



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101611314 B

(45) 授权公告日 2014. 03. 05

(21) 申请号 200780047509. X

(22) 申请日 2007. 12. 20

(30) 优先权数据

102006060112. 2 2006. 12. 20 DE

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2009. 06. 22

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/DE2007/002300 2007. 12. 20

(87) PCT国际申请的公布数据

W02008/074315 DE 2008. 06. 26

(73) 专利权人 布拉姆斯股份公司

地址 德国亨宁斯多夫

(72) 发明人 A·博格曼 J·斯塔克

(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 33/50 (2006. 01)

(56) 对比文件

JP 2007316009 A, 2007. 12. 06,

Gumusel 等. Adrenotensin: an ADM gene product with the opposite effects of ADM. 《Life Sciences》. 1995, 第 57 卷 (第 8 期),

Zhou 等. Vasoactive effects of adrenotensin and its interactions with adrenomedullin. 《Chinese Medical Journal》. 2000, 第 113 卷 (第 3 期),

Struck 等. Identification of an Adrenomedullin precursor fragment in plasma of sepsis patients. 《Peptides》. 2004, 第 25 卷 (第 8 期),

Gumusel 等. Adrenotensin: An adrenomedullin gene product contracts pulmonary blood vessels. 《Peptides》. 1996, 第 17 卷 (第 3 期),

审查员 寇飞

权利要求书2页 说明书8页

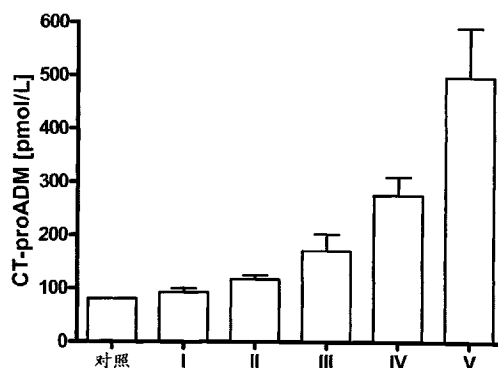
序列表3页 附图2页

(54) 发明名称

利用新颖标志物 CT-proADM 进行诊断和危险分层

(57) 摘要

本发明涉及用于对疾病进行诊断和 / 或危险分层的新颖的诊断标志物 CT-proADM (preproADM 的 C 末端片段, SEQ ID No. 1)。本发明还公开了对疾病, 尤其是对心血管疾病、心功能不全、肺和呼吸道感染和 / 或炎症进行诊断和 / 或危险分层的方法。在所述方法中, 对待测患者进行标志物 CT-proADM、或其片段或肽段、或包含在标志物组合 (标志物组、标志物簇) 中的该标志物进行测定。本发明还涉及用于实施所述方法的诊断设备和试剂盒。



1. 用于测定标志物 CT-proADM (SEQ ID No. 1) 或其肽段或片段或者包含在标志物组合中的 CT-proADM 的检测试剂在制备试剂盒或诊断装置中的用途, 所述试剂盒或诊断装置用于心功能不全、心肌梗塞、肺炎和慢性阻塞性肺疾病 COPD 的体外诊断和 / 或危险分层。

2. 根据权利要求 1 所述的用途, 其特征在于, 所述心功能不全包括慢性心功能不全、伴有充血性心功能不全的高血压性心脏病、伴有充血性心功能不全的高血压性心脏病和肾病、原发性右心室功能不全、继发性右心室功能不全、无不适左心室功能不全 (NYHA (纽约心脏协会) I 级)、增加应力下有不适的左心室功能不全 (NYHA II 级)、较轻应力下有不适的左心室功能不全 (NYHA III 级)、在休息状态下有不适的左心室功能不全 (NYHA IV 级)、心源性休克、心肌炎、心律不齐和 / 或高血压。

3. 根据权利要求 1 所述的用途, 其特征在于, 所述试剂盒或诊断装置还包含检测至少一个选自下列的其他标志物的检测试剂: 炎症标志物、心血管标志物、神经激素标志物或缺血标志物。

4. 根据权利要求 3 所述的用途, 其特征在于, 所述炎症标志物选自下列至少一种标志物: C-反应蛋白 CRP, 细胞因子, 白细胞介素, 降钙素原, 和粘附分子。

5. 根据权利要求 4 所述的用途, 其特征在于, 所述炎症标志物选自下列至少一种标志物: 细胞因子 TNF- α , 白细胞介素 IL-6, 降钙素原 1-116, 降钙素原 3-116, 和粘附分子 VCAM 或 ICAM。

6. 根据权利要求 3 所述的用途, 其特征在于, 所述心血管标志物选自下列至少一种标志物: 肌酸激酶, 髓过氧化物酶, 和肽素, 肌红蛋白, 利钠蛋白或其部分序列, 心肌钙蛋白, CRP, 以及调节循环的激素、激素原或在每一情况下其部分序列。

7. 根据权利要求 6 所述的用途, 其特征在于, 所述心血管标志物选自下列至少一种标志物: ANP 或 ANF、proANP、NT-proANP、BNP、proBNP、NT-proBNP、胃泌素释放肽原 proGRP、内皮素 1 原、瘦蛋白原、神经肽 Y 原、生长抑素原、神经肽 YY 原、阿黑皮素原、和肽素或在每一种情况下其部分序列。

8. 根据权利要求 3 所述的用途, 其特征在于, 所述缺血标志物选自下列至少一种标志物: 肌钙蛋白 I 和 T、CK-MB。

9. 根据权利要求 3 所述的用途, 其特征在于, 所述神经激素标志物是至少一种利钠蛋白或其部分序列。

10. 根据权利要求 9 所述的用途, 其特征在于, 所述利钠蛋白是 ANP 或 ANF、proANP、NT-proANP、BNP、proBNP、NT-proBNP。

