

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

G01N 33/50

[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 93118343.X

[45]授权公告日 2000年3月22日

[11]授权公告号 CN 1050668C

[22]申请日 1993.8.19 [24]颁证日 1999.12.24

[21]申请号 93118343.X

[30]优先权

[32]1992.8.19 [33]DE [31]P4227454.0

[73]专利权人 B.R.A.H.M.S. 诊断有限公司

地址 联邦德国柏林

[72]发明人 C·博湖昂

审查员 王 奕

[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
代理人 唐伟杰

权利要求书 2 页 说明书 12 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 用于实现早期检测败血症并对治疗进行跟踪的方法的药盒

[57]摘要

公开了一种早期检测败血症及检测败血症的严重程度并对治疗过程进行跟踪评估的方法,以及实现所述方法的药盒。根据本发明,测定了患者的体液样品中的肽前降钙素和/或其形成的非完整降钙素的肽片段的含量。通过测定这种确定的肽是否存在,含量多少,得出有关是否有败血症,败血症的严重程度以及/或者治疗效果的结论。

ISSN 1008-4274

权 利 要 求 书

1.用于实现早期检测败血症及检测败血症的严重程度并对治疗过程进行跟踪评估的方法的试剂盒，从中可测得病人体液样品中的肽前降钙素和/或尚未形成完整的降钙素的肽片段，这种肽的存在及其含量预示着败血症的存在，严重程度以及/或者对败血症的治疗效果，其特征在于：用于测定前降钙素含量为 0.1 至 500ng/ml 血清或血浆的试剂盒内含有：

一个或多个固定在载体上用以与样品中的前降钙素结合的第一单克隆或多克隆抗体；

另一个携带标记并且与前降钙素在不同于第一抗体的结合区域的另一区域相结合的抗体。

2.根据权利要求 1 所述的试剂盒，其特征在于测定出前降钙素和/或 N - 前降钙素 - (1 - 57) - 肽和/或 C - 前降钙素 - (60 - 116) 肽。

3.根据权利要求 1 或 2 所述试剂盒，其特征在于，所述方法为免疫诊断方法，所述抗体本身或彼此结合后对前降钙素或其形成的肽具有专一性，以区别于完整的降钙素和与降钙素有关的肽。

4.根据权利要求 3 所述的试剂盒，其特征在于，通过免疫测定法测定前降钙素，所述的用于与样品中的前降钙素相结合的第一抗体是一个单克隆抗体，它与前降钙素结合的区域不同于作为标记的第二单克隆抗体与前降钙素结合的区域，因此可以区分出前降钙素及其水解降解产物，包括降钙素。

5.根据权利要求4所述的药盒,其特征在于,通过能选择性地检测完整的前降钙素及/或C-前降钙素-(60-116)-肽的免疫测定法测定前降钙素。

6.根据权利要求3所述药盒,其特征在于通过能选择性地检测完整的前降钙素及/或N-前降钙素-(1-57)-肽的免疫测定法测定前降钙素。

7.根据权利要求6所述药盒,其特征在于样品中前降钙素含量超过1ng/ml预示可能存在败血症,前降钙素含量达到10ng/ml至500ng/ml或更高与败血症加重以及恶化有关。

8.根据权利要求7所述药盒,其特征在于,同时对降钙素水平进行测定,没有测得降钙素水平上升,就能对败血症进行诊断。

9.根据权利要求7或8所述药盒,其特征在于,如果可以将也能引起前降钙素上升的严重病毒性疾病的存在排除,那么当前降钙素水平接近20ng/ml时,就可诊断为败血症。

10.根据权利要求1所述的药盒,其特征在于,用作样品的体液为血浆或血清。

说 明 书

用于实现早期检测败血症并 对治疗进行跟踪的方法的药盒

本发明涉及用于实现败血症的早期检测,败血症严重程度的检测以及对败血症的治疗效果进行跟踪检测的方法的药盒。该方法以如下新见解为基础:某种本身已知的肽和它的某些合适的片段代表了这类疾病的可靠生物指标,由于在发病时它们表现为高浓度,所以用传统的检测方法就能很方便地对其进行测定。

