



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105980857 B

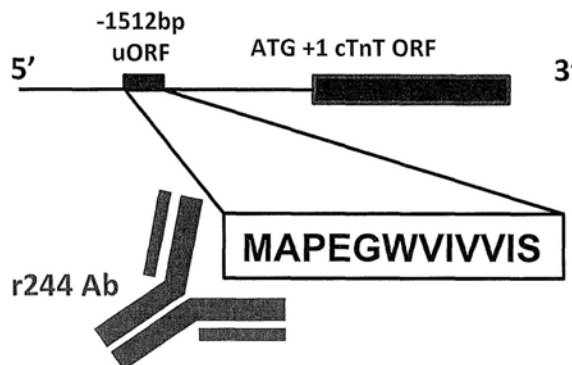
(45)授权公告日 2018.07.13

(21)申请号 201480071218.4
 (22)申请日 2014.11.14
 (65)同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 105980857 A
 (43)申请公布日 2016.09.28
 (30)优先权数据
 61/904,957 2013.11.15 US
 (85)PCT国际申请进入国家阶段日
 2016.06.27
 (86)PCT国际申请的申请数据
 PCT/NZ2014/000234 2014.11.14
 (87)PCT国际申请的公布数据
 WO2015/072865 EN 2015.05.21
 (73)专利权人 奥塔哥创新有限公司
 地址 新西兰丹尼丁
 (72)发明人 J·A·李 C·J·彭伯顿
 (74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所
 11247
 代理人 柴云峰 黄革生
 (51)Int.Cl.
 G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)
 C07K 7/08(2006.01)
 C07K 7/06(2006.01)
 C07K 16/18(2006.01)
 (56)对比文件
 CN 101568837 A,2009.10.28,
 CN 101371144 A,2009.02.18,
 EP 2261669 A1,2010.12.15,
 WO 2008030122 A1,2008.03.13,
 Chris J Pemberton et al..A Novel
 Human Cardiac Troponin T upstream Open
 Reading Frame Peptide Assists in the
 Diagnosis and Prognosis of NSTEMI
 Patients.《Circulation》.2013,
 A University of Otago Company.uORF
 Troponin biomarker to assist in diagnosis
 of acute coronary syndromes.《Otago
 Innovation》.2013,
 C.J. Pemberton et al..A novel
 troponin T peptide in acute breathless
 patients presenting to ED.《European Heart
 Journal》.2014,
 审查员 杨玉路
 权利要求书3页 说明书29页 附图8页

(54)发明名称
 用于心脏病症的生物标记物

(57)摘要
 本发明一般地涉及用于心脏病症预后和/或诊断的测定法、方法和试剂盒。本发明还提供例如针对新的类别循环型心肌钙蛋白T上游可读框(TnTuORF)肽生物标记物的结合剂,其用于预测或诊断除心肌梗死或不稳定型心绞痛之外的心脏病症。此外,本发明的结合剂可以用来增强心肌钙蛋白在心肌梗死的预后和诊断中的灵敏度和假阳性性能。



1. 一种特异性结合通过SEQ ID NO:1-4任一个定义的心脏肌钙蛋白T上游可读框(TnTuORF)肽的结合剂在生产用于预测受试者罹患除心肌梗死或不稳定型心绞痛之外的心脏病症的风险的方法的试剂中的用途,所述方法包括:

(i) 通过检测TnTuORF肽和选择性结合TnTuORF肽的结合剂之间的结合,测量来自受试者的生物样品中通过SEQ ID NO:1-4任一个定义的心脏肌钙蛋白T上游可读框(TnTuORF)肽的水平;并且

(ii) 将心脏TnTuORF肽的测量水平与来自合适对照群体的参考区间比较,

其中与对照群体相比,心脏TnTuORF肽的循环水平增加预示罹患除心肌梗死或不稳定型心绞痛之外的心脏病症。

2. 一种特异性结合通过SEQ ID NO:1-4任一个定义的心脏肌钙蛋白T上游可读框(TnTuORF)肽的结合剂在生产用于诊断受试者中除心肌梗死或不稳定型心绞痛之外的心脏病症的方法的试剂中的用途,所述方法包括:

(i) 通过检测TnTuORF肽和选择性结合TnTuORF肽的结合剂之间的结合,测量来自受试者的生物样品中通过SEQ ID NO:1-4任一个定义的心脏肌钙蛋白T上游可读框(TnTuORF)肽的水平;并且

(ii) 将心脏TnTuORF肽的测量水平与来自合适对照群体的参考区间比较,

其中与对照群体相比,TnTuORF肽的循环水平增加提示除心肌梗死或不稳定型心绞痛之外的心脏病症。

3. 根据权利要求1或权利要求2所述的用途,其中所述方法包括测量来自受试者的第一生物样品中TnTuORF肽的水平并且测量第二生物样品中TnTuORF肽的水平,其中第二生物样品取自与第一生物样品相同的受试者,但在较晚的时间段取得,并且比较第一和第二样品中的TnTuORF肽的水平,其中第一和第二样品之间TnTuORF肽的循环水平增加提示罹患除心肌梗死或不稳定型心绞痛之外的心脏病症的风险增加或提示除心肌梗死或不稳定型心绞痛之外的心脏病症和/或除心肌梗死或不稳定型心绞痛之外的心脏病症持续存在。

4. 根据权利要求1或权利要求2所述的用途,其中结合一个或多个风险因子的分析进行所述方法,所述风险因子包括心率、血红蛋白浓度、血压、年龄、性别、体重、体力活动水平、包括肥胖症事件、糖尿病事件和心脏事件的事件的家族史和循环型肌钙蛋白T和肌钙蛋白I的水平。

5. 根据权利要求4所述的用途,其中所述风险因子包括心率和血红蛋白浓度。

6. 根据权利要求1或权利要求2所述的用途,其中所述方法还包括(iii)对受试者执行治疗方案,其中发现与对照群体中TnTuORF肽的循环水平相比,受试者具有TnTuORF肽的循环水平增加。

7. 一种特异性结合通过SEQ ID NO:1-4任一个定义的心脏肌钙蛋白T上游可读框(TnTuORF)肽的结合剂在生产用于监测受试者对用于除心肌梗死或不稳定型心绞痛之外的心脏病症的药物或疗法治疗的反应性的方法的试剂中的用途,所述方法包括:

(i) 通过检测TnTuORF肽和选择性结合TnTuORF肽的结合剂之间的结合,测量来自受试者的第一生物样品中通过SEQ ID NO:1-4任一个定义的心脏TnTuORF的水平;

(ii) 通过检测TnTuORF肽和选择性结合TnTuORF肽的结合剂之间的结合,测量来自受试者的第二生物样品中通过SEQ ID NO:1-4任一个定义的心脏TnTuORF的水平,其中第二生物

样品取自相同的受试者;并且

(iii) 比较第一和第二样品中心脏TnTuORF的测量水平,

其中第一和第二样品之间心脏TnTuORF水平的增加表明对用于除心肌梗死或不稳定型心绞痛之外的心脏病症的药物或疗法的治疗反应不良并且其中第一和第二样品之间心脏TnTuORF水平的下降表明对用于除心肌梗死或不稳定型心绞痛之外的心脏病症的药物或疗法的治疗积极反应。

8. 根据权利要求1或权利要求2所述的用途,其中所述对照群体是性别和年龄匹配的受试者,所述受试者的心脏病症是已知的。

9. 根据权利要求1或权利要求2所述的用途,其中所述参考区间是来自对照群体的平均循环型TnTuORF肽浓度。

10. 根据权利要求1或权利要求2所述的用途,其中所述心脏病症选自心房纤颤、心力衰竭、心包炎、神经传导障碍、血管迷走神经性晕厥或这些病症任一个的组合。

11. 根据权利要求1或权利要求2所述的用途,其中所述生物样品是体液或心脏组织样品。

12. 根据权利要求11所述的用途,其中所述体液选自血液,包括静脉血和动脉血,血浆,血清和间质液。

13. 根据权利要求1或权利要求2所述的用途,其中所述结合剂是抗体或其抗原结合片段。

14. 根据权利要求13所述的用途,其中所述抗体选自多克隆抗体、单克隆抗体、嵌合抗体或人源化抗体或其抗原结合片段。

15. 根据权利要求14所述的用途,其中所述抗体是单克隆抗体或其抗原结合片段。

16. 根据权利要求13或权利要求14所述的用途,其中所述抗体被固定至固相。

17. 一种特异性结合通过SEQ ID NO:1-4任一个定义的心脏肌钙蛋白T上游可读框(TnTuORF)肽的结合剂在生产用于测量来自受试者的生物样品中通过SEQ ID NO:1-4任一个定义的心脏肌钙蛋白T上游可读框(TnTuORF)肽的水平测定法的试剂中的用途,所述受试者患有除心肌梗死或不稳定型心绞痛之外的心脏病症或处于患有除心肌梗死或不稳定型心绞痛之外的心脏病症的风险,所述测定法包含结合剂,所述结合剂与通过SEQ ID NO:1-4任一个定义的心脏TnTuORF肽选择性结合并且与来自受试者的生物样品中心脏TnTuORF肽结合时可以被定量测量。

18. 根据权利要求17的用途,其中所述测定法包括:

(i) 测量来自受试者的生物样品中通过SEQ ID NO:1-4任一个定义的心脏TnTuORF肽的水平;并且

(i) 将心脏TnTuORF肽的测量水平与来自合适对照群体的参考区间比较,

其中与对照群体相比,心脏TnTuORF肽的循环水平增加预示罹患除心肌梗死或不稳定型心绞痛之外的心脏病症或诊断罹患除心肌梗死或不稳定型心绞痛之外的心脏病症的受试者,并且另外其中测量步骤包括检测心脏TnTuORF肽和选择性结合心脏TnTuORF肽的结合剂之间的结合作用。

19. 根据权利要求17所述的用途,所述测定法是免疫测定法、酶免疫测定法、放射免疫测定法或化学发光测定法。

20. 根据权利要求17所述的用途,其中所述结合剂是抗体或其抗原结合片段。

21. 测量来自受试者的生物样品中通过SEQ ID NO:1-4任一个定义的心脏肌钙蛋白T上游可读框(TnTuORF)肽的水平试剂盒,所述受试者患有除心肌梗死或不稳定型心绞痛之外的心脏病症或处于患有除心肌梗死或不稳定型心绞痛之外的心脏病症的风险,所述试剂盒包含与通过SEQ ID NO:1-4任一个定义的心脏TnTuORF肽选择性结合的结合剂并且所述结合剂与TnTuORF结合时可以定量测量所述结合剂。

22. 根据权利要求21所述的试剂盒,其中所述结合剂是抗体或其抗原结合片段。

23. 根据权利要求21所述的试剂盒,还包含如何测量样品中TnTuORF肽的水平说明书。

24. 选择性结合通过SEQ ID NO:1-4任一个定义的心脏TnTuORF肽的心脏肌钙蛋白T上游可读框(TnTuORF)肽结合剂,用于预测受试者罹患除心肌梗死或不稳定型心绞痛之外的心脏病症的风险。

25. 选择性结合通过SEQ ID NO:1-4任一个定义的心脏TnTuORF肽的心脏肌钙蛋白T上游可读框(TnTuORF)肽结合剂,其用于诊断受试者中除心肌梗死或不稳定型心绞痛之外的心脏病症。

26. 分离的肌钙蛋白T上游可读框(TnTuORF)肽,其由SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4任一个中给出的氨基酸序列组成。

27. 一种选择性结合通过SEQ ID NO:1-4任一个定义的心脏TnTuORF肽的心脏肌钙蛋白T上游可读框(TnTuORF)肽结合剂在生产用于预测心脏事件后受试者中死亡率的测定法的试剂中的用途,所述测定法包含与通过SEQ ID NO:1-4任一个定义的心脏肌钙蛋白T上游可读框(TnTuORF)肽选择性结合的结合剂并且所述结合剂与来自受试者的生物样品中的心脏TnTuORF肽结合时可以被定量测量。

28. 与来自受试者的生物样品中通过SEQ ID NO:1-4任一个定义的心脏TnTuORF肽选择性结合的肌钙蛋白T上游可读框(TnTuORF)肽结合剂,用于预测受试者在心脏事件后的死亡率。

用于心脏病症的生物标记物

技术领域

[0001] 本发明一般地涉及用于心脏病症预后和/或诊断的方法、测定法和试剂盒。

[0002] 发明背景

[0003] 以下包括可以用于理解本发明的信息。不承认具体或隐含提到或援引的任何信息、出版物或文件是现有技术,或对当前描述或要求保护的发明必需。本说明书中提到的全部出版物和专利均通过完整引用的方式并入本文。

[0004] 检测心肌钙蛋白(cTn)的高度灵敏度(hs)测定法的到来已经显著地改变我们对循环中肌钙蛋白的理解并改变其用于诊断急性心肌梗死的各个方面(MI;Thygesen等人(2012)Circulation 126:2020-2035;Keller等人(2009)N.Eng.J.Med.361:868-877;Reichlin等人(2009)N.Eng.J.Med.361:858-867)。这些测定法已经导致心肌梗死(MI)诊断时间的重大改善,但是这以具有高于第99百分位数准则的升高的肌钙蛋白水平,但是实际上未出现MI的患者人数增加为代价(Reichlin等人(2012)Am.J.Med.125:1205-1213;Thygesen等人(2012)Eur.Heart J.33:2252-2257;Hammerer-Lercher等人(2013)J.Am.Heart Assoc.2(3):e000204.doi:10.1161/JAHA.113.000204)。这造成分析特异性显著降低并且因此已经提出几种基于生物标记物的策略以辅助hscTn测量(Eggers等人(2008)Eur.Heart J.29:2327-2335;Haaf等人(2011)Am.J.Med.124:731-739;Maisel等人(2013)J.Am.Coll.Cardiol.62:150-160;Cullen等人(2013)J.Am.Coll.Cardiol.62:1242-1249)。一项克服这些局限性的潜在策略是考虑产生的总潜在心肌钙蛋白,包括上游可读框肽。

[0005] 上游可读框(uORFs)是由蛋白质中主要编码区上游(5')的起始密码子和终止密码子定义的氨基酸编码序列。大约40-50%的人和小鼠转录组含有uORF(Calvo等人(2009)Proc.Natl.Acad.Sci.106:7507-7512;Iacono等人(2005)Gene 349:97-105)并且它们的频率低于偶然性期望(Neafsey等人(2007)Mol.Biol.Evol.24:1744-1751),提示它们处于选择性压力下。然而,uORF在含有转录因子、生长因子、原癌基因及其受体的蛋白质亚组中过度出现(Davuluri等人(2000)Genome Res.10:1807-1816)。除去其复杂性以外,uORF极端多样,在相对于帽和主要ORF AUG的位置、数目/转录物和长度方面变动不定(Calvo等人(2009)Proc.Natl.Acad.Sci.106:7507-7512;Somers等人(2013)Int.J.Biochem.Cell Biol.45:1690-1700)。在哺乳动物细胞中,存在涉及uORF对细胞功能发挥直接翻译作用的有限实验证据并且没有在循环中存在uORF衍生肽的证据。已经记录了单份报告:糖皮质激素受体转录物1A(GR-1A)在其1026bp 5'-UTR中拥有5个uORF起始位点。这些uORF之一编码一种93氨基酸肽,其中所述氨基酸肽在小鼠和人细胞培养物的细胞核、胞质溶胶和质膜中检出并且发现它在促进GR-1A翻译方面发挥作用(Diba等人(2001)J.Cell.Biochem.81:149-161)。

[0006] 申请人在此展示,uORF肽存在于人心肌钙蛋白T(TnT)基因的5'-UTR中并且令人惊讶地提供显示以下情况的首个直接证据:心脏TnTuORF肽的确存在于人循环中并且对其分析定量在心脏病症预后和诊断中及在改善确立的心脏病(包括心肌梗死)生物标记物的灵

敏度和假阳性性能方面具有实用性。

[0007] 发明概述

[0008] 本文中描述和要求保护的发明具有许多属性和实施方案,包括但不限于,这份发明概述中阐述或描述或参考的那些。它不意在涵盖一切并且本文中描述和要求保护的发明不限于这份发明概述中确定的特征或实施方案或受其限制,纳入所述特征或实施方案目的仅在于说明而非限制。

[0009] 本发明一般地涉及用于心脏病预后和/或诊断的测定法、方法和试剂盒。特别地,本发明涉及由肌钙蛋白T的上游可读框编码的新类别循环型生物标记物和对这种肽特异的结合剂在用于例如除心肌梗死或不稳定型心绞痛之外的心脏病预后和/或诊断的测定法、方法和试剂盒中的用途。

[0010] 在本发明的一个方面提供一种预测受试者罹患除心肌梗死或不稳定型心绞痛之外的心脏病症的风险的方法,所述方法包括:

[0011] (i) 测量来自受试者的生物样品中肌钙蛋白T上游可读框 (TnTuORF) 肽的水平;并且

[0012] (ii) 将TnTuORF肽的测量水平与来自合适对照群体的参考区间比较,

[0013] 其中与对照群体相比,TnTuORF肽的循环水平增加预示罹患除心肌梗死或不稳定型心绞痛之外的心脏病症,并且另外其中测量步骤包括检测TnTuORF肽和与TnTuORF肽选择性结合的结合剂之间的结合作用。

[0014] 在一个实施方案中,该方法还包括步骤(iii)对受试者执行治疗方案,其中发现与来自对照群体的TnTuORF肽的循环水平相比,受试者具有TnTuORF肽的循环水平增加。

