

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/68 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710159668.0

[43] 公开日 2008年5月7日

[11] 公开号 CN 101173928A

[22] 申请日 2007.7.27

[21] 申请号 200710159668.0

[30] 优先权

[32] 2006.7.28 [33] EP [31] 06118090.7

[71] 申请人 霍夫曼-拉罗奇有限公司

地址 瑞士巴塞尔

[72] 发明人 G·赫斯 A·霍施

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 刘健 黄可峻

权利要求书2页 说明书15页 附图2页

[54] 发明名称

鉴别急性呼吸短促的心源性和肺源性病因的装置和方法

[57] 摘要

本发明涉及在(i)肺疾病、(ii)心血管并发症、(iii)心血管并发症合并肺疾病或(iv)非心源性或肺源性病因的急性呼吸困难之间,鉴别患有急性呼吸短促(呼吸困难)的患者的方法,所述方法包括以下步骤,检测患者样本中SP-B的量,检测所述患者的样本中利尿钠肽的量,以及通过检测量与参照量的比较,在(i)肺疾病、(ii)心血管并发症、(iii)心血管并发症合并肺疾病或(iv)非心源性或肺源性病因的急性呼吸困难之间进行鉴别。此外,本发明涉及实施所述方法的装置和试剂盒。

1、一种在 (i) 肺疾病、(ii) 心血管并发症、(iii) 心血管并发症合并肺疾病或 (iv) 非心源性或肺源性病因的急性呼吸困难之间，鉴别患有急性呼吸短促（呼吸困难）的患者的方法，所述方法包括以下步骤：

a) 检测患者样本中 SP-B 的量；

b) 检测所述患者的样本中利尿钠肽的量；和

c) 通过比较 a) 和 b) 中的检测量与参照量，在 (i) 肺疾病、(ii) 心血管并发症、(iii) 心血管并发症合并肺疾病或 (iv) 非心源性或肺源性病因的急性呼吸困难之间进行鉴别。

2、权利要求 1 的方法，其中 (iii) 中的肺疾病是由心血管并发症引起的。

3、权利要求 1 的方法，其中 (iii) 中的心血管并发症是由肺疾病引起的。

4、权利要求 1 的方法，其中 (iii) 中的肺疾病与心血管并发症无关。

5、权利要求 1 至 4 中任一项的方法，其中低于 125 pg/ml 的利尿钠肽参照量和高于 20,000 ng/ml 的 SP-B 参照量标示 (i) 肺疾病。

6、权利要求 1 至 4 中任一项的方法，其中高于 125 pg/ml 但低于 3,200 pg/ml 的利尿钠肽参照量和高于 20,000 ng/ml 的 SP-B 参照量标示 (ii) 心血管并发症。

7、权利要求 1 至 4 中任一项的方法，其中高于 3,200 pg/ml 的利尿钠肽参照量和高于 20,000 ng/ml 的 SP-B 参照量标示 (iii) 心血管并发症合并肺疾病。

8、权利要求 1 至 4 中任一项的方法，其中低于 125 pg/ml 的利尿钠肽参照量和低于 20,000 ng/ml 的 SP-B 参照量标示 (iv) 非心源性或肺源性病因的急性呼吸困难。

9、权利要求 1 至 8 中任一项的方法，其中所述样本是血液、血浆、血清或者尿。

10、权利要求 1 至 9 中任一项的方法，其中所述利尿钠肽是 NT-proBNP。

11、权利要求 1 至 10 中任一项的方法，其中所述患者是人。

12、一种在 (i) 肺疾病、(ii) 心血管并发症、(iii) 心血管并发症合并肺疾病或 (iv) 非心源性或肺源性病因的急性呼吸困难之间，鉴别患有急性呼吸困难的患者的设备，所述设备包括：

a) 检测患者样本中 SP-B 浓度的装置；

b) 检测患者样本中利尿钠肽或者其变体的量的装置;

c) 比较检测量与适宜的参照量的装置, 由此在 (i) 肺疾病、(ii) 心血管并发症、(iii) 心血管并发症合并肺疾病或 (iv) 表现出肺症状的非心源性或肺源性病因的急性呼吸困难之间进行鉴别。

13、一种实施权利要求 1 至 11 中任一项的方法的试剂盒, 其中所述试剂盒包括实施所述方法的说明书以及:

a) 检测患者样本中 SP-B 浓度的装置;

b) 检测患者样本中利尿钠肽的量的装置;

c) 比较检测量与适宜的参照量的装置, 由此可以在 (i) 肺疾病、(ii) 表现出肺症状的心血管并发症、(iii) 心血管并发症合并肺疾病或 (iv) 非心源性或肺源性病因的急性呼吸困难之间进行彼此鉴别。

鉴别急性呼吸短促的心源性和肺源性病因的装置和方法

本发明涉及鉴别诊断急性呼吸短促病因的方法、装置和试剂盒。具体的，本发明涉及在 (i) 肺疾病、(ii) 心血管并发症、(iii) 心血管并发症合并肺疾病或 (iv) 非心源性或肺源性的呼吸困难之间，鉴别患有急性呼吸短促（呼吸困难）的患者的方法，所述方法包括以下步骤，检测患者样本中 SP-B 的量，检测所述患者的样本中利尿钠肽的量，通过检测量与参照量的比较，在 (i) 肺疾病、(ii) 心血管并发症、(iii) 心血管并发症合并肺疾病或 (iv) 非心源性或肺源性病因的急性呼吸困难之间进行鉴别。此外，本发明涉及实施所述方法的装置和试剂盒。

心血管并发症，尤其是急性心血管疾病是最常见的威胁生命的医学状况，需要紧急救助。但是，这些状况不是总能被清楚诊断。具体的，不同类型心脏疾病伴发的某些最常见症状，包括急性心血管疾病，也包括慢性心脏功能障碍例如慢性心力衰竭，也是其他（非心血管）疾病的特征症状。因此，鉴别观察到的症状是心血管或者其他病因通常是困难、麻烦和耗时的。所述鉴别可能还需要专家例如心脏病学家的帮助。

心血管并发症尤其是急性心血管疾病或者更严重慢性心力衰竭的典型症状是呼吸短促（呼吸困难）。与其他症状一样，呼吸困难可能有不同的病因，包括心血管并发症和非心血管肺疾病。为查明症状的潜在心血管病因，最好能够正确诊断特定患者例如急诊患者的病因。

