



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101688869 B

(45) 授权公告日 2014. 09. 17

(21) 申请号 200880018171. X

(22) 申请日 2008. 05. 08

(30) 优先权数据

102007021443. 1 2007. 05. 08 DE

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2009. 11. 30

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/DE2008/000781 2008. 05. 08

(87) PCT国际申请的公布数据

W02008/135038 DE 2008. 11. 13

(73) 专利权人 布拉姆斯有限公司

地址 德国亨宁斯多夫

(72) 发明人 A·贝格曼 J·施特鲁克

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 殷骏

(51) Int. Cl.

G01N 33/74 (2006. 01)

(56) 对比文件

EP 1564558 A1, 2005. 08. 17,

CN 1950521 A, 2007. 04. 18,

CN 1918473 A, 2007. 02. 21,

审查员 刘树柏

权利要求书1页 说明书9页

序列表4页 附图2页

(54) 发明名称

利用 NT-proET-1 的诊断和风险分层

(57) 摘要

本发明涉及用于心脏病以及呼吸道和肺部疾病的诊断和 / 或风险分层的方法, 根据所述方法测定了游离片段 N- 末端内皮素原 (N-terminal proendothelin) (NT-proET-1 ; 根据图 1 的前内皮素原 (preproET) 的 AS 18-52) 或其片段和肽段。

Met Asp Tyr Leu Leu Met Ile Phe Ser Leu Leu Phe Val Ala Cys Gln
1 5 20 25 30
Gly Ala Pro Gln Thr Ala Val Leu Gln Ala Gln Leu Ser Ala Val Gly
35 40 45 50 55 60
Gln Asn Gly Gly Gln Lys Pro Thr Pro Ser Pro Pro Trp Arg Leu Arg
65 70 75 80
Arg Ser Lys Arg Cys Ser Cys Ser Ser Leu Met Asp Lys Gln Cys Val
85 90 95 100
Tyr Phe Cys His Leu Asp Ile Ile Thr Val Asn Thr Pro Gln His Val
105 110 115 120
Val Pro Tyr Gly Leu Gly Ser Pro Arg Ser Lys Arg Ala Leu Gln Asn
125 130 135 140
Leu Leu Pro Thr Lys Ala Thr Asp Arg Gln Asn Arg Cys Gln Cys Ala
145 150 155 160
Ser Gln Lys Asp Lys Lys Cys Tyr Asn Phe Cys Gln Ala Gly Lys Gln
165 170 175 180
Leu Arg Ala Gln Asp Ile Met Gln Lys Asp Trp Asn Asn His Lys Lys
185 190 195 200
Gly Lys Asp Cys Ser Lys Leu Gly Lys Lys Cys Ile Tyr Gln Gln Leu
205 210 215 220
Val Arg Gly Arg Lys Ile Arg Arg Ser Ser Gln His Leu Arg Gln
225 230 235 240
Thr Arg Ser Gln Thr Met Arg Asn Ser Val Lys Ser Ser Phe His Asp
245 250 255 260
Pro Lys Leu Lys Gly Lys Pro Ser Arg Gln Arg Tyr Val Thr His Asn
265 270 275 280
Arg Ala His Trp
285 290 295 300

1-17 信号肽
18-52 NT-proET-1
53-73 成熟ET-1
53-90 Big ET-1 (或74-90)

1. 检测待检查的患者中的标记的抗体在制备试剂盒或诊断设备中的用途,所述标记选自 SEQ ID No. 6、SEQ ID No. 2 和 SEQ ID No. 3,所述试剂盒或诊断设备用于心脏病体外诊断和 / 或风险分层。
2. 根据权利要求 1 所述的用途,其特征在于所述心脏病选自心肌梗塞以及心功能不全。
3. 根据权利要求 1 所述的用途,所述试剂盒或诊断设备用于鉴定处于心脏病的增加的风险的患者和 / 或不良预后的患者。
4. 根据权利要求 1 所述的用途,其中所述患者是有症状和 / 或无症状的患者。
5. 根据权利要求 4 所述的用途,所述患者是急症患者。
6. 根据权利要求 1 所述的用途,所述试剂盒或诊断设备用于临床决策的执行。
7. 根据权利要求 6 的用途,所述临床决策是利用药物进一步的处理和治疗的临床决策。
8. 根据权利要求 6 的用途,所述临床决策是在重症护理或急症护理中的临床决策。
9. 根据权利要求 6 的用途,所述临床决策是使患者入院的决策。
10. 根据权利要求 1 所述的用途,所述试剂盒或诊断设备用于预后、鉴别诊断性早期识别和识别、严重程度评估和伴随治疗的疾病进程评估。
11. 根据权利要求 1 至 10 任一所述的用途,其特征在于,对所述标记的测定是平行或者同时进行的。
12. 根据权利要求 1 至 10 任一所述的用途,其特征在于,对至少一个患者的样本进行标志物的测定。
13. 根据权利要求 1 至 10 任一所述的用途,其特征在于,所述测定在自动分析仪上进行。
14. 根据权利要求 13 所述的用途,其特征在于,所述测定借助 Kryptor 进行。
15. 根据权利要求 1 至 10 任一所述的用途,其特征在于,所述测定利用快速测试进行。
16. 根据权利要求 15 所述的用途,其特征在于,所述快速测试是以单个或多个参数测定进行的。

利用 NT-proET-1 的诊断和风险分层

[0001] 本发明涉及用于心脏病以及呼吸道和肺部疾病诊断和 / 或风险分层的方法, 其中进行游离片段 N- 末端内皮素原 (NT-proET-1 ; 根据图 1 的前内皮素原 (preproET) 的 AS 18-52) 或其片段和肽段的测定。

