



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101971027 A

(43) 申请公布日 2011. 02. 09

(21) 申请号 200980103026. 6

博格·格朗尼·诺德埃斯特加尔德

(22) 申请日 2009. 01. 22

汉斯·乔根·尼尔森

伊布·雅勒·克里斯坦森

(30) 优先权数据

PA200800089 2008. 01. 23 DK

PA200801294 2008. 09. 15 DK

PA200801292 2008. 09. 15 DK

PA200801293 2008. 09. 15 DK

(74) 专利代理机构 北京律诚同业知识产权代理有限公司 11006

代理人 徐金国 黄韧敏

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 07. 23

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006. 01)

G01N 33/58 (2006. 01)

G01N 33/68 (2006. 01)

(86) PCT申请的申请数据

PCT/DK2009/050014 2009. 01. 22

(87) PCT申请的公布数据

W02009/092381 EN 2009. 07. 30

(71) 申请人 海莱乌医院

地址 丹麦海莱乌

申请人 哈维德夫医院

里格舒斯匹塔里特医院

(72) 发明人 朱莉娅·约翰森 斯蒂格·玻约森

权利要求书 6 页 说明书 36 页 序列表 3 页  
附图 11 页

(54) 发明名称

作为非特异疾病的通用标记的 YKL-40

(57) 摘要

本发明涉及一种诊断受试者中非特异疾病或紊乱存在的方法,其中测定的 YKL-40 水平高于参考水平表明存在非特异疾病或紊乱。受试者可能患有多种疾病或紊乱。参考水平可能是从健康个体中获得的参考水平或者可能是先前从相同受试者获得的测量值。本发明还涉及一种分类受试者的非特异疾病或紊乱的严重性的方法,其中测定的 YKL-40 水平高于或低于一个或多个参考水平显示了所述非特异疾病或紊乱的严重性。本发明进一步涉及一种可用于本发明方法的试剂盒和装置,其包括用于测量样品中的 YKL-40 水平的工具;以及将测量的 YKL-40 与至少一个 YKL-40 参考水平进行比较的工具。

1. 一种诊断受试者中非特异疾病或紊乱的存在的方法,所述方法包括:
  - v) 测定从受试者获得的样品中的 YKL-40 水平;和
  - vi) 将所述 YKL-40 水平与 YKL-40 参考水平进行比较;其中所述样品中的 YKL-40 水平高于参考水平,表明存在非特异疾病或紊乱。
2. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述 YKL-40 参考水平是通过测量来自健康个体样品中的 YKL-40 水平而获得的平均水平。
3. 如权利要求 2 所述的方法,其中所述 YKL-40 参考水平是年龄校正的平均水平。
4. 如前面任一项权利要求所述的方法,其中所述 YKL-40 参考水平是年龄校正的临界值,其对应健康个体中血清或血浆 YKL-40 水平的第 70 个百分位数。
5. 如权利要求 4 所述的方法,其中所述年龄校正的临界值是定义为  $\ln(\text{血浆 YKL-40}) = 3.1 + 0.02 \times \text{年龄(岁)}$  的第 70 个百分位数。
6. 如权利要求 1-3 任一项所述的方法,其中所述 YKL-40 参考水平是年龄校正的临界值,其对应健康个体中血清或血浆 YKL-40 水平的第 75 个百分位数。
7. 如权利要求 6 所述的方法,其中所述年龄校正的临界值是定义为  $\ln(\text{血浆 YKL-40}) = 3.2 + 0.02 \times \text{年龄(岁)}$  的第 75 个百分位数。
8. 如权利要求 1-3 任一项所述的方法,其中所述 YKL-40 参考水平是年龄校正的临界值,其对应健康个体中血清或血浆 YKL-40 水平的第 85 个百分位数。
9. 如权利要求 8 所述的方法,其中所述年龄调整的临界值是定义为  $\ln(\text{血浆 YKL-40}) = 3.4 + 0.02 \times \text{年龄(岁)}$  的第 85 个百分位数。
10. 如权利要求 1-3 任一项所述的方法,其中所述 YKL-40 参考水平是年龄校正的临界值,其对应健康个体中血清或血浆 YKL-40 水平的第 90 个百分位数。
11. 如权利要求 10 所述的方法,其中所述年龄校正的临界值是定义为  $\ln(\text{血浆 YKL-40}) = 3.5 + 0.02 \times \text{年龄(岁)}$  的第 90 个百分位数。
12. 如权利要求 1-3 任一项所述的方法,其中所述 YKL-40 参考水平是年龄校正的临界值,其对应健康个体中血清或血浆 YKL-40 水平的第 95 个百分位数。
13. 如权利要求 12 所述的方法,其中所述年龄校正的临界值是定义为  $\ln(\text{血浆 YKL-40}) = 3.6 + 0.02 \times \text{年龄(岁)}$  的第 95 个百分位数。
14. 如权利要求 1-3 任一项所述的方法,其中所述 YKL-40 参考水平是年龄校正的临界值,其对应健康个体中血清或血浆 YKL-40 水平的第 97.5 个百分位数。
15. 如权利要求 14 所述的方法,其中所述年龄校正的临界值是定义为  $\ln(\text{血浆 YKL-40}) = 3.9 + 0.02 \times \text{年龄(岁)}$  的第 97.5 个百分位数。
16. 如权利要求 1-3 任一项所述的方法,其中所述 YKL-40 参考水平是权利要求 4-15 中的两项或多项限定的一组 YKL-40 年龄依赖性临界值。
17. 如权利要求 16 所述的方法,其中所述一组 YKL-40 年龄依赖性临界值在下表中限定:

健康受试者的年龄依赖性临界值					
年龄间隔 (岁)	第70个 百分位数 ( $\mu\text{g/l}$ YKL-40)	第75个 百分位数 ( $\mu\text{g/l}$ YKL-40)	第85个 百分位数 ( $\mu\text{g/l}$ YKL-40)	第90个 百分位数 ( $\mu\text{g/l}$ YKL-40)	第95个 百分位数 ( $\mu\text{g/l}$ YKL-40)
20 - 29	40	44	54	59	65
30 - 39	48	54	65	72	80
40 - 49	59	65	80	88	98
50 - 59	72	80	98	108	119
60 - 69	88	98	119	132	145
70 - 79	108	119	154	161	178
80 - 89	132	145	178	196	217

18. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述 YKL-40 参考水平是通过测量健康个体的年龄分布亚群的样品中的 YKL-40 水平而获得的一组 YKL-40 年龄依赖性参考水平。

19. 如权利要求 18 所述的方法,其中所述一组年龄依赖性参考水平在下表中限定:

健康受试者的年龄依赖性参考水平					
年龄间隔 (岁)	第70个 百分位数 ( $\mu\text{g/l}$ YKL-40)	第75个 百分位数 ( $\mu\text{g/l}$ YKL-40)	第85个 百分位数 ( $\mu\text{g/l}$ YKL-40)	第90个 百分位数 ( $\mu\text{g/l}$ YKL-40)	第95个 百分位数 ( $\mu\text{g/l}$ YKL-40)
20 - 29	33 - 40	37 - 44	45 - 54	49 - 59	55 - 65
30 - 39	40 - 48	45 - 54	55 - 65	60 - 72	67 - 80
40 - 49	49 - 59	55 - 65	67 - 80	74 - 88	81 - 98
50 - 59	60 - 72	67 - 80	81 - 98	90 - 108	99 - 119
60 - 69	74 - 88	81 - 98	99 - 119	110 - 132	122 - 145
70 - 79	90 - 108	99 - 119	122 - 154	134 - 161	148 - 178
80 - 89	110 - 132	122 - 145	148 - 178	164 - 196	181 - 217

20. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述方法是用于诊断受试者中非特异疾病或紊乱的存在的方法,所述方法包括:

iii) 测定从受试者中获得的样品中的 YKL-40 水平;和

iv) 将所述 YKL-40 水平与 YKL-40 参考水平进行比较,所述参考水平是先前从相同受试者中测定的 YKL-40 水平;

其中所述样品中的 YKL-40 水平与 YKL-40 参考水平相比增加到至少 1.10 倍,表明存在非特异疾病或紊乱。

21. 如权利要求 20 所述的方法,其中所述 YKL-40 参考水平是经年龄校正的。

22. 如权利要求 20-21 任一项所述的方法,其中所述参考水平是通过女性增加

0.5  $\mu$ g/l/年,对男性增加 0.8  $\mu$ g/l/年进行年龄校正。

23. 如权利要求 20-22 任一项所述的方法,其中当所述样品中的 YKL-40 水平增加了约 109%或更多时,则认为该样品中的 YKL-40 水平明显高于参考水平,由此表明存在非特异疾病或紊乱。

24. 如权利要求 20-22 任一项所述的方法,其中所述样品中的 YKL-40 水平与 YKL-40 参考水平相比增加到至少 1.10 倍,表明存在非特异疾病或紊乱,更优选与 YKL-40 参考水平相比增加到至少 1.25 倍,例如 1.30 倍,或 1.40 倍;更优选至少 1.50 倍,例如 1.60 倍,1.70 倍,或 1.75 倍;更优选至少 1.75 倍,例如 1.80 倍,或 1.90 倍,或 2 倍;最优选至少 2 倍,例如 2.10 倍,2.20 倍,2.25 倍,或 2.50 倍,表明存在非特异疾病或紊乱。

25. 一种分类受试者中非特异疾病或紊乱的严重性的方法,所述方法包括:

vii) 测定从受试者中获得的样品中的 YKL-40 水平;和

viii) 将该 YKL-40 水平与一个或多个 YKL-40 参考水平进行比较;

其中所述非特异疾病或紊乱的严重性是从所述比较中推出。

26. 如权利要求 25 所述的方法,其中所述一个或多个 YKL-40 参考水平是通过测量健康个体样品中的 YKL-40 水平来提供。

27. 如权利要求 25-26 任一项所述的方法,其中所述一个或多个 YKL-40 参考水平是一个或多个年龄校正的参考水平。

28. 如权利要求 25-27 任一项所述的方法,其中所述一个或多个 YKL-40 参考水平是通过测量健康个体的年龄分布亚群的样品中的 YKL-40 水平而获得的一组 YKL-40 年龄依赖性参考水平。

29. 如权利要求 25-28 任一项所述的方法,其中所述一个或多个 YKL-40 参考水平是年龄校正的临界值,其对应健康个体中 YKL-40 的第 75 个百分位数。

30. 如权利要求 25-29 任一项所述的方法,其中所述一个或多个 YKL-40 参考水平是年龄校正的临界值,其对应健康个体中 YKL-40 的第 85 个百分位数。

31. 如权利要求 25-30 任一项所述的方法,其中所述一个或多个 YKL-40 参考水平是年龄校正的临界值,其对应健康个体中 YKL-40 的第 90 个百分位数。

32. 如权利要求 25-31 任一项所述的方法,其中所述一个或多个 YKL-40 参考水平是年龄校正的临界值,其对应健康个体中 YKL-40 的第 95 个百分位数。

33. 如权利要求 25-32 任一项所述的方法,其中所述一个或多个 YKL-40 参考水平是年龄校正的临界值,其对应健康个体中 YKL-40 的第 97.5 个百分位数。

34. 如权利要求 25 所述的方法,其中所述一个或多个参考水平是先前从相同受试者中测定的一个或多个参考水平。

35. 如权利要求 34 所述的方法,其中所述一个或多个 YKL-40 参考水平是年龄校正的 YKL-40 血浆水平,其通过对女性增加 0.5  $\mu$ g/l/年,对男性增加 0.8  $\mu$ g/l/年进行年龄校正。

36. 如权利要求 34-35 任一项所述的方法,其中所述样品中的 YKL-40 水平与 YKL-40 参考水平相比增加到至少 1.10 倍或更多,表明非特异疾病或紊乱已经发展到该疾病或紊乱的更严重阶段,更优选与 YKL-40 参考水平相比增加到至少 1.25 倍,例如 1.30 倍,或 1.40 倍;更优选增加到至少 1.50 倍,例如 1.60 倍,1.70 倍,或 1.75 倍;更优选增加到至少 1.75

倍,例如 1.80 倍,或 1.90 倍,或 2 倍;最优选增加到至少 2 倍,例如 2.10 倍,2.20 倍,2.25 倍,或 2.50 倍,表明非特异疾病或紊乱已经发展到该疾病或紊乱的更严重阶段。

37. 如权利要求 34-36 任一项所述的方法,其中所述样品中的 YKL-40 水平与 YKL-40 参考水平相比至少减小到 0.90 倍,表明非特异疾病或紊乱已经发展到该疾病或紊乱的较缓和阶段,更优选与 YKL-40 参考水平相比至少减小到 0.80 倍,例如 0.70 倍;更优选至少减小到 0.60 倍;更优选至少减小到 0.50 倍;更优选至少减小到 0.48 倍;例如 0.45 倍,0.43 倍,0.40 倍,或 0.38 倍,表明非特异疾病或紊乱已经发展到该疾病或紊乱的较缓和阶段。

38. 如权利要求 34-37 任一项所述的方法,其中所述样品中的 YKL-40 水平与 YKL-40 参考水平相比增加了 109%,表明非特异疾病或紊乱已经发展到该疾病或紊乱的更严重阶段。

39. 如权利要求 34-38 任一项所述的方法,其中所述样品中的 YKL-40 水平与 YKL-40 参考水平相比减小了 52%,表明非特异疾病或紊乱已经发展到该疾病或紊乱的较缓和阶段。

40. 如权利要求 25-39 任一项所述的方法,其中所述测定的样品的 YKL-40 水平高于一个或多个参考水平提供了非特异疾病或紊乱的分类。

41. 如权利要求 25-40 任一项所述的方法,其中通过将测定的样品的 YKL-40 水平与一个或多个 YKL-40 参考水平进行比较,提供所述非特异疾病或紊乱的分类,其中所述 YKL-40 水平越高,所述非特异疾病或紊乱就分类为越严重。

42. 如前面任一项权利要求所述的方法,其中所述疾病或紊乱是不产生升高的 C-反应蛋白水平的一种或多种疾病或紊乱或者一组疾病或紊乱。

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

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

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

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

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

48. 如权利要求 1-42 任一项所述的方法,其中所述 YKL-40 水平是在基于 PCR 的分析中测定。

49. 如前面任一项权利要求所述的方法,其中在与 YKL-40 相同的样品中测定一个或多个另外的生物标记的水平。

50. 如前面任一项权利要求所述的方法,其中所述一个或多个另外的生物标记选自 C-反应蛋白 (CRP)、ESR、癌胚抗原 (CEA)、CA-125、人表皮生长因子受体 2 (HER2)、CA19-9、乳酸脱氢酶 (LDH)、金属蛋白酶组织抑制剂 1 (TIMP-1)、脑钠素 (BNP)、白细胞介素、肿瘤坏死因子- $\alpha$ 、同型半胱氨酸、淀粉样 A 蛋白、妊娠相关血浆蛋白-A、肌钙蛋白、可溶性细胞间粘附分子-1、可溶性 UPAR、III 型前胶原性氨基端肽 (P-III-NP)、单核细胞趋化蛋白-1、纤维蛋白 D-二聚体、生长分化因子-15、缺血修饰性白蛋白、脂蛋白相关磷脂酶 A2、基质金属蛋白酶和 CKMB。

51. 如前面任一项权利要求所述的方法,其中所述一个或多个另外的生物标记选自

C- 反应蛋白、脑钠素和同型半胱氨酸。

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

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

54. 如前面任一项权利要求所述的方法,其中所述生物样品是血清或血浆。

55. 如前面任一项权利要求所述的方法,其中所述受试者是哺乳动物,优选为人。

56. YKL-40 作为存在非特异疾病或紊乱的生物标记的用途。

57. YKL-40 作为存在非特异疾病或紊乱的生物标记的用途。

58. YKL-40 作为分类非特异疾病或紊乱的严重性的生物标记的用途。

59. 一种诊断非特异疾病或紊乱的存在的装置,其中所述装置包括用于测量样品中的 YKL-40 水平的工具,以及用于将测量的 YKL-40 水平与至少一个 YKL-40 参考水平进行比较的工具。

60. 如权利要求 59 所述的装置,其中所述装置是试纸。

61. 如权利要求 59-60 任一项所述的装置,其中所述装置包括一代表临界值的单个参考水平。

62. 如权利要求 59-60 任一项所述的装置,其中所述装置包括用于将测量的 YKL-40 水平与一组年龄校正的 YKL-40 参考水平进行比较的工具。

63. 如权利要求 59-60 任一项所述的装置,其中所述装置包括用于将测量的 YKL-40 水平与下表限定的一组年龄依赖性临界值进行比较的工具:

健康受试者的年龄依赖性临界值					
年龄间隔 (岁)	第70个 百分位数 ( $\mu\text{g/l}$ YKL-40)	第75个 百分位数 ( $\mu\text{g/l}$ YKL-40)	第85个 百分位数 ( $\mu\text{g/l}$ YKL-40)	第90个 百分位数 ( $\mu\text{g/l}$ YKL-40)	第95个 百分位数 ( $\mu\text{g/l}$ YKL-40)
20 - 29	40	44	54	59	65
30 - 39	48	54	65	72	80
40 - 49	59	65	80	88	98
50 - 59	72	80	98	108	119
60 - 69	88	98	119	132	145
70 - 79	108	119	154	161	178
80 - 89	132	145	178	196	217

64. 一种试剂盒,包括:

i) 用于测量样品中的 YKL-40 水平的工具;

ii) 用于将测量的 YKL-40 水平与至少一个 YKL-40 参考水平进行比较的工具;

iii) 可选地,关于如何根据提供样品的受试者的年龄,对所述 YKL-40 参考水平进行年龄校正的说明书。

65. 如权利要求 64 所述的试剂盒,其中所述试剂盒进一步包括用于分析另外的生物标记的工具,所述另外的生物标记选自 C- 反应蛋白 (CRP)、ESR、癌胚抗原 (CEA)、CA-125、人表

皮生长因子受体 2 (HER2)、CA19-9、乳酸脱氢酶 (LDH)、金属蛋白酶组织抑制剂 1 (TIMP-1)、脑钠素 (BNP)、白细胞介素、肿瘤坏死因子- $\alpha$ 、同型半胱氨酸、淀粉样 A 蛋白、妊娠相关血浆蛋白-A、肌钙蛋白、可溶性细胞间粘附分子-1、可溶性 UPAR、III 型前胶原性氨基端肽 (P-III-NP)、单核细胞趋化蛋白-1、纤维蛋白 D-二聚体、生长分化因子-15、缺血修饰性白蛋白、脂蛋白相关磷脂酶 A2、基质金属蛋白酶和 CKMB。

66. 如权利要求 64-65 任一项所述的试剂盒,包括至少一种权利要求 59-63 所述的装置。

## 作为非特异疾病的通用标记的 YKL-40

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种诊断受试者中非特异疾病或紊乱存在的方法,其中测定的 YKL-40 水平高于参考水平表明存在非特异疾病或紊乱。受试者可能患有多种疾病或紊乱。本发明还涉及一种将受试者的非特异疾病或紊乱的严重性进行分类的方法,其中测定的 YKL-40 水平高于或低于一个或多个参考水平显示了所述非特异疾病或紊乱的严重性。本发明进一步涉及一种可用于本发明方法的试剂盒和装置,其包括用于测量样品中的 YKL-40 水平的工具;以及将测量的 YKL-40 与至少一个 YKL-40 参考水平进行比较的工具。

### 背景技术

[0002] 每当处理身体不适、疾病或者一种或多种症状时,都需要诊断潜在的疾病或紊乱。许多症状可以由几种疾病引起,包括身体和心理疾病。因此,疾病的诊断对于后续的治疗是极为重要的。在许多情况下,治疗的结果取决于疾病的进展,因此在诊断前的时间中,早期介入是非常重要的。然而,想要患者寻求医疗救助,至少需要出现一些症状。很多时候疾病可能在患者觉察之前发展,例如各种癌症疾病以及生活形态疾病,如动脉粥样硬化、冠心病、糖尿病、高血压、肝纤维化、慢性阻塞性肺疾病等。

[0003] 如果及时引入预防措施,例如改变生活方式,某些疾病可以得到更有效的治疗甚至避免。因此,参加健康普查变得越来越普遍。健康普查通常并不依赖任何症状作为起点。为了给患者作出诊断,无论是症状已经存在,还是与健康普查有关,医生都需要一个起点作为解释。

[0004] “红细胞沉降率”(也称作沉降率)先前已经被广泛用作炎症存在的指示剂。沉降率是血液红细胞在 1 小时内的沉淀速率。当存在炎性过程时,血液中高比例的纤维蛋白原引起红细胞相互粘连。沉降速率是由任何原因或炎症聚集而增大。基本沉降率在女性中稍高,并随年龄趋于上升。然而,在无症状人群中,沉降速率的有效性被它的低灵敏性和特异性所限制,但是当存在对疾病的适度怀疑时,它已经被作为一种疾病指数使用。

[0005] 目前,在炎症初始筛选方面,生物标记 C-反应蛋白(CRP)很大程度上已经接替了过去使用的沉降速率。CRP 是一种急性或慢性炎症或感染的指示剂,因此具有医学测试价值,反应炎症的存在和强度,但 C-反应蛋白的升高并不是任意情况的警示性诊断标志。例如,能够在血清 CRP 水平引起阳性应答的情况有风湿性关节炎、红斑狼疮、风湿热、癌症、心脏疾病、心血管疾病、炎症性肠病和细菌或病毒感染。然而并不是患有这些疾病的所有患者的血清 CRP 水平都升高,对于这些患者来说,血清 CRP 水平不能用作疾病指数。

### 发明内容

[0006] 本发明涉及一种诊断受试者的非特异疾病或紊乱存在的方法,所述方法包括:

[0007] i) 测定从受试者获得的样品中的 YKL-40 水平;和

[0008] ii) 将所述 YKL-40 水平与 YKL-40 参考水平进行比较;

[0009] 其中样品中的 YKL-40 水平高于参考水平表明存在非特异疾病或紊乱。优选地,

YKL-40 参考水平是通过测定健康个体样品中的 YKL-40 水平而获得的平均水平。或者, YKL-40 参考水平是先前从相同受试者中测定的 YKL-40 水平, 其中样品中的 YKL-40 水平与先前测定的 YKL-40 水平相比增加到 1.10 倍, 表明存在非特异疾病或紊乱。

[0010] 本发明还涉及一种将受试者的非特异疾病或紊乱的严重性进行分类的方法, 所述方法包括:

[0011] i) 测定从受试者获得的样品中的 YKL-40 水平; 和

[0012] ii) 将所述 YKL-40 水平与一个或多个 YKL-40 参考水平进行比较;

[0013] 其中所述非特异疾病或紊乱的严重性是从所述比较中推出的。优选地, 可通过测定健康个体样品中的 YKL-40 水平来提供一个或多个 YKL-40 参考水平。或者, YKL-40 的参考水平可以是先前从相同受试者中测定的 YKL-40 水平。

[0014] 本发明进一步涉及一种诊断非特异疾病或紊乱存在的装置, 其中所述装置包括用于测定样品中 YKL-40 水平的工具; 以及用于将测定的 YKL-40 水平与至少一个 YKL-40 参考水平进行比较的工具。在本发明的优选实施方式中, 该装置包括单一参考水平, 其代表一临界值。

[0015] 此外, 本发明涉及一套试剂盒, 包括 i) 用于测量样品中 YKL-40 水平的工具; 和 ii) 用于将测量的 YKL-40 水平与至少一个 YKL-40 参考水平进行比较的工具; iii) 可选地, 关于如何根据提供样品的受试者的年龄, 对 YKL-40 参考水平进行年龄校正的说明。

