



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102712956 A

(43) 申请公布日 2012. 10. 03

(21) 申请号 201080060553. 6

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2010. 10. 29

C12Q 1/68 (2006. 01)

(30) 优先权数据

61/256, 717 2009. 10. 30 US

61/264, 588 2009. 11. 25 US

61/326, 176 2010. 04. 20 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 06. 29

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2010/054810 2010. 10. 29

(87) PCT申请的公布数据

W02011/053831 EN 2011. 05. 05

(71) 申请人 普罗米修斯实验室股份有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 H·龚 S·L·王 S·辛格

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 余颖

权利要求书 9 页 说明书 96 页 附图 29 页

(54) 发明名称

肠易激综合征的诊断方法

(57) 摘要

本发明提供对 IBS 进行诊断、预后和亚型分析的新型生物标记物、试剂盒和方法。还提供了通过检测本文所鉴定新型 IBS 生物标记物的血清水平来帮助诊断肠易激综合征的方法。

1. 一种帮助诊断对象中肠易激综合征 (IBS) 的方法,所述方法包括:

(a) 将来自对象的血液或血清样品与 IBS 标记物结合部分接触,接触条件适于将样品内存在的 IBS 标记物转化成含所述 IBS 标记物和所述 IBS 标记物结合部分的复合物;以及

(b) 确定所述复合物的水平,从而确定所述样品中存在的所述 IBS 标记物的水平或浓度,

其中所述 IBS 标记物选自下组:糖缺失转铁蛋白,尿皮素,促肾上腺皮质素释放激素结合蛋白,皮质醇,促肾上腺皮质激素,P 物质,神经生长因子,神经激肽 A,神经激肽 B,血管活性肠肽,胰高血糖素样肽 2,促胃动素,垂体腺苷酸环化酶激活肽,5-羟色胺,色氨酸,5-羟色胺 O-硫酸盐,5-羟吲哚乙酸,5-HT 葡萄糖苷酸,酪氨酸,苯丙氨酸,UDP-葡萄糖醛酸基转移酶 1-6,5-羟色胺再摄取转运体,色氨酸羟化酶 1,单胺氧化酶 A,单胺氧化酶 B,和羟色氨酸(5-羟色胺)受体 3A。

2. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述方法还包括:

(c) 将所述样品中存在的 IBS 标记物的水平或浓度与对照水平或浓度作比较,其中所述样品中存在的 IBS 标记物的水平或浓度相对所述对照水平或浓度的差异表明所述对象患有 IBS 的可能性提高。

3. 如权利要求 2 所述的方法,其特征在于,所述对照水平或浓度是健康对象的血液或血清样品中存在的所述 IBS 标记物的水平或浓度。

4. 如权利要求 3 所述的方法,其特征在于,所述样品中存在的所述 IBS 标记物水平或浓度相对于所述对照水平或浓度提高表明所述对象患有 IBS 的可能性提高。

5. 如权利要求 3 所述的方法,其特征在于,所述样品中存在的所述 IBS 标记物水平或浓度与所述对照水平或浓度相同或降低表明所述对象不患有 IBS 的可能性提高。

6. 如权利要求 2 所述的方法,其特征在于,所述对照水平或浓度是患有 IBS 对象的血液或血清样品中存在的所述 IBS 标记物水平或浓度。

7. 如权利要求 6 所述的方法,其特征在于,所述样品中存在的所述 IBS 标记物水平或浓度与所述对照水平或浓度相同或提高表明所述对象患有 IBS 的可能性提高。

8. 如权利要求 6 所述的方法,其特征在于,所述样品中存在的所述 IBS 标记物水平或浓度相对于所述对照水平或浓度降低表明所述对象不患有 IBS 的可能性提高。

9. 如权利要求 1-8 中任一项所述的方法,其特征在于,所述 IBS 标记物是糖缺失转铁蛋白。

10. 如权利要求 1-8 中任一项所述的方法,其特征在于,所述 IBS 标记物是尿皮素。

11. 如权利要求 1-8 中任一项所述的方法,其特征在于,所述 IBS 标记物是促肾上腺皮质素释放激素结合蛋白。

12. 如权利要求 1-8 中任一项所述的方法,其特征在于,所述 IBS 标记物是皮质醇。

13. 如权利要求 1-8 中任一项所述的方法,其特征在于,所述 IBS 标记物是促肾上腺皮质激素。

14. 如权利要求 1-8 中任一项所述的方法,其特征在于,所述 IBS 标记物是 P 物质。

15. 如权利要求 1-8 中任一项所述的方法,其特征在于,所述 IBS 标记物是神经生长因子。

16. 如权利要求 1-8 中任一项所述的方法,其特征在于,所述 IBS 标记物是神经激肽 A。

17. 如权利要求 1-8 中任一项所述的方法,其特征在于,所述 IBS 标记物是神经激肽 B。
18. 如权利要求 1-8 中任一项所述的方法,其特征在于,所述 IBS 标记物是血管活性肠肽。
19. 如权利要求 1-8 中任一项所述的方法,其特征在于,所述 IBS 标记物是胰高血糖素样肽 2。
20. 如权利要求 1-8 中任一项所述的方法,其特征在于,所述 IBS 标记物是促胃动素。
21. 如权利要求 1-8 中任一项所述的方法,其特征在于,所述 IBS 标记物是垂体腺苷酸环化酶激活肽。
22. 如权利要求 1-8 中任一项所述的方法,其特征在于,所述 IBS 标记物是 5-羟色胺。
23. 如权利要求 1-8 中任一项所述的方法,其特征在于,所述 IBS 标记物是色氨酸。
24. 如权利要求 1-8 中任一项所述的方法,其特征在于,所述 IBS 标记物是 5-羟色胺 0-硫酸盐。
25. 如权利要求 1-8 中任一项所述的方法,其特征在于,所述 IBS 标记物是 5-羟基吲哚乙酸。
26. 如权利要求 1-8 中任一项所述的方法,其特征在于,所述 IBS 标记物是 5-HT 葡萄糖苷酸。
27. 如权利要求 1-8 中任一项所述的方法,其特征在于,所述 IBS 标记物是酪氨酸。
28. 如权利要求 1-8 中任一项所述的方法,其特征在于,所述 IBS 标记物是苯丙氨酸。
29. 如权利要求 1-8 中任一项所述的方法,其特征在于,所述 IBS 标记物是 UDP-葡萄糖醛酸基转移酶 1-6。
30. 如权利要求 1-8 中任一项所述的方法,其特征在于,所述 IBS 标记物是 5-羟色胺再摄取转运体。
31. 如权利要求 1-8 中任一项所述的方法,其特征在于,所述 IBS 标记物是色氨酸羟化酶 -1。
32. 如权利要求 1-8 中任一项所述的方法,其特征在于,所述 IBS 标记物是单胺氧化酶 A。
33. 如权利要求 1-8 中任一项所述的方法,其特征在于,所述 IBS 标记物是单胺氧化酶 B。
34. 如权利要求 1-8 中任一项所述的方法,其特征在于,所述 IBS 标记物是羟色氨酸(5-羟色胺)受体 3A。
35. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其特征在于,所述对象怀疑患有 IBS。
36. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其特征在于,所述结合部分包含抗体。
37. 如权利要求 36 所述的方法,其特征在于,所述方法是酶联免疫吸附试验 (ELISA)。
38. 如权利要求 37 所述的方法,其特征在于,所述 ELISA 是夹心 ELISA。
39. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其特征在于,所述方法还包括确定来自所述对象的生物样品中至少一种额外生物标记物的水平或浓度,所述生物标记物选自脑源性神经营养因子 (BDNF),中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (NGAL),TNF 相关弱凋亡诱导因子 (TWEAK),生长相关癌基因 α (GRO- α),白介素 -1 β (IL-1 β),金属蛋白酶组织抑制剂 -1 (TIMP-1),抗酿酒酵母抗体 (ASCA-IgA),抗 CBir-1 抗体 (CBir1),抗人嗜中性粒细胞胞

质抗体 (ANCA), 抗人组织转氨酶 IgA (tTG), 组胺, β -类胰蛋白酶, 前列腺素 E_2 (PGE₂), 及其组合。

40. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其特征在于, 所述方法还包括:

(d) 确定对象的症状概况, 其中所述症状概况通过鉴定所述对象中至少一种症状的存在或严重度来确定; 和

(e) 利用基于 IBS 生物标记物水平和所述症状概况的算法将所述对象诊断为患有 IBS 或不患有 IBS。

41. 如权利要求 40 所述的方法, 其特征在于, 所述至少一种症状选自下组: 胸痛、胸部不适、胃灼热、常规量餐后不适饱胀感, 不能完成常规量用餐, 腹痛, 腹部不适, 便秘, 腹泻, 胀气, 腹胀, 与疼痛或不适相关的消极想法或负面感觉, 及其组合。

42. 如权利要求 40 所述的方法, 其特征在于, 所述至少一种症状的存在或严重度采用问卷鉴定。

43. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其特征在于, 所述方法包括使用基于 IBS 生物标记物水平的算法。

44. 如权利要求 43 所述的方法, 其特征在于, 所述算法还基于系统概况。

45. 如权利要求 43 或 44 所述的方法, 其特征在于, 所述统计算法包括学习型统计分类系统。

46. 如权利要求 45 所述的方法, 其特征在于, 所述统计算法包括至少 2 种学习型统计分类系统的组合。

47. 如权利要求 46 所述的方法, 其特征在于, 所述至少 2 种学习统计分类系统的组合包括随机森林分类器和神经网络分类器。

48. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其特征在于, 所述方法还包括提供所述对象患有 IBS 的概率。

49. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其特征在于, 所述方法还包括将 IBS 的诊断分类为 IBS-便秘型 (IBS-C), IBS-腹泻型 (IBS-D), IBS-混合型 (IBS-M), IBS-交替型 (IBS-A), 或感染后 IBS (IBS-PI)。

50. 如权利要求 40-49 中任一项所述的方法, 其特征在于, 所述方法还包括将不患有 IBS 的对象诊断为患有 IBD、不患有 IBD 或是健康对象。

51. 一种监控对象中肠易激综合征 (IBS) 进展或消退的方法, 所述方法包括:

(a) 将在第一时间取自对象的第一血液或血清样品与 IBS 标记物结合部分接触, 接触条件适于将样品内存在的 IBS 标记物转化成含所述 IBS 标记物和所述 IBS 标记物结合部分的复合物;

(b) 确定所述复合物的水平, 从而确定所述第一样品中存在的所述 IBS 标记物的水平,

(c) 将在第二时间取自对象的第二血液或血清样品与 IBS 标记物结合部分接触, 接触条件适于将样品内存在的 IBS 标记物转化成含所述 IBS 标记物和所述 IBS 标记物结合部分的复合物;

(d) 确定所述复合物的水平, 从而确定所述第二样品中存在的所述 IBS 标记物的水平; 以及

(e) 比较第一样品中存在的所述 IBS 标记物水平和所述第二样品中存在的所述 IBS 标

记物水平,

其中,第二样品中的所述 IBS 标记物水平高于第一样品中表明所述对象中 IBS 的进展,而第二样品中的所述 IBS 标记物水平低于第一样品中表明所述对象中 IBS 的消退,和

其中所述 IBS 标记物选自下组:糖缺失转铁蛋白,尿皮素,促肾上腺皮质素释放激素结合蛋白,皮质醇,促肾上腺皮质激素,P 物质,神经生长因子,神经激肽 A,神经激肽 B,血管活性肠肽,胰高血糖素样肽 2,促胃动素,垂体腺苷酸环化酶激活肽,5-羟色胺,色氨酸,5-羟色胺 0-硫酸盐,5-羟吲哚乙酸,5-HT 葡萄糖苷酸,酪氨酸,苯丙氨酸,UDP-葡萄糖醛酸基转移酶 1-6,5-羟色胺再摄取转运体,色氨酸羟化酶 1,单胺氧化酶 A,单胺氧化酶 B,和羟色氨酸(5-羟色胺)受体 3A。

52. 如权利要求 51 所述的方法,其特征在于,所述 IBS 标记物是糖缺失转铁蛋白。

53. 如权利要求 51 所述的方法,其特征在于,所述 IBS 标记物是尿皮素。

54. 如权利要求 51 所述的方法,其特征在于,所述 IBS 标记物是促肾上腺皮质素释放激素结合蛋白。

55. 如权利要求 51 所述的方法,其特征在于,所述 IBS 标记物是皮质醇。

56. 如权利要求 51 所述的方法,其特征在于,所述 IBS 标记物是促肾上腺皮质激素。

57. 如权利要求 51 所述的方法,其特征在于,所述 IBS 标记物是 P 物质。

58. 如权利要求 51 所述的方法,其特征在于,所述 IBS 标记物是神经生长因子。

59. 如权利要求 51 所述的方法,其特征在于,所述 IBS 标记物是神经激肽 A。

60. 如权利要求 51 所述的方法,其特征在于,所述 IBS 标记物是神经激肽 B。

61. 如权利要求 51 所述的方法,其特征在于,所述 IBS 标记物是血管活性肠肽。

62. 如权利要求 51 所述的方法,其特征在于,所述 IBS 标记物是胰高血糖素样肽 2。

63. 如权利要求 51 所述的方法,其特征在于,所述 IBS 标记物是促胃动素。

64. 如权利要求 51 所述的方法,其特征在于,所述 IBS 标记物是垂体腺苷酸环化酶激活肽。

65. 如权利要求 51 所述的方法,其特征在于,所述 IBS 标记物是 5-羟色胺。

66. 如权利要求 51 所述的方法,其特征在于,所述 IBS 标记物是色氨酸。

67. 如权利要求 51 所述的方法,其特征在于,所述 IBS 标记物是 5-羟色胺 0-硫酸盐。

68. 如权利要求 51 所述的方法,其特征在于,所述 IBS 标记物是 5-羟基吲哚乙酸。

69. 如权利要求 51 所述的方法,其特征在于,所述 IBS 标记物是 5-HT 葡萄糖苷酸。

70. 如权利要求 51 所述的方法,其特征在于,所述 IBS 标记物是酪氨酸。

71. 如权利要求 51 所述的方法,其特征在于,所述 IBS 标记物是苯丙氨酸。

72. 如权利要求 51 所述的方法,其特征在于,所述 IBS 标记物是 UDP-葡萄糖醛酸基转移酶 1-6。

73. 如权利要求 51 所述的方法,其特征在于,所述 IBS 标记物是 5-羟色胺再摄取转运体。

74. 如权利要求 51 所述的方法,其特征在于,所述 IBS 标记物是色氨酸羟化酶 1。

75. 如权利要求 51 所述的方法,其特征在于,所述 IBS 标记物是单胺氧化酶 A。

76. 如权利要求 51 所述的方法,其特征在于,所述 IBS 标记物是单胺氧化酶 B。

77. 如权利要求 51 所述的方法,其特征在于,所述 IBS 标记物是羟色氨酸(5-羟色胺)

受体 3A。

78. 如权利要求 51-77 中任一项所述的方法,其特征在于,所述结合部分包含抗体。

79. 如权利要求 78 所述的方法,其特征在于,所述方法是酶联免疫吸附试验 (ELISA)。

80. 如权利要求 79 所述的方法,其特征在于,所述 ELISA 是夹心 ELISA。

81. 如权利要求 51-80 中任一项所述的方法,其特征在于,所述方法还包括确定来自所述对象的生物样品中至少一种额外生物标记物的水平,所述生物标记物选自脑源性神经营养因子 (BDNF),中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (NGAL),TNF 相关弱凋亡诱导因子 (TWEAK),生长相关癌基因 α (GRO- α),白介素 -1β (IL- 1β),金属蛋白酶组织抑制剂-1 (TIMP-1),抗酿酒酵母抗体 (ASCA-IgA),抗 CBir-1 抗体 (CBir1),抗人嗜中性粒细胞胞质抗体 (ANCA),抗人组织转氨酶 IgA (tTG),组胺, β -类胰蛋白酶,前列腺素 E_2 (PGE $_2$),及其组合。

82. 如权利要求 51 所述的方法,其特征在于,所述方法还包括确定对象症状概况,其中所述症状概况通过鉴定所述对象中至少一种症状的存在或严重度来确定。

83. 如权利要求 82 所述的方法,其特征在于,所述至少一种症状选自下组:胸痛、胸部不适、胃灼热、常规量餐后不适饱胀感,不能完成常规量用餐,腹痛,腹部不适,便秘,腹泻,胀气,腹胀,与疼痛或不适相关的消极想法或负面感觉,及其组合。

84. 如权利要求 51-83 中任一项所述的方法,其特征在于,所述方法包括使用基于 IBS 生物标记物水平的算法。

85. 如权利要求 84 所述的方法,其特征在于,所述算法还基于系统概况。

86. 如权利要求 84 或 85 所述的方法,其特征在于,所述算法包括统计算法。

87. 如权利要求 86 所述的方法,其特征在于,所述统计算法包括学习型统计分类系统。

88. 如权利要求 87 所述的方法,其特征在于,所述统计算法包括至少 2 种学习型统计分类系统的组合。

89. 如权利要求 88 所述的方法,其特征在于,所述至少 2 种学习统计分类系统的组合包括随机森林分类器和神经网络分类器。

90. 如权利要求 51-89 中任一项所述的方法,其特征在于,所述方法包括监控接受肠易激综合征 (IBS) 治疗用药的对象中的药物功效。

91. 一种计算机可读介质,所述介质包含用于控制一个或多个处理器的代码以将来自对象的血清或血液样品分类为是否与肠易激综合征 (IBS) 关联,所述代码包含:

对含诊断标记物概况的数据集应用统计方法以产生统计衍生决定的指令,所述决定基于所述诊断标记物概况将所述样品分类为 IBS 样品或非 IBS 样品,

其中所述诊断标记物概况表明至少一种选自下组的诊断性 IBS 标记物的水平:糖缺失转铁蛋白,尿皮素,促肾上腺皮质素释放激素结合蛋白,皮质醇,促肾上腺皮质激素,P 物质,神经生长因子,神经激肽 A,神经激肽 B,血管活性肠肽,胰高血糖素样肽 2,促胃动素,垂体腺苷酸环化酶激活肽,5-羟色胺,色氨酸,5-羟色胺 0-硫酸盐,5-羟吲哚乙酸,5-HT 葡萄糖苷酸,酪氨酸,苯丙氨酸,UDP-葡萄糖醛酸基转移酶 1-6,5-羟色胺再摄取转运体,色氨酸羟化酶 1,单胺氧化酶 A,单胺氧化酶 B,和羟色氨酸 (5-羟色胺) 受体 3A。

92. 如权利要求 91 所述的计算机可读介质,其特征在于,所述 IBS 标记物是糖缺失转铁蛋白。

93. 如权利要求 91 所述的计算机可读介质,其特征在于,所述 IBS 标记物是尿皮素。
94. 如权利要求 91 所述的计算机可读介质,其特征在于,所述 IBS 标记物是促肾上腺皮质素释放激素结合蛋白。
95. 如权利要求 91 所述的计算机可读介质,其特征在于,所述 IBS 标记物是皮质醇。
96. 如权利要求 91 所述的计算机可读介质,其特征在于,所述 IBS 标记物是促肾上腺皮质激素。
97. 如权利要求 91 所述的计算机可读介质,其特征在于,所述 IBS 标记物是 P 物质。
98. 如权利要求 91 所述的计算机可读介质,其特征在于,所述 IBS 标记物是神经生长因子。
99. 如权利要求 91 所述的计算机可读介质,其特征在于,所述 IBS 标记物是神经激肽 A。
100. 如权利要求 91 所述的计算机可读介质,其特征在于,所述 IBS 标记物是神经激肽 B。
101. 如权利要求 91 所述的计算机可读介质,其特征在于,所述 IBS 标记物是血管活性肠肽。
102. 如权利要求 91 所述的计算机可读介质,其特征在于,所述 IBS 标记物是胰高血糖素样肽 2。
103. 如权利要求 91 所述的计算机可读介质,其特征在于,所述 IBS 标记物是促胃动素。
104. 如权利要求 91 所述的计算机可读介质,其特征在于,所述 IBS 标记物是垂体腺苷酸环化酶激活肽。
105. 如权利要求 91 所述的计算机可读介质,其特征在于,所述 IBS 标记物是 5-羟色胺。
106. 如权利要求 91 所述的计算机可读介质,其特征在于,所述 IBS 标记物是色氨酸。
107. 如权利要求 91 所述的计算机可读介质,其特征在于,所述 IBS 标记物是 5-羟色胺 0-硫酸盐。
108. 如权利要求 91 所述的计算机可读介质,其特征在于,所述 IBS 标记物是 5-羟基吲哚乙酸。
109. 如权利要求 91 所述的计算机可读介质,其特征在于,所述 IBS 标记物是 5-HT 葡萄糖苷酸。
110. 如权利要求 91 所述的计算机可读介质,其特征在于,所述 IBS 标记物是酪氨酸。
111. 如权利要求 91 所述的计算机可读介质,其特征在于,所述 IBS 标记物是苯丙氨酸。
112. 如权利要求 91 所述的计算机可读介质,其特征在于,所述 IBS 标记物是 UDP-葡萄糖醛酸基转移酶 1-6。
113. 如权利要求 91 所述的计算机可读介质,其特征在于,所述 IBS 标记物是 5-羟色胺再摄取转运体。
114. 如权利要求 91 所述的计算机可读介质,其特征在于,所述 IBS 标记物是色氨酸羟化酶 1。
115. 如权利要求 91 所述的计算机可读介质,其特征在于,所述 IBS 标记物是单胺氧化酶 A。

116. 如权利要求 91 所述的计算机可读介质,其特征在于,所述 IBS 标记物是单胺氧化酶 B。

117. 如权利要求 91 所述的计算机可读介质,其特征在于,所述 IBS 标记物是羟色氨酸(5-羟色胺)受体 3A。

118. 如权利要求 91-117 中任一项所述的计算机可读介质,其特征在于,所述诊断标记物概况表明来自所述对象的生物样品中至少一种额外诊断标记物的水平,所述额外生物标记物选自脑源性神经营养因子(BDNF),中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL),TNF 相关弱凋亡诱导因子(TWEAK),生长相关癌基因 α (GRO- α),白介素-1 β (IL-1 β),金属蛋白酶组织抑制剂-1(TIMP-1),抗酿酒酵母抗体(ASCA-IgA),抗CBir-1抗体(CBir1),抗人嗜中性粒细胞胞质抗体(ANCA),抗人组织转氨酶 IgA(tTG),组胺, β -类胰蛋白酶,前列腺素 E₂(PGE₂),及其组合。

119. 如权利要求 91-118 中任一项所述的计算机可读介质,其特征在于,所述计算机可读介质包括对数据集应用统计方法以产生统计学衍生决定的指令,所述数据集包含诊断标记物概况并联合有表明所述对象中至少一种症状存在或严重度的症状概况,所述决定基于所述诊断标记物概况和所述症状概况将所述样品分类为 IBS 样品或非 IBS 样品。

120. 如权利要求 119 所述的计算机可读介质,其特征在于,所述统计方法包括单个学习型统计分类系统。

121. 如权利要求 120 所述的计算机可读介质,其特征在于,所述统计方法包括至少 2 种学习型统计分类系统的组合。

122. 如权利要求 121 所述的计算机可读介质,其特征在于,所述至少 2 种学习型统计分类系统的组合包括随机森林分类器和神经网络分类器。

123. 一种用于将来自对象的血清或血液样品分类为是否与肠易激综合征(IFS)相关的系统,所述系统包括:

(a) 数据采集模块,其配置为产生含有诊断标记物概况的数据集,其中所述诊断标记物概况表明至少一种选自下组的诊断性 IBS 标记物的存在或水平:糖缺失转铁蛋白,尿皮素,促肾上腺皮质素释放激素结合蛋白,皮质醇,促肾上腺皮质激素,P 物质,神经生长因子,神经激肽 A,神经激肽 B,血管活性肠肽,胰高血糖素样肽 2,促胃动素,垂体腺苷酸环化酶激活肽,5-羟色胺,色氨酸,5-羟色胺 O-硫酸盐,5-羟吲哚乙酸,5-HT 葡萄糖苷酸,酪氨酸,苯丙氨酸,UDP-葡萄糖醛酸基转移酶 1-6,5-羟色胺重摄取载体,色氨酸羟化酶 1,单胺氧化酶 A,单胺氧化酶 B,和羟色氨酸(5-羟色胺)受体 3A;

(b) 数据处理模块,其配置为通过对所述数据集应用统计方法来处理数据集以产生统计衍生决定,所述决定根据所述诊断标记物概况将样品分类为 IBS 样品或非 IBS 样品;以及

(c) 显示模块,其配置为显示所述统计衍生决定。

124. 如权利要求 123 所述的系统,其特征在于,所述 IBS 标记物是糖缺失转铁蛋白。

125. 如权利要求 123 所述的系统,其特征在于,所述 IBS 标记物是尿皮素。

126. 如权利要求 123 所述的系统,其特征在于,所述 IBS 标记物是促肾上腺皮质素释放激素结合蛋白。

127. 如权利要求 123 所述的系统,其特征在于,所述 IBS 标记物是皮质醇。

128. 如权利要求 123 所述的系统,其特征在于,所述 IBS 标记物是促肾上腺皮质激素。

129. 如权利要求 123 所述的系统,其特征在于,所述 IBS 标记物是 P 物质。
130. 如权利要求 123 所述的系统,其特征在于,所述 IBS 标记物是神经生长因子。
131. 如权利要求 123 所述的系统,其特征在于,所述 IBS 标记物是神经激肽 A。
132. 如权利要求 123 所述的系统,其特征在于,所述 IBS 标记物是神经激肽 B。
133. 如权利要求 123 所述的系统,其特征在于,所述 IBS 标记物是血管活性肠肽。
134. 如权利要求 123 所述的系统,其特征在于,所述 IBS 标记物是胰高血糖素样肽 2。
135. 如权利要求 123 所述的系统,其特征在于,所述 IBS 标记物是促胃动素。
136. 如权利要求 123 所述的系统,其特征在于,所述 IBS 标记物是垂体腺苷酸环化酶激活肽。
137. 如权利要求 123 所述的系统,其特征在于,所述 IBS 标记物是 5- 羟色胺。
138. 如权利要求 123 所述的系统,其特征在于,所述 IBS 标记物是色氨酸。
139. 如权利要求 123 所述的系统,其特征在于,所述 IBS 标记物是 5- 羟色胺 O- 硫酸盐。
140. 如权利要求 123 所述的系统,其特征在于,所述 IBS 标记物是 5- 羟基吲哚乙酸。
141. 如权利要求 123 所述的系统,其特征在于,所述 IBS 标记物是 5-HT 葡萄糖苷酸。
142. 如权利要求 123 所述的系统,其特征在于,所述 IBS 标记物是酪氨酸。
143. 如权利要求 123 所述的系统,其特征在于,所述 IBS 标记物是苯丙氨酸。
144. 如权利要求 123 所述的系统,其特征在于,所述 IBS 标记物是 UDP- 葡萄糖醛酸基转移酶 1-6。
145. 如权利要求 123 所述的系统,其特征在于,所述 IBS 标记物是 5- 羟色胺再摄取转运体。
146. 如权利要求 123 所述的系统,其特征在于,所述 IBS 标记物是色氨酸羟化酶 1。
147. 如权利要求 123 所述的系统,其特征在于,所述 IBS 标记物是单胺氧化酶 A。
148. 如权利要求 123 所述的系统,其特征在于,所述 IBS 标记物是单胺氧化酶 B。
149. 如权利要求 123 所述的系统,其特征在于,所述 IBS 标记物是羟色氨酸 (5- 羟色胺) 受体 3A。
150. 如权利要求 123-149 中任一项所述的系统,其特征在于,所述诊断标记物概况表明来自所述对象的生物样品中至少一种额外诊断标记物的水平,所述额外生物标记物选自脑源性神经营养因子 (BDNF),中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (NGAL),TNF 相关弱凋亡诱导因子 (TWEAK),生长相关癌基因 α (GRO- α),白介素 -1β (IL- 1β),金属蛋白酶组织抑制剂-1 (TIMP-1),抗酿酒酵母抗体 (ASCA-IgA),抗 CBir-1 抗体 (CBir1),抗人嗜中性粒细胞胞质抗体 (ANCA),抗人组织转氨酶 IgA (tTG),组胺, β - 类胰蛋白酶,前列腺素 E_2 (PGE $_2$),及其组合。
151. 如权利要求 123-150 中任一项所述的系统,其特征在于,所述数据处理模块包括对数据集应用统计方法以产生统计衍生决定的指令,所述数据集包含所述诊断标记物概况并联合有表明所述对象中至少一种症状的存在或严重度的症状概况,所述决定基于所述诊断标记物概况和所述症状概况将所述样品分类为 IBS 样品或非 IBS 样品。
152. 如权利要求 151 所述的系统,其特征在于,所述统计方法包括单个学习型统计分类系统。

153. 如权利要求 152 所述的系统,其特征在于,所述统计方法包括至少 2 种学习型统计分类系统的组合。

154. 如权利要求 153 所述的系统,其特征在于,所述至少 2 种学习统计分类系统的组合包括随机森林分类器和神经网络分类器。

肠易激综合征的诊断方法

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求 2009 年 10 月 30 日提交的美国临时申请号 61/256,717, 2009 年 11 月 25 日提交的美国临时申请号 61/264,588 和 2010 年 4 月 20 日提交的美国临时申请号 61/326,176 的优先权,其公开内容通过引用全文纳入本文用于所有目的。还通过引用纳入以下文献:2007 年 8 月 14 日提交并于 2008 年 4 月 10 日公布的美国专利公布号 2008/0085524,和 2007 年 8 月 20 日提交并于 2008 年 7 月 10 日公布的美国专利公布号 2008/0166719。

[0003] 发明背景

[0004] 肠易激综合征 (IBS) 是所有胃肠疾病中最常见的,影响 10-20% 的普通人群,在所有消化不良患者中占超过 50%。但是,研究显示患 IBS 的人群仅约 10% -50% 寻求医疗关注。IBS 患者表现出不同症状,例如,主要与排便相关的腹痛,腹泻,便秘或腹泻便秘交替,腹胀,胀气和粪便粘液过多。超过 40% 的 IBS 患者症状严重到必须在工作期间请假,减少其社交活动,避免性生活,取消约定,停止旅行,使用药物,甚至因为担心尴尬而闭门不出。美国在 IBS 上的医疗保健花费估计为每年 80 亿美元 (Talley 等, *Gastroenterol.*, 109 : 1736-1741 (1995))。

[0005] 按主要排便症状将 IBS 患者分三类:便秘主导型 IBS (IBS-C), 腹泻主导型 IBS (IBS-D) 和腹泻与便秘症状交替型 IBS (IBS-M)。现在的临床实践中,IBS 的诊断基于罗马 III 标准按患者所表现的症状以及其它 GI 疾病的排除。没有特异性生物、放射照相、内窥镜检查或生理的生物标记能用来鉴定该疾病。

[0006] 肠易激综合征是异质性胃肠 (GI) 功能疾病。越来越多证据表明其发病机理涉及免疫系统。GI 感染可能是引起 IBS 症状发生的触发因子。另一方面,IBS 常被描述为“脑—肠疾病”。5-HT 信号传导途径失调所介导的 GI 活力与分泌的改变可能是大便习惯不规律的原因。近结肠神经处肥大细胞的活化与 IBS 患者经历的异常疼痛有关。熟知肥大细胞能在活化后生成并释放多种炎性介导体。但是,不清楚这些不同的途径如何相互交流,以及它们的相互作用在 IBS 患者中的表现是否与健康对象中相同。

[0007] IBS 的确切病理生理学并未完全理解。尽管如此,对于内脏疼痛知觉的灵敏度有提高,称作外周致敏。这种致敏涉及阈值降低和初级传入神经元的转导过程增益提高,其可归因于多种介导体,包括单胺 (例如,儿茶酚胺类和吲哚胺类), P 物质,和多种细胞因子和类前列腺素如 E 型前列腺素 (参见例如, Mayer 等, *Gastroenterol.*, 107 : 271-293 (1994))。IBS 的发病机理还牵涉肠运动功能障碍,其导致管腔内容物和 / 或气体的异常处理 (参见例如, Kellow 等, *Gastroenterol.*, 92 : 1885-1893 (1987) ; Levitt 等, *Ann. Int. Med.*, 124 : 422-424 (1996))。心理因素也可造成看来与包括抑郁和焦虑在内的扰动相关 (若非由其引发) 的 IBS 症状 (参见例如, Drossman 等, *Gastroenterol. Int.*, 8 : 47-90 (1995))。

[0008] IBS 的病因并未被完全理解。肠壁排列有多层肌肉,这些肌肉在将食物从胃经肠道移至直肠时收缩和放松。通常,这些肌肉以协调的节奏收缩和放松。IBS 患者中,这些收缩通常比正常人更强且持续更久。因此,食物受迫更快通过肠,一些情况中导致胀气、腹胀和

腹泻。其它情况中,发生相反现象:食物缓慢通过,粪便变硬且干导致便秘。

[0009] IBS 的确切病理生理学仍有待阐明。尽管认为肠道蠕动障碍和内脏感觉改变是症状发病的重要原因 (Quigley, Scand. J. Gastroenterol., 38(Suppl. 237) :1-8(2003); Mayer 等, Gastroenterol., 122 :2032-2048(2002)), 当前一般将本病症视为脑-肠轴的疾病。近来,还提出了肠道传染和肠炎的作用。研究已记录了细菌学证实的胃肠炎后发生 IBS, 而另一些提供证据表明 IBS 中的低级粘膜炎症 (Spiller 等, Gut, 47 :804-811(2000); Dunlop 等, Gastroenterol., 125 :1651-1659(2003); Cumberland 等, Epidemiol. Infect., 130 :453-460(2003)) 和免疫活化 (Gwee 等, Gut, 52 :523-526(2003); Pimentel 等, Am. J. Gastroenterol., 95 :3503-3506(2000))。已考虑肠道菌群, 近期研究证明益生生物双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*) 在通过调节免疫活性治疗疾病中的功效 (O' Mahony 等, Gastroenterol., 128 :541-551(2005))。

[0010] 下丘脑-垂体-肾上腺轴 (HPA) 是人体中的核心内分泌系统 (De Wied 等, Front. Neuroendocrinol., 14 :251-302(1993)) 并提供脑和肠道免疫系统之间的重要连接。响应物理和心理应激而发生该轴的活化 (Dinan, Br. J. Psychiatry, 164 :365-371(1994)), 这两种应激都与 IBS 的病理生理学有关 (Cumberland 等, Epidemiol. Infect., 130 :453-460(2003))。已报道 IBS 患者在儿童期的性虐待和身体虐待率较高, 且在成年期有更高比例的应激性生活事件 (Gaynes 等, Baillieres Clin. Gastroenterol., 13 :437-452(1999))。此类心理社会性创伤或不良认知心理应对策略显著影响症状严重度、日常活动和健康后果。

[0011] 尽管 IBS 的病因学尚未完全鉴定, 医学界已开发了称为罗马 II 标准的共识性定义和标准, 基于病史来帮助诊断 IBS。罗马 II 标准要求连续 3 月或持续 1 年的复发性腹痛或不适, 这种腹痛或不适由排便来缓解和 / 或与大便频率或稠度改变相关以及以下情形中两种或更多种相关: 大便频率改变, 大便性状改变, 解便改变, 排粘液, 或胀气和腹胀。没有任何可能导致这些症状的结构性或生化性疾病也是必要条件。因此, 罗马 II 标准只可在有大量病史时使用, 且只在没有可另行解释症状的异常肠部解剖学或代谢过程时才可靠。类似地, 医学界近来开发的罗马 III 标准只在呈现特定症状组、详细的患者历史和身体检查时才可使用。

[0012] 文献充分记载 IBS 患者的诊断可因为 IBS 与其它疾病或紊乱之间症状的相似性而有挑战性。事实上, 由于 IBS 的症状与很多其它肠部病患相似或相同, 可能耗时数年才作出正确诊断。例如, 患有炎症肠病 (IBD) 但显示轻度体征和症状如胀气, 腹泻, 便秘和腹部疼痛的患者可能难以和 IBS 患者区分。因此, IBS 和 IBD 之间症状的相似性使得难以快速和准确诊断。鉴别诊断 IBS 和 IBD 的困难妨碍这些疾病的早期和有效治疗。不幸的是, 目前没有用于确定性区分 IBS 和表现相似症状的其它肠道疾病或紊乱的快速准确诊断方法。本发明满足这种需要, 并提供相关优点。

[0013] 发明概述

[0014] 本发明提供方法、试验、系统和代码, 用于准确分类来自个体的样品是否与肠易激综合征 (IBS) 相关。作为非限制性示例, 本发明可用于采用统计算法和 / 或经验数据将来自个体的样品分类为 IBS 样品。类似地, 本发明还提供方法、试验、系统和代码, 用于帮助诊断对象的肠易激综合征 (IBS)。本发明还可用于采用统计算法和 / 或经验数据的组合来排

除表现有 IBS-样症状的一种或多种疾病,并确认 IBS。因此,本发明提供准确的 IBS 诊断预测和有助于指导治疗决策的预后信息。

[0015] 在一方面,本发明提供帮助诊断对象中肠易激综合征 (IBS) 的方法,所述方法包括:(a) 将来自对象的血液或血清样品与 IBS 标记物结合部分接触,接触条件适于将样品内 IBS 标记物转化成含所述 IBS 标记物和 IBS 标记物结合部分的复合物;以及 (b) 确定所述复合物的水平,从而确定样品中的 IBS 标记物水平。

[0016] 在一方面,本发明提监控对象中肠易激综合征 (IBS) 的进展或消退的方法,所述方法包括:(a) 将在第一时间取自所述对象的第一血液或血清样品和 IBS 标记物结合部分接触,接触条件适于将所述样品中存在的 IBS 标记物转化成含所述 IBS 标记物和 IBS 标记物结合部分的复合物;(b) 确定所述复合物的水平,从而确定第一样品中存在的 IBS 标记物水平;(c) 将在第二时间取自所述对象的第二血液或血清样品和 IBS 标记物结合部分接触,接触条件适于将所述样品中存在的 IBS 标记物转化成含所述 IBS 标记物和 IBS 标记物结合部分的复合物;(d) 确定所述复合物的水平,从而确定第二样品中存在的 IBS 标记物水平;以及 (e) 比较第一样品中所述 IBS 标记物的存在水平和第二样品中所述 IBS 标记物的存在水平,其中第二样品中所述 IBS 标记物的水平高于第一样品表明所述对象中 IBS 的进展,而第二样品中所述 IBS 标记物的水平低于第一样品表明所述对象中 IBS 的消退。

[0017] 一方面,本发明提供计算机可读介质,其所含代码用于控制一个或多个处理器将来自对象的血清或血液样品分类为是否与肠易激综合征 (IBS) 相关,所述代码包括的指令将某统计方法应用于含诊断标记物概况的数据集以产生统计得出决定,所述决定基于所述诊断标记物概况将所述样品分类为 IBS 样品或非 IBS 样品,其中所述诊断标记物概况表明本文提供的至少一种 IBS 诊断标记物的水平。

[0018] 在另一发明,本发明提将来自对象的血清或血液样品分类为是否与肠易激综合征 (IBS) 相关的系统,所述系统包括:(a) 配置成产生含诊断标记物概况的数据集的数据采集模块,其中所述诊断标记物概况表明本文提供的至少一种 IBS 诊断标记物的存在或水平;(b) 配置成处理所述数据集的数据处理模块,所述处理通过对所述数据集应用统计方法来产生统计得出决定,该决定基于诊断标记物概况将所述样品分类为 IBS 样品或非 IBS 样品;以及 (c) 配置成显示所述统计得出决定的显示模块。

[0019] 在一方面,本发明提供将来自个体的样品分类为是否与 IBS 相关的方法,所述方法包括:(a) 通过检测所述样品中至少一种诊断标记物的存在或水平来确定诊断标记物概况;以及 (b) 采用基于所述诊断标记物概况的算法将所述样品分类为 IBS 样品或非 IBS 样品。

[0020] 在本文所提供诊断方法的某些实施方式中,所述 IBS 标记物选自下组:细胞因子,生长因子,抗嗜中性粒细胞抗体,抗酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 抗体 (ASCA),抗微生物抗体,肥大细胞标记物,应激标记物,胃肠道激素,5-羟色胺代谢物,5-羟色胺途径标记物,糖缺失转铁蛋白 (CDT),乳铁蛋白,抗组织转谷氨酰胺酶 (tTG) 抗体,脂质运载蛋白,基质金属蛋白酶 (MMP),金属蛋白酶的抑制剂 (TIMP), α 球蛋白,肌动蛋白切割蛋白, S100 蛋白,血纤维蛋白肽,降钙素基因相关肽 (CGRP),速激肽,生长素释放肽,神经降压素,促肾上腺皮质激素释放激素,丝氨酸蛋白酶,前列腺素,组胺,及其组合。

[0021] 在本文所提供诊断方法的优选实施方式中,所述 IBS 标记物选自下组:糖缺失转

铁蛋白,尿皮素 (urocortin),促肾上腺皮质素释放激素结合蛋白,皮质醇,促肾上腺皮质激素,P 物质,神经生长因子,神经激肽 A,神经激肽 B,血管活性肠肽,胰高血糖素样肽 2,促胃动素,垂体腺苷酸环化酶激活肽,5-羟色胺,色氨酸,5-羟色胺 O-硫酸盐,5-羟吲哚乙酸,5-HT 葡萄糖苷酸,酪氨酸,苯丙氨酸,UDP-葡萄糖醛酸基转移酶 1-6,5-羟色胺再摄取转运体,色氨酸羟化酶 1,单胺氧化酶 A,单胺氧化酶 B,和羟色氨酸 (5-羟色胺) 受体 3A,及其组合。

[0022] 本发明的不同方法和试验的优选实施方式中,检测表 1 中所示的 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,或更多种生物标记物的存在或水平以产生可用于预测 IBS 的诊断标记物概况。在某些情况中,本文所述的生物标记物采用免疫试验如酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 或免疫组化试验分析。

[0023] 表 1. 适合用于 IBS 分类的示例性诊断标记物。

[0024]

家族	生物标记物
细胞因子	CXCL8/IL-8
	IL-1 β
	TNF 相关弱凋亡诱导因子(TWEAK)
	瘦素
	骨保护素(OPG)
	CCL19/MIP-3 β
	CXCL1/GRO1/GRO α
	CXCL4/PF-4
	CXCL7/NAP-2
	INF β 2/IL-6
	IL-12
	CSIF/IL-10
	肿瘤坏死因子- α (TNF- α)
生长因子	表皮生长因子(EGF)
	血管内皮生长因子(VEGF)
	色素上皮衍生因子(PEDF)
	脑源神经营养因子(BDNF)
	神经鞘瘤衍生生长因子(SDGF)/双调蛋白
抗嗜中性粒细胞抗体	抗嗜中性粒细胞胞质抗体(ANCA)
	核周抗嗜中性粒细胞胞质抗体(pANCA)
	抗 I2 抗体
ASCA	ASCA-IgA
	ASCA-IgG
抗微生物抗体	抗外膜蛋白 C (OmpC)抗体
	抗 Cbir-1 鞭毛蛋白抗体
脂质运载蛋白	嗜中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL)
MMP	MMP-9
TIMP	TIMP-1
α 球蛋白	α 2-巨球蛋白(α 2-MG)
	触珠蛋白前体 α -2 (Hp α 2)
	血清类粘蛋白
肌动蛋白切割蛋白	凝溶胶蛋白
S100 蛋白	钙粒蛋白 A/S100A8/MRP-8
血纤维蛋白肽	血纤维蛋白肽 A (FIBA)
其它	乳铁蛋白
	抗组织转谷氨酰胺酶(tTG)抗体

[0025]

	糖缺失转铁蛋白(CDT)
应激标记物	尿皮素(Ucn)
	促肾上腺皮质素释放激素结合蛋白(CRFBP)
	皮质醇
	促肾上腺皮质激素(ACTH, 促皮质素)
肥大细胞标记物	类胰蛋白酶
	组胺
	前列腺素 E2 (PGE ₂)
胃肠道激素	降钙素基因相关肽(CGRP)
	P 物质
	神经生长因子(NGF)
	神经激肽 A
	神经激肽 B
	血管活性肠肽(VIP)
	胰高血糖素样肽 2 (GLP-2)
	促胃动素
	垂体腺苷酸环化酶激活肽(PACAP)
5-羟色胺代谢物	5-羟色胺
	色氨酸
	5-羟色胺 O-硫酸盐(5-羟基色胺 O-硫酸盐; 5-HT-o-硫酸盐)
	5-羟吲哚乙酸(5-HIAA)
	5-HT 葡萄糖苷酸(5-HT-GA)
血清代谢物	酪氨酸
	苯丙氨酸
5-羟色胺途径标记物	UDP-葡萄糖醛酸基转移酶 1-6 (UGT1A6)
	5-羟色胺再摄取转运体(SERT)
	色氨酸羟化酶 1 (TPH1)
	单胺氧化酶 A (MAO-A)
	单胺氧化酶 B (MAO-B)
	羟色氨酸(5-羟色胺)受体 3A (5-HT3A; 5-HT3R)

[0026] 附图简要说明

[0027] 图 1 显示本发明一个实施方式中的剂量响应曲线。

[0028] 图 2 显示本发明一个实施方式中的剂量响应曲线。

[0029] 图 3 显示本发明一个实施方式中的标准曲线。将兔抗人类胰蛋白酶涂覆在免疫试验板上,并用试验缓冲液封闭(含 5% BSA 的 PBS)。将不同浓度的人类胰蛋白酶(标准曲线)或人血清样品(以 1 : 5 和 1 : 10 稀释在试验缓冲液中)加入孔中并室温孵育 2 小时。清洗平板并添加碱性磷酸酶(AP)标记的抗类胰蛋白酶 McAb (G3),室温孵育 2 小时。清

洗平板,将 AP 底物 (CSPD) 加入各孔。用发光酶标仪检测发出的光。采用标准曲线计算血清类胰蛋白酶浓度。(类胰蛋白酶检测范围 0.019–5000ng/ml。EC₅₀ = 65ng/ml;正常混合血清中掺入 20ng/ml 类胰蛋白酶的回采率 81.5%)。见实施例 1。

[0030] 图 4 显示在 GI 对照, IBS-C 和 IBS-D 血清中类胰蛋白酶浓度的柱状图。

[0031] 图 5 显示类胰蛋白酶对数值分布的柱状图。

[0032] 图 6 显示类胰蛋白酶数据的密度分析。

[0033] 图 7 显示在 GI 对照, IBS-C, IBS-D 和 IBS-A 血清中类胰蛋白酶浓度的柱状图。

[0034] 图 8 显示本发明一个实施方式中人类胰蛋白酶的剂量响应曲线。

[0035] 图 9 显示类胰蛋白酶 ELISA 的优化。(A) 比较不同量捕获抗体的类胰蛋白酶标准曲线。(B) 优化检测抗体稀释度。(C) 比较存在不同量正常人血清 (NHS) 的类胰蛋白酶标准曲线。

[0036] 图 10 显示来自健康对照 (n = 139) 和来自患 IBS 对象 (n = 378) 的血清类胰蛋白酶水平。

[0037] 图 11 显示 IBS 患者相对健康对照的组胺和 PGE₂ 血清水平升高。

[0038] 图 12 显示从已鉴定并在本文描述的 IBS 标记物衍生的分子途径的一种实施方式。

[0039] 图 13 显示了如本发明一个实施方式所述的疾病分类系统 (DCS)。

[0040] 图 14 提供代表性色谱图,证明所鉴定的代谢物在患 IBS 个体的血清中存在的浓度不同于非 IBS 个体血清。

[0041] 图 15 显示 IBS 患者中鉴定的代谢物血清水平相对健康对照升高。

[0042] 图 16 显示 IBS 预测中鉴定的顶级变量 (top variable)。

[0043] 图 17 提供代表性色谱图,显示色氨酸和 5-HT 代谢物生成响应全血 TNF α 处理而提高。

[0044] 图 18 显示不同炎性细胞因子处理的全血中的 (A) TPH1 和 (B) MAO 表达。

[0045] 图 19 显示用不同炎性细胞因子处理的全血中的尿皮素 (Ucn) 水平 (Y 轴)。

[0046] 图 20 显示用不同炎性细胞因子处理的全血中肥大细胞标记物 (A) 组胺, (B) PGE₂, 和 (C) 类胰蛋白酶的水平。

[0047] 图 21 显示胃肠系统中由一些本文所述标记物介导的白细胞、肠嗜铬细胞、肥大细胞和血小板之间的相互作用。

[0048] 图 22 提供由来自 IBS 患者与健康对照 (HC) 对象的血清样品所得 HPLC 分析的代表性色谱图。

[0049] 图 23 显示由来自 IBS 患者 (IBS-C = 12, IBS-D = 24, IBS-M = 14) 和健康对照对象 (HC = 38) 的样品 HPLC 分析测定的 7.5 分钟峰, 13.5 分钟峰, 和 17.2 分钟峰的血清水平 (AUC)。

[0050] 图 24 提供用质谱对所述 7.5 分钟峰的结构解析。存在于 7.5 分钟峰的化合物分子量确定为 181.9m/z (A 图), 其对应于氨基酸酪氨酸的分子量。该峰的身份是酪氨酸可由其它图的结果得到进一步证实, B 图中在 m/z 164.9 显示的质量主峰对应于从所述分子离子 (181.9m/z) 丢失 OH 基团 (17m/z); C 图在 m/z 146.9 显示质量主峰, 对应于从所述分子离子丢失的 H₂O (18m/z) 和 NH₃ (17m/z); 以及 D 图在 m/z 119 显示的质量主峰, 对应于从所述分子离子丢失的 HCOOH (m/z 46) 和 OH 基团 (17m/z)。

[0051] 图 25 提供用质谱对所述 13.5 分钟峰的结构解析。存在于 13.5 分钟峰的化合物分子量确定为 165.9m/z (A 图), 其对应于氨基酸苯丙氨酸的分子量。该峰的身份是苯丙氨酸由图 B 和 C 中的结果得到进一步证实, B 图在 m/z 131.0 显示的质量主峰对应于从所述分子离子 (165.9m/z) 丢失的 H₂O (18m/z) 和 NH₃ (17m/z); 而 C 图在 m/z 120.0 显示的质量主峰对应于从所述分子离子丢失的 HCOOH (46m/z)。

[0052] 图 26 显示 HPLC 分析确定的 D- 酪氨酸掺入血清样品的剂量依赖性响应。

[0053] 图 27 显示 HPLC 分析确定的 L- 苯丙氨酸掺入血清样品的剂量依赖性响应。

[0054] 图 28 显示 5- 羟色胺途径及其在 IBS 病理生理学中的参与。

[0055] 图 29 显示全血细胞的细胞因子处理产生的 5-HT 途径代谢酶转录物水平。

[0056] 图 30 显示全血细胞的细胞因子处理所产生肥大细胞活化标记物的标准化水平。

[0057] 图 31 显示全血细胞的细胞因子处理所产生的尿皮素 (Ucn) 水平。

[0058] 发明详述

[0059] I. 引言

[0060] 对患者患有肠易激综合征 (IBS) 的诊断可以因为 IBS 与其它疾病或紊乱之间症状的相似性而有挑战性。例如, 患有炎症肠病 (IBD) 但显示轻度体征和症状如胀气, 腹泻, 便秘和腹部疼痛的患者可能难以和 IBS 患者区分。因此, IBS 和 IBD 之间症状的相似性使得难以快速和准确诊断, 并妨碍所述疾病的早期和有效治疗。

[0061] 尽管未完全理解肠易激综合征 (IBS) 的病理学, 很多研究指向 IBS 是脑 - 肠轴调节异常所导致疾病的假设 (综述参见 Öhman 和 Simrén, Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2010 年 3 月, 7(3):163-73)。支持这一理论的一种观察是重复发现可在诊断患有 IBS 的患者的肠粘膜中发现肥大细胞数量增加 (Guilarte, M. 等, Gut 56, 203-209 (2007); Walker, M. M. 等, Pharmacol. Ther. 29, 765-773 (2009); Akbar, A. 等, Gut 57, 923-929 (2008); Barbara, G. 等, Gastroenterology 126, 693-702 (2004); Barbara, G. 等, Gastroenterology 132, 26-37 (2007); Cremon, C. 等, Am. J. Gastroenterol. 104, 392-400 (2009); 和 O' Sullivan, M. 等, Neurogastroenterol. Motil., 12, 449-457 (2000))。类似地, 一些研究还发现 IBS 患者的结肠粘膜中有释放自这些细胞的介导物水平, 包括组胺和丝氨酸蛋白酶 (例如, 类胰蛋白酶) (Buhner 等, Gastroenterology 2009 年 10 月, 37(4); Barbara 等, Gastroenterology, 第 122 卷第 4 期增刊 1, A-276 页, 2002 年 4 月)。但是, 该发现仍有争议, 因为其它研究报道不存在此类关联 (Guilarte 等, Gut 2007Feb; 56(2):203-9)。

[0062] 不考虑 IBS 患者的结肠粘膜中存在肥大细胞介导物水平增加, 这一关联的诊断价值有限, 因为结肠活检是侵入性过程。尽管研究人员已在 IBS 患者的血液 / 血清 (非常适于无创诊断的流体) 中探索相似模式, 但迄今未见相关性的报道 (Lessoif 等, Ann Allergy. 1983 年 8 月; 51(2Pt 2):249-50; Guilarte, M. 等, Gut 56, 203-209 (2007); Öhman 和 Simrén, Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2010 年 3 月; 7(3):163-73)。

[0063] 有利地, 本发明提供用于诊断和分类肠易激综合征 (IBS) 的无创方法与试验等方面。在某些实施方式中, 这些方法和试验涉及检测怀疑患有或此前诊断为患有 IBS 的对象的血液和 / 或血清中不同 IBS 生物标记物的存在或浓度。在优选实施方式中, 所述方法包含检测对象的血液和 / 或血清样品中表 1 所列一种或多种 IBS 标记物。也可使用其它标记

物。

[0064] 本发明部分基于下面的惊人发现：可通过检测某些诊断标记物（例如， β -类胰蛋白酶，前列腺素 E_2 ，组胺，细胞因子，生长因子，抗嗜中性粒细胞抗体，抗酿酒酵母抗体，抗微生物抗体，肥大细胞标记物，应激标记物，胃肠道激素，5-羟色胺代谢物，5-羟色胺途径标记物，糖缺失转铁蛋白（CDT），乳铁蛋白等）的存在或水平来显著改善将来自个体的生物样品分类为 IBS 样品的准确性，所述检测为单独或与根据个体对一个或多个问题（例如，“您目前有任何症状吗？”）的回应来鉴定 IBS 相关症状的存在或严重度相联合。图 12 显示从已鉴定并在本文描述的 IBS 标记物衍生的分子途径的非限制性示例。在一些方面，本发明利用统计算法帮助将样品分类为 IBS 样品或非 IBS 样品。在其它方面中，本发明利用统计算法排除其它肠道疾病（例如，IBD），然后分类非 IBD 样品以帮助 IBS 的分类。

[0065] II. 定义

[0066] 除非另有说明，本文所用的以下术语具有属于它们自身的涵义。

[0067] 术语“分类”包括将样品与某疾病状态“关联”或“分类别”。在某些情况中，“分类”是基于统计证据、经验证据或两者。在某些实施方式中，所述分类方法和系统使用称为训练组的具有已知疾病状态的样品。一旦确立，所述训练数据集用作基准，模型或模板，将未知样品的特征与其作比较来分类所述样品的未知疾病状态。在某些情况中，分类所述样品类似于诊断样品的疾病状态。在某些其它情况中，分类所述样品类似于区分样品的疾病状态与另一疾病状态。

[0068] 术语“肠易激综合征”或“IBS”包括一组功能性肠紊乱，其表征为一种或多种症状，包括但不限于：腹痛、腹部不适，排便模式改变，排便松散或更频繁，腹泻，和便秘，通常没有任何明显的结构异常。根据主要症状，有至少三种 IBS 形式：(1) 腹泻主导型（IBS-D）；(2) 便秘主导型（IBS-C）；和 (3) 排便模式交替型 IBS（IBS-A）。IBS 也可以混合症状的形式发生（IBS-M）。IBS 有多种临床亚型，例如感染后的 IBS（IBS-PI）。

[0069] 术语“转化样品”包括物理和 / 或化学改变样品以提取标记物或者改变或修饰本文所述标记物。提取，处理，化学沉淀，ELISA，复合化，免疫提取，物理或化学修饰样品或标记物以测量标记物的水平或浓度都构成转化。只要样品或标记物在转化步骤之前与之后不相同，所述改变或修饰就是转化。

[0070] 术语“样品”包括获自个体的任何生物样品。可用于本发明的合适样品包括但不限于全血，血浆，血清，唾液，尿液，粪便（即，大便），泪液，和任何其它体液，或组织样品（即，活检），例如小肠或结肠样品，及其细胞提取物（例如，红血细胞提取物）。在一个优选实施方式中，所述样品是血液、血浆或血清样品。在一个更优选的实施方式中，所述样品是血清样品。本领域熟知样品如血清、唾液和尿液的使用（参见例如，Hashida 等，J. Clin. Lab. Anal., 11:267-86 (1997)）。本领域技术人员应理解可在分析标记物水平前稀释样品如血清样品。

[0071] 术语“生物标记物”或“标记物”包括任何诊断标记物，例如可用来将来自个体的样品分类为 IBS 样品或排除来自个体的样品中一种或多种与 IBS 样症状相关疾病或病症的生化标记物，血清学标记物，遗传标记物，或其它临床或回波描记特征。术语“生物标记物”或“标记物”也涵盖任何能用于分类 IBS 为其不同形式或临床亚型的分类标记物如生化标记物，血清学标记物，遗传标记物，或其它临床或回波描记特征。下文描述适用于本发明的

诊断标记物的非限制性示例,且包括:细胞因子,生长因子,抗嗜中性粒细胞抗体,抗酿酒酵母抗体,抗微生物抗体,肥大细胞标记物,应激标记物,胃肠道激素,5-羟色胺代谢物,5-羟色胺途径标记物,糖缺失转铁蛋白(CDT),抗组织转谷氨酰胺酶(tTG)抗体,脂质运载蛋白,基质金属蛋白酶(MMP),金属蛋白酶的组织抑制剂(TIMP), α 球蛋白,肌动蛋白切割蛋白,S100蛋白,血纤维蛋白肽,降钙素基因相关肽(CGRP),速激肽,生长素释放肽,神经降压素,促肾上腺皮质激素释放激素(CRH),丝氨酸蛋白酶(例如,类胰蛋白酶,弹性蛋白酶),前列腺素(例如,PGE₂),组胺,C反应蛋白(CRP),乳铁蛋白,抗乳铁蛋白抗体,钙卫蛋白,血红蛋白,NOD2/CARD15,5-羟色胺再摄取转运体(SERT),色氨酸羟化酶1,5-羟色胺(5-HT),乳果糖等。分类标记物的示例包括但不限于:瘦素,SERT,色氨酸羟化酶1,5-HT,胃窦粘膜蛋白8,角蛋白8,密蛋白8,连蛋白,促肾上腺皮质激素释放激素受体1(CRHR1),促肾上腺皮质激素释放激素受体2(CRHR2),类胰蛋白酶,组胺,前列腺素E₂(PGE₂)等。在一些实施方式中,诊断标记物可用来分类IBS为其不同形式或临床亚型之一。在其它实施方式中,分类标记物可用来将样品分类为IBS样品或排除一种或多种与IBS样症状相关的疾病或紊乱。本领域技术人员了解适用于本发明的其它诊断和分类标记物。

[0072] 在某些情况中,用试验如杂交试验或基于扩增的试验确定至少一种诊断标记物的存在或水平。下文描述适用于本发明方法中的杂交试验和基于扩增的试验的示例。在某些其它情况中,用免疫试验或免疫组化试验确定至少一种诊断标记物的存在或水平。本文描述适用于本发明方法的免疫试验和免疫组化试验的非限制性示例。

[0073] 本文所用术语“结合部分”指能特异性识别感兴趣生物标记物的任意类型分子。非常适用于本文所提供方法的结合部分的非限制性示例包括蛋白质,例如单克隆或多克隆抗体及其功能片段(例如,小抗体,双抗体,三抗体,单链Fv,F(ab)′等),由噬菌体展示或核糖体展示组合衍生的蛋白质,肽,核酸例如适体,以及能特异性识别感兴趣生物标记的其它分子。

[0074] 本文所用术语“概况”包括代表与疾病或紊乱如IBS或IBD相关的区别特征或特点中的任意数据集。该术语涵盖“诊断标记物概况”和“症状概况”及其组合,前者分析样品中的一种或多种诊断标记物,后者鉴定个体正在经历或已经经历的一种或多种IBS相关临床因素(即,症状)。例如,“诊断标记物概况”可包括表示一种或多种IBS和/或IBD相关诊断标记物的存在或水平的数据集。类似地,“症状概况”可包括表示一种或多种IBS和/或IBD相关症状的存在、严重度、频率和/或持续时间的数据集。

[0075] 在一些实施方式中,可构建用于测量一种或多种上述诊断标记物和/或诊断概况的组,并用来将样品分类为IBS样品或非IBS样品。本领域技术人员应当理解可以同时或依序确定多个诊断标记物的存在或水平,利用例如个体样品的等分样品或稀释。在某些情况中,当个体样品中特定诊断标记物的水平比同一标记物在对比样品(例如,正常,GI对照,IBD,和/或乳糜泻样品)或样品群(例如,超过正常,GI对照,IBD,和/或乳糜泻样品的对比群体中同一标记物的中值水平)中的水平高出至少约10%,15%,20%,25%,50%,75%,100%,125%,150%,175%,200%,250%,300%,350%,400%,450%,500%,600%,700%,800%,900%或1000%,视作升高。在某些其它情况中,当个体样品中特定诊断标记物的水平比同一标记物在对比样品(例如,正常,GI对照,IBD,和/或乳糜泻样品)或样品群(例如,低于正常,GI对照,IBD,和/或乳糜泻样品的对比群中同一标记物的中值水平)

