



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102334031 A

(43) 申请公布日 2012. 01. 25

---

(21) 申请号 200980145621. 6

(22) 申请日 2009. 12. 08

(30) 优先权数据

61/120, 795 2008. 12. 08 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 05. 11

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2009/067134 2009. 12. 08

(87) PCT申请的公布数据

W02010/077654 EN 2010. 07. 08

(71) 申请人 美艾利尔圣地亚哥有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 李席元

(74) 专利代理机构 浙江杭州金通专利事务所有

限公司 33100

代理人 徐关寿

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 18 页 附图 5 页

---

(54) 发明名称

组合的尿钠肽检测

(57) 摘要

本发明涉及诊断和评估与 BNP 相关的疾病的方法。特别的,用患者的样本为了分析是否存在多种尿钠肽或尿钠肽的含量和组合的尿钠肽结果作为一个诊断标记物质。

1. 一种实施对主体诊断的方法,包括:实施选自免疫检测群中的至少两个免疫检测,其中,基于从主体上获取的一个或多个样本进行的所述免疫检测群包括:

测试 BNP79-108 的免疫检测;测试 BNP3-76,但是不测试 BNP 的免疫检测;和测试 BNP3-108,但是不测试 BNP 的免疫检测;

从免疫检测的结果获得至少两个浓度值;其中免疫检测结果选自:实质指示 BNP 或 BNP79-108 的 NBP 浓度;实质指示 proBNP 或 BNP3-108 的 proBNP 浓度;和实质指示 NT-proBNP 或 BNP3-76 的 NT-proBNP 浓度;

获得一个组合的尿钠肽结果,该结果为以下至少两种所属浓度的函数:BNP 浓度, proBNP 浓度和 NT-proBNP 浓度;

对主体诊断进行组合的尿钠肽结果的校正,其中诊断主体包括存在肾脏功能障碍的诊断,不存在肾脏功能障碍的诊断,存在肺栓的诊断和不存在肺栓的诊断。

2. 如权利要求 1 的方法,其中所述的方法包括区分肾脏功能障碍和肺栓的诊断。

3. 如权利要求 1 的方法,其中用于测试 BNP79-108 的免疫检测为用一特异结合从 BNP 分子上脱落残基 77 和 78 后形成的构体的第一抗体和结合 BNP 和 BNP79-108 的第二抗体的三明治免疫检测。

4. 如权利要求 1 的方法,其中用于测试 BNP79-108 的免疫检测为两种抗体的三明治免疫检测,其中每一种抗体都结合 BNP 和 BNP3-108。

5. 如权利要求 1 的方法,其中用于测试 BNP3-108 但不测试 BNP 的免疫检测为用一特异结合从 proBNP 分子上脱落残基 1 和 2 后形成构体的第一抗体和结合 proBNP 和 BNP3-108 的第二抗体的三明治免疫检测。

6. 如权利要求 1 的方法,其中用于测试 BNP3-108 但不测试 BNP 的免疫检测用为两种抗体的三明治免疫检测,其中每一种抗体都结合 proBNP 和 BNP3-108。

7. 如权利要求 1 的方法,其中用于测试 BNP3-76 但不测试 BNP 的免疫检测为用一特异结合从 proBNP 分子上脱落残基 1 和 2 后形成的构体的第一抗体和结合 proBNP 和 BNP3-76 的第二抗体的三明治免疫检测。

8. 如权利要求 1 的方法,其中用于测试 BNP3-76 但不测试 BNP 的免疫检测用为两种抗体的三明治免疫检测,其中每一种抗体都结合 proBNP 和 BNP3-76。

9. 如权利要求 1 的方法,其中 BNP 的浓度通过免疫检测 BNP79-108 所获得的浓度中去除一个或两个 proBNP 和 BNP3-108 对 BNP79-108 浓度的贡献而计算获得的。

10. 如权利要求 1 的方法,其中 proBNP 的浓度通过免疫检测 BNP3-108 所获得的浓度中去除一个或多个 BNP, BNP79-108, NP-proBNP 和 BNP3-76 对 BNP3-108 浓度的贡献而计算获得的。

11. 如权利要求 1 的方法,其中 NP-proBNP 的浓度通过免疫检测 BNP3-76 所获得的浓度中去除一个或两 proBNP 和 BNP3-108 对 BNP3-76 浓度的贡献而计算获得的。

12. 如权利要求 1 的方法,其中该组合的尿钠肽结果是以下至少两个浓度的函数:BNP 浓度, proBNP 浓度和 NT-proBNP 浓度。

13. 如权利要求 12 的方法,其中该函数选自以下的比值:ProBNP 比 BNP 的比率, BNP 比 proBNP 的比率, BNP 比 NT-proBNP 的比率, NT-proBNP 比 BNP 的比率, proBNP 比 NT-proBNP 的比率,和 NT-proBNP 比 proBNP 的比率。

14. 如权利要求 9 的方法,其中 proBNP 比 BNP 的比率通过 BNP 的浓度来划分 proBNP 的浓度计算获得来提供组合的尿钠肽结果。

15. 如权利要求 9 的方法,其中 NT-proBNP 比 proBNP 的比率通过 proBNP 的浓度来划分 NT-proBNP 的浓度计算获得来提供组合的尿钠肽结果。

16. 如权利要求 2 的方法,其中组合尿钠肽的结果为 NTproBNP 对于 proBNP 的比率,该比率用实质表示 proBNP 或 BNP3-108 的 proBNP 浓度和实质表示 NT-proBNP 或 BNP3-768 的 NT-proBNP 浓度计算获得的,其中校正步骤包括将组合尿钠肽的结果与选择可以从肾功能障碍区分心脏衰竭的临界值进行比较。

17. 如权利要求 2 的方法,其中组合尿钠肽的结果为 NTproBNP 对于 proBNP 的比率,该比率用实质表示 proBNP 或 BNP3-108 的 proBNP 浓度和实质表示 NT-proBNP 或 BNP3-76 的 NT-proBNP 浓度计算获得的,其中校正步骤包括将组合尿钠肽的结果与选择的可以从肾功能障碍区分肺栓的临界值进行比较。

18. 如权利要求 2 的方法,其中组合尿钠肽的结果为 NTproBNP 对于 proBNP 的比率,该比率用实质表示 proBNP 或 BNP3-108 的 proBNP 浓度和实质表示 NT-proBNP 或 BNP3-76 的 NT-proBNP 浓度计算获得的,其中校正步骤包括将组合尿钠肽的结果与选择的可以从肾功能障碍区分肺栓和心脏衰竭的临界值进行比较。

## 组合的尿钠肽检测

### 技术领域

[0001] 本发明涉及用尿钠肽作为诊断和预后的标记物质。

[0002] 交叉引用

[0003] 本申请主张于 2008 年 12 月 8 日申请的美国临时申请, 号码 61/120, 795 的优先权, 在此作为全文引用成本发明的一部分。

### 背景技术

[0004] 以下关于发明背景技术的讨论仅仅为了帮助阅读者更好的理解本发明, 而不是对本发明的描述, 也不能被认为是对本发明的现有技术的描述。

[0005] 尿钠肽是一组自然产生的物质, 他们存在于身体内来对抗身体内的肾脏 - 血管紧张素系统的活动。在最近几年, 尿钠肽的测量已经引人注目地改变了心脏病的诊断和管理, 包括心衰和急性冠状综合症。特别的, B 型尿钠肽 (BNP-human precursor Swiss-Prot 人蛋白数据库 P 16860) 以及来源于人类前 -BNP (Pro-BNP) 的一些多肽都被用来诊断心衰, 检测心衰的严重性和用来评估心衰的预后症状。

[0006] 存在三种尿钠肽: 心房尿钠肽 (ANP), B 型尿钠肽 (BNP) 和 C 型尿钠肽 (CNP)。成熟的人类的 B 型尿钠肽 (BNP) (又称为脑钠肽) 具有 32 个氨基酸, 分子量为 4 千道尔顿 (4kDa) 的氨基酸序列, 它主要参与尿钠肽系统中来调节血压和体液平衡 (Bonow, R. O., Circulation 93:1946-1950, 1996)。BNP 的前体由 108 个氨基酸分子的合成, 称为前体 BNP (Pro-BNP), 它可以被水解成带有氮末端的 76 个氨基酸 (氨基酸 1-76), 称为 "NT-proBNP", 和 32 个成熟 32-氨基酸, 称为尿钠肽 (BNP-32) 或尿钠肽 32 (氨基酸 77-108)。已经表明 NT-pro-BNP, BNP-32, 和 BNP 前体 (pre-pro-BNP) 以及它们的一些片段可以在人类的血清中循环。参见 (Tateyama et al, Biochem. Biophys. Res. Commun. 185:760-7, 1992; Hunt et al, Biochem. Biophys. Res. Commun. 214:1175-83, 1995); 以及国际专利公开号码 W004/094459 和 W004094460, 它们中的每一个都被全部引入到本申请作为本发明的一部分。另外, BNP1-108 和 BNP77-108 的第一位置的 2 个残基可以通过水解或蛋白水解去掉, 从 BNP 的前体 (proBNP) 生成 BNP3-108 分子, 从 NT-proBNP 生成 BNP3-76 分子, 从 BNP 生成 BNP79-108 分子。检测和可以特异结合这些断列的构体的抗体可以被产生; 例如, 检测可以测定 BNP3-108, 而不能测定 proBNP (BNP1-108); 检测可以测定 BNP3-76 但是不能测定 NT-proBNP (BNP1-76); 和检测可以测定 BNP79-108, 而不能测定 BNP77-108。

[0007] 人类 108 个氨基酸的 BNP 前体 proBNP (BNP1-108) 的序列如下, 下画线为成熟的 BNP (BNP77-108) 序列

[0008] HPLGSPGSAS DLETSGLQEQ RNHLQGKLSE LQVEQTSLEP LQESPRPTGV 50 WKSREVATEG

[0009] IRGHRKVMVLY TLRAPRSPKM VQSGCFGRK MDRISSSSGL 100

[0010] GCKVLRRH 108

[0011] (序列 1).

[0012] BNP1-108 由更大的前体 pre-pro-BNP 合成, 该前体的序列如下 ("前体" 的学

列序列为粗体字母表示) : **MDPQTAPSRA LLLLLLFLHLA FLGGRS** HPLG SPGSASDLET  
SGLQEQRNHL 50

[0013] QGKLSSELQVE QTSLEPLQES PRPTGVWKS R EVATEGIRGH RKMVLYTLRA 100

[0014] PRSPKMQGS GCFGRKMDRI SSSSGLGCKV LRRH 134

[0015] (序列 2).

