



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103308673 A

(43) 申请公布日 2013. 09. 18

(21) 申请号 201210520697. 6

A61P 9/00 (2006. 01)

(22) 申请日 2012. 10. 08

(30) 优先权数据

12158678. 8 2012. 03. 08 EP

12165057. 6 2012. 04. 20 EP

61/608, 376 2012. 03. 08 US

(71) 申请人 思芬构技术有限公司

地址 德国诺因多夫

(72) 发明人 安德里斯·贝格曼 欧勒·米兰德

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有
限责任公司 11219

代理人 张颖 谢丽娜

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006. 01)

G01N 33/577 (2006. 01)

A61K 39/395 (2006. 01)

A61K 45/00 (2006. 01)

权利要求书3页 说明书25页 附图1页

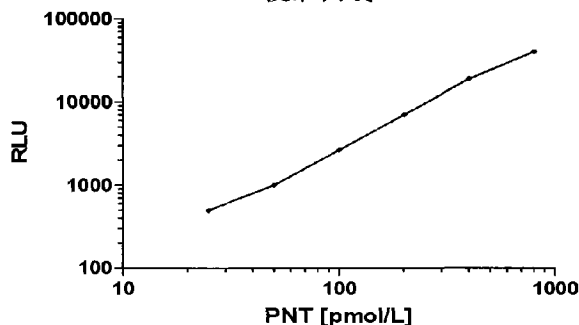
(54) 发明名称

用于预测雌性对象中发生心血管事件的风险的方法

(57) 摘要

本发明的主题是用于预测雌性对象中发生心血管事件的风险的方法,所述方法包括确定神经降压素原或其至少5个氨基酸的片段在从所述雌性对象获得的体液中的水平;和将神经降压素原或其片段的所述水平与发生心血管事件的风险相关联,其中水平升高预示发生心血管事件的风险增加。

校准曲线PNT



1. 结合物（作为诊断试剂）在制备用于预测雌性对象中发生心血管事件的风险的装置或试剂盒中的应用，所述预测包括：

- 确定神经降压素原或其至少 5 个氨基酸的片段在从所述雌性对象获得的体液中的水平；和
- 将神经降压素原或其片段的所述水平与发生心血管事件的风险相关联，其中水平升高预示发生心血管事件的风险增加。

2. 权利要求 1 的结合物（作为诊断试剂）在制备用于预测雌性对象中发生心血管事件的风险的装置或试剂盒中的应用，其中所述心血管事件是急性心血管事件，所述急性心血管事件选自心肌梗死、中风、急性心力衰竭和与心肌梗死、中风或急性心力衰竭相关的心血管死亡。

3. 权利要求 1 或 2 的结合物（作为诊断试剂）在制备用于预测雌性对象中发生心血管事件的风险的装置或试剂盒中的应用，其中神经降压素原或其至少 5 个氨基酸的片段在体液中的水平是空腹水平。

4. 权利要求 1 至 3 任一项的结合物（作为诊断试剂）在制备用于预测雌性对象中发生心血管事件的风险的装置或试剂盒中的应用，其中在从所述雌性对象采取体液样品时，所述雌性对象没有急性心血管事件的诊断史。

5. 权利要求 1 至 4 任一项的结合物（作为诊断试剂）在制备用于预测雌性对象中发生心血管事件的风险的装置或试剂盒中的应用，其中在从所述雌性对象采取体液样品时，所述雌性对象已被诊断为患有心血管疾病或糖尿病。

6. 权利要求 5 的结合物（作为诊断试剂）在制备用于预测雌性对象中发生心血管事件的风险的装置或试剂盒中的应用，其中在从所述雌性对象采取体液样品时，所述心血管疾病可以选自心力衰竭、动脉粥样硬化、高血压。

7. 权利要求 5 的结合物（作为诊断试剂）在制备用于预测雌性对象中发生心血管事件的风险的装置或试剂盒中的应用，其中在从所述雌性对象采取体液样品时，所述雌性对象已被诊断为患有 II 型糖尿病。

8. 权利要求 1 至 7 任一项的结合物（作为诊断试剂）在制备用于预测雌性对象中发生心血管事件的风险的装置或试剂盒中的应用，其中另外确定并使用以下标志物的水平：pro-BNP 或其至少 5 个氨基酸的片段或前体和 / 或 C 反应蛋白 (CRP)。

9. 权利要求 1 至 8 任一项的结合物（作为诊断试剂）在制备用于预测雌性对象中发生心血管事件的风险的装置或试剂盒中的应用，其中另外确定至少一种临床参数，所述临床参数选自：年龄、收缩压、舒张压、抗高血压治疗、体质指数、糖尿病的存在、目前吸烟。

10. 前述权利要求任一项的结合物（作为诊断试剂）在制备用于预测雌性对象中发生心血管事件的风险的装置或试剂盒中的应用，其中确定神经降压素原 1-117 的水平。

11. 前述权利要求任一项的结合物（作为诊断试剂）在制备用于预测雌性对象中发生心血管事件的风险的装置或试剂盒中的应用，其中用免疫检测法测定神经降压素原的水平。

12. 权利要求 1-11 任一项的结合物（作为诊断试剂）在制备用于预测雌性对象中发生心血管事件的风险的装置或试剂盒中的应用，其中权利要求 1 的步骤被执行一次以上，以便监测雌性对象中发生心血管事件的风险。

13. 权利要求 12 的结合物（作为诊断试剂）在制备用于预测雌性对象中发生心血管事件的风险的装置或试剂盒中的应用，其中执行所述监测以便评估所述雌性对象对所采取的预防性和 / 或治疗性措施的响应。

14. 权利要求 1-13 任一项的结合物（作为诊断试剂）在制备用于预测雌性对象中发生心血管事件的风险的装置或试剂盒中的应用，以便将所述雌性对象分级成风险组。

15. 权利要求 1-14 任一项的结合物（作为诊断试剂）在制备用于预测雌性对象中发生心血管事件的风险的装置或试剂盒中的应用，其特征在于，所述装置或试剂盒提供用于预测雌性对象中发生心血管事件的风险的现场即时测试。

16. 结合物（作为诊断试剂）在制备用于预测发生心血管事件的风险的装置或试剂盒中的应用，所述结合物包括：

- 针对 proBNP 或其至少 5 个氨基酸的片段或前体的结合物，以及
- 针对神经降压素原或其至少 5 个氨基酸的片段的结合物和 / 或针对 CRP 的结合物。

17. 结合物（作为诊断试剂）在制备用于预测发生心血管事件的风险的装置或试剂盒中的应用，其中所述结合物选自抗体、权利要求 16 的抗体片段、以及非 Ig 骨架。

18. 结合物在制备用于预防或治疗雌性对象中的心血管事件的药物中的应用，其中所述结合物指向神经降压素或神经降压素受体。

19. 权利要求 18 的结合物在制备用于预防或治疗雌性对象中的心血管事件的药物中的应用，其中所述结合物使神经降压素的生物活性降低至 70% 或更低。

20. 权利要求 18 的结合物在制备用于预防或治疗雌性对象中的心血管事件的药物中的应用，其特征在于，神经降压素的结合物选自：抗体例如典型的全长免疫球蛋白 IgG、或包含至少重链和 / 或轻链的 F 可变结构域的抗体片段例如化学偶联的抗体（抗原结合片段），包括但不限于 Fab 片段，包括 Fab 小型抗体、单链 Fab 抗体、带有表位标签的单价 Fab 抗体例如 Fab-V5Sx2；用 CH3 结构域二聚化的双价 Fab（小型抗体）；双价 Fab 或多价 Fab，例如通过借助于异源结构域多聚化而形成的，例如通过 dHLX 结构域的二聚化而形成的，例如 Fab-dHLX-FSx2；F(ab')₂ 片段，scFv 片段，多聚化的多价或 / 和多特异性 scFv 片段，双价和 / 或双特异性双抗体，**BITE®**（双特异性 T 细胞桥联抗体），三官能抗体，多价抗体，例如来自与 G 不同的类型；单结构域抗体，例如源自于骆驼或鱼的免疫球蛋白的纳米抗体。

