



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 106461685 B

(45) 授权公告日 2021.05.25

(21) 申请号 201580031908.1

(22) 申请日 2015.06.16

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 106461685 A

(43) 申请公布日 2017.02.22

(30) 优先权数据
62/012,543 2014.06.16 US
14/677,595 2015.04.02 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2016.12.14

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2015/063492 2015.06.16

(87) PCT国际申请的公布数据
W02015/193325 EN 2015.12.23

(73) 专利权人 佐拉生物科学公司
地址 芬兰艾斯堡

(72) 发明人 雷约·拉克索宁

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限公司 11240

代理人 沈敬亭 李海霞

(51) Int.Cl.
G01N 33/92 (2006.01)

(56) 对比文件
WO 2012136856 A1, 2012.10.11
WO 2013068374 A2, 2013.05.16
WO 2011092285 A2, 2011.08.04
WO 2013014286 A2, 2013.01.31
WO 2014060486 A1, 2014.04.24
CN 102971633 A, 2013.03.13
CN 103154742 A, 2013.06.12
Kirill Tarasov 等. Molecular Lipids Identify Cardiovascular Risk and Are Efficiently Lowered by Simvastatin and PCSK9 Deficiency.《J. Clin. Endocrinol. Metab.》.2013,第99卷(第1期),第E45-E52页.

审查员 周洋

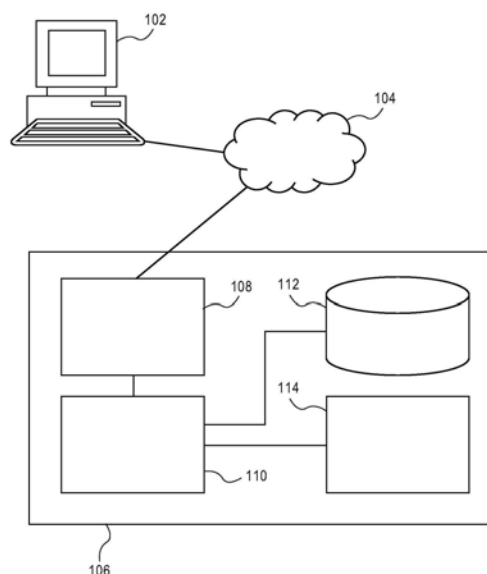
权利要求书8页 说明书36页 附图4页

(54) 发明名称

神经酰胺及其在诊断CVD中的应用

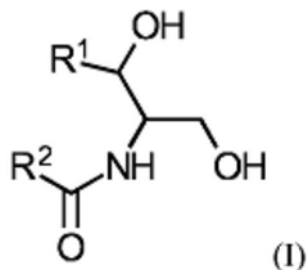
(57) 摘要

本发明具体地提供了通过确定生物样品中至少一种A组神经酰胺和至少一种B组神经酰胺的浓度并将那些浓度与对照相比较来预测CV并发症,如AMI、ACS、中风和CV死亡的方法及其应用。发现至少一种A组神经酰胺浓度降低和至少一种B组神经酰胺浓度升高表明受试者发展一种或多种CV并发症的风险升高。还提供了以下领域:新鉴别的神经酰胺分子亚类、其标记形式以及包含它们的试剂盒和组合物,用于在预测和/或诊断CV并发症中使用。



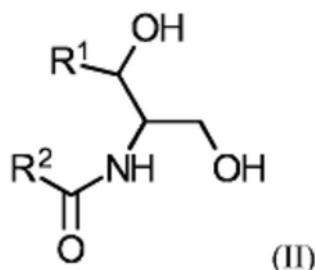
1. 至少一种式I所示的神经酰胺和至少两种式II所示的神经酰胺在制备用于确定人受试者是否具有发展一种或多种心血管 (CV) 并发症的风险的试剂或试剂盒中的应用, 其中所述一种或多种CV并发症是急性心肌梗塞、急性冠状动脉综合征、中风或CV死亡中的一种或多种, 且其中所述确定包括

(a) 确定获自所述人受试者的生物样品中至少一种式I所示的神经酰胺的浓度:



其中R¹为具有13个碳原子的单不饱和烷基链或者具有15个碳原子的饱和、单不饱和或双不饱和烷基链, 并且其中R²为具有21-25个碳原子的饱和烷基链;

(b) 确定获自所述人受试者的生物样品中至少两种式II所示的神经酰胺的浓度:



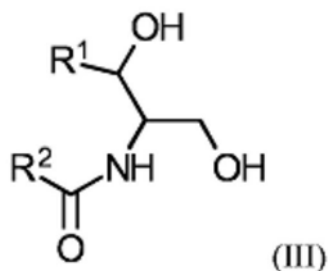
其中R¹为具有13个碳原子的直链单不饱和烷基链或者具有15个碳原子的饱和、单不饱和或双不饱和烷基链, 并且其中R²为具有15或17个碳原子的饱和烷基链、具有21-23个碳原子的单不饱和烷基链或具有23或25个碳原子的双不饱和烷基链;

(c) 将所述至少一种式I所示的神经酰胺的浓度和所述至少两种式II所示的神经酰胺的浓度与对照样品相比; 和

(d) 与所述对照样品相比, 如果所述生物样品含有降低浓度的所述至少一种式I所示的神经酰胺和提高浓度的所述至少两种式II所示的神经酰胺, 则确定所述受试者具有发展一种或多种CV并发症的升高风险, 并且其中所述生物样品为血液样品、血清样品、血浆样品或由此获得的脂蛋白部分。

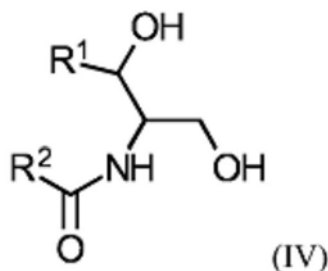
2. 至少一种式III所示的神经酰胺和至少一种式IV所示的神经酰胺在制备用于确定人受试者是否具有发展一种或多种心血管 (CV) 并发症的风险的试剂或试剂盒中的应用, 其中所述一种或多种CV并发症是急性心肌梗塞、急性冠状动脉综合征、中风或CV死亡中的一种或多种, 且其中所述确定包括

(a) 确定获自所述人受试者的生物样品中至少一种式III所示的神经酰胺的浓度:



其中 R^1 为具有13个碳原子的单不饱和烷基链或者具有15个碳原子的双不饱和烷基链，并且其中 R^2 为具有21-23或25个碳原子的饱和烷基链；

(b) 确定来自所述人受试者的生物样品中至少一种式IV所示的神经酰胺的浓度：



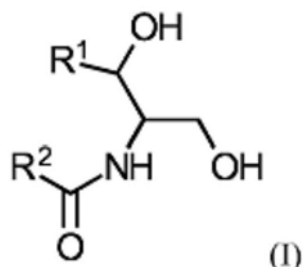
其中 R^1 为具有13个碳原子的单不饱和烷基链而 R^2 为具有15或17个碳原子的饱和烷基链、具有23个碳原子的单不饱和烷基链或具有23个碳原子的双不饱和烷基链；或者其中 R^1 为具有15个碳原子的双不饱和烷基链而 R^2 为具有15或17个碳原子的饱和烷基链、具有21-23个碳原子的单不饱和烷基链或具有23个碳原子的双不饱和烷基链；

(c) 将所述至少一种式III所示的神经酰胺的浓度和所述至少一种式IV所示的神经酰胺的浓度与对照样品相比；和

(d) 与所述对照样品相比，如果所述生物样品含有降低浓度的所述至少一种式III所示的神经酰胺和提高浓度的所述至少一种式IV所示的神经酰胺，则确定所述人受试者具有发展一种或多种CV并发症的升高风险，并且其中所述生物样品为血液样品、血清样品、血浆样品或由此获得的脂蛋白部分。

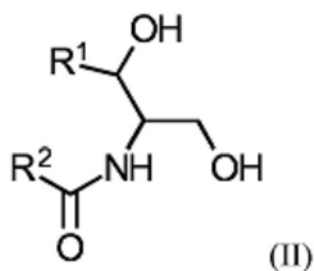
3. 至少一种式I所示的神经酰胺和至少两种式II所示的神经酰胺在制备用于评价人受试者中心血管疾病(CVD)和/或一种或多种其并发症的治疗有效性的试剂或试剂盒中的应用，其中所述一种或多种CV并发症是急性心肌梗塞、急性冠状动脉综合征、中风或CV死亡中的一种或多种，且其中所述评价包括：

(a) 确定获自所述人受试者的生物样品中至少一种式I所示的神经酰胺的浓度：



其中 R^1 为具有13个碳原子的单不饱和烷基链或者具有15个碳原子的饱和、单不饱和或双不饱和烷基链，并且其中 R^2 为具有21-25个碳原子的饱和烷基链；

(b) 确定来自所述人受试者的生物样品中至少两种式II所示的神经酰胺的浓度：



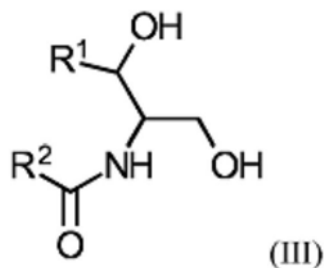
其中 R^1 为具有13个碳原子的单不饱和烷基链或者具有15个碳原子的饱和、单不饱和或双不饱和烷基链,并且其中 R^2 为具有15或17个碳原子的饱和烷基链、具有21-23个碳原子的单不饱和烷基链或具有23或25个碳原子的双不饱和烷基链;

(c) 将所述至少一种式I所示的神经酰胺的浓度和所述至少两种式II所示的神经酰胺的浓度与对照样品相比;和

(d) 与所述对照样品相比,如果所述样品含有升高浓度的所述至少一种式I所示的神经酰胺和降低浓度的所述至少两种式II所示的神经酰胺,则确定所述治疗是有效的,并且其中所述生物样品为血液样品、血清样品、血浆样品或由此获得的脂蛋白部分。

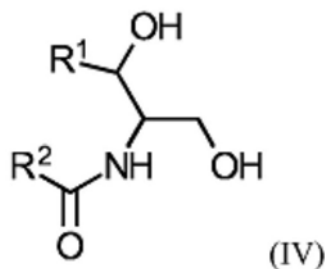
4. 至少一种式III所示的神经酰胺和至少一种式IV所示的神经酰胺在制备用于评价人受试者中心血管疾病(CVD)和/或一种或多种其并发症的治疗有效性的试剂或试剂盒中的应用,其中所述一种或多种CVD并发症是急性心肌梗塞、急性冠状动脉综合征或中风中的一种或多种,且其中所述评价包括:

(a) 确定获自所述人受试者的生物样品中至少一种式III所示的神经酰胺的浓度:



其中 R^1 为具有13个碳原子的单不饱和烷基链或者具有15个碳原子的双不饱和烷基链,并且其中 R^2 为具有21-23或25个碳原子的饱和烷基链;

(b) 确定来自所述人受试者的生物样品中至少一种式IV所示的神经酰胺的浓度:



其中 R^1 为具有13个碳原子的单不饱和烷基链而 R^2 为具有15或17个碳原子的饱和烷基链、具有23个碳原子的单不饱和烷基链或具有23个碳原子的双不饱和烷基链;或者其中 R^1 为具有15个碳原子的双不饱和烷基链而 R^2 为具有15或17个碳原子的饱和烷基链、具有21-23个碳原子的单不饱和烷基链或具有23个碳原子的双不饱和烷基链;

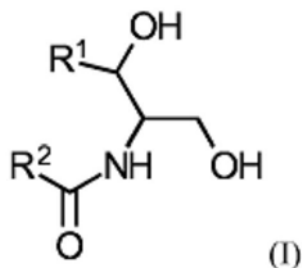
(c) 将所述至少一种式III所示的神经酰胺的浓度和所述至少一种式IV所示的神经酰

胺的浓度与对照样品相比;和

(d) 与所述对照样品相比,如果所述样品含有升高浓度的所述至少一种式III所示的神经酰胺和降低浓度的所述至少一种式IV所示的神经酰胺,则确定所述治疗是有效的,并且其中所述生物样品为血液样品、血清样品、血浆样品或由此获得的脂蛋白部分。

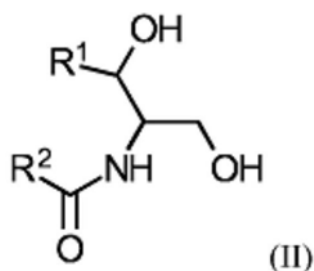
5. 至少一种式I所示的神经酰胺和至少两种式II所示的神经酰胺在制备用于在人受试者中选择心血管疾病 (CVD) 和/或一种或多种其并发症的适合治疗的试剂或试剂盒中的应用,其中所述一种或多种CV并发症是急性心肌梗塞、急性冠状动脉综合征、中风或CV死亡中的一种或多种,且其中所述选择包括:

(a) 确定获自所述人受试者的生物样品中至少一种式I所示的神经酰胺的浓度:



其中R¹为具有13个碳原子的单不饱和烷基链或者具有15个碳原子的饱和、单不饱和或双不饱和烷基链,并且其中R²为具有21-25个碳原子的饱和烷基链;

(b) 确定来自所述人受试者的生物样品中至少两种式II所示的神经酰胺的浓度:



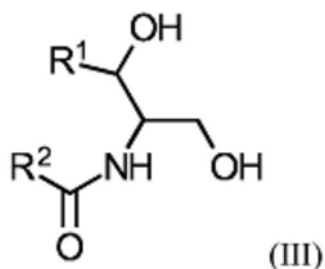
其中R¹为具有13个碳原子的单不饱和烷基链或者具有15个碳原子的饱和、单不饱和或双不饱和烷基链,并且其中R²为具有15或17个碳原子的饱和烷基链、具有21-23个碳原子的单不饱和烷基链或具有23或25个碳原子的双不饱和烷基链;

(c) 将所述至少一种式I所示的神经酰胺的浓度和所述至少两种式II所示的神经酰胺的浓度与对照样品相比;和

(d) 与所述对照样品相比,如果所述样品含有降低浓度的所述至少一种式I所示的神经酰胺和提高浓度的所述至少两种式II所示的神经酰胺,则确定所述人受试者需要治疗或需要改变或补充已施用的治疗,并且其中所述生物样品为血液样品、血清样品、血浆样品或由此获得的脂蛋白部分。

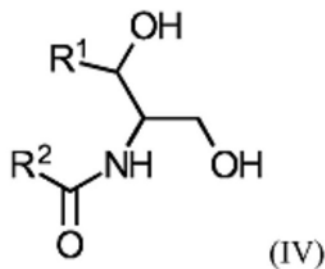
6. 至少一种式III所示的神经酰胺和至少一种式IV所示的神经酰胺在制备用于在人受试者中选择心血管疾病 (CVD) 和/或一种或多种其并发症的适合治疗的试剂或试剂盒中的应用,其中所述一种或多种CVD并发症是急性心肌梗塞、急性冠状动脉综合征或中风中的一种或多种,且其中所述选择包括:

(a) 确定获自所述人受试者的生物样品中至少一种式III所示的神经酰胺的浓度:



其中R¹为具有13个碳原子的单不饱和烷基链或者具有15个碳原子的双不饱和烷基链，并且其中R²为具有21-23或25个碳原子的饱和烷基链；

(b) 确定来自所述人受试者的生物样品中至少一种式IV所示的神经酰胺的浓度：



其中R¹为具有13个碳原子的单不饱和烷基链而R²为具有15或17个碳原子的饱和烷基链、具有23个碳原子的单不饱和烷基链或具有23个碳原子的双不饱和烷基链；或者其中R¹为具有15个碳原子的双不饱和烷基链而R²为具有15或17个碳原子的饱和烷基链、具有21-23个碳原子的单不饱和烷基链或具有23个碳原子的双不饱和烷基链；

(c) 将所述至少一种式III所示的神经酰胺的浓度和所述至少一种式IV所示的神经酰胺的浓度与对照样品相比；和

(d) 与所述对照样品相比，如果所述样品含有降低浓度的所述至少一种式III所示的神经酰胺和提高浓度的所述至少一种式IV所示的神经酰胺，则确定所述人受试者需要治疗或需要改变或补充已施用的治疗，并且其中所述生物样品为血液样品、血清样品、血浆样品或由此获得的脂蛋白部分。

7. 根据权利要求1、3或5中任一项所述的应用，其中所述至少两种式II所示的神经酰胺是以下式II所示的神经酰胺中的至少两种：Cer (d18:1/16:0)、Cer (d18:1/18:0) 和Cer (d18:1/24:1)。

8. 根据权利要求7所述的应用，其中所述至少一种式I所示的神经酰胺是以下式I所示的神经酰胺：Cer (d18:1/24:0)。

9. 根据权利要求1-6中任一项所述的应用，其中使用质谱法确定所述至少一种式I所示的神经酰胺和所述至少两种式II所示的神经酰胺或者所述至少一种式III所示的神经酰胺和所述至少一种式IV所示的神经酰胺的浓度。

10. 根据权利要求9所述的应用，其中使用与直接样品注入法或高效分离法相结合的质谱仪确定所述至少一种式I所示的神经酰胺和所述至少两种式II所示的神经酰胺或者所述至少一种式III所示的神经酰胺和所述至少一种式IV所示的神经酰胺的浓度。

11. 根据权利要求1、3、5中任一项所述的应用，其中确定至少2种式I所示的神经酰胺的浓度。

12. 根据权利要求1、3、5中任一项所述的应用，其中确定至少3种式I所示的神经酰胺的

浓度。

13. 根据权利要求2、4、6中任一项所述的应用,其中确定至少2种式III所示的神经酰胺的浓度。

14. 根据权利要求2、4、6中任一项所述的应用,其中确定至少3种式III所示的神经酰胺的浓度。

15. 根据权利要求1、3、5中任一项所述的应用,其中确定至少3种式II所示的神经酰胺的浓度。

16. 根据权利要求2、4、6中任一项所述的应用,其中确定至少2种式IV所示的神经酰胺的浓度。

17. 根据权利要求2、4、6中任一项所述的应用,其中确定至少3种式IV所示的神经酰胺的浓度。

18. 根据权利要求1-6中任一项所述的应用,其中根据下式,如果所述生物样品相比于所述对照样品包含降低的Z值,则所述受试者具有发展一种或多种CV并发症的升高风险: $Z = (\text{式I所示的神经酰胺})^a / (\text{式II所示的神经酰胺})^b$ 或 $Z = (\text{式III的神经酰胺})^a / (\text{式IV示的神经酰胺})^b$, 其中 $a, b \in \mathbb{R}$ 。

19. 根据权利要求1、3、5中任一项所述的应用,其中确定以下式(II)所示的神经酰胺的浓度: Cer(d18:1/16:0)、Cer(d18:1/18:0)和Cer(d18:1/24:1)。

20. 根据权利要求19所述的应用,其中确定以下式(I)所示的神经酰胺的浓度: Cer(d18:1/24:0)。

21. 根据权利要求1-6中任一项所述的应用,其中所述确定、评价或选择还包括在确定所述至少一种式I所示的神经酰胺和所述至少两种式II所示的神经酰胺或者所述至少一种式III所示的神经酰胺和所述至少一种式IV所示的神经酰胺的浓度之前,从所述生物样品提取脂质的步骤。

22. 根据权利要求1、3、5中任一项所述的应用,其中所述确定、评价或选择还包括在确定所述至少一种式I所示的神经酰胺和所述至少两种式II所示的神经酰胺的浓度之前,用至少一种同位素-标记的式I所示的神经酰胺和至少一种同位素-标记的式II所示的神经酰胺对所述生物样品加标的步骤。

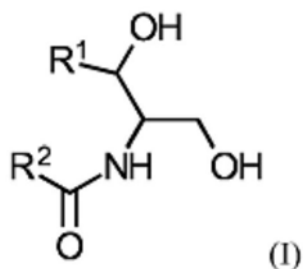
23. 根据权利要求2、4、6中任一项所述的应用,其中所述确定、评价或选择还包括在确定所述至少一种式III所示的神经酰胺和所述至少一种式IV所示的神经酰胺的浓度之前,用至少一种同位素-标记的式III所示的神经酰胺和至少一种同位素-标记的式IV所示的神经酰胺对所述生物样品加标的步骤。

24. 根据权利要求22所述的应用,其中所述至少一种同位素-标记的神经酰胺中的同位素是氘。

25. 根据权利要求23所述的应用,其中所述至少一种同位素-标记的神经酰胺中的同位素是氘。

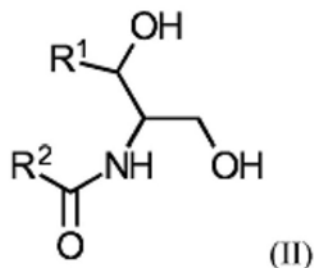
26. 一种用于预测CV并发症的组合物或试剂盒,其中所述CV并发症是急性心肌梗塞、急性冠状动脉综合征、中风或CV死亡中的一种或多种,且其中所述组合物或试剂盒包含:

