

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680016527.7

[51] Int. Cl.

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/541 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/00 (2006.01)

[43] 公开日 2008年5月28日

[11] 公开号 CN 101189518A

[22] 申请日 2006.5.11

[21] 申请号 200680016527.7

[30] 优先权

[32] 2005.5.13 [33] US [31] 60/680,868

[86] 国际申请 PCT/US2006/018281 2006.5.11

[87] 国际公布 WO2006/124526 英 2006.11.23

[85] 进入国家阶段日期 2007.11.13

[71] 申请人 马里兰巴尔的摩大学

地址 美国马里兰州

[72] 发明人 A·法撒诺

[74] 专利代理机构 北京泛华伟业知识产权代理有限公司

代理人 曹津燕 郭广迅

权利要求书4页 说明书9页 附图17页

[54] 发明名称

评价治疗方案有效性的方法

[57] 摘要

本发明提供用于评价治疗功效的材料和方法。在某些实施方案中，本发明提供一种通过测定接受治疗的受试者的血清 zonulin 水平来评价乳糜泻治疗的功效的方法。

1. 一种评价对受试者病症的治疗的有效性的方法,所述受试者需要所述治疗,所述方法包括:

从所述受试者获取样品; 以及
测定所述样品中的 zonulin 浓度。

2. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中所述样品为血液样品。

3. 根据权利要求 2 所述的方法, 进一步包括:

从所述样品中分离血清; 以及
测定所述血清中的 zonulin 浓度。

4. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中所述病症与上皮通透性的升高有关。

5. 根据权利要求 4 所述的方法, 其中所述上皮活性的升高与紧密连接的通透性的升高有关。

6. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中所述病症为与升高的血清 zonulin 水平相关的自身免疫性疾病。

7. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中所述病症为乳糜泻。

8. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中所述病症为与乳糜泻相关的疾病。

9. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中所述与乳糜泻相关的疾病选自: 周围神经病、小脑共济失调、癫痫、偏头痛、1 型糖尿病、自身免疫性甲状腺障碍、阿狄森氏病、斑秃、先天性扩张性心脏病、自身免疫性心肌炎、原发性胆汁性肝硬化、自身免疫性肝炎、自身免疫性胆管炎、少关节型关节炎、幼年关节炎、系统性红斑狼疮、史格兰氏综合征、贫血、骨质疏松症、骨质减少、特纳氏综合征、唐氏综合征、牙齿釉质缺损、肉状瘤病、乳糖不耐受、疱疹样皮炎、原因不明性不孕、流产以及复发性急性胰腺炎。

10. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中所述测定 zonulin 浓度包括:

在结合条件下, 将所述样品与结合 zonulin 的第一抗体相接触;

在结合条件下, 将所述结合的样品与结合 zonulin 的第二抗体相接触;

以及

检测所述结合的第二抗体的存在。

11. 根据权利要求 10 所述的方法，其中制备至少一种抗包含闭合小带毒素片段的蛋白质的抗体。

12. 根据权利要求 10 所述的方法，其中制备抗包含闭合小带毒素片段的蛋白质的第一抗体。

13. 根据权利要求 10 所述的方法，其中制备抗包含闭合小带毒素的 ΔG 片段的蛋白质的第一抗体。

14. 根据权利要求 13 所述的方法，其中所述 ΔG 片段包含 N 末端六个组氨酸标记。

15. 根据权利要求 10 所述的方法，其中制备至少一种抗包含闭合小带毒素的蛋白质的抗体。

16. 根据权利要求 10 所述的方法，其中制备包含闭合小带毒素的蛋白质的第二抗体。

17. 根据权利要求 16 所述的方法，其中所述第二抗体包含可检测的部分。

18. 根据权利要求 17 所述的方法，其中所述可检测的部分为生物素。

19. 一种评价对乳糜泻治疗的功效的方法，包括：

从受试者中取得样品；以及

测定所述样品中的 zonulin 浓度。

20. 根据权利要求 19 所述的方法，其中所述样品为血液样品。

21. 根据权利要求 19 所述的方法，进一步包括：

从所述样品中分离血清；以及

测定在所述血清中的 zonulin 浓度。

22. 根据权利要求 21 所述的方法，其中所述测定 zonulin 浓度包括：

在结合条件下，将所述样品与结合 zonulin 的第一抗体相接触；

在结合条件下，将所述结合的样品与结合 zonulin 的第二抗体相接触；

以及

检测所述结合的第二抗体的存在。

23. 根据权利要求 22 所述的方法，其中制备至少一种抗包含闭合小带毒素片段的蛋白质的抗体。

24. 根据权利要求 23 所述的方法，其中制备抗包含闭合小带毒素片段的蛋白质的第一抗体。

25. 根据权利要求 22 所述的方法，其中制备抗包含闭合小带毒素的

△G 片段的蛋白质的第一抗体。

26. 根据权利要求 25 所述的方法，其中所述△G 片段包含 N 末端六个组氨酸标记。

27. 根据权利要求 22 所述的方法，其中制备至少一种抗包含闭合小带毒素的蛋白质的抗体。

28. 根据权利要求 22 所述的方法，其中制备抗包含闭合小带毒素的蛋白质的第二抗体。

29. 根据权利要求 28 所述的方法，其中所述第二抗体包含可检测的部分。

30. 根据权利要求 29 所述的方法，其中所述可检测的部分为生物素。

31. 一种用于评估治疗功效的试剂盒，包括：用于检测 zonulin 的工具。

32. 根据权利要求 31 所述的试剂盒，其中所述用于检测 zonulin 的工具包括：

包含第一抗体的容器和包含第二抗体的容器。

33. 根据权利要求 31 所述的试剂盒，进一步包括包含闭合小带毒素的△G 片段的容器。

34. 根据权利要求 31 所述的试剂盒，其中制备至少一种抗包含闭合小带毒素片段的蛋白质的抗体。

35. 根据权利要求 31 所述的试剂盒，其中制备抗包含闭合小带毒素片段的蛋白质的第一抗体。

36. 根据权利要求 31 所述的试剂盒，其中制备抗包含闭合小带毒素的△G 片段的蛋白质的第一抗体。

37. 根据权利要求 36 所述的试剂盒，其中所述△G 片段包含 N 末端六个组氨酸标记。

38. 根据权利要求 31 所述的试剂盒，其中制备至少一种抗包含闭合小带毒素的蛋白质的抗体。

39. 根据权利要求 31 所述的试剂盒，其中制备抗包含闭合小带毒素的蛋白质的第二抗体。

40. 根据权利要求 39 所述的试剂盒，其中所述第二抗体包含可检测的部分。

41. 根据权利要求 40 所述的试剂盒，其中所述可检测的部分为生物

素。

42. 根据权利要求 31 所述的试剂盒, 进一步包括包含 zonulin 的容器。

43. 一种用于评价乳糜泻治疗功效的试剂盒, 包括: 用于检测 zonulin 的工具。

44. 根据权利要求 43 所述的试剂盒, 其中所述用于检测 zonulin 的工具包括:

包含第一抗体的容器和包含第二抗体的容器。

45. 根据权利要求 43 所述的试剂盒, 进一步包括包含闭合小带毒素的 ΔG 片段的容器。

46. 根据权利要求 43 所述的试剂盒, 其中制备至少一种抗包含闭合小带毒素片段的蛋白质的抗体。

47. 根据权利要求 43 所述的试剂盒, 其中制备抗包含闭合小带毒素片段的蛋白质的第一抗体。

48. 根据权利要求 43 所述的试剂盒, 其中制备抗包含闭合小带毒素的 ΔG 片段的蛋白质的第一抗体。

49. 根据权利要求 48 所述的试剂盒, 其中所述 ΔG 片段包含 N 末端的六个组氨酸标记。

50. 根据权利要求 43 所述的试剂盒, 其中制备至少一种抗包含闭合小带毒素的蛋白质的抗体。

51. 根据权利要求 43 所述的试剂盒, 其中制备抗包含闭合小带毒素的蛋白质的第二抗体。

52. 根据权利要求 51 所述的试剂盒, 其中所述第二抗体包含可检测的部分。

53. 根据权利要求 52 所述的试剂盒, 其中所述可检测的部分为生物素。

54. 根据权利要求 43 所述的试剂盒, 进一步包括包含 zonulin 的容器。

评价治疗方案有效性的方法

本申请要求 2005 年 5 月 13 日申请的申请号为 No. 60/680,868 的美国临时专利申请的优先权，本申请特意地引入其内容作为参考。

发明领域

本发明涉及诊断和对治疗方式评价的领域。

发明背景

哺乳动物的上皮包含被称为闭合小带 (zonula occludens, ZO) 的结构，闭合小带也被称为紧密连接 (TJs)。这些结构通过控制通向上皮细胞之间的空间的通路 (细胞旁途径) 来调节穿过上皮的物质通道。为了应付上皮所经受的多种不同的生理和病理刺激，紧密连接或闭合小带必须能够作出快速的、生理性的、可逆的、瞬时的、能量依赖性的、协调的反应，而这需要复杂的调控系统的参与。包含紧密连接的上皮的例子包括，但不限于肠 (特别是小肠) 和血脑屏障。