WO99/13337 公开了表面活性蛋白可用作几种特异肺疾病包括急性呼吸窘迫综合征（ARDS）的生物标记物。

WO2004/077056 公开了表面活性蛋白的全身水平可用作心力衰竭的标记物。但是，公开的技术不能够鉴别诊断表面活性蛋白水平升高的病因。具体的，已知肺疾病或损伤也可能导致所述蛋白全身水平的升高（Doyle 1997, *Am J Respir Crit Care Med* Vol. 156: 1217-1229）。因此，所述的公开方法不可避免的会产生假阳性诊断结果，从而导致不正确的治疗（Svendstrup Nielsen, 2004, *The European Journal of Heart Failure* 6: 63-70）。

此外，表面活性蛋白与 N-端脑利尿钠肽（NT-proBNP）一起已用于指示根据纽约心脏协会（NYHA）分类的心力衰竭的严重度（DePasquale, 2004, *Circulation* 110: 1091-1096）。

NT-proBNP 还和七种其他参数一起已作为呼吸困难患者急性心力衰竭的指示物（Baggish 2005, *American Heart Journal*, 151: 48-54）。

因此，长期以来显然需要能够鉴别诊断诸如患者呼吸困难，尤其是急性呼吸困难症状的病因而的装置和方法。所述装置和方法能够提供可靠的有效诊断，并能避免现有技术的缺陷。

因此，本发明的根本技术问题是在以前装置和方法基础上为解决上述需要产生的。所述技术问题通过特征在于权利要求中的以及下述的实施方案进行解决。

由此，本发明涉及在 (i) 肺疾病、(ii) 心血管并发症、(iii) 心血管并发症合并肺疾病或 (iv) 非心源性或肺源性病因的急性呼吸困难之间，鉴别患有急性呼吸短促（呼吸困难）的患者的方法，所述方法包括以下步骤：

- a) 检测患者样本中肺表面活性蛋白 SP-B 的量；
- b) 检测所述患者的样本中利尿钠肽的量；
- c) 通过比较 a) 和 b) 中的检测量与参照量，在 (i) 肺疾病、(ii) 心血管并发症、(iii) 心血管并发症合并肺疾病或 (iv) 非心源性或肺源性病因的急性呼吸困难之间进行鉴别。

本发明的方法优选是一种体外方法。此外，除了上面清楚提及的步骤外，所述方法还可包括其他步骤例如进一步的样本前处理步骤或者评定步骤。

此处使用的术语“鉴别”的含义是在患有 (i) 肺疾病、(ii) 心血管并发症、(iii) 心血管并发症合并肺疾病或 (iv) 非心源性或肺源性病因的急性呼吸困难的患者之间，在患有所述疾病的患者显示基本相同的症状即呼吸短促的情况下进行区分。此处使用的术语优选的包括鉴别诊断肺疾病、表现出肺症状的心血管并发症、心血管并发症合并肺疾病或者非心源性或肺源性病因的急性呼吸困难。

此处使用的诊断是指患者患本说明书所述疾病的可能性。本领域技术人员应该了解，对被诊断的患者来说这种评估通常不期望达到 100% 的正确率。但是所述术语需要具有统计学上显著性比例的患者能够被诊断出患有所述疾病

(例如人群研究中的一个人群)。本领域技术人员采用各种众所周知的统计评估工具,例如检验置信区间、p-值检验、Student's t-检验、Mann-Whitney 检验等等,不需额外费力就可以检测一个比例是否具有统计学上显著性。细节参见 Dowdy 和 Wearden, *Statistics for Research*, John Wiley & Sons, New York 1983。优选的置信区间是至少 90%、至少 95%、至少 97%、至少 98% 或者至少 99%。p-值优选是 0.1、0.05、0.01、0.005 或者 0.0001。

根据本发明的诊断还包括相关疾病、症状或者其风险的监控、确诊、亚分类和预报。监控涉及追踪已诊断的疾病或者并发症,例如分析疾病的进程或者特定治疗对疾病或者并发症进程的影响。确诊涉及利用其他指示物或者标记物强化或者证实已进行的诊断。亚分类涉及根据被诊断疾病的不同亚类进一步定义诊断,例如根据疾病的轻微和严重形式定义。预报涉及在其他症状或者标记物变得明显或者显著改变之前预测疾病或者并发症。

短语“急性呼吸短促”或者“急性呼吸困难”指受损的呼吸,其导致呼吸频率增加和/或呼吸量增加。因此,呼吸短促可能导致,优选的,通气过度。呼吸短促通常发生在氧饱和度水平低于正常氧饱和度水平的至少 95%。此处使用的急性呼吸困难指非持久性发生的呼吸短促,即突然发生的(急性发作呼吸困难)和与特定条件无关的(例如只发生在特定压力类型下的)呼吸短促等。此外,急性呼吸困难从急性发作开始持续不超过 2 周,而慢性呼吸困难的特征在于持续时间超过 2 周。而且,急性呼吸困难通常是进行性恶化的。

术语“肺疾病”指任何导致呼吸短促的疾病。此外,应该知道根据本发明所述的肺疾病会导致受损的肺泡毛细血管膜屏障,从而对表面活性蛋白,尤其是对此处具体所述的肺表面活性蛋白的通透性增加。所述疾病优选的是急性和慢性呼吸衰竭、肺纤维化、肺蛋白沉积、肺水肿、肺炎症、肺气肿、肥胖、甲状腺疾病或者更优选的肺栓塞。

此处使用的术语“心血管并发症”指心血管系统的任何急性或者慢性病征。心血管系统的急性病征包括急性心血管状况。因此,更优选的包括稳定心绞痛(SAP)或者急性冠状动脉综合症(ACS)。ACS 患者显示不稳定心绞痛(UAP)或者这些个体已经患有心肌梗塞(MI)。MI 可能是 ST 上升的 MI 或者无 ST 上升的 MI。MI 发生后可能发生左心室功能障碍(LVD)。所述术语还包括慢性病征,优选的,心力衰竭。应该了解所述术语还包括除了上述急性心血管状

