

[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl⁶

G01N 33/48

G01N 33/00



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 95192443.5

[43]公开日 1997 年 3 月 12 日

[11] 公开号 CN 1145116A

[22]申请日 95.1.13

[30]优先权

[32]94.2.16 [33]US[31]08 / 197,131

[86]国际申请 PCT / US95 / 00509 95.1.13

[87]国际公布 WO95 / 22763 英 95.8.24

[85]进入国家阶段日期 96.10.4

[71]申请人 分子生物研究所有限公司

地址 美国马萨诸塞州

共同申请人 哈佛大学校长及研究员协会

[72]发明人 W · V · 吉安诺比尔 S · E · 林奇

R · C · 威廉斯

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 钟守期 杨九昌

权利要求书 2 页 说明书 8 页 附图页数 3 页

[54]发明名称 吡啶烷醇(pyridinoline)交联物用作牙周
和周围植入性疾病活动的标记物

[57]摘要

一种诊断人类患者中牙周疾病或周围植入性疾病严重性的方法，其包括：a) 从所述患者口中获得组织或龈缝流体或其它流体的样品，或者是获得此患者的血样或尿样，以及 b) 测定此样品中的吡啶烷醇(pyridinoline)交联物，以此作为疾病严重性的度量。

(BJ)第 1456 号

权 利 要 求 书

1. 一种确定哺乳动物中牙周疾病或周围植入性疾病的危险或发展的方法, 所述方法包括:

- 5 a). 从所述哺乳动物的口中获得龈沟流体样品, 以及
 b). 测定所述样品中的吡啶烷醇 (pyridinoline) 交联物, 以此作为疾病发展或危险的度量。

2. 权利要求 1 中所述的方法, 其中 ICTP 交联物水平高于 50pg/样品位表明牙周或周围植入性疾病的危险。

- 10 3. 如权利要求 1 中所述的方法, 其中所述吡啶烷醇 (pyridinoline)
 交联物是 ICTP 交联物, 而且在所述流体中 ICTP 交联物水平高于 50ng/ml 表示牙周或周围植入性疾病状况的存在。

4. 权利要求 3 中所述的方法, 其中样品中 ICTP 交联物水平高于 200ng/ml 表明牙周或周围植入性疾病的危险。

- 15 5. 一种确定哺乳动物中牙周或周围植入性疾病的危险的方法, 所述方法包括:

- a). 从哺乳动物中获得血样, 以及
 b). 测定所述样品中的吡啶烷醇 (pyridinoline) 交联物, 以此作为疾病发展或危险的度量。

- 20 6. 权利要求 5 中所述的方法, 其中所述吡啶烷醇 (pyridinoline)
 交联物为 ICTP 交联物, 而且在所述样品中 ICTP 交联物水平高于 6ng/ml 表明牙周或周围植入性疾病的危险。

7. 权利要求 6 中所述的方法, 其中所述样品中 ICTP 交联物水平高于 10ng/ml 表明牙周或周围植入性疾病活动的危险。

- 25 8. 权利要求 1 的方法, 其中所述吡啶烷醇 (pyridinoline) 交联物 NTP
 交联物。

9. 权利要求 8 中所述的方法, 其中 NTP 交联物水平高于 75pmol/样品表明牙周或周围植入性疾病的危险。

10. 一种确定哺乳动物中牙周或周围植入性疾病危险或发展的方法, 所述方法包括:

- 30 a). 从此哺乳动物中获得尿样, 以及
 b). 测定所述样品中的吡啶烷醇 (pyridinoline) 交联物, 以此作为疾病进程或危险的度量。

11. 权利要求 10 中所述的方法，其中所述吡啶烷醇（pyridinoline）交联物为 NTP 交联物，而且样品中 NTP 交联物水平高于 75pmol/ μ mol 肌酸酐表明牙周或周围植入性疾病的危险。