[0002] 为了采用合适的治疗, 心脏病和 / 或呼吸道和肺部疾病的早期诊断以及鉴别在急诊室中已是必要的, 其与临床决策的需要相结合。在现有技术中, 已描述成熟 ET-1 (21 AS) 用于诊断目的, 其包括前体蛋白 Big-ET1 (38AS, 参见图 1) (Rossi GP, Seccia TM, Albertin G, Pessina AC. Measurement of endothelin : clinical and research use. Ann Clin Biochem 2000 ; 37 (Pt 5) : 608-26. 2 ; Aubin P, LeBrun G, Moldovan F, Villette JM, Creminon C, Dumas J 等人, Sandwich-type enzyme immunoassay for big endothelin-I in plasma : concentrations in healthy human subjects unaffected by sex or posture. Clin Chem 1997 ; 43 : 64-70)。此外, 已知的是内皮素激素原用于脓毒症诊断由申请人在 WO 00/22439 和 EP 1121600 B1 中公开。

[0003] 另外, 在 EP 1564558 B1 中描述了具有前内皮素原的氨基酸序列 93-212 或 168-212 (图 1, SEQ ID No. 1) 的 C- 末端内皮素原片段 (CT-proET-1) 用于对内皮素 -1 或大 - 内皮素 -1 含量的间接测定的心血管疾病诊断。

[0004] 但是, 在利用迄今为止已知的标记的情况下, 已知诊断方法的缺点仍旧是风险患者的早期和全面检测总是不能充分地成功, 并且因此, 风险分层是不充分的。因此, 本发明的一个目的是开发用于心脏病以及呼吸道和肺部疾病风险分层的方法, 所述方法能够改进风险患者的检测。

[0005] 此外, 缺点是, 在现有技术中, 通常标记的灵敏性和 / 或特异性是不足的。

[0006] 因此, 另一个目的是提供用于心脏病以及呼吸道和肺部疾病风险分层的方法, 其中至少一种标记或标记的组合在体外诊断中具有足够的灵敏性和特异性。

[0007] 因此, 本发明的目的提供用于心脏病和 / 或呼吸道和肺部疾病诊断和 / 或风险分层的方法。

[0008] 所述目的是通过用于心脏病以及呼吸道和肺部疾病诊断和风险分层的方法来实现, 其中进行 N- 末端内皮素原 (缩写为 : “NT-proET-1”) 或其片段和肽段的测定 (见下文, 根据本发明的方法)。

[0009] 令人惊讶的是, NT-proET-1 或其片段和肽段对于心脏病以及呼吸道和肺部疾病的诊断具有高灵敏性和特异性 (参见实施例和附图)。

[0010] 根据本发明, 术语“心脏病”特别是包括“急性冠脉综合征”及其冠心病的不同阶段, 其是直接危及生命的。这特别是涉及急诊医学, 即急性心肌梗塞和 / 或心绞痛, 以及还有心源性猝死。除急性心肌梗塞外, 其根据 WHO 标准 (WHO (1979) : Nomenclature and criteria for diagnosis of ischemic heart disease. Report of the Joint International Society and Federation of Cardiology/World Health Organization task force on standardization of clinical nomenclature, Circulation 59 (3) : 607-609) 被定义为急性的持续大于 20 分钟的胸痛事件, 与 ST 段抬高, 和 / 或心肌酶的增加相关, 还

涉及术语不稳定型心绞痛 (AP), 其根据本发明被认为是“心脏病”(Hamm CW :Leitlinien : Akutes Koronarsyndrom (ACS) –Teil 1 : ACS ohne persistierende ST-Hebung [Guidelines : Acute Coronary Syndrome (ACS) Part 1 : ACS without persistent ST segment elevation]. Z Kardiol (2004) 93 : 72–90)。

[0011] 在本发明的内容中, “心肌梗塞”(心脏病发作, AMI (急性心肌梗塞)) 指急性和危及生命的心脏病, 其中由于血液供给的限制(局部缺血)发生部分心肌(心肌)的坏死或组织死亡(梗塞)原因在于, 其通常存在大于 20 分钟。心脏病发作的主要症状是突然发生的持续大于 20 分钟并且通常是严重的胸部疼痛(“胸痛”), 其可以放射传播至肩部、手臂、下颌和上腹, 并且可伴有出汗、恶心以及可能的呕吐。心肌梗塞的后果, 可能是心力衰竭。

[0012] 术语“心肌梗塞后”意思是这样的患者, 其在过去已经遭遇例如, 大于 1 小时, 特别是 20 小时, 特别是 1 至 5 天, 或 3 至 5 天的心肌梗塞并且目前处于后期, 并且未遭遇直接的致命后果, 但可以间接地和直接地预计到进一步不利的事件, 例如患者又一次(后发的)心肌梗塞、心力衰竭或死亡发生, 或另外的恶化。

[0013] 在本发明的内容中, “心功能不全”还应包括在“心脏病”中。“心功能不全”是心脏急性或慢性无力向组织提供足够血液从而提供足够的氧以确保在静息或负荷情况下组织的物质代谢。临床上, 当典型症状(呼吸困难、疲劳、液体潴留)存在时, 存在心功能不全, 其根本原因是在收缩或舒张功能障碍意义上的心脏功能紊乱。根据本发明还包括慢性心功能不全 (CHF) (Kardiologie compact, published by Christian Mewis, Reimer Riessen und Ioakim Spyridopoulos, 第 2 未修订版, Thieme 2006)。下列可能是心功能不全的原因: 除了高血压(高血压 (hypertension)) 和 / 或冠状血管的动脉硬化(钙化)(冠心病)以外, 还有瓣膜性心脏病(例如风湿热的迟发后果)、心肌炎(心肌的炎症)、心率失常、心肌梗塞。根据本发明还包括具有(充血性)心功能不全的高血压心脏病、具有(充血性)心功能不全的高血压性心脏病和肾脏疾病、原发性右心功能不全、次发性右心功能不全、无症状的左心功能不全 (NYHA I 期)、在较重的体力活动过程中有症状的左心功能不全 (NYHA II 期)、在较轻的体力活动过程中有症状的左心功能不全 (NYHA III 期)、在休息时有症状的左心功能不全 (NYHA IV 期) 和心源性休克。

