

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/74

G01N 33/573

G01N 33/68



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03821224.2

[43] 公开日 2005 年 10 月 12 日

[11] 公开号 CN 1682115A

[22] 申请日 2003.9.5 [21] 申请号 03821224.2

[30] 优先权

[32] 2002.9.6 [33] FI [31] 20021598

[86] 国际申请 PCT/FI2003/000653 2003.9.5

[87] 国际公布 WO2004/023148 英 2004.3.18

[85] 进入国家阶段日期 2005.3.7

[71] 申请人 拜奥希特公司

地址 芬兰赫尔辛基

[72] 发明人 奥斯莫·斯沃瓦尼米 马蒂·哈科南

彭蒂·赛波南

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 巫肖南 封新琴

权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 3 页

[54] 发明名称 在个体中检测酸相关性疾病危险性的方法

[57] 摘要

本发明针对在个体内检测胃酸相关性疾病的危险性的方法，该方法以测定分析物胃蛋白酶原 I、空腹胃泌素 -17 和幽门螺旋菌感染标志物 (Hp - 标志物) 为基础，该方法包含：选定胃蛋白酶原 I、空腹胃泌素 -17 和 Hp - 标志物的截止点值，测定来自该个体的样本中胃蛋白酶原 I、空腹胃泌素 -17 的浓度以及 Hp 标志物的浓度或存在，并且将所测定的浓度与选定的截止点值进行比较，其中胃蛋白酶原 I 值等于或高于其相应的截止点值，加之 Hp 标志物值低于其相应截止点值，再加上空腹胃泌素 -17 值等于或低于其截止点，显示所述个体中胃酸相关性疾病的危险性增高。

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

1. 检测个体中胃酸相关性疾病的危险性的方法，该方法以测定分析物胃蛋白酶原 I、空腹胃泌素-17 和幽门螺旋菌感染标志物(Hp-标志物)为基础，
- 5 该方法包含：
- 测定来自该个体的样本中胃蛋白酶原 I、空腹胃泌素-17 的浓度以及 Hp 标志物的浓度或存在，并且
 - 将所测定的值与每一分析物的选定截止点值进行比较，其中胃蛋白酶原 I 值等于或高于其相应的截止点值，加之 Hp 标志物值低于其相应截止点
 - 10 值，再加上空腹胃泌素-17 值等于或低于其相应截止点，显示所述个体中胃酸相关性疾病的危险性增高。
2. 根据权利要求 1 的方法，其中幽门螺旋菌标志物是幽门螺旋菌抗体，其浓度从该样本中加以测量。
3. 根据权利要求 1 的方法，其中幽门螺旋菌标志物是幽门螺旋菌抗原，
- 15 其存在从该样本中加以测定。
4. 根据前述任一权利要求的方法，还包括测量受刺激的胃泌素-17 值 (G-17 刺激)。
5. 根据前述任一权利要求的方法，还包括测量分析物胃蛋白酶原 II(PGII)的浓度，并得到 PGI/PGII 比值用于比较。
- 20 6. 根据权利要求 2 的方法，其中测量来自体液，例如血清、血浆、全血、尿、唾液或泪液样本，特别是血清样本的分析物。
7. 根据前述任一权利要求的方法，其中胃酸相关性疾病是反流性疾病或巴雷特氏食道。

在个体中检测酸相关性疾病危险性的方法

5 技术领域

本发明针对在个体内检测胃酸相关性疾病危险性的方法，特别的，针对检测具有腺癌相关危险性的胃食道反流性疾病和巴雷特氏食道的危险性的方法。本方法也可被使用以测定个体发生溃疡的危险性，该溃疡是 NSAID (非类固醇抗炎药物)使用的结果，以及在幽门螺旋菌根除治疗后发生食道疾病10 的危险性。根据本发明的方法基于测定来自该个体的样本，特别是血清样本的被分析物胃蛋白酶原 I、幽门螺旋菌标志物和空腹胃泌素-17。

背景技术

反流性疾病是可由胃内容物上升、反流入食道而导致的一种病症。特15 别的，当所述反流现象在食道粘液中引起损害或炎症，例如食道炎时，使用术语“反流性疾病”。反流性疾病的典型症状是烧心。

大范围反流性疾病的并发症是一种称为巴雷特氏食道的疾病(Barrett's esophagus)，是一种涉及食道中各种程度的上皮改变的疾病。一般认为反流20 破坏食道上皮，所引起的病症继而参与食道腺癌的危险性增高。

