



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102187228 A

(43) 申请公布日 2011. 09. 14

(21) 申请号 200980141022. 7

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

(22) 申请日 2009. 10. 15

代理人 李波 郭文洁

(30) 优先权数据

08018196. 9 2008. 10. 17 EP

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 04. 15

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2009/007399 2009. 10. 15

(87) PCT申请的公布数据

W02010/043393 EN 2010. 04. 22

(71) 申请人 霍夫曼-拉罗奇有限公司

地址 瑞士巴塞尔

申请人 多伦多大学董事局

(72) 发明人 U-H·韦恩许斯-特伦 S·阿拉布

D·布洛克 A·埃米利

A·格拉莫利尼 G·赫斯

H·许迪希 P·刘 D·麦克莱南

权利要求书 1 页 说明书 32 页

序列表 3 页 附图 5 页

(54) 发明名称

双糖链蛋白聚糖在心力衰竭评估中的用途

(57) 摘要

本发明涉及用于在体外评估心力衰竭的方法,其包括以下步骤:测量样品中标记双糖链蛋白聚糖的浓度,任选地测量样品中一种或多种其他心力衰竭标记的浓度,以及通过将对于双糖链蛋白聚糖测定的浓度和对于任选地一种或多种其他标记测定的浓度与如在参考群体中确定的这种标记或这些标记的浓度比较来评估心力衰竭。还公开的是双糖链蛋白聚糖作为心力衰竭评估中的标记蛋白质的用途,包含双糖链蛋白聚糖的标记组合,和用于测量双糖链蛋白聚糖的试剂盒。

1. 一种用于评估个体中的心力衰竭的方法,其包括以下步骤:
 - a) 测量得自所述个体的样品中标记双糖链蛋白聚糖的浓度,
 - b) 任选地测量所述样品中一种或多种其他心力衰竭标记的浓度,和
 - c) 通过将步骤(a)中测定的所述浓度和任选地步骤(b)中测定的所述浓度与如在对照样品中确定的这种标记或这些标记的浓度比较来评估心力衰竭。
2. 根据权利要求1的方法,其进一步特征在于所述样品选自血清、血浆和全血。
3. 根据权利要求1和2中任一项的方法,其进一步特征在于所述一种或多种其他标记选自利钠肽标记、心肌肌钙蛋白标记和炎症标记。
4. 根据权利要求3的方法,其进一步特征在于所述一种或多种其他标记是NT-proBNP。
5. 根据权利要求3的方法,其进一步特征在于所述一种或多种其他标记是肌钙蛋白T。
6. 蛋白质双糖链蛋白聚糖作为心力衰竭评估中的标记分子的用途。
7. 包含双糖链蛋白聚糖和一种或多种其他心力衰竭标记的标记组合在心力衰竭评估中的用途。
8. 根据权利要求7的标记组合的用途,其中所述一种或多种其他标记选自利钠肽标记、心肌肌钙蛋白标记和炎症标记。
9. 根据权利要求8的标记组合的用途,所述标记组合包含至少双糖链蛋白聚糖和NT-proBNP。
10. 一种用于进行根据权利要求1的方法的试剂盒,其包含特异性测量双糖链蛋白聚糖和任选地一种或多种其他心力衰竭标记所需的试剂。
11. 根据权利要求1的方法,其中所述标记双糖链蛋白聚糖在得自处于心力衰竭的危险中的个体的样品中进行测量。

双糖链蛋白聚糖在心力衰竭评估中的用途

技术领域

[0001] 本发明涉及用于评估个体中的心力衰竭的方法,其包含以下步骤:a)测量得自个体的样品中标记双糖链蛋白聚糖(biglycan)的浓度,b)任选地测量样品中一种或多种其他心力衰竭标记的浓度,和通过将步骤(a)中测定的浓度和任选地步骤(b)中测定的浓度与如在对照样品中确定的这种标记或这些标记的浓度比较来评估心力衰竭。还公开的是双糖链蛋白聚糖作为心力衰竭评估中的标记蛋白质的用途,包含双糖链蛋白聚糖的标记组合,和用于测量双糖链蛋白聚糖的试剂盒。

背景技术

[0002] 心力衰竭(HF)是主要的且处于增长中的公共健康问题。在美国例如约5百万个患者患有HF,并且超过550000个患者每年首次诊断患有HF(见:American Heart Association, Heart Disease and Stroke Statistics:2008 Update, Dallas, Texas, American Heart Association(2008))。类似地,美国统计学显示HF是每年一千两百万—一千五百万次诊室就医和六百五十万住院天数的主因。从1990年到1999年,对于作为初步诊断为HF的每年住院治疗数目已从约810 000增加到超过一百万,并且对于作为初步或次要诊断为HF的每年住院治疗数目从两百四十万增加到三百六十万。在2001年,近53000个患者死于作为主因的HF。心力衰竭主要是老人中的病状,并且因此广泛公认的“人口老龄化”也促成增加的HF发病率。HF发病率在65岁以后的人口接近每1000人中有10人。仅在美国,在2005年关于HF总体估计的直接和间接花费是约\$279亿,并且每年约29亿美元花费在用于治疗HF的药物上(参照上文引用的AHA统计学)。

[0003] 心力衰竭

心力衰竭的特征在于心脏泵抽与机体需要一样多的血液的能力中的丧失。衰竭并不意味着心脏已停止泵抽,而是它未能如它应该那样有效地泵抽血液。

[0004] NYHA[纽约心脏学会(New York Heart Association)]和ACC/AHA[美国心脏病学会(American Association of Cardiology)/美国心脏学会(American Heart Association)]都已确定了HF的功能类别以估计疾病的发展。NYHA分类方案具有疾病状态的4个类别:类别1是在任何劳顿感水平下无症状。类别2是重劳顿感下有症状,并且类别III和IV分别是在轻和无劳顿感下有症状。

[0005] 在4阶段ACC/AHA方案中,阶段A是无症状的但处于发生HF的危险中。阶段B存在在无症状的心功能障碍证据。在阶段C中存在具有症状的心功能障碍证据。在阶段D中,尽管最大限度治疗,受试者仍具有HF症状。

[0006] HF的病因学

在医学上,心力衰竭必须被理解为复杂疾病。它可能由触发事件例如心肌梗塞(心脏病发作)的发生引起,或可能是其他原因例如高血压、糖尿病或心畸形例如心瓣膜病继发的。心肌梗塞或HF的其他原因导致心脏泵抽能力中的最初减退,例如通过损害心肌。由于一种或多种代偿机制的激活,泵抽能力中的这种减退可能不是立即引人注意的。然而,已发现HF

的发展不依赖于患者的血液动力学状态。因此,即使当患者保持无症状时,由疾病引起的损害改变也存在且正在进行。事实上,在 HF 早期阶段过程中维持正常心血管功能的代偿机制可能实际上促成最后疾病的发展,例如通过对心脏施加有害作用,及其维持循环中的足够水平血流的能力。

[0007] 在 HF 中发生的某些更重要的病理生理性改变是(i)下丘脑-垂体-肾上腺轴激活,(ii)全身性内皮功能障碍和(iii)心肌重塑。

[0008] (i)特异性针对抵抗下丘脑-垂体-肾上腺轴激活的治疗包括 β 肾上腺素能阻滞剂(B-阻滞剂)、血管紧张素转化酶(ACE)抑制剂、特定钙通道阻滞剂、硝酸盐和内皮缩血管肽-1 阻滞试剂。钙通道阻滞剂和稀释剂虽然产生临床改善,但仍未明确显示延长存活,而 B-阻滞剂和 ACE 抑制剂已显示显著延长生命,如醛固酮拮抗剂一样。使用内皮缩血管肽-1 阻滞试剂的实验性研究已显示有利效应。

[0009] (ii)全身性内皮功能障碍是充分公认的 HF 特点,并且明确呈现左心室功能障碍的时间征兆。内皮功能障碍就暗示心肌微循环与心肌细胞的关系而言是重要的。证据暗示微血管功能障碍显著促成肌细胞功能障碍和导致进行性心力衰竭的形态学改变。

[0010] 就潜在病理生理学而言,证据暗示内皮功能障碍可能由 NO 的相对缺乏引起,这可能通过 NADH 依赖性氧化酶促成血管 O_2 形成中的增加和 NO 的后续过量清除。 O_2 生产增加的潜在促成因素包括增加的交感紧张、去甲肾上腺素、血管紧张素 II、内皮缩血管肽-1 和 TNF- α 。此外,关键抗炎细胞因子 IL-10 的水平相对于 TNF- α 水平不适当地低。目前认为通过引起心肌收缩力减少、两心室扩张和低血压,升高水平的 TNF- α 连同相关的促炎细胞因子包括 IL-6 和可溶性 TNF- α 受体在 HF 进化中起重要作用,并且可能涉及内皮激活和功能障碍。还认为 TNF- α 可能在严重 HF 患者中发生的迄今未解释的肌肉消瘦中起作用。在用可溶性 TNF 受体治疗的少数患者中的初步研究已指出 NYHA 功能分类和患者健康中的改善,如通过生活质量指数测量的。

[0011] (iii)心肌重塑是伴随从无症状到有症状心力衰竭的过渡的复杂过程,并且可以描述为在心肌内的一系列适应性改变,如心室形状、质量和容量中的变化(Piano, M. R. 等人, J. Cardiovasc. Nurs. 14 (2000) 1-23;Molkentin, J. D., Ann. Rev. Physiol. 63 (2001) 391-426)。心肌重塑的主要组分是肌细胞生物学中的变化,如肌细胞肥大、通过坏死或凋亡的肌细胞丧失、细胞外基质中的变化和左心室腔几何学中的变化。不了解心肌重塑仅仅是暴露于长期神经激素刺激的毒性作用数年后发生的终末器官应答,还是心肌重塑独立地促成心力衰竭的发展。迄今为止的证据暗示合适疗法可以减慢或停止心肌重塑的发展。

[0012] 标记和疾病状态

如上所述,肌细胞肥大可能代表朝向 HF 道路的最早步骤之一。肌细胞肥大的特征在于编码收缩蛋白质和某些非收缩蛋白质的某些基因的表达增加、细胞大小增加和细胞骨架变化,所述收缩蛋白质例如 p-肌球蛋白重链和肌钙蛋白 T (TnT),所述非收缩蛋白质例如 A 型和 B 型利钠肽(Piano, M. R. 等人, J. Cardiovasc. Nurs. 14 (2000) 1-23;Molkentin, J. D., Ann. Rev. Physiol. 63 (2001) 391-426)。

[0013] 心力衰竭的人和动物模型研究暗示在心力衰竭的稍后阶段中降低的肌细胞功能。成为肌细胞功能障碍基础的机制已暗示涉及钙处理网络、肌丝和细胞骨架中的变化(de

Tombe, P. P., *Cardiovasc. Res.* 37 (1998) 367-380)。例如,在心力衰竭的人和动物模型中,肌质网钙-ATP 酶活性减少,而肌浆 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换器的 mRNA 和蛋白质水平增加。此外,在心力衰竭的人和动物模型中存在 TnT 的同种型转换,肌钙蛋白 I(TnI)的磷酸化减少,肌纤维肌动球蛋白 ATP 酶活性减少和微管形成增强。

[0014] 最初导致心肌重塑的关于心脏的改变意味着补偿心肌的患病部分,以便维持机体对于氧和营养素的需求。然而,心力衰竭的代偿期是有限的,并且最终失败的心脏无法维持满足机体需要足够的心输出量。因此,存在从代偿期到失代偿期的过渡。在失代偿期中,心脏中的改变级联继续,但不再是有利的,使患者从心力衰竭的发展朝向慢性状态和最后死亡移动。

[0015] 根据“ACC/AHA 2005 Guideline Update for the Diagnosis and Management of Chronic Heart Failure in the Adult”(S. Hunt 等人,www.acc.org = ACC/AHA 实践指导),在心力衰竭领域中的疾病连续体目前分组为如上所述的 4 个阶段。在阶段 A 和 B 中,发现处于发生心力衰竭的危险中的个体,而阶段 C 和 D 代表显示心力衰竭体征和症状的患者群。如上文参考文献中给出的关于限定不同阶段 A 到 D 的细节在此包括作为参考。

[0016] 心力衰竭中的诊断方法

具有 HF 的患者评估中的单个最有用的诊断测试是与多普勒流动研究偶联的综合二维超声心动图,以测定是否存在心肌、心脏瓣膜或心包异常,并且涉及哪个室。必须解决 3 个基本问题:1) LVEF 是被保存还是减少,2) LV 结构是正常还是异常,和 3) 是否存在可以解释临床表现的其他结构异常,例如瓣膜、心包或右心室异常? 这个信息应该用下述进行定量:EF 的数字估计值、心室尺度和 / 或容量测量、壁厚度测量、以及室几何学和局部壁活动评估。应评估右心室大小和心脏收缩性能。还应半定量测定房大小,并且测量左房尺度和 / 或容量。

[0017] 在超声心动图时获得的非侵袭性血液动力学数据是关于患者具有保存或减少 EF 的重要附加联系。二尖瓣流入模式、肺静脉流入模式和二尖瓣环速度的组合定量提供了关于 LV 充填和左心房压力的特征的数据。与下腔静脉尺度及其在呼吸过程中的应答测量偶联的三尖瓣回流梯度评估提供了心脏收缩肺动脉压和中心静脉压的估计值。

[0018] 每搏输出量可能用在 LV 流出道中的组合尺度测量和脉冲多普勒进行测定。然而,异常可能在不存在 HF 的情况下在这些参数中的任何中出现。这些必然无一与 HF 特异性关联;然而,总体正常充填模式反对临床 HF。

[0019] 从临床观点来看,该疾病在代偿和早期失代偿期中是临床上无症状的(阶段 A 中的完全无症状和阶段 B 中患有结构心脏病但无 HF 体征和症状,参照 ACC/AHA 实践指导)。该疾病的外部体征(例如呼吸短促)直到充分进入失代偿期后才出现(即,根据 ACC/AHA 实践指导的阶段 C 和 D)。目前诊断基于患者在阶段 C 和 D 中的外部症状。

[0020] 一般地具有心力衰竭的患者接受用药物的标准治疗,所述药物与涉及心力衰竭的特定机制相互作用。不存在反映这些特定机制可靠且帮助医生选择正确药物(和剂量)用于正确患者(例如 ACE 抑制剂、AT II、 β -阻滞剂等)的诊断测试。

[0021] HF 用标记的先前诊断

处于心力衰竭的危险中的患者早期评估看起来仅可能通过生物化学标记,因为在那个阶段处于发生心力衰竭的危险中的个体仍缺乏临床 HF 症状。不存在目前可用于该疾病的

可靠症状前评估的确定生物化学标记。在目前确定的 HF 诊断时,该疾病已在充分进行中。

[0022] 利钠肽家族特别是心房利钠肽家族和脑利钠肽家族近年来已证明在 HF 评估中具有重要价值。

[0023] HF 预后和需要

至少部分由于后期诊断,50%具有 HF 的患者在诊断 2 年内死亡。5 年存活率小于 30%。存在帮助早期诊断心力衰竭的新生物化学标记的明显需要。

[0024] 处于心力衰竭的危险中的个体,即对于心力衰竭临床上无症状的个体早期评估中的改善是有正当理由的。

[0025] 近年来已确定 B 性利钠肽标记代表监控具有 HF 患者中的疾病发展,且评估其心血管并发症如心脏病发作危险的极佳工具。

[0026] 然而,如对于许多其他诊断领域,单个标记是不足够的。

[0027] 虽然低 NT-proBNP 值对于排除 HF 或 LVD 具有极高的负面预测价值,但在上述和其他研究中对于心力衰竭的正面预测价值(参照 Triepels R.H. 等人, Clin. Chem. 49, Suppl. A(2003)37-38)已发现在 50-60% 范围内。因此,其自身例如具有高,或与 NT-proBNP 组合,并且与单独的 NT-proBNP 比较,具有改善的 HF 正面预测价值的,在评估处于心力衰竭的危险中的个体中有用的标记具有高临床 / 实践重要性。

[0028] 帮助具有心力衰竭患者评估的标记也具有高重要性,以达到这个临床上非常重要且苛求的诊断领域中的进一步技术发展。

[0029] 发明概述

目前已发现且确定标记双糖链蛋白聚糖可以帮助评估心力衰竭。在一个实施方案中,它可以帮助评估个体是否处于发生心力衰竭的危险中。在一个进一步的方面,它可以帮助评估疾病发展。在另一个实施方案中,它可以帮助预测心力衰竭的发作。在另一个实施方案中,它可以帮助评估且选择合适的治疗方案,以预防或治疗心力衰竭。

[0030] 本文公开的是用于评估个体中的心力衰竭的方法,其包括以下步骤:测量得自个体的样品中标记双糖链蛋白聚糖的浓度,任选地测量样品中一种或多种其他心力衰竭标记的浓度,和通过将双糖链蛋白聚糖浓度和任选地一种或多种其他标记的浓度与如在对照样品中确定的这种标记或这些标记的浓度比较来评估心力衰竭。

