



(12)发明专利申请



(10)申请公布号 CN 111465857 A

(43)申请公布日 2020.07.28

(21)申请号 201880063136.3

(22)申请日 2018.08.08

(30)优先权数据

2017903138 2017.08.08 AU

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.03.27

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/AU2018/050827 2018.08.08

(87)PCT国际申请的公布数据

W02019/028507 EN 2019.02.14

(71)申请人 昆士兰科技大学

地址 澳大利亚昆士兰

(72)发明人 C·普雅德拉 X·汉格

B·舒尔茨

(74)专利代理机构 北京世峰知识产权代理有限公司 11713

代理人 康健 王思琪

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/48(2006.01)

G01N 33/50(2006.01)

权利要求书2页 说明书15页 附图9页

(54)发明名称

诊断早期心力衰竭的方法

(57)摘要

本发明涉及用于诊断早期心力衰竭的方法。确切地说,本发明涉及基于纽约心脏病协会(NYHA)分级系统诊断I级和II级心力衰竭。本发明还能区分健康对照和NYHA III/IV级心力衰竭患者。

1. 一种用于检测受试者的早期心力衰竭的方法,所述方法包括分析获自所述受试者的生物样品并且测定所述样品中至少一种生物标志物的浓度,以及如果所述至少一种生物标志物的浓度高于或低于所述至少一种生物标志物的预定参考浓度,则为所述受试者指定心力衰竭分级。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述至少一种生物标志物的所述预定参考浓度从获自健康受试者的生物样品测定。

3. 一种检测受试者的早期心力衰竭的方法,所述方法包括分析获自所述受试者的生物样品并且测定所述样品中至少一种生物标志物的浓度,测定获自健康受试者的生物样品中所述至少一种生物标志物的浓度,以及如果来自所述受试者的样品中所述至少一种生物标志物的浓度高于或低于获自所述健康受试者的生物样品中所述至少一种生物标志物的浓度,则为所述受试者指定心力衰竭分级。

4. 一种筛查受试者的早期心力衰竭的方法,所述方法包括分析获自所述受试者的生物样品并且测定所述样品中至少一种生物标志物的浓度,以及如果所述至少一种生物标志物的浓度高于或低于所述至少一种生物标志物的预定参考浓度,则为所述受试者指定心力衰竭分级。

5. 根据权利要求1到4中任一项所述的方法,其中所述至少一种生物标志物选自由下列组成的蛋白质的组:KLK1、TCPD、S10A7、DLDH、IGHA2、CAMP、KV110、NAMPT、COPB、SPR2A和HV311。

6. 根据权利要求5所述的方法,其中所述至少一种生物标志物选自由下列组成的蛋白质的组:KLK1、TCPD、S10A7、DLDH、IGHA2和CAMP。

7. 根据权利要求6所述的方法,其中所述至少一种生物标志物是包括所述蛋白质中的两种、三种、四种、五种或六种蛋白质的生物标志物组。

8. 根据权利要求7所述的方法,其中所述生物标志物组包括所述蛋白质中的三种蛋白质。

9. 根据权利要求8所述的方法,其中所述生物标志物组包括KLK1、S10A7和CAMP。

10. 根据权利要求5所述的方法,其中所述至少一种生物标志物选自由下列组成的蛋白质的组:KV110、NAMPT、COPB、SPR2A和HV311。

11. 根据权利要求10所述的方法,其中所述至少一种生物标志物是包括所述蛋白质中的两种、三种、四种或五种蛋白质的生物标志物组。

12. 根据权利要求5到11中任一项所述的方法,其中所述生物样品选自由全血、血清、血浆、痰或唾液组成的组。

13. 根据权利要求12所述的方法,其中所述生物样品是唾液。

14. 一种用于检测与早期心力衰竭相关的至少一种生物标志物的存在的试剂盒,所述试剂盒包括固体载体,所述固体载体上固定有与所述至少一种生物标志物特异性结合的至少一种分子。

15. 一种用于检测与早期心力衰竭相关的至少一种生物标志物的存在的试剂盒,其中所述至少一种生物标志物选自由KLK1、TCPD、S10A7、DLDH、IGHA2、CAMP、KV110、NAMPT、COPB、SPR2A和HV311组成的组,所述试剂盒包括固体载体,所述固体载体上固定有与所述至少一种生物标志物特异性结合的至少一种分子。

16. 根据权利要求14或15所述的试剂盒,其中与所述至少一种生物标志物特异性结合的所述至少一种分子是与所述至少一种生物标志物特异性结合的抗体。

17. 根据权利要求16所述的试剂盒,其中所述固体载体具有固定在其上的两种、三种、四种、五种或六种抗体。

18. 根据权利要求17所述的试剂盒,其中所述固体载体具有固定在其上的三种抗体。

19. 根据权利要求18所述的试剂盒,其中所述抗体是针对KLK1、S10A7和CAMP的抗体。

诊断早期心力衰竭的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及用于诊断早期心力衰竭的方法。确切地说,本发明涉及基于纽约心脏病协会(NYHA)分级系统诊断I级和II级心力衰竭。本发明还能区分健康对照和NYHA III/IV级心力衰竭患者。

背景技术

[0002] 当心肌衰弱以致无法再泵送足够的血液来满足身体对血液和氧气的需求时,发生心力衰竭。换言之,心脏无法跟上其工作负荷。在心力衰竭的早期期间,存在多种起作用的补偿机制,包括增大、增加肌肉质量和更快地泵送。在不治疗和/或改变生活方式的情况下,这些补偿机制最终将不再有效,因此人开始经历心力衰竭的症状,例如疲劳和呼吸问题。

[0003] 在20世纪初期,尚无测量心功能的方法,因此诊断也不一致。NYHA开发了一种分级系统,该分级系统至今仍用于心力衰竭的临床描述(纽约心脏病协会标准委员会(The Criteria Committee of the New York Heart Association),1994年)。根据NYHA分级系统,基于患者体力活动中的限制、正常呼吸过程中的任何限制或症状以及呼吸短促和/或心绞痛而将患者分为四类。

[0004] 该分级系统列于表1中。

[0005] 表1. 心力衰竭的NYHA功能分级

	NYHA 分级	症状
[0006]	I	在一般体力活动期间没有症状也不受限制,例如,走路或爬楼梯时没有呼吸短促或心绞痛
	II	轻度症状,例如轻度呼吸短促和/或心绞痛,以及一般体力活动期间轻度受限
[0007]	III	即使短距离(20 - 100 米)行走也会因为症状而活动明显受限,只有在休息时才感到舒适
	IV	严重受限,即使在休息时也有症状,任何体力活动都会增加不适感

[0008] 心力衰竭主要因其全球性高患病率而给社会带来了巨大的社会和经济负担。例如,据估计,全世界每年有2300万人被诊断出此疾病(澳大利亚卫生与福利研究所(Australian Institute of Health and Welfare,AIHW)2011)。生存率也很低,澳大利亚总死亡人数中约有30%归因于心力衰竭(Palazzuoli等,2007)。心力衰竭的主要风险因素包括年龄、缺乏体力活动、饮食习惯不良导致肥胖、吸烟和过量饮酒(Palazzuoli等,2007)。随着许多国家正经历人口的老龄化,预期心力衰竭将成为更加普遍的问题(Marian和

Nambi, 2004)。

[0009] 由于此疾病的复杂性,目前尚无心力衰竭的诊断标准。确切地说,没有针对心力衰竭的简单诊断测试。虽然可以使用医学成像技术来检测心脏结构或功能的早期变化,例如上述补偿机制,但是,对所有潜在心力衰竭患者进行成像是实际或不实际或不符合成本效益的。

[0010] 现有许多非侵入性风险评分系统,其被设计成用来评估个人罹患心血管疾病(如冠心病、心力衰竭、心肌病、先天性心脏病、周围血管疾病和中风)的概率。例如,弗雷明汉风险评分(Framingham Risk Score)是一种用于评估10年内发生冠心病、外周动脉疾病和心力衰竭的风险的算法(McKee等,1971)。其它实例为用于诊断心力衰竭的波士顿(Boston)标准(Carlson等,1985)以及杜克(Duke)标准(Harlan等,1977),其中波士顿标准已被证明具有最高灵敏性和特异性(Shamsham和Mitchell,2000)。这些类型的标准利用患者病史、体检、常规临床程序和实验室测试的组合,以得出诊断结论(Krum等,2006),并且对诊断晚期或严重心力衰竭特别有用。但是,预防心力衰竭的进展和临床恶化需要早期诊断。因此,需要改善早期心力衰竭的非侵入性诊断的准确性。

[0011] 应清楚地理解,如果本文中引用现有技术出版物,则这种引用并不表示认可所述出版物构成澳大利亚或任何其它国家的所属领域公知常识的一部分。

发明内容

[0012] 本发明一般涉及心力衰竭的早期诊断方法,尤其地,涉及根据NYHA分级的I级和II级心力衰竭的早期的诊断方法。尤其地,本发明涉及与早期心力衰竭高度相关的生物标志物的鉴别和使用。

[0013] 在第一方面中,本发明提供了一种用于检测受试者的早期心力衰竭的方法,该方法包括分析获自受试者的生物样品并测定该样品中至少一种生物标志物的浓度,以及如果至少一种生物标志物的浓度高于或低于该至少一种生物标志物的预定参考浓度,则为受试者指定心力衰竭分级。可以从获自健康受试者的生物样品中测定至少一种生物标志物的预定参考浓度。

[0014] 在第二方面中,本发明提供了一种用于检测受试者的早期心力衰竭的方法,该方法包括:分析获自受试者的生物样品并且测定该样品中至少一种生物标志物的浓度,测定从健康受试者获取的生物样品中该至少一种生物标志物的浓度,并且如果来自受试者的样品中至少一种生物标志物的浓度高于或低于来自健康受试者的生物样品中该至少一种生物标志物的浓度,则为受试者指定心力衰竭分级。

[0015] 在第三方面中,本发明提供了一种用于检测受试者的早期心力衰竭的方法,该方法包括分析获自受试者的生物样品并且测定该样品中至少一种生物标志物的浓度,其中该至少一种生物标志物选自由KLK1、TCPD、S10A7、DLDH、IGHA2、CAMP、KV110、NAMPT、COPB、SPR2A和HV311组成的组,以及如果至少一种生物标志物的浓度高于或低于该至少一种生物标志物的预定参考浓度,则为受试者指定心力衰竭分级。

