



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101977933 A

(43) 申请公布日 2011. 02. 16

(21) 申请号 200980108631. 2 (51) Int. Cl.
(22) 申请日 2009. 03. 12 *C07K 16/18* (2006. 01)
(30) 优先权数据 *C07K 7/06* (2006. 01)
61/035, 761 2008. 03. 12 US *C12N 15/12* (2006. 01)
(85) PCT申请进入国家阶段日 *C07H 21/04* (2006. 01)
2010. 09. 10 *G01N 33/53* (2006. 01)
(86) PCT申请的申请数据 *G01N 33/487* (2006. 01)
PCT/NZ2009/000032 2009. 03. 12
(87) PCT申请的公布数据
W02009/113880 EN 2009. 09. 17
(71) 申请人 奥塔哥创新有限公司
地址 新西兰丹尼丁
(72) 发明人 克里斯托弗·约瑟夫·彭伯顿
阿瑟·马克·理查兹
迈克尔·加里·尼科尔斯
蒂莫西·格兰特·扬德尔
(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限
责任公司 11240
代理人 李丙林 张英

权利要求书 4 页 说明书 41 页 序列表 10 页
附图 6 页

(54) 发明名称
生物标记物

(57) 摘要

本发明提供了饥饿素信号肽的结合剂和测定法。上述试剂和测定法可用于预测、诊断、评估或监测对象中的急性心脏疾病、葡萄糖代谢障碍以及糖尿病的方法中。还提供了可用于本发明的方法中的核苷酸、多肽、以及试剂盒。

1. 一种饥饿素信号肽 (GRN-SP) 结合剂。
2. 根据权利要求 1 所述的 GRN-SP 结合剂, 所述 GRN-SP 结合剂结合 :
 - (a) GRN-SP(1-23) SEQ ID NO :15 ;
 - (b) GRN-SP(1-9) SEQ ID NO :17 ;
 - (c) 由选自 SEQ ID NO :16 或 SEQ ID NO :18 的核苷酸序列编码的氨基酸序列 ; 或
 - (d) (a) 至 (c) 中任何一种的变体或片段。
3. 根据权利要求 1 或权利要求 2 所述的 GRN-SP 结合剂, 所述 GRN-SP 结合剂是抗 GRN-SP 抗体或其抗原结合片段。
4. 根据权利要求 2 或权利要求 3 所述的结合剂, 所述结合剂选择性结合 GRN-SP(1-9) (SEQ ID NO :17)。
5. 根据权利要求 3 或权利要求 4 所述的结合剂, 所述结合剂是多克隆、单克隆、双特异性、嵌合或人源化抗体或它们的抗原结合片段。
6. 根据权利要求 1 至 5 中任一项所述的结合剂, 所述结合剂标记有可检测标记。
7. 一种编码 GRN-SP 片段的分离的核酸分子, 其中, 所述核酸选自 :
 - (a) SEQ ID NO :18 或其变体或片段 ;
 - (b) 相对于 SEQ ID NO :18 具有至少 70%、75%、80%、85%、90%、95% 或 99% 序列同一性的序列 ;
 - (c) 长度为至少 10 个核苷酸、能够在严格条件下杂交于 SEQ ID NO :18 或其变体或片段的序列 ;
 - (d) (a) 至 (c) 中任何一种的补体,
条件是所述序列不是 SEQ ID NO :16。
8. 一种包含根据权利要求 7 所述的核酸分子的基因构建体, 其包括载体、表达构建体、或宿主细胞。
9. 一种分离的 GRN-SP 多肽, 选自 :
 - (a) GRN-SP(1-9) (SEQ ID NO :17) 或其变体或片段 ;
 - (b) 相对于 SEQ ID NO :17 的多肽具有至少 70%、75%、80%、85%、90%、95% 或 99% 的氨基酸序列同一性的氨基酸序列 ; 以及
 - (c) 由根据权利要求 7 所述的核酸分子编码的 GRN-SP 多肽。
10. 根据权利要求 9 所述的多肽在制备抗 GRN-SP 抗体中的应用。
11. 一种对来自对象的生物样品中的 GRN-SP 的测定法, 所述测定法包括利用任何已知方法检测和测量在所述样品中的 GRN-SP 水平。
12. 根据权利要求 11 所述的测定法, 其中, 通过使 GRN-SP 结合于结合剂来检测所述样品中的 GRN-SP 水平, 所述结合剂结合或选择性结合 GRN-SP。
13. 一种对 GRN-SP 的测定法, 包括 :
 - (a) 结合来自生物样品的一种或多种 GRN-SP ; 以及
 - (b) 测量结合 GRN-SP 的水平。
14. 根据权利要求 12 或 13 所述的测定法, 其中, 利用根据权利要求 1 至 6 中任一项所述的 GRN-SP 结合剂结合所述 GRN-SP。
15. 根据权利要求 11 至 14 中任一项所述的测定法, 其中, 所述生物样品是来自循环来

源的样品。

16. 根据权利要求 11 至 15 中任一项所述的测定法,其中,利用质谱法,包括通过 SELDI、ESI、MALDI 或 FTICR,或利用选自 RIA、ELISA、荧光免疫测定法以及免疫放射测定法的测定法,来测量 GRN-SP 的水平。

17. 根据权利要求 16 所述的测定法,其中,所述测量包括提供 SELDI 探针,所述探针包含附着于底物的抗 GRN-SP 抗体或其抗原结合片段;使所述抗体或片段接触所述生物样品使得所述抗体或片段捕获来自所述样品的一种或多种 GRN-SP;以及利用 SELDI 测量结合 GRN-SP 的水平。

18. 一种 GRN-SP 测定法,用于在对象中预测、诊断或监测生物事件或障碍。

19. 一种用于在对象中预测、诊断或监测生物事件或障碍的方法,其中,所述事件或障碍与 GRN-SP 释放到循环中有关,所述方法包括:

(a) 测量来自所述对象的生物样品中的 GRN-SP 水平;以及

(b) 比较 GRN-SP 的水平与来自对照的 GRN-SP 水平,

其中所述测量水平与所述对照水平的偏差指示生物事件或障碍。

20. 一种用于在对象中预测、诊断或监测糖尿病、或糖尿病可能性的方法,所述方法包括:

(a) 测量来自所述对象的生物样品中的 GRN-SP 水平;以及

(b) 比较 GRN-SP 的水平与来自对照的 GRN-SP 水平,其中,GRN-SP 的测量水平低于所述对照水平指示糖尿病或易患糖尿病体质。

21. 一种用于评估对象中葡萄糖代谢的方法,所述方法包括:

(a) 在给予葡萄糖后测量对象中的 GRN-SP 水平;以及

(b) 比较所述 GRN-SP 的水平与来自对照的 GRN-SP,

其中,GRN-SP 的测量水平与所述对照水平的偏差指示葡萄糖代谢障碍。

22. 一种用于在对象中预测、诊断或监测急性心脏疾病 (ACD) 的方法,所述方法包括:

(a) 测量来自所述对象的生物样品中的 GRN-SP 水平;以及

(b) 比较所述 GRN-SP 的水平与来自对照的 GRN-SP 水平,

其中,GRN-SP 的测量水平高于所述对照水平指示 ACD。

23. 根据权利要求 22 所述的方法,其中,所述方法用于评估或监测对象中对急性心脏疾病 (ACD) 的治疗的响应,其中 GRN-SP 的测量水平相比于所述对照水平的变化指示响应所述治疗。

24. 根据权利要求 22 或权利要求 23 所述的方法,所述方法包括在 ACD 发作或临床表现的最初 6 小时、4 小时或 2 小时内测量来自所述对象的生物样品中的 GRN-SP 水平。

25. 根据权利要求 20 至 24 中任一项所述的方法,其中,在 ACD 发作或临床表现 ACD 的最初 6 小时、4 小时、2 小时、1 小时、或 30 分钟内测量 GRN-SP 水平。

26. 根据权利要求 22 至 25 中任一项所述的方法,其中,在所述样品中 GRN-SP 水平在 65 至 250pmol/L、65 至 200pmol/L、70 至 150、或 70 至 130pmol/L 的范围内则指示 ACD。

27. 根据权利要求 22 至 25 中任一项所述的方法,其中,在所述样品中 GRN-SP 水平为所述对照水平的 1.5 至 5 倍、或 2 至 3 倍则指示 ACD。

28. 根据权利要求 22 至 27 中任一项所述的方法,其中,所述急性心脏疾病是在呈现的

ECG 上具有 ST 段抬高的急性心肌梗死 (AMI)、不稳定型心绞痛、急性非 ST 段抬高型心肌梗死 ; 心肌缺血、急性心肌损伤、急性药物毒性造成的急性心肌损害、急性心肌病、或心脏移植排斥反应。

29. 根据权利要求 20 至 28 中任一项所述的方法, 其中, 所述生物样品是血液、血浆、血清、唾液、间质液、尿液或心脏组织样品。

30. 根据权利要求 20 至 29 中任一项所述的方法, 其中, 所述测量步骤包括

(a) 使 GRN-SP 结合于结合剂 ; 以及

(b) 测量结合 GRN-SP 的水平。

31. 根据权利要求 20 至 30 中任一项所述的方法, 其中, 所述结合剂是根据权利要求 1 至 6 中任一项所述的结合剂。

32. 根据权利要求 20 至 31 中任一项所述的方法, 其中, 利用选自质谱法 (包括 SELDI、ESI、MALDI 或 FTIC)、RIA、ELISA、荧光免疫测定法、免疫荧光测定法、以及免疫放射测定法的测定法测量 GRN-SP 水平。

33. 根据权利要求 22 至 32 中任一项所述的方法, 所述方法进一步包括测量所述 ACD 的一种或多种非 GRN-SP 标记物的水平, 以及比较所述水平和来自对照的标记物水平, 其中所述测量水平与所述对照水平的偏差、连同高于 GRN-SP 对照水平的 GRN-SP 测量水平, 可预测或诊断所述 ACD, 或可以用来监测所述 ACD。

34. 根据权利要求 33 所述的方法, 其中, 所述非 GRN-SP 标记物选自由肌钙蛋白 T、肌钙蛋白 I、肌酸激酶 -MB、肌红蛋白、ANP、ANP-SP、BNP、NT-BNP、BNP-SP、LDH、天冬氨酸转氨酶、H-FABP、缺血修饰白蛋白、内皮素、肾上腺髓质素、肾素以及血管紧张素 II 构成的组。

35. 根据权利要求 20 以及权利要求 29 至 32 中任一项所述的方法, 当从属于权利要求 20 时, 所述方法进一步包括测量糖尿病的一种或多种非 GRN-SP 标记物的水平并比较所述水平与来自对照的标记物水平, 其中, 所述测量水平与非 GRN-SP 标记物的对照水平的偏差、连同低于 GRN-SP 对照水平的 GRN-SP 测量水平, 可以预测或诊断糖尿病或可以用来监测糖尿病。

36. 根据权利要求 35 所述的方法, 其中, 所述非 GRN-SP 标记物选自由葡萄糖、胰岛素、乳酸酯、甘油三酯以及脂肪酸或其标记物组成的组。

37. GRN-SP 结合剂在制备用于评估对象中生物事件或障碍的 GRN-SP 测定物中的应用。

38. GRN-SP 结合剂在制造用于评估对象中生物事件或障碍的预后、诊断或监测工具中的应用。

39. 根据权利要求 37 或权利要求 38 所述的应用, 其中, 所述生物事件或障碍是糖尿病或糖尿病可能性。

40. 根据权利要求 37 或权利要求 38 所述的应用, 其中, 所述生物事件或障碍是葡萄糖代谢障碍。

41. 根据权利要求 37 或权利要求 38 所述的应用, 其中, 所述生物事件或障碍是 ACD。

42. 根据权利要求 37 至 41 中任一项所述的应用, 其中, 所述结合剂是根据权利要求 1 至 6 中任一项所述的结合剂。

43. 根据权利要求 37 至 41 中任一项所述的应用, 其中, 利用根据权利要求 11 至 18 中任一项所述的测定法、或根据权利要求 19 至 36 中任一项所述的方法, 进行所述评估、预测、

诊断或监测。

44. 一种用于预测、诊断或监测生物事件或障碍的试剂盒,包括 GRN-SP 结合剂;以及可选的用法说明书,用于根据在来自对象的生物样品中测得的 GRN-SP 水平来预测、诊断或监测所述对象中的生物事件或障碍。

45. 一种用于预测、诊断或监测急性心脏疾病 (ACD) 的试剂盒,包括 GRN-SP 结合剂;以及可选地包括用法说明书,用于在对象中在发作或临床表现的 6 或 4 小时内,根据在 ACD 发作或临床表现的 6 或 4 小时内获得的生物样品中测得的 GRN-SP 水平来预测、诊断或监测 ACD。

46. 根据权利要求 44 或权利要求 45 所述的试剂盒,其中,所述 GRN-SP 结合剂是根据权利要求 1 至 6 中任一项所述的结合剂。

47. 根据权利要求 44 至 46 中任一项所述的试剂盒,其中,所述试剂盒被校准以测量 0.1 至 350pmol/L、1 至 300pmol/L、10 至 250、或 20 至 150pmol/L 范围内的 GRN-SP 水平。

生物标记物

技术领域

[0001] 本发明涉及饥饿素信号肽 (GRN-SP) 以及其在预后、诊断和监测生物事件或障碍或状态方面的应用,其中上述生物事件或疾病或状态导致标记物释放到循环(血循环, circulation)中。上述状态包括肥胖症以及相关病症如葡萄糖代谢障碍、糖尿病以及心血管疾病,尤其是急性心脏疾病。

背景技术

[0002] 肥胖症在人群已占到流行比例。肥胖症是西方世界可预防性死亡的主要原因之一。世界卫生组织 (WHO) 将肥胖症列为十大全球健康问题之一。

[0003] 各种遗传因素和社会因素可能是引起人们肥胖的原因。当能量吸收超多能量消耗时,将产生肥胖症,但为基础水平。肥胖个体处于发生相关病症如糖尿病和心血管疾病,特别是急性心脏疾病的风险之中。

[0004] 糖尿病是一种代谢病,其特征在于胰岛素分泌、胰岛素作用其中之一缺乏或全部缺乏。这些缺乏导致慢性高血糖症。糖尿病在全世界影响 1.7 亿以上的人,并且预计在未来 20 年会加倍。

[0005] 糖尿病分为两种类型,称作 I 型糖尿病和 II 型糖尿病。I 型糖尿病是一种自身免疫相关疾病,其中个体的免疫系统会破坏胰腺的 β 细胞。患有 I 型糖尿病的个体通常是饥饿素依赖的。他们呈现有限的饥饿素分泌(若有的话)。

[0006] II 型糖尿病是最常见形式,占 90 至 95% 的病例。大多数 II 型糖尿病对象并不是饥饿素依赖的,但呈现饥饿素分泌和饥饿素作用缺乏,从而导致高血糖症。高血糖症常常是温和的并具有难以识别的症状。因此,许多 II 型糖尿病对象许多年间都未被确诊。在任何特定时间,据估计,10 至 15% 的群体可能具有发展成 II 型糖尿病的危险,但未被确诊。

[0007] 糖尿病最常见是基于用来评估葡萄糖代谢(葡萄糖处理, glucose handling) 的口服葡萄糖耐量试验来诊断。在隔夜空腹以后给予个体葡萄糖饮料以测试个体对葡萄糖的耐受性。该测试进行数小时以测量反应。不幸的是,葡萄糖耐量试验和空腹饥饿素水平测试缺乏敏感性,并且存在假阳性,其限制了它们作为糖尿病的预后指标的有用性。

[0008] 肥胖症也是心血管疾病的重要的危险因子,会使心脏事件的风险增加两至三倍。尽管认识到需要诊断和预后工具来评估个体发展糖尿病、前体葡萄糖代谢障碍、以及相关病症如心血管疾病的风险,但并没有简单而准确的测试。

[0009] 糖尿病和前体葡萄糖代谢障碍、或任何其它形式的血糖代谢障碍或胰岛素血异常的早期诊断和正在进行的评估是重要的,不仅用于处理糖尿病,而且用于处理相关病症,如心血管疾病。除为与血糖代谢障碍或胰岛素血异常有关的病症、疾病提供早期检测方法以外,例如,本发明在心血管领域还具有更广泛的应用。

[0010] 包括急性冠状动脉综合征 (ACS) 的急性心脏疾病涉及各种不同的心肌缺血事件:从不稳定型心绞痛到急性心肌梗死 (AMI)。AMI 表现为这些事件中最严重的事件,因而需要快速和准确的诊断。呈现两种或更多种所描述特点(缺血性胸部不适的病史、系列心电

图 (ECG) 迹线的进化改变以及血浆心脏生物标记物的起落) 的对象被明确确定为正经历 AMI²⁶。然而,相当一部分呈现疑似 AMI 的对象 (40% -50%) 并不具有 ECG 的系列变化、或典型的症状,因此更关注循环生物标记物浓度,以获得准确的诊断^{26,27}。

[0011] 心肌梗死的准确的早期诊断便于立刻采用再灌注治疗,包括有效的经皮或溶栓血管再生成以及附属的抗凝血和抗血小板治疗。随着每小时的诊断和处理延迟,上述治疗在减小死亡率和发病率方面的有效性逐步降低²⁻⁴。鉴于在这种临床情况中需要加速决策,所以需要鉴定循环生物标记物,以提供急性心脏疾病 (尤其是,例如 AMI) 的早期和具体诊断。

[0012] 目前的临床指南确实强调在鉴定心肌梗死和急性冠状动脉综合征中生物标记物测量的重要性²⁶。许多生物标记物已被提出用于此目的,包括肌酸激酶 -MB (CK-MB)、肌钙蛋白 T (TnT)、肌钙蛋白 I (TnI)、BNP、N-BNP (还称作 NP-BNP)、BNP 信号肽 (BNP-SP) 以及肌红蛋白,但对它们的使用存在限制。至血浆心脏生物标记物的可检测或异常升高的时间可以是 6 小时 (肌红蛋白,CK-MB) 至 12 小时 (TnT、TnI、BNP、N-BNP),其中最高水平直到损伤发作以后的 24-48 小时才发生,这对精确的诊断和治疗强加了延迟窗口¹⁻⁴。此外,肌红蛋白和 CK-MB 均是非特异性的并且可以分泌自心外来源,尤其是在外伤或手术期间¹。

[0013] 因而,已知标记物的长期诊断 / 预测能力缺乏特异性标记物的伴随能力,其中特异性标记物在临床表现的最初几小时内提供急性心脏疾病如急性心肌损伤的早期具体诊断。因此仍然需要早期标记物。

[0014] 本发明的另一个目的是提供急性心脏疾病的早期标记物,和 / 或至少向公众提供有用的选择。

发明内容

[0015] 人饥饿素信号肽 (GRN-SP) 是切割自饥饿素 (前饥饿素原) (1-117) SEQ ID NO :1 的 23 个氨基酸肽。人前饥饿素原的处理示于图 5 中。GRN-SP (1-23) 被分开显示在 SEQ ID NO :15 中。

[0016] 本发明的申请人已首次发现,饥饿素信号肽 GRN-SP 以及其片段被释放到循环中。确定和提供了有用的循环生物标记物。先前认为,GRN-SP 仅在细胞内产生²⁵。

[0017] 基于此发现,本发明的申请人在本发明的一个方面提供了用于在对象中预测、诊断、评估或监测生物事件或障碍的方法,其中上述事件与一种或多种 GRN-SP 生物标记物释放到循环中有关,该方法包括测量在获自或源自对象的样品中一种或多种 GRN-SP 生物标记物的水平,然后连同所述一种或多种生物标记物的参考值或范围对上述水平进行分析。

[0018] 在一种实施方式中,GRN-SP 生物标记物是 GRN-SP。在另一种实施方式中,GRN-SP 生物标记物是 GRN-SP 片段。在一种优选实施方式中,GRN-SP 片段是人 GRN-SP (1-9) (SEQ ID NO :17)。

[0019] 在另一种实施方式中,该方法包括比较在获自或源自对象的一个或多个样品中 GRN-SP 生物标记物、优选 GRN-SP 片段的水平与来自对照的 GRN-SP 生物标记物水平,其中测量水平与对照水平的偏差指示生物事件或障碍。

[0020] 在糖尿病对象如 I 型糖尿病对象中,或在患有另一种血糖代谢障碍 (由降低的胰岛素分泌水平造成) 的对象中,饥饿素 (胃促生长素,ghrelin) 水平将不同于正常水平,如 GRN-SP 和 / 或 GRN-SP 片段水平。此发现表明,GRN-SP 可用作上述病症的标记物。取决于

对象的胰岛素状态,在对象中的 GRN-SP 生物标记物水平将比正常水平更高或更低。

[0021] 在糖尿病对象,如 II 型糖尿病对象中,或在患有另一种胰岛素血异常 (dysinsulinemia) 的对象中,饥饿素水平将高于正常水平,如 GRN-SP 和 / 或 GRN-SP 片段水平。此发现表明,GRN-SP 和 / 或 GRN-SP 片段也可用作上述病症以及其它高胰岛素血状态 (hyperinsulinemic states) 如代谢综合征的标记物。取决于对象的胰岛素状态,在对象中的 GRN-SP 生物标记物水平将比正常水平更高或更低。

[0022] 因此,在另一个方面,本发明提供了用于预测、诊断、评估或监测糖尿病或糖尿病可能性 (潜在糖尿病, diabetes potential)、以及特点在于血糖代谢障碍和 / 或胰岛素血异常的其它病症的方法,该方法包括测量在获自或源自对象的样品中 GRN-SP 生物标记物的水平,然后连同所述一种或多种生物标记物的各自的参考值对上述水平进行分析。

[0023] 在另一种实施方式中,该方法包括比较在获自或源自对象的一个或多个样品中 GRN-SP 生物标记物、优选 GRN-SP 片段的水平与来自对照的 GRN-SP 生物标记物的水平,其中偏离对照水平的 GRN-SP 的测量水平指示糖尿病或易患糖尿病的体质、或与血糖代谢障碍和 / 或胰岛素血异常有关的另一种病症。在一种实施方式中,GRN-SP 生物标记物水平可以低于对照水平。

[0024] 本发明还提供了评估对象中的葡萄糖代谢的方法,该方法包括:

[0025] (a) 在给予葡萄糖以后,测量对象中 GRN-SP 生物标记物、优选 GRN-SP 片段的水平; 以及

[0026] (b) 比较所述 GRN-SP 与来自对照 GRN-SP 的水平,

[0027] 其中 GRN-SP 的测量水平与对照水平的偏差指示葡萄糖代谢障碍。

[0028] 本发明的申请人还令人惊讶地发现,在疑似急性冠状动脉综合征 (ACS) 的发作或临床表现以后的最初几小时内 GRN-SP 生物标记物的循环浓度是最高的。在上述最初的几小时内,峰值是正常对照群体的例如 1.5 至 5 倍。

[0029] 因此,在另外的方面,本发明提供了用于在对象中预测、诊断或监测急性心脏疾病 (ACD) 的方法,该方法包括测量在来自对象的生物样品中 GRN-SP 生物标记物、优选 GRN-SP 片段的水平,然后比较所述 GRN-SP 生物标记物的水平与来自对照或参考值或数值范围的 GRN-SP 和 / 或 GRN-SP 片段的水平,其中高于对照水平、或预先确定的参考值或数值范围的 GRN-SP 生物标记物的测量水平指示 ACD。

[0030] 本发明还提供了用于在对象中监测对生物事件或障碍,尤其是急性心脏疾病 (ACD) 的治疗的响应的方法,该方法包括测量在获自或源自对象的生物样品中 GRN-SP 生物标记物、优选 GRN-SP 片段的水平,然后比较所述 GRN-SP 生物标记物的水平与来自对照或参考值或数值范围的 GRN-SP 生物标记物水平,其中 GRN-SP 生物标记物的测量水平相比对照水平、或预先确定的参考值或数值范围的变化指示响应治疗。

[0031] 在另一个方面,本发明还提供了用于在对象中预测、诊断或监测心脏移植排斥反应的方法,该方法包括在心脏移植以后测量在获自或源自对象的生物样品中 GRN-SP 生物标记物、优选 GRN-SP 片段的水平,然后比较所述 GRN-SP 生物标记物的水平与来自对照或参考值或数值范围的 GRN-SP 生物标记物水平,其中高于对照水平、或预先确定的参考值或数值范围的 GRN-SP 生物标记物的测量水平指示移植排斥或移植排斥反应。

[0032] 本发明还提供了用于在对象中区别肺疾病和急性心脏疾病 (ACD) 的方法,该方法

包括测量在获自或源自对象的样品中 GRN-SP 生物标记物、优选 GRN-SP 片段的水平,然后比较所述 GRN-SP 生物标记物的水平与来自对照、或预先确定的参考值或数值范围的 GRN-SP 生物标记物水平,其中高于对照水平、或预先确定的参考值或数值范围的 GRN-SP 生物标记物的测量水平指示 ACD。

