



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03819947.5

[43] 公开日 2005 年 10 月 5 日

[11] 公开号 CN 1678912A

[22] 申请日 2003.7.11 [21] 申请号 03819947.5

[30] 优先权

[32] 2002. 7. 11 [33] GB [31] 0216191.7

[32] 2002. 7. 16 [33] GB [31] 0216500.9

[32] 2002. 7. 17 [33] GB [31] 0216505.8

[86] 国际申请 PCT/GB2003/003011 2003.7.11

[87] 国际公布 WO2004/008140 英 2004.1.22

[85] 进入国家阶段日期 2005.2.22

[71] 申请人 因沃耐斯瑞士医学有限公司

地址 瑞士楚格

[72] 发明人 L·额

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

代理人 黄革生 安佩东

权利要求书 1 页 说明书 9 页 附图 3 页

[54] 发明名称 人心力衰竭中的血浆尿压素

[57] 摘要

本发明提供了在哺乳动物个体中诊断心力衰竭的方法。测定来自个体的体液样品中尿压素的水平，并将其与在个体的所述体液中通常发现的指示不患有心力衰竭的参考水平进行比较。尿压素水平的增加指示心力衰竭。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1.一种在哺乳动物个体中诊断心力衰竭的方法，其中包括测定体液样品中尿压素的水平，并将其与在个体的所述体液中通常发现的指示不患有心力衰竭的参考水平进行比较，其中尿压素水平的增加指示心力衰竭。

2.根据权利要求1中所述的方法，其中尿压素水平通过使用免疫测定法确定。

3.根据权利要求1或2中所述的方法，其中另外测定至少一种指示心力衰竭的其它标记物的水平，并将其与在哺乳动物个体的所述体液中通常发现的指示不患有心力衰竭的参考水平进行比较，其中该至少一种其它标记物的水平增加指示心力衰竭。

4.根据权利要求3中所述的方法，其中其它标记物是NT-proBNP或BNP。

5.根据权利要求3或4中所述的方法，其中其它标记物的水平通过使用免疫测定法确定。

6.根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中体液是血浆或组织液。

7.根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中的个体是人。

8.在权利要求1至7的方法中使用的检测体液样品中尿压素的免疫测定法。

9.在人体中对心脏疾病的严重程度进行示踪和分级的方法，其中在一段时期内一次或多次测定尿压素以及至少一种指示心力衰竭的其它标记物的水平，并与标准模型进行比较。

10.根据权利要求9中所述的方法，其中标准模型是分析物水平对比疾病状态的标准模型。

11.根据权利要求9或10中所述的方法，其中分级是根据NYHA分级确定的。

人心力衰竭中的血浆尿压素

本发明涉及在哺乳动物个体、例如人中诊断心力衰竭的方法。特别地，本发明涉及其中测定体液样品中尿压素的水平以诊断心力衰竭的方法。

心力衰竭(左心室收缩功能障碍)是死亡率和发病率的主导原因。其病理生理学包括多种神经激素系统的激活，所述的神经激素系统包括儿茶酚胺、肾素-血管紧张素、内皮素、心钠素和脑钠素系统。这些系统中的某些以适应性方式激活，其它的以适应不良的方式激活。