[0016] 在第四方面中,本发明提供了一种用于检测受试者的早期心力衰竭的方法,该方法包括分析获自受试者的生物样品并且测定该样品中至少一种生物标志物的浓度,其中该至少一种生物标志物选自由KLK1、TCPD、S10A7、DLDH、IGHA2、CAMP、KV110、NAMPT、COPB、SPR2A和HV311组成的组,测定获自健康受试者的生物样品中该至少一种生物标志物的浓

度,以及如果来自受试者的样品中至少一种生物标志物的浓度高于或低于获自健康受试者的生物样品中该至少一种生物标志物的浓度,则为受试者指定心力衰竭分级。

[0017] 在第五方面中,本发明提供了一种用于筛查受试者的早期心力衰竭的方法,该方法包括分析获自受试者的生物样品并且测定该样品中至少一种生物标志物的浓度,以及如果该至少一种生物标志物的浓度高于或低于该至少一种生物标志物的预定参考浓度,则为受试者指定心力衰竭分级。

[0018] 在第六方面中,本发明提供了一种用于检测与早期心力衰竭相关的至少一种生物标志物的存在的试剂盒,该试剂盒包括固体载体(support),所述固体载体上固定有与至少一种生物标志物特异性结合的至少一种分子。

[0019] 在第七方面中,本发明提供了一种用于检测与早期心力衰竭相关的至少一种生物标志物的存在的试剂盒,其中该至少一种生物标志物选自由KLK1、TCPD、S10A7、DLDH、IGHA2、CAMP、KV110、NAMPT、COPB、SPR2A和HV311组成的组,该试剂盒包括固体载体,所述固体载体上固定有与至少一种生物标志物特异性结合的至少一种分子。

[0020] 在整个说明书中,除非上下文另有要求,否则词语“包含/包括(comprise, comprises, comprising)”应理解为暗示包括所述的整数或整数组,但不排除任何其它整数或整数组。

[0021] 在本发明范围内,本文描述的任何特征均可以与本文描述的任何一個或多个其它特征以任何组合形式组合。

附图说明

[0022] 图1的图示出了通过ProteinPilot数据库搜索(表3)鉴别的每种蛋白质的肽丰度,如从LC-ESI-MS/MS数据的提取离子色谱图中确定的;

[0023] 图2的一系列图比较了健康对照及NYHA I级和III/IV级心力衰竭患者中各种唾液蛋白的相对丰度,如通过SWATH-MS测定的;图2A,通过SWATH-MS验证的各种蛋白质;图2B, SPLC2 (BNP:对照);图2C, KLK1 (BNP:对照);图2D, KLK1: SPLC2 (BNP:对照);图2E, S10A7 (BNP:对照);图2F, S10A7: SPLC2 (BNP:对照);图2G, AACT (BNP:对照);以及图2H, AACT: SPLC2 (BNP:对照)。

[0024] 图3的一系列点图比较了健康对照和心力衰竭患者中所选唾液蛋白的比率。图3A, KLK1: SPLC2;图3B, S10A7: SPLC2;以及图3C, AACT: SPLC2。

[0025] 图4A、4B和4C是图3中唾液蛋白比率的ROC曲线。图4A, KLK1: SPLC2;图4B, S10A7: SPLC2;以及图4C, AACT: SPLC2。

[0026] 图5的一系列图比较了健康对照与NYHA I级和III/IV级心力衰竭患者中各种唾液蛋白(KV110、NAMPT、COPB、SPR2A和HV311)的相对丰度,如通过SWATH-MS测定的。

[0027] 图6是用于比较各队列(cohort)(NYHA I级、NYHA III/IV级和对照)之间的、图5中所示唾液蛋白的组别的ROC曲线叠加图。

[0028] 图7的一系列图比较了健康对照与NYHA I级和III/IV级心力衰竭患者中各种唾液蛋白(KLK1、TCPD、S10A7、DLDH、IGHA2和CAMP)的相对丰度,如通过SWATH-MS测定的。

[0029] 图8是用于比较各队列(NYHA I级、NYHA III/IV级和对照)之间的、图7中所示唾液蛋白的组别的ROC曲线叠加图。

[0030] 图9的一系列图比较了健康对照、患心力衰竭风险高的个体和心力衰竭患者中各种唾液蛋白 (S10A7、KLK1和CAMP) 的浓度,如通过免疫分析测定的;以及用于比较唾液蛋白组合的ROC曲线。通过结合这些唾液蛋白的浓度来生成预测评分。图9A,S10A7;图9B,CAMP;图9C,KLK1;图9D,唾液蛋白的组合预测评分;图9E,ROC曲线,用于比较心力衰竭患者和对照之间的唾液蛋白的组合;图9F,ROC曲线,用于比较SCREEN-HF (心力衰竭筛查) 队列与对照之间的唾液蛋白的组合;

[0031] 图10的图示出了在参加研究后已经患有心血管疾病的研究受试者与没有因心血管疾病入院的受试者之间的预测评分。

[0032] 图11 (A) 为6名健康对照和6名心力衰竭患者的唾液样品中KLK1、TCPD、S10A7、DLDH、IGHA2和CAMP的蛋白质印迹。(B) 为健康对照和心力衰竭患者的唾液样品中KLK1、TCPD、S10A7、DLDH、IGHA2和CAMP的具有标准误差的相对带强度。

[0033] 图12是12名健康对照和12名心力衰竭患者的另外的唾液样品中的S10A7的蛋白质印迹。

具体实施方式

[0034] 缩写

[0035] 全文使用以下缩写:

[0036] AACT= α 1抗胰凝乳蛋白酶

[0037] BNP=脑钠肽

[0038] CAMP=抗菌肽 (Cathelicidin) 抗微生物肽

[0039] COPB=外被体 (coatomer) 亚基 β

[0040] DLDH=二氢硫辛酸脱氢酶,线粒体

[0041] ESI=电喷雾电离

[0042] GELS=凝溶胶蛋白

[0043] h=小时

[0044] HV311=Ig重链V-III区KOL

[0045] IGH2=Ig α -2链C区

[0046] IGJ=免疫球蛋白J链

[0047] IQR=四分位距

[0048] KLK1=激肽释放酶1

[0049] KV110=Ig κ 链V-I区HK102

[0050] LC=液相色谱

[0051] LC-ESI-MS/MS=液相色谱-电喷雾电离-串联质谱

[0052] LPLC1=长腭、肺和鼻上皮癌相关蛋白1

[0053] min=分钟

[0054] MMP9=基质金属蛋白酶-9

[0055] MS=质谱

[0056] MS/MS=串联质谱

[0057] NAMPT=烟酰胺磷酸核糖基转移酶

[0058] NPV=阴性预测值

[0059] NYHA=纽约心脏病协会

[0060] PBS=磷酸盐缓冲盐水

[0061] PPV=阳性预测值

[0062] rcf=相对离心力

[0063] ROC=接收者操作特征

[0064] s=秒

[0065] S10A7=S100钙结合蛋白A7

[0066] SPLC2=短腭、肺及鼻相关蛋白2

[0067] SPR2A=小脯氨酸丰富蛋白2A

[0068] SWATH=所有理论碎片离子光谱的顺序窗口采集

[0069] TCPD=T-复合蛋白1亚基δ

[0070] TOF=渡越时间(time of flight)

[0071] VIME=波形蛋白

[0072] 本发明部分基于以下发现:与获自健康受试者的生物样品相比,获自患有早期心力衰竭的受试者的生物样品中的蛋白质的丰度不同。本发明人已经使用高丰度蛋白质去除和SWATH-MS来鉴别唾液蛋白,作为具备早期心力衰竭诊断效用的推定生物标志物。

[0073] 因此,在第一方面中,本发明提供了一种用于检测受试者的早期心力衰竭的方法,该方法包括分析获自受试者的生物样品并且测定该样品中至少一种生物标志物的浓度,以及如果该至少一种生物标志物的浓度高于或低于该至少一种生物标志物的预定参考浓度,则为受试者指定心力衰竭分级。可以从获自健康受试者的生物样品中测定至少一种生物标志物的预定参考浓度。

[0074] 出于本发明的目的,描述心力衰竭阶段的短语“早期(early stage)”是指纽约心脏病协会定义的功能分级:NYHA I级和/或NYHA II级。

[0075] 本文所使用的术语“生物样品”是指从受试者提取的样品。该术语包括未处理、已处理、稀释或浓缩的生物样品。从受试者获取的生物样品可以是任何合适的样品,例如全血、血清或血浆。优选地,生物样品获自受试者的颊腔。因此,生物样品可以是痰或唾液。根据提供一种用于诊断早期心力衰竭的非侵入性的具有成本效益的方法的本发明,获自受试者的生物样品优选为唾液。

[0076] 至少一种生物标志物是存在于生物样品中的蛋白质,该蛋白质已被鉴定为与早期心力衰竭相关。可以分析生物样品中至少一种、两种、三种、四种、五种、六种等生物标志物的浓度。例如,至少一种生物标志物可以是选自由以下项组成的组中的任何数量的蛋白质:KLK1、TCPD、S10A7、DLDH、IGHA2、CAMP、KV110、NAMPT、COPB、SPR2A和HV311。在一个实施方案中,至少一种生物标志物选自由KLK1、TCPD、S10A7、DLDH、IGHA2和CAMP组成的蛋白质的组。优选地,至少一种生物标志物是由这些蛋白质中的两种、三种、四种、五种或全部六种蛋白质组成的生物标志物组。在特别优选的实施方案中,生物标志物组包括KLK1、S10A7和CAMP。在替代实施方案中,至少一种生物标志物选自由KV110、NAMPT、COPB、SPR2A和HV311组成的组。在特别优选的实施方案中,至少一种生物标志物是由这些蛋白质中的两种、三种、四种、或全部五种蛋白质组成的生物标志物组。

[0077] 生物标志物的预定参考浓度可以是浓度范围的形式,使得此范围之外的生物标志物浓度指示早期心力衰竭。可选地,生物标志物的预定参考浓度可以是具体值的形式,使得高于或低于此值的生物标志物浓度指示早期心力衰竭。因此,对于用于检测受试者的早期心力衰竭的每种生物标志物,已经测定或已知来自健康受试者的生物样品中生物标志物的预定参考浓度。

[0078] 在本发明的上下文中,对于测定获自健康受试者的生物样品中的至少一种生物标志物的预定参考浓度而言,“健康受试者”是没有心力衰竭的受试者。也就是说,健康受试者是没有任何心力衰竭的外在症状并且不会被归为NYHA I级或II级的受试者。