11. 根据权利要求 1-10 之一所述的用途, 其特征在于, 所述标志物的平行或者同时被测定。

12. 根据权利要求 1-10 之一所述的用途, 其特征在于, 所述测定针对至少一个病人样本进行。

13. 根据权利要求 1-10 之一所述的用途, 其特征在于, 所述测定针对自动分析设备进行。

14. 根据权利要求 13 所述的用途, 其特征在于, 所述测定借助于 kryptor 进行。

15. 根据权利要求 1-10 之一所述的用途, 其特征在于, 所述测定借助于快速检验进行。

16. 根据权利要求 15 的用途, 其特征在于, 所述测定在单参数或多参数测定中进行。

17. 根据权利要求 1-10 之一所述的用途,其特征在于,用于临床决策。

18. 根据权利要求 17 的用途,其特征在于,所述试剂盒或诊断装置用于借助疾病的处理或治疗的药物的进一步治疗的临床决策。

19. 根据权利要求 17 的用途,其特征在于,所述试剂盒或诊断装置用于在重症医学或急救医学中患者入院的临床决策。

20. 根据权利要求 17 的用途,其特征在于,所述试剂盒或诊断装置用于患者入院的临床决策。

21. 根据权利要求 1-10 之一所述的用途,其特征在于,所述试剂盒或诊断装置用于预后、用于鉴别诊断性早期诊断和检测、用于严重程度的评价、以及用于伴随治疗评估疾病过程。

利用新颖标志物 CT-proADM 进行诊断和危险分层

[0001] 本发明涉及对疾病进行诊断和/或危险分层的新颖诊断标志物 CT-proADM(preproADM 的 C 末端片段, SEQ ID No. 1)。本发明还涉及对疾病,特别是对心血管疾病、心功能不全、肺及呼吸道感染和/或炎症进行诊断和/或危险分层的方法。在所述方法中,在待测患者中测定 CT-proADM(SEQ ID No. 1)标志物、或其肽段或片段、或者包含在标志物组合(标志物组、标志物簇)中的该标志物。本发明还涉及用于实施所述方法的诊断设备和试剂盒。

[0002] 现有技术描述了如何在诊断中测定肾上腺髓质素原(proADM)和肾上腺髓质素(EP0622458B1, Lewis LK, Smith MW, Yandle TG, Richards AM, Nicholls MG. Adrenomedullin(1-52)measured in human plasma by radioimmunoassay: plasma concentration, adsorption, and storage. Clin Chem 1998;44:571-7; Ueda S, Nishio K, Minamino N, Kubo A, Akai Y, Kangawa K 等人, Increased plasma levels of adrenomedullin in patients with systemic inflammatory response syndrome. Am J Respir Crit Care Med 1999;160:132-6; Kobayashi K, Kitamura K, Etoh T, Nagatomo Y, Takenaga M, Ishikawa T 等人, Increased plasma adrenomedullin levels in chronic congestive heart failure. Am Heart J 1996;131:994-8; Kobayashi K, Kitamura K, Hirayama N, Date H, Kashiwagi T, Ikushima I 等人, Increased plasma adrenomedullin in acute myocardial infarction. Am Heart J 1996;131:676-80.),特别是用于败血症诊断目的(EP1121600B1)。在 EP0622458B1 中同样描述了用于诊断的(前)肾上腺髓质素原的 N 端片段,例如 PAMP(Hashida S, Kitamura K, Nagatomo Y, Shibata Y, Imamura T, Yamada K 等人, Development of an ultrasensitive enzyme immunoassay for human proadrenomedullin N-terminal 20 peptide and direct measurement of two molecular forms of PAMP in plasma from healthy subjects and patients with cardiovascular disease. Clin Biochem 2004;37:14-21)。

[0003] 此外,在 EP1488209B1 中公开了用于诊断目的的肾上腺髓质素原的其他片段,即所谓的肾上腺髓质素原中段(MR-proADM)(Struck J, Tao C, Morgenthaler NG, Bergmann A. Identification of an Adrenomedullin precursor fragment in plasma of sepsis patients. Peptides 2004;25:1369-72; Morgenthaler NG, Struck J, Alonso C, Bergmann A. Measurement of midregional proadrenomedullin in plasma with an immunoluminometric assay. Clin Chem 2005;51:1823-9; Christ-Crain M, Morgenthaler NG, Stolz D, Muller C, Bingisser R, Harbarth S 等人, Pro-adrenomedullin to predict severity and outcome in community acquired pneumonia[ISRCTN04176397]. Crit Care 2006;10:R96; Christ-Crain M, Morgenthaler NG, Struck J, Harbarth S, Bergmann A, Muller B. Mid-regional pro-adrenomedullin as a prognostic marker in sepsis: an observational study. Crit Care 2005;9:R816-24)。

[0004] 但是,非常需要对疾病,特别是心血管疾病、心功能不全、肺和呼吸道感染和/或炎症做出可靠的诊断或进行(危险)分层,尤其是针对进一步临床决策,并且尤其是针对疾

病严重程度——特别是心血管疾病、心功能不全、肺和呼吸道感染和 / 或炎症。

[0005] 本发明的一个目的是提供新颖的标志物。

[0006] 本发明的另外一个目的是为疾病,特别是心血管疾病、心功能不全、肺和呼吸道感染和 / 或炎症提供改进的诊断和 / 或危险分层方法。

[0007] 上述目的一方面通过提供诊断标志物 CT-proADM(肾上腺髓质素原的 C 末段片段, SEQ ID No. 1)、或其肽段或片段得以解决,另一方面,通过对疾病的体外诊断和 / 或危险分层方法得以解决。在所述方法中,在待测患者中测定 CT-proADM(SEQ ID No. 1) 标志物、或其肽段或片段、或者包含在标志物组合(标志物组、标志物簇)中的该标志物(下文称为根据本发明的方法)。

