

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl<sup>7</sup>

G01N 33/564

A61K 39/00 A61P 9/00

# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00807857.2

[43]公开日 2002年5月29日

[11]公开号 CN 1351713A

[22]申请日 2000.5.22 [21]申请号 00807857.2  
 [30]优先权  
     [32]1999.5.21 [33]GB [31]9911772.3  
 [86]国际申请 PCT/IB00/00688 2000.5.22  
 [87]国际公布 WO00/72023 英 2000.11.30  
 [85]进入国家阶段日期 2001.11.21  
 [71]申请人 泽梅尔魏斯医科大学  
     地址 匈牙利布达佩斯  
     共同申请人 马哈维尔·辛格  
 [72]发明人 马哈维尔·辛格 佐尔坦·普罗哈斯卡  
     捷尔吉·富斯特 拉斯洛·罗米奇

[74]专利代理机构 永新专利商标代理有限公司  
 代理人 林晓红

权利要求书3页 说明书29页 附图页数5页

[54]发明名称 动脉粥样硬化和冠心病的诊断和治疗

[57]摘要

本发明涉及人 HSP60(热激蛋白 60)在人的治疗或诊断方法中的新用途,更特别地,本发明涉及诊断试验方法、诊断试剂的生产以及用于因动脉粥样硬化而患有血管疾病的患者的诊断试验试剂盒,这些患者倾向于热激蛋白诱导的补体激活,例如,患有心肌疾病如冠心病。

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

# 权 利 要 求 书

---

1. 用于人体的治疗或诊断方法的 hHSP60 或其免疫原性片段。

2. 热激蛋白诱导的补体激活的趋势的诊断试验方法，所述方法包括以下步骤：

i) 将患者样品和 hHSP60 接触；

ii) 检测任何补体激活；以及

iii) 将检测步骤 (ii) 的结果和热激蛋白诱导的补体激活的趋势相关。

3. 热激蛋白诱导的补体激活的趋势的诊断试验方法，所述方法包括以下步骤：

i) 从患者取样品；

ii) 检测步骤 (i) 的样品中任何对 hHSP60 特异性的单一的抗体；

以及

iii) 将检测步骤 (ii) 的结果和热激蛋白诱导的补体激活的趋势相关。

4. 根据权利要求 3 的诊断试验方法，其中检测步骤 (ii) 包括以下步骤：

i) 将样品和 HSP60 蛋白质族的非 hHSP60 成员接触；

ii) 将从步骤 (i) 得到的样品和 hHSP60 接触；以及

iii) 检测任何抗体-hHSP60 结合反应。

5. 根据权利要求 3 的诊断试验方法，其中检测步骤 (ii) 包括以下步骤：

i) 将样品和显示对 hHSP60 单一的表位，而不显示任何共享 HSP60 表位的抗原接触；以及

ii) 检测任何抗体-抗原结合反应。

6. 根据权利要求 4 或 5 中的任一权利要求的诊断试验方法，其中通

过任何补体激活的检测检测抗体—hHSP60 结合反应。

7. 根据权利要求 2 或 6 中的任一权利要求的诊断试验方法，其中通过 C4b 的结合检测补体激活。

8. hHSP60 在用于倾向于热激蛋白诱导的补体激活的患者的诊断试剂的生产中的用途。

9. hHSP60 和 HSP60 蛋白质族的非 hHSP60 成员在用于倾向于热激蛋白诱导的补体激活的患者的诊断试剂的生产中的用途。

10. 显示对 hHSP60 单一的表位，而不显示任何共享 HSP60 表位的抗原在用于倾向于热激蛋白诱导的补体激活的患者的诊断试剂的生产中的用途。

11. 用于倾向于热激蛋白诱导的补体激活的患者的诊断试验试剂盒，其特征在于它包含 hHSP60 或显示对 hHSP60 单一的表位，而不显示任何共享 HSP60 表位的抗原。

12. 用于倾向于热激蛋白诱导的补体激活的患者的诊断试验试剂盒，其特征在于它包含 hHSP60 和 HSP60 蛋白质族的非 hHSP60 成员。

13. 用于倾向于热激蛋白诱导的补体激活的患者的诊断试验试剂盒，其特征在于它包含显示对 hHSP60 单一的表位，而不显示任何共享 HSP60 表位的抗原。

14. hHSP60 或显示对 hHSP60 单一的表位，而不显示任何共享 HSP60 表位的抗原在用于治疗热激蛋白诱导的补体激活的药物的生产中的用途。

15. 根据权利要求 14 的 hHSP60 或显示对 hHSP60 单一的表位，而不显示任何共享 HSP60 表位的抗原的用途，其中药物是疫苗。

16. 用于治疗热激蛋白诱导的补体激活的药物的生产方法，其特征在于 hHSP 的使用。

17. 根据权利要求 2 至 7 中的任一权利要求的诊断试验方法，其是人体的诊断方法。

18. 根据权利要求 2 至 17 中的任一权利要求的诊断试验方法、用途或诊断试验试剂盒，其中热激蛋白诱导的补体激活的趋势是与动脉粥样硬化相关的疾病的趋势。

19. 根据权利要求 2 至 17 中的任一权利要求的诊断试验方法、用途或诊断试验试剂盒，其中热激蛋白诱导的补体激活的趋势是心肌疾病的趋势。

20. 根据权利要求 2 至 17 中的任一权利要求的诊断试验方法、用途或诊断试验试剂盒，其中热激蛋白诱导的补体激活的趋势是冠心病的趋势。

21. hHSP60 在识别抑制 hHSP60 诱导的补体激活的化合物或物质或试剂的方法中的用途。

22. 识别抑制 hHSP60 诱导的补体激活的化合物或物质或试剂的方法，其特征在于 hHSP 的使用。

# 说明书

---

## 动脉粥样硬化和冠心病的诊断和治疗

本发明涉及人 HSP60 (热激蛋白 60) 在人的治疗或诊断方法中的用途, 更特别地, 本发明涉及诊断试验方法、诊断试剂的生产以及用于因动脉粥样硬化而患有血管疾病的患者的诊断试验试剂盒, 这些患者倾向于热激蛋白诱导的补体激活, 例如患有心肌疾病如冠心病。

补体系统(见 McAleer, M. A. 和 Sim, R. B. 在: 补体的激活剂和抑制剂, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, R. B. Sim 编, 1993 年, 第 1 至 15 页; Reid, K. B. M. 和 Law, A., 1988 年, 补体, IRL 出版社, 牛津) 涉及抵抗感染的宿主防御—在系统激活后, 一个催化系列的反应和相互作用发生, 导致激活细胞、组织或颗粒的靶向而破坏。由于该系统的破坏性质, 如果不正确地被引发, 它具有引起宿主系统严重损伤的潜在可能 (Davis, A. E., 1988 年, Ann. Rev. Immunol., 第 6 卷: 第 595 至 628 页; Frank, M. M., 1993 年, 在: 在健康和疾病中的补体, 第二版, Whaley, K. 等编, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 第 229 页) 并且如果它的活性减小, 那么它具有使宿主开放于感染性病原体的进攻的潜在可能。

已经证明补体激活在冠心病和其它动脉粥样硬化的血管并发症的发展中具有重要作用 (Prohaszka, Z. 等, 1999 年 9 月, Int. Immunol, 第 11 卷(9), 第 1363—1370 页; Torzewski 等, 1997 年, 动脉粥样硬化, 第 132 卷: 第 131 页), 包括例如外周动脉粥样硬化和中风。最近的出版物, 如 Xu, Q. 等(1993 年, The Lancet, 第 341 卷: 第 255 页), Hoppichler, F. 等(1996 年, 动脉粥样硬化, 第 126 卷, 第 333 页), AT398495 和 Birnie, D. H. 等(1998 年, Eur. Heart J., 第 19 卷: 第 387 页) 都已经涉及了冠心病和特异性地抗动脉粥样硬化中

的分枝杆菌 65Kda 热激蛋白 (HSP) 的抗体之间的联系。热激蛋白 (也被称为唇基(chaperons)), 例如 HSP60 蛋白族, 是高度保守的, 且对抗它们的抗体被发现是高度交叉反应性的 (Ellas, D.等, 1990 年, PANS USA, 第 87 卷: 第 1576 页; Daniele, M. G.等, 1992 年, 第 5 卷, 第 443 页; de Graeff-Meeder, E. R.等, 1994 年, *Pediatr. Res.*, 第 152 卷: 第 3656 页; Metzler, B. 等, 1997 年, *Atheroscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 第 17 卷: 第 536 页; Latif, N. 等, 1997 年, *Transplant. Proc.*, 第 29 卷: 第 1039 页—1040 页; Schett, G. 等, 1995 年, *J. Clin. Invest.*, 第 96 卷(6): 第 2569—2577 页; Schett, G. 等, 1997 年, *Atherosclerosis*, 第 128 卷(1): 第 27-38 页)。已发现这些对抗 HSP 的交叉反应性抗体和动脉粥样硬化有关, 并且还发现补体激活和动脉粥样硬化有关, 虽然这些关系的确切的本质还未得知, 并且在动脉粥样硬化、补体激活和交叉反应性 HSP 抗体之间没有已知的因果关系。HSP 的其它用途在例如 WO 97/06821 中有详细描述。

来自病原体的保守的热激蛋白引发心脏病的普遍观点被例如 Bachmaler, K. 等, 1999 年, *Science*, 第 283 卷: 第 1335—1339 页证实。