根据对这一疾病的更新的理解,目前所说的“败血症”这个词概括了诸项临床特征,一般地说可观察到发热,血细胞增多,意识改变,肌力过度循环(热休克)以及代谢亢进,其主要原因在于微生物侵入了正常无菌组织。而象过去那样以检测血液中病菌作为败血症特征的方法,在败血症的诊断中已经变得不那么重要了。在临床研究中可以看到,对败血症病人病情的预断并不依据感染,尤其是细菌引起的感染的严重程度,而是依据生物体的脓毒性反应的严重程度(参见 G piLz S Fateh-Moghadam 和 k Werdan 在 *Krankenpflege* 杂志, 29 卷, 1991 年 PP.483-492 页,以及其所引用的出版物)。因此,目前在对败血症的评估中,采用并测定多种实验室参数及血液动力学参数进行诊断和病情评估,取代了阳性血培养的方法,或与之并用。在必要时,还要用到计算机辅助的所谓 Score 系统,如上面提到的文献中所讲的 APACHZ (急性生理学及慢性健康状况评估) II Score 系统,但迄今为止还没有找到一个可以作为确切的生物指标,对败血症的诊断有重大意义的参数。目前所用的所有参数,要么特异性不够好,要么不能对败血症的严重程度作出确切的评估,也不能做疗法监测,除此之外,测出诸如肿瘤坏死因子 (TNF) 或白介素如白介素 6(IL - 6)等物质对临床测定而言太复杂、昂贵并且费时。

因此,急需一个易于测定并且其定性及定量对于败血症的诊断和进展

评估具有重要指导性意义的生物指标。

本发明的目的是提供用于实现早期检测败血症及检测败血症的严重程度并对治疗过程进行跟踪评估的方法的药盒，从中可测得病人体液样品中的肽前降钙素和/或尚未形成完整的降钙素的肽片段，这种肽的存在及其含量预示着败血症的存在，严重程度以及/或者对败血症的治疗效果，其特征在于：用于测定前降钙素含量为 0.1 至 500ng/ml 血清或血浆的药盒内含有：

一个或多个固定在载体上用以与样品中的前降钙素结合的第一单克隆或多克隆抗体；

另一个携带标记并且与前降钙素在不同于第一抗体的结合区域的另一区域相结合的抗体。

通过本说明书中所述的方法和药盒已达到这一目的。本发明以一个惊人的发现为基础，这一发现是：本身已知的肽前降钙素或其高分子分裂产物，是与败血症密切相关的生物指标，它们在病人的体液样品中的浓度与败血症的严重程度密切相关，因而对败血症的进展评估及疗法监测而言，是一个很有价值的参数。

因此，通过测定肽前降钙素来诊断败血症的可能性具有重大的实际意义。因为在败血症病例中可能出现的其他生物指标，如胞质分裂素（白介素，TNF）是一些不稳定的分子，一般只以很低的浓度出现，因此要在常规的临床诊断中测定它们困难很大，也很费时，因而花费很大。完全意想不到的，根据本发明，凭以往的医学知识可以测定前降钙素，败血症情况下，其以上含量剧增，因而可测得纳克(ng)级的浓度（每一毫升血清或血浆中达一纳克上，特别是 10 纳克 ~ 500 纳克以上），而对于健康人，即使用当今最好的测定

方法也检测不到前降钙素的含量(样品浓度低于0.1ng/ml),同时,根据本发明,在败血症病例中,未观察到降钙素浓度增加,这值得注意,因为迄今为止,前降钙素一般被视为降钙素的前体,它的出现也导致降钙素的形成。

