{L})$ 。

[0038] 证实的或怀疑的感染通常是细菌感染、寄生虫感染或真菌感染的一种或多种。细菌感染可由一种或多种革兰氏阴性的或革兰氏阳性的细菌引起。所述一种或多种革兰氏阴性的细菌可以选自大肠杆菌 (*Escherichiacoli*)、克雷伯氏菌属 (*Klebsiella spp.*) (通常为克雷伯氏肺炎菌 (*K.pneumoniae*) 或产酸克雷伯菌 (*K.oxytodd*))、肠杆菌属 (*Enterobacterspp*) (通常为阴沟肠杆菌 (*E.cloacae*) 或产气肠杆菌 (*E.aerogenes*))、包特氏菌属 (*Bordetella spp.*) (通常为支气管败血性包特氏菌 (*B.bronchiseptica*)、百日咳包特氏菌 (*B.pertussis*) 或副百日咳包特氏菌 (*B.parapertussis*))、衣原体属 (*Chlamydia spp.*) (通常为砂眼衣原体 (*C.trachomatis*))、军团菌属 (*Legionella spp.*) (通常为嗜肺军团菌 (*L.pneumophila*))、假单胞菌属 (*Pseudomonas spp.*) (通常为绿脓假单胞菌 (*P.aeruginosa*))、支原体属 (*Mycoplasma spp.*) (通常为肺炎支原体 (*M.pneumoniae*))、流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenza*)、粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*)、奇异变形菌 (*Proteus mirabilis*)、鲍氏不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*)、嗜麦芽糖寡养单胞菌 (*Stenotrophomonas maltophilia*) 和脑膜炎奈瑟氏球菌 (*Neisseria meningitides*) (通常为血清组 A、B、C、H、I、K、L、X、Y、Z、29E 或 W135)。所述一种或多种革兰氏阳性的细菌可以选自葡萄球菌属 (*Staphylococcus spp.*) (通常为金黄色葡萄球菌 (*S.aureus*) 或凝固酶阴性的葡萄球菌 (*Staphylococci*))、链球菌属 (*Streptococcus spp.*) (通常为肺炎链球菌 (*S.pneumoniae*) 或酿脓链球菌 (*S.pyogenes*)) 和肠球菌属 (*Enterococcus spp.*) (通常为屎肠球菌 (*E.faecium*) 或粪肠球菌 (*E.faecalis*))。真菌感染可能由一种或多种选自以下的真菌引起：白色念珠菌 (*Candida albicans*)、热带念珠菌 (*Candida tropicalis*)、近平滑念珠菌 (*Candida parapsilosis*)、克柔念珠菌 (*Candida krusei*)、光滑念珠菌 (*Candida glabrata*) 和烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*)。

[0039] 证实的或怀疑的感染可影响身体的任何部位。典型实例包括影响以下部位的感

染:肺;呼吸道;肝;肾;泌尿道;皮肤(表皮和皮下的);心脏;胃;肠;血液;骨;关节或其任意组合。证实的或怀疑的感染可以是脑膜炎。

[0040] 感染可以通过本领域中公知的诊断实践而证实,例如取自个体的样品的微生物培养、取自个体的尿或其他体液样品的抗原测试(特别是对肺炎链球菌感染和军团菌属感染)或PCR分析(特别是对由诸如支原体、军团菌属、衣原体和百日咳包特氏菌的细菌感染引起的非典型肺炎)。新近开发了多重PCR技术,所述多重PCR技术能够同时测试多种细菌感染和真菌感染。

[0041] 感染可能因为存在一种或多种以下的一般症状而被怀疑:高于38℃的发烧;寒战;疼痛;持续痛(ache)或触痛(tenderness);全身的疲劳感;盗汗;和伴有发红、发热、肿胀或疼痛或流出白色、淡黄色或淡绿色体液的伤口或切口。

[0042] 本发明可用于确定具有发展严重败血症的一种或多种另外的危险因子和/或一种或多种倾向的个体的易感性。增加发展严重败血症的易感性的危险因子通常包括增加感染易感性的任何因子。这些因子可包括削弱的免疫系统(即个体是无免疫应答的)、或住院治疗的患者中存在静脉内导管、手术伤口、外科引流或被称为褥疮溃疡或褥疮的皮肤受损部位。糖尿病个体更易于发展严重败血症。本发明的诊断方法可以与另一检测或遗传测试联合进行以改进风险预测。

[0043] 通常,个体不具有慢性炎症相关的疾病和/或不显示与这样的疾病特别相关的症状。这样的疾病的实例包括动脉粥样硬化、阿尔茨海默病、哮喘、类风湿性关节炎、骨关节炎和诸如克罗恩氏病、溃疡性结肠炎、肠易激综合征和炎性肠病的肠的炎性疾病。如果个体确实具有慢性炎症相关的疾病,他们另外具有如上定义的证实的或怀疑的感染和/或显示SIRS标准的一种或多种或两种或更多种。

[0044] 通常,个体不具有严重败血症或不显示将导致严重败血症的诊断的症状。通常这样的症状包括败血症诱导的低血压、器官功能障碍或灌注异常。败血症诱导的低血压被定义为收缩压<90mm Hg或从不存在其他低血压原因下的基线处降低<40mm Hg。灌注异常可包括,但不限于灌注不足、乳酸性酸中毒、少尿或精神状况的急性改变。严重败血症包括作为亚类的败血症性休克状况。该状况由败血症诱导的低血压的存在而特别定义,尽管足够的体液复苏连同存在灌注异常。接受收缩性药或血管加压药的个体可能在测量灌注异常时不是低血压。

[0045] 本发明涉及测量HBP在个体中的水平。通常通过确定HBP在取自个体的体液样品中的浓度而测量HBP水平。根据本发明,与基线水平或浓度相比增加的HBP水平指示个体对发展严重败血症是易感性的或个体处于发展严重败血症的危险中。基线水平通常为HBP在被怀疑处于发展严重败血症的危险中但没有随后发展严重败血症的个体中的水平。例如,本发明人已表明,当HBP水平是通过确定HBP在取自个体血浆样品中的浓度而测量时,发展非严重败血症的个体具有约8.5ng/ml的中值HBP浓度,具有证实的或怀疑的感染但显示一种或更少的SIRS标准的个体具有约6.5ng/ml的中值HBP浓度,以及在不存在感染的情况下显示两种或更多种SIRS标准的个体具有约9ng/ml的中值HBP浓度。对于所有被怀疑处于发展严重败血症的危险中但没有随后发展严重败血症的个体类型的中值HBP浓度为约8ng/ml。

[0046] 在本发明中,在取自个体的体液样品中伴随增加的发展严重败血症易感性或危险

性的增加的 HBP 浓度通常为大于约 15ng/ml 或大于约 16ng/ml、17ng/ml、18ng/ml、19ng/ml、20ng/ml、21ng/ml、22ng/ml、23ng/ml 或 24ng/ml。伴随增加的发展严重败血症的易感性或危险性的增加的 HBP 浓度优选大于约 20ng/ml。

[0047] 根据本发明,伴随增加的发展严重败血症增加的易感性或危险性的 HBP 水平或浓度的增加相对于基线水平或浓度为至少 2 倍、2.5 倍或 3 倍。伴随增加的发展严重败血症的易感性或危险性的 HBP 水平或浓度的增加 相对于基线水平或浓度优选至少 2.5 倍。

[0048] 因此,本发明还可涉及评估 HBP/ 白细胞计数 (WBC) 的比以确定发展严重败血症的危险。

[0049] 根据本发明,相对于基线比增加的 HBP/WBC 比表明个体对发展严重败血症是易感性的或个体处于发展严重败血症的危险中。基线比通常为在被怀疑处于发展严重败血症的危险中但没有随后发展严重败血症的个体中的 HBP/WBC 比。当 HBP 在体液样品中的浓度是以 ng/ml 测量并且在血样中的 WBC 是以细胞数 $\times 10^9/1$ 测量时,本发明人已表明,例如,发展非严重败血症的个体具有约 0.7 : 1 的中值 HBP/WBC 比,具有证实的或怀疑的感染但显示一种或更少的 SIRS 标准的个体具有约 0.85 : 1 的中值 HBP/WBC 比,以及在不存在感染的情况下显示两种或更多种 SIRS 标准的个体具有约 0.9 : 1 的中值 HBP/WBC 比。对于所有被怀疑处于发展严重败血症的危险中但没有随后发展严重败血症的个体类型的中值 HBP/WBC 比为约 0.75 : 1。

