



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102084251 A

(43) 申请公布日 2011.06.01

(21) 申请号 200980113514.5

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2009.02.20

G01N 33/53 (2006.01)

(30) 优先权数据

G01N 33/68 (2006.01)

61/030,629 2008.02.22 US

C07K 7/06 (2006.01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010.10.15

(86) PCT申请的申请数据

PCT/NZ2009/000022 2009.02.20

(87) PCT申请的公布数据

W02009/104974 EN 2009.08.27

(71) 申请人 奥塔哥创新有限公司

地址 新西兰丹尼丁

(72) 发明人 克里斯托弗·约瑟夫·彭伯顿

阿瑟·马克·理查兹

迈克尔·加里·尼科尔斯

蒂莫西·格兰特·扬德尔

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限

责任公司 11240

代理人 李丙林 张英

权利要求书 5 页 说明书 34 页 序列表 9 页

附图 7 页

(54) 发明名称

用于急性冠状动脉疾病的生物标志物

(57) 摘要

本发明提供了用于预测、诊断或监测急性心脏疾病、心脏移植排斥、或区别急性心脏疾病与肺疾病的方法,其中通过在疾病或移植排斥发作或表现不久后测量在从对象获得的样品中的 ANP 信号肽水平。还提供了在本发明方法中有用的抗体。

1. 一种抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段结合
 - (a) ANP-SP 氨基酸序列 16-25 (SEQ ID NO :12) 或 1-10 (SEQ ID NO :16) ;
 - (b) 由选自 SEQ ID NO :13 或 SEQ ID NO :17 的核苷酸序列编码的氨基酸序列 ;或
 - (c) (a) 或 (b) 的变体或片段。
2. 根据权利要求 1 所述的抗体或抗原结合片段,其选择性地结合 ANP (16-25) 或 ANP (1-10)。
3. 根据权利要求 1 或权利要求 2 所述的抗体或抗原结合片段,其是单克隆、多克隆、嵌合或人源化抗体或片段。
4. 根据权利要求 1 至 3 中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其被标记有可检测标志物。
5. 一种用于预测、诊断或监测对象中的急性心脏疾病 (ACD) 的方法,所述方法包括 :
在所述 ACD 发作的 4 小时内、或所述 ACD 表现的 4 小时内测量在从所述对象获得的生物样品中的 ANP-SP 水平 ;以及将所述 ANP-SP 水平与来自对照的 ANP-SP 水平进行比较,其中,测得的高于所述对照水平的 ANP-SP 水平是 ACD 的征兆。
6. 一种用于监测对象中对急性心脏疾病 (ACD) 的治疗的的反应的方法,所述方法包括 :
在所述 ACD 发作的 4 小时内、或所述 ACD 表现的 4 小时内测量在从所述对象获得的生物样品中的 ANP-SP 水平 ;以及将所述 ANP-SP 水平与来自对照的 ANP-SP 水平,其中,测得的 ANP-SP 水平相对于所述对照水平的变化是对所述治疗的反应的征兆。
7. 一种用于在对象中预测、诊断或监测心脏移植排斥反应的方法,所述方法包括 :
在心脏移植的 4 小时内测量在从对象获得的生物样品中的 ANP-SP 水平,以及将所述 ANP-SP 水平与来自对照的 ANP-SP 水平进行比较,其中,测得的高于所述对照水平的 ANP-SP 水平是移植排斥的征兆。
8. 一种用于区别对象中的肺疾病和急性心脏疾病 (ACD) 的方法,所述方法包括 :
在所述疾病表现的 4 小时内测量在从对象获得的生物样品中的 ANP-SP 水平 ;以及将所述 ANP-SP 水平与来自对照的 ANP-SP 水平进行比较,其中,测得的高于所述对照水平的 ANP-SP 水平是 ACD 的征兆。
9. 一种用于预测、诊断或监测对象中的急性心脏疾病 (ACD)、心脏移植排斥、或 ACD/ 肺疾病的方法,所述方法包括在 ACD、心脏移植排斥或 ACD/ 肺疾病发作或临床表现的最初 4 小时内测量在从所述对象获得的生物样品中的 ANP-SP 水平,其中将测得的 ANP-SP 水平与来自对照的 ANP-SP 水平进行比较,其中,测得的高于所述对照水平的 ANP-SP 水平是 ACD 或移植排斥的征兆。
10. 根据权利要求 5 至 9 中任一项所述的方法,其中,在 ACD 发作、或 ACD、心脏移植排斥、或 ACD/ 肺疾病临床表现的最初 2 小时、1 小时、或 30 分钟内测量 ANP-SP 的水平。
11. 根据权利要求 5 至 10 中任一项所述的方法,其中,在发作或临床表现的 4 至 6 小时内、或在初始测量的 2 至 3 小时内进行重复测量。
12. 根据权利要求 5 至 11 中任一项所述的方法,其中,在所述样品中,在 40 至 300pmol/L、或 42 至 200pmol/L、或 45 至 200pmol/L 或 45 至 150pmol/L 范围内的 ANP-SP 水平是 ACD、或心脏移植排斥的征兆,或用于区分 ACD 与肺疾病。
13. 根据权利要求 5 至 11 中任一项所述的方法,其中,在所述样品中,比所述对照水平

高 3 至 8 倍的 ANP-SP 水平是 ACD、或心脏移植排斥的征兆,或用于区分 ACD 与肺疾病。

14. 根据权利要求 5 至 13 中任一项所述的方法,其中,所述 ACD 选自由急性冠状动脉综合征;在呈现 ECG 上具有 ST 段抬高型的 AMI、不稳定型心绞痛、以及非 ST- 段抬高的 MI ;心肌缺血、急性心肌损伤、急性药物毒性造成的急性心肌损伤、急性心肌病、以及心脏移植排斥组成的组。

15. 根据权利要求 14 所述的方法,其中,所述 ACD 是非 ST 段抬高的 MI。

16. 根据权利要求 14 所述的方法,其中,所述 ACD 是急性心肌缺血。

17. 根据权利要求 5 至 16 中任一项所述的方法,其中,所述生物样品是血液、血浆、血清、唾液、间质液、尿或心脏组织样品。

18. 根据权利要求 5 至 17 中任一项所述的方法,其中,所述测量步骤包括

(a) 使 ANP-SP 与结合剂结合;以及

(b) 测量结合的 ANP-SP 的水平。

19. 根据权利要求 1 至 18 中任一项所述的方法,其中,所述结合剂是抗体或其抗原-结合片段。

20. 根据权利要求 19 所述的方法,其中,所述抗体结合或选择性结合的 ANP-SP 是 ANP-SP (SEQ ID NO :14) 或其抗原片段或变体。

21. 根据权利要求 19 或权利要求 20 所述的方法,其中,所述抗体结合于 ANP-SP 的 N 端或 C 端。

22. 根据权利要求 19 至 21 中任一项所述的方法,其中,所述抗体或抗原-结合片段是根据权利要求 1 至 4 中任一项所述的抗体或片段。

23. 根据权利要求 18 至 22 中任一项所述的方法,其中,利用被固定在固相上的抗体或抗原-结合片段来测量 ANP-SP 的结合。

24. 根据权利要求 5 至 23 中任一项所述的方法,其中,利用选自 RIA、ELISA、质谱、荧光免疫测定、免疫荧光测定、以及免疫放射测定的测定来测量 ANP-SP 的水平。

25. 根据权利要求 5 至 23 中任一项所述的方法,其中,利用质谱法来测量 ANP-SP 的水平。

26. 根据权利要求 25 所述的方法,其中,所述质谱法是 SELDI、ESI、MALDI 或 FTICR。

27. 根据权利要求 5 至 26 中任一项所述的方法,其进一步包括测量所述 ACD、或心脏移植排斥、或 ACD/ 肺疾病的一种或多种非 ANP-SP 标志物的水平,以及将所述水平与来自对照的标志物水平进行比较,其中,所述测得的水平与所述对照水平的偏差,连同测得的高于 ANP-SP 的对照水平的 ANP-SP 水平,是所述 ACD 的预测或诊断,或能够用来监测所述 ACD、心脏移植排斥或 ACD/ 肺疾病。

28. 根据权利要求 27 所述的方法,其中,所述非 ANP-SP 标志物选自由肌钙蛋白 T、肌钙蛋白 I、肌酸激酶 -MB、肌红蛋白、BNP、NT-BNP、BNP-SP、LDH、天冬氨酸转氨酶以及 H-FABP 组成的组。

29. 根据权利要求 27 或权利要求 28 所述的方法,其中,测得的水平相对于所述对照水平的偏差包括更高的测得的所述非 ANP-SP 标志物水平。

30. 根据权利要求 5 至 29 中任一项所述的方法,其中,所述监测是监测对再灌注治疗的反应。

31. 一种用于在 ACD、心脏移植排斥、或 ACD/ 肺疾病发作的 4 小时内或 ACD、心脏移植排斥、或 ACD/ 肺疾病临床表现的 4 小时内,测定在从对象获得的生物样品中的 ANP-SP 的测定方法,所述测定方法包括利用任何已知的方法来检测和测量所述样品中的 ANP-SP 的水平。

32. 根据权利要求 31 所述的测定方法,其中,通过将 ANP-SP 结合于结合剂来检测所述样品中的 ANP-SP 的水平,其中所述结合剂结合或选择性地结合 ANP-SP。

33. 一种用于 ANP-SP 的测定方法,包括

(a) 结合来自生物样品的一种或多种 ANP-SP 多肽,其中所述 ANP-SP 多肽选自由 ANP-SP(1-10) (SEQ ID NO :16)、和 ANP-SP 16-25 (SEQ ID NO :12)、或它们的变体或片段组成的组;以及

(b) 测量结合的 ANP-SP 多肽的水平。

34. 根据权利要求 33 所述的测定方法,其中,利用 ANP-SP 结合剂、或根据权利要求 1 至 4 中任一项所述的抗体或其抗原-结合片段来结合所述 ANP-SP 多肽。

35. 根据权利要求 31 至 34 中任一项所述的测定方法,其中,利用质谱法来测量 ANP-SP 的水平。

36. 根据权利要求 35 所述的测定方法,其中,所述质谱法是 SELDI、ESI、MALDI 或 FTICR。

37. 根据权利要求 36 所述的测定方法,其中,所述测量包括提供 SELDI 探针,所述 SELDI 探针包含附着于底物的 ANP-SP 抗体或抗原-结合片段;使所述抗体或片段与所述生物样品接触以使所述抗体捕获来自所述样品的一种或多种 ANP-SP 多肽;以及利用 SELDI 来测量结合的 ANP-SP 的水平。

38. 根据权利要求 37 所述的测定方法,其中,利用具有层析表面的 SELDI 生物芯片来实施所述 SELDI。

39. 根据权利要求 31 至 34 中任一项所述的测定方法,其中,利用选自 RIA、ELISA、免疫荧光测定和免疫放射测定的测定来测量 ANP-SP 的水平。

40. 一种结合 ANP-SP (SEQ ID NO :14) 或其片段或变体的 ANP-SP 结合剂,用于预测、诊断或监测对象中的急性心脏疾病 (ACD)、心脏移植排斥或 ACD/ 肺疾病,其中,所述 ACD、心脏移植排斥或 ACD/ 肺疾病的特征在于,在 ACD、心脏移植排斥或 ACD/ 肺疾病发作的 4 小时内、或临床表现的 4 小时内获自所述对象的生物样品中出现 ANP-SP。

41. 根据权利要求 40 所述的 ANP-SP 结合剂,其中,ANP-SP 以 40 至 300pmol/L、或 42 至 200pmol/L、或 45 至 200pmol/L 或 45 至 150pmol/L 的范围存在于所述样品中。

42. 根据权利要求 40 所述的 ANP-SP 结合剂,其中,ANP-SP 以高于 ANP-SP 平均对照的 3 至 7 倍的水平存在于所述样品中。

43. 根据权利要求 40 至 42 中任一项所述的 ANP-SP 结合剂,其是根据权利要求 1 至 4 中任一项所述的抗体或抗原-结合片段。

44. ANP-SP 结合剂在制备用于评估对象中的急性心脏疾病 (ACD)、心脏移植排斥或 ACD/ 肺疾病的预后、诊断或监测工具中的应用,其中,所述评估在 ACD、心脏移植排斥或 ACD/ 肺疾病发作的 4 小时内、或临床表现的 4 小时内实施。

45. 根据权利要求 44 所述的应用,其中,所述预后、诊断或监测工具被校准以测量在 0.1 至 500pmol/L、或 1 至 300pmol/L 或 2 至 100pmol/L、或 5 至 150pmol/L 范围内的 ANP-SP

水平。

46. 根据权利要求 44 所述的应用,其中,所述预后、诊断或监测工具被校准以测量在高于 ANP-SP 对照水平的 3 至 7 倍范围内的 ANP-SP 水平。

47. ANP-SP 结合剂在用于预测、诊断或监测对象中的急性心脏疾病 (ACD)、心脏移植排斥或 ACD/ 肺疾病中的应用,其中,所述预后、诊断或监测在 ACD、心脏移植排斥或 ACD/ 肺疾病发作的 4 小时内、或临床表现的 4 小时内实施。

48. 根据权利要求 47 所述的应用,其中,所述预测、诊断或监测利用根据权利要求 5 至 30 中任一项所述的方法或根据权利要求 31 至 39 中任一项所述的测定方法来实现。

49. 根据权利要求 44 至 48 中任一项所述的应用,其中,所述结合剂是结合或选择性地结合 ANP-SP (SEQ ID NO :14) 或其片段或变体的结合剂。

50. 根据权利要求 49 所述的应用,其中,所述结合剂是抗体或其抗原 - 结合片段。

51. 根据权利要求 50 所述的应用,其中,所述抗体或抗原 - 结合片段是根据权利要求 1 至 4 中任一项所述的抗体或抗原 - 结合片段。

52. 根据权利要求 1 至 4 中任一项所述的 ANP-SP 抗体或其抗原 - 结合片段在制备用于评估对象中的急性心脏疾病 (ACD)、心脏移植排斥或 ACD/ 肺疾病的预后、诊断或监测工具中的应用。

53. 根据权利要求 1 至 4 中任一项所述的 ANP-SP 抗体或其抗原 - 结合片段在用于预测、诊断或监测对象中的急性心脏疾病 (ACD)、心脏移植排斥或 ACD/ 肺疾病中的应用。

54. 一种用于预测、诊断或监测急性心脏疾病 (ACD)、心脏移植排斥或 ACD/ 肺疾病的试剂盒,所述试剂盒包含根据权利要求 40 至 43 中任一项所述的 ANP-SP 结合剂,其中,所述试剂盒在 ACD、心脏移植排斥或 ACD/ 肺疾病发作的 4 小时内、或临床表现的 4 小时内与从对象获得的生物样品一起使用。

55. 一种用于预测、诊断或监测急性心脏疾病 (ACD)、心脏移植排斥或 ACD/ 肺疾病的试剂盒,所述试剂盒包含根据权利要求 40 至 43 中任一项所述的结合剂,其中,所述试剂盒被校准以测量在 0.1 至 500pmol/L、优选 1 至 300pmol/L、并且优选 2 至 100pmol/L 范围内的 ANP-SP 水平。

56. 一种用于预测、诊断或监测急性心脏疾病 (ACD)、心脏移植排斥或 ACD/ 肺疾病的试剂盒,所述试剂盒包含根据权利要求 1 至 4 中任一项所述的 ANP-SP 抗体或其抗原 - 结合片段。

57. 根据权利要求 54 至 56 中任一项所述的试剂盒,所述试剂盒进一步包括其上固定有所述结合剂或抗体的固体相。

58. 根据权利要求 54 至 57 中任一项所述的试剂盒,其进一步包括说明书,根据在发作或临床表现的 4 小时内获得的生物样品中测得的 ANP-SP 水平,用于在发作的 4 小时内、或临床表现的 4 小时内预测、诊断或监测对象中的 ACD、心脏移植排斥、或 ACD/ 肺疾病。

59. 一种编码 ANP-SP (16-25) (SEQ ID NO :12) 或 ANP-SP (1-10) (SEQ ID NO :16) 或它们的片段或变体的核酸分子,其中,所述核酸是

(a) SEQ ID NO :13 或 SEQ ID NO :17 或它们的变体或片段 ;

(b) 与 SEQ ID NO :13 或 SEQ ID NO :17 具有 70%、75%、80%、90%、95% 或 99% 序列同一性的序列 ;

(c) 在严格条件下与 SEQ ID NO:13 或 SEQ ID NO:17 或它们的片段或变体杂交的序列；

(d) 长度为至少 10 个核苷酸,能够在严格条件下与 (a) 至 (c) 中任一个的序列杂交的序列；

(e) (a) 至 (d) 中任一个的补体；

前提条件是所述序列不是 SEQ ID NO:15。

60. 一种基因构建体,其包含根据权利要求 59 所述的核酸分子。

61. 根据权利要求 60 所述的基因构建体,其是一种表达构建体。

62. 一种载体,其包含根据权利要求 60 或权利要求 61 所述的基因构建体。

63. 一种宿主细胞,其包含根据权利要求 60 至 62 中任一项所述的基因构建体或载体。

64. 一种由权利要求 59 所述的核酸分子编码的 ANP-SP 多肽、或其变体或片段。

65. 一种 ANP-SP 多肽或其变体或片段,选自：

(a) ANP-SP(16-25) (SEQ ID NO. 12) 或其变体或片段；

(b) ANP-SP(1-10) (SEQ ID NO:16) 或其变体或片段；或

(c) 与 SEQ ID NO:12 或 SEQ ID NO:16 的多肽具有至少 70%、75%、80%、85%、90%、95% 或 99% 氨基酸同一性的氨基酸序列。

66. 一种用于重组生产根据权利要求 64 或权利要求 65 所述的多肽的方法,所述方法包括以下步骤：

(a) 培养宿主细胞,所述宿主细胞包含能够表达权利要求 64 或 65 所述的多肽的权利要求 60 或 61 所述的基因构建体；以及

(b) 选择表达本发明的多肽的细胞；

(c) 从所述细胞分离已表达的多肽；以及可选地

(d) 纯化所述已表达的多肽。

67. 根据权利要求 66 所述的方法,其中,所述方法包括用所述构建体转染所述宿主细胞的预先步骤。

用于急性冠状动脉疾病的生物标志物

技术领域

[0001] 本发明涉及 ANP 信号肽 (ANP-SP) 及其在预后、诊断以及监测对象中导致生物标志物 (生物标记物, biomarker) 释放到循环中的急性心脏疾病, 包括急性冠状动脉综合征中的应用。更具体地说, 本发明涉及通过测量在疾病发作或临床表现不久 (短时间, shortly) 后取得的样品中的 ANP-SP 水平来预测、诊断或监测对象的急性心脏疾病的方法。

背景技术

[0002] 急性心脏疾病, 包括急性冠状动脉综合征 (ACS), 涵盖广谱范围的心脏缺血事件: 从不稳定型心绞痛至急性心肌梗死 (AMI)。在这些事件中, AMI 表现为最严重, 因而需要快速和准确的诊断。呈现两种或更多种所描述特征 (缺血性胸部不适史、在系列心电图 (ECG) 痕迹上的发展变化以及血浆心脏生物标志物的升高和降低) 的患者被明确地鉴定为正经历 AMI²⁵。然而, 相当大一部分呈现可疑的 AMI 的患者 (40% -50%) 并不具有在 ECG 上的系列变化、或典型的症状, 因而更着重关注用于准确诊断的循环生物标志物浓度^{25,26}。

[0003] 心肌梗死的准确早期诊断有利于迅即引入再灌注治疗, 包括有效的经皮或溶解血栓血管再生以及辅助的抗凝血和抗血小板疗法。随着在诊断和管理中延迟的每个小时, 这样的治疗在降低死亡率和发病率方面是逐步更少有效的²⁻⁴。鉴于在这种临床情况下需要加快做出决定, 所以对提供急性心脏疾病 (尤其是 AMI) 的早期和具体诊断的循环生物标志物的鉴定存在相当大的兴趣。

[0004] 确实, 目前的临床指南强调生物标志物检测在鉴定心肌梗死和急性冠状动脉综合征中的重要性²⁵。已提出许多生物标志物用于这个目的, 包括肌酸激酶-MB (CK-MB)、肌钙蛋白 T (TnT)、肌钙蛋白 I (TnI) 以及肌红蛋白, 但它们的应用存在局限性。至血浆心脏生物标志物的可检测或异常升高的时间可以是 6 小时 (肌红蛋白, CK-MB) 至 12 小时 (TnT, TnI), 其中峰值水平直到损伤发作以后 24-48 小时才出现, 这对精确的诊断和治疗强加了延迟窗口¹⁻⁴。此外, 肌红蛋白和 CK-MB 均是非特异性的并且可以分泌自心外来源, 尤其是在外伤或手术期间¹。可用于这个目的的其他生物标志物是 ANP (前 ANP 原 (ANP 原前体或 ANP 前体原, preproANP) (124-151))、N-ANP (前 ANP 原 (26-123)) (参见图 1)、BNP (前 BNP 原 103-134) 以及 N-BNP (前 BNP 原 (27-134), 其还称作 NT-BNP 原)。这些肽分泌到循环中⁶。

[0005] AMI 后早期的 ANP 和 N-ANP 血浆浓度的检测具有强大的预后价值^{2,3,7} 并且在治疗方案中结合这些肽的血浆浓度可以改善患有心力衰竭的患者的临床结果⁸。这对于 N-ANP 尤其适用, 其中 N-ANP 具有比 ANP 更长的大约 20 倍的半衰期⁵, 并由此提供关于 AMI 以后长期心脏功能的另外的重要信息。

[0006] 如同以上心脏生物标志物一样, 在损伤发作以后 6 至 12 小时, ANP 和 N-ANP 可能不会达到可检测或异常的水平, 其中峰值水平直到发作以后 24 至 48 小时才出现。因而 ANP 和 N-ANP 的长期诊断 / 预测能力缺乏特异性标志物的伴随能力, 该特异性标记在临床表现的最初几小时内提供急性心脏疾病如急性心肌损伤的早期具体诊断。因此对这样的早期标志物存在需要。

[0007] 最近,已经提出, ANP-SP 和 BNP-SP 可以用于诊断心脏病 (US 2005/0244904、WO 2005/052593)。一般性地指出,在心力衰竭患者中 ANP-SP 和 BNP-SP 的水平将高于正常患者。并没有提供关于何时检测 ANP-SP 或 BNP-SP 水平的时间过程信息。据指出, BNP-SP 水平连同 N-BNP 一起被升高。

[0008] 本发明的一个目的是以一定方式来满足对急性心脏疾病的早期标志物的需要,和/或至少向公众提供有用的选择。

发明内容

[0009] 人心房钠尿信号肽 (人心房钠利肽, human atrial natriuretic signal peptide, ANP-SP) 或前 ANP 原 (1-25) 是一种从前 ANP 原 (1-151) SEQ ID NO:1 切割的 25 个氨基酸肽。ANP-SP (1-25) 在 SEQ ID NO:14 中单独示出。

[0010] 本发明的申请人惊讶地发现,在可疑的急性冠状动脉综合征 (ACS) 发作或临床表现以后的最初几小时内, ANP-SP 的循环浓度为最高。在这些最初的几小时内,峰值大约是高于正常对照群体的 5 至 15,通常 3 至 7 倍。