本发明成功地确定了心肌疾病的原因 (确切为地说: 与动脉粥样硬化相关的疾病如冠心病、心肌梗塞和中风的原因), 这种原因在已有技术中尚未提出。已经发现 (见下面的“试验”):

- i) 人 HSP60 (hHSP60) 和抗 hHSP60 抗体的免疫复合物的形成通过经典途径 (CP) 以剂量依赖性的方式引起补体系统的激活, 但 hHSP 本身并不引起补体激活; 以及:
- ii) 引起补体激活的复合物中被抗 hHSP 抗体结合的 hHSP 表位对 hHSP 是单一的。

在患者是否患有冠心病以及冠心病的严重程度和在患者血清中特异性地对抗 hHSP 的抗体水平 (即不与其它 HSP 如分枝杆菌 HSP65 结合的抗体)

之间存在强烈的正相关。因此这可以被用作确定来自相同倾向于热激蛋白诱导的补体激活的患者和样品的诊断试验的基础。

因此，根据本发明的第一个方面，提供了在人体的治疗或诊断方法中使用的 hHSP60 或其免疫原性片段。

自然地，可以使用重组 hHSP，并且这样的重组分子可以具有小修饰，例如作为它们的氨基酸序列的改变的结果，或作为在表达系统中起作用(或不起作用)的翻译后修饰的结果。这样的分子可以具有至少 50%，或 60%、70%、80%、90%或 95%的与 hHSP60 的同源性，其通过使用 BLAST2 程序 ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) 所采用的算法测定。如上述讨论的，hHSP60 和其它 HSP60 分子的同源性很高，因此为落在本发明的范围之内，修饰分子必须显示与 hHSP60 相同的功能性质，这些性质对于本发明是基本的，即它们必须显示 hHSP 特异性表位。例如，这可以通过进行 hHSP60 和修饰分子的对比试验来测定。取自具有倾向于能够和 hHSP 结合并产生补体激活的抗体的患者的样品用修饰 hHSP60 代替 hHSP60 应该同样能够获得相同的结果。这样的修饰分子在本文中被称为“基本组成 hHSP60”，并且 hHSP60 的参比也是这种基本组成 hHSP60 分子的参比。

补体系统不适当的激活可能导致很宽范围的疾病，包括动脉粥样硬化，特别是冠心病的发展或并发症。因此本发明可以用来诊断那些具有冠心病和其它动脉粥样硬化血管并发症倾向的患者。特别令人惊奇的是，试验(下面的)已表明产生高水平的补体激活抗人 HSP60 抗体的能力是在幼年时可诊断的遗传性状，它和成年后冠心病发病的高易感性(即趋势)有关。这意味着在本发明的试验中的高水平结果对那些在其它方面很健康的幼年患者患这种疾病的易感性是指示性的。

本发明同时提供热激蛋白诱导的补体激活的趋势的诊断试验方法，其包括以下步骤：

- i) 从患者取样品；
- ii) 将样品和 hHSP60 接触；

- iii) 检测任何补体激活; 以及
- iv) 将检测步骤(iii)的结果和热激蛋白诱导的补体激活的趋势相关。

本发明同时提供热激蛋白诱导的补体激活的趋势的诊断试验方法, 其包括以下步骤:

- i) 从患者取样品;
- ii) 检测步骤(i)的样品中对 hHSP60 特异性的任何抗体; 以及
- iii) 将检测步骤(ii)的结果和热激蛋白诱导的补体激活的趋势相关。

上述检测步骤(ii)可以包括以下步骤:

- i) 将样品和 HSP60 蛋白质族的非 hHSP60 成员(例如 HSP65)接触;
- ii) 将得自步骤(i)的样品和 hHSP60 接触; 以及
- iii) 检测所有的抗体-hHSP60 结合反应。

或者, 检测步骤(ii)可以包括以下步骤:

- i) 将样品和显示对 hHSP60 单一而不显示任何共享 HSP60 表位的抗原接触; 以及
- ii) 检测任何抗体-抗原结合反应。

抗体-hHSP60 结合反应可以通过检测任何的补体激活而检测, 特别是通过 C4b(补体因子 4b)的结合。

诊断试验方法可以是人体的诊断方法。

诊断试验如 ELISA(酶连免疫吸附测定)和免疫层析试验如快速试验(Rapid-Test(EP291194))可以在本发明的诊断试验方法中使用, 其它适当的试验方法和试剂盒对本领域技术人员容易明确并正确使用。

除确定患者何时倾向于 hHSP60 介导的补体激活之外, 诊断试验还可以被用于确定倾向于热激蛋白诱导的补体激活的患者的治疗进行得如何-hHSP60 诱导的补体激活降低的水平或抗 hHSP60 抗体可以指示治疗是有效的。类似地, 其它结果如果适当, 可以指示治疗正在防止症状的发展(恶化)或可以指示该症状正在恶化。

本发明同时提供了 hHSP60 在用于倾向于热激蛋白诱导的补体激活的

患者的诊断试剂的生产中的用途。本发明同时提供了 hHSP60 和 HSP60 蛋白质族的非 hHSP60 成员在用于倾向于热激蛋白诱导的补体激活的患者的诊断试剂的生产中的用途。同时提供的还有显示对 hHSP60 单一的表位，而不显示任何共享 HSP60 表位的抗原在用于倾向于热激蛋白诱导的补体激活的患者的诊断试剂的生产中的用途。如下描述的，这样的抗原可以使用如表位定位和 mimotope 设计的技术或者使用各种其它可获得的技术而容易地产生。类似地，竞争性抑制抗 hHSP60 抗体和 hHSP60 结合的结合试剂可能是有用的。因为具有这种作为结合试剂的能力而被筛选出的分子包括多肽、 $\beta$  转角模拟物 (beta-turn mimetics)、多糖、磷脂、激素、前列腺素、类固醇、芳族化合物、杂环化合物、苯二氮草类、寡聚氮取代的甘氨酸和寡氨基甲酸酯。庞大的化合物组合库可以通过编码合成库建立，这种方法在以下文献中描述：Affymax, WO 95/12608, Affymax, WO 93/06121, 哥伦比亚大学, WO 94/08051, Pharmacopeia, WO 95/35503 和 Scripps, WO 95/30642 (这些文献均引入本文做参考)。肽文库同样可以通过噬菌体展示产生。参见，例如 Devlin, WO 91/18980。基于与抗 hHSP60 抗体竞争地与 Hhsp60 结合而筛选化合物库。抗 hHSP60 抗体结合的抑制通过补体激活抑制与得自对照的结果比较而确定。这种化合物的识别在药物发现方法中特别有用，识别与 hHSP60 或抗 hHSP60 抗体特异性地结合并且因此可以抑制抗 hHSP60 抗体的补体诱导活性的化合物。

本发明同时提供用于倾向于热激蛋白诱导的补体激活的患者的诊断试验试剂盒，其特征在于它包括 hHSP60。本发明同时提供用于倾向于热激蛋白诱导的补体激活的患者的诊断试验试剂盒，其特征在于它包括 hHSP60 和 HSP60 蛋白质族的非 hHSP60 成员。本发明同时提供用于倾向于热激蛋白诱导的补体激活的患者的诊断试验试剂盒，其特征在于它包括显示对 hHSP60 单一的表位，而不显示任何共享 HSP60 表位的抗原。

除在诊断上有用外，本发明还提供了治疗机会。与抗 hHSP60 抗体结

合以在患者中引起热激蛋白诱导的补体激活所需的 hHSP60 表位(或多个表位)可以容易地用来自倾向于(或患有)热激蛋白诱导的补体激活的患者的血清确定。通过使用表位定位(Geysen, H. M.等, 1987年, *Journal of Immunological Methods*, 第102卷: 第259—274页; Geysen, H. M.等, 1988年, *J. Mol. Recognit.*, 第1卷(1): 第32—41页; Jung, G.和 Beck-Sickinger, A. G., 1992年, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.*, 第31卷; 第367—486页), 可以产生一系列为 hHSP60 序列的重叠肽。然后每一个重叠肽可以与患者血清样品混合。那些引起补体激活的(即 C4b 的结合)显示抗体结合和补体激活所需的表位。核心表位序列可以从它们被决定并且产生显示(即携带)表位而不引起补体激活的肽或其它分子。如果表位定位失败, 那么其它技术如 mimotope 设计(Geysen, H. M.等, 1987年, 1988年, 如上; Jung, G.和 Beck-Sickger, A. G., 1992年, 如上)可以被用于合成显示表位的分子, 使用例如抗体在它们的疗效测定中作为参比物质。特别地, 这允许具有三级和四级结构特征的表位的决定和复制, 这种特征有可能无法通过表位定位识别。因此, 本发明同样延伸至 hHSP60 的片段的用途。产生单克隆抗体的克隆(Harlow, E.和 Lane, D., “使用抗体: 实验室手册, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 纽约, 1998年)可以通过它们与补体激活所需的 hHSP60 表位(上述)结合的能力, 或通过它们在 hHSP60 存在下引起补体激活的能力而容易被识别, 并且本发明延伸至到这样的单克隆抗体及其抗原结合片段的用途。类似地, hHSP60 可以被分成片段, 并且携带和显示 hHSP60 特异性表位的特异性片段被识别。其它技术(如上面讨论的)可以获得用来识别抗体靶和结合的竞争性抑制剂, 并且可以容易地得以应用。

因此根据本发明同时提供 hHSP60 在治疗热激蛋白诱导的补体激活, 特别是治疗由于动脉粥样硬化而发生的血管疾病的患者的药物的生产中的用途。药物可以用于健康的保持或恢复, 即它可以治愈、缓解、消除或减