况外，造成心力衰竭的医学情况和疾病，例如先天或者后天的心脏瓣膜疾病或病症，心肌炎，非炎性心肌病，淀粉样变或者血色素沉着病。进一步优选的心血管疾病是血栓症，优选动脉血栓症，或者造成血管钙化的疾病，优选动脉粥样硬化，以及中风。

患有心血管并发症的个体可显示临床症状（例如呼吸困难，胸痛，同样参见下面的 NYHA 分类）。具体的，纽约心脏协会（NYHA）已经将心血管疾病的症状分类为功能性分类系统。I 型患者没有明显的心血管疾病症状。体力活动不受限制，平常的体力活动不会造成过度疲劳，心悸或者呼吸困难。II 型患者体力活动轻微受限。他们在休息时感觉舒适，但平常的活动会造成疲劳，心悸或者呼吸困难。III 型患者体力活动显著受限。他们在休息时感觉舒适，但强度低于平常活动时就会造成疲劳，心悸或者呼吸困难。IV 型患者进行任何体力活动都会感觉不适。他们在休息时表现心功能不全的症状。进行任何体力活动都会增加不适感。心脏并发症的另一特征是“左心室射血分数”（LVEF），也称为“射血分数”。心脏健康的人通常具有未受损的 LVEF，一般高于 50%。具有明显症状的心脏收缩疾病的大部分患者的 LVEF 通常是 40% 或者更低。

优选的，根据本发明的患有心血管并发症并显示急性呼吸困难的患者可被分类到中间 NYHA 级，优选的，到 NYHA I、II 或 III 级，最优选的，到 NYHA II 级。

“心血管并发症合并肺疾病”的含义是患者患有心血管并发症和肺疾病。应该了解该两种疾病或病征可独立出现，即一种不会造成另一种。但是，此处所述的原发性心血管并发症导致继发性肺疾病（而且反之亦然）的情况也优选地包括在上述表述中。

此外，无论怎样，急性呼吸困难可在既没患有心血管并发症也没患有肺疾病的患者中观察到。为了本发明的目的，术语“非心源性或肺源性病因的急性呼吸困难”应包括这些例子。急性呼吸短促的优选的非心源性和非肺源性病因是，优选的，肥胖症，体重超重，患者的未锻炼或者锻炼不足的身体状况，心理状况例如焦虑状态。

此处使用的术语“患者”涉及动物，优选的是哺乳动物，更优选的是人。但是，从本发明应该看出患者应该，优选的，显示急性呼吸短促。

根据本发明的检测利尿钠肽或者肺表面活性蛋白的量涉及测量浓度的量，

优选的半定量或者定量。测量可直接或者间接进行。直接测量涉及测定利尿钠肽或者肺表面活性蛋白的量或者浓度，这基于从利尿钠肽或者肺表面活性蛋白自身获得的信号以及与样本中存在的肽分子数目直接相关的强度。这种信号（本文中有时称为强度信号）可通过例如测定利尿钠肽或者肺表面活性蛋白的特定物理或者化学性质的强度值来获得。间接测量包括测定获自次级物质（即不是利尿钠肽本身的物质）的或者生物读数系统，例如可测细胞反应、配体、标记物或者酶反应产物的信号。

根据本发明，可采用检测样本中肽量的众所周知的方式来实现检测利尿钠肽或者肺表面活性蛋白的量。所述方式包括在多种夹心、竞争或者其他分析方式中利用标记分子的免疫分析设备和方法。所述分析会产生信号，其指示是否存在利尿钠肽或者肺表面活性蛋白。此外，信号强度，优选的，与样本中的肽量直接或者间接（例如反比）相关。其他合适的方法包括测定利尿钠肽特异的物理或者化学性质，例如其精确的分子量或者 NMR 光谱。所述方法包括，优选的，生物检测器，与免疫分析偶联的光学设备，生物芯片，分析设备例如质谱仪，NMR 分析仪或者层析设备。此外，方法包括基于微板 ELISA 的方法，全自动或者机器人免疫分析（例如 Elecsys™ 分析仪所提供的），CBA（酶性钴结合分析，例如 Roche-Hitachi™ 分析仪所提供的），和胶乳凝集分析（例如 Roche-Hitachi™ 分析仪所提供的）。

优选的，检测利尿钠肽或者肺表面活性蛋白量的方法包括下列步骤：(a) 将能够诱发细胞反应的细胞与肽温育足够时间，其中所述细胞反应的强度可以指示肽的量，(b) 测量细胞反应。

为测量细胞反应，样本或者处理的样本，优选的，加入到细胞培养物中，然后测量内部或者外部的细胞反应。细胞反应可包括可检测的报告基因表达或者物质例如肽、多肽或者小分子的分泌。表达或者物质应该产生与肽量相关的强度信号。

优选的，检测利尿钠肽或者肺表面活性蛋白量的方法包括检测从样本的利尿钠肽或者肺表面活性蛋白获得的特定强度信号的步骤。

如上所述，这种信号可以是特异性针对利尿钠肽或者肺表面活性蛋白的质谱或者 NMR 光谱中观察到的特异性针对利尿钠肽或者肺表面活性蛋白的以 m/z 变量形式所观测到的信号强度。