近期的工作已经表明存在一种新的称为尿压素 II (UTN)的心血管肽，该心血管肽与硬骨鱼的荷尔蒙同源(Ames 等人, *Nature* 1999; 16: 282-286)。该环状的十一肽是孤儿 G 蛋白受体(GPR14)的配体，并且肽及受体两者均分布在心肌、内皮、脉管肌细胞和神经系统中(Ames 等人, *Nature* 1999; 16: 282-286)。虽然其对于大鼠和猴子中的某些血管床是有效的血管收缩剂(Ames 等人, *Nature* 1999; 16: 282-286; Douglas 等人, *J Cardiovasc Pharmacol* 2000; 36: S163-6)，然而其在肠系膜阻力血管中也可以是血管舒张剂(Bottrill 等人, *Br J Pharm* 2000; 130:1865-1870)。在不同脉管对 UTN 的反应性之间存在有重要的种属差异。例如，虽然猴子的脉管可被 UTN 有效地收缩，然而人肺脉管系统和肠系膜阻力血管被 UTN 高度有效地舒张(Stirrat 等人, *Am J Physiol* 2001; 280: H925-928)，人皮下阻力血管对 UTN 没有响应(Hillier 等人, *Circulation* 2001; 103:1378-1381)。UTN 对血管平滑肌长期刺激可导致肥大响应(Watanabe 等人, *J Hypertens* 2001; 19:2191-2196)。在猴子中对心肌的直接作用表现出可能由冠状血管收缩引起的心肌抑制(Ames 等人, *Nature* 1999; 16: 282-286)，然而在人心肌中证明有正性肌力作用(Russell 等人, *Br J Pharm* 2001; 132:5-9)。另外，已经描述了包括胶原沉着增加在内的肥大效应，这意味着 UTN 在心力衰竭的心室重塑中可能起作用(Zou 等人, *FEBS Lett* 2001; 508:57-60; Tzanidis 等人,

Eur Heart J 2000; 21:72)。UTN 使得心肌细胞中心钠素和脑钠素的表达增加(Zou 等人, *FEBS Lett* 2001; 508:57-60), 该变化预期在心力衰竭中会复原至更原始的表型。Douglas 等人的近期工作(Douglas 等人, *Lancet* 2002; 359:1990-1997)证明在心力衰竭患者的心肌中 UTN 及其受体的表达均增加, 甚至是在疾病的早期亦如此。UTN 存在于心脏的心肌细胞、血管平滑肌细胞、内皮和炎症细胞。关于尿压素在心力衰竭中假定的作用, 在重塑和纤维化增加导致日益增强的适应不良响应之前, 在人中最初的正性肌力作用和血管舒张作用可以是代偿性的。

第一方面, 本发明提供了在哺乳动物个体中诊断心力衰竭的方法, 其中包括测定体液样品中尿压素的水平, 并将其与在个体的所述体液中通常发现的指示不患有心力衰竭的参考水平进行比较, 其中尿压素水平增加指示心力衰竭。

可另外测定至少一种指示心力衰竭的其它标记物、如N-末端脑钠素前体(NT-proBNP)或脑钠素(BNP)的水平, 并将其与在哺乳动物个体的体液中通常发现的指示不患有心力衰竭的参考水平进行比较, 其中该至少一种其它标记物的水平增加指示心力衰竭。

尿压素或其它标记物的水平可通过使用免疫测定法测定, 体液可以是血浆或组织液。

在一个实施方案中, 本发明的方法用于在人体中诊断心力衰竭。

第二方面, 本发明提供了一种在第一方面的方法中使用的检测体液样品中尿压素的免疫测定法。

第三方面, 本发明提供了一种在人体中对心脏疾病的严重程度进行示踪和分级的方法, 其中在一段时期内一次或多次测定尿压素以及至少一种指示心力衰竭的其它标记物的水平, 并与标准模型进行比较。

标准模型可以是分析物水平对比疾病状态的标准模型, 分级可根据纽约心脏学会(NYHA)分级确定。分为四级, 为:

- 1 级: 仅在体力劳动时表现出症状的患者;
- 2 级: 正常体力劳动时表现出症状的患者;

3级: 轻体力劳动时表现出症状的患者;