(a) 至少一种同位素-标记的式(I)所示的神经酰胺:



其中R¹为具有13个碳原子的单不饱和烷基链或者具有15个碳原子的饱和、单不饱和或双不饱和烷基链,并且其中R²为具有21-25个碳原子的饱和烷基链,和

(b) 至少两种同位素-标记的式(II)所示的神经酰胺:



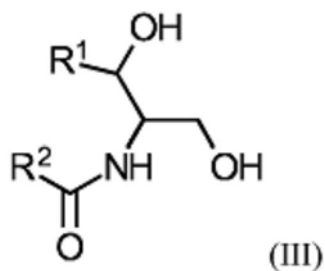
其中R¹为具有13个碳原子的单不饱和烷基链或者具有15个碳原子的饱和、单不饱和或双不饱和烷基链,并且其中R²为具有15或17个碳原子的饱和烷基链、具有21-23个碳原子的单不饱和烷基链或具有23或25个碳原子的双不饱和烷基链。

27. 根据权利要求26所述的组合物或试剂盒,其中所述至少两种同位素-标记的式(II)所示的神经酰胺是Cer(d18:1/16:0)、Cer(d18:1/18:0)和Cer(d18:1/24:1)。

28. 根据权利要求27所述的组合物或试剂盒,其中所述至少一种同位素-标记的式(I)所示的神经酰胺是Cer(d18:1/24:0)。

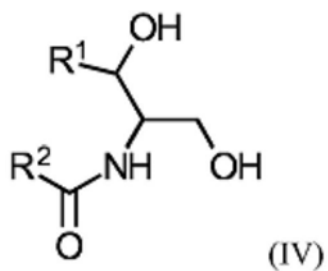
29. 一种用于预测CV并发症的组合物或试剂盒,其中所述CV并发症是急性心肌梗塞、急性冠状动脉综合征、中风或CV死亡中的一种或多种,且其中所述组合物或试剂盒包含:

(a) 至少一种同位素-标记的式III所示的神经酰胺:



其中R¹为具有13个碳原子的单不饱和烷基链或者具有15个碳原子的双不饱和烷基链,并且其中R²为具有21-23或25个碳原子的饱和烷基链;和

(b) 至少一种同位素-标记的式IV所示的神经酰胺:



其中R¹为具有13个碳原子的单不饱和烷基链而R²为具有15或17个碳原子的饱和烷基链、具有23个碳原子的单不饱和烷基链或具有23个碳原子的双不饱和烷基链；或者其中R¹为具有15个碳原子的双不饱和烷基链而R²为具有15或17个碳原子的饱和烷基链、具有21-23个碳原子的单不饱和烷基链或具有23个碳原子的双不饱和烷基链。

30. 根据权利要求26-29中任一项所述的组合物或试剂盒，其中所述至少一种同位素-标记的神经酰胺中的同位素是氘。

神经酰胺及其在诊断CVD中的应用

[0001] 相关申请的引证

[0002] 本申请主张2014年6月16日提交的美国临时专利申请No.62/012,543和2015年4月2日提交的美国专利申请No.14/677,595的优先权和权益,以上申请的全部内容作为参考并入本文。

技术领域

[0003] 本申请一般地涉及神经酰胺生物标志物及其在鉴别发展心血管(CV)并发症,如AMI(急性心肌梗塞)、ACS(急性冠状动脉综合征)、中风或CV死亡的风险提高的受试者中的应用。

背景技术

[0004] 目前的CV标志物,LDL-C、HDL-C和总胆固醇不能从具有更稳定疾病的患者中鉴别出具有高CV并发症,如AMI、ACS、中风和CV死亡风险的冠状动脉病(CAD)患者或受试者。

[0005] 术语心肌梗塞在病理上表示由于长时间缺血所造成的心肌细胞死亡,这可以由灌注需求增加或血流减少所引起的。如果它是突然且严重的,则该事件被称为“急性的”。除心脏生物标志物(肌酐激酶MB[CK-MB]、肌钙蛋白和肌红蛋白)的变化以及心电图(ECG)发现之外,通过对病史和体检的高度临床怀疑确定AMI的诊断。成像技术,如二维超声波心动描记法也用于证实心肌功能障碍。然而,目前的CV标志物、LDL-C、HDL-C和总胆固醇仅当心脏组织损害已发生时才能识别。它们不能预测CVD并发症发生的可能性。

[0006] 急性冠状动脉综合征(ACS)是用于通过流向心脏的血液突然减少所导致的任何病况的术语。急性冠状动脉综合征的第一病征可以是被称为心动停止的心脏突然停止。通常在急诊室或医院中,通过提供受损心脏组织迹象或心脏电学活动问题的相同心脏生物标志物或心电图(ECG)将急性冠状动脉综合征诊断为AMI。

[0007] 中风是由于血液对脑供给障碍,从而从脑组织夺取氧气和营养所造成的脑功能丧失。在几分钟内,脑细胞开始死亡。中风可以由动脉阻塞(缺血性中风)或者血管渗漏或破裂(出血性中风)造成。一些人可能经受通过他们脑部的暂时血流破坏(短暂性缺血性发作或TIA)。通常通过脑成像和实施身体测试来诊断中风。

[0008] 心源性猝死(SCD)是由心脏功能丧失所导致的突然、意外死亡,它还被称为心脏骤停(SCA)。心脏骤停不是心脏病发作(心肌梗塞)。当一条或多条冠状动脉存在阻塞,从而妨碍心脏接受足够的富氧血液时,发生心脏病发作。相反,当心脏电学系统机能失调并突然变得非常不规律时,发生心脏骤停。心跳快速至危险程度。可能发生心室纤维性颤动,并且血液不会输送至身体。在前几分钟内,最大的顾虑是流至脑部的血流将显著降低,从而人将失去意识。除非立即开始急救措施,否则将发生死亡。心脏骤停在没有警示的情况下发生,并且医学测试很少诊断出它将发生。相反,通常通过排除导致人突然病倒的其它原因,在SCA发生之后诊断出SCA。

[0009] 在急性期诊断出AMI、ACS、中风和心源性猝死,但是预测标志物不可用。这些事件

背后的风险因素为(例如)年龄、低脂血症、高血压、抽烟、糖尿病、CAD或上述心脏病发作。然而,没有可以预测事件存在的诊断测试,并且心血管疾病是全世界导致死亡的主要原因。此外,CVD比任何其它疾病类型对社会的花费更大。使用用于诊断CVD的相同试验来预测事件。目前,最创新的方法是使用LDL-C、HDL-C、Lp(a)、Lp-PLA2(PLAC试验)或者CRP。然而,所列的基于脂质的标志物(LDL-C、HDL-C、Lp(a)、Lp-PLA2(PLAC试验))无一提供有助于医师分类的临床有用的预测信息。在研究背景中,CRP是有希望的,然而已证明它是非特异性的(CRP是可以对多种不同刺激起反应的急性期反应物,从而导致高度可变的测试结果)并因此难以在临床使用中解释CRP值。对于可以预测CV并发症,如AMI(急性心肌梗塞)、ACS(急性冠状动脉综合征)、中风和CV死亡的诊断测试的需要仍未满足。

[0010] 与目前任何其它基于脂质的生物标志物相比,基于神经酰胺的风险分组(分级, stratification)提供了优良的p-值。此外,通过特异性脂质降低治疗(如他汀类)可以影响血浆神经酰胺水平,并因此神经酰胺标志物提供了精确且可起作用的风险分组。

[0011] 已鉴别了包括某些神经酰胺在内的一大组脂质分子以及由两个脂质分子计算获得的比值用于预测经历他汀类治疗或未经他汀类治疗的CAD患者中的CV结局(Zora Biosciences专利申请W02013068373和W02013068374)或者用于鉴别高风险CAD患者或者预测受试者是否具有发展CV并发症的风险(Zora Biosciences专利申请US 13/695,766和US13/805,319)。

[0012] 然而,仍需要预测患者发展CV并发症,如AMI、ACS、中风和CV死亡的风险的改进方法。

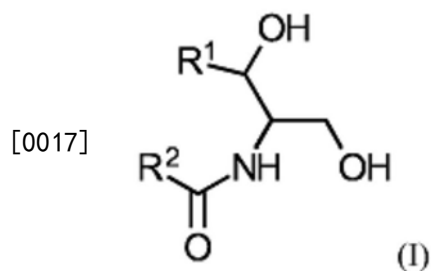
发明内容

[0013] 本发明申请公开了基于它们的结构选择神经酰胺组合以及使用它们预测CVD/CAD-相关并发症,包括AMI、ACS、中风和CV死亡的独特规则。因此,这些神经酰胺标志物提供了鉴别和治疗高风险冠状动脉病患者的方式。具体地,测试了这些灵敏且特异性的神经酰胺标志物以显示与目前临床所使用的预测CVD/CAD结局的标志物相比优良的诊断和预测价值。根据最近建立的规则,使用神经酰胺生物标志物的组合将有利于早期干预、发展和遭受较少症状以及降低与CVD有关的发病率/死亡率。因此,本文所述和所主张的神经酰胺标志物的组合允许对具有发展主要CV并发症,如AMI、ACS、中风和CV死亡的风险的患者单独调整治疗、药物干预和随访。

[0014] 根据该新近鉴别的规则,基于它们的结构以及当组合时,它们与发展CV并发症,如AMI、ACS、中风和CV死亡的风险提高的关系(基于浓度的升高或降低),已将某些神经酰胺分为不同的组。因此,在某些实施方式中,所述方法涉及确定获自受试者的生物样品中至少一种式(I)所示的神经酰胺(A组神经酰胺)和至少一种式(II)所示的神经酰胺(B组神经酰胺)的浓度。

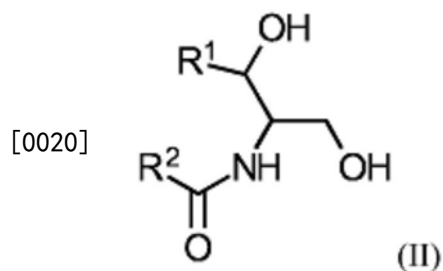
[0015] 当与至少一种式(II)所示的神经酰胺的浓度升高组合时,至少一种式(I)所示的神经酰胺的浓度降低与受试者发展CVD并发症,如AMI、ACS、中风和CV死亡的风险升高有关。

[0016] 式(I)所示的神经酰胺具有以下结构:



[0018] 其中R¹为具有13个碳原子的单不饱和烷基链或者具有15个碳原子的饱和、单不饱和或双不饱和烷基链,并且其中R²为具有21-25个碳原子的饱和烷基链。

[0019] 式(II)所示的神经酰胺具有以下结构:



[0021] 其中R¹为具有13个碳原子的单不饱和烷基链或者具有15个碳原子的饱和、单不饱和或双不饱和烷基链,并且其中R²为具有15或17个碳原子的饱和烷基链、具有21-23个碳原子的单不饱和烷基链或具有23或25个碳原子的双不饱和烷基链。

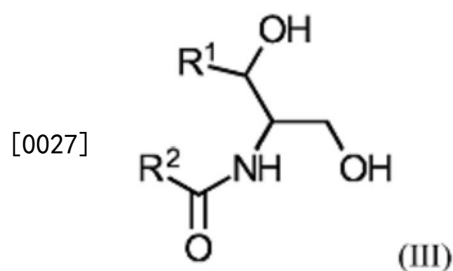
[0022] 在一个实施方式中,确定受试者是否具有发展一种或多种CV并发症的风险的方法包括以下步骤:a)确定获自所述受试者的生物样品中至少一种A组神经酰胺的浓度,b)确定获自所述受试者的生物样品中至少一种B组神经酰胺的浓度,c)将所述至少一种A组神经酰胺的浓度和所述至少一种B组神经酰胺的浓度与对照样品相比较;和d)与对照样品相比,如果所述样品含有降低浓度的至少一种A组神经酰胺和升高浓度的至少一种B组神经酰胺,则确定所述受试者发展一种或多种CV并发症的风险升高。在某些实施方式中,所述方法还包括在确定至少一种式I和II所示的神经酰胺的浓度之前,用至少一种氘标记的式I所示的神经酰胺和至少一种氘标记的式II所示的神经酰胺对所述生物样品加标(spike)。

[0023] 在一个实施方式中,确定以下式(II)所示的神经酰胺的浓度: Cer(d18:1/16:0), Cer(d18:1/18:0)和Cer(d18:1/24:1)。在另一个实施方式中,确定以下式(I)所示的神经酰胺的浓度: Cer(d18:1/24:0)和以下式(II)所示的神经酰胺的浓度: Cer(d18:1/16:0)、Cer(d18:1/18:0)和Cer(d18:1/24:1)。

[0024] 另一个方面涉及先前未知存在于人血液样品中的A组神经酰胺亚类(子集, subset)和/或式B神经酰胺亚类以及它们在确定受试者是否具有发展一种或多种CV并发症,如AMI、ACS、中风和CV死亡的风险的方法中的应用。因此,在某些实施方式中,所述方法涉及确定获自受试者的生物样品中至少一种式(III)所示的神经酰胺(C组神经酰胺)和至少一种式(IV)所示的神经酰胺(D组神经酰胺)的浓度。

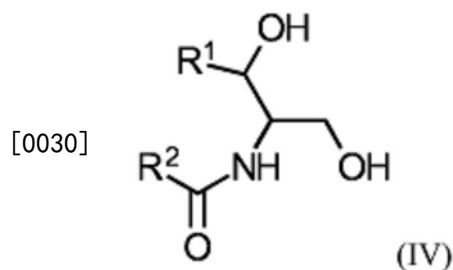
[0025] 当与至少一种式(IV)所示的神经酰胺的浓度升高组合时,至少一种式(III)所示的神经酰胺的浓度降低与受试者发展CV并发症,如AMI、ACS、中风和CV死亡的风险升高有关。

[0026] 式(III)所示的神经酰胺具有以下结构:



[0028] 其中 R^1 为具有13个碳原子的单不饱和烷基链或者具有15个碳原子的双不饱和烷基链,并且其中 R^2 为具有21-23或25个碳原子的饱和烷基链。

[0029] 式(IV)所示的神经酰胺具有以下结构:



[0031] 其中 R^1 为具有13个碳原子的单不饱和烷基链, R^2 为具有15或17个碳原子的饱和烷基链,具有23个碳原子的单不饱和烷基链,或具有23个碳原子的双不饱和烷基链;或者其中 R^1 为具有15个碳原子的双不饱和烷基链, R^2 为具有15或17个碳原子的饱和烷基链,具有21-23个碳原子的单不饱和烷基链,或具有23个碳原子的双不饱和烷基链。

[0032] 在一个实施方式中,确定受试者是否具有发展一种或多种CV并发症的风险的方法包括以下步骤:a)确定获自所述受试者的生物样品中至少一种C组神经酰胺的浓度,b)确定获自所述受试者的生物样品中至少一种D组神经酰胺的浓度,c)将所述至少一种C组神经酰胺的浓度和所述至少一种D组神经酰胺的浓度与对照样品相比较;和d)与对照样品相比,如果所述样品含有降低浓度的至少一种C组神经酰胺和升高浓度的至少一种D组神经酰胺,则确定所述受试者发展一种或多种CV并发症的风险升高。在某些实施方式中,所述方法还包括在确定至少一种式III和IV所示的神经酰胺的浓度之前,用至少一种氘标记的式III所示的神经酰胺和至少一种氘标记的式IV所示的神经酰胺对所述生物样品加标。

[0033] 在某些实施方式中,根据下式确定至少一种式(I)所示的神经酰胺和至少一种式(II)所示的神经酰胺的浓度或者至少一种式(III)所示的神经酰胺和至少一种式(IV)所示的神经酰胺的浓度: $Z = (\text{式I所示的神经酰胺})^a / (\text{式II所示的神经酰胺})^b$ 或 $Z = (\text{式III的神经酰胺})^a / (\text{式IV示的神经酰胺})^b$,其中 $a, b \in \mathbb{R}$ 。

[0034] 另一个方面涉及评价治疗受试者中CVD和/或其一种或多种并发症,如AMI、ACS、中风和CV死亡的有效性的方法,所述方法包括以下步骤:a)确定获自所述受试者的生物样品中至少一种A组神经酰胺(或者至少一种C组神经酰胺)的浓度,b)确定获自所述受试者的生物样品中至少一种B组神经酰胺(或者至少一种D组神经酰胺)的浓度,c)将所述至少一种A组神经酰胺(或者至少一种C组神经酰胺)的浓度和所述至少一种B组神经酰胺(或者至少一种D组神经酰胺)的浓度与对照样品相比;和d)与对照样品相比,如果所述样品含有相等或提高浓度的所述至少一种A组神经酰胺(或者至少一种C组神经酰胺)和相等或降低浓度的所述至少一种B神经酰胺(或者至少一种D神经酰胺),则确定所述治疗是有效的。

[0035] 在某些实施方式中,评价治疗受试者中动脉粥样硬化或CVD和/或其一种或多种并发症的有效性的方法还可以包括在所述确定步骤之后,基于在所述确定步骤中获得的所述至少一种A组神经酰胺和所述至少一种B组神经酰胺的浓度,改变、补充已施用的治疗或保持已施用的治疗不变。

[0036] 在该方法的一个实施方式中,确定以下式 (II) 所示的神经酰胺的浓度: Cer (d18:1/16:0), Cer (d18:1/18:0) 和 Cer (d18:1/24:1)。在另一个实施方式中,确定以下式 (I) 所示的神经酰胺的浓度: Cer (d18:1/24:0) 和以下式 (II) 所示的神经酰胺的浓度: Cer (d18:1/16:0)、Cer (d18:1/18:0) 和 Cer (d18:1/24:1)。

[0037] 另一个方面涉及在受试者中选择CVD和/或一种或多种其并发症,如AMI、ACS、中风和CV死亡的适当治疗的方法,所述方法包括以下步骤:a) 确定获自所述受试者的生物样品中至少一种A组神经酰胺(或者至少一种C组神经酰胺)的浓度,b) 确定获自所述受试者的生物样品中至少一种B组神经酰胺(或者至少一种D组神经酰胺)的浓度,c) 将所述至少一种A组神经酰胺(或者至少一种C组神经酰胺)的浓度和所述至少一种B组神经酰胺(或者至少一种D组神经酰胺)的浓度与对照样品相比;和d) 与所述对照样品相比,如果所述样品含有降低浓度的所述至少一种A组神经酰胺(或者至少一种C组神经酰胺)和升高浓度的至少一种B组神经酰胺(或者至少一种D组神经酰胺),则确定所述受试者需要治疗或者需要改变或补充已施用的治疗。

[0038] 在该方法的一个实施方式中,确定以下式 (II) 所示的神经酰胺的浓度: Cer (d18:1/16:0), Cer (d18:1/18:0) 和 Cer (d18:1/24:1)。在另一个实施方式中,确定以下式 (I) 所示的神经酰胺的浓度: Cer (d18:1/24:0) 和以下式 (II) 所示的神经酰胺的浓度: Cer (d18:1/16:0)、Cer (d18:1/18:0) 和 Cer (d18:1/24:1)。

[0039] 在一个实施方式中,根据本文所述和所主张的方法,将评价其有效性或将选择作为适合的治疗是脂质调节治疗(例如,如在本发明申请其它处所述的他汀(抑制素,statin)或其它脂质降低药物)。在另一个实施方式中,所述方法还包括向所述受试者施用在步骤(d)中确定所述受试者需要的治疗的步骤。

[0040] 另一个方面涉及治疗或预防受试者中CVD和/或一种或多种其并发症,如AMI、ACS、中风和CV死亡的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效剂量的药物,其中所述药物为他汀;另一种脂质降低药物,其选自除他汀之外的HMG-CoA还原酶抑制剂、尼克酸(烟酸)、胆固醇吸收抑制剂、胆固醇酯转移蛋白(CETP)、胆酸多价螯合剂、贝特类(fibrate)、植物甾醇和PCSK9抑制剂;或脂质/脂质浓度比调节剂,其选自小分子、抗体、反义RNA、小干扰RNA(siRNA)和天然或修饰的脂质,并且其中在施用所述药物之前,基于与对照样品相比,至少一种A组神经酰胺(或者至少一种C组神经酰胺)的浓度降低和至少一种B组神经酰胺(或者至少一种D组神经酰胺)的浓度升高,所述受试者已鉴别为经受CVD并发症,如AMI、ACS、中风和CV死亡或具有发展CVD并发症,如AMI、ACS、中风和CV死亡的高风险。

[0041] 可以使用任何现有技术或随后发展的技术确定生物样品中的神经酰胺浓度。在某些实施方式中,使用质谱法确定神经酰胺的浓度。在某些实施方式中,质谱仪与直接样品注入法或高效分离法相结合。