当没有刺激时，紧密连接被关闭从而限制细胞旁途径的通行。而当存在刺激时，紧密连接被可逆地打开。在美国专利 Nos. 5,945,510 和 5,948,629 中，具有哺乳动物紧密连接的生理调节元件功能的新型哺乳动物蛋白质已经被鉴定和纯化。这些被称作“zonulin”的哺乳动物蛋白质具有哺乳动物紧密连接的生理效应器的功能。某些细菌已经表现出其含有刺激紧密连接打开的毒素。霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*) 产生已知的导致紧密连接打开的毒素 (闭合小带毒素, ZOT)。据显示，6 组氨酸- ΔG 保留了打开紧密连接的能力，所述 6 组氨酸- ΔG 是指 ZOT 的 N 末端的删除部分，其中前 264 个氨基酸已经被删除并且被六个组氨酸纯化标记替换。

在自身免疫性疾病中，以及在包括食物过敏、肠道感染、例如乳糜泻的吸收障碍综合征和炎性肠道疾病的影响胃肠道的多种临床病症中会出现肠紧密连接功能障碍。具有完好的紧密连接的健康且成熟的肠粘膜成为大分子通过的主要障碍。在健康状态下，少量的免疫活性蛋白质会穿过肠

宿主 (host) 屏障。当早熟或在暴露于辐射、化疗和/或毒素之后, 紧密连接系统的完整性遭到损害, 会产生针对环境中的抗原 (包括自身免疫疾病及食物过敏) 的有害反应。

乳糜泻 (CD) 是一种由谷蛋白 (gluten) (一种存在于小麦、黑麦和大麦中的蛋白质) 吸收导致的肠紧密连接的通透性异常升高的病症。众所周知, 乳糜泻还与其它自身免疫性疾病 (AD) 有关。然而, 仍不清楚与 CD 相关的其它 AD 风险是否与正在进行的谷蛋白吸收有关, 或是仅取决于通常的遗传因素。目前, 用于乳糜泻的唯一治疗手段是不含谷蛋白的饮食 (GFD)。

为了评估治疗与异常上皮通透性相关的疾病的治疗剂的功效, 使用随疾病进程而变化的标记将是很有用的。用于调节肠通透性的 zonulin 在 CD 以及例如 1 型糖尿病的其它 AD 中被上调。本发明证明了 zonulin 能够作为评价治疗与异常上皮通透性相关疾病的治疗剂的功效的标记。

发明概述

本发明提供了用于评价治疗有效性的材料及方法。因此, 在一个实施方案中, 本发明提供了一种评价治疗有效性的方法, 所述有效性是指治疗需要治疗的受试者的病症的有效性。典型地, 该方法包括从受试者获得样品以及测定样品中的 zonulin 浓度。样品可以是本领域技术人员已知的任何类型。在一个实施方案中, 样品可以是血液样品。样品可以通过本领域技术人员熟知的方法进行处理。在一个实施方案中, 本发明的方法可以包括从样品中分离血清以及测定血清中的 zonulin 浓度。

本发明可以被用于评价许多种病症的治疗。典型地, 本发明可以被用于评价以异常的紧密连接通透性为特征的病症的治疗。因此, 本发明可以被用于评价对与上皮通透性升高相关的病症进行治疗的有效性。可以被评价的病症的治疗包括, 但不限于对自身免疫性疾病的治疗、对乳糜泻的治疗以及对乳糜泻相关的疾病的治疗。

在一个实施方案中, 本发明的方法可以包括通过采用一种或多种抗体的方法, 例如 ELISAs 来测定样品中 zonulin 的浓度。在一个实施方案中, 本发明的方法可以包括在结合条件下, 将结合 zonulin 的第一抗体与样品相接触, 在结合条件下, 将结合 zonulin 的第二抗体与结合的样品相接触; 以及检测存在的结合的第二抗体。在上述方法中, 第一抗体可以被固定于

固体支持物上，例如小球或微量滴定板中的孔。在某些实施方案中，可以制备至少一种抗包含闭合小带毒素片段的蛋白质的抗体，例如可以制备抗包含闭合小带毒素片段的蛋白质的第一抗体。可以使用包含任何适合的闭合小带毒素片段的蛋白质，例如包含闭合小带毒素的 ΔG 片段的蛋白质。在一个实施方案中，包含适合的闭合小带毒素片段的蛋白质可以是其中的 ΔG 片段包含N末端六个组氨酸标记的蛋白质。在本发明的某些方法中，可以制备至少一种抗包含闭合小带毒素的蛋白质的抗体，例如可以制备抗包含闭合小带毒素的蛋白质的第二抗体。第二抗体可以包含一种或多种可检测的部分。在一个实施方案中，第二抗体可以包含生物素。

在一个特定实施方案中，本发明提供了一种评价治疗有效性的方法，所述治疗是指对需要治疗的受试者的乳糜泻的治疗。上述方法可以包括从受试者获取样品；以及测定样品中 zonulin 的浓度。在某些实施方案中，样品可以是血液样品。该方法可以进一步包括从样品中分离血清；以及测定在血清中 zonulin 的浓度。在某些实施方案中，测定 zonulin 浓度可以包括将第一抗体固定于支持物；在引起样品中的 zonulin 与第一抗体结合的条件下，将第一抗体与样品相接触；在引起第二抗体与结合了第一抗体的 zonulin 结合的条件下，将结合的 zonulin 与第二抗体相接触；以及检测结合的第二抗体。在某些实施方案中，第二抗体可以包含可检测的部分。可检测的部分可以是可直接检测的，例如当所述部分是荧光基团时。在本发明的某些实施方案中，可检测的部分可以与结合可检测部分的试剂相接触。例如，可检测部分可以是生物素，并且可以加入结合生物素（例如，抗生物素蛋白或与例如碱性磷酸酶的酶偶连的抗生物素蛋白链菌素）的试剂。当结合可检测部分的试剂包含酶时，典型的本发明的方法包括向结合的试剂中加入酶的底物以及通过检测产物或是通过检测底物的减少来检测底物向产物的转化。

本发明还涉及了用于评价病症的治疗，例如乳糜泻的治疗的有效性的试剂盒。典型的这样的试剂盒包括检测 zonulin 的工具。用于检测 zonulin 的工具可以包括一种或多种抗- ΔG 抗体、生物素化的抗- ΔG 抗体、抗-ZOT 抗体以及生物素化的抗-ZOT 抗体，因此本发明的试剂盒可以包括一个或多个包含一种或多种抗- ΔG 抗体、生物素化的抗- ΔG 抗体、抗-ZOT 抗体以及生物素化的抗-ZOT 抗体的容器。在某些实施方案中，本发明的试剂盒可以包括包含抗体的容器。该抗体可以是抗-IgG 抗体、抗-IgA、抗-IgM

抗体和/或抗-IgE 抗体。用于本发明试剂盒的抗体可以包含一种或多种可检测的部分。在某些实施方案中，本发明试剂盒可以包括包含 zonulin 的容器和/或包含 ΔG 的容器。本发明的试剂盒可以包含一种或多种自身抗体的蛋白结合伴侣 (protein binding partners)。例如，本发明的试剂盒可以包括一个或多个包含一种或多种人谷氨酰胺转移酶 (tTG)、肌内膜抗原 (EMA)、酪氨酸磷酸酶 (IA-2)、甲状腺过氧化物酶 (TPO)、甲状腺球蛋白 (TG)、胰岛细胞或其中的蛋白质、胰岛素或谷氨酸脱羧酶 (GAD) 的容器。

本发明还涉及了用于评价乳糜泻治疗的有效性的试剂盒。典型的试剂盒包括用于检测 zonulin 的工具。用于检测 zonulin 的工具可以包含一种或多种抗- ΔG 抗体、生物素化的抗- ΔG 抗体、抗-ZOT 抗体以及生物素化的抗-ZOT 抗体，因此本发明的试剂盒可以包括一个或多个包含一种或多种抗- ΔG 抗体、生物素化的抗- ΔG 抗体、抗-ZOT 抗体以及生物素化的抗-ZOT 抗体的容器。在某些实施方案中，本发明的试剂盒包括包含抗体的容器。这些抗体可以是抗-IgG 抗体、抗-IgA、抗-IgM 抗体和/或抗-IgE 抗体。用于本发明的试剂盒的抗体可以包含一种或多种可检测的部分。在某些实施方案中，本发明的试剂盒可以包括包含 zonulin 的容器和/或包含 ΔG 的容器。本发明的试剂盒可以包含一种或多种自身抗体的蛋白结合伴侣 (protein binding partners)。例如，本发明的试剂盒可以包括一个或多个包含一种或多种人谷氨酰胺转移酶 (tTG)、肌内膜抗原 (EMA)、酪氨酸磷酸酶 (IA-2)、甲状腺过氧化物酶 (TPO)、甲状腺球蛋白 (TG)、胰岛细胞或其中的蛋白质、胰岛素或谷氨酸脱羧酶 (GAD) 的容器。