[0016] 另外,尿钠肽在患者中的水平可能被认为与肾功能障碍相关。为了响应心室的舒张而被释放的 BNP 可以引起血管舒张、阻止肾上腺皮质分泌醛固酮,和阻止肾脏分泌肾素(或高血压蛋白原酶或血管紧张肽原酶)。术语“心肾综合征”是指心脏与肾脏之间的生理关系,当主体遭受心脏衰竭的时候,这种生理关系表现出肾脏与心脏的紧密关系。虽然这些综合征仍然还不被完全理解,反馈回路循环已经被包含在神经系统(和,这些特殊的尿钠肽),炎症反应、结构和功能的肖弱组织器官中,同时产生的回路循环使对心脏和肾脏的功能更为恶化。最近关于心肾综合征的讨论可以在法国发表的文章中找到,题目:剧烈代谢失调的心衰:心肾综合征“列副临床期刊,2006 年 73 期(S2)8-13 页(“Acute decompensated heart failure: The cardiorenal syndrome,” Clev. Clinic J. Med. 73(S2):S8-S13, 2006)。

[0017] 另外,在患有静脉血栓栓塞疾病(VTED)的患者中尿钠肽的水平也可能被改变。静脉血栓栓塞疾病(VTED)表现出系列的型谱特征,他包括严重的静脉血栓症(DVT)和肺栓塞(PE)。通过年度跟踪调查,预计每年在 10 万人中有 117 人可能患有静脉血栓栓塞疾病。年发病率在 60 岁或者更老的人群中更高,这些年龄阶段的年发病率与年纪在 85 岁左右的人的发病率一样高,其中,85 岁年纪的年发病率为 10 万人中有 900 人患有静脉血栓栓塞疾病。思里沃尔泰等,国际医药期刊,1998 年,158 期,583-93 页(Silverstein et al, Arch. Intern. Med. 158:585-93, 1998)。导致静脉血栓栓塞疾病(VTED)发病的危险因素包括:年纪的增长,长期卧床不起,手术,恶性肿瘤、怀孕、含有雌性激素药物治疗(例如口服的口服避孕药物,激素治疗和三苯氧胺,它莫西芬(一种抗雌激素,用于治疗妇女乳腺癌或不育症)等),冲血性心脏衰竭、同型半胱氨酸、以及改变血液粘性的一些疾病(比如红细胞增多(症),镰状细胞(贫血)病或镰刀形红细胞(贫血)病(sickle cell disease),多发性骨髓瘤)、遗传性血栓形成缺陷。大约有 75%的 VTED 患者被确定具有以上至少一个危险因素。海特等,国际医药期刊,2002 年,162 期,1245-48 页(Heit et al, Arch. Intern. Med. 162:1245-48, 2002)。

## 发明内容

[0018] 本发明关于使用尿钠肽的检测从肺栓患者中区分出肾功能障碍和/或心衰患者。具有这些情况或疾病的人常常具有类似的明显症状,例如都有呼吸困难、心痛、咳嗽、水肿等。通过组合检测不同群体的与 BNP 相关的多肽获得的两个或更多的检测结果,可以让包括肾功能障碍和肺栓在内的疾病进行初步的鉴别诊断更为明确和清楚。

[0019] 本发明的第一方面,至少选自于由免疫检测组成的检测群体中的两个对来自主题样本的免疫检测,该检测群体包括以下免疫检测:被配置检测 BNP79-108 和可选的检测 BNP 本身(就是 BNP77-108)的免疫检测;被配置检测 BNP3-76 和可选的检测 BNP1-76 本身,但是不检测 BNP,的免疫检测;被配置检测 BNP3-108 和可选的检测 BNP1-108,但是不检测 BNP,

的免疫检测。这些免疫检测的结果被组合计算,组合计算的结果被用来诊断是否存在肾功能障碍,和 / 或是否存在肺栓,和 / 或是否存在心衰,和 / 或从心衰和 / 或肺栓的主体中区别出肾功能障碍。

[0020] 在以下更详细的描述中,检测是“被配置测试”一个特异的感兴趣的标记物质,如果哪个检测产生一个可以被测试的信号来表示与生理学相关联的标记物质浓度是否存在或者存在的量。这样的检测,可以是但不一定就必须是,特定检测某一种尿钠肽。因为一种抗体的抗原决定部位位于 8 个氨基酸上,所以免疫检测可以测试其它的多肽(例如相关的标记物质),只要这些其它的多肽包括有结合到抗体上的位点。那也就是说,检测 BNP79-108 的检测也可以检测 BNP, proBNP, 和 BNP3-108。

[0021] 在一个具体的实施例子中,检测 BNP79-108 可以被配置为用两个抗体来结合 BNP79-108 序列上位点的三明治的免疫检测。一种这样的检测可以利用特异结合从 BNP 分子上脱落残基 77 和 78 位点后形成的构体的第一抗体,利用既结合 BNP 又结合 BNP79-108 的第二抗体,这样的分析检测将不能检测前体 BNP (proBNP), BNP3-108 和 BNP3-76, 在这里定义为“BNP79-108 检测”。第二检测可以利用两个抗体,每一个抗体都结合 BNP 和 BNP79-108; 这样的检测也可以检测前体 BNP 和 BNP3-108, 这样的检测在这里定义为“BNP 检测”。

[0022] 在另一个具体的实施例子中,针对 BNP3-76 而不是 BNP 的检测也为两个抗体来结合 BNP3-76 序列上位点的三明治的免疫检测。一种检测利用特异结合从 NT-proBNP 分子上脱落残基 1 和 2 位点后形成的构体的第一抗体,可以同时结合 NT-proBNP 和 BNP-76 的第二抗体; 这样的检测将不会检测 proBNP, BNP, BNP79-108, 和 NT-proBNP, 这样的检测被定义为“BNP3-76 检测”。第二中检测利用两个抗体,每一个抗体都可以结合 NT-proBNP 和 BNP3-76, 这样的检测也可以检测 proBNP and BNP3-108, 这样的检测被定义为“NT-proBNP 检测”。

[0023] 在另一个具体的实施方式中,针对 BNP3-108 而不是 BNP 的检测也为两个抗体来结合 BNP3-108 序列上位点的三明治的免疫检测,其中至少其中一个抗体不会结合 BNP。一种这样的检测利用特异结合从 proBNP 分子上脱落残基 1 和 2 位点后形成的构体的第一抗体,第二抗体可以同时结合 proBNP 和 BNP3-108; 这样的检测将不会检测 proBNP, BNP, BNP79-108, 和 NT-proBNP, 这样的检测被定义为“BNP3-108 检测”。第二中检测利用两个抗体,每一个抗体都可以结合 proBNP 和 BNP-108, 这样的检测将不会检测 BNP, 这样的检测被定义为“proBNP 检测”。

[0024] 这样的检测按照这样选择,这样一个结果至少可以从以下两个检测结果的浓度而计算获得:可以实质表明 BNP 或 BNP79-108 的浓度(每一个浓度在这里被定义为“BNP 浓度”);可以实质表明 proBNP 或 BNP3-108 的浓度(每一个浓度在这里被定义为“proBNP 浓度”)或者度可以实质表明 NT-proBNP 或 BNP3-76 的浓度(每一个浓度在这里被定义为“NT-proBNP 浓度”)。

[0025] 使用的 BNP 或 BNP79-108 的“实质表明”浓度意思是指这个浓度已经通过去除 proBNP 或 BNP3-108, 和 NT-proBNP 或 BNP3-76 对该浓度贡献而被去卷积化(Deconvoluted)而得来的。在一个例子中,“BNP79-108 的检测”的结果可以直接使用,这是因为 proBNP, BNP3-108, NT-proBNP 和 BNP3-76 不再对这样分析结果做作贡献。在另一个例子中,“BNP 检测”的结果可以通过减去“proBNP 的检测”结果而被使用,同样,这也可以做 proBNP 贡献给 BNP 分析结果的校正。

[0026] 同样,使用的 proBNP 或 BNP3-108 的“实质表明”浓度意思在这里是指这个浓度已经通过去除 BNP 或 BNP79-108,和 NT-proBNP 或 BNP3-76 对该浓度贡献而被去卷积化 (Deconvoluted) 而得来的。使用的 NT-proBNP 或 BNP3-76 的“实质表明”浓度意思是这个浓度已经通过去除 proBNP 或 BNP3-108 和 BNP79-108 对浓度的贡献而被去卷积化 (Deconvoluted) 而得来的。

[0027] 然后,这些实质浓度被组合来确定一个“组合的尿钠肽结果”,它至少具有以下两个实质浓度的函数关系值:一个“BNP 浓度”,一个“proBNP 浓度”和一个“NT-proBNP 浓度”。在一个优选的例子中,一个函数关系值为:proBNP 比 BNP 的比率,BNP 比 proBNP 的比率,BNP 比 NT-proBNP 的比率,NT-proBNP 比 BNP 的比率,proBNP 比 NT-proBNP 的比率,或者 NT-proBNP 比 proBNP 的比率。这个比率,例如可以用来诊断是否存在 PE,是否存在肾脏功能障碍,是否存在心衰,和 / 或者,从肾脏功能障碍中区分出心衰和 / 或 PE。

[0028] 对本领域的人来讲,这种组合的尿钠肽结果可以通过多种方式被分析出来。例如,被获得的结果可以被用来与“正常”值的比较,或者与表示具有特种疾病或结果的值进行比较。特殊的诊断或预后可以基于每一个检测结果与这样的值比较,这样的值它可以代表诊断或预后的“极限值”。对诊断或 / 预后的灵敏度和特异性的检测不仅依靠每个检测的“质量”如何,他们也依靠什么是非正常结果的定义。实际上,可接受的工作特征 (Receiver Operating Characteristic) 曲线或“ROC”曲线是通过绘制可变的值相对于处于“正常”和“生病”人群的频率而获得的。对于一些特殊的标记物质,对于主题存在或不存在疾病的标记物质水平的分布将可能重叠。在这种情况下,一个检测将不可能具有 100% 的准确率来区分是否是正常或是否具有疾病。在重叠的地方就表明测试不能区分开正常和疾病。一个极限值就被选择,高于极限值 (或低于极限值,这也依靠一个标记物质如何随着疾病而改变) 的测试被认为是不正常的,同时,低于极限值的测试结果被认为是正常的。位于 ROC 曲线下的区域用来衡量这种可能性,这样该可接受的衡量将用来对一种情况的鉴别做出校正。这种方法是公知的方法,参见亨利等, X 射线科学, 1982 年, 143 期, 29-36 页 (Hanley et al., Radiology 143:29-36(1982))。

[0029] 一个可能的阳性比率、可能的阴性比率、比值比或者风险比可以被作为预报危险或诊断疾病的一个测试能力的衡量。在可能为阳性比率的情况下,值为 1 表示阳性结果在“患病”和“控制”人群中具有均等的机会存在,值大于 1 表示阳性结果更有可能存在于患病群体中,和值小于 1 表示阳性结果更有可能存在于控制群体中。在可能为阴性比率的情况下,值为 1 表示阴性结果在“患病”和“控制”人群中具有均等的机会存在,值大于 1 表示阴性结果更有可能存在于测试群体中,和值小于 1 表示阴性结果更有可能存在于控制群体中。在一个优选的方式中,一个极限值被选择用来从肾脏功能障碍中区分 PE 和或心衰,该极限值可以是:阳性或阴性可能比率至少大约为 1.5 或更大,或者大约为 0.67 或更小;更优选的,至少大约为 2 或更大,或者大约为 0.5 或更少;更优选的,至少大约为 5 或更大,或者大约为 0.2 或更小;更优选的,至少大约为 10 或更大,或者大约为 0.1 或更小;最优的,至少大约为 20 或更大,或大约为 0.005 或更小。术语“大约”在本申请中指给定值的上下 % 5 的范围内浮动。

[0030] 在比值比 (odds ratio) 的情况下,值为 1 表示阳性结果在“患病”和“控制”人群中具有均等的机会存在,值大于 1 表示阳性结果更有可能存在于患病群体中,和值小于 1 表

示阳性结果更有可能存在于控制群体中。在一个优选的方式中,一个极限值被选择用来从肾脏功能障碍中区分 PE 和 / 或心衰,该比值比可以是至少大约为 2 或更大,或者大约为 0.5 或更少,更优选的,至少大约为 3 或更大,或者大约为 0.33 或更少,更优选的,至少大约为 4 或更大,或者大约为 0.25 或更少,更优选的,至少大约为 5 或更大,或者大约为 0.2 或更少。术语“大约”在本申请中指给定值的上下%5 的范围内浮动。