[0031] 本发明还涉及蛋白质双糖链蛋白聚糖作为心力衰竭评估中的标记分子的用途。

[0032] 进一步公开的是包含双糖链蛋白聚糖和一种或多种其他心力衰竭标记的标记组合在心力衰竭评估中的用途。

[0033] 还提供的是用于进行用于在体外评估心力衰竭的方法的试剂盒,所述方法包括以下步骤:测量样品中标记双糖链蛋白聚糖的浓度,任选地测量样品中一种或多种其他心力衰竭标记的浓度,和通过将双糖链蛋白聚糖浓度和任选地一种或多种其他标记的浓度与如在参考群体中确定的这种标记或这些标记的浓度比较来评估心力衰竭,所述试剂盒包含特异性测量双糖链蛋白聚糖和任选地一种或多种其他心力衰竭标记所需的试剂。

[0034] 本发明的另外方面和优点从以下描述中将是显而易见的。然而,应当理解详述和具体实施例虽然指出本发明的优选实施方案,但仅通过示例性方式给出,因为根据这种详述,在本发明精神和范围内的各种改变和修饰对于本领域技术人员将是显而易见的。

发明内容

[0035] 在第一个实施方案中,本发明涉及用于评估个体中的心力衰竭的方法,其包括以下步骤:a)测量得自个体的样品中标记双糖链蛋白聚糖的浓度,b)任选地测量样品中一种或多种其他心力衰竭标记的浓度,和c)通过将步骤(a)中测定的浓度和任选地步骤(b)中测定的浓度与如在对照样品中确定的这种标记或这些标记的浓度比较来评估心力衰竭。

[0036] 如本文使用的,下述术语各自具有在这个部分中与之相关的含义。

[0037] 冠词“一”(“a”和“an”)在本文中用于指一个或超过一个(即,至少一个)冠词的语法目标。例如,“一种抗体”意指一种抗体或超过一种抗体。

[0038] 表达“一个或多个”指示 1 - 50,优选 1 - 20,还优选 2、3、4、5、6、7、8、9、10、12 或 15。

[0039] 如本文使用的,术语“标记”或“生物化学标记”指用作靶的分子,所述靶用于分析患者的测试样品。在一个实施方案中,此类分子靶的实例是蛋白质或多肽。在本发明中用作标记的蛋白质或多肽被认为包括所述蛋白质天然存在的片段,特别是免疫学上可检测的片段。免疫学上可检测的片段优选包含所述标记肽的至少 6、7、8、10、12、15 或 20 个邻接氨基酸。本领域技术人员应当理解由细胞释放的或存在于细胞外基质中的蛋白质可能例如在炎症过程中被损坏,并且可能变得被降解或切割成此类片段。某些标记以无活性形式合成,这可以随后通过蛋白酶解进行活化。如技术人员应当理解的,蛋白质或其片段还可以作为复合物的部分存在。此类复合物也可以用作本发明含义中的标记。此外或可替代地,标记多肽可以携带翻译后修饰。翻译后修饰的实例尤其是糖基化、酰化和 / 或磷酸化。

[0040] 术语“评估心力衰竭”用于指示根据本发明的方法将帮助医生评估个体是否处于发生心力衰竭的危险中,或帮助医生在 HF 诊断相关性的一个或多个其他领域中评估 HF 患者。评估患有 HF 个体的诊断相关性的优选领域是心力衰竭的分期,急性和慢性心力衰竭的鉴别诊断,判断疾病发展的危险,用于选择合适药物的指导,监控对于治疗的应答和 HF 患者的随访。

[0041] “心力衰竭的标记”在本发明的含义中是这样的标记,其如果与标记双糖链蛋白聚糖组合,则增加 HF 评估中对于研究中的诊断问题的相关信息。信息被视为相关的或具有附加价值,如果在给定特异性下,用于 HF 评估的灵敏度,或分别地如果在给定灵敏度下,用于 HF 评估的特异性,可以通过将所述标记包括到已包含标记双糖链蛋白聚糖的标记组合内得到改善。优选地,分别地灵敏度或特异性中的改善在 $p = 0.05$ 、 0.02 、 0.01 或更低的显著性水平下是统计上显著的。优选地,一种或多种其他心力衰竭标记选自利钠肽标记、心肌肌钙蛋白标记和炎症标记。

[0042] 如本文使用的,术语“样品”指为了在体外评估而获得的生物学样品。在本发明的方法中,样品或患者样品优选可以包含任何体液。优选测试样品包括血液、血清、血浆、尿、唾液和滑液。优选样品是全血、血清、血浆或滑液,其中血浆或血清代表最方便类型的样品。如技术人员应当理解的,任何此类评估都在体外进行。患者样品之后被弃去。患者样品单独用于本发明的体外方法中,并且患者样品的材料不转移回患者体内。一般地,样品是液体样品,例如全血、血清或血浆。

[0043] 表达“将浓度……与如对照样品中确定的浓度比较”仅用于进一步举例说明无论如何对于技术人员显而易见的那种。对照样品可以是内部或外部对照样品。在一个实施方

案中,使用内部对照样品,即在测试样品中以及在得自相同受试者的一种或多种其他样品中评估标记水平,以测定在所述标记的水平中是否存在任何改变。在另一个实施方案中,使用外部对照样品。对于外部对照样品,源自个体的样品中标记的存在或量与其在已知患有给定病状或已知处于给定病状的危险中的个体;或已知无给定病状的个体,即“正常个体”中的存在或量比较。例如,患者样品中的标记水平可以与已知与 HF 中的特定病程相关的水平比较。通常样品的标记水平与诊断直接或间接相关,并且标记水平例如用于测定个体是否处于 HF 的危险中。可替代地,患者的标记水平可以例如与已知与下述相关的标记水平比较:HF 患者中对于治疗的应答,急性和慢性心力衰竭的鉴别诊断,用于选择合适药物以治疗 HF 的指导,判断疾病发展的危险或 HF 患者的随访中。依赖于预期诊断用途,选择合适的对照样品并且在其中确定用于标记的对照或参考值。本领域技术人员应当理解此类对照样品在一个实施方案中得自年龄匹配且没有混杂疾病的参考群体。如同样对于技术人员清楚的,对照样品中确定的绝对标记值将依赖于所使用的测定。优选地来自合适参考群体的 100 个充分表征的个体的样品用于确定对照(参考)值。还优选的是参考群体可以选自 20、30、50、200、500 或 1000 个个体。健康个体代表用于确定对照值的优选参考群体。

[0044] 双糖链蛋白聚糖

双糖链蛋白聚糖是由具有约 40 kD 分子量的核心蛋白质组成的小分泌蛋白聚糖,其由 2 条糖胺聚糖链取代。双糖链蛋白聚糖的其他名称是 BGN、DSPG1、PG-I、PG-S1、蛋白聚糖-I、SLRP1A、双聚糖蛋白聚糖(biglycan proteoglycan)、骨/软骨蛋白聚糖-I、硫酸皮肤素蛋白聚糖 I、富含亮氨酸的小蛋白质 1A。人双糖链蛋白聚糖多肽作为 368 个氨基酸(参照:SEQ ID NO:1)的前原肽(pre-propeptide)(=前体多肽)形成。氨基酸 1 - 19 代表信号肽。成熟双糖链蛋白聚糖蛋白质由 SEQ ID NO:1 的氨基酸 38-368 组成,因为氨基酸 1-37 在前原肽的加工过程中被切割掉。

[0045] 双糖链蛋白聚糖是富含亮氨酸的小蛋白聚糖(SLRP)家族成员,其特征在于重复的富含亮氨酸的氨基酸基序的存在(Fisher, L.W. 等人, J. Biol. Chem. 264 (1989) 4571-4576)。双糖链蛋白聚糖和饰胶蛋白聚糖(decorin)被认为是基因复制的结果。饰胶蛋白聚糖含有一条附着的糖胺聚糖链,而双糖链蛋白聚糖含有两条链。为此,后一种蛋白质被称为双糖链蛋白聚糖。

[0046] 双糖链蛋白聚糖已在几乎每一种人组织中发现,但在器官内不是均匀分布的。它的表达模式在不同病理学条件下改变。尽管关于双糖链蛋白聚糖的生物学作用的数据量越来越多,但它的许多生物学功能大多数可能仍是不清楚的。

[0047] 双糖链蛋白聚糖是细胞外基质的多功能组分。它与多种其他蛋白质包括生长因子(TGF- β 、TNF- α)和细胞外基质蛋白质(胶原-I 和 V、纤连蛋白、营养不良聚糖和 II 型的磷脂酶 A2)结合。这些不同结合活性可以解释双糖链蛋白聚糖在许多组织中发挥不同功能的能力。它通过与胶原纤维结合且转移生长因子- β 参与结缔组织代谢。双糖链蛋白聚糖还被描述为在神经元存活中起作用。双糖链蛋白聚糖还在骨骼骨生长/重塑中起作用。双糖链蛋白聚糖缺陷小鼠显示发生骨质疏松症样表型(Xu, T. 等人, Nat. Genet. 20 (1998) 78-82)。双糖链蛋白聚糖是关于 Happle 综合征的候选基因。双糖链蛋白聚糖显示在先兆子痫中是上调的(Gogiel, T. 等人, European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology 134 (2007) 51-56)。

[0048] 双糖链蛋白聚糖还已被描述为在肿瘤学中具有作用 / 功能。几个申请通过双糖链蛋白聚糖 mRNA 或双糖链蛋白聚糖在蛋白质水平上的差异表达进行肿瘤诊断。JP 2008072952 通过几种候选标记基因的肝内胆管上皮癌 (ICC) 进行鉴别诊断, 所述候选标记基因其中之一编码双糖链蛋白聚糖。US 2006/0210975 描述了众多基因应对于新血管发生诊断有用, 所述众多基因其中之一是双糖链蛋白聚糖。WO 2001/036674 涉及通过检测在前列腺癌中具有异常表达水平的 26 种基因中的一种或多种来检测人前列腺病症例如癌症, 所述 26 种基因其中之一是双糖链蛋白聚糖。

[0049] 双糖链蛋白聚糖可能在动脉粥样硬化中起作用 (Fedarko, N. S. 等人, J. Biol. Chem. 265(1990)12200-12209; Klezovitch, O. 和 Scanu, A. M., Trends Cardiovasc. Med. 11 (2001) 263-268)。在动脉血管中, 平滑肌细胞合成双糖链蛋白聚糖。血管中动脉粥样斑块的形成与双糖链蛋白聚糖表达的增加相关 (Riessen, R. 等人, Am. J. Pathol. 144 (1994) 962 -974)。与动脉粥样斑块相关的因子也已显示引起双糖链蛋白聚糖表达的增加 (Chang, M. Y. 等人, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 23 (2003) 809-815)。

[0050] 还显示双糖链蛋白聚糖的表达通过炎性介质一氧化氮 (NO) 下调 (Schaefer, L. 等人, J. Biol. Chem. 278 (2003) 26227-26237)。

[0051] 在实验性诱导的大鼠心力衰竭中报道了数百种基因的上调, 其中有是双糖链蛋白聚糖 mRNA (Ahmed, M. S. 等人, Cardiovascular Research 60 (2003) 557-568)。人双糖链蛋白聚糖蛋白质在转基因小鼠中的过表达导致通过蛋白组学分析的心脏基因表达中的几个改变 (Berezcki, E. 等人, J. Proteome Research 6 (2007) 854-861)。

[0052] WO 2008/084268 涉及双糖链蛋白聚糖或双糖链蛋白聚糖活性增强剂的治疗用途 (抗动脉粥样硬化和抗缺血效应) 及其在用于预防和治疗动脉粥样硬化和缺血性 (例如心脏) 疾病中的用途。US 2003/0032591 提供了通过使用双糖链蛋白聚糖作为药物中的活性成分, 用于预防或减少瘢痕形成的方法。EP 0 686 397 请求保护双糖链蛋白聚糖在神经细胞再生中的治疗效应。

[0053] 应当理解在现有技术中蛋白质双糖链蛋白聚糖在体液中的存在或水平并未已知也未暗示在心力衰竭评估中具有诊断效用。

[0054] 本发明的发明人目前已发现且可以确定如从源自个体的体液样品中测量的关于双糖链蛋白聚糖的增加值是关于心力衰竭的指示。

[0055] 如在对照组或对照群体中测量的关于双糖链蛋白聚糖的值用于例如确定截断值或参考范围。超过此类截断值或在参考范围及其较高末端外的值被视为升高的。

[0056] 在一个实施方案中, 确定固定的截断值。选择此类截断值以匹配目的诊断问题。

[0057] 在一个实施方案中, 如在对照组或对照群体中测量的关于双糖链蛋白聚糖的值用于确定参考范围。在一个优选实施方案中, 如果测量的值超过参考范围的 90% 百分位数, 双糖链蛋白聚糖浓度被视为升高的。在进一步优选的实施方案中, 如果测量的值超过参考范围的 95% 百分位数、96% 百分位数、97% 百分位数或 97.5% 百分位数, 双糖链蛋白聚糖浓度被视为升高的。

[0058] 在一个实施方案中, 对照样品将是内部对照样品。在这个实施方案中, 从研究中的个体中获得系列样品, 并且比较标记水平。这可以例如用于评估治疗功效。

[0059] 根据本发明的方法是基于得自个体的液体样品和此类样品中双糖链蛋白聚糖的

测量。如本文使用的,“个体”指单个人或非人生物。因此,本文描述的方法和组合物可应用于人和兽医学疾病。优选地个体是人类。

[0060] 优选地标记双糖链蛋白聚糖通过使用特异性结合剂从液体样品中特异性测量。

[0061] 特异性结合剂是例如双糖链蛋白聚糖的受体、与双糖链蛋白聚糖结合的凝集素或针对双糖链蛋白聚糖的抗体。特异性结合剂对于其相应靶分子具有 10^7 l/mol 的亲和力。特异性结合剂对于其相应靶分子优选地具有 10^8 l/mol 或更加优选 10^9 l/mol 的亲和力。如技术人员应当理解的,术语特异性用于指出样品中存在的其他生物分子不与对双糖链蛋白聚糖具有特异性的结合剂显著结合。优选地,与除靶分子外的生物分子的结合水平导致这样的结合亲和力,其仅为与靶分子的亲和力的 10% 或更少、更优选仅 5% 或更少。优选的特异性结合剂将满足关于亲和力以及关于特异性的上述最低限度标准。

[0062] 特异性结合剂优选地是与双糖链蛋白聚糖具有反应性的抗体。术语抗体指多克隆抗体、单克隆抗体、此类抗体的抗原结合片段、单链抗体以及包含抗体的结合结构域的遗传构建体。

[0063] 可以使用保留特异性结合剂的上述标准的任何抗体片段。抗体通过现有技术操作生成,例如,如 Tijssen 中所述的(Tijssen, P., Practice and theory of enzyme immunoassays, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam (1990), 全书,特别是第 43-78 页)。此外,技术人员充分了解基于免疫吸附剂的方法,所述免疫吸附剂可以用于抗体的特异性分离。通过这些方法,可以增强多克隆抗体的品质且从而增强其在免疫测定中的性能(Tijssen, P., 同上,第 108-115 页)。

[0064] 对于如本发明中公开的成果,可以使用在山羊中产生的多克隆抗体。然而,明显地还可以使用来自不同物种例如大鼠、兔或豚鼠的多克隆抗体,以及单克隆抗体。因为单克隆抗体可以以具有恒定性质的所需任何量产生,所以它们代表在用于临床常规的测定开发中的理想工具。

[0065] 在根据本发明的方法中针对双糖链蛋白聚糖的单克隆抗体的生成和使用分别地代表另外其他优选的实施方案。

[0066] 从天然来源中纯化双糖链蛋白聚糖并不容易。双糖链蛋白聚糖的重组生产是获得更高量的双糖链蛋白聚糖的选择方法。在一个优选实施方案中,双糖链蛋白聚糖使用真核表达系统通过重组表达产生。真核表达系统的实例是杆状病毒表达、在酵母中表达和在哺乳动物表达系统中表达。在一个优选实施方案中,双糖链蛋白聚糖的表达将在哺乳动物表达系统中进行。哺乳动物表达系统的实例是 CHO 细胞、HEK 细胞、骨髓瘤细胞等。在一个进一步优选的实施方案中,重组生产的双糖链蛋白聚糖用作针对双糖链蛋白聚糖的多或单克隆抗体生产中的抗原。还可以优选通过在双糖链蛋白聚糖免疫吸附剂上的免疫吸附来纯化多克隆抗体,利用如本文上述的重组生产的双糖链蛋白聚糖。

[0067] 如技术人员目前应当理解的,双糖链蛋白聚糖已鉴定为在 HF 评估中有用的标记,可替代方法可以用于达到与本发明的成果可比较的结果。例如,可以使用生成抗体的可替代策略。此类策略尤其包含使用合成或重组肽,其代表用于免疫接种的临床上相关的双糖链蛋白聚糖表位。可替代地,可以使用也称为 DNA 疫苗接种的 DNA 免疫接种。

