



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108780079 A

(43)申请公布日 2018.11.09

(21)申请号 201680082678.6

(22)申请日 2016.12.23

(30)优先权数据

62/271,928 2015.12.28 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.08.27

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/NZ2016/050207 2016.12.23

(87)PCT国际申请的公布数据

WO2017/116239 EN 2017.07.06

(71)申请人 上游医疗技术有限公司

地址 新西兰克赖斯特彻奇

(72)发明人 C·J·彭伯顿 A·M·理查兹

(74)专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
72002

代理人 左路 林晓红

(51)Int.Cl.

G01N 33/48(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

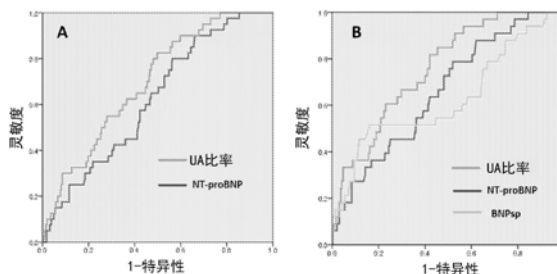
权利要求书2页 说明书32页 附图2页

(54)发明名称

不稳定型心绞痛的诊断

(57)摘要

本发明涉及诊断患者中的不稳定型心绞痛。此外,本发明涉及预测由于发展不稳定型心绞痛导致的患者中的中风和/或心力衰竭的并发症。



1. 用于诊断患者中的不稳定型心绞痛的方法,所述方法包括以下步骤:
 - (i) 测量获得自患者的生物样品中的B型利尿钠肽信号肽 (BNP_{sp}) 片段的水平、N端B型利尿钠肽 (NT-proBNP) 和白血细胞计数 (WCC) 的水平;和
 - (ii) 针对获得自对照受试者的参考水平,比较BNP_{sp}片段、NT-proBNP和WCC的水平,其中,BNP_{sp}片段和NT-proBNP与WCC的比率偏离获得自对照受试者的参考比率,诊断患者具有不稳定型心绞痛。
2. 用于预测先前已被诊断具有不稳定型心绞痛的患者中的心力衰竭和/或中风的并发症的方法,所述方法包括以下步骤:
 - (i) 测量获得自患者的生物样品中的B型利尿钠肽信号肽 (BNP_{sp}) 片段的水平、N端B型利尿钠肽 (NT-proBNP) 和白血细胞计数 (WCC) 的水平;和
 - (ii) 针对获得自对照受试者的参考水平,比较BNP_{sp}片段、NT-proBNP和WCC的水平,其中,BNP_{sp}片段和NT-proBNP与WCC的比率偏离获得自对照受试者的参考比率,预测患者将由于不稳定型心绞痛而发展心力衰竭和/或中风的并发症。
3. 根据权利要求1或权利要求2所述的方法,其进一步包括测量生物样品中钾 (K) 的水平。
4. 根据权利要求1至3中任一项所述的方法,其中所述BNP_{sp}片段是由残基17-26定义的片段 (BNP_{sp} (17-26)) 。
5. 根据权利要求1至4中任一项所述的方法,其中通过免疫测定或质谱法测定BNP_{sp}片段的水平和/或NT-proBNP的水平。
6. 根据权利要求5所述的方法,其中所述免疫测定是定量免疫测定。
7. 根据权利要求5或权利要求6所述的方法,其中所述免疫测定是夹心测定、荧光免疫测定、免疫荧光测定、免疫放射测定、发光测定或化学发光测定。
8. 根据权利要求5至7中任一项所述的方法,其中所述免疫测定包含BNP_{sp}片段结合剂和/或NT-proBNP结合剂。
9. 根据权利要求8所述的方法,其中所述结合剂是抗体或其抗原结合片段,或所述结合剂是适体。
10. 根据权利要求9所述的方法,其中所述抗体选自以下组中:单克隆抗体、多克隆抗体、嵌合抗体、双特异性抗体、人源化抗体及其抗原结合片段。
11. 根据权利要求8至10中任一项所述的方法,其中所述结合成员、抗体或适体与固相偶联。
12. 根据权利要求1至11中任一项所述的方法,其中使用接受者操作曲线 (ROC) 分析来表征不稳定型心绞痛的诊断。
13. 根据权利要求12所述的方法,其中所述接受者操作曲线 (ROC) 分析包括将BNP_{sp}片段和NT-proBNP的水平均一化为白血细胞计数。
14. 根据权利要求12或权利要求13所述的方法,其中特征在于接受者操作曲线 (ROC) 分析的不稳定型心绞痛的诊断进一步包括测定 (BNP_{sp}片段+NT-proBNP) /WCC的比率。
15. 根据权利要求1至14中任一项所述的方法,其中不稳定型心绞痛的诊断进一步包括施用干预疗法以减少、消除、减轻或治疗不稳定型心绞痛。
16. 根据权利要求1至15中任一项所述的方法,其中所述生物样品选自以下组中:全血、

血浆或血清。

17. 用于诊断患者中的不稳定型心绞痛的方法,所述方法包括以下步骤:

(i) 测量获得自患者的生物样品中的B型利尿钠肽信号肽 (BNP_{sp}) 片段的水平、N端B型利尿钠肽 (NT-proBNP) 和白血细胞计数 (WCC) 的水平;和

(ii) 针对获得自对照受试者的参考水平比较BNP_{sp}片段、NT-proBNP和WCC的水平,

其中,BNP_{sp}片段和NT-proBNP与WCC的比率偏离获得自对照受试者的参考比率,诊断患者具有不稳定型心绞痛,且其中在不稳定型心绞痛的阳性诊断的情况下:

(iii) 施用干预疗法,以减少、消除、改善或治疗患者中的不稳定型心绞痛。

18. 试剂盒或制品,其包含:

(i) 测量获得自患者的生物样品中的B型利尿钠肽信号肽 (BNP_{sp}) 片段的水平、N端B型利尿钠肽 (NT-proBNP) 和白血细胞计数 (WCC) 的水平的特异性的试剂;和

(ii) 关于如何在患者中进行不稳定型心绞痛的诊断或关于如何预测由于患者中发生不稳定型心绞痛而导致的中风和/或心力衰竭的并发症的说明书。

不稳定型心绞痛的诊断

技术领域

[0001] 本发明提供了诊断患者中的不稳定型心绞痛的新型测定法、方法和试剂盒。此外，本发明提供了预测由于不稳定型心绞痛导致的患者中的中风和/或心力衰竭的并发症的新型测定法、方法和试剂盒。

背景技术

[0002] 疑似急性冠状动脉综合征 (ACS) 常见于医院急诊科 (ED) 就诊，并且占有所有就诊者的5-15%之间[1]。经由使用高灵敏的心肌肌钙蛋白生物标志物测定法已经增强了具有真正心肌梗塞 (MI) 的那些的快速鉴定[2-5]，但具有非梗塞性缺血 (例如，不稳定型心绞痛 (UAP)) 的那些的生物标志物辅助鉴定是未满足临床需求的领域。UAP是后续心血管事件的重要临床基础，并且其明确的早期鉴定可以帮助降低相关的心血管发病率和死亡率[6]。

[0003] 申请人最近已经提供了第一个报告，即利尿钠激素B型利尿钠肽的信号肽 (sp) 区域的片段 (BNP_{sp})、A型利尿钠肽 (ANP_{sp}) 和C型利尿钠肽 (CNP_{sp}) 存在于人类循环中[7-9]。在ST段抬高MI期间，BNP_{sp}和ANP_{sp}两者均展现循环中的快速上升。在多巴酚丁胺应激超声心动图的设置中，BNP_{sp}也显示在30分钟内的迅速且显著的升高[10]。因此，鉴于需要可以将心肌缺血、缺乏组织坏死与胸痛的其它非心脏性原因区分的标志物，申请人试图确定BNP_{sp}与其它标志物诸如肌钙蛋白、NT-proBNP和BNP的组合用于在呈现可疑ACS的胸痛的患者的前瞻性研究中改进真正心肌缺血的早期鉴定的潜能。此外，申请人还评价了这些患者中BNP_{sp}连同肌钙蛋白、NT-proBNP和BNP的预后潜能。

发明内容

[0004] 本文描述和请求保护的发明具有许多属性和实施方案，包括但不限于本发明概述中阐述或描述或引用的那些。其并非旨在包括所有内容，并且本文描述和请求保护的发明不限于本发明概述中鉴定的特征或实施方案或由本发明概述中鉴定的特征或实施方案所限制，包括本发明概述仅用于说明而非限制的目的。

[0005] 申请人已经鉴定由残基17-26定义的B型利尿钠肽信号肽片段 (BNP_{sp} (17-26))、N端B型利尿钠肽 (NT-proBNP) 和白血细胞计数 (WCC) 是诊断不稳定型心绞痛中有用的生物标志物组。

[0006] 在一个方面，本发明提供了用于诊断患者中的不稳定型心绞痛的方法，所述方法包括以下步骤：

[0007] (i) 测量获得自患者的生物样品中的B型利尿钠肽信号肽 (BNP_{sp}) 片段的水平、N端B型利尿钠肽 (NT-proBNP) 和白血细胞计数 (WCC) 的水平；和

[0008] (ii) 针对获得自对照受试者的参考水平比较BNP_{sp}片段、NT-proBNP和WCC的水平，

[0009] 其中，BNP_{sp}片段和NT-proBNP与WCC的比率偏离获得自对照受试者的参考比率，诊断患者具有不稳定型心绞痛。

[0010] 在另一个方面，本发明提供了用于预测先前已被诊断具有不稳定型心绞痛的患者

中的心力衰竭和/或中风的并发症的方法,所述方法包括以下步骤:

[0011] (i) 测量获得自患者的生物样品中的B型利尿钠肽信号肽(BNPsp)片段的水平、N端B型利尿钠肽(NT-proBNP)和白血细胞计数(WCC)的水平;和

[0012] (ii) 针对获得自对照受试者的参考水平比较BNPsp片段、NT-proBNP和WCC的水平,

[0013] 其中,BNPsp片段和NT-proBNP与WCC的比率偏离获得自对照受试者的参考比率,预测患者将由于不稳定型心绞痛而发展心力衰竭和/或中风的并发症。

[0014] 在一个进一步方面,本发明提供了用于诊断患者中的不稳定型心绞痛的方法,所述方法包括以下步骤:

[0015] (i) 测量获得自患者的生物样品中的B型利尿钠肽信号肽(BNPsp)片段的水平、N端B型利尿钠肽(NT-proBNP)和白血细胞计数(WCC)的水平;和

[0016] (ii) 针对获得自对照受试者的参考水平比较BNPsp片段、NT-proBNP和WCC的水平,

[0017] 其中,BNPsp片段和NT-proBNP与WCC的比率偏离获得自对照受试者的参考比率,诊断患者具有不稳定型心绞痛,且其中在不稳定型心绞痛的阳性诊断的情况下:

[0018] (iii) 施用干预疗法,以减少、消除、改善或治疗患者中的不稳定型心绞痛。

[0019] 在又一个方面,本发明提供了用于诊断患者中的不稳定型心绞痛或用于预测由于不稳定型心绞痛导致的患者中的心力衰竭和/或中风的并发症的测试试剂盒,所述测试试剂盒包含:

[0020] (i) 测量获得自患者的生物样品中的B型利尿钠肽信号肽(BNPsp)片段的水平、N端B型利尿钠肽(NT-proBNP)和白血细胞计数(WCC)的水平的特异性的试剂;和

[0021] (ii) 关于如何在患者中进行不稳定型心绞痛的诊断或关于如何预测由于患者中发生不稳定型心绞痛而导致的中风和/或心力衰竭的并发症的说明书。

[0022] 申请人也已经鉴定由残基17-26定义的B型利尿钠肽信号肽片段(BNPsp(17-26))、B型利尿钠肽(BNP)和白血细胞计数(WCC)是诊断不稳定型心绞痛中有用的生物标志物组。

[0023] 因此,在另一个方面,本发明提供了用于诊断患者中的不稳定型心绞痛的方法,所述方法包括以下步骤:

[0024] (i) 测量获得自患者的生物样品中的B型利尿钠肽信号肽(BNPsp)片段的水平、B型利尿钠肽(BNP)和白血细胞计数(WCC)的水平;和

[0025] (ii) 针对获得自对照受试者的参考水平比较BNPsp片段、BNP和WCC的水平,

[0026] 其中,BNPsp片段和BNP与WCC的比率偏离获得自对照受试者的参考比率,诊断患者具有不稳定型心绞痛。

[0027] 在另一个方面,本发明提供了用于预测先前已被诊断具有不稳定型心绞痛的患者中的心力衰竭和/或中风的并发症的方法,所述方法包括以下步骤:

[0028] (i) 测量获得自患者的生物样品中的B型利尿钠肽信号肽(BNPsp)片段的水平、B型利尿钠肽(BNP)和白血细胞计数(WCC)的水平;和

[0029] (ii) 针对获得自对照受试者的参考水平比较BNPsp片段、BNP和WCC的水平,

[0030] 其中,BNPsp片段和BNP与WCC的比率偏离获得自对照受试者的参考比率,预测患者将由于不稳定型心绞痛而发展心力衰竭和/或中风的并发症。

[0031] 在一个进一步方面,本发明提供了用于诊断患者中的不稳定型心绞痛的方法,所述方法包括以下步骤:

[0032] (i) 测量获得自患者的生物样品中的B型利尿钠肽信号肽 (BNPsp) 片段的水平、B型利尿钠肽 (proBNP) 和白血细胞计数 (WCC) 的水平;和

[0033] (ii) 针对获得自对照受试者的参考水平比较BNPsp片段、BNP和WCC的水平,

[0034] 其中, BNPsp片段和BNP与WCC的比率偏离获得自对照受试者的参考比率, 诊断患者具有不稳定型心绞痛, 且其中在不稳定型心绞痛的阳性诊断的情况下:

[0035] (iii) 施用干预疗法, 以减少、消除、减轻或治疗患者中的不稳定型心绞痛。

[0036] 在又一个方面, 本发明提供了用于诊断患者中的不稳定型心绞痛或用于预测由于不稳定型心绞痛导致的患者中的心力衰竭和/或中风的并发症的测试试剂盒, 所述测试试剂盒包含:

[0037] (i) 测量获得自患者的生物样品中的B型利尿钠肽信号肽 (BNPsp) 片段的水平、B型利尿钠肽 (BNP) 和白血细胞计数 (WCC) 的水平的特异性的试剂;和

[0038] (ii) 关于如何在患者中进行不稳定型心绞痛的诊断或关于如何预测由于患者中发生不稳定型心绞痛而导致的中风和/或心力衰竭的并发症的说明书。

附图说明

[0039] 图1显示导致生成游离信号肽、NT-proBNP和BNP肽的人前BNP原的处理的示意图。

[0040] 图2显示前BNP原 (preproBNP) 信号肽序列的Clustal W版本1.83JALVIEW多序列对比。在该对比中使用默认ClustalW参数, 如下: DNA空位开放罚分=15.0; DNA空位延伸罚分=6.66; DNA矩阵=同一性; 蛋白空位开放罚分=10.0; 蛋白空位延伸罚分=0.2; 蛋白矩阵=Gonnet; 蛋白/DNA ENDGAP=-1; 蛋白/DNA GAPDIST=4。以Fasta格式提交氨基酸。

[0041] 图3显示505名呈现胸痛的患者中呈现TnI、hsTnT、NT-proBNP和BNPsp诊断急性心肌梗塞 (MI) 的能力的接受者操作特征 (ROC) 曲线数据。BNPsp具有0.69的曲线下面积 (AUC) ($P < 0.001$), 其比任一肌钙蛋白低~0.3个点, 并且没有增加任一种诊断MI的能力。

