



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103370619 B

(45) 授权公告日 2016.01.20

(21) 申请号 201180056109.1

(22) 申请日 2011.11.25

(30) 优先权数据

61/417,851 2010.11.29 US

61/437,609 2011.01.29 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013.05.22

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2011/062159 2011.11.25

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/074888 EN 2012.06.07

(73) 专利权人 美艾利尔圣地亚哥有限公司

地址 美国加利福尼亚州圣地亚哥市夏山路
9975 号

(72) 发明人 威廉·度德·阿诺德

克里斯·约斯特 柏林诺·兰德

乔纳森·加里 约瑟夫·布鲁切尔

瓦斯·王 斯科特·哈瑞德·荣吉尔

犹地·坤麻·威尔路德

科林第·马瑞·蒙斯

(74) 专利代理机构 杭州金道专利代理有限公司
33246

代理人 黎双华

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006.01)

(56) 对比文件

CN 101802014 A, 2010.08.11,

审查员 黄晓丽

权利要求书2页 说明书33页

序列表13页

(54) 发明名称

诊断或风险预测心力衰竭的方法和试剂

(57) 摘要

本发明部分涉及发生心力衰竭的诊断,特别的,属于诊断表现正常尿钠肽水平的那些主体的心力衰竭。本发明也部分涉及主体的风险结果的判断(例如心功能恶化,死亡率,再次住院的危险)。这种方法包括对下列来自主体的样本进行下列生物标记物的一次或多次分析,通过获得的结果给出诊断或风险,其中生物标记选自于 WAP4C, ESAM, LTBR, Mesothelin 和 Syndecan-1。

1. WAP 四 - 二硫核心区域蛋白 2 在作为制备检测主体心力衰竭试剂上的用途。
2. 根据权利要求 1 所述的用途,其中,该用途还进一步包括 ESAM, LTBR, Mesothelin, Syndecan-1, TROY 或 PIGR 在作为制备检测主体心力衰竭试剂上的用途。
3. 根据权利要求 2 所述的用途,其中,该用途还进一步包括对主体的体液样本进行如下的一个或多个检测:其中,所述的一个或多个检测选自于以下的检测:WAP 四 - 二硫核心区域蛋白 2 的检测, ESAM 的检测, LTBR 的检测, Mesothelin 的检测, Syndecan-1 的检测, TROY 的检测和 PIGR 的检测。
4. 如权利要求 3 所述的用途,包括:进一步对来自主体的体液样本进行另外的下列中的一个或多个检测,从而提供另外的一个或多个检测结果,基于所述的检测结果和所说获得的另外的检测结果来判断主体是否具有心力衰竭,所述的另外的一个或多个检测选自下列检测:BNP 的检测, NT-proBNP 的检测, proBNP 的检测。
5. 如权利要求 4 所述的用途,其特征在於,所述的判断步骤包括:对每一个获得的检测结果与相应的极限水平进行比较;和,
当检测结果高于所述的极限水平的时候,认为主体具有心力衰竭的可能性增加;当检测的结果低于所述的极限水平的时候,认为主体具有心力衰竭的相对风险;或者,
当检测的结果低于所述的极限水平的时候,认为主体具有心力衰竭的可能性降低;当检测的结果高于极限水平的时候,认为主体具有心力衰竭相对高的风险。
6. 如权利要求 5 所述的用途,其特征在於,从主体中获得的所述的极限水平的时间要早于提供主体样本来获得所述检测结果的时间。
7. 如权利要求 6 所述的用途,其特征在於,所述的极限水平是从那些具有心力衰竭的第一人群中获得,同时,该极限水平被选择用来从那些不具有心力衰竭的第二人群中区分出所述的第一人群。
8. 如权利要求 7 所述的用途,其特征在於,所述的从第二人群中区分出第一人群的极限水平具有至少 2 或者更多;至少是 0.5 或者更少的让步比或优势比。
9. 如权利要求 7 所述的用途,其特征在於,所述的从第二人群中区分出第一人群的极限水平具有至少 3 或者更多;或者至少是 0.5 或者更少的让步比或优势比。
10. 如权利要求 3 所述的用途,其特征在於,所述的体液样本选自尿液、血液、血清或血浆。
11. WAP 四 - 二硫核心区域蛋白 2 在作为制备判断具有临床上明显的冠心病的主体的一个或多个因为心血管疾病而死亡的风险,心肌梗塞的风险,因为心力衰竭而再次进医院的风险,中风的风险或短暂性脑缺血的风险试剂中的用途。
12. 根据权利要求 11 所述的用途;所述的用途还包括 ESAM, LTBR, Mesothelin, Syndecan-1, TROY 或 PIGR 在作为判断具有临床上明显的冠心病的主体的一个或多个因为心血管疾病而死亡的风险,心肌梗塞的风险,因为心力衰竭而再次进医院的风险,中风的风险或短暂性脑缺血的风险试剂中的用途。
13. 根据权利要求 12 所述的用途,进一步包括对来自主体的体液样本进行下列中的一个或多个检测,从而提供一个或多个检测结果,基于以上检测结果判断主体是否具有所述的风险,其中所述的一个或多个检测选自于以下的检测:WAP 四 - 二硫核心区域蛋白 2 的检测, ESAM 的检测, LTBR 的检测, Mesothelin 的检测, Syndecan-1 的检测, TROY 的检测和 PIGR

的检测。

14. 如权利要求 13 所述的用途,进一步对来自主体的体液样本进行另外的下列中的一个或多个检测,从而提供另外的一个或多个检测结果,基于所述的检测结果和所获得的另外的检测结果来判断主体死亡率的风险,所述的另外的一个或多个检测选自下列检测:BNP 的检测,NT-proBNP 的检测,proBNP 的检测。

15. 如权利要求 14 所述的用途,其特征在于,所述的判断步骤包括:

对每一个检测结果与相应的极限水平进行比较;当检测结果高于极限水平的时候,认为主体具死亡率的风险的可能性增加;当检测的结果低于极限水平的时候,认为主体具有相对性风险的死亡率;或者,

当检测的结果低于极限水平的时候,认为主体具有死亡率的风险的可能性降低;当检测的结果高于极限水平的时候,认为主体具有相对性风险的死亡率。

16. 如权利要求 15 所述的用途,其特征在于,从主体中获得的所述的极限水平的时间要早于提供主体本来获得所述检测结果的时间。

17. 如权利要求 15 所述的用途,其特征在于,所述的极限水平是从那些具有心力衰竭的第一人群中获得,同时,该极限水平被选择用来从那些不具有心力衰竭的第二人群中区分出所述的第一人群。

18. 如权利要求 17 所述的用途,其特征在于,所述的从第二人群区分出第一人群的极限水平具有至少 2 或者更多;至少是 0.5 或者更少的让步比或优势比。

19. 如权利要求 17 所述的用途,其特征在于,所述的从第二人群区分出第一人群的极限水平具有至少 3 或者更多;至少是 0.33 或者更少的让步比或优势比。

20. 如权利要求 15 所述的用途,其特征在于,所述的体液样本选自尿液,血液,血清或血浆。

21. WAP 四-二硫核心区域蛋白 2 生物标记物在作为制备判断具有临床上明显的心力衰竭症状的主体一个或多个因为心血管疾病而死亡的风险,心肌梗塞的风险,因为心力衰竭而再次进医院的风险,中风的风险或短暂性脑缺血的风险试剂中的用途。

22. 根据权利要求 21 所述的用途;所述的用途还包括 ESAM, LTBR, Mesothelin, Syndecan-1, TROY 或 PIGR 生物标技物在作为制备判断具有临床上明显的心力衰竭症状的主体一个或多个因为心血管疾病而死亡的风险,心肌梗塞的风险,因为心力衰竭而再次进医院的风险,中风的风险或短暂性脑缺血的风险试剂中的用途。

诊断或风险预测心力衰竭的方法和试剂

[0001] 本发明要求美国临时专利申请, 申请日:2010年11月29日, 申请号: No. 61/417, 851 ;和申请日:2011年11月29日, 申请号:No. 61/437, 609 的优先权, 每个专利申请包括表格、附图和权利要求等组成的全部作为本申请的参考。

技术领域

[0002] 本发明是关于用于监测由心力衰竭和肾功能不全而形成的心肾综合征的试剂和方法。

背景技术

[0003] 本发明背景的陈述仅仅是为了帮助读者理解本发明, 而不构成对本发明现有技术的描述或阐述。

[0004] 充血性心力衰竭(CHF)是5年存活时间中死亡率最高的绝症。如, 在弗雷明汉心脏研究所, 心力衰竭发病后存活率男性为1.7年, 女性为3.2年。总的来说存活1年和存活5年的存活率分别为男性57%和25%, 女性64%和38%。此外, 一个40岁或更大年纪的人在1/5的时间里有可能发生充血性心力衰竭。典型的, 在发生其他损伤心脏的情况后更有可能患有心力衰竭。如冠状动脉疾病, 特别是心肌梗死是最普遍心脏疾病, 也最容易引起心力衰竭。

[0005] 给患有心力衰竭的病人进行恰当的治疗有很多种方式。例如, 利尿剂通常用来减少心力衰竭病人特有的流体负载; 血管紧张转化酶(ACE)抑制剂是一类降低血压的血管舒张药, 促进血液流动, 降低心脏工作负荷; 血管紧张素 II 受体拮抗剂(ARBs)具有许多类似ACE抑制剂的优点; β -受体阻滞药能减少心力衰竭的病症, 提高心脏功能。

[0006] 最近, 钠尿肽的测定有效的改变了心脏疾病的诊断和管理方法, 包括心力衰竭和严重的冠状动脉综合征。特别地, B型钠尿肽(BNP, 瑞士人的PI6860d的前体, human precursor Swiss-Prot PI6860), 各种源自共同前体ProBNP的相关多肽(例如NT-ProBNP), 和ProBNP本身, 用来诊断心力衰竭, 检测心力衰竭的严重程度, 及预测病情发展。另外, BNP和它的相关多肽已经被证明在不稳定型心绞痛、非ST段升高的心肌梗死和ST段升高的高心肌梗死中具有诊断和预测作用。

[0007] 纽约心脏协会认为, BNP和相关多肽也可用于检测心功能状态。然而许多具有慢性或无症状心力衰竭病人的利尿钠肽水平在正常的诊断范围内(如, BNP水平低于100pg/mL; NT-proBNP水平低于400pg/mL)。因为降低检测阈值虽然会减少假阴性率(如增加了灵敏性与更少的漏诊), 但也会增加假阳性率(如降低特异性和更多的误诊), 这就需要对标志物诊断临界值的选择进行权衡。

[0008] 在传统的技術中仍然需要一些标记物物质, 用这些标记物对具有或怀疑具有充血性心力衰竭的病人进行诊断和风险分级。

发明内容

[0009] 本发明的一个方面涉及对患有或被评估为患有心力衰竭的主体提供用来诊断、预测和明确治疗方案的方法及试剂。在各方面,本发明提供心力衰竭的诊断和病情恶化风险评估的方法;提供在心力衰竭情况下的确定死亡率风险的方法,监测心力衰竭的方法;以及执行上述方法的各种装置和试剂盒。

[0010] 一方面,本发明涉及诊断心力衰竭的诊断方法。这些方法包括:对来自主体的体液样本进行一种或多种检测,从而提供一个或多个检测结果;和基于获得的检测结果来判断主体是否具有心力衰竭,其中,这些检测选自于以下检测:对 WAP 四 - 二硫化核心区域蛋白 2 的检测(也就是“WAP4C”和“HE4”), ESAM 的检测, LTBR 的检测, Mesothelin 的检测, Syndecan-1 的检测, TROY 的检测和 PIGR 的检测。

[0011] 在相关的方面,本发明涉及风险分级的方法,即,对一个主体指定一个风险的结果。这些方法包括对来自主体的体液样本进行一种或多种检测,从而提供一个或多个检测结果;和基于获得的检测结果来获得一个风险结果,其中,这些检测选自于以下检测:对 WAP4C 的检测, ESAM 的检测, LTBR 的检测, Mesothelin 的检测, Syndecan-1 的检测, TROY 的检测试剂和 PIGR 的检测。

[0012] 在某个实例中,每一个检测结果与相应的基线水平进行对比(如,诊断或预测的“临界值”)得出“阳性”或“阴性”结果。熟练的技工可以操作各种方法可以获得想要的基线水平值。在一个更优选的实施例中,基线结果可以从同一个主体的更早的检测结果获得。即,一个主体会因时间的过去而造成生物标记物浓度的改变,浓度的增加提供心力衰竭的起始或恶化指示。

[0013] 在可选择的实例中,基线结果由主体的数量决定。在使用本发明的标记物做诊断的情况下,人群可以包括一些患有或一些不患有心力衰竭的主体;在使用本发明的标记物做诊断的情况下,人群可能包含具有多种结果的主体(如心血管死亡率;心力衰竭恶化;心力衰竭的改善),和一些不具有结果的主体。如在下文中所述,基线是指一些特异性和灵敏度的可接受的水平,用于把人群分成具有典型特征的“第一”亚群(如心力衰竭恶化的风险增加)和没有这些典型特征的“第二”亚群。这里所述一个优选的临界值通过一个或多种如下的测试准确性措施来区分第一和第二人群:

[0014] 至少为 2 或更大,或大约为 0.5 或更少的让步比或优势比,更优选的是,比值至少为 3 或更大,或大约 0.33 或更小的让步比或优势比,更优选的,至少为 4 或更大,或大约为 0.25 或更小的让步比或优势比,更优选的让步比或优势比至少为 5 或更大,或大约为 0.2 或更小,最优选的让步比或优势比值至少为 10 或更大,或大约为 0.1 或更小。

[0015] 至少有 75% 的灵敏性,并具有至少 75% 特异性;ROC 曲线面积至少为 0.6,更优选的为 0.7,更优选的至少为 0.8,更优选的至少为 0.9,最优选的至少为 0.95;和/或,阳性似然比(算式为:灵敏度 / (1 - 特异性))至少为 5,更优选的至少为 10,最优选的至少为 20;或

[0016] 阴性似然比(算式为:(1 - 灵敏度) / 特异性)小于或等于 0.3,更优选的为小于或等于 0.2,最优选的为小于或等于 0.1。在本文中“关于”这个术语指给定值的上下(+/-)5% 的范围。

[0017] 这样的风险分级方法较好的指定了一个‘近期’的心力衰竭恶化风险或心血管死亡率的风险。“近期”指在 30 天内。如下文所述方法较好的指定了 7 天内的风险,更优选的为 5 天内,更优选的为 3 天内。

[0018] 优选的检测方法包括检测靶标记物的免疫测定。在此方法的检测中,抗体能特异地结合靶标记物,可以随意地结合一个或更多如下文所述“相关”多肽,如同与下文描述的相关标记物结合一样。这些免疫测定方法可以包括用一个固相上的检测标记物的抗体接触体液样品,检测抗体结合,当然,检测的形式可不需要使用本领域一般技术人员熟知的固相。本发明可以被描述为一般的免疫测定,然而其他的结合体(例如,一些适配体)也可以被用来替代本方法中使用的抗体来进行检测。优选的,体液样本选自尿液,全血,血清或血浆。

[0019] 这并不意味着诊断或预测的判断是只能基于这些一个或多个检测结果。恰恰相反,熟练的技工会明白诊断、预测、监测等等都会考虑很多另外的如后边所述的临床变量,假设诊断过程也被考虑到,检测结果也是变量;就是说,检测结果用来说明增加或降低被研究的主体患心脏衰竭的可能性。如后面附加明细所述,各种标记物(来源于主体和身体的特性)的检测可以组合起来,包括各种钠尿肽的检测,如BNP, NT-proBNP, 和 proBNP;与炎症有关的标记物的检测,如过氧化物酶、可溶性 FLT-1, C-反应蛋白和胎盘生长因子;与心脏损伤有关的标记物的检测,例如肌钙蛋白和 CK-MB, 肾脏损伤标记物的检测,例如血清肌酐, 肌酐清除率, 胱抑素 C, 和肾小球滤过率;和各种如尿量水平, 年龄因子的检测, 心血管疾病因子的有无的检测, 如糖尿病, 高血压, 体重、吸烟等。

[0020] 在某些实施例子中,方法包括进行多次进行选自于如下的检测(如2、3、4或更多),这些检测包括:WAP4C的检测、ESAM的检测、LTBR的检测、Mesothelin的检测、TROY的检测和PIGR的检测。在对体液样本进行多个检测过程中,采用相同或不同的体液进行各种不同的检测。例如,尿液中检测ESAM,血浆中可以检测LTBR;或,在血浆中检测ESAM和在多个不同的血浆样品中检测LTBR。

[0021] 另一方面,本发明涉及的检测方法也可以监测病人的心血管疾病。这些方法包括对采自一个主体的连续体液样本进行一个或多个检测,产生一个或多个检测结果,所述的检测可以是检测WAP4C、检测ESAM、检测LTBR、检测Mesothelin、检测TROY和PIGR中的一种或多种。如果随着时间的推移检测的结果值在增加,那表示心血管疾病在恶化。相应的,如果随着时间的推移,检测的结果值在减少,那表示心血管疾病在减轻。