[0031] 在危险比值 (Hazard ratio) 的情况下,值为 1 表示相对危险的终点 (例如死亡点) 在“患病”和“控制”人群中具有均等的机会出现,值大于 1 表示风险更有可能存在于患病群体中,和值小于 1 表示风险更有可能存在于控制群体中。在一个优选的方式中,一个极限值被选择来从肾脏功能障碍中区分 PE 和 / 或心衰,该危险比值可以是至少大约为 1.1 或更大,或者大约为 0.91 或更少,更优选的,至少大约为 1.25 或更大,或者大约为 0.8 或更少,更优选的,至少大约为 1.5 或更大,或者大约为 0.67 或更少,更优选的,至少大约为 2.5 或更大,或者大约为 0.4 或更少。术语“大约”在本申请中指给定值的上下%5 的范围内浮动。

[0032] 一般技术人员能够明白,诊断或预后的指示与诊断,或者与将来临床结果的预后或诊断风险是一个统计学的分析。例如,相对于那些标记物质的水平等于 X 或小于 X 的病人来讲,标记物质的水平大于 X 可的患者可以提示更有可能遭受不利的结果,这些由统计水平的显著性来决定。另外,标记物质浓度从基准水平的改变可能反应患者的预后,标记物质水平改变的程度可能与不利情况的严重程度相关。显著性统计经常通过比较两个或更多的人群来确定,并且确定一个置信区间 (confidence interval) 或者 a p 值。参见多瓦德和威尔顿,统计学研究,约汉·威力 & 孙,纽约,1983 (Dowdy and Wearden, Statistics for Research, John Wiley & Sons, New York, 1983)。本发明的最好的置信区间为 90%, 95%, 97.5%, 98%, 99%, 99.5%, 99.9% 和 99.99%, 同时最好的 p 值为 0.1, 0.05, 0.025, 0.02, 0.01, 0.005, 0.001, 和 0.0001。

[0033] 另一方面,本发明涉及一种选择治疗方案的方法。该方法优选的包括:执行本发明描述的诊断或预后方法,通过减少与诊断联系的一些不利后果来选择一个或多个治疗方案来提高患者的预后水平。本方法也可以被用来筛选一些可以如上描述提高患者预后水平的药物试剂。

[0034] 另一方面,本发明关于一种测试亚临床动脉硬化症和或主体遭受亚临床动脉硬化症的预后的试剂盒或装置。试剂盒包括执行本发明描述的这些检测方法的装置和试剂,和操作说明来指导如何检测。同样,试剂盒可以包括转换对于诊断或预后的标记物质的水平方式的一个或多个方式,比如一个参考的极限值来表示特殊的诊断或预后。这样的盒子最好包括足够的试剂来执行一个或多个这样的测定,和 / 或 FDA 批准的标签。

## 附图说明

[0035] 图 1.1A 和 1B 描述的从个体尿钠肽 (proBNP, BNP, 和 NT-proBNP) 检测结果,和在正常和患病人群中计算出来的组合尿钠肽检测结果的 ROC 数据。

[0036] 图 1.2A-2E 描述的从个体尿钠肽 (proBNP, BNP, 和 NT-proBNP) 的检测,和在正常和患病人群中计算出来的组合尿钠肽检测结果从获得的柱状图。在图 2A, 2B, 和 2C 中,在 Y 轴上的数字为单位为 pg/ml 的 proBNP 的浓度。在图 2D 和 2E, Y 轴上的数字表示 BNP 比

proBNP 的比值 (图 2D) 和 NT-proBNP 比 proBNP 的比值 (图 2E)。

[0037] 本发明的详细描述

[0038] 根据本发明的描述,提供方法和试剂来进行鉴别和使用与诊断、预后相关的标记物质,或者与 BNP 相关联的不同情况的区分。至少两种免疫检测从以下检测群中选择,该检测群包括:配置检测 BNP79-108 的免疫检测;配置检测 BNP3-76,但是不检测 BNP 的免疫检测;和配置检测 BNP3-108,但是不检测 BNP 的免疫检测;这些检测可以在来自主体的样本上进行。这些免疫检测的结果被组合计算,和这些组合计算的结果被用来进行是否存在肾脏功能障碍的诊断、和 / 或被用来进行是否存在 PE 的诊断,和 / 或,被用来从 PE 的主体中区分出肾脏功能障碍的诊断。

[0039] 通过这里的描述,测试 BNP79-108 的检测,例如用两种结合存在于 BNP79-108 分子序列上的抗原决定位点的抗体的三明治免疫检测,这种三明治免疫检测方法也可以测试其他与 BNP79-108 相关的标记物质。一抗体的抗原决定基 / 决定位点位于 8 个氨基酸上,因此,免疫测定将可以测试其它的多肽 (比如相关的标记物质),只要该其它的多肽具有必须结合用来检测的抗体上的抗原决定位点。因此,这样的测试也可以,但不一定必须是,测试 BNP, proBNP, BNP3-108 以及一些可以提供抗体结合位点特性的片段。例如,一种检测,可以利用特异结合从 BNP 上脱落的 77 和 78 位点的残基的第一抗体,和可以既结合 BNP 有又结合 BNP79-108 的第二抗体,但是这种检测将不测试 proBNP, BNP3-108, NT-proBNP 和 BNP3-76。利用两种抗体的检测,其中每一种抗体既结合 BNP 又结合 BNP79-108,这种检测也可以测试 proBNP 和 BNP3-108。每一个检测就是“检测 BNP79-108 的检测”。

[0040] 同样,测试 BNP3-76,但不是 BNP 的检测,例如,用两种结合存在于 BNP3-76 序列上的位点的抗体的三明治免疫方法,也可以,但并不是必须的,测试其他与 BNP3-76 相关的,可以提供抗体结合位点的标记物质。在一个例子中,一种检测,用一种可以特异结合从 NT-proBNP 上脱落的 1 和 2 位点的残基的第一抗体,用可以结合 NT-proBNP 和 BNP3-76 的第二抗体;这样的检测不可以测试 proBNP, BNP, BNP79-108 和 NT-proBNP。在另一个例子中,利用两种抗体的检测,其中每一种抗体可以结合 NT-proBNP 和 BNP3-76,这样的检测也可以测试 proBNP 和 BNP3-108。每一个检测就是“测试 BNP3-76 而不是 BNP 的检测”。

[0041] 同样,测试 BNP3-108,但不是 BNP 的检测,例如,用两种结合存在于 BNP3-108 序列上的位点的抗体的三明治免疫方法,但是至少有一种抗体不结合 BNP,这种抗体也可以,但并不是必须的,测试其他与 BNP3-108 相关的,可以提供抗体结合位点的标记物质。在一个这样的检测中,用一种可以特异结合从 proBNP 分子上脱落的 1 和 2 位点的残基的第一抗体,用可以同时结合 NT-proBNP 和 BNP3-76 的第二抗体;但是这样的检测可以不测试 BNP, BNP79-108 和 NT-proBNP。在第二种检测中,利用两种抗体来测试,其中每一种抗体可以结合 proBNP 和 BNP3-108,但是这样的检测不可以测试 BNP 和 BNP79-108。每一个检测就是“测试 BNP3-108 而不是 BNP 的检测”。

[0042] 用这样的这些检测,一个“实质表示”BNP 或者 BNP79-108 的浓度可以被计算出。在一个例子中,“BNP79-108 的检测”结果可以被直接使用,因为 proBNP, BNP3-108, NT-proBNP 和 BNP3-76 的浓度不会对该检测结果有贡献。在另一例子中,包括了 proBNP 和 BNP3-108 的浓度贡献的“BNP 的检测”结果可以通过减去检测 BNP3-108 而不是 BNP 的检测结果,同样,这样可以做与 proBNP 关联的对 BNP 检测结果的贡献的校正,这样就是“去卷积化”的 BNP 检

测。在这里，“实质表示”BNP 或者 BNP79-108 检测结果被定义为“BNP 的浓度”。

[0043] 同样，一个“实质表示”proBNP 或者 BNP3-108 的浓度可以被计算出。在一个例子中，“BNP3-108 的检测”结果可以被直接使用，因为 BNP，BNP79-108，NT-proBNP 和 BNP3-76 的浓度不会对该检测结果有贡献。在另一例子中，包括了 NT-proBNP 和 BNP3-76 的浓度贡献的“BNP1-108 的检测”的结果可以通过减去检测 BNP3-76 而不是 BNP 的检测结果，同样，这样可以做与 NTproBNP 关联的对 BNP1-108 检测结果的贡献的校正。在这种方式中，“实质表示”proBNP 或者 BNP3-108 检测结果被定义为“proBNP 的浓度”。和，一个“实质表示”NT-proBNP 或者 BNP3-76 的浓度可以被直接测量或通过从检测每一个尿钠肽形式的检测结果中去除 proBNP 或 BNP3-108，和 BNP 或 BNP79-108 对该检测结果的贡献而计算出来。在这种方式中，“实质表示”NTproBNP 或者 BNP3-76 检测结果被定义为“NTproBNP 的浓度”。

[0044] 这些实质浓度然后被用来成为一个“组合的尿钠肽结果”，它为以下至少两个浓度的函数值：一个“BNP 的浓度”，一个“proBNP 浓度”和一个“NTproBNP 浓度”。在一些优选的方式中，这样的函数值可以是 proBNP 比 BNP 的一个比率，BNP 比 proBNP 的一个比率，BNP 比 NT-proBNP 的一个比率，NT-proBNP 比 BNP 的一个比率，proBNP 比 NT-proBNP 的一个比率，或者 NT-proBNP 比 proBNP 的一个比率。同本领域内至少的标准化方法学一样，这些组合的尿钠肽结果可以作为诊断或预后的标记物质。

[0045] 定义

[0046] 术语“标记物质”在这里指蛋白，多肽，磷脂或者从主体上获得样本中的目的小分子。在本发明中，作为标记物质的“蛋白或多肽”可以包括任何他们的片段，特别的，可以用免疫分析方法分析的，可被检测的任何片段。例如在“组合尿钠肽结果”的情况下，“标记物质”可以起源于对一些单独的标记物质的测量。

[0047] 术语“关联标记物质”在这里是指某个特殊标记物质的一个或多个片段，或者生物合成某个特殊标记物质的父母物质，这些父母物质可以作为该标记物质本身的替代物，或者作为单独的标记物质。例如，人类 BNP 是起源于前体 108 个氨基酸蛋白分子水解而来的，在以下都指 BNP1-108。成熟的 BNP 或者“BNP 尿钠肽”或“BNP32”为 32 个氨基酸，代表前体蛋白分子上 77-108 位点之间的氨基酸序列，它可以表示为 BNP77-108。这些剩余的 1-76 在这些被称为 BNP1-76。这里大部分标记物质都是由更大的前体分子合成的，这些分子又被处理来提供成熟的标记物质，和 / 或在循环中以标记物质的片段的形式存在。这样，与这里描述的标记物质的“关联标记物质”可以被区分识别，也可以与上面描述的 BNP 的类似物质使用。另外，关联的标记物质可以是母标记物质经过共价修饰的结果，例如通过蛋氨酸，甲硫氨酸残基，泛素化 (ubiquitination) 等的氧化作用。

[0048] 术语“样本”在这里是指为了诊断、预后或评估使用而从主体，例如病人，上获得的体液样本。在一些实施方式中，样本可以为了测定正在发生的情况或针对情况进行治疗的结果为目的而被获得。优选的样本为全血，血清，血浆，脑脊髓液，尿液体，唾液，痰液，胸腔积水。另外，任何一个本领域的一般技术人员都可以认识到，一些样本都可以经过分离，纯化过程而被获得，例如从全血中分析血浆或血清。