[0008] 根据本发明,术语“危险分层”包括发现预后较差的患病患者,以便对疾病进行更强化诊断和(后续)治疗 / 处理,目的是获得尽可能有利的病程。

[0009] 因此,尤其有利地,借助于根据本发明的方法可以进行可靠的诊断和 / 或危险分层。根据本发明的方法使得能够作出导致较快速诊断的临床决策。这种临床决策还包括通过应用药物进一步治疗,所述药物用于疾病的治疗或疗法。

[0010] 因此,本发明也涉及对患者进行危险分层的方法,尤其是对患者进行危险分层以进行临床决策,尤其是在时间紧迫的重症医学或急救医学中,以及用于患者的入院。

[0011] 在根据本发明所述方法的进一步优选实施方式中,进行诊断和 / 或危险分层用于预后(预测)、用于鉴别诊断性早期诊断和检测、用于严重程度的评价、以及用于伴随治疗的疾病进程评估。

[0012] 在根据本发明所述方法的另一种实施方式中,从待测患者提取体液或者身体组织,优选血液,可选地是全血、血清或可得的血浆,并且在体外 / 离体,即在人或动物体外部进行诊断。由于在至少一个患者样品中测定标志物 CT-proADM(SEQ ID No. 1)、或者其肽段或片段、及其存在量,可以进行诊断和 / 或危险分层。

[0013] 在本发明的范围内,“疾病”被理解为人或者动物,尤其是哺乳动物的疾病。这些疾病,尤其是人类疾病在 Pschyrembel, De Gruyter, Berlin 2004 中描述。

[0014] 然而,尤其有利的是,在本发明的范围内可以对心血管疾病、心功能不全、肺和呼吸道感染和 / 或炎症做出诊断和 / 或分层。

[0015] 术语“心血管疾病”根据本发明包括所有的心脏和血液循环疾病,尤其是例如高血压、冠心病,特别是急性冠状动脉综合征、(急性)心肌梗塞、心绞痛的这类适应症。

[0016] 术语“急性冠状动脉综合征”包括对生命有直接威胁的冠心病的不同阶段。尤其涉及急救医学,即,急性心肌梗塞和 / 或心绞痛以及心源性猝死。除了急性心肌梗塞——根据 WHO 标准(WHO(1979):Nomenclature and criteria for diagnosis of ischemic heartdisease. 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),其被定义为急性胸痛事件持续 20 分钟以上,伴有 ST 段抬高和 / 或心肌酶升高——之外,该术语包括不稳定型心绞痛(AP)——其根据本发明可包含在“急性冠状动脉综合征”中(Hamm CW:Leitlinien: Akutes Koronarsyndrom(ACS)-Teil 1:ACS ohne persistierende ST-Hebung. Z Kardiol(2004)93:72-90)。

[0017] 在本发明范围内,“心功能不全”被理解为指心脏急性或慢性地无力供给组织足够的血液并从而提供足够的氧气,以便确保在静息或负荷(应激)时的组织代谢。在临床上,心功能不全在典型症状(呼吸困难、疲劳、液体潴留)存在时出现,其原因是基于收缩或舒张功能失常意义上的心功能失常。慢性心功能不全(CHF)同样包括在本发明中(Kardiologie compact,由 Chrisian Mewis, Reimer Riessen und Ioakim Spyridopoulos 出版,2. 未修订版, Thieme 2006)。心功能不全的原因可以是:心脏瓣膜缺陷(例如,风湿热的长期后果)、心肌炎(心肌炎症)、心律失常、除过高的血压(高血压)之外和/或附加冠状血管动脉硬化(钙化)(冠心病)的心脏病发作。本发明还包括下列:伴有(充血性)心功能不全的高血压性心脏病、伴有(充血性)心功能不全的高血压性心脏病和肾病、原发性右心室功能不全、继发性右心室功能不全、无不适左心室功能不全(NYHA(纽约心脏协会)I级)、增加负荷下有不适的左心室功能不全(NYHA II级)、较轻负荷下有不适的左心室功能不全(NYHA III级)、在静息状态下有不适的左心室功能不全(NYHA IV级)和心源性休克。

[0018] 在本发明的范围内,术语“肺和呼吸道感染”特别是指由细菌、病毒、真菌或者寄生虫而导致的这种感染,例如,适应症如深部呼吸道感染(LRTI:下呼吸道感染)、支气管炎、肺炎、结节病、支气管扩张、非心源性肺水肿。

[0019] 而且,根据本发明优选深部呼吸道感染(LRTI:下呼吸道感染)、支气管炎、腐败性支气管炎、肺炎。特别优选肺炎,尤其是社区获得性肺炎(CAP:社区相关肺炎)、深部呼吸道感染(LRTI:下呼吸道感染)。

[0020] 在本发明的范围内,肺炎被理解为急性或者慢性肺组织炎症。其感染由细菌、病毒或者真菌引起,少数情况下通过吸入有毒物质而毒性地引起或免疫引起。对于临床医生而言,肺炎构成多种症状群(发热或低体温、战栗、咳嗽、胸膜炎胸痛、痰量增加、呼吸频率增加、浊音(**Klopfschalldämpfung**)、支气管呼吸音、高频率干罗音(**ohrnahe Rasselgeräusche**)、胸膜摩擦音),联合至少一种胸部X光可视浸润(Harrisons Innere Medizin, herausgegeben von Manfred Dietel, Norbert Suttorp und Martin Zeitz, ABW Wissenschaftsverlag 2005)。

[0021] 在本发明的范围内,术语“肺和呼吸道感染性疾病”或“肺和呼吸道炎性疾病”指以下适应症:例如,间质性肺疾病和肺纤维化,慢性阻塞性肺疾病(COPD)、特别是 COPD 感染加重,支气管哮喘、特别是支气管哮喘感染加重,支气管癌。

