



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102482343 A

(43) 申请公布日 2012. 05. 30

(21) 申请号 201080026562. 3

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2010. 06. 15

C07K 16/00 (2006. 01)

(30) 优先权数据

C12Q 1/26 (2006. 01)

09162874. 3 2009. 06. 16 EP

G01N 33/573 (2006. 01)

09167940. 7 2009. 08. 14 EP

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 12. 15

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2010/058414 2010. 06. 15

(87) PCT申请的公布数据

W02010/146064 EN 2010. 12. 23

(71) 申请人 B. R. A. H. M. S 有限公司

地址 德国亨尼希斯多夫

(72) 发明人 约阿希姆·斯特鲁克 亚宁·舒特

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限
责任公司 11219

代理人 张颖 樊卫民

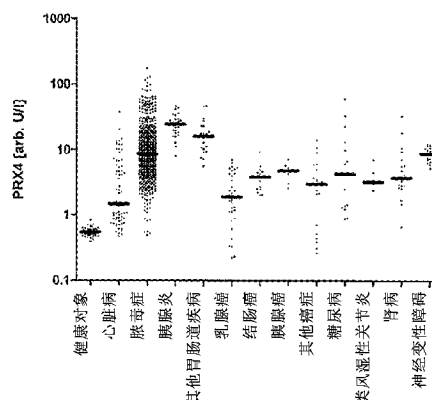
权利要求书 1 页 说明书 19 页 附图 10 页

(54) 发明名称

过氧化物氧还蛋白 4 的诊断应用

(57) 摘要

本发明涉及一种用于诊断或预后对象的疾病或临床病症的方法,所述方法包含下列步骤:(i) 提供对象的体液样品,(ii) 测定所述样品中过氧化物氧还蛋白 4 (PRX4) 或其长度为至少 20 个氨基酸残基的片段的水平,以及 (iii) 将 PRX4 或其片段的水平与疾病或临床病症相关联。



1. 一种方法,其用于对象的疾病或临床病症的诊断或鉴别诊断或预后、或用于对象的风险分层或治疗监测或治疗指导,所述方法包含下列步骤:

(i) 提供对象的体液样品,

(ii) 测定所述对象中过氧化物氧还蛋白 4 (PRX4) 或其长度为至少 20 个氨基酸残基的片段的水平,以及

(iii) 将 PRX4 或其片段的水平与疾病或临床病症相关联。

2. 权利要求 1 的方法,其前提是所述疾病或临床病症不是选自类风湿性关节炎、骨关节炎和强直性脊椎炎的疾病或临床病症。

3. 权利要求 1 的方法,其中所述疾病或临床病症与氧化应激相关。

4. 权利要求 1 至 3 任一项的方法,其中所述疾病或临床病症选自传染病、心脏病、败血症、胰腺炎、胃肠道疾病、癌症、糖尿病、类风湿性关节炎、肾病和神经变性病。

5. 权利要求 4 的方法,其中所述疾病或临床病症选自传染病、心脏病、败血症、胰腺炎、胃肠道疾病、癌症、糖尿病、肾病和神经变性病。

6. 权利要求 1 至 5 任一项的方法,其中样品中 PRX4 或其片段的水平通过将所述样品与至少一种 PRX4 结合物相接触来测定。

7. 权利要求 6 的方法,其中所述至少一种结合物是抗体,优选为单克隆抗体。

8. 权利要求 1 至 7 任一项的方法,其中 PRX4 或其片段在夹心免疫分析法中测定。

9. 权利要求 1 至 8 任一项的方法,其中在 PRX4 或其片段测定之前或期间,将样品与还原剂例如二硫苏糖醇 (DTT) 相接触。

10. 权利要求 1 至 9 任一项的方法,其中体液样品选自血液样品、血清样品、血浆样品、脑脊液样品、唾液样品、溶解的组织样品和尿液样品或任何上面提到的样品的提取物。

11. 权利要求 10 的方法,其中样品是血清样品。

12. 其中还测定其他临床参数,所述其他临床参数选自年龄、性别、收缩血压、舒张血压、抗高血压治疗、体重指数、糖尿病的存在和当前吸烟情况和 / 或其他实验室参数。

13. 权利要求 1 至 12 任一项的方法,其中使用的抗体与包含在 SEQ ID NO :1 的 PRX4 的 1 至 73 位中的表位结合,并且与 PRX4 相关蛋白的交叉反应性低于 20%。

14. 一种抗体,其与包含在 SEQ ID NO :1 的 PRX4 的 1 至 73 位中的表位结合,并且与 PRX4 相关蛋白的交叉反应性低于 20%。

15. 权利要求 14 的抗体,其中所述抗体与包含在 SEQ ID NO :1 的 PRX4 的 39-65 位中的表位结合。

16. 一种试剂盒,其包含权利要求 14 或 15 的至少一种抗体。

17. 含有 PRX4 和 / 或其长度为至少 20 个氨基酸残基的片段的器官 - 或组织 - 提取物和 / 或其富集或纯化级分作为用于提供在测定 PRX4 和 / 或其长度为至少 20 个氨基酸残基的片段中使用的校准物和 / 或对照样品的来源的应用。

18. 权利要求 1 至 13 任一项的方法、权利要求 14 或 15 任一项的抗体或权利要求 16 的试剂盒在对与氧化应激相关的疾病或临床病症例如传染病、心脏病、败血症、胰腺炎、胃肠道疾病、癌症、糖尿病、类风湿性关节炎、肾病或神经变性病进行诊断、鉴别诊断、风险分层、预后、供实施预防和 / 或治疗措施和 / 或患者管理的分层、治疗监测和或治疗指导中的应用。

过氧化物氧还蛋白 4 的诊断应用

发明领域

[0001] 本发明属于临床诊断学领域。具体来说,本发明涉及体液样品中过氧化物氧还蛋白 4(peroxiredoxin 4, PRX4) 浓度的测定以及过氧化物氧还蛋白 4 的诊断应用。

[0002] 发明背景

[0003] 需氧生物的主要问题是暴露于活性氧类别 (ROS)。然而,细胞内有许多促进 ROS 清除的生物学机制。已经提出,许多疾病例如心脏病、癌症、传染病和神经变性病,与产生 ROS 的一方面过程和另一方面的保护性过程之间的不平衡相关 [Dalle-Donne, I. 等, (2006) Clin. Chem. 52, 601-623; Valko, M. 等, (2007) Int. J. Biochem. Cell Biol. 39, 44-84]。一些 ROS 也具有有益效应,例如 H₂O₂ 在细胞吞噬性免疫细胞的微生物吞噬过程中是重要的细胞毒性剂 [El-Benna 等, (2005) Arch. Immunol. Ther. Exp. 53, 199-206]。在细胞吞噬性免疫细胞中, H₂O₂ 可以从 NADPH 氧化酶产生的超氧化物阴离子 (O²⁻) 经催化产生。此外,已知哺乳动物细胞因子和生长因子也通过 NADPH 氧化酶刺激 H₂O₂ 产生,用于第二信使信号传导目的 [Veal, E. A. 等, (2007) Mol. Cell 26, 1-14; Valko, M. 等, (2007) Int. J. Biochem. Cell Biol. 39, 44-84]。H₂O₂ 主要作为代谢过程的副产物产生,例如电子传递“泄漏”从线粒体释放 O²⁻ [Muller, F. L. (2007) J. Biol. Chem. 279, 49064-49073]。H₂O₂ 能够直接修饰脂质、蛋白质和核酸。因此,存在用于降解过氧化物的有效的脱毒途径。例如,过氧化物可以通过与谷胱甘肽、维生素和其他非酶抗氧化剂反应被直接降解,或者可以通过酶例如过氧化氢酶 (游离 H₂O₂) 或谷胱甘肽过氧化物酶 (H₂O₂ 和脂质过氧化氢物) 降解 [Valko, M. 等, (2007) Int. J. Biochem. Cell Biol. 39, 44-84]。过氧化物酶的一个特殊家族是所谓的过氧化物氧还蛋白 (peroxiredoxin), 其除了过氧化物酶活性之外还具有其他功能,例如交流细胞中的过氧化物应激。

[0004] 到目前为止,已经在哺乳动物中鉴定到 6 种过氧化物氧还蛋白同种型 [Wood, Z. A. 等, (2003) Trends Biochem. Sci. 28, 32-40; Hofman, B. 等, (2002) Biol. Chem. 383, 347-364]。它们的细胞位置包括胞质溶胶 [PRX 1 (过氧化物氧还蛋白 1)、2 和 6]、核 (PRX 1)、线粒体 (PRX3 和 6) 和过氧化物酶体 (PRX 5)。所有过氧化物氧还蛋白都包含攻击过氧化物的氧化还原活性的“过氧化”半胱氨酸残基。在该过程中,这些半胱氨酸被氧化成半胱氨酸亚磺酸 [Ellis, H. R. (1997) Biochemistry 36, 13349-133567; Choi, H. J. (1998) Nat. Struct. Biol. 5, 400-406; Montemartini, M. (1998) Eur. J. Biochem. 264, 516-524]。

[0005] 人类中的人 PRX 1、2、3 和 4 在靠近其 C-端处具有附加的“解离 (resolving)”半胱氨酸,因此被称为 2-Cys 过氧化物氧还蛋白。在过氧化物消除后,过氧化的半胱氨酸次磺酸与其配偶体的解离半胱氨酸反应,形成稳定的分子间二硫化物 [Ellis, H. R. (1997) Biochemistry 36, 13349-133567; Hirotsu, S. 等, (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96, 12333-12338]。为了再生活性位点中的硫醇,所述二硫化物进而可以被细胞特异性二硫化物还原酶还原。2-Cys 过氧化物氧还蛋白典型为同二聚体,然而,据认为它们经历进一步的流态转变成为环状十聚体并可复原 [Alphey, M. S. 等, (2000) J. Mol. Biol. 300, 903-916; Schroder, E. 等, (2000) Structure 8, 605-615; Chauhan, R. 等, (2001) Biochem. J. 354,

209-215; Wood, Z. A. 等, (2002) *Biochemistry* 41, 5493-5504]。十聚体的形成排列了活性位点以有效催化, 而活性位点中二硫化物的形成使复合物不稳定。据认为, 在高过氧化物浓度下, 发生过氧化半胱氨酸过度氧化成亚磺酸 (SO_2H) 衍生物 [Rabilloud, T. 等, (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 19396-19401; Wagner, E. 等, (2002) *Biochem. J.* 366, 777-785], 并通过阻止解离二硫化物的形成使过氧化物氧还蛋白十聚体稳定 [Schroder, E. 等, (2000) *Structure* 8, 605-615]。已显示在小鼠肺细胞中这导致 PRX 2 十聚体的聚集, 所述十聚体的出现和随后的解体与细胞周期的阻滞和最终恢复相关 [Phalen, T. J. (2006) *J. Cell Biol.* 175, 779-789]。寡聚状态的 PRX 2 可用作胞质溶胶型 H_2O_2 的监测物。

[0006] 过氧化物氧还蛋白的其他功能也表现出取决于寡聚状态, 例如伴侣蛋白活性与酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 胞质溶胶过氧化物氧还蛋白在应激后的高分子量级分 [Jang, H. H. 等, (2004) *Cell* 117, 625-635] 和体外十聚体人 PRX 1 [Lee, W. 等, (2007) *J. Biol. Chem.* 282, 22011-22022] 相关。在 PRX 1 的情况下, 该十聚体被阻止二聚体-十聚体转变的非催化性二硫化物共价稳定, 从而降低了过氧化物酶活性并增加了伴侣蛋白活性的优势 [Lee, W. 等, (2007) *J. Biol. Chem.* 282, 22011-22022]。

[0007] PRX4 具有 N-端序列, 其可能是用于定位到内质网或膜中或用于分泌的潜在信号。PRX4 在 10 年前就已鉴定, 然而对于 PRX4 在哺乳动物细胞中的真正作用还存在一些混乱。研究显示, PRX4 是一种减弱 NF- κ B (核因子 κ B) 活性的胞质溶胶蛋白 [Jin, D. Y. 等, (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 30952-30961]。来自另一项研究的结果表明 PRX4 是激活 NF- κ B 的分泌蛋白 [Haridas, V. 等, (1998) *J. Immunol.* 161, 1-6]。这种推测是基于下述发现, 即通过 Western 印迹在 Jurkat 细胞和 HL-60 细胞的培养上清液中鉴定到 PRX4。然而, 这不排除最初位于胞质溶胶中的 PRX4 仅仅是由于细胞培养过程中人为引起的细胞损伤或坏死而泄漏到上清液中的可能性。其他研究显示, 在非洲绿猴细胞中瞬时过表达的大鼠 PRX4 被易位并结合到细胞表面 [Matsumoto A. 等, (1999) *FEBS Lett.* 443, 246-250; Okado-Matsumoto, A. 等, (2000) *J. Biochem. (Tokyo)* 127, 493-501]。这些研究之间唯一一致的发现是 PRX4 在体外起到过氧化物酶作用的能力。

[0008] 最近的文献讲授了人类 PRX4 不是胞质溶胶蛋白也不被分泌 [Tavender, T.J. 等, (2008) *Biochem. J.* (2008) 411, 191-199]; 伴随着信号序列的切除, 它越入内质网 (ER), 然后重要的是, 它保留在 ER 中而不分泌。此外, 来自 HT1080、HeLa、HEK-293 细胞 (人类胚胎肾细胞) 和 HepG2 培养上清液的蛋白沉淀物的 Western 印迹分析, 显示出没有可检测的 PRX IV 分泌。作者得出结论, “PRX4 存留于人类 ER 中这一发现, 澄清了过去 10 年中一直含糊不清的问题”。与这一陈述明显一致的是, 到目前为止都没有在血液循环中可以生理性或病理生理性检测到 PRX4 的证据。因此, PRX4 是否分泌的问题似乎已被解决。