[0050] 在本发明中,当 HBP 在体液样品中的浓度是以 ng/ml 测量并且在血样中的 WBC 计数是以细胞数 $\times 10^9/1$ 测量时,伴随增加的发展严重败血症的易感性或危险性的增加的 HBP/WBC 比通常大于约 1.4 : 1,或大于约 1.5 : 1、1.6 : 1、1.7 : 1、1.8 : 1、1.9 : 1、2.0 : 1、2.1 : 1、2.2 : 1、2.3 : 1 或 2.4 : 1。伴随增加的发展严重败血症的易感性或危险性的增加的 HBP/WBC 比优选大于约 2.0 : 1。

[0051] 根据本发明,伴随增加的发展严重败血症的易感性或危险性的 HBP/WBC 比的增加相对于基线比至少为 1.5 倍、2 倍、2.5 倍或 3 倍。伴随增加的发展严重败血症的易感性或危险性的 HBP/WBC 比的增加相对于基线比优选为至少 2.5 倍。

[0052] 本发明人已确定,在被怀疑处于发展严重败血症的危险中的个体中的平均嗜中性粒细胞计数 (NC) 为白细胞计数 (WBC) 的约 80%。本发明还可评估 HBP/NC 比以确定发展严重败血症的危险。

[0053] 根据本发明,相对于基线比增加的 HBP/NC 比表明个体对发展严重败血症是易感性的或个体处于发展严重败血症的危险中。基线比通常为在不具有感染和 / 或不显示任何 SIRS 标准的个体中的 HBP/NC 比。当 HBP 在体液样品中的浓度是以 ng/ml 测量并且在血样中的 NC 计数以细胞数 $\times 10^9/1$ 测量时,本发明人已表明,例如,发展非严重败血症的个体具有约 0.55 : 1 的中值 HBP/NC 比,具有证实的或怀疑的感染但显示一种或更少的 SIRS 标准的个体具有约 0.65 : 1 的中值 HBP/NC 比,以及在不存在感染的情况下显示两种或更多种 SIRS 标准的个体具有约 0.7 : 1 的中值 HBP/NC 比。对于所有被怀疑处于发展严重败血症的危险中但没有随后发展严重败血症的个体类型的中值 HBP/NC 比为约 0.6 : 1。

[0054] 在本发明中,当 HBP 在体液样品中的浓度是以 ng/ml 测量并且在血样中的 NC 计数是以细胞数 $\times 10^9/1$ 测量时,伴随增加的发展严重败血症的易感性或危险性的增加的 HBP/NC 比通常大于约 1.1 : 1,或大于约 1.2 : 1、1.3 : 1、1.4 : 1、1.5 : 1、1.6 : 1、1.7 : 1、

1.8 : 1 或 1.9 : 1。伴随增加的发展严重败血症的易感性或危险性的增加的 HBP/NC 比优选大于约 1.6 : 1。

[0055] 根据本发明,伴随增加的发展严重败血症的易感性或危险性的 HBP/NC 比的增加相对于基线比至少为 1.5 倍、2 倍、2.5 倍或 3 倍。伴随增加的发展严重败血症的易感性或危险性的 HBP/NC 比的增加相对于基线比优选为至少 2.5 倍。

[0056] 本发明通常在从个体获得的样品上体外进行。样品通常包含个体的体液。样品优选血液、血浆、血清、尿、脑脊液或关节液样品。样品最优选血液样品。通常在检测前例如通过离心而处理所述样品。样品通常还可在检测前储存,优选地在 -70°C 以下储存。

[0057] 本领域中公知的标准方法可用于检测 HBP 水平。这些方法通常包括使用用于检测 HBP 的试剂。所述试剂通常与 HBP 特异性结合。所述试剂可以是对于 HBP 具有特异性的抗体。特异性应当理解为试剂或抗体与 HBP 结合而对任何其他分子(特别是任何其他蛋白)没有显著的交叉反应性。例如,对于 HBP 具有特异性的试剂或抗体将不显示与人嗜中性粒细胞弹性蛋白酶显著的交叉反应性。可通过任何合适的方法评估交叉反应性。

[0058] 用于本发明方法中的抗体可以是能够结合至 HBP 的全抗体或其片段。抗体可以是单克隆的。这样的全抗体通常是通过本领域公知的任何合适的方法制成的抗体。例如,通过用 HBP 在合适的条件下免疫通常为兔或小鼠的哺乳动物并从例如所述哺乳动物的血清中分离抗体分子,可以获得多克隆的抗体。单克隆抗体可通过杂交瘤或重组体方法获得。

[0059] 杂交瘤方法涉及用 HBP 在合适的条件下免疫通常为兔或小鼠的哺乳动物、然后收获所述哺乳动物的脾细胞并将其与骨髓瘤细胞融合。然后,将融合的细胞的混合物稀释并且克隆从单个母细胞中生长。随后测试由不同克隆分泌的抗体与 HBP 结合的能力,并然后将最多产生稳定的克隆在培养基中生长为高容积。收集并纯化分泌的抗体。

[0060] 重组方法涉及将不同免疫球蛋白基因区段克隆入噬菌体或酵母以产生具有稍微不同的氨基酸序列的抗体库。可以选择产生结合至 HBP 的抗体的序列并且该序列被克隆至,例如,细菌细胞系用于生产。

[0061] 通常,抗体是哺乳动物抗体,诸如灵长类抗体、人类抗体、啮齿动物抗体(例如小鼠或大鼠)、兔抗体、绵羊抗体、猪抗体、马抗体或骆驼抗体。抗体可以是骆驼科动物抗体或鲨鱼抗体。抗体可以是纳米抗体(nanobody)。抗体可以是抗体的任何类或同种型,例如 IgM,但优选 IgG。

[0062] 可用于本方法的全抗体的片段包括抗原结合部位,例如 Fab 或 F(ab)2 片段。全抗体或片段可以与其他部分结合,所述其他部分例如可用于将 2 个或更多个片段或抗体连接在一起的连接体。这样的连接体可以是化学连接体或者可以与片段或全抗体的融合蛋白的形式存在。因此,连接体可用于将具有相同或不同结合特异性的全抗体或片段连接在一起,例如将能够结合相同或不同多态性的全抗体或片段连接在一起。抗体可以是能够结合至两种不同抗原的双特异性抗体,所述两种不同抗原通常为本文提及的任意两种多态性。抗体可以通过将两种可变结构域背靠背连接而形成的“双抗体”。在用于本方法的抗体以上述具有不同特异性的不同抗原结合部位的任何形式存在的情况下,则这些不同特异性通常为在不同位置或在不同蛋白上的多态性。在一个实施方案中,抗体是包括来自诸如人源化抗体的不同天然抗体的序列的嵌合抗体。

[0063] 评估 HBP 水平的方法通常包括用能够与 HBP 特异性结合的试剂或抗体接触样品。

这样的方法可包括浸渍片测定 (dipstick assay) 和酶联免疫吸附测定 (ELISA)。通常, 浸渍片包括与 HBP 特异性结合的一种或多种抗体或蛋白。如果存在多于一种抗体, 抗体优选地具有不同的非重叠的决定子以便它们可以同时结合至 HBP。

[0064] ELISA 是需要分离试剂的非均匀的、固相测定。ELISA 通常使用夹心技术或竞争技术而进行。夹心技术需要两种抗体。第一种特异性结合 HBP 并结合至固体支持体。第二种抗体结合至标志物, 通常是酶偶联物。使用酶的底物量化 HBP- 抗体复合物并由此量化在样品中的 HBP 的量。抗原竞争性抑制测定通常也需要结合至支持体的 HBP- 特异性抗体。将 HBP- 酶偶联物加入待测定的样品 (包含 HBP)。HBP- 酶偶联物与未标记的 HBP 之间的竞争抑制允许定量样品中的 HBP 的量。用于 ELISA 反应的固体支持体优选包含孔。

[0065] 本发明还使用不包含抗体的测量 HBP 的方法。高效液相色谱 (HPLC) 分离和荧光检测优选用作确定 HBP 水平的方法。可使用先前描述的 HPLC 设备和方法 (Tsikas D 等人, J Chromatogr B Biomed Sci Appl 1998;705:174-6)。通常基于尺寸或电荷进行 HPLC 期间的分离。在 HPLC 之前, 通常将内源氨基酸和内标 L- 高精氨酸加入测定样品并且这些在 CBA 柱 (Varian, Harbor City, CA) 上被相提取。样品中的氨基酸优选邻-苯二醛 (OPA) 衍生化。对于所有氨基酸, 测定的准确度和精密度优选在质量控制样品内测定。