[0011] 因此,在第一方面,本发明提供了一种用于预测、诊断或监测对象中的急性心脏病 (ACD) 的方法,该方法包括:在 ACD 发作的 4 小时内或在 ACD 表现的 4 小时内,测量在从对象获得的生物样品中的 ANP-SP 水平;以及将所述 ANP-SP 的水平与来自对照的 ANP-SP 水平进行比较,其中测得的高于对照水平的 ANP-SP 水平为 ACD 的征兆 (指示或指征, indicative)。

[0012] 本发明还提供了一种用于监测对对象的急性心脏疾病 (ACD) 的治疗的反应的方法,该方法包括:在 ACD 发作的 4 小时内或在 ACD 表现的 4 小时内,测量在从对象获得的生物样品中的 ANP-SP 水平;以及将所述 ANP-SP 水平与来自对照的 ANP-SP 水平进行比较,其中测得的 ANP-SP 水平相对于对照水平的变化是对治疗的反应的征兆。

[0013] 在另一个方面,本发明还提供了一种用于预测、诊断或监测对象的心脏移植排斥反应的方法,该方法包括:在心脏移植的 4 小时内测量在从对象获得的生物样品中的 ANP-SP 水平;以及将所述 ANP-SP 水平与来自对照的 ANP-SP 水平进行比较,其中测得的高于对照水平的 ANP-SP 水平是移植排斥的征兆。

[0014] 本发明还提供了一种区别对象的肺疾病和急性心脏疾病 (ACD) 的方法,该方法包括:在疾病表现的 4 小时内测量在从对象获得的生物样品中的 ANP-SP 水平;以及将所述 ANP-SP 水平与来自对照的 ANP-SP 水平进行比较,其中测得的高于对照水平的 ANP-SP 水平是 ACD 的征兆。

[0015] 本发明还提供了一种用于预测、诊断或监测对象的急性心脏疾病 (ACD)、心脏移植排斥、或 ACD/肺疾病的方法,该方法包括:在 ACD、心脏移植排斥或 ACD/肺疾病发作或临床表现的最初 4 小时内,测量在从对象获得的生物样品中的 ANP-SP 水平,其中将测得的 ANP-SP 水平与来自对照的 ANP-SP 水平进行比较,其中测得的高于对照水平的 ANP-SP 水平是 ACD 或心脏移植排斥的征兆。

[0016] 在一种实施方式中,本发明的方法是体外方法。

[0017] 在一种实施方式中,在发作或临床表现的两小时或 1 小时内、或 30 分钟内,实施 ANP-SP 水平的测量。

[0018] 在一种实施方式中,生物样品是血液、唾液、间质液(interstitial fluid)、血浆、尿、血清或心脏组织。

[0019] 在一种实施方式中,测量步骤包括

[0020] (a) 使 ANP-SP 与结合剂结合;以及

[0021] (b) 测量结合的 ANP-SP 的水平。

[0022] 在一种实施方式中,结合剂是抗体或抗体片段。最常见地,抗体是单克隆抗体、多克隆抗体、嵌合抗体或人源化抗体。在一种实施方式中,抗体是单克隆抗体。

[0023] 在一种可替换的实施方式中,利用质谱法来测量 ANP-SP 的水平。

[0024] 由抗体结合的 ANP-SP 是全长人 ANP-SP 分子(SEQ ID NO:14) 或者其变体或片段。在一种实施方式中,结合是选择性的。在一种实施方式中,片段的长度为至少 4 个连续氨基酸。期望地,抗体结合 ANP-SP 的 N 端或 C 端。

[0025] 结合剂结合或选择性地结合的特异性抗原肽包括人 ANP-SP(16-25)(SEQ ID NO:12)、人 ANP-SP(1-10)(SEQ ID NO:16)、或它们的抗原-结合片段或变体。

[0026] 在一种实施方式中,利用被固定在固相上的抗体或抗体片段来测量 ANP-SP 的结合。

[0027] 可以借助于选自 RIA、ELISA、荧光免疫测定法、免疫荧光测定法、质谱法以及免疫放射测定中的测定来有用地测量 ANP-SP 的水平。

[0028] 因此,本发明还提供一种用于在 ACD、心脏移植排斥、或 ACD/ 肺疾病发作的 4 小时内或临床表现的 4 小时内,在从对象获得的生物样品中的 ANP-SP 的测定方法(assay),该测定方法包括利用任何已知方法来检测和测量样品中的 ANP-SP 水平。

[0029] 本发明还提供一种用于 ANP-SP 的测定方法,包括:

[0030] (a) 结合来自生物样品的一种或多种 ANP-SP 多肽,其中该 ANP-SP 多肽选自由 ANP-SP 1-10(SEQ ID NO:16)、以及 ANP-SP 16-25(SEQ ID NO:12)、或它们的变体或片段组成的组;以及

[0031] (b) 测量结合的 ANP-SP 多肽的水平。

[0032] 在一种实施方式中,测定是体外测定。

[0033] 本发明的方法可以进一步包括测量所述 ACD、或心脏移植排斥、或 ACD/ 肺疾病的一个或多个非 ANP-SP 标志物的水平,以及将所述水平与来自对照的标志物水平进行比较,其中测得的非 ANP-SP 标志物的水平与对照水平的偏差、连同测得的高于 ANP-SP 的对照水平的 ANP-SP 水平,是 ACD 的预测或诊断,或可以用来监测所述 ACD、心脏移植排斥或 ACD/ 肺疾病。

[0034] 用于急性冠状动脉综合征情形的标志物包括肌钙蛋白 T、肌钙蛋白 I、肌酸激酶 MB、肌红蛋白、BNP、BNP-SP、NT-BNP、LDH、天冬氨酸转氨酶、以及心脏特异性脂肪酸结合蛋白(H-FABP)。

[0035] 在另一个方面,本发明还提供了一种 ANP-SP 结合剂,其结合或选择性地结合 ANP-SP(SEQ ID NO:14) 或其抗原-结合片段或变体,用于预测、诊断或监测对象的急性心脏疾病(ACD)、心脏移植排斥或 ACD/ 肺疾病,其中 ACD、心脏移植排斥或 ACD/ 肺疾病的特征在于,在 ACD、心脏移植排斥或 ACD/ 肺疾病发作的 4 小时内或临床表现的 4 小时内,在从对象获得的生物样品中出现 ANP-SP。

- [0036] 在一种实施方式中,结合剂是抗体或其抗原-结合片段。
- [0037] 本发明还提供了一种抗体或其抗原-结合片段,其结合
- [0038] (a) ANP-SP 氨基酸序列 16-25 (SEQ ID NO :12) 或 1-10 (SEQ ID NO :16) ;
- [0039] (b) 由选自 SEQ ID NO :13 或 SEQ ID NO :17 的核苷酸序列编码的氨基酸序列 ;或
- [0040] (c) (a) 或 (b) 的变体或片段。
- [0041] 抗体可以是单克隆抗体、多克隆抗体、嵌合抗体或人源化抗体。
- [0042] 本发明还涉及 ANP-SP 结合剂在制备用于评估对象的急性心脏疾病 (ACD)、心脏移植排斥或 ACD/ 肺疾病的预后、诊断或监测工具中的应用,其中在 ACD、心脏移植排斥或 ACD/ 肺疾病发作的 4 小时内或临床表现的 4 小时内进行评估。
- [0043] 本发明还涉及本发明的抗体或抗原结合片段在制备用于评估对象的急性心脏疾病 (ACD)、心脏移植排斥或 ACD/ 肺疾病的预后、诊断或监测工具中的应用。
- [0044] 本发明还涉及本发明的应用,其中对预后、诊断或监测工具进行校准以测量在 0.1 至 500pmol/L、或 1 至 300pmol/L、或 2 至 100pmol/L、或 5 至 150pmol/L 范围内的 ANP-SP 水平。
- [0045] 在另一个方面,本发明提供了一种用于预测、诊断或监测急性心脏疾病 (ACD)、心脏移植排斥或 ACD/ 肺疾病的试剂盒,包括 ANP-SP 结合剂,其中试剂盒与在 ACD、心脏移植排斥或 ACD/ 肺疾病发作或临床表现的 4 小时内从对象获得的生物样品一起使用。
- [0046] 本发明还提供了一种用于预测、诊断或监测急性心脏疾病 (ACD)、心脏移植排斥或 ACD/ 肺疾病的试剂盒,包括本发明的抗体或抗原-结合片段。
- [0047] 本发明还提供了一种用于预测、诊断或监测急性心脏疾病 (ACD) 的试剂盒,包括本发明的结合剂或抗体或抗原-结合片段。在一种实施方式中,对试剂盒进行校准以测量在 0.1 至 500pmol/L、或 1 至 300pmol/L、或 2 至 100pmol/L、或 5 至 150pmol/L 范围内的 ANP-SP 水平。
- [0048] 在一种实施方式中,试剂盒还包括说明书,用于在发作或临床表现的 4 小时内预测、诊断或监测对象的 ACD、心脏移植排斥、或 ACD/ 肺疾病,其中根据在发作或临床表现的 4 小时内在获得的生物样品中测得的 ANP-SP 水平,并将测得的水平与对照水平进行比较。测得的高于对照水平的 ANP-SP 水平是 ACD 或移植排斥的征兆。
- [0049] 在另一个方面,本发明涉及编码 ANP-SP (16-25) (SEQ ID NO :12) 或 ANP-SP (1-10) (SEQ ID NO :16) 的核酸分子,其中所述核酸是
- [0050] (a) SEQ ID NO :13 或 SEQ ID NO :17 或它们的变体或片段 ;
- [0051] (b) 与 SEQ ID NO :13 或 SEQ ID NO :17 具有 70%、75%、80%、90%、95% 或 99% 序列同一性的序列 ;
- [0052] (c) 在严格条件下与 SEQ ID NO :13 或 SEQ ID NO :17 或它们的片段或变体杂交的序列 ;
- [0053] (d) 长度为至少 10 个核苷酸、能够在严格条件下与 (a) 至 (c) 中任一个的序列杂交的序列 ;
- [0054] (e) (a) 至 (d) 中任一个的补体 ;
- [0055] 前提条件是该序列不是 SEQ ID NO :15。
- [0056] 本发明还提供一种包含本发明的核酸分子的基因构建体、包含该基因构建体的载

体、包含该基因构建体或载体的宿主细胞、由本发明的核酸分子编码的多肽、选择性地结合本发明的多肽的抗体、以及用于重组产生本发明的多肽的方法。

[0057] 因此,在另一个方面,本发明提供一种 ANP-SP 多肽或其变体或片段,选自:

[0058] (a) ANP-SP(16-25) (SEQ ID NO:12) 或其变体或片段;

[0059] (b) ANP-SP(1-10) (SEQ ID NO:16) 或其变体或片段;或

[0060] (c) 与 SEQ ID NO:12 或 SEQ ID NO:16 的多肽具有至少 70%、75%、80%、85%、90%、95% 或 99% 氨基酸同一性的氨基酸序列。

附图说明

[0061] 现在将参照附图中的图示来描述本发明,其中

[0062] 图 1 是概述导致产生游离信号、N-ANP 以及 ANP 肽的人前 ANP 原的处理的示意图;

[0063] 图 2A 是在 6 个物种中的前 ANP 原信号肽序列的 Clustal W 版本 1.83 JALVIEW 多序列对比。在该对比中使用了默认 Clustal W 参数,如下:DNA 间隙空白罚分 = 15.0;DNA 间隙延展罚分 = 6.66;DNA 基质 = 同一性;蛋白质间隙空白罚分 = 10.0;蛋白质间隙延展罚分 = 0.2;蛋白基质 = Gonnet;蛋白质/DNA ENDGAP = -1;蛋白质/DNAGAPDIST = 4。以 Pearson(fasta) 格式提交氨基酸⁹。

[0064] 图 2B 是 6 个物种中的前 ANP 原序列的单字母标记格式。信号肽区为黑体;

[0065] 图 3 示出了放射免疫测定的结果,其中人血浆提取物(空心方块)与 ANP-SP 标准曲线(实心圆点)平行稀释;

[0066] 图 4A 示出放射免疫测定结果,上图:在自入院表明的时间在获自 AMI 患者 (n = 3) 的血浆中的 ANP-SP 浓度。在入院后 1-2 小时观测到 ANP-SP 的最高水平,其比在正常健康个体中测得的水平平均高大约 6 至 7 倍(下部实心圆点, n = 8, 示出百分范围)。下图:在上图相同的患者中,CK-MB、肌红蛋白以及 TnT 的匹配的时间过程浓度分布;

[0067] 图 4B 示出放射免疫测定结果,上图:在自入院表明的时间在获自 AMI 患者 (n = 23) 的血浆中的 ANP-SP 浓度。在入院后 1-2 小时观测到 ANP-SP 的最高水平,其比在正常健康个体中测得的水平平均高大约 5 至 7 倍(下部实心圆点, n = 66, 示出百分范围)。下图:在上图相同的患者中,CK-MB、肌红蛋白以及 TnT 的匹配的时间过程浓度分布。

[0068] 图 5 示出了 ANP-SP 抗血清的交叉反应性数据表;以及

[0069] 图 6 是示出了患者中的循环 ANP-SP 浓度来源于心脏源的条形图。

[0070] 定义

[0071] 急性心脏疾病 (ACD) 包括但不限于:急性冠状动脉综合征;在呈现 ECG 时具有 ST 段抬高的 (AMI), 不稳定型心绞痛, 以及急性非 ST 段抬高型心肌梗死;心肌缺血;急性心肌损伤;由急性药物毒性造成的急性心肌损伤, 急性心肌病, 以及心脏移植排斥。这些疾病的充分描述性定义可在参考文献 1 找到。

[0072] ACD/肺疾病是指具有未确诊的、可疑的 ACD 或肺疾病的对象。

[0073] 急性冠状动脉综合征 (ACS) 包括各种不同的心肌缺血事件, 包括不稳定型心绞痛, 在呈现的心电图 (ECG) 上具有 ST 段抬高的急性心肌梗死, 以及在 ECG 上没有 ST 段抬高的急性心肌梗死。

[0074] 术语“抗体”是指具有特定结构的免疫球蛋白分子, 其特异性地与用于合成该抗

体的包含抗原的分子、或与它密切相关的抗原相互作用（结合）。如在本文中所使用的，术语“抗体”宽泛地包括全长抗体并且还可以包括它们的某些抗体片段。还包括单克隆和多克隆抗体、多价和单价抗体、多特异性抗体（例如双特异性抗体）、嵌合抗体、人抗体、人源化抗体以及已亲和力成熟的抗体。如果抗体优先结合于 ANP-SP，例如与非 ANP-SP 多肽具有小于 25%、或小于 10%、或小于 1% 或小于 0.1% 的交叉反应度，则该抗体选择性地或特异性地结合于本发明的 ANP-SP 多肽。通常，抗体对于抗原或表位具有不大于 10^{-6} 、或 10^{-7} M、或小于约 10^{-8} M、或 10^{-9} M、或 10^{-10} 、或 10^{-11} 或 10^{-12} M 的结合亲和力（解离常数 (Kd) 值）。可以利用表面等离子体共振来评估结合亲和力。

[0075] 如在本文中所使用的，“抗原-结合片段”或“抗体片段”是指完整抗体的一部分，其优选保留抗体片段的大部分或全部、或最低限度至少一种正常功能。抗体片段，例如，可以包含 Fc 区，其保留在完整抗体中相应 Fc 区的全部或大部分或部分功能。抗体片段的实例包括 Fab、Fab'、F(ab')₂ 以及片段、线性抗体、双体分子、单链抗体 (ScFV) 以及多特异性抗体。

[0076] 如在本文中所使用的，“单克隆抗体”是指这样的抗体，其相对于单靶抗原是高度特异性抗体。单克隆抗体可以获自同源或基本上同源抗体的群体，其中，除了可能少量发生的自然突变，每个单克隆抗体是相同的和 / 或结合相同表位。

[0077] “分离的抗体”是已鉴定的抗体，其已分离或回收（或两者）自它的自然环境的成分。例如，分离自蛋白质的分离的抗体包括酶和激素。在一种实施方式中，将抗体纯化至按重量计至少 95%、或 96% 或 97% 或 98% 或 99% 的抗体。可以通过例如劳氏法 (Lowry method) 来确定纯度。通常，通过至少一个纯化步骤来制备抗体。

[0078] 如在本文中所使用的，术语“结合剂”是指任何固体或非固体材料，其能够结合 ANP-SP 或其片段或变体。在一种实施方式中，该术语是指结合至 ANP-SP 或其片段或变体的任何天然或非天然分子。结合剂的实例包括蛋白质、肽、核酸、碳水化合物（糖类，carbohydrates）、脂质、以及小分子化合物。一种选择性或特异性结合剂是抗体或其抗原结合片段。

[0079] 如在本文中所使用的，生物样品是指来源于待筛查对象的任何样品。样品可以是本领域已知的可以检测 ANP-SP 的任何样品。包括任何体液如血浆、血液、唾液、间质液、血清、尿、滑液、脑脊液、淋巴液、精液、羊膜液、心包液和腹水，以及组织如心脏组织，但不局限于此。

[0080] 术语“表位”包括任何能够特异结合于免疫球蛋白和 / 或 T 细胞受体的蛋白质决定簇。即，在抗原上的 B 和 / 或 T 细胞对其响应的位点。抗原决定簇通常包括分子的化学活性表面基团如氨基酸或糖侧链，并且通常具有特定的三维结构特征、以及特定的电荷特性。表位通常包括 3、5 或通常 8-10 个氨基酸。这些氨基酸可以是连续的、或通过三级折叠并置的非连续氨基酸。

[0081] 术语“在发作或临床表现的 4 小时内”包括在医疗设施处从 ACD、心脏移植排斥或未确诊的或可疑的 ACD/ 肺疾病的发作或表现的 1 分钟直到并包括 240 分钟。优选地，可以在发作或表现的 2 小时（从 1 分钟直到并包括 120 分钟）内或在 1 小时（从 1 分钟直到并包括 60 分钟）内、在发作或表现的 5 至 45 分钟、15 至 40 分钟、20 至 35 分钟内、或在 25 至 30 分钟内，进行测量。

[0082] 在一种实施方式中,比对照“更高”或“更低”的水平,或相对于对照的变化或偏差是统计上显著的。如果和对照水平相比,与对照水平的水平差异为 5%或更大、10%或更大、20%或更大、或 50%或更大,则可以认为存在更高的水平、更低的水平、相对于对照水平或平均对照水平的偏差或变化。统计上显著的可以可替换地被计算为 $P \leq 0.05$ 。在另外的一种可替换方式中,可以通过借助于测定参考限度或参考区间来确定更高的水平、更低的水平、偏差、以及变化。这些可以计算自直观评估或非参数方法。一般来说,这些方法计算 0.025 以及 0.975 分位数作为 $0.025 \cdot (n+1)$ 以及 $0.975 \cdot (n+1)$ 。这样的方法在本领域中是众所周知的^{22,23}。存在在对照中不存在的标志物也被设想为更高的水平、偏差或变化。不存在在对照中存在的标志物也被设想为更低的水平、偏差或变化。

[0083] 包括来自任何对象的样品如来自没有 ACD 的临床病史的正常健康对象以及患有各种 ACD 的对象,其中上述 ACD 包括但不限于在呈现的 ECG 上具有 ST 段抬高的急性冠状动脉综合征 (AMI),不稳定型心绞痛,以及急性非 ST 段抬高型 MI ;心肌缺血 ;急性心肌损伤 ;急性药物毒性造成的急性心肌损伤、急性心肌病、以及心脏移植排斥。

[0084] 术语 ANP-SP 是指用于人前 ANP 原序列 (SEQ ID NO :1) 的完全 25 个氨基酸 ANP 信号肽。ANP-SP(1-25) 在 SEQ ID NO :14 中单独示出,并且在图 2B 中被加下划线。术语 ANP-SP 还包括 ANP-SP 的变体或片段。在一种实施方式中,ANP-SP 作为信号多肽,或作为抗体可以结合的抗原多肽。ANP-SP 的变体和片段包括保留这些功能的任何一种或两种的变体和片段。

[0085] 如在本文中所使用的,术语“心肌病”是指心肌的疾病,其中心肌被弱化。这可以导致心脏的减少的抽吸。心肌病的常见原因是心肌梗死、病毒感染、高血压、酒精中毒、以及自身免疫病。

[0086] 如在本说明书和权利要求中所使用的,术语“包括”是指“至少部分由... 构成”;也就是说,当解释包括术语“包括”的本说明书和权利要求中的陈述时,在每个陈述中以该术语开始的特征都需要存在,但也可以存在其它的特征。以类似方式来解释相关术语如“包含”和“含有”。

[0087] 如在本文中所使用的,术语“多核苷酸”是指任何长度的单或双链脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸聚合物,并且作为非限制性实例包括基因的编码和非编码序列、有义和反义序列、外显子、内含子、基因组 DNA、cDNA、mRNA 前体、mRNA、rRNA、siRNA、miRNA、tRNA、核酶、重组多核苷酸、分离和纯化的天然存在的 DNA 或 RNA 序列、合成 RNA 和 DNA 序列、核酸探针、引物、片段、基因构建体、载体以及修饰的多核苷酸。可以类似地理解核酸分子。

[0088] 本文提供的多核苷酸序列的“片段”是连续核苷酸的子序列,该子序列能够特异性地杂交于感兴趣的靶,例如,长度为至少 10 个核苷酸的序列。本发明的片段包含 SEQ ID NO :15 的多核苷酸的 10、15、16、17、18、19、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、或 74 个连续核苷酸。多核苷酸序列的片段可以用作引物、探针、包括在 微阵列中、或用于本文的基于多核苷酸的选择方法中。应当类似地理解本发明的其它多核苷酸的片段(如 SEQ ID NO :13 或 SEQ ID NO :17) 或本文描述的多核苷酸。

[0089] 术语“引物”是指短多核苷酸,通常具有游离的 3' OH 基团,其杂交于模板并用

于引发互补于靶的多核苷酸的聚合作用。

[0090] 术语“探针”是指短多核苷酸，在基于杂交的测定中，该短多核苷酸用来检测互补于探针的多核苷酸序列。探针可以包括如本文所定义的多核苷酸的“片段”。

[0091] 如在本文中所使用的，术语“多肽”涵盖任何长度的氨基酸链，但通常是全长 ANP-SP 蛋白 (SEQ ID NO :14) 的至少 4 个氨基酸、至少 5 个氨基酸、或至少 6 个、至少 7 个、至少 8 个、至少 9 个、至少 10 个、至少 11 个、至少 12 个、至少 13 个、至少 14 个、至少 15 个、至少 16 个、至少 17 个、至少 18 个、至少 19 个、至少 20 个、至少 21 个、至少 22 个、至少 23 个、至少 24 个、或所有 25 个氨基酸，其中氨基酸残基通过共价肽键连接。可用于本发明的多肽可以是纯化的天然产物，或可以部分或全部地利用重组或合成技术来生产。该术语可以指多肽、多肽的聚集体如二聚体或其它多聚体、融合多肽、多肽片段、多肽变体、或它们的衍生物。应当类似地理解本发明的其它多肽（如 SEQ ID NO :12 或 SEQ ID NO :16）、或本文描述的其它多肽。