本发明的方法要测定的肽前降钙素及其可能出现的蛋白水解分裂产物都是已知的,适宜定量及定性免疫诊断测定方法也是已知的。

前降钙素是一种由116个氨基酸组成的肽,并且据目前所知,它是某种基因(CALC-1)转译表达的中间产物,并做为降钙素的前体,在大多数组织中,尤其是在甲状腺C细胞及肿瘤细胞中导致了肽激素降钙素的形成,而原始基因(CALC-1)除了形成前降钙素以外,还控制与前降钙素一基因有关的肽的形成,后者与前降钙素的长度及其51至116氨基酸序列有明显区别。参见J, Biol, chem, 261: 31(1986), pp, 14386-14391。

根据常识,前降钙素是伯蛋白前降钙素前体的水解降解的产物,基因CALC-1表达成某种形式就形成了前降钙素的前体,前降钙素通常按照表现出来的几种形式,借助于完整的降钙素的释放,进行逐步的分段降解,完整的降钙素与一个由32个氨基酸组成的序列(前降钙素的60~81氨基酸)相对应。在这一过程中,开始有两个更大的肽与其它的肽一同形成,它们可能被称作N-前降钙素-(1-57)-肽及C-前降钙素-(60~116)-肽,后者能进一步分裂成激素降钙素及被称作为下降钙素的肽(Bio-chem, J, 256, 1986, PP245-250, 和cdnce r Research, 49, 1989, PP6845-6851)。目前根据 J, Biol, Chem, 226(36), PP 24627-24631文献报导可知,除了上述文献中描述的前降钙素以外,在人甲状腺C细胞中还形成一种前降钙素的变体,它在C

末端的最后8个氨基酸与前者不同:这个肽在本发明意义上也被视为“前降钙素”，因为目前本发明的研究所采用的免疫诊断测定的方法分辨不出这两种前降钙素以及可能出现的其它与之密切相关的肽。因此，本发明意义上的“前降钙素”表示一种或多种肽，包括已知分子的前降钙素和上面提到的在C末端含有不同氨基酸组分的变体及在所用的选择性免疫诊断测定法中，特别是在下面将提到的单克隆免疫放射测定法中具有类似反应性的可能存在的变体。(参见Cancer Res, 49, 1989, P6845—6851)

所有这些肽都包含由57个以上氨基酸组成的肽序列，特别是象完整的前降钙素那样的116个氨基酸序列，它们或与已知的序列一致，或者部分一致，只是在相应于前降钙素的第108至116的氨基酸区域可能存在差别。

根据以前对测定降钙素及其有关肽方法用于诊断的尝试可知，降钙素对许多恶性疾病是一个有价值的生物指标(肿瘤指标)，并且已经研究出大量专门用于测定降钙素的免疫诊断测定法，通过使用特异的单克隆抗体，这些方法得以实现(举例参见: Clinica Chimica Acta 1988 174 PP35-54, 和 Immunol Vol141 PP 3156-3163和J, Endocr 1988 119 PP 351-357)。

还是为了测定降钙素的前体，如前降钙素及C-前降钙素-(60~119)-肽，已经研究出一种免疫诊断测定法，这一方法根据免疫放射测定法的原理，除了可以测定降钙素外，还可以通过一对单克隆抗体选择地测定前降钙素，这一对抗体中的一个特异于降钙素序列的外部(下降钙素的1~11氨基酸或前降钙素的96~107氨基酸)，例如以一种固定形式从包含这一序列的分析样品中提取肽；而这一

对单克隆抗体中的另一个则用于构成免疫放射测定法的夹层特异于降钙素中相应于第11~17氨基酸的区域(前降钙素的70~76氨基酸)。在免疫测定中,用这一方式只能测定出那些具有与下降钙素的第1~11氨基酸区域一样的降钙素区域的肽。即或者相当于一个完整的前降钙素,或者是一个具有该指定区域的肽,如C-前降钙素-(60~116)-肽(参见Cancer Res 49 1989 PP 6845-6851)。用已知的方法,从现有的众多单克隆抗体中选出那些缔合常数在 $K_{asn}=0.9 \sim 3.0 \times 10^{10} M^{-1}$ 范围的单克隆抗体命名为MAbKcoI和MAbcTo8)。这一已知的方法可直接运用于本发明相应的测定方法中,也可使用由J Immunol vol 141 No9 1988 PP3156-3163提供的方法获得的相似单克隆抗体。在这一公开方法中,为了在临床上用具有特别明确意义同时又容易估算的方法测定前降钙素的增加,需要用几对与上述抗体具有相似的强亲合力的抗体。