具有健康，即非萎缩性，粘膜的一个个体的胃是酸性的，通常在 pH 大约 1-2。然而胃中的酸分泌依赖于胃泌素-17 的释放，因为胃泌素-17 刺激酸25 释放，并且胃酸度增加在反馈机制和控制中导致从腔 G 细胞(胃泌素细胞)中胃泌素-17 的释放减少。该胃泌素 17 特别指获自基础或空腹状态下的胃泌素-17，因为由于食物对胃酸度的中和效应，刺激后，例如摄入富含蛋白餐后，测量的胃泌素-17 上升。

出版物 WO96/15456，该出版物在此引入作为参考，披露了通过测定来自个体的血清样本的分析物胃蛋白酶原 I 和胃泌素-17 的浓度筛选癌症危险30 性的方法。根据该出版物，将所测定的浓度值与针对每一分析物的选定的截止点值和参考值进行比较，所获得的结果可被用于评价胃萎缩的存在和位置以及癌症的相关危险性。

根据所披露的一个实施方式，所述测试可与对幽门螺旋菌抗体的测试

以及所谓的蛋白刺激测试结合, 根据该蛋白刺激测试在空腹后于早晨取血样本, 然后病人吃富含蛋白质的标准餐, 并且在2小时内以15分钟的间隔取血样本。在大约20分钟后清楚见到胃泌素-17的最大升高。

5 幽门螺旋菌是一种螺旋形的、革兰氏阴性细菌, 在紧邻的胃粘膜上皮细胞表面的粘液中和在细胞间隙中旺盛生长。细菌很明显是经口从一个人到另一个人传播的。细菌对胃粘膜的影响是炎症反应, 是通过释放强的炎症介质物质而由补体所介导的。急性期后, 炎症转化成慢性胃炎。在患慢性胃炎的病人中, 70-90%证实有幽门螺旋菌感染(Calam, J (1994) *Helicobacter pylori* (Review) *Eur. J. Clin Invest* 24: 501-510)。

10 WO出版物WO00/67035, 该出版物在此引入作为参考, 披露了通过定量测定血清胃蛋白酶原I和血清胃泌素-17的浓度, 并且将所获得的值与选定的截止点和参考值进行比较来评估消化性溃疡危险性的方法。这样所得到的结果使得评价可能增高了的消化性溃疡的危险性成为可能。

15 测量各种分析物的浓度的方法在本领域是已知的, 并且为此目的也有商业上可得到的试剂盒。实现该测定的有些示范性方法也在WO出版物WO96/15456中加以描述。

发明概述

20 根据本发明, 现已发现有可能在个体中通过测定分析物胃蛋白酶原I、幽门螺旋菌感染标志物和胃泌素-17, 来检测胃酸相关性疾病, 其中胃泌素-17特别的是获自空腹状态下的胃泌素-17。如果是基于胃蛋白酶原I和幽门螺旋菌标志物, 可以确定所述个体的胃粘膜是非萎缩性和非胃炎性的(无幽门螺旋菌感染), 即: 胃蛋白酶原I值高于截止点值显示健康的体粘膜, 并且个体没有幽门螺旋菌感染, 例如确立低幽门螺旋菌抗体效价后, 低空腹胃泌素-17值提示胃过酸, 并且个体发生例如上面所提到的酸相关疾病的危险性增高。

25 在导致本发明的工作中, 可以证实血清中低空腹胃泌素-17(G-17空腹)水平($<1\text{pmol/l}$)显示胃高酸度(酸输出持续较高), 胃内 H^+ 浓度抑制了胃泌素-17从胃内体胃泌素细胞中的释放。胃泌素-17的血清水平在胃粘膜正常和健康的个体中是胃酸性的间接标志物, 即: 无幽门螺旋菌抗体, 并且血清胃蛋白酶原I正常。

已经用实验证实,血清中低空腹胃泌素-17显示酸相关疾病的危险性增高至少2倍,在酸相关疾病中可以提到例如胃食道反流性疾病(包括那些带有贲门溃疡和息肉的胃食道反流性疾病)、巴雷特氏食道、与幽门螺旋菌感染无关的十二指肠溃疡病,和幽门螺旋菌感染根除后发生的胃食道反流性疾病。