中的水平低至少约 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 或 95% 时, 视作降低。

[0076] 术语“个体”, “对象”或“患者”通常指人, 但也指其它动物, 包括其它灵长类、啮齿类、犬、猫、马、羊、猪等。

[0077] 本文所用的术语“基本相同的氨基酸序列”包括与天然产生的氨基酸序列相似但不相同的氨基酸序列。例如, 与天然产生的肽、多肽或蛋白质具有基本相同氨基酸序列的某氨基酸序列可具有一个或多个修饰, 例如相对所述天然产生肽、多肽或蛋白质的氨基酸序列有氨基酸添加、缺失或取代, 只要所述经修饰序列基本保留所述天然产生肽、多肽或蛋白质的至少一种生物活性例如免疫反应性。氨基酸序列间基本相似性的比较通常用约 6-100 个残基的序列进行, 优选约 10-100 个残基, 更优选约 25-35 个残基。本发明所述肽、多肽或蛋白质或其片段的特别有用的修饰是使其例如稳定性更高的修饰。掺入一个或多个 D-氨基酸是可用于提高多肽或多肽片段稳定性的一种修饰。类似地, 赖氨酸残基的缺失或取代可通过保护多肽或多肽片段免受降解来提高稳定性。

[0078] 术语“监控 IBS 的进展或消退”包括本发明所述方法、系统和代码在确定个体疾病状态(例如, IBS 的存在或严重度)中的应用。在某些情况中, 将算法(例如, 学习型统计分类系统)的结果与同一个体在早些时候所得的结果作比较。在一些实施方式中, 本发明所述方法、系统和代码可用于预测 IBS 的进展, 例如, 通过根据诊断标记物的分析和/或鉴定 IBS 相关症状来确定个体中 IBS 快速或缓慢进展的可能性。在其它实施方式中, 本发明所述方法、系统和代码可用于预测 IBS 的消退, 例如, 通过根据诊断标记物的分析和/或鉴定 IBS 相关症状来确定个体中 IBS 快速或缓慢消退的可能性。

[0079] 术语“在接受可用于治疗 IBS 药物的个体中监控药物功效”包括本发明所述方法、系统和代码在确定用于治疗 IBS 的治疗剂给予后效力中的应用。在某些情况中, 将算法(例如, 学习型统计分类系统)的结果与同一个体在开始使用所述治疗剂前或在治疗早期所得的那些结果作比较。如本文所用, 可用于治疗 IBS 的药物是用于改善个体健康的任意化合物或药物, 包括但不限于: IBS 药物如 5-羟色胺能试剂、抗抑郁药、氯通道激活剂, 氯通道阻断剂, 鸟苷酸环化酶激动剂, 抗生素, 类罂粟碱, 神经激肽拮抗剂, 镇痉或抗胆碱剂, 颠茄生物碱, 巴比妥酸盐, 胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 类似物, 促肾上腺皮质激素释放因子 (CRF) 拮抗剂, 益生菌, 其游离碱, 其药学上可接受的盐, 其衍生物, 其类似物, 及其组合。

[0080] 术语“治疗有效量或剂量”包括能在需要的对象中实现治疗效果的药物的剂量。例如, 用于治疗 IBS 的药物的治疗有效量可以是能预防或减轻一种或多种 IBS 相关症状的用量。本领域技术人员可采用已知技术确定准确量(参见例如, Lieberman, Pharmaceutical Dosage Forms(《药物剂型》), 第 1-3 卷 (1992); Lloyd, The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding(《药物混配的艺术、科学与技术》)(1999); Pickar, Dosage Calculations(《剂量计算》)(1999); Remington: The Science and Practice of Pharmacy(《雷明顿: 药物科学和实践》), 第 20 版, Gennaro 编, LWW 出版公司 (Lippincott, Williams & Wilkins) (2003)。

III. 具体实施方式

[0081] 本发明提供用于帮助诊断对象的肠易激综合征 (IBS) 的方法、系统和代码。类似

地,本发明提供用于准确分类来自个体的样品是否与肠易激综合征(IBS)相关的方法、试验、系统和代码。在一些实施方式中,本发明依赖于统计算法(例如,学习型统计分类系统)和/或经验数据(例如,IBS标记物的存在或水平)的应用。本发明还可用于采用统计算法和/或经验数据的组合来排除表现有IBS-样症状的一种或多种疾病或紊乱,并确认IBS。因此,本发明提供准确的IBS诊断预测和有助于指导治疗决策的预后信息。

[0082] A. 帮助诊断肠易激综合征(IBS)的方法

[0083] 在一方面,本发明提供通过确定1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,或更多种表1所示生物标记物的水平来帮助诊断对象中肠易激综合征的方法,在优选实施方式中,本文所提供的方法依赖于检测选自下组的至少一个生物标记物:糖缺失转铁蛋白,尿皮素,促肾上腺皮质素释放激素结合蛋白,皮质醇,促肾上腺皮质激素,P物质,神经生长因子,神经激肽A,神经激肽B,血管活性肠肽,胰高血糖素样肽2,促胃动素,垂体腺苷酸环化酶激活肽,5-羟色胺,色氨酸,5-羟色胺O-硫酸盐,5-羟吲哚乙酸,5-HT葡萄糖苷酸,酪氨酸,苯丙氨酸,UDP-葡萄糖醛酸基转移酶1-6,5-羟色胺再摄取转运体,色氨酸羟化酶1,单胺氧化酶A,单胺氧化酶B,和羟色氨酸(5-羟色胺)受体3A,及其组合。

[0084] 在某些实施方式中,提供通过确定至少一种生物标记物和至少一种IBS生物标记物的水平来帮助诊断对象中肠易激综合征的方法,所述生物标记物选自:糖缺失转铁蛋白,尿皮素,促肾上腺皮质素释放激素结合蛋白,皮质醇,促肾上腺皮质激素,P物质,神经生长因子,神经激肽A,神经激肽B,血管活性肠肽,胰高血糖素样肽2,促胃动素,垂体腺苷酸环化酶激活肽,5-羟色胺,色氨酸,5-羟色胺O-硫酸盐,5-羟吲哚乙酸,5-HT葡萄糖苷酸,酪氨酸,苯丙氨酸,UDP-葡萄糖醛酸基转移酶1-6,5-羟色胺再摄取转运体,色氨酸羟化酶1,单胺氧化酶A,单胺氧化酶B,和羟色氨酸(5-羟色胺)受体3A,及其组合;所述IBS生物标记物选自脑源性神经营养因子(BDNF),中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL),TNF-相关弱凋亡诱导因子(TWEAK),生长相关癌基因 α (GRO- α),白介素-1 β (IL-1 β),金属蛋白酶组织抑制剂-1(TIMP-1),抗酿酒酵母抗体(ASCA-IgA),抗CBir-1抗体(CBir1),抗人嗜中性粒细胞胞质抗体(ANCA),抗人组织转氨酶IgA(tTG), β -类胰蛋白酶,组胺,前列腺素 E_2 (PGE $_2$),及其组合。

[0085] 在另一实施方式中,提供通过确定至少一种甲组生物标记物和至少一种乙组生物标记物的水平来帮助诊断对象中肠易激综合征的方法,所述甲组选自:糖缺失转铁蛋白,尿皮素,促肾上腺皮质素释放激素结合蛋白,皮质醇,促肾上腺皮质激素,P物质,神经生长因子,神经激肽A,神经激肽B,血管活性肠肽,胰高血糖素样肽2,促胃动素,垂体腺苷酸环化酶激活肽,5-羟色胺,色氨酸,5-羟色胺O-硫酸盐,5-羟吲哚乙酸,5-HT葡萄糖苷酸,酪氨酸,苯丙氨酸,UDP-葡萄糖醛酸基转移酶1-6,5-羟色胺再摄取转运体,色氨酸羟化酶1,单胺氧化酶A,单胺氧化酶B,和羟基色氨酸(5-羟色胺)受体3A,及其组合;所述乙组选自:细胞因子(例如,IL-8、IL-1 β 、TWEAK、瘦素、OPG、MIP-3 β 、GRO α 、CXCL4/PF-4和/或CXCL7/NAP-2),生长因子(例如,EGF、VEGF、PEDF、BDNF和/或SDGF),抗嗜中性粒细胞抗体(例如,ANCA、pANCA、cANCA、NSNA和/或SAPPA),ASCA(例如,ASCA-IgA、ASCA-IgG和/或ASCA-IgM),抗微生物抗体(例如,抗OmpC抗体、抗鞭毛蛋白抗体和/或抗I2抗体),乳铁蛋白,抗tTG抗体,脂质运载蛋白(例如,NGAL、NGAL/MMP-9复合物),MMP(例如,MMP-9),TIMP(例如,

TIMP-1), α -球蛋白(例如, α -2-巨球蛋白、触珠蛋白和/或血清类粘蛋白), 肌动蛋白切割蛋白(例如, 凝溶胶蛋白), S100 蛋白(例如, 钙粒蛋白), 血纤维蛋白肽(例如, FIBA), CGRP, 速激肽(例如, P 物质), 生长素释放肽, 神经降压素, 促肾上腺皮质素释放激素, 及其组合。在另一实施方式中, 还可检测其它诊断标记物的存在或水平, 如抗乳铁蛋白抗体, L-选择蛋白/CD62L, 弹性蛋白酶, C 反应蛋白质(CRP), 钙卫蛋白, 抗 U1-70kDa 自身抗体, 闭锁小带 1(ZO-1), 血管活性肠肽(VIP), 血清淀粉样蛋白 A, 促胃液激素, β -类胰蛋白酶, 组胺, 前列腺素 E_2 (PGE_2), 及其组合。

[0086] 在另一方面, 本发明提供用于将来自个体的样品分类为是否与 IBS 相关的方法, 所述方法包括: (a) 通过检测所述样品中至少一种诊断标记物的存在或水平来确定诊断标记物概况; (b) 基于所述诊断标记物概况采用第一统计算法将所述样品分类为 IBD 样品或非 IBD 样品; (c) 基于步骤 (a) 中所确定的同一诊断标记物概况或不同的诊断标记物概况采用第二统计算法将非 IBD 样品分类为 IBS 样品或非 IBS 样品。

[0087] 用于排除 IBD 的诊断标记物可以与用于确认 IBS 的诊断标记物相同。或者, 用于排除 IBD 的诊断标记物可不同于用于确认 IBS 的诊断标记物。

[0088] 在一些实施方式中, 首先排除 IBD(即, 将样品分类为 IBD 样品或非 IBD 样品) 然后确认 IBS(即, 将非 IBD 样品分类为 IBS 样品或非 IBS 样品) 的方法包括: 确定诊断标记物概况, 可选联用症状概况, 其中所述症状概况通过鉴定个体中至少一种症状的存在或严重程度来确定; 用基于所述诊断标记物概况和症状概况的第一统计算法将所述样品分类为 IBD 样品或非 IBD 样品; 且若所述样品分类为非 IBD 样品, 则用基于步骤 (a) 中所确定相同概况或不同概况的第二统计算法将所述非 IBD 样品分类为 IBS 样品或非 IBS 样品。本领域技术人员应理解所述诊断标记物概况和症状概况可以同时确定或以任意顺序依序确定。

[0089] 其它实施方式中, 本发明的方法还包括排除肠炎。肠炎的非限制性示例包括急性炎症、憩室炎, 回肠袋-直肠接合, 显微结肠炎, 传染性腹泻, 及其组合。在一些情况中, 基于 C 反应蛋白质(CRP)、乳铁蛋白、钙卫蛋白或其组合的存在或水平排除所述肠炎。

[0090] 如本文所述, 本发明的方法还可包括将所述 IBS 分类结果发送给临床医师, 例如胃肠病学家或全科医师。所述方法还可以个体患 IBS 概率的形式提供诊断。例如, 所述个体患 IBS 的概率可为约 0%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 或更高。在一些情况中, 本发明的方法还提供个体中 IBS 的预后。例如, 所述预后可以是手术, 发展出某类或临床亚型的 IBS, 发展出一种或多种症状, 或者疾病的康复。

[0091] 1. IBS 标记物

[0092] 在一方面, 提供用于帮助在对象中诊断肠易激综合征(IBS) 的方法, 所述方法包括: (a) 将来自对象的血液或血清样品与 IBS 标记物结合部分接触, 接触条件适于将样品内存在的 IBS 标记物转化成含所述 IBS 标记物和 IBS 标记物结合部分的复合物; 以及 (b) 确定所述复合物的水平, 从而确定样品中存在的 IBS 标记物水平, 其中所述 IBS 标记物选自下组: 糖缺失转铁蛋白, 尿皮素, 促肾上腺皮质素释放激素结合蛋白, 皮质醇, 促肾上腺皮质激素, P 物质, 神经生长因子, 神经激肽 A, 神经激肽 B, 血管活性肠肽, 胰高血糖素样肽 2, 促胃动素, 垂体腺苷酸环化酶激活肽, 5-羟色胺, 色氨酸, 5-羟色胺 O-硫酸盐, 5-羟吲哚乙酸, 5-HT 葡萄糖苷酸, 酪氨酸, 苯丙氨酸, UDP-葡萄糖醛酸基转移酶 1-6, 5-羟色胺再摄取转运体, 色

氨酸羟化酶 1, 单胺氧化酶 A, 单胺氧化酶 B, 和羟色氨酸 (5-羟色胺) 受体 3A。在一种实施方式中, 所述方法还包括: (c) 将所述样品中存在的 IBS 标记物水平与对照水平作比较, 其中所述样品中存在的 IBS 标记物水平相对对照水平的差异表明所述对象患有 IBS 的可能性提高。

[0093] 在一个具体实施方式中, 本发明提供帮助诊断 IBS 的试验, 所述试验包括: (a) 将其中含 IBS 标记物的样品与捕获抗 IBS 标记物抗体接触, 接触条件适于将所述 IBS 标记物转化成含所述 IBS 标记物和捕获抗 IBS 标记物抗体的复合物; (b) 将所述复合物与标记有指示抗体的酶接触将所述复合物转化成带标记复合物; (c) 将所述带标记复合物与所述酶的底物接触; 以及 (d) 检测所述样品中 IBS 标记物的存在或水平, 其中所述 IBS 标记物选自下组: 糖缺失转铁蛋白, 尿皮素, 促肾上腺皮质素释放激素结合蛋白, 皮质醇, 促肾上腺皮质激素, P 物质, 神经生长因子, 神经激肽 A, 神经激肽 B, 血管活性肠肽, 胰高血糖素样肽 2, 促胃动素, 垂体腺苷酸环化酶激活肽, 5-羟色胺, 色氨酸, 5-羟色胺 0-硫酸盐, 5-羟吲哚乙酸, 5-HT 葡萄糖苷酸, 酪氨酸, 苯丙氨酸, UDP-葡萄糖醛酸基转移酶 1-6, 5-羟色胺再摄取转运体, 色氨酸羟化酶 1, 单胺氧化酶 A, 单胺氧化酶 B, 和羟色氨酸 (5-羟色胺) 受体 3A。

[0094] 在某些实施方式中, 对照水平是来自健康对象的血液或血清样品中存在的 IBS 标记物水平, 或者来自健康对象组的血液或血清样品中存在的 IBS 标记物平均水平。在其它实施方式中, 对照水平是来自非 IBS 对象的血液或血清样品中存在的 IBS 标记物水平, 或者来自非 IBS 对象组的血液或血清样品中存在的 IBS 标记物平均水平。在另一实施方式中, 对照水平是来自患病对象的血液或血清样品中存在的 IBS 标记物水平, 或者来自患病对象组的血液或血清样品中存在的 IBS 标记物平均水平。可用以确定对照水平的患病对象的非限制性示例包括: 患有 IBS 的对象, 患有非 IBS 的胃肠疾病的对象, 患有炎症肠病 (IBD) 的对象, 患有溃疡性结肠炎 (UC) 的对象, 患有克罗恩病 (CD) 的对象, 患有乳糜泻的对象, 患有胃食管反流病 (GERD) 的对象, 患有癌症的对象, 患有胃肠道癌症的对象, 患有胃癌的对象, 患有小肠或大肠癌的对象, 等等。

[0095] 在对照水平是某个或某些健康对象的血液或血清样品中 IBS 标记物水平的情况中, 来自对象的样品中存在的 IBS 标记物水平相对所述对照水平提高表明所述对象患有 IBS 的可能性提高。反之, 当对照是某个或某些健康对象时, 来自对象的样品中存在的 IBS 标记物水平与所述对照水平相似或降低表明对象不患有 IBS 的可能性提高。

[0096] 在对照水平是某个或某些患有 IBS 对象的血液或血清样品中 IBS 标记物水平的情况中, 来自对象的样品中存在的 IBS 标记物水平与所述对照水平相似或提高表明所述对象患有 IBS 的可能性提高。反之, 当对照是某个或某些患有 IBS 的对象时, 来自对象的样品中存在的 IBS 标记物水平相对所述对照水平降低表明对象不患有 IBS 的可能性提高。

[0097] 在本发明的某些方面, 提供帮助诊断对象中肠易激综合征 (IBS) 的方法, 所述方法包括检测血液或血清样品中的某 IBS 标记物以及选自 β -类胰蛋白酶、组胺和前列腺素 E_2 (PGE_2) 的至少一个额外血液或血清生物标记物。在一种实施方式中, 所述方法包括检测或确定来自对象的血液或血清样品中所述 IBS 标记物和 β -类胰蛋白酶的水平和/或 PGE_2 的水平。在另一种实施方式中, 所述方法包括检测或确定来自对象的血液或血清样品中所述 IBS 标记物和组胺的水平。在又一种实施方式中, 所述方法包括检测或确定来自对象的

血液或血清样品中所述 IBS 标记物和 β -类胰蛋白酶、组胺及 PGE_2 的水平。所述 IBS 标记物, β -类胰蛋白酶, 组胺和 / 或 PGE_2 优选由同一血液或血清样品检测, 尽管在某些情况中, 所述生物标记物可在取自同一个体的不同血液或血清样品中检测, 例如, 在同一或不同时间取得。在某些实施方式中, 所述生物标记物可以在用来自对象的血液或血清样品的不同等分样品进行的单独试验中测定。在其它实施方式中, 所述生物标记物可以在单个多通路检测试验如 Luminex® xMAP® 试验中测定。

[0098] 在本发明的另一方面, 提供帮助诊断对象中肠易激综合征 (IBS) 的方法, 所述方法包括: 检测血液或血清样品中的 IBS 标记物以及至少一种额外生物标记物, 所述额外生物标记物选自脑源性神经营养因子 (BDNF), 中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (NGAL), TNF 相关弱凋亡诱导因子 (TWEAK), 生长相关癌基因 α (GRO- α), 白介素-1 β (IL-1 β), 金属蛋白酶组织抑制剂-1 (TIMP-1), 抗酿酒酵母抗体 (ASCA-IgA), 抗 CBir-1 抗体 (CBir1), 抗人嗜中性粒细胞胞质抗体 (ANCA), 抗人组织转氨酶 IgA (tTG), β -类胰蛋白酶, 组胺, PGE_2 , 及其组合。在某些实施方式中, 可检测至少两种所述额外生物标记物。在其它实施方式中, 可检测至少 3、4、5、6、7、8、9 或 10 种所述额外生物标记物。

[0099] 可用于检测或确定至少一种诊断标记物的存在或水平的样品通常是全血, 血浆, 血清, 唾液, 尿液, 粪便 (即, 大便), 泪液, 和任何其它体液, 或组织样品 (即, 活检), 例如小肠或结肠样品。所述样品优选是血清、全血、血浆、粪便、尿液或组织活检。在某些情况中, 本发明所述方法还包括从所述个体获取样品然后检测或确定样品中至少一种诊断标记物的存在或水平。在一种优选实施方式中, 所述额外生物标记物可以由血液或血清样品检测。在其它实施方式中, 所述额外生物标记物可由对象粪便样品或肠部活检样品检测。

[0100] 在一种实施方式中, 所述方法包括检测或确定血液或血清样品中所述 IBS 标记物和生物样品中脑源性神经营养因子 (BDNF) 的水平。在一种优选实施方式中, 检测对象血液或血清样品中的脑源性神经营养因子 (BDNF)。在另一优选实施方式中, 检测对象粪便样品或肠部活检样品中的脑源性神经营养因子 (BDNF)。在其它实施方式中, 还检测至少一种额外的生物标记物。

[0101] 在一种实施方式中, 所述方法包括检测或确定血液或血清样品中所述 IBS 标记物和生物样品内中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (NGAL) 的水平。在一种优选实施方式中, 检测对象血液或血清样品中的中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (NGAL)。在另一优选实施方式中, 检测对象粪便样品或肠部活检样品内的中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (NGAL)。在其它实施方式中, 还检测至少一种额外的生物标记物。

[0102] 在一种实施方式中, 所述方法包括检测或确定血液或血清样品中所述 IBS 标记物和生物样品中 TNF 相关弱凋亡诱导因子 (TWEAK) 的水平。在一种优选实施方式中, 检测对象血液或血清样品中的 TNF 相关弱凋亡诱导因子 (TWEAK)。在另一优选实施方式中, 检测对象粪便样品或肠部活检样品中的 TNF 相关弱凋亡诱导因子 (TWEAK)。在其它实施方式中, 还检测至少一种额外的生物标记物。

[0103] 在一种实施方式中, 所述方法包括检测或确定血液或血清样品中所述 IBS 标记物和生物样品中生长相关癌基因 α (GRO- α) 的水平。在一种优选实施方式中, 检测对象血液或血清样品中的生长相关癌基因 α (GRO- α)。在另一优选实施方式中, 检测对象粪便样品或肠部活检样品中的生长相关癌基因 α (GRO- α)。在其它实施方式中, 还检测至少一种额

外的生物标记物。

[0104] 在一种实施方式中,所述方法包括检测或确定血液或血清样品中所述 IBS 标记物和生物样品中白介素 1β (IL- 1β) 的水平。在一种优选实施方式中,检测对象血液或血清样品中的白介素 1β (IL- 1β)。在另一优选实施方式中,检测对象粪便样品或肠部活检样品中的白介素 1β (IL- 1β)。在其它实施方式中,还检测至少一种额外的生物标记物。

[0105] 在一种实施方式中,所述方法包括检测或确定血液或血清样品中所述 IBS 标记物和生物样品中金属蛋白酶组织抑制剂 -1 (TIMP-1) 的水平。在一种优选实施方式中,检测对象血液或血清样品中的金属蛋白酶组织抑制剂 -1 (TIMP-1)。在另一优选实施方式中,检测对象粪便样品或肠部活检样品中的金属蛋白酶组织抑制剂 -1 (TIMP-1)。在其它实施方式中,还检测至少一种额外的生物标记物。

[0106] 在一种实施方式中,所述方法包括检测或确定血液或血清样品中所述 IBS 标记物和生物样品中抗酿酒酵母抗体 (ASCA-IgA) 的水平。在一种优选实施方式中,检测对象血液或血清样品中的抗酿酒酵母抗体 (ASCA-IgA)。在另一优选实施方式中,检测对象粪便样品或肠部活检样品中的抗酿酒酵母抗体 (ASCA-IgA)。在其它实施方式中,还检测至少一种额外的生物标记物。

[0107] 在一种实施方式中,所述方法包括检测或确定血液或血清样品中所述 IBS 标记物和生物样品中抗 CBir 抗体 (CBir1) 的水平。在一种优选实施方式中,检测对象血液或血清样品中的抗 CBir 抗体 (CBir1)。在另一优选实施方式中,检测对象粪便样品或肠部活检样品中的抗 CBir 抗体 (CBir1)。在其它实施方式中,还检测至少一种额外的生物标记物。

[0108] 在一种实施方式中,所述方法包括检测或确定血液或血清样品中所述 IBS 标记物和生物样品中抗人嗜中性粒细胞胞质抗体 (ANCA) 的水平。在一种优选实施方式中,检测对象血液或血清样品中的抗人嗜中性粒细胞胞质抗体 (ANCA)。在另一优选实施方式中,检测对象粪便样品或肠部活检样品中的抗人嗜中性粒细胞胞质抗体 (ANCA)。在其它实施方式中,还检测至少一种额外的生物标记物。

[0109] 在一种实施方式中,所述方法包括检测或确定血液或血清样品中所述 IBS 标记物和生物样品中抗人组织转氨酶 IgA (tTG) 的水平。在一种优选实施方式中,检测对象血液或血清样品中的抗人组织转氨酶 IgA (tTG)。在另一优选实施方式中,检测对象粪便样品或肠部活检样品中的抗人组织转氨酶 IgA (tTG)。在其它实施方式中,还检测至少一种额外的生物标记物。

[0110] 在一种实施方式中,所述方法包括:检测或确定血液或血清样品中 IBS 标记物以及来自对象血液或血清样品、粪便样品或肠部活检样品的所有以下物质的水平:脑源性神经营养因子 (BDNF),中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (NGAL),TNF 相关弱凋亡诱导因子 (TWEAK),生长相关癌基因 α (GRO- α),白介素 - 1β (IL- 1β),金属蛋白酶的抑制剂 -1 (TIMP-1),抗酿酒酵母抗体 (ASCA-IgA),抗 CBir-1 抗体 (CBir1),抗人嗜中性粒细胞胞质抗体 (ANCA),抗人组织转氨酶 IgA (tTG)。

[0111] 在某些实施方式中,用试验如杂交试验或基于扩增的试验确定至少一种诊断标记物的存在或水平。适用于本发明所述方法的杂交试验的示例包括但不限于 RNA 印迹、点印迹、RNA 酶保护,及其组合。适用于本发明所述方法的基于扩增试验的非限制性示例包括逆转录酶聚合酶链反应 (RT-PCR)。

[0112] 在某些其它实施方式中,用免疫试验或免疫组化试验确定至少一种诊断标记物的存在或水平。适用于本发明所述方法的免疫试验的非限制性示例包括酶联免疫吸附测定法(ELISA)。适用于本发明所述方法的免疫组化试验的示例包括但不限于:免疫荧光试验如直接荧光抗体试验,间接荧光抗体(IFA)试验,抗补体免疫荧光试验,和亲和素-生物素免疫荧光试验。其它类型免疫组化试验包括免疫过氧化物酶试验。

[0113] 在一种优选实施方式中,用夹心酶联免疫吸附测定法(ELISA)确定所述 IBS 标记物的存在或水平。任何合适的抗体对可用于夹心 ELISA 中的捕获和检测抗体。本领域技术人员知道并理解如何选择用于试验的合适抗体对。通常,选择在不同表位结合感兴趣靶标如所述 IBS 标记物的两种抗体,使得第一(捕获)抗体的结合不干扰第二(检测)抗体。在某些实施方式中,所述检测抗体可偶联有酶,例如碱性磷酸酶,以帮助检测所述复合物。在其它实施方式中,所述试验中可使用结合所述检测抗体的偶联有酶(例如,碱性磷酸酶)的二级抗体。一般,所述复合物随后用发光底物检测,例如, Ultra LITE™(NAG 研究实验室公司(NAG Research Laboratories));Sensolyte®(AnaSpec 公司);SuperSignal ELISA 毫微微克级最高灵敏度底物(热科学公司(Thermo Scientific));SuperSignal ELISA 皮克级化学发光底物(热科学公司);CPSD(3-(4-甲氧基螺旋{1,2-二氧杂环丁烷-3,2'-(5'-氯)三环[3.3.1.1^{3,7}]癸烷}-4-基)磷酸苯二钠盐;Tropix 公司)。在一种优选实施方式中, β -类胰蛋白酶夹心 ELISA 包括使用偶联有碱性磷酸酶的抗类胰蛋白酶抗体为检测抗体,和含有 CPSD 的发光底物来提高试验灵敏度。所述 CPSD 底物可见于化学发光检测系统中,例如 ELISA-Light™系统(应用生物系统公司(Applied Biosystems))。

[0114] 在一些实施方式中,本文提供的方法还包括为对象确定症状概况的步骤,其中所述症状概况通过鉴定对象中至少一种症状的存在或严重度来确定。在一种优选实施方式中,所述方法包括:(d)确定对象的症状概况,其中所述症状概况通过鉴定所述对象中至少一种症状的存在或严重度来确定;以及(e)利用基于 IBS 生物标记物水平和所述症状概况的算法来将所述对象诊断为患有 IBS 或不患有 IBS。在一种优选实施方式中,帮助诊断对象中肠易激综合征(IBS)的所述方法包括确定诊断标记物概况,例如本文所述 IBS 标记物或其组合的概况,可选联用症状概况,其中所述症状概况通过鉴定所述个体中至少一种症状的存在或严重度来确定;并利用基于所述诊断标记物概况和症状概况的算法将所述样品分类为 IBS 样品或非 IBS 样品。

[0115] 所述症状概况通常通过鉴定至少一种症状的存在或严重度来确定,所述症状选自下组:胸痛、胸部不适、胃灼热、常规量餐后的不适饱胀感,不能完成常规量用餐,腹痛,腹部不适,便秘,腹泻,胀气,腹胀,与疼痛或不适相关的消极想法或负面感觉,及其组合。

[0116] 在优选实施方式中,鉴定 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 或更多种本文所述症状的存在或严重度以产生可用于预测 IBS 的症状概况。在某些情况中,用问卷或其它形式的书面、口头或电话调查来产生所述症状概况。所述问卷或调查通常包括标准化的问题和答案组,用于从回答者采集其当前和/或近期 IBS 相关症状的信息。

[0117] 在一些实施方式中,通过汇编和/或分析所述问卷或调查所列问题的全部答案或其子集来产生所述症状概况。在其它实施方式中,所述症状概况的产生是根据所述个体对下列问题的回应:“您目前是否经历任何症状?”按这些实施方式中任一种所产生的症状概况可与诊断标记物概况联用于本文所述基于算法的方法以提高 IBS 预测的准确性。

[0118] 在一些实施方式中,本文提供的方法还包括提供对象患有 IBS 的概率。在某些实施方式中,所述方法可包括提供所述对象很不可能,不太可能,可能或很可能患有 IBS 的概率。在相关实施方式中,提供的方法进一步包括提供分类为 IBS 样品或非 IBS 样品的某样品来自患有 IBS 对象的概率。在某些实施方式中,所述方法可包括提供样品来自很不可能,不太可能,可能或很可能患有 IBS 的对象的概率。

[0119] 在其它实施方式中,本文提供的方法还包括将 IBS 的诊断分类为 IBS-便秘型 (IBS-C), IBS-腹泻型 (IBS-D), IBS-混合型 (IBS-M), IBS-交替型 (IBS-A), 或感染后 IBS (IBS-PI)。在相关实施方式中,本文提供的方法还将样品分类为 IBS-便秘型 (IBS-C), IBS-腹泻型 (IBS-D), IBS-混合型 (IBS-M), IBS-交替型 (IBS-A), 或感染后 IBS (IBS-PI) 样品。

[0120] 在一种实施方式中,本发明提供帮助区分 IBS-D 和 IBS-A 与 IBS-C 的试验,所述试验包括:(a) 将其中含 IBS 标记物的样品与捕获抗 IBS 标记物抗体接触,接触条件适于将所述 IBS 标记物转化成含所述 IBS 标记物和捕获抗 IBS 标记物抗体的复合物;(b) 将所述复合物与标记有指示抗体的酶接触将所述复合物转化成带标记复合物;(c) 将所述带标记复合物与所述酶的底物接触;以及 (d) 检测所述样品中 IBS 标记物的存在或水平。

[0121] 在一些情况中,帮助区分 IBS-D 和 IBS-A 与 IBS-C 的所述试验还包括检测所述样品中 β -类胰蛋白酶、前列腺素 (例如, PGE_2) 和 / 或组胺的存在或水平。

[0122] 在另一些实施方式中,本文提供的方法还包括将不患有 IBS 的对象诊断为患有 IBD, 不患有 IBD, 患有乳糜泻, 不患有乳糜泻, 是健康对象, 或是不患有胃肠疾病的对象。在相关实施方式中,本文提供的方法还包括将非 IBS 样品分类为 IBD 样品, 非 IBD 样品, 健康样品, 非胃肠疾病样品, 乳糜泻样品, 等等。

[0123] 在一种实施方式中,本文提供的方法包括使用基于 IBS 生物标记物水平的算法。在某些实施方式中,所述算法还基于系统概况。在一种优选实施方式中,所述算法包括统计算法,例如学习型统计分类系统。在一种更优选的实施方式中,所述算法包括至少 2 种学习型统计分类系统的组合。在一种最优选的实施方式中,所述至少 2 种学习型统计分类系统的组合包括随机森林分类器和神经网络分类器。

[0124] 2. 应激标记物

[0125] 在一种实施方式中,本发明提供通过检测来自对象的生物样品 (例如,血液或血清样品) 中应激标记物的水平或浓度来帮助诊断对象中肠易激综合征 (IBS) 的方法。所述应激标记物的水平或浓度可通过本领域已知的不同方法确定,包括但不限于:免疫试验,例如酶免疫试验 (EIA) 如酶放大免疫测定技术 (EMIT), 酶联免疫吸附试验 (ELISA), 抗原捕获 ELISA, 夹心 ELISA, IgM 抗体捕获 ELISA (MAC ELISA), 和微粒子酶免疫测定 (MEIA); 毛细管电泳免疫试验 (CEIA); 放射免疫试验 (RIA); 免疫放射测定 (IRMA); 荧光偏振免疫测定 (FPIA); 和化学发光试验 (CL); 标记物纯化,例如通过高压液相色谱 (HPLC), 可单独或与质谱 (例如, MALDI/MS、MALDI-TOF/MS、SELDI-TOF/MS、串联 MS 等) 联用;和其它熟知方法,包括但不限于:布拉德福德 (Bradford) 测定,考马斯蓝染色,银染,用于放射性标记蛋白质的试验,以及质谱。

[0126] 在一种具体实施方式中,提供用于帮助诊断对象中肠易激综合征 (IBS) 的方法,所述方法包括:将来自对象的血液或血清样品与应激标记物结合部分接触,接触条件适

于将样品内所述应激标记物转化成含所述应激标记物和应激标记物结合部分的复合物；并确定所述复合物的水平，从而确定所述样品中所述应激标记物的水平或浓度。在一种优选实施方式中，所述应激标记物选自尿皮素 (Ucn)，促肾上腺皮质素释放激素结合蛋白 (CRFBP)，皮质醇，促肾上腺皮质激素，及其组合。

[0127] 在一种实施方式中，上文提供的方法还包括将所述样品中存在的应激标记物的水平或浓度与对照水平或浓度作比较，其中所述样品中存在的应激标记物的水平或浓度相对对照水平或浓度的差异表明所述对象患有 IBS 的可能性提高。

[0128] 在对照水平或浓度是来自健康对象的血液或血清样品中存在的所述应激标记物水平或浓度的一种实施方式中，样品中存在的应激标记物水平或浓度相对所述对照水平或浓度有提高表明所述对象患有 IBS 的可能性提高，而样品中存在的应激标记物水平或浓度与所述对照水平或浓度相同或降低表明所述对象不患有 IBS 的可能性提高。

[0129] 在对照水平或浓度是来自患有 IBS 对象的血液或血清样品中存在的所述应激标记物水平或浓度的另一实施方式中，样品中存在的应激标记物水平或浓度与所述对照水平或浓度相同或有提高表明所述对象患有 IBS 的可能性提高，而样品中存在的应激标记物水平或浓度相对所述对照水平或浓度降低表明所述对象不患有 IBS 的可能性提高。

[0130] 在另一相关实施方式中，提供通过检测应激标记物和至少一种额外 IBS 标记物的水平或浓度来帮助诊断对象中肠易激综合征 (IBS) 的方法，所述额外 IBS 标记物选自脑源性神经营养因子 (BDNF)，中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (NGAL)，TNF 相关弱凋亡诱导因子 (TWEAK)，生长相关癌基因 α (GRO- α)，白介素 -1 β (IL-1 β)，金属蛋白酶组织抑制剂 -1 (TIMP-1)，抗酿酒酵母抗体 (ASCA-IgA)，抗 CBir-1 抗体 (CBir1)，抗人嗜中性粒细胞胞质抗体 (ANCA)，抗人组织转氨酶 IgA (tTG)，组胺， β -类胰蛋白酶，前列腺素 E_2 (PGE $_2$)，及其组合。

[0131] 在一种具体实施方式中，提供用于帮助诊断对象中肠易激综合征 (IBS) 的方法，所述方法包括：将来自对象的血液或血清样品与尿皮素结合部分接触，接触条件适于将样品内存在的尿皮素转化成含尿皮素和所述尿皮素结合部分的复合物；并确定所述复合物的水平，从而确定所述样品中尿皮素的存在水平或浓度。在一种实施方式中，所述方法还包括检测至少一种额外 IBS 标记物的水平或浓度，所述额外 IBS 标记物选自脑源性神经营养因子 (BDNF)，中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (NGAL)，TNF 相关弱凋亡诱导因子 (TWEAK)，生长相关癌基因 α (GRO- α)，白介素 -1 β (IL-1 β)，金属蛋白酶组织抑制剂 -1 (TIMP-1)，抗酿酒酵母抗体 (ASCA-IgA)，抗 CBir-1 抗体 (CBir1)，抗人嗜中性粒细胞胞质抗体 (ANCA)，抗人组织转氨酶 IgA (tTG)，组胺， β -类胰蛋白酶和前列腺素 E_2 (PGE $_2$)。

[0132] 在另一具体实施方式中，提供用于帮助诊断对象中肠易激综合征 (IBS) 的方法，所述方法包括：将来自对象的血液或血清样品与促肾上腺皮质素释放激素结合蛋白结合部分接触，接触条件适于将样品内存在的促肾上腺皮质素释放激素结合蛋白转化成含促肾上腺皮质素释放激素结合蛋白和所述促肾上腺皮质素释放激素结合蛋白结合部分的复合物；并确定所述复合物的水平，从而确定所述样品中促肾上腺皮质素释放激素结合蛋白的存在水平或浓度。在一种实施方式中，所述方法还包括检测至少一种额外 IBS 标记物的水平或浓度，所述额外 IBS 标记物选自脑源性神经营养因子 (BDNF)，中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (NGAL)，TNF 相关弱凋亡诱导因子 (TWEAK)，生长相关癌基因 α (GRO- α)，白

介素-1 β (IL-1 β), 金属蛋白酶组织抑制剂-1 (TIMP-1), 抗酿酒酵母抗体 (ASCA-IgA), 抗 CBir-1 抗体 (CBir1), 抗人嗜中性粒细胞胞质抗体 (ANCA), 抗人组织转氨酶 IgA (tTG), 组胺, β -类胰蛋白酶和前列腺素 E₂ (PGE₂)。

[0133] 在另一具体实施方式中, 提供用于帮助诊断对象中肠易激综合征 (IBS) 的方法, 所述方法包括: 将来自对象的血液或血清样品与皮质醇结合部分接触, 接触条件适于将样品内存在的皮质醇转化成含皮质醇和所述皮质醇结合部分的复合物; 并确定所述复合物的水平, 从而确定所述样品中皮质醇的存在水平或浓度。在一种实施方式中, 所述方法还包括检测至少一种额外 IBS 标记物的水平或浓度, 所述额外 IBS 标记物选自脑源性神经营养因子 (BDNF), 中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (NGAL), TNF 相关弱凋亡诱导因子 (TWEAK), 生长相关癌基因 α (GRO- α), 白介素-1 β (IL-1 β), 金属蛋白酶组织抑制剂-1 (TIMP-1), 抗酿酒酵母抗体 (ASCA-IgA), 抗 CBir-1 抗体 (CBir1), 抗人嗜中性粒细胞胞质抗体 (ANCA), 抗人组织转氨酶 IgA (tTG), 组胺, β -类胰蛋白酶和前列腺素 E₂ (PGE₂)。

[0134] 在另一具体实施方式中, 提供用于帮助诊断对象中肠易激综合征 (IBS) 的方法, 所述方法包括: 将来自对象的血液或血清样品与促肾上腺皮质激素结合部分接触, 接触条件适于将样品内存在的促肾上腺皮质激素转化成含促肾上腺皮质激素和所述促肾上腺皮质激素结合部分的复合物; 并确定所述复合物的水平, 从而确定所述样品中促肾上腺皮质激素的存在水平或浓度。在一种实施方式中, 所述方法还包括检测至少一种额外 IBS 标记物的水平或浓度, 所述额外 IBS 标记物选自脑源性神经营养因子 (BDNF), 中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (NGAL), TNF 相关弱凋亡诱导因子 (TWEAK), 生长相关癌基因 α (GRO- α), 白介素-1 β (IL-1 β), 金属蛋白酶组织抑制剂-1 (TIMP-1), 抗酿酒酵母抗体 (ASCA-IgA), 抗 CBir-1 抗体 (CBir1), 抗人嗜中性粒细胞胞质抗体 (ANCA), 抗人组织转氨酶 IgA (tTG), 组胺, β -类胰蛋白酶和前列腺素 E₂ (PGE₂)。

[0135] 3. 胃肠激素

[0136] 在一种实施方式中, 本发明提供通过检测来自对象的生物样品 (例如, 血液或血清样品) 中胃肠激素的水平或浓度来帮助诊断对象中肠易激综合征 (IBS) 的方法。所述胃肠激素的水平或浓度可通过本领域已知的不同方法确定, 包括但不限于: 免疫试验, 例如酶免疫试验 (EIA) 如酶放大免疫测定技术 (EMIT), 酶联免疫吸附试验 (ELISA), 抗原捕获 ELISA, 夹心 ELISA, IgM 抗体捕获 ELISA (MAC ELISA), 和微粒子酶免疫测定 (MEIA); 毛细管电泳免疫试验 (CEIA); 放射免疫试验 (RIA); 免疫放射测定 (IRMA); 荧光偏振免疫测定 (FPIA); 和化学发光试验 (CL); 标记物纯化, 例如通过高压液相色谱 (HPLC), 可单独或与质谱 (例如, MALDI/MS、MALDI-TOF/MS、SELDI-TOF/MS、串联 MS 等) 联用; 和其它熟知方法, 包括但不限于: 布拉德福德测定, 考马斯蓝染色, 银染, 用于放射性标记蛋白质的试验, 以及质谱。

[0137] 在一种具体实施方式中, 提供用于帮助诊断对象中肠易激综合征 (IBS) 的方法, 所述方法包括: 将来自对象的血液或血清样品与胃肠激素结合部分接触, 接触条件适于将样品内存在的胃肠激素转化成含胃肠激素和所述胃肠激素结合部分的复合物; 并确定所述复合物的水平, 从而确定所述样品中胃肠激素的存在水平或浓度。在一种优选实施方式中, 所述胃肠激素选自 P 物质, 神经生长因子 (NGF), 神经激肽 A, 神经激肽 B, 血管活性肠肽 (VIP), 胰高血糖素样肽 2 (GLP-2), 促胃动素, 垂体腺苷酸环化酶激活肽 (PACAP), 及其组

合。

[0138] 在一种实施方式中,上文提供的方法还包括将所述样品中存在的胃肠激素水平和浓度与对照水平或浓度作比较,其中所述样品中存在的胃肠激素水平或浓度相对对照水平或浓度的差异表明所述对象患有 IBS 的可能性提高。

[0139] 在对照水平或浓度是来自健康对象的血液或血清样品中所述胃肠激素的存在水平或浓度的一种实施方式中,样品中胃肠道激素的存在水平或浓度相对所述对照水平或浓度有提高表明所述对象患有 IBS 的可能性提高,而样品中胃肠激素的存在水平或浓度与所述对照水平或浓度相同或有降低表明所述对象不患有 IBS 的可能性提高。

[0140] 在对照水平或浓度是来自患有 IBS 对象的血液或血清样品中所述胃肠激素的存在水平或浓度的另一实施方式中,样品中胃肠激素的存在水平或浓度与所述对照水平或浓度为相同或有提高表明所述对象患有 IBS 的可能性提高,而样品中胃肠激素的存在水平或浓度相对所述对照水平或浓度降低表明所述对象不患有 IBS 的可能性提高。

[0141] 在另一相关实施方式中,提供通过检测胃肠激素和至少一种额外 IBS 标记物的水平或浓度来帮助诊断对象中肠易激综合征 (IBS) 的方法,所述额外 IBS 标记物选自脑源性神经营养因子 (BDNF),中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (NGAL),TNF 相关弱凋亡诱导因子 (TWEAK),生长相关癌基因 α (GRO- α),白介素 -1 β (IL-1 β),金属蛋白酶组织抑制剂-1 (TIMP-1),抗酿酒酵母抗体 (ASCA-IgA),抗 CBir-1 抗体 (CBir1),抗人嗜中性粒细胞胞质抗体 (ANCA),抗人组织转氨酶 IgA (tTG),组胺, β -类胰蛋白酶,前列腺素 E_2 (PGE $_2$),及其组合。

[0142] 在一种具体实施方式中,提供用于帮助诊断对象中肠易激综合征 (IBS) 的方法,所述方法包括:将来自对象的血液或血清样品与 P 物质结合部分接触,接触条件适于将样品内存在的 P 物质转化成含 P 物质和所述 P 物质结合部分的复合物;并确定所述复合物的水平,从而确定所述样品中 P 物质的存在水平或浓度。在一种实施方式中,所述方法还包括检测至少一种额外 IBS 标记物的水平或浓度,所述额外 IBS 标记物选自脑源性神经营养因子 (BDNF),中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (NGAL),TNF 相关弱凋亡诱导因子 (TWEAK),生长相关癌基因 α (GRO- α),白介素 -1 β (IL-1 β),金属蛋白酶组织抑制剂-1 (TIMP-1),抗酿酒酵母抗体 (ASCA-IgA),抗 CBir-1 抗体 (CBir1),抗人嗜中性粒细胞胞质抗体 (ANCA),抗人组织转氨酶 IgA (tTG),组胺, β -类胰蛋白酶和前列腺素 E_2 (PGE $_2$)。

[0143] 在另一具体实施方式中,提供用于帮助诊断对象中肠易激综合征 (IBS) 的方法,所述方法包括:将来自对象的血液或血清样品与神经生长因子结合部分接触,接触条件适于将样品内存在的神经生长因子转化成含神经生长因子和所述神经生长因子结合部分的复合物;并确定所述复合物的水平,从而确定所述样品中神经生长因子的存在水平或浓度。在一种实施方式中,所述方法还包括检测至少一种额外 IBS 标记物的水平或浓度,所述额外 IBS 标记物选自脑源性神经营养因子 (BDNF),中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (NGAL),TNF 相关弱凋亡诱导因子 (TWEAK),生长相关癌基因 α (GRO- α),白介素 -1 β (IL-1 β),金属蛋白酶组织抑制剂-1 (TIMP-1),抗酿酒酵母抗体 (ASCA-IgA),抗 CBir-1 抗体 (CBir1),抗人嗜中性粒细胞胞质抗体 (ANCA),抗人组织转氨酶 IgA (tTG),组胺, β -类胰蛋白酶和前列腺素 E_2 (PGE $_2$)。

[0144] 在另一具体实施方式中,提供用于帮助诊断对象中肠易激综合征 (IBS) 的方法,

所述方法包括：将来自对象的血液或血清样品与神经激肽 A 结合部分接触，接触条件适于将样品内存在的神经激肽 A 转化成含神经激肽 A 和所述神经激肽 A 结合部分的复合物；并确定所述复合物的水平，从而确定所述样品中神经激肽 A 的存在水平或浓度。在一种实施方式中，所述方法还包括检测至少一种额外 IBS 标记物的水平或浓度，所述额外 IBS 标记物选自脑源性神经营养因子 (BDNF)，中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (NGAL)，TNF 相关弱凋亡诱导因子 (TWEAK)，生长相关癌基因 α (GRO- α)，白介素 -1 β (IL-1 β)，金属蛋白酶组织抑制剂 -1 (TIMP-1)，抗酿酒酵母抗体 (ASCA-IgA)，抗 CBir-1 抗体 (CBir1)，抗人嗜中性粒细胞胞质抗体 (ANCA)，抗人组织转氨酶 IgA (tTG)，组胺， β -类胰蛋白酶和前列腺素 E_2 (PGE $_2$)。

[0145] 在另一具体实施方式中，提供用于帮助诊断对象中肠易激综合征 (IBS) 的方法，所述方法包括：将来自对象的血液或血清样品与神经激肽 B 结合部分接触，接触条件适于将样品内存在的神经激肽 B 转化成含神经激肽 B 和所述神经激肽 B 结合部分的复合物；并确定所述复合物的水平，从而确定所述样品中神经激肽 B 的存在水平或浓度。在一种实施方式中，所述方法还包括检测至少一种额外 IBS 标记物的水平或浓度，所述额外 IBS 标记物选自脑源性神经营养因子 (BDNF)，中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (NGAL)，TNF 相关弱凋亡诱导因子 (TWEAK)，生长相关癌基因 α (GRO- α)，白介素 -1 β (IL-1 β)，金属蛋白酶组织抑制剂 -1 (TIMP-1)，抗酿酒酵母抗体 (ASCA-IgA)，抗 CBir-1 抗体 (CBir1)，抗人嗜中性粒细胞胞质抗体 (ANCA)，抗人组织转氨酶 IgA (tTG)，组胺， β -类胰蛋白酶和前列腺素 E_2 (PGE $_2$)。

[0146] 在另一具体实施方式中，提供用于帮助诊断对象中肠易激综合征 (IBS) 的方法，所述方法包括：将来自对象的血液或血清样品与血管活性肠肽结合部分接触，接触条件适于将样品内存在的血管活性肠肽转化成含血管活性肠肽和所述血管活性肠肽结合部分的复合物；并确定所述复合物的水平，从而确定所述样品中血管活性肠肽的存在水平或浓度。在一种实施方式中，所述方法还包括检测至少一种额外 IBS 标记物的水平或浓度，所述额外 IBS 标记物选自脑源性神经营养因子 (BDNF)，中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (NGAL)，TNF 相关弱凋亡诱导因子 (TWEAK)，生长相关癌基因 α (GRO- α)，白介素 -1 β (IL-1 β)，金属蛋白酶组织抑制剂 -1 (TIMP-1)，抗酿酒酵母抗体 (ASCA-IgA)，抗 CBir-1 抗体 (CBir1)，抗人嗜中性粒细胞胞质抗体 (ANCA)，抗人组织转氨酶 IgA (tTG)，组胺， β -类胰蛋白酶和前列腺素 E_2 (PGE $_2$)。

[0147] 在另一具体实施方式中，提供用于帮助诊断对象中肠易激综合征 (IBS) 的方法，所述方法包括：将来自对象的血液或血清样品与胰高血糖素样肽 2 结合部分接触，接触条件适于将样品内存在的胰高血糖素样肽 2 转化成含胰高血糖素样肽 2 和所述胰高血糖素样肽 2 结合部分的复合物；并确定所述复合物的水平，从而确定所述样品中胰高血糖素样肽 2 的存在水平或浓度。在一种实施方式中，所述方法还包括检测至少一种额外 IBS 标记物的水平或浓度，所述额外 IBS 标记物选自脑源性神经营养因子 (BDNF)，中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (NGAL)，TNF 相关弱凋亡诱导因子 (TWEAK)，生长相关癌基因 α (GRO- α)，白介素 -1 β (IL-1 β)，金属蛋白酶组织抑制剂 -1 (TIMP-1)，抗酿酒酵母抗体 (ASCA-IgA)，抗 CBir-1 抗体 (CBir1)，抗人嗜中性粒细胞胞质抗体 (ANCA)，抗人组织转氨酶 IgA (tTG)，组胺， β -类胰蛋白酶和前列腺素 E_2 (PGE $_2$)。

[0148] 在另一具体实施方式中,提供用于帮助诊断对象中肠易激综合征(IBS)的方法,所述方法包括:将来自对象的血液或血清样品与促胃动素结合部分接触,接触条件适于将样品内存在的促胃动素转化成含促胃动素和所述促胃动素结合部分的复合物;并确定所述复合物的水平,从而确定所述样品中促胃动素的存在水平或浓度。在一种实施方式中,所述方法还包括检测至少一种额外 IBS 标记物的水平或浓度,所述额外 IBS 标记物选自脑源性神经营养因子(BDNF),中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL),TNF 相关弱凋亡诱导因子(TWEAK),生长相关癌基因 α (GRO- α),白介素-1 β (IL-1 β),金属蛋白酶组织抑制剂-1(TIMP-1),抗酿酒酵母抗体(ASCA-IgA),抗CBir-1抗体(CBir1),抗人嗜中性粒细胞胞质抗体(ANCA),抗人组织转氨酶 IgA(tTG),组胺, β -类胰蛋白酶和前列腺素 E_2 (PGE $_2$)。

[0149] 在另一具体实施方式中,提供用于帮助诊断对象中肠易激综合征(IBS)的方法,所述方法包括:将来自对象的血液或血清样品与垂体腺苷酸环化酶激活肽结合部分接触,接触条件适于将样品内存在的垂体腺苷酸环化酶激活肽转化成含垂体腺苷酸环化酶激活肽和所述垂体腺苷酸环化酶激活肽结合部分的复合物;并确定所述复合物的水平,从而确定所述样品中垂体腺苷酸环化酶激活肽的存在水平或浓度。在一种实施方式中,所述方法还包括检测至少一种额外 IBS 标记物的水平或浓度,所述额外 IBS 标记物选自脑源性神经营养因子(BDNF),中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL),TNF 相关弱凋亡诱导因子(TWEAK),生长相关癌基因 α (GRO- α),白介素-1 β (IL-1 β),金属蛋白酶组织抑制剂-1(TIMP-1),抗酿酒酵母抗体(ASCA-IgA),抗CBir-1抗体(CBir1),抗人嗜中性粒细胞胞质抗体(ANCA),抗人组织转氨酶 IgA(tTG),组胺, β -类胰蛋白酶和前列腺素 E_2 (PGE $_2$)。

[0150] 4.5-羟色胺代谢物

[0151] 在一种实施方式中,本发明提供通过检测来自对象的生物样品(例如,血液或血清样品)中5-羟色胺代谢物的水平或浓度来帮助诊断对象中肠易激综合征(IBS)的方法。所述5-羟色胺代谢物的水平或浓度可通过本领域已知的不同方法确定,包括但不限于:免疫试验,例如酶免疫试验(EIA)如酶放大免疫测定技术(EMIT),酶联免疫吸附试验(ELISA),抗原捕获ELISA,夹心ELISA,IgM抗体捕获ELISA(MAC ELISA),和微粒子酶免疫测定(MEIA);毛细管电泳免疫试验(CEIA);放射免疫试验(RIA);免疫放射测定(IRMA);荧光偏振免疫测定(FPIA);和化学发光试验(CL);标记物纯化,例如通过高压液相色谱(HPLC),可单独或与质谱联用(例如,MALDI/MS、MALDI-TOF/MS、SELDI-TOF/MS、串联MS等);和其它熟知方法,包括但不限于:布拉德福德测定,考马斯蓝染色,银染,用于放射性标记蛋白质的试验,以及质谱。

[0152] 在一种具体实施方式中,提供用于帮助诊断对象中肠易激综合征(IBS)的方法,所述方法包括:将来自对象的血液或血清样品与5-羟色胺代谢物结合部分接触,接触条件适于将样品内存在的所述5-羟色胺代谢物转化成含所述5-羟色胺代谢物和5-羟色胺代谢物结合部分的复合物;并确定所述复合物的水平,从而确定所述样品中存在的所述5-羟色胺代谢物的水平或浓度。在一种优选实施方式中,5-羟色胺代谢物选自5-羟色胺、色氨酸、5-羟色胺O-硫酸盐,5-羟基吲哚乙酸,5-HT 葡萄糖苷酸,及其组合。

[0153] 在一种实施方式中,上文提供的方法还包括将所述样品中存在的5-羟色胺代谢物的水平和浓度与对照水平或浓度作比较,其中所述样品中存在的5-羟色胺代谢物的水平或浓度相对对照水平或浓度的差异表明所述对象患有IBS的可能性提高。

[0154] 在对照水平或浓度是来自健康对象的血液或血清样品中所述 5-羟色胺代谢物的存在水平或浓度的一种实施方式中,样品中 5-羟色胺代谢物的存在水平或浓度相对所述对照水平或浓度提高表明所述对象患有 IBS 的可能性提高,而样品中 5-羟色胺代谢物的存在水平或浓度与所述对照水平或浓度相同或有降低表明所述对象不患有 IBS 的可能性提高。

[0155] 在对照水平或浓度是来自患有 IBS 对象的血液或血清样品中所述 5-羟色胺代谢物的存在水平或浓度的另一实施方式中,样品中 5-羟色胺代谢物的存在水平或浓度与所述对照水平或浓度相同或有提高表明所述对象患有 IBS 的可能性提高,而样品中 5-羟色胺代谢物的存在水平或浓度相对所述对照水平或浓度降低表明所述对象不患有 IBS 的可能性提高。

[0156] 在另一相关实施方式中,提供通过检测 5-羟色胺代谢物和至少一种额外 IBS 标记物的水平或浓度来帮助诊断对象中肠易激综合征 (IBS) 的方法,所述额外 IBS 标记物选自脑源性神经营养因子 (BDNF),中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (NGAL),TNF 相关弱凋亡诱导因子 (TWEAK),生长相关癌基因 α (GRO- α),白介素 -1 β (IL-1 β),金属蛋白酶组织抑制剂-1 (TIMP-1),抗酿酒酵母抗体 (ASCA-IgA),抗 CBir-1 抗体 (CBir1),抗人嗜中性粒细胞胞质抗体 (ANCA),抗人组织转氨酶 IgA (tTG),组胺, β -类胰蛋白酶,前列腺素 E_2 (PGE $_2$),及其组合。

[0157] 在一种具体实施方式中,提供用于帮助诊断对象中肠易激综合征 (IBS) 的方法,所述方法包括:将来自对象的血液或血清样品与 5-羟色胺结合部分接触,接触条件适于将样品内存在的 5-羟色胺转化成含 5-羟色胺和所述 5-羟色胺结合部分的复合物;并确定所述复合物的水平,从而确定所述样品中 5-羟色胺的存在水平或浓度。在一种实施方式中,所述方法还包括检测至少一种额外 IBS 标记物的水平或浓度,所述额外 IBS 标记物选自脑源性神经营养因子 (BDNF),中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (NGAL),TNF 相关弱凋亡诱导因子 (TWEAK),生长相关癌基因 α (GRO- α),白介素 -1 β (IL-1 β),金属蛋白酶组织抑制剂-1 (TIMP-1),抗酿酒酵母抗体 (ASCA-IgA),抗 CBir-1 抗体 (CBir1),抗人嗜中性粒细胞胞质抗体 (ANCA),抗人组织转氨酶 IgA (tTG),组胺, β -类胰蛋白酶和前列腺素 E_2 (PGE $_2$)。

[0158] 在另一具体实施方式中,提供用于帮助诊断对象中肠易激综合征 (IBS) 的方法,所述方法包括:将来自对象的血液或血清样品与色氨酸结合部分接触,接触条件适于将样品内存在的色氨酸转化成含色氨酸和所述色氨酸结合部分的复合物;并确定所述复合物的水平,从而确定所述样品中色氨酸的存在水平或浓度。在一种实施方式中,所述方法还包括检测至少一种额外 IBS 标记物的水平或浓度,所述额外 IBS 标记物选自脑源性神经营养因子 (BDNF),中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (NGAL),TNF 相关弱凋亡诱导因子 (TWEAK),生长相关癌基因 α (GRO- α),白介素 -1 β (IL-1 β),金属蛋白酶组织抑制剂-1 (TIMP-1),抗酿酒酵母抗体 (ASCA-IgA),抗 CBir-1 抗体 (CBir1),抗人嗜中性粒细胞胞质抗体 (ANCA),抗人组织转氨酶 IgA (tTG),组胺, β -类胰蛋白酶和前列腺素 E_2 (PGE $_2$)。

[0159] 在另一具体实施方式中,提供用于帮助诊断对象中肠易激综合征 (IBS) 的方法,所述方法包括:将来自对象的血液或血清样品与 5-羟色胺 0-硫酸盐结合部分接触,接触条件适于将样品内存在的 5-羟色胺 0-硫酸盐转化成含 5-羟色胺 0-硫酸盐和所述 5-羟色胺 0-硫酸盐结合部分的复合物;并确定所述复合物的水平,从而确定所述样品中 5-羟

色胺 0- 硫酸盐的存在水平或浓度。在一种实施方式中,所述方法还包括检测至少一种额外 IBS 标记物的水平或浓度,所述额外 IBS 标记物选自脑源性神经营养因子 (BDNF),中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (NGAL),TNF 相关弱凋亡诱导因子 (TWEAK),生长相关癌基因 α (GRO- α),白介素 -1 β (IL-1 β),金属蛋白酶组织抑制剂 -1 (TIMP-1),抗酿酒酵母抗体 (ASCA-IgA),抗 CBir-1 抗体 (CBir1),抗人嗜中性粒细胞胞质抗体 (ANCA),抗人组织转氨酶 IgA (tTG),组胺, β - 类胰蛋白酶和前列腺素 E_2 (PGE $_2$)。

[0160] 在另一具体实施方式中,提供用于帮助诊断对象中肠易激综合征 (IBS) 的方法,所述方法包括:将来自对象的血液或血清样品与 5- 羟吲哚乙酸结合部分接触,接触条件适于将样品内存在的 5- 羟吲哚乙酸转化成含 5- 羟吲哚乙酸和所述 5- 羟吲哚乙酸结合部分的复合物;并确定所述复合物的水平,从而确定所述样品中 5- 羟吲哚乙酸的存在水平或浓度。在一种实施方式中,所述方法还包括检测至少一种额外 IBS 标记物的水平或浓度,所述额外 IBS 标记物选自脑源性神经营养因子 (BDNF),中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (NGAL),TNF 相关弱凋亡诱导因子 (TWEAK),生长相关癌基因 α (GRO- α),白介素 -1 β (IL-1 β),金属蛋白酶组织抑制剂 -1 (TIMP-1),抗酿酒酵母抗体 (ASCA-IgA),抗 CBir-1 抗体 (CBir1),抗人嗜中性粒细胞胞质抗体 (ANCA),抗人组织转氨酶 IgA (tTG),组胺, β - 类胰蛋白酶和前列腺素 E_2 (PGE $_2$)。