[0068] 为了测量,将得自个体的液体样品与双糖链蛋白聚糖的特异性结合剂在适合于形成结合剂双糖链蛋白聚糖复合物的条件下进行温育。此类条件无需指定,因为技术人员无

需任何创造性努力即可容易地鉴定此类合适的温育条件。测量结合剂双糖链蛋白聚糖复合物的量且用于 HF 评估。如技术人员应当理解的,存在测量特异性结合剂双糖链蛋白聚糖复合物的量的众多方法,其全部在相关教科书中详细描述(参照例如 Tijssen P., 同上, 或 Diamandis, E. P. 和 Christopoulos, T. K. (编), Immunoassay, Academic Press, Boston (1996))。

[0069] 优选地,双糖链蛋白聚糖在夹心型测定形式中进行检测。在此类测定中,第一种特异性结合剂在一侧上用于捕获双糖链蛋白聚糖,并且第二种特异性结合剂在另一侧上使用,所述第二种特异性结合剂被标记以使其可被直接或间接检测。优选地,针对双糖链蛋白聚糖的抗体用于定性(双糖链蛋白聚糖存在或不存在)或定量(测定双糖链蛋白聚糖的量)免疫测定中。

[0070] 如实施例部分中详细描述的,两种小鼠模型已用于通过先进的微阵列和蛋白质组学方法鉴定在实验动物的心脏组织中发现的 mRNA 和多肽。然而,这些模型的确获得至少部分矛盾的数据,并且当然关于 mRNA 或分别的多肽的组织数据不代表这些多肽在循环中的存在或不存在。发现在一种模型中差异表达的标记可能在第二种模型中并非差异表达,或甚至在再进一步的模型中显示矛盾数据。差异表达的 mRNA 可能发现与循环中分别多肽的增强水平无关。即使蛋白质可能在组织中差异表达,但在大多数情况下如果从体液中测量,那么这种蛋白质没有任何诊断相关性,因为它可能不被释放到循环中,可能例如在从细胞或组织释放后变成被片段化或被修饰,在循环中可能不稳定,在循环中可能无法测量,可能对于给定疾病不是特异性的等等。

[0071] 本发明的发明人令人惊讶地能够检测体液样品中的蛋白质双糖链蛋白聚糖。更加令人惊讶的是,他们能够证实双糖链蛋白聚糖在得自个体的此类样品中的存在可以与 HF 相关。不需要组织和活组织检查样品,以在 HF 评估中利用标记双糖链蛋白聚糖。测量蛋白质双糖链蛋白聚糖的水平在 HF 领域中被视为非常有利的。

[0072] 在一个优选实施方案中,根据本发明的方法用血清作为液体样品材料进行实践。在一个进一步优选的实施方案中,根据本发明的方法用血浆作为液体样品材料进行实践。在一个进一步优选的实施方案中,根据本发明的方法用全血作为液体样品材料进行实践。

[0073] 在一个进一步优选的实施方案中,本发明涉及蛋白质双糖链蛋白聚糖作为标记分子在对得自个体的液体样品进行心力衰竭评估中的用途。

[0074] 用于诊断的理想情况将是这样的情形,其中单个事件或过程将引起分别的疾病,例如在传染病中。在所有其他情况下,正确诊断可以是非常困难的,特别是当疾病的病因学并未充分了解时,如在 HF 的情况下。如技术人员应当理解的,在 HF 领域中没有生物化学标记对于特定诊断问题具有 100%特异性和同时 100%灵敏度的诊断性。相反,生物化学标记以特定可能性或预测值用于评估潜在诊断问题。技术人员完全熟悉常规用于计算关于待评估诊断问题的相关危险度或可能性的数学/统计方法。在常规临床实践中,各种临床症状和生物学标记在潜在疾病的诊断、治疗和处置中一般由医生综合考虑。

[0075] 优选地在本发明的一个进一步优选的实施方案,用于 HF 评估的方法通过在 HF 评估中测量双糖链蛋白聚糖和一种或多种其他标记的浓度并且通过使用双糖链蛋白聚糖和一种或多种其他标记的浓度进行。

[0076] 在 HF 评估中,标记双糖链蛋白聚糖将在下述中的一个或多个方面帮助医生:评估

个体关于心力衰竭的危险或评估患有心力衰竭的患者,例如目的是鉴定心力衰竭的阶段、区分急性和慢性心力衰竭、判断疾病发展的危险、在选择合适治疗中提供指导、监控患者对于治疗的应答和监控病程即 HF 患者的随访。

[0077] 筛选(评估个体是否处于发生心力衰竭的危险中):

在一个优选实施方案中,本发明涉及用于评估个体是否处于发生心力衰竭的危险中的体外方法,其包括以下步骤:测量样品中标记双糖链蛋白聚糖的浓度,任选地测量样品中一种或多种其他心力衰竭标记的浓度,和通过将双糖链蛋白聚糖的浓度和任选地对于任选地一种或多种其他标记测定的浓度与这种标记或这些标记的浓度的参考值比较来评估所述患者发生心力衰竭的危险。

[0078] 在本发明含义中的筛选涉及对个体关于其发生心力衰竭的危险的无偏评估。虽然此类筛选在理论上可以对任何样品进行,但在临床实践中此类筛选选择将通常给予由于某种原因处于发生心力衰竭的危险中的个体。如上所述,此类个体可以在临床上是无症状的,即他们没有 HF 体征或症状。在一个优选实施方案中,关于 HF 的筛选将给予处于发生心力衰竭的危险中的个体,例如归入如由 ACC/AHA 实践指导确定的阶段 A 或 B。

[0079] 如上所述,心力衰竭是发达国家中最普遍、费用最高且最能威胁生命的疾病之一。因为其高普遍性及其长的无症状期,对处于发生 HF 的危险的个体的鉴定对于干预和可能时中断病程将至关重要。如果没有非常早期的危险性评估,那么预防从 HF 的无症状状态到有症状期的疾病发展看起来是不可能的。

[0080] 关于心力衰竭的危险通过技术人员充分已知且了解的数学/统计方法进行评估。优选地,个体关于心力衰竭的危险以相关术语表达且作为所谓的相对危险度(=RR)给出。为了计算关于心力衰竭的此类 RR,将个体关于双糖链蛋白聚糖的值与在参考群体中确定的双糖链蛋白聚糖的值比较,所述参考群体优选未发生心力衰竭的健康个体。还优选的是关于心力衰竭的此类 RR 评估基于在研究期间内优选在 1 年内或还优选在 2 年内已发生心力衰竭的个体组,和在相同研究期间未发生心力衰竭的个体组。

[0081] 在另一个优选实施方案中,本发明涉及标记双糖链蛋白聚糖在筛选心力衰竭中的用途。如技术人员已知的,术语“用作标记”意指标记分子的浓度通过合适方法进行定量,并且对于此类标记测量的值随后用于指示即标记疾病或临床病状的存在或不存在。用于定量的合适方法例如是特异性结合剂如抗体。

[0082] 优选地,关于 HF 的筛选将在疑似处于未来心力衰竭的危险中的个体中进行。在这个含义中处于未来心力衰竭的危险中的患者是诊断患有高血压、动脉粥样硬化疾病、糖尿病、肥胖和代谢综合征的患者。优选地,对于患有高血压、动脉粥样硬化疾病、糖尿病和/或代谢综合征的个体评估关于未来心力衰竭的危险。

[0083] 还优选的是标记双糖链蛋白聚糖在评估关于根据 ACC/AHA 实践指导在阶段 B 中的个体的未来心力衰竭危险中的用途,即显示出心脏结构改变但未显示心力衰竭症状的个体。

[0084] 在一个进一步优选的实施方案中,本发明涉及双糖链蛋白聚糖作为 HF 标记组合中的一种标记用于 HF 筛选目的的用途。

[0085] 在筛选设置中,升高水平的双糖链蛋白聚糖是关于个体发生心力衰竭的危险增加的阳性指示剂。

[0086] 患者的分期

在一个优选实施方案中,本发明涉及帮助心力衰竭患者分期的体外方法,其包括以下步骤:a)测量样品中标记双糖链蛋白聚糖的浓度,b)任选地测量样品中一种或多种其他心力衰竭标记的浓度,和通过将步骤(a)中测定的浓度和任选地步骤(b)中测定的浓度与这种标记或这些标记的浓度的参考值比较来分级心力衰竭。优选地,标记双糖链蛋白聚糖的水平用于帮助将研究个体分类为临床上“正常的”个体组(即,根据 ACA/ACC 分类法在阶段 A 中的个体),患有结构心脏病的无症状患者(根据 ACA/ACC 分类法的阶段 B)和患有心力衰竭的患者组(即,根据 ACA/ACC 分类法在阶段 C 或阶段 D 中的患者)。

[0087] 急性心脏事件和慢性心脏病之间的区分

在一个优选实施方案中,本发明涉及帮助急性心脏事件和慢性心脏病之间的鉴别诊断的体外方法,其包括以下步骤:测量样品中标记双糖链蛋白聚糖的浓度,任选地测量样品中一种或多种其他心力衰竭标记的浓度,和通过将步骤(a)中测定的浓度和任选地步骤(b)中测定的浓度与这种标记或这些标记的浓度的参考值比较来确定急性心脏事件和慢性心脏病之间的鉴别诊断。

[0088] 本领域技术人员熟悉“急性心脏事件”和“慢性心脏病”的含义。

[0089] 优选地,“急性心脏事件”指心脏的急性病状、疾病或功能失常,特别是急性心力衰竭,例如心肌梗塞(MI)或心律失常。根据 MI 的程度,它可以随后为 LVD 和 CHF。

[0090] 优选地,“慢性心脏病”是心功能的减弱,例如由于心脏的缺血、冠状动脉疾病或先前特别是小的心肌梗塞(可能随后为进行性 LVD)。它还可以是由于炎性疾病、心脏瓣膜缺损(例如,二尖瓣缺损)、扩张性心肌病、肥厚性心肌病、心节律缺陷(心律失常)和慢性阻塞性肺疾病而引起的减弱。因此,很明显慢性心脏病还可以包括这样的患者,其已患有急性冠状动脉综合征例如 MI,但目前未遭受急性心脏事件。

[0091] 区分急性心脏事件和慢性心脏病是重要的,因为急性心脏事件和慢性心脏病可能需要完全不同的治疗方案。例如,对于出现急性心肌梗塞的患者,对于再灌注的早期治疗可能至关重要。然而,对患有慢性心力衰竭的患者进行再灌注处理充其量对这个患者无害或仅具有小伤害。

[0092] 在根据本发明的一个进一步优选的实施方案中,标记双糖链蛋白聚糖用于急性和慢性心力衰竭的鉴别诊断。

[0093] 评估疾病发展的危险

在一个优选实施方案中,本发明涉及用于评估 HF 患者关于疾病发展的危险的体外方法,其包括以下步骤:测量样品中标记双糖链蛋白聚糖的浓度,任选地测量样品中一种或多种其他心力衰竭标记的浓度,和通过将双糖链蛋白聚糖的浓度和任选地对于任选地一种或多种其他标记测定的浓度与这种标记或这些标记的浓度的参考值比较来确定所述个体关于疾病发展的危险。

[0094] 目前非常难的是以合理可能性评估或甚至预测诊断有 HF 的患者是否具有更稳定或更不稳定的状态,或疾病是否发展以及患者的健康状态是否因而可能恶化。心力衰竭的严重度和发展在临床上通常通过评估临床症状或通过使用成像技术例如超声心动图鉴定不利改变来确定。在一个实施方案中,心力衰竭的恶化通过监控左心室射血分数(LVEF)来确定。LVEF 中 5%或更多的恶化被视为疾病发展。

[0095] 在一个进一步优选的实施方案中,本发明因此涉及标记双糖链蛋白聚糖在评估关于患有 HF 患者的疾病发展危险中的用途。在关于患有 HF 患者的疾病发展评估中,升高水平的双糖链蛋白聚糖是关于疾病发展的危险增加的指示剂。

[0096] 选择合适的 HF 治疗的指导

在一个优选实施方案中,本发明涉及帮助选择合适 HF 治疗的体外方法,其包括以下步骤:测量样品中标记双糖链蛋白聚糖的浓度,任选地测量样品中一种或多种其他心力衰竭标记的浓度,和通过将双糖链蛋白聚糖的浓度和任选地对于任选地一种或多种其他标记测定的浓度与这种标记或这些标记的浓度的参考值比较来选择合适的治疗。

[0097] 预期标记双糖链蛋白聚糖将帮助医生从心力衰竭领域中在手边(at hand)的各种治疗方案中选择最合适的治疗方案。因此,在一个进一步优选的实施方案中涉及标记双糖链蛋白聚糖在选择用于患有 HF 患者的治疗方案中的用途。

[0098] 监控患者对于治疗的应答

在一个优选实施方案中,本发明涉及用于监控患者对于 HF 治疗的应答的体外方法,其包括以下步骤:a) 测量样品中标记双糖链蛋白聚糖的浓度,b) 任选地测量样品中一种或多种其他心力衰竭标记的浓度,和通过将步骤(a)中测定的浓度和任选地步骤(b)中测定的浓度与这种标记或这些标记的浓度的参考值比较来监控患者对于 HF 治疗的应答。

[0099] 可替代地用于监控患者对于治疗的应答的上述方法可以通过确定关于双糖链蛋白聚糖和任选地一种或多种其他标记的治疗前和治疗后的标记水平且比较治疗前和治疗后的标记水平进行实践。

[0100] 在临床上确定心力衰竭的诊断。根据本发明,如果患者符合如由 ACC/AHA 实践指导确定的阶段 C 或 D 的标准,则 HF 被视为临床上确定。根据这些指导,阶段 C 指患有结构心脏病且具有心力衰竭的先前或目前症状的患者。在阶段 D 中的患者是患有需要专门干预的难治性心力衰竭的那些患者。

[0101] 如上文进一步指出的,对于 NT-proBNP 测量的值与心力衰竭的严重度高度相关。然而,BNP 和 NT-proBNP 看起来在监控患者对于治疗的应答中都不理想,参照例如 Beck-da-Silva, L. 等人, *Congest. Heart Fail.* 11 (2005) 248-253, quiz 254-255。

[0102] 标记双糖链蛋白聚糖看起来适合于监控患者对于治疗的应答。本发明因此还涉及双糖链蛋白聚糖在监控患者对于治疗的应答中的用途。在那个诊断领域中,标记双糖链蛋白聚糖还可以用于确定治疗前的基线值且测量在治疗后的一个时间点或几个时间点时的双糖链蛋白聚糖。在 HF 患者随访中,减少水平的双糖链蛋白聚糖是关于 HF 的有效治疗的阳性指示剂。

[0103] 标记组合

生物化学标记可以个别进行测定,或在本发明的一个优选实施方案中,它们可以使用基于芯片或珠的阵列技术中同时进行测量。生物标记的浓度随后使用关于每种标记的个别截止独立地进行说明,或它们组合用于说明,即它们形成标记组合。

[0104] 如技术人员应当理解的,可以进行将标记水平与特定可能性或危险相关的步骤且以不同方式达到。优选地,对于标记双糖链蛋白聚糖和一种或多种其他标记测量的值在数学上进行组合,并且使组合值与潜在诊断问题相关。标记值可以通过任何合适的数学方法的现有技术与双糖链蛋白聚糖的测量进行组合。

[0105] 优选地,在标记组合中应用的数学算法是逻辑函数。应用此类数学算法或此类逻辑函数的结果优选是单个值。根据潜在诊断问题,此类值可以容易地与例如个体关于心力衰竭的危险或在患有 HF 患者的评估中有帮助的其他预期诊断用途相关联。在优选方法中,此类逻辑函数通过下述获得:a)将个体分类为组,例如正常、处于心力衰竭的危险中的个体,患有急性或慢性心力衰竭的患者等等,b)通过单变量分析鉴定在这些组之间显著不同的标记,c)逻辑回归分析以评估在评估这些不同组中有用的独立区别标记值,和 d)构建逻辑函数以使独立区别值组合。在这类分析中,标记不再是独立的而代表标记组合。

[0106] 在一个优选实施方案中,用于使关于双糖链蛋白聚糖的值和至少一种进一步标记的值组合的逻辑函数通过下述获得:a)将个体分别分类为正常和处于心力衰竭的危险中的个体的组,b)确定关于双糖链蛋白聚糖的值和至少一种进一步标记的值,c)进行逻辑回归分析,和 d)构建逻辑函数以使关于双糖链蛋白聚糖的标记值和至少一种进一步标记的值组合。

