

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2016 年 4 月 7 日 (07.04.2016)



(10) 国际公布号
WO 2016/049830 A1

- (51) 国际专利分类号:
G01N 30/02 (2006.01) *G01N 33/48* (2006.01)
G01N 30/62 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2014/087853
- (22) 国际申请日: 2014 年 9 月 30 日 (30.09.2014)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (71) 申请人: 深圳华大基因科技有限公司 (BGI SHENZHEN CO., LIMITED) [CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区北山路 146 号北山工业区综合楼 11F-3, Guangdong 518083 (CN)。 深圳华大基因研究院 (BGI SHENZHEN) [CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。
- (72) 发明人: 冯强 (FENG, Qiang); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 刘志鹏 (LIU, Zhipeng); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 孟楠 (MENG, Nan); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 王俊 (WANG, Jun); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。
- (74) 代理人: 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 (CCPIT PATENT AND TRADEMARK LAW OF-

FICE); 中国北京市西城区阜成门外大街 2 号万通新世界广场 8 层, Beijing 100037 (CN)。

- (81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。
- (84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

(54) Title: CHRONIC HEART DISEASE PATIENT SPECIFIC BIOMARKER COMPOSITION AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 冠心病患者特异性生物标志组合物及其用途

(57) Abstract: Provided is a disease specific metabolite profile, in particular a biomarker composition obtained via chronic heart disease patient blood plasma specific metabolite profile screening. Also provided are a use of the biomarker composition for chronic heart disease risk assessment, diagnosis, early diagnosis and pathological staging, and a chronic heart disease risk assessment, diagnosis, early diagnosis and pathological staging method. The biomarker composition may be used for the early diagnosis of chronic heart disease, and has high sensitivity, good specificity and favourable application prospects.

(57) 摘要: 提供一种疾病特异性代谢物谱, 特别是涉及由冠心病患者血浆特异性代谢物谱筛选得到的生物标志组合物。以及所述生物标志组合物用于冠心病的患病风险评估、诊断、早期诊断以及病理分期的用途, 以及冠心病的患病风险评估、诊断、早期诊断以及病理分期方法。提供的生物标志组合物可用于早期诊断冠心病, 并且灵敏度高、特异性好, 具有良好的应用前景。



WO 2016/049830 A1

冠心病患者特异性生物标志组合物及其用途

技术领域

本发明涉及疾病特异性代谢物谱，特别是涉及由冠心病受试者血浆特异性代谢物谱筛选得到的生物标志组合物。本发明还涉及所述生物标志组合物用于冠心病的患病风险评估、诊断、早期诊断以及病理分期的用途，以及冠心病的患病风险评估、诊断、早期诊断以及病理分期方法。

背景技术

冠状动脉性心脏病(英语:coronary artery heart disease, CAHD), 又称缺血性心脏病, 简称冠心病, 是一种最常见的心脏病, 是指因冠状动脉狭窄、供血不足而引起的心肌机能障碍和(或)器质性病变, 故又称缺血性心肌病(IHD), 在 2012 年是全球第一大死因 [1], 也是人们住院的主要原因之一[2]。冠心病可发生于任何年龄, 甚至于儿童, 但是主要发病年龄为中年以后, 并且其发病随着年龄的增长而增加。全球每年有将近 1700 万人死于动脉粥样硬化心脏病, 2020 年预计死亡增加 50%, 达 2500 万/年, 占全球死亡人数的 1/3, 排第一位。我国每年死于心血管疾病的人数达 250 万, 新发心肌梗死 50 万人, 冠心病的发生有较显著的地区差异, 北方城市普遍高于南方城市, 在男女性别上也有显著性差异, 男女比例为 2-5:1, 数据显示全球冠心病患者分布也有类似差异[3]。目前对于冠心病的诊断缺乏比较统一的标准并且现有的诊断方法如心电图、心电图负荷试验、动态心电图、核素心肌显像、超声心动图、血液学检查、冠状动脉 CT、冠状动脉造影及血管内成像技术等都具有一定的缺陷, 例如, 症状的观察、超声心动图检查则主观性太强, 冠状动脉 CT、冠状动脉造影及血管内成像技术等均为侵入式诊断, 给患者带来额外的痛苦; 现已发现的血液中单一的标志物诊断则存在敏感性和特异性差, 假阳性率较高等缺点, 开发一种无创、特异性、准确的冠心病诊断方法具有重要的意义[4、5]。

代谢组学是继基因组学和蛋白质组学之后发展起来的一门系统生物学学科，研究生物体在内在或者外在因素影响后其内源性代谢物种类、数量以及变化规律。代谢组学对有机体的整个代谢谱进行分析，探寻代谢物与生理病理变化之间的对应关系，从而为疾病诊断提供依据。因此，筛选与冠心病相关的代谢标志物，特别是多个代谢标志物的联合使用，对冠心病的代谢组学研究、临床诊断和治疗具有重大意义。

发明内容

针对现有冠心病诊断方法的有创伤性，侵入性等缺点，本发明所要解决的问题是提供能够用于冠心病诊断和患病风险评估的生物标志物组合（即生物标志组合物），以及冠心病的诊断和患病风险评估方法。

本发明采用液相色谱质谱联用的分析方法，分析冠心病群体和对照组群体的血浆样本的代谢物谱，并用模式识别进行分析比较冠心病群体和对照组群体的代谢物谱，确定特异性液相色谱质谱数据以及相关特异性生物标志物，为后续理论研究和临床诊断提供依据。

本发明第一方面涉及生物标志组合物，其至少含有选自以下生物标志物1~6中的一种或数种：

生物标志物1，其质荷比为 $310.04 \pm 0.4\text{amu}$ ，保留时间为 $611.25 \pm 60\text{s}$ ；
生物标志物2，其质荷比为 $311.05 \pm 0.4\text{amu}$ ，保留时间为 $611.26 \pm 60\text{s}$ ；
生物标志物3，其质荷比为 $220.00 \pm 0.4\text{amu}$ ，保留时间为 $122.77 \pm 60\text{s}$ ；
生物标志物4，其质荷比为 $247.09 \pm 0.4\text{amu}$ ，保留时间为 $146.37 \pm 60\text{s}$ ；
生物标志物5，其质荷比为 $255.03 \pm 0.4\text{amu}$ ，保留时间为 $117.92 \pm 60\text{s}$ ；
生物标志物6，其质荷比为 $170.03 \pm 0.4\text{amu}$ ，保留时间为 $202.18 \pm 60\text{s}$ ；
例如含有其中的1种、2种、3种、4种、5种或6种。

在本发明的实施方案中，上述6种生物标志物的特征如表1所示。

在本发明的一个实施方案中，所述生物标志组合物至少含有生物标志物1~3和6；任选地，还含有生物标志物4和/或生物标志物5。

在本发明的一个实施方案中，所述生物标志组合物含有生物标志物1~6。

在本发明的一个实施方案中，所述生物标志组合物含有生物标志物3~6。

本发明第二方面涉及试剂组合物，其含有用于检测本发明第一方面任一项的生物标志组合物的试剂。

在本发明中，用于检测上述生物标志物的试剂例如为可以与生物标志物结合的配体，例如抗体；任选地，所述用于检测的试剂还可以带有可检测的标记。所述试剂组合物为所有检测试剂的组合。

本发明第三方面涉及本发明第一方面任一项的生物标志组合物和/或第二方面任一项的试剂组合物用于制备试剂盒的用途，所述试剂盒用于冠心病的患病风险评估、诊断、早期诊断或病理分期。

在本发明的实施方案中，所述试剂盒还包括冠心病受试者和正常受试者的本发明第一方面任一项的生物标志组合物含量的训练集数据。

在本发明的一个实施方案中，其中所述的训练集数据如表2所示。

本发明还涉及一种用于冠心病的患病风险评估、诊断、早期诊断或病理分期的方法，所述方法包括测定受试者样本（例如血浆、全血）中本发明第一方面任一项的生物标志组合物中各生物标志物的含量的步骤。

在本发明的一个实施方案中，其中测定受试者样本（例如血浆、全血）中本发明第一方面任一项的生物标志组合物中各生物标志物的含量的方法为液相色谱质谱联用的方法。

在本发明的一个实施方案中，所述方法还包括建立冠心病受试者和正常受试者（对照组）样本（例如血浆、全血）的本发明第一方面任一项的生物标志组合物中各生物标示物含量的训练集的步骤。

在本发明的一个实施方案中，其中所述训练集是利用多元统计分类模型(例如随机森林模型)建立的训练集。

在本发明的一个实施方案中，其中所述训练集的数据如表 2 所示。

在本发明的一个实施方案中，所述方法还包括将受试者样本(例如血浆、全血)中本发明第一方面任一项的生物标志组合物中各生物标志物的含量与冠心病受试者和正常受试者的生物标志组合物的训练集数据进行比较的步骤。

在本发明的一个实施方案中，其中所述训练集是利用多元统计分类模型(例如随机森林模型)建立的训练集。

在本发明的一个实施方案中，其中所述训练集的数据如表 2 所示。

在本发明的一个实施方案中，其中所述进行比较是指采用受试者工作特征曲线进行比较。

在本发明的一个实施方案中，其中比较步骤的结果判定方法为，若假定受试者为非冠心病患者，进行 ROC 诊断得到的非冠心病患者的概率小于 0.5 或者患冠心病的概率大于 0.5，则表明原假定的受试者患冠心病的概率大、风险较高或者诊断为冠心病患者。

在本发明的具体实施方案中，所述方法包括以下步骤：

1) 利用液相色谱质谱联用的方法测定受试者血浆中本发明第一方面任一项的生物标志组合物中各生物标志物的含量；

2) 利用液相色谱质谱联用的方法测定冠心病受试者和正常受试者血浆中的本发明第一方面任一项的生物标志组合物的含量，并利用随机森林模型建立生物标志组合物含量的训练集(例如表 2 所示)；