[0161] 在另一具体实施方式中,提供用于帮助诊断对象中肠易激综合征 (IBS) 的方法,所述方法包括:将来自对象的血液或血清样品与 5-HT 葡萄糖苷酸结合部分接触,接触条件适于将样品内存在的 5-HT 葡萄糖苷酸转化成含 5-HT 葡萄糖苷酸和所述 5-HT 葡萄糖苷酸结合部分的复合物;并确定所述复合物的水平,从而确定所述样品中 5-HT 葡萄糖苷酸的存在水平或浓度。在一种实施方式中,所述方法还包括检测至少一种额外 IBS 标记物的水平或浓度,所述额外 IBS 标记物选自脑源性神经营养因子 (BDNF),中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (NGAL),TNF 相关弱凋亡诱导因子 (TWEAK),生长相关癌基因 α (GRO- α),白介素 -1 β (IL-1 β),金属蛋白酶组织抑制剂 -1 (TIMP-1),抗酿酒酵母抗体 (ASCA-IgA),抗 CBir-1 抗体 (CBir1),抗人嗜中性粒细胞胞质抗体 (ANCA),抗人组织转氨酶 IgA (tTG),组胺, β - 类胰蛋白酶和前列腺素 E_2 (PGE $_2$)。

[0162] 5. 血清代谢物

[0163] 在一种实施方式中,本发明提供通过检测来自对象的生物样品 (例如,血液或血清样品) 中血清代谢物的水平或浓度来帮助诊断对象中肠易激综合征 (IBS) 的方法。所述血清代谢物的水平或浓度可通过本领域已知的不同方法确定,包括但不限于:免疫试验,例如酶免疫试验 (EIA) 如酶放大免疫测定技术 (EMIT),酶联免疫吸附试验 (ELISA),抗原捕获 ELISA,夹心 ELISA, IgM 抗体捕获 ELISA (MAC ELISA),和微粒子酶免疫测定 (MEIA);毛细管电泳免疫试验 (CEIA);放射免疫试验 (RIA);免疫放射测定 (IRMA);荧光偏振免疫测定 (FPIA);和化学发光试验 (CL);标记物纯化,例如通过高压液相色谱 (HPLC),可单独或与质谱 (例如, MALDI/MS、MALDI-TOF/MS、SELDI-TOF/MS、串联 MS 等) 联用;和其它熟知方法,包括但不限于:布拉德福德测定,考马斯蓝染色,银染,用于放射性标记蛋白质的试验,以及质谱。

[0164] 在一种具体实施方式中,提供用于帮助诊断对象中肠易激综合征 (IBS) 的方法,所述方法包括:将来自对象的血液或血清样品与血清代谢物结合部分接触,接触条件适于

将样品内所述血清代谢物转化成含所述血清代谢物和血清代谢物结合部分的复合物；并确定所述复合物的水平，从而确定所述样品中存在的所述血清代谢物的水平或浓度。在一种优选实施方式中，所述血清代谢物选自酪氨酸和 / 或苯丙氨酸。

[0165] 在一种实施方式中，上文提供的方法还包括将所述样品中存在的血清代谢物水平或浓度与对照水平或浓度作比较，其中所述样品中存在的血清代谢物的水平或浓度相对对照水平或浓度的差异表明所述对象患有 IBS 的可能性提高。

[0166] 在对照水平或浓度是来自健康对象的血液或血清样品中所述血清代谢物的存在水平或浓度的一种实施方式中，样品中血清代谢物的存在水平或浓度相对所述对照水平或浓度提高表明所述对象患有 IBS 的可能性提高，而样品中血清代谢物的存在水平或浓度与所述对照水平或浓度相同或有降低表明所述对象不患有 IBS 的可能性提高。

[0167] 在对照水平或浓度是来自患有 IBS 对象的血液或血清样品中所述血清代谢物的存在水平或浓度的另一实施方式中，样品中血清代谢物的存在水平或浓度与所述对照水平或浓度相同或有提高表明所述对象患有 IBS 的可能性提高，而样品中血清代谢物的存在水平或浓度相对所述对照水平或浓度降低表明所述对象不患有 IBS 的可能性提高。

[0168] 在另一相关实施方式中，提供通过检测血清代谢物和至少一种额外 IBS 标记物的水平或浓度来帮助诊断对象中肠易激综合征 (IBS) 的方法，所述额外 IBS 标记物选自脑源性神经营养因子 (BDNF)，中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (NGAL)，TNF 相关弱凋亡诱导因子 (TWEAK)，生长相关癌基因 α (GRO- α)，白介素 -1 β (IL-1 β)，金属蛋白酶组织抑制剂 -1 (TIMP-1)，抗酿酒酵母抗体 (ASCA-IgA)，抗 CBir-1 抗体 (CBir1)，抗人嗜中性粒细胞胞质抗体 (ANCA)，抗人组织转氨酶 IgA (tTG)，组胺， β -类胰蛋白酶，PGE₂，及其组合。

[0169] 在一种具体实施方式中，提供用于帮助诊断对象中肠易激综合征 (IBS) 的方法，所述方法包括：将来自对象的血液或血清样品与酪氨酸结合部分接触，接触条件适于将样品内存在的酪氨酸转化成含酪氨酸和所述酪氨酸结合部分的复合物；并确定所述复合物的水平，从而确定所述样品中酪氨酸的存在水平或浓度。在一种实施方式中，所述方法还包括检测至少一种额外 IBS 标记物的水平或浓度，所述额外 IBS 标记物选自脑源性神经营养因子 (BDNF)，中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (NGAL)，TNF 相关弱凋亡诱导因子 (TWEAK)，生长相关癌基因 α (GRO- α)，白介素 -1 β (IL-1 β)，金属蛋白酶组织抑制剂 -1 (TIMP-1)，抗酿酒酵母抗体 (ASCA-IgA)，抗 CBir-1 抗体 (CBir1)，抗人嗜中性粒细胞胞质抗体 (ANCA)，抗人组织转氨酶 IgA (tTG)，组胺， β -类胰蛋白酶和前列腺素 E₂ (PGE₂)。

[0170] 在另一具体实施方式中，提供用于帮助诊断对象中肠易激综合征 (IBS) 的方法，所述方法包括：将来自对象的血液或血清样品与苯丙氨酸结合部分接触，接触条件适于将样品内存在的苯丙氨酸转化成含苯丙氨酸和所述苯丙氨酸结合部分的复合物；并确定所述复合物的水平，从而确定所述样品中苯丙氨酸的存在水平或浓度。在一种实施方式中，所述方法还包括检测至少一种额外 IBS 标记物的水平或浓度，所述额外 IBS 标记物选自脑源性神经营养因子 (BDNF)，中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (NGAL)，TNF 相关弱凋亡诱导因子 (TWEAK)，生长相关癌基因 α (GRO- α)，白介素 -1 β (IL-1 β)，金属蛋白酶组织抑制剂 -1 (TIMP-1)，抗酿酒酵母抗体 (ASCA-IgA)，抗 CBir-1 抗体 (CBir1)，抗人嗜中性粒细胞胞质抗体 (ANCA)，抗人组织转氨酶 IgA (tTG)，组胺， β -类胰蛋白酶和前列腺素 E₂ (PGE₂)。

[0171] 6.5-羟色胺途径标记物

[0172] 在一种实施方式中,本发明提供通过检测来自对象的生物样品(例如,血液或血清样品)中 5-羟色胺途径标记物的水平或浓度来帮助诊断对象中肠易激综合征(IBS)的方法。所述 5-羟色胺途径标记物的水平或浓度可通过本领域已知的不同方法确定,包括但不限于:免疫试验,例如酶免疫试验(EIA)如酶放大免疫测定技术(EMIT),酶联免疫吸附试验(ELISA),抗原捕获 ELISA,夹心 ELISA, IgM 抗体捕获 ELISA(MAC ELISA),和微粒子酶免疫测定(MEIA);毛细管电泳免疫试验(CEIA);放射免疫试验(RIA);免疫放射测定(IRMA);荧光偏振免疫测定(FPIA);和化学发光试验(CL);标记物纯化,例如通过高压液相色谱(HPLC),可单独或与质谱(例如, MALDI/MS、MALDI-TOF/MS、SELDI-TOF/MS、串联 MS 等)联用;和其它熟知方法,包括但不限于:布拉德福德测定,考马斯蓝染色,银染,用于放射性标记蛋白质的试验,以及质谱。

[0173] 在一种具体实施方式中,提供用于帮助诊断对象中肠易激综合征(IBS)的方法,所述方法包括:将来自对象的血液或血清样品与 5-羟色胺途径标记物结合部分接触,接触条件适于将样品内所述 5-羟色胺途径标记物转化成含所述 5-羟色胺途径标记物和 5-羟色胺途径标记物结合部分的复合物;并确定所述复合物的水平,从而确定所述样品中所述 5-羟色胺途径标记物的水平或浓度。在优选实施方式中,所述 5-羟色胺途径标记物选自 UDP-葡萄糖醛酸基转移酶 1-6, 5-羟色胺再摄取转运体,色氨酸羟化酶 1,单胺氧化酶 A,单胺氧化酶 B,羟色氨酸(5-羟色胺)受体 3A,及其组合。

[0174] 在一种实施方式中,上文提供的方法还包括将所述样品中存在的 5-羟色胺途径标记物的水平或浓度与对照水平或浓度作比较,其中所述样品中存在的 5-羟色胺途径标记物的水平或浓度相对对照水平或浓度的差异表明所述对象患有 IBS 的可能性提高。

[0175] 在对照水平或浓度是来自健康对象的血液或血清样品中所述 5-羟色胺途径标记物的存在水平或浓度的一种实施方式中,样品中 5-羟色胺途径标记物的存在水平或浓度相对所述对照水平或浓度提高表明所述对象患有 IBS 的可能性提高,而样品中 5-羟色胺途径标记物的存在水平或浓度与所述对照水平或浓度相同或有降低表明所述对象不患有 IBS 的可能性提高。

[0176] 在对照水平或浓度是来自患有 IBS 对象的血液或血清样品中所述 5-羟色胺途径标记物的存在水平或浓度的另一实施方式中,样品中 5-羟色胺途径标记物的存在水平或浓度相对所述对照水平或浓度为相同或有提高表明所述对象患有 IBS 的可能性提高,而样品中 5-羟色胺途径标记物的存在水平或浓度相对所述对照水平或浓度降低表明所述对象不患有 IBS 的可能性提高。

[0177] 在另一相关实施方式中,提供通过检测 5-羟色胺途径标记物和至少一种额外 IBS 标记物的水平或浓度来帮助诊断对象中肠易激综合征(IBS)的方法,所述额外 IBS 标记物选自脑源性神经营养因子(BDNF),中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL),TNF 相关弱凋亡诱导因子(TWEAK),生长相关癌基因 α (GRO- α),白介素-1 β (IL-1 β),金属蛋白酶组织抑制剂-1(TIMP-1),抗酿酒酵母抗体(ASCA-IgA),抗 CBir-1 抗体(CBir1),抗人嗜中性粒细胞胞质抗体(ANCA),抗人组织转氨酶 IgA(tTG),组胺, β -类胰蛋白酶,PGE₂,及其组合。

[0178] 在一种具体实施方式中,提供用于帮助诊断对象中肠易激综合征(IBS)的方法,所述方法包括:将来自对象的血液或血清样品与 UDP-葡萄糖醛酸基转移酶 1-6 结合部分接

触,接触条件适于将样品内存在的 UDP- 葡萄糖醛酸基转移酶 1-6 转化成含 UDP- 葡萄糖醛酸基转移酶 1-6 和所述 UDP- 葡萄糖醛酸基转移酶 1-6 结合部分的复合物;并确定所述复合物的水平,从而确定所述样品中 UDP- 葡萄糖醛酸基转移酶 1-6 的存在水平或浓度。在一种实施方式中,所述方法还包括检测至少一种额外 IBS 标记物的水平或浓度,所述额外 IBS 标记物选自脑源性神经营养因子 (BDNF),中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (NGAL),TNF 相关弱凋亡诱导因子 (TWEAK),生长相关癌基因 α (GRO- α),白介素 -1 β (IL-1 β),金属蛋白酶组织抑制剂 -1 (TIMP-1),抗酿酒酵母抗体 (ASCA-IgA),抗 CBir-1 抗体 (CBir1),抗人嗜中性粒细胞胞质抗体 (ANCA),抗人组织转氨酶 IgA (tTG),组胺, β -类胰蛋白酶和前列腺素 E₂ (PGE₂)。

[0179] 在另一具体实施方式中,提供用于帮助诊断对象中肠易激综合征 (IBS) 的方法,所述方法包括:将来自对象的血液或血清样品与 5-羟色胺再摄取转运体结合部分接触,接触条件适于将样品内存在的 5-羟色胺再摄取转运体转化成含 5-羟色胺再摄取转运体和所述 5-羟色胺再摄取转运体结合部分的复合物;并确定所述复合物的水平,从而确定所述样品中 5-羟色胺再摄取转运体的存在水平或浓度。在一种实施方式中,所述方法还包括检测至少一种额外 IBS 标记物的水平或浓度,所述额外 IBS 标记物选自脑源性神经营养因子 (BDNF),中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (NGAL),TNF 相关弱凋亡诱导因子 (TWEAK),生长相关癌基因 α (GRO- α),白介素 -1 β (IL-1 β),金属蛋白酶组织抑制剂 -1 (TIMP-1),抗酿酒酵母抗体 (ASCA-IgA),抗 CBir-1 抗体 (CBir1),抗人嗜中性粒细胞胞质抗体 (ANCA),抗人组织转氨酶 IgA (tTG),组胺, β -类胰蛋白酶和前列腺素 E₂ (PGE₂)。

[0180] 在另一具体实施方式中,提供用于帮助诊断对象中肠易激综合征 (IBS) 的方法,所述方法包括:将来自对象的血液或血清样品与色氨酸羟化酶 1 结合部分接触,接触条件适于将样品内存在的色氨酸羟化酶 1 转化成含色氨酸羟化酶 1 和所述色氨酸羟化酶 1 结合部分的复合物;并确定所述复合物的水平,从而确定所述样品中色氨酸羟化酶 1 的存在水平或浓度。在一种实施方式中,所述方法还包括检测至少一种额外 IBS 标记物的水平或浓度,所述额外 IBS 标记物选自脑源性神经营养因子 (BDNF),中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (NGAL),TNF 相关弱凋亡诱导因子 (TWEAK),生长相关癌基因 α (GRO- α),白介素 -1 β (IL-1 β),金属蛋白酶组织抑制剂 -1 (TIMP-1),抗酿酒酵母抗体 (ASCA-IgA),抗 CBir-1 抗体 (CBir1),抗人嗜中性粒细胞胞质抗体 (ANCA),抗人组织转氨酶 IgA (tTG),组胺, β -类胰蛋白酶和前列腺素 E₂ (PGE₂)。

[0181] 在另一具体实施方式中,提供用于帮助诊断对象中肠易激综合征 (IBS) 的方法,所述方法包括:将来自对象的血液或血清样品与单胺氧化酶 A 结合部分接触,接触条件适于将样品内存在的单胺氧化酶 A 转化成含单胺氧化酶 A 和所述单胺氧化酶 A 结合部分的复合物;并确定所述复合物的水平,从而确定所述样品中单胺氧化酶 A 的存在水平或浓度。在一种实施方式中,所述方法还包括检测至少一种额外 IBS 标记物的水平或浓度,所述额外 IBS 标记物选自脑源性神经营养因子 (BDNF),中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (NGAL),TNF 相关弱凋亡诱导因子 (TWEAK),生长相关癌基因 α (GRO- α),白介素 -1 β (IL-1 β),金属蛋白酶组织抑制剂 -1 (TIMP-1),抗酿酒酵母抗体 (ASCA-IgA),抗 CBir-1 抗体 (CBir1),抗人嗜中性粒细胞胞质抗体 (ANCA),抗人组织转氨酶 IgA (tTG),组胺, β -类胰蛋白酶和前列腺素 E₂ (PGE₂)。

[0182] 在另一具体实施方式中,提供用于帮助诊断对象中肠易激综合征 (IBS) 的方法,

所述方法包括：将来自对象的血液或血清样品与单胺氧化酶 B 结合部分接触，接触条件适于将样品内存在的单胺氧化酶 B 转化成含单胺氧化酶 B 和所述单胺氧化酶 B 结合部分的复合物；并确定所述复合物的水平，从而确定所述样品中单胺氧化酶 B 的存在水平或浓度。在一种实施方式中，所述方法还包括检测至少一种额外 IBS 标记物的水平或浓度，所述额外 IBS 标记物选自脑源性神经营养因子 (BDNF)，中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (NGAL)，TNF 相关弱凋亡诱导因子 (TWEAK)，生长相关癌基因 α (GRO- α)，白介素 -1 β (IL-1 β)，金属蛋白酶组织抑制剂 -1 (TIMP-1)，抗酿酒酵母抗体 (ASCA-IgA)，抗 CBir-1 抗体 (CBir1)，抗人嗜中性粒细胞胞质抗体 (ANCA)，抗人组织转氨酶 IgA (tTG)，组胺， β -类胰蛋白酶和前列腺素 E₂ (PGE₂)。

[0183] 在另一具体实施方式中，提供用于帮助诊断对象中肠易激综合征 (IBS) 的方法，所述方法包括：将来自对象的血液或血清样品与羟色氨酸 (5-羟色胺) 受体 3A 结合部分接触，接触条件适于将样品内存在的所述羟色氨酸 (5-羟色胺) 受体 3A 转化成含所述羟色氨酸 (5-羟色胺) 受体 3A 和羟色氨酸 (5-羟色胺) 受体 3A 结合部分的复合物；并确定所述复合物的水平，从而确定所述样品中所述羟色氨酸 (5-羟色胺) 受体 3A 的水平或浓度。在一种实施方式中，所述方法还包括检测至少一种额外 IBS 标记物的水平或浓度，所述额外 IBS 标记物选自脑源性神经营养因子 (BDNF)，中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (NGAL)，TNF 相关弱凋亡诱导因子 (TWEAK)，生长相关癌基因 α (GRO- α)，白介素 -1 β (IL-1 β)，金属蛋白酶组织抑制剂 -1 (TIMP-1)，抗酿酒酵母抗体 (ASCA-IgA)，抗 CBir-1 抗体 (CBir1)，抗人嗜中性粒细胞胞质抗体 (ANCA)，抗人组织转氨酶 IgA (tTG)，组胺， β -类胰蛋白酶和前列腺素 E₂ (PGE₂)。

[0184] 7. 糖缺失转铁蛋白 (CDT)

[0185] 在一种实施方式中，本发明提供通过检测来自对象的生物样品（例如，血液或血清样品）中糖缺失转铁蛋白水平或浓度来帮助诊断对象中肠易激综合征 (IBS) 的方法。所述糖缺失转铁蛋白的水平或浓度可通过本领域已知的不同方法确定，包括但不限于：免疫试验，例如酶免疫试验 (EIA) 如酶放大免疫测定技术 (EMIT)，酶联免疫吸附试验 (ELISA)，抗原捕获 ELISA，夹心 ELISA，IgM 抗体捕获 ELISA (MAC ELISA)，和微粒子酶免疫测定 (MEIA)；毛细管电泳免疫试验 (CEIA)；放射免疫试验 (RIA)；免疫放射测定 (IRMA)；荧光偏振免疫测定 (FPIA)；和化学发光试验 (CL)；标记物纯化，例如通过高压液相色谱 (HPLC)，可单独或与质谱（例如，MALDI/MS、MALDI-TOF/MS、SELDI-TOF/MS、串联 MS 等）联用；和其它熟知方法，包括但不限于：布拉德福德测定，考马斯蓝染色，银染，用于放射性标记蛋白质的试验，以及质谱。

[0186] 在一种具体实施方式中，提供用于帮助诊断对象中肠易激综合征 (IBS) 的方法，所述方法包括：将来自对象的血液或血清样品与糖缺失转铁蛋白结合部分接触，接触条件适于将样品内存在的糖缺失转铁蛋白转化成含糖缺失转铁蛋白和所述糖缺失转铁蛋白结合部分的复合物；并确定所述复合物的水平，从而确定所述样品中糖缺失转铁蛋白的存在水平或浓度。

[0187] 在一种实施方式中，上文提供的方法还包括将所述样品中存在的糖缺失转铁蛋白水平和浓度与对照水平或浓度作比较，其中所述样品中存在的糖缺失转铁蛋白水平或浓度相对对照水平或浓度的差异表明所述对象患有 IBS 的可能性提高。

[0188] 在对照水平或浓度是来自健康对象的血液或血清样品中所述糖缺失转铁蛋白的存在水平或浓度的实施方式中,样品中糖缺失转铁蛋白的存在水平或浓度相对所述对照水平或浓度提高表明所述对象患有 IBS 的可能性提高,而样品中糖缺失转铁蛋白的存在水平或浓度与所述对照水平或浓度相同或有降低表明所述对象不患有 IBS 的可能性提高。

[0189] 在对照水平或浓度是来自患有 IBS 对象的血液或血清样品中所述糖缺失转铁蛋白的存在水平或浓度的另一实施方式中,样品中糖缺失转铁蛋白的存在水平或浓度与所述对照水平或浓度相同或有提高表明所述对象患有 IBS 的可能性提高,而样品中糖缺失转铁蛋白的存在水平或浓度相对所述对照水平或浓度降低表明所述对象不患有 IBS 的可能性提高。

[0190] 在另一相关实施方式中,提供通过检测糖缺失转铁蛋白和至少一种额外 IBS 标记物的水平或浓度来帮助诊断对象中肠易激综合征 (IBS) 的方法,所述额外 IBS 标记物选自脑源性神经营养因子 (BDNF),中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (NGAL),TNF 相关弱凋亡诱导因子 (TWEAK),生长相关癌基因 α (GRO- α),白介素-1 β (IL-1 β),金属蛋白酶组织抑制剂-1 (TIMP-1),抗酿酒酵母抗体 (ASCA-IgA),抗 CBir-1 抗体 (CBir1),抗人嗜中性粒细胞胞质抗体 (ANCA),抗人组织转氨酶 IgA (tTG),组胺, β -类胰蛋白酶,前列腺素 E_2 (PGE $_2$),及其组合。

[0191] 在一种具体实施方式中,提供用于帮助诊断对象中肠易激综合征 (IBS) 的方法,所述方法包括:将来自对象的血液或血清样品与糖缺失转铁蛋白结合部分接触,接触条件适于将样品内存在的糖缺失转铁蛋白转化成含糖缺失转铁蛋白和所述糖缺失转铁蛋白结合部分的复合物;并确定所述复合物的水平,从而确定所述样品中糖缺失转铁蛋白的存在水平或浓度。在一种实施方式中,所述方法还包括检测至少一种额外 IBS 标记物的水平或浓度,所述额外 IBS 标记物选自脑源性神经营养因子 (BDNF),中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (NGAL),TNF 相关弱凋亡诱导因子 (TWEAK),生长相关癌基因 α (GRO- α),白介素-1 β (IL-1 β),金属蛋白酶组织抑制剂-1 (TIMP-1),抗酿酒酵母抗体 (ASCA-IgA),抗 CBir-1 抗体 (CBir1),抗人嗜中性粒细胞胞质抗体 (ANCA),抗人组织转氨酶 IgA (tTG),组胺, β -类胰蛋白酶和前列腺素 E_2 (PGE $_2$)。

[0192] B. 症状概况

[0193] 在一些实施方式中,帮助诊断对象中 IBS 的所述方法包括确定诊断标记物概况,可选联用症状概况,其中所述症状概况通过鉴定所述个体中至少一种症状的存在或严重度来确定;并利用基于所述诊断标记物概况和症状概况的算法将所述样品分类为 IBS 样品或非 IBS 样品。本领域技术人员应当理解所述诊断标记物概况和症状概况可以同时确定或以任意顺序依序确定。

[0194] 所述症状概况通常通过鉴定至少一种症状的存在或严重度来确定,所述症状选自下组:胸痛、胸部不适、胃灼热、常规量餐后的不适饱胀感,不能完成常规量用餐,腹痛,腹部不适,便秘,腹泻,胀气,腹胀,与疼痛或不适相关的消极想法或负面感觉,及其组合。

[0195] 在优选实施方式中,鉴定 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 或更多种本文所述症状的存在或严重度以产生可用于预测 IBS 的症状概况。在某些情况中,用问卷或其它形式的书面、口头或电话调查来产生所述症状概况。所述问卷或调查通常包括标准化的问题和答案组,用于从回答者采集其当前和/或近期 IBS 相关症状的信息。例如,实施例 3 提供了可包括在

用于鉴定个体中一种或多种 IBS 相关症状的存在或严重度的问卷中的示例性问题。

[0196] 在某些实施方式中,通过汇编和 / 或分析所述问卷或调查所列问题的全部答案或其子集来产生所述症状概况。在某些其它实施方式中,所述症状概况的产生是根据所述个体对下列问题的回应:“您目前是否经历任何症状?”按这些实施方式中任一种所产生的症状概况可与诊断标记物概况联用于本文所述基于算法的方法以提高 IBS 预测的准确性。

[0197] C. 统计算法的应用

[0198] 在一些实施方式中,帮助诊断对象中肠易激综合征 (IBS) 的方法在结合统计算法下基于单独诊断标记物概况或与症状概况联合。在某些情况中,所述统计算法是学习型统计分类系统。所述学习型统计分类系统可选自下组:随机森林 (RF),分类回归树 (C&RT),推进树,神经网络 (NN),支持向量机 (SVM),常规卡方自动交互检测模型,交互树,多重适应性回归仿样,机器学习分类器,及其组合。所述学习型统计分类系统优选是基于树的统计算法(例如,RF, C&RT 等)和 / 或 NN(例如,人工 NN 等)。美国专利申请号 11/368,285 中描述了可用于本发明的学习型统计分类系统的其它示例。在某些实施方式中,所述方法包括将来自对象的样品分类为 IBS 样品或非 IBS 样品。

[0199] 在某些情况中,所述统计算法是单个学习型统计分类系统。所述单个学习型统计分类系统优选包括基于树的统计算法如 FR 或 C&RT。作为非限制性示例,可采用单个学习型统计分类系统根据预测或概率值以及单独的至少一种诊断标记物的存在或水平(即,诊断标记物概况)或联合至少一种症状的存在或严重度(即,症状概况)来将样品分类为 IBS 样品或非 IBS 样品。单个学习型统计分类系统的应用通常以至少约 75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的灵敏度、特异性、阳性预测值、阴性预测值和 / 或总体准确性将样品分类为 IBS 样品。因此,将样品分类为 IBS 样品或非 IBS 样品可用于帮助诊断对象中的 IBS。

[0200] 在某些其它情况中,所述统计算法是至少 2 种学习型统计分类系统的组合。所述学习型统计算法系统的组合优选包含 RF 和 NN,例如串联或并行使用。作为非限制性示例,可先使用 RF 根据诊断标记物概况(单独或联合症状概况)产生预测或概率值,然后可用 NN 根据所述预测或概率值以及相同或不同的诊断标记物概况或概况组合来将样品分类为 IBS 样品或非 IBS 样品。有利地,本发明所述混合 RF/NN 学习型统计分类系统通常以至少约 75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的灵敏度、特异性、阳性预测值、阴性预测值和 / 或总体准确性将样品分类为 IBS 样品。在一种特别优选的实施方式中,所述统计算法是随机森林分类器或随机森林分类器与神经网络分类器的组合。

[0201] 在一些情况中,用某个或某些学习型统计分类系统所得数据可以用处理算法来处理。例如,这类处理算法可以选自下组:多层感知器,反向传播网络和 L-M(Levenberg-Marquardt) 算法。在其它情况中,可采用此类处理算法的组合,例如以并行或串行方式采用。

[0202] 在某些其它实施方式中,本发明的方法还包括将所述 IBS 分类结果发送给临床医师,例如胃肠病学家或全科医师。在另一实施方式中,本发明所述方法以个体患 IBS 概率的形式提供诊断。例如,所述个体患有 IBS 的概率可以为约 0%、5%、10%、15%、20%、25%、

30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 或更高。在另一实施方式中, 本发明的方法还提供个体中 IBS 的预后。例如, 所述预后可以是手术, 发展出某类或临床亚型的 IBS, 发展出一种或多种症状, 或者疾病的康复。

[0203] D. 试验与试剂盒

[0204] 可用本领域已知的各种试验、技术和试剂盒确定样品中一种或多种标记物的存在或水平以将所述样品分类为是否与 IBS 相关。

[0205] 本发明部分依赖于确定个体所得样品中至少一种标记物的存在或水平。本文所用的术语“确定至少一种标记物的存在”包括通过本领域技术人员已知的任何定量或定性试验来确定各感兴趣标记物的存在。在某些情况中, 确定特定性状、变量或生化或血清学物质(例如, 蛋白质或抗体)存在与否的定性试验适于检测各感兴趣标记物。在某些其它情况中, 确定 RNA、蛋白质、抗体或活性存在与否的定量试验适于检测各感兴趣标记物。本文所用的术语“确定至少一种标记物的水平”包括通过使用本领域技术人员已知的任何直接或间接的定量试验来确定各感兴趣标记物的水平。在某些情况中, 确定 RNA、蛋白质、抗体或活性的相对或绝对量的定量试验适于确定各感兴趣标记物的水平。本领域技术人员能理解可用于确定标记物水平的任意试验也可用于确定所述标记物的存在与否。

[0206] 本文所用的术语“抗体”包括免疫球蛋白分子群, 可以是多克隆或单克隆的, 且可以是任意同种型, 或者是免疫球蛋白分子的免疫活性片段。这类免疫活性片段含有构成特异性结合抗原的抗体分子部分的重链和轻链可变区。例如, 本领域已知为 Fab、Fab' 或 F(ab')₂ 的免疫球蛋白分子的免疫活性片段包括在术语抗体的含义中。

[0207] 可用流式细胞术确定样品中一种或多种标记物的存在或水平。这类流式细胞术分析包括基于珠的免疫试验, 可用于确定例如抗体标记物水平, 其方式与就白色念珠菌 (*Candida albicans*) 和 HIV 蛋白的血清抗体检测所述方式相同(参见例如, Bishop 和 Davis, *J. Immunol. Methods*, 210:79-87(1997); McHugh 等, *J. Immunol. Methods*, 116:213(1989); Scillian 等, *Blood*, 73:2041(1989))。

[0208] 用于表达标记物特异性重组抗原的噬菌体展示技术也可用来确定样品中一种或多种标记物的存在或水平。如果需要, 可以将表达例如抗体标记物特异性抗原的噬菌体颗粒用抗体锚定在多孔板上, 所用抗体例如抗噬菌体单克隆抗体 (Felici 等, “Phage-Displayed Peptides as Tools for Characterization of Human Sera(《噬菌体展示肽用作鉴定人血清的工具》)”, 收录于 Abelson 编, *Methods in Enzymol.*, 267, 圣迭戈的学术出版社 (Academic Press, Inc.) (1996))。

[0209] 包括竞争性和非竞争性免疫试验在内的多种免疫试验技术可用来确定样品中一种或多种标记物的存在或水平(参见例如, Self 和 Cook, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 7:60-65(1996))。术语免疫试验涵盖的技术包括但不限于: 酶免疫试验 (EIA) 如酶放大免疫测定技术 (EMIT), 酶联免疫吸附试验 (ELISA), 抗原捕获 ELISA, 夹心 ELISA, IgM 抗体捕获 ELISA (MAC ELISA), 和微粒子酶免疫测定 (MEIA); 毛细管电泳免疫试验 (CEIA); 放射免疫试验 (RIA); 免疫放射测定 (IRMA); 荧光偏振免疫测定 (FPIA); 和化学发光试验 (CL)。若需要, 此类免疫试验可自动化。免疫试验也可与激光诱导荧光联用(参见例如, Schmalzing 和 Nashabeh, *Electrophoresis*, 18:2184-2193(1997); Bao, *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci.*, 699:463-480(1997))。脂质体免疫试验, 例如流动注射脂质体免疫试验和脂质体传感器,

也适用于本发明（参见例如，Rongen 等，J. Immunol. Methods, 204 :105-133(1997)）。此外，浊度法试验也适用于本发明，其中蛋白质 / 抗体复合物的形成导致光散射提高，转化成峰值速率信号随着标记物浓度变化。浊度法试验可市售获自贝克曼库尔特公司 (Beckman Coulter, 加利福尼亚州布利市, 试剂盒 #449430), 并能用贝林 (Behring) 浊度计分析仪进行 (Fink 等, J. Clin. Chem. Clin. Biol. Chem. , 27 :261-276(1989))。

[0210] 抗原捕获 ELISA 可用于确定样品中一种或多种标记物的存在或水平。例如，在抗原捕获 ELISA 中，针对感兴趣标记物的抗体结合于固相，并添加样品使得所述标记物被抗体结合。通过清洗去除未结合蛋白质后，可用例如放射免疫试验（参见例如，Harlow 和 Lane, Antibodies :A Laboratory Manual (《抗体：实验室手册》)，冷泉港实验室 (Cold Spring Harbor Laboratory), 纽约, 1988)) 来定量所结合标记物的量。夹心 ELISA 也适用于本发明。例如，在双抗体夹心试验中，第一抗体结合于固相载体，使感兴趣的标记物结合于所述第一抗体。通过测定结合标记物的第二抗体含量来对所述标记物定量。所述抗体可固定化在多种固相载体上，例如磁性或色谱基质颗粒，试验板（例如，微量测试孔）的表面，数件固相基质材料或膜（例如，塑料、尼龙、纸），等等。可通过将抗体或多个抗体涂覆在固相载体上的阵列中来制得试验条。该试验条可浸入测试样品中并通过清洗和检测步骤快速处理以产生可测信号，例如有色斑点。

[0211] 放射免疫试验也适用于确定样品中一种或多种标记物的存在或水平，例如，采用碘-125 (^{125}I) 标记的二抗 (Harlow 和 Lane, 同上)。标记有化学发光标记物的二抗也可适用于本发明。采用化学发光二抗的化学发光试验适于灵敏、非放射性检测标记物水平。此类二抗可市售获自多种来源，例如安玛西亚生命科学公司 (Amersham Lifesciences, Inc., 伊利诺伊州阿灵顿高地)。

[0212] 上述免疫试验可用于确定样品中一种或多种标记物的存在或水平。作为非限制性示例，采用 IL-8 结合分子如抗 IL-8 抗体或胞外 IL-8 结合蛋白（例如，IL-8 受体）的 ELISA 可用于确定样品是否为 IL-8 蛋白阳性或用于确定样品中的 IL-8 蛋白水平。固定的嗜中性粒细胞 ELISA 可用于确定样品是否为 ANCA 阳性或用于确定样品中的 ANCA 水平。类似地，采用酵母细胞壁磷酸肽甘露聚糖 (phosphopeptidomannan) 的 ELISA 可用于确定样品是否为 ASCA-IgA 和 / 或 ASCA-IgG 阳性或用于确定样品中 ASCA-IgA 和 / 或 ASCA-IgG 的水平。采用 OmpC 蛋白或其片段的 ELISA 可用于确定样品是否为抗 OmpC 抗体阳性或用于确定样品中的抗 OmpC 抗体水平。采用 I2 蛋白或其片段的 ELISA 可用于确定样品是否为抗 I2 抗体阳性或用于确定样品中的抗 I2 抗体水平。采用鞭毛蛋白（例如，Cbir-1 鞭毛蛋白）或其片段的 ELISA 可用于确定样品是否为抗鞭毛蛋白抗体阳性或用于确定样品中的抗鞭毛蛋白抗体水平。此外，上述免疫试验对于确定样品中其它诊断标记物的存在或水平特别有用。

[0213] 抗体对感兴趣标记物的特异性免疫结合可直接或间接检测。直接标记包括连接于所述抗体的荧光或发光标签、金属、染料、放射性核素等。标记有碘-125 (^{125}I) 的抗体可用于确定样品中一种或多种标记物的水平。采用标记物特异性化学发光抗体的化学发光试验适于灵敏、非放射性检测标记物水平。标记有荧光染料的抗体也适用于确定样品中一种或多种标记物的水平。荧光染料的示例包括但不限于 DAPI、荧光素、赫斯特 (Hoechst) 33258, R-藻蓝蛋白, B-藻红蛋白, R-藻红蛋白, 罗丹明, 得克萨斯红和丽丝胺 (lissamine)。可购得连接有荧光染料的二抗，例如山羊 F(ab')₂ 抗人 IgG-FITC 可购自塔构免疫品公司 (Tago

Immunologicals,加利福尼亚州伯林盖姆)。

[0214] 间接标记包括本领域熟知的各种酶,例如辣根过氧化物酶 (HRP),碱性磷酸酶 (AP), β -半乳糖苷酶,脲酶等。可采用辣根过氧化物酶检测系统,例如和发色底物四甲基联苯胺 (TMB) 联用,在过氧化氢存在下产生 450nm 下可测的可溶性产物。例如,碱性磷酸酶检测系统可与生色底物磷酸对硝基苯酯联用,产生在 405nm 易测的可溶性产物。类似地, β -半乳糖苷酶检测系统可与生色底物邻硝基苯- β -D-半乳糖苷 (ONPG) 联用,产生在 410nm 可测的可溶性产物。脲酶检测系统可与底物如脲溴甲酚紫 (西格玛免疫化学品公司 (Sigma Immunochemicals),密苏里州圣路易斯) 联用。连接有酶的有用二抗可获自多个商业来源,例如山羊 F(ab')₂ 抗人 IgG-碱性磷酸酶可购自杰克逊免疫研究公司 (Jackson ImmunoResearch,宾夕法尼亚州西格鲁甫)。

[0215] 可分析来自直接或间接标记的信号,例如用分光光度计检测来自发光底物的颜色;用辐射计数器检测辐射如用 γ 计数器检测 ¹²⁵I;或用荧光计在某波长光的存在下检测荧光。就酶联抗体的检测而言,可用分光光度计例如 EMAX 酶标仪 (分子设备公司 (Molecular Devices),加利福尼亚州门洛帕克) 根据生产商说明书进行标记物水平量的定量分析。如果需要,本发明的试验能自动化或自动机械式进行,并且来自多个样品的信号可同时检测。

[0216] 还可定量蛋白质印迹来检测或确定样品中一种或多种标记物的存在或水平。蛋白质印迹可通过熟知的方法定量,例如扫描光密度或感光成像。作为非限制性示例,蛋白质样品在 10% 的 SDS-PAGE 拉姆力凝胶上电泳。鼠单克隆一抗与印迹反应,可用狭缝印迹预实验证明抗体结合为线性。偶联有山羊抗小鼠辣根过氧化物酶的抗体 (伯乐公司 (BioRad)) 用作二抗,用化学发光进行信号检测,例如用 Renaissance 化学发光试剂盒 (新英格兰核公司 (New England Nuclear),马萨诸塞州波士顿) 按照生产商说明书进行。印迹的放射性自显影图可用扫描密度计 (加州桑尼维尔的分子动力学公司 (Molecular Dynamics)) 分析并相对阳性对照标准化。数值报道为例如实际值与阳性对照之间的比例 (密度计量指数)。此类方法为本领域熟知,参见例如,Parra 等, J. Vasc. Surg., 28 :669-675 (1998)。

[0217] 或者,可用多种免疫组化试验技术确定样品中一种或多种标记物的存在或水平。术语免疫组化试验涵盖利用偶联 (即,结合) 了荧光染料或酶的能与感兴趣标记物反应的抗体采用荧光显微镜术或光学显微术进行视觉检测的技术,且包括但不限于直接荧光抗体试验,间接荧光抗体 (IFA) 试验,抗补体免疫荧光,亲和素-生物素免疫荧光和免疫过氧化物酶试验。例如, IFA 试验可用于确定样品是否为 ANCA 阳性,样品中的 ANCA 水平,样品是否为 pANCA 阳性,样品中的 pANCA 水平,和 / 或 ANCA 染色模式 (例如, cANCA、pANCA、NSNA 和 / 或 SAPPa 染色模式)。可以定量样品中的 ANCA 浓度,例如通过终点滴定或通过测定与已知参比标准品的荧光可见强度。

[0218] 或者,可通过检测或定量纯化标记物的量来确定感兴趣标记物的存在或水平。例如,标记物的纯化可通过单独或联用质谱 (例如, MALDI/MS、MALDI-TOF/MS、SELDI-TOF/MS, 串联 MS 等) 的高压液相色谱 (HPLC) 来实现。感兴趣标记物的定量或定性检测也可通过熟知的方法来确定,包括但不限于:布拉德福德测定,考马斯蓝染色,银染,用于放射性标记蛋白质的试验,以及质谱。

[0219] 多个标记物的分析可用一个测试样品分别或同时进行。对于标记物的单独或连续

分析,合适的设备包括临床实验室分析仪,例如 ElecSys(罗氏公司(Roche)), AxSym(雅培公司(Abbott)), Access(贝克曼公司(Beckman)), ADVIA®, CENTAUR®(拜耳公司(Bayer)), 和 NICHOLS ADVANTAGE®(尼科尔斯研究所(Nichols Institute)) 免疫试验系统。优选的设备或蛋白芯片在单一表面上进行多个标记物的同时试验。特别有用的物理形式包括用于检测多个不同标记物的多个离散、可寻址位置。此类形式包括蛋白质微阵列,或“蛋白质芯片”(参见例如,Ng 等, J. Cell Mol. Med., 6 :329-340(2002)) 和某些毛细管装置(参见例如,美国专利号 6,019,944)。在这些实施方式中,各离散的表面位置可包含抗体来固定一个或多个标记物用于在各位置作检测。或者,表面可以包含在表面离散位置固定的一种或多种离散颗粒(例如,微粒或纳米粒子),其中微粒包含抗体来固定供检测的一种或多种标记物。

[0220] 除上述用于确定多种感兴趣标记物的存在或水平的试验以外,用常规技术如 Northern 分析,逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)或基于与标记物编码序列部分互补的核酸序列的杂交的任意其它方法(例如,狭缝印迹杂交)来分析标记物 mRNA 水平也在本发明范围内。可用的 PCR 扩增技术描述于例如:Ausubel 等, Current Protocols in Molecular Biology(《新编分子生物学实验指南》),纽约约翰韦利父子公司(John Wiley & Sons, Inc., NY)(1999),第 7 章和附录 47;Theophilus 等,“PCR Mutation Detection Protocols(《PCR 突变检测方案》)”,休曼出版社(Humana Press), (2002);和 Innis 等, PCR Protocols, (《PCR 方案》,圣地亚哥,学术出版社公司(Academic Press, Inc.)(1990)。常规核酸杂交方法描述于 Anderson,“Nucleic Acid Hybridization(《核酸杂交》)”, BIOS 科学出版社(BIOS Scientific Publishers),1999。多个转录核酸序列(例如, mRNA 或 cDNA)的扩增或杂交也可由设置在微阵列中的 mRNA 或 cDNA 序列来进行。微阵列方法的概述见“Microarrays Methods and Applications:Nuts & Bolts(《微阵列方法与应用:螺母和螺栓》)”, DNA 出版社(DNA Press),2003;和 Baldi 等,“DNA Microarrays and Gene Expression:From Experiments to Data Analysis and Modeling(《DNA 微阵列与基因表达:从实验到数据分析与建模》)”,剑桥大学出版社(Cambridge University Press),2002。

[0221] 标记物如遗传标记物的基因型分析可用采用本领域已知技术进行,包括但不限于:基于聚合酶链反应(PCR)的分析,序列分析和电泳分析。基于 PCR 的分析的非限制性示例包括可购自应用生物系统公司(Applied Biosystems)的 Taqman®等位基因区分试验。序列分析的非限制性示例包括吉尔伯特二氏(Maxam-Gilbert)测序,桑格(Sanger)测序,毛细管阵列 DNA 测序,热循环测序(Sears 等, Biotechniques, 13 :626-633(1992)),固相测序(Zimmerman 等, Methods Mol. Cell Biol., 3 :39-42(1992)),用质谱如基体辅助激光解吸/电离飞行时间质谱(MALDI-TOF/MS;Fu 等, Nature Biotech., 16 :381-384(1998))的测序,和杂交测序(Chee 等, Science, 274 :610-614(1996);Drmanac 等, Science, 260 :1649-1652(1993);Drmanac 等, Nature Biotech., 16 :54-58(1998))。电泳分析的非限制性示例包括平板凝胶电泳如琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶电泳,毛细管电泳,和变性梯度凝胶电泳。用于对标记物中多态位点的个体作基因分型的其它方法包括,例如:TWT 公司(Third Wave Technologies, Inc.)的 INVADER®试验,限制性片段长度多态性(RFLP)分析,等位基因特异性寡核苷酸杂交,异源双链迁移率试验,和单链构象多态性(SSCP)分析。

[0222] 多个感兴趣标记物可合并在一个测试中用于高效处理多个样品。此外,本领域技

术人员能了解从同一对象测试多个样品（例如，在相继时间点等）的价值。系列样品的此类测试可鉴定标记物水平随时间的变化。标记物水平的提高或降低，以及标记物水平没有变化，也可为分类 IBS 或排除 IBS 样症状相关疾病和紊乱提供有用信息。

[0223] 可以构建用于测定上述一种或多种标记物的小组以提供涉及本发明所述方法的相关信息以将样品分类为与 IBS 相关。可构建此类小组以确定 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40 种或更多个体标记物的存在或水平。单个标记物或标记物子集的分析也可由本领域技术人员在不同的临床环境中进行。这些包括但不限于：流动性的，紧急监护，危重监护，加强监护，监护系统，住院病人，门诊病人，医生诊室，医疗诊所，和健康普查情况。

[0224] 标记物的分析还可在多种物理形式中进行。例如，可利用微量滴定板或自动化的应用来促进大量测试样品的处理。或者，可开发单一样品形式来促进及时处理和诊断。

[0225] 1. 实施方式

[0226] 本发明的一方面提供用于检测血液或血清样品中 IBS 标记物的试验，所述方法包括步骤：(a) 用抗 IBS 标记物第一捕获抗体涂覆固相表面；(b) 使所述固相表面与血液或血清样品接触，接触条件适于将所述样品中存在的 IBS 标记物转化成含所述 IBS 标记物和抗 IBS 标记物捕获抗体的复合物；(c) 使所述 IBS 标记物与抗 IBS 标记物复合物与第二检测抗体在适于形成三元复合物的条件下接触；以及 (d) 使所述三元复合物与发光或化学发光底物接触，其中所述 IBS 标记物选自下组：糖缺失转铁蛋白，尿皮素，促肾上腺皮质素释放激素结合蛋白，皮质醇，促肾上腺皮质激素，P 物质，神经生长因子，神经激肽 A，神经激肽 B，血管活性肠肽，胰高血糖素样肽 2，促胃动素，垂体腺苷酸环化酶激活肽，5-羟色胺，色氨酸，5-羟色胺 O-硫酸盐，5-羟吲哚乙酸，5-HT 葡萄糖苷酸，酪氨酸，苯丙氨酸，UDP-葡萄糖醛酸基转移酶 1-6，5-羟色胺再摄取转运体，色氨酸羟化酶 1，单胺氧化酶 A，单胺氧化酶 B，和羟色氨酸（5-羟色胺）受体 3A。

[0227] 在一种实施方式中，所述检测抗体偶联有碱性磷酸酶。在其它实施方式中，所述检测抗体不偶联酶，且所述方法还包括步骤 (i) 使所述三元复合物与偶联有碱性磷酸酶的第三抗体在适于形成四元复合物的条件下接触，以及 (ii) 使所述四元复合物与发光或化学发光底物接触。

[0228] 任何合适的抗体对可用于在夹心 ELISA 中捕获并检测抗体。本领域技术人员知道并理解如何选择用于试验的合适抗体对。通常，选择在不同表位结合感兴趣靶标如所述 IBS 标记物的两种抗体，使得第一（捕获）抗体的结合不干扰第二（检测）抗体。在某些实施方式中，所述检测抗体可偶联酶例如碱性磷酸酶，以帮助检测所述复合物。在其它实施方式中，所述试验中可使用结合所述检测抗体的偶联有酶（例如，碱性磷酸酶）的二级抗体。

[0229] 所述复合物通常用发光底物来检测，例如，在试剂盒如 Ultra LITE™ (NAG 研究实验室公司)；Sensolyte® (AnaSpec 公司)；SuperSignal ELISA 毫微微克级最高灵敏度底物（热科学公司 (Thermo Scientific)）；SuperSignal ELISA 皮克级化学发光底物（热科学公司）；CPSD (3-(4-甲氧基螺旋 {1,2-二氧杂环丁烷 -3,2'-(5'-氯)三环 [3.3.1.1.3,7] 癸烷}-4-基)磷酸苯二钠盐；Tropix 公司) 中所见的发光底物。

[0230] 在一种优选实施方式中，用于检测 IBS 标记物的存在或水平的试验包括夹心 ELISA，其依赖于使用偶联有碱性磷酸酶的抗 IBS 标记物抗体作为检测抗体和含有

CPSD 的发光底物来提高试验灵敏度。所述 CPSD 底物可见于化学发光检测系统中,例如 ELISA-Light™ 系统(应用生物系统公司)。

[0231] 在所述试验的一种优选实施方式中,血液或血清样品中存在的 IBS 标记物的检出限低于约 500pg/ml。在某些实施方式中,血液或血清样品中存在的 IBS 标记物的检出限低于约 500pg/ml,或低于约 400pg/ml、300pg/ml、250pg/ml、200pg/ml、150pg/ml、100pg/ml、75pg/ml、50pg/ml、40pg/ml、30pg/ml、25pg/ml、20pg/ml、15pg/ml 或低于约 10pg/ml。在一种优选实施方式中,血液或血清样品中存在的 IBS 标记物的检出限低于约 200pg/ml。在一种更优选的实施方式中,血液或血清样品中存在的 IBS 标记物的检出限低于约 100pg/ml。在一种更优选的实施方式中,血液或血清样品中存在的 IBS 标记物的检出限低于约 50pg/ml。在一种最优选实施方式中,血液或血清样品中存在的 IBS 标记物的检出限低于约 25pg/ml。

[0232] 另一方面,本发明提供帮助诊断 IBS 的试验,所述试验包括:(a) 将含 IBS 标记物的样品与捕获抗 IBS 标记物抗体接触,接触条件适于将所述 IBS 标记物转化成含所述 IBS 标记物和捕获抗 IBS 标记物抗体的复合物;(b) 将所述复合物与标记有酶的指示抗体接触将所述复合物转化成带标记复合物;(c) 将所述带标记复合物与所述酶的底物接触;以及(d) 检测所述样品中 IBS 标记物的存在或水平,其中所述 IBS 标记物选自下组:糖缺失转铁蛋白,尿皮质素,促肾上腺皮质素释放激素结合蛋白,皮质醇,促肾上腺皮质激素,P 物质,神经生长因子,神经激肽 A,神经激肽 B,血管活性肠肽,胰高血糖素样肽 2,促胃动素,垂体腺苷酸环化酶激活肽,5-羟色胺,色氨酸,5-羟色胺 O-硫酸盐,5-羟吲哚乙酸,5-HT 葡萄糖苷酸,酪氨酸,苯丙氨酸,UDP-葡萄糖醛酸基转移酶 1-6,5-羟色胺再摄取转运体,色氨酸羟化酶 1,单胺氧化酶 A,单胺氧化酶 B,和羟色氨酸(5-羟色胺)受体 3A。

[0233] 在帮助诊断 IBS 的试验的一种实施方式中,所述样品是人血清。

[0234] 在帮助诊断 IBS 的试验的另一实施方式中,所述样品获自怀疑患有 IBS 的对象。

[0235] 在帮助诊断 IBS 的试验的另一实施方式中,相对于健康对照,所述样品中的 IBS 标记物水平更高表明所述对象患有 IBS 的可能性提高。

[0236] 在帮助诊断 IBS 的试验的另一实施方式中,所述试验是酶联免疫吸附测定法(ELISA)。

[0237] 在帮助诊断 IBS 的试验的另一实施方式中,检测样品中 IBS 标记物的存在或水平包括使用检测设备。

[0238] 在帮助诊断 IBS 的试验的另一实施方式中,所述检测设备包括发光读板仪。

[0239] 在帮助诊断 IBS 的试验的另一实施方式中,所述检测设备包括分光光度计。

[0240] 在帮助诊断 IBS 的试验的另一实施方式中,所述试验还包括检测所述样品中 β -类胰蛋白酶、前列腺素 E_2 (PGE₂) 和 / 或组胺的存在或水平。

[0241] 另一方面,本发明提供帮助区分 IBS 临床亚型的试验,所述试验包括:(a) 将含 IBS 标记物的样品与捕获抗 IBS 标记物抗体接触,接触条件适于将所述 IBS 标记物转化成含所述 IBS 标记物和捕获抗 IBS 标记物抗体的复合物;(b) 将所述复合物与标记有酶的指示抗体接触将所述复合物转化成带标记复合物;(c) 将所述带标记复合物与所述酶的底物接触;以及(d) 检测所述样品中 IBS 标记物的存在或水平,其中所述 IBS 标记物选自下组:糖缺失转铁蛋白,尿皮质素,促肾上腺皮质素释放激素结合蛋白,皮质醇,促肾上腺皮质激素,

P 物质,神经生长因子,神经激肽 A,神经激肽 B,血管活性肠肽,胰高血糖素样肽 2,促胃动素,垂体腺苷酸环化酶激活肽,5-羟色胺,色氨酸,5-羟色胺 O-硫酸盐,5-羟吲哚乙酸,5-HT 葡萄糖苷酸,酪氨酸,苯丙氨酸,UDP-葡萄糖醛酸基转移酶 1-6,5-羟色胺再摄取转运体,色氨酸羟化酶 1,单胺氧化酶 A,单胺氧化酶 B,和羟色氨酸 (5-羟色胺) 受体 3A。

[0242] 在帮助区分 IBS 临床亚型的试验的一种实施方式中,所述试验帮助区分 IBS-D 和 IBS-A 与 IBS-C。

[0243] 在帮助区分 IBS 临床亚型的试验的另一实施方式中,所述样品是人血清。

[0244] 在帮助区分 IBS 临床亚型的试验的另一实施方式中,所述试验是酶联免疫吸附测定法 (ELISA)。

[0245] 在帮助区分 IBS 临床亚型的试验的另一实施方式中,检测样品中 IBS 标记物的存在或水平包括使用检测设备。

[0246] 在帮助区分 IBS 临床亚型的试验的另一实施方式中,所述试验还包括检测所述样品中 β -类胰蛋白酶、前列腺素 E_2 (PGE₂) 和 / 或组胺的存在或水平。

[0247] 在某些实施方式中,本文所述试验还包括检测至少一种额外生物标记物的存在或水平,所述额外生物标记物选自脑源性神经营养因子 (BDNF),中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (NGAL),TNF 相关弱凋亡诱导因子 (TWEAK),生长相关癌基因 α (GRO- α),白介素 -1 β (IL-1 β),金属蛋白酶组织抑制剂 -1 (TIMP-1),抗酿酒酵母抗体 (ASCA-IgA),抗 CBir-1 抗体 (CBir1),抗人嗜中性粒细胞胞质抗体 (ANCA),抗人组织转氨酶 IgA (tTG), β -类胰蛋白酶,前列腺素 E_2 (PGE₂),组胺,及其组合。

[0248] 在另一实施方式中,本文提供的试验还可包括检测至少一种额外生物标记物的存在或水平,所述额外生物标记物选自:细胞因子 (例如,IL-8、IL-1 β 、TWEAK、瘦素、OPG、MIP-3 β 、GRO α 、CXCL4/PF-4 和 / 或 CXCL7/NAP-2),生长因子 (例如,EGF、VEGF、PEDF、BDNF 和 / 或 SDGF),抗嗜中性粒细胞抗体 (例如,ANCA、pANCA、cANCA、NSNA 和 / 或 SAPPa),ASCA (例如,ASCA-IgA、ASCA-IgG 和 / 或 ASCA-IgM),抗微生物抗体 (例如,抗 OmpC 抗体、抗鞭毛蛋白抗体和 / 或抗 I2 抗体),乳铁蛋白,抗 tTG 抗体,脂质运载蛋白 (例如,NGAL、NGAL/MMP-9 复合物),MMP (例如,MMP-9),TIMP (例如,TIMP-1), α -球蛋白 (例如, α -2-巨球蛋白、触珠蛋白和 / 或血清类粘蛋白),肌动蛋白切割蛋白 (例如,凝溶胶蛋白),S100 蛋白 (例如,钙粒蛋白),血纤维蛋白肽 (例如,FIBA)、CGRP、速激肽 (例如,P 物质),生长素释放肽,神经降压素,促肾上腺皮质素释放激素,及其组合。在另一实施方式中,还可检测其它诊断标记物的存在或水平,如抗乳铁蛋白抗体,L-选择蛋白/CD62L,弹性蛋白酶,C 反应蛋白质 (CRP),钙卫蛋白,抗 U1-70kDa 自身抗体,闭锁小带 1 (ZO-1),血管活性肠肽 (VIP),血清淀粉样蛋白 A,促胃液激素,及其组合。

[0249] 在某些实施方式中,所提供的试验可包括检测至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30 或更多种本文所述的生物标记物。

[0250] 在另一方面,提供用于帮助诊断对象中 IBS 或用于将样品分类为 IBS 样品或非 IBS 样品的试剂盒。在某些实施方式中,本文所述试剂盒含有用于检测 IBS 生物标记物的存在或水平的结合部分,所述 IBS 生物标记物选自:糖缺失转铁蛋白,尿皮素,促肾上腺皮质素释放激素结合蛋白,皮质醇,促肾上腺皮质激素,P 物质,神经生长因子,神经激肽 A,神经激

肽 B, 血管活性肠肽, 胰高血糖素样肽 2, 促胃动素, 垂体腺苷酸环化酶激活肽, 5- 羟色胺, 色氨酸, 5- 羟色胺 O- 硫酸盐, 5- 羟吲哚乙酸, 5-HT 葡萄糖苷酸, 酪氨酸, 苯丙氨酸, UDP- 葡萄糖醛酸基转移酶 1-6, 5- 羟色胺再摄取转运体, 色氨酸羟化酶 1, 单胺氧化酶 A, 单胺氧化酶 B, 和羟色氨酸 (5- 羟色胺) 受体 3A。

[0251] 在其它实施方式中, 所述试剂盒还包括用于检测至少一种额外生物标记物的至少一种结合部分, 所述额外生物标记物选自脑源性神经营养因子 (BDNF), 中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (NGAL), TNF 相关弱凋亡诱导因子 (TWEAK), 生长相关癌基因 α (GRO- α), 白介素 -1 β (IL-1 β), 金属蛋白酶组织抑制剂 -1 (TIMP-1), 抗酿酒酵母抗体 (ASCA-IgA), 抗 CBir-1 抗体 (CBir1), 抗人嗜中性粒细胞胞质抗体 (ANCA), 抗人组织转氨酶 IgA (tTG), β - 类胰蛋白酶, 前列腺素 E₂ (PGE₂), 组胺, 及其组合。

[0252] 在另一实施方式中, 试剂盒将含有针对额外生物标记物的至少一种结合部分, 所述额外生物标记物选自: 细胞因子 (例如, IL-8、IL-1 β 、TWEAK、瘦素、OPG、MIP-3 β 、GRO α 、CXCL4/PF-4 和 / 或 CXCL7/NAP-2), 生长因子 (例如, EGF、VEGF、PEDF、BDNF 和 / 或 SDGF), 抗嗜中性粒细胞抗体 (例如, ANCA、pANCA、cANCA、NSNA 和 / 或 SAPPa), ASCA (例如, ASCA-IgA、ASCA-IgG 和 / 或 ASCA-IgM), 抗微生物抗体 (例如, 抗 OmpC 抗体、抗鞭毛蛋白抗体和 / 或抗 I2 抗体), 乳铁蛋白, 抗 tTG 抗体, 脂质运载蛋白 (例如, NGAL、NGAL/MMP-9 复合物), MMP (例如, MMP-9), TIMP (例如, TIMP-1), α - 球蛋白 (例如, α -2- 巨球蛋白、触珠蛋白和 / 或血清类粘蛋白), 肌动蛋白切割蛋白 (例如, 凝溶胶蛋白), S100 蛋白 (例如, 钙粒蛋白), 血纤维蛋白肽 (例如, FIBA), CGRP, 速激肽 (例如, P 物质), 生长素释放肽, 神经降压素, 促肾上腺皮质激素释放激素, 抗乳铁蛋白抗体, L- 选择蛋白 / CD62L, 弹性蛋白酶, C 反应蛋白质 (CRP), 钙卫蛋白, 抗 U1-70kDa 自身抗体, 闭锁小带 1 (ZO-1), 血管活性肠肽 (VIP), 血清淀粉样蛋白 A, 促胃液激素, 及其组合。

[0253] 在某些实施方式中, 所提供的试剂盒可含有针对至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30 种或更多种本文所述生物标记物的结合部分。

[0254] 在一种优选实施方式中, 提供用于检测血液或血清样品中 IBS 标记物的存在或水平的试剂盒。在一种实施方式中, 所述试剂盒含有第一捕获抗体和第二检测抗体, 所述捕获抗体可选连接于固相表面, 所述检测抗体结合所述 IBS 标记物上不同于捕获抗体的表位。在某些实施方式中, 所述检测抗体将偶联有碱性磷酸酶。在其它实施方式中, 所述检测抗体将不偶联有酶, 即碱性磷酸酶。在所述检测抗体不偶联酶的某些实施方式中, 所述试剂盒还包含对检测抗体特异的第三抗体, 所述第三抗体偶联有酶, 即碱性磷酸酶。