[0042] 图4显示 (A) UA比率 (AUC=0.70) 和NT-proBNP (AUC=0.62) 用于在医院就诊的390名非MI患者中鉴定UAP ($n=40$) 的ROC曲线。UA比率AUC显著好于NT-proBNP AUC ($p < 0.05$)。 (B) UA比率、NT-proBNP和BNPsp在ECG上无异常的328名非MI患者中诊断UAP ($n=33$) 的能力的ROC曲线。UA比率 (0.77) 的AUC显著好于NT-proBNP (0.66) 和BNPsp (0.63) 两者。

具体实施方式

[0043] 选择的定义

[0044] 除非另外定义, 否则本文所用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员的通常理解相同的含义。尽管与本文所述的那些相似或等同的任何测定、方法、装置和材料都可以用于实施或测试本发明, 但现在描述各种测定、方法、装置和材料。

[0045] 参考本文公开的数值范围 (例如1至10) 意在还并入参考该范围内的所有相关的数值 (例如, 1、1.1、2、3、3.9、4、5、6、6.5、7、8、9和10), 以及该范围内的任何合理的数值范围 (例如2至8、1.5至5.5和3.1至4.7), 因此, 本文明确公开的所有范围中的所有子范围也是明确公开的。这些仅仅是具体意欲的实例, 并且在枚举的最低值和最高值之间的所有可能的数值组合都被认为以类似的方式在该申请中明确陈述。

[0046] 如本说明书中所用, 词语“包含 (comprises)”、“包含 (comprising)”和类似词语不

以排他或详尽的含义理解。换言之，它们旨在意指“包括但不限于”。

[0047] 如本说明书中所用，术语“BNP_{sp}”意指B型利尿钠肽信号肽。BNP_{sp}的实例包括由残基1-27定义的全长BNP_{sp}分子以及其片段。在一个具体实例中，BNP_{sp}意指由残基17-26定义的BNP_{sp}片段(即BNP_{sp}(17-26;SEQ ID NO:1))。

[0048] 如本说明书中所用，术语“BNP”意指B型利尿钠肽，其一旦被蛋白水解酶加工，则包括N端pro-BNP (NT-proBNP) 和切割的活性形式的BNP激素。出于本说明书的目的，“BNP”是指BNP(103-134)，且“NT-proBNP”是指如图1中所定义的NT-proBNP(27-102)。

[0049] 如本说明书中所用，首字母缩略词“STEMI”意指ST段抬高心肌梗塞。

[0050] 如本说明书中所用，首字母缩略词“NSTEMI”意指非ST段抬高心肌梗塞。

[0051] 如本说明书中所用，首字母缩略词“UAP”意指不稳定型心绞痛。

[0052] 如本说明书中所用，首字母缩略词“ACS”意指急性冠状动脉综合征。

[0053] 如本说明书中所用，首字母缩略词“hsTnT”意指高度灵敏的肌钙蛋白T测定。

[0054] 如本说明书中所用，首字母缩略词“WCC”意指白血细胞计数并且涉及样品中白血细胞的水平/数目。

[0055] 如本说明书中所用，首字母缩略词“ROC”意指接受者操作特性曲线。

[0056] 如本说明书中所用，首字母缩略词“AF”意指心房纤颤。

[0057] 如本说明书中所用，术语“多肽”涵盖任何长度的氨基酸链，包括全长序列，其中氨基酸残基通过共价肽键连接。可用于本发明中的多肽可以是纯化的天然产物，或者可以部分或完全使用重组或合成技术生产。术语可以是指多肽、多肽聚合物，诸如二聚体或其它多聚体、融合多肽、多肽片段、多肽变体或其衍生物。本文中的多肽可以具有全长EPO_{sp}和/或CNP_{sp}的至少4个氨基酸、至少5个氨基酸，或至少6、至少7、至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少16、至少17、至少18、至少19、至少20、至少21、至少22或所有23个氨基酸的链长度。应当类似地理解提及的本发明的其它多肽或本文描述的其它多肽。

[0058] 如本说明书中所用，关于多肽的术语“片段”是多肽子序列(subsequence)，其可以使用结合剂检测。该术语可以是指多肽、多肽聚合物，诸如二聚体或其它多聚体、融合多肽、多肽片段、多肽变体或其衍生物。

[0059] 如应用于本文公开的多肽序列的术语“分离的”用于指从其天然的细胞环境或其它天然存在的生物学环境中移取的序列。可以通过任何方法或方法的组合(包括生物化学、重组和合成的技术)获得分离的分子。可以通过至少一个纯化步骤制备多肽序列。

[0060] 如本文所用的术语“纯化的”不需要绝对纯度。例如，在多个实施方案中，纯化的指，例如，样品中的多肽的至少约80%、85%、90%、95%、98%或99%的同质性。术语应当与本文描述的其它分子和构建体类似地理解。

[0061] 如本文所用的术语“变体”是指与具体标识的序列不同的多肽序列，其中缺失、取代或添加1至6个或更多个氨基酸残基。考虑1、2、3、4、5或6个氨基酸的取代、添加或缺失。变体可以是天然存在的等位变体，或非天然存在的变体。变体可以来自相同的物种或其它物种，并且可以涵盖同源物、旁系同源物和直系同源物。在某些实施方案中，可用于本发明中的多肽的变体具有与亲本多肽相同或相似的生物学活性，包括信号肽活性或抗原结合特性。关于多肽的术语“变体”涵盖如本文定义的多肽的所有形式。

[0062] 变体多肽序列表现出与本发明的序列至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约71%、至少约72%、至少约73%、至少约74%、至少约75%、至少约76%、至少约77%、至少约78%、至少约79%、至少约80%、至少约81%、至少约82%、至少约83%、至少约84%、至少约85%、至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%的同一性。关于多肽,在至少5至7个氨基酸位置的比较窗口发现同一性。

[0063] 多肽变体还涵盖那些变体,其表现出与具体标识的序列中的一种或多种的相似性,其可能保留那些序列的功能等效性,包括通过随机的机会发生而不能合理预期的那些变体。如上所讨论,在EPO_{sp}和/或CNP_{sp}变体的情况下,功能可以是作为信号多肽,或抗原性多肽,或两者。

[0064] 可以按以下方式确定多肽序列同一性和相似性。使用可从NCBI (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/>) 公开得到的bl2seq中的BLASTP(来自BLAST程序组,2.2.18版(2008年4月)),将主题多肽序列与候选多肽序列进行比较。利用bl2seq的默认参数,除了应当关闭低复杂性区域的过滤。

[0065] 可以使用以下UNIX命令行参数来检查多肽序列的相似性:bl2seq -i peptide_{seq1} -j peptide_{seq2} -F F -p blastp。参数-F F关闭低复杂性区域的过滤。参数-p选择用于序列对的适当算法。该程序发现序列之间的相似性区域,并且为每个这种区域报告“E值”,其为在含有随机序列的固定参考大小的数据库中,可预期偶然看到这种匹配的次数。对于远低于1的小E值,这近似为这种随机匹配的概率。当与具体标识的序列中的任一种比较时,变体多肽序列通常表现出小于 1×10^{-5} 、小于 1×10^{-6} 、小于 1×10^{-9} 、小于 1×10^{-12} 、小于 1×10^{-15} 、小于 1×10^{-18} 或小于 1×10^{-21} 的E值。还可以使用全局序列比对程序,在候选和主题多肽序列之间重叠的全长上计算多肽序列同一性。如上所讨论的EMBOSS-needle(可得自<http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/>)和GAP(Huang,X.(1994) On Global Sequence Alignment. Computer Applications in the Biosciences 10,227-235.)也是用于计算多肽序列同一性的合适的全局序列比对程序。BLASTP的用途优选用于确定根据本发明的多肽变体。

[0066] 如本文所用的术语“结合剂”是指能够结合AMH的种类、其片段或抗原性变体的任何固体或非固体材料。在一个实施方案中,该术语是指结合AMH的种类、其片段或抗原性变体的任何天然或非天然的分子。结合剂的实例包括蛋白、肽、核酸、碳水化合物、脂质和小分子化合物。一种选择性或特异性结合剂是抗体或其抗原结合片段。

[0067] 术语“抗体”是指能够特异性结合抗原(诸如例如BNP_{sp})且通常通过结合BNP_{sp}的表位或抗原决定簇(诸如例如BNP_{sp}的C端或N端区域)的免疫球蛋白分子。如本文所用,术语“抗体”广泛地包括全长抗体和其抗原结合片段或区域。还包括单克隆和多克隆抗体、多价和单价抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)、嵌合抗体、人抗体、人源化抗体和已亲和力成熟的抗体。如果抗体优先结合BNP_{sp}的区域或结构域,则抗体选择性或特异性结合BNP_{sp},所述BNP_{sp}的区域或结构域,在适当时,与非BNP_{sp}抗原/表位或其它非靶BNP_{sp}种类的交叉反应性小于25%,或小于10%,或小于1%或小于0.1%。通常,所述抗体将具有约 10^{-6} 或 10^{-7} M, 10^{-8} M或 10^{-9} M或 10^{-10} 或 10^{-11} 或 10^{-12} M的对于抗原或表位的结合亲和力(解离常数(K_d)值)。可以使用表面等离子共振(例如)或Scatchard分析评价结合亲和力。

[0068] 如本文所用,当关于抗体使用时,“抗原结合片段”或“抗体片段”或“结合片段”意指完整抗体的一部分,其优选保留完整抗体的正常结合功能的大部分或全部,或最少至少一种。抗体片段的实例包括Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段、线性抗体、双抗体、单链抗体(ScFv)、结构域抗体和多特异性抗体。

[0069] 术语“表位”包括能够特异性结合抗体和/或T细胞受体的任何抗原(例如,蛋白)决定簇。也就是说,B和/或T细胞应答的抗原上的位点。表位决定簇通常由分子的化学活性表面组群(例如氨基酸或糖侧链)组成,并且通常具有特异性三维结构特征以及特异性电荷特征。表位通常包括至少3个、5个或8-10个氨基酸。氨基酸可以是连续的,或者通过三级折叠并列的非连续氨基酸。构象和非构象表位的区别在于,在变性溶剂存在的情况下,与前者的结合而非与后者的结合丧失。

[0070] 如本文所用,术语“抗原性变体”是指与具体标识的序列不同的多肽序列,其中缺失、取代或添加一个或多个氨基酸残基。具体考虑1、2、3、4、5、6、10、15、20或更多个氨基酸的取代、添加或缺失。变体可以是天然存在的等位抗原性变体,或非天然存在的抗原性变体。变体可以来自相同的物种或其它物种,可以涵盖同源物、旁系同源物和直系同源物。在某些实例中,可用于本发明中的多肽的抗原性变体具有与亲本多肽的那些相同或相似的生物活性,包括激素功能或抗原结合特性。关于(多)肽的术语“抗原性变体”涵盖如本文定义的多肽的所有形式。术语“抗原性变体”涵盖天然存在的、重组和合成产生的多肽。例如,人BNP和BNP_{sp}的抗原性变体可以包括BNP和BNP_{sp}的非人序列,诸如衍生自小鼠、大鼠、绵羊、牛、猪等的那些序列。

[0071] 除了本领域已知的计算机/数据库方法之外,可以通过本领域已知的物理方法,例如,通过使用针对本发明的多肽产生的抗体筛选表达文库(Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第2版Cold Spring Harbor Press,1987),通过也由Sambrook等人描述的重组DNA技术或通过借助于此类抗体鉴定来自天然来源的多肽,鉴定多肽抗原变体。

[0072] “分离的抗体”是已从其天然环境的组分中分离或回收或分离和回收的鉴定的抗体。例如,与蛋白(包括酶和激素)分离。在一个实例中,将抗体纯化至抗体的至少95重量%或96重量%或97重量%或98重量%或99重量%。例如,纯度可以通过Lowry方法测定。通常,抗体将通过至少一个纯化步骤制备。

[0073] 如本文所用,“单克隆抗体”意指作为针对(或结合)单一抗原靶标的高度特异性抗体的抗体。单克隆抗体可获得自同质或基本上同质的抗体群体,其中除了可以微量存在的天然突变外,每种单克隆抗体是相同的和/或结合相同的表位。单克隆抗体使用本领域已知的方法制备,所述方法诸如例如在Harlow和Lane(1988)Antibodies,A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Publications,New York以及Harlow和Lane(1999)Using Antibodies:A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NY(本文共同和单独称为Harlow和Lane)。

[0074] 如本文所用,“多克隆抗体”意指可以针对(或可以结合)多种抗原靶标的抗体。多克隆抗体使用本领域已知的方法(诸如例如,在Harlow和Lane中,同上)制备。

[0075] 如本文所用的术语“ELISA”意指酶联免疫吸附测定,一种类型的包含用于定量样品中分析物的量的抗体和可检测标记物的竞争性结合测定。

[0076] 如本文所用的术语“捕获抗体”意指这样的抗体,其通常固定化在固相支持物诸如板、珠粒或管上,且所述抗体结合并捕获目标分析物,例如与胚胎干细胞群体相关的膜结合标志物。

[0077] 如本文所用的术语“检测抗体”意指结合目标分析物的含有可检测标记物的抗体。该标记物可以使用常规检测方式检测用于目标分析物(例如与胚胎干细胞群体相关的膜结合标志物)的定量、半定量或定性测量。

[0078] 如本文所用,术语“适体”是指具有二级结构的单链核酸分子,所述二级结构便于与靶分子诸如多肽或蛋白的高亲和力结合。在某些实例中,单链核酸是ssDNA、RNA或其衍生物以改进生物利用度。下文进一步描述适体与靶蛋白的结合亲和力。

[0079] 如本文所用,在分析物的上下文中,术语“标志物”或“生物标志物”意指在循环中特异性发现或与特定组织(例如心肌)相关的任何抗原、分子或其它化学或生物实体,其希望在受疾病或病况(例如不稳定型心绞痛)影响的特定组织中或其上得到鉴定。在具体实例中,标志物是循环肽(例如BNP_{sp}(17-26)或NT-proBNP)。在其它实例中,所述标志物是由特定细胞类型差异或优先表达的细胞表面抗原或核抗原。在其它实例中,所述标志物是由特定细胞类型差异或优先表达的细胞内抗原。

[0080] 术语“ROC”意指接受者操作特征,且ROC图通过绘制整个决策阈值范围的灵敏度相比于1-特异性来描绘两个分布之间的重叠。

[0081] 如本文所用,术语“有效量”是指疗法的量,其足以导致预防疾病或病况及其一种或多种症状的发展、复发或发作,增强或改善另一种疗法的预防作用,降低疾病的严重程度、持续时间,改善疾病或病况的一种或多种症状,预防疾病或病况的进展,引起疾病或病况的消退,和/或增强或改善另一种疗法的治疗作用。

[0082] 如本文所用,在向受试者施用疗法的上下文中的术语“管理(manage)”、“管理(managing)”和“管理(management)”是指受试者从疗法(例如预防或治疗剂)或疗法的组合获得、同时不导致疾病或病况的治愈的有益作用。在某些实例中,向受试者施用一种或多种疗法(例如一种或多种预防或治疗剂)来“管理”疾病或病况,以便预防疾病或病况的进展或恶化。

[0083] 如本文所用,在向受试者施用疗法的上下文中的术语“预防”、“预防”和“预防”是指由于施用疗法(例如预防或治疗剂)或疗法的组合(例如预防或治疗剂的组合)而在受试者中预防或抑制疾病或病况或其症状的复发、发作和/或发展。

[0084] 如本文所用,术语“预防剂”是指用于治疗不稳定型心绞痛的目的的任何分子、化合物和/或物质。预防剂的实例包括但不限于蛋白、免疫球蛋白(例如多特异性Ig、单链Ig、Ig片段、多克隆抗体及其片段、单克隆抗体及其片段)、抗体缀合物或抗体片段缀合物、肽(例如肽受体、选择蛋白)、结合蛋白、基于增殖的疗法和小分子药物。

[0085] 如本文所用,术语“治疗剂”是指用于治疗 and/或管理疾病或病况诸如不稳定型心绞痛的目的的任何分子、化合物和/或物质。治疗剂的实例包括但不限于蛋白、免疫球蛋白(例如多特异性Ig、单链Ig、Ig片段、多克隆抗体及其片段、单克隆抗体及其片段)、肽(例如肽受体、选择蛋白)、结合蛋白、生物剂、基于增殖的治疗剂、激素剂、放射免疫疗法、靶向剂、表观遗传疗法、分化疗法、生物药剂和小分子药物。