[0092] 多肽的“片段”是多肽的子序列，其实施生物活性或结合所需要的功能和 / 或提供多肽的三维结构。该术语可以指多肽、多肽的聚集体如二聚体或其它多聚体、融合多肽、多肽片段、多肽变体、或它们的衍生物。在一种实施方式中，片段能够实施上述信号肽活性，或保留 ANP-SP (1-25)、ANP-SP (1-10)、或 ANP-SP (16-25)、或本发明的其它多肽或本文描述的多肽的抗原结合特性。

[0093] 如应用于本文披露的多核苷酸或多肽序列，术语“分离的”用来指从它们的天然细胞环境中分离出来的序列。可以通过任何方法或方法的组合来获得分离的分子，包括生化、重组、以及合成技术。可以通过至少一个纯化步骤来制备多核苷酸或多肽序列。

[0094] 如在本文中所使用的，术语“纯化的”并不需要绝对纯度。在一种实施方式中，纯化的是指在样品中多核苷酸、多肽抗体、或宿主细胞至少 90%、或 95%、或 98%、或 99% 的同源性。相对于本文描述的其它分子和构建体，应类似地理解该术语。

[0095] 如用于细胞或宿主细胞，术语“分离的”描述这样的细胞或宿主细胞，其已自生物体或它的自然环境获得或分离，并且随后被保持在如本领域中已知的实验室环境中。该术语并不限于单细胞本身，而是指包含在细胞培养中的细胞或宿主细胞，并且可以包括单细胞或单宿主细胞。

[0096] 术语“重组”是指这样的多核苷酸序列，其从在其自然环境下围绕它的序列移出和 / 或与在其自然环境下不存在的序列重组。

[0097] 通过从“重组”多核苷酸序列翻译而产生“重组”多肽序列。

[0098] 如在本文中所使用的，术语“变体”是指不同于具体鉴定序列的多核苷酸或多肽序列，其中一个或多个核苷酸或氨基酸残基被缺失、取代、或插入。变体可以是天然存在的等位基因变体、或非天然存在的变体。变体可以来自相同或来自其它物种并且可以包括同系物、共生同源物以及直向同源物。在某些实施方式中，可用于本发明的多肽的变体具有包括信号肽活性或抗原结合性能的生物活性，其与亲代多肽或多核苷酸的生物活性相同或类似。相对于多核苷酸和多肽，术语“变体”包括如本文所定义的所有形式的多核苷酸和多肽。

[0099] 相对于本发明的序列，变体多核苷酸序列呈现至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 71%、至少 72%、至少 73%、至少 74%、至少 75%、至少 76%、至少 77%、至少 78%、至

少 79%、至少 80%、至少 81%、至少 82%、至少 83%、至少 84%、至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99% 的同一性。在至少 10 个核苷酸位置、至少 15 个核苷酸位置、至少 20 个核苷酸位置、至少 27 个核苷酸位置、至少 40 个核苷酸位置、至少 50 个核苷酸位置、至少 60、或至少 70 个核苷酸位置的比较窗上,或在 SEQ ID NO :13、SEQ ID NO :15、SEQ ID NO :17 或本文披露的其它多核苷酸的全长多核苷酸上找到同一性。

[0100] 可以利用全局序列比对程序(例如 Needleman, S. B. and Wunsch, C. D. (1970) J. Mol. Biol. 48, 443-453) 基于候选与主题多核苷酸序列之间的重叠序列的全长来计算多核苷酸序列同一性。Needleman-Wunsch 全面比对算法的全面实施在 EMBOSS 程序包中的针程序中找到(Rice, P. Longden, I. and Bleasby, A. EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Trends in Genetics June 2000, vol 16, No 6. pp. 276-277), 其可以获自 <http://www.hgmp.mrc.ac.uk/Software/EMBOSS/>。欧洲生物信息研究所服务器还提供设施以在两个序列之间在线进行 EMBOSS- 针全面比对(在 <http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/>)。

[0101] 可替换地,可以使用 GAP 程序,其计算两个序列的最佳全局比对而没有处罚末端间隙。在以下论文中描述了 GAP :Huang, X. (1994) On Global Sequence Alignment (Computer Applications in the Biosciences 10, 227-235)。

[0102] 多核苷酸变体还涵盖这样的变体,这些变体呈现与一个或多个具体鉴定的序列的相似性,其很可能保存那些序列的功能对等并且 将不能合理地预计通过随机机会发生。该程序发现在序列之间相似性的区域并且对于每个这样的区域报道 " E 值", 该 E 值是在包含随机序列的固定参考大小的数据库中可以预计偶然看到这样的配对的次数的预计数。这种数据库的大小是由 b12seq 程序中的默认值来设置的。对于较小的 E 值(远小于 1), E 值大约是这样的随机配对的概率。

[0103] 当与任何一种具体鉴定的序列比较时,变体多核苷酸序列优选呈现小于 1×10^{-5} 、小于 1×10^{-6} 、小于 1×10^{-9} 、小于 1×10^{-12} 、小于 1×10^{-15} 、小于 1×10^{-18} 或小于 1×10^{-21} 的 E 值。

[0104] 还可以以下列方式来确定多核苷酸序列的同一性和相似性。利用序列比对算法和序列相似性搜索工具如在 Genbank(基因库)、EMBL、Swiss-PROT 以及其它数据库中,比较了主题多核苷酸序列和候选多核苷酸序列。Nucleic Acids Res 29:1-10 and 11-16, 2001 提供了在线资源的实例。

[0105] BLASTN 的使用优选用于确定根据本发明的多核苷酸变体的序列同一性。

[0106] BLASTN(来自 BLAST 成套程序,版本 2.2., 2008 年 4 月 18 日,在 b12seq 中(Tatiana A. et al, FEMS Microbiol Lett. 174 :247-250(1999)、Altschul et al., Nuc. Acis Res 25 : 3389-3402, (1997)) 可公开获自 NCBI(<ftp://fto.ncbi.nih.gov/blast/>) 或获自 NCBI at Bethesda, Maryland, USA。除了应关闭低复杂性部分的过滤,采用 b12seq 的默认参数。

[0107] 可以使用以下 UNIX 命令行参数来检查多核苷酸序列的同一性:

[0108] `b12seq-i nucleotideseq1 -j nucleotideseq2 -F F -p blastn`

[0109] 参数 -F F 关闭低复杂性部分的过滤。参数 -p 选择用于序列对的适当的算法。在行 " Identities = " 中, b12seq 程序将序列同一性报道为相同核苷酸的数量和百分比。

[0110] 可替换地,变体多核苷酸是这样的多核苷酸,该多核苷酸在严格条件下杂交于指定的多核苷酸序列、或其补体。

[0111] 术语“在严格条件下杂交”、及其语法上的等同表述,是指在规定的温度和盐浓度条件下,多核苷酸分子杂交于靶多核苷酸分子(如固定在 DNA 或 RNA 印迹上的靶多核苷酸分子,如 Southern 印迹或 Northern 印迹)的能力。可以通过在较低严格条件下进行最初杂交,然后将严格性增加至所期望的严格性来确定在严格杂交条件下杂交的能力。

[0112] 关于长度大于约 100 个碱基的多核苷酸分子,典型的严格杂交条件是低于天然双链体的解链温度(T_m)的不大于 25 至 30°C(例如,10°C)(通常参见,Sambrook et al.,Eds,1987, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*,2nd Ed.Cold Spring Harbor Press; Ausubel et al.,1987, *Current Protocols in Molecular Biology*,Greene Publishing, 将其以引用方式结合于本文)。可以通过公式 $T_m = 81.5 + 0.41\% (G+C - \log(Na^+))$ 来计算大于约 100 个碱基的多核苷酸分子的 T_m (Sambrook et al., Eds,1987, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*,2nd Ed.Cold Spring Harbor Press; Bolton and McCarthy,1962, PNAS 84:1390)。用于长度大于 100 个碱基的多核苷酸的典型的严格条件将是杂交条件如在 6X SSC、0.2% SDS 的溶液中预洗涤;在 65°C、6X SSC、0.2% SDS 下杂交过夜;接着两次 30 分钟的洗涤,每次在 1X SSC、0.1% SDS 中和 65°C 下,以及两次 30 分钟的洗涤,每次在 0.2X SSC、0.1% SDS 中和 65°C 下。

[0113] 在一种实施方式中,严格条件使用在 42°C 下的 50% 甲酰胺、5X SSC、50mM 磷酸钠 (pH 6.8)、0.1% 焦磷酸钠、5X 登哈特溶液、经超声处理的鲑鱼精子 DNA (50 μ g/ml)、0.1% SDS、以及 10% 硫酸葡聚糖盐,在 42°C 下在 0.2X SSC 中洗涤以及在 55°C 下在 50% 甲酰胺中洗涤,接着在 55°C 下用包含 EDTA 的 0.1X SSC 洗涤。

[0114] 对于长度小于 100 个碱基的多核苷酸分子,典型的严格杂交条件是低于 $T_m - 5$ 至 10°C。平均来说,长度小于 100bp 的多核苷酸分子的 T_m 被降低大约 (500/寡核苷酸长度)°C。

[0115] 对于 DNA 模拟物,称作肽核酸 (PNA) (Nielsen et al., Science.1991 Dec 6; 254(5037):1497-500), T_m 值高于 DNA-DNA 或 DNA-RNA 杂交体的 T_m 值,并且可以利用在 Giesen et al., Nucleic Acids Res.1998 Nov 1;26(21):5004-6 中描述的公式来计算。对于长度小于 100 个碱基的 DNA-PNA 杂交体,示例性的严格杂交条件是低于 $T_m - 5$ 至 10°C。

[0116] 变体多核苷酸还包括这样的多核苷酸,其不同于本发明的序列,但是由于遗传密码的简并性,其编码与由本发明的多核苷酸编码的多肽具有类似活性的多肽。并不改变多肽的氨基酸序列的序列改变是“沉默变化”。除了 ATG(蛋氨酸)和 TGG(色氨酸),通过本领域公认的技术可以改变用于相同氨基酸的其它密码子,例如,以在特定宿主生物体中优化密码子表达。

[0117] 在编码的多肽序列中导致一个或多个氨基酸的保守取代而没有显著改变其生物活性的多核苷酸序列改变也包括在本发明中。本领域技术人员将明了用于进行表型沉默氨基酸取代的方法(参见,例如,Bowie et al.,1990, Science 247,1306⁹)。

[0118] 利用 b12seq 程序并借助于 tblastx 算法(如上所述),可以确定由于编码的多肽序列中的沉默变化和保守取代而产生的变体多核苷酸。

[0119] 相对于多肽,术语“变体”还包括天然存在的、重组和合成产生的多肽。变体多

肽序列优选呈现与本发明序列的至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 71%、至少 72%、至少 73%、至少 74%、至少 75%、至少 76%、至少 77%、至少 78%、至少 79%、至少 80%、至少 81%、至少 82%、至少 83%、至少 84%、至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99% 的同一性。在至少 5、至少 7、至少 10、至少 15、至少 20、或至少 24 个氨基酸位置的对比窗，或在 SEQ ID NO :12、SEQ ID NO :14 或 SEQ ID NO :18 的多肽、或在本发明中披露或使用的其它多肽的全长上来寻找同一性。

[0120] 多肽变体还包括那些变体，这些变体呈现与一个或多个具体鉴定序列的相似性，其很可能保存那些序列的功能对等并且将不能合理地预计通过随机机会已发生的那些。如上面所讨论的，在 ANP-SP 变体的情况下，功能可以是作为信号多肽、或抗原多肽、或两者。

[0121] 可以以下列方式来确定多肽序列同一性和相似性。利用 BLASTP (来自 b12seq 中的 BLAST 成套程序，版本 2. 2. 18 [2008 年 4 月])，其可公开获自 NCBI (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/>) 来比较主题多肽序列和候选多肽序列。除了应关闭低复杂性区域的过滤，采用了 b12seq 的默认参数。

[0122] 可以使用以下 UNIX 命令行参数来检查多肽序列的相似性：

[0123] `b12seq-i peptideseq1-j peptideseq2-F F-p blastp`

[0124] 参数 -F F 关闭低复杂性部分的过滤。参数 -p 选择用于序列对的适当的算法。该程序发现在序列之间相似性的区域并且对于每个这样的区域报道“E 值”，该 E 值是在包含随机序列的固定参考大小的数据库中可以预计偶然看到这样的配对的次数的预计数。对于较小的 E 值 (远小于 1)，E 值大约是这样的随机配对的概率。

[0125] 当与任何一种具体鉴定的序列比较时，变体多肽序列通常呈现小于 1×10^{-5} 、小于 1×10^{-6} 、小于 1×10^{-9} 、小于 1×10^{-12} 、小于 1×10^{-15} 、小于 1×10^{-18} 或小于 1×10^{-21} 的 E 值。

[0126] 对于在候选和主题多肽序列之间重叠序列的全长，也可以利用全面序列比对程序来计算多肽序列同一性。EMBOSS 针 (可获自 <http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/>) 和 GAP (Huang, X. (1994) On Global Sequence Alignment. Computer Applications in the Biosciences 10, 227-235.)，如上面所讨论的，也是合适的用来计算多肽序列同一性的全面序列比对程序。

[0127] 如上所述的 BLASTP 的应用优选用于确定根据本发明的多肽变体。

[0128] 在一种实施方式中，变体包括这样的肽，其序列与本文中的人 ANP-SP(1-25) SEQ ID NO :14、ANP-SP(16-25) SEQ ID NO :12 或 ANP-SP(1-10) SEQ ID NO :16 相差一个或多个保守性氨基酸取代、缺失或添加或插入，其并不影响肽的生物活性。保守取代通常包括一种氨基酸取代另一种具有类似特性的氨基酸，例如，在以下组内的取代：缬氨酸、甘氨酸；甘氨酸、丙氨酸；缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸；天冬氨酸、谷氨酸；天冬酰胺、谷氨酰胺；丝氨酸、苏氨酸；赖氨酸、精氨酸；以及苯丙氨酸、酪氨酸。保守取代的实例还可以参见图 2A 和图 2B 中的 ANP-SP 的序列，由此示出与人序列相比在不同哺乳动物物种中的取代。保守和半保守取代的实例可以获自下面的表 1。

[0129] 表 1

[0130]

原始残基	示例性取代	优选的取代
------	-------	-------

Ala(A)	Val ;leu ;ile ;pro	Val
Arg(R)	Lys ;gln ;asn	Lys
Asn(N)	Gln ;his ;lys ;arg	Gln
Asp(D)	Glu	Glu
Cys(C)	Ser	Ser
Gln(Q)	Asn ;his	His
Glu(E)	Asp	Asp
Gly(G)	Pro ;ala	Ala
His(H)	Asn ;gln ;lys ;arg	Arg
Ile(I)	Leu ;val ;met ;ala ;phe ;正亮氨酸	Leu
Leu(L)	正亮氨酸 ;ile ;val ;met ;ala ;phe	Phe ;val
Lys(K)	Arg ;gln ;asn	Arg
Met(M)	Leu ;phe ;ile	Leu
Phe(F)	Leu ;val ;ile ;ala ;tyr	Val
Pro(P)	Ala	Ala
Ser(S)	Thr ;gly	Gly
Thr(T)	Ser ;ala ;pro	Ser ;ala
Trp(W)	Tyr ;phe	Tyr
Tyr(Y)	Trp ;phe ;thr ;ser	Phe
Val(V)	Ile ;leu ;met ;phe ;ala ;正亮氨酸	leu

[0131] 基于常见的侧链性能,天然存在的残基被分成以下组:

[0132] (1) 疏水性的:正亮氨酸、met、ala、val、leu、ile;

[0133] (2) 中性亲水性的:cys、ser、thr;

[0134] (3) 酸性的:asp、glu;

[0135] (4) 碱性的:asn、gin、his、lys、arg;

[0136] (5) 影响链取向的残基:gly、pro;以及

[0137] (6) 芳族的:trp、tyr、phe。

[0138] 非保守取代将意味着这些类中的一类的成员交换另一类的成员。参见例如 S 在 ANP-SP 2 处被 M 取代。

[0139] 其它变体包括具有影响肽稳定性的修饰的肽。这样的类似物可以包含,例如,在肽序列中的一个或多个非肽键(其代替肽键)。还包括类似物,这些类似物包括不同于天然存在的 L-氨基酸的残基,例如 D-氨基酸或非天然存在的合成氨基酸,例如 β 或 γ 氨基酸以及环状类似物。

[0140] 可以通过本领域中已知的诱变方法来进行取代、缺失、添加或插入。技术人员将明了用于进行表型沉默氨基酸取代的方法。参见例如 Bowie et al., 1990, Science 247, 1306.⁹, Kunkel, T ;1985, PNAS, 85p488²⁷。

[0141] 本发明的多肽还包括那些在合成期间或之后,通过使用封闭/保护基团等已被修饰的多肽,例如通过生物素化、苄基化、糖基化、磷酸化、酰胺化,通过衍生化。这样的修饰可以增加多肽的稳定性或活性。这样的修饰在本领域是众所周知的。参见例如, Sambrook and Ausubel (Supra)、以及 Lundblad, R, CRC Press, 1995²⁸。

[0142] 术语“基因构建体”是指多核苷酸分子,通常双链 DNA,其可以在其中已插入另一种多核苷酸分子(插入多核苷酸分子),例如但不限于 cDNA 分子。基因构建体可以包含必

要元件,其允许转录插入多核苷酸分子,并且可选地,将转录物翻译到多肽中。插入多核苷酸分子可以来自宿主细胞,或可以来自不同的细胞或生物体和 / 或可以是重组多核苷酸。在宿主细胞内以后,基因构建体可以被变得整合到宿主染色体 DNA 中。基因构建体可以被连接于载体。

[0143] 术语“载体”是指多核苷酸分子,通常双链 DNA,其用来将基因构建体转运到宿主细胞中。载体能够在至少一种另外的宿主系统如大肠杆菌中复制。

[0144] 术语“表达构件体”是指基因构建体,该基因构建体包括必要元件,其允许转录插入多核苷酸分子,并且可选地,将转录物翻译到多肽中。表达构建体通常在 5' 至 3' 方向包含:

[0145] (a) 启动子,其在构建体将被转化进入的宿主细胞中起作用,

[0146] (b) 待表达的多核苷酸,以及

[0147] (c) 终止子,其在构建体将被转化进入的宿主细胞中起作用。

[0148] 术语“编码区”或“开放读框”(ORF)是指基因组 DNA 序列或 cDNA 序列的有义链,其能够在适当调节序列的控制下产生转录产物和 / 或多肽。通过存在 5' 翻译起始密码子和 3' 翻译终止密码子来鉴定编码序列。当插入到基因构建体中时,当它操作性地连接于启动子和终止子序列和 / 或其它调控元件时,“编码序列”能够被表达。

[0149] “调控元件”和“多核苷酸调控元件”是指任何元件,其控制或影响多核苷酸插入片段表达自载体、基因构建体或表达盒,并且包括启动子、转录控制序列、翻译控制序列、复制起点、组织特异性调控元件、时间调控元件、增强子、聚腺苷酰化信号、抑制子以及终止子。根据本发明,相对于待从载体、基因构建体或表达盒表达的多核苷酸插入片段,调控元件可以是同源的或异源的。

[0150] 如在本文中所使用的,关于多核苷酸调控元件 (PRE) 和在基因构建体中 PRE 操作性连接的序列之间的关系,“同源的”是指,PRE 通常在性质上与在构建体中它操作性连接的编码序列有关。根据本发明,同源多核苷酸调控元件可以操作性连接于感兴趣的多核苷酸以使感兴趣的多核苷酸可以从载体、基因构建体或表达盒表达。

[0151] 如在本文中所使用的,关于多核苷酸调控元件 (PRE) 和在基因构建体中 PRE 操作性连接的序列之间的关系,“异源的”是指 PRE 并不通常在性质上与在构建体中它操作性连接的编码序列有关。这样的 PRE 可以包括通常与不同基因 (不同于 INS) 有关的启动子,和 / 或分离自任何其它细菌、病毒、真核、或哺乳动物细胞的启动子。

[0152] “操作性连接”是指将待表达的序列置于调控元件的控制下,其中上述调控元件包括启动子、转录控制序列、翻译控制序列、复制起点、组织特异性调控元件、时间调控元件、增强子、聚腺苷酰化信号、抑制子以及终止子。

[0153] 术语“非编码区”是指未翻译的序列,其是翻译起始位点的上游和翻译终止位点的下游。这些序列还分别称作 5' UTR 和 3' UTR。这些区包括为转录起始和终止以及为翻译效率的调控所需要的元件。

[0154] 终止子是这样的序列,其终止转录并存在于在翻译序列下游的基因的 3' 未翻译末端。终止子是 mRNA 稳定性的重要的决定子并在一些情况下已发现具有空间调节功能。

[0155] 术语“启动子”是指在编码区上游的调控基因转录的非转录顺式调控元件。启动子包括指定转录起始位点的顺式起始元件和保守盒如 TATA 盒,以及由转录因子结合的基

序。

[0156] 术语本发明的多核苷酸或多肽的“以改变表达”用来包括这样的情况，其中对应于本发明的多核苷酸的基因组 DNA 被修饰，从而导致本发明的多核苷酸或多肽的变化的表达。基因组 DNA 的修饰可以通过基因转化或本领域已知的用于诱导突变的其它方法。“改变的表达”可以涉及所产生的信使 RNA 和 / 或多肽的量的增加或减少并且还可以导致多肽的变化的活性，这是由于所产生的多核苷酸和多肽的序列的改变。

[0157] 如在本文中所使用的，“对象”优选是哺乳动物并且包括人、以及非人哺乳动物如猫、狗、马、牛、羊、鹿、小鼠、大鼠、灵长类动物（包括大猩猩、猕猴以及黑猩猩）、负鼠（possum）以及其它家庭农场或动物园动物。优选地，哺乳动物是人。

[0158] 如在本文中所使用的，术语“表现（呈现，presentation）”是指对象在医疗设施如诊所或医院中的表现。

[0159] 如在本文中所使用的，“治疗有效量”或“治疗有效剂量”是指足以产生期望的生理效应的量或能够实现期望的结果的量，尤其用于治疗期望的疾病或病症，包括减少或消除疾病或病症的一种或多种症状或表现。

[0160] 术语“治疗”、“正在治疗”或“处理”以及“预防”是指治疗或预防措施，其缓和、改善、管理、防止、抑制、阻止或逆转 ACD、或心脏移植排斥或其效应的进展，尤其是 ACS。对象可以表现出以下一种或多种的可观测或可测量的（统计上显著的）减小：TnI、TnT BNP、N-BNP、以及本领域技术人员已知的其它通常的临床标志物，这表明改善。

[0161] 如在本文中所使用的，术语“质谱法”是指基于它们的质荷比来过滤、检测、以及测量离子的方法。参见例如 US 5, 719, 060、US 6, 204, 500、US 6, 107, 623、US 6, 124, 137、US 6, 225, 047、US 6, 268, 144、US 7, 057, 165、以及 US 7, 045, 366。通常的质谱技术包括基质辅助激光解吸电离（MALDI）和表面增强的激光解吸电离（SELDI）。两者均可以耦合于飞行时间分析器（MALDI-TOF 和 SELDI-TOF），其便于分析在非常短的离子脉冲中的毫微微摩尔（femtomole）水平的分析物。

[0162] 例如在 US 5, 719, 600、US 6, 124, 137、以及 US 6, 225, 047 中讨论的并可用于本发明的 SELDI 的版本包括表面增强的亲和力捕获（Surface-Enhanced Affinity Capture）（SEAC）、表面增强的净解吸（Surface-Enhanced Neat Desorption）（SEND）、以及表面增强的光不稳定的粘附和释放（Surface-Enhanced Photolabile Attachment and Release）（SEPAR）。