检测利尿钠肽量的方法还可以优选的包括下列步骤：(a) 肽与特异性配体接触，(b) (任选地) 除去未结合配体，(c) 测量结合配体的量。

结合的配体将产生强度信号。根据本发明的结合包括共价和非共价结合。根据本发明的配体可以是与此处所述的利尿钠肽或者肺表面活性蛋白结合的任何化合物，例如肽、多肽、核酸或者小分子。优选的配体包括抗体、核酸、肽或者多肽例如利尿钠肽的受体或者肺表面活性蛋白的结合伴侣 (partner)，及其包含所述肽结合域的片段，和适体，例如核酸或者肽适体 (aptamer)。制备所述配体的方法是本领域公知的。例如，商业化供应商提供鉴定和制备合适抗体或者适体的服务。本领域技术人员可以熟练的使用所述方法开发具有更高亲和力和特异性的所述配体的衍生物。例如，在核酸、肽或者多肽中引入随机突变。采用本领域公知的步骤，例如噬菌体展示，可以检测这些衍生物的结合。如此处所述的抗体包括多克隆和单克隆抗体，以及其片段，例如能够结合抗原或者半抗原的 Fv、Fab 和 F(ab)₂。本发明还包括人源化杂合抗体，其中显示所需抗原特异性的非人类供体抗体的氨基酸序列与人类受体抗体的序列组合。供体序列通常至少包括供体的抗原结合氨基酸残基，但也可包括供体抗体的其他结构或/和功能相关氨基酸残基。这种杂合体可用本领域公知的多种方法制备。优选的，配体或者试剂特异结合利尿钠肽。本发明的特异结合的含义是配体或者试剂基本上不结合 (与其“交叉反应”) 待分析样本中的其他肽、多肽或者物质。优选的，特异结合的利尿钠肽应当以比任何其他相关肽或者多肽高至少 3 倍，更优选至少高 10 倍，甚至更优选至少高 50 倍的亲和力被结合。如果非特异的结合同样可以例如根据其在 Western Bolt 上的大小，或者根据样本中其相对较高的丰度从而进行明确的区分和测量，则非特异的结合也是可接受的。配体的结合可通过本领域公知的任何方法测量。优选的，所述方法是半定量或者定量的。合适的方法如下所述。

首先，配体的结合可以例如通过 NMR、质谱或者表面等离子体共振直接测定。

其次，如果配体还是感兴趣的肽或者多肽的酶活性的底物，则可测定酶反应产物 (例如，可通过例如在 Western 印迹上测定酶切底物的量来测定蛋白酶的量)。或者，配体自身呈现出酶的性质，而配体/利尿钠肽或者配体/肺表面活性蛋白复合物或者与利尿钠肽或者肺表面活性蛋白分别结合的配体可以与合适

的底物接触，从而通过产生强度信号进行检测。为测定酶反应产物，底物量优选是饱和的。在反应前还可以用可检测的标记物标记底物。优选的，样本与底物接触充足的时间。充足的时间是指产生能够检测的优选可以测量的产品量所需的时间。除了检测产物量，还可以检测特定（例如可检测的）量产物出现所需的时间。

第三，配体可以共价或者非共价偶联到标记物，以便检测和测量配体。标记可采用直接或者间接的方法。直接标记涉及将标记物直接（共价或者非共价）偶联到配体。间接标记涉及将第二配体结合（共价或者非共价）到第一配体。第二配体应该是特异结合第一配体。所述第二配体可以用合适的标记物偶联和/或是结合第二配体的第三配体的靶（受体）。第二、第三甚至更高次序配体的使用通常用于增强信号。合适的第二和更高次序配体可以包括抗体，第二抗体和已知的链霉亲和素-生物素系统（Vector Laboratories, Inc.）。配体或者底物还可以用本领域已知的一种或者多种标记物进行标记。这种标记物可以是更高级配体的靶。合适的标记物包括生物素、地高辛、His-Tag、谷胺酰胺-S-转移酶、FLAG、GFP、myc-tag、流感 A 病毒血球凝集素（HA）、麦芽糖结合蛋白等等。在肽或者多肽情况下，标记物优选的在 N-端和/或 C-端。合适的标记物是用适宜检测方法能够检测到的任何标记物。典型的标记物包括金颗粒、乳胶珠、吖啶酯（acridan ester）、鲁米诺、钆、酶活性标记物、放射性标记物、磁性标记物（例如磁珠，包括顺磁和超顺磁标记物），和荧光标记物。酶活性标记物包括，例如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、荧光素酶及其衍生物。用于检测的合适底物包括二氨基联苯胺（DAB）、3,3'-5,5'-四甲基联苯胺、NBT-BCIP（四氮唑蓝(4-nitro blue tetrazolium chloride)和 5-溴-4-氯-3-吲哚基-磷酸酯，罗氏诊断提供预制储存液），CDP-SatTM（Amersham Bioscience），ECFTM（Amersham Bioscience）。合适的酶-底物组合会产生显色的反应产物、荧光或者化学发光，可根据本领域已知的方法（例如利用光敏膜或者合适的成像系统）对其测定。为检测酶反应，类似地使用上述标准。典型的荧光标记物包括荧光蛋白（例如 GFP 及其衍生物），Cy3，Cy5，德克萨斯红，荧光素和 Alexa 染料（例如 Alexa 568）。其他荧光标记物可获自例如 Molecular Probes（Oregon）。也可以使用量子点作为荧光标记物。典型的放射性标记物包括 ³⁵S、¹²⁵I、³²P 等等。放射性标记物可以用已知和合适的方法检测，例如光敏膜或者荧光成像仪。根

据本发明的合适检测方法还包括沉淀（尤其是免疫沉淀），电化学发光（电产生的化学发光），RIA（放射免疫分析），ELISA（酶联免疫吸附分析），夹心酶免疫检测，电化学发光夹心免疫分析（ECLIA），解离增益镧系荧光免疫分析（DELFLIA），闪烁逼近分析法（SPA），比浊法，浊度法，胶乳增益比浊法或者浊度法，或者固相免疫检测。本领域已知的其他方法（例如电泳，2D 凝胶电泳，SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE），Western 印迹和质谱），可以单独或者与上述标记或者其他检测方法联合使用。

此外，检测利尿钠肽量的方法优选包括（a）将含有利尿钠肽或者肺表面活性蛋白的样本与固相载体接触，所述固相载体含有上述利尿钠肽或者肺表面活性蛋白的配体，和（b）检测结合到载体上的利尿钠肽或者肺表面活性蛋白的量。所述配体，优选的选自核酸、肽、多肽、抗体和适体，优选的固定在固相载体上。制造固相载体的材料是本领域已知的，包括，尤其是，商品化的柱材料，聚苯乙烯珠、胶乳珠、磁珠、胶体金属颗粒、玻璃和/或硅芯片和表面、硝酸纤维素条、膜、片、duracytes、反应室的孔和壁、塑料管等等。配体或者试剂可以结合到许多不同载体。已知载体的例子包括玻璃、聚苯乙烯、聚氯乙烯、聚丙烯、聚乙烯、聚碳酸酯、右旋糖酐、尼龙、直链淀粉、天然和改造纤维素、聚丙烯酰胺、琼脂糖和磁铁。载体的性质根据发明目的可以是可溶或者不溶的。固定/定位所述配体的合适方法是众所周知的，包括但不限于离子、疏水、共价作用等等。根据本发明使用“悬浮阵列（suspension arrays）”作为阵列也是可以的（Nolan JP, Sklar LA. (2002). Suspension array technology: evolution of the flat-array paradigm. Trends Biotechnol. 20(1): 9-12）。在这种悬浮阵列中，载体，例如微珠或者微球，存在悬浮相中。该阵列由不同微珠或者微球组成，可能被标记的，携带不同配体。制备这种阵列的方法，例如基于固相化学和光敏保护基团，是公知的（US 5,744,305）。