[0086] 如本文所用,术语“疗法(therapies)”和“疗法(therapy)”可以是指可用于预防、

治疗和/或管理疾病或病况或其一种或多种症状的任何方法、组合物和/或药物。

[0087] 如本文所用,在向受试者施用治疗的上下文中的术语“治疗(treat)”、“治疗(treatment)”和“治疗(treating)”是指由于施用一种或多种疗法而减少、抑制、消除或减轻(例如)不稳定型心绞痛的进展和/或持续时间,减少、抑制、消除或减轻(例如)不稳定型心绞痛的严重程度,和/或改善其一种或多种症状。

[0088] 如本文所用,术语“样品”或“生物样品”是指取自或源自受试者或患者的任何样品。在本说明书中,术语“受试者”和“患者”可互换使用。这种样品可以获得自受试者,或者可以获得自旨在提供给该受试者的生物材料。例如,样品可以获得自所评估的血液或心脏组织,例如以研究受试者中的心脏状态。包括取自或源自任何受试者诸如来自正常健康受试者和/或理解其癌症状态对其有用的健康受试者的样品。优选的样品是生物流体样品。如本文所用的术语“生物流体样品”是指出于例如诊断、预测、预后、分类或评估目标受试者(诸如患者)的目的而获得的体液样品。样品可以是本领域已知的可在其中检测肽抗原的任何样品。包括任何体液,诸如例如全血样品、血浆、血清、卵泡液样品、精液样品、脑脊液、唾液、痰液、尿液、胸腔积液、间质液、滑液、淋巴液、泪液,尽管全血样品、血浆和血清尤其适合用于本发明中。此外,本领域技术人员将意识到,某些体液样品在分级分离或纯化程序之后更易于分析,例如将全血分离为血清或血浆组分。

[0089] 如本文所用,术语“纯化的”不要求绝对纯度。在一个实例中,纯化的是指样品中(例如)多肽或抗体的同质性为至少90%、或95%、或98%、或99%。

[0090] 术语“受试者”和“患者”在本文可互换使用。这些术语优选是指哺乳动物,且包括人和非人哺乳动物,诸如猫、狗、马、奶牛、绵羊、鹿、小鼠、大鼠、灵长类(包括大猩猩、猕猴和黑猩猩)、负鼠及其它驯养的农场或动物园动物。因此,本文所述的测定、方法和试剂盒可应用于人和非人动物二者,尤其非限制性地人类、灵长类、农场动物(包括牛、绵羊、山羊、猪、鹿、羊驼、美洲驼、水牛)、伴侣和/或纯种动物(包括猫、狗和马)。优选的受试者是人类,且最优选地,如本文所用的“患者”是指可以接受或正在接受疾病或病症的医疗护理或评估的活着的人类。此外,尽管受试者优选是活着的生物,但本文所述的发明同样可以用于死后分析。

[0091] 如本文所用,术语与分析物的“存在或量相关”反映通过使用已知浓度的目标分析物计算的标准曲线,测定信号通常与分析物的存在或量相关。在本文中使用该术语时,如果测定可以生成指示生理相关浓度的分析物的存在或量的可检测信号,则测定“被配置为检测”分析物。通常,在样品中测量分析物。

[0092] 在一个实施方案中,“高于”或“低于”对照的水平,或相对于对照(水平)的改变(change)或偏离(deviation)是统计学显著的。如果相比于对照水平,水平与对照水平相差约5%或更多,约10%或更多,约20%或更多,或约50%或更多,则可以认为存在相对于对照水平或平均或历史对照水平的较高水平、较低水平、偏离或改变。统计学显著的可以或者计算为 $P \leq 0.05$ 。还可以通过求助于测定参考限值或参考区间,确定较高水平、较低水平、偏离和改变。这些可以通过直观评价或非参数方法来计算。总之,这些方法可以将0.025和0.975分位数计算为 $0.025 * (n+1)$ 和 $0.975 * (n+1)$ 。此类方法是本领域众所周知的。存在对照中不存在的标志物可被视为较高的水平、差异和改变。不存在对照中存在的标志物可被视为较低的水平、偏离和改变。

[0093] 发明详述

[0094] 申请人评价了B型利钠肽信号肽 (BNPsp) 协助鉴定具有心肌梗塞 (MI) 和不稳定型心绞痛 (UAP) 的患者的能力。

[0095] 申请人研究了505名在怀疑ACS的胸痛发作的4小时内送去医院的患者。在送去医院起0、1、2和24小时抽取血液样品并测定BNPsp、NT-proBNP、TnI和高灵敏度TnT。然后评价BNPsp和其它标志物诊断急性心肌梗塞 (MI) 和不稳定型心绞痛 (UAP) 以及预测一年内的随后事件的能力。

[0096] 申请人令人惊讶地发现,当BNPsp与NT-proCNP和白血细胞计数结合测量且使用接受者操作曲线分析拟合数据时,可以在送去急诊室的具有急性冠心病的症状的患者中诊断出该不稳定型心绞痛。此外,当将患者中的钾 (K) 的水平添加至生物标志物组中时,可以增强诊断的特异性。

[0097] 有趣的是,用于区分心肌梗塞的接受者操作曲线下面积 (AUC) 数据对于BNPsp为0.69,且对于肌钙蛋白为0.97,其中BNPsp未能添加至肌钙蛋白。然而且重要地,在非MI患者中,BNPsp对UAP具有辨别力 ($p < 0.05$),并且当与NT-proBNP、白血细胞计数和钾的呈现值组合至独特参数 (UA比率) 中时,并且在具有正常ECG结果的患者中,对UAP生成0.76的AUC ($p < 0.001$)。参考图3和4,以及实施例2。

[0098] 因此,在一个方面,本发明提供了用于诊断患者中的不稳定型心绞痛的方法,所述方法包括以下步骤:

[0099] (i) 测量获得自患者的生物样品中的B型利尿钠肽信号肽 (BNPsp) 片段的水平、N端B型利尿钠肽 (NT-proBNP) 和白血细胞计数 (WCC) 的水平;和

[0100] (ii) 针对获得自对照受试者的参考水平比较BNPsp片段、NT-proBNP和WCC的水平,

[0101] 其中,BNPsp片段和NT-proBNP与WCC的比率偏离获得自对照受试者的参考比率,诊断患者具有不稳定型心绞痛。

[0102] 根据诊断,可以将干预疗法施用于患者以减少、消除、减轻或治疗不稳定型心绞痛。

[0103] 因此,在一个进一步方面,本发明提供了用于诊断患者中的不稳定型心绞痛的方法,所述方法包括以下步骤:

[0104] (i) 测量获得自患者的生物样品中的B型利尿钠肽信号肽 (BNPsp) 片段的水平、N端B型利尿钠肽 (NT-proBNP) 和白血细胞计数 (WCC) 的水平;和

[0105] (ii) 针对获得自对照受试者的参考水平比较BNPsp片段、NT-proBNP和WCC的水平,

[0106] 其中,BNPsp片段和NT-proBNP与WCC的比率偏离获得自对照受试者的参考比率,诊断患者具有不稳定型心绞痛,且其中在不稳定型心绞痛的阳性诊断的情况下:

[0107] (iii) 施用干预疗法,以减少、消除、减轻或治疗患者中的不稳定型心绞痛。

[0108] 此外,在非MI患者中,UA比率显著地预测一年内随后的中风 ($AUC = 0.70, p < 0.05$) 和心力衰竭 ($AUC = 0.82, p < 0.01$)。参见实施例2。

[0109] 因此,在一个进一步方面,本发明提供了用于预测先前已被诊断具有不稳定型心绞痛的患者中的心力衰竭和/或中风的并发症的方法,所述方法包括以下步骤:

[0110] (i) 测量获得自患者的生物样品中的B型利尿钠肽信号肽 (BNPsp) 片段的水平、N端B型利尿钠肽 (NT-proBNP) 和白血细胞计数 (WCC) 的水平;和

[0111] (ii) 针对获得自对照受试者的参考水平比较BNPsp片段、NT-proBNP和WCC的水平，
[0112] 其中，BNPsp片段和NT-proBNP与WCC的比率偏离获得自对照受试者的参考比率，预测患者将由于不稳定型心绞痛而发展心力衰竭和/或中风的并发症。

[0113] 根据特异性和灵敏度，可以通过测量样品中的钾的水平来增强诊断。因此，在根据本发明的某些实施例中，所述方法进一步包括测量获得自患者的生物样品中的钾的水平。

[0114] 在本发明的其它实例中，BNPsp片段是由全长/完整蛋白的残基17-26定义的片段（被称为BNPsp (17-26)）。

[0115] 在其它实例中，BNPsp (包括BNPsp (17-26) 和NT-proBNP) 的水平可以通过免疫测定或质谱法测量。下面给出关于通过使用基于抗体和适体的方法的免疫测定进行测量的进一步细节。

[0116] 本发明还考虑测量获得自患者的生物样品中的例如BNPsp片段、NT-proBNP和白血细胞的水平的特异性的商业试剂盒和制品。因此，在本发明的一个进一步方面，提供了试剂盒或制品，其包含：

[0117] (i) 测量获得自患者的生物样品中的B型利尿钠肽信号肽 (BNPsp) 片段的水平、N端B型利尿钠肽 (NT-proBNP) 和白血细胞计数 (WCC) 的水平的特异性的试剂；和

[0118] (ii) 关于如何在患者中进行不稳定型心绞痛的诊断或关于如何预测由于患者中发生不稳定型心绞痛而导致的中风和/或心力衰竭的并发症的说明书。

[0119] 申请人也已经鉴定由残基17-26定义的B型利尿钠肽信号肽片段 (BNPsp (17-26))、B型利尿钠肽 (BNP) 和白血细胞计数 (WCC) 是诊断不稳定型心绞痛中有用的生物标志物组。

[0120] 因此，在另一个方面，本发明提供了用于诊断患者中的不稳定型心绞痛的方法，所述方法包括以下步骤：

[0121] (i) 测量获得自患者的生物样品中的B型利尿钠肽信号肽 (BNPsp) 片段的水平、B型利尿钠肽 (BNP) 和白血细胞计数 (WCC) 的水平；和

[0122] (ii) 针对获得自对照受试者的参考水平比较BNPsp片段、BNP和WCC的水平，

[0123] 其中，BNPsp片段和BNP与WCC的比率偏离获得自对照受试者的参考比率，诊断患者具有不稳定型心绞痛。

[0124] 在另一个方面，本发明提供了用于预测先前已被诊断具有不稳定型心绞痛的患者中的心力衰竭和/或中风的并发症的方法，所述方法包括以下步骤：

[0125] (i) 测量获得自患者的生物样品中的B型利尿钠肽信号肽 (BNPsp) 片段的水平、B型利尿钠肽 (BNP) 和白血细胞计数 (WCC) 的水平；和

[0126] (ii) 针对获得自对照受试者的参考水平比较BNPsp片段、BNP和WCC的水平，

[0127] 其中，BNPsp片段和BNP与WCC的比率偏离获得自对照受试者的参考比率，预测患者将由于不稳定型心绞痛而发展心力衰竭和/或中风的并发症。

[0128] 在一个进一步方面，本发明提供了用于诊断患者中的不稳定型心绞痛的方法，所述方法包括以下步骤：

[0129] (i) 测量获得自患者的生物样品中的B型利尿钠肽信号肽 (BNPsp) 片段的水平、B型利尿钠肽 (proBNP) 和白血细胞计数 (WCC) 的水平；和

[0130] (ii) 针对获得自对照受试者的参考水平比较BNPsp片段、BNP和WCC的水平，

[0131] 其中，BNPsp片段和BNP与WCC的比率偏离获得自对照受试者的参考比率，诊断患者

具有不稳定型心绞痛,且其中在不稳定型心绞痛的阳性诊断的情况下:

[0132] (iii) 施用干预疗法,以减少、消除、减轻或治疗患者中的不稳定型心绞痛。

[0133] 在又一个方面,本发明提供了用于诊断患者中的不稳定型心绞痛或用于预测由于不稳定型心绞痛导致的患者中的心力衰竭和/或中风的并发症的测试试剂盒,所述测试试剂盒包含:

[0134] (i) 测量获得自患者的生物样品中的B型利尿钠肽信号肽(BNPsp)片段的水平、B型利尿钠肽(BNP)和白血细胞计数(WCC)的水平的特异性的试剂;和

[0135] (ii) 关于如何在患者中进行不稳定型心绞痛的诊断或关于如何预测由于患者中发生不稳定型心绞痛而导致的中风和/或心力衰竭的并发症的说明书。

[0136] 抗体和抗原结合片段

[0137] 如上所示,如本文所用的抗体或抗体是指衍生自一种或多种免疫球蛋白基因或其片段、模仿一种或多种免疫球蛋白基因或其片段或基本上由一种或多种免疫球蛋白基因或其片段编码的肽或多肽,其能够特异性结合抗原或表位[34-36]。如本说明书的定义部分所预示,术语抗体包括抗原结合片段,诸如例如保留结合抗原的能力的片段、亚序列、互补决定区(CDR),包括(i) Fab片段,由VL、VH、CL和CH₁结构域组成的单价片段;(ii) F(ab')₂片段,包含在铰链区通过二硫键连接的两个Fab片段的二价片段;(iii) 由VH和CH₁结构域组成的Fd片段;(iv) 由抗体的单臂的VL和VH结构域组成的Fv片段,(v) dAb片段[37],其由VH结构域组成;和(vi) 分离的互补决定区(CDR)。单链抗体也通过引用包括在术语“抗体”中。抗体和片段的进一步讨论可以在参考文献(例如)[38-44]中找到,所有这些文献都以其整体并入本文。

[0138] 还包括通过用抗原(诸如例如BNPsp或BNPsp片段)及其抗原性变体免疫动物诸如小鼠、大鼠或兔而获得的抗血清。简而言之,制备多克隆抗体的方法是技术人员已知的。可以在哺乳动物中产生多克隆抗体,例如,通过一次或多次注射免疫剂,以及如果需要,佐剂。通常,免疫剂和/或佐剂将通过多次皮下或腹膜内注射来注射于哺乳动物中。免疫剂可以包括BNPsp或BNPsp片段、其抗原性变体或其融合蛋白。将免疫剂与所免疫的哺乳动物中已知具有免疫原性的蛋白缀合可能是有用的。此类免疫原性蛋白的实例包括但不限于匙孔血蓝蛋白(keyhole limpet hemocyanin)、牛血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白和大豆胰蛋白酶抑制剂。可以利用的佐剂的实例包括弗氏完全佐剂和MPL TDM佐剂(单磷酸脂质A、合成海藻糖二杆菌分枝菌酸酯)。本领域技术人员可以选择免疫方案而无需过多的实验。

[0139] 可以使用本领域众所周知的杂交瘤方法制备单克隆抗体[例如,45-47]。杂交瘤细胞可以在合适的培养基中培养,或者,杂交瘤细胞可以在哺乳动物体内作为腹水生长。优选的永生化细胞系是鼠骨髓瘤细胞系,其可以例如获得自美国典型培养物保藏中心, Virginia, USA。免疫测定可用于筛选分泌目标抗体的永生化细胞系。BNPsp或BNPsp片段的序列或其抗原性变体可用于筛选中。

[0140] 用于建立由杂交瘤细胞产生的单克隆抗体的结合特异性的众所周知的方法包括免疫沉淀、放射性连接的免疫测定(RIA)、酶联免疫吸附测定(ELISA)和Western印迹[48]。例如,如上所示,单克隆抗体的结合亲和力可以例如通过Scatchard分析确定[49]。可以类似地筛选来自免疫动物的样品中多克隆抗体的存在。

