



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1780921 B

(45) 授权公告日 2010.12.08

(21) 申请号 200380110094.8

C12P 19/34 (2006.01)

(22) 申请日 2003.12.31

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

W0 0180711 A, 2001.11.01, 全文.

60/437, 439 2003.01.02 US

US 6251608 B, 2001.06.26, 全文.

(85) PCT申请进入国家阶段日

审查员 赵彦豪

2005.09.02

(86) PCT申请的申请数据

PCT/IL2003/001120 2003.12.31

(87) PCT申请的公布数据

W02004/060135 EN 2004.07.22

(73) 专利权人 拉帕波特家族医学研究院

地址 以色列海法

(72) 发明人 安德鲁·P·利维

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 林晓红

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 28 页

(54) 发明名称

用于检测触珠蛋白表型的试剂、试剂盒及其用途

(57) 摘要

一种确定糖尿病患者从用于治疗血管并发症的抗氧化剂治疗中获益的可能性的方法,该方法包括确定糖尿病患者的触珠蛋白表型并据此确定糖尿病患者从所述的抗氧化剂治疗中获益的可能性,其中与具有触珠蛋白 1-2 表型或触珠蛋白 1-1 表型的患者相比,具有触珠蛋白 2-2 表型的患者从抗氧化剂治疗中的获益要更多。

1. 用于确定触珠蛋白表型的试剂在制备一种通过确定糖尿病患者的触珠蛋白表型而确定糖尿病患者从用于治疗 and / 或预防血管并发症的维生素 E 治疗中获益的可能性的试剂盒中的用途, 其中与具有触珠蛋白 1-2 表型或触珠蛋白 1-1 表型的患者相比, 具有触珠蛋白 2-2 表型的患者从所述的维生素 E 治疗中的获益更大。

2. 权利要求 1 的用途, 其中所述的血管并发症选自微血管并发症和大血管并发症所构成的组。

3. 权利要求 2 的用途, 其中所述的血管并发症是一种选自慢性心衰、心血管死亡、中风、心肌梗死和冠状动脉血管成形术相关的再狭窄所构成的组的大血管并发症。

4. 权利要求 2 的用途, 其中所述的微血管并发症选自糖尿病视网膜病变、糖尿病神经病变和糖尿病肾病所构成的组。

5. 权利要求 2 的用途, 其中所述的大血管并发症选自冠状动脉侧支血管减少和心肌缺血所构成的组。

6. 权利要求 1 的用途, 其中所述试剂是用于确定糖尿病患者的触珠蛋白的基因型的试剂。

7. 权利要求 6 的用途, 其中所述试剂是用于通过一种选自如下一组的方法来确定糖尿病患者的触珠蛋白基因型的试剂, 所述的组由信号扩增法、直接检测法和至少一种序列改变的检测组成。

8. 权利要求 7 的用途, 其中所述的信号扩增法扩增的是选自 DNA 分子和 RNA 分子的分子。

9. 权利要求 7 的用途, 其中所述的信号扩增法选自 PCR、LCR(LAR)、自动维持合成反应 (3SR/NASBA) 和 Q- β (Q β) 复制酶反应所构成的组。

10. 权利要求 7 的用途, 其中所述的直接检测法选自循环探针反应 (CPR) 和分支 DNA 分析所构成的组。

11. 权利要求 7 的用途, 其中所述的对至少一种序列改变的检测采用一种选自如下一组的方法, 所述的组由限制性片段长度多态性 (RFLP) 分析、等位基因特异性寡核苷酸 (ASO) 分析、变性 / 温度梯度凝胶电泳 (DGGE/TGGE)、单链构象多态性 (SSCP) 分析和双脱氧指纹印迹法 (ddF) 所构成。

12. 权利要求 1 的用途, 其中所述试剂是用于直接确定糖尿病患者的触珠蛋白表型的试剂。

13. 权利要求 12 的用途, 其中所述试剂是用于通过免疫学检测法确定所述的触珠蛋白表型的试剂。

14. 权利要求 13 的用途, 其中所述的免疫学检测法选自放射免疫测定法 (RIA)、酶联免疫吸附测定法 (ELISA)、western 印迹法、免疫组织化学分析和荧光激活细胞分选 (FACS) 所构成的组。

用于检测触珠蛋白表型的试剂、试剂盒及其用途

[0001] 技术领域和背景技术

[0002] 本发明涉及一种依据触珠蛋白 2 等位基因的多态性确定补充抗氧化剂在预防糖尿病患者的心血管疾病方面的预期益处的方法。

[0003] 心血管疾病 (CVD) 是 2 型糖尿病患者的最常见的、最严重的和最昂贵的并发症¹。这是一种在 2 型糖尿病患者中最主要的死亡原因,它与糖尿病的病程无关²。一些基于人群的研究已经一致表明糖尿病个体的 CVD 的相对危险度要比非糖尿病患者高出数倍³⁻⁷。在女性中所增加的危险甚至更为突出^{4,5,8}。危险因素例如高血压、高脂血症和吸烟都独立地增加了糖尿病患者发生 CVD 的相对危险度,但是糖尿病的作用显示出是独立于常见危险因素的⁹。

[0004] 虽然在所有被研究的人群中,糖尿病患者中的 CVD 发病率都要比非糖尿病患者更高,但糖尿病患者的 CVD 的相对危险度仍存在着明显的地区和人种的差异,这并不能被组间的常见心脏危险因素的差异所完全解释¹⁰⁻²⁰。例如,对生活在英国的不同人种组中的 CVD 的相对危险度的分析已经发现,与欧洲人起源的糖尿病患者比较,南亚人起源的糖尿病患者有着明显增高的 CVD 危险度^{12,15},而非洲-加勒比海的糖尿病患者有着明显减低的 CVD 危险度^{14,16}。

[0005] 这些研究说明遗传差异可能造成糖尿病患者对 CVD 易感性的差异。

[0006] 当构思本发明时,当时假设一个可能的原因在于触珠蛋白基因的功能性等位基因的多态性。

[0007] 触珠蛋白 (Hp) 是一种结合血红蛋白的血清蛋白,它在保护性对抗 血色素启动的氧化应激上发挥着重要作用^{23,24}。缺少 Hp 基因的鼠表现出氧化应激的显著增加以及特别是在肾脏内的氧化性组织损伤。在人类,有两种常见的 Hp 等位基因 (1 和 2),表现为 1-1、2-1 和 2-2 三种主要的表型²¹⁻²³。

[0008] 已经证实三种表型在结合血红蛋白能力上的功能差异。Hp1-1 表型患者的每克 Hp 比含有触珠蛋白 2 等位基因产物的 Hp 能结合更多的血红蛋白²³。触珠蛋白 1-1 表型患者的触珠蛋白分子也是更为有效的抗氧化剂,因为更小体积的触珠蛋白 1-1 比触珠蛋白 2 等位基因的产物更容易进入氧化性组织损伤的血管外部分。这也包括具有触珠蛋白 1-1 的患者具有显著更大的肾小球对触珠蛋白的滤过 (sieving)²²。

[0009] 触珠蛋白 2 等位基因显示是在将近 2000 万年前经部分基因复制事件起源于 1 等位基因,并作为与耐感染性病原体相关的选择压力的结果在全球范围内得以散布^{24,25}。目前,触珠蛋白等位基因的相对频率在不同的人种中有着很大不同。基因复制事件已经造成 2 等位基因中的每一个所编码的触珠蛋白蛋白的生物物理和生物化学性能的极大变化²⁶。例如,与 2 等位基因所产生的蛋白产物比较,1 等位基因的蛋白产物是更好的抗氧化剂²³。通过凝胶电泳容易从 10ml 血浆中鉴定出任何个体的触珠蛋白表型 1-1、2-1 或 2-2。

[0010] 最近已经证实触珠蛋白表型是糖尿病患者发生各种微血管并发症的预测因素²⁷⁻²⁹。具体地,发现触珠蛋白 1 等位基因纯合子的患者发生视网膜病变和肾病的危险降低。在 1 型和 2 型糖尿病患者中都观察到了这种作用,至少是对肾病的作用,以及触珠蛋白 2 等位基因数目与发生肾病的梯度效应的发现强化了这种相关性²⁹。此外,已经显示触珠蛋白

表型可能是糖尿病患者发生大血管并发症的预测因素。我们已经显示具有 1-1 触珠蛋白表型的糖尿病患者经皮冠状动脉成形术后的再狭窄的发生是显著降低的^{27,30}。以往的检测普通人群的触珠蛋白和冠状动脉疾病的回顾性和横向研究已经得到了相互矛盾的结果³¹⁻³⁸。还没有研究触珠蛋白表型在糖尿病患者发生冠状动脉粥样硬化性疾病中的作用。

[0011] 以往认为不容易发生冠状动脉疾病的美洲印第安人现在也正在流行 CVD²⁰。CVD 发病率的增加已经被归结于 2 型糖尿病在该人群中的快速增长^{1,2}。Strong 心脏研究已经检测了 3 个地理区域内的美洲印第安人的心血管病的发病率、患病率和危险因素,从 1988 年开始并持续监测到现在²⁰。该人群患者的相对的遗传学均一性可以容许识别出引起糖尿病病变中的 CVD 的特异的遗传因素。

[0012] 因此,在美国专利 No. 6, 613, 519 中,首次在 Strong 心脏研究的病例 / 对照样本中得出了糖尿病患者的 CVD 的相对危险度与触珠蛋白表型之间的相关性。

[0013] 一些以往的科学出版物描述了在触珠蛋白表型与疾病之间建立联系的方法。W098/37419 教导了一种用于确定触珠蛋白的方法和试剂盒并具体地涉及包括人触珠蛋白的应用。该申请的内容集中于触珠蛋白 2-2 表型作为独立危险因素的用途,特别是涉及难治性原发性高血压的靶器官损伤,涉及动脉粥样硬化(普通人群)和急性心肌梗死以及涉及 HIV 感染的死亡率。这个申请没有提及触珠蛋白表型作为 DM 的心血管病的危险因素的用途。因为触珠蛋白 2-2 表型具有使得患者更容易成为氧化应激的趋势,因此可能会有人认为该专利间接提及了 2-2 表型作为 DM 的心血管病的负性预测因素的用途。但是,该专利的阐述没有包括如下的想法,即将触珠蛋白 1-1 表型作为减少 DM 发生心血管病的倾向的阳性预测因素,或作为补充抗氧化剂的疗效的阳性预测因素。事实上,在后来的研究中,PCT W098/37419 的作者报告了相反的结果,他们总结 Hp1-1 患者的心血管病死亡率的危险是增加的(De Bacquer et al, Atherosclerosis 2001;157:161-6)。既然许多研究已经报道没有结果或相互矛盾的结果(Buhlin et al Eur Heart J 2003;24:2099-107;Lind et al Angiology 2003;54:401-10;Hong et al Hum Hered 1997;47:283-7),那么所推论的触珠蛋白表型和疾病之间的有用的相关性就需要仔细和富有想象力的分析。

[0014] 换句话说,已经提出来源于 Hp 2-1 或 2-2 表型的氧化应激造成了普通人群中的血管并发症。也已知某些血管并发症与 DM 相关的氧化应激相关。然而,对于 Hp1-1 表型是否能影响对用于预防糖尿病患者的血管并发症的补充抗氧化剂治疗的反应,现在仍不清楚也不能预测。

[0015] PCT W098/37419 的描述包括一种触珠蛋白结合伴侣的用途。PCTW098/37419 的结合伴侣可以是任何具有至少两个与触珠蛋白结合的位点的分子。可以通过肽、抗体或它们的一部分,或通过凝集素、细胞受体、分子印迹(imprint)或细菌抗原或它们的一部分,而形成位点。这个专利的描述具体提及了化脓性链球菌的 T4 抗原的用途。所有的触珠蛋白都含有 α 链和 β 链。

[0016] 所有触珠蛋白的 β 链都是相同的,但是触珠蛋白基因的两个等位基因之间的 α 链是不同的。触珠蛋白的 $\alpha 2$ 链是根据不等交换的突变的结果,它包括 142 个氨基酸,不同于 $\alpha 1$ 链的 83 个氨基酸。 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 链是免疫学相似的,除了 $\alpha 2$ 链具有独特的氨基酸残基序列(Ala-Val-Gly-Asp-Lys-Leu-Pro-Glu-Cys-Glu-Ala-Asp-Asp-Gly-Gln-Pro-Pro-Pro-Lys-Cys-Ile, SEQ ID NO:1)。因此,这个独特肽序列的任一部分可以是用于形成区别含

有 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 链的触珠蛋白的抗体的适合的抗原决定簇,如在“应用抗体:实验手册”(Ed Harlow and David Lane eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press(1999))中所描述的那样,在此将其全部内容一同并入参考。这些抗体可以是单克隆的、多克隆的或它们的任何部分,它们可以被本领域人员所熟知的各种方法中的任何一种方法所富集或纯化。另外,编码该序列的核苷酸序列可以被便利地用于区分 Hp 基因型。