[0022] 在一些实施方式中,执行以上检测的试剂被提供在检测装置中,这些检测装置也可以被包括在一个试剂盒中。优选的试剂包括一种或多种固相抗体,固相抗体包括用于检测靶标记物并被结合在固相上的抗体。在三明治免疫检测中,这些试剂也可以包含一个或多个可被检测的被标签的抗体,可被检测的标签抗体包括用于检测靶标记物并被结合在可被检测贴有标签的抗体。附加的可选择的作为检测装置的元素会在下文中详细描述。

[0023] 详细描述

[0024] 本发明涉及一些诊断、预测和对患有充血性心力衰竭主体治疗方案的方法和试剂。

[0025] 这里所述的,本发明一方面是对心力衰竭的发生进行诊断,特别是对那些体液中展现正常钠尿肽水平的主体。本发明另一方面也是基于主体上的检测结果来判断或指定风险结果(如心功能恶化或死亡的风险),基于对主体体液样本的一种或多种检测结果,这种或这些结果选自于检测WAP4C、ESAM、LTBR、Mesothelin、TROY和Syndecan-1中的一种或多种的生物标记物的检测。

[0026] 如果从主体上获得被检测的样品是在时间t获得的,那“短期风险”指t时间后的

7 天(168 小时)。因此,这个风险是指在 t 时间开始至 168 小时后结束的这段时间里,主体的一种或多种心功能指标的恶化,甚至死亡的可能性。合适的心功能指标包括一种或几种:呼吸困难(在休息时或劳累时)、端坐呼吸、肺水肿、SaO₂ 水平、头晕或晕厥、胸疼、血压、灌注、水肿、补偿状态(即,从补偿到代谢失调,或相反过程)、末端舒张功能、末端收缩功能、心室充盈、夸二尖瓣流、左心室射血分数(LVEF)、压力测试值、图形研究结果如 CT,超声波、或 MRI、NYHA,或美国大学心脏病心脏衰竭分类等。这些特征和评估方法在业内是公知的。见,例《哈里森的内科学》,第 16 版. 麦格劳希尔集团,005, 1361-1377(Harrison's Principles of Internal Medicine, 16th ed., McGraw-Hill, 2005, pages1361-1377),其被完整的列入参考文献中。本条例并不限于此。

[0027] 更优选的,这个风险是主体在 t 时间后的 96 小时内的这段时间里,一种或多种心功能指标的恶化,甚至死亡的可能性,最优选的是主体在 t 时间后的 48-84 小时的这段时间里,一种或多种心功能指标的恶化,甚至死亡的可能性。这里所用的术语“恶化”指,相对于同一主体早期做的相同参数,在后面的时间里参数向坏的方面变化,和,与“改善”具有相反的意思。例如,这里所用的术语“心功能的恶化”指在主体在以后的时间里从无症状的状态到 NYHA 心力衰竭级别 I 或更高的级别;LVEF 恶化状态等。

[0028] 这里所述的“标记物”和“生物标记物”指蛋白、多肽、糖蛋白、蛋白多糖、脂肪、脂蛋白、糖脂、磷脂,核酸,碳水化合物,等;或用来从主体上获得样本进行靶标筛查的小分子。本发明作为标记物的“蛋白或多肽”假设可以包括任何片段,特别,是免疫可检测的片段。标记物可以包括临床“指数”如,验前概率,肺动脉高压“丹尼尔”指数、NIH 中风指数、Elebute 和 Stoner 败血症指数、杜克标准感染性心内膜炎、曼海姆腹膜炎指数、阿帕切指数等。

[0029] BNP 前体 pro-BNP (BNPMOS) 的 108 个氨基酸序列如下,划线的为成熟蛋白 BNP (BNP₇₇₋₁₀₈)。

[0030] HPLGSPGSAS DLETSGLQEQ RNHLQGKLSL LQVEQTSLEP LQESPRPTGV 50

[0031] WKSREVATEG IRGHRKVMVLY TLRAPRSPKM VQGSGCFGRK MDRISSSSSGL 100

[0032] GCKVLRRRH 108

[0033] (SEQ ID NO:1).

[0034] BNP₁₋₁₀₈作为更大的前前体(pre-pro-BNP)合成(“前”序列用粗体表示),前-前体(pre-pro-BNP)的序列如下

[0035] MDPQTAPSRA LLLLLFLHLA FLGGRSHPLG SPGSASDLET SGLQEQRNHL 50

[0036] QGKLSLQVE QTSLEPLQES PRPTGVWKS R EVATEGIRGH RKMVLYTLRA 100

[0037] PRSPKMVQGS GCFGRKMDRI SSSSGLGCKV LRRH 134

[0038] (SEQ ID NO: 2).

[0039] 当成熟蛋白本身(如 BNP)作为本发明的一个标记物时,各种相关标记物要么作为成熟蛋白的替代物,要么本身含有或作为标记物可以被检测到。因此,BNP 相关多肽 pre-pro-BNP、BNPMOS 和 BNP₁₋₇₆代替 BNP 作为心力衰竭标记物。这里所述的每一个“相关标记物”都是可识别的,使用方法类似于上述 BNP 的方法。

[0040] 这里使用的术语“ESAM”或“选择性血管内皮细胞粘附分子”指存在于生物样本中来源于选择性血管内皮细胞粘附分子前体(Swiss-Prot Q96AP7(SEQ ID NO:3))的一种或多种多肽。

[0041]

```

      10      20      30      40      50      60
MISLPGPLVT NLLRFLFLGL SALAPPSRAQ LQLHLPANRL QAVEGGEVVL PAWYTLHGEV
      70      80      90     100     110     120
SSSQPWEVPF VMWFFKQKEK EDQVLSYING VTTSKPGVSL VYSMPSRNLS LRLEGLQEKD
     130     140     150     160     170     180
SGFYSCSVNV QDKQGKSRGH SIKTLELNVL VPPAPPSCL QGVPHVGANV TLSCQSPRSK
     190     200     210     220     230     240
PAVQYQWDRQ LPSFQTFAP ALDVIRGSL LTNLSSSMAG VYVCKAHNEV GTAQCNTLE
     250     260     270     280     290     300
VSTGPGAADV AGAVVGTLVG LGLLAGLVLL YHRRGKALEE PANDIKEDAI APRTLWPWPKS
     310     320     330     340     350     360
SDTISKNGTL SSVTSARALR PPHGPPRPGA LTPTPSLSSQ ALPSPRLPTT DGAHPQFISP
     370     380     390
IPGGVSSSGL SRMGAVPVMV PAQSQAGSLV

```

(SEQ ID NO: 3)

[0042] 最优选的是, ESAM 的分析是检测一种或多种可溶性形式的 ESAM。ESAM 是一种具有大胞外域的单通道类型 I 膜蛋白, 要么通过可变剪接来删除所有或部分跨膜的区域来产生, 要么通过膜结合形式的蛋白水解产生, 多数或所有的单通道类型 I 膜蛋白存是以可溶性形式的 ESAM 存在的。在免疫测定情况下, 通过一种或多种抗体与胞外域的表位结合, 来检测这些可溶性形式的 ESAM。已经在 ESAM 中识别了以下的域:

[0043]

残基	长度	域名 (ID)
1-29	29	信号序列
30-390	361	ESAM
30-248	219	胞外
249-269	21	跨膜
270-390	121	细胞质

[0045] 这里所用的术语“LTBR”或“肿瘤坏死因子受体超级家族成员 3”指存在于生物样本中来源于 LTBR 前体的一个或多个多肽 (Swiss-Prot P36941 (SEQ ID NO:4))。

[0046]

```

      10           20           30           40           50           60
MLLPWATSAP GLAWGPLVLG LFGLLAASQP QAVPPYASEN QTCRDQEKEY YEPQHRICCS
      70           80           90          100          110          120
RCPPPGTYVSA KCSRIRDTCV ATCAENSYNE HWNYLTICQL CRPCDPVMGL EEIAPCTSKR
      130          140          150          160          170          180
KTQCRCQPGM FCAAWALECT HCELLSDCPP GTEAELKDEV GKGNNHCVPC KAGHFQNTSS
      190          200          210          220          230          240
PSARCQPHTR CENQGLVEAA PGTAQSDTTC KNPLEPLPPE MSGTMLMLAV LLPLAFFLLL
      250          260          270          280          290          300
ATVFSCIWKS HPSLCRKLGS LLKRRPQEG PNFVAGSWEP PKAHPYFPDL VQPLLPISGD
      310          320          330          340          350          360
VSPVSTGLPA APVLEAGVPQ QQSPLDLTRE PQLEPGEQSQ VAHGTNGIHV TGGSMITIGN
      370          380          390          400          410          420
IYIYNGPVLG GPPGPGDLPA TPEPPYPIPE EGDPGPPGLS TPHQEDGKAW HLAETEHCGA
      430
TPSNRGPRNQ FITHD

```

[0047] 最优选的是,对 LTBR 的分析是检测一种或多种可溶性形式的 LTBR。LTBR 是一种具有大胞外域的单通道类型 I 膜蛋白,要么通过可变剪接来删除所有或部分跨膜的区域来产生,要么通过膜结合形式的蛋白水解产生,多数或所有的单通道类型 I 膜蛋白存是以可溶性形式的 LTBR 存在的。在免疫测定情况下,通过一种或多种抗体与胞外域的表位结合,来检测这些可溶性形式的 LTBR。已经在 LTBR 中识别了以下的域:

[0048]

残基	长度	域的 ID
1-30	30	信号序列
31-435	405	LTBR

[0049]

31-227	197	胞外体
228-248	21	跨膜体
249-435	187	细胞质

[0050] 这里所用的术语“间皮素”(Mesothelin)指来存在生物样品中的来自间皮素前体的一种或多种多肽。(Swiss-Prot Q13421 (SEQ ID NO:5))。

[0051]

```

      10      20      30      40      50      60
MALPTARPLL GSCGTPALGS LLFLLFSLGW VQPSRTLAGE TGQEAAPLDG VLANPPNISS

      70      80      90     100     110     120
LSPRQLLGFP CAEVSGGLSTE RVRELAVALA QKNVKLSTEQ LRCLAHRLSE PPEDLDALPL

     130     140     150     160     170     180
DLLLFLNPDA FSGPQACTRF FSRITKANVD LLPRGAPERQ RLLPAALACW GVRGSLLESA

     190     200     210     220     230     240
DVRALGGLAC DLPGRFVAES AEVLLPRLVS CPGPLDQDQQ EAARAALQGG GPPYGGPSTW

     250     260     270     280     290     300
SVSTMDALRG LLPVLGQPII RSIPQGIVAA WRQRSSRDPS WRQPRTLILR PRFRREVEKT

     310     320     330     340     350     360
ACPSGKKARE IDESLIFYKK WELBACVDAA LLATQMDRVN AIPFTYEQLD VLKHKLDELY

     370     380     390     400     410     420
PQGYPEVVIQ HLGYLEFLKMS PEDIRKWNVT SLETLKALLE VNKGHEMSPQ AFRRLPLQVA

     430     440     450     460     470     480
TLIDRFVKGR GQLDKDTLDT LTAFYPGYLC SLSPEELSSV PPSSIWAVRP QDLDTCDPRQ

     490     500     510     520     530     540
LDVLYPKARL AFQNMNGSEY FVKIQSFLGG APTEDLKALS QQNVSMDLAT FMKLRTDAVL

     550     560     570     580     590     600
FLTVAEVQKL LGPHVEGLKA EERHRPVRDW ILRQRQDDLD TLGLGLQGGI FNGYLVLDLS

     610     620     630
MQEALSGTPC LLGPGPVLTV LALLLASTLA

```

[0052] 最优的,间皮素的分析是检测一种或多种可溶性形式的间皮素。间皮素是一种 GPI 串联膜蛋白,具有一个信号肽序列,在表达多肽的时候,该信号肽序列是被剪切掉并用一个糖磷脂膜锚着点替换。间皮素中的下列区域已被识别:

[0053]

残基	长度	域名 ID
1-36	36	信号序列
37-606	570	间皮素 (Mesothelin)
37-286	250	聚合细胞-强化因子

[0054]

296-606	311	间皮素,裂解形式
607-630	24	前肽
406-416	11	溶解状态缺失
601-630	30	溶解状态下被替换

[0055] VQGGRRGGQARAGGRAGGVEVGALSHPSLCRGPLGDALPPRTWTCSHRP

[0056] GTAPSLHPGLRAPLPC (SEQ ID NO:6)

[0057] 这里所用的术语“多配体聚糖-1” (Syndecan-1) 指来存在有生物样本中, 并来自多配体聚糖-1 前体的一种或多种多肽 (Swiss-Prot PI 8827 (SEQ ID NO:7))。

[0058]

```

      10           20           30           40           50           60
MRR AALWLWL CALALSLQPA LPQIVATNLP PEDQDGGSGDD SDNFSGSGAG ALQDITLSQQ
      70           80           90          100          110          120
TPSTWKDTQL LTAIPTSPPEP TGLEATAAST STLPAGEGPK EGEAVVLPEV EPGLTAREQE
     130          140          150          160          170          180
ATPRPRETTQ LPTTHLASTT TATTAQEAT SHPHRDMQPG HHETSTPAGP SQADLHTPHT
     190          200          210          220          230          240
EDGGPSATER AAEDGASSQL PAAEGSGEQD FTFETSGENT AVVAVEPDRR NQSPVDQGAT
     250          260          270          280          290          300
GASQGLLDRK EVLGGVIAGG LVGLIFAVCL VGFMLYRMKK KDEGSYSLEE PKQANGGAYQ
     310
KPTKQEEFYA

```

[0059] 最优选的, 多配体聚糖-1 的分析是检测一种或多种可溶性形式的多配体聚糖-1。多配体聚糖-1 是一种具有大胞外域的单通道类型 I 膜蛋白, 要么通过可变剪接来删除所有或部分跨膜域来产生, 要么通过膜结合形式的蛋白水解产生, 多数或所有的单通道类型 I 膜蛋白存是以可溶性形式多配体聚糖-1 的存在。在免疫测定情况下, 通过一种或多种抗体与胞外域的表位结合, 来检测这些可溶性形式的多配体聚糖-1。多配体聚糖-1 中的下列区域已被识别:

[0060]

残基	长度	域名 ID
1-22	22	信号序列
23-310	405	多配体聚糖-1 (Syndecan-1)
23-254	232	胞外体
255-275	21	跨膜

[0061]

276-310	35	细胞质
---------	----	-----

[0062] 这里所用的术语“TROY”或“肿瘤坏死因子受体超级家族成员 19”指来存在于生物样本中的来自 TROY 前体的一种或多种多肽 (Swiss-Prot Q9NS68 (SEQ ID NO:8))。

[0063]

```

      10          20          30          40          50          60
MRRAALWLWL CALALSLQPA LPQIVATNLP PEDQDGGSGDD SDNFSGSGAG ALQDITLSQQ
      70          80          90          100         110         120
TPSTWKDTQL LTAIPTSPEP TGLEATAAST STLPAGEGPK EGEAVVLPEV EPGLTAREQE
     130         140         150         160         170         180
ATPRPRETTQ LPTTHLASTT TATTAQEPAT SHPHRDMQPG HHETSTPAGP SQADLHTPHT
     190         200         210         220         230         240
EDGGFSATER AAEDGASSQL PAAEGSGEQD FTFETSGENT AVVAVEPDRR NQSPVDQGAT
     250         260         270         280         290         300
GASQGLLDRK EVLGGVIAGG LVGLIFAVCL VGFMLYRMKK KDEGSYSLEE PKQANGGAYQ
      310
KPTKQEEFYA

```

[0064] 最优的, TROY 的分析是检测一种或多种可溶性形式的 TROY。TROY 是一种具有大胞外域的单通道类型 I 膜蛋白, 要么通过可变剪接来删除所有或部分跨膜域产生, 要么通过膜结合形式的蛋白水解产生, 多数或所有的单通道类型 I 膜蛋白存是以可溶性形式 TROY 的存在。在免疫测定情况下, 通过一种或多种抗体与胞外域的表位结合, 来检测这些可溶性形式的 TROY。TROY 中的下列区域已被识别:

[0065]

残基	长度	域名 ID
1-29	29	信号序列
30-423	394	TROY
30-170	141	胞外体
171-191	21	跨膜
192-423	232	细胞质
416-423	8	在形态 2 中被 EA 替换

[0066] 这里所用的术语“PIGR”或“多聚免疫球蛋白受体”指来自 PIGR 前体的生物样品中存在的一种或多种多肽 (Swiss-Prot P01833 (SEQ ID NO:9))。

[0067]

```

      10          20          30          40          50          60
MLLFVLTCLL AVFPAISTKS PIFGPPEEVNS VEGNSVVSITC YYPPTSVNRH TRKYWCROGA
      70          80          90          100         110         120
RGGCITLISS EGYVSSKYAG RANLTNFPEN GTFVVNIAQL SQDDSGRYKC GLGINSRGLS
     130         140         150         160         170         180