[0141] 单克隆抗体也可以获得自重组宿主细胞。编码抗体的DNA可以获得自杂交瘤细胞

系。然后将DNA置于表达载体中,转染入宿主细胞(例如COS细胞、CHO细胞、大肠杆菌细胞)中并在宿主细胞中产生抗体。然后可以使用标准技术分离和/或纯化抗体。

[0142] 单克隆抗体或片段也可以通过重组DNA方法产生(例如,[50])。DNA修饰,诸如用人重链和轻链恒定结构域的编码序列取代代替同源鼠序列[50]也是可能的。抗体可以是单价抗体。制备单价抗体的方法是本领域众所周知的(例如,[51-53]。本文还考虑产生嵌合[54]、二价抗体[55]和多价抗体[56]。

[0143] 也可以使用其它已知的用于(诸如从噬菌体文库)产生单克隆抗体的技术(例如,[57])。

[0144] 细胞分泌的单克隆抗体可以通过常规免疫球蛋白纯化程序(诸如例如反相HPLC、蛋白A-Sepharose、羟基磷灰石色谱、凝胶电泳、透析或亲和力色谱[58])从培养基或腹水分离或纯化。

[0145] 双特异性抗体也可以是有用的。这些抗体是单克隆抗体,优选人抗体或人源化抗体,其对至少两种不同抗原具有结合特异性。本文还考虑具有多于两种特异性的抗体,例如三特异性抗体。

[0146] 本文所述的免疫测定中使用的抗体特异性结合BNP_{sp}或BNP_{sp}片段。术语“特异性结合”并不意指抗体仅结合其预期靶标,因为如上所示,抗体结合展示所述抗体结合的表位的任何多肽。相反,如果抗体对其预期靶标的亲和力是其对不展示适当表位的非靶分子的亲和力的约5倍,则其“特异性结合”。在某些实例中,抗体对靶分子的亲和力将是其对非靶分子的亲和力的至少约5倍、优选10倍、更优选25倍、甚至更优选50倍且最优选100倍或更多。在其它实例中,抗体以至少约 10^{-6} M或 10^{-7} M或至少约 10^{-8} M或 10^{-9} M或 10^{-10} 或 10^{-11} 或 10^{-12} M的亲和力结合。

[0147] 亲和力计算为 $K_d = k_{off}/k_{on}$ (k_{off} 是解离速率常数, k_{on} 是缔合速率常数且 K_d 是平衡常数)。可以通过测量标记配体在不同浓度(c)的结合分数(r)在平衡时测定亲和力。使用Scatchard方程绘制数据: $r/c = K(n-r)$:其中 r =结合配体的摩尔数/平衡时受体的摩尔数; c =平衡时的游离配体浓度; K =平衡缔合常数;且 n =每个受体分子的配体结合位点的数目。通过图形分析,在Y轴上绘制 r/c ,相比之下在X轴上绘制 r ,因此产生Scatchard图。通过Scatchard分析进行的抗体亲和力测量在本领域中是众所周知的[59]。

[0148] 许多出版物讨论了使用噬菌体展示技术来生产和筛选多肽文库用于结合选择的分析物[60-63]。噬菌体展示方法的基本概念是在编码待筛选多肽的DNA和多肽之间建立物理关联。这种物理关联由噬菌体颗粒提供,其将多肽展示为包围编码多肽的噬菌体基因组的衣壳的一部分。在多肽和它们的遗传物质之间建立物理关联,允许同时大量筛选非常大量的携带不同多肽的噬菌体。展示对靶标具有亲和力的多肽的噬菌体结合靶标,并且通过对靶标的亲和力筛选富集这些噬菌体。从这些噬菌体展示的多肽的身份可以从它们各自的基因组确定。使用这些方法,然后可以通过常规方法(例如,[64])合成被鉴定为对期望靶标具有结合亲和力的多肽。

[0149] 然后通过这些方法生成的抗体可以通过如下来选择:首先用纯化的目标多肽筛选亲和力和特异性,并且如果需要,将结果与抗体与期望从结合排除的多肽的亲和力和特异性进行比较。筛选程序可以涉及将纯化的多肽固定化在微量滴定板的分开孔中。然后将含有潜在抗体或抗体组的溶液置于各自的微量滴定孔中并孵育约30分钟至2小时。然后洗涤

微量滴定孔,并将标记的二抗(例如,如果产生的抗体是小鼠抗体,则与碱性磷酸酶缀合的抗小鼠抗体)添加至孔中并孵育约30分钟,且然后洗涤。将底物添加至孔中,并且在存在针对固定化多肽的抗体的情况下,将出现颜色反应。

[0150] 然后可以进一步分析如此鉴定的抗体在选择测定中的亲和力和特异性。在开发针对靶蛋白的免疫测定中,纯化的靶蛋白充当用于判断使用已选择的抗体的免疫测定的灵敏度和特异性的标准。因为各种抗体的结合亲和力可以不同;某些抗体对(例如,在夹心测定中)可以在空间上相互干扰等,抗体的测定性能可以是比抗体的绝对亲和力和特异性更重要的量度。

[0151] 适体

[0152] 本发明还考虑选择性结合目标分析物(包括例如BNP、BNP_{sp}及其片段)的适体。

[0153] 核酸适体是已经通过等同地反复轮次的体外选择(SELEX(通过指数富集系统进化配体))工程改造的核酸种类,其结合各种分子靶标,诸如小分子、蛋白、核酸和甚至细胞、组织和生物体。适体提供与抗体等同的分子结合和识别。除了它们的区分识别以外,适体还提供相对于抗体的优点,因为它们可以在体外完全工程改造,容易通过化学合成产生,具有期望的储存特性,并且在治疗应用中引发很少或没有免疫原性。

[0154] 根据本发明的实例,适体是单体(一个单元)。根据本发明的另一个实例,适体是多聚适体。多聚适体可以包含多个适体单元(mers)。适体的多个单元中的每一个可以是相同的。在这种情况下,多聚适体是具有单一特异性、但亲合力增强的同源多聚体(多价适体)。

[0155] 或者,多聚适体可以包含两个或更多个适体单体,其中多聚适体中的至少两个单体在结构、核酸序列或两者上是不同的。这种多聚适体在本文中称为异多聚体。异多聚体可以针对单个结合位点,即单特异性(诸如避免空间位阻)。异多聚体可以针对多个结合位点,即多特异性的。异多聚体可以针对不同分析物(包括例如BNP、BNP_{sp}及其片段)上的多个结合位点。以下提供多聚适体的进一步描述。

[0156] 多个多聚适体可以缀合以形成多聚适体的缀合物。多聚适体可以包含两个(二聚体)、三个(三聚体)、四个(四聚体)、五个(五聚体)、六个(六聚体)和甚至更多个单元。

[0157] 可以通过本领域的任何合适的方法合成和筛选本发明的适体。

[0158] 例如,可以通过SELEX(通过指数富集系统进化配体)从随机适体文库中筛选和鉴定适体。可以通过本文称为细胞-SELEX或细胞-SELEX的修饰选择方法合适地筛选和选择结合目标抗原的适体[30-32]。在其它实例中,可以通过毛细管电泳筛选结合细胞表面靶分子(例如BNP或BNP_{sp})的适体,并且基于以下观察通过SELEX富集:适体-靶分子复合物在天然聚丙烯酰胺凝胶电泳中表现出与未结合的适体相比延迟的迁移速率。

[0159] 可以生成含有单体、二聚、三聚、四聚或其它更高多聚适体的随机适体文库。可以通过包括寡核苷酸接头来连接单个适体单体以形成多聚适体融合分子来修饰随机适体文库(ssDNA或RNA)。在其它实例中,合成随机寡核苷酸文库,其具有随机化的45nt序列,其侧翼为随机序列的上游和下游的定义的20nt序列,即,称为5'-臂和3'-臂,其用于扩增选择的适体。设计连接寡核苷酸(即接头)以含有与随机适体的5'-臂和3'-臂区域互补的序列,以形成二聚适体。对于三聚或四聚适体,将小的三聚或四聚(即Holiday连接样)DNA纳米结构工程改造以包括与随机适体的3'-臂区域互补的序列,因此通过杂交生成多聚适体融合。此外,富含3-5或5-10dT的核苷酸可以作为适体-结合基序之间的单链区域工程改造至接头多

核苷酸中,这提供了多个适体的灵活性和自由度,以协调和协同与细胞配体或受体的多价相互作用。或者,也可以通过将生物素化的适体与链霉抗生物素蛋白混合来形成多聚适体。

[0160] 可以采用修饰的细胞SELEX程序来选择靶结合适体。多聚适体可以是多价的,但具有单一结合特异性(即,同多聚适体)。或者,多聚适体可以是多价的和多特异性的(即,异多聚适体)。

[0161] 因此,同多聚适体的每个单体以相同的方式结合靶蛋白(例如BNP、BNP_{sp}或其片段)。因此,根据本发明的一个实例,同多聚适体的所有单体组分都是相同的。

[0162] 相反,异多聚适体包含多个单体适体,其中至少两个结合单个靶蛋白上的不同位点或结合至少两种不同的靶蛋白。

[0163] 使用科学文献(例如,[33])中描述的方案充分建立RNA-适体的选择。

[0164] 在某些实例中,适体的合适核苷酸长度范围为长度约15至约100个核苷酸(nt),并且在各种其它实例中,长度为12-30、14-30、15-30nt、30-100nt、30-60nt、25-70nt、25-60nt、40-60nt或40-70nt。

[0165] 在其它实例中,适体具有10-100nM范围内的亲和力,其在适体与肿瘤细胞表面分子结合后,允许适体从靶分子(例如BNP或BNP_{sp})解离,导致适体核酸纳米结构的释放和再循环以靶向其它肿瘤细胞。可以通过构建通过共价或非共价键连接在一起的多聚适体,使各个适体的亲和力增加4-50倍。下文进一步描述了多聚化适体的方法。

[0166] 因此,在某些实例中,适体对目标分析物(例如,BNP或BNP_{sp})的所需亲和力可以通过调节单体适体的多重性来微调。

[0167] 多重化可以如下在文库水平完成。

[0168] 在某些实例中,接头多核苷酸具有约5个核苷酸(nt)至约100nt;在各种实例中,10-30nt、20-30nt、25-35nt、30-50nt、40-50nt、50-60nt、55-65nt、50-80nt或80-100nt的长度。本领域技术人员能够调节接头多核苷酸的长度以便在多聚结构中容纳每个单体适体。

[0169] 在某些实例中,可以从如本文所述的随机多聚适体文库中鉴定和筛选多聚适体。在其它实例中,单体适体通过一个或多个接头多核苷酸彼此连接以形成多聚适体。单体适体可以通过任何合适的方式和任何构型连接以形成多聚适体。

[0170] 应理解,本发明的单体结构可以通过SELEX后程序进一步多聚化。

[0171] 多聚体可以通过DNA的连续线性合成而线性连接(无间隔物或有核酸间隔物)。适体合成通常依赖于标准固相亚磷酰胺(phosphoramidite)化学法。

[0172] 因此,二聚体、三聚体和四聚体或更高寡聚结构(例如五聚体、六聚体、七聚体、八聚体等)可以通过聚合间隔物连接。生成此类聚合结构的方法提供于(例如)[65]中。

[0173] 在某些实例中,进一步修饰适体以保护适体免受核酸酶和其它酶促活性的影响。适体序列可以通过本领域已知的任何合适的方法进行修饰。例如,硫代磷酸酯可以掺入骨架中,并且5'-修饰的嘧啶可以包括在ssDNA的5'末端用于DNA适体。对于RNA适体,可以使用T7RNA聚合酶突变体将修饰的核苷酸(诸如用例如用2'-脱氧-NTP或-氟-NTP取代核糖骨架的2'-OH基团)掺入RNA分子中。这些修饰的适体对核酸酶的抗性可以通过将它们与来自小鼠血清的纯化的核酸酶或核酸酶一起孵育来测试,并且可以通过凝胶电泳来分析适体的完整性。

[0174] 本发明的单体或多聚适体可以进一步连接或缀合至可检测或治疗部分(即药物部

分)。

[0175] 因此,如上所示,诊断或治疗部分可以与本文实施的适体连接,以提供额外的生物活性,诸如用于诊断、预防或治疗病况或疾病。在一个实例中,诊断部分,诸如可检测部分,例如标记物(例如,His标签、flag标签),荧光,放射性,生物素/抗生物素蛋白等,可以与适体结合,并且成像、免疫组织化学或其它侵入性或非侵入性方法用于鉴定缀合物与体内位置的结合位置并将其延伸。对于治疗用途,细胞毒性剂,诸如化学治疗剂、放射性部分、毒素、抗体、核酸沉默剂,例如小干扰RNA(siRNA)或具有治疗活性的其它分子,当递送至表达适体靶向的分子的细胞时,可用于增强适体的治疗活性或提供适体提供靶向活性的生物学活性。此外,考虑了与本文所述的适体的其它缀合物,诸如但不限于支架、糖、蛋白、抗体、聚合物和纳米颗粒,其各自都具有本领域公认的治疗或诊断效用,并且可以用本文实施的适体体内靶向至特定位点。

[0176] 结合剂的检测

[0177] 本公开包括使用检测系统,其涉及使目标分析物(包括但不限于BNP、BNP_{sp}及其片段)与结合剂结合,且然后检测结合的试剂的量。类似的解决方案是检测样品中未结合的结合剂的量以得到未结合或结合的目标肽或蛋白的指示。意欲此类替代方法作为直接检测结合的结合剂的量的功能性替代方案落入本公开的范围内。本领域技术人员将理解,当样品体积已知时,样品中BNP、BNP_{sp}及其片段的浓度可以容易地从样品中BNP、BNP_{sp}及其片段的量计算。

[0178] 根据本公开的抗体在用于测定样品中BNP、BNP_{sp}及其片段的的存在和/或量的免疫测定中特别有用。由于不同抗体的可变结合亲和力,本领域技术人员将理解,应当针对特定抗体建立测量值相比于样品中蛋白的量的标准结合曲线,以使得能够测定样品中蛋白的量。然后使用这种曲线以测定样品中蛋白的真实量。换言之,需要确定使用的每种结合剂(包括抗体)的参考区间。

[0179] 样品材料包括生物流体,但不限于此。就本公开而言,生物流体通常是血液。在一个实例中,在体外测试样品。

[0180] 对BNP、BNP_{sp}及其片段特异性的免疫测定需要产生特异性结合BNP、BNP_{sp}及其片段的抗体。抗体可用于构建具有广泛特异性的免疫测定,如在下面的竞争性结合测定中,或与下文描述的其它抗体结合用于夹心型测定中,以产生对三种肽中的每一种或对其它目的肽特异性的测定法。本领域技术人员将理解,非竞争性测定也是可能的。参考下文。

[0181] 可以使用如本文提供的试剂盒进行本公开的方法。提供了用于测量生物样品中BNP、BNP_{sp}及其片段的水平的试剂盒。所述试剂盒包含结合剂,其选择性结合BNP、BNP_{sp}及其片段,并且可以在结合BNP、BNP_{sp}及其片段结合后定量测量。结合剂如上所述。

[0182] 在另一个实例中,也可以使用指示剂。指示剂可用于ELISA和RIA方法中。

[0183] 多克隆和单克隆抗体可用于竞争性结合或夹心或试纸型测定中。在该方法的一个实例中,使液体样品与抗体接触,同时或依次与标记的BNP、BNP_{sp}、片段或和含有所述抗体识别的表位的修饰的肽接触。

[0184] 所述标记物可以是放射性组分,诸如¹²⁵I、¹³¹I、³H、¹⁴C或非放射性组分,其可通过时间分辨荧光、荧光、荧光偏振、发光、化学发光或比色法进行测量。这些化合物包括铕或其它镧系元素、吖啶酮(acridinium)酯、荧光素或放射性物质诸如上述那些,其可以通过放射性