[0107] 用于使标记组合与疾病关联的逻辑函数优选采用通过应用统计方法开发且获得的算法。合适的统计方法例如是判别分析(DA)(即,线性、二次、正则化 DA)、Kernel 法(即, SVM)、非参数法(即, k-最近邻分类器)、PLS(偏最小二乘法)、基于树的方法(即,逻辑回归、CART、随机森林法、Boosting/Bagging 法)、广义线性模型(即,逻辑回归)、基于主组分的方法(即, SIMCA)、广义相加模型、基于模拟逻辑学的方法、神经网络和基于遗传算法的方法。技术人员在选择合适统计方法以评估本发明的标记组合且从而获得合适的数学算法方面没有问题。优选地,用于获得在心力衰竭评估中使用的数学算法的统计方法选自 DA(即,线性、二次、正则化判别分析)、Kernel 法(即, SVM)、非参数法(即, k-最近邻分类器)、PLS(偏最小二乘法)、基于树的方法(即,逻辑回归、CART、随机森林法、Boosting Methods)、或广义线性模型(即,逻辑回归)。关于这些统计方法的细节见于下述参考文献: Ruczinski, I. 等人, J. of Computational and Graphical Statistics 12(2003)475-511; Friedman, J. H., J. of the American Statistical Association 84(1989)165-175; Hastie, T. 等人, The Elements of Statistical Learning, Springer Verlag(2001); Breiman, L. 等人, Classification and regression trees, Wadsworth International Group, California(1984); Breiman, L., Machine Learning 45(2001)5-32; Pepe, M. S., The Statistical Evaluation of Medical Tests for Classification and Prediction, Oxford Statistical Science Series, 28, Oxford University Press(2003); 和 Duda, R. O. 等人, Pattern Classification, John Wiley & Sons, Inc., 第二版(2001)。

[0108] 本发明的一个优选实施方案是使用最优化的多变量截止用于生物学标记的潜在组合,且使状态 A 与状态 B 区分,例如分别地,为正常和处于心力衰竭的危险中的个体、响应治疗和治疗失败的 HF 患者、患有急性心力衰竭的患者和患有慢性心力衰竭的 HF 患者、显示疾病发展的 HF 患者和未显示疾病发展的 HF 患者。

[0109] 接受者操作曲线下面积(=AUC)是诊断程序的性能或准确度的指示。诊断方法的准确度通过其接受者操作特征(ROC)被最佳描述(特别参见 Zweig, M. H. 和 Campbell, G., Clin. Chem. 39(1993)561-577)。ROC 曲线是起因于在观察数据的整个范围上连续改变决策阈(decision thresh-hold)的所有灵敏度/特异性对的曲线图。

[0110] 实验室测试的临床性能依赖于其诊断准确度,或使受试者正确分类为临床上相关

亚组的能力。诊断准确度测量测试正确区分被研究的受试者的 2 个不同状况的能力。此类状况是例如健康和疾病或疾病发展相对于无疾病发展。

[0111] 在每种情况下, ROC 曲线图通过绘制灵敏度相对于 $1 -$ 关于决策阈的全范围的特异性的图来描述两种分布之间的重叠。在 y 轴上是灵敏度, 或真阳性分数 [定义为 (真阳性测试结果数目) / (真阳性数目 + 假阳性测试结果数目)]。这在疾病或状况的存在下也被称为确定性 (positivity)。它由受影响亚组单独计算。在 x 轴上是假阳性分数, 或 $1 -$ 特异性 [定义为 (假阳性测试结果数目) / (真阳性数目 + 假阳性测试结果数目)]。它是特异性指数且完全由未受影响亚组计算。因为真和假阳性分数通过使用来自 2 个不同亚组的测试结果完全分开计算, 所以 ROC 曲线图不依赖于疾病在样品中的普遍性。ROC 曲线图上的每个点代表与特定决策阈对应的灵敏度 / $1 -$ 特异性对。具有最佳区分的测试 (在 2 个分布结果中无重叠) 具有经过左上角的 ROC 曲线, 而真阳性分数为 1.0, 或 100% (最佳灵敏度), 并且假阳性分数是 0 (最佳特异性)。关于无区分测试 (关于 2 个组的结果的相同分布) 的理论曲线图是从左下角到右上角的 45° 对角线。大多数曲线图介于这 2 个极端之间。(如果 ROC 曲线图完全降到 45° 对角线之下, 那么这通过使关于“确定性”的标准从“大于”倒转为“小于”容易地进行纠正, 或反之亦然。) 定性地, 曲线图与左上角越接近, 测试的总准确度越高。

[0112] 定量实验室测试的诊断准确度的一个方便目的是通过单个数目表达其性能。最常见的总体测量是 ROC 曲线下面积 (AUC)。常规来说, 这个面积总是 ≥ 0.5 (如果它不是, 那么可以将决策规则倒转以使得其如此)。值范围在 1.0 (2 个组的测试值的最佳分离) 和 0.5 (在 2 个测试值组之间没有明显分布差异) 之间。该面积不是仅依赖于曲线图的特定部分, 例如最接近于对角线的点或在 90% 特异性下的灵敏度, 而是依赖于整个曲线图。这是 ROC 曲线图如何接近于完美曲线图 (面积 = 1.0) 的定量、描述性表达。

[0113] 总测定灵敏度将依赖于实践本文公开方法所需的特异性。在特定优选设置中, 75% 的特异性可以是足够的, 并且统计方法和所得到的算法可以基于这个特异性需求。在一个优选实施方案中, 用于评估处于心力衰竭的危险中的个体的方法基于 80%、85% 或还优选 90% 或 95% 的特异性。

[0114] 如上所述, 标记双糖链蛋白聚糖帮助评估个体发生心力衰竭的危险以及患有心力衰竭患者的进一步体外诊断评估。优选实施方案因此是双糖链蛋白聚糖作为标记分子在心力衰竭评估中的用途。

[0115] 包含双糖链蛋白聚糖和一种或多种其他 HF 标记的标记组合在 HF 患者评估或处于 HF 危险的个体评估中的用途代表本发明的一个进一步优选的实施方案。在此类标记组合中, 一种或多种其他标记优选选自利钠肽标记、心肌肌钙蛋白标记和炎症标记。

[0116] 双糖链蛋白聚糖的测量可以与之组合的一种或多种优选选择的其他 HF 标记优选选自利钠肽标记、心肌肌钙蛋白标记和炎症标记。其测量优选与双糖链蛋白聚糖测量组合或形成包含双糖链蛋白聚糖的 HF 标记组合的一部分的这些优选其他标记分别在下文中更详细地讨论。

[0117] 利钠肽标记

在本发明的含义中的利钠肽标记是选自心房利钠肽 (ANP) 家族的标记或选自脑利钠肽 (BNP) 家族的标记。

[0118] 在心房利钠肽家族或脑利钠肽家族中的多肽标记源自相应活性激素的前原形式。

[0119] 根据本发明优选的利钠肽标记是 NT-proANP、ANP、NT-proBNP、BNP 及其免疫学上可检测的生理学片段。如技术人员容易理解的,免疫学上可检测的片段必须包含允许特异性检测此类生理学片段的至少一个表位。生理学片段是如天然存在于个体循环中的片段。

[0120] 2 种利钠肽家族中的标记代表相应激素原的片段,即分别为 proANP 和 proBNP。因为相似考虑应用于 2 个家族,所以仅 BNP 标记家族将相当详细地进行描述。BNP 家族的激素原,即 proBNP 由 108 个氨基酸组成。proBNP 被切割成代表生物学活性激素 BNP 的 32 个 C 末端氨基酸(77-108)和称为 N 末端 proBNP (或 NT-proBNP)的 N 末端氨基酸 1-76。BNP、N 末端 proBNP (1-76) 以及进一步的分解产物(Hunt, P. J. 等人, *Biochem. Biophys. Res. Com.* 214 (1995) 1175-1183) 在血液中循环。完全前体分子(proBNP 1-108) 是否也存在于血浆中并未完全解决。然而,描述了(Hunt, P. J. 等人, *Peptides* 18 (1997) 1475-1481) proBNP (1-108) 在血浆中的低释放是可检测的,但由于在 N 末端非常快速的部分分解,一些氨基酸不存在。今天一般公认例如对于 NT-proBNP,位于氨基酸 10 - 50 之间的分子中心部分代表生理学上相当稳定的部分。包含 NT-proBNP 的这个中心部分的 NT-proBNP 分子可以从体液中可靠地进行测量。关于基于 NT-proBNP 分子的这个中心部分的免疫学检测方法的详细公开内容在 WO 00/45176 中给出,并且对于细节读者可在那里进行参考。仅测量 NT-proBNP 特定亚部分(subfraction) 可能具有进一步的优点,对于所述 NT-proBNP 特定亚部分已提出术语天然 NT-proBNP。关于 NT-proBNP 的这个亚部分的详细公开内容见于 WO 2004/099253。技术人员将在那里找到所有必需指导。优选地,测量的 NT-proBNP 是如用来自 Roche Diagnostics, Germany 的 Elecsys® NT-proBNP 测定测量的 NT-proBNP,或与如用来自 Roche Diagnostics, Germany 的 Elecsys® NT-proBNP 测定测量的 NT-proBNP 对应。

[0121] 预分析(Preanalytics)对于 NT-proBNP 是强有力的,这允许样品容易转运至中心实验室(Mueller, T. 等人, *Clin. Chem. Lab. Med.* 42 (2004) 942-944)。血样可以在室温下贮存数天或可以邮寄或运输而无回收损失。相反, BNP 在室温下或在 4 摄氏度下贮存 48 小时导致至少 20% 的浓度损失(Mueller, T. 等人, 同上; Wu, A. H. 等人, *Clin. Chem.* 50 (2004) 867-873)。

[0122] 源自脑的利钠肽家族(特别是 BNP 和 NT-proBNP)已在关于 HF 的特定群体筛选中充分研究。对于这些标记特别是 NT-proBNP 的发现是相当鼓舞人心的。即使在无症状“患者”中升高的 NT-proBNP 值也明确指示“心脏问题”(Gremmler, B. 等人, *Exp. Clin. Cardiol.* 8 (2003) 91-94)。这些作者显示升高的 NT-proBNP 指示“心肾痛苦”的存在且应及时转诊(prompt referral)用于进一步研究。与几个其他研究组一致, Gremmler 等人也发现异常 NT-proBNP 浓度是关于群体中的 HF 排除和呼吸困难受试者中排除左心室功能障碍(=LVD)的准确诊断测试。阴性 BNP 或 NT-proBNP 值在排除 HF 或 LVD 中的作用通过其他组的研究者进行确证,参照例如 McDonagh, T. A. 等人, *Eur. J. Heart Fail.* 6 (2004) 269-273; 和 Gustafsson, F. 等人, *J. Card. Fail.* 11, Suppl. 5 (2005) S15-20。

[0123] BNP 在心室中主要地(尽管不是唯一地)产生,并且在壁张力增加后释放。因此,释放的 BNP 增加主要反映心室功能障碍或源于心房但影响心室的功能障碍,例如通过受损的流入或血容量过度负荷。与 BNP 相反, ANP 主要由心房产生且释放。ANP 的水平因此可能主要反映心房功能。

[0124] ANP 和 BNP 是活性激素,且具有比其各自的无活性对应物 NT-proANP 和 NT-proBNP 更短的半衰期。BNP 在血液中进行代谢,而 NT-proBNP 在血液中作为完整分子循环并且如此进行肾清除。NT-proBNP 的体内半衰期比 BNP 长 120 分钟,BNP 的体内半衰期是 20 分钟 (Smith, M. W. 等人, J. Endocrinol. 167 (2000) 239-246)。

[0125] 因此,依赖于目的时间过程或性质,测量利钠肽的活性或无活性形式都可以是有利的。

[0126] 在处于心力衰竭的危险中的个体评估中,对于双糖链蛋白聚糖测量的值优选与关于 NT-proANP 和 / 或 NT-proBNP 的值组合。优选地,将 NT-proBNP 的值与双糖链蛋白聚糖的值组合。类似考虑应用于选择合适疗法、判断疾病发展的危险和监控病程。

[0127] 在双糖链蛋白聚糖用于评估患者对于治疗的应答的情况下,它的测量优选与 ANP 或 BNP 的测量组合。

[0128] 在双糖链蛋白聚糖用于区分急性和慢性心力衰竭的情况下,优选标记组合包含双糖链蛋白聚糖、ANP 或 proANP 和 BNP 或 proBNP。

[0129] 心肌肌钙蛋白标记

术语心肌肌钙蛋白涉及肌钙蛋白 I 和肌钙蛋白 T 的心脏同种型。如上文已指出的,术语标记还涉及标记分子的生理学变体,如生理学片段或复合物。对于心肌肌钙蛋白标记,它们生理学上存在的复合物已知具有诊断相关性且在此明确包括。

[0130] 肌钙蛋白 T 具有约 37.000 Da 的分子量。在心脏组织中发现的肌钙蛋白 T 同种型 (cTnT) 与骨骼肌 TnT 是充分趋异的 (divergent),以允许产生区分这两种 TnT 同种型的抗体。TnT 被视为急性心肌损伤的标记;参照 Katus, H. A. 等人, J. Mol. Cell. Cardiol. 21 (1989) 1349-1353; Hamm, C. W. 等人, N. Engl. J. Med. 327 (1992) 146-150; Ohman, E. M. 等人, N. Engl. J. Med. 335 (1996) 1333-1341; Christenson, R. H. 等人, Clin. Chem. 44 (1998) 494-501; 和 EP 0 394 819。

[0131] 肌钙蛋白 I (TnI) 是在肌肉组织中发现的肌钙蛋白复合物的 25 kDa 抑制元件。TnI 在不存在 Ca^{2+} 的情况下与肌动蛋白结合,抑制肌动球蛋白的 ATP 酶活性。在心脏组织中发现的 TnI 同种型 (cTnI) 与骨骼肌 TnI 有 40% 趋异,允许 2 种同种型在免疫学上进行区分。cTnI 的正常血浆浓度是 $<0.1 \text{ ng/ml}$ (4 pM)。cTnI 在心脏细胞死亡后被释放到血流内;因此,血浆 cTnI 浓度在患有急性心肌梗塞的患者中是升高的 (Benamer, H. 等人, Am. J. Cardiol. 82 (1998) 845-850)。

[0132] 肌钙蛋白 I 和 T 的独特心脏同种型允许其与骨骼肌的其他肌钙蛋白在免疫学上进行区分。因此,肌钙蛋白 I 和 T 从受损心脏肌肉释放到血液中可以特异性涉及心脏组织的损害。目前技术人员还理解心肌肌钙蛋白可以以其游离形式或作为复合物的部分从循环中检测出 (参照例如 US 6,333,397、US 6,376,206 和 US 6,174,686)。

[0133] 在处于心力衰竭的危险中的个体评估中以及在患有心力衰竭的患者评估中,对于双糖链蛋白聚糖测量的值优选与关于肌钙蛋白 T 和 / 或肌钙蛋白 I 的心脏同种型的值组合。与标记双糖链蛋白聚糖组合使用的优选心肌肌钙蛋白是心肌肌钙蛋白 T。

[0134] 炎症标记

技术人员熟悉术语炎症标记。优选炎症标记是白介素 -6、C 反应蛋白、血清淀粉样蛋白 A 和 S100 蛋白质。

[0135] 白介素-6 (IL-6) 是 21 kDa 分泌蛋白质,其具众多生物学活性,这可以分成涉及造血作用的活性和涉及先天免疫应答激活的活性。IL-6 是急性期反应物,且刺激各种蛋白质包括粘附分子的合成。它的主要功能是介导肝脏蛋白质的急性期生产,并且它的合成由细胞因子 IL-1 和 TNF- α 诱导。IL-6 通常由巨噬细胞和 T 淋巴细胞产生。IL-6 的正常血清浓度是 < 5 pg/ml。

[0136] C 反应蛋白(CRP)是具有 21 kDa 亚基的同源五聚体 Ca^{2+} 结合急性期蛋白质,其涉及宿主防御。CRP 合成由 IL-6 诱导,并且由 IL-1 间接诱导,因为 IL-1 可以触发在肝窦状隙中肝巨噬细胞(Kuffer cells)的 IL-6 合成。CRP 的正常血浆浓度在 90% 的健康群体中是 < 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (30 nM),并且在 99% 的健康个体中是 < 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (100 nM)。血浆 CRP 浓度可以例如通过 ELISA 进行测量。

[0137] 血清淀粉样蛋白 A (=SAA)是具有 11.7 kDa 的低分子量的急性期蛋白质。它主要由肝脏响应 IL-1、IL-6 或 TNF- α 刺激而合成,且涉及 T 细胞依赖性免疫应答调节。在急性事件后,SAA 的浓度增加至高达 1000 倍,达到 1 毫克 / 毫升。它用于监控疾病中的炎症,所述疾病广泛至囊性纤维化、肾移植排斥、创伤或感染。在类风湿性关节炎中,它在特定情况下已用作 CRP 的替代物,但 SAA 仍未被广泛接受。