21. 权利要求 18 的结合物在制备用于预防或治疗雌性对象中的心血管事件的药物中的应用，其特征在于，神经降压素受体的结合物选自：抗体例如典型的全长免疫球蛋白 IgG、或包含至少重链和 / 或轻链的 F 可变结构域的抗体片段例如化学偶联的抗体（抗原结合片段），包括但不限于 Fab 片段，包括 Fab 小型抗体、单链 Fab 抗体、带有表位标签的单价 Fab 抗体例如 Fab-V5Sx2；用 CH3 结构域二聚化的双价 Fab（小型抗体）；双价 Fab 或多价 Fab，例如通过借助于异源结构域多聚化而形成的，例如通过 dHLX 结构域的二聚化而形成的，例如 Fab-dHLX-FSx2；F(ab')₂ 片段，scFv 片段，多聚化的多价或 / 和多特异性 scFv 片段，双价和 / 或双特异性双抗体，**BITE®**（双特异性 T 细胞桥联抗体），三官能抗体，多价抗体，例如来自与 G 不同的类型；单结构域抗体，例如源自于骆驼或鱼的免疫球蛋白的纳米抗体，或肽类拮抗剂例如 [D-Trp¹¹]-神经降压素、[Tyr(Me)¹¹]-神经降压素，或非肽类拮抗剂，例如左卡巴斯汀、SR-48692（NTS1 选择性）、SR-142948（非选择性）、SR-142948A、CP 96345、[3H]SR-48692、SR-48527 和 SR-49711，或结合物骨架例如基于四连接素的非 Ig 骨架，纤连

蛋白骨架,基于脂质运载蛋白的骨架,泛素骨架,转移骨架,蛋白 A 骨架,基于锚蛋白重复域的骨架,微量蛋白、优选为形成半胱氨酸结的微量蛋白骨架,基于 Fyn SH3 结构域的骨架,基于 EGFR-A 结构域的骨架和基于 Kunitz 结构域的骨架。

用于预测雌性对象中发生心血管事件的风险的方法

技术领域

[0001] 本发明的主题是用于预测雌性对象中发生心血管事件的风险的方法,所述方法包括:

[0002] • 确定神经降压素原或其至少 5 个氨基酸的片段在从所述雌性对象获得的体液中的水平;和

[0003] • 将神经降压素原或其片段的所述水平与发生心血管事件的风险相关联,其中水平升高预示发生心血管事件的风险增加。

[0004] 术语“水平升高”的意思是在一定的阈值水平之上的水平。

背景技术

[0005] 神经降压素是源自于前神经降压素原前体的 13 个氨基酸的神经肽,并与稳定的 117 个氨基酸的肽神经降压素原 (P-NT) 一起按化学计量比例释放,成熟的激素与 3 种不同的受体结合,分别是神经降压素受体 1 和 2 (Ntsr1 和 Ntsr2) 以及神经降压素受体 3 (Ntsr3),其中神经降压素受体 1 和 2 是 G 蛋白偶联受体,神经降压素受体 3 是非 G 蛋白偶联受体并且也被称为 Sortillin-1 (SORT1)。

[0006] 神经降压素由小肠在外周释放,也由下丘脑在中央释放。神经降压素的外周分泌受到食物摄取、尤其是脂肪的刺激,并且已知其能够调节胃肠蠕动以及胰腺和胆汁的分泌。有趣的是,神经降压素作为抑制食欲的激素而参与食欲控制,因为它经中央(脑室内)和外周(腹腔内)注入大鼠之后,能够严重减少食物的摄取,这种效应似乎主要是通过神经降压素-1 受体 (Ntsr1) 介导的。在与正常体重人类对象相比而言的肥胖者中,在液体脂肪餐后,餐后血浆神经降压素浓度降低 (Widen 等,1992,Reg Peptides ;在改良的假饲 (MSF) 和液体试验 餐后肥胖者中调节肽的血浆浓度 (Plasma concentrations of regulatory peptides in obesity following modified sham feeding (MSF) and a liquid test meal)),这说明肥胖者中的神经降压素分泌调节失常。但是,还没有大规模的研究探讨过神经降压素是否以及如何与肥胖程度相关。有趣的是,P-NT 在胃旁路手术 (Roux-en-Y) 后显著增加,据显示,这是在大多数肥胖的 2 型糖尿病患者中能导致血糖正常的手术,但是尚不知道神经降压素总的来说是否参与糖尿病的发展。此外,神经降压素系统参与冠状动脉疾病和心肌梗死的发展,因为 Ntsr3 (SORT1) 基因的变异是人类中已知的最强的冠状动脉疾病常见易感基因之一。

[0007] 肥胖和癌症之间在机制上的联系基本上是未知的,但是,主流理论之一是过多的脂肪沉积会导致外周雄激素的芳构化增加,并由此导致循环的雌激素水平升高。另外,据显示,肥胖的特征之一高胰岛素血症会抑制肝脏产生性激素结合球蛋白 (SHBG),进而使雌激素和雄激素两者的可生物利用的水平升高,这揭示了肥胖使常见形式的由性激素引起的癌症形式例如乳腺癌和前列腺癌的风险增加的途径。有趣的是,神经降压素和 Ntsr1 两者的表达在恶性乳腺导管癌肿瘤中都很常见,并且实验性地药理阻断或 RNA 沉默 NTSR1 能够使小鼠中的肿瘤生长降低。

[0008] 乳腺癌细胞中神经降压素受体 1 (NTSR1) 的表达水平已被用于确定患有乳腺癌的对象的预后 (US 2011/0305633)。另外,同一作者指出,当前尚未描述出循环的神经降压素与胰腺、前列腺、或髓样甲状腺肿瘤的分期之间的明确的关联性,这可能是由于肝脏对神经降压素的快速清除。有趣的是,已发现,在一组 51 名患侵袭性乳腺导管癌的患者中,所有肿瘤中有 91% 肿瘤的神经营降压素受体 1 (NTSR1) 为阳性,但所有肿瘤中只有 31% 肿瘤在所述组织中的神经降压素为阳性 (Souaze 等, *Cancer Research* 2006 ;66 ;(12) pages 6243-6249)。

[0009] 有一些证据可表明神经降压素和神经降压素受体参与了癌的生长,尤其是参与肺癌、胰腺癌和结肠癌的生长 (Carraway 等 ;*Peptides* 27 (2006) 2445-2460)。据报道,胰腺癌患者血清中的 NT 水平显著升高 (Picheon 等, *Anticancer Research* 1999 ;19 ;1445-50)。有趣的是,该组发现,对于胰腺癌和前列腺癌两者而言,NT 水平随着疾病的进展而降低。相反地,对此, Meggiato 等 ;*Tumori* 1996 ;82 ;592 ~ 5 ;发现 NT 的血浆水平在胰腺癌中是正常的,但在诊断为胰腺炎的病例中却是升高的。

[0010] belting 等, *Cancer, Epidemiology, Biomarkes&Prevention* 已报道了血管活性肽用于预测男性中的癌症风险的应用。测定了来自马尔默饮食与癌症研究的参与者 (1768 名男性和 2293 名女性) 的空腹血浆中的 MR-pro-ANP、MR-pro-ADM 以及和肽素,所述参与者于 1991-1994 年接受基线检查前没有癌症。作者表明,在女性中,生物标志物与癌症发生率之间没有联系。

[0011] CRP 和 Pro-BNP 是人群中心血管事件的已知预测因子 (Melander 等, *JAMA*. 2009 ;302 (1) :49-57)。现在有一些关于 CRP 和 Pro-BNP 对 CVD 终点的预测能力的任何性别差异的信息。

发明内容

[0012] 本发明的主题是研究用于预测对象中发生心血管事件的风险的 NT 的预测和诊断能力,为了解决这个问题,我们在所述瑞典前瞻性世代研究 (马尔默饮食与癌症研究,参见 Melander 等, *JAMA*. 2009 ;302 (1) :49-57) 中测定了空腹血浆中神经降压素原的稳定的片段,并将该生物标志物的基线水平与 15 年随访期间的心血管事件相关联。

[0013] 令人惊奇的是,据显示,对于女性而言,神经降压素是强有力且高度显著的用于预测发生心血管事件的风险的生物标志物。

[0014] 因此,本发明的主题是用于预测雌性对象中发生心血管事件的风险的方法,所述方法包括:

[0015] • 确定神经降压素原或其至少 5 个氨基酸的片段在从所述雌性对象获得的体液中的水平 ;和

[0016] • 将神经降压素原或其片段的所述水平与发生心血管事件的风险相关联,其中水平升高预示发生心血管事件的风险增加。

[0017] 在本发明的具体实施方案中,所述心血管事件是急性心血管事件,所述急性心血管事件选自心肌梗死、中风、急性心力衰竭和与心肌梗死、中风或急性心力衰竭相关的心血管死亡。

[0018] 本研究中获得的数据还揭示了雄性对象中发生心血管事件的风险与神经降压素

原或其至少 5 个氨基酸的片段在从所述雄性对象获得的体液中的水平之间的关联性；然而，对于目前的数据来说，这种关联性不是那么显著的。因此，我们假定本发明的方法的值也适用于雄性对象，但是，在本研究中观察到的效果对于雄性来说不是那么强的。

附图说明

[0019] 图 1 示出了典型的 P-NT 剂量 / 信号曲线。

[0020] 图 2 :用于说明女性中的累积的 CVD 事件的 Kaplan Meier 图,截止值 (cuf off) > <中位数 = 109pmol/l P-NT。

具体实施方式

[0021] 此处使用的术语“对象”是指有生命的人类或非人类的生物体。在本文中，优选地，所述对象是人类对象。

[0022] 在本发明的一个实施方案中，神经降压素原或其至少 5 个氨基酸的片段在体液中的水平是神经降压素原或其至少 5 个氨基酸的片段的空腹水平。空腹水平的意思是采取血样前 12 小时没有摄取食物。

[0023] 体液可以选自血液、血清、血浆、尿液、脑脊液 (csf)、和唾液。

[0024] 在本发明方法的一个实施方案中，在从所述雌性对象采取体液样品时，所述雌性对象没有急性心血管事件的诊断史。

[0025] 在本发明方法的另一个实施方案中，在从所述雌性对象采取体液样品时，所述雌性对象已被诊断为患有心血管疾病或糖尿病。

[0026] 在具体实施方案中，在从所述雌性对象采取体液样品时，所述心血管疾病可以选自心力衰竭、动脉粥样硬化、和高血压。

[0027] 目前的数据表明，在未患有盛行的糖尿病、盛行的乳腺癌、和盛行的心血管疾病的女性中，神经降压素原或其片段的水平与心血管事件之间存在着强关联性。

[0028] 目前的数据还表明，在高血压女性中，神经降压素原或其片段的水平与心血管事件之间存在着强关联性，所述高血压女性是心血管疾病的常见高风险组。

[0029] 此外，目前的数据还表明，在血压正常的女性中，神经降压素原或其片段的水平与心血管事件之间存在着强关联性。此外，目前的数据表明，在糖尿病女性中，神经降压素原或其片段的水平与心血管事件之间存在着强关联性。

[0030] 在本发明的另一个具体实施方案中，在从所述雌性对象采取体液样品时，所述雌性对象已被诊断为患有 II 型糖尿病。在本发明的具体实施方案中，通过另外确定并使用至少一种其他标志物的水平来改进对对象中第一次不良事件的预测或对发生第一次不良事件的风险增加的对象鉴定，所述其他标志物选自：CRP, LpLA2, 胱抑素 C, 以及 A 型和 B 型利钠肽以及它们的前体及其片段，包括 ANP、proANP、NT-proANP、MR-proANP、BNP、proBNP、NT-proBNP, 甘油三酯, HDL 胆固醇或其亚组分、LDL 胆固醇或其亚组分, GDF15, ST2。

[0031] 在本发明方法的非常具体的实施方案中，除了神经降压素原或其至少 5 个氨基酸的片段的水平之外，还确定并使用以下标志物的水平：proBNP 或其至少 12 个氨基酸的片段或前体和 / 或 CRP。

[0032] 在本发明的另一个具体实施方案中，另外确定至少一种临床参数，所述临床参数

选自:年龄、收缩压、舒张压、抗高血压治疗、体质指数、糖尿病的存在、目前吸烟。

[0033] 心血管事件 (CVD) 被定义为冠状动脉事件或者致命性或非致命性中风。通过将每个瑞典居民的 10 位数字的个人识别号与以下 3 个登记处关联来鉴定事件:瑞典医院出院登记处、瑞典死亡原因登记处、和马尔默卒中登记处。基于第 9 和第 10 修订版的国际疾病分类 (ICD-9 和 ICD-10) 编码 410 和 I21 来分别定义心肌梗死。利用编码 430、431、434 和 436 (ICD-9) 以及 I60、I61、I63 和 I64 (ICD-10) 来定义致命性或非致命性中风。

[0034] 糖尿病的定义如下:在基线检查时具有内科医生诊断的病史、或在服用抗糖尿病药物、或空腹全血血糖 $> / = 6.1 \text{ mmol/l}$ (注意,这相当于血浆中的 7.0 mmol/l)。

[0035] 血压正常 / 高血压 (HBP) 的定义如下:

[0036] HBP:收缩压 $> / = 140 \text{ mmHg}$, 舒张压 $> / = 90 \text{ mmHg}$ 或在服用抗高血压药物。具有正常血压 (BP) 的对象是所有其他对象,即收缩压 $< 140 \text{ mmHg}$ 或舒张压 $< 90 \text{ mmHg}$ 或没有服用抗高血压药物的对象。

[0037] 体液中可能检测到的神经降压素原片段例如可以选自以下片段:

[0038] SEQ ID NO :1 (神经降压素原 1-147)

[0039] SESEEMKAL EADFLTNMHT SKISKAHVPS WKMTLLNVCS LVNNLNPAE ETGEVHEEEL
VARRKLPTAL DFGSLEAMLT IYQLHKICHS RAFQHWELIQ EDILDTGNDK NGKEEVIKRR IPYILKRQLY
ENKPRRRYIL KRDSYYY

[0040] SEQ ID NO :2 (神经降压素原 1-125 (大的神经调节肽 N))

[0041] SDSEEMKAL EADFLTNMHT SKISKAHVPS WKMTLLNVCS LVNNLNPAE ETGEVHEEEL
VARRKLPTAL DGF SLEAMLT IYQLHKICHS RAFQHWELIQ EDILDTGNDK NGKEEVIKR KIPYIL

[0042] SEQ ID NO :3 (神经调节肽 N:)

[0043] KIPYIL

[0044] SEQ ID NO :4 (神经降压素)

[0045] pyroQLYENKPRRP YIL

[0046] SEQ ID NO :5 (神经降压素原 1-117)

[0047] SDSEEMKAL EADFLTNMHT SKISKAHVPS WKMTLLNVCS LVNNLNPAE ETGEVHEEEL
VARRKLPTAL DFGSLEAMLT IYQLHKICHS RAFQHWELIQ EDILDTGNDK NGKEEVI

[0048] SEQ ID NO :6 (神经降压素原 1-132)

[0049] SDSEEMKAL EADFLTNMHT SKISKAHVPS WKMTLLNVCS LVNNLNPAE ETGEVHEEEL
VARRKLPTAL DGF SLEAMLT IYQLHKICHS RAFQHWELIQ EDILDTGNDK NGKEEVIKRR IPYILKRQLY
EN

[0050] Seq ID NO :7 (神经降压素原 1-125)

[0051] SDSEEMKAL EADFLTNMHT SKISKAHVPS WKMTLLNVCS LVNNLNPAE ETGEVHEEEL
VARRKLPTAL DGF SLEAMLT IYQLHKICHS RAFQHWELIQ EDILDTGNDK NGKEEVIKRR IPYIL

[0052] SEQ ID NO :8 (神经降压素原 120-140)

[0053] KIPYILKRQL YENKPRRPYI L

[0054] SEQ ID NO :9 (神经降压素原 120-147)

[0055] KIPYILKRQL YENKPRRPYIL KRDSYYY

[0056] SEQ ID NO :10 (神经降压素原 128-147)