轻热激蛋白诱导的补体激活的症状，或者它可以预防或减轻热激蛋白诱导的补体激活的可能性。该药物可以例如是疫苗。用途可以包括表位或肽的用途，所述表位和肽携带被 hHSP60 显示而不被 HSP60 分子族的其它成员显示的表位。同时提供用于治疗热激蛋白诱导的补体激活的患者的药物的生产方法，其特征不在于 hHSP60 的使用。

因为 hHSP60 已经被确定是热激蛋白诱导的补体激活的原因，hHSP60 (或如上述讨论的其片段) 可被用于药物发现方法，识别那些能够防止其引发补体激活的试剂。因此本发明同时提供识别抑制 hHSP60 诱导的补体激活的化合物、物质或试剂的方法，其特征不在于 hHSP60 (或其片段) 的使用。同时提供 hHSP60 (或其片段) 在抑制 hHSP60 诱导的补体激活的化合物、物质或试剂的识别方法中的用途。同时提供本发明的试验在药物发现方法中的用途，例如筛选组合化学库确实检测那些可以抑制 hHSP60 诱导的补体激活或动脉粥样硬化或冠心病发作的化学药品或药物。

本发明将参照附图从随后的说明中变得更加明确，它们仅通过实施例的方式显示倾向于热激蛋白诱导的补体激活的患者的检测的形式。

附图中

图 1 显示 hHSP60 的剂量依赖性的补体激活。人 HSP60 和正常人血清 (NHS; 实心方块) 或和热灭活人血清 (HIHS; 实心圆) 一起保温。与 hHSP60 结合的 C4b 的量用抗 C4b 抗体测定。未涂覆的对照平板和 NHS (空心圆) 或和 HIHS (空心三角) 一起保温。该图显示四个平行测定的平均 OD 值和标准偏差。来自于全部三个重复试验的一个代表试验的结果被列出。发现指示 (\*\*) 的情况与未涂覆的对照平板相比，C4b 的结合有显著性的增加 (斯氏 t 检验,  $p < 0.01$ );

图 2 显示无丙种球蛋白血清 (AGS) 中 hHSP60 的经典途径激活的缺乏。人 HSP60 (0.1 $\mu$ g/ml) 和 NHS 或两种不同的 AGS 一起保温。与平板

结合的 C4b 的量用抗 C4b 抗体测定。未涂覆的孔被用作对照。AGS+IgG 代表和抗体 (5%热灭活血清) 重组的 AGS。来自于全部两个重复试验的一个代表试验的结果被列出。发现指示 (\*\*\*,  $p < 0.0001$ ; \*,  $p < 0.05$ ) 的情况与未涂覆的对照平板相比, C4b 的结合有显著性的增加 (斯氏 t 检验);

图 3 显示了 (图 A) 抗 hHSP60 抗体水平和与 hHSP60 结合的 C4b 的量之间的相关。在抗 hHSP60 抗体水平和与 hHSP60 结合的 C4b 之间观察到高显著性 ( $r=0.459$ ,  $p < 0.0001$ ) 正相关。图 B 显示在抗牛分枝杆菌 HSP65 抗体水平和与 hHSP60 结合的 C4b 的量之间相关性的缺乏 ( $r=0.1068$ ,  $p=0.554$ )。通过使用在各平板上测试的 8 个单独血清的结果作为标准, 实现了在不同平板获得的结果的归一化。

图 4 显示通过竞争性 ELISA 获得的抗 hHSP60 和抗牛分枝杆菌 HSP65 抗体之间的差异。用 hHSP60 (左图) 或用牛分枝杆菌 HSP65 (右图) 涂覆 ELISA 平板, 并和患者血清的系列稀释保温。IgG 型的抗体和平板的结合被进入保温混合物中 (缓冲液被加入到对照样品中, 实心方块) 的  $5\mu\text{g/ml}$  hHSP60 (空心圆) 或 HSP65 (虚线) 阻断。来自于全部三个重复试验的一个代表试验的结果被列出。数值代表三个平行试验的平均值和 SEM OD 值;

图 5 显示对因为家族史原因而危险的儿童冠心病易感性预测的研究的结果。Y 轴显示了补体激活指数。X 轴显示了两套中值数据, 包括对照儿童的数据 (中值 0.58, 四分位间范围 (interquartile range) 0.33-1.07) (左边的数据) 以及危险儿童的数据 (中值=1.27, 四分位间范围 0.53-2.33) (右边的数据)。用 Mann-Whitney 检验的结果  $p=0.0002$ 。

## 试验

试验如下面详细描述进行且结果显示:

- i) hHSP60 能够通过抗 HSP60 抗体诱导补体级联的激活;

ii) 在 hHSP60 诱导的补体激活和抗 HSP60 抗体之间存在相关；以及  
iii) 在抗 HSP 抗体系列中，不和其它 HSP60 蛋白交叉反应的是 hHSP60 特异性抗体，其通过与 hHSP60 相互作用引起补体级联的激活。

该结果表明患者血清中的抗 hHSP60 抗体(即不和其它 HSP60 蛋白交叉反应的)的水平和因为动脉粥样硬化引起的冠心病的正相关。

另外的独立进行的研究表明本发明的试验给出在补体激活抗 hHSP60 抗体和冠心病事件中的强烈相关，第二和第三三分位数(tertile)的让步比(odds ratio)为 5.24 和 6.37。

同时用来自其父母或祖父母在 45 岁前患有心肌梗塞的健康儿童的样品进行研究。结果表明产生高水平补体激活抗 hHSP60 抗体的能力是与成年时冠心病发病的高易感性有关的遗传性状，因此是特别有用的幼年诊断。

## 定义

术语“抗体”在本文中被用于指免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性部分，即含有抗体结合部位或抗原互补位的分子。这样的分子也被称为免疫球蛋白分子的“抗原结合片段”。

抗体分子的实例是完整免疫球蛋白分子、基本上完整的免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的那些含有抗原互补位的部分，包括本领域已知为 Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub> 和 F(v) 的那些部分。

“治疗”是被设计用来治愈、缓解、消除或减轻人或动物体的症状，或者预防或降低人或动物体感染任何疾病或功能障碍的可能性的治疗。

实施本发明的形式

## 实施例 1

### 材料和方法

## 1. 热激蛋白

重组 hHSP60 和重组牛分枝杆菌 HSP65 从携带质粒 pRIB1300 的热诱导 (42°C) 大肠杆菌 K12 菌株 M1164 制备并纯化 (Thole, J.E.R. 等, 1987 年, *Infect. Immun.*, 第 55 卷: 第 1466—1475 页)。细胞通过溶菌酶处理和超声溶解。可溶性蛋白通过阴离子交换层析纯化。缓冲液通过透析变为 10mM 的碳酸氢铵, 蛋白质被分离并冻干。

## 2. 补体激活 ELISA

酶连接免疫吸附测定被用来测定固相 hHSP60 或分枝杆菌 HSP65 的补体激活能力, 如 Prohaszka Z. (1988 年, *Annal. N. Y. Acad. Sci.*, 第 851 卷: 第 94—98 页)、Prohaszka Z. 等 (1995 年, *Immunology*, 第 85 卷: 第 184 页) 和 Prohaszka Z. 等 (1997 年, *Mol. Immunol.*, 第 34 卷: 第 809 页) 所描述的。ELISA 平板用不同量的 hHSP60 或用 0.1 μg/孔的牛分枝杆菌 HSP65 涂覆。洗涤后, 孔和 50 μl 的正常人血清 (NHS, 合并的来自 10 个年轻健康个体的血清) 或者与以 1:1 的比例用含有 Ca<sup>2+</sup>和 Mg<sup>2+</sup>的巴比妥缓冲盐水预稀释的热灭活 (56°C, 30 分钟) 人血清, 或和 Mg<sup>2+</sup>EGTA 螯合的血清, 或和纯合的 C2 缺乏的 SLE (系统性红斑狼疮) 患者的血清一起在 37°C 保温 30 分钟。在另一系列试验中, 单个患者的血清在用含有 Ca<sup>2+</sup>和 Mg<sup>2+</sup>的巴比妥缓冲盐水以 1:1 的比例预稀释后被使用。与平板结合的补体蛋白的量用特异性的山羊抗 C4b 抗体和山羊抗 C3b 抗体测定 (Atlantic Antibodies, Stillwater, 明尼苏达州, 美国)。

## 3. 无丙种球蛋白血清

两个具有很低水平抗体的血清样品被用于补体激活酶免疫测定。无丙种球蛋白血清 AGS-1 得自四岁的男孩。IgG、IgA 和 IgM 型抗体水平分别为 0.375、<0.01 和 0.037g/l。所有测试的补体参数 (CH<sub>50</sub>、C3、C4

水平和溶血能力)都在正常范围内。无丙种球蛋白血清 AGS-2 又 33 岁的女性捐赠。IgG、IgA 和 IgM 水平分别为 0.380、 $<0.063$  和  $<0.042\text{g/l}$ 。所有测试的补体参数 (C3、C4 水平和溶血能力) 都在正常范围内。