例如,用于本发明中的单克隆抗体对,可以根据以前所述的用于产生与CT21具有相似结合特性的抗体的免疫方法(Motte et al J Immunol 138 1987 P3332),用CT-TT(降钙素-破伤风菌疫苗)作为免疫原来产生。用kc-TT(下降钙素-破伤风菌疫苗)对Biozzi快速响应小鼠进行免疫(Biozzi et al J ZXP Med 132 1970 P152),可以获得与KcoI具有相似结合特性的抗体,根据所述方法每次以不同途径注射进15ug的肽,共注射4次。皮下注射完全弗氏佐剂(FCA)皮下注射不完全弗氏佐剂(FIA),腹膜注射FIA,及静脉注射0.15mol/l波度的氯化钠,这一免疫进程历时13至30周,最后一次静脉注射三天后小鼠死亡。取出脾脏,用40%的聚乙烯乙二醇将其脾细胞与Nsl大鼠的骨髓瘤细胞系融合(Bellet et al J.Clin EndocrinolMet

ab 56 1983 P530), 用ELISA测定法可将这一杂合物的上清液筛分出来用于制造特异的抗体, 经有限稀释克隆后, 把这些杂化细胞植入BALB/C无毛小鼠的腹膜内, 10至14天后收集所产生的腹水。可以象Manil等报导的奸样(J Immunol Methods 90 1986 P. 25), 用4℃的50%硫酸胺作沉淀剂, 以蛋白A层析法提纯单克隆抗体。通过用戊二醛作偶合试剂分别将CT或TT连接到KC上, 来制备半抗原载体结合物CT-TT或KC-TT。(Audibert et al proc Natl Acad Sci U S A 79 1982 P 5042)。

用了一对单克隆抗体进行如下例所述的测定, 它们是上面提到过的抗体MAbK01和抗体MAbT21, 后者被视为与前降钙素分子亲合且其亲合性与上述文献描述的抗体MAbCT08极其相似(缔合常数 $K_{as} = 3.0 \times 10^{10} M^{-1}$)。按照布达佩斯条约, 将产生单克隆抗体K01和CT21的杂合物存放在德国的“DSM—Deutsche Sammlung Von Mikroorganismen and Zellkulturen GmbH,” Mascheroderweg 1B, 38124 Braunschweig, 收藏号分别为DSM Acc2124和DSMAcc2125, 日期是1993年4月20日。

根据Cancer Res 49 (1989), PP6845-6851所述方法可测得样品中所含前降钙素C—前降钙素—(60—119)肽或它们两者的浓度值, 如果这两者的或稳定性相差不大, 还可测得样品中前降钙素的初始浓度。对于本发明可能用到的测定前降钙素的几个方法, 我们直接参考了上面提到的文献及这些文献引用的文献, 并将它们的目录置于本申请的参考文献中, 以补充本申请的技术方案。

在上面提到的文献中, 为了检验前降钙素是否适合于作为肿瘤指标, 也对其进行了测定。现已确认, 前降钙素与降钙素的水平在

肿瘤病人体内的表面相似，因而得出这样一个结论，即它们都是从甲状腺的 C 细胞瘤衍生出来的，上述文献还进一步确认，那些并未患恶性疾病而只是患某些较严重的病毒感染性疾病的人的前降钙素的水平也有所增加。在这些情形下，降钙素的水平并不同时增加，这些病人不是败血性病人，人们的疾病也与败血症无任何关系。

