



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102348982 A

(43) 申请公布日 2012. 02. 08

(21) 申请号 201080011515. 1

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2010. 03. 08

G01N 33/53(2006. 01)

(30) 优先权数据

G01N 27/62(2006. 01)

2009-055057 2009. 03. 09 JP

G01N 30/72(2006. 01)

G01N 30/88(2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

G01N 33/15(2006. 01)

2011. 09. 09

G01N 33/50(2006. 01)

(86) PCT申请的申请数据

PCT/JP2010/053762 2010. 03. 08

(87) PCT申请的公布数据

W02010/104025 JA 2010. 09. 16

(71) 申请人 财团法人大阪生物科学研究所

地址 日本大阪

申请人 国立精神及神经中心

大鹏药品工业株式会社

(72) 发明人 里出良博 有竹浩介 丸山敏彦

谦内慎也 武田伸一 中村昭则

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理

有限责任公司 11204

代理人 王达佐 阴亮

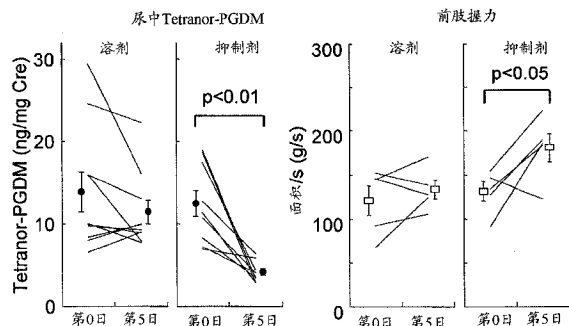
权利要求书 1 页 说明书 8 页 附图 1 页

(54) 发明名称

肌变性疾病的检测方法以及治疗效果判定方法

(57) 摘要

通过对从受试体分离出的样品中的 11, 15- 二氧 -9 α - 羟基 -2, 3, 4, 5- 四正前列 -1, 20- 二酸 (以下称为 Tetranor-PGDM) 进行测定, 能够在早期检出肌变性疾病, 并且能够对这些疾病的治疗药和 / 或治疗方法的治疗效果进行判定。



1. 肌变性疾病的检测方法,包括对从受试体分离出的样品中的 Tetranor-PGDM 含量进行测定的步骤。
2. 肌变性疾病的治疗药和 / 或治疗方法的效果判定方法,包括对从肌变性疾病的患者分离出的样品中的 Tetranor-PGDM 含量进行测定的步骤。
3. 如权利要求 1 或 2 所述的方法,其中所述样品为尿。
4. 如权利要求 1-3 中任一项所述的方法,其中通过高效液相色谱 - 串联质谱法 (HPLC-MS/MS)、酶免疫测定法 (EIA)、放射性免疫测定法 (RIA)、荧光免疫测定法 (FIA)、酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 或酶法进行 Tetranor-PGDM 的测定。
5. 如权利要求 1 或 2 所述的方法,其中所述肌变性疾病为进行性肌营养不良症、先天性肌营养不良症、肢带型肌营养不良症、面肩肱型肌营养不良症、肌强直性肌营养不良症、肌萎缩侧索硬化症或肌病。
6. 肌变性疾病的诊断测定用试剂盒,其特征在于,包括 Tetranor-PGDM 的抗体。
7. 肌变性疾病的治疗药和 / 或治疗方法的效果预测和 / 或判定用试剂盒,其特征在于,包括 Tetranor-PGDM 的抗体。
8. 如权利要求 6 或 7 所述的试剂盒,包括 Tetranor-PGDM 的抗体、被标记的 Tetranor-PGDM,以及根据需要选自抗免疫球蛋白抗体、样品稀释液、抗体和被标记的 Tetranor-PGDM 的稀释液、已知浓度的标准 Tetranor-PGDM、EIA 用的底物、EIA 用的终止液的至少 1 种。

肌变性疾病的检测方法以及治疗效果判定方法

技术领域

[0001] 本发明涉及肌变性疾病的早期检测方法,以及治疗药和 / 或治疗方法的预测和 / 或判定方法。

背景技术

[0002] 伴随有肌肉障碍或肌坏死的疾病组被称为肌病。代表性的肌病有肌营养不良症、肌肉萎缩症。肌营养不良是以肌肉变弱进而萎缩为特征的遗传性疾病的总称。其中,进行性肌肉营养不良症患者数最多,并引起遗传性的进行性肌无力。此外,肌肉萎缩症是由运动神经障碍引起的神经原性疾病。

[0003] 肌营养不良中患者数最多的迪谢内型肌营养不良,是仅在男性中发病的性染色体隐性遗传性疾病,据说每 10 万人中有 3-5 人、每 2000-3000 个新生男孩中有 1 人患病。通常在 3-5 岁时,发现跑步困难、容易跌倒等与步行、站立相关的异常,在 10 岁前后变得无法步行。之后,脊柱的变形和关节弯曲快速进行,多引起呼吸衰竭,并且有时引起心力衰竭、肺炎。