[0255] 在某些实施方式中, 所述试剂盒将还含有发光或化学发光底物, 例如, 在 Ultra LITE™ (NAG 研究实验室公司); Sensolyte® (AnaSpec 公司); SuperSignal ELISA 飞克级最高灵敏度底物 (热科学公司 (Thermo Scientific)); SuperSignal ELISA 皮克级化学发光底物 (热科学公司); 或 CPSD (3-(4- 甲氧基螺旋 {1,2- 二氧杂环丁烷 -3,2'-(5'- 氯) 三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷}-4- 基) 磷酸苯二钠盐; Tropix 公司) 中所见的发光底物。在一种优选的实施方式中, 所述发光底物是 CPSD (3-(4- 甲氧基螺旋 {1,2- 二氧杂环丁烷 -3,2'-(5'- 氯) 三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷}-4- 基) 磷酸苯二钠盐)。

[0256] 在某些实施方式中, 用于检测 IBS 标记物的存在或水平的所述试剂盒适于检测以

低于约 500pg/ml 的浓度存在于血液或血清样品中的 IBS 标记物。在某些实施方式中,所述试剂盒适于检测以低于约 500pg/ml,或低于约 400pg/ml、300pg/ml、250pg/ml、200pg/ml、150pg/ml、100pg/ml、75pg/ml、50pg/ml、40pg/ml、30pg/ml、25pg/ml、20pg/ml、15pg/ml 或低于约 10pg/ml 的浓度存在于血液或血清样品中的 IBS 标记物。在一种优选实施方式中,所述试剂盒适于检测以低于约 200pg/ml 的浓度存在于血液或血清样品中的 IBS 标记物。在一种更优选的实施方式中,所述试剂盒适于检测以低于约 100pg/ml 的浓度存在于血液或血清样品中的 IBS 标记物。在一种更优选的实施方式中,所述试剂盒适于检测以低于约 50pg/ml 的浓度存在于血液或血清样品中的 IBS 标记物。在一种最优选的实施方式中,所述试剂盒适于检测以低于约 25pg/ml 的浓度存在于血液或血清样品中的 IBS 标记物。

[0257] E. 用于监控和指定疗法的方法

[0258] 在一些实施方式中,个体诊断为患有 IBS 后,给予所述个体治疗有效量的用于治疗一种或多种 IBS 相关症状的药物。合适的 IBS 药物包括但不限于:5-羟色胺能试剂,抗抑郁剂,氯通道活化剂,氯通道阻断剂,鸟苷酸环化酶激动剂,抗生素,阿片类激动剂,神经激肽拮抗剂,镇痉剂或抗胆碱剂,颠茄生物碱,巴比妥酸盐,GLP-1 类似物,CRF 拮抗剂,益生菌,其游离碱,其药学可接受的盐,其衍生物,其类似物,及其组合。其它 IBS 药物包括填充剂,多巴胺拮抗剂,驱风剂,安神剂,右托非索泮,苯妥英,噻吗心安和地尔硫卓。此外,可以给予通过影响神经元或神经胶质细胞信号传导来调节肠道通透性的氨基酸如谷氨酰胺和谷氨酸来治疗 IBS 患者。

[0259] 在其它实施方式中,本发明所述方法还包括将 IBS 样品分类或将 IBS 诊断为 IBS-便秘型 (IBS-C),IBS-腹泻型 (IBS-D),IBS-混合型 (IBS-M),IBS-交替型 (IBS-A),或感染后 IBS (IBS-PI) 的样品或诊断。在某些情况中,将 IBS 样品分类或诊断为 IBS 的某类型、形式或临床亚型是基于至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 种或更多种本文提供的分类标记物的存在或水平。优选地,根据一种或多种本文所提供的 IBS 标记物的存在或水平将至少一种 IBS 形式与至少一种其它 IBS 形式相区分。在某些情况中,本发明所述方法可用于将 IBS-C 样品与此前鉴定为患有 IBS 的个体中的 IBS-A 和 / 或 IBS-D 样品相区分。在某些其它情况中,本发明所述方法可用于将来自此前未鉴定患有 IBS 的个体的样品分类为 IBS-A 样品,IBS-C 样品,IBS-D 样品,或非 IBS 样品。

[0260] 在某些实施方式中,所述方法还包括将分类的结果发送给临床医师。在某些其它实施方式中,所述方法还以个体患有 IBS-A、IBS-C、IBS-D、IBS-M 或 IBS-PI 概率的形式提供诊断。本发明所述方法还可包括给予所述个体治疗有效量的可用于治疗 IBS-A、IBS-C、IBS-D、IBS-M 或 IBS-PI 的药物。合适的药物包括但不限于替加色罗 (Zelnorm™),阿洛司琼 (Lotronex®),鲁比前列素 (Amitiza™),利福酰胺 (Xifaxan™),MD-1100,益生菌,及其组合。

[0261] 在样品被分类为 IBS-A 或 IBS-C 样品和 / 或个体被诊断患有 IBS-A 或 IBS-C 的情况下,可给予所述个体治疗有效剂量的替加色罗或其它 5-HT₄ 激动剂 (例如,莫沙必利,伦扎必利,AG1-001 等)。在一些情况中,当样品被分类为 IBS-C 和 / 或所述个体被诊断患有 IBS-C 时,可给予所述个体治疗有效量的鲁比前列素或其它氯通道激活剂,利福酰胺或能控制肠道细菌生长过度的其它抗生素,MD-1100 或其它鸟苷酸环化酶激动剂,阿西马朵林或其它阿片类激动剂,或他奈坦或其它神经激肽拮抗剂。在其它情况中,当样品分类为 IBS-D 和 / 或个体诊断为患有 IBS-D 时,可给予所述个体治疗有效量的阿洛司琼或其它 5-HT₃ 拮抗剂

(例如,雷莫司琼,DDP-225等),可洛菲来默(crofelemer)或其它氯通道阻断剂,他奈坦或其它神经激肽拮抗剂(例如,沙瑞度坦等),或抗抑郁剂如三环抗抑郁药。

[0262] 在另一方面,本发明提供用于监控个体中 IBS 进展或消退的方法,所述方法包括:(a) 通过检测所述样品中至少一种诊断标记物的存在或水平来确定诊断标记物概况;以及(b) 利用基于所述诊断标记物概况的算法来确定个体中 IBS 的存在或严重程度。

[0263] 在一种实施方式中,监控对象中 IBS 进展或消退的所述方法包括确定诊断标记物概况,可选联用症状概况,其中所述症状概况通过鉴定所述个体中至少一种症状的存在或严重程度来确定;并利用基于所述诊断标记物概况和症状概况的算法确定所述个体中 IBS 的存在或严重程度。

[0264] 在相关方面,本发明提供用于监控接受 IBS 治疗用药的对象中的药物功效,所述方法包括:(a) 通过检测所述样品中至少一种诊断标记物的存在或水平来确定诊断标记物概况;以及(b) 利用基于所述诊断标记物概况的算法来确定所述药物的功效。

[0265] 在一种实施方式中,监控 IBS 药物功效的所述方法包括确定诊断标记物概况,可选联用症状概况,其中所述症状概况通过鉴定所述个体中至少一种症状的存在或严重程度来确定;并利用基于所述诊断标记物概况和症状概况的算法确定所述药物的功效。

[0266] 在一种实施方式中,本发明提供用于监控对象中肠易激综合征(IBS)的进展或消退的方法,所述方法包括:(a) 将在第一时间取自所述对象的第一血液或血清样品和 IBS 标记物结合部分接触,接触条件适于将所述样品中存在的 IBS 标记物转化成含所述 IBS 标记物和 IBS 标记物结合部分的复合物;(b) 确定所述复合物的水平,从而确定第一样品中的 IBS 标记物水平;(c) 将在第二时间取自所述对象的第二血液或血清样品和 IBS 标记物结合部分接触,接触条件适于将所述样品中存在的 IBS 标记物转化成含所述 IBS 标记物和 IBS 标记物结合部分的复合物;(d) 确定所述复合物的水平,从而确定第二样品中的 IBS 标记物水平;以及(e) 比较第一样品中所述 IBS 标记物的存在水平和第二样品中所述 IBS 标记物的存在水平,其中第二样品中所述 IBS 标记物的存在水平高于第一样品表明所述对象中 IBS 的进展,而第二样品中所述 IBS 标记物的水平低于第一样品表明所述对象中 IBS 的消退。

[0267] 在监控和指定疗法方法的某些实施方式中,所述方法还包括检测至少一种额外生物标记物的存在或水平,所述额外生物标记物选自脑源性神经营养因子(BDNF),中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL),TNF 相关弱凋亡诱导因子(TWEAK),生长相关癌基因 α (GRO- α),白介素-1 β (IL-1 β),金属蛋白酶组织抑制剂-1(TIMP-1),抗酿酒酵母抗体(ASCA-IgA),抗CBir-1抗体(CBir1),抗人嗜中性粒细胞胞质抗体(ANCA),抗人组织转氨酶IgA(tTG), β -类胰蛋白酶,前列腺素 E_2 (PGE $_2$),组胺,及其组合。在某些实施方式中,所述方法包括检测至少2、3、4、5、6、7、8、9或所有10种上文所提供额外生物标记物的存在或水平。

[0268] 在另一实施方式中,所述方法还可包括检测至少一种生物标记物的存在或水平,所述生物标记物选自:细胞因子(例如,IL-8、IL-1 β 、TWEAK、瘦素、OPG、MIP-3 β 、GRO α 、CXCL4/PF-4和/或CXCL7/NAP-2),生长因子(例如,EGF、VEGF、PEDF、BDNF和/或SDGF),抗嗜中性粒细胞抗体(例如,ANCA、pANCA、cANCA、NSNA和/或SAPPA),ASCA(例如,ASCA-IgA、ASCA-IgG和/或ASCA-IgM),抗微生物抗体(例如,抗OmpC抗体、抗鞭毛蛋白抗体和/或抗I2抗体),乳铁蛋白,抗tTG抗体,脂质运载蛋白(例如,NGAL、NGAL/MMP-9复合物),MMP(例

如,MMP-9)、TIMP(例如,TIMP-1), α -球蛋白(例如, α -2-巨球蛋白、触珠蛋白和/或血清类粘蛋白),肌动蛋白切割蛋白(例如,凝溶胶蛋白),S100蛋白(例如,钙粒蛋白),血纤维蛋白肽(例如,FIBA),CGRP,速激肽(例如,P物质),生长素释放肽,神经降压素,促肾上腺皮质激素释放激素,及其组合。在另一实施方式中,还可检测其它诊断标记物的存在或水平,例如:抗乳铁蛋白抗体,L-选择蛋白/CD62L,弹性蛋白酶,C反应蛋白质(CRP),钙卫蛋白,抗U1-70kDa自身抗体,闭锁小带1(ZO-1),血管活性肠肽(VIP),血清淀粉样蛋白A,促胃液激素,及其组合。

[0269] 在一些实施方式中,可构建用于测量一种或多种上述诊断标记物的小组并用于确定IBS的存在或严重程度,或用于确定IBS药物的功效。本领域技术人员应当理解可以同时或依序确定多个诊断标记物的存在或水平,利用例如个体样品的等分样品或稀释。如上所述,通常当个体样品中特定诊断标记物的水平比同一标记物在对比样品或样品群中的水平高出(例如比中值水平高)至少约10%,15%,20%,25%,50%,75%,100%,125%,150%,175%,200%,250%,300%,350%,400%,450%,500%,600%,700%,800%,900%或1000%,视作升高。类似地,通常当个体样品中特定诊断标记物的水平比同一标记物在对比样品或样品群中的水平低(例如比中值水平低)至少约5%,10%,15%,20%,25%,30%,35%,40%,45%,50%,55%,60%,65%,70%,75%,80%,85%,90%或95%时,视作降低。

[0270] 在某些实施方式中,监控IBS进展或消退的所述方法包括确定诊断标记物概况,可选联用症状概况,其中所述症状概况通过鉴定所述个体中至少一种症状的存在或严重程度来确定;并利用基于所述诊断标记物概况和症状概况的算法确定所述个体中IBS的存在或严重程度。在某些其它实施方式中,监控IBS药物功效的所述方法包括确定诊断标记物概况,可选联用症状概况,其中所述症状概况通过鉴定所述个体中至少一种症状的存在或严重程度来确定;并利用基于所述诊断标记物概况和症状概况的算法确定所述药物的功效。本领域技术人员应当理解所述诊断标记物概况和症状概况可以同时确定或以任意顺序依序确定。

[0271] 在一些实施方式中,确定IBS的存在或严重程度或IBS药物的功效是在结合统计算法下单独基于诊断标记物概况或与症状概况联合。在某些情况中,所述统计算法是学习型统计分类系统。所述学习型统计分类系统包含本文所述的任意学习型统计分类系统。

[0272] 在某些实施方式中,本发明所述方法还可包括比较步骤(b)所确定个体中IBS的存在或严重程度与较早时候所述个体中IBS的存在或严重程度。作为非限制性示例,可以将对接受IBS药物的个体所确定的IBS存在或严重程度和对同一个体在开始使用所述IBS前或在治疗早期所确定IBS存在或严重程度作比较。在某些其它实施方式中,本发明所述方法可包括通过比较步骤(b)中所确定的IBS药物功效和在治疗早期所述个体中的IBS药物功效来确定所述IBS药物的功效。在其它实施方式中,所述方法还可包括将所述IBS监控结果发送给临床医师,例如胃肠病学家或全科医师。

[0273] F. 用于分类样品的计算机可读介质和系统

[0274] 一方面,本发明的提供计算机可读介质,其所含代码用于控制一个或多个处理器以将来自对象的血清或血液样品分类为是否与肠易激综合征(IBS)相关,所述代码包括的指令将某统计方法应用于含诊断标记物概况的数据集以产生统计衍生决定,所述决定基于所述诊断标记物概况将所述样品分类为IBS样品或非IBS样品,其中所述诊断标记物概况

表明至少一种选自下组的诊断标记物的水平：糖缺失转铁蛋白，尿皮素，促肾上腺皮质素释放激素结合蛋白，皮质醇，促肾上腺皮质激素，P 物质，神经生长因子，神经激肽 A，神经激肽 B，血管活性肠肽，胰高血糖素样肽 2，促胃动素，垂体腺苷酸环化酶激活肽，5-羟色胺，色氨酸，5-羟色胺 O-硫酸盐，5-羟吲哚乙酸，5-HT 葡萄糖苷酸，酪氨酸，苯丙氨酸，UDP-葡萄糖醛酸基转移酶 1-6，5-羟色胺再摄取转运体，色氨酸羟化酶 1，单胺氧化酶 A，单胺氧化酶 B，和羟色氨酸（5-羟色胺）受体 3A，及其结合。

[0275] 在其它实施方式中，用于确认 IBS 的所述计算机可读介质包括指令，该指令将某统计方法应用于数据集以产生统计衍生决定，所述数据集包含诊断标记物概况且可选联合有表明个体中至少一种症状存在或严重度的症状概况，所述决定基于所述诊断标记物概况和所述症状概况将所述样品分类为 IBS 样品或非 IBS 样品。本领域技术人员能理解所述统计方法能同时或以任意顺序依序应用于诊断标记物概况和症状概况。

[0276] 在一种具体实施方式中，本发明提供计算机可读介质，其所含代码用于控制一个或多个处理器以将来自个体的样品分类为是否与 IBS 相关，所述代码包括的指令将某统计方法应用于含诊断标记物概况的数据集以产生统计衍生决定，所述决定基于所述诊断标记物概况将所述样品分类为 IBS 样品或非 IBS 样品，其中所述诊断标记物概况表明样品中至少一种诊断标记物的存在或水平。

[0277] 在相关方面，本发明提供计算机可读介质，其所含代码用于控制一个或多个处理器以将来自个体的样品分类为是否与 IBS 相关，所述代码包括：(a) 将第一统计方法应用于含诊断标记物概况的数据集来产生统计衍生决定的指令，所述决定根据所述诊断标记物概况将所述样品分类为 IBD 样品或非 IBD 样品，其中所述诊断标记物概况表明样品中至少一种诊断标记物的存在或水平；且若所述样品被分类为非 IBD 样品，则包括 (b) 将第二统计方法应用于同一或不同数据集来产生第二统计衍生决定的指令，所述第二决定将所述非 IBD 样品分类为 IBS 样品或非 IBS 样品。

[0278] 在一种实施方式中，用于确认 IBS 的所述计算机可读介质对数据集应用某统计方法以产生统计衍生决定的指令，所述数据集包含诊断标记物概况且可选联合有表明个体中至少一种症状存在或严重度的症状概况，所述决定基于所述诊断标记物概况和所述症状概况将所述样品分类为 IBS 样品或非 IBS 样品。

[0279] 在其它实施方式中，用于首先排除 IBD 然后确认 IBS 的所述计算机可读介质包括对数据集应用第一统计方法以产生统计衍生决定的指令，所述数据集包含诊断标记物概况并可联合有表明个体中至少一种症状存在或严重度的症状概况，所述决定根据所述诊断标记物概况和所述症状概况将所述样品分类为 IBD 样品或非 IBD 样品；且若所述样品被分类为非 IBD 样品，还包括对同一或不同数据集应用第二统计方法来产生第二统计衍生决定的指令，所述第二决定将所述非 IBD 样品分类为 IBS 样品或非 IBS 样品。本领域技术人员能理解所述第一和 / 或统计方法能同时或以任意顺序依序应用于诊断标记物概况和症状概况。

[0280] 在一种实施方式中，所述第一和第二统计方法在不同处理器中实施。或者，所述第一和第二统计方法在单个处理器中实施。在另一实施方式中，所述第一统计方法是学习型统计分类系统。上文已描述可用于本发明的学习型统计分类系统的示例。在某些情况中，所述第一和 / 或第二统计方法是单个学习型统计分类系统，例如 RF 或 C&RT。在某些其它情

况中,所述第一和 / 或第二统计方法是至少 2 种学习型统计分类系统的组合。作为非限制性示例,所述学习型统计算法系统的组合包含 RF 和 NN 或 SVM,例如串联使用。在一些情况中,用某个或某些学习型统计分类系统所得数据可以用处理算法来处理。

[0281] 在另一发明,本发明提供用于将来自对象的血清或血液样品分类为是否与肠易激综合征 (IBS) 相关的系统,所述系统包括:(a) 数据采集模块,其配置为产生含诊断标记物概况的数据集,其中所述诊断标记物概况表明至少一种选自下组的诊断标记物的存在或水平:糖缺失转铁蛋白,尿皮素,促肾上腺皮质素释放激素结合蛋白,皮质醇,促肾上腺皮质激素, P 物质,神经生长因子,神经激肽 A,神经激肽 B,血管活性肠肽,胰高血糖素样肽 2,促胃动素,垂体腺苷酸环化酶激活肽,5-羟色胺,色氨酸,5-羟色胺 0- 硫酸盐,5-羟吲哚乙酸,5-HT 葡萄糖苷酸,酪氨酸,苯丙氨酸,UDP- 葡萄糖醛酸基转移酶 1-6,5-羟色胺再摄取转运体,色氨酸羟化酶 1,单胺氧化酶 A,单胺氧化酶 B,和羟色氨酸 (5-羟色胺) 受体 3A,及其结合;(b) 数据处理模块,其配置为通过对所述数据集应用统计方法来处理该数据集以产生统计衍生决定,该决定根据所述诊断标记物概况将样品分类为 IBS 样品或非 IBS 样品;以及 (c) 显示模块,其配置为显示所述统计衍生决定。

[0282] 在某些实施方式中,用于分类血清或血液样品是否与 IBS 相关、帮助诊断 IBS 或确认 IBS 的所述系统包含:数据采集模块,其配置成产生包含诊断标记物概况并可选联合有表明个体中至少一种症状存在或严重度的症状概况的数据集;数据处理模块,其配置成通过对所述数据集应用统计方法来处理该数据集以产生统计衍生决定,该决定根据所述诊断标记物概况和症状概况将样品分类为 IBS 样品或非 IBS 样品;以及显示模块,其配置成显示所述统计衍生决定。

[0283] 在相关方面,本发明提供用于将来自个体的样品分类为是否与 IBS 相关的系统,所述系统包括:(a) 数据采集模块,其配置为产生含有诊断标记物概况的数据集,其中所述诊断标记物概况表明样品中至少一种诊断标记物的存在或水平;(b) 数据处理模块,其配置为通过对所述数据集应用第一统计方法来处理该数据集以产生第一统计衍生决定,该决定根据所述诊断标记物概况将样品分类为 IBD 样品或非 IBD 样品;若样品被分类为非 IBD 样品,则还包括配置成对同一或不同数据集应用第二统计方法来产生第二统计衍生决定的数据处理模块,该决定将所述非 IBD 样品分类为 IBS 样品或非 IBS 样品;以及 (c) 显示模块,其配置为显示所述第一和 / 或第二统计衍生决定。

[0284] 在一种实施方式中,用于首先排除 IBD 然后确认 IBS 的所述系统包括:数据采集模块,其配置成产生包含诊断标记物概况并可选联合有表明个体中至少一种症状存在或严重度的症状概况的数据集;数据处理模块,其配置为通过对所述数据集应用第一统计方法来处理该数据集以产生第一统计衍生决定,该决定根据所述诊断标记物概况和症状概况将样品分类为 IBD 样品或非 IBD 样品;若样品被分类为非 IBD 样品,则还包括配置成对同一或不同数据集应用第二统计方法来产生第二统计衍生决定的数据处理模块,该决定将所述非 IBD 样品分类为 IBS 样品或非 IBS 样品;以及显示模块,其配置为显示所述第一和 / 或第二统计衍生决定。

[0285] 在某些实施方式中,所述诊断标记物概况表明至少一种额外诊断标记物的水平,所述额外诊断标记物选自脑源性神经营养因子 (BDNF),中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (NGAL),TNF 相关弱凋亡诱导因子 (TWEAK),生长相关癌基因 α (GRO- α),白介

素-1 β (IL-1 β), 金属蛋白酶组织抑制剂-1 (TIMP-1), 抗酿酒酵母抗体 (ASCA-IgA), 抗 CBir-1 抗体 (CBir1), 抗人嗜中性粒细胞胞质抗体 (ANCA), 抗人组织转氨酶 IgA (tTG), 组胺, β -类胰蛋白酶, 前列腺素 E₂, 及其组合。在某些实施方式中, 所述方法包括检测至少 2、3、4、5、6、7、8、9 或所有 10 种上文所提供额外生物标记物的存在或水平。

[0286] 在另一实施方式中, 所述诊断标记物概况表明至少一种额外诊断标记物的水平, 所述额外诊断标记物选自下组: 细胞因子 (例如, IL-8、IL-1 β 、TWEAK、瘦素、OPG、MIP-3 β 、GRO α 、CXCL4/PF-4 和 / 或 CXCL7/NAP-2), 生长因子 (例如, EGF、VEGF、PEDF、BDNF 和 / 或 SDGF), 抗嗜中性粒细胞抗体 (例如, ANCA、pANCA、cANCA、NSNA 和 / 或 SAPPa), ASCA (例如, ASCA-IgA、ASCA-IgG 和 / 或 ASCA-IgM), 抗微生物抗体 (例如, 抗 OmpC 抗体、抗鞭毛蛋白抗体和 / 或抗 I2 抗体), 乳铁蛋白, 抗 tTG 抗体, 脂质运载蛋白 (例如, NGAL、NGAL/MMP-9 复合物), MMP (例如, MMP-9), TIMP (例如, TIMP-1), α -球蛋白 (例如, α -2-巨球蛋白、触珠蛋白和 / 或血清类粘蛋白), 肌动蛋白切割蛋白 (例如, 凝溶胶蛋白), S100 蛋白 (例如, 钙粒蛋白), 血纤维蛋白肽 (例如, FIBA), CGRP, 速激肽 (例如, P 物质), 生长素释放肽, 神经降压素, 促肾上腺皮质激素释放激素, 及其组合。在另一实施方式中, 还可检测其它诊断标记物的存在或水平, 例如: 抗乳铁蛋白抗体, L-选择蛋白 / CD62L, 弹性蛋白酶, C 反应蛋白质 (CRP), 钙卫蛋白, 抗 U1-70kDa 自身抗体, 闭锁小带 1 (ZO-1), 血管活性肠肽 (VIP), 血清淀粉样蛋白 A, 促胃液激素, 及其组合。

[0287] G. 具有 IBS 样症状的疾病和紊乱

[0288] 多种结构或代谢疾病与紊乱可引起与 IBS 类似的体征或症状。作为非限制性示例, 有例如炎性肠病 (IBD), 乳糜泻 (CD), 急性炎症, 憩室炎, 回肠袋肛管吻合, 显微结肠炎, 慢性传染性腹泻, 乳糖酶缺乏, 癌症 (例如, 结直肠癌), 小肠或结肠的机械性梗阻, 肠道感染, 缺血, 消化不良, 吸收不良, 子宫内膜异位症和肠道未鉴别炎症性疾病等疾病和紊乱的患者可表现有腹部不适伴有轻度到中度疼痛和排便稠度和 / 或频率的改变, 与 IBS 相似。其它 IBS 样症状可包括慢性腹泻或便秘或两者交替型, 体重减轻, 腹胀或胀气, 和粪便中的粘液。

[0289] 大多数 IBD 患者可分成两种不同临床亚型, 克罗恩病和溃疡性结肠炎。克罗恩病是影响回肠下部的炎症性疾病, 常涉及结肠和肠道的其它区域。溃疡性结肠炎的表征为大多数位于大肠粘膜和粘膜下层的炎症。患这些 IBD 临床亚型的患者通常有 IBS 样症状, 例如, 腹部疼痛, 慢性腹泻, 体重减轻, 和腹部绞痛。

[0290] 乳糜泻的临床表现也以 IBS 样症状如慢性腹泻相关的腹部不适、体重减轻和腹胀为特征。乳糜泻是免疫介导的肠粘膜疾病, 通常和绒毛萎缩、小囊增生和 / 或小肠粘膜层发炎相关。除了营养素吸收不良外, 患有乳糜泻的个体有矿物质不足、维生素缺乏、骨质疏松、自身免疫性疾病、和肠部恶性肿瘤 (例如, 淋巴瘤和癌) 的风险。据信在适当的遗传和环境情况下接触蛋白质如谷蛋白 (例如, 存在于小麦、黑麦、大麦、燕麦、小米、小黑麦、斯卑尔脱小麦 (spelt) 和卡姆小麦 (Kamut) 中的麦谷蛋白和醇溶谷蛋白) 会导致乳糜泻。

[0291] 表现有 IBS 样症状的以肠道发炎为特征的其它疾病和紊乱包括, 例如, 急性炎症, 憩室炎, 回肠袋肛管吻合, 显微结肠炎和慢性传染性腹泻以及未鉴定的肠道炎症性疾病。经历急性炎症多次发作的患者通常在 IBS 样症状外还有升高的 C 反应蛋白质 (CRP) 水平。CRP 由肝脏在炎症过程的急性期中产生, 并通常在炎症过程开始后约 24 小时释放。罹患憩室炎、

回肠袋肛管吻合、显微结肠炎和慢性传染性腹泻的患者通常在 IBS 样症状外还有升高的粪便乳铁蛋白和 / 或钙卫蛋白水平。乳铁蛋白是粘膜分泌的糖蛋白,并且是白细胞继发性颗粒中的主要蛋白质。白细胞常被征集到炎性位点,在此活化,释放颗粒内容物到周围区域。该过程提高粪便中的乳铁蛋白浓度。

[0292] 在有回肠袋肛管吻合(即,重症克罗恩病中结肠完全切除后产生的储袋)的患者中观察到乳铁蛋白水平相比储袋的其它非炎性病症如储袋易激综合征(irritable pouch syndrome)提高。憩室炎患者中也观察到乳铁蛋白水平升高,该病症是消化道中鼓胀的储袋(即憩室)出现发炎和 / 或感染,导致严重的腹部疼痛、发热、恶心和排便习惯的显著改变。显微结肠炎是慢性炎症,也与粪便乳铁蛋白水平提高关联。显微结肠炎的表征为持续的水泻(不带血)、腹部疼痛,通常与体重减轻关联,在结肠镜检查 and 放射检查中为正常粘膜,有非常特异性的组织病理学变化。显微结肠炎由两种疾病组成:胶原性结肠炎和淋巴细胞结肠炎。胶原性结肠炎的病因学未知,其发现于长期水泻并有正常结肠镜检查的患者。胶原性结肠炎和淋巴细胞结肠炎都以结肠内层的淋巴细胞增加为表征。胶原性结肠炎的表征还有结肠上皮胶原层的增厚。慢性传染性腹泻也是与粪便乳铁蛋白水平提高关联的病症。慢性传染性腹泻通常由细菌、病毒、或原生动物感染引起,患者表现有 IBS 样症状如腹泻和腹部疼痛。IBD 患者中也观察到乳铁蛋白水平提高。

[0293] 除了测定 CRP 和 / 或乳铁蛋白和 / 或钙卫蛋白水平外,还可通过检测粪便中血液如粪便血红蛋白的存在来排除与肠道炎症相关的疾病和紊乱。患者未察觉的肠道出血被称为隐蔽或隐性出血。通常在来自患者的粪便样品中观察到隐性出血(例如,粪便血红蛋白)的存在。其它病症如溃疡(例如,胃、十二指肠)、癌症(例如,胃癌、结直肠癌)和痔也可表现有 IBS 样症状,包括腹部疼痛和排便稠度和 / 或频率的改变。

[0294] 此外,也可评估粪便钙卫蛋白水平。钙卫蛋白是具有抗微生物活性的钙结合蛋白,主要衍生自嗜中性粒细胞和单核细胞。已发现钙卫蛋白在胰囊性纤维变性、类风湿性关节炎、IBD、结直肠癌、HIV 和其它炎性疾病中有临床相关性。已在血清、血浆、口腔、脑脊髓液和关节液、尿液和粪便中测定其水平。已认识到粪便钙卫蛋白在 GI 疾病中的优势:室温下稳定 3-7 天使得样品能通过常规邮件装运;在克罗恩病患者中与粪便 α -1 抗胰蛋白酶关联;且在大多数胃肠癌和 IBS 患者中有升高。发现粪便钙卫蛋白与溃疡性结肠炎中疾病活性的内窥镜和组织学评级,以及镓-111 标记嗜中性粒细胞的粪便分泌(IBD 中疾病活性的标准)良好关联。

[0295] 基于上文,显然有多种疾病和紊乱能产生 IBS 样症状,因此对将样品确定性分类为 IBS 样品造成了实质性障碍。但是,通过采用例如统计算法将来自个体的样品分类为 IBS 样品,或者通过采用例如统计算法的组合来摒除(即,排除)那些与 IBS 有相似临床表现的疾病和紊乱并鉴定(即,确认)样品中的 IBS,本发明克服了这一限制。

[0296] H. 诊断标记物

[0297] 多种诊断标记物适用于本发明所述方法、系统和代码以将来自个体的样品分类为 IBS 样品或在来自个体的样品中排除一种或多种与 IBS 样症状相关的疾病或紊乱。诊断标记物的示例包括但不限于:细胞因子,生长因子,抗嗜中性粒细胞抗体,抗酿酒酵母抗体(ASCA),抗微生物抗体,抗组织转谷氨酰胺酶(tTG)抗体,脂质运载蛋白,基质金属蛋白酶(MMP),脂质运载蛋白和 MMP 的复合物,金属蛋白酶的抑制剂(TIMPS),球蛋白(例如,

α 球蛋白),肌动蛋白切割蛋白,S100 蛋白,血纤维蛋白肽,降钙素基因相关肽(CGRP),速激肽,生长素释放肽,神经降压素,促肾上腺皮质激素释放激素(CRH),丝氨酸蛋白酶(例如,类胰蛋白酶如 β -类胰蛋白酶,弹性蛋白酶,等),前列腺素(例如, PGE_2),组胺,C 反应蛋白(CRP),乳铁蛋白,抗乳铁蛋白抗体,钙卫蛋白,血红蛋白,NOD2/CARD15,5-羟色胺再摄取转运体(SERT),色氨酸羟化酶 1,5-羟色胺(5-HT),乳果糖,肥大细胞标记物,应激标记物,胃肠道激素,5-羟色胺代谢物,5-羟色胺途径标记物,糖缺失转铁蛋白(CDT),及其组合。可利用 2007 年 8 月 14 日提交的美国专利公布号 2008/0085524 中实施例 14 所述技术按本发明选择用于预测 IBS 的其它诊断标记物,该文献通过引用全文纳入本文用于所有目的。本领域技术人员还了解适用于本发明的其它诊断标记物。

[0298] 在具体实施方式中,诊断标记物概况通过检测至少 1 种,2 种或所有 3 种下列生物标记物的存在或水平来确定:丝氨酸蛋白酶(例如,类胰蛋白酶如 β -类胰蛋白酶);前列腺素(例如, PGE_2);和/或组胺。

[0299] 在其它实施方式中,确定个体样品中至少 2、3、4、5、6、7、8、9、10 种或更多种诊断标记物的存在或水平。在某些情况中,所述细胞因子包括一种或多种下述细胞因子。优选确定个体样品中 IL-8、IL-1 β 、TNF 相关弱凋亡诱导因子(TWEAK)、瘦素、骨保护素(OPG)、MIP-3 β 、GRO α 、CXCL4/PF-4、和/或 CXCL7/NAP-2 的存在或水平。在某些其它情况中,所述生长因子包括一种或多种下述生长因子。优选确定个体样品中表皮生长因子(EGF),血管内皮生长因子(VEGF),色素上皮衍生因子(PEDF),脑源性神经营养因子(BDNF),和/或双调蛋白(SDGF)的存在或水平。

[0300] 在一些情况中,所述抗嗜中性白细胞抗体包括 ANCA、pANCA、cANCA、NSNA、SAPPA,及其组合。在其它情况中,所述 ASCA 包括 ASCA-IgA、ASCA-IgG、ASCA-IgM,及其组合。在另一些情况中,所述抗微生物抗体包括抗 OmpC 抗体、抗鞭毛蛋白抗体、抗 I2 抗体,及其组合。

[0301] 在某些情况中,所述脂质运载蛋白包括一种或多种下述脂质运载蛋白。优选确定个体样品中的中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL)和/或 NGAL 和基质金属蛋白酶的复合物(例如,NGAL/MMP-9 复合物)的存在或水平。在其它情况中,所述基质金属蛋白酶(MMP)包括一种或多种下述 MMP。优选确定个体样品中 MMP-9 的存在或水平。在另一些情况中,所述金属蛋白酶的组织抑制剂(TIMP)包括一种或多种下述 TIMP。优选确定个体样品中 TIMP-1 的存在或水平。在另一些情况中,所述 α -球蛋白包括一种或多种下述 α -球蛋白。优选确定个体样品中 α 2-巨球蛋白、触珠蛋白和/或血清类粘蛋白的存在或水平。

[0302] 在某些其它情况中,所述肌动蛋白切割蛋白包括一种或多种下述肌动蛋白切割蛋白。优选确定个体样品中凝溶胶蛋白的存在或水平。在其它情况中,所述 S100 蛋白包括一种或多种下述 S100 蛋白,包括例如钙粒蛋白。在另一些情况中,所述血纤维蛋白肽包括一种或多种下述血纤维蛋白肽。优选确定个体样品中血纤维蛋白肽 A(FIBA)的存在或水平。在另一些情况中,确定个体样品中速激肽如 P 物质,神经激肽 A 和/或神经激肽 B 的存在或水平。

[0303] 在一些情况中,所述丝氨酸蛋白酶包括一种或多种下述丝氨酸蛋白酶。优选确定个体样品中丝氨酸蛋白酶如类胰蛋白酶(例如, β -类胰蛋白酶)的存在或水平。在其它情况中,所述前列腺素包括一种或多种下述前列腺素。优选确定个体样品中前列腺素如 PGE_2 的存在或水平。

[0304] 还可检测其它诊断标记物的存在或水平,例如:抗乳铁蛋白抗体,L-选择蛋白/CD62L,弹性蛋白酶,C反应蛋白质(CRP),钙卫蛋白,抗U1-70kDa自身抗体,闭锁小带1(ZO-1),血管活性肠肽(VIP),血清淀粉样蛋白A和/或促胃液激素。

[0305] 1. 丝氨酸蛋白酶

[0306] 样品中至少一种丝氨酸蛋白酶的存在或水平测定可用于本发明。本文所用的术语“丝氨酸蛋白酶”包括处于活性位点的氨基酸之一为丝氨酸的任何蛋白酶家族成员。丝氨酸蛋白酶的非限制性示例包括类胰蛋白酶(例如, α -类胰蛋白酶, β -类胰蛋白酶, γ -类胰蛋白酶,和/或 Δ -类胰蛋白酶),弹性蛋白酶,胰凝乳蛋白酶,胰蛋白酶,枯草溶菌素,及其组合。类胰蛋白酶是人肥大细胞的丰富且特异性中性蛋白酶,可在多种生物液体中测定,并可用作肥大细胞活化的有用标记物。事实上,类胰蛋白酶可用作IBS中肥大细胞活化的标记物。据信类胰蛋白酶是解释肥大细胞的促分泌和促炎效果的良好候选物,这可能是通过蛋白酶活化受体-2,但还可能涉及其它肥大细胞介导体。在一种优选实施方式中,在来自对象的血液或血清样品中检测 β -类胰蛋白酶(TPBAB1)。 β -类胰蛋白酶通常也称作类胰蛋白酶 β 1或类胰蛋白酶I,其由类胰蛋白酶 α/β 1基因(TPSAB1;NM_003294)编码,该基因翻译形成275个氨基酸的类胰蛋白酶 β 1前体蛋白(NP_003285)。然后,所述前体蛋白通过去除信号肽(氨基酸1-18)和激活肽前肽(氨基酸19-30)来处理产生成熟的类胰蛋白酶 β 1多肽(氨基酸31-275;UniProt:Q15661)。

[0307] 在某些情况中,在mRNA表达水平检测特定丝氨酸蛋白酶如类胰蛋白酶的存在或水平,采用试验如杂交试验或基于扩增的试验。在某些其它情况中,在蛋白质表达水平检测特定丝氨酸蛋白酶如类胰蛋白酶的存在或水平,采用如免疫试验(例如,ELISA)或免疫组化试验。本文描述了用于确定血清样品中类胰蛋白酶存在或水平的合适ELISA技术。在一种特别优选的实施方式中,血液或血清样品中 β -类胰蛋白酶的活性水平采用夹心ELISA试验测定,其中检测抗体是偶联有碱性磷酸酶的抗 β -类胰蛋白酶抗体,例如市售抗体G3。然后,可用发光底物例如CPSD(3-(4-甲氧基螺旋{1,2-二氧杂环丁烷-3,2'-(5'-氯)三环[3.3.1.1.3,7]癸烷}-4-基)磷酸苯二钠盐)来提高试验的灵敏度。

[0308] 2. 前列腺素

[0309] 样品中至少一种前列腺素的存在或水平测定也可用于本发明。本文所用的术语“前列腺素”包括酶促衍生自脂肪酸并在动物体内具有重要功能的脂质化合物组的任何成员。每个前列腺素含有20个碳原子,包括五碳环。前列腺素和凝血烷与前列环素一起形成前列腺素类脂肪酸衍生物。前列腺素类是二十烷醇类的亚类。前列腺素的非限制性示例包括前列腺素 I_2 (PGI₂)、前列腺素 E_2 (PGE₂)、前列腺素 $F_{2\alpha}$ (PGF_{2 α}),及其组合。在一种优选实施方式中,在来自对象,例如怀疑患有IBS的对象的血液或血清样品中测定前列腺素 E_2 (PGE₂)。在某些实施方式中,PGE₂可用ELISA或化学发光试验测定。用于确定血清样品中PGE₂的存在或水平的合适ELISA试剂盒可获自例如卡曼化学品公司(Cayman Chemicals Co.,密歇根州安娜堡)。

[0310] 3. 组胺

[0311] 样品中组胺的存在或水平测定也可用于本发明。本文所用的术语“组胺”包括在肠内参与局部免疫应答以及调节生理功能并作为神经递质的生物胺。组胺引发炎症反应。作为对外来病原体免疫应答的一部分,组胺由邻近结缔组织中所见嗜碱粒细胞和肥大细胞生

成。组胺提高毛细管对白细胞和其它蛋白质的通透性,以使其吸引外来侵入物进入受影响组织。组胺在几乎所有动物体细胞中都可见。在一种优选实施方式中,在来自对象,例如怀疑患有 IBS 的对象的血液或血清样品中测定组胺。在某些实施方式中,组胺可用 ELISA 或化学发光试验测定。用于确定血清样品中组胺的存在或水平的合适 ELISA 试剂盒可获自例如免疫技术公司 (Immunotech, 捷克共和国) 和卡曼化学品公司 (Cayman Chemicals Co., 密歇根州安娜堡)。

[0312] 4. 细胞因子

[0313] 样品中至少一种细胞因子的存在或水平测定在本发明中特别有用。本文所用的术语“细胞因子”包括免疫细胞所分泌的调节各种免疫系统功能的多种多肽或蛋白质中的任意一种,并涵盖小细胞因子如趋化因子。术语“细胞因子”还包括脂肪细胞因子,其包括由脂肪细胞分泌的一组细胞因子,它们在例如体重、红细胞生成、血管发生、伤口愈合、胰岛素抗性、免疫应答和炎症反应的调节中起作用。

[0314] 在某些方面,测定样品中至少一种细胞因子的存在或水平,所述细胞因子包括但不限于 TNF- α 、TNF 相关弱凋亡诱导因子 (TWEAK)、骨保护素 (OPG)、IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-1 受体拮抗剂 (IL-1ra)、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、可溶性 IL-6 受体 (sIL-6R)、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-17、IL-23 和 IL-27。在某些其它方面,测定样品中至少一种趋化因子的存在或水平,所述趋化因子例如 CXCL1/GR01/GR0 α 、CXCL2/GR02、CXCL3/GR03、CXCL4/PF-4、CXCL5/ENA-78、CXCL6/GCP-2、CXCL7/NAP-2、CXCL9/MIG、CXCL10/IP-10、CXCL11/I-TAC、CXCL12/SDF-1、CXCL13/BCA-1、CXCL14/BRAK、CXCL15、CXCL16、CXCL17/DMC、CCL1、CCL2/MCP-1、CCL3/MIP-1 α 、CCL4/MIP-1 β 、CCL5/RANTES、CCL6/C10、CCL7/MCP-3、CCL8/MCP-2、CCL9/CCL10、CCL11/嗜酸性粒细胞趋化因子 (Eotaxin)、CCL12/MCP-5、CCL13/MCP-4、CCL14/HCC-1、CCL15/MIP-5、CCL16/LEC、CCL17/TARC、CCL18/MIP-4、CCL19/MIP-3 β 、CCL20/MIP-3 α 、CCL21/SLC、CCL22/MDC、CCL23/MP1F1、CCL24/嗜酸性粒细胞趋化因子-2、CCL25/TECK、CCL26/嗜酸性粒细胞趋化因子-3、CCL27/CTACK、CCL28/MEC、CL1、CL2 和 CX₃CL1。在某些其他方面中,测定样品中至少一种脂肪细胞因子的存在或水平,所述脂肪细胞因子包括但不限于瘦素、脂连蛋白、抵抗素、活性或全纤溶酶原激活物抑制剂 (PAI-1)、内脂素、视黄醇结合蛋白 4 (RBP4)。优选测定 IL-8、IL-1 β 、TWEAK、瘦素、OPG、MIP-3 β 、GR0 α 、CXCL4/PF-4 和 / 或 CXCL7/NAP-2 的存在或水平。

[0315] 在另一方面,确定样品中细胞因子水平的比例。例如, TNF- α 水平与 IL-10 水平的比例 (TNF- α / IL-10), 或 IL-10 水平与 IL-12 水平的比例 (IL-10 / IL-12) 可诊断 IBS。在另一些实施方式中,任意一种细胞因子水平与任意其他细胞因子水平的比例可以是有用的。可用于本发明所述方法的比率的非限制性示例包括: TNF- α / TWEAK、TNF- α / OPG、TNF- α / IFN- α 、TNF- α / IFN- β 、TNF- α / IFN- γ 、TNF- α / IL-1 α 、TNF- α / IL-1 β 、TNF- α / IL-1ra、TNF- α / IL-2、TNF- α / IL-4、TNF- α / IL-5、TNF- α / IL-6、TNF- α / sIL-6R、TNF- α / IL-7、TNF- α / IL-8、TNF- α / IL-9、TNF- α / IL-10、TNF- α / IL-12、TNF- α / IL-13、TNF- α / IL-15、TNF- α / IL-17、TNF- α / IL-23、TNF- α / IL-27、TWEAK / OPG、TWEAK / IFN- α 、TWEAK / IFN- β 、TWEAK / IFN- γ 、TWEAK / IL-1 α 、TWEAK / IL-1 β 、TWEAK / IL-1ra、TWEAK / IL-2、TWEAK / IL-4、TWEAK / IL-5、TWEAK / IL-6、TWEAK / sIL-6R、TWEAK / IL-7、TWEAK / IL-8、TWEAK / IL-9、TWEAK / IL-10、TWEAK / IL-12、TWEAK / IL-13、TWEAK / IL-15、TWEAK / IL-17、TWEAK / IL-23、TWEAK /

IL-27、IL-6/TWEAK、IL-6/OPG、IL-6/IFN- α 、IL-6/IFN- β 、IL-6/IFN- γ 、IL-6/IL-1 α 、IL-6/IL-1 β 、IL-6/IL-1ra、IL-6/IL-2、IL-6/IL-4、IL-6/IL-5、IL-6/sIL-6R、IL-6/IL-7、IL-6/IL-8、IL-6/IL-9、IL-6/IL-10、IL-6/IL-12、IL-6/IL-13、IL-6/IL-15、IL-6/IL-17、IL-6/IL-23、IL-6/IL-27、IL-12/TWEAK、IL-12/OPG、IL-12/IFN- α 、IL-12/IFN- β 、IL-12/IFN- γ 、IL-12/IL-1 α 、IL-12/IL-1 β 、IL-12/IL-1ra、IL-12/IL-2、IL-12/IL-4、IL-12/IL-5、IL-12/IL-6、IL-12/sIL-6R、IL-12/IL-7、IL-12/IL-8、IL-12/IL-9、IL-12/IL-10、IL-12/IL-13、IL-12/IL-15、IL-12/IL-17、IL-12/IL-23、IL-12/IL-27、IL-10/TWEAK、IL-10/OPG、IL-10/IFN- α 、IL-10/IFN- β 、IL-10/IFN- γ 、IL-10/IL-1 α 、IL-10/IL-1 β 、IL-10/IL-1ra、IL-10/IL-2、IL-10/IL-4、IL-10/IL-5、IL-10/IL-6、IL-10/sIL-6R、IL-10/IL-7、IL-10/IL-8、IL-10/IL-9、IL-10/IL-12、IL-10/IL-13、IL-10/IL-15、IL-10/IL-17、IL-10/IL-23、IL-10/IL-27、IL-8/TWEAK、IL-8/OPG、IL-8/IFN- α 、IL-8/IFN- β 、IL-8/IFN- γ 、IL-8/IL-1 α 、IL-8/IL-1 β 、IL-8/IL-1ra、IL-8/IL-2、IL-8/IL-4、IL-8/IL-5、IL-8/IL-6、IL-8/sIL-6R、IL-8/IL-7、IL-8/IL-8、IL-8/IL-9、IL-8/IL-10、IL-8/IL-12、IL-8/IL-13、IL-8/IL-15、IL-8/IL-17、IL-8/IL-23、IL-8/IL-27,或一种细胞因子对另一因子的任何其它比例。

[0316] 在某些情况中,在 mRNA 表达水平检测特定细胞因子的存在或水平,采用试验如杂交试验或基于扩增的试验。在某些其它情况中,在蛋白质表达水平检测特定细胞因子的存在或水平,采用如免疫试验(例如,ELISA)或免疫组化试验。可获得用于确定血清、血浆、唾液或尿液样品中细胞因子如 IL-8、IL-1 β 、MIP-3 β 、GRO α 、CXCL4/PF-4 或 CXCL7/NAP-2 的存在或水平的合适 ELISA 试剂盒,例如获自 R&D 系统公司(R&D Systems, Inc., 明尼苏达州明尼阿波利斯),尼金公司(Neogen Corp., 肯塔基州列克星敦),艾普科诊断品公司(Alpco Diagnostics, 新罕布什尔州塞伦),试验设计公司(Assay Designs, Inc., 密歇根州安娜堡),BD 生物科学药物公司(BD Biosciences Pharmingen, 加利福尼亚州圣地亚哥),英杰公司(Invitrogen, 加利福尼亚州卡马里奥),卡巴开公司(Calbiochem, 加利福尼亚州圣地亚哥),开米康国际公司(CHEMICON International, Inc., 加利福尼亚州泰姆库拉),安替基尼克斯美洲公司(Antigenix America Inc., 纽约州亨廷顿),凯杰公司(QIAGEN Inc., 加利福尼亚州巴伦西亚),伯乐公司(Bio-Rad Laboratories, Inc., 加利福尼亚州赫尔库司),和/或宾得医学系统公司(Bender MedSystems Inc., 加利福尼亚州伯林盖姆)。

[0317] 5. TWEAK

[0318] TWEAK 是结构相关细胞因子的 TNF 超家族中的一员。全长的膜锚定 TWEAK 可见于很多细胞类型的表面,还在胞外环境中测得蛋白水解加工产生的较小生物活性形式(参见例如,Chicheportiche 等, J. Biol. Chem., 272:32401-32410(1997))。TWEAK 通过结合名为成纤维细胞生长因子诱导型 14(Fn14; 也称作肿瘤坏死因子受体超家族成员 12A 或 TNFRSF12A) 的 TNF 受体超家族成员来起作用。TWEAK 有多种生物活性,包括刺激细胞生长和血管发生,诱导炎性细胞因子,和刺激凋亡(参见例如,Wiley 等, Cytokine Growth Factor Rev., 14:241-249(2003))。具体地, TWEAK 已显示诱导成纤维细胞和滑膜细胞中的 PGE₂、MMP-1、IL-6、IL-8、RANTES 和 IP-10 表达,以及上调内皮细胞中的 ICAM-1、E- 选择蛋白、IL-8 和 MCP-1 表达(参见例如, Campbell 等, Front. Biosci., 9:2273-2284(2004))。也已证明 TWEAK 结合 Fn14 受体或组成型 Fn14 过量表达会激活 NF- κ B 信号转导途径,这在免

疫和炎症过程、肿瘤生成、癌治疗抗性和肿瘤发生中起重要作用（参见例如，Winkles 等，Cancer Lett.，235：11-17(2006)；和 Winkles 等，Front. Biosci.，12：2761-2771(2007)）。本领域技术人员应理解 TWEAK 还称作肿瘤坏死因子配体超家族成员 12(TNFSF12)、APO3 配体(APO3L)、CD255、DR3 配体、FN14 和 UNQ181/PRO207。

[0319] 可以获得用于确定生物样品如血清、血浆、唾液或尿液样品中 TWEAK 存在或水平的合适 ELISA 试剂盒，例如获自安替基尼克斯美洲公司（纽约州亨廷顿），宾得医学系统公司（加利福尼亚州伯林盖姆），艾格迪亚公司（Agdia Inc.，印第安纳州爱克哈特），美利坚研究产品公司（American Research Products Inc.，马萨诸塞州贝尔蒙特），生物介质公司（Biomedica Corp.，加利福尼亚州福斯特城），BV 公司（BioVision, Inc.，加利福尼亚州山景城）和卡米亚生物医学公司（Kamiya Biomedical Co.，华盛顿州西雅图）。

[0320] 6. 骨保护素 (OPG)

[0321] OPG 是结构相关细胞因子的 TNF 超家族中有 401 个氨基酸的成员。OPG 与 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 的受体活化剂 (RANK) 同源，其通过作为 RANK 配体 (RANKL；也称为 OPG 配体 (OPGL)) 的可溶性假受体来抑制巨噬细胞分化成破骨细胞并调节破骨细胞再吸收。因此，OPG-RANK-RANKL 系统在破骨细胞的形成、功能和存活中起到直接且关键的作用。还显示 OPG-RANK-RANKL 系统调节癌细胞迁移，从而控制骨转移瘤的发展。本领域技术人员理解 OPG 也称作骨保护素和成骨作用抑制因子 (OCIF)。

[0322] 可获得用于确定血清、血浆、唾液或尿液样品中 OPG 的存在或水平的合适 ELISA 试剂盒，例如获自安替基尼克斯美洲公司（纽约州亨廷顿），免疫诊断系统有限公司 (Immunodiagnostic Systems Ltd.，英国博尔顿) 和 BV 公司（北卡罗来纳州坎德勒）。

[0323] 7. 瘦素

[0324] 瘦素是细胞因子的脂肪细胞因子家族中的成员，是 16-kD 的肽激素，通过抑制食物摄取和刺激能量消耗在体重调节中起关键作用。其主要由脂肪细胞合成并以和体脂含量成比例的量在血浆中循环（参见例如，Maffei 等，Nat. Med.，1：1155-1161(1995)；Considine 等，Diabetes，45：992-994(1996)）。瘦素在不同物种间显示高度同源性，它还和其它细胞因子显示结构相似性（参见例如，Madej 等，FEBS Lett.，373：13-18(1995)）。瘦素通过瘦素受体起作用，该受体是 I 型细胞因子超家族受体中的一种单跨膜结构域受体，该家族受体的特征为含 4 个半胱氨酸残基的胞外基序和多个纤连蛋白 III 型结构域（参见例如，Heim，Eur. J. Clin. Invest.，26：1-12(1996)）。已知瘦素受体作为同型二聚体存在，并通过配体结合受体后发生的构象改变而活化（参见例如，Devos 等，J. Biol. Chem.，272：18304-18310(1997)）。目前已鉴定了由可变剪接产生的六个瘦素受体同种型（参见例如，Wang 等，Nature，393：684-688(1998)；Lee 等，Nature，379：632-635(1996)）。

[0325] 可以获得用于确定生物样品如血清、血浆、唾液或尿液样品中瘦素的存在或水平的合适 ELISA 试剂盒，例如获自 R&D 系统公司（明尼苏达州明尼阿波利斯），BBI 公司 (B-Bridge International，加利福尼亚州山景市)，尼金公司（肯塔基州列克星敦），试验设计公司（密歇根州安娜堡），英杰公司（加利福尼亚州卡马里奥），开米康国际公司（加利福尼亚州泰姆库拉），安替基尼克斯美洲公司（纽约州亨廷顿），林可研究公司 (LINCO Research, Inc.，密苏里州圣查尔斯)，诊断系统实验室公司 (Diagnostic Systems Laboratories, Inc.，德克萨斯州韦伯斯特)，免疫生物实验室公司 (Immuno-Biological

Laboratories, Inc., 明尼苏达州明尼阿波利斯), 和卡曼化学品公司 (密歇根州安娜堡)。

[0326] 8. 生长因子

[0327] 样品中一种或多种生长因子的存在或水平测定也可用于本发明。本文所用的术语“生长因子”包括能刺激细胞增殖和 / 或细胞分化的多种肽、多肽或蛋白质中的任何一种。

[0328] 在某些方面, 测定样品中至少一种生长因子的存在或水平, 所述生长因子包括但不限于: 表皮生长因子 (EGF), 肝素结合表皮生长因子 (HB-EGF), 血管内皮生长因子 (VEGF), 色素上皮衍生因子 (PEDF; 也称作 SERPINF1), 双调蛋白 (AREG; 也称作神经鞘瘤衍生生长因子 (SDGF)), 碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF), 肝细胞生长因子 (HGF), 转化生长因子- α (TGF- α), 转化生长因子- β (TGF- β), 骨形态发生蛋白 (例如, BMP1-BMP15), 血小板衍生生长因子 (PDGF), 神经生长因子 (NGF), β -神经生长因子 (β -NGF), 营养因子 (例如, 脑源性营养因子 (BDNF), 神经营养蛋白 3 (NT3), 神经营养蛋白 4 (NT4), 等等), 生长分化因子-9 (GDF-9), 粒细胞集落刺激因子 (G-CSF), 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF), 肌肉生长抑制素 (GDF-8), 红细胞生成素 (EPO) 和血小板形成素 (TPO)。优选确定 EGF、VEGF、PEDF、双调蛋白 (SDGF) 和 / 或 BDNF 的存在或水平。

[0329] 在某些情况中, 在 mRNA 表达水平检测特定生长因子的存在或水平, 采用试验如杂交试验或基于扩增的试验。在某些其它情况中, 在蛋白质表达水平检测特定生长因子的存在或水平, 采用如免疫试验 (例如, ELISA) 或免疫组化试验。可获得用于确定血清、血浆、唾液或尿液样品中生长因子如 EGF、VEGF、PEDF, SDGF 或 BDNF 的存在或水平的合适 ELISA 试剂盒, 例如获自安替基尼克斯美洲公司 (纽约州亨廷顿), 普洛麦格公司 (Promega, 威斯康星州麦迪逊), R&D 系统公司 (明尼苏达州明尼阿波利斯), 英杰公司 (加利福尼亚州卡马里奥), 开米康国际公司 (加利福尼亚州泰姆库拉), 尼金公司 (肯塔基州列克星敦), 派罗科技公司 (PeproTech, 新泽西州洛基山), 艾普科诊断公司 (新罕布什尔州塞伦), 皮尔斯生物技术公司 (Pierce Biotechnology, Inc., 伊利诺斯州洛克福德), 和 / 或艾巴赞公司 (Abazyme, 马萨诸塞州尼德姆)。

[0330] 9. 脂质运载蛋白

[0331] 样品中一种或多种脂质运载蛋白的存在或水平测定也可用于本发明。本文所用的术语“脂质运载蛋白”包括多种胞外小蛋白中的任意一种, 这些小蛋白特征为多种共有的分子识别特性: 能结合一些疏水性小分子; 结合特定细胞表面受体; 以及和可溶性大分子形成复合物 (参见例如, Flowers, Biochem. J., 318:1-14 (1996))。脂质运载蛋白的不同生物功能通过这些特性中的一种或多种来介导。脂质运载蛋白家族显示显著的功能多样性, 在视黄醇运输, 无脊椎动物的隐藏色, 嗅感和外激素转运, 以及前列腺素合成中都有作用。脂质运载蛋白还参与调控细胞稳态和免疫应答的调节, 并作为载体蛋白在内源和外源化合物的常规清除中起作用。尽管脂质运载蛋白在序列水平上有很高多样性, 它们的三维结构具有统一的特征。脂质运载蛋白晶体结构高度保守, 并包括单个八链连续的氢键反向平行 β -桶状结构, 其围住内部的配体结合位点。

[0332] 在某些方面, 测定样品中至少一种脂质运载蛋白的存在或水平, 所述脂质运载蛋白包括但不限于: 嗜中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (NGAL; 也称为人嗜中性粒细胞脂质运载蛋白 (HNL) 或脂质运载蛋白-2), 冯·埃布纳腺 (vonEbner's gland) 蛋白 (VEGP; 也称为脂质运载蛋白-1), 视黄醇结合蛋白 (RBP), 红紫素 (PURP), 视黄酸结合蛋白 (RABP),

α_{2u} -球蛋白 (A2U), 主要尿蛋白 (MUP), 胆汁三烯结合蛋白 (BBP), α -甲壳青, 妊娠蛋白 14 (PP14), β -乳球蛋白 (Blg), α_1 -微球蛋白 (A1M), C8 的 γ 链 (C8 γ), 载脂蛋白 D (ApoD), 拉氏蛋白 (Iazarillo, LAZ), 前列腺素 D2 合酶 (PGDS), 静息特异性蛋白 (QSP), 脉络丛蛋白, 气味结合蛋白 (OBP), α_1 -酸糖蛋白 (AGP), 普罗贝辛 (probasin, PBAS), 阿弗洛底辛 (aphrodisin), 血清类粘蛋白, 和孕激素相关子宫内膜蛋白 (PAEP)。在某些其它方面, 确定至少一种脂质运载蛋白复合物的存在或水平, 包括例如 NGAL 和基质金属蛋白酶的复合物 (例如, NGAL/MMP-9 复合物)。优选确定 NGAL 或其与 MMP-9 的复合物的水平。

[0333] 在某些情况中, 在 mRNA 表达水平检测特定脂质运载蛋白的存在或水平, 采用试验如杂交试验或基于扩增的试验。在某些其它情况中, 在蛋白质表达水平检测特定脂质运载蛋白的存在或水平, 采用如免疫试验 (例如, ELISA) 或免疫组化试验。可得到用于确定血清、血浆或尿液样品中脂质运载蛋白如 NGAL 的存在或水平的合适的 ELISA 试剂盒, 例如获自抗体工房公司 (AntibodyShop A/S, 丹麦根措夫特), 实验临床公司 (LabClinics SA, 西班牙巴塞罗那), 琉森化学公司 (Lucerna-Chem AG, 瑞士琉森), R&D 系统公司 (明尼苏达州明尼阿波利斯) 和试验设计公司 (密歇根州安娜堡)。可得到用于确定 NGAL/MMP-9 复合物的存在或水平的合适试剂盒, 例如获自 R&D 系统公司 (明尼苏达州明尼阿波利斯)。其它 NGAL 和 NGAL/MMP-9 复合物 ELISA 技术描述于例如 Kjeldsen 等, Blood, 83 :799-807 (1994) 和 Kjeldsen 等, J. Immunol. Methods, 198 :155-164 (1996)。

[0334] 10. 基质金属蛋白酶

[0335] 样品中至少一种基质金属蛋白酶 (MMP) 的存在或水平测定也可用于本发明。本文所用的术语“基质金属蛋白酶”或“MMP”包括能降解多种胞外基质蛋白、切割细胞表面受体、释放凋亡配体和 / 或调节趋化因子的锌依赖性肽链内切酶。MMP 还被认为在细胞行为如细胞增殖、迁移 (粘连 / 分散)、分化、血管发生和宿主防御中起主要作用。