3) 采用 ROC 曲线，将受试者血浆中本发明第一方面任一项的生物标志组合物中各生物标志物的含量与冠心病受试者和正常受试者的生物标志组合物的训练集数据进行比较；

4) 若假定受试者为非冠心病患者，进行 ROC 诊断得到的非冠心病患者的概率小于 0.5 或者患冠心病的概率大于 0.5，则表明原假定的受试者患冠心病的概率大、风险较高或者诊断为冠心病患者。

本发明还涉及本发明第一方面任一项的生物标志组合物，用于冠心病的患病风险评估、诊断、早期诊断或病理分期。

在本发明的一个实施方案中，其中测定受试者样本（例如血浆、全血）中本发明第一方面任一项的生物标志组合物中各生物标志物的含量的方法为液相色谱质谱联用的方法。

在本发明的一个实施方案中，还包括建立冠心病受试者和正常受试者的本发明第一方面任一项的生物标志组合物中各生物标志物含量的训练集的步骤。

在本发明的一个实施方案中，其中所述训练集是利用多元统计分类模型(例如随机森林模型)建立的训练集。

在本发明的一个实施方案中，其中所述训练集的数据如表 2 所示。

在本发明的一个实施方案中，还包括将受试者样本（例如血浆、全血）中本发明第一方面任一项的生物标志组合物中各生物标志物的含量与冠心病受试者和正常受试者的生物标志组合物的训练集数据进行比较的步骤。

在本发明的一个实施方案中，其中所述训练集是利用多元统计分类模型(例如随机森林模型)建立的训练集。

在本发明的一个实施方案中，其中所述训练集的数据如表 2 所示。

在本发明的一个实施方案中，其中所述进行比较的方法是指采用受试者工作特征曲线的方法进行比较。

在本发明的一个实施方案中，其中比较步骤的结果判定方法为，若假定受试者为非冠心病患者，进行 ROC 诊断得到的非冠心病患者的概率小于 0.5 或者患冠心病的概率大于 0.5，则表明原假定的受试者患冠心病的概率大、风险较高或者诊断为冠心病患者。

在本发明的实施方案中，所述生物标志组合物中各生物标志物的含量，以及所述训练集中各生物标志物含量数据的获得，是通过以下步骤：

(1) 样本的收集与处理：收集临床病人或者模型动物的血浆样本；样本经过有机溶剂进行液液萃取，有机溶剂包括但不限于乙酸乙酯、氯仿、乙醚、正丁醇、石油醚、二氯甲烷、乙腈等；或者经过蛋白沉淀，蛋白沉淀方法包括加入有机溶剂（例如甲醇、乙醇、丙酮、乙腈、异丙醇）、各类酸碱盐沉淀、加热沉淀、过滤/超滤、固相萃取，离心等方法单独或者综合的方式进行处理；样本进行干燥或者不进行干燥再利用各种有机溶剂（例如甲醇，乙腈，异丙醇，氯仿等，优选为甲醇、乙腈）或者水（单独或者组合，不含盐或者含盐）溶解；样本不进行衍生化或者利用试剂（例如三甲基硅烷，氯甲酸乙酯，N-甲基三甲基硅基三氟乙酰胺等）进行衍生化处理。

(2) 液相色谱质谱分析测定（HPLC-MS）：采用基于液相色谱和质谱的方法得到血浆中的代谢物谱，代谢物谱经过处理得到各个峰的峰高或者峰面积（peak intensity）以及质荷比和保留时间（retention time）等数据，其中的峰面积即代表生物标志物的含量。

在本发明的一个具体实施方式中，步骤（1）中的处理包括样本经过有机溶剂进行液液萃取；或者经过蛋白沉淀；样本进行干燥或者不进行干燥，再利用单独或者组合的有机溶剂或者水进行溶解，所述水不含盐或者含盐，盐包括氯化钠，磷酸盐，碳酸盐等；样本不进行衍生化或者利用试剂进行衍生化处理。

在本发明的一个具体实施方式中，步骤（1）有机溶剂进行液液萃取中，所述有机溶剂包括但不限于乙酸乙酯、氯仿、乙醚、正丁醇、石油醚、二氯甲烷、乙腈。

在本发明的一个具体实施方式中，步骤（1）蛋白沉淀中，包括但不限于加入有机溶剂、各类酸碱盐沉淀、加热沉淀、过滤/超滤、固相萃取、离心方法单独或者组合的方式进行处理，其中所述有机溶剂包括甲醇、乙醇、丙酮、乙腈、异丙醇。

在本发明的一个具体实施方式中，步骤（1）中优选地包括使用蛋白沉淀方法进行处理，优选地使用乙醇进行蛋白沉淀。

在本发明的一个具体实施方式中，步骤（1）样本进行干燥或者不

进行干燥，再利用有机溶剂或者水溶解中，所述有机溶剂包括甲醇、乙腈、异丙醇、氯仿，优选为甲醇、乙腈。

在本发明的一个具体实施方式中，步骤（1）样本利用试剂进行衍生化处理中，所述试剂包括三甲基硅烷，氯甲酸乙酯，N-甲基三甲基硅基三氟乙酰胺。

在本发明的一个具体实施方式中，步骤（2）中代谢物谱经过处理得到原始数据，所述原始数据优选地是各个峰的峰高或者峰面积以及质量数和保留时间等数据。

在本发明的一个具体实施方式中，步骤（2）中，对原始数据进行峰检测和峰匹配，优选地采用 XCMS 软件进行所述峰检测和峰匹配。

质谱分析类型大致分为离子阱、四级杆、静电场轨道离子阱、飞行时间质谱四类，这四类分析器的质量偏差分别为 0.2amu、0.4amu、3ppm、5ppm。本发明得到的实验结果是离子阱分析的，所以适用于所有以离子阱和四级杆为质量分析器的质谱仪器，包括 Thermo Fisher 的 LTQ Orbitrap Velos、Fusion、Elite 等，Waters 的 TQS、TQD 等，AB Sciex 的 5500、4500、6500 等，Agilent 的 6100、6490 等，Bruker 的 amaZon speed ETD 等。

在本发明的实施方案中，用质谱的峰面积（peak intensity）表示生物标志物的含量。

在本发明中，所述的质荷比和保留时间具有本领域公知的含义。

本领域技术人员公知，当采用不同的液相色谱质谱联用设备以及不同的检测方法时，本发明的生物标志组合物中各生物标志物的原子质量单位和保留时间会在一定范围内波动；其中，所述原子质量单位可以在 $\pm 0.4\text{amu}$ ，例如 $\pm 0.2\text{amu}$ ，例如 $\pm 0.1\text{amu}$ 的范围内波动，所述保留时间可以在 $\pm 60\text{s}$ ，例如 $\pm 45\text{s}$ ，例如 $\pm 30\text{s}$ ，例如 $\pm 15\text{s}$ 的范围内波动。

在本发明中，随机森林模型和 ROC 曲线的使用方法为本领域所公知(参见参考文献[7]和[8])，本领域技术人员可以根据具体情况进行

参数设置和调整。

在本发明中，所述训练集是指和测试集具有本领域公知的含义。在本发明的实施方案中，所述训练集是指包含一定样本数的冠心病受试者和正常受试者待测样本中的各生物标志物的含量的数据集合。所述测试集是用来测试训练集性能的数据集合。

在本发明中，构建了冠心病受试者和正常受试者的生物标志物的训练集，并以此为基准，对待测样本的生物标志物含量值进行评估。

在本发明的实施方案中，所述训练集的数据如表 2 所示。

在本发明中，所述受试者可以为人或者模型动物。

在本发明中，质荷比的单位为 amu，amu 是指原子质量单位，也称为道尔顿（Dalton，Da，D），是用来衡量原子或分子质量的单位，它被定义为碳 12 原子质量的 1/12。

在本发明中，可以选用生物标志物中的一种或多种进行冠心病的患病风险评估、诊断或病理分期等，优选地，至少选取其中的四种，即生物标志物 1~3 和生物标志物 6 进行评估，或者同时选用这 6 种生物标志物(生物标志物 1~6)进行评估，以获得理想的灵敏度和特异性。

本领域技术人员知晓，当进一步扩大样本量时，利用本领域公知的样本检测和计算方法，可以得出每种生物标志物在样本中的正常含量值区间（绝对数值）。这样当采用除质谱以外的其它方法对生物标志物的含量进行检测时（例如利用抗体和 ELISA 方法等），可以将检测得到的生物标志物含量的绝对值与正常含量值进行比较，任选地，还可以结合统计学方法，以得出冠心病的患病风险评估、诊断以及病理分期等。

不希望受任何理论的限制，发明人指出这些生物标志物是存在于人体中的内源性化合物。通过本发明所述的方法对受试者血浆的代谢物谱进行分析，代谢物谱中的质量数值以及保留时间指示相应生物标志物的存在及在代谢物谱中的对应位置。同时，冠心病群体的所述生物标志物在其代谢物谱中表现出一定的含量范围值。

机体内源性小分子是生命活动的基础，疾病的状态与机体功能的变化必然会引起内源性小分子在体内代谢的变化，本发明表明，冠心病组和对照组的血浆代谢物谱存在明显的差异。本发明通过对冠心病组和对照组代谢物谱的比较和分析，得到多种相关的生物标志物，结合高质量的冠心病人群和正常人群生物标志物的代谢物谱数据作为训练集，能够准确地对冠心病进行患病风险评估、早期诊断和病理分期。该方法与目前常用的诊断方法相比，具有无创、方便、快捷的特点，且灵敏度高，特异性好。