[0004] 用于肌营养不良诊断的检查有血液检查、神经传导检查、肌电图、肌肉活组织检查、DNA 分析等。神经传导检查查明运动障碍、感知障碍是否是由末梢神经障碍引起,寻找障碍部位或障碍程度,对神经进行电刺激进而测量刺激传导的速度。在检查的特性方面,其需要特殊的装置,由于对神经直接进行电刺激,因此会感觉到麻刺感、疼痛、不适感,并伴随一些痛苦。

[0005] 肌电图检查查明运动障碍是否是由肌肉引起或由神经引起,寻找障碍部位或程度,需要特殊的装置,伴有向肌肉中刺入针而产生的疼痛。虽然也存在不伴有疼痛的体表面肌电图检查,但必须在检查设备上测定。

[0006] 由于肌肉活组织检查需要采集肌肉组织,因此是创伤性的,不能说是简便的检查。此外, DNA 分析是迪谢内型或贝克型肌营养不良的诊断所必须的,但并不适用于肌变性疾病,缺乏通用性。

[0007] 血液检查通常利用肌酸激酶。肌酸激酶是主要存在于骨骼肌和心肌的可溶性部分的酶,由于细胞的损伤而漏入血液中。在肌营养不良的情况下,骨骼肌发生障碍以及坏死,血液中肌酸激酶显示出明显的高值,从而由此进行肌营养不良的诊断,但血液中的肌酸激酶也可能因其他的疾病而显示出高值,因此难以仅基于肌酸激酶的浓度来鉴别诊断,需要同时进行其他的检查。

[0008] 在其他的进行性肌营养不良症、因神经异常而导致肌肉发生障碍或坏死的疾病中,也进行测定血液中肌酸激酶的血液检查,但由于在肌障碍和肌坏死以外的疾病中血液肌酸激酶水平也显示出高值,因此需要其他的肌障碍或肌坏死的标志物。

[0009] 因此,期望能够在早期简便地对诸如肌营养不良的肌变性疾病进行诊断的方法或诊断试剂盒。

[0010] 11,15- 二氧 -9 α - 羟基 -2,3,4,5- 四正前列 -1,20- 二酸 (以下称为

Tetranor-PGDM) 作为前列腺素 D₂ (以下称为 PGD₂) 的代谢物而己知, 报告称 Tetranor-PGDM 在尿中的排泄量随人或小鼠的炎症反应而增加, 而且是反映 PGD₂ 的生成的标志物 (非专利文献 1)。

[0011] 另一方面, 有报告称, 在诸如肌营养不良的肌变性疾病的变性部位, 对 PGD₂ 的产生进行催化的造血前列腺素 D 合酶 (以下称为 HPGDS) 的表达增强, 而且 PGD₂ 与疾病发展的防止和改善相关 (专利文献 1, 非专利文献 2)。

[0012] 但是, 完全不知道 Tetranor-PGDM 作为肌变性疾病的患者的尿中排泄物以高浓度被检出, 且上述 Tetranor-PGDM 的浓度由于 HPGDS 抑制剂的给药而显著降低。

[0013] 专利文献 1: 日本国专利申请公开公报“特开 2005-119984 号公报”

[0014] 非专利文献 1: J. Biol. Chem, Vol. 283, No. 2, 1179-1188 (2008)

[0015] 非专利文献 2: Acta Neuropathol, 104, 377-384 (2002)

发明内容

[0016] 技术问题

[0017] 本发明的目的在于, 提供通过测定尿中的 Tetranor-PGDM 来有效地诊断肌变性疾病的方法, 以及对这些疾病的治疗药和 / 或治疗方法的治疗效果进行判定的方法。

[0018] 本发明的另一目的在于, 提供肌变性疾病的诊断试剂盒, 所述诊断试剂盒靶向 Tetranor-PGDM。

[0019] 技术方案

[0020] 本发明人为了实现上述目的而进行了深入研究, 并基于所得的如下见解完成本发明。

[0021] 1) 与正常动物相比, 作为尿中 PGD₂ 代谢物的 Tetranor-PGDM 的水平在肌营养不良模型动物中增加。

[0022] 2) 通过向肌营养不良模型动物给予公知的 PGD₂ 合酶抑制剂, Tetranor-PGDM 的尿中排泄量减少。

[0023] 本发明提供以下的肌变性疾病的检出方法, 肌变性疾病的诊断测定用试剂盒以及肌变性疾病的治疗药和 / 或治疗方法的效果预测和 / 或判定用试剂盒。

[0024] 项 1. 肌变性疾病的检测方法, 包括对从受试体分离出的样品中的 Tetranor-PGDM 含量进行测定的步骤。

[0025] 项 2. 肌变性疾病的治疗药和 / 或治疗方法的效果判定方法, 包括对从肌变性疾病的患者分离出的样品中的 Tetranor-PGDM 含量进行测定的步骤。