[0033] 本发明还提供了用于在对象中预测、诊断或监测急性心脏疾病 (ACD)、心脏移植排斥、或 ACD/ 肺疾病的方法,该方法包括在 ACD、心脏移植排斥或 ACD/ 肺疾病的发作或临床表现的约最初 6 或 4 小时内,测量在获自或源自对象的样品中 GRN-SP 生物标记物、优选 GRN-SP 片段的水平,比较 GRN-SP 生物标记物的测量水平与来自对照、或参考值或数值范围的 GRN-SP 生物标记物水平,其中高于对照水平、或预先确定的参考值或数值范围的 GRN-SP 生物标记物的测量水平指示 ACD 或心脏移植排斥、或心脏移植排斥。

[0034] 在一种更广泛的实施方式中,本发明的申请人的发现可以用来预测、诊断、评估或监测任何事件,其中 GRN-SP、或 GRN-SP 片段被释放到循环中。

[0035] 在本发明的心脏方法的一种实施方式中,在疾病表现或其发生的约 6 小时、或约 4 小时、或约 2 小时、或约 1 小时、约 30 分钟内,或约 15 分钟内,测量获自对象的样品(样品衍生物)的 GRN-SP 生物标记物水平一次或多次。本发明包括在 6 小时、4 小时、2 小时、1 小时、半小时、以及四分之一小时内的单次或多次 GRN-SP 生物标记物测量。还包括在 6 小时以后,对随后获自或源自对象的样品,测量 GRN-SP 生物标记物或另外测量 GRN-SP 生物标记物。

[0036] 在一种实施方式中,本发明的方法是体外方法。

[0037] 在一种实施方式中,样品是血液、唾液、间质液、血浆、尿液、血清或心脏组织。在一种优选实施方式中,样品是血液或血浆。

[0038] 在一种实施方式中,测量步骤包括检测 GRN-SP 生物标记物和结合剂之间的结合,其中结合剂选择性地结合 GRN-SP 生物标记物。在一种实施方式中,测量步骤包括:

[0039] (a) 使 GRN-SP 生物标记物结合于结合剂;以及

[0040] (b) 测量结合 GRN-SP 生物标记物的水平。

[0041] 在一种实施方式中,结合剂是抗体或其抗原结合片段。最常见地,抗体是单克隆、多克隆、双特异性、嵌合或人源化抗体。在一种实施方式中,抗体是单克隆抗体。

[0042] 在另一种实施方式中,利用质谱法来测量 GRN-SP 生物标记物的水平。

[0043] 由抗体结合或检测的 GRN-SP 生物标记物是全长人 GRN-SP 分子 (SEQ ID NO:15) 或其抗原变体或片段。在一种实施方式中,片段的长度为至少 4 个连续氨基酸。在另一种实施方式中,结合或检测的片段是人 GRN-SP(1-9) SEQ ID NO:17。抗体可以结合 GRN-SP 或 GRN-SP 片段的 N 端或 C 端。

[0044] 结合剂选择性地结合的特异性抗原肽包括人 GRN-SP(1-9) (SEQ ID NO:17 或它们的抗原结合片段或变体。

[0045] 在一种实施方式中,利用固定在固相上的抗体或抗体片段来测量 GRN-SP 生物标记物的结合。

[0046] 通常可以借助于一种测定来测量 GRN-SP 生物标记物的水平,其中上述测定选自 RIA、ELISA、荧光免疫测定法、免疫荧光测定试验、质谱法以及免疫放射测定试验。

[0047] 因此,本发明还提供了用于在来自对象的生物样品中对 GRN-SP 生物标记物的测

定,该测定包括利用任何已知方法来检测和测量在样品或样品衍生物中的 GRN-SP 生物标记物的水平。

[0048] 本发明还提供了对 GRN-SP 生物标记物的测定,包括:

[0049] (a) 结合来自样品的一种或多种 GRN-SP 生物标记物;以及

[0050] (b) 测量结合的 GRN-SP 生物标记物的水平。

[0051] 可以利用本发明的 GRN-SP 生物标记物-结合剂来结合 GRN-SP 生物标记物。

[0052] 本发明还提供了 GRN-SP 生物标记物测定,用于预测、诊断、评估或监测对象中的生物事件或障碍。

[0053] 在一种实施方式中,该测定是体外测定。

[0054] 本发明的血糖代谢障碍相关方法可以进一步包括测量例如糖尿病的一种或多种非 GRN-SP/GRN-SP 片段标记物的水平,并比较所述水平与来自对照的标记物水平,其中测量水平与非 GRN-SP 标记物的对照水平的偏差、连同偏离或低于 GRN-SP 的对照水平的 GRN-SP 的测量水平一起,可以预测或诊断例如糖尿病,或可以用来监测例如糖尿病。

[0055] 用于糖尿病的非 GRN-SP/GRN-SP 片段标记物可以包括葡萄糖、胰岛素、乳酸酯以及甘油三酯或脂肪酸水平。其它标记物包括 HbA1C 和果糖胺。

[0056] 本发明的心脏相关方法可以进一步包括测量所述 ACD、或心脏移植排斥、或 ACD/肺疾病的一种或多种非 GRN-SP 或非 GRN-SP 片段标记物的水平,并比较上述水平与来自对照或参考值或数值范围的标记物水平,其中测量水平与非 GRN-SP 标记物的对照或参考水平的偏差、连同高于对照或参考 GRN-SP 生物标记物水平的 GRN-SP 生物标记物的测量水平一起,可以预测或诊断 ACD,或可以用来评估或监测所述 ACD(包括心脏移植排斥)或 ACD/肺疾病。

[0057] 用于急性冠状动脉综合征情况下的标记物包括肌钙蛋白、肌钙蛋白 T、肌钙蛋白 I、肌酸激酶 MB、肌红蛋白、BNP、NT-BNP、BNP-SP、BNP-SP 片段、ANP、ANP-SP、ANP-SP 片段、LDH、天冬氨酸转氨酶、心脏特异性脂肪酸结合蛋白(H-FABP)、缺血修饰白蛋白、内皮素、肾上腺髓质素以及血管紧张素 II。

[0058] 在另一个方面,本发明还提供了 GRN-SP 生物标记物结合剂。在一种实施方式中,本发明的 GRN-SP 生物标记物结合剂结合或检测:

[0059] (a) GRN-SP(1-23)SEQ ID NO:15;

[0060] (b) GRN-SP(1-9)SEQ ID NO:17;

[0061] (c) 由选自 SEQ ID NO:16 或 SEQ ID NO:18 的核苷酸序列编码的氨基酸序列;或

[0062] (d) (a) 至 (c) 的任何一种的变体或片段。

[0063] 结合剂可用于预测、诊断、评估或监测生物事件或障碍,其与 GRN-SP 或 GRN-SP 片段释放到循环中有关。上述事件或障碍包括对象的糖尿病、葡萄糖代谢障碍、以及急性心脏疾病(ACD)。

[0064] 在一种实施方式中,结合剂是抗 GRN-SP 抗体或抗 GRN-SP 片段抗体或任何一种的抗原结合片段。

[0065] 本发明还提供了抗 GRN-SP 生物标记物抗体或其抗原结合片段,其结合:

[0066] (a) GRN-SP 1-23(SEQ ID NO:15);

[0067] (b) GRN-SP 1-9(SEQ ID NO:17);

- [0068] (c) 由选自 SEQ ID NO :16 或 SEQ ID NO :18 的核苷酸序列编码的氨基酸序列 ;或
- [0069] (d) (a) 至 (c) 的任何一种的变体或片段。
- [0070] 抗体可以是单克隆、多克隆、双特异性、嵌合、或人源化抗体,或任何一种的结合片段或构建体 (construct)。
- [0071] 本发明还涉及 GRN-SP 生物标记物结合剂在制备 (manufacture)GRN-SP 生物标记物测定以评估对象中的生物事件或障碍中的应用,或涉及 GRN-SP 生物标记物结合剂在制造一种工具中的应用,该工具用于预后、诊断、评估或监测对象中的生物事件或障碍。在一种实施方式中,事件或障碍与 GRN-SP 和 / 或 GRN-SP 片段释放到循环中有关,包括来自葡萄糖代谢障碍、糖尿病、或急性心脏疾病 (ACD)。
- [0072] 本发明还涉及本发明的抗体或抗原结合片段在制造用于评估生物事件或障碍的预后、诊断、评估或监测工具中的应用,其中上述生物事件或障碍与 GRN-SP 和 / 或 GRN-SP 片段释放到循环中有关并且包括对象中的葡萄糖代谢障碍、糖尿病、急性心脏疾病 (ACD)、心脏移植排斥或 ACD/ 肺疾病。
- [0073] 在一种实施方式中,对预后、诊断或监测工具进行校准以测量约 0.1 至约 500pmol/L、或约 1 至约 300pmol/L、约 10 至约 250 或约 20 至约 150pmol/L 范围内的 GRN-SP 水平。
- [0074] 在另一个方面,本发明提供了用于在对象中预测、诊断或监测生物事件的试剂盒,该试剂盒包括本发明的 GRN-SP 生物标记物结合剂。
- [0075] 在一种实施方式中,对试剂盒进行校准以测量约 0.1 至约 500pmol/L、约 1 至约 300pmol/L、约 10 至约 250pmol/L 或约 20 至约 150pmol/L 范围内的 GRN-SP 生物标记物水平。
- [0076] 在一种实施方式中,试剂盒还包括用法说明书,用于根据在样品或样品衍生物中测得的 GRN-SP 生物标记物水平并通过比较测量水平与对照或参考水平,来预测、诊断、评估或监测对象中的生物事件或障碍,包括葡萄糖代谢障碍例如糖尿病或 ACD。偏离对照或参考水平的 GRN-SP 生物标记物的测量水平指示生物事件或障碍,如,例如, ACD (包括移植排斥)、葡萄糖代谢障碍或糖尿病。在一种实施方式中,样品在发作或临床表现的 4 小时内获得。
- [0077] 在另一个方面,本发明涉及编码 GRN-SP 片段的核酸分子,其中所述核酸选自
- [0078] (a) SEQ ID NO :18 或其变体或片段 ;
- [0079] (b) 相对于 SEQ ID NO :18 具有至少 70%、75%、80%、85%、90%、95%、或 99% 序列同一性的序列 ;
- [0080] (c) 能够在严格条件下杂交于 SEQ ID NO :18 或其变体或片段的长度为至少 10 个核苷酸的序列 ;以及
- [0081] (d) (a) 至 (c) 的任何一种的补体
- [0082] 条件是该序列不是 SEQ ID NO :16。
- [0083] 在一种实施方式中,由核酸分子编码的 GRN-SP 片段是 GRN-SP (1-9) (SEQ ID NO : 17)。
- [0084] 本发明还提供了包含本发明的核酸分子的基因构建体。在一种实施方式中,基因构建体是表达构建体。本发明还提供了包含基因构建体的载体,包含基因构建体或载体的

宿主细胞,由本发明的核酸分子编码的多肽,选择性地结合本发明的多肽的抗体,以及用于重组产生本发明的多肽的方法。

[0085] 因此,在另一个方面,本发明提供了分离的 GRN-SP 生物标记物或其变体或片段,它们选自

[0086] (a) GRN-SP(1-9) SEQ ID NO:17 或其变体或片段;

[0087] (b) 相对于 SEQ ID NO:17 的多肽具有至少 70%、75%、80%、85%、90%、95%、或 99% 氨基酸同一性的氨基酸序列;以及

[0088] (c) 由本发明的核酸分子编码的 GRN-SP 多肽。

[0089] 本发明还涉及本发明的多肽在制备抗 GRN-SP 生物标记物抗体中的应用。

[0090] 用于重组产生本发明的多肽的方法包括以下步骤:

[0091] (a) 培养包含本发明的基因构建体并且能够表达本发明的多肽的宿主细胞;

[0092] (b) 选择表达本发明的多肽的细胞;

[0093] (c) 从细胞中分离表达的多肽;以及可选地

[0094] (d) 纯化表达的多肽。

[0095] 在一种实施方式中,该方法包括用构建体转染宿主细胞的预先步骤。

附图说明

[0096] 现将参照附图来描述本发明,其中

[0097] 图 1A 是柱形图,示出患者中的循环 GRN-SP(1-9) 生物标记物浓度源自心脏来源。

[0098] 图 1B 是柱形图,示出循环成熟饥饿素由心脏清除。

[0099] 图 2 示出放射免疫测定的结果,表明健康人体中 GRN-SP(1-9) 的血浆浓度与 BMI 不表现任何相关性。

[0100] 图 3 示出放射免疫测定的结果,表明正常健康个体血液中的饥饿素 -SPn(1-9) 免疫反应性与体重指数不表现相关性。

[0101] 图 4 示出放射免疫测定的结果,表明通过口服摄入 75g 葡萄糖(一种用于代谢负荷下胰岛素敏感性和释放的常用试验),免疫反应性血浆饥饿素 -SPn(1-9),如饥饿素本身,被显著降低。

[0102] 图 5 是示意图,概述人前饥饿素原的加工,导致产生自由信号、N-饥饿素以及饥饿素肽。

[0103] 图 6 放射免疫测定结果,示出了上图:在患有文件证明的 ST 段抬高的心肌梗死(STEMI)的患者体内,从医院急诊科表现时($t = 0$)起 GHR-SPn(1-9) 生物标记物的连续血浆浓度。注意 GHR-SPn 的峰值水平在表现后约 1-2 小时获得并经 8-12 小时返回正常水平。正常范围的数据由红线标出,其中示出了正常范围的上百分位(upper percentiles)和下百分位(lower percentiles)。下图:在上图中鉴别的相同 STEMI 患者体内的伴随 TnI、CK-MB 以及肌红蛋白血浆水平。

[0104] 图 7 示出 GRN-SP(1-9) 生物标记物抗血清的交叉反应性数据的表格。

[0105] 图 8 示出分别来自大鼠、人、羊、猪、小鼠、狗和猫的饥饿素信号肽序列的共有序列比对(一致性比对,consensus alignment)。

[0106] 定义

[0107] 急性心脏疾病 (ACD) 包括但不限于:急性冠状动脉综合征,包括在呈现的 ECG 上具有 ST 段抬高的急性心肌梗死 (AMI),不稳定型心绞痛,以及急性非 ST 段抬高型心肌梗死;心肌缺血;急性心肌损伤;急性药物毒性造成的急性心肌损害,急性心肌病,以及心脏移植排斥。这些疾病的充分描述、定义可参见参考文献 1。

[0108] ACD/肺疾病是指患有未确诊的、或疑似 ACD 或肺疾病的对象。

[0109] 急性冠状动脉综合征 (ACS) 包括各种不同的心肌缺血事件,包括不稳定型心绞痛,在呈现的心电图 (ECG) 上具有 ST 段抬高的急性心肌梗死,以及在 ECG 上没有 ST 段抬高的急性心肌梗死。

[0110] 术语“抗体”是指具有特定结构的免疫球蛋白分子,其特异性地相互作用(结合)于包含抗原(用于合成抗体)的分子或特异性地相互作用(结合)于与它密切相关的抗原。如在本文中所使用的,术语“抗体”广泛地包括全长抗体并且还可以包括它们的某些抗体片段。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、人源化抗体以及具有成熟亲和力的抗体。如果抗体优先结合于 GRN-SP,例如与非 GRN-SP 多肽具有小于 25%、或小于 10%、或小于 1%或小于 0.1%的交叉反应性,则抗体选择性地或特异性地结合于本发明的 GRN-SP 多肽。通常,对于抗原或表位,抗体将具有不大于 10^{-6} 、或 10^{-7} M、或小于约 10^{-8} M、或 10^{-9} M、或 10^{-10} 、或 10^{-11} 或 10^{-12} M 的结合亲和力(解离常数(Kd)值)。可以例如利用表面等离子体共振、或 Scatchard 分析,来评估结合亲和力。

[0111] 如在本文中所使用的,“抗原结合片段”或“抗体片段”是指完整抗体的一部分,该部分优选保留抗体片段的大多数或全部、或者最低限度至少一种的正常功能。抗体片段的实例包括 Fab、Fab'、F(ab')₂ 以及 Fv 片段、线性抗体、双体分子(diabodies)、单链抗体(ScFV)以及多特异性抗体。

[0112] 如在本文中所使用的,“单克隆抗体”是指这样的抗体,其相对于单靶抗原是高度特异性抗体。单克隆抗体可以获自同源或基本同源抗体的群体,其中,除了可能少量发生的自然突变,每个单克隆抗体是相同的和/或结合相同表位。

[0113] “分离的抗体”是已鉴定的抗体,其已分离或回收(或分离并回收)自它的自然环境的部分中。例如,分离自包括酶和激素的蛋白质。在一种实施方式中,将抗体纯化至按重量计至少 95%、或 96%或 97%或 98%或 99%的抗体。可以通过例如劳氏法来确定纯度。通常,通过至少一个纯化步骤来制备抗体。

[0114] 如在本文中所使用的,术语“结合剂”是指任何固体或非固体材料,其能够结合 GRN-SP 或其片段或变体。在一种实施方式中,该术语是指任何天然或非天然分子,其结合于 GRN-SP 或其片段或变体。结合剂的实例包括蛋白质、肽、核酸、碳水化合物、脂质、以及小分子化合物。一种选择性或特异性结合剂是抗体或其抗原结合片段。

[0115] 如在本文中所使用的,样品或生物样品是指获自或源自待筛查对象的任何样品。样品可以是本领域已知的任何样品,其中可以检测 GRN-SP 生物标记物。包括任何体液如血浆、血液、唾液、间质液、血清、尿液、滑液、脑脊液、淋巴液、精液、羊膜液、心包液和腹水,以及组织如心脏组织,但不限于此。

[0116] 术语“表位”包括任何蛋白质决定子,其能够特异结合于免疫球蛋白和/或 T 细胞受体。即,在抗原上的 B 和/或 T 细胞对其响应的位点。抗原决定簇(表位决定子,

epitopic determinant) 通常包括分子的化学活性表面基团如氨基酸或糖侧链, 并且通常具有特定的三维结构特征、以及特定的电荷特性。表位通常包括至少 3、5 或通常 8-10 个氨基酸。这些氨基酸可以是连续的、或通过三级折叠并列的非连续氨基酸。

[0117] 术语“在发作或临床表现的 6 小时内”包括在医疗设施处例如 ACD、心脏移植排斥或未确诊的或疑似 ACD/ 肺疾病的发作或表现的 1 分钟直至并包括 360 分钟。可以在发作或表现的 4 小时 (从 1 分钟直至并包括 240 分钟) 内、在 2 小时 (从 1 分钟直至并包括 120 分钟) 内或在 1 小时 (从 1 分钟直至并包括 60 分钟) 内、在发作或表现的 5 至 45 分钟、15 至 40 分钟、20 至 35 分钟内、或在 25 至 30 分钟内, 进行测量。

[0118] 在一种实施方式中, 比对照或参考值“更高”或“更低”的水平, 或与对照或参考值的变化、差异、或偏差是统计上显著的。如果和对照或参考水平相比, 与对照或参考水平的水平差异为约 5% 或更大、约 10% 或更大、约 20% 或更大、或约 50% 或更大, 则可以认为存在更高水平、更低水平, 与对照或参考水平或平均对照或参考水平存在差异、或偏差, 或变化。统计上的显著性可以可替换地被计算为 $P \leq 0.05$ 。在一种进一步的可替换实施方式中, 可以通过借助于测定参考限度或参考区间来确定更高水平、更低水平、偏差、以及变化。这些可以计算自直观评估或非参数方法。一般来说, 这些方法计算 0.025 以及 0.975 分位数作为 $0.025 * (n+1)$ 以及 $0.975 * (n+1)$ 。这样的方法在本领域是众所周知的^{22,23}。存在对照中不存在的标记物 (包括 GRN-SP), 例如, 也被设想为更高水平、偏差或变化。不存在在对照中存在的标记物 (包括 GRN-SP) 也被设想为更低水平、偏差或变化。

[0119] 包括获自或源自任何对象的样品如来自没有生物事件或障碍 (包括葡萄糖代谢障碍、糖尿病或 ACD) 的临床病史的正常健康对象以及患有各种 ACD 的对象, 其中上述 ACD 包括但不限于在呈现的 ECG 上具有 ST 段抬高的急性冠状动脉综合征 (AMI), 不稳定型心绞痛, 以及急性非 ST 段抬高型 MI ; 心肌缺血 ; 急性心肌损伤 ; 急性药物毒性造成的急性心肌损害、急性心肌病、以及心脏移植排斥。

[0120] 如在本文中所使用的, 术语“心肌病”是指心肌的疾病, 其中心肌变虚弱。这可以导致心脏抽吸减少。心肌病的常见原因是心脏病发作、病毒感染、高血压、酒精中毒、以及自身免疫病。

[0121] 如在本文中所使用的, “生物事件或障碍”是指这样一类事件, 其中 GRN-SP 生物标记物被释放到对象的循环中, 包括急性和慢性病症。典型的病症包括代谢病如肥胖症、糖尿病、肾病、葡萄糖代谢障碍, 其包括代谢综合征、葡萄糖不耐受、高血糖、以及胰岛素抗性 ; 非酒精性脂肪肝病 (包括非酒精性脂肪肝炎 (steatohepatitis)) 和脂肪肝病 (包括酒精性肝病)、心血管疾病 (包括 ACD 如但不限于急性冠状动脉综合征)。慢性病症的实例是糖尿病和心血管疾病。

[0122] 术语 GRN-SP 是指用于人前饥饿素原序列 (SEQ ID NO :1) 的完全 23 个氨基酸 GRN 信号肽。GRN-SP (1-23) 分开显示在 SEQ ID NO :15 中。GRN-SP 生物标记物包括 GRN-SP 以及 GRN-SP 衍生或 GRN-SP 相关的多肽, 其包括 GRN-SP 的变体或片段, 或基本上由、或由 GRN-SP 的变体或片段组成。可用作 GRN-SP 生物标记物的片段包括 GRN-SP (1-9) (SEQ ID NO :17)。在一种实施方式中, GRN-SP 作为信号多肽, 或作为抗体可以与其结合的抗原多肽。GRN-SP 的变体和片段包括保留至少抗原性结合功能的变体和片段。

[0123] 如在本说明书和权利要求中所使用的, 术语“包括”是指“至少部分由... 组成”;

这就是说,当解释在包括“包括”的本说明书和权利要求中的陈述时,在每个陈述中以此术语为开端的特征均需存在,但也可以存在其它特征。以类似方式解释相关术语如“包含”。

[0124] 如在本文中所使用的,术语“糖尿病”包括 I 型(糖尿病)和 II 型糖尿病。I 型糖尿病被定义为慢性高血糖的状态。在葡萄糖耐量试验 2 小时以后、或在随机样品中,大于 7.0mmol/L 和 / 或超过 11.1mmol/L 的数值的空腹静脉血浆葡萄糖水平指示 I 型糖尿病(参见 Oxford Textbook of Medicine, Warrell et al ;4th Ed, 2005, p317)。

[0125] 如在本文中所使用的,术语“葡萄糖代谢障碍”包括高血糖和低血糖的各种状态(包括代谢综合征)。高血糖状态包括糖耐量减低(IGT)和空腹血糖受损(IFG)。小于 7.0mmol/L 的空腹静脉血浆葡萄糖水平和在 2 小时的葡萄糖耐量试验值在 7.8 和 11.1mmol/L 之间指示 IGT。6.1 至 6.9mmol/L 的空腹血糖水平指示 IFG(参见 Oxford Textbook of Medicine, 上文)。

[0126] 如在本文中所使用的,术语“葡萄糖耐量试验”是指众所周知的葡萄糖试验,其通常在空腹以后进行,其中对象喝溶解在 250ml 水中的 75g 无水葡萄糖(参见 Oxford Textbook of Medicine, 上文)。

[0127] 如在本文中所使用的,术语“多核苷酸”是指任何长度的单或双链脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸聚合物,并且作为非限制性实例包括基因的编码和非编码序列、有义和反义序列、外显子、内含子、基因组 DNA、cDNA、mRNA 前体、mRNA、rRNA、siRNA、miRNA、tRNA、核酶、重组多核苷酸、分离和纯化的天然存在的 DNA 或 RNA 序列、合成 RNA 和 DNA 序列、核酸探针、引物、片段、基因构建体、载体以及修饰多核苷酸。可以类似地理解核酸分子。

[0128] 本文提供的多核苷酸序列的“片段”是连续核苷酸的亚序列,该亚序列能够特异性地杂交于感兴趣的靶,例如,长度为至少 10 个核苷酸的序列。在一种实施方式中,本发明的片段包含 SEQ ID NO :16 的多核苷酸中至少 10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67 或 68 个连续核苷酸。多核苷酸序列的片段可以用作引物、探针、包括在微阵列中、或用于本文的基于多核苷酸的选择方法中。应当类似地理解本发明的其它多核苷酸的片段(如 SEQ ID NO :18)或本文描述的多核苷酸。例如,对于 GRN-SP 多核苷酸 SEQ ID NO :18,片段具有 SEQ ID NO :18 中的至少 10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25 或 26 个连续核苷酸。