[0014] 在本发明的内容中, “呼吸道和肺部疾病”的意思特别是“肺部和呼吸道感染”, 具体而言, 由细菌、病毒、真菌, 或寄生虫引起的这些感染, 例如适应症如下呼吸道感染 (LRTI)、支气管炎、肺炎、结节病、支气管扩张或非心源性肺水肿。另外, 根据本发明, 下呼吸道感染 (LRTI), 支气管炎, 腐败性支气管炎和肺炎是优选的。完全特别优选的是肺炎, 特别是社区获得性肺炎 (CAP) 以及下呼吸道感染 (LRTI)。

[0015] 在本发明的内容中, 肺炎应解释为肺部组织的急性或慢性疾病, 其感染是由细菌、病毒或真菌、寄生虫引起的, 很少情况还由有毒物质的吸入中毒引起或免疫引起。对于临床医生而言, 肺炎是不同症状的组合(发烧或体温过低、寒战、咳嗽、胸膜炎性胸部疼痛、痰产生增加、呼吸频率增加、叩音浊 (**Klopfschalldämpfung**)、支气管呼吸、近耳高音罗音、胸膜摩擦音), 与至少一种胸部 X 射线图像上可识别的浸润结合 (Harrisons Innere Medizin [Harrison's Internal Medicine], published by Manfred Dietel, Norbert Suttrop 和 Martin Zeitz, ABW Wissenschaftsverlag 2005)。

[0016] 在本发明的内容中, “呼吸道和肺部疾病”特别是指“慢性肺部和呼吸道疾病”, 具

体而言这样的适应症如肺间质疾病和肺纤维化、慢性阻塞性肺部疾病 (COPD), 特别是 COPD 感染恶化、支气管哮喘, 特别是支气管哮喘的感染恶化以及支气管癌。完全特别优选的是 COPD, 特别是 COPD 感染恶化。

[0017] 根据本发明, COPD 是指一组慢性疾病, 其特征为在体力活动过程中咳嗽、痰增加以及呼吸困难。主要地, 应当提及慢性阻塞性支气管炎和肺气肿。这两种疾病模式的特征在于特别是呼气吃力。COPD 主要症状还通俗地称为“吸烟者的咳嗽”。本发明对急性恶化是特别有利的。

[0018] 上述所有适应症还在例如, Pschyrembel, De Gruyter, 9th edition, Berlin 2004 中描述。

[0019] 根据本发明, 术语“风险分层”, 包括患者特别是急症患者和风险患者, 其具有较差的预后的鉴定, 目的是为了更深入诊断和治疗 / 处理心脏病, 特别是急性冠脉综合征和心肌梗塞、心绞痛和 / 或心肌梗塞后、心功能不全或呼吸道和肺部疾病, 特别是感染和慢性炎症, 以使该疾病达到尽可能有利的进程的目的。因此根据本发明的风险分层允许有效的治疗方法, 它可例如在急性冠脉综合征的情况下, 以经皮冠状动脉介入和更新的药物的形式存在, 或用于处理或治疗心功能不全, 例如, 利用 ACE 抑制剂、AT1 拮抗剂: 血管紧张素 II 受体阻滞剂 (亚型 1)、 β 阻滞剂比索洛尔、卡维地洛、美托洛尔和奈必洛尔、加压素受体拮抗剂、起始于 NYHA III 期的醛固酮拮抗剂、钙致敏剂 (左西孟旦), 或利用抗生素用于处理或治疗感染或慢性呼吸道和肺部疾病。

[0020] 因此, 本发明同样涉及患者的鉴定, 所述患者处于心脏病以及呼吸道和肺部疾病的增加的风险和 / 或具有心脏病以及呼吸道和肺部疾病不良预后, 具体而言在有症状和 / 或无症状患者中, 特别是急症患者。

[0021] 特别是, 在急症和 / 或重症护理的情况下, 通过利用根据本发明的方法, 可以特别有利地进行可靠的分层。因此, 根据本发明的方法使导致治疗的迅速成功以及防止死亡的临床决策成为可能。这些临床决策还包括使用药物的进一步处理, 用于心脏病以及呼吸道和肺部疾病的处理或治疗。

[0022] 因此, 本发明还涉及用于患有心脏病和 / 或呼吸道和肺部疾病的患者的诊断和 / 或风险分层方法, 以用于临床决策的执行, 例如利用药物进一步处理和治疗, 优选在时间紧迫的重症或急症护理, 包括使患者入院的决策。

[0023] 因此, 在进一步优选的实施方式中, 根据本发明的方法涉及了对心脏病和 / 或呼吸道疾病的治疗控制。

[0024] 在进一步优选的实施方式中, 进行根据本发明的用于诊断和 / 或风险分层的方法以用于预后、鉴别诊断性早期识别和识别、严重程度评估、以及伴随治疗的疾病进程的评估。

[0025] 在进一步优选的实施方式中, 本发明涉及用于心脏病和 / 或呼吸道和肺部疾病的早期诊断或鉴别诊断或预后的体外诊断方法, 其中在待检查的患者中进行 NT-proET-1 标记, 或其片段和肽段的测定。

[0026] 在根据本发明的方法的一个实施方式中, 从待测患者中采集体液, 优选血液, 任选地为全血或血清或可用血浆, 并且在体外 / 离体 (就是说在人类或动物机体以外) 进行诊断。由于 NT-proET-1 标记或其片段和肽段的测定, 实现了高灵敏性和特异性 (参见实施例

