



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104114686 A

(43) 申请公布日 2014. 10. 22

(21) 申请号 201280065796. 8

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2012. 11. 07

C12M 1/34 (2006. 01)

(30) 优先权数据

61/556, 810 2011. 11. 07 US

61/584, 165 2012. 01. 06 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 07. 02

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/063935 2012. 11. 07

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/070760 EN 2013. 05. 16

(71) 申请人 夏尔人类遗传性治疗公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 P·哈斯利特 C·理查德

(74) 专利代理机构 北京商专永信知识产权代理
事务所(普通合伙) 11400

代理人 郭玥 葛强

权利要求书5页 说明书25页 附图10页

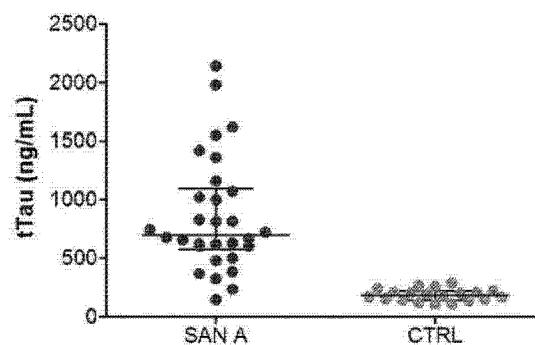
(54) 发明名称

Sanfilippo 综合征的生物标志物及其用途

(57) 摘要

本发明提供了有效且准确表征 Sanfilippo 综合征的生物标志物。具体地, 本发明提供了在 Sanfilippo 综合征中差异表达的生物标志物。单独或组合使用的那些生物标志物可以允许更准确可靠表征 Sanfilippo 综合征, 导致更精确确定该综合征的类型和 / 或严重度。此外, 根据本发明的创造性生物标志物可用于有效监测 Sanfilippo 综合征患者中的治疗响应和 / 或优化 Sanfilippo 综合征的治疗。

总Tau



1. 一种表征 Sanfilippo 综合征的方法,包括
测量获自受试者的样品中一种或多种生物标志物的水平,其中所述一种或多种生物标志物选自表 1 所列的那些及其组合,
基于所测量的所述一种或多种生物标志物的水平与对照水平对比,确定所述受试者中 Sanfilippo 综合征的严重程度。
2. 权利要求 1 所述的方法,其中所述一种或多种生物标志物包括选自表 1 的至少两种生物标志物。
3. 权利要求 1 所述的方法,其中所述一种或多种生物标志物包括选自表 1 的至少三种生物标志物。
4. 权利要求 1 所述的方法,其中所述一种或多种生物标志物包括选自表 1 的至少四种生物标志物。
5. 前述权利要求任一项所述的方法,其中所述一种或多种生物标志物包括选自 Tau、磷酸化 Tau (p181)、钙结合蛋白 D-28K 或肝细胞生长因子的至少一种生物标志物。
6. 前述权利要求任一项所述的方法,其中所述一种或多种生物标志物包括选自 Tau、磷酸化 Tau (p181)、钙结合蛋白 D-28K 或肝细胞生长因子的至少两种生物标志物。
7. 前述权利要求任一项所述的方法,其中所述一种或多种生物标志物包括选自 Tau、磷酸化 Tau (p181)、钙结合蛋白 D-28K 或肝细胞生长因子的至少三种生物标志物。
8. 前述权利要求任一项所述的方法,其中所述一种或多种生物标志物包括 Tau、磷酸化 Tau (p181) 和肝细胞生长因子。
9. 前述权利要求任一项所述的方法,其中所述一种或多种生物标志物包括 Tau、磷酸化 Tau (p181)、钙结合蛋白 D-28K 和肝细胞生长因子。
10. 前述权利要求任一项所述的方法,其中测量所述一种或多种生物标志物的蛋白表达水平。
11. 权利要求 10 所述的方法,其中通过使用特异性结合所述一种或多种生物标志物的一种或多种抗体进行免疫测定来测量所述一种或多种生物标志物的蛋白表达水平。
12. 权利要求 10 所述的方法,其中通过进行 2D- 凝胶电泳来测量所述一种或多种生物标志物的蛋白表达水平。
13. 权利要求 1-9 任一项所述的方法,其中测量所述一种或多种生物标志物的核酸表达水平。
14. 权利要求 13 所述的方法,其中通过杂交测量所述一种或多种生物标志物的核酸表达水平。
15. 权利要求 13 所述的方法,其中通过 RT-PCR 扩增测量所述一种或多种生物标志物的核酸表达水平。
16. 前述权利要求任一项所述的方法,其中所述样品获自脑脊液 (CSF)、细胞、组织、全血、漱口水、血浆、血清、尿、粪便、唾液、脐带血、绒毛样品、绒毛样品培养物、羊水、羊水培养物、经子宫颈灌洗液及其组合。
17. 前述权利要求任一项所述的方法,其中所述样品是脑脊液 (CSF) 样品。
18. 权利要求 1-16 任一项所述的方法,其中所述样品是外周血样品。
19. 前述权利要求任一项所述的方法,其中所述对照水平指示没有 Sanfilippo 综合征

的对照受试者中所述一种或多种生物标志物的水平。

20. 权利要求 19 所述的方法,其中所述对照水平是在获自一个或多个健康对照受试者的对照样品中相同条件下测量的所述一种或多种生物标志物的水平。

21. 权利要求 20 所述的方法,其中所述对照样品是从多个健康对照受试者汇集的样品。

22. 权利要求 19 所述的方法,其中所述对照水平是基于历史数据的数值参照。

23. 权利要求 19-22 任一项所述的方法,其中在所述样品中测量的所述一种或多种生物标志物的水平与所述对照水平之间的差异与所述受试者中 Sanfilippo 综合征的严重度相关联。

24. 权利要求 1-18 任一项所述的方法,其中所述对照水平指示罹患已知严重度的 Sanfilippo 综合征的对照受试者中所述一种或多种生物标志物的水平。

25. 权利要求 1-18 任一项所述的方法,其中所述对照水平是基于历史数据建立的指示预定 Sanfilippo 综合征疾病阶段的数值阈值。

26. 权利要求 1-18 任一项所述的方法,其中所述对照水平指示预定类型的 Sanfilippo 综合征。

27. 前述权利要求任一项所述的方法,其中所述一种或多种生物标志物与一种或多种其他标志物结合使用。

28. 权利要求 27 所述的方法,其中所述一种或多种其他标志物选自以下组成的组: GAG、 β -氨基己糖苷酶、LAMP1、LAMP2 及其组合。

29. 前述权利要求任一项所述的方法,其中确定 Sanfilippo 综合征严重度的步骤包括确定所述受试者中的 Sanfilippo 综合征是否是 A、B、C 或 D 型。

30. 权利要求 1-28 任一项所述的方法,其中所述 Sanfilippo 综合征是 A 型 Sanfilippo 综合征。

31. 权利要求 29 所述的方法,其中所述方法还包括鉴定受试者治疗方案的步骤。

32. 一种用于监测 Sanfilippo 综合征患者中治疗响应的方法,包括:

测量获自接受 Sanfilippo 综合征治疗的 Sanfilippo 综合征患者的样品中一种或多种生物标志物的水平,其中所述一种或多种生物标志物选自表 1 所列的那些、GAG 及其组合,和基于测量的所述一种或多种生物标志物的水平与对照水平对比,维持或调整所述治疗。

33. 权利要求 32 所述的方法,其中维持或调整治疗的步骤包括维持所述治疗的剂量和/或频率。

34. 权利要求 32 所述的方法,其中维持或调整治疗的步骤包括增加所述治疗的剂量和/或频率。

35. 权利要求 32 所述的方法,其中维持或调整治疗的步骤包括减少所述治疗的剂量和/或频率。

36. 权利要求 32-35 任一项所述的方法,其中所述对照水平是在接受所述治疗之前所述 Sanfilippo 综合征患者中所述一种或多种生物标志物的水平。

37. 权利要求 32-35 任一项所述的方法,其中所述对照水平是在所述治疗期间的较早时间点测量的所述 Sanfilippo 综合征患者中所述一种或多种生物标志物的水平。

38. 权利要求 32-35 任一项所述的方法,其中所述对照水平是没有所述治疗的对照患者中所述一种或多种生物标志物的水平。

39. 权利要求 36-38 任一项所述的方法,其中所述一种或多种生物标志物的降低的水平指示所述患者对所述治疗具有积极响应。

40. 权利要求 36-38 任一项所述的方法,其中所述 Sanfilippo 综合征是 A 型 Sanfilippo 综合征。

41. 权利要求 40 所述的方法,其中所述治疗是酶替代疗法。

42. 权利要求 41 所述的方法,其中所述酶替代疗法包括施用重组乙酰肝素 N-硫酸酯酶(HNS) 蛋白。

43. 权利要求 42 所述的方法,其中所述重组 HNS 蛋白通过鞘内递送施用。

44. 权利要求 36-43 任一项所述的方法,其中所述样品选自以下组成的组:脑脊液(CSF)、细胞、组织、全血、血浆、血清、血液及其组合。

45. 权利要求 36-44 任一项所述的方法,其中所述样品是脑脊液(CSF) 样品。

46. 权利要求 36-44 任一项所述的方法,其中所述样品是外周血样品。

47. 权利要求 36-46 任一项所述的方法,其中所述一种或多种生物标志物包括 GAG。

48. 权利要求 36-46 任一项所述的方法,其中所述一种或多种生物标志物包括选自表 1 的至少一种生物标志物。

49. 权利要求 36-46 任一项所述的方法,其中所述一种或多种生物标志物包括选自 Tau、磷酸化 Tau (p181)、钙结合蛋白 D-28K 或肝细胞生长因子的至少一种生物标志物。

50. 权利要求 36-46 任一项所述的方法,其中所述一种或多种生物标志物包括选自 Tau、磷酸化 Tau (p181)、钙结合蛋白 D-28K 或肝细胞生长因子的至少两种生物标志物。

51. 权利要求 36-46 任一项所述的方法,其中所述一种或多种生物标志物包括选自 Tau、磷酸化 Tau (p181)、钙结合蛋白 D-28K 或肝细胞生长因子的至少三种生物标志物。

52. 权利要求 36-46 任一项所述的方法,其中所述一种或多种生物标志物包括选自 Tau、磷酸化 Tau (p181) 和肝细胞生长因子。

53. 权利要求 36-46 任一项所述的方法,其中所述一种或多种生物标志物包括选自 Tau、磷酸化 Tau (p181)、钙结合蛋白 D-28K 和肝细胞生长因子。

54. 权利要求 36-53 任一项所述的方法,其中测量所述一种或多种生物标志物的蛋白表达水平。

55. 权利要求 54 所述的方法,其中通过使用特异性结合所述一种或多种生物标志物的一种或多种抗体进行免疫测定来测量所述一种或多种生物标志物的蛋白表达水平。

56. 权利要求 36-53 任一项所述的方法,其中测量所述一种或多种生物标志物的核酸表达水平。

57. 一种试剂盒,包括:

用于测量选自表 1 所列那些及其组合的一种或多种生物标志物的水平的一种或多种试剂;和

指示预定 Sanfilippo 综合征的类型或阶段的对照水平,或用于测定所述一种或多种生物标志物的对照水平的对照样品。

58. 权利要求 57 所述的试剂盒,其中所述试剂盒还包括指示 Sanfilippo 综合征不存在

的附加对照水平,或者用于测定所述附加对照水平的附加对照样品。

59. 权利要求 57 或 58 所述的试剂盒,其中所述试剂盒还包括用于测量 GAG 的试剂。

60. 权利要求 57-59 任一项所述的试剂盒,其中所述一种或多种试剂测量所述一种或多种生物标志物的蛋白表达水平。

61. 权利要求 55 所述的试剂盒,其中所述一种或多种试剂包括与所述一种或多种生物标志物特异性结合的一种或多种抗体。

62. 权利要求 57-59 任一项所述的试剂盒,其中所述一种或多种试剂测量所述一种或多种生物标志物的核酸表达水平。

63. 权利要求 62 所述的试剂盒,其中所述一种或多种试剂包括与所述一种或多种生物标志物的 mRNA 特异性杂交的一种或多种寡核苷酸探针。

64. 一种用于监测 Sanfilippo 综合征患者中治疗响应的方法,包括:

测量获自接受 Sanfilippo 综合征治疗的 Sanfilippo 综合征患者的一种或多种神经发育生物标志物的水平,和

基于测量的所述一种或多种神经发育生物标志物的变化与对照受试者对比,维持或调整所述治疗。

65. 权利要求 64 所述的方法,其中所述一种或多种神经发育生物标志物包括脑解剖标志物。

66. 权利要求 64 所述的方法,其中所述脑解剖标志物指示脑容量。

67. 权利要求 66 所述的方法,其中所述脑容量选自以下组成的组:白质容量、灰质容量、皮质容量、复合脑室+CSF 容量、小脑容量、全脑容量及其组合。

68. 权利要求 64 所述的方法,其中所述对照水平是在接受所述治疗之前所述 Sanfilippo 综合征患者中所述一种或多种脑解剖标志物的水平。

69. 权利要求 64 所述的方法,其中所述对照水平是在所述治疗期间的较早时间点测量的所述 Sanfilippo 综合征患者中所述一种或多种脑解剖标志物的水平。

70. 权利要求 64 所述的方法,其中所述对照水平是没有所述治疗的对照患者中所述一种或多种脑解剖标志物的水平。

71. 权利要求 64-67 任一项所述的方法,其中所述一种或多种脑解剖标志物的降低的水平指示所述患者对所述治疗具有积极响应。

72. 权利要求 64-69 任一项所述的方法,其中所述 Sanfilippo 综合征是 A 型 Sanfilippo 综合征。

73. 权利要求 64-72 任一项所述的方法,其中所述治疗是酶替代疗法。

74. 权利要求 73 所述的方法,其中所述酶替代疗法包括施用重组乙酰肝素 N-硫酸酯酶(HNS) 蛋白。

75. 权利要求 74 所述的方法,其中所述重组 HNS 蛋白通过鞘内递送施用。

76. 权利要求 64-75 任一项所述的方法,其中维持或调整治疗的步骤包括维持所述治疗的剂量和/或频率。

77. 权利要求 64-75 任一项所述的方法,其中维持或调整治疗的步骤包括增加所述治疗的剂量和/或频率。

78. 权利要求 64-75 任一项所述的方法,其中维持或调整治疗的步骤包括减少所述治

疗的剂量和 / 或频率。

Sanfilippo 综合征的生物标志物及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2012 年 1 月 6 日提交的美国临时专利申请序号 61/584,165 和 2011 年 11 月 7 日提交的美国临时专利申请序号 61/556,810 的优先权,其每一个的整体在此通过引用并入。

[0003] 背景

[0004] 黏多糖沉积症 III (MPS-III) 还称为 Sanfilippo 综合征,是一种罕见的常染色体隐性溶酶体贮积病,由分解糖胺聚糖(以前叫黏多糖)硫酸乙酰肝素所需酶之一的缺陷引起。硫酸乙酰肝素是必需的细胞表面糖蛋白并且是形成和维持细胞外基质的关键组分,在细胞表面受体-配体相互作用中具有多种作用。已经鉴定了四种不同类型的 MPS-III :MPS-III A、B、C 和 D(还分别称为 A、B、C 和 D 型 Sanfilippo 综合征)。这四种 MPS-III 类型各自区别在于不同的酶缺陷。已知 A 型综合征 (MPS-III A) 是由于迄今发现的肝素 N- 硫酸酯酶基因中超过 70 个不同突变而发生的,所述突变降低或消除酶功能。已将 B 型综合征 (MPS-III B) 与酶 N- 乙酰基- α -D- 氨基葡萄糖苷酶的破坏相关联。已将 C 型综合征 (MPS-III C) 与乙酰基-CoA : α - 氨基葡萄糖苷乙酰基转移酶相关联。已将 D 型综合征 (MPS-III D) 与酶 N- 乙酰基葡萄糖胺-G- 硫酸酯酶相关联。所有这些酶参与硫酸乙酰肝素调控。

[0005] Sanfilippo 综合征的发病率在地区上差别很大,平均发病率为每 100,000 个新生儿中大约 1 例,A 型综合征 (MPS-III A) 占有病例的 60%。由于遗传疾病的性质,其在早期儿童发育期间显现,并导致寿命通常不超过十几岁到二十岁出头。尽管该疾病有不同的遗传原因,但该综合征的诊断和分期是有问题的,因为所有四种类型的 MPS-III 都被认为是临床上不能区分的。婴儿表现正常,并且儿童可能后来发生一些温和的面部畸形。通常与其他形式的黏多糖沉积症相关的关节僵硬和粗糙发质通常不存在,直至疾病晚期。在相对无症状的婴儿期和极早儿童期之后,患者通常出现发育迟缓和/或行为问题,随后逐渐的智力下降,导致严重痴呆,运动技能逐渐丧失和最终活动性丧失。主要是神经系统症状的微妙且非特异性的临床特征发病使得该病在早期难以诊断。目前用于诊断 MPS-III 的方法是基于用于测量酶水平和基因测序的测定法,两个都是昂贵且费时的。此外,硫酸乙酰肝素的原始累积触发了具有原发性 CNS 表现的知之甚少的病理性级联,这使之难以使用现有的诊断方法来准确评估疾病严重程度并为 Sanfilippo 综合征患者提供最佳治疗。

