



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101952721 A

(43) 申请公布日 2011. 01. 19

(21) 申请号 200980102933. 9

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2009. 01. 22

G01N 33/53 (2006. 01)

(30) 优先权数据

G01N 33/58 (2006. 01)

PA200800089 2008. 01. 23 DK

G01N 33/68 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 07. 23

(86) PCT申请的申请数据

PCT/DK2009/050015 2009. 01. 22

(87) PCT申请的公布数据

W02009/092382 EN 2009. 07. 30

(71) 申请人 里格舒斯匹塔里特医院

地址 丹麦哥本哈根

(72) 发明人 严斯·凯斯楚普

(74) 专利代理机构 北京律诚同业知识产权代理

有限公司 11006

代理人 徐金国 黄韧敏

权利要求书 2 页 说明书 29 页 序列表 3 页

附图 11 页

(54) 发明名称

根据测量生物标记 YKL-40 的水平所发现的生存预后，对患有心血管疾病的个体的分类

(57) 摘要

本发明涉及一种测量 YKL-40 水平并将该测量值用作个体的生存预后的方法，所述个体患有由动脉粥样硬化引起的心脏疾病。该方法可用于分类个体以便优化治疗或者在治疗期间或治疗前或后监测个体。个体可能患有任意类型的心血管疾病或紊乱。该方法还可在诊断和预后中检测和确定生物样品中是否存在 YKL-40 分子的显著性水平。YKL-40 水平还可用于预测疾病复发。

1. 一种根据患有由动脉粥样硬化引起的心脏疾病的个体的生存预后,分类所述个体的方法,所述方法包括:测量所述个体的生物样品中的 YKL-40 水平,以及将测量的 YKL-40 水平与 YKL-40 参考水平比较。

2. 一种联系患有由动脉粥样硬化引起的心脏疾病的个体的生存预后,监测所述个体的健康状况的方法,所述方法包括:测量所述个体的生物样品中的 YKL-40 水平,以及将测量的 YKL-40 水平与 YKL-40 参考水平比较。

3. 如权利要求 1-2 任一项所述的方法,其中所述个体患有冠状动脉粥样硬化性疾病。

4. 如前面任一项权利要求所述的方法,其中所述心脏疾病是稳定型冠状动脉疾病。

5. 如前面任一项权利要求所述的方法,其中所述 YKL-40 参考水平是通过测量健康个体样品中的 YKL-40 水平获得的平均水平。

6. 如权利要求 1-5 任一项所述的方法,其中所述参考水平是约 $80 \mu\text{g/l}$ 的临界值。

7. 如前面任一项权利要求所述的方法,其中所述 YKL-40 参考水平是一组临界值。

8. 如权利要求 7 所述的方法,其中所述一组临界值选自以下临界值的一个或多个:约 $80 \mu\text{g/l}$ 、约 $90 \mu\text{g/l}$ 、约 $100 \mu\text{g/l}$ 、约 $110 \mu\text{g/l}$ 、约 $120 \mu\text{g/l}$ 、约 $130 \mu\text{g/l}$ 、约 $140 \mu\text{g/l}$ 、约 $150 \mu\text{g/l}$ 、约 $160 \mu\text{g/l}$ 、约 $170 \mu\text{g/l}$ 、约 $180 \mu\text{g/l}$ 、约 $190 \mu\text{g/l}$ 、约 $200 \mu\text{g/l}$ 、约 $210 \mu\text{g/l}$ 和约 $220 \mu\text{g/l}$ 。

9. 如前面任一项权利要求所述的方法,其中所述个体的生存预后是患心肌梗死的风险的预测。

10. 如前面任一项权利要求所述的方法,其中所述 YKL-40 水平是用免疫分析法测量。

11. 如前面任一项权利要求所述的方法,其中所述免疫分析法是竞争性免疫分析法。

12. 如前面任一项权利要求所述的方法,其中所述免疫分析法使用可检测标记来测量 YKL-40,所述可检测标记选自放射性同位素、酶、荧光分子、化学发光分子、生物发光分子和胶体金属。

13. 如前面任一项权利要求所述的方法,其中所述免疫分析法使用单克隆抗体测量 YKL-40。

14. 如权利要求 1 至 12 任一项所述的方法,其中所述免疫分析法使用多克隆抗体测量 YKL-40。

15. 如权利要求 1 至 9 任一项所述的方法,其中所述 YKL-40 水平是在基于 PCR 的分析中测量。

16. 如前面任一项权利要求所述的方法,其中所述 YKL-40 水平是与其他生物标记水平一起测量。

17. 如权利要求 16 所述的方法,其中所述其他生物标记选自 C-反应蛋白 (CRP)、脑钠素 (BNP)、白细胞介素、肿瘤坏死因子- α 、同型半胱氨酸、淀粉样 A 蛋白、妊娠相关血浆蛋白-A、肌钙蛋白、可溶性细胞间粘附分子-1、可溶性 UPAR、III 型前胶原性氨基端肽 (P-III-NP)、单核细胞趋化蛋白-1、纤维蛋白 D-二聚体、肌球蛋白轻链-1 (MLC-1)、P-选择蛋白和 CKMB。

18. 如前面任一项权利要求所述的方法,其中所述 YKL-40 水平是用试纸测量。

19. 如前面任一项权利要求所述的方法,其中所述生物样品是血液、血清或血浆。

20. 如前面任一项权利要求所述的方法,其中所述个体是人。

21. 一种根据患有由动脉粥样硬化引起的心脏疾病的个体的生存预后,分类和 / 或监测所述个体的装置,所述生存预后是通过将所述个体的生物样品中测量的 YKL-40 水平与 YKL-40 参考水平比较而发现。

22. 如权利要求 21 所述的装置,其中所述装置包括用于测量样品中的 YKL-40 水平的工具,以及用于将测量的 YKL-40 水平与至少一个 YKL-40 参考水平比较的工具。

23. 如权利要求 21-22 任一项所述的装置,其中所述装置是试纸。

24. 如权利要求 21-23 任一项所述的装置,其中所述装置包括一代表临界值的信号参考水平。

25. 如权利要求 21-23 任一项所述的装置,其中所述装置包括用于将测量的 YKL-40 水平与 YKL-40 的一组临界值进行比较的工具。

26. 一种试剂盒,包括用于检测生物样品中的 YKL-40 水平的工具;用于将测量的 YKL-40 水平与 YKL-40 参考水平进行比较的工具;以及关于如何根据个体的 YKL-40 水平来分类和 / 或监测个体的说明。

27. 如权利要求 26 所述的试剂盒,其中所述试剂盒进一步包括用于检测另外的生物标记的工具,优选地所述另外的生物标记选自 C- 反应蛋白、同型半胱氨酸、脑钠素、白细胞介素、肿瘤坏死因子- α 、同型半胱氨酸、淀粉样 A 蛋白、妊娠相关血浆蛋白-A、肌钙蛋白、可溶性细胞间粘附分子-1、可溶性 UPAR、III 型前胶原性氨基端肽 (P-III-NP)、单核细胞趋化蛋白-1、纤维蛋白 D- 二聚体、生长分化因子-15、缺血修饰性白蛋白、脂蛋白相关磷脂酶 A2、基质金属蛋白酶和 CKMB;更优选地另外的生物标记选自 C- 反应蛋白、脑钠素和 / 或同型半胱氨酸。

28. 如权利要求 26-27 任一项所述的试剂盒,包括至少一种权利要求 21-25 所述的装置。

29. 一种治疗患冠状动脉疾病的个体的方法,包括测量所述个体生物样品中的 YKL-40 水平;基于测量的水平选择药物;以及将足量的所述药物施予所述个体。

30. 如权利要求 29 所述的方法,其中所述疾病是稳定型冠状动脉疾病。

31. 如权利要求 29-30 任一项所述的方法,其中所述比较是通过与权利要求 5-8 任一项所述的一个或多个参考水平比较来进行。

根据测量生物标记 YKL-40 的水平所发现的生存预后,对患有心血管疾病的个体的分类

[0001] 将该申请或本申请中引用的所有专利和非专利参考文献在此全部纳入作为参考。

技术领域

[0002] 本发明涉及一种检测生物标记 YKL-40 的方法,该 YKL-40 作为个体生存预后的标记。个体可能患有任意类型的心血管疾病或紊乱,而发现的 YKL-40 水平能够根据生存预后来自分类和 / 或监测这些个体。

背景技术

[0003] 据世界卫生组织统计,心血管疾病是全球死亡的首要原因,并且预计将继续保持首位。2005 年估计有 1750 万人死于心血管疾病,相当于全球死亡人口的 30%。在这些死者中,760 万是由于心脏病发作,570 万是由于中风。如果不采取适当的措施,到 2015 年估计每年有 2 千万人死于心血管疾病,主要死于心脏病发作和中风。

[0004] 心血管疾病由心脏和血管的紊乱引起,包括冠心病(心脏病发作)、冠状动脉疾病、血压升高(高血压)、外周动脉疾病、风湿性心脏病、先天性心脏病和心力衰竭等。等到心血管紊乱检测出来时,根本原因(通常是动脉粥样硬化)已经发展了数十年,可能已经是晚期。心血管疾病的主要原因是吸烟、身体缺乏活动和不健康的饮食习惯。

[0005] 心血管疾病的治疗取决于每位病患中具体的疾病形式。药物可能会有帮助,如抗心绞痛和降压药物、阿司匹林和他汀类降胆固醇药物。通常,可能有必要进行手术或血管成形术以重开、修复或替换受损的血管,例如通过搭桥手术、经皮冠状动脉介入治疗和安装心脏起搏器,以及作为最后手段的必要的移植。

[0006] 对每个病患进行最佳治疗可以改善治疗效果,不管是施予药物、手术还是其他,并且不管该治疗是治愈性还是改善性的都没有影响。根据生存预后对患有心血管疾病或紊乱的个体进行分类,有助于选择最佳的治疗,改善治疗效果,改善生存率,降低复发风险,并提高心血管疾病发生后的生活质量。此外,当心血管疾病或紊乱发生后需要辅导生活方式时,监测该组个体的能力有助于选择最有效的当前和后续的治疗。

发明内容

[0007] 本发明涉及一种根据生存预后,分类和 / 或监测患心血管疾病或紊乱的个体的方法,例如尤其是由动脉粥样硬化引起的心脏疾病,所述生存预后是以所述个体样品中生物标记 YKL-40 分子或其片段的水平的测量为基础。将发现的 YKL-40 水平与参考水平比较,以便分类和 / 或监测该个体的状态。此外,YKL-40 水平也可用于预测疾病复发的风险。

[0008] YKL-40 是一种新的生存预后的生物标记。YKL-40 水平可在任意类型的生物样品中测量,如血清、血液或血浆样品,并且测量的 YKL-40 可以是蛋白质或其片段或肽、或者 YKL-40 编码基因的其他转录产物。

[0009] 本发明的一个目的是提供一种根据个体的生存预后,对患心血管疾病的个体进行

分类的方法,例如尤其是动脉粥样硬化引起的心脏疾病。所述方法包括:测量所述个体的生物样品中的 YKL-40 水平,以及将测量的水平与 YKL-40 参考水平进行比较。

[0010] 本发明的另一目的是提供一种与生存预后相联系,监测患心血管疾病的个体的健康状态的方法,例如由动脉粥样硬化引起的心脏疾病。所述方法包括:测量所述个体的生物样品中的 YKL-40 水平,以及将测量的水平与 YKL-40 参考水平进行比较。YKL-40 参考水平可以是本文所描述的任意参考水平,尤其如“参考水平”部分所描述。本发明该方法的进一步细节可以从上述涉及“个体分类”的第一方法的文字中明显看出。因此,除非另有说明,关于本发明第一方法提及的任意特征原则上适用于本发明的这一方法。

[0011] 本发明的另一目的是提供一套试剂盒,包括检测生物样品中的 YKL-40 的方法,以及关于如何根据个体的 YKL40 水平,对个体进行分类和/或监测的说明。

[0012] 本发明还提供一种包括试剂盒的实施方式,该试剂盒包括检测生物样品中的 YKL-40 的方法和关于如何根据个体的 YKL-40 水平,对个体进行分类和/或监测的说明,以及用于检测另外的生物标记的方法。

附图说明

[0013] 图 1:YKL-40 研究中个体的人口统计数据;

[0014] 图 2:风险比;

[0015] 图 3:包括干预指标和风险因素的风险比;

[0016] 图 4:根据临界值分类得到的生存曲线;

[0017] 图 5:根据分类得到的生存曲线;

[0018] 图 6:从中看到的 A 和 B 试纸实施方式;

[0019] 图 7:f(YKL-40) 单独或者与风险因素加上选择的治疗指标相结合对死亡时间、心血管死亡和心肌梗死的影响。

[0020] 发明详细说明

[0021] 定义

[0022] 提供以下定义是为了简化本发明的讨论,因此它们不应理解为对本发明的限制,本发明的范围通过附加的权利要求和以下说明来限定。

[0023] 改善:改进或变得更好;与疾病状态的严重性或进展的缓解相关,包括它的减轻或治愈,或者感觉到的严重性的缓解,如相关疼痛的缓解。

[0024] 抗体:免疫球蛋白分子及免疫球蛋白分子的活性部分或片段,如 Fab 和 $F(ab')_2$, 它们能够与 YKL-40 蛋白的抗原决定簇结合。例如,抗体是完整的免疫球蛋白分子或保留免疫活性的片段。

[0025] 抗原:产生免疫性的全长 YKL-40 分子或其片段。

[0026] 生物样品:从个体中获得的样品。

[0027] 生物标记:特定生物学性质的分子指标,如具体的病理或生理状态。在本文中术语“标记”与它同义。

[0028] 心血管疾病:术语心血管疾病指涉及心脏或血管(动脉和静脉)的一类疾病。该术语指影响心血管系统与心血管疾病的后果的任意疾病,并在本文中按此意思使用。心血管疾病有许多种类型,包括但不限于:急性冠脉综合症、急性心肌梗死(AMI/STEMI/ST 段抬

高)、心肌梗死(心脏病发作)、不稳定型心绞痛/UAP/非ST段抬高心肌梗死、动脉瘤、心绞痛、动脉粥样硬化、冠状动脉疾病(CAD)、缺血性心脏病、心肌缺血、心律不齐、心房纤颤、心律紊乱、室性心动过速、心室纤颤、心脏死亡和心脏猝死、心肌病、充血性心力衰竭、心力衰竭、心室舒张与收缩功能障碍、扩张型心肌病、血压升高(高血压)、肥厚性心肌病、瓣膜疾病、二尖瓣脱垂、二尖瓣回流和/或狭窄、主动脉瓣回流和/或狭窄、心肌炎和静脉血栓栓塞。

[0029] 疾病状态:个体中的疾病或损伤。

[0030] 紊乱:通常是先天型的个体疾病或损伤。

[0031] hnRNA:异核RNA。

[0032] 个体:一个物种的单个成员,本文优选哺乳动物物种。

[0033] mAb:单克隆抗体。

[0034] 哺乳动物:本文使用的包括人类和非人类。

[0035] mRNA:信使RNA。

[0036] 病患:患有疾病或紊乱的任意个体。

[0037] RNA:从天然或合成源中分离的任意类型的RNA。

[0038] 稳定型冠状动脉疾病:术语“稳定型冠状动脉疾病”指冠状动脉疾病、或者由动脉粥样硬化斑块在向心肌(心脏的肌肉)供应氧和营养素的冠状动脉壁内堆积引起的动脉粥样硬化性心脏疾病,其中该疾病产生稳定的症状或信号。

[0039] 基本上纯的:用于描述YKL-40,指基本完整的分子,其本质上不包含在自然界可能与YKL-40同时出现的其他分子。

[0040] 个体的分类

[0041] 心血管疾病是全球首要的死亡原因。动脉粥样硬化症是心血管疾病的主要原因,由于促进动脉粥样硬化症发生的生活方式继续在各大洲蔓延,预计心血管疾病仍是未来死亡的首要原因。因此,为患心血管疾病的个体提供最好的治疗,对患病个体以及治疗日益增加的病患的医疗机构来说都是很有意义的。

[0042] 最好的治疗是针对每个个体定制的治疗。例如,已经知道,患有与高死亡率有关的冠状动脉疾病(CAD)的人,对同样的治疗反应不同,但还没有一种办法来监测给定的治疗手段的作用或者在不幸发生前区分这些病患。本发明解决了这一问题,它提供了一种分类系统,可以根据生存预后对每个个体进行分类,并且提供了一种随时间推移监测个体的方法。分类和监测是基于测量取自待分类/监测的个体的生物样品中YKL-40的水平,以及将发现的水平与其参考水平比较。这可以为个体的生存提供预后,因此有助于确定该个体应该接受的治疗强度以及所施予的治疗是否足够或不足。

[0043] 根据生存预后的分类,对每个个体定制治疗,将会提高施予的治疗方法的改善及治疗效果,提高患者整体的生存率,降低复发风险,并提高心血管疾病发生后的生活质量。而且,施予的药量可能被大大调整,由此带来经济利益。此外,当心血管疾病或紊乱发生后需要辅导生活方式时,对该组个体进行监测的能力将有助于选择最有效的当前和后续治疗,并具有指导作用。

[0044] 统计学上的YKL-40水平升高表明死亡的风险增大,如实施例中所见。因此YKL-40是一种生物标记,其可以由测定的YKL-40水平进行个体的生存预后。预后可能与本临床领

域技术人员已知的健康状态的其他信号相关。如果 YKL-40 水平增加到统计学的显著水平,则可提出死亡或生存率降低的预后。

[0045] 监测个体是有意义的,以便评估治疗效果,例如疾病的改善情况,应该在治疗之前(作为背景)和治疗期间定期地测量取自个体的生物分析样品中(血液、血清或其他)的 YKL-40 水平。因为 YKL-40 水平的减少或增加可能是短暂的,该分析优选定期(例如,每周)以及在每次治疗之前和之后进行。根据治疗过程、病例的严重性或其他临床变化因素,本领域的普通临床医生能够确定用于分析 YKL-40 水平的适当方案,目的是监测特定个体的疾病和/或治疗。

[0046] 参考水平

[0047] 统计学上的 YKL-40 水平升高是对生存的指示,如本文所述可用于分类和/或监测患心脏疾病的个体。通过将测量值与参考水平值相联系,可以确定指定个体的 YKL-40 水平是否增加。形成参考水平的计算基础的个体组可以是不同年龄的健康个体组,或者可以是特定年龄组。健康个体是在采样时未诊断出心脏相关疾病或紊乱的个体。

[0048] 特定年龄的个体组可包括所有出生在同年或同十年内的个体或任意其他组,例如包括年龄 0-10 岁、年龄 10-20 岁、年龄 20-30 岁、年龄 30-40 岁、年龄 40-50 岁、年龄 50-60 岁、年龄 60-70 岁、年龄 70-80 岁、年龄 80-90 岁、年龄 90-100 岁等个体的组。间隔可跨度 2 年的年龄差距,3、4、或 5 年的年龄差距,6、7、8、9、10 年的年龄差距(如上所写),12、15、20 或更多年的年龄差距。间隔还可以是开放式的,例如个体全部大于 20、30、40、50、60 岁或其他年龄。

[0049] 采样用于得到 YKL-40 参考水平的不同年龄或特定年龄的个体组还可能是患有疾病的个体,如心脏疾病或紊乱,以及显示或不显示症状的、或以前患有这类疾病或紊乱并视为已治愈的个体。例如,心脏疾病或紊乱可能是冠状动脉疾病或任意上述心脏疾病或紊乱。形成参考水平的计算基础的个体组还可以是混合性别或相同性别的个体组。参考水平也可从当前患心脏疾病或紊乱的相同个体中获得,例如,可在诊断疾病或紊乱之前(生病前)和/或在确立疾病或紊乱的症状之前(症状前)获得的一个或多个样品中测量 YKL-40 水平。