[0042] 来自受试者的生物样品和对照样品优选地为血液样品,更优选地为血浆样品,或者还优选地为血清样品。在某些实施方式中,所述血液样品为在过滤器上干燥的血斑。它还

可以是部分的血液、血浆或血清,例如,其脂质部分。因此,在某些实施方式中,所述方法包括在确定A、B、C和/或D组神经酰胺的浓度之前,从生物样品提取脂质的其它步骤。作为另外一种选择,来自受试者的样品和对照样品两者均可以是组织样品,例如,动脉组织,如颈动脉组织,或动脉斑块材料,如颈动脉斑块材料。

[0043] 另一个方面为用于预测CV并发症或者用于进行本文所公开的任何方法的组合物或试剂盒。在某些实施方式中,所述组合物或试剂盒包含至少一种同位素(例如,氘)-标记的式I所示的神经酰胺和/或至少一种式(II)所示的神经酰胺。在一个实施方式中,所述试剂盒包含以下同位素(例如,氘)-标记的式(II)所示的神经酰胺: Cer (d18:1/16:0)、Cer (d18:1/18:0) 和 Cer (d18:1/24:1)。在另一个实施方式中,所述试剂盒包含以下同位素(例如,氘)-标记的式(I)所示的神经酰胺: Cer (d18:1/24:0) 及以下同位素(例如,氘)-标记的式(II)所示的神经酰胺: Cer (d18:1/16:0)、Cer (d18:1/18:0) 和 Cer (d18:1/24:1)。

[0044] 另一个实施方式涉及包含至少一种同位素(例如,氘)-标记的式(III)所示的神经酰胺和/或至少一种同位素(例如,氘)-标记的式(IV)所示的神经酰胺的组合物或试剂盒。

附图说明

[0045] 引入并构成本说明书一部分的附图显示了某些实施方式,并且与书面描述一起用于解释本文所公开的组合物和方法的某些原理。

[0046] 图1通过最小学生氏t检验p-值显示了10种A组神经酰胺物质的平均相对变化/差异(病例相对于对照组平均值的差异除以对照组的平均浓度)。

[0047] 图2通过最小学生氏t检验p-值显示了10种B组神经酰胺物质的平均相对变化/差异(病例相对于对照组平均值的差异除以对照组的平均浓度)。

[0048] 图3显示了6种不属于A组或B组神经酰胺的神经酰胺物质的平均相对变化/差异(病例相对于对照组平均值的差异除以对照组的平均浓度)。

[0049] 图4提供了根据本发明的一些实施方式的系统的示意图。具体地,该附图显示了可以在根据所公开的系统和方法的计算机系统106的实施中使用的多个硬件、软件及其它资源。

具体实施方式

[0050] 现将详细参考多个示例性实施方式,在附图中显示了并且在随后的详细说明中讨论了这些实施方式的实例。应理解提供以下详细说明以使读者完全了解本发明方面的某些实施方式、特征和细节,并且不应将其理解为对本发明范围的限制。

[0051] 1. 缩写

[0052] 除非另外说明,否则在本发明申请中使用的缩写具有以下含义: LDL-C: 低密度脂蛋白胆固醇; HDL-C: 高密度脂蛋白胆固醇; CVD: 心血管疾病; CV: 心血管; CAD: 冠状动脉病; IVUS: 血管内超声; NIRS: 近红外光谱; OCT: 光学相干断层扫描; CABG: 冠状动脉旁路手术; MS: 质谱法; OR: 机会比 (odds ratio); SD: 标准偏差; AUC: 曲线下面积; Sens: 灵敏度; Spec: 特异性; MRC%: 平均相对变化; p-val: P-值; q-val: 和Q-值; Pr(>Chi): 卡方; ICD-10: 国际疾病和相关健康问题统计分类,第10修订版。

[0053] 2. 定义

[0054] 为了使本发明可以更容易理解,首先定义了某些术语。在整个详细说明中描述了其它定义。

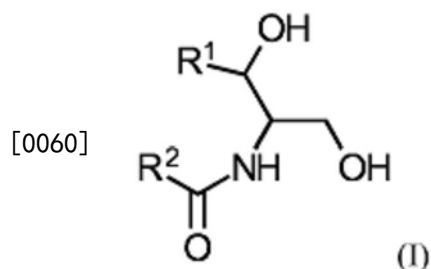
[0055] 术语“受试者”、“宿主”、“患者”和“个体”在本文中可互换使用以表示需要诊断或疗法的任何哺乳动物受试者,具体地,人。受试者先前可以已经经受心血管疾病事件,如心绞痛、心肌梗塞或中风。CVD可以是或可以不是动脉粥样硬化的结果。或者,受试者可以是先前没有CVD病征的健康个体。

[0056] 冠状动脉血管病/心血管疾病 (CVD) 具有它在本领域中的一般含义,并且用于划分影响身体的心脏、心脏瓣膜、血液和脉管系统的多种病况,包括CAD。在本发明公开中,术语CVD和CAD可以互换使用。心血管疾病包括内皮功能障碍、冠状动脉病、心绞痛、心肌梗塞、动脉粥样硬化、充血性心力衰竭、高血压、脑血管疾病、中风、短暂性缺血性发作、深静脉血栓形成、周围动脉疾病、心肌病、心律不齐、主动脉瓣狭窄和动脉瘤。这些疾病经常涉及动脉粥样硬化。在本发明优选的实施方式中,心血管疾病是与动脉粥样硬化有关的心血管疾病。

[0057] 如本文所使用的,术语“计算机实施方法”表示利用机械或装置实现其目的的方法。

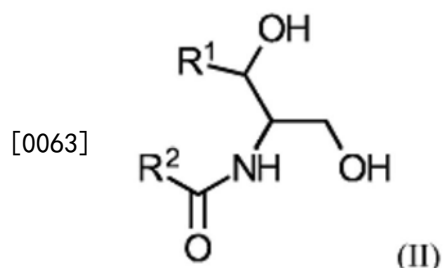
[0058] 如本文所使用的,术语“处理器”表示能够解释和执行指令的装置。具体地,处理器使用逻辑电路来接收输入数据和提供适当的输出数据。处理器可以通过网络彼此通信。

[0059] 如本发明申请中所使用的,“A组神经酰胺”、“A组的神经酰胺”等表示式(I)所示的神经酰胺:



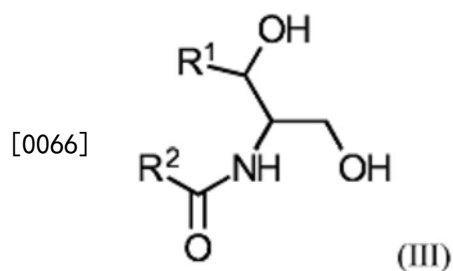
[0061] 其中R¹为具有13个碳原子的单不饱和烷基链或者具有15个碳原子的饱和、单不饱和或双不饱和烷基链,并且其中R²为具有21-25个碳原子的饱和烷基链。

[0062] 如本发明申请中所使用的,“B组神经酰胺”、“B组的神经酰胺”等表示式(II)所示的神经酰胺:



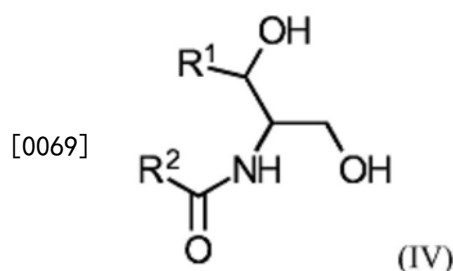
[0064] 其中R¹为具有13个碳原子的单不饱和烷基链或者具有15个碳原子的饱和、单不饱和或双不饱和烷基链,并且其中R²为具有15或17个碳原子的饱和烷基链,具有21-23个碳原子的单不饱和烷基链或具有23或25个碳原子的双不饱和烷基链。

[0065] 如本发明申请中所使用的,“C组神经酰胺”、“C组的神经酰胺”等表示式(III)所示的神经酰胺:



[0067] 其中R¹为具有13个碳原子的单不饱和烷基链或者具有15个碳原子的双不饱和烷基链,并且其中R²为具有21-23或25个碳原子的饱和烷基链。

[0068] 如本发明申请中所使用的,“D组神经酰胺”、“D组的神经酰胺”等表示式(IV)所示的神经酰胺:



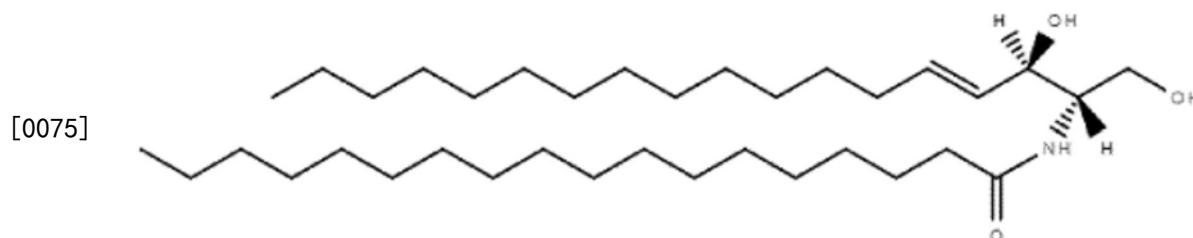
[0070] 其中R¹为具有13个碳原子的单不饱和烷基链,R²为具有15或17个碳原子的饱和烷基链,具有23个碳原子的单不饱和烷基链,或具有23个碳原子的双不饱和烷基链;或者其中R¹为具有15个碳原子的双不饱和烷基链,R²为具有15或17个碳原子的饱和烷基链,具有21-23个碳原子的单不饱和烷基链,或具有23个碳原子的双不饱和烷基链。

[0071] 如本文所使用的,根据本发明的“脂质降低药物”优选地为HMG-CoA还原酶抑制剂、尼克酸(烟酸)、胆固醇吸收抑制剂、胆固醇酯转移蛋白(CETP)抑制剂、胆酸多价螯合剂、贝特类(fibrate)、植物甾醇和PCSK9抑制剂。

[0072] 如本文所使用的,“胆固醇吸收抑制剂”优选地为依泽替米贝(ezetimibe)或SCH-48461;胆固醇酯转移蛋白(CETP)抑制剂优选地为evacetrapib、安塞曲匹(anacetrapib)或达塞曲匹(dalcetrapib);胆酸多价螯合剂优选地是考来维仑、考来烯胺或考来替泊;贝特类(fibrate)优选地是非诺贝特、吉非贝齐、氯贝丁酯(clofibrate)或苯扎贝特,并且PCSK9抑制剂选自PCSK9特异性抗体、siRNA和模拟肽(peptidomimetic)。

[0073] 3. 神经酰胺结构和命名

[0074] 神经酰胺分子由类鞘氨醇碱(sphingoid base)(SB)和脂肪酸(FA)链组成。以下显示了一种代表性神经酰胺分子的结构。



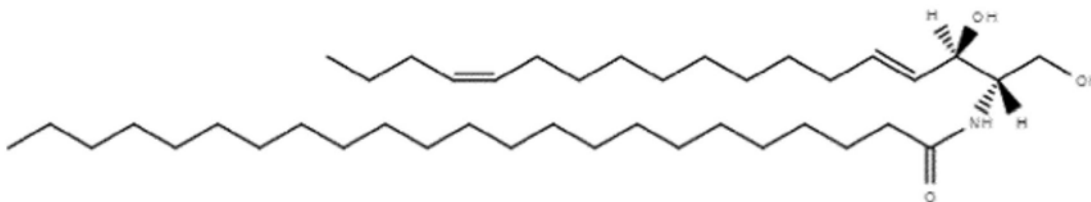
[0076] 这种Cer(d18:1/18:0)脂质是B组神经酰胺,其中R¹是具有15个碳原子的单不饱和烷基链,R²是具有17个碳原子的饱和烷基链。

[0077] 通常,作为第一对数对应于SB,第二对数对应于FA来提供神经酰胺的命名。例如,

在以上Cer (d18:1/18:0) 分子中,第一数字对 (d18:1) 是指SB,第二数字对 (18:0) 是指FA。在SB和FA命名中,每对第一个数字是指SB或FA链中碳原子的数目,而第二个数字是指SB或FA链的碳-碳双键的数目。因此,在Cer (d18:1/18:0) 中,SB具有18个碳原子和1个碳-碳双键,而FA具有18个碳原子并且没有碳-碳双键。根据它们在其结构中是否具有双键,FA可以是饱和或不饱和的。例如,FA 16:1是具有16个碳原子和1个碳-碳双键的不饱和FA,而FA 18:0是具有18个碳原子并且没有碳-碳双键的饱和FA。

[0078] 通过其它实例,Cer (d18:2/23:0) 的结构如下所示:

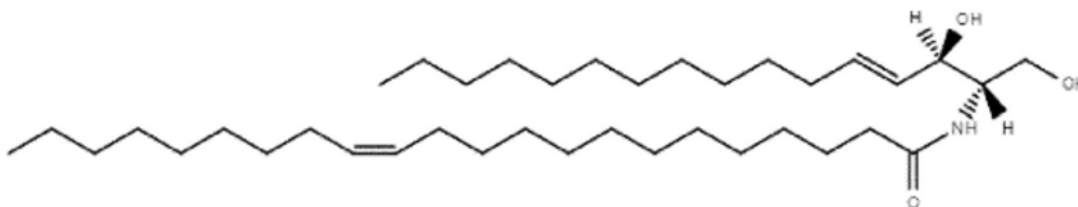
[0079]



[0080] 这种脂质是A组神经酰胺,其中R¹是具有15个碳原子的双不饱和烷基链,R²是具有22个碳原子的饱和烷基链。

[0081] 通过其它实例,Cer (d16:1/22:1) 的结构如下所示:

[0082]



[0083] 这种脂质是B组神经酰胺,其中R¹是具有13个碳原子的单不饱和烷基链,R²是具有21个碳原子的单不饱和烷基链。

[0084] 在神经酰胺从头合成中,在碳4中形成了SB的第一个双键,从而形成SBs d16:1和d18:1。SB的第二个双键最通常位于碳14,从而形成SB d18:2。

[0085] 根据FA链的长度和碳-碳双键的数目,FA链中的双键可以位于多个位置。在22:1FA中,最常见的双键位置位于碳13。在23:1FA中,最常见的双键位置位于碳14。在24:1FA中,最常见的双键位置位于碳15。在24:2和26:2FA中,最常见的双键位置位于碳5和9。

[0086] 4. 诊断方法

[0087] 本文公开了通过测量生物样品中神经酰胺的某些组合来预测CV并发症,包括AMI、ACS、中风和心血管死亡的方法。基于动物试验,神经酰胺已参与CVD的病理发生,然而很大程度上缺少人的数据。我们最近显示某些脂质,包括某些独特的神经酰胺分子与CV死亡有关 (US13/695,766、US 13/805,319、W02013068373、W02013068374和Tarasov等人,2014)。

[0088] 出于诊断使用,标志物应具有尽可能高的灵敏度和特异性。灵敏度量度通过标志物正确分类为病例的病例比例,而特异性则量度通过标志物正确分类为对照的对照比例。出于诊断使用,重要的是足够高百分比的未来将要具有CV事件的受试者将在早期被鉴别以进行靶向治疗。然而,为了限制治疗费用,相比于低特异性标志物,高特异性标志物是优选的。

[0089] 例如,灵敏度0.7的测试将表示在将要面对CV事件的100000位患者的群体中,通过测试将有70000位被鉴别为对该事件具有高风险。特异性为0.2时,在具有稳定的CVD但没有将出现的严重事件的100000患者群体中,仅有20000位将被正确鉴别为低风险,而80000位

将错误地被鉴别为高风险。这将意味着80000位患者的靶向治疗费用将白白使用。相反,如果对于相同事件使用特异性值0.8的替代测试,则仅有20000位患者将被错误地鉴别为对严重事件具有高风险。与低特异性测试相比,这将节省60000位患者的治疗费用。

[0090] 本发明申请公开了选择神经酰胺的组合来鉴别对发展CV并发症具有升高风险的患者的具有显著改善的灵敏度和特异性的规则。通过属于两个不同种类的神经酰胺的结构确定这种改善的灵敏度和特异性,从而来自第一结构种类的至少一种神经酰胺的浓度降低以及来自第二结构种类的至少一种神经酰胺的浓度升高表明了发展CV并发症的升高风险。与常规风险标志物或单独的神经酰胺分子或其比值相比,根据所公开的规则所选的来自两个种类的神经酰胺物质的特定组合在预测CV并发症方面是优良的。

[0091] 通过随机选择神经酰胺物质的组合不能实现这种改善的诊断。作为替代,应根据本文所公开的规则,通过将至少一种具有极长饱和脂肪酸的神经酰胺和至少一种具有长链饱和脂肪酸或极长链不饱和脂肪酸中任一种的神经酰胺组合,来选择神经酰胺组合。具体地,与单独的神经酰胺或来源于两个脂质分子的比值相比,神经酰胺的所选组合显示出改善的诊断灵敏度和特异性。通过神经酰胺物质的结构和制备神经酰胺种类成员的多种神经酰胺合酶的生物学功能确定神经酰胺的这些特定组合的疾病相关特异性。

[0092] 在具有高CV并发症风险的人中,具有极长饱和脂肪酸链(22:0至26:0)的神经酰胺(A组神经酰胺)的浓度较低。另一方面,在具有高CV并发症风险的人中,具有长链饱和脂肪酸(16:0和18:0)和极长链不饱和脂肪酸(22:1至26:2)的神经酰胺(B组神经酰胺)的浓度较高。当测量至少一种A组神经酰胺和至少一种B组神经酰胺,而不是选择(例如)两个A组或B组神经酰胺时,CV并发症的诊断改善。

[0093] 在下表中显示了当组合时,发现提供改善的诊断能力的两个不同的神经酰胺种类,其中A组神经酰胺物质包括所列鞘氨醇碱(SB)中的一种和所列脂肪酸(FA)中的一种,并且其中B组神经酰胺物质包括所列鞘氨醇碱(SB)中的一种和所列脂肪酸(FA)中的一种。

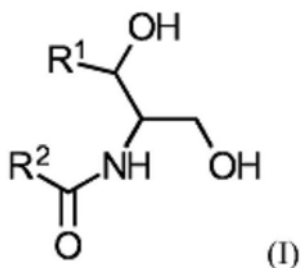
A 组（浓度降低）			B 组（浓度升高）		
具有极长饱和 FA 的神经酰胺			具有长链饱和 FA 和 极长链不饱和 FA 的神经酰胺		
SB		FA	SB		FA

[0094]

d16:1	+	22:0	d16:1	+	16:0
d18:0		23:0	d18:0		18:0
d18:1		24:0	d18:1		22:1
d18:2		25:0	d18:2		23:1
		26:0			24:1
					24:2
					26:2

[0095] 还可能通过化学式定义两个神经酰胺的结构种类。A组神经酰胺(降低浓度与CV并发症高风险有关)具有根据式I的结构:

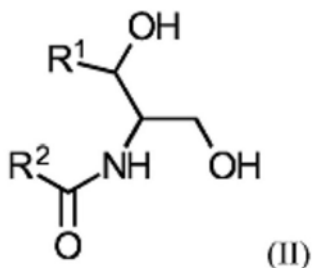
[0096]



[0097] 其中 R^1 为具有13个碳原子的单不饱和烷基链或者具有15个碳原子的饱和、单不饱和或双不饱和烷基链,并且其中 R^2 为具有21-25个碳原子的饱和烷基链。

[0098] B组神经酰胺(提高浓度与CV并发症高风险有关)具有根据式II的结构:

[0099]



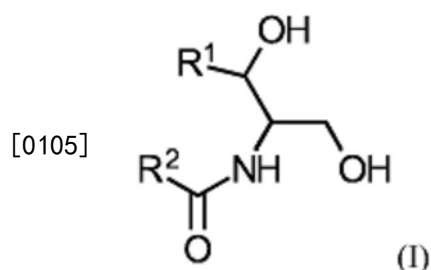
[0100] 其中 R^1 为具有13个碳原子的单不饱和烷基链或者具有15个碳原子的饱和、单不饱和或双不饱和烷基链,并且其中 R^2 为具有15或17个碳原子的饱和烷基链,具有21-23个碳原子的单不饱和烷基链或具有23或25个碳原子的双不饱和烷基链。

[0101] 还可以通过负责它们合成的神经酰胺合酶的功能对A组和B组神经酰胺分类。在人中已鉴别了6种不同的神经酰胺合酶 (CerS1-6)。基于神经酰胺合酶 (CerS) 对FA底物已知的特异性,B组神经酰胺含有只通过CerS1、S4、S5和S6产生的神经酰胺,这些已知合成具有长FA (14-18碳) 的神经酰胺。在A组和B组中均存在通过CerS2和S3合成的具有极长FA (≥ 22 个碳原子) 的脂肪酸。然而,A组中的极长神经酰胺分子是饱和的,而B组中的极长神经酰胺是不饱和的。因此,根据饱和水平,将CerS2和S3的产物分为A组或B组。