```

[0068]

```

FDVSLEVSQG PGLLNDRTKVY TVDLGRVTI NCPFKTENAO KRKSLYKQIG LYPVLVIDSS
    190      200      210      220      230      240
GYVNPNYTGR IRLDIQGTGQ LLFSVVINQL RLSDAGQYLC QAGDDSNNSK KNADLQVLKP
    250      260      270      280      290      300
EPPELVYEDLR GSVTFHCALG PEVANVAKFL CRQSSGENCD VVNTLTKRA PAFEGRILLN
    310      320      330      340      350      360
PQDKDGSFVS VITGLRKEDA GRYLCGAHSD GQLQEGSPIQ AWQLFVNEES TIPRSPTLVK
    370      380      390      400      410      420
GVAGGSVAVL CPYNRKESKS IKYWCLWEGA QNGRCPLLVD SEGWVKAQYE GRLSLLEEPG
    430      440      450      460      470      480
NGTFTVILNQ LTRDAGFYW CLTNGDTLWR TTVEIKIIEG EPNLKVPGNV TAVLGETLKV
    490      500      510      520      530      540
PCHFPCFKFSS YEKYWCKWNN TGCQALPSQD EGPSKAFVNC DENSRVLSLT LNLVTRADEG
    550      560      570      580      590      600
WYWCGVKQGH FYGETAAVYV AVEERKAAGS RDVSLAKADA APDEKVLDSG FREIENKAIQ
    610      620      630      640      650      660
DPRLFABEKA VADTRDQADG SRASVDSGSS EEQGGSSRAL VSTLVPLGLV LAVGAVAVGV
    670      680      690      700      710      720
APARHRKNVD KVSIRSRYTD ISMSDFENSR EFGANDNMGA SSITQETS LGKEEFVATTE
    730      740      750      760
STTETKEPKK AKRSSKEEAE MAYKDFLLQS STVAEEAODG PQEA

```

[0069] 最优的,PIGR的分析是检测一种或多种可溶性形式的PIGR。PIGR是一种具有大胞外域的单通道类型 I 膜蛋白,要么通过可变剪接来删除所有或部分跨膜域产生,要么通过膜结合形式的蛋白水解产生,多数或所有的单通道类型 I 膜蛋白存是以可溶性形式PIGR的存在。在免疫测定情况下,通过一种或多种抗体与胞外域的表位结合来检测这些可溶性形式的PIGR。PIGR中的下列区域已被识别:

[0070]

残基	长度	域名 (Domain ID)
1-18	18	信号序列
19-764	746	PIGR
19-638	620	胞外体
残基	长度	域名 (Domain ID)
639-661	23	跨膜
662-764	103	细胞质

[0071]

19-603	585	促进分泌的区域 (一种可溶解的形式)
--------	-----	--------------------

[0072] 这里所用的术语“WAP 四二硫化物核心域蛋白 2”、“WAP4C”或“HE4”指来存在于生物样本中来自 WAP 四二硫化物核心域蛋白 2 前体的一种或多种多肽。WAP 四二硫化物核心域蛋白 2 的人类前体 (Swiss-Prot entry Q14508) 具有下列序列 (SEQ ID NO:1):

[0073] 10 20 30 40 50 60

[0074] MPACRLGPLA AALLLSLLLF GFTLVSGTGA EKTGVCPELQ ADQNCTQECV SDSECADNLK

[0075] 70 80 90 100 110 120

[0076] CCSAGCATFC SLPNDKEGSC PQVNINFPQL GLCRDQCQVD SQCPGQMKCC RNGCGKIVSCV

[0077] 残基 长度 域名 (Domain ID)

[0078] 1-30 30 信号序列

[0079] 31-124 94 WAP 四二硫化物核心域蛋白 2 来自 WAP 四二硫化物核心域蛋白 2 前体的下列的可选择形式如下:

[0080] 2-23 22 → LQVQVNLVPSPLPTYPSFF YP (SEQ ID NO:2), 异构体 2

[0081] 24-74 51 在异构体 2 中缺失

[0082] 27-74 48 再异构体 3 中缺失

[0083] 71-79 9 → LLCPNGQLAE (SEQ ID NO:3), 异构体 4

[0084] 75-102 28 → ALFHWHLKTRRLWEIS GPRP RRPTWDSS (SEQ ID NO 4), 异构体 5

[0085] 80-124 45 在异构体 4 中缺失

[0086] 103-124 22 在异构体 5 中缺失

[0087] 因为标记物片段的产生是一个持续的过程, 他可能是共用的时间之间的一个函数, 该时间可以是: 触发标记物释放到组织的时间和获得样品或分析样品的这段时间之间, 和获得样本的时间和分析样本的时间之间; 不同组织的组织样本; 储存条件; 存在的水解酶的数量等; 当同时设计对一种或多种标记物的检测和执行这个检测时, 为了提供一个精确的预测或诊断结果, 有必要考虑到这些降解因素的影响。另外, 个别能从多种标记物片段中区分的抗体可以单独用来分别检测不同片段的存在或数量。这个针对个体的单独的检测可以提供比在单个分析中检测多个片段的结果具有更精确的预测或诊断结果。例如, 各种各样的片段检测方法采用不同的权重因子, 来对样品中的原始钠利尿多肽的数量提供更精确的评估。

[0088] 没有考虑到临床样品中可能存在的片段的降解可能会对任何预测或诊断方法产生严重后果。例如, 在一个简单的案例中, 采用三明治免疫分析检测 BNP 的时候, 存在的大量生物活性 BNP (如 50%) 现在已被降解到一个失活形式。用于与生物活性 BNP 和无活性 BNP 的共同区域结合的抗体的免疫分析可以比存在于样本中的活性 BNP 的数量高估 2 倍以上, 这就可能产生一个“假阳性”结果。样品中生物活性物质被高估也会为病患的管理带来严重的后果。又一次采用 BNP 例子来做说明, BNP 浓度用来确定是否治疗有效果 (如, 通过监测 BNP 来看, 通过治疗是否高水平恢复到正常水平)。相同的上述的“假阳性”BNP 结果可能因为当前治疗无效的假象导致医生继续、增加或更改治疗方法。

[0089] 这里所用的术语被测物“相关信号的存在或数量”反映了这种理解。通过已知浓度的靶标被分析物质或被测物来制作标准曲线, 分析信号与被测物的存在或存在的数量相关联。如同这里所用的术语, 如果分析产生一种可检测的信号, 则说明存在被测物, 或存在与被测物类似生理浓度的被测物, 这个测试就可以被用来进行检测。因为抗体的表位在 8

个氨基酸的序列顺序上,用于检测感兴趣的标记物的免疫检测也会检测与标记物序列有关的多肽,只要这些多肽含有与分析中所用的一种抗体或多种抗体结合的必需表位。这里所用术语“有关的标记物”对于生物标记物,如一种心肌损伤标记物,是指能被检测到的特殊标记物或其生物合成亲本中的一个或多个片段,变体等,它可以代替标记物本身或成为独立的生物标记物。术语也指存在于生物样品中来自生物标记物前体的一种或多种多肽,这种前体可能额外带有一些基团,如结合蛋白、受体、肝素,脂类,糖类等。

[0090] 就这一点而言,本领域的熟练技工知道获得免疫分析信号是复合物产生的直接结果,复合物是由一种或多种抗体和靶标生物分子(如被测物)和包含与抗体结合的必需表位的多肽形成的。当这种分析检测全长的生物标记物时,测试结果表示为靶标生物标记物的浓度,分析产生的信号实际上是样品中存在的所有这种“免疫活性”多肽作用的结果。除了免疫检测,生物标记物也可以通过分析蛋白(如点杂交,蛋白质印迹,层析法,质谱分析法等)和分析核苷酸(mRNA)的方法来测定。这里所用的技术包括但不限于所列出技术。

[0091] 最优选的分析是“被配置来检测”一个特定的标记物。“被配置来检测”一种标记物的分析意味着分析过程中能够产生一种可检测信号,这种信号说明存在目标标记物的存在,或存在与目标标记物的生理类似物的存在。在这个分析过程中可以特别检测分析一种特殊标记物(如检测一种标记物,但不是部分或所有相关标记物)。因为一个抗体表位大约在8个氨基酸上,一个免疫检测可以检测其他多肽(如相关标记物),只要其他多肽包含与检测使用抗体相结合的必要表位。其他多肽就是指分析中“免疫可检测的”,可以包括各种亚型(如剪接变体)。在三明治免疫分析中,相关标记物必须含有至少2个能与本检测过程中使用的抗体结合的表位,才能被检测到。最优选的免疫检测片段包含至少8个标记物上相临近的残基或与其亲本的相临近的残基。

[0092] 这里所用的“检测样本”指从目标主体例如一个病人获得的用于诊断、预测或评价的体液样本。在实施例中,这个样本可以为了确定持续状态的结果或这种状态的治疗效果而获得。优选的检测样本包括血液、血清、血浆、脑脊液、尿液、唾液、痰和胸腔积液。另外,使用本领域的分馏或提纯技术可以让一些检测样本更加容易被分析,例如把全血分成血清和血浆。

[0093] 这里所用“多数”指至少2。优选的多数指至少3,更优选的至少5,更优选的至少10,更优秀的至少15,最优选的至少20。在一个特定实施例中,多数是一个大数字,如至少100。

[0094] 这里所用的术语“主体”指一个人或非人类有机体。当然这里所述的方法和试剂都适用于人类和兽类疾病。更优选的,主体是活体机体,本发明所述的方法和试剂也可以用于尸检。最优选的主体是“病人”,如由于某种疾病或情况需要接受医治的活的人类。这包括那些患有正在研究病原的未知病害的人。

[0095] 这里所用的术语“诊断”指本领域熟练技术人员用来明确或决定一个病人是否患有一种已知疾病或状况的方法。技术工人通常基于一种或多种诊断指标,如一种标记物的存在、不存在、数量或数量的改变来说明某种状态或疾病的存在、不存在或严重程度。术语“诊断”对患有或没有患有某种特定疾病不具有100%的准确性,只是相对于没有而给出一个可能发生的结果。实际上,技术人员明白术语“诊断”指主体患某种疾病的可能性的增加。

[0096] 类似的,预测常常通过监测一种或多种“预测指标”来检测的。在病人(或从病人

获得的样品中)存在标记物或标记物的数量表示给出的治疗程序或可能发生的结果。例如从病人采集的样本中一种或多种预测指标达到一个足够高的水平,相比具有低标记物值的类似病人来讲,这个水平表示具有高标记物值的病人具有更高的患病率或死亡率。预测指标值或值的改变指病人“向不好的结果靠近的可能性增加”,反过来也与患病率或死亡的可能性增加有关。

[0097] 这里所用的关于标记物的术语中使用的“相应的”或“相关的”指病人中标记物的存在或存在的数量与那些已知具有给定情况的某个人中的标记物的存在或存在数量进行的比较,或与具有给定状况风险人的标记物的比较,或与不具有给定状况的人的比较。如上面所述,一个病人样本中的标记物水平可以与某种特定的诊断的已知水平进行比较。那这个样本的标记物水平就是所说的与一个诊断相应的;即,技术人员能用标记物水平来决定病人是否患有一种特异型诊断(疾病),并进行相应的应答。样本标记物水平也可以有选择的与已知好的结果的标记物水平进行比较(例如未患病的样本,等)。在优选的实施例中,标记物的水平也与总体概率或利用 ROC 曲线产生的特定结果有关。

[0098] 在某个实施例中,本发明所采用的的方法包括分析结果与基线结果的比较。本发明所用的术语“基线”指用来作为比较数值的分析值(即,检测结果与之比较)。实际上,这说明来自主体的样本标记物被检测,检测结果与基线比较。高于基线的数值说明诊断或预测的第一种可能性,低于基线的数值说明诊断或预测的第二种可能性。

[0099] 基线可以用本领域技术人员熟知的许多种方式中进行选择。例如可以从一定人群的主体中获得一个标记物或多个标记物的数据库(如在体液中尿液、血液、血清或血浆的浓度)。主体的人口数可以分成至少两个亚群。第一亚群包括那些主体,这些主体已经被确认患有疾病,具有某种结果或更一般的说处于第一阶段。例如,这第一亚群的病人可以是那些被诊断为具有心力衰竭,和那些肾功能衰弱的人。为了方便,第一亚群的主体被称为“有病的”,尽管如此,这亚群实际上由于存在特定的特征而选择出的。第二亚群是未归入第一亚群的主体。第二亚群在下文中被称为“无病的”。

[0100] 然后,基线结果可以利用合理的特异性和敏感性来区分有病的和无病的亚群。在检验中,改变基线仅仅是假阳性结果和假阴性结果的数量之间的交替互换,这是因为不同标记物的使用导致的。具有这种检测的重叠区的有效性经常用 ROC 曲线(受试者工作特性)来表达。ROC 曲线是本领域技术人员熟知的。ROC 横轴代表(1-特异性)假阳性率的增加。曲线的纵轴代表敏感性,代表正确率的增加。选定一个特定的阈值或切点值,值(1-特异性)会被确定,也就会获得对应的敏感性。ROC 曲线下的区域是测量标记物水平能正确识别某种疾病或状态的可能性。当然曲线下的区域也能用来确定检测的有效性。

[0101] 可选择的,个人主体可选择提供他们自己的基线,那样短期的或暂时的变化就用来说明特定诊断或预测。例如,用最初的时间里测量一种或多种标记物用来作为一种或多种基线结果,在以后的时间里又测一次,随着时间变化,标记物水平的改变(或缺失)就能被确定或测量。在这个实施例中,标记物从第一次到第二次数值的增加可以暗示特别的预测结果,或特别的诊断结果等。同样的,标记物从第一次到第二次数值的减少也可以暗示特别的预测结果,或特别的诊断结果等。在这样一个实施例中,多数标记物相互间没有变化。一个或多个标记物值的短期变化也可以被用来同时与群体基线的单时间点标记物值进行比较。

[0102] 在实施例中,为主体确定一个标记物的基线水平,然后用同样的标记物进行后续的检测分析。后续分析结果与基线结果进行比较,相对于低于基线值,大于基线值说明心功能恶化。类似的,相对于高于基线值,低于基线值说明心功能好转。

[0103] 在实施例中,为主体确定一个标记物的基线水平,然后用同样的标记物进行后续的检测分析。后续结果与基线结果比较,相对于低于基线值,大于基线值则说明死亡率的风险会增加。类似的,相对于高于基线值,低于基线值则说明死亡率的风险会降低。

[0104] 这里所述单个标记物水平的测量也可以用附加的其它标记物的测量来扩大或增强。例如,与血压调节有关的其它标记物,包括其它的利尿肽和 / 或它们的相关标记物,可以与 BNP 和 / 或它的相关标记物同时使用,或分开使用。适合的分析包括,但不限于,检测 ANP, proANP, NT-proANP, CNP, 激肽原, CGRP II, 尿紧张素 II, BNP, NT-proBNP, proBNP, 降血钙素基因相关肽, 精氨酸加压素, 内皮素 -1 (和 / 或大 ET-1), 内皮素 -2 (和 / 或大 ET-2), 内皮素 -3 (和 / 或大 ET-3), 原降钙素, 钙磷蛋白, 肾上腺髓质素, 醛固酮, 血管紧张肽 1 (和 / 或血管紧张肽 1), 血管紧张肽 2 (和 / 或血管紧张肽 2), 血管紧张肽 3 (和 / 或血管紧张肽 3), 缓激肽, 速激肽 -3, 降血钙素, 肾素, 尿扩张素和胃饥饿素, 和 / 或一个或多个相关的标记物。

[0105] 本发明所述的方法也可以利用各种临床变量作为变量。例如这些变量包括尿排出量水平、年龄、是否存在如糖尿病, 高血压, 抽烟等的心血管疾病因子。包括但不限于以上所列出的这些变量。

[0106] 把多个标记物组合成单一的试剂, 以便像单标记物一样使用的适宜的方法, 该内容在 2002 年 12 月 24 日申请的第 60/436, 392 号美国临时专利申请, 2003 年 12 月 23 日申请的 PCT/US03/41426, 2002 年 12 月 27 日申请的第 10/331, 127 号美国专利申请和 PCT 社区内的 PCT/US03/41453 申请中有详细描述。上述的每个专利包含有该方法的详细内容, 包括所有表格、图片和权利要求的一个的全部作为本发明的一部分。在一个可选的方式中, 分析结果可以使用一个“m 中包括 n 的”(“n - of - m”)方式。本方法的一个例子就是使用 2 个标记物, 当任何一个标记物高于对应的基线值就标志着心力衰竭的诊断或不好结果风险的增加(在“m 中包括 n 的”方式中, 这是 2 中包括 1 的(“1-of-2”)结果)。如果两个标记物同时高于相应的基线(一个 2 包括 2 的(2-of-2)结果), 更能肯定主体所处的状态。