[0163] 旨在提及本文披露的一系列的数字（例如 1 至 10）还包括在所述范围内的所有相关数字（例如，1、1.1、2、3、3.9、4、5、6、6.5、7、8、9 以及 10）以及在上述范围内的任何范围的有理数（例如 2 至 8、1.5 至 5.5 以及 3.1 至 4.7），因此，明确披露了本文明确披露的所有范围的所有子范围。这些仅是具体设想的实例并且在列举的最低值和最高值之间的数值的所有可能的组合被认为以类似方式明确陈述在本申请中。

具体实施方式

[0164] 人心钠肽（ANP）是心脏钠利肽家族的成员。如图 1 所示，前 ANP 原是 151 个氨基酸分子。信号肽 ANP-SP（1-25）（在图 2B 中以黑体示出）被切割以产生前 ANP 原（26-151）。前 ANP 原（26-151）又进一步被处理以产生生物活性形式的前 ANP 原（124-151）和前 ANP 原

(26-123)。前 ANP 原是由心房肌细胞合成、储存、以及释放的 28 个氨基酸肽。成熟人 ANP 以下划线形式示在图 2B 中。可能地, ANP-SP 被信号肽酶 (SPP) 降解成更小片段;通常在 ANP-SP(1-25) 序列的疏水中心区附近。

[0165] 长期一直认为, ANP-SP 的功能作用限于控制 ANP 在内质网中的运输。一旦实现这一点以后, 已假定, 然后信号肽被降解, 甚至没有被从细胞分泌。

[0166] 最近, 已假定 (但未证明), ANP-SP 可以出现在循环中 (WO 2005/052593、US 2005/0244904)。基于该假设, 已提出 ANP-SP 用作心脏疾病的循环生物标志物。本发明的申请人已获得进一步的和非常意外的发现。在患有急性心肌梗死 (AMI) 的患者中, 在患者症状发作以后的最初几小时内, ANP-SP 的循环浓度为最高, 事实上在表现至医院或诊所的时间。这与预期相反: ANP-SP 水平将与 N-ANP 水平相关, 并且因此可以预计从 ACD、心脏移植排斥, 或未确诊的或可疑的 ACD 或肺疾病的发作或临床表现的 12 至 24 小时内达到它们的峰值。在最初几小时内观测到的水平是惊人地非常高, 经常达到峰值, 其比在正常对照群体中的水平高大约 5 至 15、通常 3 至 7 倍。

[0167] ANP-SP 的水平保持高于在对照群体中的 ANP-SP 水平。这些发现提示, ANP-SP 可用作心脏移植排斥, ACD, 包括急性冠状动脉综合征 (ACS) 如 AMI, 尤其是非 ST 段升高 MI, 急性心肌缺血的非常清楚的早期标志物, 并且可以用来区分 ACD 和肺疾病。

[0168] 基于这些惊人的发现, 本发明的申请人已首次确定, 有利的是, 在疾病发作或临床表现的 4 或 2 小时内, 筛查在从对象获得的生物样品中的循环 ANP-SP 或其变体或片段, 以及, 或可替换地编码 ANP-SP 的核苷酸序列或其变体和片段。

[0169] 可用于本发明的是 ANP-SP 的抗原片段或变体, 其长度为至少 4 或 5 个氨基酸。已知具有少至 4 个氨基酸的肽是生物学上活性的。参见例如 Gilchrist et al, *Biology and Reproduction*, 21, 732-739, 2004、以及 SeIa et al., *Behring Ins. Mitt.*, 91, 54-66, 1992。特别有用的片段是在 ANP-SP 的 N 端 (1-13) 或 C 端 (16-25)。特异性抗原肽的实例是 ANP-SP(16-25) (SEQ ID NO:12) 以及 ANP-SP(1-10) (SEQ ID NO:16)。分别在 SEQ ID NO:13 和 17 中给出相应的核苷酸序列。由本发明的申请人首次提供这些序列。核酸分子和肽都构成本发明的方面。

[0170] 因此, 在第一方面, 本发明提供了一种分离的核酸分子, 其编码 ANP-SP(16-25) (SEQ ID NO:12) 或 ANP-SP(1-10) (SEQ ID NO:16) 或它们的变体或片段, 其中所述核酸是

[0171] (a) SEQ ID NO:13 或 SEQ ID NO:17 或它们的变体或片段;

[0172] (b) 与 SEQ ID NO:13 或 SEQ ID NO:17 具有 70%、75%、80%、90%、95% 或 99% 序列同一性的序列;

[0173] (c) 在严格条件下杂交于 SEQ ID NO:13 或 SEQ ID NO:17 或它们的片段或变体的序列;

[0174] (d) 长度为至少 10 个核苷酸的序列, 其能够在严格条件下杂交于 (a) 至 (c) 中任一种的序列;

[0175] (e) (a) 至 (d) 中任一种的补体;

[0176] 前提条件是该序列不是 SEQ ID NO:15。

[0177] 本发明还提供由本发明的核酸分子编码的分离 ANP-SP 多肽。

[0178] 本发明的具体多肽包括具有 SEQ ID NO:12 或 SEQ ID NO:16 的氨基酸序列的多

肽,如在所附序列中所指明的。还设想作为本发明的一部分的是:如本文所定义的这些多肽的变体和片段、或与 SEQ ID NO:12 或 SEQ ID NO:16 的多肽具有至少 70%、75%、80%、85%、90%、95% 或 99% 氨基酸同一性的氨基酸序列。在一种实施方式中,变体或片段是功能等效变体或片段。即,变体或片段保持 SEQ ID NO:12 或 SEQ ID NO:16 作为抗原或信号肽的功能。

[0179] 在一种实施方式中,分离了本发明的或本文以其它方式描述的核酸分子。利用本领域普通技术人员已知的各种技术,它们可以分离自生物样品。例如,可以通过使用在 Mullis et al., Eds. 1994 *The Polymerase Chain Reaction*, Birkhauser 中描述的聚合酶链反应 (PCR) 来分离这样的多核苷酸。可以利用源自本发明的多核苷酸序列的引物(如本文定义的)来扩增本发明的核酸分子。(参见例如 Mullis, Sambrook, 上文;以及 *Molecular Diagnostic PCR Handbook* Gerrit, V et al., Springer, 2005)。

[0180] 用于分离多核苷酸的另外的方法包括使用所有、或部分的本发明的多核苷酸,尤其是具有在 SEQ ID NO:13 或 SEQ ID NO:17 中陈述的序列的多核苷酸,作为杂交探针。将标记的多核苷酸探针杂交于固定在载体如硝酸纤维素滤膜或尼龙膜上的多核苷酸的技术可以用来筛选基因组或 cDNA 文库。类似地,可以将探针耦合于珠并且杂交于靶序列。可以利用已知的技术协议如磁力分离来实现分离。示例性的严格杂交和洗涤条件如上文给出。

[0181] 可以通过本领域中众所周知的技术如限制性内切酶消化和寡核苷酸合成来生产多核苷酸片段。

[0182] 在本领域众所周知的方法中,部分多核苷酸序列可以用作探针,以鉴定样品中的相应全长多核苷酸序列。这样的方法包括基于 PCR 的方法、5' RACE (*Methods Enzymol.* 218:340-56 (1993); Sambrook et al, *Supra*) 以及基于杂交的方法、基于计算机/数据库的方法。可检测标记如放射性同位素标记、荧光标记、化学发光标记以及生物发光标记可以用来方便检测。起始于引物并基于已知区,反向 PCR 还允许获得未知序列,其侧挂本文披露的多核苷酸序列 (Triglia et al., *Nucleic Acids Res* 16,8186, (1998))。该方法使用多种限制性内切酶,以在基因的已知区中产生合适的片段。然后通过分子内连接作用,片段被环化,并用作 PCR 模板。趋异性引物从已知区设计。为了物理上组装全长克隆,可以采用标准分子生物学方法 (Sambrook et al., *Supra*)。便于本发明的多核苷酸的扩增的引物和引物对也构成本发明的另一方面。

[0183] 可以通过所描述的方法来鉴定变体(包括直向同源物)。可以利用基于 PCR 的方法来鉴定变体多核苷酸 (Mullis et al., Eds. 1994 *The Polymerase Chain Reaction*, Birkhauser)。通常,引物的多核苷酸序列(其通过 PCR 可用来扩增多核苷酸分子的变体)可以基于编码相应氨基酸序列的保守区的序列。

[0184] 用于鉴定变体多核苷酸的另外的方法包括使用所有、或部分的指定的多核苷酸作为杂交探针来筛选如上所述的基因组或 cDNA 文库。通常,可以使用基于编码相应氨基酸序列的保守区的序列的探针。与当筛选相同于探针的序列时所使用的的那些杂交条件相比,杂交条件还可以是较低严格的。

[0185] 还可以通过上面讨论的基于计算机的方法来鉴定变体序列(包括多核苷酸和多肽变体)。此外,相关序列的组的多序列对比可以借助于 CLUSTALW (Thompson, et al., *Nucleic Acids Research*, 22:4673-4680 (1994), <http://www-igbmc.u-strasbg.fr/>

[BioInfo/ClustalW/Top.html](#)) 或 T-COFFEE (Cedric Notredame et al, J. Mol. Biol. 302 : 205-217 (2000)) 或 PILEUP, 其采用累进的、成对比对。(Feng et al., J. Mol. Evol. 25, 351 (1987))。

[0186] 模式识别应用软件可用来发现基序或标签序列。例如, MEME (Multiple Em for Motif Elicitation) 发现在一组序列中的基序和标签序列, 并且 MAST (Motif Alignment and Search Tool) 使用这些基序以在查询序列中鉴定类似或相同基序。MAST 结果提供为一系列的与所发现的基序的适当统计数据 and 可视概述的序列对比。MEME 和 MAST 是由 University of California, San Diego 开发的。

[0187] PROSITE (Bairoch et al., Nucleic Acids Res. 22, 3583 (1994); Hofmann et al., Nucleic Acids Res. 27, 215 (1999)) 是一种鉴定翻译自基因组或 cDNA 序列的脱羧酶蛋白的功能的方法。PROSITE 数据库 (www.expasy.org/prosite) 包含生物学上重要的模式和分布并且被设计, 使得它可以与适当的计算工具一起用来将新序列指定给已知家族的蛋白质, 或确定那个 (那些) 已知域存在于序列中 (Falquet et al., Nucleic Acids Res. 30, 235 (2002))。Prosearch 是一种工具, 该工具可以搜索具有给定序列模式或特征的 SWISS-PROT 和 EMBL 数据库。

[0188] 可以按照它们与在相同基因组 (共生同源物) 或不同基因组 (直向同源物) 中的其它蛋白质的序列相关性来对蛋白质进行分类。正源基因是这样的基因, 其通过物种形成演化自共同的祖先基因并且当它们进化时通常保留相同功能。平行进化同源基因是这样的基因, 其被复制在基因组中并且基因可以获得新的特异性或改进的功能, 其可以与最初的特异性 and 功能有关。在 Tatusov et al., Science 278, 631-637, 1997 中述评了系统发育分析方法。

[0189] 如上所述, 本发明还涉及由本发明的核酸分子编码的 INS-SP 多肽, 并且包括这些多肽的变体和片段。

[0190] 除上述的计算机 / 数据库方法以外, 还可以通过物理方法来鉴定多肽变体, 例如通过使用相对于本发明的多肽征集的抗体来筛查表达文库 (Sambrook et al., Molecular Cloning : A Laboratory Manual, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Press, 1987), 通过同样由 Sambrook 等人描述的重组 DNA 技术, 或通过在抗体的帮助下鉴定来自天然来源的多肽。

[0191] 多肽 (包括变体多肽) 可以利用本领域众所周知的肽合成方法如使用固相技术的直接肽合成来制备 (例如 Merrifield, 1963, in J. Am Chem. Soc. 85, 2149; Stewart et al., 1969, in Solid-Phase Peptide Synthesis, WH Freeman Co, San Francisco California; Matteucci et al. J. Am. Chem. Soc. 103 : 3185-3191, 1981, 以及 Atherton et al., in Solid Phase Peptide Synthesis : a practical approach, IRL press (1989)) 或自动化合成, 例如利用来自 Applied Biosystems (California, USA) 的合成仪。还可以利用合成方法来产生多肽的突变形式, 如编码氨基酸序列的 DNA 的位点特异性诱变, 如由 Adelman et al. ; DNA 2, 183 (1983) 所描述的。还参见 Protein Protocols Handbook; Walker, J. Humana Press 2002。

[0192] 在一种实施方式中, 分离了本文中的多肽以及变体多肽。利用本领域众所周知的各种技术它们可以分离或纯化自天然来源 (例如 Deutscher, 1990, Ed, Methods

in Enzymology, Vol.182, Guide to Protein Purification, 以及 Protein Protocols Handbook, 上文)。技术包括但不限于 HPLC、离子交换层析、以及免疫层析。

[0193] 可替换地,多肽和变体多肽可以重组表达在合适的宿主细胞中并自上述细胞分离(如下文所述)。多肽和变体可用于产生抗体,以及在其它用途中产生配体。

[0194] 本文描述的基因构建体可以包含一种或多种所披露的多核苷酸序列和/或本发明的编码所披露的多肽的多核苷酸,并且可以用于转化,例如,细菌、真菌、昆虫、哺乳动物或植物的生物。本发明的基因构建体旨在包括如本文所定义的表达构建物。包括载体(如 pBR322、pUC18、pU19、Mp18、Mp19、Co1E1、PCR1 以及 pKRC),噬菌体(如 λ gt10),以及 M13 质粒(如 pBR322、pACYC 184、pT127、RP4、p1J101、SV40 以及 BPV),黏粒,YACS,BAC 穿梭载体如 pSA3, PAT28 转座子(如在 US 5,792,294 中所描述的)等。

[0195] 构建体可以方便地包括选择基因或选择性标记。通常使用抗生素抗性标记如氨苄青霉素、氨基蝶呤、或四环素。

[0196] 可用于构建体中的启动子包括 β -内酰胺酶、碱性磷酸酶、色氨酸、以及 tac 启动子体系,其是本领域中众所周知的。酵母启动子包括但不限于 3-磷酸甘油酸激酶、烯醇化酶、己糖激酶、丙酮酸脱羧酶、葡糖激酶、以及甘油醛-3-磷酸酯脱氢酶。

[0197] 增强子还可以用来作用于启动子以增强转录。用于本文的合适的增强子包括 SV40 增强子、巨细胞病毒早期启动子增强子、珠蛋白、白蛋白、胰岛素等。

[0198] 用于产生和使用基因构建体和载体的方法在本领域是众所周知的并且通常描述在 Sambrook et al., (上文)、以及 Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing,1987 中。用于用载体转化所选择的宿主细胞的方法也是已知的,例如,由 Cohen, SN ;PNAS 69,2110,1972 描述的氯化钙处理。

[0199] 关于构建体、启动子、增强子、以及宿主细胞的一般性讨论,参见 Principles of Gene Manipulation and Genomics ;Primrose, S et al., Blackwell Publishing 2006, Ed. 7., 以及 From Genes to Genomes :Concepts and Applications of DNA Technology, Dale, J et al., Wiley-Interscience,2007, Ed. 2。

[0200] 包含所描述的基因构建体和载体的宿主细胞可以源自原核或真核来源,例如酵母、细菌、真菌、昆虫(例如杆状病毒)、动物、哺乳动物或植物生物。在一种实施方式中,宿主细胞是分离的宿主细胞。最常用作宿主细胞的原核细胞是大肠杆菌的菌株。其它原核宿主包括但不限于假单胞菌属、芽孢杆菌属、沙雷氏菌属、克雷伯氏菌属、链霉菌属、李斯特氏菌属、酵解属、沙门菌属以及分枝杆菌属。

[0201] 用于表达重组蛋白的真核细胞包括但不限于 Vero 细胞,HeLa,CHO(中国仓鼠卵巢细胞),293,BHK 细胞,MDCK 细胞,COS 细胞,以及前列腺癌细胞系如 PrEC、LNCaP、Du 145 以及 RWPE-2。这些细胞可获自 ATCC, Virginia, USA。

[0202] 与本发明的核酸分子的表达相容的原核启动子包括已知领域的构成型启动子(如 λ 噬菌体的 int 启动子和 pBR322 的 β -内酰胺酶基因序列的 bla 启动子)和可调节启动子(如 lacZ、recA 以及 gal)。为了表达,还可能需要在编码序列上游的核糖体结合位点。

[0203] 包含基因构建体如表达构建体的宿主细胞可用于重组生产多肽的方法。这样的方法在本领域是众所周知的(参见例如 Sambrook et al, 上文)。这些方法通常涉及在适当介

质中并在适合于或有利于本发明的多肽的表达和选择的条件下培养宿主细胞。可以另外在适合于选择宿主细胞（表达本发明的多肽）的介质中生长包含选择性标记的细胞。在适合于表达多肽的条件下，选择和培养表达本发明的多肽的转化宿主细胞。利用本领域众所周知的方法，表达的重组多肽可以分离和纯化自培养基，这样的方法包括硫酸铵沉淀、离子交换层析、凝胶过滤、亲和层析、电泳等（例如 Deutscher, Ed, 1990, *Methods in Enzymology*, Vol 182, *Guide to Protein Purification*）。宿主细胞还可以用于这样的方法，这些方法用于生产由本发明的表达的多肽产生的产物。

[0204] 在另一个方面，本发明提供了一种用于预测、诊断或监测对象中的急性心脏疾病（ACD）的方法，该方法包括：

[0205] 在 ACD 发作或表现的 4 或 2 小时内，测量在从对象获得的生物样品中的 ANP-SP 水平；以及比较所述 ANP-SP 水平和来自对照的 ANP-SP 水平，其中测得的高于对照水平的 ANP-SP 水平为 ACD 的征兆。

[0206] 在另一个方面，本发明提供了一种用于监测对象对急性心脏疾病（ACD）的治疗的反应的方法，该方法包括在 ACD 发作或表现的 4 或 2 小时内测量在从对象获得的生物样品中的 ANP-SP 水平，然后比较所述 ANP-SP 水平与来自对照的 ANP-SP 水平，其中测得的 ANP-SP 水平与对照水平的变化是对治疗的反应的征兆。

[0207] 在本领域已知，其它心脏钠利肽如 BNP 前体例如 BNP 27-102 可以用来预测或诊断心脏移植排斥事件以及用来区分呼吸困难（呼吸短促）的肺原因和心血管原因。参见 US 2005/0244902。因此，可以类似地预测，ANP-SP 可以用作心脏移植排斥的早期标志物（基于心脏组织分析）、以及用来区分肺疾病和急性心脏疾病。

[0208] 因此，本发明还提供了一种用于预测、诊断或监测对象的心脏移植排斥事件的方法，该方法包括在心脏移植的 4 小时内测量在从对象获得的生物样品中的 ANP-SP 水平，然后比较所述 ANP-SP 的水平与来自对照的 ANP-SP 水平，其中高于对照水平的 ANP-SP 的测量水平为移植排斥的征兆。

[0209] 本发明还提供了一种在对象中区别肺疾病和急性心脏疾病（ACD）的方法，该方法包括在疾病表现的 4 小时内测量在从对象获得的生物样品中的 ANP-SP 水平，然后比较所述 ANP-SP 的水平与来自对照的 ANP-SP 水平，其中测得的 ANP-SP 水平高于对照水平为 ACD 的征兆。

[0210] 在一种实施方式中，本发明提供了一种用于在对象中预测、诊断或监测急性心脏疾病（ACD）、心脏移植排斥、或 ACD/肺疾病的方法，该方法包括在 ACD、移植排斥或 ACD/肺疾病发作或临床表现的最初 4 小时内测量在从对象获得的生物样品中的 ANP-SP 水平。对 ANP-SP 的测量水平与来自对照的 ANP-SP 水平进行比较，其中测得的高于对照水平的 ANP-SP 水平是 ACD 或移植排斥的征兆。

[0211] 技术人员将明了，为了评估的目的，ANP-SP 水平需要相关于参考值或对照值。

[0212] 如在本文中所使用的，对照可以是个体或组，从其获得 ANP-SP 样品并确定平均 ANP-SP 水平。通常，个体或组将包括正常健康个体或不知道患有 ACD、心脏移植排斥或 ACD/肺疾病的个体的组。大多数个体中的 ANP-SP 水平在 14-26pmol/L 之间，并且平均对照水平为约 20.8pmol/L。可替换地，可以基于来自先前测试的个体或组的多个读数来评估对照水平。对照水平的另一个实例是在心脏组织中在 ANP-SP 与 ANP 水平之间的比例量度。可以

对对象的 ANP-SP 水平和对照群体的平均 ANP-SP 水平进行比较。心脏组织对照群体中的 ANP-SP 水平可以是比正常对照群体中的 ANP-SP 水平高约 1.5 至 3、通常 2 至 3 或 2.5 至 3 倍。可替换地,对照可以是在较早时间获自相同对象的一个或多个读数或这样的读数的平均值。为具体方法确定适当的对照和对照水平在本领域中是众所周知的。

[0213] 应当明了,测量样品中 ANP-SP 水平的步骤可以是对单一样品的单独测量、或对多个样品的重复测量。因此,在一种实施方式中,测量可以包括在发作或临床表现的最初 4 小时、2 小时、或 1 小时内在不同时间获得的样品中的 ANP-SP 的 1 至 20 次测量,1 至 10、1 至 5、1 至 3、1 或 2、或 2 或 3 次测量。还可以在 4 或两小时周期之外进行单次或重复测量,以确定 ANP-SP 水平是否已降至正常对照水平、或心脏组织对照水平。

[0214] 在一种实施方式中,该方法包括测量在发作或表现的最初 1 小时内获得的 1 或 2 个样品中的 ANP-SP 水平,接着测量在发作或表现、或 ANP-SP 水平的初始测量的 2 至 4 小时、或 2 至 3 小时内获得的 1 或 2 个样品中的 ANP-SP 水平。

[0215] 如上所述,在发作或表现的最初 4 或两小时内测得的 ANP-SP 水平通常比在正常对照中测得的 ANP-SP 水平高 3 至 7 或 5 至 7 倍。如上所述,在上述范围内还包括以下具体范围:3 至 6、3 至 5、3 至 4、4 至 7、4 至 6、4 至 5、以及 5 至 6 倍更高。

[0216] 在另一种实施方式中,在样品中,40 至 300pmol/L、或 42 至 200pmol/L、或 45 至 200pmol/L、或 45 至 150pmol/L 范围中的 ANP-SP 水平为 ACD、心脏移植排斥的征兆,或用来区分 ACD 和肺疾病。

[0217] 如上所述,上述范围还包括在如 50 至 130pmol/L、55 至 120pmol/L、60 至 90pmol/L 等范围内的任何值。

[0218] 如上文所定义的生物样品可以是任何生物材料,其中可以发现或分泌 ANP-SP。在一种实施方式中,生物样品是循环生物样品,例如血液、血清或血浆。在一种实施方式中,生物样品是心脏组织。

[0219] 核酸测定

[0220] 可以按照本领域中众所周知的方法来确定样品中 ANP-SP 的存在以及其表达水平,如 Southern 印迹法 (DNA 印迹法)、Northern 印迹法、FISH 或数量 PCR (用来量化 mRNA 的转录) [(Thomas, Proc. Nat, Acad. Sci. USA 77 :5201-5205 1980), (Jain KK, Med Device Technol. 2004 May ;15(4) :14-7)]、斑点印迹、DNA 分析或原位杂交,其中利用适当标记的探针并基于本文提供的序列。