此处使用的术语“量”包括利尿钠肽或者肺表面活性蛋白的绝对量，利尿钠肽或者肺表面活性蛋白的相对量或者浓度，以及与此相关的任意值或者参数。这种值或者参数包含通过直接测量得到的利尿钠肽或者肺表面活性蛋白的所有特定物理或者化学性质所获得的强度信号值，例如质谱或者 NMR 光谱中的强度值。此外，还包括说明书中其他地方描述的通过间接测量得到的所有值或者参数，例如响应利尿钠肽或者肺表面活性蛋白的生物读数系统所测定的表

达水平或者获自特异结合配体的强度信号。应该知道与上述量或者参数相关的值还可通过所有标准数学公式获得。

本说明书中所使用的术语“肺表面活性蛋白”涉及肺表面活性蛋白 B (SP-B)。所述术语, 优选的, 涉及人蛋白及其变体, 优选的, 等位基因变体或者种特异同源物、旁系同源物或者直系同源物。人蛋白在现有技术中已经详细描述了其特征, 并公开在例如, Hawgood, 1989, *Am J Physiol -Lung Cellular and Molecular Physiology*, Vol 257, Issue 2:13-L22(针对所有表面活性蛋白), Takahashi 2006, *Curr Pharm Des*, 12(5):589-598(针对 SP-A 和 SP-D), 以及 Kurutz 2002, *Biochemistry*, 41(30):9627-9636, Guttentag 1998, *Am J Physiol -Lung Cellular and Molecular Physiology*, Vol 275, Issue 3:L559-L566(针对 SP-B)。

具体的, 还涉及肺表面活性蛋白的变体, 其氨基酸水平与人肺表面活性蛋白具有至少 60% 同一性, 更优选至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 95%、至少 98% 或者至少 99% 同一性。基本与之相似并且还涉及能够被诊断装置或者通过针对相应全长肽的配体所识别的蛋白降解产物。还包括变体多肽, 其与人肺表面活性蛋白的氨基酸序列相比, 存在氨基酸缺失、替代和/或添加, 并且所述多肽具有肺表面活性蛋白性质。此处所述的肺表面活性蛋白性质是指免疫学和/或生物学特性。优选的, 肺表面活性蛋白变体具有免疫学特性(即表位构成), 该特性与此处具体描述的肺表面活性蛋白的特性相当。因此, 所述变体应能够被上述用于检测肺表面活性蛋白的装置或者配体识别。变体还包括翻译后修饰的肺表面活性蛋白例如糖基化蛋白。

此外, 应该知道所述术语还包括上述特异肺表面活性蛋白或者其变体的任意组合。例如, SP-B 可以与 SP-D 或者 SP-A 或者两者组合在一起检测。

术语“利尿钠肽”包含心钠素肽 (ANP) 型和脑钠素肽 (BNP) 型及其具有相同预知效果的变体。根据本发明的利尿钠肽包含 ANP 型和 BNP 型肽及其变体 (参见例如 Bonow, R.O.(1996). *New insights into the cardiac natriuretic peptides. Circulation* 93: 1946-1950)。

ANP 型肽包含 pre-proANP、proANP、NT-proANP 和 ANP。

BNP 型肽包含 pre-proBNP、proBNP、NT-proBNP 和 BNP。

前肽前体 (对于 pre-proBNP 是 134 个氨基酸) 包含一条短的信号肽, 该信号肽经酶切从而释放肽前体 (对于 pre-proBNP 是 108 个氨基酸)。肽前体被

进一步剪切成氨基端的肽前体（氨基端-肽前体，对于 NT-proBNP 是 76 个氨基酸）和活性激素（对于 BNP 是 32 个氨基酸，对于 ANP 是 28 个氨基酸）。

本发明优选的利尿钠肽是 NT-proANP、ANP、NT-proBNP、BNP 及其变体。ANP 和 BNP 均是活性激素，半衰期短于它们的各自非活性对应物，NT-proANP 和 NT-proBNP。BNP 在血液里代谢，而 NT-proBNP 作为完整分子在血液中循环，由此经肾脏清除。NT-proBNP 的体内半衰期是 120 分钟，长于 BNP 的 20 分钟（Smith MW, Espiner EA, Yandle TG, Charles CJ, Richards AM. Delayed metabolism of human brain natriuretic peptide reflects resistance to neutral endopeptidase. *J Endocrinol.* 2000; 167: 239-46）。

采用 NT-proBNP 可使预分析更强大，使样本可以方便的转移到中心实验室（Mueller T, Gegenhuber A, Dieplinger B, Poelz W, Haltmayer M. Long-term stability of endogenous B-type natriuretic peptide (BNP) and amino terminal proBNP (NT-proBNP) in frozen plasma samples. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 942-4.）。血液样本在室温可保存几天，或者邮寄或者运输，不会造成损失。与此相反，BNP 在室温或者 4℃ 保存 48 小时会导致至少 20% 的浓度损失（Mueller T, Gegenhuber A 等, *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 942-4, 如前; Wu AH, Packer M, Smith A, Bijou R, Fink D, Mair J, Wallentin L, Johnston N, Feldcamp CS, Haverstick DM, Ahnadi CE, Grant A, Despres N, Bluestein B, Ghani F. Analytical and clinical evaluation of the Bayer ADVIA Centaur automated B-type natriuretic peptide assay in patients with heart failure: a multisite study. *Clin Chem* 2004; 50: 867-73.）。因此，根据时程和感兴趣的性质，检测利尿钠肽的活性或者非活性形式均是有益的。