[0057] QLYENKPRRP YILKRDSYYY

[0058] 在本发明方法的更具体的实施方案中,确定神经降压素原 1-117 的水平。

[0059] 在具体的实施方案中,用免疫检测法测定神经降压素原的水平。更具体地,免疫检测法是按照 Ernst 等 Peptides 27(2006)1787-1793 中的描述使用的。可用于确定神经降压素原或其至少 5 个氨基酸的片段的水平的免疫检测法是基于本发明的结合物,所述结合物用于在雌性对象的离体体液中,选择性测定针对根据 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:10 所述的任何神经降压素原序列中的至少一种的免疫反应性。

[0060] 在本发明的另一个实施方案中,可用于确定神经降压素原或其至少 5 个氨基酸的片段的水平的免疫检测法是基于本发明的两种不同的结合物,所述结合物用于在雌性对象的离体体液中,选择性测定针对根据 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:10 所述的任何神经降压素原序列中的两种不同的部分序列的免疫反应性。因此,在根据 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:10 中任一个所述的神经降压素原的同一部分中,两种结合物靶向不同的序列。

[0061] 在本发明的具体实施方案中,免疫检测法可用于确定神经降压素原或其至少 5 个氨基酸的片段的水平,其中两种不同的结合物特异性地靶向根据 SEQ ID NO:5 所述的神经降压素原的 N 端部分 1-117 以选择性测定针对该序列的免疫反应性,所述免疫检测法的特征在于所述免疫反应性不是神经降压素 (NT) (SEQ ID NO:4) 或神经调节肽 N(NMN) (SEQ ID NO:3) 的免疫反应性。由此,通过使用两种不同的结合物进行的夹心免疫检测法,免疫检测法仅特异性地识别神经降压素原的 N 端肽,所述两种不同的结合物与所述 N 端序列的不同的部分序列发生特异性结合,所述不同的部分序列含有完整的前神经降压素原的第 67-85 位氨基酸和第 121-140 位氨基酸两者(如 Ernst 等(2006)中的图 1 所示)。(对此,参见 US2008/0280306——用于测定释放进入到循环中的神经降压素的免疫检测法 (Immunoassay for determining the release of neurotensin into the circulation); 以及 Ernst 等,神经降压素原 1-117:在人体循环中鉴定到的稳定的神经降压素前体片段 (Proneurotensin 1-117, a stable neurotensin precursor fragment identified in human circulation), Peptides(27), 1787-1793(2006))。

[0062] 在另一个具体实施方案中,上述免疫检测法的特征还可以在于,在结合物是抗体的情况下,结合物是特异性的单抗隆抗体和 / 或亲和纯化的多克隆抗体。其中的一种抗体可以以与固相结合的形式使用,该固相优选地是各自的试管壁,并且第二抗体是标记的或可选择性标记的抗体。可以用放射性同位素或通过化学发光、生物发光、荧光、或通过本领域技术人员已知的酶标记进行所述标记。优选地,所述第二抗体是通过化学发光标记的。

[0063] 由于标记了两种抗体中的至少一种,因此,在将两种抗体结合到根据 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:10 中任一个所述的神经降压素原之后,产生了可测定的信号,这使得所产生的夹心复合物能够在测定溶液中被检测到。(对此,参见 US2008/0280306——用于测定释放进入到循环中的神经降压素的免疫检测法 (Immunoassay for determining the release of neurotensin into the circulation); 以及 Ernst 等,神经降压素原 1-117:在人体循环中鉴定到的稳定的神经降压素前体片段 (Proneurotensin 1-117, a stable neurotensin precursor fragment identified in human circulation), Peptides(27), 1787-1793(2006))。

[0064] 上述免疫检测法在实施例 2 中有更详细的概述。应当结合根据实施例 2 所使用的

测试和校准来看待所有的阈值和值。本领域技术人员可能知道,阈值的绝对值可能受到所使用的校准的影响。这意味着,应当在本文(实施例 2)所使用的校准的背景下理解本文中给出的所有值和阈值。人 P-NT 校准品可得自 ICI-Diagnostics, Berlin, Germany。或者,还可以用合成或重组的 P-NT 1-117 或其片段对该检测法进行校准(同样参见 Ernst 等, 2006)。

[0065] 根据本发明的方法,用于确定雌性对象中发生心血管事件的风险的阈值为高于 78pmol/l PNT,优选为 100pmol/l,更优选为 150pmol/l。在具体实施方案中,所述阈值为约 100pmol/l。这些阈值与上面提到的校准方法相关。P-NT 值超过所述阈值,意味着该对象发生心血管事件的风险增加。

[0066] 在本发明方法的具体实施方案中,通过另外确定并使用至少一种实验室参数或其他标志物的水平来改进对对象发生心血管事件的风险的预测,所述实验室参数或其他标志物选自空腹血糖或空腹血浆葡萄糖、甘油三酯、HDL 胆固醇或其亚组分、LDL 胆固醇或其亚组分、胱抑素 C、胰岛素、CRP、血管升压素或其前体或其片段、以及 BNP 或其前体或其片段。

[0067] 在本发明方法的具体实施方案中,另外确定至少一种临床参数,所述临床参数选自:年龄、性别、收缩压、舒张压、抗高血压治疗(AHT)、体质指数、腰围、腰臀比、目前为吸烟者、糖尿病遗传性、以及先前的心血管疾病(CVD)。

[0068] 根据本发明,本发明的主题还是用于预测对象中发生心血管事件的风险或鉴定发生心血管事件的风险增加的对象的方法,其中神经降压素原或其至少 5 个氨基酸的片段的水平被单独或与其他有预测用途的实验室或临床参数联合用于预测对象发生心血管事件的风险,这是通过选自以下备选方案的方法实现的:

[0069] • 与“健康”或“明显健康”对象人群中全部预先确定的样品中的神经降压素原或其片段水平的中位数进行比较,

[0070] • 与“健康”或“明显健康”对象人群中全部预先确定的样品中的神经降压素原或其片段水平的四分位数进行比较,

[0071] • 基于 Cox 比例风险分析进行计算,或通过使用风险指数计算例如 NRI(净重新分类指数)或 IDI(综合鉴别指数)进行计算。

[0072] 在本发明方法的一个实施方案中,所述方法被执行一次以上,以便监测雌性对象中发生心血管事件的风险。

[0073] 在本发明方法的另一个实施方案中,执行所述监测以便评估所述雌性对象对所采取的预防性和/或治疗性措施的响应。

[0074] 在本发明方法的另一个实施方案中,使用所述方法以便将所述雌性对象分级成风险组。

[0075] 本发明还包括用于执行本发明的方法的装置。因此,在该装置中实施上文所述的检测法。所述装置是一种自动装置,该装置使得能够测定所施加的生物发光和化学发光,正如上文中为本发明的检测法所描述的。优选地,所述装置使得能够进行报告基因检测、ATP 监测、发光免疫检测(LIA)、酶测定、和细胞发光/氧化爆发。因此,按照本发明,该装置可被称为多模式光度计。该装置的特征还在于,优选被置于试管中的一种或多种样品能够以链式测定一次或连续测定多次,甚至能够在很长的一段测试时间内进行测定。此外,本发明的装置的特征在于珀尔帖冷却检测器、容积可变的注射器、管室中的温度控制、以

及还有控制所述装置的软件单元,所述软件优选地是 TubeMaster。这样的装置的一个实例是 Autolumat LB953 多管光度计 (Berthold Technologies GmbH&Co. KG, Bad Wildbad, Germany)。

[0076] 本发明还包括用于执行本发明的方法的现场即时测试 (point-of-care) 装置。在所述现场即时测试装置中实施如前所述的检测法。现场即时测试是通过使用可运输、便携、且手持的仪器来完成的,所述仪器能够执行本发明的方法。因此,能够在非常短的时间内、在待检查的对象所在位置处或附近进行测定和各自的分析。本发明的现场即时测试装置的特征在于免疫层析测量仪,该测量仪能够检测检测法中所使用的结合物的至少一种可光学检测的标签 (标记)。

[0077] 本发明还包括用于执行本发明的方法的检测法和 / 或试剂盒。检测法如前所述,而用于执行免疫检测法的各自的试剂盒除了检测法本身以外,还可以由本领域技术人员已知的惯用的辅助试剂例如缓冲液和洗涤液组成。