[0079] 本发明人惊奇地发现,与健康受试者中特定蛋白质的丰度相比,相同蛋白质在被归为NYHA I级或II级受试者的唾液中的丰度提高。相反地,与健康受试者中特定蛋白质的丰度相比,相同蛋白质在被归为NYHA I级或II级受试者的唾液中的丰度降低。

[0080] 尽管可以基于来自受试者的生物样品中仅一种生物标志物的浓度为受试者指定心力衰竭分级,但是基于生物样品中两种、三种、四种、五种或更多种生物标志物的浓度来指定分级是更有利的,因为使用更多的生物标志物可以实现更程度的分级确定性。

[0081] 当使用由两种或更多种生物标志物组成的生物标志物组来检测受试者的早期心力衰竭时,此组可以由这样的生物标志物组成:所述生物标志物在心力衰竭受试者唾液中的浓度比健康受试者唾液中相同生物标志物的浓度高。可选地,此组可以由这样的生物标志物组成:所述生物标志物在心力衰竭受试者唾液中的浓度比健康受试者唾液中相同生物标志物的浓度低。进一步作为替代,此组可以由生物标志物的组合组成,其中至少一种生物标志物在心力衰竭受试者唾液中的浓度高于相同的生物标志物在健康受试者唾液中的浓度,并且至少一种生物标志物在心力衰竭受试者唾液中的浓度低于相同的生物标志物在健康受试者唾液中的浓度。

[0082] 在第二方面中,本发明提供了一种用于检测受试者的早期心力衰竭的方法,该方法包括分析获自受试者的生物样品并且测定该样品中至少一种生物标志物的浓度,测定获自健康受试者的生物样品中该至少一种生物标志物的浓度,以及如果来自该受试者的样品中该至少一种生物标志物的浓度高于或低于获自健康受试者的生物样品中该至少一种生物标志物的浓度,则为受试者指定心力衰竭分级。

[0083] 生物样品中至少一种生物标志物的浓度,无论是来自潜在心力衰竭受试者还是健康受试者,都可以通过用于测定蛋白质浓度的任何适当方法来测定。例如,该浓度可以通过质谱分析来测定。将特定生物标志物在来自潜在心力衰竭受试者的样品的质谱中的峰强度与在来自健康受试者的样品的质谱中的峰强度进行比较,可以提供这两个样品中生物标志物丰度的相对差异的指示。更准确的比较可以通过使用以下实例中详述的SWATH-MS来获得。

[0084] 可选地,可以使用与至少一种生物标志物特异性结合的一种或多种试剂来测定生物样品中至少一种生物标志物的浓度。例如,所述试剂可以包括针对生物标志物的表位的抗体,其中抗体任选地包括用于检测抗体-生物标志物复合物的存在的标签(例如,荧光标记)。

[0085] 在第三方面中,本发明提供了一种用于检测受试者的早期心力衰竭的方法,该方法包括分析获自受试者的生物样品并且测定该样品中至少一种生物标志物的浓度,其中该

至少一种生物标志物选自由KLK1、TCPD、S10A7、DLDH、IGHA2、CAMP、KV110、NAMPT、COPB、SPR2A和HV311组成的蛋白质的组,以及如果至少一种生物标志物的浓度高于或低于该至少一种生物标志物的预定参考浓度,则为该受试者指定心力衰竭分级。可以从获自健康受试者的生物样品中测定至少一种生物标志物的预定参考浓度。

[0086] 可以分析生物样品中至少一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种或全部十一种蛋白质的浓度。尽管可以基于生物样品中仅一种蛋白质的浓度为受试者指定心力衰竭分级,但是基于生物样品中两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种或十一种蛋白质的浓度来指定分级是更有利的,因为使用更多的生物标志物可以实现更高分级的分级确定性。

[0087] 可以通过测定比较数据的灵敏度和特异性来评估分级的确定性。

[0088] 在第四方面中,本发明提供了一种用于检测受试者的早期心力衰竭的方法,该方法包括分析获自受试者的生物样品并且测定该样品中至少一种生物标志物的浓度,其中该至少一种生物标志物选自由KLK1、TCPD、S10A7、DLDH、IGHA2、CAMP、KV110、NAMPT、COPB、SPR2A和HV311组成的蛋白质组,测定获自健康受试者的生物样品中该至少一种生物标志物的浓度,以及如果来自受试者的样品中至少一种生物标志物的浓度高于或低于获自该健康受试者的生物样品中该至少一种生物标志物的浓度,则为该受试者指定心力衰竭分级。

[0089] 在第五方面中,本发明提供了一种用于检测与早期心力衰竭相关的至少一种生物标志物的存在的试剂盒,该试剂盒包括固体载体,该固体载体上固定有与该至少一种生物标志物特异性结合的至少一种分子。

[0090] 与至少一种生物标志物特异性结合的至少一种分子可以是任何适当的分子。优选地,该至少一种分子包括与至少一种生物标志物特异性结合的抗体。因此,固体载体可以具有固定在其上的一种、两种、三种、四种等等的抗体。

[0091] 固体载体可以是可被适当地修饰以用于固定抗体并且适合于至少一种检测方法的任何合适的材料。适用于固体载体的材料的代表性实例包括玻璃和改性玻璃或功能化玻璃、塑料(包括丙烯酸、聚苯乙烯以及苯乙烯与其它材料的共聚物,聚丙烯、聚乙烯、聚丁烯、聚氨酯、聚四氟乙烯等)、多糖、尼龙或硝化纤维素、树脂、二氧化硅或基于二氧化硅的材料(包括硅和改性硅)、碳、金属、无机玻璃和塑料。固体载体可允许在没有明显发荧光的情况下进行光学检测。

[0092] 固体载体可以是平面的,但是也可以使用其它构造的基材。例如,固体载体可以是内表面上放置有抗体的管。

[0093] 在第六方面中,本发明提供了一种用于检测与早期心力衰竭相关的至少一种生物标志物的存在的试剂盒,其中该至少一种生物标志物选自由KLK1、TCPD、S10A7、DLDH、IGHA2、CAMP、KV110、NAMPT、COPB、SPR2A和HV311组成的组,该试剂盒包括固体载体,该固体载体上固定有与至少一种生物标志物特异性结合的至少一种分子。

[0094] 实施例

[0095] 实施例1

[0096] 材料和方法

[0097] 研究参加者

[0098] 这项研究得到了昆士兰大学医学伦理机构委员会(University of Queensland

Medical Ethical Institutional Board) 和梅特卫生服务人类研究伦理委员会 (Mater Health Services Human Research Ethics Committee) 以及皇家布里斯班妇女医院研究管理机构 (Royal Brisbane and Women's Hospital Research Governance) 的批准。所有研究参加者均>18岁,并在收集样品前给予知情同意。健康对照的排除标准基于一项简单的问卷,要求志愿者表明其是否存在任何合并症 (comorbid disease) 和口腔疾病 (例如牙周病和牙龈炎、自身免疫性、传染性、肌肉骨骼或恶性疾病以及最近有过手术或外伤)。如果存在任何病症,则参加者将被排除在研究之外。志愿者来自白种人和亚洲种族,没有发烧或感冒的症状,并且口腔卫生良好。

[0099] 从2012年1月至2014年7月,从澳大利亚布里斯班的昆士兰大学、梅特成人医院 (Mater Adult Hospital) 或皇家布里斯班妇女医院 (Royal Brisbane and Women's Hospital) 招募了总计30名健康对照和33名有症状的心力衰竭患者。梅特成人医院和皇家布里斯班妇女医院的心脏病专家们使用纽约心脏病协会 (NYHA) 功能分级系统根据患者的临床症状对这些患者进行了分级。所有参与研究的患者均被分类为NYHA III级或IV级患者。心力衰竭患者的平均年龄为67.6岁,健康对照的平均年龄为49.7岁。心力衰竭患者队列中男性占63.3%,健康对照队列中男性占43.3%。

[0100] 唾液样品收集

[0101] 根据先前公布的方法,从早期和晚期心力衰竭患者以及健康对照中收集非刺激性静息全唾液 (Martinet W等,2003;Punyadeera C等,2011;Foo JY等,2013;Castagnola M等,2011;Helmerhorst EJ和Oppenheim FG,2007;Loo JA等,2010)。要求志愿者在收集唾液前至少30分钟不要进食或饮用 (水除外)。要求志愿者用水冲洗口腔以去除食物颗粒和碎屑,向前和向下倾斜头,在口腔中蓄积唾液,然后将其吐出到置于冰上的Falcon管 (50mL, Greiner, Germany) 中。将样品通过干冰转移到实验室,并且等分到Eppendorf低蛋白吸附管 (Eppendorf, USA) 中,并保存在-80℃,用于后期分析。

[0102] 唾液样品中的总蛋白质浓度

[0103] 对于初步筛查,使用2D Quant试剂盒 (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden) 测量了来自患者 (n=10) 和对照 (n=10) 的唾液样品中的总蛋白浓度。使用SpectraMax® 190酶标仪 (Molecular Devices, LLC, California, USA) 在480nm下测量吸光度。使用Quick Start™ Bradford Protein Assay (Bio-Rad, USA) 对获自患者 (n=30) 和对照 (n=30) 的唾液样品中的总蛋白浓度进行定量,以进行SWATH-MS验证 (见下文)。

[0104] 用于质谱分析的唾液样品制备

[0105] 分别汇合从心力衰竭患者和健康对照收集的蛋白质含量标准化的唾液样品。汇合来自每个个体的等量的总蛋白质,以便得到对照和患者各10mg的总的汇合蛋白质。根据制造商的说明,使用ProteoMiner®小容量试剂盒 (Bio-Rad, Hercules, CA) 对汇合样品进行处理。将珠粒填充床 (20μL) 添加到汇合唾液中,并在25℃在旋转振荡器上孵育16小时。通过在1,000相对离心力 (rcf) 下离心1分钟使珠粒团粒化,并弃去上清液。将珠粒用磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 洗涤三次,并在8M尿素、2%CHAPS和5%乙酸 (20μL) 中洗脱结合的蛋白。通过加入1:1的甲醇:丙酮 (80L) 沉淀出洗脱的蛋白质,将其在-20℃孵育16小时,并在18,000rcf离心10分钟。将蛋白质团粒重新悬浮于含1%SDS的pH 8的50mM Tris-HCl缓冲液中。通过添加

DTT至10mM并在95℃孵育10分钟来还原半胱氨酸,然后通过添加丙烯酰胺至25mM并在23℃孵育1小时进行烷基化。如上所述沉淀蛋白质,将其重新悬浮于含有蛋白质组学级胰蛋白酶(1μg) (SigmaAldrich,USA)的50mM NH_4HCO_3 (50μL)中,并在37℃孵育16小时。