5 12. 权利要求 1 的方法，其中所述吡啶烷醇（pyridinoline）交联物是 HP 和/或 LP 交联物。

13. 权利要求 12 中所述的方法，其中所述样品中 HP 或 LP 交联物水平高于 60nmol 表明牙周或周围植入性疾病的危险。

14. 权利要求 10 的方法，其中所述吡啶烷醇（pyridinoline）交联物是 HP 或 LP 交联物。

10 15. 权利要求 14 中所述的方法，其中所述样品中 HP 或 LP 交联物水平高于 60nmol/mmol 肌酸酐表明牙周或周围植入性疾病的危险。

说明书

吡啶烷醇 (pyridinoline) 交联物用作牙周
和周围植入性疾病活动的标记物

发明背景

5 本发明涉及牙周和周围植入性疾病严重性的测定。

目前依靠诸如龈袋深度、探查时出血情况和放射照片等临床参数来
诊断牙周和周围植入性疾病活动。因为这些参数缺乏预测未来附着物损
失的能力而且仅提供关于既往疾病活动存在的资料, 所以它们具有局限
性。在牙周病学诊断中急需活动性牙周炎的预见性标记物, 这是目前研
10 究的焦点。

牙周疾病是一个一般性术语, 它是用于描述侵袭牙龈以及将牙齿固
定于颌中的支持连接组织和牙槽骨的特殊疾病。牙周疾病是人类最常见
的感染性疾病之一。最近 15 年, 随着 6 ~ 18 岁儿童中龋齿的减少以及
对于总人口的较好的预防计划的实行, 导致牙齿脱落的牙周疾病已经表
15 现得尤为重要。在龋齿减少而使更多的牙齿得以保存的同时, 更多的牙
齿则处于受到牙周疾病侵袭的危险之中 (Shaw, J. H., N. Eng. J. Med.
(1987) 317 : 996 Williams, R. C., N. Eng. J. Med. (1990) 332 : 373)。因此,
牙周疾病的识别与诊断已变得更加重要。

诊断牙周疾病的临床参数的应用有许多限制。例如 Haffajee 与合作
20 者 (Haffajee, A. D., 等人 J. Periodontal (1991) 18 : 117) 已经证实, 非
临床参数对于牙周疾病活动已表现出预见性。因此已进行了深入研究以
开发用于牙周疾病评价的诊断性试验。已经研究了 40 多种不同的针对龈
缝流体 (GCF) 成分的试验, 例如: 胶原酶 (Villela, B.等人, J.
Periodont. Res. (1987) 22 : 264), 碱性磷酸酶 (Ishikawa, I. 等人, Arch.
25 Oral. Biol., (1970) 15 : 1401; Binder, T. A. 等人, J. Periodont.
Res. (1987) 22 : 14), 组织蛋白酶类活性 (Kunimatsu, K. 等人, J.
Periodont. Res. (1990) 25 : 69; Cox, S. W. 等人, J. Periodont. Res.
(1989) 24 : 353; Cox, S. W. 等人, J. Periodont. Res. (1989) 24 : 41;
Beighton, D.和 Life, J. S. C., Arch. Oral. Biol. (1989) 34 : 843), 和 β -
30 葡萄糖醛酸酶 (Lamster I. B. 等人, J. Periodontol. (1985) 56 :
139)。

尽管这些成分过剩, 但目前仍没有已被证实对于牙周疾病中将来骨

和附着物的损伤具有较高预见性的可行诊断试验。因为这些成分的破坏作用是医师最终关心的事情，所以应当评价它们的破坏性。已从表现出牙周炎临床迹象的病人的 GCF 中发现连接性组织缔合蛋白，诸如葡糖胺聚糖（Giannobile, w. v. 等人, J. Periodontol. (1993) 64 : 186）和
5 osteonectin（Bowers, M. K. 等人, J. Periodontol (1989) 60 : 448）。然而，还没有进行将这些成分与未来骨或附着物损伤联系起来的纵向研究。