附图说明

图1. 冠心病患者组(a)和正常人组(b)质谱总离子流图。

图2. PLS-DA得分图。棱形（白色）代表正常组，三角形（黑色）代表冠心病组。

图3. 主成分分析荷载图。三角形（黑色）代表VIP值大于1的变量。

图4. Volcano-plot图。水平虚线以上部分是差异代谢物，其中两条竖直虚线两侧的物质（黑色三角形）是fold-change大于1.2且Q-value小于0.05的代谢物，两条竖直虚线间的物质（灰色球型）是fold-change小于0.8且Q-value小于0.05的代谢物。

图5. S-plot图。棱形（黑色）是VIP大于1的变量。

图6.主成分分析得分图。棱形（白色）代表正常组，三角形（黑色）代表冠心病组。使用发现的标记物对83个测试集数据进行主成分分析。

图7. 随机森林模型(Randomforest)模型的ROC图。Training ROC是基于训练集，AUC=1；Test ROC是基于测试集，AUC=1。

图8. 随机去掉训练集中的310.04和311.05质荷比的ROC测试集图，AUC=0.8851。

图9. 6个潜在标记物的随机组合挑选图。竖直线标记处左侧是至少需要检测的4个标记物。

具体实施方式

下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述,但是本领域技术人员将会理解,下列实施例仅用于说明本发明,而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体条件者,按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市购获得的常规产品。

本发明的冠心病和正常受试者的血浆样本来自广东省人民医院。

实施例 1

1.1 样本收集:收集志愿者的晨血,立即置于-80℃低温冰箱中储存。正常组共收集 52 份血浆样本,冠心病组共收集 40 份血浆样本。

1.2 样本的处理:冰冻的样本置于室温下解冻,取血浆样本 500 μ L 至于 2.0 mL 离心管中,加入甲醇 1000 μ L 稀释,10000 rpm 离心 5 min,备用。

1.3 液相色谱质谱联用分析

仪器设备

HPLC-MS-LTQ Orbitrap Discovery (Thermo, Germany)

色谱条件

色谱柱: C18 柱(150 mm $\times$ 2.1 mm, 5 μ m); 流动相 A: 0.1 % 甲酸水溶液, 流动相 B: 0.1%甲酸乙腈溶液; 梯度洗脱程序: 0~3 min, 5% B, 3~36 min, 5%~80% B, 36~40 min, 80%~100% B, 40~45 min, 100% B, 45~50 min, 100%~5% B, 50~60 min, 5% B; 流速: 0.2 mL/min; 进样体积 20 μ L。

质谱条件

ESI 离子源, 正离子模式采集数据, 扫描质量 m/z 50~1000。离子源参数 ESI: 鞘气为 10, 辅气为 5, 毛细管温度为 350℃, 锥孔电压 4.5KV。

1.4 数据处理

采用 XCMS 软件 (例如得自 <http://metlin.scripps.edu/xcms/>) 对原始数据进行峰检测和峰匹配, 采用 R 软件采用 PLS-DA (partial least squares - discriminant analysis) 对冠心病组代谢物谱 (图 1a) 和正常组代谢物谱 (图 1b) 进行差异性变量进行模式识别分析, 建立 PLS-DA

数学模型。

1.5 比较和确定特征性代谢物谱

通过比较正常组与冠心病组的血浆代谢物谱图，建立冠心病患者血浆代谢物谱（图 1），结果表明，正常组和冠心病组的血浆代谢物谱图是有明显差异的。

实施例 2

2.1 样本收集：收集志愿者的晨尿，立即置于-80℃低温冰箱中储存。正常组共收集 52 份血浆样本，冠心病组共收集 40 份血浆样本。

2.2 样本的处理：冰冻的样本置于室温下解冻，取血浆样本 500 μL 至于 2.0 mL 离心管中，加入甲醇 1000 μL 稀释，10000 rpm 离心 5 min，备用。

2.3 液相色谱质谱联用分析

仪器设备

HPLC-MS-LTQ Orbitrap Discovery (Thermo, Germany)

色谱条件

色谱柱：C18 柱(150 mm $\times$ 2.1 mm, 5 μm)；流动相 A: 0.1 % 甲酸水溶液，流动相 B: 0.1%甲酸乙腈溶液；梯度洗脱程序：0~3 min, 5% B, 3~36 min, 5%~80% B, 36~40 min, 80%~100% B, 40~45 min, 100% B, 45~50 min, 100%~5% B, 50~60 min, 5% B；流速：0.2 mL/min；进样体积 20 μL 。

质谱条件

ESI 离子源，正离子模式采集数据，扫描质量 m/z 50~1000。离子源参数 ESI: 鞘气为 10, 辅气为 5, 毛细管温度为 350℃, 锥孔电压 4.5KV。

2.4 数据处理

采用 XCMS 软件对原始数据进行相关前处理,得到二维矩阵数据, wilcox-test 统计代谢物峰的显著性差异；采用正交偏最小二乘法判别分析(PLS-DA, partial least squares - discriminant analysis) 对冠心病组代谢物谱（图 1a）和正常组代谢物谱（图 1b）进行差异性变量进行模

式识别分析, 结合 VIP、Volcano-plot 图和 S-plot 图筛选出潜在的生物标志物。

2.5 代谢谱分析和潜在的生物标志物

2.5.1 正交偏最小二乘法判别分析 (PLS-DA)

采用 PLS-DA 方法来区分正常组和冠心病组, 进一步通过 VIP 值(主成分分析 Loading-plot) (图 3)、Volcano-plot(图 4)和 S-plot(图 5)筛选潜在标志物。从图 3、图 4 可知, 正常组和冠心病组存在明显的差异性代谢物。如图 5 所示, S-plot 图中每个点代表一个变量, S-plot 图表明变量与模型的相关性。黑色的棱形标记的变量为 VIP 大于 1 的变量, 它们具有较大的偏差并且与模型有良好的相关性, 见图 2、5。

2.5.2 潜在生物标记物

根据模式识别模型 PLS-DA 的 VIP 值筛选潜在标志物, 在 PLS-DA 模型中提取 VIP 值大于 1 的变量, 并进一步根据荷载图, Volcano-plot 图和 S-plot 图进一步选择具有较大偏差和相关性的变量, 以及结合 P 值小于 0.05, Q 值小于 0.05 的变量, 得到 6 个潜在的生物标记物, 如表 1 所示。

表 1 潜在的生物标记物

质荷比(amu)	保留时间 Rt (sec)	比率 (正常组/冠心病组)	P 值	Q 值	VIP 值
310.04	611.25	0.0001	2.17E-15	1.92E-12	1.16
311.05	611.26	0.0025	1.35E-12	8.20E-11	1.16
220.00	122.77	0.6414	3.86E-02	2.75E-02	1.01
247.09	146.37	0.3984	5.61E-08	3.37E-07	1.24
255.03	117.92	0.3484	3.83E-06	1.21E-05	1.26
170.03	202.18	0.0156	3.79E-03	4.08E-03	4.54

2.5.3 主成分分析 (PCA)

PCA 是一种无师监督模式识别方法, 可以直观地在多维空间上描述样本间的差异。使用得到的 6 个差异的标记物对 83 个肥胖组和对照

组样本进行 PCA 分析, 从图 6 可知, 在 PCA 模型中, 两组在第一主成分方向上基本分开, 表明正常组和冠心病组的血浆代谢谱存在明显的区别。

2.5.4 受试者诊断曲线 (ROC)

使用随机森林模型 (RandomForest) [7] 和受试者诊断曲线 (receiver operating characteristic curve, ROC, 也叫受试者工作特征曲线) [8] 对 6 个潜在标记物进行正常组与冠心病组的判别。通过选取 92 个正常组与冠心病组代谢物谱峰面积数据采用 ROC 建模作为训练集 (参见参考文献 [7] 和 [8]) (表 2), 另外选取 83 个测试样本 (含冠心病的样本 38 个, 正常对照样本 45 个) 作为测试集, 测试结果为 $AUC=1$, FN (假阴性) $=0$, FP (假阳性) $=0$ (图 7), 具有较高的准确度和特异性, 具有良好的开发为诊断方法的前景, 从而为冠心病疾病的诊断提供依据。

表2 训练集代谢物谱峰面积数据

样品编号	组别(1: 冠心病组; 0: 正常组)	质荷比					
		310.0474	311.0511	220.0088	247.0927	255.0378	170.0328
CD5751_1	1	0.035971	0.028941	2.0698	1.847557	3.447373	1.838497
CD5767_1	1	0.518048	0.528351	1.67918	1.057417	1.427185	0.642363
CD5778_1	1	0.118419	0.114578	5.274362	1.636753	5.136574	0.856236
CD5779_1	1	0.830761	0.825451	1.981177	1.820087	0.678725	3.258685
CD5782_1	1	2.273	2.266954	2.183817	1.795206	2.589921	0.378109
CD5783_1	1	0.142664	0.143573	1.950855	1.546727	1.105065	1.232417
CD5788_1	1	0.297865	0.296303	0.80925	0.357977	0	0.163506
CD5795_1	1	5.468021	5.71178	1.796937	1.627936	2.73744	0.247029
CD5796_1	1	0.218944	0.217782	3.1631	1.449651	2.229824	0.525126
CD5797_1	1	1.4614	1.436343	3.226244	0.713308	2.545898	0.692436
CD5805_1	1	0.79711	0.813508	2.906224	1.529678	0.3218	1.169494
CD5814_1	1	2.094091	2.036124	1.027309	0.67968	0.706373	0.526758
CD5816_1	1	2.73073	2.79561	1.510684	1.580599	1.310362	0.566224
CD5819_1	1	0.001538	0.01335	1.591497	1.396263	0.941163	0
CD5822_1	1	3.744198	3.809473	2.267795	1.429436	2.422802	0.086586
CD5831_1	1	3.260472	3.348123	2.334711	1.218704	3.769648	1.490568
CD5832_1	1	0.028251	0.024733	1.883654	1.928723	4.108324	0.871313
CD5833_1	1	3.207548	3.22654	1.264351	0.833532	5.375295	0.26837

