



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113167724 A

(43) 申请公布日 2021.07.23

(21) 申请号 201980078519.2

巴勃罗·巴尔托卢奇

(22) 申请日 2019.11.29

迈克尔·马登

(30) 优先权数据

18306588.7 2018.11.30 EP

(74) 专利代理机构 成都超凡明远知识产权代理有限公司 51258

代理人 王晖 刘书芝

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.05.28

(51) Int.Cl.

G01N 21/31 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2019/083152 2019.11.29

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/109589 EN 2020.06.04

(71) 申请人 国家健康与医学研究院

地址 法国巴黎

申请人 巴黎第十二大学

公共救济事业局-巴黎医院

(72) 发明人 劳伦特·基热

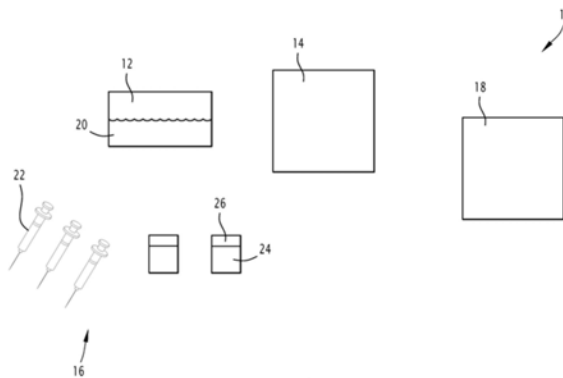
权利要求书4页 说明书23页 附图6页

(54) 发明名称

用于确定一种蛋白质含量的方法及相关的装置和方法

(57) 摘要

本发明旨在提供用于确定血液中至少一种蛋白质的方法,该方法更精确同时还易于实施。发明人以原始方式利用光谱法和定量技术以准确地确定生物样品的蛋白质含量,特别是对于氧合血红蛋白、高铁血红蛋白、结合于血清白蛋白和血色素结合蛋白的血红素以及胆红素。这样的方法可以有利地用于涉及血红素-相关的或血红素蛋白质-相关的疾患的各种应用中,特别是用于诊断、用于跟踪治疗、用于确定生物标志物或用于筛选的方法。这样的方法对于使血袋合格也是令人感兴趣的。



1. 一种用于确定生物样品中至少一种蛋白质含量的方法, 其中的几种蛋白质包括氧合血红蛋白、高铁血红蛋白、结合于血清白蛋白的血红素、胆红素和结合于血色素结合蛋白的血红素, 所述确定方法至少包括以下步骤:

a) 在目标波长范围内提供所述样品的初始光谱,

b) 将当前光谱设置为所述初始光谱,

c) 迭代以下步骤:

c1) 确定所述样品中的蛋白质含量, 所述确定是通过使用所述当前光谱的光谱分析或/和化学定量进行的,

c2) 基于确定的所述蛋白质含量, 推导与所述蛋白质相关的目标波长范围内的整体光谱成分, 以及

c3) 从所述当前光谱中去除推导的光谱成分,

d) 输出确定的蛋白质含量,

只要氧合血红蛋白、高铁血红蛋白、结合于血清白蛋白和血色素结合蛋白的血红素以及胆红素的含量没有被确定, 就对不同的蛋白质依次迭代步骤c)。

2. 根据权利要求1所述的确定方法, 其中, 通过降低所述蛋白质的二阶导数的值来迭代步骤c), 所述蛋白质的二阶导数的值定义为所述样品中所述蛋白质的光谱成分随光谱波长的二阶导数在目标波长范围内的最大振幅, 或所述样品中所述蛋白质的光谱成分随光谱波长的二阶导数的二阶导数最小值和最大值之间的差的绝对值在目标波长范围内的最大值。

3. 根据权利要求1或2所述的确定方法, 其中, 所述光谱分析包括:

- 提供与所考虑的蛋白质相关的参考光谱, 以及

- 计算所述参考光谱和所述当前光谱之间的归一化系数。

4. 根据权利要求3所述的确定方法, 其中, 所述归一化系数是所考虑的蛋白质的二阶导数的值和所述参考光谱的二阶导数的值之间的比率, 所述参考光谱的二阶导数的值定义为随所述参考光谱的波长的二阶导数在目标波长范围内的最大振幅, 或随所述参考光谱的波长的二阶导数的二阶导数最小值和最大值之间的差的绝对值在目标波长范围内的最大值。

5. 根据权利要求3或4所述的确定方法, 其中, 满足以下性质中的至少一种:

- 对氧合血红蛋白进行光谱分析, 并针对在三个区间中选择的至少一个波长计算所述归一化系数, 第一区间涵盖包括在415纳米和417纳米之间的波长, 第二区间涵盖包括在542纳米和544纳米之间的波长, 以及第三区间涵盖包括在576纳米和578纳米之间的波长, 所述区间优选为第三区间;

- 对高铁血红蛋白进行光谱分析, 并针对在350纳米至750纳米范围内选择的至少一个波长计算所述归一化系数, 以及

- 对胆红素进行光谱分析, 并针对在350纳米至750纳米范围内选择的至少一个波长计算所述归一化系数。

6. 根据权利要求1至5中的任一项所述的确定方法, 其中, 对血浆血红素进行光谱分析, 并使用结合于血清白蛋白的血红素和结合于血色素结合蛋白的血红素参考光谱, 针对在300纳米至750纳米范围内选择的至少一个波长计算所述归一化系数。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的确定方法, 其中, 所述化学定量选自以下组成的组:

- 通过添加CO来定量氧合血红蛋白,
- 通过添加KCN来定量高铁血红蛋白,
- 通过添加CO和连二亚硫酸钠来定量血浆血红素,
- 通过添加DTN来定量结合于血色素结合蛋白的血红素
- 通过添加血红素来定量总血色素结合蛋白,
- 通过添加血红素和连二亚硫酸钠来定量总血色素结合蛋白,以及
- 通过添加血红素、CO和连二亚硫酸钠来定量总血色素结合蛋白。

8. 根据权利要求1至7中任一项所述的确定方法,其中,在所述输出步骤中,所述确定的含量包括蛋白质中的其他含量,其不同于氧合血红蛋白的含量、高铁血红蛋白的含量、结合于血清白蛋白和血色素结合蛋白的血红素的含量、胆红素的含量,所述其他含量是选自以下组成的组的蛋白质的含量:

- 羧化血红蛋白,
- 肌红蛋白,
- 卟啉,
- 胆色素原,
- 尿胆素,
- 通过血红素加氧酶的血红素的分解代谢的产物,和
- 胆红素降解和氧化的产物,诸如胆绿素或血红素盒,
- 器官功能障碍和细胞溶解的产物,
- 代谢底物,和
- 代谢降解产物。

9. 根据权利要求1至8中任一项所述的确定方法,其中,当依次确定氧合血红蛋白、高铁血红蛋白、结合于血清白蛋白的血红素和胆红素的含量时,通过化学定量确定氧合血红蛋白、高铁血红蛋白、结合于血清白蛋白含量的血红素和胆红素中的至少一种。

10. 根据权利要求1至9中任一项所述的确定方法在以下中的用途:

• 用于预测受试者有患血红素-相关的或血红素蛋白质-相关的疾患的风险的方法,所述预测方法至少包括以下步骤:

-进行确定所述受试者的生物样品中至少一种蛋白质含量的方法步骤,以获得确定的参数,所述确定方法是根据权利要求1至9中任一项所述的,

-在所述确定的参数上预测所述受试者有患所述血红素-相关的或血红素蛋白质-相关的疾患的风险;

• 用于诊断血红素-相关的或血红素蛋白质-相关的疾患的方法,所述诊断方法至少包括以下步骤:

-进行确定所述受试者的生物样品中至少一种蛋白质含量的方法步骤,以获得确定的蛋白质含量,所述确定方法是根据权利要求1至9中任一项所述的,以及

- 根据所述确定的蛋白质含量诊断所述血红素-相关的或血红素蛋白质-相关的疾患;

• 用于定义血红素-相关的或血红素蛋白质-相关的疾患的阶段的方法,所述定义方法至少包括以下步骤:

-进行确定所述受试者的生物样品中至少一种蛋白质含量的方法步骤,以获得确定的蛋白质含量,所述确定方法是根据权利要求1至9中任一项所述的,以及

-根据所述确定的蛋白质含量定义所述血红素-相关的或血红素蛋白质-相关的疾患的阶段;

• 用于鉴定用于预防和/或治疗血红素-相关的或血红素蛋白质-相关的疾患的治疗靶标的方法,所述方法包括以下步骤:

-进行确定第一受试者的图像的生物样品中至少一种蛋白质含量的方法步骤,以获得第一确定的蛋白质含量,所述确定方法是根据权利要求1至9中任一项所述的,并且所述第一受试者是患所述血红素-相关的或血红素蛋白质-相关的疾患的受试者,

-进行确定第二受试者的生物样品中至少一种蛋白质含量的方法步骤,以获得第二确定的蛋白质含量,所述确定方法是根据权利要求1至9中任一项所述的,并且所述第二受试者是未患所述血红素-相关的或血红素蛋白质-相关的疾患的受试者,以及

-基于所述第一和第二确定的蛋白质含量的比较选择治疗靶标;

• 用于鉴定生物标志物的方法,所述生物标志物是血红素-相关的或血红素蛋白质-相关的疾患的诊断生物标志物、血红素-相关的或血红素蛋白质-相关的疾患的易感性生物标志物、血红素-相关的或血红素蛋白质-相关的疾患的预后生物标志物、或响应于血红素-相关的或血红素蛋白质-相关的疾患的治疗的预测性生物标志物,所述方法包括以下步骤:

-进行确定第一受试者的生物样品中至少一种蛋白质含量的方法步骤,以获得第一确定的含量,所述确定方法是根据权利要求1至9中任一项所述的,并且所述第一受试者是患所述血红素-相关的或血红素蛋白质-相关的疾患的受试者,

-进行确定第二受试者的图像的生物样品中至少一种蛋白质含量的方法步骤,以获得第二确定的蛋白质含量,所述确定方法是根据权利要求1至9中任一项所述的,并且所述第二受试者是未患所述血红素-相关的或血红素蛋白质-相关的疾患的受试者,以及

-基于所述第一和第二确定的蛋白质含量的比较选择生物标志物,以及

• 用于筛选可用作药物的化合物的方法,所述化合物对已知的用于预防和/或治疗血红素-相关的或血红素蛋白质-相关的疾患的治疗靶标有作用,所述方法包括以下步骤:

-进行确定第一受试者的生物样品中至少一种蛋白质含量的方法步骤,以获得第一确定的蛋白质含量,所述确定方法是根据权利要求1至9中任一项所述的,并且所述第一受试者是患所述血红素-相关的或血红素蛋白质-相关的疾患的且已接受所述化合物的受试者,

-进行确定第二受试者的生物样品中至少一种蛋白质含量的方法步骤,以获得第二确定的蛋白质含量,所述确定方法是根据权利要求1至9中任一项所述的,并且所述第二受试者是患所述血红素-相关的或血红素蛋白质-相关的疾患的且未接受所述化合物的受试者,以及

-基于所述第一和第二确定的蛋白质含量的比较选择化合物。

11. 一种用于使包含受试者的生物样品的医疗袋特别是血袋合格或不合格的方法,所述方法包括:

-进行确定所述医疗袋中的至少一种蛋白质含量的方法的步骤,以获得确定的蛋白质含量,所述确定方法是根据权利要求1至9中任一项所述的,

-基于所述确定的蛋白质含量,使医疗袋合格或不合格。

12. 一种用于监测受试者中针对血红素-相关的或血红素蛋白质-相关的疾患的治疗方法,所述受试者患有所述血红素-相关的或血红素蛋白质-相关的疾患并且已接受所述治疗,所述方法包括:

-进行确定所述受试者的生物样品中至少一种蛋白质含量的方法步骤,以获得确定的蛋白质含量,所述确定方法是根据权利要求1至9中任一项所述的,以及

-监测所述确定的蛋白质含量,从而监测受试者中针对血红素-相关的或血红素蛋白质-相关的疾患的治疗,所述受试者患有血红素-相关的或血红素蛋白质-相关的疾患并且已接受所述治疗。

13. 一种包括计算机可读介质的计算机程序产品,其上具有包括程序指令的计算机程序,所述计算机程序可加载到数据处理单元中,并且当所述计算机程序由所述数据处理单元运行时适于引起根据权利要求1至12中任一项所述的方法的步骤的执行。

14. 一种计算机可读介质,其上编码有根据权利要求13所述的计算机程序。

15. 一种用于确定生物样品(20)中至少一种蛋白质含量的设备(10),其中的几种蛋白质包括氧合血红蛋白、高铁血红蛋白、结合于血清白蛋白的血红素、结合于血色素结合蛋白的血红素和胆红素,用于确定的所述设备(10)至少包括分光光度计(14)、定量材料(16)和分析系统(18),所述设备(10)适于进行根据权利要求1至12中任一项所述的一种方法。