附图简要说明

图 1 为显示进行 GFD 饮食的乳糜泻患者的乳糜泻生物标记的分析结果的柱状图。

图 2 为显示进行 GFD 饮食的乳糜泻患者的自身抗体的分析结果的柱状图。

图 3 为显示未进行 GFD 饮食的乳糜泻患者的乳糜泻生物标记的分析结果的柱状图。

图 4 为显示未进行 GFD 饮食的乳糜泻患者的自身抗体的分析结果的柱状图。

图 5 为显示患有相关 AI 病症的受试者的自身抗体的分析结果的柱状

图，其中显示与已存在的自身免疫（AI）病症（1型糖尿病、格雷夫斯病或类风湿性关节炎）相关的自身抗体的含量。

图 6 为显示未患有相关的 AI 病症的受试者的自身抗体的分析结果的柱状图，其中显示与已存在的自身免疫（AI）病症（1型糖尿病、格雷夫斯病或类风湿性关节炎）相关的自身抗体的含量。

图 7 为显示进行 GFD 的受试者中抗甲状腺过氧化物酶（TPO）的自身抗体的分析结果的线形图。

图 8 为显示进行 GFD 并且开始时具有 TPO 自身抗体的受试者的 zonulin 分析结果的线形图。

图 9 为显示进行 GFD 的受试者中抗甲状腺球蛋白（TG）的自身抗体的分析结果的线形图。

图 10 为显示进行 GFD 并且开始时具有 TG 自身抗体的受试者的血清 zonulin 水平的分析结果的线形图。

图 11 为显示进行 GFD 的受试者中抗胰岛细胞（ICA）的自身抗体的分析结果的线形图。

图 12 为显示进行 GFD 并且开始时具有 ICA 自身抗体的受试者的血清 zonulin 水平的分析结果的线形图。

图 13 为显示进行 GFD 的受试者中抗谷氨酸脱羧酶（GAD）的自身抗体的分析结果的线形图。

图 14 为显示进行 GFD 并且开始时具有 GAD 自身抗体的受试者的血清 zonulin 水平的分析结果的线形图。

图 15 为显示经测试与 HLA 型相关的自身抗体呈阳性的受试者的百分比的圆形分析图。

图 16 为显示与受试者年龄相关的自身抗体的含量的柱状图。

图 17 显示了患有所示的自身免疫性疾病 HC（健康对照）、CD（乳糜泻）、AIH（自身免疫性肝炎）、PBC（原发性胆汁性肝硬化）、DM（退化性脊髓疾病）、APS-1（1型自身免疫性多腺体综合征）、MS（多发性硬化症）的患者的血清 zonulin 水平的分析结果。

发明详述

本发明使用的受试者是指接受治疗的例如哺乳动物的任何动物。受试者包括但不限于人类。

本领域技术人员应该理解本发明被用于评价对以升高的血清 zonulin 水平为特征的任何疾病进行治疗的有效性。特别地，本发明可以被用于评价对与血清 zonulin 水平的升高相关的自身免疫性疾病进行治疗的有效性，所述自身免疫性疾病例如乳糜泻、原发性胆汁性肝硬化以及退化性脊髓疾病。

本发明的材料与方法可以被用于评价乳糜泻治疗的有效性。例如，在治疗方案开始之前或伴随着治疗方案的开始，对需要治疗乳糜泻的受试者的血清 zonulin 水平进行测定。在治疗过程中和/或后的适当时间，可以另外一次或多次测定血清 zonulin 水平，并与治疗开始时获得的血清 zonulin 水平相对比。因此，在本发明的某些实施方案中，本发明的方法需要从正在接受治疗或已经接受完治疗的受试者中重复获取样品并且测定样品中 zonulin 的水平。本发明的方法还需要将样品的 zonulin 水平与参考样品的 zonulin 水平进行对比，所述参考样品可以来自相同的受试者（例如从治疗开始时取得的样品）或不同来源。血清 zonulin 水平的降低是病症改善的标志，表明治疗是有效的。

本发明的材料与方法可以被用于评价乳糜泻相关疾病的治疗的有效性。本领域技术人员知道多种疾病都与乳糜泻相关联（参见，例如 Lee 和 Green, *Current Opinion in Rheumatology* 2006, 18:101-107 中第 104 页的表 1），本发明的材料与方法可以被用于评价乳糜泻相关疾病的治疗的有效性。与乳糜泻相关的疾病可以包括：例如周围神经病、小脑共济失调、癫痫以及偏头痛的神经病；例如 1 型糖尿病、自身免疫性甲状腺障碍、阿狄森氏病以及斑秃的内分泌疾病；例如先天性扩张性心肌病以及自身免疫性心肌炎的心脏病；例如原发性胆汁性肝硬化、自身免疫性肝炎以及自身免疫性胆管炎的肝病；例如少关节型关节炎（oligoarticular arthritis）、幼年关节炎、系统性红斑狼疮以及史格兰氏综合征的风湿病；以及例如贫血症、骨质疏松症或骨质减少、特纳氏综合征、唐氏综合征、牙齿釉质缺损（dental enamel defects）、肉状瘤病、乳糖不耐受症、疱疹样皮炎（灼烧、骚痒、水疱疹（blistering rash））的其它疾病以及其它皮肤障碍、原因不明性不孕、流产以及复发性急性胰腺炎。

本发明的材料与方法可以被用于评价对包括但不限于自身免疫性疾病的多种病症进行治疗的有效性。自身免疫性疾病的例子包括但不限于 IgA 肾病、魏格纳肉芽肿病、多发性硬化、硬皮病、系统性硬化病、类风

湿性关节炎、克罗恩氏病、红斑狼疮、桥本氏甲状腺炎（甲状腺功能减退（underactive thyroid）、格雷夫斯病（甲状腺功能亢进）、自身免疫性内耳疾病、大疱性类天疱疮、德维克病、肺出血肾炎综合征（Goodpasture's syndrome）、Lambert-Eaton 肌无力综合征（Lambert-Eaton myasthenic syndrome, LEMS）、自身免疫性淋巴增生性综合征（ALPS）、副癌综合征以及多腺体自身免疫综合征（PGA）。

本发明的材料与方法可以被用于评价引起肠通透性升高的胃肠炎症的治疗的有效性。因此，本发明可以用于评价例如引起蛋白损失的肠病的肠道病症的治疗。产生蛋白损失的肠病的原因：

例如艰难梭状芽孢杆菌（*Clostridium difficile*）感染、小肠结肠炎、志贺氏菌病、病毒性胃肠炎、寄生虫侵染、细菌过度生长、惠普尔病；

例如胃炎的伴有黏膜糜烂或溃疡的疾病、胃癌、胶原性结肠炎、炎症性肠病；以及

例如梅内特雷尔病的不伴有溃疡的黏膜疾病、乳糜泻、嗜酸细胞性胃肠炎。

本发明还包括用于评价治疗有效性的试剂盒以及用于测定例如血清中的 zonulin 浓度的试剂盒。典型的本发明的试剂盒包括一个或多个包含一种或多种用于实施本发明的试剂的容器。用于实施本发明的试剂包括但不限于缓冲液、缓冲盐、金属离子、发色的化合物、抗体、酶、荧光化合物等。本发明的试剂盒可以包括一个或多个包含 zonulin、 ΔG 或其它可用作参考标准的化合物的容器。本发明的试剂盒可以包括包含一种或多种抗体的容器，其中抗体与可检测的部分偶连。可检测部分可以是本领域技术人员已知的任何物质，例如酶（例如过氧化物酶、荧光素酶）、其它蛋白质（例如绿色荧光蛋白质）、光学上可检测的化合物（例如荧光基团、发光团）、配对结合（binding pair）成分（例如生物素/抗生物素蛋白链菌素、异羟基洋地黄毒甙元/抗异羟基洋地黄毒甙元）、或其它本领域技术人员已知的任何可检测的部分。当本发明的试剂盒包含酶时，该试剂盒可以包括一个或多个包含酶的底物的容器。

提供以下实施例的目的仅是用于说明，决不是要限制本发明的范围。

实施例 1

病人与方法：

病人为 54 名经诊断患有 CD 的病人 (20 名男性和 34 名女性; 平均年龄: 39 岁; 经活组织检查证实: 42/54)。在 8 名受试者中发现相关的 AD (2 名 1 型糖尿病、1 名格雷夫斯病、5 名类风湿性关节炎)。

在诊断时和进行平均周期为 17 个月的 GFD (范围从 10 至 49) 后收集血清样品。测定所有血清样品中与 CD (抗谷氨酰胺转移酶-tTG、抗肌内膜抗体-EMA)、1 型糖尿病 (IA-2: 酪氨酸磷酸酶, IAA: 抗胰岛素抗体, GAD: 谷氨酸脱羧酶)、甲状腺炎 (TPO: 甲状腺过氧化物酶抗体, TG: 甲状腺球蛋白抗体) 相关的自身抗体以及 zonulin 水平。

通过夹心酶联免疫吸收分析来测定血清 zonulin。根据 El Azmar 等 *Gastroenterology* 123:1607-1615, 2002 的记载并稍加变化, 进行 zonulin 夹心酶联免疫吸收分析 (ELISA)。

简言之, 塑料微量滴定板 (Costar, Cambridge, MA) 经兔 zonulin 包被, 所述兔 zonulin 与抗闭合小带毒素 (Zot) 的衍生物 ΔG IgG 抗体 (0.1 mol/l 碳酸钠缓冲液中 10 μ g/ml, pH 9.0) 进行交叉反应。使用标准方法通过用 ΔG 对兔免疫来制备这些抗体。