[0015] 在另一个实施方案中,该方法还包括测量来自受试者的第一生物样品中TnTuORF肽的水平并且测量第二生物样品中TnTuORF肽的水平,其中第二生物样品取自与第一生物样品相同的受试者,但在较晚的时间段取得,并且比较第一和第二样品中的TnTuORF肽的水平,其中第一和第二样品之间TnTuORF肽的循环水平增加表明罹患除心肌梗死或不稳定型心绞痛之外的心脏病症的风险增加。

[0016] 在本发明的另一个方面提供一种诊断受试者中罹患除心肌梗死或不稳定型心绞痛之外的心脏病症的风险的方法,所述方法包括:

[0017] (i) 测量来自受试者的生物样品中肌钙蛋白T上游可读框 (TnTuORF) 肽的水平;并且

[0018] (ii) 将TnTuORF肽的测量水平与来自合适对照群体的参考区间比较,

[0019] 其中与对照群体相比,TnTuORF肽的循环水平增加提示除心肌梗死或不稳定型心绞痛之外的心脏病症,并且另外其中测量步骤包括检测TnTuORF肽和与TnTuORF肽选择性结合的结合剂之间的结合作用。

[0020] 在一个实施方案中,该方法还包括步骤(iii)对受试者执行治疗方案,其中发现与来自对照群体的TnTuORF肽的循环水平相比,受试者具有TnTuORF肽的循环水平增加。

[0021] 在根据本发明任何方面的另一个实施方案中,测量生物样品中的TnTuORF肽可以进行多于一次。例如,可以在涵盖数小时、数天、数周、数月或数年的一段时间进行一次、两次、三次、四次、五次、十次、十五次等测量。

[0022] 在又一个实施方案中,该方法包括测量来自受试者的第一生物样品中TnTuORF肽

的水平并且测量第二生物样品中TnTuORF肽的水平,其中第二生物样品取自与第一生物样品相同的受试者,但在较晚的时间段取得,并且比较第一和第二样品中的TnTuORF肽的水平,其中第一和第二样品之间TnTuORF肽的循环水平增加表明除心肌梗死或不稳定型心绞痛之外的心脏病症和/或除心肌梗死或不稳定型心绞痛之外的心脏病症持续存在。

[0023] 根据本发明任何方面的在某些实施方案中,除心肌梗死或不稳定型心绞痛之外的心脏病症包括例如心房纤颤、心力衰竭、心包炎、血管迷走神经性晕厥、神经传导障碍及其组合。

[0024] 在本发明的又一个方面提供一种监测受试者对用于除心肌梗死或不稳定型心绞痛之外的心脏病症的药物或疗法治疗的反应性的方法,所述方法包括:

[0025] (i) 测量来自受试者的第一生物样品中TnTuORF肽的水平;

[0026] (ii) 测量来自受试者的第二生物样品中TnTuORF肽的水平,其中第二生物样品取自相同的受试者;并且

[0027] (iii) 比较第一和第二样品中TnTuORF肽的测量水平,

[0028] 其中第一和第二样品之间TnTuORF肽水平的增加表明对用于除心肌梗死或不稳定型心绞痛之外的心脏病症的药物或疗法治疗反应不良并且其中第一和第二样品之间TnTuORF肽水平的下降表明对用于除心肌梗死或不稳定型心绞痛之外的心脏病症的药物或疗法的治疗的积极反应。

[0029] 取决于待治疗的心脏病症,可能的是第一和第二样品之间TnTuORF肽的水平增加表明对用于除心肌梗死或不稳定型心绞痛之外的心脏病症的药物或疗法的积极反应。换句话说,第一和第二样品之间TnTuORF肽的水平降低表明对用于除心肌梗死或不稳定型心绞痛之外的心脏病症的药物或疗法的反应不良。

[0030] 因此,在本发明的又一个方面提供一种监测受试者对用于除心肌梗死或不稳定型心绞痛之外的心脏病症的药物或疗法治疗的反应性的方法,所述方法包括:

[0031] (i) 测量来自受试者的第一生物样品中TnTuORF肽的水平;

[0032] (ii) 测量来自受试者的第二生物样品中TnTuORF肽的水平,其中第二生物样品取自相同的受试者;并且

[0033] (iii) 比较第一和第二样品中TnTuORF肽的测量水平,

[0034] 其中第一和第二样品之间TnTuORF肽水平的下降表明对用于除心肌梗死或不稳定型心绞痛之外的心脏病症的药物或疗法治疗反应不良并且其中第一和第二样品之间TnTuORF肽水平的增加表明对用于除心肌梗死或不稳定型心绞痛之外的心脏病症的药物或疗法治疗积极反应。

[0035] 在根据本文公开的任何方法的其他实施方案中,测量步骤包括检测TnTuORF肽和与TnTuORF肽选择性结合的结合剂之间的结合。在一个实施方案中,结合剂是抗体或其抗原结合片段。在另一个实施方案中,抗体是单克隆抗体或其抗原结合片段。在其他实施方案中,使用固定至固相的抗体测量与TnTuORF肽的结合。

[0036] 在本发明的又一个方面,提供一种测量来自受试者的生物样品中肌钙蛋白T上游可读框(TnTuORF)肽的水平的测定法,所述受试者患有除心肌梗死或不稳定型心绞痛之外的心脏病症或处于患有除心肌梗死或不稳定型心绞痛之外的心脏病症的风险,所述测定法包含与TnTuORF肽选择性结合并且与TnTuORF肽结合时可以定量测量的结合剂。

[0037] 在本发明的又一个方面提供一种测量来自受试者的生物样品中肌钙蛋白T上游可读框 (TnTuORF) 肽的水平试剂盒, 所述受试者患有除心肌梗死或不稳定型心绞痛之外的心脏病症或处于患有除心肌梗死或不稳定型心绞痛之外的心脏病症的风险, 所述测定法包含与TnTuORF肽选择性结合的结合剂并且所述结合剂与TnTuORF结合时可以定量测量所述结合剂。

[0038] 在本发明的另一个方面提供一种选择性结合TnTuORF肽的肌钙蛋白T上游可读框 (TnTuORF) 肽结合剂, 其用于预测受试者罹患除心肌梗死或不稳定型心绞痛之外的心脏病症的风险。

[0039] 在本发明的又一个方面提供一种选择性结合TnTuORF肽的肌钙蛋白T上游可读框 (TnTuORF) 肽结合剂, 其用于诊断受试者中除心肌梗死或不稳定型心绞痛之外的心脏病症。

[0040] 在本发明的另一个方面提供与TnTuORF肽选择性结合的肌钙蛋白T上游可读框 (TnTuORF) 肽结合剂在制造药物中的用途, 所述药物用于预测受试者罹患除心肌梗死或不稳定型心绞痛之外的心脏病症的风险。

[0041] 在本发明的又一个方面提供与TnTuORF肽选择性结合的肌钙蛋白T上游可读框 (TnTuORF) 肽结合剂在制造药物中的用途, 所述药物用于诊断受试者中除心肌梗死或不稳定型心绞痛之外的心脏病症。

[0042] 在本发明的又一个方面提供分离的肌钙蛋白T上游可读框 (TnTuORF) 肽。

[0043] 在一个实施方案中, TnTuORF肽选自SEQ ID NOS: 1、2、3或4任一项中所述的肽。

[0044] 在本发明的另一个方面提供一种用于改善心肌钙蛋白在预测受试者的心肌梗死风险方面的灵敏度和假阳性性能的测定法, 所述测定法包含与肌钙蛋白T上游可读框 (TnTuORF) 肽选择性结合并且所述结合剂与来自受试者的生物样品中的TnTuORF肽结合时可以定量测量所述结合剂。

[0045] 在本发明的又一个方面提供一种用于改善心肌钙蛋白在诊断受试者中心肌梗死方面的灵敏度和假阳性性能的测定法, 所述测定法包含与肌钙蛋白T上游可读框 (TnTuORF) 肽选择性结合的结合剂并且所述结合剂与来自受试者的生物样品中的TnTuORF肽结合时可以定量测量所述结合剂。

[0046] 在根据任何一个方面的一个实施方案中, 心肌钙蛋白包括肌钙蛋白T和肌钙蛋白I。在另一个实施方案中, 测定法包括计算心肌钙蛋白和TnTuORF肽之间的产物比率。

[0047] 在本发明的又一个方面, 提供一种用于预测心脏事件后受试者中死亡率的测定法, 所述测定法包含与肌钙蛋白T上游可读框 (TnTuORF) 肽选择性结合的结合剂并且所述结合剂与来自受试者的生物样品中的TnTuORF肽结合时可以定量测量所述结合剂。

[0048] 在本发明的又一个方面提供一种用于改善N-末端脑利尿钠肽 (NT-proBNP) 在预测受试者在心脏事件后罹患急性失代偿性心力衰竭的风险方面的灵敏度和假阳性性能的测定法, 所述测定法包含与肌钙蛋白T上游可读框 (TnTuORF) 肽选择性结合的结合剂并且所述结合剂与来自受试者的生物样品中的TnTuORF肽结合时可以定量测量所述结合剂。

[0049] 在本发明的又一个方面提供一种用于测量来自受试者的生物样品中肌钙蛋白T上游可读框 (TnTuORF) 肽水平用于改善心肌钙蛋白在预测或诊断受试者中心肌梗死方面的灵敏度和假阳性性能的试剂盒, 所述试剂盒包含与TnTuORF肽选择性结合的结合剂并且所述结合剂与TnTuORF结合时可以定量测量所述结合剂。

[0050] 在本发明的又一个方面提供一种测量来自受试者的生物样品中肌钙蛋白T上游可读框(TnTuORF)肽的水平用于改善N-末端脑利尿钠肽(NT-proBNP)预测受试者在心脏事件后罹患急性失代偿性心力衰竭的风险方面的灵敏度和假阳性性能的试剂盒,所述试剂盒包含与TnTuORF肽选择性结合的结合剂并且所述结合剂与TnTuORF结合时可以定量测量所述结合剂。

[0051] 在本发明的又一个方面提供一种与来自受试者的生物样品中TnTuORF肽选择性结合的肌钙蛋白T上游可读框(TnTuORF)肽结合剂,其用于改善心肌钙蛋白在预测或诊断受试者中心肌梗死方面的灵敏度和假阳性性能。

[0052] 在本发明的又一个方面提供一种与来自受试者的生物样品中TnTuORF肽选择性结合的肌钙蛋白T上游可读框(TnTuORF)肽结合剂,其用于预测受试者在心脏事件后的死亡率。

[0053] 在本发明的又一个方面提供一种与来自受试者的生物样品中TnTuORF肽选择性结合的肌钙蛋白T上游可读框(TnTuORF)肽结合剂,其用于改善N-末端脑利尿钠肽(NT-proBNP)预测受试者在心脏事件后罹患急性失代偿性心力衰竭的风险方面的灵敏度和假阳性性能。

[0054] 附图简述

[0055] 图1显示TnTuORF及r244抗血清的基因位置和表位设计。编码人心肌钙蛋白T(NCBI检索号NG_007556)的主要可读框(ORF)由(ATG+1 cTnT ORF)指示。在距cTnT ORF的5'上游-1512碱基对(bp)处,存在编码具有序列MAPEGWVIVVIS的推定性12氨基酸肽(TnTuORF)的uORF。申请人在兔中产生用于免疫测定法中的针对TnTuORF的氨基末端的多克隆抗血清(r244)。

[0056] 图2显示了与合成性TnTuORF肽标准曲线(闭合圆圈)相比,展示人静脉血浆的平行稀释度(空心圆圈;显示稀释度)的代表性TnTuORF免疫测定法曲线。

[0057] 图3显示109份正常健康志愿者血浆样品中免疫反应性(IR)TnTuORF的浓度,如通过与肌酐的统计学显著(按Spearman秩相关分析, $r=0.201$, $p<0.05$)负相关性展示。

[0058] 图4显示接受临床适用的心脏导管插入术的16位患者中IR TnTuORF(上半小图)和免疫反应性hsTnT(下半小图)的区域性动脉-静脉浓度。静脉浓度是灰色条形,其中深色条形是比较器官对循环水平潜在贡献作用的时间匹配的动脉样品。FV=股静脉,RV=肾静脉,HV=肝静脉,IVC=下腔静脉,JUG=颈静脉,CS=心脏冠状窦,PA=肺动脉。条形是平均数 \pm SD,*= $p<0.05$,**= $p<0.01$,按配对t-检验。

[0059] 图5显示人循环中免疫反应性TnTuORF的高效液相层析(HPLC)。(A)从人血浆免疫亲和纯化的TnTuORF,其在反相HPLC上作为两个峰(I和II)洗脱。如图所示,洗脱的峰II与合成性TnTuORF肽一致。灰线表明乙腈的浓度。(B)来自小图A的免疫反应性峰I和II的大小排阻HPLC揭示出峰II具有约1.5千道尔顿(k)的表观 M_r ,与TnTuORF理论分子量(预测的 M_r 1.3k)一致。峰I具有约1k的表观 M_r ,与羧基末端缩短形式一致。箭头指示校正肽的分子量值。 V_t =柱总体积。

[0060] 图6显示从医院就诊至就诊后72小时4位ST升高MI患者的静脉血中TnTuORF(小图A)和hsTnT(小图B)的伴同免疫反应性(IR)浓度。数据是平均数 \pm SD。

[0061] 图7显示NTproBNP、TnTuORF和TnTuORF+Hb+心率(HR)变量诊断其他心脏病状($n=$

26) 的性能的接受者操作曲线 (ROC) 分析图。

[0062] 图8显示hsTnT和肌钙蛋白PLUS诊断急性NSTEMI (n=96) 的性能的接受者操作曲线 (ROC) 分析图。

[0063] 图9显示接受者操作曲线 (ROC) 分析图, 其显示24小时NTproBNP和NTproBNPxTnTuORF预测指数入院1年内因急性失代偿性心力衰竭再入院 (n=10) 的预后能力。

[0064] 定义

[0065] 概述

[0066] 除非另外具体限定, 否则本文所用的全部技术术语和科学术语应当理解为具有如本发明所属领域 (例如, 免疫学、免疫组织化学、蛋白质化学和生物化学领域) 的普通技术人员共同理解的相同意思。

[0067] 除非另外说明, 否则本发明中利用的重组蛋白和免疫学技术是本领域技术人员熟知的标准程序。这类技术在作为来源的以下文献中全面描述和解释, 如J. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and Sons (1984), J. Sambrook等人, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), T.A. Brown (编者), Essential Molecular Biology: A Practical Approach, 第1和第2卷, IRL Press (1991), D.M. Glover和B.D. Hames (编者), DNA Cloning: A Practical Approach, 第1-4卷, IRL Press (1995年和1996年), 和F.M. Ausubel等人, (编者), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988, 包括至今的全部更新), Ed Harlow和David Lane (编者) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, (1988), 和J.E. Coligan等人 (编者) Current Protocols in Immunology, John Wiley&Sons (包括至今的全部更新)。

[0068] 术语“和/或”, 例如“X和/或Y”应当理解为意指“X和Y”或“X或Y”并且应当视作为两种意思或任一种意思提供明确支持。

[0069] 在整个这份说明书范围内, 除非另外特别声明, 或者另外上下文要求, 对单个步骤、主题组合物、步骤群组、主题组合物群组的提及应当理解为涵盖一个和多个 (即一种或多种) 的这些步骤、主题组合物、步骤群组、主题组合物群组。

[0070] 谈及本文公开的数字范围 (例如, 1至10) 还意在包括谈及该范围内部的全部相关数字 (例如, 1、1.1、2、3、3.9、4、5、6、6.5、7、8、9和10) 并且还意在谈及该范围内的任何有理数范围 (例如, 2至8, 1.5至5.5, 和3.1至4.7), 并且因此, 明确公开本文中明确所公开的全部范围的全部子范围。这些仅是具体意指的例子并且在所列举的最低值和最高值之间的全部可能数值组合均视为在本申请中以相似方式明确陈述。

[0071] 在整个这份说明书范围内, 词“包含”, 或变型如“包括”或“包含着”, 将理解为暗示包含所述的要素、整数或步骤, 或者要素、整数或步骤群组, 但是不排斥任何其他要素、整数或步骤, 或者要素、整数或步骤群组。

[0072] 本领域技术人员将理解除了具体描述的那些内容之外, 本文中所述的本发明易于进行变化和修改。应当理解本发明包括全部此类变化和修改。本发明也分别或总体地包括在本说明书中提及或显示的全部步骤、特征、组合物和化合物, 以及任意和全部组合或任意两个或多个所述步骤或特征。

[0073] 本发明不限于本文所述具体实施方案的范围,所述具体实施方案仅意在起到示例目的。如本文所述,功能等同的产物、组合物和方法显然处于本发明的范围内。

[0074] 除非另外特别声明,否则在已作必要修正的情况下,本文的任何实施方案应当适用于任何其他实施方案。

[0075] 选择的定义

[0076] 在整个这份说明书范围内,术语“TnTuORF”意指肌钙蛋白T上游可读框肽。在本说明书中,术语“TnTuORF”和“TnTuORF肽”互换使用,并且意指在循环中作为独立化学实体存在并且由肌钙蛋白T基因上游可读框编码的任何肽。

[0077] 本发明的术语“除急性心肌梗死或不稳定型心绞痛之外的心脏病症”包括任何除心肌梗死或不稳定型心绞痛之外的心脏病症,并且例如包括心房纤颤、心力衰竭、心包炎、神经传导障碍及其组合。