[0078] 在具体的实施方案中,除了本领域技术人员已知的惯用的辅助试剂例如缓冲液和洗涤液以外,用于执行本发明的检测法的试剂盒还可以由以下成分组成,特别是

[0079] i) 第一免疫试剂,其包括被固定在固相 (优选为试管壁) 上的针对人神经降压素原的部分序列的第一种特异性的结合物,在特定的实施方案中,所述第一种结合物是针对序列 SEQ ID NO :1 至 SEQ ID NO :10 中的任一个,

[0080] ii) 第二免疫试剂,其包括溶解和标记形式 (优选地,第二抗体是通过化学发光标记的) 的针对人神经降压素原的部分序列的第二种特异性的结合物,在特定的实施方案中,所述第二种结合物是针对 SEQ ID NO :1 至 SEQ ID NO :10 中的任一个,条件是第二种结合物靶向与第一种结合物的靶向序列不同的序列,和

[0081] iii) 标准和校准溶液,其含有确定的量的肽制品,所述肽制品具有所述第一和第二特异性抗体的结合位点。

[0082] 在本发明的另一个实施方案中,用于执行前述检测法的装置或试剂盒可以提供基于所述检测法的现场即时测试,以预测雌性对象中发生心血管事件的风险。

[0083] 本发明的主题也是神经降压素或神经降压素受体的结合物,所述结合物可用于预防或治疗雌性对象中的心血管事件。

[0084] 因此,在另一个实施方案中,本发明提供了神经降压素或神经降压素受体的结合物,所述结合物可用于制备用于预防或治疗雌性对象中的心血管事件的药物。

[0085] 在本发明的一个实施方案中,所述结合物使神经降压素的生物活性降低至 70% 或更低。

[0086] 根据本发明,神经降压素的结合物选自:抗体例如典型的全长免疫球蛋白 IgG、或包含至少重链和 / 或轻链的 F 可变结构域的抗体片段例如化学偶联的抗体 (抗原结合片段),包括但不限于 Fab 片段,包括 Fab 小型抗体、单链 Fab 抗体、带有表位标签的单价 Fab 抗体例如 Fab-V5Sx2;用 CH3 结构域二聚化的双价 Fab (小型抗体);双价 Fab 或多价 Fab,例如通过借助于异源结构域多聚化而形成的,例如通过 dHLX 结构域的二聚化而形成的,例如 Fab-dHLX-F5Sx2;F(ab')₂ 片段,scFv 片段,多聚化的多价或 / 和多特异性 scFv 片段,双价和 / 或双特异性双抗体, BITE® (双特异性 T 细胞桥联抗体),三官能抗体,多价抗体,例如来自与 G 不同的类型;单结构域抗体,例如源自于骆驼或鱼的免疫球蛋白的纳米抗体。

[0087] 根据本发明,神经降压素受体的结合物选自:抗体例如典型的全长免疫球蛋白 IgG、或包含至少重链和 / 或轻链的 F 可变结构域的抗体片段例如化学偶联的抗体(抗原结合片段),包括但不限于 Fab 片段,包括 Fab 小型抗体、单链 Fab 抗体、带有表位标签的单价 Fab 抗体例如 Fab-V5Sx2 ;用 CH3 结构域二聚化的双价 Fab(小型抗体);双价 Fab 或多价 Fab,例如通过借助于异源结构域多聚化而形成的,例如通过 dHLX 结构域的二聚化而形成的,例如 Fab-dHLX-FSx2 ;F(ab')₂ 片段, scFv 片段,多聚化的多价或 / 和多特异性 scFv 片段,双价和 / 或双特异性双抗体, **BITE®** (双特异性 T 细胞桥联抗体),三官能抗体,多价抗体,例如来自与 G 不同的类型;单结构域抗体,例如源自于骆驼或鱼的免疫球蛋白的纳米抗体,或肽类拮抗剂例如 [D-Trp¹¹]-神经降压素、[Tyr(Me)¹¹]-神经降压素(例如由 Quiron 等描述的),或非肽类拮抗剂,例如左卡巴斯汀、SR-48692(NTS1 选择性)、SR-142948(非选择性)、SR-142948A、CP 96345、[3H]SR-48692、SR 48692、SR-48527 和 SR-49711,或结合物骨架(scaffold)例如基于四连接素的非 Ig 骨架(例如 US2010/0028995 中所描述的)、纤连蛋白骨架(例如 EP1266025 中所描述的)、基于脂质运载蛋白的骨架(例如 WO2011/154420 中所描述的)、泛素骨架(例如 WO 2011/073214 中所描述的)、转移骨架(transferring scaffold)(例如 US 2004/0023334 中所描述的)、蛋白 A 骨架(例如 EP 2231860 中所描述的)、基于锚蛋白重复域的骨架(例如 WO 2010/060748 中所描述的)、微量蛋白(microprotein)(优选为形成半胱氨酸结的微量蛋白)骨架(例如 EP 2314308 中所描述的)、基于 Fyn SH3 结构域的骨架(例如 WO 2011/023685 中所描述的)、基于 EGFR-A 结构域的骨架(例如 WO 2005/040229 中所描述的)和基于 Kunitz 结构域的骨架(例如 EP 1941867 中所描述的)。

[0088] 实施例

[0089] 实施例 1

[0090] 抗体的制备

[0091] 用于免疫的肽 / 偶合物

[0092] 合成了用于免疫的肽(JPT Technologies, Berlin, Germany),所述肽具有额外的 N 端半胱氨酸残基以将所述肽与牛血清白蛋白(BSA)偶合。通过使用 Sulfo-SMCC(Perbio-science, Bonn, Germany)将所述肽与 BSA 共价偶联。根据 Perbio 的手册执行偶联步骤。

[0093] 标记的抗体(LA)肽(P-NT 1-19):

[0094] H-CSDSEEEMKALEADFLTNMH-NH₂

[0095] 固相抗体(SPA)肽(P-NT 44-62):

[0096] H-CNLNSPAEETGEVHEEELVA-NH₂

[0097] 按照如下方法生成抗体:

[0098] 将 BALB/c 小鼠用 100 μg 肽-BSA 偶合物于第 0 天和第 14 天进行免疫(被乳化在 100 μl 完全弗氏佐剂中),并用 50 μg 于第 21 天和第 28 天进行免疫(在 100 μl 不完全弗氏佐剂中)。在执行融合实验前 3 天,通过一次腹腔内注射和一次静脉内注射给予,动物接受 50 μg 溶解在 100 μl 盐水中的偶合物。

[0099] 用 1mL 50%聚乙二醇将来自免疫后小鼠的脾细胞和骨髓瘤细胞系 SP2/0 的细胞在 37°C 下融合 30 秒。在洗涤后,将细胞接种于 96 孔细胞培养板中。通过在 HAT 培养基(补

充有 20% 胎牛血清和 HAT 补充物的 RPMI1640 培养基) 中生长来选择杂交克隆。在两周之后, HAT 培养基被替换成 HT 培养基用于传代 3 次, 然后返回到正常的细胞培养基中。

[0100] 在融合后 3 周时, 对细胞培养上清中的抗原特异性 IgG 抗体进行初次筛选。测试为阳性的微量培养物被转移到 24 孔板中进行增殖。在再次测试之后, 用有限稀释技术将所选择的培养物克隆化和再克隆化, 并确定亚型。

[0101] (Lane, R. D. “用于提高分泌单克隆体的杂交瘤的生产的短时间聚乙二醇融合技术 (A short-duration polyethylene glycol fusion technique for increasing production of monoclonal antibody-secreting hybridomas)”, J. Immunol. Meth. 81:223-228; (1985); Ziegler, B. 等“通过细胞荧光计和单克隆 GAD 抗体的补体依赖性抗体介导的细胞毒性进行检验时, 不能在大鼠胰岛细胞的表面上检测到谷氨酸脱羧酶 (GAD) (Glutamate decarboxylase (GAD) is not detectable on the surface of rat islet cells examined by cytofluorometry and complement-dependent antibody-mediated cytotoxicity of monoclonal GAD antibodies)”, Horm. Metab. Res. 28:11-15, (1996))。