[0006] 因此,本领域需要发展更有效的指示 Sanfilippo 综合征和该综合征严重度的生物标志物。

[0007] 概述

[0008] 本发明提供了用于有效、准确且患者友好地表征 Sanfilippo 综合征的生物标志物。如下文实例中讨论的,本发明部分基于与 Sanfilippo 综合征相关的各种生物标志物的发现。不希望受任何特定理论束缚,预期这些生物标志物可以说明 Sanfilippo 综合征发生和发展的潜在病理级联和/或机理。因此,单独或组合使用的这些生物标志物可以允许更准确可靠地表征 Sanfilippo 综合征,导致更精确确定该综合征的类型和/或严重程度。此外,根据本发明的创造性生物标志物可用于有效监测 Sanfilippo 综合征患者中的治疗响应和/或

优化 Sanfilippo 综合征的治疗。

[0009] 一方面,本发明提供了一种表征 Sanfilippo 综合征的方法,其包括测量获自受试者的样品中一种或多种生物标志物的水平,其中所述一种或多种生物标志物选自表 1 所列的那些及其组合,并基于所测量的所述一种或多种生物标志物的水平与对照水平对比,确定所述受试者中 Sanfilippo 综合征的严重度。在一些实施方案中,所述一种或多种生物标志物包括选自表 1 的至少 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18 或 19 种生物标志物。

[0010] 在一些实施方案中,所述一种或多种生物标志物包括选自 Tau、磷酸化 Tau(p181)、钙结合蛋白 D-28K 或肝细胞生长因子的至少一种生物标志物。在一些实施方案中,所述一种或多种生物标志物包括选自 Tau、磷酸化 Tau(p181)、钙结合蛋白 D-28K 或肝细胞生长因子的至少两种生物标志物。在一些实施方案中,所述一种或多种生物标志物包括选自 Tau、磷酸化 Tau(p181)、钙结合蛋白 D-28K 或肝细胞生长因子的至少三种生物标志物。在一些实施方案中,所述一种或多种生物标志物包括 Tau、磷酸化 Tau(p181) 和肝细胞生长因子。在一些实施方案中,所述一种或多种生物标志物包括 Tau、磷酸化 Tau(p181)、钙结合蛋白 D-28K 和肝细胞生长因子。

[0011] 在一些实施方案中,测量所述一种或多种生物标志物的蛋白表达水平。在一些实施方案中,通过使用特异性结合所述一种或多种生物标志物的一种或多种抗体进行免疫测定来测量所述蛋白表达水平。在一些实施方案中,通过进行 2D- 凝胶电泳来测量所述一种或多种生物标志物的蛋白表达水平。在一些实施方案中,测量所述一种或多种生物标志物的核酸表达水平。在一些实施方案中,通过杂交测量所述一种或多种生物标志物的核酸表达水平。在一些实施方案中,通过扩增测量所述一种或多种生物标志物的核酸表达水平。在其他实施方案中,用于测量所述一种或多种生物标志物的核酸表达水平的扩增方法是 RT-PCR 扩增。而在其他实施方案中,用于测量所述一种或多种生物标志物的核酸表达水平的方法选自由以下组成的组:基于核酸序列的扩增 (NASBA)、转录介导的扩增 (TMA)、定量 PCR(qPCR)、实时 PCR、环介导的等温扩增 (LAMP)、TaqMan、Invader、InvaderPlus、滚环、链置换扩增 (SDA)、Q- β - 复制酶、解旋酶依赖性扩增 (HDA)、分支 DNA、水解 FRET 探针、连接酶链反应 (LCR)、简并寡核苷酸引物 PCR 或本领域技术人员已知的其他方法。

[0012] 在一些实施方案中,用于测量所述一种或多种生物标志物的样品是生物样品。在一些实施方案中,所述样品获自脑脊液 (CSF)、细胞、组织、全血、漱口水、血浆、血清、尿、粪便、唾液、脐带血、绒毛样品培养物、羊水、羊水培养物、经子宫颈灌洗液及其组合。在一些实施方案中,所述样品来自自由以下组成的组:脑脊液 (CSF)、细胞、组织、全血、漱口水、血浆、血清、尿、粪便、唾液、脐带血、绒毛样品培养物、羊水、羊水培养物或经子宫颈灌洗液。在一些实施方案中,所述样品是脑脊液 (CSF) 样品。在一些实施方案中,所述样品是外周血样品。

[0013] 在一些实施方案中,所述一种或多种生物标志物与对照水平对比,其中所述对照水平指示没有 Sanfilippo 综合征的对照受试者中一种或多种生物标志物的水平。在一些实施方案中,所述对照水平是在获自一个或多个健康对照受试者的对照样品中条件下测量的所述一种或多种生物标志物的水平。在一些实施方案中,所述对照样品是从多个健康对照受试者汇集的样品。而在其他实施方案中,所述对照水平是基于历史数据的数值参照。

[0014] 在一些实施方案中,样品中一种或多种生物标志物与对照水平相比升高。在一些实施方案中,在所述样品中测量的所述一种或多种生物标志物的水平与所述对照水平之间的差异与所述受试者中 Sanfilippo 综合征的严重度相关联。在一些实施方案中,所述对照水平指示罹患已知严重度的 Sanfilippo 综合征的对照受试者中所述一种或多种生物标志物的水平。在一些实施方案中,所述对照水平是基于历史数据建立的指示预定 Sanfilippo 综合征疾病阶段的数值阈值。在一些实施方案中,所述对照水平指示预定类型的 Sanfilippo 综合征。

[0015] 在一些实施方案中,所述一种或多种生物标志物与一种或多种其他标志物结合使用。在一些实施方案中,所述一种或多种其他标志物选自以下组成的组:糖胺聚糖 (GAG) (例如硫酸乙酰肝素)、 β -氨基己糖苷酶、溶酶体相关膜蛋白 1、溶酶体相关膜蛋白 2 及其组合。在一些实施方案中,确定 Sanfilippo 综合征严重度的步骤包括确定所述受试者中的 Sanfilippo 综合征是否是 A、B、C 或 D 型。在一些实施方案中,用于诊断受试者 Sanfilippo 综合征的方法还包括鉴定所述受试者治疗方案的步骤。

[0016] 另一方面,本发明提供了一种用于监测 Sanfilippo 综合征患者中治疗响应的方法,包括:测量获自接受 Sanfilippo 综合征治疗的 Sanfilippo 综合征患者的样品中一种或多种生物标志物的水平,其中所述一种或多种生物标志物选自表 1 所列的那些、糖胺聚糖 (GAG)、硫酸乙酰肝素及其组合,并基于测量的所述一种或多种生物标志物的水平与对照水平对比来维持或调整所述治疗。在一些实施方案中,维持或调整所述治疗的步骤包括维持所述治疗的剂量和 / 或频率。在一些实施方案中,维持或调整所述治疗的步骤包括增加所述治疗的剂量和 / 或频率。在一些实施方案中,维持或调整所述治疗的步骤包括减少所述治疗的剂量和 / 或频率。

[0017] 在一些实施方案中,所述对照水平是在接受所述治疗之前所述 Sanfilippo 综合征患者中所述一种或多种生物标志物的水平。在一些实施方案中,所述对照水平是在所述治疗期间的较早时间点测量的所述 Sanfilippo 综合征患者中所述一种或多种生物标志物的水平。在一些实施方案中,所述对照水平是没有所述治疗的对照患者中所述一种或多种生物标志物的水平。在一些实施方案中,所述 Sanfilippo 综合征患者中所述一种或多种生物标志物的水平与对照相比降低。在一些实施方案中,所述一种或多种生物标志物的降低的水平指示所述患者对所述治疗具有积极响应。在一些实施方案中,所述 Sanfilippo 综合征选自自由 A、B、C 或 D 型组成的组。在特定实施方案中,所述 Sanfilippo 综合征是 A 型 Sanfilippo 综合征。

[0018] 在一些实施方案中,所述治疗是酶替代疗法。在一些实施方案中,所述酶替代疗法包括施用重组乙酰肝素 N- 硫酸酯酶 (HNS) 蛋白。在其他实施方案中,所述酶替代疗法包括施用来自由以下组成的组的重组酶:乙酰肝素 G 硫酸酯酶、N- 乙酰基 - α -D- 氨基葡萄糖苷酶、乙酰基 -CoA : α - 氨基葡萄糖苷乙酰基转移酶、N- 乙酰基葡萄糖胺 -G- 硫酸酯酶和 / 或其组合。在一些实施方案中,所述重组酶通过鞘内递送施用。而在其他实施方案中,所述重组 HNS 蛋白通过鞘内递送施用。

[0019] 在一些实施方案中,获自 Sanfilippo 综合征患者的样品选自自由以下组成的组:脑脊液 (CSF)、细胞、组织、全血、血浆、血清、血液及其组合。在一些实施方案中,获自 Sanfilippo 综合征患者的样品是脑脊液 (CSF)。在一些实施方案中,获自 Sanfilippo 综合征

患者的样品是外周血样品。

[0020] 在一些实施方案中,所述一种或多种生物标志物包括糖胺聚糖 (GAG) 硫酸乙酰肝素。在一些实施方案中,所述一种或多种生物标志物包括选自表 1 的至少一种生物标志物。在一些实施方案中,所述一种或多种生物标志物包括选自 Tau、磷酸化 Tau (p181)、钙结合蛋白 D-28K 或肝细胞生长因子的至少一种生物标志物。在一些实施方案中,所述一种或多种生物标志物包括选自 Tau、磷酸化 Tau (p181)、钙结合蛋白 D-28K 或肝细胞生长因子的至少两种生物标志物。在一些实施方案中,所述一种或多种生物标志物包括选自 Tau、磷酸化 Tau (p181)、钙结合蛋白 D-28K 或肝细胞生长因子的至少三种生物标志物。在一些实施方案中,所述一种或多种生物标志物包括 Tau、磷酸化 Tau (p181) 和肝细胞生长因子。在一些实施方案中,所述一种或多种生物标志物包括 Tau、磷酸化 Tau (p181)、钙结合蛋白 D-28K 和肝细胞生长因子。

[0021] 在一些实施方案中,测量所述一种或多种生物标志物的蛋白表达水平。在一些实施方案中,通过使用特异性结合所述一种或多种生物标志物的一种或多种抗体进行免疫测定来测量所述蛋白表达水平。在一些实施方案中,通过进行 2D- 凝胶电泳来测量所述一种或多种生物标志物的蛋白表达水平。在一些实施方案中,测量所述一种或多种生物标志物的核酸表达水平。在一些实施方案中,通过杂交测量所述一种或多种生物标志物的核酸表达水平。在一些实施方案中,通过扩增测量所述一种或多种生物标志物的核酸表达水平。在其他实施方案中,用于测量所述一种或多种生物标志物的核酸表达水平的扩增方法是 RT-PCR 扩增。而在其他实施方案中,用于测量所述一种或多种生物标志物的核酸表达水平的方法选自由以下组成的组:基于核酸序列的扩增 (NASBA)、转录介导的扩增 (TMA)、定量 PCR (qPCR)、实时 PCR、环介导的等温扩增 (LAMP)、TaqMan、Invader、InvaderPlus、滚环、链置换扩增 (SDA)、Q- β - 复制酶、解旋酶依赖性扩增 (HDA)、分支 DNA、水解 FRET 探针、连接酶链反应 (LCR)、简并寡核苷酸引物 PCR 或本领域技术人员已知的其他方法。

[0022] 另一方面,本发明提供了一种试剂盒,包括:用于测量选自表 1 所列那些及其组合的一种或多种生物标志物的水平的一种或多种试剂,和指示预定 Sanfilippo 综合征的类型或阶段的对照水平,或用于测定所述一种或多种生物标志物的对照水平的对照样品。在一些实施方案中,所述试剂盒还包括指示 Sanfilippo 综合征不存在的附加对照水平,或者用于测定所述附加对照水平的附加对照样品。在一些实施方案中,所述试剂盒还包括用于测量糖胺聚糖 (GAG) 的试剂。在一些实施方案中,所述一种或多种试剂测量所述一种或多种生物标志物的蛋白表达水平。在一些实施方案中,所述一种或多种试剂包括与所述一种或多种生物标志物特异性结合的一种或多种抗体。在一些实施方案中,所述一种或多种试剂测量所述一种或多种生物标志物的核酸表达水平。在其他实施方案中,所述一种或多种试剂包括与所述一种或多种生物标志物的 mRNA 特异性杂交的一种或多种寡核苷酸探针。

[0023] 而在另一实施方案中,本发明提供了一种用于监测 Sanfilippo 综合征患者中治疗响应的方法,包括:测量获自接受 Sanfilippo 综合征治疗的 Sanfilippo 综合征患者的一种或多种神经发育生物标志物的水平,并基于测量的所述一种或多种神经发育生物标志物的变化与对照受试者对比来维持或调整所述治疗。

[0024] 在一些实施方案中,所述一种或多种神经发育生物标志物包括脑解剖标志物。在一些实施方案中,所述脑解剖标志物指示脑容量。在一些实施方案中,所述脑容量选自由以

下组成的组：白质容量、灰质容量、皮质容量、复合脑室 +CSF 容量、小脑容量、全脑容量及其组合。

[0025] 在一些实施方案中，所述对照水平是在接受所述治疗之前所述 Sanfilippo 综合征患者中所述一种或多种脑解剖标志物的水平。在一些实施方案中，所述对照水平是在所述治疗期间的较早时间点测量的所述 Sanfilippo 综合征患者中所述一种或多种脑解剖标志物的水平。在一些实施方案中，所述对照水平是没有所述治疗的对照患者中所述一种或多种脑解剖标志物的水平。

[0026] 在一些实施方案中，所述一种或多种脑解剖标志物的降低的变化指示所述患者对所述治疗具有积极响应。

[0027] 在一些实施方案中，所述 Sanfilippo 综合征是 A 型 Sanfilippo 综合征。

[0028] 在一些实施方案中，所述治疗是酶替代疗法。在一些实施方案中，所述酶替代疗法包括施用重组乙酰肝素 N-硫酸酯酶 (HNS) 蛋白。在一些实施方案中，所述重组 HNS 蛋白通过鞘内递送施用。

[0029] 在一些实施方案中，维持或调整治疗的步骤包括维持所述治疗的剂量和 / 或频率。在一些实施方案中，维持或调整治疗的步骤包括增加所述治疗的剂量和 / 或频率。在一些实施方案中，维持或调整治疗的步骤包括减少所述治疗的剂量和 / 或频率。

[0030] 如本申请中使用的，术语“约”和“大约”等效使用。本申请中使用的有或没有约 / 大约的任何数字表示涵盖相关领域普通技术人员理解的任何正常波动。

[0031] 本发明的其他特征、目的和优势在以下详述中是明显的。然而，应该理解，详述虽然指示本发明的实施方案，但其仅作为示例说明、而非限制给出。本发明范围内的各种变化和调整对于看过详述的本领域技术人员而言将变得明显。

[0032] 附图简述

[0033] 附图仅为示例说明目的，而不是限制。

[0034] 图 1. 针对日历年龄的心理年龄当量。针对 Sanfilippo 综合征受试者的实际日历年龄绘制心理年龄当量。

[0035] 图 2. 年龄相关的发育商下降。示例性数据，说明针对年龄（月）绘制的基线发育商，以检查 Sanfilippo 综合征受试者中年龄相关的下降。

[0036] 图 3. 年龄相关的发育商下降。附加的示例性数据，说明针对年龄（月）绘制的基线发育商，以检查 Sanfilippo 综合征受试者中年龄相关的下降。

[0037] 图 4. 非对比 Brian MRI。使用 FreeSurfer 软件的自动化容量分析。

[0038] 图 5. 脑皮质容量变化。示例性数据，说明在 6 岁之前和之后被诊断患有 Sanfilippo 综合征的儿童中针对年龄（月）绘制的脑皮质容量（灰质容量）变化。

[0039] 图 6. 脑皮质容量变化。示例性数据，说明在 6 岁之前和之后被诊断患有 Sanfilippo 综合征的儿童中针对年龄（岁）绘制的脑皮质容量（灰质容量）变化。

[0040] 图 7. 脑室和 CSF 容量变化。在 6 岁之前和之后被诊断患有 Sanfilippo 综合征的儿童中检查脑室和 CSF 容量变化。

[0041] 图 8. 白质变化。在 6 岁之前和之后被诊断患有 Sanfilippo 综合征的儿童中检查脑皮质容量（白质容量）变化。

[0042] 图 9. 小脑容量变化。在 6 岁之前和之后被诊断患有 Sanfilippo 综合征的儿童中

检查小脑容量变化。

[0043] 图 10. 全脑容量变化。在 6 岁之前和之后被诊断患有 Sanfilippo 综合征的儿童中检查全脑容量变化。

[0044] 图 11. 脑皮质容量对发育商。将每个受试者的脑皮质容量（灰质容量）与发育商对比。

[0045] 图 12. 脑室和 CSF 容量对发育商。将每个受试者的脑皮质容量（灰质容量）与发育商对比。

[0046] 图 13. 白质容量对发育商。将每个受试者的白质容量与发育商对比。

[0047] 图 14. 全脑容量对发育商。将每个受试者的全脑容量与发育商对比。

[0048] 图 15. 使用 Shire GAG 测定测试硫酸乙酰肝素糖胺聚糖。在研究中使用 Shire GAG 测定对每个受试者测定脑脊液中硫酸乙酰肝素糖胺聚糖的水平。