[0066] 可使用本领域中公知的标准方法测量个体中的白细胞计数或嗜中性粒细胞计数。这样的方法包括自动计数或手动计数。

[0067] 本发明还提供了诊断试剂盒, 所述诊断试剂盒包括用于测量个体中的 HBP 水平并从而确定该个体是否处于发展严重败血症的危险中的装置。试剂盒通常包括特异性结合 HBP 的一种或多种抗体。例如, 试剂盒可包括单克隆抗体、多克隆抗体、单链抗体、嵌合抗体、CDR 移植抗体或人源化抗体。抗体可以是完整的免疫球蛋白分子或其片段如 Fab 片段、F(ab')₂ 片段或 Fv 片段。如果存在多于一种抗体, 抗体优选具有不同的非重叠的决定子以便它们可同时结合至 HBP。

[0068] 所述试剂盒可另外包括用于测量个体中 WBC 计数的装置。

[0069] 所述试剂盒可另外包括使上述方法的任一实施方案能够实施的一种或多种其他试剂或装置。这样的试剂或装置包括以下的一种或多种: 合适的缓冲液 (水溶液)、从样品中分离 HBP 的装置、从个体中获得样品的装置 (例如包括针的导管或装置) 或可在其上进行定量反应的包括孔的支持体。试剂盒可以任选地包括使试剂盒能够用于本发明方法的说明书或关于本方法可对哪些个体实施的详细说明。

[0070] 治疗

[0071] 本发明还涉及对通过本发明方法鉴定为处于发展严重败血症的危险中的个体的治疗。因此, 用于降低发展严重败血症的危险的物质可用于制备用于治疗通过本发明方法鉴定为处于发展严重败血症的危险中的个体的药物。因此, 通过本发明方法鉴定为处于发展严重败血症的危险中的个体的状况可通过施用这样的物质而被改善。从而, 严重败血症可被预防。可用于降低发展严重败血症的危险的治疗有效量的物质可给予通过本发明方法鉴定为需要其的个体。适于降低发展严重败血症的危险的物质通常包括一种或多种抗生素和 / 或一种或多种静脉注射液。所述一种或多种抗生素通常为广谱抗生素。广谱抗生素通常选自一种或多种氨基糖苷类、头孢菌素类、氟喹诺酮类、林可酰胺类、大环内酯类、青霉素类、磺胺类药或四环素类。例如, 合适的抗生素包括, 但不限于, 庆大霉素、卡那霉素、新霉

素、链霉素、托普霉素、头孢唑啉、头孢氨苄、头孢匹林、头孢拉定、头孢呋辛、头孢克肟、头孢噻肟、头孢他啶、头孢唑肟、头孢曲松、环丙沙星、左氧氟沙星、氧氟沙星、克林霉素、阿奇霉素、克拉霉素、红霉素、阿莫西林、氨苄西林、氨苄西林-舒巴坦、氯唑西林、双氯西林、美洛西林、萘夫西林、苯唑西林、苄星青霉素 G、青霉素 G 钾、普鲁卡因青霉素 G、青霉素 V 钾、哌拉西林、替卡西林、替卡西林-克拉维酸钾、乙胺嘧啶-磺胺多辛、磺胺嘧啶、磺胺异噁唑、磺胺甲噁唑、甲氧苄啶-磺胺甲噁唑、金霉素、多西环素和四环素。

[0072] 根据本发明可用于降低发展严重败血症的危险的物质通常与药学上可接受的载体或稀释剂配制用于本发明中的施用。药物载体或稀释剂可以是，例如，等渗溶液。例如，固体口服形式可包括连同活性物质的：稀释剂，如乳糖、葡萄糖、蔗糖、纤维素、玉米淀粉或马铃薯淀粉；润滑剂，如硅石、滑石、硬脂酸、硬脂酸镁或硬脂酸钙和 / 或聚乙二醇；结合剂，例如淀粉、阿拉伯树胶、明胶、甲基纤维素、羧甲基纤维素或聚乙烯吡咯烷酮；崩解剂，如淀粉、海藻酸、藻酸盐或羟基乙酸淀粉钠；沸腾复合剂；染料；增甜剂；湿润剂，如卵磷脂、聚山梨醇酯、硫酸月桂酯；和通常用于药物制剂的非毒性的且药理学上非活性的物质。这样的药物制剂可以已知的方式制备，例如通过混合过程、粒化过程、制片过程、包糖衣过程或薄膜包衣过程。

[0073] 用于口服施用的液态分散体可以是糖浆、乳液或悬浮液。糖浆可包含例如蔗糖或蔗糖与甘油和 / 或甘露醇和 / 或山梨醇作为载体。

[0074] 悬浮液和乳液可包含例如天然树胶、琼脂、藻酸钠、果胶、甲基纤维素、羧甲基纤维素或聚乙烯醇作为载体。用于肌肉内注射的悬浮液或溶液可包含连同活性物质的药学上可接受的载体，例如无菌水、橄榄油、油酸乙酯、诸如丙二醇的二醇，以及如果需要，合适量的利多卡因盐酸盐。

[0075] 用于静脉内施用或输注的溶液可包含例如无菌水作为载体，或者优选地，它们可以无菌的、含水的、等渗的盐溶液的形式。

[0076] 将用于预防严重败血症的治疗有效量的物质施用于根据本发明被鉴定的患者。例如抗生素的剂量可根据多种参数确定，特别是根据使用的物质；待治疗患者的年龄、体重和状况；施用途径；以及所需的治疗方案。此外，医师将能够对任何特定患者确定所需施用途径和剂量。根据特定抗生素的活性、待治疗的受治疗者的年龄、体重和状况以及施用的频率与途径，典型的日剂量为每 kg 体重从约 0.1mg 至 50mg。优选地，日剂量水平为从 5mg 至 2g。剂量可以单剂量提供或者可以多剂量提供，例如以诸如每日施用 2 剂、3 剂或 4 剂的有规律的间隔服用。

[0077] 以下实施例举例说明了本发明：

实施例

[0078] 1. 方法

[0079] 研究参与者

[0080] 2006 年 3 月至 2007 年 4 月，具有临床上怀疑感染的 202 个成年患者被选入在瑞典隆德大学医院 (Lund University Hospital) 的传染病医疗中心 (Infectious Disease Clinic) 的前瞻性研究。入选的标准为发烧 $> 38^{\circ}\text{C}$ 并且抗生素治疗少于 24 小时。在许可进入时记录抗生素治疗的持续时间、人口统计学、SIRS 标准和收缩压 (SBP)。分析 C 反应蛋

白 (CRP)、乳酸盐和 WBC 计数,并且用于后来分析 HBP、IL-6 水平的血浆样品在从许可进入的 12 小时内获得。在 20 个患者中,与记录 SIRS 标准和 SBP 平行获得达 96 小时的连续血浆样品。在出院后,记录最终的诊断和 28 天死亡率并且根据 SIRS 标准对患者分类 (Bone 等人, Chest 1992 ;101 (6) :1644-55)。

[0081] 严重败血症 (第一组) 被定义为存在败血症并且 SBP < 90mmHg 或在血样收集的 24h 内从基线处 > 40mmHg 的 SBP 降低;败血症 (第二组) 被定义为显示出两种或更多种 SIRS 标准以及感染;非败血症 (第三组) 被定义为显示一种 SIRS 标准以及感染;和非感染 (第四组) 被定义为显示两种或更多种 SIRS 标准以及非感染的最终诊断。

[0082] 最终感染诊断为肺炎 (n = 61)、上呼吸道感染 (n = 35)、泌尿道感染 (n = 38)、表皮和皮下感染 (n = 29)、心内膜炎 (n = 4)、肠胃炎 (n = 12) 或包括局部感染的其他感染 (n = 11)。在 35 个患者 (17%) 中诊断出菌血症 (17 个革兰氏阴性和 18 个革兰氏阳性的细菌)。显示两种或更多种 SIRS 标准的非感染的诊断是肺栓子和系统性血管炎。将血样收集在 4mL 塑料的血浆柠檬酸盐管中、立即以 3000rpm 离心 10min、等分并在 -70°C 下储存直到分析时。

