

(12) 发明专利申请

(10) 授权公告号 CN 103069276 A

(43) 申请公布日 2013. 04. 24

(21) 申请号 201180032762. 4

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2011. 08. 01

G01N 33/53(2006. 01)

(30) 优先权数据

2010A000442 2010. 08. 05 IT

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 12. 28

(86) PCT申请的申请数据

PCT/IT2011/000276 2011. 08. 01

(87) PCT申请的公布数据

WO2012/017466 EN 2012. 02. 09

(71) 申请人 D. M. G. 意大利有限公司

地址 意大利波梅齐亚(罗马省)

(72) 发明人 S·卡西亚拉 L·斯特纳蒂

R·维塔里

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 袁逸

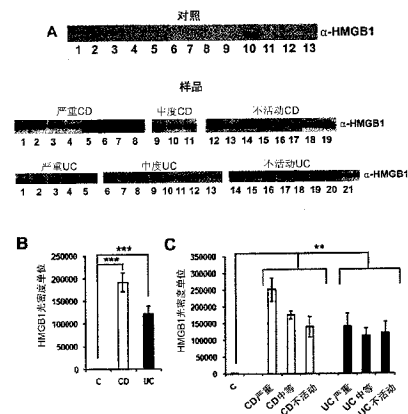
权利要求书1页 说明书9页 附图2页

(54) 发明名称

HMGB1 作为炎性肠病病情的生物标志物的用途、其在粪便样品中的非侵入性检测方法及其试剂盒

(57) 摘要

通过粪便提取物中 HMGB1 蛋白的存在来测定人炎性肠病病情、以及该蛋白质与慢性炎性肠病特别是克罗恩病 (CD) 和溃疡性结肠炎 (UC) 发病机理的牵连的非侵入性方法, 包括通过使用合适的抗原-抗体的 Western blot 分析或 ELISA 分析来检测粪便中 HMGB1 的存在的分析方案。本发明还包括用于实现该方法的比色试剂盒。



1. 一种用于检测、诊断和预测人类患者炎性肠病病情的非侵入性方法,其特征在于,所述方法检测所述患者的粪便样品中的 HMGB1 水平。
2. 一种方法,其中将粪便样品中 HMGB1 水平的降低用作对给定治疗的应答标志物。
3. 根据权利要求 1 的方法,其中所述的炎性肠病病情选自下组:慢性炎性肠病 (IBD),特别是克罗恩病 (CD) 和溃疡性结肠炎 (CU)。
4. 根据权利要求 1 和 2 的方法,其中所述人类患者是患有 IBD 的儿科患者。
5. 根据前述权利要求的方法,其特征在于,所述方法具有以下步骤:
 - 对所述粪便样品称重,并使其悬浮于 PBS 提取缓冲液中;
 - 对所述样品均质化,并对上清粪便提取物进行离心后的提取;
 - 通过 Bradford 测定法来评价所述蛋白质的浓度;
 - 通过蛋白质印迹法来分析所述粪便提取物。
6. 根据前述权利要求的方法,其特征在于,在通过蛋白质印迹法对所述提取物进行分析期间,用抗 HMGB1 多克隆或单克隆抗体来温育转移至 PVDF 滤膜的所述粪便提取物。
7. 根据前述权利要求的方法,其特征在于,所述抗 HMGB1 多克隆抗体是使用对应于人 HMGB1 氨基酸 165-180 的合成肽作为免疫原在兔中产生的,并且所述抗 HMGB1 单克隆抗体对应于产生自小鼠骨髓瘤与 B 细胞的融合的杂交瘤的克隆 115603,所述 B 细胞获自采用纯化的源自大肠杆菌 (E. coli) 的重组人 HMGB1 蛋白免疫的小鼠。
8. 根据权利要求 5 的方法,其特征在于,对所述粪便提取物的所述分析是通过 ELISA 测定法进行的。
9. 根据前述权利要求的方法,其特征在于,将蛋白质印迹测定法中用到的同样的抗体用作进行所述 ELISA 测定法时的抗体。
10. 根据前述权利要求的方法,其特征在于,所使用的抗 HMGB1 抗体为:使用对应于人 HMGB1 氨基酸 165-180 的合成肽作为免疫原在兔中产生的抗 HMGB1 多克隆抗体,以及对应于产生自小鼠骨髓瘤与 B 细胞的融合的杂交瘤的克隆 115603 的抗 HMGB1 单克隆抗体,所述 B 细胞获自采用纯化的源自大肠杆菌的重组人 HMGB1 蛋白免疫的小鼠。
11. 一种根据前述权利要求的方法、基于抗原-抗体特异性反应检测人粪便样品中的 HMGB1 蛋白的比色试剂盒,其特征在于,所述抗体是抗 HMGB1 多克隆抗体或抗 HMGB1 单克隆抗体。
12. 一种根据前述权利要求的比色试剂盒,其特征在于,所使用的抗 HMGB1 抗体为:使用对应于人 HMGB1 氨基酸 165-180 的合成肽作为免疫原在兔中产生的抗 HMGB1 多克隆抗体,以及对应于产生自小鼠骨髓瘤与 B 细胞的融合的杂交瘤的克隆 115603 的抗 HMGB1 单克隆抗体,所述 B 细胞获自采用纯化的源自大肠杆菌的重组人 HMGB1 蛋白免疫的小鼠。