[0050] 以个体 YKL-40 水平为基础的个体的分类可根据实施例中的描述的结果进行。从这些结果中可以看出,增加的 YKL-40 水平与增加的风险比之间存在关联。风险比表明死亡的风险增加,可按照本领域技术人员知道的方法计算。在本实施例中,生存分析中的风险比是指解释变量不稳定型心绞痛、心肌梗死、心脏死亡或总死亡对事件的风险或危险的影响。因此,某个 YKL-40 数值的风险比显示心肌梗死(MI)、心血管死亡或所有原因的死亡的风险增加。

[0051] 分类的一种方法是用临界值作为参考值。临界值是通常将许多个体分为两组的值:YKL-40 水平高于特定临界值的组,以及 YKL-40 水平低于特定临界值的组。临界值可以是任意值,其代表任意类型的生物样品中测量的或者本领域技术人员选择的生理 YKL-40 水平。

[0052] 临界值可用作是或非指标,指示个体面临的风险是否增加。风险增加可能是疾病的风险增加,例如心脏病;尤其是由动脉粥样硬化引起的心脏疾病,尤其是个体以前或现在患有的心脏疾病,或者该风险可能是生存期短的风险增加,例如由 YKL-40 水平增加/YKL-40 水平高于临界值得出。

[0053] 在本发明方法的一种实施方式中, YKL-40 的参考水平是约 $80 \mu\text{g/l}$ 的临界值, 例如, 特别是 $82 \mu\text{g/l}$ 。从本文实施例中可以看出, 本发明人意外地发现, 低于约 $80 \mu\text{g/l}$ 的 YKL-40 水平与风险比没有相关性, 而高于所述值的 YKL-40 水平与心血管死亡、心肌梗死 (MI) 以及所有原因的死亡率的危险比有相关性。因此, 本发明人发现, 高于约 $80 \mu\text{g/l}$ 的 YKL-40 水平可用于分类患有由动脉粥样硬化引起的心脏疾病的个体, 例如稳定型冠状动脉疾病; 通过测量所述个体的生物样品中的 YKL-40 水平, 以及将测量的水平与 YKL-40 的参考水平比较, 根据他们的生存预后进行分类。

[0054] 本发明的方法中提到的生存预后具体地可以是对患有心血管死亡的预后, 更优选是对患有心肌梗死的风险的预后。

[0055] 临界值可以选自以下数值组中的任意值, 或落入任意的所述值之间: $80 \mu\text{g/l}$ 血清 YKL-40、 $90 \mu\text{g/l}$ 、 $95 \mu\text{g/l}$ 、 $100 \mu\text{g/l}$ 、 $105 \mu\text{g/l}$ 、 $110 \mu\text{g/l}$ 、 $115 \mu\text{g/l}$ 、 $120 \mu\text{g/l}$ 、 $125 \mu\text{g/l}$ 、 $130 \mu\text{g/l}$ 、 $140 \mu\text{g/l}$ 、 $150 \mu\text{g/l}$ 、 $160 \mu\text{g/l}$ 、 $170 \mu\text{g/l}$ 、 $180 \mu\text{g/l}$ 、 $190 \mu\text{g/l}$ 和 / 或 $200 \mu\text{g/l}$ 血清 YKL-40。在本发明方法的一种实施方式中, 临界值可以是以下任意值: $100 \mu\text{g/l}$ 血清 YKL-40、 $105 \mu\text{g/l}$ 、 $106 \mu\text{g/l}$ 、 $107 \mu\text{g/l}$ 、 $108 \mu\text{g/l}$ 、 $109 \mu\text{g/l}$ 、 $110 \mu\text{g/l}$ 、 $110 \mu\text{g/l}$ 、 $111 \mu\text{g/l}$ 、 $112 \mu\text{g/l}$ 、 $113 \mu\text{g/l}$ 、 $114 \mu\text{g/l}$ 、 $115 \mu\text{g/l}$ 、 $120 \mu\text{g/l}$ 血清 YKL-40。在一种具体实施方式中, 临界值是 $110 \mu\text{g/l}$ 血清 YKL-40。

[0056] 除上述约 $80 \mu\text{g/l}$ 的临界值以外, 可根据个体的 YKL-40 水平进一步对个体分类。例如, 这可通过以下临界值组进行, 其中增加的 YKL-40 水平, 即临界值, 表明所讨论的心脏疾病进入更严重 / 晚期阶段: 约 $80 \mu\text{g/l}$ 、约 $90 \mu\text{g/l}$ 、约 $100 \mu\text{g/l}$ 、约 $110 \mu\text{g/l}$ 、约 $120 \mu\text{g/l}$ 、约 $130 \mu\text{g/l}$ 、约 $140 \mu\text{g/l}$ 、约 $150 \mu\text{g/l}$ 、约 $160 \mu\text{g/l}$ 、约 $170 \mu\text{g/l}$ 、约 $180 \mu\text{g/l}$ 、约 $190 \mu\text{g/l}$ 、约 $200 \mu\text{g/l}$ 、约 $210 \mu\text{g/l}$ 以及约 $220 \mu\text{g/l}$ 。

[0057] 或者, 在此基础上, 例如个体可根据他们的 YKL-40 水平增量在 20 范围内来分组, 使得: 组 0 个体具有小于 $90 \mu\text{g/l}$ (微克 / 升) 的血清 YKL-40 水平, 组 1 个体具有 $100 \mu\text{g/l} \pm 10 \mu\text{g/l}$ 的血清 YKL-40 水平, 组 2 个体具有 $120 \mu\text{g/l} \pm 10 \mu\text{g/l}$ 的血清 YKL-40 水平, 组 3 个体具有 $140 \mu\text{g/l} \pm 10 \mu\text{g/l}$ 的血清 YKL-40 水平, 组 4 个体具有 $160 \mu\text{g/l} \pm 10 \mu\text{g/l}$ 的血清 YKL-40 水平, 组 5 个体具有 $180 \mu\text{g/l} \pm 10 \mu\text{g/l}$ 的血清 YKL-40 水平, 组 6 个体具有 $200 \mu\text{g/l} \pm 10 \mu\text{g/l}$ 的血清 YKL-40 水平, 组 7 个体具有 $220 \mu\text{g/l} \pm 10 \mu\text{g/l}$ 的血清 YKL-40 水平, 组 8 个体具有 $240 \mu\text{g/l} \pm 10 \mu\text{g/l}$ 的血清 YKL-40 水平, 组 9 个体具有 $260 \mu\text{g/l} \pm 10 \mu\text{g/l}$ 的血清 YKL-40 水平, 组 10 个体具有 $280 \mu\text{g/l} \pm 10 \mu\text{g/l}$ 的血清 YKL-40 水平, 组 11 个体具有 $300 \mu\text{g/l} \pm 10 \mu\text{g/l}$ 的血清 YKL-40 水平, 组 12 个体具有 $320 \mu\text{g/l} \pm 10 \mu\text{g/l}$ 的血清 YKL-40 水平, 组 13 个体具有 $340 \mu\text{g/l} \pm 10 \mu\text{g/l}$ 的血清 YKL-40 水平, 组 14 个体具有高于 $350 \mu\text{g/l}$ 的血清 YKL-40 水平。在给定的实施例中, 使用的是 YKL-40 血清水平, 然而, 从其他生物样品中获得的、以及以蛋白、RNA 或本文提及的其他形式测量的 YKL-40 水平也都属于本发明的范围。组别之间的增量还可能是 $2 \mu\text{g/l}$, 例如 4、5、6、8、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、75、80、95、90 或 $100 \mu\text{g/l}$ YKL-40。优选地, 增量为血清中测量的 20 或 $30 \mu\text{g/l}$ YKL-40。 20 或 $30 \mu\text{g/l}$ YKL-40 的增量可以 $50 \mu\text{g/l}$ YKL-40 为起点。

[0058] 或者, 对于上面给出的实例, 可以从比上述更低的血清 YKL-40 水平开始进行个体的分类, 例如, 组 0 包括具有 $40 \mu\text{g/l} \pm 5 \mu\text{g/l}$ 的血清 YKL-40 水平的个体, 组 1 个体具有

50 $\mu\text{g}/1+/-5\mu\text{g}/1$ 的血清 YKL-40 水平,组 2 个体具有 60 $\mu\text{g}/1+/-5\mu\text{g}/1$ 的血清 YKL-40 水平,组 3 个体具有 70 $\mu\text{g}/1+/-5\mu\text{g}/1$ 的血清 YKL-40 水平,组 4 个体具有 80 $\mu\text{g}/1+/-5\mu\text{g}/1$ 的血清 YKL-40 水平,组 5 个体具有 90 $\mu\text{g}/1+/-5\mu\text{g}/1$ 的血清 YKL-40 水平,组 6 个体具有 100 $\mu\text{g}/1+/-5\mu\text{g}/1$ 的血清 YKL-40 水平,等等。用于分类目的的优选分组可能与待分类的个体的年龄以及疾病状态、未来治疗方案等有关。

[0059] 下表显示了分类方案的另一实例。在该实施方式中,各组别是以在生物样品中测量的 YKL-40 的浓度范围为特征。该实例中给出的范围跨越 25 $\mu\text{g}/1$ 的增量,但还可以是更小的增量,例如 5、10、15 或 20 $\mu\text{g}/1$,或者可选择地跨越更大的增量,如 30、35、40、45 或 50、60、70、80、90 或 100 $\mu\text{g}/1$ 。

[0060]

组	血清 YKL-40, $\mu\text{g}/1$
1	< 85
2	85-110
3	110-135
4	135-160
5	160-185
6	185-210
7	210-235
8	235-260
9	260-285
10	> 285

[0061]

[0062] 对于以上和以下所述的所有分类分组,适用的是:YKL-40 水平越高,心血管疾病就更严重 / 晚期,生存预后就越差。

[0063] 优选使用健康个体的正常 YKL-40 水平值作为参考水平,以便与测定的 YKL-40 水平进行比较。当使用这类正常值时,还可能包括年龄校正,或者,例如按照严重性分类。因此,可将年龄校正的参考水平用作本发明方法中的参考水平,该年龄校正的参考水平是从健康个体中获得的、或者优选地如名称为“作为非特定疾病的一般标记的 YKL-40”的共同未决申请中所述,尤其是术语“参考水平”部分所述。

[0064] 因为血清 YKL-40 水平与相关的风险比之间存在联系,待分类的个体也可根据

计算的风险比来分类。个体组也可根据百分位数来分类,例如总组为 100%,10%的最低 YKL-40 水平的组为组 1,第二最低 10%百分位数是组 2 等等。百分位数可以是 1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、12.5%、13%、14%、15%、20%、25%、30%、33%或 35%百分位数组,或者是介于上述百分位数之间或高于上述百分位数的任意百分位数。实施例中给出的是 10%百分位数分组的例子。

[0065] 本发明提供一种根据个体的生存预后,对患有由动脉粥样硬化引起的心脏疾病的个体进行分类的方法,所述方法包括:测量所述个体的生物样品中的 YKL-40 水平,以及将测量的水平与临界值进行比较。临界值是指 YKL-40 水平,例如生物样品中的 YKL-40 水平,如血清 YKL-40 水平。YKL-40 水平可以是本文所述的任意一个或多个 YKL-40 水平。生存预后可具体地是对患心血管死亡的预后,更优选地是对患心肌梗死的风险的预后。

[0066] 本发明的一种具体实施方式涉及一种根据冠状动脉粥样硬化疾病个体的患心肌梗死风险的预后,对所述个体进行分类的方法,所述方法包括:测量所述个体的生物样品中的 YKL-40 水平,以及将测量的水平与一个或多个临界值进行比较。优选地,一个或多个临界值中的其中一个是约 80 μ g/l。

[0067] 本发明进一步提供一种根据个体的生存预后,对所述个体进行分类的方法,所述方法包括:测量所述个体的生物样品中的 YKL-40 水平;以及将测量的水平与 YKL-40 参考水平进行比较。统计学上的显著增加是个体生存期变短指标。个体可能患有任意类型的疾病,如心血管疾病。具体地,个体可能患有冠状动脉疾病。

[0068] 个体的监测

[0069] 本发明涉及一种基于由 YKL-40 水平测量得出的个体的生存预后,对个人进行监测的方法。根据测量的 YKL-40 水平来监测个体,可用作个体健康的一般状态的指示和/或作为施予的治疗的有效性的指示。个体或病患可能患有的一种疾病或紊乱,如心血管疾病或紊乱。具体地,个体或病患可能患有冠状动脉疾病。

[0070] 监测 YKL-40 水平作为对患有心血管紊乱和疾病的个体的死亡预后,有助于对每一个体施予最佳的治疗。施予有效的治疗不但提高所施予的治疗的改善和治疗效果以及个体的生存几率,并且降低复发几率。因此, YKL-40 可以用于监测患有稳定型冠状动脉疾病的病患的医学治疗的充分性,从而有助于降低这些病患中非致命和致命性心血管事件的高发生率。而且,在评估给定的治疗的费用/益处时,施予最有效的治疗也是一个议题。

[0071] 因此,本发明的一个方面是提供一种联系个体的生存预后,监测个体的健康状态的方法,所述方法包括:测量所述个体的生物样品中的 YKL-40 水平;以及将测量的水平与 YKL-40 参考水平进行比较;其中统计学显著增加是个体的生存期变短指标。

[0072] 本发明还涉及一种治疗患有冠状动脉疾病的患者的方法,包括测量所述个体的生物样品中的 YKL-40 水平;基于测量水平选择药物;以及将足量的所述药物施予所述个体。冠状动脉疾病优选地是稳定型冠状动脉疾病,所述比较优选地是通过与本文上述一个或多个参考水平进行比较。

[0073] 心脏疾病和紊乱

[0074] 术语心血管疾病指涉及心脏或血管(动脉和静脉)的一类疾病。该术语指影响心血管系统与心血管疾病的后果的任意疾病,并在本文中按此意思使用,不过它通常与动脉粥样硬化联系使用。心血管疾病有许多种类型,包括:急性冠脉综合症、急性心肌梗死

(AMI/STEMI/ST 段抬高)、心肌梗死(心脏病发作)、不稳定型心绞痛/UAP/非 ST 段抬高心肌梗死、动脉瘤、心绞痛、动脉粥样硬化、冠状动脉疾病(CAD)、缺血性心脏病、心肌缺血、心律不齐、心房纤颤、心律失常、室性心动过速、心室纤颤、心脏死亡和心脏猝死、心肌病、充血性心力衰竭、心力衰竭、心室舒张与收缩功能障碍、扩张型心肌病、血压升高(高血压)、肥厚性心肌病、瓣膜疾病、二尖瓣脱垂、二尖瓣回流和/或狭窄、主动脉瓣回流和/或狭窄、心肌炎和静脉血栓栓塞,所有这些都与本发明相关。

[0075] 本发明特别关注的是下文将更详细说明的以下疾病:冠状动脉粥样硬化性心脏病(CAD)、动脉粥样硬化性冠心病、动脉粥样硬化性心血管疾病、缺血性心肌病、缺血性冠状动脉疾病、缺血性心脏衰竭、缺血性心脏病、缺血性心律失常、非致命性急性心肌梗死、冠心病猝死(心脏死亡),以及致命和非致命性急性心肌梗死、急性冠脉综合症、急性心肌梗死/急性心肌梗死/AMI/STEMI/ST 段抬高、心房纤颤、心律失常、心肌病、充血性心力衰竭、心肌缺血、心肌梗死、不稳定型心绞痛/UAP/非 ST 段抬高、心肌梗死、室性心动过速和心室纤颤。本发明尤其最关注的是与动脉粥样硬化相关的任意心脏/心血管疾病或紊乱。

[0076] 稳定型心绞痛可以描述为通常在活动或压力下发生的胸痛或不适,其中疼痛或不适的发作由相似或持续不变的活动量或压力引起。不稳定型心绞痛(UAP)可以被描述为不可预料或突然地发生、严重性或频率增加的心绞痛;可能在没有刺激的情况下发作,例如在睡觉或休息期间,并且可能对硝酸甘油没有应答,并且可能持续特别长的时间。不稳定型心绞痛也被认为是急性心肌梗死的初级阶段,而急性心肌梗死又可能导致心血管死亡。然而,UAP 通常难以记录,因为缺乏实际的生理学可测量的参数。此外,急性心肌梗死可以根据心电图(ECG/EKG)的迹象分组,即分为非 ST 段抬高心肌梗死(NSTEMI)或 ST 段抬高心肌梗死(STEMI)。

[0077] 本发明的一种具体实施方式涉及一种根据个体的生存预后,对患有由动脉粥样硬化引起的心脏疾病的个体进行分类的方法,其中所述心脏疾病不是非稳定型心绞痛,所述方法包括:测量所述个体的生物样品中的 YKL-40 水平,以及将测量的水平与 YKL-40 参考水平进行比较。参考水平是本文描述的任意参考水平,尤其如“参考水平”部分所述。

[0078] 本发明的另一种具体实施方式涉及一种根据他们的生存预后,对患有由动脉粥样硬化引起的心脏疾病的个体进行监测的方法,其中所述心脏疾病不是非稳定型心绞痛,所述方法包括:测量所述个体的生物样品中的 YKL-40 水平,以及将测量的水平与 YKL-40 参考水平进行比较。参考水平是本文描述的任意参考水平,尤其如“参考水平”部分所述。

[0079] 动脉粥样硬化症

[0080] 动脉粥样硬化症是一种影响动脉血管的疾病。它是一种动脉壁中的慢性炎症反应,很大程度是因为脂蛋白的沉积。这是由动脉内多斑块的形成引起。动脉粥样硬化产生两个主要问题。首先,动脉粥样硬化斑块,尽管通过动脉扩张长期补偿,最终还是导致斑块破裂和动脉狭窄,因此器官供血不足。如果补偿动脉扩张过程过度,则形成净动脉瘤。这些并发症是慢性的,缓慢地进展和积累。最常见的是,软斑块突然破裂,引起血栓的形成,血栓将快速减缓或阻止血流,即在 5 分钟内,导致由动脉供血的组织死亡。这种灾难性事件就是梗死。一种公认的最常见的情况是冠状动脉的冠状动脉血栓症,引起心肌梗死(心脏病发作)。在非常晚期的疾病中,另一种常见情况是腿部供血不足引起的跛行,通常是由于狭窄与凝块导致的动脉瘤段收缩的结合。因为动脉粥样硬化是全身范围的过程,类似的事件也

发生在脑、肠、肾、腿等的动脉中。

[0081] 炎症在动脉粥样化形成和硬化血栓性事件中起着重要作用,并且与心肌梗塞、中风和心血管死亡的发展相关。而且,所有暴露在损害中的血管化组织都显示出改变的胶原代谢和炎症。正如研究结果所表明,YKL-40 是由炎症组织中的巨噬细胞和中性粒细胞产生。YKL-40 是患有心血管疾病或紊乱(如冠状动脉疾病)的个体中急性和慢性炎症的一种新的生物标记。

[0082] 冠状动脉疾病

[0083] 冠状动脉疾病(CAD)是西方最常见的心脏疾病形式。冠状动脉疾病,也称作冠状动脉粥样硬化性心脏病、冠心病(HAD)、动脉粥样硬化性心脏病、动脉粥样硬化性心血管疾病、缺血性心脏病和动脉粥样硬化性心脏病,是动脉粥样硬化斑块在向心肌供应氧和营养素的动脉的壁内积累的最终结果。尽管冠心病的症状和征兆可以在疾病的晚期状态中看出,但是大多数患有冠心病的个体随着疾病的进展数十年都无疾病征象,直至最终出现症状首次发作,通常是“突然”心脏病发作。在数十年进展之后,一些动脉粥样硬化斑块可能破裂并(伴随血液凝结系统的激活)开始限制血液流向心肌。