[0009] 然而, 到目前为止关于 PRX4 的分泌性的所有已发表的实验都是基于细胞系的, 但是这些结果是否反映出天然情况还不清楚。

[0010] 此外, 已知在某些癌症组织中 PRX4 的表达被改变; 参见 W02004/055519 A2。PRX4、也称为 NKEF C, 已知是自然杀伤细胞的增强剂; 参见 US 5, 985, 612 A1。

[0011] Chang 等 (*J. Rheumatology* 2009; 36 (5), 872-80) 在蛋白质组学方法中, 在来自滑膜组织的样品中观察到大量蛋白的浓度变化, 其中包括 PRX4。此外, Chang 等宣称, 在早期类风湿性关节炎患者的血浆样品中观察到 PRX4 浓度升高。然而, 专业人员预计在 Chang 等

使用的测定条件下将会出现测量的人为假象。

[0012] 发明描述

[0013] 本发明是基于本发明人的意外发现,即在生理和病理生理两种条件下都能在血液循环中检测到 PRX4。因此,本发明涉及 PRX4 的诊断应用。

[0014] 本发明涉及用于诊断或预后对象的疾病或临床病症或用于对象的风险分层或治疗监测或治疗指导的方法,所述方法包含下列步骤:

[0015] (i) 提供对象的体液样品,

[0016] (ii) 测定所述样品中过氧化物氧还蛋白 4 (PRX4) 或其长度为至少 20 个氨基酸残基的片段的水平,以及

[0017] (iii) 将 PRX4 或其片段的水平与疾病或临床病症相关联。

[0018] 具体来说,本发明涉及用于诊断或预后对象的疾病或临床病症的方法,所述方法包含下列步骤:

[0019] (i) 提供对象的体液样品,

[0020] (ii) 测定所述样品中过氧化物氧还蛋白 4 (PRX4) 或其长度为至少 20 个氨基酸残基的片段的水平,以及

[0021] (iii) 将 PRX4 或其片段的水平与疾病或临床病症相关联。

[0022] 更具体来说,本发明涉及用于诊断对象的疾病或临床病症的方法,所述方法包含下列步骤:

[0023] (i) 提供对象的体液样品,

[0024] (ii) 测定所述样品中过氧化物氧还蛋白 4 (PRX4) 或其长度为至少 20 个氨基酸残基的片段的水平,以及

[0025] (iii) 将 PRX4 或其片段的水平与疾病或临床病症相关联。

[0026] 在本发明的情形中,“诊断”是指识别和(早期)检测对象的疾病或临床病症,并可以包含鉴别诊断。此外,在某些实施方案中,评估疾病或临床病症的严重性也被术语“诊断”所涵盖。

[0027] “预后”是指预测对象患有特定疾病或临床病症的后果或具体风险。

[0028] 在本发明的情形中,“风险分层”可以是指根据对象的进一步预后将其分成不同的风险组。风险分层还涉及为了实施预防和/或治疗措施和/或患者管理而进行的分层。

[0029] PRX4 或其片段可以包含在同多聚体或与其他蛋白例如其他过氧化物氧还蛋白或其长度为至少 20 个氨基酸残基的片段的异多聚体中。因此,在本发明的情形中,可以测定 PRX4 单体的水平和/或包含在同多聚体复合物和/或异多聚体复合物中的 PRX4 的水平。换句话说,在优选实施方案中,PRX4 或其片段存在于同多聚体复合物或异多聚体复合物中,并且测定所述同多聚体复合物或异多聚体复合物的水平。

[0030] PRX4 的氨基酸序列显示在 SEQ ID NO:1 中。

[0031] “测定所述样品中过氧化物氧还蛋白 4 (PRX4) 或其长度为至少 20 个氨基酸残基的片段的水平”是指样品中 PRX4 或其相应片段的测定与 PRX4 和/或相应片段作为单体存在还是存在于多聚体复合物中、多聚体复合物是同多聚体复合物还是异多聚体复合物无关。换句话说,PRX4 或其片段的测定涵盖了其相应同多聚体或异多聚体的测定。

[0032] 在本发明的情形中,“对象”是人类或非人类哺乳动物。例如,对象可以是被怀疑患

有与氧化应激相关或由其引起的疾病或临床病症、或被诊断患有这样的疾病或临床病症的患者。具体来说,在后一种情况下,本方法可用于疾病或临床病症的诊断、鉴别诊断、风险分层、预后、供实施预防和 / 或治疗措施和 / 或患者管理的分层、治疗监测和治疗指导。

[0033] 当在本文中使用时,术语“患者”是指由于疾病而接受医疗护理或应接受医疗护理的活的人类或非人类哺乳动物。这包括患有正在研究病征的未确定疾病的个体。因此,本文描述的方法和分析适用于人类和兽医疾病两者。

[0034] 使用本发明的方法诊断的疾病或临床病症优选与氧化应激相关。在具体实施方案中,可以根据本发明诊断的疾病或临床病症可以选自传染病、心脏病、败血症(包括重症败血症和败血性休克)、胰腺炎、胃肠道疾病、癌症、糖尿病、类风湿性关节炎、肾病和神经变性病。在另一个实施方案中,疾病或临床病症选自传染病、心脏病、败血症、胰腺炎、胃肠道疾病、癌症、糖尿病、肾病和神经变性病。在另一个实施方案中,疾病或临床病症选自传染病、心脏病、败血症、胰腺炎、胃肠道疾病、糖尿病、肾病和神经变性病。

[0035] 在本发明的另一个具体实施方案中,疾病或临床病症不是类风湿性关节炎。

[0036] 因此,在该具体实施方案中,本发明涉及用于诊断或预后对象的疾病或临床病症或用于对象的风险分层或治疗监测或治疗指导的方法,所述方法包含下列步骤:

[0037] (i) 提供对象的体液样品,

[0038] (ii) 测定所述样品中过氧化物氧还蛋白 4(PRX4) 或其长度为至少 20 个氨基酸残基的片段的水平,以及

[0039] (iii) 将 PRX4 或其片段的水平与不是类风湿性关节炎的疾病或临床病症相关联。

[0040] 在本发明的另一个具体实施方案中,疾病或临床病症不是选自类风湿性关节炎、骨关节炎和强直性脊椎炎的疾病或临床病症。

[0041] 因此,在该具体实施方案中,本发明涉及用于诊断或预后对象的疾病或临床病症或用于对象的风险分层或治疗监测或治疗指导的方法,所述方法包含下列步骤:

[0042] (i) 提供对象的体液样品,

[0043] (ii) 测定所述样品中过氧化物氧还蛋白 4(PRX4) 或其长度为至少 20 个氨基酸残基的片段的水平,以及

[0044] (iii) 将 PRX4 或其片段的水平与不是类风湿性关节炎、骨关节炎和强直性脊椎炎的疾病或临床病症相关联。

[0045] 心血管疾病或心脏病可以例如选自急性冠脉综合症、动脉粥样硬化、高血压、中风和短暂缺血性发作。胃肠道疾病可以是例如溃疡性结肠炎或克罗恩病(Morbus Crohn)。癌症可以是例如结肠、乳腺或胰腺癌。肾病可以是例如慢性或急性肾病。神经变性病可以例如选自阿茨海默氏病(Alzheimer's disease)、轻度认知障碍和帕金森氏病(Parkinson's disease)。

[0046] 正如上面概述的,PRX4 可以单体或多聚体形式存在,因此,在本发明方法的具体实施方案中,可以测定 PRX4 的同多聚体、特别是同十聚体或同五聚体的水平。在另一个具体实施方案中,可以确定 PRX4 的异多聚体的存在或不存在或其水平。多聚体,无论是同还是异多聚体,当通过尺寸排阻层析使用凝胶过滤柱在非变性条件下测定时,优选具有约 158kDa 至约 660kDa 范围内、优选 330kDa+/-50kDa 的表观分子量。

[0047] PRX4 或其片段的的存在可以例如通过将样品与至少一种 PRX4 结合物相接触来确

定。所述至少一种结合物可以是例如抗体。优选,至少一种结合物与其他蛋白、特别是其他过氧化物氧还蛋白例如 PRX1、PRX2、PRX3、PRX5 和 PRX6 具有低于 20% 的交叉反应性。更优选,至少一种结合物与其他蛋白、特别是其他过氧化物氧还蛋白例如 PRX1、PRX2、PRX3、PRX5 和 PRX6 具有低于 2% 的交叉反应性。在具体实施方案中,所述至少一种结合物与包含在 SEQ ID NO :1 的 PRX4 的 1-73 位中的表位结合。在另一个具体实施方案中,所述至少一种结合物与包含在 SEQ ID NO :1 的 PRX4 的 39-65 位中的表位结合。

[0048] 为了将获得对 Prx 家族的其他成员表现出交叉反应性的抗 PRX4 抗体的可能性降至最低,在 PRX4 的 N- 端部分中选择了作为免疫原的来源的区域,所述区域在 Prx 家族的几种其他成员 (Prx 1 和 2) 中不存在相应区域 (图 1)。由此,已经通过设计排除了对 Prx1 和 2 的交叉反应性。只有 PRX3 具有延伸 Prx1 和 2 的 N- 端、因此有可能对应于 PRX4 的 N- 端部分的区域 (图 1)。两个相应序列都在下面强调。这两个序列之间的同源性程度可以忽略。因此,通过开发针对 PRX4 序列的抗体,必定可以预期到由于这种非常低的序列同源性,这些抗体将不会与 PRX3 交叉反应。在实验上,可以通过对待测抗体与分别代表 PRX4 和 PRX3 的 N- 端部分的等摩尔量相应化学合成肽的结合进行定量,来评估交叉反应性。准确来说,将待测抗体按照描述进行标记。肽可以按照描述来合成。肽可以按照“抗体包被”部分的描述进行包被。按照“免疫分析法 A. 2”下的描述,只是略去样品,在肽包被的管上进行标记抗体的结合。通过用与 PRX3 肽结合的抗体的量 (信号) 除以与 PRX4 肽结合的抗体的量 (信号) 来计算交叉反应性 (%)。

[0049] PRX4

[0050] SEQ ID NO :8

[0051] Met Glu Ala Leu Pro Leu Ala Ala Thr Thr Pro Asp His Gly Arg

[0052] 1 5 10 15

[0053] His Arg Arg Leu Leu Leu Pro Leu Leu Leu Phe Leu Leu Pro Ala

[0054] 20 25 30

[0055] Gly Ala Val Gln Gly Trp Glu Thr Glu Glu Arg Pro Arg Thr Arg Glu

[0056] 35 40 45

[0057] Glu Glu Cys His Phe Tyr Ala Gly Gly Gln Val Tyr Pro Gly Glu Ala

[0058] 50 55 60

[0059] Ser Arg Val Ser Val Ala Asp His Ser Leu His Leu Ser Lys Ala Lys

[0060] 65 70 75 80

[0061] Ile Ser Lys Pro Ala Pro Tyr Trp Glu Gly Thr Ala Val Ile Asp Gly

[0062] 85 90 95

[0063] Glu Phe Lys Glu Leu Lys Leu Thr Asp Tyr Arg Gly Lys Tyr Leu Val

[0064] 100 105 110

[0065] Phe Phe Phe Tyr Pro Leu Asp Phe Thr Phe Val Cys Pro Thr Glu Tle

[0066] 115 120 125

[0067] Ile Ala Phe Gly Asp Arg Leu Glu Glu Phe Arg Ser Ile Asn Thr Glu

[0068] 130 135 140

[0069] Val Val Ala Cys Ser Val Asp Ser Gln Phe Thr His Leu Ala Trp Ile

[0070]	145	150	155	160
[0071]	Asn Thr Pro Arg Arg Gln Gly Gly Leu Gly Pro Ile Arg Ile Pro Leu			
[0072]		165	170	175
[0073]	Leu Ser Asp Leu Thr His Gln Ile Ser Lys Asp Tyr Gly Val Tyr Leu			
[0074]		180	185	190
[0075]	Glu Asp Ser Gly His Thr Leu Arg Gly Leu Phe Ile Ile Asp Asp Lys			
[0076]		195	200	205
[0077]	Gly Ile Leu Arg Gln Ile Thr Leu Asn Asp Leu Pro Val Gly Arg Ser			
[0078]		210	215	220
[0079]	Val Asp Glu Thr Leu Arg Leu Val Gln Ala Phe Gln Tyr Thr Asp Lys			
[0080]	225	230	235	240
[0081]	His Gly Glu Val Cys Pro Ala Gly Trp Lys Pro Gly Ser Glu Thr Ile			
[0082]		245	250	255
[0083]	Ile Pro Asp Pro Ala Gly Lys Leu Lys Tyr Phe Asp Lys Leu Asn			
[0084]		260	265	270
[0085]	<u>PRX3</u>			
[0086]	<u>SEQ ID NO :9</u>			
[0087]	Met Ala Ala Ala Val Gly Arg Leu Leu Arg Ala Ser Val Ala Arg His			
[0088]	1	5	10	15
[0089]	Val Ser Ala Ile Pro Trp Gly Ile Ser Ala Thr Ala Ala Leu Arg Pro			
[0090]		20	25	30
[0091]	Ala Ala Cys Gly Arg Thr Ser Leu Thr Asn Leu Leu Cys Ser Gly Ser			
[0092]		35	40	45
[0093]	Ser Gln Ala Lys Leu Phe Ser Thr Ser Ser Ser Cys His Ala Pro Ala			
[0094]		50	55	60
[0095]	Val Thr Gln His Ala Pro Tyr Phe Lys Gly Thr Ala Val Val Asn Gly			
[0096]		65	70	75
[0097]	Glu Phe Lys Asp Leu Ser Leu Asp Asp Phe Lys Gly Lys Tyr Leu Val			
[0098]	80	85	90	95
[0099]	Leu Phe Phe Tyr Pro Leu Asp Phe Thr Phe Val Cys Pro Thr Glu Ile			
[0100]		100	105	110
[0101]	Val Ala Phe Ser Asp Lys Ala Asn Glu Phe His Asp Val Asn Cys Glu			
[0102]		115	120	125
[0103]	Val Val Ala Val Ser Val Asp Ser His Phe Ser His Leu Ala Trp Ile			
[0104]		130	135	140
[0105]	Asn Thr Pro Arg Lys Asn Gly Gly Leu Gly His Met Asn Ile Ala Leu			
[0106]		145	150	155
[0107]	Leu Ser Asp Leu Thr Lys Gln Ile Ser Arg Asp Tyr Gly Val Leu Leu			
[0108]	160	165	170	175