用于确定一种蛋白质含量的方法及相关的装置和方法

技术领域

[0001] 本发明涉及用于确定(测定)至少一种蛋白质含量的方法。本发明还涉及用于诊断血红素-相关的或血红素蛋白质-相关的疾患的方法。本发明还涉及用于鉴定用于预防和/或治疗血红素-相关的或血红素蛋白质-相关的疾患的治疗靶标的方法。本发明还涉及用于鉴定生物标志物的方法,该生物标志物是血红素-相关的或血红素蛋白质-相关的疾患的诊断生物标志物,肝病的易感性生物标志物,血红素-相关的或血红素蛋白质-相关的疾患的预后生物标志物,或响应于血红素-相关的或血红素蛋白质-相关的疾患的治疗的预测性生物标志物。本发明还涉及用于筛选可用作药物的化合物的方法,该化合物对已知的用于预防和/或治疗血红素-相关的或血红素蛋白质-相关的疾患的治疗靶标有作用。该方法还涉及用于使医疗袋合格或不合格的方法以及用于监测针对血红素-相关的或血红素蛋白质-相关的疾患的治疗的方法。本发明还涉及相关的计算机程序产品和计算机可读介质。

背景技术

[0002] 许多疾病表现出影响血液的症状。

[0003] 因此,希望对血液进行化学分析。

[0004] 从文献US 9 638 686 A1已知测量全血血红蛋白参数的方法,包括:提供光源,沿光路从光源引导具有光谱范围的光,提供具有样品接收室的比色皿模块,提供设置在所述光路中的一对第一和第二光漫射器,其中所述比色皿模块设置在所述一对第一和第二光漫射器之间,将来自比色皿模块的光引导到光学光谱仪中,以及将来自所述光谱仪的电信号处理为可用于显示和报告全血样品的血红蛋白参数值和/或总胆红素参数值的输出信号。

[0005] 从文献US 9 638 686 A1已知测量全血血红蛋白参数的方法,包括:提供光源,沿光路从光源引导具有光谱范围的光,提供具有样品接收室的比色皿模块,提供设置在所述光路中的一对第一和第二光漫射器,其中所述比色皿模块设置在所述一对第一和第二光漫射器之间,将来自比色皿模块的光引导到光学光谱仪中,以及将来自所述光谱仪的电信号处理为可用于显示和报告全血样品的血红蛋白参数值和/或总胆红素参数值的输出信号。

[0006] 文献US 2007/292963 A1还提出了用于确定血清中成分的存在和浓度的方法,包括以下步骤:提供血清样品,使用光谱仪对血清样品进行光学分析以提供基于血清样品的光学性质的光谱数据,基于光谱数据与参考光谱的比较确定血清样品中白蛋白、球蛋白和血红蛋白的浓度,以及输出确定的白蛋白、球蛋白和血红蛋白的浓度。该发明可用于准确确定血清中白蛋白、球蛋白和血红蛋白的浓度,并可形成初始癌症筛查的基础并评估患者对治疗的反应。

[0007] 从文献EP 1 211 505 A1还已知用于测量物质的方法,该方法根据光热转化检测方法在微芯片的毛细管中进行样品制备以及样品中物质的检测,从而可以在非常短的时间内简单且容易地测量从活生物体成分中获得的非常少量的样品中的物质诸如血红蛋白和磷化铝(ALP)的量。另外,该方法能够减少因测量而造成的浪费。此外,该发明的方法使用具有长波长的激光作为激发光,从而可以制造光热转化检测装置并且可以低成本进行测量。

因此,可以将文献EP 1 211 505 A1的用于测量物质的方法适当地应用于POC分析等。另外,该发明的用于测量物质的方法甚至能够根据光热检测方法简单且容易地测量其中具有乳糜的血样。另外,使用该发明的测量试剂,能够根据光热转化检测方法稳定地测量从活生物体成分中获得的非常少量的样品中的物质诸如血红蛋白和ALP的量。

[0008] 然而,这些文献的方法和设备不容易实施,并且所提供的测量可能不如所期望的那么准确。

发明内容

[0009] 本发明旨在提供用于确定(测定)血液中至少一种蛋白质的方法,该方法更精确同时还易于实施。

[0010] 为此,本说明书描述了用于确定生物样品中至少一种蛋白质含量的方法,其中的几种蛋白质包括氧合血红蛋白、高铁血红蛋白、结合于血清白蛋白的血红素、结合于血色素结合蛋白(总血色素结合蛋白)的血红素和胆红素,所述用于确定的方法(以下也称为确定方法)至少包括以下步骤:

[0011] a) 在目标波长范围内提供样品的初始光谱,

[0012] b) 将当前光谱设置为初始光谱,

[0013] c) 迭代以下步骤:

[0014] c1) 确定样品中的蛋白质含量,该确定是通过使用当前光谱的光谱分析或/和化学定量进行的,

[0015] c2) 基于确定的所述蛋白质的含量,推导与所述蛋白质相关的目标波长范围内的整体光谱成分,以及

[0016] c3) 从当前光谱中去除推导的光谱成分,

[0017] d) 输出确定的蛋白质含量,

[0018] 只要氧合血红蛋白、高铁血红蛋白、碳氧血红蛋白、结合于血清白蛋白和血色素结合蛋白的血红素和胆红素的含量没有被确定,就对不同的蛋白质依次迭代步骤c)。

[0019] 根据本发明的有利的但不是强制性的其他方面,确定方法可以结合以任何技术上可接受的组合采用的以下特征中的一种或几种:

[0020] -通过降低蛋白质的二阶导数的值来迭代步骤c),蛋白质的二阶导数的值定义为样品中蛋白质的光谱成分随光谱波长的二阶导数在目标波长范围内的最大振幅,或样品中蛋白质的光谱成分随光谱波长的二阶导数的最小值和最大值之间的差的绝对值在目标波长范围内的最大值。在类似的方法中,化学定量的使用将利用吸收变化(反应完成后的差分光谱)的最小值和最大值之间的差的绝对值在目标波长范围内的值,或随差分光谱的波长的二阶导数在目标波长范围内的最大振幅。特别地,当两种物质对信号有贡献时,使用在二阶导数的波长范围内的模拟。

[0021] -光谱分析包括提供与所考虑的蛋白质相关的参考光谱,以及计算参考光谱和当前光谱之间的归一化系数。

[0022] -归一化系数是所考虑的蛋白质的二阶导数的值和参考光谱的二阶导数的值之间的比率,参考光谱的二阶导数的值定义为随参考光谱的波长的二阶导数在目标波长范围内的最大振幅或随参考光谱的波长的二阶导数的二阶导数最小值和最大值之间的差的绝对

值在目标波长范围内的最大值。特别地,当两种物质对信号有贡献时,使用在二阶导数的波长范围内的模拟。

[0023] -满足以下性质中的至少一种:

[0024] -对氧合血红蛋白进行光谱分析,并针对在三个区间中选择的至少一个波长计算归一化系数,第一区间涵盖包括在415纳米和417纳米之间的波长,第二区间涵盖包括在542纳米和544纳米之间的波长,以及第三区间涵盖包括在576纳米和578纳米之间的波长,该区间优选为第三区间;

[0025] -对高铁血红蛋白进行光谱分析,并针对在350纳米至750纳米范围内选择的至少一个波长计算归一化系数,以及

[0026] -对胆红素进行光谱分析,并针对在350纳米至750纳米范围内选择的至少一个波长计算归一化系数。

[0027] -对血浆血红素进行光谱分析,并使用结合于血清白蛋白的血红素和结合于血色素结合蛋白的血红素参考光谱,针对在300纳米至750纳米范围内选择的至少一个波长计算归一化系数。

[0028] -化学定量选自以下组成的组:

[0029] -通过添加CO来定量氧合血红蛋白,

[0030] -通过添加KCN来定量高铁血红蛋白,

[0031] -通过添加CO和连二亚硫酸钠来定量血浆血红素,

[0032] -通过添加DTN来定量结合于血色素结合蛋白的血红素,

[0033] -通过添加血红素来定量总血色素结合蛋白,

[0034] -通过添加血红素和连二亚硫酸钠来定量总血色素结合蛋白,以及

[0035] -通过添加血红素、CO和连二亚硫酸钠来定量总血色素结合蛋白。在输出步骤中,确定的含量包括其他蛋白质含量,这些其他含量不同于氧合血红蛋白的含量、高铁血红蛋白的含量、结合于血清白蛋白和血色素结合蛋白的血红素的含量、胆红素的含量,其他含量是选自以下组成的组的蛋白质的含量:

[0036] -羧化血红蛋白,

[0037] -高价铁血红蛋白(ferryl hemoglobin),

[0038] -其他血红素靶标分子,

[0039] -肌红蛋白,

[0040] -卟啉,

[0041] -通过血红素加氧酶的血红素的分解代谢的产物,

[0042] -胆红素降解和氧化的产物,诸如胆绿素或血红素盒(heme box)、粪胆素、尿胆素(urobilin),

[0043] -器官功能障碍和细胞溶解(cytosis)的产物,

[0044] -代谢底物,

[0045] -辅因子,以及

[0046] -代谢降解产物。

[0047] -当依次确定氧合血红蛋白、高铁血红蛋白、结合于血清白蛋白的血红素和胆红素的含量时,通过化学定量确定氧合血红蛋白、高铁血红蛋白、结合于血清白蛋白的血红素和

胆红素中的至少一种。

[0048] 说明书描述了用于预测受试者有患血红素-相关的或血红素蛋白质-相关的疾患的风险的方法,该预测方法至少包括以下步骤:

[0049] -进行确定受试者的生物样品中至少一种蛋白质含量的方法步骤,以获得确定的参数,该确定方法如前所述,以及

[0050] -在确定的参数上预测受试者有患血红素-相关的或血红素蛋白质-相关的疾患的风险。

[0051] 说明书还涉及用于诊断血红素-相关的或血红素蛋白质-相关的疾患的方法,该诊断方法至少包括以下步骤:

[0052] -进行确定受试者的生物样品中至少一种蛋白质含量的方法步骤,以获得确定的蛋白质含量,该确定方法如前所述,以及

[0053] -基于确定的蛋白质含量诊断血红素-相关的或血红素蛋白质-相关的疾患。

[0054] 说明书描述了用于鉴定用于预防和/或治疗血红素-相关的或血红素蛋白质-相关的疾患的治疗靶标的方法,该方法包括以下步骤:

[0055] -进行确定第一受试者的图像的生物样品中至少一种蛋白质含量的方法步骤,以获得第一确定的蛋白质含量,该确定方法如前所述,并且第一受试者为患血红素-相关的或血红素蛋白质-相关的疾患的受试者,

[0056] -进行确定第二受试者的生物样品中至少一种蛋白质含量的方法步骤,以获得第二确定的蛋白质含量,该确定方法如前所述,并且第二受试者为未患血红素-相关的或血红素蛋白质-相关的疾患的受试者,以及

[0057] -基于第一和第二确定的蛋白质含量的比较选择治疗靶标。

[0058] 说明书还涉及用于定义血红素-相关的或血红素蛋白质-相关的疾患的阶段的方法,该定义方法至少包括以下步骤:

[0059] -进行用于确定受试者的生物样品中至少一种蛋白质含量的方法步骤,以获得确定的蛋白质含量,该确定方法如前所述,以及

[0060] -基于确定的蛋白质含量以及结合其他生物参数(用于诊断的预测算法),定义血红素-相关的或血红素蛋白质-相关的疾患的阶段。

[0061] 说明书还涉及用于筛选可用作药物的化合物的方法,该化合物对已知的用于预防和/或治疗血红素-相关的或血红素蛋白质-相关的疾患的治疗靶标有作用,该方法包括以下步骤:

[0062] -进行确定第一受试者的生物样品中至少一种蛋白质含量的方法步骤,以获得第一确定的蛋白质含量,该确定方法如前所述,并且第一受试者为患血红素-相关的或血红素蛋白质-相关的疾患的并且已接受所述化合物的受试者,

[0063] -进行确定第二受试者的生物样品中至少一种蛋白质含量的方法步骤,以获得第二确定的蛋白质含量,该确定方法如前所述,并且第二受试者为患血红素-相关的或血红素蛋白质-相关的疾患的并且未接受所述化合物的受试者,以及

[0064] -基于第一和第二确定的蛋白质含量的比较选择化合物。

[0065] 说明书描述了用于使包含受试者的生物样品的医疗袋合格或不合格的方法,该方法包括:

[0066] -进行用于确定医疗袋中的至少一种蛋白质含量的方法步骤,以获得确定的蛋白质含量,该确定方法如前所述,以及

[0067] -基于确定的蛋白质含量,使医疗袋合格或不合格。

[0068] 说明书还涉及用于鉴定生物标志物的方法,该生物标志物是血红素-相关的或血红素蛋白质-相关的疾患的诊断生物标志物、血红素-相关的或血红素蛋白质-相关的疾患的易感性生物标志物、血红素-相关的或血红素蛋白质-相关的疾患的预后生物标志物、或响应于血红素-相关的或血红素蛋白质-相关的疾患的治疗的预测性生物标志物,该方法包括以下步骤:

[0069] -进行确定第一受试者的生物样品中至少一种蛋白质含量的方法步骤,以获得第一确定的含量,该确定方法如前所述,并且第一受试者为患血红素-相关的或血红素蛋白质-相关的疾患的受试者,

[0070] -进行确定第二受试者的图像的生物样品中至少一种蛋白质含量的方法步骤,以获得第二确定的蛋白质含量,该确定方法如前所述,并且第二受试者为未患血红素-相关的或血红素蛋白质-相关的疾患的受试者,以及