在 4°C 下孵育过夜后, 在含 0.05% 吐温 20 的 Tris 缓冲盐 (TBS-T) 中清洗滴定板四次, 用 TBS-T 在 37°C 下孵育 1 小时进行封闭。在 TBS-T 清洗四次后, 加入五种 ΔG 系列标准品 (50、25、12.5、6.2、3.1 以及 0 ng/ml) 和病人血清样品 (在 TBS-T 中以 1: 101 稀释), 在 4°C 下孵育过夜。用含 0.2% 吐温 20 的 Tris 缓冲盐清洗四次后, 将滴定板在 4°C 下与生物素化的抗 Zot IgG 抗体 (美国专利 No. 5,945,510) 一起孵育 4 小时, 并且与生物素蛋白链菌素偶连的碱性磷酸酶相接触。使用商业化的试剂盒 (ELISA 扩增试剂盒; Invitrogen) 进行显色反应。利用微板自动读数仪 (Molecular Devices Thermomax 微板读数仪) 测量 495nm 下的吸收值。

使用商业上可获得的试剂盒检测自身抗体: 抗 (人)-谷氨酰胺转移酶 (抗-tTG) 酶联免疫吸收分析 (ELISA), Scimedx 公司, 新泽西州; 抗-肌内膜抗体 (抗-EMA) 间接免疫荧光抗体分析 (IFA), 其利用了猴食管组织, Scimedx 公司, 新泽西州; 抗-酪氨酸磷酸酶 (抗 IA-2) 放射免疫分析 (RIA), Kronus Boise 研究中心, 爱达荷州; 抗-甲状腺过氧化物酶抗体 (抗-TPO) 酶免疫分析 (EIA), Scimedx 公司, 新泽西州; 抗-甲状腺球蛋白 (抗-TG) EIA, Scimedx 公司, 新泽西州; 抗-胰岛细胞抗体 (抗-ICA) IFA, 其利用了猴胰腺组织, Scimedx 公司, 新泽西州; 抗-胰岛素

抗体 (IAA) RIA, Kronus Boise 研究中心, 爱达荷州; 以及抗-谷氨酸脱羧酶 (抗-GAD) RIA, Kronus Boise 研究中心, 爱达荷州。

在经诊断患有 CD 的病人中, 76% 表现出血清 zonulin 升高, 39% 检测到自身抗体 (TPO: 21.7%, TG 19.6%, GAD 6.5%, ICA 4.4% 以及 IA-2 2.5%)。经过 GFD 后, 13% 的病入的 EMA 和 zonulin, 以及 35% 的受试者的 tTG 保持变化的状态。某些自身抗体降低 (TPO: 10.9%, GAD 4.4%), 而其它保持不变 (TG 23.9%, ICA 4.4% 以及 IA-2 2.2%)。53 个病人中有 7 人没有进行 GFD。这些受试者的 zonulin、EMA 以及 tTG 发生变化, 他们当中的 14% 的自身抗体呈阳性。在这些受试者中, 在随后的评价中 zonulin 水平与血清自身抗体都不发生变化。结论: 未治疗的 CD 特异性地显示出 zonulin 上调并且血清自身抗体的含量升高。经 GFD 治疗后, 血清 zonulin 水平趋于正常, 出现了与某些自身抗体 (特别是 TPO) 的含量降低相关联的情形。上述结果间接地表明肠屏障功能的恢复可以降低相关自身免疫现象的风险。这些结果还表明如果早期 (年龄低于 30 岁) 进行 GFD 治疗, 自身抗体会出现血清转化, 这表明如果 CD 被及早地诊断并开始进行 GFD, 则可能产生对抗自身免疫共同发病的保护作用。

实施例 2

图 17 显示了从病人获得的血清进行血清 zonulin 水平分析的结果, 所述病人患有所示的自身免疫疾病 HC (健康对照)、CD (乳糜泻)、AIH (自身免疫性肝炎)、PBC (原发性胆汁性肝硬化)、DM (退化性脊髓疾病)、APS-1 (1 型自身免疫性多腺体综合征)、MS (多发性硬化)。乳糜泻、自身免疫性肝炎、原发性胆汁性肝硬化以及退化性脊髓疾病均与升高的血清 zonulin 水平相关。

尽管本发明已经通过参考其中的特定实施方案的方式进行了详细描述, 然而对于本领域的普通技术人员而言显而易见的是, 可以在不脱离本发明的精神和范围的条件下做出各种变化和修正, 并且这样的变化和修正可以在所附的权利要求书的范围内实施。引入本发明作为参考的所有专利和公开出版物均被特意地和分别地指明引用其全文作为参考。