[0109]	Glu Gly Ser Gly Leu Ala Leu Arg Gly Leu Phe Ile Ile Asp Pro Asn
[0110]	180 185 190
[0111]	Gly Val Ile Lys His Leu Ser Val Asn Asp Leu Pro Val Gly Arg Ser
[0112]	195 200 205
[0113]	Val Glu Glu Thr Leu Arg Leu Val Lys Ala Phe Gln Tyr Val Glu Thr
[0114]	210 215 220
[0115]	His Gly Glu Val Cys Pro Ala Asn Trp Thr Pro Asp Ser Pro Thr Ile
[0116]	225 230 235
[0117]	Lys Pro Ser Pro Ala Ala Ser Lys Glu Tyr Phe Gln Lys Val Asn Gln
[0118]	240 245 250 255

[0119] PRX4 和 / 或其片段可以在例如免疫分析法、优选为夹心分析法中测定。在具体实施方案中,这样的夹心分析法包含至少两种结合物,其能够结合 PRX4 的相同表位或交叠表位。在这种情况下,结合物的这个表位或这些表位优选包含在 SEQ ID NO :1 的 PRX4 的 39-65 位中。

[0120] 在另一个优选实施方案中,夹心分析法包含至少两种结合物,其能够结合 PRX4 的不同表位。优选,一种结合物结合包含在 SEQ ID NO :1 的 PRX4 的 39-65 位中的表位,第二种结合物结合包含在 SEQ ID NO :1 的 PRX4 的 51-65 位中的表位。

[0121] 夹心免疫分析法可以例如设计成一步分析法或两步分析法。

[0122] 在本发明的方法中,在 PRX4 的测定之前或期间,可以将样品与试剂相接触,所述试剂导致在测定方面提高 PRX4 和 / 或其稳定片段的离体稳定性,和 / 或提高分析法的分析检测限和 / 或与分析检测限相关的其他度量例如功能性测定灵敏度、信噪比。“提高离体稳定性”是指免疫反应性优选为恒定的并且不显著增加或减小,直至检测。所述试剂优选可以是还原剂,例如二硫苏糖醇 (DTT)、β-巯基乙醇、抗坏血酸或 Cu^{2+} 离子。DTT 是优选的。在这种情况下,样品中 DTT 的终浓度优选在 1 至 10mM 之间。

[0123] 体液样品优选选自血液样品、血清样品、血浆样品、脑脊液样品、唾液样品、溶解的组织样品和尿液样品,或任何上面提到的样品的提取物。优选,样品不源自于滑膜组织。优选,样品是血清样品或血浆样品。最优选情,对于所有待确定的疾病来说样品是血清样品。

[0124] 在一个非常具体的实施方案中,样品是血清样品,并且疾病或临床病症选自类风湿性关节炎、骨关节炎和强直性脊椎炎。

[0125] 在另一个非常具体的实施方案中,疾病或临床病症不是类风湿性关节炎,并且样品是血清或血浆样品。

[0126] 优选,在获得血浆或血清样品的方式中,可能含有 PRX4 的血细胞与血浆或血清定量分离。在本发明的情形中,应该避免血液样品的溶血。

[0127] 在本发明的情形中,“血浆”是在离心后获得的含有抗凝剂的事实上不含细胞的血液上清液。示例性的抗凝剂包括钙离子结合化合物例如 EDTA 或柠檬酸盐和凝血酶抑制剂例如肝素盐或水蛭素。可以通过将抗凝的血液 (例如柠檬酸化、EDTA 化或肝素化的血液) 以 2000 至 3000g 离心至少 15 分钟来获得无细胞的血浆。

[0128] 因此,优选,在本发明的情形中使用的血浆样品已在 1500g 以上进行 30 分钟离心,优选在至少 2000g 下进行至少 30 分钟离心,更优选在至少 3000g 下进行至少 20 分钟离心,

最优选在至少 3000g 下进行至少 30 分钟离心。

[0129] 在本发明的一个具体实施方案中,血浆样品不是柠檬酸盐处理过的血浆样品。

[0130] 在本发明的情形中,“血清”是血液在完成充分凝固后未稀释的、细胞外部分。凝固通常在 30 分钟后完成。血清可以通过将凝固后的样品以 1500g 的最低速度离心至少 10 分钟来获得。

[0131] 因此,优选,在本发明的情形中使用的血清样品已在至少 1500g 下进行至少 10 分钟、优选至少 15 分钟、更优选至少 20 分钟离心。最优选,血清样品已在至少 3000g 下进行至少 20 分钟离心。

[0132] 在分离血清或血浆时,温度不应该低于 15℃或超过 24℃。

[0133] 在本发明的方法和分析的情形中,除了对象样品中 PRX4 的测定之外,还可以执行其他标志物或者临床或实验室参数的测定,并解释其与疾病或临床病症的关联。这意味着其他信息可以包含在诊断、预后、风险分层、治疗监测或治疗指导中。

[0134] 实验室参数是例如样品中的其他指示性标志物例如肽标志物的水平。

[0135] 这并不暗示——尽管也不排除——这样的测定在技术上是组合的。其他信息的使用可以用产生对象的诊断、预后、风险分层、治疗监测或治疗指导的参数——无论是实验室和 / 或临床参数——的任何类型的数学组合来进行。这种数学组合的一个实例是 Cox 比例风险分析,从其可以推导出对象遭到某些后果的风险,但是也可以使用其他方法。

[0136] 本发明还包括将个体的 PRX4 水平与预定值进行比较。预定值可以采取各种形式。它可以是单个截止值,例如群体的中位数或平均值或 75th、90th、95th 或 99th 百分位数。它可以根据对比组来建立,例如一个规定组的风险为另一个规定组风险的两倍。它可以是范围,例如将测试群体相等(或不等)地分组,例如低风险组、中风险组和高风险组,或分成四等分,最低的四分之一是具有最低风险的个体,最高的四分之一是具有最高风险的个体。

[0137] 在所选的特定群体中,预定值可以根据他们的嗜好、种族、遗传等而变化。例如,表现健康、不吸烟的群体(没有可检测的疾病并且没有与氧化应激相关的既往病史)与吸烟群体或其成员具有与氧化应激相关的病史的群体相比,可能具有不同的标志物“正常”范围。因此,所选的预定值可以考虑个体所属类别。本技术领域的普通专业人员可以使用不超出常规的实验来选择适合的范围和类别。

[0138] PRX4 和其他标志物的水平可以通过本技术领域任何认可的方法来获得。所述水平可以通过免疫分析法或用于测定标志物水平的其他常规技术来测定。认可的方法包括将患者体液样品送往商业实验室测量,但是也可以执行现场测量。

[0139] 适合的标志物包括但不限于生物标志物,例如肽类激素或其片段,或肽类激素的前体或前体片段。

[0140] 替代地或附加地,可以将 PRX4 或其片段的测定到的水平与临床参数相结合。因此,在本发明的另一个优选实施方案中,通过测定和使用 PRX4 以外的临床参数,改进了对对象的诊断、预后、风险分层、治疗监测或治疗指导,所述临床参数选自但不限于下述这些:年龄、性别、收缩血压、舒张血压、抗高血压治疗、体重指数、糖尿病的存在和当前吸烟情况。

[0141] 患者样品中 PRX4 和任选的一种或多种附加的其他标志物肽(或其片段或其前体或片段)的水平、即浓度,可以促进例如疾病或临床病症的患者诊断或后果预后、患者风险评估、鉴别诊断、风险分层、供实施预防和 / 或治疗性措施和 / 或患者管理的分层、治疗监测

和治疗指导。具体来说, PRX4 浓度超过阈值可以指示患者的特定后果或预后或鉴别诊断。

[0142] 通过本发明的方法或使用本发明的分析法获得的包括 PRX4 在内的标志物水平, 可以用本技术领域的专业人员公知的许多方式进行分析。例如, 可以将获得的每个分析结果与“正常”值或指示特定诊断、预后或后果的值进行比较。具体的诊断 / 预后可以取决于每个分析结果与这样的值的比较, 所述值可以被称为诊断或预后“阈值”。在某些实施方案中, 用于一种或多种诊断或预后指示物的分析法, 仅仅通过在所述分析中指示物的存在或不存在与病症或疾病相关联。例如, 可以设计分析法, 使得只有当高于特定目标阈值浓度时才出现阳性信号, 并且低于该浓度时所述分析法不提供高于背景的信号。

[0143] 诊断性和 / 或预后性测试的灵敏度和特异性不仅取决于测试的分析“质量”, 它们而且还取决于构成异常结果的定义。在实践中, 典型地通过将“正常”(即表观健康的)和“患病”群体中的变量值对其相对频率进行作图, 计算出受试者工作特征曲线(ROC 曲线)。对于任何特定标志物来说, 患有或未患疾病的对象的标志物水平分布可能交叠。在这样的状况下, 测试不能以 100% 准确性绝对辨别正常与疾病, 并且交叠的区域表示测试不能辨别正常与疾病的地方。选择一个阈值, 高于它(或低于它, 取决于标志物随着疾病如何变化)时测试被认为是异常的, 低于它时测试被认为是正常的。ROC 曲线下面积是查出的测量值将允许正确鉴定病症的概率的度量。即使在测试结果不一定给出准确数字的情况下, ROC 曲线也能使用。只要人们能够对结果排序, 人们即能产生 ROC 曲线。例如, 对“患病”样品的测试结果可以按照程度排序(例如 1 = 低, 2 = 正常, 3 = 高)。这种排序可以与“正常”群体中的结果相关联, 并产生 ROC 曲线。这些方法在本技术领域是公知的。参见例如 Hanley 等, 1982. Radiology 143 :29-36。优选, 所选的阈值能够提供的 ROC 曲线面积大于约 0.5、更优选大于约 0.7、更加优选大于约 0.8、更加优选大于约 0.85, 并且最优选大于约 0.9。在这种情形中, 术语“约”是指给定测量值的 $\pm 5\%$ 。

[0144] ROC 曲线的水平轴表示 $(1 - \text{特异性})$, 其随着假阳性率而增加。曲线的垂直轴表示灵敏度, 其随着真阳性率而增加。因此, 对于所选的具体截止值来说, 可以测定 $(1 - \text{特异性})$ 的值, 并可以获得相应的灵敏度。ROC 曲线下面积是测量到的标志物水平可以正确鉴定疾病或病症的概率的度量。因此, ROC 曲线下面积可用于确定测试的有效性。

[0145] 在某些实施方案中, 不依赖于组中的一个或多个标志物的具体阈值来确定从对象获得的标志物水平情况是否指示了特定诊断 / 预后。相反, 本发明可以利用标志物组“情况”作为统一的整体进行评估。在这样的标志物组中变化的特定“指纹”模式实际上可以起到特定的诊断或预后指示物的作用。正如在本文中讨论的, 变化的模式可以从单一样品、或从组的一个或多个成员的时间变化(或组响应值)获得。这里的组是指一组标志物。

[0146] 正如在后文所描述的, 组响应值优选通过在各种截止值下将特定标志物组的灵敏度(即真阳性)对组的 $1 - (\text{特异性})$ (即假阳性)进行 ROC 曲线作图来确定。在这些方法中, 将来自对象的标志物测量值的情况合在一起考虑, 提供了诊断或预后的总体概率(表示成数字分值或风险百分率)。在这样的实施方案中, 某些标志物亚组的升高可能足以指示一个患者的特定诊断 / 预后, 而不同的标志物亚组的升高可能足以指示另一个患者的相同或不同的诊断 / 预后。也可以向组中的一个或多个标志物应用权重因数, 例如, 当标志物在鉴定特定诊断 / 预后中效用特别高时, 可以将其加权, 使得在给定水平下, 它单独即足以指示阳性结果。同样, 也可以提供权重因数, 使得特定标志物的任何给定水平都不足以指示阳

性结果,而只有当另一个标志物也有助于分析时才指示结果。

[0147] 在某些实施方案中,选择包含 PRX4 的标志物组以表现出至少约 70% 的灵敏度、更优选至少约 80% 的灵敏度、更加优选至少约 85% 的灵敏度、更加优选至少约 90% 的灵敏度以及最优选至少约 95% 的灵敏度,与至少约 70% 的特异性、更加优选至少约 80% 的特异性、更加优选至少约 85% 的特异性、更加优选至少约 90% 的特异性以及最优选至少约 95% 的特异性相组合。在特别优选的实施方案中,灵敏度和特异性两者均为至少约 75%、更优选至少约 80%、更加优选至少约 85%、更加优选至少约 90% 以及最优选至少约 95%。在这种情况下,术语“约”是指给定测量值的 $\pm 5\%$ 。