[0102] 通过基于结构和/或神经酰胺合酶对存在于神经酰胺内的脂肪酸底物的特异性将某些神经酰胺分类为独特的组,本发明申请公开了选择对鉴别具有发展CV并发症高风险的患者具有显著改善的灵敏度和特异性的神经酰胺组合的规则。

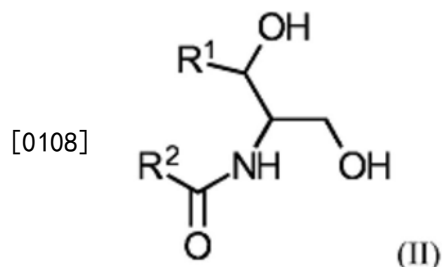
[0103] 在具体的实施方式中,提供了确定受试者是否具有发展一种或多种CV并发症,如AMI、ACS、中风和CV死亡的风险的方法,其中所述方法包括

[0104] (a) 确定获自所述受试者的生物样品中至少一种式I所示的神经酰胺的浓度:



[0106] 其中 R^1 为具有13个碳原子的单不饱和烷基链或者具有15个碳原子的饱和、单不饱和或双不饱和烷基链,并且其中 R^2 为具有21-25个碳原子的饱和烷基链;

[0107] (b) 确定获自所述受试者的生物样品中至少一种式II所示的神经酰胺的浓度:



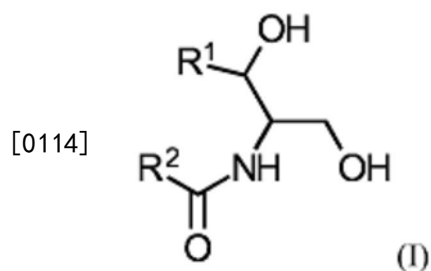
[0109] 其中 R^1 为具有13个碳原子的单不饱和烷基链或者具有15个碳原子的饱和、单不饱和或双不饱和烷基链,并且其中 R^2 为具有15或17个碳原子的饱和烷基链,具有21-23个碳原子的单不饱和烷基链或具有23或25个碳原子的双不饱和烷基链;

[0110] (c) 将所述至少一种式I所示的神经酰胺的浓度和所述至少一种式II所示的神经酰胺的浓度与对照样品相比;和

[0111] (d) 与所述对照样品相比,如果所述生物样品含有降低浓度的所述至少一种式I所示的神经酰胺和提高浓度的所述至少一种式II所示的神经酰胺,则确定所述受试者具有发展一种或多种CV并发症的升高风险。

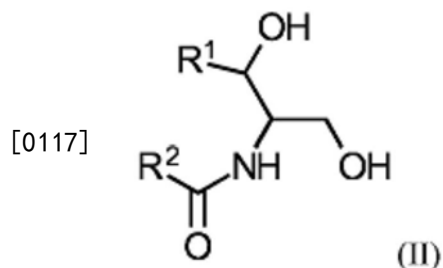
[0112] 另一个方面涉及用于评价受试者中CVD和/或一种或多种其并发症,如AMI、ACS、中风和CV死亡的治疗有效性的方法,所述方法包括以下步骤:

[0113] (a) 确定获自所述受试者的生物样品中至少一种式I所示的神经酰胺的浓度:



[0115] 其中R¹为具有13个碳原子的单不饱和烷基链或者具有15个碳原子的饱和、单不饱和或双不饱和烷基链,并且其中R²为具有21-25个碳原子的饱和烷基链;

[0116] (b) 确定获自所述受试者的生物样品中至少一种式II所示的神经酰胺的浓度:



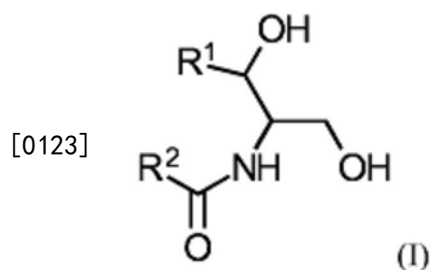
[0118] 其中R¹为具有13个碳原子的单不饱和烷基链或者具有15个碳原子的饱和、单不饱和或双不饱和烷基链,并且其中R²为具有15或17个碳原子的饱和烷基链,具有21-23个碳原子的单不饱和烷基链或具有23或25个碳原子的双不饱和烷基链;

[0119] (c) 将所述至少一种式I所示的神经酰胺的浓度和所述至少一种式II所示的神经酰胺的浓度与对照样品相比;和

[0120] (d) 与所述对照样品相比,如果所述样品含有相等或升高浓度的所述至少一种式I所示的神经酰胺和相等或降低浓度的所述至少一种式II所示的神经酰胺,则确定所述治疗是有效的。

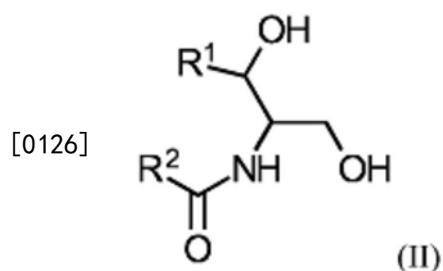
[0121] 另一个方面涉及在受试者中选择CVD和/或一种或多种其并发症,如AMI、ACS、中风和CV死亡的适合治疗的方法,所述方法包括:

[0122] (a) 确定获自所述受试者的生物样品中至少一种式I所示的神经酰胺的浓度:



[0124] 其中R¹为具有13个碳原子的单不饱和烷基链或者具有15个碳原子的饱和、单不饱和或双不饱和烷基链,并且其中R²为具有21-25个碳原子的饱和烷基链;

[0125] (b) 确定获自所述受试者的生物样品中至少一种式II所示的神经酰胺的浓度:



[0127] 其中R¹为具有13个碳原子的单不饱和烷基链或者具有15个碳原子的饱和、单不饱和或双不饱和烷基链,并且其中R²为具有15或17个碳原子的饱和烷基链,具有21-23个碳原子的单不饱和烷基链或具有23或25个碳原子的双不饱和烷基链;

[0128] (c) 将所述至少一种式I所示的神经酰胺的浓度和所述至少一种式II所示的神经酰胺的浓度与对照样品相比;和

[0129] (d) 与所述对照样品相比,如果所述样品含有降低浓度的所述至少一种式I所示的神经酰胺和升高浓度的所述至少一种式II所示的神经酰胺,则确定所述受试者需要治疗或者需要改变或补充已施用的治疗。

[0130] 在上述方法的一个实施方式中,确定至少2、至少3、至少4、至少5或至少6个式I所示的神经酰胺的浓度。在另一个实施方式中,确定至少2、至少3、至少4、至少5或至少6个式II所示的神经酰胺的浓度。在另一个实施方式中,确定至少2、至少3、至少4、至少5或至少6个式I所示的神经酰胺的浓度并且确定至少2、至少3、至少4、至少5或至少6个式II所示的神经酰胺的浓度。

[0131] 在上述方法的一个实施方式中,确定至少一种以下式(II)所示的神经酰胺的浓度: Cer (d18:1/16:0), Cer (d18:1/18:0) 和 Cer (d18:1/24:1)。在某些实施方式中,可以在上述方法中确定以下式(II)所示的神经酰胺或它们的组合:

[0132]

式(II)	式(II)	式(II)
Cer (d18:1/16:0)		
Cer (d18:1/18:0)		
Cer (d18:1/24:1)		
Cer (d18:1/16:0)	Cer (d18:1/18:0)	
Cer (d18:1/16:0)	Cer (d18:1/24:1)	
Cer (d18:1/18:0)	Cer (d18:1/24:1)	
Cer (d18:1/16:0)	Cer (d18:1/18:0)	Cer (d18:1/24:1)

[0133] 在另一个实施方式中,确定以下式(I)所示的神经酰胺的浓度: Cer (d18:1/24:0) 和至少一种以下式(II)所示的神经酰胺的浓度: Cer (d18:1/16:0)、Cer (d18:1/18:0) 和 Cer (d18:1/24:1)。在某些实施方式中,可以在上述方法中确定式(I)和式(II)所示的神经酰胺的下列组合的浓度:

[0134]

式(I)	式(II)	式(II)	式(II)
Cer (d18:1/24:0)	Cer (d18:1/16:0)		
Cer (d18:1/24:0)	Cer (d18:1/18:0)		
Cer (d18:1/24:0)	Cer (d18:1/24:1)		
Cer (d18:1/24:0)	Cer (d18:1/16:0)	Cer (d18:1/18:0)	

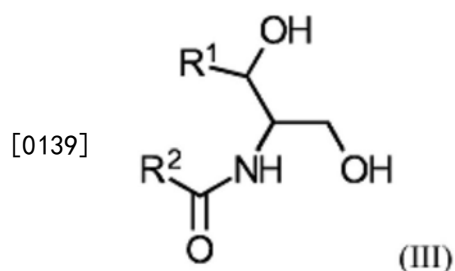
Cer (d18:1/24:0)	Cer (d18:1/16:0)	Cer (d18:1/24:1)	
Cer (d18:1/24:0)	Cer (d18:1/18:0)	Cer (d18:1/24:1)	
Cer (d18:1/24:0)	Cer (d18:1/16:0)	Cer (d18:1/18:0)	Cer (d18:1/24:1)

[0135] 另一个方面涉及先前未知存在于人血液样品中的A组神经酰胺亚类和/或B组神经酰胺亚类以及它们在确定受试者是否具有发展一种或多种CV并发症,如AMI、ACS、中风和CV死亡的风险的方法中的应用。下表1列出了新鉴别的神经酰胺:

[0136] 表1:新鉴别的d16:1和d18:2神经酰胺

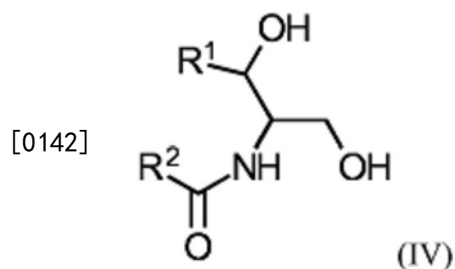
d16:1神经酰胺	d18:2神经酰胺
Cer (d16:1/16:0)	Cer (d18:2/16:0)
Cer (d16:1/18:0)	Cer (d18:2/18:0)
Cer (d16:1/22:0)	Cer (d18:2/22:0)
Cer (d16:1/23:0)	Cer (d18:2/22:1)
Cer (d16:1/24:0)	Cer (d18:2/23:0)
Cer (d16:1/24:1)	Cer (d18:2/23:1)
Cer (d16:1/24:2)	Cer (d18:2/24:0)
Cer (d16:1/26:0)	Cer (d18:2/24:1)
	Cer (d18:2/24:2)
	Cer (d18:2/26:0)

[0138] 代表A组神经酰胺亚类的新鉴别的神经酰胺具有式III所示的结构:



[0140] 其中R¹为具有13个碳原子的单不饱和烷基链或者具有15个碳原子的双不饱和烷基链,并且其中R²为具有21-23或25个碳原子的饱和烷基链。

[0141] 代表B组神经酰胺亚类的新鉴别的神经酰胺具有式IV所示的结构:

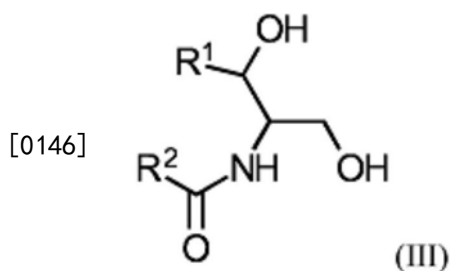


[0143] 其中R¹为具有13个碳原子的单不饱和烷基链,R²为具有15或17个碳原子的饱和烷基链,具有23个碳原子的单不饱和烷基链,或具有23个碳原子的双不饱和烷基链;或者其中R¹为具有15个碳原子的双不饱和烷基链,R²为具有15或17个碳原子的饱和烷基链,具有21-23个碳原子的单不饱和烷基链,或具有23个碳原子的双不饱和烷基链。

[0144] 因此,某些实施方式涉及用于确定受试者是否具有发展一种或多种CV并发症,如

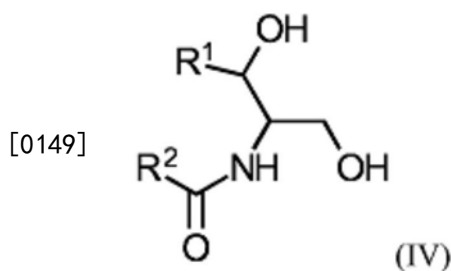
AMI、ACS、中风和CV死亡的风险的方法,其中所述方法包括

[0145] (a) 确定获自所述受试者的生物样品中至少一种式III所示的神经酰胺的浓度:



[0147] 其中R¹为具有13个碳原子的单不饱和烷基链或者具有15个碳原子的双不饱和烷基链,并且其中R²为具有21-23或25个碳原子的饱和烷基链;

[0148] (b) 确定获自所述受试者的生物样品中至少一种式IV所示的神经酰胺的浓度:



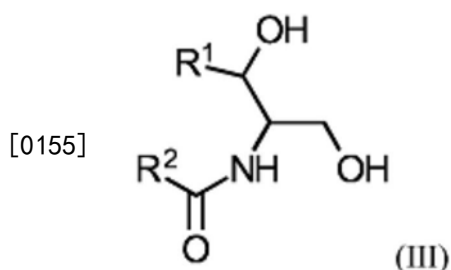
[0150] 其中R¹为具有13个碳原子的单不饱和烷基链,R²为具有15或17个碳原子的饱和烷基链,具有23个碳原子的单不饱和烷基链,或具有23个碳原子的双不饱和烷基链;或者其中R¹为具有15个碳原子的双不饱和烷基链,R²为具有15或17个碳原子的饱和烷基链,具有21-23个碳原子的单不饱和烷基链,或具有23个碳原子的双不饱和烷基链;

[0151] (c) 将所述至少一种式III所示的神经酰胺的浓度和所述至少一种式IV所示的神经酰胺的浓度与对照样品相比;和

[0152] (d) 与所述对照样品相比,如果所述生物样品含有降低浓度的所述至少一种式III所示的神经酰胺和升高浓度的所述至少一种式IV所示的神经酰胺,则确定所述受试者具有发展一种或多种CV并发症的升高风险。

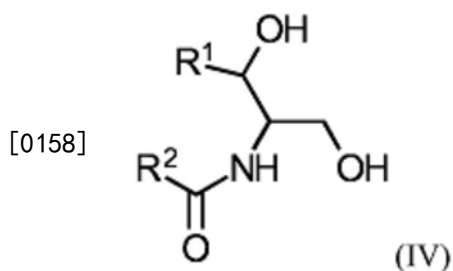
[0153] 另一个方面涉及用于评价受试者中CVD和/或一种或多种其并发症,如AMI、ACS、中风和CV死亡的治疗有效性的方法,所述方法包括:

[0154] (a) 确定获自所述受试者的生物样品中至少一种式III所示的神经酰胺的浓度:



[0156] 其中R¹为具有13个碳原子的单不饱和烷基链或者具有15个碳原子的双不饱和烷基链,并且其中R²为具有21-23或25个碳原子的饱和烷基链;

[0157] (b) 确定获自所述受试者的生物样品中至少一种式IV所示的神经酰胺的浓度:



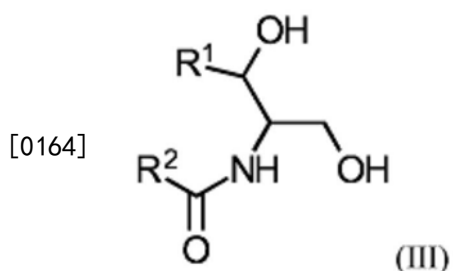
[0159] 其中 R^1 为具有13个碳原子的单不饱和烷基链, R^2 为具有15或17个碳原子的饱和烷基链,具有23个碳原子的单不饱和烷基链,或具有23个碳原子的双不饱和烷基链;或者其中 R^1 为具有15个碳原子的双不饱和烷基链, R^2 为具有15或17个碳原子的饱和烷基链,具有21-23个碳原子的单不饱和烷基链,或具有23个碳原子的双不饱和烷基链;

[0160] (c) 将所述至少一种式III所示的神经酰胺的浓度和所述至少一种式IV所示的神经酰胺的浓度与对照样品相比;和

[0161] (d) 与所述对照样品相比,如果所述样品含有相等或升高浓度的所述至少一种式III所示的神经酰胺和相等或降低浓度的所述至少一种式IV所示的神经酰胺,则确定所述治疗是有效的。

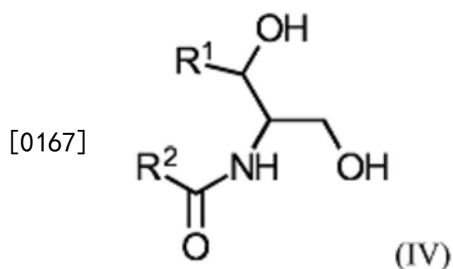
[0162] 另一个方面涉及在受试者中选择CVD和/或一种或多种其并发症,如AMI、ACS、中风和CV死亡的适合治疗的方法,所述方法包括以下步骤:

[0163] (a) 确定获自所述受试者的生物样品中至少一种式III所示的神经酰胺的浓度:



[0165] 其中 R^1 为具有13个碳原子的单不饱和烷基链或者具有15个碳原子的双不饱和烷基链,并且其中 R^2 为具有21-23或25个碳原子的饱和烷基链;

[0166] (b) 确定获自所述受试者的生物样品中至少一种式IV所示的神经酰胺的浓度:



[0168] 其中 R^1 为具有13个碳原子的单不饱和烷基链, R^2 为具有15或17个碳原子的饱和烷基链,具有23个碳原子的单不饱和烷基链,或具有23个碳原子的双不饱和烷基链;或者其中 R^1 为具有15个碳原子的双不饱和烷基链, R^2 为具有15或17个碳原子的饱和烷基链,具有21-23个碳原子的单不饱和烷基链,或具有23个碳原子的双不饱和烷基链;

[0169] (c) 将所述至少一种式III所示的神经酰胺的浓度和所述至少一种式IV所示的神经酰胺的浓度与对照样品相比;和

[0170] (d) 与所述对照样品相比,如果所述样品含有降低浓度的所述至少一种式III所示的神经酰胺和升高浓度的所述至少一种式IV所示的神经酰胺,则确定所述受试者需要治疗或者需要改变或补充已施用的治疗。

[0171] 在上述方法的一个实施方式中,确定至少2、至少3、至少4、至少5或至少6个式III所示的神经酰胺的浓度。在另一个实施方式中,确定至少2、至少3、至少4、至少5或至少6个式IV所示的神经酰胺的浓度。在另一个实施方式中,确定至少2、至少3、至少4、至少5或至少6个式III所示的神经酰胺的浓度并且确定至少2、至少3、至少4、至少5或至少6个式IV所示的神经酰胺的浓度。

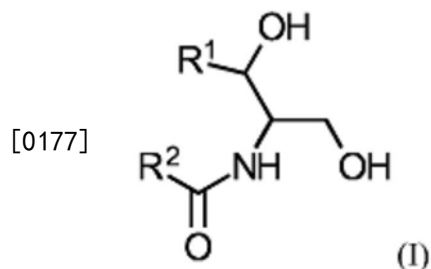
[0172] 在上述方法的某些实施方式中,根据下式确定至少一种式(I)所示的神经酰胺和至少一种式(II)所示的神经酰胺的浓度或者至少一种式(III)所示的神经酰胺和至少一种式(IV)所示的神经酰胺的浓度: $Z = (\text{式I所示的神经酰胺})^a / (\text{式II所示的神经酰胺})^b$ 或 $Z = (\text{式III的神经酰胺})^a / (\text{式IV示的神经酰胺})^b$,其中 $a, b \in \mathbb{R}$,并且(式I所示的神经酰胺)、(式II所示的神经酰胺)、(式III所示的神经酰胺)和(式IV所示的神经酰胺)分别表示式I所示的神经酰胺的浓度、式II所示的神经酰胺的浓度、式III所示的神经酰胺的浓度和式IV所示的神经酰胺的浓度。根据该实施方式,与所述对照样品相比,如果所述生物样品含有升高的Z值,则所述受试者具有发展一种或多种CV并发症的高风险。在其它实施方式中,与所述对照样品相比,如果所述样品含有相等或降低的Z值,则所述等式用于确定所述治疗是有效的。在另一个实施方式中,与所述对照样品相比,如果所述样品含有升高的Z值,则根据治疗心血管患者的适当方针以及其中开出的治疗方案和剂量施用,计算Z值以用于确定受试者需要治疗或者需要调整治疗水平。