CD5838_1	1	0.672543	0.669593	2.269154	1.465057	1.48128	1.196006
CD5851_1	1	2.225022	2.232207	2.231923	1.564476	1.626777	1.065598
CD5860_1	1	3.588629	3.619216	1.623603	0.349931	1.466329	2.37164
CD5863_1	1	0.01132	0.011593	2.806604	1.334728	1.423662	0.469683
CD5867_1	1	0.096234	0.095499	1.864931	1.113036	4.784302	0.359933
CD5871_1	1	3.275621	3.38236	1.351764	0.405	2.682353	0.089361
CD5877_2	1	2.900862	2.903243	6.918055	0.863341	1.525894	0.248852
CD5881_2	1	4.546949	4.59075	6.97697	0.302554	1.321564	1.111718
CD5884_2	1	0.457603	0.461464	9.928549	2.066072	12.84567	0.449829
CD5891_2	1	0.098234	0.106791	0.84521	1.595202	2.156983	0.800175
CD5892_2	1	0	0.000933	5.960872	1.560398	3.367482	0.560264
CD5898_2	1	0.000153	0.004361	0.817571	1.463604	1.986249	0.713979
CD5900_2	1	2.296194	2.291767	6.686202	0.650392	1.617971	0.69235
CD5916_2	1	0.229847	0.112529	7.224221	1.473773	1.725251	0.841159
CD5923_2	1	1.470656	1.481594	11.02546	1.473311	1.955908	1.359043
CD5925_2	1	0.000292	0	5.76178	1.351079	1.62615	0.127491
CD5926_2	1	0.000984	0.002923	0.668754	1.208468	1.655	0.554825
CD5931_2	1	3.045312	3.090104	0.555586	0.246728	3.868446	0.107213
CD5934_2	1	2.761015	2.807205	0.932432	1.439827	2.482806	0.332513
CD5935_2	1	2.59472	2.570944	6.481325	1.600715	1.829884	0.653901
CD5988_2	1	0.074743	0.076354	8.927902	0.287215	4.092279	0.856305
CD5990_2	1	0.528431	0.531329	7.455305	2.119379	8.704949	0.402132

N165E_2		0		0	0.001198	2.273735	0.219128	1.404477	0.468192
N167E_2		0		0.000153	0.003134	0.330128	1.427848	2.519408	0.947302
N168E_2		0		0	0.004276	0.532362	1.193247	2.307861	0.635855
N170E_2		0		0.000123	0.006678	1.865563	0.62836	1.752023	0.876193
N171E_2		0		0.000108	0.002391	0.69803	1.43365	1.397692	0.506712
N185E_2		0		0	0.000993	0.556966	1.31429	1.097642	0.570415
N186E_2		0		0	0.000913	0.315125	1.586638	0.800838	0.930858
N187E_2		0		0	0.004406	2.299563	0.286376	1.737154	1.048589
N190E_2		0		0.0043	0.002773	1.338285	1.36053	1.854572	1.10703
N191E_2		0		0	0.002541	4.508579	1.504058	4.033288	0.69268
N195E_2		0		0	0.004779	0.385074	0.251441	0.94138	1.314871
N197E_2		0		0	0.002084	2.091143	1.331258	1.345158	0.77953
N198gan_huruilian_2		0		0.000116	0.003454	4.933436	0.018222	0	1.500137
N199gan_linrufang_2		0		0	0.001958	2.272987	0.022897	0	1.087806
N200E_2		0		0	0.000896	0.427487	0.433903	2.398669	0.340811
N201gan_lvhuix_2		0		0	0.002775	2.366315	0.013556	0.035438	0.362495
N203gan_1		0		0	0.003349	0.887285	0.078262	0	3.139258
N204gan_wangmiaorong_1		0		0.000167	0.00143	0.909609	0.06722	0.104947	2.562048
N205gan_liuqifang_1		0		0	0	0.853212	0.049627	0.049099	3.671745
N206gan_liuguoying_1		0		0.000268	0.002434	0.860768	0.071575	0	3.307561
N207E_2		0		0.001081	0.002212	0.662516	0.635003	2.114432	0.689146
N208gan_zhengshuX_2		0		0	0.00256	4.877083	0.023979	0	0.575836

N209gan_wangxin_2	0	9.43E-05	0.00151	1.282423	0.013061	0	1.529018
N212E_1	0	0.000208	0.006068	1.451385	1.210609	0.883391	2.824106
N213E_1	0	0	0.003607	0.213409	1.329888	0.812546	0.567079
N214E_1	0	0.000194	0.002669	0.345	1.358322	0.37904	2.964935
N215E_1	0	0	0.001307	0.616592	2.579593	1.53582	0.878895
N217E_1	0	0.000261	0.002067	1.393546	1.469455	0.781215	2.802722
N218E_1	0	0.000154	0	1.002086	0.994796	1.424977	0.515163
N220E_1	0	0	0.002992	0.836052	1.463508	0.756875	3.049891
N222E_1	0	0	0.00519	1.476197	1.434959	0.853225	1.892389
N223E_1	0	0	0.002726	0.994038	1.259697	0.732209	2.262991
N226E_1	0	0	0.033521	0.245588	1.383716	1.351605	0.71867
N227E_1	0	0	0.006596	1.112362	1.38151	1.48167	0.675359
N228E_1	0	0.001776	0.001104	2.128	0.720528	0.740941	1.334337
N229E_1	0	0	0.006393	1.382065	0.957774	0.537195	2.750898
N231E_1	0	0	0.002535	0.864953	1.816202	2.984069	2.654364
N232E_1	0	0	0.002986	0.396396	0.411945	0.42109	4.548935
N233E_1	0	0	0.006421	1.02865	0.464872	2.490481	1.610518
N234E_1	0	0	0.004642	1.071868	1.526404	1.642752	0.63371
N235E_1	0	0	0	1.634843	0.480648	1.674944	0.985628
N236E_1	0	0	0.004328	1.166732	0.867571	1.2451	1.58132
N237E_1	0	0.000284	0.002743	1.382313	0.273098	0.619799	5.461519
N238E_1	0	0	0.002365	0.138054	1.218771	0.687922	1.281134

N239E_1		0	0.000128	0.005445	3.55656	1.314373	0.736699	0.753425
N241E_1		0	0.000128	0.00495	1.320156	0.331016	0.915875	1.332363
N242E_1		0	0.000169	0.003374	1.959169	0.166331	0.319434	1.013391
N243E_1		0	0	0.001174	1.286338	1.603114	1.067129	2.545529
N244E_1		0	0	0.020157	0.885433	1.110168	1.142692	1.858838
N245E_1		0	0.000156	0.001082	0.237614	0.360275	0.671792	2.873411
N247E_2		0	0.000107	0.004216	0.247196	1.321152	0.972867	0.926548
N248E_2		0	0	0.001756	0.264963	1.250571	0.716003	1.141921

利用随机森林模型计算这6个潜在的生物标记物对于肥胖组和正常组的分型能力，分型能力结果（从高往低排列）如表3所示，表中的标记物至少要采用前面的4种标记物进行检测（图9），这样才能保持较高的灵敏度和特异性。

表3 潜在标记物的分型能力

代谢物(质荷比) (amu)	正常组解释值	肥胖组解释值	MeanDecreaseAccuracy (准确率)	MeanDecreaseGini (基尼值)
310.04	0.168808	0.203038	0.180087	17.56405
311.05	0.111137	0.137121	0.119923	14.38203
220.00	0.023173	0.020618	0.021529	3.634677
170.03	0.017363	0.015979	0.016477	3.425181
255.03	0.010633	0.005938	0.008497	3.596366
247.09	0.007744	0.006723	0.007192	2.095741

若随机去掉训练集中的质荷比，比如310.04和311.05，得到ROC测试集（上述83个测试集样本）的AUC=0.8851，AUC明显降低，FN=0.184和FP=0.200，FN和FP明显增大（图8），冠心病诊断能力明显降低。

参考文献:

[1] Finegold, JA; Asaria, P; Francis, DP. Mortality from ischaemic heart disease by country, region, and age: Statistics from World Health Organisation and United Nations. International journal of cardiology. 4 December 2012, 168 (2): 934–45.

[2] World Health Organization Department of Health Statistics and Informatics in the Information, Evidence and Research Cluster. The global burden of disease 2004 update. Geneva: WHO. 2004. ISBN 92-4-156371-0.

[3] Elizabeth Barrett-Connor. Gender differences and disparities in all-cause and coronary heart disease mortality: epidemiological

aspects. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.** 2013 Aug;27(4):481-500.

[4] Madjid M, Willerson JT. Inflammatory markers in coronary heart disease. **Br Med Bull.** 2011;100:23-38. doi: 10.1093/bmb/ldr043. Epub 2011 Oct 18.

[5] Spoletini I1, Vitale C, Rosano GM. Biomarkers for predicting postmenopausal coronary heart disease. **Biomark Med.** 2011 Aug;5(4):485-95. doi: 10.2217/bmm.11.51.

[6] Kishore Kumar Pasikanti, Kesavan Esuvaranathan, Paul C. Ho, et al. Noninvasive urinary metabonomic diagnosis of human bladder cancer. **Journal of Proteome Research**, 2010, 9, 2988–2995.

[7] Liaw, Andy & Wiener, Matthew. Classification and Regression by randomForest, **R News** (2002), Vol. 2/3 p. 18.