[0129] 术语“引物”是指短多核苷酸,通常具有自由的 3' OH 基团,其杂交于模板并用于引发互补于靶的多核苷酸的聚合作用。

[0130] 术语“探针”是指短多核苷酸,在基于杂交的测定中,该短多核苷酸用来检测互补于探针的多核苷酸序列。探针可以包括如本文所定义的多核苷酸的“片段”。

[0131] 如在本文中所使用的,术语“多肽”包括任何长度的氨基酸链,包括全长序列,其中通过共价肽键来连接氨基酸残基。可用于本发明的多肽可以是纯化的天然产物,或部分或全部地利用重组或合成技术来产生。该术语可以指多肽、多肽的聚集体如二聚体或其它多聚体、融合多肽、多肽片段、多肽变体、或它们的衍生物。本文中的多肽可以具有全长 GRN-SP 蛋白(SEQ ID NO :15)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。应当类似地理解本发明的其它多肽（如 SEQ ID NO :17）、或本文描述的其它多肽。

[0132] 多肽的“片段”是多肽的亚序列，其执行生物活性或结合所需要的功能和 / 或提供多肽的三维结构。该术语可以指多肽、多肽的聚集体如二聚体或其它多聚体、融合多肽、多肽片段、多肽变体、或它们的衍生物。在一种实施方式中，片段能够执行上述信号肽活性，或保留 GRN-SP(1-23)、GRN-SP(1-9)、或本发明的其它多肽或本文描述的多肽的抗原结合特性。

[0133] 当应用于本文披露的多核苷酸或多肽序列时，术语“分离的”用来指从它们的天然细胞环境中分离出来的序列。可以通过任何方法或方法的组合来获得分离的分子，包括生化、重组、以及合成技术。可以通过至少一个纯化步骤来制备多核苷酸或多肽序列。

[0134] 如在本文中所使用的，术语“纯化的”并不需要绝对纯度。在一种实施方式中，纯化的是指在样品中多核苷酸、多肽抗体、或宿主细胞至少 90%、或 95%、或 98%、或 99% 的同源性。相对于本文描述的其它分子和构建体，应类似地理解该术语。

[0135] 当用于细胞或宿主细胞时，术语“分离的”描述这样的细胞或宿主细胞，其已获得或分离自生物体或其自然环境，并且随后被保持在如本领域已知的实验室环境中。该术语并不限于单细胞本身，而且指包含在细胞培养中的细胞或宿主细胞，并且可以包括单细胞或单宿主细胞。

[0136] 术语“重组”是指这样的多核苷酸序列，其从自然情况下围绕它的序列分离出来和 / 或重组于在自然情况下并不存在的序列。

[0137] 由“重组”多核苷酸序列翻译而产生“重组”多肽序列。

[0138] 如在本文中所使用的，术语“变体”是指不同于具体鉴定序列的多核苷酸或多肽序列，其中 1 至 18 或更多核苷酸、以及 1 至 6 或更多氨基酸残基被缺失、取代、或添加。具体设想 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17 或 18 个核苷酸的取代。还设想 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基因变体、或非天然存在的变体。变体可以来自相同或来自其它物种并且可以包括同源物、旁系同源物 (paralogues) 以及直系同源物 (orthologues)。在某些实施方式中，可用于本发明的多肽的变体具有包括信号肽活性或抗原结合特性的生物活性，其相同于或类似于亲代多肽或多核苷酸的生物活性。关于多核苷酸和多肽的术语“变体”包括如本文所定义的所有形式的多核苷酸和多肽。

[0139] 相对于本发明的序列，变体多核苷酸序列呈现至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 71%、至少 72%、至少 73%、至少 74%、至少 75%、至少 76%、至少 77%、至少 78%、至少 79%、至少 80%、至少 81%、至少 82%、至少 83%、至少 84%、至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99% 的同一性。借助于至少 10 个核苷酸位置、至少 15 个核苷酸位置、至少 20 个核苷酸位置、至少 27 个核苷酸位置、至少 40 个核苷酸位置、至少 50 个核苷酸位置、至少 60 或至少 65 个核苷酸位置的对比窗，或借助于 SEQ ID NO :16 的全长多核苷酸，来确定同一性。对于本文披露的其它多核苷酸，可以类似地确定同一性。例如，对于 SEQ ID NO :18，对比窗可以是至少 10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26 或 27 个核苷酸位置。

[0140] 可以基于候选和主题多核苷酸序列之间的重叠序列的全长来计算多核苷酸序列同一性,其中利用全局序列比对(global sequence alignment)程序(例如Needleman, S. B. and Wunsch, C. D. (1970) *J. Mol. Biol.* 48,443-453)。Needleman-Wunsch 全局比对算法的全面实施参见EMBOSS程序包中的针程序(Rice, P. Longden, I. and Bleasby, A. EMBOSS: The European Molecular Biology OpenSoftware Suite, *Trends in Genetics* June 2000, vol 16, No 6. pp. 276-277),其可以获自<http://www.hgmp.mrc.ac.uk/Software/EMBOSS/>。欧洲生物信息研究所服务器还提供设施以在两个序列之间在线进行EMBOSS-针全局比对(<http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/>)。

[0141] 可替换地,可以使用GAP程序,其计算两个序列的最佳全局比对而没有罚分末端间隙。在以下论文中描述了GAP:Huang, X. (1994) *On Global Sequence Alignment (Computer Applications in the Biosciences* 10,227-235)。

[0142] 多核苷酸变体还包括那些变体,其呈现与一个或多个具体鉴定序列的相似性,其很可能保存那些序列的功能对等并且将不能合理地预计以随机机会已发生。此程序发现在序列之间相似性的区域并且对于每个这样的区域报道“E值”,该E值是在包含随机序列的固定参考大小的数据库中可以预计偶然看到这样的配对的次数的预计数。这种数据库的大小在b12seq程序中默认设置。对于较小的E值(远小于1),E值大约是这样的随机配对的概率。

[0143] 当和任何一种具体鉴定序列比较时,变体多核苷酸序列优选呈现小于 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。

[0144] 还可以下述方式来确定多核苷酸序列同一性和相似性。利用序列比对算法和序列相似性搜索工具如在Genbank、EMBL、Swiss-PROT以及其它数据库中,比较主题多核苷酸序列和候选多核苷酸序列。*Nucleic Acids Res* 29:1-10 and 11-16,2001提供了在线资源的实例。

[0145] BLASTN 优选用于确定根据本发明的多核苷酸变体的序列同一性。

[0146] BLASTN(来自BLAST成套程序,版本2.2.,2008年4月18日,在b12seq中(Tatiana A. et al, *FEMS Microbiol Lett.* 174:247-250(1999)、Altschul et al., *Nuc. Acis Res* 25:3389-3402, (1997)) 可公开获自NCBI(<ftp://fto.ncbi.nih.gov/blast/>)或获自NCBI(于Bethesda, Maryland, USA)。除了应关闭低复杂性部分的过滤,采用b12seq的默认参数。

[0147] 可以使用以下UNIX命令行参数来检查多核苷酸序列的同一性:

[0148] `b12seq-i nucleotideseq1-jnucleotideseq2-F F-p blastn`

[0149] 参数-F F关闭低复杂性部分的过滤。参数-p选择用于序列对的适当的算法。在进行“Identities =”中,b12seq程序将序列同一性报道为相同核苷酸的数量和百分比。

[0150] 可替换地,变体多核苷酸是这样的多核苷酸,该多核苷酸在严格条件下杂交于指定的多核苷酸序列、或其补体。

[0151] 术语“在严格条件下杂交”、以及其语法等效表述,是指在温度和盐浓度的规定条件下,多核苷酸分子杂交于靶多核苷酸分子(如固定在DNA或RNA印迹上的靶多核苷酸分子,如Southern印迹或Northern印迹)的能力。可以通过在较低严格条件下的最初杂交,然后增加严格性至所期望的严格性,来确定在严格杂交条件下杂交的能力。

[0152] 关于长度大于约100个碱基的多核苷酸分子,典型的严格杂交条件是低于天然

双链体的解链温度 (T_m) 不大于 25 至 30°C (例如, 10°C) (一般地参见, Sambrook et al, Eds, 1987, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Press; Ausubel et al, 1987, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing, 其以引用方式结合于本文)。可以通过公式 $T_m = 81.5 + 0.41\% (G+C - \log(Na^+))$ 来计算大于约 100 个碱基的多核苷酸分子的 T_m (Sambrook et al, Eds, 1987, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Press; Bolton and McCarthy, 1962, *PNAS* 84:1390)。用于长度大于 100 个碱基的多核苷酸的典型的严格条件将是杂交条件如在 6X SSC、0.2% SDS 的溶液中预洗涤; 在 65°C、6X SSC、0.2% SDS 下杂交过夜; 接着两次 30 分钟的洗涤, 每次在 1X SSC、0.1% SDS 中, 于 65°C 下, 以及两次 30 分钟的洗涤, 每次在 0.2X SSC、0.1% SDS 中, 于 65°C 下。

[0153] 在一种实施方式中, 严格条件使用在 42°C 下的 50% 甲酰胺、5x SSC、50mM 磷酸钠 (pH 6.8)、0.1% 焦磷酸钠、5x 登哈特溶液、经超声处理的鲑鱼精子 DNA (50 μ g/ml)、0.1% SDS、以及 10% 硫酸葡聚糖, 在 42°C 下在 0.2x SSC 中洗涤以及在 55°C 下在 50% 甲酰胺中洗涤, 接着在 55°C 下用包含 EDTA 的 0.1x SSC 洗涤。

[0154] 关于长度小于 100 个碱基的多核苷酸分子, 典型的严格杂交条件是低于 T_m 5 至 10°C。平均来说, 长度小于 100bp 的多核苷酸分子的 T_m 被降低大约 (500/寡核苷酸长度)°C。

[0155] 关于 DNA 模拟物, 其称作肽核酸 (PNA) (Nielsen et al, *Science*. 1991 Dec 6; 254(5037):1497-500), T_m 值高于 DNA-DNA 或 DNA-RNA 杂交体的 T_m 值, 并且可以利用在 Giesen et al, *Nucleic Acids Res.* 1998 Nov 1; 26(21):5004-6 中描述的公式来计算。对于长度小于 100 个碱基的 DNA-PNA 杂交体, 典型的严格杂交条件是低于 T_m 5 至 10°C。

[0156] 变体多核苷酸也包括这样的多核苷酸, 其不同于本发明的序列, 但是由于遗传密码的简并性, 其编码与由本发明的多核苷酸编码的多肽具有类似活性的多肽。并不改变多肽的氨基酸序列的序列改变是“沉默变化 (silent variation)”。除了 ATG (蛋氨酸) 和 TGG (色氨酸), 通过技术领域公认的技术, 可以改变用于相同氨基酸的其它密码子, 例如, 以在特定宿主生物体中优化密码子表达。

[0157] 在编码多肽序列中导致一个或若干氨基酸的保守取代而没有显著改变其生物活性的多核苷酸序列改变也包括在本发明中。本领域技术人员将明了用于进行表型沉默氨基酸取代的方法 (参见, 例如, Bowie et al, 1990, *Science* 247, 1306)。

[0158] 利用 b12seq 程序并借助于 tblastx 算法 (如上所述), 可以确定由于编码多肽序列中的沉默变化和保守取代而产生的变体多核苷酸。

[0159] 相对于多肽, 术语“变体”还包括天然存在的、重组和合成产生的多肽。相对于本发明的序列, 变体多肽序列优选呈现至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 71%、至少 72%、至少 73%、至少 74%、至少 75%、至少 76%、至少 77%、至少 78%、至少 79%、至少 80%、至少 81%、至少 82%、至少 83%、至少 84%、至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99% 的同一性。基于至少 5、至少 7、至少 10、至少 15、至少 20、至少 21 或至少 22 个氨基酸位置的对比窗, 或基于 SEQ ID NO:15 的多肽、或在本发明中披露或使用的其它多肽的全长, 来确定同一性。例如, 对于 SEQ ID NO:17, 对比窗可以是至少 5、

6、7、8 或氨基酸位置,或多肽的全长。

[0160] 多肽变体还包括那些变体,其呈现与一个或多个具体鉴定序列的相似性,其很可能保存那些序列的功能对等 (functional equivalence) 并且将不能合理地预计通过随机机会已发生。正如上面所讨论的,在 GRN-SP 变体的情况下,功能可以是作为信号多肽、或抗原多肽、或这两者。

[0161] 可以下述方式来确定多肽序列同一性和相似性。利用 bl2seq 中的 BLASTP (来自 BLAST 成套程序,版本 2.2.18[2008 年 4 月]),其可公开获自 NCBI (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/>),比较主题多肽序列和候选多肽序列。除了应关闭低复杂性区域的过滤,采用 bl2seq 的默认参数。

[0162] 可以使用以下 UNIX 命令行参数来检查多肽序列的相似性:

[0163] `bl2seq-i peptideseq1-j peptideseq2-F F-p blastp`

[0164] 参数 -F F 关闭低复杂性部分的过滤。参数 -p 选择用于序列对的适当的算法。此程序发现在序列之间具有相似性的区域并且对于每个这样的区域报道“E 值”,该 E 值是在包含随机序列的固定参考大小的数据库中可以预计偶然看到这样的配对的次数的预计数。对于较小的 E 值 (远小于 1),E 值大约是这样的随机配对的概率。

[0165] 当和任何一种具体鉴定序列比较时,变体多肽序列通常呈现小于 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。

[0166] 也可以基于在候选和主题多肽序列之间重叠序列的全长并利用全局序列比对程序来计算多肽序列同一性。EMBOSS 针 (可获自 <http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/>) 和 GAP (Huang, X. (1994) On Global Sequence Alignment. Computer Applications in the Biosciences 10, 227-235.), 正如上面所讨论的,也是适宜的用来计算多肽序列同一性的全局序列比对程序。

[0167] 如上所述的 BLASTP 的应用优选用于确定根据本发明的多肽变体。

[0168] 在一种实施方式中,变体包括这样的肽,其序列与本文中的人 GRN-SP(1-23) SEQ ID NO:15 或 GRN-SP(1-9) SEQ ID NO:17 相差 1、2、3、4、5、6 或更多保守性氨基酸取代、缺失、添加或插入,其并不影响肽的生物活性。保守取代通常包括一种氨基酸取代另一种具有类似特性的氨基酸,例如,在以下组内的取代:缬氨酸、甘氨酸;甘氨酸、丙氨酸;缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸;天冬氨酸、谷氨酸;天冬酰胺、谷氨酰胺;丝氨酸、苏氨酸;赖氨酸、精氨酸;以及苯丙氨酸、酪氨酸。保守取代的实例还可以参见如示于序列列表中的 GRN-SP 的序列,从而示出和人序列相比在不同哺乳动物物种中的取代。其它保守取代可以获自图 8 和以下表 1。

[0169] 表 1

原有残基	典型取代	其它取代
Ala (A)	val; leu; ile	
Arg (R)	lys; gln; asn	
Asn (N)	gln; his; lys; arg	
Asp (D)	glu	
Cys (C)	ser	tyr
Gln (Q)	asn	
Glu (E)	asp	
Gly (G)	pro; ala	arg, ser
His (H)	asn; gln; lys; arg	
[0170] Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; 正亮氨酸	
Leu (L)	正亮氨酸; ile; val; met; ala; phe	
Lys (K)	arg; gln; asn	
Met (M)	leu; phe; ile	val
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	
Pro (P)	ala	val, leu, ser, thr
Ser (S)	thr	
Thr (T)	ser	ala
Trp (W)	tyr; phe	leu
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; 正亮氨酸	

[0171] 基于常见的侧链性能,天然存在的残基被分组:

[0172] (1) 疏水的:正亮氨酸、met、ala、val、leu、ile;

[0173] (2) 中性亲水的:cys、ser、thr;

[0174] (3) 酸性的:asp、glu;

[0175] (4) 碱性的:asn、gln、his、lys、arg;

[0176] (5) 影响链定向的残基:gly、pro;以及

[0177] (6) 芳族的:trp、tyr、phe。

[0178] 非保守取代将意味着这些中的一种类型的一个成员替换为另一种类型的一个成员。

[0179] 其它变体包括具有影响肽稳定性的修饰的肽。这样的类似物可以包含,例如,在肽序列中的一个或多个非肽键(其代替肽键)。还包括类似物,这些类似物包括不同于天然存在的L-氨基酸的残基,例如D-氨基酸或非天然存在的合成氨基酸,例如 β 或 γ 氨基酸以及环状类似物。

[0180] 可以通过本领域已知的诱变方法来进行取代、缺失、添加或插入。技术人员将明了用于进行表型沉默氨基酸取代的方法。参见例如Bowie et al.,1990,Science 247,1306.⁹, Kunkel, T;1985,PNAS,85p 488.²⁷。

[0181] 本发明的多肽还包括那些在合成期间或以后已被修饰的多肽,例如通过生物素

化、苄基化、糖基化、磷酸化、酰胺化,通过衍化,其中使用封闭/保护基团等。上述修饰可以提高多肽的稳定性或活性。上述修饰在本领域是众所周知的。参见例如, Sambrook and Ausubel(上文)、以及 Lundblad, R, CRC Press, 1995.²⁸。

[0182] 术语“基因构建体”是指多核苷酸分子,通常是双链 DNA,其可以在其中已插入另一种多核苷酸分子(插入多核苷酸分子)如但不限于 cDNA 分子。基因构建体可以包含必要元件,其允许转录插入多核苷酸分子,并且可选地,将转录物翻译到多肽中。插入多核苷酸分子可以源自宿主细胞,或可以源自不同的细胞或生物体和/或可以是重组多核苷酸。在宿主细胞内以后,基因构建体可以被整合于宿主染色体 DNA。基因构建体可以连接于载体。

[0183] 术语“载体”是指多核苷酸分子,通常是双链 DNA,其用来将基因构建体转运到宿主细胞中。载体能够在至少一种另外的宿主系统如大肠杆菌 (*E. coli*) 中复制。

[0184] 术语“表达构建体”是指基因构建体,该基因构建体包括必要元件,其允许转录插入片段多核苷酸分子,并且可选地,将转录物翻译到多肽中。表达构建体通常在 5' 至 3' 方向包含:

[0185] (a) 启动子,其在构建体将被转化进入的宿主细胞中起作用,

[0186] (b) 待表达的多核苷酸,以及

[0187] (c) 终止子,其在构建体将被转化进入的宿主细胞中起作用。

[0188] 术语“编码区”或“开放阅读框”(ORF)是指基因组 DNA 序列或 cDNA 序列的有义链,其能够在适当调节序列的控制下产生转录产品和/或多肽。通过 5' 翻译起始密码子和 3' 翻译终止密码子的存在来鉴定编码序列。当被插入基因构建体时,并且当它可操作连接于启动子和终止子序列和/或其它调节元件时,“编码序列”能够被表达。

[0189] “调节元件”和“多核苷酸调节元件”是指任何元件,其控制或影响多核苷酸插入(片段)表达自载体、基因构建体或表达框,并且包括启动子、转录控制序列、翻译控制序列、复制起点、组织特异性调节元件、时间调节元件(temporal regulatory element)、增强子、聚腺苷酰化信号、阻遏物以及终止子。根据本发明,相对于待表达自载体、基因构建体或表达框的多核苷酸插入(片段),调节元件可以是同源的或异源的。

[0190] 如在本文中所使用的,关于多核苷酸调节元件(PRE)和在基因构建体中 PRE 可操作连接的序列之间的关系,“同源”是指,PRE 通常在性质上与在构建体中它可操作连接的编码序列有关。根据本发明,同源多核苷酸调节元件可以可操作连接于感兴趣的多核苷酸以致感兴趣的多核苷酸可以表达自载体、基因构建体或表达框。

[0191] 如在本文中所使用的,关于多核苷酸调节元件(PRE)和在基因构建体中 PRE 可操作连接的序列之间的关系,“异源”是指 PRE 并不通常在性质上与在构建体中它可操作连接的编码序列有关。上述 PRE 可以包括通常与不同基因(不同于 GRN)有关的启动子,和/或分离自任何其它细菌、病毒、真核细胞、或哺乳动物细胞的启动子。

[0192] “可操作连接”是指待表达的序列置于调节元件的控制下,其中上述调节元件包括启动子、转录控制序列、翻译控制序列、复制起点、组织特异性调节元件、时间调节元件、增强子、聚腺苷酰化信号、阻遏物以及终止子。

[0193] 术语“非编码区”是指非翻译序列,其是翻译起始位点的上游和翻译终止位点的下游。这些序列还分别称作 5' UTR 和 3' UTR。这些区包括为转录起始和终止以及为翻译效率调节所需要的元件。

[0194] 终止子是这样的序列,其终止转录并存在于在翻译序列下游的基因的 3' 未翻译末端。终止子是 mRNA 稳定性的重要的决定子 (determinants) 并在某些情况下已发现具有空间调节功能。

[0195] 术语“启动子”是指在编码区上游的非转录顺式调节元件,其调节基因转录。启动子包括顺式起始元件,其指定转录起始位点以及保守盒如 TATA 盒,以及由转录因子结合的基序。

[0196] 术语本发明的多核苷酸或多肽的“改变表达”用来包括这样的情况,其中对应于本发明的多核苷酸的基因组 DNA 被修饰,从而导致本发明的多核苷酸或多肽的改变表达。基因组 DNA 的修饰可以通过基因转化或本领域已知的用于诱导突变的其它方法进行。“改变表达”可以涉及所产生的信使 RNA 和 / 或多肽的量的增加或减少并且还可以导致多肽的改变的活性,这是由于所产生的多核苷酸和多肽的序列的改变。

[0197] 如在本文中所使用的,“对象”优选是哺乳动物并且包括人、以及非人哺乳动物如猫、狗、马、牛、羊、鹿、小鼠、大鼠、灵长类动物(包括大猩猩、猕猴以及黑猩猩)、负鼠以及其它家庭农场或动物园动物。在一种实施方式中,哺乳动物是人。

[0198] 如在本文中所使用的,术语“表现”是指对象在医疗设施如诊所或医院中的表现。

[0199] 如在本文中所使用的,“治疗有效量”或“治疗有效剂量”是指足以产生所期望的生理效应的量或能够实现所期望的结果的量,尤其用于治疗所期望的疾病或病症,包括减少或消除疾病或病症的一种或多种症状或表现。

[0200] 术语“治疗”以及“预防”是指治疗或预防措施,其缓和、改善、处理、防止、抑制、阻止或逆转生物事件的进展,其中上述生物事件的特征在于 GRN-SP 水平显示与正常对照水平的偏差并且包括葡萄糖代谢障碍、糖尿病、高血糖症、肥胖症、心血管疾病、ACD、或心脏移植排斥或其效应,尤其是 ACS。对象可以显示以下一种或多种的可观测或可测量的(统计上显著的)减小:葡萄糖、乳酸酯、胰岛素、脂肪酸、甘油三酯、Tn、TnI、TnT、BNP、N-BNP、BNP-SP(及其片段)、ANP、ANP-SP(及其片段)、肌酸激酶-MB、肌红蛋白、LDH、天冬氨酸转氨酶、H-FABP、缺血修饰白蛋白、内皮素、肾上腺髓质素、肾素、血管紧张素 II、以及本领域技术人员已知的其它常用临床标记物,这表明得到改善。

[0201] 如在本文中所使用的,术语“质谱法”是指基于它们的质荷比来过滤、检测、以及测量离子的方法。参见例如 US 5, 719, 060、US 6, 204, 500、US 6, 107, 623、US 6, 124, 137、US 6, 225, 047、US 6, 268, 144、US 7, 057, 165、以及 US 7, 045, 366。通常的质谱技术包括基质辅助激光解吸电离(MALDI)和表面增强激光解吸电离(SELDI)。两者均可结合飞行时间分析器(MALDI-TOF 和 SELDI-TOF),其便于分析在非常短的离子脉冲中的毫微微摩尔水平的分析物。

[0202] 例如在 US 5, 719, 600、US 6, 124, 137、以及 US 6, 225, 047 中讨论的并可用于本发明的 SELDI 的版本包括表面增强亲和捕获(Surface-Enhanced Affinity Capture(SEAC))、表面增强完全解吸(Surface-Enhanced Neat Desorption(SEND))、以及表面增强感光性附着与释放(Surface-Enhanced Photolabile Attachment and Release(SEPAR))。

[0203] 提及本文披露的一系列的数字(例如 1 至 10)还旨在包括在所述范围内的所有相关数字(例如,1、1.1、2、3、3.9、4、5、6、6.5、7、8、9 以及 10)以及在上述范围内的任何范围的

有理数（例如 2 至 8、1.5 至 5.5 以及 3.1 至 4.7），因而，明确披露了本文明确披露的所有范围的所有子范围。这些仅是具体设想的实例并且在列举的最低值和最高值之间的数值的所有可能的组合被认为以类似方式明确陈述在本申请中。