[0084] 冠状动脉疾病可能在不同的程度上显示出来。它可能影响供应心肌的单条冠状动脉或血管,或者它可能影响两条血管,三条血管或更多。疾病的严重性随受影响的血管数目的增加而增加。此外,疾病的严重性还取决于受影响的血管是末端血管还是侧支血管。侧支血管就是与其他血管一起供应组织区域的血管,如心肌层的区域,因此有两条或多条血管供应相同组织区域。末端血管是单独供应特定组织区域的血管,例如心肌的特定区域。因此,如果末端血管受影响,与侧支血管受影响相比,疾病更加严重。

[0085] 在本发明方法的优选实施方式中,个体患有冠状动脉粥样硬化性心脏病。在本发明更优选的实施方式中,心脏病是稳定型冠状动脉疾病。

[0086] 急性冠脉综合症

[0087] 急性冠脉综合症(ACS)是一组体征和症状,通常是胸痛和其他特征的结合,被解释为通向心脏的血流突然减小的结果(心肌缺血);最常见的原因是心外膜冠状动脉中粥样硬化斑块的破裂。急性冠脉综合症通常反映由动脉粥样硬化引起的冠状动脉损伤的程度。急性冠脉综合症的亚型包括不稳定型心绞痛(UA,与心肌损伤无关),以及两种形式的心肌梗死(心脏病发作),其中心肌受到损伤。根据心电图(ECG/EKG)的迹象,将这些类型命名为非ST段抬高心肌梗死(NSTEMI)和ST段抬高心肌梗死(STEMI)。

[0088] 急性心肌梗死(AMI或MI),更常称作心脏病发作,是向心脏部位供血受阻时发生的一种医学疾病,最常见的是因为易碎斑块的破裂。急性心肌梗死的结果对个体可能是致命的或非致命的。所产生的缺血或缺氧引起心脏组织的损伤和潜在的死亡。重要的风险因素是血管疾病的既往史,如动脉粥样硬化性心脏病和/或心绞痛、以前的心脏病发作或中风、以前的任意心节率异常或昏厥的情况、年龄-尤其是大于40岁的男性和大于50岁的女性、吸烟、过量饮酒、滥用某些药物、高甘油三酯水平、高LDL(“低密度脂蛋白”)和低HDL(“高密度脂蛋白”)、糖尿病、高血压、肥胖和某些人中长期高水平的压力。

[0089] ACS应该与稳定型心绞痛区分开,稳定型心绞痛是在活动时发展,在休息时消退。与稳定型心绞痛相反,不稳定型心绞痛突然发作,通常在休息时或者活动量最小时,或者在较个体以前的心绞痛(“递增型心绞痛”)更轻程度的运动时。新发作的心绞痛也被认为是

不稳定型心绞痛,因为它暗示了冠状动脉中的新问题。

[0090] 本发明的一个目的是提供一种基于个体的生存预后,对患有不稳定型心绞痛或心肌梗死的一个或多个个体进行分类和 / 或监测的方法,所述个体的生存预后是以获取自所述个体的样品中增加的 YKL-40 水平来衡量。更优选地,对一个或多个患有心肌梗死 (MI) 的个体进行分类和 / 或监测。不稳定型心绞痛被视为 MI 的初级阶段。

[0091] 缺血性心肌病

[0092] 缺血性心肌病 (也称作局部缺血性心脏病 (IHD) 以及与缺血性心肌病相关的疾病、缺血性冠状动脉疾病、缺血性心脏衰竭、缺血性心脏病、缺血性心律失常及心肌缺血) 是由于输送至心肌层的氧不足引起的心脏肌肉无力,冠状动脉疾病 (冠状动脉的动脉粥样硬化) 是最常见的原因。贫血和睡眠窒息是相对常见的情况,其能够促进心肌缺血和甲状腺机能亢进,能够引起继发于高输出心脏衰竭的“相对的”局部缺血。患有缺血性心肌病的个体通常具有心肌梗死病史 (心脏病发作), 然而即便在没有心肌梗死的情况下,长期缺血也会引起对心肌层的足够损伤,促成临床上显著的心肌症。在一项典型的报告中,受心肌梗死影响的部位在其梗死时最初开始坏死,然后被疤痕组织 (纤维化) 代替。这种纤维化组织是运动不能的 ; 它不再是肌肉,并且不能有助于心脏发挥泵的功能。如果心脏的运动不能区足够大,则心脏受影响的一侧 (如左侧或右侧) 将衰竭,这种衰竭是缺血性心肌病的功能性结果。稳定型缺血性心脏病的症状包括心绞痛和运动耐力下降。不稳定型 IHD 在休息时表现为胸痛或其他症状,或者迅速恶化的心绞痛。用心电图、验血 (心脏标记物)、心脏应力试验或冠状动脉造影照来诊断 IHD。根据症状和风险,治疗可以使用药物、经皮冠状动脉介入治疗 (血管成形术) 或者冠状动脉搭桥手术 (CABG)。许多疾病能够导致心肌症。这些疾病包括血色病、淀粉样变性病、糖尿病、甲状腺机能亢进、溶酶体贮积病和肌营养不良症。

[0093] 本发明的一个目的是提供一种基于个体的生存预后,对患有上述缺血性心肌病的一个或多个个体进行分类和 / 或监测的方法,所述方法包括 : 测量所述个体的生物样品中的 YKL-40 水平,以及将测量的水平与 YKL-40 参考水平进行比较。参考水平可以是本文所述的任意参考水平,尤其是如“参考水平”部分所述。YKL-40 水平可以通过本文公开的任意类型的分析方法进行测量,如免疫分析法或基于 PCR 的分析,并且可以在任意类型的生物样品中测量,尤其是血清、血浆或血液样品。

[0094] 心脏衰竭

[0095] 充血性心脏衰竭 (CHF)、充血性心力衰竭 (CCF) 或者仅仅心脏衰竭,是一种可以由任意结构性或功能性心脏紊乱引起的状况,这种紊乱损害心脏充满或泵出足够量血液贯穿机体的能力。它不能与“心跳停止”混淆,心跳停止称为心律停止或心搏停止,它是正常心脏功能的停止,随后的血流动力学崩溃导致死亡。因为在初始或随后的评价中,不是所有的个体都有容量过度负荷,所以术语“心力衰竭”要优于旧术语“充血性心力衰竭”。由于缺乏普遍一致的定义,在诊断中存在困难,心力衰竭通常是未确诊的,尤其当病情被认为“平和”时。

[0096] 本发明的一个目的是提供基于个体的生存预后,对患有心力衰竭的一个或多个个体进行分类和 / 或监测的方法,所述方法包括 : 测量所述个体的生物样品中的 YKL-40 水平,以及将测量的水平与 YKL-40 参考水平进行比较。

[0097] 心搏停止

[0098] 心搏停止,也称作心搏呼吸停止、心跳呼吸骤停或循环骤停,是由于收缩期心脏不能有效收缩导致的正常血液循环的突然停止。“停止的”血液循环阻止氧气向身体各组织传输。脑组织缺氧或脑部供氧不足,使受害者丧失意识并停止正常呼吸,但濒死呼吸仍可能发生。如果心搏停止超过5分钟未处理,有可能发生脑损伤,不过新的治疗方法如诱导低温已经开始延长这段时间。为了改善生存和神经功能恢复,即时反应是极为重要的。心搏停止是医疗突发事件,在某些个体组中,如果及早处理是有可能逆转的。当突发的心搏停止导致死亡,这称作心源性猝死(SCD),也称作冠心病猝死。心搏停止主要的急救处理是心脏复苏(俗称CPR),以提供循环支持直至获得明确的医疗处理,医疗处理将会根据心脏表现出来的节奏而改变,但通常需要去心脏纤颤。

[0099] 心搏停止以及心源性猝死的最常见的潜在原因是冠状动脉疾病,其他类型的原因包括:非动脉粥样硬化性冠状动脉病变、心肌肥厚、心肌病和心力衰竭,包括致心律失常性右室心肌病、肥厚型心肌病、扩张型心肌病、心肌梗死、非压缩型心肌病、炎症、浸润、肿瘤和变性过程、心脏瓣膜疾病、先天性心脏病、原发性电生理异常,如先天和后天的两种长QT综合症、病窦综合症,Brugada综合症、儿茶酚胺多形性室性心动过速、与神经体液和中枢神经系统的影响有关的节律不稳、婴儿猝死综合症与儿童猝死、心震荡、机械干扰静脉回流、主动脉夹层分离以及毒性/代谢紊乱。

[0100] 本发明的一个目的是提供一种根据个体的生存预后,对患有充血性心力衰竭的个体进行监测和/或分类的方法,所述方法包括:测量所述个体的生物样品中的YKL-40水平,以及将测量的水平与YKL-40参考水平进行比较。生物样品可以是血液、血清或血浆。

[0101] 心律失常

[0102] 心律失常是心脏电活动不规则或者比正常快或慢的任意一种情况。某些心律失常是威胁生命的医疗突发事件,其可能引起心搏停止和猝死。其他的引起症状加剧,例如意识到不同的心率或者心悸,这都会让人烦恼。有些是相当轻微的,可以被视为正常。本发明关注的常见的一系列心律失常包括但不限于:房性节律、房性期前收缩(PACS)、游走性房性起搏点、多发性房性心动过速、室上性心动过速(SVT)、心房扑动、心房纤颤(Afib)、室性节律、室性期前收缩(PVC)、加速性心室自主节律、室性心动过速(VT)、心室纤颤(VF)、多形性室性心动过速、心室额外搏动、心房室性心律失常、AV窦性心动过速、AV折返性心动过速、Wolff-Parkinson-White综合症、Lown-Ganong-Levine综合症、交界性心律失常、交界性节律、交界性心动过速、交界性早搏复合、心脏传导阻滞(也称作AV传导阻滞)、一度心脏传导阻滞(也称为PR延长)、二度心脏传导阻滞、1型二度心脏传导阻滞(也称作Mobitz I或Wenckebach)、2型二度心脏传导阻滞(也称作Mobitz II)、三度心脏传导阻滞(也称作完全性心脏阻滞)以及不常见的心律失常,如三联律。

[0103] 本发明特别关注的是以下心律失常:室性心动过速、心室纤颤和心房纤颤,以下将详细描述其中每一种。

[0104] 室性心动过速(V-tach或VT)是一种源于心脏其中一个心室的心动过速,或快速心搏节律。这是潜在地威胁生命的心律失常,因为它可能导致心室纤颤和猝死。室性心动过速可以基于其形态学、病情持续时间或者基于症状进行分类。某些VT与合理的心输出量相关,甚至可能是无症状的。从中长期看,心脏通常难以忍受这种节律,个体必然恶化至无脉动的VT或者恶化至VF。

[0105] 心室纤颤 (V-fib 或 VF) 是心脏中心室心肌存在不协调收缩的情况。结果是心脏不能充分泵血;很快发生缺氧,接着在 20 至 30 秒内失去意识。心室纤颤是医疗突发事件,如果心律不齐持续超过几秒钟,血液循环将停止 - 证据为没有脉动、血压和呼吸 - 最终发生死亡。心室纤颤是心搏停止和心源性猝死的原因。

[0106] 心房纤颤 (AF 或 afib) 是一种涉及心脏两个上腔室 (心房) 的心律不齐。它被定义为 “irregularly irregular”, 并且在诊脉时通常被确认如此。心房纤颤是最常见的心律失常;风险随年龄增加,超过 80 岁的人 8% 患有 AF。在心房纤颤中,通常由窦房结产生的电脉冲被心房中的无组织活动取代,导致不规则的脉冲传导至产生心跳的心室。结果就是不规则的心跳。这可能是连续的 (持续或永久性 AF), 或者在正常心律之间交替 (发作性 AF)。心房纤颤的自然趋势是变为慢性疾病。慢性 AF 导致死亡风险增加。心房纤颤通常是无症状的,并且其自身通常不是致命的,但是可能导致心悸、头晕、胸痛或充血性心力衰竭。患有心房纤颤的个体的中风几率显著增加 (约为正常人群的 2-7 倍), 因此 AF 是中风的一大原因。

[0107] 本发明的一个目的是提供一种根据个体的生存预后,对患有心律失常的个体进行监测和/或分类的方法,所述方法包括:测量所述个体的生物样品中的 YKL-40 水平,以及将测量的水平与 YKL-40 参考水平进行比较。参考水平可以是本文描述的任意参考水平,尤其如“参考水平”部分所述。本发明尤其关注的是如室性心动过速、心室纤颤和心房纤颤这类心律失常。生物样品可以是血液、血清或血浆样品,分析方法可以是免疫分析法。

[0108] 交叉指示和寿命

[0109] 患心血管疾病的风险随着年龄、吸烟、血胆固醇过多 (高胆固醇水平)、糖尿病和高血压而增加。本发明的一个目的是提供一种根据个体的 YKL-40 水平做出的任意上述指示,对所述个体进行监测和分类的方法, YKL-40 水平是在从所述个体获得的生物样品中测量。参考水平可以是本文描述的任意 YKL-40 水平,尤其如“参考水平”部分所述。此外, YKL-40 可以用作指示寿命的生物标记;血清 YKL-40 水平越低,生存预后越好。

[0110] 本发明的一个实施方式是一种根据个体的生存预后,对一个或多个个体进行分类和/或监测的方法,所述方法包括:测量所述个体的生物样品中的 YKL-40 水平,以及将测量的水平与 YKL-40 参考水平进行比较。参考水平可以是本文描述的任意 YKL-40 水平,尤其如“参考水平”部分所述。在另外的实施方式中,试剂盒中包括如何进行分类和/或监测的说明,以及检测和定量生物样品中的 YKL-40 所需的元件。

[0111] YKL-40

[0112] YKL-40 的命名是基于它的三个 N- 端氨基酸酪氨酸 (Y)、赖氨酸 (K) 和亮氨酸 (L) 及其约 40KDa 的分子量 (Johansen et al. 1992)。人 YKL-40 的完整氨基酸 (SEQ ID NO :2) 和编码序列 (SEQ ID NO :1) 可在 GenBank 中找到,登录号 :M80927。人 YKL-40 含有 383 个氨基酸的单多肽链,并且就进化史来说是一种高度保守的肝素结合性与甲壳素结合性血浆糖蛋白。人 YKL-40 与其他几种哺乳动物的同系物之间的序列同一性为:猪 (84% 序列同一性),牛 (83%),山羊 (83%),绵羊 (83%),豚鼠、大鼠 (80%),小鼠 (73%)。YKL-40 是“哺乳动物甲壳酶样蛋白”中的一员,但是没有甲壳酶活性。YKL-40 的体外表达在正常的人单核细胞中是没有的,但是可以在巨噬细胞分化的后期通过激活的单核细胞和中性粒细胞,通过血管平滑肌细胞、癌细胞和关节软骨细胞而强烈地诱导。在体内, YKL-40mRNA 和蛋

白通过炎症组织中的巨噬细胞亚群表达,如动脉粥样硬化斑块、患有巨细胞性关节炎的个体的关节炎脉管、发炎的滑膜、肉瘤病灶,还通过瘤周巨噬细胞来表达。

[0113] 分子加工支配 YKL-40 的诱导,但它的确切功能尚不清楚。YKL-40 是一种分泌蛋白,表明它的活性位点很可能是细胞外;不过还没有识别出 YKL-40 的特异性细胞表面或者可溶性受体。YKL-40 是成纤维细胞和软骨细胞的生长因子,与 IFG-1 协同发挥作用,由 TNF 和 IL-6 调控,并且需要 NF-kappaB 的持续活化 (Millis et al.,1986)。通过 AKT 的磷酸化,纤维原细胞的 YKL-40 处理可以抵消对 TNF 和 IL-1 的炎性应答,从而减弱 ASK1 介导的信号途径 (Junker et al.,2005 ;*Nøjgaard* et al.,2003)。这导致金属蛋白酶和 IL-8 表达水平降低 (Junker et al.,2005 ;*Nøjgaard* et al.,2003)。此外,YKL-40 与 I 型、II 型和 III 型胶原结合,并调节 I 型胶原纤维蛋白形成的速率 (Kamal et al.,2006)。这些观察结果表明 YKL-40 在炎症环境中可能发挥保护的作用,限制细胞外基质的降解,并由此控制组织重塑。YKL-40 还可以充当内皮细胞的化学诱导剂,刺激它们的迁移,并促进血管平滑肌细胞的迁移和粘着 (Nishikawa et al.,2003 ;Boot et al.,1999),表明了血管形成方面的作用。YKL-40 也是纤维原细胞的生长因子 (Vind et al.,2003 ;Shackelton et al.,1995 ;Renkema et al.,1998, De Ceunicnck et al.,2001, Recklies et al.,2002, Ling et al.,2004, Recklies et al.,2005),并具有抗分解作用,在组织重塑期间保护细胞外基质。此外,动脉粥样硬化斑块中的巨噬细胞表达 YKL-40mRNA,尤其是那些已经渗透病灶深处的巨噬细胞,并且在动脉粥样硬化症早期病灶的巨噬细胞中发现最高的 YKL-40 表达 (Boot et al.,1999)。YKL-40 还可以被视为一种急性期蛋白,因为它的血浆或血清浓度在几种炎症疾病中是增加的。

[0114] 调节 YKL-40 的生物效应的细胞受体尚不可知,但是胞浆内信号传导途径的激活表明 YKL-40 与细胞膜上的信号组件发生相互作用。

[0115] 本发明的一个目的是检测 YKL-40 基因的任意转录产物,该基因的转录产物可能是 YKL-40 蛋白的 hnRNA、mRNA、全长蛋白、片段蛋白、或肽。可以理解的是,可同时检测一种或多种蛋白、RNA 转录物、片段和 / 或肽。本发明的另一方面是通过任意可得的手段检测转录产物,例如通过免疫分析法进行 YKL-40 蛋白、其片段或肽的抗体检测,以及通过基于 PCR 的分析进行检测,例如通过 RT-PCR 检测 RNA。

[0116] YKL-40 与心脏疾病

[0117] 本发明公开了一种根据个体的生存预后,对个体进行分类和 / 或监测的方法。所述生存预后是基于生物样品中 YKL-40 水平的测量,以及将结果值与一个或多个参考水平比较。个体可以是健康个体或者患有上述任意心脏疾病的个体。本发明特别关注的是由动脉粥样硬化引起的心脏疾病或紊乱。

[0118] 从下文以及实施例给出的结果可以确定,YKL-40 水平在患有心脏疾病的个体中是增加的。从这些结果也可以看出,YKL-40 水平越高,个体生存预后越短。

[0119] 因此意外地发现,YKL-40 是一种新的生物标记,YKL-40 的水平指示个体的生存预后。

[0120] 与实施例中描述的对照相比,血清 YKL-40 水平在患有慢性冠状动脉疾病的个体是增加的。因此,在患有冠状动脉疾病的个体中,YKL-40 是慢性心肌缺血和 / 或血管生成变化的新的生物标记,并且用作生存的预后标记,或者作为新情况 (如心肌梗塞) 的预后标

记。从实施例中可以确定,对于血清 YKL-40 增加的心血管死亡,无事件生存率明显降低。对于最高血清 YKL-40(组 VI,血清 YKL-40 $\geq 256 \mu\text{g/l}$) 心血管死亡率是 8.0%,而低血清 YKL-40(组 I,血清 YKL-40 $< 110 \mu\text{g/l}$) 是 2.6%(图 5C)。根据 YKL-40 水平分为高或低的个体之间,心血管死亡率存在 3 倍以上的差异。这种关系在所有原因的死亡率中更为清晰(图 5D)。最高血清 YKL-40 的病患 2.6 年内死亡率为 18.4%,相比之下低血清 YKL-40 病患为 5.3%,几乎为 3.5 倍。