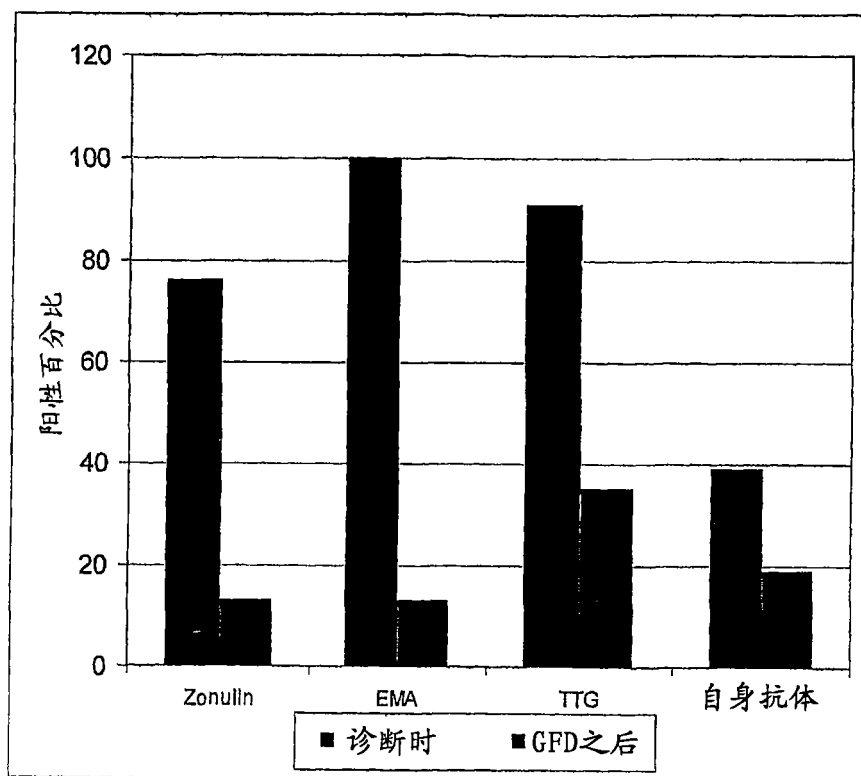


图1

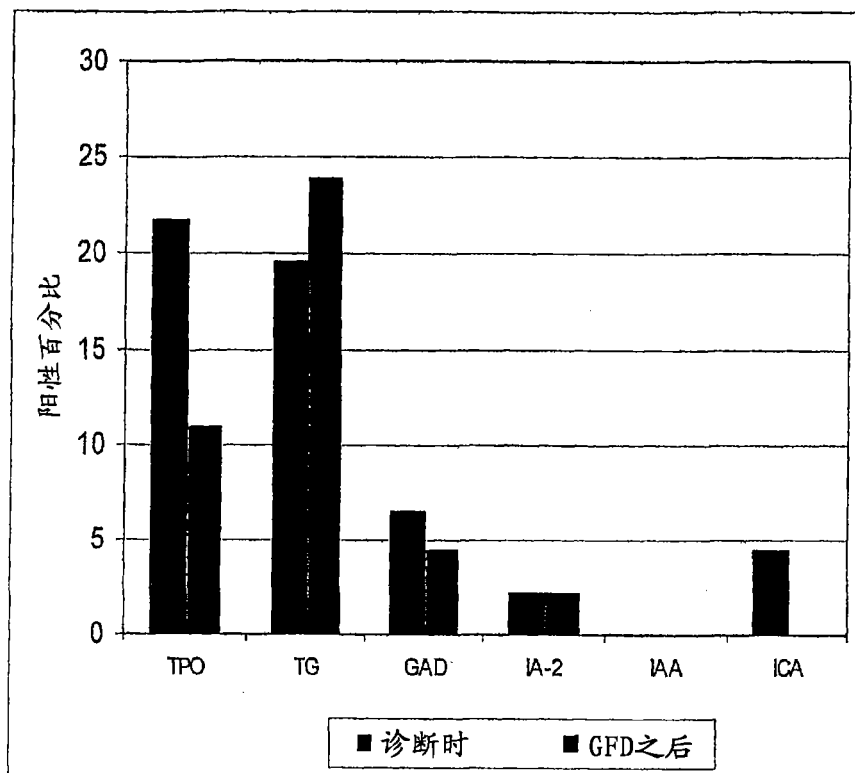


图 2

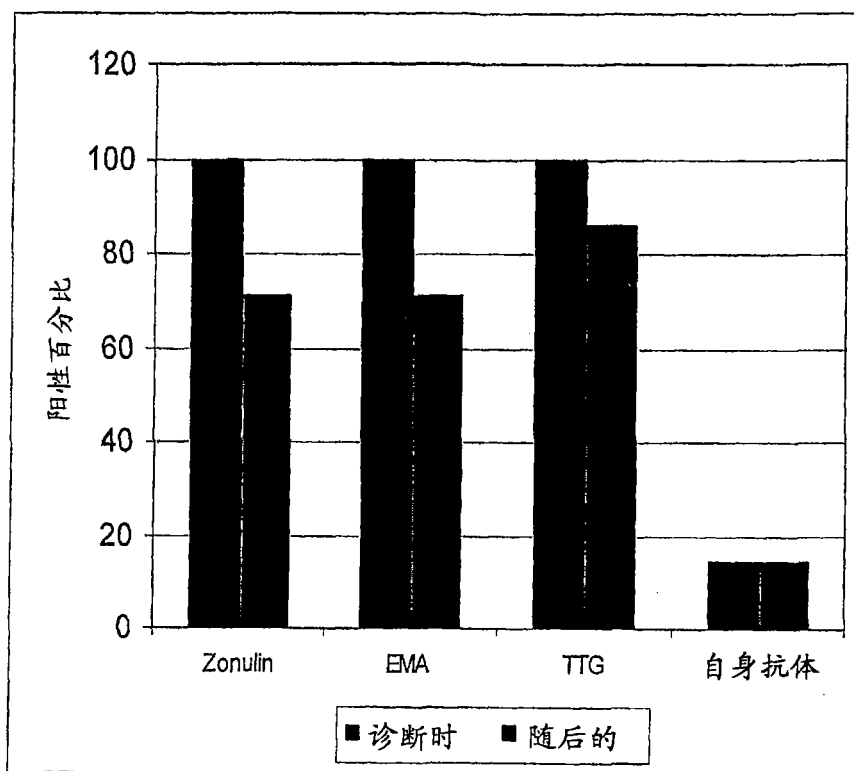


图3

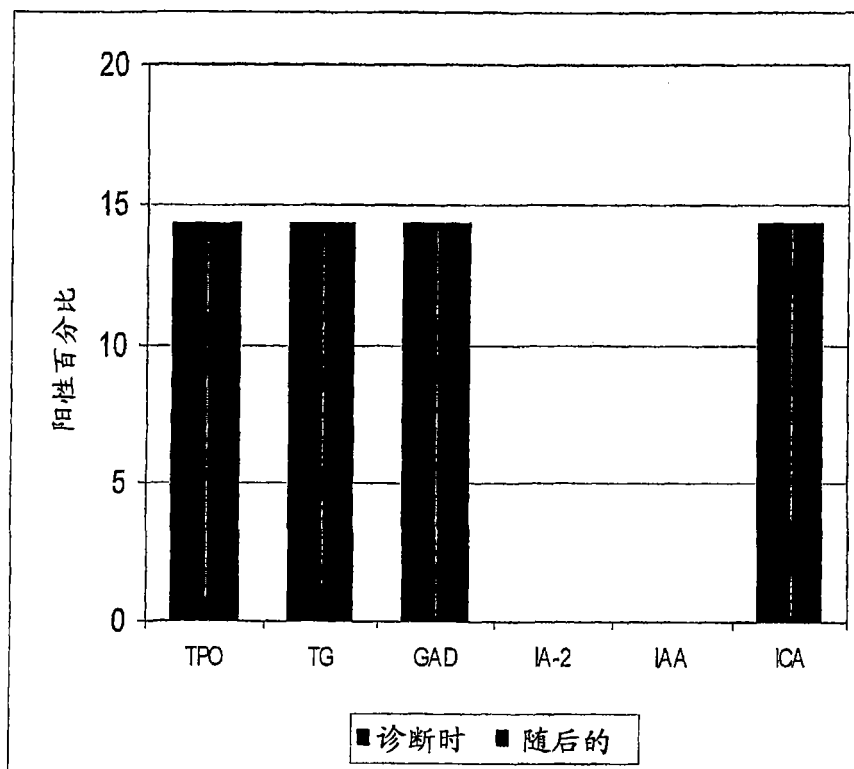


图4

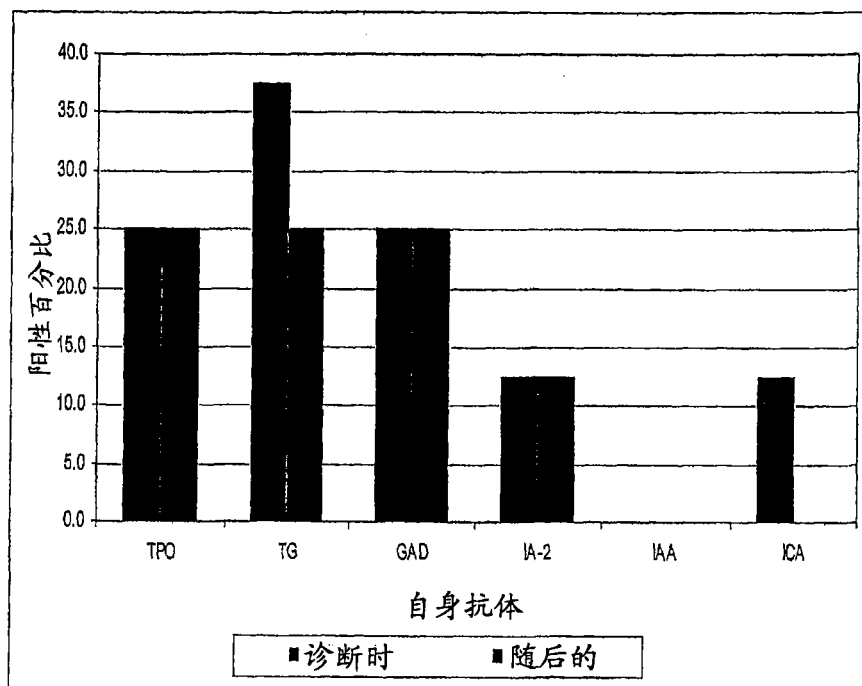


图5

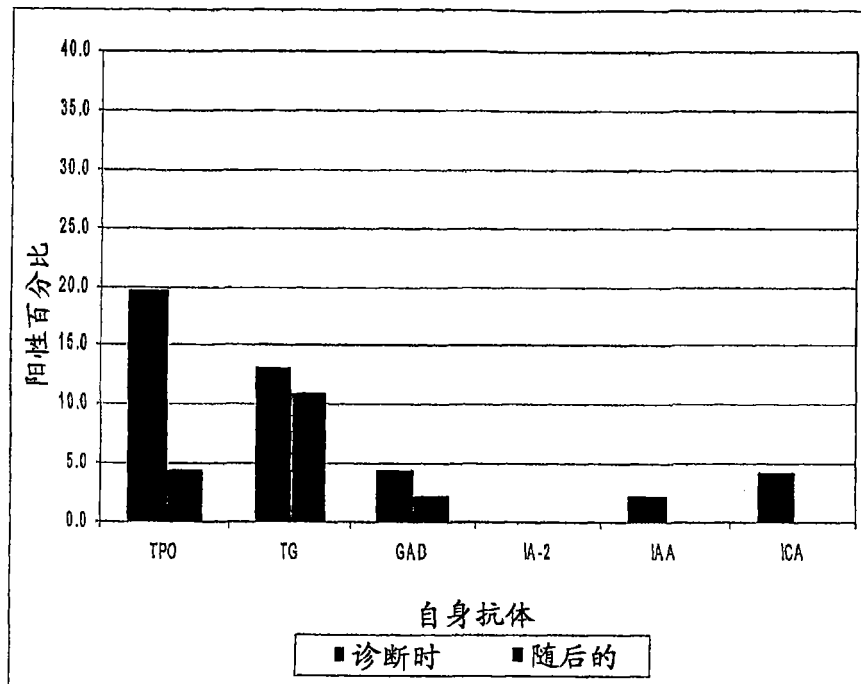


图6

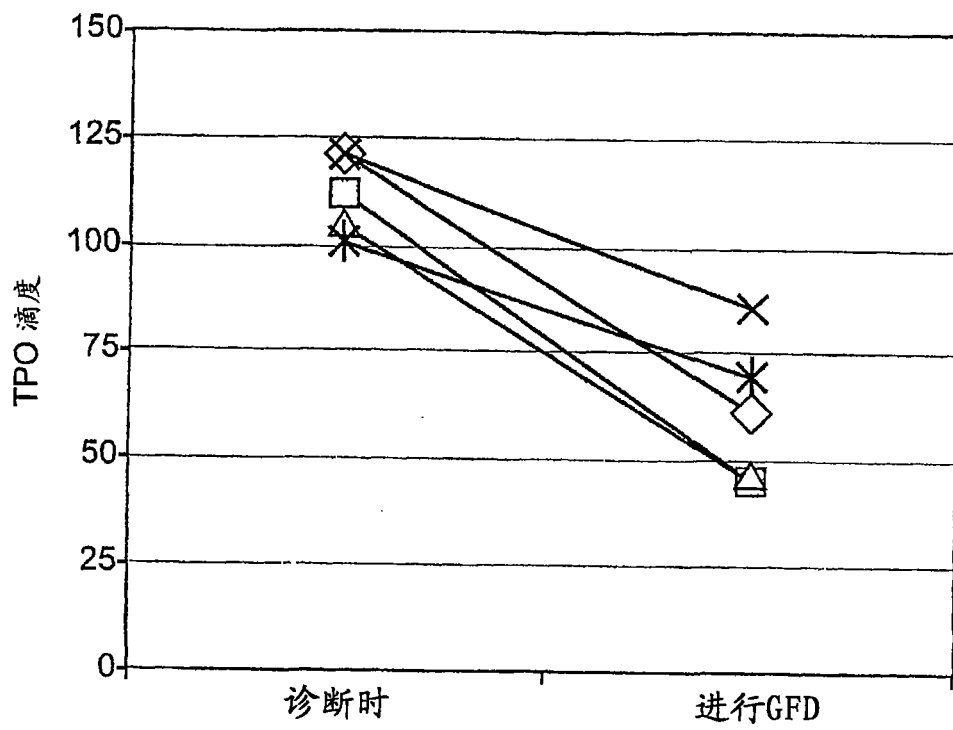


图7

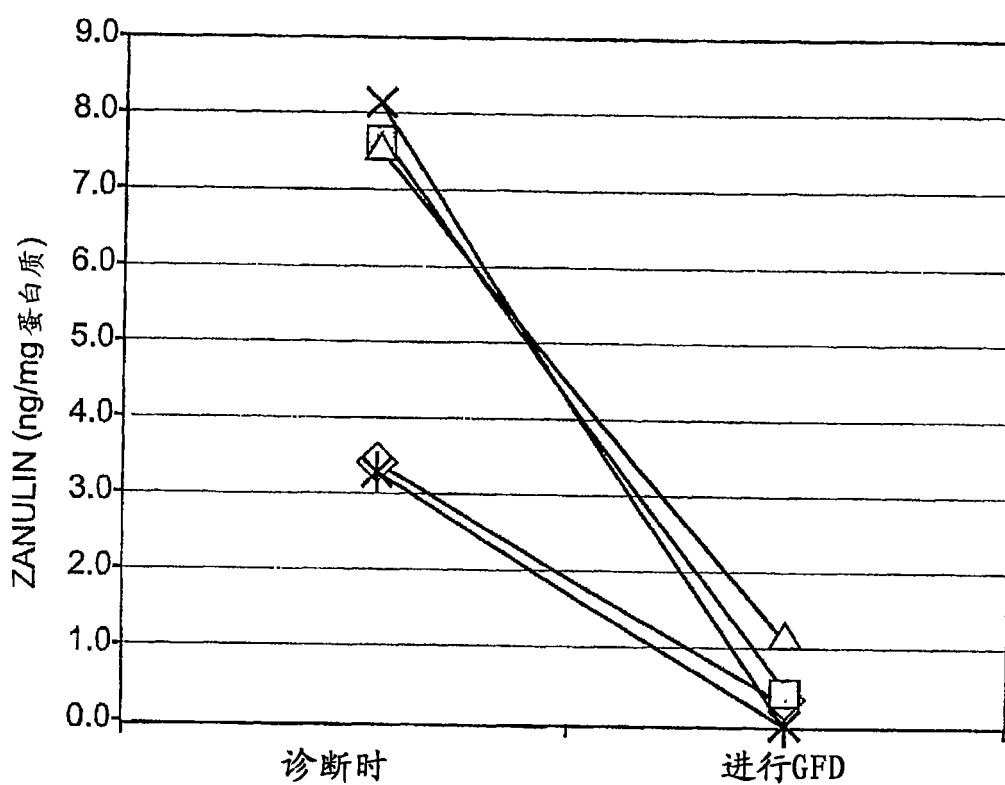


图8