[0022] 根据本发明, COPD 指一组慢性疾病,其特征是咳嗽、痰多和负荷下呼吸困难。首先,要提及慢性阻塞性支气管炎和肺气肿。这两种疾病的临床表现尤其通过呼气阻塞来表征。而且, COPD 的主要症状被通俗地称为“吸烟者的咳嗽”。本发明在急性加重情况下尤其有利。

[0023] 在本发明的范围内,“CT-proADM”被理解为由 33 个氨基酸组成的游离人类蛋白质或者多肽,所述氨基酸具有氨基酸序列 SEQ ID No. 1:SLPEAGPGRTLVS SKPQAHGAPPPSGSAPHFL;或片段,所述片段具有前肾上腺髓质素原 SEQ ID No. 2(图 1)的氨基酸序列 153-185(153 位表示 Ser, 185 位表示 Leu)(Kitamura K, Sakata J, Kangawa K, Kojima M, Matsuo H, Eto T. Cloning and characterization of cDNA encoding a precursor for human adrenomedullin Biochem Biophys Res Commun 1993;194:720-725);或其肽段和

/ 或其片段。此类片段可以是,例如, SEQ ID No. 1 的氨基酸序列 1-15 和 / 或前肾上腺髓质素原 (图 1) 的 153-167 或 SEQ ID No. 1 的 19-33 和 / 或前肾上腺髓质素原 (图 1) 的 171-185 (见实施例)。CT-proADM 由于其血管收缩效应也被称为肾上腺加压素 (adrenotensin) (Gumusel B, Chang JK, Hyman A, Lippman H. Adrenotensin: an ADM gene product with the opposite effects of ADM. Life Sci 1995 ;57 :PL87-90)。

[0024] 此外,根据本发明的“CT-proADM”可以具有修饰,例如乙二醇化或糖基化、脂质化或者衍生化。

[0025] 在另一种实施方式中,“CT-proADM” (SEQ ID No. 1) 也可额外连同其它标志物测定,其中“CT-proADM”包含在标志物组合 (标志物组,标志物簇) 中,即,优选已经指示出疾病的这种标志物组合。然而,优选此类标志物,其进而指示出本发明范围内优选的适应症 / 疾病,以及可以带来协同效应。

[0026] 由此,本发明涉及根据本发明方法的这样的实施方式,其中额外连同至少一个选自下列的其它标志物对待测患者进行测定:炎症标志物、心血管标志物、神经激素标志物或缺血标志物。

[0027] 根据本发明,炎症标志物可以选自下列至少一种标志物:C-反应蛋白 (CRP),细胞因子诸如例如 TNF- α , 白细胞介素诸如例如 IL-6,降钙素原 (1-116, 3-116),和粘附分子如 VCAM (血管细胞粘附分子) 或者 ICAM (细胞间粘附分子);且心血管标志物选自下列至少一种标志物:肌酸激酶,髓过氧化物酶,和肽素,肌红蛋白,利钠蛋白——特别是 ANP (或 ANF)、proANP、NT-proANP、BNP、proBNP、NT-proBNP 或者在每一情况下其部分序列,心肌钙蛋白,CRP。此外,还包括调节循环的激素 (原),特别是如胃泌素释放肽原 (proGRP)、内皮素原 (proEnd)、瘦蛋白原、神经肽 Y 原、生长抑素原、神经肽 YY 原、阿黑皮素原、和肽素或在每一情况下其部分序列。

[0028] 缺血标志物可以选自下列至少一种标志物:肌钙蛋白 I 和 T、CK-MB。此外,神经激素标志物可以是至少一种利钠蛋白,特别是 ANP (或 ANF)、proANP、NT-proANP、BNP、proBNP、NT-proBNP 或者在每一情况下其部分序列。

[0029] 特别优选的是 CT-proADM 与激素原,特别是 proBNP、NT-proBNP 的标志物组合。

[0030] 在本发明的另一个实施方式中,根据本发明的方法可以借助平行或同时测定标志物 (例如,96 孔或更多孔的多孔滴定板) 而实施,其中该测定对至少一个患者样品进行。

[0031] 此外,根据本发明的方法及其测定也可以借助自动分析设备进行,特别是 Kryptor (<http://www.kryptor.net/>)。

[0032] 在另一实施方式中,根据本发明的方法及其测定可以借助快速检验 (例如侧流检验 (lateral-flow Test)) 进行,无论是单参数还是多参数测定。

[0033] 本发明另外涉及 CT-proADM (SEQ ID No. 1) 或其肽段或片段的应用,用于疾病,特别是对心血管循环疾病、心功能不全、肺和呼吸道感染和 / 或炎症的体外诊断和 / 或危险分层。

[0034] 在另一实施方式中,本发明涉及 CT-proADM (SEQ ID No. 1) 或其肽段或片段在心脏诊断中的应用。

[0035] 本发明另外涉及 CT-proADM (SEQ ID No. 1) 或其肽段或片段、或包含在标志物组合 (标志物组、标志物簇) 中的应用,用于对疾病,特别是对心血管循环疾病、心功能不全、肺

和呼吸道感染和 / 或炎症进行体外诊断和 / 或危险分层, 以及尤其是考虑到上述实施方式。所述标志物组合可以任选包含额外的合适标志物。

[0036] 另一个目的是提供合适的诊断设备或应用所述设备实施根据本发明的方法。

[0037] 在本发明范围内, 这种诊断设备被理解为特别是阵列或分析仪器 (例如免疫分析、ELISA 等), 在宽泛的意义上, 其为用于实施根据本发明方法的设备。

[0038] 本发明还涉及试剂盒或者这种试剂盒的应用, 用于对疾病, 特别是心血管疾病、心功能不全、肺和呼吸道感染和 / 或炎症进行体外诊断和 / 或者危险分层, 在所述方法中, 特别考虑上述实施方式, 对待测患者测定 CT-proADM (SEQ ID No. 1) 标志物、或其肽段或片段、或包含在标志物组合 (标志物组、标志物簇) 中的该标志物。这种检测试剂包括例如抗体等。