[8] Jianguo Xia, David I. Broadhurst, Michael Wilson, David S. Wishart. Translational biomarker discovery in clinical metabolomics: an introductory tutorial. **Metabolomics** (2013) 9:280–299.

权 利 要 求

1. 生物标志组合物，其至少含有选自以下生物标志物1~6中的一种或数种：

生物标志物1，其质荷比为 $310.04 \pm 0.4\text{amu}$ ，保留时间为 $611.25 \pm 60\text{s}$ ；
生物标志物2，其质荷比为 $311.05 \pm 0.4\text{amu}$ ，保留时间为 $611.26 \pm 60\text{s}$ ；
生物标志物3，其质荷比为 $220.00 \pm 0.4\text{amu}$ ，保留时间为 $122.77 \pm 60\text{s}$ ；
生物标志物4，其质荷比为 $247.09 \pm 0.4\text{amu}$ ，保留时间为 $146.37 \pm 60\text{s}$ ；
生物标志物5，其质荷比为 $255.03 \pm 0.4\text{amu}$ ，保留时间为 $117.92 \pm 60\text{s}$ ；
生物标志物6，其质荷比为 $170.03 \pm 0.4\text{amu}$ ，保留时间为 $202.18 \pm 60\text{s}$ 。

2. 权利要求1的生物标志组合物，其至少含有生物标志物1~3和6；
任选地，还含有生物标志物4和/或生物标志物5。

3. 权利要求1的生物标志组合物，其含有生物标志物1~6。

4. 试剂组合物，其含有用于检测权利要求1-3任一项的生物标志组合物的试剂。

5. 权利要求1-3任一项的生物标志组合物和/或权利要求4的试剂组合物用于制备试剂盒的用途，所述试剂盒用于冠心病的患病风险评估、诊断、早期诊断或病理分期。

6. 权利要求5的用途，所述试剂盒还包括冠心病受试者和正常受试者的权利要求1-3任一项的生物标志组合物含量的训练集数据。

7. 权利要求6的用途，其中所述的训练集数据如表2所示。

8. 一种用于冠心病的患病风险评估、诊断、早期诊断或病理分期

的方法，所述方法包括测定受试者样本（例如血浆、全血）中权利要求 1-3 任一项的生物标志组合物中各生物标志物的含量的步骤。

9. 权利要求 8 的方法，其中测定受试者样本（例如血浆、全血）中权利要求 1-3 任一项的生物标志组合物中各生物标志物的含量的方法为液相色谱质谱联用的方法。

10. 权利要求 8 的方法，所述方法还包括建立冠心病受试者和正常受试者样本（例如血浆、全血）的权利要求 1-3 任一项的生物标志组合物含量的训练集的步骤。

11. 权利要求 10 的方法，其中所述训练集是利用多元统计分类模型(例如随机森林模型)建立的训练集。

12. 权利要求 11 的方法，其中所述训练集的数据如表 2 所示。

13. 权利要求 7-12 任一项的方法，所述方法还包括将受试者样本（例如血浆、全血）中权利要求 1-3 任一项的生物标志组合物中各生物标志物的含量与训练集数据进行比较的步骤，所述训练集是指冠心病受试者和正常受试者样本的权利要求 1-3 任一项的生物标志组合物含量的训练集。

14. 权利要求 13 的方法，其中所述训练集是利用多元统计分类模型(例如随机森林模型)建立的训练集。

15. 权利要求 14 的方法，其中所述训练集的数据如表 2 所示。

16. 权利要求 13-15 任一项的方法，其中所述进行比较是指采用受试者工作特征曲线进行比较。

17. 权利要求 16 的方法，其中比较步骤的结果判定方法为，若假定受试者为非冠心病患者，进行 ROC 诊断得到的非冠心病患者的概率小于 0.5 或者患冠心病的概率大于 0.5，则表明原假定的受试者患冠心病的概率大、风险较高或者诊断为冠心病患者。

18. 权利要求 1-3 任一项的生物标志组合物，用于冠心病的患病风险评估、诊断、早期诊断或病理分期。

19. 权利要求 18 的生物标志组合物，其中测定受试者样本（例如血浆、全血）中权利要求 1-3 任一项的生物标志组合物中各生物标志物的含量的方法为液相色谱质谱联用的方法。

20. 权利要求 18 的生物标志组合物，还包括建立冠心病受试者和正常受试者的权利要求 1-3 任一项的生物标志组合物含量的训练集的步骤。

21. 权利要求 20 的生物标志组合物，其中所述训练集是利用多元统计分类模型（例如随机森林模型）建立的训练集。

22. 权利要求 21 的生物标志组合物，其中所述训练集的数据如表 2 所示。

23. 权利要求 18-22 任一项的生物标志组合物，还包括将受试者样本（例如血浆、全血）中权利要求 1-3 任一项的生物标志组合物中各生物标志物的含量与训练集数据进行比较的步骤，所述训练集是指冠心病受试者和正常受试者样本的权利要求 1-3 任一项的生物标志组合物含量的训练集。

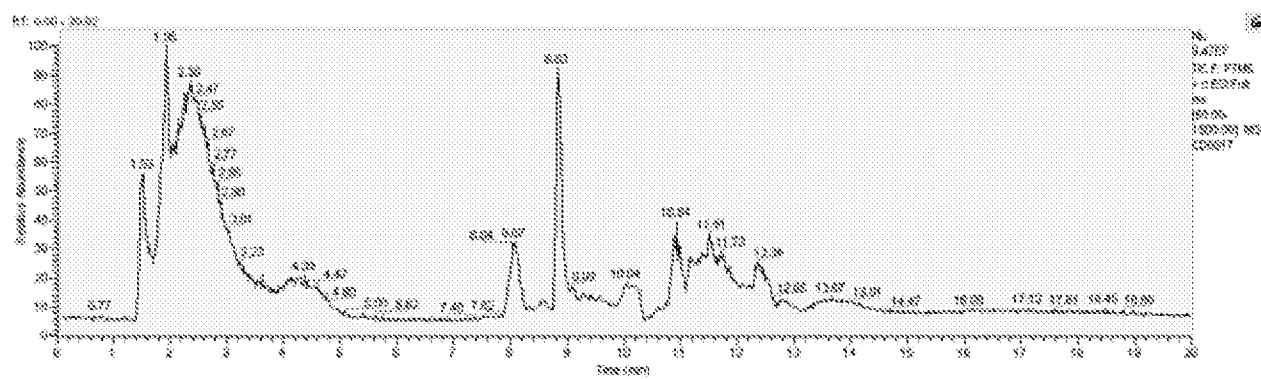
24. 权利要求 23 的生物标志组合物，其中所述训练集是利用多元

统计分类模型(例如随机森林模型)建立的训练集。

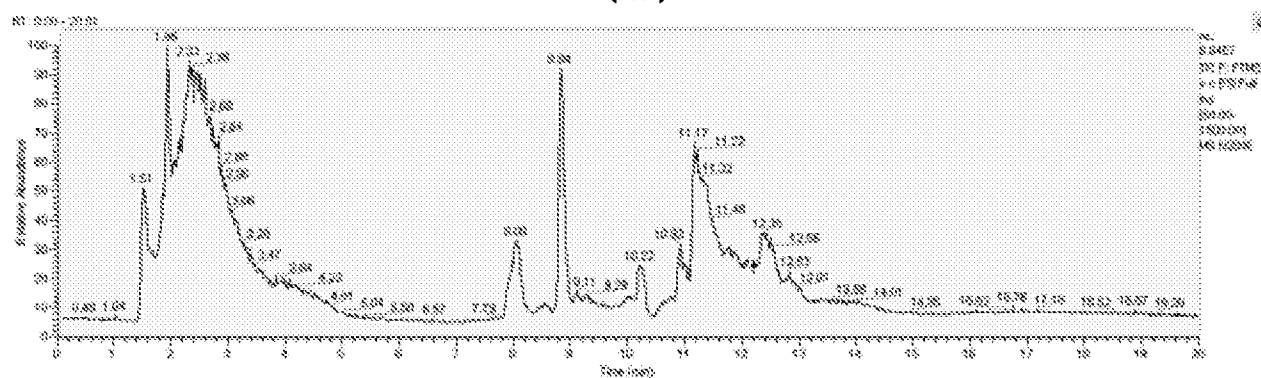
25. 权利要求 24 的生物标志组合物, 其中所述训练集的数据如表 2 所示。

26. 权利要求 23-25 任一项的生物标志组合物, 其中所述进行比较是指采用受试者工作特征曲线进行比较。

27. 权利要求 26 的生物标志组合物, 其中比较步骤的结果判定方法为, 若假定受试者为非冠心病患者, 进行 ROC 诊断得到的非冠心病患者的概率小于 0.5 或者患冠心病的概率大于 0.5, 则表明原假定的受试者患冠心病的概率大、风险较高或者诊断为冠心病患者。



(a)



(b)