[0049] 在这里使用的“多数”是指至少两个。优选的，多数是指至少 3 个或，更优选的为至少 5，甚至更多为至少 10，甚至至少为 15，最优选的为至少 20。在一个更优选的方式中，多数代表更大的数量，例如至少为 100。

[0050] 术语“主体”在这里是指人类或非人类的有机体。这样,本发明的方法和试剂都可以在人类或动物疾病中运用。进一步,尽管一个优选的方式中的主体最好为活体有机体,当然本发明也可以被使用在死后的尸体检测中。优选的“主体”为病人或患者,例如活着的接受药物治疗的人类。这也包括为了病理学信息而被调查的没有明显疾病的人。在本发明的一个案例中,优选的主体为了评估是否存在亚临床的动脉硬化症一些个体,他们并不表现出临床症状,最优选的,这些个体不表现出胸痛或 EGG 改变,没有稳定的绞痛反应,不稳定的绞痛反应和 / 或心肌梗塞。优选的主体为了那些为了预兆性评估的个体,他们不表现出临床症状,最优选的不具有胸痛或 EGG 改变,不表现出稳定的绞痛,不稳定的绞痛和 / 或不表现心肌梗塞,但是他们可以被用来进行亚临床的动脉硬化症诊断。

[0051] 术语“诊断”在这里是指一些方法,普通的一般技术人员可以通过该方法来进行评估或决定一个患者是否遭受给定的疾病或情况。该熟练的技术人员经常安排一些针对一个或多个诊断指示剂的诊断,例如标记物质,存在,不存在,数量或数量的变化,这些可以反应该情况是否存在,以及严重程度。

[0052] 同样,“预后”指一种给定的结果或过程发生的可能性。这经常通过检查一个或多个预后指示试剂来测定。这些标记物质,在患者中(从患者中的样本上)存在的数量或是否存在,提供一个信号的可能性来表示给定的过程或结构是否会发生。例如,当一个或多个从患者中取出的样本中的预后指示试剂达到一个足够高的水平的时候,该信号特征指示该患者,相对于那些底水平的患者来讲,有更大的可能性来体验将来的打击。预后指示试剂的水平或水平的改变,它又反过来与不健康或死亡的可能性联系,是指作为“对于不利结果具有更容易患病的体质相联系”。

[0053] 术语“校正”,作为诊断或预后标记物质的参考,在这里指把患者的标记物质的存在或数量与那些已经知道遭受给定情况,或已经知道处于危险的人进行比较,或者与那些已经知道没有给定情况的人进行比较。如上面的讨论,在一个患者样本中的标记物质的水平可以与已经知道与特殊诊断标记物质的水平进行比较,也就是,普通的技术人员可以使用该标记物质的水平来确定患者是否需要特殊方式的诊断,以及响应的反应。可选的,该样本中的标记物质的水平可以与已经知道具有好的情况(例如不存在疾病等)的标记物质的水平进行比较。

[0054] 术语“决定诊断”在这里指普通的技术人员通过这些方法可以决定患者是否存在某种疾病。术语“诊断”不是指 100% 的准确决定是否存在某种疾病的能力,或者也不是指一个给定的过程或结果相对没有的情况下更有可能发生的能力。相反,普通的技术人员可以理解该术语“诊断”是指某种疾病是否存在患者中的增加的可能性。一个优选的方式中,诊断表示一种疾病被增加了 5% 的机会存在,大约 10% 的机会,大约 15% 的机会,大约 20% 的机会,大约 25% 的机会,大约 30% 的机会,大约 40% 的机会,大约 50% 的机会,大约 60% 的机会,大约 75% 的机会,大约 90% 的机会和大约 95% 的机会存在。术语“大约”在本发明中指正负 2% 的范围内变化。

[0055] 同样,术语“决定预后”在这里指普通的技术人员通过这些方法可以决定患者在将来可能出现一个或多个临床结果的可能性。普通的技术人员可以理解该术语“预后”是指某种临床结果在将来某天发生的被增加的可能性。一个优选的方式中,预后表示一种临床结果,相对于“控制”人群来讲,被增加了 5% 的机会,大约 10% 的机会,大约 15% 的机会,大

约 20% 的机会, 大约 25% 的机会, 大约 30% 的机会, 大约 40% 的机会, 大约 50% 的机会, 大约 60% 的机会, 大约 75% 的机会, 大约 90% 的机会和大约 95% 的机会。术语“大约”在本发明中指正负 2% 的范围内变化。

[0056] 术语“肾衰竭”在这里指主体属于或者在 48 小时内有增加的危险性具有剧烈的肾伤害程度的等级划分, 在梅思特等中 (Mehta et al., Crit. Care 11 :R31 (doi :10.1186.cc5713), 2007) 中有具体的描述, 再次作为全部引用:

[0057] “阶段 I”: 血清中肌氨酸酐增加到等于或大于 0.3mg/dL ( $>$ ; 26.4 微摩尔 / 升 26.4  $\mu$ mol/L), 或者血清中肌氨酸酐增加到等于或大于基线尿液的 150% (1.5 倍) 以上, 基线尿液输出量一般在 6 小时内少于 0.5 毫升 / 小时。

[0058] “阶段 II”: 血清中肌氨酸酐增加到等于或大于基线尿液的 200% (2 倍) 以上, 基线尿液输出量一般在 12 小时内少于 0.5 毫升 / 小时。。

[0059] “阶段 III”: 血清中肌氨酸酐增加到等于或大于基线尿液的 300% (3 倍) 以上, 基线尿液输出量一般在 24 小时内少于 0.5 毫升 / 小时或者无尿液达 12 小时。

[0060] 术语“心力衰竭”在这里是指一个主题属于美国心脏病学院 / 美国心脏心力衰竭组织在关于它的分级表 (亨式等人在“ACC/AHS2005”上发表的关于诊断和管理心力衰竭中) (Chronic Heart Failure in the Adult, " Circulation 112(12) :e154-235 (doi : 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.167586), 2005 ;)

[0061] 阶段 A : 患者在将来具有发生心力衰竭的高危险性, 但是没有功能或结构的失调。

[0062] 阶段 B : 心脏结构失调, 但是在任何阶段没有征兆出现。

[0063] 阶段 C : 在具有心脏结果问题下具有早期的或当前的心力衰竭征兆, 但是还是可以通过药物治疗。

[0064] 阶段 D : 更高级的需要医院基础支持, 心脏移植或减轻痛苦的疾病。

[0065] 术语“肺塞”这里所用的一个主题是指患了肺动脉或者他的一个分之发生血管堵塞, 通常发生时 (血液从静脉血栓) 静脉血栓成为赶出其形成和血栓化从而在肺部的一动脉的血液供应。

[0066] 所谓“不连续或离散”, 在这里是指不连续表面的区域。也就是说, 两个区域是彼此分离的, 如果不属于任何一个领域的一部分的边界完全围绕着这两个区域。所谓“可以独立寻址”这里所用的指的是从离散的表面区域可以获得一个特定的信号。

[0067] 所谓“抗体”, 是指在这里是指模仿或实质上由免疫球蛋白基因或免疫球蛋白基因编码的肽或多肽, 以及他们的片段, 这些抗体具有特异性结合抗原或抗原表位的能力。参见以下参考文献: W·E·鲍威尔等的《基础免疫学》(第 3 版本), 纽约 1993 年 Raven 出版 (Fundamental Immunology, 3rd Edition, W.E. Paul, ed., Raven Press, N.Y. (1993)); 威尔逊等的 1994 年的《免疫方法》175 卷: 267-273 (Wilson (1994) J. Immunol. Methods 175 :267-273); 亚麻式的《生物生理学方法杂志》, 1992 年, 25 卷, 85-97 页 (Yarmush (1992) J. Biochem. Biophys. Methods 25 :85-97.)。术语“抗体”包括抗原 - 结合部分, 例如“抗原结合位点”(例如一些片段, 或者子序列或一些具有结合抗原能力的互补决定区 (CDRs)), 包括 (i) Fab 片段, 一个由 VL, VH, CL and CH1 区组成但价片段; (ii) 2 个 F(ab') 片段, 一个二价的片段包括在铰链区域通过二硫化合物连接的两个片段; (iii) 包括 VH 和 CH1 区域的 Fd 片段; (iv) 包括抗体单个臂状 VL 和 VH 区域的 Fv 片段; (v) 包括有 VH 区域的 dAb 片段

(Ward et al., (1989) Nature 341 :544-546) 和 (vi) 单独的互补决定区 (CDR). 单链抗体物质也被包括在本发明的术语所定义的“抗体”中。

[0068] 术语“特异性结合”没有任何意图表示一个抗体专有地结合目标物质。更合适的, 如果抗体对于目标物质的亲和力大约为 5-4 倍于该抗体与非目标物质的之间的亲和力就认为该抗体为“特异性地结合”。优选的, 相对与抗体与非目标物质的亲和力而言, 抗体与目标物质的亲和力至少为 5 倍, 优选的为 10 倍, 更优选的为 25 倍, 甚至更优选的为 50 倍, 最优选的为 100 倍或更大。在有些优选的方式中, 抗体或其它结合物质和抗原之间的特异结合意思是指他们之间至少为  $10^6\text{M}^{-1}$  结合亲和力, 优选的大约为  $10^8\text{M}^{-1}$  与大约  $10^9\text{M}^{-1}$  之间; 大约  $10^9\text{M}^{-1}$  与大约  $10^{10}\text{M}^{-1}$  之间, 或者大约  $10^{10}\text{M}^{-1}$  与大约  $10^{11}\text{M}^{-1}$  之间。

[0069] 亲和力通过如下公式计算:  $K_d = k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$  ( $k_{\text{off}}$  为分裂速度常数,  $k_{\text{on}}$  为结合速度常数和  $K_d$  为平衡常数). 亲和力可以通过在平衡状态下测定不同浓度情况下被标记的配合基的小片段结合数。该数据通过斯卡恰特 (Scatchard equation) 方程式做图:  $r/c = K(n-r)$  :

[0070]  $r$  = 在平衡状态下, 被结合的配合基的摩尔数 / 接受体的摩尔数 ;

[0071]  $c$  = 在平衡状态下的自由的配合基的浓度 ;

[0072]  $K$  = 平衡常数 ;

[0073]  $n$  = 每一个接受分子所结合的配合基的数量

[0074] 通过作图分析,  $r/c$  的值被绘制在 Y 轴上,  $r$  被绘制在 X 轴上, 这样就形成了斯卡恰特图。亲和力就是所做图线条的负斜率 (negative slope of the line),  $k_{\text{off}}$  可以通过结合的标记的配合基与非标记的过量的配合基的竞争而测试到 (参见例如美国专利号码 6, 316, 409)。对于目标分子的目标试剂的亲和力至少为  $1 \times 10^{-6}$  摩尔 / 升, 更优选的为至少大约  $1 \times 10^{-7}$  摩尔 / 升, 更优选的为至少大约为  $1 \times 10^{-8}$  摩尔 / 升。甚至更优选的为至少大约  $1 \times 10^{-9}$  摩尔 / 升和更优选的为至少大约  $1 \times 10^{-10}$  摩尔 / 升。通过斯卡恰特 (Scatchard equation) 方程式来测定抗体的亲和力是本领域已知道的技术。参见皖易科等, 免疫杂志, 1991 年, 12 期 :425-43 (van Erp et al., J. Immunoassay 12 :425-43, 1991;) 和纳尔逊和勾威沃特, 生物群计算机程序方法, 1988 年, 27 期 65-8, (Nelson and Griswold, Comput. Methods Programs Biomed. 27 :65-8)。