#### 附图说明

[0016] 图 1: 根据年龄和性别得到的 2116 名健康女性和 1494 名健康男性的 YKL-40 血浆浓度。参与者在 1991-1994 年血液采样时未患已知的疾病, 并且在 16 年追踪期间保持健康 (即, 没有人死亡或患癌症、缺血性心血管疾病、肝脏疾病、糖尿病、慢性阻塞性肺疾病、哮喘、风湿性关节炎、炎性肠病和肺炎)。这些健康参与者的中值血浆 YKL-40 是  $42 \mu\text{g/L}$  (2.5% -97.5% 百分位数范围:  $14-168 \mu\text{g/L}$ ; 90% 百分位数  $92 \mu\text{g/L}$ ; 95% 百分位数  $124 \mu\text{g/L}$ )。血浆 YKL-40 水平在两种性别中都随着年龄增大而增大 (t 检验  $p < 0.0001$ )。血浆 YKL-40 与年龄之间的 spearman' s rho 相关性是 0.41 ( $p < 0.0001$ )。女性和男性之间的血浆 YKL-40 没有差异 (Mann-Whitney U;  $p = 0.27$ )。

[0017] 图 2: 929 名 (463 名女性和 466 名男性) 健康参与者组中的 YKL-40 血浆浓度, 从他们 1991-1994 年检查的血液中进行第一次 YKL-40 测定, 并且从 2001-2003 年检查的血液中进行第二次 YKL-40 测定。平均增加在女性中为  $0.5 \mu\text{g/L/年}$  (四分位间距  $-0.6-2.1 \mu\text{g/L/年}$ ), 男性中为  $0.8 \mu\text{g/L/年}$  (四分位间距  $-0.3-2.9 \mu\text{g/L/年}$ )。这说明血浆 YKL-40 在保持健康的受试者中是非常稳定的, 并且计算回归稀释比率为 0.8042。男性和女性之间没有统计学差异。

[0018] 图 3A: 在 2116 名健康女性和 1494 名健康男性中测定 YKLA-40 的血浆浓度。参与者在 1991-1994 年血液采样时未患已知的疾病, 并且在 16 年追踪期间保持健康 (即没有人死亡或者患癌症、缺血性心血管疾病、肝脏疾病、糖尿病、慢性阻塞性肺疾病、哮喘、风湿性关节炎、炎症性肠病和肺炎)。这些图显示了这些健康参与者中取决于年龄的 50% 百分位数血浆 YKL-40 (圆圈), 70% 百分位数 (定义为  $\ln(\text{血浆 YKL-40}) = 3.1 + 0.02 \times \text{年龄 (岁)}$ ), 75% 百分位数 (定义为  $\ln(\text{血浆 YKL-40}) = 3.2 + 0.02 \times \text{年龄 (岁)}$ ), 90% 百分位数 (定

义为  $\ln(\text{血浆 YKL-40}) = 3.5 + 0.02 \times \text{年龄(岁)}$ ), 以及 95% 百分位数 (定义为  $\ln(\text{血浆 YKL-40}) = 3.6 + 0.02 \times \text{年龄(岁)}$ )。男性和女性合并。

[0019] 图 3B : 与图 3A 对应, 另外的血浆 YKL-40 百分位数 : 85% 百分位数 (定义为  $\ln(\text{血浆 YKL-40}) = 3.4 + 0.02 \times \text{年龄(岁)}$ ) 和 97.5% 百分位数 (定义为  $\ln(\text{血浆 YKL-40}) = 3.9 + 0.02 \times \text{年龄(岁)}$ )。

[0020] 图 4A : 一般人群的取决于 YKL-40 血浆浓度增加的寿命和存活率 (分成 5 个等级和 10 岁年龄百分位数类别 : 0-33% 百分位数、34-66%、67-90%、91-95% 和 96-100%)。下面的时间刻度分别为左截断年龄和追踪时间。追踪从血液采样时开始, 以死亡或者 2007 年 7 月为结束, 以先到的为准。将男性和女性合并。为进行比较, 显示了相同人群中吸烟状态的影响。

[0021] 图 4B : 取决于血浆 YKL-40 百分位数类别、吸烟状态、性别和年龄的绝对 10 年死亡率。基于哥本哈根市心脏研究 1991-1994 年检查并追踪 16 年的 8899 名参与者。P 值用于测试对数检验趋势。从左至右给出了 < 50 岁、50-70 岁和 > 70 岁的各年龄组的血浆 YKL-40 百分位数类别 0-33%、34-66%、67-90%、91-95% 和 96-100%。

[0022] 图 5 : 16 名健康受试者的 YKL-40 血浆浓度的个体日变化。

[0023] 图 6 : 38 名健康受试者为期 3 周的血浆 YKL-40 水平的个体变化。

[0024] 图 7 : 23 名受试者在 4 轮为期 3 周的测试中每轮得到的中值血浆 YKL-40 水平 (每一条表示每一轮每个受试者的中值)。

[0025] 图 8 : 30 名健康女性为期 4 周采样的个体血浆 YKL-40 水平, 其中 21 名女性 3 年后重复进行。

[0026] 图 9A 和 9B : 如上所见的试纸实施方式。

[0027] 发明详细说明

[0028] 本发明人意外地发现, YKL-40 水平可以用作通用的生物标记 (物), 指示非特异疾病或紊乱的存在。因此, 通过本发明的方法, YKL-40 水平可以用于诊断非特异疾病或紊乱的存在。

[0029] 提供以下定义是为了简化本发明的讨论, 因此不应将它们理解为对本发明的限制, 本发明通过所附权利要求和说明书整体来限定。

[0030] 本文使用的术语“非特异疾病或紊乱”, “非特异疾病”或“非特异紊乱”, 用于表示任意疾病或紊乱, 例如任意一种或多种疾病或紊乱, 它们有待被具体地诊断为具体的疾病或紊乱。患有非特异疾病或紊乱的受试者可以与一般人群进行区分, 因为它们不健康, 即患有某些形式的疾病或紊乱。因此, 诊断非特异疾病或紊乱的存在并不提供受试者中存在的特定疾病或紊乱的信息。

[0031] 本文使用的术语“通用生物标记 (物)” (general biomarker), 用于表示一种生物标记, 其给出受试者存在疾病或紊乱的指示, 与健康的受试者形成对照。通用生物标记并不给出关于受试者的具体疾病或紊乱的信息或诊断, 而是用于初始的筛选。然而, 缺乏通用生物标记, 例如水平低于可检测的水平, 或者低于预先定义的临界值, 并不应视为受试者中不存在疾病或紊乱的证据。通用生物标记可以用于给出存在疾病或紊乱的第一指示, 作为进一步诊断具体疾病的起始点。

[0032] 针对炎症广泛使用的通用生物标记的实例是血浆 C- 反应蛋白 (CRP)。CRP 通常与

初始筛选联系使用,例如用作心脏疾病、心血管疾病、细菌感染、病毒感染等的粗略指示剂。然而,某些患有疾病或紊乱的病人没有血清 CRP 水平或血清 CRP 水平的增加,因此 CRP 水平不能用作患有这些疾病的所有患者的疾病指数。

[0033] 在 CRP 广泛使用并为人熟知之前,红血球沉淀速率(通常称作沉淀速率)被用在初始筛选中作为炎症的非特异性测量,即作为疾病指数。

[0034] 本发明的方法提供一种 YKL-40 形式的新型的通用生物标记,并提供一种诊断非特异疾病或紊乱存在的方法或分类这种非特异疾病或紊乱的严重性的方法。进一步发现,YKL-40 不仅可以用于确定是否存在非特异疾病或紊乱,也可以确定疾病的状态,例如非特异疾病或紊乱的严重性。换句话说,已经发现 YKL-40 水平可以用作疾病指数。因此,YKL-40 可以用于分类受试者的疾病或紊乱是朝向更严重还是更缓和的状态发展。本发明人已经发现 YKL-40 是一种比 CRP 更广泛的通用生物标记。

[0035] 因此,本发明的第一方面涉及一种诊断受试者的非特异疾病或紊乱存在的方法,所述方法包括:

[0036] iii) 测定从受试者获得的样品中的 YKL-40 水平;和

[0037] iv) 将所述 YKL-40 水平与 YKL-40 参考水平进行比较;

[0038] 其中样品中的 YKL-40 水平高于参考水平表明存在非特异疾病或紊乱。

[0039] 本发明的方法是关于诊断任何疾病或紊乱的存在,例如任何一种或多种疾病或紊乱。例如,所述疾病或紊乱可以是导致 YKL-40 水平增加的任意疾病或紊乱。

[0040] 已经发现,个体中的血清或血浆 YKL-40 水平是长期稳定的,不受每日或每周变化的影响;还发现,该水平不受至少 20 分钟的锻炼的影响。因此,个体中的血清或血浆 YKL-40 的一次测量可以用于本发明的方法中。优选地,样品可以获得自受试者,例如之前已经戒除重度饮酒的受试者,以及例如没有细菌感染等明显症状的受试者。视需要可以在之后的时间点(如两周后)获得第二次或进一步的样品,以确认第一次测定的 YKL-40 水平的结果。

[0041] 应强调的是,YKL-40 水平的增加,例如血浆或血清中,可以反映多种或不同类型的疾病或紊乱,并且这种 YKL-40 水平的增加在健康受试者中一般见不到。因此根据本发明,YKL-40 可以用作一种疾病指数。

[0042] 本发明的第二方面涉及 YKL-40 作为非特异疾病或紊乱存在的生物标记的用途。从描述本发明的上述方法的文字中,可以明显看出本发明这一方面的进一步细节。因此,关于本发明方法所提及的任意特征加以必要的更改都适用于 YKL-40 作为非特异疾病或紊乱存在的生物标记的用途。

[0043] 本发明还涉及一种测定受试者中存在增加的 YKL-40 水平的方法,例如增加的血浆或血清 YKL-40 水平,所述方法包括:

[0044] v) 测定从受试者获得的样品中的 YKL-40 水平;和

[0045] vi) 将所述 YKL-40 水平与 YKL-40 参考水平进行比较;

[0046] 其中样品中的 YKL-40 水平高于参考水平表明所述受试者中存在非特异疾病或紊乱。参考水平可以是本文所述的,尤其是“参考水平”部分所述的任何参考水平。该方法优选地用于诊断受试者中非特异疾病或紊乱的存在,例如本文描述的任意疾病或紊乱。

[0047] 本发明的第三方面涉及一种诊断受试者中非特异疾病或紊乱存在的方法,所述方法包括:

[0048] i) 测定从受试者获得的样品中的 YKL-40 水平 ;和

[0049] ii) 将所述 YKL-40 水平与 YKL-40 参考水平进行比较 ;所述参考水平是先前从相同的受试者中测定的 YKL-40 水平 ;

[0050] 其中样品中的 YKL-40 水平与 YKL-40 参考水平相比增加到 1.10 倍,表明存在非特异疾病或紊乱。从描述本发明上述第一方面的文字中可以明显看出本发明第三方面的进一步细节。因此,除非另有说明,关于本发明第一方面提及的任意特征加以必要的更改都适用于本发明的第三方面。

[0051] 本发明的第四方面涉及一种分类受试者中非特异疾病或紊乱的严重性的方法,所述方法包括 :

[0052] iii) 测定从受试者获得的样品中的 YKL-40 水平 ;和

[0053] iv) 将所述 YKL-40 水平与一个或多个 YKL-40 参考水平进行比较 ;

[0054] 其中所述非特异疾病或紊乱的严重性是从所述比较中推出的。优选地,一个或多个 YKL-40 参考水平可以通过测量来自健康个体的样品中的 YKL-40 水平来提供。或者, YKL-40 参考水平可以是先前从相同受试者中测定的 YKL-40 水平。这种类型的参考水平将在下文进一步描述,尤其是在以下“参考水平”部分。

[0055] 本发明人意外地发现, YKL-40 水平可以作为一种生物标记用于本发明的第四方面,通过与一个或多个 YKL-40 参考水平进行比较,用于分类非特异疾病或紊乱的严重性。本发明人进一步发现, YKL-40 水平可以用作生物标记,用于跟踪记录疾病或紊乱的进展,即疾病或紊乱朝向疾病或紊乱的更严重还是较缓和的阶段发展,从而随着时间的推移重复和 / 或继续分类疾病或紊乱的严重性。当受试者的 YKL-40 测定值与一个或多个参考水平比较时,这是特别有意义且可行的,所述参考水平是先前从相同受试者中获得的测量值。因此,根据本发明的方法, YKL-40 水平不仅可以用于分类受试者的疾病或紊乱的严重性,而且可以分类和跟踪疾病或紊乱的严重性。

[0056] 患有相同疾病的病人在疾病严重性方面具有显著的差异 (即疾病严重性的等级不同)。本文使用的术语“严重阶段”、“严重性”、“较缓和”和“更严重”用于表示严重的等级,例如根据对治愈的预测、存活的预测、疾病进展的预测,或者根据不同的预先确定的疾病阶段。这些阶段可以取决于不同的症状、和 / 或传统的可测量的生物标记水平、身体功能等。当集中研究一个和相同受试者的疾病进展时,则更严重的阶段指病情的恶化 ;反之,与先前确定的相比,较缓和的阶段指病情的好转,例如由于有令人满意的治疗方案。

[0057] 从描述本发明上述的第一或第三方面的文字中可以明显看出本发明第四方面的进一步细节。因此,除非另有说明,关于本发明第一或第三方面提及的任意特征加以必要的更改都适用于本发明的第四方面。

[0058] 本发明的第五方面涉及 YKL-40 作为一种分类疾病或紊乱的严重性的生物标记的用途。从描述本发明上述方法的文字中可以明显看出本发明该方面的进一步细节。因此,关于本发明的方法所提及的任意特征加以必要的更改都适用于 YKL-40 作为一种分类疾病或紊乱的严重性的生物标记的用途。

[0059] 本发明的方法可以用于鉴别那些也可通过 CRP 鉴别的疾病的存在或严重性,而且可以进一步用于鉴别那些在 CRP 水平不产生响应的疾病。因此,在本发明的一种实施方式中,非特异疾病或紊乱是不产生升高的 C- 反应蛋白水平的一种或多种疾病或紊乱或一组

疾病或紊乱。

[0060] 可以进一步设想,本发明的方法可用作个性化医疗中与伴随诊断试验相关的诊断工具。例如,这可能与 YKL-40 配体或用于治疗疾病或紊乱的其他类型的化合物相关。

[0061] 本文使用的术语“改善”用于表示改进或者变得更好;与疾病状态的严重性或进展的缓解相关,包括它的减轻或治愈,或者感觉到的严重性的缓解,如相关疼痛的缓解。

[0062] 本文使用的术语“抗体”用于表示免疫球蛋白分子及免疫球蛋白分子的活性部分或片段,如 Fab 和 F(ab')<sub>2</sub>,它们能够与 YKL-40 蛋白的抗原决定簇结合。例如,抗体是完整的免疫球蛋白分子或保留该免疫活性的片段。本文使用的术语“抗原”用于表示免疫原性的全长 YKL-40 分子或者其片段。

[0063] 本文使用的术语“生物样品”用于表示从受试者或个体获得的样品。

[0064] 本文使用的术语“生物标记”用于表示特定生物学性质如病理或生理状态的分子指示剂。

[0065] 本文使用的术语“疾病”和/或“紊乱”用于表示受试者或者个体的疾病、损伤或紊乱。紊乱通常是先天性的疾病或损伤。

[0066] 本文使用的术语“受试者”和/或“个体”用于表示一种物种的单个成员,本文优选地表示哺乳动物物种。本文使用的术语“哺乳动物”包括人类和非人类。本文使用的术语“病人”用于表示患有疾病或紊乱的任意个体。

[0067] 本文使用的术语“hnRNA”表示异核 RNA。本文使用的术语“mAb”表示单克隆抗体。本文使用的术语“mRNA”表示信使 RNA。本文使用的术语“RNA”表示从天然或合成源分离的任意类型的 RNA。本文使用的术语“基本上纯的”用于描述 YKL-40,指基本完整的分子,其本质上不包含可能与 YKL-40 同时出现的其他分子。

[0068] YKL-40

[0069] YKL-40 的命名是基于它的三个 N-端氨基酸酪氨酸(Y)、赖氨酸(K)和亮氨酸(L)及其约 40kDa 的分子量(Johansen et al. 1992)。人 YKL-40 的完整氨基酸(SEQ ID NO :2)和编码序列(SEQ ID NO :1)可在 GenBank 中找到,登录号:M80927。人 YKL-40 含有 383 个氨基酸的单肽链,并且就进化史来说是一种高度保守的肝素结合性与几丁质结合性血浆糖蛋白。人 YKL-40 与来自几种其他哺乳动物的同系物之间的序列同一性为:猪(84%序列同一性),牛(83%),山羊(83%),绵羊(83%),豚鼠、大鼠(80%),小鼠(73%)。YKL-40 是“哺乳动物几丁质酶样蛋白”中的一员,但是没有几丁质酶活性。YKL-40 的体外表达在正常的人单核细胞中是没有的,但是可以在巨噬细胞分化的后期通过激活的单核细胞和中性粒细胞,通过血管平滑肌细胞、癌细胞和关节软骨细胞而强烈地诱导。在体内,YKL-40mRNA 和蛋白通过炎症组织中的巨噬细胞亚群表达,如动脉粥样硬化斑块、患有巨细胞性关节炎的个体的关节炎脉管、发炎的滑膜、肉瘤病灶,以及通过瘤周巨噬细胞表达。

[0070] 分子处理支配 YKL-40 的诱导,但它的确切功能尚不清楚。YKL-40 是一种分泌蛋白,表明它的活性位点很可能是细胞外;不过还没有识别出 YKL-40 的特异性细胞表面或者可溶性受体。YKL-40 是成纤维细胞和软骨细胞的生长因子,与 IGF-1 协同发挥作用,由 TNF 和 IL-6 调控,并且需要 NF-kappaB 的持续活化(Recklies et al., 2002, Ling et al., 2004, Recklies et al., 2005)。通过 AKT 的磷酸化,纤维原细胞的 YKL-40 处理可以抵消对 TNF 和 IL-1 的炎性应答,从而减弱 ASK1 介导的信号途径。这导致金属蛋白酶和 IL-8 表达的水平降

低 (Recklies et al., 2002, Ling et al., 2004, Recklies et al., 2005)。而且, YKL-40 与 I 型、II 型和 III 型胶原结合, 并调节 I 型胶原纤维蛋白形成的速率 (Bigg et al., 2006)。这些观察结果表明 YKL-40 在炎症环境中可能发挥保护的作用, 限制细胞外基质的降解, 并由此控制组织重塑。YKL-40 还可以充当内皮细胞的化学诱导剂, 刺激它们的迁移, 并促进血管平滑肌细胞的迁移和粘着 (Millis et al., 1986, Nishikawa et al., 2003; Shackelton et al., 1995), 表明了血管形成方面的作用。YKL-40 也是纤维原细胞的生长因子, 并具有抗分解作用, 在组织重塑期间保护细胞外基质 (De Ceunicnck et al., 2001, Recklies et al., 2002, Ling et al., 2004, Recklies et al., 2005)。此外, 动脉粥样硬化斑块中的巨噬细胞表达 YKL-40mRNA, 尤其是那些已经渗透病灶深处的巨噬细胞, 并且在动脉粥样硬化症早期病灶的巨噬细胞中发现最高的 YKL-40 表达 (Boot et al., 1999)。此外, YKL-40 可以被视为一种急性期蛋白, 因为它的血浆或血清浓度在几种炎症疾病中是增大的。

[0071] 介导 YKL-40 的生物效应的细胞受体尚不知, 但是胞浆内信号传导途径的激活表明 YKL-40 与细胞膜上的信号组件发生相互作用。

[0072] 本发明的一个目的是检测 YKL-40 基因的任意转录产物, 该基因的转录产物可能是 YKL-40 蛋白的 hnRNA、mRNA、全长蛋白、片段蛋白、或肽。可以理解的是, 可同时检测一种或多种蛋白、RNA 转录物、片段和 / 或肽。本发明的另一方面是通过任意可得的手段检测转录产物, 例如通过免疫分析检测 YKL-40 蛋白、其片段或肽的抗体等, 以及通过基于 PCR 的分析进行检测, 例如通过 RT-PCR 检测 RNA。

#### [0073] YKL-40 的检测

[0074] 本发明的肽和核苷酸包括 YKL-40 的功能衍生物、YKL-40 肽及其编码核苷酸。“功能衍生物”表示分子的“片段”、“变体”、“类似物”或“化学衍生物”。分子的“片段”, 例如本发明的任意 DNA 序列, 包括该分子的任意核苷酸子集。这类分子的“变体”是指基本上与整个分子或其片段相似的天产生的分子。分子的“类似物”指基本上与整个分子或其片段相似的非天然分子。

[0075] 如果两个分子的氨基酸序列基本相同, 则认为一个分子与另一分子“基本相似”。基本相似的氨基酸分子具有相似的生物活性。因此, 假定两种分子具有相似的活性, 即使其中一个分子含有另一分子中没有的另外的氨基酸残基, 或者氨基酸残基的序列不一致, 它们也被视为本文使用的术语“变体”。

[0076] 此外, 当分子含有另外的通常不是分子一部分的化学基团时, 该分子被看作是另一分子的“化学衍生物”。这类基团可以改善分子的溶解性、吸收、生物半衰期等。或者, 该基团也可降低分子的毒性, 消除或者减轻分子的任意未知的副作用等。能够调节这种作用的基团已经被公开, 例如 Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1980。

[0077] YKL-40 一级氨基酸序列的微小修饰可能产生与本文所述的 YKL-40 肽具有基本相似的活性的多肽和蛋白。这种修饰可以是有意设计的, 如通过定位诱变, 或者可以是无意识的。通过这些修饰产生的所有的肽都包含在本文中, 只要 YKL-40 的生物活性仍然存在。此外, 一个或多个氨基酸的缺失也可以导致对所得的分子结构的修饰, 而不显著改变它的生物活性。这样可以开发具有更广用途的更小的活性分子。例如, 可以除去氨基或羧酸末端的氨基酸, 对于酶发挥令人满意的催化或抗原活性来说, 可能不需要这些氨基酸。

[0078] 无论多克隆还是单克隆抗体都可用于本发明下述的免疫分析和治疗方法中。某些抗 YKL-40 抗体可以商业购买,或者可根据本文描述或本领域已知的方法产生。通过将基本上纯的 YKL-40 或者抗原 YKL-40 肽多次皮下或者肌肉内注射到适宜的非人哺乳动物中,可以产生多克隆抗体。YKL-40 肽的抗原性可以通过常规的技术来测定,以确定用该肽免疫过的动物的抗体应答的程度。一般而言,用于产生抗 YKL-40 抗体的 YKL-40 肽通常应该诱导产生高滴度抗体,该抗体对 YKL-40 有相对高的亲和力。在本发明的一种实施方式中,使用试纸测定 YKL-40 水平。

[0079] 视需要,免疫肽可以使用本领域熟知的技术通过偶联作用与载体相连接。这类常用的可以与肽化学偶联的载体包括钥孔戚血蓝素 (KLH)、甲状腺球蛋白、牛血清白蛋白 (BSA) 以及破伤风类毒素。然后,将偶联的肽用于免疫动物(如小鼠或兔子)。因为 YKL-40 可保存在哺乳动物物种中,优选的是使用载体蛋白以增强 YKL-40 蛋白的免疫原性。

[0080] 然后,从取自哺乳动物的血液样品中获得抗体。用于开发多克隆抗体的技术是本领域已知的,例如 *Methods of Enzymology, "Production of Antisera With Small Doses of Immunogen: Multiple Intradermal Injections"*, Langone, et al. eds. (Acad. Press, 1981)。由动物制备的多克隆抗体可以进一步被纯化,例如通过将产生抗体的肽与基质结合并从基质中洗脱。本领域的技术人员知晓免疫领域中常用的纯化和/或浓缩多克隆抗体及单克隆抗体的多种技术,例如见 Coligan, et al., Unit 9, *Current Protocols in Immunology*, Wiley Interscience, 1991。

[0081] 然而,优选地,产生的 YKL-40 抗体为单克隆抗体("mAb's")。对制备单克隆抗体来说,优选的是免疫小鼠或大鼠。本发明使用的术语"抗体"包括完整分子及其片段,例如能够与抗原决定簇结合的 Fab 和 F(ab')<sub>2</sub>。同时,在本文中,术语"本发明的 mAb's"指对于 YKL-40 具有特异性的单克隆抗体。