根据本发明最优的利尿钠肽是 NT-proBNP，及其变体。如上简述，根据本发明所述的人 NT-proBNP 是一种多肽，其包含优选的对应人 NT-proBNP 分子氨基端部分的 76 个氨基酸。人 BNP 和 NT-proBNP 的结构在现有技术中已有详尽描述，例如 WO 02/089657, WO 02/083913, Bonow 1996, *New Insights into the cardiac natriuretic peptides. Circulation* 93: 1946-1950。优选的，此处所使用的人 NT-proBNP 是在 EP 0 648 228 B1 中公开的人 NT-proBNP。这些现有技术文件在此处引入作为本文公开的 NT-proBNP 及其变体特定序列的参考。

根据本发明所述的人 NT-proBNP 还包括上述人 NT-proBNP 的所述特定序列的等位基因变体和其他变体。具体的，还涉及变体多肽，其氨基酸水平与人

NT-proBNP 具有至少 60% 的同一性, 更优选至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 95%、至少 98% 或者至少 99% 的同一性。基本与之相似并且还构想了能够被诊断装置或者通过针对相应全长肽的配体所识别的蛋白降解产物。还包括变体多肽, 其与人 NT-proBNP 的氨基酸序列相比, 存在氨基酸缺失、替代和/或添加, 并且所述多肽具有人 NT-proBNP 性质。此处所述的人 NT-proBNP 性质是指免疫学和/或生物学特性。优选的, 人 NT-proBNP 变体具有免疫学特性(即表位构成), 该特性与此处具体描述的人 NT-proBNP 的特性相当。因此, 所述变体应能被上述用于检测利尿钠肽量的装置或者配体特异识别(即无交叉反应)。NT-proBNP 的生物学和/或免疫学特性的检测方法可以参见, Karl 等(Karl 1999. Development of a novel, N-Terminal-proBNP (NT-proBNP) assay with a low detection limit. Scand J Clin Invest 230: 177-181), Yeo 等(Yeo 2003. Multicenter evaluation of the Roche NT-proBNP assay and comparison to the Biosite Triage assay. Clinica Chimica Acta 338: 107-115), 以及以下实施例。

变体还包括翻译后修饰的利尿钠肽例如糖基化蛋白。

根据本发明的变体还可以是样本收集后进行修饰的肽或者多肽, 例如共价或者非共价结合标记物尤其是放射性或者荧光标记物到肽。

此外, 应该知道所述术语还涉及上述特定利尿钠肽的任意组合。

术语“样本”是指体液样本, 分离的细胞样本或者组织或者器官的样本。体液样本可用公知技术获得, 包括, 优选的, 血液、血浆、血清或者尿的样本。组织或者器官的样本可以取自任意组织或者器官, 例如通过活组织检查。通过分离技术例如离心或者细胞分选, 分离的细胞可以取自体液或者组织或者器官。

此处使用的比较包括将待分析样本包含的利尿钠肽或者肺表面活性蛋白的量, 与说明书中下述合适参照源的量进行比较。应该知道此处使用的比较是指相应参数或者值的比较, 例如绝对量与绝对参照量比较, 而浓度与参照浓度比较, 或者待测样本所获得的强度信号与参照样本的同型强度信号比较。本发明方法的步骤(b)中所述的比较可以是人工或者计算机辅助进行的。对计算机辅助比较来说, 测定量的值可以与由计算机程序储存在数据库中的合适参照所对应的值进行比较。计算机程序可用于进一步评价比较结果, 即以合适的输出形式自动提供本文所述疾病的鉴别诊断。

此处使用的术语“参照量”是指通过上述比较，可以评价患者是否患有任意一种上述疾病或者病征的量。相应的，该参照可以来自患有 (i) 肺疾病、(ii) 心血管并发症、(iii) 心血管并发症合并肺疾病或 (iv) 非心源性或肺源性病因的急性呼吸困难的患者，即来自关于心血管并发症和肺疾病的健康个体。应该了解如果使用的参照是来自患有疾病或者疾病组合的患者，与所述参照量基本一致的待检患者样本中的肽或者蛋白量标示患有相应的疾病或者疾病组合。如果使用来自健康个体的参照，与参照显著不同的待检患者样本中的肽或者蛋白量（即不同于此处所述的表面活性蛋白和利尿钠肽的标准值）将标示患有疾病。用于个体的参照量根据不同生理参数例如年龄、性别或者种族而不同。因此，采用本发明的方法将参照样本与检测样本一起即同时或者先后分析，可以确定合适的参照量。

本发明的研究发现如果检测到肺表面活性蛋白的量升高，而检测到利尿钠肽的量没有升高或者微弱升高，该患者应该是仅患有肺疾病。如果检测到利尿钠肽和表面活性蛋白的量相对于正常范围都升高，该患者应该患有心血管并发症。如果利尿钠肽的量显著增强，而表面活性蛋白的量也升高，该患者应该患有心血管并发症合并肺疾病。最后，如果相对参照，检测到的量都不升高，该患者应该患有本说明书中其他地方描述的非心源性、非肺源性病因导致的急性呼吸困难。SP-B 量的正常生理范围（即未升高）是 12,000 至 20,000 ng/ml，优选 20,000 ng/ml。利尿钠肽尤其是 NT-proBNP 的正常生理范围（即未升高）是 80 至 150 pg/ml，优选 125 pg/ml。此处使用的显著增强的升高是指利尿钠肽优选 NT-proBNP 的量大于或者等于 3,200 pg/ml。应该了解上述量根据测量的统计和误差会有不同。

有利地，发现显示出肺症状尤其是急性呼吸短促的患者样本中存在肺表面活性蛋白的量与 NT-proBNP 的量组合，可以鉴别诊断所述症状的病因。由于本发明，患者尤其是急诊患者可以更为方便可靠的诊断，并然后根据所述鉴别诊断的结果进行治疗。

上面以及下文所作的术语解释和定义适用于特征在于本说明书和权利要求的所有实施方案。

以下实施方案是本发明方法的特别优选的实施方案。

在本发明方法的优选实施方案中，心血管并发症合并肺疾病（参见上面

(iii)) 的肺疾病是心血管并发症引起的。

在本发明方法的优选实施方案中, (iii) 的心血管并发症是肺疾病引起的。

在本发明方法的另一优选实施方案中, (iii) 的肺疾病与心血管并发症无关。

在本发明方法的其他优选实施方案中, 低于 125 pg/ml 的利尿钠肽参照量和高于 20,000 ng/ml 的 SP-B 参照量标示 (i) 肺疾病。

在本发明方法的另一个优选实施方案中, 高于 125 pg/ml 但低于 3,200 pg/ml 的利尿钠肽参照量和低于 20,000 ng/ml 的 SP-B 参照量标示 (ii) 心血管并发症。