[0017] 抗氧化剂、触珠蛋白和糖尿病患者的心血管疾病 (CVD) 的预防:与普通人群中的 2-4% 的发病率相比较,成人糖尿病患者中的冠状动脉疾病的总发病率超过 55%。与非糖尿病患者相比较,有糖尿病的 CVD 男性患者的死亡率比无糖尿病的患者多两倍,女性患者更要多四倍 (Stamler, et al. Diabetes Care 1993 ;16 :434-444)。氧化应激的增加代表了一种吸引人的统一机制,其可解释一些已知的介导糖尿病血管病变的信号传导通路的共同激活 (Nishikawa et al., Nature 2000 ;404 :787-790)。高糖血症和葡萄糖自氧化所形成的氧化环境使得形成了进展的糖化终产物 (AGE) (Ohgami et al., J Diabetes Complic 2002 ;16 :56-59) 及经修饰的低密度脂蛋白 (ox-LDL) (Steinberg D J Biol Chem 1997 ;272 :20963-6), 它能刺激涉及糖尿病血管病中所发现的病理和形态学改变的多种炎性因子的形成。实验动物数据支持了氧化假说,其中抗氧化剂例如维生素 E 已经被证实能显著地延迟动脉粥样硬化的进程 (Williams et al Atherosclerosis 1992 ;94 :153-59)。但是,尽管在体外和实验室研究中有希望的结果,但是一些最近的、大规模的前瞻性的安慰剂对照临床试验不能提供结论性的证据支持单独使用维生素 E (HOPE Study Investigators N E J Med 2000 ;342 :154-160 ;Hodis et al, Circulation 2002 ;106 :1453-59 ;Jiang et al, J Biol Chem 2002 ;277 :31850-6) 或与其他抗氧化维生素联合使用维生素 E (GISSI, Lancet 1999 ;354 :4477-55 ;Brown et al NE J Med 2001 ;345 :1538-92 ;Marchioli et al, Lipids ;2001 ;36 Suppl :S53-63 ;Waters et al, JAMA 2002 ;288 :2432-40 ;Witztum et al Trends Cardio Med 2001 ;11 :93-102) 减少大的不良性心血管事件的发生率的益处。心脏后果预防评价 (HOPE) 试验就是这样的研究,它特异地研究了维生素 E 治疗对预防糖尿病的 CVD 的疗效 (HOPE Study Investigators N E J Med 2000 ;342 :154-160)。HOPE 研究没有证实每日施与 400IU 维生素 E 4.5 年对心血管 (CV) 后果的任何临床益处。已经提出一些机制解释维生素 E 在这些研究中表面失败的原因。Steinberg 已经提出只有在表现为氧化应激增强的特异的亚组中才有可能证实抗氧化剂治疗的益处 (Steinberg et al Circulation 2002 ;105 :2107-111)。

[0018] 糖尿病患者的血管并发症随着时间而发生,即使用胰岛素或口服降糖 (降低血糖) 药物控制住他们的血糖水平。有多种糖尿病高危发生的血管并发症,包括糖尿病视网膜病变、糖尿病性白内障和青光眼、糖尿病肾病、糖尿病神经病变、间歇性跛行和坏疽、高脂血症和心血管问题例如高血压、动脉粥样硬化和冠状动脉疾病。动脉粥样硬化可以引起心绞痛和心脏病发作,并且它在糖尿病人群中的发病率是非糖尿病人群的两倍,同等影响着男性和女性。

[0019] 越来越多的证据显示这些糖尿病的血管疾病只发生在那些遗传学易感的患者中 (UK Prospective Study Group Diab Care 1998 ;21 :1271-77)。触珠蛋白基因具有多态性,具有两类主要类型的等位基因,称为 1 和 2。最近已经证实触珠蛋白基因的这种多态性是糖尿病个体的 CVD 的独立的危险因素 (见 2003 年 9 月 2 日授予 Levy 等的美国专利 No :

6,613,519、下面的实施例 1、和 Levy et al J Am Coll Card 2002 ;40 :1984-90)。发现触珠蛋白 2 等位基因纯合子的糖尿病患者有着比那些触珠蛋白 1 等位基因纯合子的患者高出 5 倍的 CVD 危险度。同一作者也已经证实触珠蛋白 2 等位基因蛋白产物是一种弱抗氧化剂,弱于触珠蛋白 1 等位基因蛋白产物 (Melamed-Frank et al Blood 2001 ;98 :3693-98)。但是,上述的研究既没有寻找也没有暗示补充抗氧化剂和糖尿病患者的 CVD、以及触珠蛋白表型的相关性、或这种相关性在预测从抗氧化剂治疗中获益的用途。因此,我们假设补充抗氧化剂对于触珠蛋白 2 等位基因纯合子的糖尿病患者在预防不良的心血管事件上将是有益的。为了验证这种假说,我们用触珠蛋白将 HOPE 研究的参与者分类并依据维生素 E 和雷米普利 (Ramipril) 治疗确定出这些可能的触珠蛋白类型的主要心血管终点的相对危险率。

[0020] 一种预测哪些特定的糖尿病患者有着更低的心血管病的危险以及哪些特殊的患者亚组将从预防性抗氧化剂治疗中获益的方法是一种被广泛 认同的需要,并且这将是极为有益的。这样的一种方法将容许医生最好地利用可获得的资源,且最大程度地将每个患者的危险最小化。

发明内容

[0021] 根据本发明,提供了一种确定糖尿病患者从用于治疗血管并发症的抗氧化剂治疗中获益的可能性的方法,该方法包括确定糖尿病患者的触珠蛋白表型并据此确定出糖尿病患者从所述的抗氧化剂治疗中获益的可能性,其中与具有触珠蛋白 1-2 表型或触珠蛋白 1-1 表型的患者相比,具有触珠蛋白 2-2 表型的患者从所述的抗氧化剂治疗中的获益更大。

[0022] 根据本发明的仍另一个部分,提供了一种确定减少糖尿病患者的氧化应激对于预防糖尿病相关的血管并发症的重要性的方法,该方法包括确定糖尿病患者的触珠蛋白表型的步骤,并据此确定出减少特定的糖尿病患者的氧化应激的重要性,其中与具有触珠蛋白 1-2 表型或触珠蛋白 1-1 表型的患者相比,在具有触珠蛋白 2-2 表型的患者中减少氧化应激的重要性更大。

[0023] 根据下面描述的本发明的优选的实施方案的进一步的特点,血管并发症选自微血管并发症和大血管并发症所构成的组。

[0024] 根据下面描述的本发明的优选的实施方案的进一步的特点,血管并发症是一种选自慢性心衰、心血管死亡、中风、心肌梗死和冠状动脉血管成形术相关的再狭窄所构成的组的大血管并发症。

[0025] 根据下面描述的本发明的优选的实施方案的进一步的特点,微血管并发症选自糖尿病视网膜病变、糖尿病肾病和糖尿病神经病变所构成的组。

[0026] 根据下面描述的本发明的优选的实施方案的进一步的特点,大血管并发症选自冠状动脉侧支血管减少 (fewer coronary artery collateral blood vessels) 和心肌缺血所构成的组。

[0027] 根据下面描述的本发明的优选的实施方案的进一步的特点,通过确定糖尿病患者的触珠蛋白基因型实现对触珠蛋白表型的确定。

[0028] 根据下面描述的本发明的优选的实施方案的仍进一步的特点,通过一种选自信号扩增法、直接检测法和至少一种序列改变的检测所构成的组的方法实现确定糖尿病患者的触珠蛋白基因型的步骤。

[0029] 根据下面描述的本发明的优选的实施方案的进一步的特点,信号扩增法扩增一种选自自由 DNA 分子和 RNA 分子所构成的组的分子。

[0030] 根据下面描述的本发明的优选的实施方案的仍进一步的特点,信号扩增法选自自由 PCR、LCR(LAR)、自动维持合成反应(3SR/NASBA)和 Q- β (即 Q β)复制酶反应所构成的组。

[0031] 根据下面描述的本发明的优选的实施方案的仍进一步的特点,直接检测法选自自由循环探针反应(CPR)和分支 DNA(branched DNA)分析所构成的组。

[0032] 根据下面描述的本发明的优选的实施方案的进一步的特点,对至少一种序列改变的检测采用了一种选自自由限制性片段长度多态性(RFLP分析)、等位基因特异性寡核苷酸(ASO)分析、变性/温度梯度凝胶电泳(DGGE/TGGE)、单链构象多态性(SSCP)和双脱氧指纹印迹法(ddF)所构成的组的方法。

[0033] 根据下面描述的本发明的优选的实施方案的仍进一步的特点,通过直接确定糖尿病患者的触珠蛋白表型实现对所述的触珠蛋白表型的确定。

[0034] 根据下面描述的本发明的优选的实施方案的仍进一步的特点,通过免疫检测法实现确定触珠蛋白表型的步骤。

[0035] 根据下面描述的本发明的优选的实施方案的进一步的特点,免疫检测法选自自由放射免疫检测法(RIA)、酶联免疫吸附检测法(ELISA)、western 印迹法、免疫组织化学分析法和荧光激活细胞分选术(FACS)所构成的组。

具体实施方案

[0036] 本发明是一种评价高血糖患者发生心血管疾病的危险的方法,以便能够在适当的情况下施用预防性药物。具体地,本发明是一种评价糖尿病患者从用于预防心血管疾病(CVD)的抗氧化剂治疗中获益的可能性的方法。

[0037] 在详细地解释本发明的至少一种具体实施方案之前,要明白本发明并没有将其应用限定于在下面的描述和附图说明中所公开的成分的构建和排列的细节中。本发明能以不同的方法实践或实施其他的实施方案。也要明白在此所采用的措辞和术语只是用于说明的目的,并不应当被认作为限制。

[0038] 根据一些大的最近发表的大临床试验,抗氧化剂治疗没有被推荐用于预防 CVD 高危患者的不良的 CV 后果(The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. N Eng J Med 2000 ;342 :154-160 ;Hodis, et al. Circulation 2002 ; 106 :1453-1459 ;Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell' Infarto Miocardico. Lancet 1999 ;354 :447-455 ;Brown et al. N Engl J Med 2001 ;345 : 1583-1592.)。

[0039] 虽然对来自一项对预防性抗氧化剂治疗的疗效的大规模研究的数据的分析没有提示整个样本从抗氧化剂治疗中的任何获益,但是本作者首次证实了可以鉴定出的确从补充抗氧化剂中获益的亚组。具体地,在 HOPE 研究中,用维生素 E 补充具有显著统计学意义地减少了具有 Hp 2-2 表型的糖尿病个体的 CV 死亡和非致死性心肌梗死,以及用雷米普利治疗具有显著统计学意义地减少了复合终点(非致死性 MI、中风或心血管死亡)(见以下的实施例 II)。对 Strong 心脏研究中的触珠蛋白表型与 CVD 的相关性的分析表明 Hp 2-2 增加了糖尿病 CVD 的危险(见以下的实施例 I,和 Levy AP et al. J Am Coll Card 2002 ;40 :

1984-1990) 以及 Hp 2-2 是一种较差的抗氧化剂 (Melamed-Frank M, et al. Blood 2001; 98:3693-3698)。无意于受到单一的假说所限制, Hp 2-2 的较差的抗氧化剂特性可以解释从抗氧化剂中获益可能是选择性来自该糖尿病患者亚组的原因, 并且这些发现明显是具有显著统计学意义的。在已经观察到触珠蛋白类型对非糖尿病患者的 CVD 发生率没有显著影响 (见以下的实施例 I), 以及已经显示出抗氧化剂治疗 (用维生素 E) 对非糖尿病患者没有任何作用 (见以下的实施例 II), 从这些事实中可以找到触珠蛋白的这种作用的其他支持。无意于受单一假说的限制, 可以假设 Hp 2-2 的低下的抗氧化活性的重要性只能在存在产生氧化应激的其他机制 (糖尿病) 的情况下才能在临床上表现出来。

[0040] 因此, 根据本发明, 提供了一种确定糖尿病患者从用于治疗血管并发症的抗氧化剂治疗中获益的可能性的方法, 该方法包括确定出糖尿病患者的触珠蛋白表型并据此确定出糖尿病患者从所述的抗氧化剂治疗中获益的可能性, 其中与具有触珠蛋白 1-2 表型或触珠蛋白 1-1 表型的患者相比, 具有触珠蛋白 2-2 表型的患者从所述的抗氧化剂治疗中的获益更大。