[0336] 在某些方面, 测定样品中至少一种 MMP 的存在或水平, 所述 MMP 包括但不限于: MMP-1 (间质胶原酶), MMP-2 (明胶酶 -A)、MMP-3 (基质降解酶 -1)、MMP-7 (基质溶解因子)、MMP-8 (嗜中性粒细胞胶原酶)、MMP-9 (明胶酶 -B)、MMP-10 (基质降解酶 -2)、MMP-11 (基质降解酶 -3)、MMP-12 (巨噬细胞金属弹性蛋白酶)、MMP-13 (胶原酶 -3)、MMP-14、MMP-15、MMP-16、MMP-17、MMP-18 (胶原酶 -4)、MMP-19、MMP-20 (烯胺素)、MMP-21、MMP-23、MMP-24、MMP-25、MMP-26 (基质溶解因子 -2)、MMP-27 和 MMP-28 (上皮水解素)。优选确定 MMP-9 的存在或水平。

[0337] 在某些情况中, 在 mRNA 表达水平检测特定 MMP 的存在或水平, 采用试验如杂交试验或基于扩增的试验。在某些其它情况中, 在蛋白质表达水平检测特定 MMP 的存在或水平, 采用如免疫试验 (例如, ELISA) 或免疫组化试验。可得到用于确定血清或血浆样品中 MMP 如 MMP-9 的存在或水平的合适 ELISA 试剂盒, 例如获自卡巴开公司 (加利福尼亚州圣地亚哥), 开米康国际公司 (加利福尼亚州泰姆库拉) 和 R&D 系统公司 (明尼苏达州明尼阿波利斯)。

[0338] 11. 金属蛋白酶的组织抑制剂

[0339] 样品中至少一种金属蛋白酶的抑制剂 (TIMP) 的存在或水平测定也可用于本发明。本文所用的术语“金属蛋白酶的抑制剂”或“TIMP”包括能抑制 MMP 的蛋白质。

[0340] 在某些方面, 测定样品中至少一种 TIMP 的存在或水平, 所述 TIMP 包括但不限于:

TIMP-1、TIMP-2、TIMP-3 和 TIMP-4。优选确定 TIMP-1 的存在或水平。

[0341] 在某些情况中,在 mRNA 表达水平检测特定 TIMP 的存在或水平,采用试验如杂交试验或基于扩增的试验。在某些其它情况中,在蛋白质表达水平检测特定 TIMP 的存在或水平,采用如免疫试验(例如,ELISA)或免疫组化试验。可得到用于确定血清或血浆样品中 TIMP 如 TIMP-1 的存在或水平的合适 ELISA 试剂盒,例如获自艾普科诊断品公司(新罕布什尔州塞伦),卡巴开公司(加利福尼亚州圣地亚哥),英杰公司(加利福尼亚州卡马里奥),开米康国际公司(加利福尼亚州泰姆库拉)和 R&D 系统公司(明尼苏达州明尼阿波利斯)。

[0342] 12. 球蛋白

[0343] 样品中至少一种球蛋白的存在或水平测定也可用于本发明。本文所用的术语“球蛋白”包括在血清电泳中迁移低于白蛋白的异质血清蛋白家族系列中的任意成员。通常用蛋白质电泳将球蛋白分类为以下三类: α -球蛋白(即, α 1-球蛋白或 α 2-球蛋白); β -球蛋白;和 γ -球蛋白。

[0344] α -球蛋白包括一组血浆中的球形蛋白质,其在碱性或荷电溶液中为高度移动性。它们通常起抑制某些血液蛋白酶和抑制活性的作用。 α -球蛋白的示例包括但不限于: α 2-巨球蛋白(α 2-MG),触珠蛋白(Hp),血清类粘蛋白, α 1-抗胰蛋白酶, α 1-抗胰凝乳蛋白酶, α 1-抗血纤维蛋白酶,抗凝血酶,血浆铜蓝蛋白,肝素辅助因子 II,视黄醇结合蛋白,和皮质激素传递蛋白。优选确定 α 2-MG、触珠蛋白和/或血清类粘蛋白的存在或水平。在某些情况中,确定一种或多种触珠蛋白同种异型,例如,Hp 前体、Hp β 、Hp α 1 和 Hp α 2。

[0345] 在某些情况中,在 mRNA 表达水平检测特定球蛋白的存在或水平,采用试验如杂交试验或基于扩增的试验。在某些其它情况中,在蛋白质表达水平检测特定球蛋白的存在或水平,采用如免疫试验(例如,ELISA)或免疫组化试验。用于确定血清、血浆或尿液样品中球蛋白如 α 2-MG、触珠蛋白或血清类粘蛋白的存在或水平的合适 ELISA 试剂盒可获自例如 GWB 公司(GenWay Biotech, Inc.,加利福尼亚州圣地亚哥)和/或免疫诊断公司(Immundiagnostik AG,德国本斯海姆)。

[0346] 13. 肌动蛋白切割蛋白

[0347] 样品中至少一种肌动蛋白切割蛋白的存在或水平测定也可用于本发明。本文所用的术语“肌动蛋白切割蛋白”包括参与肌动蛋白重塑和细胞运动调节的蛋白质家族中的任意成员。肌动蛋白切割蛋白的非限制性示例包括凝溶胶蛋白(也称作短杆素或肌动蛋白解聚因子),绒毛蛋白,碎片蛋白和肾上腺肌割蛋白。例如,凝溶胶蛋白是白细胞、血小板和其它细胞的蛋白质,其在亚微摩尔钙的存在下切开肌动蛋白纤维,从而使胞质肌动蛋白凝胶溶胶化。

[0348] 在某些情况中,在 mRNA 表达水平检测特定肌动蛋白切割蛋白的存在或水平,采用试验如杂交试验或基于扩增的试验。在某些其它情况中,在蛋白质表达水平检测特定肌动蛋白切割蛋白的存在或水平,采用如免疫试验(例如,ELISA)或免疫组化试验。用于确定血浆样品中肌动蛋白切割蛋白如凝溶胶蛋白的存在或水平的合适 ELISA 技术描述于例如 Smith 等, J. Lab. Clin. Med., 110:189-195(1987) 和 Hiyoshi 等, Biochem. Mol. Biol. Int., 32:755-762(1994)。

[0349] 14. S100 蛋白

[0350] 样品中至少一种 S100 蛋白的存在或水平测定也可用于本发明。本文所用的术语

“S100 蛋白”包括以细胞类型特异性表达和存在 2 个 EF 手型钙结合域为特征的低分子量酸性蛋白家族中的任何成员。人体中有至少 21 种不同类型的 S100 蛋白。该名称源自 S100 蛋白在中性 pH 下 100% 溶于硫酸铵的事实。大多数 S100 蛋白为同型二聚体,由经非共价键结合在一起的两个相同多肽组成。尽管 S100 蛋白与钙调蛋白结构相似,但差别在于它们是细胞特异性的,根据环境因素以不同水平在特定细胞中表达。S-100 蛋白通常存在于衍生自神经嵴的细胞中(例如,许旺细胞(Schwann cell),黑素细胞,神经胶质细胞),软骨细胞,脂肪细胞,肌上皮细胞,巨噬细胞,朗格汉斯细胞(Langerhans cell),树状细胞和角质细胞。S100 蛋白与多种胞内和胞外功能有关,例如:调节蛋白质磷酸化、转录因子, Ca^{2+} 稳态,细胞骨架成分的动态,酶活性,细胞生长与分化和炎症反应。

[0351] 钙粒蛋白是在包括肾上皮细胞和嗜中性粒细胞在内的多种细胞类型中表达的 S100 蛋白,在慢性炎症条件下浸润性单核细胞和粒细胞中富含该蛋白。钙粒蛋白的示例包括但不限于:钙粒蛋白 A(也称作 S100A8 或 MRP-8),钙粒蛋白 B(也称作 S100A9 或 MRP-14)和钙粒蛋白 C(也称作 S100A12)。

[0352] 在某些情况中,在 mRNA 表达水平检测特定 S100 蛋白的存在或水平,采用试验如杂交试验或基于扩增的试验。在某些其它情况中,在蛋白质表达水平检测特定 S100 蛋白的存在或水平,采用如免疫试验(例如,ELISA)或免疫组化试验。可得到用于确定血清、血浆或尿液样品中 S100 蛋白如钙粒蛋白 A(S100A8)或钙粒蛋白 B(S100A9)的存在或水平的合适 ELISA 试剂盒,例如获自半岛实验室公司(Peninsula Laboratories Inc.,加利福尼亚州圣卡洛斯)和/或海克特生物技术公司(Hycult biotechnology b.v.,荷兰乌坚)。

[0353] 钙卫蛋白是 S100A8 和 S100A9 的复合物,是嗜中性粒细胞、单核细胞和角质细胞胞质中的钙结合与锌结合蛋白。钙卫蛋白是嗜中性粒细胞和巨噬细胞中的主要蛋白质,在这些细胞胞质内总蛋白中的占比多达 60%。该蛋白因此是嗜中性粒细胞周转的替代标记物。其在粪便中的浓度与肠粘膜的嗜中性粒细胞浸润强度和炎症的严重程度关联。在一些情况中,钙卫蛋白可用粪便小样(50-100mg)由 LEISA 测定(参见例如,John 等,Scand J Gastroenterol.,36:291-296(2001))。

[0354] 15. 速激肽

[0355] 样品中至少一种速激肽的存在或水平的测定也可用于本发明。本文所用的术语“速激肽”包括共有羧基末端序列 Phe-X-Gly-Leu-Met-NH₂ 的酰胺化神经肽。速激肽通常结合一个或多个速激肽受体(例如,TACR1、TACR2 和/或 TACR3)。

[0356] 在某些方面,测定样品中至少一种速激肽的存在或水平,所述速激肽包括但不限于:P 物质、神经激肽 A 和神经激肽 B。优选确定 P 物质的存在或水平。P 物质是长 11 个氨基酸的肽,由神经末梢在中枢和外周神经系统中释放。在由 P 物质释放神经元神经支配的大量生物学位点中,包括皮肤、肠、胃、膀胱和心血管系统。

[0357] 在某些情况中,在 mRNA 表达水平检测特定速激肽的存在或水平,采用试验如杂交试验或基于扩增的试验。在某些其它情况中,在蛋白质表达水平检测特定速激肽的存在或水平,采用如免疫试验(例如,ELISA)或免疫组化试验。可获得用于确定血清、血浆、唾液或尿液样品中速激肽如 P 物质的存在或水平的合适 ELISA 试剂盒,例如获自 MD 生物科学公司(MD Biosciences Inc.,明尼苏达州圣保罗),试验设计公司(密歇根州安娜堡),R&D 系统公司(明尼苏达州明尼阿波利斯),西格玛奥德里奇公司(密苏里州圣路易斯),和卡曼

化学品公司（密歇根州安娜堡）。

[0358] 16. 生长素释放肽

[0359] 样品中生长素释放肽的存在或水平的确测定也可用于本发明。本文所用的术语“生长素释放肽”包括 28 个氨基酸的肽，其为生长激素促分泌素受体（GHSR）的内源配体并参与调节生长激素释放。生长素释放肽可以酰化，通常在丝氨酸残基 3 处酰化有 n-辛酰基，以形成活性生长素释放肽。或者，生长素释放肽可以未酰化形式（即，去酰基-生长素释放肽）存在。生长素释放肽主要在专门的肠嗜铬细胞中表达，该细胞主要位于胃基底粘膜中，具有与瘦素相反的代谢影响。生长素释放肽刺激进食，提高碳水化合物的使用并减少脂肪利用，提高胃动力和酸分泌，并降低自主活动。

[0360] 在某些情况中，在 mRNA 表达水平检测特定生长素释放肽的存在或水平，采用试验如杂交试验或基于扩增的试验。在某些其它情况中，在蛋白质表达水平检测特定生长素释放肽的存在或水平，采用如免疫试验（例如，ELISA）或免疫组化试验。可得到用于确定血清、血浆、唾液或尿液样品中活性生长素释放肽或去酰基生长素释放肽的存在或水平的合适 ELISA 试剂盒，例如获自艾普科诊断公司（新罕布什尔州塞伦），卡曼化学品公司（密歇根州安娜堡），林可研究公司（密苏里州圣查尔斯）和诊断系统实验室公司（德克萨斯州韦伯斯特）。

[0361] 17. 神经降压素

[0362] 样品中神经降压素的存在或水平测定也可用于本发明。本文所用的术语“神经降压素”包括广泛分布于中枢神经系统和胃肠道的十三肽。神经降压素已鉴定为多种胃肠途径功能和病情发生和发展中的重要介体，通过与特定受体的相互作用对神经、上皮细胞和 / 或免疫和炎性系统中的细胞直接或间接作用来施加其影响（参见例如，Zhao 等，*Peptides*, 27 :2434-2444 (2006)）。

[0363] 在某些情况中，在 mRNA 表达水平检测特定神经降压素的存在或水平，采用试验如杂交试验或基于扩增的试验。在某些其它情况中，在蛋白质表达水平检测特定神经降压素的存在或水平，采用如免疫试验（例如，ELISA）或免疫组化试验。用于确定样品中神经降压素的存在或水平的合适 ELISA 技术描述于例如 Davis 等，*J. Neurosci. Methods*, 14 : 15-23 (1985) 和 Williams 等，*J. Histochem. Cytochem.*, 37 :831-841 (1989)。

[0364] 18. 促肾上腺皮质激素释放激素

[0365] 样品中促肾上腺皮质激素释放激素（CRH；也称作促皮质激素释放因子或 CRF）的存在或水平测定也可用于本发明。本文所用的术语“促肾上腺皮质激素释放激素”，“CRH”，“促皮质激素释放因子”或“CRF”包括由下丘脑室旁核所分泌的 41 个氨基酸的肽，其介导哺乳动物如人中应激响应的近端部分。CRH 通常结合一个或多个促肾上腺皮质激素释放激素受体（例如，CRHR1 和 / 或 CRHR2）。CRH 由下丘脑、脊髓、胃、脾、十二指肠、肾上腺和胎盘表达。

[0366] 在某些情况中，在 mRNA 表达水平检测 CRH 的存在或水平，采用试验如杂交试验或基于扩增的试验。在某些其它情况中，在蛋白质表达水平检测 CRH 的存在或水平，采用如免疫试验（例如，ELISA）或免疫组化试验。可获得用于确定血清、血浆、唾液或尿液样品中 CRH 的存在或水平的合适 ELISA 试剂盒，例如获自艾普科诊断公司（新罕布什尔州塞伦）和科兹莫生物有限公司（Cosmo Bio Co., Ltd., 日本东京）。

[0367] 19. 抗嗜中性粒细胞抗体

[0368] 测定样品中 ANCA 的水平 and / 或 pANCA 的存在与否也对本发明有用。本文所用的术语“抗嗜中性粒细胞胞质抗体”或“ANCA”包括针对嗜中性粒细胞的胞质和 / 或核成分的抗体。ANCA 活性可根据嗜中性粒细胞中的 ANCA 染色模式分成几大类：(1) 细胞质嗜中性粒细胞染色而无核周突出显示 (cANCA)；(2) 沿核外缘的核周染色 (pANCA)；(3) 沿核内缘的核周染色 (NSNA)；以及 (4) 斑点遍布整个嗜中性粒细胞的弥散染色 (SAPPA)。在某些情况中，pANCA 染色对 DNA 酶处理敏感。术语 ANCA 涵盖抗嗜中性粒细胞反应性的所有种类，包括但不限于：cANCA、pANCA、NSNA 和 SAPPA。类似地，术语 ANCA 涵盖所有免疫球蛋白同种型，包括但不限于免疫球蛋白 A 和 G。

[0369] 可确定个体样品中的 ANCA 水平，例如，用醇固定的嗜中性粒细胞通过免疫试验如酶联免疫吸附试验 (ELISA) 测定。可确定特定 ANCA 类别如 pANCA 的存在与否，例如，采用免疫组化试验如间接荧光抗体 (IFA) 试验。优选地，样品中 pANCA 的存在与否用经过 DNA 酶处理的已固定嗜中性粒细胞通过免疫荧光试验确定。除了已固定的嗜中性粒细胞外，适于确定 ANCA 水平的 ANCA 特异性抗原包括但不限于：未纯化或部分纯化的嗜中性粒细胞提取物；纯化的蛋白质、蛋白片段或合成肽，例如组蛋白 H1 或其 ANCA 反应性片段（参见例如，美国专利号 6,074,835）；组蛋白 H1 样抗原，孔蛋白抗原，拟杆菌属 (*Bacteroides*) 抗原，或其 ANCA 反应性片段（参见例如，美国专利号 6,033,864）；分泌小泡抗体或其 ANCA 反应性片段（参见例如，美国专利号 08/804,106）；和抗 ANCA 独特型抗体。本领域技术人员了解其它 ANCA 特异性抗原的应用在本发明范围内。

[0370] 20. 抗酿酒酵母抗体

[0371] 样品中 ASCA (例如，ASCA-IgA 和 / 或 ASCA-IgG) 的存在或水平测定也可用于本发明。本文所用的术语“抗酿酒酵母免疫球蛋白 A”或“ASCA-IgA”包括与酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) 特异性反应的免疫球蛋白 A 同种型的抗体。类似地，术语“抗酿酒酵母免疫球蛋白 G”或“ASCA-IgG”包括与酿酒酵母特异性反应的免疫球蛋白 G 同种型的抗体。

[0372] 用 ASCA 特异性抗原确定样品是否为 ASCA-IgA 或 ASCA-IgG 阳性。此类抗原可以由 ASCA-IgA 和 / 或 ASCA-IgG 特异性结合的任何抗原或抗原混合物。尽管 ASCA 抗体最初以其结合酿酒酵母的能力为特征，但本领域技术人员应理解 ASCA 特异性结合的抗原可获自酿酒酵母或获自多种其它来源，只要所述抗原能特异性结合 ASCA 抗体。因此，可用于确定样品中 ASCA-IgA 和 / 或 ASCA-IgG 水平的 ASCA 特异性抗原的示例性来源包括但不限于：全灭活酵母细胞如酵母属 (*Saccharomyces*) 或念珠菌属 (*Candida*) 细胞，酵母细胞壁甘露聚糖如磷酸肽甘露聚糖 (PPM)；寡糖如低聚甘露糖；拟糖脂；抗 ASCA 独特型抗体；等等。酵母的不同种类和菌株，例如酿酒酵母菌株 Su1、Su2、CBS 1315 或 BM 156，或白色念珠菌 (*Candida albicans*) 菌株 VW32 适用作 ASCA-IgA 和 / 或 ASCA-IgG 特异性抗原。纯化和合成的 ASCA 特异性抗原也适用于确定样品中 ASCA-IgA 和 / 或 ASCA-IgG 的水平。纯化抗原的示例包括但不限于纯化寡糖抗原如低聚甘露糖。合成抗原的示例包括但不限于：合成低聚甘露糖如美国专利公布号 20030105060 中所述的那些，例如 D-Man β (1-2) D-Man β (1-2) D-Man β (1-2) D-Man-OR，D-Man α (1-2) D-Man α (1-2) D-Man α (1-2) D-Man-OR，和 D-Man α (1-3) D-Man α (1-2) D-Man α (1-2) D-Man-OR，其中 R 是氢原子，C₁-C₂₀ 烷基或可选带标记的连接基团。

[0373] 酵母细胞壁甘露糖如 PPM 的制品可用来确定样品中 ASCA-IgA 和 / 或 ASCA-IgG

的水平。此类水溶性表面抗原可通过本领域已知的任何适当提取技术制备,包括,例如通过高压灭菌法制备或者可市售购得(参见例如, Lindberg 等, Gut, 33 :909-913(1992))。PPM 的酸稳定部分也可用于本发明的统计算法 (Sendid 等, Clin. Diag. Lab. Immunol., 3 :219-226(1996))。可用于确定样品中 ASCA 水平的一种示例性 PPM 源自葡萄汁酵母 (*S. Uvarum*) 菌株 ATCC #38926。

[0374] 纯化寡糖抗原如低聚甘露糖也可用于确定样品中 ASCA-IgA 和 / 或 ASCA-IgG 的水平。纯化的低聚甘露糖抗原优选转化成拟糖脂,例如 Faille 等, Eur. J. Microbiol. Infect. Dis., 11 :438-446(1992) 中所述。本领域技术人员了解此类低聚甘露糖抗原与 ASCA 的反应性优化可通过改变甘露糖链长 (Frosh 等, Proc Natl. Acad. Sci. USA, 82 :1194-1198(1985)); 异头构型 (Fukazawa 等, 收录于“Immunology of Fungal Disease(《真菌病的免疫学》)”, E. Kurstak(编), 马塞尔-德克公司 (Marcel Dekker Inc.), 纽约, 第 37-62 页 (1989); Nishikawa 等, Microbiol. Immunol., 34 :825-840(1990); Poulain 等, Eur. J. Clin. Microbiol., 23 :46-52(1993); Shibata 等, Arch. Biochem. Biophys., 243 :338-348(1985); Trinel 等, Infect. Immun., 60 :3845-3851(1992)); 或连接位置 (Kikuchi 等, Planta, 190 :525-535(1993))。

[0375] 用于本发明所述方法的适当低聚甘露糖包括但不限于含有甘露四糖 Man(1-3)Man(1-2)Man(1-2)Man 的低聚甘露糖。可如上 Faille 等所述从 PPM 纯化此类低聚甘露糖。对 ASCA 特异的一种示例性拟糖脂可通过从相应的 PPM 释放低聚甘露糖然后将已释放的低聚甘露寡糖与 4-十六烷基苯胺等偶联来构建。

[0376] 21. 抗微生物抗体

[0377] 样品中抗 OmpC 抗体水平测定也可用于本发明。本文所用的术语“抗外膜蛋白 C 抗体”或“抗 OmpC 抗体”包括针对细菌外膜孔蛋白的抗体,例如 PCT 专利公布号 WO 01/89361 所述。术语“外膜蛋白 C”或“OmpC”指与抗 OmpC 抗体有免疫反应性的细菌孔蛋白。

[0378] 来自个体的样品中存在的抗 OmpC 抗体水平可利用 OmpC 蛋白或其片段例如其免疫活性片段测定。可用于确定样品中抗 OmpC 抗体水平的合适 OmpC 抗原包括但不限于 OmpC 蛋白,氨基酸序列与 OmpC 蛋白基本相同的 OmpC 多肽,或其片段,例如其免疫活性片段。如本文所用, OmpC 多肽通常描述与 OmpC 蛋白的氨基酸序列相同性超过约 50%, 优选相同性超过约 60%, 更优选相同性超过约 70%, 更加优选超过约 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的多肽,其中所述氨基酸相同性采用序列比对程序如 CLUSTALW 确定。可制备此类抗原,例如,通过从肠道细菌如大肠杆菌 (*E. Coli*) 纯化,通过核酸如 Genbank 登录号 K00541 的重组表达,通过合成手段例如溶液或固相肽合成,或通过采用噬菌体展示。

[0379] 样品中抗 I2 抗体水平测定也可用于本发明。本文所用的术语“抗 I2 抗体”包括针对与细菌转录调节子有同源性的微生物抗原的抗体,如美国专利号 6,309,643 中所述。术语“I2”指与抗 I2 抗体有免疫反应性的微生物抗原。微生物 I2 蛋白是 100 个氨基酸的多肽,其与来自巴斯德梭菌 (*C. Pasteurianum*) 的预测蛋白 4、来自结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 的 Rv3557c 和来自超嗜热菌 (*Aquifex aeolicus*) 的转录调节子共有一些相似性和弱同源性。I2 蛋白的核酸和蛋白质序列描述于例如美国专利号 6,309,643。

[0380] 来自个体的样品中存在的抗 I2 抗体水平可利用 I2 蛋白或其片段例如其免疫活性片段测定。可用于确定样品中抗 I2 抗体水平的合适 I2 抗原包括但不限于 I2 蛋白,氨基酸

序列与 I2 蛋白基本相同的 I2 多肽,或其片段,例如其免疫活性片段。此类 I2 多肽显示与 I2 蛋白的序列相似性大于巴斯德梭菌蛋白 4,并包括其同种型变体和同系物。如本文所用, I2 多肽通常描述与天然产生 I2 蛋白的氨基酸序列相同性超过约 50%,优选相同性超过约 60%,更优选相同性超过约 70%,更加优选超过约 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的多肽,其中所述氨基酸相同性采用序列比对程序如 CLUSTALW 确定。可制备此类 I2 抗原,例如,通过从微生物纯化,通过 I2 抗原编码核酸的重组表达,通过合成手段例如溶液或固相肽合成,或通过采用噬菌体展示。

[0381] 样品中抗鞭毛蛋白抗体水平测定也可用于本发明。本文所用的术语“抗鞭毛蛋白抗体”包括针对细菌鞭毛的蛋白组分的抗体,如 PCT 专利公布号 WO 03/053220 和美国专利公布号 20040043931 中所述。术语“鞭毛蛋白”指与抗鞭毛蛋白抗体有免疫反应性的细菌鞭毛蛋白。微生物鞭毛蛋白是在细菌鞭毛中所见蛋白,其自身排列成空心柱以形成纤丝。

[0382] 来自个体的样品中存在的抗鞭毛蛋白抗体水平可利用鞭毛蛋白或其片段例如其免疫活性片段测定。可用于确定样品中抗鞭毛蛋白抗体水平的合适鞭毛蛋白抗原包括但不限于鞭毛蛋白如 Cbir-1 鞭毛蛋白,鞭毛蛋白 X,鞭毛蛋白 A,鞭毛蛋白 B,其片段,及其组合,氨基酸序列与鞭毛蛋白基本相同的鞭毛蛋白多肽,或其片段,例如其免疫活性片段。如本文所用,鞭毛蛋白多肽通常描述与天然产生鞭毛蛋白的氨基酸序列相同性超过约 50%,优选相同性超过约 60%,更优选相同性超过约 70%,更加优选超过约 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的多肽,其中所述氨基酸相同性采用序列比对程序如 CLUSTALW 确定。可制备此类鞭毛蛋白抗原,例如,通过从细菌如胆汁螺杆菌 (*Helicobacter Bilis*)、鼯鼠螺杆菌 (*Helicobacter mustelae*)、幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*)、溶纤维丁酸弧菌 (*Butyrivibrio fibrisolvens*) 和盲肠中所见细菌纯化,通过鞭毛蛋白抗原编码核酸的重组表达,通过合成手段例如溶液或固相肽合成,或通过采用噬菌体展示。

[0383] 22. 肥大细胞标记物

[0384] 样品中肥大细胞标记物的存在或水平测定也可用于本发明。本文所用的术语“肥大细胞标记物”包括指示肥大细胞或柱状细胞的存在或丰度提高的任何蛋白质或代谢物。在某些实施方式中,这些肥大细胞标记物可存在于肥大细胞的细胞表面和 / 或在肥大细胞内差异性表达或存在。肥大系统通常发现于结缔组织中,并容纳含高水平组胺和肝素的大颗粒。据信这些细胞衍生自 CD34+ 骨髓前体细胞并在多种生物过程中起作用,包括伤口愈合,抵御病原体的防御,变态反应和过敏性反应。肥大细胞标记物的非限制性示例包括类胰蛋白酶、组胺、前列腺素 E2 (PGE₂)、前列腺素 D2 (PGD₂)、羧基肽酶 A、凝乳酶、CD25、CD34、CD117 (c-Kit)、LAMP-1 (CD107a)、LAMP-2 (CD107b) 等。

[0385] 据推测,毗邻肠部神经支配的炎性肥大细胞可能引起 IBS 中所经历的腹部疼痛 (Rijnierse A. 等, *Pharmacol Ther.* (2007))。与此相符,发现 IBS 患者中肠道位置的肥大细胞数量增加并活化。定位到胃肠道后,肥大细胞由变应原、微生物产物和 / 或神经递质刺激,释放各种生物活性介导物刺激分泌神经 (secreto-motor) 反射并提高所感知的腹部疼痛感觉。因此,胃肠道中存在增高水平的肥大细胞或肥大细胞代谢物可诊断 IBS。因此,在一种实施方式中,与肥大细胞脱颗粒作用关联的生物标记物如类胰蛋白酶、前列腺素 E2、组胺、和组胺代谢物 (包括 4-咪唑乙酸、t-甲基组胺和 t-甲基-4-咪唑乙酸) 可用于本发明所述方法。在其它实施方式中,从肥大细胞差异释放的生物标记物可用于本发明所述方

法,包括 5-羟色胺、神经生长因子、血管内皮细胞生长因子、TNF- α 、TNF- γ 、IL-6 和 IL-8。

[0386] 在某些情况中,在 mRNA 表达水平检测肥大细胞标记物的存在或水平,采用试验如杂交试验,基于扩增的试验,例如 qPCR 试验、RT-PCR 试验,或基于质谱的试验。在某些其它情况中,在蛋白质表达水平检测肥大细胞标记物的存在或水平,采用如免疫试验(例如,ELISA),免疫组化试验或基于质谱的试验。

[0387] 在某些实施方式中,所述肥大细胞标记物可以是类胰蛋白酶、组胺、前列腺素 E₂(PGE₂),或其组合。在另一些实施方式中,肥大细胞的存在或丰度提高可以用抗 Ki 抗体检测,例如 Ki-MC1 或 Ki-M1P 单克隆抗体(Hamann K. 等, Br J Dermatol. (1995)),或用荧光小檗碱结合试验检测(Berlin 和 Enerback, Int Arch Allergy Appl Immunol. (1983))。

[0388] 23. 胃肠激素

[0389] 样品中至少一种胃肠激素的存在或水平测定也可用于本发明。本文所用的术语“胃肠激素”包括存在于肠道的由细胞所释放的化学物或肽,其改变位于生物体内第二细胞的代谢。通常,激素在结合位于细胞表面的特定受体后促进靶细胞内的响应。在动物中,激素通常在血流中全身传输,但是它们也可通过扩散易位。以此方式,内分泌激素分子直接分泌入血流,而外分泌激素直接分泌入导管,它们由此穿入血流或者经旁分泌信号传导在体内扩散。适用作 IBS 标记物的胃肠激素的非限制性示例包括降钙素基因相关肽(CGRP)、P 物质、神经生长因子(NGF)、神经激肽 A、神经激肽 B、血管活性肠肽(VIP)、胰高血糖素样肽 1(GLP-1)、胰高血糖素样肽 2(GLP-2)、促胃动素、垂体腺苷酸环化酶活化肽(PACAP)、胰泌素、胆囊收缩素、神经肽 Y、胰多肽、肽 YY、肠高血糖素和葡萄糖依赖性促胰岛素肽。

[0390] 在某些情况中,在 mRNA 表达水平检测肠肽激素标记物的存在或水平,采用试验如杂交试验,基于扩增的试验,例如 qPCR 试验、RT-PCR 试验,或基于质谱的试验。在某些其它情况中,在蛋白质表达水平检测肽激素标记物的存在或水平,采用如免疫试验(例如,ELISA),免疫组化试验或基于质谱的试验。

[0391] 24. 降钙素基因相关肽(CGRP)

[0392] CGRP 是肽降钙素家族的成员,其在人体中以两种成熟形式 α -CGRP 和 β -CGRP 存在。 α -CGRP 是由降钙素/CGRP 基因的可变剪接形成的 37 个氨基酸的肽:ACDTATCVTHRLA GLLSRSGGVVKNFVPTNVGSKAF-NH₂(SEQ ID NO:1)。 β -CGRP 是相关的由降钙素相关多肽 β 前体基因形成的 37 氨基酸多肽 ACNTATCVTHRLAGLLSRSGGMVKS NFVPTNVGSKAF-NH₂(SEQ ID NO:2)。在某些情况中,CGRP 可由降钙素同种型 CGRP 前原蛋白(NP_001029125)或其变体(例如 NP_001029124 或 NP_001732),CGRP 前肽(CAA34070)或降钙素相关多肽 β 前体(NP_000719)组成。

[0393] CGRP 是一种在外周和中枢神经元中产生的最为丰富的肽(Rosenfeld MG 等, Nature(1983)),并且是最有效的肽血管舒张剂并在疼痛的传递中起作用(Brian SD 等, Nature(1985);McCulloch 等,PNAS(1986))。据信 CGRP 在心血管稳态和伤害感受中通过由异聚受体(heteromeric receptor)介导其效果来起作用,该异聚受体由称作降钙素受体样受体(CLR)的 G 蛋白偶联受体和受体活性修饰蛋白(RAMP1)(Poyner DR 等, Pharmacol Rev. (2002))组成。

[0394] 在某些情况中,在 mRNA 表达水平检测 CGRP 或其前体的存在或水平,采用试验如杂交试验,基于扩增的试验,例如 qPCR 试验、RT-PCR 试验,或基于质谱的试验。在某些其

它情况中,在蛋白质表达水平检测肽激素标记物的存在或水平,采用如免疫试验(例如,ELISA),免疫组化试验或基于质谱的试验。用于确定血清、血浆、唾液或尿液样品中 CGRP 的存在或水平的合适 ELISA 试剂盒可获自例如卡曼化学品公司(密歇根州安娜堡),巴亨控股公司(Bachem Holding AG)/半岛实验室公司(加利福尼亚州圣卡洛斯),和 BP 诊断公司(BioPorto Diagnostics,丹麦)。

[0395] 25. P 物质

[0396] P 物质是长 11 个氨基酸的肽(RPKPQQFFGLM-NH₂;SEQ ID NO:3),由神经末梢在中枢和外周神经系统中释放。在由 P 物质释放神经元支配的大量生物学位点中,包括皮肤、肠、胃、膀胱和心血管系统。P 物质在前速激肽原 A 基因(TAC1;NM_003182)的差异剪接后从多肽前体衍生。在某些实施方式中,P 物质或 P 物质前体蛋白可用作 IBS 的标记物,例如,TAC1 多肽(NP_003173;NP_054704;NP_054702;和 NP_054703)或其转录物。

[0397] 在某些情况中,在 mRNA 表达水平检测 P 物质或其前体的存在或水平,采用试验如杂交试验,基于扩增的试验,例如 qPCR 试验、RT-PCR 试验,或基于质谱的试验。在某些其它情况中,在蛋白质表达水平检测肽激素标记物的存在或水平,采用如免疫试验(例如,ELISA),免疫组化试验或基于质谱的试验。可得到用于确定血清、血浆、唾液或尿液样品中 P 物质的存在或水平的合适 ELISA 试剂盒,例如获自卡曼化学品公司(密歇根州安娜堡),巴亨控股公司/半岛实验室公司(加利福尼亚州圣卡洛斯),和 MD 生物科学公司(明尼苏达州圣保罗)。

[0398] 26. 神经生长因子(NGF)

[0399] NGF 是 NGF- β 家族的成员,是同二聚体化并纳入更大复合物中的分泌蛋白。NGF 具有神经生长刺激活性且所述复合物参与调节交感和某些感觉神经元的生长和分化。小型的分泌蛋白诱导特定靶神经元的分化和存活。NGF 结合能响应此生长因子的细胞表面上至少两个受体,TrkA 和 LNGFR。NGF 是小的多肽(NP_002497 的 122-241 残基),衍生自 NGF 基因(NM_002506)编码的前体多肽(NP_002497)。在某些实施方式中,NGF、NGF 前体多肽或 NGF 前肽(NP_002497 的 19-121 残基)可用作 IBS 标记物。

[0400] 在某些情况中,在 mRNA 表达水平检测 NGF 或其前体的存在或水平,采用试验如杂交试验,基于扩增的试验,例如 qPCR 试验、RT-PCR 试验,或基于质谱的试验。在某些其它情况中,在蛋白质表达水平检测 NGF、其前体或其前蛋白的存在或水平,采用如免疫试验(例如,ELISA),免疫组化试验或基于质谱的试验。可获得用于确定血清、血浆、唾液或尿液样品中 NGF 的存在或水平的合适 ELISA 试剂盒,例如获自密理博公司(Millipore,马萨诸塞州比莱瑞卡),CUSABIO 生物技术有限公司(CUSABIO Biotech Co.,Ltd.,特拉华州纽瓦克),艾玫尔卡生物科学公司(Emelca Biosciences,比利时),希格诺西斯公司(Signosis, Inc.,加利福尼亚州萨尼维尔)。

[0401] 27. 神经激肽 A

[0402] 神经激肽 A 是长 10 个氨基酸的肽(HKTDSFVGLM;SEQ ID NO:4),在前速激肽原 A 基因(TAC1;NM_003182)的差异剪接后从多肽前体衍生。该肽是神经肽神经递质的速激肽家族成员。在某些实施方式中,神经激肽 A 或神经激肽 A 前体蛋白可用作 IBS 的标记物,例如,TAC1 多肽(NP_003173 和 NP_054703)或其转录物。

[0403] 在某些情况中,在 mRNA 表达水平检测神经激肽 A 或其前体的存在或水平,采用试

验如杂交试验,基于扩增的试验,例如 qPCR 试验、RT-PCR 试验,或基于质谱的试验。在某些其它情况中,在蛋白质表达水平检测神经激肽 A 的存在或水平,采用如免疫试验(例如,ELISA),免疫组化试验或基于质谱的试验。可获得用于确定血清、血浆、唾液或尿液样品中神经激肽 A 的存在或水平的合适 ELISA 试剂盒,例如获自阿柏堪穆公司(Abcam,马萨诸塞州剑桥)和菲茨杰拉德工业公司(Fitzgerald Industries,马萨诸塞州北阿克顿),和瑞博奥公司(RayBiotech, Inc,佐治亚州诺克斯)。

[0404] 28. 神经激肽 B

[0405] 神经激肽 B 是长 10 个氨基酸的肽(DMHDFVGLM-NH₂;SEQ ID NO :5),衍生自速激肽 3 基因(TAC3 ;NM_003182)所编码的速激肽 3 前体(NP_037383)。该肽是神经肽神经递质的速激肽家族成员。在某些实施方式中,神经激肽 B 或神经激肽 B 前体蛋白可用作 IBS 的标记物,例如,TAC3 多肽(NP_037383)或其转录物。

[0406] 在某些情况中,在 mRNA 表达水平检测神经激肽 B 或其前体的存在或水平,采用试验如杂交试验,基于扩增的试验,例如 qPCR 试验、RT-PCR 试验,或基于质谱的试验。在某些其它情况中,在蛋白质表达水平检测神经激肽 B 的存在或水平,采用如免疫试验(例如,ELISA),免疫组化试验或基于质谱的试验。可获得用于确定血清、血浆、唾液或尿液样品中神经激肽 B 的存在或水平的合适 ELISA 试剂盒,例如获自阿柏堪穆公司(马萨诸塞州剑桥),巴亨控股公司/半岛实验室公司(加利福尼亚州圣卡洛斯),和 RB 生物技术公司(佐治亚州诺克斯)。

[0407] 29. 血管活性肠肽(VIP)

[0408] VIP 是 28 个氨基酸的肽激素(HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSILN;SEQ ID NO :6),发现于人的肠、胰脏和下丘脑。该肽诱导平滑肌松弛,导致抑制胃酸分泌和肠腔吸收,并刺激水分泌入胰液和胆汁。VIP 在血管活性肠肽基因(Entrez 基因 ID :7432)差异剪接后从多肽前体衍生。在某些实施方式中,VIP、VIP 前体蛋白(例如 NP_919416 或 NP_003372),VIP 前肽或编码 VIP 肽的转录物(例如 NM_003381 或 NM_194435)可用作 IBS 标记物。

[0409] 在某些情况中,在 mRNA 表达水平检测 VIP 的存在或水平,采用试验如杂交试验,基于扩增的试验,例如 qPCR 试验、RT-PCR 试验,或基于质谱的试验。在某些其它情况中,在蛋白质表达水平检测 VIP、其前体或其前肽的存在或水平,采用如免疫试验(例如,ELISA),免疫组化试验或基于质谱的试验。可获得用于确定血清、血浆、唾液或尿液样品中 VIP 的存在或水平的合适 ELISA 试剂盒,例如获自菲尼克斯制药公司(Phoenix Pharmaceuticals, Inc.,加利福尼亚州伯林格姆)和 BP 诊断公司(丹麦),和瑞博奥公司(佐治亚州诺克斯)。

[0410] 30. 胰高血糖素样肽 2(GLP-2)

[0411] GLP-2 是 33 个氨基酸的肽激素(HADGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTKITD;SEQ ID NO :7),在肠、胰脏和脑中表达。已知 GLP-2 与 GLP-1 共分泌入肠,在其中起调节胃动力、分泌、糖转运和细胞分化与增殖的作用。GLP-2 衍生自由胰高血糖素基因(CGC ;NM_002054)编码的多肽前体胰高血糖素原。在某些实施方式中,GLP-2、GLP-2 前体蛋白(例如 NP_002045),GLP-2 前肽或编码 GLP-2 肽的转录物(例如 NM_002054)可用作 IBS 标记物。

[0412] 在某些情况中,在 mRNA 表达水平检测 GLP-2 的存在或水平,采用试验如杂交试验,基于扩增的试验,例如 qPCR 试验、RT-PCR 试验,或基于质谱的试验。在某些其它情况

中,在蛋白质表达水平检测 GLP-2、其前体或其前肽的存在或水平,采用如免疫试验(例如,ELISA),免疫组化试验或基于质谱的试验。可获得用于确定血清、血浆、唾液或尿液样品中 GLP-2 的存在或水平的合适 ELISA 试剂盒,例如获自 RB 生物技术公司(佐治亚州诺克斯),BS 英国公司(BioSupply UK,英格兰),和 BC 公司(BioCat GmbH,德国)。

[0413] 31. 促胃动素

[0414] 促胃动素是 22 个氨基酸的肽激素(FVPIFTYGELQRMQEKERNKGQ;SEQ ID NO:8),分泌自位于小肠内的内分泌 M 细胞。一旦释出,促胃动素即刺激产生胃蛋白酶并调节移动性复合运动,后者负责转运不消化的物质经过消化道。促胃动素衍生自由促胃动素基因(MLN;Entrez 基因 ID:4295)编码的前体多肽原促胃动素。MLN 基因的转录进行差异剪接产生两种同种型(NM_002418 和 NM_001040109)之一,这导致两种不同前体多肽(NP_002409 和 NP_001035198)的翻译。在某些实施方式中,促胃动素、促胃动素前体多肽、促胃动素前肽(如促胃动素相关肽)或编码促胃动素的转录物可用作 IBS 的标记物。

[0415] 在某些情况中,在 mRNA 表达水平检测促胃动素的存在或水平,采用试验如杂交试验,基于扩增的试验,例如 qPCR 试验、RT-PCR 试验,或基于质谱的试验。在某些其它情况中,在蛋白质表达水平检测促胃动素、其前体或其前肽的存在或水平,采用如免疫试验(例如,ELISA),免疫组化试验或基于质谱的试验。可获得用于确定血清、血浆、唾液或尿液样品中促胃动素的存在或水平的合适 ELISA 试剂盒,例如获自阿柏堪穆公司(马萨诸塞州剑桥),CUSABIO 生物技术有限公司(特拉华州纽瓦克),康肽公司(Phoenix Biotech,中国)。

[0416] 32. 垂体腺苷酸环化酶激活肽(PACAP)

[0417] PACAP 是血管活性神经肽(VN),遍布于神经系统、胃肠道和淋巴系统。VN 如 PACAP 和 VIP 起神经递质、神经调节剂、亲神经性刺激剂、激素调节剂、血管舒张剂和免疫及伤害感受调节剂的作用。PACAP 是腺苷酸环化酶激活多肽 1(垂体)基因(ADCYAP1;Entrez 基因 ID:1271617)编码的前体蛋白(NP_001108)。ADCYAP1 基因的转录进行差异剪接产生两种同种型(NM_001099733 和 NM_001117)之一,这导致两种不同前体多肽(NP_001093203 和 NP_001108)的翻译。所表达的 PACAP 多肽再被处理成各种更小的肽,包括两种前肽,即 PACAP 相关肽(DVAHGILNEAYRKVLDQLSAGKHLQSLVARGVGGSLGGGAGDDAEPLS;SEQ ID NO:9),垂体腺苷酸环化酶激活多肽 38(HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL GKRYKQ RVKNK;SEQ ID NO:10)和垂体腺苷酸环化酶激活多肽 27(HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL;SEQ ID NO:11)。在某些实施方式中,PACAP、PACAP 前体多肽、PACAP 前肽(如 PACAP 相关肽,垂体腺苷酸环化酶激活多肽 38、垂体腺苷酸环化酶激活多肽 27)或编码 PACAP 的转录物可用作 IBS 的标记物。

[0418] 在某些情况中,在 mRNA 表达水平检测 PACAP 的存在或水平,采用试验如杂交试验,基于扩增的试验,例如 qPCR 试验、RT-PCR 试验,或基于质谱的试验。在某些其它情况中,在蛋白质表达水平检测 PACAP、其前体或其前肽的存在或水平,采用如免疫试验(例如,ELISA),免疫组化试验或基于质谱的试验。可获得用于确定血清、血浆、唾液或尿液样品中 PACAP 的存在或水平的合适 ELISA 试剂盒,例如获自圣克鲁斯生物技术公司(Santa Cruz Biotechnology,加利福尼亚州圣克鲁斯),USBIO 公司(US Biological,马萨诸塞州斯瓦姆斯科特),和诺复斯生物制品公司(Novus Biologicals,科罗拉多州利特尔顿)。

[0419] 33. 5-羟色胺代谢物

[0420] 样品中至少一种 5-羟色胺(5-羟基色胺;5-HT)代谢物的存在或水平测定也可用

于本发明。本文所用的术语“5-羟色胺代谢物”包括 5-羟色胺、5-羟色胺生物合成中间体和 5-羟色胺代谢物。5-羟色胺主要见于胃肠道,在其中起调节肠道运动的作用,较少见于中枢神经系统,在后者中参与调节情绪、食欲、睡眠、肌肉收缩和多种认知功能。5-羟色胺水平在 IBS 患者的胃肠道中上调。此外,IBS(D) 中 5-羟色胺浓度比 IBS(C) 中高。但是,不易测定血浆中的 5-羟色胺水平波动,因为 5-羟色胺转运体 (SERT) 对再摄入血小板进行严密调节。因此,在本文提供的一种实施方式中,5-羟色胺代谢物可在生物样品如血液和尿液中检测,以反映肠中的 5-羟色胺浓度,用于诊断 IBS。适合用作 IBS 标记物的 5-羟色胺代谢物的非限制性示例包括色氨酸,5-HT-o-硫酸盐,5-羟色胺 O-硫酸盐 (5-羟基色胺 O-硫酸盐; 5-HT-o-硫酸盐),5-羟基吲哚乙酸 (5-HIAA),5-HT 葡萄糖苷酸 (5-HT-GA) 和 5-羟基色醇 (5-HTOL)。

[0421] 在某些情况中,5-羟色胺代谢物的存在或水平用基于质谱的试验,基于质子磁共振波谱的试验,色谱试验(例如,液相色谱试验或 HPLC),免疫试验(例如,ELISA)等来检测。

[0422] 34. 肠神经系统血清代谢物

[0423] 样品中至少一种肠神经系统血清代谢物的存在或水平测定也可用于本发明。本文所用的术语“肠神经系统血清代谢物”包括多巴胺、去甲肾上腺素、肾上腺素、酪氨酸、苯丙氨酸,多巴胺、去甲肾上腺素、肾上腺素生物合成中间体,和多巴胺、去甲肾上腺素、肾上腺素代谢物。在本文提供的一种实施方式中,可检测生物样品如血液和尿液中的肠神经系统血清代谢物,以诊断、分亚型或提供 IBS 的预后。在某些实施方式中,酪氨酸水平提高关联或指示 IBS 或者与 IBS 可能性提高相关。在其它实施方式中,酪氨酸水平提高关联或指示 IBS-D 或 IBS-M。在另一实施方式中,苯丙氨酸水平提高关联或指示 IBS 或者与 IBS 可能性提高相关。在其它实施方式中,苯丙氨酸水平提高关联或指示 IBS-D 或 IBS-M。

[0424] 在某些情况中,肠神经系统血清代谢物的存在或水平用基于质谱的试验,基于质子磁共振波谱的试验,色谱试验(例如,液相色谱试验或 HPLC),免疫试验(例如,ELISA)等来检测。

[0425] 1. 5-羟色胺途径标记物

[0426] 样品中至少一种 5-羟色胺途径标记物的存在或水平测定也可用于本发明。本文所用的术语“5-羟色胺途径标记物”包括参与胃肠道内 5-羟色胺的生物合成或代谢或 5-羟色胺水平调节的基因、蛋白质和酶。适用作 IBS 标记物的 5-羟色胺途径标记物的非限制性示例包括 UDP-葡萄糖醛酸基转移酶 1-6 (UGT1A6),5-羟色胺再摄取转运体 (SERT),色氨酸羟化酶 1 (TPH1),单胺氧化酶 A (MAO-A),单胺氧化酶 B (MAO-B) 和羟色氨酸受体 3A (5-HT3A; 5-HT3R)。

[0427] 1. UDP-葡萄糖醛酸基转移酶 1-6 (UGT1A6)

[0428] UGT1A6 是 ER 膜结合酶的 UDP-葡萄糖醛酸/UDP-葡萄糖基转移酶超家族的成员,催化多种底物的葡萄糖醛酸化。UDP-葡萄糖醛酸/UDP-葡萄糖基转移酶超家族酶催化 UTP-糖的糖基加成到小疏水分子上。哺乳动物 UDP-葡萄糖醛酸转移酶描述于例如 Burchell 等, DNA Cell Biol., 10(7):487-94(1991)。这些酶在 C 末端区域共有约 50 个氨基酸残基的保守结构域,并在异生素如药物(例如,拓扑异构酶 I 抑制剂)和致癌物的解毒和后续排除中起主要作用。此前已发现 5-羟色胺是 UGT1A6 的特异性内源底物 (King C. 等, Arch Biochem

Biophys(1999))。E. C. 2. 4. 1. 17 酶 UGT1A6 由 UDP 葡萄糖醛酸基转移酶 1 家族,多肽 A6 基因 (UGT1A6 ;Entrez 基因 ID :54578) 编码并在转录物可变剪接 (NM_001072 和 NM_205862) 后从两种前体多肽 (NP_001063 和 NP_995584) 之一成熟而来。UGT1A6 基因存在多种等位基因,包括 UGT1A6*1、UGT1A6*2、UGT1A6*3 和 UGT1A6*4 (Nagar S. 等, Pharmacogenetics (2004))。这些单体型含有已知 UGT1A6 SNP 的多种组合,包括 rs6759892 (158T > G)、rs1042708 (348C > A)、rs2070959 (680 A > G)、rs1105879 (691 A > G) 和 rs1042709 (1667 G > C)。在某些实施方式中,UGT1A6、其前体蛋白、UGT1A6mRNA 或 UGT1A6SNP、单体型或基因型可用作 IBS 的标记物。

[0429] 在某些情况中,在 mRNA 表达水平检测 UGT1A6 的存在或水平,采用试验如杂交试验,基于扩增的试验,例如 qPCR 试验、RT-PCR 试验,或基于质谱的试验。在某些其它情况中,在蛋白质表达水平检测 UGT1A6 或其前体的存在或水平,采用如免疫试验 (例如,ELISA),免疫组化试验或基于质谱的试验。可获得用于确定血清、血浆、唾液或尿液样品中 UGT1A6 的存在或水平的合适 ELISA 试剂盒,例如获自亚诺法公司 (Abnova,加利福尼亚州核桃市),和圣克鲁斯生物技术公司 (加利福尼亚州圣克鲁斯)。在另一些情况中,UGT1A6 基因的 SNP 或特定单体型或基因型用试验来检测,例如杂交试验,基于扩增的试验,例如 qPCR 试验、RT-PCR 试验,单核苷酸测序试验或基于质谱的试验。

[0430] 2. 5- 羟色胺选择性再摄取转运体 (SERT)

[0431] SERT 是促进转运单胺神经递质进出细胞的膜结合受体的单胺转运体家族成员。5- 羟色胺受体 (SERT) 介导 5- 羟色胺摄入神经元和血小板,从而调节体内 5- 羟色胺水平。此前已将 SERT 基因的多态性与各种疾病关联,包括婴儿猝死综合征 (SIDS),阿尔茨海默病,创伤后精神紧张性障碍,抑郁,肺动脉高血压,心肌梗死和 IBS (综述参见 Murphy DL 等, Mol Interv. (2004))。SERT 是 70kDa 的跨膜受体 (NP_001036),由溶质载体家族 6 (神经递质转运体,5- 羟色胺),成员 4 基因 (SLC6A4 ;Entrez 基因 ID :6532 ;NM_001045) 编码。已在 SLC6A4 基因中鉴定出多个 SNP,包括 rs6355 (472G > C)、rs2228673 (908G > C)、rs28914832 (1578A > C)、rs28914833 (1698T > C)、rs28914834 (1953C > G)、rs6352 (2120A > C) 和 I425V。此外,已描述 SLC6A4 基因启动子区的多态性,包括 A > G 多态性 (rs25531) 和导致短变体的 44 个碱基对多态性缺失 (rs4795541 ;Heils A 等, J Neurochem. (1996))。在某些实施方式中,SERT、SLC6A4mRNA、或 SLC6A4SNP、单体型、多态性变体或基因型可用作 IBS 的标记物。

[0432] 在某些情况中,在 mRNA 表达水平检测 SERT 的存在或水平,采用试验如杂交试验,基于扩增的试验,例如 qPCR 试验、RT-PCR 试验,或基于质谱的试验。在某些其它情况中,在蛋白质表达水平检测 SERT 的存在或水平,采用如免疫试验 (例如,ELISA),免疫组化试验或基于质谱的试验。可获得用于确定血清、血浆、唾液或尿液样品中 SERT 的存在或水平的合适 ELISA 试剂盒,例如获自百奇公司 (Abgent,加利福尼亚州圣地亚哥),OG 技术公司 (OriGene Technologies,马里兰州罗克维尔),和阿柏堪穆公司 (马萨诸塞州剑桥)。在另一些情况中,SLC6A4 基因的 SNP、多态性或特定单体型或基因型用试验来检测,例如杂交试验,基于扩增的试验,例如 qPCR 试验、RT-PCR 试验,单核苷酸测序试验或基于质谱的试验。

[0433] 3. 色氨酸羟化酶 1 (TPH1)

[0434] TPH1 是 E. C. 1. 14. 16. 4 酶,催化 L- 色氨酸羟化形成 5- 羟色胺生物合成的中间

体 5-羟色氨酸。在哺乳动物肠和中枢神经系统中发现两种色氨酸羟化酶的同种型 (TPH1 和 TPH2)。TPH1 是肠中所见的主要同种型,而 TPH2 是中枢神经系统中表达的主要同种型。具体地,TPH 在多种细胞谱系中表达,包括脊神经元,松果体细胞,肥大细胞,单核白细胞,朗格罕氏岛的 β 细胞,和肠及胰的肠嗜铬细胞。TPH1 是由色氨酸羟化酶 1 基因 (TPH1 ;Entrez 基因 ID :7166 ;NM_004179) 编码的 50kDa 蛋白质 (NP_004170)。已在 TPH1 基因中鉴定出多个 SNP,包括 rs172423 (301+1281G > A)、rs211102 (930+629A > G)、rs10488683 (402+1276A > G)、rs684302 (117+1840C > T)、rs503964 (723C > T)、rs490895 (789C > T)、rs41274350 (820C > A)、rs41274348 (929C > T) 和 rs56151798 (1095T > C)。多个 TPH1 SNP 与精神疾病相关,包括冲动攻击性行为 (New AS 等, Am J Med Genet. (1998)) 和精神分裂症 (Allen NC 等, Nat Genet. (2008))。在某些实施方式中,TPH1、TPH1 mRNA、或 TPH1 SNP、单体型、多态性变体或基因型可用作 IBS 的标记物。

[0435] 在某些情况中,在 mRNA 表达水平检测 TPH1 的存在或水平,采用试验如杂交试验,基于扩增的试验,例如 qPCR 试验、RT-PCR 试验,或基于质谱的试验。在某些其它情况中,在蛋白质表达水平检测 TPH1 的存在或水平,采用如免疫试验 (例如,ELISA),免疫组化试验或基于质谱的试验。可获得用于确定血清、血浆、唾液或尿液样品中 TPH1 的存在或水平的合适 ELISA 试剂盒,例如获自诺复斯生物制品公司 (科罗拉多州利特尔顿) 和阿柏堪穆公司 (马萨诸塞州剑桥)。在另一些情况中,TPH1 基因的 SNP、多态性或特定单体型或基因型用试验来检测,例如杂交试验,基于扩增的试验,例如 qPCR 试验、RT-PCR 试验,单核苷酸测序试验或基于质谱的试验。

[0436] 4. 单胺氧化酶 A (MAO-A)

[0437] E. C. 1. 4. 3. 4 酶 MAO-A 是含黄素的胺氧化还原酶的酶家族成员。该酶位于线粒体外膜,在 FAD 辅因子的帮助下催化包括 5-羟色胺、去甲肾上腺素和肾上腺素在内的神经活性和血管活性胺的脱氨。MAO-A 是由单胺氧化酶 A 基因 (MAOA ;Entrez 基因 ID :4128 ;NM_000240) 编码的 59.7kDa 蛋白质 (NP_000231)。已在 MAOA 基因中鉴定出多个 SNP,包括 rs1800464 (566A > C)、rs58524323 (696G > A)、rs1137068 (818G > T)、rs72554632 (1067C > T)、rs6323 (1072G > T)、rs61730725 (1074T > C)、rs1799835 (1121T > G)、rs1800465 (1207A > T)、rs1803987 (1324G > T)、rs7065428 (1342A > G)、rs1803986 (1516G > T)、rs1137070 (1591T > C)、rs1800466 (1740A > G)、rs3788862 (NT_079573.3, 位置 6369131A/C) 和 rs1465108 (NT_079573.3, 位置 6389976A/G)。已将多个 MAOA SNP 与疾病关联,包括自闭症谱系障碍 (Yoo HJ 等, Neurosci Res. (2009)), 双相情感疾病 (Lin 等, Behav Brain Funct. (2008)), 和注意力缺陷 / 多动症 (Rommelse NN 等, Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. (2008))。在某些实施方式中,MAO-A、MAOA mRNA、或 MAOA SNP、单体型、多态性变体或基因型可用作 IBS 的标记物。

[0438] 在某些情况中,在 mRNA 表达水平检测 MAOA 的存在或水平,采用试验如杂交试验,基于扩增的试验,例如 qPCR 试验、RT-PCR 试验,或基于质谱的试验。在某些其它情况中,在蛋白质表达水平检测 MAO-A 的存在或水平,采用如免疫试验 (例如,ELISA),免疫组化试验或基于质谱的试验。可获得用于确定血清、血浆、唾液或尿液样品中 MAO-A 的存在或水平的合适 ELISA 试剂盒,例如获自诺复斯生物制品公司 (科罗拉多州利特尔顿),阿柏堪穆公司 (马萨诸塞州剑桥) 和亚诺法公司 (加利福尼亚州核桃市)。在另一些情况中,MAOA 基因

的 SNP、多态性或特定单体型或基因型用试验来检测,例如杂交试验,基于扩增的试验,例如 qPCR 试验、RT-PCR 试验,单核苷酸测序试验或基于质谱的试验。

[0439] 5. 单胺氧化酶 B(MAO-B)

[0440] E. C. 1. 4. 3. 4 酶 MAO-B 是含黄素的胺氧化还原酶的酶家族成员。MAO-B 与 MAO-A 共有约 70% 的序列相同性,且如同 MAO-A 也位于线粒体外膜并催化神经活性和血管活性胺的脱氨。MAO-B 优选使苄胺、苯乙胺和多巴胺脱氨。由于 MAO-A 使 5-羟色胺和肾上腺素脱氨的亲合性高于 MAO-B,就抑郁症的一线治疗而言 MAO-B 抑制剂优于 MAO-A 抑制剂。MAO-B 是由单胺氧化酶 B 基因(MA0B;Entrez 基因 ID:4129;NM_000898)编码的 58.8kDa 蛋白质(NP_000889)。已在 MAO-B 基因中鉴定出多个 SNP,包括 rs12010260(260 G > T)、rs17856663(289 G > A)、rs17852046(565 C > A)、rs12845783(767 A > C)、rs12850496(775 C > A)、rs12845773(777 A > C)、rs7879356(782 A > G)、rs55815323(1087 C > T)、rs5952696(1229 A > G)、rs6324(1637 C > T)、rs1040399(NT_079573.3,位置 6477166 C/T)和 rs6651806(NT_079573.3,位置 6540731 A/C)。已将多个 MAOB SNP 与疾病关联,包括注意力不足多动症(Li J 等,Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. (2008)和易患严重抑郁症(Dlugos AM 等,J Neural Transm. (2009))。在某些实施方式中,MAO-B、MAOB mRNA、或 MAOBSNP、单体型、多态性变体或基因型可用作 IBS 的标记物。

[0441] 在某些情况中,在 mRNA 表达水平检测 MAOB 的存在或水平,采用试验如杂交试验,基于扩增的试验,例如 qPCR 试验、RT-PCR 试验,或基于质谱的试验。在某些其它情况中,在蛋白质表达水平检测 MAO-B 的存在或水平,采用如免疫试验(例如,ELISA),免疫组化试验或基于质谱的试验。可获得用于确定血清、血浆、唾液或尿液样品中 MAOB 的存在或水平的合适 ELISA 试剂盒,例如获自诺复斯生物制品公司(科罗拉多州利特尔顿),阿柏堪穆公司(马萨诸塞州剑桥)和圣克鲁斯生物技术公司(加利福尼亚州圣克鲁斯)。在另一些情况中,MAOB 基因的 SNP、多态性或特定单体型或基因型用试验来检测,例如杂交试验,基于扩增的试验,例如 qPCR 试验、RT-PCR 试验,单核苷酸测序试验或基于质谱的试验。

[0442] 6. 羟色氨酸受体 3A(5-HT₃R)