[0121] 本发明的一个目的是根据个体的生存预后,对个体进行分类和 / 或监测的方法,所述生存预后是从个体的样品中测量的 YKL-40 水平中发现的。具体来说,本发明的一个目的是提供一种根据患有冠状动脉疾病 (CAD) 个体的生存预后,对所述个体进行分类和 / 或监测的方法。更具体地,该方法涉及患有 CAD 的个体,所述 CAD 影响至少一条血管、例如两条血管、例如三条血管、例如四条血管、例如五条血管、或例如六条血管。本发明的另一个方面是受到影响的血管可以是末端血管或侧枝血管,或者如果两条或多条血管受到影响,其受影响的可能是末端或侧枝血管的结合。

[0122] CAD 的程度不能由受影响的血管的数目来判断。更确切讲,CAD 的程度与个体受影响的血管中存在的动脉粥样硬化的程度相关。同样,其中多条血管受影响的患有 CAD 的个体,与单条血管受影响的个体相比,可能具有较少的症状。

[0123] 如实施例中可见,增加的 YKL-40 水平也是心肌梗死的预后生物标记。意外地发现,YKL-40 与 MI 和心血管死亡显著相关。先前已经证实,MI 是心血管死亡的主要原因。因此,本发明的一个目的是提供一种根据患有心肌梗塞 (MI) 的个体的生存预后,对所述个体进行分类和 / 或监测的方法。

[0124] 如实施例所述,与对照相比,急性 ST 段抬高心肌梗死 (STEMI) 的翌日,血清 YKL-40 水平增加。因此,YKL-40 是患有冠状动脉疾病的个体中,慢性心肌缺血和 / 或血管生成的变化的新生物标记,并且用作生存的预后标记。因此本发明的一个目的是提供一种根据个体的生存预后,对患有急性冠状综合症的个体进行分类和 / 或监测的方法。具体来讲,本发明一个目的是提供一种对患有非 ST 段抬高心肌梗死 ((NSTEMI) 或 ST 段抬高心肌梗死 (STEMI) 的个体进行分类和 / 或监测的方法,不管这些疾病是致命还是非致命的。

[0125] 在以下所述的实施例中,在相对较短的 2.6 年随访期间,血清 YKL-40 的 HR 高,在 MI(急性心肌梗死)中为 1.83,心血管死亡中为 3.28,所有原因的死亡中为 3.75。这些 HR 值是高的;YKL-40 强度的指示已经成为一种生物标记。

[0126] YKL-40 的检测

[0127] 本发明的肽和核苷酸包括 YKL-40 的功能衍生物、YKL-40 肽及其编码核苷酸。“功能衍生物”表示分子的“片段”、“变体”、“类似物”或“化学衍生物”。分子的“片段”,例如本发明的任意 DNA 序列,包括该分子的任意核苷酸子集。这类分子的“变体”是指基本上与整个分子或其片段相似的天然产生的分子。分子的“类似物”指基本上与整个分子或其片段相似的非天然分子。

[0128] 如果两个分子的氨基酸序列基本相同,则认为一个分子与另一分子“基本相似”。基本相似的氨基酸分子具有相似的生物活性。因此,假定两种分子具有相似的活性,即使其中一个分子含有另一分子中没有的另外的氨基酸残基,或者如果氨基酸残基的序列不一致,它们也被视为本文使用的术语“变体”。

[0129] 此外,当分子含有另外的通常不是分子一部分的化学基团时,该分子被看作是另一分子的“化学衍生物”。这类基团可以改善分子的溶解性、吸收、生物半衰期等。或者,这类基团也可降低分子的毒性,消除或者减轻分子的任意未知的副作用等。能够调节这种作用的基团已经被公开,例如 Remington 's Pharmaceutical Sciences, 16th Ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1980。

[0130] YKL-40 初级氨基酸序列的微小修饰可能产生与本文所述的 YKL-40 肽具有基本相似的活性的多肽和蛋白。这种修饰可以是有意设计的,如通过定位诱变,或者可以是无意识的。通过这些修饰产生的所有的肽都包含在本文中,只要 YKL-40 的生物活性仍然存在。此外,一个或多个氨基酸的缺失也可以导致对所得的分子结构的修饰,而不显著改变它的生物活性。这样可以开发具有更广用途的更小的活性分子。例如,可以除去氨基或羧酸末端的氨基酸,对于酶发挥令人满意的催化或抗原活性来说,可能不需要这些氨基酸。

[0131] 无论多克隆还是单克隆抗体都可用于本发明下述的免疫分析和治疗方法中。某些抗 YKL-40 抗体可以商业购买,或者可根据本文描述或本领域已知的方法产生。通过将基本上纯的 YKL-40 或者抗原 YKL-40 肽多次皮下或者肌肉内注射到适宜的非人哺乳动物中,可以产生多克隆抗体。YKL-40 肽的抗原性可以通过常规的技术来测定,以确定用该肽免疫过的动物的抗体应答的程度。一般而言,用于产生抗 YKL-40 抗体的 YKL-40 肽通常应该诱导产生高滴度抗体,该抗体对 YKL-40 有相对高的亲和力。

[0132] 视需要,免疫肽可以使用本领域熟知的技术通过偶联作用与载体相连接。这类常用的可以与肽化学偶联的载体包括钥孔戚血蓝素 (KLH)、甲状腺球蛋白、牛血清白蛋白 (BSA) 和破伤风类毒素。然后,将偶联的肽用于免疫动物(如小鼠或兔子)。因为 YKL-40 可保存在哺乳动物物种中,优选的是使用载体蛋白以增强 YKL-40 蛋白的免疫原性。

[0133] 然后,从取自哺乳动物的血液样品中获得抗体。用于开发多克隆抗体的技术是本领域已知的,例如 *Methods of Enzymology*, "Production of Antisera With Small Doses of Immunogen: Multiple Intradermal Injections", Langone, et al. eds. (Acad. Press, 1981)。由动物制备的多克隆抗体可以进一步被纯化,例如通过与基质结合并从基质中洗脱,其中肽与基质结合,产生的抗体与该肽结合。本领域的技术人员应该知道免疫领域中常用的纯化和 / 或浓缩多克隆抗体及单克隆抗体的各种技术,例如见 Coligan, et al., Unit 9, *Current Protocols in Immunology*, Wiley Interscience, 1991。

[0134] 然而,优选地,产生的 YKL-40 抗体为单克隆抗体 ("mAb' s")。对于单克隆抗体的制备,优选的是免疫小鼠或大鼠。本发明使用的术语“抗体”包括完整分子及其片段,例如能够与抗原决定簇结合的 Fab 和 F(ab')₂。同时,在本文中,术语“本发明的 mAb' s”指对于 YKL-40 具有特异性的单克隆抗体。

[0135] 用于生产分泌 mAbs 的杂交瘤细胞的一般方法是众所周知的 (Kohler and Milstein, 1975)。简而言之,如 Kohler 和 Milstein 所述,该技术包括从 5 名单独患有黑色素瘤、畸胎瘤或子宫癌、神经胶质瘤或肺癌的癌症病患的局部引流淋巴结中分离淋巴细胞(此处样品是从手术样本中获得);将细胞集中;以及将细胞与 SHFP-1 融合。杂交瘤细胞经筛选,用于生产与癌细胞系结合的抗体。

[0136] mAb' s 中 YKL-40 特异性的确认可以用相对常规的筛选技术来完成(例如酶联免疫吸附分析,或“ELISA”),以确定所关注的 mAb 的基本反应模式。还可能用于评估一种

mAb, 在没有过度试验的情况下, 通过确定被测试的 mAb 是否防止本发明的 mAb 与上述分离的 YKL-40 相结合, 以确定是否具有与本发明 mAb 同样的特异性。如果被测试的 mAb 与本发明的 mAb 竞争, 本发明 mAb 显示的结合下降, 那么有可能是这两种单克隆抗体结合相同或密切相关的表位。确定一种 mAb 是否具有本发明 mAb 的特异性的另一种方法是: 用通常能与 mAb 反应的抗原来预孵育本发明的 mAb, 并确定被测试的 mAb 与抗原结合的能力是否被抑制。如果被测试的 mAb 被抑制, 那么很可能它具有与本发明的 mAb 相同或密切相关的表位特异性。

[0137] 免疫分析方法

[0138] 使用的免疫分析方法必须是定量的, 使得患病个体的 YKL-40 的水平可以与健康人中存在的正常水平和 / 或该个体中测量的背景水平相区别。因此, 优选的是在固相上使用可检测的标记 (直接或间接) 的竞争性和夹心分析法。该标记会提供一种检测信号, 指示抗体与 YKL-40 抗原的结合。抗体或抗原可以用本领域已知的任意标记物来标记以提供检测信号, 包括放射性同位素、酶、荧光分子、化学发光分子、生物发光分子和胶体金。在已知的分析方法中, 对于灵敏度来说, 放射免疫分析 (RIA) 或者酶联免疫分析 (ELISA) 是最优选的。因此, 放射性同位素是优选的标记。

[0139] 可以直接与抗体结合、或间接与 YKL-40 抗原结合的金属离子的实例是本领域技术人员熟知的, 包括 ^{125}I 、 ^{111}In 、 ^{97}Ru 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{72}As 、 ^{89}Zr 、 ^{90}Y 和 ^{201}Tl 。考虑到易于连接且不损害抗原结合特异性, 优选的是 ^{125}I (钠盐, Amersham, United Kingdom)。用 ^{125}I 标记 YKL-40 可按照 Salacinski, et al. (1981) 中描述的方法进行。用于提供 ^{125}I 标记的 Iodogen (1, 3, 4, 6-四氯-3 α , 6 α -二苯基苄脲) 可购自 Pierce and Warriner, Chester, England。

[0140] 本发明的放射性免疫测定法使用与基本上等体积的 YKL- 抗血清和 YKL-40 示踪物一起孵育的标准品或样品。该标准品和样品通常一式两份进行分析。本发明分析的灵敏度 (检测限) 为约 $10\ \mu\text{g}/\text{l}$ 。本文中的灵敏度定义为等于零结合值的标准偏差 2 倍的可检测质量。标准曲线在 $20\text{--}100\ \mu\text{g}/\text{l}$ 之间一般是线性的。以下实施例中描述的分析的批内变异系数与批间变异系数分别为 $< 6.5\%$ 和 $< 12\%$ 。

[0141] 本领域技术人员可以理解, 虽然不一定像 RIA 那样灵敏, 但使用放射性同位素以外的标记物的分析方法也具有某些优势, 因此可被采用作为 RIA 设计的替代方案。例如, 酶联免疫吸附分析 (ELIAS) 容易自动化, 使用易于从许多研究和临床实验室中获得的 ELISA 微量滴定板读取器和试剂。荧光、化学发光和生物发光标记具有可以视觉检测的优点, 不过在分析中它们不像放射性同位素那样用于定量被抗体结合的抗原数量。

[0142] 基于 PCR 的分析

[0143] 此外, 本领域技术人员可以理解, 免疫分析法以外的方法也可用于检测和定量生物样品中 YKL-40 的存在。例如, 编码 YKL-40 的多肽可用本领域已知的定量聚合酶链反应 (PCR) 方法来检测。进行定量 PCR 的优选方法是使用竞争模板进行的竞争性 PCR 技术, 竞争模板含有一个或多个碱基对的诱导突变, 导致竞争体在序列或大小方面不同于目标 YKL-40 基因模板。其中一种引物是生物素化的、或者优选地是氨基化的, 使得所得 PCR 产物的一条链 (通常是反义链) 可以通过氨基-羧基、氨基-氨基、生物素-链亲和素或其他适宜的与固体载体的紧密结合进行固定, 该固体载体已经与适当的反应物紧密结合。最优选地, PCR 产物、固相载体以及反应物之间的结合是共价结合, 这样能可靠地使键在变性条件下抵抗

解偶联。

[0144] 一旦 PCR 产物的氨基化或生物素化的链被固定,未结合的互补链就在碱性变性洗涤中分离出来,并从反应环境中除去。将与目标和竞争核酸相对应的序列特异性寡核苷酸 (“SSO' s”)用检测标签进行标记。然后,SSO' s 与反义链进行杂交,不存在已除去的未结合的正义链的竞争。添加合适的分析试剂,并且通过 ELISA 测定工具测定杂交的程度,该工具与使用的检测标签和固相载体工具是相称的,优选地为 ELISA 酶标仪。使用单独来自 PCR 反应扩增模板的标准曲线,将测定值与衍生的目标核酸含量进行比较,所述模板包含目标模板和竞争性模板。该方法是具有优势的,因为它是定量的,不依赖于 PCR 循环的次数,并且不受 SSO 探针与 PCR 产物的互补链之间竞争的影响。

[0145] 或者,部分聚合步骤与整个杂交步骤可以在固相载体上进行。在该方法中,捕获在固相载体上的是核苷酸聚合引物(优选寡糖),而不是 PCR 产物的链。然后,将目标和竞争性核酸 PCR 产物添加到固相载体上,并进行聚合步骤。将聚合产物的未结合的正义链在上述变性条件下除去。

[0146] 通过标记的寡糖 SSO 探针的检测,使用合适的测定工具(优选 ELISA 阅读器)和之前所述的标准曲线,可以确定目标核酸与竞争性核酸的比率。该方法的效率很高,使得聚合步骤中的链反应可以是非必需的,从而缩短完成该方法所需要的时间。该方法的精确度也得到增强,因为最终的聚合产物不必从反应管转移到固相载体上用于杂交,从而限制了它们受损失或损害的可能性。然而,对具体样品来说,如果需要,PCR 可在单独的反应管中用于扩增目标和竞争性核酸,接着在固相载体上进行最后的聚合。

[0147] 在反应的最后几个周期中,可以向反应液中添加一些本领域技术人员已知的分子,该分子能够提供不同的可检测信号,指示结合的 PCR 产物的形成(例如标记的核苷酸发色团,其可以形成不同的颜色,指示目标和竞争性 PCR 产物的形成)。目标和竞争性核酸之间的比率也可以通过 ELISA 或其他适宜的测定工具以及与检测标签反应的试剂来测定,所述检测标签与固定的杂交引物的 3' 端相连。通过进行常规的非竞争性 PCR 方案,该方法还可适用于检测样品中是否存在特定的基因(不进行定量)。

[0148] 本领域的普通技术人员知道或者可易于确认,如何选择合适的底物用于上述的方法。至于上述技术的进一步细节,可参考 Kohsaka, et al., Nuc. Acids Res., 21 :3469-3472, 1993 ;Bunn, et al., U. S. Pat. No. 5, 213, 961 以及 tonnis, et al., PCR Protocols :A Guide to Methods and Applications, Acad. Press, 1990 中公开的内容,本文将其中的内容纳入,仅为了说明定量 PCR 方案的相关领域的状态。

[0149] 酶分析法

[0150] YKL-40 似乎是一种水解酶,因此可以基于酶分析法测定功能性 YKL-40 蛋白或蛋白片段的水平,其中 YKL-40 的底物被水解成可检测的形式。

[0151] 试纸

[0152] 检测 YKL-40 的具体方法涉及一种装置,该装置包括安装在固体载体上的快速、定性和 / 或定量测试系统,用于测定生物样品中的 YKL-40 水平。

[0153] 测试系统可使用上述任意分析系统,例如免疫分析、基于 PCR 的分析或酶分析。优选免疫分析用于本测试系统。

[0154] 固体载体可以用于任意相中以完成上述任意的分析,尤其是免疫分析,包括试纸、

膜、吸收垫、珠子、微孔、试管等。优选的是测试装置,其可由测试人员或者自我测试的病患方便地使用,很少需要或者不需要事先的培训。这种优选的测试装置包括试纸和膜分析系统。这种常规测试系统的制备和使用在专利、医疗和科学文献中有很好的描述。如果使用试纸,则抗-YKL-40 抗体与试纸的一端结合,使得带有抗体的末端可以浸入或浸在生物样品上。或者,可以通过移液管、滴管、镊子等将样品涂在抗体包被的试纸或膜上,或者直接从机体喷到试纸上。

[0155] 在本发明的这一方面中,优选的是液体的或可以转化为液体的生物样品。尤其优选的是可以从机体获得的液体生物样品;此处的实例包括但不限于:血液、血清、血浆、尿液、脑液、关节液、精液和唾液。

[0156] 抗-YKL-40 的抗体可以是任意同工型,如 IgA、IgG 或 IgM、Fab 片段等。抗体可以是单克隆或多克隆的,并且可通过 Harlow and Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988 中广泛描述的方法进行制备,在此将其纳入作为参考。另见关于免疫分析的部分。抗体可以通过直接或间接的方式加到固体载体上。间接结合有利于 YKL-40 结合位点最大限度暴露于分析溶液中,因为这些位点自身并不用于与载体结合。可使用多克隆抗体,因为多克隆抗体可以识别 YKL-40 的不同表位,从而增强分析的灵敏度。或者,可使用抗 YKL-40 的单克隆抗体。

[0157] 固体载体优选地是在 YKL-40 抗体与固体载体结合之后被非特异性封闭。周围区域的非特异性封闭可以用全的或衍生的牛血清白蛋白,或来自其他动物的胚乳、全动物血清、酪蛋白、非脂肪乳等。

[0158] 样品是与 YKL-40 特异性抗体一起加到固体载体上,使得 YKL-40 通过所述抗体结合在固体载体上。将样品过量的和未结合的部分除去,优选将固体载体洗涤,使得抗体-抗原复合物保留在固体载体上。固体载体可用洗涤液洗涤,洗涤液可含有清洁剂,如吐温-20、吐温-80、或者十二烷基硫酸钠。

[0159] 在 YKL-40 与固体载体结合之后,涂布与 YKL-40 反应的第二抗体。第二抗体可被标记,优选可见的标记物标记。所述标记物可以是可溶性的或颗粒状的,并且可包含染色的免疫球蛋白结合物质、简单染料或染料聚合物、染色的乳胶珠、含染料的脂质体、染色细胞或者生物体,或者金属的、有机的、无机的或者染料固体。可以通过本领域熟知的多种方法将标记物与 YKL-40 抗体结合。在本发明的一些实施方式中,标记物可以是能够与信号产生系统偶联的酶。可视标记物的实例包括碱性磷酸酶、 β -牛乳糖、辣根过氧化物酶和生物素。许多酶-发色体或者酶-底物-发色体结合体是已知的,可以用于酶联分析。

[0160] 与样品同步,可以用已知量的 YKL-40 进行相应的步骤,并且这一步骤可以作为分析的标准。

[0161] 将固体载体再次洗涤,以除去未结合的标记的抗体,并且将该标记的抗体经可视观察并测定数量。标记物的积累通常可以视觉评估。这种视觉检测可以检测不同的颜色,如红色、黄色、褐色或绿色,取决于所使用的标记物。积累的标记物也可通过光检测装置来检测,如反射率分析仪、视频图像分析仪等。积累的标记物的可视强度可能与样品中的 YKL-40 浓度相关。通过将可视强度与一组参考标准比较,可以得出积累的标记物的可视强度与 YKL-40 量之间的关系。优选地,按照与未知样品相同的方法分析标准品,更优选地,与所述样品一起进行,或者在相同固体载体上或者在不同的固体载体上。使用的标准品的浓

度范围可以从约每升溶液中约 $1 \mu\text{g}$ YKL-40 高至每升溶液中约 1mg YKL-40, 优选地, 测试血浆样品的范围是从 $50 \mu\text{g}/\text{l}$ 至 $400 \mu\text{g}/\text{l}$ YKL-40。优选地, 使用几种不同浓度的 YKL-40 标准品, 以便通过比较颜色强度更加准确地测定未知物的数量。例如, 当与类似于 $200 \mu\text{g}/\text{l}$ YKL-40 的颜色强度相比较时, 类似于 $110 \mu\text{g}/\text{l}$ YKL-40 的颜色强度可被视为阴性。

[0162] 所述装置, 例如本文描述的试纸或者其他基于固体载体的测试系统, 通过与一个或多个标准品 / 对照区域比较, 可用于辅助测定生物样品中 YKL-40 的大致水平。因此, 可以将 YKL-40 的浓度范围确定在应用于该装置的标准 / 对照区域的两个 YKL-40 浓度之间。或者, YKL-40 的水平可以调节为高于或低于 YKL-40 的临界值, 将所选择的临界值的浓度应用于试纸的对照区域。