[0148] 在其他实施方案中,阳性似然比、阴性似然比、比值比或风险比被用作测试的预测风险或诊断疾病的能力的度量。在阳性似然比的情况下,值为 1 表示在“患病”和“对照”组二者的对象中阳性结果的可能性相等;值大于 1 表示在患病组中阳性结果的可能性更大;值小于 1 表示在对照组中阳性结果的可能性更大。在阴性似然比的情况下,值为 1 表示在“患病”和“对照”组二者的对象中阴性结果可能性相等;值大于 1 表示在测试组中阴性结果的可能性更大;值小于 1 表示在对照组中阴性结果的可能性更大。在某些优选实施方案中,优选选择包括 PRX4 的标志物组以表现出至少约 1.5 以上或约 0.67 以下、更优选至少约 2 以上或约 0.5 以下、更加优选至少约 5 以上或约 0.2 以下、更加优选至少约 10 以上或约 0.1 以下,以及最优选至少约 20 以上或约 0.05 以下的阳性或阴性似然比。在这种情况下,术语“约”是指给定测量值的 $\pm 5\%$ 。

[0149] 在比值比的情况下,值为 1 表示在“患病”和“对照”组二者的对象中阳性结果的可能性相等;值大于 1 表示在患病组中阳性结果的可能性更大;值小于 1 表示在对照组中阳性结果的可能性更大。在某些优选实施方案中,优选选择标志物和 / 或标志物组以表现出至少约 2 以上或约 0.5 以下、更优选至少约 3 以上或约 0.33 以下、更加优选至少约 4 以上或约 0.25 以下、更加优选至少约 5 以上或约 0.2 以下以及最优选至少约 10 以上或约 0.1 以下的比值比。在这种情况下,术语“约”是指给定测量值的 $\pm 5\%$ 。

[0150] 在风险比的情况下,值为 1 表示在“患病”和“对照”组二者中终点(例如死亡)的相对风险相等;值大于 1 表示在患病组中风险更高;值小于 1 表示在对照组中风险更高。在某些优选实施方案中,优选选择标志物组以表现出至少约 1.1 以上或约 0.91 以下、更优选至少约 1.25 以上或约 0.8 以下、更加优选至少约 1.5 以上或约 0.67 以下、更加优选至少约 2 以上或约 0.5 以下以及最优选至少约 2.5 以上或约 0.4 以下的风险比。在这种情况下,术语“约”是指给定测量值的 $\pm 5\%$ 。

[0151] 专业技术人员将会理解,将诊断或预后指示物与诊断或与将来临床后果的预后风险相关联,是一种统计学分析。例如,通过统计学显著性水平确定,标志物水平大于 X 可以指示患者与水平低于或等于 X 的患者相比更可能遭受不利后果。此外,标志物浓度从基线水平的改变可以反映患者的预后,并且标志物水平变化的程度可能与后果的严重性相关。统计学显著性通常通过比较两个或多个群体并确定置信区间和 / 或 p 值来确定。参见例如 Dowdy 和 Wearden,《用于研究的统计学》(Statistics for Research), John Wiley & Sons, New York, 1983。本发明的优选置信区间是 90%、95%、97.5%、98%、99%、99.5%、99.9% 和 99.99%,而优选的 p 值是 0.1、0.05、0.025、0.02、0.01、0.005、0.001 和 0.0001。

[0152] 在其他实施方案中,可以进行 PRX4 和任选的其他标志物的多次测定,并可以使用

标志物的时间变化来确定疾病或临床病症的诊断或预后、或用于患有疾病或临床症状的对象的风险分层或治疗监测或治疗指导。例如,可以在初始时间测定对象样品中的 PRX4 浓度,并在第二个时间从第二个对象样品再次测定。在这样的实施方案中,水平从初始时间到第二个时间的增加可以指示特定的诊断或特定的预后。同样地,水平从初始时间到第二个时间的减少可以指示特定的诊断或特定的预后。

[0153] 当在本文中使用时,术语“样品”是指出于对目标对象例如患者进行诊断、预后或评估的目的而获得的体液样品。优选的测试样品包括血液、血清、血浆、脑脊液、尿液、唾液、痰液和胸膜腔积液。此外,本技术领域的专业人员将会认识到,某些测试样品在分级或纯化程序、例如将全血分离成血清或血浆组分后,将更容易分析。

[0154] 当在本文中用于指称诊断和预后标记物的应用时,术语“相关联”是指将患者中标记物的存在或量,与其在已知患有给定病症或已知具有给定病症风险的人、或已知没有给定病症的人中的存在或量进行比较。正如上面讨论的,可以将患者样品中的标志物水平与已知与特定诊断或预后相关的水平进行比较。样品的标志物水平据说已经与诊断相关联;也就是说,专业技术人员可以使用该标志物水平确定患者是否具有特定类型的诊断,并做出相应反应。或者,样品的标志物水平可以与已知与良好后果(例如不存在疾病等)相关的标志物水平进行比较。在优选实施方案中,将一组标志物的水平与总体概率或特定后果相关联。

[0155] 对于 PRX4 水平、其他标志物和 / 或参数、药物治疗和疾病的每种特定组合来说,必须确定用于将对象分层为不同组(类别)中的适合的阈值水平。这可以通过例如将参比患者群体按照他们的 PRX4 水平分成一定分位数例如四分位数、五分位数、乃至适合的百分位数组。对于高于和低于一定百分位数的每个分位数或组来说,可以计算风险比,根据例如接受了某种药物治疗的患者与没有接受的患者之间的存活率来比较不利后果、即“不利效应”的风险。在这种情形中,高于 1 的风险比(HR)表示已接受治疗的患者与未治疗患者相比不利后果的风险更高。低于 1 的 HR 表示患者组中某种治疗的有益效应。在 1 左右(例如 ± 0.1) 的 HR 表示对于特定患者组来说没有升高的风险但是也没有来自药物治疗的益处。通过对某些分位数的患者的 HR 在彼此之间和与整个患者群体的 HR 进行比较,能够鉴定具有升高风险的患者和从药物治疗获益的患者的那些分位数,从而根据本发明将对象进行分层。

[0156] 本文中 PRX4 水平的测定(或测量或检测),可以使用下面解释的检测方法和 / 或诊断分析法来进行。

[0157] 当在本文中提到时,“分析法”或“诊断分析法”可以是在诊断学领域中应用的任何类型的分析法。这样的分析法可以基于待检测的分析物与具有一定亲和性的一种或多种捕获探针的结合。对于捕获分子(在本文中也称为“结合物”)与靶分子或目标分子之间的相互作用来说,亲和常数优选大于 10^8M^{-1} 。

[0158] 在本发明的情形中,“捕获分子”是可用于结合来自样品的靶分子或目标分子、即分析物(即在本发明的情况下是 PRX4 和任选的其他标志物)的分子。因此,捕获分子必须在空间上和表面特征例如表面电荷、疏水性、亲水性、路易斯供体和 / 或受体是否存在等方面适当构型,以特异性结合靶分子或目标分子。因此,结合可以由例如捕获分子与靶分子或目标分子之间的离子、范德华、 $\pi-\pi$ 、 $\delta-\pi$ 、疏水或氢键相互作用或两种以上上面提到的

相互作用的组合来介导。在本发明的情形中,捕获分子可以例如选自核酸分子、糖类分子、RNA 分子、蛋白质、抗体、肽或糖蛋白。优选,捕获分子是抗体,包括与靶分子或目标分子具有足够亲和性的其片段,并包括重组抗体或重组抗体片段,以及所述抗体的化学和 / 或生物化学修饰的衍生物或源自于其变体链的长度为至少 12 个氨基酸、优选长度为至少 20 个氨基酸的片段。

[0159] 优选的检测方法包括各种格式的免疫分析法,例如放射免疫分析 (RIA)、化学发光和荧光免疫分析、酶联免疫分析 (ELISA)、基于 Luminex 的珠子阵列、蛋白质微阵列分析,以及快速检测格式例如免疫层析条试验。

[0160] 分析法可以是同源或异源分析、竞争和非竞争性夹心分析。在特别优选的实施方案中,分析法是夹心分析的形式,其是非竞争性免疫分析,其中待检测和 / 或定量的分子与第一抗体并与第二抗体结合。第一抗体可以结合到固相例如珠子、孔或其他容器的表面、芯片或条上,并且第二抗体是用例如染料、放射性同位素或反应性或催化活性部分标记的抗体。然后通过适合的方法测量与分析物结合的标记抗体的量。“夹心分析”所涉及的通用组合物和程序是已确立的,并为专业技术人员所公知。(《免疫分析手册》(The Immunoassay Handbook), David Wild 主编, Elsevier LTD, Oxford; 第三版 (2005 年 5 月), ISBN-13 : 978-0080445267 ; Hultschig C 等, Curr Opin Chem Biol. 2006 Feb ; 10(1) : 4-10. PMID : 16376134), 在此引为参考。

[0161] 在特别优选实施方案中,分析法包含两种捕获分子,优选为都作为分散体存在于液体反应混合物中的抗体,其中第一种标记组分连在第一种捕获分子上,其中所述第一种标记组分是基于荧光或化学发光淬灭或扩增的标记系统的一部分,并且所述标记系统的第二种标记组分连在第二种捕获分子上,使得当两种捕获分子与分析物结合后产生可测量的信号,允许检测在包含样品的溶液中形成的夹心复合物。

[0162] 更优选,所述标记系统包含稀土穴状化合物或稀土螯合物与荧光染料或化学发光染料、特别是花青类型的染料的组合。

[0163] 在本发明的情形中,基于荧光的分析法包含使用染料,所述染料可以例如选自 FAM(5- 或 6- 羧基荧光素)、VIC、NED、荧光素、荧光素异硫氰酸酯 (FITC)、IRD-700/800、花青染料例如 CY3、CY5、CY3.5、CY5.5 和 Cy7、占吨、6- 羧基 -2',4',7',4,7- 六氯荧光素 (HEX)、TET、6- 羧基 -4',5' - 二氯 -2',7' - 二甲氧基荧光素 (JOE)、N, N, N', N' - 四甲基 -6- 羧基罗丹明 (TAMRA)、6- 羧基 -X- 罗丹明 (ROX)、5- 羧基罗丹明 -6G(R6G5)、6- 羧基罗丹明 -6G(RG6)、罗丹明、罗丹明绿、罗丹明红、罗丹明 110、BODIPY 染料例如 BODIPY TMR、俄勒冈 (Oregon) 绿、香豆素类例如伞形酮、苯并亚胺类例如 Hoechst 33258 ; 菲啶类例如德克萨斯 (Texas) 红、雅吉瓦 (Yakima) 黄、Alexa Fluor、PET、溴化乙锭、吖啶类染料、咪唑染料、吩噻嗪染料、卟啉染料、聚甲炔染料等。

[0164] 在本发明的情形中,基于化学发光的分析法包含使用基于化学发光材料的物理原理的染料,所述原理描述在 Kirk-Othmer 的《化学技术百科全书》(Encyclopedia of chemical technology) 第四版, J. I. Kroschwitz 执行主编, M. Howe-Grant 编辑, John Wiley & Sons, 1993, vol. 15, p. 518-562 中,在此引为参考,包括在 551-562 页中的引用文献。优选的化学发光染料是吖啶酯。

[0165] 本发明还涉及抗体,所述抗体与包含在 SEQ ID NO : 1 的 PRX4 的 1-73 位中的表位

结合,并与 PRX4 相关蛋白具有低于 20% 的交叉反应性。优选情况下,所述抗体与 PRX4 相关蛋白的交叉反应性低于 2%。

[0166] 在具体实施方案中,所述抗体与包含在 SEQ ID NO:1 的 PRX4 的 39 至 65 位中的表位结合。在优选实施方案中,所述抗体与包含在 SEQ ID NO:1 的 PRX4 的 51 至 65 位中的表位结合。在另一个优选实施方案中,所述抗体与包含在 SEQ ID NO:1 的 PRX4 的 39 至 65 位中的表位结合。

[0167] 在优选实施方案中,所述抗体是单克隆抗体。或者,所述抗体是多克隆抗体。

[0168] 本发明还涉及包含至少一种本发明的抗体的诊断试剂盒。

[0169] 此外,本发明涉及使用含有 PRX4 和 / 或其长度为至少 20 个氨基酸残基的片段的器官或组织提取物和 / 或其富集或纯化级分作为来源,提供在 PRX4 和 / 或其长度为至少 20 个氨基酸残基的片段的测定中使用的校准物和 / 或对照样品。正如在上文中描述的,PRX4 或其片段可以是单体或存在于异多聚体或同多聚体中。

[0170] 器官提取物可以是含有 PRX4 的任何器官的提取物。然而,优选器官提取物是肝脏提取物。器官优选为非人类器官,例如猪或牛的器官。

[0171] 本发明还涉及使用本发明的方法、抗体和试剂盒对与氧化应激相关的疾病或临床病症例如传染病、心脏病、败血症(包括重症败血症和败血性休克)、胰腺炎、胃肠道疾病、癌症、糖尿病、类风湿性关节炎、肾病或神经变性病进行诊断、鉴别诊断、风险分层、预后、供实施预防和 / 或治疗措施和 / 或患者管理的分层、治疗监测和 / 或治疗指导。