[0443] 5-HT₃R 是配体门控离子通道受体超家族的成员。5-HT₃R 多肽是五聚体跨膜 5-HT₃受体的亚基,所述受体可由同型五聚体 5-HT₃R 或含至少一个 5-HT₃R 亚基的异型五聚体结构组成。5-HT₃受体是离子传导孔,当结合 5-羟色胺时引起构象变化引起神经元的兴奋性应答。近来已显示微小 RNA 作用于 HT3R 受体的调节(Kapeller J 等,Hum Mol Genet. (2008))。5-HT₃R 蛋白质由 5-羟基色胺(5-羟色胺)受体 3A 基因(HTR3A;Entrez 基因 ID:3359)编码并通过在可变剪接转录物(NM_000869、NM_001161772 和 NM_213621)后从前体多肽(NP_000860、NP_001155244 和 NP_998786)去除信号肽来加工。已在 HTR3A 基因中鉴定出多个 SNP,包括 rs33940208(168 C > T)、rs72466464(170 C > T)、rs72466465(205 G > A)、rs72466467(705 G > T)、rs34327364(714 G > A)、rs4938063(896 G > A)、rs56232120(969 G > A)、rs35815285(1169 G > A)、rs12285005(1198 C > T)、rs35592083(1320 C > T)、rs34111946(1471 G > A)、rs35944954(1479 C > T)、rs1176713(1515 A > G)、rs1150220(NT_033899.7,位置 17420302 C/T)和 rs1062613(97 C > T)。已将多个 HTR3A SNP 与疾病关联,包括治疗抵抗型精神分裂症(Ji X 等,Neurosci Lett. (2008))和自闭症

(Anderson BM 等, Neurogenetics(2009))。在某些实施方式中, 5-HT3R、HTR3A mRNA、HTR3A 微小 RNA、或 HTR3A SNP、单体型、多态性变体或基因型可用作 IBS 的标记物。

[0444] 在某些情况中, 在 mRNA 表达水平检测 HTR3A 的存在或水平, 采用试验如杂交试验, 基于扩增的试验, 例如 qPCR 试验、RT-PCR 试验, 或基于质谱的试验。在某些其它情况中, 在蛋白质表达水平检测 5-HT3R 存在或水平, 采用如免疫试验 (例如, ELISA), 免疫组化试验或基于质谱的试验。可获得用于确定血清、血浆、唾液或尿液样品中 5-HT3R 的存在或水平的合适 ELISA 试剂盒, 例如获自瑞博奥公司 (佐治亚州诺克斯) 和圣克鲁斯生物技术公司 (加利福尼亚州圣克鲁斯)。在另一些情况中, HTR3A 基因的 SNP、多态性或特定单体型或基因型用试验来检测, 例如杂交试验, 基于扩增的试验, 例如 qPCR 试验、RT-PCR 试验, 单核苷酸测序试验或基于质谱的试验。

[0445] J. 应激标记物

[0446] 样品中至少一种应激标记物的存在或水平测定也可用于本发明。本文所用的术语“应激标记物”包括起介导中枢神经系统应激响应作用的任意肽、激素、代谢物、蛋白质或基因。这些标记物包括应激响应所释放的激素, 应激响应差异性生成的代谢物, 应激响应差异性生成的基因和蛋白, 和结合应激依赖性激素及代谢物的细胞受体。适用作 IBS 标记物的应激标记物的非限制性示例包括促肾上腺皮质激素释放激素 (CRH ;CRF), 尿皮素 (Ucn), 促肾上腺皮质激素释放激素结合蛋白 (CRFBP) 和促肾上腺皮质激素 (ACTH, 促皮质素)。

[0447] 1. 促肾上腺皮质激素释放激素 (CRH ;CRF)

[0448] CRH 是参与中枢神经系统应激响应的神经内分泌激素。该激素介导很多应激相关的外周效应和行为反应。已证明 CRH 参与在上和下消化道中的应激诱导活动。CRH 是 41 个氨基酸的肽激素 (SEPPISLDLTFHLLREVLEMARAEQLAQQAHNSNRKLMEII ;SEQ ID NO :12), 衍生自促肾上腺皮质激素释放激素基因 (CRH ;Entrez 基因 ID :1392 ;NM_000756) 所编码的前体多肽 (促肾上腺皮质激素释放激素前体 ;NP_000747)。已在 CRH 基因中鉴定出多个 SNP, 包括 rs12721511 (189 C > G)、rs72556398 (236 G > C)、rs3832590 (330-CCG > CGCCCG)、rs6159 (473 A > C)、rs28364016 (692 G > C)、rs28364017 (NT_008183.18, 位置 18943997 A/G) 和 rs28364014 (NT_008183.18, 位置 18943683C/G)。在某些实施方式中, CRH、CRH 前体多肽、CRH 前肽、CRH mRNA、或 CRH SNP、单体型、多态性变体或基因型可用作 IBS 的标记物。

[0449] 在某些情况中, 在 mRNA 表达水平检测 CRH 的存在或水平, 采用试验如杂交试验, 基于扩增的试验, 例如 qPCR 试验、RT-PCR 试验, 或基于质谱的试验。在某些其它情况中, 在蛋白质表达水平检测 CRH 存在或水平, 采用如免疫试验 (例如, ELISA), 免疫组化试验或基于质谱的试验。可获得用于确定血清、血浆、唾液或尿液样品中 CRH 的存在或水平的合适 ELISA 试剂盒, 例如获自 IBL 美洲公司 (IBL America, 明尼苏达州明尼阿波利斯) 和阿柏泰克公司 (Abbotec, 加利福尼亚州圣地亚哥)。在另一些情况中, CRH 基因的 SNP、多态性或特定单体型或基因型用试验来检测, 例如杂交试验, 基于扩增的试验, 例如 qPCR 试验、RT-PCR 试验, 单核苷酸测序试验或基于质谱的试验。

[0450] 2. 尿皮素 1 (Ucn)

[0451] Ucn 是肽激素, 是蛙皮降压肽 / 促皮质激素释放因子 / 硬骨鱼紧张肽家族的成员。尿皮素对 CRF-1 和 CRF-2 受体都有高亲和性, 并且是比 CRH 更有效的食欲抑制剂。不同于主要在下丘脑生成的 CRH, UCN 在胃肠道中生成, 因此比 CRH 更易于在血浆

中检测。UCN 是 40 个氨基酸的肽激素 (DNPSLSIDLTFHLLRTLLELARTQSQRERAEQNRIIFDS V;SEQ ID NO:13), 衍生自尿皮素基因 (UCN;Entrez 基因 ID:7349;NM_003353) 所编码的前体多肽 (尿皮素前原蛋白;NP_003344)。已在 CRH 基因中鉴定出多个 SNP, 包括 rs11557508 (NT_022184.14;位置 6347221 C/T)、rs28364046 (NT_022184.14;位置 6346948 A/G)、rs35403114 (NT_022184.14;位置 6346902 C/T)、rs6709781 (NT_022184.14;位置 6346798 C/G)、rs28364045 (525 C > T) 和 rs11557507 (NT_022184.14;位置 6346118G/T)。在某些实施方式中,UCN、UCN 前体多肽、UCN 前肽、UCN mRNA、或 UCN SNP、单体型、多态性变体或基因型可用作 IBS 的标记物。

[0452] 在某些情况中,在 mRNA 表达水平检测 UCN 的存在或水平,采用试验如杂交试验,基于扩增的试验,例如 qPCR 试验、RT-PCR 试验,或基于质谱的试验。在某些其它情况中,在蛋白质表达水平检测 UCN 的存在或水平,采用如免疫试验 (例如,ELISA),免疫组化试验或基于质谱的试验。可获得用于确定血清、血浆、唾液或尿液样品中 UCN 的存在或水平的合适 ELISA 试剂盒,例如获自诺复斯生物制品公司 (科罗拉多州利特尔顿),阿柏堪穆公司 (马萨诸塞州剑桥) 和美国生物制品公司 (马萨诸塞州斯瓦姆斯科特)。在另一些情况中,UCN 基因的 SNP、多态性或特定单体型或基因型用试验来检测,例如杂交试验,基于扩增的试验,例如 qPCR 试验、RT-PCR 试验,单核苷酸测序试验或基于质谱的试验。

[0453] 3. 促肾上腺皮质素释放激素结合蛋白 (CRHBP)

[0454] CRHBP 对 CRH 和 Ucn 都有高亲和性,防止 CRF 受体活化并从而调节这些肽激素的生物活性和生物利用度。惊人的是,这些相互作用由 CRHBP 上的不同结合表面介导 (Huisin 等, J Biol Chem. (2008))。CRHBP 是衍生自促肾上腺皮质素释放激素结合蛋白基因 (CRHBP;Entrez 基因 ID:1393;NM_001882) 所编码前体多肽 (NP_001873) 的分泌型糖蛋白。已在 CRHBP 基因中鉴定出多个 SNP,包括 rs1133082 (372C > A)、rs1053967 (529C > T)、rs34347676 (544G > A)、rs26844303 (547C > G)、rs3792738 (NT_006713.14, 位置 26842142A/C)、rs41272246 (NT_006713.14, 位置 26843420A/C) 和 rs2135078 (NT_006713.14, 位置 26859826C/T)。已将多个 CRHBP SNP 与疾病关联,包括焦虑和酗酒疾病 (Enoch MA 等, PLoS One (2008)) 以及自发早产 (Velez DR 等, PLoS One (2008))。在某些实施方式中,CRHBP、CRHBP mRNA、或 CRHBP SNP、单体型、多态性变体或基因型可用作 IBS 的标记物。

[0455] 在某些情况中,在 mRNA 表达水平检测 CRHBP 的存在或水平,采用试验如杂交试验,基于扩增的试验,例如 qPCR 试验、RT-PCR 试验,或基于质谱的试验。在某些其它情况中,在蛋白质表达水平检测 CRHBP 存在或水平,采用如免疫试验 (例如,ELISA),免疫组化试验或基于质谱的试验。可获得用于确定血清、血浆、唾液或尿液样品中 CRHBP 的存在或水平的合适 ELISA 试剂盒,例如获自百奇公司 (Abgent, 加利福尼亚州圣地亚哥),阿柏泰克公司 (加利福尼亚州圣地亚哥),和艾普科公司 (新罕布什尔州塞伦)。在另一些情况中,CRHBP 基因的 SNP、多态性或特定单体型或基因型用试验来检测,例如杂交试验,基于扩增的试验,例如 qPCR 试验、RT-PCR 试验,单核苷酸测序试验或基于质谱的试验。

[0456] 4. 皮质醇

[0457] 皮质醇是肾上腺响应应激和焦虑生成的皮质类固醇激素。糖皮质激素的生成受 CRH 和促肾上腺皮质激素 (ACTH) 调节。响应应激或焦虑而释放后,皮质醇起到帮助恢复稳

态的作用,并影响体内多种代谢物的水平,这些代谢物包括胰岛素,血清中骨胶原游离氨基酸,胃酸分泌,钠,钾,水和铜。在某些情况中,皮质醇的存在或水平用基于质谱的试验,基于质子磁共振波谱的试验,色谱试验(例如,液相色谱试验或HPLC),免疫试验(例如,ELISA),基于荧光共振能量转移(FRET)的试验(Yu等, Assay Drug Dev Technol. (2007)),基于酶片段互补的试验(Kumar A等, Biosens Bioelectron. (2007)),荧光试验(Appel D等, Anal Bioanal Chem. (2005))等来检测。

[0458] 5. 促肾上腺皮质激素(ACTH,促皮质素)

[0459] ACTH是39个氨基酸的促激素(SYSMEHFRWGKPVGKKRRPVKVYPNGAEDESAEAFPLEF; SEQ ID NO:14),由垂体前叶生成并分泌,起刺激甲状腺生成和释放甲状腺激素的作用。ACTH通常在响应生物应激中生成,并影响肾上腺皮质的雄性激素和皮质醇的生成提高。ACTH衍生自促阿片-黑素细胞皮质素原(pro-opiomelanocortin)前蛋白(NP_000930; NP_001030333)的成熟形式,其在促阿片-黑素细胞皮质素原基因(POMC; Entrez 基因ID: 5443; NM_000939; NM_001035256)可变剪接后翻译。促阿片-黑素细胞皮质素原前蛋白被深加工成11种潜在的多肽,包括NPP(残基27-102),促黑素细胞激素 γ (残基77-87),潜在的肽(残基105-134),促皮质素(残基138-176),促黑素细胞激素 α (残基138-150),促肾皮素样中间肽(残基156-176),促脂解素 β (残基179-267),促脂解素 γ (残基179-234),促黑素细胞激素 β (残基217-234), β -内啡肽(残基237-267)和甲硫氨酸脑啡肽(残基237-241)。已在POMC基因中鉴定出多个SNP,包括rs8192605(281C>T)、rs28932470(421A>G)、rs28932471(448C>T)、rs28930368(545C>T)、rs35254395(552插入AGCAGCGGC)、rs10654394(560插入GCCGCTGCT)、rs34650613(609C>T)、rs8192606(657C>G)、rs45463492(697G>T)、rs2071345(848C>T)、rs28932472(969C>G)、rs3754860(NT_022184.14,位置4209187C/T)、rs1009388(NT_022184.14,位置4207034C/G)和rs1042571(NT_022184.14,位置4199820C/T)。已将多个POMC SNP与疾病关联,包括帕金森病(Shadrina M等, Neurosci Lett. (2006)),肥胖症(Ahituv N等, Am J Hum Genet. (2007)和药物依赖(Zhang H等, Biol Psychiatry (2009))。在某些实施方式中,ACTH、POMC mRNA、或POMC SNP、单体型、多态性变体或基因型可用作IBS的标记物。

[0460] 在某些情况中,在mRNA表达水平检测POMC的存在或水平,采用试验如杂交试验,基于扩增的试验,例如qPCR试验、RT-PCR试验,或基于质谱的试验。在某些其它情况中,在蛋白质表达水平检测ACTH的存在或水平,采用如免疫试验(例如,ELISA),免疫组化试验或基于质谱的试验。可获得用于确定血清、血浆、唾液或尿液样品中ACTH的存在或水平的合适ELISA试剂盒,例如获自凯尔生物技术公司(Calbiotech Inc.,加利福尼亚州春谷),GWB公司(加利福尼亚州圣地亚哥),和MD生物制品公司(明尼苏达州圣保罗)。在另一些情况中,POMC基因的SNP、多态性或特定单体型或基因型用试验如杂交试验,基于扩增的试验,例如qPCR试验、RT-PCR试验,单核苷酸测序试验或基于质谱的试验来检测。

[0461] K. 其它诊断标记物

[0462] 样品中乳铁蛋白的存在或水平测定也可用于本发明。在某些情况中,在mRNA表达水平检测乳铁蛋白的存在或水平,采用试验如杂交试验或基于扩增的试验。在某些其它情况中,在蛋白质表达水平检测乳铁蛋白的存在或水平,采用如免疫试验(例如,ELISA)或免疫组化试验。获自卡巴开(加利福尼亚州圣地亚哥)的乳铁蛋白ELISA试剂盒可用来检测

血浆、尿液、支气管肺泡灌洗液或脑脊髓液样品中的人乳铁蛋白。类似地,获自 USBIO 公司(马萨诸塞州斯瓦姆斯科特)的 ELISA 试剂盒可用于确定血浆样品中的乳铁蛋白水平。美国专利公布号 20040137536 描述了用于确定粪便样品中存在升高的乳铁蛋白水平的 ELISA 试验。类似地,美国专利公布号 20040033537 描述了用于确定粪便、粘液或胆汁样品中内源乳铁蛋白浓度的 ELISA 试验。在一些实施方式中,可采用例如乳铁蛋白或其片段来检测样品中抗乳铁蛋白抗体的存在或水平。

[0463] 样品中糖缺失转铁蛋白(CDT)的存在或水平测定也可用于本发明。CDT 是目前用于检测存在大量饮酒的诊断测试。该测试通常检测血液、血清、毛发或尿样中糖缺失转铁蛋白的水平,即修饰有 0、1 或 2 条唾液酸链的转铁蛋白多肽。因此,采用 CDT 测试鉴定有酗酒问题或酒精中毒的个体。在某些实施方式中,CDT 测试或 CDT 水平可用作 IBS 的标记物。在某些其它情况中,CDT 的存在或水平由电泳试验检测,如购自消费者遗传学公司(Consumer Genetics, Inc., 加利福尼亚州萨尼维尔)和西比亚电泳公司(Sebia electrophoresis, 佐治亚州诺克斯)。在某些其它情况中,CDT 的存在或水平采用如免疫试验(例如,ELISA),等电点聚焦试验,免疫组化试验或基于质谱的试验来检测。

[0464] 免疫试验如 ELISA 对于确定样品中 C 反应蛋白质(CRP)的存在或水平也特别有用。例如,获自艾普科公司(新罕布什尔州塞伦)的夹心比色 ELISA 试验可用于确定血清、血浆、尿样或粪便样品中的 CRP 水平。类似地,获自生物介质公司(Biomedica Corporation, 加利福尼亚州福斯特城)的 ELISA 试剂盒可用于检测样品中的 CRP 水平。确定样品中 CRP 水平的其它方法描述于例如美国专利号 6,838,250 和 6,406,862 以及美国专利公布号 20060024682 和 20060019410。

[0465] 此外,潜血反应即大便潜血通常表明胃肠疾病,且已开发多种试剂盒来监控胃肠出血。例如,贝克曼库尔特公司(Beckman Coulter)的产品潜血检测 SENSIA 是针对胃肠出血、缺铁、消化性溃疡、溃疡性结肠炎的诊断辅助手段,并在一些情况中用于筛查结直肠癌。该特定试验是基于愈创树酯被过氧化氢氧化产生蓝色。可从海莱纳实验室公司(Helena Laboratories, 得克萨斯州博蒙特)购得用于检测粪便样品中血液的类似比色试验。通过确定血红蛋白或血红素活性的存在或水平来检测粪便样品中潜血的其它方法描述于例如美国专利号 4,277,250、4,920,045、5,081,040 和 5,310,684。

[0466] 样品中血纤维蛋白原或其蛋白水解产物如血纤维蛋白肽的存在或水平测定也可用于本发明。血纤维蛋白原是在肝中合成的血浆糖蛋白,由 3 个结构不同的亚基组成: α (FGA); β (FGB) 和 γ (FGG)。凝血酶导致血纤维蛋白原分子的有限蛋白水解,该过程中血纤维蛋白肽 A 和 B 分别从 α 和 β 链的 N 末端区域释放。血纤维蛋白肽 A 和 B 的测序已在多个物种中完成,它们可能具有作为血管收缩剂的生理作用,并可能在血液凝固中帮助局部止血。在一种实施方式中,人血纤维蛋白肽 A 包含序列:Ala-Asp-Ser-Gly-Glu-Gly-Asp-Phe-Leu-Ala-Glu-Gly-Gly-Gly-Val-Arg (SEQ ID NO:15)。在另一实施方式中,人血纤维蛋白肽 B 包含序列:Glp-Gly-Val-Asn-Asp-Asn-Glu-Glu-Gly-Phe-Phe-Ser-Ala-Arg (SEQ ID NO:16)。获自 ADI 公司(American Diagnostica Inc., 康涅狄格州斯坦福)的 ELISA 试剂盒可用于检测血浆或其它生物液体中人血纤维蛋白肽 A 的存在或水平。

[0467] 在某些实施方式中,样品中降钙素基因相关肽(CGRP)的存在或水平测定可用于本发明。降钙素是甲状腺滤泡旁细胞合成的 32 个氨基酸的肽激素。它导致血清钙的降低,

该作用与甲状旁腺激素相反。CGRP 和降钙素衍生自位于染色体 11 上的 CT/CGRP 基因。CGRP 是 37 个氨基酸的肽,而且是有效的内源血管扩张剂。CGRP 主要在神经组织中产生,但是,其受体的表达遍布于体内。获自卡曼化学品公司(密歇根州安娜堡)的 ELISA 试剂盒可用于检测包括血浆、血清、神经组织、CSF 和培养介质在内的多种样品中人 CGRP 的存在或水平。

[0468] 在其它实施方式中,样品中抗组织转谷氨酰胺酶(tTG)抗体的存在或水平测定可用于本发明。本文所用的术语“抗 tTG 抗体”包括识别组织转谷氨酰胺酶(tTG)或其片段的任何抗体。转谷氨酰胺酶是广泛存在且物种间高度保守的 Ca^{2+} -依赖性酶的多样化家族。在所有转谷氨酰胺酶中,tTG 的分布最广泛。在某些情况中,抗 tTG 抗体是抗 tTG IgA 抗体,抗 -tTG IgG 抗体,或其混合物。获自美国 SBB 公司(ScheBo Biotech USA Inc.,佐治亚州马利埃塔)的 ELISA 试剂盒可用于检测血液样品中人抗 tTG IgA 抗体的存在或水平。

[0469] 样品中 NOD2/CARD15 基因多态性的存在或水平测定也可用于本发明。例如,可从来自个体的样品中鉴定 NOD2 基因中的多态性如产生 R703W 蛋白质变体的 C2107T 核苷酸变体(参见例如,美国专利公布号 20030190639)。在替代实施方式中,NOD2mRNA 水平可用作本发明的诊断标记物以帮助分类 IBS。

[0470] 样品中 5-羟色胺再摄取转运体(SERT)基因多态性的存在或水平测定也可用于本发明。例如,SERT 基因启动子区的多态性对转录活性有影响,导致 5-HT 再摄取效率改变。已证明在 SERT-P 缺失/缺失基因型和 IBS 表型之间观察到强基因型关联(参见例如,Yeo Gut,53:1396-1399(2004))。在替代实施方式中,SERT mRNA 水平可用作本发明的诊断标记物以帮助分类 IBS(参见例如,Gershon, J. Clin. Gastroenterol., 39(增刊 5): S184-193(2005))。

[0471] 在某些方面,色氨酸羟化酶-1mRNA 的水平是诊断标记物。例如,已证明色氨酸羟化酶-1mRNA 在 IBS 中显著减少(参见例如,Coats, Gastroenterology, 126: 1897-1899(2004))。在某些其它方面,测定甲烷的乳果糖呼气试验可用作 IBS 的诊断标记物,甲烷表明细菌过度生长。

[0472] 其它诊断标记物包括但不限于:L-选择蛋白/CD62L、抗 U1-70kDa 自身抗体、闭锁小带 1(ZO-1)、血管活性肠肽(VIP)、血清淀粉样蛋白 A、促胃液素、NB3 基因多态性、NCI1 基因多态性、粪便白细胞、 α 2A 和 α 2C 肾上腺素受体基因多态性、IL-10 基因多态性、TNF- α 基因多态性、TGF- β 1 基因多态性、 α -肾上腺素能受体、G 蛋白、5-HT_{2A} 基因多态性、5-HTT LPR 基因多态性、5-HT₄ 受体基因多态性、连蛋白和 33 聚体肽(Shan 等, Science, 297: 2275-2279(2002);PCT 专利公布号 WO 03/068170)。

[0473] L. 分类标记物

[0474] 多种分类标记物适用于本发明的方法、系统和代码以将 IBS 分入某一类、形式或临床亚型如 IBS-便秘型(IBM-C), IBS-腹泻型(IBM-D), IBS-混合型(IBM-M), IBS-交替型(IBM-A),或感染后 IBS(IBM-PI)。分类标记物的示例包括但不限于上述任意诊断标记物(例如,瘦素,5-羟色胺再摄取转运体(SERT),色氨酸羟化酶-1,5-羟基色胺(5-HT),类胰蛋白酶, PGE₂,组胺等),以及窦粘膜蛋白 8,角蛋白-8,密蛋白-8,连蛋白,促肾上腺皮质激素释放激素受体-1(CRHR1),促肾上腺皮质激素释放激素受体-2(CRHR2)等。

[0475] 例如,下文实施例 1 和 2 显示测定 β -类胰蛋白酶水平对区分 IBM-C 患者样品与 IBM-A 和 IBM-D 患者样品特别有用。类似地,出于所有目的通过引用全文纳入本文的 2007

年8月14日提交的美国专利公开号2008/0085524中,实施例1证明测定瘦素水平对于区分IBS-C患者样品与IBS-A和IBS-D患者样品特别有用。此外,已显示粘膜SERT和色氨酸羟化酶-1的表达在IBS-C和IBS-D中降低(参见例如,Gershon, J. Clin. Gastroenterol., 39(增刊5):S184-193(2005))。此外,IBS-C患者显示餐后5-HT释放减弱,而IBS-PI患者有更高的5-HT峰值水平(参见例如,Dunlop, Clin Gastroenterol Hepatol., 3:349-357(2005))。而且,由图11可见,组胺和PGE₂的血清水平对于区分IBS-D患者样品与IBS-A、IBS-C和健康对照患者样品也特别有用。

[0476] M. 统计算法

[0477] 在一些方面,本发明提供用于将样品分类为是否与IBS相关的方法、试验、系统和代码,采用统计算法或方法来将样品分类为IBS样品或非IBS样品。在其它方面中,本发明提供用于将样品分类为是否与IBS相关的方法、试验、系统和代码,采用第一统计算法或方法将样品分类为非IBD样品或IBD样品(即,IBS排除步骤),然后用第二统计算法或方法将所述非IBS样品分类为IBS样品或非IBS样品(即,IBS确认步骤)。所述统计算法或方法优选各自独立包含一种或多种学习型统计分类系统。如本文所述,学习型统计分类系统的组合有利地为将样品分类为是否与IBS相关提供改善的灵敏度、特异性、阴性预测值、阳性预测值和/或总体准确性。在一种优选实施方式中,本文提供的所述方法、试验、系统和代码采用至少两种统计算法的组合。

[0478] 在一些实施方式中,所述第一统计算法是选自下组的学习型统计分类系统:随机森林(RF),分类回归树(C&RT),推进树,神经网络(NN),支持向量机(SVM),常规卡方自动交互检测模型,交互树,多重适应性回归仿样,机器学习分类器,及其组合。在某些情况中,所述第一统计算法是单个学习型统计分类系统。所述单个学习型统计分类系统优选包括基于树的统计算法如FR或C&RT。在某些其它情况中,所述第一统计算法是至少2种学习型统计分类系统的组合,例如串行或并行使用。作为非限制性示例,可先使用RF根据诊断标记物概况(单独或联合症状概况)产生预测或概率值,然后可用NN(例如,人工NN)根据所述预测或概率值以及相同或不同的诊断标记物概况或概况组合来将样品分类为非IBD样品或IBD样品。本发明所述混合RF/NN学习型统计分类系统通常以至少约75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的灵敏度、特异性、阳性预测值、阴性预测值和/或总体准确性将样品分类为非IBD样品。

[0479] 在某些实施方式中,所述第二统计算法包括上述任何学习型统计分类系统。在某些情况中,所述第二统计算法是单个学习型统计分类系统,例如基于树的统计算法(例如,RF或C&RT)。在某些其它情况中,所述第二统计算法是至少2种学习型统计分类系统的组合,例如串行或并行使用。作为非限制性示例,可先使用RF根据诊断标记物概况(单独或联合症状概况)产生预测或概率值,然后可用NN(例如,人工NN)或SVM根据所述预测或概率值以及相同或不同的诊断标记物概况或概况组合来将所述非IBD样品分类为非IBS样品或IBS样品。本文所述混合RF/NN或RF/SVM学习型统计分类系统通常以至少约75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的灵敏度、特异性、阳性预测值、阴性预测值和/或总体准确性将样品分类为IBS样品。

[0480] 在一些情况中,用某个或某些学习型统计分类系统所得数据可以用处理算法来处理。例如,这类处理算法可以选自下组:多层感知器,反向传播网络和 LM 算法。在其它情况中,可采用此类处理算法的组合,例如以并行或串行方式采用。

[0481] 术语“统计算法”或“统计方法”包括用来确定变量间关系的各种统计分析中任何一种。在本发明中,所述变量是至少一种感兴趣标记物的存在或水平和 / 或至少一种 IBS 相关症状的存在或严重度。可用本文所述的统计算法分析任意数量的标记物和 / 或症状。例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60 种或更多种生物标记物和 / 或症状可包括在统计算法中。在一种实施方式中,采用逻辑回归。在另一实施方式中,采用线性回归。在某些情况中,本发明的统计算法可采用给定群体中特定标记物的分位数度量作为变量。分位数是将数据样本分成(尽可能)含有等量观测的一组“分割点”。例如,四分位数是将数据样本分成 4 组含有等量观测(尽可能)的数值。较低的四分位是有序数据集由低到高四分之一处的数据值;较高的四分位是有序数据集由高到低四分之一处的数据值。五分位数是将数据样本分成 5 组含有等量(尽可能)观测值的数值。本发明还可包括用标记物水平的百分位数范围(例如,三分位、四分位、五分位等)或其累积指数(例如,标记物水平的四分位总和)作为算法中的变量(如同用连续变量)。

[0482] 本发明的统计算法优选包含一种或多种学习型统计分类系统。本文所用的术语“学习型统计分类系统”包括能适用于复杂数据集(例如,感兴趣标记物组和 / 或 IBS 相关症状列表)并基于此类数据集作出决定的机器学习算法技术。在一些实施方式中,采用单个学习型统计分类系统如分类树(例如,随机森林)。在其它实施方式中,采用 2、3、4、5、6、7、8、9、10 种或更多种学习型统计分类系统的组合,优选串行使用。学习型统计分类系统的示例包括但不限于:采用归纳学习(例如,决策 / 分类树如随机森林、分类和回归树(C&RT)、推进树等),可能近似正确(Probably Approximately Correct, PAC)学习,连接学习(例如,神经网络(NN),人工神经网络(ANN),神经模糊网络(NFN),网状结构,感知器如多层感知器,多层前馈网络,神经网络的应用,信念网络中的贝叶斯学习等),强化学习(例如,已知环境中的被动学习例如朴素学习,自适应动态学习,和时序差分学习,未知环境中的被动学习,未知环境中的主动学习,学习型作用-数值函数,强化学习的应用等)和遗传算法和进化规划的那些系统。其它学习型统计分类系统包括支持向量机(例如,核方法),多变量自适应回归仿样(MARS),L-M 算法,高斯-牛顿算法,混合高斯模型,梯度下降算法和学习矢量量化(LVQ)。

[0483] 随机森林是采用 Leo Breiman 和 Adele Cutler 所开发算法构建的学习型统计分类系统。随机森林采用大量单个决定树并通过选择由个体树所确定类别的模式(即,最常发生的)来决定分类。随机森林分析可采用例如获自萨尔伏德系统公司(Salford Systems,加利福尼亚州圣地亚哥)的随机森林(RandomForests)软件来进行。随机森林的说明参见例如 Breiman, Machine Learning, 45:5-32(2001);和 http://stat-www.berkeley.edu/users/breiman/RandomForests/cc_home.htm。

[0484] 分类和回归树代表了拟合经典回归模型的计算机密集型替代选择,通常用来根据一种或多种预测因子确定感兴趣类别或连续应答的最佳可能模型。分类回归树分析可采用例如获自萨尔伏德系统公司(加利福尼亚州圣地亚哥)的 CART 软件或获自史丹索特公司

(StatSoft, Inc., 俄克拉荷马州塔尔萨) 的 Statistica 数据分析软件来进行。对分类回归树的说明可见于 Breiman 等, “Classification and Regression Trees(《分类回归树》)”, CH 出版社 (Chapman and Hall), 纽约 (1984); 和 Steinberg 等, “CART :Tree-Structured Non-Parametric Data Analysis(《CART :树结构的非参数数据分析》)”, 萨尔伏德系统公司, 加利福尼亚州圣地亚哥, (1995)。

[0485] 神经网络是互连的多组人工神经元, 用数学或计算机模型根据连接方法的计算来进行信息加工。通常, 神经网络为自适应系统, 根据在网络中流动的外部或内部信息改变其结构。神经网络的具体示例包括前馈神经网络如感应器, 单层感应器, 多层感应器, 反向传播网络, ADALINE 网络, MADALINE 网络, Learnmatrix 网络, 径向基函数 (RBF) 网络, 和自组织映射或 Kohonen 自组织网络; 递归神经网络如简单递归网络和 Hopfield 网络; 随机神经网络如 Boltzmann 机; 模块化神经网络如委员会机器 (committee of machine) 和联想神经网络; 和其它类型的网络如瞬间训练神经网络, 脉冲神经网络, 动态神经网络和级联神经网络。神经网络分析可采用例如获自史丹索特公司 (俄克拉荷马州塔尔萨) 的 Statistica 数据分析软件来进行。对神经网络的描述参见例如 Freeman 等, 收录于 “Neural Networks :Algorithms, Applications and Programming Techniques(《神经网络 :算法、应用和编程技术》)”, AS 出版公司 (Addison-Wesley Publishing Company) (1991); Zadeh, Information and Control, 8 :338-353(1965); Zadeh, “IEEE Trans. on Systems, Man and Cybernetics,” 3 :28-44(1973); Gersho 等, 收录于 “Vector Quantization and Signal Compression(《矢量量化与信号压缩》)”, Kluwer 学术出版社, 波士顿、多尔德雷赫特、伦敦 (1992); 和 Hassoun, “Fundamentals of Artificial Neural Networks(《人工神经网络基础》)”, MIT 出版社, 马萨诸塞州剑桥、伦敦 (1995)。

[0486] 支持向量机是用于分类和回归的一组相关监督学习技术, 描述于例如 Cristianini 等, “An Introduction to Support Vector Machines and Other Kernel-Based Learning Methods(《支持向量机和其它基于核的学习方法的入门》)”, 剑桥大学出版社 (Cambridge University Press), 2000)。支持向量机分析可以采用例如 Thorsten Joachims(康奈尔大学) 开发的 SVM^{light} 软件或采用 Chih-Chung Chang 和 Chih-Jen Lin(台湾大学) 开发的 LIBSVM 软件来进行。

[0487] 本文所述的学习型统计分类系统可以用来自健康个体、IBS 患者、IBD 患者和 / 或乳糜泻患者的样品组 (例如, 血清学样品) 来训练和测试。例如, 来自由医师诊断的患者且优选由胃肠病学家诊断为患有 IBD 患者的样品适用于训练和测试本发明的学习型统计分类系统, 所述诊断用活组织检查、结肠镜检查或免疫试验作出, 例如, 如美国专利号 6, 218, 129 中所述。来自诊断为患有 IBD 的患者的样品还可用免疫试验例如美国专利号 5, 750, 355 和 5, 830, 675 所述免疫试验, 分成克罗恩病或溃疡性结肠炎。用已公开标准如 Manning、罗马 I、罗马 II 或罗马 III 诊断标准诊断为患有 IBS 的患者的样品适用于训练和测试本发明的学习型统计分类系统。来自健康个体的样品可包括未鉴定为 IBD 和 / 或 IBS 样品的那些。本领域技术人员知道获取可用于训练和测试本发明所述学习型统计分类系统的患者样品组的其它技术和诊断标准。

[0488] 本文所用的术语 “灵敏度” 指本发明的诊断方法、系统或代码在样品为阳性如患有 IBS 时给出阳性结果的概率。灵敏度计算为真阳性结果的数量除以真阳性与假阴性的

总和。灵敏度基本上是对本发明的方法、系统或代码从未患病者中正确鉴定出 IBS 患者的良好程度的度量。可选择统计算法使得分类 IBS 的灵敏度为至少约 60%，并可以是例如，至少约 65%、70%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99%。在优选实施方式中，分类 IBS 的灵敏度在采用学习型统计分类系统的组合（参见美国专利公布号 2008/0085524 中的实施例 10，所述专利通过引用全文纳入本文用于所有目的）时为至少约 90%，或者在采用单个学习型统计分类系统（参见美国专利公布号 2008/0085524 中的实施例 11，所述专利通过引用全文纳入本文用于所有目的）时为至少约 85%。

[0489] 本文所用的术语“特异性”指本发明的诊断方法、系统或代码在样品不是阳性如不患有 IBS 时给出阴性结果的概率。特异性计算为真阴性结果的数量除以真阴性与假阳性的总和。特异性基本上是对本发明的方法、系统或代码从 IBS 患者中排除未患病者的良好程度的度量。可选择统计算法使得分类 IBS 的特异性为至少约 70%，并可以是例如，至少约 75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99%。在优选实施方式中，分类 IBS 的特异性在采用学习型统计分类系统的组合（参见美国专利公布号 2008/0085524 中的实施例 10，所述专利通过引用全文纳入本文用于所有目的）时为至少约 86%，或者在采用单个学习型统计分类系统（参见美国专利公布号 2008/0085524 中的实施例 11，所述专利通过引用全文纳入本文用于所有目的）时为至少约 84%。

[0490] 本文所用的术语“阴性预测值”或“NPV”指鉴定为不患有 IBS 的个体确实不患所述疾病的概率。阴性预测值可计算为真阴性结果的数量除以真阴性与假阴性的总和。阴性预测值由所述诊断方法、系统或代码的特征以及所分析群体中疾病流行率确定。可选择统计算法使得具有某一疾病流行率的群体中的阴性预测值范围为约 70%–99%，并可以是例如，至少约 70%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99%。在优选实施方式中，分类 IBS 的阴性预测值在采用学习型统计分类系统的组合（参见美国专利公布号 2008/0085524 中的实施例 10，所述专利通过引用全文纳入本文用于所有目的）时为至少约 87%。

[0491] 本文所用的术语“阳性预测值”或“PPV”指鉴定为患有 IBS 的个体确实患所述疾病的概率。阳性预测值可计算为真阳性结果的数量除以真阳性与假阳性的总和。阳性预测值由所述诊断方法、系统或代码的特征以及所分析群体中疾病流行率确定。可选择统计算法使得具有某一疾病流行率的群体中的阳性预测值范围为约 80%–99%，并可以是例如，至少约 80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99%。在优选实施方式中，分类 IBS 的阳性预测值在采用学习型统计分类系统的组合（参见美国专利公布号 2008/0085524 中的实施例 10，所述专利通过引用全文纳入本文用于所有目的）时为至少约 90%。

[0492] 包括阴性和阳性预测值在内的预测值受所分析群体中的疾病流行率影响。在本发明所述方法、系统和代码中，可选择统计算法以就具有特定 IBS 患病率的临床群体产生所需临床参数。例如，可就多至约 1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65% 或 70% 的 IBS 患病率选择学习型

统计分类系统,该患病率可以是在例如临床医师诊室如胃肠病学家诊室或全科医生诊室中所见。

[0493] 本文所用的术语“总体一致性”或“总体准确性”指本发明的方法、系统或代码分类疾病状态的准确性。总体准确性计算为真阳性和真阴性之和除以样品结果总数,并受所分析群体中的疾病流行率影响。例如,可选择统计算法使得具有某一疾病流行率的患者群体中的总体准确性为至少约 60%,并可以是例如,至少约 65%、70%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%。在优选实施方式中,分类 IBS 的总体准确性在采用学习型统计分类系统的组合(参见美国专利公布号 2008/0085524 中的实施例 10,所述专利通过引用全文纳入本文用于所有目的)时为至少约 80%。

[0494] N. 疾病分类系统

[0495] 图 13 显示了根据本发明一个实施方式的疾病分类系统 (DCS) (200)。如图所示,DCS 包括 DCS 智能模块 (205),例如计算机,其具有处理器 (215) 和存储模块 (210)。所示智能模块还包括用于通过一种或多种直接连接(例如,USB、火线 (Firewire) 或其它接口)和一种或多种网络连接(例如,包括调制解调器或其它网络接口装置)来传送和接受信息的通信模块(未显示)。存储模块可包括内部存储装置和一个或多个外部存储装置。该智能模块还包括显示模块 (225),例如监视器或打印机。在一方面,该智能模块通过直接连接或通过网络 (240) 来接收数据,例如来自数据采集模块如测试系统 (250) 的患者测试结果。例如,测试系统可配置成对一个或多个患者样品 (255) 运行多重分析物测试并自动提供测试结果给所述智能模块。数据也可经用户的直接输入提供给智能模块,或可以下载自便携式介质如压缩盘 (CD) 或数字多功能盘 (DVD)。测试系统可以整合有智能模块,直接与智能模块耦联,或可以通过网络与智能模块远程耦联。如已经熟知的,该智能模块还可通过网络与一种或多种客户端系统 (230) 交换数据。例如,请求方的医师或卫生保健提供者可用客户端系统 (230) 获得并查阅来自智能模块的报告,该智能模块可位于实验室或医院内。

[0496] 网络可以是 LAN(局域网)、WAN(广域网)、无线网络、点对点网络、星形网、令牌网络、枢纽网络或其它设置。由于目前应用中最常见网络类型是 TCP/IP(Transfer Control Protocol and Internet Protocol,传输控制协议和互联网协议)网络,例如本文很多实施例中所用的常称作因特网(首字母大写的 Internet)的全球网络,但应当理解本发明可使用的网络不限于此,尽管 TCP/IP 是目前的优选方案。

[0497] 美国专利公布号 2008/0085524 的图 2 所示系统中的多个元件可包括常规的熟知元件,本文无需再作详细解释。例如,所述智能模块可实施为台式个人计算机、工作站、主机、笔记本电脑等。各客户端系统可包括台式个人计算机、工作站、笔记本电脑、PDA、手机、或任何有 WAP 功能的装置或能直接或间接接口因特网或其它网络连接的任何其它计算装置。客户端系统通常运行 HTTP 客户端,例如浏览程序如微软的 Internet Explorer™ 浏览器,网景的 Navigator™ 浏览器,Opera 的浏览器,或在手机、PDA 或其它无线装置的情况中为有 WAP 功能的浏览器,等等,允许客户端系统的用户通过网络访问、处理和查看来自智能模块对该用户开放的信息和页面。各客户端系统通常还包括一种或多种用户界面装置,例如键盘、鼠标、触摸屏、笔等,用于联同智能模块提供的页面、表单和其它信息来和显示器(例如,监视屏幕、LCD 显示器等)(235)上的浏览器所提供的图形用户界面(GUI)交互。如上所

述,本发明适合与因特网一起使用,因特网指具体的全球互联网络。但是,应当理解可用其它网络替代因特网,例如外连网、内连网、虚拟专用网络 (VPN)、非基于 TCP/IP 的网络、LAN 或 WAN,等等。

[0498] 根据一种实施方式,各客户端系统及其所有组件可由操作者用各种应用程序如浏览器来设置,所述应用程序包括用中央处理单元如 Intel®Pentium®处理器等运行的计算机代码。类似地,智能模块及其所有组件可由操作者用一个或多个应用程序来设置,所述应用程序包括用中央处理单元 (215) 如英特尔奔腾处理器或类似处理器或多个处理器单元来运行的计算机代码。用于操作和设置智能模块以如本文所述处理数据并测试结果的计算机代码优选下载并存储在硬盘上,但全部程序代码或其部分也可存储在熟知的其它任何易失性或非易失性存储介质中,例如 ROM 或 RAM,或在能存储程序代码的任何其它计算机可读介质 (260) 上,例如压缩盘 (CD) 介质,数字多功能盘 (DVD) 介质,软盘,ROM, RAM 等。

[0499] 用于实施本发明不同方面和实施方式的计算机代码可在能于计算机系统中运行的任意编程语言中实施,例如, C、C++、C#、HTML、Java、JavaScript 或其它任意脚本语言如 VBScript。此外,全部程序代码或其部分可体现为载波信号,其可通过因特网或通过熟知的其它任何常规网络连接 (例如,外连网、VPN、LAN 等) 用熟知的任何通信介质和协议 (例如, TCP/IP、HTTP、HTTPS、Ethernet 等) 传递并从软件来源 (例如,服务器) 下载。

[0500] 根据一种实施方式,智能模块实施一种疾病分类方法来分析患者测试结果和 / 或问卷答复以确定患者样品是否与 IBS 关联。数据可保存于存储器 (210) 中的一个或多个数据表格或其它逻辑数据结构或者保存于偶联智能模块的单独存储器或数据库系统中。一种或多种统计方法通常应用于包括特定患者测试数据的数据集。例如,所述测试数据可包括诊断标记物概况,其包含的数据表明患者样品中至少一种标记物的存在或水平。所述测试数据还可包括症状概况,其包含的数据表明患者正在经历或近期经历过的至少一种 IBS 相关症状的存在或严重度。在一方面,统计方法根据所述诊断标记物概况和 / 或症状概况产生统计衍生决定来将患者样品分类为 IBS 样品或非 IBS 样品。在另一方面,第一统计方法根据所述诊断标记物概况和 / 或症状概况产生第一统计衍生决定来将患者样品分类为 IBD 样品或非 IBD 样品。若所述患者样品分类为非 IBD 样品,则对相同或不同的数据集应用第二统计方法来产生第二统计衍生决定将所述非 IBS 样品分类为 IBS 样品或非 IBS 样品。所述第一和 / 或第二统计衍生决定可显示在与智能模块关联或偶联的显示装置上,或者所述决定可提供给并显示于单独的系统如客户端系统 (230)。所显示的结果允许医师作出合理的诊断或者预后。

[0501] 0. 治疗与治疗监控

[0502] 来自个体的样品一旦分类为 IBS 样品,本发明的方法、系统和代码还可包括给予所述个体治疗有效量的治疗一种或多种 IBS 相关症状可用药物 (即, IBS 药物)。就治疗应用而言, IBS 药物可以单独给予或联合一种或多种其它 IBS 药物和 / 或一种或多种降低 IBS 药物相关副作用的药物来共同给予。

[0503] IBS 药物可在必要时和适当的药物赋形剂一起给予,并可通过任何可接受的给药方式来进行。因此,给药可以是,例如静脉内,局部,皮下,经皮,透皮,肌肉内,口服,含服,舌下,经牙龈,经腭,关节内,胃肠外,微动脉内,皮内,心室内,颅内,腹膜内,病损内,鼻内,经直肠,经阴道,或通过吸入。“共同给予”指 IBS 药物的给予是在第二药物 (例如,另一 IBS 药

物,可用于降低所述 IBS 药物副作用的药物等)给药的同一时间、临给药前或者刚给药后。

[0504] 治疗有效量的 IBS 药物可重复给予,例如,至少 2、3、4、5、6、7、8 次或更多次,或者所述剂量可通过连续灌输给予。所述剂量可以采用固体、半固体、冻干粉剂或液体剂型的形式,例如,片剂、丸剂、团剂、囊剂、粉剂、溶液、悬浮剂、乳剂、栓剂、保留灌肠剂、霜剂、油膏剂、洗剂、凝胶剂、气溶胶、泡沫剂等,优选以适合精确剂量单次给药的单位剂型。

[0505] 本文所用的术语“单位剂型”指适合作为单一剂量用于人对象或其他哺乳动物的物理离散单位(例如,安瓿),每个单位包含预定量的 IBS 药物和合适的药用赋形剂,所述预定量经计算能产生所需的起始反应、耐受性和/或治疗效果。此外,可制备更浓缩的剂型,然后可由此产生更稀释的单位剂型。因此,所述更浓缩的剂型将含有显著超过例如至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 倍或更多倍的所述 IBS 药物量。

[0506] 本领域技术人员已知制备此类剂型的方法(参见例如,Remington's Pharmaceutical Sciences(《雷明顿药物科学》),第 18 版,马克出版公司(Mack Publishing Co.),宾夕法尼亚州伊斯顿(1990))。所述剂型通常包括常规的药物载体或赋形剂并可另外包括其它药用试剂、载体、佐剂、稀释剂、组织渗透促进剂、增溶剂等。可用本领域熟知方法对特定剂型和给药途径调整合适的赋形剂(参见例如,《雷明顿药物科学》,同上)。

[0507] 合适赋形剂的示例包括但不限于:乳糖、右旋糖、蔗糖、山梨糖醇、甘露醇、淀粉、阿拉伯胶、磷酸钙、藻酸盐、西黄蓍胶、明胶、硅酸钙、微晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素、水、盐水、糖浆、甲基纤维素、乙基纤维素、羟丙基甲基纤维素和聚丙烯酸如卡波普(Carbopol),例如卡波普 941、卡波普 980、卡波普 981 等。所述剂型可另外包括润滑剂,例如滑石粉、硬脂酸镁和矿物油;润湿剂;乳化剂;助悬剂;防腐剂如羟基苯甲酸甲酯、乙酯和丙酯(即,对羟基苯甲酸酯类);pH 调节剂,例如无机与有机酸和碱;甜味剂;和芳香剂。所述剂型还可包含生物可降解的聚合珠、葡聚糖和环糊精包合物。

[0508] 对于口服给药,治疗有效剂量可以是片剂、囊剂、乳剂、悬浮剂、溶液剂、糖浆剂、喷剂、锭剂、粉剂和缓释制剂的形式。用于口服给药的合适赋形剂包括药物级的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、滑石粉、纤维素、葡萄糖、明胶、蔗糖、碳酸镁等。

[0509] 在一些实施方式中,治疗有效剂量可采用丸剂、片剂或囊剂的形式,因而所述剂型可包含 IBS 药物以及以下任意一种:稀释剂如乳糖、蔗糖、磷酸二钙等;崩解剂如淀粉或其衍生物;润滑剂如硬脂酸镁等;粘合剂如淀粉、阿拉伯树胶、聚乙烯吡咯烷酮、明胶、纤维素及其衍生物。IBS 药物也可配制成置于例如聚乙二醇(PEG)载体中的栓剂。

[0510] 液体剂型的制备可通过将 IBS 药物和可选的一种或多种药学上可接受佐剂溶解或悬浮于载体例如盐水(如,0.9% w/v 的氯化钠)、右旋糖水溶液、甘油、乙醇等,以形成溶液或悬浮液,例如用于口服、局部或静脉内给药。IBS 药物也可配制在保留灌肠剂中。

[0511] 对于局部给药,治疗有效剂量可以是乳剂、洗剂、凝胶剂、泡沫剂、乳膏剂、胶冻剂、溶液剂、悬浮剂、油膏剂和透皮贴剂的形式。对于吸入给药,IBS 药物可以经雾化器作为干粉或液体形式递送。对于肠胃外给药,治疗有效剂量可以是无菌可注射溶液和无菌包装粉剂的形式。优选地,可注射溶液以约 4.5-7.5 的 pH 配制。

[0512] 治疗有效剂量还可以冻干形式提供。此类剂型可包括缓冲液,例如碳酸氢盐,用于在给药前重建,或者所述缓冲液可以包括在冻干剂型中,用于采用例如水来重建。所述冻干剂型还可包含适当的血管收缩剂,例如肾上腺素。所述冻干剂型可以在注射器中提供,可选

联合用于重建的缓冲液一起包装,从而重建剂型可以立即给予个体。

[0513] 用于治疗 IBS 的治疗用途中,IBS 药物可以每日约 0.001mg/kg- 约 1000mg/kg 的起始剂量给予。采用的日剂量范围可以是约 0.01mg/kg- 约 500mg/kg,约 0.1mg/kg- 约 200mg/kg,约 1mg/kg- 约 100mg/kg,或约 10mg/kg- 约 50mg/kg。然而,剂量也可根据个体的需求、IBS 症状的严重度以及所用的 IBS 药物而变化。例如,剂量可以考虑按本文所述方法分类为患有 IBS 个体中的 IBS 症状严重度来凭经验确定。在本发明的情况中,给予个体的剂量应当足以随时间在所述个体中产生有益的治疗响应。剂量大小也可由伴随个体中特定 IBS 药物给予的任何不良副作用的存在、性质、和程度来决定。确定用于特定状况的合适剂量在本领域从业人员的技术范围内。通常,用低于该 IBS 药物最优剂量的较小剂量开始治疗。此后,所述剂量通过小量递增直至达到该环境下最优效果。方便起见,如果需要,在给药日中可分配总的日剂量,并按部分给予。

[0514] 本文所用的术语“IBS 药物”包括治疗一种或多种 IBS 相关症状所用药物的全部药学上可接受形式。例如,所述 IBS 药物可以是外消旋或同分异构混合物,结合于离子交换树脂的固体复合物等。此外,IBS 药物可以是溶剂合物形式。术语“IBS 药物”还旨在包括所述 IBS 药物的所有药学上可接受盐、衍生物和类似物,及其组合。例如,IBS 药物的药学上可接受盐包括但不限于:其酒石酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐、酒石酸氢盐、二氢氯化物、水杨酸盐、半琥珀酸盐、柠檬酸盐、顺丁烯二酸盐、盐酸盐、氨基甲酸盐、硫酸盐、硝酸盐、苯甲酸盐形式,及其组合等。任意形式的 IBS 药物都适合用于本发明,例如 IBS 药物的药学上可接受盐,IBS 药物的游离碱,或其混合物。

[0515] 可用于治疗一种或多种 IBS 相关症状的合适 IBS 药物包括但不限于:5-羟色胺能试剂,抗抑郁剂,氯通道活化剂,氯通道阻断剂,鸟苷酸环化酶激动剂,抗生素,类阿片,神经激肽拮抗剂,镇痉剂或抗胆碱剂,颠茄生物碱,巴比妥酸盐,胰高血糖素样肽 (GLP-1) 类似物,促皮质激素释放因子 (CRF) 拮抗剂,益生菌,其游离碱,其药学可接受的盐,其衍生物,其类似物,及其组合。其它 IBS 药物包括填充剂,多巴胺拮抗剂,驱风剂,安神剂,右托非索泮,苯妥英,噻吗心安和地尔硫卓。

[0516] 5-羟色胺能剂可用于治疗 IBS 症状如便秘、腹泻和 / 或交替型便秘与腹泻。5-羟色胺能剂的非限制性示例描述于 Cash 等, Aliment. Pharmacol. Ther., 22: 1047-1060 (2005), 并包括 5-HT₃ 受体激动剂 (例如, MKC-733 等), 5-HT₄ 受体激动剂 (例如, 替加色罗 (Zelnorm™), 普卢卡必利, AG1-001 等), 5-HT₃ 受体拮抗剂 (例如, 阿洛司琼 (Lotronex®), 西兰司琼, 昂丹司琼, 格拉司琼, 多拉司琼, 雷莫司琼, 帕洛诺司琼, E-3620, DDP-225, DDP-733 等), 混合的 5-HT₃ 受体拮抗剂 / 5-HT₄ 受体激动剂 (例如, 西沙必利, 莫沙必利, 伦扎必利等), 其游离碱, 其药学上可接受的盐, 其衍生物, 其类似物, 及其组合。此外, 可以给予通过影响神经元或神经胶质细胞的信号传导来调节肠部通透性的氨基酸如谷氨酰胺和谷氨酸来治疗 IBS 患者。

[0517] 抗抑郁剂如选择性 5-羟色胺再摄入抑制剂 (SSRI) 或三环抗抑郁药对于治疗 IBS 症状如腹痛、便秘和 / 或腹泻特别有益。SSRI 抗抑郁剂的非限制性示例包括西酞普兰、氟伏沙明、帕罗西汀、氟西汀、舍曲林, 其游离碱, 其药学上可接受的盐, 其衍生物, 其类似物, 及其组合。三环抗抑郁药的示例包括但不限于: 去甲丙咪嗪、去甲替林、普罗替林、阿米替林、氯米帕明、多虑平、丙咪嗪、三甲丙咪嗪、马普替林、阿莫沙平、氯米帕明, 其游离碱, 其药

学上可接受的盐,其衍生物,其类似物,及其组合。

[0518] 氯通道激活剂可用于治疗 IBS 症状如便秘。氯通道激活剂的非限制性示例为鲁比前列素 (Amitiza™),其游离碱,其药学上可接受的盐,其衍生物,或其类似物。此外,氯通道阻断剂如可洛菲来默可用于治疗 IBS 症状如腹泻。鸟苷酸环化酶激动剂如 MD-1100 可用于治疗 IBS 相关的便秘(参见例如, Bryant 等, Gastroenterol., 128 :A-257 (2005))。抗生素如新霉素也可适用于治疗 IBS 相关的便秘(参见例如, Park 等, Gastroenterol., 128 :A-258 (2005))。不可吸收的抗生素如利福西酰胺 (Xifaxan™) 适于治疗 IBS 相关的小肠细菌过度生长和 / 或便秘(参见例如, Sharara 等, Am. J. Gastroenterol., 101 : 326-333 (2006))。

[0519] 阿片类如 κ 阿片(例如,阿西马朵林)可以用于治疗 IBS 相关疼痛和 / 或便秘。神经激肽 (NK) 拮抗剂如他奈坦,沙瑞度坦和其它 NK2 和 / 或 NK3 拮抗剂可以用于治疗 IBS 症状如结肠内肌肉的过敏、便秘和 / 或腹泻。镇痉药或抗胆碱剂如双环胺可以用于治疗 IBS 症状如肠和膀胱的肌肉痉挛。其它镇痉药或抗胆碱剂如颠茄生物碱(例如,阿托品,莨菪胺,莨菪碱等)可以和巴比妥酸盐如苯巴比妥联用以降低 IBS 相关肠痉挛。GLP-1 类似物如 GTP-010 可用于治疗 IBS 症状如便秘。CRF 拮抗剂如抗压素 (astressin) 和益生菌如 VSL#3®可以用于治疗一种或多种 IBS 症状。本领域技术人员了解目前使用或开发中的适用于治疗一种或多种 IBS 相关症状的其它 IBS 药物。

[0520] 一旦来自个体的样品被分类为 IBS 样品,所述个体还可以周期性时间间隔监控以评估某个治疗方案的功效。例如,某些标记物的水平根据治疗例如药物的治疗效果而改变。在个体化方案中监控患者以评估响应并理解某些药物或治疗的效果。此外,患者可能不对药物响应,但标记物可能改变,提示这些患者属于可通过其标记物水平鉴定的特殊群体(非响应性)。这些患者可以中断其现行治疗并指定替代治疗。

[0521] IV. 实施例

[0522] 提供以下实施例,用以说明而非限制所要求保护的发明。

[0523] 2007 年 8 月 14 日提交的美国专利公布号 2008/0085524 中的实施例通过引用全文纳入本文用于所有目的。

[0524] 实施例 1. 用于预测 IBS 的类胰蛋白酶 ELISA。

[0525] 本实施例描述了用于检测肥大细胞 β -类胰蛋白酶的存在或水平的灵敏 ELISA。另见图 1-7。

[0526] 背景:肥大细胞在肠易激综合征 (IBS) 的发病机理中起重要作用。远端肠段肥大细胞浸润和活化的提高与 IBS 的症状发生和严重度关联。肥大细胞与 IBS 患者中内脏传入神经对粘膜刺激的响应提高有关。测定肥大细胞标记物可对 IBS 的临床诊断有重要作用。但是,该努力因为缺乏灵敏的试验而受挫。

[0527] 方法:我们在此报道用于测定人血清样品中类胰蛋白酶水平的高度灵敏的双面 ELISA 试验(检出限 0.019ng/ml)的开发和验证。该试验准确、稳健且可重复。用该试验测定健康对照和 IBS 患者中的血清类胰蛋白酶浓度。

[0528] 结果:健康对照中的平均血清类胰蛋白酶水平是 9.32 ± 2.1 ng/ml ($n = 156$)。IBS-D 和 IBS-A 患者显示的血清类胰蛋白酶浓度显著更高 (IBS-D 为 12.71 ng/ml ($n = 209$) 而 IBS-A 为 11.94 ng/ml ($n = 57$), $p < 0.01$);但 IBS-C 的平均类胰蛋白酶水平是 9.34 ng/

ml ($n = 118$), 就 IBS-C 而言与健康对照没有显著差异。

[0529] 结论 :这是目前开发的能将 IBS-D 和 IBS-A 患者与 IBS-C 患者和健康对照相区分的首个生物标记物。将血清类胰蛋白酶水平与普罗米修斯公司 (Prometheus) 的其它 IBS 生物标记物联用, 我们能改善 IBS-D 和 IBS-A 患者诊断的准确性。

[0530] 开发了 ELISA 试验, 采用兔抗类胰蛋白酶作为捕获抗体和偶联有碱性磷酸酶的 G3 作为检测抗体来确定血清肥大细胞 β -类胰蛋白酶水平。用发光底物 CPSD (3-(4-甲氧基螺旋 {1,2-二氧杂环丁烷-3,2'-(5'-氯)三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷}-4-基) 磷酸苯二钠盐) 来提高试验的灵敏度。用含 5% BSA 的缓冲液和 10% 正常人血清在 1-1000ng/ml 的 β -类胰蛋白酶标准范围内观察到线性剂量响应曲线。该试验的下限为 0.019ng/ml, 类胰蛋白酶浓度为 1ng/ml 和 1000ng/ml 时试验内和试验间的变异系数低于 15%。加入血清的已知量纯化类胰蛋白酶的回收率为 88%。利用免疫试验检测健康对照、IBS-C 和 IBS-D 患者的类胰蛋白酶的血清水平。健康对照中的平均血清类胰蛋白酶水平是 7.0 ± 2.1 ng/ml ($n = 113$)。IBS-C 和 IBS-D 中的平均类胰蛋白酶水平分别为 9.6ng/ml ($n = 116$) 和 12.7 ($n = 209$)。采用截止值 11.4ng/ml (均值 +2SD), 对 GI 健康对照的试验特异性为 82% ($n = 156$), 对 IBS-C 和 IBS-D 的试验特异性分别为 21.5% 和 24.9%。与患者的症状和其它 IBS 标记物联用, 血清类胰蛋白酶水平可有助于将 IBS-D 与其它类型的肠易激综合征相区分。

[0531] 实施例 2. 评估血清类胰蛋白酶水平在 IBS 中的诊断效用。

[0532] 背景 :肥大细胞在肠易激综合征 (IBS) 的发病机理中起重要作用。远端肠段肥大细胞浸润和活化的提高与 IBS 的症状发生和严重度关联。肥大细胞与 IBS 患者中内脏传入神经对粘膜刺激的响应提高有关。测定肥大细胞标记物可对 IBS 的临床诊断有重要作用。但是, 该努力因为缺乏灵敏的试验而受挫。

[0533] 方法 :我们在此报道用于测定人血清样品中类胰蛋白酶水平的高度灵敏的双位 ELISA 试验 (检出限 0.019ng/ml) 的开发和验证。该试验准确、稳健且可重复。用该试验测定健康对照和 IBS 患者中的血清类胰蛋白酶浓度。

[0534] 结果 :健康对照中的平均血清类胰蛋白酶水平是 7.1 ± 2.5 ng/ml。IBS-D 和 IBS-A 患者显示血清类胰蛋白酶浓度 (IBS-D 为 10.3 ± 8.7 ng/ml 而 IBS-A 为 12.1 ± 10.7 ng/ml) 高于健康对照对象, 但 IBS-C 的平均类胰蛋白酶水平为 9.6 ± 9.4 ng/ml。IBS-C 和 IBS-D 组间的血清类胰蛋白酶水平有统计学差异 ($p < 0.01$)。