[0049] 图 16. 肝细胞生长因子蛋白水平的对比。从确认诊断 MPS-III A (SANA) 和年轻成人健康对照 (CTRL) 的受试者患者收集脑脊液 (CSF) 样品。从腰椎鞘内空间抽取 CSF 并使用基于 luminex 的基于多重珠的免疫测定来分析。测定每个样品内的肝细胞生长因子蛋白的浓度。

[0050] 图 17. 钙结合蛋白 D 蛋白水平的对比。从确认诊断 MPS-III A (SAN A) 和年轻成人健康对照 (CTRL) 的受试者患者收集脑脊液 (CSF) 样品。从腰椎鞘内空间抽取 CSF 并使用基于 luminex 的基于多重珠的免疫测定来分析。测定每个样品内的钙结合蛋白 D 蛋白的浓度。

[0051] 图 18. 总 Tau 蛋白水平的对比。从确认诊断 MPS-III A (SAN A) 和年轻成人健康对照 (CTRL) 的受试者患者收集脑脊液 (CSF) 样品。从腰椎鞘内空间抽取 CSF 并使用基于 luminex 的基于多重珠的免疫测定来分析。测定每个样品内的总 Tau 蛋白的浓度。

[0052] 图 19. 磷酸化 Tau 蛋白水平的对比。从确认诊断 MPS-III A (SAN A) 和年轻成人健康对照 (CTRL) 的受试者患者收集脑脊液 (CSF) 样品。从腰椎鞘内空间抽取 CSF 并使用基于 luminex 的基于多重珠的免疫测定来分析。测定每个样品内的磷酸化 Tau 蛋白的浓度。

[0053] 定义

[0054] 为了使本发明更容易被理解, 首先定义一些术语。以下术语和其他术语的附加定义在整个说明书中提出。

[0055] 抗体: 如本文使用的, 术语“抗体”指由基本上由免疫球蛋白基因或免疫球蛋白基因片段编码的一种或多种多肽组成的多肽。公认的免疫球蛋白基因包括 κ 、 λ 、 α 、 γ 、 δ 、 ϵ 和 μ 恒定区基因以及无数免疫球蛋白可变区基因。轻链通常被分类为 κ 或 λ 。重链通常被分类为 γ 、 μ 、 α 、 δ 或 ϵ , 其反过来分别定义免疫球蛋白类别 IgG、IgM、IgA、IgD 和 IgE。已知典型的免疫球蛋白 (抗体) 结构单元包括四聚体。每个四聚体包括两个相同的多肽链对, 每对具有一个“轻”链 (约 25kD) 和一个“重”链 (约 50-70kD)。每个链的 N 端定义了主要负责抗原识别的约 100 至 110 或更多氨基酸的可变区。术语“可变轻链” (VL) 和“可变重链” (VH) 分别指这些轻链和重链。抗体可以特异性针对特定抗原。抗体或其抗原可以是分析物或结合配偶体。抗体作为完整的免疫球蛋白或作为通过各种肽酶消化产生的许多充分表征的片段而存在。因此, 例如, 胃蛋白酶在铰链区中二硫键之下消化抗体以产生 F(ab)'₂, 自身是通过二硫键与 VH-CH1 结合的轻链的 Fab 的二聚体。可以在

温和条件下还原 F(ab)'₂ 以破坏铰链区中的二硫键,从而将 F(ab)'₂ 二聚体转化成 Fab' 单体。Fab' 单体本质上是具有铰链区部分的 Fab(关于其他抗体片段的更详细描述,参见 Fundamental Immunology, W.E. Paul 编辑, Raven Press, N.Y. (1993))。虽然以完整抗体消化的方式定义了各种抗体片段,但是本领域普通技术人员将理解,这种 Fab' 片段可以通过化学或通过利用重组 DNA 方法从头合成。因此,如本文使用的,术语“抗体”还包括通过完整抗体修饰产生的或者使用重组 DNA 方法从头合成的抗体片段。在一些实施方案中,抗体是单链抗体,例如其中可变重链和可变轻链结合在一起(直接或通过肽连接体)形成连续多肽的单链 Fv(scFv) 抗体。单链 Fv(scFv) 多肽是共价连接的 VH:VL 异二聚体,其可以从包括直接结合或通过肽编码连接体结合的 VH- 和 VL- 编码序列的核酸表达(参见例如, Huston 等人.(1988)Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85:5879-5883,其全部内容通过引用并入本文)。存在许多结构用于将来自抗体 V 区的天然聚合但化学分开的多肽轻链和多肽重链转化成 scFv 分子,其将折叠成基本类似于抗原结合位点结构的三维结构。参见例如,美国专利号 5,091,513 和 5,132,405 和 4,956,778。

[0056] 阵列:术语“阵列”、“微阵列”和“生物芯片”在本文可互换使用。它们指可杂交的阵列元素、优选多个已知序列的核酸分子在基底表面上的排列。术语“微阵列”更具体指小型化以需要显微镜检查供视觉评价的阵列。

[0057] 结合剂:如本文使用的,术语“结合剂”包括结合抗原或靶蛋白或肽的任何天然存在的、合成的或基因工程化的剂,例如蛋白。结合剂可以衍生自天然存在的抗体或者合成工程化的。结合蛋白或结合剂可以通过结合特定抗原而形成复合体并引发生物反应(例如,激动或拮抗特定的生物活性)而发挥类似于抗体的功能。结合剂或结合蛋白可以包括分离的片段、由抗体重链和轻链的可变区组成的“Fv”片段、其中轻链和重链可变区通过肽连接体连接的重组单链多肽分子(“ScFv 蛋白”)、和由模拟高变区的氨基酸残基组成的最小识别单位。如本文使用的,术语结合剂还可以包括通过完整抗体修饰产生的或者使用重组 DNA 方法从头合成的抗体片段。在一些实施方案中,抗体是单链抗体,例如其中可变重链和可变轻链结合在一起(直接或通过肽连接体)形成连续多肽的单链 Fv(scFv) 抗体。单链 Fv(scFv) 多肽是共价连接的 VH:VL 异二聚体,其可以从包括直接结合或通过肽编码连接体结合的 VH- 和 VL- 编码序列的核酸表达(参见例如, Huston 等人.(1988)Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85:5879-5883,其全部内容通过引用并入本文)。存在许多结构用于将来自抗体 V 区的天然聚合但化学分开的多肽轻链和多肽重链转化成 scFv 分子,其将折叠成基本类似于抗原结合位点结构的三维结构。参见例如,美国专利号 5,091,513 和 5,132,405 和 4,956,778。在一些实施方案中,如本文使用的术语结合剂还可以包括抗体。参见抗体的定义。

[0058] 生物标志物:如本文定义的,术语“生物标志物”指可用作疾病、发生疾病的风险、携带状态或治疗介入的响应的指示剂的物质(例如,蛋白或核酸)。通常,适合的生物标志物作为指示剂具有可以客观地测量和评价的特点。在一些实施方案中,生物标志物是一种有机生物分子,其在取自一种表型状态(例如,具有一种疾病)的受试者的样品中与另一种表型状态(例如,没有所述疾病)相比差异存在。如果计算不同组中生物标志物的平均或中值表达水平是统计学上显著的,则生物标志物在不同表型状态之间差异存在。常用的统计学显著性检验包括但不限于 t 检验、ANOVA、Kruskal-Wallis、Wilcoxon、Mann-Whitney、

比值比 (odds ratio)、线性判别分析 (Linear Discriminant Analysis)、二次判别分析 (Quadratic Discriminant Analysis) 和 K-邻近 (K-nearest neighbor)。单独或组合的生物标志物提供了受试者属于一种表型状态或另一种表型状态的相对风险的量度。因此,它们可用作疾病(诊断)、药物治疗效力(诊疗诊断)和药物毒性的标志物。

[0059] 脑解剖标志物:如本文使用的,术语“脑解剖标志物”指脑的任何解剖特征。在一些实施方案中,脑解剖标志物包括但不限于头盖骨内封闭的、与脊髓连续的且包括灰质和白质的中枢神经系统的任何部分。

[0060] 化合物和剂:术语“化合物”和“剂”在本文可互换使用。它们指任何天然存在或非天然存在的(即,合成或重组的)分子,例如生物大分子(例如核酸、多肽或蛋白),有机或无机分子,或从诸如细菌、植物、真菌或动物(特别是哺乳动物,包括人)细胞或组织的生物材料制成的提取物。化合物可以是单分子或者至少两个分子的混合物或复合物。

[0061] 对照:如本文使用的,术语“对照”具有其领域公认的、结果与之对比的标准的含义。通常,使用对照来增加实验中的完整性,通过分离变量以做出关于这些变量的结论。在一些实施方案中,对照是与测试反应或测定同时进行以提供对比的反应或测定。在一个实验中,应用“测试”(即,被测试的变量)。在第二个实验“对照”中,没有应用被测试的变量。在一些实施方案中,对照是历史对照(即,以前进行的测试或测定,或者以前已知的量或结果)。在一些实施方案中,对照是或包括印刷或以其他方式保存的记录。对照可以是阳性对照或隐性对照。

[0062] 诊断:如本文使用的,术语“诊断”指旨在确定个体是否罹患疾病或病痛的过程。在本发明上下文中,“Sanfilippo 综合征的诊断”指旨在以下的一个或多个的过程:确定个体是否罹患 Sanfilippo 综合征,鉴定 Sanfilippo 综合征亚型(即,亚型 A、B、C 或 D),并确定疾病的阶段(例如,早期 Sanfilippo 综合征或晚期 Sanfilippo 综合征)。

[0063] 差异表达的生物标志物:如本文使用的,术语“差异表达的生物标志物”当与 Sanfilippo 综合征一起使用时,指其表达水平在罹患 Sanfilippo 综合征的受试者(或受试者群体)中不同于其在健康或正常受试者(或健康或正常受试者群体)中的表达水平的生物标志物。该术语还涵盖其表达水平对于不同疾病亚型(即, Sanfilippo 综合征 A、B、C 或 D)有差异的生物标志物。该术语还涵盖其表达水平在疾病的不同阶段(例如,温和或早期 Sanfilippo 综合征、严重或晚期 Sanfilippo 综合征)有差异的生物标志物。差异表达包括在生物标志物的时间或细胞表达模式中的定量以及定性差异。如下文更详细描述,单独或与其他差异表达的生物标志物组合的差异表达的生物标志物可用于诊断、分期、治疗性药物开发和相关领域中的许多不同应用。本文公开的差异表达的生物标志物的表达模式可以描述为 Sanfilippo 综合征、Sanfilippo 综合征亚型、Sanfilippo 综合征阶段和 Sanfilippo 综合征严重度和/或进展的指纹或签名。它们可用作对比和表征未知样品和探求其进一步信息的样品的参考点。如本文使用的,术语“降低的表达水平”指如通过本文描述的一种或多种方法测量的至少 10%或更多、例如 20%、30%、40%、或 50%、60%、70%、80%、90%或更多的表达降低,或者大于 1 倍、2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、10 倍、50 倍、100 倍或更多的表达降低。如本文使用的,术语“增加的表达水平”指如通过一种或多种方法、例如本文描述的方法测量的至少 10%或更多、例如 20%、30%、40%、或 50%、60%、70%、80%、90%或更多的表达增加,或者大于 1 倍、2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、10 倍、50 倍、100 倍或更多的表达增加。

[0064] 酶替代疗法 (ERT) :如本文使用的,术语“酶替代疗法 (ERT)”指通过提供丢失的酶来校正酶缺陷的任何治疗策略。在一些实施方案中,通过鞘内施用来提供丢失的酶。在一些实施方案中,通过注入血流来提供丢失的酶。一旦施用,酶被细胞摄取并运输至溶酶体,酶在那里发挥作用以消除溶酶体中由于酶缺陷而累积的物质。通常,对于有效的溶酶体酶替代疗法,将治疗性酶递送至贮积缺陷明显的靶组织中适当细胞中的溶酶体。

[0065] 有效量 :如本文使用的,术语“有效量”指足以满足其预期目的的化合物或剂的量。在本发明上下文中,所述目的可以是例如 :调节至少一种创造性生物标志物的表达 ;和 / 或延迟或预防 Sanfilippo 综合征的发作 ;和 / 或减缓或停止 Sanfilippo 综合征症状的进展、加重或恶化 ;和 / 或缓解与 Sanfilippo 综合征相关的一种或多种症状 ;和 / 或带来 Sanfilippo 综合征症状的减轻,和 / 或治愈 Sanfilippo 综合征。

[0066] 提高,增加或减少 :如本文使用的,术语“提高”、“增加”或“减少”或语法等同物指示相对于基线测量的值,所述基线测量例如相同个体在开始本文所述治疗之前的测量或者对照个体 (或多个对照个体) 在缺乏本文所述治疗时的测量。“对照个体”是罹患与被治疗的个体相同形式的溶酶体贮积病 (例如, Sanfilippo 综合征) 的个体,其年龄与被治疗个体大致相同 (以保证被治疗个体与对照个体的疾病阶段相当)。

[0067] 鞘内施用 :如本文使用的,术语“鞘内施用”或“鞘内注射”指注射进入脊椎管 (脊髓周围的鞘内空间)。可以使用各种技术,包括但不限于通过钻孔或脑池或腰穿刺或类似方法的侧脑室注射。在一些实施方案中,根据本发明的“鞘内施用”或“鞘内递送”指通过腰区或腰部的 IT 施用或递送,即,腰 IT 施用或递送。如本文使用的,术语“腰部”或“腰区”指第三和第四腰椎骨之间的区域 (下背) 和更多包含脊骨的 L2-S1 部位。

[0068] 杂交 :术语“杂交”指两个单链核酸通过互补碱基配对的结合。术语“特异性杂交”指其中核酸分子在严格条件 (例如,在与杂交链具有较低程度互补性的竞争核酸存在下) 下与特定核酸序列优先结合、成双或杂交的过程。在本发明的某些实施方案中,这些术语更具体指其中来自测试样品的核酸片段 (或区段) 优先结合特定探针且较低程度或完全不结合其他探针的过程,例如当这些探针固定在阵列上时。

[0069] 试剂盒 :如本文使用的,术语“试剂盒”指用于递送材料的任何递送系统。在反应测定上下文中,此类递送系统包括允许贮存、运输或递送反应试剂 (例如,在适当容器中的寡核苷酸、酶等) 和 / 或支持材料 (例如,缓冲剂,用于进行测定的说明书等) 从一个地点至另一个地点的系统。例如,试剂盒包括含有相关反应试剂和 / 或支持材料的一个或多个密封器 (例如,盒子)。如本文使用的,术语“零散试剂盒”指包括两个或多个单独容器的递送系统,所述容器各自含有总试剂盒组分的子部分。可以将所述容器一起或单独递送至预期受体。例如,第一容器可以含有用于测定的酶,而第二容器含有寡核苷酸。术语“零散试剂盒”预期涵盖含有受美国联邦食品、药品和化妆品法案第 520 (e) 章管理的分析物特异性试剂 (ASR) 的试剂盒,但是不限于此。实际上,包括各自含有总试剂盒组分的子部分的两个或多个单独容器的任何递送系统包括在术语“零散试剂盒”中。相反,“组合试剂盒”指在单个容器中 (例如,在容纳每一种所需组分的单个盒子中) 含有所有反应组分的递送系统。术语“试剂盒”包括零散和组合的试剂盒。

[0070] 正常 :如本文使用的,术语“正常”当用于修饰术语“个体”或“受试者”时,它们指没有特定疾病或病症并且也不是所述疾病或病症的携带者的个体或个体组。术语“正常”在

本文还用于定性从正常或野生型个体或受试者分离的生物样本或样品,例如“正常的生物样品”。

[0071] 核酸:如本文使用的,指寡核苷酸、核苷酸或多核苷酸及其片段或部分,并且指可以是单链或双链并且代表有义或反义链的基因组或合成起源的 DNA 或 RNA。

[0072] 核酸分子:术语“核酸分子”和“多核苷酸”在本文可互换使用。它们指单链或双链形式的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸聚合物,并且除非另外说明,涵盖可以与天然存在的核苷酸相似的方式发挥功能的天然核苷酸的已知类似物。所述术语涵盖具有合成骨架的核酸样结构以及扩增产物。

[0073] 蛋白:一般而言,“蛋白”是多肽(即,通过肽键相互连接的一串至少两个氨基酸)。蛋白可以包括非氨基酸的部分(例如,可以是糖蛋白)和/或可以不同方式加工或修饰。本领域普通技术人员将理解,“蛋白”可以是细胞产生的完整多肽链(有或没有信号序列),或者可以是其功能部分。普通技术人员将进一步理解,蛋白有时可以包括例如通过一个或多个二硫键连接或通过其他方式结合的多于一个的多肽链。

[0074] 探针:如本文使用的,术语“探针”指已知序列的核酸分子,其可以是短 DNA 序列(即,寡核苷酸)、PCR 产物或 mRNA 分离物。探针是来自测试样品的核酸片段与之杂交的特异性 DNA 序列。探针通过一种或多种类型的化学键、通常通过氢键形成来特异性结合互补或基本互补序列的核酸。