[0039] 本发明因此涉及抗体, 特别是单克隆抗体, 用于 CT-proADM 的检测, 所述单克隆抗体优选在 SEQ ID No. 1 的结合点位 1-15 或 19-33 彼此独立地分别与 CT-proADM 单独结合; 或在这两个结合位点之一处或在这两个结合位点处结合所述 CT-proADM。

[0040] 下列实施例和附图是为了对本发明进行更详细的解释, 但本发明不限于这些实施例和附图。

实施例:

[0041] 免疫分析

[0042] 肽合成

[0043] 从 preproADM 的已知氨基酸序列选择两个区域 (位置 153-167、171-185)。各自补充有 N 末端半胱氨酸残基的所述区域被化学合成、纯化、借助于质谱和反相 HPLC 检测质量、和根据标准方法以等分试样冻干为可溶肽 (Firma JPT, Berlin, Deutschland)。该肽的氨基酸序列为:

[0044] PSK 16 CSLPEAGPGRTLVSSE 位置 153-167

[0045] PHL 16 CHGAPAPPSGSAPHFL 位置 171-185

[0046] 此外, 合成包含 preproADM 的区域位置 153-185 (PSL33SLPEAGPGRTLVSSEKPAHGAPAPPSGSAPHFL) 的肽。

[0047] 偶联和免疫

[0048] 借助于 MBS (间马来酰亚胺苯甲酰基 -N- 羟基琥珀酰亚胺酯), 使得多肽 PSK16 和 PHL16 与载体蛋白 KLH (匙孔血蓝蛋白) 偶联 (见操作说明书 "NHS Esters-Maleimide Crosslinkers (NHS 酯 - 马来酰亚胺 交联剂" PIERCE 公司, Rockford, IL, USA)。应用这些偶联物, 按照如下步骤对绵羊免疫: 每只绵羊最初接受 100 μ g 偶联物 (质量数据基于偶联物的肽部分), 并且接下来每四个星期接受 50 μ g 偶联物 (质量数据基于偶联物的肽部分)。从开始免疫后四个月开始, 每 4 个星期从每只羊采集 700ml 血液, 并通过离心获得抗血清。偶联、免疫和抗血清的提取由 MicroPharm 公司, Carmarthenshire UK 进行。

[0049] 抗体的纯化

[0050] 在一步法中, 已经从免疫后四个月开始提取的抗血清中制备肽特异性抗体。

[0051] 对此, 首先将肽 PSK 16 和 PHL 16 偶联于 SulfoLink 凝胶 (见操作说明书 "SulfoLink Kit", PIERCE 公司, Rockford, IL, USA)。在该方法中, 对每 5mg 肽提供 5ml 凝

胶进行偶联。

[0052] 来自羊抗血清的肽特异性抗体针对肽的亲纯化如下进行：

[0053] 首先对肽柱进行三次交替清洗，其中各使用 10ml 洗脱缓冲液（50mM 柠檬酸，pH 值为 2.2）和结合缓冲液（100mM 磷酸钠，0.1% 吐温，pH 值为 6.8）。将 100ml 抗血清经 0.2 μ m 过滤并与现有的柱材料混合。为此，使用 10ml 结合缓冲液从柱定量地冲洗凝胶。在室温下过夜震荡进行温育。将沉积物定量地转移到空柱（NAP 25, Pharmacia, 空的）。弃去通过物。然后用 250ml 结合缓冲液洗涤以便移去蛋白质（洗脱液蛋白质含量 < 0.02 A280nm）。在冲洗过的柱上加入洗脱缓冲液，收集各为一毫升的级分。用 BCA- 方法（见操作说明书，PIERCE 公司，Rockford, IL, USA）测定每一级分的蛋白质含量。合并蛋白质浓度 > 0.8mg/ml 的级分。采用 BCA 方法对合并物进行蛋白质测定后，得到产量为 34mg 的抗-PSK 16 抗体和 48mg 的抗-Phl16 抗体。

[0054] 标记

[0055] 按照操作说明，经 NAP-5 凝胶过滤柱（Pharmacia），将 500 μ l 经过纯化的抗-PSK16 抗体（参见上文）在 1ml 100mM 的磷酸钾缓冲液（pH 值为 8.0）中进行缓冲交换。用 100mM 的磷酸钾缓冲液（pH 值为 8.0）将抗体溶液的蛋白质浓度调节为 1.5mg/ml。

[0056] 为了进行化学发光标记，将抗体进一步处理如下：用 10 μ l 的 MA70- 吡啶 鎓-NHS- 酯（1mg/ml；HOECHST 公司 Behring）处理 67 μ l 抗体溶液，并在室温下温育 15 分钟。然后加入 423 μ l 1M 的甘氨酸并再温育 10 分钟。接下来，按照操作说明将标记的沉积物在 1ml 洗脱液 A（50mM 磷酸钾，100mM 氯化钠，pH 值为 7.4）中通过 NAP-5 凝胶过滤柱（Pharmacia）进行缓冲交换，在该过程中，脱除低分子量组分。为了分离未连接于抗体的最终标记残余物，进行凝胶过滤 HPLC（柱：Waters Protein Pak SW300）。进行试验，并且用洗脱液 A 在 1ml/ 分钟的流速下进行层析。利用流率光度计对 368nm 和 280nm 波长进行测定。作为抗体标记程度的度量的 368nm/280nm 吸光度比在峰值为 0.10+/-0.01。采集包含单体抗体的级分（保留时间为 8-10 分钟）并收集在 3ml 100mM 磷酸钠、150mM 氯化钠、5% 牛血清白蛋白、0.1% 叠氮化钠的液体中、pH 值 7.4 中。