[0078] 如本文所用的术语“生物样品”包括生物流体,其选自血液(包括静脉血和动脉血)、血浆、血清、间质液或任何其他体液。术语“生物样品”还包括心脏组织样品。如本文所用的术语“生物样品”和“体液样品”指出于例如诊断、预后、分级或评价目的受试者(如患者)目的所获得的生物样品或体液样品。在某些实施方案中,可以获得这种样品用于诊断除心肌梗死或不稳定型心绞痛之外的心脏病症、用于进行除心肌梗死或不稳定型心绞痛之外的心脏病症的风险分级、用于对除心肌梗死或不稳定型心绞痛之外的心脏病症患者中的病程形成预后、用于鉴定除心肌梗死或不稳定型心绞痛之外的心脏病症风险升高的患者或其组合。此外,本领域技术人员会认识到,在分级分离或纯化流程(例如,将全血分离成血清或血浆组分)后将更轻易地分析某些体液样品。

[0079] 如本文所用的术语“水平”意指数量/重量或重量/重量的TnTuORF。它还意在涵盖表述为数量/体积或重量/体积的“浓度”。术语“循环水平”意指循环体液中存在的TnTuORF肽的数量/重量或重量/重量或浓度。

[0080] 在一个实施方案中,TnTuORF肽(或该物质的任何其他生物标记物)的循环水平与对照相比“增加”或“下降”或距对照(水平)的“变化”或“偏差”是统计学显著的。如果与对照相比水平,增加的水平、降低的水平、距对照水平或平均或历史对照水平的偏差或变化与对照水平差异约5%或更大、约10%或更大、约20%或更大或约50%或更大,可以视为存在所述增加的水平、降低的水平、距对照水平或平均或历史对照水平的偏差或变化。统计学显著性可以备选地计算为 $P \leq 0.05$ 。增加的水平、降低的水平、偏差或变化也可以借助测定法参考限值或参考区间来确定。这些可以从直觉评定或非参数方法计算。总之,这些方法可以将0.025分位数和0.975分位数计算为 $0.025 * (n+1)$ 和 $0.975 * (n+1)$ 。这类方法是本领域熟知的。对照中不存在的标志物的出现可以视为较高的水平、偏差或变化。对照中存在的标志物不出现可以视为较低的水平、偏差或变化。

[0081] 具体而言,如本文所用的术语“参考区间”意指在代表性浓度的统计限值范围内的数值或备选地,具有上限或下限浓度的数值。参考区间一般将从未罹患可能导致人为升高循环型TnTuORF水平的任何预存病状的受试者获得。这些病状在本文他处讨论。

[0082] 如本文所用的术语“ $\Delta\%$ ”理解成指给定变量(即TnTuORF肽的水平或浓度)的变化百分数。通过以下方式确定 $\Delta\%$:取得生物样品中TnTuORF肽的终浓度、扣减TnTuORF肽的初始浓度并将它除以TnTuORF肽的初始浓度,其中结果表述为百分数。因此,通过非限制性例

子,从初始浓度800pmol/mL的300pmol/mL增量代表37.5%变化。

[0083] 为了清晰目的,31-39 Δ %增量例如包括31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%或39 Δ %增量,以及其间的分数。

[0084] 如本文所用的术语“受试者”意在指人类或非人灵长类。在一个实施方案中,受试者是人。

[0085] 本发明的术语“合适的对照群体”指来自已知其心脏病症信息的性别匹配和年龄匹配的受试者的平均循环型TnTuORF肽水平。对照群体用来提供合适参考区间,测量的TnTuORF肽水平与之进行比较。

[0086] 如本文所用的术语“结合剂”意指结合TnTuORF肽的任何分子,包括小分子、来自任何物种的抗体(无论是多克隆或单克隆)、抗原结合片段如Fab和Fab₂、人源化抗体、嵌合抗体、或以其他方式修饰(包括氨基酸置换和/或与其他肽或蛋白质(例如PEG)融合)的抗体。它还包括来自任何物种的受体或结合蛋白或其修饰形式。在一个例子中,结合剂与TnTuORF特异性结合。

[0087] 如本文所用的术语“特异性结合”应当意指,结合剂与特定物质比它与备选物质更频繁、更快速、持续时间更长和/或以更大亲和力反应或缔合。例如,与TnTuORF特异性结合的结合剂与这种蛋白质或其表位或免疫原性片段以它与不相关蛋白质和/或其表位或免疫原性片段结合相比更大亲和力、亲合力、更轻易和/或持续时间更长地结合。通过阅读这个定义,还理解例如与第一靶(例如TnTuORF)特异性结合的结合剂可以与第二靶特异性结合或可以与之不特异性结合。因而,“特异性结合”不必然地要求排他性结合或不可检测地结合另一个分子。通常,但不必然地,对结合的提及意指特异性结合。

[0088] 术语“抗体”指能够通过含于至少一个可变区内部的抗原结合位点与靶如TnTuORF特异性结合的免疫球蛋白分子。本术语包括4链抗体(例如,两条轻链和两条重链)、重组或修饰的抗体(例如,嵌合抗体、人源化抗体、灵长类化抗体、去免疫化抗体、半抗体、双特异性抗体)和单结构域抗体如结构域抗体和单一重链抗体(例如,骆驼抗体或软骨鱼免疫球蛋白新抗原受体(IgNAR))。抗体通常包含可以布置入恒定区或恒定片段或可结晶片段(Fc)中的恒定结构域。优选的抗体形式包括4链结构作为其基本单元。全长抗体包含共价连接的两条重链(约50-70kDa)和两条轻链(各自约23kDa)。轻链通常包含可变区和恒定结构域并且在哺乳动物中是κ轻链或λ轻链。重链通常包含可变区和由铰链区连接至额外恒定结构域的一个或两个恒定结构域。哺乳动物的重链属于以下类型之一:α、δ、ε、γ或μ。每条轻链还与重链之一共价连接。例如,两条重链和重链和轻链由链间二硫键并通过非共价相互作用结合在一起。链间二硫键的数目可以在不同类型的抗体之间变动。每条链具有N-末端可变区(各自长约110个氨基酸的V_H或V_L)和在C末端的一个或多个恒定结构域。轻链的恒定结构域(约110个氨基酸长度的C_L)与重链的第一恒定结构域对其并与之二硫键连接(约330-440个氨基酸长度的C_H)。轻链可变区与重链可变区对齐。抗体重链可以包含2或更多个额外C_H结构域(如,C_H2、C_H3等)并且可以包含可在C_H1恒定结构域和C_m恒定结构域之间鉴定的铰链区。抗体可以属于任何类型(例如,IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、类别(例如,IgG 1、IgG2、IgG 3、IgG4、IgA1和IgA2)或亚类。在一个例子中,抗体是鼠(小鼠或大鼠)抗体或灵长类(优选地人)抗体。术语“抗体”不仅涵盖完整的多克隆或单克隆抗体,还涵盖变体、包含具有抗原结合位点的抗体部分的融合蛋白、人源化抗体、人抗体、嵌合抗体、灵长类化抗体、去免疫化抗

体或贴面抗体。

[0089] 术语“抗原结合片段”应当意指保留与TnTuORF结合的能力的任何抗体片段并且优选地指与TnTuORF特异性结合的那种。本术语包括Fab片段、Fab'片段、F(ab')片段、单链抗(SCA或SCAB)等。“Fab片段”由抗体分子的单价抗原结合片段组成,并且可以通过用木瓜蛋白酶消化完整抗体分子产生,以产生由完整轻链和一部分重链组成的片段。抗体分子的“Fab'片段”可以通过以下方式获得:用胃蛋白酶处理完整抗体分子,接着还原,以产生由完整轻链和一部分重链组成的片段。以这种方式处理的每个抗体分子获得两个Fab'片段。抗体的“F(ab')₂片段”由借助两个二硫键结合在一起的两个Fab'片段的二聚体组成,并且通过用胃蛋白酶消化完整抗体分子,无后续还原情况下获得。“Fv片段”是表达为两条链的含有轻链可变区和重链可变区的基因工程化片段。“单链抗体”(SCA)是含有由合适、柔性多肽接头连接的轻链可变区和重链可变区的基因工程化单链分子。

[0090] 术语“嵌合抗体”指这类抗体,在所述抗体中重链和/或轻链的部分与源自特定物种(例如,鼠,如小鼠)或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,同时所述链的其余部分与源自另一个物种(例如,灵长类,如人)或属于另一个抗体类别或亚类的抗体以及这种抗体的片段中的相应序列相同或同源,只要它们展示想要的生物活性(美国专利号4,816,567;和Morrison等人,(1984)Proc.Natl Acad.Sci USA 81:6851-6855)。

[0091] 术语“人源化抗体”应当理解成指通常使用重组技术制备的嵌合分子,所述嵌合分子具有衍生自非人类物种免疫球蛋白的表位结合位点和基于人免疫球蛋白结构和/或序列的分子的剩余免疫球蛋白结构。抗原结合位点优选地包含来自非人类抗体的嫁接到人抗体可变结构域中适宜的构架区上的互补决定区(CDR)和来自人抗体的剩余区域。表位结合位点可以是野生型的或通过一个或多个氨基酸置换进行修饰。已知重链和轻链的可变区均含有在响应于所讨论的表位方面变动并且决定结合能力的三个互补性决定区(CDR),其旁侧分布4个构架区(FR),所述构架区在给定物种中相对保守并且推定性为CDR提供支架。当相对于特定表位制备非人抗体时,可以通过在待修饰的人抗体存在的FR上移植衍生自非人抗体的CDR,“再塑造”或“人源化”可变区。

[0092] 术语“表位”包括能够与抗体和/或T细胞受体特异性结合的任何抗原(例如,蛋白质)决定簇。即,抗原上B和/或T细胞响应的位点。表位决定簇通常由化学活跃的表面成组分子如氨基酸或糖侧链组成并且通常具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。表位一般例如包括至少3、5或8-10个氨基酸。氨基酸可以是连续氨基酸或通过立体折叠并置的不连续氨基酸。构象型表位和非构象型表位的区分在于,对前者而非对后者的结合作用在变性溶剂存在的情况下丧失。

[0093] 如本文所用,术语“抗原性变体”指与具体鉴定的序列不同的多肽序列,其中缺失、置换或添加一个或多个氨基酸残基。具体构思置换、添加或缺失1、2、3或4个氨基酸。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。变体可以来自相同物种或来自其他物种并且可以涵盖同源物、旁系同源物和直向同源物。在某些实施方案中,可用于本发明中的多肽的抗原性变体具有生物活性,包括与亲本多肽相同或相似的激素功能或抗原性结合特性。提及(多)肽的术语“抗原性变体”涵盖全部形式的如本文定义的多肽。术语“抗原性变体”涵盖天然存在的、重组和合成产生的多肽。

[0094] 除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鉴定

多肽抗原性变体,例如,通过使用针对本发明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)、通过还由Sambrook等人描述的重组DNA技术或通过借助这类抗体从天然来源鉴定多肽。

[0095] 发明详述

[0096] 本文所述的肌钙蛋白T上游可读框(TnTuORF)肽和结合剂在除心肌梗死或不稳定型心绞痛之外的心脏病症预后或诊断的测定法、方法和试剂盒中的用途在检测例如心房纤颤、心力衰竭、心包炎、神经传导障碍、血管迷走神经性晕厥及其组合的早期发作中具有明显的临床意义(在Thygesen等人(2012)Circulation 126:2020-2035中定义;第2024页上表I)。本文所述的发明为临床医生提供将受试者分层的能力,所述受试者可能潜在地面临心脏病症风险或现有心脏病症加重的风险。另外,本公开的方法、测定法和试剂盒为临床医生提供监测受试者对现有疗法的反应性的手段。例如,通过测量在受试者中随时间推移的TnTuORF水平,临床医生可以监测受试者对疗法或治疗的反应。

[0097] 进一步,本发明指向涉及对TnTuORF肽特异的结合剂的测定法、方法和试剂盒,所述测定法、方法和试剂盒用于改善心肌钙蛋白在预测或诊断心肌梗死中的灵敏度和假阳性性能、用于改善NT-proBNP在预测受试者在心脏事件后因急性失代偿性心力衰竭再入院的风险方面的灵敏度和假阳性性能以及预测受试者在心脏事件后死亡率方面的灵敏度和假阳性性能。

[0098] 考虑以下详细描述,本文所述的发明将变得显而易见。

[0099] TnTuORF肽在人循环中存在

[0100] 申请人起初力图证实其假设:由心肌钙蛋白的上游可读框编码的肽作为不同和独立的生物标记物在循环中存在并且尤其在人血浆中存在。

[0101] 在心肌钙蛋白基因的详细生物信息学分析后,申请人鉴定了一个位于心肌钙蛋白T主要启动密码子-1512bp(即上游)的可读框(ORF)(图1)。Kozak评分为+2并且高度可能被翻译,申请人预测这个上游可读框(uORF)应当编码一种推定性12氨基酸肽并且力图使用免疫组织化学证实其存在。

[0102] 申请人起初产生针对具有预测序列MAPEGWVIVVIS(SEQ ID NO:1)的推定性12氨基酸肽的氨基末端的多克隆抗体。这种抗体(r244)展示与其他已知和建立的循环型肽和/或药物的交叉反应性低或无交叉反应性,并且重要地,所述肽和/或药物例如包括心脏肌钙蛋白T和心脏肌钙蛋白I、N-末端脑利尿钠肽(NT-proBNP)和成熟形成的脑利尿钠肽(BNP;实施例2中的表III)。

[0103] r244多克隆抗体随后用来开发灵敏和特异性放射免疫测定法。图2显示代表性TnTuORF免疫测定曲线,所述曲线与合成性TnTuORF肽标准曲线相比显示人静脉血浆(从健康成人受试者的外周血获得)的平行稀释度。这些数据提供首个直接证据以说明循环中作为不同化学实体存在的肽存在,所述肽由上游可读框编码性序列(在这种情况下肌钙蛋白T的uORF)编码。

[0104] 进一步并且重要地,TnTuORF与高灵敏度肌钙蛋白T(hsTnT)水平、年龄、血压和身体质量指数没有相关性。

[0105] 申请人接下来力图通过与免疫测定法偶联的反相高效液相层析(RP-HPLC)和大小

排阻高效液相层析(SE-HPLC),鉴定通过免疫测定法检出的TnTuORF种类(图5)。这些分析的结果证实,免疫反应性TnTuORF在人血浆中作为(i)完整12氨基酸肽(即MAPEGWVIVVIS;SEQ ID NO:1)和(ii)羧基末端缩短形成存在,所述羧基末端缩短形成包括但不限于MAPEGWVIVVI(SEQ ID NO:2)、MAPEGWVIVV(SEQ ID NO:3)和MAPEGWVIV(SEQ ID NO:4)。

[0106] TnTuORF作为心脏病症的生物标记物

[0107] 已经确立免疫反应性TnTuORF实际上存在于人循环中,申请人随后力图确定其在心脏病症(包括急性冠状动脉综合征)中的潜在临床用途。起初,从四个独立队列招募患者,即,(i)无心血管病、内分泌病或精神病证据或病史的健康志愿者队列(n=109),(ii)接受临床适用的心脏导管插入术的患者队列(n=16),(iii)记录到ST抬升型心肌梗死(n=4)的患者队列和急性冠状动脉综合征的患者队列(n=502)。实施例1的方法部分中描述了关于从这些不同的患者队列采集血样的程度细节。

[0108] 初始量值集合涉及考虑循环型TnTuORF肽作为导致心肌梗死的急性心肌缺血(即,患者队列(iii))的诊断性生物标记的潜在临床用途。图5A显示,TnTuORF肽的静脉浓度趋向于在症状发作后的前4-5小时下降并且尽管在约24小时存在总体增加返回平台期,TnTuORF水平实际上小于正常对照中观察到的那些水平的一半(实施例5)。与hsTnT相比,其中这种标志物的浓度在缺血事件后急性期的STEMI患者的血浆中剧烈上升(图5B),这些数据不支持TnTuORF肽临床用于诊断导致心肌梗死的急性心肌缺血。

[0109] 为了评估TnTuORF肽在预测或诊断其他心脏病症,包括急性冠状动脉综合征方面的潜在用途(Thygesen等人(2012)Circulation 126:2020-2035),申请人实施了一项502位患者参与的前瞻性观察研究,所述患者前往急诊科(ED),主诉疑似心源性胸痛,表II(实施例1)中展示所述胸痛患者的人口统计数据和分析物数据。多种分析的结果证实,在前往ED的患者中的TnTuORF肽血浆浓度具有诊断除心肌梗死(MI)和不稳定型心绞痛(UA)之外的心脏病症的实用性(图7)。

[0110] 因而,申请人已经令人惊讶地发现,在除心肌梗死或不稳定型心绞痛之外的心脏病症的患者中,TnTuORF肽的循环型浓度在患者症状发作后的前12小时最高。在发作的头12、10、8、6、4、2或1小时或在临床呈现病症数小时观察到的水平令人惊讶地高,经常达到高于正常对照群体中水平多达2倍、3倍、4倍和5倍,并且常见地1.5倍。

[0111] 总之,一种或多种TnTuORF肽可用作例如除心肌梗死或不稳定型心绞痛之外的心脏病症(包括例如,心房纤颤、心力衰竭、心包炎、神经传导障碍及其组合)以及如本文所示的其他病症的明确早期标志物。

[0112] 基于这些令人惊讶的发现,申请人已经首次确定,它将可用于筛查取自受试者的生物样品中的一种或多种TnTuORF肽或其片段,特别地,例如,在发作的头12、10、8、6、4、2或1小时或在临床呈现病症时筛查。

[0113] 因此,在本发明的一个方面提供一种预测受试者罹患除心肌梗死或不稳定型心绞痛之外的心脏病症的风险的方法,所述方法包括:

[0114] (i) 测量来自受试者的生物样品中肌钙蛋白T上游可读框(TnTuORF)肽的水平;并且

[0115] (ii) 将TnTuORF肽的测量水平与来自合适对照群体的参考区间比较,

[0116] 其中与对照群体相比,TnTuORF肽的循环水平增加预示罹患除心肌梗死或不稳定

型心绞痛之外的心脏病症,并且另外其中测量步骤包括检测TnTuORF肽和与TnTuORF肽选择性结合的结合剂之间的结合作用。

[0117] 在本发明的另一个方面提供一种诊断受试者中罹患除心肌梗死或不稳定型心绞痛之外的心脏病症的方法,所述方法包括:

[0118] (i) 测量来自受试者的生物样品中肌钙蛋白T上游可读框(TnTuORF)肽的水平;并且

[0119] (ii) 将TnTuORF肽的测量水平与来自合适对照群体的参考区间比较,

[0120] 其中与对照群体相比,TnTuORF肽的循环水平增加提示除心肌梗死或不稳定型心绞痛之外的心脏病症,并且另外其中测量步骤包括检测TnTuORF肽和与TnTuORF肽选择性结合的结合剂之间的结合作用。

[0121] 熟练读者将理解出于评价目的,TnTuORF肽的水平可以有用地与参比值或对照值比较或相关。在一个实施方案中对照群体是已知其心脏病症的性别和年龄匹配的受试者。

[0122] 如本文所用,对照群体可以是从中取得TnTuORF肽的样品并且确定平均水平的个体或群体。通常,个体或群体将包含健康个体或未知罹患心脏病症的正常个体群体。在一个实施方案中,参考区间是来自对照群体的平均循环型TnTuORF肽浓度。对照群体中TnTuORF肽的水平在约430-1130pg/mL之间,平均数为约778pg/mL($P < 0.001$)。备选地,可以基于来自先前检验的个体或群体的多个读数,评估对照群体。在730-1590pg/mL(平均数约1159pg/mL)级别的水平一般表明除心肌梗死或不稳定型心绞痛之外的心脏病症。

[0123] 将可以理解,测量样品中TnTuORF肽水平的步骤可以是对单份样品单次测量或对多份样品重复测量,这取决于正在研究的生物学事件。在心脏病症的情况下,测量可以包括例如,1至20次或更多次测量TnTuORF肽,1至10次、1至5次、1至3次、或2或3次测量在不同时间取得的样品中的TnTuORF肽。在一个实施方案中,对病症或疑似病症发作或临床表现的12、10、8、6、4、2小时范围内或1小时或更短时间范围内取得的样品测量。上述样品时间范围以外的单个或重复测量也可以进行以确立TnTuORF肽的水平是否已经落至正常对照水平或例如心脏组织对照水平。

[0124] 本发明的测定法、方法和试剂盒包括测量发作或呈现的头一小时内取得的一份或两份样品中TnTuORF肽的水平,随后测量发作或呈现的2至4小时或2至3小时内取得的一份或两份样品中TnTuORF肽的水平,或初始测量TnTuORF肽的水平。

[0125] 因此,在某些实施方案中,预测受试者罹患除心肌梗死或不稳定型心绞痛之外的心脏病症的风险的方法或诊断受试者中除心肌梗死或不稳定型心绞痛之外的心脏病症的方法还包括测量来自受试者的第一生物样品中TnTuORF肽的水平并且测量第二生物样品中TnTuORF肽的水平,其中第二生物样品取自与第一生物样品相同的受试者,但在较晚的时间段取得,并且比较第一和第二样品中的TnTuORF肽的水平,其中第一和第二样品之间TnTuORF肽的循环水平增加提示罹患心脏病症的风险增加。

[0126] 如上文所示,TnTuORF肽的水平可以在心脏病症发作或呈现的头1个至12、10、8、6、4或2小时或更短时间范围内测量并且为例如1.5-5倍高于正常对照中测量的水平。

[0127] 如上文定义的生物样品可以是其中TnTuORF肽可以存在或分泌的任何生物材料。在一个实施方案中,生物样品是循环性生物样品,例如静脉血和动脉血、血浆、血清或间质液。在另一个实施方案中,生物样品是心脏组织或心脏组织样品。

[0128] 术语“测量生物样品中TnTuORF肽的水平”指能够确定样品中TnTuORF肽水平或浓度的方法学,如,例如免疫测定法,包括放射免疫测定法,酶联免疫吸附测定法(ELISA)、免疫荧光测定法和免疫放射测定法,如本领域技术人员将已知。在一个例子中,TnTuORF肽水平表述为pg/mL。术语TnTuORF肽水平和TnTuORF肽浓度可以互换地使用。

[0129] 在本发明的测定法、方法和试剂盒中,测量步骤包括检测TnTuORF肽和结合剂之间的结合,所述结合剂与TnTuORF肽选择性或特异性结合并且与生物学事件其他标记物具有低交叉反应性。在某些实施方案中,结合剂是抗体或其抗原结合片段。抗体可以是单克隆抗体、多克隆抗体、嵌合抗体或人源化抗体或其抗原结合片段。在其他实施方案中,结合剂或抗体可以固定至固相。在本说明书中其他地方更详述地描述了结合剂,包括抗体和抗原结合片段。

[0130] 将TnTuORF浓度增加至心率值和血红蛋白浓度时,进一步改善了TnTuORF肽预测或诊断除心肌梗死或不稳定型心绞痛之外的心脏病症的特异性和灵敏度。以说明的方式并且参考图7,当将TnTuORF增加至心率和Hb浓度时,除心肌梗死和不稳定型心绞痛之外的心脏病症的诊断从AUC=0.79 (P<0.001) 改善至AUC=0.83 (P<0.001)。因此,在本发明的某些实施方案中,本发明的预测或诊断心脏病症的测定法、方法和试剂盒也可以结合一个或多个风险因子的分析一起进行,所述风险因子例如是心率、血红蛋白浓度、血压、年龄、性别、体重、体力活动水平、事件(包括肥胖症事件、糖尿病事件和心脏事件)家族史和肌钙蛋白T和肌钙蛋白I的循环水平。

[0131] 相对于上文所提及的“AUC”值和如后续实施例中对TnTuORF肽及其预测或诊断受试者心脏病症的能力所述,群体研究也可以用来选择决策阈值。接受者操作特征(“ROC”)源自信号检测理论领域,所述信号检测理论在第二次世界大战期间发展用于分析雷达图像,并且ROC分析经常用来选择能够最佳区分“患病”亚群与“未患病”亚群的阈值。当某人检验为阳性,但是实际上未患疾病时,这种情况下出现假阳性。另一方面,当某人检验为阴性,提示其健康,此时他们实际上罹患疾病时,出现假阴性。为了绘制ROC曲线,在决策阈值连续变动时,测定真阳性率(TPR)和假阳性率(FPR)。由于TPR等价于灵敏度并且FPR等同于(1-特异性),所以ROC曲线有时称作灵敏度与(1-特异性)曲线。一项完美检验将具有曲线下面积(ROC) 1.0;一项随机检验将具有面积0.5。选择阈值以提供可接受的特异性和灵敏度水平。

[0132] 如上文所述,本公开的方法、测定法和试剂盒为临床医生提供监测受试者对现有疗法的反应性的手段。

[0133] 因此,在本发明的另一个实施方案中,用于预测或诊断受试者的除心肌梗死或不稳定型心绞痛之外的心脏病症的方法还包括对受试者执行治疗方案,其中发现与对照群体中TnTuORF肽的循环水平相比,受试者出现TnTuORF肽的循环水平增加。

[0134] 另外,在本发明的又一个方面提供一种监测受试者对用于除心肌梗死或不稳定型心绞痛之外的心脏病症的药物或疗法治疗的反应性的方法,所述方法包括:

[0135] (i) 测量来自受试者的第一生物样品中TnTuORF的水平;

[0136] (ii) 测量来自受试者的第二生物样品中TnTuORF的水平,其中第二生物样品取自相同的受试者;并且

[0137] (iii) 比较第一和第二样品中TnTuORF的测量水平,

[0138] 其中第一和第二样品之间TnTuORF水平的增加表明对用于除心肌梗死或不稳定型

心绞痛之外的心脏病症的药物或疗法治疗反应不良并且其中第一和第二样品之间TnTuORF水平的下降表明对用于除心肌梗死或不稳定型心绞痛之外的心脏病症的药物或疗法治疗积极反应。

[0139] 取决于待治疗的心脏病症,可能的是第一和第二样品之间TnTuORF肽的水平增加表明对用于除心肌梗死或不稳定型心绞痛之外的心脏病症的药物或疗法的积极反应。换句话说,第一和第二样品之间TnTuORF肽的水平降低表明对用于除心肌梗死或不稳定型心绞痛之外的心脏病症的药物或疗法的反应不良。

[0140] 因此,在本发明的又一个方面提供一种监测受试者对用于除心肌梗死或不稳定型心绞痛之外的心脏病症的药物或疗法治疗的反应性的方法,所述方法包括:

[0141] (i) 测量来自受试者的第一生物样品中TnTuORF肽的水平;

[0142] (ii) 测量来自受试者的第二生物样品中TnTuORF肽的水平,其中第二生物样品取自相同的受试者;并且

[0143] (iii) 比较第一和第二样品中TnTuORF肽的测量水平,

[0144] 其中第一和第二样品之间TnTuORF肽水平的下降表明对用于除心肌梗死或不稳定型心绞痛之外的心脏病症的药物或疗法治疗反应不良并且其中第一和第二样品之间TnTuORF肽水平的增加表明对用于除心肌梗死或不稳定型心绞痛之外的心脏病症的药物或疗法治疗积极反应。

[0145] 其中受试者待监测的情况下,多份生物样品可以随时间推移取得。连续采样允许随时间推移测量标志物水平的变化。采样可以提供关于事件大致发作时间、事件严重程度的信息,提示哪种治疗性方案可能是适宜的、对所用治疗性方案的响应或长期预后。可以在护理点如在急救车中、医生诊室、在临床表现时、在住院期间、在门诊患者中或在例行健康筛选期间等实施分析。

[0146] 再次,该方法也可以结合一个或多个心脏病症风险因子的分析一起进行,所述心脏病症风险因子例如是心率、血红蛋白浓度、血压、年龄、性别、体重、体力活动水平、事件(包括肥胖症事件、糖尿病事件和心脏事件)家族史和肌钙蛋白T和肌钙蛋白I的循环水平。

[0147] 最后,本领域技术人员将理解,本发明是还涉及特异性TnTuORF肽结合成员,以及它们在制造药物中的用途,所述药物用于预测或诊断罹患除心肌梗死或不稳定型心绞痛之外的心脏病症的受试者或面临形成前述心脏病症的风险的受试者。

[0148] 因此,本发明还提供选择性结合TnTuORF肽的肌钙蛋白T上游可读框(TnTuORF)肽结合剂,所述结合剂用于预测受试者罹患除心肌梗死或不稳定型心绞痛之外的心脏病症的风险。

[0149] 本发明还提供选择性结合TnTuORF肽的肌钙蛋白T上游可读框(TnTuORF)肽结合剂,所述结合剂用于诊断受试者中除心肌梗死或不稳定型心绞痛之外的心脏病症。

[0150] 本发明还提供与TnTuORF肽选择性结合的肌钙蛋白T上游可读框(TnTuORF)肽结合剂在制造药物中的用途,所述药物用于预测受试者罹患除心肌梗死或不稳定型心绞痛之外的心脏病症的风险。

[0151] 本发明还提供与TnTuORF肽选择性结合的肌钙蛋白T上游可读框(TnTuORF)肽结合剂在制造药物中的用途,所述药物用于诊断受试者中除心肌梗死或不稳定型心绞痛之外的心脏病症。

[0152] TnTuORF作为心肌梗死的生物标记物

[0153] 尽管其在能够直接预测或诊断导致心肌梗死的急性心肌缺血方面缺少实用性,令人惊讶地,申请人显示TnTuORF肽改善现有心肌钙蛋白生物标记物在预测和/或诊断心肌梗死方面的灵敏度和假阳性性能。从绝对来说,肌钙蛋白I x hs肌钙蛋白T/TnTuORF(本文中称作肌钙蛋白PLUS™)的乘积比使2小时内检出的心肌梗死患者人数增加4%(即94/96或98% NSTEMI患者;相比之下,hsTnT检出90/96或90% NSTEMI患者并且TnI检出88/96或92% NSTEMI患者)并且降低假阳性诊断率7%(实施例6;图8)。

[0154] 因此,在本发明的又一个方面提供一种用于改善心肌钙蛋白在预测受试者的心肌梗死风险方面的灵敏度和假阳性性能的测定法,所述测定法包含与肌钙蛋白T上游可读框(TnTuORF)肽选择性结合的结合剂并且所述结合剂与来自受试者的生物样品中的TnTuORF肽结合时可以被定量测量。

[0155] 本发明还提供一种用于改善心肌钙蛋白在诊断受试者中心肌梗死方面的灵敏度和假阳性性能的测定法,所述测定法包含与肌钙蛋白T上游可读框(TnTuORF)肽选择性结合的结合剂并且所述结合剂与来自受试者的生物样品中的TnTuORF肽结合时可以被定量测量。

[0156] 在根据任何一个方面的一个实施方案中,心肌钙蛋白包括肌钙蛋白T和肌钙蛋白I。在一个例子中,心肌钙蛋白可以由高灵敏度肌钙蛋白T(hsTnT) x 肌钙蛋白I代表。在另一个实施方案中,通过求得心肌钙蛋白对TnTuORF肽的乘积比,改善心肌钙蛋白的灵敏度和假阳性性能。在一个例子中,乘积比由hsTnT x TnI/TnTuORF代表。如上文描述,这种乘积比增加心肌钙蛋白在预测或诊断心肌梗死中的灵敏度和假阳性性能。

[0157] 本发明还提供一种用于测量来自受试者的生物样品中肌钙蛋白T上游可读框(TnTuORF)肽水平用于改善心肌钙蛋白在预测或诊断受试者中心肌梗死方面的灵敏度和假阳性性能的试剂盒,所述试剂盒包含与TnTuORF肽选择性结合的结合剂并且所述结合剂与TnTuORF结合时可以定量测量所述结合剂。

[0158] 在一个实施方案中,试剂盒还包含如何测量TnTuORF肽的水平说明书。

[0159] 本发明还提供与来自受试者的生物样品中TnTuORF肽选择性结合的肌钙蛋白T上游可读框(TnTuORF)肽结合剂,所述结合剂用于改善心肌钙蛋白在预测或诊断受试者中心肌梗死方面的灵敏度和假阳性性能。

[0160] 另外,就预后而言,肌钙蛋白PLUS™(即hsTnT x TnI/TnTuORF)比仅hsTnT和TnI(AUC分别是0.72和0.71)更精确地预测1年时的死亡率(AUC=0.74, P<0.001),但是在肌钙蛋白T或肌钙蛋白I预测1年内因心肌梗死或慢性心力衰竭而再入院方面无改善。

[0161] 因此,在本发明的又一个方面提供一种用于预测心脏事件后受试者中死亡率的测定法,所述测定法包含与肌钙蛋白T上游可读框(TnTuORF)肽选择性结合的结合剂并且与所述结合剂来自受试者的生物样品中的TnTuORF肽结合时可以被定量测量。

[0162] 在一个实施方案中,该测定法可以用来预测受试者中心脏事件后长达9个月、10个月、11个月、12个月、13个月、14个月和15个月的死亡率和更常见地在心脏事件后12个月的死亡率。

[0163] 本发明还提供与来自受试者的生物样品中TnTuORF肽选择性结合的肌钙蛋白T上游可读框(TnTuORF)肽结合剂,所述结合剂用于预测受试者在心脏事件后的死亡率。

[0164] 向匹配的NTproBNP增加单个住院患者24小时TnTuORF浓度改善了24小时单一NTproBNP预测约1年因急性失代偿性心力衰竭(ADHF)再入院的ROC曲线(AUC=0.93对0.91;图9)。

[0165] 因此,在本发明的又一个方面提供一种用于改善N-末端脑利尿钠肽(NT-proBNP)预测受试者在心脏事件后罹患急性失代偿性心力衰竭的风险方面的灵敏度和假阳性性能的测定法,所述测定法包含与肌钙蛋白T上游可读框(TnTuORF)肽选择性结合的结合剂并且所述结合剂与来自受试者的生物样品中的TnTuORF肽结合时可以被定量测量。

[0166] 在一个实施方案中,测定法可以用来预测受试者在心脏事件后罹患急性失代偿性心力衰竭的风险长达心脏事件后9个月、10个月、11个月、12个月、13个月、14个月和15个月,并且更常见地在心脏事件后12个月。

[0167] 本发明还提供测量来自受试者的生物样品中肌钙蛋白T上游可读框(TnTuORF)肽的水平用于改善N-末端脑利尿钠肽(NT-proBNP)预测受试者在心脏事件后罹患急性失代偿性心力衰竭的风险方面的灵敏度和假阳性性能的试剂盒,所述试剂盒包含与TnTuORF肽选择性结合的结合剂并且所述结合剂与TnTuORF结合时可以定量测量所述结合剂。

[0168] 最后,本发明还提供与来自受试者的生物样品中TnTuORF肽选择性结合的肌钙蛋白T上游可读框(TnTuORF)肽结合剂,所述结合剂用于改善N-末端脑利尿钠肽(NT-proBNP)预测受试者在心脏事件后罹患急性失代偿性心力衰竭的风险方面的灵敏度和假阳性性能。