4级: 休息时表现出症状的患者。

发明人研究了人心力衰竭(左心室收缩功能障碍)中 UTN 的血浆水平, 并将其与更确定的 N-末端脑钠素前体(N-末端 proBNP)的血浆水平增加进行了比较。血浆从 126 名心力衰竭患者以及 220 名年龄和性别匹配的正常对照中取得。通过免疫发光测定法测定了 N-末端 proBNP 和 UTN。心力衰竭患者的血浆中 N-末端 proBNP 和 UTN 两者均增加, 并且显著相关($r_s = 0.35, P < 0.001$)。与 N-末端 proBNP 相反, 在血浆 UTN 和 NYHA 分级之间没有联系。虽然血浆 N-末端 proBNP 表现出与年龄和女性性别正性相关, 但是在血浆 UTN 中没有表现出这种年龄依赖性的变化, 并且正常女性中的水平比男性低。N-末端 proBNP 和 UTN 诊断心力衰竭的受试者工作特征曲线的面积分别为 0.90 和 0.86(两者均 $P < 0.001$)。在心力衰竭患者中血浆 UTN 增加, 这表明该肽在所述疾病的病理生理学中起作用。在心力衰竭的诊断中, 血浆 UTN 是 N-末端 proBNP 的有用的替换物, 因为其在心力衰竭中的水平增加与年龄、性别或 NYHA 分级无关。

在本发明中, 将所测定的尿压素水平(以及指示心脏疾病的其它标记物的水平, 如果测定了的话)与在个体的所述体液中通常发现的指示不患有心力衰竭的参考水平比较。这些参考水平可由对不患有心力衰竭的个体的群体研究而确定。所述个体可按照年龄和/或性别匹配。

如所提及的, 其它标记物可以是 N-末端 proBNP。可二者择一或另外地, 可测定 BNP 的水平。心肌细胞中储存的 proBNP (两种循环形式、即 BNP (活性肽)和 N-末端 BNP (NTproBNP, 非活性肽)的完整前体)在左心室的释放以及 BNP 产物的增加由心肌伸长、心肌张力和心肌受损而激发。

其中测定尿压素水平的体液可以是血浆或组织液, 虽然也可使用其它来源的体液, 即全血、血清或尿液。

本发明中所测定的标记物可使用免疫测定法检测。在一个实施方案中, 免疫测定法如下进行: 将取自待测个体的样品与适宜的抗体在当如果存在标记物时可发生免疫特异性结合的条件下接触, 检测或测定抗体的任何免

疫特异性结合的量。任何适宜的免疫测定法均可使用，其非限制性地包括使用例如下述技术的竞争性或非竞争性测定体系：western 印迹法、放射免疫测定法、ELISA(酶联免疫吸附法)、“夹心”免疫测定、免疫沉淀测定、沉淀素反应、凝胶扩散沉淀素反应、免疫扩散测定、聚集测定、补体结合测定、免疫放射测定、荧光免疫测定和 A 蛋白免疫测定。

例如，标记物可在液态样品中通过两步夹心测定法测定。在第一步，使用捕获试剂(例如抗标记物抗体)来捕获标记物。该捕获试剂可任选地固定在固相上。在第二步，使用直接或间接标记的检测试剂来检测所捕获的标记物。在一个实施方案中，检测试剂为抗体。在另一实施方案中，检测试剂为外源凝集素。

本发明还提供了可在本发明的第一方面的方法中使用的、用于检测尿压素的免疫测定法、试剂盒或装置。该免疫测定试剂盒或装置可含有与尿压素特异性结合的抗体，或者还含有结合心力衰竭的其它标记物的抗体。另外，该免疫测定法可任选地含有下述的一种或多种：(1)使用该免疫测定法、试剂盒或装置诊断心力衰竭的说明；(2)标记了的抗体结合配体；(3)固定有抗体的固相(例如试纸)；以及(4)显示管理部门许可用于诊断、预诊断、治疗的用途或其任意组合的标签或插页。如果没有提供抗体的标记了的结合配体，则抗体本身可用可检测的标记物如化学发光部分、酶部分、荧光部分或放射性部分进行标记。

此处所用的术语“抗体”指免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性部分，即包含与抗原特异性结合的抗原结合位点的分子。可用于本发明的免疫球蛋白可以是免疫球蛋白分子的任何类(例如 IgG、IgE、IgM、IgD 和 IgA)或亚类。抗体包括但不局限于多克隆抗体、单克隆抗体、双特异性抗体、人源化和嵌合抗体、单链抗体、Fab 片段及 F(ab')₂ 片段、由 Fab 表达文库产生的片段、抗独特型抗体(抗-Id)以及上述任一的表位结合片段。