#### 4. 抗 hHSP60/HSP65 抗体的测定

与卡普拉黄素 60 族 (重组 hHSP60, 重组牛分枝杆菌 HSP65) 蛋白反应的 IgG 型抗体的量通过以前描述的 ELISA (Prohaszka, Z. 等, 1995 年, 如前述) 进行测定。平板用  $0.1\ \mu\text{g}$ /孔的 hHSP60 或牛分枝杆菌 HSP65 涂覆。在洗涤和阻断 (PBS, 0.5% 明胶) 后, 孔和  $100\ \mu\text{l}$  的以 1:500 比例在含有 0.5% 明胶和 0.05% 吐温 20 的 PBS 中稀释后的血清样品一起保温。抗 HSP 抗体的结合通过使用对  $\gamma$  链特异性的抗人 IgG 过氧化物酶标记的抗体 (Sigma, St Louis, 美国) 和邻苯二胺 (Sigma) 测试系统测定。光密度在 492nm 处测量 (参比波长为 620nm), 平均结果通过重复试验孔计算。对照抗 HSP60 兔多克隆抗血清 (StressGen SPA-804) 的系列稀释用作标准。作为光学密度值获得的数据相对于该标准以单位/ml 计算。

#### 5. 竞争性 ELISA

前面描述的 ELISA 试验中的一个步骤被修改以评估重组 HSP 的抗体竞争作用。要测试的血清在含有 0.5% 明胶和 0.05% 吐温 20 以及另外的  $5\ \mu\text{g/ml}$  hHSP60 或 HSP65 的 PBS 中稀释。PBS 被加入到对照样品中。试验如前面描述的那样进行。

#### 6. 统计分析

相关系数通过非参数 Spearman 方法计算。组对比通过使用 GraphPad Prism2.0 软件包 (San Diego, CA, USA) 用斯氏 t 检验或非参数 Mann-Whitney 检验计算。

## 7. 患者

74 个患有冠心病的患者 (60 个男性, 14 个女性, 平均年龄为 60 岁) 参加本研究。患者的基本数据总结在表 1 中。所有患者都进行了血管造影术和旁通手术 (by-pass operation)。样品在手术六个月后获得以排除急性疾病和紧张的影响。血清被等分然后保存在  $-70^{\circ}\text{C}$  直到使用。这 74 个患者是根据他们的抗 HSP60 抗体水平随机挑选的 (37 个患者具有“高” (高于中值) 水平, 37 个患者具有“低” (低于中值) 水平)。

## 试验

### 1. 通过 hHSP60 进行的补体激活

为测试固相 hHSP 是否能够诱导补体级联激活, 应用 Prohaszka, Z. 等 (1995 年, 如前所述) 和 Prohaszka, Z. 等 (1997 年, 如前所述) 的固相 ELISA 测试系统。人 HSP60 涂覆的 ELISA 平板和 NHS (含有中等水平的 ( $114.8 \pm 15.7 \text{ U/ml}$ , 平均  $\pm$ SD) 抗 HSP60 抗体) 一起保温且测定 C4b 和 C3b 的结合 (表 2)。补体蛋白对 hHSP60 涂覆的平板的结合均明显地高于没有涂覆的平板, 这一现象表明 hHSP 能够引发补体级联。由于 NHS 的热灭活将 C4b 和 C3b 的结合降低至背景水平, 补体系统被 hHSP60 的激活看起来需要血清和 hHSP60 的相互作用。由于 C4b 和 C3b 结合在含有  $\text{Mg}^{2+}$ -EGTA 的血清中均没有被发现, 因此这种激活通过经典途径 (CP) 发生。已知  $\text{Ca}^{2+}$  的螯合抑制 CP。通过 hHSP60 进行的 CP 激活通过显示得自纯合 C2 缺乏的 SLE 患者的血清的 C3b 结合的缺乏而被进一步证实, 尽管 CP 的引发这一事实发生, 这是由于这种血清中发现显著的 C4b 结合 (表 2)。通过 hHSP 进行的 CP 激活的特异性通过其剂量依赖性的显示而被证明。

### 2. hHSP60 通过抗 HSP60 抗体引发 CP

补体级联的 CP 的引发能够通过两种途径进行: 通过免疫复合物的形

成或通过 C1q (CP 的第一个组分) 被某分子、病毒或细菌产物直接结合。为了确定 hHSP60 如何引发 CP, 将固相 hHSP60 和 AGS 样品一起保温。如图 2 所示, 在任何 AG 血清中都没有观察到显著的 CP 激活。AGS-1 血清和抗体 (由 HIHS 提供) 的重组导致显著的 CP 激活, 表明 hHSP 仅在抗体存在下, 即通过免疫复合物的形成引发 CP。

### 3. hHSP60 诱导的 CP 和抗 HSP60 抗体水平之间的相关

为了评价特异性抗 HSP60 抗体 (已知其以不同的量在患有动脉粥样硬化损伤患者的血清中存在) 对通过 hHSP60 进行的 CP 激活的影响, hHSP60 诱导的 CP 激活的程度 (C4b 对 hHSP60 涂覆的平板的结合) 在具有已知量的抗 hHSP60 和抗牛分枝杆菌 HSP65 抗体的单个血清样品中测试。这些样品在旁通手术 6 个月后取自 74 个冠心病患者。观察到 hHSP60 诱导的 CP 激活的程度 (通过 C4b 的结合测定) 和抗 HSP60 抗体的量之间的高度显著性正相关 ( $r=0.459$ ,  $p<0.0001$ ) (图 3, 图 A)。相反, CP 激活的程度与抗牛分枝杆菌 HSP65 抗体的水平不相关 ( $r=0.09$ ,  $p=0.451$ ), 尽管抗 hHSP65 抗体的量和抗 hHSP60 的量强烈相关 ( $r=0.425$ ,  $p=0.0005$ )。在相同血清样品的一部分中, 分析了通过牛分枝杆菌 HSP65 进行的 CP 激活 (图 3, 图 B)。在单个血清样品中的通过 HSP65 进行的 CP 激活比 hHSP60 弱许多, 且看起来不受抗 HSP65 抗体量的影响 (Spearman 相关系数  $r=0.106$ ,  $p=0.554$ )。然后分析了在具有高或低水平抗 hHSP60 抗体的血清样品中 hHSP60 诱导的 CP 激活程度的差异。在具有高于中值水平的抗 hHSP60 抗体的血清中通过 hHSP60 进行的 CP 激活显著性地高于在具有低于中值水平的抗 hHSP60 抗体的血清中通过 hHSP60 进行的 CP 激活 ( $p=0.0001$ , Mann-Whitney 检验)。在分枝杆菌 HSP65 诱导的 CP 激活和抗 HSP65 抗体的情况中没有观察到相同的差异 ( $p=0.787$ )。

#### 4. 抗 hHSP60 和抗 HSP65 抗体之间的差异

竞争性的 ELISA 被用于确定抗 HSP60/65 抗体是否对不同抗原的相同表位是特异性的 (即是否相同的抗体和不同的抗原交叉反应) 或是否对不同抗原显示的不同表位是特异性的。ELISA 平板用 hHSP60 或用牛分枝杆菌 HSP65 蛋白涂覆并和测试血清的系列稀释一起保温。每种情况中保温混合物含有  $5\mu\text{g}/\text{ml}$  hHSP60 或 HSP65 (或作为对照的缓冲液) 作为竞争性抗原。在本试验中共测定 10 个来自研究组的血清。图 4 显示从三个患者的血清中获得的结果。患者 4101 的血清中含有显著量的抗 hHSP60 抗体但没有抗 HSP65 抗体。将该血清与 hHSP60 保温明显地降低了抗体对固相 hHSP60 的结合活性, 而和 HSP65 保温没有影响抗体结合。患者 KM 的血清表现出很强的抗 HSP65 活性而非抗 hHSP60 活性。该血清和 HSP65 保温明显地降低了抗体对固相 HSP65 的结合活性, 而和 hHSP60 保温没有影响抗体结合。患者 4395 的血清含有与 hHSP65 和 HSP60 都反应的抗体。在该样品中, 和同源 HSP 制备物 (即 hHSP60 和 HSP65 的其它对) 保温几乎完全消除抗体结合而 hHSP60 仅很小地抑制抗 HSP65 结合, 反之亦然。图 4 没有显示的其它 7 个血清样品获得类似的结果。

#### 结论

从试验结果中可以获得两个重要的结论。第一, hHSP60 单独不激活补体系统, 但抗体与固相 hHSP60 的复合导致明显的补体激活, 该激活取决于特异性抗体的量。第二, 抗 hHSP60 和牛分枝杆菌 HSP65 的抗体在它们的抗原特异性和补体激活能力方面互不相同。

此外, 固相重组 hHSP60 能够激活合并的正常人血清以及冠心病患者血清中的补体系统。由于第一补体成分被  $\text{Mg}^{2+}$ -EGTA 阻断的 C4 激活和结合抑制, 以及具有纯合 C2 缺乏患者的血清中没有出现 C3 与 hHSP60 的结合, 因此可以推断 hHSP60 通过 CP 激活人血清中的补体。

CP 可以被不同的物质直接激活或用特异性抗体的贡献, 即通过免疫

复合物的形成被激活。在 hHSP60 的情况中，由于在无丙种球蛋白的血清样品没有观察到补体激活，CP 的引发看起来是通过免疫复合物的形成而发生的。

本发明的发现表明抗 hHSP60 的特异性抗体引发，并且剂量依赖性地促进通过 hHSP60 进行的补体激活。

此外，抗 IgG 抗体(类风湿因子)同样可能影响这种激活。并且，分枝杆菌 HSP65 同样被发现激活 CP，但这种激活的程度与抗 HSP60 或抗 HSP65 抗体的水平不相关。由于抗 HSP65 和抗幽门螺杆菌抗体彼此相关(Birnie, D.H.等, 1998 年, 如前所述), 进行了试验以确定是否抗 *H. pylori* 抗体的量和 HSP65 诱导的补体激活程度相关。发现与 HSP65 结合的 C4b 的量和在 CHD 患者血清中抗 *H. pylori* 抗体水平间有强烈的正相关。另一种对 HSP65 诱导的 CP 激活和抗 HSP65 抗体水平之间缺乏相关性的可能的解释有可能是抗 HSP65 抗体的不同的(补体非激活)亚型。