具体实施方式

[0204] 饥饿素（胃促生长素，GRN）是通过胎盘、肾脏、下丘脑和垂体的内分泌细胞产生的一种多肽激素。在胃里（饥饿素产生的主要场所），胃底内层的上皮细胞产生饥饿素。饥饿素参与调节能量平衡。饥饿素通过激活下丘脑摄食中枢用于增强个体的食欲、摄食量和最终体重。饥饿素诱发高血糖症，并抑制胰岛素的释放。在心血管组织中也发现了饥饿素及其受体（Garcia, E et al ; Ghrelin and cardiovascular health, Current opinion in Pharmacology, vol 6, Issue 2, 2006, p142-147）。如在 SEQ ID NO:1 中所示，前饥饿素原是一种 117 个氨基酸分子。它由通过二硫桥连接的两个多肽链（A 和 B）构成。前饥饿素原（1-117）被剪切以产生 23 个氨基酸的信号肽（SEQ ID NO:15）、94 个氨基酸的饥饿素原以及 28 个氨基酸的饥饿素激素。人前饥饿素原的加工示于图 5 中。

[0205] 长期以来一直认为，GRN-SP 的功能作用限于控制饥饿素在内质网中的运输。据推断，一旦做到这一点后，信号肽即被降解，甚至不再被细胞所分泌²⁵。

[0206] 不同于惯常观点，本发明的申请人现已发现，GRN-SP，通常以 GRN-SP 片段的形式，出现在循环中。此发现本身意味着 GRN-SP 和 GRN-SP 片段可用作一系列的生物事件的循环生物标记物。例如，可预计在糖尿病对象和未确诊的糖尿病对象中，例如，ISN-SP 的水平将高于或低于正常对照或参考水平，其取决于对象是低胰岛素血还是高胰岛素血（insulinemic）。更低水平则指示缺乏饥饿素作用或分泌。

[0207] 因此，在一个方面，本发明提供了用于在对象中预测、诊断或监测生物事件或障碍的方法，其中事件或障碍与 GRN-SP 生物标记物释放到循环中有关，该方法包括：

[0208] (a) 测量在来自对象的生物样品中 GRN-SP 生物标记物的水平；以及

[0209] (b) 比较 GRN-SP 生物标记物的水平和来自对照的 GRN-SP 水平或参考值。

[0210] 其中测量水平与对照或参考水平的偏差指示生物事件或障碍。

[0211] 生物事件或障碍包括葡萄糖代谢障碍、糖尿病以及 ACD。

[0212] 因此，本发明还提供了用于在对象中评估葡萄糖代谢的方法，该方法包括：

[0213] (a) 在给予葡萄糖以后测量在对象中 GRN-SP 生物标记物的水平；以及

[0214] (b) 比较所述 GRN-SP 生物标记物的水平和来自对照的 GRN-SP 水平或参考水平。

[0215] 其中 GRN-SP 的测量水平与对照或参考水平的偏差指示葡萄糖代谢障碍。

[0216] 通常，和对照水平相比，偏差将是更低的 GRN-SP 测量水平。例如，在患有高血糖症的对象中³¹。

[0217] 在此方法中，按照众所周知的葡萄糖耐量试验规程（Oxford Textbook of Medicine, 上文），可以作为第一步骤给予葡萄糖。

[0218] 可以在按照标准规程进行葡萄糖试验以后 2 小时，来评估 GRN-SP 生物标记物的血浆浓度，通常为静脉血浆 GRN-SP。然而，例如在给予葡萄糖以后的 15、30、45、60、90 以及 105 分钟进行中间测量也是有用的。

[0219] 本发明还提供了用于在对象中预测、诊断、评估或监测糖尿病、或糖尿病可能性

(潜在糖尿病, diabetic potential) 的方法, 该方法包括:

[0220] (a) 测量在来自对象的生物样品中 GRN-SP 生物标记物的水平; 以及

[0221] (b) 比较 GRN-SP 生物标记物的水平和来自对照或参考的 GRN-SP 水平,

[0222] 其中 GRN-SP 生物标记物的测量水平比对照或参考水平更高或更低指示糖尿病或易患糖尿病体质³¹。

[0223] GRN-SP 生物标记物水平是高于还是低于正常水平, 将取决于对象的胰岛素状态。

[0224] 本发明的申请人还已令人惊讶地发现, 在患有急性心肌梗死 (AMI) 的患者中, 在患者的症状发作以后的最初几小时内 (实际是在医院或诊所表现时), GRN-SP 的循环浓度为最高。在最初 2 小时至 6 小时、或 4 小时内观测到的水平令人惊讶地非常高, 经常达到峰值, 该峰值为正常对照群体中水平的大约 1.5 至 5 倍、通常 2 至 3 倍。过去没有暗示饥饿素或 GRN-SP 或 GRN-SP 片段可用作 ACD、心脏移植排斥的标记物或用于未确诊或疑似 ACD 或肺疾病的标记物。

[0225] 这些发现暗示, GRN-SP 生物标记物可用作心脏移植排斥、ACD 包括急性冠状动脉综合征 (ACS) 如 AMI, 尤其是非 ST 段抬高 MI, 以及急性心肌缺血的非常清楚的早期标记物, 并且可以用来区分 ACD 和肺疾病。

[0226] 基于这些令人惊讶的发现, 本发明的申请人已首次确定, 在获自对象的生物样品中筛查循环 GRN-SP 或其变体或片段, 以及或可替换地编码 GRN-SP 或其变体和片段的核苷酸序列 (尤其是在疾病发作或临床表现的约 6、约 4 或约 2 小时内), 将是有用的。

[0227] 可用于本发明的是 GRN-SP 的抗原片段或变体, 其长度为至少 4 或 5 个氨基酸。已知具有少至 4 个氨基酸的肽具有生物活性。参见例如 Gilchrist et al, *Biology and Reproduction*, 21, 732-739, 2004; 以及 Sela et al., *Behring GRN. Mitt.*, 91, 54-66, 1992。特别有用的片段是在 GRN-SP 的 N 端 (1-19) 或 C 端。特异性抗原肽的实例是 GRN-SP (1-9) SEQ ID NO:17。在 SEQ ID NO:18 给出相应的核苷酸序列。由本发明的申请人首次提供这些序列。核酸分子和肽均形成本发明的多个方面。

[0228] 因此, 在另一个方面, 本发明提供了编码 GRN-SP 片段的核酸分子, 其中所述核酸是

[0229] (a) SEQ ID NO:18 或其变体或片段;

[0230] (b) 相对于 SEQ ID NO:18 具有至少 70%、75%、80%、90%、95% 或 99% 序列同一性的序列;

[0231] (c) 能够在严格条件下杂交于 SEQ ID NO:18 的长度为至少 10 个核苷酸的序列;

[0232] (d) (a) 至 (c) 任何一种的补体;

[0233] 条件是该序列不是 SEQ ID NO:16。SEQ ID NO:16 是编码信号肽的全长核酸序列。

[0234] 本发明还提供了由本发明的核酸分子编码的分离的 GRN-SP 多肽和 GRN-SP 片段。

[0235] 本发明的具体多肽包括具有 SEQ ID NO:17 的氨基酸序列的多肽, 如所附序列列表中列出的。还设想如本文定义的这些多肽的变体和片段, 或相对于 SEQ ID NO:17 的多肽具有至少 70%、75%、80%、85%、90%、95% 或 99% 氨基酸同一性的氨基酸序列。在一种实施方式中, 变体或片段是功能等效变体或片段。即, 变体或片段保持 SEQ ID NO:17 作为抗原或信号肽的功能。当然并不要求已知的全长 GRN-SP (1-23) SEQ ID NO:15 本身, 但可用于本发明。例如, 这些多肽可以用于抗 GRN-SP 抗体的制备。

[0236] 在一种实施方式中,分离了本发明的或本文描述的核酸分子。利用本领域技术人员已知的各种技术,它们可以分离自生物样品。例如,可以通过使用在 Mullis et al., Eds. 1994 *The Polymerase Chain Reaction*, Birkhauser 中描述的聚合酶链式反应 (PCR) 来分离上述多核苷酸。可以利用源自本发明的多核苷酸序列的引物(如本文定义的)来扩增本发明的核酸分子。(参见例如 Mullis, Sambrook, 上文;以及 *Molecular Diagnostic PCR Handbook* Gerrit, V et al., Springer, 2005)。

[0237] 用于分离多核苷酸的另外的方法包括使用所有、或部分的本发明的多核苷酸,尤其是具有在 SEQ ID NO:18 中陈述的序列的多核苷酸,作为杂交探针。将标记多核苷酸探针杂交于固定在固体载体如硝酸纤维素滤膜或尼龙膜上的多核苷酸的技术可以用来筛选基因组或 cDNA 文库。类似地,可以将探针结合于珠粒以及杂交于靶序列。可以利用已知的技术领域的规程如磁性分离来进行分离。典型的严格的杂交和洗涤条件如上文所给出的。

[0238] 可以通过本领域众所周知的技术如限制性内切酶消化和寡核苷酸合成来产生多核苷酸片段。

[0239] 在本领域众所周知的方法中,部分多核苷酸序列可以用作探针,以鉴定样品中的相应全长多核苷酸序列。上述方法包括基于 PCR 的方法、5' RACE (Methods Enzymol. 218: 340-56 (1993); Sambrook et al, 上文) 以及杂交为基础的方法、计算机/数据库为基础的方法。可检测标记如放射性同位素标记、荧光标记、化学发光标记以及生物发光标记可以用来方便检测。基于已知区域起始于引物,反向 PCR 还允许获得未知序列,其侧接本文披露的多核苷酸序列 (Triglia et al., *Nucleic Acids Res* 16, 8186, (1998))。该方法使用若干种限制性内切酶,以在基因的已知区域中产生适宜的片段。然后通过分子内连接作用,片段被环化,并用作 PCR 模板。趋异性引物设计自己知区。为了实际组装全长克隆,可以采用标准的分子生物学方法 (Sambrook et al, 上文)。便于本发明的多核苷酸的扩增的引物和引物对还形成本发明的另一方面。

[0240] 可以通过所描述的方法来鉴定变体(包括直系同源物)。可以利用基于 PCR 的方法来鉴定变体多核苷酸 (Mullis et al, Eds. 1994 *The Polymerase Chain Reaction*, Birkhauser)。通常,引物的多核苷酸序列,其可用来扩增多核苷酸分子的变体(通过 PCR),可以基于编码相应氨基酸序列的保守区的序列。

[0241] 用于鉴定变体多核苷酸的另外的方法包括使用所有、或部分的指定的多核苷酸作为杂交探针来筛选如上所述的基因组或 cDNA 文库。通常,可以使用这样的探针,其基于编码相应氨基酸序列的保守区的序列。与筛选相同于探针的序列时所用的那些杂交条件相比,杂交条件的严格性也可以较弱。

[0242] 变体序列,包括多核苷酸和多肽变体,还可以通过上述基于计算机的方法来鉴定。

[0243] 此外,相关序列的组的多序列比对可以借助于 CLUSTALW (Thompson, et al, *Nucleic Acids Research*, 22:4673-4680 (1994), <http://www-igbmc.u-strasbg.fr/BioInfo/ClustalW/Top.html>) 或 T-COFFEE (Cedric Notredame et al, *J. Mol. Biol.* 302: 205-217 (2000)) 或 PILEUP (其采用累进的、成对对比) 而进行。(Feng et al., *J. Mol. Evol.* 25, 351 (1987))。

[0244] 模式识别应用软件可用来发现基序或标签序列(特征序列, signature sequence)。例如, MEME (基序启发的多 Em (Multiple Em for Motif Elicitation)) 发现

在一组序列中的基序和标签序列,以及 MAST(基序比对和搜索工具(Motif Alignment and Search Tool))使用这些基序以在查询序列中鉴定类似或相同基序。MAST 结果提供为一系列的与所发现的基序的适当统计数据 and 可视概观的序列比对。MEME 和 MAST 由加利福尼亚大学(圣迭哥)开发。

[0245] PROSITE(Bairoch et al., Nucleic Acids Res. 22, 3583(1994); Hofmann et al., Nucleic Acids Res. 27, 215(1999)) 是鉴定由基因组或 cDNA 序列翻译的未识别蛋白的功能的方法。PROSITE 数据库 (www.expasy.org/prosite) 包含生物学上重要的模式和线谱(profiles) 并且被加以设计,以致它可以和适当的计算工具一起用来将新序列指定给已知家族的蛋白质,或确定哪个(哪些)已知结构域存在于序列中(Falquet et al, Nucleic Acids Res. 30, 235(2002))。Prosearch(蛋白搜索)是一种工具,该工具可以搜索具有给定序列模式或特征的 SWISS-PROT 和 EMBL 数据库。

[0246] 可以按照它们与在相同基因组(旁系同源物)或不同基因组(直系同源物)中的其它蛋白质的序列相关性来对蛋白质进行分类。直系同源基因(orthologous)是这样的基因,其通过物种形成而由共同的祖先基因进化得到并且在它们进化时通常保留相同功能。旁系同源基因(paralogous)是这样的基因,其被复制在基因组中并且基因可以获得新特异性或改变的功能,其可以与最初的特异性和功能有关。在 Tatusov et al, Science 278, 631-637, 1997 中述评了种系发育分析方法。

[0247] 如上所述,本发明还涉及由本发明的核酸分子编码的 GRN-SP 多肽,并且包括这些多肽的变体和片段。

[0248] 除上述计算机/数据库方法以外,还可以通过物理方法来鉴定多肽变体,例如通过使用相对于本发明的多肽产生的抗体来筛查表达文库(Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Press, 1987), 通过同样由 Sambrook 等描述的重组 DNA 技术,或通过在上述抗体的帮助下鉴定来自天然来源的多肽。

[0249] 多肽(包括变体多肽)的制备可以利用本领域众所周知的肽合成方法如使用固相技术的直接肽合成(例如 Merrifield, 1963, in J. Am. Chem. Soc. 85, 2149; Stewart et al, 1969, in Solid-Phase Peptide Synthesis, WH Freeman Co, San Francisco California; Matteucci et al. J. Am. Chem. Soc. 103: 3185-3191, 1981, 以及 Atherton et al., in Solid Phase Peptide Synthesis: a practical approach, IRL press(1989)) 或自动化合成,例如利用来自 Applied Biosystems(California, USA) 的合成仪。还可以利用合成方法来产生多肽的突变形式,如编码氨基酸序列的 DNA 的位点特异性诱变,如由 Adelman et al; DNA 2, 183(1983) 所描述的。还参见 Protein Protocols Handbook; Walker, J. Humana Press 2002。

[0250] 在一种实施方式中,分离了本文中的多肽以及变体多肽。它们可以分离或纯化自天然来源,其中利用本领域众所周知的各种技术(例如 Deutscher, 1990, Ed, Methods in Enzymology, Vol. 182, Guide to Protein Purification, 以及 Protein Protocols Handbook, 上文)。这些技术包括但不限于 HPLC、离子交换色谱、以及免疫色谱。

[0251] 可替换地,多肽和变体多肽可以重组表达在适宜的宿主细胞中并分离自细胞(如下文所述)。多肽和变体可用于产生抗体,以及在其它用途中产生配体。

[0252] 本文描述的基因构建体可以包含一种或多种所披露的多核苷酸序列和/或本发

明的编码所披露的多肽的多核苷酸,并且可以用于转化,例如,细菌、真菌、昆虫、哺乳动物或植物生物体。本发明的基因构建体旨在包括如本文所定义的表达构建体。包括有载体(如 pBR322、pUC18、pU19、Mp18、Mp19、Co1E1、PCR1 以及 pKRC),噬菌体(如 λ gt10),以及 M13 质粒(如 pBR322、pACYC184、pT127、RP4、p1J101、SV40 以及 BPV),粘粒,YACS,BAC 穿梭载体如 pSA3,PAT28 转座子(如在 US 5,792,294 中所描述的)等。

[0253] 构建体可以方便地包括选择基因或选择性标记。通常使用抗生素抗性标记如氨基青霉素、氨基蝶呤、或四环素。

[0254] 可用于构建体中的启动子包括 β -内酰胺酶、碱性磷酸酶、色氨酸、以及 tac 启动子体系,其是本领域中众所周知的。酵母启动子包括但不限于 3-磷酸甘油酸激酶、烯醇化酶、己糖激酶、丙酮酸脱羧酶、葡糖激酶、以及甘油醛-3-磷酸酯脱氢酶。

[0255] 增强子还可以用来作用于启动子以增强转录。用于本文的适宜的增强子包括 SV40 增强子、巨细胞病毒(cytomeglovirus)早期启动子增强子、珠蛋白、白蛋白、胰岛素等。

[0256] 关于构建体、启动子、增强子、以及宿主细胞的一般性讨论,参见 Principles of Gene Manipulation and Genomics;Primrose, S et al., Blackwell Publishing 2006, Ed. 7.,以及 From Genes to Genomes:Concepts and Applications of DNA Technology, Dale, J et al., Wiley-Interscience,2007, Ed. 2。

[0257] 用于产生和使用基因构建体和载体的方法在本领域是众所周知的并且一般性描述在 Sambrook et al.(上文)、以及 Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing,1987 中。用于用载体转化所选择的宿主细胞的方法也是已知的,例如,由 Cohen, SN;PNAS 69,2110,1972 描述的氯化钙处理。

[0258] 包含所描述的基因构建体和载体的宿主细胞可以源自原核或真核来源,例如酵母、细菌、真菌、昆虫(例如杆状病毒)、动物,哺乳动物或植物生物体。在一种实施方式中,宿主细胞是分离的宿主细胞。最常用作宿主细胞的原核细胞是大肠杆菌的菌株。其它原核宿主包括但不限于假单胞菌属(Pseudomonas)、芽孢杆菌属(Bacillus)、沙雷氏菌属(Serratia)、克雷伯氏菌属(Klebsiella)、链霉菌属(Streptomyces)、李斯特氏菌属(Listeria)、酵解属(Sachharomyces)、沙门菌属(Salmonella)以及分枝杆菌属(Mycobacteria)。

[0259] 用于表达重组蛋白的真核细胞包括但不限于 Vero 细胞、HeLa、CHO(中国仓鼠卵巢细胞)、293、BHK 细胞、MDCK 细胞、COS 细胞,以及前列腺癌细胞系如 PrEC、LNCaP、Du 145 以及 RWPE-2。这些细胞可获自 ATCC(维吉尼亚,USA)。

[0260] 与本发明的核酸分子的表达相容的原核启动子包括本领域已知的组成型启动子(如 λ 噬菌体的 int 启动子和 pBR322 的 β -内酰胺酶基因序列的 bla 启动子)和可调节启动子(如 lacZ、recA 以及 gal)。为了表达,还可能需要在编码序列上游的核糖体结合位点。

[0261] 包含基因构建体如表达构建体的宿主细胞可用于重组生产多肽的方法。这样的方法在本领域是众所周知的(参见例如 Sambrook et al,上文)。这些方法通常涉及在适当介质中并在适合于或有利于本发明的多肽的表达和选择的条件下培养宿主细胞。可以另外在适合于选择宿主细胞(表达本发明的多肽)的介质中生长包含选择性标记的细胞。在适合于表达多肽的条件下,选择和培养表达本发明的多肽的转化宿主细胞。利用本领域众所周

知的方法,表达的重组多肽可以分离和纯化自培养基,上述方法包括硫酸铵沉淀、离子交换色谱、凝胶过滤、亲和色谱、电泳等(例如Deutscher,Ed,1990,Methods in Enzymology,Vol I 182, Guide to Protein Purification)。宿主细胞还可以用于这样的方法,这些方法用于生产由本发明的表达的多肽产生的产物。

[0262] 在另一个方面,本发明提供了用于在对象中预测、诊断或监测急性心脏疾病(ACD)的方法,该方法包括:

[0263] 测量在获自或源自对象的生物样品中 GRN-SP 生物标记物的水平并比较所述 GRN-SP 的水平和来自对照或参考值或参考范围的 GRN-SP 生物标记物水平,其中高于对照或参考水平的 GRN-SP 生物标记物的测量水平指示 ACD。

[0264] 在另一个方面,本发明提供了用于在对象中监测对急性心脏疾病(ACD)的治疗的响应的方法,该方法包括测量在来自对象的生物样品中 GRN-SP 生物标记物的水平并比较所述 GRN-SP 生物标记物的水平和来自对照、参考、或参考范围的 GRN-SP 水平,其中 GRN-SP 生物标记物的测量水平相比于对照或参考水平的变化指示响应于治疗。

[0265] 本领域已知,BNP 前体如 BNP27-102 前体(proBNP27-102)、BNP27-47 前体(proBNP27-47)可以用于预测或诊断心脏移植排斥反应(episode)以及用来区分呼吸困难(呼吸短促)的肺原因和心血管原因。参见 US 2005/0244902。设想,GRN-SP 可以用作心脏移植排斥的早期标记物(基于心脏组织分析),以及用来区分肺疾病和急性心脏疾病。

[0266] 因此,本发明还提供了用于在对象中预测、诊断或监测心脏移植排斥反应的方法,该方法包括测量在心脏移植以后在来自对象的生物样品中 GRN-SP 生物标记物的水平并比较所述 GRN-SP 生物标记物的水平和来自对照、参考或参考范围的 GRN-SP 水平,其中高于对照或参考水平的 GRN-SP 生物标记物的测量水平指示移植排斥。

[0267] 本发明还提供了用于在对象中区别肺疾病和急性心脏疾病(ACD)的方法,该方法包括测量在来自对象的生物样品中 GRN-SP 生物标记物的水平,然后比较所述 GRN-SP 生物标记物的水平与来自对照、或参考或参考范围的 GRN-SP 生物标记物水平,其中高于对照或参考水平的 GRN-SP 生物标记物的测量水平指示 ACD。

[0268] 在一种实施方式中,本发明提供了用于在对象中预测、诊断或监测急性心脏疾病(ACD)、心脏移植排斥、或 ACD/肺疾病的方法,该方法包括在 ACD、心脏移植排斥或 ACD/肺疾病的发作或临床表现的最初约 2 小时内测量在来自对象的生物样品中 GRN-SP 生物标记物的水平。

[0269] 对 GRN-SP 生物标记物的测量水平和来自对照、参考或参考范围的 GRN-SP 生物标记物水平进行比较,其中高于对照或参考水平的 GRN-SP 生物标记物的测量水平指示 ACD 或移植排斥。

[0270] 技术性读者将明了,为了评估的目的,GRN-SP 生物标记物水平将通常与参考值或范围或对照值相关。

[0271] 如在本文中所使用的,对照可以是个体或组,从其获得 GRN-SP 生物标记物样品并确定平均 GRN-SP 生物标记物水平。通常,个体或组将包括正常健康个体或不知道患有待监测的生物事件的个体组,如葡萄糖代谢障碍、糖尿病、ACD(包括心脏移植排斥)、或 ACD/肺疾病。在大多数个体中 GRN-SP 生物标记物水平为 35-50pmol/L,并且平均对照水平为约 43pmol/L。可替换地,可以基于来自先前测试个体或组的多个读数来评估对照水平。

[0272] 对照水平的另一个实例是在心脏组织或来自糖尿病或肥胖个体或患有葡萄糖代谢障碍的个体的组织中的 GRN-SP 生物标记物和饥饿素水平之间的比例量度 (ratiometric measure)。可以比较对象的 GRN-SP 生物标记物水平和对照群体的平均 GRN-SP 生物标记物水平。在心脏组织对照群体中的 GRN-SP 水平可以为正常对照群体中 GRN-SP 水平的约 1.5 至 5、通常约 2 至 3 或约 2.5 至 3 倍 (或更多倍)。和正常对照群体中的 GRN-SP 水平相比,在糖尿病对象、或葡萄糖代谢障碍对照群体中的 GRN-SP 水平可以为约 2 倍更高或更低 31。

[0273] 可替换地,对照可以是在较早时间获自相同对象的一个或多个读数或上述读数的平均值。为特定方法确定适当的对照和对照水平是本领域众所周知的。

[0274] 应当明了,测量样品中 GRN-SP 生物标记物水平的步骤可以是对单一样品的单次测量、或对若干样品的重复测量,这取决于待研究的生物事件。在 ACD 的情况下,测量可以包括,例如,在不同时间,对获自或源自对象的样品,进行 GRN-SP 生物标记物的 1 至 20 次测量、1 至 10 次、1 至 5 次、1 至 3 次、1 或 2 次、或 2 或 3 次测量。在一种实施方式中,在疾病发作或临床表现的约最初 6、5、4、3、2 小时内、或在 1 小时内,进行测量。还可以在以上采样周期之外进行单次或重复测量,以确定和正常对照水平、或心脏组织对照水平、或有关参考水平或范围相比,GRN-SP 水平生物标记物是否已升高或降低。