[0172] 人类过氧化物氧还蛋白 4 (PRX4) 的氨基酸序列 SEQ ID NO:1:

[0173]	10	20	30	40	50	60
[0174]	MEALPLLAAT	TPDHGRHRRL	LLLPLLLFLL	PAGAVQGWET	EERPRTREEE	CHFVAGGQVY
[0175]	70	80	90	100	110	120
[0176]	PGEASRVSA	DHSLHLSKAK	ISKPAYWEG	TAVIDGEFKE	LKLTDIRGKY	LVFFFYPLDF
[0177]	130	140	150	160	170	180
[0178]	TFVCPTEIIA	FGDRLEEFRS	INTEVVACSV	DSQFTHLAWI	NTPRRQGGLG	PIRIPLLSDL
[0179]	190	200	210	220	230	240
[0180]	THQISKDYG	VYLED SGHTLR	GLFIIDDKGI	LRQITLNDLP	VGRSVDETLR	LVQAFQYTDK
[0181]	250	260	270			
[0182]	HGEVCPAGWK	PGSETIIPDP	AGKLKYFDKL	N		

[0183] 附图描述

[0184] 图 1:人类过氧化物氧还蛋白家族成员的序列比对。序列比对使用 www.uniprot.org 上的 BLAST 程序来进行。

[0185] 图 2:PRX4 免疫反应性的剂量响应曲线。在两张图中都是用分析法 A.1。在图 A 中测量了猪肝提取物的稀释液,在图 B 中测量了肽 PEE27 的稀释液。

[0186] 图 3:使用同源夹心分析法和异源夹心分析法在人类血清中检测到的 PRX4 免疫反应性的相关性。使用了分析法 A.1(X-轴)和 B(Y-轴)。

[0187] 图 4:通过尺寸排阻 HPLC 分级的人类血清合并物(A)或猪肝提取物(B)的 PRX4 免疫反应性曲线。标出了尺寸校准物的洗脱时间。

[0188] 图 5:DTT 对可检测的 PRX4 免疫反应性的影响。图 A 显示了猪肝提取物稀释液的

剂量响应曲线依赖于分析法 A. 1 的第一个温育步骤中的分析缓冲液中使用的 DTT 浓度。图 B 显示了使用分析法 A. 1, 在第一个温育步骤中包含或不含 3mM DTT 的情况下, 在人类血清样品中检测到的 PRX4 免疫反应性的相关性。

[0189] 图 6 :DTT 对可检测的 PRX4 免疫反应性的离体稳定性的影响。显示了从 5 个样品获得的平均值。

[0190] 图 7 :在临床样品中测量到的 PRX4 免疫反应性。样品按照相应患者的疾病类型进行分组。标出了每个组的中位数值。

[0191] 图 8 :在患有败血症、重症败血症和败血性休克的患者的样品中 PRX4 水平与降钙素原 (PCT) 水平的相关性 (Spearman $r = 0.33$)。PCT 水平是败血症、重症败血症和败血性休克的标志物。

[0192] 图 9 :以 1500g、2000g、2500g 和 3000g 离心后从血清和血浆样品回收的 PRX4 比较。值针对 3000g 下的值 ($= 100\%$) 进行归一化。

[0193] 图 10 :败血症患者在入院后连续的天中的 PRX。

[0194] 图 11 :重度急性胰腺炎患者的 PRX。

[0195] 图 12 :中风患者的 PRX。

实施例

[0196] 实施例 1 :临床样品的分析

[0197] 材料和方法

[0198] 肽

[0199] 从人类过氧化物氧化蛋白 4 的已知氨基酸序列 (参见 SEQ ID NO:1) 选择了两个区域, 将其通过标准程序进行化学合成 (JPT GmbH, Berlin, 德国)。这些肽是 :PEC 13 (SEQ ID NO:2 :序列 ETEERPRTREEEC, 即 SEQ ID NO:1 的 PRX4 的 39-51 位残基), PCS15 (SEQ ID NO:3 :序列 :CHFYGAGQVYPGEAS, 即 SEQ ID NO:1 的 PRX4 的 51-65 位残基) 和 PEE27 (SEQ ID NO:4 :序列 :ETEERPRTREEEGGGETEERPRTREE, 即 SEQ ID NO:1 的 39-50 位残基, 后面跟着 GGG, 后面再跟着 SEQ ID NO:1 的 39-50 位残基)。

[0200] 单克隆抗体

[0201] 通过标准程序产生针对 PEC13 和 PCS15 的单克隆抗体 (Harlow E, Lane D. 《抗体-实验室手册》(Antibodies-A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor :Cold Spring Harbor Laboratory, 1988 ;Lane RD ;用于增加分泌单克隆抗体的杂交瘤产生的短时间聚乙二醇融合技术 (A short-duration polyethylene glycol fusion technique for increasing production of monoclonal antibody-secreting hybridomas). J Immunol Methods 1985 ;81 :223-8)。简单来说, 使用 Sulfo-MBS (间-马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羧基琥珀酰亚胺酯) 将肽与 BSA 接合。使用这些接合物对 Balb/c 小鼠进行免疫接种和增强, 并将脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合以产生杂交瘤细胞系。筛选细胞分泌与包被在聚苯乙烯固相上的免疫原性肽结合的抗体的能力。使用这种方法, 产生了分泌单克隆抗体 340/4F2 和 340/3F1 (针对 PEC13) 和 357/3B6 (针对 PCS15) 的细胞系。为了下一步实验, 通过蛋白 G 亲和层析从培养上清液中纯化单克隆抗体。

[0202] 多克隆抗体

[0203] 按照标准程序产生了针对 PEC13 的多克隆抗体 (参见 EP 1488209A1、EP 1738178 A1)。简单来说,使用 MBS(间-马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯)将肽 PEC13 与载体蛋白 KLH(匙孔血蓝蛋白)(PIERCE, Rockford, IL, USA) 偶联。使用该接合物按照下述方案对绵羊进行免疫接种:绵羊最初用 100 μ g 接合物(质量是指接合物的肽部分)进行免疫接种,然后每 4 周时间进行加强,每次使用 50 μ g 接合物。在初次免疫后 4 个月,从绵羊获得 300ml 抗血清。如下所述从抗血清纯化抗原特异性抗体:将 5mg 肽 PEC13 与 5ml SulfoLink 凝胶(PIERCE, Rockford, IL, USA) 偶联。逐批将 50ml 抗血清与凝胶在室温下温育 4 小时。将材料转移到柱中(NAP25 空柱, Pharmacia)。舍弃流过物,并将凝胶用 100ml 清洗缓冲液(100mM 磷酸钾, 0.1% Tween20, pH 6.8)清洗,然后用 50mM pH 2.7 的柠檬酸将特异性结合的抗体洗脱下来。将洗脱液对 50mM 磷酸钠, 100mM NaCl, pH 8.0 透析。抗体产量为 36.6mg。

[0204] 抗体的标记

[0205] 标记通过标准程序来进行参见 EP 1488209 A1、EP 1738178 A1):将纯化抗体的浓度调整至 1g/L,并通过以 1 : 5 的摩尔比例与化学发光标记物 MACN-吖啶-NHS-酯(1g/L; InVent GmbH, Hennigsdorf, 德国)在室温下温育 30 分钟对抗体进行标记。通过在室温下加入 1/10 体积的 1mol/L Tris 10 分钟来终止反应。通过在 NAP-5 柱(GE Healthcare, Freiburg, 德国)和 Bio-Sil® SEC-400-5HPLC 柱(BIO-RAD)上进行尺寸排阻层析,将标记的抗体与游离标记物分离开。

[0206] 抗体的包被

[0207] 包被按照标准程序进行(参见 EP 1488209 A1、EP 1738178 A1):将聚苯乙烯管(Greiner)用纯化的抗体(每管 2 μ g 抗体,在 300 μ L 10mmol/L Tris, 10mmol/L NaCl, pH 7.8 中)在 22°C 下包被过夜。然后将管用含有 3% Karion FP(Merck)、0.5% 无蛋白酶 BSA(Sigma)的 10mmol/L 磷酸钠(pH 6.5)阻断,并冷冻干燥。

[0208] 标准品基质的产生

[0209] 从来自健康人类对象的血清合并物,如下所述通过亲和层析消除 PRX4 免疫反应性:将 5mg 抗体 340/3F1 与 5ml CarboLink™ 偶联凝胶(PIERCE, Rockford, IL, USA) 偶联,并将血清合并物(总体积 200ml; 10 个个体各 20ml 的合并物)连续四次通过柱子。

[0210] 标准品

[0211] 根据分析法的类型,通过在标准品基质中制作肽 PEE27 或来自猪肝的可溶性总蛋白提取物(SCIPAC, UK)的连续稀释液来制备免疫分析的标准品(详细情况在后面描述)。在使用前将标准品储存在 -30°C 下。对于 PEE27 标准品来说,根据肽物质的重量指定标准品浓度。对于肝脏提取物标准品来说,指定任意 PRX4 浓度 [arb. U/1]。多少 U 对应于免疫反应性 PRX4 的何种质量,通过鉴定使得确定量的抗 PEC13 单克隆抗体(2 μ g/管)包被的管的结合能力饱和和所需的标准品浓度来粗略估算。当使用 50 μ l PRX4 浓度为 300arb. U/1 的标准品时,近似达到饱和。

[0212] 免疫分析法

[0213] 使用上述组分,建立了几种夹心免疫分析法。

[0214] A. 1) 使用单克隆抗体的同源免疫分析法 / 两步版本

[0215] 使用抗 PEC13 抗体 340/4F2 作为固相抗体。使用抗 PEC13 抗体 340/3F1 作为标记

抗体。用于第一个温育步骤的分析缓冲液是 300mM 磷酸钾, pH 7.0, 100mM NaCl, 10mM EDTA, 0.09% 叠氮钠, 0.5% BSA, 0.1% 非特异性牛 IgG, 0.1% 非特异性绵羊 IgG, 0.1% 非特异性小鼠 IgG。在所指出的情况下, DTT 以 3mM 的浓度添加到分析缓冲液中, 除非另有指示。用于第二个温育步骤的分析缓冲液是 300mM 磷酸钾, pH 7.0, 50mM NaCl, 10mM EDTA, 0.09% 叠氮钠, 0.5% BSA, 0.1% 非特异性牛 IgG, 0.1% 非特异性绵羊 IgG, 0.1% 非特异性小鼠 IgG, 并且每 100 μ l 含有 10^6 个相对光单位 (RLU) 的 MACN 标记抗体。在第一个温育步骤中, 将 100 μ l 标准品或样品和 100 μ l 分析缓冲液移取到包被的管中。将管在 22°C 下、在搅拌下温育 20 小时。然后将管用 1mL B. R. A. H. M. S 清洗溶液 (B. R. A. H. M. S AG, Hennigsdorf, 德国) 清洗 4 次。然后加入 100 μ l 含有 MACN 标记抗体的缓冲液, 并将管在 22°C 下、在搅拌下温育 2 小时。然后将管用 1mL B. R. A. H. M. S 清洗溶液 (B. R. A. H. M. S AG, Hennigsdorf, 德国) 清洗 4 次, 并使用 LB952T 光度计 (Berthold) 测量结合的化学发光, 每个管测量 1 秒钟。使用 MultiCalc 软件 (Spline Fit) 计算样品浓度。

[0216] A. 2) 使用单克隆抗体的同源免疫分析法 / 一步版本

[0217] 使用与分析法 A. 1 相同的分析组分。将 100 μ l 标准品或样品和 100 μ l 含有 MACN 标记抗体的缓冲液移取到包被的管中, 并将管在 22°C 下在搅拌下温育 2 小时。然后将管用 1mL B. R. A. H. M. S 清洗溶液 (B. R. A. H. M. S AG, Hennigsdorf, 德国) 清洗 4 次, 并使用 LB952T 光度计 (Berthold) 测量结合的化学发光, 每个管测量 1 秒钟。使用 MultiCalc 软件 (Spline Fit) 计算样品浓度。

[0218] B) 使用单克隆抗体的异源免疫分析法 / 两步版本

[0219] 使用抗 PCS15 抗体 357/3B6 作为固相抗体。使用抗 PEC13 抗体 340/4F2 作为标记抗体。使用来自猪肝的可溶性蛋白提取物作为标准材料 (参见上文)。所有其他条件和程序如分析法 A. 1 所述。

[0220] C) 使用多克隆抗体的同源免疫分析法 / 两步版本

[0221] 纯化的绵羊抗 PEC13 抗体既用作固相抗体也用作标记抗体。所有其他条件和程序如分析法 A. 1 所述。

[0222] 尺寸排阻层析

[0223] 使用 Bio-Sil® SEC-400-5HPLC 柱 (BIO-RAD), 对含有内源 PRX4 免疫反应性的人类血清合并物以及猪肝可溶性蛋白提取物进行分级。样品体积为 100 μ l。运行缓冲液是 50mM 磷酸钾, pH 7.4, 150mM NaCl, 0.09% 叠氮钠。流速为 0.8mL/min。收集 0.4mL 级分, 并使用分析法 A. 1 测量 PRX4 免疫反应性。

[0224] 临床样品的测量

[0225] 测量了来自患有各种疾病的患者的血清样品中的 PRX4。这些疾病是心血管疾病包括慢性和急性心力衰竭、急性冠脉综合症、动脉粥样硬化、高血压、中风、短暂缺血性发作 (合称心脏病), 传染病, 败血症、重症败血症、败血性休克 (合称败血症), 胰腺炎, 其他胃肠道疾病包括溃疡性结肠炎、克罗恩病, 癌症包括结肠、乳腺和胰腺癌, 糖尿病, 类风湿性关节炎, 慢性和急性肾病 (合称肾病), 阿茨海默氏病、轻度认知病、帕金森氏病 (合称神经变性病)。也测量了来自健康对象的样品。