[0106] 对于使用个体样品进行的SWATH-MS验证,向含有50μg总蛋白的唾液中补充等体积的100mM Tris-HCl缓冲液(pH 8)、2%SDS和20mM DTT,并在95℃孵育10分钟。然后如上所述将蛋白质烷基化、沉淀和消化。

[0107] 质谱和数据分析

[0108] 使用C18 Zip Tips (Millipore,USA) 对肽进行脱盐,并在配备Nanospray III接口(AB SCIEX)的Triple TOF 5600质谱仪上使用Prominence nanoLC系统(Shimadzu,Japan)通过LC-ESI-MS/MS对其进行分析,基本上如先前所述(Foo等,2013;Ovchinnikov等,2012)。在Agilent C18捕集器(孔径300Å,粒径5μm,0.3mm i.d.x 5mm)上,以30μL/min的流速,将约2μg的肽脱盐3分钟,然后在Vydac EVEREST反相C18 HPLC柱(孔径300Å,粒径5μm,150μm i.d.x 150mm)上以流速1μL/min进行分离。在2分钟内用1-10%梯度的缓冲液B分离肽,然后在45分钟内用10-60%的缓冲液B分离,其中缓冲液A(1%乙腈和0.1%甲酸),缓冲液B(80%乙腈和0.1%甲酸)。气体和电压设置根据需要进行调整。在350-1800的m/z进行MS-TOF扫描0.5秒,接着进行MS/MS的信息依赖型采集,以每频谱0.05秒在40-1800的m/z进行前20种肽的自动CE选择。使用相同LC参数进行SWATH分析,在350-1800的m/z进行MS-TOF扫描0.05秒,接着在400-1250的m/z范围,以26m/z隔离窗口(isolation window)、1m/z窗口重叠进行高灵敏度信息独立型采集,每次0.1秒。碰撞能量由Analyst软件(AB SCIEX)根据m/z窗口范围自动指定。

[0109] 使用ProteinPilot(AB SCIEX),通过使用标准设置搜索LudwigNR数据库(截至2012年1月27日从<http://apcf.edu.au>下载;16,818,973个序列;5,891,363,821个残基)来鉴别蛋白质,其中所述标准设置为:样品类型,鉴别;半胱氨酸烷基化,无;仪器,Triple-TOF 5600;种类,没有限制;ID焦点,生物修饰;酶,胰蛋白酶;搜索工作,详细的ID。对所有搜索都使用ProteinPilot进行伪发现率分析。置信度大于99%且局部伪发现率小于1%的鉴别出的肽用于进一步分析。如先前所述,基于蛋白质等级、得分、肽覆盖百分比和肽数目进行蛋白质丰度的半定量比较(Bailey和Schulz,2013)。使用Peak View 1.1获得提取的离子色谱图。使用ProteinPilot数据作为离子库用于SWATH分析。使用Peak View 1.2软件以标准设置自动测量蛋白质丰度。将每种蛋白质的丰度标准化为每个单独样品中已鉴别的蛋白质的总丰度,进行对数转换并使用ANOVA进行比较。使用基于R(RDevelopment Core Team,2011)的开源(open-sourced)统计包Msstats(Clough等,2012;Chang等,2012)对用SWATH分析生成的数据进行蛋白质重要性分析。使用组比较功能来比较心力衰竭患者与对照之间蛋白质丰度的显著变化。

[0110] 实施例2

[0111] 通过LC-ESI-MS/MS鉴别蛋白质

[0112] 针对心力衰竭的推定的新型唾液蛋白质生物标志物可以通过如下手段鉴定:分别汇合BNP升高患者的唾液和健康对照的唾液,减少ProteoMiner动态范围,使用胰蛋白酶消化蛋白质以及使用LC-ESI-MS/MS和数据库搜索来鉴别肽。为检测在心力衰竭患者与对照之

间存在丰度变化的蛋白质,使用半定量方法来比较针对每种蛋白质所鉴别的肽的等级、得分、肽覆盖百分比和肽数目。这种半定量方法鉴别出多种推定的丰度不同的蛋白质,如表2所示。

[0113] 表2比较心力衰竭患者与对照,丰度不同的唾液蛋白质

蛋白质登录号	N			评分			%Cov			肽(95%)		
	B	C	²	B	C	²	B	C	²	B	C	²
sp Q96DR5 SPLC2_HUMAN	53	16	37	4	18.51	-14.51	8.83	40.96	-32.12	2	9	-7
sp P22079 PERL_HUMAN	87*	27	60		12	-12		13.06	-13.06		6	-6
sp Q08380 LG3BP_HUMAN	72	25	47	2	12.02	-10.02	2.22	18.12	-15.90	1	6	-5
sp P06396 GELS_HUMAN	15	7	8	13.44	22.07	-8.63	18.16	27.62	-9.46	7	12	-5
sp P08670 VIME_HUMAN	79	51	28	2	8	-6	2.15	9.23	-7.08	1	4	-3
sp P07237 PDIA1_HUMAN	61	38	23	4	10	-6	3.54	10.24	-6.70	2	5	-3
sp P07737 PROF1_HUMAN	21	30	-9	12	11.62	0.38	55.71	55.71	0.00	7	7	0
sp P01833 PIGR_HUMAN	18	33	-15	12	10.59	1.41	12.30	8.51	3.79	6	5	1
sp P04075 ALDOA_HUMAN	22	52	-30	10	8	2	25.27	18.96	6.31	5	4	1
sp P06870 KLK1_HUMAN	47	101	-54	4.09	2	2.09	14.12	9.16	4.96	3	1	2
sp P0CG06 LAC3_HUMAN	31	74	-43	8	4	4	46.23	32.08	14.15	4	2	2
sp P01591 IGJ_HUMAN	45	128*	-83	5.54		5.54	23.27		23.27	4		4
sp P14780 MMP9_HUMAN	42	128*	-86	6		6	5.94		5.94	3		3
sp Q8TDL5 LPLC1_HUMAN	10	60	-50	17.07	6	11.07	22.73	8.88	13.85	11	3	8

B, BNP; C, 对照; ², BNP-对照; N, 蛋白质等级; *, 未检测到, 低等级。

[0115] 为了初步验证这些推定的生物标志物,对根据LC-ESI-MS/MS数据的提取的离子色谱图(图1)确定的、通过ProteinPilot数据库搜索(表3)鉴别的每种蛋白质的肽的丰度进行比较。肽丰度的比较鉴别出与对照样品相比,心力衰竭患者中丰度明显更高的两种蛋白质(长腭、肺和鼻上皮癌相关蛋白1,即LPLC1(P=0.0004)以及基质金属蛋白酶-9,即MMP9(P=0.02))以及丰度明显更低的两种蛋白质(凝溶胶蛋白,即GELS(P=0.03)以及短腭、肺和鼻相关蛋白2,即SPLC2(P=0.0003))。几种其它蛋白质显示出大的丰度变化(激肽释放酶1, KLK1;免疫球蛋白J链, IGJ;以及波形蛋白, VIME),由于检测到的被确信鉴别出的肽的数量少,因此无法对其进行统计比较。因此,该初步分析鉴别出心力衰竭的几种推定的唾液蛋白生物标志物。

[0116] 表3使用ProteinPilot鉴别的每种蛋白质的相对肽丰度

蛋白质登录号	肽	ZMass	m/z	z	评分
splP01591IIGJ_HUMAN	CYTAVVPLVYGGETK	0.0008	835.92	2	16
splP01591IIGJ_HUMAN	IIVPLNNR	-0.0028	469.78	2	8
splP01591IIGJ_HUMAN	MVETALTPDACYPD	0.0015	798.84	2	10
splP01833IPIGR_HUMAN	CPLLVDSEGWVK	-0.0043	708.85	2	10
splP01833IPIGR_HUMAN	DGSFSVVITGLR	-0.0022	625.83	2	15
splP01833IPIGR_HUMAN	ILLNPQDK	-0.0031	470.77	2	8
splP01833IPIGR_HUMAN	LVSLLNLVTR	-0.0015	614.88	2	16
splP01833IPIGR_HUMAN	NADLQVLKPEPELVYEDLR	0.0104	747.73	3	18
splP01833IPIGR_HUMAN	VYTVDLGR	-0.0021	461.74	2	7
splP06396IGELS_HUMAN	AQPVQVAEGSEPDGFWEALGGK	-0.0036	1136.54	2	16
splP06396IGELS_HUMAN	EPAHLMSLFGGKPMIYK	0.0006	508.77	4	10
splP06396IGELS_HUMAN	EVQGFESATFLGYFK	0.0017	861.92	2	9
splP06396IGELS_HUMAN	HVVPNEVVVQR	0.0011	638.36	2	10
splP06870IKLK1_HUMAN	LTEPADTITDAVK	-0.0024	687.35	2	12
splP06870IKLK1_HUMAN	QADEDYSHDLMLLR	-0.0019	853.39	2	12
splP08670IVIME_HUMAN	EEAENTLQSFRR	-0.0073	662.30	2	11
splP08670IVIME_HUMAN	EYQDLLNVK	-0.001	561.29	2	10
splP08670IVIME_HUMAN	ILLAELEQLK	-0.0036	585.35	2	8
[0117] splP0CG06ILAC3_HUMAN	AAPSVTLPFPSSSEELQANK	0.0026	662.67	3	16
splP0CG06ILAC3_HUMAN	AAPSVTLPFPSSSEELQANK	0.0024	993.51	2	16
splP0CG06ILAC3_HUMAN	SYSCQVTHEGSTVEK	-0.0038	575.92	3	12
splP0CG06ILAC3_HUMAN	YAASSYLSLTPEQWK	0.0013	872.43	2	16
splP0CG06ILAC3_HUMAN	YAASSYLSLTPEQWK	0.0031	581.95	3	17
splP14780IMMP9_HUMAN	LGLGADVAQVTGALR	-0.0032	720.90	2	9
splP14780IMMP9_HUMAN	QLSLPETGELDSATLK	0.0004	851.44	2	11
splP14780IMMP9_HUMAN	SLGPALLLLQK	-0.0047	576.86	2	11
splQ8TDL5ILPLC1_HUMAN	ALGFEEAAESSLTK	-0.0029	662.33	2	19
splQ8TDL5ILPLC1_HUMAN	DALVLTPLASLWKPSSPVSQ	-0.0008	998.53	2	15
splQ8TDL5ILPLC1_HUMAN	GDQLILNLNNISSDR	-0.011	836.42	2	14
splQ8TDL5ILPLC1_HUMAN	ILTQDTPEFFIDQGHAK	0.0046	653.99	3	13
splQ8TDL5ILPLC1_HUMAN	IPLDMVAGFNTPLVK	-0.0016	807.94	2	19
splQ8TDL5ILPLC1_HUMAN	SGVPVSLVK	-0.0006	443.27	2	9
splQ8TDL5ILPLC1_HUMAN	SSIGLINEK	-0.0023	480.76	2	10
splQ96DR5ISPLC2_HUMAN	FVNSVINTLK	-0.0028	567.82	2	10
splQ96DR5ISPLC2_HUMAN	ISNSLILDVK	-0.0023	551.32	2	14
splQ96DR5ISPLC2_HUMAN	LEPVLHEGLETVDNTLK	0.0002	636.34	3	13
splQ96DR5ISPLC2_HUMAN	LLNNVISK	-0.0029	450.77	2	9
splQ96DR5ISPLC2_HUMAN	LLPTNTDIFGLK	-0.0007	666.37	2	10
splQ96DR5ISPLC2_HUMAN	VDLGLVLQK	-0.0006	436.26	2	10

