



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109791143 A

(43)申请公布日 2019.05.21

(21)申请号 201780059983.8

(22)申请日 2017.09.27

(30)优先权数据

20165730 2016.09.29 FI

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.03.28

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/FI2017/050680 2017.09.27

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/060556 EN 2018.04.05

(71)申请人 梅蒂克斯生物化学有限公司

地址 芬兰埃斯波

(72)发明人 P·普西宁 T·索尔萨

V·萨洛马 J·尤希拉

A·科尔沃 S·蒂萨拉

(74)专利代理机构 北京市中伦律师事务所

11410

代理人 杨黎峰 钟锦舜

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/573(2006.01)

权利要求书1页 说明书14页 附图7页

(54)发明名称

确定与心血管疾病相关的风险的方法

(57)摘要

本发明涉及一种用于确定心血管疾病风险的新方法,包含检测样本中的MMP-8和CRP,并将检测的量与MMP-8和CRP的相应预定值进行比较,其中检测MMP-8和CRP水平升高指示心血管事件或疾病的存在或风险。本发明还涉及检测MMP-8和CRP用于预测发生心血管事件的风险、监测治疗对心血管事件或心血管疾病的影响,或用于检测亚临床心血管疾病的存在用途。此外,提出了一种用于构建CVD疾病存在或CVD事件风险的风险预测模型的方法。

1. 一种用于确定与心血管疾病相关的风险的方法,包括:检测样本中的基质金属蛋白酶-8 (MMP-8) 和C反应蛋白 (CRP),并将检测到的MMP-8和CRP的量与MMP-8和CRP的相应预定值进行比较,其中检测到MMP-8和CRP水平升高指示心血管疾病的存在或指示心血管事件或心血管疾病的风险。

2. 根据权利要求1的方法,其中当MMP-8的量高于MMP-8的预定值并且CRP的量高于CRP的预定值时,所述检测到的MMP-8和CRP水平升高。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中检测升高的MMP-8和CRP水平预测在检测后一年内发生心血管事件的风险。

4. 根据权利要求1至3所述的方法,其中检测活化的MMP-8。

5. 根据权利要求1至4所述的方法,其中所述心血管事件或心血管疾病选自由以下组成的组:心血管疾病 (CVD)、诸如心绞痛和急性心肌梗塞 (AMI) 的冠状动脉疾病 (CAD)、中风、高血压性心脏病、风湿性心脏病、心肌病、心房颤动、先天性心脏病、心内膜炎、主动脉瘤和外周动脉疾病,优选所述心血管事件或心血管疾病是CVD事件或CAD,诸如AMI。

6. 根据权利要求1至5所述的方法,其中所述方法用于监测治疗对心血管事件或心血管疾病的影响。

7. 根据权利要求1至6所述的方法,其中所述方法用于评估首次或随后的心血管事件的风险。

8. 根据权利要求1至7所述的方法,其中所述方法用于检测亚临床心血管疾病。

9. 根据权利要求1至8所述的方法,其中所述样本是血清、血浆或全血。

10. 根据权利要求9所述的方法,其中所述样本是血清。

11. 根据权利要求1至10所述的方法,其中用免疫测定法进行MMP-8的检测。

12. 根据权利要求1至10所述的方法,其中用免疫测定法进行CRP的检测。

13. 根据权利要求11或12所述的方法,其中所述免疫测定法是选自由以下组成的组的一种或多种:ELISA、IFMA、侧向流动和基于微流体的即时 (PoC) 测定、透射比浊法、散射比浊法、颗粒增强透射比浊法、颗粒增强散射比浊法和乳胶凝集。

14. 一种用于构建CVD疾病或CVD事件风险的风险预测模型的方法,其中所述方法基于在样本中检测MMP-8和CRP。

15. 一种检测MMP-8和CRP的用途,用于预测在检测后一年内发生心血管事件的风险,用于评估首次或随后的心血管事件的风险、用于监测治疗或药物对心血管疾病的进展或患心血管事件的风险的影响,或在明显临床症状之前检测亚临床心血管疾病的存在。

确定与心血管疾病相关的风险的方法

技术领域

[0001] 本发明描述了用于改善心血管疾病的预测和估计预后的方法。本方法基于生物标志物的鉴定和随后组合,该生物标志物特别适合于区分具有心血管疾病事件风险的受试者和健康受试者。本文鉴定的生物标志物还可用于检测亚临床心血管疾病以及监测治疗或药物对心血管疾病的影响。本发明包含基质金属蛋白酶-8 (MMP-8) 和C反应蛋白 (CRP) 的用途,其用于心血管疾病事件的预测和估计预后,以及用于监测治疗和药物对心血管疾病事件的影响。此外,MMP-8和CRP浓度测量值可用于检测亚临床心血管疾病。

背景技术

[0002] 心血管疾病 (CVD) 是一类涉及心脏或血管的疾病。心血管疾病是全球死亡的主要原因。心血管疾病包含以下疾病,如冠状动脉疾病 (CAD) (诸如心绞痛和急性心肌梗塞 (AMI))、中风、高血压性心脏病、风湿性心脏病、心肌病、心房颤动、先天性心脏病、心内膜炎、主动脉瘤和外周动脉疾病。

[0003] 几种不同的病理生理机制在CVD发病机制、发展和过程中起重要作用。这些包括但不限于炎症、感染、促血栓形成和血栓形成活性、剪切应力和内皮反应性。CVD的主要原因是动脉粥样硬化,这是一种表征为受影响的血管壁中积聚脂质和炎症的疾病。在动脉粥样硬化过程和病理发展过程中,受影响的动脉壁由于积聚和形成脂肪病变或条纹而变厚,导致斑块(动脉粥样硬化)的积聚。平滑肌和具有细胞外脂滴的泡沫细胞核以及富含I型胶原蛋白的细胞外基质 (ECM) 形成(纤维)帽,随着时间的推移,特别是当受到增强的且连续和持续的炎症影响时,将使该帽易于破裂(Herman等人,2001)。因此,这些过程导致闭塞和血栓,闭塞和血栓通常导致不良心血管事件或结果。

[0004] I型胶原蛋白是动脉粥样硬化病变中主要的蛋白质细胞外基质 (ECM) 成分和纤维帽的承重分子。在胶原水解基质金属蛋白酶 (MMP) 中,MMP-8在催化上是最有效的并且能够引发I型胶原的降解(Sorsa等人,2006)。

[0005] 在不稳定性心绞痛中发现了病理性升高的MMP-8mRNA和蛋白质表达、产生以及血清/血浆水平。此外,还发现了血清/血浆MMP-8与病程之间的关联,以及不良CVD结果的长期发展。已经证实升高的血清MMP-8水平与CVD发病率增加有关并且反映了其增加。在细胞培养研究中,MMP-8通过其使保护性纤维帽变薄的能力与动脉粥样硬化斑块不稳定有关,从而使其更容易破裂(Herman等人,2001)。在人动脉粥样硬化斑块样本中,MMP-8蛋白和mRNA与巨噬细胞共定位 (Molloy等人,2004)。此外,腹主动脉瘤含有显著高于正常主动脉组织的MMP-8浓度 (Wilson等人,2005)。在患有斑块进展的无症状患者中观察到斑块MMP-8活性增加 (Turu等人,2005)。与具有更稳定形态的病变相比,易于破裂的斑块表达更多的免疫反应性MMP-8 (Herman等人,2001)。

[0006] 然而,迄今为止,只有少数研究调查了血清MMP-8浓度与CVD的关系。两项病例对照研究结果显示,心力衰竭和脑缺血患者的血清MMP-8浓度降低 (Wilson等人,2005;Lorenz1等人,2003)。在最近的两项大型研究中,血浆MMP-8浓度与CAD的存在和严重程度 (Kato等

人,2005)和颈动脉斑块进展(Turu等人,2005)呈正相关。Tuomainen等人的结果(2007年和2014年)显示血清MMP-8浓度在普遍或亚临床动脉粥样硬化中升高并且与致死结果相关。最近发现血浆MMP-8是代谢综合征的重要预测因子,即使在调整促炎细胞因子hs-CRP和TNF- α 后,这种关系仍然存在(Hoseini等人,2015)。

[0007] 升高的系统性MMP-8也在其他疾病中发挥重要作用。已充分记录MMP-8在ECM处理和炎症及免疫应答修饰中的主要作用以及作为药物靶标。

[0008] CRP是一种常见的炎症标志物,已发现其存在于心血管疾病风险患者中的水平升高。最近的研究表明,基础CRP水平升高的患者患糖尿病、高血压和心血管疾病的风险增加。CRP被认为是动脉粥样硬化和冠心病(CHD)的标志物。

[0009] 有了这种医学和生物学背景,鉴别和(PoC)诊断发展或进展为不良CVD结果的风险较高的人的早期或初始发作和/或阶段/步骤/过程的能力是至关重要的,不仅对医疗领域和医疗行业,对全球医疗保健系统也是非常重要的。