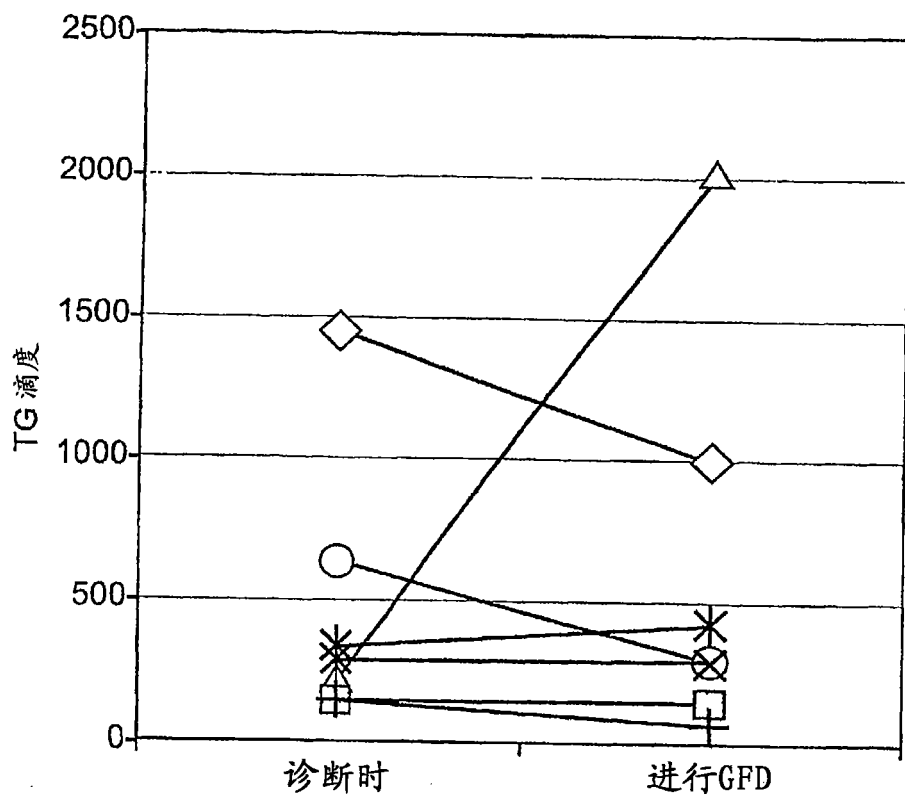


图9

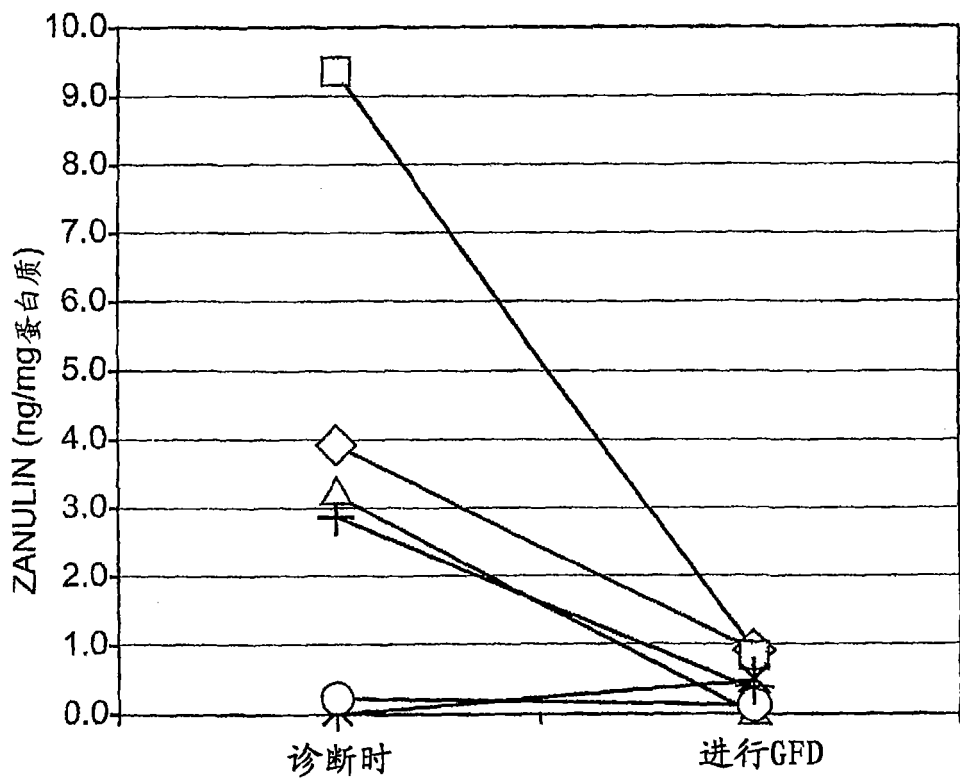


图10

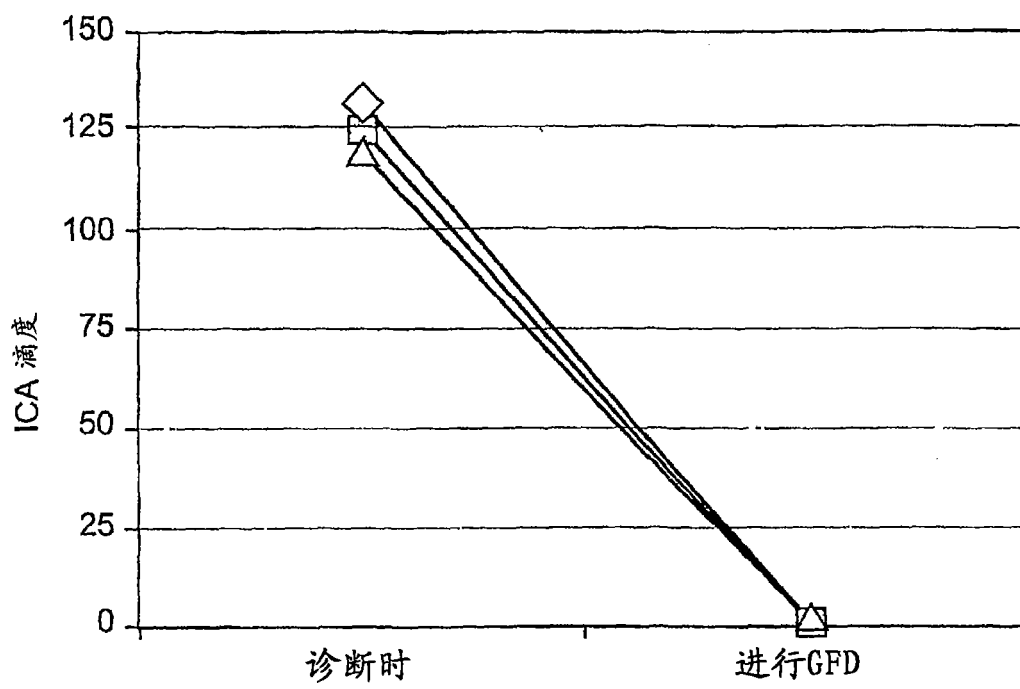


图11

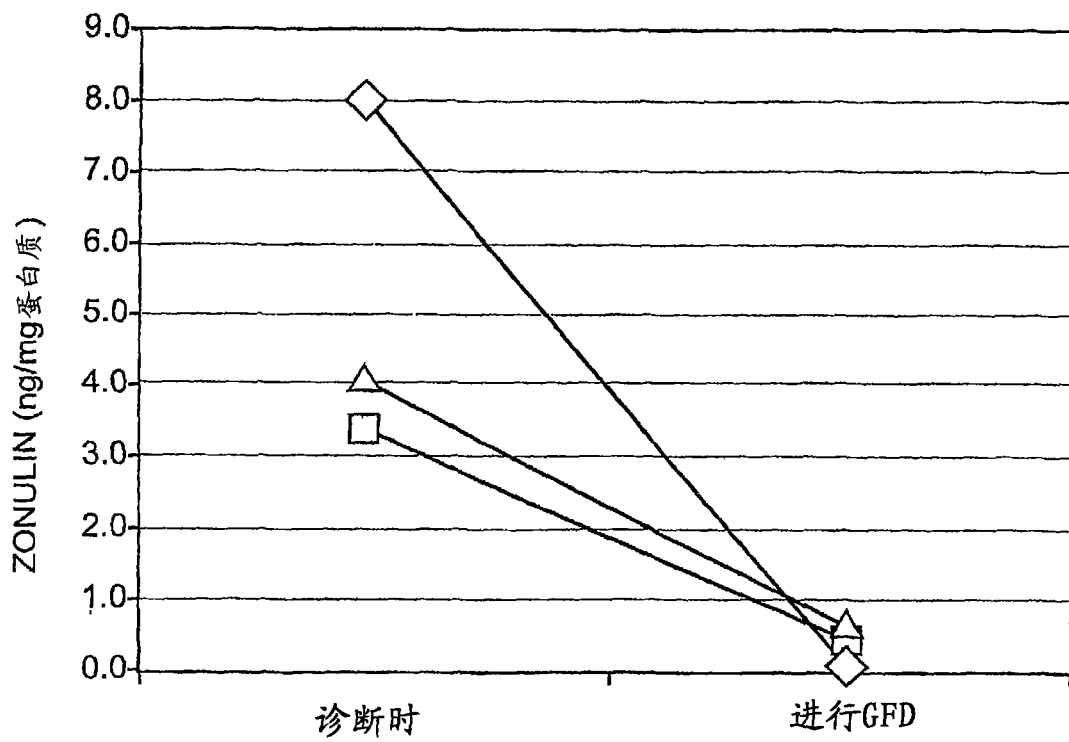


图12

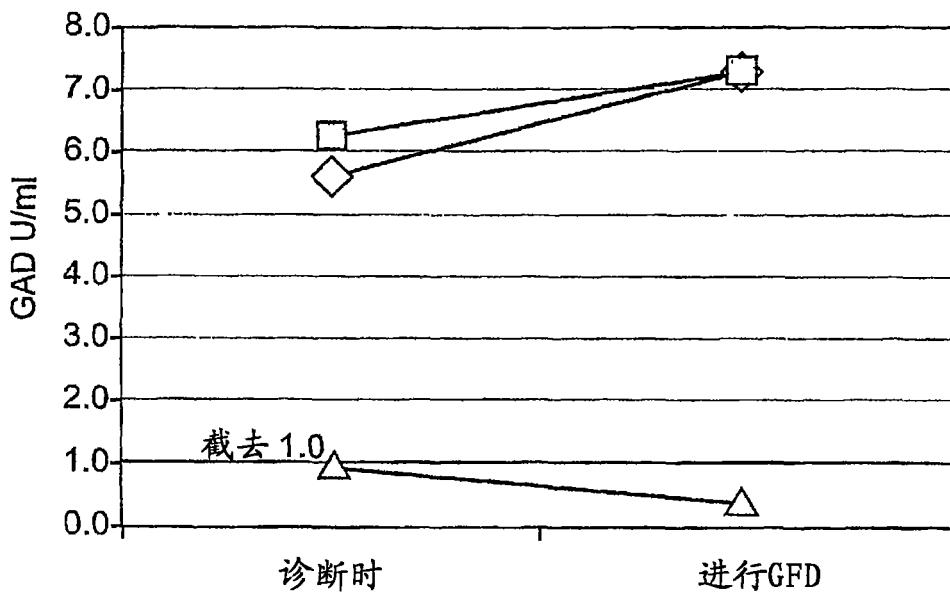


图13

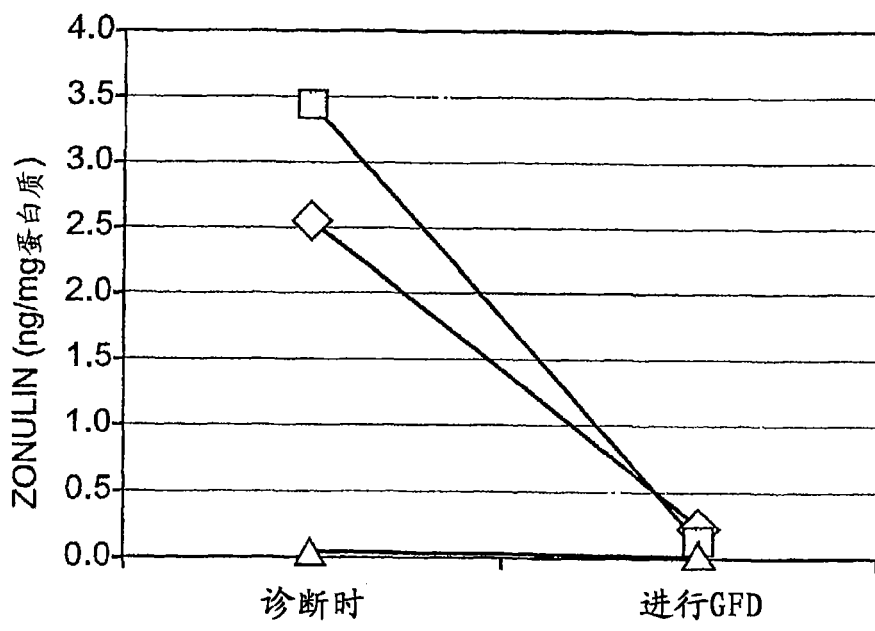


图14

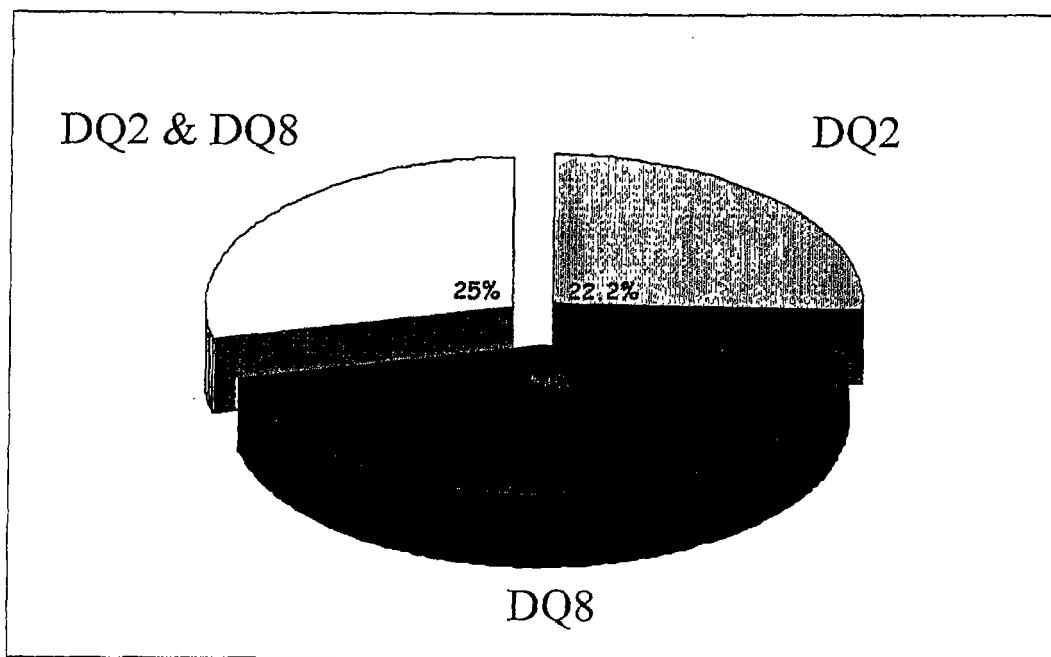


图15

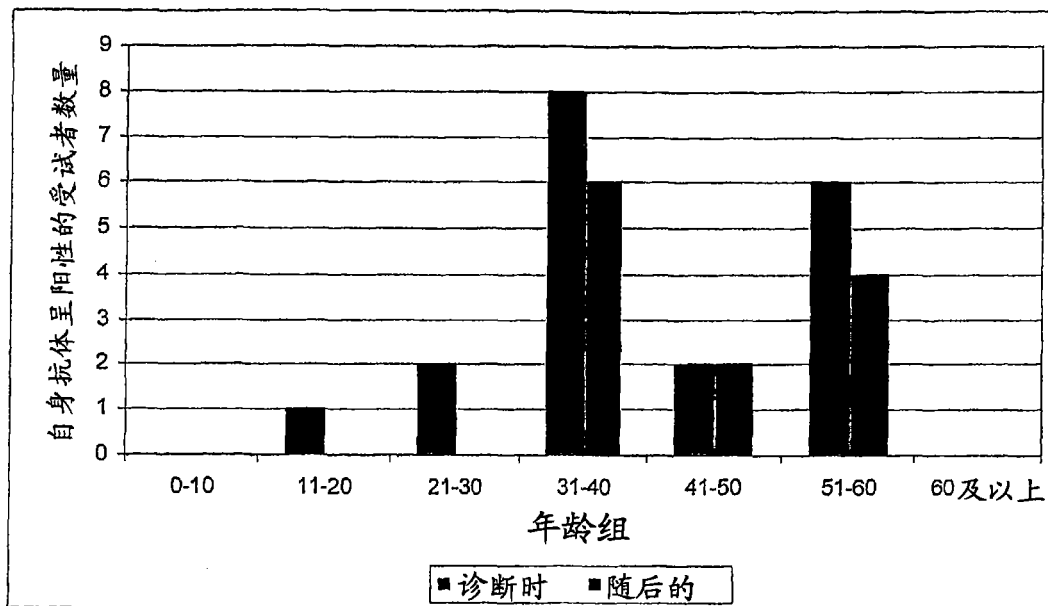


图16