特别的,本发明针对在个体内检测胃酸相关性疾病的危险性的方法,该方法以测定分析物胃蛋白酶原 I、空腹胃泌素-17和幽门螺旋菌感染标志物(Hp-标志物)为基础,该方法包含:

-测定来自该个体的样本中胃蛋白酶原 I、空腹胃泌素-17的浓度以及 Hp 标志物的浓度或存在,并且

-将所测定的值与每一分析物的选定截止点值进行比较,其中胃蛋白酶原 I 值等于或高于其相应的截止点值,加之 Hp 标志物值低于其相应截止点值,再加上空腹胃泌素-17值等于或低于其相应截止点,显示所述个体中胃酸相关性疾病的危险性增高。

因此本发明提供一种方法,使得鉴定一种个体成为可能,该个体具有发生酸相关疾病的增高的危险性,例如上面所示例的那些酸相关疾病,以及相关腺癌危险性。

所详细说明的方法可因而被用来作为对个体中来自样本,例如血液、血清或血浆样本的胃酸度的间接测试。

发明详述

根据本发明,将一分析物的所测量值与截止点值进行比较的过程,其目的是为了证实分析物的所测量值是否大于、等于、还是小于相应的截止点值。

在本发明的上下文中,个体或受检者指哺乳动物,如人,或动物,如宠物,例如狗。

本发明因而在第一步包括一种方法,用来至少测定来自将要被测试的个体的样本中幽门螺旋菌标志物、胃蛋白酶原 I(PGI)和空腹胃泌素-17。

根据本发明的幽门螺旋菌感染的标志物或指示物可以,例如是幽门螺旋菌抗体,其数值可以从体液样本中加以测定。这样的样本有利地是血清样本,但也可以是唾液、尿、泪液样本,例如能得到的用来测量抗体值的

商用试剂盒。幽门螺旋菌抗体的截止点值可由本领域技术人员很容易地加以测定。在本发明的一个实施方式中，我们使用了 30 EIU 的值，作为指示幽门螺旋菌感染存在或不存在的截止点(cut-off)。针对幽门螺旋菌的特异性抗体也可用蛋白质印迹进行测量。

- 5 另一可选择途径是通过测定抗原自身的存在评价幽门螺旋菌感染的存在。这样的测量法可例如在来自患者的大便样本上完成，并且，针对这一目的的测定法，例如酶免疫测定，是商业上可得到的(参照例如 Lancet 1999; 354,30-33)。也有可能使用已熟知的测量二氧化碳含量的方法，测定来自患者呼吸中抗原的存在，来自被标记的尿素的二氧化碳的形成受幽门螺旋菌
- 10 细菌催化，并且为这一测定所提供的系统也是商业上可得到的(例如 Noster AB, 瑞典所生产的 Heliprobe™)。另一可选择途径是从在患者胃进行内窥镜过程中取下的活组织检查样本中测定抗原存在或不存在。在这一可选择途径中，试验对抗原来说或者阳性或者阴性，并且抗原的存在被理解为指示
- 15 幽门螺旋菌感染。在本发明的上下文中，当 Hp-标志物是抗原本身时，试验是阳性或阴性，并且感染的截止点—感染的截止点是阳性和阴性之间的交界值—可因此被认为是零，阳性试验指示抗原存在，并且因而指示异常状态，而阴性试验是低于这一标志物的截止点的值。

胃蛋白酶原和胃泌素优选从体液样本加以测定，特别是从血清、血浆或全血样本，或从尿、唾液、或泪液样本。

- 20 所述方法包括测量胃蛋白酶原 I 分析物，但根据本发明的一个实施方式，也有可能另外还测量胃蛋白酶原 II 分析物(PGII)的浓度，并且使用 PGI 与 PGII 的比值而不是 PGI，或者另外作为将要与预先测定的截止点值比较的值。胃蛋白酶原 I 以及胃蛋白酶原 I 与 II 的比值倾向于随着体粘膜萎缩的加剧而线性降低。