[0102] 单克隆抗体的产生

[0103] 通过标准抗体生产方法 (Marx 等, Monoclonal Antibody Production, ATLA 25, 121, 1997) 产生抗体, 并通过蛋白质 A-层析法进行纯化。根据 SDS 凝胶电泳分析, 抗体的纯度为 > 95%。

[0104] 实施例 2

[0105] 用于定量人神经降压素原的免疫检测法

[0106] 使用的技术是基于吡啶酯标记的夹心包被管发光免疫检测法。

[0107] 标记的复合物 (示踪剂): 将 100 μ g (100 μ l) LA (1mg/ml 溶于 PBS, pH 7.4) 与 10 μ l 吡啶 NHS 酯 (1mg/ml 溶于乙腈, InVent GmbH, Germany) (EP 0353971) 混合并在室温下孵育 20 分钟。将标记的 LA 在 Bio-Sil SEC 400-5 (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) 上通过凝胶过滤 HPLC 进行纯化。纯化的 LA 被稀释在 (300mmol/l 磷酸钾、100mmol/l NaCl、10mmol/l Na-EDTA、5g/l 牛血清白蛋白, pH 7.0) 中。终浓度约为每 200 μ l 含 800.000 相对光单位 (RLU) 的标记的复合物 (约 20ng 标记的抗体)。用 AutoLumat LB 953 (Berthold Technologies GmbH & Co. KG) 测定吡啶酯化学发光。

[0108] 固相: 用 SPA (1.5 μ g SPA/0.3ml 100mmol/l NaCl、50mmol/l tris-HCl, pH 7.8) 包被聚苯乙烯管 (Greiner Bio-One International AG, Austria) (室温下 18 小时)。在用 5% 牛血清白蛋白封闭之后, 将所述管用 pH 7.4 的 PBS 洗涤并真空干燥。

[0109] 校准

[0110] 用含 P-NT 的人血清稀释液对检测法进行校准。将所集中的具有高 P-NT 免疫反应性的人血清 (InVent Diagnostika, Henningsdorf, Germany) 用马血清 (Biochrom AG, Deutschland) 进行稀释 (检测标准品)。

[0111] 用人 P-NT 校准品 (ICI-Diagnostics, Berlin, Germany) 对该标准品进行校准。或者, 可以用合成或重组的 p-NT 1-117 或其片段对该检测法进行校准 (同样参见 Ernst 等, 2006)。

[0112] P-NT 免疫检测法:

[0113] 用移液器将 50 μ l 样品 (或校准品) 吸到 SPA 包被的管中, 在加入标记的

LA(200 μ l) 之后,将所述管在 18-25 $^{\circ}$ C 下孵育 16-22 小时。通过用洗涤液 (20mM PBS, pH 7.4, 0.1% Triton X-100) 洗涤 5 次 (每次 1ml) 以去除未结合的示踪剂。

[0114] 用 LB 953 测定管结合的 LA。

[0115] 图 1 示出了典型的 P-NT 剂量 / 信号曲线。

[0116] 实施例 3: 群体研究

[0117] 方法

[0118] 我们测定了来自 4362 名参与者 (平均年龄 58 ± 6 岁, 女性占 59%) 的空腹血浆中的 P-NT, 这些参与者属于于 1991-1994 年接受马尔默饮食与癌症研究的基线检查的人群。我们用多变量调整 (所有传统的心血管危险因素, 糖尿病危险因素, 并且在癌症分析中还有癌症的遗传性) 后的 Cox 比例风险模型来将基线 P-NT (与 log 转换后的 P-NT 每增加一个标准偏差对应的风险比率) 与发生每个研究终点的第一次事件的时间相关联, 中位随访时间超过 12 年。终点是通过瑞典国家医院出院登记处、瑞典心肌梗死登记处、马尔默卒中登记处和瑞典癌症登记处检索到的。通过这些登记处检索到的终点是经过验证的并发现是准确的。

[0119] 总研究人群的临床特征

[0120] 表 1

[0121] 描述性统计

[0122]

	N	平均值	标准偏差
MDCS筛选时的年龄	4362	57.643	5.9797
收缩压 (mmHg)	4362	141.91	19.158
舒张压 (mmHg)	4362	87.02	9.501
体质指数 (体重/kgxkg)	4362	25.7642	3.91173
腰围 (cm)	4361	83.56	12.791
葡萄糖 (mmol/l)	4362	5.1826	1.33736
甘油三酯 (mmol/l)	4362	1.3142	.63660
高密度脂蛋白 (mmol/l)	4362	1.3908	.37068
低密度脂蛋白 (mmol/l)	4362	4.1632	.98774
P-胰岛素	4280	7.889	7.6975
PNT (pmol/l)	4362	123.01743	76.746549
有效的N (成列删除)	4279		

[0123] 表 2

[0124] 性别

[0125]

	频率	百分比	有效百分比	累积百分比
有效 男性	1803	41.3	41.3	41.3
女性	2559	58.7	58.7	100.0
总计	4362	100.0	100.0	

[0126] 表 3

[0127] 问卷 + 日记记录 : 根据问卷或日记记录本得到的基线时的抗高血压治疗 (C02、C03、C07、C08、C09)

[0128]

	频率	百分比	有效百分比	累积百分比
有效 否	3684	84.5	84.5	84.5
是	678	15.5	15.5	100.0
总计	4362	100.0	100.0	

[0129] 表 4

[0130] 糖尿病 (空腹血糖 > 6.0 或者问卷调查后为糖尿病)

[0131]

	频率	百分比	有效百分比	累积百分比
有效 否	3993	91.5	91.5	91.5
是	369	8.5	8.5	100.0
总计	4362	100.0	100.0	

[0132] 表 5

[0133] 目前为吸烟者

[0134]

	频率	百分比	有效百分比	累积百分比
有效 .00	3212	73.6	73.6	73.6
1.00	1150	26.4	26.4	100.0
总计	4362	100.0	100.0	

[0135] 表 6

[0136] 研究中女性的临床特征

[0137] 描述性统计

[0138]

	N	平均值	标准偏差
MDCS 筛选时的年龄	2559	57.554	5.9403
收缩压 (mmHg)	2559	140.50	19.311
舒张压 (mmHg)	2559	85.65	9.117
体质指数 (体重/kgxkg)	2559	25.5196	4.19083
腰围 (cm)	2559	76.99	10.245
葡萄糖 (mmol/l)	2559	5.0418	1.21798
甘油三酯 (mmol/l)	2559	1.2245	.58404
高密度脂蛋白 (mmol/l)	2559	1.5123	.36949
低密度脂蛋白 (mmol/l)	2559	4.2016	1.04762
P-胰岛素	2512	7.223	5.4223
PNT [pmol/L]	2559	125.60633	77.681673
有效的 N (成列删除)	2512		

[0139] 表 7

[0140] 问卷 + 日记记录 : 根据问卷或日记记录本得到的基线时的抗高血压治疗 (C02、C03、C07、C08、C09)

[0141]

	频率	百分比	有效百分比	累积百分比
有效 否	2173	84.9	84.9	84.9
是	386	15.1	15.1	100.0
总计	2559	100.0	100.0	

[0142] 表 8

[0143] 糖尿病（空腹血糖 > 6.0 或者问卷调查后为糖尿病）

[0144]

	频率	百分比	有效百分比	累积百分比
有效 否	2396	93.6	93.6	93.6
是	163	6.4	6.4	100.0
总计	2559	100.0	100.0	

[0145] 表 9

[0146] 目前为吸烟者

[0147]

	频率	百分比	有效百分比	累积百分比
有效 .00	1906	74.5	74.5	74.5
1.00	653	25.5	25.5	100.0
总计	2559	100.0	100.0	

[0148] 表 10

[0149] 研究中男性的临床特征

[0150] 描述性统计

[0151]

	N	平均值	标准偏差
MDCS 筛选时的年龄	1803	57.769	6.0345
收缩压 (mmHg)	1803	143.90	18.766
舒张压 (mmHg)	1803	88.95	9.698
体质指数 (体重/kgxkg)	1803	26.1113	3.44882
腰围 (cm)	1802	92.89	9.932
葡萄糖 (mmol/l)	1803	5.3825	1.46780
甘油三酯 (mmol/l)	1803	1.4416	.68477
高密度脂蛋白 (mmol/l)	1803	1.2183	.29669
低密度脂蛋白 (mmol/l)	1803	4.1087	.89336
P-胰岛素	1768	8.835	10.0090
PNT [pmol/l]	1803	119.34300	75.268054
有效的 N (成列删除)	1767		