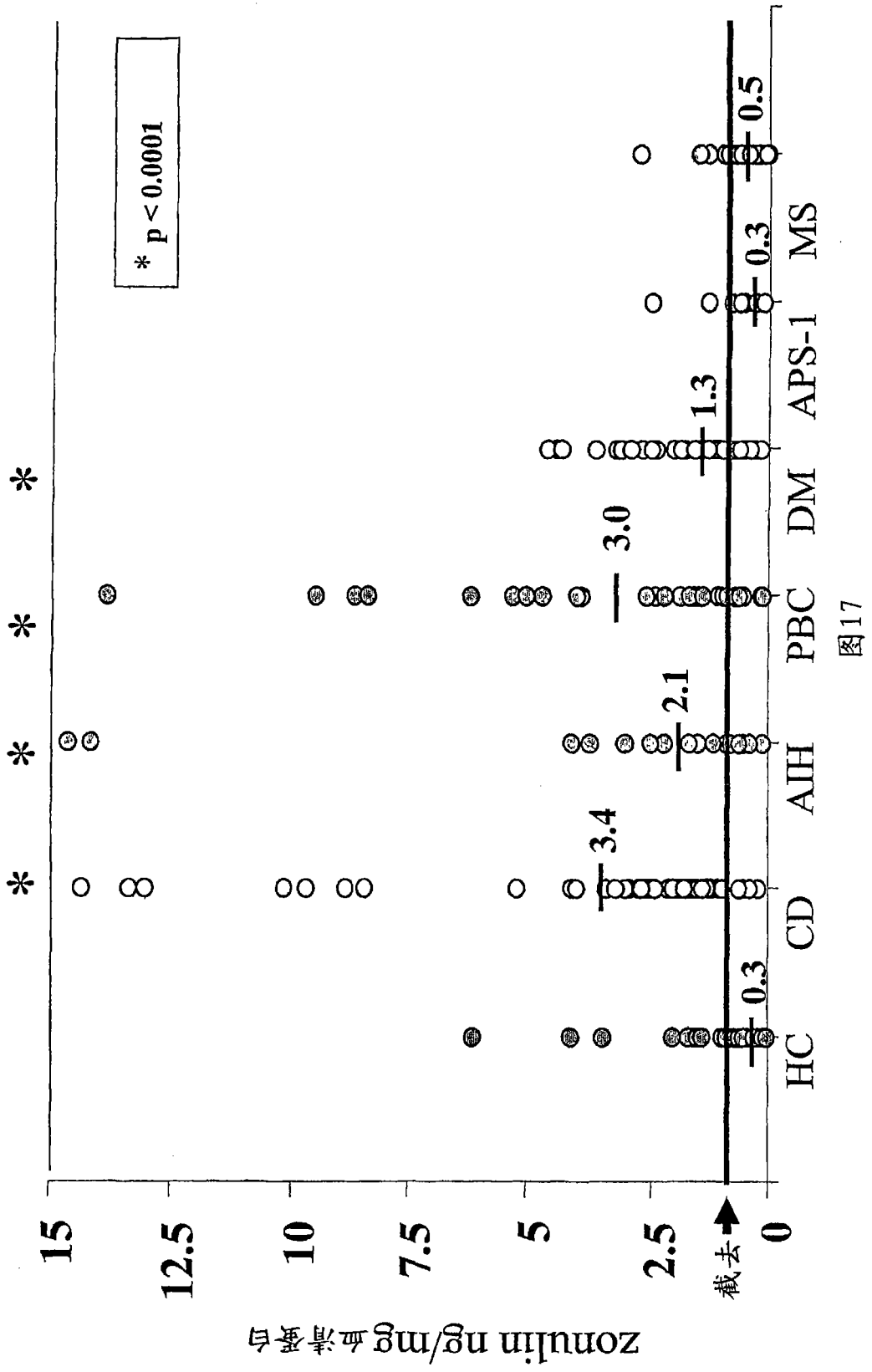


图17

专利名称(译)	评价治疗方案有效性的方法		
公开(公告)号	CN101189518A	公开(公告)日	2008-05-28
申请号	CN200680016527.7	申请日	2006-05-11
[标]申请(专利权)人(译)	马里兰大学巴尔的摩分校		
申请(专利权)人(译)	马里兰巴尔的摩大学		
当前申请(专利权)人(译)	马里兰巴尔的摩大学		
[标]发明人	A法撒诺		
发明人	A·法撒诺		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/541 G01N33/53 G01N33/00		
CPC分类号	G01N33/566 G01N33/564 G01N2800/062 A61P1/02 A61P1/04 