这些发现表明当暴露于 hHSP60 与特异性抗体的复合体时，补体系统可能被有效激活。不同的病理症状和紧张状况都可能明显地增加内皮细胞中 hHSP60 的表达(Wick, G.等, 1995 年, *Immunol. Today*, 第 16 卷: 第 27 页; Xu, Q.和 Wick, G., 1996 年, *Mol. Med. Today*, 第 2 卷(9): 第 372 页)。例如, 非毒性的局部缺血再灌注被发现产生能够激活人血清中补体系统的人体脐静脉内皮细胞(Collard, C.D.等, 1997 年, *Circulation*, 第 96 卷: 第 326 页)。这一过程的机理还没有完全被了解。然而, 本结果表明在内皮细胞表面 hHSP60 的过度表达可能是提高培养的内皮细胞补体激活能力的因素之一, 特别是在抗 HSP65 抗体的高滴定度存在时。由于补体激活在动脉粥样硬化形成的早期和晚期都具有重要的作用, 本发现具有重要的病理学意义。

假定的抗 HSP65 抗体在冠心病的发展中的作用被最近的几个发现所支持。Xu 等(1993 年, 如前所述)发现高水平的抗分枝杆菌 HSP65 抗体

与颈动脉粥样硬化有关。更近地, Hopplicher 等(1996 年, 如前所述)测得 114 个患有冠心病的患者具有与 76 个年龄和性别相当的健康对照相比明显升高的抗 HSP65 滴定度。类似地, Birnie 等(1998 年, 如前所述)验证了在冠状动脉粥样硬化的程度和抗 HSP65 抗体的滴定度之间的正相关。

抗 hHSP60 和抗 HSP65 抗体在它们的抗原识别和补体激活能力之间的差异的验证非常重要, 并且在以前没有被提出。与健康的受检者相比, 60kDa 族的热激蛋白的抗体在患有几种疾病的患者体内升高。如果抗卡普拉黄素族不同成员的抗体被平行测量, 通常(但不总是(Handley, H.H. 等, 1996 年, Clin.Exp.Immunol., 第 103 卷: 第 429 页))在它们的量之间发现强烈的相关。已经发现在 HIV 患者的血清中抗 HSP60 和抗 HSP65 抗体水平之间存在显著性的相关。

## 实施例 2

### 中年男性冠心病易感性的预测研究

下面的研究由独立的第三方进行, 并由下列人员使用 CardioPath Ltd. 提供的诊断试验试剂盒如下详细描述的进行, 这些人员为: MD FRCP 的 G J Miller 教授和 MRC Epidemiology and Medical Care Unit, Wolfson Institute of Preventive Medicine, Charterhouse Square, London EC1M 6BQ, United Kingdom 的 David Howarth 博士。

全部 256 个柠檬酸盐血浆样品如下面详细介绍地进行分析。对每一个取自某病例的样品, 即患有冠心病的患者, 从没有心脏问题迹象的患者中选择两个样品。

- 56 个样品与 110 个对照取自事件发生前的病例。
- 33 个样品与 66 个对照取自事件发生后的病例。

所有的样品均取自中年男性, 并且病例和两个对照样品是年龄匹配

的。取样后，样品立即进行离心并在-45℃冷冻，然后在用干冰运输到MRC单元。血浆然后在-80℃存贮并且仅在用于此评价时解冻。本试验的实际测试为盲试，直到测试全部完成才开始分析。

## 1. 试验原理

将纯化的人重组 HSP60 蛋白涂覆在微滴孔表面。然后施加样品。抗 hHSP60 抗体和孔中的抗原复合。未结合的物质被洗去，加入过氧化物酶缀合的抗 C4b。如果抗体已经结合并激活补体级联，C4b 缀合物将与共价结合在抗原上的 C4b 片段结合。未结合的物质再次被洗去。加入底物 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB) 后，仅在酶存在的那些孔中有颜色出现，表明人 C4b 的存在。然后通过加入硫酸终止酶促反应并在 450nm 测量吸光度。

## 2. 材料

成分/化学药品	商品来源	产品代码
平板	Dynex	Immulon 4
平板盖	Griener	n/a
HHSP60	Stressgen	SPP-740
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Fisher	S/2920/53
NaHCO <sub>3</sub>	BDH	10247
蔗糖	Sigma	S9378
Tris	Sigma	T1503
NaCl	Sigma	S9625
吐温 20	Sigma	P1379
明胶	Sigma	G0262
兔抗 hHSP60	Stressgen	SPA-804-1
C4b	Diasorin	80255
稳定酶	Surmodics	SZ02
山羊抗兔 Ab	Amdex	AX01-0301X
TMB 底物	Dako	S1600
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sigma	102761C

HSP60 ([www.stressneg.com](http://www.stressneg.com)) 是从人早幼粒细胞白血病 (HL-60) 的 cDNA 文库克隆的重组 hHSP60。

平板涂覆：将 50  $\mu$ l 在 0.05M, pH 为 9.6 的碳酸盐缓冲液中的 1  $\mu$ g/ml hHSP60 加入到每个孔中，并在 4 $^{\circ}$ C 保温过夜。然后在将平板阻断之前用 200  $\mu$ l 的 1%明胶、5%蔗糖、0.15M NaCl、0.05M 的 Tris 以及 0.1% 吐温 20 洗涤，并在液体除去前在 RT(室温) 保温 1 小时，平板在 37 $^{\circ}$ C 干燥过夜。

阴性对照：0.05M Tris、0.15M NaCl、5%明胶，pH 7.5

低阳性对照：低阳性对照包括在 0.05M Tris、0.15M NaCl、5%明胶，pH 7.5 中的约 1/500 的稀释兔抗 hHSP60。

缀合物：在稳定酶缀合物稀释剂中的约 1/500 稀释的 C4b 蛋白的异双功能 HRP 缀合物。低阳性对照还含有约 1/60000 稀释的山羊抗兔 HSP 缀合物。

洗涤缓冲液：0.05M Tris、0.15M NaCl、0.1% 吐温 20，pH 7.5。

终止溶液：0.2% 硫酸。

### 测定试剂盒:

1. Instruction Leaflet, EIA 数据记录纸	1+1
2. 微滴板和平板盖: 用 hHSP60 蛋白涂覆孔, 用塑料密封膜密封, 用平板盖覆盖并包含在带有干燥剂的可重新密封的箔袋中。	12×8 孔+1
3. 阴性对照(蓝色)(试剂 2)	1×1ml
4. 低阳性对照(LP)(绿色)(试剂 3)	1×1ml
5. 抗 C4b1e HRP IgG 缀合物缀合物(紫色)(试剂 4)	1×11ml
6. 洗涤缓冲液: 20X 浓缩(无色)(试剂 5)	1×50ml
7. TMB 底物(无色)(试剂 7)	1×11ml
8. 终止溶液(无色)(试剂 8)	1×11ml

### 试剂制备:

洗涤缓冲液: 使用 1 份洗涤缓冲液浓缩物和 19 份蒸馏水稀释浓洗涤缓冲液。为每 8 个孔条(well strip), 通过加入 4ml 浓缓冲液到 76ml 蒸馏水中制备 80ml 稀洗涤缓冲液。

### 3. 测定步骤

1. 在开始测定前使所有的试剂盒成分和测试样品达到室温(20℃到 25℃)。
2. 试剂盒对照应与每批样品一起展开以检验试验性能。试剂盒对照应该平行两份展开。为包括试剂盒对照在内的要测试的样品数目选择足够的微孔条。将条放置在框上, 并除去保护塑料密封膜。在提供的 EIA 数据记录纸上记录试剂盒对照和测试样品的位置。未使用的条应该被存贮在带有干燥剂的可重新密封的箔袋中, 其在置于 2℃到 8℃存贮前被替换。
3. 不稀释对照或测试样品, 将 50 μl 样品或对照血清(试剂 2、3)分散到适当的孔中。对照应该最后加入以确保结果的精确解释。轻轻摇动 5

秒钟。用提供的平板盖盖上平板，然后在 RT 20°C 到 30°C 将其放在吸水纸上 20 分钟。

4. 在保温周期结束时，移去平板，留下吸水纸，然后如下面描述洗涤平板。
5. 如在试剂制备部分描述的那样稀释洗涤缓冲液（试剂 5）。用稀洗涤缓冲液手动或用自动平板洗涤器洗涤平板三次。对于机器洗涤，确保每个孔分散 300  $\mu$ l 且将适当的消毒剂加入到废液收集瓶中。洗涤完毕，通过在吸水纸上轻敲倒置的平板除去过量液体。

对于手动洗涤，通过仔细地将内容物清空到含有适当的消毒剂的容器中洗涤孔，然后将孔置于废液容器中。再重复该过程两次。洗涤后，通过在吸水纸上轻敲倒置的平板除去过量液体。必须记住对试验用血清的潜在生物危害采取适当的预防措施。这些预防措施必须贴在实验室的公共区域。洗涤步骤很关键，因为不充分的洗涤会导致差的精确度和错误升高的吸光度。