[0173] 对于本文所述的方法和应用,进一步包括确定来自所述受试者的样品中总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、脱脂蛋白A-I、脱脂蛋白A-II和/或脱脂蛋白B(ApoB)和/或Apo脂蛋白C-III(ApoC-III)的血清水平的步骤可以是有用并且甚至有利的。此外,根据所公开的方法或应用的一个实施方式,所述受试者优选地是不具有以下中的一种或多种的升高的血清水平:总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、载脂蛋白C-III(ApoC-III)或载脂蛋白B(ApoB),或者HDL-胆固醇(HDL-C)降低的血清水平的受试者。

[0174] 5. 检测方法

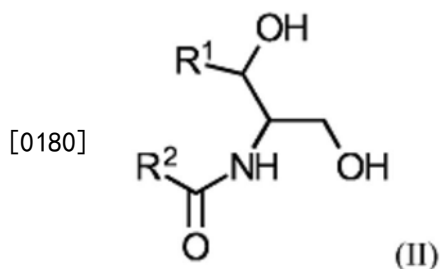
[0175] 本文还公开了在获自受试者的生物样品中检测至少一种式I所示的神经酰胺和至少一种式II所示的神经酰胺的浓度的方法,其中所述方法包括:

[0176] (a) 确定获自所述受试者的生物样品中至少一种式I所示的神经酰胺的浓度:



[0178] 其中 R^1 为具有13个碳原子的单不饱和烷基链或者具有15个碳原子的饱和、单不饱和或双不饱和烷基链,并且其中 R^2 为具有21-25个碳原子的饱和烷基链;

[0179] (b) 确定获自所述受试者的生物样品中至少一种式II所示的神经酰胺的浓度:



[0181] 其中R¹为具有13个碳原子的单不饱和烷基链或者具有15个碳原子的饱和、单不饱和或双不饱和烷基链,并且其中R²为具有15或17个碳原子的饱和烷基链,具有21-23个碳原子的单不饱和烷基链或具有23或25个碳原子的双不饱和烷基链;并且任选地

[0182] (c) 将所述至少一种式I所示的神经酰胺的浓度和所述至少一种式II所示的神经酰胺的浓度与对照样品相比。

[0183] 在上述方法的一个实施方式中,确定至少2、至少3、至少4、至少5或至少6个式I所示的神经酰胺的浓度。在另一个实施方式中,确定至少2、至少3、至少4、至少5或至少6个式II所示的神经酰胺的浓度。在另一个实施方式中,确定至少2、至少3、至少4、至少5或至少6个式I所示的神经酰胺的浓度并且确定至少2、至少3、至少4、至少5或至少6个式II所示的神经酰胺的浓度。

[0184] 在上述方法的一个实施方式中,确定至少一种以下式(II)所示的神经酰胺的浓度: Cer (d18:1/16:0), Cer (d18:1/18:0) 和 Cer (d18:1/24:1)。在某些实施方式中,可以在上述检测方法中确定以下式(II)所示的神经酰胺或它们的组合:

[0185]

式(II)	式(II)	式(II)
Cer (d18:1/16:0)		
Cer (d18:1/18:0)		
Cer (d18:1/24:1)		
Cer (d18:1/16:0)	Cer (d18:1/18:0)	
Cer (d18:1/16:0)	Cer (d18:1/24:1)	
Cer (d18:1/18:0)	Cer (d18:1/24:1)	
Cer (d18:1/16:0)	Cer (d18:1/18:0)	Cer (d18:1/24:1)

[0186] 在另一个实施方式中,确定以下式(I)所示的神经酰胺的浓度: Cer (d18:1/24:0) 和至少一种以下式(II)所示的神经酰胺的浓度: Cer (d18:1/16:0)、Cer (d18:1/18:0) 和 Cer (d18:1/24:1)。在某些实施方式中,可以在上述检测方法中确定式(I)和式(II)所示的神经酰胺的下列组合的浓度:

[0187]

式(I)	式(II)	式(II)	式(II)
Cer (d18:1/24:0)	Cer (d18:1/16:0)		
Cer (d18:1/24:0)	Cer (d18:1/18:0)		
Cer (d18:1/24:0)	Cer (d18:1/24:1)		
Cer (d18:1/24:0)	Cer (d18:1/16:0)	Cer (d18:1/18:0)	
Cer (d18:1/24:0)	Cer (d18:1/16:0)	Cer (d18:1/24:1)	
Cer (d18:1/24:0)	Cer (d18:1/18:0)	Cer (d18:1/24:1)	

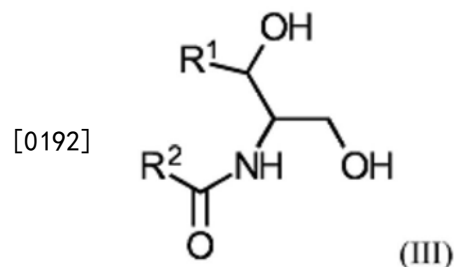
Cer (d18:1/24:0)	Cer (d18:1/16:0)	Cer (d18:1/18:0)	Cer (d18:1/24:1)
------------------	------------------	------------------	------------------

[0188] 在上述方法的一个实施方式中,所述生物样品和所述对照样品包含至少一种同位素(例如,氘)标记的式I所示的神经酰胺和至少一种同位素(例如,氘)标记的式II所示的神经酰胺。一般地,同位素-标记的神经酰胺将是在生物样品中检测的相同的神经酰胺。例如,如果确定以下式II所示的神经酰胺的浓度: Cer (d18:1/16:0)、Cer (d18:1/18:0) 和 Cer (d18:1/24:1) 和以下式I所示的神经酰胺的浓度: Cer (d18:1/24:0), 则所述生物样品和所述对照样品将包含同位素-标记的 Cer (d18:1/16:0)、同位素-标记的 Cer (d18:1/18:0)、同位素-标记的 Cer (d18:1/24:1) 和同位素-标记的 Cer (d18:1/24:0)。

[0189] 在上述方法的一个实施方式中,受试者先前经受了心血管疾病事件,如心绞痛、心肌梗塞或中风。

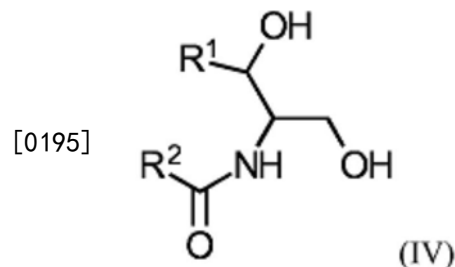
[0190] 本文还公开了在获自受试者的生物样品中检测至少一种式III所示的神经酰胺和至少一种式IV所示的神经酰胺的浓度的方法,其中所述方法包括:

[0191] (a) 确定获自所述受试者的生物样品中至少一种式III所示的神经酰胺的浓度:



[0193] 其中R¹为具有13个碳原子的单不饱和烷基链或者具有15个碳原子的双不饱和烷基链,并且其中R²为具有21-23或25个碳原子的饱和烷基链;

[0194] (b) 确定获自所述受试者的生物样品中至少一种式IV所示的神经酰胺的浓度:



[0196] 其中R¹为具有13个碳原子的单不饱和烷基链,R²为具有15或17个碳原子的饱和烷基链,具有23个碳原子的单不饱和烷基链,或具有23个碳原子的双不饱和烷基链;或者其中R¹为具有15个碳原子的双不饱和烷基链,R²为具有15或17个碳原子的饱和烷基链,具有21-23个碳原子的单不饱和烷基链,或具有23个碳原子的双不饱和烷基链;并且任选地

[0197] (c) 将所述至少一种式III所示的神经酰胺的浓度和所述至少一种式IV所示的神经酰胺的浓度与对照样品相比。

[0198] 在上述方法的一个实施方式中,确定至少2、至少3、至少4、至少5或至少6个式III所示的神经酰胺的浓度。在另一个实施方式中,确定至少2、至少3、至少4、至少5或至少6个式IV所示的神经酰胺的浓度。在另一个实施方式中,确定至少2、至少3、至少4、至少5或至少6个式III所示的神经酰胺的浓度并且确定至少2、至少3、至少4、至少5或至少6个式IV所示的神经酰胺的浓度。

[0199] 在上述方法的一个实施方式中,所述生物样品和所述对照样品包含至少一种同位素(例如,氘)标记的式III所示的神经酰胺和至少一种同位素(例如,氘)标记的式IV所示的神经酰胺。一般地,同位素-标记的神经酰胺将是在生物样品中检测的相同的神经酰胺。

[0200] 在上述方法的一个实施方式中,受试者先前经受了心血管疾病事件,如心绞痛、心肌梗塞或中风。

[0201] 6. 测量神经酰胺的浓度

[0202] 结合本文所述和所主张的所有方面和实施方式,通常使用测定进行神经酰胺浓度的确定。可以通过多种化学和高分辨分析技术进行来自受试者样品和(在适当情况下)相应对照样品的神经酰胺的浓度的收集信息。适合的分析技术包括(但不限于)质谱和核磁共振光谱。能够分辨单个神经酰胺或神经酰胺种类并提供它们的结构信息的任何高分辨率技术可以用于收集所讨论的神经酰胺标志物的信息,例如,来自生物样品的神经酰胺谱。使用质谱法(MS)收集神经酰胺标志物的信息是所公开方法的优选实施方式之一。MS仪可以连接至直接样品注入法(direct sample infusion method),如自动纳流离子源装置,或连接至高效分离方法(high performance separation method),如高效液相色谱法(HPLC)或超高效液相色谱(UPLC)。

[0203] 可以使用其它方法或者可以将其它方法与MS和/或HPLC/UPLC结合来检测所关心的神经酰胺,包括(例如)核磁共振谱、液相色谱、薄层色谱、气相色谱、荧光光谱或双偏振干涉法和/或免疫测定,如ELISA。根据替代选择或其它实施方式,可以使用能够特异地结合神经酰胺的结合部分来检测和/或定量样品中的神经酰胺。所述结合部分可以包括(例如)配体-受体对成员,即能够具有特异性结合相互作用的一对分子。结合部分还可以包括(例如)特异性结合对成员,如抗体-抗原、酶-底物、核酸-基配体、其它蛋白配体或本领域中已知的其它特异性结合对。

[0204] 在优选的实施方式中,使用质谱法(MS)测量神经酰胺浓度,其中MS仪可以与直接注入法或高效分离方法,如HPLC或者UPLC相结合。

[0205] 7. 样品制备和同位素-标记的神经酰胺

[0206] 根据本文所述和所主张的方法,来自受试者的生物样品和对照样品两者均优选地为血液样品,更优选地,血浆样品或血清样品。所述样品还可以是干燥的血斑。它还可以是血液、血浆或血清的一部分,例如,从样品提取的脂质部分。可以结合(例如)测量患者中胆固醇含量来采集血液样品。可以制备所采集的血液样品,并且可以使用本领域技术人员熟知的技术来分离血清或血浆。可以使用针和BD Vacutainer®塑料管或者 Vacutainer®Plus 塑料管(BD Vacutainer® SST™管含有用于血清分离的喷雾涂层硅胶和聚合物凝胶)从患者采集静脉血液样品。可以(例如)通过在室温下以1300RCF离心10分钟从采集的血液样品分离血清,并将血清在-80℃保存在小塑料管中。可以(例如)通过在4℃以2,500×g离心5分钟分离血浆。通过将血斑置于滤纸上并使其风干来制备干燥血斑。

[0207] 作为另外一种选择,来自受试者的样品和对照样品两者均还可以是组织样品,例如,动脉组织,如颈动脉组织,或动脉斑块材料,如颈动脉斑块材料。

[0208] 在一个实施方式中,所述生物样品加标(spike)已知量的同位素-标记的A组、B组、C组或D组神经酰胺。可以使用可用于检测所关心的神经酰胺的任何同位素,其包括(但不限于)氢(例如,氘)、碳和氧同位素。在优选的实施方式中,在脂质提取之前,所述生物样品加

标同位素-标记的神经酰胺。将同位素-标记的神经酰胺用作内标而不是天然存在的分子。在优选的实施方式中,将氘标记物用于产生氘标记的神经酰胺,其包括(但不限于)N-棕榈酰-D-赤-鞘氨醇-d7 (N-palmitoyl-D-erythro-sphingosine-d7) (d18:1/16:0)、N-硬脂酰-D-赤-鞘氨醇-d7 (N-stearoyl-D-erythro-sphingosine-d7) (d18:1/18:0)、N-二十四碳酰基-D-赤-鞘氨醇-d7 (N-lignoceroyl-D-erythro-sphingosine-d7) (d18:1/24:0) 和N-二十四碳稀酰基-D-赤-鞘氨醇-d7 (N-nervonoyl-D-erythro-sphingosine-d7) (Cer (d18:1/24:1))。

[0209] 8. 对照

[0210] 将获自受试者的生物样品中的神经酰胺水平与对照相比较。所述对照可以是来自健康个体的生物样品。所述对照还可以是来自不具有重大CVD事件史的CAD患者的样品。它还可以是代表来自健康个体的一般群体的样品组合的样品或者代表来自没有重大CVD事件史的CAD患者群体的样品组合的样品。所述生物样品可以是全血、血清或血浆。它还可以是组织样品。然而,在优选的实施方式中,所述生物样品是血浆或血清。

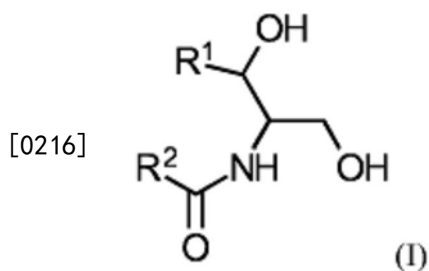
[0211] 作为另外一种选择,所述对照可以是有关根据本发明的神经酰胺标志物的一组数据,例如,当采取自健康个体时,样品中的,或者当采取自健康个体的一般群体时,或采取自没有重大CVD事件史的CAD患者时,或者采取自没有重大CVD事件史的CAD患者群体时,样品组合中的根据本发明的神经酰胺浓度的信息。所述信息,以及因此获得的相应数据组可以是先前确定的、计算的或外推的,或者可以是有待于确定的、计算的或外推的,或者还可以取自文献。

[0212] 在评价治疗有效性的方法中,如以上所讨论的,所述对照样品可以来自健康个体,在这种情况下,来自受试者的生物样品含有与对照样品大致相同或相等(未显著不同)的至少一种A组(或C组)神经酰胺和至少一种B组(或D组)神经酰胺的浓度的发现表明所述治疗是有效的。作为另外一种选择,所述对照样品可以获自具有发展一种或多种CV并发症,如AMI、ACS、中风或CV死亡的风险的受试者。在某些实施方式中,获得对照样品的受试者是正在治疗的相同个体,在这种情况下,相对于对照样品提高的至少一种A组(或C组)神经酰胺的浓度和相对于对照样品降低的至少一种B组(或D组)神经酰胺的浓度表明治疗是有效的。

[0213] 9. 组合物和试剂盒

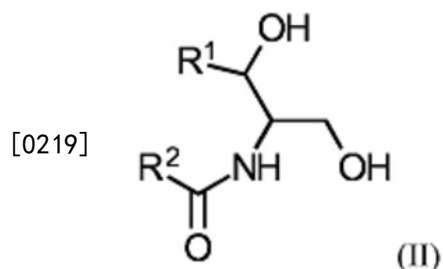
[0214] 另一个方面是用于预测CV并发症或者用于实施本文所公开的任何方法的试剂盒,其中所述试剂盒包含至少一种同位素(例如,氘)标记的A、B、C或D组神经酰胺和任选地用于实施所述方法的一种或多种试剂。还涵盖了包含至少一种同位素(例如,氘)标记的A、B、C或D组神经酰胺的组合物。

[0215] 在一个实施方式中,所述组合物或试剂盒包含至少一种同位素(例如,氘)-标记的式I所示的神经酰胺:



[0217] 其中R¹为具有13个碳原子的单不饱和烷基链或者具有15个碳原子的饱和、单不饱和或双不饱和烷基链,并且其中R²为具有21-25个碳原子的饱和烷基链。

[0218] 在另一个实施方式中,所述组合物或试剂盒包含至少一种同位素(例如,氘)-标记的式II所示的神经酰胺:



[0220] 其中R¹为具有13个碳原子的单不饱和烷基链或者具有15个碳原子的饱和、单不饱和或双不饱和烷基链,并且其中R²为具有15或17个碳原子的饱和烷基链,具有21-23个碳原子的单不饱和烷基链或具有23或25个碳原子的双不饱和烷基链。

[0221] 例如,在某些实施方式中,所述组合物或试剂盒包含以下同位素(例如,氘)-标记的式II所示的神经酰胺中的一种或它们的组合:

[0222]

式 (II)	式 (II)	式 (II)
Cer (d18:1/16:0)		
Cer (d18:1/18:0)		
Cer (d18:1/24:1)		
Cer (d18:1/16:0)	Cer (d18:1/18:0)	
Cer (d18:1/16:0)	Cer (d18:1/24:1)	
Cer (d18:1/18:0)	Cer (d18:1/24:1)	
Cer (d18:1/16:0)	Cer (d18:1/18:0)	Cer (d18:1/24:1)

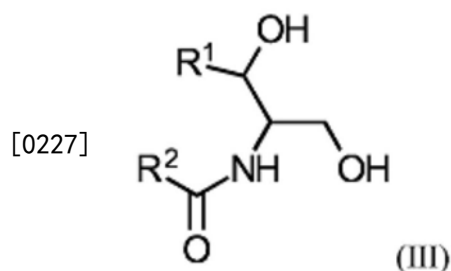
[0223] 在另一个实施方式中,所述试剂盒或组合物包含至少一种同位素(例如,氘)-标记的式I所示的神经酰胺和至少一种同位素(例如,氘)-标记的式II所示的神经酰胺。在其它实施方式中,所述试剂盒或组合物包含至少2、至少3、至少4、至少5或至少6个同位素(例如,氘)-标记的式I所示的神经酰胺和/或至少2、至少3、至少4、至少5或至少6个同位素(例如,氘)-标记的式II所示的神经酰胺。

[0224] 例如,在某些实施方式中,所述组合物或试剂盒包含同位素(例如,氘)-标记的式(I)和式II所示的神经酰胺的下列组合:

[0225]

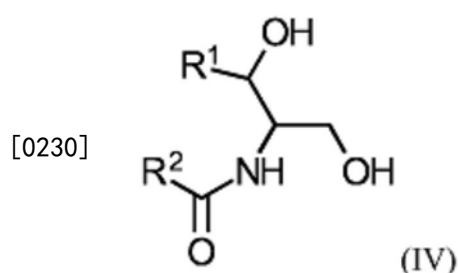
式 (I)	式 (II)	式 (II)	式 (II)
Cer (d18:1/24:0)	Cer (d18:1/16:0)	:	:
Cer (d18:1/24:0)	Cer (d18:1/18:0)	:	:
Cer (d18:1/24:0)	Cer (d18:1/24:1)	:	:
Cer (d18:1/24:0)	Cer (d18:1/16:0)	Cer (d18:1/18:0)	:
Cer (d:8:1/24:0)	Cer (d18:1/16:0)	Cer (d18:1/24:1)	:
Cer (d:8:1/24:0)	Cer (d18:1/18:0)	Cer (d18:1/24:1)	
Cer (d:8:1/24:0)	Cer (d18:1/16:0)	Cer (d18:1/18:0)	Cer (d18:1/24:1)

[0226] 在其它实施方式中,所述组合物或试剂盒包含至少一种同位素(例如,氘)-标记的式III所示的神经酰胺:



[0228] 其中R¹为具有13个碳原子的单不饱和烷基链或者具有15个碳原子的双不饱和烷基链,并且其中R²为具有21-23或25个碳原子的饱和烷基链。

[0229] 另一个方面涉及包含至少一种同位素(例如,氘)-标记的式IV所示的神经酰胺的组合物或试剂盒:



[0231] 其中R¹为具有13个碳原子的单不饱和烷基链,R²为具有15或17个碳原子的饱和烷基链,具有23个碳原子的单不饱和烷基链,或具有23个碳原子的双不饱和烷基链;或者其中R¹为具有15个碳原子的双不饱和烷基链,R²为具有15或17个碳原子的饱和烷基链,具有21-23个碳原子的单不饱和烷基链,或具有23个碳原子的双不饱和烷基链。

[0232] 在另一个实施方式中,所述试剂盒或组合物包含至少一种同位素(例如,氘)-标记的式III所示的神经酰胺和至少一种同位素(例如,氘)-标记的式IV所示的神经酰胺。在其它实施方式中,所述试剂盒或组合物包含至少2、至少3、至少4、至少5或至少6个同位素(例如,氘)-标记的式III所示的神经酰胺和/或至少2、至少3、至少4、至少5或至少6个同位素(例如,氘)-标记的式IV所示的神经酰胺。所述组合物还可以包含溶液,如蒸馏水、缓冲溶液或其它适合的溶剂。