[0275] 在一种实施方式中,该方法包括测量在发作或表现的约最初 1 小时内获得的 1 或 2 个样品中的 GRN-SP 生物标记物水平,接着测量在发作或表现、或初始测量 GRN-SP 水平的约 2 至约 4 小时、或约 2 至约 3 小时内获得的 1 或 2 个样品中的 GRN-SP 生物标记物水平。

[0276] 如上所述,在发作或表现的最初 6、4、或 2 小时内测得的 GRN-SP 水平可以为在正常对照中测得的 GRN-SP 生物标记物水平的 1.5 至 5 倍、通常 2 至 3 倍。

[0277] 在另一种实施方式中,在样品中,约 65 至约 250pmol/L、约 65 至约 200pmol/L、约 70 至约 150pmol/L、或约 70 至约 130pmol/L 范围内的 GRN-SP 生物标记物的水平指示 ACD、心脏移植排斥,或用来区分 ACD 和肺疾病。

[0278] 在生物事件或障碍如糖尿病、或葡萄糖代谢障碍的情况下,例如,测量可以包括多次计算并连同确定的临床评估,如经常用于胰岛素。

[0279] 如上述所定义的生物样品可以是任何生物材料,其中可以定位 (locate) 或分泌 GRN-SP 生物标记物。在一种实施方式中,生物样品是循环生物样品,例如血液、血清或血浆。在一种实施方式中,生物样品是心脏组织。

[0280] 核酸测定

[0281] 可以按照本领域已知方法来确定在样品中 GRN-SP 的存在以及其表达水平,如 Southern 印迹法、Northern 印迹法、FISH 或定量 PCR (用来量化 mRNA 的转录) [(Thomas, Proc. Nat, Acad. Sci. USA77 :5201-52051980), (Jain KK, Med Device Technol. 2004May ; 15(4) :14-7)], 斑点印迹 (DNA 分析) 或原位杂交,其中利用适当标记的探针并基于本文提供的序列。

[0282] 因此,本发明还提供了用于在样品中检测本发明的核酸分子的存在的测定方法,该方法包括:

[0283] (a) 使样品接触多核苷酸探针,该探针在严格杂交条件下杂交于核酸序列;以及

[0284] (b) 检测样品中杂交复合体的存在。

[0285] 在一种实施方式中,核酸分子是 SEQ ID NO :18 或它们的变体或片段。

[0286] 在一种实施方式中,杂交探针是标记探针。标记的实例包括荧光标记、化学发光标记、放射酶标记以及生物素-亲和素标记。按照本领域已知的方法如上述那些方法来进行标记探针的标记和可视化(显现,visulisation)。

[0287] 为方便起见,可以将核酸探针固定于固体载体上,其中固体载体包括但不限于树脂(如聚丙烯酰胺)、碳水化合物(如琼脂糖)、塑料(如聚碳酸酯)、以及乳胶珠粒。

[0288] 正如上面所讨论的,核酸分子探针可以优选为 RNA、cDNA 或 DNA 分子。在一种实施方式中,探针是、或包括 SEQ ID NO :18。

[0289] 严格杂交条件是如上面所讨论的。

[0290] 可以利用已知技术如 RT-PCR 和电泳技术(包括 SDS-PAGE)来确定核酸标记物的表达水平。利用这些技术,可以扩增在对象样品中的本发明的核酸分子的 DNA 或 cDNA 序列,以及测量 DNA 或 cDNA 或 RNA 的水平。

[0291] 在一种可替换的方法中,可以直接在样品中而没有扩增的情况下测量 DNA、cDNA 或 RNA 水平。

[0292] 在一种实施方式中,该方法是 Northern 印迹杂交分析。可以基于本文鉴定的 GRN-SP 生物标记物序列来制备用于 Northern 印迹杂交分析的探针。在一种实施方式中,探针包括参考序列的至少 10、12、15、18、21、24、27、30、36、42、51、60、63、66 或 69 或更多连续核苷酸。

[0293] 可替换地,可以利用基于逆转录的 PCR(RT-PCR)测定并利用对于核酸序列具有特异性的引物来测量表达水平。如果需要的话,可以相对于对照核酸分子来比较样品中 NS-SP 生物标记物多核苷酸的水平,其中对照核酸分子的表达与待测量的参数或条件无关。对照核酸分子是指一种分子,其中在疾病或移植排斥状态和健康状态之间水平并没有差异。对照分子的水平可以用来归一化在比较群体中的水平。这样的对照分子的实例是 GAP-DH。本发明的 GRN-SP 生物标记物多核苷酸的水平将随着生物事件或障碍而变化。

[0294] 肽测定

[0295] 在一种实施方式中,测量步骤包括检测 GRN-SP 生物标记物和结合剂之间的结合,其中结合剂结合(包括选择性地或特异性地结合)GRN-SP 或其片段或变体。作为测量的预先步骤,可以使 GRN-SP 生物标记物多肽结合于结合剂,该结合剂结合 GRN-SP 或其片段或变体。

[0296] 因此,在一种实施方式中,本发明提供了用于测定生物样品的 GRN-SP 生物标记物的方法,该测定方法包括利用任何已知方法来检测和测量在样品中的 GRN-SP 生物标记物的水平。

[0297] 在一种实施方式中,生物样品是在 ACD、心脏移植排斥、或 ACD/肺疾病发作的 6 或 4 小时内、或在 ACD、心脏移植排斥、或 ACD/肺疾病的临床表现的 6 或 4 小时内获自对象。

[0298] 在一种实施方式中,本发明提供了用于测定 GRN-SP 生物标记物的方法,该方法包括:

[0299] (a) 结合来自生物样品的一种或多种 GRN-SP 生物标记物多肽;以及

[0300] (b) 测量结合 GRN-SP 生物标记物多肽的水平。

[0301] 在一种实施方式中,GRN-SP 生物标记物多肽选自组 GRN-SP1-9(SEQ ID NO :17)或其变体或片段。应当明了,在一种实施方式中,在测定中可以结合多于一种类型的 GRN-SP

多肽,例如 GRN-SP1-9 和 GRN-SP1-23。

[0302] 在一种实施方式中,利用结合剂来结合 GRN-SP 生物标记物多肽。上述结合剂是选择性(特异性)结合剂。即,它与生物事件的其它标记物,并且更具体地说饥饿素,具有低交叉反应性。在一种实施方式中,结合剂是抗体或其抗原结合片段。在抗体用于测定的情况下,可以相对于 GRN-SP 生物标记物的任何抗原部分来产生(raise)抗体,包括在 N 端或 C 端。在一种实施方式中,相对于 GRN-SP(1-23)SEQ ID NO:15;GRN-SP(1-9)SEQ ID NO:17 或由本发明的核苷酸序列编码的氨基酸序列来产生抗体;或它们的变体或片段。

[0303] 本发明还涉及上述结合剂、抗体、抗体的抗原结合片段、以及它们的应用。应用包括在测定中的应用,或在制造 GRN-SP 生物标记物的测定、预后、诊断或监测工具中的应用。上述测定或工具可以用来监测对象中的生物事件或障碍,其包括葡萄糖代谢障碍、糖尿病以及 ACD。

[0304] 抗体可以具有分离或纯化形式。结合于 GRN-SP 或其片段或变体的抗体可以具有任何形式,包括所有类型的多克隆抗体、单克隆抗体、双特异性抗体、单链抗体、人抗体、人源化抗体以及嵌合抗体(通过基因重组产生)。还包括通过用 GRN-SP 或其片段或变体来免疫动物如小鼠、大鼠或兔而获得的抗血清。抗体可以结合于在一组 GRN-SP 片段中的共同 GRN-SP 序列,或结合于特异性 GRN-SP 片段,或甚至结合于 GRN-SP 片段的组。

[0305] 本文中还可以使用抗体或修饰抗体的片段,只要它结合 BNP-SP 或其片段或变体。抗原结合片段可以是 Fab、F(ab')₂、F(ab')₂、Fc 或 Fv 片段或单链 Fv(scFv),其中通过适当的接头连接来自 H 和 L 链的 Fv 片段(Huston et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-83(1988))。抗体的“Fc”部分是指免疫球蛋白重链的一部分,其包含一个或多个重链恒定区结构域、CH1、CH2 以及 CH3,但并不包括重链可变区。

[0306] 抗体的“Fv”部分是包含完全抗原识别和抗原结合位点的最小抗体片段。该区由紧密、非共价结合的一个重链和一个轻链可变域的二聚体构成。

[0307] Fab 片段包含轻链的恒定域和重链的第一恒定域(CH1)。Fab' 片段具有加入 CH1 域的 Fab 羧基末端的几个残基,包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。F(ab')₂ 片段表示其间具有半胱氨酸铰链并已被分开的成对的 Fab' 片段。F(ab')₂ 片段具有两个抗原结合位点。可以通过抗体的木瓜蛋白酶消化来产生 Fab 片段。

[0308] 关于抗体和片段的讨论,参见例如 PNAS USA 81:6851-6855(1984), Protein Eng 8(10)1057-1062(1995);The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Springer-verlag 1994, Rosenburg and Moore Eds;PNAS USA 90:6444-6448(1993); Nature 321:522-525(1986);Nature 332:323-329(1988),以及 WO 2005/003154。

[0309] 用于制备、检测、修饰以及分离抗体的方法在本领域是众所周知的(参见列如 Maintaining and using Antibodies:A Practical Handbook, Howard, G et al., CRC Press 2006;Protein-protein Interactions:A Molecular Cloning Manual, Golemis E(Ed), CSHL Press, 2002;Harlow and Lane(1998,¹¹ Milstein¹⁸, Suresh¹⁹,以及 Brennan²⁰)。在一种实施方式中,通过免疫适宜的宿主哺乳动物来产生所使用的抗体。包含 GRN-SP 生物标记物的融合蛋白也可以用作免疫原。

[0310] 可以通过与各种分子的结合来修饰抗体,如聚乙二醇(PEG)、生物素、链霉亲和素、化学发光标记、荧光标记、量热标记、以及放射免疫标记(如本文讨论的)。可以通过化学修

饰抗体来获得修饰抗体。这些修饰方法是本领域中的常规方法。

[0311] 可替换地,抗体可以获得为嵌合抗体,在源自非人抗体的可变区和源自人抗体的恒定区之间,或获得为人源化抗体,其包含源自非人抗体的互补决定区(CDR)、源自人抗体的框架区(FR)、以及恒定区。可以利用本领域已知方法来制备上述抗体^{16,17,22}。

[0312] 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,如果需要的话,佐剂。通常,将通过多次皮下或腹膜内注射在哺乳动物中注射免疫剂和/或佐剂。免疫剂可以包括 GRN-SP 或其片段或变体或其融合蛋白。可以有利的是,在要免疫的哺乳动物中,将免疫剂结合于已知为免疫原性的蛋白。上述免疫原性蛋白的实例包括但不限于钥孔血蓝蛋白(keyhole limpet hemocyanin)、牛血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白、以及大豆胰蛋白酶抑制剂。可以采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、合成海藻糖二霉菌酸脂(dicorynomycolate))。本领域技术人员可以无需过度实验而选择免疫方案。

[0313] 可以利用本领域众所周知的杂交瘤方法来制备单克隆抗体。参见例如 Kohler and Milstein, 1975¹¹、US 4, 196, 265、US 4, 816, 567 以及 Golemis(上文)。可以在适宜的培养基中培养杂交瘤细胞,可替换地,杂交瘤细胞可以在哺乳动物体内生长为腹水。优选的永生细胞系(imortalized cell lines)是小鼠骨髓瘤细胞系,其可以获自,例如,美国典型培养物库(American Type Culture Collection)(维吉尼亚, USA)。免疫测定可以用来筛选分泌感兴趣抗体的永生细胞系。在筛选中可以使用 GRN-SP 或其片段或变体的序列。

[0314] 因此,本文还设想杂交瘤,其是能够分泌 GRN-SP 特异性单克隆抗体的永生细胞系。

[0315] 用于确定由杂交瘤细胞所产生的单克隆抗体的结合特异性的众所周知的方式包括免疫沉淀、放射性连接免疫测定(RIA)、酶联免疫吸附测定(ELISA)以及 Western 印迹。(Lutz et al., Exp. Cell. Res. 175 :109-124(1988)、Golemis(上文)、以及 Howard(上文))。例如,单克隆抗体的结合亲和力可以,例如,通过在 Munson et al., Anal Biochem 107 : 220(1980)中描述的斯卡查德分析法来确定。对于来自免疫动物的样品,可以类似地筛查多克隆抗体的存在。

[0316] 单克隆抗体还可以获自重组宿主细胞。编码抗体的 DNA 可以获自杂交瘤细胞系。然后将 DNA 置于表达载体中,转染到宿主细胞(例如, COS 细胞、CHO 细胞、大肠杆菌(E. coli)细胞)以及在宿主细胞中产生的抗体。然后可以利用标准技术来分离和/或纯化抗体。

[0317] 还可以使用用于单克隆抗体生产的其它已知技术如从噬菌体文库生产。参见例如, Nature 352 :624-628(1991)。

[0318] 为了方便检测,本文的抗体和片段可以标记有可检测标记如荧光化合物、生物发光化合物、以及化学发光化合物,以及放射性同位素、磁珠和亲和标记(例如生物素和亲和素)。允许间接测量结合的标记的实例包括酶,其中底物可以提供有色荧光产物,适宜的酶包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、苹果酸脱氢酶等。可以连同荧光激活细胞分选仪一起使用荧光色素(例如得克萨斯红、荧光素、藻胆蛋白、以及藻红蛋白)。标记技术在本领域是众所周知的。

[0319] 通过常规的免疫球蛋白纯化程序如,例如,反相 HPLC、蛋白质 A-琼脂糖、羟基磷

灰石色谱、凝胶电泳、透析、或亲和色谱,可以从培养基或腹水流体分离或纯化由细胞分泌的单克隆抗体。参见例如, Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, NY (1982)。

[0320] 还可以通过重组 DNA 方式来产生单克隆抗体或片段(参见例如美国专利号 4,816,567)。DNA 修饰如人重链和轻链恒定域的编码序列替代来代替同源鼠序列(以上美国专利号 4,816,567)也是可能的。抗体可以是单价抗体。用于制备单价抗体的方法在本领域是众所周知的(美国专利号 5,334,708、5,821,047、以及 7,476,724)。本文还设想(US 6,020,153)嵌合(US 4,816,567)、双价抗体(US 5,843,708)以及多价抗体的生产。

[0321] 嵌合单克隆抗体是这样的抗体,其中重链和/或轻链的一部分相同于或同源源自特定物种或属于特定抗体(亚)类的抗体中的相应序列。链的剩余部分相同于或同源源自另一物种或属于另一抗体(亚)类的抗体中的相应序列、以及其片段,只要它们呈现所需的生物活性。(参见 US 4,816,567 上文)。

[0322] 本发明的抗体可以进一步包括人源化抗体或人抗体。人源化抗体包括人免疫球蛋白,其中来自受体的互补决定区(CDR)的残基被来自非人物种的 CDR 的残基取代。由非人来源如兔、大鼠以及小鼠生产人源化抗体是众所周知的^{13,14,15}。

[0323] 还可以利用本领域已知的各种技术来产生人抗体,包括噬菌体展示文库¹⁶;以及转基因方法,参见,例如 Neuberger 1996¹⁷;以及 Vaughan et al, 1998¹⁸。

[0324] 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,其对于至少两种不同的抗原具有结合特异性。例如 GRN-SP 或其变体或片段,以及抗原,该抗原选自包括前饥饿素原、ANP、ANP-SP、BNP、CK-MB、TnT、TnI、BNP、BNP-SP、NT-BNP、肌红蛋白、LDH、天冬氨酸转氨酶、H-FABP、缺血修饰白蛋白、内皮素、肾上腺髓质素、肾素以及血管紧张素 II 的组。本文还设想具有多于两种特异性的抗体例如三特异性抗体。

[0325] 用于制备双特异性抗体的方法在本领域是已知的。参见例如 Milstein and Cuello 1983¹⁹、Suresh et al, 1986²⁰ 以及 Brennan et al., 1985²¹。

[0326] 由抗体结合或选择性地结合的 GRN-SP 生物标记物是 GRN-SP 或其变体或片段(正如上面所讨论的)。

[0327] 在一种实施方式中,抗体结合 GRN-SP 的 N 端(1-9)。结合剂选择性地结合的特异性抗原肽的实例包括 GRN-SP(1-9)(SEQ ID NO:17)。

[0328] 可以通过本领域已知的任何方式来检测 GRN-SP 生物标记物的结合,包括特异的(基于抗体)和非特异的(如 HPLC 固相)。最常见地,利用测定方法如 ELISA 或 RIA(如上所述)来检测本文的抗体。竞争性结合测定、夹心测定、非竞争性测定、荧光免疫测定法、免疫荧光测定试验、或免疫放射测定试验、发光测定、化学发光测定以及质谱分析如表面增强激光解吸和电离(SELDI)、电喷雾电离(ESI)、基质辅助激光解吸电离(MALDI)、傅立叶变换离子回旋共振质谱(FTICR),单独或连同非特异性结合剂,如色谱形式(chromatography format),也是可行的。参见例如, Golemis, E 以及 Howard G. (上文)。

[0329] 方便地,可以将抗体固定于固态底物以方便 GRN-SP/抗体复合物的洗涤和分离。利用本领域已知技术,可以实现抗体与固体载体的结合。参见例如 Handbook of Experimental Immunology, 4th edition, Blackwell Scientific Publications, Oxford(1986)。用于抗体的有用固态底物包括玻璃、尼龙、纸以及塑料。类似地,可以将

GRN-SP 吸附于固态底物如吸附性二氧化硅、或树脂颗粒、或硅片,其可选地涂布或衍化有 (derivatise) 离子交换、反相 (例如 C18 涂层) 或其它材料。底物可以具有珠粒、平板、管、棒或生物芯片的形式。生物芯片的实例包括 CIPHERGEN, ProteinChip 阵列 (CIPHERGEN Biosystems(CAUSA))、以及可获自 Perkin Elmer, USA 的 Packard BioChip。还参见 US 6, 225, 047、US 6, 329, 209。生物芯片可以包括色谱表面。具有可寻址位置的生物芯片或平板 (plates) 以及分立的 (discreet) 微量滴定板是特别有用的。此外优选使用的是多重系统,其中包含针对多种分析物的抗体的珠粒用来测量单一样品中的分析物水平。待测量的分析物可以包括其它心脏标记物以及 GRN-SP 或其变体或片段。本文使用的适宜的多重珠粒系统的一个实例是 Luminex Fluorokine Multianalyte Profiling 系统。

[0330] 抗体测定方法在本领域是众所周知的,参见例如 US 5, 221, 685、US 5, 310, 687、US 5, 480, 792、US 5, 525, 524、US 5, 679, 526、US 5, 824, 799、US 5, 851, 776、US 5, 885, 527、US 5, 922, 615、US 5, 939, 272、US 5, 647, 124、US 5, 985, 579、US 6, 019, 944、US 6, 113, 855、US 6, 143, 576 和 US 5, 955, 377 (关于未标记测定)、以及 US 5, 631, 171, 还参见 Zola, Monoclonal Antibodies :A Manual of Techniques pp147-158 (CRC Press, Inc 1987), Harlow and Lane (1998) Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Publications, New York, 以及 US 2005/0064511 (关于测定形式和条件的描述)。所有上述参考文献的全部内容以引用方式结合于本文。

[0331] 免疫测定分析仪也是众所周知的并且除其它很好描述的系统²² 以外还包括 Beckman Access、Abbott AxSym、Roche ElecSys 以及 Dade Behring Status 系统。

[0332] 可以直接或间接检测 GRN-SP 生物标记物和抗体结合形成复合物。利用标记如荧光、发光、放射性核素、金属、染料等来进行直接检测。间接检测包括结合可检测标记如地高辛或酶如辣根过氧化物酶和碱性磷酸酶以形成标记抗体,接着为通过添加检测试剂来检测标记的步骤。

[0333] 辣根过氧化物酶 (例如) 可以用底物,如,邻苯二胺二盐酸盐 (OPD) 和过氧化物温育而产生可以测量其吸光度的有色产物,或用鲁米诺和过氧化物加以温育而产生化学发光,其可以用光度计加以测量 (如在本领域中已知的)。生物素或地高辛可与强烈结合于它们的结合剂进行反应。例如,蛋白质亲和素和链霉亲和素将强烈结合于生物素。然后另一种可测量的标记与其共价结合或连接,其中通过与蛋白质的直接反应、或通过使用通常可获得的交联剂如 MCS 和碳二亚胺、或通过添加螯合剂结合或连接。

[0334] 通常,复合物分离自未复合试剂,例如通过离心。如果抗体被标记,则复合物的量将由所检测的标记的量来反映。可替换地,可以通过结合于抗体来标记 GRN-SP 生物标记物,然后在竞争性测定中通过测量当用包含未标记 GRN-SP 生物标记物的生物样品温育抗体标记 GRN-SP 生物标记物时所结合的标记 GRN-SP 生物标记物的减少来检测 GRN-SP 生物标记物。可以使用其它免疫测定例如夹心测定。

[0335] 在一种实施方式中,与抗体接触以后,通常在 4°C 下过夜 18 至 25 小时、或在 25°C 至 40°C 下 1 至 2 至 4 小时,将结合于结合剂 (抗体) 的标记 GRN-SP 生物标记物与未结合的标记 GRN-SP 生物标记物分离。在溶液相测定中,可以通过添加结合于固相颗粒如纤维素、或磁性材料的抗 γ 球蛋白抗体 (二抗) 来完成分离。二抗 (secondary antibody) 在不同用于产生一抗的物种中产生并结合一抗 (primary antibody)。因此,经由二抗,所有一抗

结合于固相。通过离心或磁吸引从溶液移除这种复合物,然后利用结合于它的标记来测量所结合的标记肽。用于分离与自由标记结合的其他可选方法包括形成免疫复合物(其沉淀自溶液),通过聚乙二醇沉淀抗体,或将自由标记的肽结合于活性炭并通过离心或过滤从溶液除去。通过适当方法(如上述那些方法)来测量在分离的结合或自由相中的标记。

[0336] 竞争性结合测定还可以设计为固相测定,其更易于进行,因而优于上述那些方法。这种类型的测定使用具有孔的平板(通常称作 ELISA 或免疫测定平板)、固体珠粒或管表面。一抗被吸附或共价结合于平板、珠粒或管的表面,或通过吸附或共价结合第二抗 γ 球蛋白或抗 Fc 区抗体被间接结合于平板。一起或顺序地将样品和标记肽(如上述)加入平板,然后在便于在样品中的 GRN-SP 和标记肽之间进行抗体结合竞争的条件加以温育。可以随后吸出未结合的标记肽并冲洗平板,从而留下附着于平板的抗体结合的标记肽。然后可以利用上述技术测量标记肽。

[0337] 夹心型测定具有更高的特异性、速度以及更大的测量范围。在这种类型的测定中,借助于吸附、共价结合、或用于固相竞争结合测定的抗 Fc 或 γ 球蛋白抗体(如上所述),将相对于 GRN-SP 生物标记物过量的一抗附着于 ELISA 平板的孔、珠粒或管。使样品液或提取物接触附着于固相的抗体。由于抗体过量,所以这种结合反应通常是快速的。还用样品并和一抗同时或顺序地温育相对于 GRN-SP 生物标记物的二抗。选择这种二抗以结合于 GRN-SP 生物标记物上的位点,该位点不同于一抗的结合位点。上述两种抗体反应导致夹层,其中来自样品的 GRN-SP 生物标记物被夹在两种抗体之间。二抗通常标记有如上文详细描述用于竞争性结合测定的容易测量的化合物。可替换地,可以使标记的第三抗体(其特异性地结合于二抗)接触样品。在冲走未结合材料以后,可以通过针对竞争性结合测定所概述的方法来测量和量化结合的标记抗体。

[0338] 还可以使用浸渍片型测定(dipstick type assay)。这些测定方法在本领域是众所周知的。它们可以例如,采用较小颗粒如附着有特异性抗体的金或有色乳胶颗粒。可以将待测量的液体样品加入预加载有颗粒的膜或纸条带的一端,并允许沿着条带进行迁移。样品中的抗原与颗粒的结合会改善颗粒结合于捕获位点的能力,其中进一步沿着条带,上述捕获位点包含用于颗粒的结合剂,如抗原或抗体。有色颗粒在这些位点的累积导致显色并取决于样品中竞争性抗原的浓度。其它浸渍片可以采用共价结合于纸或膜条带的抗体以捕获样品中的抗原。采用结合于酶如辣根过氧化物酶的二抗的随后反应以及用底物温育以产生颜色、荧光或化学发光输出,将使得能够量化样品中的抗原。

[0339] 如在以下实施例中所讨论的,在一种实施方式中,放射免疫测定(RIA)是所使用的实验室技术。在一种 RIA 中,放射性标记抗原和未标记抗原用于与抗体的竞争性结合。常见放射性标记包括 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^3H 以及 ^{14}C 。