HMGB1 作为炎性肠病病情的生物标志物的用途、其在粪便样品中的非侵入性检测方法及其试剂盒

[0001] 描述

[0002] 本发明与检测和诊断人慢性炎性肠病 (IBD “炎性肠病”) 的材料和方法有关。尤其, 本发明描述了一种通过粪便提取物中 HMGB1 蛋白的存在来测定人炎性肠病病情、以及该蛋白质与慢性炎性肠病特别是克罗恩病 (CD) 和溃疡性结肠炎 (UC) 发病机理的牵连的非侵入性方法。本发明还包括用于实现该方法的比色试剂盒。

发明领域

[0003] 高迁移率族蛋白 1 (HMGB1) 是一种与非组蛋白染色质相关联的非组蛋白核蛋白质, 表现为能够通过诱导炎症反应来应答组织损伤的刺激 (1) 的 DAMP (伤害相关分子模式) 分子原型。HMGB1 在诸如 LPS、TNF α 、IL-1 β 、IL-6 和 IL-8 (4) 之类的促炎症刺激后由巨噬细胞 (2) 和肠上皮细胞 (3) 主动分泌, 并且它由坏死细胞而非凋亡细胞释放 (5)。分泌至胞外空间的 HMGB1 与以下不同的分子形成高炎症复合体: 单链 DNA、LPS、IL-1 β 和核小体, 其与它们各自的受体诸如 TLR9、TLR4、IL-1R 和 TLR2 相互作用, 激活固有免疫。另外, HMGB1 可结合糖基化最终产物受体 RAGE (高级糖基化最终产物受体), 但不形成复合体 (6)。

[0004] 胞外 HMGB1 诱导炎症介质的产生 (4), 并可能在自身免疫性疾病或炎性疾病的发病机理中扮演重要角色, 这些疾病包括类风湿性关节炎 (7)、系统性红斑狼疮 (8) 和多发性肌炎 (9)。美国专利 No. 6, 303, 321 描述的发明涉及治疗败血症的药物组合物。该药物组合物包括作为活性物质的有效量的 HMGB1 拮抗剂或抑制剂。在 HMGB1 的拮抗剂中, 优选使用结合 HMGB1 蛋白的抗体、HMGB1 编码基因的反义序列、及 HMGB1 受体的拮抗剂。因此, 该发明的主题还有治疗败血症的方法, 包括施用有效量的 HMGB1 拮抗剂。该发明还提供了一种诊断和预后方法, 用于监测患者病情的严重程度和预测具有休克样症状或显示相关联症状的患者的败血症及相关病情的可能临床病程。该诊断和预后方法包括测定样品中特别是在血清或全血中 HMGB1 蛋白的浓度, 将其与 HMGB1 标准浓度比较。较高水平的 HMGB1 是预后不良或可能发生毒性反应的指标。该诊断方法也可应用于其他组织或液体空间例如脑脊液或尿液。

[0005] HMGB1 和胃肠道: 技术发展水平

[0006] 压力、组织损伤或肠粘膜微生物抗原症状激活参与固有免疫应答的细胞, 例如巨噬细胞和树突状细胞, 从而引发炎症反应。

[0007] 随炎症刺而激释放到细胞外基质的 HMGB1 的存在似乎通过改变肠道上皮细胞的渗透性和导致微生物抗原进入的增多来显著影响肠屏障功能。事实上, 体外和体内的研究已将由受免疫刺激的肠上皮细胞或由其他免疫细胞分泌的 HMGB1 的存在与肠屏障功能障碍关联起来 (10-15)。此外, 由于炎症细胞因子的释放, HMGB1 也潜在地参与结肠炎症, 正如在动物模型中 (16, 17)、以及在结肠炎的坏死性形式 (18, 19) 中所证实的。

[0008] 通过抗 HMGB1 分子来减少所分泌的 HMGB1 似乎与肠屏障损坏和粘膜炎症两者的改善皆相关 (11, 13, 14, 16, 19, 20)。

[0009] 从患者获得的组织样本中的 HMGB1 蛋白的存在和量已经被用作肠道癌症特别是结肠和直肠癌症的诊断和预后标志物,正如在美国专利申请 2006/0188883 中描述。然而,众所周知,癌症疾病是一种与炎性肠病非常不同的病情。此外,该专利申请的目标是只在生物组织的使用中适用,并没有提供与粪便材料的使用有关的参考。

[0010] 在最近一篇由 Davè 等所著的文章 (16) 中显示了在有慢性结肠炎的小鼠模型中使用抗炎剂如丙酮酸乙酯以减少 HMGB1 分泌的结果。对粪便样品进行的测试表明施用丙酮酸乙酯后大便中 HMGB1 水平降低。

[0011] 但是, Davè 对结肠炎的研究中进行的实验仅提到了小鼠模型,而且已知这样得到的结果并非总是能够自动扩展到人及其疾病;事实上,通过使用动物模型得到的结果经常与相应的人类疾病完全不一致,在分子标记物方面、在疾病的临床病程以及在对具体治疗的应答方面皆是如此。