计数、测量发光或荧光输出、吸光度等直接测量。所述标记物也可以是可以间接测量的任何组分,诸如生物素、地高辛或酶,诸如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶。这些标记物可以通过多种方式间接测量。例如,辣根过氧化物酶可以与底物诸如邻苯二胺二盐酸盐(OPD)和过氧化物一起孵育,以生成其吸光度可以测量的有色产物,或与鲁米诺和过氧化物一起孵育,以产生可以在发光计中测量的化学发光。生物素或地高辛可以与强烈结合它们的结合剂反应;例如抗生物素蛋白将强烈结合生物素。这些结合剂可以进而共价结合或连接至可测量的标记物,诸如辣根过氧化物酶或如上所述的其它直接或间接测量的标记物。这些标记物和上述标记物可以与肽或蛋白连接:-在合成期间,通过与标记物直接反应,或通过使用常用的交联剂诸如MCS和碳二亚胺,或通过添加螯合剂。

[0185] 在与抗体接触后,通常在4℃下持续18至25小时,或在30℃至40℃下持续1至240分钟,与结合剂(例如,抗体)结合的标记肽与未结合的标记肽分离。在溶液相测定中,可以通过添加与固相颗粒(诸如纤维素)或磁性材料偶联的抗 γ 球蛋白抗体(二抗)来完成分离。二抗在与用于一抗的物种不同的物种中产生并结合一抗。因此,所有一抗都经由二抗与固相结合。通过离心或磁性吸引将该复合物从溶液中移除,并使用与其结合的标记物测量结合的标记肽。用于从游离标记物分离结合标记物的其它选择包括形成免疫复合物(其从溶液中沉淀),通过聚乙二醇沉淀抗体或使游离的标记肽结合木炭并通过过滤的离心从溶液中移除。分离的结合或游离相中的标记物通过适当的方法(诸如上面呈现的那些)测量。

[0186] 竞争性结合测定也可以配置为固相测定,其更容易进行,且因此优于上述那些。这种类型的测定使用具有孔的板(通常称为ELISA或免疫测定板)、固体珠粒或管的表面。一抗被吸附或共价结合至板、珠粒或管的表面,或通过吸附或共价结合至板上的第二抗 γ 球蛋白或抗Fc区抗体间接结合。将样品和标记的肽(如上所述)一起或依次添加至板,并在允许竞争样品中的BNP、BNP_{sp}及其片段和标记的肽之间的抗体结合的条件下孵育。随后可以吸出未结合的标记肽,并冲洗板,留下附接至板的抗体结合的标记肽。然后可以使用上述技术测量标记的肽。

[0187] 由于特异性、速度和更大的测量范围的原因,夹心型测定是更优选的。在这种类型的测定中,过量的一抗BNP、BNP_{sp}及其片段经由吸附、共价偶联或抗Fc或 γ 球蛋白抗体附接至ELISA板的孔、珠粒或管,如上对于固相竞争结合测定所述。使样品流体或提取物与附接至固相的抗体接触。因为抗体过量,所以这种结合反应通常快速。针对BNP、BNP_{sp}及其片段的二抗也与样品且同时或依次与一抗一起孵育。选择该二抗以结合BNP、BNP_{sp}及其片段上不同于一抗的结合位点的位点。这两种抗体反应产生夹心,其中来自样品的BNP、BNP_{sp}及其片段夹在两种抗体之间。二抗通常用可容易测量的化合物标记,如上文对于竞争性结合测定所详述。或者,可以使特异性结合二抗的标记的三抗与样品接触。在洗涤未结合的材料后,可以通过对于竞争性结合测定概述的方法测量结合的标记的抗体。在洗去未结合的标记抗体后,可以如竞争性结合测定所概述定量结合的标记物。

[0188] 免疫测定

[0189] 通常,免疫测定涉及使含有或怀疑含有目标肽生物标志物的样品与至少一种特异性结合生物标志物的抗体接触。然后生成信号,其指示通过样品中的肽与抗体的结合形成的复合物的存在或量。然后将信号与样品中肽生物标志物的存在或量相关(定量、半定量或定性)。技术人员众所周知许多方法和装置用于检测和分析肽生物标志物(例如,[66-79])。

[0190] 根据本发明的测定装置和方法可以利用各种夹心、竞争或非竞争性测定形式的标记分子来生成与例如样品中BNP或BNP_{sp}或其片段的的存在或量相关的信号。用于本发明的合适的测定形式尤其包括酶联免疫测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)、竞争性结合测定等。还考虑色谱、质谱和蛋白“印迹”方法。另外,可以采用某些方法和装置,诸如生物传感器和光学免疫测定,来确定分析物的存在或量,而不需要标记的分子[80,81]。本领域技术人员还认识到,机器人仪器包括但不限于ACCESS®TM、Abbott AXSYM®TM、Roche ELECSYS®TM、Dade Behring STRATUS®TM系统是能够执行此处描述的免疫测定的免疫测定分析仪,作为本发明的一个实例。

[0191] 抗体或其它多肽可以固定化至各种固体支持物上,用于本发明的测定和方法中。可用于固定化特异性结合剂的固体支持物或相包括在固相结合测定中作为固相开发和/或使用的那些。合适的固相的实例包括膜过滤器、基于纤维素的纸、珠粒(包括聚合颗粒、乳胶颗粒和顺磁颗粒)、玻璃、硅晶片、微粒、纳米颗粒、TentaGels、AgroGels、PEGA凝胶、SPOCC凝胶和多孔板。测定条可以通过在固体支持物上的阵列中包被一种或多种抗体来制备。该条然后可以浸入测试样品,且然后通过洗涤和检测步骤迅速处理,以生成可测量的信号,诸如色点。抗体或其它多肽可以通过例如直接缀合至测定装置表面或通过间接结合而与测定装置的特定区域结合。在后一种情况的一个实例中,抗体或其它多肽可以固定化在颗粒或其它固体支持物上,并且该固体支持物固定化至装置表面。

[0192] 生物测定需要检测方法,并且用于定量结果的最常用方法之一是将可检测标记物缀合至对生物系统或待研究样品中的一种组分具有亲和力的蛋白。在本发明的测定和方法中,可检测标记物通常缀合至结合剂,诸如抗体。可以直接或间接检测BNP_{sp}或其片段与抗体的结合以形成复合物。可检测标记物可以包括本身可检测的分子(例如,荧光部分、电化学标记物、金属螯合物等)以及可以通过产生可检测的反应产物(例如,酶诸如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶等)或通过本身可检测的特异性结合分子(例如,生物素、洋地黄毒苷、麦芽糖、寡聚组氨酸、2,4-二硝基苯、苯基胍酸盐、ssDNA、dsDNA等)间接检测的分子。

[0193] 通过说明的方式,例如,辣根过氧化物酶可以与底物诸如邻苯二胺二盐酸盐(OPD)和过氧化物一起孵育,以生成其吸光度可以测量的有色产物,或与鲁米诺和过氧化物一起孵育,以产生可以在如本领域已知的发光计中测量的化学发光。生物素或地高辛可以与强烈结合它们的结合剂反应。例如,蛋白抗生物素蛋白和链霉抗生物素蛋白将强烈结合生物素。然后通过蛋白的直接反应,或通过使用常用的交联剂诸如碳二亚胺,或通过添加螯合剂,将另一种可测量的标记物与其共价结合或连接。

[0194] 检测还包括荧光标记物之间的荧光共振能量转移(FRET),特别是在根据本发明的用于同时测量例如BNP、BNP_{sp}及其片段的双测定形式中。

[0195] 因此,本发明还考虑不同种类的BNP和BNP_{sp}的分析,诸如例如使用多位点测定形式检测和测量BNP_{sp}(17-26),如本领域技术人员所知(例如,[82])。

[0196] 从标记物生成信号可以使用本领域众所周知的各种光学、声学 and 电化学方法进行。如本文所述,检测模式的实例包括荧光、放射化学检测、反射、吸光度、电流分析、电导、阻抗、干涉测量、椭圆光度法等。该列表并不意在限制性。基于抗体的生物传感器也可用于测定分析物的存在或量,其任选地消除对标记的分子的需要。

[0197] 免疫测定分析仪也是众所周知的,并且包括Beckman Access、Abbott AxSym、

Roche ElecSys和Dade Behring Status系统以及其它良好描述的系统。

[0198] 固相和可检测标记缀合物的制备通常包括使用化学交联剂。交联剂含有至少两个反应性基团,并且通常分为同官能交联剂(含有相同的反应性基团)和杂官能交联剂(含有不同的反应性基团)。通过胺、巯基偶联或非特异性反应的同双官能交联剂可得自许多商业来源。马来酰亚胺、烷基和芳基卤化物、 α -卤代酰基和吡啶基二硫化物是硫醇反应性基团。马来酰亚胺、烷基和芳基卤化物和 α -卤代酰基与巯基反应以形成硫醇醚键,而吡啶基二硫化物与巯基反应以产生混合的二硫化物。吡啶基二硫化物产物是可裂解的。亚氨酸酯对蛋白-蛋白交联也是非常有用的。各自组合成功缀合的不同属性的各种异双官能交联剂可商购获得。

[0199] 夹心型测定(一种类型的竞争性结合测定)具有更高的特异性、速度和更大的测量范围。在这种类型的测定中,过量的BNP_{sp}或BNP_{sp}片段的一抗经由吸附、共价偶联或二抗附接至ELISA板的孔、珠粒或管,如上对于固相竞争结合测定所述。使样品流体或提取物与附接至固相的抗体接触。因为抗体过量,所以这种结合反应通常快速。针对BNP或BNP_{sp}的检测抗体也与样品且同时或依次与一抗一起孵育。选择检测抗体以结合BNP或BNP_{sp}上不同于一抗的结合位点的位点。这两种抗体反应产生夹心,其中来自样品的BNP或BNP_{sp}或片段夹在两种抗体之间。检测抗体通常用可容易测量的化合物标记,如上文所详述。或者,可以使特异性结合检测抗体的标记的三抗与样品接触。在洗掉未结合的材料后,可以通过对于竞争性结合测定概述的方法测量和定量结合的标记的抗体。

[0200] 在本发明的某些实例中,使用各种类型的免疫测定,其可以包括竞争性类型的免疫测定。竞争性免疫测定的实例包括酶免疫测定或酶联免疫吸附测定(EIA或ELISA)、荧光免疫测定、放射性测量或放射免疫测定(RIA)、磁性分离测定(MSA)、侧向流测定、扩散免疫测定、免疫沉淀测定、使用与固体支持物结合的分析物的免疫吸附或“抗原降低”测定或凝集测定。在一种这样的测定中,样品含有未知量的待测量的分析物,其可以是蛋白,诸如BNP_{sp}或BNP_{sp}片段。所述分析物也可以称为抗原。可以向样品中掺入已知或固定量的标记的分析物。然后将掺入的样品与结合分析物(例如BNP或BNP_{sp}或其片段)的抗体一起孵育,使得样品中的分析物和添加至样品中的标记的分析物竞争结合可用的抗体结合位点。根据样品中存在的未标记的分析物的相对浓度,或多或少的标记分析物将能够结合抗体结合位点。因此,当测量与抗体结合的标记分析物的量时,其与样品中的未标记分析物的量成反比。然后可以使用本领域已知的标准技术,基于测量的标记分析物的量来计算原始样品中的分析物的量。

[0201] 在另一种类型的竞争性免疫测定中,结合分析物(诸如BNP或BNP_{sp}或其片段)的抗体可以与配体偶联或缀合,其中配体结合添加至样品中的额外的抗体。这种配体的一个实例包括荧光素。额外的抗体可以与固体支持物结合。额外的抗体结合与抗体偶联的配体,其进而结合分析物或者另外结合标记的分析物,形成大复合物(mass complex),其允许分离和测量由与标记的分析物偶联的标记物生成的信号。

[0202] 在另一种类型的竞争性免疫测定中,待测量的分析物可以与固体支持物结合,并与结合分析物的抗体和含有待测量的分析物的样品一起孵育。抗体结合与固体支持物结合的分析物或样品中的分析物,其相对比例取决于样品中分析物的浓度。然后将结合与固体支持物结合的分析物的抗体与另一种与标记物偶联的抗体(诸如抗小鼠IgG)结合。然后检

测从标记物生成的信号的量以测量与结合至固体支持物的分析物结合的抗体的量。这种测量将与样品中存在的分析物的量成反比。这种测定可以以微量滴定板形式使用。

[0203] 如本文公开的本发明的实例可用于进行称为免疫测定、“双位点”或“夹心”免疫测定的免疫测定,其中分析物可以结合或夹在两种抗体之间,所述抗体结合分析物(诸如BNP或BNPsp或其片段)上不同的表位。此类免疫测定的代表性实例包括酶免疫测定或酶联免疫吸附测定(EIA或ELISA)、免疫放射测定(IRMA)、荧光免疫测定、侧向流测定、扩散免疫测定、免疫沉淀测定和磁性分离测定(MSA)。在一种这样的测定中,可以描述为“捕获”抗体的一抗可以与固体支持物结合,其实例已在上面列出。可以使用本领域已知的程序将捕获抗体结合至固体支持物或包被在固体支持物上。或者,捕获抗体可以与配体偶联,所述配体被结合至固体支持物或包被在固体支持物上的额外的抗体识别。经由配体的捕获抗体与额外的抗体的结合然后间接地将捕获抗体固定化在固体支持物上。这种配体的一个实例是荧光素。可以描述为“检测”抗体的二抗可以与标记物偶联,所述标记物可以包含化学发光剂、量热剂、能量转移剂、酶、荧光剂或放射性同位素。可以使用本领域已知的程序将检测抗体与标记物偶联或缀合。所述标记物可以包含与二抗偶联的第一蛋白,诸如生物素,和与酶偶联的第二蛋白,诸如链霉抗生物素蛋白。所述第二蛋白结合第一蛋白。当提供有底物时,所述酶产生可检测的信号,使得测量的信号的量对应于与分析物结合的第二抗体的量。辣根过氧化物酶是这种酶的一个实例;可能的底物包括TMB(3,3',5,5'-四甲基联苯胺、OPD(邻苯二胺)和ABTS(2,2'-联氨基-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸))。

[0204] 夹心免疫测定或夹心ELISA特别适用于本发明中。

[0205] 也可以使用试纸型测定法。这些测定法是本领域众所周知的。它们可以例如采用连接有特定抗体的小颗粒,诸如金或有色乳胶颗粒。待测量的液体样品可以添加至预装有颗粒的膜或纸条的一个末端,并允许沿着条带迁移。样品中的抗原(诸如BNP、BNPsp或其片段)与颗粒的结合改变颗粒结合捕获位点的能力,所述捕获位点进一步沿着条带含有颗粒的结合剂,诸如抗原或抗体。在这些位点处有色颗粒的累积导致显色,这取决于样品中竞争抗原的浓度。其它试纸方法可以采用与纸或膜条共价结合以捕获样品中的抗原的抗体。采用与酶诸如辣根过氧化物酶偶联的二抗以及与底物一起孵育以产生颜色、荧光或化学发光输出的后续反应将使得能够定量样品中的抗原。

[0206] 也可以使用放射免疫测定法(RIA)。在一种RIA中,放射性标记的抗原和未标记的抗原用于与抗体的竞争性结合中。常见的放射性标记物包括¹²⁵I、¹³¹I、³H和¹⁴C。涉及用特异性抗体和放射性标记的抗体结合蛋白沉淀BNP、BNPsp或其片段的放射免疫测定法可以测量沉淀中标记的抗体的量,其与样品中BNP或BNPsp的量成比例。或者,产生标记的BNP、BNPsp或其片段,并使用未标记的抗体结合蛋白。然后添加待测试的生物样品。来自标记的BNP、BNPsp或其片段的计数减少与样品中BNP、BNPsp或其片段的量成比例。

[0207] 在RIA中,将结合的BNP、BNPsp或其片段与游离的BNP、BNPsp或其片段分离也是可行的。这可以涉及用二抗沉淀BNP/抗体或BNPsp/抗体复合物。例如,如果BNP/抗体或BNPsp/抗体复合物含有兔抗体,则可以使用驴抗兔抗体沉淀复合物并计数标记物的量。例如,在LKB,Gammamaster计数器[83]中。