[0226] 结果

[0227] 抗体设计

[0228] PRX4 属于几种相关蛋白的家族。尽管对于它们在组织外部的出现毫无了解,但我们在设计所开发的抗 PRX4 抗体的表位特异性中考虑到了这种关系,并且我们合成了用于免疫接种的肽,其对应于位于 PRX4 的 N-端部分、即 73 位氨基酸上游的区域。这样的区域在 PRX 蛋白家族的其他成员中不存在,或缺乏与 PRX4 的序列同源性(图 1)。

[0229] 剂量响应曲线

[0230] 使用用于测量 PRX4 免疫反应性的同源夹心分析设计(A.1),通过使用猪肝提取物形式的天然分析物或含有所用抗体的两份表位的合成肽,能够产生剂量响应曲线(图 2)。使用分析设计 C、即使用多克隆抗体代替单克隆抗体时,获得了类似结果(数据未显示)。使用这些分析法,能够在患者样品中检测到 PRX4 免疫反应性(在下文中描述)。

[0231] 测量的分析物的性质

[0232] 用于测量多聚体分析物的同源夹心免疫分析、即利用两种具有相同表位特异性的抗体的夹心分析,与利用两种具有不同表位特异性的抗体的异源夹心免疫分析这种典型提供非常高的分析物特异性的情况相比,可能更倾向于与目标靶分子之外的其他分子发生非特异性交叉反应,这类似于竞争免疫分析。为了评估同源 PRX4 分析法 A.1 是否还检测复杂样品例如血清中除了 PRX4 免疫反应性之外的其他分子,在同源分析法 A.1 和异源分析法 B 中测量了含有 PRX4 免疫反应性的患者样品。两种分析法的测量结果高度相关($r = 0.9$; 图 3),证实了同源分析法 A.1 非常特异地检测 PRX4 免疫反应性。

[0233] 通过尺寸排阻层析,然后使用分析法 A.1 测量得到的级分,对纯粹血清(使用了来自败血症患者的血清合并物)和肝脏提取物中的 PRX4 免疫反应性的表观分子量进行了分析。在该分析中,在纯粹血清和肝脏提取物两者中检测到的 PRX4 免疫反应性具有 158 至 660kDa 之间、更具体约为 330kDa 的表观分子量(图 4)。该发现与下述可能性相符,即 PRX4 可能作为同多聚体、更具体为同十聚体或同五聚体存在,和/或作为其中一个以上 PRX4 分子与一个或多个同种类或不同种类的蛋白相缔合的异多聚体(例如 PRX1 的情形)存在。

[0234] 还原剂的影响

[0235] 当向分析法 A.1 的第一个温育步骤中使用的分析缓冲液加入还原剂例如 DTT 时,对于猪肝提取物和人类血清样品两者来说,检测到的 PRX4 免疫反应性令人吃惊地急剧增加(图 5)。当 DTT 浓度高于 2mM 时影响最显著,在 2 至 5mM 之间时基本上达到平台。因此,适合的 DTT 浓度是 3mM,将其用于进一步分析中。人类血清样品中的 PRX4 免疫反应性的行为与来自猪肝提取物的 PRX4 相同,正如当存在或不存在 DTT 情况下测量样品时获得的理想的相关性(图 5, Spearman $r = 0.98$) 所表明的。分析法 A.1(+3mM DTT) 的功能分析灵敏度,其被定义为分析间 CV 为 20% 时的浓度,被测定为 0.7arb. U/l。造成观察到的效应的推测机制,可能是 PRX4 多聚体内二硫键的部分还原产生了较小的 PRX4 多聚体,并同时暴露出以前不可接近的表位。

[0236] 通过向分析缓冲液添加 DTT 而观察到的另一个效应,是 PRX4 免疫反应性的表观离体稳定性的提高:当从分析法 A.1 的第一个温育步骤中使用的分析缓冲液中省略 DTT 时,在人类血清或血浆中可检测的 PRX4 免疫反应性随着样品的离体储存时间而增加(图 6),这种增加在 22℃ 下比 4℃ 下更显著。意外的是,向在分析法 A.1 的第一个温育步骤中使用的分析缓冲液加入 3mM DTT 阻止了 PRX4 免疫反应性的这种明显增加。可以推测,在样品储存后,内源 PRX4 多聚体经历结构变化(可能由蛋白酶或其他效应分子介导),导致原本不可接

近或不易接近的表位部分暴露。然后,通过添加 DTT 所介导的 PRX4 多聚体的结构变化引起比样品储存所诱导的 PRX4 免疫反应性的增加强得多的增加,最终使得样品是否储存过变得无关紧要,只要样品与还原剂例如 DTT 进行接触即可。观察到的还原剂例如 DTT 的有益效应,可以通过在任何阶段接触样品来获得,即还原剂可以在测定前直接添加到样品中,或者它可以包含在与样品的分析温育中。

[0237] 与在同源分析法(分析法 A)中所观察到的还原剂例如 DTT 的有益效应类似,当使用检测 PRX4 免疫反应性的异源夹心分析法(分析法 B)时,在分析灵敏度和离体稳定性上也观察到了还原剂例如 DTT 的同样有益的效应。与分析法 A 中相同,在分析法 B 中,在人类血清样品中测量到的 PRX4 浓度也不受添加 DTT 的影响(当使用分析法 B,在分析法的第一个温育步骤中使用的分析缓冲液中不存在或存在 3mMDTT 的情况下测量样品时;存在或不存在 DTT 情况下的测量值强烈相关(Spearman $r = 0.96$))。当都在存在 DTT 下运行时,异源分析法 B 与同源分析法 A.1 相比,相关性也很强(Spearman $r = 0.85$)。

[0238] 临床样品的测量

[0239] 因为已经提出 PRX4 可能表达在血细胞中,因此我们评估了溶血对血浆样品中测量到的免疫反应性的影响。观察到只有当发生严重溶血时,即只有当看见样品变红(血红蛋白浓度为 400g/dL 以上)时,才能检测到 PRX4 免疫反应性。在常规实验室中,具有这种溶血程度的样品典型不用于任何类型的分析。因此,溶血对 PRX4 测定的准确性的潜在不利影响在实践中不重要。

[0240] 测量了来自患有各种疾病的患者的血清样品中的 PRX4(图 7)。这些疾病是心血管疾病包括慢性和急性心力衰竭、急性冠脉综合症、动脉粥样硬化、高血压、中风、短暂缺血性发作(合称心脏病),传染病,败血症、重症败血症、败血性休克(合称败血症),胰腺炎,其他胃肠道疾病包括溃疡性结肠炎、克罗恩病,癌症包括结肠、乳腺和胰腺癌,糖尿病,类风湿性关节炎,慢性和急性肾病(合称肾病),阿茨海默氏病、轻度认知病、帕金森氏病(合称神经变性病)。还测量了来自健康对象的样品。来自健康对象的 PRX4 水平大多数高于分析法的功能灵敏度,但是与所调查的所有其他患者组相比是最低的。在患有败血症、胰腺炎和其他胃肠道疾病的患者中检测到的水平最高。因为在许多疾病类型中观察到 PRX4 的升高,因此乍一看 PRX4 测量值的诊断应用潜力似乎不高。然而,这最可能是低估了,因为不是所有这些患者都表现出相同的症状和临床病症,而总的来说任何实验室测量值的价值必须在症状和病症的背景下来看。PRX4 作为参与氧化应激调控的酶,必须被假定为反映了氧化应激水平,因此是疾病过程的急性程度和/或严重性的度量。

[0241] 在患有败血症、重症败血症和败血性休克的患者中,PRX4 与 PCT 相关(Spearman $r = 0.33$)(参见图 8)。已知在这样的患者群体中,PCT 水平的逐渐升高与疾病严重性逐渐增加相关[Müller B 等,(2000)Crit Care Med. 28(4):977-83]。

[0242] 实施例 2:血浆与血清样品的比较

[0243] 从 10 个个体获得了几个血清和 EDTA 血浆等分试样。将等分试样在不同离心力(分别为 1500、2000、2500 和 3000g)下离心 15 分钟,以将血清和血浆分别与固体血液化合物(血细胞等)分离开。测量血清和血浆中的 PRX4,并且对于每个个体和样品基质,将 1500、2000、2500g 下获得的 PRX4 浓度除以在 3000g 下离心后获得的相应值(只包括高于分析法功能灵敏度的值)。结果显示在图 9 中。显示的是这些计算值的平均值和标准偏差。

图 9 中显示的实验证实了血清值不依赖于施加的离心力,而血浆平均值随着离心力降低而增加。此外,血浆值的精确度比血清值的差得多。

[0244] **结论**,与血清相反,血浆含有不溶性 PRX4 免疫反应性,并且需要极端的离心条件来除去它们。如果离心进行得不充分,则可能得出假性升高的 PRX4 值和糟糕的精确度的检测结果。

[0245] 表 1:血清和血浆样品的平均变异系数 (CV)

	血清		血浆	
	<FAS	>FAS	<FAS	>FAS
[0246] n=	36	114	11	139
平均 CV	./.	4.0%	./.	5.8%

[0247] 还通过对血液收集管 (monovette) 如下进行离心,从 150 个健康个体平行地获得了血清和血浆样品:血清:15min,2000g;血浆:15min,3000g。PRX4 测量两份平行样。对于血浆来说,与血清 (n = 114) 相比,更多的样品 (n = 139) 给出了高于分析法功能灵敏度 (FAS) 的值。计算了所有高于 FAS 的值的两份平行测量值的变异系数 (CV) 平均值,参见表 1。对于血浆样品来说,与血清样品 (4.0%) 相比, CV 明显更高 (5.8%)。

[0248] **结论**,即使当为了获得血浆而施加强离心力 (例如 3000g) 时,PRX4 值的精确度也比相应的血清样品差。此外,给出高于 FAS 的 PRX4 值的水浆样品比血清样品更多这一发现,表明即使在强离心条件下,与血清中相比,在血浆中也可能获得更多假性升高的 PRX4 值。

[0249] 实施例 3

[0250] 在入院后连续的天中测量了败血症患者的 PRX4。

[0251] 图 10 显示了 16 位败血症患者的 PRX4 值 (中位数为 9.9arb. U/l; 范围为 0.62-50.7arb. U/l)。

[0252] 在来自死亡患者与存活患者的所有值的平均 PRX4 值之间,存在显著差异 ($P < 0.0001$) (分别为 16.2 对 7.7arb. U/l)。

[0253] 死亡患者显示出比存活者更高的 PRX4 值。

[0254] 实施例 4

[0255] 测量了胰腺炎患者的样品。368 位胰腺炎患者的 PRX4 浓度在 0.378arb. U/l 至 80.6arb. U/l 之间,中位数为 4.53arb. U/l。

[0256] 患有严重急性胰腺炎 (SAP) 的患者在症状出现后至少第 3 天,表现出比轻度急性胰腺炎 (MAP) 患者更高的 PRX4 值。

[0257] 实施例 5

[0258] 在中风患者中测量了样品中的 PRX4 值。

[0259] 测量了 24 位中风患者的样品 [中位数为 5.5arb. U/l; 范围为 6.674-22.9arb. U/l]。中风患者表现出比对照组对象更高的 PRX4 值。