本发明提供了在哺乳动物个体中诊断心力衰竭的方法，其中包括测定体液样品中指示心脏疾病的至少一种第一标记物和/或尿压素的水平，并将其与在哺乳动物个体的所述体液中通常发现的指示不患有心力衰竭的参考

水平进行比较,其中至少一种第一标记物和/或尿压素的水平增加指示心力衰竭。本发明还提供了一种在人类个体中对心脏疾病的严重程度进行示踪和分级的方法,其中在一段时期内一次或多次测定尿压素以及至少一种第一标记物的水平,并与标准模型进行比较。

至于其它每个方面,本发明每个方面优选的特征已做必要的修改。此处提及的现有技术的文献以法律所允许的最大程度引用。

本发明在下述非限制性的实施例中进一步进行描述。参考下述附图:

图 1a 和 1b 显示了血浆 NT proBNP 和血浆 UTN 分别对 NYHA 分级作图的图表;

图 2a 和 2b 是 NT proBNP 和 UTN 分别在诊断心力衰竭中的受试者工作曲线(ROC); 以及

图 3 是 N-末端 proBNP 和 UTN 的组合在诊断心力衰竭中的 ROC 曲线预后指数。

方法

得自正常对照和心力衰竭患者的血浆样品。

从 Leicester Royal Infirmary 的诊所和病房中招募患有心力衰竭的患者。所有患者均有心力衰竭的临床诊断,并且超声心动图证明射血分数低于 45%。正常对照与这些患者的年龄和性别相匹配,没有药物治疗,并且超声心动图证明射血分数高于 55%。患者的特征在表 1 中给出。

卧床休息 15 分钟后静脉穿刺获得 10ml 血液,在包含 EDTA 和抑肽酶的冰冷试管中混合。离心后回收血浆,于 -70℃ 储存待测。

N-末端 proBNP 的测定

N-末端 proBNP 的测定基于 Karl (Karl 等人, *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 1999; 230:177-181)所描述的非竞争性 N-末端 proBNP 测定。针对人 N-末端 proBNP 的 N-末端(氨基酸 1-12)和 C-末端(氨基酸 65-76)产生家兔多克隆抗体。

将来自血清的 IgG 在 A 蛋白琼脂糖柱上纯化。用针对 C-末端的抗体(每 ELISA 板孔 100 μ L, 0.5 μ g)作为捕获抗体。将 N-末端抗体亲和纯化并生物素化。将样品或 N-BNP 标准品的等分试样(20 μ L)于 4 $^{\circ}$ C 在 C-末端抗体包覆的孔中与生物素化的抗体一起孵育 24 小时。在洗涤之后, 每孔加入标记有甲基-吡啶酯的抗生物素蛋白链菌素(抗生物素蛋白链菌素-MAE, 5×10^6 相对光单位/ml)(Hart & Taaffe, *J Immunol Methods* 1987; 101:91-96)。将板在如前所述的 Dynatech MLX 发光测量计上读数(Hughes 等人, *Clin Sci* 1999; 96:373-380)。检测下限为 5.7fmol/ml 未经萃取的血浆。可接受的测定间和测定内变异系数分别为 2.3%和 4.8%。ANP、BNP 或 CNP 没有交叉反应性。

尿压素 II 的测定

从 Phoenix Pharmaceuticals Inc., Belmont, CA 获得对 UTN 循环形式特异的抗体。以在反相 HPLC 上纯化的生物素化 UTN 作为示踪剂。采用使用血浆 C₁₈ 萃取液的竞争性测定法, 将 50ng 抗体与萃取液或标准(每孔 1 至 2000fmol)在 100 μ l 测定缓冲液(如 12 所述)中孵育。于 4 $^{\circ}$ C 孵育 24 小时后, 加入生物素化的 UTN 示踪剂(每孔 250fmol)。在包覆有抗家兔 IgG 的 ELISA 板(100 ng/孔)中回收免疫沉淀物。在洗涤和与抗生物素蛋白链球菌-MAE 孵育之后, 如上所述引发化学发光。测定间和测定内的变异系数分别为 2.3%和 8.1%, 对 BNP 或 N-末端 proBNP 没有反应性。测定下限为 3.1 fmol/ml。