[0208] 接受者操作特征(ROC)分析

[0209] 实验室测试的临床表现取决于其诊断准确性,或将受试者正确分类为临床相关亚

组的能力。诊断准确性测量测试正确区分所研究的受试者的两种不同条件的能力。此类条件例如是健康和疾病或良性相比于恶性疾病。

[0210] 在每种情况下,接受者操作特征(ROC)图通过绘制整个决策阈值范围的灵敏度相比于1-特异性来描绘两个分布之间的重叠。在y轴上是灵敏度,或者是真阳性分数[定义为(真阳性测试结果的数目)/(真阳性的数目+假阴性测试结果的数目)]。这也被称为疾病或病况存在的条件下的阳性。它仅从受影响的亚组计算。在x轴上是假阳性分数,或1-特异性[定义为(假阳性结果的数目)/(真阴性的数目+假阳性结果的数目)]。它是特异性的指数,并且完全从未受影响的亚组计算。因为真阳性和假阳性分数是通过使用来自两个不同亚组的测试结果完全分开计算的,所以ROC图独立于样品中的疾病流行。ROC图上的每个点代表对应于特定决策阈值的灵敏度/-特异性对。具有完全区分的测试(在两个结果分布中没有重叠)具有穿过左上角的ROC图,其中真阳性分数为1.0或100%(完全灵敏度),并且假阳性分数是0(完全特异性)。没有区别的测试的理论图(两组的结果分布相同)是从左下角至右上角的45°对角线。大多数图落在这两个极端之间。如果ROC图完全低于45°对角线,则这通过将“阳性”的标准从“大于”反转为“小于”或反之亦然来容易地解决。定性地,图越接近于左上角,则测试的整体准确度越高。

[0211] 定量实验室测试的诊断准确度的一个方便目标是通过单个数字来表达其性能。最常见的总体量度是ROC图下的面积。通过惯例,该区域总是 ≥ 0.5 (如果不是,则可以反转决策规则以使其如此)。值范围为1.0(两组的测试值的完全分离)和0.5(两组测试值之间没有明显的分布差异)之间。该区域不仅取决于图的特定部分,诸如最接近于对角线的点或90%特异性的灵敏度,但在整个图上。这是ROC图与完美图如何接近的定量的、描述性的表述(面积=1.0)。

[0212] 试剂盒和制品

[0213] 本发明还涉及用于进行本文所述的测定和方法的装置和试剂盒。合适的试剂盒包含足以进行所述BNP或BNP_{sp}种类中至少一种的测定的试剂,以及进行所述阈值比较的说明书。例如,试剂盒将被格式化用于本领域已知的测定,特别是ELISA测定。

[0214] 在本发明的一个方面,存在试剂盒或制品,其包含:

[0215] (i) 测量获得自患者的生物样品中的B型利尿钠肽信号肽(BNP_{sp})片段的水平、N端B型利尿钠肽(NT-proBNP)和白血细胞计数(WCC)的水平的特异性的试剂;和

[0216] (ii) 关于如何在患者中进行不稳定型心绞痛的诊断或关于如何预测由于患者中发生不稳定型心绞痛而导致的中风和/或心力衰竭的并发症的说明书。

[0217] 在某些实例中,用于进行此类测定的试剂在测定装置中提供,并且此类测定装置可以包括在这种试剂盒中。例如,优选的试剂可以包含一种或多种固相抗体,所述固相抗体包含检测与固体支持物结合的BNP或BNP_{sp}种类的抗体。

[0218] 因此,在本发明的某些实例中,第一结合剂固定化在固体支持物上。

[0219] 在夹心免疫测定的情况下,此类试剂还可以包括一种或多种可检测标记的抗体,所述可检测标记的抗体包含检测与可检测标记物结合的预期BNP或BNP_{sp}种类的抗体。可以作为测定装置的一部分提供的其它任选元件在下文中描述。可检测标记物可以包括本身可检测的分子(例如,荧光部分、电化学标记物、电化学发光(ec1)标记物、金属螯合物、胶体金属颗粒等)以及可以通过产生可检测的反应产物(例如,酶诸如辣根过氧化物酶、碱性磷酸

酶等)或通过使用本身可检测的特异性结合分子(例如,与二抗结合的标记的抗体、生物素、洋地黄毒苷、麦芽糖、寡聚组氨酸、2,4-二硝基苯、苯基胍酸盐、ssDNA、dsDNA等)间接检测的分子。

[0220] 因此,在本发明的其它实例中,第二结合剂包含可检测的标记物。

[0221] 如本文所述,本发明的试剂盒内包含的结合剂可以包括抗体或其抗原结合片段,例如单克隆抗体或其抗原结合片段。关于结合成员的详细描述,包括抗体和抗原结合片段,在本文别处描述。

[0222] 在某些方面,所述试剂盒包含用于分析至少一种测试样品的试剂。所述试剂盒还可以包括用于进行本文所述的一种或多种诊断和/或预后关联的装置和说明书。优选的试剂盒将包含用于进行夹心测定的抗体对,或用于进行分析物(例如BNP或BNP_{sp})的竞争性测定的标记种类。优选地,抗体对包含与固相缀合的一抗和与可检测标记物缀合的二抗,其中第一和二抗各自将结合BNP或BNP_{sp}的不同形式。通常,并且为了特异性,本发明的试剂盒中使用的每种抗体包括单克隆抗体。用于使用试剂盒和进行关联的说明书可以是标记的形式,这是指在其制造、运输、销售或使用期间的任何时间附着于试剂盒或以其它方式伴随试剂盒的任何书面或记录材料。例如,术语标记包括广告传单和小册子、包装材料、说明书、音频或录像带、计算机光盘以及直接印在试剂盒上的书写。

[0223] 本发明的范围内进一步包括试剂盒,其包含用于检测和测量不同种类的BNP(包括BNP和BNP_{sp})的双重目的或多位点测定法。也就是说,本发明提供了测定法和试剂盒,其能够在已获得自受试者的生物样品中同时测定不同种类的BNP和BNP_{sp}的存在和量。在某些实例中,本发明提供了双重目的测定法和试剂盒,其包含用于同时测量BNP和BNP_{sp}及其片段的双重目的测定法,其中所述测定法包括本文所述的测定法的任何组合。

[0224] 在本说明书中对现有技术文献的任何引用不应被认为是承认这种现有技术是众所周知的或形成本领域公知常识的一部分。

[0225] 参考以下实施例进一步描述本发明。应当理解,请求保护的本发明不以任何方式受这些实施例的限制。

[0226] 实施例

[0227] 实施例1:材料和方法

[0228] 研究群体和设计

[0229] 怀疑急性冠状动脉综合征(ACS)的胸痛患者被前瞻性地纳入我们正在进行的观察性研究(称为急性冠状动脉事件中的信号肽(SPACE,<http://www.anzctr.org.au>, ACTRN12609000057280))中。根据新西兰卫生部健康和残疾伦理委员会(Health and Disabilities Ethics Committee of the Ministry of Health, New Zealand)批准的方案纳入所有患者。所有参与者在招募前都给出知情同意,并且所有调查都符合赫尔辛基宣言的原则。在2009年3月和2013年9月之间,招募了505名符合条件的18岁或以上的患者,其主要抱怨为急性胸痛,临床上怀疑为ACS且距发作 \leq 4小时。更一般/非典型症状(诸如疲劳、恶心、呕吐、出汗和晕眩)未被用作入选标准。排除具有透析末期肾病的患者。

[0230] 判定的诊断

[0231] 获得所有临床数据、但不是BNP_{sp}或hsTnT结果的两位独立的心脏病专家根据发布的指南[1]进行急性MI的判定诊断。在不一致的情况下,独立的第三位心脏病专家决定解决

这一点。MI的诊断的生物化学组分基于当前的TnI测定(非高度灵敏),在呈现的12小时内具有1个>99th URL(第99百分位数=0.03pg/L)值。急诊科就诊期间的心房纤颤(AF)从ECG确定,而UAP的诊断基于确证性侵袭性调查(运动耐量测试(ETT)或多巴酚丁胺应激超声心动图测试(DSE))或血管造影导管插入发现来进行。

[0232] 随访和预后终点

[0233] 在出院后365天内,通过电话或书面形式对患者进行随访。报告的临床事件由患者自身(或他们的主要医师)确定,这通过治疗机构的记录或通过集中的关于死亡率和事件的新西兰卫生部数据库登记条目证实。考虑的出院后终点是死亡、MI、急性失代偿性心力衰竭和中风。通过ROC分析对三组分析事件;所有患者(n=505)、MI患者(n=115)和非MI患者(n=390)。

[0234] 临床评价和样品收集

[0235] 对于所有患者,初步评价包括临床病史、身体检查、ECG记录、标准血液测试、脉搏血氧仪和胸部放射线摄影。患者管理由主治医师决定。只有标准临床核心实验室TnI(Abbott Architect,研究开始时可用的非高灵敏指数测试)和其它标准血液测试结果可由治疗人员使用。

[0236] 在给予同意后,在送医后0、1、2和12-24小时采集系列血液样品用于测量BNPsp、NT-proBNP和hsTnT(EDTA管)和TnI和脂质(肝素管)。将血液样品(10ml)吸入在冰上冷却的EDTA管中,以2500g离心10分钟,并在测定前将血浆冷冻于-80℃。将肝素样品收集至5ml管中,并立即送至医院核心生物化学单元用于测量cTnI和脂质。

[0237] BNPsp测定

[0238] 使用我们先前报道的测定法测量BNPsp[7-10]。简而言之,该测定具有 5.0 ± 0.6 pmol/L的样品检测限值, 161 ± 8 pmol/L的ED50, $4-112$ pmol/L的样品工作范围,其中测定内CV为<10%。分别地,测定间CV在130pmol/L时为~14%,且在44pmol/L时为~13%。BNPsp的正常范围的第99百分位数上限为25pmol/L,其中测定内CV为6.2%。交叉反应性评估显示,对其它相关肽或心血管病症中常用药物的没有可检测到的干扰。

[0239] 心脏和其它标志物测定

[0240] 在Cobas e411分析仪(Roche Diagnostics)上测定NT-proBNP和hsTnT。NT-proBNP测定的检出限值(LOD)为5ng/L,并且在44ng/L时具有4.6%的不精确变异系数(CV)。hsTnT测定的LOD为5ng/L,其中13ng/L时的不精确CV为<10%。为了本研究的目的,14ng/L的hsTnT值被用作MI诊断的正常截止值和临床阈值的上限[11]。所有hsTnT结果均在Roche的全球重新评价hsTnT期间提交给Penzberg,仅需3次调整,其所有都低于14ng/L。TnI由当前测定法(Abbott Architect)测定,其中第99百分位数截止值为30ng/L(0.03ug/L)。胆固醇、HDL、LDL和甘油三酯由核心Christchurch医院实验室(Canterbury Health Laboratories)在Abbott Series C分析仪上测定。

[0241] 统计分析

[0242] 连续变量表示为中数(四分位数范围,(IQR)),且分类变量表示为数字和百分比。使用非参数Mann-Whitney U检验和使用Pearson χ^2 检验的分类变量分析患者结果和连续变量之间的双变量关联。血浆分析物结果的分析采用Spearman等级相关性测试和接受者操作特征曲线(ROC)分析,且诊断性能(灵敏度、特异性、阳性预测值(PPV)和阴性预测值(NPV))

使用SPSS v22 (IBM) 进行。对于ROC曲线生成和生物标志物组比较,将生物标志物数据分析为标准化变量(z-评分)。在所有情况下,从获得自t=0、1和2小时样品的最大生物标志物值推导标准化变量。

[0243] 通过ROC分析评价个体生物标志物(BNP_{sp}、NT-proBNP、TnI和hsTnT)用于预测指数MI和UAP。根据ROC分析是否指示较低或较高的值,使用分析物进行用于检测指数UAP的标准化生物标志物的组合评价,因此生成称为“UA比率”的比率。因此,UA比率利用较低的ROC值,与中性表现者(~0.5)相比,其与较高ROC值具有增加的分离,以预测指数UAP。较高的ROC分析物用作分子,而较低的ROC值用作分母。迭代分析鉴定了最佳性能标准化标志物的最小核心集合,其累加性质通过单一去除和添加来证实,同时在3个随机选择的研究群体部分中评价一致性。

[0244] 使用Hanley和McNeill [12]的方法进行ROC曲线比较。在所有分析中,p-值<0.05被认为是显著的。

[0245] 实施例2:结果

[0246] 患者的特征

[0247] 招募的505名患者的基线特征显示于表1中。115名(23%)具有判定的心肌梗塞,40名(8%)具有UAP,324名(64%)具有未区分或非心脏性胸痛,26名(5%)具有非ACS心脏病,诸如心房纤颤(AF)、心力衰竭或主动脉瓣狭窄。在这些替代的心脏病中,19名(4%)在其急诊科送医期间处于AF中。

[0248] 生物标志物水平

[0249] 呈现BNP_{sp}水平与身高负相关($r=-0.13, p=0.006$),与WCC($r=0.17, P<0.001$)、HDL($r=0.10, p=0.035$)、NT-proBNP($r=0.10, p=0.043$)、TnI($r=0.11, p=0.01$)和hsTnT($r=0.10, p=0.029$)正相关。与其它诊断相比,血浆BNP_{sp}在MI和其它心脏疾病组中显著更高(表1)。去除MI病例的情况下,与其它诊断相比,BNP_{sp}水平在UAP患者中显著更高(表I)。有趣的是,与没有AF的患者(22.2(18.3-25.9pmol/L), $n=486$)相比,BNP_{sp}的呈现水平在处于AF中的那些(25.9(19.8-36.0pmol/L), $n=19$)中显著更高($p=0.018$)。hsTnT和TnI两者均在MI中显著升高(如所预期),并且hsTnT在其它心脏病中也显著升高(表I)。与非心脏病例或具有未区分胸痛的那些相比,NT-proBNP水平在所有心脏病组中都升高。

[0250] MI的诊断

[0251] 指数TnI测定对于MI的诊断具有0.97的ROC AUC,而研究性hsTnT测量生成0.96的AUC(表II,图3)。两种测定均生成高灵敏度、特异性、PPV和NPV数据。相反,BNP_{sp}生成AUC=0.69和NT-proBNP=0.64。向TnI、hsTnT或NT-proBNP中添加BNP_{sp}不会改进它们各自的AUC、灵敏度或特异性。

[0252] 心肌缺血和其它诊断的鉴定

[0253] 在整个研究组中,没有标志物AUC超出检测UAP的非鉴别线,最接近的是NT-proBNP,AUC为0.58(95%CI,0.50-0.67, $p=0.079$)。当移除具有MI的患者($n=115$)时,这导致390名患者有资格用于分析。对该组的ROC分析揭示,仅proBNP、BNP_{sp}、钾和白血细胞计数(WCC)生成显著的AUC用于鉴定具有判定的UAP的患者(表II)。对于具有UAP的患者的鉴定,UA比率生成0.70的AUC(表II),其显著好于最佳个别标志物NT-proBNP($p<0.05$,图4A)。因此,UA比率的中值标准化值在具有判定UAP的患者中与所有其它诊断相比显著更高(1.19

(0.49-2.92) vs. 0.43 (0.24-1.29), $p=0.002$)。进一步分析, 聚焦于没有ECG异常证据的非MI患者 ($n=328$), 揭示UA比率具有用于鉴定0.76的UAP的AUC ($n=33$, 95%CI, 0.68-0.83, $p<0.001$, 图4B), 其中灵敏度、特异性、PPV和NPV分别为90%、50%、18%和98%。该AUC比比较的NT-proBNP (AUC=0.66, 95%CI 0.57-0.75) 和BNP_{sp} (AUC=0.63, 95%CI, 0.52-0.74, 图4B) 显著更好 ($p<0.05$)。从UA比率连续单地去掉个别变量并在研究群体的3个随机选择的部分中重复评价其性能, 证实了该比率的一致测试性能。