胶原蛋白构成骨有机基质的 90 % 左右。I 型胶原蛋白是骨组织中最丰富的胶原蛋白（Deftos, L. J., Clin. Chem. (1991) 37 : 1143）。
10 随着前胶原蛋白生物合成以及它释放入成熟的细胞外基质中，胶原蛋白分子形成交联物，这为基质提供了额外的机械稳定性（Miyahara, M. 等人, J. Biol. Chem. (1982) 257 : 8442）。这些分子间交联物是在一个胶原蛋白分子上的末端非螺旋端肽区与螺旋部分之间或与另一个链之间形成的。所得交联物最初为二价，随着胶原蛋白基质的成熟，它们依次变
15 为多价配合物（Last, J. A. 等人, Int. J. Biochem. (1990) 22 : 559）。由赖氨酸和羟基赖氨酸残基引发交联物生物合成。有两大类交联物：（1）赖氨酰氧化酶引发的交联物，和（2）非酶促糖基化赖氨酸和羟基赖氨酸残基的衍生物。吡啶烷醇（pyridinoline）交联的 I 型胶原蛋白的羧基末端端肽（ICTP）是已经由吡啶烷醇（pyridinoline）交联的 I 型胶原
20 蛋白的羧基末端端肽区衍生的。在 I 型胶原蛋白降解过程中释放 ICTP。在血液中发现免疫化学完整形式的 ICTP，它似乎衍生自骨吸收。ICTP 交联物含有三个肽，其中最基本的一个是 $\alpha_1(I)$ 链的羧基末端端肽，它明显小于由 SDS - PAGE 测定的 ICTP 肽（Risteli, J. 等人, Clin. Chem. (1993), 39 : 635）。

25 胶原蛋白还作为另一类吡啶烷醇（pyridinoline）交联物的前体：I 型胶原蛋白的交联 N - 端肽（NTP）（发现于原始 I 型胶原蛋白分子的 N 端），羟基赖氨酰吡啶烷醇（pyridinoline）（吡啶烷醇（pyridinoline）或 HP），和赖氨酰吡啶烷醇（pyridinoline）（脱氧吡啶烷醇（pyridinoline）或 LP），它们在尿中可测得（Seyedin S. M. 等人, J.
30 Bone Miner. Res. (1993), 8 : 635；Gertz, B. J. 等人, J. Bone Miner. Res. (1994), 9 : 135；Eriksen, E. F. 等人, (1993), J. Bone Miner. Res. 8 : 127）。从 I 型胶原蛋白降解过程中产生的这些分子（ICTP, NTP, HP

和 LP) 被称作“吡啶烷醇 (pyridinoline) 交联物”。

已在某些代谢性骨疾病中观察到 ICTP 交联物血清浓度的变化, 它与通过组织形态学方法或钙动力学研究测定的骨吸收率有关 (Eriksen, E. F. 等人, J. Bone Miner. Res.(1993) 8 : 127; Hassager, C.等人, Bone Miner. Res. (1992), 7 : 1307)。血清 ICTP 交联物也与 ICTP 交联物的尿排泄有关, 这可通过 HPLC 测定 (Robins, S. P., Biochem. J. (1982), 207 : 617)。

在与骨溶解增加相关的情况下, 可看到 ICTP 交联物的血清浓度升高, 例如多发性骨髓瘤, 溶骨性转移瘤, 类风湿性关节炎和制动术 (Elomaa, I. 等人, Br. J. Cancer, (1992), 66 : 337)。另外, 研究表明绝经后妇女中, 雌激素治疗可使血清 ICTP 交联物的浓度降低。

发明概述

本发明特征在于一种确定人类患者中牙周疾病或周围植入性疾病发展的方法, 其包括获得来自患者口腔的组织, 流体或龈沟流体的样品或者是患者血液或尿液的样品, 以及测定吡啶烷醇 (pyridinoline) 交联物, 以此作为疾病发展的度量标准。

在优选实施方案中, 龈沟流体(“ GCF ”) 中 ICTP 水平大于 50ng/ml, 更优选大于 100 ng/ml 或者是 50pg/样品位提示存在疾病。而且在优选的实施方案中, 外周血中 ICTP 水平为 6 ng/ml 或更高, 更优选 10 ng/ml 则提示存在疾病。优选的实施方案中还包括: 尿中 NTP 水平为 100 pmol/ μ mol 肌酸酐提示存在疾病; 和 HP 或 LP 水平为 150nmol/ μ mol 肌酸酐也提示存在疾病。另外, GCF 或血液中 NTP 水平为 100pmol 也提示存在疾病; 和 HP 或 LP 水平为 150 μ mol 也提示存在疾病。