[0340] 涉及用特异性抗体和放射性标记抗体结合蛋白沉淀 GRN-SP 生物标记物的放射免疫测定可以测量在沉淀物中标记抗体的量,其与样品中 GRN-SP 生物标记物的量成正比。可替换地,产生了标记的 GRN-SP 生物标记物并使用未标记的抗体结合蛋白。然后添加要测试的生物样品。来自标记 GRN-SP 生物标记物的计数的减少与样品中 GRN-SP 生物标记物的量成正比。

[0341] 在 RIA 中,还可以分离结合 GRN-SP 生物标记物和自由的 GRN-SP 生物标记物。这可能涉及用二抗沉淀 GRN-SP 生物标记物/抗体复合物。例如,如果 GRN-SP 生物标记物/

抗体复合物包含兔抗体,则驴抗兔抗体可以用来沉淀复合物并计数标记的量。例如在 LKB,伽玛主计数器 (Gammamaster counter) 中。参见 Hunt et al²²。

[0342] 本发明的方法进一步包括测量葡萄糖代谢障碍、糖尿病、肾病、心血管疾病、ACD、心脏移植排斥、或 ACD/ 肺疾病的一种或多种其它标记物的水平,其不是 GRN-SP 生物标记物。可以比较其它(一种或多种)标记物的水平和来自对照群体的平均对照水平。测量水平与平均对照水平的偏差可以预测或诊断糖尿病或易患该病的体质、心血管疾病、ACD 或心脏移植排斥。

[0343] 已经依据 GRN-SP 生物标记物水平的不同、偏差或更低或水平降低指示葡萄糖代谢障碍或糖尿病、以及 GRN-SP 生物标记物水平的更高或水平提高指示 ACD 或心脏移植排斥,描述了本发明的方法。还可以是,在某些事件或障碍中,GRN-SP 生物标记物的水平将降低或更低或将升高或更高,这取决于事件或障碍的代谢作用。还设想高于或低于对照水平的测量偏差。

[0344] 本文中对于 ACD 和心脏移植排斥特别有用的其它标记物包括肌钙蛋白、肌钙蛋白 T、肌钙蛋白 I、肌酸激酶 MB、肌红蛋白、BNP、NT-BNP、BNP-SP、BNP-SP 片段、ANP、ANP-SP、ANP-SP 片段、LDH、天冬氨酸转氨酶、H-FABP、内皮素、肾上腺髓质素、缺血修饰白蛋白、肾素、以及血管紧张素 II¹。这些标记物均涉及心脏功能不良或疾病。对于糖尿病、以及葡萄糖代谢障碍,其它标记物包括胰岛素、乳酸酯、葡萄糖、脂肪酸以及甘油三酯或它们的标记物。用于上述标记物的测定方法是众所周知的并用于本领域。例如,各种上述测定例行用于临床环境,如由 Vogel, H, (2007) Drug Discovery and Evaluation :Pharmacological Assays Ed 3. Springer pp.Ed. :3, pp 2071 和由 Runge et al. (2006) Principles of Molecular medicine Ed.2 Springer, pp 1268 所描述的。用于进行上述测定的试剂盒和试剂可商业上获自若干供应商,包括 QuantiChrom™ 和 EnzyChrome™ 葡萄糖、脂肪酸和甘油三酯测定 (BioAssay Systems,加利福尼亚,USA) 以及葡萄糖、甘油三酯和自由脂肪酸测定试剂盒 (BioVision,加利福尼亚,USA)。

[0345] 使 GRN-SP 生物标记物水平相关于其它标记物可以提高 GRN-SP 的预测、诊断或监测价值。在 ACD、心脏移植排斥或 ACD/ 肺疾病的情况下,GRN-SP 标记物水平与已知心脏标记物的结合可以增加患者结果的预测或诊断价值。

[0346] 可以使用单试样同时或分别进行若干肽标记物的分析。同时、两个或多位点形式测定是优选的。多重珠粒、微量测定物或生物芯片系统是特别有用的。上述珠粒、测定物或芯片可以具有若干分立的、经常可寻址的位置,包括相对于一种或多种标记物(包括 GRN-SP 和 GRN-SP 片段)的抗体。上述一种或多种标记物包括多于一种的 GRN-SP 标记物。例如,它可以有利于测定 N 端和 C 端 GRN-SP 生物标记物片段以及结合测定结果。许多其它这样的标记物组合是可行的。US2005/0064511、US 6,019,944、以及 Ng and Hang, J. Cell Mol. Med. ,6 :329-340 (2002) 描述了可用于本发明的微阵列、芯片、毛细管装置以及技术。Luminex 提供了可用于本发明的多重珠粒系统。还参见 The Protein Protocols Handbook, 上文。适用于单独或顺序测定的实验室分析仪包括 AxSym (Abbott, USA)、ElecSys (Roche)、Access (Beckman)、ADVIA **CENTAUR®** (Bayer) 以及 Nichols **Advantage®** (Nichols GRNtitude) 免疫测定系统。

[0347] 在一种实施方式中,在单一表面如芯片或阵列上进行多种多肽的同时测定。

[0348] 在另一种实施方式中,进行一种或多种非 GRN-SP 标记物的单独测定,并且结果对照或合并于 GRN-SP 生物标记物结果。

[0349] 在监测对象的情况下,可以随着时间的推移获取若干生物样品。连续取样便于随着时间的推移测量标记物水平的变化,尤其是 GRN-SP 生物标记物。采样可以提供关于事件的大概发作时间、事件的严重性的信息,表明哪些治疗方案可能是合适的、响应于所采用的治疗方案、或长期预后。可以在医疗点如在救护车中、医生办公室,在临床表现时、在住院期间,对门诊患者,或在例行健康检查期间,进行分析。

[0350] 还可以连同一种或多种风险因素的分析一起进行本发明的方法,其中风险因素如但不限于年龄、体重、身体活动水平、性别以及事件(如肥胖症、糖尿病、葡萄糖代谢障碍、以及心脏事件)的家史。还可以连同本发明的方法一起来使用测试结果。例如,葡萄糖耐量试验、ECG 结果以及临床检查。GRN-SP 的循环水平的统计上显著的变化、连同一种或多种另外的风险因素或测试结果,可以用来更准确地诊断或预后对象的病症。

[0351] 本文的方法还可以用作治疗指南(guide)。例如开始何种治疗以及何时治疗监测、检测治疗的阳性或不利影响(例如抗有丝分裂药物的心脏毒性)、胰岛素、葡萄糖代谢、甘油三酯以及脂肪酸浓度,以及如果需要或在需要时(取决于结果)治疗方案的调节。这可以改善患者的短期、中期和长期结果。关于治疗指南,参见 Troughton et al⁸。

[0352] 急性心脏疾病

[0353] 本发明的申请人已表明,GRN-SP 生物标记物的浓度与急性心脏疾病相关(图6)。此外,在患者呈现有疑似急性心肌梗死(AMI)或心脏病发作的情况下,在临床表现以后,GRN-SP 生物标记物水平处于最高值。呈现有急性心脏疾病,以及尤其是由(心脏病发作,在心脏肌肉或心肌中留下瘢痕)引起的急性心肌缺血冠状动脉疾病的对象可以或可以不经历随后的心肌梗死(MI)。利用目前的临床技术和标记物,并不能容易地诊断不经历 MI 的组。因此本发明的申请人提供了有用的早期和特异性标记物,用于与 MI 有关的心肌损伤。这可以便于起因于不良事件(AE)的心肌损伤的早期诊断以及便于医师区分上述情况与其它急性冠状动脉综合征以及区分其与胸痛的其它原因。例如心绞痛、胃肠疾病、肺/胸膜疾病等。这显著缩短了等待目前的心脏生物标记物如肌红蛋白、CK-MB、TnT 以及 TnI 的水平升高所经历的 6 小时至 12 小时的窗口。因而可以更早进行更准确的诊断和治疗,从而减小发病率和死亡率并产生更好的预后结果。

[0354] 在另一种实施方式中,本发明可用于监测在心脏病患者中的再灌注治疗。再灌注治疗通常包括经皮冠状动脉介入治疗(例如血管成形术)和/或药物治疗。在药物治疗中通常采用用于血管再生的溶栓药物。辅助疗法包括抗凝和抗血小板治疗。当在诊断以后尽快采用时,再灌注治疗是最有效的。为加速诊断所进行的 GRN-SP 测试便于再灌注治疗的快速采用。还可以通过重复测试来监测治疗的有效性,并在适当情况下调整疗法。关于再灌注治疗的全面讨论,参见本文的 Braunwald et al¹。

[0355] 心脏疾病

[0356] 本发明的方法还可以用于诊断或预测对象的心脏疾病。

[0357] 心脏移植排斥

[0358] 本发明还用于监测心脏移植,通常心脏异体移植排斥反应,其中在移植期间和以后之后通过定期组织活检并利用 GRN-SP 生物标记物测量进行检测。相对于对照水平,在心

脏移植的约 6、4 或 2 小时内测得的 GRN-SP 生物标记物水平的增加可以用来预测或诊断排斥反应。

[0359] 本发明还提供了在生物样品中测定 GRN-SP 生物标记物的方法。在一种实施方式中,样品是在 ACD、心脏移植排斥或 ACD/ 肺疾病发作约 6、4 或 2 小时内、或在 ACD、心脏移植排斥或 ACD/ 肺疾病临床表现约 6、4 或 2 小时内获自对象。该测定方法包括利用任何已知方法来检测和测量样品中的 GRN-SP 生物标记物水平。在一种实施方式中,该测定方法是体外测定方法。这样的方法包括但不限于所有上面讨论的已知的测定技术以及凝胶电泳技术、Western 印迹、气相光谱 (gas phase spectroscopy)、原子力显微术 (atomic force microscopy)、表面等离子体共振、质谱法²³。

[0360] 在一种实施方式中,该测定方法包括一种或多种核酸序列,其结合于本发明的一种或多种 GRN-SP 生物标记物核酸序列。大范围的有义和反义探针和引物可以设计自本文的核酸序列。利用上面讨论的已知技术来确定 GRN-SP 生物标记物序列的表达水平。阵列可以是固态底物例如“芯片”(如在美国专利号 5,744,305 中所描述的)或硝酸纤维素膜。关于有用阵列的讨论,参见例如 Microarray Technology and its Application, Müller, U et al., Springer 2005, 以及 Gene Expression Profiling by Microarrays :Clinical Implications, Hofmann, W-K ;Cambridge University Press 2006。

[0361] 由本文的 GRN-SP 生物标记物表达的蛋白质还可以用于测定,并且结果与表达在正常对照样品中的相同蛋白质的表达水平加以比较。可以利用本领域已知的和本文讨论的测定形式来评估蛋白质的存在和量。

[0362] 优选通过使 GRN-SP 生物标记物结合于结合剂如抗体,包括本本发明的抗体,并测量结合 GRN-SP 生物标记物的存在量,来检测样品中 GRN-SP 生物标记物的存在。

[0363] 如上所述,结合或选择性地结合 GRN-SP 的抗体(包括其变体和片段)形成本发明的另一方面并且通过上面讨论的技术可以制备这些抗体。这些抗体可用于本发明的方法和测定。

[0364] 在另外的方面,本发明提供了用于在对象中预测、诊断、评估或监测生物事件或障碍的试剂盒,其中生物事件包括葡萄糖代谢障碍、糖尿病、新血管疾病、急性心脏疾病(ACD,包括心脏移植排斥)、或 ACD/ 肺疾病,上述试剂盒包括 GRN-SP 生物标记物结合剂(或用于多种 GRN-SP 生物标记物的结合剂),该结合剂包括本发明的抗体或抗原结合片段。当试剂盒用于诊断 ACD、心脏移植排斥、或 ACD/ 肺疾病时,在一种实施方式中,生物样品,例如,是在 ACD、心脏移植排斥、或 ACD/ 肺疾病的发作或临床表现的约 6、4 或 2 小时内获自对象。

[0365] 本发明还提供了用于预测、诊断、评估或监测急性心脏疾病(ACD)、心脏移植排斥、或 ACD/ 肺疾病的试剂盒,该试剂盒包括本发明的结合剂,其中对试剂盒进行校准以测量约 0.1 至约 500pmol/L、约 1 至约 300pmol/L、约 10 至约 250 或约 20 至约 150pmol/L 范围内的 GRN-SP 水平。

[0366] 可以按照已知技术,例如利用具有已知水平的 GRN-SP 生物标记物的血液样品、或各自具有不同已知水平的 GRN-SP 的一组校准,来进行测定校准。用于诊断试剂盒的试验条带(test strips)通常是在制造期间加以校准。参见例如 US 6,780,645。试剂盒可用于测量生物样品中的 GRN-SP 生物标记物水平。检测试剂可以是互补于 GRN-SP 或 GRN-SP 标记物的片段的寡核苷酸序列、或结合于由标记物编码的多肽的抗体。试剂可以结合于固态基

质（如上面所讨论的）或包装（packaged）有用于将它们结合于基质的试剂。固态基质或底物可以具有珠粒、平板、管、浸渍片、条带或生物芯片的形式（所有如上面所讨论的）。

[0367] 检测试剂包括洗涤剂 and 能够检测结合抗体（如标记二抗）的试剂、或能够和标记抗体反应的试剂。

[0368] 试剂盒还将方便地包括对照试剂（阳性和 / 或阴性）和 / 或用于检测核酸、多肽、或抗体的装置。试剂盒还可以包括用法说明书，如在 ACD、心脏移植排斥或 ACD/ 肺疾病发作或表现的 6、4 或 2 小时内从对象获取生物样品，测量样品中的 GRN-SP 水平，比较测量水平与对照水平，以及关联比较结果和心脏状况。通常，和对照相比，GRN-SP 标记物水平的增加指示 ACD 或心脏移植排斥、或 ACD（与肺疾病相对）。

[0369] 在糖尿病的情况下，和对照相比，更低或更高 GRN-SP 生物标记物水平指示糖尿病或易患糖尿病体质，是更高还是更低则取决于糖尿病的特性和对象的糖尿病状态。

[0370] 最常见地，试剂盒形式化为用于本领域已知的测定，在一种实施方式中用于 PCR、Northern 杂交或 Southern ELISA 测定（如在本领域中已知的）。

[0371] 试剂盒还可以包括用于 ACD、移植排斥、或 ACD/ 肺疾病的标记物的一种或多种另外的测定。在 ACS 的情况下，另外的标记物测定可以包括用于以下一种或多种的测定：肌钙蛋白 T、肌钙蛋白 I、肌酸激酶 MB、肌红蛋白、ANP、BNP、BNP-SP、BNP-SP 片段、ANP、ANP-SP、ANP-SP 片段、NT-BNP、LDH、天冬氨酸转氨酶、H-FABP、内皮素、肾上腺髓质素、缺血修饰白蛋白、肾素以及血管紧张素 II。在一种实施方式中，所有标记物包括在试剂盒中。

[0372] 在糖尿病的情况下，另外的试剂盒成分可以是用于标记物的测量装置，其中标记物可以包括葡萄糖、胰岛素、乳酸酯、甘油三酯或脂肪酸水平或其标记物。

[0373] 试剂盒将包括一个或多个容器并且还可以包括收集装置，例如，瓶、袋（如静脉输液袋）、小瓶、注射器、以及试管。至少一个容器容纳产品，该产品可有效用于预测、诊断、或监测生物事件如肥胖症、糖尿病、肾病、心血管疾病、ACD（尤其是 ACS）、移植排斥、或 ACD/ 肺疾病。上述产品通常是核酸分子、多肽或结合剂，尤其是本发明的抗体或抗原结合片段，或包含任何这些成分的组合物。在一种优选实施方式中，在容器上或伴随容器的用法说明或标签指明，上述组合物可用于预测、诊断、或监测生物事件。其它成分可以包括针、稀释剂以及缓冲剂。有益地，试剂盒可以包括至少一个容器，该容器包含缓冲液，如磷酸缓冲盐溶液、林格氏液以及葡萄糖溶液。

[0374] 试剂盒中理想地包括结合或选择性地结合 GRN-SP 生物标记物（以及，可选地，非 GRN-SP 生物标记物）的结合剂。在一种实施方式中，结合剂是抗体，优选本发明的抗体或抗原结合片段。在测定和试剂盒中所使用的抗体，在一种实施方式中，可以是单克隆或多克隆抗体，并且可以在任何哺乳动物（如上面所讨论的）中制备。抗体可以针对由本发明的 GRN-SP 生物标记物核酸序列、GRN-SP (1-23)、GRN-SP (1-9) 或基于或包括上述肽的合成肽而制备，或可以相对于外源性序列而产生，其中外源性序列融合于编码本发明的 GRN-SP 生物标记物肽的核酸序列。

[0375] 在一种试剂盒的实施方式中，将 GRN-SP 生物标记物检测试剂固定于固态基质如多孔条带或芯片以形成至少一个 GRN-SP 生物标记物检测位点。多孔条带的测量或检测区可以包括多个检测位点，这样的检测位点包含 GRN-SP 生物标记物检测试剂。可以以长条、交叉或点或其它排列方式来安排位点。测试条带或芯片还可以包含用于阴性和 / 或阳性对

照的位点。对照位点可以可替换地是在不同条带或芯片上。不同的检测位点可以包含不同量的固定核酸或抗体,例如在第一检测位点有较高量以及在随后的位点有较低量。在添加生物试样以后,显示可检测信号的位点的数目提供了在样品中存在的 GRN-SP 生物标记物的量的定量或半定量指示。

[0376] 在试剂盒中还可以包括用于样品分析的装置,该装置包括包含适当成分(标记物、抗体以及试剂)的一次性测试筒以进行样品测试。该装置将适宜地包括测试区和测试结果窗口。免疫色谱筒是上述装置的实例。参见例如 US 6,399,398、US 6,235,241 以及 US 5,504,013。

[0377] 可替换地,该装置可以是电子装置,其便于输入、存储以及评价所测得的标记物水平(相对于对照水平)以及其它标记物水平。US 2006/0234315 提供了上述装置的实例。此外可用于本发明的是 CIPHERGEN' s Protein **Chip**[®],利用 CIPHERGEN' s Protein **Chip**[®]软件包,其可以用来处理 SELDI 结果。

[0378] 在本说明书中,其中已参考专利说明书、其它外部文件、或其它来源的信息,这通常是为了给讨论本发明的特点提供背景。除非另有具体说明,参考上述外部文件并不认为是承认上述文献、或上述来源的信息(在任何司法中)是现有技术、或形成本领域的公知常识的一部分。

[0379] 现将以非限制性方式参照以下实施例来说明本发明。

[0380] 实施例 1

[0381] 方法

[0382] 所有人方案得到 Upper South Regional Ethics Committee of the Ministry of Health(新西兰)的准予,并按照赫尔辛基宣言进行。

[0383] 化学制品

[0384] 合成人 GRN 信号肽 GRN-SP(1-9)(SEQ ID NO:17)由 Mimotopes(澳大利亚)合成,其中利用温和 Fmoc 固相合成方法 30。所有缓冲试剂购买自 **BDH**[®](UK)和/或 Sigma(Mo, USA)。借助于用于定向载体结合的半胱氨酸,合成 C-末端延伸的 GRN-SP(1-9)。还借助于用于在相同肽上示踪物(tracer)制备的酪氨酰残基对 GRN-SP(1-9)进行 C-末端延伸。

[0385] 人类研究

[0386] 为了进行健康志愿者参考范围研究,血液样品获自隔夜空腹以后的 28 位健康志愿者(16 位妇女,平均年龄 50.3 ± 2.5 岁(范围 21-72 岁),BMI $26.0 \pm 0.8 \text{ kg/m}^2$)。该研究扩展至总共 86 位志愿者。将样品放入冰上的管中并于 $+4.0^\circ\text{C}$ 和 2700g 下离心 5 分钟,然后将血浆储存于 -80°C 直至分析。

[0387] 随后该研究扩展至 23 位 STEMI 患者。在克赖斯特彻奇医院的心脏特诊室中表现。在隔夜空腹后,将 18 规格(18-gauge)的静脉插管插入前臂静脉以采血。在进入心脏特诊室(时间 0)时以及在作为住院患者以后的 0、0.5、1、2、4、8、12、24 以及 72 小时抽取静脉样品(10ml),将样品放入冰上的管中并 $+4^\circ\text{C}$ 和 2700g 下离心 5 分钟,然后将血浆储存于 -80°C 直至分析。

[0388] 血浆提取

[0389] 如先前所描述的²²,用 SepPak Cartridges(Waters,USA)提取所有血浆样品,并在 RIA 和 HPLC 以前,干燥和储存于 -20°C 。

[0390] 激素浓度分析

[0391] 根据标准制造商方案, Roche Diagnostics¹⁷, 在 Elecsys 2010 (Roche, USA) 上使用异种免疫测定并使用钆标记的生物素化抗体, 分析血浆样品中的 TnI、CK-MB 和肌红蛋白。

[0392] 通过特异性 RIA 如下测量 GRN-SP :

[0393] GRN-SP RIA

[0394] 为了测量推定的人 GRN-SP 生物标记物肽, 我们产生了新的 RIA, 其针对人前饥饿素原 (1-23) 信号序列 (SEQ ID NO :15) 的 GRN-SP 氨基酸 1-9 (SEQ ID NO :17)。

[0395] 抗体生成

[0396] 在室温下通过温和混合, 将前 GRN 原 (1-9)^{Cys10} 结合于经顺丁烯二酰亚胺 (maleimide) 处理的在 PBS (pH7.0) 中的 N-ε-马来酰亚胺己酸琥珀酰亚胺酯 (EMCS) 衍生的 BSA。用弗氏佐剂 (2ml) 乳化结合肽并以每月间隔在 4-5 个部位皮下注射 (总共 2ml) 给 2 只新西兰白兔。在注射后 12 天对兔进行放血以评估抗体滴度直至达到适当水平。关于 RIA, 利用最终稀度为 1 : 15,000 的抗血清来确定 GRN-SPIR。这种抗血清没有可检测到与多肽及药物的交叉反应 (示于图 7), 包括人 BNP 原 (proBNP) (1-13)、BNP 原 (1-76)、ANP 原 (1-30)、胰岛素、血管紧张素 II、血管紧张素 (1-7)、尾加压素 II、CNP、饥饿素、C-饥饿素 (52-117)、CNP 原 (1-15)、肾上腺髓质素、尿促皮素 I、尿促皮素 II、BNP-SPn (1-10), ANP-SPc (16-25)、ANP-SP (1-10)、INS-SPn (1-9)。按照 Klee, G G. Interference in immunoassays Clin Lab Bed, 2004, 24 :1-18. 来评价交叉反应。

[0397] 碘化和测定方法

[0398] 借助于氯胺 T 法来碘化前 GRN 原 (1-9)^{Tyr10}, 然后用反相 HPLC (RP-HPLC) 加以纯化, 如先前描述的²¹。按照这种制备, 测试了 RP-HPLC 以后的碘化示踪物形式。将所有样品、标准物、放射性示踪物以及抗血清溶液稀释在基于钾的测定缓冲液中²²。测定温育液包含 100 μL 样品或标准 (0-640pmol) 人前 GRN 原 (1-9) 结合 100 μL 抗血清, 在 4°C 下对其进行旋转和温育 24 小时。然后添加 100 μL 示踪物 (4000-5000cpm) 并在 4°C 下进一步温育 24 小时。通过固相二抗方法 (驴抗羊 **Sac-Cel®**, IDS Ltd, 英国) 最终分离自由和结合的免疫反应活性并用 Gammamaster 计数器 (LKB, 乌普萨拉, 瑞典) 加以计数。

[0399] 统计分析

[0400] 所有结果表示为平均值 ± SEM。利用用于重复测量的双因素 (two-way) ANOVA, 接着最低显著性差异事后测试 (post-hoc testing), 分析了时间过程数据 (time-course data)。利用一般线性回归模型, 进行了血浆激素浓度的相关分析。在所有分析中, P 值 < 0.05 被认为是显著的。

[0401] 结果

[0402] 为了确定饥饿素的 23 个氨基酸信号肽或从其衍生的片段是否存在于人类的循环中, 我们开发了特异的放射免疫测定 (RIA), 其针对前饥饿素原 (1-23) 的残基 1-9。血浆提取物的稀释显示了与标准曲线 (未示出) 的平行性。在健康人中 GRN-SP (1-9) 的血浆浓度最初确定为 31.3 ± 2.4 pmol/L (n = 28)。随后更大的研究 (n = 86) 给出血浆浓度为 42.9 ± 1.5 pmol/L (见图 6)。在健康人体中, 血液中 GRN-SPIR 的浓度没有显示与 BMI 显著相关 (图 3)。

[0403] 在已确定了免疫反应性 (IR) GRN-SP (1-9) 肽存在于人血浆中以后, 我们测量了在

患有文件证明的 AMI 的患者中 IR GRN-SP(1-9) 的连续浓度 (图 6)。在入院后 1-2 小时观测到 IR GRN-SP 的最高浓度, 然后经 72 小时缓慢下降至稳定水平。重要的是, 平均峰值水平是正常的健康志愿者中水平的 2 至 3 倍 (2 至 5 倍范围)。肌红蛋白的峰值浓度在入院后 1-2 小时出现, 而峰值 TnI 和 CK-MB 水平直到入院后 8-12 小时才得到。

[0404] 优选地, 检测 IR GRN-SP 片段。

[0405] 为了评价 GRN-SP 在控制代谢和 / 或能量平衡中的作用, 给 7 个正常的健康志愿者口服 75g 葡萄糖。如图 4 所示, GRN-SP(1-9) 和饥饿素本身的血浆水平在摄取葡萄糖后有显著减少, 这与其在能量平衡中发挥作用相一致。

[0406] 实施例 2

[0407] 对具有临床上稳定的疑似 ACS 的 8 位患者进行插管并从多个器官部位获得血液样品, 上述多个器官部位是股动脉 FA(1) 和 FA(2)、股静脉 (FV)、肾静脉 (RV)、肝静脉 (HV)、下腔静脉 (IVC)、颈静脉 (JUG)、心脏冠状窦静脉 (CS) 以及肺动脉 (PA)。血液被收集到冷冻 EDTA 管中, 通过离心从血浆制备以及对血浆进行 GRN-SPRIA。图 1 清楚示出, GRN-SP(1-9) 浓度最高的部位是 CS, 排出心脏特别是心室的静脉。这是有力的证据, 证实心脏是 GRN-SP 分泌的主要场所。与此一致, GRN-SP 的冠状窦水平与另一种已知的心脏肽 BNP-SP 强烈相关 (图 2)。

[0408] 结论

[0409] 在临床上稳定的患者中, 循环 GRN-SP 生物标记物浓度可能来源于心脏来源。大量的心脏分泌与 GRN-SP 肽和亚肽 (subpeptides) 作为心脏激素相一致。响应文件证明的 AMI 的 GRN-SP 肽和亚肽的增加支持以下想法: 它们具有作为心脏疾病的生物标记物的作用。此外, GRN-SP 生物标记物血浆水平对血浆葡萄糖的增加的响应还暗示它在能量平衡中可能发挥作用。

[0410] 讨论

[0411] 此证据首次证实在患者表现 ACD 的两个小时内或在 ACD 发作的两个小时内, 前饥饿素原的信号肽、以及其片段存在于循环和细胞外腔隙 (extracellular space) 中。我们表明了, 首先血液中 GRN-SPIR 的测量具有潜力作为急性心肌缺血和 / 或随后损伤的快速生物标记物, 以及其次事件以后 GRN-SP 的测量具有潜在价值可作为长期预后和结果的标记物。

[0412] 我们还表明, 血浆中 GRN-SP 生物标记物的测量可潜在地用于代谢作用和 / 或能量平衡领域, 尤其用于葡萄糖代谢的评估。

[0413] 本领域技术人员当然明了, 以上描述是通过举例方式来提供且本发明并不限于此。

[0414] 参考文献

[0415] 1. Braunwald E, Zipes DP, Libby P. Acute myocardial infarction Chp. 35 Heart disease : a textbook of cardiovascular medicine, 6th ed. 2001. pgs. 1114-1231.