[0075] 衡量测试的准确性可以参照非希尔等的《重病特别护理》, 2003 年 29 期 1043-51 页 (Fischer et al., Intensive Care Med. 29 :1043-51, 2003) 上具体详细的方法和使用他来测试一个给定的标记物质或多个标记物质的效果。这些衡量包括特异性, 灵敏性, 先兆性预测价值以及相似的比率, 诊断比值比和 ROC 曲线区域。正如上面的描述, 最好的测试和检测表现出一个或多个以下描述的结果 :

[0076] 至少有 75% 的灵敏度, 同时具有 75% 的特异性 ;

[0077] 至少 0.6 的 ROC 曲线区域, 优选的为 0.7, 更优选的为 0.8, 更优选的为至少 0.9, 更优选的为至少 0.9 和最优选的为 0.95 的 ROC 曲线区域 ; 和 / 或阳性可能比率 (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, 和阴性可能比率 ((1- 灵敏度) / 特异性) 小于或等于 0.3, 最好的为小于或等于 0.2, 和最优选的为小于或等于 0.1。

[0078] 分析测量策略

[0079] 各种各样的方法和装置都可以被运用到本发明中来测试和分析标记物质。对于患者样品中的多肽或蛋白, 免疫分析装置和方法被经常使用到。这些参见美国专

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, 以上所列举的每个在这里包括所有的表, 图和权利要求被全部引用并与本发明构成一体。这些装置和方法可以利用标记的分子进行三明治、竞争或非竞争检测模式, 产生一个与感兴趣的被分析物质存在或数量相关的信号。另外, 这样的方法和装置, 例如生物传感器、光学免疫分析也可以被用来测试被分析物质的存在或数量而不需要标记分析。见美国专利 5, 631, 171 和 5, 955, 377, 以上所列举的每个专利的全部, 包括所有的表, 图和权利要求, 在这里被全部引用并与本发明构成一体。本技术领域的一般技术人员可以认识到, 一些自动设备, 包括但不限于, 贝壳曼设备 (BECKMAN), 雅培的 AxSYM, 罗式的 ElecSys, 宝林曼状态系统 (Stratus systems) 都属于免疫分析仪器, 他们也可以实现本发明所教导的免疫检测。

[0080] 更好的, 利用免疫法分析本发明的标记物质和方法, 更优选的使用三明治方法, 尽管其他的方法也是本领域知晓的 (例如分析 RNA 水平的分析)。通常, 一个标记物质的存在或数量使用特异结合每一个标记物质的抗体来测试特异的结合而检测。任何合适的免疫分析都可以被使用, 例如酶联免疫 (ELISA), 放射免疫方法 (RLAs), 竞争结合分析以及类似的方法。特异结合抗体的免疫可以被直接或检测的测试。直接的标记包括荧光、发光元件, 金属, 颜料, 放射性核酸以及类似的直接与抗体连接。非直接的标记包括本领域熟悉的酶类, 例如碱性的磷酸酶, 辣根过氧化酶以及类似的。

[0081] 使用固定的特异结合抗体的方法在本发明也是可行的。这些抗体可以被固定在很多种支撑介质, 例如磁性或层析矩阵微粒, 测试盘子的表面 (例如微孔), 或者固体基体材料上或膜上 (例如塑料, 尼龙或纸上) 或者与他们类似的材料上。一分析试剂条可以通过处理抗体或多个抗体在固体表面上而被准备。该试剂条然后可以被插入到样本中, 进行快速的冲洗和检测步骤来产生一个信号, 例如一个带有颜色的点。

[0082] 为了分开或连续检测标记物质, 合适的设备包括临床使用的分析仪, 例如 ElecSys (罗式), the AxSym (雅培), the Access (Beckman), 以及商标为 ADVIA® CENTAUR® (Bayer) 的免疫分析系统, 商标为 NICHOLS ADVANTAGE® (Nichols Institute) 的免疫分析系统等等。更优选的设备使用单个检测装置来执行多个标记物质的分析。特别的, 使用具有不连续的, 可以地址化的物理格式表面来进行多种不同被分析物质的检测。这样的设备可以包括蛋白微分析仪或“蛋白芯片”(例如参见 Ng and Hag, J. Cell Mol. Med. 6 : 329-340 (2002)) 和这样的毛细装置 (见美国专利 6, 019, 944)。在这些实施方式中, 每一个不同的位置上的独立的表面可以包括固定一个或多个被分析物质 (例如一标记物质) 的抗体来在每个位置上进行测试。表面也可选的包括一个或多个不同的微粒 (例如微粒子或纳米粒子), 他们被固定在表面上的不同位置, 这样包括有抗体的微粒子可以为了测试而固定一个被分析物质 (例如标记物质)。

[0083] 为了一个或多个检测, 本发明的检测装置也包括被共扼到固体相上的第一抗体和被共扼有信号发生元件的第二抗体。如此的检测装置被利用来进行三明治免疫分析一个或多个被分析物质。这些装置可以还包括一个样本施加区域和从样本施加区域流动到第二个检测装置区域的流动路径, 第二个检测装置区域包括被共扼到固体相上的第一抗体。

[0084] 随着样本沿着流动路径被驱使而被动的流动 (例如通过毛细压力, 流体静力学或其他的一旦样本被施加就不需要再操作的压力), 主动的流动 (例如通过机械泵产生的压

力,电子泵,地心引力,被增加的空气压力等等),或者被动或主动方式的结合的驱使压力。更优选的,样本被施加到样本施加区域上,沿着流体路径将接触被共扼到固体相上的第一抗体和被共扼有信号发生元件的第二抗体(三明治检测模式)。另外的,装置还可以包括从全血中过滤分离血清或血浆,包括混合腔体等等,或者由于工艺要求而被包括到装置上。更优选的装置包括在《免疫测定手册》的第41章,题目为“近患者测试:商标为 Triage®的心脏病系统,作者戴维等等,自然出版集团,2001(Near Patient Tests:Triage® Cardiac System,”in *The Immunoassay Handbook*, 2<sup>nd</sup> ed., David Wild, ed., Nature Publishing Group, 2001)。该文章的全部作为本发明的一部分被引用。

[0085] 标记物质的分析可以通过不同的物理模式被检测分析。例如,使用微量盘或者自动控制可以被使用来加快检测大量样本的进程。可选的,单个样本的模式也可以发展而被用来进行快速治疗或诊断,例如在紧急运输或急诊室里。

[0086] 在另一个方式中,本发明也提供一个分析标记物质的试剂盒子。这样的盒子包括装置和为了分析至少一个测试样本的试剂以及如何进行检测的说明书。当然,该盒子也可以包括利用这些从标记物质面板上的免疫检测而获得的信息进行某种治疗的一个或多个手段。或者其他的可以执行本发明所描述方法的测定策略,包括层析(例如高效液相色谱分析 HPLC),质谱测量,基于受体的检测和以上方式的结合。

[0087] 检测的临床灵敏度被定义为这种检测可以正确预测具有某种疾病的百分数,特异性被定义为这种检测可以正确预测不具有某种疾病的百分数(*Tietz Textbook of Clinical Chemistry*, 2nd edition, Carl Burtis and Edward Ashwood eds., W. B. Saunders and Company, p. 496)。衡量测试的准确性可以参见《重病特别护理》(Fischer et al., *Intensive Care Med.* 29:1043-51, 2003)所描述的方法而得到,也被用于来测定一个给定标记物质或多个标记物质的效力。这种测定包括灵敏度,特异性,先兆性值,可能的比率,诊断让步比(diagnostic odds ratios),和 ROC 曲线区域。正如上面的讨论,优选的测试和检测表现出一个或多个如下不同测试的结果:

[0088] 从主体具有肾功能衰竭从区分肺栓的能力,具有阳性或阴性让步比分别为至少 1.5 或者更大,或者大约 0.67 或更小;优选的,至少为 2 或更大;或大约 0.5 或更小;仍然更优选的,至少为 5 或更大;或大约 0.2 或更小;甚至更优选的为至少 10 或更大;或大约 0.1 或更小;最优选的为至少 20 或更大;或大约 0.05 或更小。术语“大约”在这里指正负给定测量值的 5% 上下浮动。

[0089] 从主体具有肾功能衰竭从区分肺栓的能力,具有让步比至少为 2 或者更大,或者大约 0.5 或更小;优选的,至少为 3 或更大;或大约 0.33 或更小;仍然更优选的,至少为 4 或更大;或大约 0.25 或更小;甚至更优选的为至少 5 或更大;或大约 0.2 或更小;最优选的为至少 10 或更大;或大约 0.1 或更小。术语“大约”在这里指正负给定测量值的 5% 上下浮动。

[0090] 从主体具有肾功能衰竭从区分肺栓的能力,具有危险率至少为 1.1 或者更大,或者大约 0.91 或更小;优选的,至少为 1.25 或更大;或大约 0.8 或更小;仍然更优选的,至少为 1.5 或更大;或大约 0.67 或更小;甚至更优选的为至少 2 或更大;或大约 0.5 或更小;最优选的为至少 2.5 或更大;或大约 0.4 或更小。术语“大约”在这里指正负给定测量值的 5% 上下浮动。

**[0091] 抗体的选择**

**[0092]** 抗体的选择和产生可以采用多种方法。例如,一种方法就是纯化感兴趣的多肽或者合成感兴趣的多肽。例如利用本领域知晓的固相氨基酸合成方法,例如参见 M·D 谢尔河等的《蛋白纯化指南》,酶联免疫方法 (1990),182 卷 (Guide to Protein Purification, Murray P. Deutcher, ed., Meth. Enzymol. Vol 182(1990)); G·B 菲尔德等的《氨基酸固相合成》,酶联免疫方法 (1997),289 卷 (Solid Phase Peptide Synthesis, Greg B. Fields ed., Meth. Enzymol. Vol 289(1997)); 科所等的《医药化学杂志》(日本东京)(1990),38:1192-99(Kiso et al, Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)38:1192-99,1990); 莫思多等的《生物多肽,蛋白,核酸》(1995)1:255-60(Mostafavi et al, Biomed. Pept. Proteins Nucleic Acids 1:255-60,1995); 富基瓦等的《医药化学杂志》(日本东京)(1990),38:1192-99(Fujiwara et al, Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)44:1326-31,1996)。选择的多肽可以被注射到例如老鼠或兔子中去产生多克隆的或单克隆抗体。任何本领域的技术人员都可以知道很多公知的方法可以产生抗体,例如在爱底华·哈落,大卫·兰顿编写的《抗体·实验手册》(1998),冷春海港,纽约 (Antibodies, A Laboratory Manual, Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory(1988), Cold Spring Harbor, N. Y.)。本领域的一般技术人员可以知道抗体的结合片段或 Fab 片段的模仿也可以通过基因信息等制造(例如丽巴等的《抗体工程》:牛津大学出版社(1995)的实际操作指南:免疫杂志,149,3914-3920 (Borrebaeck, C, ed.), 1995, Oxford University Press, Oxford; J. Immunol. 149,3914-3920(1992))。

**[0093]** 另外,也有很多种报告使用抗菌素显示技术来生产和识别多肽文库从而通过结合筛选出目标抗体(参见 Cwirla et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 87,6378-82,1990; Devlin et al., Science 249,404-6,1990, Scott and Smith, Science 249,386-88,1990; and Ladner et al., U. S. Pat. No. 5,571,698.)。抗菌素显示技术的一个基本的理论就是建立编码被筛选的多肽的 DNA 和该多肽的物理学联系,这种物理联系被抗菌素粒子提供,它显示为作为衣壳部分的多肽,该衣壳又包括有编码该多肽的衣壳。多肽和他们的基因物质之间的物理关系允许同时大量筛选那些包括有不同多肽的抗菌素。显示一个与目标物质具有亲和力的多肽的抗菌素通过与目标物质的亲和力而浓缩。从这些抗菌素显示而鉴别的多肽可以从他们各自的特殊基因测定。使用这些方法,具有对设计特定目标的结合亲和力的多肽然后可以根据传统的方法大量合成,参见美国专利号 o. 6,057,098 的描述,该专利的所有图表,权利要求等全部内容与本发明内容结合而为本发明的一部分。