本发明提供一种牙周疾病的定量测定方法, 另外还可发现初期和早期疾病, 而不象当前临床技术那样仅能发现晚期疾病。另外, 本发明的方法不仅使疾病得到发现和诊断, 而且还使疾病得到精确定位, 从而可以对受感染最严重的组织进行治疗。

本发明的其它特征和优点将明显地体现于下面详细说明和权利要求书中。

详细说明

首先简短说明附图。

附图

图 1 是表明牙周炎与龈沟流体中 ICTP 交联物之间相互关系的图形。

图 2 是通过狗健康位与牙周炎位的 $^{99m}\text{Tc} - \text{MDP}$ 摄取的对比显示其骨代谢活动区别的图形。

5 图 3 是表明牙周炎与循环 ICTP 交联物之间相互关系的图形。

图 4 是表明循环 ICTP 交联物与牙周炎之间相互关系的图形。

GCF 采集

GCF 是在牙龈与牙齿之间的沟中流出的一种分泌物。在 GCF 开始形成时，它还未与口中的唾液混合，只是在它离开龈沟进入口腔后与唾液混合。按照本发明在采集用于分析的 GCF 时，希望将唾液对 GCF 的稀释减小至最低程度。因此应当除去采集 GCF 龈沟附近的唾液，优选使用棉卷，并结合使用压缩空气吹该区域。

风干以后，将一条多孔材料如甲基纤维素滤纸放置于龈沟中并且将此材料维持于龈沟中大约 30 秒，从而采集到 GCF。将此材料插入龈沟直至感到轻微的抵触。采集 GCF 以后，应用 Peritron 6000TM 测量仪器或其它类似仪器测定流体体积。应用含有蛋白酶抑制剂的磷酸盐缓冲盐水从滤条上洗脱采集的流体。冻藏此样品直至需要分析时。在分析之前，可在室温下融化样品，然后通过任一常规技术，诸如放射免疫测定法（RIA）或其它标准检测方法（如 ELISA）检验这些样品的 ICTP 交联物。

犬实验

用狗（两只 1 岁雄性猎兔犬）来评价作为牙周疾病活动标记物的 ICTP 交联物的测定方法。左四分体随机地作为试验位，而右四分体作为对照位。在研究开始前两只动物均接受口腔病预防 14 天。然后将狗进行下面的步骤。

以下面的方法在两只狗的左四分体中引起试验性牙周炎：将 3 - 0 丝质结扎线系在全部四个四分体的第一至第四上下颌骨的前磨牙上。给狗饲喂促进发斑的水湿性 Purina 狗食。结孔线诱导牙周炎表明严重的细菌聚集，而且随着后来的骨吸收导致速发炎症反应。右侧对照四分体没有丝质结扎线，相反常规地进行口腔卫生程序。每月的口腔卫生程序的目的是为了保持对照四分体中牙龈的健康。此处 $6 \text{ 牙/半口} \times 2 \text{ 侧/狗} \times 1 \text{ 放射照片位/牙} = 12 \text{ 个对照位和 } 12 \text{ 个实验位的总数}$ 。

此健康和疾病的情况通过应用消影术和核医学来证实，它们可用来快速而准确地确定骨吸收的量，而且还可将实验和对照位之间 ICTP 交联物的 GCF 水平与这些参数相互联系。

5 在结扎线诱导牙周炎过程开始时进行消影术测定，如基线所示，然后在牙周炎开始后的 2 周、4 周、6 周、8 周、10 周、12 周、16 周和 6 个月在实验位和对照位均进行测定。

在基线、1 月、2 月、4 月和 6 月时，对照位和实验位还都进行 ICTP 交联物样品测定。这里 $6 \text{ 牙/半口} \times 2 \text{ 侧/狗} \times 3 \text{ 样品位/牙} = 18 \text{ 对照位和 } 18 \text{ 实验位的总数}$ 。