[0026] 项 3. 如项 1 或 2 所述的方法, 其中所述样品为尿。

[0027] 项 4. 如项 1-3 中任一项所述的方法, 其中通过高效液相色谱 - 串联质谱 (HPLC-MS/MS)、酶免疫测定法 (EIA)、放射性免疫测定法 (RIA)、荧光免疫测定法 (FIA)、酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 或酶法进行 Tetranor-PGDM 的测定。

[0028] 项 5. 如项 1 或 2 所述的方法, 其中所述肌变性疾病为进行性肌营养不良症、先天性肌营养不良症、肢带型肌营养不良症、面肩肱型肌营养不良症、肌强直性肌营养不良症、肌萎缩侧索硬化症或肌病。

[0029] 项 6. 肌变性疾病的诊断测定用试剂盒, 其特征在于, 包括 Tetranor-PGDM 的抗体。

[0030] 项 7. 肌变性疾病的治疗药和 / 或治疗方法的效果预测和 / 或判定用试剂盒, 其特征在于, 包括 Tetranor-PGDM 的抗体。

[0031] 项 8. 如项 6 或 7 所述的试剂盒, 包括 Tetranor-PGDM 的抗体、被标记的 Tetranor-PGDM, 以及根据需要选自抗免疫球蛋白抗体、样品稀释液、抗体和被标记的 Tetranor-PGDM 的稀释液、已知浓度的标准 Tetranor-PGDM、EIA 用的底物、EIA 用的终止液的至少 1 种。

[0032] 有益效果

[0033] 根据本发明, 通过对从受试体分离出的样品中的 Tetranor-PGDM 进行测定, 能够简便地且在早期诊断肌变性疾病, 而且能够有效地对这些疾病的治疗药和 / 或治疗方法的治疗效果进行判定。

[0034] 而且根据本发明, 通过将尿中增加的 Tetranor-PGDM 作为标志物来使用, 能够制成能够简便地诊断肌变性疾病的诊断用试剂盒来进行利用。

附图说明

[0035] 图 1 是表示 mdx 小鼠中的 HPGDS 抑制剂给药后的尿中 Tetranor-PGDM 浓度以及前肢握力的变化的图。

[0036] 图 2 的左图是表示给予 HPGDS 抑制剂约 1 年后, 变更为溶剂给药时的尿中 Tetranor-PGDM 浓度的变化的图; 右图是表示给予溶剂约 1 年后, 变更为抑制剂给药时的肌营养不良犬 (CXMDJ) 的尿中 Tetranor-PGDM 浓度的变化的图。

具体实施方式

[0037] 在本发明中, 能够以 Tetranor-PGDM 作为指标来进行肌变性疾病的诊断, 且能够有效地对这些疾病的治疗药和 / 或治疗方法的治疗效果进行判定。而且, 通过将 Tetranor-PGDM 作为标志物来使用, 能够提供这些疾病的诊断用试剂盒以及肌变性疾病的治疗药和 / 或治疗方法的效果预测和 / 或判定用试剂盒。

[0038] 根据本发明的实施方式, 通过对从患有或可能患有肌变性疾病的受试体分离出的样品中的 Tetranor-PGDM 进行测定, 能够检出或诊断伴随肌障碍或肌坏死的疾病。具体而言, 在样品中的 Tetranor-PGDM 的浓度或含量高于预定值时, 该受试体能够被诊断为患有肌变性疾病。从受试体分离出的样品中的 Tetranor-PGDM 的预定值, 能够通过健康人的样品和肌变性疾病患者的样品中的 Tetranor-PGDM 进行测定来确定。

[0039] 此外, 治疗药和 / 或治疗方法的效果判定方法如下: 对治疗开始前 / 治疗药给药开始前肌变性疾病的患者的样品中的 Tetranor-PGDM 与治疗开始后 / 治疗药给药开始后的 Tetranor-PGDM 的测定值进行比较, 治疗开始后 / 治疗药给药开始后的样品中的 Tetranor-PGDM 的测定值显著或具有显著倾向地降低时, 判定治疗或治疗药给药有效, 样品中的 Tetranor-PGDM 的测定值在治疗开始 / 治疗药给药开始前后没有显著或显著倾向的差异时, 判定该治疗药 / 治疗方法无效。

[0040] 根据本发明的另一方面, 能够提供使用抗体来检测样品中的 Tetranor-PGDM 的诊断用试剂盒。

[0041] 本文中的术语“受试体”是指哺乳动物, 包括例如人、猴、牛、马、大鼠、小鼠、豚鼠、

兔、犬、猫、绵羊、山羊。优选地,受试者是人。

[0042] 根据本发明的方法测定的 Tetranor-PGDM,作为尿中 PGD₂ 的代谢物而被发现。此外, Tetranor-PGDM 还在血液和粪便中被发现。