[0233] 本文所公开的所有试剂盒可以附有使用它们来预测CV并发症,如AMI、ACS、中风和CV死亡的说明书。

[0234] 10. 计算机实施的诊断方法

[0235] 根据本文所公开的所有方面和实施方式,所提供的方法可以是计算机实施的。

[0236] 在一个实施方式中,本发明任何计算机-实施的方法还可以包括以下步骤:(i)通过至少一个处理器获得反映生物样品中至少一种A组神经酰胺和至少一种B组神经酰胺(或者至少一种C组神经酰胺和至少一种D组神经酰胺)的浓度的信息;和(ii)以用户可读格式输出生物样品中至少一种A组神经酰胺和至少一种B组神经酰胺(或者至少一种C组神经酰胺和至少一种D组神经酰胺)的浓度。

[0237] 在另一个实施方式中,计算机-实施的方法还可以包括以下步骤:通过至少一个处理器确定生物样品中对照和至少一种A组神经酰胺和至少一种B组神经酰胺(或者至少一种

C组神经酰胺和至少一种D组神经酰胺)的浓度之间的差异百分比;和以用户可读格式输出在确定步骤(iii)中获得的差异百分比。

[0238] 在另一个实施方式中,计算机-实施的方法还可以包括以下步骤:基于输出步骤中获得的差异百分比,确定受试者是否具有发展一种或多种CV并发症的风险。

[0239] 在计算机-实施的方法的一个实施方式中,至少一种A组神经酰胺包括Cer (d18:1/24:0) 和至少一种B组神经酰胺包括Cer (d18:1/16:0)、Cer (d18:1/18:0) 和Cer (d18:1/24:1)。

[0240] 在如图4所示的实施方式中,计算机系统106可以包括一个或多个处理器110,其与运行受操作系统控制或结合操作系统运行的随机存取存储器相结合。实施方式中的处理器110可以包含在一个或多个服务器、群集器(cluster)或其它计算机或硬件资源中,或者可以使用基于云的资源实施。所述操作系统可以是(例如)LinuxTM操作系统、UnixTM操作系统,或其它开源(open-source)或专有操作系统或平台的分布。处理器110可以与数据存储112,如在硬盘或驱动器组上存储的数据库通信,以存取或存储其它数据的程序命令。

[0241] 处理器110还可以通过网络接口108通信,所述网络接口反过来可以通过一种或多种网络104通信,如因特网或其它公共或私人网络,从而可以从客户机102或者其它装置或服务接收查询或其它请求。另外,处理器110可以使用网络接口108通过一种或多种网络104将信息、指令、工作流查询部分工作流或其它数据发送至用户。网络接口104可以包括或通信连接至一个或多个服务器。客户机102可以是(例如)与因特网连接的个人电脑。

[0242] 一般地,可以编程或配置处理器110以执行控制逻辑和控制运行以实施本文所公开的方法。处理器110可以进一步通信连接(即,通过通信信道连接)至协同处理器(co-processors)114。协同处理器114可以是专用硬件和/或固件组件(firmware components),其配置以执行本文所公开的方法。因此,可以通过处理器110和/或协同处理器114执行本文所公开的方法。

[0243] 计算机系统106、相关网络连接以及其它硬件、软件和服务资源的其它配置是可能的。

[0244] 以下实施例进一步定义和描述了本文中的实施方式。

[0245] 实施例

[0246] 实施例1

[0247] 研究患者。Corogene研究是前瞻性群组研究,其中依次将5000位芬兰患者送去赫尔辛基大学中心医院(Helsinki University Central Hospital)进行诊断性冠状动脉血管造影。在本研究中,分析了436位CAD患者,他们在至少一条冠状动脉中具有>50%的狭窄。在该嵌套式-病例-对照研究中,每个病例匹配一位对照受试者。情况是在平均2.5年的随访期内,CAD患者由于CV原因死亡。匹配对照是在随访期间不出于任何原因死亡的CAD患者。匹配准则包括:年龄、性别、体重指数、他汀类的使用、抽烟和2型糖尿病。

[0248] 分析方法。为了定量,使用在Hamilton Microlab Star机器人上进行的改良Folch脂质提取法提取神经酰胺,如Jung HR等人,High throughput quantitative molecular lipidomics.Biochim Biophys Acta.2011Nov;1811(11):925-34中所述,该文献以其全部内容作为参考并入本文。样品加标已知量的非内源合成内标。在脂质提取后,将样品在氯仿:甲醇(1:2,v/v)中复原并将合成外标在提取后加标至提取物中。在MS分析前,将提取物

保存在-20℃。

[0249] 根据Sullards MC等人, Structure-specific, quantitative methods for analysis of sphingolipids by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: "inside-out" sphingolipidomics. *Methods Enzymol.* 2007; 432: 83-115, 在配备有超高压液相色谱(UHPLC)系统(Eksigent ultraLC 100 system)的混合型三重四极杆/线性离子阱质谱(5500QTRAP)上使用基于多反应监控(MRM)的方法以负离子模式分析神经酰胺。

[0250] 补充LC-MRM分析以包括先前未知存在于人血浆中的(d16:1和d18:2)神经酰胺的新组的精确测量(参见表1)。通过后续MS/MS分析和保留时间验证了它们在人血浆中的存在。在MS/MS中,通过预期分子离子所产生的选择性鞘氨醇碎片离子确认了鉴别,例如,对应于d16:1的236.25的m/z,对应于d18:2的262.25的m/z。此外,通过系统保留时间的改变对其进行补充。特征迁移确认了新型神经酰胺物质的身份。出于在本发明申请中所述的目的,它们的存在和作为生物标志物进行的能力是惊奇且意外的。

[0251] 将通过质谱法获得的所检测峰的质量和计数转化为相应脂质名称和浓度列表。产生标定线(calibration lines)以确定所监控的每个脂质种类的动态定量范围,例如,定量限。内标用于定量内源脂质物质。标定线用于确定所述方法的定量限。

[0252] 应用严格的截止值,从而将背景噪声与实际脂质峰分离。控制每个样品,并且仅当满足接受标准时接受。将所检测峰的质量和计数转化为相应脂质名称的列表。将脂质归一化为它们各自的内标和样品体积以获得它们的浓度。

[0253] Cer(d18:1/16:0)、Cer(d18:1/18:0)、Cer(d18:1/24:0)和Cer(d18:1/24:1)分子的靶标神经酰胺定量。如Jung等人所述,使用在Hamilton Microlab Star机器人上进行的改良Folch脂质提取法提取神经酰胺。对于Cer(d18:1/16:0)、Cer(d18:1/18:0)、Cer(d18:1/24:0)和Cer(d18:1/24:1)的特定组合的定量,在脂质提取之前将生物样品加标已知量的以下氘标记的内标:N-棕榈酰-D-赤-鞘氨醇-d7(d18:1/16:0)、N-硬脂酰-D-赤-鞘氨醇-d7(d18:1/18:0)、N-二十四碳酰基-D-赤-鞘氨醇-d7(d18:1/24:0)和N-二十四碳稀酰基-D-赤-鞘氨醇-d7(Cer(d18:1/24:1))。由于没有适合的不含脂质的基质可用,在溶液中制备标定线的标准品。将已知量的分析物和稳定同位素-标记的内标加入至氯仿:甲醇(1:2,v/v)中以制备标定线的点。

[0254] 使用基于多反应监控(MRM)的方法,以正离子模式在配备有超高压液相色谱(UHPLC)系统(Eksigent ultraLC 100 system)的混合型三重四极杆/线性离子阱质谱(QTRAP 5500)上进行LC-MS/MS。

[0255] 将样品提取物(5μL)在60℃的柱温下加载到连接至Waters Acquity BEH C18, 1.7 μm VanGuard预柱(前置柱)的Waters Acquity BEH C18, 2.1×50mm id. 1.7 μm上。流动相A包括10mM乙酸铵在具有0.1%甲酸的HPLC级水中的溶液和流动相B。流速0.5μL/min,梯度如下:0.0-0.5min, 85%B; 0.5-1.5min, 85至100%B; 1.5-4, 100%B; 4.10-5min, 85%B。源温度设置为300℃;离子喷雾为5000V;去簇电压(declustering potential)为30V;入口电位(entrance potential)为10;气体1和气体2设置为50和30。每次扫描的停留时间是25msec,碰撞能设置为40V。总采集时间为4.5分钟。

[0256] 使用Analyse软件(1.6版)采集数据,并使用MultiQuant(3.0版)处理。例如,对Cer(d18:1/16:0)和Cer(d18:1/18:0)使用 $1/x^2$ 的权重,对Cer(d18:1/24:1)和Cer(d18:1/24:

1) 使用 $1/y^2$ 的权重,通过分析物/内标的峰面积比对实际浓度作图构建标定线曲线。从标定线读出样品的峰面积比。

[0257] 对于母体离子的MS/MS,标记标准品的鞘氨醇主链中的7氘在它们的鞘氨醇碎片离子中提供了7Da的质量迁移。因此,在内源物质和内标的MRM分析中包括鞘氨醇碎片离子的母体离子的质量差将为7Da,例如,Cer d18:1/16:0和D7-Cer 18:1/16:0的MRM转变分别为538.5/264.2和545.5/271.2。

[0258] 内标和包含质量迁移的相应内源物质的相同分析行为,如提取回收率、电离和保留时间有助于精确测量和定量。从标定线读取样品中内源神经酰胺与其内标的峰面积比以提供样品中内源神经酰胺准确的量。如前所述,通过LC-MRM分析混合了确定量的氘化标准物的内源神经酰胺的稀释系列来获得标定线。

[0259] 具体地,为该测定制备了氘标记的内标。因此,先前未进行这些具体的氘标记的神经酰胺的绝对定量。

[0260] 统计方法。机会比定量描述了对于群体中稳定的CAD个体,所述心血管结局事件的存在/不存在和无事件的存在/不存在之间的关系。每标准偏差的机会比(OR/SD) 定量了作为对变量中一个标准偏差变化的响应,病例组中阳性预测的机会除以对照组中阳性预测的机会。四分位数机会比(OR 2-4) 定量了相对于第一四分位数中的这些比值,不同四分位数中阳性结局与阴性结局的比值。接收工作特性曲线下面积(AUC) 描述了标志物整体预测表现。其值在0和1之间,其中0.5对应于随机结局预测,50/50(例如,硬币翻转),并且较高的值表明了灵敏度(sens) 和特异性(spec) 而言更好的预测准确度。将平均相对变化(MRC%) 计算为病例与对照组之间神经酰胺浓度的平均值的差异除以对照组中的平均值。使用学生氏t检验,对log-转换的数据计算P-值。还计算了q-值估计值的假发现率。这些q-值估计了p-值小于相应标志物的p-值的所有标志物中假阳性发现的百分比。

[0261] 使用脂质浓度(模型中任一单个脂质或两个脂质,其对应于单个标志物相对于两个标志物的诊断模型),将用于解释病例相对于对照分组的逻辑回归模型对Corogene研究群体进行拟合。估计了具有偏差统计的似然比检验。通常,将偏差测量用于比较模型。偏差是模型的拟合统计质量,其代表了模型和数据之间缺少拟合的测量。一般地,偏差越大,则数据和模型之间的拟合越差。偏差通常不能直接解释,而是与对相同数据拟合的其它模型的偏差相比较。参见,例如,Nelder,J.A.;Wedderburn,R.W.M. (1972). "Generalized Linear Models." Journal of the Royal Statistical Society. Series A (General) 135 (3): 370-84.

[0262] 可以将似然比检验应用于嵌套模型,即应用于两个模型,一个具有更大数量的变量,而另一个具有更大模型的变量亚组。偏差统计大致遵循卡方分布,根据它可以估计统计显著性。在本发明中,已将 $p < 0.05$ 用作显著性差异的阈值。如果 $p > 0.05$,就将病例与对照相区分而言,两个模型彼此不显著不同。相反,当 $p < 0.05$ 时,具有较大数目变量的模型优于较小的模型。使用偏差统计的用于嵌套模型的似然比检验是用于比较具有不同变量数目的模型的已建立的方法。

[0263] 结果。在实例研究中,在随访期间,将具有CV事件的CAD患者中的神经酰胺浓度与无事件的对照受试者相比较。图1和2通过最小学生氏t检验p-值显示了10种A组和10种B组神经酰胺物质的平均相对变化/差异(病例相对于对照组平均值的差异除以对照组的平均

浓度)。由于A组或B组中大部分神经酰胺物质以 $p < 0.05$ 将病例与对照组相区分,因此这些证明了单个神经酰胺物质将高风险患者(具有未来出现CV事件)与对照患者相区分的能力(例如,更好的机会比(AUC),或灵敏度和特异性,较低的p值)。

[0264] 还分析了不属于A组或B组的神经酰胺,并且发现,一般地,通过对log-转化的浓度估计值的学生氏t检验,这些神经酰胺不能以 $p < 0.05$ 将病例与对照相区分,如图3所示。

[0265] 将偏差统计用于分析随访期间,与无事件的对照受试者相比,来自Corogene研究的患者,具体地,具有CV事件的CAD患者的神经酰胺浓度的不同组合。在模型比较1-9中总结了偏差统计的结果。

[0266] 实施例2

[0267] 模型比较1。在模型比较1中,将单个神经酰胺物质(A组或B组)与两个神经酰胺的组合相比,其中一个来自A组,另一个来自B组。在模型比较1中,对于组合的两个标志物模型对任一个单个标志物模型的 $\text{Pr}(>\text{Chi}) < 0.05$ 的事实表明组合模型的区分能力显著地优于单个标志物模型,如下表4所示。

[0268] 表4:模型比较1

[0269]	Cer(d18:1/16:0) (B) vs.		Cer(d18:1/24:0) (A) vs.	
	Cer(d18:1/16:0) (B) + Cer(d18:1/24:0) (A)		Cer(d18:1/24:0) (A) + Cer(d18:1/16:0) (B)	
	偏差	$\text{Pr}(>\text{Chi})$	偏差	$\text{Pr}(>\text{Chi})$
	-45,2	$1,80 \cdot 10^{-11}$	-77,0	$2,20 \cdot 10^{-16}$

[0270] 实施例3

[0271] 模型比较2。没有具体理由将区分模型限制于仅两个神经酰胺的组合。然而,出于实用的目的和出于限制成本的原因,优选地使用尽可能少的神经酰胺。因此,必须在提高灵敏度和特异性的益处与分析更多分子脂质物质的额外费用之间权衡。在模型比较2中,将使用2个神经酰胺物质的模型与使用3个神经酰胺物质的模型进行比较,其中所述3个神经酰胺标志物包括至少一个A组神经酰胺和至少一个B组神经酰胺。在模型比较2中,对于组合的3个标志物模型对任一个双标志物模型的 $\text{Pr}(>\text{Chi}) < 0.05$ 表明3个标志物模型的区分能力显著优于双标志物模型,如下表5所示。

[0272] 表5:模型比较2

[0273]	Cer(d18:0/18:0) (B) + Cer(d18:1/23:1) (B) vs.		Cer(d18:0/18:0) (B) + Cer(d18:2/25:0) (A) vs.	
	Cer(d18:0/18:0) (B) + Cer(d18:1/23:1) (B) + Cer(d18:2/25:0) (A)		Cer(d18:0/18:0) (B) + Cer(d18:2/25:0) (A) + Cer(d18:1/23:1) (B)	
	偏差	$\text{Pr}(>\text{Chi})$	偏差	$\text{Pr}(>\text{Chi})$
	-42,4	$7,30 \cdot 10^{-11}$	-33,3	$7,70 \cdot 10^{-09}$

[0274] 实施例4

[0275] 模型比较3:提高模型中神经酰胺物质的数目未必表示将获得更好的模型。举例来说,模型比较3显示3个神经酰胺的模型不优于2个神经酰胺的模型。在这种情况下,将来自B组的2个神经酰胺的组合与来自B组的3个神经酰胺相比较。在模型比较3中,与2个标志物的模型相比,对于组合的3个标志物的模型的 $\text{Pr}(>\text{Chi}) > 0.05$ 表明3个标志物的模型的区分能

力未显著优于双标志物模型,如表6所示。

[0276] 表6:模型比较3

[0277]	Cer(d18:1/23:1) (B) + Cer(d18:1/18:0) (B) vs. Cer(d18:1/23:1) (B) + Cer(d18:0/18:0) (B) + Cer(d18:1/18:0) (B)	
	偏差	Pr(>Chi)
	-2,3	0,1321

[0278] 因此,模型比较3表明仅提高神经酰胺的数目不会导致改善的模型表现。然而,应根据本发明申请中所提供的指导来选择组合的神经酰胺,其中有至少一种A组神经酰胺和至少一种B组神经酰胺。

[0279] 实施例5

[0280] 模型比较4。模型比较4中显示了神经酰胺物质的有趣组合。该组合包括3个B组神经酰胺: Cer (d18:1/16:0)、Cer (d18:1/18:0) 和 Cer (d18:1/24:1) 和一个A组神经酰胺: Cer (d18:1/24:0)。该特别组合系统地出现在所有分析的研究群体中。另外,一般地,与神经酰胺物质的丰度相比,在人血清或血浆样品中富含模型比较4中的神经酰胺物质。组合了所述4种神经酰胺物质的模型的表现优于任何情况下使用其单个组分的模型 (所有的Pr (>Chi) < 0.05), 如表7所示。

[0281] 表7:模型比较4

[0282]	Cer(d18:1/16:0) (B) + Cer(d18:1/18:0) (B) + Cer(d18:1/24:0) (A) + Cer(d18:1/24:1) (B)	
	vs. Cer(d18:1/16:0)	
	偏差	Pr(>Chi)
	-66,3	$2,69 \cdot 10^{-14}$
	vs. Cer(d18:1/18:0)	
	偏差	Pr(>Chi)
	-59,9	$6,06 \cdot 10^{-13}$
	vs. Cer(d18:1/24:0)	
	偏差	Pr(>Chi)
	-98,1	$2,20 \cdot 10^{-16}$
	vs. Cer(d18:1/24:1)	
	偏差	Pr(>Chi)
	-86,4	$2,20 \cdot 10^{-16}$

[0283] 实施例6

[0284] 模型比较5-7。一般地,可能认为生物标志物组合的诊断能力将随所分析的生物标志物的数目的提高而提高。然而,如模型比较3所示,在预测CV并发症的情况下,这种认识对于神经酰胺生物标志物不一定适用。模型比较5-7进一步证明在模型中简单提高神经酰胺物质的数目,而不应用选择至少一种A组神经酰胺和至少一种B组神经酰胺的规则,这不会改善模型表现。因此,模型比较5-7证明与基于最近鉴别的选择至少一种A组神经酰胺和至少一种B组神经酰胺的规则来选择神经酰胺相比,随机选择神经酰胺缺少诊断能力。

[0285] 在模型比较5中,分析了不属于A组或B组的神经酰胺的组合。在表8中,显示了15个模型比较以及它们的偏差统计和卡方p-值估计 ($p < 0.05$ 表示模型之间存在显著性差异)。在

每个模型比较中,比较了不包含至少一种A组神经酰胺和至少一种B组神经酰胺的神经酰胺的随机组合。在具有不同模型大小的所有15个实施例中,偏差统计的p-值大于0.05,这表示与具有较少神经酰胺的模型相比,具有更多非A/B神经酰胺的模型在区分病例-对照分组方面不会显著更好。