[0118] 实施例3

[0119] 使用SWATH-MS进行验证

[0120] 为了验证根据汇合样品的ProteoMiner®分析而鉴别出的推定的新型生物标志物,对从心力衰竭患者和对照中收集的各唾液样品进行了SWATH-MS检测。通过对心力衰竭患者和对照的唾液的无偏SWATH-MS蛋白质组学比较,鉴别出了丰度差异>2倍且校正的P<0.01的七种蛋白质。这包括通过ProteoMiner分析鉴别为推定的心力衰竭生物标志物的SPLC2蛋白。对照中SPLC2的相对丰度是心力衰竭患者中的1.89倍。具有高特异性的唾液(几乎完全组分分离)(参见图2A,校的值P<0.0001)证明SPLC2是心力衰竭的唾液蛋白生物标志物。由于KLK1在心力衰竭患者唾液中的丰度比在对照唾液中的丰度更高,因此通过ProteoMiner分析还推定地将KLK1鉴别为潜在生物标志物(图1)。KLK1丰度的提高也通过

SWATH-MS分析得到验证,这表明KLK1丰度在心力衰竭患者体中比在对照中增加1.3倍(图2B,校正的 $P < 0.0001$)。

[0121] 由于心力衰竭患者与对照相比SPLC2丰度降低而KLK1丰度升高,因此对这些经过单独验证的生物标志物的丰度比率在鉴别心力衰竭中的效用进行了研究。观测到在心力衰竭患者与对照之间存在较大且高度显著的区别,比率和高特异性的差异为5.3倍(图2C, $P = 0.00001$)。进行接收者操作特性(ROC)曲线分析,以确定SPLC2和KLK1作为生物标志物的诊断能力。KLK:SPLC2的分析(图3A,图4A)显示曲线下面积(AUC)值为0.75,灵敏度为70.0%,特异性为66.7%。

[0122] 实施例4

[0123] 生物标志物组的预测能力

[0124] 使用基于R(R Development Core Team,2011)的Msstats(Clough等,2012;Chang等,2012)评估了包括推定的生物标志物KV110、NAMPT、COPB、SPR2A和HV311的组对早期心力衰竭的预测能力(图5)。表4列出了各种队列(NYHA I级, $n=20$;NYHA III/IV级, $n=19$;健康对照, $n=20$)中生物标志物组合的灵敏度和特异性。

[0125] 表4生物标志物组合的灵敏度和特异性

[0126]		AUC	灵敏度	特异性	阳性预测值(PPV)	阴性预测值(NPV)
	I 级 vs 对照	0.96	95.0 %	90.0 %	94.7 %	90.5 %
[0127]	III/IV 级 vs 对照	0.85	79.0 %	95.0 %	82.6 %	93.8 %
	III/IV 级 vs I 级	0.65	73.8 %	60.0 %	70.6 %	63.7 %

[0128] 图6中的ROC曲线提供了五种生物标志物KV110、NAMPT、COPB、SPR2A和HV311的组合的诊断潜力的有用汇总。ROC曲线下的面积越接近1,诊断潜力越好。与健康对照中的五种生物标志物相比,NYHA I级患者中的五种生物标志物组合的ROC曲线的AUC为0.96,灵敏度为95.0%,特异性为90.0%(图6)。这些结果表明五种生物标志物的组合具有高诊断能力。

[0129] 使用基于R(R Development Core Team,2011)的Msstats(Clough等,2012;Chang等,2012)评估了包括推定的生物标志物KLK1、TCPD、S10A7、DLDH、IGHA2和CAMP的组对早期心力衰竭的预测能力(图7)。表5列出了各种队列(NYHA I级, $n=20$;NYHA III/IV级, $n=19$;健康对照, $n=20$)中生物标志物的组合的灵敏度和特异性。

[0130] 表5生物标志物的组合的灵敏度和特异性

		AUC	灵敏度	特异性	PPV	NPV
[0131]	I 级 vs 对照					
	III/IV 级 vs 对照	0.91	84.2%	85.0%	85.0%	84.2%
	III/IV 级 vs I 级	0.71	68.4%	70%	70.0%	68.5%

[0132] 图8中的ROC曲线提供了六种生物标志物KLK1、TCPD、S10A7、DLDH、IGHA2和CAMP的组合的诊断潜力的有用汇总。ROC曲线下的面积越接近1,诊断潜力越好。与健康对照中的六

种生物标志物相比,NYHA I级患者中的六种生物标志物组合的ROC曲线的AUC为0.86,灵敏度为80.0%,特异性为70.0%(图8)。这些结果表明六种生物标志物的组合具有高诊断能力。

[0133] 使用基于R(R Development Core Team,2011)的Msstats(Clough等,2012;Chang等,2012)评估了包括推定的生物标志物KLK1、S10A7和CAMP的组对心力衰竭高风险个体的预测能力(图9)。表6列出了各种队列(心力衰竭患者,n=100;患心力衰竭风险高的个体(SCREEN-HF),n=121;健康对照,n=88)中生物标志物的组合的灵敏度和特异性。

[0134] 表6生物标志物的组合的灵敏度和特异性

		AUC	灵敏度	特异性	PPV	NPV
[0135]	SCREEN-HF vs 对照					
	HF 患者 vs 对照	0.78	73.0%	72.7%	70.3%	75.3%

[0136] 图10示出在参加研究后患有心血管疾病的研究受试者与没有因心血管疾病入院的受试者之间的预测评分。

[0137] 在SCREEN-HF队列的99名参加者中,有11人因初步诊断为心血管疾病而入院。在这11人中,由三个标志物的组产生的预测评分在0.139到0.996的范围,中值为0.517(IQR:0.256-0.920),而在没有因心血管疾病入院的个体中,此预测评分范围为0.086到0.992,中值为0.294(IQR:0.172-0.679)。两组SCREEN-HF队列之间存在统计学上的显著差异(p=0.0382)。

[0138] 为验证作为诊断组的成员的KLK1、TCPD、S10A7、DLDH、IGHA2和CAMP,对随机选择的6名健康对照和随机选择的6名心力衰竭患者进行了蛋白质印迹分析。如图11所示,在个别唾液样品中检测到S10A7和IGHA2。6个心力衰竭患者样品中有5个检测到S10A7,而6个健康对照样品中只有1个检测到S10A7。将每个样品的带强度针对健康对照的平均带强度进行标准化。与SWATH-MS的结果相似,S10A7和IGHA2这两者在心力衰竭患者样品中均呈现出高于健康对照样品的蛋白质丰度。心力衰竭患者中S10A7的平均带强度是健康对照样品中的6倍。IGHA2在心力衰竭患者样品中的丰度高于健康对照样品(1.06:1),但未观测到显著差异。与初始筛查的结果相反,KLK1在健康对照中的表达与患者样品相似(1:0.98)。CAMP表达也不同,在心力衰竭患者中的表达高于对照(1:1.452)。蛋白质印迹未检测到TCPD和DLDH。

[0139] 整个说明书中所提及的“一个实施方案”或“一种实施方案”是指结合此实施方案描述的特定特征、结构或特性包括在本发明的至少一个实施方案中。因此,贯穿本说明书在多个地方出现的短语“在一个实施方案中”或“在一种实施方案中”并不一定都指同一个实施方案。此外,特定的特征、结构或特性可以以任何适当方式组合成一个或多个组合。

[0140] 根据法规,已经以或多或少针对结构或方法特征的语言描述了本发明。应理解,本发明不限于所示出或描述的特定特征,因为本文所述的方式包括实施本发明的优选形式。因此,在由本领域技术人员适当解释的所附权利要求书(如果有)的适当范围内,可以以任何形式或修改主张本发明。

[0141] 引文列表

[0142] Australian Institute of Health and Welfare 2011.Cardiovascular

disease:Australian facts 2011.Cardiovascular disease series.Cat.no.CVD 53.Canberra:AIHW. (<http://www.aihw.gov.au/WorkArea/DownloadAsset.aspx?id=10737418530>)

[0143] Bailey UM and Schulz BL, Deglycosylation systematically improves N-glycoprotein identification in liquid chromatography-tandem mass spectrometry proteomics for analysis of cell wall stress responses in *Saccharomyces cerevisiae* lacking aAlg3p, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2013; 923-924:16-21

[0144] Carlson KJ, Lee DCS, Goroll AH, Leahy M and Johnson RA, An analysis of physicians' reasons for prescribing long-term digitalis therapy in outpatients, *J Chron Dis*, 1985; 38:733-739

[0145] Castagnola M, Inzitari R, Fanali C, Iavarone F, Vitali A, Desiderio C, Vento G, Tirone C, Romagnoli C, Cabras T, Manconi B, Sanna MT, Boi R, Pisano E, Olianias A, Pellegrini M, Nemolato S, Heizmann CW, Faa G and Messina I, The surprising composition of the salivary proteome of preterm human newborn, *Mol Cell Proteomics*, 2011; 10(1):M110.003467

[0146] Chang CY, Picotti P, Hüttenhain R, Heinzelmann-Schwarz V, Jovanovic M, Aebersold R and Vitek O, Protein significance analysis in selected reaction monitoring (SRM) measurements, *Mol Cell Proteomics*, 2012; 11(4):M111.014662

[0147] Clough T, Thaminy S, Ragg S, Aebersold R and Vitek O, Statistical protein quantification and significance analysis in label-free LC-MS experiments with complex designs, *BMC Bioinformatics*, 2012; 13(Suppl 16):S6