[0071] -基于第一和第二确定的蛋白质含量的比较选择生物标志物。

[0072] 说明书还涉及用于监测在受试者中针对血红素-相关的或血红素蛋白质-相关的疾患的治疗的方法,所述受试者患有血红素-相关的或血红素蛋白质-相关的疾患并已接受所述治疗,该方法包括:

[0073] -进行用于确定受试者的生物样品中至少一种蛋白质含量的方法步骤,以获得确定的蛋白质含量,该确定方法如前所述,以及

[0074] -监测确定的蛋白质含量从而监测在受试者中针对血红素蛋白质-相关的疾病的治疗,所述受试者患有血红素-相关的或血红素蛋白质-相关的疾患并已接受所述治疗。

[0075] 说明书还描述了计算机程序产品,其包括计算机可读介质,其上具有包括程序指令的计算机程序,所述计算机程序可加载到数据处理单元中,并且当计算机程序由数据处理单元运行时,所述计算机程序适于引起如前所述的方法的步骤的执行。

[0076] 说明书还涉及在其上编码有如前所述的计算机程序的计算机可读介质。

[0077] 说明书还涉及用于确定生物样品中至少一种蛋白质含量的设备,其中的几种蛋白质包括氧合血红蛋白、高铁血红蛋白、结合于血清白蛋白的血红素、血红素结合的或游离的血色素结合蛋白(总浓度)和胆红素,用于确定的设备至少包括分光光度计、定量材料和分析系统,所述设备适于进行如前所述的一种方法。

附图说明

[0078] 基于以下描述将更好地理解本发明,以下描述是与附图相对应地给出的,并且作为说明性实例,而不限制本发明的目的。在附图中:

[0079] -图1示意性地示出了适于确定生物样品中至少一种蛋白质含量的设备的实例;

[0080] -图2示出了系统和计算机程序产品的实例,所述系统和计算机程序产品是设备的一部分,并且其相互作用使得能够进行设备使用的计算以确定样品的一种或多种蛋白质含量,

[0081] -图3是进行用于确定生物样品中至少一种蛋白质含量的方法的实例的实例的流

程图，

- [0082] -图4是示出不同血红素复合物的各种吸收光谱的图像，
- [0083] -图5是示出不同血红素复合物的不同二阶导数的图像，和
- [0084] -图6是示出基于血色素结合蛋白测量的校准测量的图像。

具体实施方式

- [0085] 设备的描述
- [0086] 在图1上示出了设备10。
- [0087] 设备10是适于确定生物样品中至少一种含量蛋白质的设备。
- [0088] 设备10包括至少一个容器12、分光光度计14、定量材料16和分析系统18。
- [0089] 至少一个容器12包括要分析的生物样品20。
- [0090] 生物样品20是来自受试者的样品。
- [0091] 受试者是动物，诸如哺乳动物，像老鼠、猴子或人类。
- [0092] 如本文所用并且根据本发明的所有方面，术语“样品”表示血液、新鲜全血、外周血、外周血单核细胞(PBMC)、血清、血浆或尿液。
- [0093] 样品20包括几种蛋白质，其中包括氧合血红蛋白、高铁血红蛋白、结合于血清白蛋白的血红素、血红素结合的或游离的血色素结合蛋白和胆红素。
- [0094] 氧合血红蛋白指定血红蛋白的还原的(Fe^{2+})形式。在该还原的形式中，血红蛋白是其还原的血红素(Fe^{2+})在空气下与氧结合的血红蛋白(在低 O_2 压力下未结合的脱氧的)。
- [0095] 氧合血红蛋白涵盖氧合血红蛋白A(式 HbA_{O_2})、氧合血红蛋白F(式 HbF_{O_2})、氧合血红蛋白A2、氧糖化血红蛋白以及其他广泛的血红蛋白变体(S、E、C)。
- [0096] 基于它们在300纳米(nm)和900nm之间的相似吸收性质，这些氧合血红蛋白可被称为单一物质。
- [0097] 尽管对于健康的成年人，可以发现约90%的氧合血红蛋白A，但对于婴儿，氧合血红蛋白A和氧合血红蛋白F均可以发现。
- [0098] 在下文中，将氧合血红蛋白标记为 HbO_2 。
- [0099] 高铁血红蛋白是血红蛋白的一种形式，其中血红素的铁处于氧化态+3(Fe^{3+})并且不能连接 Fe^{2+} 的双原子配体。
- [0100] 这意味着铁态+3不与 O_2 、CO和非常弱的NO结合。然而，这种铁可以强力地与铁配体 CN^- 和 N_3^- 结合以及微弱地与 H_2O 和 OH^- 结合。
- [0101] 高铁血红蛋白称为metHb。与亚铁氧态相似，在由不同人类血红蛋白物质引起的metHb之间未观察到光谱差异。
- [0102] 在 O_2 存在的稳态下，结合于血清白蛋白的血红素(氯高铁血红素(hemin))被氧化到+3氧化态(Fe^{3+})。
- [0103] 结合于血清白蛋白的血红素可以参与酶催化反应。
- [0104] 结合于血清白蛋白的血红素被称为血红素-SA。
- [0105] 在 O_2 存在的稳态下，结合于血色素结合蛋白的血红素(氯高铁血红素)被氧化到+3氧化态(Fe^{3+})。
- [0106] 由于铁His-Fe-His的六配位非常强，结合于血色素结合蛋白的血红素不参与酶催

化反应。

[0107] 结合于血清血色素结合蛋白的血红素被称为血红素-Hx。

[0108] 可以注意到,与metHb相反, Fe^{3+} 的双原子配体只能以低亲和力值($>>\text{mM}$)与血红素-SA和血红素-Hx结合。

[0109] 胆红素是血红蛋白的降解产物。

[0110] 胆红素通常与白蛋白结合在血液中循环。

[0111] 生物样品20优选为流体。

[0112] 分光光度计14适于测量溶液的光谱。

[0113] 术语光谱是指吸收光谱。

[0114] 通过使电磁波穿过溶液20获得光谱。

[0115] 例如,电磁波是由光源产生的。

[0116] 光谱是所述电磁波的吸收随波长的演变。

[0117] 特别地可以通过测量溶液在每个波长下的透射率来测量吸收光谱。

[0118] 特别地获得包括在200纳米(nm)和1000nm之间,优选在300nm至700nm之间的波长的光谱。

[0119] 定量材料16是能够对样品20的至少一种成分进行化学分析的材料。

[0120] 根据图1的实例,定量材料16包括注射器22、带有可刺穿的塞子26的定量容器24。

[0121] 在图1中,仅示出了三个注射器22和两个定量容器24,但是可以考虑注射器22和定量容器24的其他数量。

[0122] 注射器22可用于将塞子26刺穿并收集容纳在定量容器24中的产品。

[0123] 定量容器24的内容物通常是给定浓度的给定化学材料的溶液。

[0124] 参考图2进一步详述分析系统18,其中示出了系统18和计算机程序产品28。计算机程序产品28和系统18之间的相互作用使得能够进行用于确定至少一种成分的方法。

[0125] 系统18是计算机。在当前情况下,系统18是笔记本计算机。

[0126] 更通常地,系统18是计算机或计算系统,或类似的电子计算装置,其适于将计算系统的寄存器和/或存储器内的表示为物理量诸如电子量的数据操纵和/或转化为计算系统的存储器、寄存器或其他此类信息储存、传输或显示装置内的类似表示为物理量的其他数据。

[0127] 系统18包括处理器30、键盘32和显示单元34。

[0128] 处理器30包括数据处理单元36、存储器38和读取器40。读取器40适于读取计算机可读介质。

[0129] 计算机程序产品28包括计算机可读介质。

[0130] 计算机可读介质是可以由处理器30的读取器40读取的介质。计算机可读介质是适合于储存电子指令并且能够被耦合到计算机系统总线的介质。

[0131] 此类计算机可读储存介质为例如磁盘、软盘、光盘、CD-ROM、磁光盘、只读存储器(ROM)、随机存取存储器(RAM)、电可编程只读存储器(EPROM)、电可擦可编程只读存储器(EEPROM)、磁卡或光卡或者任何适合储存电子指令并能够被耦合到计算机系统总线的其他类型的介质。

[0132] 计算机程序储存在计算机可读储存介质中。计算机程序包括一种或多种储存的程

序指令序列。

[0133] 计算机程序可加载到数据处理单元36中,并且当计算机程序由数据处理单元36运行时,所述计算机程序适于引起确定方法的计算步骤的执行。

[0134] 确定方法的描述

[0135] 现在通过示出进行如图3的流程图所示的确定方法的实例来描述设备10的操作。

[0136] 该方法包括提供指定的步骤a)的步骤、设置指定的步骤b)的步骤、迭代指定的步骤c)的步骤和输出指定的步骤d)的步骤。

[0137] 在步骤a)中,提供样品20的初始光谱。

[0138] 该光谱是例如通过使用分光光度计14获得的。

[0139] 可以在收集样品20之后立即测量光谱,或在将样品保存在保存条件之后测量光谱。

[0140] 例如,样品20可以保存在包括在5°C和10°C之间的温度下数小时(直到24h)。

[0141] 替代地,可以将样品20冷冻并保存在包括在-80°C和-20°C之间的温度。样品的冷冻能够限制简单存放的样品的变化(在-80°C下储存之前在液氮中冷冻)。

[0142] 样品20也可以用稳定剂保存。

[0143] 样品20也可以进行分馏、稀释或浓缩。这使得能够改善样品中蛋白质的可检测性。

[0144] 稀释后,样品20的光密度小于或等于2,优选地小于或等于1。

[0145] 样品20也可以在小于或等于8的pH下缓冲。

[0146] 优选在包括在7.35和7.45之间,特别是等于7.4的pH下进行缓冲。

[0147] 这是特别有利的,因为metHb取决于pH,具有pKa为8。

[0148] 此缓冲是通过使用缓冲溶液获得的。

[0149] 例如,缓冲溶液是磷酸钾溶液或磷酸钠溶液。

[0150] 作为特定实例,缓冲溶液是pH为7.4且由50mM磷酸钾和50mM NaCl组成的溶液。

[0151] 缓冲溶液可以容纳在定量容器24中。

[0152] 替代地,在另一实施方式中,初始光谱由分析系统18接收,光谱的测量先前在另一位置且特别是在其中收集生物样品20的位置中进行。

[0153] 在步骤a)的最后,获得样品20的初始光谱。

[0154] 在步骤b)中,将当前光谱设置为初始光谱。

[0155] 步骤b)使得能够为步骤c)设置初始化。

[0156] 步骤c)包括三个步骤的迭代。

[0157] 第一步是步骤c1),在此过程中确定样品中的蛋白质含量。

[0158] 蛋白质含量是指样品中所述蛋白质的量。

[0159] 蛋白质含量是例如质量含量、质量浓度或摩尔含量。

[0160] 质量含量是蛋白质的质量。

[0161] 例如,质量含量可以用皮克(pg)表示。

[0162] 质量浓度是样品中蛋白质的质量和蛋白质的体积之比。

[0163] 质量浓度可以用毫克每升(mg/L)表示。

[0164] 摩尔含量是蛋白质的摩尔数。

[0165] 摩尔含量用微摩尔/ μ M表示。

[0166] 第一步骤c1) 通过使用由分光光度计14进行的当前光谱的光谱分析和/或使用定量材料16的化学定量来进行。

[0167] 第二步骤是步骤c2), 在第二步骤c2) 中将光谱成分与基于确定的含量的蛋白质相关联。

[0168] 由于光谱成分是在波长的限制区域(小于3或可能更大的以下实例)上估算的, 对所定量的蛋白质或化学分子具有高度特异性, 因此从通过在测量窗口中的物质信号和其参考之间的强度比加权的纯化的物质光谱(参考光谱)推导出其例如在UV/可见光区域上的整个光谱。

[0169] 例如, 将公式“光谱成分 = 参考光谱 × D0样品 / D0参考(可以使用特定波长或波长区域或简单地公式[物质]) × 参考光谱”例如相对于1 μ M归一化。

[0170] 第三步骤是步骤c3), 在该步骤中, 从当前光谱中去除推导的光谱成分。

[0171] 步骤c3) 在于将当前光谱减去推导的光谱成分, 以获得新的当前光谱。

[0172] 只要四种物质的含量没有被确定, 就优选地通过降低二阶导数的值对不同的蛋白质依次迭代步骤c)。

[0173] 蛋白质的二阶导数的值定义为: 样品中蛋白质的光谱成分随光谱波长的二阶导数在目标波长范围内的最大振幅, 或样品中蛋白质的光谱成分随光谱波长的二阶导数的最小值和最大值之间的差的绝对值在目标波长范围内的最大值。