[0163] 本发明的一个目的是提供一种基于个体的生存预后, 对个体进行分类和 / 或监测的装置, 生存预后是通过将所述个体的生物样品中的 YKL-40 水平与 YKL-40 参考水平比较而发现。该装置内和 / 或上可能有多个参考水平 / 标准, 或者装置内和 / 或上可能有单个参考水平 / 标准。在后一种情况下, 该装置是基于个体的生存预后来分类和 / 或监测个体, 生存预后是通过将所述个体的生物样品中的 YKL-40 水平与 YKL-40 的临界值比较而发现。如本文以上所讨论, 可使用任意的 YKL-40 临界值 (浓度)。

[0164] 本发明装置的具体实施方式涉及一种装置, 包括用于测量样品中 YKL-40 水平的工具; 以及用于将测量的 YKL-40 水平与至少一个参考水平比较的工具。参考水平优选地可能是单个参考水平, 例如约 $80 \mu\text{g}/\text{l}$ 的临界值, 或者参考水平可能是 YKL-40 的一组临界值。如果是这种情况, 该装置包括用于将测量的 YKL-40 水平与 YKL-40 的一组临界值比较的工具。

[0165] 此外, 分析可用于在治疗期间监测病患的 YKL-40 水平, 因为如果治疗有效的話, YKL-40 水平应该会降低。对本领域技术人员显而易见的是, 可能有必要进行病患样品的一个或多个系列稀释, 使得病患样品的 YKL-40 水平可以与一组标准值中的一个进行比较。然后, 将病患的 YKL-40 测量值用稀释倍数校正。

[0166] 虽然各步骤可以在相同的容器 (例如试管) 中进行, 只要它是干净的并且在每个步骤后都清洗, 不过本发明最好进行快速便捷的现场分析, 对各步骤使用三个独立的容器, 一个用于样品, 一个用于洗涤, 一个用于冲洗可检测的标记物。

[0167] 因此本发明的一个目的是使用试纸测量生物样品的 YKL-40 水平, 用于根据个体的 YKL-40 参考水平进行分类, 生物样品来自所述个体。(见图 6A 和 6B)。

[0168] 分析本发明的 YKL-40 所需的所有材料和试剂可以集中装配于一个试剂盒中。该试剂盒通常包括含有已知浓度的 YKL-40 的一种或多种溶液; 一洗涤液; 一发色体的溶液, 其通过酶直接或间接地与底物作用而改变颜色或色度; 一抗 -YKL-40 抗体, 其与标记物结合以便可以被检测到; 用于转移所述液体的移液管; 用于所述溶液的试管; 以及一固体载体, 尤其适合插入所述试管中, 将 YKL-40 的多克隆抗体携带到该固体载体的表面。该试剂盒也可包含具有抗 -YKL-40 抗体的一个或多个固体载体, 用于同时或单独地分析一个或多个样品; 以及培养标记物所需的必要试剂。还优选地是提供使用 YKL-40 作为标准品, 以便将它与未知的样品一起现进行分析。这种试剂盒将包括用于每种试剂的不同容器。

[0169] 在上述测试试剂盒中, 试剂可由事先装有试剂或对照品的贮存瓶或者一个或多个试管提供。

[0170] 试剂盒的组分也可以以干燥或冻干的形式提供。当试剂或组分以干燥的形式提供时,一般通过添加适宜的溶剂进行冲调。可以想到的是,溶剂也可在另一容器装置中提供。

[0171] 本发明的试剂盒通常包括用于容纳试剂的工具,例如商业销售的严格封闭的小瓶或管,例如注射器或吹塑的塑料容器,该容器中保存有所需要的小瓶。试剂盒还包括一套关于如何进行分析的说明书。

[0172] 在本发明的替换实施方式中,所述试纸和/或试剂盒可包括用于分析除 YKL-40 以外的生物标记的工具,例如以下非限制性组中的一种或多种生物标记:C-反应蛋白(CRP)、脑钠素(BNP)、白细胞介素、肿瘤坏死因子- α 、同型半胱氨酸、淀粉样 A 蛋白、妊娠相关血浆蛋白-A、肌钙蛋白、可溶性细胞间粘附分子-1、可溶性 UPAR、III 型前胶原氨基端肽(P-III-NP)、单核细胞趋化蛋白-1、纤维蛋白 D-二聚体、生长分化因子-15、缺血修饰性白蛋白、脂蛋白相关水解磷脂酶 A2、基质金属蛋白酶、穿透素 3、分泌型磷脂酶 A2 组 IIA、细胞间粘附分子-1、心脏型脂肪酸结合蛋白(H-FABP)、肌球蛋白轻链-1(MLC-1)、P-选择蛋白和 CKMB。优选地,所述试纸和/或试剂盒包括用于分析 C-反应蛋白和/或脑钠素和/或同型半胱氨酸的工具。

[0173] 其他生物标记

[0174] YKL-40 是针对所有死亡和心脏死亡的依赖性生物标记,并且可用于相应的方面。然而,YKL-40 还可与其他已知的生物标记联合使用,例如 C-反应蛋白(CRP)、脑钠素(BNP)、白细胞介素、肿瘤坏死因子- α 、同型半胱氨酸、淀粉样 A 蛋白、妊娠相关血浆蛋白-A、肌钙蛋白、可溶性细胞间粘附分子-1、可溶性 UPAR、III 型前胶原性氨基端肽(P-III-NP)、单核细胞趋化蛋白-1、纤维蛋白 D-二聚体、生长分化因子-15、缺血修饰性白蛋白、脂蛋白相关磷脂酶 A2、基质金属蛋白酶、穿透素 3、分泌型磷脂酶 A2 组 IIA、细胞间粘附分子-1、心脏型脂肪酸结合蛋白(H-FABP)、肌球蛋白轻链-1(MLC-1)、P-选择蛋白和 CKMB。在所述生物标记中,可溶性和不溶性形式的蛋白都与本发明相关,如 UPAR 或可溶性 UPAR;细胞间粘附分子-1 和可溶性细胞间粘附分子-1 及其他。上述任意标记的水平可以在生物样品中测定,如血液、血清、血浆或组织样品,通过任意可用的方法,如使用免疫分析或基于 PCR 的分析或几种分析方法的结合。

[0175] 因此,本发明的另一个方面提供一种通过将个体的 YKL-40 水平与其他生物标记的水平结合,对个体进行分类和监测的方法,这些其他生物标记选自但不限于:C-反应蛋白(CRP)、脑钠素(BNP)、白细胞介素和肿瘤坏死因子- α 、同型半胱氨酸、淀粉样 A 蛋白、妊娠相关血浆蛋白-A、肌钙蛋白、可溶性细胞间粘附分子-1、可溶性 UPAR、III 型前胶原性氨基端肽(P-III-NP)、单核细胞趋化蛋白-1、纤维蛋白 D-二聚体、生长分化因子-15、缺血修饰性白蛋白、脂蛋白相关水解磷脂酶 A2、基质金属蛋白酶和 CKMB。这些另外的生物标记中,尤其关注的是 C-反应蛋白、脑钠素和同型半胱氨酸。

[0176] 在本发明方法的一种优选实施方式中,YKL-40 水平是与其他生物标记水平一起测量。优选地所述其他生物标记选自 C-反应蛋白(CRP)、脑钠素(BNP)、白细胞介素、肿瘤坏死因子- α 、同型半胱氨酸、淀粉样 A 蛋白、妊娠相关血浆蛋白-A、肌钙蛋白、可溶性细胞间粘附分子-1、可溶性 UPAR、III 型前胶原氨基端肽(P-III-NP)、单核细胞趋化蛋白-1、纤维蛋白 D-二聚体、肌球蛋白轻链-1、P-选择蛋白和 CKMB。

[0177] 上述实施方式,连同任意需要的医疗和/或取样设备,以及该设备的使用说明和

如何完成所选分析的说明,可以包含在一套试剂盒中。

[0178] 生物样品

[0179] 生物样品是从个体中获得。这样生物样品可以是选自组织、骨骼、血液、血清和血浆样品。与本发明特别相关的是血液、血清或血浆。本领域的普通技术人员能够容易地确定哪一种分析样品源最适宜用于分类或监测具体的疾病、或紊乱、或一般健康状态,针对任一项增加的 YKL-40 水平进行生存预后。

[0180] 个体

[0181] 本文所指的个体是某一物种的单个成员,本文优选哺乳动物物种。任意哺乳动物物种都是本发明的对象,不过以下任意物种是尤其相关的:小鼠、大鼠、豚鼠、仓鼠、兔、猫、狗、猪、牛、马、羊、猴和人。本发明最优选的个体是人。本发明中个体也指病患或受试者。

[0182] 试剂盒

[0183] 本发明的另一实施方式包括一套试剂盒,其中该试剂盒至少包括辅助评估从个体获得的生物样品中 YKL-40 水平的组成部分,以及如何操作的说明书。所述组成部分可以是检测 YKL-40 水平的方法,如免疫分析法,或者是专门针对 YKL-40 检测进行的免疫分析所需的部件。可选地,试剂盒进一步或替换地包括完成基于 PCR 分析的组成部分,用于检测 YKL-40 和测定生物样品中 YKL-40 的水平。试剂盒可进一步包括用于获得一个或多个生物样品的装备,例如,该装备可以是注射器、小瓶或其他。试剂盒可以被包装供单次使用或重复使用,其中的元件可以是一次性的,例如在单次使用之后处理掉,或者可以具有重复使用的性质。

[0184] 本发明的一种具体实施方式涉及一套试剂盒,包括用于检测生物样品中 YKL-40 水平的工具;用于将测量的 YKL-40 水平与 YKL-40 参考水平进行比较的工具;以及关于如何根据个体的 YKL-40 参考水平,对个体进行分类和/或监测的说明。

[0185] 在一种实施方式中,所述试剂盒,除了用于检测和测定 YKL-40 水平以外,可进一步包括用于检测一个或多个另外的生物标记的工具,例如 C-反应蛋白、同型半胱氨酸、脑钠素、白细胞介素、肿瘤坏死因子- α 、同型半胱氨酸、淀粉样 A 蛋白、妊娠相关血浆蛋白-A、肌钙蛋白、可溶性细胞间粘附分子-1、可溶性 UPAR、III 型前胶原氨基端肽 (P-III-NP) 和 CKMB。优选地,所述包括检测除 YKL-40 以外的其他生物标记的试剂盒包括用于检测和/或测定生物样品中的 C-反应蛋白、脑钠素和/或同型半胱氨酸的组成部分。

[0186] 本发明的试剂盒还可包括本文上述的至少一种装置。

[0187] 附图详细说明

[0188] 图 1 YKL-40 研究中个体的人口统计数据:录入时和根据增加的 YKL-40 血清浓度统计的病患的人口统计特征。根据血清 YKL-40 百分位数分组。数值表示为数字(百分比)或中值(IQR,四分位数间距)。使用趋势检验进行 6 个组之间的统计学比较。MI,急性心肌梗塞。n. a,不可用。I 组:YKL-40 < 110 μ g/l;II:110 μ g/l \leq YKL-40 < 129 μ g/l;III:129 μ g/l \leq YKL-40 < 153 μ g/l;IV:153 μ g/l \leq YKL-40 < 191 μ g/l;V:191 μ g/l \leq YKL-40 < 256 μ g/l;以及 VI:YKL-40:256 μ g/l \leq YKL-40。

[0189] 图 2 风险比:6 组血清 YKL-40 组中每组 95% 置信区间的风险比(HR),该风险比是从 2.6 年随访期间时间对事件(不稳定型心绞痛、急性心肌梗死(MI)、心血管死亡和所有原因的死亡率)的 4 个 Cox 分析中得到。将干预指标(克拉霉素或安慰剂)作为协变量。P

值： $*0.01 < P < 0.05$ ； $**0.0005 \leq P < 0.01$ ；以及 $***P < 0.0005$ 。I 组 $< 50\%$ 百分位数： $YKL-40 < 110 \mu g/l$ ；II $50\% \leq YKL-40 < 60\%$ 百分位数： $110 \mu g/l \leq YKL-40 < 129 \mu g/l$ ；III $60\% \leq YKL-40 < 70\%$ 百分位数： $129 \mu g/l \leq YKL-40 < 153 \mu g/l$ ；IV $70\% \leq YKL-40 < 80\%$ 百分位数： $153 \mu g/l \leq YKL-40 < 191 \mu g/l$ ；V $80\% \leq YKL-40 < 90\%$ 百分位数： $191 \mu g/l \leq YKL-40 < 256 \mu g/l$ ；以及 VI $\geq 90\%$ 百分位数 $YKL-40 : 256 \mu g/l \leq YKL-40$ 。

[0190] 图 3 包括干预指标和风险因素的风险比：6 组血清 YKL-40 组中每组 95% 置信区间的风险比 (HR)，该风险比是在多变量模型中，在 2.6 年随访期间，从时间对心肌梗塞 (MI)、心血管死亡和所有原因的死亡率这 3 个 Cox 分析中得到。将干预指标 (克拉霉素或安慰剂) 和其他的风险因素 (性别、先前的急性心肌梗死、年龄 (< 60 ； ≥ 60 岁)、吸烟状况、高血压和糖尿病) 作为协变量。P 值： $*0.01 < P < 0.05$ ； $**0.0005 \leq P < 0.01$ ；以及 $***P < 0.0005$ 。I 组 $< 50\%$ 百分位数： $YKL-40 < 110 \mu g/l$ ；II $50\% \leq YKL-40 < 60\%$ 百分位数： $110 \mu g/l \leq YKL-40 < 129 \mu g/l$ ；III $60\% \leq YKL-40 < 70\%$ 百分位数： $129 \mu g/l \leq YKL-40 < 153 \mu g/l$ ；IV $70\% \leq YKL-40 < 80\%$ 百分位数： $153 \mu g/l \leq YKL-40 < 191 \mu g/l$ ；V $80\% \leq YKL-40 < 90\%$ 百分位数： $191 \mu g/l \leq YKL-40 < 256 \mu g/l$ ；以及 VI $\geq 90\%$ 百分位数 $YKL-40 : 256 \mu g/l \leq YKL-40$ 。

[0191] 图 4 依照临界值分类得到的生存曲线：2.6 年随访期间，在 YKL-40 值高于或低于 $110 \mu g/l$ 的病患中不稳定型 AP (图 4A) 和 MI (图 4B) 的无事件生存率。

[0192] 图 5 依照分类得到的生存曲线：2.6 年随访期间六个血清 YKL-40 组中各组的无事件生存率：

[0193] I： $< 50\%$ 百分位数： $YKL-40 < 110 \mu g/l$ ；

[0194] II： $50\% \leq YKL-40 < 60\%$ 百分位数： $110 \mu g/l \leq YKL-40 < 129 \mu g/l$ ；

[0195] III： $60\% \leq YKL-40 < 70\%$ 百分位数： $129 \mu g/l \leq YKL-40 < 153 \mu g/l$ ；

[0196] IV： $70\% \leq YKL-40 < 80\%$ 百分位数： $153 \mu g/l \leq YKL-40 < 191 \mu g/l$ ；

[0197] V： $80\% \leq YKL-40 < 90\%$ 百分位数： $191 \mu g/l \leq YKL-40 < 256 \mu g/l$ ；以及

[0198] VI： $\geq 90\%$ 百分位数： $256 \mu g/l \leq YKL-40$ 。

[0199] 研究的事件是：图 5A) 不稳定型心绞痛，图 5B) MI，图 5C) 心血管死亡，和图 5D) 所有原因的死亡率。

[0200] 图 6 由上面可见的 A 和 B 试纸实施方式：试纸载体材料 (1) 带有用于生物材料的分析区域 (2) 和一个对照或标准区域 (3. 图 6A) 或多个对照或标准区域 (4a. 至 4. e. 图 6B)。单个 (3) 标准或多个 (例如以增加或减小顺序，每个区域一个浓度) YKL-40 浓度可适用于对照或标准区域，以便能够用图 6A 中显示的条 (stick) 读取阳性 / 阴性结果，或者通过与图 6B 中的对照区域比较，评估生物样品中大概的 YKL-40 浓度。样品 / 分析区域类似于最后的检验。

[0201] 图 7 :f (YKL-40) 单独或者与风险因素结合，以及与风险因素加选择的处理指标结合，对死亡时间、心血管死亡时间和 MI 的影响。因为血清 YKL-40 水平低于 $82 \mu g/l$ 时，血清 YKL-40 和任意事件的 HR 的对数没有关系，而高于该值时，YKL40 的对数和 $\log HR$ 之间存在线性关系，我们使用转换公式转换血清 YKL-40： $Y = \log(\max(82, \text{血清 YKL-40}/\mu g/l))$ 。

实施例

[0202] 以下提供的实施例说明 YKL-40 水平与个体生存的关系、心血管治疗和紊乱的治疗进展,以及监测患有所述疾病的个体。然而,这些实施例不应理解为对本发明范围的限制,本发明范围由附加的权利要求限定。

[0203] 在实施例中,缩写“AP”表示心绞痛,“HR”表示风险比,“MI”表示心肌梗死,“AMI”表示急性心肌梗塞,“min”表示分钟,“hrs”和“h”表示小时,以标准缩写表示测量单位(如 ml)。

[0204] 实施例 1

[0205] 病患

[0206] 病患包括先前公开的随机、双盲、安慰剂对照、多中心 CLARICOR 临床试验病患,患有稳定型冠状动脉疾病,以每日一次口服克拉霉素 500mg(Klacid **Uno®**, Abbott, UK)、或相匹配的安慰剂 (Jespersen et al., 2006) 治疗两周。病患(年龄 18-85 岁)在 1993 年至 1999 年期间被诊断出心肌梗死或心绞痛(ICD 编码 209-219),并且在 1999 年 8 月还活着。4373 名患者符合参加该研究的条件,并于 1999 年 10 月 5 日和 2000 年 4 月 15 日之间随机分布。如果病患有前面所述的心肌梗死、心绞痛、经皮冠状动脉腔内成形术或冠状动脉搭桥手术的病史,则该病患符合条件 (Jespersen et al., 2006)。4350 名病患提供了血液,其中 4298 名病患的血清可用于 YKL-40 测定。病患随机完成电子记录形式,记录关于以前的心肌梗死、心绞痛、经皮冠状动脉介入治疗、冠状动脉搭桥手术、动脉性高血压、糖尿病、吸烟和医药治疗的信息。

[0207] 随访

[0208] 病患的随访都是无计划的。有关死亡的信息来自丹麦中央民事登记处,其记录了所有居民的重要状况。有关致命和非致命的录入信息来自丹麦国家医院挂号处,所有躯体医院入院的数据。登记 100%是在这些登记表中。在初始 2.6 年随访期间,基于这些登记表,协调中心收集死亡证明书和医院记录的复印件,并且将每个潜在时间单独地转交至事件委员会,并且收集的所有死亡证明书用于其他地方描述的余下 6 年随访期 (Jespersen et al., 2006, Gluud et al., 2007)。

[0209] 终止点

[0210] 在本生物标记研究中,我们从随机到重新录入考察了 I. 死亡、心血管死亡、非致命性 MI、不稳定型心绞痛, II. 非致命性 MI 或不稳定型心绞痛,以及 III. 达到非致命性 MI、不稳定型心绞痛或死亡的时间。心肌梗死的诊断需要与心肌缺血或心肌梗死相符合的心肌酶(肌酸激酶-同工酶 MB 或肌钙蛋白)的升高和心电图仪中 ST 段的显著变化。将长期持久的胸痛或休息时胸痛,而酶没有重大变化,归类为不稳定型心绞痛。

[0211] 道德规范

[0212] 该研究得到当地伦理委员会 (KF 01-076/99), 丹麦医药管理局 (2612-975) 和丹麦的数据保护局 (199-1200-174) 的许可,并按照 Helsinki 宣言进行。参与者都作了书面知情同意书。