[0082] 用于生产分泌 mAbs 的杂交瘤细胞的一般方法是众所周知的 (Kohler and Milstein, 1975)。简而言之,如 Kohler 和 Milstein 所述,该技术包括从 5 名单独患有黑色素瘤、畸胎癌或子宫癌、神经胶质瘤或肺癌的癌症病人的局部引流淋巴结中分离淋巴细胞(此处样品是从手术样本中获得);将细胞集中;以及将细胞与 SHFP-1 融合。杂交瘤细胞经筛选,用于生产与癌细胞系结合的抗体。

[0083] mAb's 中 YKL-40 特异性的确认可以用相对常规的筛选技术来完成(例如酶联免疫吸附分析,或"ELISA"),以确定所关注的 mAb 的基本反应模式。还可能用于评估一种 mAb,在没有过度试验的情况下,通过确定被测试的 mAb 是否防止本发明的 mAb 与所述分离的 YKL-40 相结合,以确定是否具有与本发明 mAb 同样的特异性。如果被测试的 mAb 与本发明的 mAb 竞争,本发明 mAb 显示的结合下降,那么有可能是这两种单克隆抗体结合相同的或密切相关的表位。确定一种 mAb 是否具有本发明 mAb 的特异性的另一种方法是:用通常能与 mAb 反应的抗原来预孵育本发明的 mAb,并确定被测试的 mAb 与抗原结合的能力是否被抑制。如果被测试的 mAb 被抑制,那么很可能它具有与本发明的 mAb 相同或密切相关的表位特异性。

[0084] 免疫分析方法

[0085] 使用的免疫分析方法必须是定量的,使得患病个体的 YKL-40 的水平可以与健康人中存在的正常水平和/或该个体中测量的背景水平相区别。因此,优选的是在固相上使

用可检测的标记（直接或间接）的竞争性和夹心分析法。该标记会提供一种检测信号，指示抗体与 YKL-40 抗原的结合。抗体或抗原可以用本领域已知的任意标记物来标记以提供检测信号，包括放射性同位素、酶、荧光分子、化学发光分子、生物发光分子和胶体金。在已知的分析方法中，对于灵敏度而言，放射免疫分析 (RIA) 或者酶联免疫分析 (ELISA) 是最优选的。因此，放射性同位素是优选的标记。

[0086] 因此，在本发明方法的具体实施方式中，YKL-40 水平是用免疫分析法来测定。在一种实施方式中，免疫分析是竞争性免疫分析。

[0087] 在本发明的一种实施方式中，免疫分析使用单克隆抗体来测定 YKL-40。在本发明另一种实施方式中，免疫分析使用多克隆抗体来测定 YKL-40。

[0088] 当本发明的方法使用免疫分析法时，则可使用检测标记来测定 YKL-40，该检测标记选自放射性同位素、酶、荧光分子、化学发光分子、生物发光分子和胶体金属。

[0089] 可以直接与抗体结合、或间接与 YKL-40 抗原结合的金属离子的实例是本领域技术人员熟知的，包括  $^{125}\text{I}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{97}\text{Ru}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ 、 $^{68}\text{Ga}$ 、 $^{72}\text{As}$ 、 $^{89}\text{Zr}$ 、 $^{90}\text{Y}$  和  $^{201}\text{Tl}$ 。考虑到易于连接且不损害抗原结合特异性，优选的是  $^{125}\text{I}$ （钠盐，Amersham, United Kingdom）。用  $^{125}\text{I}$  标记 YKL-40 可按照 Salacinski, et al. (1981) 中描述的方法进行。用于提供  $^{125}\text{I}$  标记的 Iodogen (1,3,4,6-四氯-3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -二苯基苄胺) 可购自 Pierce and Warriner, Chester, England。

[0090] 在本发明优选的实施方式中，YKL-40 的血浆水平可以通过双位点夹心型酶联免疫吸附分析 (ELISA)（如商业的 Quidel, California, USA）以一式两份进行测定 (Harvey et al., 1998)，使用链霉亲和素包被的微孔板、生物素化的 Fab 单克隆捕获抗体、以及碱性磷酸酶标记的多克隆检测抗体。当使用 Quidel 时，ELISA 的回收率是 102%，检测限是 10  $\mu\text{g/L}$ 。本文中灵敏度定义为等于零结合值的标准偏差的 2 倍的可检测质量。标准曲线在 20-300  $\mu\text{g/L}$  之间一般是线性的。批内变异系数是 5%（在 40  $\mu\text{g/L}$  时）、4%（在 104  $\mu\text{g/L}$  时）、4%（在 155  $\mu\text{g/L}$  时）。批间变异系数 < 6%。

[0091] 本发明的另一种实施方式使用放射性免疫测定法，其中将标准品或样品与基本上等体积的 YKL- 抗血清和 YKL-40 示踪物一起孵育。标准品和样品通常一式两份进行分析。本发明分析的灵敏度（检测限）为约 10  $\mu\text{g/L}$ 。本文中的灵敏度定义为等于零结合值的标准偏差 2 倍的可检测质量。标准曲线在 20-100  $\mu\text{g/L}$  之间一般是线性的。以下实施例中描述的分析的批内变异系数与批间变异系数分别为 < 6.5% 和 < 12%。

[0092] 本领域技术人员可以理解，虽然不一定像 RIA 那样灵敏，但使用放射性同位素以外的标记物的分析程序也具有某些优势，因此可被采用作为 RIA 设计的替代方案。

[0093] 例如，酶联免疫吸附分析 (ELIAS) 容易自动化，使用易于从许多研究和临床实验室中获得的 ELISA 微量滴定板读取器和试剂。荧光、化学发光和生物发光标记具有可以视觉检测的优点，不过在分析中它们不像放射性同位素那样用于定量被抗体结合的抗原数量。

[0094] 基于 PCR 的分析

[0095] 此外，本领域技术人员可以理解，免疫分析法以外的方法也可用于检测和定量生物样品中 YKL-40 的存在。例如，编码 YKL-40 的多肽可用本领域已知的定量聚合酶链反应 (PCR) 方法来检测。因此，在本发明方法的一种实施方式中，YKL-40 水平是以基于 PCR 的分析方法来测定。进行定量 PCR 的优选方法是使用竞争模板进行的竞争性 PCR 技术，竞争模板

含有一个或多个碱基对的诱导突变,导致竞争体在序列或大小方面不同于目标 YKL-40 基因模板。其中一种引物是生物素化的、或者优选地是氨基化的,使得所得 PCR 产物的一条链(通常是反义链)可以通过氨基-羧基、氨基-氨基、生物素-链亲合素或其他适宜的与固体载体的紧密结合进行固定,该固体载体已经与适当的反应物紧密结合。最优选地,PCR 产物、固相载体以及反应物之间的结合是共价结合,这样能可靠地使键在变性条件下抵抗解偶联。

[0096] 一旦 PCR 产物的氨基化或生物素化的链被固定,未结合的互补链就在碱性变性洗涤中分离出来,并从反应环境中除去。将与目标和竞争核酸相对应的序列特异性寡核苷酸(“SSO' s”)用检测标签进行标记。然后,SSO' s 与反义链进行杂交,不存在已除去的未结合的正义链的竞争。添加合适的分析试剂,并且通过 ELISA 测定工具测定杂交的程度,该工具与使用的检测标签和固相载体工具是相称的,优选地为 ELISA 酶标仪。将测定值与衍生的目标核酸含量使用单独来自 PCR 反应扩增模板的标准曲线进行比较,所述模板包含目标模板和竞争性模板。该方法是具有优势的,因为它是定量的,不依赖于 PCR 循环的次数,并且不受 SSO 探针与 PCR 产物的互补链之间竞争的影响。

[0097] 或者,部分聚合步骤与整个杂交步骤可以在固相载体上进行。在该方法中,捕获在固相载体上的是核苷酸聚合引物(优选寡糖),而不是 PCR 产物的链。然后,将目标和竞争性核酸 PCR 产物添加到固相载体上,并进行聚合步骤。将聚合产物的未结合的正义链在上述变性条件下除去。

[0098] 通过标记的寡糖 SSO 探针的检测,使用合适的测定方法(优选 ELISA 阅读器)和之前所述的标准曲线,可以确定目标核酸与竞争性核酸的比率。该方法的效率很高使得聚合步骤中的链反应可以是非必需的,从而缩短完成该方法所需要的时间。该方法的精确度也得到增强,因为最终的聚合产物不必从反应管转移到固相载体上用于杂交,从而限制了它们受损失或损害的可能性。然而,对具体样品来说,如果需要,PCR 可在单独的反应管中用于扩增目标和竞争性核酸,接着在固相载体上进行最后的聚合。

[0099] 在反应的最后几个周期中,可以向反应液中添加一些本领域技术人员已知的分子,该分子能够提供不同的可检测信号,指示结合的 PCR 产物的形成(例如标记的核苷酸发色团,其可以形成不同的颜色,指示目标和竞争性 PCR 产物的形成)。目标和竞争性核酸之间的比率也可以通过 ELISA 或其他适宜的测定方法以及与检测标签反应的试剂来测定,所述检测标签与固定的杂交引物的 3' 端相连。通过进行常规的非竞争性 PCR,该方法还可适用于检测样品中是否存在特定的基因(不进行定量)。

[0100] 本领域的普通技术人员知道或者可易于确认,如何选择合适的底物用于上述的方法。至于上述技术的进一步细节,可参考 Kohsaka, et al., Nuc. Acids Res., 21:3469-3472, 1993; Bunn, et al., U. S. Pat. No. 5, 213, 961 以及 tonnis, et al., PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Acad. Press, 1990 中公开的内容,本文将其中的内容纳入,仅为了说明定量 PCR 方法相关领域的现有技术。

[0101] 参考水平

[0102] YKL-40 的水平提高表示存在非特异疾病或紊乱,因此可以用于诊断此种非特异疾病或紊乱的存在。通过将测定的值与参考水平值进行比较,可确定给定的受试者的 YKL-40 水平是否提高。参考水平还可以是一个或多个参考水平,例如每个参考水平反映非特异疾

病或紊乱的增强的严重性,或者例如参考水平可以是先前从相同受试体的样品中测量获得的一个或多个参考水平。

[0103] 例如,先前已经针对各种疾病或从健康个体中报道了 YKL-40 水平,由此给出正常水平的指示。然而,先前报道的来自健康个体的“正常”YKL-40 水平,在后续随着时间推移得不到支持时,可以研究该健康个体是否随时间推移而保持健康。相应地,先前报道的 YKL-40 水平包括那些在采样时潜在地患有未被识别的疾病的个体,因此报道的 YKL-40 水平不能代表真实的“正常水平”。例如,在不考虑年龄影响的情况下,这种先前报道的来自健康个体的 YKL-40 水平也可以报道为平均水平。

[0104] 从本发明中包含的实施例中可以看出,本发明已经建立一种表达真实的“正常水平”的方法。该正常水平的识别是以大量健康个体为基础,并且随时间推移对这些个体进行追踪,以证实他们是否为真的“健康个体”。本发明人意外地发现,识别的“正常水平”可以根据本发明的方法用于诊断受试者中疾病或紊乱的存在,例如非特异疾病或紊乱。本发明人还发现,年龄对 YKL-40 水平有很大的影响,因此在使用本发明的方法时需要考虑年龄。

[0105] YKL-40 的参考水平可以用多种方式表示;传统地,参考水平可来自不同年龄的健康个体组。本发明人已经研究了年龄对 YKL-40 水平的影响,并且发现测量的 YKL-40 水平最好与特定年龄组进行相比。

[0106] 个体的特定年龄组可包括所有出生在同年或十年内的个体或任意其他分组,例如包括年龄 0-10 岁,年龄 10-20 岁,年龄 20-30 岁,年龄 30-40 岁,年龄 40-50 岁,年龄 50-60 岁,年龄 60-70 岁,年龄 70-80 岁,年龄 80-90 岁,年龄 90-100 岁等个体的组。间隔可以是相隔 2 岁的年龄差异,3、4 或 5 岁的年龄差异,6、7、8、9、10 岁的年龄差异(如上所写),12、15、20 或更多岁的年龄差异。所述间隔还可以是开放式的,例如个体都大于 20、30、40、50、60 或其他年龄。

[0107] 本发明人发现,男性和女性的血浆 YKL-40 水平之间没有统计学差异(见本文实施例 1)。因此,形成参考水平的计算基础的个体组可以是混合性别或相同性别的个体组。参考水平也可从当前正待诊断疾病或紊乱存在的相同个体中获得。例如,YKL-40 水平可以在一个或多个样品中测量,该样品是在诊断疾病或紊乱之前(生病前),或者在确立疾病或紊乱的症状之前(症状前)获得。

[0108] 在本发明的优选实施方式中,YKL-40 的参考水平是通过测定健康个体样品中的 YKL-40 而获得的平均水平,更优选地,由此获得的平均水平是经年龄校正的平均水平。

[0109] 具体来讲,在本发明的一种实施方式中,平均水平是约 14 至约 168  $\mu\text{g/L}$  范围(2.5% -97.5% 百分位数范围)的 YKL-40 血浆水平,优选小于约 124  $\mu\text{g/L}$  的血浆水平(95% 百分位数),更优选小于约 92  $\mu\text{g/L}$  的血浆水平(90% 百分位数)。优选地,该平均水平是约 35 至约 55  $\mu\text{g/L}$  的 YKL-40 血浆水平,例如优选约 40 至约 50  $\mu\text{g/L}$ 。在本发明更具体的实施方式中,中值水平是约 42  $\mu\text{g/L}$  的 YKL-40 血浆水平。血浆 YKL-40 水平在两种性别中都随年龄增加而增加,并且女性和男性的血浆 YKL-40 水平之间没有差异。这些血浆 YKL-40 水平来自大量健康受试者的样品并通过研究大量健康受试者的样品而得到,因此为本发明方法中使用的血浆 YKL-40 水平提供了有充分根据的参考水平(见本文实施例 1)。

[0110] 当本发明使用年龄校正的平均水平时,则该平均水平对女性来说可通过增加 0.5  $\mu\text{g/L}$ /年来进行年龄校正,男性为 0.8  $\mu\text{g/L}$ /年。该年龄-校正优选地是针对相同受

试者中先前测定的 YKL-40 水平进行,例如,其可以与本发明的第三或第四方面相关。或者,参考水平可以是一组 YKL-40 年龄依赖性参考水平,例如一个或多个 YKL-40 参考水平,通过测量健康个体的年龄分布亚群的样品的 YKL-40 水平而获得,即本文以上所述的个体的年龄特异性分组,例如都在相同 10 年内出生的个体。例如,一组参考水平,每一个都是以下年龄组中健康个体的平均 YKL-40 血浆水平:30 至 39 岁,40 至 49 岁,50 至 59 岁,60 至 69 岁。本文以下进一步给出优选的 YKL-40 年龄依赖性参考水平组。

[0111] 在本发明方法的具体实施方式中, YKL-40 的一个或多个参考水平中,有一个是年龄校正的临界值,其对应健康个体中测定的 YKL-40 的第 75 个百分位数。

[0112] 在本发明方法的另一种具体实施方式中, YKL-40 的一个或多个参考水平中,有一个是年龄校正的临界值,其对应健康个体中测定的 YKL-40 的第 85 个百分位数。

[0113] 在本发明方法的另一种具体实施方式中, YKL-40 的一个或多个参考水平中,有一个是年龄校正的临界值,其对应健康个体中测定的 YKL-40 的第 90 个百分位数。

[0114] 在本发明方法的另一种具体实施方式中, YKL-40 的一个或多个参考水平中,有一个是年龄校正的临界值,其对应健康个体中测定的 YKL-40 的第 95 个百分位数。

[0115] 在本发明方法的另一种具体实施方式中, YKL-40 的一个或多个参考水平中,有一个是年龄校正的临界值,其对应健康个体中测定的 YKL-40 的第 97.5 个百分位数。

[0116] 在本发明方法的优选实施方式中, YKL-40 的一个或多个参考水平包括由测量健康个体样品中的 YKL-40 水平而获得的一组 YKL-40 参考水平:第一参考水平是 YKL-40 的中位值,第二参考水平是 YKL-40 的第 75 个百分位数,第三参考水平是 YKL-40 的第 85 个百分位数,第四参考水平是 YKL-40 的第 90 个百分位数,第五参考水平是 YKL-40 的第 95 个百分位数,第六参考水平是健康个体中 YKL-40 的第 97.5 个百分位数,第七参考水平是 YKL-40 的中位值的 4.5 倍,第八参考水平是健康个体中 YKL-40 的中位值的 5 倍。

[0117] 另一种具体说明参考水平的方法是使用临界值。临界值一般是将许多个体分成两组的值:一组具有高于具体临界值的 YKL-40 水平,一组具有低于具体临界值的 YKL-40 水平。临界值可以是代表生理 YKL-40 水平的任意数值,该生理 YKL-40 水平可以在任意类型的生物样品中测定,或者由该领域内的技术人员进行选择。

[0118] 临界值可用作个体是否属于某一类别的是或否的指示剂,对本发明来说,它与非特异疾病或者与非特异疾病或紊乱的不同阶段的严重性相对应(与本发明的第四方面相关)。

[0119] 在本发明的一种实施方式中, YKL-40 参考水平是年龄校正的临界值,例如约  $80 \mu\text{g/l}$  血清 YKL-40 的临界值,例如约  $90 \mu\text{g/l}$  血清,约  $100 \mu\text{g/l}$  血清,约  $110 \mu\text{g/l}$  血清,约  $120 \mu\text{g/l}$  血清,或约  $130 \mu\text{g/l}$  血清 YKL-40。优选约  $100 \mu\text{g/l}$  血清 YKL-40。年龄校正可以按照本文其他地方所述进行。

[0120] 因此,在本发明优选的实施方式中, YKL-40 参考水平是年龄校正的临界值,对应健康个体中血浆 YKL-40 的第 90 个百分位数,例如年龄约 50 岁的受试者的 YKL-40 血浆值为  $92 \mu\text{g/l}$ ,或年龄约 60 岁的受试者的 YKL-40 血浆值为  $111 \mu\text{g/l}$ ;更优选地,它是对应健康个体中血浆 YKL-40 的第 95 个百分位数的年龄校正的临界值,例如年龄约 50 岁的受试者的 YKL-40 血浆值为  $100 \mu\text{g/l}$ ,或年龄约 60 岁的受试者的 YKL-40 血浆值为  $124 \mu\text{g/l}$ 。当第 95 个百分位数血浆水平经年龄校正,并用作临界值时,则 YKL-40 水平中可以存在更大的

潜在个体差异。例如,当本发明的方法集中针对一个个体受试者应用时,使用第 95 个百分位数,或者第 97.5 个百分位数可能是恰当的。然而,在本发明方法的某些例子中,优选的是应用第 90 个百分位数的血浆 YKL-40 水平,例如,当该方法应用于筛选目的以识别尚未产生症状的非特异疾病时。以相同的方式,例如对于筛选目的来说,还可能恰当的是使用健康个体中血浆 YKL-40 的第 70 个百分位数、第 75 个百分位数或第 85 个百分位数,使用哪种百分位数将取决于所需要的灵敏性的水平。选择作为临界值的百分位数越低,获得的灵敏性越高。通过使用低百分位数,可发现受试者仅轻微地受到疾病或紊乱的影响,如疾病或紊乱的早期阶段。然而,选择的百分位数越低,筛选中发现的未患非特异疾病或紊乱的受试者部分越高,这可能是由于潜在的个体的生物变化。

[0121] 因此,通过确定样品中 YKL-40 的测定水平是否高于一个或多个参考水平,进一步提供了本发明的第四方面的非特异疾病或紊乱的严重性的分类。换句话说,通过将样品中测定的 YKL-40 水平与 YKL-40 的一个或多个参考水平进行比较来提供非特异疾病或紊乱的分类,其中 YKL-40 水平越高,非特异疾病或紊乱的分类就越严重。

[0122] 或者,临界值可定义为与 3610 名健康受试者中限定的以下百分位数对应的血浆 YKL-40 水平:根据年龄

[0123] 70%百分位数(定义为  $\ln(\text{血浆 YKL-40}) = 3.1 + 0.02 \times \text{年龄(岁)}$ ),

[0124] 75%百分位数(定义为  $\ln(\text{血浆 YKL-40}) = 3.2 + 0.02 \times \text{年龄(岁)}$ ),

[0125] 90%百分位数(定义为  $\ln(\text{血浆 YKL-40}) = 3.5 + 0.02 \times \text{年龄(岁)}$ ),和

[0126] 95%百分位数(定义为  $\ln(\text{血浆 YKL-40}) = 3.6 + 0.02 \times \text{年龄(岁)}$ )。

[0127] 临界值还可定义为与 3610 名健康受试者中限定的以下百分位数对应的血浆 YKL-40 水平:根据年龄

[0128] 70%百分位数(定义为  $\ln(\text{血浆 YKL-40}) = 3.1 + 0.02 \times \text{年龄(岁)}$ ),

[0129] 75%百分位数(定义为  $\ln(\text{血浆 YKL-40}) = 3.2 + 0.02 \times \text{年龄(岁)}$ ),

[0130] 85%百分位数(定义为  $\ln(\text{血浆 YKL-40}) = 3.4 + 0.02 \times \text{年龄(岁)}$ ),

[0131] 90%百分位数(定义为  $\ln(\text{血浆 YKL-40}) = 3.5 + 0.02 \times \text{年龄(岁)}$ ),

[0132] 95%百分位数(定义为  $\ln(\text{血浆 YKL-40}) = 3.6 + 0.02 \times \text{年龄(岁)}$ ),和

[0133] 97.5%百分位数(定义为  $\ln(\text{血浆 YKL-40}) = 3.9 + 0.02 \times \text{年龄(岁)}$ )。

[0134] 在本发明方法的优选实施方式中,YKL-40 的参考水平是用受试者的年龄,直接根据上述公式计算。该公式在图 3A 和 3B 中也有描述,这些图可以以更直接的方式应用,可以在不需要计算的情况下确定临界值。图 3A 和 3B 还可以直接将测定的 YKL-40 水平和受试者的年龄与例如第 90 个百分位数和第 95 个百分位数进行比较,从而立即指示出测定的 YKL-40 水平不同于参考水平的程度。通过对第 90 个百分位数使用上述公式,年龄约 20 岁、约 30 岁、约 40 岁、约 50 岁、约 60 岁、约 70 岁的受试者的临界值分别为:约 49  $\mu\text{g/l}$ 、约 60  $\mu\text{g/l}$ 、约 74  $\mu\text{g/l}$ 、约 90  $\mu\text{g/l}$ 、约 110  $\mu\text{g/l}$  和约 134  $\mu\text{g/l}$  YKL-40。因此,对于第 95 个百分位数来说,上述公式给出以下临界值:分别为约 55  $\mu\text{g/l}$ 、约 67  $\mu\text{g/l}$ 、约 81  $\mu\text{g/l}$ 、约 99  $\mu\text{g/l}$ 、约 122  $\mu\text{g/l}$  和约 148  $\mu\text{g/l}$  的 YKL-40。

[0135] 在本发明方法的一种实施方式中,YKL-40 参考水平是对应健康个体血清或血浆 YKL-40 水平的第 70 个百分位数的年龄校正的临界值。更优选地,该年龄校正的临界值是定义为  $\ln(\text{血浆 YKL-40}) = 3.1 + 0.02 \times \text{年龄(岁)}$  的第 70 个百分位数。

[0136] 在本发明方法的另一种实施方式中, YKL-40 参考水平是对应健康个体血清或血浆 YKL-40 水平的第 75 个百分位数的年龄校正的临界值。更优选地, 年龄校正的临界值是定义为  $\ln(\text{血浆 YKL-40}) = 3.2 + 0.02 \times \text{年龄(岁)}$  的第 75 个百分位数。

[0137] 在本发明方法的另一种实施方式中, YKL-40 参考水平是对应健康个体血清或血浆 YKL-40 水平的第 85 个百分位数的年龄校正的临界值。更优选地, 年龄校正的临界值是定义为  $\ln(\text{血浆 YKL-40}) = 3.4 + 0.02 \times \text{年龄(岁)}$  的第 85 个百分位数。