发明内容

[0010] 本发明的目的是提供一种用于确定心血管疾病风险的新方法,包含从血液样本中检测基质金属蛋白酶-8(MMP-8)和C反应蛋白(CRP),并将检测到的MMP-8和CRP的量与MMP-8和CRP的相应预定值进行比较,其中检测到MMP-8和CRP水平升高指示心血管疾病的存在或指示心血管事件或心血管疾病的风险。

[0011] 本发明的另一个目的是构建用于在明显临床症状或CVD事件风险之前存在亚临床CVD疾病的风险预测模型的方法,其中所述方法基于检测样本中的MMP-8和CRP。

[0012] 本发明的另一个目的是使用检测MMP-8和CRP来预测心血管事件的风险,优选在测试后一年内;用于评估首次或随后的心血管事件的风险;用于监测治疗对心血管事件或心血管疾病的影响;或者用于在明显临床症状之前检测亚临床心血管疾病的存在。

[0013] 根据本发明的一个方面,基于检测到升高的MMP-8和CRP水平,可以向受试者显示另外的测试或可以指示受试者进一步进行医学咨询。

[0014] 根据本发明的另一方面,它将有助于在首次或随后的心血管事件之前引导患者进行心脏检查。

附图说明

[0015] 图1.在具有高血清CRP和高MMP-8浓度组合(实线)和没有高血清CRP和高MMP-8浓度组合(虚线)的受试者中,在1年的随访中没有发生CVD事件(A)和AMI(B)的累计生存率。根据年龄和性别调整Kaplan-Meier估计进行分析。

[0016] 图2.从AMI患者获得的MMP-8浓度的相关数据,并用时间分辨免疫荧光测定法(IFMA)和固相酶联免疫吸附测定法(ELISA)测量。结果以散点图表示。

[0017] 图3.用IFMA(A)和ELISA(B)测量来自患有AMI或心绞痛的患者以及来自对照受试者的平均MMP-8浓度。两种测定法均显示患者与对照组之间MMP-8浓度的差异非常显著($p < 0.001$),但是用IFMA测定的患者与对照组之间的差异大于用ELISA测定的。结果以盒型图表示。中心线代表平均值,误差条代表95%CI。

[0018] 图4.用IFMA(A)和ELISA(B)测量的心绞痛或AMI患者以及对照受试者的MMP-8浓度

与CRP浓度的相关数据。(A)用IFMA获得的MMP-8浓度统计学显著相关,相关系数为 $r = 0.311$ ($p = 0.008$),而(B)用ELISA获得的MMP-8浓度统计学显著相关,相关系数为 $r = 0.301$ ($p = 0.011$)。

具体实施方式

[0019] 本发明人已经发现,在人体中呈现不同免疫级联的两种通常已知的炎症性标志物的组合,即MMP-8和CRP,可用于预测心血管疾病的风险、估计心血管疾病的预后以及监测正在进行治疗和药物对心血管疾病和心血管事件风险的有效性。此外,MMP-8和CRP可用于在明显的临床症状(诸如心绞痛、呼吸短促、疲劳、心悸和头晕)之前检测亚临床心血管疾病。

[0020] 由此,检测受试者的全血、血浆或血清中的MMP-8和CRP浓度可用于例如:1)确定心血管疾病事件的风险;2)在出现明显临床症状之前确定亚临床心血管疾病或病症的存在;3)估计心血管疾病或病症的预后;以及4)监测治疗或药物对心血管疾病进展或心血管事件风险的有效性。

[0021] 确定CRP和MMP-8的组合似乎是有用的。在CVD中,动脉粥样硬化破裂过程、内皮功能障碍和胰岛素受体功能障碍的进展涉及病理性过量的CRP、促炎细胞因子、活性氧物质和蛋白水解的独立或协同作用。这些机制诱导连续且持续的全身性低度炎症,也称为“无声杀手(silent killer)”。蛋白水解过程是低度系统性炎症的一部分,涉及MMP-8的作用,MMP-8除了是最有效的I型胶原酶外,还可以降解非基质生物活性底物,诸如细胞因子、趋化因子、转化生长因子-1、丝氨酸蛋白酶抑制剂、载脂蛋白AI、胰岛素受体、免疫和细胞信号因子,从而改变对各种疾病中病理过程/方向的系统免疫和代谢反应。

[0022] MMP-8可以由各种细胞表达和产生,包括但不限于——嗜中性粒细胞、单核细胞/巨噬细胞、内皮细胞、纤维细胞、皮细胞和浆细胞。这些细胞中的许多种存在于或被增加到动脉粥样硬化或CVD病变中。这些细胞影响CRP和促炎介质的表达,并且还产生病理性升高的全身性MMP-8,该MMP-8通常被检测并且被认为是全身性低度炎症的重要参与者。

[0023] 根据本发明的心血管疾病包含以下疾病,如冠状动脉疾病(CAD)(诸如心绞痛和急性心肌梗塞(AMI))、中风、高血压性心脏病、风湿性心脏病、心肌病、心房颤动、先天性心脏病、心内膜炎、主动脉瘤和外周动脉疾病。在本发明的优选实施方案中,疾病是CVD或疾病事件,例如CAD事件,诸如AMI。

[0024] 本发明的一个实施方案涉及一种用于确定与心血管疾病相关的风险的方法,包含检测样本中的MMP-8和CRP,以及将MMP-8和CRP的量与MMP-8和CRP的相应预定值进行比较,其中检测到MMP-8和CRP水平升高指示心血管疾病的存在或指示受试者心血管事件或心血管疾病的风险。基于检测到升高的MMP-8和CRP水平,可以指示受试者寻求进一步的医疗咨询或另外的检查。

[0025] 本发明的另一个优选实施方案涉及一种方法,该方法检测心血管疾病、评估首次或随后的心血管事件的风险、在明显的临床症状之前检测亚临床心血管疾病,或监测治疗或药物对心血管疾病进展或具有心血管事件的风险的影响,所述方法包含检测样本中的MMP-8和CRP,并将检测到的MMP-8和CRP的量与MMP-8和CRP的相应预定值进行比较,其中检测到MMP-8和CRP水平升高指示心血管疾病的存在或指示心血管事件或心血管疾病的风险。

根据本发明,当MMP-8的量高于MMP-8的预定值并且CRP的量高于CRP的预定值时,检测到MMP-8和CRP水平升高。

[0026] 根据本发明,在确定与心血管疾病相关的风险的方法中,心血管事件或心血管疾病可以选自心血管疾病(CVD)、冠状动脉疾病(CAD)(诸如心绞痛和急性心肌梗塞(AMI))、中风、高血压性心脏病、风湿性心脏病、心肌病、心房颤动、先天性心脏病、心内膜炎、主动脉瘤和外周动脉疾病,优选所述心血管事件或心血管疾病是CVD事件或CAD,诸如AMI。

[0027] 风险预测模型可用于估计具有(诊断模型)或发展特定疾病或结果(预后模型)的概率。在临床实践中,这些模型用于告知患者并指导治疗管理。根据Hendriksen等人(2013),在预测模型可用于日常实践之前,建议三个阶段。在开发阶段,重点是模型开发,通常使用多变量逻辑(诊断)或生存(预测)回归分析。所开发模型的性能通过辨别、校准和(重新)分类来表示。在验证阶段,使用这些相同的性能测量在一组新患者中测试开发的模型。最后,在影响阶段,评估预测模型实际指导患者管理的能力。用本文所述方法检测的MMP-8和CRP值可用于构建CVD事件风险的预测模型。

[0028] 心血管疾病的治疗可包括生活方式改变、药物、侵入性手术(诸如血运重建心脏康复),或其组合。

[0029] 用于治疗心血管疾病的药物包括:抗血小板(其可以稀释血液并防止血液凝固)、他汀类药物(诸如阿托伐他汀、辛伐他汀、罗苏伐他汀和普伐他汀,其可降低胆固醇)、 β -受体阻滞剂(包括阿替洛尔、比索洛尔、美托洛尔和奈必洛尔)、硝酸盐、ACE(血管紧张素转换酶)抑制剂(诸如雷米普利和赖诺普利、血管紧张素II受体拮抗剂和钙通道阻滞剂)、利尿剂(其通过尿液冲走身体多余的水和盐)、以及多西环素药物(降低血浆或血清中升高的CRP和MMP-8和MMP-9的水平)(Payne等人,2011,Kormi等人,2014,Alfakry等人,2016)。本发明的方法还可用于监测这些或其他治疗对心血管疾病的有效性以及用于预测治疗期间的首次或随后的心血管事件。根据结果,患者的疾病得到控制,患者处于低风险,当患者由于治疗和药物程序而具有低的MMP-8和CRP值,并且由于治疗和药物程序,MMP-8和CRP值的组合是低的。