[0012] 此外,在该研究中使用的小鼠模型还采用了转基因的小鼠品系,其对于 IL-10 即一抗炎细胞因子的基因编码被删除了,这导致小鼠的结肠炎。这与人类疾病相比是一种颇为不同的状态,在人类疾病中是由复杂得多的促成因素决定了疾病的发作。

[0013] 事实上,众所周知,在实验室动物模型中绝对无法再现表征人类的遗传和环境易变性。特别是,炎性肠病是多因素疾病,其中遗传和环境易变性在疾病的发作和发展中扮演重要角色。

[0014] 事实上,到目前为止,对于 CD,已有超过 30 个易感基因位点被标识出来,对于 CU 要少一些,进一步,并非所有受影响的个人均表达了相同的基因变异,而且,具有这种基因变异并不一定意味着会显现这种疾病;即,在有炎性疾病的人之间有很大的遗传易变性,这不同于小鼠模型,在小鼠模型中遗传同质性几乎是完全的。

[0015] 此外,环境压力在生活方式(饮食、吸烟、压力)方面、以及药物的使用或暴露于有害环境物质的方面在人与人之间各异,并在疾病的发作方面也扮演了角色,而且个体与个体之间,肠道菌群的组成也不同。在这方面,非常值得关注的是各重要的国家和国际集团最近进行的研究强调了共生菌群在炎性肠病方面的关键角色,与健康个体相比,这些共生菌群在受影响个体中是改变了的。再一次,在标准条件下,小鼠模型完全不会受到环境压力所影响,或者受到的影响至少要少得多,微生物谱在接受同样饮食的个体之间的易变性也少得多。

[0016] HMGB1 在人肠道炎症中的角色

[0017] 很少有关 HMGB1 在人体肠道炎症中的角色的研究:一最近的出版物指出 RAGE 配体(故而包括 HMGB1)为病理状况例如关节炎和结肠炎的潜在“生物标志物”(21),另一出版物标识出 HMGB1 为 ANCA(抗中性粒细胞胞质抗体)的一种新抗原,正如在有溃疡性结肠炎的患者血清中观察到的(22)。

[0018] 用作肠道炎症标志物的蛋白质

[0019] 生物标志物代表一种客观衡量炎症的非侵入性方法,并且可在某些疾病(23)(包括炎性肠病(IBD,“炎性肠病”)的评价中扮演主要或次要的角色。

[0020] 这样的标志物可被标识为血清的或粪便的,并可以用于诊断特定病程,用于将疾病分为不同亚型,用于评价其活动性、演变和预后,用于预测对医疗性治疗的应答或预测复发(24)。

[0021] 对于几种炎性疾病（包括 IBD）可用的血清标志物是：红细胞沉降率（ESR）、C-反应蛋白（CRP）、抗中性粒细胞胞质抗体（ANCA）和抗酿酒酵母抗体（ASCA）（24）。然而，它们对肠道炎症表现出低敏感度和特异性，并且与症状和疾病活动性指数相关性不佳（24）。

[0022] 与此相反，粪便标志物对胃肠道疾病如 IBD 的诊断表现出更大的特异性，因为在不涉及消化系统的疾病中它们的水平并不增加（25, 26）；而且，它们具有不一定需要采用内窥镜分析来评估疾病活动性这一优势（26, 27）。目前，乳铁蛋白和钙防卫蛋白是对肠道炎症使用最多的粪便标志物（24, 25, 28, 29）。事实上，大便中这些蛋白质的存在是对疾病活动性、复发预测的相当准确的衡量，并且能在有严重结肠炎的患者之中标识出高风险人群及监测药物治疗的效果。

[0023] 由于找到非侵入性的、敏感度更高、特异性更好、但又更经济的检测胃肠道炎症的方法的需求日益增加，大量的注意力被继续投入到对符合上述特征的新分子的标识上。

[0024] 目标和初步结果

[0025] 由于 HMGB1 有释放针对于细胞炎症库的募集的信号和激活由于外源性或内源性刺激导致的免疫应答这一众所周知的能力，本发明人提出了研究该蛋白质与人炎性肠病尤其是 CD 和 UC 的发病机理可能的牵连。

[0026] CD 的特征在于透壁炎症，其可影响消化道从口腔到肛门的任何节段。通常情况下，以不连续的方式涉及更多个节段。炎症涉及受影响节段的整个壁面，并且往往会扩散到邻近的肠系膜和淋巴结。最常见地，它波及末端回肠和结肠。

[0027] 在 UC 中，炎症病程局限于结肠，并且只影响粘膜。对直肠的波及是恒定的，并可伴随着对结肠的可变上游节段的波及。

[0028] 目前，这些疾病在西方国家（欧洲和北美）的患病率对于 UC 是每 10 万常住者大约 70-150 例并且对于 CD 是每 10 万常住者大约 20-40 例。它们主要是青春期后期和年轻成人年龄的疾病，发病高峰发生在 15 至 35 岁之间。