[0043] 本发明的从受试体分离出的样品优选为尿、粪便、血液、血浆、血清,更优选为尿。

[0044] 本文中的术语“测定”包括检出、定量和半定量中的任一个。因此,“对 Tetranor-PGDM 进行测定”,包括检出样品中的 Tetranor-PGDM 和测定其表达量的两种情况,而且,包括判别表达量是否在预定值以上的情况,换言之,即表达量为预定值以上时检出该表达的情况。

[0045] 作为测定 Tetranor-PGDM 的方法,例示出 GC-MS、HPLC、高效液相色谱-串联质谱法 (HPLC-MS/MS)、酶免疫测定法 (EIA)、放射性免疫测定法 (RIA)、荧光免疫测定法 (FIA)、酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 和酶法,优选高效液相色谱-串联质谱法 (HPLC-MS/MS),或从操作的简便性出发,优选使用抗 Tetranor-PGDM 抗体的免疫测定法,特别是酶免疫测定法 (EIA)、放射性免疫测定法 (RIA)、荧光免疫测定法 (FIA) 和酶联免疫吸附测定法 (ELISA),特别优选酶免疫测定法 (EIA) 和酶联免疫吸附测定法 (ELISA)。

[0046] 作为肌变性疾病,例示出进行性肌营养不良症、先天性肌营养不良症、肢带型肌营养不良症、面肩肱型肌营养不良症、肌强直性肌营养不良症、肌萎缩侧索硬化症、肌病、肌肉拉伤、心肌病 (心肌梗塞)、糖尿病性末梢血管障碍 (血管平滑肌障碍),优选为诸如进行性肌营养不良症、先天性肌营养不良症、肢带型肌营养不良症、面肩肱型肌营养不良症、肌强直性肌营养不良症的肌营养不良症和肌萎缩侧索硬化症。

[0047] 能够用于判定肌变性疾病的治疗效果的治疗药不受特别限定,可以使用任何治疗药,例如造血前列腺素 D 合酶 (HPGDS) 抑制剂、前列腺素 D 受体拮抗剂,优选造血前列腺素 D 合酶 (HPGDS) 抑制剂。

[0048] 优选通过免疫测定法来测定样品中 Tetranor-PGDM 的浓度,因为该方法能够简便地对大量的样品进行同时测定。

[0049] 能够用于免疫测定法或试剂盒的抗 Tetranor-PGDM 抗体可以是例如多克隆抗体或单克隆抗体。

[0050] 制造抗体时,可以向动物 (大鼠、小鼠、豚鼠、兔、犬、猫、绵羊、山羊等) 给予 Tetranor-PGDM 来进行免疫接种,从而制备多克隆抗体和单克隆抗体。或者,使 Tetranor-PGDM 与诸如牛血清白蛋白 (BSA)、球蛋白、甲状腺球蛋白、血清蛋白的适当的蛋白结合,之后,与适当的佐剂形成悬浮混合物,并以一定的时间间隔对动物 (大鼠、小鼠、豚鼠、兔、犬、猫、绵羊、山羊等) 进行给药,经过预定时间后采集动物的血清并通过公知的方法进行处理,由此能够得到多克隆抗体和单克隆抗体。

[0051] 具体而言,可以如下制备单克隆抗体:根据需要使多克隆抗体制备时所使用的 Tetranor-PGDM 与适当的蛋白结合,并作为免疫原使用从而使动物免疫,再利用杂交瘤来制备单克隆抗体,其中,上述杂交瘤是通过将由脾脏得到的单克隆抗体形成细胞与骨髓瘤细胞融合而得到的。

[0052] 杂交瘤能够通过如下方法得到。分数次、每隔 2-3 周,将按照如上操作得到的 Tetranor-PGDM 单独或其蛋白结合体与弗氏完全佐剂一起腹腔内给药、静脉内给药或皮下给药至诸如小鼠、大鼠、兔的适当的哺乳动物从而进行免疫。然后,使来自脾脏或其它器官

的抗体形成细胞与诸如骨髓瘤细胞的能够在试管内增殖的肿瘤细胞融合。作为融合方法，可以按照 Kohler and Milstein 的常用方法 (Nature, vol. 256, 495 (1975)) 利用聚乙二醇来进行，或者利用仙台病毒等进行。

[0053] 使用由上述方法得到的抗 Tetranor-PGDM 抗体，实施 Tetranor-PGDM 的免疫测定法。作为上述免疫测定法，优选通过靶向所测定的物质 Tetranor-PGDM 的周知的竞争性免疫测定法来进行，可以列举通过标记物质进行分类的酶免疫测定法 (EIA)、荧光免疫测定法 (FIA)、发光免疫测定法、放射性免疫测定法 (RIA) 等。特别优选 EIA 法。