[0254] 表1: 患者的基线特征 (中值, IQR, 百分比)

[0255]

	心肌梗塞 (MI)	不稳定型心绞痛 (UAP)	其它心脏病症	未分化/非心脏性胸痛	所有患者	p-值
患者, 数目(%)	115 (23)	40 (8)	26 (5)	324 (64)	505 (100)	
性别, 数目(%)						
男性	78 (68)	26 (65)	16 (62)	185 (57)	305 (60)	<0.001
女性	37 (32)	14 (35)	10 (38)	139 (43)	200 (40)	<0.001
年龄, 岁						
男性	66 (56-76)	64 (58-70)	65 (52-77)	59 (48-70)	62 (51-70)	<0.001
女性	78 (68-86)	66 (59-73)	73(65-80)	68 (58-80)	68 (59-80)	<0.001
分析物						
<i>Chol (mg.dL⁻¹)</i> ψ	181 (154-216)	175 (141-213)	174 (149-202)	187 (153-214)	184 (154-216)	
<i>HDL (mg.dL⁻¹)</i> ψ	40 (34-50)	39 (35-42)	40 (30-58)	40 (37-53)	40 (36-51)	
<i>LDL (mg.dL⁻¹)</i> ψ	116 (93-143)	107 (77-139)	101 (85-125)	116 (89-135)	114 (89-135)	
<i>Trig (mg.dL⁻¹)</i> \S	159 (97-195)	149 (95-177)	142 (88-181)	166 (126-186)	161 (107-206)	
风险因素(%)						
高血压	79 (69)	33 (83)	20 (77)	195 (60)	327 (65)	<0.01
糖尿病	19 (4)	9 (23)	4 (15)	43 (13)	75 (15)	<0.01
目前吸烟者	16 (3.5)	2 (5)	0 (0)	47 (15)	65 (13)	<0.01
曾经吸烟者	57 (11)	21 (53)	19 (73)	157 (48)	254 (50)	<0.01

[0256]

<i>BMI (kg.m²)</i>	27.7 (24.7-31.3)	27.2 (25.1-30.3)	27.7 (24.6-31.8)	27.7 (24.9-31.3)	27.7 (24.7-31.1)	
病史(%)						
<i>CVD</i>	78 (68)	36 (90)	13 (50)	199 (61)	326 (65)	<0.01
<i>MI</i>	36 (31)	20 (50)	10 (38)	99 (31)	165 (33)	<0.01
<i>CABG</i>	9 (8)	6 (15)	3 (12)	35 (11)	53 (10)	<0.01
<i>高脂血症</i>	62 (54)	34 (85)	14 (54)	193 (60)	303 (60)	<0.01
<i>心绞痛</i>	48 (42)	30 (75)	17 (65)	158 (49)	253 (50)	<0.01
<i>心脏衰竭</i>	10 (9)	4 (10)	2 (8)	33 (10)	49 (10)	<0.01
ECG 结果(%)						
<i>LBBB</i>	3 (3)	1 (3)	1 (4)	9 (3)	14 (4)	
<i>ST 段抬高</i>	23 (20)	0 (0)	2 (8)	0 (0)	25 (7)	<0.01
<i>ST 段压低</i>	10 (9)	1 (3)	3 (12)	2 (1)	16 (4)	<0.01
<i>T 波倒置</i>	20 (17)	5 (13)	6 (23)	30 (9)	61 (13)	<0.01
无变化	59 (51)	33 (83)	14 (54)	283 (9)	389 (72)	<0.01
标志物水平						
<i>hsTnT(ng/L)</i>	79* (37-219)	6 (3-10)	22* (8-36)	5 (3-12)	8 (3-27)	*<0.01
<i>TnI (ug/L)</i>	0.25* (0.07-1.30)	0.01 (0.01-0.01)	0.02 (0.01-0.04)	0.01 (0.01-0.01)	0.01 (0.01-0.03)	*<0.01
<i>BNPsp (pmol/L)</i>	26.1* (20.5-36.9)	23.1† (18.1-28.2)	25.0* (19.6-34.0)	21.3 (17.7-24.2)	22.3 (18.4-26.2)	*<0.01 †<0.05
<i>proBNP(ng/L)</i>	758* (279-1447)	436* (288-1445)	1159* (445-2013)	340 (157-767)	392 (183-1063)	*<0.01
<i>UA 比率</i>	0.44* (-0.81-1.96)	0.23* (-0.50-1.94)	0.01 (-0.51-1.40)	-0.76 (-1.37-0.16)	-0.35 (-1.09-0.76)	*<0.01

[0257] 表II:用于诊断MI和确定的不稳定型心绞痛(UAP)的ROC曲线参数

[0258] MI的诊断(n=115/505)

[0259]

标志物	AUC	95%CI	灵敏度%	特异性%	PPV%	NPV%	p-值
TnI	0.97	0.96-0.99	85	95	83	96	<0.001
hsTnT	0.96	0.94-0.98	94	83	62	98	<0.001
NT-proBNP	0.64	0.58-0.69	56	73	38	85	<0.001
BNPsp	0.69	0.63-0.75	55	84	50	86	<0.001
UA比率	0.64	0.58-0.70	60	68	36	85	<0.001

[0260] UAP的诊断(n=40/390)

[0261]

标志物	AUC	95%CI	灵敏度%	特异性%	PPV%	NPV%	p-值
TnI	0.54	0.44-0.64	5	85	4	89	0.419
hsTnT	0.51	0.42-0.59	10	80	5	89	0.910
NT-proBNP	0.62	0.54-0.70	83	37	13	95	0.012
钾	0.61	0.53-0.70	5	97	16	90	0.019
WCC ¹	0.60	0.52-0.69	5	93	8	90	0.032
BNPsp	0.59	0.49-0.70	83	45	15	96	0.048
UA比率 ²	0.70*	0.62-0.77	83	51	16	97	<0.001

[0262] 表III:呈现标志物水平鉴定1年内的结果的ROC表现(AUC,95%CI)。†=p<0.05,*=p

<0.01。nd=未测定

[0263] 整个研究组 (n=505)

[0264]

标志物	死亡率 (n=21)	MI (n=29)	中风 (n=10)	心力衰竭 (n=10)
TnI	0.70* (0.59-0.80)	0.64* (0.54-0.74)	0.51 (0.34-0.68)	0.72† (0.58-0.86)

[0265]

hsTnT	0.70* (0.60-0.80)	0.68* (0.59-0.77)	0.68 (0.55-0.80)	0.82* (0.73-0.90)
NT-proBNP	0.73* (0.63-0.74)	0.70* (0.60-0.79)	0.77* (0.64-0.90)	0.92* (0.84-1.00)
BNPsp	0.59 (0.49-0.69)	0.44 (0.33-0.55)	0.48 (0.31-0.64)	0.51 (0.34-0.69)
UA 比率	0.61 (0.48-0.75)	0.62† (0.52-0.72)	0.63 (0.49-0.77)	0.81* (0.70-0.92)

[0266] MI患者 (n=115)

[0267]

标志物	死亡率 (n=7)	MI (n=13)		
NT-proBNP	0.71 (0.48-0.94)	0.63 (0.47-0.78)	nd	nd
BNPsp	0.54 (0.49-0.69)	0.71† (0.57-0.85)	nd	nd
NT-proBNP + BNPsp	0.67 (0.40-0.93)	0.70† (0.56-0.84)	nd	nd

[0268] 非MI患者 (n=390)

[0269]

标志物	死亡率 (n=14)	MI (n=16)	中风 (n=9)	心力衰竭 (n=7)
UA 比率	0.62 (0.48-0.77)	0.61 (0.48-0.74)	0.70† (0.55-0.85)	0.82* (0.67-0.96)
BNPsp	0.59 (0.48-0.70)	0.47 (0.33-0.62)	0.50 (0.31-0.65)	0.61 (0.37-0.85)

[0270] BNPsp和UA比率的预后能力

[0271] 从指数承认至1年针对BNPsp的预后表现评价整个研究组 (n=505), 揭示BNPsp在呈现时没有预测死亡率、心肌梗塞、中风或心力衰竭。此外, BNPsp没有增加hsTnT、TnI或NT-proBNP就那些结果而言的预测能力(表III)。相反, 变量UA比率预测了一年内的MI (n=29, p=0.029) 和心力衰竭 (n=10, p=0.001) (表III)。

[0272] 聚焦于单独的MI患者 (n=115) 揭示BNPsp浓度产生0.71的AUC (p=0.014), 其中BNPsp<26pmol/L与一年内的新MI (n=13) 显著相关。添加BNPsp将NT-proBNP用于预测一年内的新MI的AUC从0.63 (p=0.136) 改进至0.70 (p=0.021, 表III)。UA比率没有预测MI患者中的任何结果。未患有MI的个体 (n=390) 的分析揭示, UA比率可以预测一年内的中风 (n=9, P=0.038) 和心力衰竭 (n=7, p=0.004) (表III)。BNPsp没有预测非MI患者中的任何事件。

[0273] 实施例3:讨论

[0274] 申请人将BNP_{sp}鉴定为急性MI [7]和侵袭性心脏测试[10]中具有迅速上升的概况的实体的早期工作为本文呈现的研究提供了基本原理。该工作的主要发现是:i)BNP_{sp}在具有胸痛的ED患者中对急性MI具有与和肽素(~0.7)相似的ROC诊断能力[13]。然而,与和肽素不同,它没有增加对肌钙蛋白的诊断能力;ii)BNP_{sp}水平在呈现AF的患者中显著升高,iii)BNP_{sp}连同NT-proBNP一起对非MI个体中的UAP具有一定的辨别力,并且这两者组合WCC和K⁺的累加值产生UAP中可以具有诊断潜力的独特比率,尤其是在其ECG上无变化的患者中,以及iv)BNP_{sp}可能增加来自患有急性MI的患者中的NT-proBNP的预后信息。

[0275] 2小时内的BNP_{sp}水平在急性MI中升高的发现与我们先前在STEMI患者中的发现一致[7]。此外,该研究还证实了心肌缺血中BNP_{sp}升高的高度动态性质,因为本研究中的升高在其发作和偏移中是快速的。这种BNP_{sp}释放模式可能使其在检测重复缺血发作方面有用,但使得升高更难以检测并需要重复采样。从循环的快速半衰期和清除可能是BNP_{sp}未增加用于诊断MI的hsTnT测量的原因之一。

[0276] 具有AF的患者中BNP_{sp}的升高是一个新型发现。潜在的机制未知,但可以反映不同群体的心房肌细胞和/或心动过速诱导的缺血后快速变化的局部机械应激。BNP/NT-proBNP与AF发生和风险预测的关系是众所周知的[14-16],肌钙蛋白也是如此[17,18],并且确定BNP_{sp}在更大的适当设计的研究样品中是否具有相似能力将是感兴趣的。

[0277] BNP检测缺少梗塞的心肌缺血的潜在能力得到了实验[19]、临床[20]和荟萃分析研究[21]的证据支持,所述研究都表明BNP测量可以改进侵袭性测试方案期间的心肌缺血的检测。我们的BNP_{sp}在非MI患者中对UAP有一定辨别力的数据,尽管没有NT-proBNP那么强烈,但也是积极的发现,并且同时与我们先前在经历应激超声心动图测试的CAD患者中的报道[10]一致,是由没有接受任何测试刺激或侵袭的个体生成的。将BNP_{sp}添加至NT-proBNP进一步发展为“UA比率”的概念,其中还包括在UAP患者中展现显著ROC反应的其它变量。UA比率背后的基本原理是尝试包括多种对目标综合征差异性反应的可能有用的生物标志物值。在此处鉴定的四种变量中,BNP_{sp}和NT-proBNP在直觉上是适当的,另外两者则不那么适当。在分母上使用WCC反映了这样的事实:在本研究中,与所有其它诊断组相比,UAP中WCC水平显著降低(P=0.01)。相反,在急性MI患者中,WCC值显著更高(P<0.01)。关于UAP患者中的WCC水平的文献存在差异,其中报道称它们升高[22]、未改变[23]且降低[24]。这种变异可能反映了研究组的采样时间、先前用药史和吸烟状况。相比之下,我们发现UAP患者中的钾水平的升高(非显著),其生成了微弱、但显著的ROC AUC,并且值得注意的是,钾与NT-proBNP和BNP_{sp}中每一种及其组合在UAP的检测中阳性组合。

[0278] 关于此处建议的UA比率,UAP患者中,特别是可疑的CG组中生成的PPV和NPV值,在组合的运动和超声心动图测试所报道的范围内[25]。此外,UA比率对一年内随后的MI、中风和心力衰竭发作具有预后能力。未来的研究可能解决:1)此处描述的比率是否可以改进来自目前侵袭性心脏测试方案的低诊断和治疗产量[26],以及2)是否存在该比率与UAP的其它新型潜在标志物诸如microRNA的任何组合[27]。

[0279] 尽管已经通过实施例的方式描述了本发明,但应当理解,在不脱离如权利要求中所限定的本发明的范围的情况下,可以进行变化和修改。此外,在特定特征存在已知等同物的情况下,此类等同物被并入,如同在本说明书中具体提及的那样。

[0280] 参考文献

[0281] 1.Thygesen K,Alpert JS,Jaffe AS,Simoons ML,Chaitman BR,White HD;Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Universal Definition of Myocardial Infarction.Third universal definition of myocardial infarction.Circulation 2012;126:2020-35.

[0282] 2.Keller T,Zeller T,Peetz D,Tzikas S,Roth A,Czyz E,等人,Sensitive troponin I assay in early diagnosis of acute myocardial infarction.N Engl J Med 2009;361:868-77.

[0283] 3.Reichlin T,Hochholzer W,Bassetti S,Steuer S,Stelzig C,Hartwiger S,等人,Early diagnosis of myocardial infarction with sensitive cardiac troponin assays.N Engl J Med 2009;361:858-67.

[0284] 4.Reichlin T,Twerenbold R,Reiter M,Steuer S,Bassetti S,Balmelli C,等人,Introduction of high sensitivity troponin assays:impact on myocardial infarction incidence and prognosis.Am J Med 2012;125:1205-13.

[0285] 5.Thygesen K,Mair J,Giannitsis E,Mueller C,Lindahl B,Blankenberg S,等人,Study Group on Biomarkers in Cardiology of ESC Working Group on Acute Cardiac Care.How to use high-sensitivity cardiac troponins in acute cardiac care.Eur Heart J 2012;33:2252-57.

[0286] 6.Hamm CW,Bassand JP,Agewall S,Bax J,Boersma E,Bueno H,等人,ESC Committee for Practice Guidelines.ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation:The Task Force for the management of acute coronary syndromes (ACS) in patients presenting without persistent ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC).Eur Heart J 2011;32:2999-3054.

[0287] 7.Siriwardena M,Kleffmann T,Ruygrok P,Cameron VA,Yandle TG,Nicholls MG,等人,BNP signal peptide circulates in human blood:evaluation as a potential biomarker of cardiac ischemia.Circulation 2010;122:255-64.

[0288] 8.Pemberton CJ,Siriwardena M,Kleffmann T,Ruygrok P,Palmer SC,Yandle TG,等人,First identification of circulating preproANP signal peptide fragments in man:initial assessment as cardiovascular biomarkers.Clin Chem 2012;58:757-77.

[0289] 9.Pemberton CJ,Siriwardena M,Kleffmann T,Richards AM.CNP signal peptide fragments are present in the human circulation.Biochem Biophys Res Commun 2014;449:301-306.

[0290] 10.Siriwardena M,Campbell V,Richards AM,Pemberton CJ.Cardiac biomarker responses to dobutamine stress echocardiography in healthy volunteers and patients with coronary artery disease.Clin Chem 2012;58:1492-94.

[0291] 11.Giannitsis E,Kurz K,Hallermayer K,Jarusch J,Jaffe AS,Katus

HA.Analytical validation of a high-sensitivity cardiac troponin T assay.Clin Chem 2010;56:254-61.