图 1

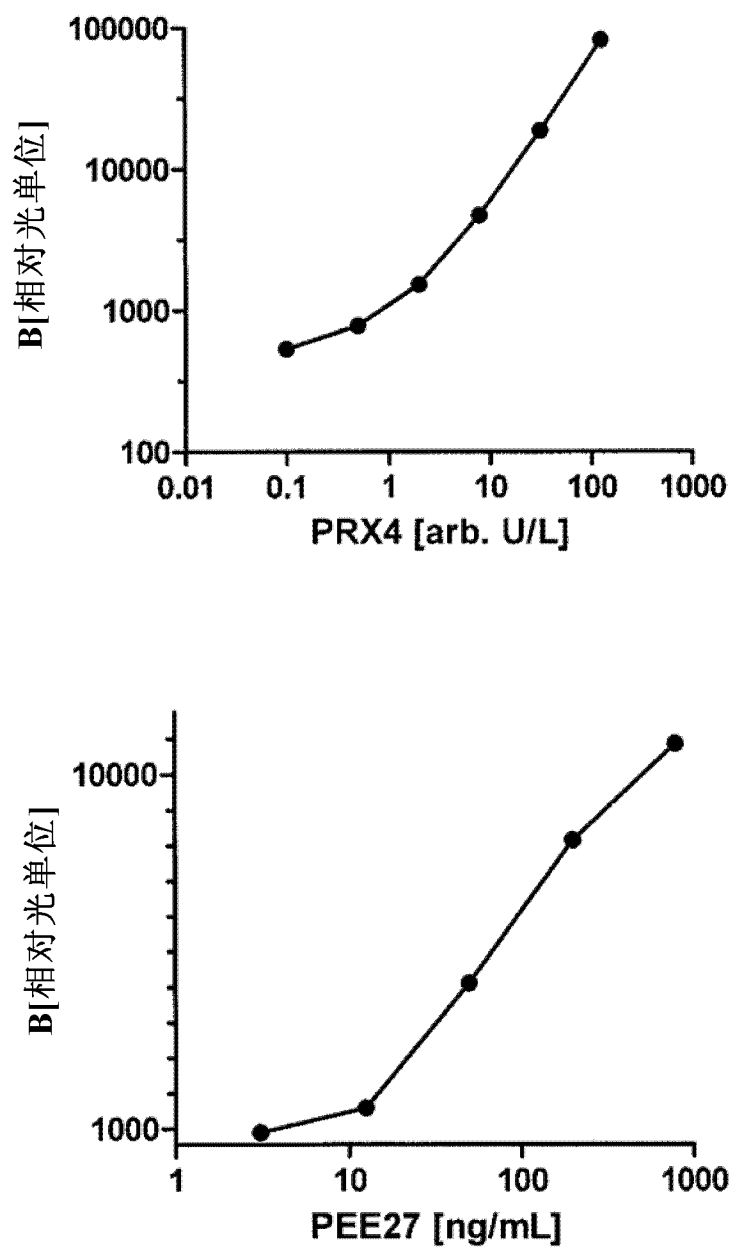


图 2

均相与非均相夹心测定法比较

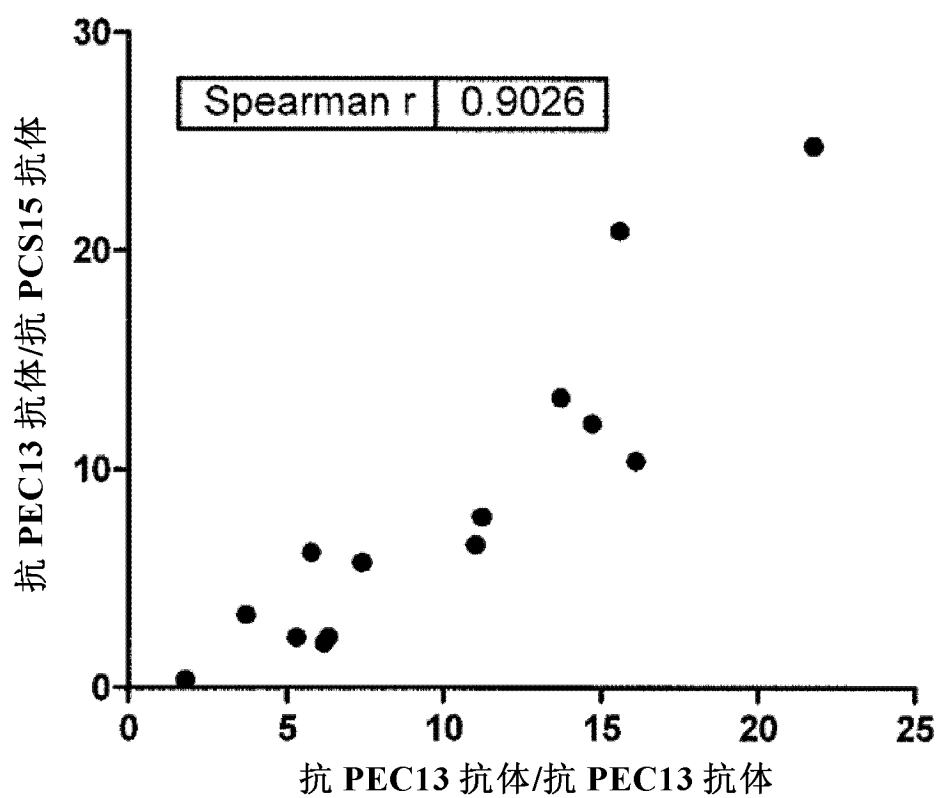


图 3

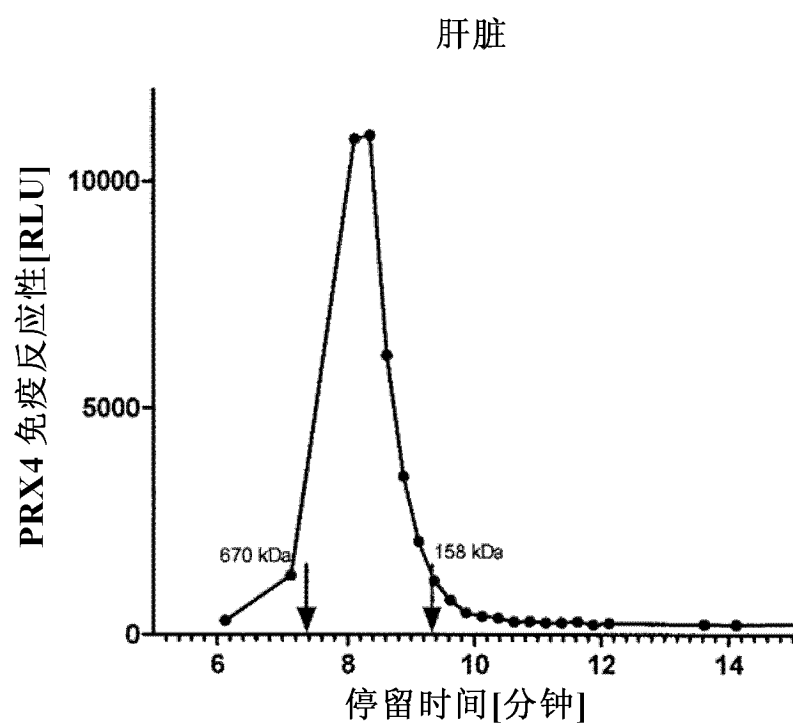
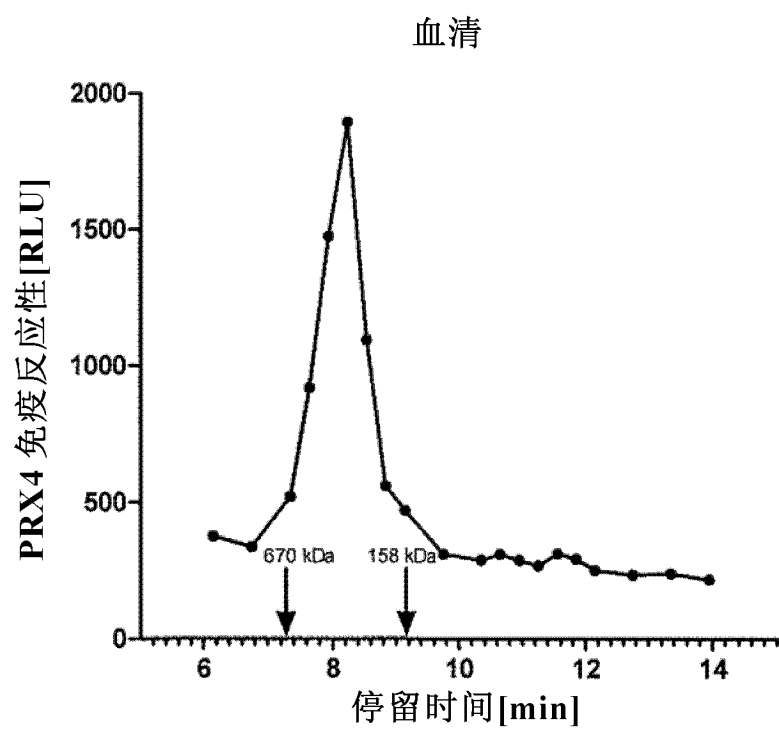
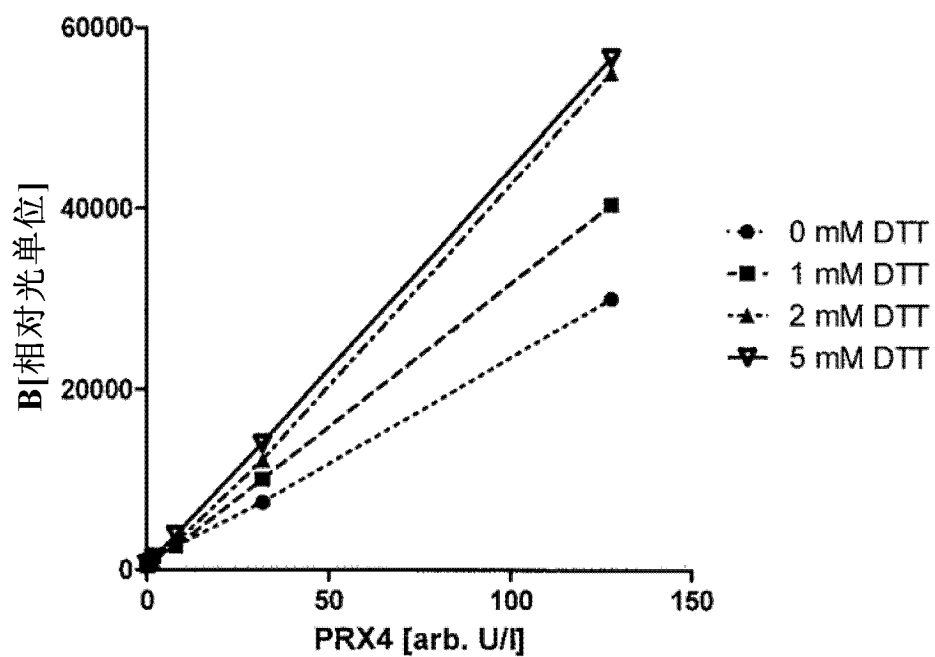