[0030] 用于检测或确定MMP-8和/或CRP浓度、量或水平的样本通常是全血、血浆或血清。在某些情况下,本发明的方法还包含在检测或确定样本中标志物的存在、量或水平之前从个体获得样本。优选地,样本是血清或血浆。

[0031] 可以使用本领域已知的任何方法测量样本中的MMP-8浓度。该测定可以是定性的、半定量的或定量的免疫测定。根据本发明的合适检测方法的非限制性实例包括Western印迹、IFMA、EIA、ELISA、IEMA、侧流测定、浸渍测定、微流体床边即时(PoC)测定、表面等离子体共振测定、电化学测定或任何其他已知的配体结合或直接检测测定系统。直接检测测定系统或技术是指不基于配体结合用于分析的任何方法,即以下技术,如:尺寸排阻色谱[SEC](诸如高压液相色谱[HPLC])或凝胶渗透色谱(GPC)(诸如SDS-PAGE);或分子光谱学方法(诸如核磁共振光谱(NMR))、紫外/可见光谱、电喷雾-电离(ESI)等。

[0032] 根据本发明的一个方面,MMP-8和CRP的检测可以用免疫测定进行。更优选地,一种或多种免疫测定可选自由以下组成的组:ELISA、IFMA、透射比浊法(turbidimetry)、散射比浊法(nephelometry)、粒子增强透射比浊法、粒子增强散射比浊法、胶乳凝集法、侧向流动测定法和微流体PoC测定法。

[0033] 本发明的优选实施方案是以下方法,该方法用于预测心血管事件或估计心血管疾病的预后、监测治疗或药物对心血管疾病进展和患心血管事件的风险的影响、以及在明显临床症状之前检测亚临床心血管疾病,其中例如通过应用约2.5mg/l的截止值进行乳胶免疫测定法CRP16测试CRP,并且通过应用约55ng/ml的截止值的时间分辨免疫荧光测定法测试MMP-8。

[0034] 除非另有说明,否则在说明书和权利要求中使用的术语具有诊断领域中常用的含义。具体而言,以下术语具有如下所示的含义。

[0035] 术语“检测亚临床疾病或检测亚临床病症”应理解为意指在明显的临床症状(即疾病或病症的诊断)之前鉴定或确定亚临床疾病的存在。术语“亚临床疾病”应理解为意指低于临床检测表面的疾病。亚临床疾病没有可识别的临床发现。它不同于临床疾病,其具有可以识别的体征和症状。许多疾病(包括CVD、糖尿病、甲状腺功能减退症和类风湿性关节炎)在它们作为临床疾病表现之前通常是亚临床的。

[0036] 术语“阳性”和“阴性”是指样本中测试分析物(即MMP-8或CRP)浓度的值分别高于(高的或阳性的)和低于(低的或阴性的)预定值(基线、阈值或参考浓度)。

[0037] 样本中分析物的预定值是指正常个体中样本中分析物的基线或阈值浓度;如果所述样本中分析物的值高于此预定值,则测试结果为阳性。样本中分析物的预定值可以根据测定的形式和测定中使用的特定试剂(例如,使用的特定抗体)而变化,但是可以通过相对于含有已知量分析物的对照样本评估正常个体中的样本中分析物的浓度,由本领域技术人员来确定和设定。

[0038] 连续变量是指可以在其最小值和最大值之间取任何值的变量。

[0039] 活性MMP-8是指与其前体或前驱体形式不同的不同形式的活化蛋白酶。

[0040] MMP-8活化是指将MMP-8的前体形式转变和/或转化为活性/活化的(即催化活性的)MMP-8的生物学或生物化学过程。根据本发明的一个优选实施方案,检测到活化的MMP-8。

[0041] 本发明人早先发现(WO 2015/128549),通过检测较小的MMP-8片段而不是高分子量的活性MMP-8,可以增强活性MMP-8的检测。

[0042] 本发明的实施方案还提供了系统和计算机可读介质,其用于使计算机系统基于确定的MMP-8和CRP来执行用于确定个体是否具有与形成心血管疾病或事件相关的风险的方法。

[0043] 特别地,本发明还涉及一种用于分析生物样本的系统,包含:

[0044] a) 确定模块,其被配置为接收生物样本并确定

[0045] MMP-8和CRP;和/或

[0046] b) 测试结果信息,其中测试结果信息包含MMP-8和CRP值

[0047] c) 存储设备,其被配置为存储来自确定模块的信息;

[0048] d) 比较模块,适于将存储在存储设备上的测试结果信息与参考数据进行比较,并提供比较结果,其中比较结果由参考样本/预定水平导出,该参考样本/预定水平由以下导出;

[0049] 目前已知具有正常MMP-8水平的受试者或患者组,其中生物样本和参照样本的类似结果指示受试者目前不具有或者不倾向于具有该疾病或疾病事件,或者不具有或不倾向

于具有发生疾病或疾病事件或疾病进展的风险;和/或

[0050] 已知具有该疾病或倾向于具有该疾病的受试者或患者组,其中生物样本和参照样本的类似结果指示受试者具有或者倾向于具有该疾病或该疾病事件,或者具有或倾向于具有发生疾病或疾病事件或疾病进展的风险,以及

[0051] e) 显示模块,用于部分地基于用户的比较结果显示内容,其中该内容是指示受试者当前具有疾病,或者倾向于具有心血管疾病,或者倾向于具有发生疾病或疾病事件或疾病进展的风险增加的信号。

[0052] 实施例

[0053] 给出以下实施例仅用于说明本发明的各种实施方案,并且它们不意味着以任何方式限制本发明。本领域技术人员将容易理解,由所附权利要求限定的本发明非常适合于实现目的并获得上述目的和优点。

[0054] 基于人口的样本

[0055] FINRISK97参与了该调查的8446名25-74岁参与者的入口样本,该调查在芬兰的五个地理区域进行(Borodulin等人,2015年)。该调查包括自我调查问卷和临床检查体重、身高和血压测量以及抽血。该研究得到了国家公共卫生研究所伦理委员会的批准,并根据赫尔辛基宣言进行。

[0056] 实验室分析

[0057] 在采血之前,要求参与者禁食4小时并避免在白天早些时候进餐。中位禁食时间为5(IQR 2)小时。2005年在赫尔辛基国立卫生与福利研究所的疾病风险部门处Architect c8000分析仪(美国伊利诺伊州雅培(Abbott)公园雅培实验室)上使用乳胶免疫测定(意大利米兰Sentinel诊断公司)由冷冻血清样本(-70°C)进行超灵敏CRP的测量。根据制造商的说明,由IFMA(芬兰艾斯堡Medix Biochemica公司)测定MMP-8的浓度。

[0058] 用IFMA进行MMP-8分析

[0059] MMP-8IFMA是用于测定人MMP-8的定量酶免疫测定法。该夹心测定法使用两种针对人MMP-8的单克隆抗体。抗体1491-E6-F7和1492-B3-C11(芬兰艾斯堡Medix Biochemica公司)分别用作捕获抗体和示踪抗体。微孔板涂有一种针对MMP-8的单克隆抗体。另一种抗体与HRP缀合,形成用于检测MMP-8存在的酶缀合物。为了进行测定,将80 μ l测定缓冲液和20 μ l标准品、对照和样本加入到板的适当孔中。将板在室温下在水平振荡器上孵育1小时。标准品、对照中以及如果存在于样本中的MMP-8与微孔结合。将孔洗涤五次以除去未结合的物质。在该洗涤步骤后,将100 μ l酶缀合物加入所有孔中。将板在水平振荡器上再次孵育1小时并如上洗涤。此后,将100 μ l ABTS酶底物加入孔中。将板如上所述摇动15分钟。加入50 μ l酸性终止溶液终止反应。为了混合溶液,轻轻摇动板。使用酶标仪(芬兰万塔赛默飞世尔(Thermo Fisher)科学公司Multiskan)在414nm处测量孔中溶液的吸光度。由产生的标准曲线获得对照和样本的浓度。

[0060] 用ELISA(Amersham)进行MMP-8分析

[0061] ELISA是基于夹心原理的即用型固相酶联免疫吸附测定法。将100 μ l样本(稀释度1:4)和标准品在室温下在涂有识别人MMP-8的抗体的微量滴定孔中孵育1小时。孵育后,将孔洗涤四次。加入100 μ l生物素化的示踪抗体,其将结合捕获的人MMP-8。孵育1小时后,将孔洗涤四次。然后加入100 μ l链霉亲和素-过氧化物酶缀合物以结合生物素化的示踪抗体。孵

育1小时后,再次洗涤孔。加入100 μ l TMB溶液,链霉亲和素-过氧化物酶缀合物将与该底物四甲基联苯胺(TMB)反应。通过加入100 μ l草酸终止30分钟的孵育。用分光光度计(芬兰万塔赛默飞世尔科学公司Multiskan)测量450nm处的吸光度。可以由标准曲线确定与标准同时进行的样本的人MMP-8浓度。