和附图),并且基于在至少一个患者样品中的存在量可以进行诊断或风险分层。

[0027] 在本发明的内容中,“NT-proET-1”理解为人蛋白或多肽(其可获自前内皮素原,并且在前内皮素原的构架中(SEQ ID No. 1 和图 1),包括具有氨基酸 18-52 的游离片段)以及可从其获得的片段或肽段,特别是 APETAVLGAELSAV(SEQ ID No. 2), preproET-1(SEQ ID No. 1 和图 1) 的位点 18-31 以及 GENGGEKPTSPPPWRLRRSKR(SEQ ID No. 3), preproET-1(SEQ ID No. 1 和图 1) 的位点 32-52。此外,根据本发明的这些多肽可具有翻译后修饰,例如乙二醇化(Glykolisierung),脂质体化或衍生化。

[0028] 在进一步的实施方式中,NT-proET-1 或其片段和肽段的测定可附加地用另外的标记进行,特别优选地是已经指示心脏病,特别是冠心病和/或呼吸道和肺部疾病的那些标记。

[0029] 因此,本发明涉及根据本发明方法的这样一个实施方式,其中测定是利用至少一种另外的选自炎症标记、心血管标记、神经激素标记或局部缺血标记的标记,在待测的患者中附加地进行。

[0030] 根据本发明,炎症标记可选自 C-反应蛋白(CRP)、细胞因子例如 TNF- α 、白细胞介素例如 IL-6、降钙素原(1-116, 3-116)和粘附分子例如 VCAM 或 ICAM 中的至少一种标记,而心血管标记特别是指示心肌组织坏死的标记,并且影响血压的标记可选自下述中的至少一种标记:肌酸激酶、肌红蛋白、髓过氧化物酶、利尿钠蛋白,特别是 ANP(或 ANF)、proANP、NT-proANP、BNP、proBNP、NT-proBNP 或其各自的序列段,心肌肌钙蛋白、CRP。此外,就此而言还应包括循环调节激素(原),特别是如原胃泌素释放肽(proGRP)、内皮素原-2、内皮素原-3、原-瘦蛋白、原-神经肽 Y、原-促生长素抑制素、原-神经肽 YY、原-阿黑皮素、原-肾上腺髓质素(proADM)、原-加压素(proAVP)或其各自的序列段。局部缺血标记可选自肌钙蛋白 I 和 T、CK-M β 中的至少一种标记。另外,神经激素标记可以是至少一种另外的利尿钠蛋白,特别是 ANP(或 ANF)、proANP、NT-proANP、BNP、proBNP 或其各自的序列段。在本发明的进一步的实施方式中,根据本发明的方法可根据体外诊断,利用标记的平行或同时测定(例如具有 96 和更多孔的多孔板)来进行,其中对至少一个患者样品进行测定。

[0031] 此外,根据本发明的方法及其测定可在基于自动分析系统的诊断设备中进行,特别是利用 Kryptor(<http://www.kryptor.net/>)。

[0032] 在进一步的实施方式中,根据本发明的方法及其测定可利用快速测试(例如侧向流动测试或床边体外诊断(Point of Care))进行,其可以单个或多个参数测定。在一个特别优选的实施方式中,它是自我测试或适用于急症诊断的设备。

[0033] 本发明进一步涉及 NT-proET-1 或其片段和肽段的用途,用于心脏病和/或呼吸道和肺部疾病的风险分层和/或早期诊断或鉴别诊断或心脏病和/或呼吸道和肺部疾病预后的体外诊断。

[0034] 另一个目的是提供相应的诊断设备或其用于进行根据本发明的方法的用途。

[0035] 在本发明的内容中,这种诊断设备理解为最广义上的阵列或分析(例如免疫分析、ELISA 等等)的设备,用于进行根据本发明的方法。

[0036] 本发明进一步涉及用于心脏病和/或呼吸道和肺部疾病诊断和/或风险分层的试剂盒,其包括用于测定 NT-proET-1、或其片段和肽段,任选地以上提及的另外的标记的检测试剂。这些检测试剂包括例如抗体等等。

[0037] 提供下列实施例和附图用于更详细地描述本发明,但是本发明将不限于这些实施例和附图。

实施例和附图:

免疫分析

[0038] 利用夹心免疫分析测定 NT-proET-1,如 Struck 等所述 (Struck J, Morgenthaler NG, Bergmann A. Proteolytic processing pattern of the endothelin-1 precursor in vivo. *Peptides* 2005 ;26 ;2482-6)。

肽合成:

[0039] 源自 preproET-1 的已知氨基酸序列 (图 1),选择两个区域 (位点 18-31,32-52)。所述区域在一种情况下,添加 N-末端半胱氨酸残基,利用标准方法化学合成为可溶性肽,并纯化,利用质谱和反相 HPLC 控制其质量,并且等份冻干它们 (JPT company, Berlin, Germany)。所述肽的氨基酸序列是: PAV15 CAPETAVLGAELSAV preproET-1 的位点 18-31 (图 1), MPGC22 GENGGEKTPSPPWRLRRSKRC preproET-1 的位点 32-52 (图 1)。此外,合成包括 preproET-1 的位点 18-52 区域的肽 (PAR35APETAVLGAELSAVGENGGEKTPSPPWRLRRSKR)。