[0152] 表 11

[0153] 问卷 + 日记记录 : 根据问卷或日记记录本得到的基线时的抗高血压治疗 (C02、C03、C07、C08、C09)

[0154]

	频率	百分比	有效百分比	累积百分比
有效 否	1511	83.8	83.8	83.8
是	292	16.2	16.2	100.0
总计	1803	100.0	100.0	

[0155] 表 12

[0156] 糖尿病（空腹血糖 > 6.0 或者问卷调查后为糖尿病）

[0157]

	频率	百分比	有效百分比	累积百分比
有效 否	1597	88.6	88.6	88.6
是	206	11.4	11.4	100.0
总计	1803	100.0	100.0	

[0158] 表 13

[0159] 目前为吸烟者

[0160]

	频率	百分比	有效百分比	累积百分比
有效 .00	1306	72.4	72.4	72.4
1.00	497	27.6	27.6	100.0
总计	1803	100.0	100.0	

[0161] 结果

[0162] 心脏代谢风险因素与 P-NT 之间的横向关系 (cross sectional relationship)

[0163] 研究人群的基线特征示于表 1 中。女性具有比男性 [109 (79-150) 比 99 (71-144) pmol/l] ($P < 0.001$) 略高但显著更高的 P-NT [中位数 (四分位数范围)]。P-NT 与肥胖程度、心血管风险因素和糖尿病风险因素之间的横向关系通常是弱的, 在两种性别中均与空腹胰岛素浓度具有最强的关联性 (补充表 1)。在具有向后剔除并且保留 P 值为 0.10 的线性回归模型中, P-NT 的显著的独立决定因素在女性中是吸烟以及胰岛素、葡萄糖、和 HDL 的空腹浓度 (均为正相关), 在男性中是吸烟以及胰岛素和 HDL 的空腹浓度 (正相关) 以及年龄和 LDL (负相关) (表 2)。

[0164] 表 14

[0165] 所有人中 PNT 的四分位数:

[0166] PNT [pmol/l]

[0167]

PNT 的百分位组 pmol/l	N	中位数	最小值	最大值
1	1091	60.22000	3.270	75.740
2	1090	89.29000	75.790	104.600
3	1092	122.67000	104.640	147.610
4	1089	190.03000	147.660	1154.520
总计	4362	104.62000	3.270	1154.520

[0168] 表 15

[0169] 女性中 PNT 的四分位数：

[0170] PNT[pmol/l]

[0171]

PNT的百分位组pmol/l	N	中位数	最小值	最大值
1	639	62.37000	5.100	78.580
2	639	92.07000	78.610	108.770
3	641	125.07000	108.960	150.000
4	640	194.38500	150.050	1154.520
总计	2559	108.96000	5.100	1154.520

[0172] 表 16

[0173] 男性中 PNT 的四分位数：

[0174] PNT[pmol/l]

[0175]

PNT的百分位组pmol/l	N	中位数	最小值	最大值
1	450	58.02000	3.270	70.800
2	451	85.88000	70.970	98.820
3	451	118.18000	98.880	143.940
4	451	186.39000	144.180	1057.360
总计	1803	98.88000	3.270	1057.360

[0176] 表 17

[0177]

心血管疾病							
	每 1 SD 的 HR	P 值	四分位数 1	四分位数 2	四分位数 3	四分位数 4	趋势 P
所有 (4362/519)	1.17 (1.07-1.27)	<0.001	1.0 (ref)	1.09 (0.84-1.42)	1.39 (1.09-1.78)	1.37 (1.07-1.75)	0.003
女性 (2559/224)	1.33 (1.17-1.51)	<0.001	1.0 (ref)	0.91 (0.59-1.41)	1.58 (1.08-2.30)	1.65 (1.13-2.41)	0.001
男性 (1803/295)	1.06 (0.95-1.19)	0.310	1.0 (ref)	1.25 (0.90-1.74)	1.26 (0.90-1.76)	1.21 (0.87-1.69)	0.278
心血管死亡率							
	每 1 SD 的 HR	P 值	四分位数 1	四分位数 2	四分位数 3	四分位数 4	趋势 P
所有 (4362/174)	1.29 (1.12-1.49)	0.001	1.0 (ref)	0.95 (0.59-1.53)	1.41 (0.91-2.17)	1.73 (1.14-2.61)	0.003
女性 (2559/75)	1.50 (1.21-1.87)	<0.001	1.0 (ref)	1.02 (0.47-2.22)	1.53 (0.76-3.08)	2.18 (1.13-4.20)	0.008
男性 (1803/99)	1.16 (0.96-1.41)	0.132	1.0 (ref)	1.06 (0.58-1.93)	1.36 (0.76-2.42)	1.43 (0.82-2.51)	0.147

[0178] P-NT 与心血管疾病、心血管死亡率和所有原因的死亡率的预测

[0179] 在基线检查之前未患有心血管疾病的对象中,519 人在 14.4 ± 4.4 年的随访期间发生第一次心血管疾病事件。在全面调整了心血管风险因素(年龄、性别、抗高血压治疗、收缩压、体质指数、糖尿病、HDL、LDL 和吸烟)的基线水平后,P-NT 每增加一个 SD 就伴随着发生心血管疾病的风险增加 17% (表 3)。在 P-NT 与女性性别之间有强相互作用 ($P < 0.001$),性别分层分析揭示了,在女性中,基线 P-NT 每增加一个 SD 就强烈地伴随着发生心血管疾病的风险增加 33%,而在男性中没有显著的相关性(表 3)。四分位数分析揭示了,顶部与底部的四分位数在总人群中伴随着发生心血管疾病的风险增加 37%,在女性中伴随着风险增加 65% (表 3)。对空腹胰岛素浓度、即 P-NT 的最强的横向关联因素的进一步调整不影响结果(未示出)。

[0180] 然后,在全面调整了所有心血管风险因素的模型中,我们在总人群中以及分别在男性和女性中评估了总死亡率与心血管死亡率之间的关系。P-NT 每增加一个 SD 就在总人群中伴随着所有原因的死亡率的风险显著增加 8%,在女性中所有原因的死亡率的风险为 13%,而在男性中没有这种与 P-NT 相关的增加的风险(表 3)。所出现的额外的死亡风险主要是由心血管死亡引起的,其中在总人群中,每 SD 增加的心血管死亡风险为 29%,在女性中额外的风险为 50%。与属于 P-NT 的底部四分位数的女性对象相比,属于顶部四分位数的女性对象发生心血管死亡的风险增加超过 2 倍(表 3)。

[0181] 用于基线 P-NT 与心血管疾病的发生率、所有原因的死亡率和心血管死亡率的多变量 Cox 比例风险模型。

[0182] 在 P-NT、N-BNP 和 CRP 之间的逐一比较

[0183] 为了比较 P-NT 与已建立的血浆生物标志物之间的统计强度和研究终点的效果估计,我们将 P-NT 与 N-BNP 和 CRP 同时输入到全面调整后的模型中(按 Melander 等, JAMA. 2009 ;302(1) :49-57 所描述的测定 CRP 和 N-BNP)。如下所述,对于总人群中的大多数终点来说,P-NT 表现得与 N-BNP 和 CRP 一样地好,而在女性中,P-NT 表现得明显比 N-BNP 和 CRP 好(在女性中,单独的 CRP 是不显著的)。将 N-BNP 和 P-NT 组合(参见 Melander 等, JAMA. 2009 ;302(1) :49-57) 进一步提高了对女性中 CVD 的预测能力,从每 1SD 33% HR(单独的 P-NT) 提高至每 1SD 34.8% ($p < 0.001$) (P-NT 和 N-BNP 的组合)。

[0184] 表 18

[0185] CVD 事件 - 所有对象

[0186] 方程中的变量

[0187]