[0054] 通常，竞争法中可以使用标记抗原。标记物质包括例如酶、荧光物质、发光物质、放射性同位素等。标记物质与抗原的结合可以利用公知的形成共价键或非共价键的方法来进行制备。结合的方法中，可以列举例如：使用例如缩合剂来形成共价键的方法、使用各种交联剂的方法等（例如，参照“蛋白质核酸酶”增刊 31 号，37-45 页 (1985)）。利用共价键的方法中，除了可以使用抗原中存在的官能团之外，还可以在利用通常方法导入诸如硫醇基、氨基、羧基、羟基的官能团后，通过结合这些官能团来制造标记抗原。此外，作为利用非共价键的方法，可以列举物理吸附法。

[0055] Tetranor-PGDM 的测定，优选通过例如以下记载的免疫测定法来实施。使预定量的被标记的 Tetranor-PGDM、抗 Tetranor-PGDM 抗体与含有 Tetranor-PGDM 的样品（特别是尿样品）竞争地反应，根据与抗体结合的或没有结合的标记抗原的量，对样品中的 Tetranor-PGDM 进行定量。

[0056] 可以如下进行与抗体结合的标记抗原和未结合的标记抗原的分离：添加抗免疫球蛋白抗体，分离沉淀的（标记抗原）-（抗 Tetranor-PGDM 抗体）-（抗免疫球蛋白抗体）复合物，测定与复合物结合或没有结合的标记物质。上述方法被称为双抗体法，还可以通过使用木炭过滤器的方法来进行。还能够通过对与固相结合抗免疫球蛋白抗体、与固相结合或没有结合的标记物质进行测定来实施抗免疫球蛋白抗体测定。抗免疫球蛋白抗体，能够通过公知的方法，例如物理吸附法、利用交联剂或共价键的化学结合法、利用抗生物素-生物素结合的结合法等与固相结合。不用说，标记物质的测定应根据所用的标记物质的类型来进行选择。

[0057] 本发明的试剂盒包括抗 Tetranor-PGDM 抗体，而且在更优选的实施方式中，还包括标记的 Tetranor-PGDM 和抗 Tetranor-PGDM 抗体。在试剂盒中，可以根据需要加入例如与抗 Tetranor-PGDM 抗体结合的抗免疫球蛋白抗体、样品稀释液、抗体和标记的 Tetranor-PGDM 的稀释液、已知浓度的标准 Tetranor-PGDM 等，在 EIA 用的试剂盒中，还可以加入例如底物、终止液等。

[0058] 在本发明中用于测定 Tetranor-PGDM 的样品具体地为例如从人采集的尿。

[0059] 在肌变性疾病患者的效果判定方法中，对治疗药给药前后的样品（特别是尿）中的 Tetranor-PGDM 的测定值进行比较。

[0060] 样品还可以使用累积一天量的尿，并可以直接使用采集的样品进行测定。采集的尿可以在室温下进行保存，但优选在低温下进行保存直至测定使用。

[0061] 样品中含有的 Tetranor-PGDM 的测定，可以相对于所采集的样品总量来进行，也可以相对于所采集的样品的一部分来进行并考虑利用诸如肌酸酐的对照物质进行校正。

[0062] 从操作的简便性出发，样品中含有的 Tetranor-PGDM 的测定，优选相对于所采集

的样品的一部分来进行并考虑利用肌酸酐进行校正。

[0063] 下面,对本发明所使用的预定值进行说明。

[0064] 用于肌变性疾病患者的治疗效果判定的预定值,可以通过测定健康人和患者的样品中的 Tetranor-PGDM 来确定,然后每一测定值能够用于确定作为根据通常方法判定有无治疗效果的标准“预定值”。

[0065] 例如在样品为尿的情况下,应当优选使用健康人和肌变性疾病患者的一天的累积尿或在规定时间内采集的尿来确定预定值。

[0066] 在通过测定 Tetranor-PGDM 判定治疗效果的方法中,在伴随治疗药给药的治疗管理下,将给予治疗药前的患者的尿中含有的 Tetranor-PGDM 浓度的值设为预定值,较之于该预定值,尿中的 Tetranor-PGDM 浓度的值显著或具有显著倾向地降低时,判定治疗药和/或治疗方法有效,该治疗方法和/或治疗药给药继续进行。此外,尿中的 Tetranor-PGDM 浓度的值没有显著或具有显著倾向地降低时,判断治疗方法和/或治疗药无效,并尝试其他的治疗药和/或治疗方法。

[0067] 实施例

[0068] 以下,使用实施例对本发明进行详细说明,但本发明并不限于这些实施例。

[0069] 实施例 1

[0070] 1. 材料和方法

[0071] (1) 材料和样品

[0072] 使用以下的动物作为肌营养不良模型动物。

[0073] 肌营养不良小鼠 :mdx (C57B1/10 ScSn, 获得来源 :JAX Laboratories)

[0074] 肌营养不良犬 :CXMD_J (CXMD_J, 获得来源 :国立精神及神经中心)

[0075] 此外,为了比较,使用具有相同血统的动物作为对照动物。

[0076] 野生型小鼠 (C57BL/10 ScSn, 获得来源 :JAX Laboratories)

[0077] 正常比格犬 (获得来源 :国立精神及神经中心)