[0083] HBP、IL-6、CRP、乳酸盐、WBC 和 HBP/WBC 比的分析

[0084] 通过夹心 ELISA 测定 HBP 的浓度 (ng/ml), 如在 (Tapper 等人 ;Blood2002 ;99 (5) : 1785-93) 中所述。血浆样品在 PBS 中稀释 1/40 并且以双份运行。如在 (Rasmussen 等人 ;FEBS Lett 1996 ;390 (1) :109-12) 中所述生产并纯化重组体人 HBP。如在 (Lindmark 等人 ;J. Leukoc. Biol 1999 ; 66 (4) :634-43) 中所述制备并纯化针对重组体 HBP 的小鼠单克隆抗体 (2F23A) 和兔抗血清 (409A) 并分别以 1/3000 和 1/7000 使用。来自 Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA) 的过氧化物酶偶联的山羊抗兔 IgG 以 1/3000 使用。通过用 WBC ($\times 10^9$ 细胞 /L) 除 HBP 浓度 (ng/ml) 计算 HBP/WBC 比。

[0085] 用市售的人 IL-6 试剂盒 (Quantikine, R&D Systems, UK) 测试 IL-6, 检测限 3pg/mL。血浆样品被稀释 1/40。在 Roche Hitachi Modular-P 上根据生产商的说明使用来自 Roche Diagnostics (Mannheim, Germany) 的试剂进行 CRP 和乳酸盐分析,除了用于乳酸盐分析的样品取自血浆柠檬酸盐管而不是草酸盐 - 氟化物管。

[0086] 根据生产商的说明 (Sysmex) 在 Sysmex XE2100 中测量白细胞计数 (WBC)。

[0087] 统计分析

[0088] 以中值、四分位数范围提供数据。使用曼 - 怀氏等级和检验 (Mann-Whitney rank sum test) 进行显著性检验。双尾 p 值 < 0.05 被视为统计学上显著的。确定 HBP、HBP/WBC 比、CRP、WBC 和 IL-6 的接受者工作特征 (Receiver-operating characteristic) (ROC) 曲线 (DeLong 等人 ;Biometrics 1988 ;44 (3) :837-45) 和曲线下面积 (AUC)。以 95% 置信区间 (95% CI) 报道 AUC 值。从交叉表计算敏感性、特异性、阳性预测值和阴性预测值。阳性似然比和阴性似然比也在表 1 中报道。

[0089] 2. 结果

[0090] 研究的参与者的特征

[0091] 满足入选标准的 202 个患者包括在内。将患者分为以下 4 组:51 个患有严重败血症的患者 (第一组);95 个患有败血症的患者 (第二组);44 个非败血症的患者 (第三组) 和 12 个非感染的患者 (第四组)。这 4 组的中值年龄和男性 / 女性比分别为 62 岁, 31/20 ;

57 岁,42/53;44 岁,15/29;和 73 岁,11/1。在第一组、第二组和第三组中分别有 22 个、11 个和 2 个患者被发现菌血症。

[0092] 研究参与者中 HBP 水平和 HBP/WBC 比的分析

[0093] 许可进入时,与在第二组、第三组和第四组中分别为 1/95、0/44 和 0/12 患者相比,严重败血症组 ($p < 0.0001$) (图 1a) 的 HBP 水平显著较高,42/51 患者超过 20ng/ml 的截断水平。此外,与其他组相比,严重败血症组的患者显示显著 ($p < 0.0001$) 较高的 HBP/WBC 比 (图 1b)。在严重败血症组的 44/51 患者中、在败血症组的 2/95 患者中、在非败血症组的 0/44 患者中和在非感染组的 0/12 患者中发现高于 2.0 的 HBP/WBC 比。此外,与在败血症组中的 2/95 患者和在另外 2 个组中的 0 个患者相比较,在严重败血症组中的 47/51 患者的血浆 HBP 水平 $> 20\text{ng/ml}$ 或 HBP/WBC 比 > 2.0 (表 1)。

[0094] 类似地,在严重败血症组中的 CRP、IL-6 和乳酸盐水平也显著较高 ($p = 0.003$, $p < 0.0001$, $p < 0.0001$),尽管在组之间存在大量重叠 (图 1c 至图 1e)。

[0095] HBP 水平和 HBP/WBC 比的预测值分析

[0096] 如在本研究中假定 25% 的严重败血症患病率,与计算的 CRP 和 IL-6 的所有不同截断水平相比,以下变量显示在诊断严重败血症中更好的特异性、敏感性、阳性预测值 (PPV)、阴性预测值 (NPV)、阳性似然比 (PLR) 和阴性似然比 (NLR):

[0097] -HBP 水平 $> 20\text{ng/ml}$ 表明个体将发展严重败血症;或

[0098] -HBP/WBC 比 > 2.0 表明个体将发展严重败血症;或

[0099] -HBP 水平 $> 20\text{ng/ml}$ 或 HBP/WBC 比 > 2.0 表明个体将发展严重败血症。

[0100] 这些发现在表 1a、表 1b 和表 1c 中概述并且由 ROC 曲线 (图 2) 所支持。在表 2 中显示 ROC 曲线的统计学分析。

[0101] HBP 水平和 HBP/WBC 比在临床症状发作前预测严重败血症

[0102] 在严重败血症组的 51 个患者的 20 个患者中,在达到最低 SBP 之前,HBP 值被提高,达 12h (图 3a 和图 3b)。在 24h 内,在 11 个患者中的 HBP 水平快速降低,所述患者用足够的抗生素和静脉注射液治疗并痊愈而 没有并发症。然而,在患者持续循环系统不稳定的 5 个病例中,HBP 水平保持升高,这些患者中的 1 个在入选日的 28 天内死亡 (图 4a)。

[0103] 在全部 5 个患者中,全部死于严重败血症组并且全部是在最后一次收集的升高的 HBP 样品之后 1-4 日内死亡。在患有败血症的 6 个患者中和具有非败血症的 1 个患者中,HBP 水平保持低于 20ng/ml,以上患者随后连续取样 (图 4b)。

[0104] 在严重败血症组中的 20 个患者在许可进入时具有增加的 HBP 水平或 HBP/WBC 比但是正常的 SBP,表明这些指标能够在标准临床诊断成为可能之前预测严重败血症。这通过呈现 3 天发烧、腹泻和呕吐病史的 70 岁女性来示例说明。身体检查是不显著的,除了发烧 38°C、脉搏率 100 但 130mm/Hg 的正常 SBP,并且她住院时临时诊断为肠胃炎。她被给予 1000ml 静脉内晶体液。6 小时后,她发展为 SBP 为 70mm/Hg 的严重低血压、呼吸窘迫,并被立即转移至 ICU,后来在 ICU 诊断出由于大肠杆菌败血症的具有弥漫性血管内凝血的 ARDS (成人呼吸窘迫综合征)。在许可进入时,她的 HBP 水平为 80ng/ml 并且 HBP/WBC 比为 4.2。

[0105] 表 1a:在诊断严重细菌性败血症中所测试的变量的敏感性、特异性、阳性预测值、阴性预测值、阳性似然比和阴性似然比

[0106]

变量	截断	敏感性 %	特异性 %	PPV %	NPV %	PLR	NLR
HBP (ng/ml)	>20	82.4	99.3	97.7	94.3	118	0.18
HBP/WBC 比	>2	86.3	98.7	95.6	95.5	66.4	0.14
HBP/WBC 比或 HBP 水平 (ng/ml)	>2 或 >20	92.2	98.7	95.9	97.4	71	0.08
CRP (mg/l)	>50	88.2	36.4	31.9	90.2	1.39	0.32
	>100	82.3	53.6	37.5	90.0	1.77	0.33
	>150	64.7	71.3	42.9	85.6	2.25	0.49
	>200	37.2	80.8	39.6	79.2	1.94	0.77
IL6 (pg/ml)	>100	78.4	72.8	49.4	91.0	2.88	0.30
	>200	62.7	77.5	48.5	86.0	2.78	0.48
	>500	47.0	84.0	50.0	82.5	2.94	0.63
	>1000	43.0	90.0	59.5	82.4	4.30	0.23
乳酸盐 (mmol/l)	>2.5	27.5	98.0	82.4	79.6	13.7	0.74
	>2.0	41.2	91.8	63.6	81.8	5.0	0.64
	>1.5	52.9	77.6	45.0	82.6	2.4	0.61
	>1	88.2	46.3	36.3	91.9	1.6	0.25