	B	SE	Wald	df	Sig.	Exp(B)	Exp(B)的 95.0% CI	
							下限	上限
年龄	.079	.010	68.888	1	.000	1.082	1.062	1.103
性别	-.476	.106	20.042	1	.000	.621	.505	.765
AHTJB	.231	.116	3.991	1	.046	1.260	1.004	1.581
SBPB	.015	.003	35.264	1	.000	1.015	1.010	1.020
BMIB	-.012	.014	.775	1	.379	.988	.962	1.015
DMB	.544	.130	17.618	1	.000	1.723	1.336	2.221
HDLJB	-.851	.169	25.479	1	.000	.427	.307	.594
LDLB	.152	.048	9.800	1	.002	1.164	1.058	1.280
目前为吸烟者 0	.495	.106	21.876	1	.000	1.640	1.333	2.017
ZLNPNT	.133	.046	8.336	1	.004	1.142	1.044	1.250
ZLNBPNP	.132	.049	7.168	1	.007	1.141	1.036	1.257
ZLN CRP	.147	.050	8.523	1	.004	1.158	1.049	1.278

[0188] 表 19

[0189] CVD 事件 - 女性对象

[0190] 方程中的变量

[0191]

	B	SE	Wald	df	Sig.	Exp(B)	Exp(B)的 95.0% CI	
							下限	下限
年龄	.080	.015	28.703	1	.000	1.084	1.052	1.116
性别				0 ^a				
AHTB	.466	.168	7.664	1	.006	1.593	1.146	2.215
SBPB	.014	.004	13.454	1	.000	1.014	1.007	1.022
BMIB	-.038	.019	3.908	1	.048	.962	.927	1.000
DMB	.925	.202	21.035	1	.000	2.522	1.699	3.745
HDLB	-.926	.231	16.088	1	.000	.396	.252	.623
LDLB	.116	.069	2.801	1	.094	1.123	.980	1.286
目前为吸烟者 0	.740	.155	22.725	1	.000	2.095	1.546	2.840
ZLNBPNP	.154	.071	4.755	1	.029	1.167	1.016	1.340
ZLNCRP	.112	.077	2.123	1	.145	1.119	.962	1.301
ZLN PNT	.224	.070	10.217	1	.001	1.251	1.091	1.435

[0192] 图 2 :用于说明女性中的累积的CVD事件的Kaplan Meier图,截止值(cu f off) >

<中位数 = 109pmol/l P-NT。

[0193] 给出了整个观察阶段中通过基线 P-NT 预测的 CVD 事件。

[0194] 亚组分析

[0195] 在方程中使用相同的变量,我们研究了用于预测 CVD、死亡率、CVD 死亡率的不同的亚组。先前具有 CVD 事件的对象被排除。

[0196] 表 20

[0197] CVD 事件的预测

[0198]

亚组	对象数目	事件的数目	每 1SDPNT 的风险	显著性 (p 值)
全部	4361	519	16,5%	<0,001
女性	2559	224	33,2%	<0,001
男性	1802	295	6%	0,31 (n.s.)
糖尿病女性	163	40	42,9%	0,05
非糖尿病女性	2396	184	33,6%	<0,001
HBP 女性	1545	178	30,6%	<0,001
正常 BP 女性	1014	46	40,8%	0,014
无癌症、糖尿病 和 CVD 事件的 病史的女性	2022	144	30,6%	0,001

[0199] CVD 事件的预测仅与女性相关。在完全健康的亚组和高风险亚组如糖尿病女性或 HBP 女性中, P-NT 的预测能力是相似的。

[0200] 表 21

[0201] CVD 死亡率的预测

[0202]

亚组	对象数目	事件的数目	每 1SDPNT 的风险	显著性 (p 值)
全部	4361	174	28,7%	0,001
女性	2559	75	50%	<0,001
男性	1803	99	16%	0.132 (n.s.)
糖尿病女性	163	14	141%	0,006
非糖尿病女性	2396	61	39,6%	0,006
HBP 女性	1545	63	35,1%	0,016
正常 BP 女性	1014	12	125,7%	0,001
无癌症、糖尿病 和 CVD 事件的 病史的女性	2022	48	36%	0,025

[0203] P-NT 对 CVD 死亡率的预测在女性中是强烈的,在男性中是不显著的。给出了 P-NT 在健康女性 and 高风险女性 (糖尿病或 HBP) 中的预测能力。

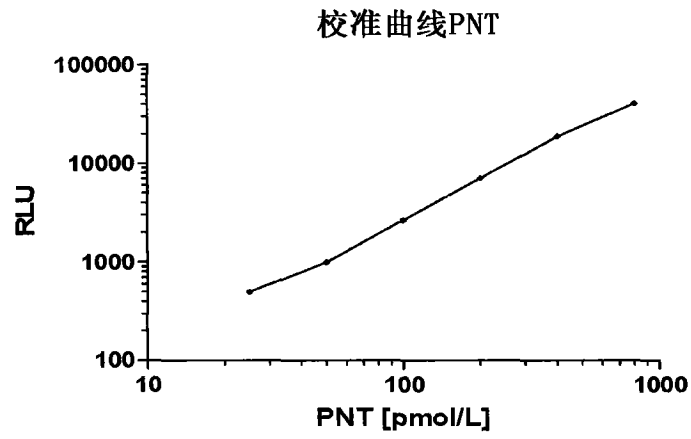


图 1

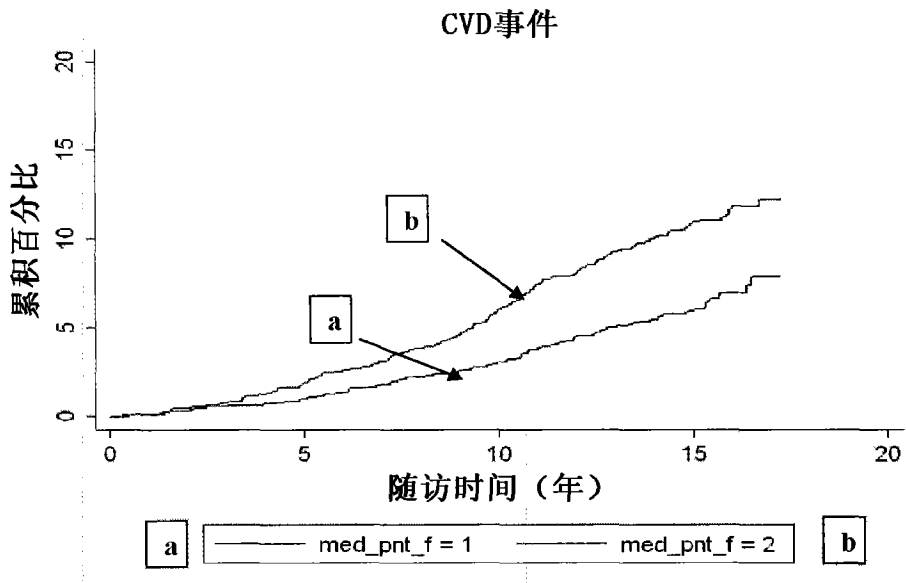


图 2

专利名称(译)	用于预测雌性对象中发生心血管事件的风险的方法		
公开(公告)号	CN103308673A	公开(公告)日	2013-09-18
申请号	CN201210520697.6	申请日	2012-10-08
[标]申请(专利权)人(译)	思芬构技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	思芬构技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	思芬构技术有限公司		
[标]发明人	安德里斯贝格曼 欧勒米兰德		
发明人	安德里斯·贝格曼 欧勒·米兰德		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/577 A61K39/395 A61K45/00 A61P9/00		
CPC分类号	A61P9/00 A61P25/00 A61P43/00 G01N33/74 G01N2800/32 G01N2800/50 G01N33/53 G01N33/68 C07K16/26 G01N33/6893 G01N2333/575 G01N2800/323 G01N2800/325		
代理人(译)	张颖 谢丽娜		
优先权	2012158678 2012-03-08 EP 2012165057 2012-04-20 EP 61/608376 2012-03-08 US		
其他公开文献	CN103308673B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明的主题是用于预测雌性对象中发生心血管事件的风险的方法，所述方法包括确定神经降压素原或其至少5个氨基酸的片段在从所述雌性对象获得的体液中的水平；和将神经降压素原或其片段的所述水平与发生心血管事件的风险相关联，其中水平升高预示发生心血管事件的风险增加。