[0138] S100 蛋白质形成不断增加的 Ca^{2+} 结合蛋白家族,其今天包括超过 20 个成员。S100 蛋白质的生理学相关结构是同源二聚体,但某些还可以彼此形成同源二聚体,例如 S100A8 和 S100A9。细胞内功能范围从调节蛋白质磷酸化、酶活性或细胞骨架动力学到参与细胞增殖和分化。因为某些 S100 蛋白质也从细胞中释放,所以细胞外功能也得到描述,例如神经元存活、星形胶质细胞增殖、凋亡诱导和炎症性过程调节。S100A8、S100A9、异源二聚体 S100A8/A9 和 S100A12 已在炎症中发现,其中 S100A8 响应慢性炎症,而 S100A9、S100A8/A9 和 S100A12 在急性炎症中增加。S100A8、S100A9、S100A8/A9 和 S100A12 已与具有炎症组分的不同疾病关联,包括某些癌症、肾同种异体移植排斥、大肠炎和最重要地 RA (Burmeister,G. 和 Gallacchi,G., *Inflammopharmacology* 3 (1995)221-230;Foell,D. 等人, *Rheumatology* 42 (2003) 1383-1389)。用于评估处于 HF 危险中的个体或患有 HF 的患者最优选 S100 标记(例如用于根据本发明的标记组合中的)是 S100A8、S100A9、S100A8/A9 异源二聚体和 S100A12。

[0139] sE- 选择素(可溶性内皮细胞白细胞粘附分子-1,ELAM-1)是仅在内皮细胞上且仅在由炎症性细胞因子(IL-1 β 、TNF- α)或内毒素活化后表达的 115 kDa、I 型跨膜糖蛋白。细胞表面 E- 选择素是白细胞与内皮的滚动附着(白细胞在炎症部位外渗的基本步骤)介质,从而在局部炎症应答中起重要作用。可溶性 E- 选择素在健康个体的血液中发现,可能源于表面表达分子的蛋白酶解切割。在血清中升高水平的 sE- 选择素已在各种病理学条件下得到报道(Gearing, A. J. 和 Hemingway, I., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 667 (1992) 324-331)。

[0140] 在一个优选实施方案中,本发明涉及双糖链蛋白聚糖作为 HF 的标记分子与一种或多种其他 HF 标记分子组合在对得自个体的液体样品中的 HF 评估中的用途。

[0141] 如上所述,在根据本发明的优选方法中,对于双糖链蛋白聚糖测量的值至少与选自利钠肽标记、心肌肌钙蛋白标记和炎症标记的至少一种进一步标记的值组合。

[0142] 在一个优选实施方案中,本发明涉及标记组合双糖链蛋白聚糖和 NT-proBNP 在心力衰竭评估中的用途。

[0143] 在一个优选实施方案中,本发明涉及标记组合双糖链蛋白聚糖和肌钙蛋白 T 在心力衰竭评估中的用途。

[0144] 在一个优选实施方案中,本发明涉及标记组合双糖链蛋白聚糖和 CRP 在心力衰竭评估中的用途。

[0145] 在一个进一步优选的实施方案中,本发明涉及包含标记双糖链蛋白聚糖、肌钙蛋白 T、NT-proBNP 和 CRP 的标记组合。

[0146] 在另外一个进一步优选的实施方案中,本发明涉及在用于通过生物化学标记在体外评估 HF 的方法中使用的标记组(a marker panel),其包含测量样品中双糖链蛋白聚糖和一种或多种其他 HF 标记的浓度,并且在 HF 评估中使用测定的浓度。

[0147] 根据本发明的标记组优选使用蛋白质阵列技术进行测量。阵列是可寻址单个标记的集合。此类标记可以是可空间寻址的,例如在微量滴定板内含有的或在平面表面上点样的阵列,其中每个标记存在于不同 X 和 Y 坐标上。可替代地,标记可以基于标记、珠、纳米颗粒或物理性质进行寻址。微阵列可以根据普通技术人员已知的方法进行制备(参见例如,US 5,807,522 ;Robinson, W. H. 等人, Nat. Med. 8 (2002) 295-301 ;Robinson, W. H. 等人, Arthritis Rheum. 46 (2002) 885-893)。如本文使用的,阵列指具有多种可寻址标记的任何免疫学测定。在一个实施方案中,可寻址标记是抗原。在另一个实施方案中,可寻址元件是自身抗体。微阵列是小型化形式的阵列。如本文使用的,抗原指可以与抗体特异性结合的任何分子。术语自身抗体是本领域中定义明确的。

[0148] 在一个优选实施方案中,本发明涉及包含标记双糖链蛋白聚糖和任选地一种或多种其他 HF 标记的蛋白质阵列。

[0149] 在一个优选实施方案中,本发明涉及包含标记双糖链蛋白聚糖和 NT-proBNP 的蛋白质阵列。

[0150] 在一个优选实施方案中,本发明涉及包含标记双糖链蛋白聚糖和肌钙蛋白 T 的蛋白质阵列。

[0151] 在一个优选实施方案中,本发明涉及包含标记双糖链蛋白聚糖和 CRP 的蛋白质阵列。

[0152] 在一个进一步优选的实施方案中,本发明涉及包含标记双糖链蛋白聚糖、肌钙蛋白 T、NT-proBNP 和 CRP 的蛋白质阵列。

[0153] 在另外一个进一步优选的实施方案中,本发明涉及试剂盒,其包含特异性测量双糖链蛋白聚糖所需的试剂。还优选的是这样的试剂盒,其包含特异性测量双糖链蛋白聚糖所需的试剂和测量一种或多种其他心力衰竭标记所需的试剂,所述双糖链蛋白聚糖和一种或多种其他心力衰竭标记一起用于 HF 标记组合中。

[0154] 提供下述实施例、序列列表和图以帮助理解本发明,本发明的真实范围在所附权利要求中阐述。应当理解可以在所述操作中进行修改而不背离本发明的范围。

附图说明

[0155] 图 1 野生型和 R9C 小鼠的表型分析。(A) 在 24 周时期后产生关于野生型小鼠(n=79)和 R9C 小鼠(n=44)的存活曲线。(B)通过超声心动图评估的心脏缩短(= 缩短分数)。在 R9C 转基因动物中的显著功能缺损早在 8 周龄时开始。

[0156] 图 2 野生型和 AB 小鼠中的超声心动图和血液动力学参数。(A) 在手术后 2、4 和 8 周时以 mmHg 为单位的最大压力的变化。(B) 在手术后 2、4 和 8 周时在左心室射血分数 (LVEF) % 的变化 (实心环指示来自假手术小鼠的数据, 并且空心环指示来自具有主动脉绑扎 (AB) 的小鼠的数据)。

[0157] 图 3 分别在来自 242 个 HF 患者的样品和 118 个对照样品中测量的双糖链蛋白聚糖。以 ng/ml 的浓度在 y 轴上给出。分别地, 源自患有心力衰竭患者的样品标记为 HF (HF = 正方形) 和健康对照标记为 NHS (正常人血清 = NHS = 菱形)。

[0158] 图 4 分别在来自临床实践 (clinical routine) 的 HF 样品和扩展的对照组中检测的双糖链蛋白聚糖值。对于双糖链蛋白聚糖, 分别地如在源自患有心力衰竭的患者的样品 (标记 (HF)) 和来自健康对照的样品 (标记正常人血清 = NHS) 中测量, 给出计算浓度。箱须图 (box-and-whisker-blots) 显示上和下四分位数 (箱) 以及最高和最低值 (须)。

实施例

[0159] 实施例 1

心力衰竭的小鼠模型

1. 1 R9C 小鼠模型

已报道遗传性人扩张型心肌病中起因于人受磷蛋白基因 (PLN) 基因 (PLN-R9C) 中的 Arg9 至 Cys 转换 (Schmitt, J. P. 等人, Science 299 (2003) 1410-1413)。在受累患者中扩张型心肌病的发作一般在青春期过程中开始, 随后为心脏功能的进行性恶化, 导致危象和死亡。这种突变的转基因小鼠模型显示与受累患者相似的心脏表型且呈现扩张型心肌病、心脏收缩力减少和过早死亡 (Schmitt 等人, 2003, 同上)。

[0160] 我们确定了关于转基因小鼠的存活曲线。PLN-R9C 小鼠具有仅 ~ 20 周的生存中值, 其中小于 15% 持续经过 24 周 (图 1A)。在 PLN-R9C 系中第一例记录的死亡在 12 周龄时观察到, 而仅一个野生型对照小鼠经过 24 周时期死亡。8 周选择为在第一个记录死亡前的“早”期疾病的代表时间点, 而选择 16 周是因为它是 8 和 24 周之间的中点 (标准 DCM)。分离心脏的病理学详细分析显示即使在 PLN-R9C 小鼠 8 周龄时心室和心房扩大的证据。在苏木精和伊红染色后的分离心肌 (得自野生型和 PLN-R9C 小鼠横切片也显示在转基因动物中在 8 周时开始的左心室扩张或心室壁变薄的证据, 其伴随着随年龄的持续扩张发展。

[0161] 功能心脏测量通过对于 8、16 和 24 周大的雄性小鼠的超声心动图进行 (在表 1 中概括)。前和后壁厚度的超声心动图测量显示 R9C 小鼠在 8 周时具有显著扩张, 这在小鼠寿命自始至终持续恶化。如通过心脏缩短评估的 (图 1B), 收缩力在 8 周时也轻微但显著减少, 而更明显的降低到 16 周时非常明显。分析的雌性小鼠显示与雄性相同的发现 (数据未显示)。

[0162] 表 1: 在雄性小鼠中在 8、16 和 24 周时在野生型和 R9C 小鼠中的超声心动图和血液动力学参数。

	WT	R9C	WT	R9C	WT	R9C
年龄	8 周	8 周	16 周	16 周	24 周	24 周
性别	M	M	M	M	M	M
HR (bpm)	560 $\pm$ 6	567 $\pm$ 5	569 $\pm$ 5	552 $\pm$ 15	565 $\pm$ 9	502 $\pm$ 15*
AW (mm)	0.66 $\pm$ 0.01	0.60 $\pm$ 0.01*	0.70 $\pm$ 0.01	0.58 $\pm$ 0.01*	0.71 $\pm$ 0.01	0.57 $\pm$ 0.01*
PW (mm)	0.66 $\pm$ 0.01	0.61 $\pm$ 0.01*	0.70 $\pm$ 0.01	0.59 $\pm$ 0.01*	0.71 $\pm$ 0.01	0.57 $\pm$ 0.01*
LVEDD (mm)	3.82 $\pm$ 0.05	4.01 $\pm$ 0.03*	3.92 $\pm$ 0.07	5.01 $\pm$ 0.06*	3.99 $\pm$ 0.05	5.48 $\pm$ 0.08*
LVESD (mm)	1.82 $\pm$ 0.05	2.13 $\pm$ 0.04*	1.84 $\pm$ 0.06	3.36 $\pm$ 0.09*	1.89 $\pm$ 0.03	4.23 $\pm$ 0.09*
FS (%)	52.7 $\pm$ 0.9	47.6 $\pm$ 1.2*	53.1 $\pm$ 0.7	32.9 $\pm$ 1.9*	52.9 $\pm$ 1.5	22.6 $\pm$ 2.1*
VCfc (circ/s)	10.5 $\pm$ 0.2	9.1 $\pm$ 0.2*	10.5 $\pm$ 0.1	7.0 $\pm$ 0.5*	10.9 $\pm$ 0.3	5.1 $\pm$ 0.5*
PAVc (cm/s)	102.4 $\pm$ 2.4	97.8 $\pm$ 2.6	110.1 $\pm$ 3.7	85.3 $\pm$ 3.2*	111.3 $\pm$ 2.9	73.6 $\pm$ 3.1*
AVA (m/s ²)	65.7 $\pm$ 1.3	60.6 $\pm$ 1.6	66 $\pm$ 3.2	47.9 $\pm$ 2.5*	67.1 $\pm$ 3.1	40 $\pm$ 2.2*
样品 (n)	6	9	6	9	5	5

[0163] 表 1 中的值是平均值 $\pm$ SEM。在表 1 中使用的符号:HR= 心率;AW, PW= 前和后壁厚(左心室);LVEDD, LVESD= 分别地为左心室舒张和收缩末期尺度;FS= 缩短分数 = (LVEDD-LVESD)/LVEDD $\times$ 100%;ETC = 对于 HR 校正的射血时间;VCFC= 对于 HR 校正的周边缩短速度 = FS/ETC;PAVC= 对于 HR 校正的峰值主动脉速度;E- 波 = 早期充盈二尖瓣舒张期波;LVESP, LVDP= 左心室收缩和舒张末期压;+dP/dtmax= 左心室压力的最大正一阶导数;-dP/dtmax= 左心室压力的最大负一阶导数;AVA= 主动脉速度的加速度(PAVc/ 加速时间);* P <0.05 与 WT 比较。

[0164] 1.2 主动脉绑扎(AB)小鼠模型

在这个小鼠模型中通过主动脉绑扎(AB)引起的压力过度负荷诱导心脏肥大和心力衰竭。

[0165] 通过手术干预,在 C57BL 小鼠中进行压力负荷过度。升主动脉缩窄(称为主动脉绑扎)诱导特别是在左心室中的心脏肥大和心肌肌肉增长,作为对于动脉缩窄的初级应答。在这个小鼠模型的较后阶段中,心脏变得肥大且最终扩张。这个模型是充分表征的,并且已证明基于经验可以约 10-15%或更少的低死亡率高度重现。在缩窄后,这个动物模型允许评估响应血液动力学应激的左心室肥大和心力衰竭的发生过程。

[0166] 简言之,C57BL 小鼠用混合氯胺酮(90 mg/kg)和 Rompun (10 mg/Kg)进行麻醉,并且使用 25 号针结扎主动脉。假手术的小鼠经历相同手术操作,除结扎不向针拉紧外。

[0167] 实验时间点

为了检查肥大应答,绑扎动物和假手术对照在干预后 1、2、4 和 8 周时处死。心脏功能和肥大发生通过超声心动图分析进行评估,并且通过在死后检查组织学进行证实。表 2 显示关于通过超声心动图在各个时间点评估的心脏功能概述。表 2 中给出的超声心动图参数的细节是技术人员已知的,并且可以例如见于 Asahi, M. 等人,Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101 (2004) 9199-9204 和 Oudit, G. Y. 等人,Nat. Med. 9 (2003) 1187-1194。

表 2

参数	2 周假	2 周 AB	4 周假	4 周 AB	8 周假	8 周 AB
心率 (bpm)	271.6 ± 31.2	286.3 ± 39.1	275.3 ± 25.8	276.5 ± 28.1	255.5 ± 23.9	310.8 ± 18.0
最大容量 (uL)	32.2 ± 2.3	36.4 ± 3.4	36.9 ± 1.1	40.8 ± 1.6	38.1 ± 1.5	48.9 ± 4.4
最小容量 (uL)	13.7 ± 2.4	15.8 ± 3.3	14.7 ± 1.9	25.7 ± 0.9	18.4 ± 0.5	36.5 ± 3.7
收缩末期容量 (uL)	14.7 ± 2.8	16.9 ± 3.3	15.5 ± 2.1	28.0 ± 0.7	19.3 ± 0.5	40.2 ± 4.3
舒张末期容量 (uL)	30.6 ± 2.4	34.5 ± 3.2	35.2 ± 1.1	39.8 ± 1.6	36.8 ± 1.4	47.2 ± 4.1
最大压力 (mmHg)	93.1 ± 3.5	149.2 ± 4.8	92.6 ± 0.8	153.5 ± 6.1	93.6 ± 5.0	169.8 ± 10.2
最小压力 (mmHg)	4.9 ± 1.3	3.2 ± 0.4	3.6 ± 0.1	7.3 ± 3.6	4.1 ± 0.5	6.2 ± 1.9
收缩末期压力 (mmHg)	87.3 ± 4.3	139.4 ± 2.8	89.2 ± 1.0	149.6 ± 5.0	90.5 ± 4.9	168.3 ± 9.8
舒张末期压力 (mmHg)	14.0 ± 3.2	10.6 ± 2.7	13.0 ± 0.7	16.8 ± 4.8	16.5 ± 1.4	16.9 ± 3.1
每搏输出量 (uL)	18.6 ± 1.0	20.6 ± 0.7	22.2 ± 2.3	15.1 ± 1.2	19.7 ± 1.4	12.4 ± 1.0
射血分数 (%)	58.7 ± 5.1	57.9 ± 4.5	60.0 ± 5.3	36.8 ± 1.9	51.5 ± 1.6	25.8 ± 2.0
心输出量 (uL/min)	5113.5 ± 819.2	5879.1 ± 714.0	6114.8 ± 897.0	4108.6 ± 310.3	5066.0 ± 653.3	3893.8 ± 466.1
每搏功 (mmHg*uL)	1339.6 ± 134.0	2196.3 ± 94.6	1577.8 ± 134.4	1477.8 ± 99.6	1451.8 ± 130.4	1179.2 ± 104.1
动脉弹性 (Ea) (mmHg/uL)	4.8 ± 0.4	6.8 ± 0.3	4.1 ± 0.4	10.1 ± 0.7	4.7 ± 0.4	14.1 ± 1.7
最大 dPdt (mmHg/sec)	5481.6 ± 491.1	6785.3 ± 434.2	6036.0 ± 352.9	5133.2 ± 621.4	5755.8 ± 652.9	6454.4 ± 712.0
最小 dPdt (mmHg/sec)	-5049.6 ± 426.9	-7427.5 ± 685.3	-4743.3 ± 287.7	-5484.75 ± 412.2	-4564.5 ± 525.8	-7625 ± 586.5
最大 dVdt (uL/sec)	883.0 ± 61.2	758.0 ± 29.8	856.5 ± 27.4	1152.8 ± 206.3	1188.0 ± 114.1	1041.2 ± 109.6
最小 dVdt (uL/sec)	-679.6 ± 71.4	-696.3 ± 30.6	-703.5 ± 52.2	-921.0 ± 158.0	-1000.5 ± 76.8	-938.4 ± 126.2
P@最大 dVdt (mmHg)	9.0 ± 2.5	7.4 ± 2.6	4.6 ± 0.4	10.3 ± 3.4	6.2 ± 1.0	13.3 ± 4.5
P@最大 dPdt (mmHg)	44.1 ± 2.1	46.3 ± 3.5	49.0 ± 2.6	47.1 ± 2.8	49.6 ± 5.6	52.8 ± 3.6
V@最大 dPdt (uL)	31.2 ± 2.4	35.5 ± 3.5	35.0 ± 1.1	39.7 ± 1.6	37.0 ± 1.5	47.3 ± 4.4
V@最小 dPdt (uL)	14.7 ± 2.6	17.1 ± 3.2	15.6 ± 1.9	27.0 ± 0.7	19.2 ± 0.4	39.0 ± 4.3
Tau_w (msec)	11.4 ± 1.2	8.6 ± 0.7	10.7 ± 0.9	11.2 ± 1.3	11.3 ± 0.5	8.8 ± 0.4
Tau_g (msec)	15.8 ± 1.5	12.1 ± 1.2	17.5 ± 0.7	17.4 ± 1.0	17.5 ± 1.0	15.6 ± 1.0
最大功率 (mWatts)	6.4 ± 0.6	9.5 ± 0.4	6.8 ± 0.5	8.8 ± 0.5	7.3 ± 0.7	9.0 ± 0.5
前负荷调整最大功率 (mWattsul ²)	74.8 ± 16.5	85.0 ± 12.9	55.5 ± 2.4	57.3 ± 7.4	53.6 ± 3.0	46.1 ± 11.5