[0221] 因此,本发明还提供了一种用于检测在对象中本发明的核酸分子的存在的方法,该方法包括:

[0222] (a) 使样品与多核苷酸探针接触,该探针在严格杂交条件下杂交于核酸序列;以及

[0223] (b) 检测样品中杂交复合体的存在。

[0224] 在一种实施方式中,核酸分子是 SEQ ID NO :13 或 SEQ ID NO :17 或它们的变体或片段。

[0225] 优选地,杂交探针是标记探针。标记的实例包括荧光标记、化学发光标记、放射酶标记以及生物素-亲和素标记。按照技术领域已知的方法如上述那些方法来进行标记探针的标记和可视化。

[0226] 为方便起见,可以将核酸探针固定在载体上,其中载体包括树脂(如聚丙烯酰胺)、碳水化合物(如琼脂糖)、塑料(如聚碳酸酯)、以及乳胶珠。

[0227] 如上面所讨论的,核酸分子探针可以优选为 RNA、cDNA 或 DNA 分子。在一种实施方式中,探针是、或包括 SEQ ID NO:13 或 SEQ ID NO:17。

[0228] 严格杂交条件如上面所讨论。

[0229] 可以利用已知技术如 RT-PCR 和电泳技术(包括 SDS-PAGE)来确定核酸标志物的表达水平。利用这些技术,可以扩增在对象样品中的本发明的核酸分子的 DNA 或 cDNA 序列,并且测量 DNA 或 cDNA 或 RNA 的水平。

[0230] 在一种可替换的方法中,可以在没有扩增的情况下直接在样品中测量 DNA、cDNA 或 RNA 水平。

[0231] 目前优选的方法是 Northern 印迹(RNA 印迹)杂交分析。可以基于本文鉴定的标志物序列来制备用于 Northern 印迹杂交分析的探针。在一种实施方式中,探针包括参比序列的至少 10、至少 12、至少 15、至少 18、至少 24、至少 30、至少 36、至少 42、至少 51、至少 60、或至少 70 个或更多个连续核苷酸。

[0232] 可替换地,可以利用基于逆转录的 PCR(RT-PCR)测定并利用对于核酸序列特异性的引物来测量表达水平。如果期望,可以相对于对照核酸分子来比较样品中标志物的水平,其中对照核酸分子的表达与待测量的参数或条件无关。对照核酸分子是指其中在疾病或移植排斥状态和健康状态之间水平并没有差异的分子。对照分子的水平可以用来归一化比较群体中的水平。这样的对照分子的实例是 GAP-DH。本发明的标志物的水平将随着疾病而变化。

[0233] 肽测定

[0234] 在一种实施方式中,测量步骤包括检测 ANP-SP 和结合剂之间的结合,其中结合剂结合(包括选择性地或特异性地结合)ANP-SP 或其片段或变体。作为测量的预先步骤,可以使 ANP-SP 结合于结合剂,该结合剂结合 ANP-SP 或其片段或变体。

[0235] 因此,在一种实施方式中,本发明提供了一种用于在 ACD、心脏移植排斥、或 ACD/肺疾病发作的 4 小时内或在 ACD、心脏移植排斥、或 ACD/肺疾病临床表现的 4 小时内测定在从对象获得的生物样品中的 ANP-SP 的方法,该测定方法包括利用任何已知的方法来检测和测量样品中的 ANP-SP 水平。

[0236] 在另一种实施方式中,本发明提供了一种用于测定 ANP-SP 的方法,包括:

[0237] (a) 结合来自生物样品的一种或多种选自由 ANP-SP 1-10、以及 ANP-SP 16-25、或它们的变体或片段组成的组中的 ANP-SP 多肽;以及

[0238] (b) 测量结合的 ANP-SP 多肽的水平。

[0239] 在一种实施方式中,结合剂是选择性(特异性)的结合剂。即,它与生物事件的其它标志物具有低交叉反应度,并且更具体地 ANP 或 NT-ANP。在一种实施方式中,结合剂是抗体或其抗原结合片段。

[0240] 本发明还涉及这样的抗体、或抗体的抗原结合片段。抗体可以以分离或纯化的形式。结合于 ANP-SP 或其片段或变体的抗体可以以任何形式,包括所有类型的多克隆抗体、单克隆抗体、单链抗体、人抗体、人源化抗体以及嵌合抗体(通过基因重组产生)。还包括通过用 ANP-SP 或其片段或变体免疫动物如小鼠、大鼠或兔而获得的抗血清。抗体可以结合于

在 ANP-SP 片段的组中的共同 ANP-SP 序列,或结合于特异性 ANP-SP 片段,或甚至结合于一组 ANP-SP 片段。

[0241] 本文中还可以使用抗体或修饰抗体的片段,只要它结合 ANP-SP 或其片段或变体。抗原结合片段可以是 Fab、F(ab')₂、F(ab')、Fc 或 Fv 片段或单链 Fv(scFv),其中通过适当的接头连接来自 H 和 L 链的 Fv 片段 (Huston et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-83(1988))。抗体的“Fc”部分是指免疫球蛋白重链的一部分,其包含一个或多个重链恒定区域、CH1、CH2 以及 CH3,但并不包括重链可变区。

[0242] 抗体的“Fv”部分是包含完全抗原识别和抗原结合位点的最小抗体片段。该区由紧密、非共价缔合的一个重链和一个轻链可变结构域的二聚体构成。

[0243] Fab 片段包含轻链的恒定结构域和重链的第一恒定结构域(CH1)。Fab' 片段具有加入到 CH1 结构域的 Fab 羧基末端的几个残基,包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。F(ab')₂ 片段表示其间具有半胱氨酸铰链并已被分开的成对 Fab' 片段。F(ab')₂ 片段具有两个抗原结合位点。可以通过抗体的木瓜蛋白酶消化来产生 Fab 片段。

[0244] 关于抗体和片段的讨论,参见例如 PNAS USA 81:6851-6855(1984), Protein Eng 8(10)1057-1062(1995); The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Springer-verlag 1994, Rosenberg and Moore Eds; PNAS USA 90:6444-6448(1993); Nature 321:522-525(1986); Nature 332:323-329(1988), 以及 WO 2005/003154。

[0245] 用于制备抗体、以及检测、修饰和分离抗体的方法在本领域中是众所周知的(参见例如 Maintaining and using Antibodies: A Practical Handbook, Howard, G et al., CRC Press 2006; Protein-protein Interactions: A Molecular Cloning Manual, Golemis E(Ed), CSHL Press, 2002; Harlow and Lane(1998,¹⁰Milstein¹⁸, Suresh¹⁹, 以及 Brennan²⁰)。在一种实施方式中,通过免疫合适的宿主哺乳动物来产生所使用的抗体。包含 ANP-SP 的融合蛋白也可以用作免疫原。

[0246] 可以通过与各种分子的轭合来修饰抗体,如聚乙二醇(PEG)、生物素、链霉亲和素、化学发光标记、荧光标记、量热标记、以及放射免疫标记(如本文讨论的)。可以通过化学修饰抗体来获得修饰的抗体。这些修饰方法在本领域中是常规的。

[0247] 可替换地,抗体可以在来自非人抗体的可变区和来自人抗体的恒定区之间作为嵌合抗体获得,或作为人源化抗体获得,其包含来自非人抗体的互补性决定区(CDR)、来自人抗体的构架区(FR)、以及恒定区。可以利用已知技术方法来制备这样的抗体^{16,17,22}。

[0248] 简言之,制备多克隆抗体的方法对于技术人员来说是已知的。可以在哺乳动物中征集多克隆抗体,例如,通过一次或多次注射免疫剂以及,如果需要的话,佐剂。通常,将通过多次皮下或腹腔内注射在哺乳动物中注射免疫剂和/或佐剂。免疫剂可以包括 ANP-SP 或其片段或变体或其融合蛋白。在要免疫的哺乳动物中,将免疫剂共轭于已知为免疫原性的蛋白可能是有用的。这样的免疫原性蛋白的实例包括但不限于钥孔血蓝蛋白(keyhole limpet hemocyanin)、牛血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白(bovine thyroglobulin)、以及大豆胰蛋白酶抑制剂。可以采用的佐剂的实例包括弗氏完全佐剂(Freund's complete adjuvant)和 MPL TDM 佐剂(单磷酸脂质 A、合成海藻糖二霉菌酸脂)。本领域技术人员可以选择免疫协议而无需过度的实验。

[0249] 可以利用本领域众所周知的杂交瘤方法来制备单克隆抗体。参见例如 Kohler and

Milstein, 1975¹¹、US 4, 196, 265、US 4, 816, 567 以及 Golemis(上文)。可以在合适的培养基中培养杂交瘤细胞,可替换地,杂交瘤细胞可以在哺乳动物体内生长为腹水。优选的永生细胞系是小鼠骨髓瘤细胞系,其可以获自,例如, American Type Culture Collection, Virginia, USA。免疫测定可以用来筛选分泌感兴趣的抗体的永生细胞系。在筛选中可以使用 ANP-SP 或其片段或变体的序列。

[0250] 因此,本文还设想杂交瘤,其是能够分泌 ANP-SP 特异性单克隆抗体的永生细胞系。

[0251] 用于确定由杂交瘤细胞所产生的单克隆抗体的结合特异性的众所周知的方式包括免疫沉淀、放射性连接免疫测定 (RIA)、酶联免疫吸附测定 (ELISA) 以及 Western 印迹 (蛋白质印迹)。(Lutz et al., Exp. Cell. Res. 175 :109-124(1988)、Golemis(上文)、以及 Howard(上文))。例如,单克隆抗体的结合亲和力可以,例如,通过在 Munson et al., Anal Biochem 107 :220(1980) 中描述的斯卡查德分析来确定。对于来自免疫动物的样品,可以类似地筛查多克隆抗体的存在。

[0252] 单克隆抗体还可以获自重组宿主细胞。编码抗体的 DNA 可以获自杂交瘤细胞系。然后将 DNA 放入表达载体中,转染到宿主细胞(例如, COS 细胞、CHO 细胞、大肠杆菌细胞)中,并在宿主细胞中产生抗体。然后可以利用标准技术来分离和 / 或纯化抗体。

[0253] 还可以使用用于单克隆抗体生产的其它已知技术如从噬菌体文库。参见例如, Nature 352 :624-628(1991)。

[0254] 为了方便检测,本文的抗体和片段可以标记有可检测标记如荧光化合物、生物发光化合物、和化学发光化合物,以及放射性同位素、磁珠和亲和标记(例如生物素和亲和素)。允许间接测量结合的标记的实例包括酶,其中底物可以提供有色荧光产物,合适的酶包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、苹果酸脱氢酶等。可以连同荧光激活细胞分选仪一起使用荧光色素(例如得克萨斯红 (Texas Red)、荧光素、藻胆蛋白、以及藻红蛋白)。标记技术在本领域中是众所周知的。

[0255] 通过常规免疫球蛋白纯化程序如,例如,反相 HPLC、蛋白质 A- 琼脂糖、羟基磷灰石层析、凝胶电泳、透析、或亲和层析,可以从培养基或腹水液体中分离或纯化由细胞分泌的单克隆抗体。参见例如, Scopes, Protein Purification :Principles and Practice, Springer-Verlag, NY(1982)。

[0256] 还可以通过重组 DNA 方式来生产单克隆抗体或片段(参见例如美国专利号 4, 816, 567)。DNA 修饰如人重链和轻链恒定域的编码序列替代同源小鼠序列(以上美国专利号 4, 816, 567)也是可能的。抗体可以是单价抗体。用于制备单价抗体的方法在本领域中是众所周知的(美国专利号 5, 334, 708、5, 821, 047、以及 7, 476, 724)。本文还设想 (US 6, 020, 153) 嵌合 (US 4, 816, 567)、双价抗体 (US5, 843, 708) 以及多价抗体的生产。

[0257] 嵌合单克隆抗体是这样的抗体,其中重链和 / 或轻链的一部分相同于或同源来自特定物种或属于特定抗体(亚)类的抗体的相应序列。链的剩余部分相同于或同源来自另一物种或属于另一抗体(亚)类的抗体的相应序列、及其片段,只要它们呈现必要的生物活性。(参见 US 4, 816, 567 Supra)。

[0258] 本发明的抗体可以进一步包括人源化抗体或人抗体。人源化抗体包括人免疫球蛋白,其中来自受体的互补决定区 (CDR) 的残基被来自非人物种的 CDR 的残基取代。从非人

来源如兔、大鼠以及小鼠生产人源化抗体是众所周知的^{12,13,14}。

[0259] 还可以利用本领域中已知的各种技术来产生人抗体,包括噬菌体展示文库¹⁵、以及转基因方法,参见,例如 Neuberger 1996¹⁶、以及 Vaughan et al., 1998¹⁷。

[0260] 双特异性抗体也可以是有用的。这些抗体是单克隆抗体,优选人抗体或人源化抗体,其对于至少两种不同的抗原具有结合特异性。例如 ANP-SP 或其变体或片段,以及抗原,该抗原选自包括前 ANP 原、ANP、CK-MB、TnT、TnI、BNP、BNP-SP、以及肌红蛋白的组。本文还设想多于两种特异性的抗体例如三特异抗体。

[0261] 用于制备双特异性抗体的方法在本领域中是已知的。参见例如 Milstein and Cuello 1983¹⁸、Suresh et al., 1986¹⁹ 以及 Brennan et al., 1985²⁰。

[0262] 由抗体选择性地结合的 ANP-SP 是如上面所讨论的 ANP-SP 或其变体或片段。

[0263] 在一种实施方式中,抗体结合 ANP-SP 的 C 端 (16-25)。结合剂选择性地结合的特异性抗原肽的实例是 ANP-SP (16-25) SEQ ID NO :12。另一个实例是 ANP-SP (1-10) SEQ ID NO : 16。

[0264] 可以通过本领域中已知的任何方式来检测 ANP-SP 的结合,包括特异的(基于抗体)和非特异的(如 HPLC 固相)。最常见地,利用测定方法如 ELISA 或 RIA (如上所述) 来检测本文的抗体。竞争性结合测定、夹心测定、非竞争性测定、荧光免疫测定法、荧光免疫测定试验、或免疫放射测定试验、发光测定、化学发光测定以及质谱分析如表面增强激光解吸和电离 (SELDI)、电喷雾电离 (ESI)、基质辅助激光解吸电离 (MALDI)、傅立叶变换离子回旋共振质谱 (FTICR), 单独或连同非特异性结合剂如层析形式也是可行的。参见例如, Golemis, E 以及 Howard G. (Supra(上文))。

[0265] 方便地,可以将抗体固定至固态底物以方便 ANP-SP/ 抗体复合物的洗涤和分离。利用已知技术,可以实现抗体与载体的结合。参见例如 Handbook of Experimental Immunology, 4th edition, Blackwell Scientific Publications, Oxford (1986)。用于抗体的有用固态底物包括玻璃、尼龙、纸以及塑料。类似地,可以将 ANP-SP 吸附到固态底物如吸附性二氧化硅、或树脂颗粒、或硅片上,其可选地涂布有或衍化有离子交换、反相(例如 C18 涂层)或其它材料。底物可以以珠子、平板、管、棒或生物芯片的形式。生物芯片的实例包括 Ciphergen, ProteinChip 阵列 (Ciphergen Biosystems (CA, USA))、以及可获自 Perkin Elmer, USA 的 Packard BioChips。还参见 US 6, 225, 047、US 6, 329, 209。生物芯片可以包括层析表面。具有可寻址位置的生物芯片或平板以及分立的微量滴定板是特别有用的。此外优选使用的是多重系统,其中包含针对多种分析物的抗体的珠用来测量单一样品中的分析物水平。待测量的分析物可以包括其它心脏标志物以及 ANP-SP 或其变体或片段。供本文使用的合适的多重珠系统的一个实例是 Luminex Fluorokine Multianalyte Profiling 系统 (R&D Systems, MN, USA)。

[0266] 抗体测定方法在本领域中是众所周知的,参见例如 US 5, 221, 685、US 5, 310, 687、US 5, 480, 792、US 5, 525, 524、US 5, 679, 526、US 5, 824, 799、US 5, 851, 776、US 5, 885, 527、US 5, 922, 615、US 5, 939, 272、US 5, 647, 124、US 5, 985, 579、US 6, 019, 944、US 6, 113, 855、US 6, 143, 576 和 US 5, 955, 377 (关于未标记测定)、以及 US 5, 631, 171, 还参见 Zola, Monoclonal Antibodies : A Manual of Techniques pp147-158 (CRC Press, Inc 1987), Harlow and Lane (1998) Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour

Publications, New York, 以及 US 2005/0064511 (关于测定格式和条件的描述)。将所有上述参考文献的全部内容以引用方式结合于本文。

[0267] 免疫测定分析仪也是众所周知的并且除其它很好描述的系统²¹ 以外还包括 Beckman Access、Abbott AxSym、Roche ElecSys 以及 Dade Behring Status 系统。

[0268] 可以直接或间接地检测用于形成复合物的 ANP-SP 和抗体的结合。利用标记如荧光、发光、放射性核素、金属、染料等来进行直接检测。间接检测包括结合可检测标记如地高辛或酶如辣根过氧化物酶和碱性磷酸酶以形成标记的 ANP-SP 抗体,接着的步骤是通过添加检测试剂来检测标记。

[0269] 辣根过氧化物酶例如可以用底物如邻苯二胺二盐酸盐 (OPD) 和过氧化物加以温育以产生可以测量其吸光度的有色产物,或用鲁米诺和过氧化物加以温育以产生化学发光,其可以用光度计加以测量(如在本领域中已知的)。生物素或地高辛可以与强烈结合于它们的结合剂反应。例如,蛋白质亲和素和链霉亲和素将强烈结合于生物素。然后另一种可测量的标记与其共价结合或连接,其中通过与蛋白质的直接反应、或通过使用通常可获得的交联剂如 MCS 和碳二亚胺、或通过添加螯合剂。

[0270] 通常,复合物例如通过离心而分离自未复合试剂。如果抗体被标记,则复合物的量将由所检测的标记的量来反映。可替换地,可以通过结合于抗体来标记 ANP-SP,然后用竞争性测定并通过测量当用包含未标记的 ANP-SP 的生物样品温育抗体标记的 ANP-SP 时所结合的标记 ANP-SP 的减少来检测 ANP-SP。可以使用其它免疫测定例如夹心测定。

[0271] 在一种实施方式中,在与抗体接触以后,通常在 4°C 下过夜 18 至 25 小时、或在 25°C 至 40°C 下 1 至 2 至 4 小时,将结合于结合剂(抗体)的标记 ANP-SP 分离自未结合的标记 ANP-SP。在溶液相测定中,可以通过添加耦合于固相颗粒如纤维素、或磁性材料的抗 γ 球蛋白抗体(二抗)来完成分离。二抗是在用于一抗的不同物种中加以征集并结合一抗。因此,经由二抗,所有一抗结合于固相。通过离心或磁吸从溶液中移除该复合物,然后利用结合于它的标记来测量所结合的标记肽。用于分离结合的与游离的标记的其它选择包括形成免疫复合物(其沉淀自溶液),通过聚乙二醇沉淀抗体,或将游离的标记肽结合于活性炭并通过离心过滤从溶液除去。通过适当方法(如上述那些方法)来测量在分离的结合或游离相中的标记。

[0272] 竞争性结合测定还可以构造为固相测定,其更容易进行,因而优于上述那些方法。这种类型的测定使用具有孔的平板(通常称作 ELISA 或免疫测定平板)、固体珠或管表面。一抗被吸附或共价结合于平板、珠或管的表面,或通过吸附或共价结合第二抗 γ 球蛋白或抗 Fc 区抗体被间接结合于平板。一起或顺序地将样品和标记肽(如上述)加入到平板中,然后在允许在样品中的 ANP-SP 和标记肽之间进行抗体结合竞争的条件下加以温育。可以随后吸出未结合的标记肽并冲洗平板,从而留下附着于平板的抗体结合的标记肽。然后可以利用上述技术来测量标记肽。

[0273] 夹心测定具有更大的特异性、速度以及更大的测量范围。在这种类型的测定中,借助于吸附、共价偶联、或用于固相竞争性结合测定的抗 Fc 或 γ 球蛋白抗体(如上所述),将相对于 ANP-SP 过量的一抗附着于 ELISA 平板的孔、珠或管。使样品液或提取物与附着于固相的抗体接触。由于抗体过量,所以这种结合反应通常是快速的。还用样品并与一抗同时或顺序地温育相对于 ANP-SP 的二抗。选择这种二抗以结合于 ANP-SP 上的位点,该位点不

同于一抗的结合位点。这两种抗体反应导致夹层,其中来自样品的 ANP-SP 被夹在两种抗体之间。二抗通常标记有如上文详细描述的进行竞争性结合测定的容易测量的化合物。可替换地,可以使标记的第三抗体(其特异性地结合于二抗)与样品接触。在冲走未结合的材料以后,可以通过针对竞争性结合测定所概述的方法来测量和量化结合的标记抗体。

[0274] 还可以使用浸染棒型测定。这些测定方法在本领域中是众所周知的。它们可以例如,采用较小的颗粒如附着有特异性抗体的金或有色乳胶颗粒。可以将待测量的液体样品加入到预加载有颗粒的膜或纸条的一端,并允许沿着条进行迁移。样品中的抗原与颗粒的结合会改善颗粒结合于捕获位点的能力,其中进一步沿着条,上述捕获位点包含用于颗粒的结合剂如抗原或抗体。有色颗粒在这些位点的累积导致显色并取决于样品中竞争性抗原的浓度。其它试条法可以采用共价结合于纸或膜带的抗体以捕获样品中的抗原。采用耦合于酶如辣根过氧化物酶的二抗的随后反应以及用底物温育以产生颜色、荧光或化学发光输出,将使得能够量化样品中的抗原。

[0275] 如在以下实施例中所讨论的,在一种实施方式中,放射免疫测定(RIA)是所使用的实验室技术。在一种 RIA 中,放射性标记的抗原和未标记的抗原用于与抗体的竞争性结合。常见的放射性标记包括 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^3H 以及 ^{14}C 。

[0276] 涉及用特异性抗体和放射性标记抗体结合蛋白沉淀 ANP-SP 的放射免疫测定可以测量在沉淀物中标记抗体的量,作为与样品中 ANP-SP 的量成正比。可替换地,产生了标记的 ANP-SP 并使用未标记的抗体结合蛋白。然后添加要测试的生物样品。来自标记的 ANP-SP 的计数的减少与样品中 ANP-SP 的量成正比。

[0277] 在 RIA 中,还可以从游离的 ANP-SP 中分离结合的 ANP-SP。这可能涉及用二抗沉淀 ANP-SP/ 抗体复合物。例如,如果 ANP-SP/ 抗体复合物包含兔抗体,则驴抗兔抗体可以用来沉淀复合物并计数标记的量。例如在 LKB, Gammamaster 计数器中。参见 Hunt et al.²¹

[0278] 本发明的方法进一步包括测量 ACD、心脏移植排斥、或 ACD/ 肺疾病的一种或多种非 ANP-SP 标志物的水平。可以比较其它标志物或多种标志物的水平和来自对照群体的平均对照水平。测量水平与平均对照水平的偏差可以预测或诊断 ACD 或心脏移植排斥。