6. 在每个孔中分散 100  $\mu$ l 缀合物（试剂 4）。在将盖放到平板上并放回保温器之前，轻轻地摇动平板 5 秒钟，确保平板被放置在吸水纸的顶部。在 RT 20°C 到 30°C 保温 60 分钟。
7. 在保温周期结束时，重复步骤 4 以及步骤 5 中描述的洗涤步骤。
8. 在每个孔中分散 100  $\mu$ l 稳定化的 TMB 底物（试剂 7）。在将盖放回到平板并在室温（20°C 到 30°C）置于黑暗中 15 分钟之前，轻轻地晃动平板 5 秒钟。
9. 通过加入 100  $\mu$ l 终止液（试剂 8）到每个孔中终止反应。这将导致在含有酶的孔中颜色从蓝到黄的变化，该现象表明补体激活的存在在。在空气将平板读数器清除。在终止反应后立即测定每个孔在 450nm 的吸光度。

#### 4. 结果的计算和解释

对每一个试验和对照，测定孔中获得的 OD。

试验有效性：对有效的试验结果，低阳性对照的平均 OD 值应该大于 0.3。

显示阳性结果的 OD 水平，即补体激活抗 hHSP60 抗体的显著水平，可以预期在样品群之间变化，例如在成年和幼年群体之间。例如，在一个群体中被认为是阳性的结果可能在另一群体中并不重要。因此，对被研究的群体建立了标准曲线，该曲线将 OD 与实际危险相关并定义了结果被认为是阳性的截断值。

为了在各个试验间进行比较，必须计算补体激活指数 (CAI)：

$$\text{CAI} = \text{样品的 OD} / \text{低阳性对照的平均 OD}$$

低阳性对照的平均 OD 的使用允许不同系列试验，例如使用不同的设备之间的结果标准化。

#### 5. 结果

在采集原始数据后进行下列统计分析。

在病例和对照中的补体激活指数：

结果如表 3.1 所示。将外露层 (outlier) 从对照中除去。

条件对数回归分析：

优势比 (OR) 为在  $\log$  CAI 中的 1 sd 增加 (0.94)。

这等价于 CAI 的 2.6 倍增长。

数据如表 4 所示。

事件发生的时间：

56 个病例在他们的事件发生前取样。在 33 个病例中，在事件发生后取样。

与事件发生的时间有明显的相互影响 ( $p=0.007$ )。在事件发生取样的病例中, CAI 显著性地增加, 而这种关系在事件发生后取样的病例中没有被发现。

事件发生前的样品:

事件发生前所取样品的数据如表 5 所示。

事件发生后的样品:

事件发生后所取样品的数据如表 6 所示。

在那些事件发生前取样的病例中, 没有证据表明该关系根据事件的近似性而变化 ( $p=0.65$ )。

## 6. 等分分析

通过等分进行的 CAI 分析表明该关系是非线性的, 仅在最低等分中危险降低。CAI 等分的截断点为 0.27 和 0.6。同样存在与事件发生时间的显著性相互影响 ( $p=0.007$ )。

所有的等分分析中的结果如表 7 所示。事件发生前的样品的等分结果如表 8 所示, 而事件发生后的样品的等分结果如表 9 所示。

在补体激活指数嵌套的 (nested) 病例一对照研究中的单变关系如表 10 所示。

补体激活指数:

对事件发生前所取的样品, 补体激活指数的等分和病例/对照状态之间的关系在对吸烟状况、心收缩压、胆固醇、甘油三酸酯、纤维蛋白原以及体重指数的调整后依然保持 ( $P=0.003$ )。

相对于等分 1, 等分 2 和等分 3 的让步比分别为 5.24 (1.50-18.26)

和 6.37 (1.80-22.58)。

全部模型如表 11 所示。该分析使用 155 个观察—53 个病例和 102 个匹配的对照。让步比在除吸烟和抗体指数的变量中提高了 1 sd。甘油三酸酯和纤维蛋白原用对数变换。

在模型中单独使用补体激活指数的等分，ROC (接受器工作特征) 曲线下的面积为 0.65。

## 7. 结论

数据表明由本发明的试验测定的补体激活指数 (CAI) 与患冠心病的危险强烈相关。这如表 8 所示。

表 10 表明胆固醇、吸烟、纤维蛋白原和心收缩压同样与这些男性的危险相关。

表 11 是对这些危险因素的独立关系的强度的多变量分析。从该表中的 p 值和 95% 置信区间可以看到仅该试验与危险独立相关。与具有分布中低部三分之一水平的男性相比，中部三分之一的男性的危险为 5.2 倍，而高部三分之一的男性的危险为 6.4 倍。

在本评价中，所使用的试验试剂盒因此被认为对冠心病危险具有高预测性。

### 实施例 3

#### 在儿童中由于家族历史的危险的冠心病易感性的预测研究

##### 1. 介绍

已知来自于患冠心病事件家庭的儿童与那些来自阴性家族史的同辈人相比，在长大后更易发生冠心病。进行研究以调查是否那些父母和/或祖父母在 45 岁以前患有心肌梗塞的健康儿童用本发明的试验试剂盒给出比对照样品显著性高的结果。

分析了总共 117 个样品。

危险儿童—64 个年龄在 10 到 16 岁之间的健康儿童，他们的父母或祖父母中至少有一个在 45 岁以前患有心肌梗塞。

对照—53 个年龄匹配的健康儿童，他们在选择性外科手术前或受到外伤后被随机选择。这些对照并不完全充分，因为他们中仅有一部分被问及家族史，因此不能排除这组中同样含有危险儿童。因此预期当危险儿童与正确的对照，即那些被证明阴性冠心病家族史的儿童相比时，结果(下面)中显示的差异将更高。

血清样品在测试前在  $-70^{\circ}\text{C}$  保存。

#### 1. 试验原理

一如前所详述的。

#### 2. 材料

一如前所详述的。

#### 3. 试验过程

一如前所详述的。

#### 4. 结果的计算和解释

一如前所详述的。

#### 5. 结果

在采集原始数据后，进行下列统计分析。

危险儿童的让步比 (OR) 通过使用在对照组中测定的两个单独的 75% 和 95% 的截断限计算。这给出分别使用补体激活指数 (CAI) 1.07 和 2.0 的截断值。

数据在表 12 和 13 以及图 5 中给出。

该结果表明危险组的儿童与对照组的儿童相比给出显著性高的结果。

## 7. 结论

数据表明在本评价中，产生高水平补体激活抗 hHSP60 抗体的能力是与在成年时冠心病发病的易感性升高相关的遗传性状。

这意味着在本发明的试验中的高水平结果对那些在其它方面完全健康的幼年患者患这种疾病的易感性是指示性的。

### 实施例 4

或者，为了识别具有抗 hHSP60 抗体的患者样品，在将患者样品与 hHSP 接触前，提供附加的涂覆有非人 HSP60 的微滴板。将样品与非人 HSP60 接触并使之结合。然后将未结合的样品和孔分离并与孔中具有 hHSP60 的微滴板接触，方法如上继续。这有助于确定只有对仅在 hHSP60 上发现的表位有特异性的抗体和 hHSP60 结合。

### 实施例 5

代替使用与微滴板的孔结合的 hHSP60 以检测来自倾向于 hHSP60 诱导的补体激活的患者的样品，从患者的血清中分离 hHSP60 特异性抗体，然后用于 mimotope 设计以产生 hHSP60 特异性表位的 mimotope。这些 mimotope 然后被用于涂覆微滴板的孔并与患者样品接触。任何患者抗体与这些 mimotope 的结合都指示患者样品中的抗 hHSP60 抗体，因此也是属于倾向于 hHSP60 诱导的补体激活的患者的。

### 实施例 6

将实施例 4 中的 mimotope 注入倾向于 hHSP60 诱导的补体激活的患者中以使它们可以与 hHSP60 竞争结合抗 hHSP60 抗体，从而降低通过

hHSP60 进行的补体激活。类似地, 将非抗 hHSP60 抗体的 hHSP60 特异性结合试剂注入患者中以竞争性地抑制抗 hHSP60 抗体与 hHSP60 的结合。

表 1 具有已知的抗 HSP60 抗体水平的患者的基本数据

	具有低 (<中值) 水平抗 HSP60 抗体的患者 (n=37)	具有高 (>中值) 水平抗 HSP60 抗体的患者 (n=37)
年龄	60, 35-76	60, 40-69
性别	31 个男性, 6 个女性	29 个男性, 8 个女性
BMI (kg/m <sub>2</sub> )	27.5, 22-34	29, 24-38
MI 家族史	48.64%	45.94%
血清胆固醇, mmol/l	6.1, 3.4-9.0	6.75, 3.5-11.0
HDL-胆固醇	1.26, 0.7-1.4	1.25, 0.73-1.92
LDL-胆固醇	4.11, 1.7-6.5	3.98, 2.0-8.1
血清甘油三酸酯, mmol/l	1.77, 0.3-9.6	2.2, 0.6-5.5
从不吸烟	44%	31%
曾经吸烟	53%	55%
目前吸烟	3%	14%
抗 hHSP60 (单位/ml)	22.5, 0-71.8	447.9, 137.6-2410
抗牛分枝杆菌 HSP65 (单位/ml)	6.6, 0-103.3	20.63, 2.0-380.5