[0168] 除功能参数外,对在 2、4 和 8 周时来自 AB 小鼠和对照小鼠的心脏组织进行通过苏木精 / 伊红(HE)染色的组织学分析。组织学分析证实关于 AB 小鼠的预期坏死和重塑过程,而假手术小鼠中的心脏组织未显示任何显著改变。在手术后 2 周时,结扎小鼠的心室显示

显著的左心室肥大,这在 4 周后已进一步发展且在手术后 8 周时非常类似末期扩张型心肌病。

[0169] 实施例 2

微阵列分析

粗组织制剂用于微阵列分析,无需进一步分离细胞器。微阵列数据分析方法在文献中得到描述(参见例如,US 5,807,522;Robinson, W.H. 等人, Nat. Med. 8 (2002) 295-301; Robinson, W.H. 等人, Arthritis Rheum. 46 (2002) 885-893)。

[0170] 样品制备和质谱法

心脏匀浆化和细胞器分离

分离心脏,去除心房,用剃须刀片将心室小心地切碎,并且用冰冷的 PBS(磷酸盐缓冲盐水)充分清洗,以去除过量血液。使用松紧合适的手提式玻璃匀浆器将组织在 10 ml 裂解缓冲液(250 mM 蔗糖、50 mM Tris-HCl pH 7.6、1 mM MgCl₂、1 mM DDT (二硫苏糖醇)和 1 mM PMSF(苯甲基磺酰氟)中匀浆化 30 秒。所有后续步骤在 4℃下进行。裂解产物在台式离心机中以 800 x g 离心 15 分钟;上清液作为细胞溶质、线粒体和微粒体组分(fraction)的来源。含有核的团块在 8ml 裂解缓冲液中稀释,并且分层到 4 ml 0.9 M 蔗糖缓冲液(0.9 M 蔗糖、50 mM Tris-HCl pH 7.6、1 mM MgCl₂、1 mM DDT 和 1 mM PMSF)上,并且在 4℃下以 1000 x g 离心 20 分钟。使所得到的团块重悬浮于 8 ml 2M 蔗糖缓冲液(2 M 蔗糖、50 mM Tris-HCl pH 7.4、5 mM MgCl₂、1 mM DTT 和 1 mM PMSF)中,分层到 4 ml 2M 蔗糖缓冲液上,并且通过以 150,000 x g 超速离心(Beckman SW40.1 转子)1 小时形成沉淀。核作为沉淀回收。通过在 4℃下以 7500 x g 再次离心 20 分钟从上清液中分离线粒体;所得到的沉淀在裂解缓冲液中洗涤 2 次。分离线粒体后的细胞质在 Beckman SW41 转子中以 100,000 x g 超速离心 1 小时,使微粒体形成沉淀。上清液作为细胞溶质组分(= cyto)。

[0171] 细胞器提取

通过使线粒体在低渗裂解缓冲液(10 mM HEPES、pH 7.9、1 mM DTT、1 mM PMSF)中在冰上温育 30 分钟提取可溶性线粒体蛋白质。将悬浮液短暂超声处理,并且以 13,000 x g 离心 30 分钟去除碎片。上清液作为“mito 1”组分。使所得到的不溶性沉淀重悬浮于膜去污剂提取缓冲液(20 mM Tris-HCl、pH 7.8、0.4 M NaCl、15%甘油、1 mM DTT、1 mM PMSF、1.5% Triton-X-100)中,并且轻轻振荡 30 分钟,随后以 13,000 x g 离心 30 分钟;上清液作为“mito 2”组分。

[0172] 通过使微粒体重悬浮于膜去污剂提取缓冲液中来提取膜结合蛋白质。使悬浮液伴随轻轻振荡温育 1 小时,并且以 13,000 x g 离心 30 分钟去除不溶性碎片。上清液作为“micro”组分。

[0173] 细胞器提取物的消化和 MudPIT 分析

用 5 体积冰冷的丙酮在约 20℃下使来自每种组分的约 100 μg 总蛋白质(如通过 Bradford 测定而测定的)的等分试样沉淀过夜,随后以 13,000 x g 离心 15 分钟。使蛋白质沉淀在 37℃下溶解于小体积的 8 M 尿素、50 mM Tris-HCl、pH 8.5、1 mM DTT 中 1 小时,随后用 5 mM 碘乙酰胺在 37℃下在黑暗中甲酰胺甲基化 1 小时。随后用等体积的 100 mM 碳酸氢铵 pH 8.5 使样品稀释至 4 M 尿素,并且用 1:150 倍比的胞内蛋白酶 Lys-C (Roche Diagnostics, Laval, Quebec, Canada)在 37℃下消化过夜。第二天,用等体积的 50 mM 碳

酸氢铵 pH 8.5 使样品稀释至 2 M 尿素,用 CaCl₂ 补充至 1 mM 的终浓度,并且与 Poroszyme 胰蛋白酶珠(Applied Biosystems, Streetsville, Ontario, Canada)在 30℃ 下伴随旋转温育过夜。根据制造商的说明书,用 SPEC-Plus PT C18 柱体(Anslys Diagnostics, Lake Forest, CA)固相提取所得到的肽混合物,并且贮存于 -80℃ 直至进一步使用。如所述的建立全自动化 20 小时长的 12 步多循环 MudPIT 程序(Kislinger, T. 等人, Mol. Cell Proteom. 2 (2003) 96 - 106)。简言之,将 HPLC 四元泵与 LCQ DECA XP 离子陷阱质谱仪(Thermo Finnigan, San Jose, CA)连接。使用 P-2000 激光拉制器(Sutter Instruments, Novato, CA)使 100- μ m i.d. 熔凝石英毛细管微型柱(Polymicro Technologies, Phoenix, AZ)拉至细尖端,并且用 8 cm 的 5 μ m Zorbax Eclipse XDB-C18 树脂(Agilent Technologies, Mississauga, Ontario, Canada)填充,随后用 6 cm 的 5 μ m Partisphere 强阳离子交换树脂(Whatman, Clifton, NJ)填充。使用压力容器将单个样品手动装载到分开的柱上。层析溶剂条件完全地如 Kislinger, T. 等人, Mol. Cell Proteom. 2 (2003) 96 - 106 中所述。

[0174] 蛋白质鉴定和验证

SEQUEST 数据库搜索算法用于使肽串联质谱与在局部维持的最小冗余 FASTA 格式数据库中的肽序列匹配,所述数据库包含得自 Swiss-Prot/TrEMBL 和 IPI 数据库的小鼠和人蛋白质序列。为了在统计学上评估关于对照的经验假发现率且因此使假阳性鉴定降到最低,所有谱在正常(正向)和倒转(反向)氨基酸方向中针对蛋白质序列进行搜索(Kislinger, T. 等人, Mol. Cell Proteom. 2 (2003) 96 - 106)。STATQUEST 过滤算法随后应用于所有假定搜索结果,以获得关于每个候选鉴定的统计可靠性(置信度得分)测量(截止 p 值 $\leq .15$, 与正确匹配的 85% 或更大似然对应)。使用基于 Perl 的脚本,将高置信度匹配分解成内部 SQL 型数据库(in-house SQL-type database)。数据库设计为适应关于多个肽匹配与给定蛋白质的数据库搜索结果和谱信息(扫描标题(header)),连同关于样品名称、实验数目、MudPIT 步骤、细胞器来源、氨基酸序列、分子量、等电点、电荷和置信水平的信息。仅具有 95% 或更多的预测置信度 p 值和对于其总共检测出至少 2 个谱的那些蛋白质保留用于进一步分析。

[0175] 实施例 3

在模型系统中获得的数据的统计评估

3.1 用于产生关于 R9C 小鼠模型的差异表达 p 值的统计方法

用如实施例 2 中所述方法获得的原始数据由各自具有谱计数的 6190 种蛋白质组成,所有谱的总和与蛋白质相关,对于各个运行 137 次不同实验。对原始数据 6190 种蛋白质亚组实施总体归一化,这首先使每次运行中的数据分成等数目组,对于我们的分析设为 100,基于其谱计数。随后对每个组(1 - 100)进行 LOESS (Cleveland, W. S. 和 Devlin, S. J., Journal of the American Statistical Association 83 (1988) 596-610),调整跨越具有相似谱计数的一组基因在谱计数中的差异。

[0176] 基于我们的原始数据,我们构建了 2 个线性模型,第一个模型使用对照 / 疾病、时间(8W、16W、结束)和定位(cyto、micro、mitoI、mitoII)作为因子且使用下述进行描述:

$$\text{运行计数} = \beta_0 + \beta_1 \text{时间} + \beta_2 \text{时间}^2 + \beta_3 \text{定位} + \beta_4 \text{对照} \quad (1)$$

第二个模型仅使用时间(8W、16W、结束)和定位(cyto、micro、mitoI、mitoII)作为因子且使用下述进行描述:

运行计数 = $B0 + B1 \text{ 时间} + B2 \text{ 时间}^2 + B3 \text{ 定位}$ (2)

其中 $B0$ 是截距术语, 并且 $B1$ 、 $B2$ 、 $B3$ 和 $B4$ 是关于可变时间、平方时间、定位和对照 / 疾病的斜率估计值。

[0177] 使用 Anova 比较两个模型, 其中无效假设是在两个模型之间不存在差异。低 p 值随后指出不存在足够证据说明两个模型是相同的。额外信息指出状态(即, 对照 / 疾病)看起来是模型的显著组分。为了提取在我们的对照和疾病模型之间具有相对蛋白质丰度的显著改变的蛋白质, 我们将 6190 种蛋白质列表, 基于其计算的 p 值进行排序。这产生具有 p 值 < 0.05 的一组 593 种蛋白质。

[0178] 为了解释来自上述模型的多重假设检验, p 值随后使用假发现率(FDR)校正, 特别是 Benjamini-Hochberg FDR 校正(Benjamini, Y. 和 Hochberg, Y., Journal of the Royal Statistical Society B. 57 (1995) 289-300)进行校正。这对于 R9C 小鼠模型产生具有校正 p 值 < 0.05 的一组 40 种蛋白质。

[0179] 3.2 用于产生关于主动脉绑扎小鼠模型的差异表达 p 值的统计方法

从主动脉缩窄小鼠模型的 68 次实验运行中鉴定了具有谱计数的 3152 种蛋白质。将相同数据分析应用于如上文对于 R9C 小鼠模型描述的关于主动脉缩窄小鼠模型的数据集。

[0180] 实施例 4

4.1. 用于测量人血清和血浆样品中的双糖链蛋白聚糖的 ELISA

为了检测人血清或血浆中的双糖链蛋白聚糖, 开发了夹心 ELISA。为了捕获和检测抗原, 使来自 Roche 和 R&D Systems (目录号 :AF 2667) 的 2 种抗双糖链蛋白聚糖多克隆抗体的等分试样分别与生物素和地高辛缀合。为了生产 Roche 的抗双糖链蛋白聚糖抗体, 在 HEK 细胞中表达由 368 个氨基酸组成的重组双糖链蛋白聚糖蛋白质。这种抗原用于兔的免疫接种。在纯化后, 用生物素标记多克隆内部抗双糖链蛋白聚糖抗体。

[0181] 链霉抗生物素蛋白包被的 96 孔微量滴定板与 100 μl 生物素化抗双糖链蛋白聚糖多克隆抗体一起在 1x PBS 溶液中以 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 温育 60 分钟。在温育后, 将板用 1x PBS + 0.02% Tween-20 洗涤 3 次, 用 PBS + 2% BSA (牛血清白蛋白) 封闭 45 分钟, 并且随后再次用 1x PBS + 0.02% Tween-20 洗涤 3 次。孔随后与 100 μl 作为标准抗原的重组双糖链蛋白聚糖连续稀释液或分别来自患者或对照个体的稀释血清或血浆样品(在 1x PBS + 1% BSA 中 1:10)一起温育 1 小时。在双糖链蛋白聚糖结合后, 将板用 1x PBS + 0.02% Tween-20 洗涤 3 次。对于结合双糖链蛋白聚糖的特异性检测, 使孔与 100 μl 地高辛标记的抗双糖链蛋白聚糖多克隆抗体一起在 1x PBS + 1% BSA 中以 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 温育 45 分钟。其后, 板洗涤 3 次以去除未结合抗体。在下一个步骤中, 孔与 100 μl 75 mU/ml 抗地高辛-POD 缀合物(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany, 目录号 1633716)一起在 1x PBS + 1% BSA 中温育 30 分钟。板随后用如上相同洗涤缓冲液洗涤 6 次。对于抗原-抗体复合物的检测, 将孔与 100 μl ABTS 溶液(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany, 目录号 11685767)一起温育, 并且在 20 分钟后用 ELISA 读数仪在 405 和 492 nm 下测量光密度(OD)。

[0182] 4.2. 分别用患有 HF 且从临床实践中获得的患者和表面健康供体血清进行双糖链蛋白聚糖 ELISA

为了进一步评估双糖链蛋白聚糖测定在常规临床条件下的效用, 研究了一组来自 HF 患者($n=242$)的血清和来自表面健康对照患者的 118 份血清。如前文提及的, 血清在 1xPBS

+ 1% BSA 中 1:10 稀释。表 3 显示了关于这些扩展组的结果：

表 3：双糖链蛋白聚糖 ELISA 结果(具有来自临床实践的 HF 样品的组)

心力衰竭患者			正常人血清		
样品	MW Delta OD	x (因子 10) 浓 度 [ng/mL]	样品	MW Delta OD	x (因子 10) 浓 度 [ng/mL]
4143	0,493	155,4	1	0,365	87,3
4144	0,465	144,4	2	0,187	53,7
4145	0,321	86,5	3	0,237	64,2
4146	0,223	51,2	4	0,136	40,7
4150	0,370	106,1	5	0,120	35,9
4151	0,118	15,2	6	0,147	43,8
4152	0,264	65,8	7	0,138	41,5
4153	0,173	34,1	8	0,092	24,5
4154	0,199	42,8	9	0,146	43,6
4155	0,144	23,5	10	0,279	72,3
4157	0,207	45,8	11	0,175	51,0
4158	0,158	28,8	12	0,150	44,8
4159	0,395	116,3	13	0,146	43,8
4161	0,274	69,5	14	0,229	62,7
4162	0,741	255,0	15	0,205	57,7
4163	0,420	126,3	16	0,152	43,3
4164	0,174	34,4	17	0,134	38,4
4170	0,103	11,5	18	0,250	63,6
4171	0,135	20,4	19	0,148	42,3
4172	0,147	24,8	20	0,273	67,6
4173	0,272	68,6	21	0,300	72,4
4174	0,164	30,9	22	0,297	71,9
4175	0,090	8,5	23	0,193	52,5
4176	0,123	16,5	24	0,175	48,6
4178	0,300	68,4	25	0,223	58,4
4181	0,295	66,9	26	0,231	60,1