[0107] 表 1b:在诊断严重细菌性败血症中 HBP 的不同截断水平的敏感性和特异性

[0108]

HBP 截断 (ng/ml)	特异性	敏感性
>15	95.1	88.2
>16	98.0	88.2
>17	98.6	84.3
>19	98.6	84.3
>20	99.3	82.4
>21	99.3	80.4
>22	99.3	78.4
>23	99.3	76.5
>24	99.3	74.5

[0109] 表 1c:在诊断严重细菌性败血症中 HBP/WBC比的不同截断水平的敏感性和特异性
 [0110]

HBP/WBC 比截断	特异性	敏感性
1.4	87.1	92.2
1.5	95.0	88.2
1.7	95.5	86.3
1.8	96.3	86.3
1.9	98.0	86.3
2.0	98.6	86.3
2.1	98.6	84.3
2.2	98.6	81.4
2.3	98.6	78.4
2.4	98.6	74.5
3.6	99.3	54.9

[0111] 表 2:在诊断严重细菌性败血症中对所测试的变量的 ROC曲线的分析
 [0112]

测试结果 变量	曲线下 面积	标准 偏差 (a)	渐近 显著性 (b)	渐近95% 置信区间	
				下限	上限
HBP (ng/ml)	.954	.017	.000	.920	.988
HBP/WBC 比	.949	.022	.000	.905	.993
HBP/WBC 比 或 HBP 水平 (ng/ml)	.960	.019	.000	.923	.997
CRP (mg/ml)	.719	.040	.000	.641	.797
IL6 (pg/ml)	.789	.038	.000	.714	.863
乳酸盐(mmol/l)	.769	.050	.000	.697	.841
WBC 计数	.511	.050	.820	.413	.608

[0001]

序列表

<110> 汉莎医药有限公司
<120> 诊断方法
<130> N101680A SER
<150> GB 0711327.7
<151> 2007-06-12
<160> 1
<170> PatentIn 版本 3.0

<210> 1
<211> 222
<212> PRT
<213> 智人 (homo sapiens)

<400> 1

Ile Val Gly Gly Arg Lys Ala Arg Pro Arg Gln Phe Pro Phe Leu Ala
1 5 10 15

Ser Ile Gln Asn Gln Gly Arg His Phe Cys Gly Gly Ala Leu Ile His
20 25 30

Ala Arg Phe Val Met Thr Ala Ala Ser Cys Phe Gln Ser Gln Asn Pro
35 40 45

Gly Val Ser Thr Val Val Leu Gly Ala Tyr Asp Leu Arg Arg Arg Glu
50 55 60

Arg Gln Ser Arg Gln Thr Phe Ser Ile Ser Ser Met Ser Glu Asn Gly
65 70 75 80

Tyr Asp Pro Gln Gln Asn Leu Asn Asp Leu Met Leu Leu Gln Leu Asp
85 90 95

Arg Glu Ala Asn Leu Thr Ser Ser Val Thr Ile Leu Pro Leu Pro Leu
100 105 110

[0002]

Gln	Asn	Ala	Thr	Val	Glu	Ala	Gly	Thr	Arg	Cys	Gln	Val	Ala	Gly	Trp
	115						120					125			

Gly	Ser	Gln	Arg	Ser	Gly	Gly	Arg	Leu	Ser	Arg	Phe	Pro	Arg	Phe	Val
	130					135					140				

Asn	Val	Thr	Val	Thr	Pro	Glu	Asp	Gln	Cys	Arg	Pro	Asn	Asn	Val	Cys
145					150					155					160

Thr	Gly	Val	Leu	Thr	Arg	Arg	Gly	Gly	Ile	Cys	Asn	Gly	Asp	Gly	Gly
				165					170					175	

Thr	Pro	Leu	Val	Cys	Glu	Gly	Leu	Ala	His	Gly	Val	Ala	Ser	Phe	Ser
			180					185						190	

Leu	Gly	Pro	Cys	Gly	Arg	Gly	Pro	Asp	Phe	Phe	Thr	Arg	Val	Ala	Leu
	195						200						205		