[0062] hsCRP分析

[0063] 如Salomaa等人(2010)所述,使用Latex免疫测定CRP16(雅培(Abbott),Architect c8000)进行hsCRP分析。

[0064] 统计

[0065] 通过全国死因登记和国家医院出院登记的记录联系确定了一年内的以下终点:心血管疾病(CVD)、急性心肌梗塞(AMI)、炎症性肠病(IBD)(由于发病率低随访5年)和癌症(非黑色素瘤皮肤癌除外)。分别在基线处对免于CVD、IBD或癌症的7448、7893或8276名受试者进行分析。

[0066] 用t-检验分析有和没有发生疾病或事件的受试者之间血清CRP和MMP-8浓度差异的统计学显著性。在分析之前,通过对数变换对具有偏斜分布的值进行归一化。通过使用针对年龄和性别调整的Cox比例风险模型分析考虑MMP-8和CRP浓度的发生疾病的生存率数据。估计MMP-8和CRP浓度的百分位数的危险,并选择第50百分位作为临界值,即参考类别是MMP-8或CRP值或两个值低于第50百分位的人。从而计算受试者的结果,其中MMP-8和CRP浓度均超过与参考类别相比的阈值。使用SPSS 22.0(IBM公司,2013发布,用于Windows的IBM SPSS Statistics,版本22.0,纽约州阿蒙克市:IBM公司)进行统计分析。

[0067] 实施例1.受试者中与CVD和AMI相关的血清MMP-8和CRP浓度。

[0068] 如上所述,测量在基线处没有CVD的受试者中血清MMP-8和CRP浓度的浓度水平,并且用1年的随访确定这些浓度与具有CVD或AMI的可能性的关联。结果显示,与未经历AMI或任何CVD事件的人相比,经历AMI或任何CVD事件的人血清CRP和MMP-8浓度的总和更高——均高于相应阈值/平均值。这些组之间的这种组合差异是显著的(表1和表2)。如表1中所示,CVD患者的平均浓度总和为1.97,而没有CVD的患者为1.55($p < 0.001$)。MMP-8的平均浓度单独不显著,而单独考虑CVD时CRP浓度也显著($p < 0.001$)。在表2中,显示AMI受试者的平均浓度总和为2.07,而没有AMI的受试者为1.55($p = 0.001$)。在AMI中,MMP-8和CRP的平均浓度均不显著。

[0069] 表1.在基线处没有CVD但在1年的随访中有和没有发生CVD事件的受试者中的平均血清MMP-8和CRP浓度。

	没有 CVD 事件	有 CVD 事件	
	平均值 (SD)		p 值 ¹
[0070] CRP (mg/l)	2.40 (4.88)	10.8 (21.1)	<0.001
MMP-8 (ng/ml)	50.3 (66.7)	66.5 (105.9)	0.456
Log CRP+log MMP-8	1.55 (0.67)	1.97 (1.02)	<0.001

[0071] ¹对数转换后的t检验。

[0072] 表2. 在基线处没有CVD但在1年的随访中有和没有AMI事件的受试者中的平均血清MMP-8和CRP浓度。

	有 AMI	没有 AMI	
	平均值 (SD)		p 值 ¹
[0073] CRP (mg/l)	2.43 (4.98)	17.0 (21.1)	0.051
MMP-8 (ng/ml)	50.3 (66.7)	84.5 (142.4)	0.272
Log CRP+log MMP-8	1.55 (0.68)	2.07 (1.23)	0.001

[0074] ¹对数转换后的t检验。

[0075] 表3公开了发生CVD事件的风险比 (HR), 其由高的 (高于平均值的或阳性的) MMP-8和CRP浓度值与低的 (低于平均值的或阴性的) 值进行比较计算得到, 其中参考组的HR (低于平均值的或阴性的) 设置为1。所有MMP-8、CRP或其组合值高于均值时, HR值看起来高于1。与单独使用CRP和MMP-8 (值) 相比, 使用CRP和MMP-8 (值) 的组合更高。高的 (高于第50百分位) CRP和高MMP-8浓度的组合倾向于表明HR高于单独这些生物标志物的高浓度。累计生存率组合结果显示风险预测的统计学显著性, CVD的p值分别为0.011和AMI的0.043。在图1A和图1B中, 呈现了对于CRP和MMP-8均高于第50百分位 (标记为1.0) 的患者相比于MMP-8或CRP或MMP-8和CRP二者低于第50百分位 (标记为0) 的患者, 没有CVD事件或AMI的累计生存率。这些数字指示CRP和MMP-8均高于第50百分位的受试者的风险较高。

[0076] 表3. 高血清CRP和MMP-8浓度的关联以及它们与1年随访中的CVD事件和AMI的组合。CRP的平均值为2.50mg/l, MMP-8的平均值为55.0ng/ml。

	HR (95% CI)		P 值 ¹
CVD 事件	低于平均值	高于平均值	
CRP	1	2.03 (1.17-3.51)	0.011
MMP-8	1	1.45 (0.56-3.75)	0.439
[0077] 组合 CRP、MMP-8	1	2.67 (1.34-5.34)	0.005
AMI			
CRP	1	1.50 (0.58-3.90)	0.401
MMP-8	1	1.59 (0.59-4.48)	0.380
组合 CRP、MMP-8	1	3.15 (1.04-9.57)	0.043

[0078] ¹根据年龄和性别调整Cox回归,p值用于估算高于平均值的浓度。

[0079] 实施例2. 与炎症性肠病 (IBD) 及癌症相关的血清MMP-8和CRP浓度

[0080] 炎症性肠病 (IBD) 是结肠和小肠的一组炎症性病症。克罗恩病和溃疡性结肠炎是炎症性肠病的主要类型。早期表明IBD与CRP升高显著相关,因为该蛋白在受影响的患者中可以具有不同的作用 (Henriksen等人,2008)。作为炎症标志物,CRP有助于预测、监测和评估IBD的存在、严重程度和治疗方法。

[0081] 例如,丹麦研究人员已经表明,与CRP水平低的人相比,血液CRP水平高的人在生命后期罹患任何癌症的风险增加30%,并且与罹患肺癌和可能结直肠癌的风险相关 (Cancer.Net,ASCO的患者网站)。研究人员还发现,在患有癌症的人群中,诊断前CRP水平高的人比不具有升高CRP的癌症患者更早死亡的可能性为80%。

[0082] 因此,先前的研究表明CRP与IBD和CRP以及癌症之间存在联系。本发明人想要研究MMP-8浓度和/或MMP-8和CRP浓度的总和是否可以用作关于这些疾病的指示或预测标志物。在本研究(表4)中,患有和未患IBD事件的受试者之间的平均CRP或MMP-8浓度没有显著差异,但这些标记的总和具有显著差异。罹患发生癌症的受试者中的总和也高于未罹患癌症的受试者,这种差异是由于较高的CRP水平。对于癌症,平均CRP浓度单独是显著的。

[0083] 表4. 在5年随访期间患有IBD或癌症以及未患IBD或癌症的受试者中的血清MMP-8和CRP浓度及其总和。

	平均值 (SD)		p 值 ¹
	未患 IBD	患有 IBD	
CRP (mg/l)	2.54 (5.28)	3.68 (3.34)	0.083
MMP-8 (ng/ml)	50.0 (66.5)	68.4 (53.4)	0.057
Log CRP+log MMP-8	1.57 (0.68)	2.04 (0.57)	0.017
	未患癌症	患有癌症	
CRP (mg/l)	2.48 (5.09)	3.50 (6.52)	<0.001
MMP-8 (ng/ml)	49.8 (66.1)	54.3 (72.9)	0.709
Log CRP+log MMP-8	1.56 (0.68)	1.74 (0.73)	<0.001

[0084] ¹对数转换后的t检验。

[0085] 还在一年的随访中研究了这些生物标志物与发生癌症的关联。在这种情况下,CRP和MMP-8浓度在患有癌症的受试者中(分别和组合)显著高于未患癌症的受试者(表5)。

[0086] 表5. 在1年的随访中;患有和未患癌症的受试者中的血清MMP-8和CRP浓度及其总和。

	平均值 (SD)		p 值 ¹
	未患癌症	患有癌症	
[0088] CRP (mg/l)	2.49 (5.10)	4.97 (9.55)	0.024
MMP-8 (ng/ml)	49.8 (66.1)	66.1 (77.1)	0.048
Log CRP+log MMP-8	1.56 (0.68)	1.89 (0.83)	0.017

[0089] ¹对数转换后的t检验

[0090] 单独高MMP-8浓度与发生癌症的风险显著相关。然而，与单独使用MMP-8获得的预测相比，组合高的（高于第50百分位）CRP和高的（高于第50百分位）MMP-8浓度并未改善发生IBD或癌症（表6）的预测。这些标志物和它们的总和都不与IBD的风险相关。