[0057] 偶联

[0058] 用纯化过的抗-Phl 16 抗体如下涂覆照射过的 5ml 小聚苯乙烯管（Greiner 公司）：该抗体在 50mM 的 Tris、100mM 氯化钠、pH 7.8 中稀释为浓度 6.6 μ g/ml。在每个小管中吸入 300 μ l 该溶液。在 22 摄氏度下对小管进行 20 小时温育。抽吸溶液。然后对每个小管填充 4.2ml 10mM 磷酸钠、2% Karion FP、0.3% 牛血清白蛋白、pH 值 6.5。20 小时之后抽吸溶液。最后将小管在真空干燥器中干燥。

[0059] 免疫试验的实施和分析

[0060] 将在正常马血清（SIGMA 公司）中连续稀释的肽 PSL33 用作标准材料。根据起始肽重量的浓度被指定给以此方式制得的标准品。

[0061] 夹心免疫分析如下述进行：将 50 μ l 标准品或测试物以及含有 100 万 RLU（相对光单位）的 MA70 标记抗体的 200 μ l 检测缓冲剂（100mM 磷酸钠、150mM 氯化钠、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）吸入各自涂覆有抗体的小试管中。在 22°C 在振荡下进行 2 小时的温育。然后每次用 1ml 的清洗溶液（0.1% Tween20）将各个小管清洗 4 次，滴尽并在光度计（BERTHOLD 公司，LB952T；Basisreagenzien BRAHMS

AG) 中对粘附于小管的化学发光进行测定。借助 MultiCalc 软件 (Spline Fit) 在标准曲线上读出测试物的 CT-proADM 浓度。

[0062] 可用所述检测测定的分析物被称为 C 末端肾上腺髓质素原 (CT-proADM)。

[0063] 临床价值

[0064] 正常范围

[0065] 在健康对照人的测试物 ($n = 200$) 中对 CT-proADM 的浓度进行测定。中位数是 77.6 pmol/L, 最低测量值是 46.6, 最高值是 136.2 pmol/L, 95% 百分位数值分别是 58.6 或 113.8 pmol/L。

[0066] 心功能不全 / 严重度

[0067] 测定患有慢性或急性失代偿性心功能不全的患者的 CT-proADM 浓度。CT-proADM 浓度与心功能不全的严重度有关: 在 4 个严重度 NYHA 分类 I-IV 中, CT-proADM 浓度的平均值为: 85、107、140.4 或 242.7 pmol/L (见图 2)。

[0068] 慢性心功能不全 / 诊断

[0069] CT-proADM 值是对患有慢性心功能不全的 316 例患者组和 200 例健康对照组测定的。受者作用特征分析 (Receiver-Operator-Characteristics Analyse) 示出 AUC 是 0.79。阈值 (cut-off Wert) 是 122 pmol/ml 时, 得出灵敏度 39.7% 和特异性 98%。在阈值是 113 pmol/L 下, 得到灵敏度 46.3% 和特异性 95%。

[0070] 慢性心功能不全 / 预测 (预后)

[0071] CT-proADM 值是对患有慢性心功能不全的 316 例患者组测定的。患者在 360 天的平均时期内被观察。在此期间死亡 42 例患者, 存活 274 例。通过受者作用特征分析确定预测死亡率的最佳阈值 (定义为灵敏度和特异性的最大乘积): 119.7 pmol/L。在这个阈值下, 预测的灵敏度是 73.2%, 特异性是 62.2%。阈值 119.7 pg/ml 下的死亡似然比是: 1.9。

[0072]

	< 119.7 pmol/L	> 119.7 pmol/L
存活的	172	103
死亡的	11	30

[0073] 急性心功能不全 / 诊断

[0074] CT-proADM 值是对患有急性呼吸困难的 125 例患者组测定的。在这 125 例患者中有 69 例患者患有心功能不全。用于心功能不全的鉴别诊断的受者作用特征分析示出 AUC 是 0.75。在阈值是 410 pmol/L 下, 得到灵敏度 12.4% 和特异性 98%。在阈值是 315 pmol/L 下, 得到灵敏度 18.3% 和特异性 95%。

[0075] 急性心功能不全 / 预测 (预后)

[0076] CT-proADM 值是对患有急性失代偿性心功能不全的 69 例患者组测定的。患者在 360 天的时期内被观察。在此期间死亡 21 例患者, 存活 48 例。通过受者作用特征分析确定预测死亡率的最佳阈值 (定义为灵敏度和特异性的最大乘积): 192 pmol/L。在这个阈值下, 预测的灵敏度是 66.6%, 特异性是 75%。阈值 192 pmol/L 下的死亡率似然比是: 2.5。

[0077]

	< 192 pmol/L	> 192 pmol/L
存活的	36	12
死亡的	7	14

[0078] 心肌梗塞 / 预测 (预后)

[0079] 样本在患有急性心脏病发作的 287 例患者在发生心脏病发作后三天后获得,测定 CT-proADM。患者在 360 天的时期内被观察。在此期间,220 例患者不经历不利事件,67 例死亡或者因心功能不全再次入院。通过受者作用特征分析确定预测死亡或者因心功能不全再次入院率的最佳阈值(定义为灵敏度和特异性的最大乘积):161.9pmol/L。在这个阈值下,预测的灵敏度是 67.2%,特异性是 79.1%。阈值 161.9pmol/L 下的不利事件似然比是:3.2。

[0080]

	< 161.9pmol/L	> 161.9pmol/L
无不利事件	174	46
死亡 / 心功能不全	22	45

[0081] 肺炎 / 严重度和预测(预后)