[0138] 在本发明方法的另一种实施方式中, YKL-40 参考水平是对应健康个体血清或血浆 YKL-40 水平的第 90 个百分位数的年龄校正的临界值。更优选地, 年龄校正的临界值是定义为  $\ln(\text{血浆 YKL-40}) = 3.5 + 0.02 \times \text{年龄(岁)}$  的第 90 个百分位数。

[0139] 在本发明方法的另一种实施方式中, YKL-40 参考水平是对应健康个体血清或血浆 YKL-40 水平的第 95 个百分位数的年龄校正的临界值。更优选地, 年龄校正的临界值是定义为  $\ln(\text{血浆 YKL-40}) = 3.6 + 0.02 \times \text{年龄(岁)}$  的第 95 个百分位数。

[0140] 在本发明方法的另一种实施方式中, YKL-40 参考水平是对应健康个体血清或血浆 YKL-40 水平的第 97.5 个百分位数的年龄校正的临界值。更优选地, 年龄校正的临界值是定义为  $\ln(\text{血浆 YKL-40}) = 3.9 + 0.02 \times \text{年龄(岁)}$  的第 97.5 个百分位数。

[0141] 在本发明方法的一种具体实施方式中, YKL-40 参考水平是一组 YKL-40 年龄依赖性临界值, 定义为本文上述分别对应第 70 个、第 75 个、第 85 个、第 90 个、第 95 个或第 97.5 个百分位数的年龄校正的临界值中的两个或多个。

[0142] 在本发明第一或第四方面的另一种优选实施方式中, YKL-40 参考水平是一组 YKL-40 年龄依赖性临界值, 其由第 70 个、第 75 个、第 85 个、第 90 个、第 95 个或第 97.5 个百分位数中的两个或多个来定义, 例如优选由上述公式来计算。例如, 当临界值是该年龄组中的最高值时, 还可以针对计算一组年龄, 如 20-29 岁、30-39 岁、40-49 岁等, 计算一组 YKL-40 年龄依赖性临界值。在本发明第一或第四方面的一种优选实施方式中, 临界值组如下:

[0143]

健康受试者的年龄依赖性临界值					
年龄间隔 (岁)	第70个 百分位数 ( $\mu\text{g/l YKL-40}$ )	第75个 百分位数 ( $\mu\text{g/l YKL-40}$ )	第85个 百分位数 ( $\mu\text{g/l YKL-40}$ )	第90个 百分位数 ( $\mu\text{g/l YKL-40}$ )	第95个 百分位数 ( $\mu\text{g/l YKL-40}$ )
20 - 29	40	44	54	59	65
30 - 39	48	54	65	72	80
40 - 49	59	65	80	88	98
50 - 59	72	80	98	108	119
60 - 69	88	98	119	132	145
70 - 79	108	119	154	161	178
80 - 89	132	145	178	196	217

[0144] 通过上述公式获得的类似值是用于本发明方法的更加详细的一组优选的年龄依赖性临界值:

[0145]

年龄间隔 (岁)	健康受试者的年龄依赖性临界值				
	第70个 百分位数 ( $\mu\text{g/l}$ YKL-40)	第75个 百分位数 ( $\mu\text{g/l}$ YKL-40)	第85个 百分位数 ( $\mu\text{g/l}$ YKL-40)	第90个 百分位数 ( $\mu\text{g/l}$ YKL-40)	第95个 百分位数 ( $\mu\text{g/l}$ YKL-40)
20 - 24	36	40	48	54	59
25 - 29	40	44	54	59	65
30 - 34	44	48	59	65	72
35 - 39	48	54	65	72	80
40 - 44	54	59	72	80	88
45 - 49	59	65	80	88	98
50 - 54	65	72	88	98	108
54 - 59	72	80	98	108	119
60 - 64	80	88	108	119	132
65 - 69	88	98	119	132	145
70 - 74	98	108	132	145	161
75 - 79	108	119	145	161	178
80 - 84	119	132	161	178	196
85 - 89	132	145	178	196	217

[0146] 上述的一组 YKL-40 年龄依赖性参考水平可以用于本发明的方法中。优选的一组健康受试者的年龄依赖性参考水平可以由上述公式计算。因此,用于本发明方法中的一组优选的年龄依赖性参考水平如下:

[0147]

健康受试者的年龄依赖性参考水平					
年龄间隔 (岁)	第70个 百分位数 ( $\mu\text{g/l}$ YKL-40)	第75个 百分位数 ( $\mu\text{g/l}$ YKL-40)	第85个 百分位数 ( $\mu\text{g/l}$ YKL-40)	第90个 百分位数 ( $\mu\text{g/l}$ YKL-40)	第95个 百分位数 ( $\mu\text{g/l}$ YKL-40)
20 - 29	33 - 40	37 - 44	45 - 54	49 - 59	55 - 65
30 - 39	40 - 48	45 - 54	55 - 65	60 - 72	67 - 80
40 - 49	49 - 59	55 - 65	67 - 80	74 - 88	81 - 98
50 - 59	60 - 72	67 - 80	81 - 98	90 - 108	99 - 119
60 - 69	74 - 88	81 - 98	99 - 119	110 - 132	122 - 145
70 - 79	90 - 108	99 - 119	122 - 154	134 - 161	148 - 178
80 - 89	110 - 132	122 - 145	148 - 178	164 - 196	181 - 217

[0148] 通过上述公式获得的同样的值是用于本发明方法中的更加详细的一组优选年龄依赖性参考水平：

[0149]

健康受试者的年龄依赖性参考水平					
年龄间隔 (岁)	第70个 百分位数 ( $\mu\text{g/l}$ YKL-40)	第75个 百分位数 ( $\mu\text{g/l}$ YKL-40)	第85个 百分位数 ( $\mu\text{g/l}$ YKL-40)	第90个 百分位数 ( $\mu\text{g/l}$ YKL-40)	第95个 百分位数 ( $\mu\text{g/l}$ YKL-40)
20 - 24	33 - 36	37 - 40	45 - 48	49 - 54	55 - 59
25 - 29	37 - 40	40 - 44	49 - 54	55 - 59	60 - 65
30 - 34	40 - 44	45 - 48	55 - 59	60 - 65	67 - 72
35 - 39	45 - 48	49 - 54	60 - 65	67 - 72	74 - 80
40 - 44	49 - 54	55 - 59	67 - 72	74 - 80	81 - 88
45 - 49	55 - 59	60 - 65	74 - 80	81 - 88	90 - 98
50 - 54	60 - 65	67 - 72	81 - 88	90 - 98	99 - 108
54 - 59	67 - 72	74 - 80	90 - 98	99 - 108	110 - 119
60 - 64	74 - 80	81 - 88	99 - 108	110 - 119	122 - 132
65 - 69	81 - 88	90 - 98	110 - 119	122 - 132	134 - 145
70 - 74	90 - 98	99 - 108	122 - 132	134 - 145	148 - 161
75 - 79	99 - 108	110 - 119	134 - 145	148 - 161	164 - 178
80 - 84	110 - 119	122 - 132	148 - 161	164 - 178	181 - 196
85 - 89	122 - 132	134 - 145	164 - 178	181 - 196	200 - 217

[0150] 在本发明的另一种实施方式中,当样品中的 YKL-40 水平增大约 25% 或更多,例如

约 50%或更多,约 60%或更多,约 70%或更多,约 80%或更多,约 90%或更多,约 100%或更多,约 110%或更多,约 120%或更多,约 130%或更多,约 140%或更多,或约 150%或更多时,则认为在样品中测定的 YKL-40 水平高于参考水平,由此表明存在非特异疾病或紊乱。

[0151] 正如本文先前针对本发明的第三和第四方面所述的那样,参考水平也可以在先前的某一时间点从相同的受试者中获得。因此,本发明的第三方面是诊断受试者中非特异疾病或紊乱存在的方法,所述方法包括:

[0152] i) 测定从受试者获得的样品中的 YKL-40 水平;和

[0153] ii) 将所述 YKL-40 水平和 YKL-40 参考水平进行比较,所述参考水平是先前从相同受试者中测定的 YKL-40 水平;

[0154] 其中样品中的 HYKL-40 水平与 YKL-40 参考水平增加到 1.10 倍,表明存在非特异疾病或紊乱。优选地,视需要,YKL-40 参考水平是年龄校正的参考水平,例如对于女性为增加  $0.5 \mu\text{g}/\text{l}/\text{年}$ ,男性为  $0.8 \mu\text{g}/\text{l}/\text{年}$ 。这可能与下述相关,例如,当先前获得的参考水平大于 3 岁时,例如大于 5 岁、大于 8 岁、或大于 10 岁时。例如,当先前获得的参考水平大于 10 岁时。

[0155] 当适用的参考水平为先前从同样受试者中测定的 YKL-40 水平,样品中的 YKL-40 水平增加约 109%或更多时,则认为样品中测定的 YKL-40 显著高于参考水平,从而显著地表明存在非特异疾病或紊乱。以下是计算的实例,其中先前测定的 YKL-40 水平是  $50 \mu\text{g}/\text{l}$ ,增加了 109%的 YKL-40 水平计算为: $50 \mu\text{g}/\text{l} + (50 \mu\text{g}/\text{l} \times 1.09) \mu\text{g}/\text{l} = 50 \mu\text{g}/\text{l} + 54.5 \mu\text{g}/\text{l} = 104.5 \mu\text{g}/\text{l}$ 。增加约 109%或更多可能涉及任意方法变化、生物变化或其他可能影响 YKL-40 的因素,详细见本文实施例 2。

[0156] 如上所述,本发明人已经发现 YKL-40 的平均增加对女性来说为  $0.5 \mu\text{g}/\text{l}/\text{年}$ ,男性为  $0.8 \mu\text{g}/\text{l}/\text{年}$ 。因此,如果先前从同样受试者中测定的 YKL-40 水平增加超过该数值,那么存在患有非特异疾病或紊乱的风险,或者例如已经存在的尚未被识别的非特异疾病或紊乱正在发展的更严重。因此,有增加,但增加低于上述 109%,可能表示存在疾病或紊乱,或者表明疾病或紊乱在恶化。因此,例如对于年龄约 25 岁的女性来说,先前测定的 YKL-40 水平为约  $60 \mu\text{g}/\text{l}$ ,并在 5 年后测定新的水平,根据年龄的增加应该是约  $2.5 \mu\text{g}/\text{l}$ ,即年龄相关的新数值应该是约  $62.5 \mu\text{g}/\text{l}$ 。如果该值经测定为约  $66 \mu\text{g}/\text{l}$ ,则表明可能存在非特异疾病或紊乱。

[0157] 在本发明方法的尤其优选的实施方式中,在参考水平是先前从相同个体中测定获得的情况下,样品中的 YKL-40 水平与 YKL-40 参考水平相比增加的 1.10 倍,表明存在非特异疾病或紊乱,更优选地,与 YKL-40 参考水平相比为至少 1.25 倍,例如 1.30 倍,或 1.40 倍;更优选至少 1.50 倍,例如 1.60 倍,1.70 倍,或 1.75 倍;更优选至少 1.75 倍,例如 1.80 倍,或 1.90 倍,或 2 倍;最优选至少 2 倍,例如 2.10 倍,2.20 倍,2.25 倍或 2.50 倍,表明存在非特异疾病或紊乱。以下是与  $50 \mu\text{g}/\text{l}$  的参考水平相比增加到 1.10 倍的水平计算实例: $50 \mu\text{g}/\text{l} \times 1.10 = 55 \mu\text{g}/\text{l}$ (即新的水平是  $55 \mu\text{g}/\text{l}$ )。

[0158] 由上可知,增加越高,存在非特异疾病或紊乱的指示性就越强。在本发明第三方面的优选实施方式中,与相同个体中先前测定获得的 YKL-40 参考水平相比,样品中的 YKL-40 水平增加到 2 倍,例如至少 2 倍,表明存在非特异疾病或紊乱。增加到至少 2 倍与上述的显著增加了 109%或更高相对应。

[0159] 如果先前从相同受试者中测定的 YKL-40 水平已经处于预计存在非特异疾病或紊乱的水平,见本发明的第一方面,那么随时间的增加预期不会高于女性  $0.5 \mu\text{g}/\text{l}$ /年或男性  $0.8 \mu\text{g}/\text{l}$ /年的年龄依赖性增长;除非非特异疾病或紊乱在恶化。在这种情况下,尤其优选的是,增加的倍数较低。因此,优选的是,样品中的 YKL-40 水平与 YKL-40 参考水平相比增加到至少 1.10 倍,表明存在非特异疾病或紊乱,或者非特异疾病或紊乱正在恶化。

[0160] 而且,在本发明方法的一种实施方式中,参考水平是先前从相同个体中测定获得,样品中的 YKL-40 水平与 YKL-40 参考水平相比减小到 0.90 倍(十分之九),表明已经发生好转。因此,在一种实施方式中,样品中的 YKL-40 水平与 YKL-40 参考水平相比至少减小到 0.90 倍,表明非特异疾病或紊乱已经发展到该疾病或紊乱的较缓和阶段,或者该受试者甚至已经被治愈,更优选与 YKL-40 参考水平相比,至少减小到 0.80 倍,例如 0.70 倍;更优选减小到 0.60 倍;更优选至少减小到 0.50 倍;最优选至少减小到 0.48 倍,例如 0.45 倍、0.43 倍、0.40 倍或 0.38 倍。以下是与  $100 \mu\text{g}/\text{l}$  的参考水平相比,减小到 0.90 倍的水平计算实例: $100 \mu\text{g}/\text{l} \times 0.90 = 90 \mu\text{g}/\text{l}$ ,即新的和较低的血浆 YKL-40 水平是  $90 \mu\text{g}/\text{l}$ 。当书写为某一水平至少减少到例如 0.90 倍时,意思是该水平减小到 0.90 倍或例如 0.80 倍、0.70 倍等,即  $100 \mu\text{g}/\text{l}$  的水平至少减小到  $90 \mu\text{g}/\text{l}$  或更低值。

[0161] 在本发明第三方面的更优选实施方式中,样品中的 YKL-40 水平与 YKL-40 参考水平相比减小了 52%,表明非特异疾病或紊乱已经发展到疾病或紊乱较缓和的阶段。以下是计算的实例,其中先前测定的 YKL-40 水平是  $100 \mu\text{g}/\text{l}$ ,减小 52% 的 YKL-40 水平计算如下: $100 \mu\text{g}/\text{l} - (100 \mu\text{g}/\text{l} \times 0.52) \mu\text{g}/\text{l} = 100 \mu\text{g}/\text{l} - 52 \mu\text{g}/\text{l} = 48 \mu\text{g}/\text{l}$ 。减小约 52% 可能涉及任意方法的变化、生物变化或者影响 YKL-40 水平的其他因素,详见本文的实施例 2。

[0162] 至于本发明第四方面,尤其优选的是通过与一个或多个参考水平相比确定样品中 YKL-40 水平的增加,以分类非特异疾病或紊乱的严重性。因此,在一种实施方式中,样品中的 YKL-40 水平与参考水平相比增加到至少 1.10 倍或更多,表明非特异疾病或紊乱已经发展到更严重的阶段,更优选与 YKL-40 参考水平相比增加到至少 1.25 倍,例如 1.30 倍,或 1.40 倍;更优选增加到至少 1.50 倍,例如 1.60 倍,1.70 倍或 1.75 倍;甚至更优选增加到至少 1.75 倍,例如 1.80 倍,或 1.90 倍,或 2 倍;最优选增加到至少 2 倍,例如 2.10 倍,2.20 倍,2.25 倍,或 2.50 倍,表明非特异疾病或紊乱已经发展到更严重的阶段。这些确定增长的倍数的应用在上述关于本发明的其余方面有进一步的说明。

[0163] 在本发明第四方面的更优选实施方式中,样品中的 YKL-40 水平与 YKL-40 参考水平相比增加了 109%,表明非特异疾病或紊乱已经发展到该疾病或紊乱的更严重的阶段。以下是计算实例,其中先前测定的 YKL-40 水平是  $50 \mu\text{g}/\text{l}$ ,增加了 109% 的 YKL-40 水平计算如下: $50 \mu\text{g}/\text{l} + (50 \mu\text{g}/\text{l} \times 1.09) \mu\text{g}/\text{l} = 50 \mu\text{g}/\text{l} + 54.5 \mu\text{g}/\text{l} = 104.5 \mu\text{g}/\text{l}$ 。

[0164] 同样,本发明第四方面的非特异疾病或紊乱的严重性的分类可以通过与一个或多个参考水平比较,确定样品中 YKL-40 水平的减小来完成。因此,在一种实施方式中,其中样品中的 YKL-40 水平与 YKL-40 参考水平相比至少减小到 0.90 倍,表明非特异疾病或紊乱已经发展到该疾病或紊乱的较缓和的阶段,更优选地与 YKL-40 参考水平相比至少减小到 0.80 倍,例如 0.70 倍;更优选至少减小到 0.60 倍;更优选至少减小到 0.50 倍;最优选至少减小到 0.48 倍,例如 0.45 倍,0.43 倍,0.40 倍,或 0.38 倍,表明非特异疾病或紊乱已经发展到该疾病或紊乱的较缓和的阶段。这些确定增长的倍数的应用在上述关于本发明的其余

方面有进一步的说明。

[0165] 在发明第四方面的更优选实施方式中,样品中的 YKL-40 水平与 YKL-40 参考水平相比减小了 52%,表明特异性疾病或紊乱已经发展到该疾病或紊乱的较缓和的阶段。

[0166] 本发明第四方面的优选实施方式涉及一种分类受试者中非特异疾病或紊乱的严重性的方法,所述方法包括:

[0167] i) 测定从受试者获得的样品中的 YKL-40 水平,和

[0168] ii) 将该 YKL-40 水平与一个或多个 YKL-40 参考水平进行比较,所述参考水平是先前从相同受试者中测定的一个或多个水平。

[0169] 其中,样品中的 YKL-40 水平与 YKL-40 参考水平相比增加到至少 1.10 倍,表明疾病或紊乱已经发展到该疾病或紊乱的更严重的阶段;和

[0170] 其中,样品中的 YKL-40 水平与 YKL-40 参考水平相比至少减小到 0.90 倍,表明疾病或紊乱已经发展到该疾病或紊乱的较缓和的阶段。

[0171] 从上述可知,增加越高,疾病或紊乱就发展到越严重的阶段。在本发明第四方面的优选实施方式中,样品中的 YKL-40 水平与先前从相同个体中测定的 YKL-40 参考水平相比增加到 2 倍,例如至少 2 倍,表明疾病或紊乱发展到该疾病或紊乱的更严重的阶段。

[0172] 其他生物标记

[0173] YKL-40 是一种依赖性的通用生物标记,用于检测非特异疾病或紊乱的存在,或者用于分类非特异疾病或紊乱的严重性,并且可用于相应的方面。然而,YKL-40 水平还可与其他已知的生物标记联合使用,例如 C-反应蛋白 (CRP)、ESR、癌胚抗原 (CEA)、CA-125、人表皮生长因子受体 2 (HER2)、CA19-9、乳酸脱氢酶 (LDH)、金属蛋白酶组织抑制剂 1 (TIMP-1)、脑钠素 (BNP)、白细胞介素、肿瘤坏死因子- $\alpha$ 、同型半胱氨酸、淀粉样 A 蛋白、妊娠相关血浆蛋白-A、肌钙蛋白、可溶性细胞间粘附分子-1、可溶性 UPAR、III 型前胶原性氨基端肽 (P-III-NP)、单核细胞趋化蛋白-1、纤维蛋白 D-二聚体、生长分化因子-15、缺血修饰性白蛋白、脂蛋白相关磷脂酶 A2、基质金属蛋白酶、穿透素 3、分泌型磷脂酶 A2 组 IIA、细胞间粘附分子-1、心脏型脂肪酸结合蛋白 (H-FABP)、肌球蛋白轻链-1 (MLC-1)、P-选择素和 CKMB。在所提及的生物标记中,可溶性和不溶性形式的蛋白都与本发明相关,如 UPAR 或可溶性 UPAR;细胞间粘附分子-1 和可溶性细胞间粘附分子-1 及其他。上述任意标记的水平可以在生物样品中测定,如血液、血清、血浆或组织样品,通过任意可用的方法,如使用免疫分析或基于 PCR 的分析或几种分析方法的结合。

[0174] 因此,本发明的另一个方面提供一种通过将受试者的 YKL-40 水平与其他生物标记的水平结合来诊断受试者的方法,这些生物标记选自但不限于:C-反应蛋白 (CRP)、ESR、癌胚抗原 (CEA)、CA-125、人表皮生长因子受体 2 (HER2)、CA19-9、乳酸脱氢酶 (LDH)、金属蛋白酶组织抑制剂 1 (TIMP-1)、脑钠素 (BNP)、白细胞介素和肿瘤坏死因子- $\alpha$ 、同型半胱氨酸、淀粉样 A 蛋白、妊娠相关血浆蛋白-A、肌钙蛋白、可溶性细胞间粘附分子-1、可溶性 UPAR、III 型前胶原性氨基端肽 (P-III-NP)、单核细胞趋化蛋白-1、纤维蛋白 D-二聚体、生长分化因子-15、缺血修饰性白蛋白、脂蛋白相关水解磷脂酶 A2、基质金属蛋白酶和 CKMB;优选 C-反应蛋白、ESR、癌胚抗原 (CEA)、CA-125、人表皮生长因子受体 2 (HER2)、CA19-9、乳酸脱氢酶 (LDH)、脑钠素 (BNP)、白细胞介素、肿瘤坏死因子- $\alpha$ 、同型半胱氨酸、淀粉样 A 蛋白、妊娠相关血浆蛋白-A、肌钙蛋白、可溶性细胞间粘附分子-1、可溶性 UPAR、III 型前胶原

氨基端肽 (P-III-NP)、单核细胞趋化蛋白 -1、纤维蛋白 D- 二聚体、生长分化因子 -15、缺血修饰性白蛋白、脂蛋白相关水解磷脂酶 A2、基质金属蛋白酶和 CKMB。在这些额外的生物标记中,尤其有益的是 C- 反应蛋白、脑钠素和同型半胱氨酸。

[0175] 在本发明该方面的一种具体实施方式中,额外的生物标记选自 C- 反应蛋白 (CRP)、ESR、癌胚抗原 (CEA)、CA-125、人表皮生长因子受体 2 (HER2)、CA19-9、乳酸脱氢酶 (LDH)、金属蛋白酶组织抑制剂 1 (TIMP-1)、脑钠素 (BNP)、白细胞介素、肿瘤坏死因子 - $\alpha$ 、同型半胱氨酸、淀粉样 A 蛋白、妊娠相关血浆蛋白 -A、肌钙蛋白、可溶性细胞间粘附分子 -1、可溶性 UPAR、III 型前胶原氨基端肽 (P-III-NP)、单核细胞趋化蛋白 -1、纤维蛋白 D- 二聚体、生长分化因子 -15、缺血修饰性白蛋白、脂蛋白相关水解磷脂酶 A2、基质金属蛋白酶和 CKMB ;更优选地选自 C- 反应蛋白、脑钠素和 / 或同型半胱氨酸。

[0176] 上述实施方式,连同任意需要的医疗和 / 或取样设备,以及该设备的使用说明和如何完成所选分析的说明,可以包含在一套试剂盒中。

#### [0177] 生物样品

[0178] 生物样品是从受试者中获得。如此说来,生物样品可以是选自组织、血液、血清、血浆、尿液样品、尿液、脑脊髓液、滑膜液、腹水和唾液的样品。与本发明特别相关的是血液、血清或血浆,更优选地生物样品是血清或血浆。本领域的普通技术人员能够容易地确定哪一种分析样品源最适宜用于诊断具体的疾病、紊乱或者一般健康状态。

#### [0179] 受试者

[0180] 本文所指的受试者是某一物种的单个个体,本文优选一种哺乳动物物种。任意哺乳动物物种都是本发明的对象,不过以下任意物种是尤其相关的:小鼠、大鼠、豚鼠、仓鼠、兔、猫、狗、猪、牛、马、羊、猴和人。最优选地,本发明的受试者是人。在本发明中受试者也指病人或个人。