[0075] 特异性检测表达水平的试剂:如本文使用的,术语“特异性检测表达水平的试剂”指用于检测一种或多种生物标志物的表达水平的一种或多种试剂。适合试剂的实例包括但不限于能够特异性结合感兴趣的标志物蛋白的抗体、能够特异性杂交感兴趣的多核苷酸序列的核酸探针、或能够特异性扩增感兴趣的多核苷酸序列的 PCR 引物。术语“扩增”在本文广义上用于表示产生/生成扩增产物。如本文使用的,“扩增”一般指生成想要序列、特别是样品的那些序列的多个拷贝的过程。

[0076] 样品:如本文使用的,术语“样品”涵盖从生物来源获得的任何样品。术语“生物样品”和“样品”在本文可互换使用。作为非限制性实例,生物样品可以包括脑脊液(CSF)、血液、羊水、浆液、尿、粪便、表皮样品、皮肤样品、面颊拭子、精液、羊水、培养的细胞、骨髓样品和/或绒毛。方便的生物样品可通过例如从口腔表面刮细胞来获得。任何生物样品的细胞培养物也可用作生物样品,例如绒毛样品培养物和/或羊水培养物,例如羊膜细胞培养物。生物样品还可以是例如从任何器官或组织(包括活检或尸检样本)获得的样品,可以包括细胞(无论是原始细胞还是培养的细胞)、任何细胞的条件培养基、组织或器官、组织培养物。在一些实施方案中,适合本发明的生物样品是已经被加工以释放或以其他方式可获得供本文所述检测的核酸。适合的生物样品可获自生命的阶段,例如胎儿、年轻成人、成人(例如,孕妇)等。还可以使用固定或冷冻的组织。

[0077] 受试者:如本文使用的,术语“受试者”指人或任何非人类动物(例如,小鼠、大鼠、兔、狗、猫、牛、猪、绵羊、马或灵长类动物)。人包括产前和产后的形式。在许多实施方案中,受试者是人。受试者可以是患者,指向医疗提供者寻求疾病诊断或治疗的人。术语“受试者”在本文与“个体”或“患者”可互换使用。受试者可罹患或易感疾病或疾患,但是可以或不表现出所述疾病或疾患的症状。

[0078] 系统:术语“系统”和“生物系统”在本文可互换使用。系统可以是表达或包

括至少一种创造性生物标志物的任何生物实体。在本发明上下文中,考虑体外、体内和离体系统;并且所述系统可以是细胞、生物液、生物组织或动物。例如,系统可以源自活的受试者(例如,它可以通过抽血或者通过进行针头活检来获得),或者源自患病受试者(例如,它可以在尸检时获得)。

[0079] 罹患:“罹患”疾病、疾患和/或病症的个体已经被诊断患有或表现出所述疾病、疾患和/或病症的一种或多种症状。

[0080] 治疗:如本文使用的,术语“治疗(treatment)”(也称为“治疗(treat)”或“治疗(treating)”)是指任意施用的治疗性蛋白质(例如溶酶体酶),其部分地或者完全地缓解、改善、减轻、抑制或者延缓特定疾病、疾患和/或病症(例如, Sanfilippo 综合征)的一种或多种症状或特征的发生,减少其严重度和/或减少其发病率。这种治疗可以针对不表现相关疾病、疾患和/或病症的体证的受试者,和/或仅表现所述疾病、疾患和/或病症的早期体证的受试者。可选择地或者额外地,这种治疗可以针对表现相关疾病、疾患和/或病症的一种或多种已建立的体证的受试者。

[0081] 详述

[0082] 本发明特别提供了在 Sanfilippo 综合征患者中差异表达的生物标志物以及使用此类生物标志物供诊断、治疗监测和/或优化的方法。在一些实施方案中,本文提供的创造性生物标志物可用于诊断 Sanfilippo 综合征(例如 A、B、C 和 D 型),确定所述综合征的严重程度、阶段和/或类型。在一些实施方案中,本文提供的创造性生物标志物可用于评价治疗效力,监测 Sanfilippo 综合征患者中的治疗响应和/或治疗优化。本文提供的创造性生物标志物可以单独或组合使用,含有或没有已知与溶酶体贮积病相关的其他生物标志物,作为一组生物标志物的部分。

[0083] 以下章节详细描述了本发明的各个方面。章节的使用不意味着限制本发明。每个章节可应用于本发明的任何方面。在本申请中,除非另外说明,“或”的使用表示“和/或”。

[0084] Sanfilippo 综合征的生物标志物

[0085] 适合本发明的生物标志物可以包括可用作 Sanfilippo 综合征的疾病状态、该综合征的严重程度或对治疗介入的响应的指示剂的任何物质(例如,蛋白或核酸)。通常,适当的生物标志物具有可以作为指示剂客观测量并评价的特点。通常,适当的 Sanfilippo 综合征的生物标志物在 Sanfilippo 综合征患者和正常健康个体之间差异表达。因此,在一些实施方案中,“差异表达分析”可用于鉴定 Sanfilippo 综合征的生物标志物。如本文使用的,术语“差异表达分析”指对比两个或多个样品(例如,获自 Sanfilippo 综合征患者的样品与获自健康对照个体的对照样品)中基因或蛋白表达水平或模式的方法。通常,如果两个样品之间的表达水平或模式的差异(例如,增加或减少)是统计学上显著的(即,所述差异不是由随机变化引起的),则基因或蛋白是差异表达的。在一些实施方案中,如果两个样品之间的表达水平的差异大于 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、1 倍、1.2 倍、1.5 倍、1.75 倍、2 倍、2.25 倍、2.5 倍、2.75 倍或 3 倍,则基因或蛋白被差异表达。

[0086] 如实施例章节讨论的,成功使用了差异表达分析鉴定了 Sanfilippo 综合征的生物标志物。具体地,已经发现,某些蛋白或基因的升高或降低的表达与 Sanfilippo 综合征的存在相关。因此,此类差异表达的蛋白或基因的表达和/或活性水平的分析可用于评价 Sanfilippo 综合征的风险,检测 Sanfilippo 综合征的存在,监测 Sanfilippo 综合征的进展或

消除,和 / 或监测治疗响应或优化。

[0087] 根据本发明的 Sanfilippo 综合征的示例性生物标志物列于表 1。列于表 1 的生物标志物的蛋白和核酸 (例如,基因、mRNA 和 / 或 cDNA) 序列是本领域已知的。例如,表 1 所列的每个生物标志物的蛋白和核酸序列可获自 GenBank,并且可以使用表 1 所列每个生物标志物的名称检索而容易地发现。与本申请申请日在 GenBank 可获得的表 1 所列生物标志物的每一个的名称相关的蛋白和核酸 (例如,基因、mRNA 和 / 或 cDNA) 序列通过引用并入本文。

[0088] 本文提供的生物标志物可以作为指示剂单独或组合使用以评价 Sanfilippo 综合征的风险,检测 Sanfilippo 综合征的存在,监测 Sanfilippo 综合征的进展或消除,和 / 或监测治疗响应或优化。在一些实施方案中,可以使用本文描述的个体生物标志物。在一些实施方案中,选自表 1 的至少 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18 或 19 个生物标志物可以组合作为一组使用。

[0089] 在特定实施方案中,根据本发明的适合的生物标志物选自 Tau、磷酸化 Tau(p181)、钙结合蛋白 D-28K 和 / 或肝细胞生长因子。例如,可以使用选自 Tau、磷酸化 Tau(p181)、钙结合蛋白 D-28K 或肝细胞生长因子的任何一个、两个、三个生物标志物。在一些实施方案中,可以使用 Tau、磷酸化 Tau(p181) 和肝细胞生长因子。在一些实施方案中,可以组合使用其全部四个 (Tau、磷酸化 Tau(p181)、钙结合蛋白 D-28K 和肝细胞生长因子)。

[0090] 在一些实施方案中,本文描述的创造性生物标志物可以与一种或多种其他标志物,特别是已知与溶酶体贮积病、特别是 Sanfilippo 综合征 (例如 A、B、C 或 D 型 Sanfilippo 综合征) 相关的那些标志物结合使用。因此,在一些实施方案中,本文描述的一种或多种创造性生物标志物 (例如,表 1 中提供的那些) 可以与其他标志物,例如糖胺聚糖 (GAG) 硫酸乙酰肝素、 β -氨基己糖苷酶、LAMP1、LAMP2 (仅例举几个) 结合使用。

[0091] 表 1.- 鉴定的示例性生物标志物

[0092]

生物标志物	缩写	线性分析	二次分析	邻近
A-1- 抗胰蛋白酶	AAT	-	-	0.0750
A-2- 巨球蛋白	A-2-M	0.0667	0.0000	0.0500
载脂蛋白 B	Apo B	-	-	0.1000
钙结合蛋白		0.1000	0.0333	0.0500
补体 C3	C3	-	0.0583	0.0583
脂肪酸结合蛋白,心脏	H-FABP	-	0.0583	0.0333
肝素结合 EGF 样生长因子	HB-EGF	0.1000	-	-
肝细胞生长因子	HGF	-	0.0417	0.0167

激肽释放酶-7	KLK-7	-	0.0500	0.1000
溶酶体相关膜蛋白 2	LAMP2	0.1000	0.1000	0.0750
巨噬细胞集落刺激因子 1	M-CSF	-	0.1000	0.0667
单核细胞趋化蛋白 1	MCP-1	-	0.0750	0.0500
性激素结合球蛋白	SHBG	0.0667	0.0250	0.0000
Tau		-	0.0333	0.0667
甲状腺素结合球蛋白	TBG	-	0.0917	0.0667
肿瘤坏死因子受体样 2	TNFR2	0.0500	0.0833	0.0333
血管内皮生长因子受体 1	VEGFR-1	-	0.0750	0.0583
玻连蛋白		-	-	0.0500
pTau(181)		-	0.0917	0.0667

[0093] 测量生物样品中的生物标志物水平

[0094] 可以使用许多方法测量生物样品中的生物标志物水平。通常,可以使用指示生物标志物的表达或活性水平的任何特点来实施本发明。在一些实施方案中,测量样品中生物标志物的蛋白表达水平。在一些实施方案中,测量样品中生物标志物的核酸表达水平。

[0095] 生物样品

[0096] 可以将本发明方法应用至允许测定一种或多种创造性生物标志物的任何类型的生物样品。适合的生物样品的实例包括但不限于脑脊液 (CSF)、细胞、组织、全血、漱口水、血浆、血清、尿、粪便、唾液、脐带血、绒毛样品、绒毛样品培养物、羊水、羊水培养物、经子宫颈灌洗液。适合本发明的生物样品可以是受试者收集的新鲜或冷冻的样品,或者是具有已知的诊断、治疗和 / 或结果历史档案样品。可以通过任何侵入性或非侵入性方法来收集生物样品,例如通过从受试者抽取 CSF 或血液,或者使用细针吸入或针头活检,或者通过外科活检。

[0097] 在某些实施方案中,可以在没有或具有有限的样品加工下使用生物样品。例如,可以从生物样品制备蛋白提取物。在一些实施方案中,蛋白提取物含有总蛋白含量。在一些实施方案中,可以制备含有膜蛋白、核蛋白和胞浆蛋白的一种或多种的蛋白提取物。蛋白提取方法是本领域公知的 (参见例如“Protein Methods”, D. M. Bollag 等人,第 2 版,1996,Wiley-Liss;“Protein Purification Methods :A Practical Approach”,E. L. Harris 和 S. Angal (编辑),1989;“Protein Purification Techniques :A Practical Approach”,S. Roe, 第 2 版,2001,Oxford University Press;“Principles and Reactions of Proteins Extraction,Purification,and Characterization”,H. Ahmed,2005,CRC Press :Boca Raton, FL)。多种多样的试剂盒可用来从体液和组织提取蛋白,并且可商业途径获自

例如 BioRad Laboratories(Hercules, CA)、BD Biosciences Clontech(Mountain View, CA)、Chemicon International, Inc. (Temecula, CA)、Calbiochem(San Diego, CA)、Pierce Biotechnology(Rockford, IL) 和 Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA)。所有这些试剂盒通常包括详细描述所要遵循的方案的用户指南。试剂盒之间的灵敏度、加工时间和成本可以不同。本领域普通技术人员可以容易地选择最适合特定情况的试剂盒。获得蛋白提取物之后,优选将提取物的蛋白浓度标准化为与对照样品一样的值,以允许定量蛋白标志物的信号。可以使用光度或光谱方法或凝胶电泳来进行这种标准化。

[0098] 在一些实施方案中,可以从生物样品提取核酸。例如,可以在分析之前从样品提取 RNA。RNA 提取方法是本领域公知的(参见例如, J. Sambrook 等人,“Molecular Cloning: A Laboratory Manual”,1989,第2版,Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY)。从体液或组织分离 RNA 的大多数方法是基于蛋白变性剂存在下的组织破坏,以快速且有效地失活 RNA 酶。然后通过选择性乙醇沉淀、苯酚/氯仿抽提,随后异丙醇沉淀或氯化铯、氯化锂或三氟乙酸铯梯度离心,从蛋白污染物进一步纯化和浓缩分离的总 RNA。试剂盒也可用于从体液或组织提取 RNA(即,总 RNA 或 mRNA),并且可商业途径获自例如 Ambion, Inc. (Austin, TX)、Amersham Biosciences(Piscataway, NJ)、BD Biosciences Clontech(Palo Alto, CA)、BioRad Laboratories(Hercules, CA)、GIBCO BRL(Gaithersburg, MD) 和 Qiagen, Inc. (Valencia, CA)。

[0099] 在某些实施方案中,提取之后,扩增 mRNA 并转录成 cDNA,其然后可以用作通过适当 RNA 聚合酶进行多轮转录的模板。扩增方法是本领域公知的(参见例如, A. R. Kimmel 和 S. L. Berger, Methods Enzymol. 1987, 152:307-316; J. Sambrook 等人,“Molecular Cloning: A Laboratory Manual”,1989,第2版,Cold Spring Harbour Laboratory Press: New York;“Short Protocols in Molecular Biology”, F. M. Ausubel(编辑),2002,第5版,John Wiley&Sons;美国专利号 4,683,195;4,683,202 和 4,800,159)。可以使用非特异性引物例如锚定的寡-dT 引物或随机序列引物,或者使用与被监测的每个探针的 RNA 互补的靶特异性引物,或者使用热稳定性 DNA 聚合酶(例如,禽成髓细胞瘤病毒逆转录酶或莫洛尼鼠白血病病毒逆转录酶)进行逆转录反应。

[0100] 测量蛋白表达水平

[0101] 可以通过任何适当方法进行生物样品中蛋白表达水平的测量或测定(参见例如 E. Harlow 和 A. Lane,“Antibodies: A Laboratories Manual”,1988, Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY)。

[0102] 一般而言,通过使获自受试者的生物样品与一种或多种蛋白生物标志物的结合剂接触来测定蛋白表达水平;检测样品中与结合剂结合的一种或多种蛋白生物标志物的水平;并对比样品中一种或多种蛋白生物标志物的水平与对照样品中相应的蛋白生物标志物的水平。如本文使用的,术语“结合剂”指特异性结合创造性蛋白生物标志物的实体,例如多肽或抗体。如果实体与多肽以可检测的水平反应/相互作用、但是与含有无关序列或不同多肽序列的肽不可检测地反应/相互作用,则所述实体“特异性结合”所述多肽。

[0103] 在某些实施方案中,适合的结合剂是核糖体,有或没有肽组分、RNA 分子或多肽(例如,包括蛋白标志物的多肽序列的多肽、其肽变体或这种序列的非肽模拟物)。

[0104] 在其他实施方案中,适合的结合剂是特异性针对本文描述的蛋白生物标志物的抗

体(例如,特异性针对表1所列任何生物标志物的抗体)。在一些实施方案中,适合的抗体可以以特异性结合蛋白生物标志物例如磷酸化蛋白(例如,磷酸化 Tau(p181))的特定形式。用于本发明方法的适合抗体包括单克隆和多克隆抗体、免疫活性片段(例如 Fab 或 (Fab)₂ 片段)、抗体重链、人源化抗体、抗体轻链和嵌合抗体。可以使用本领域已知的方法制备抗体,包括单克隆和多克隆抗体、片段和嵌合体(参见例如, R. G. Mage 和 E. Lamoyi, “Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications”, 1987, Marcel Dekker, Inc. : New York, pp. 79-97 ;G. Kohler 和 C. Milstein, Nature, 1975, 256 :495-497 ;D. Kozbor 等人, J. Immunol. Methods, 1985, 81 :31-42 ;和 R. J. Cote 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. 1983, 80 :2026-203 ;R. A. Lerner, Nature, 1982, 299 :593-596 ;A. C. Nairn 等人, Nature, 1982, 299 :734-736 ;A. J. Czernik 等人, Methods Enzymol. 1991, 201 :264-283 ;A. J. Czernik 等人, Neuromethods :Regulatory Proteins Modification :Techniques&Protocols, 1997, 30 :219-250 ;A. J. Czernik 等人, Neuroprotocols, 1995, 6 :56-61 ;H. Zhang 等人, J. Biol. Chem. 2002, 277 :39379-39387 ;S. L. Morrison 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. , 1984, 81 :6851-6855 ;M. S. Neuberger 等人, Nature, 1984, 312 :604-608 ;S. Takeda 等人, Nature, 1985, 314 :452-454)。本发明方法中待使用的抗体可以通过本领域公知的方法纯化(参见例如 S. A. Minden, “Monoclonal Antibody Purification”, 1996, IBC Biomedical Library Series :Southbridge, MA)。例如,可以通过穿过蛋白标志物或其片段结合的柱来亲和纯化抗体。然后可以使用具有高盐浓度的缓冲液从柱洗脱结合的抗体。