[0107] 诊断和 / 或预测测试的敏感性和特异性不仅仅更多依赖检测分析的“质量”——而且他们也依赖是什么造成不正常结果组成的定义。实际上, 接收者操作特征曲线, 或 ROC 曲线通常通过绘制一个变量值与相对频率在“正常”与“疾病”的人群。对少许特殊标记物, 有或没有“疾病”的主体中的标记物水平的分布可能会重叠。在这种情况下, 检测不能 100% 的精确区分正常人群与疾病人群, 重叠区域则说明检测不能区分正常与疾病。这就需要选择一个临界值, 高于(或低于, 取决于标记物随疾病如何变化)临界值检测被认为是不正常, 低于临界值被认为是正常。ROC 曲线下的区域是可能性的测量, 即测量对状态的正确识别。ROC 曲线甚至能在测量结果不能给出一个确切数字的时候使用。只要对一个结果分级, 就能造出 ROC 曲线。例如, 根据程度(1= 低, 2= 标准, 3= 高)对“有病”样本的检测结果进行分级。这个分级与“标准”人群的结果有关, ROC 曲线就制作好了。这个方法是本领域技术人员熟知的, 见 Hanley et al., Radiology 143:29-36(1982)。

[0108] 检测准确性的测量也可以用 Fischer 等 Intensive Care Med. 29:1043-51, 2003

所述的方法,测量一个已给定的标记物或多个标记物的效果。这些测量方法包括敏感性、特异性、预测值、概率比、诊断的让步比(diagnostic odds ratios)和 ROC 曲线面积。如上面讲述的一样,优选的检测和分析方法展示了用各种测量方法所得的一种或多种结果。

[0109] 优选的,基线具有至少约 70% 的敏感性,更优选的至少约 80% 的敏感性,更优选的至少约 85% 的敏感性,更优选的至少约 90% 的敏感性,最优选的至少约 95% 的敏感性;基线同时具有至少约 70% 的特异性,更优选的至少约 80% 的特异性,更优选的至少约 85% 的特异性,更优选的至少约 90% 的特异性,最优选的至少约 95% 的特异性。在一个特定的优选实施例中,敏感性和特异性至少都是约 75%,更优选的至少约 80%,更优选的至少约 85%,更优选的至少约 90%,最优选的至少约 95%。本发明中的术语“大约”指给定测量值的上下 5% 的范围(+/-5%)。

[0110] 另一个实施例中,阳性拟然比,阴性拟然比,比值比,或风险比都可以具有用来衡量诊断疾病或预测风险的能力。在利用阳性拟然比时,数值等于 1 说明“有病”和“对照”群组的主体都是阳性结果的可能性是一样的;数值大于 1 说明有病群组的主体更可能具有阳性结果;数值小于 1 说明对照组更有可能是阳性结果。在阴性拟然比情况下,数值 1 说明“有病”和“对照”群组的主体都是阴性结果的可能性是一样的;大于 1 说明有病组的主体更可能具有阴性结果;数值小于 1 说明对照组更有可能是阴性结果。在更优选的实施例中,多个标记物或多个标记物组能更好的表示阳性或阴性拟然比,阳性或阴性拟然比至少约等于 1.5 或更大,或约等于 0.67 或更少;更优选至少约等于 2 或更大,或约等于 0.5 或更少;更优选的至少等于 5 或更大,或约等于 0.2 或更小;更优选的至少等于 10 或更大,或约等于 0.1 或更小;最优选的至少等于 20 或更大,或约等于 0.05 或更小。本发明所说的术语“约等于”表示给定检测值的 +/-5%。

[0111] 在利用让步比的情况下,数值等于 1 说明“有病”和“对照”群组的主体都是阳性结果的可能性是一样的;数值大于 1 说明有病群组的主体更可能具有阳性结果;数值小于 1 说明对照组更有可能是阳性结果。在更优选的实施例中,多个标记物或标记物组能更好的表示让步比,让步比至少约等于 2 或更大,或约等于 0.5 或更少;更优选至少约等于 3 或更大,或约等于 0.33 或更少;更优选的至少等于 4 或更大,或约等于 0.25 或更小;更优选的至少等于 5 或更大,或约等于 0.2 或更小;最优选的至少等于 10 或更大,或约等于 0.1 或更小。本发明所说的术语“约等于”表示给定检测值的 +/-5%。

[0112] 在利用风险比的情况下,数值等于 1 说明“有病”和“对照”群组的终结(如死亡)风险都相等;数值大于 1 说明有病群组的终结风险更大;数值小于 1 说明对照组的终结风险更大。在更优选的实施例中,多个标记物或标记物组能更好的表示风险比,风险比至少约等于 1.1 或更大,或约等于 0.91 或更少;更优选至少约等于 1.25 或更大,或约等于 0.8 或更少;更优选的至少等于 1.5 或更大,或约等于 0.67 或更小;更优选的至少等于 2 或更大,或约等于 0.5 或更小;最优选的至少等于 2.5 或更大,或约等于 0.4 或更小。本发明所说的术语“约等于”表示给定检测值的 +/-5%。

[0113] 很多方法和装置设备是本领域技术人员熟知的用来检测当前发明中的标记物。关于检测病人样本中的多肽或蛋白,免疫检测设备和方法是经常使用的,见美国专利 6,143,576;6,113,855;6,019,944;5,985,579;5,947,124;5,939,272;5,922,615;5,885,527;5,851,776;5,824,799;5,679,526;5,525,524;和 5,480,792,每一个专利内容都被完整的列入

参考文献中,包括所有的表格、图形和权利要求。这些设备和方法可以利用各种标签大分子在三明治检测,以竞争或非竞争检测形式产生与靶标被分析物存在或数量相关的信号。另外,某种方法和设备,例如生物传感器和光学免疫检测法可以不需要标签的大分子就可以检测靶标被分析物的存在或存在的数量。见美国专利 5,631,171;和 5,955,377,每一个专利内容都被完整的列入参考文献中,包括所有的表格、图形和权利要求。本领域熟练技术人员认为机械仪器包括但不限于贝克曼,雅培 AxSym,罗氏 ElecSys, Dade Behring 层云系统的免疫检测系统可以进行这里所述的免疫检测。

[0114] 优选,免疫检测法分析标记物,虽然其他方法也是本领域技术人员熟知的(例如测量标记物 RNA 水平),但最优选的是三明治免疫检测法。通过对应标记物的特异抗体及其检测特异性结合通常可以检测到标记物的存在或存在的数量。任何合适的免疫分析方法都可以采用,例如酶联免疫检测法(ELISA),放射免疫检测法(RIAs),竞争性结合检测,等等。标记物与特异抗体的免疫结合可以被直接检测或间接检测。例如免疫检测法,生物检测分析需要检测的方法,最常用的定量的方法是结合一种酶,荧光基团或其他大分子物质能形成抗体-标签物。可检测的标签物包括本身就可被检测的大分子物质(如荧光基团,电化学标签,金属螯合物等),也包括产生可检测反应产物的间接可检测分子(例如如酶像辣根过氧化物酶,碱性磷酸酶等)或被一个可检测的结合分子特异结合(例如生物素,地高辛,麦芽糖, oligohistidine, 2,4-二硝基苯,苯基硼酸, ssDNA, dsDNA 等)。特别优选的可检测标签是如美国专利 5,763,189, 6,238,931, 和 6,251,687 和国际出版物 W095/08772 中所述的荧光乳胶粒,上述的专利和出版物都被完整的列入参考文献中。颗粒中的示范共轭会在下文中提到。包括荧光或发冷光标签,金属,染料,放射性核素和类似物的直接标签被与抗体结合,间接标签包括各种本领域数值的酶,例如碱性磷酸酶,辣根过氧化物酶和类似物。

[0115] 利用被固定的抗体来特异检测标记物也属于本发明的一部分。这里所用的术语“固相”是一个广义物质,它包括固体,半固体,凝胶,胶片,薄膜,网状物,毛毡类,复合物,微粒,试纸和类似物等,本领域技术人员通常可用于吸附大分子的物质。固相物质可以无孔或有孔。适宜的固相包括那些成熟的和/或在固相结合检测中作为固相的物质。例如,《免疫分析》的全部作为本发明的参考或一部分(见:例 chapter9ofImmunoassay, E. P. Dianianidis and T.K.Christopoulos eds., Academic Press:New York)。适宜的固相例子包括膜,滤器,纤维素纸,玻璃珠(包括聚合的,乳胶的和顺磁的颗粒),玻璃,硅片,微粒,纳米粒子,例如 Tenta 凝胶, Agro 凝胶, PEGA 凝胶, SPOCC 凝胶, 和多孔盘(见, 例, Leon et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 8:2997, 1998; Kessler et al., Agnew. Chem. Int. Ed. 40:165, 2001; Smith et al., J. Comb. Med. 1:326, 1999; Orain et al., Tetrahedron Lett. 42:515, 2001; Papanikos et al., J. Am. Chem. Soc. 123:2176, 2001; Gottschling et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 11:2997, 2001)。抗体可以被固定在各种固体载体上,例如磁性或色谱级的基质颗粒,检测板表面(如微孔板),固体基片材料或膜(如塑料,尼龙,纸)等等。通过在固相载体上涂上一种抗体或多种矩阵式排列的抗体,形成测试条。这些测试条随后浸入检测样品中,然后通过快速冲洗和检测步骤产生可测量信号,例如色斑。当采用多种检测方式时,在单个固相载体上可以产生很多分开地可设定地址的位置,每一个位置都对应不同的标记物,每一个位置都包括与这些标记物结合的抗体。这里所述的术语“离散”指不连续的表面区域。那就是说,如果不属于任一个区域的边界完全围绕两个区域中的每

一个区域,即两块表面区域是相互独立的,离散的。这里所用的术语“独立地址”指相互离散的表面区域,在这些区域上可以获得特异信号。

[0116] 为了单独或连续检测标记物,适宜的装置包括临床检验分析仪,例如 ElecSys (Roche), the AxSym (Abbott), the Access (Beckman), the ADVIA® CENTAUR® (Bayer) 免疫分析系统, NICHOLS ADVANTAGE® (Nichols Institute) 免疫分析系统等。优选的装置能用单个检测过程中同时进行多种标记物的检测。特别有用的物理形式包括具有多个离散的表面,能在可寻地址的位置上检测多种不同被分析物。这些形式包括蛋白基因芯片,或“蛋白质芯片”(见,例, Ng and Ilag, J. Cell Mol. Med. 6:329-340 (2002) 和毛细管设备(见,例, U. S. Patent No. 6, 019, 944)。在这些实施例中,每一个离散的表面位置包括用来固定一种或多种被分析物(例如标记物)的抗体。离散的表面可有选择性地包含一种或多种离散粒子(例如微粒或纳米粒子),这些离散粒子被固定在表面的离散位置上,那些离散的表面位置上的微粒子可以包括用来固定一种被分析物(例如标记物质)的抗体。

[0117] 为了一种或多种检测,本发明中优选的检测装置包括与固相结合的第一种抗体,与信号发生元件结合的第二抗体。这些检测设备配制在一起形成三明治式来检测一种或多种被分析物。更优选的这些检测设备可以进一步包含一个样本施加样区,和一个从样本施加区到第二设备区域的流动路径,流体路径中包含了与固相结合的第一种抗体。

[0118] 检测装置中样本可以沿着流动路径可以被动地(例如通过毛细管,流体静力学,或一旦样品进入设备不需要进一步操作就有的其他动力),积极地(例如机械泵产生的力作用下,电渗透驱动泵,离心力,增加的空气压力等),或通过一种积极的和被动的组合形成的驱动力来被驱动。最优选的,加入样品施加区的样本沿着流体路径既可以和与固相结合的第一种抗体接触,又可以和信号发生元件结合的第二抗体接触(三明治式检测形式)。另外的元件,例如把血液分成血清和血浆的过滤器,混合室等,如有需要可以让技术人员增加到以上的装置中。典型的装置如在免疫检测手册第二版第 41 章,题为“靠近病人的检测: Triage® Cardiac 系统”, David Wild 编辑,自然出版集团,2001 中有具体(“Near Patient Tests: Triage® Cardiac System,” in The Immunoassay Handbook, 2nd ed., David Wild, ed., Nature Publishing Group, 2001) 的描述,该内容已在参考文献中完整列出并作为本发明的一部分。

[0119] 标记物的分析也可以在各种物理形式中进行。例如,利用微孔板或自动化的设备可促进大量样品的检测过程。可选的,单个样品可进行实时的即时检测和诊断,例如在流动门诊或急诊室设备。

[0120] 在另一个实施例中,本发明提供一个分析标记物的试剂盒来。优选的试剂盒包括至少分析一个测试样本的装置和试剂,以及执行检测的说明书。试剂盒可选择的包含一种或多种方法使用,通过免疫检测标记物组获得的信息来控制或排除某些诊断或预测结果。这里采用的其他测量方法包括色谱分析法(例如 HPLC),质谱法,基于受体检测法和上述方法的组合。

[0121] 这里所用的术语“抗体”指一个肽或多肽,源自一个或多个免疫球蛋白基因或具有特异结合抗原或表位能力的部分片段,大量编码或仿造获得。例如免疫学基本原理,第 3 版, W. E. Paul 编辑., 乌鸦出版社, 纽约 (1993); Wilson (1994) 免疫性方法, 175:267-273; Yarmush (1992) 生物化学与生物物理方法, 25:85-97 (见, 例 Fundamental

Immunology, 3rd Edition, W. E. Paul, ed., Raven Press, N. Y. (1993); Wilson (1994) J. Immunol. Methods 175:267-273; Yarmush (1992) J. Biochem. Biophys. Methods 25:85-97)。术语抗体包括抗原结合部分,例如,保留与抗原结合能力的“抗原结合点”(例如,片段,子序列,互补决定区(CDRs)),它包括(i) Fab 片段,一个由 VL, VH, CL 和 CH1 域组成的单价片段;(ii) F(ab')₂ 片段,由一个二硫键链接的 2 个 Fab 片段组成的二价片段;(iii) Fd 片段,包括 VH 和 CH1 域的 Fd 片段;(iv)由抗体一个单臂的 VL 和 VH 域组成的 Fv 片段;(v)由 VH 域组成的 dAb 片段(Ward et al., (1989) Nature 341:544-546);和(vi)一个单独的互补决定域(CDR)。参考文献中“抗体”也包含单链抗体。

[0122] 优选的,抗体能特异的与靶标的标记物结合。术语“特异结合”不是为了说明抗体与它的预定的目标专一的结合,而是当抗体与它的预定目标结合的亲和力比非目标的亲和力大 5 倍时所指的“特异结合”的抗体。优选的抗体对目标分子的亲和力比非目标分子的亲和力至少约大 5 倍,更优选的为 10 倍,更优选的为 25 倍,更优选的为 50 倍,最优选的为 100 倍或更多。在优选的实施例中,抗体或其他结合物质与抗原的特异结合的亲和力至少为 10^6M^{-1} 。优选的,抗体的结合亲和力至少为 10^7M^{-1} ,更优选的,为 10^8M^{-1} 到 10^9M^{-1} ,更优选的,为 10^9M^{-1} 到 10^{10}M^{-1} ,或 10^{10}M^{-1} 到 10^{11}M^{-1} 。亲和力的计算方法为 $K_d = k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ (k_{off} 是解离速率常数, k_{on} 是结合速率常数, k_d 是平衡常数。亲和力由平衡常数决定,平衡常数通过测量各种浓度(c)下标记物配合基的分数范围(r)得到。数据利用 Scatchard 方程作图: $r/c = K(n-r)$

[0123] 其中,

[0124] r = 平衡时,结合配体 / 平衡时受体的摩尔数

[0125] c = 平衡时自由的配合基的浓度

[0126] K = 平衡常数

[0127] n = 每个受体分子的配体结合位点数

[0128] 通过图形分析, Y 轴绘制了 r/c , 对应的 X 轴绘制 r , 然后形成一个斯卡查德图。亲和力是线的负斜率。非标签的过量配体竞争结合贴有标签的配体决定 k_{off} 数值(见例美国专利第 6, 316, 409)。用于目标分子的目标试剂的亲和力优选的是至少 1×10^6 摩尔 / 升, 更优选的至少是 1×10^7 摩尔 / 升, 更优选的至少是 1×10^8 摩尔 / 升, 更优选的至少是 1×10^9 摩尔 / 升, 最优选的至少是 1×10^{10} 摩尔 / 升。通过斯卡查德图形分析抗体亲和力在本领域是公知的。见《免疫测定杂志》和《生物化学的计算, 方法和程序》等(See, e. g., van Erp et al., J. Immunoassay 12:425-43, 1991; Nelson and Griswold, Compute. Methods Programs Biomed. 27:65-8, 1988.)。