[0041] 鉴于例如 HOPE 和 GISSI 研究等的研究结果并没有对抗氧化剂治疗对其起效的亚群作出任何提示, 在此所示的数据首次清楚地显示了维生素 E 补充具有显著统计学意义地减少了具有 Hp 2-2 表型的糖尿病个体的 CV 死亡及非致死性心肌梗死, 而雷米普利具有显著统计学意义地减少了复合终点 (非致死性 MI、中风或心血管死亡) (见以下的实施例 II)。因此, 本发明还提供了一种确定减少糖尿病患者的氧化应激以预防糖尿病相关的血管并发症的重要性的方法, 该方法包括确定糖尿病患者的触珠蛋白表型的步骤, 据此确定出减少特异的糖尿病患者的氧化应激的重要性, 其中与具有触珠蛋白 1-2 表型或触珠蛋白 1-1 表型的患者相比, 在具有触珠蛋白 2-2 表型的患者中减少氧化应激的重要性更大。

[0042] 本发明也提供了一种用于评价糖尿病患者从用于治疗血管并发症的抗氧化剂治疗中获益的可能性的试剂盒。试剂盒包括用于确定糖尿病患者的触珠蛋白表型的成套试剂以及该试剂盒被用于评价糖尿病患者从用于治疗血管并发症的抗氧化剂治疗中获益的可能性。从下面的描述以及进一步从触珠蛋白 1 和 2 等位基因的熟知的和特征性的序列数据中可以发现, 这些试剂的特性对于本领域人员将是显而易见的。

[0043] 通过下面实施例部分的表 1-6 中的数据证实了本发明的方法和试剂盒的效用。

[0044] 因此, 在来自基于人群的纵向研究的样本中, 在此证实了触珠蛋白表型是一种糖尿病患者从用于治疗血管并发症的抗氧化剂治疗中获益的可能性的重要的预测因素。在本发明的一个实施方案中, 血管并发症选自由微血管并发症和大血管并发症所构成的组。

[0045] 糖尿病患者有着发生各种血管并发症的危险, 包括糖尿病视网膜病变、糖尿病性白内障和青光眼、糖尿病肾病、糖尿病神经病变、间歇性跛行和坏疽、高脂血症及心血管问题例如高血压、动脉粥样硬化和冠状动脉疾病。动脉粥样硬化可以引起心绞痛和心脏病发作, 并且它在糖尿病人群中的发生率是非糖尿病人群的两倍, 同等影响男性和女性。糖尿病的微血管并发症在此包括糖尿病神经病变 (神经损伤)、糖尿病肾病 (肾病) 和视觉异常 (例如糖尿病视网膜病变、青光眼、白内障和角膜疾病)。大血管并发症包括进展性动脉粥样硬化性冠状动脉血管病变例如心肌梗死、慢性心脏衰竭、心血管死亡和心脏病、中风和周围血管病 (它可导致溃疡、坏疽和截肢)。

[0046] 在另一个实施方案中, 血管并发症是一种选自由慢性心衰、心血管死亡、中风、心

肌梗死、冠状动脉血管成形术相关的再狭窄、冠状动脉侧支血管减少和心肌缺血所构成的组的大血管并发症。在另一个实施方案中,血管并发症是一种微血管并发症,例如糖尿病神经病变、糖尿病肾病或糖尿病视网膜病变。

[0047] 在不同的人种组中的触珠蛋白 1 等位基因的频率与这些组中的糖尿病微血管和大血管并发症的相对发病率之间的相关性进一步支持了触珠蛋白对于补充抗氧化剂对糖尿病的血管病变的可能益处的预测价值。

[0048] 例如,非洲-加勒比海的糖尿病患者具有低相对危险度的 CVD^{14,16} 和微血管并发症以及高频率的触珠蛋白 1 等位基因(在人群中为 0.87)²⁶,而澳大利亚土著¹⁹的糖尿病患者和南亚的糖尿病患者^{12,15}具有高相对危险度的 CVD 和糖尿病微血管⁴⁷ 并发症以及相对低频率的触珠蛋白 1 等位基因(分别为 0.18 和 0.09)²⁶。

[0049] 最近鉴定了触珠蛋白表型可以影响动脉粥样硬化性 CVD 的临床病程的两种机制。首先,经皮腔内冠状动脉血管成形术后的再狭窄的分级危险被证实是与触珠蛋白 2 等位基因相关^{27,30}。其次,证实了具有触珠蛋白 2-1 表型的糖尿病个体比有着相似程度的冠状动脉疾病的具有触珠蛋白 2-2 表型的个体有着显著更多的冠状动脉的侧支血管。以往已经证实个体间在冠状动脉侧支循环程度上的差异是心肌梗死的严重度的关键的决定因素⁴⁸。

[0050] 一些功能已经被指定到触珠蛋白,它可以影响动脉粥样硬化的进展。血清触珠蛋白的主要功能是结合游离的血红蛋白,这已经被认识超过 60 年²²。这种相互作用被认为是帮助清除铁并阻止它从尿液的丢失,以及作用为一种抗氧化剂,据此保护组织对抗血红蛋白介导的组织氧化²³。不同触珠蛋白表型的抗氧化能力已经显示出不同,触珠蛋白 1-1 蛋白显示出具有比其他形式的蛋白更优的抗氧化保护作用²³。假定氧化应激在发生糖尿病血管并发症中的非常重要的作用,这样的一种抗氧化剂假说是特别吸引人的^{49,50}。可能进一步放大的不同类型的触珠蛋白所提供的氧化保护的表面差异是具有不同表型的个体中所存在的触珠蛋白的大小的 大体差异。触珠蛋白 1-1 明显要比触珠蛋白 2-2 更小,因此可能更好地进入到血管外间隙并预防血管损伤部位上的血红蛋白介导的组织损伤²³。但是,对触珠蛋白在动脉粥样硬化中的作用仍了解的很少,一些研究相互矛盾地证实了 Hp1-1 增加了心血管死亡率的危险(De Bacquer et al, Atherosclerosis 2001;157:161-6)。

[0051] 触珠蛋白也被证实是作为免疫调节物发挥作用,并且这种作用可能不会与它在血红蛋白代谢中的作用没有关联^{21,23}。最近在单核细胞/巨噬细胞中已经鉴定出一种触珠蛋白-血红蛋白复合物的特异性受体为 CD163,一个 B 组清道夫受体富含半胱氨酸超家族的成员⁵²。另一个该清道夫受体超家族的成员 CD36 先前已经被表明在 LDL 代谢中发挥着重要作用以及对于动脉粥样硬化病变的发展具有重要意义⁵³⁻⁵⁵。发现与血红蛋白复合的触珠蛋白 2-2 对该受体的亲和力比与血红蛋白复合的触珠蛋白 1-1 高出 10 倍⁵¹。已经表明与 CD163 结合的配体诱导了酪氨酸激酶依赖性信号级联所造成的大量炎性细胞因子的分泌⁵⁶。也已经证实触珠蛋白单独能与粒细胞和单核细胞结合。触珠蛋白阻断了中性粒细胞对各种激动剂和已知的血浆膜受体的反应,说明触珠蛋白可能作用为一种免疫系统的受体-配体相互作用的拮抗剂⁵⁷。已经证实触珠蛋白与 MAC-1 或 CD11b/CD18 受体⁵⁸(一种整联蛋白家族的成员)的特异性结合。这些整联蛋白已经显示出在血管壁对损伤的反应上发挥着重要作用⁵⁹。

[0052] 多个研究已经说明细菌感染在动脉粥样硬化斑块的发展和去稳定上的重要作用

⁶⁰。在这个方面,各种表型在预防体外和体内细菌及病毒复制上的能力的差别对于与触珠蛋白相关的动脉粥样硬化的不同的相对危险度可能是重要的²³⁻²⁵。这可以归结于铁清除上的差异²³以及不同表型所提供的免疫调节的差异⁵¹。

[0053] 这些发现与在此所显示的关于触珠蛋白表型和从用于预防糖尿病血管并发症的补充抗氧化剂中获益的结果完全一致。具有不同的触珠蛋白表型的糖尿病患者对抗氧化剂治疗的相对反应的显著差异应该足以保证在 CVD 危险分层算法中和在评价为预防糖尿病患者的 CVD 所设计的潜在的治疗干预(例如补充抗氧化剂和联合抗氧化剂与药物治疗)中所用的糖尿病患者进行大规模测试。

[0054] 根据本发明方法的各种优选的实施方案,通过多种方法中的任一方法实现对受试者的触珠蛋白表型的确定,这些方法包括但不限于信号扩增法、直接检测法和对至少一种序列改变的检测。这些方法通过确定基因型间接地确定出表型。如在下面所解释的那样,通过分析触珠蛋白基因产物直接地完成对触珠蛋白表型的确定。

[0055] 本发明的各种优选的实施方案的信号扩增法可以扩增例如 DNA 分子或 RNA 分子。可被用作本发明的一部分的信号扩增法包括,但不限于,PCR、LCR(LAR)、自动维持合成反应(3SR/NASBA)或 Q- β (Q β) 复制酶反应。

[0056] 聚合酶链反应(PCR):如在授予 Mullis 和 Mullis 等的美国专利 No. 4,683,195 和 4,683,202 中所描述的聚合酶链反应(PCR)是一种增加基因组 DNA 混和物中的靶序列片段的浓度且无克隆或纯化的方法。该技术提供了一种解决低浓度靶序列的问题的方法。PCR 可被用于将靶序列浓度直接地增加到可被容易检测到的水平。用于扩增靶序列的这个方法包括往含有所需的靶序列的 DNA 混和物中引入摩尔过量的两种与双链靶序列的相应链互补的寡核苷酸引物。将混和物变性,然后杂交。在杂交后,用聚合酶延伸引物使得形成互补链。常可按需重复变性、杂交(退火)和聚合酶延长(延伸)的步骤,以获得相对高浓度的所需的靶序列片段。

[0057] 通过引物彼此的相对位置可确定所需靶序列片段的长度,因此该长度是可控的参数。因为所需的靶序列片段成为了混和物中的显性序列(按浓度方式),它们被认为是“PCR 扩增的”。

[0058] 连接酶链反应(LCR 或 LAR):Barany, Proc. Natl. Acad. Sci., 88:189 (1991); Barany, PCR Methods and Applic., 1:5(1991); 和 Wu and Wallace, Genomics 4:560(1989) 所描述的连接酶链反应[LCR,有时被称为“连接酶扩增反应(LAR)"]已经发展成为扩增核酸的公认的可选择的方法。在 LCR 中,将四种寡核苷酸,与靶 DNA 的一条链独特杂交的两种邻近的寡核苷酸,以及与相反链杂交的一个邻近寡核苷酸的互补组混和,并往混和物中加入 DNA 连接酶。假若在连接处具有完全的互补性,连接酶将共价连接每组杂交分子。重要的是,在 LCR 中,仅当探针与靶样本的序列碱基配对且无缺口或错配时,两个探针才被连接在一起。重复循环的变性和连接扩增 DNA 的短片段。LCR 也已经与 PCR 联用得到对单碱基改变的强化检测(Segev, PCT Publication No. W09001069 A1(1990))。但是,因为在本检测中所用的四种寡核苷酸能配对形成两个短的可连接的片段,因此有形成靶序列非依赖性背景信号的可能。用于突变筛选的 LCR 的应用被限定于检查特异性的核酸位点。

[0059] 自动维持合成反应(3SR/NASBA):自动维持合成反应(3SR)(Guatelli et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 87:1874-1878, 1990) 和 Proc. Natl. Acad. Sci., 87:7797, 1990 中

的勘误表)是一种基于转录的体外扩增体系(Kwok et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 86: 1173-1177, 1989),它能在单一温度下指数扩增 RNA 序列。然后扩增的 RNA 可被用于突变检测(Fahy et al., PCR Meth. Appl., 1:25-33, 1991)。在这个方法中,寡核苷酸引物被用于将噬菌体 RNA 聚合酶启动子加入到相关序列的 5' 末端。在酶和包括第二种引物、逆转录酶、RNase H、RNA 聚合酶和核糖及脱氧核糖核苷三磷酸的底物的鸡尾酒中,靶序列进行转录、cDNA 合成及第二链合成的重复循环以扩增相关区域。3SR 检测突变的用途被动态地限定于筛选 DNA 的小片段(例如 200-300 个碱基对)。

[0060] Q- β (Q β) 复制酶:在这个方法中,识别相关序列的探针被连接到用于 Q β 复制酶的可复制的 RNA 模板上。通过使用序列特异性连接步骤已的效率下,所需的循环数目是被禁止的。另外,以比预期靶序列更好的平均效率扩增的任何的背景产物将成为主导产物。

[0061] 许多变量也可影响 PCR 的平均效率,包括靶 DNA 长度和二级结构、引物长度和设计、引物和 dNTP 浓度、和缓冲液组合物,等等。外源 DNA 对反应物的污染(例如 DNA 溅到实验品的表面)或交叉污染也是一个主要原因。必须为每个不同的引物对和靶序列仔细地优化反应条件,甚至对于有经验的研究者,这个过程也需要花费数天。这些过程的烦琐包括多种技术原因和其他因素,代表着在临床实践中使用 PCR 的明显缺点。事实上,PCR 仍以重要的方式渗透到临床市场中。LCR 有着同样的问题,如 LCR 必须被优化使用各种靶序列的不同的寡核苷酸序列。另外,两种方法都要求能进行精确温度循环的昂贵设备。