[0148] Foo JYY, Wan Y, Schulz BL, Kostner K, Atherton J, Cooper-White J, Dimeski G and Punyadeera C, Circulating fragments of N-terminal pro-B-type natriuretic peptides in plasma of heart failure patients, *Clin Chem*, 2013; 59:1523-1531

[0149] Harlan WR, Oberman A, Grimm R and Rosati RA, Chronic congestive heart failure in coronary artery disease: clinical criteria, *Ann Intern Med*, 1977; 86(2):133-138

[0150] Helmerhorst EJ and Oppenheim FG, Saliva: a dynamic proteome, *J Dent Res*, 2007; 86:680-693

[0151] Krum H, Jelinek MV, Stewart S, Sindone A and Atherton JJ, 2011 Update to national heart foundation of Australia and cardiac society of Australia and New Zealand guidelines for the prevention, detection and management of chronic heart failure in Australia, 2006, *Med J Aust*, 2011; 194(8):405-409

[0152] Loo JA, Yan W, Ramachandran P and Wong DT, Comparative human salivary and plasma proteomes, *J Dent Res*, 2010; 89:1016-1023

[0153] McKee PA, Castelli WP, McNamara PM and Kannel WB, The natural history of congestive heart failure: the Framingham study, *N Engl J Med*, 1971; 285(26):1441-1446

- [0154] Marian AJ and Nambi V, Biomarkers of cardiac disease, *Expert Rev Mol Diagn*, 2004; 4: 805-20
- [0155] Martinet W, Schrijvers DM, De Meyer GRY, Herman AG and Kockx MM, Western array analysis of human atherosclerotic plaques: Downregulation of apoptosis-linked gene 2, *Cardiovasc Res*, 2003; 60 (2) : 259-267
- [0156] Ovchinnikov DA, Cooper MA, Pandit P, Coman WB, Cooper-White JJ, Keith P, Wolvetang EJ, Slowey PD and Punyadeera C, Tumor-suppressor gene promoter hypermethylation in saliva of head and neck cancer patients, *Transl Oncol*, 2012; 5 (5) : 321-326
- [0157] Palazzuoli A, Iovine F, Gallotta M and Nuti R, Emerging cardiac markers in coronary disease: Role of brain natriuretic peptide and other biomarkers, *Minerva Cardioangiol*, 2007; 55 (4) : 491-496
- [0158] Punyadeera C, Dimeski G, Kostner K, Beyerlein P and Cooper-White J, One-step homogeneous C-reactive protein assay for saliva, *J Immunol Methods*, 2011; 373: 19-25
- [0159] R Development Core Team (2011), *R: A language and environment for statistical computing*, Vienna, Austria: the R Foundation for Statistical Computing
- [0160] Shamsham F and Mitchell J, Essentials of the diagnosis of heart failure, *Am Fam Physician*, 2000; 61 (5) : 1319-1328
- [0161] The Criteria Committee of the New York Heart Association, *Nomenclature and Criteria for Diagnosis of Diseases of the Heart and Great Vessels*, 9th ed., Little, Brown; Boston, 1994, pp. 253-256