统计学分析

在 SPSS 第 11 版上进行统计学分析。数据以中间数[范围]给出。通过 Kruskal-Wallis 方差分析进行比较, 描绘受试者工作特征曲线(ROC)。采用 Spearman's rho(r_s)进行相关分析。认为 $P < 0.05$ 的值具有统计学意义。

结果

表 1 显示了正常人和心力衰竭患者的特征，他们在年龄和性别上匹配良好。如所预期的，心力衰竭患者中 N-末端 proBNP 显著增加。在正常人群中，N-末端 proBNP 与年龄增加之间正性相关($r_s = 0.41$, $P < 0.001$)，并且女性中的水平比男性高($P < 0.001$, 表 1)。N-末端 proBNP 随 NYHA 分级增加而增加(图 1a, 通过 Kruskal Wallis 测试的 $P < 0.001$)。在心力衰竭患者中血浆 UTN 也增加(表 1)，但是与年龄没有相关性。与 N-末端 proBNP 不同，在女性中的水平比男性低($P < 0.001$, 表 1)。血浆 UTN 不受 NYHA 分级增加的影响(图 1b)。在心力衰竭患者中 N-末端 proBNP 和 UTN 均增加而与性别无关(对于所有比较, $P < 0.001$)。N-末端 proBNP 和 UTN 也适度相关($r_s = 0.35$, $P < 0.001$)。

在心力衰竭患者中，血浆 UTN 水平与利尿剂、 β -阻滞剂或 ACE 抑制剂的使用无关。N-末端 proBNP 和 UTN 用于检测心力衰竭的 ROC 曲线的面积分别为 0.90 和 0.86 ($P < 0.001$, 与对角参考线相比)。

使用 SPSS 上的单变量普通线性模型程序，输入年龄作为协同变量，性别和 NYHA 分级作为因子，对心力衰竭患者中 N-末端 proBNP 水平进行 log 标准化分析，得到模型的 r^2 为 0.446($P < 0.001$)，以年龄、性别和 NYHA 分级作为显著征兆性变量(分别为 $P < 0.034$ 、0.002 和 0.001)。经鉴别这些因子均不是 UTN 的征兆性变量($r^2 = 0.058$)。因此，心力衰竭患者中的 UTN 水平增加而与年龄、性别或 NYHA 分级无关。

由图 1a 和 1b 中的图表进行比较可以看到，与单独测定 NT proBNP 相比，测定血浆 UTN 与测定血浆 NT proBNP 的组合可提供更多的有关心力衰竭诊断的信息。即，NT ProBNP 水平仅在发展到 NYHA 分级 3 级时开始增加，而血浆 UTN 水平在 NYHA 分级高于 1 级的患者中即增加。因此，测定这两种标记物可较早期地鉴定心脏疾病。

表 1. 患者特征。给出了中间值[范围]并使用 Kruskal-Wallis 或 Mann Whitney 测试计算 P 值(比较正常人和心力衰竭患者)。

	正常对照	心力衰竭患者	P 值
数量	220 (78 (35%) 女性)	126 (37 (29%) 女性)	对于性别 无意义
年龄 (岁)	61.3 [26-80.6]	63 [20-87]	ns
药物治疗	无		
利尿剂		98	
β阻滞剂		47	
ACE 抑制剂		99	
病因学			
缺血性心肌病		83	
扩张性心肌病		32	
高血压性心肌病		7	
瓣膜疾病		4	
NT proBNP 水平			
全部	21.4 [5.7-991.9]	657 [6-29368]	0.001
男性	12.5 [5.7-631.2]	464 [6-25182]	0.001
女性	47.7 [5.7-991.9]	3127 [104-29368]	0.001
UTN 水平			
全部	6.6 [3.1-42.6]	22.1 [3.1-49.2]	0.001
男性	7.2 [3.1-42.6]	22.4 [3.1-46.7]	0.001
女性	4.6 [3.1-17.4]	20.6 [3.1-49.2]	0.001