[0078] (2) 受试化合物

[0079] 使用以下受试化合物,其可以作为公知的造血前列腺素 D 合酶 (HPGDS) 抑制剂而得到 :

[0080] 受试化合物 1 :4- 二苯甲氧基 -1- {3- (1H- 四唑 -5- 基) - 丙基 } 哌啶 (Jpn. J. Pharmacol. , 78, 1-10 (1998)) ;

[0081] 受试化合物 2 :N- 甲氧基 -N- 甲基 -4- (5- 苯甲酰基苯并咪唑 -2- 基 -3,5- 二甲基吡咯 -2- 甲酰胺 (国际公开 W02007007778 号公报)。

[0082] (3) 小鼠尿采集

[0083] 向 4 周龄的 mdx 小鼠,以 30mg/kg 的用量口服给予溶剂 (0.5% 甲基纤维素溶液) 或受试化合物 15 天。使用小鼠用代谢笼采集受试化合物 1 的给药开始前和给药 5 天后约 12 小时的时间段内的尿。此外,为了比较,从同周龄的同血统野生型小鼠采集尿作为对照。使用测定试剂盒 (L type Wako CRE • M, 和光纯药) 对尿中肌酸酐浓度进行测定。

[0084] (4) 犬尿采集

[0085] 对 CXMD_J 口服给予溶剂 (0.5% 甲基纤维素溶液) 或受试化合物 2 约 1 年后,开始向溶剂给药犬给予受试化合物 2,并向受试化合物 2 给药犬给予溶剂。在由溶剂给药向受试

化合物 2 给药的变更以及由受试化合物 2 给药向溶剂给药的变更之前,分别对尿进行采集。此外,给药液体变更后,随时间推移对尿进行采集。此外,为了比较,从正常比格犬采集尿作为对照。

[0086] (5) 尿的预处理

[0087] 在 200 μ L 的采集自小鼠或犬的尿中,混合 5ng 作为内标的氘标记的 Tetranor-PGDM-d6(Cayman Chemical 公司)。使用纯净水将体积调至 2mL,并将 pH 调整至 3。然后将尿注入预先用 5mL 乙腈和 5mL 纯净水平衡后的 Sep-Pak Vac C18 Cartridge(Waters) 中。通过用纯净水制备的 5mL 的 10% 乙腈溶液和 10mL 的己烷清洗后,用 5mL 的乙酸乙酯进行洗脱,然后在氮气气流下干燥。使残渣溶解于用纯净水制备的 100 μ L 的 10% 乙腈溶液中,作为测定样品。

[0088] (6) Tetranor-PGDM 的测定

[0089] 使用预处理后的尿样品测定 Tetranor-PGDM 水平。使用高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS) 装置进行测定。在测定中,使用 Prominence System(系统控制器 CBM-20A,送液单元 LC-20AD 2 台、在线脱气装置 DGU-20A₃、柱温箱 CTO-20A、带有冷却功能的自动进样器 SIL-20AC,岛津制作所制) 作为 HPLC 装置,使用 Inertsil ODS3(内径 2.1mm \times 长 50mm;GL Science 公司制) 作为保护柱,使用 Inertsil ODS3(内径 2.1mm \times 长 250mm;GL Science 公司制) 作为分离柱,流动相具有 0.01% -0.2% 甲酸或 0.01% -0.2% 乙酸,以及乙腈或乙腈/甲醇(90 : 10) 的浓度梯度。将流速设定为 0.2mL/分钟。将柱温箱设定为 37 $^{\circ}$ C,将自动进样器设定为 4 $^{\circ}$ C。MS/MS 部使用以电喷雾电离作为离子源的重四级杆质谱仪(4000Q TRAP LC/MS/MS 系统,Applied Biosystems 公司制)。使用 MRM(多反应监测) 进行定量。在该方法中,从大量母离子(前体离子)和 CID(碰撞诱导解离) 生成的碎片离子中特异性地选择真正的母离子,并根据母离子的面积对母离子进行精确定量。具体地,通过电喷雾电离生成目标分子的母离子,使用第一台质量分析器(Q1) 分离这些母离子,在碰撞部(Q2) 通过 CID(碰撞诱导解离) 产生这些母离子的独特的碎片离子,然后在第二台质量分析器(Q3) 中分离这些碎片离子,再通过其下游的检测器检测该碎片离子。如下进行 Tetranor-PGDM(质量数 328) 的检测,通过 CID(碰撞诱导解离) 将生成的 m/z(质量数 \div 电荷) 为 327 的离子进一步分解,使用由此生成的 m/z 为 155、143、109 中的任一种碎片离子。如下进行内标 Tetranor-PGDM-d6(质量数 334) 的检测,通过 CID(碰撞诱导解离) 将生成的 m/z(质量数 \div 电荷) 为 333 的离子进一步分解,使用由此生成的 m/z 为 161、149、109 中的任一种碎片离子。使用 MS/MS 附带的软件 Analyst Version 1.4.1 来进行数据分析。对所得质谱图中来自 Tetranor-PGDM 的峰面积进行计算,并根据使用标准样品制成的标准曲线进行各峰的定量。定量时,在每次分析中,通过使用来自作为内标加入的 Tetranor-PGDM-d6 的峰面积值校正提取效率和离子化效率来进行校正。