**[0094]** 如果有必要,通过这些方法产生的这些抗体然后通过感兴趣的纯化的多肽进行首次亲和力和特异性筛选,然后与带有用来排除结合多肽的抗体进行亲和力和特异性比较。筛选的方法可以固定纯化的多肽在微孔板上。含有潜在的抗体或抗体群溶液被添加到每一个微孔板上,然后孵育 30 分钟到 2 小时。然后,该微孔板被洗脱,标记的第二抗体(例如带有碱性磷酸酶的抗老鼠抗体的抗体,如果该抗体是由老鼠免疫产生的)被添加这些孔中,然后再孵育 30 分钟,最后再次洗脱。底物被加入到孔中,如果具有与固定的多肽结合的抗体存在,将会发生颜色反应。

**[0095]** 这些被筛选的抗体还可以进一步的分析他们的亲和力和特异性。在为了产生目标蛋白的抗体免疫分析过程中,纯化的目标蛋白作为一个标准,通过该标准来调节被选择的抗体在免疫分析中的特异性和灵敏性。因为多种具有亲和力的抗体可能也不同,这些抗体

对（在三明治检测中）可能在空间结构上相互影响等，执行检测的抗体可能需要更重要的测量，相对纯粹的亲和力和特异性的抗体而言。

[0096] 任何本领域的一般技术人员都可以认识到很多方法可以用来生产抗体或结合片段，以及为了亲和力和特异性来筛选和选择可以结合各种多肽的抗体，但是这些方法并不能改变本发明的范围。

[0097] 例子

[0098] 如下描述的例子只是举例说明本发明。这些例子没有任何企图来限制本发明的范围。

[0099] 例 1：患者人群的描述

[0100] 正常

[0101] 这类人群由明显健康，正常的主体组成并作为新诊断测试的“控制”主体。正常人的标准包括 (1) 在登记注册时为 18-65 岁和 (2) 有能力书写书面知情同意书的人群。但不包括以下人群：(1) 具有急性或慢性疾病（例如高血压，糖尿病，艾滋）；(2) 从登记注册 30 天内需要抗体治疗的急性（尿路感染），(3) 当前有喝酒或吸毒证明的，(4) 5 年内得过急性肿瘤，恶性皮肤癌除外，(5) 最近 3 个月内作过大型手术和 (6) 通过调查被认为不合适的人群。

[0102] 心脏舒张功能障碍 (DD)

[0103] 这类人群的标准为：年纪大于 18 岁并具有中间或低可能性的胸痛，他们承认到医院胸痛科室去过 (CPU)。为了更好的为了研究，那些具有心肌梗塞 (myocardial infarction (MI)) 和曾经作为 CPU 部分的心脏超声波的负应力病人也被排除在外。压力回声作为一个左心房 (left ventricular (LV)) 喷门运动的一个客观的证据，LV 的厚度和心室舒张功能不良的多谱参数 (Doppler parameters)。同时，排除的标准也包括：具有初级评估 / 诊断表明具有心膜冠心病 ((CAD) 或心肌梗塞，以及由于历史心室舒张功能不良而导致的充血性心脏衰竭 (CHF)。在超声波检测中具有心室舒张功能不良的患者也被排除在外。

[0104] 肺栓 (PE)

[0105] 年纪包括大于或包括 18 岁的患者的人群被要求进行 PE 的诊断，存在 PE 的标准为：(1) 肺部血管造影为阳性，或 (2) 用高可能性的 V/Q 扫描，或者 (3) 较低级的极端双阳性研究和高怀疑为 PE (基于以下历史性，身体检查，动脉血管空气，胸片和心电图 (ECG) 组合中的之一的临床调查来确定在临床上接近 80% 的概率可能患有 PE)，或 (4) 在不存在慢性肺病中具有不正常的超声波心电图的患者具有高临床怀疑性，或 (5) 阳性的螺旋 CT 血管造影。那些具有左心脏衰竭，和冠心病症状，或者肾脏功能衰竭（肌氨酸酐大于 1.5mg/dl）的患者被排除在外。

[0106] HF (心力衰竭)

[0107] 这一部分人群包括年纪大于 18 岁以上的并需要心力衰竭治疗的患者。患者具有 (1) 当前具有心肌梗塞 (MI (myocardial infarction)) 或具有 1 毫米的或更大的 ST 分离的 ACS (严重的冠心病症状)，(2) 需要透析的肾脏衰竭；(3) 最近过去一月的血液透析，(4) 登记入册 (基线) Triage<sup>®</sup> BNP 检测浓度 = 100pg/ml or 或更小，(5) 或者其他为了治疗 HF 而进行药物治疗和实验性的治疗都被排除在外。包括年纪在 18 或以上的人群，他们进行

过 HF 治疗后处于稳定时期的病人的人群也被排除在外。对亚人群的排除标准也包括那些不能给出正常的承诺,具有严重的肺炎病历史,为了 COPD 而进行长时间的氧气治疗,原发性肺高血压,要求透析的肾病历史,具有肝病历史,使用左心室辅助设备 (LVADs),撞击过, MI, PTCA(percutaneous transluminal coronary artery angioplasty), CABG(coronary artery bypass graft),或者最近 1 个月有咽绞痛,严重的主动脉狭窄病历史,严重的二尖瓣狭窄病历史,压缩性心包炎历史的病人,具有心脏移植,阶段 1 的心脏移植,最近 1 月具有非 Q 值波动的 MI 的 ICD or DRG 的病人,和具有轻微肺病的病人。

[0108] RD(肾脏衰竭)

[0109] 这类人群具有血液透析的病人。这群病人包括年纪在 18-96 岁之间的男性或女性。在这里也可以指“RF”或肾脏衰竭。

[0110] 例子 2 检测

[0111] 血液样本被经过培训的人收集在带有作为抗凝试剂 EDTA 的标准血液收集试管中。通过离心从细胞中分离获得血清,并冷冻并储存在  $-20^{\circ}\text{C}$  或者冷藏直到分析。血清被冷冻 1 小时。检测通过标准的免疫检测技术:微流装置。这种装置实质和《免疫测定手册》的第 41 章,题目为“近患者测试:商标为 Triage®的心脏病系统所描述的装置一样,作者戴维等等,自然出版集团,2001(Near Patient Tests:Triage® Cardiac System,” in The Immunoassay Handbook, 2<sup>nd</sup> ed., David Wild, ed., Nature Publishing Group, 2001)。

[0112] BNP 检测 1:两个结合 BNP79-108 序列上位点的抗体的 BNP 三明治免疫方法。除了 BNP 外,该检测也可以测试 BNP79-108, proBNP 和 BNP3-108。

[0113] BNP 检测 2:两个结合 BNP79-108 序列上位点的抗体的 BNP 三明治免疫方法,其中一种特异结合从 BNP 上脱落 77 和 78 残基后形成的构体的抗体。这种抗体通过抗菌素显示来筛选,在该方法中,老鼠被 BNP79-108 序列免疫后,产生的抗体在过量存在 BNP 的情况下筛选 BNP79-108 的抗体。过量的 BNP 可以竞争结合那些不特异结合 BNP79-108 的任何抗体。该检测不测试 BNP79-108, proBNP 和 BNP3-108。

[0114] BNP 前体 (proBNP) 检测 1:BNP 前体检测通过这样来检测:使用一种特异结合 BNP79-108 序列上位点的抗体,另一种特异结合 BNP3-76 序列上位点的抗体。除了检测 BNP 前体外,该检测还检测 BNP3-108。

[0115] BNP 前体 (proBNP) 检测 2:BNP 前体检测通过这样来检测:使用一种特异结合 BNP79-108 序列上位点的抗体,另一种特异结合从 BNP 上脱落 1 和 2 位点残基后形成的构体的抗体。这种抗体通过抗菌素显示来筛选,在该方法中,老鼠被 BNP3-108 序列免疫后,产生的抗体在过量存在 BNP 前体的情况下筛选 BNP3-108 的抗体。过量的 BNP 前体可以竞争结合那些不特异结合 BNP3-108 的任何抗体。该检测不测试 BNP, NT-proBNP, proBNP 和 BNP3-76。

[0116] NT-BNP 前体检测 1:NT-BNP 前体检测通过这样来检测:使用结合 BNP3-76 序列上位点的两种抗体。除了检测 NT-BNP 前体外,该检测还检测 BNP 前体, BNP3-108 和 BNP3-76。

[0117] NT-BNP 前体 (NT-proBNP) 检测 2:NT-BNP 前体检测通过这样来检测:使用一种特异结合 BNP3-76 序列上位点的抗体,另一种特异结合从 BNP 前体上脱落 1 和 2 位点残基后形成构体的抗体。这种抗体通过抗菌素显示来筛选,在该方法中,老鼠被 BNP3-108 序列免疫后,产生的抗体在过量存在 BNP 前体的情况下筛选 BNP3-108 的抗体。过量的 BNP 前体可以竞争结合那些不特异结合 BNP3-108 的任何抗体。该检测不测试 BNP, NT-proBNP, proBNP

和 BNP3-108.

[0118] 例子 3 :从肾功能障碍人群中区分出肺栓人群

[0119] 为了同时测量 NT-proBNP 和 proBNP,一结合 NT-proBNP 中间位置的位点的抗体与一个可以被检测的标记(荧光能量转移乳胶或者“FETL”)共扼连接,两种抗体,一种为特异结合来自从 proBNP 上脱落 1 和 2 残基后形成构体的抗体,另一种结合 BNP 的抗体,他们沿着微流检测装置的测试通道被固定在分离的捕获区域上,该微流检测装置实质如《免疫测定手册》的第 41 章,题目为“近患者测试:商标为 Triage®的心脏病系统所描述的装置一样,作者戴维等等,自然出版集团,2001(Near Patient Tests:Triage® Cardiac System,” in The Immunoassay Handbook,2<sup>nd</sup> ed.,David Wild,ed.,Nature Publishing Group,2001)。“NT-proBNP”的分析检测结果可以测试 BNP3-76 和 BNP3-108,然而“proBNP”的检测结果可以测量 BNP3-108,但是不能测量 BNP3-76。

[0120] 在通道上的两个免疫检测分析结果被同时用纯化的重组 proBNP,并且用含有 EDTA 人血清稀释的溶液进行校准。这对来自哺乳动物细胞表达的 proBNP 抗体的结果,在质量浓度上,大约有 4-5 倍的特异性于来自细菌细胞表达的 proBNP 抗体。一旦样本被检测,检测分析结果被转换成浓度值对 proBNP 的结果进行校准。NT-proBNP (BNP3-76) 的浓度通过从 NT-proBNP 的检测结果减去 proBNP 的浓度而获得。

[0121] 为了同时测量 BNP 和 proBNP,一结合 BNP 的抗体与一个可以被检测的 FETL 共扼连接。两种抗体,一种为结合 BNP 的抗体,另一种结合 proBNP 的抗体,他们沿着微流检测装置的测试通道被固定在分离的捕获区域上。“BNP”检测分析结果能够测试 BNP, proBNP 和 BNP3-108,然而“proBNP”的检测结果能够测量 proBNP 和 BNP3-108,但是不能测量 BNP。