[0535] 结论 :血清类胰蛋白酶浓度是目前开发的能区分 IBS-D 和 IBS-C 患者的首个生物标记物。血清类胰蛋白酶水平可以和其它 IBS 生物标记物联用以改善 IBS 诊断的准确性。

[0536] 图 8 显示了本文所述类胰蛋白酶 ELISA 中人类胰蛋白酶的剂量依赖性响应。方案 :将 96 孔微量滴定板用 100ml 含 2mg/ml 抗人类胰蛋白酶抗体的碳酸钠 (pH 9.6) 于 4℃ 涂覆过夜。用 PBST 清洗后, 将平板用 300ml/孔的封闭 / 试验缓冲液 (含 5% BSA 的 PBS) 于室温 (RT) 温和搅拌孵育 30 分钟。清洗后, 向板中添加 100ml/孔连续稀释 (1 : 8 稀释于试验缓冲液) 的人类胰蛋白酶。RT 再孵育 2 小时后, 清洗平板, 然后用 100ml 在试验缓冲液中优化稀释的 AP 偶联抗人类胰蛋白酶孵育。平板在温和搅拌下孵育 2 小时, 然后清洗。向各孔加入 100ml 的 Tropix CSPD 底物, 避光孵育 30 分钟, 然后用发光酶标仪读取发光值。相对发光单位 (RLU) 和类胰蛋白酶浓度用 Prism Graphpad 程序作图。类胰蛋白酶检测范围 = 0.019-5,000ng/ml。EC50 = 65ng/ml。正常合并血清中掺入 20ng 的回收率为 81.5%。

[0537] 图 9 显示本文所述类胰蛋白酶 ELISA 的优化。图 10 显示来自健康对照 ($n = 139$) 和来自患 IBS 对象 ($n = 378$) 的血清类胰蛋白酶水平。由 ELISA 在用试验缓冲液稀释 10 倍的血清样品中测定类胰蛋白酶水平。还按亚型显示 IBS 患者: IBS-D ($n = 206$): 腹泻主导型; IBS-C ($n = 116$): 便秘主导型; IBS-A ($n = 56$): 交替症状。各数值是两次测定的平均值。实线是各组的中值。截止值 12ng/ml 由健康对象的中值 $+2\text{SD}$ (虚线) 计算得来。* 相对健康对象 $p < 0.0001$; ** 相对 IBS-D 的 $p < 0.0001$; 秩和 U 检验 (Mann Whitney U test)。表 2 提供 IBS 亚型和健康对象中的类胰蛋白酶水平的小结 (截断值 = 12.0ng/ml)。

[0538] 表 2. IBS 亚型和健康对象中的类胰蛋白酶水平 (ng/ml) (截断值 = 12.0ng/ml)。

[0539]

	健康对照	IBS	IBS-D	IBS-C	IBS-A
对象 (n)	139	381	209	116	56
均值 (ng/mL)	7.1	10.3	10.3	9.6	12.1
标准偏差	2.4	9.2	8.7	9.4	10.7
阳性	9	82	44	22	16

[0540] 图 11 显示 IBS 患者相对健康对照的组胺和 PGE_2 血清水平升高。用来自卡曼公司的试剂盒通过 ELISA 在 $50\mu\text{l}$ 血清中测定 PGE_2 。用免疫技术公司的 EIA 试剂盒在 $10\mu\text{l}$ 血清中测定组胺。样品以一式两份测试。实线为各组的中值。因此,在某些方面,通过检测相对健康对照、IBS-A 和 / 或 IBS-C 样品或标准品的较高 PGE_2 水平可诊断 IBS-D 或将其与其它 IBS 临床亚型相区分。在某些其它方面,通过检测相对健康对照和 / 或 IBS-C 样品或标准品的较高组胺水平可诊断 IBS-D 或 IBS-A 或者将其与 IBS-C 相区分。

[0541] 结论:(1) 开发了能以高灵敏度、准确性和精密度测定血清类胰蛋白酶水平的夹心 ELISA 法。该试验有高度的可重现性,并适于大量人血清的常规测试。(2) 我们采用该 ELISA 发现健康对照和 IBS 患者间类胰蛋白酶水平的显著差异。在 IBS 患者中,IBS-D 和 IBS-A 患者的类胰蛋白酶水平在统计上高于 IBS-C 患者。(3) 还发现 IBS 患者血清样品中其它肥大细胞标记物、组胺和 PGE_2 异常。这些标记物与类胰蛋白酶的联用可改善 IBS 诊断准确性。

[0542] 实施例 3. 用于鉴定 IBS 相关症状的存在或严重度的问卷。

[0543] 本实施例显示了可用于鉴定个体中一种或多种 IBS 相关症状的存在或严重度的问卷。该问卷可由所述个体在诊所或医师的诊室内完成,或者可以带回家并在该个体返回诊所或医师诊室,例如去抽血时提交。

[0544] 在一些实施方式中,所述问卷包含第一部分,其中含有一组问题要求个体对于一种或多种 IBS 相关症状的存在或严重度给出答案。该问卷通常包括针对鉴定 IBS 相关症状,例如胸部疼痛、胸部不适、胃灼热、常规量用餐后有不适饱胀感、不能吃完常规量的用餐、腹部疼痛、腹部不适、便秘、腹泻、胀气和 / 或腹胀的存在、严重度、频率和 / 或持续时间的问题。

[0545] 在某些情况中,所述问卷的第一部分包括罗马基金会董事会 (Rome Foundation

Board) 根据罗马 III 标准所编制问卷的全部问题或其子集,这些问题可获自 <http://www.romecriteria.org/questionnaires/>。例如,所述问卷可包括 <http://www.romecriteria.org/pdfs/AdultFunctGIQ.pdf> 中 Rome III Diagnostic Questionnaire for the Adult Functional GI Disorders(用于成人功能性 GI 疾病的罗马 III 诊断问卷)(附录 C) 第 920-936 页中所列的全部 93 个问题或其子集。该问卷的第一部分优选含有罗马 III 诊断问卷所列 93 个问题中的 16 个(见表 3)。或者,该问卷的第一部分可含有表 3 所示 16 个问题的子集(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 或 15)。作为非限制性示例,问卷中可包括表 3 所列以下 10 个问题:问题编号 2、3、5、6、9、10、11、13、15 和 16。本领域技术人员应理解该问卷的第一部分可包括与表 3 所示问题类似的关于疼痛、不适和 / 或排便稠度变化的问题。

[0546] 表 3. 鉴定 IBS 相关症状存在或严重度的问卷的示例性第一部分。

[0547]

1. 过去 3 个月内,您感到胸部中间疼痛或不适(与心脏问题无关)的频率如何?	① 从未 ① 低于每月 1 天 ② 每月 1 天 ③ 每月 2-3 天 ④ 每周 1 天 ⑤ 超过每周 1 天 ⑥ 每天
2. 过去 3 个月内,您发生胃灼热(胸部的烧灼样不适或烧灼样疼痛)的频率如何?	① 从未 ① 低于每月 1 天 ② 每月 1 天 ③ 每月 2-3 天 ④ 每周 1 天 ⑤ 超过每周 1 天 ⑥ 每天
3. 过去 3 个月内,您在常规量用餐后有不饱胀感的频率如何?	① 从未 → ① 低于每月 1 天 ② 每月 1 天 ③ 每月 2-3 天 ④ 每周 1 天

[0548]

	⑤ 超过每周 1 天 ⑥ 每天
4. 过去 3 个月内,您不能吃完常规量的用餐的频率如何?	① 从未 → ② 低于每月 1 天 ③ 每月 1 天 ④ 每月 2-3 天 ⑤ 每周 1 天 ⑥ 超过每周 1 天 ⑦ 每天
5. 过去 3 个月内,您在腹部中间,肚脐上方但并非胸中感到疼痛或不适的频率如何?	① 从未 → ② 低于每月 1 天 ③ 每月 1 天 ④ 每月 2-3 天 ⑤ 每周 1 天 ⑥ 超过每周 1 天 ⑦ 每天
6. 过去 3 个月内,您感到腹部任何位置不适或疼痛的频率如何?	① 从未 → ② 低于每月 1 天 ③ 每月 1 天 ④ 每月 2-3 天 ⑤ 每周 1 天 ⑥ 超过每周 1 天 ⑦ 每天
7. 在过去 3 个月内,您排便次数少于每周 3 次(0-2 次)的频率如何?	① 从不或很少 ② 有时 ③ 经常 ④ 大多数时候 ⑤ 总是这样
8. 过去 3 个月内,您发生排便困难或大便结块的频率如何?	① 从不或很少 ② 有时 (25% 的时间) ③ 经常 (50% 的时间) ④ 大多数时候(75%的时间) ⑤ 总是这样
9. 过去 3 个月内,您在排便时感觉费力的频率如何?	① 从不或很少 ② 有时 ③ 经常 ④ 大多数时候

[0549]

	④ 总是这样
10. 过去 3 个月内, 您在排便后有排便不尽感的频率如何?	① 从不或很少 ① 有时 ② 经常 ③ 大多数时候 ④ 总是这样
11. 过去 3 个月内, 您在排便时感觉大便难以排出(即, 堵塞)的频率如何?	① 从不或很少 ① 有时 ② 经常 ③ 大多数时候 ④ 总是这样
12. 过去 3 个月内, 您为了完成排便按压肛门处或肛周或者清除大便的频率如何?	① 从不或很少 ① 有时 ② 经常 ③ 大多数时候 ④ 总是这样
13. 前述问题 27-32 中所列的便秘症状是否在超过 6 个月以前开始?	① 否 ① 是
14. 过去 3 个月内, 您发生大便松软、呈糊状或水样便的频率如何?	① 从不或很少 → ① 有时 (25% 的时间) ② 经常 (50% 的时间) ③ 大多数时候(75%的时间) ④ 总是这样
15. 过去 3 个月内, 您感觉胀气或腹胀的频率如何?	① 从不 → ① 低于每月 1 天 ② 每月 1 天 ③ 每月 2-3 天 ④ 每周 1 天 ⑤ 超过每周 1 天 ⑥ 每天
16. 您的胀气或腹胀症状是否开始于超过 6 个月以前?	① 否 ① 是

[0550] 在其他实施方式中, 所述问卷包含第二部分, 其中含有一组问题要求个体对于关联 IBS 相关疼痛或不适的负面想法或感受的存在或严重度给出答案。例如, 所述问卷可以包括问题用于鉴定个体经历一种或多种 IBS 症状相关的疼痛或不适时焦虑、恐慌、神经质、担忧、忧虑、苦恼、紧张、抑郁、无望、绝望、悲观、疑虑和 / 或消极的存在、严重度、频率和 / 或持续时间。

[0551] 在某些情况中, 问卷的第二部分包括 Sullivan 等, The Pain Catastrophizing Scale :Development and Validation (疼痛悲惨评级 :开发与验证), Psychol. Assess., 7 :

524-532(1995) 中所述问卷中的全部问题或其子集。例如,所述问卷可包括由个体按疼痛悲惨评级 (PCS) 来回答的一组问题,该评级表明所述个体在经历疼痛时有某些负面想法和感受的程度:0 = 完全没有;1 = 程度轻微;2 = 程度中等;3 = 程度严重;4 = 总是。问卷的第二部分可含有涉及鉴定关联 IBS 相关疼痛或不适的负面想法或感受的存在或严重度的 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15 个或更多问题或陈述。作为非限制性示例,可要求个体对他或她在经历疼痛时有一种或多种下列想法的程度作评级:“我总在紧张疼痛会不会结束”;“我觉得我再也受不了了”;“我变得担心疼痛会更厉害”;“我急切想要疼痛结束”;和“我一直在想有多疼”。本领域技术人员应理解所述问卷可包含涉及关联 IBS 相关疼痛或不适的负面想法或感受的类似问题。

[0552] 在一些实施方式中,所述问卷仅包括问卷第一部分的问题或其子集(参见如表 3)。在其它实施方式中,所述问卷仅包括问卷第二部分的问题或其子集。

[0553] 由所述个体完成问卷后,可将对应于各问题答案的数量加和,所得数值可以与来自所述个体的样品中一种或多种诊断标记物的分析联合并用本文所述统计算法处理以提高 IBS 预测的准确性。

[0554] 或者,所述个体对问题“您是否正经历任何症状?”的“是”或“否”的答案可与本文所述一种或多种生物标记物的分析联合并用单个统计算法或统计算法的组合来处理以提高 IBS 预测的准确性。

[0555] 实施例 4. 基于血液的诊断试验用于诊断肠易激综合征 (IBS)

[0556] 本实施例描述了首个针对肠易激综合征 (IBS) 的基于血液的生物标记物测试。该测试能帮助临床医师诊断 IBS。用采集自公认的 IBS 专家和 GI 诊所明确的 IBS 样品证实下文所述 IBS 诊断。样品为罗马 II 或罗马 III 阳性且患者诊断为 IBS 已超过 1 年。该测试的灵敏度为 50%,特异性为 88%,总体准确性为 70%。

[0557] 用于开发本试验的总群体由 1,721 例血清样品组成。所用验证组由 516 例血清样品组成,其中 50%根据罗马 II 或罗马 III 标准诊断有 IBS;36%是非 IBS 疾病对照;14%是正常健康对照。试验的灵敏度为 50%而特异性为 88%。在确认 IBS 时,其中医师确定患者中疾病概率为约 75%,94%的阳性测试结果为真阳性,而 38%的阴性结果为真阴性。在排除 IBS 时,其中医师确定患者中疾病概率为约 25%,86%的阴性测试结果为真阴性,而 61%的阳性结果为真阳性。

[0558] 该试验涉及生物标记物的定量分析与由随机森林分类器和神经网络分类器组成的双重学习型统计分类系统。

[0559] 试验的样本要求为医师获取 2.0ml 的分离血清,例如,在 SST 管中。为了最佳结果,样品应当在采样 2 小时内离心并冷藏。当试验检测前需要运输样品时,所述样品应当是冷藏或冷冻的。为了最佳结果,样品在使用前的保藏若为 4℃则不应超过 7 天,若为冷冻则不超过 30 天。

[0560] 简要说,对 IBS 生物标记物 ASCA-IgA、CBir1、ANCA 和 tTG 用特异性抗体来进行酶联免疫吸附试验 (ELISA)。此外,对 IBS 生物标记物 BDNF、NGAL、TWEAK、GRO- α 、IL-1 β 和 TIMP-1 进行化学发光试验。表 4 提供健康对象中这些标记物正常范围的参考数值。

[0561] 表 4. IBS 试验中所测标记物的参考值。

[0562]

标记物	参考水平
BDNF(脑源性神经营养因子)	7536.5-31324.4pg/ml •
NGAL(中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白)	28.3-272.5ng/ml
TWEAK(TNF- 相关弱凋亡诱导因子)	351.6-1751.7pg/ml
GRO- α (生长相关癌基因 α)	26.4-499.3pg/ml
IL-1 β (白介素-1 β)	279.5-1358.6fg/ml
TIMP-1(金属蛋白酶组织抑制剂-1)	156.1-410.6ng/ml
ASCA-IgA(抗酿酒酵母抗体)	< 20.0EU/ml
CBir1(抗CBir-1抗体)	< 21.0EU/ml
ANCA(抗人嗜中性粒细胞胞质抗体)	< 12.1EU/ml
tTG(抗人组织转氨酶IgA)	< 4.0U/ml

[0563] 在某些情况中,来自上述 IBS 生物标记物检测的信息可以和患者所提供的症状信息联用。例如,患者可以填写其症状自评量表,其中的信息可以和来自 IBS 生物标记物的信息联合以进一步帮助临床医师诊断 IBS。表 5 提供可以此方式使用的自评量表示例。

[0564] 表 5. 通常与 IBS 相关症状的示例性患者自评量表。

[0565]

IBS 症状自评量表
请填写并在下次会面时带来。
姓名 _____
会面日期 _____
请在目前有或过去曾经有的症状旁打勾。请注意这些症状发生的频率。
_____ 再发性腹痛或不适
_____ 排便频率异常(排便次数大于每日 3 次或小于每周 3 次)
_____ 大便形态异常(结块/硬结或松散/水样便)
_____ 大便排出异常(难便, 急便, 或感觉排便不尽)
_____ 粘液排出
_____ 胀气或感觉腹胀
_____ 泛气
_____ 紧迫感 (需要快速找到卫生间)

[0566] 实施例 5. 在肠易激综合征患者血清中鉴定新型代谢物。

[0567] 5-羟色胺是通过色氨酸脱氢酶催化从色氨酸转化而来。体内超过 95% 的 5-HT 是由胃肠道的肠嗜铬细胞所释放。已知 5-HT 通过位于肠神经系统的粘膜下层和肠肌层的神经元的多种受体亚型所起作用,在 GI 道的正常功能中发挥关键作用。5-HT 的异常水平与肠易激综合征的发病机理相关联。

[0568] 5-HT (羟色胺) 在 GI 活动、分泌和感知中发挥重要作用。5-羟色胺能治疗作用于 5-HT 受体,有效改善 IBS 患者经历的症状。研究 5-HT 代谢物可鉴定能用于准确诊断 IBS 的生物相关生物标记物。

[0569] 在来自 12 例 IBS-C, 24 例 IBS-D, 14 例 IBS-M 患者和 38 例健康对象的样品中用高效液相色谱法 (HPLC) 研究了血清代谢物。我们开发并优化了高通量 HPLC 方法,采用允许我们在 IBS 和健康对照样品中分离超过 20 个峰的联苯柱。就 5-HT 及其代谢物的水平比较来自相同对象的血浆、血清和尿液样品。

[0570] 简要来说,血清样品根据已批准的 IRB (普罗米修斯公司 08IBS04 方案) 采集在 SST 管中。300ul 人血清用 60ul 异丙醇和 360ul 乙腈除蛋白。然后将混合物以 2000x g 离心 15 分钟。含有代谢物的上清液转至第二试管并用 Speed Vac Plus (型号 SC110A) 浓缩。干的团块用 160ul 水重建,其中 100ul 进样至 HPLC 系统 (安捷伦 1200)。

[0571] 液相色谱采用安捷伦 1200HPLC 系统进行,该系统由四元泵、自动进样器、DAD 和 FLD 组成。色谱分离在 Varian Pursuit Diphenyl 5 μ m 4.6x 150mm 柱上进行,由 Metaguard Pursuit XR 10 μ m C18 保护柱,以及 SunFire 5 μ m 4.6x20mm C18 保护柱加以保护。对于分析的最初 20 分钟,采用 100% 缓冲液 A 到 100% 缓冲液 B 的梯度。55 分钟后,在 1 分钟内将流动相从 100% 缓冲液 B 变为 100% 缓冲液 A。然后保持 10 分钟 100% 缓冲液 A 以为下次进样作准备。流动相 A 由用冰醋酸调至 pH 4 的 10mM 乙酸钠缓冲液组成。流动相 B 与缓冲液 A 相同但含有 12% 甲醇。5-HT 以及其它吲哚采用设置为 225 激发和 342 发射的 FLD 检测。色氨酸和犬尿氨酸分别用波长设置为 278 和 360 的 UV 检测。

[0572] 测定于 25°C 在 $E_{ox} = 0.65V$ 下进行。校正曲线在 10-200pg/mL 范围内为线性。按国际接受的标准进行方法验证。血液采集自健康对照和 IBS 对象。

[0573] 在分析后,鉴定了多个已知分析物,例如色氨酸和 5-HT 及其代谢物 5-HT-O-S 和犬尿氨酸,以及保留时间分别为荧光检测器的 7.5 分钟、13.5 分钟、52 分钟和 UV 检测器的 20 分钟的多个新型代谢物。该分析的代表性色谱图如图 14 所示。图 15 显示各生物标记物的水平。

[0574] 由表 6 可见,用内标标准化后,所有 3 种 IBS 亚型中的血清 5-HT 浓度都低于健康对照,健康对象的中值 AUC 为 94.5,而 IBS-C、IBS-D 和 IBS-M 分别为 66.85、48.3 和 46.25。用 5-HT 标准化后,所有 3 种 IBS 亚组中 7.5 分钟和 13.5 分钟峰的曲线下面积都更高。IBS-D 患者的 20 分钟 UV 峰水平高于 IBS-C、IBS-M 和健康志愿者。这些发现提示血清代谢物可用作 IBS 诊断的生物标记物。图 16 显示了血清代谢物的预测力。

[0575] 表 6. HPLC 分析血清代谢物的结果。

[0576]

峰	均值				中值				S.E.			
	IBS-C	IBS-D	IBS-M	H/C	IBS-C	IBS-D	IBS-M	H/C	IBS-C	IBS-D	IBS-M	H/C
20 分钟 UV (未知)	88.5	114.1	90.8	83.0	66.3	108.9	75.9	67.8	22.2	13.9	12.9	11.1
30 分钟 UV (未知)	380.3	569.0	466.7	359.3	267.2	388.4	372.5	256.6	124.8	112.2	70.0	51.7
5-HT/IS	89.0	51.3	52.1	97.5	66.9	48.3	46.3	94.1	23.9	8.7	8.3	9.6
7.5 分钟 FLD/5-HT	7486.0	4413.0	3233.0	1148.0	948.0	1583.0	2219.0	806.2	4660.0	1242.0	814.6	149.2
13.5 分钟 FLD/5-HT	699.2	299.2	193.3	75.6	76.4	97.8	163.8	42.1	524.5	94.5	43.5	13.9

[0577] 实施例 6. 炎性细胞因子处理对人血细胞中的 5-HT 代谢和肥大细胞活化的影响。

[0578] 肠易激综合征是多因素功能性 GI 疾病。已显示局部肠粘膜的炎性刺激是 IBS 疾病发生的触发因素。5- 羟色胺失调,肥大细胞活化和应激响应都对该疾病的发病机理有贡献。本实施例提供了对这些途径的相互作用的研究,该研究在用炎性细胞因子处理的健康志愿者血液样品中进行。测定 5-HT 代谢和应激标记物与肥大细胞的血浆水平的变化。发现炎性刺激改变色氨酸和 5-HT 代谢。类似地,血浆犬尿氨酸和 5-HT-O-S 水平受 TNF- α 处理上调。IL-1 β 刺激导致肥大细胞活化标记物 PGE₂ 的水平升高。定量 5-HT 生物合成酶 (TPH-1) 和代谢酶 (MAO) 可发现这些酶的转录物被细胞因子改变。对这些途径之间相互作用的理解帮助我们鉴定用以协助临床诊断的生物学相关生物标记物。

[0579] 肠易激综合征是异质性疾病。越来越多证据表明免疫系统参与其发病机理。肠胃传染可作为症状发生的触发因素。IBS 常被描述为“脑 - 肠疾病”。胃肠活动和分泌的变更可能是排便习惯不规律的原因,这可能由 5- 羟色胺信号系统的失调介导。近结肠神经处的活化肥大细胞与 IBS 患者中的异常疼痛有关。熟知肥大细胞能在活化后释放和生成多种炎性介导体。尚不明确这些途径如何彼此通信以及 IBS 患者中的相互作用表现是否与健康对象中相同。

[0580] 如下采集并处理血液样品。将来自健康志愿者的新鲜人血液样品采集到肝素管中。样品等分入 7 个 15ml 的普通管并用炎性细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 、TIMP1、NGAL、2-Plex(BDNF 和 TWEAK)、5-Plex(Gro- α 、ASCA、ANCA、tTG、CBir1) 在细胞培养箱中 37 $^{\circ}$ C 处理 2 天。为了测量样品中的代谢物水平,用异丙醇和乙腈从 300 μ l 经处理血浆样品中提取化学物。代谢物用联苯柱 (安捷伦系统) 通过 HPLC 分离。该机器在 0-12% 甲醇梯度下运行 20 分钟,然后在 12% 甲醇下等度运行 55 分钟。5-HT 和其它吲哚采用设置为 225 激发和 342 发射的 FLD 检测。色氨酸和犬尿氨酸分别用波长设置为 278 和 360 的 UV 检测。该分析的代表性色谱图如图 17 所示。如图 18 和表 7 中所见,血液样品的 TNF- α 处理显著刺激色氨酸和 5-HT 代谢,导致犬尿氨酸和 5-HT-O-S 生成提高。

[0581] 表 7. 炎性细胞因子处理对血液样品中色氨酸、犬尿氨酸和 5-HT-O-S 水平的影响。

[0582]

处理	色氨酸	犬尿氨酸	5-HT-O-S
----	-----	------	----------

空白	2, 851. 90	17. 10	56. 50
IL1b	3, 865. 96	54. 90	86. 70
TIMP1	3, 903. 20	71. 10	85. 00
TNF α	3, 471. 10	147. 56	124. 67
2Plex	3, 950. 35	22. 70	91. 20
5Plex	3, 857. 94	26. 30	92. 60

[0583] MAO、TPH1 和 SERT 表达概况分析 :将 2. 4ml 的各经处理血液样品添加到 Paxigen 管中,按生产商方案制备总 RNA。将 200ng 总 RNA 逆转录成 cDNA,随后通过 qPCR 反应用 200ng cDNA 进行定量 (ABI 7000 系统)。

[0584] 免疫标记物的测定 :用 ELISA 测定肥大细胞标记物、5-HT 和尿皮素 (Ucn)。类胰蛋白酶和 Ucn 用普罗米修斯公司开发的试验测定。PGE₂、组胺和 5-HT 用市售试验测定。如表 8 和图 19 中所见,Ucn 水平响应 TNF- α 、TIMP1 和 NGAL 处理而显著升高。如表 9 和图 20 中所见,肥大细胞标记物 PGE₂ 响应 IL-1 β 处理而显著升高。

[0585] 表 8. 炎性细胞因子处理对 Ucn 释放水平的影响

[0586]

处理	Ucn ng/ml
空白	NA
5-plex	NA
2plex	NA
IL-1b	NA
NGAL	14. 7+8. 5
TIMP1	37. 8+2. 1
TNF α	42. 8+1. 1

[0587] 表 9. 炎性细胞因子处理对肥大细胞标记物水平的影响。

[0588]

处理	肥大细胞标记物		
	类胰蛋白酶	PGE ₂	组胺
空白	19.8+1.1	1621.7+89.1	294.9+43.3
5plex	20.5+1.3	1505.8+105.5	269.2+18.2
2plex	21.7+0.7	1916.8+126.4	279.7+29.8
IL-1 β	20.7+0.74	5588.6+560.8	257.3+35.3
NGAL	20.3+1	1700.3+23.6	265.5+20.0
TIMP-1	21.2+0.27	1818.5+185.1	261.6+30.5
TNF- α	20.4+2.0	2394.3+83.4	208.8+28.9

[0589] 本实施例证明 TNF- α 处理引起健康人血细胞中色氨酸代谢物犬尿氨酸和 5-HT 代谢物 5-HT-O-S 的释放提高。色氨酸和 5-HT 代谢的改变可能是由于细胞因子处理诱导血细胞中的 5-HT MAO 和 TPH1 表达改变。此外,发现肥大细胞标记物 PGE₂ 的水平在 IL-1 β 处理新鲜全血后显著升高。进一步研究 IBS 患者血液细胞中细胞因子响应可以对影响 IBS 发病机理的途径中的机制性相互作用有所揭示。

[0590] 实施例 7. 发现酪氨酸、苯丙氨酸和 5-羟色胺可作为鉴定 IBS 及其亚型的可用代谢物生物标记物。

[0591] 5-羟色胺 (5-羟基-色胺, 5-HT) 在胃肠 (GI) 活动、分泌和感知中发挥重要作用。5-HT₃ 受体拮抗剂阿洛司琼已获批用于治疗重度腹泻主导型女性肠易激综合征 (IBS) 患者,而 5-HT₄ 受体激动剂替加色罗已获批用于治疗便秘主导型 IBS 患者。由于 5-HT 在 IBS 中的显著作用,血清中 5-HT 及其代谢物的分析可鉴定能用于 IBS 准确诊断的生物学相关生物标记物。为此目的,已采用高效液相色谱法 (HPLC) 分析来自 IBS 患者和健康对照 (HC) 对象的血清代谢物,探寻新型生物标记物。事实上,发现了多种潜在的生物标记物,它们在 IBS 患者与 HC 对象中显示不同的浓度。为了鉴定这些新型生物标记物,进行合并的人血清样品的大规模提取和 HPLC 纯化,用于分离这些标记物并用质谱分析来确定其化学结构。标记物之一被鉴定为 5-HT 本身,而另两个分离的标记物被鉴定为酪氨酸和苯丙氨酸,随后通过向人血清样品中掺入合成的酪氨酸和苯丙氨酸证实了分析 HPLC 中这些标记物峰的特性。发现在 HC 对象中的 5-HT 血清水平高于 IBS 患者,而 IBS 患者亚型具有不同水平的酪氨酸和苯丙氨酸。酪氨酸和苯丙氨酸水平的测定与 IBS 诊断有关联,因为这两种氨基酸是肠神经系统重要调节子多巴胺、去甲肾上腺素、和肾上腺素生物合成的前体。

[0592] 尽管 IBS 的病因学仍不明了,有证据表明在 IBS 中有多种病理生理学途径失调,包括 5-羟色胺 (5-HT) 生物合成与代谢,肥大细胞浸润,内脏超敏感性,应激响应和细菌感染 (感染后 IBS)。其中,5-HT 系统在 GI 生理学和病理生理学中起重要作用,且多种 5-HT 受体激动剂和拮抗剂已获准用于治疗 IBS 或正对此进行临床开发。为此,对 IBS 患者血清样品中 5-HT 及其代谢物作为潜在生物标记物的鉴定可推动 IBS 的准确诊断并提供更好的治疗。为此目的,已开发高效液相色谱法 (HPLC) 方法以鉴定来自 IBS 患者和健康对照 (HC) 对象的血清样品中的潜在生物标记物。

[0593] 用于 HPLC 分析的血清样品的制备:根据 IRB 批准方案将 IBS 患者血清样品采集入

SST 管并从志愿者获得健康对照血清样品。为制备用于 HPLC 分析的血清样品,将 300 μ L 血清通过和 60 μ L 异丙醇与 360 μ L 乙腈在 Eppendorf 管中涡旋并将混合物在 2000Xg 离心 15 分钟来完成除蛋白。含有血清代谢物的上清液转至第二 Eppendorf 管并用 Speed Vac Plus 浓缩器(型号 SC110A)将溶剂蒸发。干的团块用 160 μ L 水重建,其中 100 μ L 进样至 HPLC 系统(安捷伦 1200)供分析。

[0594] 分析 HPLC 过程:分析所用的 HPLC 系统是安捷伦 1200 型 HPLC 系统,由二元泵、自动采样器、DAD 检测器和 FLD 检测器组成。代谢物的分离在 4.6x150mm, 5 μ m, Varian Pursuit Diphenyl 柱上进行,由串联的 10 μ m, C18 Metaguard Pursuit XR 保护柱以及 4.6x20mm, 5 μ m, C18 Sun Fire 保护柱加以保护。流动相 A 由用冰乙酸缓冲至 pH4.0 的 10mM 乙酸钠溶液组成,而流动相 B 是含 12% 体积甲醇的流动相 A。通过以 1 毫升/分钟的流速用 20 分钟从 100% 流动相 A 改变至 100% 流动相 B 的梯度然后以 100% 流动相 B 保持 35 分钟来室温进行 HPLC 分析。在 55 分钟时,流动相在 1 分钟内从 100% B 变为 100% A,并在 100% A 保持 10 分钟以准备进行下一分析。5-HT 以及其它含吲哚分子用设置为激发波长 225nm 和发射波长 342nm 的 FLD 检测器来检测。犬尿氨酸和其它代谢物用 DAD 检测器来检测,UV 波长分别设置为 278 和 360nm。

[0595] 代谢物的大规模分离与鉴定:为确定 HPLC 分析中所鉴定生物标记物峰的化学结构,用 3D BioOptima 进行合并血清样品的大规模纯化并用质谱确定所分离代谢物标记物的结构。

[0596] 图 22 显示来自 IBS 患者(图 22, a、b 和 c 小图)和健康对照对象(d、e 和 f 小图)的血清样品所作 HPLC 分析所得的代表性色谱图。a 和 d 小图中的峰由 278nm 的 UV 吸收测得,而 b 和 e 小图中的峰由 360nm 的 UV 吸收测得。c 和 f 小图中的峰由荧光检测监测。如图 22 中所见,洗脱于 7.5、13.5 和 17.2 分钟的 3 个主峰(表示在框中)显示 IBS 和 HC 血清样品之间的峰面积差异。还注意到 IBS 和 HC 血清样品之间其它洗脱峰的峰面积差异,但它们不那么显著。由于 IBS 和 HC 对象之间 7.5、13.5 和 17.2 分钟峰面积的显著差异,用 HPLC 方法评估了所有采集的血清样品。图 23 显示在获自 IBS-C、IBS-D、IBS-M 和 HC 对象的血清样品中所述三个峰水平的统计分布。如图 23 中所见,发现 HC 对象的 17.2 分钟峰的血清水平高于 IBS 患者,而 IBS 患者亚型具有不同水平的 7.5 和 13.5 分钟峰。通过在 HPLC 分析中与掺入 5-HT 标准品共洗脱将 17.2 分钟的洗脱峰方便地鉴定为 5-HT,但 7.5 和 13.5 分钟峰的身份尚未知。为确定这两个峰的化学结构,进行合并血清样品的大规模纯化以分离这两个峰中存在的化合物并通过质谱确定其结构。图 24 显示质谱对 7.5 分钟峰的结构说明,确定其身份为酪氨酸,而图 25 显示质谱对 13.5 分钟峰的结构说明,确定其身份为苯丙氨酸。图 26 显示标准 D- 酪氨酸掺入血清样品产生线性剂量依赖性响应曲线所得的 HPLC 分析结果,图 27 显示标准 L- 苯丙氨酸掺入血清样品产生线性剂量依赖性响应曲线所得的 HPLC 分析结果。

[0597] 该研究中,开发了 HPLC 方法来分析获自 IBS 患者和健康对照对象的血清样品中存在的代谢物,探寻用于 IBS 诊断的潜在生物标记物。发现 3 个主峰,其对应于酪氨酸、苯丙氨酸和 5- 羟色胺。发现在健康对照对象中的 5- 羟色胺血清水平高于 IBS 患者,而 IBS 患者亚型具有不同水平的酪氨酸和苯丙氨酸。在 5- 羟色胺水平以外,酪氨酸和苯丙氨酸水平的测定也与 IBS 诊断有关联,因为这两种氨基酸是肠神经系统的重要调节子多巴胺、去甲

肾上腺素、和肾上腺素生物合成的前体。

[0598] 实施例 8. TNF α 处理导致色氨酸代谢物犬尿氨酸和 5-HT 代谢物 5-HT-O-SO₃H 的释放提高。全血细胞中 IL-1 β 处理提高 PGE₂ 而 TNF α 和 TIMP1 处理提升尿皮素水平。

[0599] 肠易激综合征 (IBS) 是多因素功能性胃肠 (GI) 疾病。已认为局部肠粘膜的炎性刺激是 IBS 疾病发生的一种触发因素。参与 5-羟色胺 (5-HT) 失调, 肥大细胞活化和应激响应的途径都对该疾病的发病机理有贡献。为了尝试寻找用于 IBS 诊断的生物标记物, 在用炎性细胞因子所处理来自健康志愿者的全血样品中研究这些途径的相互影响。测定 5-HT 代谢和肥大细胞活化与应激标记物的水平的变化。发现炎性细胞因子刺激改变色氨酸和 5-HT 代谢。血浆犬尿氨酸和 5-HT-O-SO₃H 水平受 TNF- α 处理而上调。IL-1 β 刺激导致肥大细胞活化标记物 PGE₂ 的水平升高。5-HT 生物合成酶 (TPH1) 和代谢酶 (MAO)mRNA 水平的测定表明这些酶的转录物受细胞因子处理影响。因此, 对这些途径之间相互作用的理解能帮助我们鉴定用以协助 IBS 临床诊断的生物学相关标记物。

[0600] 血液样品采集和处理: 将来自健康志愿者的新鲜人血液样品采集到肝素管中。所采集的样品等分入 7 个 15ml 的普通管并用炎性细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 、TIMP1 (基质金属蛋白酶组织抑制剂-1)、NGAL (中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白) 在细胞培养箱中 37°C 处理 2 天。

[0601] 代谢物测定: 用异丙醇和乙腈提取来自各 300 μ L 经处理血浆样品的产物, 用联苯柱在安捷伦 HPLC 系统上分析提取物。代谢物的分离用含 0-12% 甲醇的 10mM pH 4.0 乙酸钠缓冲液的线性梯度进行 20 分钟, 然后用含 12% 甲醇的同一缓冲液等度运行 35 分钟。吲哚代谢物和 5-HT 用设置为激发波长 225nm 和发射波长 342nm 的 FLD 检测器来检测。色氨酸和犬尿氨酸分别用波长设置为 278nm 和 360nm 的 UV 检测。

[0602] MAO、TPH1 和 SERT 表达概况分析: 将来自各经处理血液样品的 2.4ml 等分样品添加到 PAXgen 管中, 按生产商方案制备总 RNA。将 200ng 总 RNA 等分样品逆转录成 cDNA, 用 200ng 所得 cDNA 通过 qPCR 反应进行定量 (ABI7000 系统)。

[0603] 免疫标记物的测定: 类胰蛋白酶和 Ucn (尿皮素) 用普罗米修斯公司开发的试验测定。PGE₂、组胺和 5-HT 用市售 ELISA 试验测定。

[0604] 图 28 显示 5-HT 途径及其在 IBS 病理生理学中的参与。5-HT₃ 受体拮抗剂阿洛司琼 (Lotronex) 已获批用于治疗重度腹泻主导型女性 IBS 患者, 因为它阻断 5-HT₃ 受体的活化, 所述活化导致肠分泌、推进和疼痛的刺激。表 10 显示全血细胞中细胞因子处理对 5-HT 途径代谢物水平的影响, 而图 29 显示全血细胞中细胞因子处理对 5-HT 途径代谢酶的转录物水平的影响。如表 10 所见, TNF α 处理显著提高代谢物犬尿氨酸和 5-HT-O-SO₃H 的相对水平, 表明该细胞因子刺激色氨酸和 5-HT 代谢, 这导致犬尿氨酸和 5-HT-O-SO₃H 合成提高。用 IL-1 β 和 TIMP1 处理未见对 5-HT 途径代谢物的不同效果。

[0605] 相反, 全血细胞的 TNF α 处理抑制 MAO 转录但不抑制 TPH1, 而 IL-1 β 处理显著提高 TPH1 的转录水平但对 MAO 无此影响 (见图 29)。TIMP1 处理也轻微提高 TPH1 的转录水平但抑制 MAO 的转录水平, 而 NGAL 处理看来对这两种转录物没有多大影响。SERT 的转录水平在任何经处理细胞中都无法测得。表 11 和图 30 显示全血细胞的细胞因子处理产生的肥大细胞活化标记物的水平。用 IL-1 β 处理显著提高标记物 PGE₂ 的水平, 但用 NGAL、TIMP1 和 TNF α 处理未见其它标记物水平的显著改变。图 31 显示全血细胞的细胞因子处理所产

生的应激响应标记物尿皮素 (Ucn) 的水平。尿皮素水平通过 $\text{TNF } \alpha$ 、TIMP1 和 NGAL 处理而显著提高,而 IL-1 β 处理无此效果。图 19 显示的图说明由本文所确定的一些标记物介导的胃肠系统中白细胞、肠嗜铬细胞、肥大细胞和血小板之间的相互作用。

[0606] 表 10. 细胞因子处理全血细胞产生的 5-HT 途径代谢物水平。

[0607]

细胞因子处理	色氨酸相对水平	犬鸟氨酸相对水平	5-HT-O-S03H 相对水平
未处理	2, 851. 90	17. 10	56. 50
IL-1 β	3, 865. 96	54. 90	86. 70
TIMP1	3, 903. 20	71. 10	85. 00
$\text{TNF } \alpha$	3, 471. 10	147. 56	124. 67

[0608] 表 11. 细胞因子处理全血细胞产生的肥大细胞活化标记物水平。

[0609]

细胞因子处理	类胰蛋白酶 (ng/mL)	PGE_2 (pg/mL)	组胺 (pg/mL)
未处理	19.8 $\pm$ 1.1	1621.7 $\pm$ 89.1	294.9 $\pm$ 43.3
IL-1 β	20.7 $\pm$ 0.74	5588.6 $\pm$ 560.8	257.3 $\pm$ 35.3
NGAL	20.3 $\pm$ 1	1700.3 $\pm$ 23.6	265.5 $\pm$ 20.0
TIMP1	21.2 $\pm$ 0.27	1818.5 $\pm$ 185.1	261.6 $\pm$ 30.5
$\text{TNF } \alpha$	20.4 $\pm$ 2.0	2394.3 $\pm$ 83.4	208.8 $\pm$ 28.9

[0610] 本实施例证明在健康人全血细胞中, $\text{TNF } \alpha$ 处理导致色氨酸代谢物犬尿氨酸和 5-HT 代谢物 5-HT-O-S03H 的释放提高。不受理论限制, 色氨酸和 5-HT 代谢物所见的改变可能由细胞因子处理诱导的血细胞中酶 MAO 和 TPH1 的表达改变所造成。

[0611] 如图 30 可见, 肥大细胞活化标记物 PGE_2 的水平在 IL-1 β 处理全血细胞后显著升高。此外, 如图 31 所示, 在全血细胞中, $\text{TNF } \alpha$ 和 TIMP1 处理还显著提高应激响应标记物尿皮素的水平。进一步研究 IBS 患者血细胞对细胞因子处理的响应可以对影响 IBS 发病机理的途径中的机制性相互作用有所揭示。

[0612] 参考文献:

[0613] 1. Barbara G 和 Cremon C. Serine proteases: new players in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. (丝氨酸蛋白酶: 腹泻主导型肠易激综合征中的新参与者) Gut. 2008 May; 57(5): 591-9.

[0614] 2. Barbara G, Wang B, Stanghellini V 等, Mast Cell-Dependent Excitation of Visceral-Nociceptive Sensory Neurons in Irritable Bowel Syndrome. (肠易激综合征中内脏-伤害性感觉神经元的肥大细胞依赖性激发) Gastroenterology 2007; 132: 26-37.

[0615] 3. Foley KF, Pantano C, Ciolino A, Mawe GM. IFN- γ and $\text{TNF- } \alpha$ decrease serotonin transporter function and expression in Caco2 cells. (IFN- γ 和 $\text{TNF- } \alpha$

降低 Caco2 细胞中的 5-羟色胺转运体功能和表达)Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 292 :G779-G784, 2007.

[0616] 4. Burczynski ME, Peterson RL, Twine NC, Zuberek KA, Brodeur BJ, Casciotti L, Maganti V, Reddy PS, Strahs A, Immermann F, Spinelli W, Schwertschlag U, Slager AM, Cotreau MM, Dorner AJ. Molecular classification of Crohn ' s disease and ulcerative colitis patients using transcriptional profiles in peripheral blood mononuclear cells. (用外周血单核细胞中的转录概况对克罗恩病和溃疡性结肠炎患者的分子分类)J Mol Diagn, 8 :51-61, 2006.

[0617] 虽然通过阐述和举例的方式详细描述了上述发明以清晰理解,但本发明技术人员应理解可在所附权利要求书范围内实施某些改变和修改。此外,本文提供的各参考文献通过引用全文纳入本文,就如同各参考文献单独通过引用纳入本文。

优化涂覆抗体

用不同量涂覆抗体的人类胰蛋白酶的剂量响应曲线

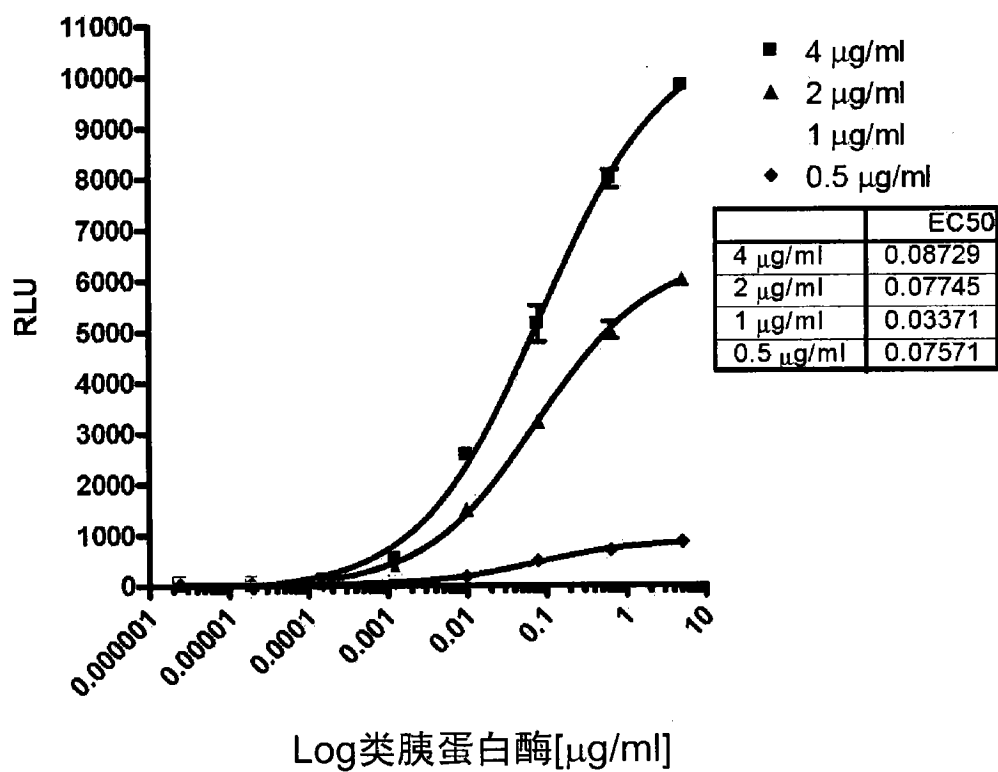


图 1

优化检测抗体

用不同稀释度检测抗体AP-G3的
类胰蛋白酶的剂量响应曲线

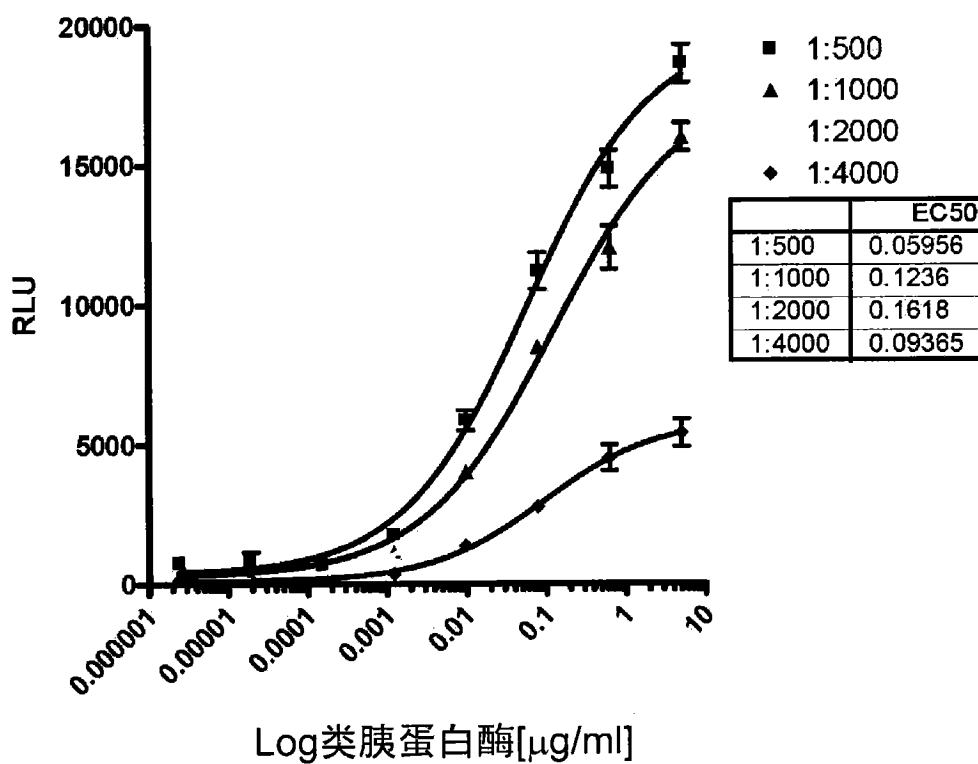


图 2

开发灵敏的人类胰蛋白酶ELISA用于
检测人血清中的类胰蛋白酶

类胰蛋白酶ELISA标准曲线

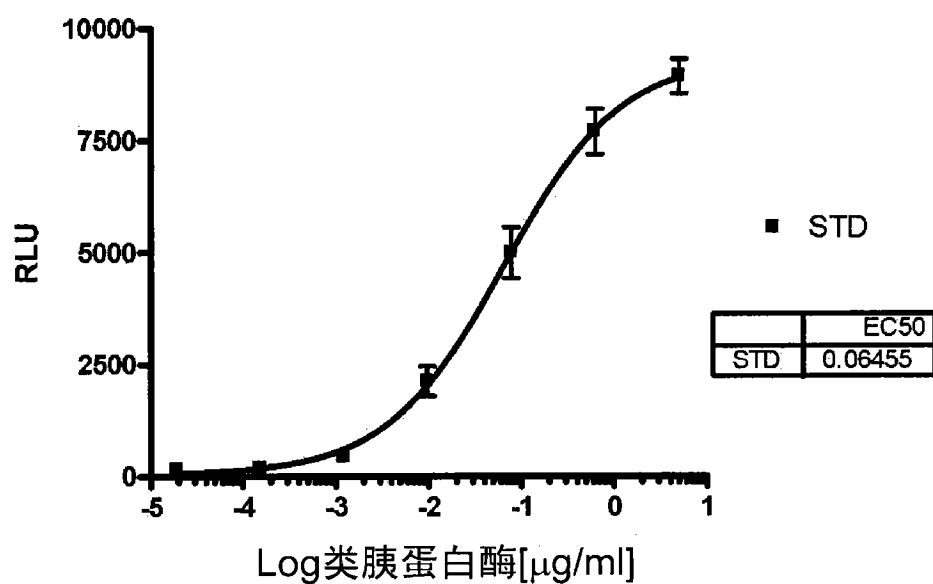


图 3

GI对照(71), IBS-C (61), 和IBS-D (203)

患者的血清中的人类胰蛋白酶浓度

数值表示为均值 (SEM)

*对于IBS-D的 $p = 0.0019$;

秩和U检验 (Mann Whitney U test)

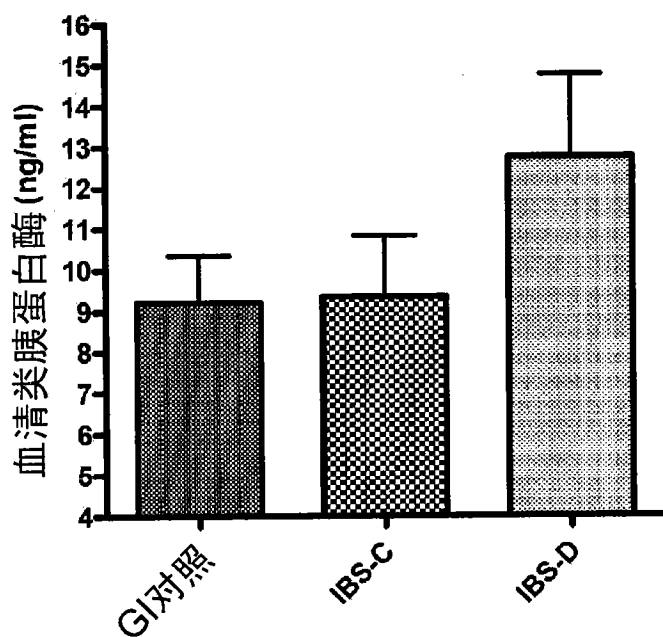


图 4

类胰蛋白酶对数值分布

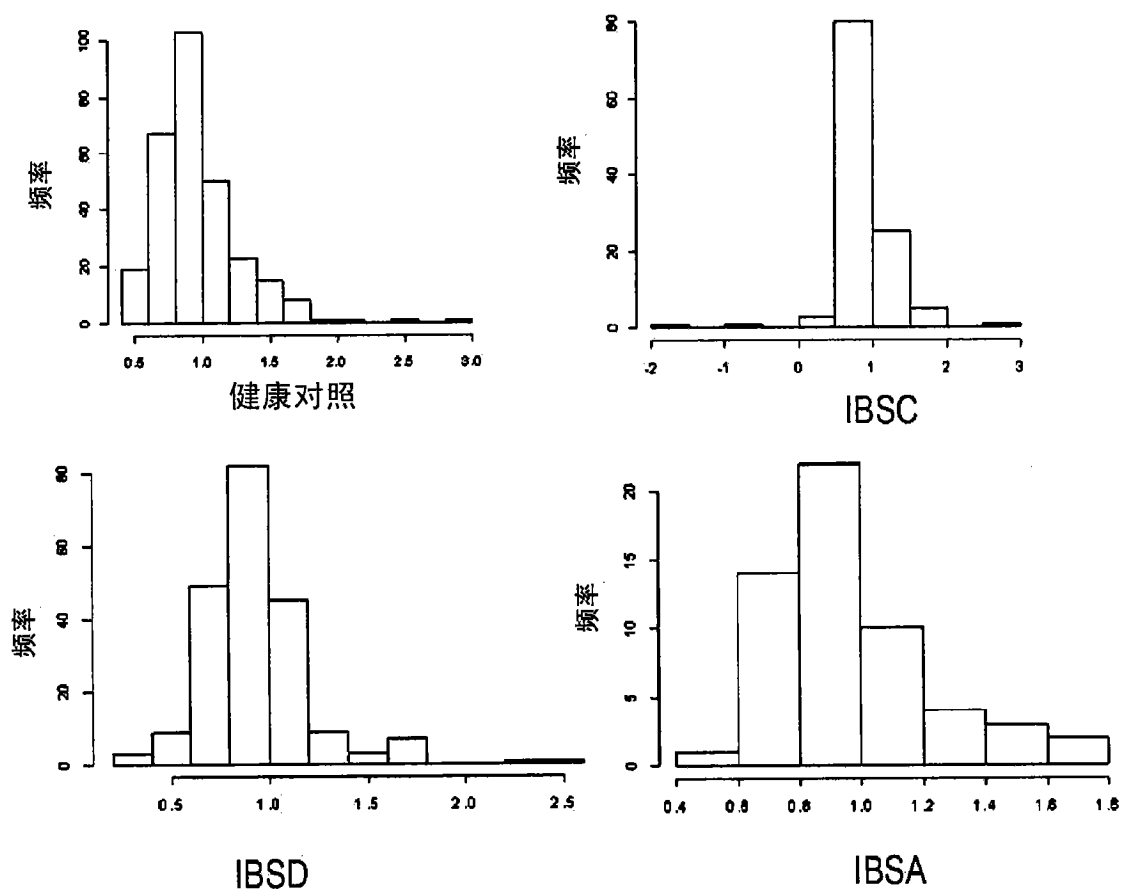


图 5

类胰蛋白酶数据的密度分析

06IBS03 组

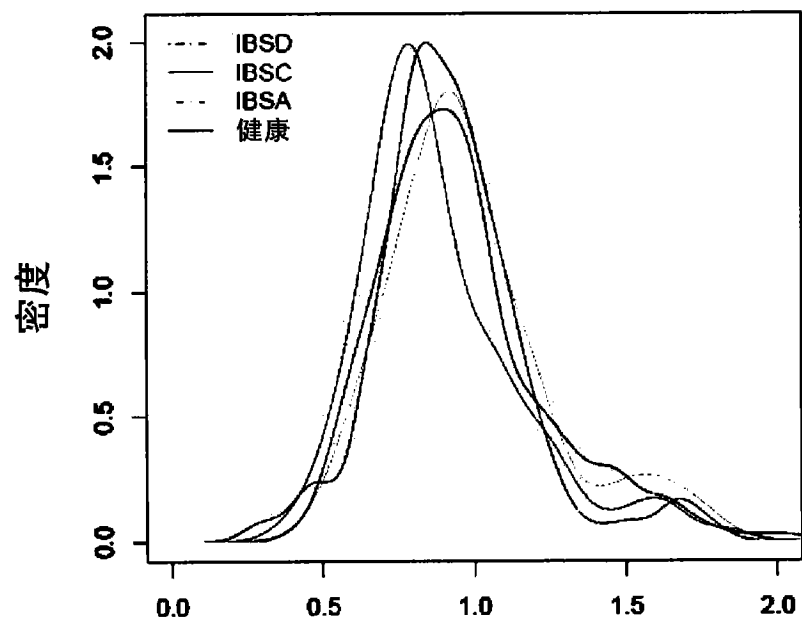


图 6

来自健康对照 (n=156), IBS-D (n=209), IBS-C (n=119),
和 IBS-A (n=57) 的血清中人类胰蛋白酶浓度

数值表示为均值 (SEM), 对于 IBS-D 的 $p < 0.05$; 秩和 U 检验

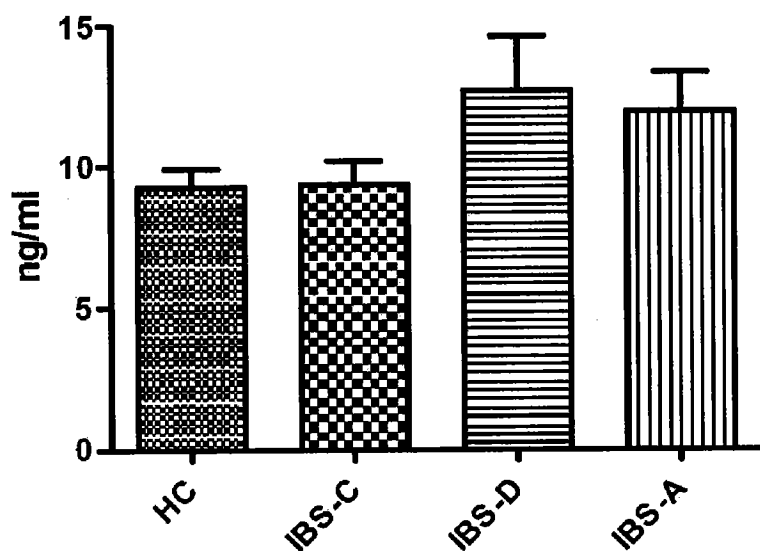


图 7

人类胰蛋白酶标准曲线

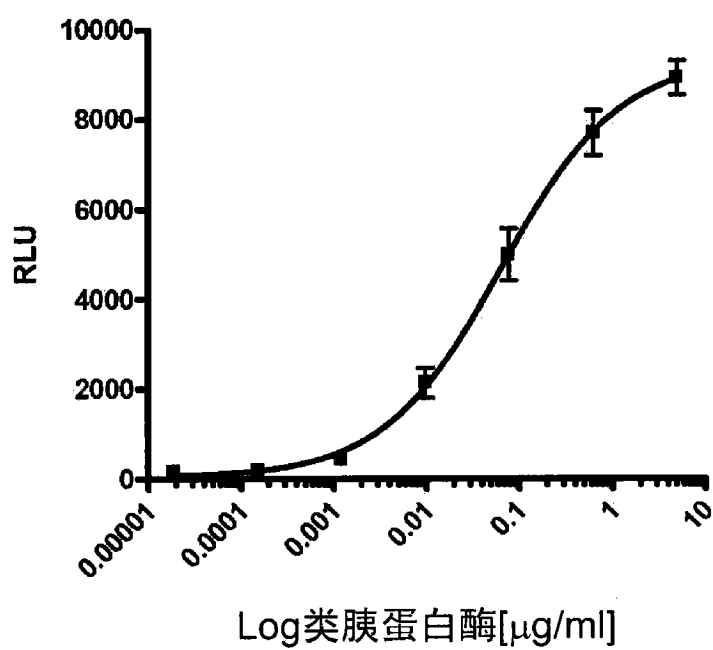


图 8

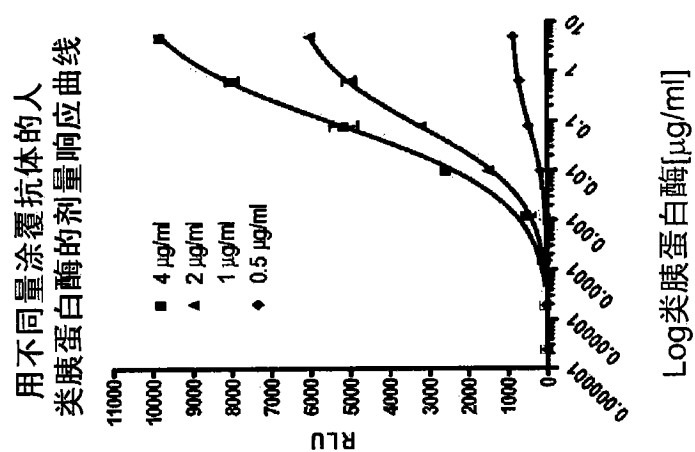


图 9A

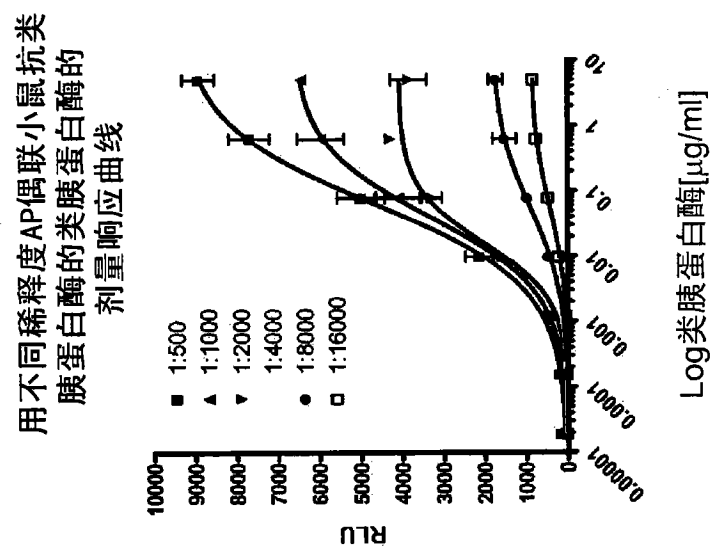


图 9B

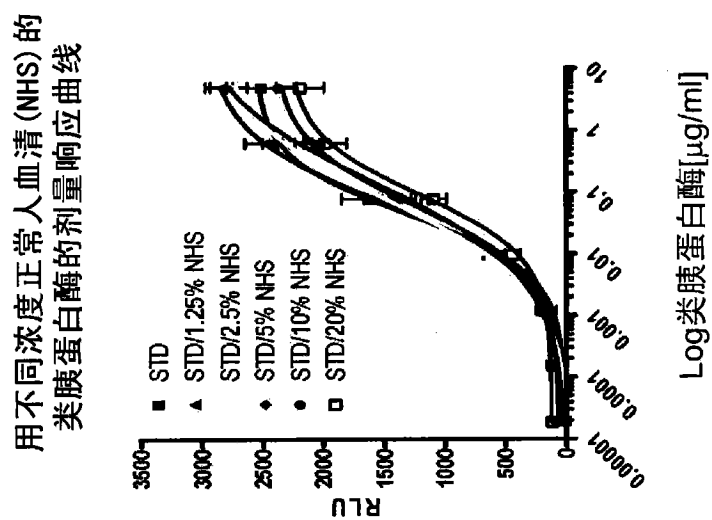


图 9C

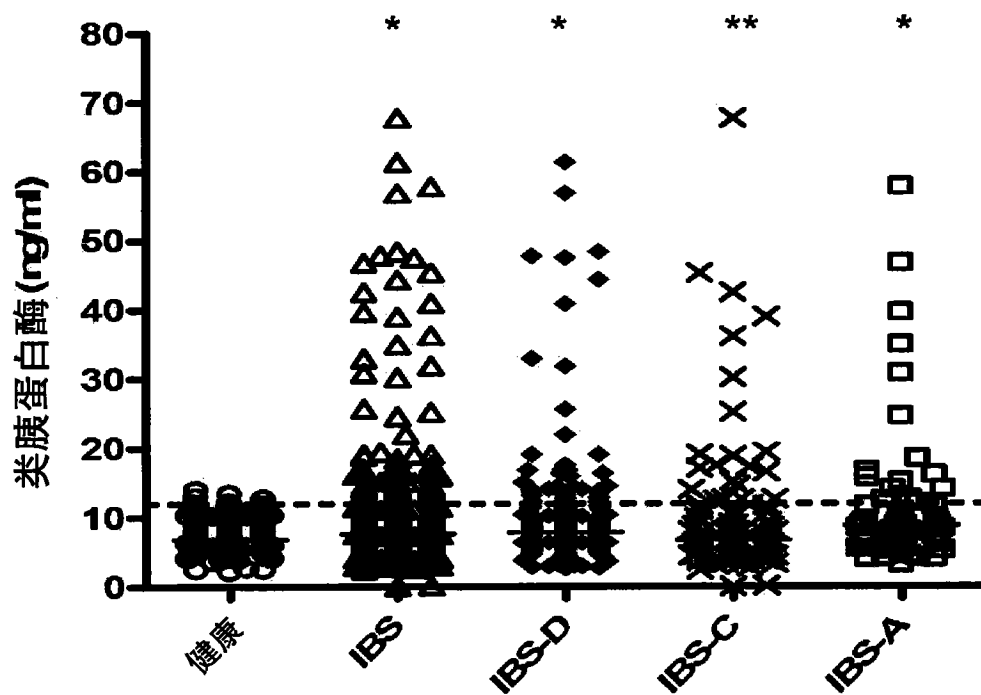
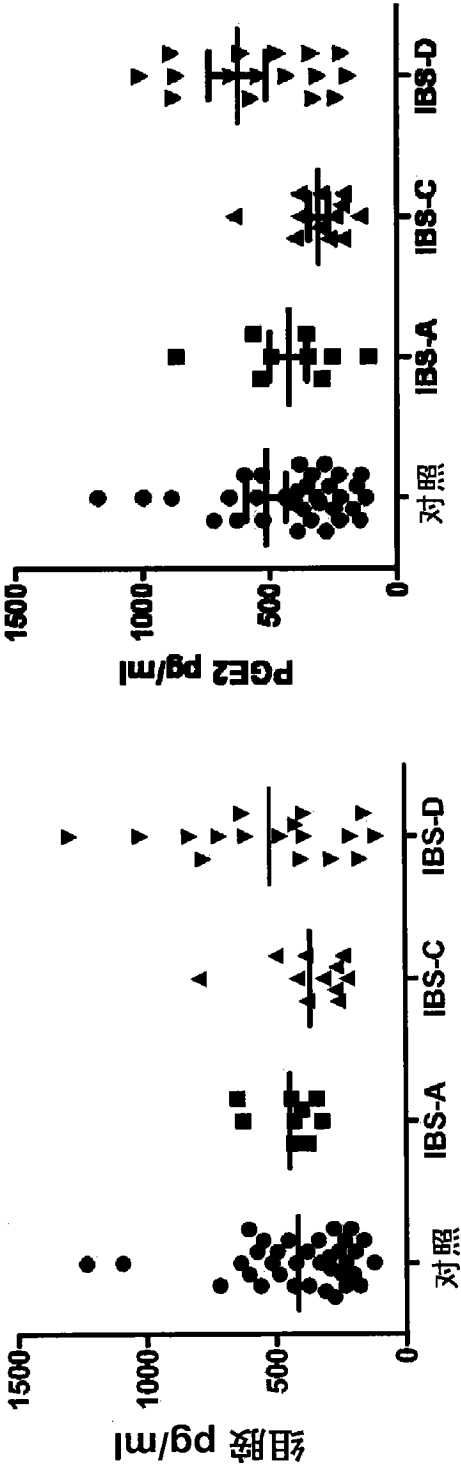