图 1

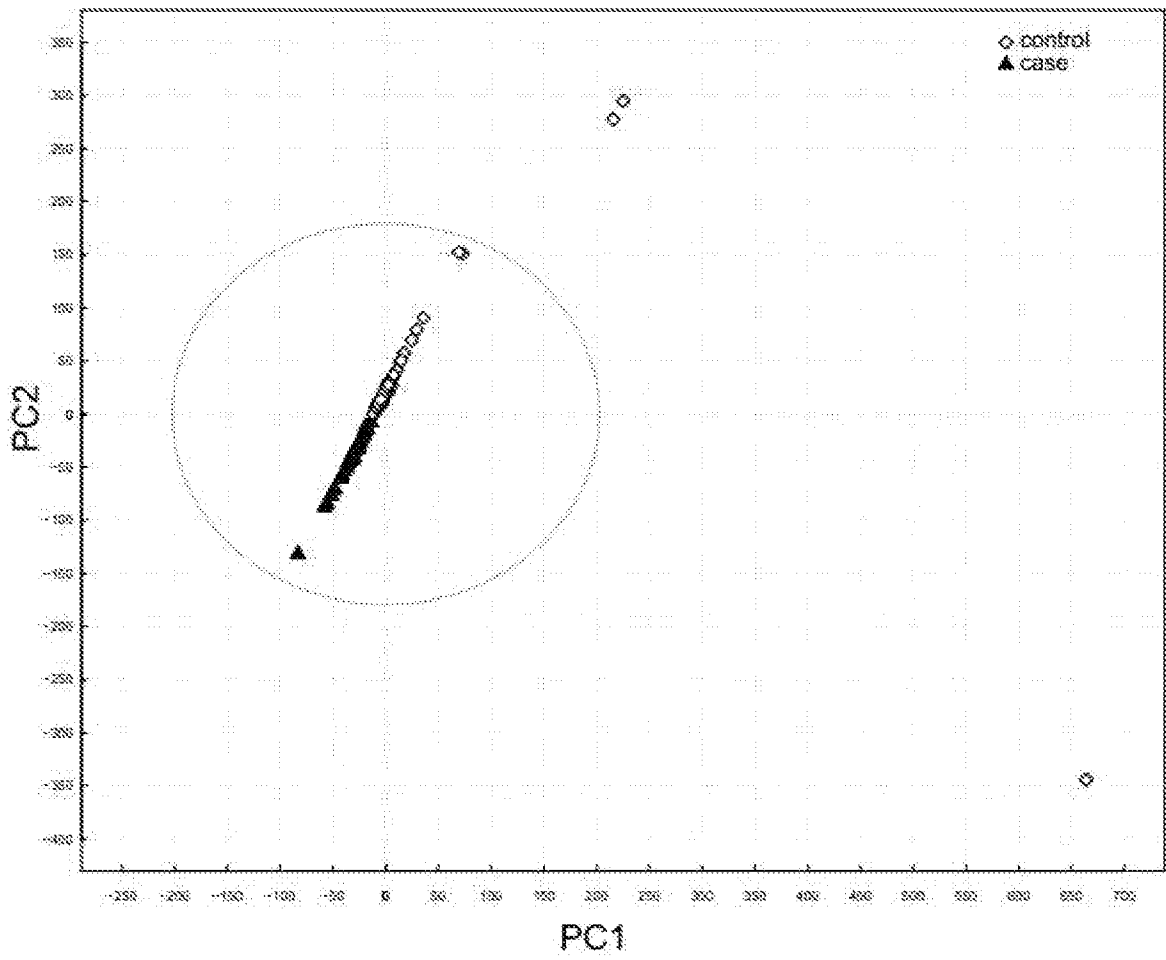


图2

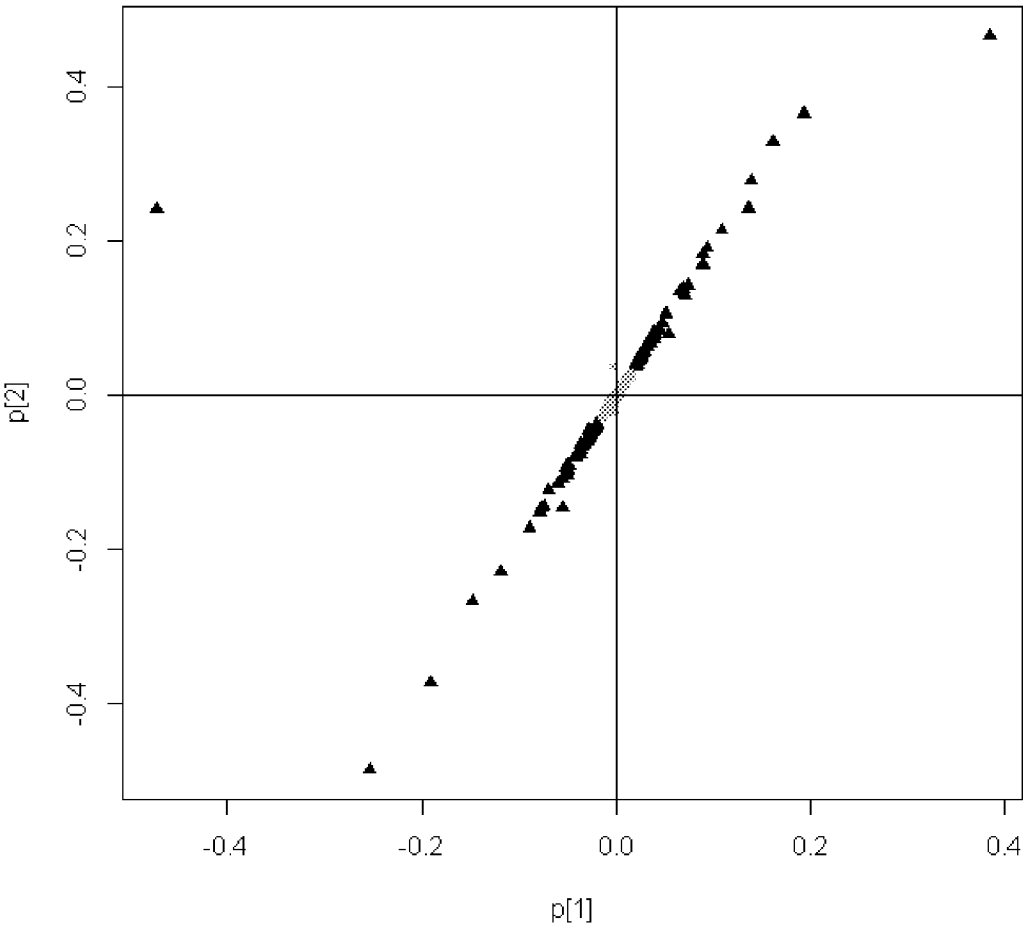


图3

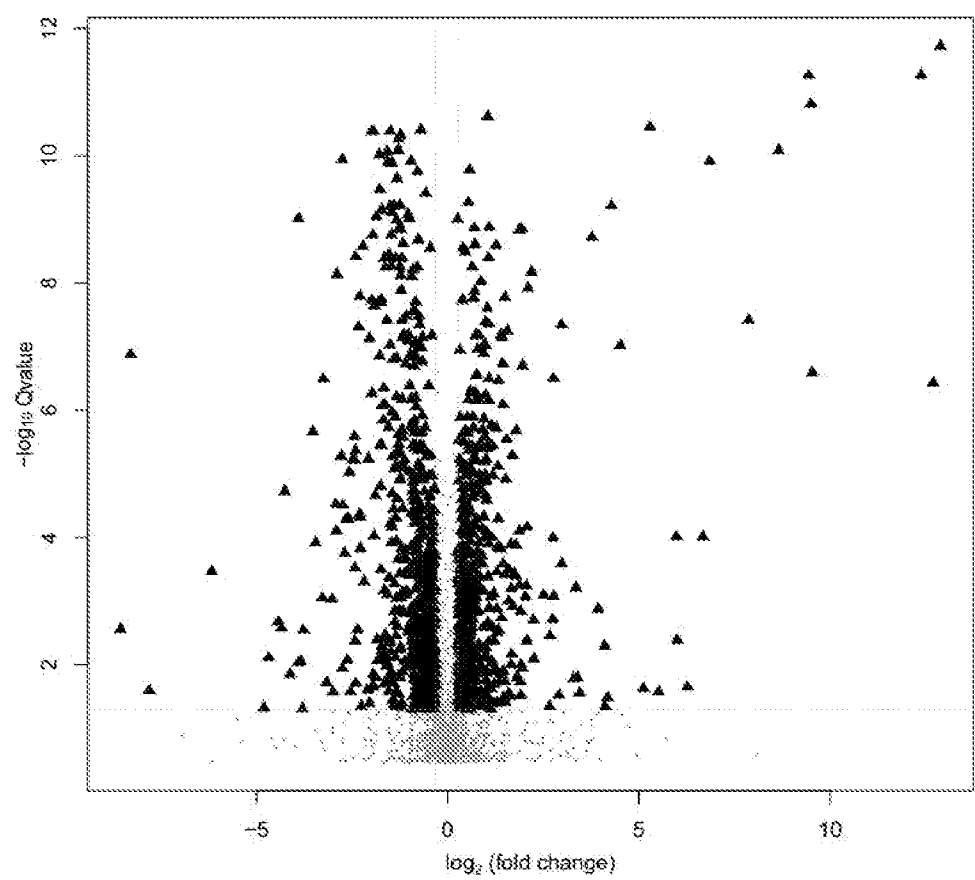


图4

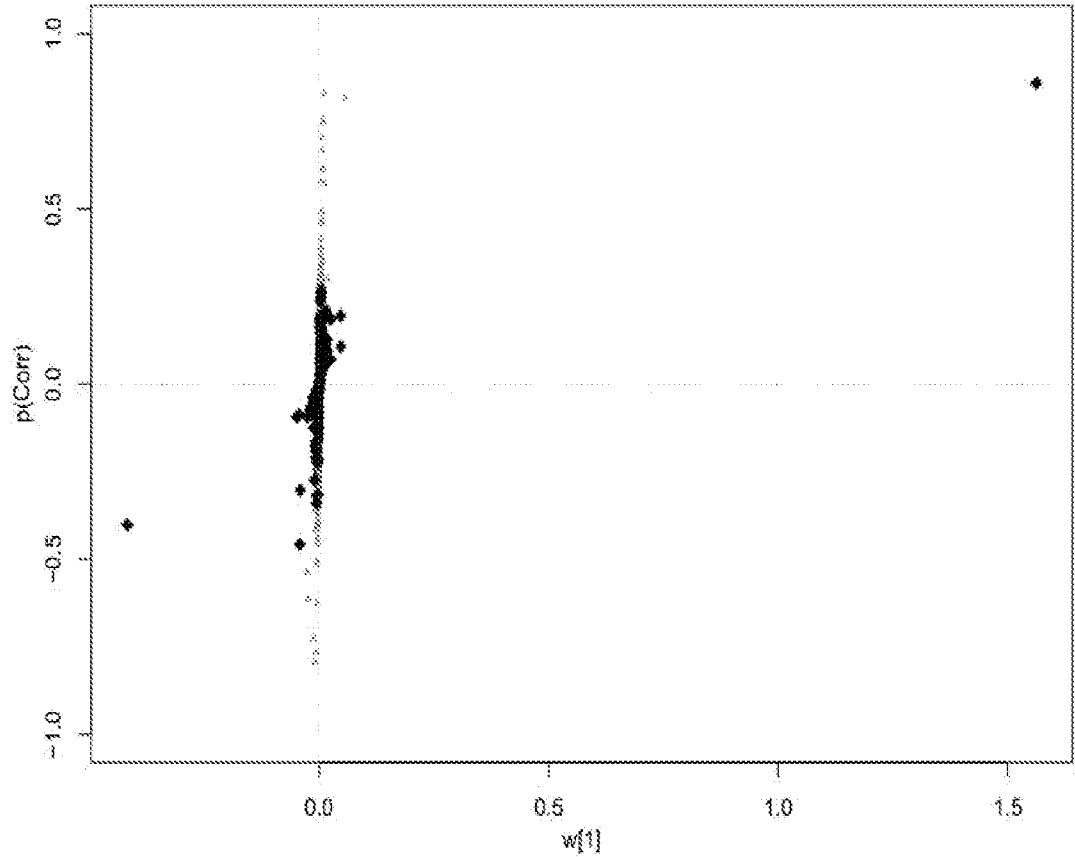


图5

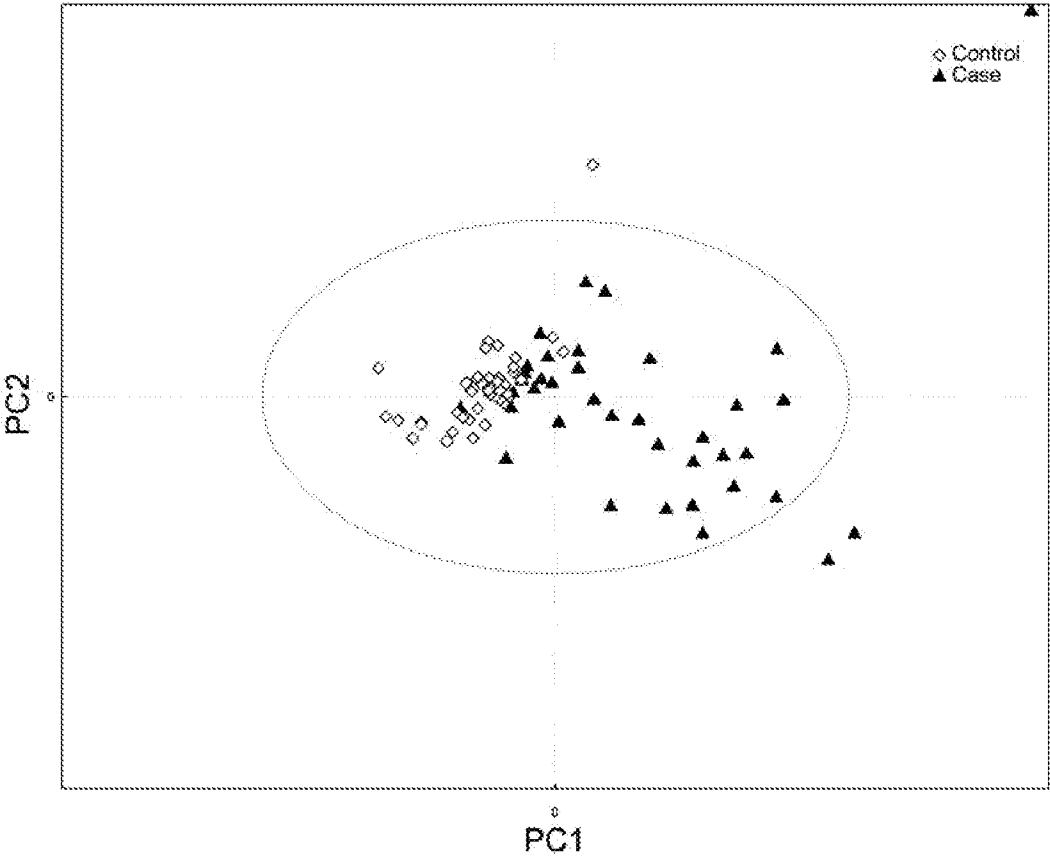


图6

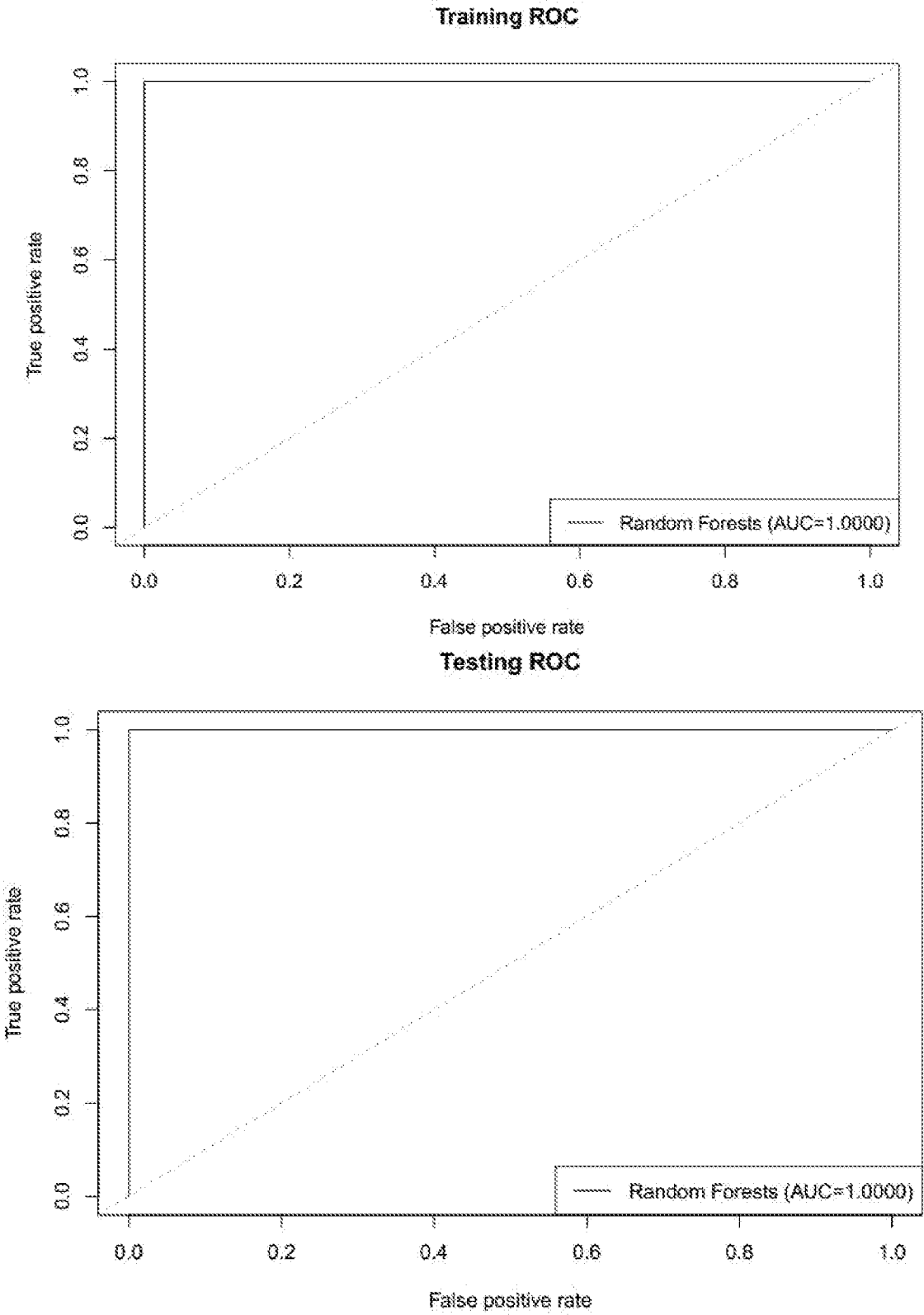


图 7

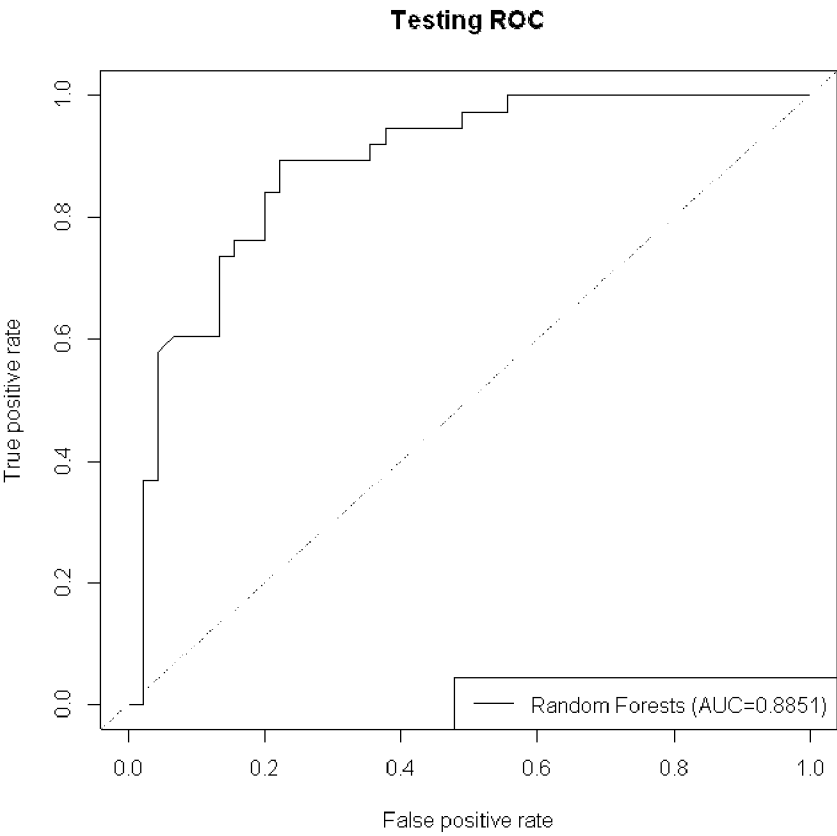


图8

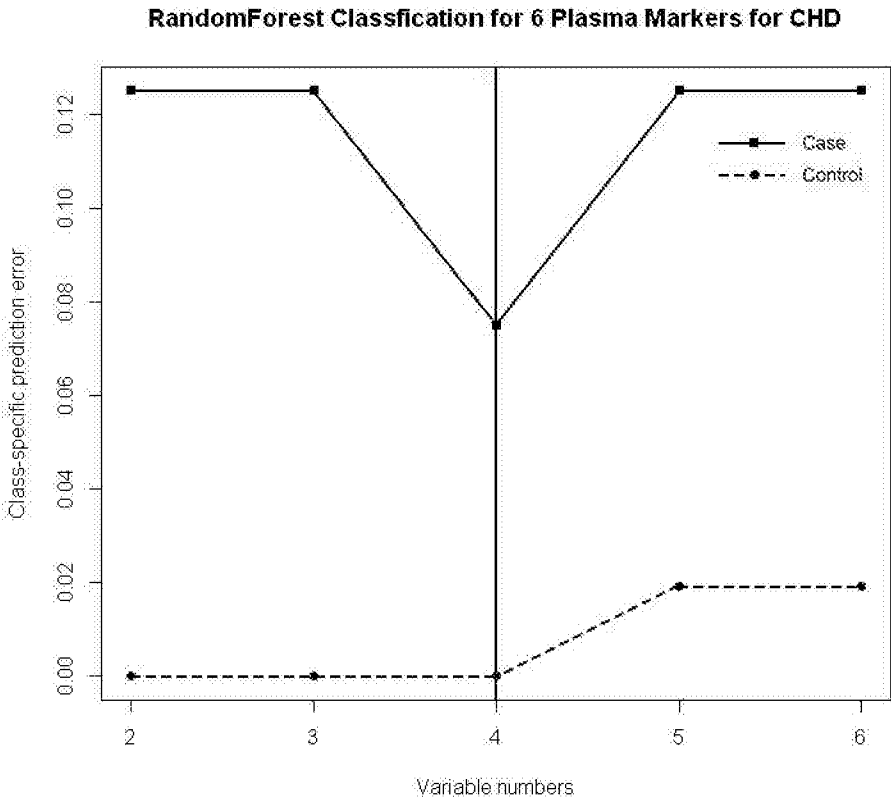


图9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2014/087853

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 30/02 (2006.01) i; G01N 30/62 (2006.01) i; G01N 33/48 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, EPODOC, CNPAT, CNKI: heart disease, marker, biomarker, metabonomic, metabolomic, diagnosis, m/z, karyoplasmic ratio, mass to charge, retention time, HPLC, MS, IPLC, liquid chromatography, mass spectrometry, BGI

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 102323351 A (BGI (SHENZHEN) CORP.) 18 January 2012 (18.01.2012) description, paragraphs [0018]-[0020] and [0050]-[0058]	4
A	CN 102323351 A (BGI (SHENZHEN) CORP.) 18 January 2012 (18.01.2012) description, paragraphs [0018]-[0020] and [0050]-[0058]	1-3, 5-27
A	CN 101769910 A (DALIAN INSTITUTE OF CHEMICAL PHYSICS, CHINESE ACADEMY OF SCIENCE) 07 July 2010 (07.07.2010) the whole description	1-27
A	W0 2013171586 A2 (UTI LIMITED PARTNERSHIP) 21 November 2013 (21.11.2013) the whole description	1-27

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 14 May 2015	Date of mailing of the international search report 17 June 2015
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer FENG, Mingyan Telephone No. (86-10) 01062413722

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/CN2014/087853

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Haleem JI et al. "Detection of Bladder Cancer in Human Urine by Metabolomic Profiling Using High Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry" The Journal of Urology, vol. 179, no. 6, 23 April 2008 (23.04.2008) the abstract, page 2423, the right column, the first and second paragraph	1-27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2014/087853