[0416] 2. Richards AM, Nicholls MG, Yandle TG, Frampton C, Espiner EA, Turner JG, Buttimore RC, Lainchbury JG, Elliott JM, Ikram H, Crozier IG, Smyth DW. Plasma N-terminal pro-brain natriuretic peptide and adrenomedullin : new neurohormonal predictors of left ventricular function and prognosis after myocardial infarction. Circulation 1998;97:1921-1929.

- [0417] 3. Jernberg T, Stridsberg M, Venge P, Lindahl B. N-terminal pro Brain Natriuretic Peptide on admission for early risk stratification of patients with chest pain and no ST-segment elevation. *J. Am. Coll. Cardiology* 2002 40 :437-445.
- [0418] 4. Omland T, Persson A, Ng L, O'Brien R, Karlsson T, Herlitz J, Hartford M, Caidahl K. N-terminal pro-B-type natriuretic peptide and long-term mortality in acute coronary syndromes. *Circulation*. 2002;106 :2913-2918.
- [0419] 5. Pemberton CJ, Johnson ML, Yandle TG, Espiner EA. Deconvolution Analysis of the Secretion and Elimination of Cardiac Natriuretic Peptides During Acute Volume Overload. *Hypertension* 2000 ;36 :355-359.
- [0420] 6. Richards AM, Nicholls MG, Troughton RW, Lainchbury JG, Elliott J, Frampton C, Espiner EA, Crozier IG, Yandle TG, Turner J. Antecedent hypertension and heart failure after myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiology*. 2002;39 :1182-1188.
- [0421] 7. Troughton RW, Prior DL, Pereira JJ, Martin M, Fogarty A, Morehead A, Yandle TG, Richards AM, Starling RC, Young JB, Thomas JD, Klein AL. Plasma B-type natriuretic peptide levels in systolic heart failure: importance of left ventricular diastolic function and right ventricular systolic function. *J Am Coll Cardiol*. 2004;43 :416-422.
- [0422] 8. Troughton RW, Frampton CM, Yandle TG, Espiner EA, Nicholls MG, Richards AM. Treatment of heart failure guided by plasma amino-terminal brain natriuretic peptide (N-BNP) concentrations. *Lancet* 2000;355 :1126-1130.
- [0423] 9. Multiple Sequence Alignment with the Clustal series of programs *Nucleic Acids Res* (2003) 31(13) :3497-500.
- [0424] 10. Bowie, J. U et al, (1990). Deciphering the message in Protein Sequences: Tolerance to Amino Acid Substitutions. *Science* 247, 1306-1310.
- [0425] 11. Harbour and Lane 1998. *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Press New York. 27
- [0426] 12. Kohler and Milstein 1975. continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity. *Nature*, 256, 495-497.
- [0427] 13. Verhoeyen M. C Milstein, and G Winter Reshaping human antibodies: grafting an antilysozyme activity. *Science* 1988 Mar 25 ;239(4847) :1534-6.
- [0428] 14. Jones, P. T., Dear, P. H., Foote, J., Neuberger, M. S. and Winter, G. " Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. " *Nature*(1986) 321 :522-525.
- [0429] 15. Riechmann L, Clark M, Waldmann H, Winter G. Reshaping human antibodies for therapy. *Nature*. 1988 Mar 24 ;332(6162) :323-7.
- [0430] 16. Hoogenboom HR, Winter G (1992) Human antibodies from synthetic repertoires of germline VH gene segments rearranged in vitro. *J Mol Biol*. 1992 Sep 20 ;227(2) :381-8.

- [0431] 17. Michael Neuberger(1996)Generating high-avidity human Mabs in mice Nature Biotechnology 14,826
- [0432] 18. Tristan J. Vaughan, Jane K. Osbourn&Philip R. Tempest (1998)Human antibodies by design. Nature Biotechnology 16,535-539
- [0433] 19. Milstein and Cuello(1983)The co-expression of two immunoglobulin heavy-chain/light-chain pairs, where the two heavy chaGRN have different specificities, Nature,305 :537-539.
- [0434] 20. Suresh, M. R. , Cuello, A. C. and Milstein, C. (1986)Bi-specific monoclonal antibodies from hybrid hybridomas. Methods in Enzymology,121 :210-228.
- [0435] 21. Brennan et al. , " Preparation of bispecific antibodies by chemical recombination of monoclonal immunoglobulin G1 fragments " Science 229 : 81-83(1985).
- [0436] 22. Hunt PJ, Richards AM, Nicholls MG, Yandle TG, Doughty RN, Espiner EA. Immunoreactive amino terminal pro brain natriuretic peptide(NT-proBNP) :a new marker of cardiac impairment. Clin. Endocrinol. 199747 :287-296.
- [0437] 23. The Immunoassay Handbook. 3rd edition, ed. David Wild. Elsevier Ltd, 2005.
- [0438] 24. Solber H. Approved recommendation(1987)on the theory of reference values. Part 5. Statistical treatment of collected reference values. Determination of reference limits. Journal of clinical Chemistry and Cilinical Biochemistry 198725 :645-656.
- [0439] 25. Braud VM, Allan DS, O' Callaghan CA, Soderstrom K, D' Andrea A, Ogg GS, Lazetic S, Young NT, Bell JI, Phillips JH, Lanier LL, McMichael AJ. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. Nature 1998391 :795-799.
- [0440] 26. Universal definition of myocardial infarction. Consensus statement from the Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Taskforce for the redefinition of myocardial infarction. Circulation 2007116 :2634-2653.
- [0441] 27. National Academy of Clinical Biochemistry and IFCC Committee for standardisation of markers of cardiac damage laboratorymedicine practice guidelines :analytical issues for biochemical markers of acute coronary syndromes. Circulation 2007 115 :e352-e355.
- [0442] 28. Kunkel, Thomas A. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 82, pp. 488-492, January 1985.
- [0443] 29. Techniques in Protein Modification By Roger L. Lundblad Edition :2 Published by CRC Press, 1995 288 pages.
- [0444] 30. Atherton et al. (1989)Solid Phase Synthesis :a practical approach, IRL press.
- [0445] 31. **Pöykkö** SM, Kellokoski E, **Hörkkö** S, Kauma H, **Kesäniemi** YA, Ukkola

0. Low plasma ghrelin is associated with insulin resistance, hypertension, and the prevalence of type 2 diabetes Diabetes. 2003 Oct ;52(10) :2546-53.

[0446] 本发明并不限于上述特定的优选实施方式。本领域技术人员可以对所披露的优选实施方式进行各种改进而没有偏离本发明的构思。所有这样的改进都将在本发明的范围内。

[0447] 本文参考或提及的所有专利、出版物、科学论文、万维网站、以及其它文件和材料表明与本发明有关领域中的技术人员的水平，并且每个上述引用的文件和材料以引用方式结合于本文，其结合程度等同于如果其单独地以引用方式作为整体结合或作为整体在本文中描述。申请人保留物理上将来自任何上述专利、出版物、科学论文、万维网站、以电子方式可获得的信息、以及其它引用的材料或文件的任何及所有材料和信息加入本说明书的权利。

[0448] 本专利的书面说明部分包括所有权利要求。另外，所有权利要求，包括所有原权利要求以及所有来自任何及所有优先权文件的权利要求，其全部内容以引用方式结合于本说明书的书面说明部分，并且申请人保留将任何及所有上述权利要求物理上加入本申请的书面说明或任何其它部分的权利。因此，例如，在任何情况下本专利都不可以解释为据宣称未提供权利要求的书面说明（基于权利要求的精确措辞未用这些文字陈述在本专利的书面说明部分中）。

[0449] 在本说明书中披露的所有特点可以以任何组合加以结合。因此，除非另有明确陈述，所披露的每个特点仅是等效或类似特点的通用系列的一个实例。

[0450] 应当明了，虽然已连同详细描述来描述了本发明，但上述描述用来说明而不是限制本发明的范围，本发明的范围是由所附权利要求的范围加以限定。因此，根据上述内容，应当明了，虽然为说明的目的本文已描述了本发明的具体实施方式，但可以进行各种改进而不偏离本发明的精神和范围。其它方面、优点、以及改进是在以下权利要求的范围内并且本发明仅受限于所附权利要求。

[0451] 本文描述的具体方法和组合物代表优选实施方式并且是示例性的，而不是用于限制本发明的范围。鉴于本说明书，本领域技术人员将明了其它目的、方面、以及实施方式，并且包括在本发明的精神内，如由权利要求的范围所限定的。本领域技术人员显而易见的是，可以对本文披露的本发明进行多种替代和改进而不偏离本发明的范围和精神。本文说明性地描述的发明可以适当地在没有任何要素或多种要素、或限制或多种限制（其在本文中并没有明确披露为必不可少的）的条件下实施。因此，例如，在本文的每种情况下，在本发明的实施方式或实施例中，术语“包含”、“包括”、“含有”等要广泛而没有限制地加以理解。本文说明性地描述的方法和过程可以适当地以步骤的不同次序来实施，以及它们不一定限于在本文或权利要求中所指定的步骤次序。

[0452] 已采用的术语和措辞是用作描述而不是限制的术语，并且并不是要使用这样的术语和措辞来排除所示和所描述的特点的任何等同替代或其一部分，而是应当明了，在如要求的本发明的范围内各种改进是可能的。因此，应当理解，虽然通过各种实施方式和/或优选实施方式以及可选的特点，已具体披露了本发明，但本领域技术人员可以采取的本文所披露构思的任何及所有改进和变化被认为是在如所附权利要求所限定的本发明的范围内。

[0453] 本文已广泛和一般地描述了本发明。属于属类披露内容的每个更窄的种和亚属组

也形成本发明的一部分。这包括本发明的带有附带条件或负面限制而从属中消除任何主题的属类描述,不论本文中是否明确列举缺失的材料。

[0454] 还应当明了,如在本文中以及在所附权利要求中所使用的,单数形式“一”、“一种”以及“该”包括复数指称(除非上下文另有明确规定),术语“X和/或Y”是指“X”或“Y”或者“X”和“Y”,以及名词后的字母“s”是指上述名词的复数和单数形式。此外,在按照马库什组来描述本发明的特点或方面的情况下,它是指,并且本领域技术人员将明了,本发明包括马库什组的任何个体成员和成员的任何亚组并且还按照马库什组的任何个体成员和成员的任何亚组加以描述,以及申请人保留修改申请或权利要求的权利以具体提到马库什组的任何个体成员或成员的任何亚组。

[0455] 其它实施方式落在以下权利要求内。本专利不可以解释为限于本文具体和/或明确披露的具体实施例或实施方式或方法。在任何情况下,本专利不可以解释为限于由专利局的任何审查员或任何其它官员或雇员作出的任何陈述,除非这样的陈述是由申请人采用书面回应形式确定地表达和无限定条件或保留地表达。

[0001]

P36106DMS序列表-PCT公开.txt

序列表

<110> 奥塔哥创新有限公司 (OTAGO INNOVATION LIMITED)
 <120> 生物标记物
 <130> P36106DMS
 <140> PCT/NZ2009/000032
 <141> 2009-03-12
 <150> 61/035,761
 <151> 2008-03-12
 <160> 18
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 智人
 <300>
 <308> NP_057446
 <309> 2008-02-10
 <313> (1).. (117)
 <400> 1
 Met Pro Ser Pro Gly Thr Val Cys Ser Leu Leu Leu Leu Gly Met Leu
 1 5 10 15
 Trp Leu Asp Leu Ala Met Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His
 20 25 30
 Gln Arg Val Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu
 35 40 45
 Gln Pro Arg Ala Leu Ala Gly Trp Leu Arg Pro Glu Asp Gly Gly Gln
 50 55 60
 Ala Glu Gly Ala Glu Asp Glu Leu Glu Val Arg Phe Asn Ala Pro Phe
 65 70 75 80
 Asp Val Gly Ile Lys Leu Ser Gly Val Gln Tyr Gln Gln His Ser Gln
 85 90 95
 Ala Leu Gly Lys Phe Leu Gln Asp Ile Leu Trp Glu Glu Ala Lys Glu
 100 105 110
 Ala Pro Ala Asp Lys
 115
 <210> 2
 <211> 518

[0002]

P36106DMS序列表-PCT公开.txt

<212> DNA
<213> 智人

<300>
<308> NM_016362
<309> 2008-02-10
<313> (1)..(528)

<400> 2
acctccgccca ggaactgcag gccacactgt ctgcaaccca gctgaggcca tgcctcccc 60
agggaccgtc tgcagcctcc tgctcctcgg catgctctgg ctggacttgg ccatggcagg 120
ctccagcttc ctgagccctg aacaccagag agtccagcag agaaaggagt cgaagaagcc 180
accagccaag ctgcagcccc gagctctagc aggctggctc cgcccggaag atggagggtca 240
agcagaaggg gcagaggatg aactggaagt ccggttcaac gcccccttg atgttggat 300
caagctgtca ggggttcagt accagcagca cagccaggcc ctggggaagt ttcttcagga 360
catcctctgg gaagaggcca aagaggcccc agccgacaag tgatcgcca caagccttac 420
tcacctctct ctaagtttag aagcgetcat ctggcttttc gcttgcttct gcagcaactc 480
ccacgactgt tgtacaagct caggaggcga ataatgttc aaactgta 528

<210> 3
<211> 117
<212> PRT
<213> 褐鼠

<300>
<308> NP_067701
<309> 2008-02-17
<313> (1)..(117)

<400> 3

Met Val Ser Ser Ala Thr Ile Cys Ser Leu Leu Leu Leu Ser Met Leu
1 5 10 15

Trp Met Asp Met Ala Met Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His
20 25 30

Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu
35 40 45

Gln Pro Arg Ala Leu Glu Gly Trp Leu His Pro Glu Asp Arg Gly Gln
50 55 60

Ala Glu Glu Ala Glu Glu Leu Glu Ile Arg Phe Asn Ala Pro Phe
65 70 75 80

Asp Val Gly Ile Lys Leu Ser Gly Ala Gln Tyr Gln Gln His Gly Arg
85 90 95

[0003]

P36106DMS序列表-PCT公开.txt

Ala Leu Gly Lys Phe Leu Gln Asp Ile Leu Trp Glu Glu Val Lys Glu
 100 105 110

Ala Pro Ala Asn Lys
 115

<210> 4
 <211> 501
 <212> DNA
 <213> 褐鼠

<300>
 <308> NM_021669
 <309> 2008-02-17
 <313> (1)..(501)

<400> 4
 tccagatcat ctgtcctcac caccaaggcc atgggtgtctt cagcagactat ctgcagtttg 60
 ctactcctca gcatgctctg gatggacatg gccatggcag gttccagctt cttgagccca 120
 gagcaccaga aagcccagca gagaaaggaa tccaagaagc caccagctaa actgcagcca 180
 cgagctctgg aaggctggct ccaccagag gacagaggac aagcagaaga ggcagaggag 240
 gagctggaaa tcaggttcaa tgctcccttc gatgttggca tcaagctgtc aggagctcag 300
 taccagcagc atggccgggc cctgggaaag tttcttcagg atatcctctg ggaagaggtc 360
 aaagaggcgc cagctaacaa gtaaccactg acaggactgg tcctgtact ttcctcctaa 420
 gcaagaactc acatccagct tctgcctctc ctgcaactcc cagcactctc ctgctgactt 480
 acaaataaat gttcaagctg t 501

<210> 5
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> 绵羊

<300>
 <308> NP_001009721
 <309> 2007-09-25
 <313> (1)..(116)

<400> 5
 Met Pro Ala Pro Arg Thr Ile Tyr Ser Leu Leu Leu Leu Ser Leu Leu
 1 5 10 15
 Trp Met Asp Leu Ala Met Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His
 20 25 30
 Gln Lys Leu Gln Arg Lys Glu Pro Lys Lys Pro Ser Gly Arg Leu Lys
 35 40 45
 Pro Arg Ala Leu Glu Gly Gln Phe Asp Pro Asp Val Gly Ser Gln Glu
 50 55 60

[0004]

P36106DMS序列表-PCT公开.txt

Glu Gly Ala Glu Asp Glu Leu Glu Ile Arg Phe Asn Ala Pro Phe Asn
65 70 75 80

Ile Gly Ile Lys Leu Ser Gly Ala Gln Ser Leu Gln His Gly Gln Thr
85 90 95

Leu Gly Lys Phe Leu Gln Asp Ile Leu Trp Glu Glu Ala Glu Glu Thr
100 105 110

Leu Ala Asp Glu
115

<210> 6
<211> 531
<212> DNA
<213> 绵羊

<300>
<308> NM_001009721
<309> 2007-09-25
<313> (1)..(531)

<400> 6
tcgtcctccg cccggaaccc caggtccatc tgcctccagc cagggaagcc atgcccgcc 60
cgcgaccat ctacagcctg ctgctgctca gcctgctctg gatggacttg gccatggcgg 120
gctccagctt tctgagccct gaacatcaga aactgcagag aaaggaacct aagaagccgt 180
caggcagact gaagccccgg gccctggaag gccagtttga cccggatgtg ggaagtcagg 240
aggaaggtgc agaggacgag ctggaaatcc ggttcaatgc cccctttaac attgggatca 300
agetgtcagg ggctcagtc ctcagcacg gccagactct ggggaagttt cttcaggaca 360
ttctttggga agaagccgaa gaaaccctgg ctgacgagtg accagccctc ggaccaacca 420
cctgtctggt ctcccgcct cagaagctct cacctggctt ccgggacact tccgagacca 480
cgtgcagctc tgaggggtac tagcctagga ggtgaataaa tactcaaacg g 531

<210> 7
<211> 118
<212> PRT
<213> 野猪

<300>
<308> NP_998972
<309> 2007-09-25
<313> (1)..(118)

<400> 7

Met Pro Ser Thr Gly Thr Ile Cys Ser Leu Leu Leu Ser Val Leu
1 5 10 15

[0005]

P36106DMS序列表-PCT公开.txt

Leu Met Ala Asp Leu Ala Met Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu
 20 25 30

His Gln Lys Val Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Ala Ala Lys
 35 40 45

Leu Lys Pro Arg Ala Leu Glu Gly Trp Leu Gly Pro Glu Asp Ser Gly
 50 55 60

Glu Val Glu Gly Thr Glu Asp Lys Leu Glu Ile Arg Phe Asn Ala Pro
 65 70 75 80

Cys Asp Val Gly Ile Lys Leu Ser Gly Ala Gln Ser Asp Gln His Gly
 85 90 95

Gln Pro Leu Gly Lys Phe Leu Gln Asp Ile Leu Trp Glu Glu Val Thr
 100 105 110

Glu Ala Pro Ala Asp Lys
 115

<210> 8
 <211> 509
 <212> DNA
 <213> 野猪

<300>
 <308> NM_213807
 <309> 2007-09-25
 <313> (1)..(509)

<400> 8
 agccaggaag accagctgag gccatgccct ccacggggac cattgcagc ctgctgctcc 60
 tcagcgtgct cctcatggca gacttggcca tggcgggctc cagcttcttg agccccgaac 120
 accagaaagt gcagcagaga aaggagtcca agaagccagc agccaaactg aagccccggg 180
 ccttgaagg ctggctggc ccagaagaca gtggtgaggt ggaaggcacg gaggacaagc 240
 tggaaatccg gttcaacgcc cctgtgatg ttgggatcaa gttgtcaggg gctcagtcag 300
 accagcacgg ccagcccctg gggaaatttc tccaggacat cctctgggaa gaggtcactg 360
 aggccccggc cgacaagtga ttgtccctga gaccagccac ctctgttctc ccagcttctc 420
 aagggtcac ctggcttcca ggacgcttc actatcacac ccagctctga gggacgctag 480
 cctgggaggt gaataaacat tcagactgg 509

<210> 9
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 小鼠

<300>

[0006]

P36106DMS序列表-PCT公开.txt

<308> NP_067463
 <309> 2008-03-02
 <313> (1)..(117)

<400> 9

Met Leu Ser Ser Gly Thr Ile Cys Ser Leu Leu Leu Leu Ser Met Leu
 1 5 10 15

Trp Met Asp Met Ala Met Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His
 20 25 30

Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu
 35 40 45

Gln Pro Arg Ala Leu Glu Gly Trp Leu His Pro Glu Asp Arg Gly Gln
 50 55 60

Ala Glu Glu Thr Glu Glu Glu Leu Glu Ile Arg Phe Asn Ala Pro Phe
 65 70 75 80

Asp Val Gly Ile Lys Leu Ser Gly Ala Gln Tyr Gln Gln His Gly Arg
 85 90 95

Ala Leu Gly Lys Phe Leu Gln Asp Ile Leu Trp Glu Glu Val Lys Glu
 100 105 110

Ala Pro Ala Asp Lys
 115

<210> 10
 <211> 527
 <212> DNA
 <213> 小鼠

<300>
 <308> NM_021488
 <309> 2008-03-02
 <313> (1)..(527)

<400> 10

atccccaggc attccaggtc atctgtctc accaccaaga ccatgctgtc ticaggcacc 60

atctgcagtt tgctgtact cagcatgctc tggatggaca tggccatggc aggctccagc 120

ttctgagcc cagagcacca gaaagcccag cagagaaagg aatccaagaa gccaccagct 180

aaactgcagc cactgactct ggaaggctgg ctccaccagc aggacagagg acaagcagaa 240

gagacagagg aggagctgga gatcaggctc aatgctcctc tcgatgttgg catcaagctg 300

tcaggagctc agtatcagca gcatggccgg gccctgggga agttttctca ggatatcctc 360

tgggaagagg tcaaagaggc gccagctgac aagtaaccac ggacaggcct gacccccgtg 420

ctttcttct cctgagcaag aactcacatc cgcctcagcc tctcggcaa ctcccagcac 480

[0007]

P36106DMS序列表-PCT公开.txt

tctcctacca ctttaagaat aaatgttcac ctgtatgccca aatgttc 527

<210> 11
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 家犬

<300>
 <308> NP_001003052
 <309> 2007-06-27
 <313> (1).. (117)