在本发明令人意想不到地确认了降钙素的水平与败血症的存在及其严重程度有密切的关系之后，又着手研究了败血病情况下前降钙素的水平上升而降钙素水平不同时上升的原因，以及更进一步，是什么导致那些严重病毒感染性疾病与败血症的直接区别。对于一个甲状腺全部切除的败血症患者，也测得其前降钙素的水平上升到典型败血症患者的水平，显然在败血症情况下，前降钙素不是在甲状腺形成的，而另有一个器官可以形成前降钙素。如果考虑到在病毒性肝炎情况下前降钙素水平的上升，因而假设这另一器官是肝脏，因而先将前降钙素水平的上升解释成是病毒性疾病直接作用于肝细胞的结果，再进一步考虑到是由与败血症有关的病菌产生的内毒素间接地，但更有效地对这些肝细胞产生的影响。但是，要注意这一事后的解释仍只是一个假设，而不是经实验证明的理论。

在严重的病毒性疾病情况下前降钙素的水平上升这一现象对本发明的败血症诊断方法有一定影响，因而当前降钙素水平只上升到一个较低程度，别的严重病毒性疾病也能达到这一值时，在作败血病诊断前就先排除这一病毒疾病。

因此，根据本发明，本发明的药盒特征在于，如果可以将也能引起前降钙素上升的严重病毒性疾病的存在排除，那么当前降钙素水平接近 20ng/ml 时，就可诊断为败血症。

另外，患有慢性肾衰竭的病人会排泄出无序的肽，因而会有人预料其象前降钙素这类的肽的水平会上升，但这一上升在临床上与上面所述的上升没多大关系，因为上面提到的都是肾脏方面没有毛

病的病人。但是，负责临床诊断的内科医生会容易考虑到这些情况。

本发明并不局限于仅用上述方法测定前降钙素，还可使用其他公知的测定方法，包括使用别的单克隆或多克隆抗体，如特异于N-前降钙素-(1-57)-肽，尤其是其第51至57氨基酸的抗体。常用多克隆抗体对应N-前降钙素-(1-57)-肽区域取代上述方法中用mAbkoI与标记好的单克隆抗体共同与前降钙素的降钙素区域结合，因而可以发现在两种情况下测得的前降钙素含量的浓度值相似，但事实上如要使用上述的多克隆抗体，只能检测到完整的前降钙素肽中的一个分子中的区域，据此可以得出这样一个结论，即在败血症情况下，事实上主要是完整的前降钙素水平上升，因而不完整的肽的形成至少是次要的。

从原理上讲，也可以通过以不同于免疫诊断的方式测得前降钙素实现本发明的方法，例如用高压液相色谱法，只要存在或可以研究出这些有足够灵敏度及专一性的方法就行。

另外，尽管目前本发明主要是在血清或血浆样品中测定前降钙素，但从原理上讲本发明的方法还包括在其他体液中比如全血和尿中测定前降钙素，只需证明可以用可再现的方式测得这些液体中的前降钙素的水平。

关于本领域的现状还需指出，据Surgerg vol 108, 6, (1990) PP 1097-1101报导，败血症病人血浆中与降钙素有关的肽CGRP的水平以pg级的幅度稍有上升(达 $14.9 \pm 3.2 \text{ pg/ml}$ ，而对照组为 $2.0 \pm 0.3 \text{ pg/ml}$)。这一发现得不出任何关于其他有关的肽的水平结论，并且绝对浓度相当低，败血症病人较之正常人的相对浓度的增加值与本发明方法的增加值相比也相当低，所以将CGRP确定的败血症的指标是

不合适的。

另外，据Lancet 1, (1983), P 294报导，当儿童患严重脑膜炎双球菌血症时，其降钙素的水平上升两至三倍，但接着又有Pediatr, Res, 18, (1984), P811页修改了这一说法，认为测得的物质可能不是完整的降钙素，但又未能指出实际上测得的到底是什么物质。我们不得不将在这种情况下观察到的接近三倍于正常值的增加与本发明方法中前降钙素的增加幅度达1000倍相比较，可见所述文献并不代表与本发明有关的技术方案。