[0174] 为了简化起见, 下面仅使用第一种定义。

[0175] 该值可以通过模拟来测量或获得。

[0176] 所述四种物质是HbO₂、metHb、结合的血红素(血红素-SA或血红素-Hx)和胆红素。

[0177] 可以注意到, 也可以认为, 假若血红素-SA和血红素-Hx算作两种物质, 只要五种物质的含量没有被确定, 就迭代步骤c)。

[0178] 在下一部分中详述此类步骤c)的实例。

[0179] 在步骤d), 输出确定的蛋白质含量。

[0180] 该方法特别适于分析样品诸如生物流体的各种成分。

[0181] 该方法特别提供了HbO₂、metHb、血红素-SA、血红素-Hx和胆红素的含量。如将在其他部分中解释的, 可以在步骤d)中输出其他物质。

[0182] 步骤C)的特定实施的详细描述

[0183] 在这种情况下, 样本20, 通过降低二阶导数中的阶数, 包括: HbCO、HbO₂、metHb、血红素-SA、血红素-Hx和胆红素。可以从吸烟者身上特别地观察到这种特定的样品2(CO中毒或CO疗法)。

[0184] 下面将通过为每种物质提供几种技术来描述这些物质中每种确定步骤。

[0185] 该分析的目的是去除更容易定义的物质(较高的振幅、最窄的宽度、特定波长窗口, 低或无其他光谱物质的干扰)。一旦确定了物质, 则在信号归一化后, 将其整体光谱与其纯参考光谱相减。由于HbO₂和metHb是最容易鉴定的物质, 该过程将首先从他们的确定开始。

[0186] 确定HbCO含量

[0187] 没有提出确定HbCO含量的特定技术。

[0188] 例如, 可以认为其是在初始光谱中(优选地在420nm处)使用HbCO的最大吸收峰的

光谱技术。

[0189] 这使得能够确定样品20中的HbCO含量。

[0190] 然后从初始光谱中去除该光谱含量。

[0191] 确定HbO₂含量

[0192] 为了确定HbO₂含量,提出了两种技术:光谱技术和化学技术。

[0193] 光谱分析

[0194] 根据该技术,提供了与氧合血红蛋白相关的参考光谱。

[0195] 参考光谱例如具有信息库。

[0196] 参考光谱由HbO₂样品获得,所述样品的HbO₂含量大于或等于99%。

[0197] 可以从健康的非吸烟受试者的红血球中获得这样的HbO₂样品。红血球可以用生理血清洗涤。红血球在水稀释后(至少3倍H₂O体积/RBC体积)进行裂解。将获得的溶液以10000-15000g离心,以回收上清液中的HbO₂样品。可以通过在纯O₂下将保存在冰上的样品暴露在光源下进行光解离并用O₂取代CO来去除微量的CO。如果在化学定量后存在微量的metHb,可以在通过色谱法去除之前通过几种还原系统(例如铁氧化还原蛋白/铁氧化还原蛋白还原酶/NADPH)去除。其他选择是在CO下将HbO₂样品饱和,然后用稍微过量的连二亚硫酸钠还原metHb。在用脱盐色谱法去除连二亚硫酸盐后,如前所述,用O₂取代CO。

[0198] 任选地,HbO₂样品也可以通过色谱柱纯化,该色谱柱适于排除具有特定尺寸和/或离子交换的颗粒。HbCO光谱可以通过HbO₂样品的CO气体饱和来获得。

[0199] 然后,计算参考光谱和当前光谱之间的归一化系数 K_{HbO_2} 。

[0200] 归一化系数是样品20中HbO₂的振幅和HbO₂的参考光谱的振幅的比率。

[0201] 可以使用许多定义来确定这种比率。

[0202] 例如,归一化系数定义为HbO₂的二阶导数的值和参考光谱的二阶导数的值之比的最小值。

[0203] 特别地,在该实例中,归一化系数定义为HbO₂的二阶导数的值和参考光谱的二阶导数的值之比。参考光谱的二阶导数的值定义为随光谱的波长的二阶导数的最大振幅(负号)。

[0204] 在数学上可以写作:

$$[0205] \quad K = \frac{\frac{d^2 S_C}{d\lambda^2}}{\max_{\lambda} \frac{d^2 S_{REF}}{d\lambda^2}}$$

[0206] 其中:

[0207] • $\frac{d^2 A}{dB^2}$ 是提供数量A相对数量B的二阶导数的运算符,

[0208] • S_C 是当前光谱,

[0209] • S_{REF} 是参考光谱,

[0210] • λ 表示波长的值,并且

[0211] • $\max_{\lambda} A$ 表示A随波长的最大振幅(负号)。

[0212] 针对至少一种波长计算归一化系数。

[0213] 所述波长选自由416纳米 (nm)、543nm和577nm组成的组。优选使用577nm,因为该信号受其他物质的光谱贡献的影响最弱。

[0214] 在一些实施方式中,归一化系数考虑其他系数。

[0215] 例如,归一化系数考虑了样品在其收集过程中的稀释因子;例如抗凝剂的存在。

[0216] 作为特定实施,基于溶质体积 V_S 、收集体积 V_C 和血细胞比容率 (hematocrit ratio) Htc获得稀释因子FD。作为说明,可以使用以下公式:

$$[0217] \quad FD = \frac{(1 - Htc) * V_C}{(1 - Htc) * V_C - V_S}$$

[0218] 在变体中或此外,归一化系数还可以考虑血浆在PBS中的稀释因子。

[0219] 典型地,将样品稀释到1/2直至1/20之间的缓冲溶液中。它取决于信号幅度以及光学设备的波长路径和所需样品的体积。目的是最大程度地减少用于测量的生物样品的量,并在可能的情况下在整个分析范围内将所有物质的信号设置在0.1和10D之间。

[0220] 归一化系数还考虑了所考虑的物质可能与其他分子结合的事实。

[0221] 对于HbO₂的情况,一部分不可逆地结合到触珠蛋白上,这意味着HbO₂光谱的评估包括来自游离HbO₂的贡献和来自结合到触珠蛋白的HbO₂的贡献。

[0222] 触珠蛋白可以通过与抗体的生化反应来测量。

[0223] 基于不同的触珠蛋白异构体平均具有两种Hb二聚体/触珠蛋白的结合能力这一事实推导出游离HbO₂。知道触珠蛋白的浓度g/L以及取约85kDa的平均MW,就可以估算基于血红素的触珠蛋白池在 μ M的HbO₂中的结合能力,并将总测量的HbO₂减去该值,最终得到游离HbO₂的合理估算。在存在HbCO和MetHb的情况下,可以使用总血红蛋白浓度 (HbCO+HbO₂+MetHb) 来计算游离HbO₂。

[0224] 归一化系数K提供获得HbO₂含量的途径。

[0225] 例如,通过使用比尔-朗伯(Beer-Lambert)定律,可以获得以下等式:

$$[0226] \quad c = \frac{A}{K \cdot \xi \cdot l}$$

[0227] 其中:

[0228] • c是HbO₂的浓度,

[0229] • A是参考样品的吸光度,

[0230] • ξ 是HbO₂的消光系数,以及

[0231] • l是样品的厚度。

[0232] A、 ξ 和l是已知的或提供的。

[0233] 特别地,消光系数可以在表

[0234] 因此,以上公式使得能够确定浓度,然后该浓度提供获得HbO₂含量的途径。

[0235] 化学定量技术

[0236] HbO₂可以通过添加CO来定量。

[0237] 可以考虑用于追踪通过添加CO而产生的反应的任何方法。

[0238] 在该实例的上下文中,只要设备10已配备有分光光度计14,则光谱追踪可以是有

利的。

[0239] 在化学定量的情况下,值可以由化学反应后的吸收变化的最大值或最小值产生,或者优选地由最小值和最大值之间的差的绝对值得出。这些后者值也可以由化学反应后的吸收变化的二阶导数产生。

[0240] 确定metHb含量

[0241] 通过仅用高铁血红蛋白取代氧合血红蛋白,先前针对氧合血红蛋白的光谱分析所作的类似说明适用于高铁血红蛋白。这些说明在下面不再重复。仅突出显示特定的差异。

[0242] 用于计算归一化系数的波长在350nm至700nm的范围内选择。

[0243] 高铁血红蛋白通过添加KCN来定量。

[0244] 可以通过使用KCN溶液来实现定量,所述KCN溶液的阴离子 CN^- 的浓度包括在100 μM 和500 μM 之间,优选地在150 μM 和250 μM 之间,更优选地等于200 μM 。

[0245] 孵育时间为例如5分钟。实际上,在室温下 CN^- 与metHb结合的双分子速率为约100/M/s,这预测使用200 μM 的KCN在几分钟后超过99%结合。如果使用NaCN代替KCN,同样适用,特别是在浓度方面。

[0246] 因为metHb也与阴离子 N_3^- 反应,可使用 NaN_3 代替KCN来定量metHb。

[0247] 在这种情况下,可以通过使用 NaN_3 溶液来实现定量,所述 NaN_3 溶液的阴离子 N_3^- 的浓度包括在500 μM 和1000 μM 之间,优选地更优选等于500 μM 。

[0248] 如前所述,可以使用光谱技术追踪定量。

[0249] 确定血红素-SA含量

[0250] 为了确定血红素-SA含量,提出了两种技术:光谱技术和化学技术。

[0251] 当前光谱的光谱分析

[0252] 通过仅用血红素-SA取代 HbO_2 ,先前针对 HbO_2 的光谱分析所作的类似说明适用于血红素-SA。这些说明在下面不再重复。仅突出显示特定的差异。

[0253] 通过使用过量的人白蛋白相比血红素的血红素-SA样品获得参考光谱。在等待结合反应完成后,在添加血红素之前和之后测量人白蛋白的光谱。在减去初始游离白蛋白光谱后获得血红素-SA光谱。

[0254] 例如,这种血红素-SA样品可以如下获得。可以将血红素溶解在0.1N的NaOH溶液中并避光保存,然后再将其添加到以0.2 μM 过滤的AS溶液中,最终溶液中对于5摩尔SA有1摩尔血红素。在没有光的情况下平衡20分钟后,获得溶液。

[0255] 任选地,可以如步骤a)所述缓冲溶液。

[0256] 用于计算归一化系数的波长在200nm至800nm的范围内选择。

[0257] 优选地,该范围可以包括在300nm和700nm之间,在350和460nm之间和/或600和700nm之间。在光谱的红色部分,可以进行第一估算,以限制紫色部分中的其他分析。当血红素-SA浓缩时,二阶导数可以给出其浓度的估算值。在较低的浓度下,可以通过减去一定量的参考光谱来模拟信号,以获得通过分别在610和600nm之间以及在675和700nm之间选择的两个点的直线的最佳模拟;后者的点被限制为属于测量的光谱。

[0258] 化学定量技术

[0259] 血红素-SA可以通过在CO下添加连二亚硫酸钠(DTN)来定量。从Hx被血浆血红素耗尽的患者血液中获得由DTN还原CO:血红素(Fe^{3+})-SA->血红素(Fe^{2+} -CO)-SA引起的吸收变

化的参考光谱。由于血浆生化条件和结合相互作用状态,该光谱与在PBS中用纯化的人SA获得的光谱略有不同。

[0260] 确定血红素-Hx含量

[0261] 至于血红素-SA,确定血红素-Hx中的含量可以使用两种技术:有或没有化学添加。这也取决于存在于生物流体中血红素的量以及AS与Hx之间的结合竞争。除了基于血红素的治疗外,血浆中天然的大量血红素与在血红素降解而从循环中去除之后的低血红素-Hx量相关。仅保留了血红素-SA只是因为Hx浓度比AS浓度低约50,以及Hx转换效率不足。然后仅在低血红素浓度下观察到血红素竞争SA和Hx之间的结合。换句话说,如果在单独确定后不能去除血红素-SA成分,则血红素-Hx的体内检测与血红素-SA的伴随检测相关。因此,在低血红素浓度下确定血红素-SA可能涉及类似的操作。两种物质的确定都需要使用其各自二阶导数光谱的线性组合优选地在350和460nm之间进行模拟。

[0262] 光谱分析

[0263] 通过仅用血红素-Hx取代HbO₂,先前针对HbO₂的光谱分析所作的类似说明适用于血红素-Hx。这些说明在下面不再重复。仅突出显示特定的差异。

[0264] 根据所使用的技术,用于计算归一化系数的波长在300nm至700nm的范围内选择。

[0265] 通过使用稍微过量(20%)的人血色素结合蛋白相比血红素的血红素-Hx样品,对于血红素-SA开发的相似的方法,获得参考光谱。

[0266] 化学定量技术

[0267] 血红素-Hx可以通过在CO下添加连二亚硫酸钠(DTN)来定量。如上所述,在PBS中用纯化的人Hx获得由DTN还原CO:血红素(Fe³⁺)-Hx->血红素(Fe²⁺-CO)-Hx引起的吸收变化的参考光谱。血浆中的血红素-Hx是通过用减去由化学定量估算的metHb还原的贡献后的血红素-Hx和血红素-SA参考光谱两者模拟还原后吸收变化而确定的。

[0268] 在变体中,血红素-Hx可以通过添加连二亚硫酸钠(DTN)来定量。该定量是强大的工具,因为与其他典型定量相比,它不需要校准曲线,并且是基于血浆Hx池结合能力。在PBS中用纯化的人Hx再次获得在没有试剂消耗的氧气的情况下由DTN还原:血红素(Fe³⁺)-Hx->血红素(Fe²⁺)-Hx引起的吸收变化的参考光谱。在添加DTN之前,在N₂或Ar下将血红素(Fe³⁺)-Hx样品脱氧(添加过氧化氢酶以预防氧化副反应)。只有这种技术能够直接测量520和600nm之间的血红素-Hx含量。实际上,在脱氧状态下,Hx表现出两个强烈而狭窄的吸收峰,其可以使用二阶(2nd)导数检测到,而其他脱氧物质(HbFe²⁺、血红素Fe²⁺-SA、胆红素)则显示宽峰。在位于561nm处的补充有血红素的血浆的二阶导数的最大振幅处,或者优选使用该二阶导数的最大值(550-551nm)和最小值(561nm)之差的绝对值估算血红素-Hx。注意,在两个波长下其他物质对二阶导数光谱的微小贡献在振幅和符号上均相等,因此它们在减去后不影响血红素-Hx的测量。最终,可以在540和575nm之间使用全局模拟。