虽然该研究考虑了血浆中 UTN 和 NT-proBNP 的水平,人们也可考虑对其它来源的体液即全血、血清、组织液或尿液进行分析。另外,人们可预期将 BNP 而不是 NT-proBNP 结合血浆 UTN 进行监测,以得到相似的有关心脏疾病诊断的信息,因为 BNP 也随 NT-proBNP 在血浆中有表达。

讨论

该研究首次证明,在心力衰竭患者中血浆 UTN 水平非常显著地增加,同时结合有前述的 N-末端 proBNP 水平增加(Hunt 等人, *Clin Endocrinol* 1997; 47:287-296; Hughes 等人, *Clin Sci* 1999; 96:373-380)。因此,心力衰竭患者中 UTN 在人心肌中表达的增加(Douglas 等人, *Lancet* 2002; 359:1990-1997)在血浆中也有所反应。虽然血浆 N-末端 proBNP 随年龄和

女性性别增加，然而该年龄趋势在正常人群中对于 UTN 并不明显。这些年龄和性别在肽测定中的差异强调了将患者和正常对照按年龄和性别匹配的重要性，如本研究中所做到的。两种血浆肽的相关性与体外观察到的 UTN 增加心肌 BNP 表达的结果(Zou 等人, *FEBS Lett* 2001; 508:57-60)非常一致。与水平随 NYHA 分级增加的 N-末端 proBNP 不同，UTN 水平在 NYHA 1 级患者中就增加，对于更严重的疾病没有进一步的变化。这是否反应了清除率与疾病严重程度的差异仍有待研究。对于心力衰竭的检测，将 UTN 的 ROC 曲线下面积与 N-末端 proBNP 的 ROC 曲线下面积进行比较，表明了该肽在精确诊断心力衰竭中的用途。UTN 用于诊断心力衰竭的特别有用的特征是其不依赖于患者中例如年龄、性别和 NYHA 分级的因素。对照中的 N-末端 proBNP 受所有这些变量的影响非常显著。

目前血浆中 UTN 的来源是未知的，但是可能是起源于心血管，因为已经证明其在心肌细胞、内皮、脉管肌细胞和炎症细胞中的表达增加(Douglas 等人, *Lancet* 2002; 359:1990-1997)。结合该证据，我们的数据表明，在心力衰竭的病理生理学中可能涉及 UTN 系统。目前还不清楚活性增加是心室功能障碍的起因还是心室功能障碍的结果。