[0029] 在此背景下，本发明人对在有 IBD 的儿科患者的粪便中的 HMGB1 的发现给予了极大的关注，这是因为已知该蛋白质是在被分泌至细胞外基质时发挥其炎症活性的，而粪便正是从肠道产生并被排除的。然后将所获得的数据与对照组的数据进行了比较。

[0030] 令人惊奇地发现了，在有 IBD 的患者的粪便中观察到的 HMGB1 水平与健康对照的粪便中观察到的 HMGB1 水平相比显著增加（图 1）。这允许确立对患者的大便中 HMGB1 的确定能被用作肠道炎症的标志物。此外，已经清楚的是，有中等程度疾病的患者（疾病指标为 PCDAI/PUCAI \leq 25/60 的组）因为接受治疗而显现出比起有严重疾病的患者减少的 HMGB1 存在。因此，该蛋白质除了是一很好的炎症标志物外，看来也是对治疗的应答的良好指标（图 1）。为此目的开发的方法如下所解说。

[0031] 取样

[0032] 从患有 IBD 的 40 名儿科患者（分别为，19 名患有克罗恩病（CD）的患者以及 21 名患有溃疡性结肠炎（UC）的患者）、外加 13 名对照所收集的粪便样品通过 Western blot（蛋白质印迹法）被分析来评估 HMGB1 的存在。Western blot 的条件是为该目的专门开发的，为此用到了用于 HMGB1 检测的两个特异性抗体。

[0033] 与 HMGB 1 蛋白的存在有关的高亮带通过使用 ImageQuant 软件（GE 医疗集团生命科学，Uppsala, 瑞典）接收光密度分析；这样就可以向 HMGB1 水平的范围赋一数值。

[0034] 对患者的 IBD 的诊断是按照已得到广泛认可和共享 (30) 的内窥镜和组织学标准来进行的。CD 的活动性是通过“小儿克罗恩病的疾病活动性指数”(PCDAI) 来测定的,这是一种基于临床和实验室参数的测定方法 (31);若该值 ≤ 10 则此疾病被认为是不活动的,若该值 $> 10-30$ 则被认为是轻度至中度,且若该值 > 30 则被认为是严重的。UC 的活动性按照“小儿溃疡性结肠炎活动性指数”(PUCAI) 来定秩 (32);后者是一最近得到验证的非侵入性的多参数方法,根据该指数,该疾病被认为处于缓解期(分数低于 10),轻微疾病(分数在 10 至 34 之间),中度(分数在 35 至 64 之间)以及严重疾病(分数在 65 至 85 之间)。

[0035] 采用 SES-CD(33) 和 Matt 氏分数 (34) 来为溃疡性结肠炎确定内窥镜分数。为计算 SES-CD,肠道被分为 5 段(回肠、左结肠、横结肠、右结肠、直肠),并且对每段中的疾病活动性程度赋了一范围从 0 到 12 的值(总的值范围:0-60)。为计算 Matt 氏分数,肠道被分为 6 段(盲肠、升结肠、横结肠、降结肠、乙状结肠、直肠),在每段中对疾病活动性程度赋一范围从 1 到 4 的值(总的值范围:6-24)。

[0036] 基于本研究中所征召的患者的这些指数,已经发现 13 例 IBD 患者为有严重疾病(8 名为 CD 并且 5 名为 UC),11 例为轻度至中度(3 名为 CD 并且 8 名为 UC),以及 16 例为不活动的(8 名为 CD 并且 8 名为 UC)(表 1)。

[0037] 表 1 列出了临床试验中所征召的患者,按照疾病类型和严重程度划分。

[0038] 表 1. 受研究患者人群中的人口结构特征和 IBD 疾病活动性指数。PCDAI:“小儿克罗恩病疾病活动性指数”,PUCAI:“小儿溃疡性结肠炎活动性指数”

[0039]

对象	性别	年龄(岁)	PCDAI
严重疾病			
MC1	F	10	57
MC2	M	17	55
MC3	M	10	35
MC4	M	12	35
MC5	F	12	35
MC6	M	15	30
MC7	F	17	35
MC8	F	17	25
中度疾病			
MC9	M	15	22

MC10	M	9	17
MC11	M	13	15
不活动疾病			
MC12	F	13	10
MC13	F	16	10
MC14	M	10	10
MC15	M	14	10
MC16	M	11	10
MC17	M	18	5
MC18	M	16	5
MC19	M	12	5
CU1	F	14	80
CU2	F	10	75
CU3	M	12	75
CU4	F	7	65
CU5	M	11	65
中度疾病			
CU6	F	14	60
CU7	M	11	60
CU8	M	15	50
CU9	M	11	40
CU10	F	14	40
CU11	F	17	25
CU12	M	13	15

CU13	M	11	15
不活动疾病			
CU14	F	18	10
CU15	F	18	5
CU16	F	11	5
CU17	M	12	0
CU18	M	10	0
CU19	F	10	0
CU20	F	7	0
CU21	M	14	0

[0040]