#### [0181] 装置

[0182] 本发明的另一方面涉及一种诊断非特异疾病或紊乱存在的装置,其中所述装置包括用于测定样品中 YKL-40 水平的工具;以及将测定的 YKL-40 水平与至少一个 YKL-40 参考水平进行比较的工具。例如,用于测定样品中 YKL-40 水平的工具可以是一种测试系统,其适用于上述任意分析系统,如免疫分析、基于 PCR 的分析或酶分析。本发明优选的是免疫分析。

[0183] 例如,本发明的装置包含一种安装在固体载体上的快速、定性和 / 或定量的测试系统,用于测定生物样品中的 YKL-40 水平。

[0184] 固体载体可以用于任意相中以完成上述任意的分析,尤其是免疫分析,包括试纸、膜、吸收垫、珠子、微孔、试管等。优选的是测试装置,其可由测试人员或者自我测试的病人方便地使用,很少需要或者不需要事先的培训。这种优选的测试装置包括试纸和膜分析系统。这种常规测试系统的制备和使用在专利、医疗和科学文献中有很好的描述。如果使用试纸,则抗 -YKL-40 抗体与试纸的一端结合,使得带有抗体的末端可以浸入或浸在生物样品上。或者,可以通过移液管、滴管、镊子等将样品涂在抗体涂布的试纸或膜上。因此,在本发明这一方面的优选实施方式中,所述装置是试纸。

[0185] 在本发明的这一方面中,优选的是液体或可以转化为液体的生物样品。特别优选的是可以从机体获得的液体生物样品;此处的实例包括但不限于:血液、血清、血浆、尿液、

脑脊髓液、滑膜液、腹水和唾液。更优选血清和血浆样品。

[0186] 抗-YKL-40的抗体可以是任意同工型,如IgA、IgG或IgM、Fab片段等。抗体可以是单克隆或多克隆的,并且可通过Harlow and Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988中广泛描述的方法进行制备,在此将其纳入作为参考。另见关于免疫分析的部分。抗体可以通过直接或间接的方式包被到固体载体。间接结合有利于YKL-40结合位点最大限度暴露于分析液体中,因为这些位点自身并不用于与载体结合。可使用多克隆抗体,因为多克隆抗体可以识别YKL-40的不同表位,从而增强分析的灵敏度。或者,可使用抗-YKL-40单克隆抗体。

[0187] 固体载体优选地是在YKL-40抗体与固体载体结合之后被非特异性封闭。周围区域的非特异性封闭可以用全的或衍生的牛血清白蛋白,或来自其他动物的胚乳、全动物血清、酪蛋白、非脂肪乳等。

[0188] 样品是与YKL-40特异性抗体一起加到固体载体上,使得YKL-40通过所述抗体结合在固体载体上。将样品过量的和未结合的部分除去,优选将固体载体洗涤,使得抗体-抗原复合物保留在固体载体上。固体载体可用洗涤液洗涤,洗涤液可含有清洁剂,如吐温-20、吐温-80、或者十二烷基硫酸钠。

[0189] 在YKL-40与固体载体结合之后,添加与YKL-40反应的第二抗体。第二抗体可被标记,优选可见的标记物标记。所述标记物可以是可溶性的或颗粒状的,并且可包含染色的免疫球蛋白结合物质、简单染料或染料聚合物、染色的乳胶珠、含染料的脂质体、染色细胞或者生物体,或者金属的、有机的、无机的或者染料固体。可以通过本领域熟知的多种方法将标记物与YKL-40抗体结合。在本发明的一些实施方式中,标记物可以是能够与信号产生系统偶联的酶。可见标记物的实例包括碱性磷酸酶、 $\beta$ -牛乳糖、辣根过氧化物酶和生物素。许多酶-发色体或者酶-底物-发色体结合体是已知的,可以用于酶联分析。

[0190] 与样品同步,可以用已知量的YKL-40进行相应的步骤,并且这一步骤可以作为分析的标准。

[0191] 将固体载体再次洗涤,以除去未结合的标记的抗体,并且将该标记的抗体经可观察并测定数量。标记物的积累通常可以视觉评估。这种视觉检测可以检测不同的颜色,如红色、黄色、褐色或绿色,取决于所使用的标记物。积累的标记物也可通过光检测装置来检测,如反射率分析仪、视频图像分析仪等。积累的标记物的可视强度可能与样品中的YKL-40浓度相关。通过将可视强度与一组参考标准比较,可以得出积累的标记物的可视强度与YKL-40量之间的关系。优选地,按照与未知样品相同的方法分析标准品,更优选地,与所述样品一起进行,不管是在相同还是不同的固体载体上。使用的标准品的浓度范围可以从约每升溶液约 $1\mu\text{g}$  YKL-40高至每升溶液约 $1\text{mg}$  YKL-40,优选地,测试血浆样品的范围是从 $40\mu\text{g}/\text{l}$ 至 $400\mu\text{g}/\text{l}$  YKL-40。优选地,使用几种不同浓度的YKL-40标准品,以便通过比较颜色强度更加准确地测定未知物的数量。例如,当与类似于 $200\mu\text{g}/\text{l}$  YKL-40的颜色强度相比较时,类似于 $110\mu\text{g}/\text{l}$  YKL-40的颜色强度可被视为阴性。

[0192] 所述装置,例如本文描述的试纸或者其他基于固体载体的测试系统,通过与一个或多个标准品/对照区域比较,可用于辅助测定生物样品中YKL-40的大致水平。因此,可以将YKL-40的浓度范围确定在应用于该装置的标准/对照区域的两个YKL-40浓度之间。或者,YKL-40的水平可以调节为高于或低于YKL-40的临界值,将所选择的临界值的浓度应

用于试纸的对照区域。在该装置内和 / 或上可存在多个参考水平 / 标准, 或者在该装置内和 / 或上存在单个参考水平 / 标准。在后一种情况下, 该装置可用作是非测试, 以将样品中的 YKL-40 水平与一个参考水平比较, 即观察样品的 YKL-40 水平是否高于或低于该参考水平。在本发明装置的优选实施方式中, 所述装置包括单一参考水平, 代表一临界值。该参考水平可以是本文上述术语“参考水平”中描述的任意参考水平。

[0193] 虽然各步骤可以在相同的容器 (例如试管) 中进行, 只要它是干净的并且在每个步骤后都清洗, 不过本发明最好进行快速便捷的现场分析, 对各步骤使用三个分开的容器, 一个用于样品, 一个用于洗涤, 一个用于冲洗可检测的标记物。

[0194] 因此本发明的一个目的是使用试纸测量生物样品的 YKL-40 水平, 用于根据个体的 YKL-40 参考水平进行分类, YKL-40 参考水平来自所述个体。(见图 9A 和 9B)。

[0195] 在本发明这一方面的替换实施方式中, 该装置进一步包括用于分析除 YKL-40 以外的生物标记的工具, 例如来自以下非限制性组的任意一种或多种生物标记: C-反应蛋白 (CRP)、癌胚抗原 (CEA)、CA-125、人表皮生长因子受体 2 (HER2)、CA19-9、乳酸脱氢酶 (LDH)、脑钠素 (BNP)、白细胞介素、肿瘤坏死因子- $\alpha$ 、同型半胱氨酸、淀粉样 A 蛋白、妊娠相关血浆蛋白-A、肌钙蛋白、可溶性细胞间粘附分子-1、可溶性 UPAR、III 型前胶原氨基端肽 (P-III-NP)、单核细胞趋化蛋白-1、纤维蛋白 D-二聚体、生长分化因子-15、缺血修饰性白蛋白、脂蛋白相关水解磷脂酶 A2、基质金属蛋白酶、穿透素 3、分泌型磷脂酶 A2 组 IIA、细胞间粘附分子-1、心脏型脂肪酸结合蛋白 (H-FABP)、肌球蛋白轻链-1 (MLC-1)、P-选择蛋白和 CKMB。该装置优选地包括用于分析 C-反应蛋白和 / 或脑钠素和 / 或同型半胱氨酸的工具。

[0196] 在本发明这一方面的具体实施方式中, 该装置包括用于分析额外的生物标记的工具, 该生物标记选自 C-反应蛋白 (CRP)、ESR、癌胚抗原 (CEA)、CA-125、人表皮生长因子受体 2 (HER2)、CA19-9、乳酸脱氢酶 (LDH)、金属蛋白酶组织抑制剂 (TIMP-1)、脑钠素 (BNP)、白细胞介素、肿瘤坏死因子- $\alpha$ 、同型半胱氨酸、淀粉样 A 蛋白、妊娠相关血浆蛋白-A、肌钙蛋白、可溶性细胞间粘附分子-1、可溶性 UPAR、III 型前胶原氨基端肽 (P-III-NP)、单核细胞趋化蛋白-1、纤维蛋白 D-二聚体、生长分化因子-15、缺血修饰性白蛋白、脂蛋白相关水解磷脂酶 A2、基质金属蛋白酶和 CKMB; 更优选地包括用于分析 C-反应蛋白、脑钠素和 / 或同型半胱氨酸的工具。

[0197] 所述与该装置相关的至少一个参考水平可以是如本文“参考水平”部分所述的任意 YKL-40 参考水平。在本发明装置的一种具体实施方式中, 该装置包括单一参考水平, 表示一临界值。

[0198] 在本发明这一方面的另一种具体实施方式中, 该装置包括用于将测量的 YKL-40 水平与一组年龄校正的 YKL-40 参考水平进行比较的工具。

[0199] 在本发明这一方面的另一种具体实施方式中, 该装置包括用于将测量的 YKL-40 水平与如下表定义的一组年龄依赖性临界值进行比较的工具:

[0200]

年龄间隔 (岁)	健康受试者的年龄依赖性临界值				
	第70个 百分位数 ( $\mu\text{g/l}$ YKL-40)	第75个 百分位数 ( $\mu\text{g/l}$ YKL-40)	第85个 百分位数 ( $\mu\text{g/l}$ YKL-40)	第90个 百分位数 ( $\mu\text{g/l}$ YKL-40)	第95个 百分位数 ( $\mu\text{g/l}$ YKL-40)
20 - 29	40	44	54	59	65
30 - 39	48	54	65	72	80
40 - 49	59	65	80	88	98
50 - 59	72	80	98	108	119
60 - 69	88	98	119	132	145
70 - 79	108	119	154	161	178
80 - 89	132	145	178	196	217

[0201] 试剂盒

[0202] 分析本发明的 YKL-40 所需的所有材料和试剂可以集中装配于一个试剂盒中, 该试剂盒至少包括辅助评估从个体获得的生物样品中 YKL-40 水平的组成部分, 以及如何操作的说明书。

[0203] 所述组成部分可以是检测 YKL-40 水平的方法, 如免疫分析, 或者是专门针对 YKL-40 检测进行的免疫分析所需的部件。可选地, 试剂盒进一步或替换地包括完成基于 PCR 分析的组成部分, 该分析用于检测 YKL-40 和测定生物样品中 YKL-40 的水平。试剂盒可进一步包括用于获得一个或多个生物样品的装备, 例如, 该装备可以是注射器、小瓶或其他。试剂盒可以被包装单次使用, 或者重复使用, 其中的组成部分可以是一次性的, 例如在单次使用之后处理掉, 或者可以具有重复使用的性质。

[0204] 本发明的另一方面涉及一种试剂盒, 包括:

[0205] i) 用于测定样品中的 YKL-40 水平的工具;

[0206] ii) 用于将测量的 YKL-40 水平与至少一个 YKL-40 参考水平进行比较的工具; 以及

[0207] iii) 可选地, 如何根据提供样品的受试者的年龄对 YKL-40 参考水平进行年龄校正的说明。

[0208] 所述至少一个参考水平可以是本文“参考水平”部分中描述的任何 YKL-40 参考水平。

[0209] 测量样品中的 YKL-40 水平的工具可包括含有已知浓度的 YKL-40 的一种或多种溶液; 一洗涤液; 一发色体的溶液, 其通过酶直接或间接地与底物作用而改变颜色或色度; 一抗-YKL-抗体, 其与标记物结合以便可以被检测到; 移液管, 用于转移所述液体; 用于所述溶液的试管; 以及一固体载体, 尤其适合插入所述试管中, 将 YKL-40 的多克隆抗体携带到该固体载体的表面。该试剂盒也可包含具有抗-YKL-40 抗体的一个或多个固体载体, 用于同时或单独地分析一个或多个样品; 以及培养标记物所需的必要试剂。所述工具中包含的用于与测量的 YKL-40 水平进行比较的至少一个 YKL-40 参考水平可以是 YKL-40 标准品,

该标准品可以与未知的样品一起现进行分析。这种试剂盒将包含明显的用于单个试剂的容器。

[0210] 在上述测试试剂盒中,试剂可由事先填充有试剂或对照品的贮藏瓶或者一个或多个试管提供。

[0211] 试剂盒的组分也可以以干燥或冻干的形式提供。当试剂或组分以干燥的形式提供时,一般通过添加适宜的溶剂进行冲调。可以想到的是,溶剂也可提供在另一容器工具中。

[0212] 本发明的试剂盒一般包括用于容纳试剂的工具,例如商业销售的严格封闭的小瓶或管,例如注射器或吹塑的塑料容器,其中保存有所需要的小瓶。该试剂盒还包括一套关于如何进行分析的说明书。

[0213] 在本发明的替换实施方式中,该试剂盒可包括用于分析除 YKL-40 以外的生物标记的工具,例如以下非限制性组中的一种或多种标记:C-反应蛋白(CRP)、癌胚抗原(CEA)、CA-125、人表皮生长因子受体 2(HER2)、CA19-9、乳酸脱氢酶(LDH)、脑钠素(BNP)、白细胞介素、肿瘤坏死因子- $\alpha$ 、同型半胱氨酸、淀粉样 A 蛋白、妊娠相关血浆蛋白-A、肌钙蛋白、可溶性细胞间粘附分子-1、可溶性 UPAR、III 型前胶原氨基端肽(P-III-NP)、单核细胞趋化蛋白-1、纤维蛋白 D-二聚体、生长分化因子-15、缺血修饰性白蛋白、脂蛋白相关水解磷脂酶 A2、基质金属蛋白酶、穿透素 3、分泌型磷脂酶 A2 组 IIA、细胞间粘附分子-1、心脏型脂肪酸结合蛋白(H-FABP)、肌球蛋白轻链-1(MLC-1)、P-选择蛋白和 CKMB。

[0214] 在本发明这一方面的具体实施方式中,所述试剂盒包括分析额外的生物标记的工具,该生物标记选自 C-反应蛋白(CRP)、ESR、癌胚抗原(CEA)、CA-125、人表皮生长因子受体 2(HER2)、CA19-9、乳酸脱氢酶(LDH)、金属蛋白酶组织抑制剂 1(TIMP-1)、脑钠素(BNP)、白细胞介素、肿瘤坏死因子- $\alpha$ 、同型半胱氨酸、淀粉样 A 蛋白、妊娠相关血浆蛋白-A、肌钙蛋白、可溶性细胞间粘附分子-1、可溶性 UPAR、III 型前胶原氨基端肽(P-III-NP)、单核细胞趋化蛋白-1、纤维蛋白 D-二聚体、生长分化因子-15、缺血修饰性白蛋白、脂蛋白相关水解磷脂酶 A2、基质金属蛋白酶和 CKMB;更优选用于分析 C-反应蛋白、脑钠素和/或同型半胱氨酸的工具。

[0215] 优选地,所述试剂盒包括用于分析 C-反应蛋白和/或脑钠素和/或同型半胱氨酸的工具。

[0216] 本发明的试剂盒还可包括本发明上述“装置”部分所述的装置。

[0217] 将本发明申请中引用的所有专利或非专利参考文献在此全部纳入作为参考。

## 实施例

[0218] 以下实施例仅为举例说明之用,不应理解为限制本发明的范围。本发明的范围以所附的权利要求书来限定。

[0219] 实施例 1、正常受试者中的血浆 YKL-40 水平与作为独立危险因素的血浆 YKL-40

[0220] 方法

[0221] 参与者

[0222] 使用了丹麦一般人群、哥本哈根市心脏研究中心的 1991-1994 检查的基于人口的前瞻性研究(Bojesen et al,2003;Nordestgaard et al,2007;Schnohr et al,2002)。在哥本哈根居民中进行性别和年龄分层之后,随机选择 20 岁及 20 岁以上的参与者按 5 年分

组。在受邀的 17180 名受试者中有 10135 名参与者,并在 8899 名参与者中获得了血浆用于 YKL-40 测定。利用他们唯一的中央人口登记号,从 1991-1994 检查的基线一直到 2007 年 7 月对参与者追踪了 16 年。追踪是 100%完成的。大约 99%是丹麦裔白种人。在血液采样时(1991-1994),1763 名参与者患有已知的与血浆 YKL-40 水平增加相关的疾病(癌症、缺血性心血管疾病、肝脏疾病、糖尿病、慢性阻塞性肺疾病、哮喘、风湿性关节炎、炎症性肠病或肺炎)。在追踪期间,另外 3526 人患上这些疾病中的至少一种。3059 人死亡。追踪结束时剩余 3610 名健康参与者。

[0223] 在哥本哈根市中心心脏研究组 2001-2003 检查的 929 名参与者的血浆样本中再次测量血浆 YKL-40。选择这些参与者是因为他们在 1991-1994 和 2001-2003 检查中未患有任何已知的疾病,可以用于校正回归稀释偏差(ClarkeR, 1999)。

[0224] 参与者填写自我管理式(self-administered)调查表,由出席当天的参与者和研究者确证。参与者报告了吸烟习惯,并分为从不吸烟、以前吸烟和现在吸烟者。

[0225] 结束点

[0226] 利用参与者唯一的丹麦国家中央人口登记号,从三种不同的人口登记处收集有关死亡和发病率的信息。从丹麦国家民事登记系统获得有关死亡的信息(Juel et al, 1999)。从丹麦国家病人登记处(34)获得 1976 年至 2007 年 7 月的 ICD8 与 ICD10 代码中的发病率信息,并且分为与血浆 YKL-40 水平增加相关的以下诊断:缺血性心血管疾病、肝脏疾病、糖尿病、慢性阻塞性肺疾病、哮喘、风湿性关节炎、炎症性肠病或肺炎。癌症的诊断获得自丹麦国家癌症登记处(从 1947 一直到 2004 年)和丹麦国家病人登记处(从 1947 一直到 2004 年),丹麦国家癌症登记处确认了丹麦所有癌症中的 98%(35, 36)。

[0227] 道德规范

[0228] 所有参与者都做出了书面知情同意书。该研究得到 Herlev 医院和丹麦伦理委员会的许可(No. 100. 2039/91 与 01-144/01, 哥本哈根和菲特烈斯贝委员会),并且按照 Helsinki 宣言进行。

[0229] YKL-40 分析

[0230] YKL-40 血浆水平是通过商业的双位点夹心型酶联免疫吸附分析(ELISA),利用链霉菌亲合素涂层的微孔板、生物素化  $\alpha$ -Fab 单克隆捕获抗体以及碱性磷酸酶标记的多克隆检测抗体,在  $-80^{\circ}\text{C}$  下冷冻 12-15 年的样本中以一式两份来测定(Quidel Corporation, San Diego, California)(Harvey et al, 1998)。ELISA 的回收率为 102%,检测限为  $10\ \mu\text{g/L}$ 。批内分析变异系数为 5% ( $40\ \mu\text{g/L}$ )、4% ( $104\ \mu\text{g/L}$ ) 和 4% ( $155\ \mu\text{g/L}$ )。批间分析变异系数  $< 6\%$ 。

[0231] 统计分析

[0232] 使用 STATA 10.0 版本(Stata Corp LP, College Station, Texas)。双侧  $P < 0.05$  视为有显著性。使用了 Mann-Whitney 秩和检验与 Spearman' s rho 相关性。根据性别和 10 岁年龄组中的血浆 YKL-40 百分位数,将血浆 YKL-40 水平分为几类:百分位数类别是 0-33%、34-66%、67-90%、91-95% 和 96-100%。表 3 中只用了三个百分位数类别 0-33%、34-90% 和 91-100%。

[0233] Kaplan-Meier 曲线图标示了所有参与者中相对于左截断年龄和追踪时间的累积存活率。Kaplan-Meier 曲线还标示了分组的患有癌症、缺血性心血管疾病、肝脏疾病、糖尿

病、慢性阻塞性肺疾病和哮喘的参与者相对于追踪时间的累积存活率。用对数秩检验考查血浆 YKL-40 百分位数类别之间的差异。用 Cox 回归分析计算死亡的风险比和 95% 置信区间。针对其他危险因素,将风险比加以校正,如性别、年龄(十分位数)和血液采样时的吸烟习惯(从不/以前/现在吸烟者)。对于趋势测试,将增加的血浆 YKL-40 类别标记为 0、1、2、3 和 4 或 0、1 和 2(仅用于表 3 中的结果),用作 Cox 回归中的连续变量。用模型的似然比值检验的卡方值(1df)计算趋势测试的 P 值,该模型没有将 YKL-40 类别嵌套在带有 YKL-40 类别的模型中。在 Schonefeld 残差的基础上测试了随时间推移的风险的比例,并未发现侵害。关于基线变项的信息为 99% 以上的完整性;将带有不完整变项信息的个体从多因素分析中排除。用非参数法校正风险比,用于回归稀释偏差(Clarke et al, 1999)。为了该校正,使用了来自 929 名健康个体的血浆 YKL-40 值,他们参与了 1991-1994 基线检查和 2001-2003 追踪检查;然而,主要的分析是针对所有 8899 名参与者进行。计算回归稀释比率为 0.8042。

[0234] 用来自 Poisson 回归模型的回归系数估计血浆 YKL-40 百分位数类别的绝对 10 年死亡率,该模型包括以下变项:性别、年龄(< 50、50-70、> 70 岁)和血液采样时的吸烟习惯(从不、以前和现在吸烟者)。绝对死亡率是以百分数形式估算的发病率(事件/10 年)。

[0235] 结果

[0236] 健康参与者的血浆 YKL-40

[0237] 研究人群包括 8899 名参与者(女性 56%),年龄 20 至 95 岁,平均 59 岁。表 4 给出了血浆 YKL-40 百分位数类别中所有参与者的针对年龄和性别校正的基线特征。7136 名(80%)参与者在 1991-1994 年血液采样时未患任何已知的疾病。在 16 年追踪期间 3576 人患病,在追踪结束时剩余 3610 名健康参与者。这些健康参与者中的中值血浆 YKL-40 是  $42 \mu\text{g/L}$ (2.5% -97.5% 百分位数范围:  $14-168 \mu\text{g/L}$ ; 90% 百分位数  $92 \mu\text{g/L}$ ; 95% 百分位数  $124 \mu\text{g/L}$ )。血浆 YKL-40 水平在两种性别中都随年龄增长而增加(趋势检验  $p < 0.0001$ ) (图 1)。血浆 YKL-40 与年龄之间的 Spearman's rho 相关性是 0.41 ( $p < 0.0001$ )。男女的血浆 YKL-40 之间没有差异(Mann-Whitney U;  $p = 0.27$ )。

[0238] 929 名健康参与者组(463 女性和 466 男性)中的 YKL-40 的血浆浓度可以见图 2,他们从 1991-1994 检查的血液中进行第一次 YKL-40 测定,从 2001-2003 检查的血液中进行第二次 YKL-40 测定。平均增加为女性  $0.5 \mu\text{g/L/年}$ (四分位数间距  $-0.6-2.1 \mu\text{g/L/年}$ )以及男性  $0.8 \mu\text{g/L/年}$ ( $-0.3-2.9 \mu\text{g/L/年}$ )。这说明血浆 YKL-40 在保持健康的受试者中是非常稳定的,计算得回归稀释比例 0.8042。男性和女性之间没有统计学差异。

[0239] 2116 名健康女性和 1494 名健康男性组中的 YKL-40 的血浆浓度可见图 3,他们在 1991-1994 年血液采样时未患已知的疾病,并且在 16 年追踪期间保持健康(即没有人死亡或患癌症、缺血性心血管疾病、肝脏疾病、糖尿病、慢性阻塞性肺疾病、哮喘、风湿性关节炎、炎症性肠病或肺炎)。该图说明了这些健康参与者的平均血浆 YKL-40,根据年龄,70% 百分位数(定义为  $\ln(\text{血浆 YKL-40}) = 3.1 + 0.02 \times \text{年龄(岁)}$ ),75% 百分位数(定义为  $\ln(\text{血浆 YKL-40}) = 3.2 + 0.02 \times \text{年龄(岁)}$ ),90% 百分位数(定义为  $\ln(\text{血浆 YKL-40}) = 3.5 + 0.02 \times \text{年龄(岁)}$ )以及 95% 百分位数(定义为  $\ln(\text{血浆 YKL-40}) = 3.6 + 0.02 \times \text{年龄(岁)}$ )。女性和男性被合并。