[0091] 表6. 高血清CRP和MMP-8浓度及其组合与5年随访中发生IBD以及1年随访中发生癌症的关联。

	HR (95% CI)		p 值 ¹
	低于平均值	高于平均值	
IBD			
CRP	1	2.15 (0.67-6.91)	0.199
MMP-8	1	2.57 (0.86-7.68)	0.092
[0092] 组合 CRP、MMP-8	1	2.32 (0.51-10.6)	0.278
癌症			
CRP	1	1.36 (0.73-2.52)	0.337
MMP-8	1	2.46 (1.36-4.43)	0.003
组合 CRP、MMP-8	1	2.41 (1.12-5.18)	0.025

[0093] ¹根据年龄和性别调整Cox回归，p值用于估算高于平均值的浓度。

[0094] 实施例3. 通过IFMA或ELISA测定的关于MMP-8浓度的相关数据。

[0095] 已知在用于检测MMP-8和MMP-8的活化部分的领域中已知的不同抗体和方法之间的差异，发明人想要研究获得的相关数据是否依赖于用于确定MMP-8浓度的测定法。如前所述，使用不同的MMP-8抗体通过IFMA和ELISA测量MMP-8浓度。对患者和对照受试者进行测量（343名患者，他们是急性冠状动脉综合征（ACS）（Pussinen等人，2013）。对照组年龄±2岁、性别和教区相匹配。纳入标准为：没有明确或疑似冠心病或卒中的病史，也没有前4周内的手术或化疗史。他们没有心绞痛的阳性病史，即与运动相关的任何位置的胸痛以及通过休息缓解。他们都没有服用任何药物用于治疗糖尿病、高血压或血脂异常。

[0096] 结果显示在表7和散点图(图2)中。当用IFMA和ELISA测量平均MMP-8浓度水平时,两种测定的患者和对照受试者之间MMP-8水平的差异是非常显著的($p < 0.001$)。用IFMA测定的心绞痛或AMI患者与对照组之间的差异大于用ELISA测定的(图3和表8)。

[0097] 表7.从AMI患者获得的MMP-8浓度的相关数据,并用IFMA和ELISA测量。对数变换浓度的Pearson相关性。 r = 相关系数。

	MMP-8-IFMA
[0098] MMP-8-ELISA	$r=0.509$ $p < 0.001$ $n=90$

[0099] 表8.用IFMA和ELISA测量的平均MMP-8浓度。

测定法	组	N	平均值	SD	SE
MMP-8, IFMA (ng/ml)	ACS 患者	45	315.6	337.2	50.3
	对照	45	117.5	85.0	12.7
MMP-8, ELISA (ng/ml) Amersham	ACS 患者	45	126.6	104.0	15.5
	对照	45	65.6	51.8	7.7

[0101] 结果表明,(A)用IFMA测量的MMP-8浓度与CRP浓度统计学显著相关,相关系数为 r 0.311 ($p=0.008$),而(B)用ELISA测量的MMP-8与CRP浓度浓度统计学显著相关,相关系数为 r 0.301 ($p=0.011$) (图4)。因此,相关性似乎与测试类型无关。用IFMA或ELISA测量的平均MMP-8浓度(具有标准偏差)示于表9中。

[0102] 表9.用IFMA或ELISA获得的平均MMP-8浓度(具有SD)。浓度以对数方式转化。

测定法	组	平均值	SD
[0103] MMP-8, IFMA (ng/ml)	对照	4.57	0.70
	心绞痛	5.40	1.11
	AMI	5.44	0.75
	总计	5.04	0.89
MMP-8, ELISA (ng/ml) Amersham	对照	3.86	0.81
	心绞痛	4.39	0.79
	AMI	4.65	0.81
	总计	4.26	0.88

[0104] 参考文献

[0105] Alfakry H, Malle E, Koyani CN, Pussinen PJ, Sorsa T. 嗜中性粒细胞蛋白水解激活级联:慢性牙周病与冠心病之间可能的机制联系 (Neutrophil proteolytic activation cascades: a possible mechanistic link between chronic periodontitis and coronary heart disease). *Innate Immunity* 2016;22(1):85-99.

[0106] Borodulin K, Vartiainen E, Peltonen M, Jousilahti P, Juolevi A, Laatikainen T, Männistö S, Salomaa V, Sundvall J, Puska P. 芬兰心血管危险因素的四十年趋势 (Forty-year trends in cardiovascular risk factors in Finland). *Eur J Public Health* 2015;25(3):539-46.

[0107] Dejonckheere E. 等人, 基质金属蛋白酶-8在炎症性病症和癌症进展中具有重要作用 (Matrix metalloproteinase-8 has a central role in inflammatory diseases and cancer progression). *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2011;22:73-81.

[0108] Hendriksen JM, Geersing GJ, Moons KG, de Groot JA. 诊断和预后预测模型 (Diagnostic and prognostic prediction models). *J Thromb Haemost.* 2013; Suppl 1: 129-41.

[0109] Henriksen M, Jahnsen J, Lygren I, Stray N, Sauar J, Vatn MH, Moum B; IBSEN 研究组. C反应蛋白:炎症性肠病中炎症的预测因子和标志物。来自基于人口的前瞻性研究的结果 (C-reactive protein: a predictive factor and marker of inflammation in inflammatory bowel disease. Results from a prospective population-based study). *Gut* 2008;57(11):1518-23.

[0110] Herman MP, Sukhova GK, Libby P, Gerdes N, Tang N, Horton DB 等人. 中性粒细胞胶原酶 (基质金属蛋白酶-8) 在人动脉粥样硬化中的表达:转录分析表明一种新的胶原溶解途径 (Expression of neutrophil collagenase (matrix metalloproteinase-8) in human atheroma: a novel collagenolytic pathway suggested by transcriptional profiling). *Circulation* 2001;16(104):1899-904.

- [0111] Hoseini SM, Kalantari A, Afarideh M 等人. 血浆MMP-8、MMP-9和TIMP-1的评估鉴定代谢综合征中的候选心脏代谢风险标志物: 来自双盲巢式病例对照研究的结果 (Evaluation of plasma MMP-8, MMP-9 and TIMP-1 identifies candidate cardiometabolic risk标志物 in metabolic syndrome: results from double-blinded nested case-control study). *Metabolism*. 2015; 64: 527-38.
- [0112] Kato R, Momiyama Y, Ohmori R, Taniguchi H, Nakamura H, Ohsuzu F. 血浆基质金属蛋白酶-8浓度与冠状动脉疾病的存在及严重程度相关 (Plasma matrix metalloproteinase-8 concentrations are associated with the presence and severity of coronary artery disease). *Circ J*. 2005; 69: 1035-1040.
- [0113] Kormi I, Alfakry H, Tervahartiala T, Pussinen PJ, Sinisalo J, Sorsa T. 长期全身强力霉素治疗对冠状动脉搭桥患者血清组织降解蛋白酶的影响: 随机、双盲、安慰剂对照临床试验 (The effect of prolonged systemic doxycycline therapy on serum tissue degrading proteinases in coronary bypass patients: a randomized, double-masked, placebo-controlled clinical trial). *Inflamm Res*. 2014; 63: 329-334.
- [0114] Lorenzl S, De Pasquale G, Segal AZ, Beal MF. 基质金属蛋白酶和基质金属蛋白酶组织抑制剂水平在脑缺血早期的失调 (Dysregulation of the levels of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in the early phase of cerebral ischemia). *Stroke*. 2003; 34: e37-e38.
- [0115] Molloy KJ, Thompson MM, Jones JL, Schwalbe EC, Bell PRF, Naylor AR, Loftus IM. 不稳定的颈动脉斑块表现出升高的基质金属蛋白酶-8活性 (Unstable carotid plaques exhibit raised matrix metalloproteinase-8 activity). *Circulation*. 2004; 110: 337-343.
- [0116] Payne JB, Golub LM, Stoner JA, Lee H, Reinhardt RA, Sorsa T, Slepian ML. 亚细菌-剂量-多西环素治疗对全身炎症血清生物标志物的影响: 随机、双盲、安慰剂对照临床试验 (The effect of subantimicrobial-dose-doxycycline periodontal therapy on serum生物标志物s of systemic inflammation: a randomized, double-masked, placebo-controlled clinical trial). *J Am Dent Assoc*. 2011; 152 (3): 262-273.
- [0117] Pussinen PJ, Sarna S, Puolakkainen M, Öhlin H, Sorsa T, Pesonen E. 急性冠状动脉综合征及其复发中血清基质金属蛋白酶-8及其组织抑制剂的平衡 (The balance of serum matrix metalloproteinase-8 and its tissue inhibitor in acute coronary syndrome and its recurrence). *Int J Cardiol*. 2013; 167 (2): 362-8.
- [0118] Salomaa V, Havulinna A, Saarela O, Zeller T, Jousilahti P, Jula A, Muenzel T, Aromaa A, Evans A, Kuulasmaa K, Blankenberg S. 31种新型生物标志物作为临床上发生糖尿病的预测因子 (Thirty-one novel生物标志物s as predictors for clinically incident diabetes). *PLoS One*. 2010; 5 (4): e10100.
- [0119] Sorsa T, Tjäderhane L, Konttinen YT, Lauhio A, Salo T, Lee HM 等人. 基质金属蛋白酶: 对牙周炎症的发病机制、诊断和治疗的贡献 (Matrix metalloproteinases: contribution to pathogenesis, diagnosis and treatment of periodontal inflammation). *Ann Med*. 2006; 38: 306-21.