[0041] 粪便样品的制备

[0042] 粪便样品获得自受 IBD 影响的、具有不同严重程度的疾病的儿科患者 (表 1), 以及获得自健康对照, 其招募于罗马“La Sapienza”大学儿科胃肠病学和肝病学组儿科系, 其由 Salvatore Cucchiara 教授领导。

[0043] 收集在用于粪便的无菌容器中的这些样品保存于 -20°C 至 -80°C 之间的温度直至分子分析。

[0044] 粪便样品的称重和在缓冲溶液中的悬浮

[0045] 每份样品 (等同于标准粪便容器内的勺子的容量) 使用无菌尖端从容器中移除, 放入 1.5ml eppendorf 管中, 并使用数字天平称重。样品被重悬浮在提取缓冲液 (磷酸盐缓冲液 PBS pH 7.2) 中以得到 500mg/ml 的最终浓度, 该缓冲液由 ScheBo Biotech 公司销售, 其含有去垢剂和叠氮化钠。

[0046] 大便的均质化和提取

[0047] 将样品在室温 (RT) 下涡旋一分钟, 然后在室温下置于轨道摇床中约 1 小时。在 10000rpm 下于 4°C 离心 5 分钟后, 收集上清液, 其即定义为提取出的粪便, 通过 Bradford 测定法 (Biolabs) 来测定蛋白质浓度。得到的样品可以立即通过 Western blot 测定法来分析或保存于 -80°C 并随后分析。

[0048] 通过 Western blot 分析粪便提取物

[0049] 对于 20 μg 粪便蛋白提取物, 加入等体积的 2X 样品缓冲液 (100mM Tris-Cl pH 6.8, 10% β -巯基乙醇, 4% SDS, 20% 甘油, 0.2% 溴酚蓝); 随后将样品煮沸 5 分钟, 在通过 Western blot (WB) 分析提取物之前短暂离心。使用 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶来分离粪便蛋白提取物, 随后通过 70 伏的电转移 1 小时来转移到 PVDF 滤膜 (Amersham) 上。采用封闭缓冲液 (0.02M Tris-Cl pH 7.6, 0.137M 氯化钠, 5% 的脱脂奶粉) 在室温下温育 1 小时来

封闭滤膜上的非特异性位点,随后用在抗体缓冲液(0.02M Tris-Cl pH7.6,0.137M氯化钠,3%的脱脂奶粉)中1:1000稀释的抗HMGB1多克隆抗体(目录号H9593,Sigma)、或用在抗体缓冲液中1:500稀释的抗HMGB1单克隆抗体(目录号MAB1690,R&D Systems,明尼阿波利斯,美国)于4℃温育滤膜16小时。然后进行三次在TBS-T 0.1%吐温(0.02M的Tris-Cl pH 7.6,0.137M氯化钠,0.1%吐温)中的洗涤,每次5分钟,并且随后,在使用购自Sigma的抗HMGB1的情况下用抗兔二抗在室温下温育滤膜1小时,而在用R&D System的抗HMGB1抗体温育的情形中则是使用抗鼠二抗,它们两者都偶联过氧化物酶(Santacruz),于抗体缓冲液中1:4000稀释。在TBS-T+0.1%吐温中执行3次各5分钟的额外洗涤,随后采用ECLplus(Amersham)和放射自显影膜(Kodak)进行化学发光信号的检测。

[0050] 图1显示了通过使用R&D System的抗HMGB1单克隆抗体的Western blot分析所检测到的在大便样品中的HMGB1蛋白。特别地,板块A显示了Western blot的结果,板块B显示了患者的Western blot高亮带的光密度值的图表,板块C显示了按照疾病严重程度分组的患者的Western blot高亮带的光密度值的图表。

[0051] Western blot高亮带的光密度分析允许获得与粪便样品中存在的HMGB1水平有关的数值。特别是已发现在健康个体中,该数值的范围是从1000至3000,表达为任意光密度单位(ADU),平均值为1200ADU;有CD的受试者显示出范围从20000至380000ADU的数值,平均值为190000ADU;而所有患有UC的患者显示出与在被分析粪便样品中存在的HMGB1水平有关的、范围从6000至280000ADU的数值,平均值等于120000ADU(图1-B)。该图中,星号是指通过Mann-Whitney统计检验来评价的统计显著性:其中 $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ 。

[0052] 此分析表明,IBD患者的粪便中的HMGB1蛋白表达同对照相比显著增加,在后者中检测不到($p < 0.001$)(图1)。该结果表明,粪便中检测到的HMGB1蛋白的存在是人体肠道炎症的标志物。HMGB1蛋白的存在同样在16名具有在PCDAI和PUCAI指数基础上被定义为不活动的疾病的患者的粪便中检测到;但是,根据内窥镜分数的评估,这些患者具有一定程度的肠道炎症,这与对他们粪便中的HMGB1的检测相符。