[0062] 核酸检测技术的多个应用例如对等位基因变异的研究不仅涉及检测复合背景中的特异序列,也涉及具有一些或单个核苷酸差异的序列之间的区别。PCR 检测等位基因特异性变异的一个方法是依据当模板链和引物的 3' 末端之间存在错配时难以用 Taq 聚合酶合成 DNA 链的事实。通过使用仅与其中一种可能的等位基因完全配对的引物可以检测等位基因特异性变异,与另一种等位基因的错配作用为阻止引物的延伸,并据此避免该序列的扩增。该方法有着很大的局限,就是错配的碱基组成影响着阻止延伸通过错配的能力,以及某些错配不能阻止延伸或只有很小的影响(Kwok et al., Nucl. Acids Res., 18:999, 1990)。

[0063] 使用具有更大影响的相似的 3' 错配策略阻止 LCR 中的连接(Barany, PCR Meth. Applic., 1:5, 1991)。任何错配有效地阻断了耐热连接酶的作用,但是用 LCR 仍有着靶序列非依赖性背景连接产物启动扩增的缺点。而且,用于鉴别个别位置上的核苷酸的 PCR 与随后的 LCR 的组合对于临床实验室也是非常麻烦的问题。

[0064] 本发明的各种优选的实施方案的直接检测法可以是例如循环探针反 经解决了非杂交探针的复制所产生的具有假阳性的先前被认识到的主要问题。但是,可得到的耐热的 DNA 连接酶对于这种 RNA 底物是无效的,因此必须用 T4 DNA 连接酶在低温(37°C)下进行裂解。这种方法避免了使用高温,以此作为得到和 LCR 一样的特异性的方法,连接事件可被用于检测连接位点处的突变而不是其他部位的突变。

[0065] 一种成功的诊断方法必须是非常特异的。控制核酸杂交的特异性的笔直方法是通过控制反应温度。虽然 3SR/NASBA 和 Q β 体系都能生成大量的信号,但是每个体系中所含的一种或多种酶无法在高温(即> 55°C)下使用。因此,不能通过提高反应温度避免探针的非特异性杂交。如果为了使得探针更容易在低温下解链而将探针缩短,在复合基因组中具有超过一个完全匹配的类然比将增加。因为这些原因,PCR 和 LCR 目前支配着检测技术的研究领域。

[0066] PCR 和 LCR 中的扩增方法的基础是一个循环的产物成为了所有随后循环的模板，据此每个循环将数量加倍的事实。每个如此加倍体系的最终产量可表示为： $(1+X)^n = y$ ，其中“X”是平均效率（每个循环所拷贝的百分比），“n”是循环数目，以及“y”是总效率或反应的产量（Mullis, PCRMethods Applic., 1:1, 1991）。如果靶 DNA 的每个拷贝都被用作聚合酶链反应的每个循环的模板，那么平均效率为 100%。如果进行 20 个循环的 PCR，那么产量将是原料的 2^{20} 、或 1,048,576 个拷贝。如果反应条件将平均效率减少为 85%，那么在这 20 个循环内的产量将仅仅是原料的 1.85^{20} 或 220,513 个拷贝。换句话说，85% 效率下进行的 PCR 将产生只有在 100% 效率下进行的反应中所产生的终产物的 21%。被减少为 50% 平均效率的反应将生成少于 1% 的可能产物。

[0067] 在实践中，常规聚合酶反应很少得到理论上的最大产率，PCR 通常进行超过 20 个循环以补偿更低的产量。在 50% 平均效率下，需要 34 个循环以得到在 20 个循环所得到的理论上可能的百万级扩增，以及在更低效率或分支 DNA 分析。

[0068] 当得到足够量的所需检测的核酸时，不是制备靶序列的更多拷贝（如 PCR 和 LCR）而是对序列的直接检测是一个优点。最特别的是，没有指数扩增信号的方法是更适合于定量分析的。甚至如果通过将多个染料连接到单个寡核苷酸来增强信号，终信号强度和靶序列量之间的相关性是直接的。这样的一种体系所有的其他优点是反应的产物本身不会启动其他的反应，所以产物对实验品表面的污染不是那样多被关注的问题。直接检测的常用方法包括 Northern 和 Southern 区带核糖核酸酶保护测定通常需要使用放射性以及不适用于自动化检测。最近设计的技术已经设法去消除使用放射性和 / 或改善自动化格式的敏感性。两个实例是“循环探针反应”（CPR）和“分支 DNA”（bdDNA）。

[0069] 循环探针反应（CPR）：循环探针反应（CPR）（Duck et al., BioTech., 9:142, 1990）使用一种长的嵌合寡核苷酸，其中中心部分是由 RNA 构成的，而两个末端是由 DNA 构成的。探针与靶 DNA 的杂交以及对耐热的 RNaseH 的暴露造成 RNA 部分被消化。这就不稳定了双链体的剩余的 DNA 部分，将探针的剩余部分从靶 DNA 中释放出来并容许另一个探针分子重复该过程。以线性速度蓄积了以分割的探针分子形式的信号。虽然重复过程增加了信号，但寡核苷酸的 RNA 部分对于在样本制备过程中所带入的 RNase 是敏感的。

[0070] 分支 DNA：Urdea et al., Gene 61:253-264 (1987) 所描述的分支 DNA (bdDNA) 包括具有分支结构的寡核苷酸，它容许每个单个寡核苷酸携带 35 到 40 个标记（例如碱性磷酸酶）。虽然这个方法增强了来自杂交事件的信号，但同样增加了来自非特异性结合的信号。

[0071] 根据本发明不同的优选的实施方案对至少一种序列改变的检测可以通过例如限制性片段长度多态性（RFLP）分析、等位基因特异性寡核苷酸（ASO）分析、变性 / 温度梯度凝胶电泳（DGGE/TGGE）、单链构象多态性（SSCP）分析或双脱氧指纹（ddF）来实现。

[0072] 在临床诊断上，对于容许检测特异性核酸序列和序列改变的测试的需要正在快速增长。随着来自人和致病性生物体的基因的核酸序列数据的积累，对于检测特异序列内的突变的快速、廉价和易用的测试的需要正在快速增长。

[0073] 已经设计了多种方法来扫描核酸片段的突变。一个选择是确定每个测试样本（例如细菌分离物）的整个基因序列。对于小于近 600 个核苷酸的序列，用扩增的材料（例如 PCR 反应产物）可以完成测试。这虽然避免了与克隆相关片段有关的时间和费用。但是，需要特殊的设备和训练有素的人员，并且该方法的劳动强度太大和太昂贵，因此在临床环境

中是不现实和不有效的。

[0074] 考虑到与测序相关的困难,可以在一些其他的水平上描述核酸的给定片段。在最低分辨率上,可以用电泳通过与在相同的胶上所跑的已知链进行比较确定出分子的大小。通过在电泳之前用限制性酶的组组合进行分解可以得到分子的更多详细的图像,以容许构建出有序的图谱。用标记探针的杂交可以检测片段内的特异性序列的存在,或用部分化学降解或在存在链终止核苷酸类似物时用引物延伸可以确定出精确的核苷酸序列。

[0075] 限制性片段长度多态性 (RFLP) :对于相似序列之间的单碱基差异的检测,通常需要最高分辨率水平上的分析。对于预先已知相关核苷酸的位置的情况,已经发展出一些用于检测单一碱基改变而非直接测序的方法。例如,如果相关突变发生在限制性内切酶识别序列内,消化模式的改变可作为诊断工具(例如限制性片段长度多态性 [RFLP] 分析)。

[0076] 通过 RFLP 的形成或破坏也可以检测单点突变。通过在错配处的降解所生成的 RNA 片段的存在或大小可以检测并定位突变。用一些化学试剂也可识别并降解 DNA 异双链体中的单核苷酸错配,这提供了一种可选择的检测单碱基取代的策略,遗传学称为“错配化学降解”(MCC) (Gogos et al., Nucl. Acids Res., 18 :6807-6817, 1990)。但是,这种方法需要使用四氧化锇和六氢吡啶,这是两种剧毒化学物,它们不适合用于临床实验室。

[0077] RFLP 分析具有低敏感性并需要大量样本。当 RFLP 分析被用于检测点突变时,因为其特性,它被限制仅用于检测那些在已知限制性内切酶的限制性序列内的单碱基改变。此外,大部分现有的酶具有 4 到 6 个碱基对的识别序列,并且对于许多大规模的 DNA 操作,这些酶的裂解过于频繁 (Eckstein and Lilley (eds.), Nucleic Acids and Molecular Biology, vol. 2, Springer-Verlag, Heidelberg, 1988)。因此,它只适用于很少部分的情况,因为大多数突变不在这些位点的范围内。

[0078] 已经分离出许多具有 8 碱基对特异性的稀有切割的限制性内切酶,它们被广泛地用于遗传学绘图,但是这些酶很少,被限定于对富含 G+C 序列的识别,并在高度簇生的位点降解 (Barlow and Lehrach, Trends Genet., 3 :167, 1987)。最近,已经发现 I 组内含子所编码的内切酶可能有着超过 12 个碱基对的特异性 (Perlman and Butow, Science 246 :1106, 1989),但是它们仍是很少数目的。

[0079] 等位基因特异性寡核苷酸 (ASO) :如果改变不是在识别序列内,那么可以设计等位基因特异性寡核苷酸 (ASO) 以在突变的核苷酸附近进行杂交,这样引物的延伸或连接事件可被作为匹配或错配的指示。与放射性标记的等位基因特异性寡核苷酸 (ASO) 的杂交也已经被用于检测特异的点突变 (Conner et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 80 :278-282, 1983)。该方法依据单个核苷酸差异所造成的短 DNA 片段的解链温度的差异。严格的杂交和洗涤条件可以区分突变型和野生型等位基因。多个研究者也已经广泛地用应用于 PCR 产物的 ASO 方法检测并描述 ras 基因 (Vogelstein et al., N. Eng. J. Med., 319 :525-532, 1988; 和 Farr et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 85 :1629-1633, 1988) 和 gsp/gip 癌基因 (Lyons et al., Science 249 : 655-659, 1990) 中的点突变。因为在多个位点存在不同的核苷酸改变, ASO 方法要求使用覆盖所有可能的致癌性突变的多个寡核苷酸。

[0080] 对于上述的每种技术(即 RFLP 和 ASO),必须在测试前预先知道可疑突变的精确位置。也就是说,当需要检测一个相关基因或序列中是否存在的突变时,它们是不适合的。

[0081] 变性 / 温度梯度凝胶电泳 (DGGE/TGGE) :两种其他的方法依赖于检测较少的序

列改变所造成的电泳迁移率的改变。这些方法中的一个方法被称为“变性梯度凝胶电泳”(DGGE),它根据对当电泳地溶解于梯度凝胶时,稍微不同的序列将表现出局灶解链的不同模式的观察。以这种方法,可以将变体区分为有着单一核苷酸差异的同源双链体对异源双链体的解链特性的差异,这种差异可以检测靶序列中的突变的存在,因为它们的电泳迁移率的相应改变。用长的 G-C 碱基对(30-80)在一端“锁定(clamped)”所分析的片段(常为 PCR 产物),以容许将相关序列完全变性而不发生链的完全解离。将 GC “锁(clamp)”连接到 DNA 片段上的增加了可被 DGGE 识别的突变的比例(Abrams et al., Genomics 7:463-475,1990)。将一个 GC “锁”连接到一个引物上是关键,它保证了所扩增的序列具有低的解离温度(Sheffield et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 86:232-236,1989; and Lerman and Silverstein, Meth. Enzymol., 155:482-501,1987)。已经发展出利用温度梯度的对该技术的修饰方法(Wartell et al., Nucl. Acids Res., 18:2699-2701,1990),并且该方法也可被应用于 RNA:RNA 双链体(Smith et al., Genomics 3:217-223,1988)。

[0082] DGGE 应用的限制包括需要必须将所测试的每种类型的 DNA 的变性条件最优化。此外,方法还需要制备胶和在电泳期间保持所需高温的特殊设备。与合成所测试的每个序列的一种寡核苷酸上的锁定尾(clampingtail)所相关的费用也是一个主要问题。另外,DGGE 需要长的运转时间。在被称为恒定变性凝胶电泳(CDGE)的 DGGE 的修饰方法中缩短了 DGGE 的长运转时间(Borrensen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8405,1991)。为了达到高效地检测突变,CDGE 要求在不同的变性条件下完成凝胶。