缀合与免疫

[0040] 通过 MBS (间-马来酰亚胺苯甲酰-N-羟基琥珀酰亚胺酯,) 的方法,将肽 PAV15 和 MPGC22 缀合至 KLH (匙孔血蓝蛋白) 载体蛋白 (参见操作说明书“NHS-Esters-Maleimide Crosslinkers”PIERCE 公司, Rockford, IL, USA)。根据以下方案,将这些缀合物用于免疫绵羊:每只绵羊起始接受 100 μ g 缀合物 (相对于缀合物的肽部分的数量信息) 并且随后每只 50 μ g 缀合物 (相对于缀合物的肽部分的数量信息) 每四周一次。免疫起始后第四个月开始,每四周从每只绵羊收集 700ml 血液,并通过离心从所述血液获得抗血清。由 MicroPharm 公司, Carmarthen, UK 进行结合、免疫和抗血清的获得。

抗体纯化

[0041] 在 1-步法中,从抗血清制备肽-特异性抗体,所述抗血清在免疫后的第四个月开始产生。为了该目的,首先将肽 PAV15 和 MPGC22 偶合至 SulfoLink 凝胶 (参见操作说明书“SulfoLink Kit”PIERCE 公司, Rockford, IL, USA)。为了偶合,每 5ml 凝胶提供 5mg 肽。来自抗所述肽的绵羊抗血清的肽-特异性抗体的亲和纯化如下进行:首先将肽柱洗涤三次,每次交替利用 10ml 洗脱缓冲液 (50mM 柠檬酸, pH 2.2) 和结合缓冲液 (100mM 磷酸钠, 0.1% Tween, pH 6.8)。经 0.2 μ m 过滤 100ml 抗血清并且与可用的柱材料混合。此外,用 10ml 结合缓冲液定量将凝胶从柱上冲洗掉。温育在振荡下于室温过夜进行。将这些批次定量转移至空柱 (NAP 25, Pharmacia, 空的)。去除流过物。然后,用不含蛋白质的 250ml 结合缓冲液 (洗脱液蛋白含量 < 0.02 A280nm) 进行洗涤步骤。将洗脱缓冲液添加至洗涤柱,并且每个级分收集 1ml。对于每个级分,利用 BCA 方法测定蛋白含量 (参见 PIERCE 公司, Rockford, IL, USA 的操作说明书)。将具有蛋白浓度 > 0.8mg/ml 的级分集中。利用 BCA 方

法对收集物进行蛋白测定后,抗-PAV15 抗体获得 27mg 产量以及抗-MPGC22 抗体获得 35mg 产量。

标记

[0042] 经过 NAP-5 凝胶过滤柱 (Pharmacia), 根据操作说明书, 将 500 μ l 纯化的抗-MPGC22 抗体 (参见上文) 在 1ml 100mM 磷酸钾缓冲液 (pH 8.0) 中进行缓冲液更换。利用 100mM 磷酸钾缓冲液 (pH8.0), 将抗体溶液的蛋白浓度调节至 1.5mg/ml。对于化学发光标记, 对抗体进一步进行如下处理: 将 67 μ l 抗体溶液与 10 μ l MA70-吖啶 (Akridinium)-NHS-酯 (1mg/ml; HOECHSTBehring) 混合并在室温温育 15 分钟。然后, 添加 423 μ l 的 1M 甘氨酸并另外温育 10 分钟。然后, 根据操作说明书, 经过 NAP-5 凝胶过滤柱 (Pharmacia) 在 1ml 洗脱液 A (50mM 磷酸钾, 100mM NaCl, pH 7.4) 中将标记批次进行缓冲液更换, 并且就此去除低-分子量成分。为了分离未结合至抗体的最后剩余的标记, 进行凝胶过滤 HPLC (柱: Waters Protein Pak SW300)。加载样品并利用洗脱液 A, 以流速 1ml/分钟层析样品。利用光度计, 测定波长 280nm 和 368nm。368nm/280nm 的吸收比 (作为抗体标记程度的测量标准) 峰值为 0.10+/-0.01。收集含有单体抗体的级分 (停留时间 8-10min) 并收集在 3ml 100mM 磷酸钠、150mM NaCl、5% 牛血清白蛋白、0.1% 叠氮化钠 pH 7.4 中。

偶合

[0043] 如下用纯化的抗-PAV15 抗体包被经照射的 5ml 聚苯乙烯小管 (Greiner): 在 50mM Tris, 100mM NaCl, pH 7.8 中将抗体稀释至 6.6 μ g/ml 的浓度。将 300 μ l 该溶液吸移至每个小管中。将小管在 22°C 温育 20 小时。吸出溶液。然后, 将每个小管填充 4.2ml 10mM 磷酸钠、2% Karion FP、0.3% 牛血清白蛋白, pH 6.5。20 小时后, 吸出溶液。最后, 将小管在真空干燥仪中干燥。

免疫分析的进行和评估

[0044] 使用的标准材料为肽 PAR35, 其在正常马血清 (SIGMA 公司) 中进行连续稀释。如此产生的标准物根据原始肽重量配置浓度。夹心免疫分析如下起始: 50 μ l 标准或样本和 200 μ l 分析缓冲液 (100mM 磷酸钠、150mM NaCl、5% 牛血清白蛋白、0.1% 非特异性绵羊 IgG、0.1% 叠氮化钠 pH 7.4), 其包括 MA70-标记抗体的 1 百万 RLU (相对光单位) 被吸移至分别用抗体包被的测试小管。在 22°C 下进行温育 2 小时, 同时振荡。然后, 每次利用 1ml 洗涤溶液 (0.1% Tween20) 对每个小管进行四次洗涤步骤, 滴干, 并利用光度计 (BERTHOLD, LB952T; base reagents BRAHMS AG) 测量结合至管的化学发光。利用 MultiCalc (Spline Fit) 软件, 从标准曲线读取样本的 NT-proET-1 浓度。可以利用所述的分析法测定的分析物被称为 N-末端内皮素原-1 (NT-proET-1)。