[0105] 不同于制备,本发明方法中要使用的抗体可以获自科学或商业来源(例如, Cayman Chemical)。

[0106] 标记的结合剂。在某些实施方案中,结合剂直接或间接用可检测部分标记。可检测剂的作用是通过允许显现结合剂与蛋白标志物(或其类似物或片段)结合形成的复合物来促进诊断方法的检测步骤。优选地,选择可检测剂,使得它产生可以测量且其强度与被分析样品中存在的蛋白标志物的量相关(优选成比例)的信号。标记生物分子例如多肽和抗体的方法是本领域公知的(参见例如, “Affinity Techniques. Enzyme Purification :Part B”, Methods in Enzymol. , 1974, 第 34 卷, W. B. Jakoby 和 M. Wilneck(编辑), Academic Press :New York, NY ;和 M. Wilchek 和 E. A. Bayer, Anal. Biochem. , 1988, 171 :1-32)。

[0107] 许多可检测剂的任何一种可用于实施本发明。适合的可检测剂包括但不限于:各种配体、放射性核素、荧光染料、化学发光剂、微粒(例如,量子点、纳米晶体、磷和类似物)、酶(例如, ELISA 中使用的那些,即,辣根过氧化物酶、 β -半乳糖苷酶、萤光素酶、碱性磷酸酶)、比色标记、磁性标记和生物素、地高辛(dioxigenin)或可针对其获得抗血清或单克隆抗体的其他半抗原和蛋白。

[0108] 在某些实施方案中,结合剂(例如抗体)可以固定在载体或支持体(例如,珠、磁性颗粒、乳胶颗粒、微量滴定板孔、样品池或其他反应容器)。适合的载体或支持体材料的实例包括琼脂糖、纤维素、硝酸纤维素、葡聚糖、葡聚糖凝胶、琼脂糖凝胶、脂质体、羧甲基纤维素、聚丙烯酰胺、聚苯乙烯、辉长石(gabbros)、滤纸、磁铁石、离子交换树脂、塑料膜、塑料管、玻璃、聚胺-甲基乙烯基醚-马来酸共聚物、氨基酸共聚物、乙烯-马来酸共聚物、尼龙、蚕丝等。结合剂可以使用特异性针对第一结合剂的第二结合剂间接固定(例如,特异性针对蛋白标志物的小鼠抗体可以使用涂布于载体或支持体上的绵羊抗小鼠 IgG Fc 片段特异

性抗体固定)。

[0109] 可以使用免疫测定法测定生物样品中的蛋白表达水平。此类测定法的实例是时间分辨荧光免疫测定 (TR-FIA)、放射免疫测定、酶免疫测定 (例如, ELISA)、免疫荧光免疫沉淀、乳胶凝集、血凝集、Western 印迹和组织化学测试, 其是本领域公知的常规方法。如本领域技术人员理解的, 免疫测定法可以是竞争性或非竞争性的。通过结合剂与蛋白标志物的结合形成的复合物产生的信号的检测和定量方法将取决于测定和可检测部分 (例如, 荧光部分) 的性质。

[0110] 可选地, 蛋白表达水平可以使用本领域已知用于检测蛋白的基于质谱的方法或基于图像 (包括标记配体的使用) 的方法来测定。其他适合的方法包括 2D- 凝胶电泳, 基于蛋白组学的方法。蛋白组学研究样品中蛋白表达的总变化, 可以包括以下步骤: (1) 通过电泳 (1-D PAGE) 分离样品中的个体蛋白, (2) 从凝胶回收 (例如, 通过质谱或 N 末端测序) 的个体蛋白的鉴定, 和 (3) 使用生物信息学的数据分析。

[0111] 测量核酸表达水平

[0112] 测量或测定生物样品中核酸的表达水平可以通过任何适当方法进行, 包括但不限于杂交 (例如, Southern 或 Northern 分析)、聚合酶链式反应 (PCR) (参见例如, 美国专利号 4,683,195 ;4,683,202 和 6,040,166 ;“PCR Protocols :A Guide to Methods and Applications”, Innis 等人 (编辑), 1990, Academic Press :New York)、逆转录酶 PCR (RT-PCT)、锚定 PCR、竞争性 PCR (参见例如, 美国专利号 5,747,251)、cDNA 末端的快速扩增 (RACE) (参见例如, “Gene Cloning and Analysis :Current Innovations, 1997, pp. 99-115) ;连接酶链反应 (LCR) (参见例如, EP01320308), 单边 PCR (Ohara 等人, Proc. Natl. Acad. Sci., 1989, 86 :5673-5677), 原位杂交, 基于 Taqman 的测定 (Holland 等人, Proc. Natl. Acad. Sci., 1991, 88 :7276-7280), 差异显示 (参见例如, Liang 等人, Nucl. Acid. Res., 1993, 21 :3269-3275) 和其他 RNA 指纹技术, 基于核酸序列的扩增 (NASBA) 和其他基于转录的扩增系统 (参见例如, 美国专利号 5,409,818 和 5,554,527), Q β 复制酶, 链置换扩增 (SDA), 修复链反应 (RCR), 核酸酶保护测定, 基于差减的方法, Rapid-Scan™ 等。

[0113] 可以使用本领域已知的常规方法构建用于检测生物样品中多核苷酸序列的核酸探针。适合的探针可以基于编码来自编码生物标志物的核酸区域的至少 5 个连续氨基酸的核酸序列, 并且优选包括约 15 至约 50 个核苷酸。核酸探针可以用可检测的部分标记, 如上文在结合剂的情况下提到的。核酸探针和可检测部分之间的结合可以是共价的或非共价的。可检测部分可以直接或者通过连接体间接连接至核酸探针 (E. S. Mansfield 等人, Mol. Cell. Probes, 1995, 9 :145-156)。用于标记核酸分子的方法是本领域公知的 (关于本领域标记方案、标记检测技术和最近发展的综述, 参见例如, L. J. Kricka, Ann. Clin. Biochem. 2002, 39 :114-129 ;R. P. van Gijlswijk 等人, Expert Rev. Mol. Diagn. 2001, 1 :81-91 ;和 S. Joos 等人, J. Biotechnol. 1994, 35 :135-153)。

[0114] 核酸探针可用于杂交技术以检测编码生物标志物的多核苷酸。该技术一般包括将获自受试者的生物样品中的核酸分子与核酸探针在使得所述核酸探针与所述核酸分子中的互补序列发生特异性杂交的条件下接触并孵育。通常, 使用了严格的杂交条件。在一些实施方案中, “严格的杂交条件” 指至少与以下一样严格的杂交条件 :在 42℃ 下, 50% 甲酰胺、5XSSC、50mM NaH₂PO₄、pH6.8、0.5% SDS、0.1mg/mL 超声处理的鲑鱼精 DNA 和 5XDenhart

溶液中杂交过夜；在 45℃ 下，用 2XSSC、0.1% SDS 洗涤；并在 45℃ 下用 0.2XSSC、0.1% SDS 洗涤。在一些实施方案中，严格的杂交条件不应该允许在一段 20 个连续核苷酸中相差超过两个碱基的两个核酸杂交。孵育之后，去除非杂交的核酸，并且检测并定量已经与探针杂交的核酸的存在和量。

[0115] 包括编码生物标志物的多核苷酸序列的核酸分子的检测可以包括使用诸如 PCR（例如 RT-PCR）的扩增方法扩增特定的多核苷酸序列，随后使用本领域已知的技术分析扩增的分子。适合的引物可以由本领域技术人员常规设计。为了使测定条件下的杂交最大化，本发明方法中采用的引物和探针一般与编码生物标志物的核酸的一部分具有至少 60%、优选至少 75% 和更优选至少 90% 同一性。

[0116] 可以使用本文描述的杂交和扩增技术来测定包含编码本文描述的创造性生物标志物的多核苷酸序列的核酸分子的表达的定性和定量方面。

[0117] 可选地，从编码每个生物标志物的核酸衍生的寡核苷酸或更长片段可以用作微阵列中的靶。许多不同的阵列配置及其制备方法是本领域技术人员已知的（参见例如，美国专利号 5,445,934；5,532,128；5,556,752；5,242,974；5,384,261；5,405,783；5,412,087；5,424,186；5,429,807；5,436,327；5,472,672；5,527,681；5,529,756；5,545,531；5,554,501；5,561,071；5,571,639；5,593,839；5,599,695；5,624,711；5,658,734；和 5,700,637）。微阵列技术允许同时测量大量多核苷酸序列的稳态水平。目前广泛使用的微阵列包括 cDNA 阵列和寡核苷酸阵列。使用微阵列的分析一般基于从标记探针接收的信号强度的测量，所述标记探针用于检测来自样品的与固定于微阵列上已知位置的核酸探针杂交的 cDNA 序列（参见例如，美国专利号 6,004,755；6,218,114；6,218,122；和 6,271,002）。基于阵列的基因表达方法是本领域已知的并且已经描述于许多科学出版物以及专利中（参见例如，M. Schena 等人，Science, 1995, 270 :467-470；M. Schena 等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1996, 93 :10614-10619；J. J. Chen 等人，Genomics, 1998, 51 :313-324；美国专利号 5,143,854；5,445,934；5,807,522；5,837,832；6,040,138；6,045,996；6,284,460；和 6,607,885）。

[0118] 与对照比较

[0119] 一旦测定了（如上所述）被分析的生物样品中感兴趣的一种或多种生物标志物的表达水平，它们可以与一种或多种对照样品的表达水平对比。根据本发明方法的表达水平的对比优选在获得的表达水平已经针对测定样品量的差异和使用样品质量的变化性（例如，提取的蛋白量，或测试的 mRNA 的量和质量）而校正之后进行的。可以使用本领域公知的不同方法进行校正。例如，可以在分析样品之前使用光度或光谱方法或凝胶电泳（如上已经提到的）来标准化样品的蛋白浓度。在含有核酸分子的样品情况下，可以通过针对相同样品中参考基因（例如，管家基因）标准化水平来进行校正。可选地或附加地，标准化可以基于所有测定的基因或其大子集的平均或中值信号（例如，在 RT-PCR 情况下的 Ct）（总标准化方法）。

[0120] 神经发育生物标志物

[0121] 本发明适合的神经发育生物标志物可以包括可用作 Sanfilippo 综合征的疾病状态、该综合征的严重度或治疗介入的响应的指示剂的任何发育生物标志物（例如，认知、行为或运动技能）。通常，适当的发育生物标志物具有可以作为指示剂客观测量并评价的特

点。通常,适当的 Sanfilippo 综合征的发育生物标志物可用于区分 Sanfilippo 综合征患者和正常健康个体。因此,在一些实施方案中,“差异发育分析”可用于鉴定 Sanfilippo 综合征的发育生物标志物。如本文使用的,术语“差异发育分析”指对比两个或多个受试者的发育特点、技能或模式(例如,获自 Sanfilippo 综合征患者的神经发育数据与获自健康对照个体的对照样品)的方法。通常,两个或多个受试者之间观察到的差异发育特点、技能或模式是统计学上显著的(即,差异不是由随机变化引起的)。

[0122] 在一些实施方案中,所述发育生物标志物是神经发育生物标志物。在一些实施方案中,所述神经发育生物标志物与神经运动功能相关,例如但不限于上肢功能、下肢功能、手眼协调、神经肌肉反应、疼痛反应、温度反应、表情、活动范围和 / 或整体身体移动。在一些实施方案中,神经发育生物标志物与神经认知功能相关,例如但不限于学习能力、认知技能、记忆功能、阅读水平、I. Q.、短期记忆、长期记忆、问题解决和 / 或一般分析能力。在一些实施方案中,神经发育生物标志物与言语和语言有关,例如但不限于词汇水平、发音、通告(annunciation)和 / 或口腔运动技能。在一些实施方案中,神经发育生物标志物与神经行为功能相关,例如但不限于识别水平、注意力和意识、组织、多任务能力、活动水平和 / 或自我控制。本领域技术人员将理解,可以使用大量标准化测试、调查或问卷来分析上述神经发育生物标志物的任何一个。此外,这种标准化测试、调查或问卷可以根据个案情况设计,以解决特定病态,或者可以是本领域目前可获得的那些的一种或多种。例如,在一些实施方案中,可以使用贝莉婴幼儿发育量表 III (BSID) 进行发育评估。在一些实施方案中,可以使用考夫曼儿童成套评价测验 (KABC)。

[0123] 在一些实施方案中,神经发育生物标志物与神经解剖结构和 / 或其功能相关。在一些实施方案中,神经解剖生物标志物包括但不限于全脑容量、全脑大小、脑组织组成、灰质容量、白质容量、皮质容量、皮质厚度、脑室和 CSF 容量、小脑容量、基底节大小、基底节容量、额叶容量、顶叶容量、枕叶容量和 / 或颞叶容量。在一些实施方案中,神经解剖生物标志物包括但不限于电冲击、突触发射 (synaptic firing)、神经动力学和 / 或脑血流。本领域技术人员将理解,可以使用许多分析测试来分析上述结构或功能性神经解剖生物标志物的任何一个。例如,在一些实施方案中,可以使用 X 射线、正电子发射断层照相 (PET)、PIB-PET、F18PET、单光子发射计算机断层扫描 (SPECT)、磁共振成像 (MRI)、功能磁共振成像 (fMRI)、弥散张量 MRI (DTMRI)、弥散加权 MRI (DWMRI)、灌注加权 MRI (PWMRI)、弥散 - 灌注加权 MRI (DPWMRI)、磁共振光谱 (MRS)、脑电图 (EEG)、脑磁图 (MEG)、经颅磁刺激 (TMS)、深部脑刺激 (DBS)、激光多普勒超声、光学断层成像、计算机辅助断层扫描 (CT) 和 / 或结构 MRI (sMRI) 来分析神经解剖生物标志物。上述测定方法可以在有或没有对比试剂下使用,所述对比试剂例如荧光或放射标记的化合物、抗体、寡核苷酸、蛋白或代谢物。

[0124] 如实施例章节讨论的,差异发育分析成功用于鉴定 Sanfilippo 综合征的发育生物标志物。具体地,已经发现,某些发育特点和 / 或表型可能与 Sanfilippo 综合征的存在相关。因此,单独或与蛋白生物标志物结合的发育生物标志物的分析可用于评价 Sanfilippo 综合征的风险,检测 Sanfilippo 综合征的存在,监测 Sanfilippo 综合征的进展或消除,和 / 或检测治疗响应或优化。

[0125] Sanfilippo 综合征的诊断

[0126] 考虑到其表达谱与 Sanfilippo 综合征相关的一种或多种生物标志物可以诊断

Sanfilippo 综合征,区分不同类型的 Sanfilippo 综合征 (Sanfilippo A、B、C 或 D),区别疾病的不同阶段,确定疾病严重程度,和 / 或评估发育 Sanfilippo 综合征的风险。因此,在一些实施方案中,本发明提供了分析获自疑似患有 Sanfilippo 综合征的受试者的生物样品以测量本文描述的生物标志物的表达水平的方法,以确定所述受试者是否具有 Sanfilippo 综合征,处于发展 Sanfilippo 综合征的风险,或者确定所述综合征的严重程度。通常,在此类方法中,将针对获自受试者的生物样品测定或测量的生物标志物的水平与一种或多种对照水平对比。可以使用所述生物标志物的各种对照水平。例如,适合的对照水平可以指示没有 Sanfilippo 综合征的对照受试者中一种或多种生物标志物的水平。这种对照水平可以通过在相同条件下同时测量获自一个或多个健康对照受试者的对照样品中相应的一种或多种生物标志物而获得。适合的对照样品可以从一个健康对照个体获得或者从多个健康对照个体汇集。在一些实施方案中,指示健康个体中生物标志物的水平的对照水平可以从显著数目的个体确定,并且获得平均或均值。通常,健康对照个体处于相当的年龄或其他发育状态。在一些实施方案中,生物标志物的适合的对照水平是基于历史数据的数值参照,还称为历史对照 (即,之前进行的测试或分析,或者之前已知的量或结果)。在一些实施方案中,对照水平是或包括印刷或以其他方式保存的记录。在一些实施方案中,与适当对照水平相比一种或多种生物标志物的统计学显著的升高水平,指示受试者具有 Sanfilippo 综合征,处于发展 Sanfilippo 综合征的风险。在一些实施方案中,与适当对照水平相比一种或多种生物标志物的统计学显著的降低水平,指示受试者具有 Sanfilippo 综合征,处于发展 Sanfilippo 综合征的风险。各种统计技术和分析方法可用于确定生物标志物是否具有统计学显著的升高或降低的水平 (即,所述差异不是由随机变化引起的)。示例性的统计技术和方法包括但不限于线性和二次判别分析、k-邻近。在一些实施方案中,如果生物样品中测量的生物标志物的水平与对照水平相比高超过 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、1 倍、1.2 倍、1.5 倍、1.75 倍、2 倍、2.25 倍、2.5 倍、2.75 倍或 3 倍,则所述生物标志物具有升高的水平。在一些实施方案中,如果生物样品中测量的生物标志物的水平与对照水平相比减少超过 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 或 95%,则所述生物标志物具有降低的水平。