Phe	Arg	Asp	Trp	Ile	Asp	Gly	Val	Leu	Asn	Asn	Pro	Gly	Pro
	210					215					220		

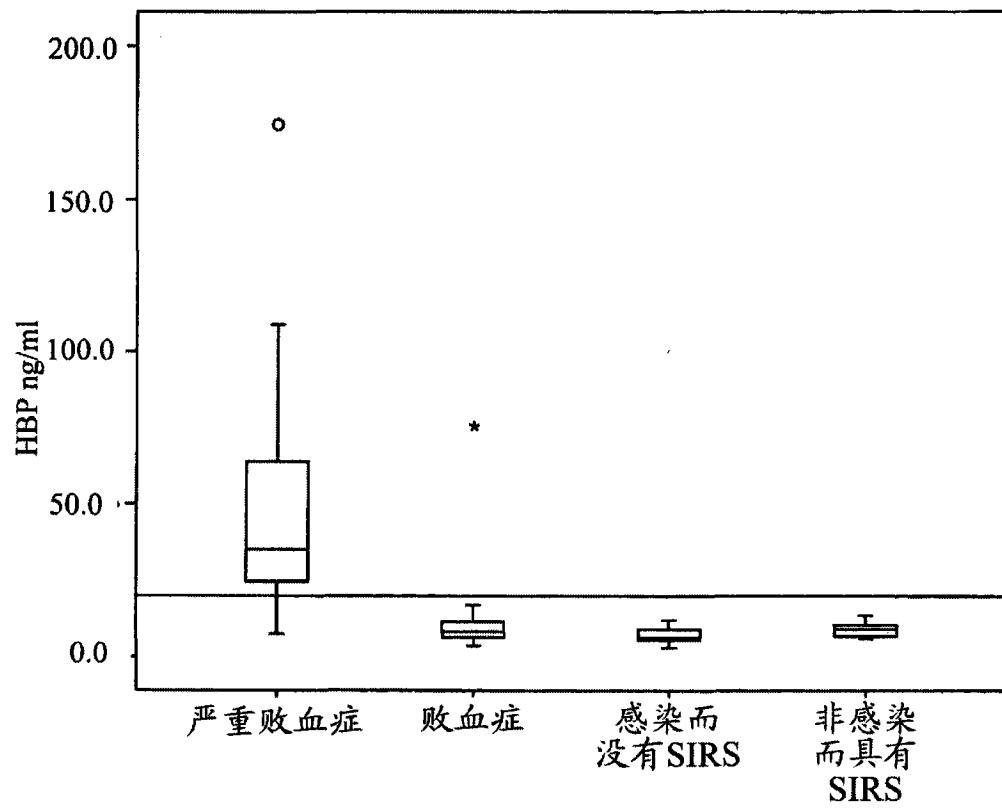


图 1a

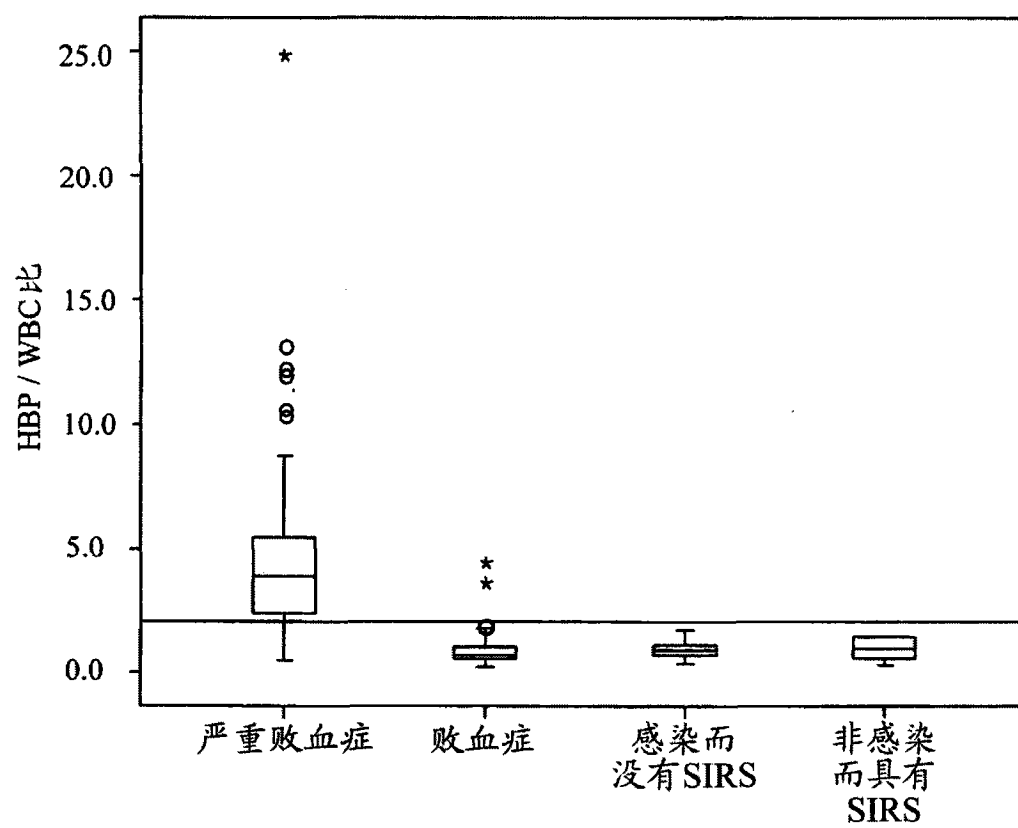


图 1b