表 3	(续)		NS		
HFS					
样品	MW Delta OD	x (因子 10) 浓度 [ng/mL]	样品	MW Delta OD	x (因子 10) 浓度 [ng/mL]
4182	0,326	76,9	27	0,080	18,1
4187	0,348	84,3	28	0,184	50,5
4189	0,424	110,6	29	0,081	18,5
4190	0,594	171,9	30	0,185	50,8
4191	0,261	55,6	31	0,189	39,5
4192	1,011	336,3	32	0,127	17,8
4193	0,182	31,6	33	0,115	14,4
4194	0,752	232,2	44	0,122	16,0
4196	0,298	67,8	45	0,132	19,3
4198	0,200	36,8	46	0,073	4,7
4199	0,150	22,4	47	0,068	3,6
4200	0,419	108,6	48	0,105	12,1
4202	0,722	220,9	49	0,107	12,7
4203	0,210	39,8	50	0,093	9,3
4204	0,594	172,0	51	0,238	56,7
4205	0,322	75,4	52	0,155	27,4
4206	0,607	176,9	53	0,146	24,4
4212	0,338	80,8	54	0,202	44,1
4213	0,161	25,6	55	0,151	26,0
4588	0,224	61,7	56	0,172	33,7
4589	0,570	121,7	57	0,191	34,1
4590	0,341	83,2	58	0,324	76,1
4591	0,503	110,4	59	0,193	34,9
4594	0,240	65,0	60	0,132	17,6
4595	0,235	63,9	61	0,127	16,3
4597	0,298	75,8	62	0,110	11,7
4606	0,345	83,8	63	0,126	16,0
4607	0,357	86,0	64	0,211	40,3
4608	0,462	103,4	65	0,124	15,5
4613	0,191	54,7	66	0,099	9,1
4622	0,620	130,5	67	0,165	26,9
4623	0,306	77,2	68	0,345	83,1
4624	0,542	116,9	69	0,127	16,3
4625	0,269	70,4	70	0,285	63,6
4633	0,286	73,5	71	0,186	32,8
4640	0,274	71,2	72	0,207	38,9
4641	0,223	61,5	73	0,236	48,1
4643	0,554	118,9	74	0,103	10,1
4676	0,528	114,5	75	0,368	91,0
4677	0,494	108,9	76	0,312	80,1

表 3			NS		
HFS					
	(续)				
样品	MW Delta OD	x (因子 10) 浓度 [ng/mL]	样品	MW Delta OD	x (因子 10) 浓度 [ng/mL]
4678	0,388	91,1	77	0,222	49,1
4680	0,255	67,8	78	0,379	103,7
4681	0,306	77,2	79	0,196	40,4
4684	0,415	95,8	80	0,176	34,0
4685	0,367	83,5	81	0,152	26,5
4687	0,530	109,3	82	0,227	50,7
4688	0,228	59,5	83	0,354	95,0
4690	0,220	57,9	84	0,235	53,7
4691	0,409	90,2	85	0,142	23,1
4692	0,764	149,5	86	0,194	32,1
4693	0,384	86,2	87	0,259	52,2
4694	0,229	59,6	88	0,149	19,1
4695	0,258	65,0	89	0,140	16,6
4696	0,494	103,5	90	0,186	29,6
4697	0,317	75,2	91	0,328	75,3
4698	0,318	75,3	92	0,218	39,4
4699	0,428	93,2	93	0,351	83,1
4700	0,325	76,5	94	0,165	23,6
4701	0,274	67,9	95	0,132	14,4
4702	0,386	86,5	96	0,309	76,2
4703	0,578	117,1	97	0,411	113,1
4704	0,840	165,2	98	0,181	34,2
4705	0,367	83,4	99	0,276	65,2
4706	0,222	58,3	100	0,291	70,3
4707	0,563	114,6	101	0,152	25,2
4708	0,279	68,8	102	0,132	19,3
4711	0,182	50,1	103	0,116	14,8
4712	0,202	54,4	104	0,186	35,4
4713	0,298	72,1	105	0,349	90,5
4714	0,410	115,1	106	0,195	54,2
4715	0,281	69,3	107	0,228	61,4
4717	0,473	138,1	108	0,282	72,4
4720	0,496	146,7	109	0,409	96,4
4726	0,273	66,4	110	0,293	74,6
4728	0,760	247,4	111	0,693	154,7
4729	0,376	103,0	112	0,279	71,8
4730	0,622	194,2	113	0,296	75,1
4732	0,345	91,7	114	0,503	114,2
4736	0,302	76,6	115	0,383	91,5
4737	0,548	165,9	116	0,398	91,9

表 3			(续)		
HFS			NS		
样品	MW Delta OD	x (因子 10) 浓度 [ng/mL]	样品	MW Delta OD	x (因子 10) 浓度 [ng/mL]
4738	0,711	228,5	117	0,497	124,1
4739	0,370	219,2	118	0,302	62,2
4790	0,356	95,7	119	0,442	106,0
4795	0,392	108,8	120	0,329	70,2
4799	0,312	79,9	121	0,334	71,8
4805	0,394	109,5	122	0,244	45,0
4806	0,326	84,9	123	0,095	6,6
4807	0,197	40,9	124	0,189	29,6
4808	0,343	90,9	125	0,341	73,9
4811	0,494	145,9	126	0,342	74,1
4813	0,862	288,0	127	0,314	65,7
4815	0,887	297,9	128	0,300	61,6
4819	0,719	231,4	总计	118	
4820	0,872	292,1			
4821	0,570	174,4			
4822	0,439	125,7			
4823	0,394	109,3			
4827	0,511	152,1			
4830	1,080	376,3			
4831	0,627	186,0			
4832	0,791	251,7			
4836	0,551	156,3			
4837	0,297	64,8			
4838	0,488	132,6			
4843	0,119	11,1			
4845	0,598	174,3			
4846	0,655	197,2			
4847	0,390	97,1			
4849	0,323	73,4			
4850	0,709	218,4			
4851	0,460	122,0			
4853	0,262	53,2			
4855	0,721	223,1			
4857	0,559	159,3			
4858	0,862	281,1			
4860	0,517	143,4			
4862	0,577	166,4			
4867	0,684	208,3			
4868	0,855	278,2			
4869	0,278	59,0			

表 3 HFS	(续)	
样品	MW Delta OD	x (因子 10) 浓度 [ng/mL]
4871	0,239	45,8
4872	0,603	176,4
4873	0,361	86,7
4876	0,367	88,8
4878	0,499	136,7
4879	0,572	164,2
4880	0,396	99,0
4881	0,224	41,1
4882	0,730	226,6
4886	0,415	114,4
4889	0,897	306,2
4893	0,804	267,2
4894	0,815	271,6
4895	0,489	142,0
4896	1,009	353,6
4900	1,192	420,0
4902	1,129	406,2
4904	1,507	420,0
4905	0,218	45,6
4906	0,173	31,7
4907	0,383	102,5
4911	0,371	98,3
4912	0,368	97,3
4913	0,871	295,2
4914	0,509	149,6
4916	0,711	229,2
4917	1,434	420,0
4928	0,905	309,7
4929	1,690	420,0
4930	1,162	414,3
4937	0,645	202,9
4940	0,611	189,4
4941	1,107	396,3
4942	0,566	171,6
4943	0,178	33,3
4944	0,454	128,6
4945	0,975	339,2
4948	0,470	135,0
4949	0,823	275,2
4950	1,268	420,0

表 3 HFS	(续)	
样品	MW Delta OD	x (因子 10) 浓度 [ng/mL]
4952	0,621	138,4
4953	0,644	143,5
4954	0,651	145,0
4955	0,647	144,1
4956	1,166	374,8
4957	0,524	118,3
4961	1,004	272,0
4965	1,038	289,9
4967	0,330	81,5
4968	0,522	117,9
4971	0,513	116,2
4974	0,816	188,7
4975	1,076	322,8
4976	1,207	420,0
4977	0,996	296,4
4978	0,568	127,2
4979	0,577	128,9
4981	0,457	105,3
4982	0,562	125,9
4983	1,164	419,2
4986	0,568	127,2
4995	0,893	215,3
4996	1,015	290,8
4997	0,725	162,7
5004	0,732	164,8
5005	0,526	118,7
5008	0,615	137,1
5009	0,558	125,1
5010	0,386	92,1
5011	0,405	94,2
5012	0,588	154,8
5020	0,288	58,0
5021	0,582	152,9
5022	0,437	104,2
5023	0,423	99,9
5026	0,949	286,1
5030	0,247	45,9
5031	1,531	420,0
5034	0,983	299,2
5035	0,943	284,0

表 3	(续)	
HFS	MW	x (因子
样品	Delta OD	10) 浓度
		[ng/mL]
5036	0,566	147,5
5042	0,590	155,6
5043	0,830	241,5
5044	0,580	152,1
5045	0,885	262,3
5046	1,277	398,9
5048	0,770	219,9
5049	0,337	72,5
5050	0,385	87,8
5055	0,223	39,0
5056	1,240	374,3
5057	0,472	115,8
5058	0,459	111,7
5063	0,770	219,9
5064	0,577	151,0
5065	0,520	131,8

样品总数
目 242

在表 3 中概括的数据也在图 3 中图解显示。表 3 的数据也已用于计算图 4 中显示的箱形图。图 3 和 4 证实与在源自表面健康对照个体的血清中测量的双糖链蛋白聚糖值比较,在源自患有心力衰竭患者的血清中测量的平均双糖链蛋白聚糖值存在相当大的差异。

[0183] 实施例 5

在心力衰竭评估中的包含标记双糖链蛋白聚糖的标记组合

实施例 5.1. 标记组合 NT-proBNP 和双糖链蛋白聚糖

分别评估标记组合 NT-proBNP 和双糖链蛋白聚糖,用于区分阶段 B 和阶段 C 加上 D 中的患者。通过分析得自充分表征的个体组的个体液体样品(即根据 ACA/ACC 关于 HF 分类标准在阶段 B 中的 50 个个体和患有 HF 且根据 ACA/ACC 关于 HF 分类标准具有阶段 C 的 50 个患者)来评估诊断准确度。通过商购可得的测定(Roche Diagnostics, NT-proBNP-assay (目录号 03 121 640 160 用于 Elecsys® Systems 免疫测定分析仪)测量的 NT-proBNP 和如上所述测量的双糖链蛋白聚糖在得自这些个体各自中的血清样品中进行定量。根据 Zweig, M. H. 和 Campbell, G., 同上进行 ROC 分析。通过正则化判别分析(Friedman, J. H., Regularized Discriminant Analysis, Journal of the American Statistical Association 84(1989) 165-175)计算关于双糖链蛋白聚糖与确定标记 NT-proBNP 的组合用于区分阶段 C 中的患者与阶段 B 中的患者的区分能力。

[0184] 实施例 5.2 标记组合肌钙蛋白 T 和双糖链蛋白聚糖

分别评估标记组合肌钙蛋白 T 和双糖链蛋白聚糖,用于区分患有急性心脏事件的患者

与患有慢性心脏病的患者。通过分析得自充分表征的个体组的个体液体样品(即诊断为患有急性心脏事件的 50 个个体和诊断为患有慢性心脏病的 50 个个体)来评估诊断准确度。如通过商购可得的测定(目录号 201 76 44 用于 Elecsys[®] Systems 免疫测定分析仪)测量的肌钙蛋白 T 和如上所述测量的双糖链蛋白聚糖在得自这些个体各自中的血清样品中进行定量。根据 Zweig, M. H. 和 Campbell, G., 同上进行 ROC 分析。通过正则化判别分析(Friedman, J. H., Regularized Discriminant Analysis, Journal of the American Statistical Association 84 (1989) 165-175) 计算关于双糖链蛋白聚糖与确定标记肌钙蛋白 T 的组合用于区分阶段 C 中的患者与阶段 B 中的患者的区分能力。

[0185] 实施例 5.3 标记组合双糖链蛋白聚糖和 CRP

分别评估标记组合 C 反应蛋白和双糖链蛋白聚糖, 用于区分诊断为具有心肌病患者与未患有任何混杂心脏病的对照比较。通过分析得自充分表征的具有心肌病的 50 个个体和 50 个健康对照个体组的个体液体样品, 评估诊断准确度。如通过商购可得的测定(Roche Diagnostics, CRP-测定(Tina-quant C-reactive protein(latex)high sensitive assay - Roche 目录号 11972855 216)测量的 CRP 和如上所述测量的双糖链蛋白聚糖在得自这些个体各自中的血清样品中进行定量。根据 Zweig, M. H. 和 Campbell, G., 同上进行 ROC 分析。通过正则化判别分析(Friedman, J. H., Regularized Discriminant Analysis, Journal of the American Statistical Association 84 (1989) 165-175) 计算关于双糖链蛋白聚糖与确定标记 CRP 的组合用于区分阶段 C 中的患者与阶段 B 中的患者的区分能力。

[0186] 尽管本发明已为了清楚和理解进行相当详细的描述, 但本领域技术人员应当理解根据本公开内容的阅读, 可以进行形式和细节的各种改变, 而不背离在所附权利要求中的本发明的真实范围。

[0187] 所有出版物、专利和申请在此整体引入作为参考, 其程度与每个此类参考文献特别且单独地指出整体引入作为参考相同。

序列表

<110> Roche Diagnostics GmbH
University of Toronto
F. Hoffmann-La Roche AG

<120> 双糖链蛋白聚糖在心力衰竭评估中的用途

<130> 25425 WO

<150> EP08018196

<151> 2008-10-17

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 368

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Met Trp Pro Leu Trp Arg Leu Val Ser Leu Leu Ala Leu Ser Gln Ala
1 5 10 15

Leu Pro Phe Glu Gln Arg Gly Phe Trp Asp Phe Thr Leu Asp Asp Gly
20 25 30

Pro Phe Met Met Asn Asp Glu Glu Ala Ser Gly Ala Asp Thr Ser Gly
35 40 45

Val Leu Asp Pro Asp Ser Val Thr Pro Thr Tyr Ser Ala Met Cys Pro
50 55 60

Phe Gly Cys His Cys His Leu Arg Val Val Gln Cys Ser Asp Leu Gly
65 70 75 80

Leu Lys Ser Val Pro Lys Glu Ile Ser Pro Asp Thr Thr Leu Leu Asp
85 90 95

Leu Gln Asn Asn Asp Ile Ser Glu Leu Arg Lys Asp Asp Phe Lys Gly
100 105 110

Leu Gln His Leu Tyr Ala Leu Val Leu Val Asn Asn Lys Ile Ser Lys
115 120 125

Ile His Glu Lys Ala Phe Ser Pro Leu Arg Lys Leu Gln Lys Leu Tyr
130 135 140

Ile Ser Lys Asn His Leu Val Glu Ile Pro Pro Asn Leu Pro Ser Ser
145 150 155 160

Leu Val Glu Leu Arg Ile His Asp Asn Arg Ile Arg Lys Val Pro Lys
165 170 175

Gly Val Phe Ser Gly Leu Arg Asn Met Asn Cys Ile Glu Met Gly Gly
180 185 190

Asn Pro Leu Glu Asn Ser Gly Phe Glu Pro Gly Ala Phe Asp Gly Leu
195 200 205

Lys Leu Asn Tyr Leu Arg Ile Ser Glu Ala Lys Leu Thr Gly Ile Pro

210	215	220	
Lys Asp Leu Pro Glu Thr Leu Asn Glu Leu His Leu Asp His Asn Lys			
225	230	235	240
Ile Gln Ala Ile Glu Leu Glu Asp Leu Leu Arg Tyr Ser Lys Leu Tyr			
245	250		255
Arg Leu Gly Leu Gly His Asn Gln Ile Arg Met Ile Glu Asn Gly Ser			
260	265		270
Leu Ser Phe Leu Pro Thr Leu Arg Glu Leu His Leu Asp Asn Asn Lys			
275	280		285
Leu Ala Arg Val Pro Ser Gly Leu Pro Asp Leu Lys Leu Leu Gln Val			
290	295		300
Val Tyr Leu His Ser Asn Asn Ile Thr Lys Val Gly Val Asn Asp Phe			
305	310	315	320
Cys Pro Met Gly Phe Gly Val Lys Arg Ala Tyr Tyr Asn Gly Ile Ser			
325	330		335
Leu Phe Asn Asn Pro Val Pro Tyr Trp Glu Val Gln Pro Ala Thr Phe			
340	345		350
Arg Cys Val Thr Asp Arg Leu Ala Ile Gln Phe Gly Asn Tyr Lys Lys			
355	360	365	