[0127] 在一些实施方案中,可以使用指示罹患 Sanfilippo 综合征的对照受试者中相应的一种或多种生物标志物的水平的对照水平。这种对照水平可以通过在相同条件下同时测量获自一个对照个体或从多个对照个体汇集的对照样品中相应的一种或多种生物标志物来确定。在一些实施方案中,指示罹患 Sanfilippo 综合征的个体中生物标志物的水平的对照水平可以从显著数目的个体确定,并且获得平均或均值。通常,适合的对照个体罹患相同类型的 Sanfilippo 综合征并且处于基本相同的疾病和发育阶段 (例如,相同的年龄并具有相似的疾病症状)。在一些实施方案中,适合的对照水平可以是基于历史数据建立的数值阈值 (即,之前进行的测试或分析,或者之前已知的量或结果),其与具有 Sanfilippo 综合征,处于发展 Sanfilippo 综合征的风险或是 Sanfilippo 综合征携带者的受试者相关联。在这些实施方案中,与适合的对照水平相比,生物样品中测量的一种或多种生物标志物的统计误差边际内基本相似的水平或者统计学显著的升高或降低的水平指示受试者具有 Sanfilippo 综合征或处于发展 Sanfilippo 综合征的风险。各种统计学方法和技术、例如本文描述的那些可用于确定统计误差边际和统计学显著性。在一些实施方案中,如果生物样品中测量的生物标志物的水平与对照水平相比高超过 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、1

倍、1.2 倍、1.5 倍、1.75 倍、2 倍、2.25 倍、2.5 倍、2.75 倍或 3 倍,则所述生物标志物具有升高的水平。在一些实施方案中,如果生物样品中测量的生物标志物的水平与对照水平相比减少超过 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 或 95%,则所述生物标志物具有降低的水平。

[0128] 在一些实施方案中,可以使用生物样品中一种或多种生物标志物的升高或降低的水平来确定所述综合征的严重度。在一些实施方案中,定量一种或多种生物标志物的升高或降低的水平来确定综合征的严重度和 / 或阶段。

[0129] 鉴定或监测治疗

[0130] 本发明还提供了在受试者中评价治疗效力、监测治疗响应、预后病程和测量疾病进展的方法。通常,在这种方法中,从一个或多个时间点的受试者获得的生物样品测定的适合生物标志物(例如,选自表 1 的那些和其他已知的标志物,例如 GAG)的水平与从一个或多个其他时间点的受试者的水平相对比。例如,可以在疗程之前或开始时测量生物标志物水平。可以在整个治疗过程的一个或多个时间点测量生物标志物水平,并且与治疗前或疗程的更早时间点的水平相对比。适当治疗的鉴定或选择,确定患者是否积极响应治疗和 / 或优化治疗可以使用这些方法中获得的信息来指导。

[0131] 例如,使用本文描述的方法,熟练医师可以基于通过测定本文所述一种或多种生物标志物(例如,选自表 1 的那些和 Sanfilippo 综合征的其他生物标志物,例如 GAG)的表达和 / 或活性水平而提供给患者的诊断和疾病分析,选择并开具适合每个个体患者的治疗。具体地,本发明提供给医师早期诊断 Sanfilippo 综合征的非主观方式,其允许早期治疗,此时介入可能具有其最大效果,可能预防或减缓疾病进展并改善患者生活质量。给定患者的适当治疗方案的选择可以仅基于本文描述的创造性方法提供的诊断 / 分期来进行。可选地或附加地,医师还可以考虑现有方法中使用的其他临床或病理参数以诊断 Sanfilippo 综合征并评估其进展。

[0132] 在一些实施方案中,本文描述的创造性方法可以用于监测 Sanfilippo 综合征患者中的治疗响应。通常,例如,在接受 Sanfilippo 综合征治疗之后测量 Sanfilippo 综合征患者中一种或多种生物标志物的水平。然后将测量的水平与对照水平对比以确定 Sanfilippo 综合征患者是否对所述治疗具有积极响应。如本文使用的,对治疗的“积极响应”包括降低的疾病症状的严重度,疾病减缓的进展、消除或治愈。适合的对照水平可以是在接受治疗之前从相同患者获得的或在治疗的较早时间点测量的一种或多种生物标志物的水平。在一些实施方案中,适合的对照水平是没有治疗的对照患者中一种或多种生物标志物的水平。在一些实施方案中,这种对照水平可以从显著数目的对照患者确定,并且获得平均或均值。通常,对照患者处于相当的疾病或发育阶段。通常,与适当对照水平相比一种或多种生物标志物的统计学显著的降低或升高的水平指示患者对治疗具有积极响应。各种统计学方法和技术例如本文描述的那些科用于确定统计学显著性。在一些实施方案中,如果在感兴趣的相关时间点获得的生物样品中测量的生物标志物的水平与对照水平相比减少超过 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%,则所述生物标志物具有降低的水平。在一些实施方案中,如果生物样品中测量的生物标志物的水平与对照水平相比高超过 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、1 倍、1.2 倍、1.5 倍、1.75 倍、2 倍、2.25 倍、2.5 倍、2.75 倍或 3 倍,则所述生物标志物具有升高的水平。

[0133] 本发明的创造性方法可应用于所有类型的 Sanfilippo 综合征（例如，A、B、C 和 D 型 Sanfilippo 综合征）和 Sanfilippo 综合征的各种治疗。具体地，本文描述的创造性方法可用于鉴定作为 Sanfilippo 综合征的适当治疗的酶替代疗法。使用 A 型 Sanfilippo 综合征作为非限制性实例，医师可能基于使用本文描述的方法测定的一种或多种生物标志物的水平而推荐给患者施用重组乙酰肝素 N-硫酸酯酶（HNS）蛋白作为治疗。例如，医师可以确定治疗有效量的治疗剂（例如，替换酶，例如 HNS 蛋白），施用间隔和 / 或途径，至少部分基于根据本发明的生物标志物水平。

[0134] 如本文使用的，术语“治疗有效量”一般指足以实现对 Sanfilippo 综合征患者有意义的益处的量，例如足以调节溶酶体酶受体或其活性、从而治疗这种溶酶体贮积病或其症状（例如，在施用本发明组合物至受试者之后减少或消除“斑马体”或细胞空泡化的存在或发生）的量。本文描述的生物标志物水平可用于确定适当的治疗有效量的因子。在一些实施方案中，生物标志物水平可以与受试者的其他特点组合使用。此类特点包括受试者的病症、疾病严重度、健康状况、年龄、性别和体重。

[0135] 本文描述的生物标志物水平也可用于确定施用途和 / 或间隔的因素。在一些实施方案中，生物标志物水平可以与其他因素例如受试者病症的性质、疾病严重度和程度组合使用。例如，医师可以推荐治疗剂（例如，替换酶，例如 HNS 蛋白）以规律间隔（例如，每年一次，每六个月一次，每五个月一次，每三个月一次，两月一次（每两个月一次），每月一次（每个月一次），两周一次（每两周一次），每周一次）定期鞘内施用，依据根据本发明测量的生物标志物水平，有或没有考虑其他因素，例如受试者病症的性质、疾病严重度和程度。在一些实施方案中，医师还可以推荐鞘内施用与其他施用途（例如，静脉内、皮下、肌肉内、胃肠外、经皮或经粘膜（例如，口服或鼻））结合使用，依据根据本发明测量的生物标志物水平和 / 或其他因素，例如受试者病症的性质、疾病严重度和程度。

[0136] 在各种治疗期间，可以在一个或多个时间点从患者获得样品，并且可以测量适当生物标志物的水平并与适当对照水平对比。可以调节治疗的剂量和频率以优化治疗效力。用于监测治疗响应的适当样品包括但不限于脑脊液（CSF）、细胞、组织、全血（例如外周血样品）、血浆、血清、血液及其组合。还可以使用上述其他生物样品。

[0137] 试剂盒

[0138] 本发明还提供了包括用于进行根据本发明的创造性方法的各种试剂和材料的试剂盒。可以由诊断实验室、试验实验室或从业者进行本文描述的诊断 / 表征 / 分期 / 监测程序。本发明提供了可用于这些不同环境的试剂盒。

[0139] 例如，用于表征生物样品、测量生物标志物水平（例如，蛋白或核酸水平）、诊断受试者 Sanfilippo 综合征、鉴定亚型、表征严重度、分期疾病、和 / 或监测受试者中根据本创造性方法的治疗响应的材料和试剂可以一起组装在试剂盒中。在某些实施方案中，创造性的试剂盒包括特异性检测一种或多种生物标志物（例如选自表 1 的那些，其他已知的标志物，例如 GAG、 β -氨基己糖苷酶、LAMP1、LAMP2）的蛋白或核酸表达水平的至少一种或多种试剂和根据本发明方法使用试剂盒的说明书。

[0140] 每个试剂盒可优选包括使程序特异性的试剂。因此，为了检测 / 定量蛋白标志物（或其类似物或片段），特异性检测蛋白表达水平的试剂可以是特异性结合蛋白标志物（或其类似物或片段）的抗体。为了检测 / 定量包括编码生物标志物的多核苷酸序列的核酸分

子,特异性检测表达水平的试剂可以是与多核苷酸序列互补的核酸探针(例如,cDNA或寡核苷酸)。核酸探针可以或不固定在基底表面(例如,珠、微阵列等)。

[0141] 根据本发明的试剂盒或其他产品可以包括容纳各种试剂的一个或多个容器。适合的容器包括例如瓶、管形瓶、注射器(例如,预填充注射器)、安瓿。容器可以由许多材料形成,例如玻璃或塑料。

[0142] 在一些实施方案中,本发明的试剂盒可以包括如本文所述的适当的对照水平和用于测定对照水平的对照样品。在一些实施方案中,本发明试剂盒可以包括根据本发明的一种或多种方法使用试剂盒的说明书,并且可以包括用于加工获自受试者的生物样品和/或用于进行测试的说明书,用于解释结果的说明书以及管理药物或生物产品生产、使用或销售的政府机构(例如FDA)规定形式的通知书。

[0143] 通过参考以下实施例将更全面理解本发明。然而,不应将它们解释为至本发明的范围。所有的文献引用通过引用并入。

实施例

[0144] 实施例1:MPSIIIA的自然历史研究和发展评估

[0145] 如上讨论的,黏多糖沉积症III(MPS-III)还称为Sanfilippo综合征,是一种罕见的常染色体隐性溶酶体贮积病,由分解糖胺聚糖(以前叫黏多糖)硫酸乙酰肝素所需酶之一的缺陷引起。硫酸乙酰肝素是一种重要的细胞表面糖蛋白并且是形成和维持细胞外基质的关键组分。已经鉴定了四种不同类型的MPS-III(Sanfilippo综合征):MPS-III A、B、C和D(还分别称为A、B、C和D型Sanfilippo综合征)。虽然四种MPS-III类型的每一个表现出基本相似的临床症状,它们各自区别在于不同的酶缺陷。已知MPS-III A(Sanfilippo综合征A)是由于乙酰肝素N-硫酸酯酶基因中70个不同的可能突变而发生的,所述突变降低酶功能。已将MPS-III B(Sanfilippo综合征B)与酶N-乙酰基- α -D-氨基葡萄糖苷酶的破坏相关联,MPS-III C(Sanfilippo综合征C)与酶乙酰基-CoA: α -氨基葡萄糖苷乙酰基转移酶相关联,MPS-III D(Sanfilippo综合征D)与酶N-乙酰基葡萄糖胺-G-硫酸酯酶相关联,所有这些酶参与硫酸乙酰肝素调控。结果,每个酶的缺陷引起Sanfilippo综合征患者中硫酸乙酰肝素的累积。

[0146] 尽管病理级联被较少理解,但硫酸乙酰肝素的原始累积触发了毒性代谢物的二次累积、神经炎症、破坏的生长因子信号传导、失调的细胞死亡。Sanfilippo综合征患者的临床特征完全是神经性的。通常,Sanfilippo综合征患者具有正常的婴儿早期。发育延迟经常是该病的第一表现。几种行为障碍是温和童年的突出特征。渐进性痴呆则导致后退和发育倒退的“安静期”。通常,Sanfilippo综合征患者存活至十几岁或二十出头。

[0147] 为了更好地理解Sanfilippo综合征的潜在病理,本发明人对MPS-III A进行了自然历史研究。该研究是基于观察的研究,没有考察性治疗,以获得领会并发展MPS-IIIA临床疾病谱的理解。研究的第二目的是确定一系列临床上可确定的参数,其可用于监测12个月期间的疾病进展。使用该方法,本发明人能够鉴定临床试验中适用于未来试验治疗的候选临床终点。

[0148] 为了本研究,招募了总计25名地域不同的疾病受试者(16名男性和9名女性),具有证实的MPS-IIIA诊断。要求每个MPS-IIIA受试者具有各自大于1岁的日历年龄和发育

年龄。本研究的对照组包括 20 名年轻的健康成人受试者,来自跨北美洲的广泛地理分布。在一年期间每 6 个月进行一次评价。每个 MPS-III A 和对照患者经历全面的神经发育评估和脑成像。

[0149] 使用贝莉婴幼儿发育量表 III (BSID) 或考夫曼儿童成套评价测验 (KABC) 方法进行发育评估。对于 BSID 和 KABC 方法,对于每个参与者,以月计算总心理年龄当量 (MA)。通过受试者心理年龄当量除以其以月计的实际年龄来确定受试者的发育商 (DQ): $DQ(\%) = (MA/CA) \times 100$ 。为了本研究,对总计 23 名受试者进行发育分析。第一组由 17 名受试者组成,每名受试者在 6 岁前被诊断患有 MPS-III A,平均 DQ 为 26 ± 18 。第二组由 6 名受试者组成,每名受试者在 6 岁后被诊断患有 MPS-III A,平均 DQ 为 52 ± 27 。分析该数据以对比每个受试者的日历年龄与其实验确定的心理年龄 (MA) (图 1) 和发育商 (DQ) (图 2-3)。

[0150] 使用非对比 MRI 对每名受试者进行脑成像。对于本研究,对总计 23 名受试者进行脑扫描。第一组由 17 名受试者组成,每名受试者在 6 岁前被诊断患有 MPS-III A,平均年龄为 4.3 ± 1.7 岁。第二组由 6 名受试者组成,每名受试者在 6 岁后被诊断患有 MPS-III A,平均年龄为 10.7 ± 3.7 岁。使用收集的图像,使用 FreeSurfer 软件进行自动化容量分析 (图 4)。通过评价几种不同的解剖标准来评估本研究的脑容量,例如:灰质容量、白质容量、皮质容量、脑室 +CSF 容量、小脑容量和全脑容量)。分析数据以评价当与 MPS-III A 受试者日历年龄 (图 5-10) 和发育阶段 (图 11-14) 对比时,脑容量随时间变化之间可能的关联。

[0151] 观察

[0152] 基于本研究的发现,观察到几个关键的趋势。首先,受试者基线发育阶段和年龄之间的对比揭示了对于在 6 岁之前或之后被诊断的那些 MPS-III A 患者而言不同的可能的年龄相关的下降 (图 1-3)。这些发现也表明被诊断较晚发病的那些受试者可具有较缓慢的疾病进展。该数据还表明在 6 岁之前被诊断的那些患者表现出明显的大约 30 个月的心理年龄高原现象 (图 2 和 3)。由于在 6 岁之前和之后被诊断的儿童表现出不同的疾病进展模式,这表明晚期诊断可以替代表型和预后差异。这可能通过脑容量分析来进一步支持,这表明对于在 6 岁之前被诊断患有 MPS-III A 的那些受试者,存在皮质容量的可能下降和复合脑室 +CSF 容量的升高。

[0153] 其次,脑容量和发育状态之间的对比表明,对于被诊断患有 MPS-III A 的那些受试者,存在与复合脑室 +CSF 容量减少一致的 DQ 下降。在 6 岁之前和之后被诊断的受试者中都观察到了这种减少,表明该关系独立于疾病发作。而且,该数据还表明与扩大的脑室相关的皮质灰质的可能损失。

[0154] 实施例 2:CSF GAG 水平的表征

[0155] 本研究的目的是确定硫酸乙酰肝素糖胺聚糖 (GAG) 在脑中的病理性累积是否反映 MPS-III A 受试者的脑脊液中升高的 GAG 水平。为了本研究,招募了总计 25 名地域不同的疾病受试者,具有证实的 MPS-III A 诊断。要求每名 MPS-III A 受试者具有各自大于 1 岁的日历年龄和发育年龄。本研究的对照组包括 20 名年轻的健康成人受试者,来自跨北美洲的广泛地理分布。在一年期间每 6 个月进行一次评价。每名受试者经历腰椎穿刺以从腰椎鞘内空间获得脑脊液 (CSF),并且立即将样品以 1ml 小份在 -80°C 冷冻。为本实验选择的生物液是脑脊液,因为该介质沐浴中枢神经系统,并且其组成成分以与中枢神经系统中的那些动态平衡存在。