图 10



标记物	HC N=35	IBS-A N=9	IBS-C N=12	IBS-D N=17
PGGE2 pg/ml	370.4	256.0	282.4	542
组胺 pg/ml	338.3	429.3	318.3	418.2

图 11

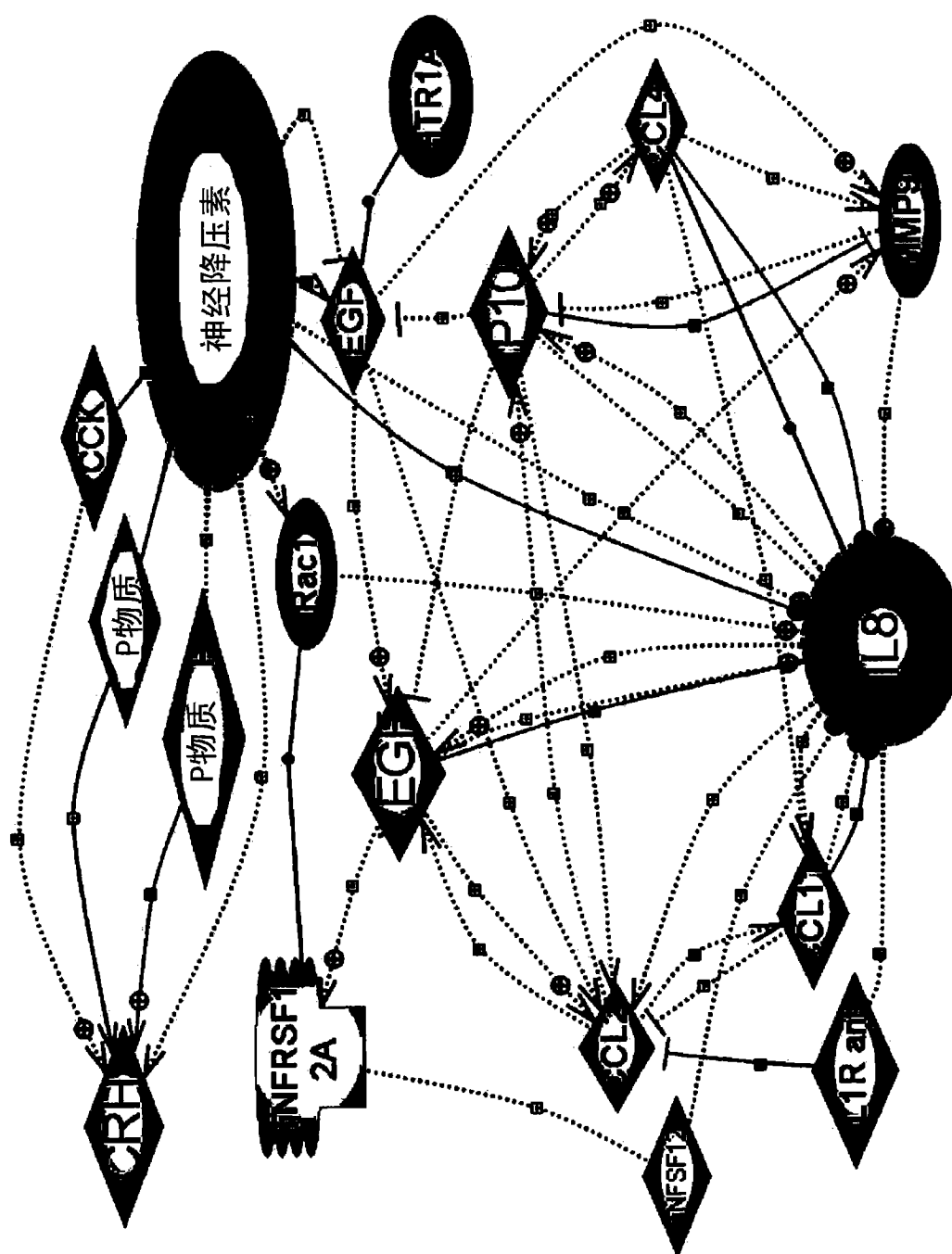


图 12

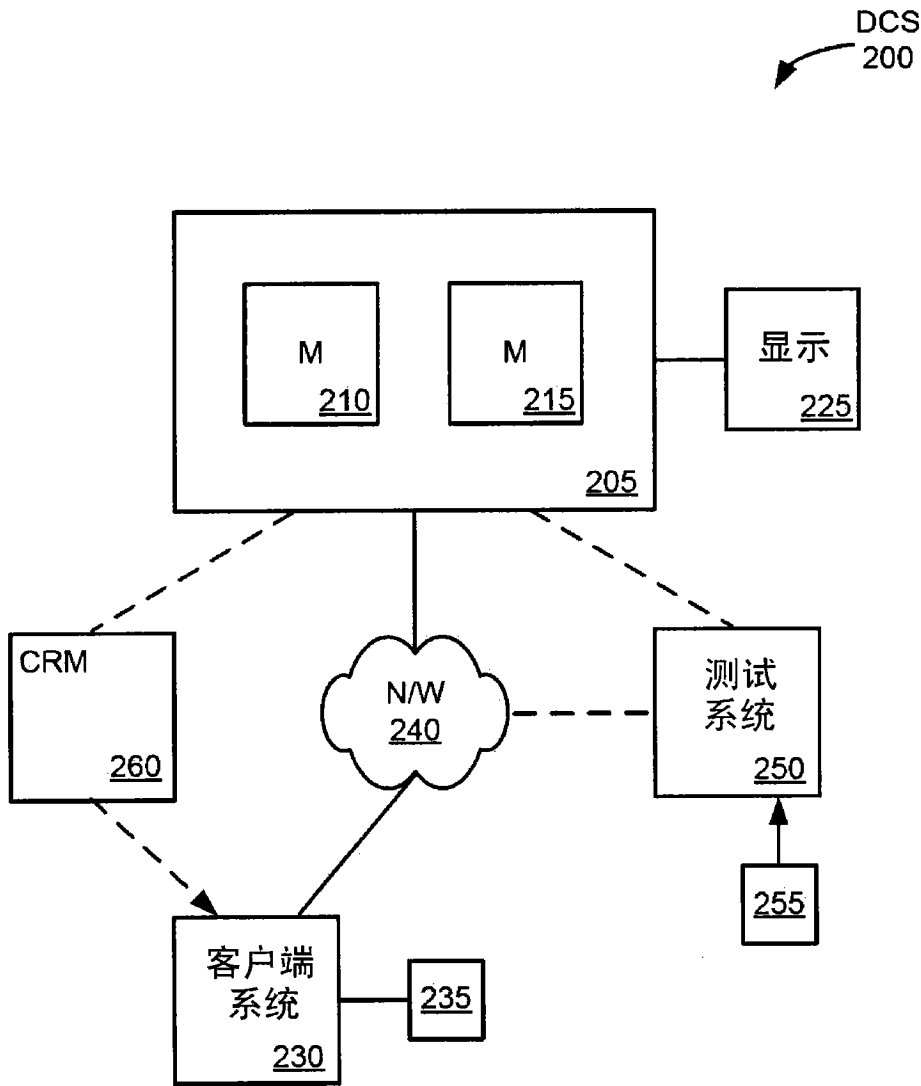


图 13

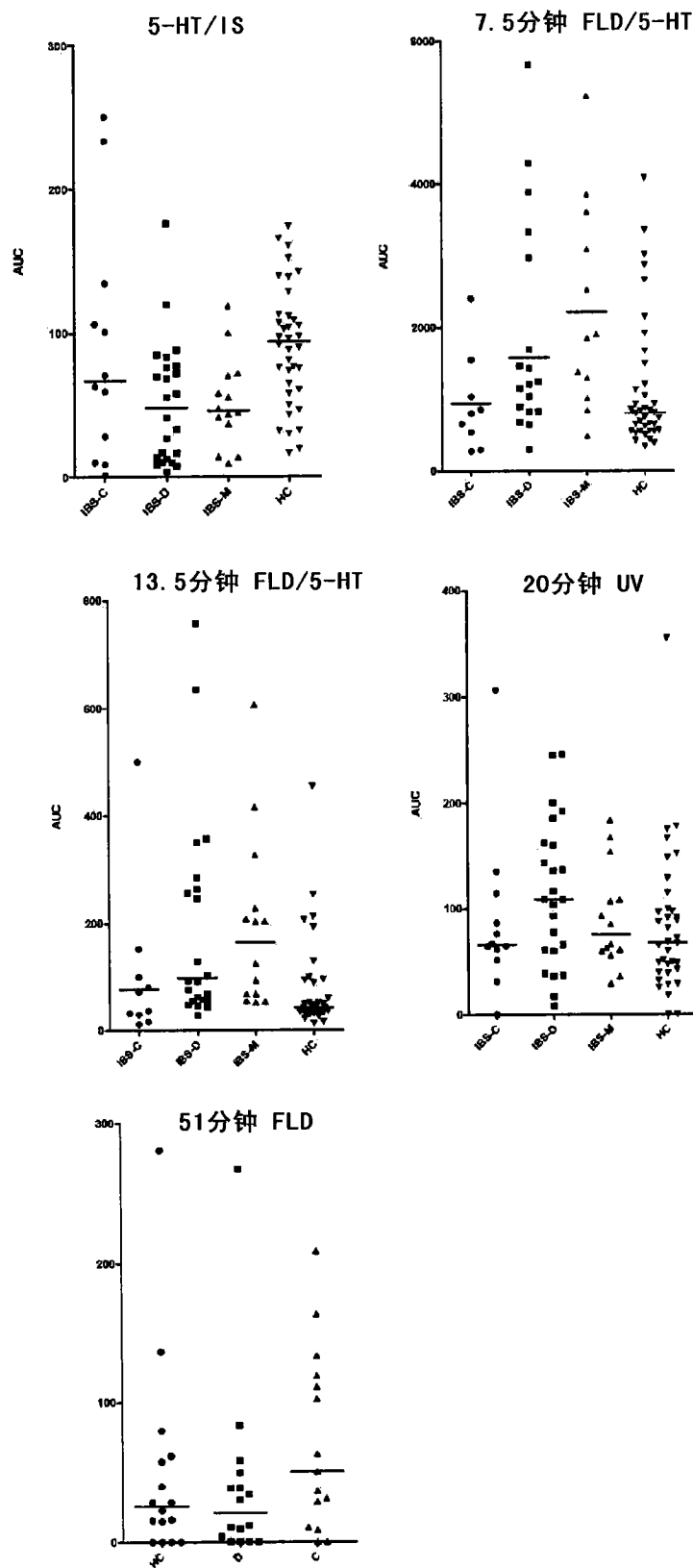


图 15

变量	评分	
FLD225_20_分钟_峰_面积	100.00	
UV278_15_5_分钟_峰_面积	80.18	
FLD225_17_5_分钟_峰_面积_5_HT	45.13	
UV278_19_5_分钟_峰_面积	39.68	
UV360_16_分钟_峰_面积_犬尿氨酸	15.18	
FLD225_13_5_分钟_峰_面积	11.06	

图 16

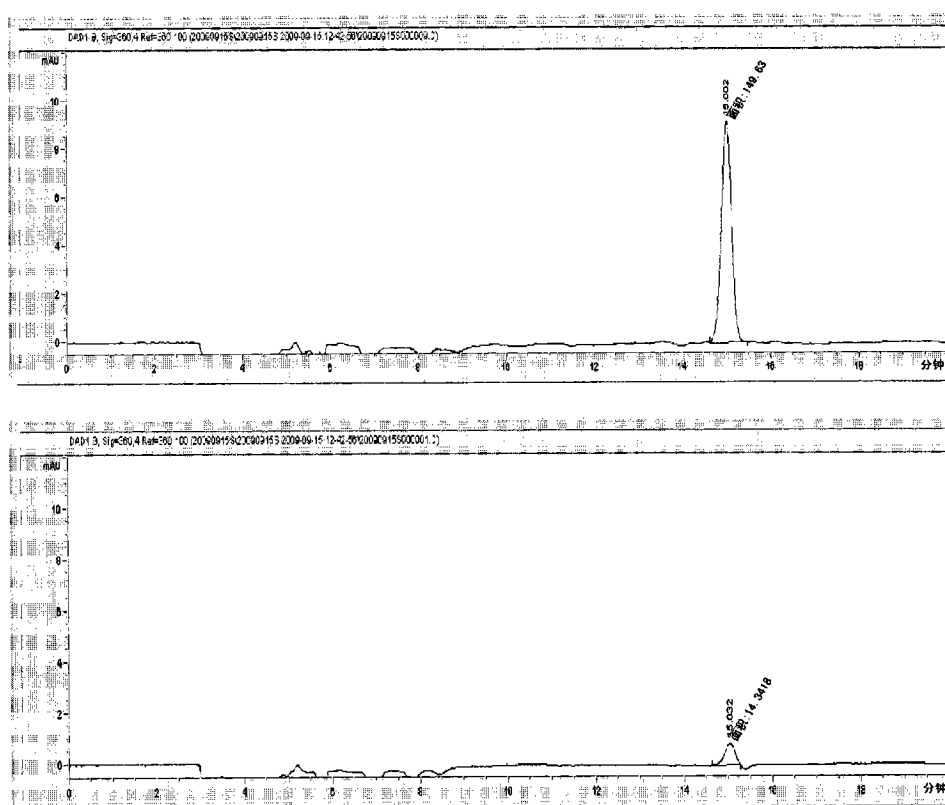


图 17

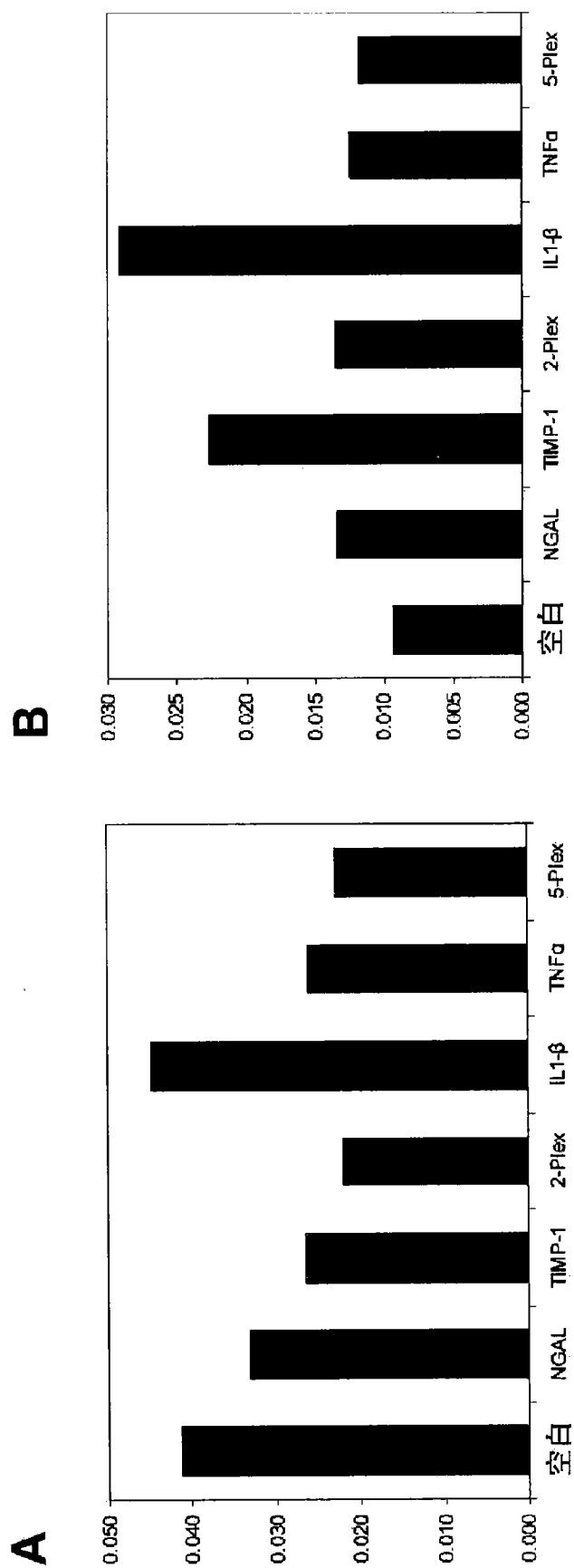


图 18

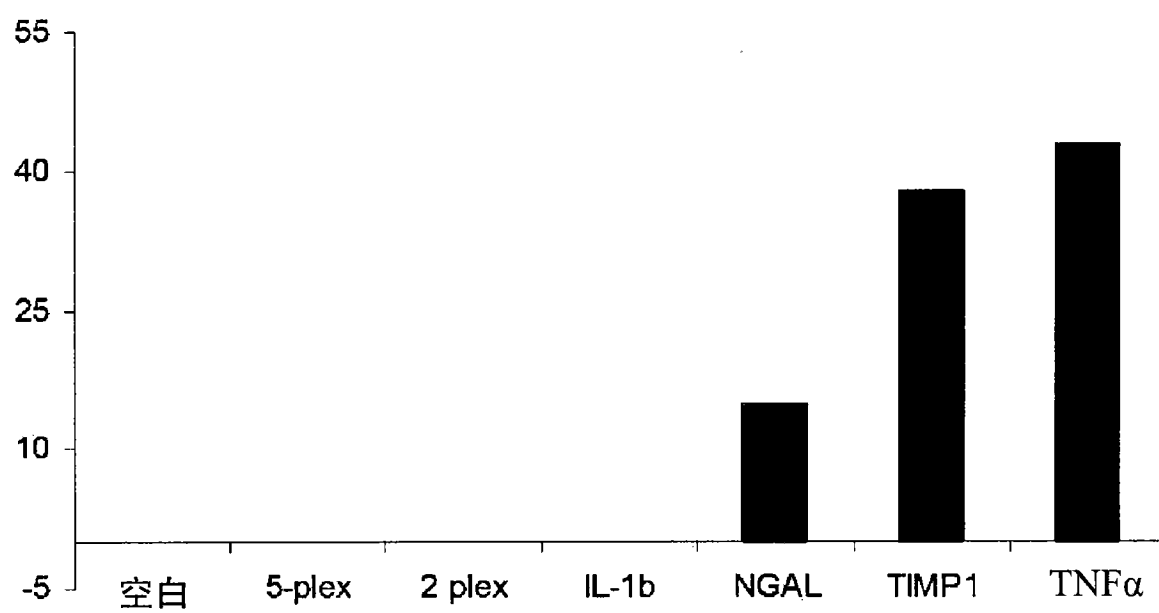


图 19

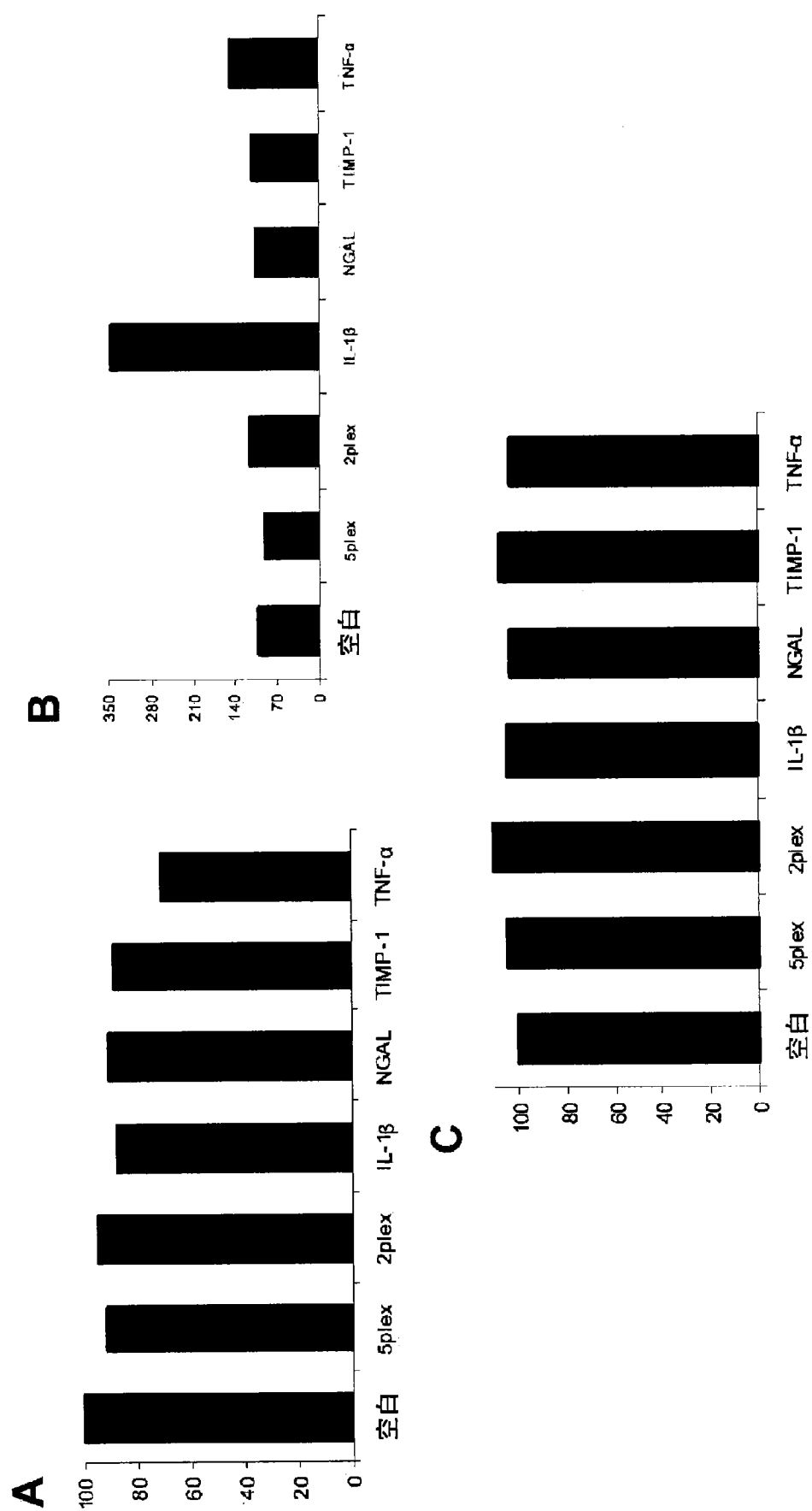


图 20

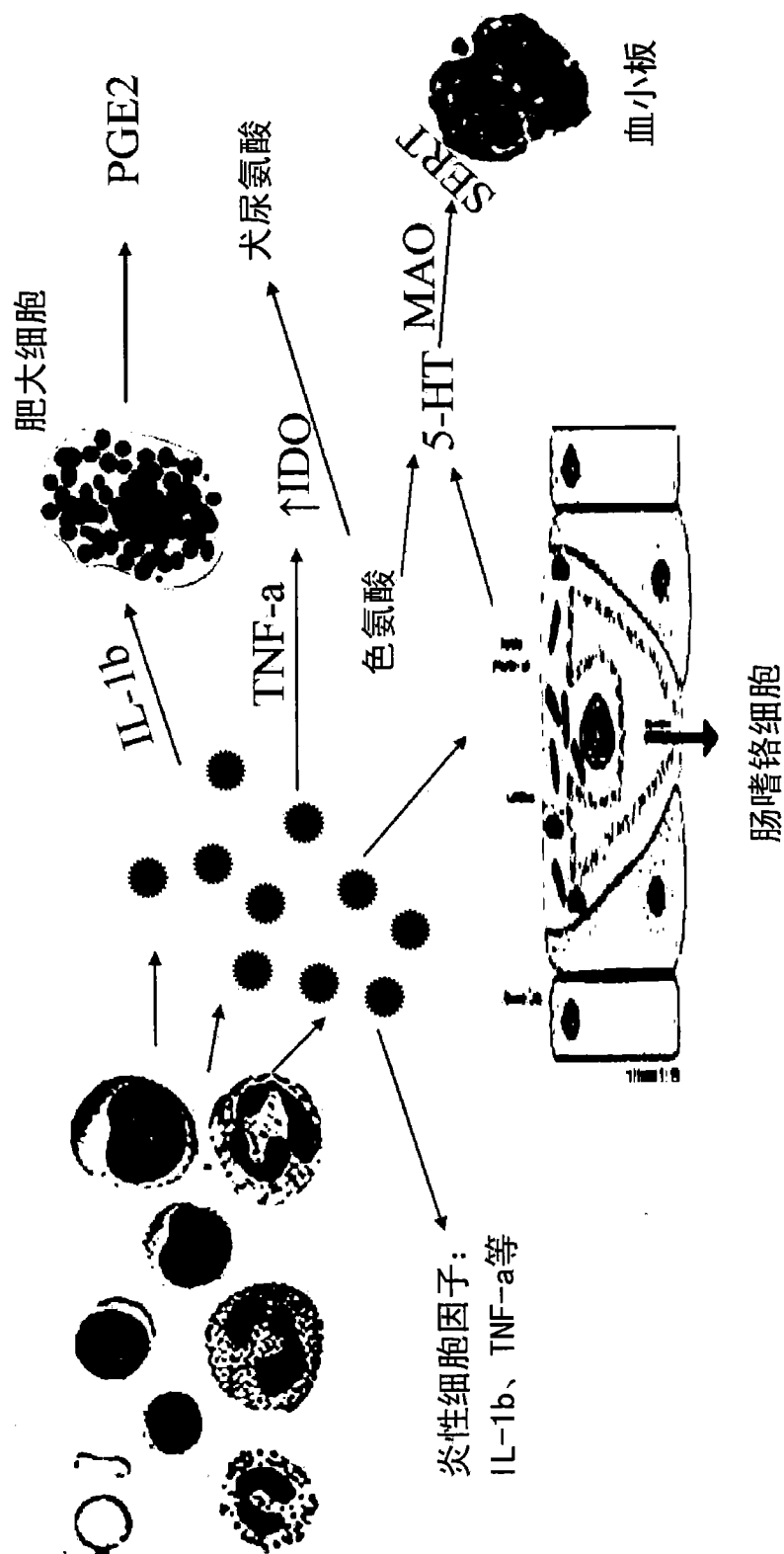


图 21

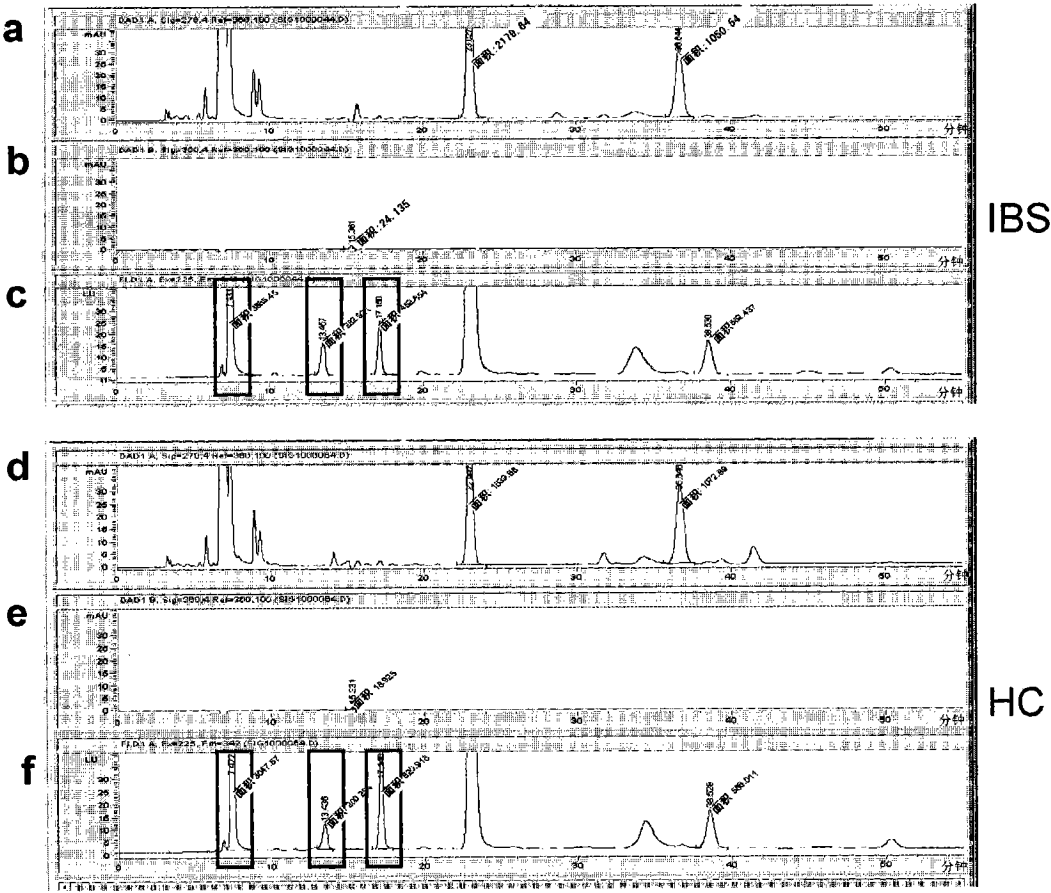


图 22

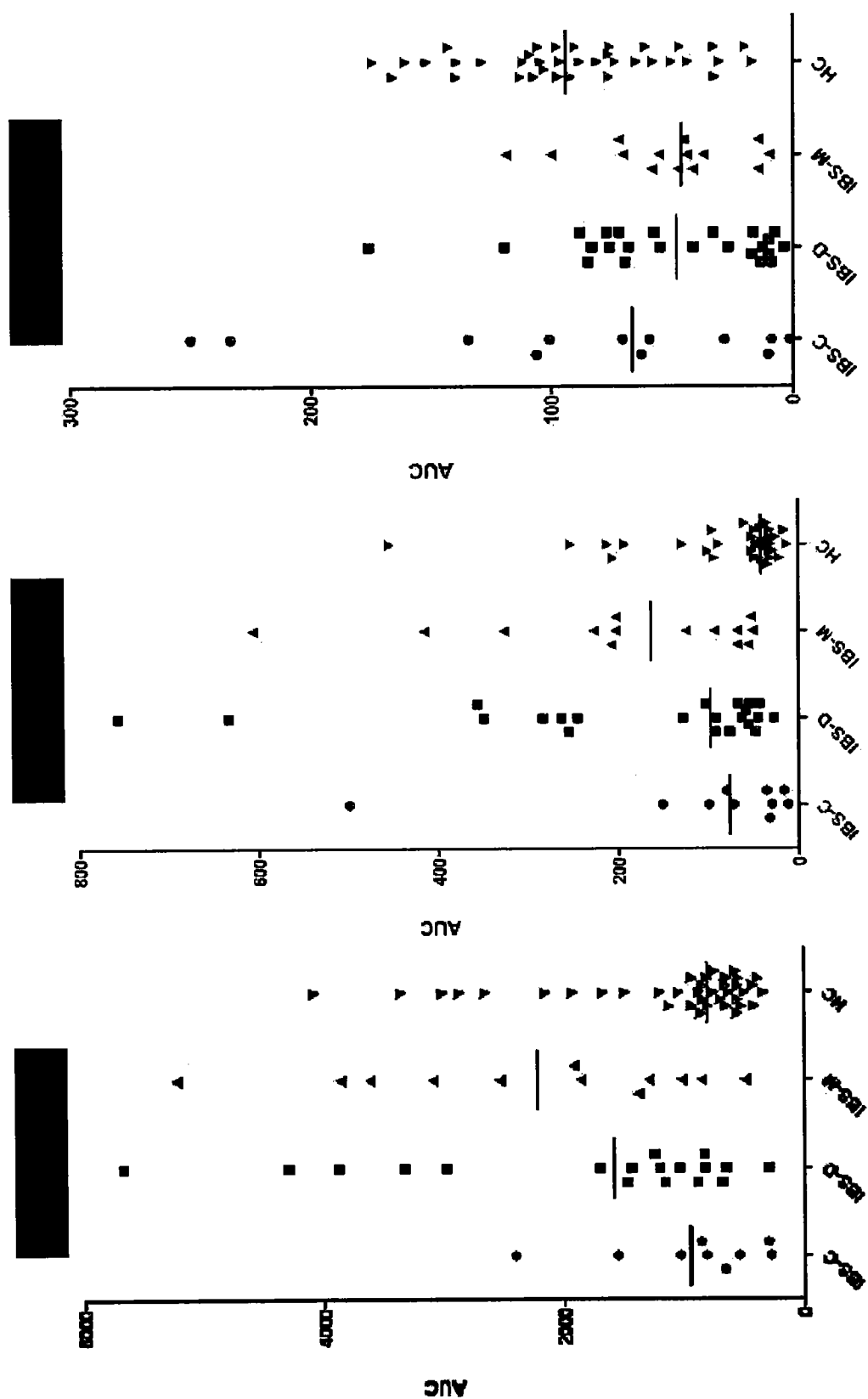


图 23

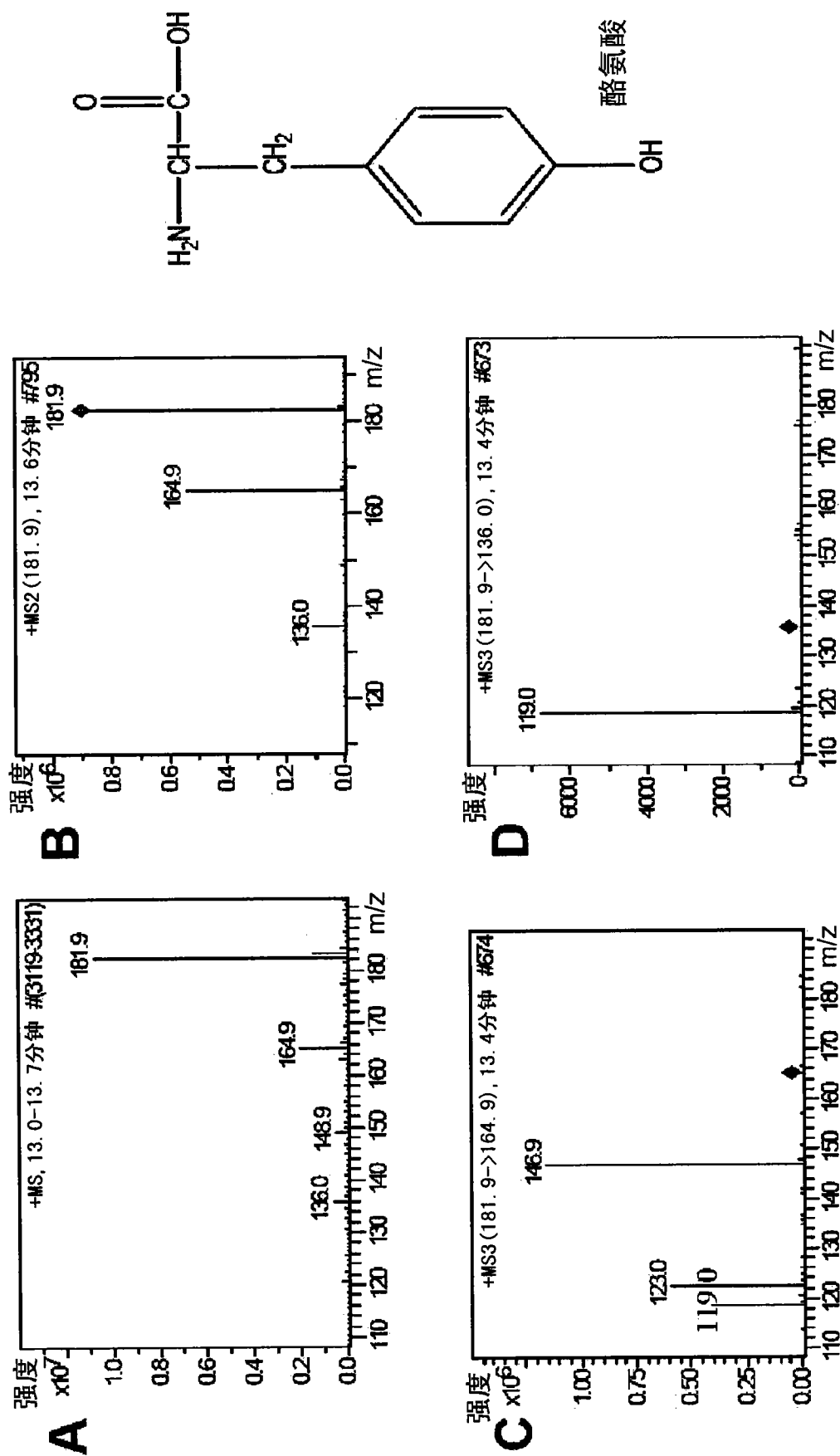


图 24

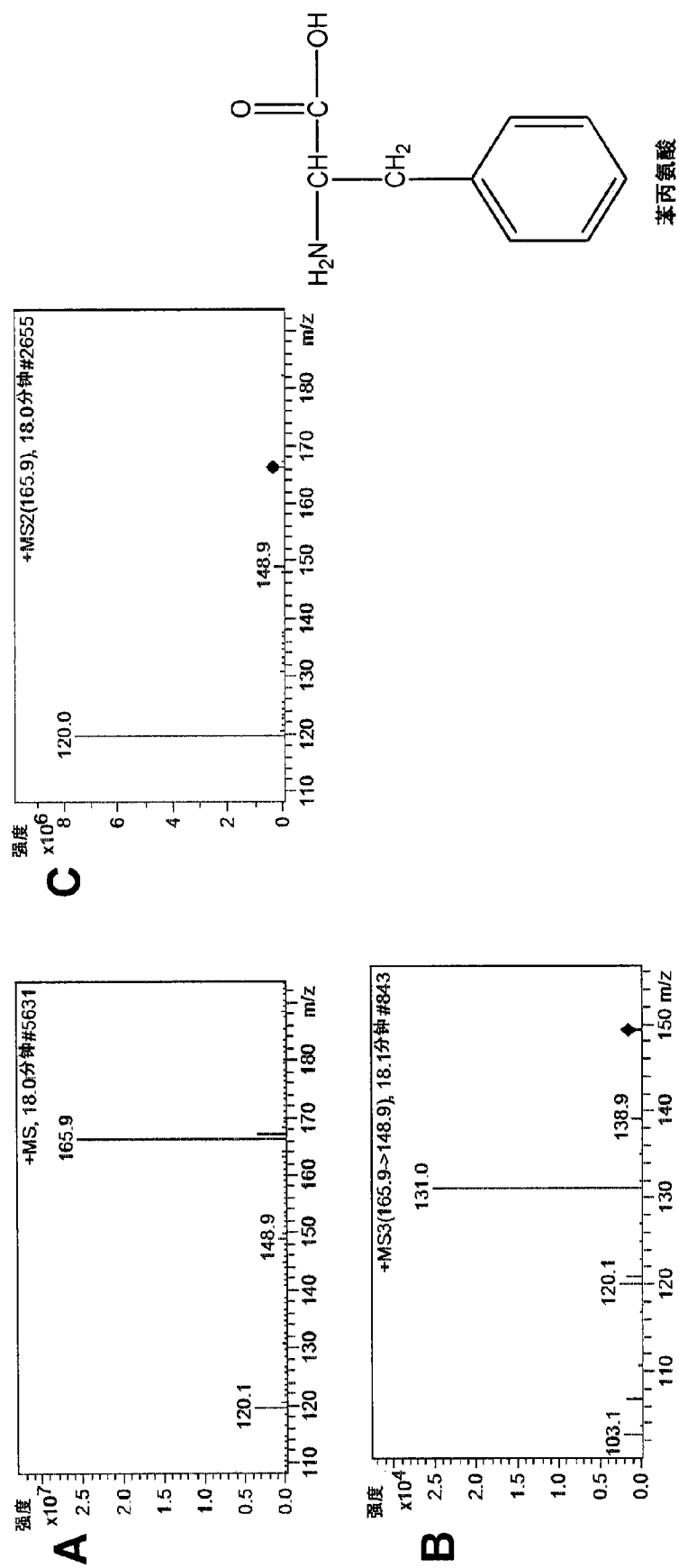
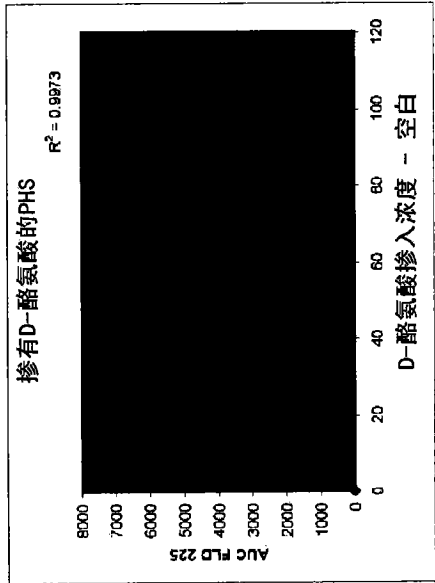


图 25



掺入PHS的 D-酪氨酸量(ug/ml)	AUC FLD = 225	已减去 空白
0	3096	0
2.5	3676.61	580.61
10	3992.48	896.48
25	5005.5	1909.5
50	6989.85	3893.85
100	10421.30	7325.3

掺入50 ug/ml D-酪氨酸

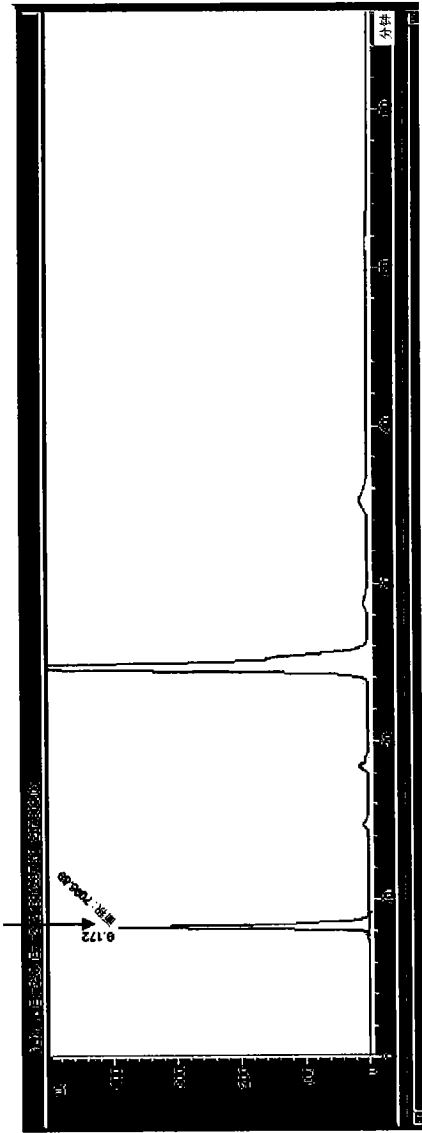


图 26

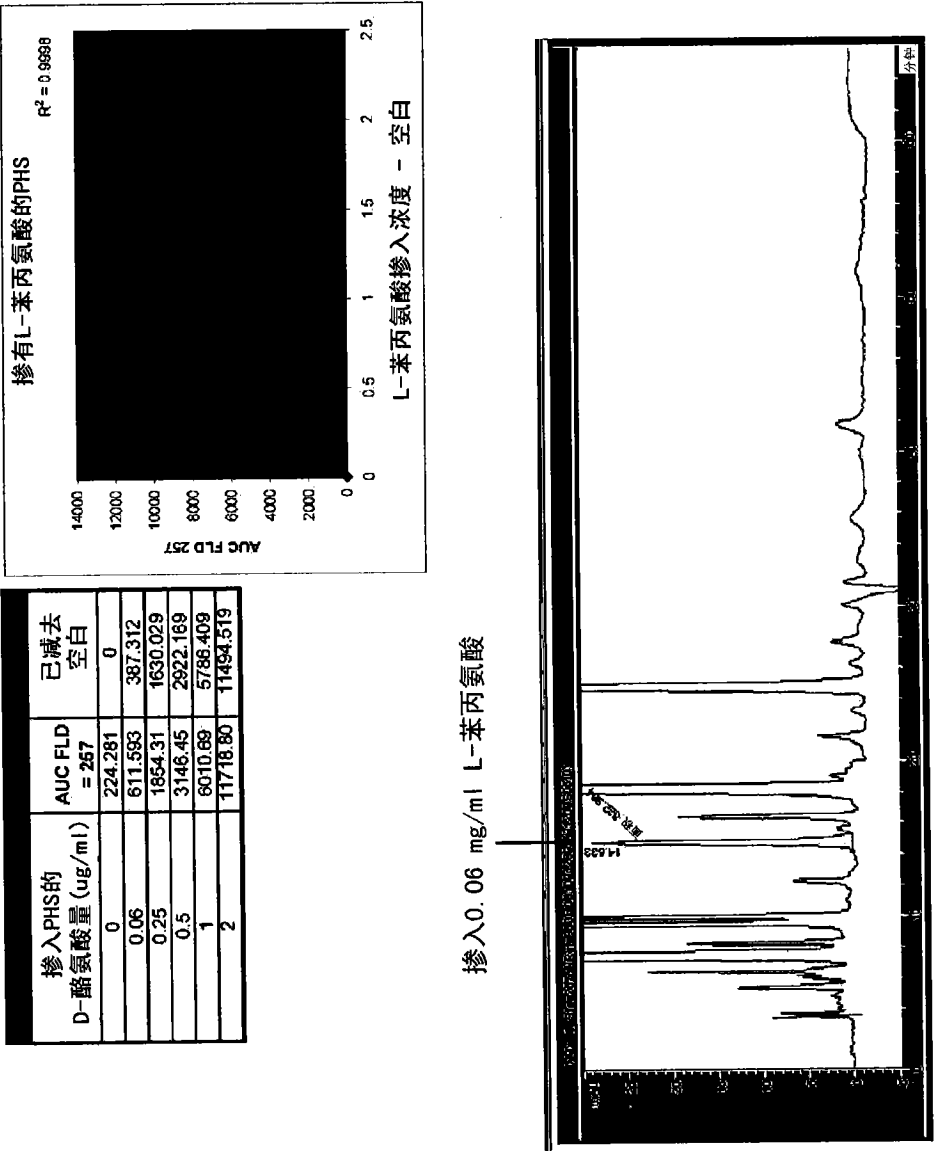


图 27

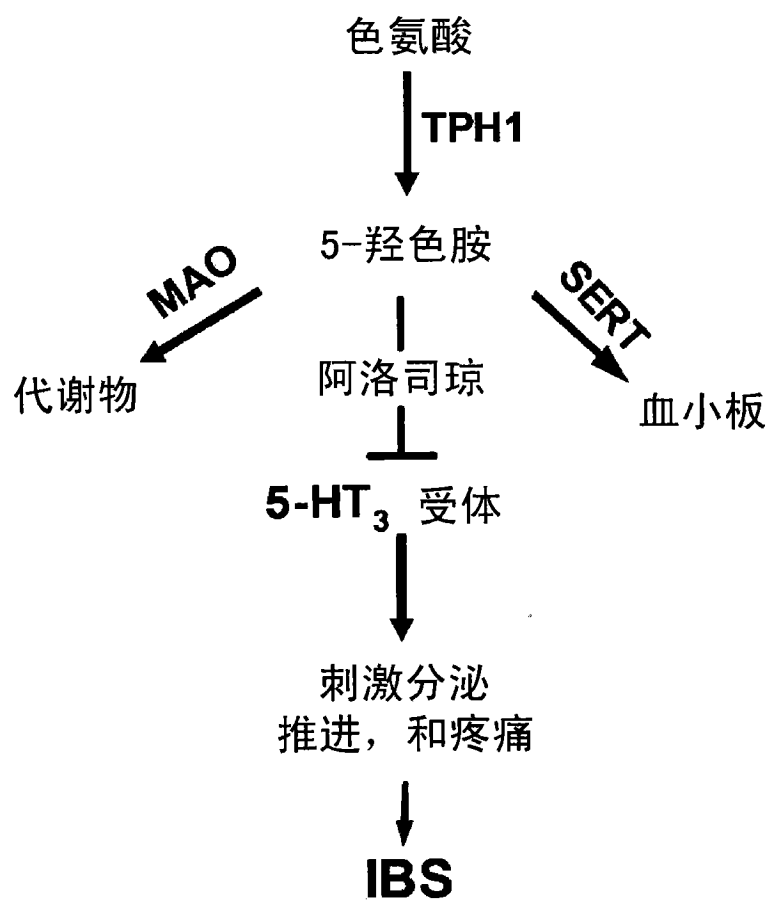


图 28

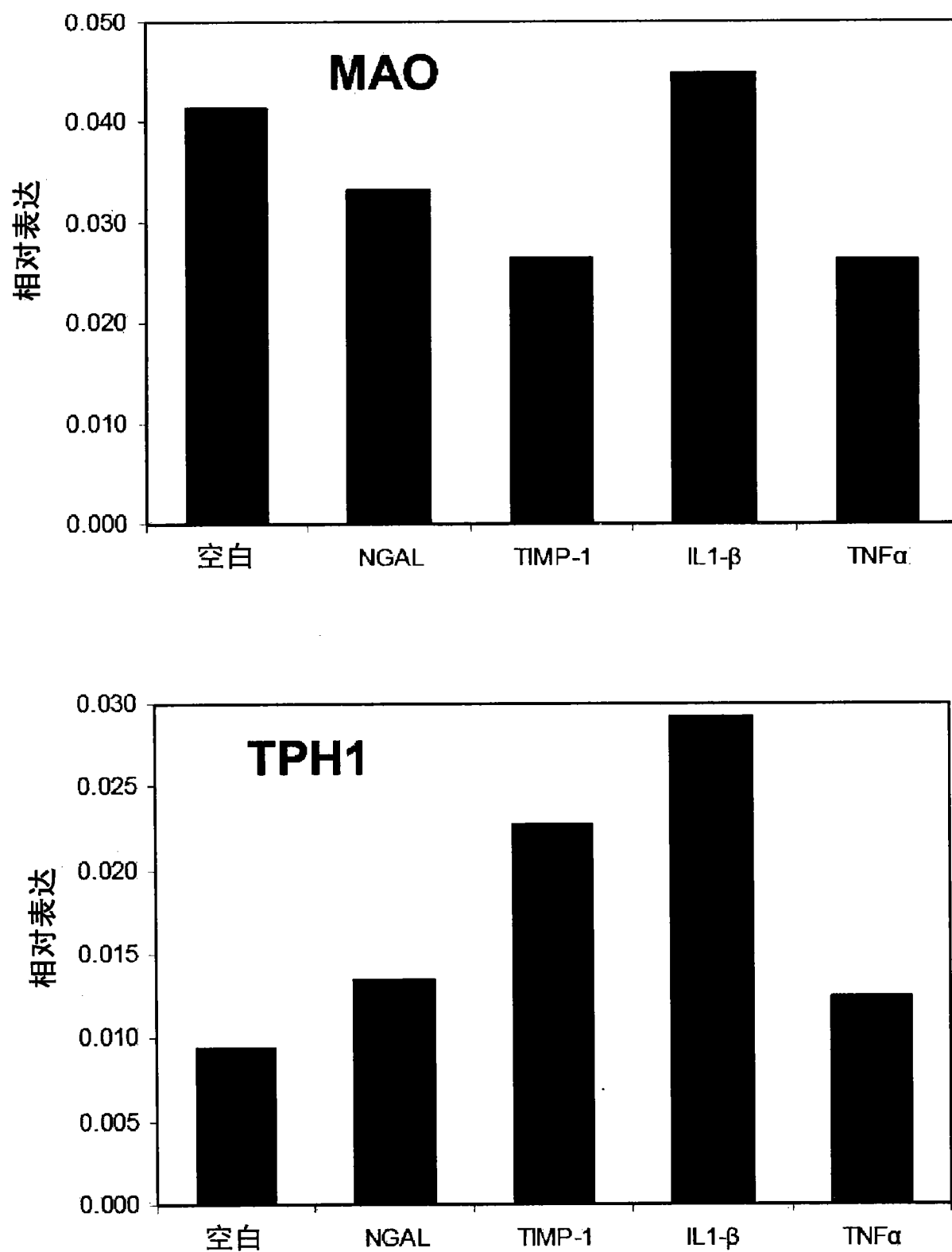


图 29

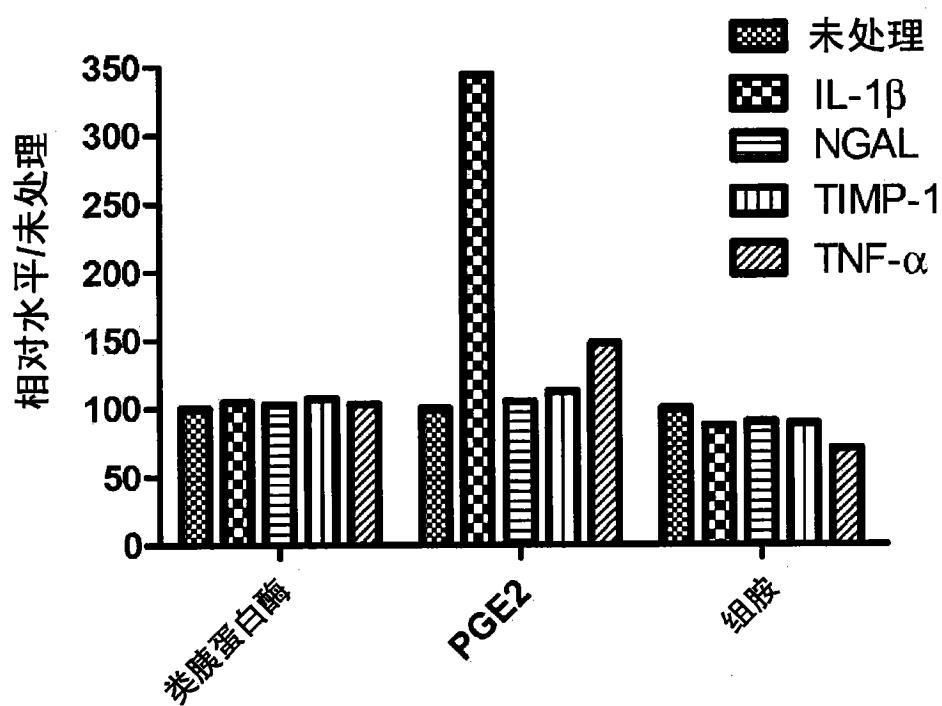


图 30

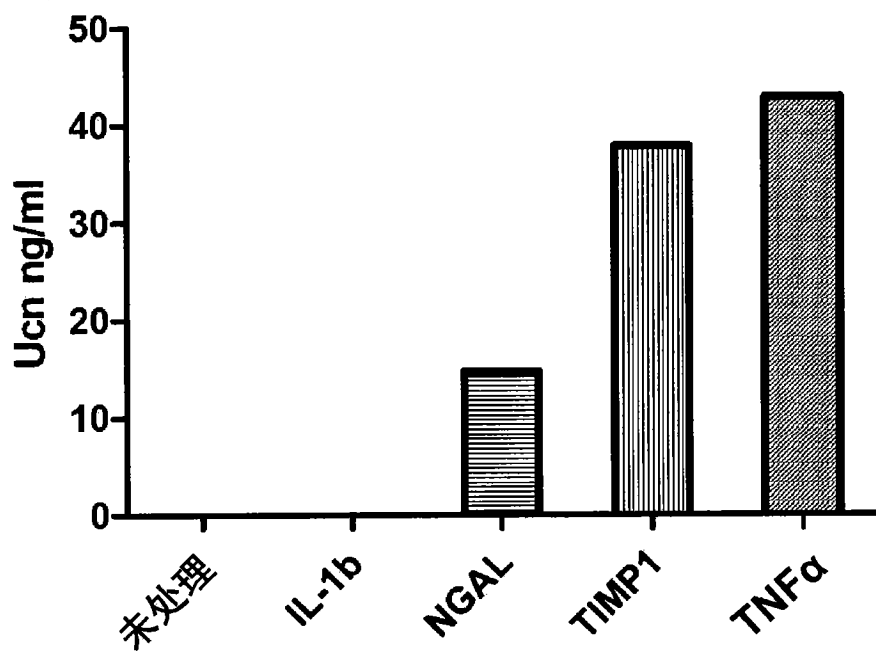


图 31