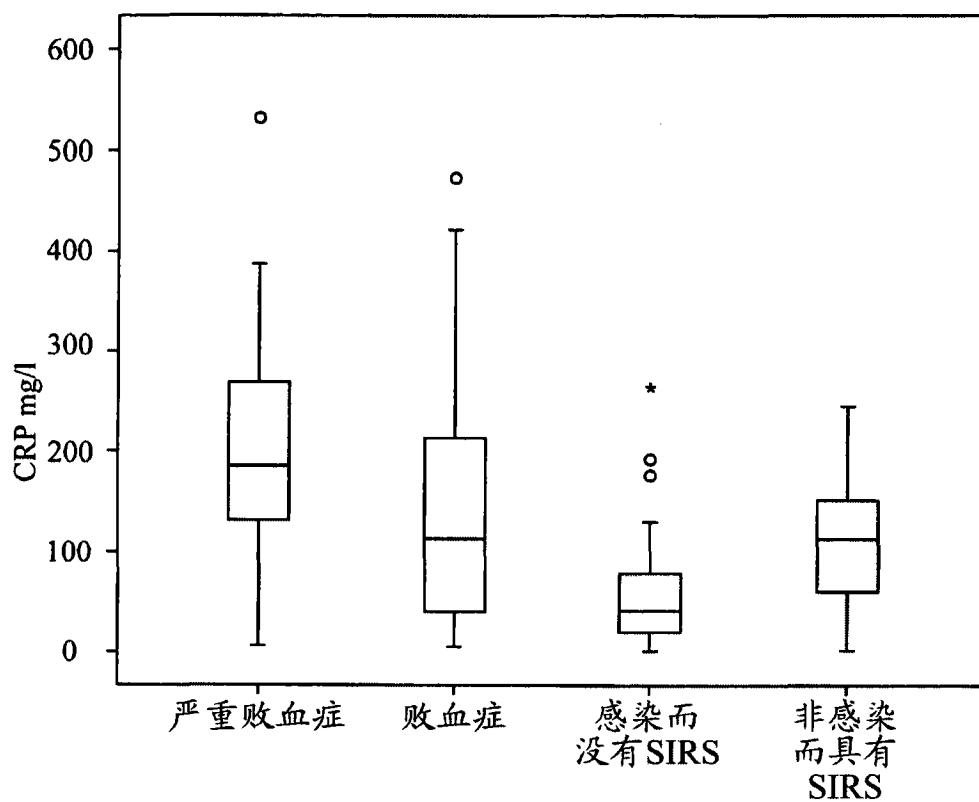


图 1c

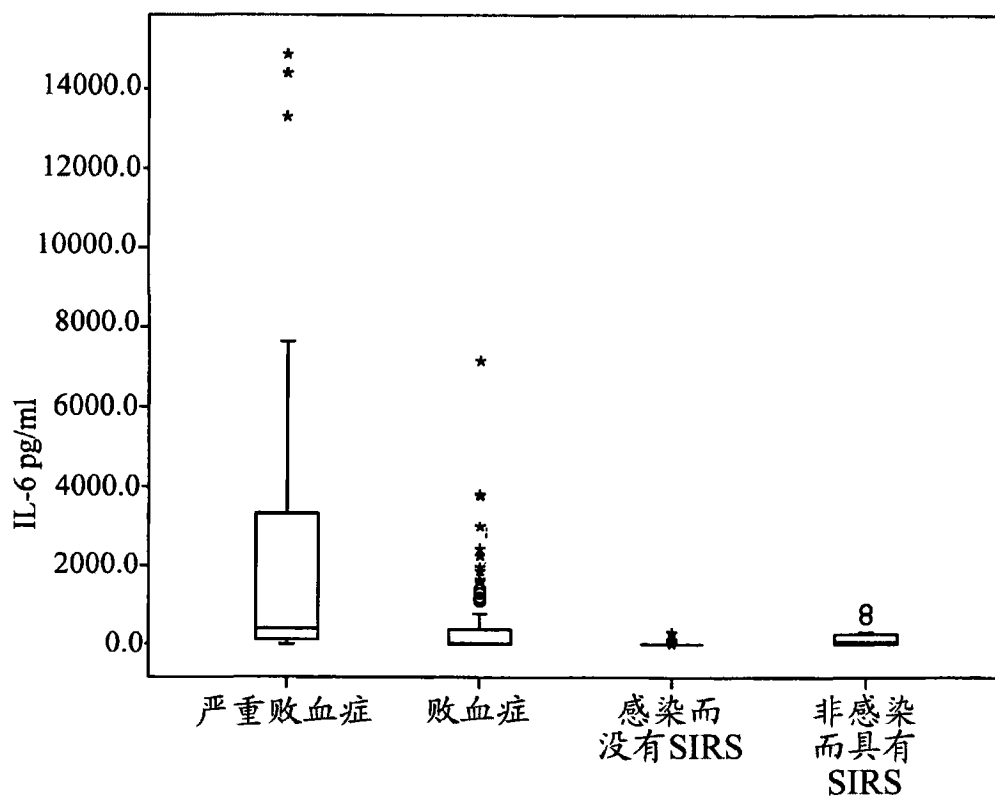


图 1d

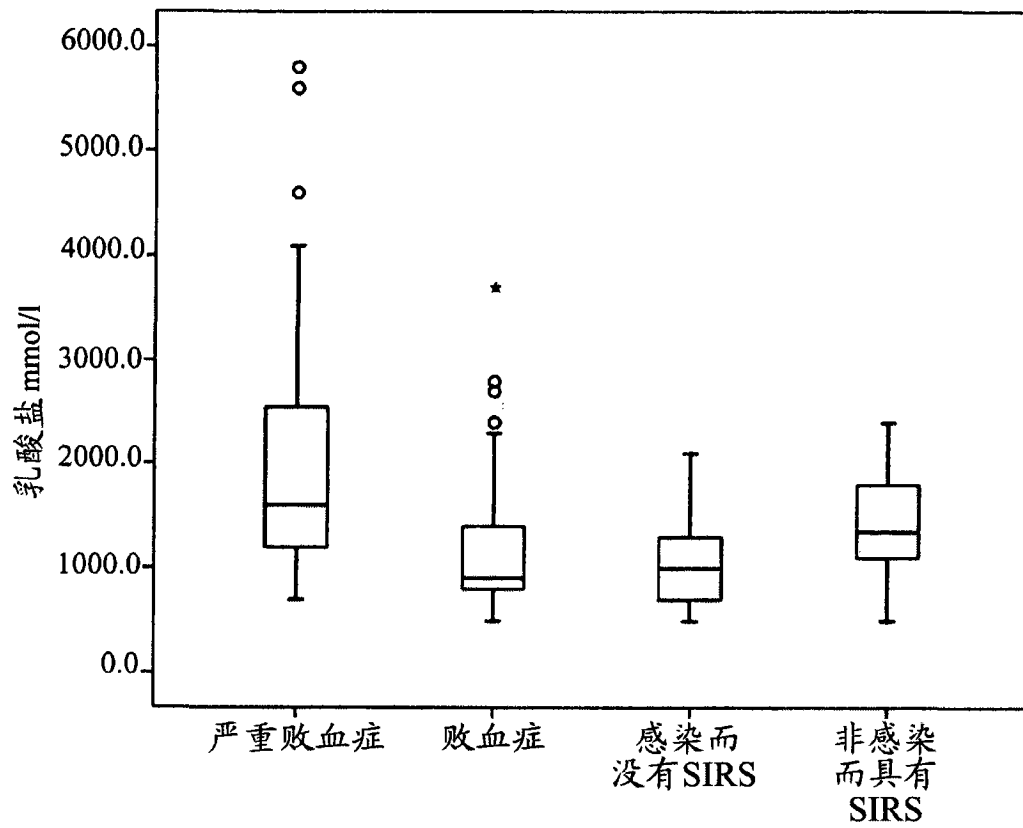


图 1e

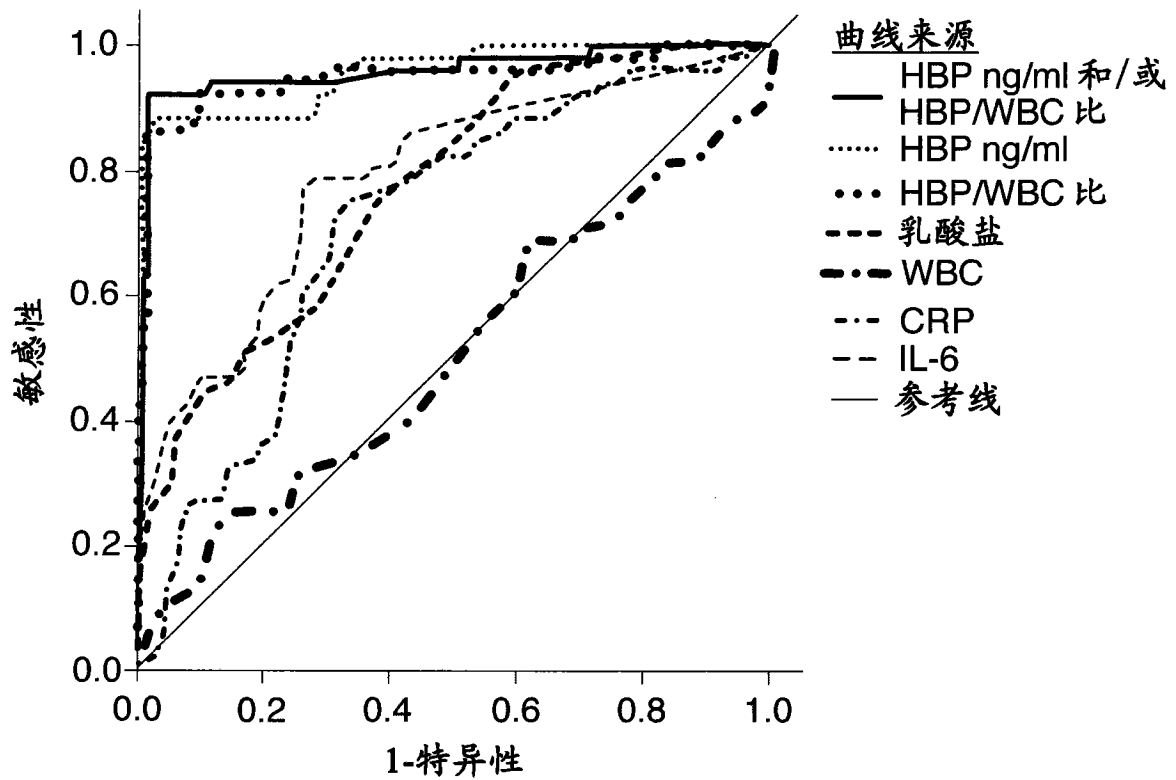


图 2