[0286] 表8:模型比较5

A 和 B 组外的组合的比较	偏差	P- 值
Cer(d18:1/20:0)+Cer(d18:1/21:0)+Cer(d18:1/26:2)+Cer(d18:0/20:0) vs Cer(d18:1/20:0)+Cer(d18:1/26:2)+Cer(d18:0/20:0)	-8,08*10 ⁻⁰⁵	0,992826
Cer(d18:1/21:0)+Cer(d18:1/20:0)+Cer(d18:1/26:2) vs Cer(d18:1/20:0)+Cer(d18:1/26:2)	-0,00879	0,925325
Cer(d18:1/20:0)+Cer(d18:1/21:0) vs Cer(d18:1/20:0)	-0,05299	0,817934
Cer(d18:0/20:0)+Cer(d18:1/21:0)+Cer(d18:1/20:0) vs Cer(d18:0/20:0)+Cer(d18:1/20:0)	-0,11153	0,738412
Cer(d18:1/20:0)+Cer(d18:1/21:0)+Cer(d18:1/26:2)+Cer(d18:0/20:0) vs Cer(d18:1/20:0)+Cer(d18:1/21:0)+Cer(d18:1/26:2)	-0,14819	0,700267
Cer(d18:1/20:0)+Cer(d18:0/20:0)+Cer(d18:1/26:2) vs Cer(d18:1/20:0)+Cer(d18:1/26:2)	-0,1569	0,692029
Cer(d18:1/20:0)+Cer(d18:0/20:0) vs Cer(d18:1/20:0)	-0,2269	0,63383
Cer(d18:0/20:0)+Cer(d18:1/21:0)+Cer(d18:1/20:0) vs Cer(d18:1/21:0)+Cer(d18:1/20:0)	-0,28544	0,59316
Cer(d18:1/26:2)+Cer(d18:0/20:0)+Cer(d18:1/21:0) vs Cer(d18:1/26:2)+Cer(d18:0/20:0)	-0,59528	0,440384
Cer(d18:1/26:2)+Cer(d18:1/21:0) vs Cer(d18:1/26:2)	-0,80246	0,370359
Cer(d18:1/26:2)+Cer(d18:0/20:0)+Cer(d18:1/21:0) vs Cer(d18:1/26:2)+Cer(d18:1/21:0)	-0,99255	0,319119
Cer(d18:1/20:0)+Cer(d18:1/21:0)+Cer(d18:1/26:2)+Cer(d18:0/20:0) vs Cer(d18:1/21:0)+Cer(d18:1/26:2)+Cer(d18:0/20:0)	-0,99354	0,318878
Cer(d18:1/26:2)+Cer(d18:0/20:0) vs Cer(d18:1/26:2)	-1,19973	0,273375
Cer(d18:1/20:0)+Cer(d18:0/20:0)+Cer(d18:1/26:2) vs Cer(d18:0/20:0)+Cer(d18:1/26:2)	-1,58874	0,207506
Cer(d18:1/21:0)+Cer(d18:1/20:0)+Cer(d18:1/26:2) vs Cer(d18:1/21:0)+Cer(d18:1/26:2)	-1,8379	0,175197

[0288] 在模型比较6中,比较了A组神经酰胺(无至少一种B组神经酰胺)的随机组合。在表9中,显示了15个模型比较以及它们的偏差统计和卡方p-值估计(p<0.05表示模型之间存在显著性差异)。在具有不同模型大小的所有15个实施例中,偏差统计的p-值大于0.05,这表示与具有较少A组神经酰胺的模型相比,具有更多A组神经酰胺的模型在区分病例-对照分组方面不会显著更好。

[0289] 表9:模型比较6

[0290]

A 组组合的比较	偏差	P-值
Cer(d16:1/23:0)+Cer(d18:2/26:0) vs Cer(d18:2/26:0)	-1,22*10 ⁻⁰⁵	0,997211
Cer(d18:1/25:0)+Cer(d18:2/22:0)+Cer(d18:1/24:0)+Cer(d16:1/26:0)+Cer(d18:2/23:0) vs Cer(d18:1/25:0)+Cer(d18:2/22:0)+Cer(d16:1/26:0)+Cer(d18:2/23:0)	-0,00016	0,990018
Cer(d18:1/24:0)+Cer(d18:1/26:0)+Cer(d18:0/24:0)+Cer(d18:0/25:0)+Cer(d18:2/22:0) vs Cer(d18:1/24:0)+Cer(d18:1/26:0)+Cer(d18:0/24:0)+Cer(d18:0/25:0)	-0,00027	0,986808
Cer(d18:2/14:0)+Cer(d18:1/25:0)+Cer(d18:2/26:0) vs Cer(d18:1/25:0)+Cer(d18:2/26:0)	-0,00052	0,981846
Cer(d18:2/26:0)+Cer(d18:1/24:0)+Cer(d18:2/23:0)+Cer(d18:1/26:0) vs Cer(d18:2/26:0)+Cer(d18:1/24:0)+Cer(d18:1/26:0)	-0,00124	0,971963
Cer(d18:0/24:0)+Cer(d18:2/24:0)+Cer(d16:1/26:0)+Cer(d16:1/24:0) vs Cer(d18:0/24:0)+Cer(d18:2/24:0)+Cer(d16:1/26:0)	-0,00241	0,960812
Cer(d16:1/22:0)+Cer(d18:1/24:0)+Cer(d18:2/26:0)+Cer(d18:2/24:0)+Cer(d18:1/23:0) vs Cer(d18:1/24:0)+Cer(d18:2/26:0)+Cer(d18:2/24:0)+Cer(d18:1/23:0)	-0,00382	0,950741
Cer(d18:2/26:0)+Cer(d16:1/26:0)+Cer(d18:2/24:0)+Cer(d16:1/24:0) vs Cer(d18:2/26:0)+Cer(d18:2/24:0)+Cer(d16:1/24:0)	-0,00462	0,945827
Cer(d16:1/26:0)+Cer(d18:2/26:0)+Cer(d18:2/14:0)+Cer(d18:2/24:0) vs Cer(d16:1/26:0)+Cer(d18:2/26:0)+Cer(d18:2/24:0)	-0,0068	0,934272
Cer(d16:1/23:0)+Cer(d18:2/25:0)+Cer(d18:1/25:0)+Cer(d18:2/24:0) vs Cer(d16:1/23:0)+Cer(d18:2/25:0)+Cer(d18:2/24:0)	-0,00743	0,931329
Cer(d18:2/23:0)+Cer(d16:1/22:0)+Cer(d18:1/24:0)+Cer(d16:1/26:0)+Cer(d18:2/26:0) vs Cer(d18:2/23:0)+Cer(d16:1/22:0)+Cer(d16:1/26:0)+Cer(d18:2/26:0)	-0,01043	0,918649
Cer(d18:2/24:0)+Cer(d16:1/26:0)+Cer(d18:0/25:0)+Cer(d18:2/22:0) vs Cer(d18:2/24:0)+Cer(d18:0/25:0)+Cer(d18:2/22:0)	-0,01459	0,903867
Cer(d18:2/26:0)+Cer(d18:2/14:0)+Cer(d18:1/24:0)+Cer(d18:1/26:0)+Cer(d16:1/22:0) vs Cer(d18:2/26:0)+Cer(d18:1/24:0)+Cer(d18:1/26:0)+Cer(d16:1/22:0)	-0,0147	0,903505

A 组组合的比较	偏差	P- 值
Cer(d16:1/24:0)+Cer(d18:2/24:0)-Cer(d18:2/22:0)+Cer(d16:1/26:0) vs Cer(d16:1/24:0)+Cer(d18:2/24:0)-Cer(d18:2/22:0)	-0,01491	0,902817
Cer(d18:1/26:0)+Cer(d16:1/23:0)+Cer(d18:2/14:0)+Cer(d18:2/23:0) vs Cer(d18:1/26:0)+Cer(d18:2/14:0)-Cer(d18:2/23:0)	-0,01718	0,895724

[0291] 在模型比较7中,比较了B组神经酰胺(无至少一种A组神经酰胺)的随机组合。在表10中,显示了15个模型比较以及它们的偏差统计和卡方p-值估计($p < 0.05$ 表示模型之间存在显著性差异)。在具有不同模型大小的所有15个实施例中,偏差统计的p-值大于0.05,这表示与具有较少B组神经酰胺的模型相比,具有更多B组神经酰胺的模型在区分病例-对照分组方面不会显著更好。

[0292] 表10:模型比较7

[0293]

B 组组合的比较	偏差	P- 值
Cer(d16:1/16:0)+Cer(d18:1/24:1)-Cer(d18:0/18:0)+Cer(d18:0/24:2)+Cer(d18:1/16:0) vs Cer(d16:1/16:0)+Cer(d18:1/24:1)+Cer(d18:0/18:0)+Cer(d18:1/16:0)	-7,10*10 ⁻⁰⁶	0,997874
Cer(d18:1/23:1)+Cer(d18:0/24:2) vs Cer(d18:1/23:1)	-7,20*10 ⁻⁰⁶	0,997859
Cer(d18:2/22:1)+Cer(d16:1/16:0)-Cer(d18:0/18:0)+Cer(d18:1/16:0)+Cer(d18:0/24:2) vs Cer(d18:2/22:1)+Cer(d16:1/16:0)+Cer(d18:0/18:0)+Cer(d18:1/16:0)	-7,08*10 ⁻⁰⁵	0,993284
Cer(d18:1/24:1)+Cer(d18:2/24:2)-Cer(d18:0/24:1)+Cer(d18:1/23:1)+Cer(d18:1/18:0) vs Cer(d18:1/24:1)+Cer(d18:2/24:2)+Cer(d18:1/23:1)+Cer(d18:1/18:0)	-0,00025	0,98747
Cer(d18:1/23:1)+Cer(d18:1/16:0)-Cer(d18:1/24:2)+Cer(d18:1/18:0)+Cer(d18:0/24:1) vs Cer(d18:1/16:0)+Cer(d18:1/24:2)+Cer(d18:1/18:0)+Cer(d18:0/24:1)	-0,00034	0,985232
Cer(d16:1/16:0)+Cer(d18:2/18:0)-Cer(d18:0/16:0)+Cer(d18:0/24:2) vs Cer(d18:2/18:0)+Cer(d18:0/16:0)-Cer(d18:0/24:2)	-0,00047	0,982751
Cer(d18:0/16:0)+Cer(d18:2/24:2)-Cer(d16:1/16:0)+Cer(d18:0/24:2)+Cer(d18:1/24:1) vs Cer(d18:0/16:0)+Cer(d18:2/24:2)+Cer(d16:1/16:0)+Cer(d18:1/24:1)	-0,00084	0,97694
Cer(d18:1/22:1)+Cer(d18:1/23:1)-Cer(d16:1/16:0)+Cer(d18:2/24:2) vs Cer(d18:1/22:1)+Cer(d18:1/23:1)+Cer(d18:2/24:2)	-0,00098	0,975028
Cer(d18:0/16:0)+Cer(d18:2/18:0)-Cer(d18:1/24:1)+Cer(d18:0/24:1) vs Cer(d18:0/16:0)+Cer(d18:1/24:1)-Cer(d18:0/24:1)	-0,00129	0,971348

B 组组合的比较	偏差	P- 值
Cer(d16:1/16:0)+Cer(d18:1/22:1)+Cer(d18:1/23:1) vs Cer(d18:1/22:1)+Cer(d18:1/23:1)	-0,00141	0,970081
Cer(d18:2/16:0)+Cer(d18:0/24:2)+Cer(d18:2/24:2)+Cer(d18:0/18:0)-Cer(d18:2/22:1) vs Cer(d18:2/16:0)+Cer(d18:0/24:2)+Cer(d18:2/24:2)-Cer(d18:0/18:0)	-0,00188	0,965379
Cer(d18:2/24:2)+Cer(d18:1/18:0)+Cer(d18:2/22:1)+Cer(d18:2/16:0)+Cer(d18:1/23:1) vs Cer(d18:1/18:0)+Cer(d18:2/22:1)+Cer(d18:2/16:0)-Cer(d18:1/23:1)	-0,00229	0,961812
Cer(d18:2/18:0)+Cer(d16:1/16:0)+Cer(d18:0/18:0)+Cer(d18:0/16:0)-Cer(d18:1/24:1) vs Cer(d18:2/18:0)+Cer(d18:0/18:0)+Cer(d18:0/16:0)-Cer(d18:1/24:1)	-0,00321	0,9548
Cer(d16:1/16:0)+Cer(d18:2/18:0)+Cer(d18:0/16:0)-Cer(d18:0/24:2) vs Cer(d16:1/16:0)+Cer(d18:2/18:0)+Cer(d18:0/16:0)	-0,00378	0,950985
Cer(d16:1/16:0)+Cer(d18:0/24:1)-Cer(d18:0/16:0)-Cer(d18:1/22:1) vs Cer(d18:0/24:1)+Cer(d18:0/16:0)+Cer(d18:1/22:1)	-0,00529	0,941997

[0294] 实施例7

[0295] 模型比较8-9。模型比较8-9补充了模型比较1、2和4，其将至少一种A组和至少一种B组神经酰胺的组合与全是A组神经酰胺（模型比较8）或者全是B组神经酰胺（模型比较9）的组合相比。这些模型比较证明了基于最近鉴别的具有至少一种A组神经酰胺和至少一种B组神经酰胺的规则来选择神经酰胺的诊断能力。

[0296] 在模型比较8中，将至少一种A组神经酰胺和至少一种B组神经酰胺的组合与仅有A组神经酰胺的组合相比较。在表11中，显示了30个模型比较以及它们的偏差统计和卡方p-值估计（ $p < 0.05$ 表示模型之间存在显著性差异）。在具有不同模型大小的所有30个实施例

中,偏差统计的p-值小于0.05,这表示与仅具有A组神经酰胺的模型相比,具有至少一种A组神经酰胺和至少一种B组神经酰胺的模型在区分病例-对照分组方面显著更好。

[0297] 表11:模型比较8

来自 A+B 组 vs A 组的组合的比较	偏差	P- 值
A_Cer(d18:2/24:0)+A_Cer(d18:2/14:0)+B_Cer(d18:1/24:1)+B_Cer(d18:1/24:2) vs A_Cer(d18:2/24:0)+A_Cer(d18:2/14:0)	-98,1871	$4,77*10^{-22}$
A_Cer(d18:2/14:0)+A_Cer(d18:1/25:0)+B_Cer(d18:1/23:1)+B_Cer(d18:1/16:0) vs A_Cer(d18:2/14:0)+A_Cer(d18:1/25:0)	-96,4759	$1,12*10^{-21}$
A_Cer(d18:2/14:0)+A_Cer(d18:1/24:0)+B_Cer(d18:1/16:0)+B_Cer(d18:0/24:1) vs A_Cer(d18:2/14:0)+A_Cer(d18:1/24:0)	-95,3734	$1,95*10^{-21}$
A_Cer(d18:2/24:0)+A_Cer(d18:0/24:0)+B_Cer(d18:1/24:2) vs A_Cer(d18:2/24:0)+A_Cer(d18:0/24:0)	-87,6104	$7,97*10^{-21}$
A_Cer(d18:1/25:0)+B_Cer(d18:1/23:1)+B_Cer(d18:1/24:2) vs A_Cer(d18:1/25:0)	-91,9287	$1,09*10^{-20}$
A_Cer(d16:1/26:0)+A_Cer(d18:1/26:0)+B_Cer(d18:1/24:2) vs A_Cer(d16:1/26:0)+A_Cer(d18:1/26:0)	-85,5673	$2,24*10^{-20}$
A_Cer(d18:1/23:0)+A_Cer(d18:2/23:0)+B_Cer(d18:1/24:2)+B_Cer(d18:1/18:0) vs A_Cer(d18:1/23:0)+A_Cer(d18:2/23:0)	-87,2167	$1,15*10^{-19}$
A_Cer(d18:1/24:0)+B_Cer(d18:1/24:2)+B_Cer(d18:2/16:0) vs A_Cer(d18:1/24:0)	-86,8036	$1,42*10^{-19}$
A_Cer(d18:1/23:0)+B_Cer(d18:1/24:2) vs A_Cer(d18:1/23:0)	-80,3857	$3,08*10^{-19}$
A_Cer(d18:2/25:0)+B_Cer(d18:1/24:2)+B_Cer(d16:1/16:0) vs A_Cer(d18:2/25:0)	-85,2126	$3,14*10^{-19}$
A_Cer(d18:2/14:0)+A_Cer(d18:2/24:0)+B_Cer(d18:0/18:0)+B_Cer(d18:1/16:0) vs A_Cer(d18:2/14:0)+A_Cer(d18:2/24:0)	-85,2039	$3,15*10^{-19}$
A_Cer(d16:1/22:0)+A_Cer(d18:1/25:0)+B_Cer(d18:1/18:0)+B_Cer(d16:1/16:0) vs A_Cer(d16:1/22:0)+A_Cer(d18:1/25:0)	-84,5342	$4,40*10^{-19}$
A_Cer(d18:2/22:0)+A_Cer(d18:1/24:0)+B_Cer(d18:2/16:0)+B_Cer(d18:1/16:0) vs A_Cer(d18:2/22:0)+A_Cer(d18:1/24:0)	-83,7895	$6,39*10^{-19}$
A_Cer(d16:1/23:0)+A_Cer(d18:2/23:0)+B_Cer(d18:1/24:2) vs A_Cer(d16:1/23:0)+A_Cer(d18:2/23:0)	-78,7667	$6,99*10^{-19}$
A_Cer(d18:1/23:0)+B_Cer(d18:1/24:2)+B_Cer(d18:0/24:1) vs A_Cer(d18:1/23:0)	-83,1759	$8,68*10^{-19}$
A_Cer(d18:1/23:0)+B_Cer(d18:1/24:2)+B_Cer(d18:1/24:1) vs A_Cer(d18:1/23:0)	-82,1792	$1,43*10^{-18}$
A_Cer(d18:1/23:0)+A_Cer(d18:2/22:0)+B_Cer(d18:1/18:0) vs A_Cer(d18:1/23:0)+A_Cer(d18:2/22:0)	-76,7722	$1,92*10^{-18}$
A_Cer(d18:1/25:0)+B_Cer(d18:1/16:0)+B_Cer(d18:0/16:0) vs A_Cer(d18:1/25:0)	-80,1605	$3,92*10^{-18}$

[0298]

[0299]

来自 A+B 组 vs A 组的组合的比较	偏差	P- 值
A_Cer(d18:1/25:0)+B_Cer(d18:1/23:1)+B_Cer(d18:0/16:0) vs A_Cer(d18:1/25:0)	-77,8771	$1,23*10^{-17}$
A_Cer(d18:2/14:0)+B_Cer(d18:1/24:2) vs A_Cer(d18:2/14:0)	-72,8176	$1,42*10^{-17}$
A_Cer(d18:2/22:0)+A_Cer(d18:2/14:0)+B_Cer(d18:0/18:0)+B_Cer(d18:2/24:2) vs A_Cer(d18:2/22:0)+A_Cer(d18:2/14:0)	-77,0652	$1,84*10^{-17}$
A_Cer(d18:1/25:0)+A_Cer(d18:0/25:0)+B_Cer(d18:1/16:0)+B_Cer(d18:0/24:2) vs A_Cer(d18:1/25:0)+A_Cer(d18:0/25:0)	-77,0528	$1,85*10^{-17}$
A_Cer(d18:2/24:0)+A_Cer(d18:2/14:0)+B_Cer(d18:1/24:1)+B_Cer(d18:1/23:1) vs A_Cer(d18:2/24:0)+A_Cer(d18:2/14:0)	-76,9415	$1,96*10^{-17}$
A_Cer(d18:2/22:0)+A_Cer(d16:1/23:0)+B_Cer(d18:1/24:2)+B_Cer(d18:0/24:1) vs A_Cer(d18:2/22:0)+A_Cer(d16:1/23:0)	-76,2966	$2,71*10^{-17}$
A_Cer(d18:1/24:0)+A_Cer(d18:2/22:0)+B_Cer(d18:1/24:1) vs A_Cer(d18:1/24:0)+A_Cer(d18:2/22:0)	-71,4015	$2,91*10^{-17}$
A_Cer(d18:2/24:0)+A_Cer(d18:1/24:0)+B_Cer(d16:1/16:0)+B_Cer(d18:1/16:0) vs A_Cer(d18:2/24:0)+A_Cer(d18:1/24:0)	-75,9818	$3,17*10^{-17}$
A_Cer(d18:1/23:0)+A_Cer(d18:0/24:0)+B_Cer(d18:1/18:0)+B_Cer(d18:2/16:0) vs A_Cer(d18:1/23:0)+A_Cer(d18:0/24:0)	-75,4404	$4,15*10^{-17}$
A_Cer(d16:1/22:0)+A_Cer(d18:2/26:0)+B_Cer(d16:1/16:0)+B_Cer(d18:1/18:0) vs A_Cer(d16:1/22:0)+A_Cer(d18:2/26:0)	-75,3128	$4,43*10^{-17}$
A_Cer(d18:1/26:0)+B_Cer(d18:1/18:0)+B_Cer(d18:2/18:0) vs A_Cer(d18:1/26:0)	-74,8376	$5,61*10^{-17}$
A_Cer(d18:1/25:0)+A_Cer(d18:0/24:0)+B_Cer(d18:0/24:1)+B_Cer(d18:1/23:1) vs A_Cer(d18:1/25:0)+A_Cer(d18:0/24:0)	-73,7486	$9,68*10^{-17}$

[0300] 在模型比较9中,将至少一种A组神经酰胺和至少一种B组神经酰胺的组合与仅有B组神经酰胺的组合相比较。在表12中,显示了30个模型比较以及它们的偏差统计和卡方p-值估计 ($p < 0.05$ 表示模型之间存在显著性差异)。在具有不同模型大小的所有30个实施例中,偏差统计的p-值小于0.05,这表示与仅具有B组神经酰胺的模型相比,具有至少一种A组神经酰胺和至少一种B组神经酰胺的模型在区分病例-对照分组方面显著更好。

[0301] 表12:模型比较9

[0302]