[0083] 一种与 DGGE 类似的技术被命名为稳定梯度凝胶电泳(TGGE),它使用温度梯度而不是化学变性梯度(Scholz, et al., Hum. Mol. Genet. 2:2155,1993)。TGGE 需要使用能产生垂直定位于电场的温度梯度的特殊设备。TGGE 能检测相对小的 DNA 片段中的突变,因此扫描大的基因片段要求在跑胶之前使用多量 PCR 产物。

[0084] 单链构象多态性(SSCP):另一种常用的方法是 Hayashi、Sekya 和他们的同事们发展的被称为“单链构象多态性”(Hayashi, PCR Meth. Appl., 1:34-38,1991 所综述的),它依据于单链核酸在非变性条件中具有特征性的构象的发现,这些构象影响迁移率。认为互补链具有非常不同的结构,使得一条链能与另一条链区分开。片段内的序列的改变也将改变构象,最终改变迁移率,使得它被用作为一种检测序列变异的方法(Orita, et al., Genomics 5:874-879,1989)。

[0085] SSCP 过程包括变性在双链上都被标记的 DNA 片段(例如 PCR 产物),随后在非变性的聚丙烯酰胺凝胶上进行慢的电泳分离,这样可以形成分子间的相互作用以及在跑胶期间不会相互干扰。该技术对于凝胶组成和温度上的差异是极为敏感的。这个方法的严重的局限性是比较在明显相似的条件在不同的实验室所生成的数据中会遇到相当大的困难。

[0086] 双脱氧指纹印迹法(ddF):双脱氧指纹印迹法(ddF)是另一种被发展用于扫描基因内突变的技术(Liu and Sommer, PCR Methods Appl., 4:97,1994)。ddF 技术组合了 Sanger 双脱氧测序和 SSCP 的内容。用一个双脱氧终止物进行双脱氧测序反应,然后如 SSCP 分析那样,在非变性的聚丙烯酰胺凝胶上电泳反应产物以检测出终止片段的迁移率的变更。虽然 ddF 在增加敏感性方面是对 SSCP 的一个改进,但是 ddF 需要使用昂贵的双脱氧核苷酸,并且该技术仍被局限于分析适合于 SSCP 分析的大小的片段(即,最适合于检测 200-300 个碱基对的片段中的突变)。

[0087] 除外上述的限制外,所有的这些方法都受所分析的核酸片段的大小的限制。对于直接测序法,超过 600 个碱基对的序列需要克隆,以及为了覆盖整个片段所需的亚克隆或引物步移所带来的耽搁和花费。SSCP 和 DGGE 甚至有着更为严重的大小限制。因为减少了对序列改变的敏感性,认为这些方法不适用于更大的片段。尽管报道 SSCP 能检测 200 个碱基对片段内的 90% 的单碱基取代,但是对于 400 个碱基对的片段,检测降低到了 50%。同样的,当片段的长度达到 500 个碱基对时,DGGE 的敏感性降低。作为直接检测和 SSCP 组合的 ddF 技术也受可被扫描的 DNA 的相当小的大小的限制。

[0088] 根据本发明的一个当前的优选的实施方案,通过单链构象多态性 (SSCP) 技术例如 cDNA-SSCP 或基因组 DNA-SSCP 实现寻找肿瘤细胞或来源于肿瘤患者的细胞内的上述的任一基因例如还原叶酸载体 (RFC) 基因内的一个或多个突变的步骤。不过,也可采用其他的方法,它们包括但不限于核酸测序、聚合酶链反应、连接酶链反应、自动维持合成反应、Q β 复制酶、循环探针反应、分支 DNA、限制性片段长度多态性分析、错配化学切割、异双链体分析、等位基因寡核苷酸、变性梯度凝胶电泳、恒定变性凝胶电泳、温度梯度凝胶电泳和双脱氧指纹印迹法。

[0089] 如在下面的实施例部分所进一步举例的那样,通过分析触珠蛋白基因的蛋白基因产物或其部分,也能直接地完成对触珠蛋白表型的确定。例如,Wassell 等 (Ann Clin Biochem 1999 ;36 :609-12) 描述了一种对电泳分离的触珠蛋白蛋白的敏感、直接的分析以及一种特殊染色。另外,用一种免疫学检测法经常完成这样的直接分析。

[0090] 例如在“Using Antibodies :A Laboratory Manual”(Ed Harlow,David Laneeds., Cold Spring Harbor Laboratory Press(1999) 中充分解释了免疫学检测法,那些本领域人员能实现下面所总结的作为本发明一部分的各种技术。所有的免疫学技术都需要特异于两种触珠蛋白的等位基因的一种等位基因的抗体。适合用作为本发明的一部分的免疫学检测法包括,但不限于放射免疫测定法 (RIA)、酶联免疫吸附测定法 (ELISA)、western 印迹法、免疫组化分析和荧光激活细胞分选术 (FACS)。

[0091] 放射免疫测定法 (RIA) :在一个版本中,该方法包括用特异的抗体和固定于可沉淀载体例如琼脂糖珠上的放射性标记的抗体结合蛋白 (例如用 I^{125} 标记的蛋白 A) 沉淀所需的底物,在本例和下面详细描述的方法中该底物为触珠蛋白。在所沉淀的珠中的计数数目与底物的数目成正比。

[0092] 在 RIA 的另一个版本中,采用了标记底物和为标记的抗体结合蛋白。加入不同数量的含有未知量底物的标本。来自标记底物的所沉淀的计数的减少与所加入样本中的底物数目成正比。

[0093] 酶联免疫吸附测定法 (ELISA) :该方法包括将含有蛋白底物的样本 (例如固定的细胞或蛋白质溶液) 固定于一个表面例如微量滴定板的一个孔上。与酶偶联的底物特异性抗体被使用并被容许与底物结合。然后用采用与抗体偶联的酶的色度法反应检测并定量抗体的存在。在这个方法中常用的酶包括辣根过氧化物酶和碱性磷酸酶。如果被很好地标定以及在线性的反应范围内,样本中所存在的底物的量与所产生的色度成比例。常采用标准底物提高定量的准确性。

[0094] Western 印迹法 :该方法包括用丙烯酰胺凝胶将底物与其他蛋白分开,随后将底物转移到膜上 (例如尼龙或 PVDF)。然后用特异于底物的抗体检测底物的存在,随后用抗体

结合试剂检测抗体。抗体结合试剂可以是例如蛋白 A 或其他抗体。抗体结合试剂可以是如上述的被放射性标记的或酶联的。检测可以通过放射自显影技术、比色反应或化学发光法。该方法容许定量底物的量并通过底物在膜上的相对位置确定出底物的身份,该相对位置是底物在电泳期间在丙烯酰胺凝胶上的移动距离的指示。

[0095] 免疫组织化学分析:这个方法包括用底物特异性抗体检测固定细胞内的原位底物。底物特异性抗体可以是酶联的或与荧光团相连的。检测是通过显微镜或主观评价。如果采用酶联抗体,可能需要比色反应。

[0096] 荧光激活细胞分选术 (FACS):这个方法包括用底物特异性抗体检测细胞内原位的底物。底物特异性抗体与荧光团相连。检测是通过细胞分选仪,它可阅读当每个细胞经过光束时所发射出的光的波长。这个方法可以同时采用两种或多种抗体。

[0097] 当把本发明付诸实践时,对 HOPE 研究数据的分析也首次发现,维生素 E 和药物雷米普利具有相似的触珠蛋白型特异性的益处。雷米普利是常用的治疗高血压的药物,因此预计它可用于预防 CVD。但是,雷米普利的预防作用的幅度 ($RR = 0.57$) 以及预防被严格地限定于一种触珠蛋白表型亚组 (Hp 2-2) 的情况说明,雷米普利的预防作用超过了它对高血压的疗效。除了它的作为血管紧张素转化酶 (ACE) 抑制剂的活性外,雷米普利还有作为抗氧化剂的活性,因为雷米普利治疗在体内减少了氧自由基种类 (Lopez-Jaramillo, et al J Hum Hypertens 2002 ;16S1 :S100-300)。这里两种具有明显不同的生物化学后果的抗氧化剂为经触珠蛋白分型所鉴定出的糖尿病患者亚组提供了相似的临床益处的论证说明,抗氧化剂治疗的范例可适用于其他的抗氧化剂,例如 Trolox (Sagach et al PharmaRes 202 ;45 :435-39)、Raxofelast (Campo et al, Cardiovasc Drug Rev 1997 ;15 :157-73)、TMG (Meng et al Bioorg Med Chem Ltrs 2002 ;12 :2545-48)、AGI-1067 (Yoshida et al Atheroscler 2002 ;162 :111-17)、Probucol (Kita et al PNAS USA 1987 ;84 :7725) 以及具有与维生素 E 相似的抗氧化作用的机制的钙离子通道阻滞剂 (MakI, et al. Pharma Res. 2002 ;45 :27-33),例如尼索地平、尼非地平 and 尼卡地平。因此,预计将从这些抗氧化剂的预防治疗获益的人群 (Hp 2-2 的糖尿病患者) 将类似于在此所证实的从维生素 E 和雷米普利补充中获益的人群。但是,对糖尿病患者从补充抗氧化剂中获益的确定不能被应用于所有的抗氧化剂维生素,因为不管是在未经选择的样本还是在糖尿病患者中,在 CVD 后果和维生素 C 补充之间都没有发现相关性 (数据没有显示)。

[0098] 在此对 HOPE 研究数据的新的分析处理现在已经提供了清楚的证据,其中抗氧化剂维生素 E 在未分层的糖尿病患者中没有明显的益处,可以确定出一个证实从抗氧化剂治疗中显著获益的糖尿病患者的亚组。因此,这些数据说明将所有糖尿病患者的触珠蛋白表型分型以及为了预防糖尿病的 CVD 给具有 Hp 2-2 表型的患者提供预防性抗氧化剂补充治疗的巨大价值。这种预防性抗氧化剂作用并不限于单一的抗氧化剂 (例如维生素 E),多种潜在的抗氧化剂例如 Trolox、Raxefiolfast、AGI-1067、Probucol、TMG 和钙离子通道阻滞剂也是有效的。从对其他临床研究的分析中可以确定出这些不同的药剂的相对疗效。

[0099] 本领域人员明白用任何来自受测个体的适合的生物学样本都可以直接地或遗传学地实现对个体的触珠蛋白表型的确定,这些样本包括但不限于血液、血浆、血细胞、唾液或漱口所得到的细胞、以及身体分泌物例如尿液和泪液、以及来自活检的样本等等。

[0100] 通过阅读以下的实施例,本领域人员将清楚地知道本发明的其他目的、优点和新

的特点,这些实施例无意于对本发明做任何限定。另外,每一个在上面所描述的以及在下面的权利要求书中所要求的本发明的各种实施方案和部分都可以在下面的实施例中找到实验支持。

[0101] 实施例

[0102] 现在一起参照下面的实施例以及上述的描述,以非限制性方式举例说明了本发明。

[0103] 一般地,在此所用的术语和在本发明中所用的实验室方法包括分子、生物化学、微生物学和重组 DNA 技术。在文献中已经充分地解释了这些技术。见例如,“Molecular Cloning:A laboratory Manual”Sambrook et al., (1989);“Current Protocols in Molecular Biology”Volumes 1-111 Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., “Current Protocols in Molecular Biology”, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, “A Practical Guide to Molecular Cloning”, John Wiley & Sons, New York (1988); Watson et al., “Recombinant DNA”, Scientific American Books, New York; Birren et al. (eds) “Genome Analysis: A Laboratory Manual Series”, Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); 如在美国专利 No. 4,666,828、4,683,202、4,801,531、5,192,659 和 5,272,057 中所提出的方法学;“Cell Biology: A Laboratory Handbook”, Volumes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); “Culture of Animal Cells-A Manual of Basic Technique” by Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), Third Edition; “Current Protocols in Immunology” Volumes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al. (eds), “Basic and Clinical Immunology” (8th Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (eds), “Selected Methods in Cellular Immunology”, W. H. Freeman and Co., New York (1980); 在专利和科学文献中广泛地描述了可获得的免疫检测法, 见例如美国专利 No. 3,791,932、3,839,153、3,850,752、3,850,578、3,853,987、3,867,517、3,879,262、3,901,654、3,935,074、3,984,533、3,996,345、4,034,074、4,098,876、4,879,219、5,011,771 和 5,281,521; “Oligonucleotide Synthesis” Gait, M. J., ed. (1984); “Nucleic Acid Hybridization” Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1985); “Transcription and Translation” Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1984); “Animal Cell Culture” Freshney, R. I., ed. (1986); “Immobilized Cells and Enzymes” IRL Press, (1986); “A Practical Guide to Molecular Cloning” Perbal, B., (1984) 和 “Methods in Enzymology” Vol. 1-317, Academic Press; “PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications”, Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., “Strategies for Protein Purification and Characterization-A Laboratory Course Manual” CSHL Press (1996); 在此将其全部内容一同并入作为参考。在本文件的全文中提供了其他常用的参考文献。相信这些方法在本领域是熟知的,为了读者的便利,我们提供了这些方法。在此一同并入参考其所含的所有信息。