- [0120] Tuomainen AM, Nyyssonen K, Laukkanen JA, Tervahartiala T, Tuomainen TP, Salonen JT, Sorsa T, Pussinen PJ. 血清基质金属蛋白酶-8浓度与男性的心血管结果相关 (Serum matrix metalloproteinase-8 concentrations are associated with cardiovascular outcome in men). *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:2722-2728.
- [0121] Tuomainen AM, Kormi I, Havulinna AS, Tervahartiala T, Salomaa V, Sorsa T, Pussinen PJ. 血清组织降解蛋白酶和心血管疾病事件 (Serum tissue-degrading proteinases and incident cardiovascular disease events). *Eur J Prev Cardiol.* 2014;21(7):806-812.
- [0122] Turu MM, Krupinski J, Catena E, Rosell A, Montaner J, Rubio F, Alvarez-Sabin J, Cairols M, Badimon L. 在超声检查颈动脉斑块进展的无症状患者中, 斑块内MMP-8水平增加 (Intraplaque MMP-8 levels are increased in asymptomatic patients with carotid plaque progression on ultrasound). *Atherosclerosis.* 2005;187:161-169.
- [0123] Wilson EM, Gunasinghe HR, Coker ML, Sprunger P, Lee-Jackson D, Bozkurt B, Deswal A, Mann DL, Spinale FG. 心力衰竭患者中的血浆基质金属蛋白酶和抑制剂谱 (Plasma matrix metalloproteinase and inhibitor profiles in patients with heart failure). *J Card Fail.* 2002;8:390-398.
- [0124] Wilson WR, Schwalbe EC, Jones JL, Bell PR, Thompson MM. 腹主动脉瘤的发病机制中的基质金属蛋白酶8 (嗜中性粒细胞胶原酶) (Matrix metalloproteinase 8 (neutrophil collagenase) in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysm). *Br J Surg.* 2005;92:828-833.