来自 A+B 组 vs B 组的组合的比较	偏差	P- 值
A_Cer(d18:2/26:0)+A_Cer(d16:1/22:0)+B_Cer(d16:1/16:0)-B_Cer(d18:2/24:2) vs B_Cer(d16:1/16:0)+B_Cer(d18:2/24:2)	-87,9369	$8,03 \times 10^{-20}$
A_Cer(d18:2/24:0)+A_Cer(d18:1/26:0)+B_Cer(d18:1/24:2) vs B_Cer(d18:1/24:2)	-87,3635	$1,07 \times 10^{-19}$
A_Cer(d18:2/24:0)+A_Cer(d18:1/26:0)+B_Cer(d18:1/24:2) vs B_Cer(d18:1/24:2)	-87,3635	$1,07 \times 10^{-19}$
A_Cer(d18:2/24:0)+A_Cer(d18:1/26:0)+B_Cer(d18:1/16:0)-B_Cer(d18:2/24:2) vs B_Cer(d18:1/16:0)+B_Cer(d18:2/24:2)	-84,6387	$4,18 \times 10^{-19}$
A_Cer(d18:2/25:0)+B_Cer(d18:2/24:2) vs B_Cer(d18:2/24:2)	-69,1183	$9,27 \times 10^{-17}$
A_Cer(d16:1/22:0)+A_Cer(d18:2/25:0)+B_Cer(d18:2/16:0)-B_Cer(d18:2/24:2) vs B_Cer(d18:2/16:0)+B_Cer(d18:2/24:2)	-73,37	$1,17 \times 10^{-16}$
A_Cer(d18:2/24:0)+B_Cer(d18:2/24:2) vs B_Cer(d18:2/24:2)	-66,7609	$3,07 \times 10^{-16}$
A_Cer(d18:2/25:0)+A_Cer(d16:1/23:0)+B_Cer(d18:0/24:2)-B_Cer(d18:2/24:2) vs B_Cer(d18:0/24:2)+B_Cer(d18:2/24:2)	-70,7431	$4,35 \times 10^{-16}$
A_Cer(d18:2/24:0)+B_Cer(d18:1/24:2) vs B_Cer(d18:1/24:2)	-65,5054	$5,80 \times 10^{-16}$
A_Cer(d18:1/23:0)+A_Cer(d18:2/26:0)+B_Cer(d18:1/16:0)-B_Cer(d18:1/24:2) vs B_Cer(d18:1/16:0)+B_Cer(d18:1/24:2)	-70,074	$6,08 \times 10^{-16}$
A_Cer(d18:2/14:0)+A_Cer(d18:2/26:0)+B_Cer(d18:0/24:1)-B_Cer(d18:1/24:2) vs B_Cer(d18:0/24:1)+B_Cer(d18:1/24:2)	-68,4406	$1,38 \times 10^{-15}$
A_Cer(d16:1/24:0)+A_Cer(d18:1/23:0)+B_Cer(d16:1/16:0) vs B_Cer(d16:1/16:0)	-68,0755	$1,65 \times 10^{-15}$
A_Cer(d18:2/24:0)+A_Cer(d18:2/25:0)+B_Cer(d18:1/23:1)-B_Cer(d18:1/24:1) vs B_Cer(d18:1/23:1)+B_Cer(d18:1/24:1)	-67,43	$2,28 \times 10^{-15}$
A_Cer(d18:1/26:0)+B_Cer(d18:1/23:1)+B_Cer(d18:1/16:0) vs B_Cer(d18:1/23:1)+B_Cer(d18:1/16:0)	-61,4525	$4,54 \times 10^{-15}$
A_Cer(d18:2/24:0)+A_Cer(d18:2/23:0)+B_Cer(d18:1/24:2) vs B_Cer(d18:1/24:2)	-65,9445	$4,79 \times 10^{-15}$
A_Cer(d18:2/25:0)+A_Cer(d18:0/24:0)+B_Cer(d18:1/24:1) vs B_Cer(d18:1/24:1)	-65,7703	$5,23 \times 10^{-15}$
A_Cer(d18:0/24:0)+A_Cer(d18:1/25:0)+B_Cer(d18:1/24:2)-B_Cer(d18:2/22:1) vs B_Cer(d18:1/24:2)+B_Cer(d18:2/22:1)	-64,4492	$1,01 \times 10^{-14}$
A_Cer(d18:1/26:0)+B_Cer(d18:1/24:2) vs B_Cer(d18:1/24:2)	-59,7105	$1,10 \times 10^{-14}$
A_Cer(d18:0/25:0)+A_Cer(d18:1/25:0)+B_Cer(d18:1/23:1)-B_Cer(d18:0/16:0) vs B_Cer(d18:1/23:1)+B_Cer(d18:0/16:0)	-63,3033	$1,79 \times 10^{-14}$
A_Cer(d18:1/25:0)+A_Cer(d18:2/25:0)+B_Cer(d18:1/24:2)-B_Cer(d18:2/24:2) vs B_Cer(d18:1/24:2)+B_Cer(d18:2/24:2)	-62,2116	$3,10 \times 10^{-14}$
A_Cer(d18:2/14:0)+A_Cer(d18:2/25:0)+B_Cer(d18:1/16:0)-B_Cer(d18:2/18:0) vs B_Cer(d18:1/16:0)+B_Cer(d18:2/18:0)	-61,1778	$5,19 \times 10^{-14}$

[0303]

来自 A+B 组 vs B 组的组合的比较	偏差	P- 值
A_Cer(d18:1/26:0)+B_Cer(d18:1/23:1)+B_Cer(d18:1/24:1) vs B_Cer(d18:1/23:1)+B_Cer(d18:1/24:1)	-56,5949	$5,35 \times 10^{-14}$
A_Cer(d18:1/25:0)+B_Cer(d18:0/24:2)+B_Cer(d18:1/24:1) vs B_Cer(d18:0/24:2)+B_Cer(d18:1/24:1)	-55,574	$9,00 \times 10^{-14}$
A_Cer(d18:2/24:0)+B_Cer(d18:2/24:2)+B_Cer(d18:1/23:1) vs B_Cer(d18:2/24:2)+B_Cer(d18:1/23:1)	-55,4461	$9,61 \times 10^{-14}$
A_Cer(d18:2/24:0)+A_Cer(d18:0/24:0)+B_Cer(d18:2/18:0) vs B_Cer(d18:2/18:0)	-59,9392	$9,65 \times 10^{-14}$
A_Cer(d18:0/24:0)+A_Cer(d18:1/25:0)+B_Cer(d18:0/16:0) vs B_Cer(d18:0/16:0)	-59,55	$1,17 \times 10^{-13}$
A_Cer(d18:1/23:0)+A_Cer(d18:2/24:0)+B_Cer(d18:2/16:0) vs B_Cer(d18:2/16:0)	-58,8706	$1,65 \times 10^{-13}$
A_Cer(d18:2/25:0)+B_Cer(d18:2/16:0)+B_Cer(d18:0/24:2) vs B_Cer(d18:2/16:0)+B_Cer(d18:0/24:2)	-54,189	$1,82 \times 10^{-13}$
A_Cer(d18:2/26:0)+A_Cer(d18:2/22:0)+B_Cer(d18:1/24:1) vs B_Cer(d18:1/24:1)	-58,6415	$1,85 \times 10^{-13}$
A_Cer(d18:2/24:0)+A_Cer(d18:0/25:0)+B_Cer(d16:1/16:0)+B_Cer(d18:0/18:0) vs B_Cer(d16:1/16:0)+B_Cer(d18:0/18:0)	-57,6935	$2,96 \times 10^{-13}$

[0304] 因此,本研究结果证明了至少以下趋势:(1)与单独的A组神经酰胺或B组神经酰胺相比,将至少一种A组神经酰胺和至少一种B组神经酰胺组合显著改善了它们的区分能力;(2)如果神经酰胺组合包含至少一种A组和至少一种B组神经酰胺,则提高A组和B组神经酰胺的数目将显著提高区分能力;(3)提高A组神经酰胺(无B组神经酰胺)的数目不会显著改善组合神经酰胺的区分能力;(4)提高B组神经酰胺(无A组神经酰胺)的数目不会显著改善组合神经酰胺的区分能力;和(5)提高不属于A组或B组的神经酰胺的数目不会显著改善组合神经酰胺的区分能力。

[0305] 因此,这些数据有助于建立选择神经酰胺生物标志物来预测CV并发症的具有显著改善的区分能力(将具有发展CV并发症风险的患者与对照患者相区分)的新规则。与单独的标志物或脂质比或者未根据该选择规则选择的神经酰胺标志物的组合相比,通过遵守新的选择规则并将至少一种A组神经酰胺和至少一种B组神经酰胺组合,病例-对照分组可以显著更准确。

[0306] 尽管已参考本发明优选的实施方式具体地显示和描述了本发明,但是本领域技术人员将理解在不背离所附权利要求所涵盖的本发明的范围的情况下,可以对其中的形式和细节做出多种改变。

A 组神经酰胺										
神经酰胺	OR/SD	OR 第 2 四分位数	OR 第 3 四分位数	OR 第 4 四分位数	AUC	Sens	Spec	MRC%	p-val	q-val
Cer(d18:2/25:0)	0.57 (0.46-0.71)	0.31 (0.17-0.54)	0.21 (0.12-0.38)	0.19 (0.11-0.35)	0.66 (0.61, 0.71)	0.59	0.66	-20	3,5*10 ⁻⁰⁹	1,8*10 ⁻⁰⁹
Cer(d16:1/24:0)	0.65 (0.53-0.80)	0.32 (0.18-0.57)	0.22 (0.12-0.39)	0.21 (0.12-0.38)	0.66 (0.60, 0.71)	0.56	0.72	-18	4,8*10 ⁻⁰⁹	2,4*10 ⁻⁰⁹
Cer(d18:2/24:0)	0.61 (0.50-0.76)	0.22 (0.12-0.40)	0.19 (0.10-0.34)	0.20 (0.11-0.37)	0.66 (0.61, 0.71)	0.51	0.79	-17	5,9*10 ⁻⁰⁹	2,9*10 ⁻⁰⁹
Cer(d18:2/26:0)	0.60 (0.48-0.74)	0.47 (0.27-0.82)	0.28 (0.16-0.49)	0.28 (0.16-0.49)	0.65 (0.60, 0.70)	0.6	0.65	-19	2,5*10 ⁻⁰⁸	1,2*10 ⁻⁰⁸
Cer(d18:1/26:0)	0.65 (0.53-0.80)	0.28 (0.16-0.50)	0.30 (0.17-0.54)	0.25 (0.14-0.44)	0.63 (0.58, 0.69)	0.51	0.72	-14	1,0*10 ⁻⁰⁶	4,0*10 ⁻⁰⁷
Cer(d16:1/26:0)	0.69 (0.56-0.85)	0.35 (0.20-0.60)	0.35 (0.20-0.60)	0.25 (0.14-0.45)	0.64 (0.58, 0.69)	0.56	0.69	-15	2,2*10 ⁻⁰⁶	8,2*10 ⁻⁰⁷
Cer(d18:1/25:0)	0.65 (0.53-0.80)	0.55 (0.32-0.96)	0.37 (0.21-0.64)	0.29 (0.17-0.51)	0.63 (0.57, 0.68)	0.57	0.64	-13	3,4*10 ⁻⁰⁶	1,2*10 ⁻⁰⁶
Cer(d16:1/23:0)	0.76 (0.63-0.93)	0.42 (0.24-0.73)	0.36 (0.21-0.63)	0.33 (0.19-0.57)	0.62 (0.57, 0.67)	0.55	0.65	-13	9,6*10 ⁻⁰⁶	3,2*10 ⁻⁰⁶
Cer(d18:2/23:0)	0.74 (0.61-0.90)	0.36 (0.20-0.63)	0.25 (0.14-0.45)	0.33 (0.19-0.58)	0.61 (0.56, 0.67)	0.56	0.65	-12	2,4*10 ⁻⁰⁵	7,7*10 ⁻⁰⁶
Cer(d16:1/22:0)	0.82 (0.67-0.99)	0.31 (0.17-0.54)	0.23 (0.13-0.41)	0.36 (0.20-0.62)	0.61 (0.56, 0.67)	0.49	0.79	-9	1,6*10 ⁻⁰⁴	4,6*10 ⁻⁰⁵

图1

B 组神经酰胺										
神经酰胺	OR/SD	OR 第 2 四分位数	OR 第 3 四分位数	OR 第 4 四分位数	AUC	Sens	Spec	MRC%	p-val	q-val
Cer(d18:1/22:1)	2.21 (1.68-2.90)	1.40 (0.80-2.44)	2.64 (1.52-4.59)	5.50 (3.07-9.84)	0.69 (0.64, 0.74)	0.57	0.76	31	2,8*10 ⁻¹¹	2,1*10 ⁻¹¹
Cer(d18:1/24:2)	2.17 (1.68-2.80)	1.10 (0.63-1.91)	2.08 (1.21-3.59)	4.67 (2.63-8.29)	0.67 (0.62, 0.72)	0.58	0.71	26	3,5*10 ⁻¹⁰	2,1*10 ⁻¹⁰
Cer(d18:1/18:0)	2.18 (1.70-2.79)	1.14 (0.66-1.99)	2.25 (1.30-3.89)	4.86 (2.73-8.65)	0.67 (0.62, 0.72)	0.6	0.69	32	4,9*10 ⁻¹⁰	2,9*10 ⁻¹⁰
Cer(d18:1/16:0)	1.99 (1.58-2.52)	0.98 (0.56-1.69)	2.00 (1.16-3.43)	3.94 (2.24-6.94)	0.66 (0.61, 0.71)	0.67	0.59	20	2,7*10 ⁻⁰⁹	1,5*10 ⁻⁰⁹
Cer(d18:0/18:0)	1.91 (1.48-2.45)	1.19 (0.68-2.07)	2.42 (1.40-4.19)	4.25 (2.41-7.50)	0.65 (0.60, 0.70)	0.63	0.63	42	5,9*10 ⁻⁰⁸	2,6*10 ⁻⁰⁸
Cer(d18:1/23:1)	1.79 (1.43-2.23)	0.87 (0.50-1.50)	1.59 (0.93-2.72)	3.51 (2.00-6.16)	0.65 (0.60, 0.70)	0.65	0.6	21	7,9*10 ⁻⁰⁸	3,4*10 ⁻⁰⁸
Cer(d18:0/16:0)	1.69 (1.36-2.12)	1.38 (0.80-2.38)	1.66 (0.97-2.86)	3.92 (2.23-6.90)	0.64 (0.58, 0.69)	0.52	0.72	24	2,0*10 ⁻⁰⁶	7,5*10 ⁻⁰⁷
Cer(d18:1/24:1)	1.59 (1.28-1.96)	1.28 (0.74-2.20)	1.72 (1.00-2.96)	3.46 (1.98-6.05)	0.62 (0.57, 0.68)	0.64	0.58	14	1,0*10 ⁻⁰⁵	3,5*10 ⁻⁰⁶
Cer(d18:1/26:2)	1.51 (1.23-1.86)	1.18 (0.69-2.02)	1.32 (0.77-2.26)	2.62 (1.51-4.54)	0.60 (0.55, 0.66)	0.6	0.57	17	2,7*10 ⁻⁰⁴	7,3*10 ⁻⁰⁵
Cer(d16:1/16:0)	1.32 (1.09-1.60)	0.84 (0.49-1.44)	1.10 (0.64-1.87)	1.79 (1.04-3.07)	0.57 (0.52, 0.62)	0.5	0.65	10	2,1*10 ⁻⁰²	4,3*10 ⁻⁰³

图2

不属于 A 和 B 组的神经酰胺										
神经酰胺	OR/SD	OR 第 2 四分位数	OR 第 3 四分位数	OR 第 4 四分位数	AUC	Sens	Spec	MRC%	p-val	q-val
Cer(d16:1/20:0)	1.02 (0.85-1.24)	0.52 (0.30-0.89)	0.65 (0.38-1.12)	0.61 (0.35-1.04)	0.47 (0.42, 0.53)	0.45	0.56	1	0.44	0.069
Cer(d18:2/20:0)	1.00 (0.83-1.21)	0.79 (0.46-1.34)	0.56 (0.33-0.96)	0.85 (0.50-1.45)	0.47 (0.42, 0.53)	0.44	0.53	0	0.48	0.073
Cer(d18:2/26:1)	0.89 (0.74-1.08)	0.95 (0.56-1.62)	0.63 (0.37-1.08)	0.73 (0.43-1.25)	0.54 (0.49, 0.59)	0.57	0.53	-5	0.21	0.036
Cer(d18:2/21:0)	0.92 (0.76-1.11)	0.61 (0.35-1.04)	0.82 (0.48-1.39)	0.56 (0.33-0.96)	0.55 (0.49, 0.60)	0.46	0.64	-4	0.25	0.041
Cer(d18:1/16:1)	0.94 (0.78-1.14)	0.54 (0.32-0.93)	0.82 (0.48-1.39)	0.85 (0.50-1.45)	0.51 (0.45, 0.56)	0.53	0.47	-2	0.43	0.068
Cer(d16:1/21:0)	0.99 (0.82-1.20)	0.88 (0.52-1.50)	0.85 (0.50-1.44)	0.91 (0.54-1.55)	0.52 (0.47, 0.57)	0.47	0.65	0	0.54	0.082

图3

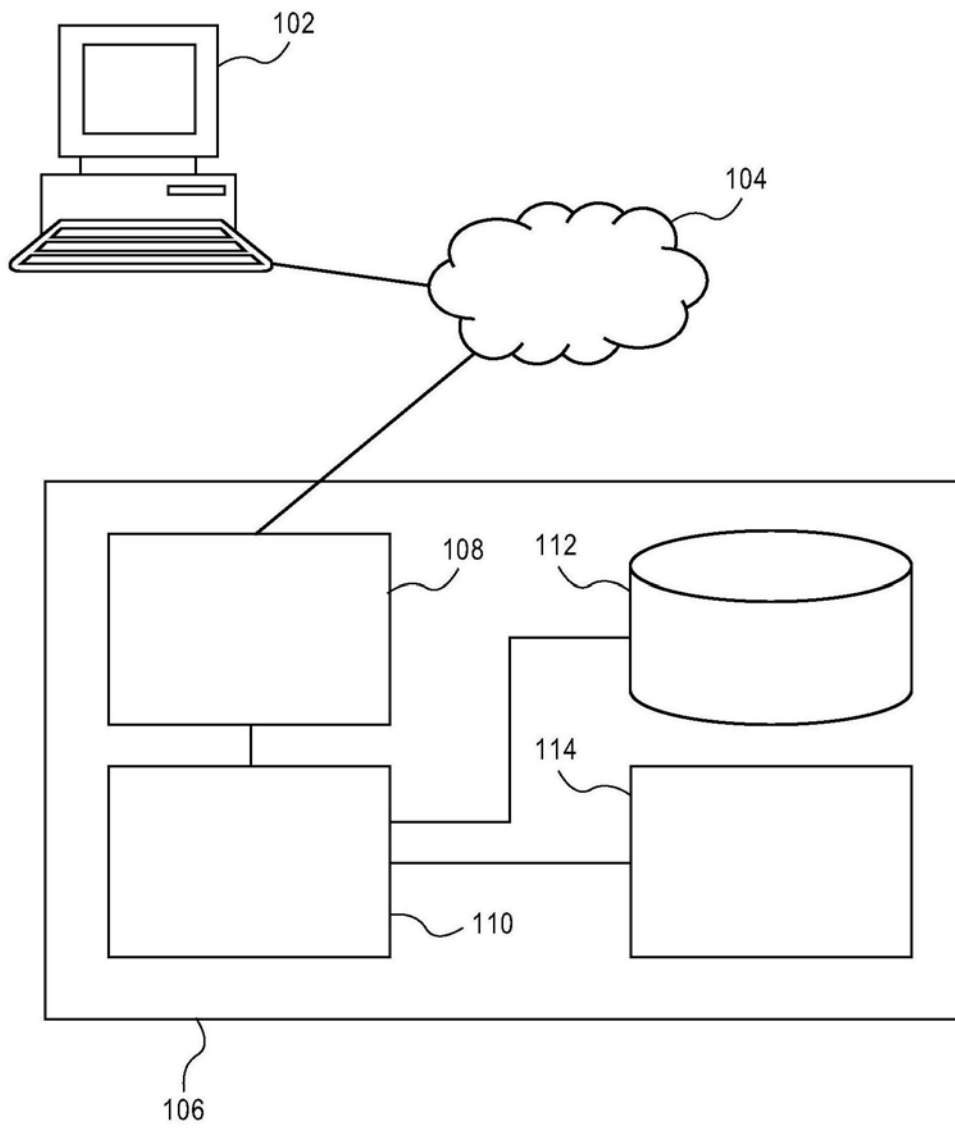


图4