[0082] 样本在患有社区获得性肺炎的 142 例患者入院时获得,测定 CT-proADM。患者在 70 天的时期内被观察。在此期间死亡 10 例患者。CT-proADM 浓度随 PSI(肺炎严重度指数)——用于疾病严重度的评分(图 3)——而增大,并且相对于健康对照组(77pmol/L)以中位数 135pmol/L 增加。用于预测死亡率的受者作用特征分析得到的 AUC 是 0.89。通过受者作用特征分析确定预测死亡率的最佳阈值(定义为灵敏度和特异性的最大乘积):194.5pmol/L。在这个阈值下,预测的灵敏度是 100%,特异性是 81.2%。阈值 194.5pmol/L 下的死亡似然比是:5.5。

[0083]

	< 194.5pmol/L	> 194.5pmol/L
无不利事件	108	24
死亡	0	10

[0084] 加重的 COPD

[0085] 测定患有慢性阻塞性肺疾病伴随下呼吸道感染的 53 例患者的 CT-proADM。这些患者的 CT-proADM 以中位数 106pmol/L,高于健康对照组(77pmol/L),但是低于肺炎患者(见上,135pmol/L)。

[0001]

SEQUENCE LISTING

<110> Brahms Aktiengesellschaft

<120> 利用新颖标志物 CT-proADM 进行诊断和危险分层

<130> 06/15 BRAHMS 32W0

<140> 10 2006 060 112.2

<141> 2006-12-20

<160> 4

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 33

<212> PRT

<213> Human

<400> 1

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

Gln Ala His Gly Ala Pro Ala Pro Pro Ser Gly Ser Ala Pro His Phe
20 25 30

Leu

<210> 2

<211> 185

<212> PRT

<213> 人

<400> 2

Met Lys Leu Val Ser Val Ala Leu Met Tyr Leu Gly Ser Leu Ala Phe
1 5 10 15

[0002]

Leu Gly Ala Asp Thr Ala Arg Leu Asp Val Ala Ser Glu Phe Arg Lys
20 25 30

Lys Trp Asn Lys Trp Ala Leu Ser Arg Gly Lys Arg Glu Leu Arg Met
35 40 45

Ser Ser Ser Tyr Pro Thr Gly Leu Ala Asp Val Lys Ala Gly Pro Ala
50 55 60

Gln Thr Leu Ile Arg Pro Gln Asp Met Lys Gly Ala Ser Arg Ser Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ser Ser Pro Asp Ala Ala Arg Ile Arg Val Lys Arg Tyr Arg
85 90 95

Gln Ser Met Asn Asn Phe Gln Gly Leu Arg Ser Phe Gly Cys Arg Phe
100 105 110

Gly Thr Cys Thr Val Gln Lys Leu Ala His Gln Ile Tyr Gln Phe Thr
115 120 125

Asp Lys Asp Lys Asp Asn Val Ala Pro Arg Ser Lys Ile Ser Pro Gln
130 135 140

Gly Tyr Gly Arg Arg Arg Arg Arg Ser Leu Pro Glu Ala Gly Pro Gly
145 150 155 160

Arg Thr Leu Val Ser Ser Lys Pro Gln Ala His Gly Ala Pro Ala Pro
165 170 175

Pro Ser Gly Ser Ala Pro His Phe Leu
180 185

[0003]

<210> 3
<211> 16
<212> PRT
<213> 人

<400> 3

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

<210> 4
<211> 16
<212> PRT
<213> 人

<400> 4

Cys	His	Gly	Ala	Pro	Ala	Pro	Pro	Ser	Gly	Ser	Ala	Pro	His	Phe	Leu
1				5					10					15	