- 25 在根据本发明的方法中，使用胃蛋白酶原 I 的截止点值，该值是区分正常和萎缩行体粘膜的正常截止点值。根据本发明的一个实施方式，该实施方式已给出可靠结果，所使用的血清或血浆胃蛋白酶原 I 的截止点值为 $\geq 50\mu\text{g/l}$ 。这一数值比经常使用的 $25\mu\text{g/l}$ 的截止点稍微高一些，可以使用它以
- 30 以保证所检验的个体确实具有非萎缩性的粘膜。血清或血浆胃蛋白酶原 I 的上参考限在大约 $130\mu\text{g/l}$ ，由此在上限附近或超过上限的值可被用来证实疾病的危险性增高。然而，本领域技术人员可轻易地选择将要被用于特定

状态和所要测试的特定人群的截止点值。

同样地，对于胃泌素而言，可以确定一截止点值，并且根据本发明测定空腹胃泌素-17。根据本发明的一个实施方式，发现空腹胃泌素-17 以 $\leq 1\text{pmol/l}$ 为截止点值适于大多数用途。这样一个数值也被证明可有效区分具有发生酸相关疾病的危险性的个体和不具有危险性的个体，酸相关疾病如上面所定义。

在涉及测定分析物浓度的检验中，截止点值(cut-off value)的概念对本领域技术人员是熟知的。截止点值通常意味着一个数值或一组数值，其被选择以作为对所研究的测试来说在参考值(正常值)和异常值之间的界限。这样的截止点值是方法特异性的，依赖于为用来测定分析物浓度的测试方法所选择的特异性和敏感性，参见例如 William J. Marshall, *Clinical Chemistry*, 第3版, 1995, Mosby。

如先前所提到的，测量胃蛋白酶原 I，任选胃蛋白酶原 II 和胃泌素-17 的方法在本领域是熟知的。测量通常为免疫方法，使用针对该被分析物的单或多克隆抗体。

所用的检测方法包括，例如，测量吸收度、荧光或发光。也可能同时完成所有三种被分析物的测量，例如在同一微孔板上的不同孔中或在其上的同一孔中，这提供了一种特别方便的方法。

如先前所提到的，也有商用试剂盒，可用来测量各种分析物浓度，例如 GastroPanel (Biohit Oyj, 赫尔辛基, 芬兰)，用来从血液样本中测量胃蛋白酶原 I、胃泌素-17 和幽门螺旋菌抗体。所测量的数据可随后例如用软件加以评估，例如 GastroSoft®软件，其基于获自分析物浓度的结果草拟出诊断，并给出进一步治疗的建议。

25 附图说明

图 1: 显示具有正常胃部的巴雷特氏阴性和巴雷特氏阳性患者的空腹胃泌素-17 水平。从结果可以看出，在巴雷特氏阳性患者中，55% 的空腹胃泌素-17 值等于或低于 1pmol/l ，而只有 23% 的巴雷特氏阴性患者具有如此低的胃泌素-17 值。其区别在统计上是显著的。因而空腹胃泌素-17 是一个标志物，在有正常胃的个体组中，将具有发生酸相关疾病的危险性的个体与不具有危险性的个体区别开。

图 2: 显示具有正常胃的巴雷特氏阴性和巴雷特氏阳性患者的空腹胃泌素-17 水平。

图 3: 餐后胃泌素-17(受刺激的胃泌素-17)的相应水平。很明显, 空腹胃泌素-17 在巴雷特氏阴性和巴雷特氏阳性患者之间导致统计学上的显著区别, 然而餐后胃泌素-17 却不是这样。

实验测试

图 1-3 所显示的结果基于下列测试。

测试材料由 300 名患胃消化不良、进行过内窥镜检查的病人组成。他们被有目的地加以搜集, 患者被分成两组。病例组由 15 名患者组成, 他们在组织学上和用内窥镜证实具有典型的长段巴雷特氏。在这些当中, 11 人具有正常和健康的胃粘膜, 正常和健康的胃粘膜的定义是没有幽门螺旋菌胃炎(幽门螺旋菌 IgG 抗体效价 <30 EIU), 并且胃蛋白酶原 I 血清水平正常($\geq 50\mu\text{g/l}$)。他们还在胃腔和胃体的内窥镜活组织检查中具有正常胃组织学。对照(126 名患者)由不具有巴雷特氏食道和幽门螺旋菌抗体的患者组成, 并具有正常血清胃蛋白酶原 I。将这两组(病例和对照)进行比较。