[0090] (7) 症状评价

[0091] 对于 mdx 小鼠的症状评价,使用小鼠用握力测定装置(牵引计,BrainScienceIdea 制) 测定前肢的握力。在 2 分钟以内进行一次测定,算出 5 次试验的平均值。

[0092] 2. 结果

[0093] (1) mdx 小鼠的尿中 Tetranor-PGDM 浓度水平高

[0094] 在野生型小鼠中,使用尿中肌酸酐浓度校正后的 Tetranor-PGDM 浓度为

6.8±1.0ng/mg Cre(平均值±标准误差),但是在mdx小鼠中,浓度为17.8±0.8ng/mg Cre(平均值±标准误差, $p < 0.0003$),显示出约3倍的高值。上述结果表明,能够将尿中的Tetranor-PGDM浓度用作肌营养不良中症状发展的尿中标志物。

[0095] (2)HPGDS抑制剂改善mdx小鼠的症状,使尿中Tetranor-PGDM浓度降低

[0096] 对HPGDS抑制剂对mdx小鼠的症状的效果进行了评价。在溶剂给药组中,前肢握力没有显著的变化,但通过反复口服给予受试化合物1,mdx小鼠的前肢握力显著增加(图1右)。对相同mdx小鼠的尿中Tetranor-PGDM浓度进行测定,其结果是在受试化合物1给药组中,尿中Tetranor-PGDM浓度显著降低(图1左)。上述结果表明,mdx小鼠的症状改善与尿中Tetranor-PGDM浓度的改变具有相关性。

[0097] (3)CXMD_J的尿中Tetranor-PGDM浓度水平高

[0098] 与正常犬相比,在肌营养不良模型犬CXMD_J中,尿中Tetranor-PGDM浓度水平较高,给予受试化合物2的CXMD_J的尿中Tetranor-PGDM浓度降低(表1)。上述结果表明,能够将尿中Tetranor-PGDM浓度用作肌营养不良中症状发展的尿中标志物。

[0099] 表1

[0100] 肌营养不良模型犬的尿中的Tetranor-PGDM浓度

[0101]

	Tetranor-PGDM 浓度 (ng/ml)
正常犬 (1)	5.9
正常犬 (1)	9.3
正常犬 (1)	5.0
正常犬 (1)	5.8
CXMD _J 犬	27.8
给予 HPGDS 抑制剂的 CXMD _J 犬	17.9

[0102] (4)通过HPGDS抑制剂给药,使CXMD_J中的尿中Tetranor-PGDM浓度降低

[0103] 口服给予受试化合物2约一年后,变更为溶剂给药的CXMD_J的尿中Tetranor-PGDM浓度增加(图2左),症状评分逐渐恶化。另一方面,口服给予溶剂约一年后,变更为抑制剂给药的CXMD_J的尿中Tetranor-PGDM浓度降低(图2右),症状评分改善。上述结果表明,能够将尿中Tetranor-PGDM浓度的变化用作判定或预测肌营养不良中治疗药给药的效果的标志物。