[0169] TnTuORF的结合剂

[0170] 通过检测TnTuORF肽和与TnTuORF肽选择性结合的结合剂之间的结合,测量体液样品中的TnTuORF肽。用于本公开的方法中的结合剂优选地具有低交叉反应性,例如与ANP和BNP的低交叉反应性。结合剂可以包括使用抗原性TnTuORF肽或其片段作为免疫抗原制备的抗体或抗原结合片段如Fab和F(ab)₂。多肽或片段也可以如所述那样与载体偶联。在一个例子中,结合剂是抗体。抗体可以是单克隆或多克隆抗体。用于产生多克隆抗体和单克隆抗体及其片段的方法是本领域熟知的(例如参见Harlow和Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1988),但是也由申请人在内部开发(例如Siriwardena等人(2010) *Circulation* 122:255-264)。出于特异性的理由,优选单克隆抗体。本领域技术人员将领会,对于体外测定法,不需要人源化抗体。

[0171] 在一个例子中,产生针对抗原性TnTuORF肽的抗体。在一个例子中,抗原性TnTuORF肽包含MAPEGWVIVVIS (SEQ ID NO:1)、MAPEGWVIVVI (SEQ ID NO:2)、MAPEGWVIVV (SEQ ID NO:3)或MAPEGWVIV (SEQ ID NO:4)。这通常提供足够表位供特异性氨基酸检测。

[0172] 单克隆抗体可以通过已知的现有技术方法产生。这些方法包括Kohler等人(1975) *Nature* 256 (5517):495-7描述的免疫学方法以及Huse等人(1989) 246 (4935):1275-81描述的重组DNA方法。还构思使用重组噬菌体抗体系统产生单链可变抗体片段和后续突变(如位点特异性诱变)或链变换以产生针对NT-CNP肽的抗体。

[0173] 产生多克隆抗体的常规方法详述于Harlow和Lane(上文)中。简而言之,该方案需要用分离的NT-CNP肽按多个间隔的时间段免疫选择的动物宿主如兔、山羊、驴、绵羊、大鼠或小鼠(通常为兔),在放血和血液收集前有一次或多次血液检验。血清可以通过离心从凝固的血液分离。可以使用ELISA或放射免疫测定法、竞争性测定法或等同的现有方法,对血清检验多克隆抗体的存在。

[0174] 对TnTuORF特异的抗体可以在首先使这些肽或相似肽缀合至大蛋白质如匙孔血蓝蛋白(KLH)、牛血清白蛋白(BSA)或牛甲状腺球蛋白以赋予它们免疫原性后产生。偶联可以通过使用任何蛋白质交联剂实现,所述交联剂例如包括常见试剂戊二醛、碳二亚胺或N-(ε-马来酰亚胺-己酰基氧基)琥珀酰亚胺酯(MCS)——前提是在偶联之前向肽序列添加半胱氨酸残基。将这些缀合物按每月一次间隔时间注入兔、绵羊、小鼠或其他物种中,接着2周后收集血液样品,这将能够产生多克隆抗体或从小鼠的脾产生单克隆抗体。

[0175] 例如,可以处死上文描述的小鼠宿主并且取出其脾。随后分离信使RNA(mRNA)并且使用针对抗体可变区重链和轻链的特异性引物和聚合酶链反应(PCR)扩增法,从该mRNA产生cDNA。重链和轻链的DNA序列用接头序列连接,以确保正确的可读框。随后,将DNA构建体插入载体(例如,质粒或噬菌体、或病毒)中以转化入宿主。在一个例子中,载体是噬菌体。

[0176] 合适的宿主可以选自原核细胞、酵母细胞、昆虫细胞或哺乳动物细胞。在一个例子中,使用原核宿主,优选地大肠杆菌(*Escherichia coli*)。噬菌体产生病毒衣壳并且抗体片段表达在衣壳上,即噬菌体展示文库。可以对噬菌体展示文库筛选对特定抗原具有适宜亲和力的抗体片段。可以筛选文库多次并且通过蛋白质工程技术,如位点定向诱变和链改组可以对抗体构建体进行修饰,所述蛋白质工程技术均处于本领域技术人员的能力范围内。

[0177] 结合剂的检测包括肽结合测定法

[0178] 本发明包括一种涉及TnTuORF肽与结合剂结合并且随后检测结合的肽数量的检测系统的用途。一项相似解决方案旨在检测样品中未结合的结合剂的量以得到未结合或结合的TnTuORF的提示。意图是这类备选方法落于本发明的范围内作为功能性备选分案以直接检测结合的结合剂的数量。本领域技术人员将理解,当样品体积已知时,样品中TnTuORF的浓度可以轻易地从样品中TnTuORF的量计算。

[0179] 在本发明的测定法、方法和试剂盒中,测量步骤包括检测TnTuORF肽和结合剂之间的结合,所述结合剂与TnTuORF肽选择性或特异性结合并且与其他生物学事件标记物具有低交叉反应性。

[0180] 因此,在本发明的又一个方面提供一种测量来自受试者的生物样品中肌钙蛋白T上游可读框(TnTuORF)肽的水平测定法,所述受试者罹患或处于患有除心肌梗死或不稳定型心绞痛之外的心脏病症的风险,所述测定法包含与TnTuORF肽选择性结合并且与TnTuORF肽结合时可以定量测量的结合剂。

[0181] 在某些实施方案中,结合剂是抗体或其抗原结合片段。抗体可以是单克隆抗体、多克隆抗体、嵌合抗体或人源化抗体或其抗原结合片段。因而,在一个实施方案中,本发明的测定法是免疫测定法。

[0182] 本发明的抗体特别可用于确定样品中TnTuORF存在和/或其量的免疫测定法中。归因于不同抗体的可变结合亲和力,本领域技术人员将理解,应当对特定抗体建立测量值相对于样品中TnTuORF数量的标准结合曲线,以便能够确定样品中TnTuORF的量。这种曲线用来确定样品中TnTuORF的真实数量。

[0183] 样品材料包括但是不限于生物流体。就本公开而言,生物流体通常选自全血、血浆或血清。

[0184] 对TnTuORF肽特异的免疫测定法通常将需要产生与TnTuORF肽特异性结合的抗体。在一个例子中,抗体识别由MAPEGWVIVVIS (SEQ ID NO:1)、MAPEGWVIVVI (SEQ ID NO:2)、

MAPEGWVIVV (SEQ ID NO:3) 或MAPEGWVIV (SEQ ID NO:4) 定义的TnTuORF肽。这些抗体可以用来构建具有宽特异性的免疫测定法,如下文的竞争结合测定法中那样,或与下文描述的其他抗体联合用于夹层型测定法中以产生对TnTuORF肽特异的测定法。本领域技术人员将理解,非竞争性测定法也是可能的。夹心免疫测定的后面的抗体包括对包括MAPEGWVIVVIS (SEQ ID NO:1) 及其羧基缩短形式(即SEQ ID NOS:2-4)的氨基酸序列特异的那些。

[0185] 在另一个例子中,也可以使用指示剂。指示剂可以用于ELISA和RIA分析模式中。

[0186] 多克隆抗体和单克隆抗体可以用于竞争性结合测定法或夹层型测定法中。在这种方法的一个例子中,将液体样品与抗体接触并且同时或依次与标记的TnTuORF肽或含有抗体识别的表位的修饰肽接触。

[0187] 标记物可以是放射性组分如¹²⁵I、¹³¹I、³H、¹⁴C或可以通过时间分辨荧光法、荧光法、荧光偏振法、发光法、化学发光法或比色法测量的非放射性组分。这些化合物包括可以通过放射性计数、测量发光或荧光输出、光吸光度等直接测量的铈或其他镧系元素、吖啶酯、荧光素或放射性物质如上文那些。标记物也可以是间接测量的任何组分,如生物素、地高辛或酶如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶。这些标记物可以按多种方式间接测量。辣根过氧化物酶例如可以与底物如二盐酸邻苯二胺(OPD)和过氧化物温育以产生可以测量其吸光度的有色产物,或与鲁米诺和过氧化物温育以产生可以在光度计中测量的化学发光。生物素或地高辛可以与与之强烈结合的结合剂反应;例如抗生物素蛋白将与生物素强烈结合。这些结合剂可以转而共价结合至或连接至可测量标记物如辣根过氧化物酶或其他直接或间接测量的标记物,如上文那些。这些标记物和上文那些可以与肽或蛋白质连接:在合成期间、通过与标记物直接反应,或通过使用常见可获得的交联剂如MCS和碳二亚胺,或通过添加螯合剂。

[0188] 与抗体接触后,通常在4°C时18至25小时或在30°C至40°C时1至240分钟,与结合剂(抗体)结合的标记肽与未结合的标记肽分离。在溶液相测定法中,可以通过添加与固相粒子如纤维素或磁性材料偶联的抗 γ 球蛋白抗体(第二抗体)完成分离。第二抗体在与用于第一抗体的物种不同的物种中产生并且它结合第一抗体。全部第一抗体因此均通过第二抗体与固相结合。通过离心或磁力吸引从溶液取出这种复合物并且使用与它结合的标记物测量结合的标记肽。分离结合型标记物与游离标记物的其他选项包括形成从溶液沉淀的免疫复合物、通过聚乙二醇沉淀抗体或使游离的标记肽结合至活性炭并通过离心或过滤从溶液取出。通过适宜方法如上文提出的那些测量分离的结合相或游离相中的标记物。

[0189] 竞争结合测定法也可以设置为更易进行并且因此相对于上文那些是优选的固相测定法。这种类型的测定法使用带孔的平板(通称为ELISA或免疫测定平板)、固体珠或管表面。第一抗体吸附于或共价结合至平板、珠或管的表面,或通过吸附于或共价结合至平板的第二抗 γ 球蛋白或抗Fc区抗体间接结合。将样品和标记肽(如上)一起或依次添加至平板并且在允许竞争样品中TnTuORF与标记肽之间抗体结合作用的条件下温育。未结合的标记肽可以随后吸出并且淋洗平板,留下与平板连接的抗体结合的标记肽。随后可以使用上文描述的技术测量标记肽。

[0190] 夹层型测定法因特异性、速度和更大测量范围的原因而更优选。在这种类型的测定法中,过量的针对NT-CNP的第一抗体通过吸附、共价偶联或抗Fc或 γ 球蛋白抗体与ELISA平板孔、珠或管连接,如上文对固相竞争结合测定法所述。使样品液或提取物与连接至固相

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TnTuORF肽的第二抗体也同时或依次地连同第一抗体一起与样品温育。选择这种第二抗体以结合至NT-CNP上与第一抗体的结合位点不同的位点。这两种抗体反应导致夹心物,其中来自样品的NT-CNP夹在两种抗体之间。第二抗体通常用如上文详述的可容易测量化合物标记用于竞争结合测定法。备选地,与第二抗体特异性结合的标记第三抗体可以与样品接触。在洗涤未结合的材料后,可以通过对竞争结合测定法概述的方法测量结合的标记抗体。在洗去未结合的标记抗体后,可以如竞争结合测定法概述的那样定量结合的标记物。

[0191] 也可以使用浸渍片型测定法。这些测定法是本领域熟知的。它们可以例如利用与特异性抗体连接的小粒子如金粒子或有色乳胶粒子。可以将待测量的液体样品添加至预载有粒子并允许沿膜条或纸条迁移的膜条或纸条的一个末端。样品中抗原与粒子的结合调节粒子与捕获位点结合的能力,所述捕获位点沿纸条进一步含有针对粒子如抗原或抗体的结合剂。有色粒子在这些位点的积累导致显色,其依赖于样品中竞争性抗原的浓度。其他浸渍片方法可以利用共价结合至纸条或膜条的抗体以捕获样品中的抗原。使用与酶如辣根过氧化物酶偶联的第二抗体的后续反应和与底物温育以产生颜色、荧光输出或化学发光输出将能够定量样品中的抗原。

[0192] 试剂盒

[0193] 一般,试剂盒将是针对本领域已知的测定法格式化,并且在某些实施方案中针对如本领域已知的RIA或ELISA测定法格式化。

[0194] 试剂盒还可以包括一种或多种用于本文所述病症的额外标记物。例如在心脏病症的情况下,额外标记物可以包括以下一种或多种:肌钙蛋白T、肌钙蛋白I、肌酸激酶MB、肌红蛋白、ANP、BNP、BNP-SP、ANP、ANP-SP、NT-BNP、LDH、天冬氨酸氨基转移酶、H-FABP、内皮素、肾上腺髓质素、凝乳酶和血管紧张肽II。

[0195] 试剂盒可以由一个或多个容器组成并且还可以包括采集设备,例如,瓶、袋(如静脉输液袋)、小瓶、注射器和试管。至少一个容器将纳入并且将容纳有效预测、诊断或监测生物学事件如除心肌梗死或不稳定型心绞痛之外的心脏病症等的产品。产品通常是多肽和/或结合剂,尤其本发明的抗体或抗原结合片段或包含前述任一者的组合物。在一个实施方案中,在容器上或与容器结合的说明书或标签指示组合物用于预测、诊断或监测心脏病症。其他组分可以包括针头、稀释剂和缓冲剂。有用地,试剂盒可以包括至少一个容器,所述容器包含可药用缓冲液,如磷酸缓冲盐水、林格氏溶液(Ringer's solution)或右旋糖溶液。

[0196] 选择性结合TnTuORF肽或其片段的结合剂希望地包括在试剂盒中。在一个实施方案中,结合剂是本发明的抗体或抗原结合片段。测定法和试剂盒中所用的抗体可以例如是单克隆或多克隆的,并且可以在如上文所述的任何哺乳动物中制备,并且例如包括使用天然和融合肽制备的抗原结合片段和抗体。

[0197] 在一个试剂盒实施方案中,TnTuORF肽结合剂固定在固体基质(例如,多孔条或芯片上)以形成至少一个针对TnTuORF肽或其片段的检测位点。多孔条的测量区或检测区可以包括多个检测位点,这类检测位点含有检测试剂。位点可以按条、十字或点或其他排列方式排列。测试条或芯片还可以含有阴性对照和/或阳性对照位点。对照位点可以备选地在不同的条或芯片上。不同检测位点可以含有不同量的固定化核酸或抗体,例如,在第一检测位点中数量较高并且在后续位点中数量较小。当添加检验生物样品时,展示可检测信号的位点

数目提供样品中存在的TnTuORF肽或其片段的量的定量指示。

[0198] 试剂盒中还可以包括用于样品分析的装置,所述装置包含一次性测试筒,所述一次性测试筒具有实施样品检验的适宜组分(标志物、抗体和试剂)。该装置将便利地包括检验区和检验结果窗。免疫层析筒是这类装置的例子。参见例如US 6,399,398;US 6,235,241和US 5,504,013。

[0199] 备选地,装置可以是电子装置,所述电子装置允许输入、储存和评价相对于对照水平的已测量标志物的水平和其他标志物水平。US 2006/0234315提供这类装置的例子。还可用于本发明中的是CIPHERGEN的Protein**Chip**[®],所述Protein Chip可以用来利用CIPHERGEN Protein**Chip**[®] 软件包处理SELDI结果。

[0200] TnTuORF肽的临床用途

[0201] 临床诊断心脏病症,包括急性冠状动脉综合征(ACS),严重依赖于循环型诊断性生物标记物如心肌钙蛋白,包括肌钙蛋白T和肌钙蛋白I。然而,循环型肌钙蛋白的可检测变化的延迟(甚至用高度灵敏性(hs)测定法时)在大量出现疑似心脏病症的患者中导致临床不确定性。因此,鉴定可以提供心脏病症早期信息的新生物标记物是非常重要的。申请人这里提供首个证据:上游可读框(uORF)肽在人循环中作为不同化学实体存在。这种uORF衍生自心肌钙蛋白T(TnTuORF)并且存在于正常健康个体中。在除心肌梗死和不稳定型心绞痛之外的心脏病症患者中观察到TnTuORF的最高血浆水平,所述心脏病症例如包括但不限于心房纤颤、心力衰竭、心包炎和神经传导障碍,并且可以因此用于本发明的测定法、方法和试剂盒中以预测或诊断受试者中的心脏病症。

[0202] 现在将根据以下非限制性实施例说明本发明。

实施例

[0203] 实施例1:方法和材料

[0204] 化学品

[0205] 合成性人TnTuORF、TnTuORF(Tyr)、TnTuORF(Cys)和囊泡整合膜蛋白36的信号肽的氨基酸1-7(VIP36sp(1-7))由Mimotopes(Melbourne,澳大利亚)按质谱法和高效液相层析(HPLC)纯度大于95%合成。全部其他合成或纯化的蛋白质购自Hytest(Turku,FI)、Peptide Institute(大阪,日本)或Sigma-Aldrich(St Louis,美国)。

[0206] 人TnTuORF测定法开发

[0207] 评定人心肌钙蛋白T的主要可读框的5'区域上游(NCBI检索号NG_007556)鉴定了一种推定性12氨基酸肽(完整氨基酸序列MAPEGWVIVVIS;SEQ ID NO:1),其在主要可读框(ORF)起始位点上游1,512bp编码,具有Kozak评分+2和高效翻译的高度可能性(图1)。这个序列在人骨骼肌快肌肌钙蛋白T(NCBI检索号NG_013085)或人骨骼肌慢肌肌钙蛋白T(NCBI检索号NG_011829)中未见到。但是,对NCBI BLAST搜索引擎的检验揭示出一个部分序列,囊泡整合膜蛋白36的信号肽的头7个氨基酸(序列MAAEGWI)作为展示同源性(Fiedler等人(1994)EMBO J.13:1729-1740)。申请人事先证实信号肽存在于人循环中(Siriwardena等人(2010)Circulation 122:255-264;Pemberton等人(2012)Clin.Chem.58:757-767)并且因而检测抗体针对TnTuORF的氨基末端,并且评估VIP36sp(1-7)肽的潜在干扰作用。对