10 总之，样品分析的总数如下。

时间点	对照四分体		实验四分体	
	ICTP 交联物 样品数	放射照片位数	ICTP 交联物 样品数	放射照片位数
基线	18	12	18	12
2 周	18	12	18	12
4 周	18	12	18	12
6 周	18	12	18	12
8 周	18	12	18	12
10 周	18	12	18	12
12 周	18	12	18	12
16 周	18	12	18	12
24 周	18	12	18	12
总数	162	108	162	108

龈沟流体（GCF）采集

15 从两狗各四分体中第 1 至第 4 前磨牙的正中、颊和远部位采集 GCF。如上所述，用甲基纤维素条采集 GCF，并用 Periotron 6000TM 测定 GCF 的体积。将样品放入含有 55 μl 在 pH 为 7.4 的磷酸盐缓冲盐水中的蛋白酶抑制剂（15nM 抑肽酶和 1mM 苯基甲基磺酰氟（PMSF））的溶液中，并放入 1ml Eppendorf 水瓶中。随后将流体在冰条件下贮藏，接着在 25 $^{\circ}\text{C}$ 在 60 分钟的时间内从采集装置上洗脱此流体。然后将此样品在 -20 至 -80 $^{\circ}\text{C}$ 下贮藏直至需要进行 ICTP 交联物分析。

ICTP 交联物分析

可将冰冻样品在室温下融化以便随后通过 RIA 进行 ICTP 交联物的分析 (Risteli, J. 等人 Clin. Chem, (1993), 39: 635 - 640)。可使所有的样品和试剂达到室温。将样品和标准样在 12 × 75mm 试管中准备为正副两份。将样品等分至各试管中, 并向各样品中加入 200 μl 兔抗 - ICTP。向各样品中加入 200 μl [¹²⁵I]ICTP, 接着在 37 °C 下混合并保温 2 小时。将 500 μl 羊抗兔 IgG 悬浮液与 PEG 一起加入所有试管中。将样品涡旋搅拌并在 20 - 25 °C 下保温 30 分钟。然后将样品在 4 °C 下以 2000×g 离心 30 分钟。随后立即从各样品中茺出上清液。应用一个 γ - 闪烁计数器, 将 ICTP 标准样 (1 ~ 50ng/ml) 和 GCF 样品 (ng/ml) 一起进行评价, 通过将 B/BO(%) 与 ICTP 浓度对比标绘 GCF 样品。此试验可以检测少至 0.34ng/ml 的 ICTP。为了进行对比, 还估计两只狗血清和唾液样品的 I 型胶原蛋白的 ICTP 交联物羧基末端端肽含量。

外周血浓度的分析

从基线开始至结扎线诱导牙周炎后的 6 个月中每隔 2 周采集中午外周血样, 以进行 ICTP 吡啶烷醇 (pyridinoline) 交联物的分析 (ICTP 分析方法如上所述) 通过应用骨吸收的核医学和减法射线照相参数的研究而进行对比 (见图 2 和 3)。

尿吡啶烷醇 (pyridinoline) 交联物浓度的分析

为测定尿吡啶烷醇 (pyridinoline) 交联物 (即 NTP、HP 和 LP), 如前所述将 24 小时尿样进行化验 (Seyedin, S. M. 等人, (1993), J. Bone Miner. Res., 8: 635; Hanson, D. A. (1992), J. Bone Miner. Res., 7: 1251)。在狗活动性牙周骨破坏的估计期间 (结扎线诱导牙周炎后 3 个月) 和在口腔卫生程序开始并恢复健康后采集样品。在健康与活动性疾病之间进行比较以表明其尿吡啶烷醇 (pyridinoline) 交联物水平的区别。其显著区别与骨吸收的核医学和减法射线照相指标相互关联。