[0156] 使用标准的 GAG 测定来测量脑脊髓糖胺聚糖水平。例如, 申请人开发的 GAG 测定是被开发以测量样品中糖胺聚糖的功能属性的方法(图 15)。数据表明脑脊液中的 GAG 水平显著增加。

[0157] 该实施例的结果指示 CSF 硫酸乙酰肝素水平在 Sanfilippo 综合征患者中升高, 并且似乎保持在相对恒定的水平达 12 个月。因此, GAG 水平可用作表征疾病严重度并监测治疗响应的指示剂。

[0158] 实施例 3: Sanfilippo 综合征的生物标志物的鉴定

[0159] 实验设计

[0160] 本发明人已经进行了详细分析以鉴定将反映患者中 MPS-III 的神经病例后果的生物标志物。为本实验选择的生物液是脑脊液, 因为该介质沐浴中枢神经系统, 并且其组成成分与中枢神经系统中的那些动态平衡存在。然而, 本领域技术人员将理解, 几种其他的生物液可用于鉴定差异的生物标志物。

[0161] 为了本研究, 招募了总计 25 名地域不同的疾病受试者, 具有证实的 MPS-III 诊断。要求每名 MPS-III 受试者具有各自大于 1 岁的日历年龄和发育年龄。本研究的对照组包括 20 名年轻的健康成人受试者, 来自跨北美洲的广泛地理分布。在一年期间每 6 个月进行一次评价。每名受试者经历腰椎穿刺以从腰椎鞘内空间获得脑脊液 (CSF), 并且立即将样品以 1ml 小份在 -80°C 冷冻。使用基于 Luminex 的基于多重珠的免疫测定来分析 CSF 样品 (Elshai 等人, Methods, 2006, 38 : 4, 317-323, 在此通过引用并入), 使用含有分析物特异性生物酰化检测剂抗体的荧光微珠。由服务提供商 Rules-Based Medicine (RBM) 进行蛋白组评价。分析每个样品以确定来自以下的 245 种不同的蛋白生物标志物的每一个的蛋白浓度水平: RBM Discovery Map 1.0, RBM OncoMap 和定制 Neuro/LSD Multiplex。Neuro/LSD Multiplex 包括以下 13 种分析物标志物: 14-3-3 蛋白、 β 淀粉样蛋白的三种形式、 α -Synuclein、 β -氨基己糖苷酶、胶质原纤维酸性蛋白、溶酶体相关膜蛋白 1、溶酶体相关膜蛋白 2、髓磷脂碱性蛋白、Tau、磷酸化 Tau (p181) 和泛素 C-末端水解酶 1。

[0162] 蛋白差异生物标志物的鉴定

[0163] 使用从基于珠的免疫测定产生的数据, 进行统计学分析以鉴定 Sanfilippo 综合征的差异蛋白生物标志物。为了该分析, 使用称为判别分析 (Discriminant Analysis) 的统计学技术考虑 245 种生物标志物的每一个独立于其他。在该方法中, 分类规则产生于所述数据, 以将每个数据点分类入感兴趣的一组。这样, 希望的分类规则将具有低分类误差率, 指示希望的生物标志物。在理想状态下, 使用一个数据集产生分类规则并对一个独立数据集测试该规范。然而, 因为这是不可能的, 通过一次排除一个观察, 通过产生并测试分类规则来确定交叉验证误差率。这产生了几乎无偏差的分类误差率估算。此外, 还使用线性和二次判别分析来分析数据, 以开发称为 k-邻近的、适合具有高维度的小样品数据集的分布自由 (或非参数的) 的方法。对于采用的每一种方法, 以并列方式提出分类误差率为 10% 或更小的生物标志物。从该途径, 通过这些方法的至少一种鉴定了 19 种生物标志物 (表 1), 其具有 $\leq 10\%$ 或更小的分类误差率。19 种鉴定的生物标志物、肝细胞生长因子、钙结合蛋白 D、总 Tau 和磷酸化 Tau (p181) 中, 全部显示了 MPS-III 和对照受试者之间强的差异表达 (图 16-19)。虽然目前的统计学方法用于本实验, 但本领域技术人员将理解, 几种其他统计学方法可用于鉴定差异生物标志物 (参见例如, Wu 等人, 2003, Bioinformatics, 19 : 1636-1643 ;

Biswas 等人, Statistical Advances in Biomedical Sciences; Clinical Trials, Epidemiology, Survival Analysis, and Bioinformatics, 2007; Azuaje, Francisco, Bioinformatics and Biomarker Discovery: “omic” data analysis for personalized medicine, 2010, John Wiley and Sons; 通过引用并入本文)。

[0164] 这些生物标志物可用于表征 Sanfilippo 综合征, 特别是确定疾病的严重度、类型和阶段, 用于监测治疗响应和 / 或评价治疗或疗法的效力。

[0165] 等同替代

[0166] 本领域技术人员使用不超过常规实验会发现或能够确认本文描述的发明的实施方案的许多等同替代。本发明的范围不是要限于上述说明书, 而是如以下权利要求书所示。