[0104] 实验方法

[0105] 在给出提供实验数据支持本发明的实施例之前,参照以下的方法:

[0106] 患者:

[0107] 对 Strong 心脏研究的设计、调查方法和实验室技术以及参与的印第安人团体先

前已经被发表^{20,39,40}。

[0108] 研究组包括超过 4,549 位在 1989 年 7 月和 1992 年 1 月之间在首次进行检查时年龄为 45 岁到 74 岁的个体。所有入选部落成员的参与率平均为 65%。未参与者在年龄和糖尿病的自报率上与参与者相似。在第二次检查（1993 年 7 月到 1995 年 12 月）及第三次检查（1997 年 7 月到 1999 年 12 月）时仍存活的个体的复检率平均为 88% 和 90%。

[0109] 每个阶段的临床检查包括个人调查和体格检查。取空腹血液样本用于生物化学测定,并进行 75 克口服葡萄糖耐受试验。将血液样本收集于 EDTA 中,收集血浆并储存于 -20℃。得到标准的血压测定,以及按先前所描述的连接并记录心电图^{39,40}。根据世界卫生组织标准将参与者分类为糖尿病⁴¹。如果参与者正在服用抗高血压药物或者如果他们的收缩压超过 140mmHg 或舒张压超过 90mmHg,就认为这些参与者为高血压。

[0110] 通过部落和医院的记录以及通过研究者与参与者和他们家庭的直接接触鉴定出 1998 年和至今期间的 Strong 心脏研究组中的死亡。从州卫生部中得到死亡证明书的拷贝并由一位疾病分类学家集中进行 ICD-9 编号。最初从如前所述的死亡证明书中鉴定出可能的 CVD 死亡⁴²。从尸解报告、病历记录摘要和如前所述的填表员的调查中研究死亡原因⁴²。由 Strong 心脏研究死亡率复习委员会的医师成员独立地复习所有材料确认死亡原因。先前描述了致死性 CVD 和中风的标准⁴²。

[0111] 在每次检查时都复习病历记录以识别自上一次检查以来所已经发生的如前所述的任何致死性心血管事件、明确的 MI 和明确的 CVD。也复习了那些在第二次或第三次检查中没有参与的人员的记录。对于所有潜在的 CVD 事件或干涉,病历记录被经训练的病历记录摘录者所复习。复习并摘要了门诊随诊记录中的 CVD 诊断性操作（例如平板试验、冠状动脉造影）。由 Strong 心脏研究发病率或死亡率复习委员会的一个医师成员复习了从图表复习中所得到的信息以建立特异的 CVD 诊断。发病率复习委员会的其他医师成员对摘要记录的盲向复习显示在诊断上有着 > 90% 的一致性。

[0112] HOPE 研究和患者特征:心脏后果预防评估 (HOPE) 研究被设计用于验证关于两种称为血管紧张素转化酶 (ACE) 抑制剂或维生素 E 的预防性处理策略将比安慰剂更能改善心血管事件高危患者的发病率和死亡率的假说。在这个研究中所包括的患者被认为是具有未来致死性或非致死性心血管事件的高危性,因为他们的年龄 (> 55 岁)、现有的或以往的心血管病或糖尿病。糖尿病患者至少还有一种其他的危险因素,或者是已知的心血管病或其他因素例如吸烟、高胆固醇或高血压。将雷米普利或安慰剂加入到伴随药物中,在大多数患者中,这些药物包括抗高血压药物 (除 ACE-I 以外)、降脂药或阿司匹林。先前已经详细地描述了 HOPE 研究设计和方案 (见例如, The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators, NE J Med, 2000 ;342:154-60 and Sleight, P, J Renin Angioten Aldost Sys 2000 ;1:18-20)。简单地,研究人群包括超过 9,451 个 CVD 高危的患者 (3,654 个 DM)。研究为 2×2 因子设计,被随机分为 400IU 天然维生素 E (RRR- α -tocophorol acetate) 或安慰剂和 10mg 雷米普利或安慰剂。随诊患者平均 4.5 年。主要研究后果包括非致死性 MI、中风或心血管死亡。

[0113] 病例和对照的定义:

[0114] 本研究是一个病例对照研究,设计用于检测 CVD 和触珠蛋白表型之间的相关性。206 个 CVD 病例和对照 (经年龄、性别和地理区域匹配) 被用于这个分析。

[0115] 触珠蛋白表型分型：

[0116] 通过凝胶电泳和利用 Smith 最初描述的使用淀粉凝胶电泳和联苯胺的过氧化物酶染色的方法的改良方法的过氧化物酶染色从 $10\ \mu\text{L}$ EDTA 血浆中确定出触珠蛋白表型^{44, 45, 46}。患者血浆被储存在 -20°C 。所有化合物都购自以色列 Sigma 公司 (Rehovot, Israel)。通过首先在磷酸缓冲盐水中洗涤血细胞 5 次然后将细胞裂解在每 ml 压缩细胞体积 9ml 的无菌水中, 从肝素化血液中制备得到 10% 血红蛋白水溶液。在 10,000g 离心细胞裂解液 40 分钟, 并将含有血红蛋白的上清液分装储存在 -70°C 。将血浆 ($10\ \mu\text{L}$) 和 $2\ \mu\text{L}$ 10% 血红蛋白溶液混和, 并将样本在室温下放置 5 分钟以使得形成触珠蛋白-血红蛋白复合物。在跑电泳之前, 将等体积 ($12\ \mu\text{L}$) 的含有 125mM Tris 碱 pH 6.8、20% (w/v) 甘油和 0.001% (w/v) 溴酚蓝的样本缓冲液加入到每样本中。利用含有 25mM Tris 碱和 192mM 甘氨酸的缓冲液用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离触珠蛋白-血红蛋白复合物。成层胶为 125mM Tris 碱 (pH 6.8) 中的 4% 聚丙烯酰胺 (29 : 1 丙烯酰胺 / 双丙烯酰胺), 以及分离胶是 360mM Tris 碱 (pH 8.8) 中的 4.7% 聚丙烯酰胺 (29 : 1 丙烯酰胺 / 双丙烯酰胺)。在 250 伏恒压下进行电泳 3 个小时。在完成电泳后, 通过将胶浸泡在玻璃器皿内的新鲜制备的染色溶液中可以肉眼看到触珠蛋白-血红蛋白复合物。染色溶液 (通过按所列的次序加入试剂制备得到) 含有 5ml 0.2% (w/v) 3,3',5,5'-四甲基联苯胺甲醇溶液、0.5ml 二甲基亚砷、10ml 5% (v/v) 冰醋酸、1ml 1% (w/v) 铁氰化钾和 $150\ \mu\text{L}$ 30% (w/w) 过氧化氢。在 15 分钟内可看到对应于触珠蛋白-血红蛋白复合物的条带, 该条带是稳定超过 48 个小时。照相记录下所有的胶。在实验室中, 无任何有关于患者的知识下确定出所有样本的触珠蛋白表型。

[0117] 实验室接受用于分析的血浆样本, 触珠蛋白表型分型在所有的除了 6 个样本外都是可能的。对于这 6 个患者, 还不清楚是否它们表示患者不合成任何的触珠蛋白 (Hp 0 表型)^{22, 23} 或触珠蛋白的浓度在所描述的检测法的检测限度之下。

[0118] 对于来自 HOPE 研究的样本, 根据已建立的方法 (Hochberg I et al Atherosclerosis 2002 ;161 :441-446), 用聚丙烯酰胺凝胶电泳从 $10\ \mu\text{L}$ 样本中进行触珠蛋白表型分型。从 1 等位基因纯合子 (Hp1-1)、2 等位基因纯合子 (Hp 2-2) 或在触珠蛋白位点为杂合子 (Hp 2-1) 的个体中得到标记条带图案。我们已经在从血浆中所确定的触珠蛋白表型和用聚合酶链反应从基因组 DNA 中所确定的触珠蛋白基因型之间建立了 100% 一致性 (Koch W, et al Clin Chem 2002 ;277 :13635-40)。在超过 99.6% 的所有检测样本中得到了一个明确的触珠蛋白表型。在未知患者的临床或治疗状态下进行触珠蛋白表型分型。

[0119] 统计学分析：

[0120] 在病例和对照之间以及在三种触珠蛋白表型之间比较了 CVD 的危险因素年龄、性别、LDL 和 HDL 胆固醇、甘油三脂、收缩期 BP、BMI、糖尿病、吸烟、CVD 家族史和入选中心。另外, 在病例和对照之间以及在三种触珠蛋白表型之间比较了由胰岛素、空腹血糖水平、HbA1c、DM 持续时间和 DM 家族史所构成的 DM 特征。进行了单因素和多因素 logistic 回归模型以确定出这些 CVD 危险因素和 DM 特征是否与表型相关。用类然比测定参数。

[0121] 通过调整三种触珠蛋白表型的 CVD 危险因素和 DM 特征, 运行常用的 logistic 回归模型将糖尿病患者具有 CVD 事件的可能性模型化。用两个指示符变量编码糖尿病-表型之间的相互作用, 一个指的是糖尿病患者, 另一个指的是非糖尿病患者。通过对残数

(residuals) 进行分析测定出模型的符合度。

[0122] 用 SAS 6.02 进行对 HOPE 研究数据的所有分析。按需用 t 检验或 χ^2 检验比较根据触珠蛋白的患者的特征。报告了主要后果心血管死亡、非致死性心肌梗死和中风的相对危险度 (RR) 和 95% 可信度区间。

[0123] 实验结果

[0124] 实施例 I 触珠蛋白表型是糖尿病患者的 CVD 危险的预测因素

[0125] 在下面的表 1 中显示了病例对照组的根据 CVD 危险因素和 DM 特征的临床特征

[0126] 表 1 病例 - 对照组的 CVD 危险因素

[0127]

CVD 危险因素		对照组			病例组		
		平均值	STD		平均值	STD	
年龄		59.16	8.01		60.09	8.08	
LDL 胆固醇		112.1	30.44		123.0	40.47	
		中位数	最小值	最大值	中位数	最小值	最大值
DM 持续时间					6.00	0.00	41.00
收缩期 BP		124.0	81.0	210.0	131.0	88.00	205.0
BMI		29.76	17.71	48.07	29.84	19.59	72.36
HbA1b		4.00	4.00	13.10	7.20	4.00	15.50
空腹血糖		118.5	77.00	365.0	148.0	57.00	354.0
胰岛素		15.99	2.20	144.7	18.45	1.50	314.5
		n	%		n	%	
女性		102	49.51		102	49.51	
糖尿病		93	45.15		146	70.89	
现有吸烟者		136	66.0		143	70.69	
糖尿病家族史		131	63.5		145	70.34	
CVD 家族史		119	57.77		148	71.84	
中心	OK	74	35.92		74	35.92	
	SD	73	35.44		73	35.44	
	AZ	59	28.64		59	28.64	

[0128] 病例和对照在年龄、性别和地理区域上进行了匹配。这些数据与先前在该人群中的发现一致,即糖尿病、LDL 胆固醇和高血压都是 CVD 的独立的预后因素²⁰。

[0129] 对本队列的触珠蛋白表型分型发现了 25% 1-1、44% 2-1 和 31% 2-2 的分布。1 等位基因的频率为 0.47%,这与已经报道的该人群中的触珠蛋白等位基因的频率非常吻合。

在不同的触珠蛋白表型之间都没有发现在单因素和多因素 logistic 回归分析具有 1-1 表型的概率中所确定出的任何的 CVD 危险因素或 DM 特征上任何显著的差异。

[0130] 表 2 提供了在调整 CVD 危险因素和 DM 特征之前和之后预测每个糖尿病和非糖尿病个体的触珠蛋白表型的 CVD 事件的概率的条件 logistic 回归。

[0131] 表 2 预测 CVD 事件的条件 logistic 回归

[0132]

未调整			
变量	OR	95% CI	p 值
DM 和 Hp 2-1 (对 DM 和 Hp1-1)	2.32	(1.27-4.23)	0.006
DM 和 Hp 2-2 (对 DM 和 Hp1-1)	5.08	(2.37-10.89)	<0.001
DM 和 Hp 2-2 (对 DM 和 Hp 2-1)	3.26	(1.67-6.37)	<0.001
非 DM, Hp 2-1 (对非 DM, Hp1-1)	0.63	(0.33-1.20)	0.159
非 DM, Hp 2-2 (对非 DM, Hp1-1)	1.10	(0.53-2.30)	0.795
非 DM, Hp 2-2 (对非 DM, Hp 2-1)	0.75	(0.40-1.38)	0.350

[0133]