临床评价

正常范围

[0045] 在健康对照者样本 (n = 200) 中测定 NT-proET-1 浓度。中值为 30.5pmol/L, 测定

的最小值为 2.0, 最高值为 53pmol/L, 95% 在 16.3 和 47.2pmol/L 之间。

心功能不全 / 严重程度

[0046] 测定患有慢性或急性失代偿性心功能不全患者中 NT-proET-1 浓度。NT-proET-1 浓度与心功能不全严重程度相关, 具体地是与增加的严重性相关: 四类严重程度 NYHA I-IV 的 NT-proET-1 浓度中值为: 35.4、37.3、45.5 和 83.9pmol/L (参见图 2)。

慢性心功能不全 / 诊断

[0047] 测定患有慢性心功能不全的 316 名患者的集合和 200 名健康对照患者的 NT-proET-1 值。接受者 - 工作特征分析显示 AUC 为 0.72。对于临界值 49.7pmol/L, 该分析产生 34.3% 灵敏性, 98% 特异性。对于临界值 47.2pmol/L, 该分析产生 38.5% 灵敏性, 95% 特异性。

慢性心功能不全 / 预后

[0048] 测定了患有慢性心功能不全的 316 名患者的集合的 NT-proET-1 值。监测患者的平均时间为 360 天。在该时间段, 42 名患者死亡, 274 名存活。利用接受者 - 工作特征分析, 测定预后死亡率的最佳临界值 (定义为灵敏性和特异性的最大产生): 51.3pmol/L。在该临界值, 预后的灵敏性为 71.4%, 特异性为 74.5%。在临界值 51.3pmol/L 死亡的似然比为 2.8。

	< 51.3pmol/L	> 51.3pmol/L
存活	204	70
死亡	12	30

急性心功能不全 / 诊断

[0049] 测定了 125 名患有急性呼吸困难的患者的集合的 NT-proET-1 值。125 名患者中 69 名患有心功能不全。用于心功能不全鉴别诊断的接受者工作特征分析显示 AUC 为 0.72。对于临界值 111pmol/L, 该分析产生的灵敏性为 10.2%, 特异性为 98%。对于临界值 90.5pmol/L, 该分析产生的灵敏性为 17.5%, 特异性为 95%。

急性心功能不全 / 预后

[0050] 测定了 69 名患有急性失代偿性心功能不全的患者的集合的 NT-proET-1 值。监测患者 360 天的时间。在这个时期中, 21 名患者死亡, 48 名存活。利用接受者 - 工作特征分析, 测定预后死亡率的最佳临界值 (定义为灵敏性和特异性的最大产生): 64pmol/L。在该临界值, 预后的灵敏性为 66.6%, 特异性为 68.7%。在临界值 64pmol/L, 死亡似然比为 2.0。

	< 64pmol/L	> 64pmol/L
存活	33	15

死亡	7	14
----	---	----

心肌梗塞 / 预后

[0051] 从 246 名患有急性心肌梗塞的患者中在心肌梗塞发作发生三天后获得样品, 并且测定 NT-proET-1。监测患者 60 天的时期。在这个时期中, 220 名患者没有不良事件, 26 名死亡或由于心功能不全再入院治疗。利用接受者-工作特征分析 ($AUC = 0.70$), 测定死亡率或由于心功能不全再入院治疗的预后的最佳临界值 (定义为灵敏性和特异性的最大产生): 63.9pmol/l 。在该临界值, 预后灵敏性为 65.4% , 特异性为 73.6% 。在临界值 63.9pmol/l , 不良事件的似然比为 2.5。

	$< 63.9\text{pmol/l}$	$> 63.9\text{pmol/l}$
没有不良事件	162	58
死亡 / 心功能不全	9	17

肺炎 / 严重程度和预后

[0052] 从患有社区获得性肺炎的入院的 142 名患者获得样品, 并且测定 NT-proET-1。监测患者 70 天的时期。在这个时期中, 10 名患者死亡。NT-proET-1 浓度随 PSI (肺炎严重程度指数, 其是一种疾病严重程度的评分) 而上升 (图 3), 并且平均为 53pmol/l , 高于健康对照患者 (30.5pmol/l)。对于死亡率预后, 接受者-工作特征分析显示 AUC 为 0.89。利用接受者-工作特征分析, 测定死亡率预后的最佳临界值 (定义为灵敏性和特异性的最大产生): 77pmol/l 。在该临界值, 预后灵敏性为 100% , 特异性为 81.2% 。在临界值 77pmol/l , 死亡率的似然比为 5.5。

	$< 77\text{pmol/l}$	$> 77\text{pmol/l}$
没有不良事件	108	24
死亡	0	10

恶化的 COPD

[0053] 测定了患有慢性阻塞性肺部疾病并同时具有下呼吸道感染的 53 名患者的 NT-proET-1。这些患者的平均值为 47pmol/l , 高于健康对照 (30.5pmol/l), 但是低于肺炎患者 (参见上文 53pmol/l)。表: 纽约心脏学会 (NYHA) 分类 NYHA I 体力活动不受限。日常体力活动不会导致过度的疲劳、心律失常、呼吸困难或心绞痛。NYHA II 体力活动轻度受限。休息时无症状, 但日常体力活动导致疲劳、心律失常、呼吸困难或心绞痛。NYHA III 体力活动明显受限。休息时无症状, 但轻于日常的体力活动即导致疲劳、心律失常、呼吸困难或心绞痛。NYHA IV 在任何体力活动后加重, 并且在休息时亦有症状。卧床。

附图描述:

[0054] 图 1 显示前内皮素原-1 的氨基酸序列 (AS), 具有如下片段:1-17 信号肽、18-52NT-proET-1、53-73 成熟 ET-1、53-90 大-ET-1 (或 74-90)。

图 2 :