[0240] 与血清 CRP(Kushner et al., 2006)相反,发现两种性别之间的血浆 YKL-40 没有

差异。而且,证实了在一大群健康参与者中,血浆 YKL-40 随时间推移而保持稳定。

[0241] 929 名健康参与者组中的血浆 YKL-40 的中值增加为女性  $0.5 \mu\text{g/L/年}$  (四分位数间距  $-0.6-2.1 \mu\text{g/L/年}$ ) 和男性  $0.8 \mu\text{g/L/年}$  ( $-0.3-2.9 \mu\text{g/L/年}$ ),他们从 1991-1994 检查的血液中进行第一次 YKL-40 测定,从 2001-2003 检查的血液中进行第二次 YKL-40 测定。男性和女性之间的差异不明显。

[0242] 对于伴有突发事件(癌症、缺血性心血管疾病、肝脏疾病、糖尿病、慢性阻塞性肺疾病和哮喘)的参与者来说,YKL-40 的中值血浆浓度高于保持健康的参与者(表 1)。

[0243] 因为炎症标志物血清 C-反应蛋白(CRP)的轻微升高已被证明可以预测健康和患病个体的死亡(Kushner et al,2006),也考察了低血浆 CPR(即  $\leq 1.75\text{mg/L}$ ) 参与者中的血浆 YKL-40 的预测价值。研究了血浆 YKL-40 浓度的预测价值是否不依赖于 CRP。在 4453 名低血浆 CRP 浓度(即  $\leq 1.75\text{mg/L}$ ) 的参与者中,死亡的风险比为:血浆 YKL-40 百分位数类别 34-66% 为 1.0(95% CI, 0.8-1.2),血浆 YKL-40 百分位数类别 67-90% 为 1.4(1.1-1.7),血浆 YKL-40 百分位数类别 91-95% 为 2.3(1.6-3.3),类别 96-100% 为 3.4(2.5-4.8) VS. 血浆 YKL-40 百分位数类别 0-33% ( $\log_{10}p$  趋势 12.1)。在血浆 CRP  $> 1.75\text{mg/L}$  的参与者中发现了相似的结果 ( $\log_{10}p$  趋势 18.3) (表 2)。因此,这些受试者的死亡风险比随着血浆 YKL-40 水平的增加而明显地增加,证实血浆 YKL-40 不依赖于血浆 CRP。

[0244] 升高的血浆 YKL-40 与增加的死亡风险并非与特定的疾病类型有关,而是在患有癌症、缺血性心血管疾病、肝脏疾病、糖尿病、慢性阻塞性肺疾病的参与者都有发现,不管是 1991-1994 年的血液采样时间之前还是在 16 年追踪期间。

[0245] 增加的 plasma YKL-40 与增加的死亡风险之间的相关性与吸烟状况和死亡风险之间的相关性相似或更高。此外,多因素 cox 分析,包括吸烟状况、年龄和性别,证明 plasma YKL-40 是一个独立的危险因素,即显示 plasma YKL-40 百分位数类别是早期死亡的危险因素,不依赖于年龄、性别、血浆 CRP、吸烟状况或疾病(癌症、缺血性心血管疾病以及其他与升高的 plasma YKL-40 有关的疾病)。血浆 YKL-40 的增加与吸烟有关(趋势,  $p = 0.0005$ )。

[0246] 在这项对丹麦一般人群的成年人的研究中,发现 YKL-40 的升高的 plasma 浓度可以预测早期死亡。血浆 YKL-40 升高的参与者与低 plasma YKL-40 的参与者相比,中值生存年龄之间的差异为 14 年。在血液采样之后的 15 年追踪中,这两组中活着的参与者的比例差异为 26%。

[0247] 这项研究的效力在于,在一大群很有特征性的受试者中,在一个长期的追踪阶段并且追踪没有损失的情况下,评估了 plasma YKL-40 的预测价值。

[0248] 血浆 YKL-40 作为一般人群死亡的危险因素

[0249] 在 16 年追踪期间,8899 名参与者中的 3059 名死亡。血浆 YKL-40 的增加(分为 5 类和 10 岁年龄百分位类别)与所有原因导致的早期死亡风险性的增加相关(对数秩检验,  $p = 3.8 \times 10^{-46}$ ) (表 3 和图 4A)。低 plasma YKL-40 的参与者(百分位数 0-33%) 相比高 plasma YKL-40 的参与者(百分位数 96-100%) 具有更长的中值生存年龄,83 年 vs. 69 年,长出 15 年,生存率 70% vs. 44%。因此,增大的 plasma YKL-40 对中值生存年龄和 15 年存活的影响类似于吸烟状况对它们的影响,或者高于吸烟状况的影响(表 3 和图 4A)。

[0250] 对于总死亡来说,多因素校正的(血液采样时的性别、年龄和吸烟状况)风险比,与 plasma YKL-40 百分位数类别 0-33% 相比 ( $p$ -趋势,  $p = 1.0 \times 10^{-37}$ ), plasma YKL-40 百分位数类

别 34-66% 为 1.2 (95% CI, 1.1-1.3), 67-90% 为 1.6 (1.4-1.8), 91-95% 为 2.3 (1.9-2.8), 以及血浆 YKL-40 百分位类别 96-100% 为 2.8 (2.4-3.4)。在对暴死进行校正后, 这些估算保持不变 (表 2)。根据性别和 10 岁年龄百分位数类别的血浆 YKL-40, 计算死亡的风险比 (HR)。

[0251] 在患有癌症的参与者中, 在患有缺血性心血管死亡的参与者中以及在患有其他疾病的参与者中, 还发现血浆 YKL-40 百分位数类别的增加与多因素校正的死亡风险的风险比的增加之间有高度显著的关系 ( $\log_{10}p$  趋势分别为 11.4、12.5 和 15.1) (表 2)。

[0252] 绝对 10 年死亡率

[0253] 在血浆 YKL-40 百分位数类别 0-33% 中, 从不吸烟的年龄 < 50 岁的女性中, 最低的绝对 10 年死亡率为 1.2% (图 4B)。男性中的绝对 10 年死亡率高于女性, 并且随年龄以及从不 - 以前 - 现在吸烟的状况而增加。在 96-100% 血浆 YKL-40 百分位数类别中, 在吸烟的年龄 > 70 岁的女性和男性中, 最高绝对 10 年死亡率为 78% 和 90% (图 4B)。

[0254] 总之, 在这项对来自一般人群的受试者进行的前瞻性研究中, 发现不受吸烟的影响, 升高的 YKL-40 血浆浓度与早期死亡之间存在很强的联系。

[0255]

表1: 来自一般人群的研究参与者的状况与血浆YKL-40浓度

状况	血液采样时		追踪期间出现情况的参与者				追踪期间, n	
	n	中值 (IQR), µg/l	性别和血浆YKL-40的10年组百分位, n (%)					
			0-33%	34-66%	67-90%	91-95%	96-100%	
健康	7136	42 (30-61)	1364 (38)	1247 (35)	759 (21)	138 (4)	102 (3)	3610
任意疾病 *	1763	67 (42-110)	1121 (32)	1117 (32)	883 (25)	207 (6)	198 (6)	3526
癌症	704	65 (42-107)	528 (34)	509 (32)	376 (24)	83 (5)	79 (5)	1575
缺血性心血管疾病	664	73 (46-116)	455 (30)	491 (33)	397 (27)	79 (6)	76 (5)	1498
肝脏疾病	81	96 (49-217)	30 (20)	37 (25)	27 (18)	20 (13)	37 (25)	151
糖尿病	156	71 (45-128)	147 (28)	159 (30)	147 (28)	36 (7)	42 (8)	531
慢性阻塞性肺疾病	155	71 (46-122)	252 (29)	251 (29)	237 (28)	51 (6)	68 (8)	859
哮喘	93	56 (39-96)	98 (34)	86 (31)	67 (23)	20 (7)	15 (5)	288

\*死亡 (仅发生的事件): 癌症、缺血性心血管疾病、肝脏疾病、糖尿病、慢性阻塞性肺疾病、哮喘、风湿性关节炎、炎症性肠病、肺炎。一些参与者患有一种以上的疾病。IQR, 四分位数间距。

[0256]

表2: 死亡的风险比与血浆YKL-40浓度

人口/状况	参与者 状况	性别与YKL-40的10岁年龄组百分位的风险比*				-log <sub>10</sub> (p-趋势)	
		0-33%	34-66%	67-90%	91-100%		
全部§/死亡	8875/3047	1.0	1.2 (1.1-1.3)	1.6 (1.4-1.8)	2.3 (1.9-2.8)	2.8 (2.4-3.4)	37.3
全部§/非暴死	8804/2976	1.0	1.2 (1.1-1.3)	1.6 (1.4-1.8)	2.3 (1.9-2.8)	2.8 (2.4-3.4)	36.8
全部§/暴死	8875/71	1.0	1.6 (0.8-3.2)	1.2 (0.5-2.8)	1.9 (0.5-7.1)	2.6 (0.8-8.8)	0.7
从不吸烟者/死亡	2028/450	1.0	1.1 (0.8-1.4)	1.6 (1.2-2.2)	2.5 (1.5-4.2)	3.6 (2.1-6.1)	7.2
曾经吸烟者/死亡	6847/2597	1.0	1.2 (1.1-1.4)	1.6 (1.4-1.8)	2.2 (1.8-2.7)	2.7 (2.2-3.3)	30.4
血浆CRP-浓度 ≤1.75mg/L/死亡	4453/1081	1.0	1.0 (0.8-1.2)	1.4 (1.1-1.7)	2.3 (1.6-3.3)	3.4 (2.5-4.8)	12.1
血浆CRP-浓度 >1.75mg/L/死亡	4404/1958	1.0	1.3 (1.1-1.5)	1.5 (1.3-1.8)	2.1 (1.6-2.6)	2.4 (1.9-3.0)	18.3
患癌症的参与者§/死亡	2271/1400	1.0	1.1 (1.0-1.3)	1.4 (1.2-1.6)	2.1 (1.5-2.8)	2.4 (1.8-3.1)	11.4
患缺血性心血管疾病的参与者§/死亡	2158/1327	1.0	1.2 (1.0-1.5)	1.5 (1.2-1.8)	2.4 (1.8-3.3)	2.3 (1.7-3.1)	12.5
患其他疾病的参与者§**/死亡	2820/1599	1.0	1.2 (1.0-1.4)	1.4 (1.2-1.7)	2.0 (1.5-2.5)	2.4 (1.9-3.0)	15.1

§ 24名参与者吸烟状况不明 ↑ 另外18名参与者的CRP血浆浓度不明

\*风险比用其他因素校正, 如血液采样时的性别、年龄(十分位数)和吸烟习惯(从不/以前/现在吸烟者), 用回归稀释偏差校正。CRP=C反应蛋白。 \*\*良性肝脏疾病、糖尿病、阻塞性肺疾病和哮喘、风湿性关节炎、炎症性肠病、肺炎。一些参与者患有以上疾病。

[0257] 表3. 根据血浆YKL-40百分位数类别或吸烟状况#, 来自一般人群的参与者的中值存活年龄和15年存活率

[0258]

危险因素	中值存活年龄, 岁 (95%置信区间)	15-年存活率, % (95% CI)
<b>YKL-40</b>		
96-100%	69 (66-72)	44 (39-49)
91-95%	73 (69-75)	52 (47-58)
67-90%	78 (77-80)	59 (57-62)
34-66%	81 (80-82)	66 (64-67)
0-33%	83 (82-84)	70 (68-71)
<b>吸烟</b>		
现在	76 (75-77)	60 (58-61)
以前	82 (81-83)	61 (59-63)
从不	87 (86-88)	76 (74-78)

[0259] # 基于哥本哈根市心脏研究 1991-1994 年检查并跟踪 16 年的 8899 名参与者。

[0260] 表 4. 来自一般人群的研究参与者的基线特征<sup>□</sup>

[0261]

#### 由性别和10-岁年龄血浆YKL-40百分位分类

特征	0-33%	34-66%	67-90%	91-95%	96-100%	P 趋势
个数 (%)	2964 (33)	2932 (33)	2121 (24)	445 (5)	437 (5)	-
女性, %	57	56	56	56	57	0.96
年龄, 岁	61 (48-71)	61 (48-71)	61 (48-71)	60 (48-71)	61 (48-71)	0.12
现在吸烟者, %	43	48	51	56	58	0.0005

[0262] <sup>□</sup> 数值收集自哥本哈根市心脏研究 1991-1994 年检查, 并表示为个数、百分数或中值 (四分位数间距)。用趋势检验进行 5 个 YKL-40 百分位类别之间的统计学比较 (YKL-40 类别编码为 0、1、2、3 和 4, 表示递增的百分位类别)。

[0263] 实施例 2 健康受试者中 YKL-40 的血清浓度的每日、每周及长期变化

[0264] 材料和方法

[0265] 参考区间

[0266] 从 245 名健康受试者中收集血清 (女 / 男 134/111, 中值年龄 49 岁, 范围 18-79)。

[0267] 日变化

[0268] 在 24 小时内从 16 名健康受试者中 (10/6, 48 岁, 范围 32-66) 收集 7 次血清 (第 1 天 :10AM、1PM、4PM、7PM、10PM ;第 2 天 :7AM、10AM)。

[0269] 3 周中的每日变化

[0270] 在 3 周内于上午 8 点 (8AM) 从医院员工中招收的 38 名受试者中 (21/17, 41 岁, 范围 22-66) 收集 5 次血清 (第 1、2、8、15 和 22 天)。第 8 天下午 2 点 (2PM) 也收集了样品。

[0271] 2 年中的每周变化

[0272] 在 3 周内于 8AM 从医院员工中招收的 23 名受试者中 (14/9, 42 岁, 范围 31-66) 收集 5 次血清 (第 1、2、8、15 和 22 天), 之后重复 6、12 和 24 个月。

[0273] 3 年中的变化

[0274] 在 4 周内于 8AM 和 10AM 之间从 30 名健康女性中 (48 岁, 范围 24-62) 收集 5 次血清 (第 1、8、15、22 和 29 天), 之后在其中 21 名受试者中重复 3 年。

[0275] 锻炼后的变化

[0276] 体育锻炼之前、用测功计自行车进行两段式 25 分钟锻炼计划后, 从 14 名健康受试者中 (10/4, 50 岁, 范围 35-64) 收集血清。本研究中包含的健康受试者以前没有病史, 没有经历过任何症状, 而且没有疾病的征兆, 也没有服用任何药物。

[0277] 道德规范

[0278] 该项研究得到当地科学伦理委员会的许可, 并按照 Helsinki 宣言进行。受试者被口头和书面告知了该项研究, 并且全部提供了书面知情同意书。所有人都被告知他们可以随时停止研究。

[0279] YKL-40ELISA

[0280] 正确处理血液样品是很重要的, 以尽可能减小血清中 YKL-40 的变化, 该变化与疾病进程不相关, 但代表着方法变化 (Johansen et al., 2006, A ;Johansen et al., 2006, B 和 Harvey et al., 1998)。血液样品允许在室温下凝块, 在 1/2-2 小时内于最小 2500g 下离心 10 分钟, 将血清储存在 -80°C 直到分析。血清 YKL-40 是通过商业的双位点夹心型酶联免疫吸附分析 (ELISA) (Quidel Corporation, San Diego, CA), 利用链霉亲和素包被的微孔板、生物素化  $\gamma$ -Fab 单克隆捕获抗体以及碱性磷酸酶标记的多克隆检测抗体以一式两份进行测定 (Harvey et al., 1998)。ELISA 的回收率为 102%, 检测限为 20  $\mu$ g/L (Johansen et al., 2006, B ;Harvey et al., 1998)。批内分析的变异系数 (CV) 为  $\leq 5.0\%$ , 批间分析 CV  $\leq 10.2\%$ 。来自各个受试者的样品是在相同的 ELISA 板上分析。

[0281] 统计分析

[0282] 血清 YKL-40 的描述统计学通过中位数和几何平均数、变异系数和 95% 置信区间和范围来呈现。血清 YKL-40 的分布是不对称的, 因此将对数转换 (正态) 用于统计估计。参考区间是用线性回归来估计, 对数标尺上为 YKL-40。分析的血清 YKL-40 随时间的变化 (24 小时、3 周、6 个月、12 个月、24 个月和 3 年中的变化) 是用 CV 给出, 并与 YKL-40ELISA 的批内和批间 CV 比较。假设 YKL-40 对数转换的随机效应模型 (乘法模型), 估算受试者内部、受试者之间以及各轮之间的方差分量, 并通过几何平均数的变异系数加以呈现 (Kirkwood, 1979)。个体 YKL-40 的 2 次测量之间的差异的 95% 置信限是在对数标尺上计算并转换。与总变异相比较的受试者之间的相对同质性是通过同类相关系数来估算。用带有重复测量的一般线性模型来分析逐日长期变化与体力活动的血清 YKL-40。P 值  $< 5\%$  视为有显著

性。用 Bonferroni 校正法校正多次测试的 P 值。所有统计学计算都用 SAS 完成 (9.1, SAS Institute, Cary, NC, USA)。

#### [0283] 结果

[0284] 在健康受试者中,中值血清 YKL-40 为  $43 \mu\text{g/L}$  (范围:  $20\text{--}184 \mu\text{g/L}$ ; 5-95% 区间:  $20\text{--}124$ ), 且男性和女性之间没有差异 ( $P = 0.54$ )。血清 YKL-40 随年龄而增大 ( $\rho = 0.45$ ;  $P < 0.0001$ )。针对年龄和性别校正的血清 YKL-40 的正态参考区间是通过线性回归来构建, 血清 YKL-40 作为因变量 (对数转换), 年龄和性别作为解释变量。上限定义为所给定的年龄和性别的第 95 个百分位数。年龄校正的受试者批间 CV 为 45%。

[0285] 图 5 说明 24 小时内 7 个时间点个体的血清 YKL-40 的日变化。平均血清 YKL-40 从 10AM 到 10PM 增加了 23% ( $P = 0.01$ ), 但在对多次测试校正时无显著意义。没有观察到其他显著性差异。

[0286] 在骑自行车 25 分钟后, 没有发现血清 YKL-40 的变化 ( $P > 0.08$ , 线性模型)。

[0287] 图 6 显示 3 周内 6 个时间点 (第 1、2、8、15 和 22 天的 8AM) 个体的血清 YKL-40 的周变化。每个受试者的血清 YKL-40 的每日中值 CV 为 16%。在第 8 天, 于 8AM 和 2PM 时收集样品, 血清 YKL-40 轻微增大 ( $47 \mu\text{g/L}$  vs.  $52$ , 8% 差异,  $P < 0.0001$ )。

[0288] 图 7 说明 3 周内 5 个时间点 (第 1、2、8、15 和 22 天的 8AM) 以及在 6 个月 (第 2 轮)、12 个月 (第 3 轮) 和 24 个月 (第 4 轮) 后重复进行的个体的血清 YKL-40 的变化。每个受试者的血清 YKL-40 的每日中值 CV 为总体 16% (范围 0-92%), 以及 16% (0-63%, 第 1 轮)、19% (5-92%, 第 2 轮)、15% (0-64%, 第 3 轮) 和 21% (0-47%, 第 4 轮)。

[0289] 这 4 轮中没有检测到系统性增大或减小 ( $P = 0.09$ )。利用带有血清 YKL-40 对数转换的随机效应模型估计方差分量, 得到受试者内部的 CV 为 27.3%, 24 个月的 CV 为 8.8%。在 24 个月的期间, 包括随时间变化和批间变化的受试者内部 CV 为 30.2%。在 24 个月的期间, 组内相关系数为 72.4%。受试者内部的血清 YKL-40 中估计的变化, 包括批间变化在内, 得到该相同受试者两次测量之间差异的 95% 置信限。如果第二次 YKL-40 测量值下降 52% 或者增加 109%, 那么这种幅度的差异是显著的, 并且不只是预分析条件、方法学和正常生物变化的反映。

[0290] 图 8 显示 1 个月内以及 3 年后再次进行的五个时间点个体的血清 YKL-40 的周变化。血清 YKL-40 的中值 CV 是 17% (第 1 轮) 和 13% (第 2 轮)。在分析的受试者中, 这两轮中 ( $n = 21$ ) 在两个时期之间都没有观察到血清 YKL-40 的变化 ( $P = 0.37$ , 线性模型)。利用带有血清 YKL-40 对数转换的随机效应模型估计方差分量, 得到受试者内部 CV 为 26.0%, 3 年的 CV 为 7.3%。受试者内部包括随时间变化和批间变化为 28.8%。包括受试者内部变化和随时间变化在内的受试者之间的变化为 54%。在 3 年期间, 组内相关系数为 72.2%, 表明与受试者之间的变化相比, 受试者内部变化相对较低。

#### [0291] 结论

[0292] 本研究表明, 血清 YKL-40 在健康受试者中在短期及长达 3 年的长期采样期间都是稳定的, 包括批间变化的受试者的内部 CV 为  $\sim 30\%$ 。该研究中血清 YKL-40 的受试者之间变化为 45%, 确定了正态常参考区间, 并且与对本研究健康受试者进行的其他研究中所发现的相似。

[0293] 血清 YKL-40 的组内相关性在 2 年和 3 年期间为 72.4% 和 72.2%, 说明与受试者之

间变化相比,受试者内部变化相对较低。本研究中发现的组内相关性与其他血清标记中发现的相似,例如 Ockene 等人报导了高敏 C 反应蛋白的组内相关性为 66% (Ockene et al., 2001)。

[0294] 目前估计的包括批间变化的健康受试者内部的血清 YKL-40 的变化确定:血清 YKL-40 增加 > 109% 和减少 > 52% 视为有显著性,并且不只是预分析条件、方法学和正常生物变化的反映。

[0295] 因此,目前的研究显示,血清 YKL-40 的日变化没有显著性,体育锻炼也没有影响。与血清 YKL-40 的受试者之间变化相比,受试者内部变化相对较低,证实 YKL-40 是一种可靠的生物标记。

[0296] 参考文献

[0297] Bigg HF, Wait R, Rowan AD, Cawston TE. The mammalian chitinase-like lectin, YKL-40, binds specifically to type I collagen fibril formation. *J Biol Chem* 2006 ;281 :21082-95.

[0298] Bojesen SE, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. Integrin  $\beta$  3 leu33prohomozygosity and risk of cancer. *J Natl Cancer Inst* 2003 ;95 :1150-7.

[0299] Boot RG, van Achterberg TAE, van Aken BE, Renkema GH, Jacobs MJHM, Aerts JMFG, et al. Strong induction of members of the chitinase family of proteins in atherosclerosis. Chitotriosidase and human cartilage gp-39 expressed in lesion macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999 ;19 :687-94.

[0300] Bunn, et al., U. S. Pat. No. 5, 213, 961

[0301] Clarke R, Shipley M, Lewington S, et al. Underestimation of risk associations due to regression dilution in long-term follow-up of prospective studies. *Am J Epidemiol* 1999 ;150 :341-53.

[0302] Coligan, et al., Unit 9, *Current Protocols in Immunology*, Wiley Interscience, 1991).

[0303] De Ceuninck F, Gauffillier S, Bonnaud A, Sabatini M, Lesur, C, Pastoureau P. YKL-40 (Cartilage gp-39) induces proliferative events in cultured chondrocytes and synoviocytes and increases glycosaminoglycan synthesis in chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2001 ;285 :926-31.

[0304] Harlow and Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.

[0305] Harvey S, Weisman M, O' Dell J, et al. Chondrex: new marker of joint disease. *Clin Chem* 1998 ;44 :509-16.

[0306] Innis, et al., *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Acad. Press, 1990.