只调整 DM 特征			
变量	OR	95% CI	p 值
DM 和 Hp 2-1 (对 DM 和 Hp1-1)	1.86	(0.93-3.69)	0.078
DM 和 Hp 2-2 (对 DM 和 Hp1-1)	3.90	(1.68-9.09)	0.002
DM 和 Hp 2-2 (对 DM 和 Hp 2-1)	2.10	(1.00-4.40)	0.049
非 DM, Hp 2-1 (对非 DM, Hp1-1)	1.40	(0.48-4.09)	0.542
非 DM, Hp 2-2 (对非 DM, Hp1-1)	2.31	(0.76-7.05)	0.141
非 DM, Hp 2-2 (对非 DM, Hp 2-1)	1.65	(0.73-3.75)	0.228

[0134]

调整了 DM 特征和 CVD 危险因素			
变量	OR	95% CI	p 值
DM 和 Hp 2-1 (对 DM 和 Hp1-1)	1.85	(0.86-3.96)	0.116
DM 和 Hp 2-2 (对 DM 和 Hp1-1)	4.70	(1.86-11.88)	0.001
DM 和 Hp 2-2 (对 DM 和 Hp 2-1)	2.55	(1.14-5.67)	0.022
非 DM, Hp 2-1 (对非 DM, Hp1-1)	1.70	(0.53-5.49)	0.373
非 DM, Hp 2-2 (对非 DM, Hp1-1)	2.97	(0.90-9.77)	0.073
非 DM, Hp 2-2 (对非 DM, Hp 2-1)	1.75	(0.71-4.29)	0.225

[0135] 这些数据显示,在调整了所有的 CVD 危险因素和 DM 特征后,在 Strong 心脏研究的糖尿病参与者中,那些具有触珠蛋白表型 2-2 的参与者发生 CVD 事件的可能性是那些具有 1-1 表型的参与者发生 CVD 事件的可能性的 4.7 倍 (1.86-11.88 OR 95% CI) ($p = 0.001$),

以及是那些具有 2-1 表型的参与者发生 CVD 事件的可能性的 2.5 倍 (1.14-5.67 OR 95% CI) ($p = 0.022$)。此外,具有触珠蛋白表型 2-1 的患者发生 CVD 事件的可能性是具有 1-1 表型的患者的 1.8 倍 (0.86-3.96 OR 95% CI),尽管没有统计学显著差异。综上所述,这些数据说明触珠蛋白 2 等位基因数目造成糖尿病个体具有不同程度的发生 CVD 的危险。

[0136] 最后,在非糖尿病患者中,观察到有着临界统计学显著差异的趋势,即具有触珠蛋白表型 2-2 的非糖尿病患者发生 CVD 事件的可能性是具有 1-1 表型的非糖尿病患者的 3.0 倍 (0.90-9.77 OR 95% CI) ($p = 0.073$)。

[0137] 下面的表 3 总结了这些结果。

[0138] 表 3 预测调整 DM 和 CVD 危险因素后的 CVD 事件的概率的条件

[0139] logistic 回归

[0140]

			95%CI	
危险因素	OR (CVD)	低限	高限	p 值
DM 和 Hp 2-1 (对 DM 和 Hp1-1)	1.85	0.86	3.96	0.116
DM 和 Hp 2-2 (对 DM 和 Hp1-1)	4.70	1.86	11.88	0.001
DM 和 Hp 2-2 (对 DM 和 Hp 2-1)	2.55	1.14	5.67	0.022
非 DM, Hp 2-1 (对非 DM, Hp1-1)	1.70	0.53	5.49	0.373
非 DM, Hp 2-2 (对非 DM, Hp1-1)	2.97	0.90	9.77	0.073
非 DM, Hp 2-2 (对非 DM, Hp 2-1)	1.75	0.71	4.29	0.225

[0141] 实施例 II 触珠蛋白表型是糖尿病患者从抗氧化剂治疗中获益的预测因素

[0142] 进行触珠蛋白表型分型的 HOPE 样本的患者特征:在来自最初的 HOPE 队列的本来就已得到血浆的 3176 个患者 (1078 个糖尿病) 中得到触珠蛋白表型。这些患者代表随机选择的连续的来自整个 HOPE 队列的患者的组。在下面的表 4 中显示了根据 CVD 危险因素和治疗方案的 HOPE 队列的临床特征。

[0143] 表 4HOPE 研究中的患者特征

[0144]

	Hp1-1 (N=487)	Hp 2-1 (N=1454)	Hp 2-2 (N=1226)
人口统计学数据			
年龄 (SD) 岁	65.8 (6.5)	65.4 (6.4)	65.3 (6.7)
女性 n (%)	105 (21.6)	309 (21.3)	290 (23.7)
临床特征			
高血压 n (%)	220 (45.2)	577 (39.7)	499 (40.7)
糖尿病 (DM) n (%)	177 (36.3)	502 (34.5)	399 (32.5)
高胆固醇血症 n (%)	324 (66.5)	967 (66.5)	841 (68.6)
现有吸烟 n (%)	66 (13.6)	194 (13.3)	175 (14.3)
BMI (SD) (kg/m ²)	28.0 (4.4)	27.9 (4.3)	27.6 (4.2)
药物 n (%)			
β 阻滞剂	216 (44.4)	636 (43.7)	527 (43.0)
阿司匹林/抗血小板药物	384 (78.9)	1197 (82.3)	992 (80.9)
降脂药	147 (30.2)	442 (30.4)	418 (34.1)
雷米普利	256 (52.6)	808 (55.6)	641 (52.3)
维生素 E	228 (46.8)	717 (49.3)	645 (52.6)

[0145] 这个 HOPE 队列的亚组的基本特征与整个队列没有显著差异。由触珠蛋白表型所分组的样本的基本特征在基本的人口统计学的、临床的或治疗特征上都没有显著差异（表 4）。

[0146] Hp 表型对 CV 后果的作用：在没有接受抗氧化剂治疗的对象中，在整个研究样本的各个触珠蛋白表型的主要复合终点（非致死性 MI、中风或心血管死亡）的发生率上没有显著差异（Hp 1-1 45/259 17.4%，Hp 2-1 113/737 15.3%，Hp 2-2 95/581 16.4%，趋势 χ^2 为 0.08， $P = 0.87$ ）。但是，与在上述的 Strong 心脏研究中所报道的结果一致（见实施例 I 和 Levy AP, et al. Haptoglobin phenotype is an independent risk factor for cardiovascular disease in individuals with diabetes: the strong heart study. J Am Coll Card 2002; 40: 1984-1990），我们发现在没有接受抗氧化剂治疗的 HOPE 研究的 DM 患者中，增加了与 Hp 等位基因相关的主要复合终点（非致死性 MI、中风或心血管死亡）的危险度（Hp 1-1 13/79 16.5%，Hp 2-1 44/225 19.6%，Hp 2-2 48/187 25.7%，趋势 χ^2 为 5.67， $P = 0.02$ ）。

[0147] 维生素 E 对 CV 后果的作用：下面的表 5 显示了对所有患者和糖尿病（DM）患者的与触珠蛋白表型相关的有和无维生素 E 补充的主要 CV 后果（非致死性 MI、中风或心血管死亡）的分析结果。

[0148] 表 5 CV 后果与维生素 E 补充的相对危险度

[0149] 所有患者

[0150]

	Hp1-1	Hp 2-1	Hp 2-2
N	487	1454	1226
主要 (95%CI)	0.97 (0.63-1.50)	0.96 (0.74-1.25)	0.92 (0.69-1.22)
p 值	NS	NS	NS
CV 死亡 (95%CI)	1.10 (0.56-2.12)	1.07 (0.69-1.64)	0.94 (0.68-1.30)
p 值	NS	NS	NS
MI (95%CI)	0.79 (0.47-1.33)	1.02 (0.75-1.38)	0.94 (0.68-1.30)
p 值	NS	NS	NS
中风 (95%CI)	1.50 (0.56-4.04)	0.92 (0.53-1.60)	0.85 (0.46-1.57)
p 值	NS	NS	NS

[0151] 仅糖尿病患者

[0152]

	Hp1-1	Hp 2-1	Hp 2-2
N	177	502	399
主要 (95%CI)	0.84 (0.40-1.79)	1.08 (0.72-1.61)	0.70 (0.45-1.10)
p 值	NS	NS	NS
CV 死亡 (95%CI)	0.64 (0.21-1.92)	1.0 (0.53-1.93)	0.45 (0.23-0.90)
p 值	NS	NS	*
MI (95%CI)	0.83 (0.33-2.06)	0.99 (0.45-2.18)	0.57 (0.33-0.97)
p 值	NS	NS	*
中风 (95%CI)	2.24 (0.41-12.4)	0.99 (0.45-2.18)	1.15 (0.47-2.82)
p 值	NS	NS	NS

[0153] 给定RRR为有维生素E与无维生素E的CV事件比较的危险度的平均值(95%CI)。

[0154] *, $p < 0.05$, 统计学显著性差异; NS, 无统计学显著差异。

[0155] 在整个所研究的样本中, 不论触珠蛋白表型如何, 没有与维生素E补充所相关的对任何主要CV后果的显著性益处(表5, 所有患者)。此外, 如先前所报道的(The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients. N Eng J Med 2000; 342:154-160)(表5, DM患者), 维生素E补充在未选择的DM组没有显著益处。令人惊奇的是, 在具有触珠蛋白2-2表型的DM患者中, 发现维生素E治疗显著地降低了CV死亡的危险(RR 0.45, 95%CI 0.23-0.90; $P = 0.003$)以及显著地降低了非致死性心肌梗死(MI)的危险(RR 0.57, 95%CI 0.33-0.97; $P = 0.02$), 而维生素E治疗对任何其他的触珠蛋白表型(Hp1-1和Hp 2-1)的DM患者的任何主要CV后果都没有显著的益处。

[0156] 雷米普利对CV后果的作用: 下面的表6显示了对所有患者和糖尿病(DM)患者的与触珠蛋白表型相关的有和雷米普利补充的主要CV后果(非致死性MI、中风或心血管死亡)的分析结果。

[0157] 表 6CV 后果与雷米普利补充的相对危险度

[0158] 所有患者

[0159]

	Hp1-1	Hp 2-1	Hp 2-2
N	453	1349	1129
主要 (95%CI)	0.74 (0.47-1.17)	0.81 (0.62-1.07)	0.76 (0.57-1.02)
p 值	NS	NS	NS
CV 死亡 (95%CI)	0.58 (0.29-1.18)	1.02 (0.66-1.58)	0.87 (0.55-1.37)
p 值	NS	NS	NS
MI (95%CI)	0.61 (0.35-1.06)	0.88 (0.64-1.20)	0.83 (0.59-1.17)
p 值	NS	NS	NS
中风 (95%CI)	0.91 (0.33-2.51)	0.68 (0.38-1.21)	0.53 (0.27-1.04)
p 值	NS	NS	NS

[0160] 仅糖尿病患者

[0161]

	Hp1-1	Hp 2-1	Hp 2-2
N	177	502	399
主要 (95%CI)	0.78 (0.35-1.75)	0.97 (0.72-1.61)	0.57 (0.36-0.90)
p 值	NS	NS	*
CV 死亡 (95%CI)	0.42 (0.13-1.36)	0.97 (0.50-1.88)	0.56 (0.28-1.12)
p 值	NS	NS	NS
MI (95%CI)	0.53 (0.19-1.46)	0.99 (0.81-2.13)	0.57 (0.38-1.12)
p 值	NS	NS	NS
中风 (95%CI)	1.29 (0.21-7.82)	0.58 (0.25-1.34)	0.42 (0.16-1.09)
p 值	NS	NS	NS

[0162] *, $p < 0.05$, 统计学显著性差异; NS, 无统计学显著差异。给定 RRR 为有雷米普利与无雷米普利的 CV 事件比较的危险度的平均值 (95% CI)。

[0163] 从对整个样本的分析中可证实不论触珠蛋白表型如何, 没有与雷米普利补充所相关的对任何主要 CV 后果的显著性益处 (表 6, 所有患者)。和维生素 E 的作用相似, 雷米普利补充在未选择的 DM 组中没有显著益处。令人惊奇的是, 仅在具有触珠蛋白 2-2 表型的 DM 患者中观察到雷米普利对复合主要终点中风、CV 死亡和心肌梗死的显著益处 (RR 0.57, 95% CI 0.36-0.90; $P < 0.05$)。雷米普利对任何其他的触珠蛋白表型 (Hp1-1 和 Hp 2-1) 的任何主要 CV 后果都没有益处。

[0164] 应该理解, 为了清楚的目的在各个实施方案的上下文中所描述的本发明的某些特征也可以以组合形式出现于单一实施方案中。相反地, 为了简洁的目的在单个实施方案的上下文中所描述的本发明的各种特征也可以被分开地或以任何合适的亚组合的形式提供。

[0165] 尽管已经结合特异的实施方案描述了本发明,但是本领域人员显然能进行许多变更、修饰和变异。因此,本发明包括所有这些只要在所附的权利要求书的精神及大范围内的变更、修饰和变异。在本说明书中所提及的所有出版物、专利和专利申请均在此以其全部内容并入本说明书作为参考,如同每个出版物、专利或专利申请均被具体地和单独地指明并入本申请作为参考。另外,在本申请中对任何参考文献的引用或认可都不应当被解释为承认这些参考文献作为本发明的现有技术。

[0166] 参考文献列表

[0167] 1.Howard BV, Magee MF.Diabetes and Cardiovascular Disease. CurrAtheroscler Rep 2000 ;2 ;476-481.