[0213] YKL-40 分析

[0214] YKL-40 的血浆水平是通过商业的双位点夹心型酶联免疫吸附分析 (ELISA) (Quidel Corporation, San Diego, CA) (Harvey 1998), 利用链霉亲和素包被的微孔板、生物素化 -Fab 单克隆捕获抗体以及碱性磷酸酶标记的多克隆检测抗体以一式两份来测定。

ELISA 的回收率为 102% (Harvey et al., 1998; 亲自观察)。检测限是 20 $\mu\text{g/L}$ (Harvey et al., 1998)。批内分析 CV 为 5.0% (平均 YKL-40 浓度 40 $\mu\text{g/L}$, $n = 40$)、3.9% (平均 104 $\mu\text{g/L}$, $n = 40$) 和 3.8% (平均 155 $\mu\text{g/L}$, $n = 40$)。批间分析 CV 是 5.3% (平均 42 $\mu\text{g/L}$, $n = 277$) 和 6.3% (平均 151 $\mu\text{g/L}$, $n = 277$ (亲自观察))。

[0215] 统计分析

[0216] 时间对事件的分布用 Kaplan-Meier 法计算,并用 Breslow 检验比较显著性差异。Cox- 分析用于分析一个或多个协变量对时间-事件的影响。当变量用于测试 Cox 模型的比例假设时,扩展的 Cox 分析包括协变量、时间、以及时间和协变量之间的相互作用。后一项测试可由协变量组的 log-log 图的可视评估加以补充。因为用 Shapiro Wilk W 检验进行评估时,血清 YKL-40 的分布以及 $\log(\text{YKL-40})$ 的分布明显不同于高斯分布,因此用非参数检验(两组, Mann-Whitney 检验; 两组以上, Kruskal-Wallis 检验)比较病患组别之间的血清 YKL-40 水平。这些分析用 SPSS 15.0 版完成。

[0217] 为了考察时间-特定事件是否与病患的 YKL-40 明显相关,将 YKL-40 的血清浓度转化为分类变量,用血清 YKL-40 分布的 10 个百分位数作为临界值。将 10 个组的 Kaplan-Meier 生存曲线进行显著性差异的比较。将干预指标包含在内作为分层变量,以补偿克拉霉素对心血管死亡的影响(19)。如果结论是相同的,则在干预组阶层上对分析进行汇总。最后评估 YKL-40 组与平均存活时间之间的关系是否为单调递减函数。Cox 模型假设血清 YKL-40 和风险比(HR)的对数之间呈线性,是通过观察 $\log \text{HR}$ 与血清 YKL-40 百分位数组的血清 YKL-40 平均值之间的关系而评估得出。将第一组用作 HR 的参考。

[0218] 在另一项分析中发现,当血清 YKL-40 值低于 82 $\mu\text{g/l}$ 时,血清 YKL-40 水平与任意事件的风险比(HR)的对数之间没有关系,当高于该值时, YKL-40 的对数与 $\log \text{HR}$ 之间存在线性关系;我们使用转换公式转换血清 YKL-40: $Y(\text{转换的血清 YKL-40}) = \log(\max(82, \text{血清 YKL-40}/\mu\text{g/l}))$ 。所有引起死亡和心脏死亡的事件中,年龄都满足线性假设。对于 MI 使用转换公式 $Y = \max(63, \text{年龄}/\text{岁})$ 。如果转换的 YKL-40 对事件发生时间有显著的影响,我们就重复分析,用已知的风险因素(年龄、性别、以前的 MI、吸烟状况、高血压、糖尿病)校正。如果影响仍然很显著,我们在分析中纳入选择的治疗指标。这些因素选择如下:选择包括一半病患的随机样品并完成相应数据材料的分析,包括协变量、风险因素和所有医疗治疗指标(β -阻滞剂、ACE 抑制剂、钙阻滞剂、抑制素、阿司匹林(magnyl)、持久的硝酸盐、地高辛、利尿剂、抗心律失常剂)。在这项分析中,将治疗指标外的所有协变量保留在分析中,该分析包括后向消除,用 $p = 0.10$ 的似然比值检验除去变量。用另一半数据材料重复该分析。选择的治疗指标是保留在这两项分析中的那些。

[0219] 使用的显著性水平是 0.05,所有检验都是双侧的。为了解释由于多次测试引起的 I 型实验误差的膨胀,我们使用了 Bonferroni 校正,得出显著性水平 $0.05/22 = 0.0023$,因为完成了 22 次检验。这些分析是用 SPSS 15.0 版完成。

[0220] 结果

[0221] 与受试者的人口统计和临床特征相关的血清 YKL-40

[0222] 图 1 说明了所包括的患稳定型冠状动脉疾病的病患的人口统计数据。录入时平均年龄为 65 岁(范围:30 至 85 岁)。4298 名登记的病患中共有 31% 为女性,68% 以前患有心肌梗死。4298 名病患的中值血清 YKL-40 是 110 $\mu\text{g/l}$ (范围 20 至 3047 $\mu\text{g/l}$)。登记的

用克拉霉素或安慰剂治疗的病患之间的血清 YKL-40 没有差异。血清 YKL-40 在先前患过或未患过 MI 的病患中无显著性差异（中值 $111 \mu\text{g/l}$ ，范围 $20\text{--}3047 \mu\text{g/l}$ ，对比 $106 \mu\text{g/l}$ ，范围 $20\text{--}2802 \mu\text{g/l}$ ）。

[0223] 对所有事件来说，在 1% 显著性水平时，第二至第五个百分位数的各项之间的风险比 (HR) 与最低百分位数 I 无显著性差异，因此将前五个百分位数合并为一个，以获得 6 个 YKL-40 组（见图 1 的文字）。YKL-40 组中的分析表明，血清 YKL-40 水平增加与年龄增加 ($P < 0.0005$)、高血压 ($P < 0.0005$) 和糖尿病 ($P < 0.0005$) 相关（图 1），但是与性别、以前的 MI 或录入时的吸烟状况无关。

[0224] 血清 YKL-40 作为总死亡、心血管死亡、心肌梗死 (MI) 和不稳定型心绞痛 (UAP) 的风险因素

[0225] 在 2.6 年随访期间，330 名 (7.6%) 病患出现新的心脏事件，包括 115 名病患患有不稳定型 AP (2.6%) 和 219 名患有 MI (5.0%)。

[0226] 在 2.6 年随访期间，当与血清 YKL-40 低于 $110 \mu\text{g/l}$ 的那些病患相比时，水平较高的组与不稳定型 AP 的发生无显著相关，但与 MI 显著相关（图 4, $P = 0.002$ ）。在上述一项分析随后进行的分析中考虑了医院未登记的心脏事件。针对 2.6 年随访重新计算产生以下数字：新的心脏事件发生在共 390 名病患中 (9.1%)，包括 120 名患不稳定型 AP 的病患 (2.8%) 和 270 名患 MI 的病患 (6.3%)，17 名病患登记患有 UAP 和 MI (0.4%)（图 2 和 3）。共计 187 名病患患心血管死亡 (4.3%)，并且共计 377 名病患死亡 (8.7%)。

[0227] Cox 模型的比例假设已经满足。Cox 模型的血清 YKL-40 与 HP 的对数之间的呈线性的假设在各项分析中都没有满足。包括 YKL-40 类别和干预指标的 Cox 分析显示（见图 2 和 3），在 2.6 年随访期间，血清 YKL-40 显著预测 MI (0.004)、心血管死亡 ($p < 0.0005$) 和所有原因的死亡率 ($p < 0.0005$)，但不能预测不稳定型 AP。对心血管风险因素（ < 60 相比 ≥ 60 岁，性别、以前的 MI、吸烟状况、高血压和糖尿病）进行多变量校正只稍微改变了该结果（图 3）。

[0228] 所有原因的死亡的 HR 显著地随血清 YKL-40 的增加而增加，并且它们与低于 $110 \mu\text{g/l}$ 的血清 YKL-40 (组 I) 相比，组 II 为 1.45、组 III 1.89、组 IV 2.37、组 V 2.59 和组 VI 3.75 (除组 II 外，均为 $P < 0.0005$)（图 2）。针对心血管风险因素进行多变量校正只稍微降低了 HR (图 3)。

[0229] 图 5A-D 概述了在 2.6 年随访期间，六个血清 YKL-40 组中各组的不稳定型 AP、MI、心血管死亡以及所有原因死亡的无事件生存率。不稳定型 AP 随时间的发生率不依赖于当前研究中的血清 YKL-40 (图 5A)。然而，对 MI 来说，组 I 明显与其余组分离。随着血清 YKL-40 的增加，MI 和心血管死亡的无事件生存率明显降低。MI 的无事件生存率随血清 YKL-40 的增加而降低；对于最高的血清 YKL-40，患 MI 的比例为 7.0% 和 9.0% 之间（组 II 至组 VI），低血清 YKL-40 为 5.0%（组 I）（图 1B）。对于最高的血清 YKL-40，心血管死亡率为 8.0%（组 VI），低血清 YKL-40 为 2.6%（组 I）（图 5C）。这种关系在所有原因的死亡率中更加明显（图 5D）。最高血清 YKL-40 的病患中 18.4% 在 2.6 年内死亡，相比之下低血清 YKL-40 的病患中为 5.3%。通过对心血管风险因素进行多变量校正，MI、心血管死亡和所有原因死亡的 HR 仅稍微降低（图 3）。探测性 Cox 分析显示，当排除患心脏死亡的病患时，死亡时间与 YKL-40 之间仍有高度显著的相关性 ($p < 0.0005$)。当排除死于心脏死亡以外的其他原

因的病患时,同样是如此 ($p < 0.0005$)。

[0230] 在以血清 YKL-40 值的临界点 $82 \mu\text{g/l}$ 进行的分析中, Y (转换的血清 YKL-40) 与心血管死亡 ($\text{HR} = 1.88, 95\% \text{置信区间 (C. I.)} = 1.54-2.31, p < 0.001$)、所有原因的死亡 ($\text{HR} = 2.01, 95\% \text{ C. I.} = 1.75-2.31, p < 0.001$) 以及 MI ($\text{HR} = 1.38, 95\% \text{ C. I.} = 1.13-1.68, p = 0.002$) 显著相关, 但与不稳定型心绞痛却不是 ($p = 0.85$) (图 7)。对心血管危险因素 (年龄、性别、以前的 MI、吸烟状况、高血压、糖尿病) 进行多变量校正后, Y 有助于显著地预测所有原因的死亡 ($\text{HR} = 1.67, 95\% \text{ C. I.} = 1.43-1.95, p < 0.001$) 和心血管死亡 ($\text{HR} = 1.5195\% \text{ C. I.} = 1.20-1.89, p = 0.001$), 但不能显著预测 MI ($p = 0.26$)。在评估医学治疗的预测显著性的分析中, 当分析中保留所有危险因素 (见统计分析部分) 时, 以利尿剂、地高辛和他汀类进行的治疗也保留在死亡时间的分析中。在心脏死亡时间的分析中, 只保留了用地高辛治疗。在对心血管危险因素进行多变量校正后, 选择的医疗指标 Y 明显地有助于所有原因的死亡 ($\text{HR} = 1.62, 95\% \text{ C. I.} = 1.37-1.90, p < 0.001$) 和心血管死亡 ($\text{HR} = 1.5295\% \text{ C. I.} = 1.20-1.92, p = 0.001$) 的预测。

[0231] 总之, 已经发现在患有稳定型冠状动脉疾病的病患中, 血清 YKL-40 水平是所有死亡、心脏死亡与心肌梗死的非常强的生物标记。由于在随访期间, 患有不稳定型心绞痛的个体数量低, 其中的结果对不稳定型心绞痛和 YKL-40 来说是不确定的。然而, 结果显示, YKL-40 是一种令人意外的恰当的生物标记, 用于监测患有如稳定型冠状动脉疾病或其他心脏疾病或紊乱的个体的医学治疗的充分性, 尤其是由动脉粥样硬化引起的那些疾病或紊乱; 和 / 或用于根据个体的生存预后, 根据患心血管死亡的预后, 或患心肌梗死的风险的预后, 对个体进行分类。这些监测或分类可通过已经公开的方法来完成: 通过测量所述个体的生物样品中的 YKL-40 水平, 以及将测量的水平与 YKL-40 参考水平比较。通过这种方法, 尤其是血清 YKL-40 水平, 还有从其他生物样品中获得的 YKL-40 水平, 都可帮助降低患冠状动脉疾病或其他心脏疾病的个体的高死亡率。

[0232] 讨论

[0233] 本研究证实, 高血清 YKL-40 浓度是稳定型 CAD 病患的 MI、心脏死亡和所有原因死亡的显著预测物。最高 YKL-40 水平的病患中, 风险比增加到 3 倍以上。另外, 高血清 YKL-40 与年龄增长、高血压和糖尿病有关, 但与性别、以前的 MI 或录入时的吸烟状况无关。对这些变量进行校正分析对 MI 的 HR、心血管死亡率和所有原因死亡率均无重大影响。

[0234] 炎症在动脉粥样硬化形成和动脉粥样硬化血栓形成事件中起着重要作用, 并且与心肌梗死、中风和心血管死亡相关 (Jialal et al., 2003; Lindahl et al., 2000; Mueller et al., 2002; Ridker et al., 2001; Ridker et al., 2002; Albert et al., 2002)。YKL-40 是患稳定型冠状动脉疾病的病患中急性和慢性炎症的新生物标记。这可以由以下发现来支持: YKL-40 是由位于炎症组织中的巨噬细胞和中性粒细胞产生 (Johansen et al., 2006; Volck et al., 1998; Boot et al., 1999; Johansen et al., 1999; Johansen et al., 2005; Johansen et al., 2000)。YKL-40 与蛋白质胰岛素样生长因子 -1 协同作用, 充当成纤维细胞和软骨细胞的生长因子, 并且它限制了肿瘤坏死因子 - α 和白细胞介素 -1 (Recklies et al., 2002; Ling et al., 2004) 以及 IL-6 (亲自观察) 的分解代谢作用。

[0235] 参考文献

[0236] Albert CM, Ma J, Rifai N, Stampfer MJ, Ridker PM. Prospective study of

C-reactive protein, homocysteine, and plasma lipid levels as predictors of sudden cardiac death. *Circulation*. 2002 ;105 :2595-9.

[0237] Boot RG, van Achterberg TAE, van Aken BE, Renkema GH, Jacobs MJHM, Aerts JMFG, et al. Strong induction of members of the chitinase family of proteins in atherosclerosis. Chitotriosidase and human cartilage gp-39 expressed in lesion macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999 ;19 :687-94.

[0238] Bunn, et al., U. S. Pat. No. 5, 213, 961

[0239] Coligan, et al., Unit 9, *Current Protocols in Immunology*, Wiley Interscience, 1991).

[0240] De Ceuninck F, Gauffillier S, Bonnaud A, Sabatini M, Lesur, C, Pastoureau P. YKL-40 (Cartilage gp-39) induces proliferative events in cultured chondrocytes and synoviocytes and increases glycosaminoglycan synthesis in chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2001 ;285 :926-31.

[0241] Fiore CE, Tamborino C. YKL-40 and graft rejection. *Am J Med* 2000 ;108 :688-9.

[0242] Gluud C, Als-Nielsen B, Damgaard M, et al. Clarithromycin for two weeks for stable coronary heart disease : six-year follow-up of the CLARICOR randomized trial and updated meta-analysis of antibiotics for coronary heart disease. Resubmitted 2007.

[0243] Harlow and Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.

[0244] Harvey S, Weisman M, O' Dell J, et al. Chondrex : new marker of joint disease. *Clin Chem* 1998 ;44 :509-16.

[0245] Innis, et al., *PCR Protocols : A Guide to Methods and Applications*, Acad. Press, 1990.

[0246] Jespersen CM, Als-Nielsen B, Damgaard M, et al. Randomised placebo controlled multicentre trial to assess short term clarithromycin for patients with stable coronary heart disease : CLARICOR trial. *BMJ* 2006 ;332 :22-7

[0247] Jialal I, Devaraj S. Role of C-reactive protein in the assessment of cardiovascular risk. *Am J Cardiol* 2003 ;91 :200-2.

[0248] Johansen JS, Baslund B, Garbarsch C, Garbarsch C, Hansen M, Stoltenberg M, et al. YKL-40 in giant cells and macrophages from patients with giant cell arteritis. *Arthritis Rheum* 1999 ;42 :2624-30.

[0249] Johansen JS, Christoffersen P, Møller S, Price PA, Henriksen JH, Garbarsch C, et al. Serum YKL-40 is increased in patients with hepatic fibrosis. *J Hepatol* 2000 ;32 :911-20.

[0250] Johansen JS, Milman N, Hansen M, Garbarsch C, Price PA, Grandal N. Increased serum YKL-40 in patients with pulmonary sarcoidosis. A potential marker of disease activity ? *Respiratory Medicine* 2005 ;99 :396-402.

- [0251] Johansen JS, Jensen BV, Roslind A, Nielsen D, Price PA. Review. Serum YKL-40, a new prognostic biomarker in cancer patients? Review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006 ;15 :194-202.
- [0252] Junker N, Johansen JS, Hansen LT, Lund EL, Kristjansen PG. Regulation of YKL-40 expression during genotoxic or microenvironmental stress in human glioblastoma cells. *Cancer Sci* 2005 ;96 :183-90.
- [0253] Kamal SM, Turner B, He Q, Rasenack J, Bianchi L, Al Tawil A, et al. Progression of fibrosis in hepatitis C with and without schistosomiasis: correlation with serum markers of fibrosis. *Hepatology* 2006 ;43 :771-9.
- [0254] Kohler and Milstein, *Nature*, 256 :495, 1975
- [0255] Kohsaka, et al., *Nuc. Acids Res.* , 21 :3469-3472, 1993
- [0256] Langone, et al. eds. (Acad. Press, 1981).
- [0257] Lindahl B, Toss H, Siegbahn A, Venge P, Wallentin L. Markers of myocardial damage and inflammation in relation to long-term mortality in unstable coronary artery disease. *N Engl J Med* 2000 ;343 :1139-47.
- [0258] Ling H, Recklies AD. The chitinase 3-like protein human cartilage glycoprotein 39 inhibits cellular responses to the inflammatory cytokines interleukin-1 and tumour necrosis factor- α . *Biochem J* 2004 ;380 :651-9.
- [0259] Millis AJT, Hoyle M, Kent L. In vitro expression of a 38,000 dalton heparin-binding glycoprotein by morphologically differentiated smooth muscle cells. *J Cell Physiol* 1986 ;127 :366-72.
- [0260] Mueller C, Buettner HJ, Hodgson JM, Marsch S, Perruchoud AP, Roskamm H, Neumann FJ. Inflammation and long-term mortality after non-ST-elevation acute coronary syndrome treated with a very early invasive strategy in 1042 consecutive patients. *Circulation* 2002 ;105 :1412-5.
- [0261] Nishikawa KC, Millis AJT. gp38k (CHI3L1) is a novel adhesion and migration factor for vascular cells. *Exp Cell Res* 2003 ;287 :79-87.
- [0262] **Nøjgaard** C, Johansen JS, Christensen E, Skovgaard LT, Price PA, Becker U, et al. Serum levels of YKL-40 and PIIINP as prognostic markers in patients with alcoholic liver disease. *J Hepatol* 2003 ;39 :179-86.
- [0263] Recklies AD, White C, Ling H. The chitinase 3-like protein human cartilage 39 (HC-gp39) stimulates proliferation of human connective-tissue cells and activates both extracellular signal-regulated kinase- and protein kinase B-mediated signalling pathways. *Biochem J* 2002 ;365 :119-26
- [0264] Recklies AD, Ling H, White C, Bernier SM. Inflammatory cytokines induce production of CHI3L1 by articular chondrocytes. *J Biol Chem.* 2005 ;280 :41213-21.
- [0265] Remington ' s *Pharmaceutical Sciences*, 16th Ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1980.
- [0266] Renkema GH, Boot RG, Au FL, et al. Chitotriosidase, a chitinase, and the

39-kDa human cartilage glycoprotein, a chitin-binding lectin, are homologues of family 18 glycosyl hydrolases secreted by human macrophages. *Eur J Biochem* 1998 ; 251 :504-9.