酰胺化胃泌素-17 的空腹水平的平均值(G-17 空腹)在患者中比在对照中显著 ($P=0.045$, Mann-Whitney U 检验) 降低 ($4.0\pm 6.1\text{pmol/l}$ 与 $2.0\pm 3.0\text{pmol/l}$)。另一方面, 餐后 G-17 水平(G-17 餐后)在病例和对照中没有区别。相反, G-17 餐后在巴雷特氏患者中比在对照中稍高($15.7\pm 18.2\text{pmol/l}$ 与 13.4 ± 18.2)。

当将 1pmol/l 设作截止点界限时, 11 个巴雷特氏患者中有 6 个(55%)的 G-17 空腹水平低于这一截止点, 而这一流行率在对照中是 126 个中有 29 个(23%)($P<0.05$, X^2 检验)。

此外, 还有 5 个具健康、正常胃粘膜、但发生十二指肠溃疡(DU)的患者(这些患者中溃疡的病因学是使用 NSAID 或阿司匹林, 此外还有正常或高酸输出)。这 5 个 DU 病人中 G-17 空腹的血清水平极低($0.458\pm 0.431\text{pmol/l}$); 即, 显著低于适当的非 DU、非巴雷特氏对照的值。

具有正常胃和具有HpAb<30EIU和S-PGI ≥ 50 μg/l的巴雷特氏阴性病人中乙酰化的胃泌素17的空腹血清水平

直方图 (低数值)