减法射线照相技术

应用在基线和 2、4、6、8、10、12、16 和 24 周时所拍摄的标准放射照片测定牙槽骨的损耗。放射照片在 90KVP, 15Ma 和 0.5s 下曝光, 并在自动底 处理机中冲洗。然后用如下计算机辅助方法分析此照片: 应用一个闭路电视系统 (GE 型号 4TE5) 照相机将放射照片转变

为减法图像,此照相机与一个模数转换器相连,它可以在一个时帧(1/30秒)内以固态记忆形式贮存一个完整的电视画面。此设备-数字帧接收器(成像技术,PC视帧接收器)可以使像帧数字化并贮存,而且还通过应用IBM PC ATTM作为中央处理器,从而具有二百万比特以上(512 × 512 象素,每8比特为1象素)信息容量。

借助于能够在二维空间内正交移动并且在同一平面内旋转的微操纵器将图像置于空间寄存器中(Klinger)。利用全部256个(8比特)灰度级的分辨率将第1个放射照片存入计算机的硬盘驱动器中。连续“捕获”第二个放射照片的图像使被对比的第二个底片的配准便利,同时
10 在同一电视屏幕上显示第一和第二放射照片之间的差相。由于在底片处理中或到X射线管的电压方面的轻微变化可导致所得底片中的对比差异,因此应用Ruttiman的非参数 γ 校正算法(Ruttiman, U. E.等人, J. Periodont. Res. (1986) 21:486)以校正两底片之间的对比差异。当电视屏幕一律为灰色而且诸如牙的解剖结构不能清晰辨别时便完成了配准。

15 为测量两个放射照片之间骨的损失,对于正中和远牙根表面要测定在CEJ与牙槽嵴顶高度之间的距离。在牙槽嵴(对于纵向骨损失来说)或者在PDL空间变得模糊的位点(根据明显的下侧骨缺损)测得牙槽骨高度。将此测量结果在图像处理系统中转换为放大放射照片。在每个放射照片上测量每位上骨损失的毫米数。将2周时的放射照片图像从
20 基线时的放射照片上减去。将4周时的放射照片图像从基线时的放射照片上减去,如此直至6个月的结果。这样便提供了在每个放射照片时间间隔(0、0.5、1、1.5、2、2.5、3、4和6个月)之间的多级分离率。前面研究已经表明在估计骨损失方面此方法的误差在原始放射照片上小于0.08mm。

25 核医学技术

核医学技术已经应用了测定骨代谢的变化(Jeffcoat, M. K. 等人, Adv. Dent. Res. (1987), 1:80)。因为代谢变化早于结构改变,所以核医学技术可用于测定从放射照片所能发现的变化之前的骨性异常,而且
30 还可用于预测骨损失或它的抑制情况,这些将会在随后的放射照片中看到。在动物模型中,核医学技术通过测定骨代谢可用于扩大和加强在骨吸收上的结扎线诱导牙周炎的放射照片的测定。所用技术如下:在研究开始时(基线),给两狗均静脉内注射1.5mCi/kg的⁹⁹Tc - MDP。考

考虑到经过 60 分钟以使血液和软组织放射性药物得到清除，然后测量牙槽骨的摄取量。

利用碲化镉半导体探针探测器以获得两只狗每个四分体的第一至第 4 前磨牙的摄取量。每位的摄取量除以骨性突起的摄取量，此骨性突起将头颅骨表面分为背侧和后侧。此比率用以校正注射剂量以及放射药物的生物和生理衰变中存在差异的数据，因此它使动物之间摄取数据的对比便利。在 1 月、2 月、4 月和 6 月末，重复每个研究位上的放射药物的摄取。