在本发明方法的另一个优选实施方案中, 高于 3,200 pg/ml 的利尿钠肽参照量和高于 20,000 ng/ml 的 SP-B 参照量标示 (iii) 心血管并发症合并肺疾病。

在本发明方法的另一优选实施方案中, 低于 125 pg/ml 的利尿钠肽参照量和低于 20,000 ng/ml 的 SP-B 参照量标示 (iv) 非心源性或肺源性病因的急性呼吸困难。

而且, 在本发明方法的优选实施方案中, 所述样本是血液、血浆、血清或者尿。

在本发明方法的另一优选实施方案中, 所述利尿钠肽是 NT-proBNP。

此外, 在本发明方法的优选实施方案中, 所述患者是人。

此外, 本发明涉及在 (i) 肺疾病、(ii) 表现出肺症状的心血管并发症、(iii) 心血管并发症合并肺疾病或 (iv) 非心源性或肺源性病因的急性呼吸困难之间, 鉴别患有急性呼吸困难的患者的设备, 包括:

- a) 检测患者样本中肺表面活性蛋白 SP-B 浓度的装置;
- b) 检测患者样本中利尿钠肽或者其变体的量的装置;
- c) 比较检测量与适宜的参照量的装置, 由此在 (i) 肺疾病、(ii) 心血管并发症、(iii) 心血管并发症合并肺疾病或 (iv) 非心源性或肺源性病因的急性呼吸困难之间进行鉴别。

此处使用的术语“设备”是指装置系统, 至少包括彼此操作性相连从而进行预测的上述装置。优选的检测利尿钠肽或者肺表面活性蛋白量的装置和进行比较的装置在上述于本发明相关的方法中已经公开。如何将这此装置操作性相连应依赖于所述设备包括的装置类型。例如, 如果使用自动检测肽量的装置, 所述自动操作装置获得的数据可通过例如计算机程序处理, 以便进行诊断或者

鉴别本文所述的疾病。优选的，在这种情况下所有装置被包含在单一设备中。所述设备相应的包括检测样本中肽量的分析单元和处理分析结果用于鉴别诊断的计算机单元。任选地，如果使用诸如检测条的装置检测肽量，诊断装置可以包括将测定量与以下量进行比照的对照条或者表，所述量已知与 (i) 肺疾病、(ii) 心血管并发症、(iii) 心血管并发症合并肺疾病或 (iv) 非心源性或肺源性病因的急性呼吸困难或者健康对照个体相关。检测条优选偶联与利尿钠肽或者肺表面活性蛋白特异结合的配体。所述条或者设备，优选包括检测所述肽与所述配体结合的装置。优选的检测装置在与上述本发明方法相关的实施方案中已经公开。在这种情况下，装置按如下方式操作性连接：所述系统的使用者根据操作手册里的使用说明和解释汇总检测量结果及其诊断值。在这种实施方案中装置可以是分离的设备，但优选，组装为试剂盒。本领域技术人员无需额外费力即可知晓如何连接这些装置。优选设备是那些不需要专业临床医师的专业知识就可以操作的设备，例如，仅需上样的检测条或者电子设备。结果可以用诊断原始数据的形式输出，其需要医师的解释。但是，优选输出设备对原始数据进行处理，而无需专业医师的解释。其他进一步优选的设备包括根据本发明方法的上述分析单元/设备（例如生物传感器、阵列、与特异性识别利尿钠肽的配体偶联的固相载体、表面等离子体共振设备、NMR 光谱仪、质谱仪等等）或者评估单位/设备。

最后，本发明涉及实施本发明方法的试剂盒，其中所述试剂盒包括：

a) 检测患者样本中肺表面活性蛋白 SP-B 浓度的装置；

b) 检测患者样本中利尿钠肽或者其变体量的装置；

c) 比较检测量与适宜的参照量的装置，由此在 (i) 肺疾病、(ii) 心血管并发症、(iii) 心血管并发症合并肺疾病或 (iv) 非心源性或肺源性病因的急性呼吸困难之间进行彼此鉴别。

此处使用的术语“试剂盒”是指上述装置的汇总，优选的，分别或者在单一容器中提供。所述容器，优选的，包括实施本发明方法的使用说明书。

所有在本说明书中引用的参考文献以其完全公开的内容以及在本说明书中特别提及的公开内容引入本文作为参考。

附图显示：

图 1：该图显示检测到患有心力衰竭 (HF)、肺疾病 (LD) 或者两者 (Comb.

HF+LD) 的患者群的 NT-proBNP 浓度, 以及对照人群 (Ctr.) 的浓度的柱状图。N 代表患者数目。此外, 还标出了中值以及第 75%、95%、5% 和 25%。

图 2: 该图显示检测到患有心力衰竭 (HF)、肺疾病 (LD) 或者两者 (Comb. HF+LD) 的患者群的 SP-B 浓度, 以及对照人群 (Ctr.) 的浓度的柱状图。N 代表患者数目。此外, 还标出了中值以及第 75%、95%、5% 和 25%。

以下实施例只是为了说明本发明。无论任何情况, 其均不应被理解为对本发明范围的限制。

实施例: 急性呼吸困难患者的预期性研究

对包括 214 名急性呼吸困难患者的人群进行临床研究, 分析他们是否患有心力衰竭、肺疾病或者两种疾病的组合。通过临床检查、ECG 和超声心动图确诊, 将这些患者分为三个疾病组。患者的血液样本用原型 SP-B ELISA 进行分析(对于 SP-B 量使用 Flinders 分析操作步骤, 而对于 NT-proBNP 浓度使用 Elecsys NT-proBNP™ 分析(罗氏诊断))。

NT-proBNP 浓度的检测结果如图 1 所示。患有两种疾病组合(心力衰竭和肺疾病)的患者显示显著升高的 NT-proBNP 水平, 心力衰竭患者显示升高的 NT-proBNP 水平。但是, 肺病患者只显示稍微升高或者正常的 NT-proBNP 水平。