[0269] 根据另一实例,最终总的Hx含量可以通过在生物样品中添加血红素来定量。在血红素结合后,在Hx测量之前,在6.5和7.4之间的pH,优选地pH 7.0,添加相对于其生物浓度的标准上限稍微过量的血红素,在室温下孵育约30min。这样,该定量能够以摩尔浓度(血红素结合能力)确定生物流体中的Hx含量。典型地,在通过用缓冲液稀释(即1/2稀释)设置pH后,在血浆中添加20μM血红素用于Hx定量。当血浆中的血红素浓度升高时,可能不需要添加血红素,因为Hx显然已经饱和。知道Hx仅拥有一个血红素结合位点,使用60kDa的平均分子

量以g/L换算Hx浓度。

[0270] 有趣地,由于血浆血红素与Hx之间在没有上调(例如在某些炎症状况下)的情况下存在负相关,因此Hx的测量可得出血红素浓度的间接状态,反之亦然。这意味着异常高浓度的Hx和低量的血红素可能表示特定的生理病理症状。低的Hx浓度可能是由于存在伴有Hb降解的血管内溶血和/或由于骨髓中的红细胞生成异常。在铁过载严重的情况下,下调也是可能的。

[0271] 确定胆红素含量

[0272] 为了确定胆红素含量,仅提出了光谱分析。

[0273] 通过仅用胆红素取代HbO₂,先前针对HbO₂的光谱分析所作的类似说明适用于胆红素。这些说明在下面不再重复。仅突出显示特定的差异。

[0274] 参考光谱是通过胆红素样品获得的,所述胆红素样品的胆红素含量为约10μM。

[0275] 这种胆红素样品是具有过量的血清白蛋白(SA)的胆红素的样品。

[0276] 例如,这种胆红素样品可以如下获得。可以将胆红素溶解在0.1N的NaOH溶液中并避光保存,然后将其添加到以0.2μM过滤的AS溶液中,最终溶液对于2摩尔SA有1摩尔胆红素。在没有光的情况下平衡20分钟后,获得溶液。其他选择是使用没有慢性病理的献血者的具有约50μM胆红素的血浆样品(可以使用缀合有葡萄糖醛酸的或未缀合的不同比例的胆红素)。在减去剩余的HbO₂成分后获得胆红素光谱(应评估不存在其他Hb或降解产物)。

[0277] 如在步骤a)所述的,将溶液优选地在pH 7.4的PBS中缓冲。

[0278] 用于计算归一化系数的波长在350nm至700nm的范围内选择。

[0279] 优选地,用于计算归一化系数的波长在440nm至540nm的范围内选择。更优选地,所使用的波长为约501nm。

[0280] 图解说明

[0281] 图4至6以图的方式展示了在确定血色素结合蛋白含量的特定情况下先前确定含量的一些步骤。

[0282] 图4显示了在没有O₂情况下还原的不同物质的光谱。HxFe²⁺的光谱与二阶导数中的其他光谱相比将非常占优势,因为它显示出两个非常细的谱带。

[0283] 图5展示了规避血色素结合蛋白的此类问题的方法。它代表了在561nm(第一个虚线箭头)处的二阶导数的分析,或者通过取最大值(参考第二个虚线箭头约550-551nm)和561nm处的最小值之间的差进行的二阶导数的分析。这使得能够消除其他物质的弱贡献,其在550-551nm和561nm之间变化不大。可以使用这两种分析。

[0284] 图6展示了使用血红素的测量的校准图。精度可低至0.1g/L,且甚至低于0.05g/L。

[0285] 其他元素

[0286] 先前已经描述的方法可以扩展到许多其他物质。

[0287] 值得一提的是:

[0288] -羧化血红蛋白(HbCO),

[0289] -高价铁血红蛋白,

[0290] -血浆血红素,其可特别地通过添加CO和/或连二亚硫酸钠来定量。在连二亚硫酸钠的存在下,血红素Fe³⁺的铁原子被还原,并然后在没有O₂的情况下与CO结合(O₂与连二亚硫酸钠反应)。这使得光谱确定成为可能,

- [0291] -肌红蛋白，
- [0292] -卟啉，
- [0293] -胆色素原，
- [0294] -尿胆素，
- [0295] -通过血红素加氧酶的血红素的分解代谢的产物，
- [0296] -胆红素降解/氧化产物：胆绿素，血红素盒，
- [0297] -器官功能障碍和细胞溶解的产物(辅酶分子、血红素蛋白质、细胞色素P450、转氨酶)，以及
- [0298] -代谢底物，代谢降解物。
- [0299] 确定血浆和其他流体/生物样本中Hb、血红素和Hb降解产物的替代化学方法
- [0300] 使用类似的形式体系。“参考光谱”或“SR”是针对单个蛋白质获得的吸收光谱。通常在实施本发明的方法之前获得参考光谱。差分参考光谱“SDR”对应于与给定物质的化学反应相关的吸光度变化。
- [0301] “计算的光谱”或“计算的中间光谱”是从通过“K”归一化因子(所确定的物质的信号幅度之比与其参考之间的比率)加权的其参考光谱，从测量的光谱物质SA中减去之后得到的光谱。
- [0302] 该方法基于在CO存在下通过连二亚硫酸钠还原血浆 Fe^{3+} 。与仅使用在 CN^- 存在下的反应的前述方法相比，它涉及添加两个另外的化学反应。在CO下，在没有 O_2 (其被连二亚硫酸盐消耗)的情况下，对于先前平衡的样品，在连二亚硫酸钠存在下还原 Fe^{3+} 血红素血浆物质的铁原子。第一步是用CO(CO的亲和力比 O_2 高200倍)取代空气中的 O_2 还原球 Fe^{2+} 。一旦形成键 $\text{Fe}^{2+}\text{-CO}$ ，这被认为是不可逆的，在添加测定所需的化学试剂后不会改变铁的化学性质，并因此与其相关的光谱成分没有任何变化。添加CO后，只有具有 Fe^{3+} 的物质对定量方法保持敏感。
- [0303] 化学反应的顺序如下：
- [0304] 1) 如前所述在记录血浆光谱SA之后添加KCN
- [0305] 2) 添加气态CO
- [0306] 3) 添加连二亚硫酸钠。
- [0307] 然而，应该注意的是，步骤1)和2)可以颠倒而不改变分析的最终结果。
- [0308] 测量协议的不同步骤如下：
- [0309] 1) 在pH 7.4+/-0.1缓冲的空气下血浆的SA光谱。计算血红素化的(heminised)物质时将考虑稀释因子。
- [0310] 2) 在添加CO后 SA^{CO} 血浆光谱：从由CO取代 O_2 结合 Fe^{2+} 引起的光谱变化($\text{SA}-\text{SA}^{\text{CO}}$)化学定量在空气中与 O_2 结合的、游离和/或与触珠蛋白复合的(由于游离Hb的计算给出了更多的触珠蛋白，因此去除了该命题) HbFe^{2+} 。
- [0311] 在添加CO气体或已知体积的CO饱和的PBS后，CO的浓度在100 μM 和1mM之间(气态CO在25 $^{\circ}\text{C}$ 下的溶解度在1atm下为约1mM)。孵育时间为约1分钟。
- [0312] 3) 添加KCN后在CO存在下血浆的 $\text{SA}^{\text{CO+KCN}}$ 光谱：从由 CN^- 与 Fe^{3+} 结合引起的光谱变化($\text{SA}^{\text{CO}}-\text{SA}^{\text{CO+KCN}}$)化学确定已经描述的 Fe^{3+} 球蛋白(以前称为metHb)。也可以考虑将其他化学化合物用于NaCN或甚至 NaN_3 或 KN_3 定量(N_3^- 是 Fe^{3+} 的配体)。氰化物盐的浓度为约0.2 μM ，叠氮

化物盐的浓度在0.5和1mM之间。孵育时间在3分钟和5分钟之间。应当注意,血红素与HSA和Hx结合的亲和力太弱,以至于在该浓度范围内不能给出铁配体的结合信号。

[0313] 4) 在添加连二亚硫酸钠后,在CO和KCN存在下 $SA^{CO+KCN+DTN}$ 血浆光谱:从由 Fe^{3+} 还原引起的光谱变化($SA^{CO+KCN}-SA^{CO+KCN+DTN}$)化学测定结合于人白蛋白(HSA)和血清血色素结合蛋白(Hx)的血清 Fe^{3+} 血浆血红素。一旦还原的 Fe^{2+} 与溶液中存在的CO结合。该信号将由几种光谱跃迁组成,即:

[0314] • HSA-血红素(Fe^{3+})→HSA-血红素(Fe^{2+})-CO,

[0315] • Hx-血红素(Fe^{3+})→Hx-血红素(Fe^{2+})-CO和

[0316] metHb(Fe^{3+})- CN^- →Hb(Fe^{2+})-CO,其将从先前的测定(3)和所涉及物质的参考光谱计算得出。

[0317] 如果在没有 CN^- 或 N_3^- 的情况下分别在其他样品上进行metHb定量,则光谱跃迁将是metHb(Fe^{3+})→Hb(Fe^{2+})-CO。所有定量将优选在生理pH7.4+/-0.1下以及对于参考光谱进行。在添加浓度为约0.5-1mM的连二亚硫酸盐后,孵育时间为约20-30min。最后,基于由添加连二亚硫酸盐引起的光谱变化(其中减去了在CO下metHb还原对信号的贡献)计算的信号,将作为参考光谱的线性组合进行分析,以了解在CO存在下还原后HSA-血红素(Fe^{3+})和Hx-血红素(Fe^{3+})的光谱贡献。将总血浆血红素计算为HSA-血红素(Fe^{3+})和Hx-血红素(Fe^{3+})的浓度之和。仅HSA-相关的血红素可能与其他分子靶标相互作用或与组织解离。由于某些抗凝剂(肝素或EDTA)会升高血浆的pH,并可能改变清除剂物质之间的血红素分布,因此柠檬酸盐下的血浆或简单地血清应给出更接近的血红素命运状态(总血红素计算不变)。至于血红素-SA,血红素-Hx的确定是基于以上开发的纯光谱分析,或基于本部分中开发的化学定量之后的。血红素-Hx的浓度将与总血浆血红素成反比,这是由于在其血红素复合形式的肝内吞作用后Hx的低转化率。

[0318] 从冻干的蛋白质(Sigma Aldrich)获得在pH 7.4+/-0.1下CO还原后Hx的差分参考光谱。Hx/血红素比率为约1.2,即在过氧化氢酶和超氧化物歧化酶存在下蛋白质过量。然后记录Hx-血红素光谱(Fe^{3+})。在样品脱氧并在CO下平衡后,在添加后几分钟在大约200 μ M连二亚硫酸钠存在下还原铁后,最终测量Hx-血红素(Fe^{2+})-CO光谱。归一化基于在413-414nm处的Hx-血红素(Fe^{3+})的消光系数,并且应与计算在测量容器中的NaOH中血红素原料的稀释液后获得的值相当;通过基于在403-404nm处的血红素-HAS消光系数(以及二阶导数),在HSA溶液(HSA比率/血红素>2)中称重或稀释来估算血红素原料的浓度。

[0319] 从具有过量血红素(大约10 μ M)的镰状细胞患者血液中获得在CO下还原(孵育20-30min)后HSA的差分参考光谱。由于Hx耗尽是几乎全部的(通过定量技术确认),因此在减去低metHb部分后血浆血红素的光谱成分来自HSA-血红素(Fe^{3+})。在350nm和460nm之间的紫外光中,使用从HSA-血红素(Fe^{3+})归一化的二阶导数,将血浆在pH 7.4+/-0.1的PBS中稀释后,获得差分参考光谱。由于生化条件和血浆(存在胆红素)中结合位点的构象,在CO下还原后血浆血红素-HSA的差分参考光谱与从PBS中纯化的人白蛋白获得的差分参考光谱略有不同。在高[血红素](血红素-Hx耗尽)下,仅来自HSA的差分光谱可用于模拟紫外光中或/和可见光前(pre)中的信号。

[0320] 当可测量时(取决于信噪比),差分光谱的二阶导数表示也可以用于估算HSA和Hx在350和450nm之间的血红素结合。注意,血红素-HSA和血红素-Hx二阶导数的归一化的最大

振幅(在422-424nm之间负号)很接近,使得它们的平均值可用于直接估算总血浆血红素浓度,准确度为约+/-5% (使用差分光谱,准确度为约+/-10%)。

[0321] 在高[血红素](血红素-Hx耗尽)下,仅来自HSA的差分光谱的二阶导数可用于模拟紫外光中或/和可见光中优选520和620nm之间的信号。

[0322] 在此分析阶段,化学确定的以下各种物质的贡献:HbO₂、MetHb、HSA-血红素、Hx-血红素(在空气中获得的参考光谱)可以从血浆SA的初始光谱中减去,因此在信号处理后可以分析其他光谱物质例如总胆红素(游离和缀合的)。