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 102323351 A	18 January 2012	None	
CN 101769910 A	07 July 2010	None	
WO 2013171586 A2	21 November 2013	WO 2013171586 A3	30 January 2014
		US 20150099668 A1	09 April 2015

A. 主题的分类 G01N 30/02(2006.01)i; G01N 30/62(2006.01)i; G01N 33/48(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类																				
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) G01N 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) WPI, EPDOC, CNPAT, CNKI: 冠心病, 标志物, 质荷比, 保留时间, 液质联用, 液相色谱, 质谱, 代谢物谱, 诊断, 华大基因, heart disease, marker, biomarker, metabonomic, metabolomic, diagnosis, m/z, karyoplasmic ratio, mass to charge, retention time, HPLC, MS, UPLC, liquid chromatography, mass spectrometry																				
C. 相关文件 <table border="1"> <thead> <tr> <th>类 型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>CN 102323351 A (深圳华大基因科技有限公司) 2012年 1月 18日 (2012 - 01 - 18) 说明书第0018-0020、0050-0058段</td> <td>4</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 102323351 A (深圳华大基因科技有限公司) 2012年 1月 18日 (2012 - 01 - 18) 说明书第0018-0020、0050-0058段</td> <td>1-3、5-27</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 101769910 A (中国科学院大连化学物理研究所等) 2010年 7月 7日 (2010 - 07 - 07) 说明书全文</td> <td>1-27</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2013171586 A2 (UTI LIMITED PARTNERSHIP) 2013年 11月 21日 (2013 - 11 - 21) 说明书全文</td> <td>1-27</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>Haleem JI et al. "Detection of Bladder Cancer in Human Urine by Metabolomic Profiling Using High Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry" The Journa of Urology, 第第179卷卷, 第第6期期, 2008年 4月 23日 (2008 - 04 - 23), 摘要, 第2423页右栏第1-2段</td> <td>1-27</td> </tr> </tbody> </table>			类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	X	CN 102323351 A (深圳华大基因科技有限公司) 