[0129] 可以用几种方法生产和选择抗体。例如一种是纯化目的多肽或用本领域熟知的如固相肽合成方法来合成目的多肽。见《蛋白质纯化指南》;《固相肽合成》;(See, e. g., Guide to Protein Purification, Murray P. Deutcher, ed., Meth. Enzymol. Vol 182 (1990); Solid Phase Peptide Synthesis, Greg B. Fields ed., Meth. Enzymol. Vol 289 (1997); Kiso et al., Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 38:1192-99, 1990; Mostafavi et al., Biomed. Pept. Proteins Nucleic Acids 1:255-60, 1995; Fujiwara et al., Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 44:1326-31, 1996)。选择的多肽随后被注射到例如小鼠或兔子, 来产生多克隆或单克隆抗体。本领域熟练技术人员知道许多方法可以用来生产抗体, 例如抗体, 实验室规程, Harlow and David Lane 编辑, 冷泉港实验室(1988), 冷泉港, 纽约中所

述(Antibodies, A Laboratory Manual, Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory(1988), Cold Spring Harbor, N. Y)。本领域熟练技术人员也知道模拟抗体的结合片段或 Fab 片段可以用各种方法从基因信息中产生(Antibody Engineering: A Practical Approach (Borrebaeck, C., ed.), 1995, Oxford University Press, Oxford; J. Immunol. 149, 3914-3920(1992))

[0130] 另外, 很多出版物都报道利用噬菌体展示技术来生产和筛选多肽文库用于结合选定的靶标(See, e. g, Cwirla et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA87, 6378-82, 1990; Devlin et al., Science249, 404-6, 1990, Scott and Smith, Science249, 386-88, 1990; and Ladner et al., U. S. Pat. No. 5, 571, 698)。噬菌体展示技术的基本定义是筛选 DNA 编码的多肽和多肽间的物理关联。这种物理关联是噬菌体颗粒提供的, 展示了多肽作为包被编码多肽的噬菌体基因组的部分噬菌体衣壳蛋白。多肽与基因材料间的物理关联是通过同时大量筛选具有不同多肽的噬菌体建立的。噬菌体展示与靶标有亲和作用的多肽与靶标结合的过程, 这些噬菌体通过与靶标的亲和力富集起来。从这些富集的噬菌体中通过他们不同的基因组鉴定多肽。用这些方法鉴定具有与预期靶标结合的多肽, 并通过常规手段批量合成这些多肽。见例美国专利 6, 057, 098, 该专利的所有表格、图形和权利要求都被完整的列在参考文献中并作为本发明的一部分。

[0131] 然后, 通过噬菌体展示方法产生的抗体可以再次通过纯化的目的多肽进行亲和力和特异性的筛选, 如果有必要, 比较抗体与被排除不能结合的多肽的亲和力和特异性。筛选程序包括固定纯化多肽在微量滴定板的隔开的不同孔中。含有可能抗体或抗体组的溶液接着放入各自的微量滴定孔中, 培养 30 分钟到 2 小时。然后冲洗微量滴定板的孔, 在孔中加入标签物的第二抗体(例如, 与碱性磷酸酶偶联的鼠抗抗体, 如果培养的抗体是鼠抗体)然后培养 30 分钟并冲洗。碱性磷酸酶底物加入到孔中, 接着结合有抗体的多肽的孔中就发生颜色反应。

[0132] 鉴定的抗体进一步在设计好的检测中进行亲和力和特异性分析。用免疫检测分析靶标蛋白, 纯化的靶标蛋白作为标准来评断使用选定抗体的免疫检测的敏感性和特异性。因为各种抗体的结合亲和力可能不同; 某些抗体对可能在空间上干扰其他的抗体(如在三明治检测中), 抗体检测性能的衡量比其绝对亲和力和特异性的衡量更加重要。

[0133] 本领域的技术人员认为许多途径都可用来生产抗体或结合片段, 筛选和选择各种多肽的亲和力和特异性, 但这些途径都不能改变本发明的范围。

[0134] 实施例子

[0135] 下列例子用于说明本发明, 但并不对本发明的范围起到任何的限定。

[0136] 实施例子 1 生物化学分析

[0137] 用标准免疫分析技术测量标记物。这些技术包括利用抗体特异性结合一个或多个目标分析物。

[0138] 如 W098/43739, W098/08606, W098/21563, and W093/24231 所述, 用 TECAN Genesis RSP200/8 或 Perkin Elmer Minitrak Workstations, 微孔板检测法, 或用 Biosite 有限公司生产的微流体装置进行免疫检测。可以根据目的被分析物的特征和浓度范围, 用三明治免疫检测法或竞争免疫检测法进行检测或测量。

[0139] 在一些情况下, 在微孔盘(microtiter plates)中进行人血浆(或血清)样本, 基于

磁珠免疫检测技术的多种和单一检测。每一次检测中,第一抗体与 Radix Biosolutions 公司生产的并经修饰过的顺磁性珠子(Luminex®)进行偶联。第二抗体(三明治免疫检测法)或是抗原(竞争性检测)都被生物素连接。荧光信号用链球菌生物素-R-藻红蛋白(Streptavidin-R-Phycoerythrin)(SA-RPE:Prozyme PJ31S)产生。所有的检测都是不同类型的,需要多次洗涤;为了防止磁珠移动,所有的洗涤都是把96孔的盘放置在96孔磁性环架上进行(Ambion)(magnetic ring stand)的。所有的液体操作步骤都用 Beckman Biomek 的 FX 完成的。

[0140] 另外情况下,直接对应选择的被分析物的单克隆抗体以每个抗体大约与5个N-羧基琥珀酰亚胺生物素半族(NHS-生物素,NHS-biotin)相偶联。然后偶联的生物素-抗体被加入每孔中含有标准抗生物素蛋白384(avidin384)的微孔盘中,没有与微孔盘结合的抗体被冲洗掉。去除含有未结合抗体的溶液,并用洗涤缓冲液清洗,洗涤缓冲液(PH7.42)中含有20mM的硼酸盐,150mM的NaCl,0.1%叠氮化钠和0.02%吐温-20。这些组成“抗标记物”的微孔盘。另一个直接对应同样被分析物的单克隆抗体与碱性磷酸酶偶联,例如,用琥珀酰亚胺基4-[N-马来酰亚胺基甲基]环己烷-1-甲酸叔丁酯(SMCC)和N-琥珀酰亚胺基3-[2-吡啶基二硫]丙酸酯(SPDP)(Pierce, Rockford, IL)。吸取含有HAMA抑制剂的血浆样品(10微升)到微孔盘的孔中,培养60分钟。去除样品,并用洗涤缓冲液清洗孔。加入碱性磷酸酶偶联的抗体到孔中,再培养60分钟,然后去除偶合物抗体,用洗涤缓冲液冲洗井。在孔中加入底物(AttoPhos®, Promega, Madison, WI),荧光产物的产生率与检测样品中被分析物的浓度有关。

[0141] 通过把抗原与校准曲线的矩阵按照质量比例混合产生8点校正曲线。在三明治检测中,这个矩阵是来自健康的捐赠人的血浆(或血清);8个点中的一个点包括为了中和存在的内生抗原的自由抗体。在竞争检测中,这个矩阵是CD8缓冲液(PH8.0)(10mmol/L Tris-HCl, 150mmol/L NaCl, 1mmol/L MgCl₂, 0.1mmol/L ZnCl₂, 10mL/L 聚乙烯醇(分子量为9000-10000), 10g/L BSA, and 1g/L 叠氮钠)。样本被储存在384孔的微孔板中并被保藏在-70°C的温度下。37°C的温度下融化样本盘,然后加入8点校正曲线试剂。

[0142] 检测在室温下进行。加带有珠子的第一抗体溶液到384孔的检测盘上(10u1/孔),然后加入来自样本盘的融化的样品(10u1/孔),混合,然后培养1小时。注意,在检测盘中的检测时,竞争检测法的操作不同于三明治检测,在把样本转移到检测盘之前先加入生物素偶联的抗原到样本中。为了后续的处理,每一个384孔板被分成4个96孔板。如上所说,清洗板子;三明治检测法中,需要与生物素偶联的第二抗体共培养后再次清洗。混合物的检测需要用SA-RPE进行标签,被清洗,然后用Luminex® LX200读取仪器读取。每次检测的中值信号用于对每个样品的数据的计算。抗原浓度用标准曲线计算,这个标准曲线是由8点校正曲线提供的适合一个5参数逻辑斯蒂函数的信号决定的。

[0143] 这些检测可以被纯化的蛋白来校准(该蛋白要么与选择的被分析物相同,要么相关,并能在分析过程能够被检测到),对被稀释到含有EDTA的血浆的蛋白与来自人群中的样本进行相同的处理。在加入纯化的标记蛋白前,测量血浆中存在的内生被分析物的水平,该内生被分析物的水平在校准的时候也被考虑进去计算标记物的值。当有必要减少校准过程中的内生被分析物的水平时,可以用标准免疫亲和性方法从血浆中除去该内生被分析物。校准曲线的测试与来自人群中的样本的测试方法是相同,用获得的结果绘制一个“剂量反

应”曲线(检测信号与分析物浓度的方程),用这个曲线可以根据采自主体样本的检测信号来确定样本中被分析物质的浓度。

[0144] 用微流体装置检测的情况下,用于检测的装置实质与免疫分析手册最中,41章中,题目为“病人边的检测:Triage®心血管系统”中的所述的装置一样(第2版.,David Wild,编辑,自然出版集团,2001)。

[0145] 在三明治免疫检测中,把血浆样品加入包含所有必需检测试剂的微流体装置中,该微流体装置中包括干燥的HAMA抑制剂。血浆通过一个过滤器,去除悬浮颗粒。通过毛细管作用进入一个“反应室”。这个反应室包含适用于靶标分析物的荧光乳胶颗粒-抗体的偶联体(后面名为FETL-抗体偶联体),也可以包含适用于几种选定分析物的FETL-抗体的偶联体。FETL-抗体的偶联体被溶解到血浆后形成反应混合物,反应混合物在反应室培养一段时间(约1分钟),从而使血浆中的目标被分析物与抗体结合。培养后,反应混合物通过毛细管作用继续在检测通道中下移。用于检测目的被分析物的抗体被固定在离散的捕获区里,捕获区位于“检测通道”的表面上。在反应室形成的被分析物/FETL-抗体的复合物在对应的捕获带中被捕获,并形成三个三明治式的复合物,而未结合的FETL-抗体的偶联体被多余的血浆冲洗,并从检测通道进入废液室。在捕获带捕获的分析物与抗体-FETL混合物的数量通过荧光光度计(Triage® MeterPlus,美国博适股份有限公司)定量检测,并被换算成血浆样本中选定被分析物的数量。

[0146] 个别检测被用于结合以下的标记物质:WAP4C, BNP, ESAM, LTBR, Mesothelin, Syndecan-1, TROY, 和PIGR。报告单位如下:WAP4C, ng/mL;BNP pg/mL;ESAMng/mL;LTBR, ng/mL;Mesothelin, ng/mL;PIGR, ng/mL;Syndecan-1, ng/mL;Troynng/mL;下列表格中列出了统计学内容。“N”是每一组中主体的数量;“25th”, “50th”, 和“75th”指分别在第25个,第50个和75个百分位的值;“SD”是标准偏差;均值的SE指均值的标准误差。

[0147] 实施例子 2. 测试的统计描述

[0148] 表 1

[0149]

标记物	群体	N	Min	Mean	SE of Mean	Max	25th	50th	75th	SD
BNP	临床正常	112	18.0	52.0	8.1	847.2	18.0	28.8	48.6	85.9
BNP	ACC/AHA 阶段 A/B 无症状心力衰竭	25	18.0	88.4	22.0	424.4	20.1	31.2	132.3	109.8
BNP	有症状心力衰竭 NYHA I-II	35	18.0	367.2	97.8	2900.0	45.4	184.4	349.8	578.7
BNP	BNP ≤ 100 pg/mL 临床正常	98	18.0	32.2	1.9	98.8	18.0	23.4	42.6	18.4
BNP	BNP ≤ 100 pg/mL ACC/AHA 阶段, A/B 无症状心力衰竭	18	18.0	29.9	3.5	75.3	18.0	27.2	35.4	14.8
BNP	BNP ≤ 100 pg/mL 有症状心力衰竭 NYHA I-II	13	18.0	41.5	6.9	83.9	20.4	41.3	59.9	24.7
ESAM	临床正常	112	5.8	22.7	0.6	41.6	19.0	21.9	25.5	6.4
ESAM	ACC/AHA 阶段 A/B 无症状心力衰竭	25	28.2	42.7	2.4	75.5	34.3	42.1	45.6	11.9
ESAM	有症状心力衰竭 NYHA I-II	35	28.6	56.0	2.9	84.3	42.5	57.2	68.4	17.4
ESAM	BNP ≤ 100 pg/mL 临床正常	98	5.8	22.0	0.6	41.4	18.7	21.8	24.2	6.0

[0150]

标记物	群体	N	Min	Mean	SE of Mean	Max	25th	50th	75th	SD
ESAM	BNP ≤ 100 pg/mL ACC/AHA 阶段 A/B 无症状心力衰竭	18	28.2	39.2	1.8	57.8	34.3	39.7	43.9	7.5
ESAM	BNP ≤ 100 pg/mL 有症状心力衰竭 NYHA I-II	13	31.7	57.6	5.3	82.0	39.2	57.5	76.7	19.0
LTBR	临床正常	112	0.4	0.5	0.0	1.0	0.4	0.4	0.4	0.1
LTBR	ACC/AHA 阶段 A/B 无症状心力衰竭	25	0.4	1.1	0.1	2.7	0.7	0.9	1.4	0.5
LTBR	有症状心力衰竭, NYHA I-II	35	0.5	2.0	0.2	5.4	1.0	1.8	2.8	1.2
LTBR	BNP ≤ 100 pg/mL 临床正常	98	0.4	0.5	0.0	1.0	0.4	0.4	0.4	0.1
LTBR	BNP ≤ 100 pg/mL ACC/AHA 阶段 A/B 无症状心力衰竭	18	0.4	1.0	0.1	1.8	0.6	0.8	1.3	0.4
LTBR	BNP ≤ 100 pg/mL 有症状心力衰竭 NYHA I-II	13	0.6	2.0	0.3	4.4	1.0	1.6	3.2	1.2
Mesothe lin	临床正常	112	0.4	5.1	0.3	22.9	2.5	4.3	6.6	3.6
Mesothe lin	ACC/AHA 阶段 A/B 无症状心力衰竭	25	1.0	27.4	4.1	87.0	12.0	20.3	38.1	20.3
Mesothe lin	有症状心力衰竭, NYHA I-II	35	1.7	45.7	6.0	147.6	19.5	43.8	59.0	35.4
Mesothe lin	BNP ≤ 100 pg/mL 临床正常	98	0.4	4.7	0.3	14.6	2.4	4.0	6.3	3.0
Mesothe lin	BNP ≤ 100 pg/mL ACC/AHA 阶段 A/B 无症状心力衰竭	18	8.5	28.3	5.0	87.0	12.4	18.9	43.8	21.2
Mesothe lin	BNP ≤ 100 pg/mL 有症状心力衰竭, NYHA I-II	13	4.4	45.2	10.4	147.6	18.7	46.0	59.7	37.6
PIGR	临床正常	112	10.2	58.6	2.9	169.6	40.5	52.3	68.9	30.6
PIGR	ACC/AHA 阶段 A/B 无症状心力衰竭	25	11.1	209.8	41.4	829.4	49.7	177.2	279.6	206.8
PIGR	有症状心力衰竭, NYHA I-II	35	13.1	299.8	34.1	778.5	135.3	289.5	453.2	201.7
PIGR	BNP ≤ 100 pg/mL 临床正常	98	10.2	53.8	2.5	161.1	39.2	49.6	64.4	24.4
PIGR	BNP ≤ 100 pg/mL ACC/AHA 阶段 A/B 无症状心力衰竭	18	11.1	147.3	27.6	396.5	37.0	128.4	217.3	117.3

[0151]

标记物	群体	N	Min	Mean	SE of Mean	Max	25th	50th	75th	SD
PIGR	BNP <= 100 pg/mL 有症状心力衰竭, NYHA I-II	13	13.1	133.2	28.7	296.5	58.3	94.7	208.7	103.4
Syndeca n-1	临床正常	112	0.8	2.9	0.1	11.7	2.1	2.7	3.4	1.4
Syndeca n-1	ACC/AHA 阶 段 A/B无症状心力 衰竭	25	5.8	11.1	1.0	25.6	7.8	8.7	12.9	5.2
Syndeca n-1	有症状心力衰竭, NYHA I-II	35	3.7	15.0	1.4	36.4	10.8	14.5	15.9	8.1
Syndeca n-1	BNP <= 100 pg/mL 临床正常	98	0.8	2.8	0.1	11.7	1.9	2.6	3.3	1.4
Syndeca n-1	BNP <= 100 pg/mL ACC/AHA 阶 段 A/B无症状心力 衰竭	18	6.3	11.4	1.3	25.6	8.4	8.7	12.3	5.6
Syndeca n-1	BNP <= 100 pg/mL 有症状心力衰竭 NYHA I-II	13	3.7	15.5	2.5	36.4	11.0	14.8	16.0	9.1
Troy	临床正常	112	0.2	0.5	0.0	1.4	0.4	0.5	0.6	0.2
Troy	ACC/AHA 阶 段 A/B无症状心力 衰竭	25	0.4	1.1	0.1	3.4	0.7	0.9	1.2	0.6
Troy	有症状心力衰竭 NYHA I-II	35	0.5	1.6	0.1	3.7	1.1	1.4	1.8	0.8
Troy	BNP <= 100 pg/mL临床正常	98	0.2	0.5	0.0	1.4	0.4	0.5	0.6	0.2
Troy	BNP <= 100 pg/mL ACC/AHA 阶 段 A/B无症状心力 衰竭	18	0.4	1.0	0.1	2.2	0.7	0.9	1.1	0.4
Troy	BNP <= 100 pg/mL 症状心力衰竭 NYHA I-II	13	0.6	1.4	0.2	2.9	0.9	1.4	1.8	0.7