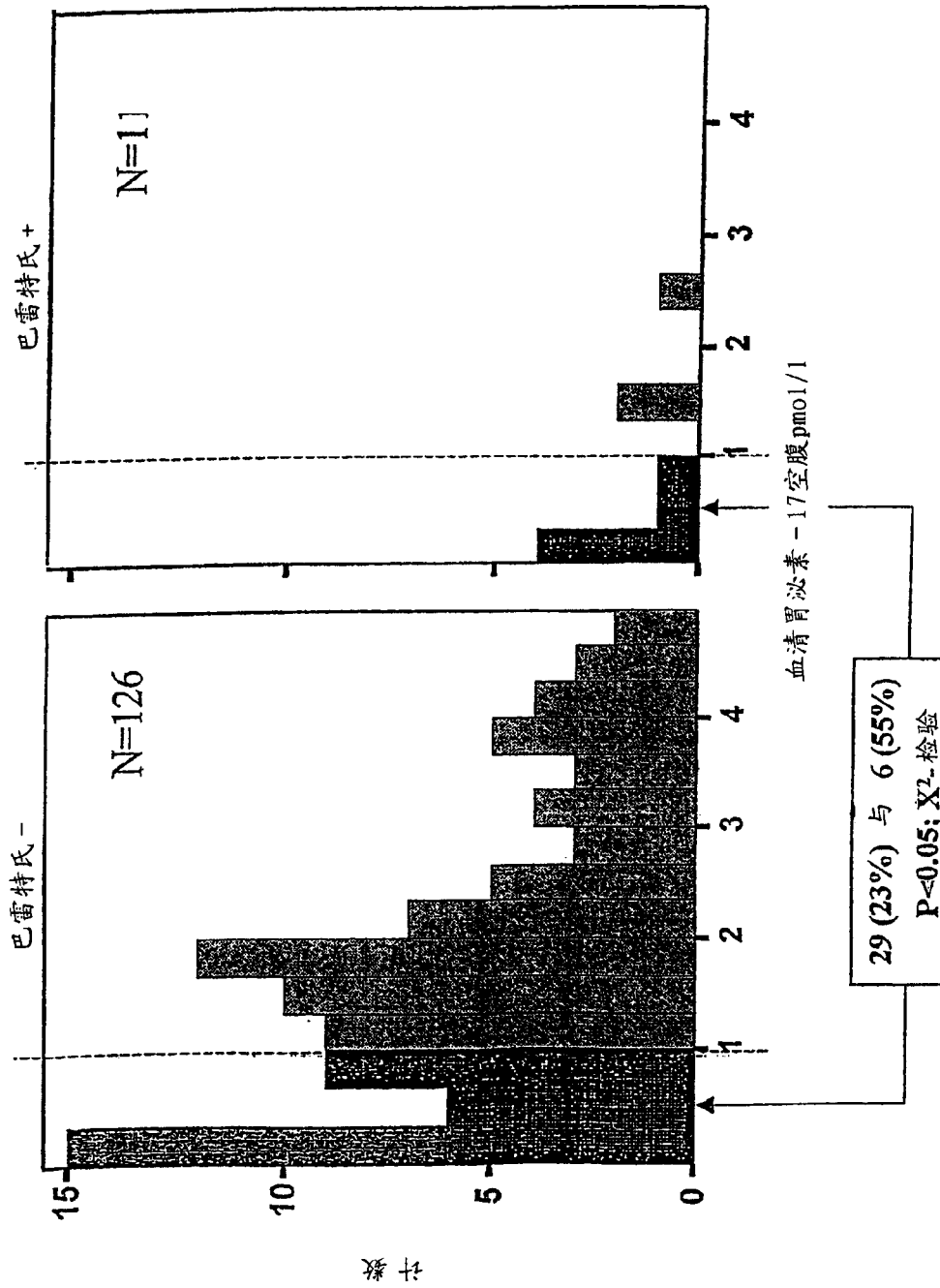


图 1

具有正常胃和具有HpAb<30EIU和S-PGI ≥ 50 μg/l的巴雷特氏
病人中酰胺化的胃泌素17的空腹血清水平

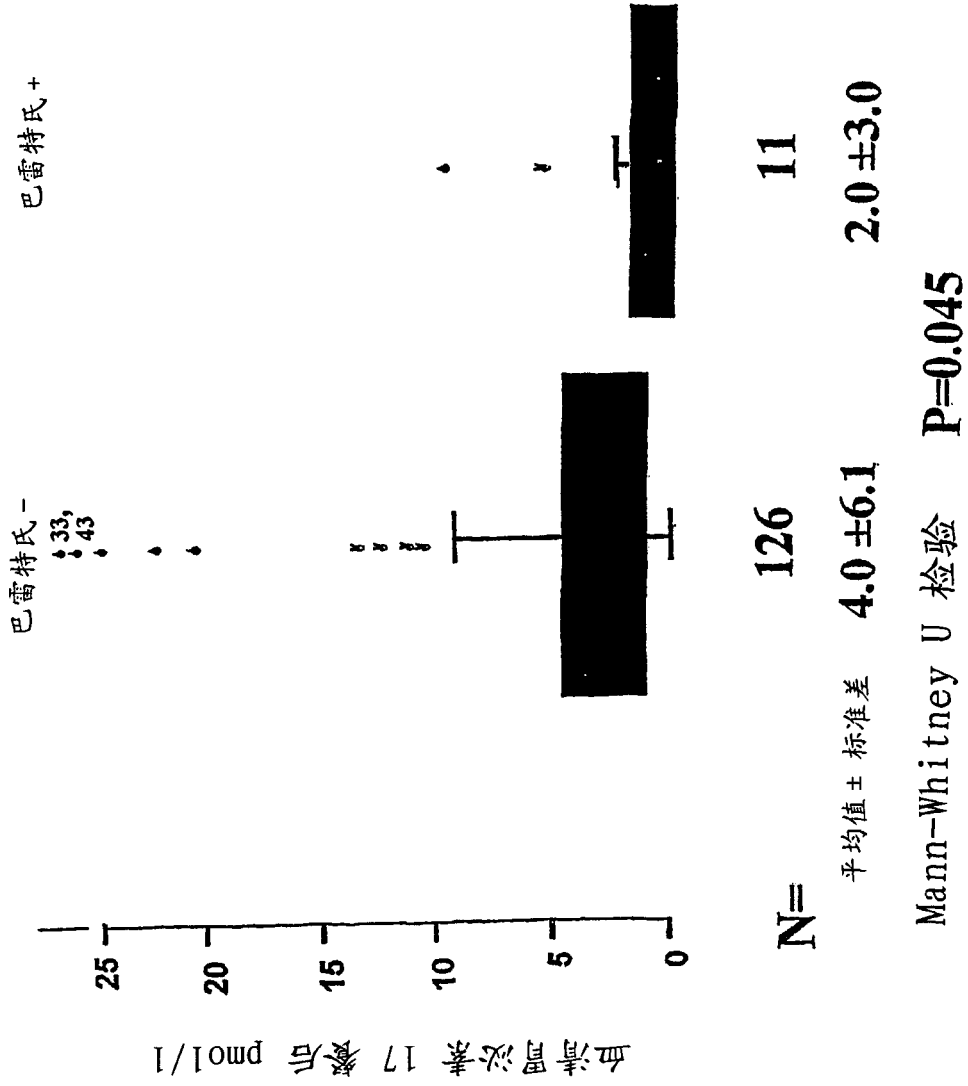
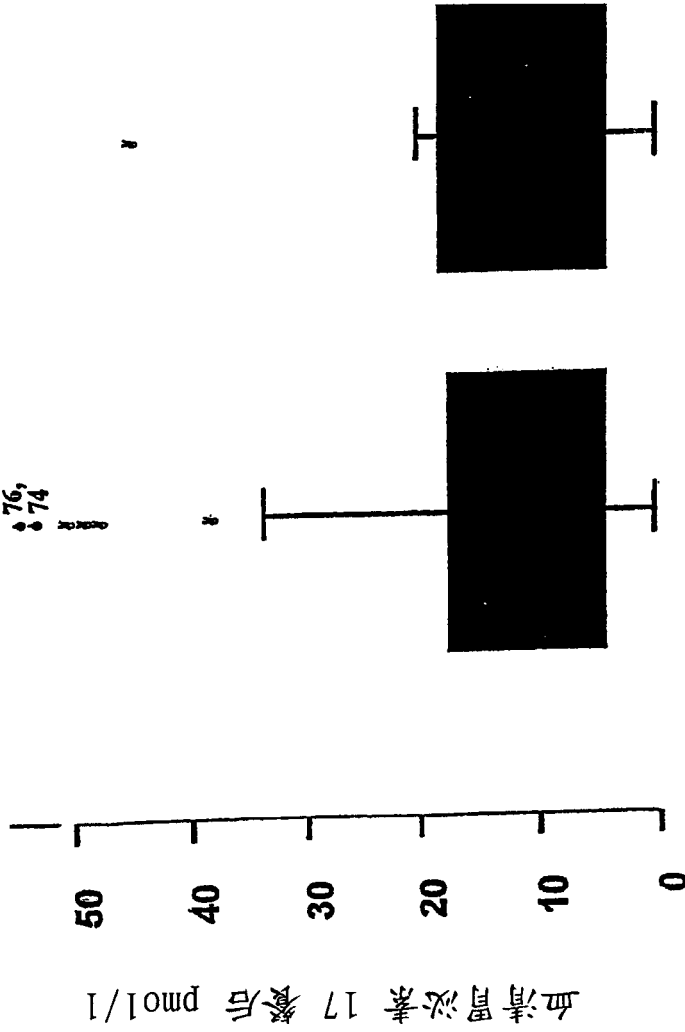