[0122] 免疫检测分析结果被同时用纯化的重组 proBNP,并且用含有 EDTA 人血清稀释的溶液进行校准。这对来自哺乳动物细胞表达的 proBNP 抗体的结果,在质量浓度上,大约有 4-5 倍的特异性于来自细菌细胞表达的 proBNP 抗体。一旦样本被检测,检测分析结果被转换成浓度值对 proBNP 的结果进行校准。

[0123] NT-proBNP (BNP3-76) 的浓度通过从 NT-proBNP 的检测结果减去 proBNP 的检测结果而获得。BNP 的浓度通过从 BNP 的检测结果减去 proBNP 的检测结果而获得 BNP 的检测中分离出来。在第二个检测装置上的“proBNP”检测可以和在第一个检测装置上的“proBNP”检测很好的相关性(秩相关系数(Spearman correlation) $R = 0.98$ ,同时  $p < 0.0001$ ),通过巴步克拉衰退分析( $p < 0.01$ )(Passing-Bablok regression analysis),同时产生一个更轻微大的结果:BNP 面板 1 上的 proBN P 检测 = 1.46 [NT-proBNP 面板 1 上的 proBNP 检测]-41.28pg/ml。95%的置信区间为 1.41-1.52。测试结果的不同可以归因于不同抗体的特异性不同。

[0124] 以下的统计描述是使用这些分析而获得的:测试值作为 pg/mL proBNP 而被报告:

[0125]

BNP 检测	正常	DD	PE	HF	RD
计数	77	81	84	133	442
5th 百分点	0.00	0.00	0.00	457.94	87.11

25th 百分点	6.47	4.31	14.98	1610.88	473.33
50th 百分点	22.03	24.16	195.30	4184.45	2014.85
75th 百分点	89.59	147.55	876.71	8365.82	5394.15
95th 百分点	632.00	437.74	5342.40	16631.64	16018.50

[0126]

proBNP 检测	正常	DD	PE	HF	RF
计数	77	81	84	133	442
5th 百分点	0.00	0.00	0.00	255.46	108.28
25th 百分点	7.46	4.98	12.18	1001.28	404.32
50th 百分点	25.93	21.33	91.65	2287.90	1031.93
75th 百分点	57.23	67.08	525.52	4030.23	2724.97
95th 百分点	402.41	202.38	2946.52	9634.88	6348.33

[0127]

<b>NT-proBNP 检测</b>	<b>正常</b>	<b>DD</b>	<b>PE</b>	<b>HF</b>	<b>RF</b>
计数	76	81	78	73	182
5th 百分点	60.53	0.93	45.93	3794.41	5165.19
25th 百分点	181.21	98.59	264.77	12641.53	14388.59
50th 百分点	659.62	303.67	2195.31	27455.58	22253.77
75th 百分点	1660.44	1470.09	9500.87	38374.03	35639.36
95th 百分点	7570.75	2977.98	38241.53	48099.11	47336.80

[0128] 使用这些数据，ROC 分析被执行用来比较不同的人群（图 1 和 2）。SPSS 15.0 为“窗口”（SPSS, Chicago, IL）被用来进行 ROC 分析。在从 RD 区分 HF，从 RD 区分 PE（ROC 的区域接近 0.95）中，NT-proBNP 对 proBNP 的比率优于其他任何生物标记物质，同时，在也测试 proBNP 的传统的 BNP 和 NT-proBNP 检测中，很难从 RD 中区分 PE 和 HF（ROC 的区域 = ~ 0.50）。

[0129] 尽快本发明已经通过足够详细描述和作为例子来进行足够详细的说明，以至本领域于的一般技术人员都可以根据本发明进行制造和使用。没有超出本发明的精神和精髓下对本发明的各种改变，修改和改进应该是显然的。本发明在这里提供的例子仅仅是本发明

的最佳实施方式,是可以实施和仿效的,但他们不是对本发明的范围做出任何限制。在这里的这些修改和其他用途对于本领域的人是显然的。这些修改也被包括在本发明的精髓里也被本发明的权利要求范围所限定。

[0130] 对于本领域的一般技术人员来讲,没有超出本发明的精神和精髓下各种对本发明揭示的内容进行替换方式的改变和改变也是显然的。

[0131] 本发明所列举的所有的专利和出版物都作为本发明所属的本领域一般技术人员的指示。所有的专利和出版物当他们各个出版物被特别作为参考被本发明引用的时候也可以和本发明构成本发明的所揭示的一部分。

[0132] 本发明一些例子性的说明在用的时候可以缺少在本发明没有特别揭示的一些任何技术元素,任何限制。这样,例如,在每一个例子中,任何技术术语“包括”,“实质由…组成”和“由…组成”也可以被其它一个或两个元素替代。那些被本发明使用的作为术语描述的这些术语以及解释并不是对本发明的限制,也没有任何企图使用这些术语来排除任何作为本发明一部分描述的等价的替换,但是可以认识到在本明的精髓下可以对本发明做各种各样的变化以及修正。因此,应该清楚,尽管本发明已经通过最佳的实施方式和任选特征来进行描述,修改和变化本发明的核心概念应该是本发明领域内一般技术人员所能做的,以及这些更改和修正也应该被认为是属于本发明的权利要求范围内。

[0133] 其他的实施方式也因该被以下的权利要求所定义。

测试结果	ROC 区域 (95% CI)	“控制”	“疾病”	“控制”数量	“疾病”数量	与疾病的变化
各种 proBNP	0.91(0.86-0.96)	正常	RF	57	178	增加
	0.98(0.97-1.00)	正常	HF	57	73	增加
	0.74(0.65-0.83)	正常	PE	57	60	增加
	0.55(0.44-0.66)	正常	DD	57	51	增加
	0.61(0.51-0.71)	PE	RF	60	178	增加
	0.84(0.77-0.91)	PE	HF	60	73	增加
	0.91(0.87-0.95)	DD	RF	51	178	增加
	0.98(0.97-1.00)	DD	HF	51	73	增加
	0.87(0.81-0.93)	HF	RF	73	178	减少
检测 BNP (测试 BNP 和 proBNP)	0.85(0.79-0.91)	正常	RF	57	178	增加
	0.97(0.94-1.00)	正常	HF	57	73	增加
	0.77(0.68-0.85)	正常	PE	57	60	增加
	0.62(0.51-0.73)	正常	DD	57	51	增加
	0.51(0.41-0.61)	PE	RF	60	178	增加
	0.81(0.73-0.88)	PE	HF	60	73	增加
	0.80(0.74-0.86)	DD	RF	51	178	增加
	0.97(0.94-1.00)	DD	HF	51	73	增加
	0.88(0.83-0.93)	HF	RF	73	178	减少
检测 NT-proBNP (测试 NT-proBNP 和 proBNP)	0.97(0.95-1.00)	正常	RF	57	178	增加
	0.97(0.93-1.00)	正常	HF	57	73	增加
	0.75(0.66-0.84)	正常	PE	57	60	增加
	0.50(0.39-0.61)	正常	DD	57	51	减少
	0.82(0.75-0.89)	PE	RF	60	178	增加
	0.82(0.75-0.89)	PE	HF	60	73	增加
	1.00(0.99-1.00)	DD	RF	51	178	增加
	0.99(0.97-1.00)	DD	HF	51	73	增加
	0.52(0.44-0.61)	HF	RF	73	178	减少
BNP (= BNP 检测 - proBNP 的检测)	0.65(0.58-0.72)	正常	RF	57	178	增加
	0.96(0.93-0.99)	正常	HF	57	73	增加
	0.75(0.66-0.84)	正常	PE	57	60	增加
	0.65(0.55-0.76)	正常	DD	57	51	增加
	0.62(0.54-0.71)	PE	RF	60	178	减少
	0.76(0.67-0.84)	PE	HF	60	73	增加
	0.56(0.48-0.63)	DD	RF	51	178	增加
	0.94(0.90-0.98)	DD	HF	51	73	增加
	0.88(0.83-0.92)	HF	RF	73	178	减少

\*当 proBNP 的测量大于(> 5 pg/ml)时候计算

图 1A

测试结果	ROC 区域 (95% CI)	“控制”	“疾病”	“控制” N	“疾病” N	与疾病的变化
NT-proBNP (= NT-proBNP 检测 - proBNP)	0.98(0.95-1.00)	正常	RF	57	178	增加
	0.97(0.93-1.00)	正常	HF	57	73	增加
	0.75(0.66-0.84)	正常	PE	57	60	增加
	0.50(0.39-0.61)	正常	DD	57	51	减少
	0.83(0.76-0.90)	PE	RF	60	178	增加
	0.82(0.75-0.90)	PE	HF	60	73	增加
	1.00(0.99-1.00)	DD	RF	51	178	增加
	0.99(0.97-1.00)	DD	HF	51	73	增加
	0.51(0.43-0.59)	HF	RF	73	178	减少
BNP / proBNP*	0.53(0.44-0.63)	正常	RF	57	178	减少
	0.74(0.65-0.83)	正常	HF	57	73	增加
	0.71(0.61-0.80)	正常	PE	57	60	增加
	0.70(0.60-0.81)	正常	DD	57	51	增加
	0.74(0.66-0.82)	PE	RF	60	178	减少
	0.53(0.42-0.63)	PE	HF	60	73	减少
	0.73(0.64-0.83)	DD	RF	51	178	减少
	0.55(0.43-0.66)	DD	HF	51	73	减少
	0.80(0.74-0.86)	HF	RF	73	178	减少
NT-proBNP/ proBNP*	0.94(0.90-0.98)	正常	RF	57	178	增加
	0.63(0.53-0.73)	正常	HF	57	73	增加
	0.50(0.40-0.61)	正常	PE	57	60	增加
	0.57(0.46-0.68)	正常	DD	57	51	减少
	0.95(0.93-0.98)	PE	RF	60	178	增加
	0.63(0.53-0.72)	PE	HF	60	73	增加
	0.97(0.95-0.99)	DD	RF	51	178	增加
	0.70(0.61-0.79)	DD	HF	51	73	增加
	0.92(0.88-0.95)	HF	RF	73	178	增加