[0053] 特别是在具有活动的CD和UC的患者中,SES-CD和Matt氏分数的中位数分别是23.0(值范围:14-34)和18.0(值范围:8-24),并且在具有不活动的CD和UC的患者中,SES-CD和Matt氏分数的中位数分别是7.5(值范围:0-15)和11.5(值范围:6-18)。这些指数表明,即使在根据PCDAI和PUCAI指数定义为所谓不活动的患者中,也有一定程度的肠道炎症,并且HMGB1还可以提供疾病的非活动状态的指示,并因此被视为对这些不活动炎症病情非常敏感的标志物。将粪便中检测到的HMGB1蛋白水平与粪便钙防卫蛋白水平进行了比较,后者目前被认为是上选的生物标志物并且对于通过ELISA来诊断肠道炎症而言是可靠的(29,35)。该分析的结果显示于图2,其中星号表示根据Mann-Whitney统计检验得到的统计显著性,其中 $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ 。与健康对照相比(图1-B,图2-A),这两种蛋白质在患者粪便中结果都明显增加($p < 0.001$)。然而,不活动CD和UC组显示出很低的钙防卫蛋白水平,但是相比起对照(在CD和UC中 $p < 0.01$)(图1-C,图2-B)而言粪便HMGB1水平显著增加。总之,该比较显示出在所有诊断为有活动炎症性疾病(CD和UC两者都是如此)的患者的粪便样品中这两种蛋白质的水平的显著相关性(在CD中 $r : 0.77$,在UC中 $r : 0.70$, $p < 0.01$),其中, r =根据Spearman氏检验的秩相关性系数。这种相

关性在只考虑具有不活动炎性疾病的患者时便消失了（在 CD 中 $r : 0.22$, 在 UC 中 $r : 0.18$, 无症状）。事实上, 在尽管根据内窥镜分数仍然显示一定程度的炎症、但具有根据 PCDAI 和 PUCAI 指数定义为所谓不活动的疾病的所有 16 名患者中, HMGB1 都显著升高了, 但钙防卫蛋白仅在其中两例中升高。这表明 HMGB1 是对由经典的疾病活动性指数所揭示的具有临床静态疾病的患者的持久性肠道炎症非常敏感的标志物。但是, 经典的疾病活动性指数作为临床和实验室特征的混合物, 并不总是与内窥镜检查所检测到的肠道炎症相关。

[0054] 因此, 可设想将 HMGB1 蛋白用作针对疾病在表面上缓解了的患者复发的潜在分子预后参数。在图 1 中, 具有 IBD 的患者与健康对照相比在粪便中显示出显著的 HMGB1 增加。此外, 在 HMGB1 水平和疾病的严重程度之间有直接的相关。总之, HMGB1 不仅是很好的炎症标志物, 看来也提供了疾病严重程度的良好指标, 且因此可以用作对治疗应答的标志物。

[0055] 根据本文所述, 可见本发明的重要性是不言而喻的: HMGB1 作为生物标志物的用途以及检测其在大便样品中的存在的方法是显著的进步, 因为这能够以一种安全和非侵入的方式诊断人肠道炎症的存在和水平, 避免了对大多数患者高度创伤性的往往反复的影像研究。

[0056] 此外, 蛋白质表达水平可用作疾病复发的预后标志物, 以及作为对治疗的应答的标志物。

[0057] 值得注意的是, 对于粪便提取物的分析, 并不是仅可使用 Western blot 测定法。发明人确实把注意力转向开发通过 ELISA 法来检测粪便中 HMGB1 的存在分析方案, ELISA 法使用对 Western blot 测定法所用到的同样的抗体, 其在对于目标蛋白质在特异性和敏感度方面给出了好到出乎意料的结果。因此, 正在构建使用在通过 WB 法在大便样品中检测蛋白质时已用过的这两种抗体的 ELISA 试剂盒。除了 Western blot, 提供 ELISA 方案的这一选择是由以下事实决定的, 即, 该技术简单并且还允许能够更好地量化反应, 事实上, ELISA 板的颜色强度是与抗原-抗体复合物（一抗）的数量成正比的, 并且因此也与被分析的样品中的（能够结合至一抗的）抗原浓度成正比。

[0058] 参考书目

[0059] 1. Wang 等 *Am J Respir Crit Care Med* 164 :1768-73, (2001)

[0060] 2. Fink 等 *J Intern Med.* 261 :349-62, (2007)

[0061] 3. Hirschfeld 等 *J Immunol.* 165 :618-22, (2000)

[0062] 4. Andersson 等 *J Exp Med.* 192 :565-570, (2000)

[0063] 5. Scaffidi 等 *Nature.* 418 :191-5, (2002)

[0064] 6. Bianchi 等 *J Leukoc Biol.* (2009)

[0065] 7. Taniguchi 等 *Arthritis Rheum.* 48 :971-81, (2003)

[0066] 8. Jiang 等 *Ann Rheum Dis.* 67 :727-8, (2008)

[0067] 9. Ulfgren 等 *Arthritis Rheum.* 50 :1586-94, (2004)

[0068] 10. Luan ZG 等 *Pancreas* 39 :216-23 (2010)

[0069] 11. Fink *M. Crit Care Med* (2009)

[0070] 12. Yang R 等 *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 297 :R362-9 (2009)

[0071] 13. Wu R 等 *Crit Care Med* 37 :2483-5 (2009)