[0267] Ridker PM, Stampfer MJ, Rifai N. Novel risk factors for systemic atherosclerosis: a comparison of C-reactive protein, fibrinogen, homocysteine, lipoprotein(a), and standard cholesterol screening as predictors of peripheral arterial disease. *JAMA* 2001 ;285 :2481-5.

[0268] Ridker PM, Rifai N, Rose L, Buring JE, Cook NR. Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N Engl J Med* 2002 ;347 :1557-65.

[0269] Salacinski, et al., *Anal. Biochem.*, 117 :136-146, 1981

[0270] Shackelton LM, Mann DM, Millis AJT. Identification of a 38-kDa heparin-binding glycoprotein(gp38k) in differentiating vascular smooth muscle cells as a member of a group of proteins associated with tissue remodelling. *J Biol Chem* 1995 ;270 :13076-83.

[0271] Vind I, Johansen JS, Price PA, Munkholm P. Serum YKL-40, a potential new marker of disease activity in patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2003 ;38 :599-605.

[0272] Volck B, Price PA, Johansen JS, **Sørensen** O, Benfield T, Calafat J, et al. YKL-40, a mammalian member of the chitinase family, is a matrix protein of specific granules in human neutrophils. *Proc Assoc Am Phys* 1998 ;110 :351-60.

[0001]