表 2

[0152]

标记物	群体	N	Min	Max	Median	Mean	SE of mean
BNP	CVD 死亡 是	275	30.0	2600.0	69.2	132.0	13.0
BNP	CVD 死亡 不是	1464	30.0	2600.0	30.0	73.6	3.3
BNP	所有	1739	30.0	2600.0	35.5	82.8	3.5
ESAM	CVD 死亡 是	275	9.1	71.2	31.0	31.9	0.5
ESAM	CVD 死亡 不是	1464	0.2	75.8	28.1	28.9	0.2
ESAM	所有	1739	0.2	75.8	28.5	29.4	0.2
LTBR	CVD 死亡 是	275	0.3	4.9	0.3	0.5	0.0
LTBR	CVD 死亡 不是	1464	0.3	18.2	0.3	0.5	0.0
LTBR	所有	1739	0.3	18.2	0.3	0.5	0.0
Mesothelin	CVD 死亡 是	275	0.5	275.5	9.6	13.2	1.1
Mesothelin	CVD 死亡 不是	1464	0.1	380.0	7.7	11.4	0.5

[0153]

Mesothelin	所有	1739	0.1	380.0	8.0	11.7	0.4
PIGR	CVD 死亡 是	275	14.5	605.4	110.1	128.1	4.7
PIGR	CVD 死亡 不是	1466	4.8	715.7	81.0	94.4	1.6
PIGR	所有	1741	4.8	715.7	84.2	99.7	1.6
Syndecan-1	CVD 死亡 是	275	0.9	20.1	3.9	4.4	0.1
Syndecan-1	CVD 死亡 不是	1465	0.2	35.2	3.8	4.6	0.1
Syndecan-1	所有	1740	0.2	35.2	3.8	4.6	0.1
Troy	CVD 死亡 是	275	0.2	3.9	0.8	0.9	0.0
Troy	CVD 死亡 不是	1463	0.0	9.6	0.6	0.7	0.0
Troy	所有	1738	0.0	9.6	0.6	0.7	0.0

[0154] 实施例子 2. 用生物标记诊断心力衰竭

[0155] 如下列每一个表格所述定义了类似的两组。用 ROC 分析来区分组 1 和组 2。ROC 曲线的意义和面积的运用在如放射学 (Radiology (1982) 143:29-36) 中有具体的描述 (它的内容已完整的列在参考文献中并作为本发明的一部分)。通过比较, $AUC < 0.5$ 说明出现负向标记 (说明, 相对与组 1 来比较, 组 2 中的标记降低了), 通过比较, $AUC > 0.5$ 说明出现正向标记 (说明组 2 中的标记比组 1 提高了)。

[0156] 表 3:

[0157]

N, 组 1: 临床正常	N, 组 2: 有症状心力衰竭 NYHA I-II	生物标记物	ROC AUC	ROC AUC 95% CI			P-值
112	35	BNP	0.81	0.71	-	0.98	< 0.0001
112	35	ESAM	0.98	0.96	-	1.00	< 0.0001
112	35	LTBR	0.99	0.98	-	1.00	< 0.0001
112	35	Mesothelin	0.94	0.88	-	1.00	< 0.0001
112	35	Syndecan-1	0.98	0.97	-	1.00	< 0.0001

[0158] 表 4:

[0159]

N, 组 1: BNP ≤ 100 pg/mL 临床正常	BNP ≤ 100 pg/mL, 有症状心力衰 竭NYHA I-II	生物标记物	ROC AUC	ROC AUC 95% CI			P-值
98	13	BNP	0.59	0.397	-	0.785	0.1791
98	13	ESAM	0.99	0.97	-	1.00	< 0.0001
98	13	LTBR	0.99	0.98	-	1.00	< 0.0001
98	13	Mesothelin	0.95	0.88	-	1.00	< 0.0001
98	13	Syndecan-1	0.98	0.94	-	1.00	< 0.0001

[0160] 表 5:

[0161]

组 1: 临床 正常	N, 组 2: ACC/AHA 阶 段 A/B 无症状心力衰竭	生物标记物	ROC AUC	ROC AUC 95% CI			P-值: H0: 面 积 ≤ 0.5, H1: 面
---------------	--	-------	------------	-------------------	--	--	------------------------------------

[0162]

							积 > 0.5.
112	25	BNP	0.54	0.39	-	0.69	0.2964
112	25	ESAM	0.97	0.94	-	0.99	< 0.0001
112	25	LTBR	0.89	0.78	-	1.00	< 0.0001
112	25	Mesothelin	0.93	0.85	-	1.00	< 0.0001
112	25	Syndecan-1	0.99	0.98	-	1.00	< 0.0001

[0163] 表 6:

[0164]

N, 组: BNP ≤ 100 pg/mL 临床正常	N, 组 2: BNP ≤ 100 pg/mL ACC/AHA 阶 段 A/B 无症状心力衰竭	生物标记物	ROC AUC	ROC AUC 95% CI			P-值: H0: 面 积 ≤ 0.5, H1: 面 积 > 0.5.
98	18	BNP	0.57	0.26	-	0.59	0.8088
98	18	ESAM	0.97	0.95	-	1.00	< 0.0001
98	18	LTBR	0.91	0.80	-	1.00	< 0.0001
98	18	Mesothelin	0.98	0.96	-	1.00	< 0.0001
98	18	Syndecan-1	0.99	0.98	-	1.00	< 0.0001

[0165] 从这些结果中可以看到,每一种 BNP, ESAM, LTBR, Mesothelin, 和 Syndecan-1 中的每一种标记物都能从临床正常人中区分患有 NYHA 1 类和 2 类心力衰竭的病人(表 1)。对于 BNP 而言, ESAM, LTBR, Mesothelin, 和 Syndecan-1 的每一种都表现出了非常好的 ROC 区域, BNP 目前是临床使用上建立的最好的心力衰竭标记。重要的是, ESAM, LTBR,

Mesothelin, 和 Syndecan-1 的每一种都能从血浆的 BNP 水平小于 100pg/mL (这个水平常常被诊断为心力衰竭阴性)的情况下具有高置信度地区分患有 NYHA 1 类和 2 类心力衰竭的病人(表 2)。

[0166] 在那些被临床判断为具有 ACC/AHA 阶段 A/B, 无症状心力衰竭的病人中, BNP 是一个极端不好的诊断标记(表 3 和表 4), BNP 的 ROC 面积与随机相比差异不显著。相反, ESAM, LTBR, Mesothelin, 和 Syndecan-1 中的每一个都具有高置信度地识别这些无症状心力衰竭。

[0167] 实施例子 3. 生物标记的预测使用

[0168] 通过标记物的 4 分位数水平和规范第一四分位数的概率, 我们计算调整 CVD 和 CHD 死亡的让步比(AOR)。对于第四个四分位数, AOR 可以表示为下面的等式:

$$[0169] \quad AOR(Q4) = \frac{\frac{P(+|Q4, X)}{P(-|Q4, X)}}{\frac{P(+|Q1, X)}{P(-|Q1, X)}}$$

[0170] 在等式中, P(+|Q4, X) 是死亡的概率, 设定主体的标记水平在第四分位数内, 对所有主体用该算式时, 协变量值 X (如年龄, 性别) 需要被调整。相对于存活, 分子和分母分别为第四和第一四分位数的死亡概率。我们也用关于临床 CVD 和 CHD 死亡的数据来计算经验概率。我们也用比例风险模型(CPH) 模拟数据 [2], 用来评估标记水平、年龄、性别等对存活率的影响。用 Kaplan-Meier 方法计算存活概率的经验估计值, 作为被查验的数据(除了兴趣的终点, 如由于某种原因下主体退出研究)。用于分析的适当方法可以再 Dupont, William Dudley 上找到; 为生物医学研究者建立的统计模型; 简单介绍用于分析复杂数据(Cambridge University Press; 2002; Collett, David); 医学研究中的存活数据模型(CRC Press; 2003; and Bender, Ralf, Augustin, Thomas 和 Blettner, Maria); 医学统计学(24; 1713; 2005)。 (这些内容已列在参考文献中), 心血管疾病的死亡风险; 国际疾病分类 - 第 9 次修订标准。被包括在 390 号 -459 号登记的死亡的 CVD 死亡:

[0171] 表 7

[0172]

生物标记物	未调整指数 (exp(Beta))	未调整P值	未调整风险率, 四四分数 V. 第一四分数	BNP-被调整过的指数	BNP-被调整过的P值	BNP-被调整过的风险率, 第四四分数 V. 第一四分数
Troy	1.6	1.66E-10	4.1	1.5	4.41E-09	3.7
PIGR	1.7	2.68E-13	5.2	1.7	1.01E-11	4.7
BNP	1.6	5.35E-14	4.3	N/A	N/A	N/A

[0173] 在这些数据中, TROY 和 PIGR 生物标记物质仍是统计学上重要的预测死亡的方法, 可以随着 BNP 浓度调整模型。

[0174] Example 4. WAP4C 的预测用途

[0175] 下列研究利用一个来自心力衰竭咨询公司(COACH) 的协调研究结果的专利, 1023 个因为心力衰竭(HF) 而住院病人的一个多通道, 随机的对照试验, 见 Arch. Intern. Med. 168:316-24, 2008(See, Arch. Intern. Med. 168:316-24, 2008)。病人被分成 1-3 组: 一

个对照组(心脏病专家跟进研究)和 2 个干预组,他们是具有心力衰竭(HF)的病人,并使用附加的基本或加强措施,通过护士专门管理。研究进行 18 个月。由于心力衰竭(HF),加快死亡或再住院等原因,主要终点为死亡或再住院时间。

[0176] 从心力衰竭咨询公司(COACH)的主体获得 WAP4- 硫化物核心域蛋白 2 的测量值作为基线。基线的划分是如上所述的随机到谨慎或积极干预,病人进入 HF 状态 2 天后开始算起。下列表格中列出了这些测量值的描述性统计内容。N”是每一组中主体的数量;“25th”,“50th”,和“75th”指分别在第 25 个,第 50 个和 75 个百分位的值;“SD”是标准偏差;均值的 SE 指均值的标准误差。

[0177] 表 8

[0178]

	无死亡	无HF重住院	无死亡无HF重住院	死亡,发生所有可能的事	HF重住院	死亡,发生所有可能的事或HF重住院
N	479	419	327	92	148	240
0个百分位	0.71	0.71	0.71	2.22	1.03	1.03
25个百分位 25%	3.18	3.15	2.87	4.87	4.06	4.41
50个百分位 50%	5.17	5.17	4.67	7.66	7.94	7.81
75个百分位 75%	9.26	8.69	7.66	17.17	12.29	13.93
100个百分位 100%	42.72	63.26	33.94	63.26	30.19	63.26
均值	7.112	7.47	6.06	12.50	9.10	10.41
SE	0.262	0.35	0.27	1.16	0.51	0.55
变异	32.60	51.93	22.96	123.49	38.75	73.60
SD	5.71	7.21	4.79	11.11	6.22	8.58

[0179] WAP4- 硫化物核心域蛋白 2 测量值作为基线的作用是区分所确定风险结果的测试。通过 4 分标记水平计算 CVD 和 CHD 死亡调整相对危险性(AOR),标准化第一个 4 分位数。对于第四个四分位,AOR 可以表示为下面的等式:

$$[0180] \quad AOR(Q4) = \frac{P(+|Q4, X)}{P(+|Q1, X)} \div \frac{P(-|Q4, X)}{P(-|Q1, X)}$$

[0181] 在等式中, P(+|Q4, X) 是死亡的概率,设定主体的标记水平在第四分位数内,对所有主体用该算式时,协变量值 X (如年龄,性别)需要被调整。相对于存活,分子和分母分别为第四和第一四分位数的死亡概率。我们也用关于临床 CVD 和 CHD 死亡的数据来计算经验概率。我们也用比例风险模型模拟数据 [2],用来评估标记水平、年龄、性别等对存活率的影响。用 Kaplan-Meier 方法计算存活概率的经验估计值作为被查验的数据((除了兴趣的终点,如由于某种原因下主体退出研究)。

[0182] 表 9

[0183]

事件：HF再住院或死亡（所有的原因）		
	危害比（第三vs.第一三分位数）	P-值
WAP4C	3.30	1.8E-12
WAP4C,根据登记的年龄,性别, NYHA类型调整 COACH 处理组	2.80	4.0E-08
WAP4C,根据登记的年龄,性别, NYHA类型和 BNP调整COACH 处理组	2.26	2.7E-05
WAP4C,根据登记的年龄,性别, 糖尿病, LVEF, 和NYHA类型调整COACH 处理组	2.65	1.6E-06
WAP4C,根据登记的年龄,性别, 糖尿病, LVEF, NYHA类型和BNP调整COACH 处理组	2.00	1.3E-03

[0184] 表 10

[0185]

事件：HF再住院		
	危害比（第三比第一三分位数）	P-值
WAP4C	2.83	3.3E-07
WAP4C,根据登记的年龄,性别, NYHA类型调整 COACH 处理组	2.70	1.3E-05
WAP4C,根据登记的年龄,性别, NYHA类型和 BNP调整COACH 处理组	2.32	3.6E-04
WAP4C,根据登记的年龄,性别, 糖尿病, LVEF, NYHA类型调整COACH 处理组	2.79	2.3E-05
根据登记的年龄,性别, 糖尿病, LVEF, NYHA 类型和BNP调整COACH 处理组	2.27	1.4E-03

[0186] 表 11

[0187]

事件：HF再住院或死亡（所有可能的原因）		
	让步比（第三比第一三分位数）	P-值
WAP4C	4.21	<0.001
WAP4C,根据年龄,性别调整COACH 处理组	3.26	<0.001
WAP4C,根据登记的年龄,性别, 糖尿病, LVEF, NYHA类型和BNP调整COACH 处理组	2.69	<0.001

[0188] 表 12

[0189]

事件: HF再住院		
	让步比 (第三比第一三分位数)	P-值
WAP4C	2.47	<0.001
WAP4C,根据年龄, 性别调整COACH 处理组	2.37	0.001
WAP4C,根据登记的年龄, 性别NYHA类型和BNP调整COACH 处理组	2.21	0.005

[0190] 表 13

[0191]

临床二分法	AUC (自信度)	S.E.	p-值	N (对照)	N (有病)
HF再住院或死亡 (所有可能的原因)	0.69 (0.64-0.73)	0.023	<0.001	327	240
HF再住院或死亡 (所有可能的原因) (T > 180 天)	0.61 (0.55-0.68)	0.032	<0.001	321	101
HF再住院或死亡 (所有可能的原因) (T ≤ 180 天)	0.72 (0.67-0.77)	0.026	<0.001	428	139
HF再住院	0.61 (0.56-0.66)	0.027	<0.001	419	148
HF再住院(T > 180 天)	0.60 (0.52-0.67)	0.037	0.005	353	69
HF再住院(T ≤ 180 天)	0.66 (0.59-0.72)	0.034	<0.001	488	79

[0192] 下列研究利用来自心脏和灵魂研究的专利(Whooley 等, J. Am. Med. Assoc. 300:2379-2388, 2008)。病人由登记有冠状动脉疾病的医院门诊病人组成,他们来自 2 个退伍军人事务部医疗中心(旧金山 VA 医疗中心和阿洛阿尔托保健系统,加利福尼亚),一个大学医疗中心(加利福尼亚大学,旧金山)和旧金山社区保健网的 9 个公共卫生健康中心。病人具有下列条例中的一个即符合要求:具有心肌梗死历史,具有一个或多个冠状血管中的至少 50%狭窄的血管造影史,具有跑步或核试验引起的运动诱发缺血前兆;冠状动脉重建术史,或具有内科医生或心脏病学家的冠状动脉疾病诊断书。在 2000 年 9 月 11 至 2002 年 12 月 20 日间共计有 1024 名参与者:240 来自公共卫生健康中心,346 来自大学医疗中心,438 来自 VA 医疗中心。

[0193] 目的临床终点是心血管死亡,心血管住院治疗 and 心力衰竭。血浆中的 BNP, WAP4C 和这两个标记相结合的结果在登记时被测量,用来评估后续 10 年中疾病的发生风险。

[0194] 表 14

[0195]