[0279] 虽然相对于更高水平或 ANP-SP 水平的增加为 ACD、或心脏移植排斥的征兆而描述了本发明的方法,但还可能的是,在某些事件或障碍中,ANP-SP 的水平将降低或更低。还设想测量低于对照水平的偏差。

[0280] 在本文中特别有用的其它标志物包括肌钙蛋白 T、肌钙蛋白 I、肌酸激酶 MB、肌红蛋白、BNP、NT-BNP、BNP-SP、LDH、天冬氨酸转氨酶、H-FABP、内皮素、肾上腺髓质素、凝乳酶以及血管紧张素 II¹。这些标志物均与心脏功能不良或疾病有关。使 ANP-SP 的水平与其它标志物相关可以增加 ANP-SP 的预测、诊断或监测价值。在 ACD、心脏移植排斥或 ACD/ 肺疾病的情况下,使 ANP-SP 标志物水平与已知心脏标志物结合可以增加患者结果的预测或诊断价值。

[0281] 可以使用单试样同时或分别进行许多肽标志物的分析。同时、两个或多位点格式测定是优选的。多重珠、微量测定或生物芯片系统是特别有用的。上述珠、测定或芯片可以具有许多分立的、经常可寻址位置,包括相对于一种或多种标志物(包括 ANP-SP)的抗体。该一种或多种标志物包括多于一种的 ANP-SP 标志物。例如,它可以有利于测定 N 端和 C 端 ANP-SP 片段并且结合测定结果。许多其它这样的标志物组合是可行的。US2005/0064511、

US6,019,944、以及 Ng and Hang, J. Cell Mol. Med., 6:329-340(2002) 提供了可用于本发明的微阵列、芯片、毛细管装置以及技术的描述。Luminex 提供了可用于本发明的多重珠系统。还参见 The Protein Protocols Handbook, 上文。适用于单独或顺序测定的实验室分析仪包括 AxSym (Abbott, USA)、ElecSys (Roche)、Access (Beckman)、ADVIA CENTAUR[®] (Bayer) 以及 Nichols Advantage[®] (Nichols Institute) 免疫测定系统。

[0282] 在一种实施方式中,在单一表面如芯片或阵列上进行多种多肽的同时测定。

[0283] 在监测对象的情况下,可以随着时间的推移获取多种生物样品。连续取样允许随着时间的推移测量标志物水平的变化,尤其是 ANP-SP。采样可以提供关于事件的大概发作时间、事件的严重性(表明哪些治疗方案可以是合适的)、对所采用的治疗方案的反应、或长期预后的信息。可以在医疗点如在救护车中、医生办公室、在临床表现时、在住院期间、在门诊服务时、或在例行健康检查期间,进行分析。

[0284] 还可以连同一种或多种风险因素的分析一起进行本发明的方法,其中风险因素诸如但不限于年龄、体重、性别以及事件(如心脏事件)的家史。还可以连同本发明的方法一起来使用测试结果。

[0285] 例如,ECG 结果以及临床检查。ANP-SP 的循环水平的统计上显著的增加、连同一种或多种另外的风险因素或测试结果,可以用来更准确地诊断或预后对象的病症。

[0286] 本文的方法还可以用作治疗指南。例如开始何种治疗以及何时治疗监测、检测治疗的阳性或不利影响,例如抗有丝分裂药物的心脏毒性,以及如果需要时(取决于结果)治疗方案的调节。这可以改善患者的短期、中期和长期结果。关于治疗指南,参见 Troughton et al.²⁴。

[0287] 急性心脏疾病

[0288] 本发明的申请人已表明,全长 ANP-SP 分子(1-25) 以及其各种片段的浓度与急性心脏疾病相关。此外,在患者呈现有可疑的急性心肌梗死(AMI) 或心肌梗死的情况下,在临床表现以后,ANP-SP 水平处于它们的最高值。呈现有急性心脏疾病,并且尤其是由(心肌梗死,在心脏肌肉或心肌中留下瘢痕)引起的急性心肌缺血冠状动脉疾病的患者可以或可以不经历随后的心肌梗死(MI)。利用目前的临床技术和标志物,并不能容易地诊断并不经历 MI 的组。因此本发明的申请人已首次提供了一种有用的早期和特异性标记,用于与 MI 有关的心肌损伤。这可以允许起因于不良事件(AE) 的心肌损伤的早期诊断并且允许医师区分这样的病例与其它急性冠状动脉综合征以及胸痛的其它原因。例如心绞痛、胃肠疾病、肺/胸膜疾病等。这显著缩短了等待目前的心脏生物标志物如肌红蛋白、CK-MB、TnT 以及 TnI 的水平升高时目前经历的 6 小时至 12 小时的窗口。因而可以更早实现更精确的诊断和治疗,从而减小发病率和死亡率并产生更好的预后结果。

[0289] 在另一种实施方式中,本发明可用于监测在心脏病患者中的再灌注治疗。再灌注治疗通常包括经皮冠状动脉介入(例如血管成形术)和/或药物治疗。在药物治疗中通常采用用于血管再生的溶栓药物。辅助疗法包括抗凝和抗血小板治疗。当在诊断以后尽快采用时,再灌注治疗是最有效的。为加速诊断所进行的 ANP-SP 测试允许再灌注治疗的立刻引入。还可以通过重复测试来监测治疗的有效性,并在适当情况下调节疗法。关于再灌注治疗的全面讨论,参见本文的 Braunwald et al.¹。

[0290] 心脏疾病

[0291] 本发明的方法还可以用于诊断或预测对象中的心脏疾病。

[0292] 本发明的申请人已表明,在患有急性心脏疾病的患者中,在心脏事件以后,ANP-SP水平会升高。类似地可能的是,患有心脏疾病或具有患上心脏疾病的风险的患者将呈现比对照群体中的平均对照水平更高水平的ANP-SP。这表明,作为心脏疾病的标志物,ANP-SP具有广阔的应用。

[0293] 心脏移植排斥

[0294] 本发明还用于在移植期间和之后通过定期组织活检利用ANP-SP测量来监测心脏移植,通常心脏异体移植排斥。相对于对照水平,在心脏移植的4或2小时内测得的ANP-SP水平的增加可以用来预测或诊断排斥反应。

[0295] 本发明还提供了一种用于在ACD、心脏移植排斥或ACD/肺疾病发作或临床表现的4或两小时内测定获自对象的生物样品中的ANP-SP的方法,该测定方法包括利用任何已知的方法来检测和测量样品中的ANP-SP水平。优选地,该测定方法是体外测定方法。这样的方法包括但不限于²²所有上面讨论的已知测定技术以及凝胶电泳技术、Western印迹、气相光谱、原子力显微术、表面等离子体共振、质谱。

[0296] 在一种实施方式中,该测定方法包括一种或多种核酸序列,其结合于本发明的ANP-SP核酸序列中的一种或多种。各种各样的有义和反义探针和引物可以设计自本文的核酸序列。利用上面讨论的已知技术来确定ANP-SP序列的表达水平。阵列可以是固态底物例如“芯片”(如在美国专利号5,744,305中所描述的)或硝酸纤维素膜。关于有用阵列的讨论,参见例如Microarray Technology and its Application, Müller, U et al., Springer 2005,以及Gene Expression Profiling by Microarrays: Clinical Implications, Hofmann, W-K; Cambridge University Press 2006。

[0297] 由本文的ANP-SP标志物表达的蛋白质也可以用于测定,并且将结果与在正常对照样品中表达的相同蛋白质的表达水平加以比较。可以利用本领域已知的和本文讨论的测定格式来评估蛋白质的存在和量。

[0298] 优选通过使ANP-SP结合于结合剂如抗体(包括本发明的抗体)并测量结合的ANP-SP的存在量来检测样品中ANP-SP的存在。

[0299] 如上所指出的,对于ANP-SP具有选择性的抗体(包括其变体和片段)构成本发明的另外的方面并且通过上面讨论的技术可以制备这些抗体。这些抗体可用于本发明的方法和测定中。

[0300] 在另外的方面中,本发明提供了一种用于预测、诊断或监测急性心脏疾病(ACD)、心脏移植排斥、或ACD/肺疾病的试剂盒,该试剂盒包括ANP-SP结合剂,其包括本发明的抗体或抗原结合片段。在一种实施方式中,试剂盒在ACD、心脏移植排斥、或ACD/肺疾病发作或临床表现的4或两小时内用于获自对象的生物样品。已知领域的ANP结合剂也可以用于试剂盒。

[0301] 本发明还提供了一种用于预测、诊断或监测急性心脏疾病(ACD)、心脏移植排斥、或ACD/肺疾病的试剂盒,该试剂盒包括本发明的结合剂,其中试剂盒被校准以测量0.1至500pmol/L、或1至300pmol/L、或2至100pmol/L、或5至150pmol/L范围的ANP-SP水平。

[0302] 可以按照已知领域的技术,例如利用具有已知水平的ANP-SP的血液样品、或各自具有不同已知水平的ANP-SP的一组校准,来进行测定校准。用于诊断试剂盒的测试条通常

是在制造期间加以校准。参见例如 US 6, 780, 645。试剂盒可用于测量生物样品中的 ANP-SP 水平。检测试剂可以是互补于 ANP-SP 或 ANP-SP 标志物的片段的寡核苷酸序列、或结合于由标志物编码的多肽的抗体。试剂可以结合于固态基质（如上面所讨论的）或包装有用于将它们结合于基质的试剂。固态基质或底物可以以所有如上面所讨论的珠、平板、管、浸棒、条或生物芯片的形式。

[0303] 检测试剂包括洗涤剂 and 能够检测结合抗体（如标记二抗）的试剂、或能够与标记抗体反应的试剂。

[0304] 试剂盒还将方便地包括对照试剂（阳性和 / 或阴性）和 / 或用于检测核酸或抗体的装置。试剂盒还可以包括用法说明书，如在 ACD、心脏移植排斥或 ACD/ 肺疾病发作或表现的 4 或 2 小时内从对象获取生物样品，测量样品中的 ANP-SP 水平，比较测量水平与对照水平，以及使结果与心脏状况相关联。通常，与对照相比，ANP-SP 标志物水平的增加为 ACD 或心脏移植排斥、或 ACD 的指征（与肺疾病相反）。

[0305] 最通常地，试剂盒将被形成一定形式以用于本领域中已知的测定，并且在一种实施方式中用于 PCR、Northern 杂交或 Southern ELISA 测定（如在本领域中已知的）。

[0306] 试剂盒还可以包括用于 ACD、移植排斥、或 ACD/ 肺疾病的一种或多种另外的标志物。在 ACS 的情况下，另外的标志物可以包括以下中的一种或多种：肌钙蛋白 T、肌钙蛋白 I、肌酸激酶 MB、肌红蛋白、BNP、NT-BNP、BNP-SP、LDH、天冬氨酸转氨酶、H-FABP、内皮素、肾上腺髓质素、凝乳酶以及血管紧张素 II (angiotensin II)。一种实施方式中，所有标志物包括在试剂盒中。

[0307] 试剂盒将包括一个或多个容器并且还可以包括收集装置，例如，瓶、袋（如静脉输液袋）、小瓶、注射器、以及试管。至少一个容器容纳产品，该产品可有效用于预测、诊断、或监测 ACD（尤其是 ACS）、移植排斥、或 ACD/ 肺疾病。该产品通常是核酸分子、多肽或结合剂，尤其是本发明的抗体或抗原结合片段，或包含任何这些物质的组合物。在一种优选的实施方式中，在容器上或伴随容器的用法说明或标签指明，该组合物可用于预测、诊断、或监测 ACD（尤其是 ACS）、移植排斥、或 ACD/ 肺疾病。其它成分可以包括针、稀释剂以及缓冲剂。有用地，试剂盒可以包括至少一个容器，该容器包含药用缓冲液，如磷酸缓冲盐溶液，林格氏液以及葡萄糖溶液。

[0308] 试剂盒中期望包括选择性地结合 ANP-SP 的结合剂。在一种实施方式中，结合剂是抗体，优选本发明的抗体或抗原结合片段。在测定和试剂盒中所使用的抗体可以是单克隆或多克隆抗体，并且可以在如上面所讨论的任何哺乳动物中制备。抗体可以相对于由本发明的 ANP-SP 核酸序列、ANP-SP (1-25) 编码或指示的天然肽、或基于上述肽的合成肽来制备，或可以相对于外源性序列所征集，其中外源性序列融合于编码本发明的 ANP-SP 肽的核酸序列。

[0309] 在一种试剂盒实施方式中，将 ANP-SP 检测试剂固定在固态基质如多孔带或芯片上以形成至少一个 ANP-SP 检测位点。多孔带的测量或检测区可以包括多个检测位点，这样的检测位点包含 ANP-SP 检测试剂。可以以长条、交叉或点或其它布置来布置位点。测试条或芯片还可以包含用于阴性和 / 或阳性对照的位点。对照位点可以可替换地处于不同条或芯片上。不同的检测位点可以包含不同量的固定核酸或抗体，例如在第一检测位点有较高量并且在随后的位点有较低量。在添加生物试样以后，显示可检测信号的位点的数目提供

了在样品中存在的 ANP-SP 的量的定量指示。

[0310] 在试剂盒中还可以包括用于样品分析的装置,该装置包括包含适当成分(标志物、抗体以及试剂)的一次性测试筒以进行样品测试。该装置将方便地包括测试区和测试结果窗口。免疫层析筒是这样的装置的实例。参见例如 US 6,399,398、US 6,235,241 以及 US 5,504,013。

[0311] 可替换地,该装置可以是电子装置,其允许输入、存储以及评价所测得的标志物水平(相对于对照水平)以及其它标志物水平。US 2006/0234315 提供了这样的装置的实例。此外可用于本发明的是 CIPHERGEN' s Protein Chip ®,利用 CIPHERGEN' s Protein Chip ® 软件包,其可以用来处理 SELDI 结果。

[0312] 在本说明书中,其中已参考专利说明书、其它外部文件、或其它来源的信息,这通常是用于为讨论本发明的特点提供背景的目的。除非另有具体说明,否则参考这样的外部文件并不认为是承认这样的文献、或这样的来源的信息(在任何管辖范围内)是现有技术、或构成本领域的公知常识的一部分。

[0313] 现将以非限制性方式参照以下实施例来说明本发明。

[0314] 实施例 1

[0315] 方法

[0316] 所有人方案得到新西兰健康部的高级南方区伦理委员会(Upper South Regional Ethics Committee of the Ministry of Health)的批准,并按照赫尔辛基宣言进行。

[0317] 化学品

[0318] 合成人 ANP 信号肽 ANP-SP(16-25)(SEQ ID NO:12)和 ANP-SP(1-10)(SEQ ID NO:16)是利用温和 Fmoc 固相合成方法²⁹由 Mimotopes(澳大利亚)合成的。所有缓冲试剂购买自 BDH ®(UK)和/或 Sigma(Mo, USA)。合成了具有 C 端的 ANP-SP(16-25),其中 C 端延伸有用于定向载体耦合的半胱氨酸。ANP-SP(16-25)还 C 端延伸有酪氨酰残基,用于在相同肽上的示踪物制备。

[0319] 人类研究

[0320] 为了进行健康志愿者参考范围研究,血液样品最初获自隔夜空腹以后的 8 位健康志愿者(5 位妇女,3 位男子,平均年龄 47 ± 8 岁(范围 31-65 岁),BMI $25.1 \pm 3.2 \text{kg/m}^2$)。

[0321] 随后研究扩展到 66 位健康志愿者,平均年龄 47 ± 8 岁(范围 31-65 岁),BMI $25.1 \pm 3.2 \text{kg. /m}^2$ 。血液样品还在隔夜空腹以后获自该组。

[0322] 为了分析在急性心肌损伤中的 ANP-SP 浓度,我们最初研究了 3 位连续患者(3 位男子,平均年龄 67 ± 3 岁(范围 65-70 岁)),在胸痛发作和 ST 段抬高急性 MI 的明确证据的 4 小时内,连同血浆肌钙蛋白 T(TnT)的上升然后下降,呈现在 Coronary Care Unit at Christchurch Hospital。

[0323] 排除患有源性休克的患者。随后将研究扩展到包括 23 位患者,平均年龄 67 ± 3 岁(范围 65-70 岁)。未测量 BMI。

[0324] 将 18 号静脉插管插入到前臂静脉中用于采集血液。在进入 Coronary Care Unit(时间 0)时以及在作为住院患者以后的 0.5、1、4、8、12、24 以及 72 小时抽取静脉样品(10ml)。将样品放入冰上的管中并在 $+4^\circ\text{C}$ 下以 2700g 离心 5 分钟,然后将血浆储存在 -80°C 直至分析。

[0325] 血浆提取

[0326] 如先前所描述的²¹,用 SepPak Cartridges (Waters, USA) 提取所有血浆样品,并在 RIA 和 HPLC 以前,干燥和储存在 -20℃。

[0327] 激素浓度分析

[0328] 利用多相免疫测定并用 Elecsys 2010 (Roche, USA) 测定了血浆样品的 TnT、CK-MB 以及肌红蛋白,其中利用钆标记的生物素化抗体并按照标准制造商协议, Roche Diagnostics。¹⁷ 通过特异性 RJA 测量了 ANP-SP,具体如下:

[0329] ANP-SP RIA

[0330] 为了测量假定存在的人 ANP-SP IR 肽,我们生成了新的和特异性 RIA,其针对人前 ANP 原 (1-25) 信号序列 (SEQ ID NO :1) 的氨基酸 16-25。

[0331] 抗体生成

[0332] 在室温下通过温和混合,将前 ANP 原 Cys¹⁵(16-25) 耦合至在 PBS (pH 7.0) 中的经顺丁烯二酰亚胺处理的 N-e- 马来酰亚胺己酸琥珀酰亚胺酯 (EMCS) 衍生的 BSA。用弗氏佐剂 (2ml) 乳化耦合肽并以每月间隔在 4-5 个部位皮下注射 (总共 2ml) 到 2 只新西兰白兔中。在注射后 12 天对兔进行放血以评估抗体滴度直至达到适当的水平。对于 RIA,利用最终稀度为 1 : 15,000 的抗血清来确定 ANP-SP IR。该抗血清与图 5 中所指示的肽和药物,其包括人 BNP 原 (1-13)、BNP 原 (1-76)、ANP 原 (1-30)、ANP、ANP-SPn (1-10)、BNP、BNP-SPn (1-10)、BNP-SPc (17-26)、内皮素 1、血管紧张素 II、血管紧张素 (1-7)、硬骨鱼紧张肽 II、CNP、CNP 原 (1-15)、肾上腺髓质素、优洛可定 I 以及优洛可定 II,没有可检测的交叉反应度 (均 ≤ 0.01%)。按照 Klee GG. Interference in hormone immunoassays Clin Lab Med, 2004, 24 :1-18 评估交叉反应度。

[0333] 碘化和测定方法

[0334] 借助于氯胺 T 法来碘化前 ANP 原 Tyr¹⁵(16-25),然后用反相 HPLC (RP-HPLC) 加以纯化,如先前描述的²¹。通过该制备,测试了 RP-HPLC 以后的两种碘化的示踪物形式。将所有样品、标准物、放射性示踪物以及抗血清溶液稀释在基于钾的测定缓冲液中。对包含 100 μ L 样品的²¹ 测定温育液或结合有 100 μ L 抗血清的标准 (0-640pmol) 人前 ANP 原 (16-25) 在 4℃ 下进行旋转和温育 24 小时。然后添加 100 μ L 的示踪物 1 或示踪物 2 (4000-5000cpm) 并在 4℃ 下进一步温育 24 小时。通过固相二抗方法 (驴抗羊 Sac-Cel[®], IDS Ltd, 英国) 最终分离游离和结合的免疫反应活性,并用 Gammamaster 计数器 (LKB, Uppsala, 瑞典) 加以计数。

[0335] 统计分析

[0336] 所有结果表示为平均值 ± SEM。利用用于重复测量的双向 ANOVA,接着最低显著性差异事后测试,分析了时间过程数据。利用一般线性回归模型进行了血浆激素浓度的相关分析。在所有分析中, P 值 < 0.05 被认为是显著的。

[0337] 结果

[0338] 为了确定 ANP 的 25 个氨基酸信号肽或从其衍生的片段是否存在于人类的循环中,我们开发了一种特异的放射免疫测定 (RIA),其针对前 ANP 原 (1-25) (ANP-SP, 图 2) 的残基 16-25。血浆提取物的稀释显示了与标准曲线 (图 3) 的平行性,并且在健康人中 ANP-SP 的血浆浓度为 2.3±0.7pmol/L (n = 8) (当使用痕迹 1 时)。

[0339] 在已确定了 IR ANP-SP 肽存在于人血浆中以后,我们再次利用痕迹 1 (n = 3, 图 4A) 测量了在患有文件证明的 AMI 的患者中 IRANP-SP 的连续浓度。入院后的 1-2 小时观测到 IR ANP-SP 的最高浓度,并经 72 小时缓慢下降至稳定水平。重要的是,平均峰值水平是比在正常健康志愿者中的水平 (范围 3-7) 高 5 至 15 倍并且保持长达 72 小时。入院后的 1-2 小时,出现肌红蛋白的峰值浓度,而没有获得峰值 TnT 和 CK-MB 水平直到入院后的 8-12 小时。

[0340] 我们利用基于痕迹 2 的 ANP-SP (16-25) RIA 重新检查了上述发现和比率。因此,我们利用痕迹 2 发现在健康人中 ANP-SP 的血浆浓度为 $20.8 \pm 5.7 \text{ pmol/L}$ (n = 66)。继此,我们利用痕迹 2 测定在患有文件证明的 AMI 的 23 位患者中重新测量了连续 ANP-SP 血浆浓度。再次,医院表现后的 1-2 小时观测到 ANP-SP 的最高浓度 ($P < 0.001$, n = 23),其经 72 小时缓慢下降至基线。平均峰值水平比正常志愿者水平 (范围 3-8) 高 5-15 倍,并且这些峰值出现的时间远在 CK-MB 和肌钙蛋白的峰值以前。

[0341] 实施例 2

[0342] 对具有临床上稳定的可疑的 ACS 的 8 位患者进行插管并从多个器官部位获得血液样品,所述多个器官部位是股动脉 (FA)、肝静脉 (HV)、下腔静脉 (IVC)、心脏冠状窦静脉 (CS) 以及肺动脉 (PA)。血液被收集到冷冻的 EDTA 管中,通过离心制备自血浆以及对血浆进行 ANP-SP RIA。图 6 清楚地表明,ANP-SP 浓度的最高部位是 CS,静脉排空心脏,尤其是心室。这是有力的证据,表明,心脏是 ANP-SP 分泌的主要部位并且与 ANP 的已知的基因表达模式 (在心脏中最高) 一致。

[0343] 结论

[0344] 在临床上稳定的患者中的循环 ANP-SP 浓度来自心脏来源。显著的的心脏分泌与 ANP-SP 为心脏激素是一致的。

[0345] 讨论

[0346] 该证据首次证明,在患者呈现有 ACD 的两小时内或在 ACD 发作的两小时内,前 ANP 原的信号肽存在于循环和细胞外腔隙中。我们首次表明,在血液中 ANP-SP 的测量具有作为急性心肌缺血和 / 或随后损伤的快速生物标志物的潜力,并且其次,在事件以后 ANP-SP 的测量具有作为长期预后和结果的标志物的潜在价值。

[0347] 本领域技术人员当然明了,以上描述是通过举例来提供的并且本发明并不限于此。

[0348] 参考文献

[0349] 1. Braunwald E, Zipes DP, Libby P. Acute myocardial infarction Chp. 35 Heart disease : a textbook of cardiovascular medicine, 6th ed. 2001. pgs. 1114-1231.