图 4



抗 PEC13 抗体/抗 PEC13 抗体
+/- DTT

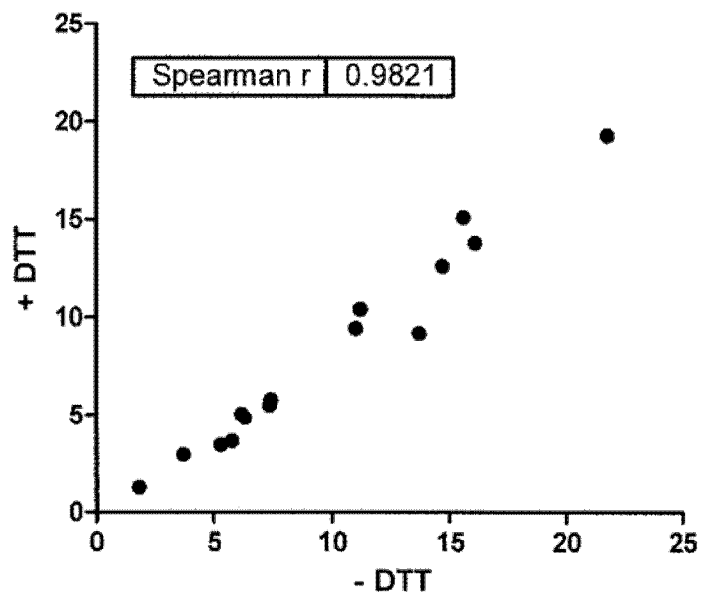


图 5

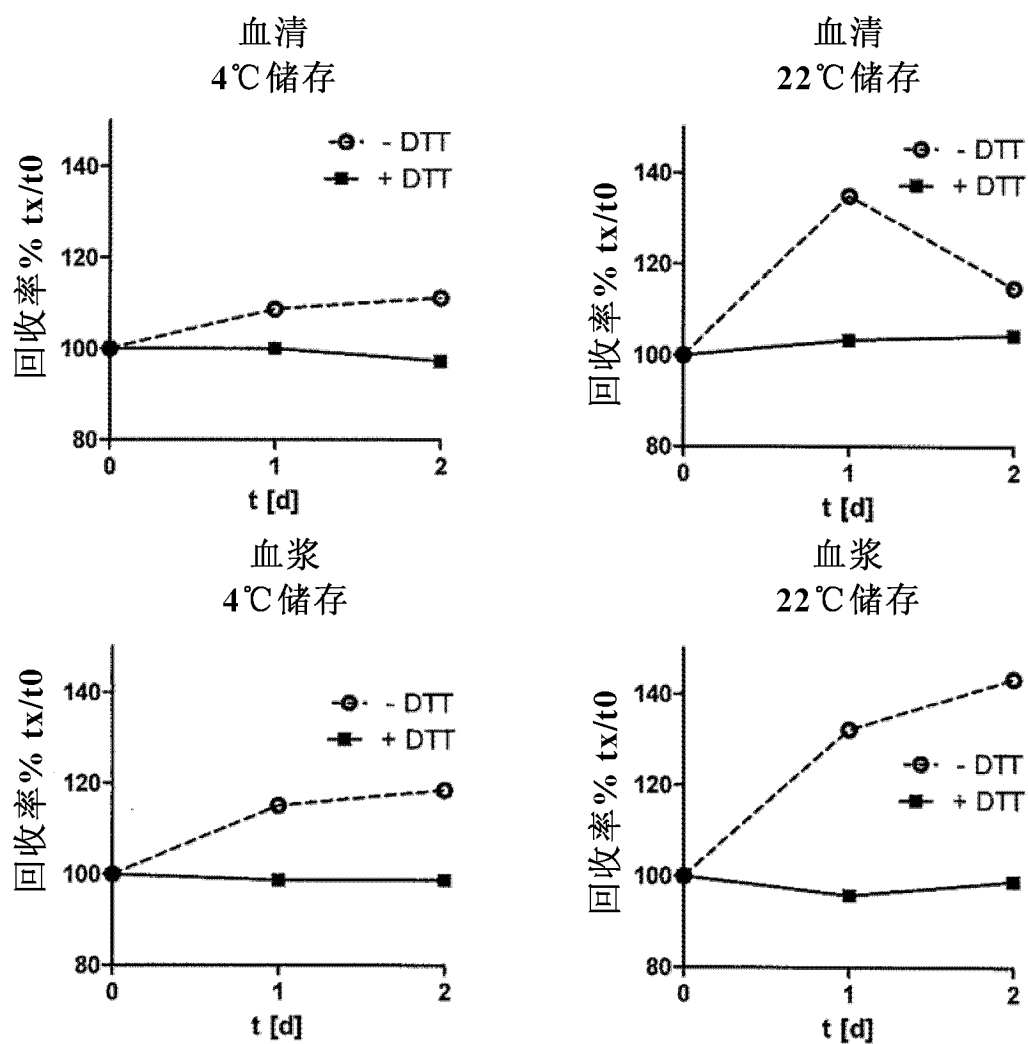


图 6

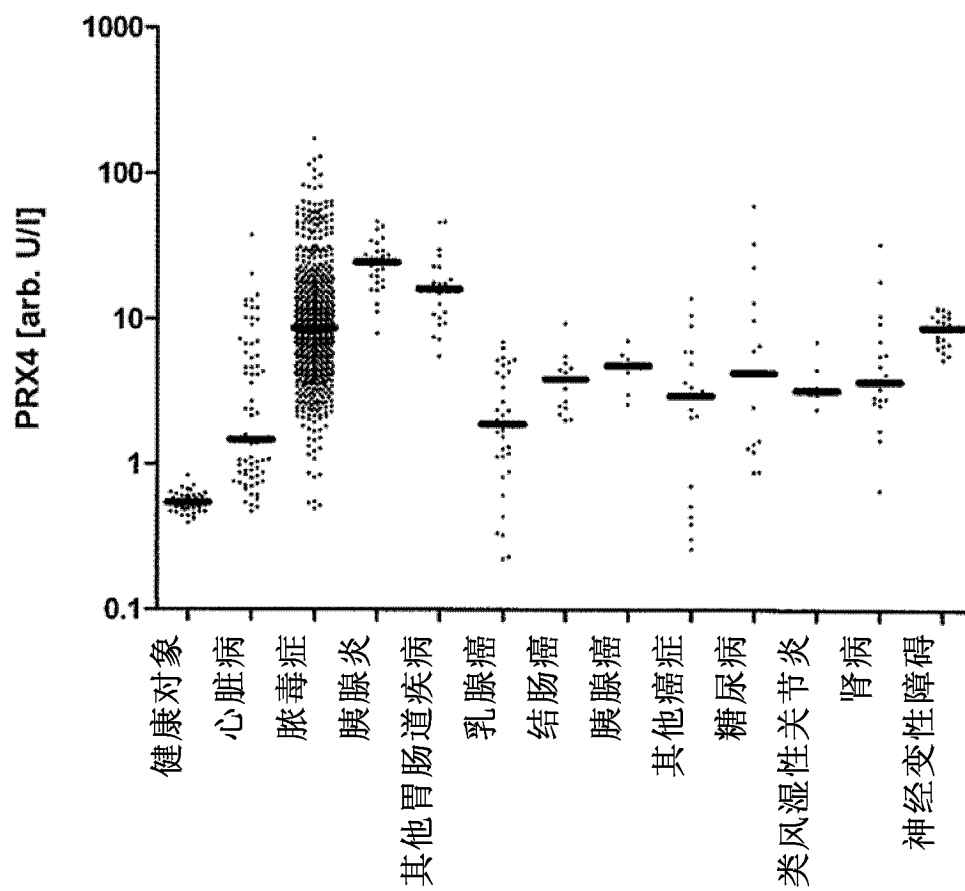


图 7

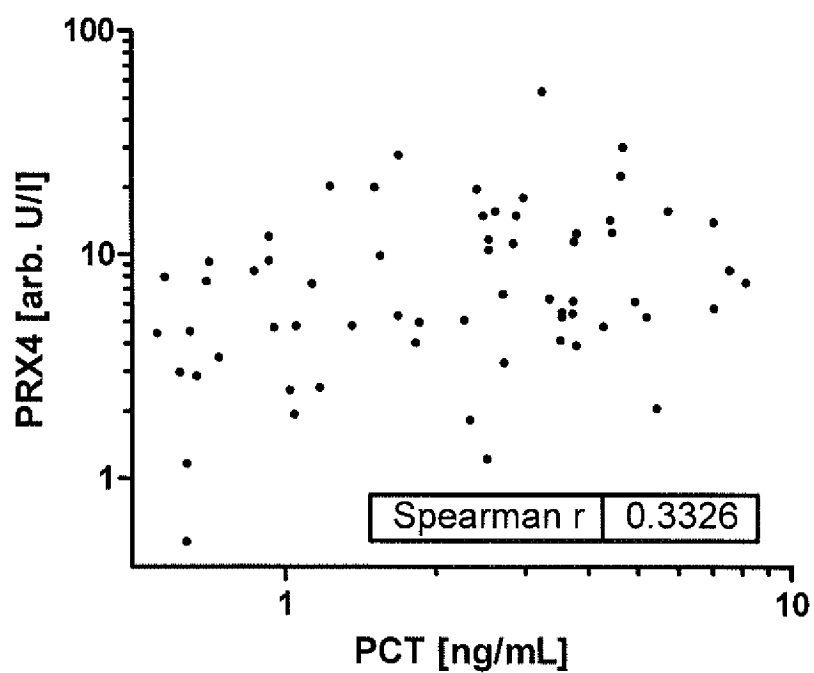


图 8

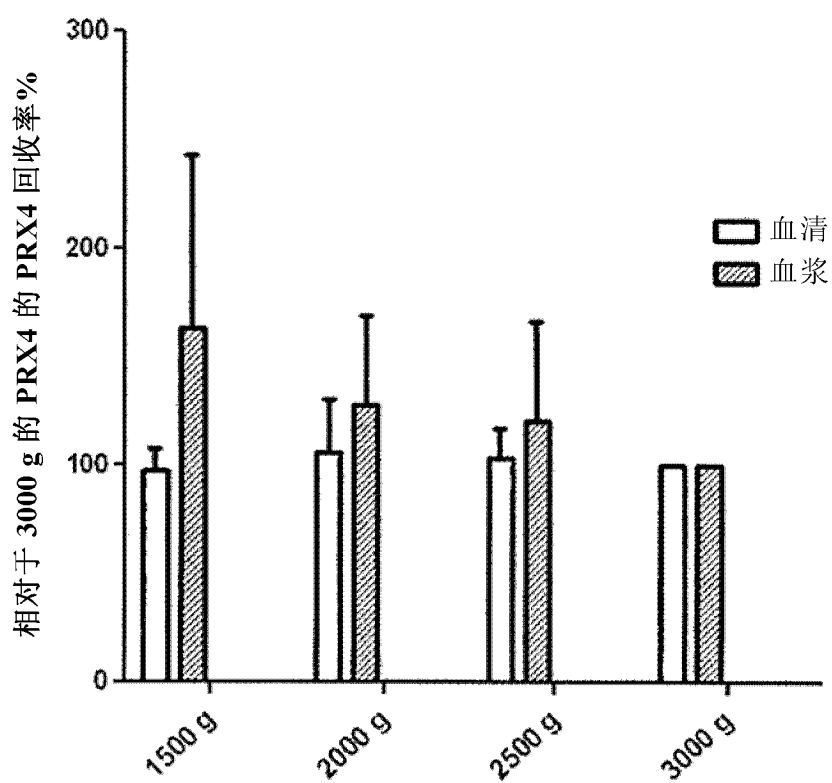


图 9

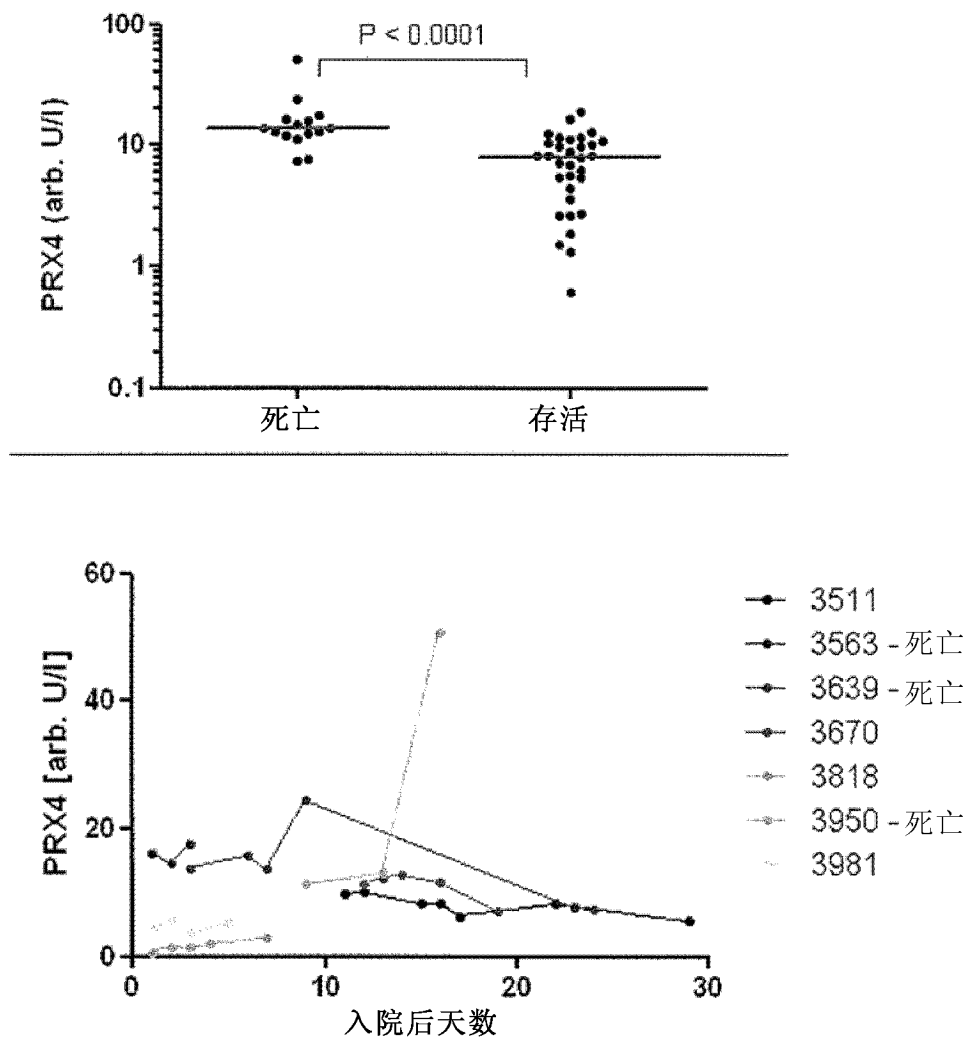


图 10

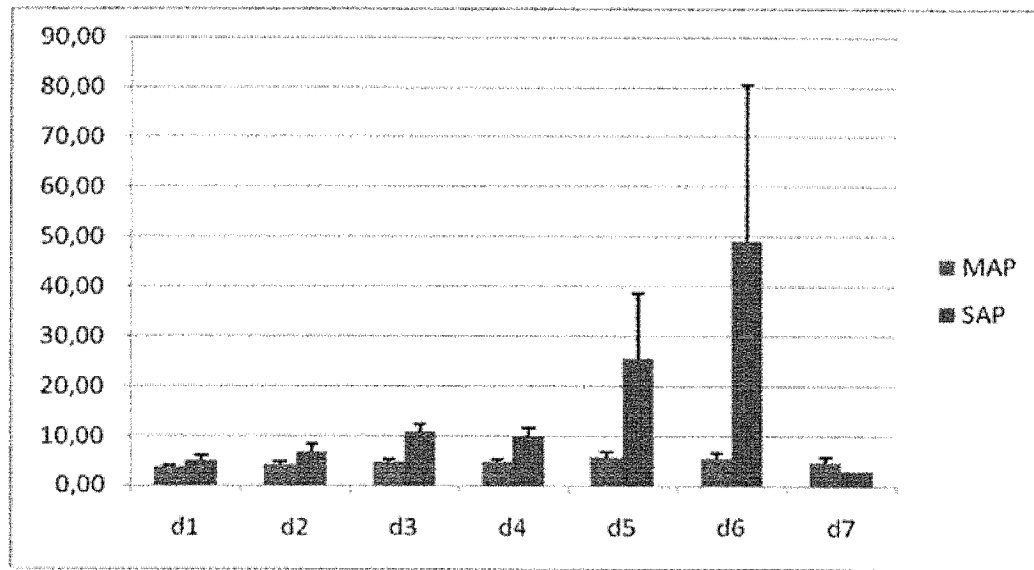


图 11

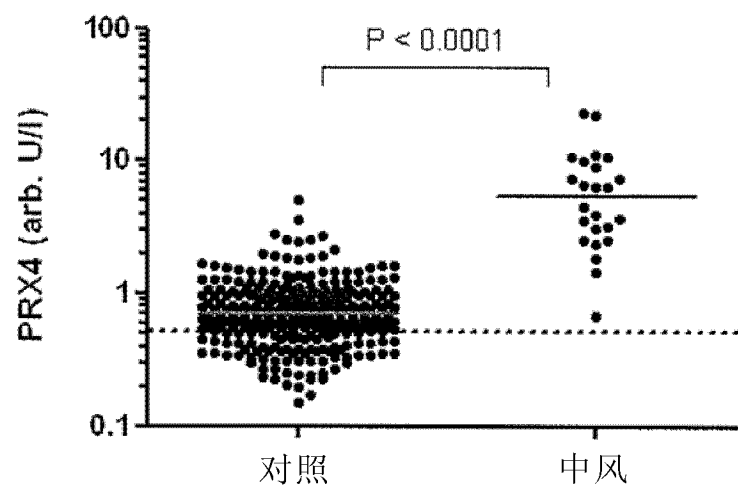


图 12