A61P1/16 A61P1/18 A61P3/00 A61P15/06 A61P15/08 A61P17/00 A61P17/04 A61P17/14 A61P19/00 A61P19/02 A61P19/10 A61P25/00 A61P25/02 A61P25/06 A61P25/08 A61P25/28 A61P27/02 A61P27/16 A61P29/00		
优先权	60/680868 2005-05-13 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供用于评价治疗功效的材料和方法。在某些实施方案中，本发明提供一种通过测定接受治疗的受试者的血清zonulin水平来评价乳糜泻治疗的功效的方法。

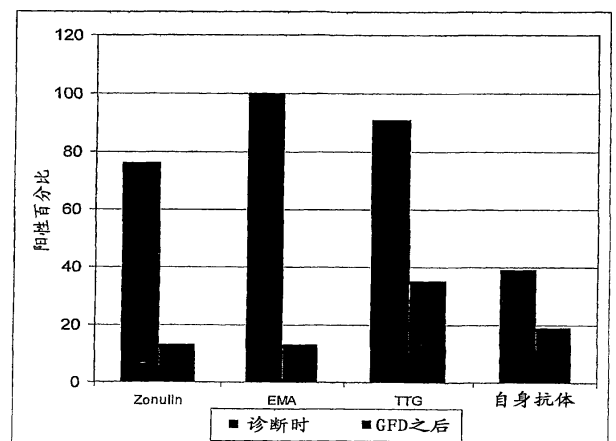


图 1