下面将用能证实上述有关报导的临床数据进一步详细描述本发明的方法。

根据Cancer Res 49 (1989), PP 6845-6851描述的单克隆抗体K COI (DSM Acc2124)和CT21 (DSM ACC2125) (见上述)测定前降钙素的方法对全部前降钙素进行测定。

这些例子是用来说明本发明的，不应理解成是对本发明的限制。

例1

对因各种疾病住院的儿童的前降钙素水平的测定。

测定了不同病组的因各种疾病住院的儿童的前降钙素水平 (PCT)。

结果见表1。

可见，败血症患者的PCT (前降钙素水平) 高达180ng/ml，而“正常”病毒性疾病患者的PCT值最高只达到2ng/ml，只是在极严重的肠道及肝脏的病毒疾病情况下升至16nm/ml，只有一例达35ng/ml。

表1

患细菌及病毒感染的儿童的血清PCT水平

组	年龄(岁)	PCT (ng/ml)	临床情况
对照组 (n=20)	0.3—10	<0.1	因各种非感染性疾病住院的儿童
细菌感染 儿童组 (n=7)	0.5—8.5	16—180	5例脑膜炎(3例嗜血杆菌, 2例脑膜炎球菌)1例肺结核 1例感染葡萄球菌并有史 蒂文斯—约翰逊综合症
新生儿 (n=6)	NN	13—160	6例阳性血培养新生儿(大 肠杆菌乙种链球菌, 肠菌 李斯特菌属)
病毒感染 (n=10)	NN—9	<0.1—0.2	3例淋巴细胞脑膜炎 7例各种病毒感染(干扰素 上升)
n=3 (n=3)	0.1—5	1.1—16	2例风疹病毒 1例冠状病毒感染
先天性 coxoplas mosts (n =6)	2—5 NN	1.5—3.5 <0.1	全为“甲肝” 临床症状皆不显著

例2

败血症患者PCT水平的相关性、根据APACHE(急性生理学及慢性健康状况评估) II score观察到的病程状况及他们患病的严重程度。

对20例经心脏手术后的败血症患者静脉注射假单胞菌属一免疫球蛋白IgG治疗败血症,在五天内观察了其PCT水平,同时根据APACHE II Score对他们的病状进行了评估.总结出来的结果见下表2。

表2

	第一天	第二天	第三天	第五天
APACHE II Score				
治疗有效者 (n=11)	26 ± 1	24 ± 2	23 ± 3	16 ± 1
治疗无效者 (n=9)	28 ± 2	31 ± 2	31 ± 2	29 ± 1
PCT	2	2	2	
治疗有效者 (n=11)	87 ± 33	87 ± 37	104 ± 41	22 ± 7
治疗无效者 (n=9)	259 ± 56	278 ± 61	214 ± 68	181 ± 66
		2	2	
致死率				
治疗有效者 (n=11)	9%			
治疗无效者 (n=9)	56%	3		

± SEM

1P<0.05 (M-W) 2P<0.05 (wilcoxon) 3P<0.05 (chi²)

从表2可以清楚地看出，对败血症治疗有较好反应者(治疗有效者)的PCT水平随着临床状况的改善而下降，而对治疗没有反应者(治疗无效者)的PCT几乎一成不变地保持较高水平。还可看出，治疗无效者的初始PCT水平就明显高于治疗有效者，即前者疾病的严重程度更大，比较APACHE II Score值也可清楚地看到，PCT的值与败血症的不同严重等级有明显的关系，死亡率的数据也证实了这一点。

这些结果还进一步表明，在败血症早期治疗过程中跟踪测定PCT水平能提供可靠的疗效信息，因此，在必要时可及时改变治疗方案，例如可以另选一种抗菌素制剂。

从烧伤者的病例也可以得出相似的结果，这些烧伤者因植皮而患败血症，被施以各种抗菌素制剂进行治疗。有效的治疗总与PCT浓度明显下降相伴随，因而当用第一种抗菌素制剂治疗无效时—由PCT浓度保持不变而确定—可以改用第二种可使PCT水平立即下降的抗菌素制剂。