[0055] NT-proET-1 浓度作为心功能不全严重程度的函数。图显示是健康对照 (n = 200) 和基于 NYHA 严重程度评分 (NYHA I :n = 22、NYHA II :n = 126、NYHA III :n = 132、NYHA 4 :n = 17) 分级的心功能不全患者的平均值 (+SEM)。

[0056] 图 3 :NT-proET-1 作为心功能不全严重程度的函数。图显示的是健康对照 (n = 200) 和基于肺炎严重程度指数 (PS II :n = 36、PSI II :n = 44、PSI III :n = 25、PSI IV :n = 19、PSI V :n = 18) 分级的肺炎患者的平均值 (+SEM)。

[0001]

序列表

<110> Brahms Aktiengesellschaft

<120> 利用 NT-proET-1 的诊断和风险分层

<130> 03/07 BRAHMS 35W0

<140> PCT/DE2008/

<141> 2008-05-08

<150> 10 2007 041 443.1

<151> 2007-05-08

<160> 6

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 212

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Met Asp Tyr Leu Leu Met Ile Phe Ser Leu Leu Phe Val Ala Cys Gln
1 5 10 15

Gly Ala Pro Glu Thr Ala Val Leu Gly Ala Glu Leu Ser Ala Val Gly
20 25 30

Glu Asn Gly Gly Glu Lys Pro Thr Pro Ser Pro Pro Trp Arg Leu Arg
35 40 45

Arg Ser Lys Arg Cys Ser Cys Ser Ser Leu Met Asp Lys Glu Cys Val
50 55 60

Tyr Phe Cys His Leu Asp Ile Ile Trp Val Asn Thr Pro Glu His Val
65 70 75 80

[0002]

Val Pro Tyr Gly Leu Gly Ser Pro Arg Ser Lys Arg Ala Leu Glu Asn
85 90 95

Leu Leu Pro Thr Lys Ala Thr Asp Arg Glu Asn Arg Cys Gln Cys Ala
100 105 110

Ser Gln Lys Asp Lys Lys Cys Trp Asn Phe Cys Gln Ala Gly Lys Glu
115 120 125

Leu Arg Ala Glu Asp Ile Met Glu Lys Asp Trp Asn Asn His Lys Lys
130 135 140

Gly Lys Asp Cys Ser Lys Leu Gly Lys Lys Cys Ile Tyr Gln Gln Leu
145 150 155 160

Val Arg Gly Arg Lys Ile Arg Arg Ser Ser Glu Glu His Leu Arg Gln
165 170 175

Thr Arg Ser Glu Thr Met Arg Asn Ser Val Lys Ser Ser Phe His Asp
180 185 190

Pro Lys Leu Lys Gly Lys Pro Ser Arg Glu Arg Tyr Val Thr His Asn
195 200 205

Arg Ala His Trp
210

<210> 2

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人

<400> 2

[0003]

Ala Pro Glu Thr Ala Val Leu Gly Ala Glu Leu Ser Ala Val
1 5 10

<210> 3

<211> 21

<212> PRT

<213> 智人

<400> 3

Gly Glu Asn Gly Gly Glu Lys Pro Thr Pro Ser Pro Pro Trp Arg Leu
1 5 10 15

Arg Arg Ser Lys Arg
20

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 合成衍生物

<400> 4

Cys Ala Pro Glu Thr Ala Val Leu Gly Ala Glu Leu Ser Ala Val
1 5 10 15

<210> 5

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 合成衍生物

<400> 5

Gly Glu Asn Gly Gly Glu Lys Pro Thr Pro Ser Pro Pro Trp Arg Leu

[0004]

1	5	10	15
---	---	----	----

Arg Arg Ser Lys Arg Cys
20

<210> 6
<211> 35
<212> PRT
<213> 智人

<400> 6

Ala Pro Glu Thr Ala Val Leu Gly Ala Glu Leu Ser Ala Val Gly Glu
1 5 10 15

Asn Gly Gly Glu Lys Pro Thr Pro Ser Pro Pro Trp Arg Leu Arg Arg
20 25 30

Ser Lys Arg
35

Met	Asp	Tyr	Leu	Leu	Met	Ile	Phe	Ser	Leu	Leu	Phe	Val	Ala	Cys	Gln	1	5	10	15
Gly	Ala	Pro	Glu	Thr	Ala	Val	Leu	Gly	Ala	Glu	Leu	Ser	Ala	Val	Gly	20	25	30	
Glu	Asn	Gly	Gly	Glu	Lys	Pro	Thr	Pro	Ser	Pro	Pro	Trp	Arg	Leu	Arg	35	40	45	
Arg	Ser	Lys	Arg	Cys	Ser	Cys	Ser	Ser	Leu	Met	Asp	Lys	Glu	Cys	Val	50	55	60	
Tyr	Phe	Cys	His	Leu	Asp	Ile	Ile	Trp	Val	Asn	Thr	Pro	Glu	His	Val	65	70	75	80
Val	Pro	Tyr	Gly	Leu	Gly	Ser	Pro	Arg	Ser	Lys	Arg	Ala	Leu	Glu	Asn	85	90	95	
Leu	Leu	Pro	Thr	Lys	Ala	Thr	Asp	Arg	Glu	Asn	Arg	Cys	Gln	Cys	Ala	100	105	110	
Ser	Gln	Lys	Asp	Lys	Lys	Cys	Trp	Asn	Phe	Cys	Gln	Ala	Gly	Lys	Glu	115	120	125	
Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Ile	Met	Glu	Lys	Asp	Trp	Asn	Asn	His	Lys	Lys	130	135	140	
Gly	Lys	Asp	Cys	Ser	Lys	Leu	Gly	Lys	Lys	Cys	Ile	Tyr	Gln	Gln	Leu	145	150	155	160
Val	Arg	Gly	Arg	Lys	Ile	Arg	Arg	Ser	Ser	Glu	Glu	His	Leu	Arg	Gln	165	170	175	
Thr	Arg	Ser	Glu	Thr	Met	Arg	Asn	Ser	Val	Lys	Ser	Ser	Phe	His	Asp	180	185	190	
Pro	Lys	Leu	Lys	Gly	Lys	Pro	Ser	Arg	Glu	Arg	Tyr	Val	Thr	His	Asn	195	200	205	
Arg	Ala	His	Trp													210			