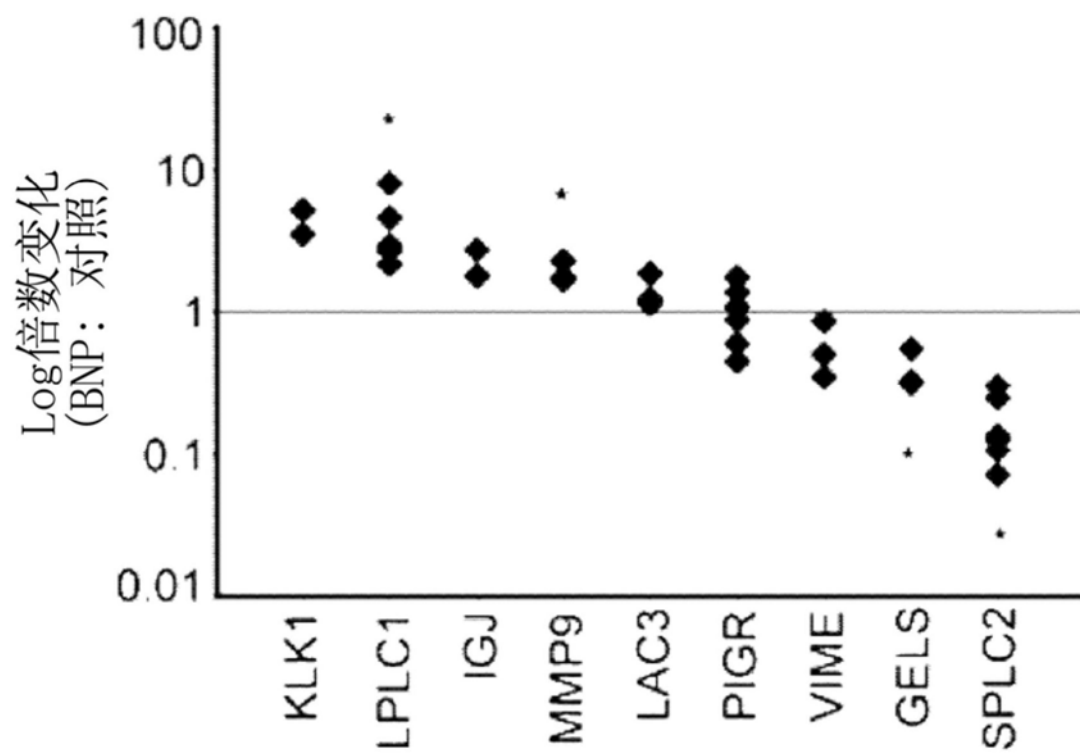


图1

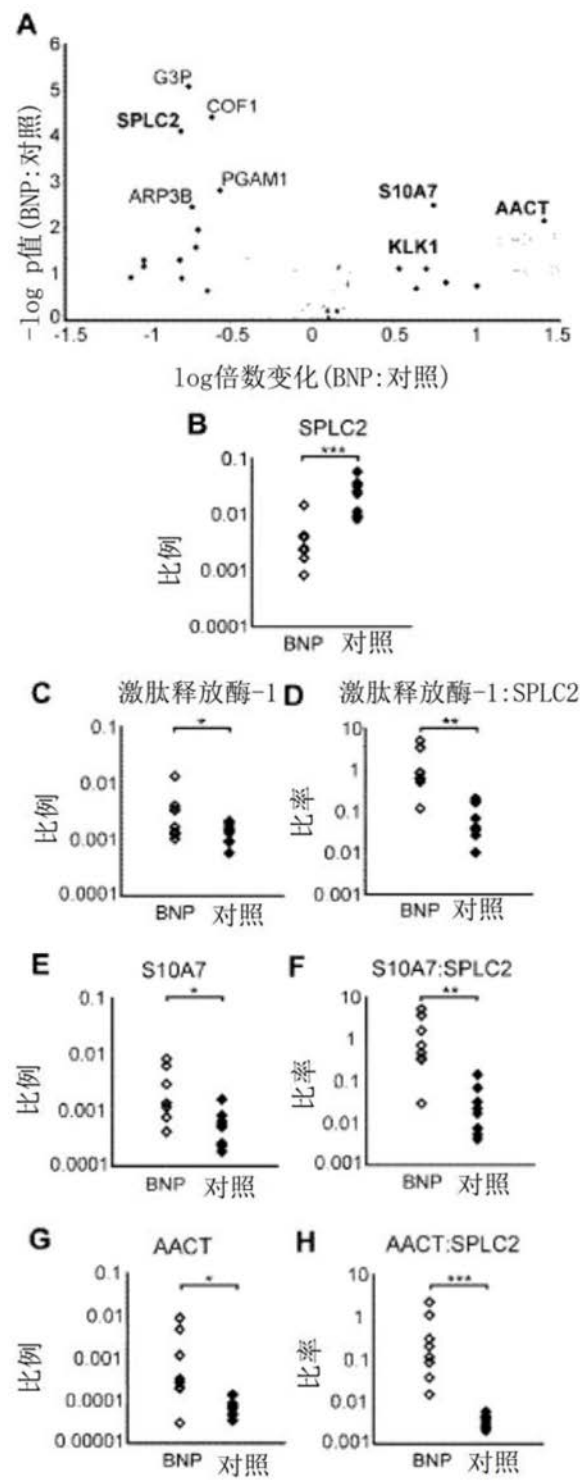


图2

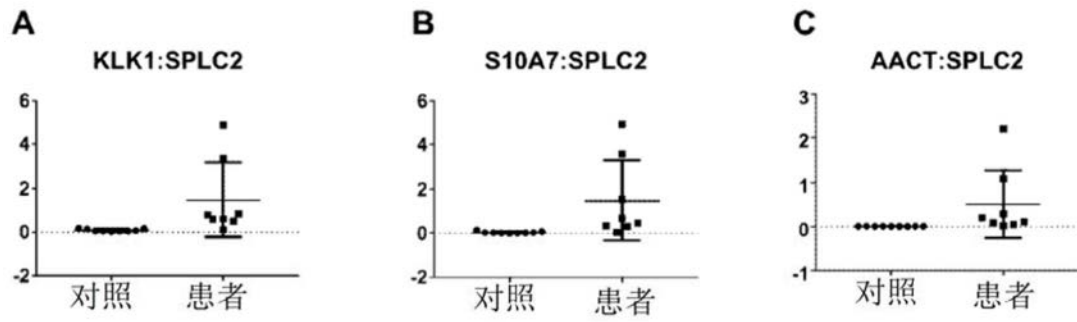


图3

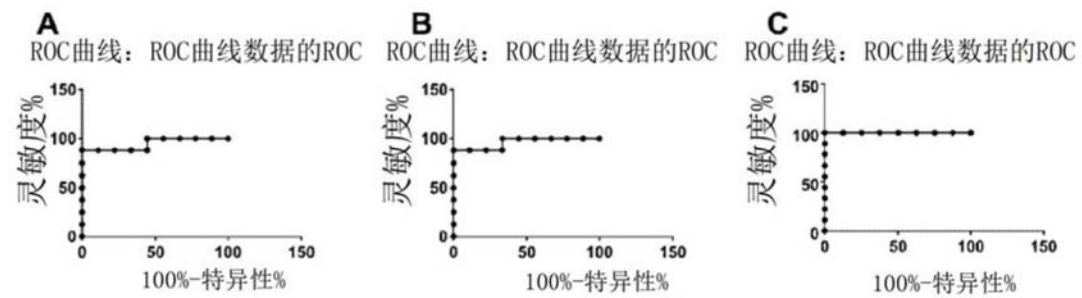


图4

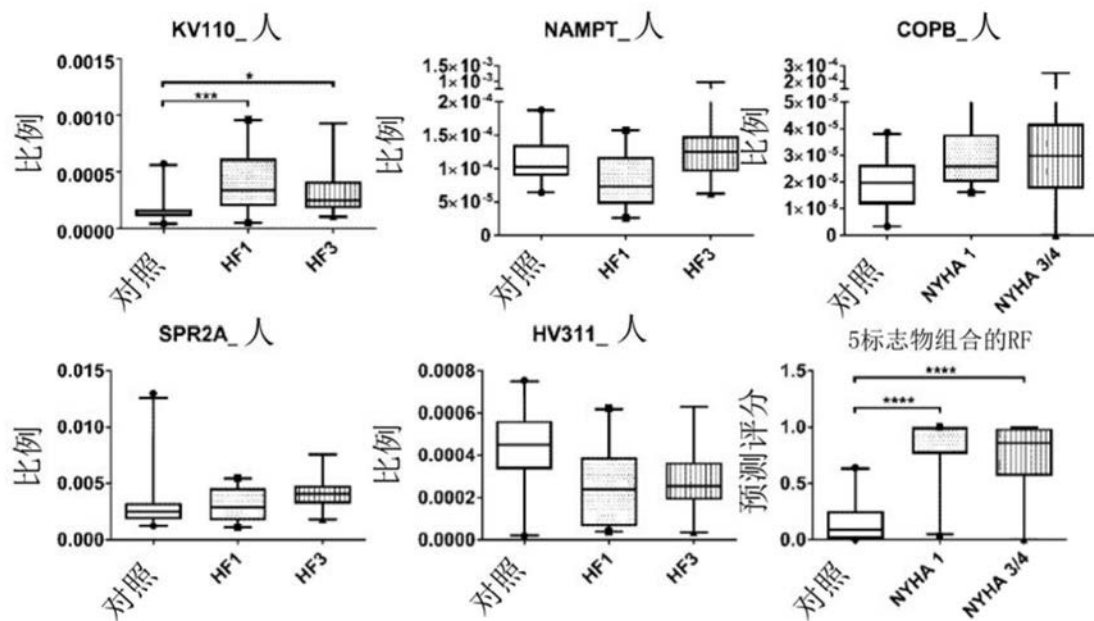


图5

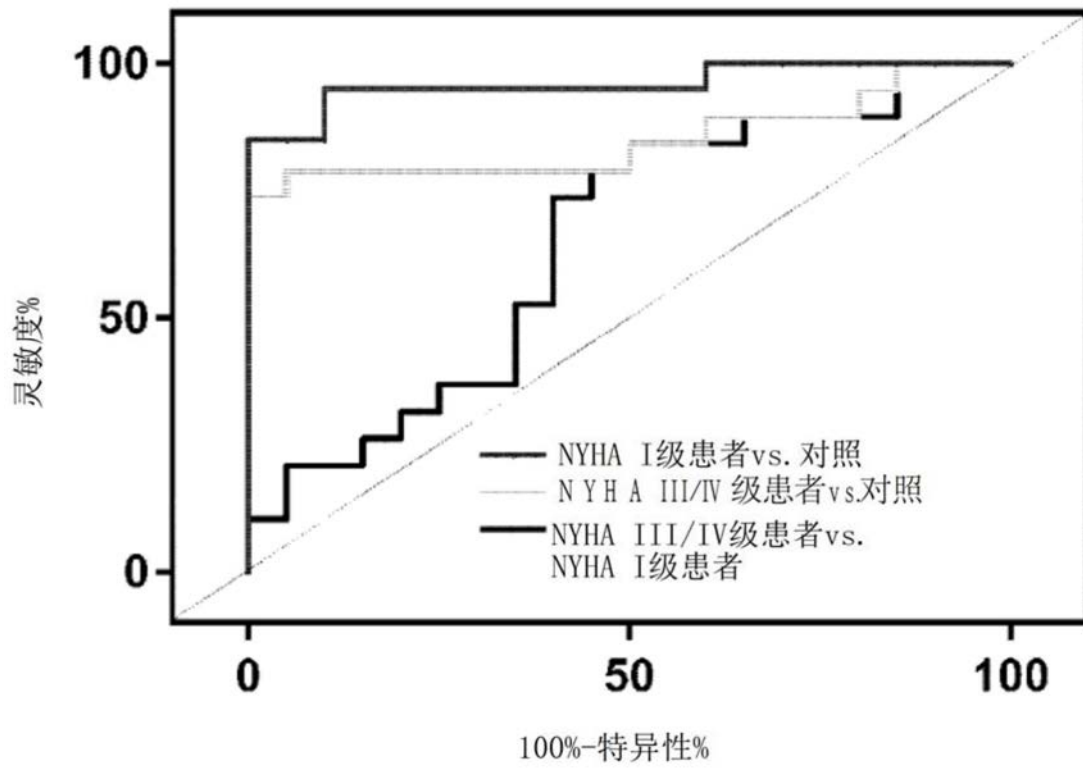


图6