- [0072] 14. Liu S 等 Am J Physiol Cell Physiol 290 :C990-9(2006)
- [0073] 15. Sappington 等 Gastroenterology. 123 :790-802, (2002)
- [0074] 16. Dave SH 等 J Leukoc Biol 86 :633-43(2009)
- [0075] 17. Maeda S 等 Biochem Biophys Res Commun 360 :394-400(2007)
- [0076] 18. Dai S 等 J Biol Chem 285 :4995-5002. (2009)
- [0077] 19. Zamora R 等 Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 289 :G643-52(2005)
- [0078] 20. Yang R 等 Mol Med 12 :105 :14(2006)
- [0079] 21. Clynes R 等 Curr Mol Med 7 :743-51(2007)
- [0080] 22. Ito I 等 J Biol Chem 282 :16336-44(2007)
- [0081] 23. Desai D 等 Aliment Pharmacol Ther 25 :247-255(2007)
- [0082] 24. Gisbert JP 等 Gastroenterol Hepatol 30 :117-129(2007)
- [0083] 25. Angriman I 等 Clin Chim Acta 381 :63-68(2007)
- [0084] 26. Tibbie JA, Bjarnason I. Fecal Drugs Today (Bare) 37 :85-96(2001)
- [0085] 27. Vermeire S 等 Gut 55 :426-431(2006)
- [0086] 28. Sutherland AD 等 Dis Colon Rectum 51 :1283-1291(2008)
- [0087] 29. Gisbert JP, McNicholl AG Dig Liver Dis 41 :56-66(2009)
- [0088] 30. Bousvaros A, Antonioli DA, Colletti RB 等 J Pediatr Gastroenterol Nutr 44 :653-74(2007)
- [0089] 31. Hyams JS, Mandel F, Ferry GD, 等 J Pediatr Gastroenterol Nutr 12 :439-47(1991)
- [0091] 32. Turner D, Otley AR, Mack D, 等 Gastroenterology 133 :423-32. (2007)
- [0092] 33. Daperno M, D'Haens G, Van Assche G, 等 Gastrointest Endosc 60 :505-12(2004)
- [0093] 34. Osada T, Ohkusa T, Yokoyama T, 等 Inflamm Bowel Dis 16 :192-197(2010)
- [0094] 35. Diamanti A, Panetta F, Basso MS 等 Inflamm Bowel Dis 16 :1926-30(2010)

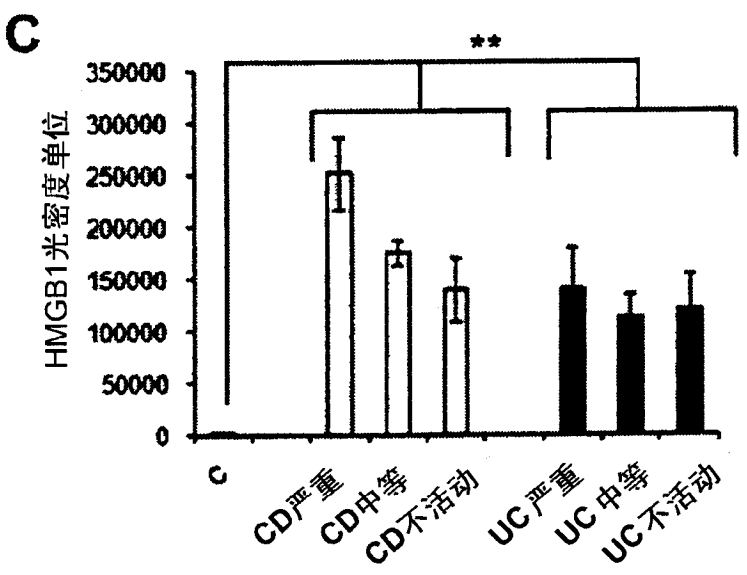
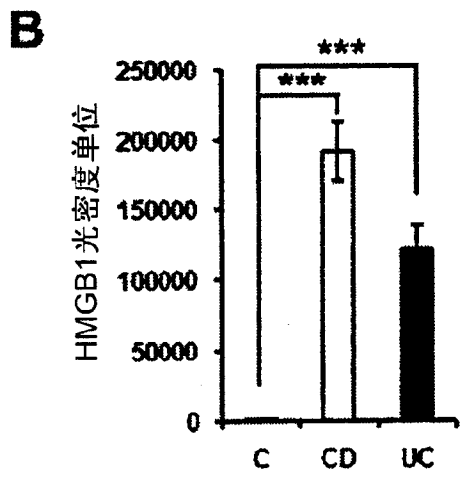
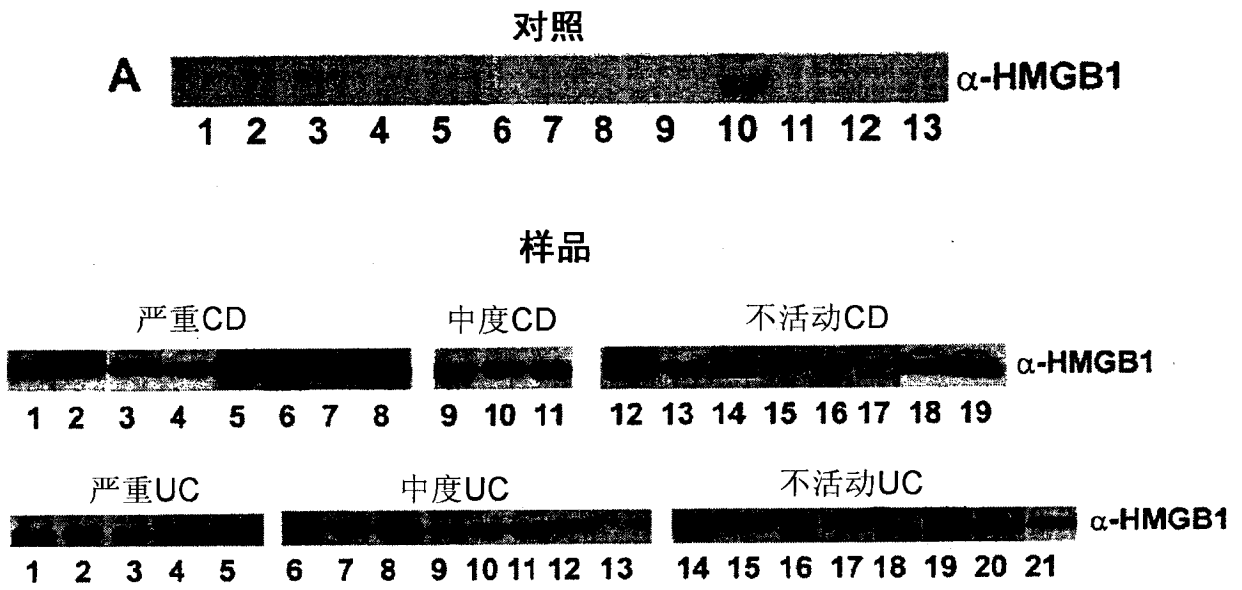