TnTuORF的氨基末端特异的抗体根据申请人的先前方案形成(Siriwardena等人(2010) *Circulation* 122:255-264;Pemberton等人(2012) *Clin.Chem.*58:757-767)。简而言之,将合成的TnTuORF (Cys) 与匙孔血蓝蛋白(KLH) 偶联并真皮内注射至4只新西兰白兔中5-6个部位内。在注射后11-13天对兔采血并且该程序每周一次重复4-6次,直至获得足够的抗血清(r244)滴度。

[0208] ^{125}I -放射标记的人TnTuORF (Tyr) 的制备

[0209] 使用0.5mCi $\text{Na-}^{125}\text{I}$ 在5 μg 氯胺T存在下在5 μL 0.5M磷酸盐缓冲液,pH7.3中碘化人TnTuORF (Tyr) (2.5 μg) 15-20秒。通过添加又一份5 μL 磷酸盐缓冲液中的50 μg 半胱氨酸HCl终止反应。将所得到的碘化物加载于10cm RP300 Brownlee HPLC柱(Applied Biosystems, San Jose, CA) 上并且用0.1%三氟乙酸(TFA) 中0%至60%乙腈的梯度经15分钟以流速1mL/分钟洗脱纯的TnTuORF (^{125}I -Tyr)。

[0210] TnTuORF和心脏标志物测定法

[0211] 对于TnTuORF测定法,抗血清r244按最终稀释度1:15,000使用。全部放射性示踪剂和抗血清均稀释于免疫分析缓冲液中(Siriwardena等人(2010) *Circulation* 122:255-264)。血浆样品和标准品1:3稀释于分析缓冲液中。分析温育物由与稀释度1:5000的50 μL 抗体混合的50 μL 样品或标准品(0-13,000pg/mL TnTuORF肽)组成,它们4 $^{\circ}\text{C}$ 混合并静置温育22小时。随后添加50 μL 碘化TnTuORF (Tyr) 示踪剂(约3000cpm),在4 $^{\circ}\text{C}$ 管内混合并静置温育另外22小时。随后通过固相第二抗体法(驴抗-兔SacCel, Immunodiagnostic Systems, Boldon, UK) 分离游离TnTuORF和结合的TnTuORF。将2%聚乙二醇/磷酸盐缓冲液中的Sac-Cel (500 μL) (Sac-Cel终浓度5%) 添加至每只管并且在室温静置温育30分钟。将管随后以2800x g离心15分钟,倾析上清液并且在Gammamaster计数器(LKB, 乌普萨拉, 瑞典) 中对沉淀物计数。溶血评定结果确定TnTuORF直至血红蛋白浓度高达1.5g/L或血浆脂质含量高达2.0g/L时未改变。通过自有免疫测定法测定NT-proBNP (Richards等人(2006) *J.Am.Coll.Cardiol.*47:52-60;Wright等人(2003) *J.Am.Coll.Cardiol.*42:1793-1800)。在Elecsys 2010分析仪(Roche Diagnostics) 上以第99分位数截断值14pg/mL测定高灵敏度TnT。由Roche全球再评定hsTnT期间全部hsTnT结果均提交至Penzberg (Apple等人(2012) *Clin.Chem.*58:1599-1600) 并仅报告3个结果需要调整。通过最新一代测定法(Abbott Architect) 以第99分位数截断值0.03 $\mu\text{g}/\text{L}$ 测定TnI。

[0212] 人血浆样品采集

[0213] 根据新西兰卫生部健康和残障伦理委员会批准的伦理方案,从4个研究群体获得人血浆样品(人口统计数据在表I和表II中给出)。全部参与者均在招募前给出知情同意书并且全部研究与赫尔辛基宣言原则相符。血浆样品抽取自:(i) 无心血管病、内分泌病或精神病证据或病史(n=109)的健康志愿者队列,(ii) 接受临床适用的心脏导管插入术的患者队列(n=16),(iii) 记录到ST抬升型心肌梗死(n=4)的患者队列和(iv),ACS队列(n=502)。对于这项研究,将因主诉胸痛持续时间<4小时前往Christchurch医院的患者招募入我们的前瞻性观察性研究,称作急性冠脉事件中的信号肽(SPACE, <http://www.anzctr.org.au>,ACTRN12609000057280)。根据指导原则定义,招募主诉急性胸部、上腹部、颈部、颞部或臂部痛、无明显非心脏来源和持续 ≥ 20 分钟的疑似ACS患者(Leupker等人(2003) *Circulation* 108:2543-2549)。不使用更一般/非典型的症状(如乏力、恶心、呕吐、

出汗和虚弱)作为纳入标准。根据2007ESC/ACCF/AHA/WHF特别小组指导原则 (Thygesen等人 (2007) Circulation 352:98-100),由可获得全部临床数据但不知道TnTuORF的两名独立心脏科医生确诊判定的急性MI诊断。诊断的生物化学要素使用入院24小时内血浆cTnI升高 $\geq 0.03\mu\text{g/L}$ 。全部相关的临床参数,人口统计参数和诊断参数均在指标入院时采集,随访45天和365天。

[0214] 表I:患者组(i)-(iii)的人口统计数据(平均数 \pm SD)

[0215]

	正常对照 (n=109)	导管插入术 (n=16)	STEMI(n=4)
年龄(岁)	43.9 \pm 15.2	65.6 \pm 10.6	61.3 \pm 2.9
男性	40 (37%)	12 (75%)	3 (75%)
BMI(kg.m ²)	26.2 \pm 4.3	29.4 \pm 6.4	26.5 \pm 6.6
高血压	27 (21.6%)	10 (63%)	2 (50%)
糖尿病	6 (5.5%)	4 (25%)	0 (0%)
高血脂	18 (17%)	-	0 (0%)
GFR(mL/分 钟/1.73m ²)	83.0 \pm 13.5	61.9 \pm 24.7	-

[0216] 将全部患者的血液均抽入含有1.8mg/mL Na³-EDTA的冷却真空采血管(Becton-Dickinson)中。样品在抽血2小时内离心并且血浆贮存在-80℃。对于组(i),单份样品(在过夜禁食后)从前臂静脉取得,立即离心以制备血浆并贮存在-80℃。组(ii)中的患者经左股动脉插管并且从区域血管部位(股静脉、肾静脉、肝静脉、下腔静脉、颈静脉、心脏冠状窦和肺动脉)抽取血液。取得入院和出院股动脉样品以比较。在医院就医时症状呈现后的以下时间取得组(iii)中STEMI患者的前臂静脉样品:0小时、0.5小时、1小时、2小时、4小时、8小时、12小时、24小时、48小时和72小时。组(iv)中的患者是在医院就医时和在症状呈现后1、2和24小时抽取血液样品。

[0217] 表II:患者组(iv)的人口统计数据(平均数 \pm SD)

[0218]

	心肌梗死 (MI)	不稳定型 心绞痛 (UA)	其他心脏 病症	非心源性胸 痛	全部患者均	p-值
患者人数(%)	114 (23)	40 (8)	26 (5)	322 (64)	502 (100)	
性别人数(%)						
男性	77 (15)	26 (5)	16 (3)	182 (37)	302 (60)	
女性	37 (7)	14 (3)	10 (2)	139 (28)	200 (40)	
年龄, 岁						
男性	66.0±13.1	64.0±8.3	65.0±14.1	59.0±13.7	62.2±13.4	
女性	78.0±12.7	66.0±7.6	72.5±6.7	68.0±13.5	68.3±12.9	<0.001
分析物						
24 小时 TnI(ug/L)						
男性	7.8±15.6	0.02±0.03	0.3±1.2	0.01±0.02	2.1±8.6	<0.001
女性	6.1±11.9	0.01±0.01	0.2±0.6	0.01±0.01	1.2±5.6	<0.001
Chol (mg.dL ⁻¹) ψ	181.1±60.3	175.2±45.2	173.7±31.3	186.8±59.3	183.5±57.4	
HDL (mg.dL ⁻¹) ψ	39.5±12.5	38.6±10.7	40.3±13.8	39.6±12.3	39.5±12.3	
LDL (mg.dL ⁻¹) ψ	116.3±38.8	106.7±37.7	100.7±25.6	115.5±36.9	114.2±37.1	
Trig(mg.dL ⁻¹) \S	159.1±83.0	149.1±90.7	141.6±57.9	166.1±182.9	161.3±148.3	
风险因子(%)						
高血压	78 (16)	33 (7)	20 (4)	192 (38)	323 (65)	
糖尿病	19 (4)	9 (2)	4 (1)	43 (8)	75 (15)	

[0219]

<i>BMI(kg.m²)</i>	28.4±5.2	27.6±4.3	28.4±5.5	28.5±6.1	28.4±5.7	
当前吸烟者	16 (3.5)	2 (0.5)	0 (0)	44 (9)	62 (13)	
曾经吸烟者	56 (11)	21 (4)	19 (4)	157 (31)	253 (50)	
病史(%)						
<i>CVD</i>	78 (15)	36 (7)	13 (3)	199 (40)	326 (65)	
<i>MI</i>	36 (7)	20 (4)	10 (2)	99 (20)	165 (33)	
<i>CABG</i>	9 (1.5)	6 (1)	3 (0.5)	35 (7)	53 (10)	
高脂血症	62 (12)	34 (7)	14 (3)	193 (38)	303 (60)	
咽峡炎	48 (10)	30 (6)	17 (3)	158 (31)	253 (50)	
心力衰竭	10 (2)	4 (1)	2 (0.5)	33 (6.5)	49 (10)	
ECG 结果						
<i>LBBB</i>	3 (1)	1 (0)	1 (0)	7 (2)	12 (4)	
ST 抬升	23 (6)	0 (0)	2 (1)	0 (0)	25 (7)	
<i>ST-压低</i>	10 (3)	1 (0)	3 (0.5)	2 (0.5)	16 (4)	
<i>T 波倒置</i>	20 (4)	5 (1)	6 (1)	30 (7)	61 (13)	
无变化	58 (9)	33 (6)	14 (3)	283 (54)	388 (72)	

[0220] Ψ = 将 $\text{mg} \cdot \text{dL}^{-1}$ 胆固醇转化成 mmo1/L , 乘以 0.0259

[0221] \S = 将 $\text{mg} \cdot \text{dL}^{-1}$ 甘油三酯转化成 mmo1/L , 乘以 0.0113

[0222] 从人血浆纯化 TnTuORF 肽

[0223] 为了纯化人血浆中检测到的免疫反应性 TnTuORF, 在偶联有 TnTuORF (Cys) 的 SulfoLink™ 柱 (Pierce Biotechnology, IL) 上通过抗原亲和层析法从 r244 纯化抗 TnTuORF IgG. 2mL r244 净抗血清用 PBS (pH7.2) 1:1v/v 稀释并且通过 SulfoLink™ 柱。将结合的抗体用 0.1M 甘氨酸 (pH 2.5) 洗脱并且针对 3 次 0.1M 磷酸盐缓冲液洗涤透析。纯化的 r244 抗 TnTuORF IgG 随后与根据制造商说明书准备的蛋白 A 琼脂糖凝胶 (Pierce Biotechnology, IL) 偶联。为了获得纯的 TnTuORF, 将 100mL ST 抬升型 MI 患者血浆用 PBS (pH7.2) 1:1v/v 稀释并且在重力下在室温通过蛋白 A/r244-IgG 柱 2 小时。将层析柱随后用 0.1M PBS/0.5M NaCl (pH 7.2) 洗涤并且用 0.1M 甘氨酸 (pH 2.5) 洗脱。收集 1mL 级分并且将等分试样按 1:10v/v 用免疫分析缓冲液稀释并交付特异性免疫测定法以确定纯化的 TnTuORF 的量。原始甘氨酸洗脱级分立即贮存在 -80°C 直至借助 HPLC 评估为止。

[0224] 高效液相层析法 (HPLC)

[0225] 0.1M 甘氨酸中的免疫亲和纯化 TnTuORF 肽在 40°C 直接加载到反相 (RP) HPLC 柱

(Phenomenex, Torrance, CA) 上并且用10-40%乙腈/0.1%TFA梯度经30分钟以流速1mL/分钟洗脱。按1分钟间隔时间收集级分,并且对等分试样进行TnTuORF免疫测定。将免疫反应性级分空气干燥并且随后采用流速0.25mL/分钟的60%乙腈/0.1%TFA等度梯度,在G2000硅胶柱(Toyosoda, JP)进行大小排阻(SE)HPLC。按1分钟间隔时间收集级分并通过如用于RP-HPLC的免疫测定法探测以确定近似分子大小。在免疫纯化的TnTuORF洗脱后,将RP-HPLC用合成性TnTuORF肽校准。SE-HPLC试验用细胞色素C(Mr 12,000)、抑蛋白酶肽(Mr 6,500)、CNP22(Mr 2,200)和血管紧张肽II(Mr 1,045)肽校准。

[0226] 统计学

[0227] 结果作为平均数±SD给出。在适宜时使用配对的双尾Student t检验实施平均数的比较。使用Spearman等级次序相关性检验和接受者操作曲线(ROC)分析,使用SPSS v17实施血浆分析物浓度的相关性分析。为了生成ROC曲线生成和比较生物标记物组,将生物标记物数据作为标准化变量(z-评分)分析。在全部情况下,标准化变量从t=0、1和2小时样品中获得的最大生物标记值(3个值的最大值)导出。在全部分析中,p值<0.05视为显著的。

[0228] 实施例2:鉴定人血浆中的内源TnTuORF

[0229] 针对TnTuORF氨基末端的多克隆抗体r244构成一种敏感、特异性放射免疫测定法(图2),平均零结合作用为31±3%,样品检测限值为26±6pg/mL,ED₅₀为458±105pg/mL并且工作范围是130-3900pg/mL,其中分析内变异系数(CV)在25次分析范围内<10%。分析间CV在1300pg/mL时是14%并且在740pg/mL时是15%。抗血清244与相关内源肽,尤其心肌钙蛋白T、肌钙蛋白I和VIP36sp(1-7)和熟知的药物的交叉反应性可忽略(表III)。初步评估证实TnTuORF免疫反应性存在于来自采集入Na³-EDTA的外周血的人血浆中并且它与合成的标准品曲线平行稀释(图2)。正常人静脉血浆中的免疫反应性TnTuORF水平(平均数±SD)是725±340pg/mL(范围273-2260pg/mL,正常范围上限第99百分位数=1885pg/mL);每份样品中均检出免疫反应性。TnTuORF浓度在男性中显著较高(825±403pg/mL对666±285pg/mL,P=0.018)并且仅与血浆肌酸酐具有显著的生物化学相关性(r=0.201,P=0.036,图3)。伴同性hsTnT水平、年龄、血压和BMI与TnTuORF没有显著关联。相应的hsTnT水平是6.0±2.4pg/mL(范围3.0-14.9pg/mL)并且免疫反应性存在于49%的样品(53/109)中。hsTnT水平倾向于男性中更高(6.6±2.4pg/mL对5.5±2.3pg/mL)并且与年龄显著相关(r=0.328,P=0.017)。

[0230] 表III:r244兔抗人TnTuORF抗血清的交叉反应性数据

[0231]

肽/药物	与 TnTuORF 抗血清的交叉反应性(%)
TnTuORF	100
VIP36sp(1-7)	<0.3
心肌肌钙蛋白 T	<0.01
心肌肌钙蛋白 I	<0.01
hFABP	<0.01
CK-MB	<0.01
proBNP(1-13)	<0.001
proBNP(1-76)	<0.001
proANP(1-30)	<0.003
ANP	<0.002
BNP	<0.003
内皮素 1	<0.003
血管紧张肽 II	<0.003
血管紧张肽(1-7)	<0.01
硬骨鱼紧张肽 II	<0.003
CNP22	<0.004
clopidigrel	0
吗啡	0
阿司匹林	0

[0232] 全部肽均是人形式。

[0233] 实施例3:免疫反应性TnTuORF向循环中的释放

[0234] 认为用于诊断MI的TnT形式是心脏特异的 (Thygesen等人 (2012) Circulation 126:2020-2035)。与此一致,申请人预计TnTuORF水平将在流出心脏的血液中(即心脏冠状窦样品中)较供给心脏的血液(即动脉样品)中更高。冠状窦血浆与同时抽取的动脉血浆样品相比倾向于含有较高浓度的免疫反应性TnTuORF ($978.2 \pm 118.1 \text{ pg/mL}$ 对 $908.7 \pm 88.9 \text{ pg/mL}$,平均数 \pm SD, $P=0.472$,图4)。然而,还跨肝静脉观察到TnTuORF的静脉水平升高,而跨股静脉的TnTuORF水平倾向于降低。相比之下,hsTnT水平在心脏冠状窦血浆样品中显著升高的($13.1 \pm 2.7 \text{ pg/mL}$ 对 $10.1 \pm 1.8 \text{ pg/mL}$, $P=0.019$)。hsTnT的肾静脉水平与动脉水平相比显

著较低 ($8.6 \pm 1.5 \text{ pg/mL}$ 对 $10.1 \pm 1.7 \text{ pg/mL}$, $P=0.002$, 图4)。因此, TnTuORF和cTnT的区域性血浆概况在净产生的梯度和跨器官清除过程方面不同。

[0235] 实施例4: 分析通过RIA检出的免疫反应性种类

[0236] 通过免疫亲和纯化法从100mL血浆制备纯化的TnTuORF并且随后使其经历偶联免疫测定法的RP-HPLC和SE-HPLC进一步鉴定。初级RP-HPLC鉴定出两个主要免疫反应性峰, 其中第二者与合成性TnTuORF肽一致地洗脱(峰II, 图5A)。在SE-HPLC上, RP-HPLC衍生的峰II在大约1.5K分子量处洗脱, 而峰I在大约1K分子量处洗脱(图5B)。总而言之, 这些结果提示免疫反应性TnTuORF在人血浆中作为(i)完整12氨基酸形式和(ii)羧基末端缩短形成存在, 所述羧基末端缩短形成包括MAPEGWVIVVI (SEQ ID NO:2)、MAPEGWVIVV (SEQ ID NO:3) 或MAPEGWVIV (SEQ ID NO:4)。