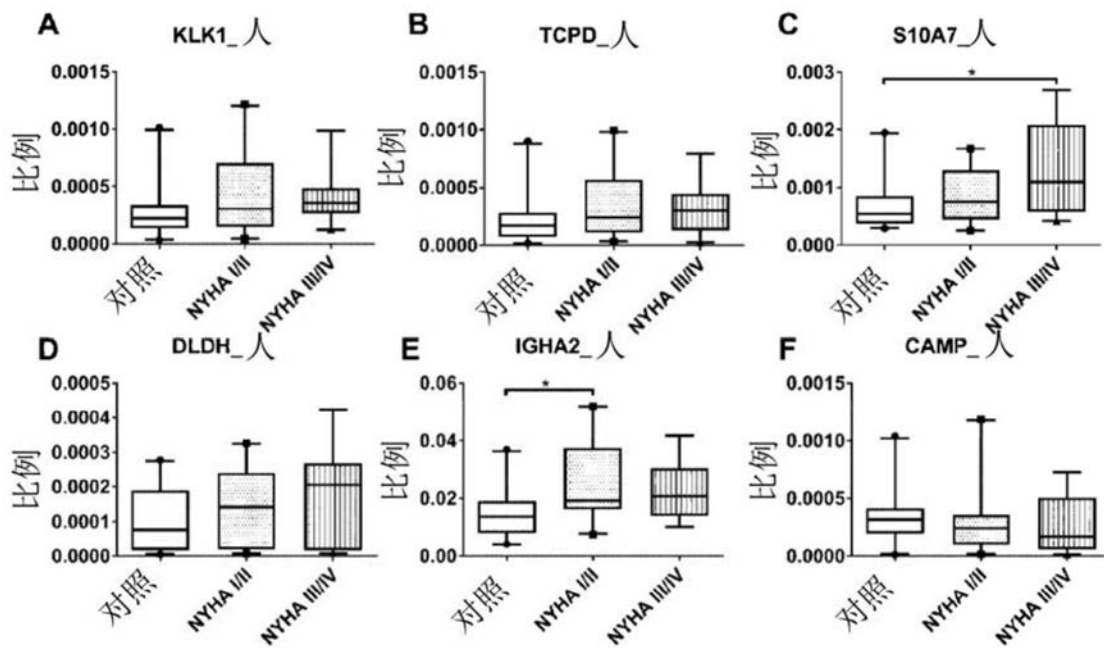


图7

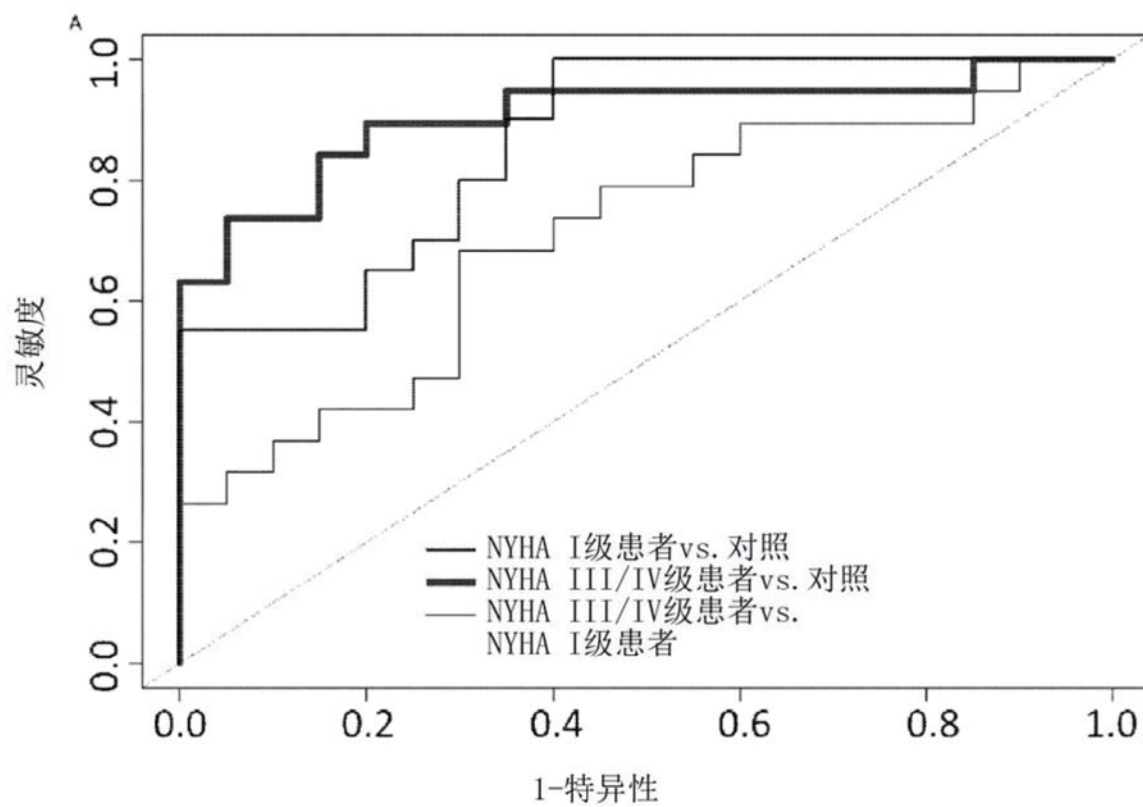


图8

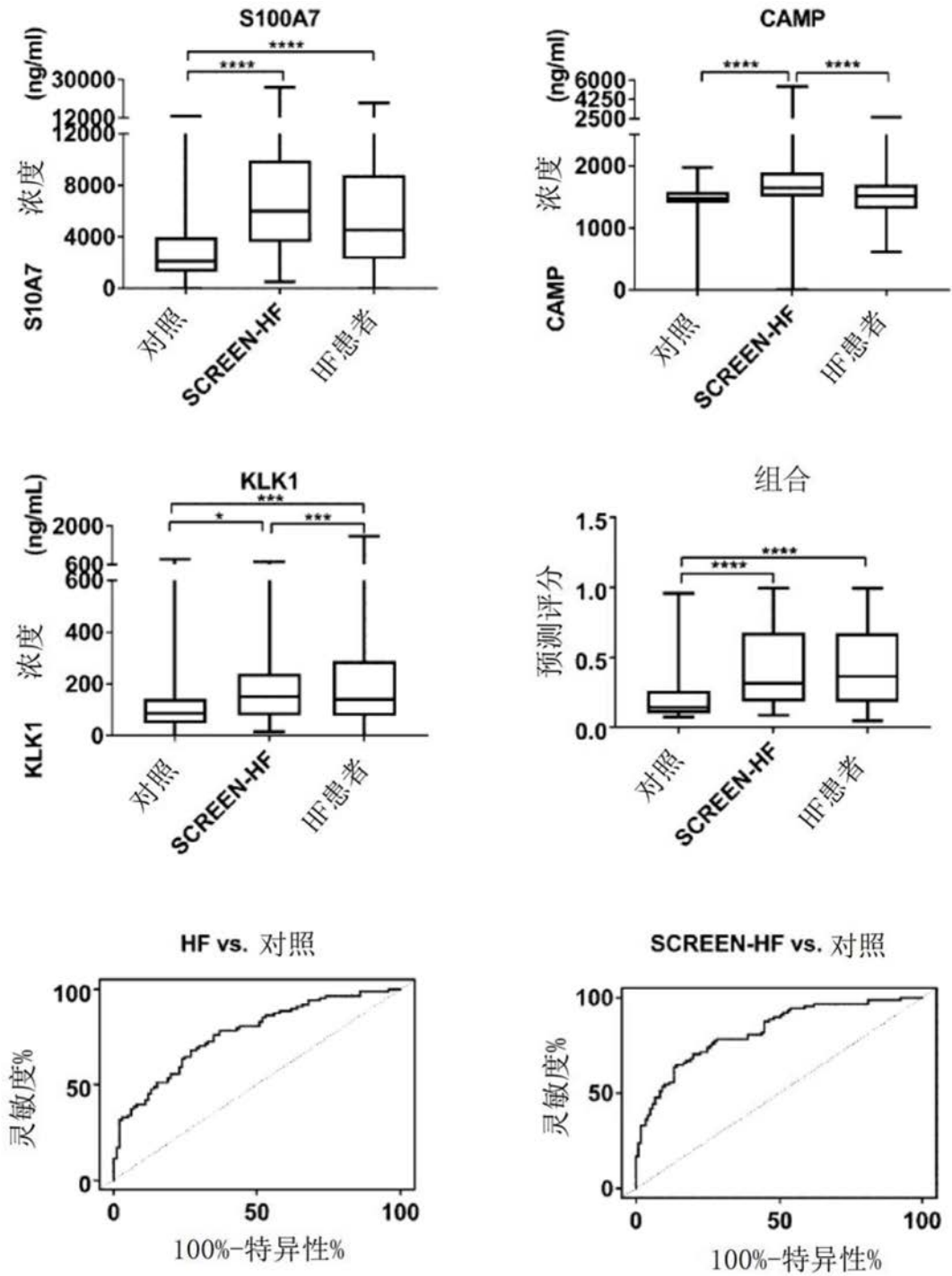


图9

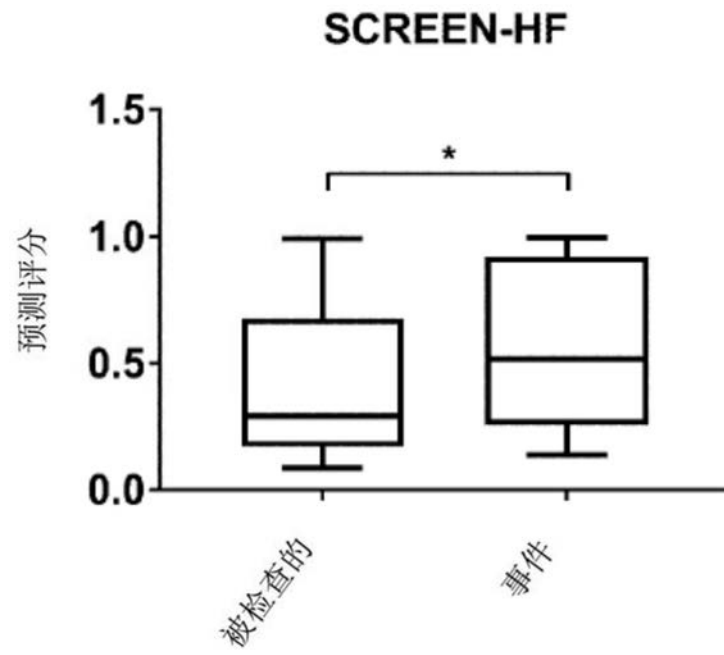


图10

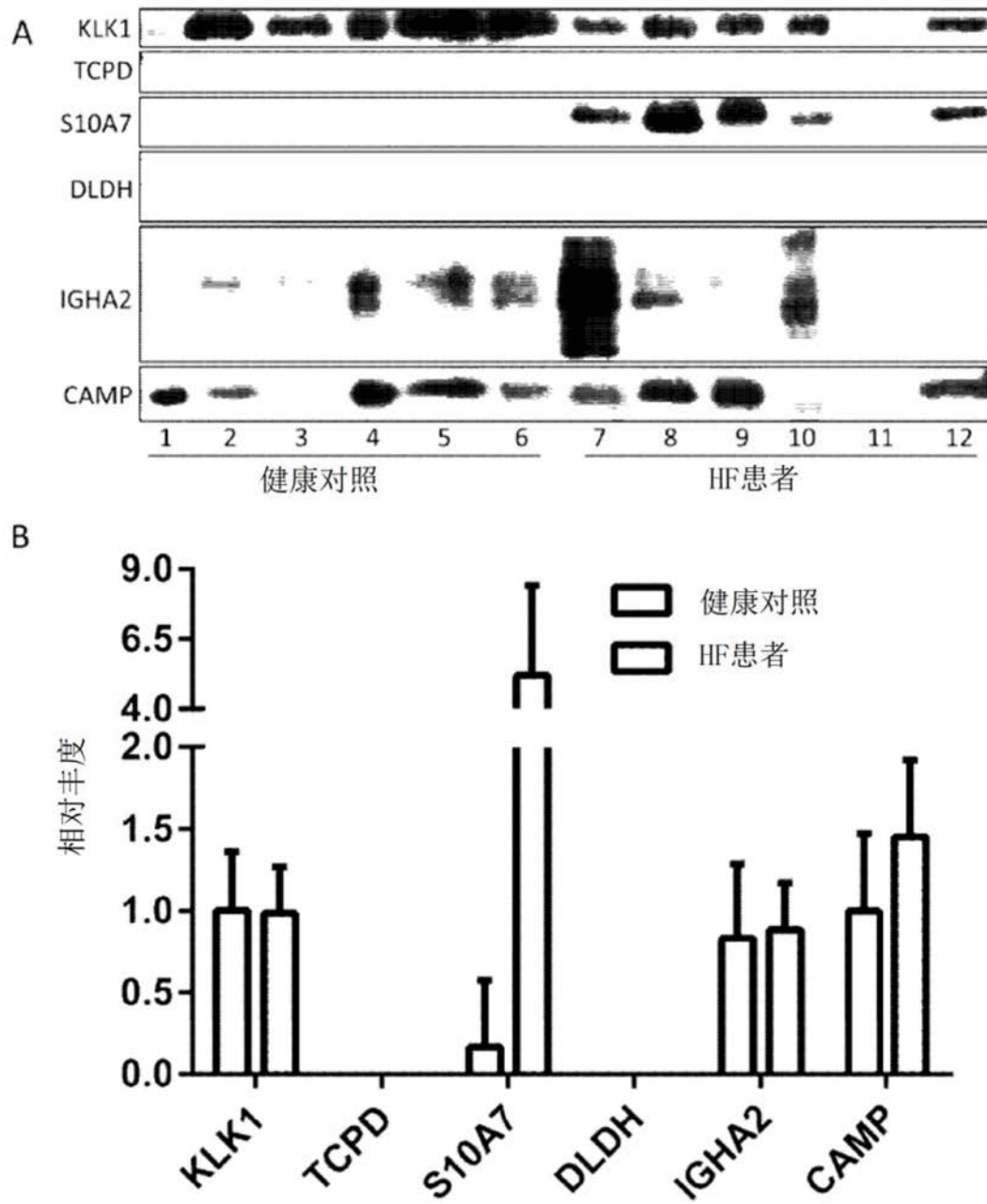


图11

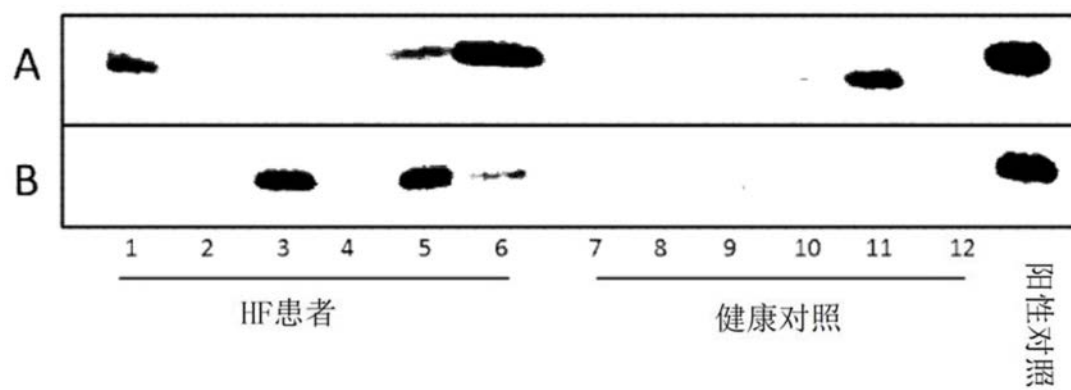


图12