图 2 显示不同患者组中 SP-B 量的检测结果。肺疾病或者两种疾病的组合显示 SP-B 量的升高。与文献中描述的参照值相比, 表现出由非心源性或肺源性病因导致的呼吸困难的患者未显示显著升高的 SP-B。

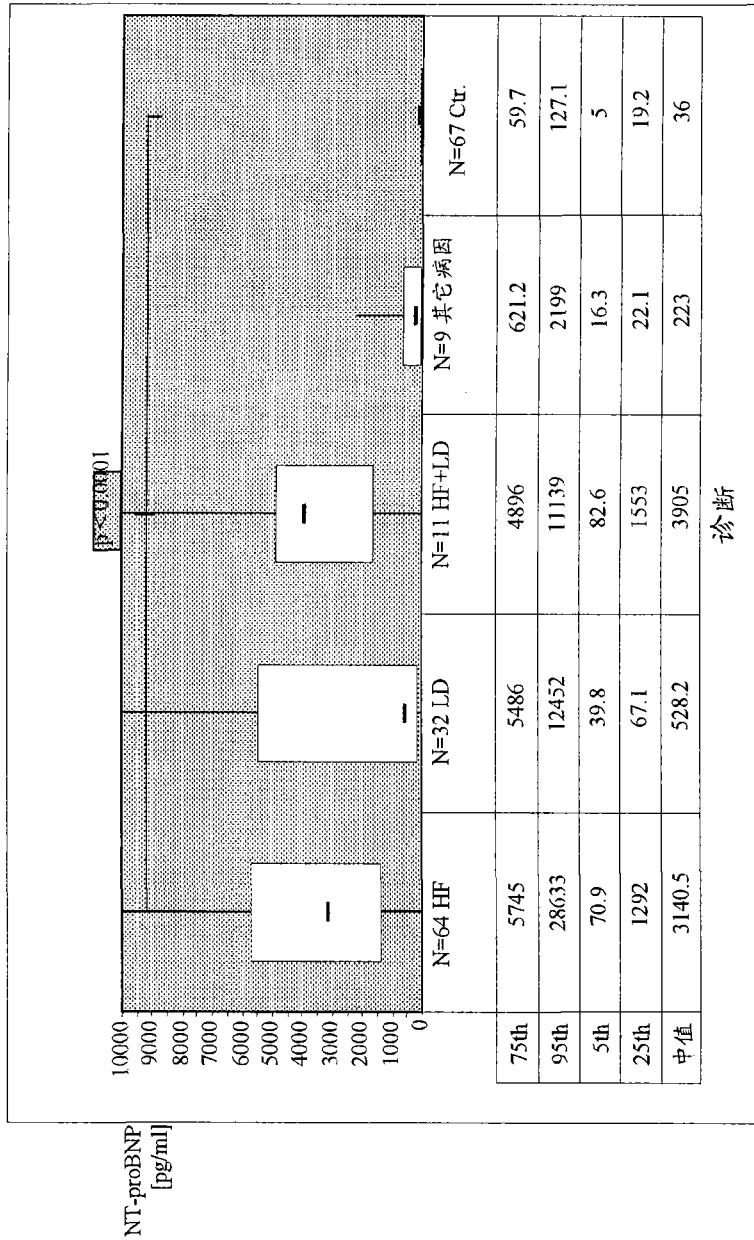


图 1

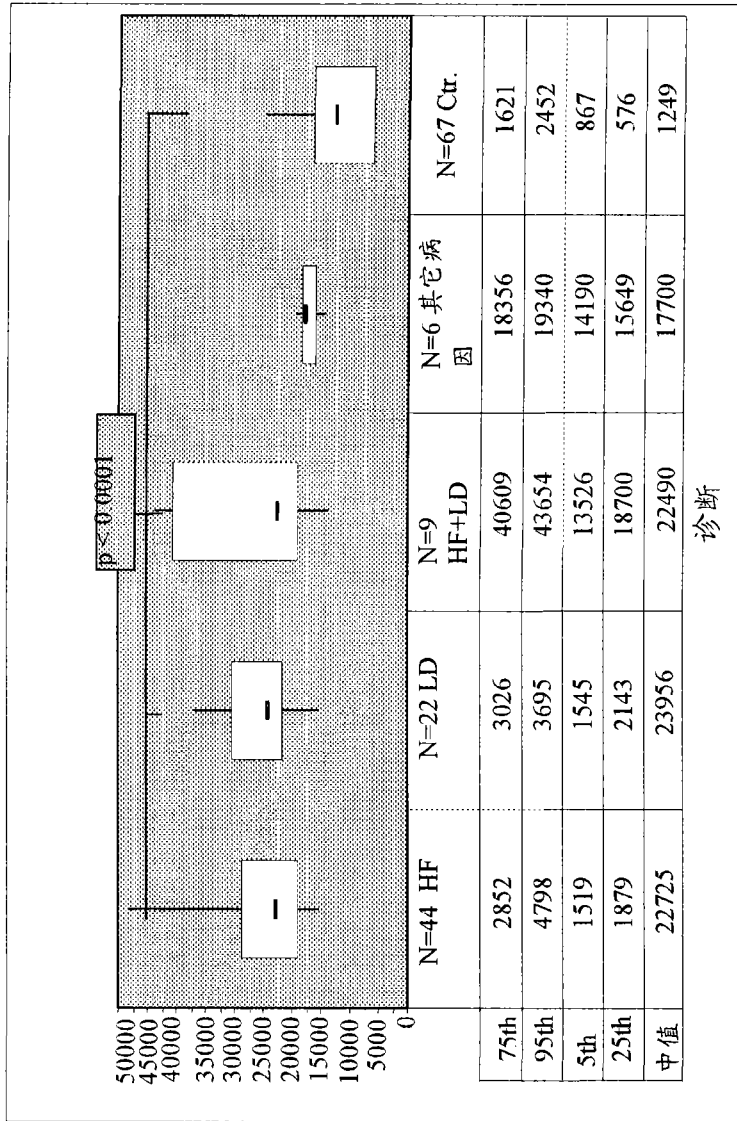


图 2