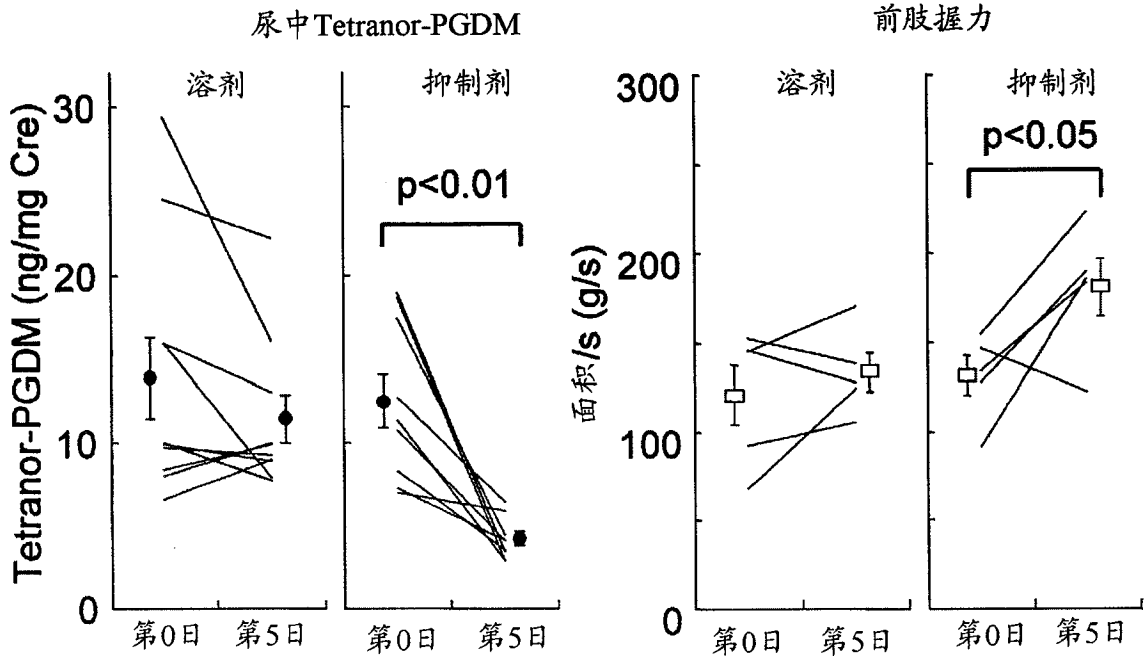


图 1

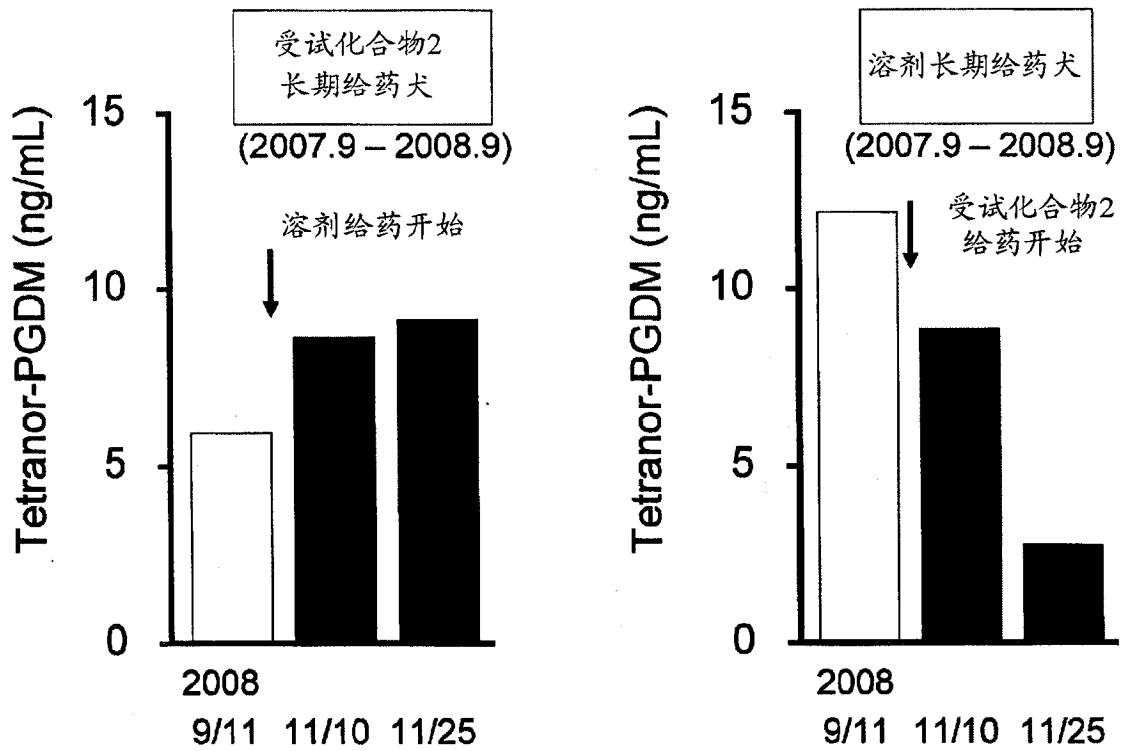


图 2

专利名称(译)	肌变性疾病的检测方法以及治疗效果判定方法		
公开(公告)号	CN102348982A	公开(公告)日	2012-02-08
申请号	CN201080011515.1	申请日	2010-03-08
申请(专利权)人(译)	大鹏药品工业株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	大鹏药品工业株式会社		
[标]发明人	里出良博 有竹浩介 丸山敏彦 谦内慎也 武田伸一 中村昭则		
发明人	里出良博 有竹浩介 丸山敏彦 谦内慎也 武田伸一 中村昭则		
IPC分类号	G01N33/53 G01N27/62 G01N30/72 G01N30/88 G01N33/15 G01N33/50		
CPC分类号	G01N30/7233 G01N33/6893 G01N2030/8813 G01N2800/28 G01N2800/2878		
代理人(译)	明亮		
优先权	2009055057 2009-03-09 JP		
其他公开文献	CN102348982B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

通过对从受试体分离出的样品中的11, 15-二氧-9 α -羟基-2, 3, 4, 5-四正前列-1, 20-二酸(以下称为Tetranor-PGDM)进行测定, 能够在早期检出肌变性疾病, 并且能够对这些疾病的治疗药和/或治疗方法的治疗效果进行判定。