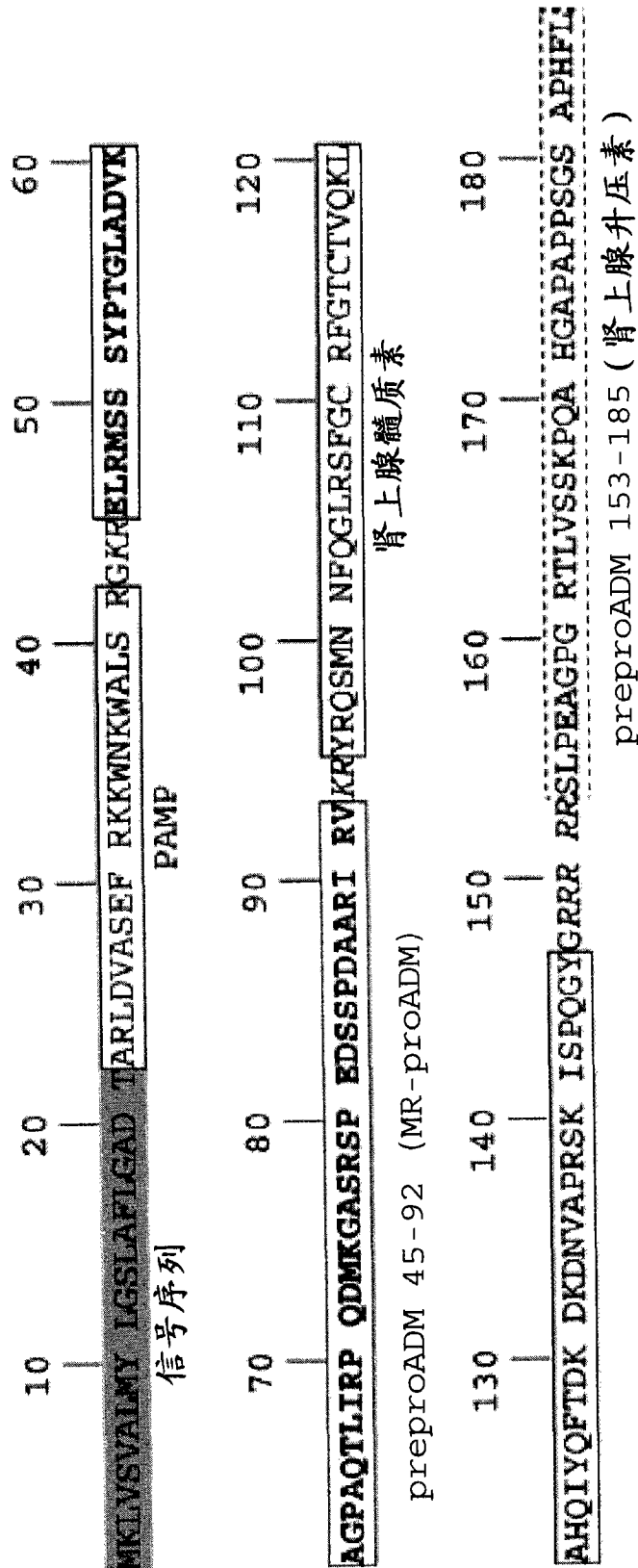


图 1

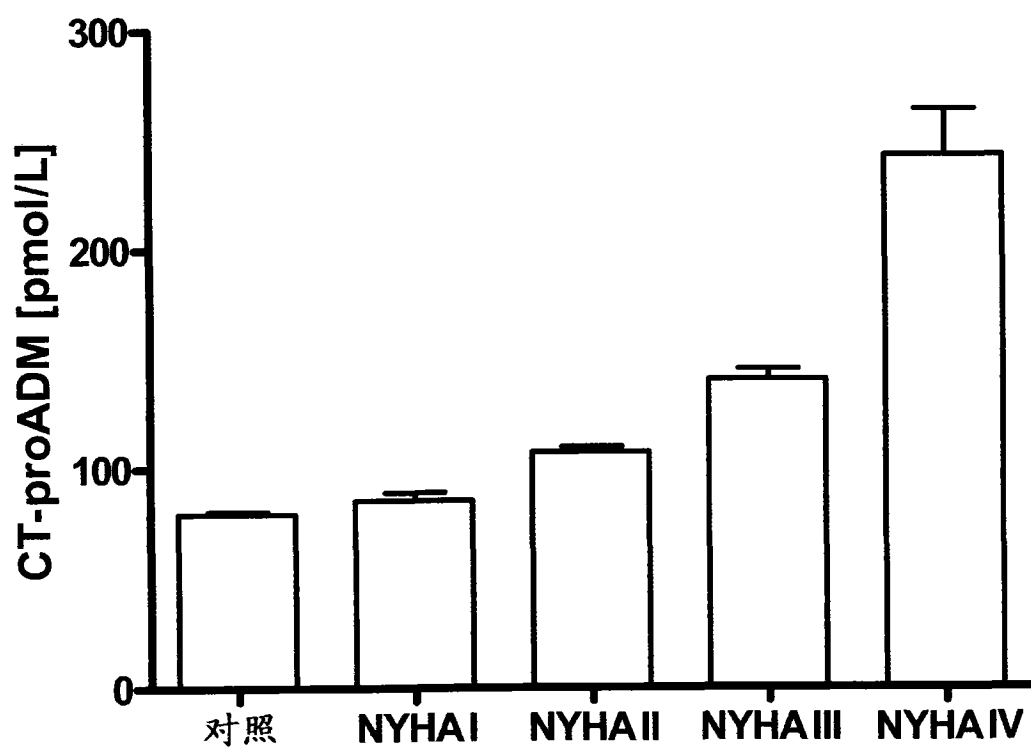


图 2

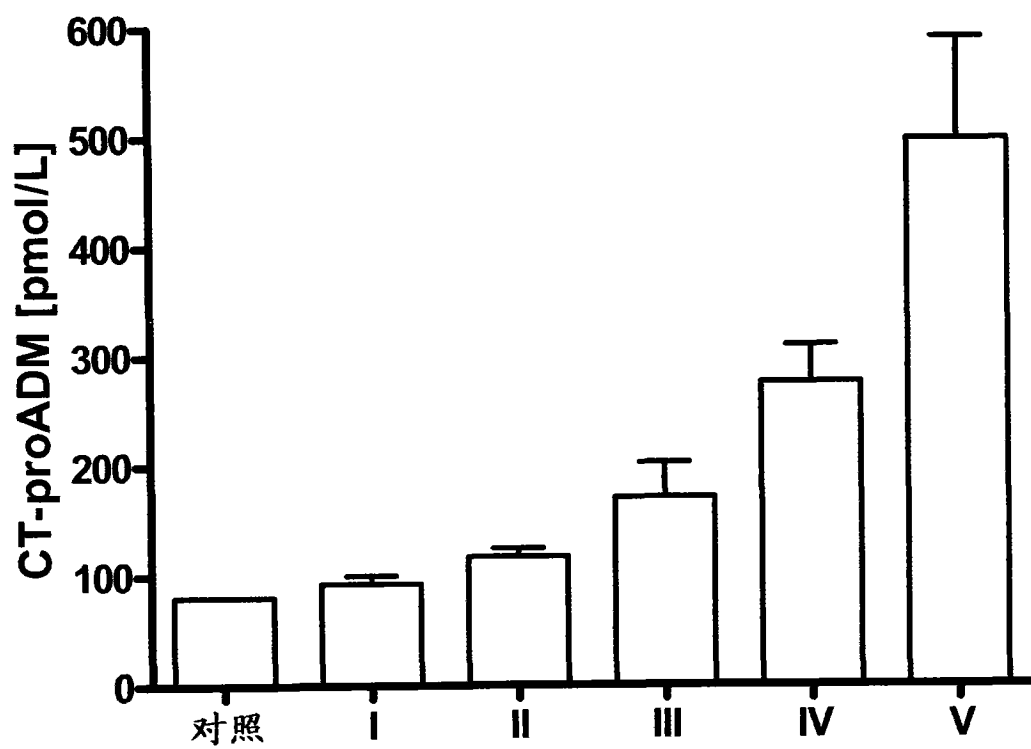


图 3