1-17 信号肽

18-52 NT-proET-1

53-73 成熟ET-1

53-90 Big ET-1 (或74-90)

图 1

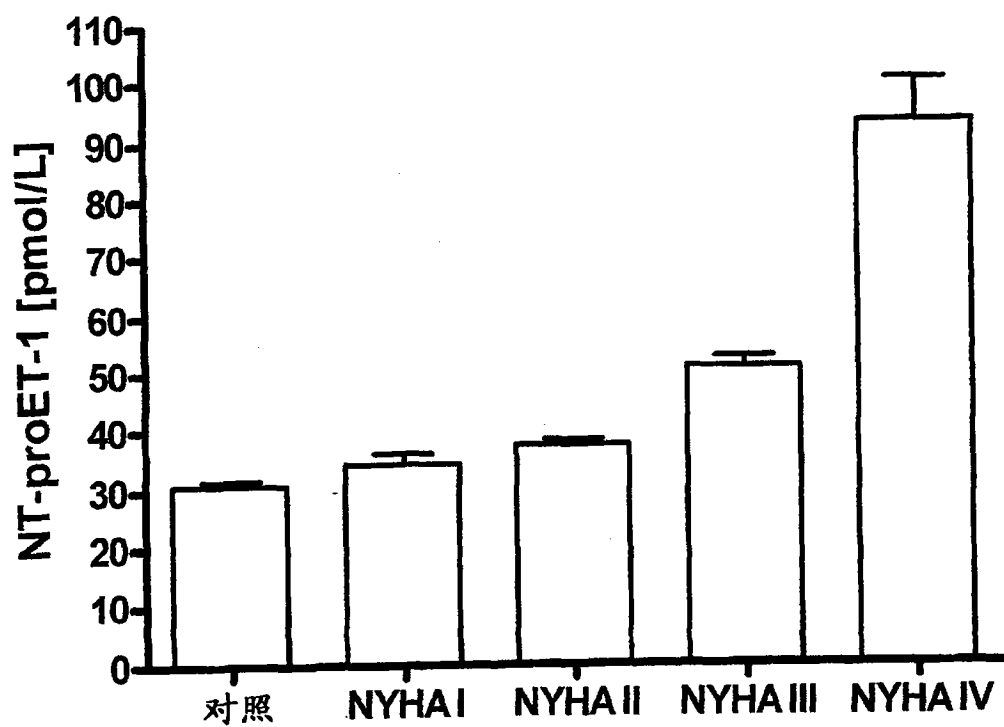


图 2

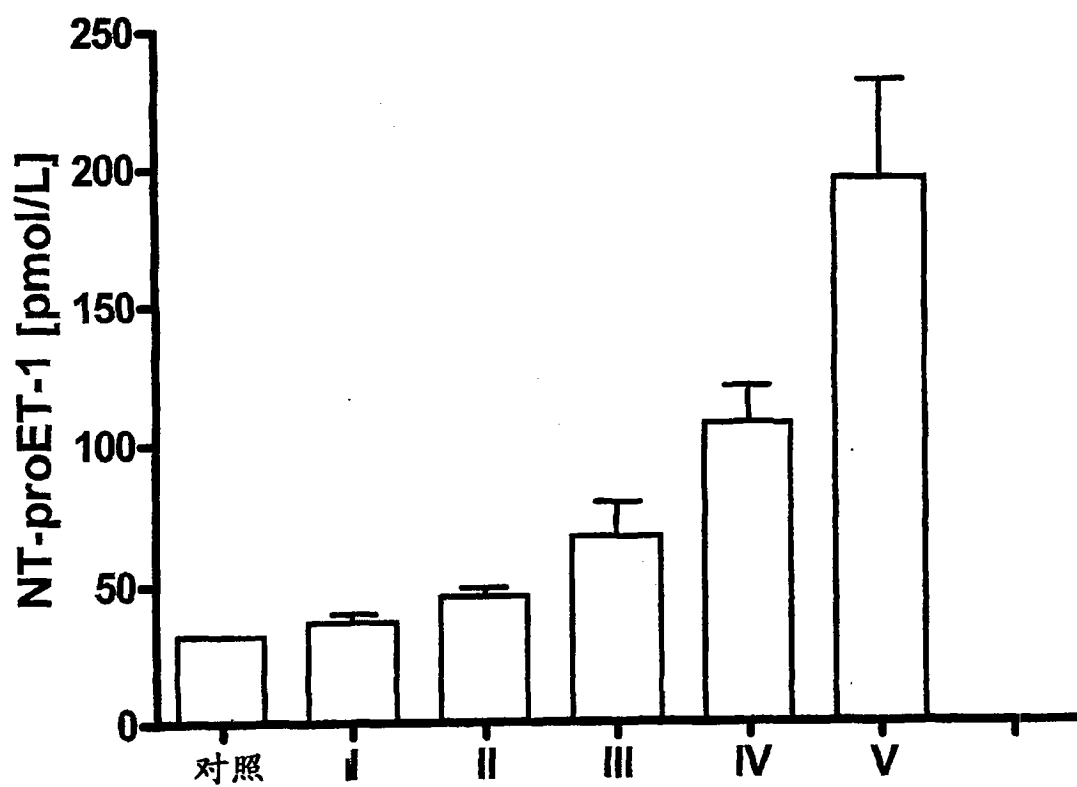


图 3