[0323] 用于不同测定的分析方程式如下(粗体表示与不同定量相关的归一化系数)

[0324] 1) 通过添加CO确定最初与O₂结合的HbFe²⁺:

$$[0325] \quad SA - SA^{CO} = K^{CO} \times SDR^{CO} \quad (SDR^{CO} = SR^{HbO_2} - SR^{HbCO})$$

[0326] 2) 通过添加KCN定量MetHbFe³⁺:

$$[0327] \quad SA^{CO} - SA^{CO+KCN} = K^{KCN} \times SDR^{KCN} \quad (SDR^{KCN} = SR^{MetHb} - SR^{MetHb-CN})$$

[0328] 3) 通过添加DTN进行HSA和Hx-相关的血浆血红素测定:

$$[0329] \quad \bullet \quad SA^{CO+kcn+DTN} - SA^{CO+kcn} = K^{HSA-血红素} \times SDR^{HSA-血红素Fe2+CO/HSA-血红素Fe3+} + K^{Hx-血红素} \times SDR^{Hx-血红素Fe2+CO/Hx-血红素Fe3+} - K^{KCN} \times SDR^{HbCO/metHbCN} \quad (K^{KCN} \text{的计算如上所述})$$

[0330] 其中:

$$[0331] \quad \bullet \quad SDR^{HbCO/metHbCN} = SR^{HbCO} - SR^{MetHb-CN}$$

$$[0332] \quad \bullet \quad SDR^{HSA-血红素Fe2+CO/HSA-血红素Fe3+} = SR^{HSA-血红素Fe2+CO} - SR^{HSA-血红素Fe3+}$$

$$[0333] \quad \bullet \quad SDR^{Hx-血红素Fe2+CO/Hx-血红素Fe3+} = SR^{Hx-血红素Fe2+CO} - SR^{Hx-血红素Fe3+}$$

[0334] 4) 通过添加DTN进行HSA和Hx-相关的血浆血红素测定:

$$[0335] \quad SC^{CO+kcn+DTN} = SA - K^{CO} \times SR^{HbO_2} - K^{KCN} \times SR^{MetHb} - K^{HSA-血红素} \times$$

$$[0336] \quad SR^{HSA-血红素Fe3+} - K^{Hx-血红素} \times SR^{Hx-血红素Fe3+}$$

[0337] 将分析SC光谱以确定其他光谱物质,诸如HbCO和胆红素。

[0338] 数据分析可以涉及使用二阶导数的表示进行数学处理,以放大最佳分辨的吸收峰;在这种化学测定中,对于CO-连接的物质(其在420nm处具有非常强的吸收带和窄的宽度)来说就是这种情况。分析领域涵盖了300和700nm之间,更特别地在350nm和450nm之间的白光和近UV的整个光谱,其中吸收带对于血红素化的物质是最强的。该方法还可用于人体中其他体液、细胞和来自活检的组织提取物中的血红素/Hb的确定。它的应用领域可以扩展到动物中的定量以及用于细胞培养。

[0339] 血红素的量化使用,例如使用优选地包含100和500μM之间的人HSA或动物来源的HAS的在pH 7.4下的PBS缓冲液(其在血红素存在下的参考光谱将被测量和标准化)。

[0340] 通过UV/可见光谱法的血色素结合蛋白确定方法

[0341] 这些方法基于先前开发的相同的分析和数学方法。它们基于添加Hx底物,在这种情况下,是要对其进行测定的血浆中或任何其他生物介质中的血红素。在本文中开发血浆中的定量。

[0342] 第一种方法是在添加血红素后测量差分光谱。将单独和在存在过量血红素的情况下测量测定介质的吸收光谱(SA^{基准})。然后将考虑稀释因子来计算差分光谱SA^{血红素}-SA^{基准},以分析由血红素与血清蛋白HSA和Hx结合产生的信号。信号的二阶导数将被建模为两种主要蛋白质复合物在属于[350nm,700nm]的λ处,优选地在属于[350nm,460nm]的λ处的二阶导数

的线性组合。与HSA-血红蛋白相比，Hx-血红蛋白光谱的二阶导数的高强度使得该方法对Hx的确定非常敏感，甚至超过血红蛋白与HSA的结合。

[0343] 但是，由于减去了待分析介质的吸光度，该介质可以具有处于固定状态的血红蛋白的血红蛋白-结合部分，特别是对于具有低血管内溶血的血浆（在慢性中度溶血的情况下Hx被耗尽），期望通过上述方法在添加血红蛋白之前预先测量血红蛋白-Hx的比例，以便计算添加血红蛋白之前和之后的血红蛋白-Hx的总量。

[0344] 第二种方法在于用过量的血红蛋白以相同的方式测量血浆光谱，但是在添加连二亚硫酸钠之后，以减少血红蛋白并获得Hx (Fe²⁺) - 血红蛋白光谱。在将血红蛋白添加到冻干的Hx中并且在N₂下脱氧（添加SOD和过氧化氢酶）后添加连二亚硫酸盐之后，如上所述获得Hx (Fe²⁺) - 血红蛋白光谱。实际上，该物质与在500nm和600nm之间具有两个吸收峰的光谱相关，其中一个吸收峰在560nm处细且强。结果，添加连二亚硫酸钠后血浆样品的二阶导数对Hx (Fe²⁺) - 血红蛋白的存在非常敏感，而存在的其他物质1'HbFe²⁺、1'HSA (Fe²⁺) - 血红蛋白和胆红素在此波长范围内的光谱贡献将通常是可忽略的（宽光谱且较低强度）。然而，在低量的Hx的情况下，可以从连二亚硫酸盐添加后的信号中去除从Hb和胆红素定量测量的其他成分以及基于已知的血红蛋白添加量的HSA-血红蛋白成分，以便更容易地测量Hx含量。后者方法仅依赖于获得单一SA^{血红蛋白+连二亚硫酸盐}。下面更详细地开发该分析。最后，使用相同的方法来确定Hx (Fe²⁺) - 血红蛋白物质，总血浆血红蛋白的定量可以通过以下来实现：在下文所述的相同缓冲液条件下稀释血浆后添加纯化的游离Hx以替代与血清成分相互作用的血红蛋白结合稳定态，对于Hx其最强的清除剂。

[0345] 两种血浆血色素结合蛋白定量方法都依赖于血红蛋白的添加以使要定量的Hx饱和。孵育pH是要控制的重要参数。孵育pH在6.5和7.4之间，特别是等于7.0，以降低血红蛋白对HSA的亲和力，并从而促进Hx结合。不像柠檬酸盐更接近生理pH或血清，具有抗凝剂肝素和EDTA的血浆的pH大于7.4，对于pH>7.4的样品，样品将在50mM PBS 50mM磷酸盐NaCl pH 6.0中稀释到1/2，以及对于pH约7.4的样品，样品将在相同的pH 6.5缓冲液中稀释。孵育的最终pH接近7.0。应当注意，可以使用其他缓冲液在7.0的pH下缓冲样品。然后在搅拌下逐渐添加血红蛋白，以便从在测量当天制备的0.1N NaOH中的1mM血红蛋白的原料溶液（例如Sigma Aldrich）中获得约20μM的最终浓度。如果对于病理而言，血色素结合蛋白的浓度异常高(>1.2g/L)，则血红蛋白的过量可能会增加。在稀释后超过20min，在包含HSA的pH 7.4的PBS缓冲液中稀释后通过称重确定原料的浓度并可能地通过UV/可见分光光度法来控制。

[0346] 血浆样品在血红蛋白存在下的孵育持续30分钟，然后将样品在pH 7.4PBS中稀释1/3以进行最终测量，即对于第一种方法的SA^{血红蛋白}光谱和/或对于添加连二亚硫酸盐后的第二种化学方法的光谱SA^{血红蛋白+连二亚硫酸盐}；因此，相同样品可用于两种类型的Hx测定。如果在连二亚硫酸盐存在下通过化学方法测得的Hx≥0.05g/L中存在显著差异，则表明了去除Hx-相关的血浆血红蛋白后血浆中存在。应当注意，血浆等分试样可以用相同的方式稀释而无需添加血红蛋白来测量第一种定量方法中使用的并然后用于表征溶血的其他生物标志物的参考光谱(SA^{基准})。

[0347] 在闭塞管中制备连二亚硫酸钠溶液，该闭塞管对预先用氮脱氧的气体具有低渗透性。然后将试剂溶解在pH 7.4的PBS中，在N₂下脱氧，可选地在脱气后并且以大约0.1M的浓度可使用24小时。在不存在氮的情况下，连二亚硫酸盐可以用脱气的或不脱气的缓冲液制

备,但是,在这种情况下,包含连二亚硫酸盐的管必须完全充满缓冲液以去除包含活性物质的整个气相: O_2 和连二亚硫酸盐(在不搅拌溶液的情况下去除连二亚硫酸盐以限制任何剩余的气相向液相扩散)。还优选在添加连二亚硫酸盐至最终浓度优选为0.5mM之前,对血浆+血红蛋白样品进行脱氧或消除测量池中的气相。同样地,重要的是要避免在添加连二亚硫酸盐后在包含 O_2 的气相存在下剧烈平衡血浆,因为连二亚硫酸盐通过与包含在气相中的 O_2 反应被消耗。添加连二亚硫酸盐后,优选在一分钟内无延迟地测量光谱。相对于由纯化的Hx和血红蛋白获得的参考光谱Hx(Fe^{2+})-血红蛋白,取其在561nm处的最小值或优选地561nm处的最小值和551nm处的最大值之间的差,通过模拟540nm和580nm之间的二阶导数,使用二阶导数测量Hx的浓度。

[0348] 这些方法的主要优点是分析是基于参考光谱的。因此,不必制作校准直线(与Elisa测试不同)。这些定量方法测量血浆Hx对血红蛋白的结合能力,并且与用抗体沉淀后的浊度法相比,这些方法不受Hx糖基化变化或分子聚集体的存在的影响。定量方法的最终结果用 μM 的Hx表示,并且可以转换为g/L的Hx,取平均分子量为60kD。

[0349] 应用

[0350] 可以考虑这种确定方法的许多应用。本部分中将对其中一些进行开发。

[0351] 特别开发了与血红蛋白-相关的或血红蛋白蛋白质-相关的疾患,且特别是至少作为症状涉及血红蛋白-相关的或血红蛋白蛋白质-相关的疾患的疾病有关的应用。血红蛋白-相关的或血红蛋白蛋白质-相关的疾患特别涵盖血红蛋白-相关的疾病或RBC疾病。作为另一特定实例,血红蛋白-相关的或血红蛋白蛋白质-相关的疾患特别涵盖血管内容血的疾患。

[0352] 但是,血红蛋白-相关的或血红蛋白蛋白质-相关的疾患并不涵盖所有与血液相关的疾病。值得注意的是,脑动脉瘤诸如蛛网膜下腔出血不是血红蛋白-相关的或血红蛋白蛋白质-相关的疾患。

[0353] 当相关时,这些应用是体外应用。

[0354] 预测方法

[0355] 对于该应用,提出了用于预测受试者有患血红蛋白-相关的或血红蛋白蛋白质-相关的疾患的风险的方法。

[0356] 用于预测的方法包括用于进行以下方法步骤的步骤:用于确定受试者的生物样品或其代谢/降解产物(如以下其他应用中的天然色素)中至少一种蛋白质含量的方法,以获得确定的参数。

[0357] 预测方法还包括基于所确定的参数来预测受试者有患血红蛋白-相关的或血红蛋白蛋白质-相关的疾患的风险的步骤。

[0358] 诊断方法

[0359] 本应用对应于用于诊断血红蛋白-相关的或血红蛋白蛋白质-相关的疾患的方法。

[0360] 诊断方法包括进行以下方法的步骤:用于确定受试者的生物样品中的至少一种蛋白质含量的方法,以获得确定的蛋白质含量。

[0361] 诊断方法还包括基于确定的蛋白质含量,进行诊断血红蛋白-相关的或血红蛋白蛋白质-相关的疾患的步骤。

[0362] 治疗方法

[0363] 本应用对应于用于治疗血红蛋白-相关的或血红蛋白蛋白质-相关的疾患的方法(追

踪)。

[0364] 治疗方法包括进行以下方法的步骤:用于确定受试者的生物样品中至少一种蛋白质含量的方法,以获得确定的蛋白质含量(即治疗前后至少一种含量分子的稳态比较)。

[0365] 治疗方法还包括基于确定的蛋白质含量,施用治疗血红素-相关的或血红素蛋白质-相关的疾患的药物(骨髓移植,基因疗法)。

[0366] 定义阶段的方法

[0367] 在本应用中,提出了用于定义血红素-相关的或血红素蛋白质-相关的疾患的阶段的方法。

[0368] 疾病的阶段是疾病的不同级别。通常基于疾病的症状来定义阶段。

[0369] 定义方法包括进行以下方法的步骤:用于确定受试者的生物样品中至少一种蛋白质含量的方法,以获得确定的蛋白质含量。

[0370] 然后,定义方法包括基于确定的蛋白质含量以及结合其他生物参数(用于诊断的预测算法)来定义血红素-相关的或血红素蛋白质-相关的疾患的阶段。

[0371] 鉴定靶标的方法

[0372] 本应用对应于鉴定用于预防和/或治疗血红素-相关的或血红素蛋白质-相关的疾患的治疗靶标的方法。

[0373] 鉴定方法包括进行以下方法的步骤:确定第一受试者的图像的生物样品中至少一种蛋白质含量的方法,该第一受试者为患血红素-相关的或血红素蛋白质-相关的疾患的受试者。