<400> 11

Met Pro Ser Leu Gly Thr Met Cys Ser Leu Leu Leu Phe Ser Val Leu
 1 5 10 15

Trp Val Asp Leu Ala Met Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His
 20 25 30

Gln Lys Leu Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu
 35 40 45

Gln Pro Arg Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gly Pro Glu Asp Thr Ser Gln
 50 55 60

Val Glu Glu Ala Glu Asp Glu Leu Glu Ile Arg Phe Asn Ala Pro Phe
 65 70 75 80

Asp Val Gly Ile Lys Leu Ser Gly Pro Gln Tyr His Gln His Gly Gln
 85 90 95

Ala Leu Gly Lys Phe Leu Gln Glu Val Leu Trp Glu Asp Thr Asn Glu
 100 105 110

Ala Leu Ala Asp Glu
 115

<210> 12
 <211> 547
 <212> DNA
 <213> 家犬

<300>
 <308> NM_001003052
 <309> 2007-06-27
 <313> (1).. (547)

<400> 12
 gaattcgcca cgagggaat cccagcgcga tctgacacca tgcctcct ggggaccatg 60

tgcagcctgc tgctctcag tgtgctctgg gtggacctgg ccatggcggg ctccagcttc 120

ctaagtcccg aacaccagaa actacagcag agaaaggagt ccaagaagcc gccggccaaa 180

[0008]

P36106DMS序列表-PCT公开.txt

ctgcagcccc gagccctaga aggctccctt ggcccagaag acacaagtca agtggaagag 240
 gcagaggatg agctggaaat cgggttcaat gccccctttg atgttggaat caagctgtca 300
 gggcctcagt accaccagca tggccaggca ctcggaagt ttcttcaaga ggttctttgg 360
 gaagacacca acgaggccct ggcagacgag tgatcatcca caagatgggc ctgcctgttc 420
 tccccccacc ctagaagcac tcacctgact tttacactgt ttctgcagct actcccagtt 480
 ctgagtggta ctagtgaag aggtgaataa acattcaaac cataaaaaaa aaaaaaaaaa 540
 actcgag 547

<210> 13
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> 猫

<300>
 <308> NP_001009853
 <309> 2007-09-03
 <313> (1)..(116)

<400> 13

Met Pro Ser Pro Gly Thr Val Cys Ser Leu Leu Leu Phe Ser Met Leu
 1 5 10 15

Trp Ala Asp Leu Ala Met Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His
 20 25 30

Gln Lys Val Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln
 35 40 45

Pro Arg Ala Leu Glu Gly Leu Ile His Pro Glu Asp Thr Ser Gln Val
 50 55 60

Glu Gly Ala Glu Asp Glu Leu Glu Ile Arg Phe Asn Ala Pro Phe Asp
 65 70 75 80

Val Gly Ile Lys Leu Ser Gly Ala Gln Tyr His Gln His Gly Gln Ala
 85 90 95

Leu Gly Lys Phe Leu Gln Asp Val Leu Trp Glu Glu Ala Asp Glu Val
 100 105 110

Leu Ala Asp Glu
 115

<210> 14
 <211> 640
 <212> DNA
 <213> 猫

[0009]

P36106DMS序列表-PCT公开.txt

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (69)..(69)
<223> n is a, c, g, or t

<300>
<308> NM_001009853
<309> 2007-09-03
<313> (1)..(640)

<400> 14
ggcagagaga aagggagaga tcgagaatcc caagcagcat ggagcttgat gcagggatcg      60
aactcatgng actgtgagat catgacctga gctgaaacca agaatcagat gcttaactga      120
cttccaccag gaatcccagg cccacctgac accatgccct ccccggggac cgtgtgcagc      180
ctgtctctct tcagcatgct gtgggcagac ttggccatgg caggetccag ctctctgagc      240
cccgaacacc agaaagtaca gagaaaggaa tccaagaagc caccagcaa actgcagccc      300
cgagctcttg aaggcttgat ccaccagaa gacacaagtc aagtggaagg ggcagaggat      360
gaactagaaa tccggttcaa cgcccctttt gatgttggaa tcaagctgtc aggggctcag      420
taccaccagc atggccaggc gctggggaag tttcttcagg acgtcctttg ggaagaggcc      480
gatgaggtec tggcagatga gtgatcatcc actagaacga cccactgcc ttctcccaa      540
cctgacagcg cccacctggc ttttaaactg tttctgcaac aacatccagt tctgagtgg      600
actagcttaa gaagtgtata aacattcatg ctgtatgccc      640

<210> 15
<211> 23
<212> PRT
<213> 智人

<300>
<308> NP_057446
<309> 2008-02-10
<313> (1)..(23)

<400> 15
Met Pro Ser Pro Gly Thr Val Cys Ser Leu Leu Leu Leu Gly Met Leu
1          5          10          15

Trp Leu Asp Leu Ala Met Ala
20

<210> 16
<211> 69
<212> DNA
<213> 智人

<300>
<308> NM_016362
<309> 2008-02-10

```

[0010]

P36106DMS序列表-PCT公开.txt

<313> (1).. (69)

<400> 16

atgccctccc cagggaccgt ctgcagcctc ctgctcctcg gcatgctctg gctggacttg 60

gccatggca

69

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<300>

<308> NP_057446

<309> 2008-02-10

<313> (1).. (9)

<400> 17

Met Pro Ser Pro Gly Thr Val Cys Ser

1

5

<210> 18

<211> 27

<212> DNA

<213> 智人

<300>

<308> NM_016362

<309> 2008-02-10

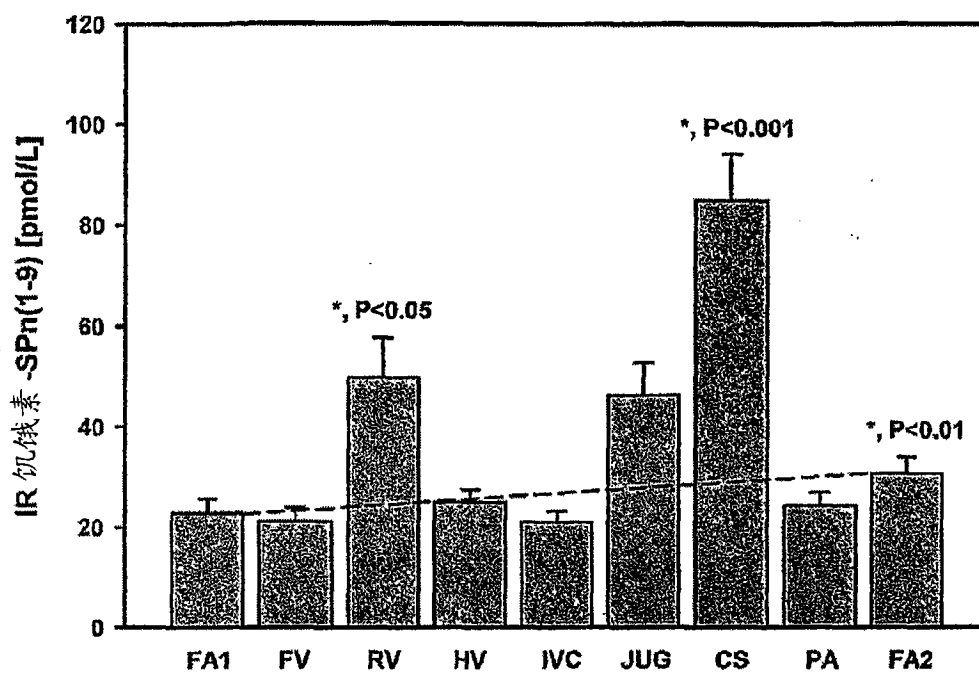
<313> (1).. (27)

<400> 18

atgccctccc cagggaccgt ctgcagc

27

IR饥饿素-SPn(1-9)区域研究, n = 8



成熟饥饿素区域研究, n = 8

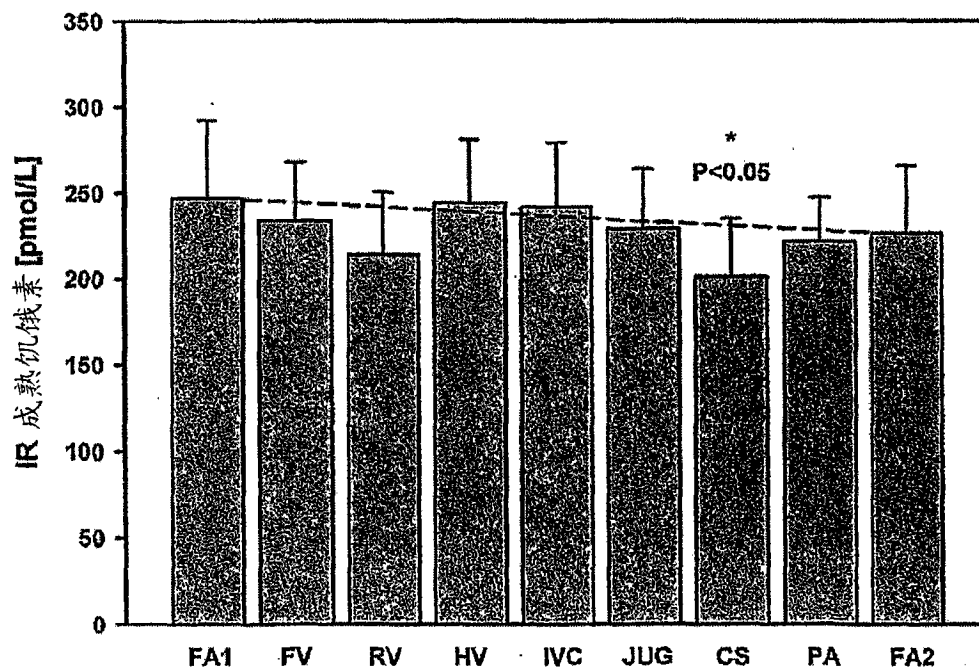


图 1

BNP-SP对比饥饿素-SPn
冠状窦血浆, n=8.

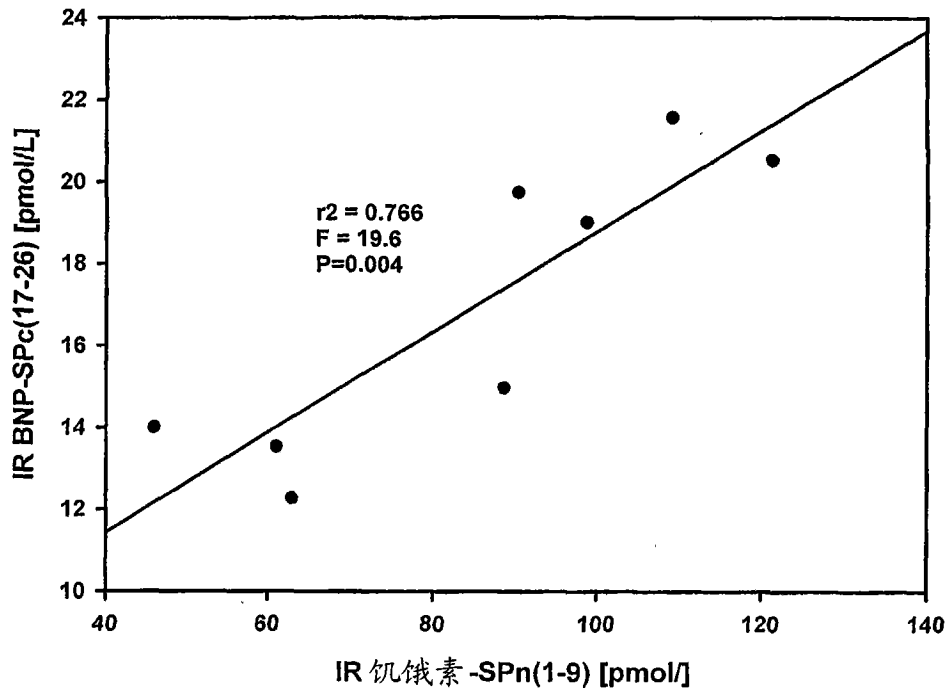


图 2

Ghr-SPn 对比 BMI, 正常范围, N=28

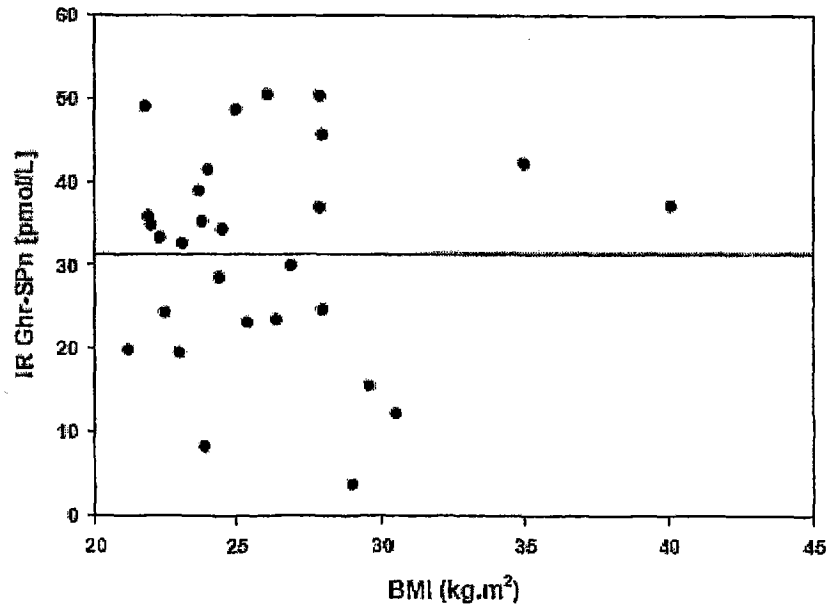


图 3

口服GTT期间的Ghr-SPn, n=7

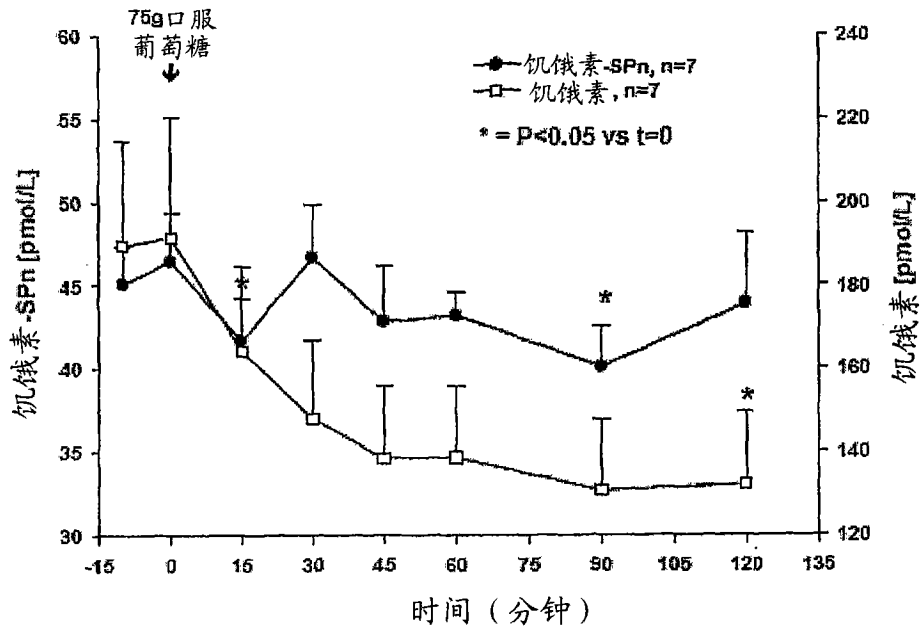


图 4

人前饥饿素原 (1-117)

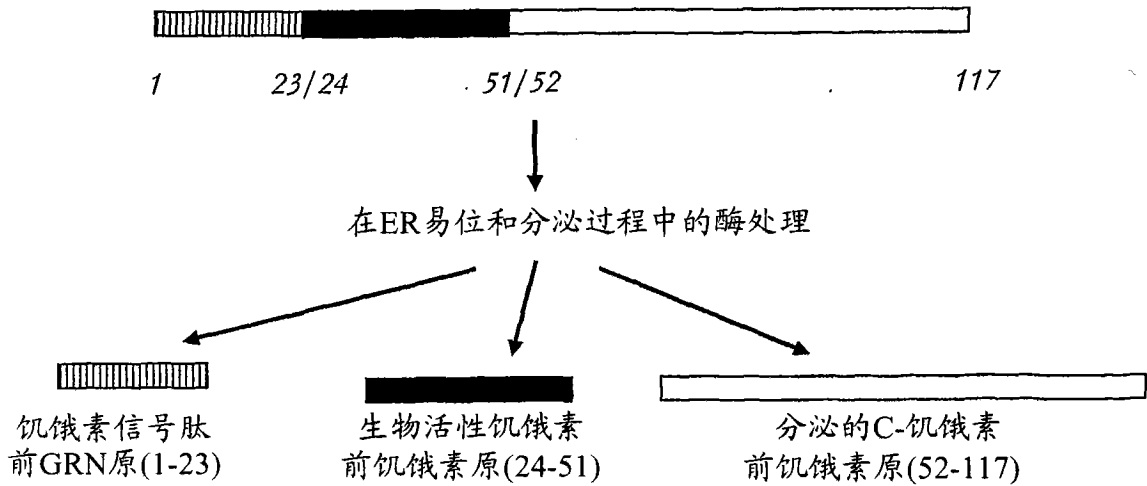


图 5

STEMI患者生物标记物曲线,N=23

** = P<0.001 vs 72hr

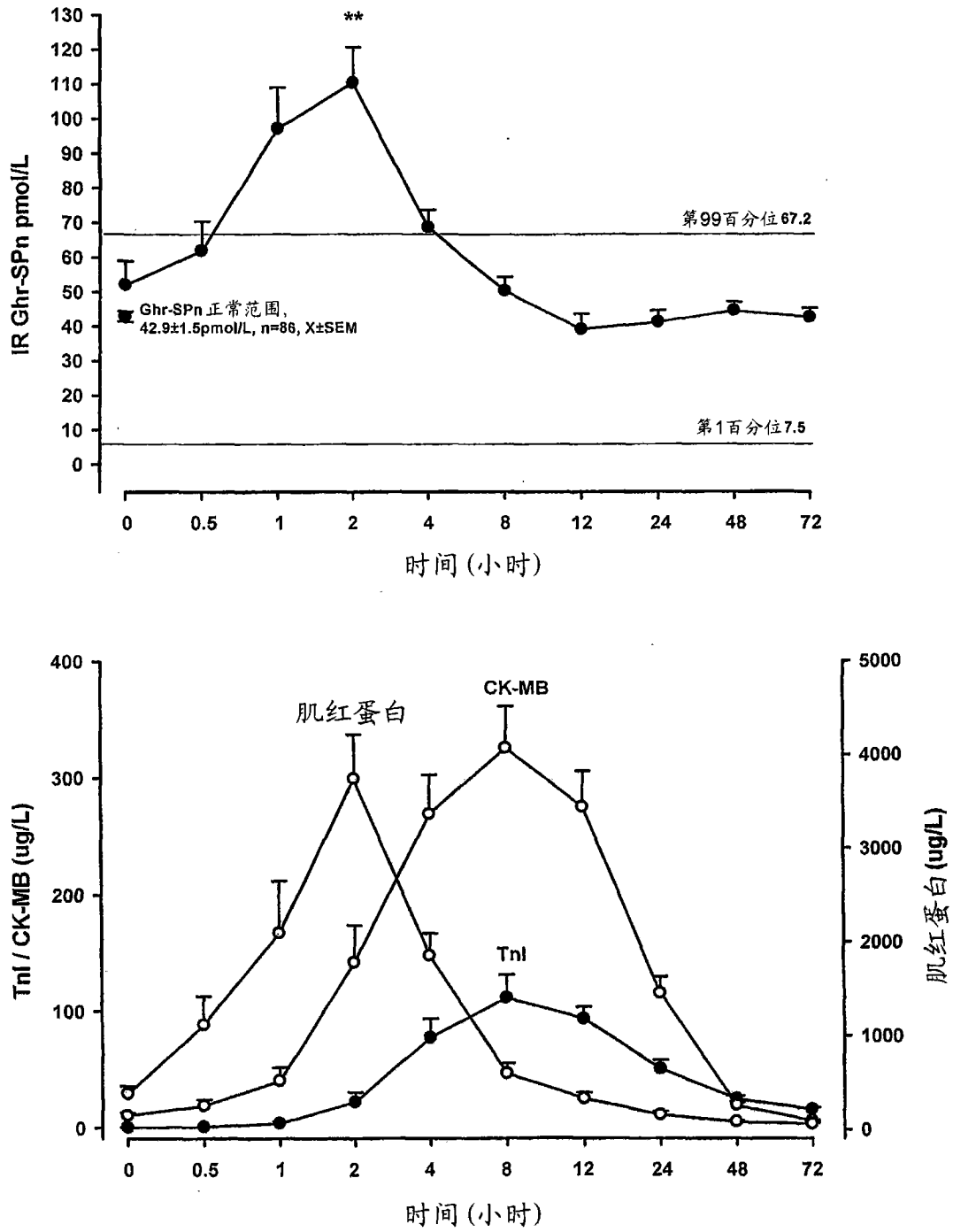


图 6

<u>肽</u>	<u>与Ghr-SPn(1-9)抗血清的交叉反应性(%)</u>
Ghr-SPn(1-9)	100
BNP原(1-13)	<0.003
BNP原(1-76)	<0.01
ANP原(1-30)	<0.009
胰岛素	<0.003
IGF-I	<0.002
IGF-II	<0.006
ANP	<0.008
BNP	<0.009
内皮素1	<0.006
血管紧张素 II	<0.003
血管紧张素(1-7)	<0.01
尾加压素 II	<0.003
CNP	<0.006
饥饿素	<0.007
C-饥饿素	<0.01
CNP原(1-15)	<0.008
肾上腺髓质素	<0.01
尿促皮素 I	<0.01
尿促皮素 II	<0.01
BNP-SPn(1-10)	<0.001
ANP-SPc(16-25)	<0.001
ANP-SPn(1-10)	<0.001
INS-SPn(1-9)	<0.001
氯吡格雷	0
吗啡	0
阿司匹林	0

图 7

褐鼠(<i>Rattus norvegicus</i>)	MVSSATICSLLLLSMLWM-DMAMA
智人(<i>Homo sapiens</i>)	MPSPGTVCSLLLLGMLWL-DLAMA
绵羊(<i>Ovis aries</i>)	MPAPRTIYSLLLLSLLWM-DLAMA
野猪(<i>Sus scrofa</i>)	MPSTGTICSLLLLSVLLMADLAMA
小鼠(<i>Mus musculus</i>)	MLSSGTICSLLLLSMLWM-DMAMA
家犬(<i>Canis lupus familiaris</i>)	MPSLGTMCSSLLLFVWLWV-DLAMA
猫(<i>Felis catus</i>)	MPSPGTVCSLLLFVWLWA-DLAMA
共有序列	MPSPGTICSLLLLSMLWMADLAMA

图 8

专利名称(译)	生物标记物		
公开(公告)号	CN101977933A	公开(公告)日	2011-02-16
申请号	CN200980108631.2	申请日	2009-03-12
[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	克里斯托弗·约瑟夫·彭伯顿 阿瑟·马克·理查兹 迈克尔·加里·尼科尔斯 蒂莫西·格兰特·扬德尔		
发明人	克里斯托弗·约瑟夫·彭伯顿 阿瑟·马克·理查兹 迈克尔·加里·尼科尔斯 蒂莫西·格兰特·扬德尔		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/18 C07K7/06 C07H21/04 G01N33/487 C12N15/12		
CPC分类号	G01N33/74 G01N2800/042 G01N2800/50 G01N2800/324 G01N33/6893 G01N2333/60 C07K14/60 C07K16/18		
代理人(译)	李丙林 张英		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了饥饿素信号肽的结合剂和测定法。上述试剂和测定法可用于预测、诊断、评估或监测对象中的急性心脏疾病、葡萄糖代谢障碍以及糖尿病的方法中。还提供了可用于本发明的方法中的核苷酸、多肽、以及试剂盒。

原有残基	典型取代	其它取代
Ala (A)	val; leu; ile	
Arg (R)	lys; gln; asn	
Asn (N)	gln; his; lys; arg	
Asp (D)	glu	
Cys (C)	ser	tyr
Gln (Q)	asn	
Glu (E)	asp	
Gly (G)	pro; ala	arg, ser
His (H)	asn; gln; lys; arg	
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; 正亮氨酸	
Leu (L)	正亮氨酸; ile; val; met; ala; phe	
Lys (K)	arg; gln; asn	
Met (M)	leu; phe; ile	val
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	
Pro (P)	ala	val, leu, ser, thr
Ser (S)	thr	
Thr (T)	ser	ala
Trp (W)	tyr; phe	leu
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; 正亮氨酸	