[0237] 申请人将使用串联Ms/MS进一步表征循环型TnTuORF肽以证实这种肽的序列和降解。

[0238] 实施例5: STEMI患者中的TnTuORF肽

[0239] 已经确立免疫反应性TnTuORF存在于人循环中, 申请人力图确定循环型TnTuORF作为导致心肌梗死的急性心肌缺血的诊断性生物标记物的临床用途。在记录有ST抬升心肌梗死(STEMI)的其症状发作在就医前不足4小时的4位患者中, TnTuORF的静脉浓度倾向于在症状发作后4-5小时下降并且截止24小时升高返回平台区(图6A)。截止症状发作后5小时的平均浓度几乎是正常对照中所见平均浓度的一半并且截止72小时未充分返回该范围。该曲线明显不同于hsTnT的曲线, 后者在STEMI的血浆中急剧升高(图6B)。

[0240] 实施例6: 表现胸痛的患者的前瞻性观察研究中的TnTuORF肽

[0241] 为了评估TnTuORF测量辅助诊断ACS的潜力, 申请人实施一项连续呈现疑似心源性胸痛主诉的502位患者参与的前瞻性观察研究。表II中给出患者人口统计数据和分析物数据。大约23%的患者得到最终判定的心肌梗死(MI)诊断。出现TnTuORF浓度并不具有诊断急性MI (ROC AUC=0.46, $P=NS$) 或不稳定型心绞痛(UA, ROC AUC=0.47, $P=NS$) 的任何实用性, 但是具有良好的诊断除ACS之外心脏病症患的能力(AUC=0.79, $P<0.001$, 图7), 这比NTproBNP (AUC=0.72, $P<0.001$) 更精确。因此, 与全部其他患者群体相比, 症状出现两小时内的TnTuORF最大浓度在具有非MI、非UA心脏病症的患者中显著较高 ($1159 \pm 429 \text{ pg/mL}$ 对 $778 \pm 353 \text{ pg/mL}$, $P<0.001$)。另外, 将TnTuORF添加至心率和血红蛋白(Hb)浓度时, 诊断替代心脏病症的AUC改善至0.83 ($P<0.001$, 图7)。hsTnT和TnI均具有诊断非ST抬升型MI (NSTEMI) 的优异诊断能力, ROC曲线分别是0.95和0.97 (NSTEMI $n=96$, 二者均为 $P<0.001$)。相比之下, TnI x hsTnT/TnTuORF的乘积比(此处命名为TroponinPLUS™)产生0.97的AUC, $P<0.001$, 图8。从绝对项来说, 在症状出现两小时内, hsTnT检出94%的NSTEMI患者(90/96)而TnI检出92%(88/96), 尽管hsTnT展示的这种改进的灵敏度以假阳性增加为代价(hsTnT阳性非MI患者=68对TnI阳性非MI患者=32)。相比之下, TroponinPLUS在两小时内检出98%的NSTEMI患者(94/96)并且产生63个非MI阳性结果。因此, 与单一hsTnT相比, TroponinPLUS比率增加两小时检出MI患者的人数4%, 并且减少假阳性率7%。

[0242] 就预后而言, TroponinPLUS比单一hsTnT和TnI (AUC分别是0.72和0.71) 略微更好地预测1年时的死亡率(AUC=0.74, $P<0.001$), 但是在肌钙蛋白T或肌钙蛋白I预测1年内因MI或CHF而再入院方面无改善。向匹配的NTproBNP增加单次住院患者24小时TnTuORF浓度改

善了24小时单一NTproBNP预测1年因急性失代偿性心力衰竭(ADHF)再入院的ROC曲线(0.93对0.91;图9)。

[0243] 讨论/总结

[0244] 申请人的结果是uORF肽作为循环中不同的独立实体的首次阐明。先前已经报道,来自GR-1A受体的uORF肽存在于分离的细胞胞质提取物中(Diba等(2001) *J. Cell. Biochem.* 81:149-161),该作者未报道它在其实验中所用的培养基中存在。申请人未在免疫测定法或HPLC中找到人血浆中TnTuORF与hsTnT相关的证据;实际上,TnTuORF的血浆水平倾向于与hsTnT和TnI负相关。然而,申请人不能排除TnTuORF缔合或结合至其他血浆实体(如自身抗体或其他结合蛋白)的可能性,如已经对TnT和TnI报道(Eriksson等人(2005) *N. Engl. J. Med.* 352:98-100; Savukoski等人(2012) *Clin. Chem.* 58:1040-1048)。

[0245] 在调查的STEMI患者队列中(实施例1,表I),区域性血浆浓度分析揭示心脏冠状窦含有最高数量的hsTnT,并且这个观察结果与hsTnT的心血管诊断实用性完全一致。但是,值得注意的是,4/16位个体具有升高的肝动脉-静脉hsTnT梯度,6/16具有升高的颈动脉-静脉梯度并且11/16具有升高的股动脉-静脉梯度。这不太可能与分析问题有关,因为差异总是比测定法CV大得多。不清楚这些观察结果的关联性,但是它可能潜在地促成采用hsTnT测定法时观察到的诊断特异性减少,尤其在已经作为假阳性肌钙蛋白T的可能来源指出的背景下(Jaffe等人(2011) *J. Am. Coll. Cardiol.* 58:1819-1824)。hsTnT的肾静脉浓度显著降低提示肾脏或许是hsTnT的主要清除机构。相对于TnTuORF,虽然申请人观察到跨心脏冠状窦的升高的动脉-静脉梯度,但这不是统计学显著的。

[0246] 免疫纯化的TnTuORF在RP系统和SE-HPLC系统上与完整形式和羧基末端降解形式一致地洗脱。TnTuORF因此就降解而言可比于cTnT和cTnI,但是不知道相似的酶或过程是否造成这种情况。重要地,根据免疫测定法验证,cTnT和cTnI不与TnTuORF抗体交叉反应或未出现在RP-曲线和SE-HPLC曲线上。另外,使用BLAST序列比对工具发现的最接近的肽身份是VIP36sp(1-7)。这种肽仅与TnTuORF的头7个氨基酸相差两个氨基酸,虽然显示它与TnTuORF肽抗体具有<0.3%交叉反应性并且因此具有干扰本发明测定法的最小可能性。这些数据表明,在TnTuORF的位置3处的脯氨酸在我们的抗体识别作用发挥主要作用并且辅助维持分析特异性,并且将需要通过串联MS/MS完整表征循环型TnTuORF以证实这种肽的序列和降解。

[0247] 当前证据提示uORF与蛋白质产生负相关(Calvo等人(2009) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106:7507-7512; Vogel等人(2010) *Mol. Sys. Biol.* 6:400-408; Matsui等人(2007) *FEBS Letts.* 581:4184-4188),但是它们的实际功能活性已经仅在少数病例中展示。例如,通过uORF产生顺式作用肽可以通过使核糖体停在uORF的末端减少下游主要ORF的翻译起始(Oyama等人(2004) *Genome Res.* 14:2048-2052)。这份证据,连同以下申请人观察结果:静脉TnTuORF浓度在具有记录的STEMI的患者中起初降低,促使申请人研究可能有用的倒数关系是否可能在表现出疑似急性心肌梗死的胸痛的患者中TnTuORF和hsTnT和/或TnI之间存在。如预期,与其他患者组相比,心肌梗死患者中在症状表现两小时内hsTnT和TnI的平均最大浓度显著较高。与之相反,TnTuORF的最大浓度倾向于在心肌梗死患者中较低并且与其他心脏病症患者相比显著较低。与单独的hsTnT测量相比,使用TnTuORF作为与心肌钙蛋白T和肌钙蛋白I(TroponinPLUS™)比率的分母导致NSTEMI的诊断和1年死亡率预后的改善。还有意义的是TnTuORF在鉴定出现除心肌梗死之外心脏病症的胸痛患者中的诊断性能,可以通

过增加心率和Hb变量改善这种性能。

[0248] 虽然已通过举例方式描述本发明,但是应当理解,可以进行众多变型和改变而不偏离如权利要求书中定义的本发明范围。另外,在特定特征的已知等同方案存在情况下,如同在本说明书中特别提到那样并入这类等同方案。