[0350] 2. Tapanainen JM, Lindgren KS, Makikallio TH, Vuolteenaho O, Leppaluoto J, Huikuri HV. Natriuretic peptides as predictors of non-sudden and sudden cardiac death after acute myocardial infarction in the beta-blocking era. J Am Coll Cardiol. 2004 43(5) :757-763.

[0351] 3. Jernberg T, Stridsberg M, Venge P, Lindahl B. N-terminal pro Brain Natriuretic Peptide on admission for early risk stratification of patients with chest pain and no ST-segment elevation. J. Am. Coll. Cardiology 2002 40 :437-445.

- [0352] 4. Omland T, Persson A, Ng L, O'Brien R, Karlsson T, Herlitz J, Hartford M, Caidahl K. N-terminal pro-B-type natriuretic peptide and long-term mortality in acute coronary syndromes. *Circulation*. 2002 106 :2913-2918.
- [0353] 5. Thibault G, Murthy KK, Gutkowska J, Seidah NG, Lazure C, Chretien M, Cantin M. NH₂-terminal fragment of rat pro-atrial natriuretic factor in the circulation: identification, radioimmunoassay and half-life. *Peptides*. 1988 9 :47-53.
- [0354] 6. Omland T, Aakvaag A, Bonarjee VV, Caidahl K, Lie RT, Nilsen DW, Sundsfjord JA, Dickstein K. Plasma brain natriuretic peptide as an indicator of left ventricular systolic function and long-term survival after acute myocardial infarction. Comparison with plasma atrial natriuretic peptide and N-terminal proatrial natriuretic peptide. *Circulation*. 1996 93(11) :1963-1969.
- [0355] 7. Squire IB, O'Brien RJ, Demme B, Davies JE, Ng LL. N-terminal pro-atrial natriuretic peptide (N-ANP) and N-terminal pro-B-type natriuretic peptide (N-BNP) in the prediction of death and heart failure in unselected patients following acute myocardial infarction. *Clin Sci (Lond)*. 2004 107(3) :309-316.
- [0356] 8. Chenna R, Sugawara H, Koike T, Lopez R, Gibson T J, Higgins DG, Thompson JD. Multiple Sequence Alignment with the Clustal series of programs *Nucleic Acids Res* (2003) 31(13) :3497-500.
- [0357] 9. Bowie, J. U et al, (1990). Deciphering the message in Protein Sequences: Tolerance to Amino Acid Substitutions. *Science* 247, 1306-1310.
- [0358] 10. Harlow and Lane 1998. *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Press New York.²⁷
- [0359] 11. Kohler and Milstein 1975. Continuous cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity. *Nature*, 256(5517), 495-497.
- [0360] 12. Verhoeyen M. C Milstein, and G Winter Reshaping human antibodies: grafting an antilysozyme activity. *Science* 1988 Mar 25 ;239(4847) :1534-6.
- [0361] 13. Jones, P. T., Dear, P. H., Foote, L, Neuberger, M. S. and Winter, G. " Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. " *Nature* (1986) 321 :522-525.
- [0362] 14. Riechmann L, Clark M, Waldmann H, Winter G. Reshaping human antibodies for therapy. *Nature*. 1988 Mar 24 ;332(6162) :323-7.
- [0363] 15. Hoogenboom HR, Winter G (1992) Human antibodies from synthetic repertoires of germline VH gene segments rearranged in vitro. *J Mol Biol*. 1992 Sep 20 ;227(2) :381-8.
- [0364] 16. Michael Neuberger (1996) Generating high-avidity human Mabs in mice *Nature Biotechnology* 14, 826
- [0365] 17. Tristan J. Vaughan, Jane K. O. Sboorn & Philip R. Tempest (1998) Human antibodies by design. *Nature Biotechnology* 16, 535-539

- [0366] 18. Milstein and Cuello(1983)The co-expression of two immunoglobulin heavy-chain/light-chain pairs, where the two heavy chains have different specificities, Nature, 305 :537-539.
- [0367] 19. Suresh, M. R. , Cuello, A. C. and Milstein, C. (1986)Bi-specific monoclonal antibodies from hybrid hybridomas. Methods in Enzymology, 121 :210-228.
- [0368] 20. Brennan et al. , " Preparation of bispecific antibodies by chemical recombination of monoclonal immunoglobulin G1 fragments " Science 229 : 81-83(1985).
- [0369] 21. Hunt PJ, Richards AM, Nicholls MG, Yandle TG, Doughty RN, Espiner EA. Immunoreactive amino terminal pro brain natriuretic peptide (NT-proBNP) : anew marker of cardiac impairment. Clin. Endocrinol. 1997 47 :287-296.
- [0370] 22. The Immunoassay Handbook. 3rd edition, ed. David Wild. Elsevier Ltd, 2005.
- [0371] 23. Solber H. Approved recommendation(1987)on the theory of reference values. Part 5. Statistical treatment of collected reference values. Determination of reference limits. Journal of clinical Chemistry and Cilinical Biochemistry 198725 :645-656.
- [0372] 24. Troughton RW, Prior DL, Pereira JJ, Martin M, Fogarty A, Morehead A, Yandle TG, Richards AM, Starling RC, Young JB, Thomas JD, Klein AL. Plasma B-type natriuretic peptide levels in systolic heart failure :importance of left ventricular diastolic function and right ventricular systolic function. J Am Coll Cardiol. 2004 43 :416-422.
- [0373] 25. Universal definition of myocardial infarction. Consensus statement from the Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Taskforce for the redefinition of myocardial infarction. Circulation 2007 116 :2634-2653.
- [0374] 26. National Academy of Clinical Biochemistry and IFCC Committee for standardisation of markers of cardiac damage laboratory medicine practice guidelines :analytical issues for biochemical markers of acute coronary syndromes. Circulation 2007 115 :e352-e355.
- [0375] 27. Kunkel, Thomas A. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. Proc. Natl. Acad. Set. USA Vol. 82, pp. 488-492, January 1985.
- [0376] 28. Techniques in Protein Modification By Roger L. Lundblad Edition :2 Published by CRC Press, 1995 288 pages.
- [0377] 29. Atherton et al. (1989)Solid Phase Synthesis :a practical approach, IRL press.
- [0378] 将在上述列表和整个说明书（包括专利说明书）中的所有参考文献和引文的全部内容以引用方式结合于本文。

[0001]

序列表

<110> 奥塔哥创新有限公司 (OTAGO INNOVATION LIMITED)
 <120> 生物标志物
 <130> P36107DMS
 <160> 15
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 151
 <212> PRT
 <213> 智人
 <300>
 <308> NP_006163
 <309> 2008-02-17
 <313> (1)..(151)
 <400> 1
 Met Ser Ser Phe Ser Thr Thr Thr Val Ser Phe Leu Leu Leu Leu Ala
 1 5 10 15
 Phe Gln Leu Leu Gly Gln Thr Arg Ala Asn Pro Met Tyr Asn Ala Val
 20 25 30
 Ser Asn Ala Asp Leu Met Asp Phe Lys Asn Leu Leu Asp His Leu Glu
 35 40 45
 Glu Lys Met Pro Leu Glu Asp Glu Val Val Pro Pro Gln Val Leu Ser
 50 55 60
 Glu Pro Asn Glu Glu Ala Gly Ala Ala Leu Ser Pro Leu Pro Glu Val
 65 70 75 80
 Pro Pro Trp Thr Gly Glu Val Ser Pro Ala Gln Arg Asp Gly Gly Ala
 85 90 95
 Leu Gly Arg Gly Pro Trp Asp Ser Ser Asp Arg Ser Ala Leu Leu Lys
 100 105 110
 Ser Lys Leu Arg Ala Leu Leu Thr Ala Pro Arg Ser Leu Arg Arg Ser
 115 120 125
 Ser Cys Phe Gly Gly Arg Met Asp Arg Ile Gly Ala Gln Ser Gly Leu
 130 135 140
 Gly Cys Asn Ser Phe Arg Tyr
 145 150
 <210> 2
 <211> 840
 <212> DNA
 <213> 智人
 <300>
 <308> NM_006172
 <309> 2008-02-17
 <313> (1)..(840)
 <400> 2

[0002]

```

agggacagac gtaggccaag agaggggaac cagagaggaa ccagagggga gagacagagc    60
agcaagcagt ggattgctcc ttgacgacgc cagcatgagc tccttctcca ccaccaccgt    120
gagcttcctc cttttactgg cattccagct cctaggtcag accagagcta atcccatgta    180
caatgccgtg tccaacgcag acctgatgga tttcaagaat ttgctggacc atttgaaga    240
aaagatgcct ttagaagatg aggtcgtgcc cccacaagtg ctcagtgagc cgaatgaaga    300
agcgggggct gctctcagcc cctccctga ggtgcctccc tggaccgggg aagtcagccc    360
agcccagaga gatggaggig ccctcgggcg gggcccctgg gactcctctg atcgatctgc    420
cctcctaaaa agcaagctga gggcgctgct cactgccctc cggagcctgc ggagatccag    480
ctgcttcggg ggcaggatgg acaggattgg agcccagagc ggactgggct gtaacagctt    540
ccggtactga agataacagc cagggaggac aagcagggct gggcctaggg acagactgca    600
agaggctcct gtcacctggg gtctctgctg catttgtgtc atcttgttgc catggagtig    660
tgatcatccc atctaagctg cagcttctg tcaacacttc tcacatctta tgtaactgt    720
agataaagtg gtttgatggt gacttcctcg cctctcccac cccatgcatt aaattttaag    780
gtagaacctc acctgttact gaaagtggtt tgaagtga taaacttcag caccatggac    840

```

<210> 3
 <211> 152
 <212> PRT
 <213> 褐鼠

<300>
 <308> NP_036744
 <309> 2008-02-11
 <313> (1)..(152)

<400> 3

```

Met Gly Ser Phe Ser Ile Thr Lys Gly Phe Phe Leu Phe Leu Ala Phe
1           5           10           15

Trp Leu Pro Gly His Ile Gly Ala Asn Pro Val Tyr Ser Ala Val Ser
20          25          30

Asn Thr Asp Leu Met Asp Phe Lys Asn Leu Leu Asp His Leu Glu Glu
35          40          45

Lys Met Pro Val Glu Asp Glu Val Met Pro Pro Gln Ala Leu Ser Glu
50          55          60

Gln Thr Asp Glu Ala Gly Ala Ala Leu Ser Ser Leu Ser Glu Val Pro
65          70          75          80

Pro Trp Thr Gly Glu Val Asn Pro Ser Gln Arg Asp Gly Gly Ala Leu
85          90          95

Gly Arg Gly Pro Trp Asp Pro Ser Asp Arg Ser Ala Leu Leu Lys Ser
100         105         110

Lys Leu Arg Ala Leu Leu Ala Gly Pro Arg Ser Leu Arg Arg Ser Ser
115         120         125

Cys Phe Gly Gly Arg Ile Asp Arg Ile Gly Ala Gln Ser Gly Leu Gly
130         135         140

```

[0003]

Cys Asn Ser Phe Arg Tyr Arg Arg
145 150

<210> 4
<211> 831
<212> DNA
<213> 褐鼠

<300>
<308> NM_012612
<309> 2008-02-11
<313> (1)..(831)

<400> 4
cggacaaagg ctgagagaga aaccagagag tgagccgaga cagcaaacat cagatcgtgc 60
cccgaccac gccagcatgg gtccttctc catcaccaag ggcttcttcc tcttcttggc 120
cttttggctc ccaggccata ttggagcaaa tcccgtatac agtgcggtgt ccaacacaga 180
tctgatggat ttcaagaacc tgctagacca cctggaggag aagatgccgg tagaagatga 240
ggtcatgcct ccgcaggccc tgagcgagca gaccgatgaa gcgggggagg cacttagctc 300
cctctctgag gtgcctcctt ggactgggga agtcaaccg tctcagagag atggagggtgc 360
tctcggggcg gccccctggg acccctccga tagatctgcc ctcttgaaaa gcaaactgag 420
ggctctgctc gctggccctc ggagcctgag aaggtcaagc tgcttcgggg gtaggattga 480
caggattgga gccagagcg gactaggctg caacagcttc cggtagcgaa gataacagcc 540
aaatctgctc gagcagatcg caaaagatcc caagcccttg cgggtgtgtca cacagcttgg 600
tcgcattgcc actgagaggt ggtgaatacc ctccctggagc tgcagcttcc tgtcttcac 660
tatcacgac gatgttaagt gtagatgagt ggtttagtga ggccttacct ctcccactct 720
gcataattaag gtagatcctc accccttca gaaagcagtt ggaaaaaaat aaatccgaat 780
aaatttcagc accacggaca gacgctgagg cctgaaaaaa aaaaaaaaaa a 831

<210> 5
<211> 152
<212> PRT
<213> 绵羊

<300>
<308> AAB92564
<309> 2001-02-05
<313> (1)..(152)

<400> 5

Met Gly Ser Ser Ala Ile Thr Thr Ser Phe Leu Leu Phe Val Ala Phe
1 5 10 15

Gln Leu Pro Gly Gln Thr Gly Ala Asn Pro Val Tyr Gly Ser Val Ser
20 25 30

Asn Ala Asp Leu Met Asp Phe Lys Asn Leu Leu Asp Arg Leu Glu Asp
35 40 45

Lys Met Pro Leu Glu Asp Glu Ala Val Pro Ser Gln Val Leu Ser Glu
50 55 60

Gln Asn Glu Glu Ala Gly Ala Pro Leu Ser Pro Leu Ser Glu Val Pro

[0004]

65	70	75	80
Pro Trp Asp Gly Gly Arg Ser Thr Gln Pro Arg Glu Met Gly Ala Pro	85	90	95
Ser Asp Gly Asp Pro Gly Asn Pro Pro Arg Ser Val Leu Leu Lys Ser	100	105	110
Lys Leu Arg Ala Leu Leu Thr Ala Pro Arg Ser Leu Arg Arg Ser Ser	115	120	125
Cys Phe Gly Gly Arg Met Asp Arg Ile Gly Ala Gln Ser Gly Leu Gly	130	135	140
Cys Asn Ser Phe Arg Tyr Arg Arg	145	150	

<210> 6
 <211> 2207
 <212> DNA
 <213> 绵羊

<300>
 <308> AF037465
 <309> 2001-02-05
 <313> (1).. (2207)

<400> 6
 tgaattagga ctctagaaaa ctactttctc ttcacctgga cactgagagg gacagtcagg 60
 ggggtgggggt agccctgcgg ggggcagggt ctgccctccg ccaactgctga tgagtcaagg 120
 gtgaggccag ctccagcctc tggactaatt tgcctgatgc cgagcagccg gctgcctgcc 180
 acatcctccc ctcccgcctt tatttggagc tgacagctga gcagcaaacc aacagggggag 240
 ctggggcccc gccaacctc accctctgct tccccgatg agtcccgttg ccgaggagaa 300
 agaagccgga ggcatcagtg tgagataacc aaggactctt ttttgcctt ctcacacctt 360
 gaagtgggaa cctcttgagg caaatcaaca agaatgtggc tcctgcagct gagggtcctg 420
 ggggttgctg gggctgctca aggcagaggg gctgtgacaa gcaggctgga ctgataactt 480
 taaaaatctt ctgctgctc ctcactcagc tgctttatca ctgcaagtga caggatgggg 540
 agggttccag ctctccggac gagctcccag agagccaggg ggctataaaa agaggaggct 600
 cagggcagct gggagacaga gacggacaaa ggccaacagt gaaagccaa agaagccaga 660
 gaggaggcag caagcaccag accgaccatt ccttgaccga agccaggggg ctataaaaag 720
 aggaggctca gggcagctgg gagacagaga cggacaaaagg ccaacagtga aaggccaaag 780
 aagccagaga ggaggcagca agcaccagac cgaccattcc ttgaccgac ccagcatggg 840
 ctctccgcc atcaccacga gcttctctc ctttggggc tttcagctcc cagggcaaac 900
 aggagcaaat cccgtgtatg gctctgtgtc caatgcagac ctgatggatt tcaaggtagg 960
 gccaggaaaag cggcatggtc tgggtgagg gggttgtgac attggcccag gcagcgagac 1020
 ttctccctt ccatcttct tttgtaaaga atttctgga ccgtttggag gacaagatgc 1080
 ctllagaaga tgaggctgtg cctcacaag tattaagtga gcagaatgaa gaagctgggg 1140
 cccctctcag cctctttca gaggtgctc cctgggatgg gggagggtca acgcagccca 1200
 gagagatggg ggcgcctcgc gacggggacc ctgggaatcc tccgagatct gtctctctga 1260

[0005]

```

agagcaagct gagggcactg ctactgccc ctgggagcct gcgagggtcc agtgcttcg 1320
ggggaaggat ggacaggatt ggagcccaga gtggattggg ctgcaacagc ttccgggtaa 1380
gaggacctga ggatggaagt gggatgggga ggaaggaaat tatggtttca ttgacattca 1440
atccttgcga aagaacacca cccgggaatg ccttcagtag gaaagggaca gcatagaagc 1500
aacccttta aaatttctgc cccaaactgg cggggagggg gttgtgctct gagtctcagg 1560
acaatgatac caacctcagc tacagttggc tgagaaaatg ctaagaaaaa aaaactttac 1620
tgccacgagc aatggggact taaattgttc atggggccaa atcacctgtg ctctgctggt 1680
tggtagtcca tgtcctttgc agaatcatca gattccaaag gattgaaatt gggcaggact 1740
gactttacta gctcctaacg ggcaattgtt ttaccagttt acagaagtca gagggtcac 1800
aggctggagt ggaggctggt ggaaggagg cagagtctga tgaagctgac tttccggig 1860
gagtcaggtc accaaaccaa acatgtctct gctctcttgt agtatcgaag ataacggcca 1920
gggaggagga aaaggcaggc caggccccag gcagtcttca agagaatccc ctggggtctc 1980
tcaactcaact ttgtcgcac  tggttgccat caagttgagt tgtgacaagt gttctattca 2040
agcatcagct tcctgtcaac atttctcaca ttttatgcta aatgtagaca aagtattta 2100
actgtggctt ctccacctct cccacctatg tgtttaagttt ttatcacctg ttaccaacat 2160
cagtttgaat atgaataaac ttcacaccat ggacagaaac agtaggc 2207
    
```

```

<210> 7
<211> 150
<212> PRT
<213> 猪

<300>
<308> NP_999425
<309> 2007-09-25
<313> (1)..(150)
    
```

```

<400> 7

Met Ser Ser Phe Thr Ile Thr Val Ser Phe Leu Leu Val Leu Val Phe
1           5           10          15

Gln Phe Pro Gly Gln Thr Arg Ala Asn Pro Val Tyr Gly Ser Val Ser
                20           25           30

Asn Ala Asp Leu Met Asp Phe Lys Asn Leu Leu Asp His Leu Glu Asp
                35           40           45

Lys Met Pro Leu Glu Asp Glu Ala Met Pro Pro Gln Val Leu Ser Glu
50           55           60

Gln Asn Glu Glu Val Gly Ala Pro Leu Ser Pro Leu Leu Glu Val Pro
65           70           75           80

Pro Trp Thr Gly Glu Val Asn Pro Ala Gln Arg Asp Gly Gly Ala Leu
85           90           95

Gly Arg Gly Pro Trp Asp Ala Ser Asp Arg Ser Ala Leu Leu Lys Ser
100          105          110

Lys Leu Arg Ala Leu Leu Ala Ala Pro Arg Ser Leu Arg Arg Ser Ser
    
```

[0006]

	115	120	125	
Cys Phe Gly Gly Arg Met Asp Arg Ile Gly Ala Gln Ser Gly Leu Gly				
130		135	140	
Cys Asn Ser Phe Arg Tyr				
145		150		
<210> 8				
<211> 474				
<212> DNA				
<213> 猪				
<300>				
<308> NM_214260				
<309> 2007-09-25				
<313> (1)..(474)				
<400> 8				
acgacgccag catgagctcc ttcacatca ccgtgagctt cctcctcgtt ctggtgtttc			60	
agttcccagg gcaaaccaga gcgaacctg tgtacggctc cgtgtccaat gcagacctga			120	
tggatttcaa gaatttgctg gaccacttgg aggacaagat gcctttagaa gatgaggcta			180	
tgccccaca agtactaagc gagcagaatg aggaagtggg ggcccccttc agccccctt			240	
tggaggtacc tccttgacc ggggagtgga acccagccca gagagatggg ggtgcccttg			300	
ggcggggccc ctgggacgt tccgatagat ctgcccttct gaagagcaag ctgagggcac			360	
tgcttgctgc ccctcggagc ctgcggaggt ccagctgctt cgggggtagg atggacagga			420	
ttggagcaca gagtggactg ggctgtaaca gcttccggta ctgaagataa cagc			474	
<210> 9				
<211> 152				
<212> PRT				
<213> 小鼠				
<300>				
<308> NP_032751				
<309> 2008-02-10				
<313> (1)..(152)				
<400> 9				
Met Gly Ser Phe Ser Ile Thr Leu Gly Phe Phe Leu Val Leu Ala Phe				
1	5	10	15	
Trp Leu Pro Gly His Ile Gly Ala Asn Pro Val Tyr Ser Ala Val Ser				
20	25	30		
Asn Thr Asp Leu Met Asp Phe Lys Asn Leu Leu Asp His Leu Glu Glu				
35	40	45		
Lys Met Pro Val Glu Asp Glu Val Met Pro Pro Gln Ala Leu Ser Glu				
50	55	60		
Gln Thr Glu Glu Ala Gly Ala Ala Leu Ser Ser Leu Pro Glu Val Pro				
65	70	75	80	
Pro Trp Thr Gly Glu Val Asn Pro Pro Leu Arg Asp Gly Ser Ala Leu				
85	90	95		

[0007]

Gly Arg Ser Pro Trp Asp Pro Ser Asp Arg Ser Ala Leu Leu Lys Ser
 100 105 110

Lys Leu Arg Ala Leu Leu Ala Gly Pro Arg Ser Leu Arg Arg Ser Ser
 115 120 125

Cys Phe Gly Gly Arg Ile Asp Arg Ile Gly Ala Gln Ser Gly Leu Gly
 130 135 140

Cys Asn Ser Phe Arg Tyr Arg Arg
 145 150

<210> 10
 <211> 844
 <212> DNA
 <213> 小鼠

<300>
 <308> NM_008725
 <309> 2008-02-10
 <313> (1)..(844)