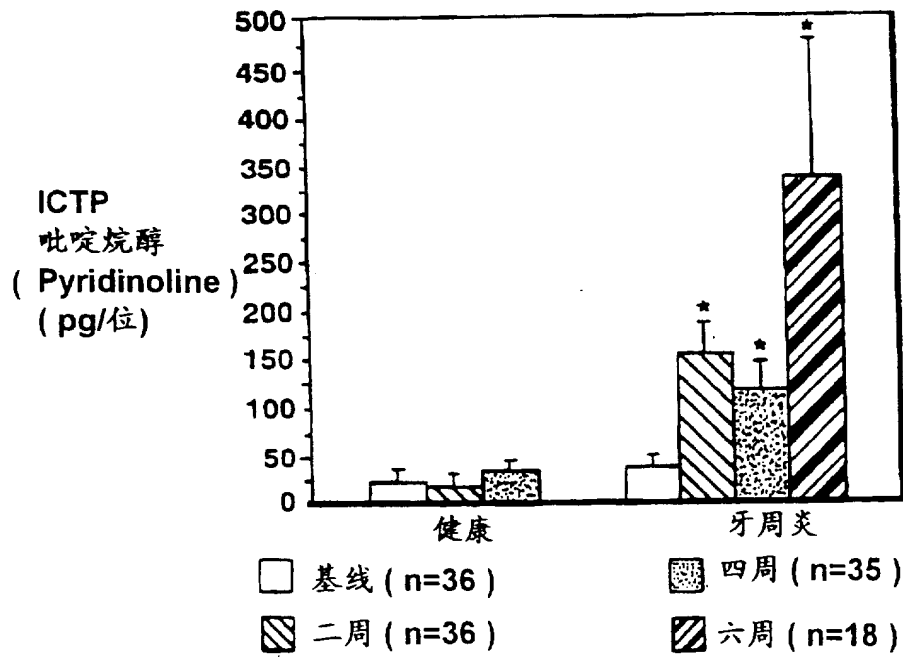
在实验中证明了本发明依靠 ICTP 交联物水平确定疾病存在的方法的效率，其结果以图解形式描述于图 1 - 4 中，图例显示自狗中采集的龈沟流体（GCF）和外周血样的数据，此数据与从基线至 6 周的牙周炎的诱导相随，并对应放射药物摄取量（图 3）。从 2 至 6 周的牙周炎位中发现在 GCF ICTP 交联物水平/位（图 1）和 ng/ml（图 2）中在统计学上有显著增长（ $P < 0.05$ ）。从健康位上采集的 GCF 样品表明只有所有时间点的 ICTP 交联物水平较低。

参考图 3，在第 4 周 ICTP 交联物水平的增长与牙周炎位上 ^{99m}Tc - MDP 的放射药物的摄取量的显著升高相互关联，它表明与增强的骨代谢活动（即骨吸收）相互关联。

图 4 表示诱导牙周炎对循环外周血的 ICTP 吡啶烷醇（pyridinoline）交联物水平的影响，在口一侧牙上诱导牙周炎，同时对侧保持牙周健康。在 6 周时与基线对比显示显著增长（ $P < 0.05$ ）。此说明牙周炎即使全身 ICTP 吡啶烷醇（pyridinoline）交联物水平升高，也局部地使 GCF 中的 ICTP 吡啶烷醇（pyridinoline）交联物水平升高，（见图 1）。

其它实施方案在下面权利要求之内。

说明书附图



*P<0.05 (与健康对比)