\*当 proBNP 的测量大于 (> 5 pg/ml) 时候计算

图 1B

**BNP (=BNP 的检测-porBNP)**

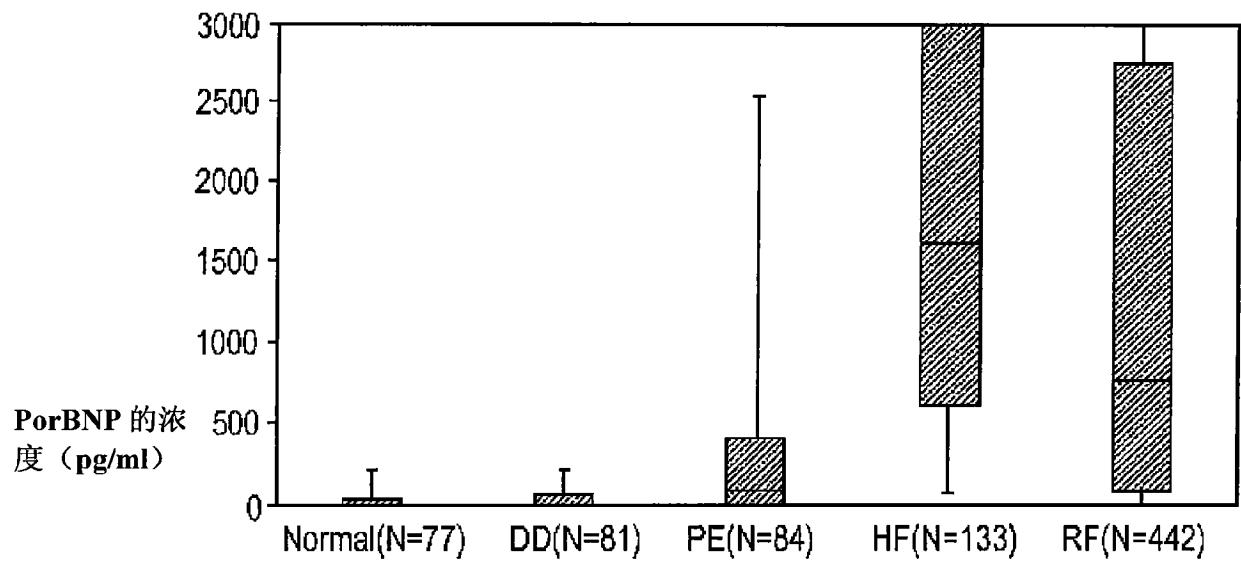


图 2A

**NT-proBNP (=NT-proBNP 的检测-porBNP)**

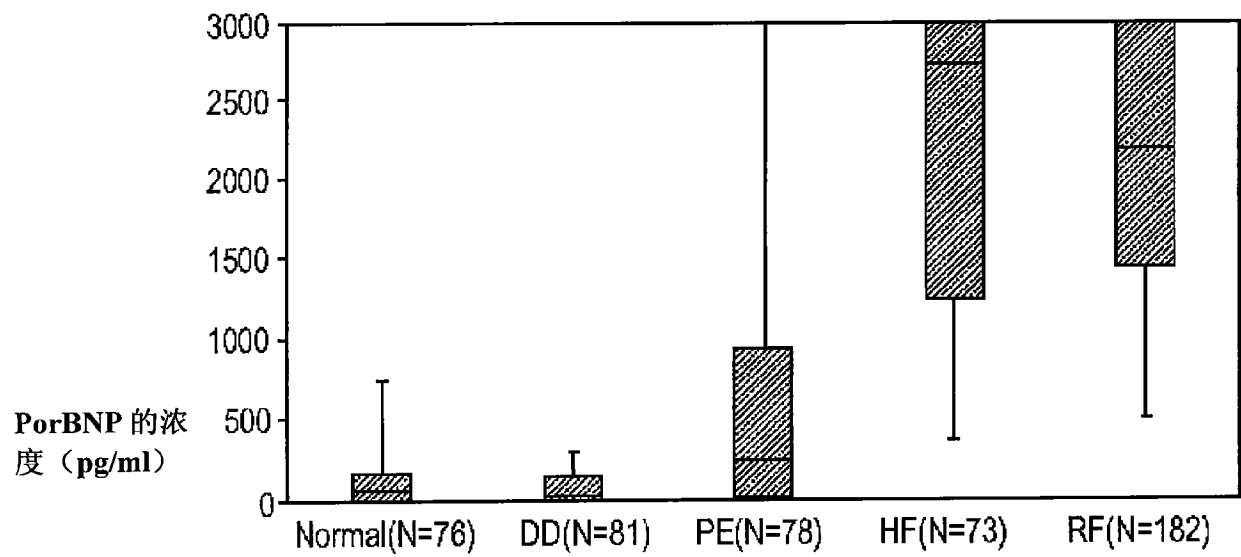


图 2B

PorBNP 的检测

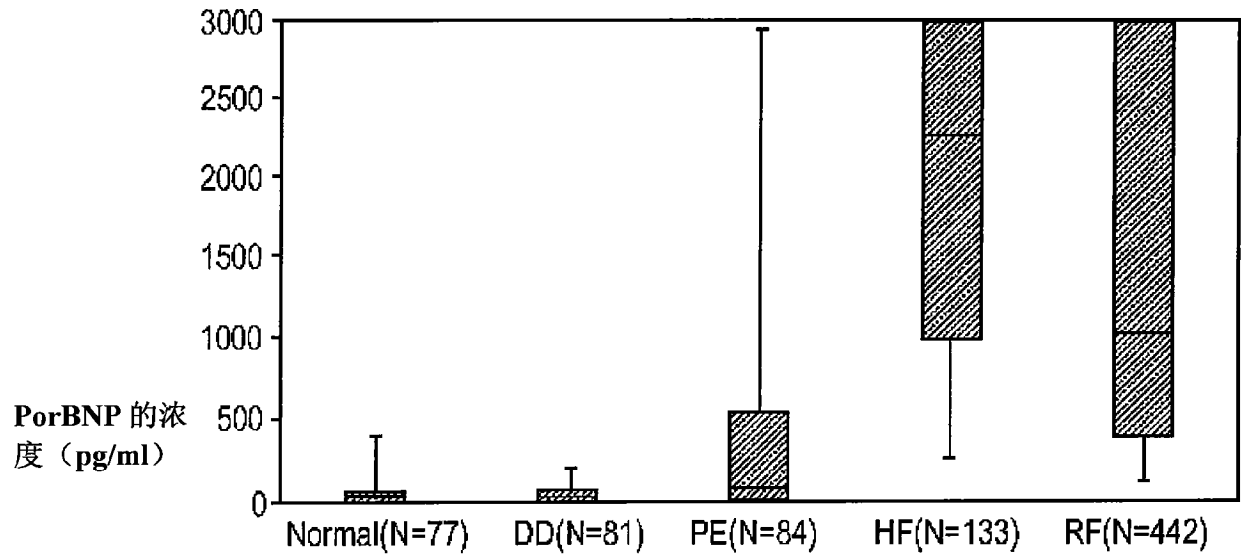


图 2C

BNP / proBNP

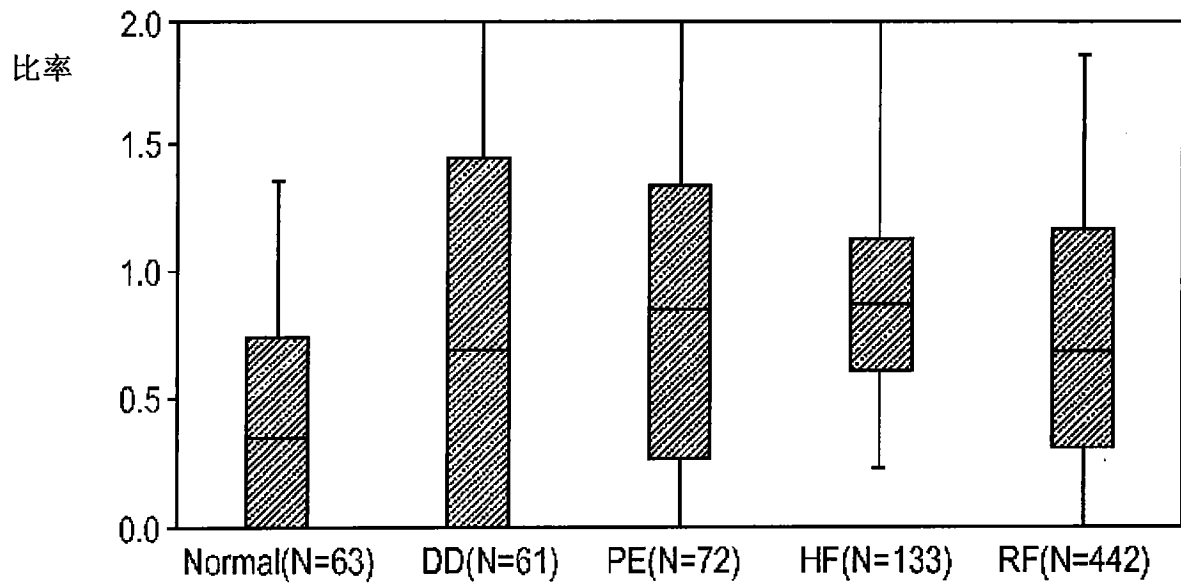


图 2D

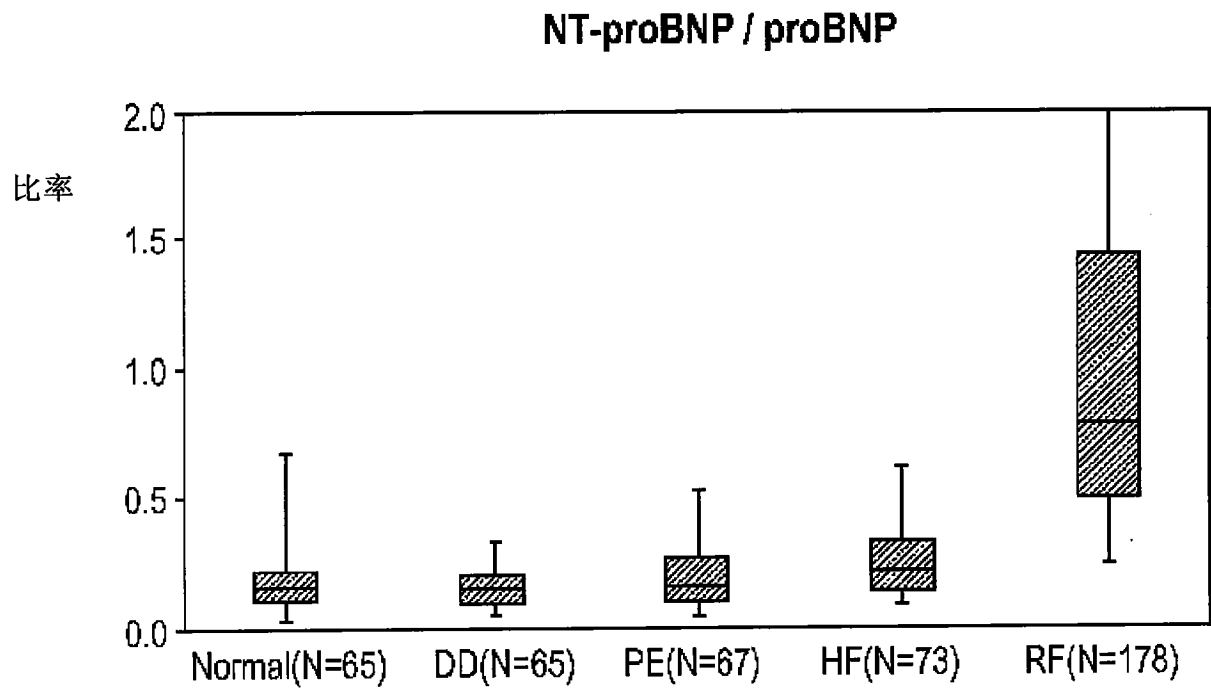


图 2E

专利名称(译)	组合的尿钠肽检测		
公开(公告)号	<a href="#">CN102334031A</a>	公开(公告)日	2012-01-25
申请号	CN200980145621.6	申请日	2009-12-08
[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	李席元		
发明人	李席元		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N2800/347 G01N2333/575 G01N33/74 G01N2800/12		
优先权	61/120795 2008-12-08 US		
其他公开文献	CN102334031B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及诊断和评估与BNP相关的疾病的方法。特别的，用患者的样本为了分析是否存在多种尿钠肽或尿钠肽的含量和组合的尿钠肽结果作为一个诊断标记物质。

NT-proBNP 检测	正常	DD	PE	HF	RF
计数	76	81	78	73	182
5th 百分点	60.53	0.93	45.93	3794.41	5165.19
25th 百分点	181.21	98.59	264.77	12641.53	14388.59
50th 百分点	659.62	303.67	2195.31	27455.58	22253.77
75th 百分点	1660.44	1470.09	9500.87	38374.03	35639.36
95th 百分点	7570.75	2977.98	38241.53	48099.11	47336.80