[0292] 12.Hanley JA,McNeill BJ.A method of comparing the areas under receiver operating characteristic curves derived from the same cases.Radiology 1983;148:839-43.

[0293] 13.Raskovalova T,Twerenbold R,Collinson PO,Keller T,Bouvaist H,Folli C,等人,Diagnostic accuracy of combined cardiac troponin and copeptin assessment for early rule-out of myocardial infarction:a systematic review and meta-analysis.Eur Heart J Acute Cardiovasc Care 2014;3:18-27.

[0294] 14.Patton KK,Ellinor PT,Heckbert S,Christenson RH,DeFilippi C,Gottdiener JS,等人,N-terminal pro-B-type natriuretic peptide is a major predictor of the development of atrial fibrillation:the Cardiovascular Health Study.Circulation2009;120:1768-74.

[0295] 15.Schnabel RB,Larson MG,Yamamoto JF,Sullivan LM,Pencina MJ,Meigs JB,等人,Relations of biomarkers of distinct pathophysiological pathways and atrial fibrillation incidence in the community.Circulation 2010;121:200-207.

[0296] 16.Sinner MF,Stepas KA,Moser CB,Krijthe BP,Aspelund T,Sotoodehnia N,等人,B-type natriuretic peptide and C-reactive protein in the prediction of atrial fibrillation risk:the CHARGE-AF consortium of community based cohort studies.Europace 2014;16:1426-33.

[0297] 17.Hussein AA,Bartz TM,Gottdiener JS,Sotoodehnia N,Heckbert SR,Lloyd-Jones D,等人,Serial measures of cardiac troponin T levels by a highly sensitive assay and incident atrial fibrillation in a prospective cohort of older ambulatory adults.Heart Rhythm 2015:[http://:dx.doi.org/10.1016.j.hrthm.2015.01.020](http://dx.doi.org/10.1016.j.hrthm.2015.01.020)

[0298] 18.Filion KB,Agarwal SK,Ballantyne CM,Eberg M,Hoogeveen RC,Huxley RR,等人,High sensitivity cardiac troponin T and the risk of incident atrial fibrillation:the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study.Am Heart J 2015;169:31-8.

[0299] 19.Mollmann H,Nef HM,Kostin S,Dragu A,Maack C,Weber M,等人,Ischemia triggers BNP expression in the human myocardium independent from mechanical stress.Int J Cardiol 2010;141:265-71.

[0300] 20.Staub D,Jonas N,Zellweger MJ,Nusbaumer C,Wild D,Pfisterer ME,等人,Use of N-terminal pro-B-type natriuretic peptide to detect myocardial ischemia.Am J Med 2005;118:1287.

[0301] 21.Nadir MA,Witham MD,Szwejkowski BR,Struthers AD.Meta-analysis of B-type natriuretic peptide's ability to identify stress induced myocardial ischemia.Am J Cardiol 2011;107:662-67.

[0302] 22.Yip HK,Wu CJ,Hang CL,Chang HW,Yang CH,Hsieh YK,等人,Levels and

values of inflammatory markers in patients with angina pectoris. *Int Heart J* 2005;46:571-81.

[0303] 23. Avramakis G, Papadimitraki E, Papakonstandinou D, Liakou K, Zidianakis M, Dermitzakis A, 等人, Platelets and white blood cell subpopulations among patients with myocardial infarction and unstable angina. *Platelets* 2007;18:16-23.

[0304] 24. Yang N, Feng JP, Chen G, Kou L, Li Y, Ren P, 等人, Variability in lipid profile among patients presented with acute myocardial infarction, unstable angina and stable angina pectoris. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2014;18:3761-66.

[0305] 25. Cheitlin MD, Alpert JS, Armstrong WF, Aurigemma GP, Beller GA, Bierman FZ, 等人, ACC/AHA Guidelines for the Clinical Application of Echocardiography. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee on Clinical Application of Echocardiography). Developed in collaboration with the American Society of Echocardiography. *Circulation* 1997;95:1686-1744.

[0306] 26. Hermann LK, Newman DH, Pleasant A, Rojanasartikul D, Lakoff D, Goldberg SA, 等人, Yield of routine provocative cardiac testing among patients in an emergency department based-chest pain unit. *JAMA Intern Med* 2013;173:1128-33.

[0307] 27. Zeller T, Keller T, Ojeda F, Reichlin T, Twerenbold R, Tzikas S, 等人, Assessment of microRNAs in patients with unstable angina pectoris. *Eur Heart J* 2014;35:2106-14.

[0308] 28. Pemberton CJ, Johnson ML, Yandle TG, Espiner EA. Deconvolution analysis of cardiac natriuretic peptides during acute volume overload. *Hypertension* 2000;36:355-59.

[0309] 29. Zimmermann R, Baki S, Dengler TJ, Ring GH, Remppis A, Lange R, 等人, Troponin T release after heart transplantation. *Br Heart J* 1993;69:395-98.

[0310] 30. Dastjerdi 等人, 2011 *Biotechnology and Applied Biochemistry* 58(4): 226-230

[0311] 31. Phillips 等人, 2008, *Anal Chim Acta* 621:101-108

[0312] 32. Shamah 等人, 2008, *Acc Chem Res* 41:130-138

[0313] 33. Ohuchi 等人, 2006. *Biochimie* 88:897-904

[0314] 34. *Fundamental Immunology*, 第3版, W.E. Paul, 编, Raven Press, N.Y. (1993)

[0315] 35. Wilson (1994) *J. Immunol. Methods* 175:267-273

[0316] 36. Yarmush (1992) *J. Biochem. Biophys. Methods* 25:85-97

[0317] 37. Ward 等人, (1989) *Nature* 341:544-546

[0318] 38. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984)

[0319] 39. *Protein Eng* 8(10) 1057-1062 (1995)

[0320] 40. *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Springer-verlag

1994, Rosenberg and Moore Eds

- [0321] 41. Proc. Natl. Acad. Sci USA 90:6444-6448 (1993)
- [0322] 42. Nature 321:522-525 (1986)
- [0323] 43. Nature 332:323-329 (1988)
- [0324] 44. WO 2005/003154
- [0325] 45. Kohler和Milstein (1975) Nature (5517) 256, 495-497
- [0326] 46. 美国专利号4,196,265
- [0327] 47. 美国专利号4,816,567
- [0328] 48. Lutz等人, (1988) Exp. Cell. Res. 175:109-124
- [0329] 49. Munson等人, (1980) Anal Biochem 107:220
- [0330] 50. 美国专利号4,816,567
- [0331] 51. 美国专利号5,334,708
- [0332] 52. 美国专利号5,821,047
- [0333] 53. 美国专利号7,476,724
- [0334] 54. 美国专利号4,816,567
- [0335] 55. 美国专利号5,843,708
- [0336] 56. 美国专利号6,020,153
- [0337] 57. Nature 352:624-628 (1991)
- [0338] 58. Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, NY (1982).
- [0339] 59. van Erp等人, (1991) J. Immunoassay 12:425-43; Nelson and Griswold (1988) Comput. Methods Programs Biomed. 27:65-8
- [0340] 60. Cwirla等人, (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 6378-82
- [0341] 61. Devlin等人, (1990) Science 249, 404-6
- [0342] 62. Scott和Smith (1990) Science 249, 386-88
- [0343] 63. 美国专利号5,571,698
- [0344] 64. 美国专利号US 6,057,098
- [0345] 65. 美国专利申请号20120225088
- [0346] 66. 美国专利号6,143,576
- [0347] 67. 美国专利号6,113,855
- [0348] 68. 美国专利号6,019,944
- [0349] 69. 美国专利号5,985,579
- [0350] 70. 美国专利号5,947,124
- [0351] 71. 美国专利号5,939,272
- [0352] 72. 美国专利号5,922,615
- [0353] 73. 美国专利号5,885,527
- [0354] 74. 美国专利号5,851,776
- [0355] 75. 美国专利号5,824,799
- [0356] 76. 美国专利号5,679,526

- [0357] 77.美国专利号5,525,524
- [0358] 78.美国专利号5,480,792
- [0359] 79.The Immunoassay Handbook,David Wild,编Stockton Press,New York,1994
- [0360] 80.美国专利号5,631,171
- [0361] 81.美国专利号5,955,377
- [0362] 82.美国专利号7,541,160
- [0363] 83.Hunt等人,Clin.Endocrinol.1997 47:287-296

人心脏组织前BNP原(1-134)

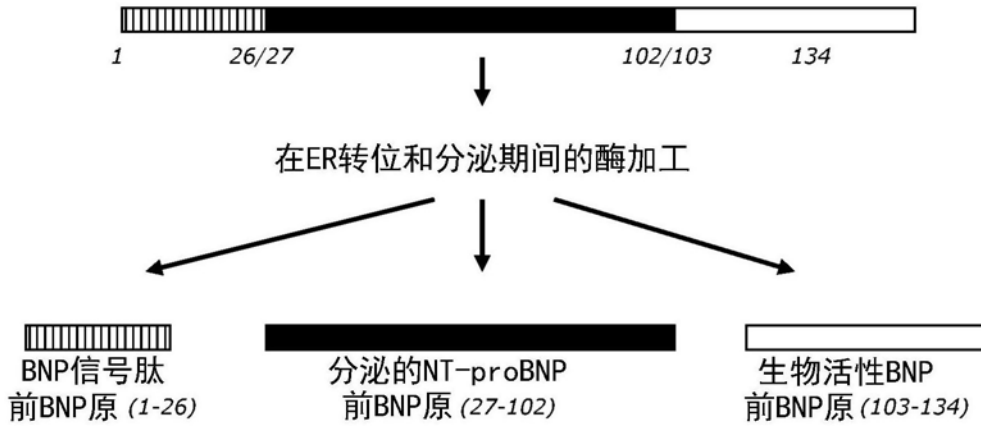


图1

人/1-26	MDPQTAPSRALLLLLFLHLAFLGGRS
猫/1-26	MDPKTALLRALLLLLFLHLSPLGGRS
绵羊/1-26	MDPQKALSR TLLLLLFLHLSLLGCRS
猪/1-25	MGPRMALPR-VLLLLLFLHLLLLGCRS
狗/1-26	MEPCAALPRALLLLLFLHLSPLGGRP
大鼠/1-26	MDLQKVLPMILLLLFLNLSPLGGHS
小鼠/1-26	MDLLKVLSQMILFLLFLYLSPLGGHS

图2

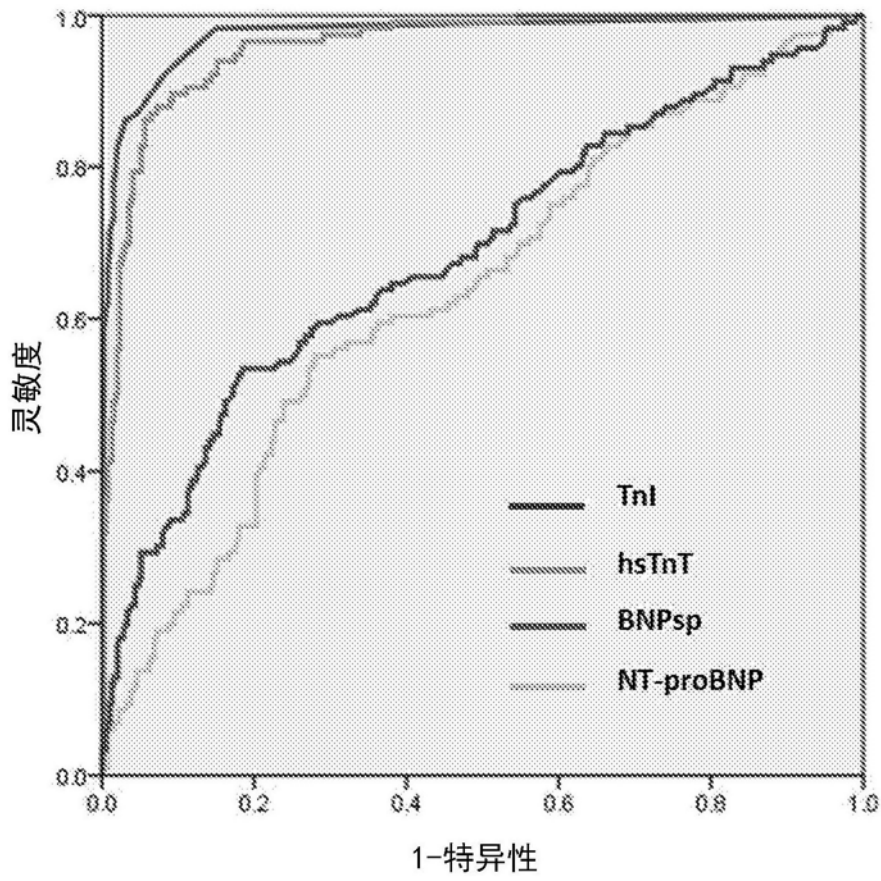


图3

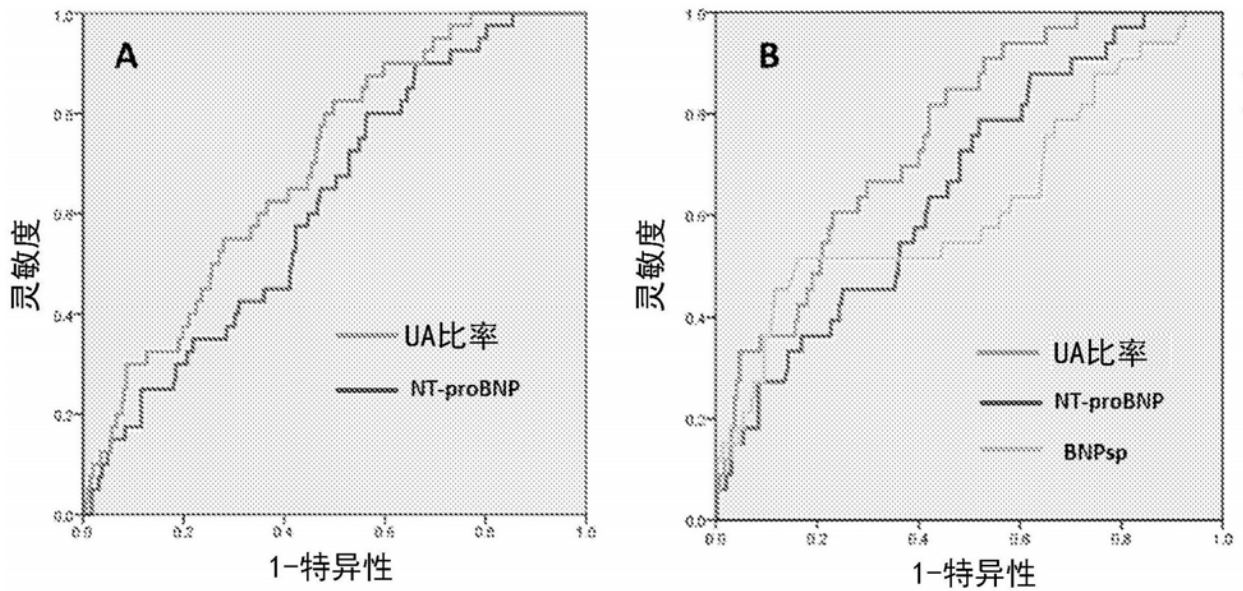


图4

专利名称(译)	不稳定型心绞痛的诊断		
公开(公告)号	CN108780079A	公开(公告)日	2018-11-09
申请号	CN201680082678.6	申请日	2016-12-23
[标]发明人	CJ彭伯顿 AM理查兹		
发明人	C·J·彭伯顿 A·M·理查兹		
IPC分类号	G01N33/48 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/56972 G01N33/6893 G01N33/74 G01N2333/58 G01N2800/325 G01N2800/50 G01N2800/52 G01N33/84 G01N2800/32		
代理人(译)	林晓红		
优先权	62/271928 2015-12-28 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及诊断患者中的不稳定型心绞痛。此外，本发明涉及预测由于发展不稳定型心绞痛导致的患者中的中风和/或心力衰竭的并发症。