变量由中值、范围表示; BMI 表示人体重指数; MI—心肌梗塞; HDL—高密度脂蛋白; LDL—低密度脂蛋白。

表 2 通过 HSP60 进行的补体激活

	C4b-结合到:		C3b-结合到:	
	HSP60-涂覆的平板	未涂覆的平板	HSP60-涂覆的平板	未涂覆的平板
NHS	0.383±0.036*	0.083±0.02	0.507±0.028	0.28±0.037
斯氏 t 检验, p	<0.0001	-	<0.0001	-
HIHS	0.121±0.015	0.118±0.008	0.217±0.022	0.255±0.027
斯氏 t 检验, p	0.65	-	0.023	-
Mg <sup>2+</sup> EGTA-NHS	0.077±0.012	0.081±0.025	0.1±0.005	0.123±0.034
斯氏 t 检验, p	0.68	-	0.13	-
C2D	0.179±0.036	0.088±0.017	0.242±0.022	0.285±0.011
斯氏 t 检验, p	0.0002	-	0.0014	-

\* 数字为 6 个 (NHS, HIHS) 或 3 个 (Mg<sup>2+</sup>EGTA-NHS, C2D) 平行测试的平均 OD 值±标准偏差。三个类似试验中的一个代表试验被列出。NHS=正常人血清, HIHS=热灭活的人血清; C2D=同型结合 C2 缺乏患者的血清。

表 3 病例和对照中的补体激活指数 (CAI)

	对照	病例
几何平均值 (近似的 sd)	0.43 (0.41)	0.52 (0.47)
中值	0.36	0.47
N	N=176	N=89

表 4 条件对数回归分析

OR (95% CI)	P 值
1.23 (0.94 - 1.62)	p=0.14

表 5 事件发生前取的样品

	对照	病例	OR (95% CI) P 值
几何平均值 (近似的 sd)	0.39 (0.37)	0.6 (0.54)	1.74 (1.18 - 2.56) p=0.003
中值	0.33	0.55	
N	110	56	

表 6 事件发生后取的样品

	对照	病例	OR (95% CI) P 值
几何平均值 (近似的 sd)	0.50 (0.50)	0.40 (0.36)	0.80 (0.53 - 1.21) p=0.29
中值	0.41	0.39	
N	66	33	

表 7 通过三分位数进行的结果的全面分析

CAI 的三分位数	OR (95% CI)	p 值
1	1.00	p=0.02
2	2.48 (1.24-4.97)	
3	2.16 (1.08-4.31)	

表 8 事件发生前样品的三分位数分析

CAI 的三分位数	OR (95% CI)	P 值
1	1.00	p=0.0002
2	5.57 (1.96-15.84)	
3	5.92 (2.04-17.21)	

表 9 在事件发生后样品的三分位数分析

CAI 的三分位数	OR (95% CI)	P 值
1	1.00	p=0.67
2	0.92 (0.32-2.68)	
3	0.65 (0.24-1.78)	

表 10 补体激活指数嵌套的病例-对照研究中的单变量关系

	让步比	P> z	(95% 置信区间)
体内胞体指数	1.17	0.370	0.83 - 1.63
胆固醇	1.74	0.003	1.20 - 2.53
甘油三酸酯	1.22	0.249	0.87 - 1.71
吸烟	2.04	0.052	0.99 - 4.18
纤维蛋白原	1.59	0.009	1.12 - 2.25
心脏收缩的血压	1.50	0.021	1.06 - 2.12

表 11 完全 CAI 模型

	让步比	P> z	(95% 置信区间)
体重指数	0.98	0.950	0.60 - 1.60
胆固醇	1.52	0.060	0.98 - 2.36
甘油三酸酯	1.02	0.936	0.64 - 1.62
吸烟	1.49	0.361	0.63 - 3.54
纤维蛋白原	1.22	0.367	0.80 - 1.86
心收缩压	1.13	0.600	0.72 - 1.78
CAI 三分位数 1	1.00		
CAI 三分位数 2	5.24	0.009	1.50 - 18.26
CAI 三分位数 3	6.37	0.004	1.80 - 22.58

表 12 通过 75%和 95%百分位数 (percentile) 的 CAI 样品分布

CAI 值	对照组中的 N°	危险组中的 N°
< 1.07	40	28
> 1.07	13	36
< 2.0	49	41
> 2.0	4	23

表 13 让步比 (OR)

切分点 (CAI)	OR (95% CI)	P 值
1.07	3.95 (1.78 - 8.73)	p = 0.0007
2.0	6.87 (2.19 - 21.49)	p = 0.0003

图1

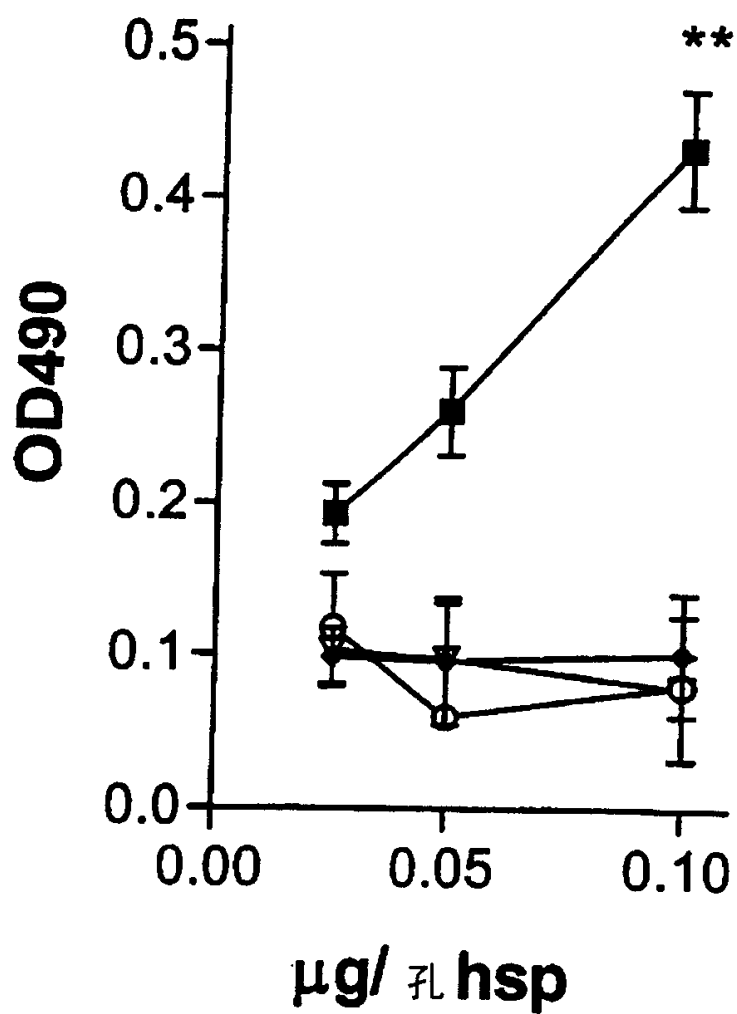


图2

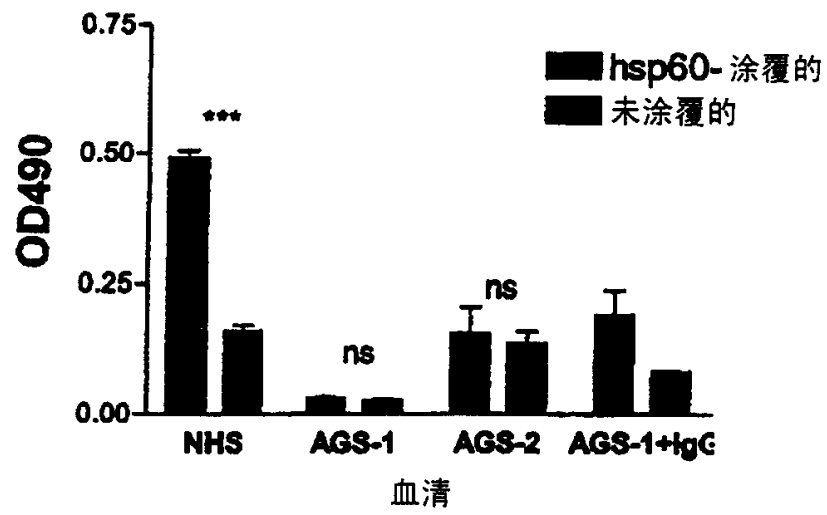
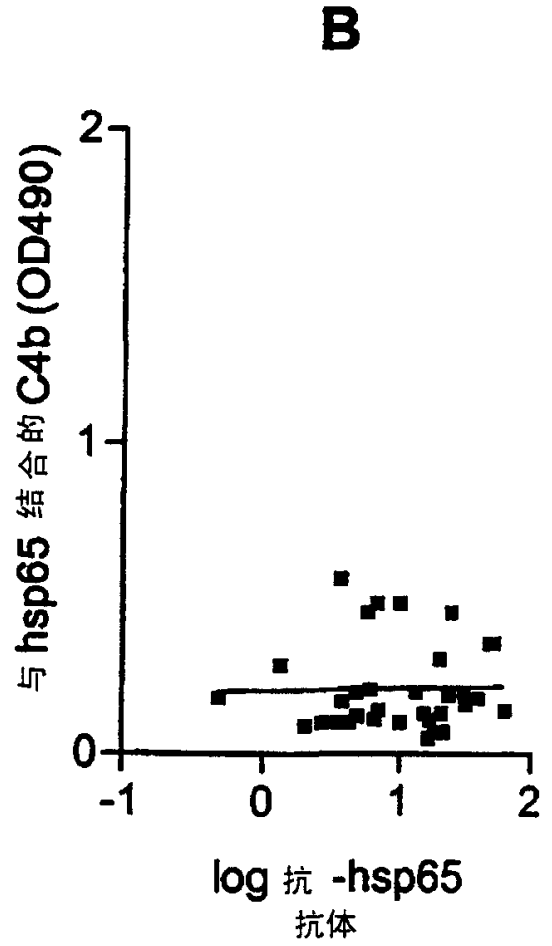
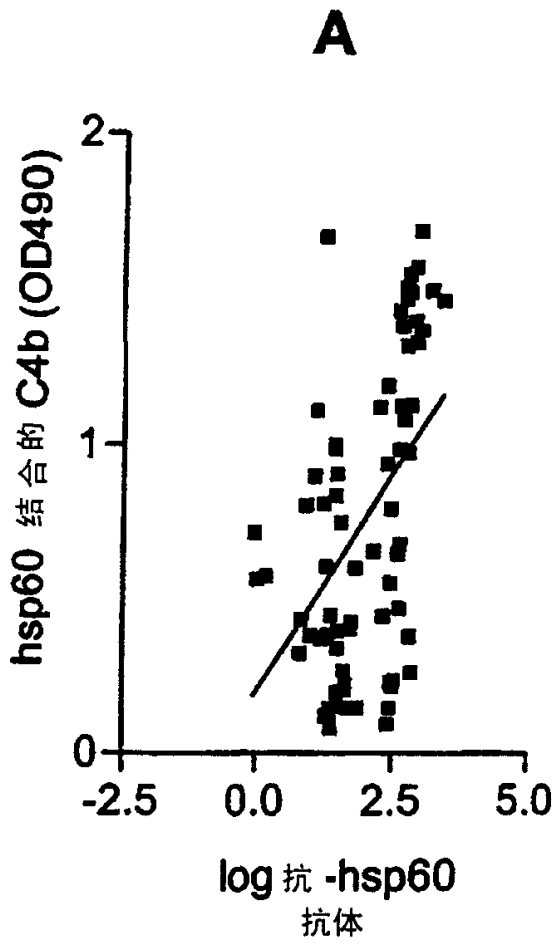