1065-9.10P4序列表

序列表

<110> 里格舒斯匹塔里特医院

<120> 根据测量生物标记YKL-40的水平所发现的生存预后, 对患有心血管疾病的个体的分类

<130> 1065-9.10P4

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1741

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

ctaggtagct ggcaccagga gccgtgggca agggaagagg ccacaccctg ccctgctctg      60
ctgcagccag aatgggtgtg aaggcgtctc aaacaggctt tgttggtctg gtgctgctcc     120
agtgtctctc tgcatacaaa ctggtctgct actacaccag ctggtcccag taccgggaag     180
gcgatgggag ctgcttccca gatgcccttg accgcttctt ctgtaccac acatcttaca     240
gctttgcaaa tataagcaac gatcacatcg acacctggga gtggaatgat gtgacgctct     300
acggcatgct caacacactc aagaacagga accecaacct gaagactctc ttgtctgtcg     360
gaggatggaa ctttgggtct caaagathtt ccaagatagc ctccaacacc cagagtcgcc     420
ggactttcat caagtcagta ccgccattcc tgcgcaccca tggctttgat gggtggacc     480
ttgcttggtt ctacctgga cggagagaca aacagcattt taccacccta atcaaggaaa     540
tgaagccga atttataag gaagcccagc cagggaaaaa gcagctcctg ctacagcgag     600
cactgtctgc ggggaaggtc accattgaca gcagctatga cattgccaa agatcccaac     660
acctggattt cattagcatc atgacctacg attttcatgg agcctggcgt gggaccacag     720
gccatcacag tcccctgttc cgaggtcagg aggatgcaag tcttgacaga ttcagcaaca     780
ctgactatgc tgtggggtag atgttgaggc tgggggctcc tgccagtaag ctggtgatgg     840
gcacccccac cttcgggagg agcttcactc tggcttcttc tgagactggt gtgagagccc     900
caatctcagg accgggaatt ccaggccggt tcaccaagga ggcagggacc ctgctctact     960
atgagatctg tgacttctc cgcggagcca cagtccatag aaccctcggc cagcaggtcc    1020
cctatgccac caaggcaac cagtgggtag gatacgacga ccaggaaagc gtcaaaagca    1080
agggtcagta cctgaaggat aggcagctgg caggcgcctt ggtatgggcc ctggacctgg    1140
atgacttcca gggctctctc tgcggccagg atctgcgctt ccctctcacc aatgccatca    1200
aggatgcact cgtgcaacg tagccctctg ttctgcacac agcaoggggg ccaaggatgc    1260
cccgtecccc tetggtcca gctggccggg agcctgatca cctgccttgc tgagtcccag    1320
gctgagcctc agtctcctc cttggggccc tatgcagagg tccacaacac acagatttga    1380
gctcagccct ggtgggcaga gaggtagggg tggggctgtg gggatagtga ggcacgcaa    1440
tgtaagactc gggattagta cacacttgtt gatgattaat ggaaatgttt acagatcccc    1500
aagcctggca aggaatttc ttcaactccc tgccccctag ccctccttat caaaggacac    1560
cattttggca agctctatca ccaaggagcc aaacatccta caagacacag tgaccatact    1620
aattataccc cctgcaaaag cagcttgaaa ccttcactta ggaacgtaat cgtgtcccct    1680
atcctacttc cccttcctaa ttccacagct gctcaataaa gtacaagagt ttaacagtgt    1740

```

[0002]

g 1741

<210> 2
 <211> 383
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Met Gly Val Lys Ala Ser Gln Thr Gly Phe Val Val Leu Val Leu Leu
 1 5 10 15

Gln Cys Cys Ser Ala Tyr Lys Leu Val Cys Tyr Tyr Thr Ser Trp Ser
 20 25 30

Gln Tyr Arg Glu Gly Asp Gly Ser Cys Phe Pro Asp Ala Leu Asp Arg
 35 40 45

Phe Leu Cys Thr His Ile Ile Tyr Ser Phe Ala Asn Ile Ser Asn Asp
 50 55 60

His Ile Asp Thr Trp Glu Trp Asn Asp Val Thr Leu Tyr Gly Met Leu
 65 70 75 80

Asn Thr Leu Lys Asn Arg Asn Pro Asn Leu Lys Thr Leu Leu Ser Val
 85 90 95

Gly Gly Trp Asn Phe Gly Ser Gln Arg Phe Ser Lys Ile Ala Ser Asn
 100 105 110

Thr Gln Ser Arg Arg Thr Phe Ile Lys Ser Val Pro Pro Phe Leu Arg
 115 120 125

Thr His Gly Phe Asp Gly Leu Asp Leu Ala Trp Leu Tyr Pro Gly Arg
 130 135 140

Arg Asp Lys Gln His Phe Thr Thr Leu Ile Lys Glu Met Lys Ala Glu
 145 150 155 160

Phe Ile Lys Glu Ala Gln Pro Gly Lys Lys Gln Leu Leu Leu Ser Ala
 165 170 175

Ala Leu Ser Ala Gly Lys Val Thr Ile Asp Ser Ser Tyr Asp Ile Ala
 180 185 190

Lys Ile Ser Gln His Leu Asp Phe Ile Ser Ile Met Thr Tyr Asp Phe
 195 200 205

His Gly Ala Trp Arg Gly Thr Thr Gly His His Ser Pro Leu Phe Arg
 210 215 220

Gly Gln Glu Asp Ala Ser Pro Asp Arg Phe Ser Asn Thr Asp Tyr Ala
 225 230 235 240

Val Gly Tyr Met Leu Arg Leu Gly Ala Pro Ala Ser Lys Leu Val Met
 245 250 255

[0003]

Gly Ile Pro Thr Phe Gly Arg Ser Phe Thr Leu Ala Ser Ser Glu Thr
 260 265 270

Gly Val Gly Ala Pro Ile Ser Gly Pro Gly Ile Pro Gly Arg Phe Thr
 275 280 285

Lys Glu Ala Gly Thr Leu Ala Tyr Tyr Glu Ile Cys Asp Phe Leu Arg
 290 295 300

Gly Ala Thr Val His Arg Thr Leu Gly Gln Gln Val Pro Tyr Ala Thr
 305 310 315 320

Lys Gly Asn Gln Trp Val Gly Tyr Asp Asp Gln Glu Ser Val Lys Ser
 325 330 335

Lys Val Gln Tyr Leu Lys Asp Arg Gln Leu Ala Gly Ala Met Val Trp
 340 345 350

Ala Leu Asp Leu Asp Asp Phe Gln Gly Ser Phe Cys Gly Gln Asp Leu
 355 360 365

Arg Phe Pro Leu Thr Asn Ala Ile Lys Asp Ala Leu Ala Ala Thr
 370 375 380

特征	所有病人	组I YKL-40 < 50%	组II 50%≤ YKL-40 < 60%	组III 60%≤ YKL-40 < 70%	组IV 70%≤ YKL-40 < 80%	组V 80%≤ YKL-40 < 90%	组VI 90%≤ YKL-40	趋势 P-值
个数 (%)	4298 (100)	2162 (50.3)	417 (9.7)	446 (10.4)	425 (9.9)	424 (9.9)	424 (9.9)	n.a.
血清 YKL-40, µg/l 中值 (IQR)	110 (75-168)	76 (58-92)	118 (114-124)	140 (134-146)	169 (159-178)	216 (203-236)	383 (279-552)	n.a.
女性, 个数 (%)	1313 (30.5)	671 (31.0)	140 (33.6)	129 (28.9)	123 (28.9)	126 (29.7)	124 (29.2)	P=0.237
年龄, 岁数中值 (IQR)	66 (58-73)	63 (56-70)	66 (57-74)	68 (61-74)	69 (62-75)	70 (62-77)	69 (62-77)	P<0.0005
以前的MI, 个数 (%)	2914 (67.8)	1444 (66.8)	286 (68.3)	297 (66.6)	290 (68.2)	301 (71.0)	297 (70.0)	P=0.073
高血压, 个数 (%)	1731 (40.3)	505 (37.2)	180 (43.2)	185 (41.5)	175 (41.2)	184 (43.4)	202 (47.6)	P<0.0005
现在吸烟者, 个数 (%)	1545 (35.9)	750 (34.7)	156 (37.4)	165 (37.0)	153 (36.0)	155 (36.6)	166 (39.2)	P=0.095
糖尿病, 个数 (%)	661 (15.4)	293 (13.6)	52 (12.5)	70 (15.7)	77 (18.1)	77 (18.2)	92 (21.7)	P<0.0005

图 1

YKL-40(X) 组 (µg/l)	不稳定型心绞痛			MI			心血管死亡			所有原因的死亡		
	HR	下限	上限	HR	下限	上限	HR	下限	上限	HR	下限	上限
组 I	1.00			1.00			1.00			1.00		
组 II	1.32	0.73	2.37	1.66*	1.12	2.47	1.55	0.90	2.67	1.45	0.98	2.15
组 III	1.24	0.69	2.23	1.60*	1.108	2.37	1.99**	1.23	3.23	1.89***	1.34	2.68
组 IV	1.03	0.54	1.97	1.77**	1.20	2.61	2.63***	1.67	4.14	2.37***	1.71	3.30
组 V	1.00	0.52	1.91	1.83**	1.25	2.60	2.54***	1.61	3.99	2.59***	1.88	3.55
组 VI	0.93	0.47	1.82	1.51	1.00	2.30	3.28***	2.15	5.02	3.75***	2.81	5.00

图 2

YKL-40(QQ) 组 (µg/l)	MI			心血管死亡			所有原因的死亡		
	HR	下限	上限	HR	下限	上限	HR	下限	上限
组 I	1.00			1.00			1.00		
组 II	1.57*	1.06	2.34	1.45	0.85	2.50	1.36	0.92	2.02
组 III	1.47	0.99	2.18	1.72*	1.06	2.79	1.65**	1.17	2.34
组 IV	1.58*	1.07	2.34	2.15**	1.36	3.39	1.98***	1.42	2.76
组 V	1.60*	1.09	2.36	2.07**	1.31	3.26	2.15***	1.56	2.96
组 VI	1.31	0.86	2.00	2.66***	1.73	4.09	3.13***	2.34	4.19

MI

心血管死亡

所有原因的死亡

N= 270
P=0.047

N=187
P<0.0005

N=377
P<0.0005

图 3

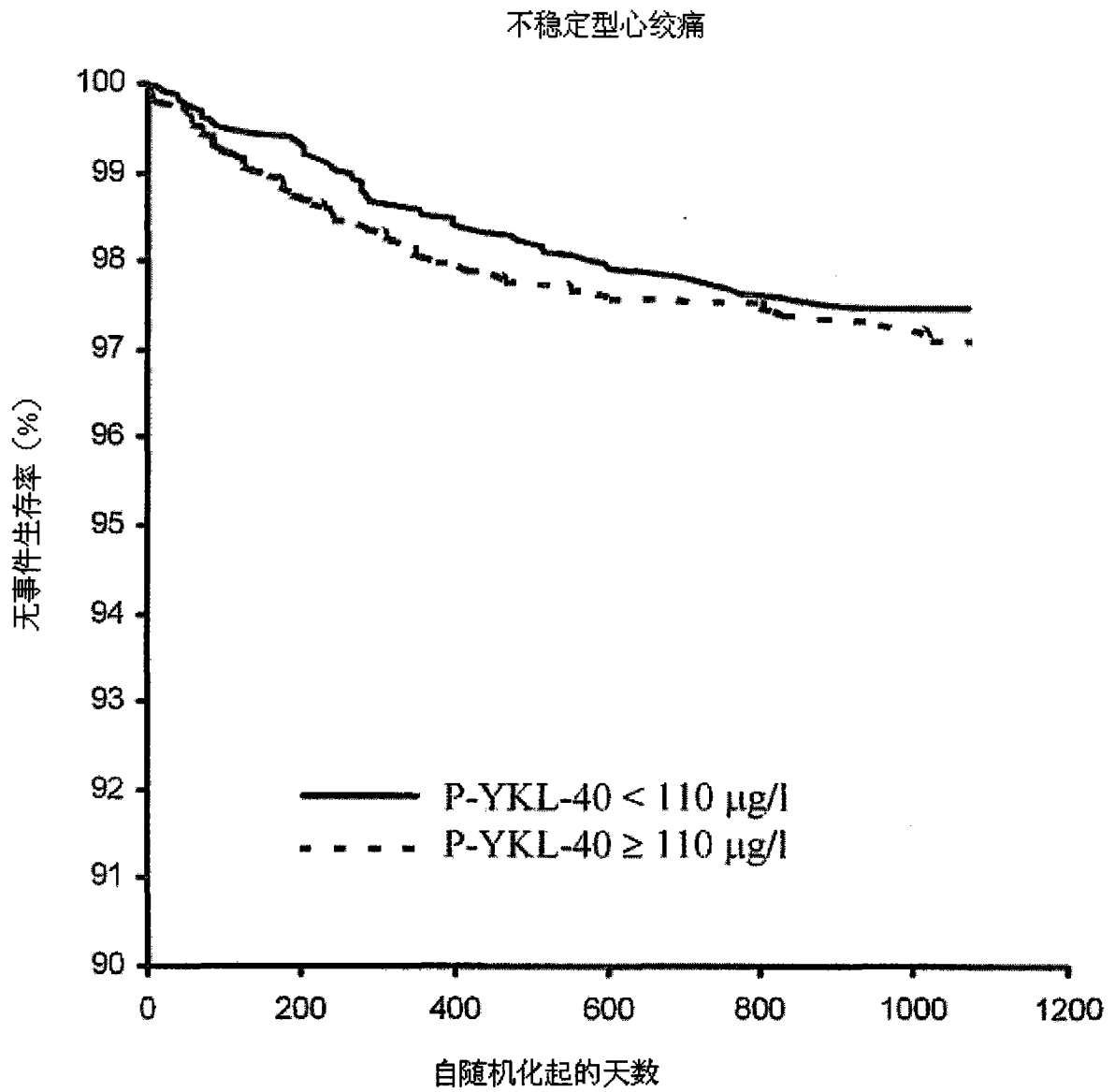


图 4A

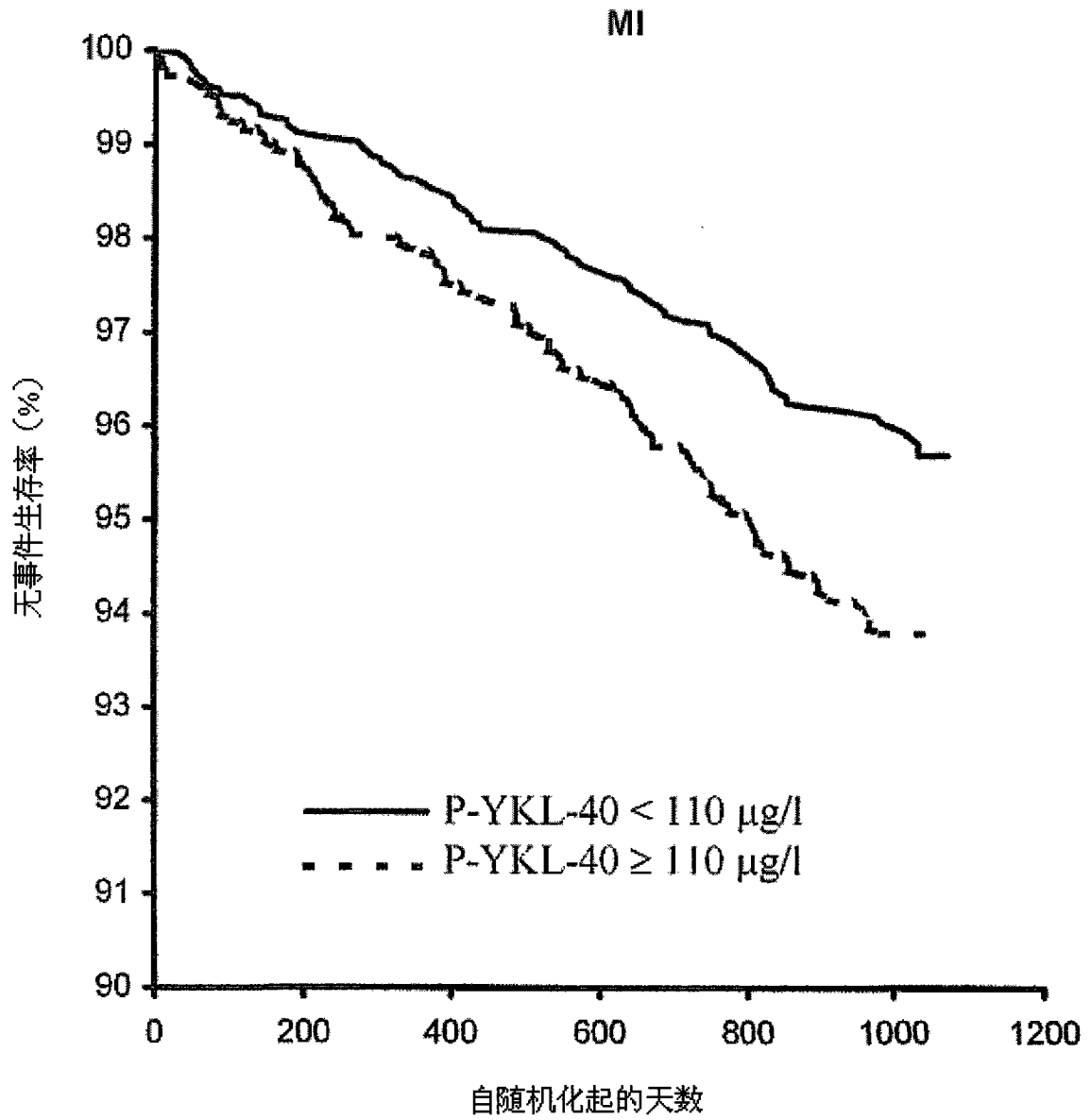


图 4B

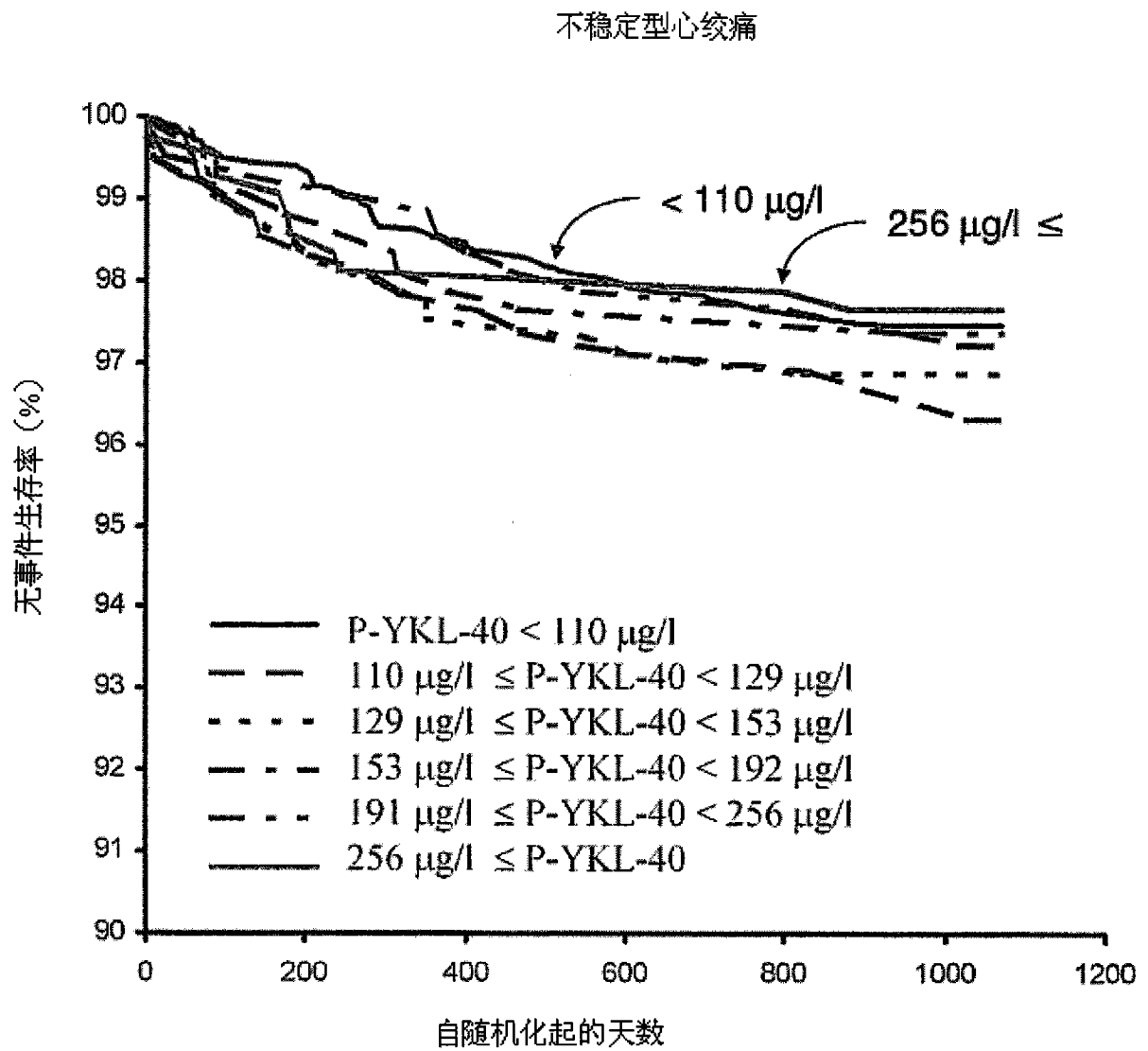


图 5A

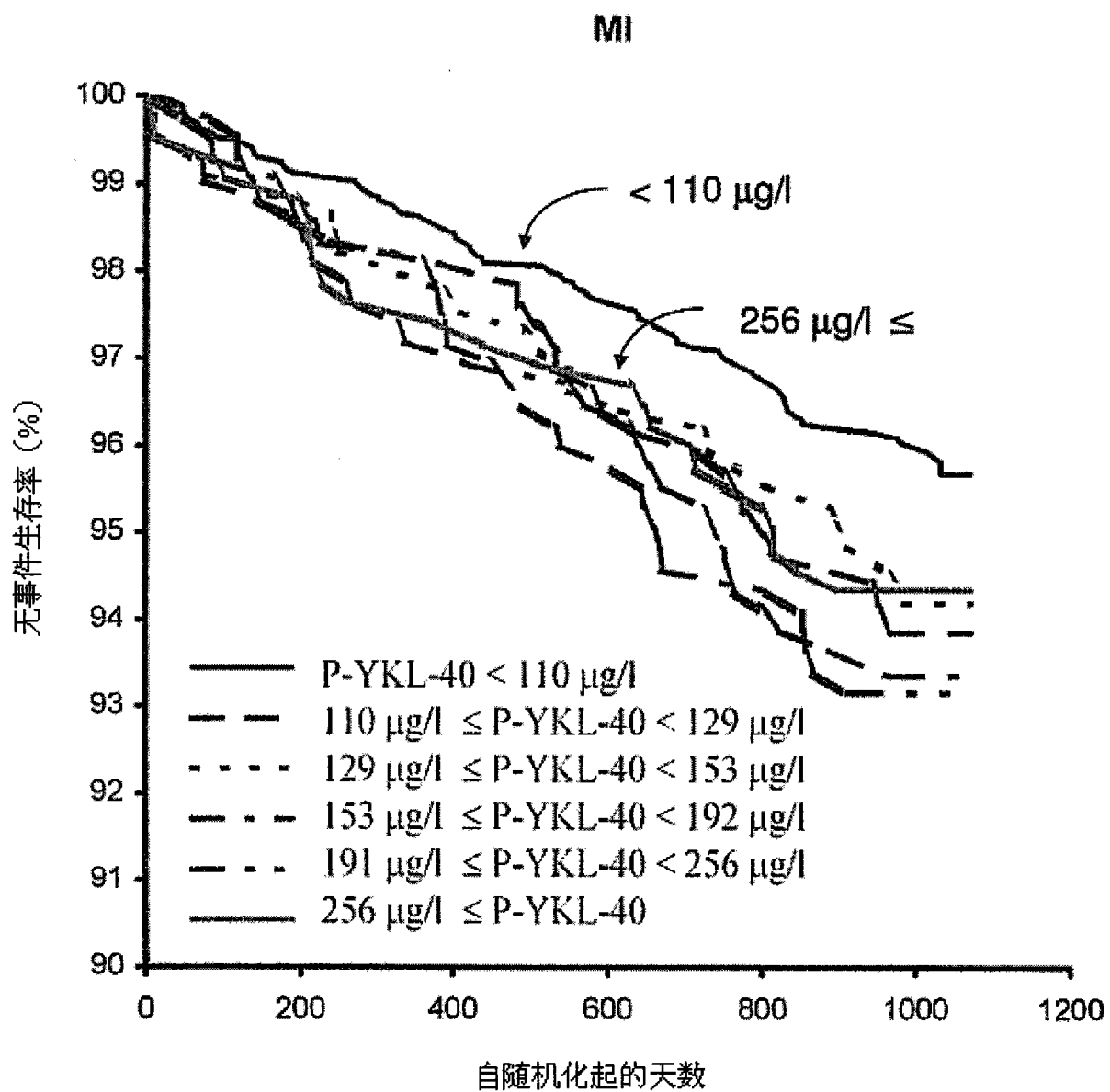


图 5B

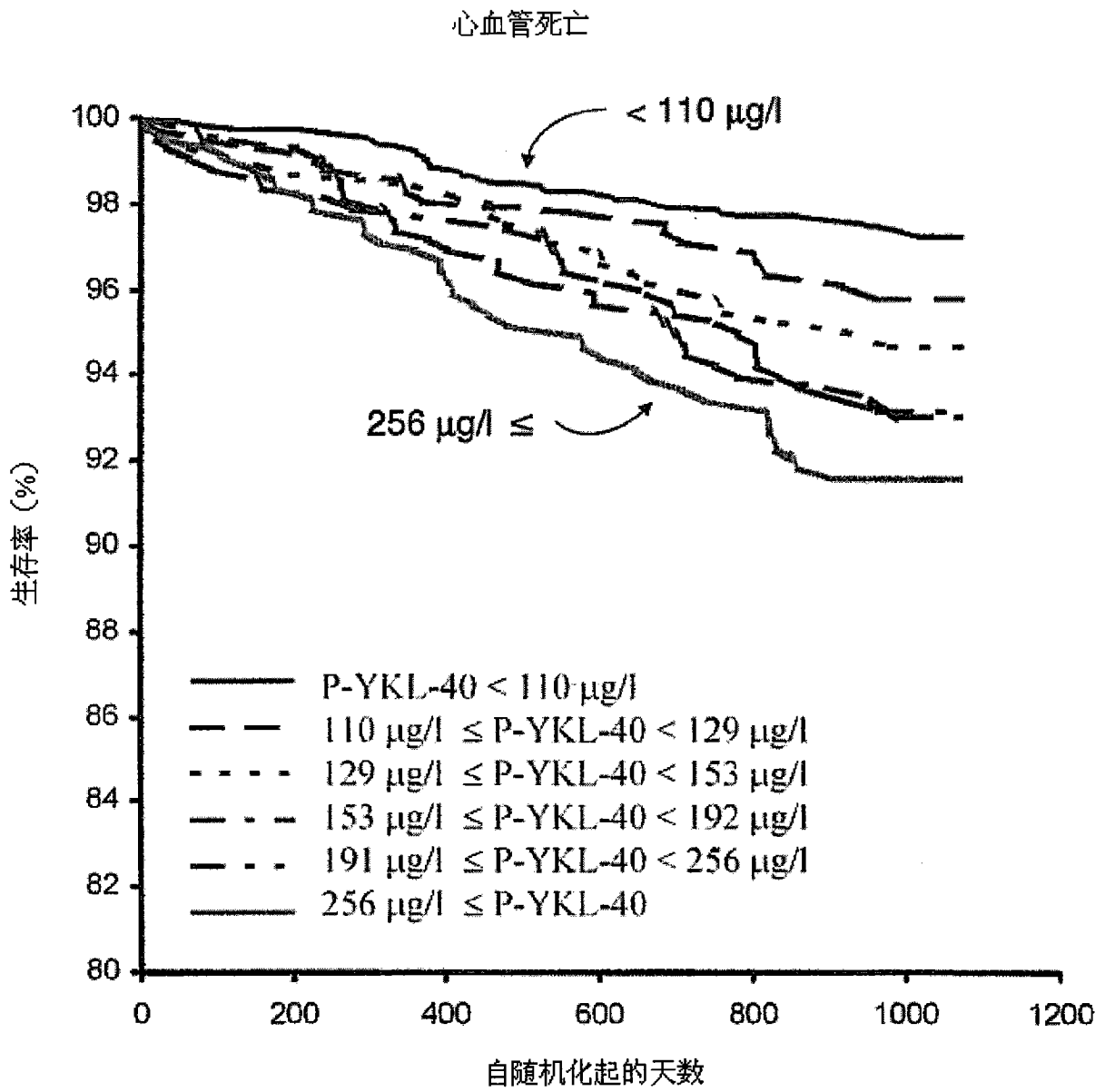


图 5C

所有原因的死亡

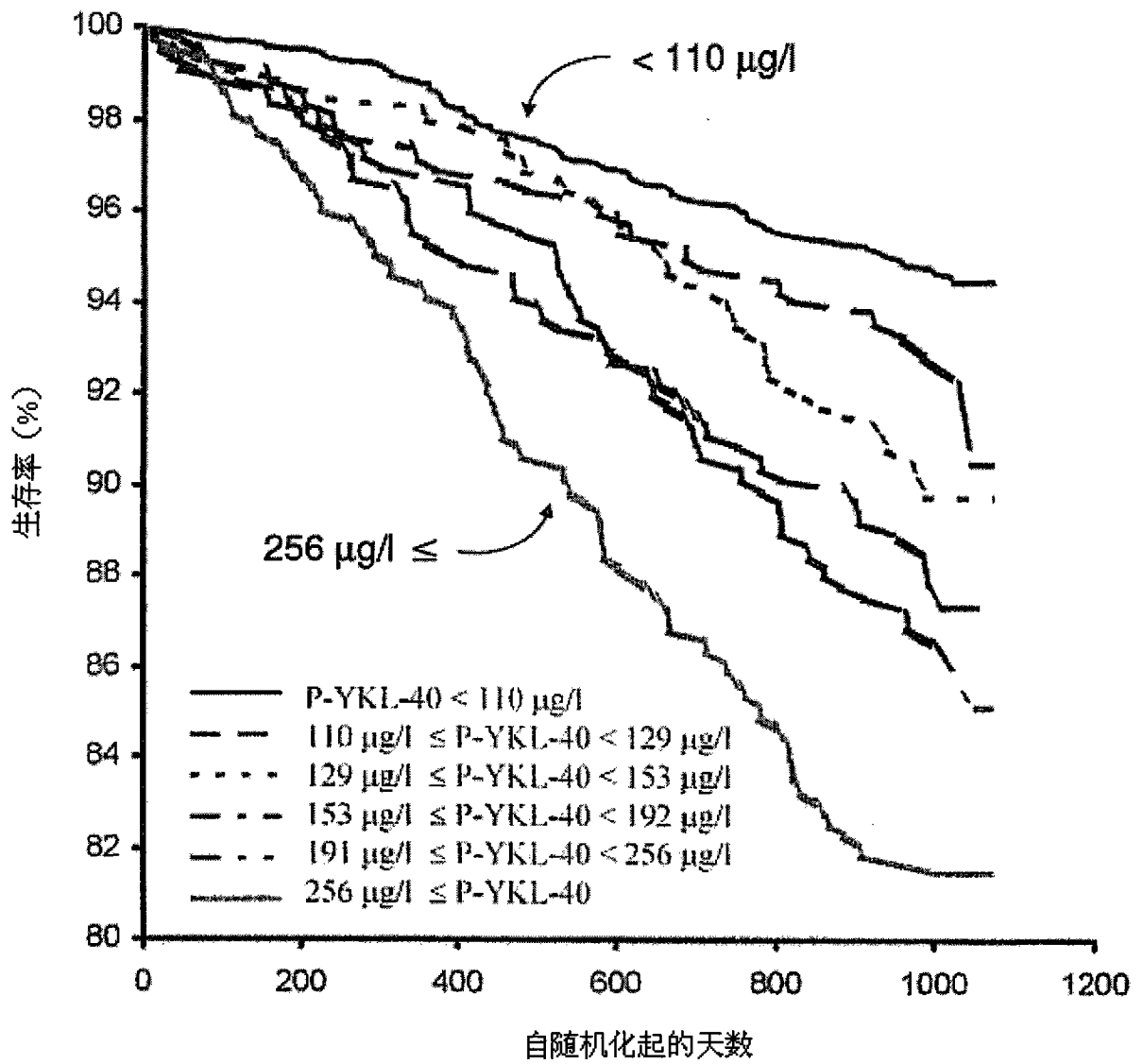


图 5D

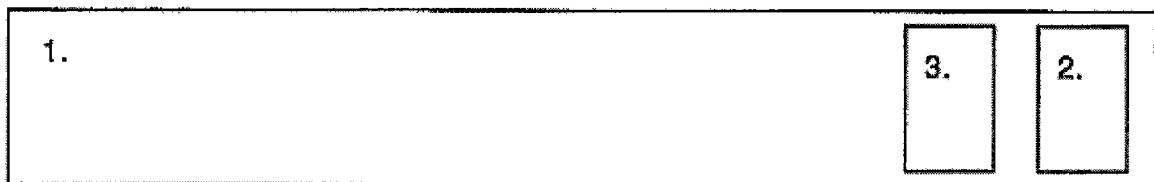


图 6A

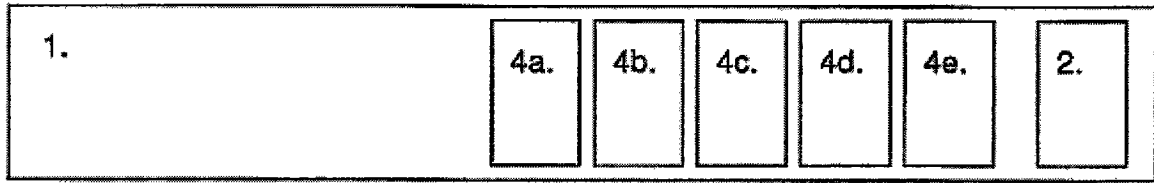


图 6B

事件	Cox分析中包括的协变量									
	f(YKL-40)+ 干预指标 ^b			f(YKL-40)+ 干预指标 ^b + 风险因素 ^c			f(YKL-40)+ 干预指标 ^b + 风险因素+选择的 治疗指标 ^d			
	风险比 (HR)	95% 置信区间 (C.I)	p	HR	95% C.I.	p	HR	95% C.I.	p	
死亡	2.01	1.75-2.31	< 0.001	1.67	1.43-1.95	<0.001	1.62	1.37-1.90	<0.001	
心血管死亡	1.88	1.54-2.31	<0.001	1.51	1.20-1.89	<0.001	1.52	1.20-1.92	0.001	
心肌梗死 (MI)	1.38	1.13-1.68	0.002	1.13	0.91-1.41	0.26	1.14	0.91-1.41	0.25	

a) $f(YKL-40) = \log(\max(82, S-YKL-40(\mu g/l)))$

b) 用克拉霉素治疗的指标, 所有分析中都包括先验 (参考: 安慰剂)

c) 年龄、性别、高血压、糖尿病、吸烟状况和以前的MI

d) 利尿剂、地高辛和他汀类的治疗指标都包括在死亡分析中。

在心血管死亡的分析中, 只包括地高辛治疗的指标。

在MI的分析中, 只包括Ace抑制剂治疗的指标。

图 7

专利名称(译)	根据测量生物标记YKL-40的水平所发现的生存预后,对患有心血管疾病的个体的分类		
公开(公告)号	CN101952721A	公开(公告)日	2011-01-19
申请号	CN200980102933.9	申请日	2009-01-22
[标]发明人	严斯凯斯楚普		
发明人	严斯·凯斯楚普		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/58 G01N33/68		
CPC分类号	G01N2333/924 G01N2800/324 G01N33/6893 G01N2800/323		
代理人(译)	徐金国		
优先权	200800089 2008-01-23 DK		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种测量YKL-40水平并将该测量值用作个体的生存预后的方法，所述个体患有由动脉粥样硬化引起的心脏疾病。该方法可用于分类个体以便优化治疗或者在治疗期间或治疗前或后监测个体。个体可能患有任意类型的心血管疾病或紊乱。该方法还可在诊断和预后中检测和确定生物样品中是否存在YKL-40分子的显著性水平。YKL-40水平还可用于预测疾病复发。

特征	组I YKL-40 < 50%	组II YKL-40 50% < YKL-40 < 80%	组III YKL-40 80% < YKL-40 < 90%	组IV YKL-40 90% < YKL-40 < 95%	趋势 P-值
人数	208 (53.3)	117 (6.7)	46 (10.4)	42 (9.9)	na
所有病人	10 (75.00)	118 (114.24)	104 (134.46)	159 (178.28)	na
女性, 个数 (%)	87 (83.0)	140 (83.6)	123 (82.9)	126 (82.7)	P=0.237
年龄, 岁, 中值 (Q2)	63 (57.7)	68 (57.4)	69 (67.4)	70 (62.7)	P<0.005
年龄, 岁, 中值 (Q3)	68 (62.8)	72 (66.6)	74 (66.2)	71 (71.0)	P=0.073
收缩压, 个数 (%)	144 (66.8)	105 (41.5)	115 (41.2)	194 (46.4)	P<0.005
高血压, 个数 (%)	105 (41.5)	105 (37.0)	153 (36.0)	166 (39.2)	P=0.065
糖尿病, 个数 (%)	150 (34.7)	152 (12.5)	70 (15.7)	82 (21.7)	P<0.005