[0307] Johansen JS, Williamson MK, Rice JS, Price PA. Identification of proteins secreted by human osteoblastic cells in culture. *J Bone Miner Res* 1992 ; 7 :501-12.

[0308] Johansen JS, Jensen BV, Roslind A, Nielsen D, Price PA. Serum YKL-40, a

newprognostic biomarker in cancer patients? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006 ;15 :194-202. A

[0309] Johansen JS. Studies on serum YKL-40 as a biomarker in diseases within inflammation tissue remodelling, fibrosis and cancer. *Dan Med Bull* 2006 ;53 : 172-209. B

[0310] Juel K, Helweg-Larsen K. The Danish registers of causes of death. *Dan Med Bull* 1999 ;46 :354-7.

[0311] Kirkwood TBL. Geometric means and measures of dispersion. *Biometrics* 1979 ;35 :908-9.

[0312] Kohler and Milstein, *Nature*. 256 :495, 1975.

[0313] Kohsaka, et al., *Nuc. Acids Res.*, 21 :3469-3472, 1993.

[0314] Kushner I, Rzewnicki D, Samols D. What does minor elevation of C-reactive protein signify? *Am J Med* 2006 ;119 :166. e17-166. e28.

[0315] Langone, et al. eds. *Acad. Press*, 1981.

[0316] Ling H, Recklies AD. The chitinase 3-like protein human cartilage glycoprotein 39 inhibits cellular responses to the inflammatory cytokines interleukin-1 and tumour necrosis factor- $\alpha$ . *Biochem J* 2004 ;380 :651-9.

[0317] Millis AJT, Hoyle M, Kent L. In vitro expression of a 38,000 dalton heparin-binding glycoprotein by morphologically differentiated smooth muscle cells. *J Cell Physiol* 1986 ;127 :366-72.

[0318] Nishikawa KC, Millis AJT. gp38k (CH13L1) is a novel adhesion and migration factor for vascular cells. *Exp Cell Res* 2003 ;287 :79-87.

[0319] Nordestgaard BG, Benn M, Schnohr P, Tybjaerg-Hansen A. Nonfasting triglycerides and risk of myocardial infarction, ischemic heart disease, and death in men and women. *JAMA* 2007 ;298 :299-308.

[0320] Ockene IS, Matthews CE, Rifai N, Ridker PM, Reed G, Stanek E. Variability and classification accuracy of serial high-sensitivity C-reactive protein measurements in healthy adults. *Clin Chem* 2001 ;47 :444-50.

[0321] Recklies AD, White C, Ling H. The chitinase 3-like protein human cartilage 39 (HC-gp39) stimulates proliferation of human connective-tissue cells and activates both extracellular signal-regulated kinase- and protein kinase B-mediated signaling pathways. *Biochem J* 2002 ;365 :119-26.

[0322] Recklies AD, Ling H, White C, Bernier SM. Inflammatory cytokines induce production of CH13L1 by articular chondrocytes. *J Biol Chem*. 2005 ;280 : 41213-21.

[0323] Remington ' s *Pharmaceutical Sciences*, 16th Ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa 1980.

[0324] Renkema GH, Boot RG, Au FL, et al. Chitotriosidase, a chitinase, and the 39-kDa human cartilage glycoprotein, a chitin-binding lectin, are homologues of

family 18glycosyl hydrolases secreted by human macrophages. Eur J Biochem 1998 ; 251 :504-9.

[0325] Salacinski, et al., Anal. Biochem. , 117 :136-146, 1981.

[0326] Schnohr P, Jensen JS, Scharling H, Nordestgaard BG. Coronary heart disease risk factors ranked by importance for the individual and community. A 21 year follow-up of 12000 men and women from The Copenhagen City Heart Study. Eur Heart J 2002 ; 23 :620-6.

[0327] Shackelton LM, Mann DM, Millis AJT. Identification of a 38-kDa heparin-binding glycoprotein (gp38k) in differentiating vascular smooth muscle cells as a member of a group of proteins associated with tissue remodelling. J Biol Chem 1995 ; 270 :13076-83.

[0001]

## 1065-8. 10P4序列表

## 序列表

<110> 海莱乌医院; 哈维德夫医院; 里格舒斯匹塔里特医院  
 <120> 作为非特异疾病的通用标记的YKL-40  
 <130> P1959PC00  
 <160> 2  
 <170> PatentIn version 3.5  
 <210> 1  
 <211> 1741  
 <212> DNA  
 <213> 人类  
 <400> 1  
 ctaggtagct ggcaccagga gccgtgggca agggaagagg ccacaccctg ccttgcctctg 60  
 ctgcagccag aatgggtgtg aaggcgtctc aaacaggctt tgtggctctg gtgctgctcc 120  
 agtgcctgctc tgcatacaaa ctggtctgct actacaccag ctggtcccag taccgggaag 180  
 gccgatgggag ctgcttccca gatgcccllg accgcttccct ctgtaccac atcatctaca 240  
 gctttgcaa tataagcaac gatcacatcg acacctggga gtggaatgat gtgacgctct 300  
 acggcatgct caacacactc aagaacagga accccaacct gaagactctc ttgtctgtcg 360  
 gaggatggaa ctttgggtct caaagatttt ccaagatagc ctccaacacc cagagtgcgc 420  
 ggactttcat caagttagta ccgccattcc tgcgcaccca tggctttgat gggctggacc 480  
 ttgcttgct ctaccctgga cggagagaca aacagcattt taccacccta atcaaggaaa 540  
 tgaaggccga atttataaag gaagcccagc cagggaaaaa gcagctcctg ctccagcagc 600  
 cacgtctgctc ggggaagtc accattgaca gcagctatga cattgccaag atatccaac 660  
 acctggattt cattagcacc atgacctagc attttcatgg agcctggcgt gggaccacag 720  
 gccatcacag tcccctgttc cgaggtcagg aggalgcaag lccctgacaga ttccagcaaca 780  
 ctgactatgc tgtgggttac atgttgagcc tgggggctcc tgcagtaag ctggtgatgg 840  
 gcacccccac ctccgggagg agcttcactc tggcttcttc tgagactggg gtggagcccc 900  
 caatctcagg accgggaatt ccaggccggt tcaccaagga ggcagggacc ctgctcact 960  
 atgagatctg tgacttctc cgcggagcca cagtccatag aaccctcggc cagcaggtcc 1020  
 cctatgccac caagggcaac cagtgggtag gatacagca ccaggaaagc gtcaaaagca 1080  
 aggtgcagta cctgaaggat aggcagctgg caggcggccat ggtatgggccc ctggacctgg 1140  
 atgacttcca gggctccttc tgcggccagg atctgcgctt cctctcacc aatgccatca 1200  
 aggatgcact cgctgcaacg tagccctctg ttctgcacac agcacggggg ccaaggatgc 1260  
 cccgtcccc tctggctcca gctggccggg agcctgatca cctgcccctg tgagtcaccag 1320  
 gctgagcctc agtctccctc ccttggggcc tatgcagagg tccacaacac acagatttga 1380  
 gctcagccct ggtgggcaga gaggtaggga tggggctgtg gggatagtga ggcatcgcaa 1440  
 tghtaagctc gggattagta cacacttgtt gatgattaat ggaatgttt acagatcccc 1500  
 aagcctggca aggaatttc ttcaactccc tgcctccctag ccctccttat caaaggacac 1560  
 cattttggca agctctatca ccaaggagcc aaacatccta caagacacag tgaccatact 1620  
 aattataccc cctgcaaagc cagcttgaaa ccttcaacta ggaacgtaac cgtgtcccct 1680  
 atctacttcc ccttctctaa ttccacagct gctcaataaa gtacaagagt ttaacagtgt 1740

[0002]

1065-8. 10P4序列表

8

1741

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 383

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人类

&lt;400&gt; 2

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[0003]