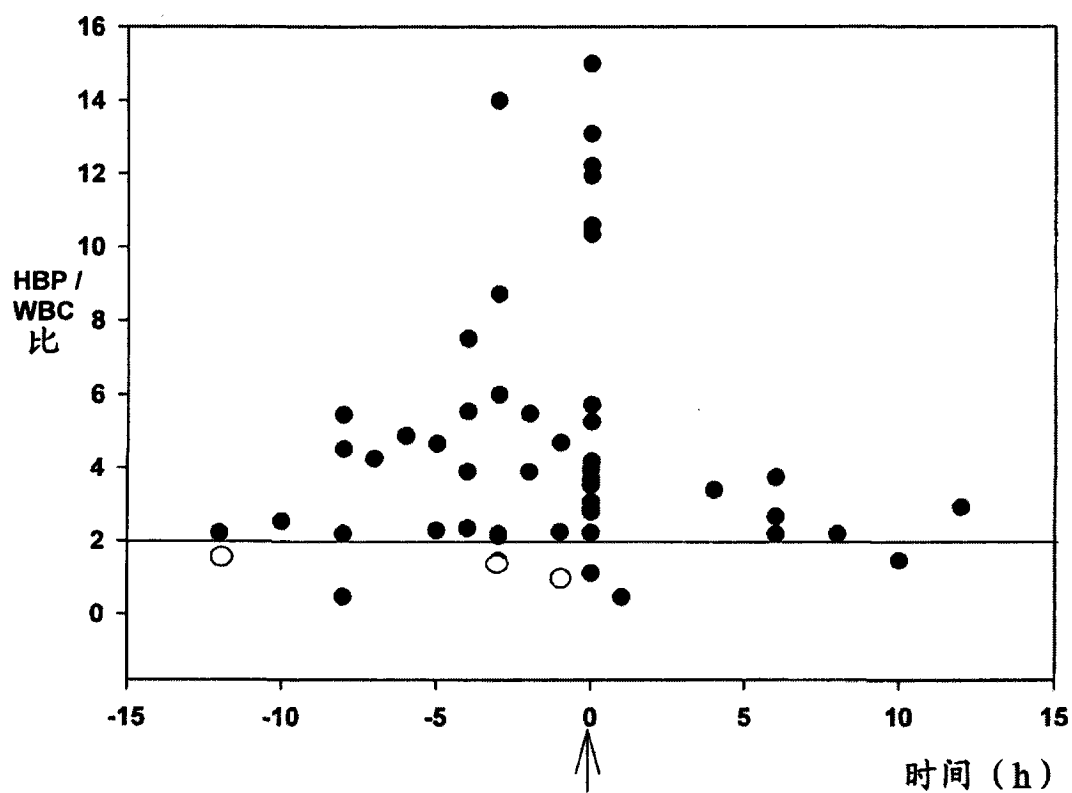


图 3a

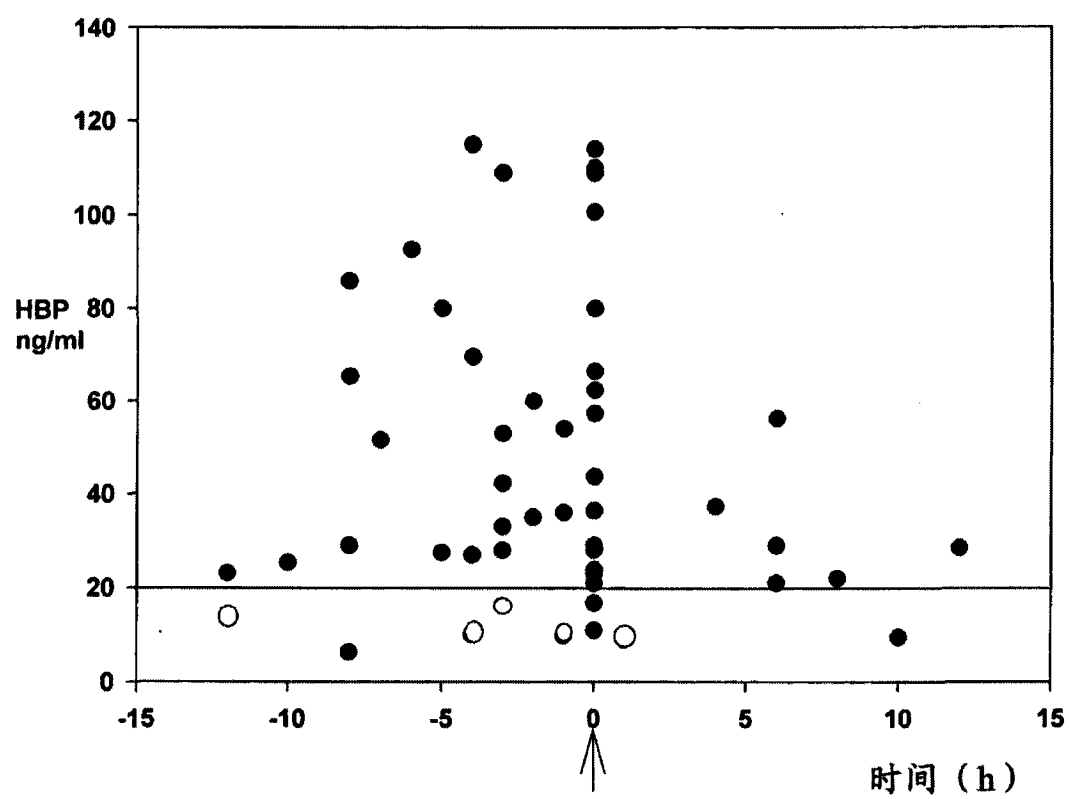


图 3b

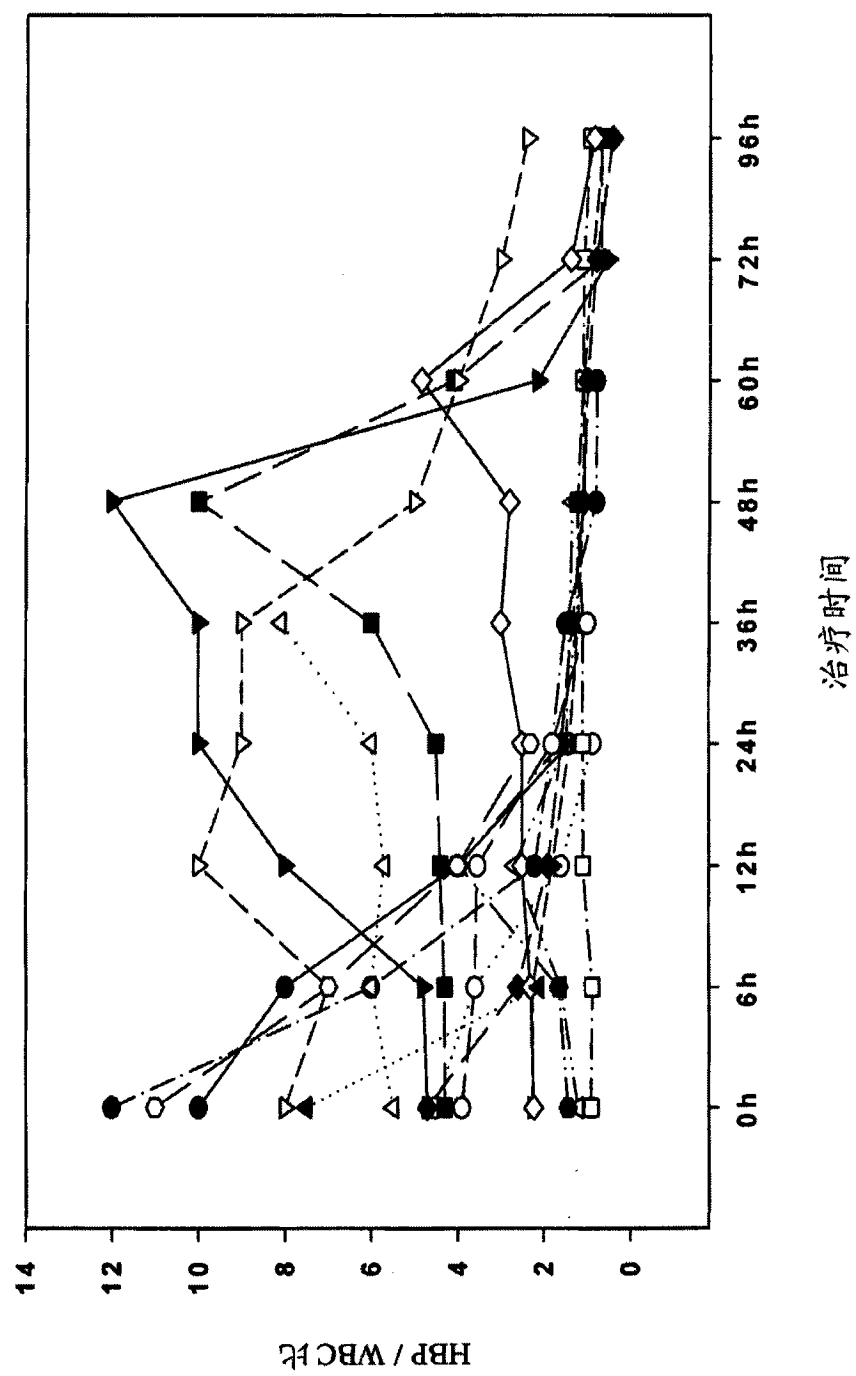


图 4a

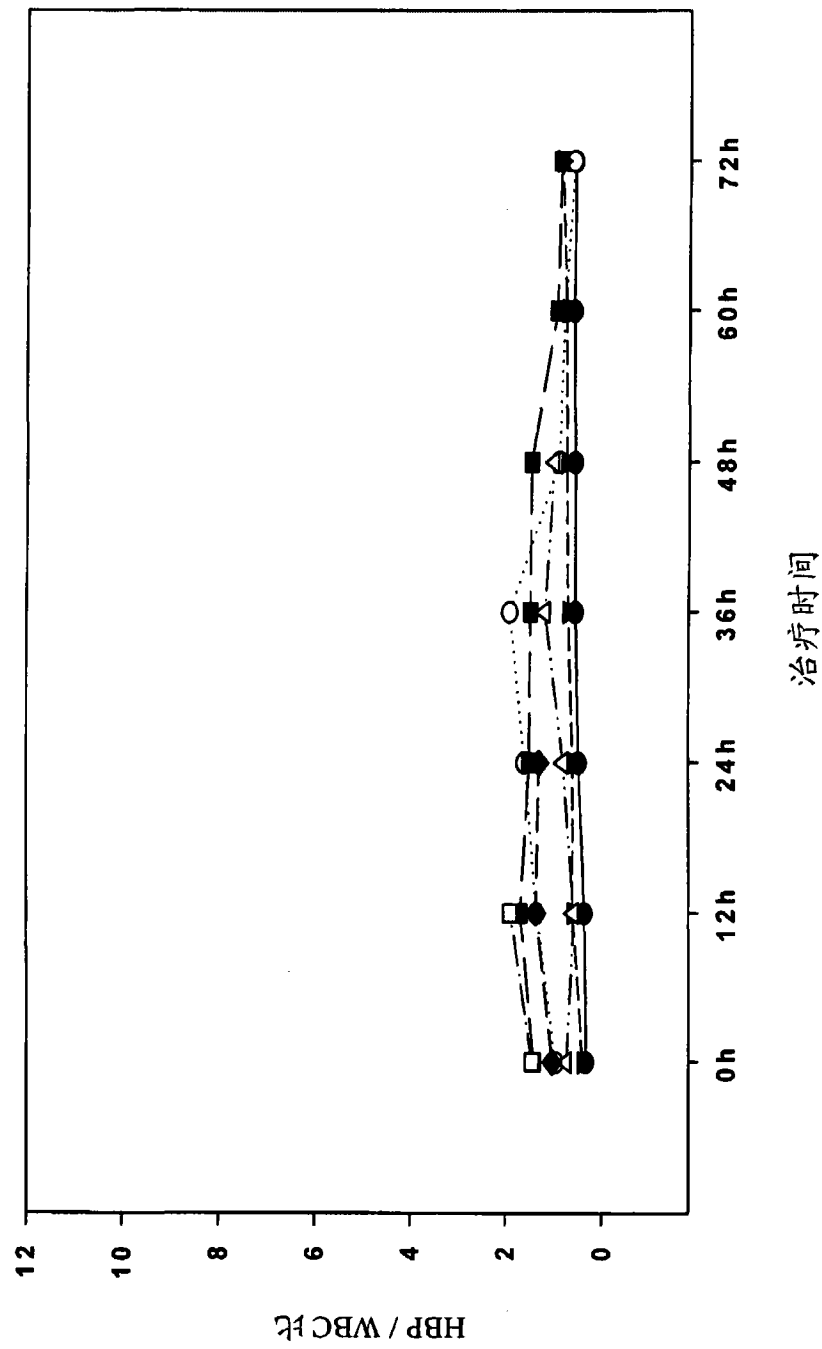


图 4b