2012年 1月 18日 (2012 - 01 - 18) 说明书第0018-0020、0050-0058段	4	A	CN 102323351 A (深圳华大基因科技有限公司) 2012年 1月 18日 (2012 - 01 - 18) 说明书第0018-0020、0050-0058段	1-3、5-27	A	CN 101769910 A (中国科学院大连化学物理研究所等) 2010年 7月 7日 (2010 - 07 - 07) 说明书全文	1-27	A	WO 2013171586 A2 (UTI LIMITED PARTNERSHIP) 2013年 11月 21日 (2013 - 11 - 21) 说明书全文	1-27	A	Haleem JI et al. "Detection of Bladder Cancer in Human Urine by Metabolomic Profiling Using High Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry" The Journa of Urology, 第第179卷卷, 第第6期期, 2008年 4月 23日 (2008 - 04 - 23), 摘要, 第2423页右栏第1-2段	1-27
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																		
X	CN 102323351 A (深圳华大基因科技有限公司) 2012年 1月 18日 (2012 - 01 - 18) 说明书第0018-0020、0050-0058段	4																		
A	CN 102323351 A (深圳华大基因科技有限公司) 2012年 1月 18日 (2012 - 01 - 18) 说明书第0018-0020、0050-0058段	1-3、5-27																		
A	CN 101769910 A (中国科学院大连化学物理研究所等) 2010年 7月 7日 (2010 - 07 - 07) 说明书全文	1-27																		
A	WO 2013171586 A2 (UTI LIMITED PARTNERSHIP) 2013年 11月 21日 (2013 - 11 - 21) 说明书全文	1-27																		
A	Haleem JI et al. "Detection of Bladder Cancer in Human Urine by Metabolomic Profiling Using High Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry" The Journa of Urology, 第第179卷卷, 第第6期期, 2008年 4月 23日 (2008 - 04 - 23), 摘要, 第2423页右栏第1-2段	1-27																		
☐ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。																				
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件																				
国际检索实际完成的日期 2015年 5月 14日		国际检索报告邮寄日期 2015年 6月 17日																		
ISA/CN的名称和邮寄地址 中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 中国 传真号 (86-10)62019451		授权官员 封明艳 电话号码 (86-10)01062413722																		

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2014/087853

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN	102323351	A	2012年 1月 18日	无	
CN	101769910	A	2010年 7月 7日	无	
WO	2013171586	A2	2013年 11月 21日	WO	2013171586 A3 2014年 1月 30日
				US	20150099668 A1 2015年 4月 9日