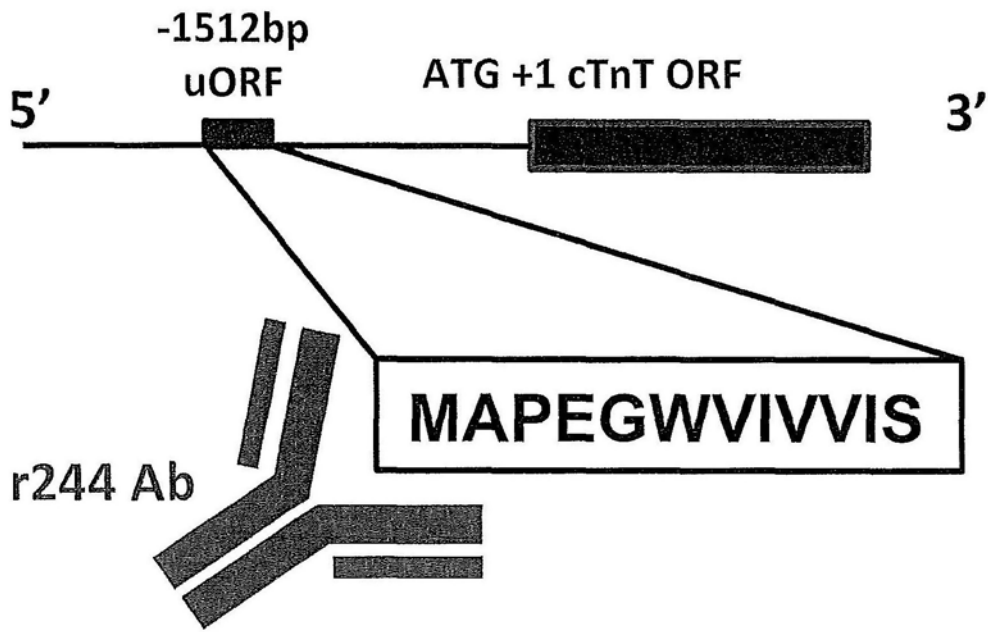


图1

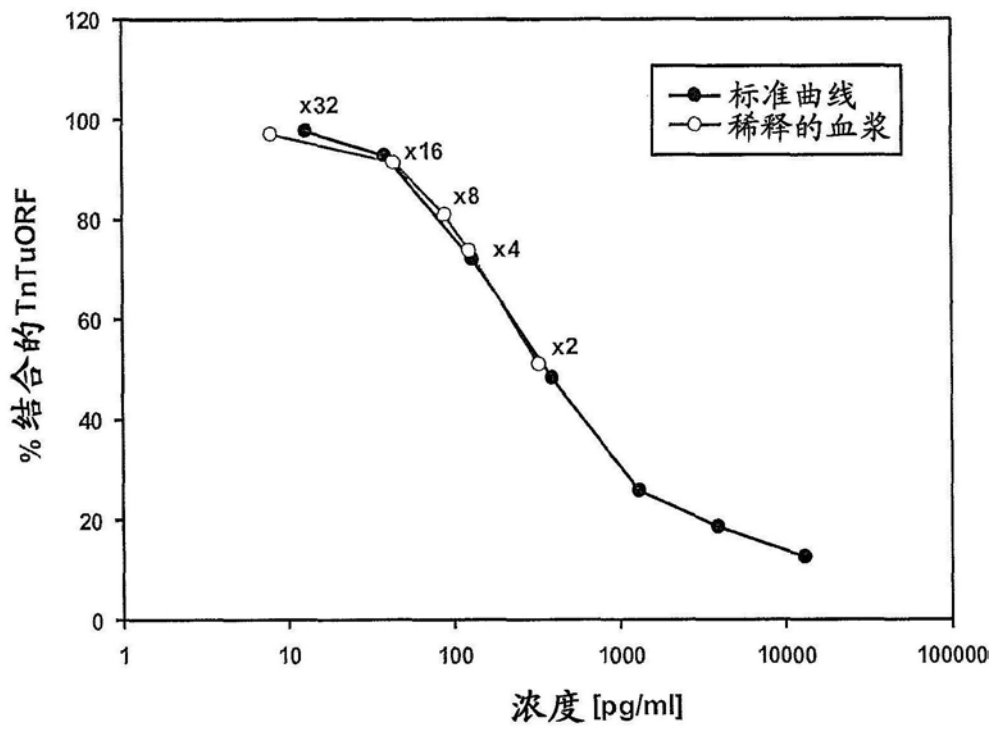


图2

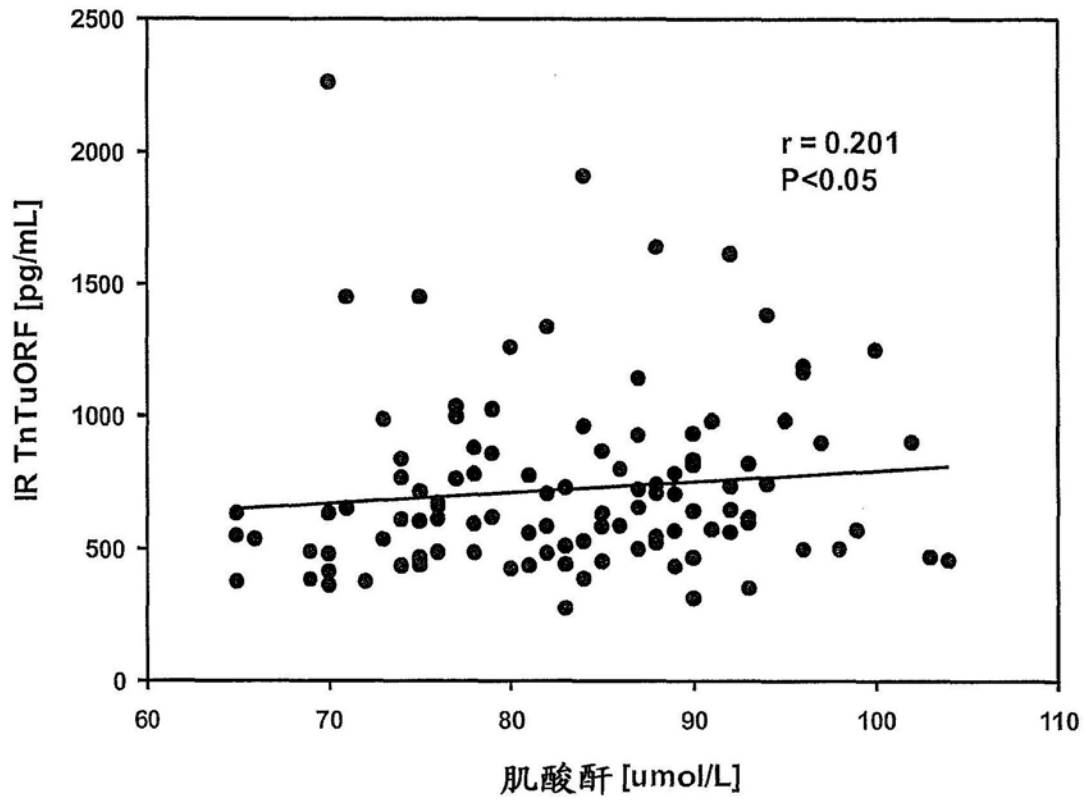


图3

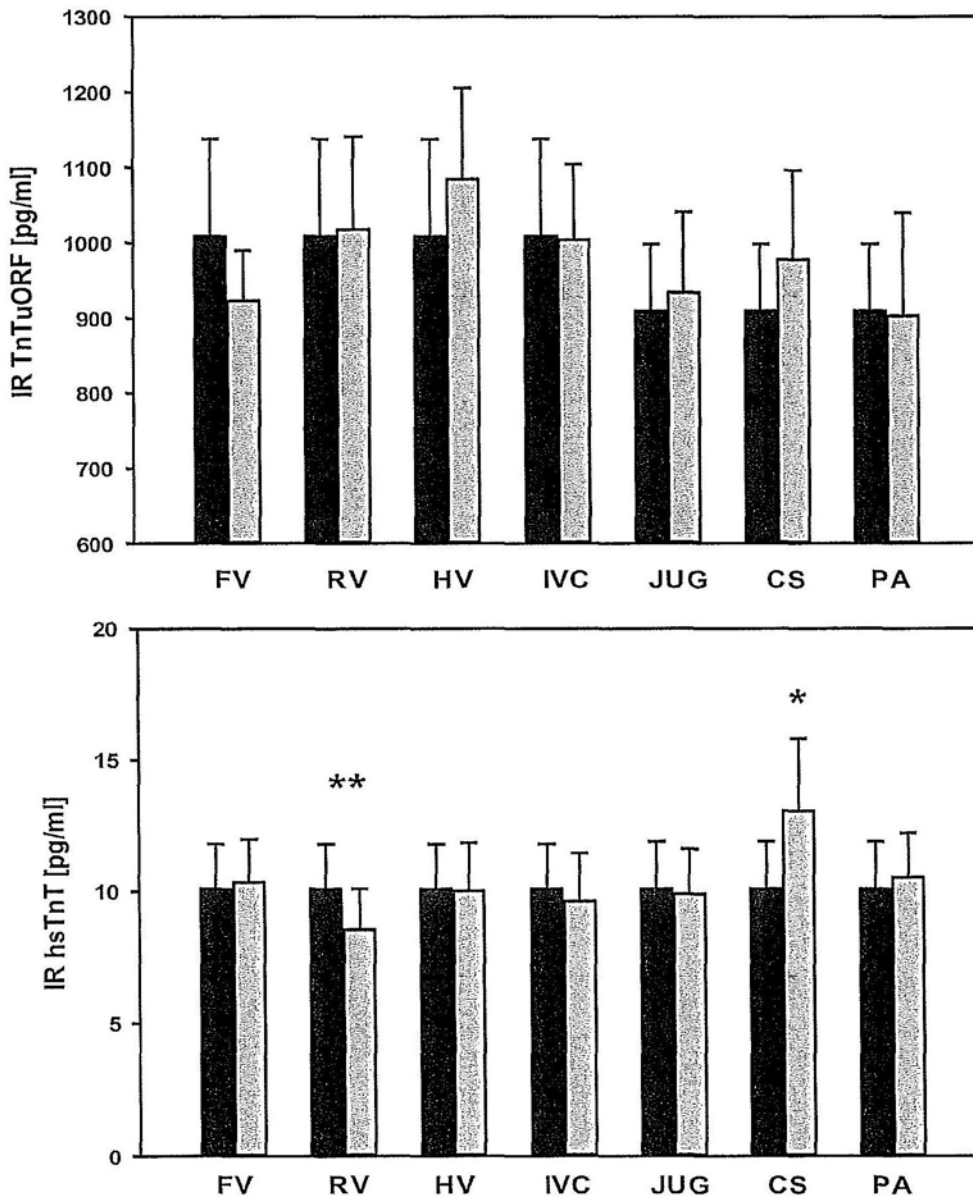


图4

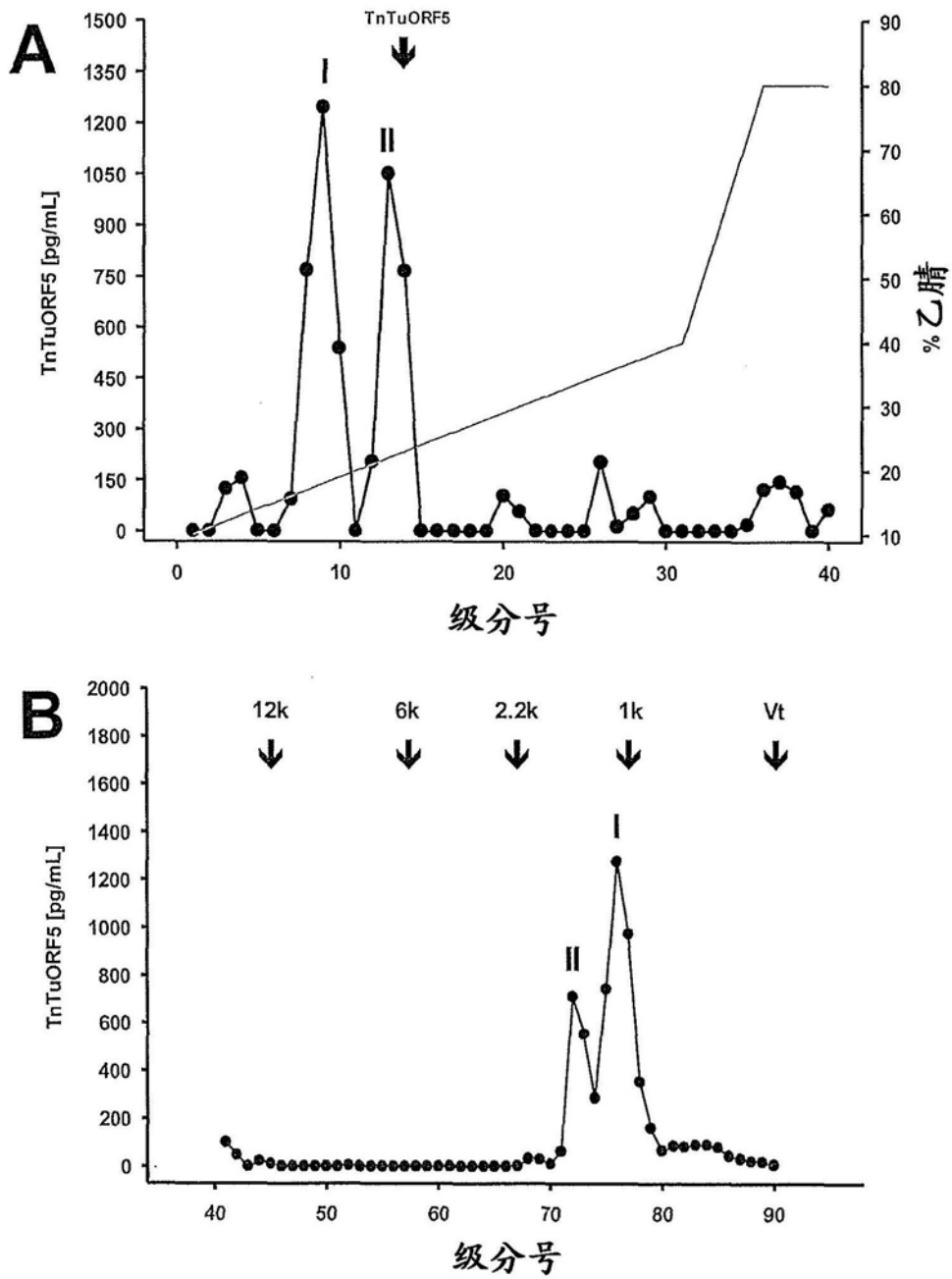


图5

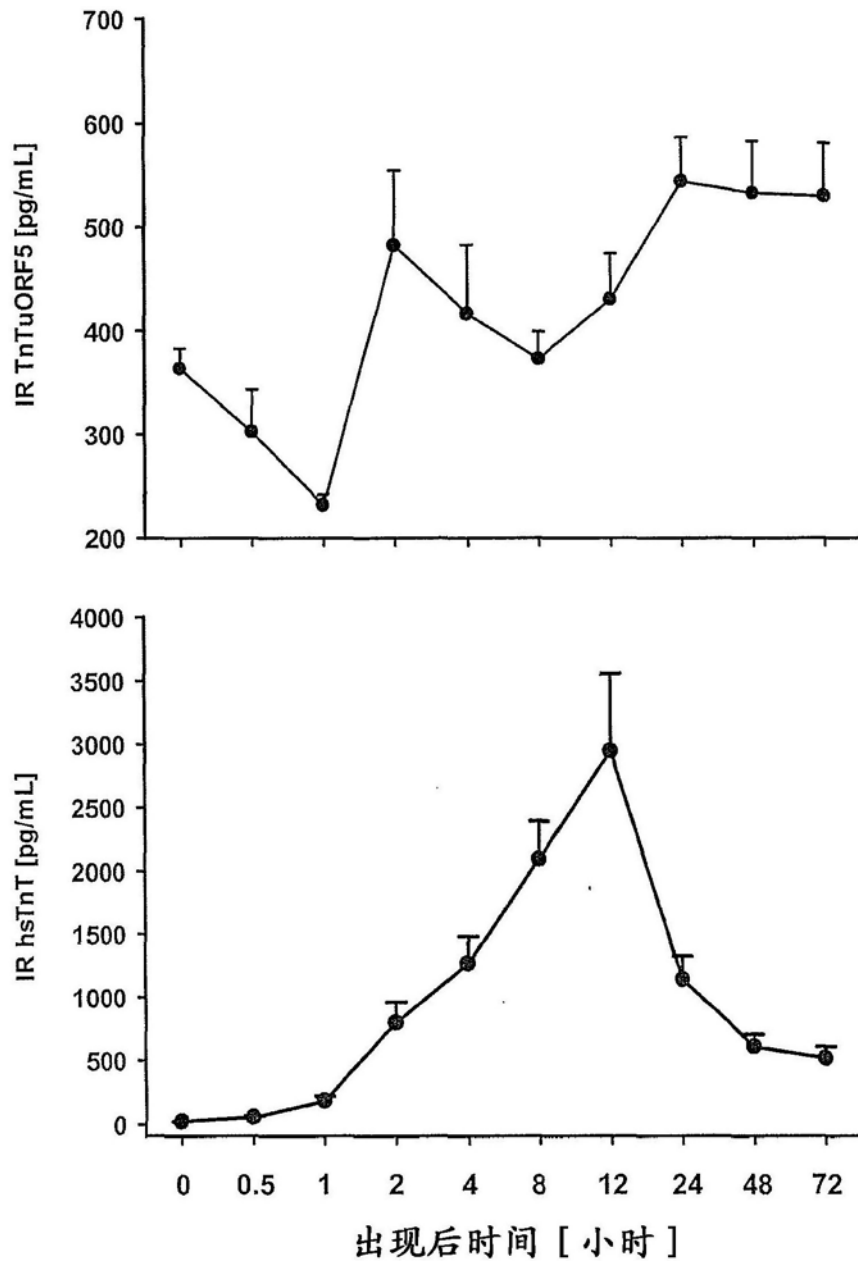


图6

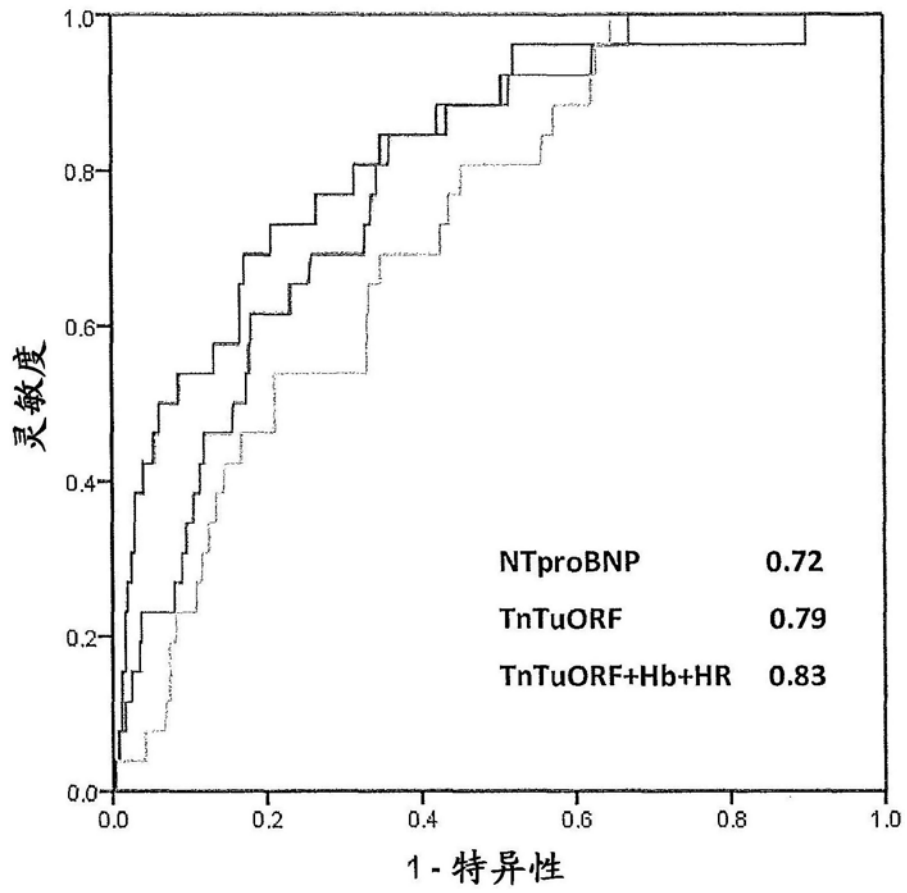


图7

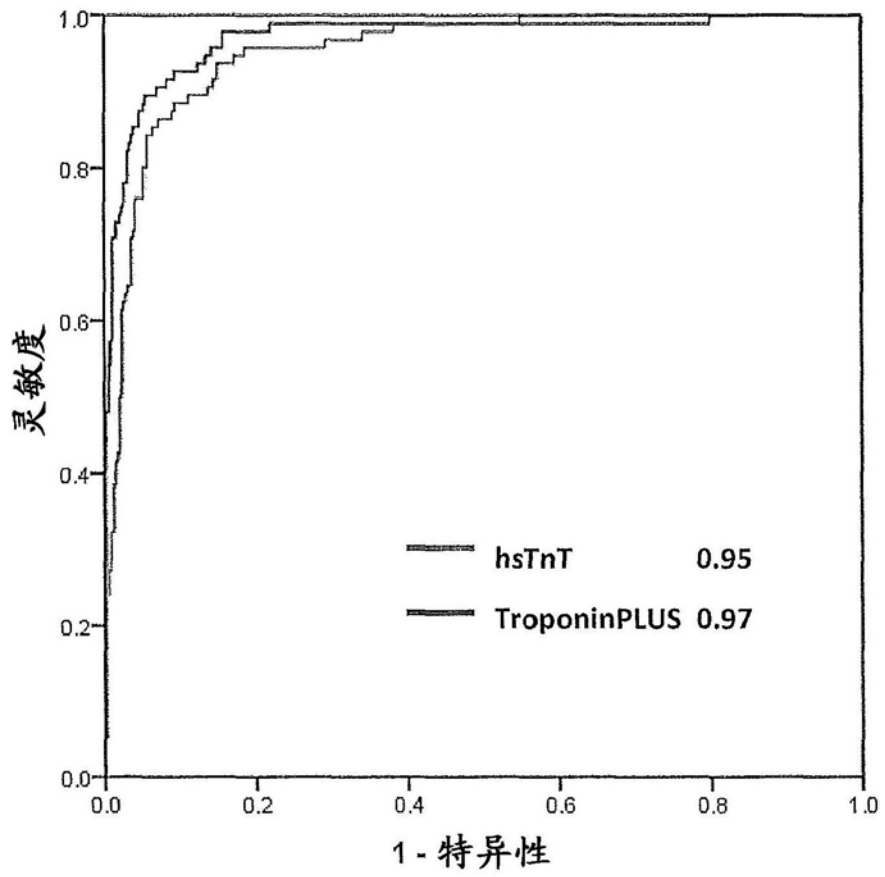


图8

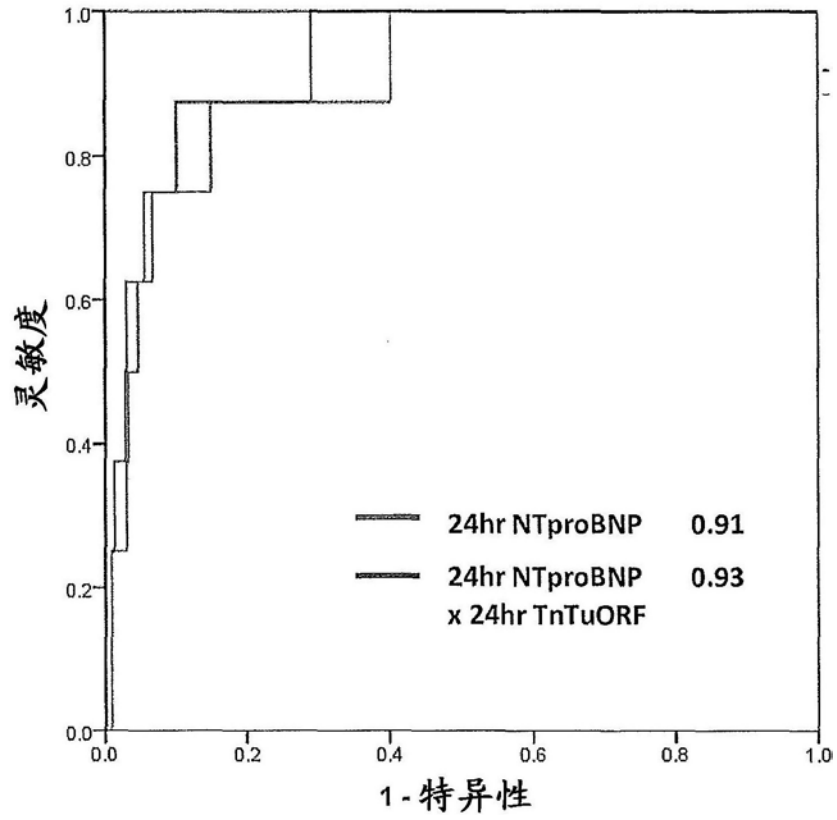


图9

专利名称(译)	用于心脏病症的生物标记物		
公开(公告)号	CN105980857B	公开(公告)日	2018-07-13
申请号	CN201480071218.4	申请日	2014-11-14
[标]申请(专利权)人(译)	奥塔哥创新有限公司		
申请(专利权)人(译)	奥塔哥创新有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	奥塔哥创新有限公司		
[标]发明人	JA李 CJ彭伯顿		
发明人	J·A·李 C·J·彭伯顿		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/53 C07K7/08 C07K7/06 C07K16/18		
CPC分类号	G01N33/6893 C07K14/4716 C07K16/18 C07K2317/33 C07K2317/34 G01N33/6887 G01N2333/4712 G01N2800/32 G01N2800/50 G01N2800/52		
代理人(译)	柴云峰		
优先权	61/904957 2013-11-15 US		
其他公开文献	CN105980857A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明一般地涉及用于心脏病症预后和/或诊断的测定法、方法和试剂盒。本发明还提供例如针对新的类别循环型心肌钙蛋白T上游可读框(TnTuORF)肽生物标记物的结合剂，其用于预测或诊断除心肌梗死或不稳定型心绞痛之外的心脏病症。此外，本发明的结合剂可以用来增强心肌钙蛋白在心肌梗死的预后和诊断中的灵敏度和假阳性性能。