[0374] 鉴定方法还包括进行以下方法的步骤:确定第二受试者的生物样品中至少一种蛋白质含量的方法,以获得第二确定的蛋白质含量,第二受试者是未患血红素-相关的或血红素蛋白质-相关的疾患的受试者。

[0375] 鉴定方法进一步包括基于第一确定的蛋白质含量和第二确定的蛋白质含量的比较选择治疗靶标的步骤。

[0376] 鉴定生物标志物的方法

[0377] 在本应用中,提出了用于鉴定生物标志物的方法。

[0378] 生物标志物可以是血红素-相关的或血红素蛋白质-相关的疾患的诊断生物标志物、血红素-相关的或血红素蛋白质-相关的疾患的易感性生物标志物、血红素-相关的或血红素蛋白质-相关的疾患的预后生物标志物、或响应于血红素-相关的或血红素蛋白质-相关的疾患的治疗的预测性生物标志物中的一种生物标志物。

[0379] 鉴定方法包括进行以下方法的步骤:确定第一受试者的生物样品中至少一种蛋白质含量的方法,以获得第一确定的含量,第一受试者为患血红素-相关的或血红素蛋白质-相关的疾患的受试者。

[0380] 鉴定方法包括进行以下方法的步骤:确定第二受试者的图像的生物样品中至少一种蛋白质含量的方法,以获得第二确定的蛋白质含量,第二受试者是未患血红素-相关的或血红素蛋白质-相关的疾患的受试者。

[0381] 鉴定方法包括基于第一确定的蛋白质含量和第二确定的蛋白质含量的比较选择生物标志物。

[0382] 筛选化合物的方法

- [0383] 本应用对应于用于筛选化合物的方法。
- [0384] 所述化合物是药物。
- [0385] 所述药物对已知的用于预防和/或治疗血红素-相关的或血红素蛋白质-相关的疾患的治疗靶标有作用。
- [0386] 筛选方法包括进行以下方法的步骤:确定第一受试者的生物样品中至少一种蛋白质含量的方法,以获得第一确定的蛋白质含量,第一受试者为患血红素-相关的或血红素蛋白质-相关的疾患的并且已接受所述化合物的受试者。
- [0387] 在该上下文中,术语“接受”涵盖药物的任何给药方式。
- [0388] 筛选方法还包括进行以下方法的步骤:确定第二受试者的生物样品中至少一种蛋白质含量的方法,以获得第二确定的蛋白质含量,第二受试者为患血红素-相关的或血红素蛋白质-相关的疾患的并且未接受所述化合物的受试者。
- [0389] 筛选方法还包括基于第一确定的蛋白质含量和第二确定的蛋白质含量的比较选择化合物。
- [0390] 使合格或不合格的方法
- [0391] 本应用对应于用于使血袋合格和不合格的方法。血液是涵盖红细胞和血浆的通用术语。
- [0392] 袋是容器。
- [0393] 袋包含受试者的生物样品。
- [0394] 使合格或不合格的方法包括进行以下方法的步骤:用于确定医疗袋中的至少一种蛋白质含量的方法,以获得确定的蛋白质含量。
- [0395] 使合格或不合格的方法还包括基于确定的蛋白质含量使医疗袋合格或不合格。
- [0396] 例如,如果蛋白质的含量显示样品的质量下降到无法再使用样品的程度,则该袋是不合格的。
- [0397] 这种特定应用的想法是分析保藏介质中的溶血含量,但如果有任何疑问也收集红细胞以在100-500 μ M白蛋白(体内)存在下在pH 7.4的等渗pb中孵育(袋的pH随着保藏时间而降低,并且通常在6和7之间)以回收可以与膜相互作用的所有物质,并也测量会降低输血量的最脆弱的成分。对于血浆袋,基于血红素及其衍生的物质检测异常溶血含量的存在,并且还估算可用作通过血浆交换治疗伴有持续溶血的患者的治疗剂的总Hx浓度。(触珠蛋白可以通过在脱氧前添加Hb并在过氧化氢酶存在下用连二亚硫酸盐还原来测量;确实,结合到触珠蛋白的脱氧二聚体和脱氧Hb四聚体的光谱不同,因此添加等同于正常触珠蛋白范围的上限的Hb能够使用与本文档中开发的相同方法估算蛋白质)。因此,该应用等同于治疗应用的质量控制。
- [0398] 监测治疗的方法
- [0399] 本应用对应于用于监测在受试者中针对血红素-相关的或血红素蛋白质-相关的疾患的治疗的方法,所述受试者患有血红素-相关的或血红素蛋白质-相关的疾患并已接受所述治疗。
- [0400] 监测方法包括进行以下方法的步骤:确定受试者的生物学样品中至少一种蛋白质含量的方法,以获得确定的蛋白质含量。
- [0401] 监测方法进一步包括监测确定的蛋白质含量,从而监测在受试者中针对血红素-

相关的或血红蛋白-相关的疾患的治疗,所述受试者患有血红蛋白-相关的或血红蛋白-相关的疾患并已接受所述治疗。

[0402] 这样的应用对应于许多可能的应用,其中一些将在下面描述。

[0403] 值得注意的是,该方法可用于:

[0404] -监测精氨酸血红蛋白卟啉病(heme arginate porphyries)的治疗;

[0405] -监测纯化的或重组的血色素结合蛋白治疗;

[0406] -监测来自Hb或其他治疗用途的血液替代品的添加;

[0407] -监测引起溶血的治疗,诸如体外膜肺氧合(ecmo)(体外循环、血液透析、或心脏假体);

[0408] -表征血浆交换、血浆除去法(通过添加其清除剂触珠蛋白和血色素结合蛋白清除Hb和血红蛋白)计算交换量(患者血浆的稀释),以及

[0409] -使用血色素结合蛋白的确定以与红血球(red globule)的病理相互作用。

[0410] 申请人通过使用如前所述的方法还对镰状细胞疾病(SCD)和β地中海贫血患者进行了实验。患者的主要部分正在接受HU、输血或两者的治疗(其他治疗诸如螯合剂铁是相关的)。

[0411] 粗略地了解到当不进行治疗时,那么溶血/红细胞生成异常的所有参数都将更高,申请人已经能够仅在SCD中检测到更高Hb含量血浆并且接近于β地中海贫血的正常范围(中度或输血程序下)。特别是,这种Hb大部分是游离的,并且不与SOD中的触珠蛋白复合。因此,它将能够在组织中渗出并随着血红蛋白在膜(例如,肾小球)上的积累而降解,并最终引起长期功能障碍的器官,而且还能使由内皮细胞合成的部分NO分解代谢(促进血管收缩)。metHb含量可以与氧化应激以及在NO与氧化Hb反应后的血管收缩水平(高血压)有关。

[0412] 在β地中海贫血的情况下,血红蛋白占大多数。如果没有血红蛋白加氧酶(铁蛋白)的支持,血浆中血红蛋白的降解也会在铁释放后引起促氧化剂细胞毒性反应。如果一部分血红蛋白在内皮中被分解代谢,则将存在可能有利的跨血红蛋白的降解产物:胆绿素和胆红素但特别是CO的信号传导途径的激活(抗炎、抗聚集、抗增殖、血管活性……)。膜上的积累将引起坏死(精氨酸血红蛋白的治疗)。申请人还注意到根据病理将测量区间与生物标志物分开。

[0413] 在β地中海贫血中,且特别是对于输血患者,随着血色素结合蛋白的耗尽,血红蛋白的重要量是完全出乎意料的,并且由于前述确定方法的精度,已经被检测到。

[0414] 确定方法的另一应用是用于监测延迟溶血性输血反应(DHTR),其是输血反应的一种类型。

[0415] 再次,发明人已经表明,使用该确定方法使得能够形成DHTR的更好的诊断。

[0416] 最终,申请人通过这些生物标志物的状态显示了未治疗患者的稳态。在管理样品中没有测量偏差或问题使得数据不可靠。因此,治疗的追踪可以使用这些生物标志物,以期获得有利的演变。

[0417] 另外,作为应用,可以考虑专门研究Hx-血红蛋白复合物。例如,可以考虑在具有Hx-血红蛋白复合物受体的组织中增加HO活性,以克服氧化应激的存在。作为另一实例,Hx-血红蛋白复合物可以在移植之前用作器官调理溶液(肾脏、肝脏等)的佐剂,以减轻局部缺血/再灌注综合征的有害影响。可以使用血红蛋白作为生物信使,特别是因为通过使用这种复合物的定量将使其追踪成为可能。

[0418] 还可以考虑血红素加氧酶的HO,具有抗氧化途径的激活。

[0419] 总而言之,已经提出了用于确定血液中至少一种蛋白质或其代谢/降解产物(天然色素)的方法,该方法更精确同时仍易于实施。这使得能够考虑对于血红素-相关的或血红素蛋白质-相关的疾患或疾病的许多应用。通过考虑以下化学定量技术之一,可以特别提高此精度:

[0420] -通过添加CO来定量氧合血红蛋白,

[0421] -通过添加KCN或 N_3^- 来定量高铁血红蛋白,

[0422] -通过添加CO和连二亚硫酸钠来定量血浆血红素,

[0423] -通过添加DTN来定量结合于血色素结合蛋白的血红素,

[0424] -通过添加血红素来定量总血色素结合蛋白,以及

[0425] -通过添加血红素和连二亚硫酸钠来定量总血色素结合蛋白。

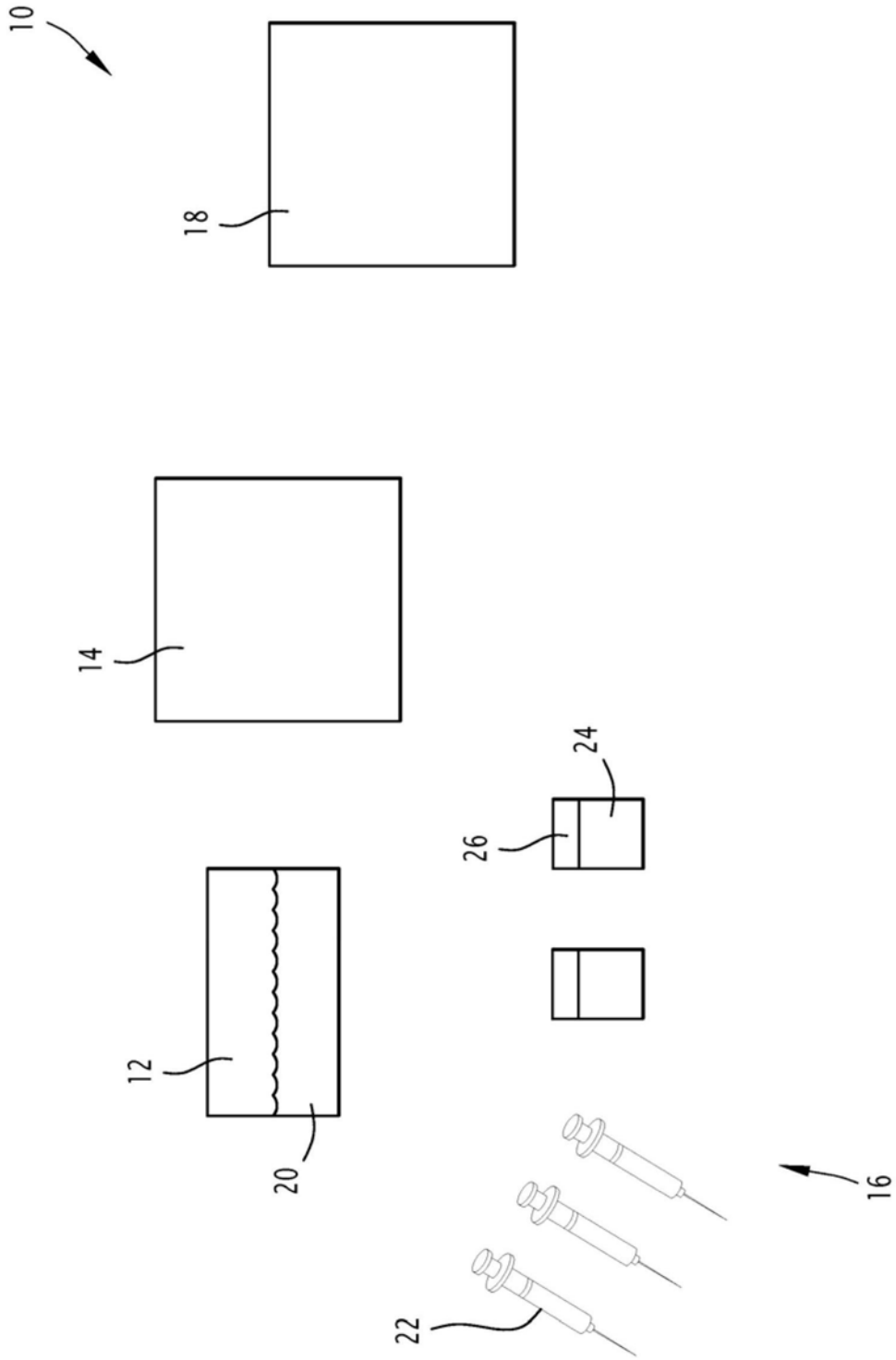


图1

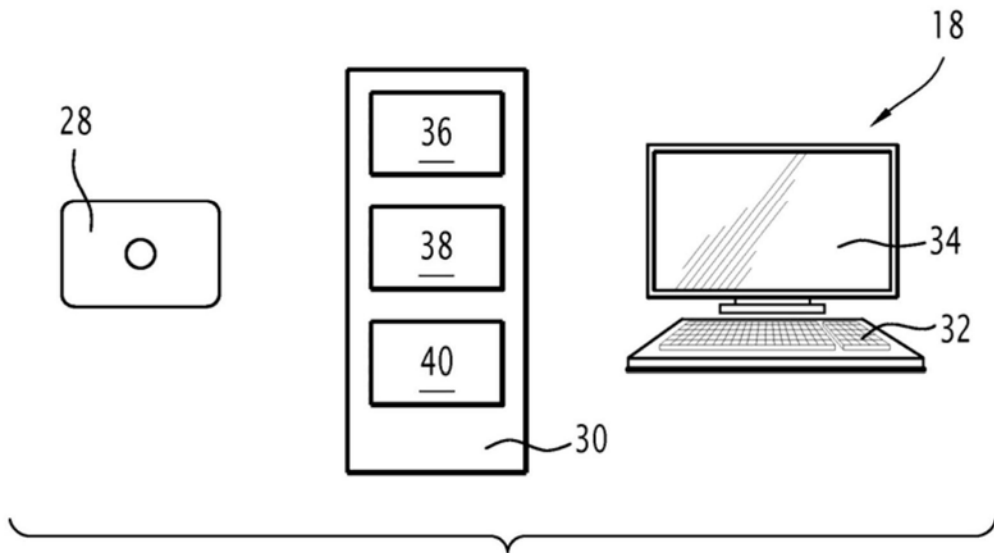


图 2

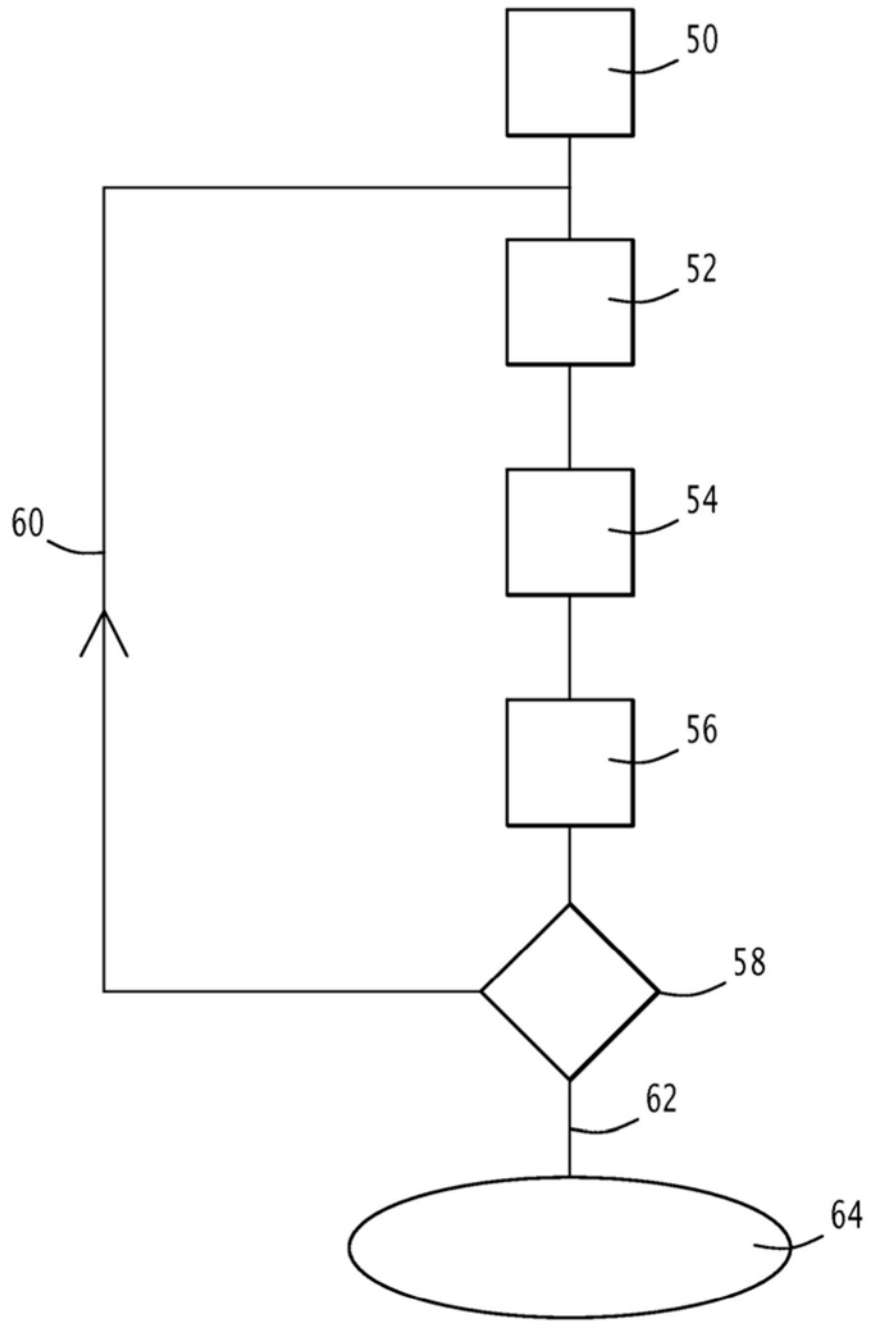


图3

不同血红素复合物的吸收光谱

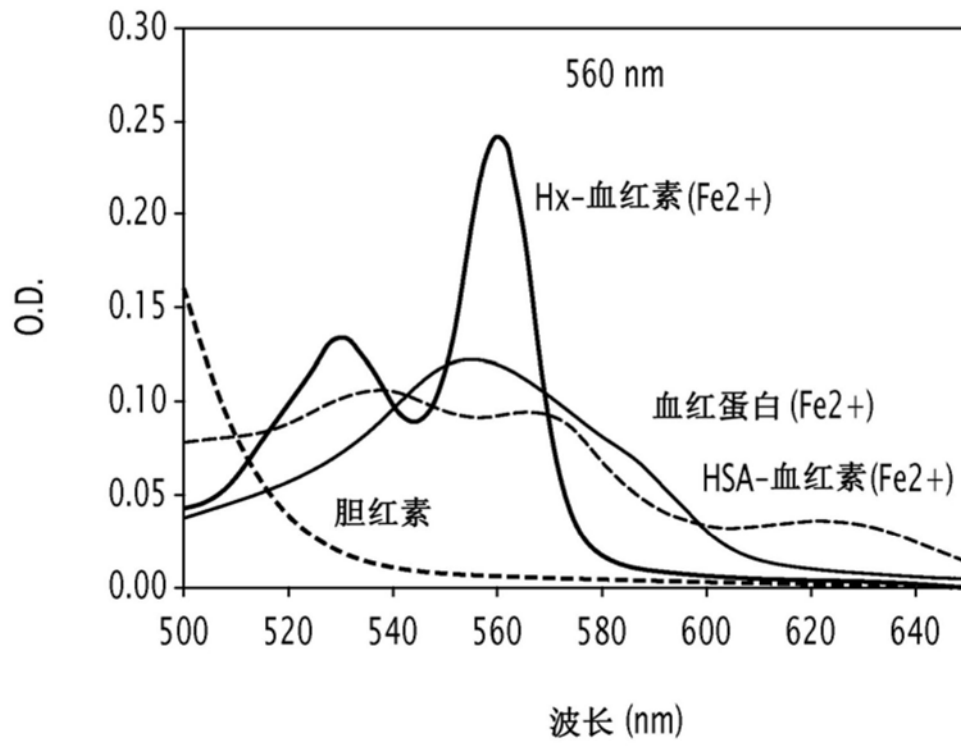


图4

不同血红素复合物的二阶导数

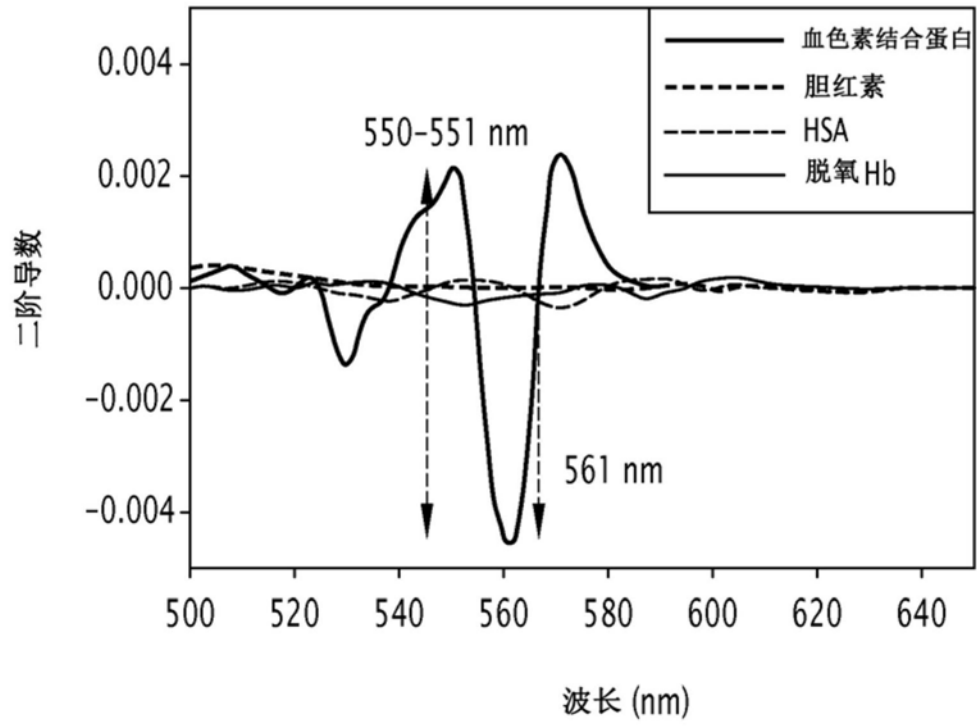


图5

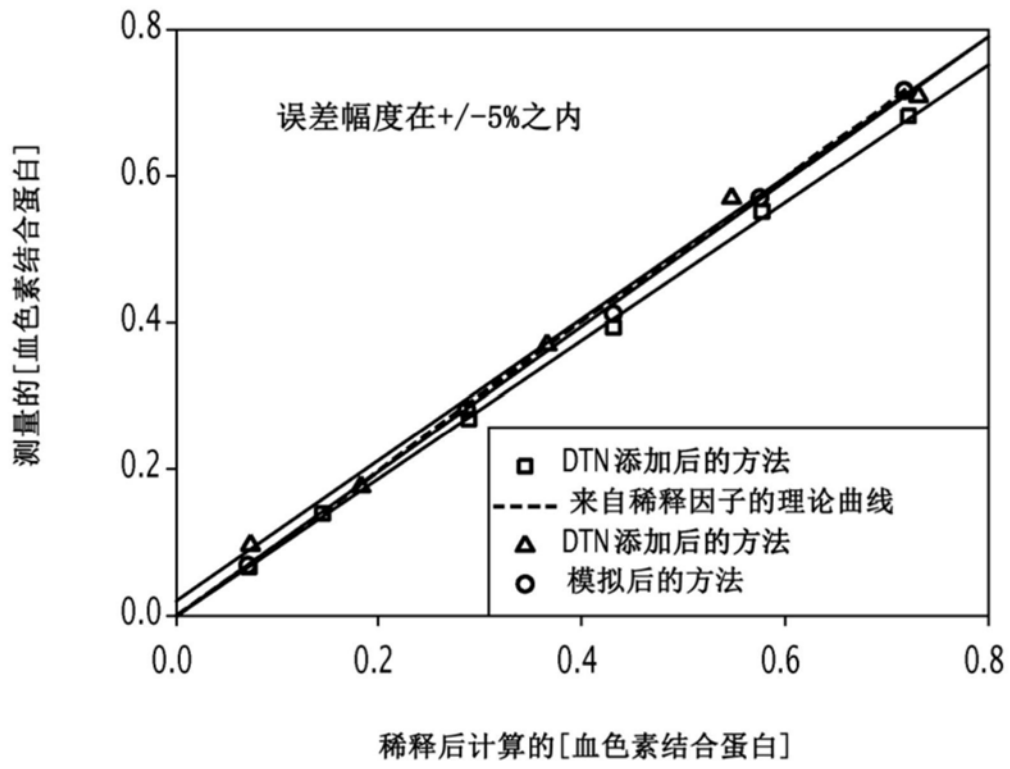


图6