图3



# 图4

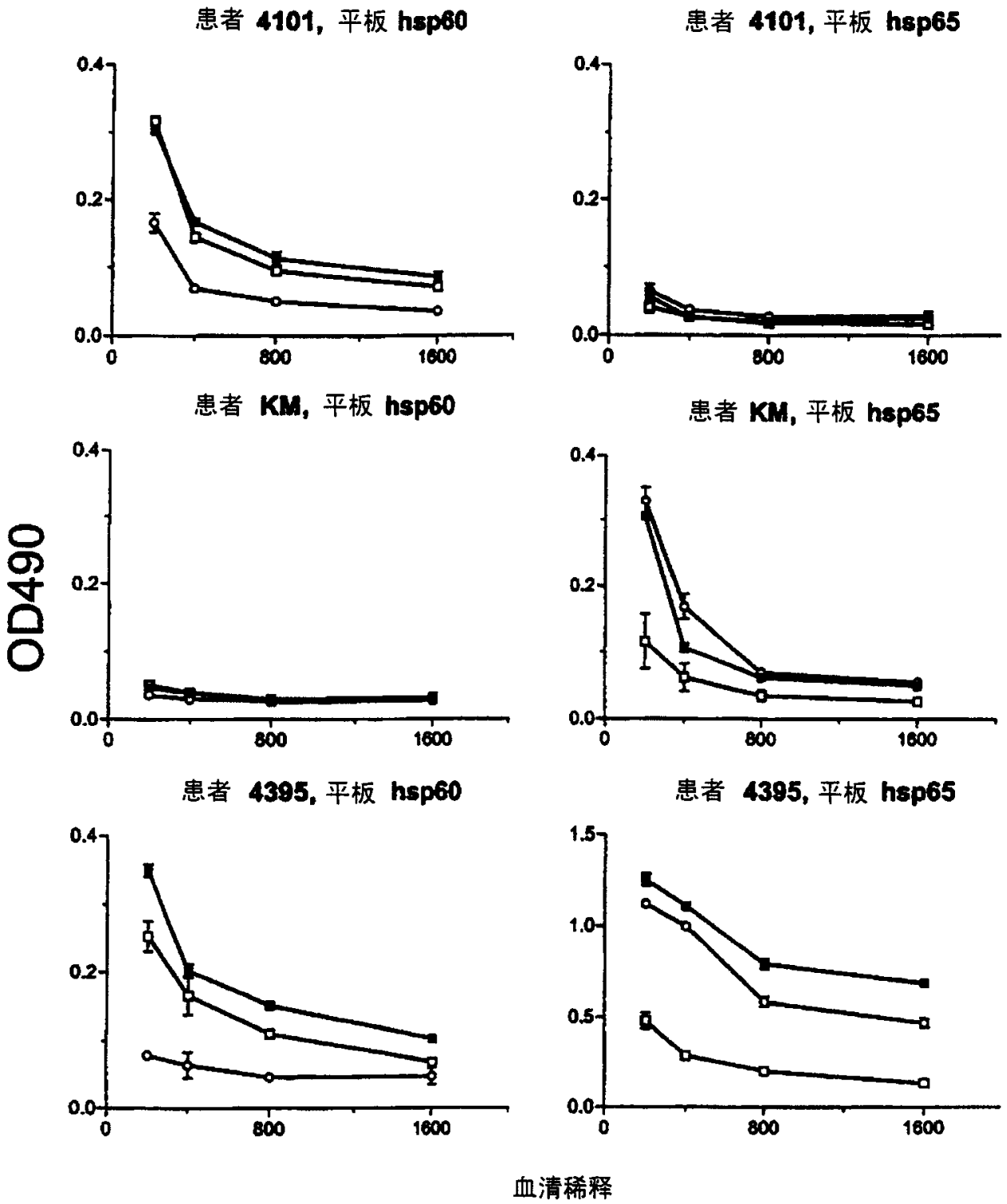
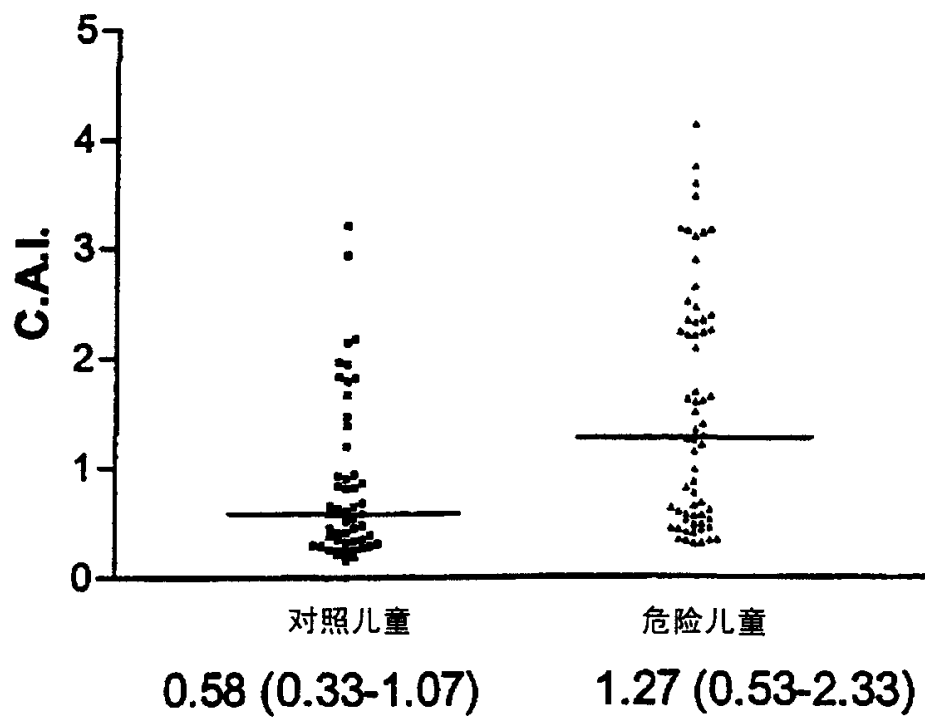


图5



专利名称(译)	动脉粥样硬化和冠心病的诊断和治疗		
公开(公告)号	<a href="#">CN1351713A</a>	公开(公告)日	2002-05-29
申请号	CN00807857.2	申请日	2000-05-22
[标]发明人	马哈维尔辛格 佐尔坦普罗哈斯卡 捷尔吉富斯特 拉斯洛罗米奇		
发明人	马哈维尔·辛格 佐尔坦·普罗哈斯卡 捷尔吉·富斯特 拉斯洛·罗米奇		
IPC分类号	G01N33/50 A61K39/00 A61K45/00 A61P9/00 A61P9/04 A61P9/10 C07K14/47 C12N15/09 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/564 G01N33/68		
CPC分类号	G01N2333/47 G01N2800/324 C07K14/47 G01N33/6893 A61K39/0008 A61P9/00 A61P9/04 A61P9/10		
代理人(译)	林晓红		
优先权	1999011772 1999-05-21 GB		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及人HSP60(热激蛋白60)在人的治疗或诊断方法中的新用途,更特别地,本发明涉及诊断试验方法、诊断试剂的生产以及用于因动脉粥样硬化而患有血管疾病的患者的诊断试验试剂盒,这些患者倾向于热激蛋白诱导的补体激活,例如,患有心肌疾病如冠心病。