这种新的心血管肽在心力衰竭的病理生理学中有所涉及提出了一种在将来能使用适宜的受体激动剂或拮抗剂调节的荷尔蒙系统。其作为心力衰竭的诊断测试的用途可能是更直接的。

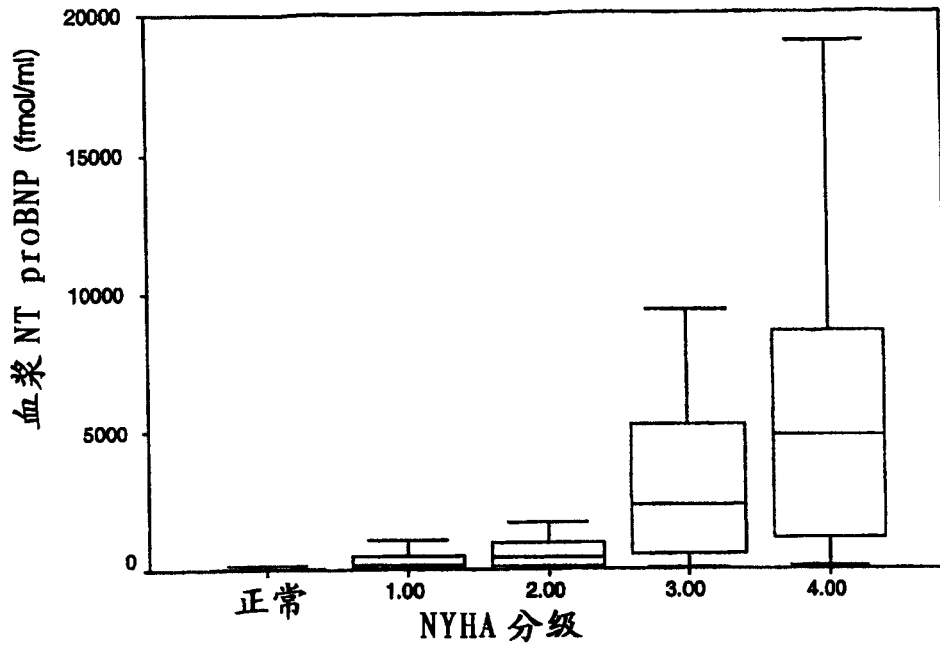


图 1a

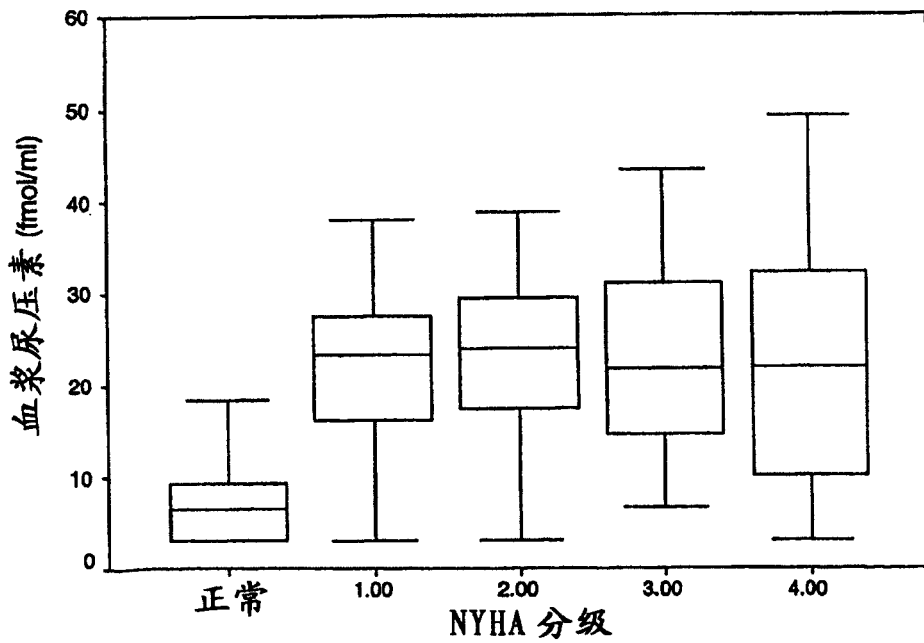


图 1b

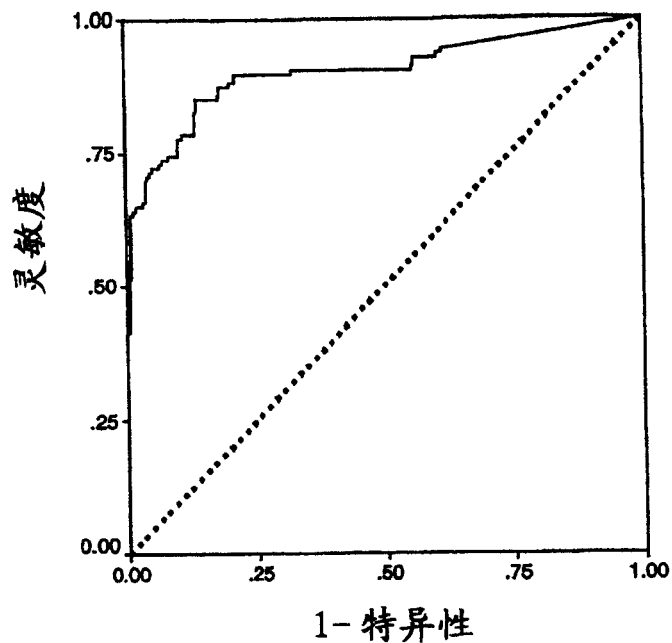


图 2a

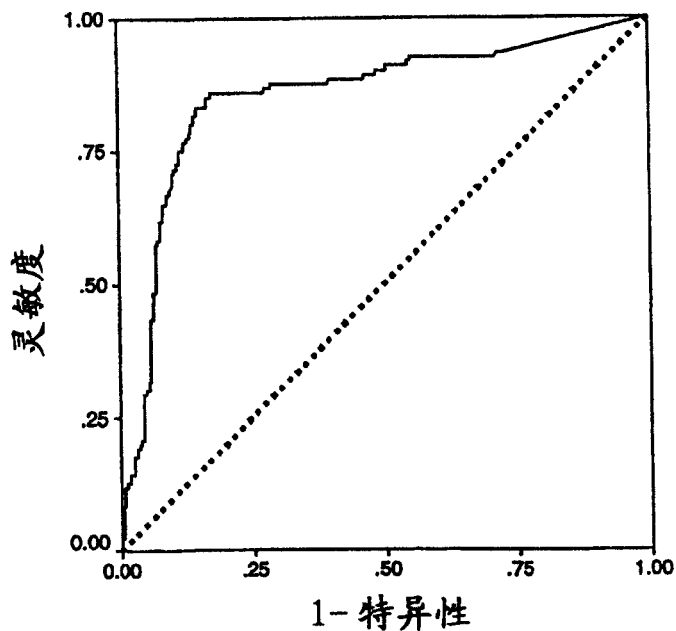


图 2b

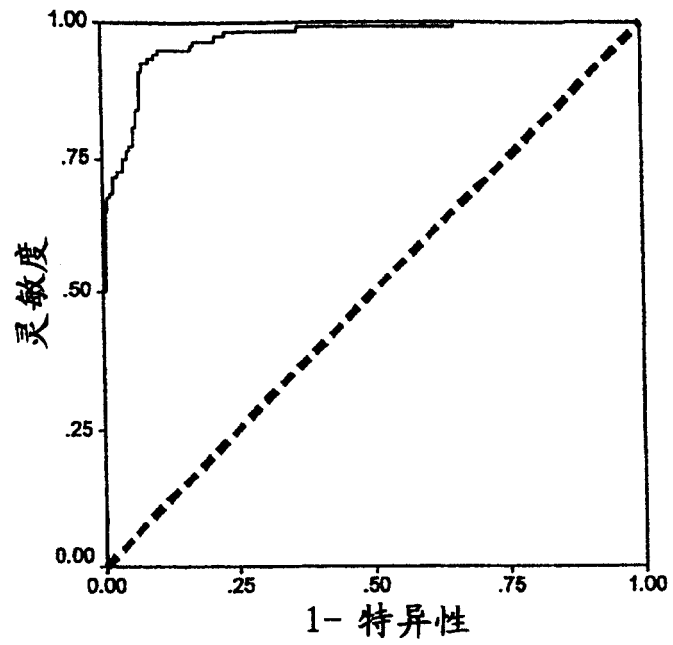


图 3

专利名称(译)	人心力衰竭中的血浆尿压素		
公开(公告)号	CN1678912A	公开(公告)日	2005-10-05
申请号	CN03819947.5	申请日	2003-07-11
[标]发明人	L·额		
发明人	L·额		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/26 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/6893 C07K16/26 G01N2333/5751		
优先权	2002016191 2002-07-11 GB 2002016500 2002-07-16 GB 2002016505 2002-07-17 GB		
其他公开文献	CN100582782C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了在哺乳动物个体中诊断心力衰竭的方法。测定来自个体的体液样品中尿压素的水平，并将其与在个体的所述体液中通常发现的指示不患有心力衰竭的参考水平进行比较。尿压素水平的增加指示心力衰竭。