图 1

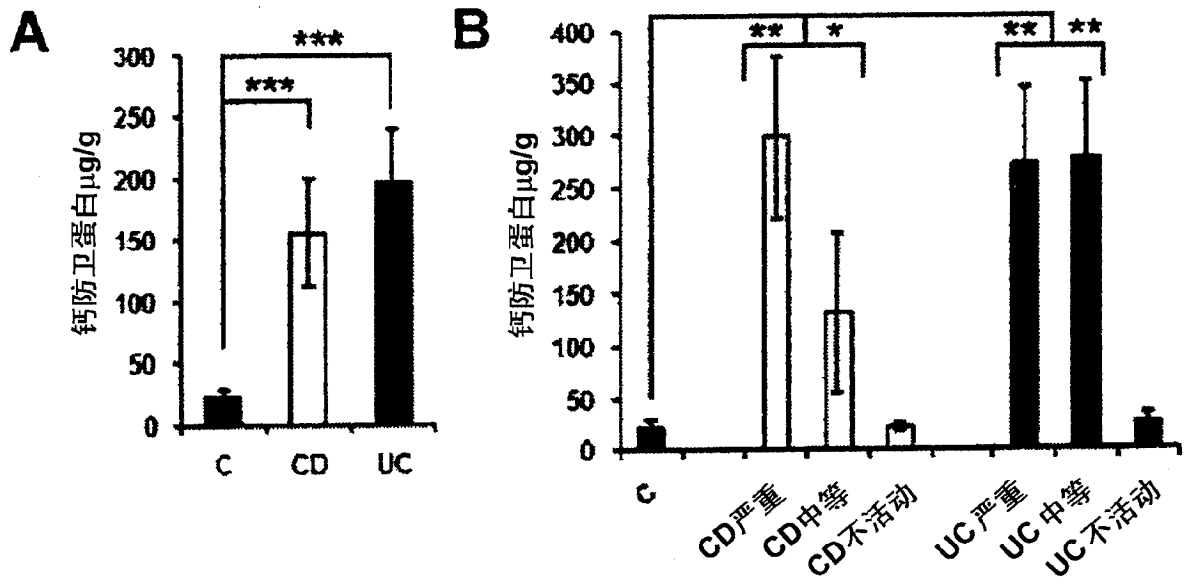


图 2

专利名称(译)	HMGB1作为炎性肠病病情的生物标志物的用途、其在粪便样品中的非侵入性检测方法及其试剂盒		
公开(公告)号	CN103069276A	公开(公告)日	2013-04-24
申请号	CN201180032762.4	申请日	2011-08-01
[标]发明人	S·卡西亚拉 L·斯特纳蒂 R·维塔里		
发明人	S·卡西亚拉 L·斯特纳蒂 R·维塔里		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/53 G01N2800/065 G01N33/6875 G01N2800/52		
优先权	2010A000442 2010-08-05 IT		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

通过粪便提取物中HMGB1蛋白的存在来测定人炎性肠病病情、以及该蛋白质与慢性炎性肠病特别是克罗恩病(CD)和溃疡性结肠炎(UC)发病机理的牵连的非侵入性方法，包括通过使用合适的抗原-抗体的Western blot分析或ELISA分析来检测粪便中HMGB1的存在的分析方案。本发明还包括用于实现该方法的比色试剂盒。