## 1065-8. 10P4序列表

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

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

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

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

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

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

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

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

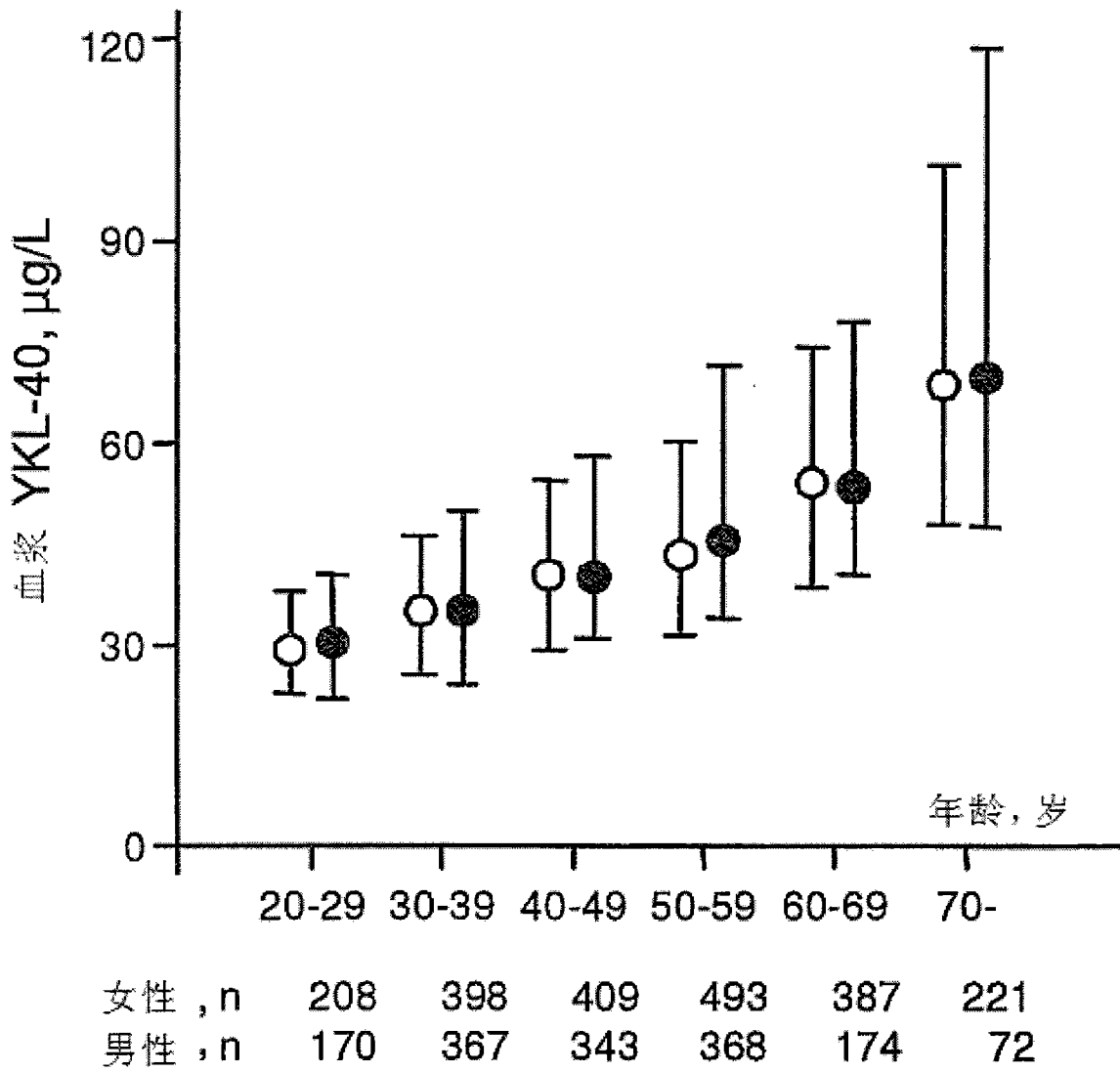


图 1

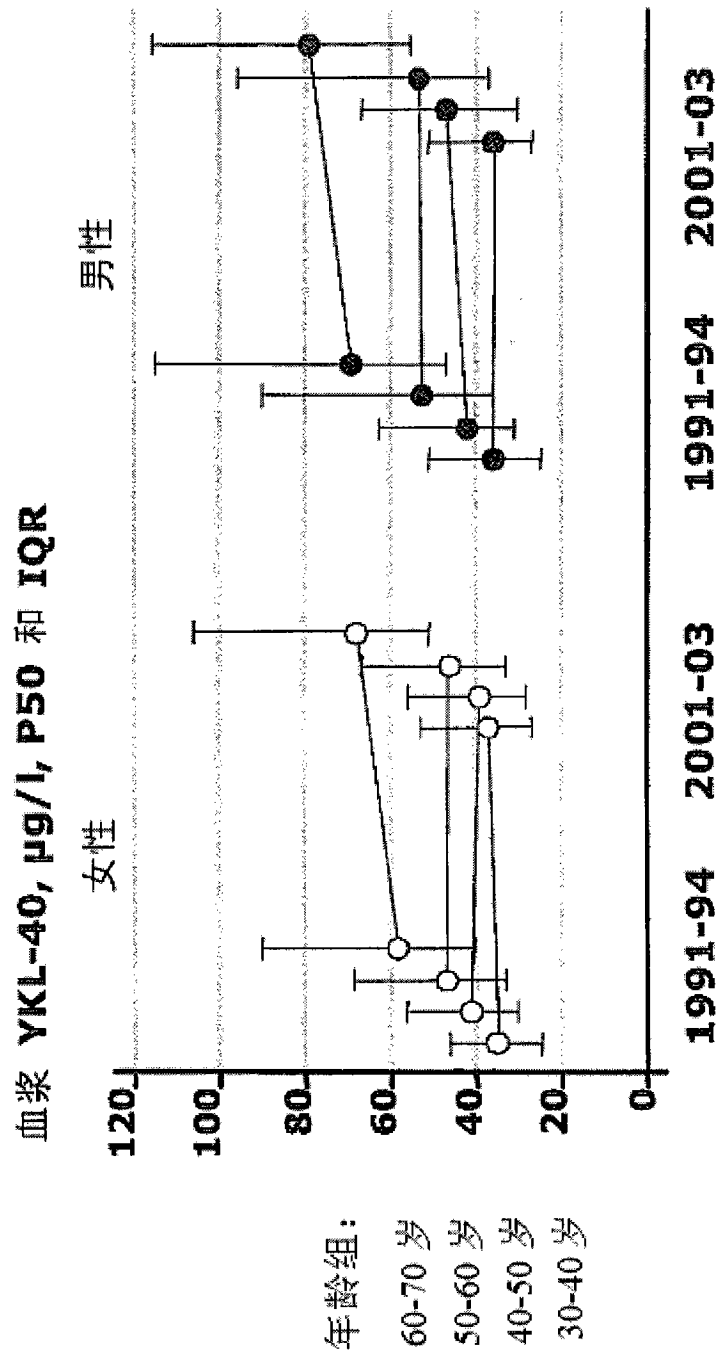


图 2

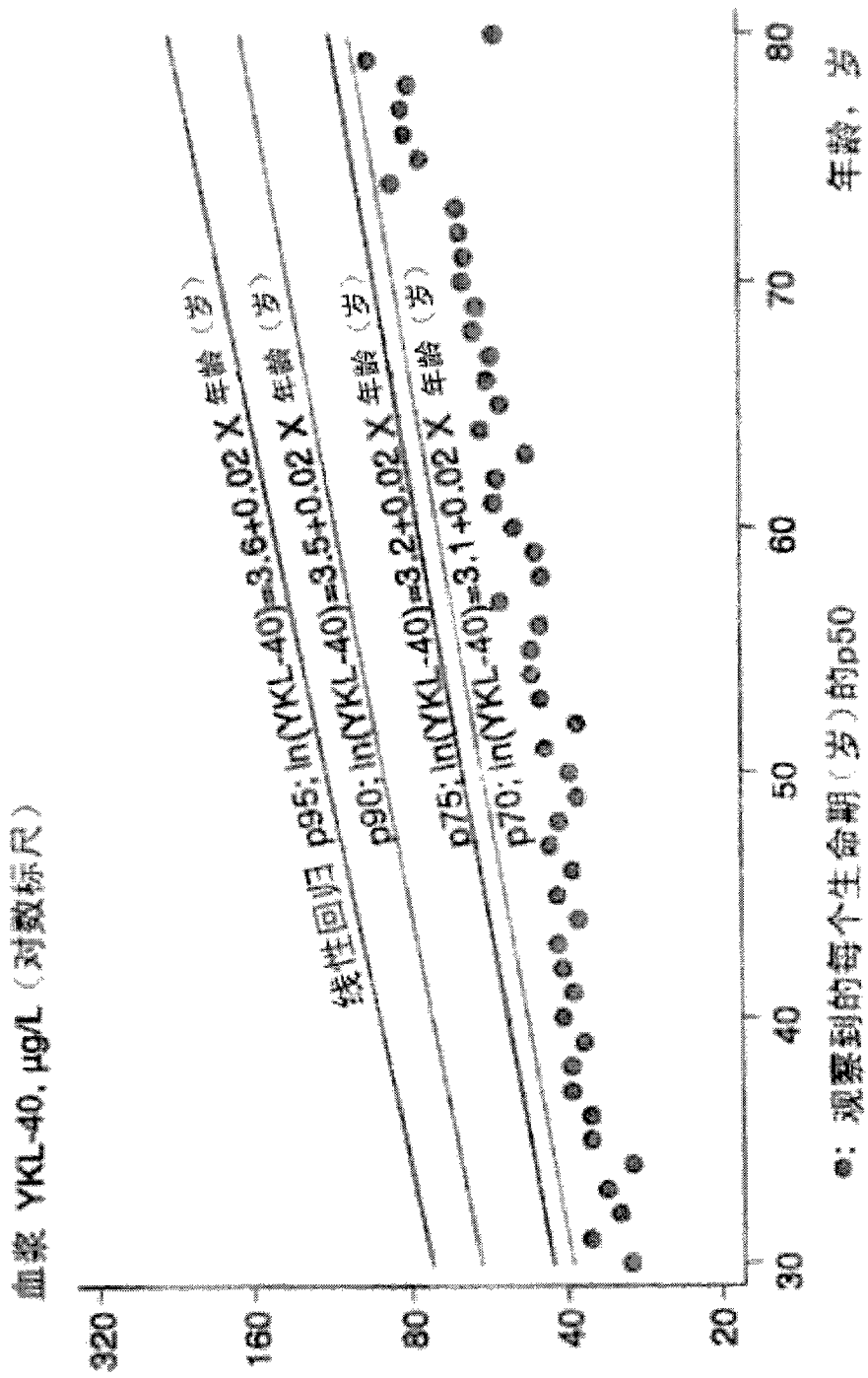


图 3A

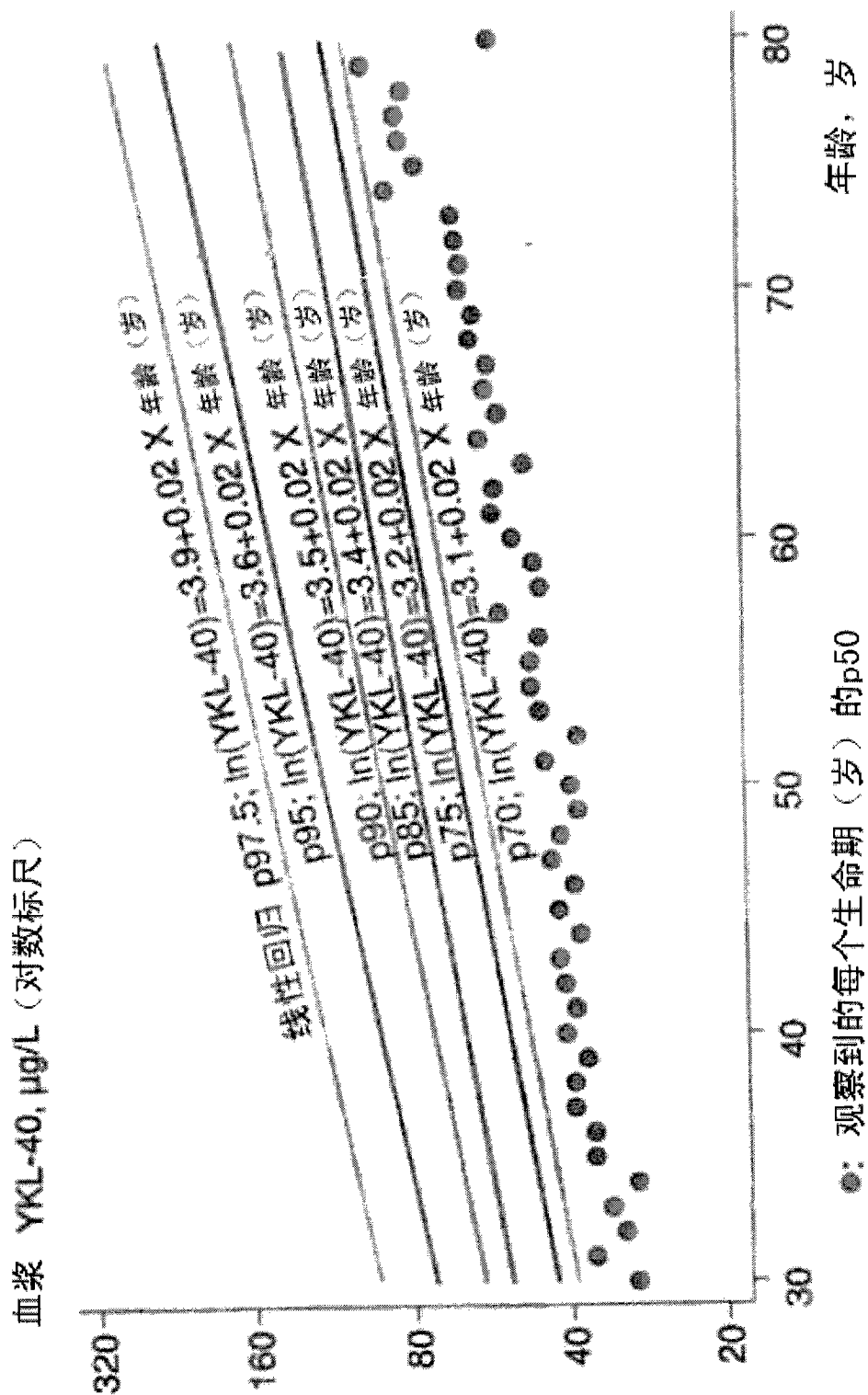


图 3B

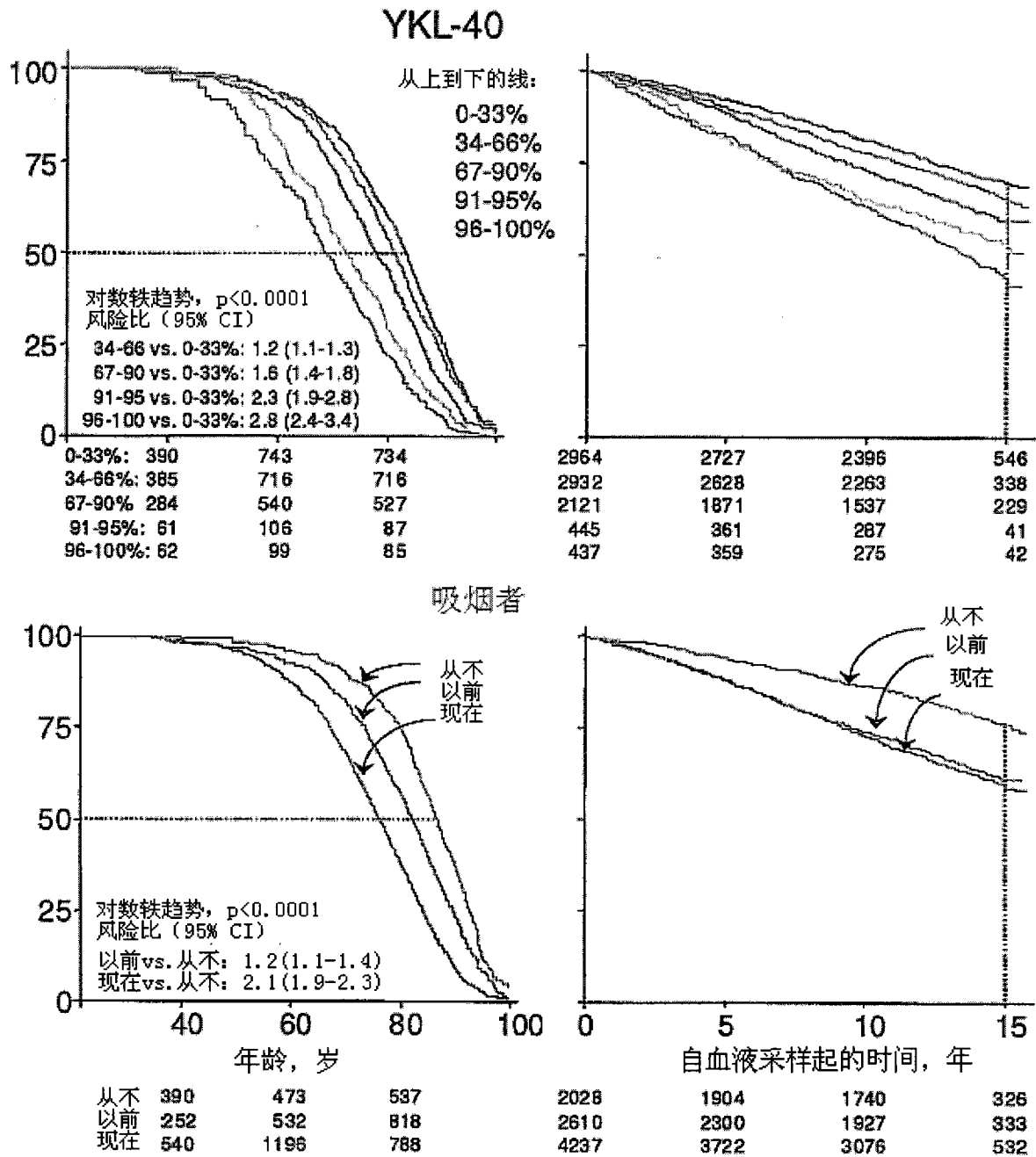


图 4A

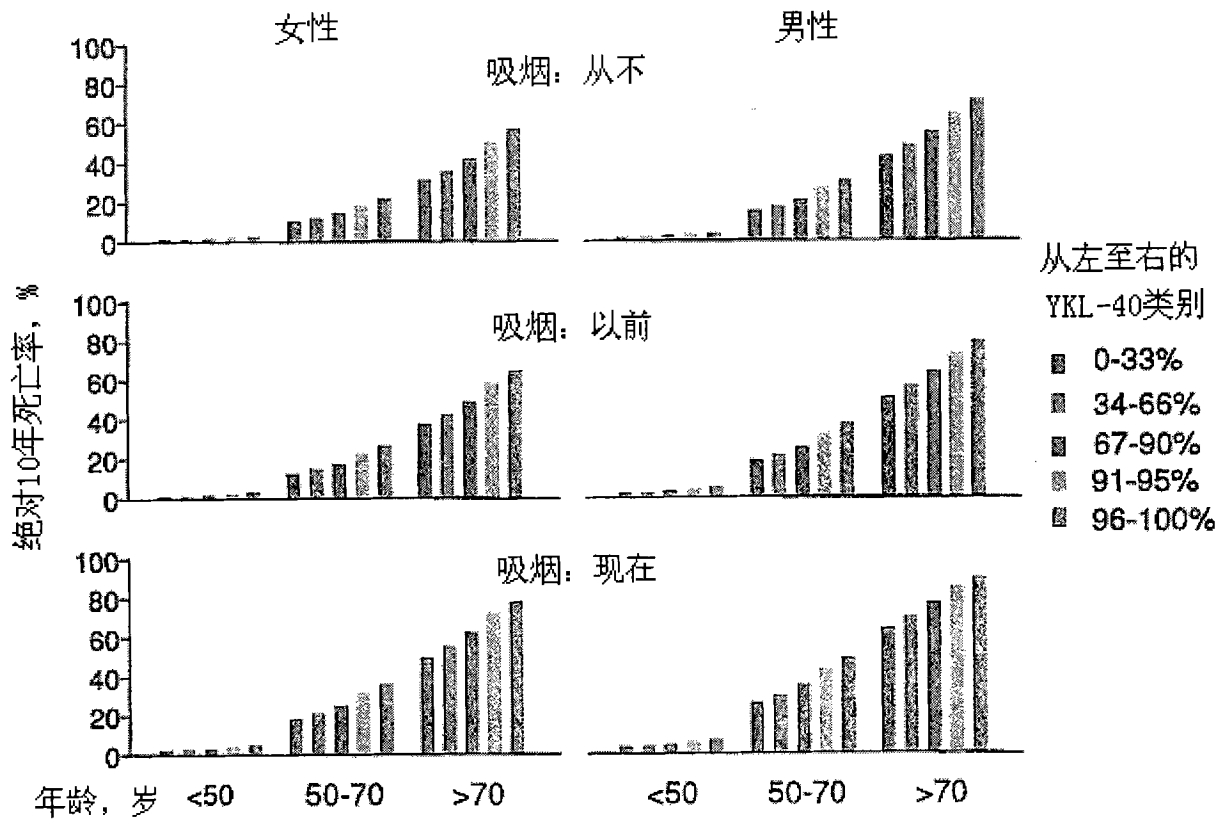


图 4B

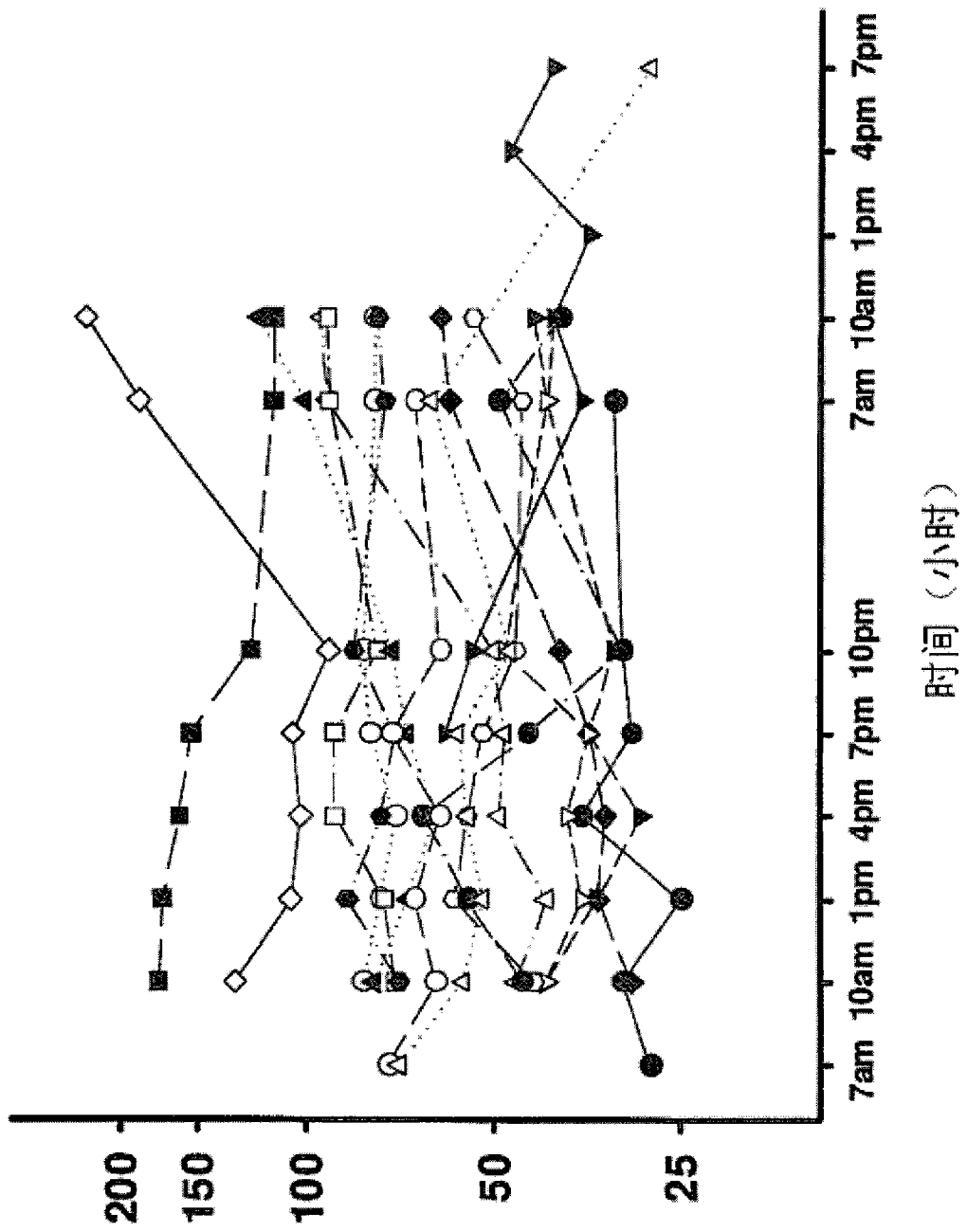


图 5

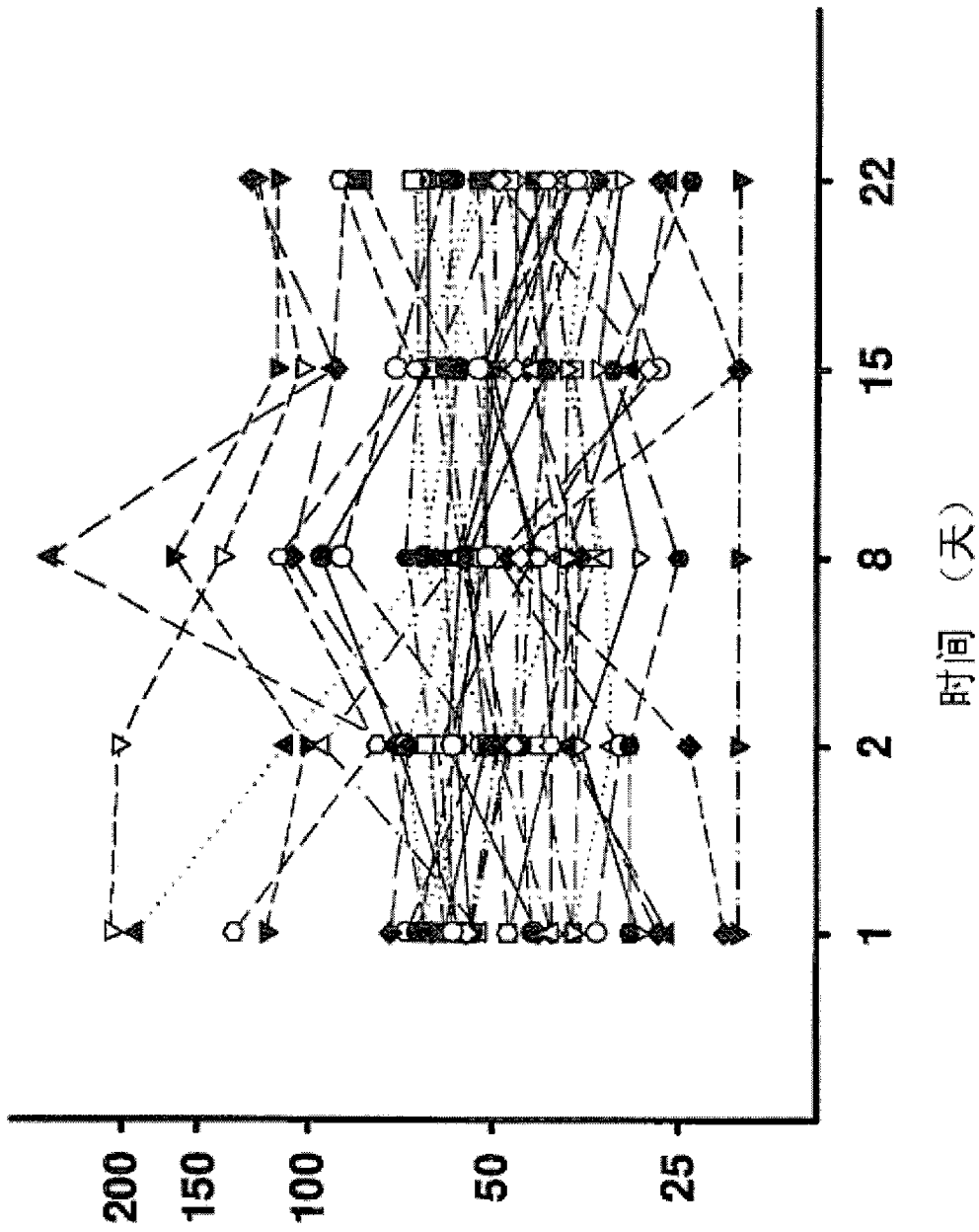


图 6

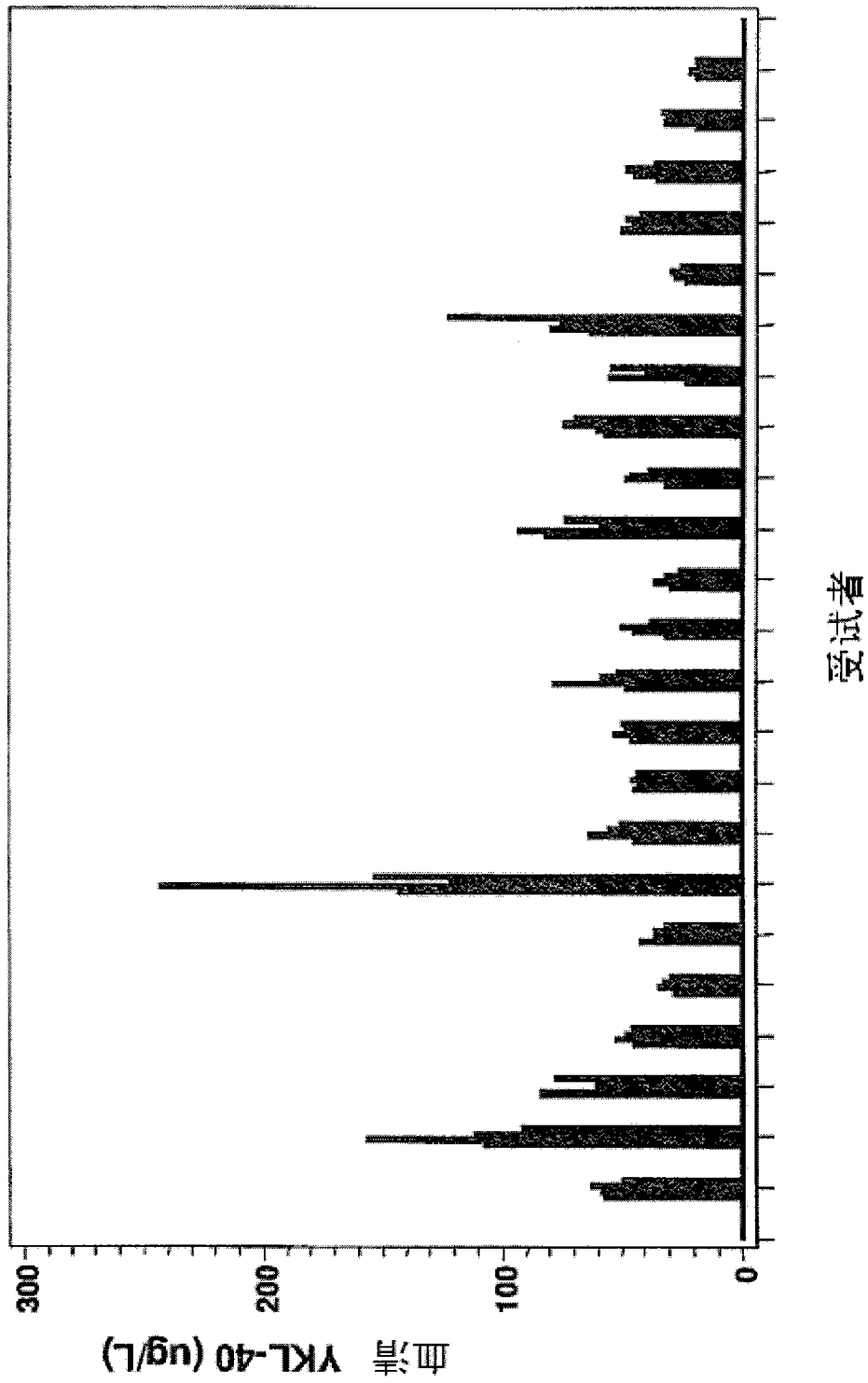


图 7

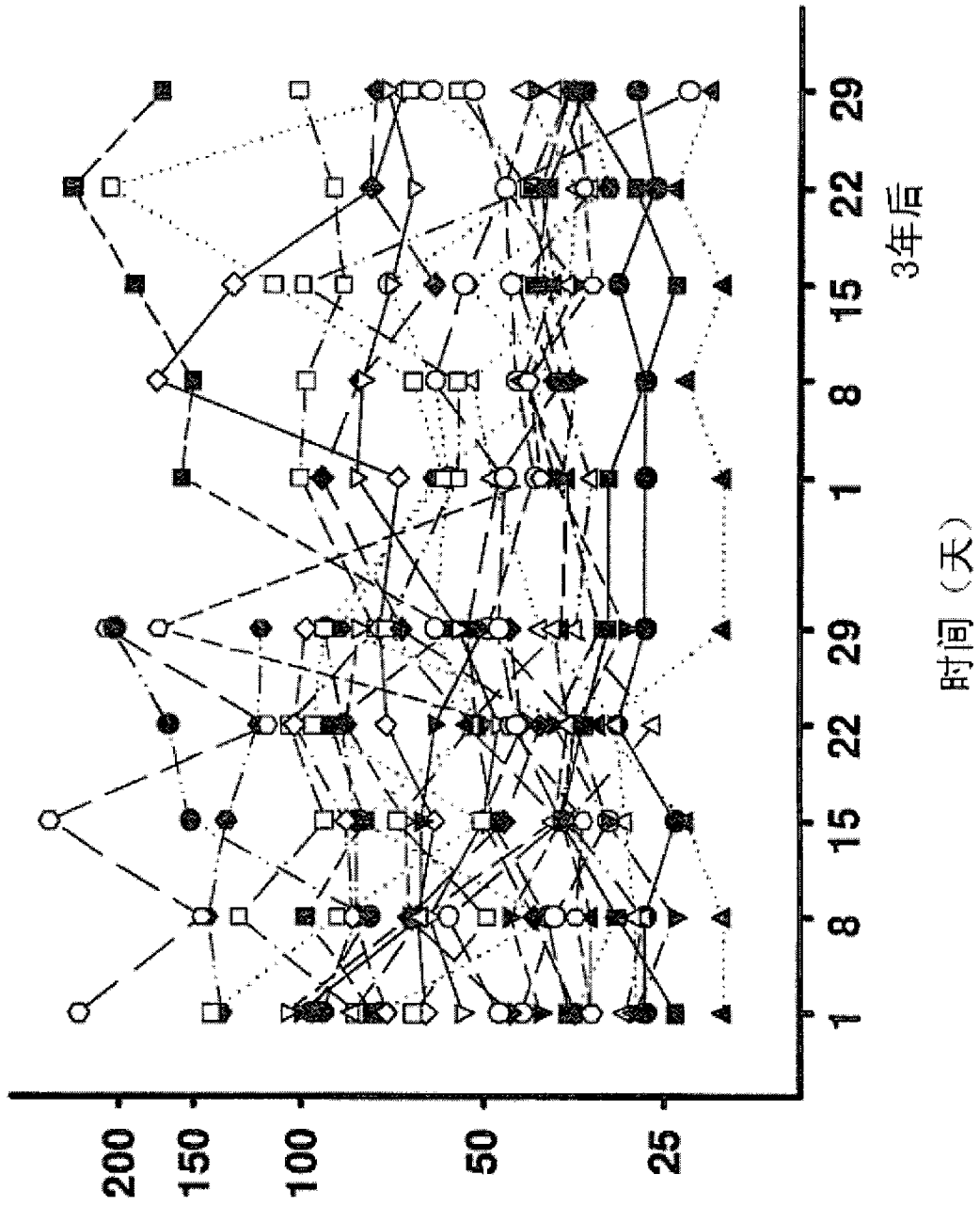
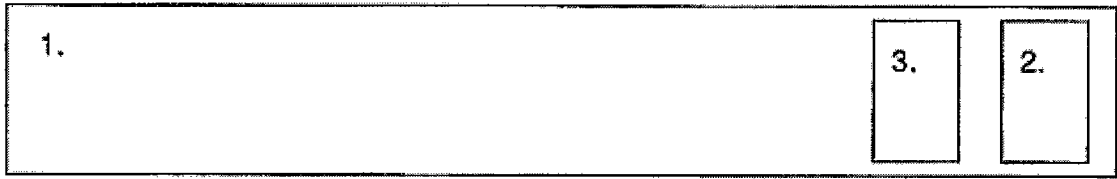


图 8

**A**



**B**

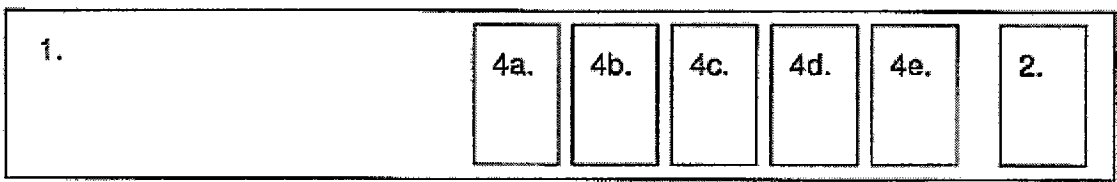


图 9

专利名称(译)	作为非特异疾病的通用标记的YKL-40		
公开(公告)号	<a href="#">CN101971027A</a>	公开(公告)日	2011-02-09
申请号	CN200980103026.6	申请日	2009-01-22
[标]申请(专利权)人(译)	海莱乌医院 哈维德夫医院		
申请(专利权)人(译)	海莱乌医院 哈维德夫医院		
当前申请(专利权)人(译)	海莱乌医院 哈维德夫医院		
[标]发明人	朱莉娅约翰森 斯蒂格玻约森 博格格朗尼诺德埃斯特加尔德 汉斯乔根尼尔森 伊布雅勒克里斯坦森		
发明人	朱莉娅·约翰森 斯蒂格·玻约森 博格·格朗尼·诺德埃斯特加尔德 汉斯·乔根·尼尔森 伊布·雅勒·克里斯坦森		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/58 G01N33/68		
CPC分类号	G01N2800/50 G01N33/6893 G01N2400/00		
代理人(译)	徐金国		
优先权	200801292 2008-09-15 DK 200801293 2008-09-15 DK 200801294 2008-09-15 DK 200800089 2008-01-23 DK		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及一种诊断受试者中非特异疾病或紊乱存在的方法，其中测定的YKL-40水平高于参考水平表明存在非特异疾病或紊乱。受试者可能患有多种疾病或紊乱。参考水平可能是从健康个体中获得的参考水平或者可能是先前从相同受试者获得的测量值。本发明还涉及一种分类受试者的非特异疾病或紊乱的严重性的方法，其中测定的YKL-40水平高于或低于一个或多个参考水平显示了所述非特异疾病或紊乱的严重性。本发明进一步涉及一种可用于本发明方法的试剂盒和装置，其包括用于测量样品中的YKL-40水平的工具；以及将测量的YKL-40与至少一个YKL-40参考水平进行比较的工具。

年龄间隔 (岁)	健康受试者的年龄依赖性临界值				
	第70个 百分位数 ( $\mu\text{g/l}$ YKL-40)	第75个 百分位数 ( $\mu\text{g/l}$ YKL-40)	第85个 百分位数 ( $\mu\text{g/l}$ YKL-40)	第90个 百分位数 ( $\mu\text{g/l}$ YKL-40)	第95个 百分位数 ( $\mu\text{g/l}$ YKL-40)
20 - 29	40	44	54	59	65
30 - 39	48	54	65	72	80
40 - 49	59	65	80	88	98
50 - 59	72	80	98	108	119
60 - 69	88	98	119	132	145
70 - 79	108	119	154	161	178
80 - 89	132	145	178	196	217