事件：HF 再住院和/或全部死亡		
	危害比（第三比第一三分位数）	P-值
WAP4C	4.9162	2.06E-25
WAP4C,根据年龄，性别调整	3.9068	1.30E-16
WAP4C,根据年龄，性别和BNP调整	3.2658	3.75E-12
WAP4C,根据年龄，性别，糖尿病和LVEF调整	3.4416	4.98E-14
WAP4C,根据年龄，性别，糖尿病，LVEF和BNP调整	2.9954	1.08E-10

[0196] 表 15

[0197]

事件：HF 再住院		
	危害比（第三比第一三分位数）	P-值
WAP4C	6.8519	7.57E-14
WAP4C,根据年龄，性别调整	5.4647	4.95E-10
WAP4C,根据年龄，性别和BNP调整	3.8442	2.25E-06
WAP4C,根据年龄，性别，糖尿病和LVEF调整	4.3588	4.88E-08
WAP4C,根据年龄，性别，糖尿病，LVEF和BNP调整	3.2062	4.04E-05

[0198] 表 16

[0199]

事件：HF 再住院和/或全因死亡		
	让步比（第三比第一三分位数）	P-值
WAP4C	7.6886	6.60E-28
WAP4C,根据年龄，性别调整	5.8193	2.18E-19
WAP4C,根据年龄，性别和BNP调整	4.3416	4.52E-13

[0200] 表 17

[0201]

事件：HF 再住院		
	让步比（第三比第一三分位数）	P-值
WAP4C	7.1342	4.30E-13
WAP4C,根据年龄，性别调整	5.6849	8.12E-10

[0202]

WAP4C,根据年龄, 性别和 BNP 调整	3.5182	2.31E-05
------------------------	--------	----------

[0203] 表 18

[0204]

临床二分法	AUC (置信区间)	S.E.	P-值	N 对照	N 有病
HF 再住院和/或全因死亡	0.738 (0.706-0.770)	0.016	<0.001	607	374
HF 再住院和/或全因死亡(T > 180 天)	0.727 (0.694-0.760)	0.017	<0.001	607	345
HF 再住院和/或全因死亡 (T<= 180 天)	0.797 (0.731-0.863)	0.034	<0.001	952	29
HF 再住院 (T > 180 days)	0.732 (0.691-0.772)	0.021	<0.001	822	159
HF 再住院(T > 180 天)	0.720 (0.676-0.764)	0.022	<0.001	822	137
HF 再住院(T<= 180 天)	0.778 (0.700-0.857)	0.04	<0.001	959	22

[0205] 表 19

[0206]

事件: HF 再住院						
标记物	AUC	95% LCI	95% UCI	SE	ND	D
BNP + WAP4C*	0.814	0.780	0.848	0.017	822	159
BNP	0.798	0.761	0.835	0.019	822	159
WAP4C	0.732	0.691	0.772	0.021	822	159

[0207] 表 20

[0208]

事件: 全因死亡, MI, HF 再住院, 中风, 或短暂性脑缺血发作						
标记物	AUC	95% LCI	95% UCI	SE	ND	D
BNP + WAP4C*	0.751	0.721	0.782	0.016	560	421
WAP4C	0.729	0.697	0.760	0.016	560	421
BNP	0.686	0.653	0.720	0.017	560	421

[0209] * 表示多次逻辑回归模型(Multiple logistic regression model)

[0210] 表 21

[0211]

事件: HF 再住院					
比较 [†]	AUC 差异	95% LCI	95% UCI	SE	p
BNP + WAP4C vs WAP4C	0.082	0.042	0.122	0.021	<0.0001
BNP vs WAP4C	0.066	0.018	0.114	0.025	0.0075
BNP + WAP4C vs BNP	0.016	0.004	0.028	0.006	0.0110

[0212] 表 22

[0213]

事件：全因死亡，MI，HF再住院，中风，或短暂性脑缺血发作

[0214]

比较†	AUC 差异	95% LCI	95% UCI	SE	p
BNP + WAP4C vs BNP	0.065	0.043	0.086	0.011	<0.0001
BNP + WAP4C vs WAP4C	0.023	0.003	0.042	0.010	0.0218
WAP4C vs BNP	0.042	0.006	0.079	0.019	0.0226

[0215] †表示用德隆，德隆和卡克 - 皮尔生方法来对 ROC AUCs 之间的比较

[0216] 本领域技术人员将很容易理解，本发明适用于执行对象并获得提到的，也包括固有的结果和优点。这里所提到的例子是优选的实施例，具有示范性，但本发明对本发明的范围做任何限制。

[0217] 显然本领域技术人员可以在不违背本发明范围和精神的情况下，本发明所公开的是可以做出不同的替换和修改的。

[0218] 本发明说明书中提到的所有专利和出版物都表示这些是本领域的公开技术，本发明可以使用。这里所引用的所有专利和出版物都被同样列在参考文献中，跟每一个出版物具体的单独被参考引用一样。这里所述的本发明可以在缺乏任何一种元素或多种元素，一种限制或多种限制的情况下实现，这里这种限制没有特别说明。例如这里每一个实例中术语“包含”，“实质由……组成”和“由……组成”可以用两者之一的其余 2 个术语代替。这里采用的术语和表达方式所描述方式，而不受其限制，这里也没有任何意图来指明此书描述的这些术语和解释排除了任何等同的特征，但是可以知道，可以在本发明和权利要求的范围内做任何合适的改变或修改。可以理解，本发明所描述的实施例都是一些优选的实施例和特点，任何本领域的一般技术人员都可以根据本发明描述的精髓下做一些更改和变化，这些更改和变化也被认为属于本发明的范围和独立权利要求以及附属权利要求所限制的范围。

[0219] 其他的实施方式都在如下的权利要求中。

SEQUENCE LISTING

- <110> 美艾利尔圣地亚哥有限公司
 <120> 诊断或风险预测心力衰竭的方法和试剂
 <130>
 <140> PCT/US2011/062159
 <141> 2011 年 11 月 25
 <150> 61/437,609
 <151> 2011-01-29
 <150> 61/417,851
 <151> 2010-11-29
 <160> 13
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1

His Pro Leu Gly Ser Pro Gly Ser Ala Ser Asp Leu Glu Thr Ser Gly
 1 5 10 15
 Leu Gln Glu Gln Arg Asn His Leu Gln Gly Lys Leu Ser Glu Leu Gln
 20 25 30
 Val Glu Gln Thr Ser Leu Glu Pro Leu Gln Glu Ser Pro Arg Pro Thr
 35 40 45
 Gly Val Trp Lys Ser Arg Glu Val Ala Thr Glu Gly Ile Arg Gly His
 50 55 60
 Arg Lys Met Val Leu Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met
 65 70 75 80
 Val Gln Gly Ser Gly Cys Phe Gly Arg Lys Met Asp Arg Ile Ser Ser
 85 90 95
 Ser Ser Gly Leu Gly Cys Lys Val Leu Arg Arg His
 100 105

- <210> 2
 <211> 134
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 2

Met Asp Pro Gln Thr Ala Pro Ser Arg Ala Leu Leu Leu Leu Leu Phe
 1 5 10 15

Leu His Leu Ala Phe Leu Gly Gly Arg Ser His Pro Leu Gly Ser Pro
 20 25 30
 Gly Ser Ala Ser Asp Leu Glu Thr Ser Gly Leu Gln Glu Gln Arg Asn
 35 40 45
 His Leu Gln Gly Lys Leu Ser Glu Leu Gln Val Glu Gln Thr Ser Leu
 50 55 60
 Glu Pro Leu Gln Glu Ser Pro Arg Pro Thr Gly Val Trp Lys Ser Arg
 65 70 75 80
 Glu Val Ala Thr Glu Gly Ile Arg Gly His Arg Lys Met Val Leu Tyr
 85 90 95
 Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser Gly Cys
 100 105 110
 Phe Gly Arg Lys Met Asp Arg Ile Ser Ser Ser Ser Gly Leu Gly Cys
 115 120 125
 Lys Val Leu Arg Arg His
 130
 <210> 3
 <211> 390
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 3
 Met Ile Ser Leu Pro Gly Pro Leu Val Thr Asn Leu Leu Arg Phe Leu
 1 5 10 15
 Phe Leu Gly Leu Ser Ala Leu Ala Pro Pro Ser Arg Ala Gln Leu Gln
 20 25 30
 Leu His Leu Pro Ala Asn Arg Leu Gln Ala Val Glu Gly Gly Glu Val
 35 40 45
 Val Leu Pro Ala Trp Tyr Thr Leu His Gly Glu Val Ser Ser Ser Gln
 50 55 60
 Pro Trp Glu Val Pro Phe Val Met Trp Phe Phe Lys Gln Lys Glu Lys
 65 70 75 80
 Glu Asp Gln Val Leu Ser Tyr Ile Asn Gly Val Thr Thr Ser Lys Pro
 85 90 95
 Gly Val Ser Leu Val Tyr Ser Met Pro Ser Arg Asn Leu Ser Leu Arg
 100 105 110
 Leu Glu Gly Leu Gln Glu Lys Asp Ser Gly Pro Tyr Ser Cys Ser Val
 115 120 125
 Asn Val Gln Asp Lys Gln Gly Lys Ser Arg Gly His Ser Ile Lys Thr
 130 135 140

Leu Glu Leu Asn Val Leu Val Pro Pro Ala Pro Pro Ser Cys Arg Leu
 145 150 155 160
 Gln Gly Val Pro His Val Gly Ala Asn Val Thr Leu Ser Cys Gln Ser
 165 170 175
 Pro Arg Ser Lys Pro Ala Val Gln Tyr Gln Trp Asp Arg Gln Leu Pro
 180 185 190
 Ser Phe Gln Thr Phe Phe Ala Pro Ala Leu Asp Val Ile Arg Gly Ser
 195 200 205
 Leu Ser Leu Thr Asn Leu Ser Ser Ser Met Ala Gly Val Tyr Val Cys
 210 215 220
 Lys Ala His Asn Glu Val Gly Thr Ala Gln Cys Asn Val Thr Leu Glu
 225 230 235 240
 Val Ser Thr Gly Pro Gly Ala Ala Val Val Ala Gly Ala Val Val Gly
 245 250 255
 Thr Leu Val Gly Leu Gly Leu Leu Ala Gly Leu Val Leu Leu Tyr His
 260 265 270
 Arg Arg Gly Lys Ala Leu Glu Glu Pro Ala Asn Asp Ile Lys Glu Asp
 275 280 285
 Ala Ile Ala Pro Arg Thr Leu Pro Trp Pro Lys Ser Ser Asp Thr Ile
 290 295 300
 Ser Lys Asn Gly Thr Leu Ser Ser Val Thr Ser Ala Arg Ala Leu Arg
 305 310 315 320
 Pro Pro His Gly Pro Pro Arg Pro Gly Ala Leu Thr Pro Thr Pro Ser
 325 330 335
 Leu Ser Ser Gln Ala Leu Pro Ser Pro Arg Leu Pro Thr Thr Asp Gly
 340 345 350
 Ala His Pro Gln Pro Ile Ser Pro Ile Pro Gly Gly Val Ser Ser Ser
 355 360 365
 Gly Leu Ser Arg Met Gly Ala Val Pro Val Met Val Pro Ala Gln Ser
 370 375 380
 Gln Ala Gly Ser Leu Val
 385 390
 <210> 4
 <211> 435
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 4
 Met Leu Leu Pro Trp Ala Thr Ser Ala Pro Gly Leu Ala Trp Gly Pro
 1 5 10 15

Leu Val Leu Gly Leu Phe Gly Leu Leu Ala Ala Ser Gln Pro Gln Ala
 20 25 30
 Val Pro Pro Tyr Ala Ser Glu Asn Gln Thr Cys Arg Asp Gln Glu Lys
 35 40 45
 Glu Tyr Tyr Glu Pro Gln His Arg Ile Cys Cys Ser Arg Cys Pro Pro
 50 55 60
 Gly Thr Tyr Val Ser Ala Lys Cys Ser Arg Ile Arg Asp Thr Val Cys
 65 70 75 80
 Ala Thr Cys Ala Glu Asn Ser Tyr Asn Glu His Trp Asn Tyr Leu Thr
 85 90 95
 Ile Cys Gln Leu Cys Arg Pro Cys Asp Pro Val Met Gly Leu Glu Glu
 100 105 110
 Ile Ala Pro Cys Thr Ser Lys Arg Lys Thr Gln Cys Arg Cys Gln Pro
 115 120 125
 Gly Met Phe Cys Ala Ala Trp Ala Leu Glu Cys Thr His Cys Glu Leu
 130 135 140
 Leu Ser Asp Cys Pro Pro Gly Thr Glu Ala Glu Leu Lys Asp Glu Val
 145 150 155 160
 Gly Lys Gly Asn Asn His Cys Val Pro Cys Lys Ala Gly His Phe Gln
 165 170 175
 Asn Thr Ser Ser Pro Ser Ala Arg Cys Gln Pro His Thr Arg Cys Glu
 180 185 190
 Asn Gln Gly Leu Val Glu Ala Ala Pro Gly Thr Ala Gln Ser Asp Thr
 195 200 205
 Thr Cys Lys Asn Pro Leu Glu Pro Leu Pro Pro Glu Met Ser Gly Thr
 210 215 220
 Met Leu Met Leu Ala Val Leu Leu Pro Leu Ala Phe Phe Leu Leu Leu
 225 230 235 240
 Ala Thr Val Phe Ser Cys Ile Trp Lys Ser His Pro Ser Leu Cys Arg
 245 250 255
 Lys Leu Gly Ser Leu Leu Lys Arg Arg Pro Gln Gly Glu Gly Pro Asn
 260 265 270
 Pro Val Ala Gly Ser Trp Glu Pro Pro Lys Ala His Pro Tyr Phe Pro
 275 280 285
 Asp Leu Val Gln Pro Leu Leu Pro Ile Ser Gly Asp Val Ser Pro Val
 290 295 300
 Ser Thr Gly Leu Pro Ala Ala Pro Val Leu Glu Ala Gly Val Pro Gln
 305 310 315 320
 Gln Gln Ser Pro Leu Asp Leu Thr Arg Glu Pro Gln Leu Glu Pro Gly

	325		330		335
Glu Gln Ser Gln Val Ala His Gly Thr Asn Gly Ile His Val Thr Gly					
	340		345		350
Gly Ser Met Thr Ile Thr Gly Asn Ile Tyr Ile Tyr Asn Gly Pro Val					
	355		360		365
Leu Gly Gly Pro Pro Gly Pro Gly Asp Leu Pro Ala Thr Pro Glu Pro					
	370		375		380
Pro Tyr Pro Ile Pro Glu Glu Gly Asp Pro Gly Pro Pro Gly Leu Ser					
385		390		395	400
Thr Pro His Gln Glu Asp Gly Lys Ala Trp His Leu Ala Glu Thr Glu					
	405		410		415
His Cys Gly Ala Thr Pro Ser Asn Arg Gly Pro Arg Asn Gln Phe Ile					
	420		425		430
Thr His Asp					
	435				
<210> 5					
<211> 630					
<212> PRT					
<213> Homo sapiens					
<400> 5					
Met Ala Leu Pro Thr Ala Arg Pro Leu Leu Gly Ser Cys Gly Thr Pro					
1	5		10		15
Ala Leu Gly Ser Leu Leu Phe Leu Leu Phe Ser Leu Gly Trp Val Gln					
	20		25		30
Pro Ser Arg Thr Leu Ala Gly Glu Thr Gly Gln Glu Ala Ala Pro Leu					
	35		40		45
Asp Gly Val Leu Ala Asn Pro Pro Asn Ile Ser Ser Leu Ser Pro Arg					
	50		55		60
Gln Leu Leu Gly Phe Pro Cys Ala Glu Val Ser Gly Leu Ser Thr Glu					
65		70		75	80
Arg Val Arg Glu Leu Ala Val Ala Leu Ala Gln Lys Asn Val Lys Leu					
	85		90		95
Ser Thr Glu Gln Leu Arg Cys Leu Ala His Arg Leu Ser Glu Pro Pro					
	100		105		110
Glu Asp Leu Asp Ala Leu Pro Leu Asp Leu Leu Leu Phe Leu Asn Pro					
	115		120		125
Asp Ala Phe Ser Gly Pro Gln Ala Cys Thr Arg Phe Phe Ser Arg Ile					
	130		135		140
Thr Lys Ala Asn Val Asp Leu Leu Pro Arg Gly Ala Pro Glu Arg Gln					