图 1

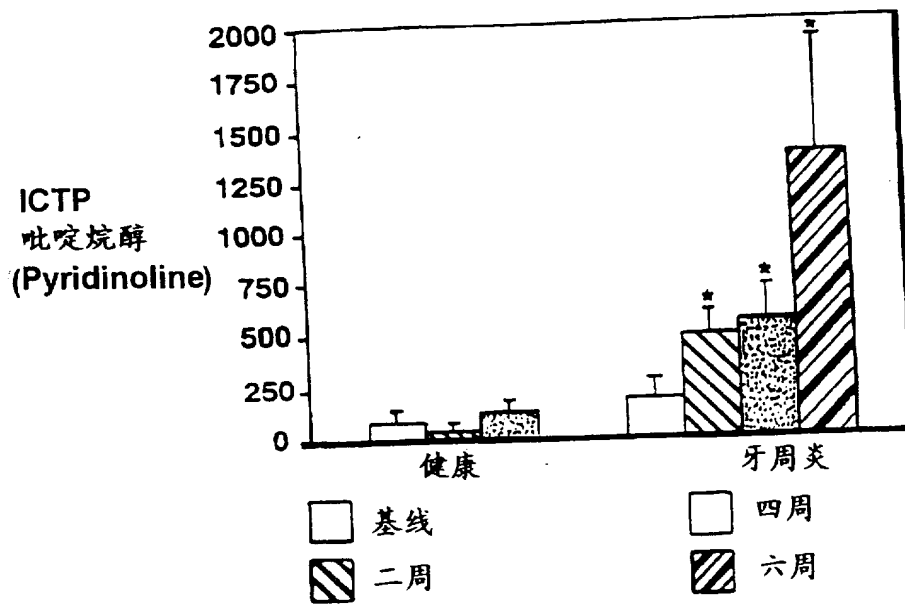


图 2 *P<0.05 (与健康对比)

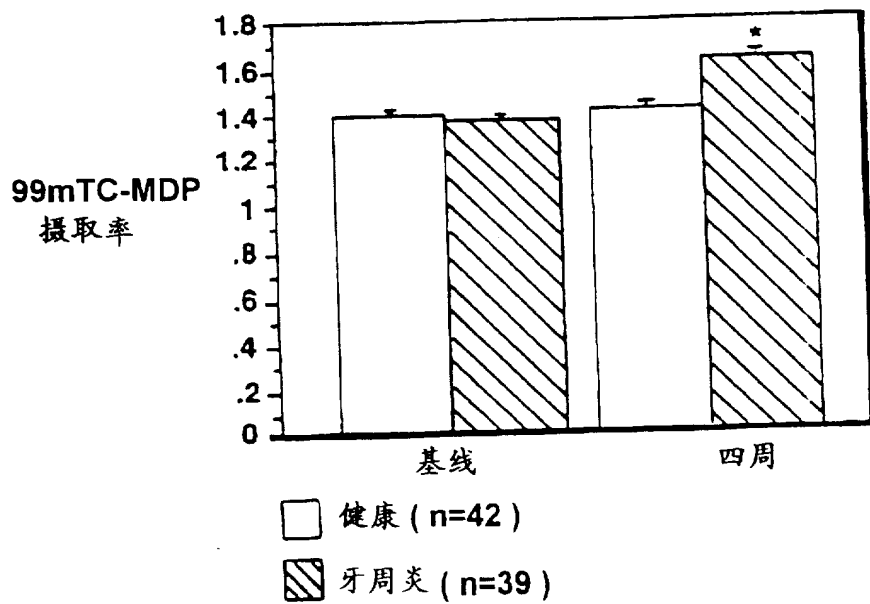
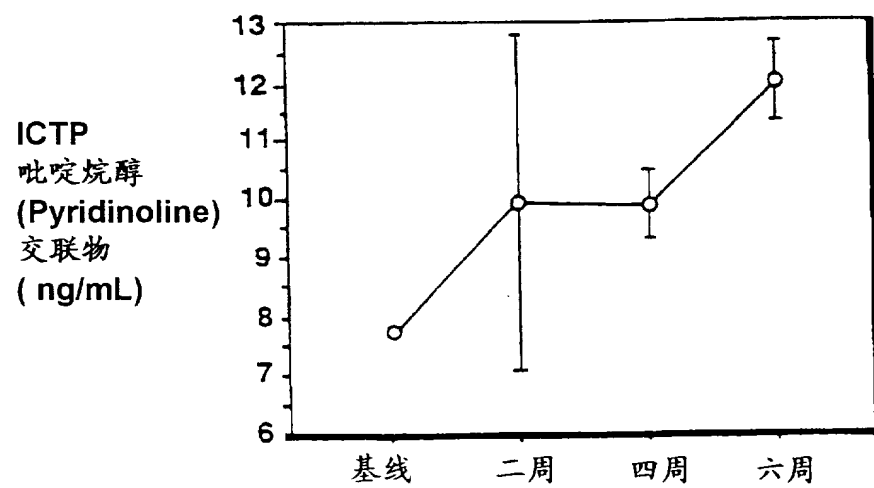


图 3 *P<0.05 (与健康对比)



* $P < 0.05$ (与健康 and 基线对比)

图 4