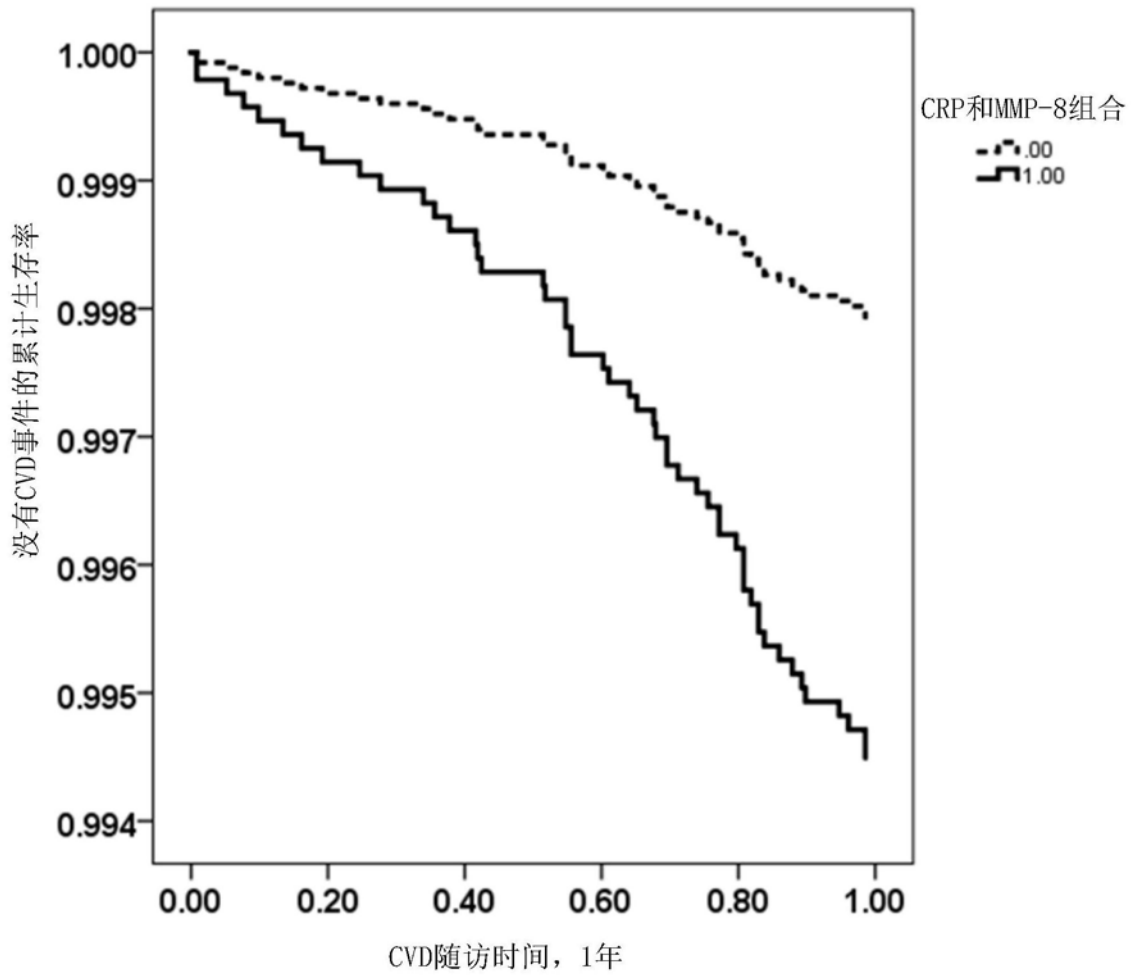


图1A

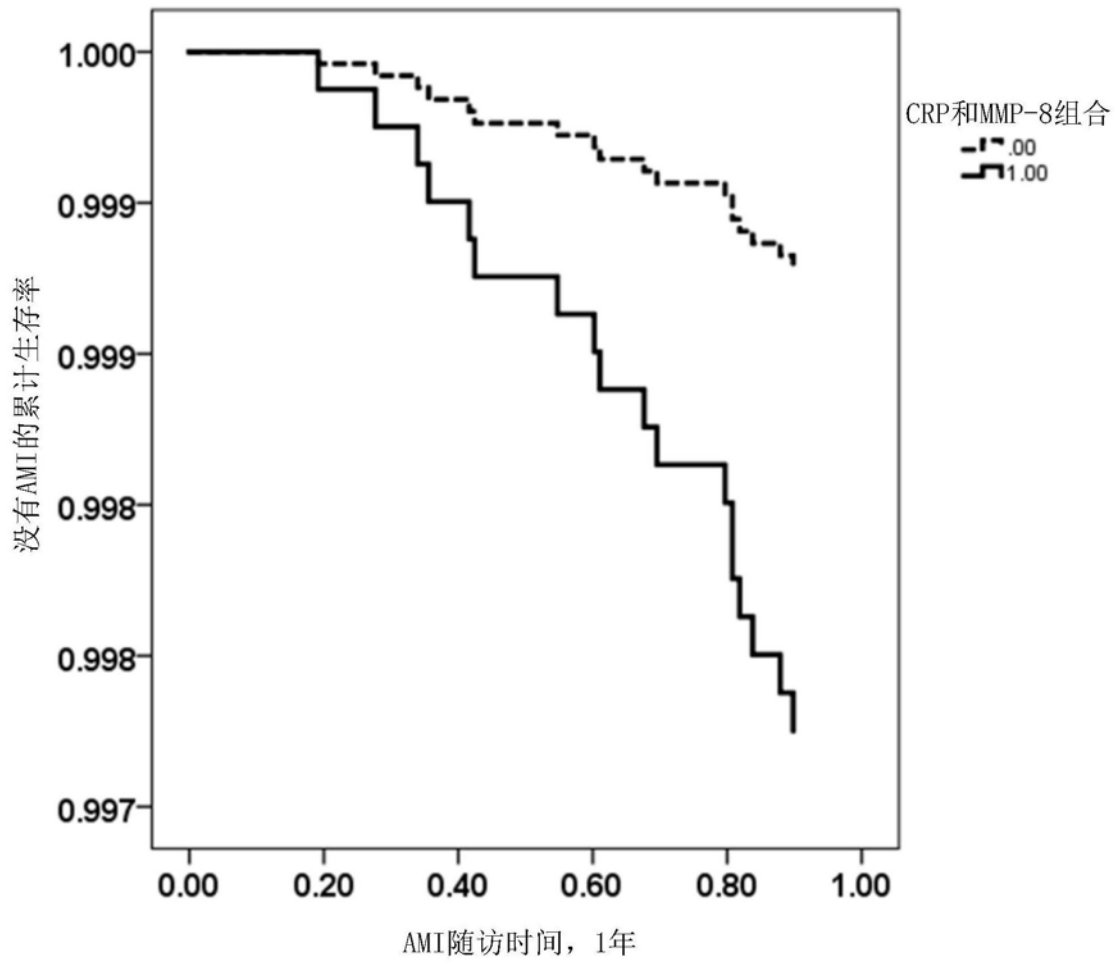


图1B

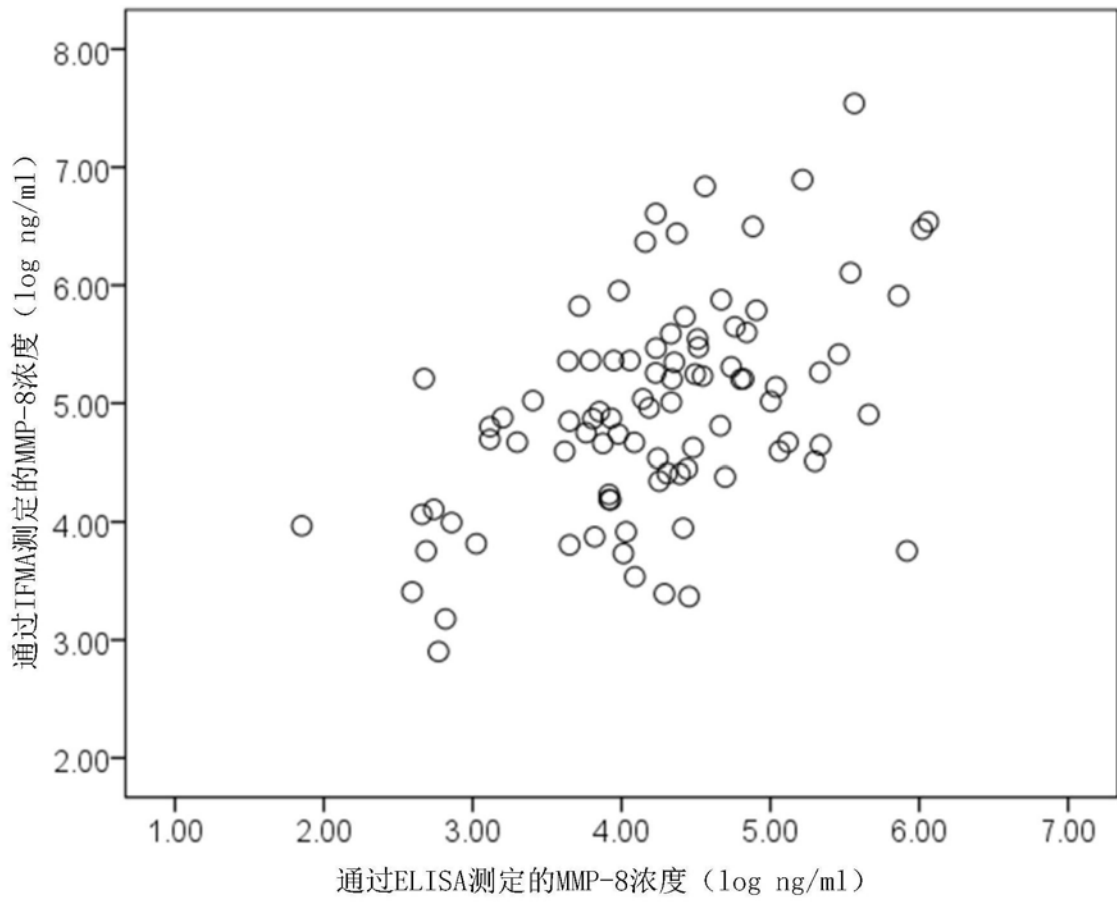


图2

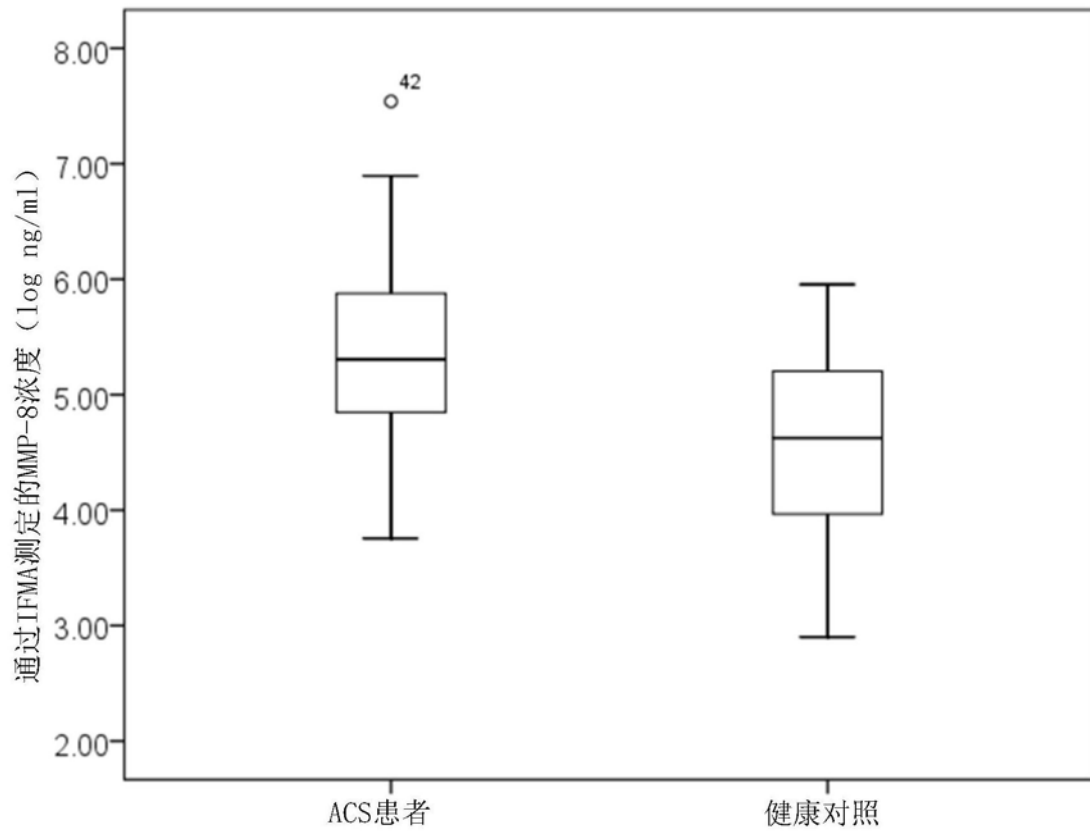


图3A

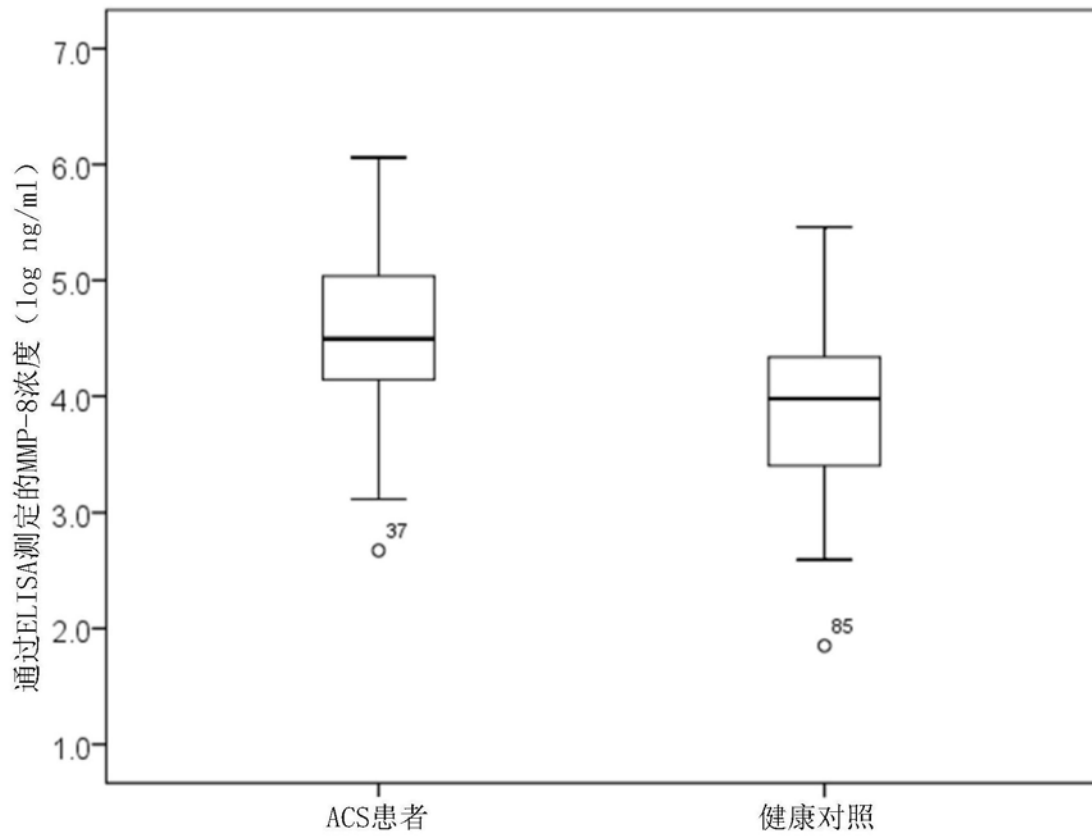


图3B

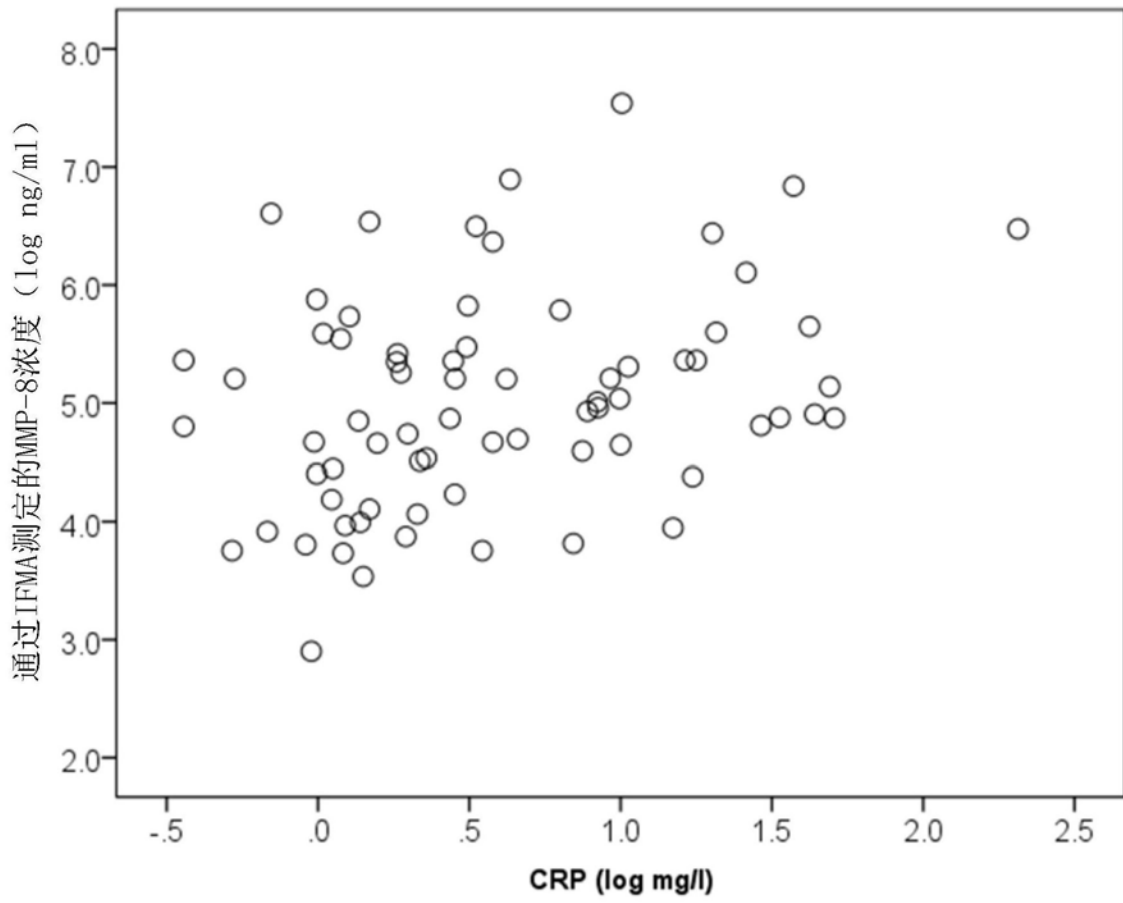


图4A

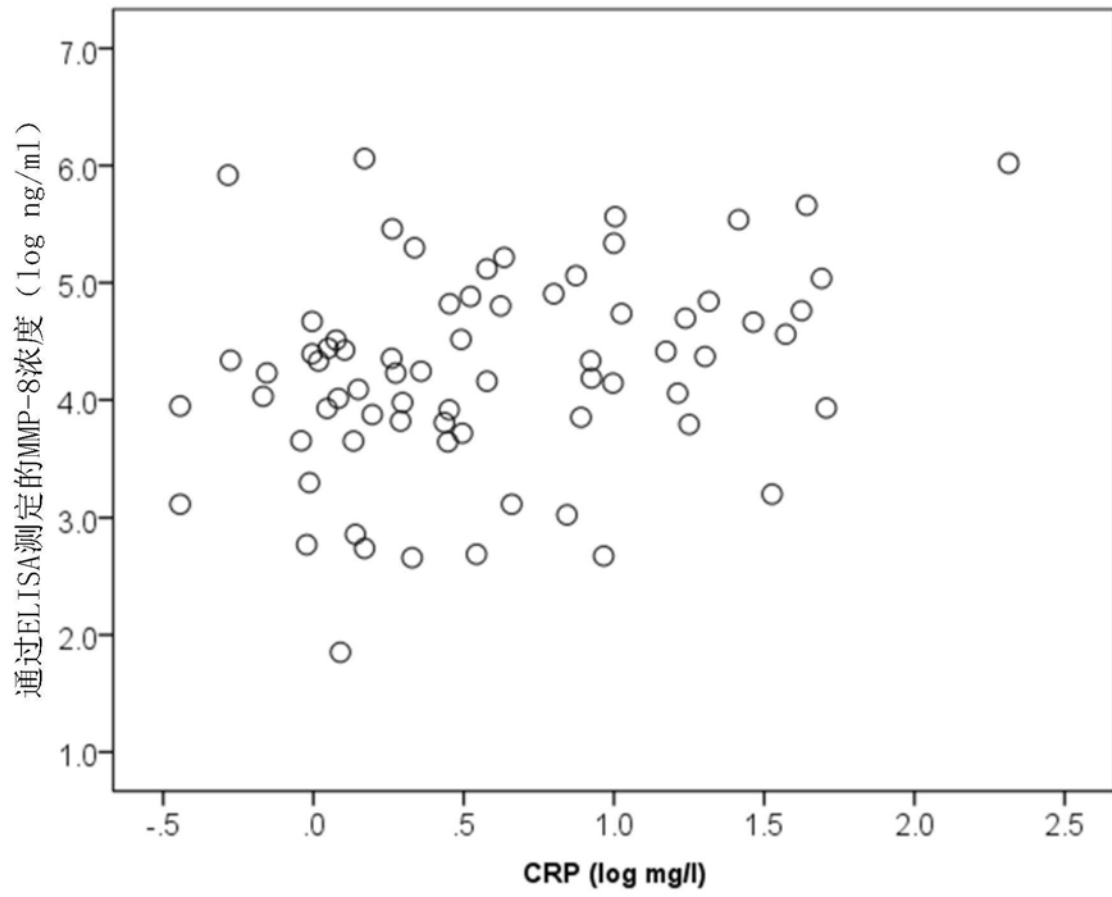


图4B

专利名称(译)	确定与心血管疾病相关的风险的方法		
公开(公告)号	CN109791143A	公开(公告)日	2019-05-21
申请号	CN201780059983.8	申请日	2017-09-27
[标]申请(专利权)人(译)	梅蒂克斯生物化学有限公司		
申请(专利权)人(译)	梅蒂克斯生物化学有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	梅蒂克斯生物化学有限公司		
[标]发明人	T·索尔萨 A·科尔沃		
发明人	P·普西宁 T·索尔萨 V·萨洛马 J·尤希拉 A·科尔沃 S·蒂萨拉		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/68 G01N33/573		
CPC分类号	G01N33/53 G01N33/573 G01N33/68 G01N33/6893 G01N2333/4737 G01N2333/96494 G01N2800/32 G01N2800/50 G16H50/30		
代理人(译)	杨黎峰		
优先权	2016005730 2016-09-29 FI		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种用于确定心血管疾病风险的新方法，包含检测样本中的MMP-8和CRP，并将检测的量与MMP-8和CRP的相应预定值进行比较，其中检测MMP-8和CRP水平升高指示心血管事件或疾病的存在或风险。本发明还涉及检测MMP-8和CRP用于预测发生心血管事件的风险、监测治疗对心血管事件或心血管疾病的影响，或用于检测亚临床心血管疾病的存在的用途。此外，提出了一种用于构建CVD疾病存在或CVD事件风险的风险预测模型的方法。