145	150	155	160
Arg Leu Leu Pro Ala Ala Leu Ala Cys Trp Gly Val Arg Gly Ser Leu			
	165	170	175
Leu Ser Glu Ala Asp Val Arg Ala Leu Gly Gly Leu Ala Cys Asp Leu			
	180	185	190
Pro Gly Arg Phe Val Ala Glu Ser Ala Glu Val Leu Leu Pro Arg Leu			
	195	200	205
Val Ser Cys Pro Gly Pro Leu Asp Gln Asp Gln Gln Glu Ala Ala Arg			
	210	215	220
Ala Ala Leu Gln Gly Gly Gly Pro Pro Tyr Gly Pro Pro Ser Thr Trp			
225	230	235	240
Ser Val Ser Thr Met Asp Ala Leu Arg Gly Leu Leu Pro Val Leu Gly			
	245	250	255
Gln Pro Ile Ile Arg Ser Ile Pro Gln Gly Ile Val Ala Ala Trp Arg			
	260	265	270
Gln Arg Ser Ser Arg Asp Pro Ser Trp Arg Gln Pro Glu Arg Thr Ile			
	275	280	285
Leu Arg Pro Arg Phe Arg Arg Glu Val Glu Lys Thr Ala Cys Pro Ser			
	290	295	300
Gly Lys Lys Ala Arg Glu Ile Asp Glu Ser Leu Ile Phe Tyr Lys Lys			
305	310	315	320
Trp Glu Leu Glu Ala Cys Val Asp Ala Ala Leu Leu Ala Thr Gln Met			
	325	330	335
Asp Arg Val Asn Ala Ile Pro Phe Thr Tyr Glu Gln Leu Asp Val Leu			
	340	345	350
Lys His Lys Leu Asp Glu Leu Tyr Pro Gln Gly Tyr Pro Glu Ser Val			
	355	360	365
Ile Gln His Leu Gly Tyr Leu Phe Leu Lys Met Ser Pro Glu Asp Ile			
	370	375	380
Arg Lys Trp Asn Val Thr Ser Leu Glu Thr Leu Lys Ala Leu Leu Glu			
385	390	395	400
Val Asn Lys Gly His Glu Met Ser Pro Gln Ala Pro Arg Arg Pro Leu			
	405	410	415
Pro Gln Val Ala Thr Leu Ile Asp Arg Phe Val Lys Gly Arg Gly Gln			
	420	425	430
Leu Asp Lys Asp Thr Leu Asp Thr Leu Thr Ala Phe Tyr Pro Gly Tyr			
	435	440	445
Leu Cys Ser Leu Ser Pro Glu Glu Leu Ser Ser Val Pro Pro Ser Ser			
	450	455	460

<400> 7

Met Arg Arg Ala Ala Leu Trp Leu Trp Leu Cys Ala Leu Ala Leu Ser
 1 5 10 15
 Leu Gln Pro Ala Leu Pro Gln Ile Val Ala Thr Asn Leu Pro Pro Glu
 20 25 30
 Asp Gln Asp Gly Ser Gly Asp Asp Ser Asp Asn Phe Ser Gly Ser Gly
 35 40 45
 Ala Gly Ala Leu Gln Asp Ile Thr Leu Ser Gln Gln Thr Pro Ser Thr
 50 55 60
 Trp Lys Asp Thr Gln Leu Leu Thr Ala Ile Pro Thr Ser Pro Glu Pro
 65 70 75 80
 Thr Gly Leu Glu Ala Thr Ala Ala Ser Thr Ser Thr Leu Pro Ala Gly
 85 90 95
 Glu Gly Pro Lys Glu Gly Glu Ala Val Val Leu Pro Glu Val Glu Pro
 100 105 110
 Gly Leu Thr Ala Arg Glu Gln Glu Ala Thr Pro Arg Pro Arg Glu Thr
 115 120 125
 Thr Gln Leu Pro Thr Thr His Leu Ala Ser Thr Thr Thr Ala Thr Thr
 130 135 140
 Ala Gln Glu Pro Ala Thr Ser His Pro His Arg Asp Met Gln Pro Gly
 145 150 155 160
 His His Glu Thr Ser Thr Pro Ala Gly Pro Ser Gln Ala Asp Leu His
 165 170 175
 Thr Pro His Thr Glu Asp Gly Gly Pro Ser Ala Thr Glu Arg Ala Ala
 180 185 190
 Glu Asp Gly Ala Ser Ser Gln Leu Pro Ala Ala Glu Gly Ser Gly Glu
 195 200 205
 Gln Asp Phe Thr Phe Glu Thr Ser Gly Glu Asn Thr Ala Val Val Ala
 210 215 220
 Val Glu Pro Asp Arg Arg Asn Gln Ser Pro Val Asp Gln Gly Ala Thr
 225 230 235 240
 Gly Ala Ser Gln Gly Leu Leu Asp Arg Lys Glu Val Leu Gly Gly Val
 245 250 255
 Ile Ala Gly Gly Leu Val Gly Leu Ile Phe Ala Val Cys Leu Val Gly
 260 265 270
 Phe Met Leu Tyr Arg Met Lys Lys Lys Asp Glu Gly Ser Tyr Ser Leu
 275 280 285
 Glu Glu Pro Lys Gln Ala Asn Gly Gly Ala Tyr Gln Lys Pro Thr Lys
 290 295 300

Gln Glu Glu Phe Tyr Ala
 305 310
 <210> 8
 <211> 310
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 8
 Met Arg Arg Ala Ala Leu Trp Leu Trp Leu Cys Ala Leu Ala Leu Ser
 1 5 10 15
 Leu Gln Pro Ala Leu Pro Gln Ile Val Ala Thr Asn Leu Pro Pro Glu
 20 25 30
 Asp Gln Asp Gly Ser Gly Asp Asp Ser Asp Asn Phe Ser Gly Ser Gly
 35 40 45
 Ala Gly Ala Leu Gln Asp Ile Thr Leu Ser Gln Gln Thr Pro Ser Thr
 50 55 60
 Trp Lys Asp Thr Gln Leu Leu Thr Ala Ile Pro Thr Ser Pro Glu Pro
 65 70 75 80
 Thr Gly Leu Glu Ala Thr Ala Ala Ser Thr Ser Thr Leu Pro Ala Gly
 85 90 95
 Glu Gly Pro Lys Glu Gly Glu Ala Val Val Leu Pro Glu Val Glu Pro
 100 105 110
 Gly Leu Thr Ala Arg Glu Gln Glu Ala Thr Pro Arg Pro Arg Glu Thr
 115 120 125
 Thr Gln Leu Pro Thr Thr His Leu Ala Ser Thr Thr Thr Ala Thr Thr
 130 135 140
 Ala Gln Glu Pro Ala Thr Ser His Pro His Arg Asp Met Gln Pro Gly
 145 150 155 160
 His His Glu Thr Ser Thr Pro Ala Gly Pro Ser Gln Ala Asp Leu His
 165 170 175
 Thr Pro His Thr Glu Asp Gly Gly Pro Ser Ala Thr Glu Arg Ala Ala
 180 185 190
 Glu Asp Gly Ala Ser Ser Gln Leu Pro Ala Ala Glu Gly Ser Gly Glu
 195 200 205
 Gln Asp Phe Thr Phe Glu Thr Ser Gly Glu Asn Thr Ala Val Val Ala
 210 215 220
 Val Glu Pro Asp Arg Arg Asn Gln Ser Pro Val Asp Gln Gly Ala Thr
 225 230 235 240
 Gly Ala Ser Gln Gly Leu Leu Asp Arg Lys Glu Val Leu Gly Gly Val
 245 250 255

Ile Ala Gly Gly Leu Val Gly Leu Ile Phe Ala Val Cys Leu Val Gly
 260 265 270
 Phe Met Leu Tyr Arg Met Lys Lys Lys Asp Glu Gly Ser Tyr Ser Leu
 275 280 285
 Glu Glu Pro Lys Gln Ala Asn Gly Gly Ala Tyr Gln Lys Pro Thr Lys
 290 295 300
 Gln Glu Glu Phe Tyr Ala
 305 310
 <210> 9
 <211> 764
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 9
 Met Leu Leu Phe Val Leu Thr Cys Leu Leu Ala Val Phe Pro Ala Ile
 1 5 10 15
 Ser Thr Lys Ser Pro Ile Phe Gly Pro Glu Glu Val Asn Ser Val Glu
 20 25 30
 Gly Asn Ser Val Ser Ile Thr Cys Tyr Tyr Pro Pro Thr Ser Val Asn
 35 40 45
 Arg His Thr Arg Lys Tyr Trp Cys Arg Gln Gly Ala Arg Gly Gly Cys
 50 55 60
 Ile Thr Leu Ile Ser Ser Glu Gly Tyr Val Ser Ser Lys Tyr Ala Gly
 65 70 75 80
 Arg Ala Asn Leu Thr Asn Phe Pro Glu Asn Gly Thr Phe Val Val Asn
 85 90 95
 Ile Ala Gln Leu Ser Gln Asp Asp Ser Gly Arg Tyr Lys Cys Gly Leu
 100 105 110
 Gly Ile Asn Ser Arg Gly Leu Ser Phe Asp Val Ser Leu Glu Val Ser
 115 120 125
 Gln Gly Pro Gly Leu Leu Asn Asp Thr Lys Val Tyr Thr Val Asp Leu
 130 135 140
 Gly Arg Thr Val Thr Ile Asn Cys Pro Phe Lys Thr Glu Asn Ala Gln
 145 150 155 160
 Lys Arg Lys Ser Leu Tyr Lys Gln Ile Gly Leu Tyr Pro Val Leu Val
 165 170 175
 Ile Asp Ser Ser Gly Tyr Val Asn Pro Asn Tyr Thr Gly Arg Ile Arg
 180 185 190
 Leu Asp Ile Gln Gly Thr Gly Gln Leu Leu Phe Ser Val Val Ile Asn
 195 200 205

Gln Leu Arg Leu Ser Asp Ala Gly Gln Tyr Leu Cys Gln Ala Gly Asp
 210 215 220
 Asp Ser Asn Ser Asn Lys Lys Asn Ala Asp Leu Gln Val Leu Lys Pro
 225 230 235 240
 Glu Pro Glu Leu Val Tyr Glu Asp Leu Arg Gly Ser Val Thr Phe His
 245 250 255
 Cys Ala Leu Gly Pro Glu Val Ala Asn Val Ala Lys Phe Leu Cys Arg
 260 265 270
 Gln Ser Ser Gly Glu Asn Cys Asp Val Val Val Asn Thr Leu Gly Lys
 275 280 285
 Arg Ala Pro Ala Phe Glu Gly Arg Ile Leu Leu Asn Pro Gln Asp Lys
 290 295 300
 Asp Gly Ser Phe Ser Val Val Ile Thr Gly Leu Arg Lys Glu Asp Ala
 305 310 315 320
 Gly Arg Tyr Leu Cys Gly Ala His Ser Asp Gly Gln Leu Gln Glu Gly
 325 330 335
 Ser Pro Ile Gln Ala Trp Gln Leu Phe Val Asn Glu Glu Ser Thr Ile
 340 345 350
 Pro Arg Ser Pro Thr Val Val Lys Gly Val Ala Gly Gly Ser Val Ala
 355 360 365
 Val Leu Cys Pro Tyr Asn Arg Lys Glu Ser Lys Ser Ile Lys Tyr Trp
 370 375 380
 Cys Leu Trp Glu Gly Ala Gln Asn Gly Arg Cys Pro Leu Leu Val Asp
 385 390 395 400
 Ser Glu Gly Trp Val Lys Ala Gln Tyr Glu Gly Arg Leu Ser Leu Leu
 405 410 415
 Glu Glu Pro Gly Asn Gly Thr Phe Thr Val Ile Leu Asn Gln Leu Thr
 420 425 430
 Ser Arg Asp Ala Gly Phe Tyr Trp Cys Leu Thr Asn Gly Asp Thr Leu
 435 440 445
 Trp Arg Thr Thr Val Glu Ile Lys Ile Ile Glu Gly Glu Pro Asn Leu
 450 455 460
 Lys Val Pro Gly Asn Val Thr Ala Val Leu Gly Glu Thr Leu Lys Val
 465 470 475 480
 Pro Cys His Phe Pro Cys Lys Phe Ser Ser Tyr Glu Lys Tyr Trp Cys
 485 490 495
 Lys Trp Asn Asn Thr Gly Cys Gln Ala Leu Pro Ser Gln Asp Glu Gly
 500 505 510
 Pro Ser Lys Ala Phe Val Asn Cys Asp Glu Asn Ser Arg Leu Val Ser

515	520	525
Leu Thr Leu Asn Leu Val Thr Arg Ala Asp Glu Gly Trp Tyr Trp Cys		
530	535	540
Gly Val Lys Gln Gly His Phe Tyr Gly Glu Thr Ala Ala Val Tyr Val		
545	550	555
Ala Val Glu Glu Arg Lys Ala Ala Gly Ser Arg Asp Val Ser Leu Ala		
565	570	575
Lys Ala Asp Ala Ala Pro Asp Glu Lys Val Leu Asp Ser Gly Phe Arg		
580	585	590
Glu Ile Glu Asn Lys Ala Ile Gln Asp Pro Arg Leu Phe Ala Glu Glu		
595	600	605
Lys Ala Val Ala Asp Thr Arg Asp Gln Ala Asp Gly Ser Arg Ala Ser		
610	615	620
Val Asp Ser Gly Ser Ser Glu Glu Gln Gly Gly Ser Ser Arg Ala Leu		
625	630	635
Val Ser Thr Leu Val Pro Leu Gly Leu Val Leu Ala Val Gly Ala Val		
645	650	655
Ala Val Gly Val Ala Arg Ala Arg His Arg Lys Asn Val Asp Arg Val		
660	665	670
Ser Ile Arg Ser Tyr Arg Thr Asp Ile Ser Met Ser Asp Phe Glu Asn		
675	680	685
Ser Arg Glu Phe Gly Ala Asn Asp Asn Met Gly Ala Ser Ser Ile Thr		
690	695	700
Gln Glu Thr Ser Leu Gly Gly Lys Glu Glu Phe Val Ala Thr Thr Glu		
705	710	715
Ser Thr Thr Glu Thr Lys Glu Pro Lys Lys Ala Lys Arg Ser Ser Lys		
725	730	735
Glu Glu Ala Glu Met Ala Tyr Lys Asp Phe Leu Leu Gln Ser Ser Thr		
740	745	750
Val Ala Ala Glu Ala Gln Asp Gly Pro Gln Glu Ala		
755	760	
<210> 10		
<211> 120		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 10		
Met Pro Ala Cys Arg Leu Gly Pro Leu Ala Ala Ala Leu Leu Leu Ser		
1	5	10
Leu Leu Leu Phe Gly Phe Thr Leu Val Ser Gly Thr Gly Ala Glu Lys		

专利名称(译)	诊断或风险预测心力衰竭的方法和试剂		
公开(公告)号	CN103370619B	公开(公告)日	2016-01-20
申请号	CN201180056109.1	申请日	2011-11-25
[标]申请(专利权)人(译)	美艾利尔圣地亚哥有限公司		
申请(专利权)人(译)	美艾利尔圣地亚哥有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	美艾利尔圣地亚哥有限公司		
[标]发明人	威廉度德阿诺德 克里斯约斯特 柏林诺兰德 乔纳森加里 约瑟夫布鲁切尔 瓦斯王 斯科特哈瑞德荣吉尔 犹地坤麻威尔路德 科林第马瑞蒙斯		
发明人	威廉·度德·阿诺德 克里斯·约斯特 柏林诺·兰德 乔纳森·加里 约瑟夫·布鲁切尔 瓦斯·王 斯科特·哈瑞德·荣吉尔 犹地·坤麻·威尔路德 科林第·马瑞·蒙斯		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/6893 G01N2800/325 G01N2800/60		
审查员(译)	黄晓丽		
优先权	61/417851 2010-11-29 US 61/437609 2011-01-29 US		
其他公开文献	CN103370619A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明部分涉及发生心力衰竭的诊断，特别的，属于诊断表现正常尿钠肽水平的那些主体的心力衰竭。本发明也部分涉及主体的风险结果的判断（例如心功能恶化，死亡率，再次住院的危险）。这种方法包括对下列来自主体的样本进行下列生物标记物的一次或多分析，通过获得的结果给出诊断或风险，其中生物标记选自于WAP4C，ESAM,LTBR,Mesothelin和Syndecan-1。

10 20 30 40 50 60
MISLPGPLVT NLLRFLFLGL SALAPPSRAQ LQLHLPANRL QAVEGGEVVL PAWYTLHGEV
70 80 90 100 110 120
SSSQPWEVVF VMWFFKQKEK EDQVLSYING VTTSKPGVSL VYSMPSRNLS LRLEGLQEKD
130 140 150 160 170 180
SGPYSCSVNV QDKQGKSRGH SIKTLELNVL VPPAPPSRCL QGVPHVGANV TLSCQSPRSK
190 200 210 220 230 240
PAVQYQWDRQ LPSFQTFAP ALDVIRGSL S LTNLSSMAG VYVCKAHNEV GTAQCNVTLE
250 260 270 280 290 300
VSTGPGAAVV AGAVVGTLVG LGLLAGLVLL YHRRGKALEE FANDIKEDAI APRTLWPWKS
310 320 330 340 350 360
SDTISKNGTL SSVTSARALR PPHGPPRPGA LTPTFSLSSQ ALPSPRLPTT DGAHPQPISP
370 380 390
IPGGVSSSGL SRMGAVPMV PAQSQAGSLV

(SEQ ID NO: 3)