<400> 10
 agtgacggac aaaagctgag agagagagag aaagaaacca gagtgggcag agacagcaaa 60
 catcagatcg tgccccgacc cagccagca tgggctcctt ctccatcacc ctgggcttct 120
 tctctgtctt ggcccttttg cttccagccc atattggagc aaatcctgtg tacagtgcgg 180
 tgtccaacac agatctgatg gatttcaaga acctgctaga ccacctggag gagaagatgc 240
 cggtagaaga tgaggatcatg cccccgcagg ccctgagtga gcagactgag gaagcagggg 300
 ccgcacttag ctccccccc gaggtgcctc cctggactgg ggaggtaaac ccacctctga 360
 gagacggcag tgctctaggg cgcagcccct gggacccctc cgatagatct gccctcttga 420
 aaagcaaac gagggctctg ctgcttgccc ctcgagcct acgaagatec agctgcttcg 480
 ggggtaggat tgacaggatt ggagcccaga gtggactagg ctgcaacagc ttccggtacc 540
 gaagataaca gcccaaggagg aaaaggcagt cgattctgct tgagcagatc gcaaaagatc 600
 ctaagccctt gtggtgtgtc acgcagcttg gtcacattgc cactgtggcg tggatgaacac 660
 cctctggag ctgcggcttc ctgccttcat ctatcacgat cgatgttaa tgtagatgag 720
 tggcttagtg gggctctgcc tctcccactc tgcatattaa ggtagatcct cacccttttc 780
 agaaaagcagt tggaaaaaaaa aaaaaagaat aaacttcagc accaaggacg aaaaaaaaaa 840
 aaaa 844

<210> 11
 <211> 149
 <212> PRT
 <213> 家犬

<300>
 <308> P07499 Uniprot
 <309> 2007-10-23
 <313> (1)..(149)

<400> 11
 Met Gly Ser Pro Ile Ala Ala Ser Phe Leu Leu Phe Leu Ala Val Gln
 1 5 10 15

Leu Leu Gly Gln Thr Gly Ala Asn Pro Val Tyr Gly Ser Val Ser Asn

[0008]

20	25	30
Ala Asp Leu Leu Asp Phe Lys Asn Leu Leu Asp Arg Leu Glu Asp Lys 35 40 45		
Met Pro Leu Glu Asp Glu Ala Glu Ser Pro Gln Ala Leu Ser Glu Gln 50 55 60		
Asn Ala Glu Ala Gly Ala Ala Leu Ser Pro Leu Pro Glu Val Pro Pro 65 70 75 80		
Trp Thr Gly Glu Val Ser Pro Ala Gln Arg Asp Gly Gly Ala Leu Gly 85 90 95		
Arg Ser Pro Trp Asp Ser Ser Asp Arg Ser Ala Leu Leu Lys Ser Lys 100 105 110		
Leu Arg Ala Leu Leu Ala Ala Pro Arg Ser Leu Arg Arg Ser Ser Cys 115 120 125		
Phe Gly Gly Arg Met Asp Arg Ile Gly Ala Gln Ser Gly Leu Gly Cys 130 135 140		

Asn Ser Phe Arg Tyr
145

<210> 12
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 智人

<300>
 <308> NP_006163
 <309> 2008-02-17
 <313> (16)..(25)

<400> 12

Ala Phe Gln Leu Leu Gly Gln Thr Arg Ala
1 5 10

<210> 13
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 智人

<300>
 <308> NM_006172
 <309> 2008-02-17
 <313> (140)..(169)

<400> 13
 gcattccagc tcttaggtca gaccagagct

30

<210> 14
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 智人

<300>
 <308> NP_006163
 <309> 2008-02-17
 <313> (1)..(25)

[0009]

<400> 14

Met Ser Ser Phe Ser Thr Thr Thr Val Ser Phe Leu Leu Leu Leu Ala
 1 5 10 15

Phe Gln Leu Leu Gly Gln Thr Arg Ala
 20 25

<210> 15

<211> 75

<212> DNA

<213> 智人

<300>

<308> NM_006172

<309> 2008-02-17

<313> (95)..(169)

<400> 15

atgagtcct tctccaccac caccgtgagc ttcctccttt tactggcatt ccagtccta 60

ggtcagacca gagct 75

<210> 16

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人

<300>

<308> NP_006163

<309> 2008-02-17

<313> (1)..(10)

<400> 16

Met Ser Ser Phe Ser Thr Thr Thr Val Ser
 1 5 10

<210> 17

<211> 30

<212> DNA

<213> 智人

<300>

<308> NM_006172

<309> 2008-02-17

<313> (95)..(124)

<400> 17

atgagtcct tctccaccac caccgtgagc 30

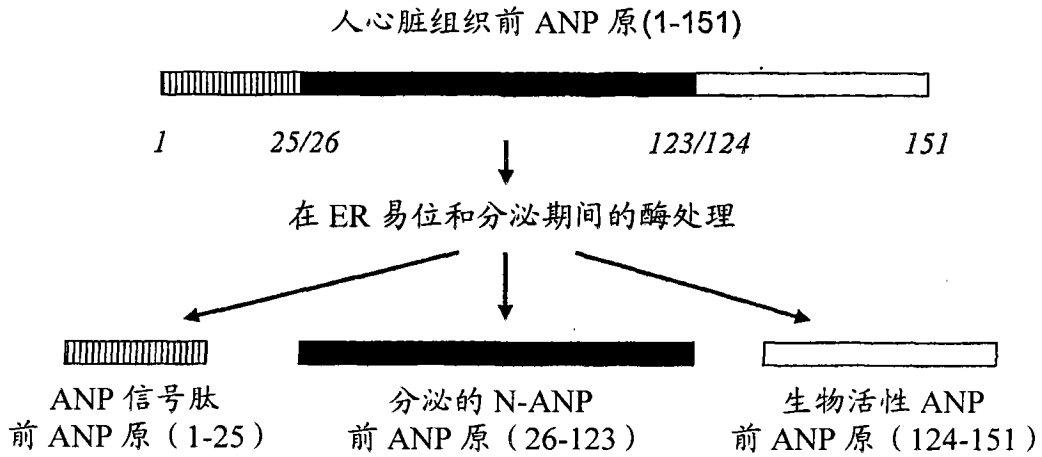


图 1

人/1-25	MSSFSTTTVSFLLLLAFQLLGQTRA
羊/1-24	-MGSSAITTSFLLLFVAFQLEPGQTGA
猪/1-24	-MSSFTITVSFLLVLFVQFFPGQTRA
狗/1-23	--MGSPIAASFLLFLAVQLLGQTGA
大鼠/1-24	-MGSFSITKGFLEFLAFWLPGHIGA
小鼠/1-24	-MGSFSITLGFLLVLAFWLPGHIGP
	. : . * : * : * : .

“*” 是指在列中的残基在所有比对的序列中是相同的。
 “.” 是指观察到保守取代。
 “:” 是指观测到半保守取代。

根据生理化学标准的残基分类

AVFPMILW	正常文本	小 (小 + 疏水的 (包括芳族 -Y))
DE	黑色	酸性
RHK	黑体	碱性
STYHCNGQ	斜体	羟基 + 胺 + 碱性 -Q

图 2A

人 (基因库登录号 NP_006163)
MSSFSTTVSFLLLAFQLLGGQTRANPMYNAVSNADLMDFNLLDHLEEKMPLEDEVVPPQVLSEPNEEAGAALSPLPEVPPWTGEVSPAQRDGGAL
LGRGPWDSDRSALLKSKLRALLTAPRSLRRSSCFGGRMDRIGAQSGLGCNSFRY

大鼠 (基因库登录号 NP_036744)
MGSFSITKGFLLFLAFWLPGHIGANPVYSVSNADLMDFNLLDHLEEKMPVEDEVMPQALSEQTDEAGAALSSLSEVPPWTGEVNPSPQRDGGAL
GRGPWDPSDRSALLKSKLRALLAGPRSLRRSSCFGGRIDRIGAQSGLGCNSFRYRR

羊 (基因库登录号 AAB92564)
MGSSAITTSFLLFVAFQLPGQTGANPVYGSVSNADLMDFNLLDRLEDKMPLEDEAVPSQVLSEQNEEAGAPLSPLESEVPPWDGGRSTQPREMGAP
SDGDPGNPPRSVLLKSKLRALLTAPRSLRRSSCFGGRMDRIGAQSGLGCNSFRYRR

猪 (基因库登录号 NP_999425)
MSSFITTVSFLLVLFQFPQTRANPVYGSVSNADLMDFNLLDHLEDKMPLEDEAMPQVLSEQNEEVGAPLSPLESEVPPWTGEVNPAPQRDGGAL
GRGPWDASDRSALLKSKLRALLAAPRSLRRSSCFGGRMDRIGAQSGLGCNSFRY

小鼠 (基因库登录号 NP_032751)
MGSFSITLIGFFLVLAFWLPGHIGANPVYSVSNADLMDFNLLDHLEEKMPVEDEVMPQALSEQTEEAGAALSSLPEVPPWTGEVNPPLRDGSAL
GRSPWDPSDRSALLKSKLRALLAGPRSLRRSSCFGGRIDRIGAQSGLGCNSFRYRR

狗 (基因库登录号 XP_850357)
MGSPIAASFLLFLAVQLLGGQTRANPVYGSVSNADLMDFNLLDRLEDKMPLEDEAESQALSEQNAEAGAALSPLPEVPPWTGEVSPAQRDGGALG
RS.PWDSSDRSALLKSKLRALLAAPRSLRRSSCFGGRMDRIGAQSGLGCNSFRY

图 2B

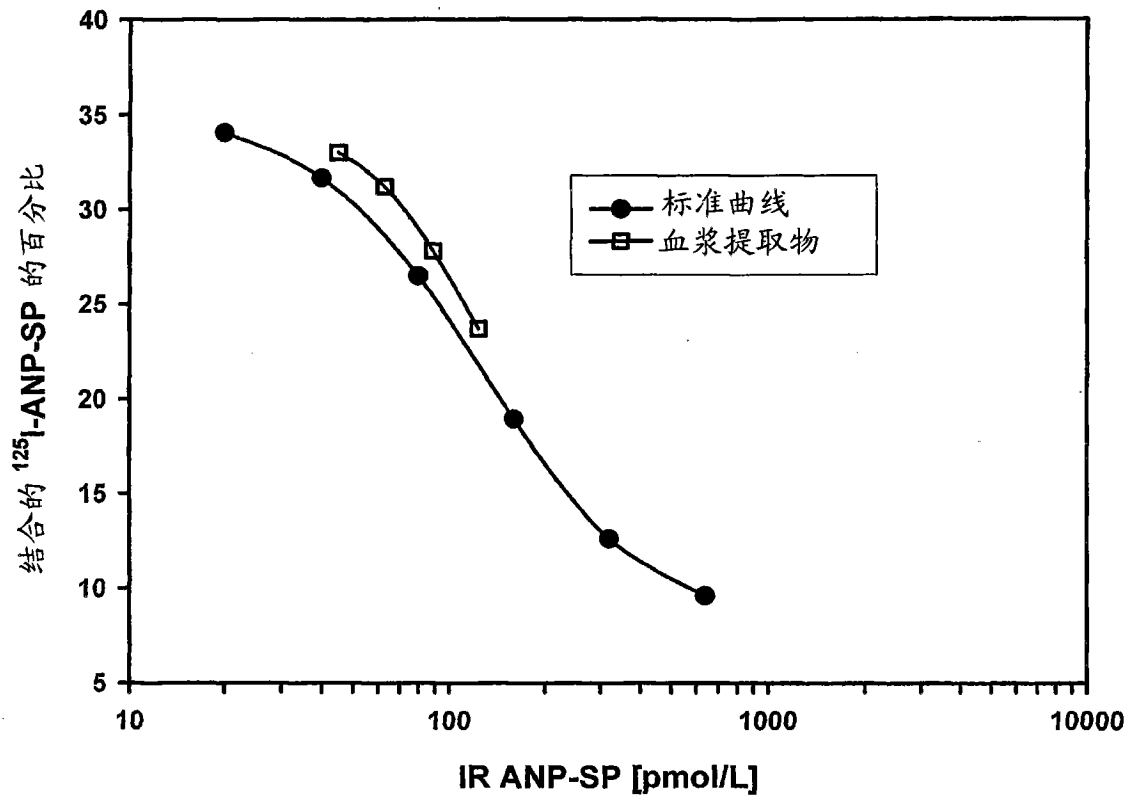


图 3

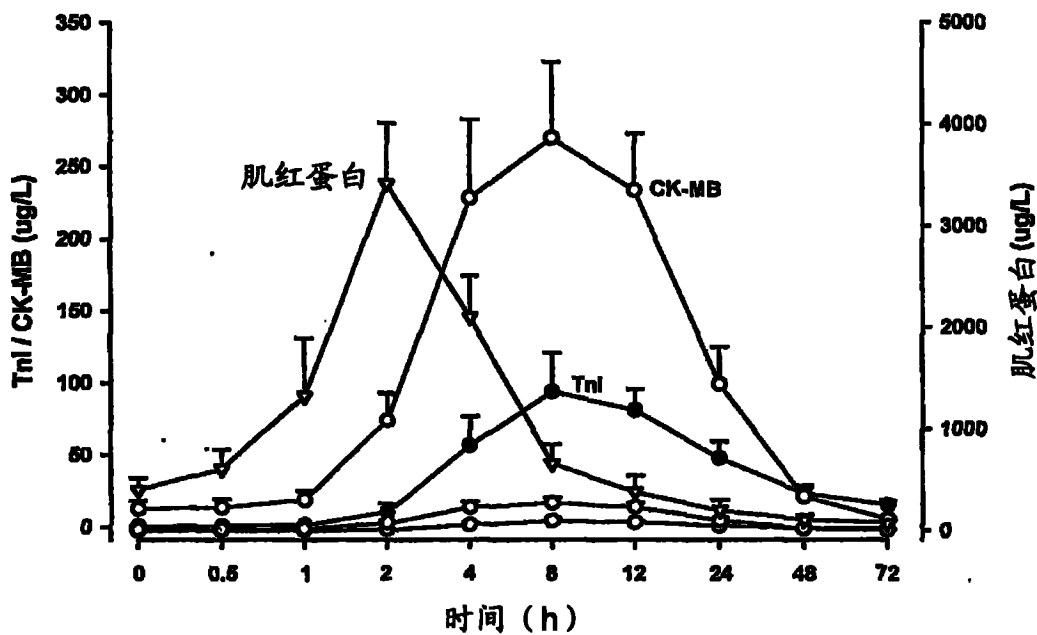
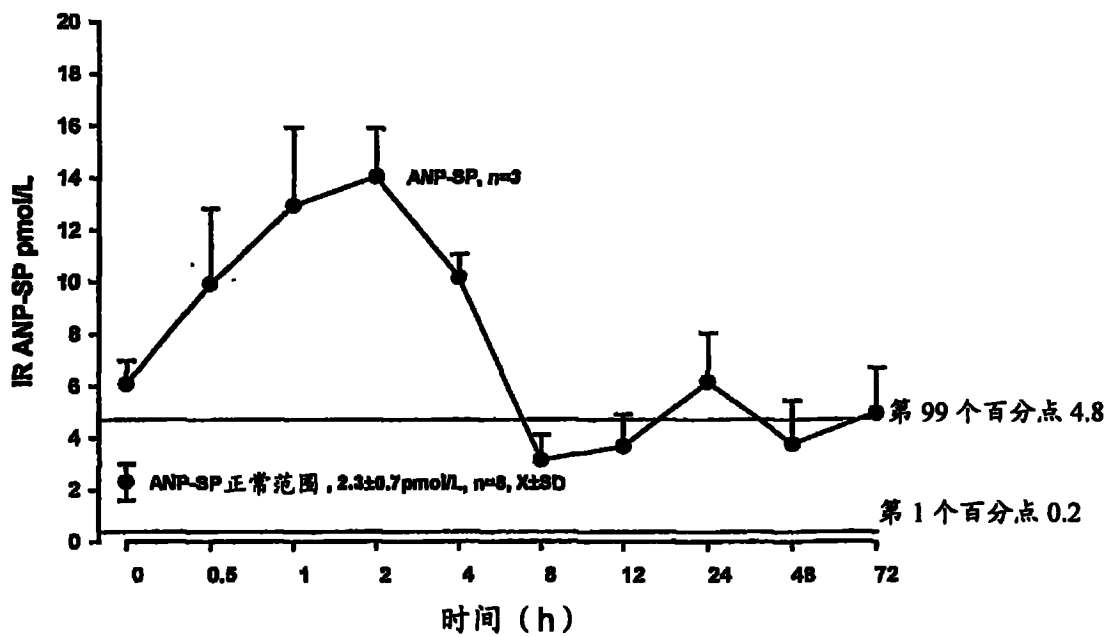


图 4A

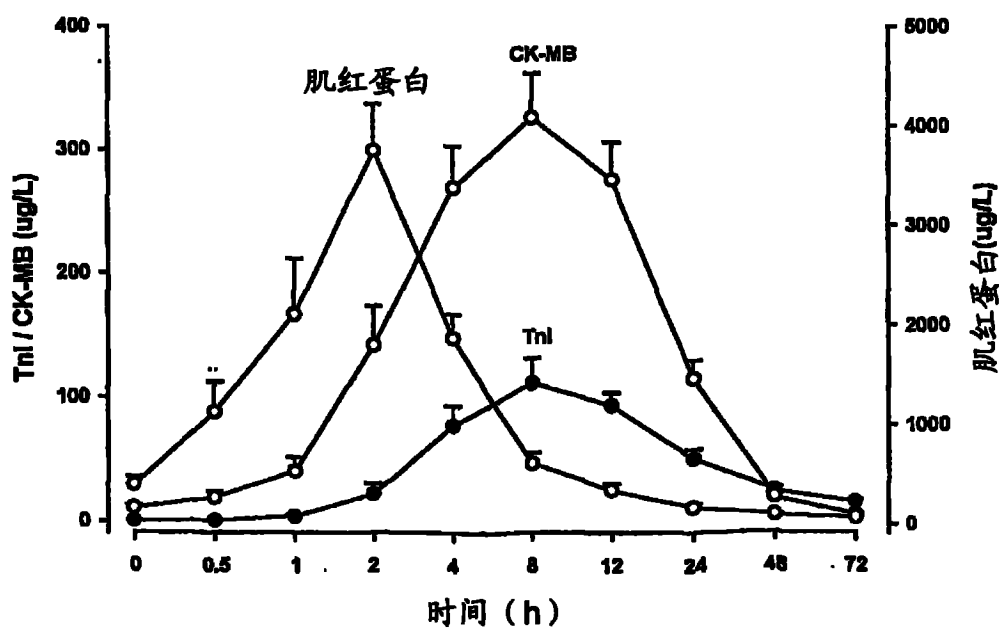
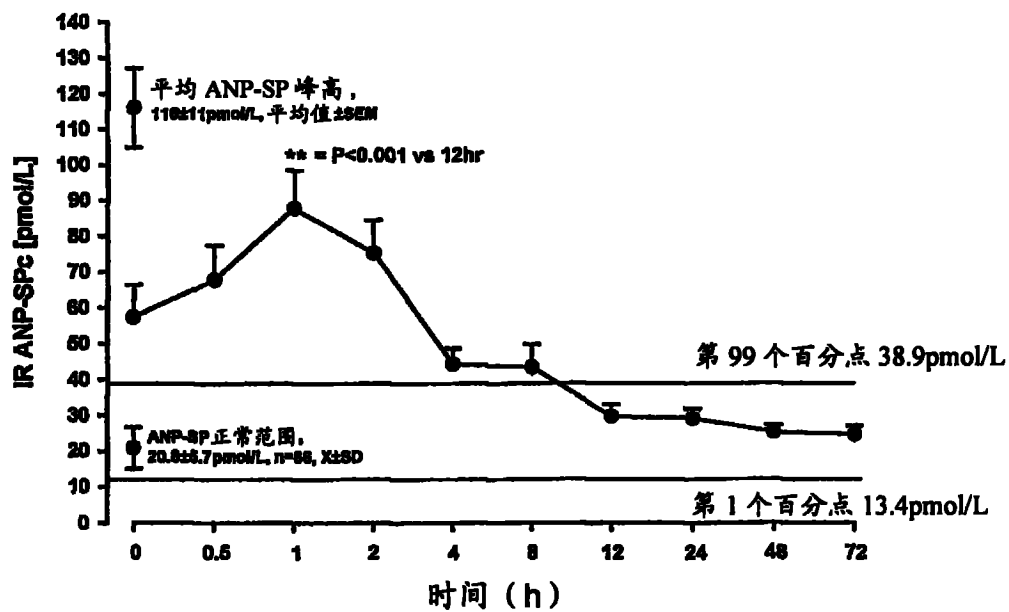


图 4B

<u>肽</u>	<u>与 ANP-SP 抗血清的交叉反应性 (%)</u>
ANP-SPc(16-25)	100
BNP-SPc(17-26)	<0.001
BNP-SPn(1-10)	<0.001
ANP-SPn(1-10)	<0.001
氯吡格雷	0
吗啡	0
阿司匹林	0
BNP 原(1-13)	<0.003
BNP 原(1-76)	<0.01
ANP 原(1-30)	<0.009
ANP	<0.008
BNP	<0.009
内皮素 1	<0.006
血管紧张素 II	<0.003
血管紧张素(1-7)	<0.01
尾加压素 II	<0.003
CNP	<0.006
CNP 原(1-15)	<0.008
肾上腺髓质素	<0.01
尿促皮素 I	<0.01
尿促皮素 II	<0.01

图 5

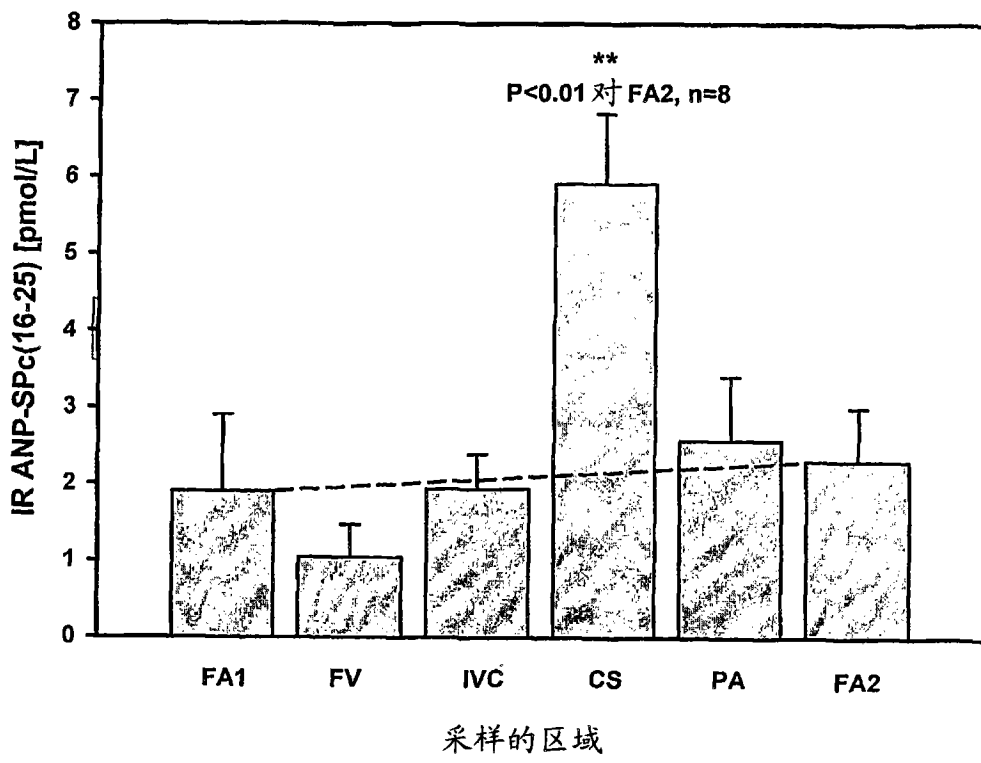


图 6