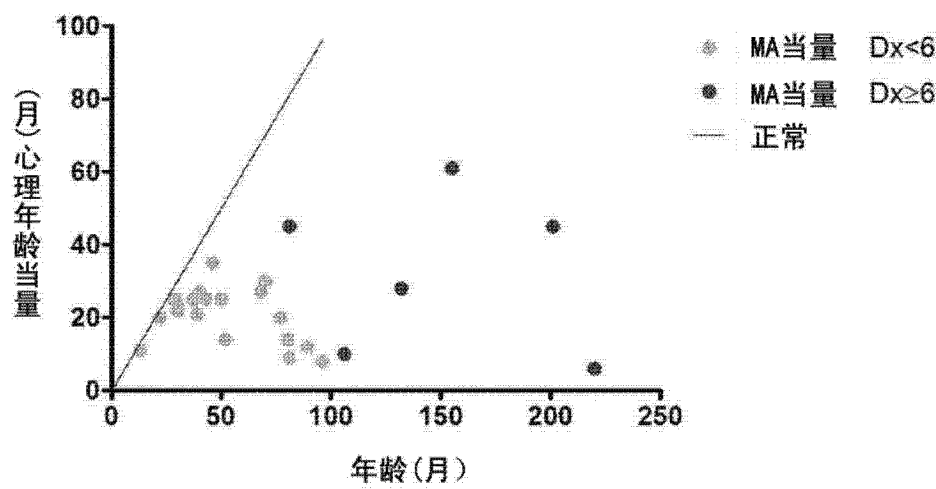


图 1

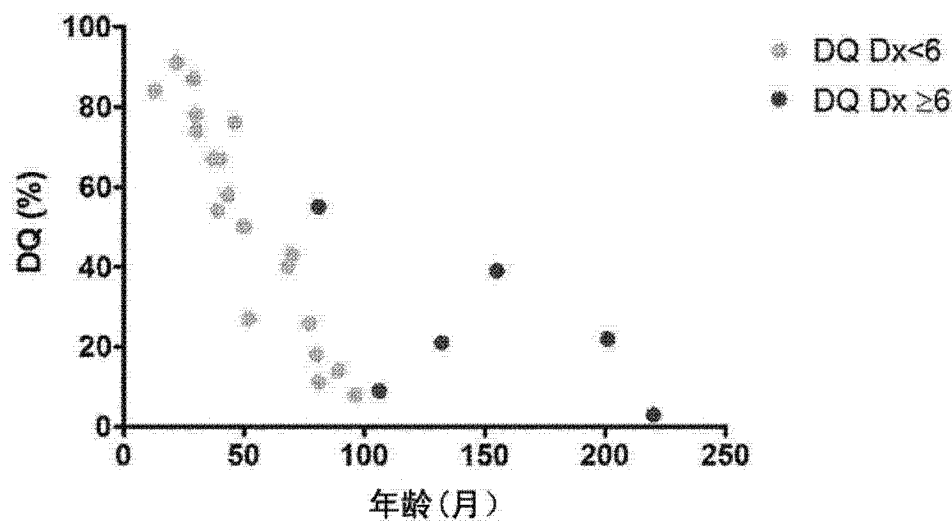


图 2

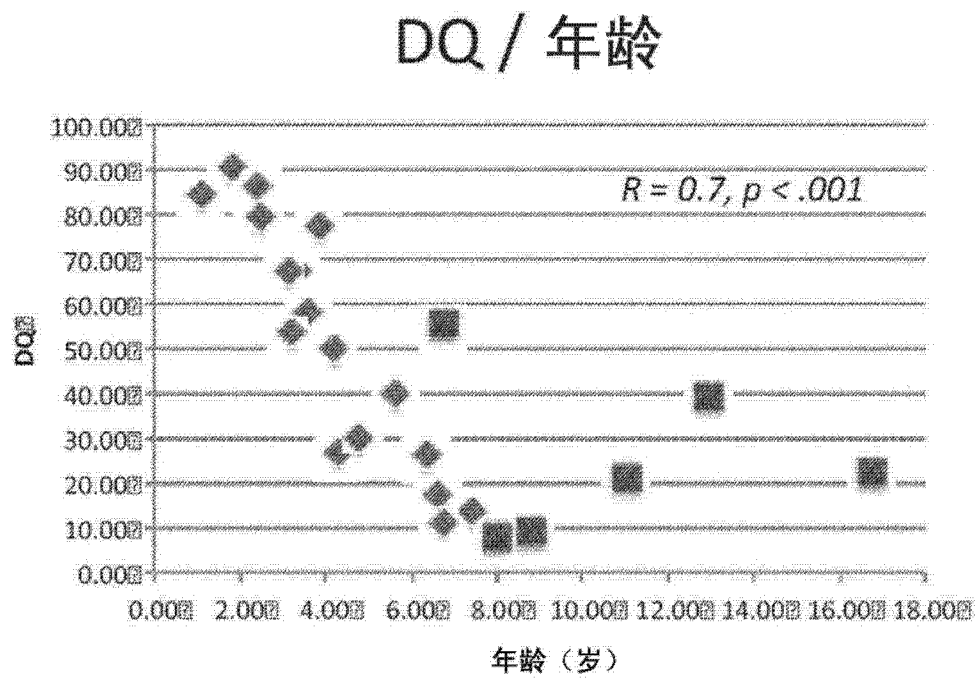


图 3

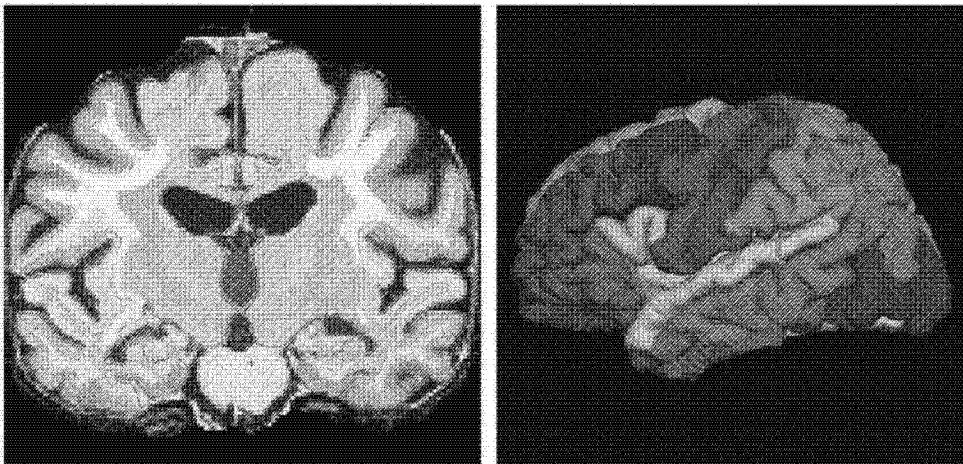


图 4

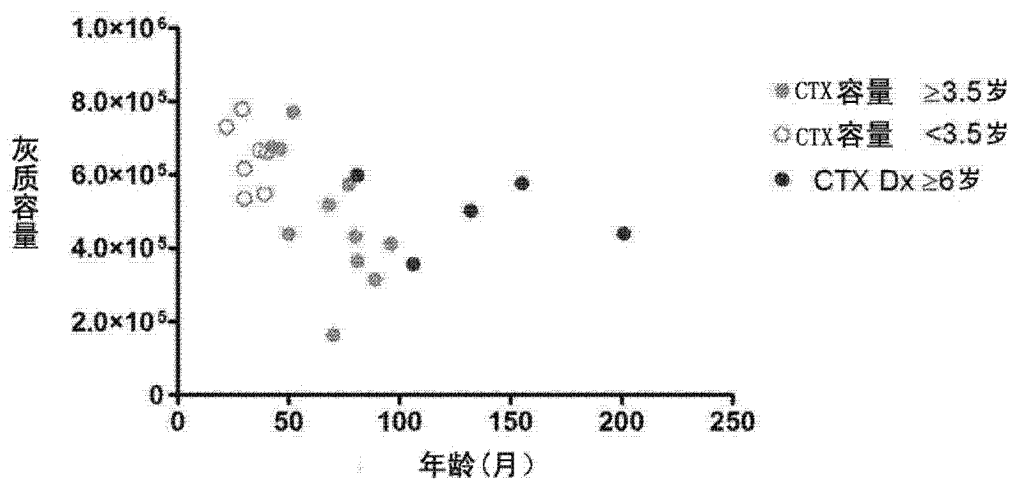


图 5

皮质容量对年龄

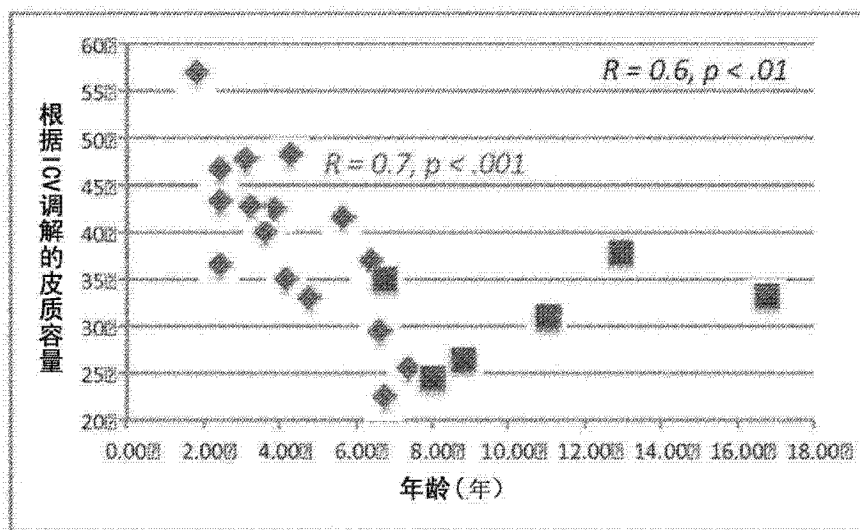


图 6

脑室和CSF容量对年龄

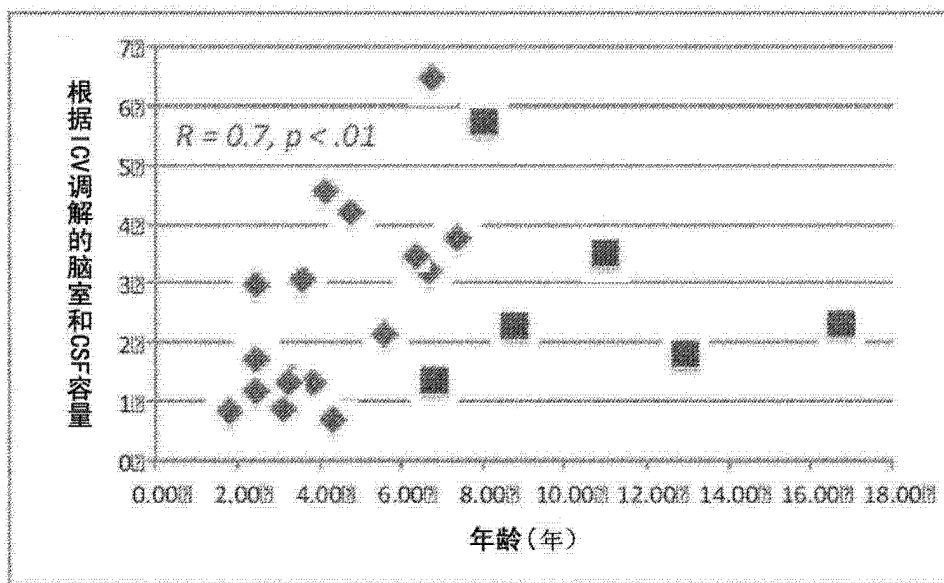


图 7

白质容量对年龄

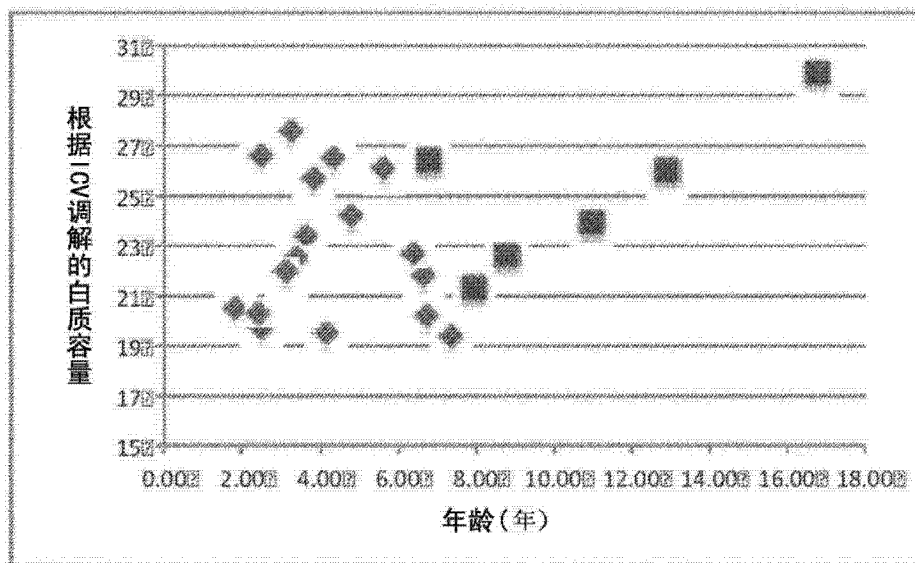


图 8

小脑容量对年龄

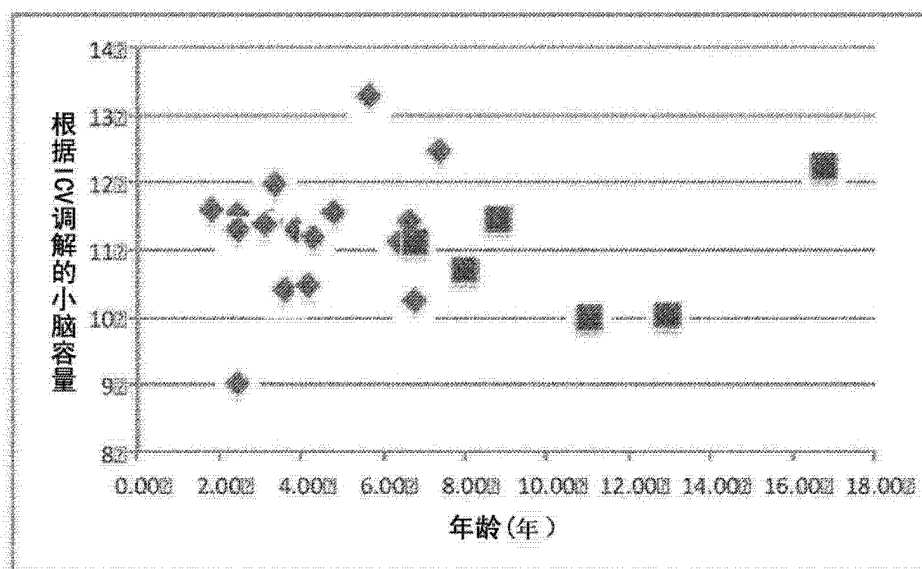


图 9

脑容量对年龄

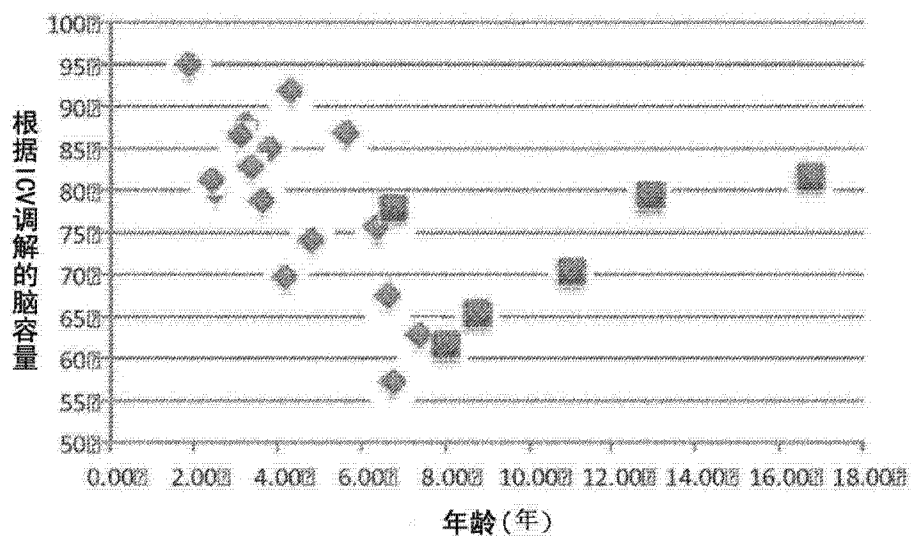


图 10

皮质容量对DQ

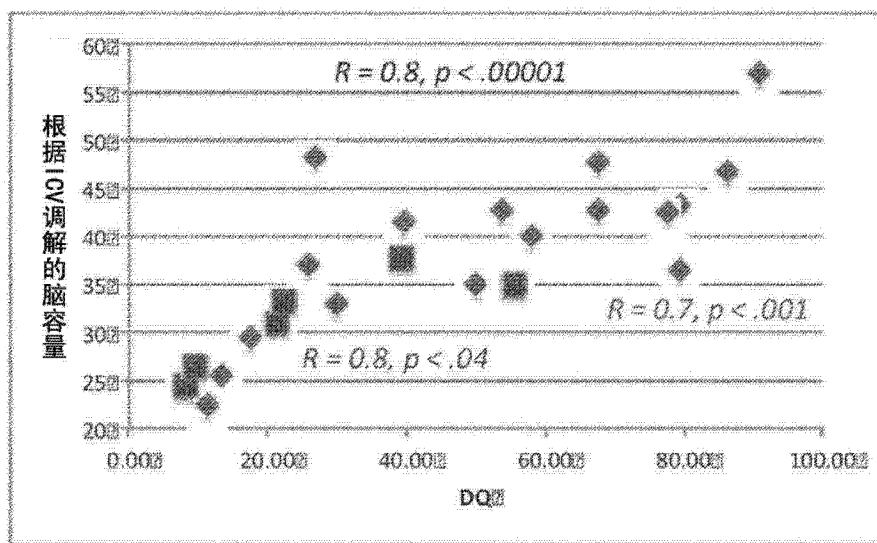


图 11

脑室和CSF容量对DQ

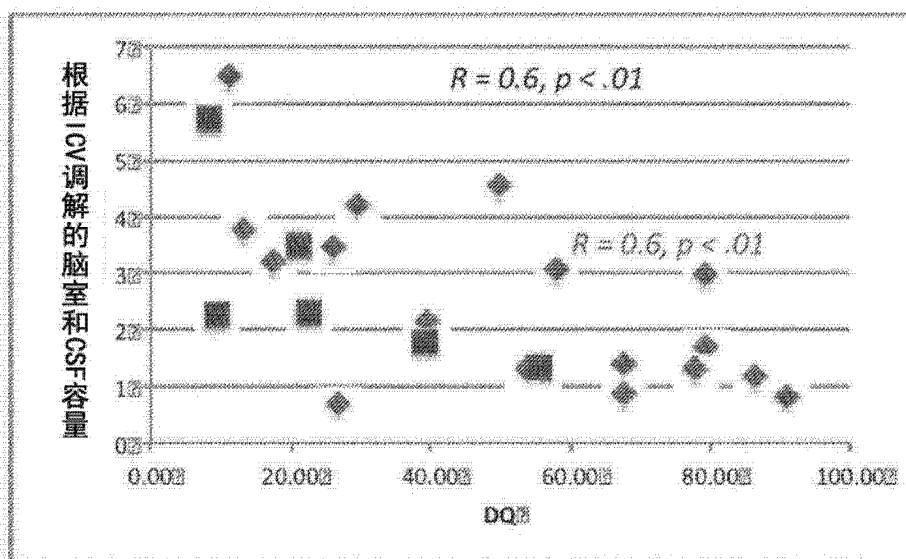


图 12

白质容量对DQ

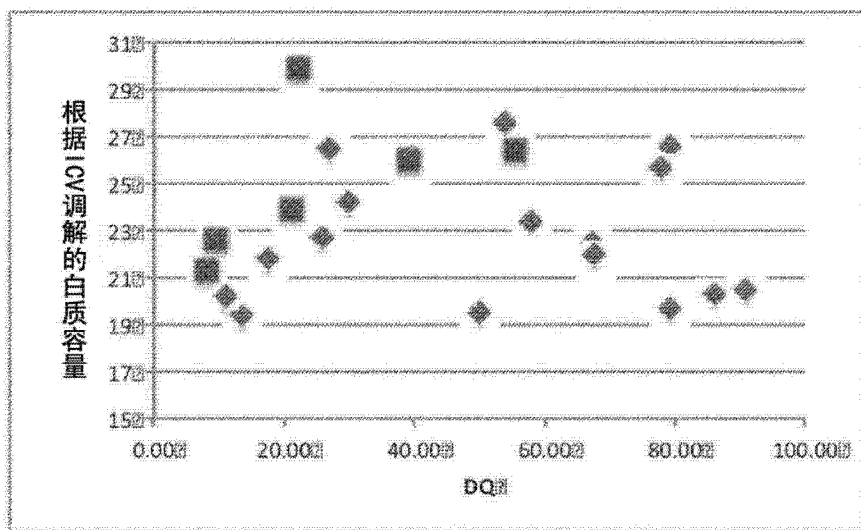


图 13

脑容量对DQ

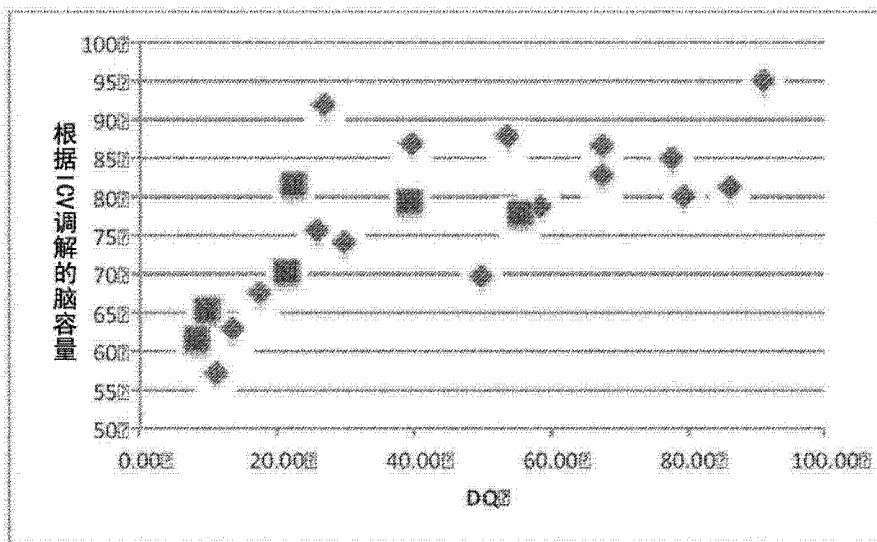


图 14

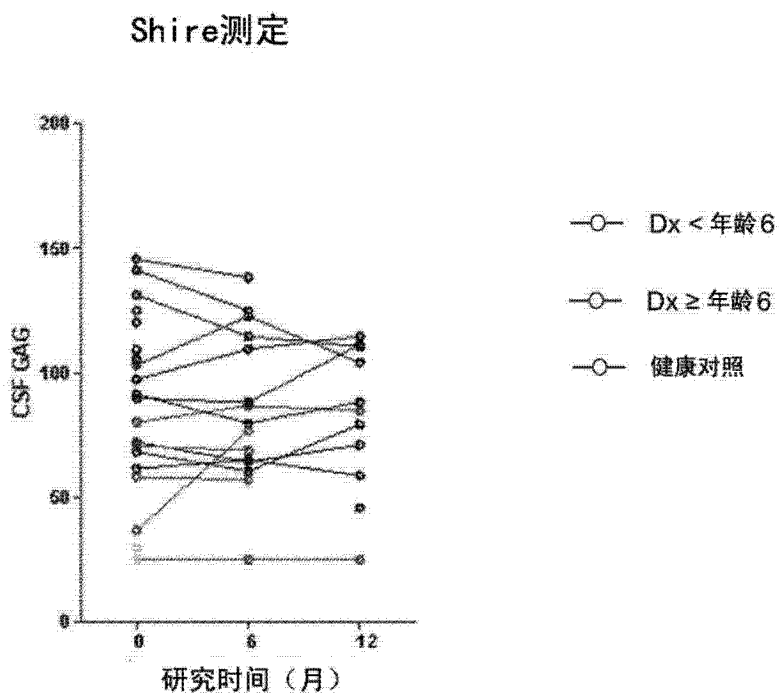


图 15

肝细胞生长因子

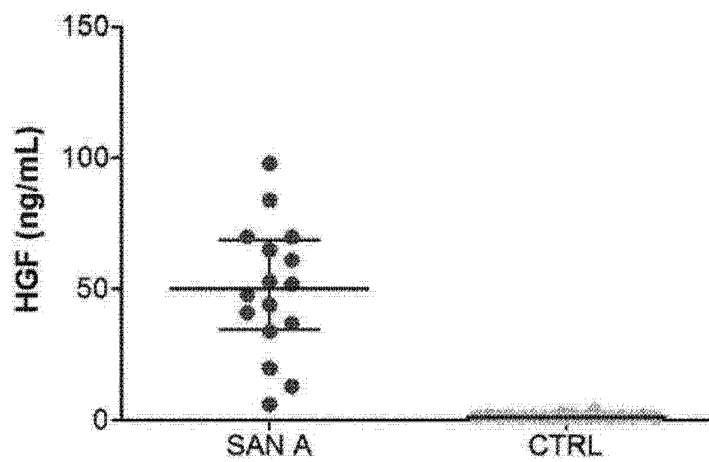


图 16

钙结合蛋白D

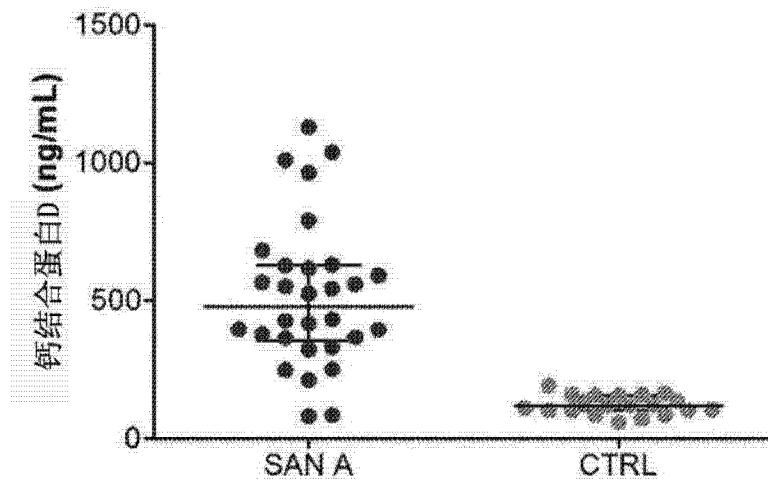


图 17

总Tau

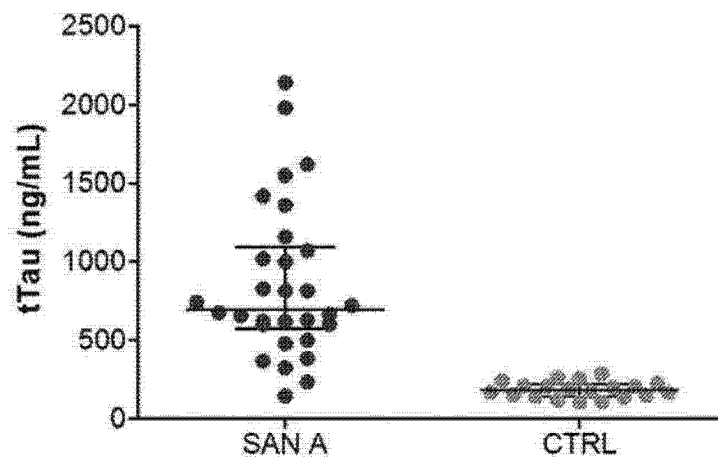


图 18

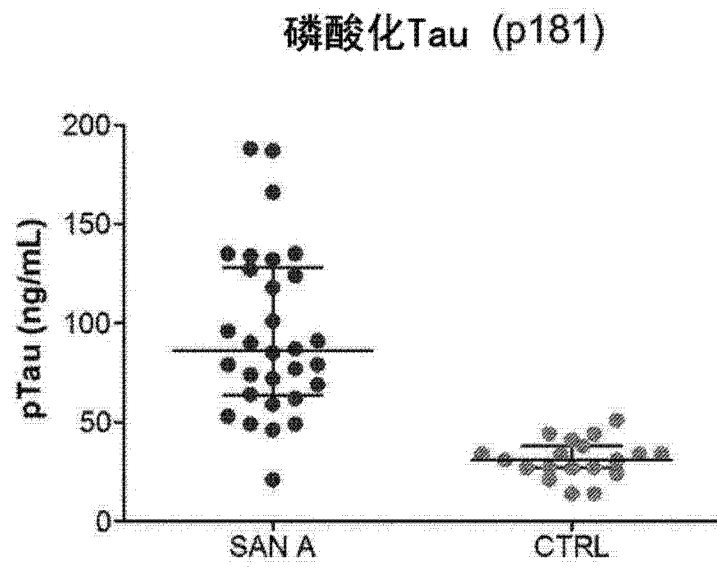


图 19