[0168] 2.Aronson D.Rayfield EJ.Diabetes in Textbook of CardiovascularMedicine.Topol EJ ed.Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers, 1998 ;171-194.

[0169] 3.Stamler J,VaccaroO,Neaton JD,Wentworth D.Diabetes,other riskfactors and 12-year cardiovascular mortality for men screened in the multiplerisk factor intervention trial.Diab Care 1993 ;16 ;434-444.

[0170] 4.Kannel W, McGee D.Diabetes and glucose tolerance as risk factorsfor cardiovascular disease.The Framingham Study.Diab Care 1979 ;2 ;120-126.

[0171] 5.Jarrett RJ, Shipley MJ.Type 2(non-insulin dependent)diabetesmellitus and cardiovascular disease-putative association via commonantecedents :Further evidence from the Whitehall Study.Diabetologia 1988 ;31 ;737-740.

[0172] 6.Fontbonne A, Eschwege E, Cambien F, et al.Hypertriglyceridemia as arisk factor for coronary artery disease mortality in subjects with impairedglucose tolerance or diabetes ;Results from the 11-year follow up of the ParisProspective Study.Diabetologia 1989 ;32 ;300-304.

[0173] 7.Donahue RP, Orchard TG.Diabetes mellitus and macrovascularcomplications.An epidemiological perspective.Diab Care 1992 ;15 : 1141-1155.

[0174] 8.Barret-Connor E, Cohn B, Wingard D, Edelstein SL.Why is diabetesmellitus a stronger risk factor for fatal ischemic heart disease in women thenin men ? The Rancho Bernard Study.JAMA 1991 ;265 ;627-631.

[0175] 9.Hammoud T, Tanguay JF, Bourassa MG.Management of coronaryartery disease ;therapeutic options in patients with diabetes.J Am Coll Card2000 ;36 : 355-365.

[0176] 10.Head J, Fuller JH.International variations in mortality amongdiabetic patients.The WHO Multinational Study of Vascular Disease inDiabetics.Diabetologia 1990 ;33 ;447-481.

[0177] 11.Grimaldi A, Heurtier A.Epidemiology of cardiovascularcomplications of diabetes.Diab Metab 1999 ;3 ;12-20.

[0178] 12.Woods KL, Samanta A, Burden AC.Diabetes mellitus as a riskfactor for

- acute myocardial infarction in Asians and Europeans. *Br Ht J* 1989 ;62 :118-122.
- [0179] 13. Cruickshank JK, Alleyne SA. Black West Indian and matched white diabetics in Britain compared with diabetics in Jamaica : body mass, blood pressure and vascular disease. *Diab Care* 1987 ;10 :170-179.
- [0180] 14. UK Prospective Diabetes Study Group. Ethnicity and cardiovascular disease. The incidence of myocardial infarction in white, south Asian and afro-Caribbean patients with type 2 diabetes. *Diab Care* 1998 ;21 :1271-1277.
- [0181] 15. Mather HM, Chaturvedi N, Fuller JH. Mortality and morbidity from diabetes in south Asians and Europeans : 11-year follow up of the southall diabetes survey, London, UK. *Diab Med* 1998 ;15 :53-59.
- [0182] 16. Chaturverdi N, Jarrett J, Morrish N, Keen H, Fuller JH. Differences in mortality and morbidity in African-caribbean and European people with non-insulin dependent diabetes mellitus : results of 20 year follow up of a London cohort of a multinational study. *Brit Med J* 1996 ;313 :848-852.
- [0183] 17. Chaturverdi N, Fuller JH. Ethnic differences in mortality from cardiovascular disease in the UK : do they persist in people with diabetes ? *J Epid Comn Health* 1996 ;50 :137-139.
- [0184] 18. Samanta A, Burden AC, Jagger C. A comparison of the clinical features and vascular complications of diabetes between migrant Asians and Caucasians in Leicester, UK. *Diab Res Clin Pract* 1991 ;14 :205-213.
- [0185] 19. Hoy W, Kelly A, Jacups S, et al. Stemming the tide : reducing cardiovascular disease and renal failure in Australian Aborigines. *Aust N Z J Med* 1999 ;29 :480-483.
- [0186] 20. Howard BV, Lee ET, Cowan LD, et al. Rising tide of cardiovascular disease in American Indians. The Strong Heart Study. *Circ* 1999 ;99 :2389-2395.
- [0187] 21. Dobryszcka W. Biological functions of haptoglobin - new pieces to an old puzzle. *Eur J Clin Chem* 1997 ;35 :647-654.
- [0188] 22. Bowman BH, Kurosky A. Haptoglobin : the evolutionary product of duplication, unequal crossing over, and point mutation. *Adv Hum Gen* 1982 ;12 :189-261.
- [0189] 23. Langlois MR, Delanghe JR. Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans. *Clin Chem* 1996 ;42 :1589-1600.
- [0190] 24. Delanghe J, Langlois M, Ouyang J, Claeys G, De Buyzere M, Wuyts B. Effect of haptoglobin phenotypes on growth of *Streptococcus pyogenes*. *Clin Chem Lab Med* 1998 ;36 :691-696.
- [0191] 25. Quaye IK, Ekuban FA, Goka BQ, et al. Haptoglobin 1-1 is associated with susceptibility to severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000 ;94 :216-219.
- [0192] 26. Giblett ER. Genetic Markers in Human Blood. Oxford, Blackwell

Scientific,1969 :63-125.

[0193] 27. Levy AP, Roguin A, Marsh S, et al. Haptoglobin phenotype and vascular complications in diabetes. N Eng J Med 2000 ;343 :369-370.

[0194] 28. Nakhoul F, Marsh S, Hochberg I, Leib R, Miller B, Levy AP. Haptoglobin phenotype and diabetic retinopathy. JAMA 2000 ;284 :1244-1245.

[0195] 29. Nakhoul F, Zoabi R, Kantor Y, et al. Haptoglobin phenotype and diabetic nephropathy. Diabetologia 2001 ;in press.

[0196] 30. Roguin A, Hochberg I, Nikolsky E, et al. Haptoglobin phenotype as a predictor of restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. Am J Card 2001 ;87 :330-332.

[0197] 31. Delanghe J, Cambier B, Langlois M, et al. Haptoglobin polymorphism, a genetic risk factor in coronary artery bypass surgery. Atheroscler 1997 ;132 :215-219.

[0198] 32. Chapelle JP, Albert A, Smeets JP, Heusghem C, Kulbertus HE. Effect of the haptoglobin phenotype on the size of a myocardial infarct. N Eng J Med 1982 ;307 :457-463.

[0199] 33. Delanghe JR, Duprez DA, De Buyzere ML, et al. Haptoglobin polymorphism and complications in established essential arterial hypertension. J Hyper 1993 ;11 :861-867.

[0200] 34. Surya Prabha P, Padma T, Ramaswamy M. Haptoglobin patterns in essential hypertension and associated conditions-increased risk for Hp2-2. Hum Herid 1987 ;37 :345-348.

[0201] 35. Golabi P, Kshatriya GK, Kapoor AK. Association of genetic markers with coronary heart disease (myocardial infarction)-a case-control study. J Ind Med Assoc 1999 ;97 :6-7.

[0202] 36. Hong SH, Kang BY, Lim JH, et al. Haptoglobin polymorphism in Korean patients with cardiovascular disease. Hum Herid 1997 ;47 :283-287.

[0203] 37. Bilgrami G, Tyagi SP, Qasim A. Serum haptoglobin in cases of ischemic heart disease. Jpn Heart J 1980 ;21 :505-510.

[0204] 38. Frohlander N, Johnson O. Haptoglobin groups in acute myocardial infarction. Hum Herid 1989 ;39 :345-350.

[0205] 39. Lee ET, Welty TK, Fabsitz R, et al. The Strong Heart Study : a study of cardiovascular disease in American Indians : design and methods. Am J Epid 1990 ;132 :1141-1155.

[0206] 40. Howard BV, Welty TK, Fabsitz R, et al. Risk factors for coronary heart disease in diabetic and nondiabetic North Americans : the Strong Heart Study. Diabetes 1992 ;41 :4-11.

[0207] 41. WHO Expert Committee on Diabetes Mellitus. Second Report. Geneva, World Health Organization. 1980 (technical report series 646).

- [0208] 42. Lee ET, Cowan LD, Howard WJ, et al. All cause mortality and cardiovascular disease mortality 13 American Indian populations aged 45 to 74 years, 1984 to 88: the Strong Heart Study. *Am J Epidemiol* 1998;147:995-1008.
- [0209] 43. Howard BV, Lee ET, Cowan LD, et al. Coronary heart disease prevalence and its relation to risk factors in American Indians: the Strong Heart Study. *Am J Epidemiol* 1995;142:254-268.
- [0210] 44. Linke RP. Typing and subtyping of haptoglobin from native serum using disc gel electrophoresis in alkaline buffer: application to routine screening. *Anal Biochem* 1984;141:55-61.
- [0211] 45. Wassell J, Keevil B. A new method for haptoglobin phenotyping. *Ann Clin Biochem* 1999;36:609-612.
- [0212] 46. Smithies O. Zone electrophoresis in starch gels: group variations in the serum proteins of normal human adults. *Biochem J* 1955;61:629-641.
- [0213] 47. McGill MJ, Donnelly R, Molyneaux L, Yue DK. Ethnic differences in the prevalence of hypertension and proteinuria in NIDDM. *Diabetologia* 1996;39:173-179.
- [0214] 48. Habib G, Heibig J, Forman S, et al. Influence of coronary artery collateral vessels on myocardial infarct size in humans. Results of phase I thrombolysis in myocardial infarction (TIMI) trial. *Circulation* 1991;83:739-746.
- [0215] 49. Guigliano D, Ceriello A, Paolisso G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetologia* 1996;39:257-267.
- [0216] 50. Nishikawa T, Edelstein D, Brownlee M. The missing link: a single unifying mechanism for diabetic complications. *Kidney Int* 2000;58(S77):S26-S30.
- [0217] 51. Kristiansen M, Graversen JH, Jacobsen C, et al. Identification of the hemoglobin scavenger receptor. *Nature* 2001;409:198-201.
- [0218] 52. Resnick D, Pearson A, Krieger M. The SRCR superfamily: a family reminiscent of the Ig superfamily. *Trends Biochem Sci* 1994;19:5-8.
- [0219] 53. Nathan CF, Murray HW, Cohn ZA. Current concepts: the macrophage as an effector cell. *N Engl J Med* 1980;303:622-626.
- [0220] 54. Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS. Binding site of macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low-density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:333-337.
- [0221] 55. Rosenfeld ME, Khoo JC, Miller E, Parthasarathy S, Palinski W, Witztum JL. Macrophage-derived foam cells freshly isolated from rabbit atherosclerotic lesions degrade modified lipoproteins, promote oxidation of low-density lipoproteins, and contain oxidation specific lipid protein adducts. *J Clin Invest* 1990;87:90-99.

- [0222] 56. Van den Heuvel MM, Tensen CP, van As JH, et al. Regulation of CD 163 on human macrophages: cross-linking of CD 163 induces signaling and activation. *J Leuk Biol* 1999;66:858-866.
- [0223] 57. Wagner L, Gessl A, Baumgartner Parzer S, Base W, Waldhausl W, Pastemack MS. Haptoglobin phenotyping by newly developed monoclonal antibodies. Demonstration of haptoglobin uptake into peripheral blood neutrophils and monocytes. *J. Imm* 1996;156:1989-1996.
- [0224] 58. El Ghmati SM, Van Hoeyveld EM, Van Strijp JAG, Ceuppens JL, Stevens EAM. Identification of haptoglobin as an alternative ligand for CD11b/CD18. *J Imm* 1996;156:2542-2552.
- [0225] 59. Chia MC. The role of adhesion molecules in atherosclerosis. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1998;35:573-602.
- [0226] 60. Epstein SE, Zhu J, Burnett MS, Zhou YF, Vercellotti G, Hajjar D. Infection and atherosclerosis: potential roles of pathogen burden and molecular mimicry. *Art Thromb Vasc Biol* 2000;20:1417-1420.