图 2

具有正常胃和具有HpAb<30EIU和S-PGI ≥ 50 μg/l的巴雷特氏病人中酰胺化的胃泌素17餐后血清水平

巴雷特氏- 巴雷特氏+



N=

平均值 ± 标准差

13.4 ± 18.2 15.7 ± 18.2

Mann-Whitney U 检验 P=0.828

图 3

专利名称(译)	在个体中检测酸相关性疾病危险性的方法		
公开(公告)号	CN1682115A	公开(公告)日	2005-10-12
申请号	CN03821224.2	申请日	2003-09-05
[标]申请(专利权)人(译)	拜奥希特公司		
申请(专利权)人(译)	拜奥希特公司		
当前申请(专利权)人(译)	拜奥希特公司		
[标]发明人	奥斯莫斯沃瓦尼米 马蒂哈科南 彭蒂赛波南		
发明人	奥斯莫·斯沃瓦尼米 马蒂·哈科南 彭蒂·赛波南		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/569 G01N33/573 G01N33/74 G01N33/68		
CPC分类号	G01N2333/205 G01N33/573 G01N33/56922 G01N2333/595		
优先权	2002001598 2002-09-06 FI		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明针对在个体内检测胃酸相关性疾病的危险性的方法，该方法以测定分析物胃蛋白酶原I、空腹胃泌素 - 17和幽门螺旋菌感染标志物(Hp - 标志物)为基础，该方法包含：选定胃蛋白酶原I、空腹胃泌素 - 17和Hp - 标志物的截止点值，测定来自该个体的样本中胃蛋白酶原I、空腹胃泌素 - 17和Hp标志物的浓度或存在，并且将所测定的浓度与选定的截止点值进行比较，其中胃蛋白酶原I值等于或高于其相应的截止点值，加之Hp标志物值低于其相应截止点值，再加上空腹胃泌素 - 17值等于或低于其截止点，显示所述个体中胃酸相关性疾病的危险性增高。