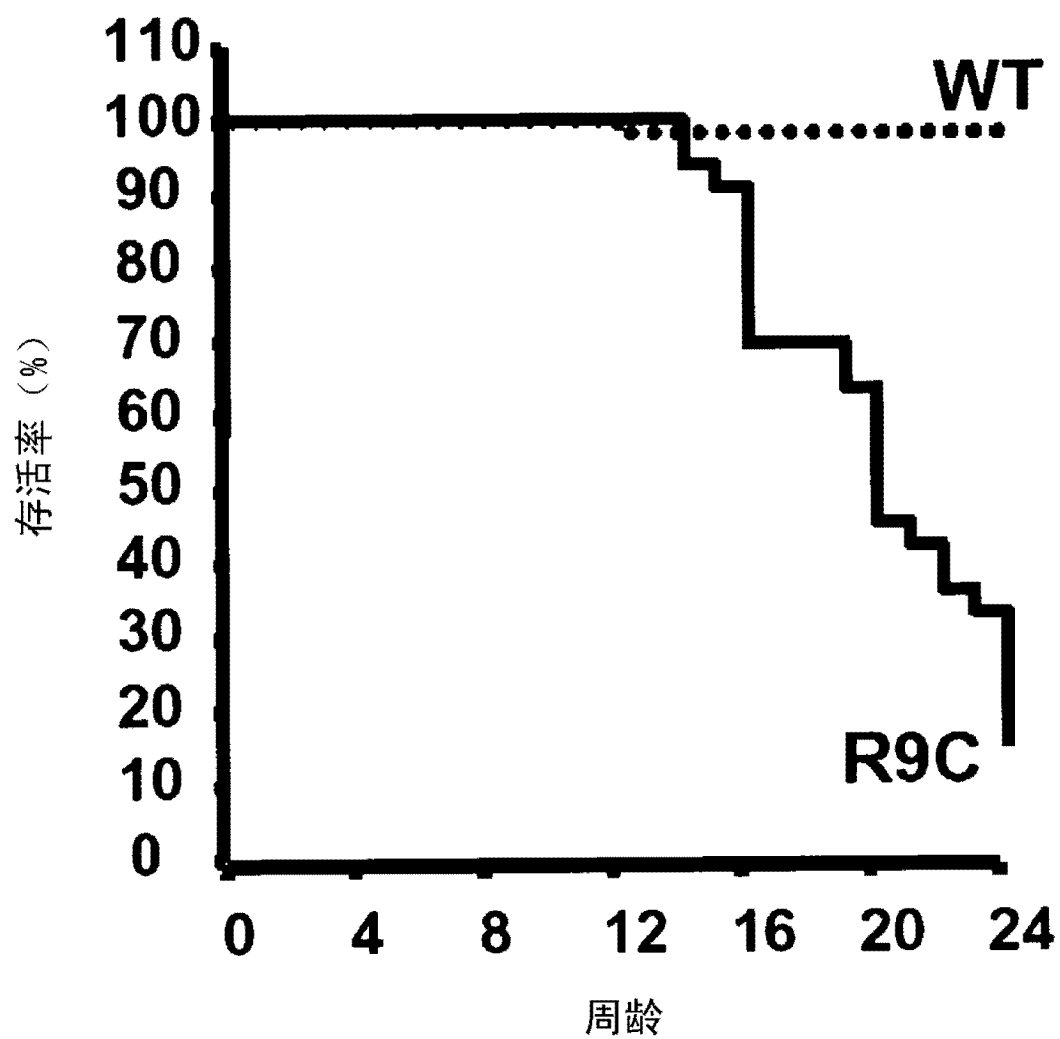


图 1A

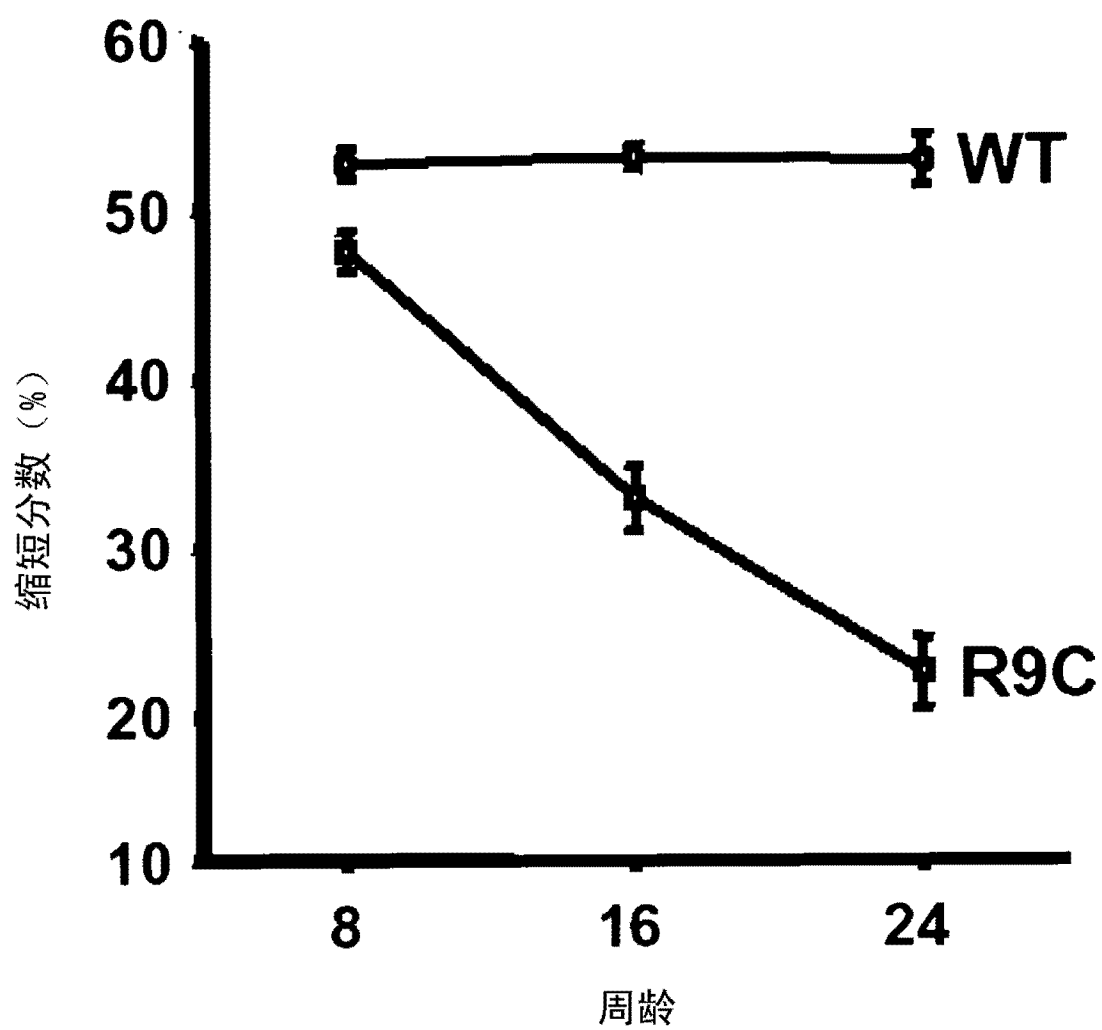


图 1B

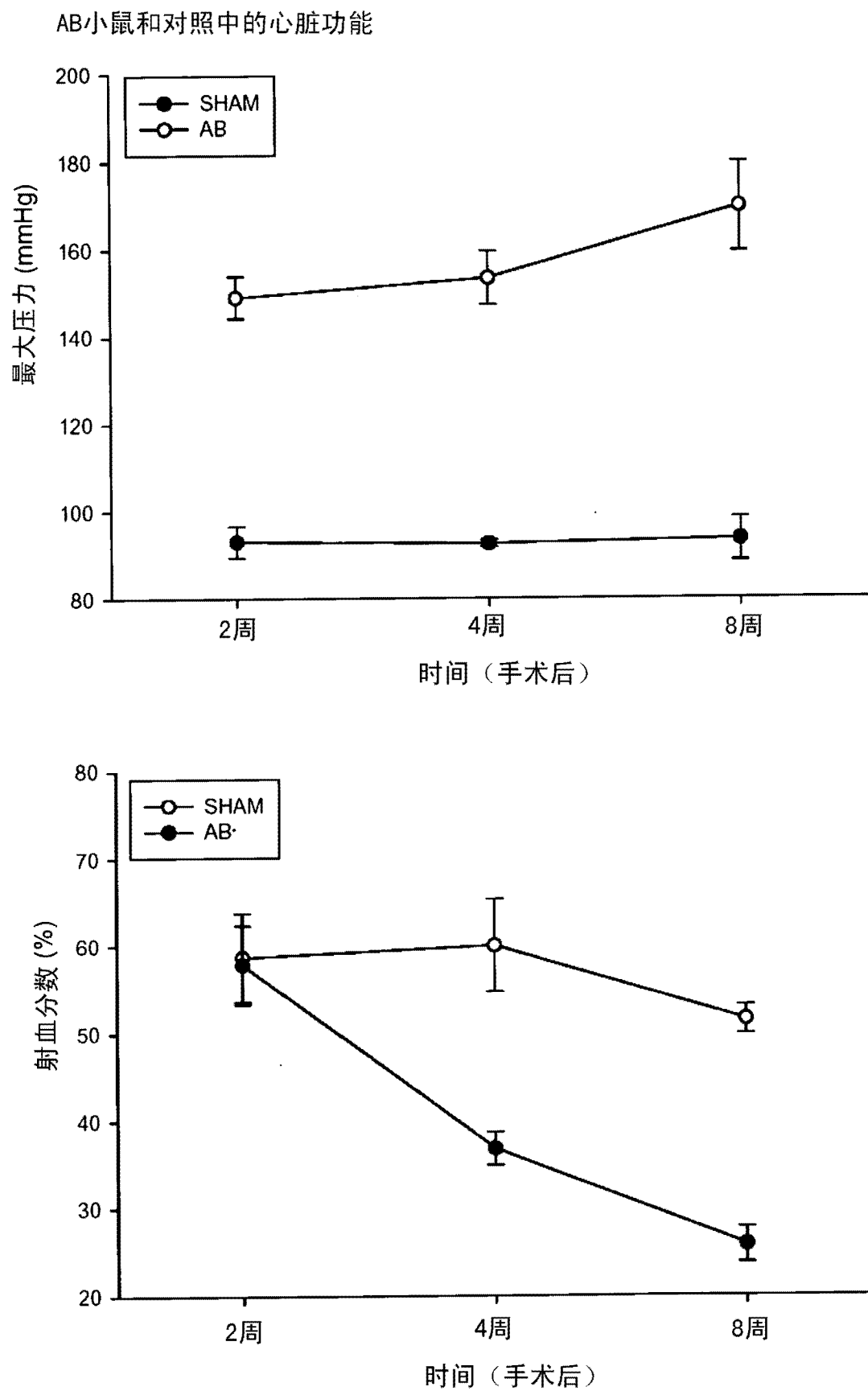
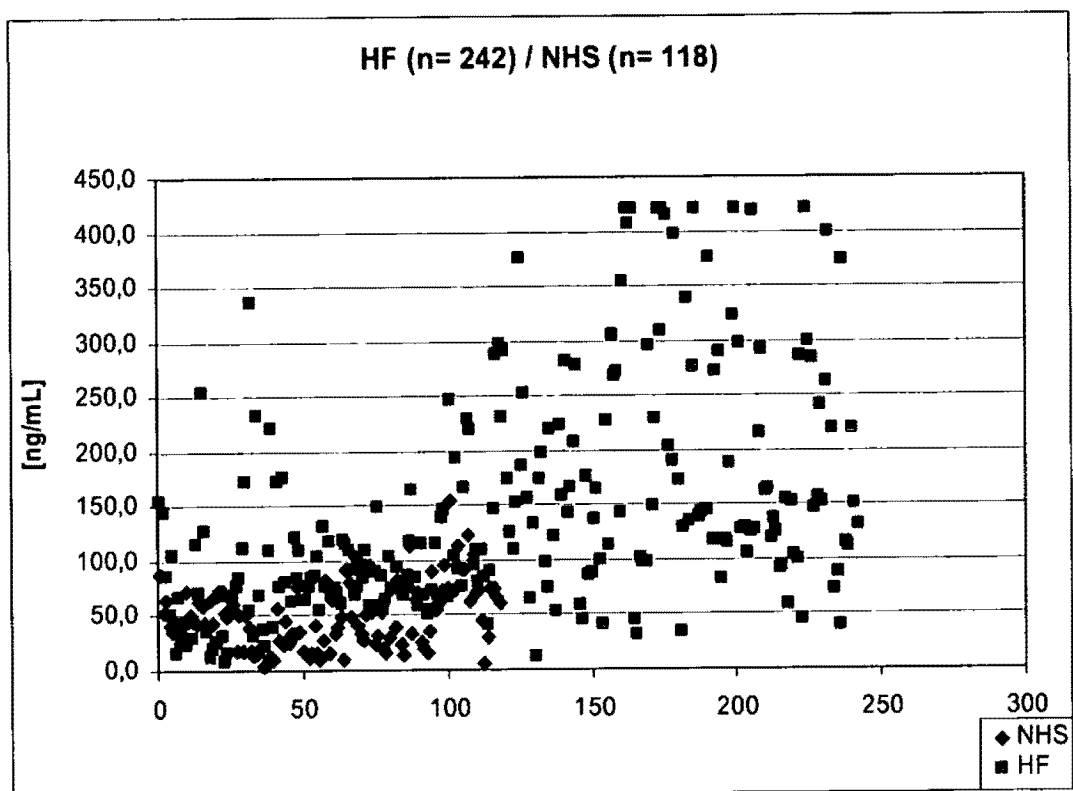


图 2



NHS n= 118

图 3

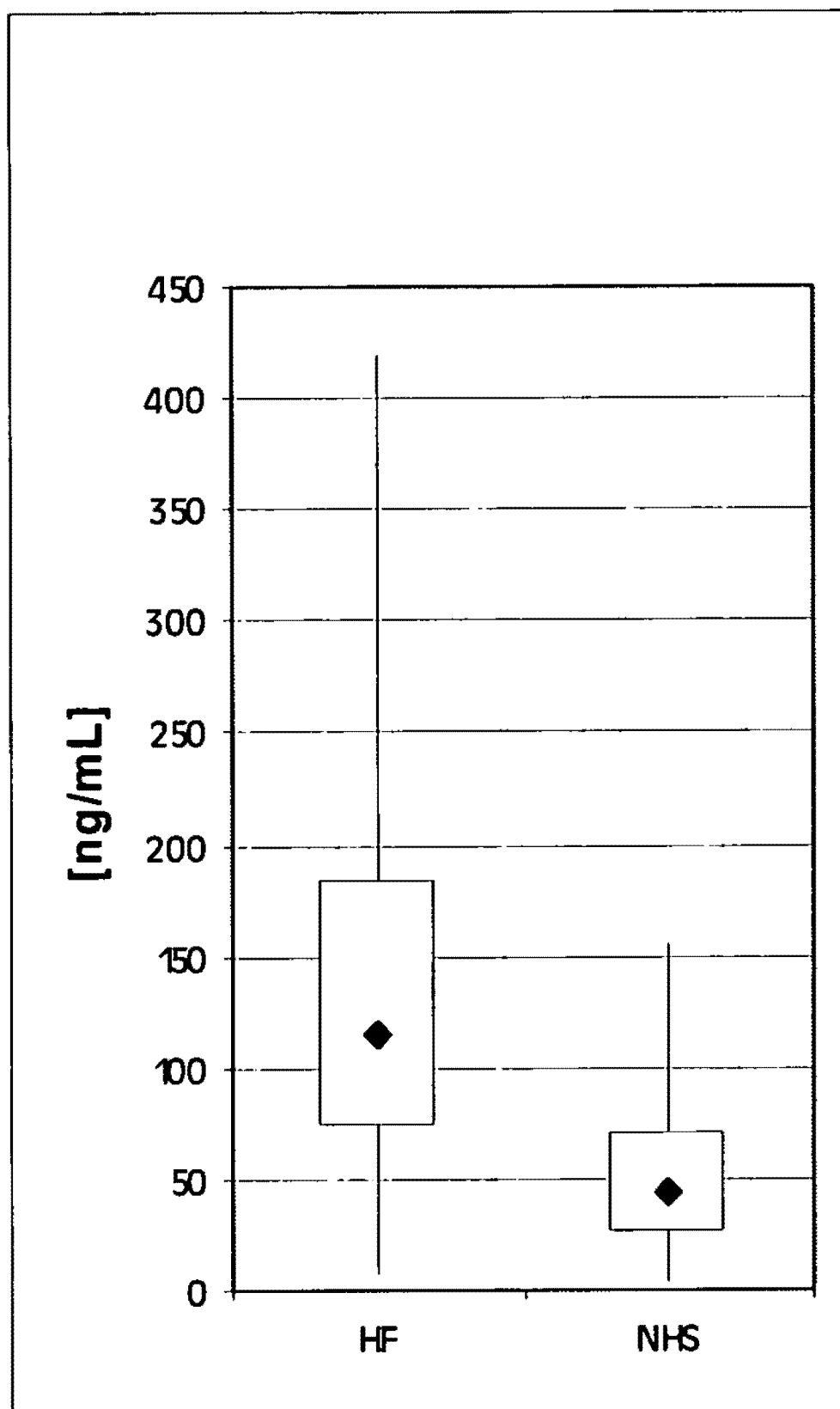


图 4