



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105164536 B

(45)授权公告日 2018.02.06

(21)申请号 201480008554.4

(22)申请日 2014.03.04

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105164536 A

(43)申请公布日 2015.12.16

(30)优先权数据
1303936.7 2013.03.05 GB

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2015.08.12

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2014/054185 2014.03.04

(87)PCT国际申请的公布数据
W02014/135546 EN 2014.09.12

(73)专利权人 兰道克斯有限公司
地址 爱尔兰多尼戈尔郡

(72)发明人 彼得·菲茨杰拉德

伊凡·麦康内尔 约翰·拉蒙特
夏兰·理查德森

(74)专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理
有限责任公司 11204
代理人 王达佐 洪欣

(51)Int.Cl.
G01N 33/68(2006.01)

(56)对比文件
US 2004/0235718 A1,2004.11.25,
US 2007/0099203 A1,2007.05.03,
Lidija Jerkovic et al.Afamin Is a
Novel Human Vitamin E-Binding
Glycoprotein Characterization and In
Vitro Expression.《JOURNAL OF PROTEOME
RESEARCH》.2005,第4卷(第3期),

审查员 贾静

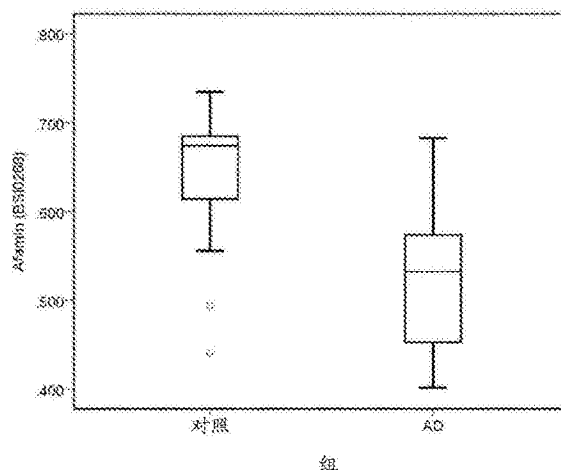
权利要求书1页 说明书17页 附图21页

(54)发明名称

阿尔兹海默症诊断的组合物和方法

(57)摘要

本发明涉及诊断患有阿尔兹海默症(AD)或有患AD风险的对象的方法。具体地,本发明通过测定Afamin与取自个体的流体样本中至少一种其它生物标志物的组合的水平鉴定患有AD或有患AD风险的对象,所述其它生物标志物为诸如 α -1-抗胰凝乳蛋白酶、 α -2-巨球蛋白、ApoB100、补体C5、丝氨酸苏氨酸蛋白激酶TBK1或补体C3。此外,也可以将基因型(载脂蛋白E或谷胱甘肽S-转移酶 Ω)纳入考虑,并在分类算法中使用以测定对象患有AD或有患AD风险的可能性。



1. 一种基质,所述基质由下述a或b组成:

a. 对Afamin具有特异性的一种或多种探针、对 α -1-抗胰凝乳蛋白酶具有特异性的一种或多种探针和任选地对一种或多种下述生物标志物具有特异性的一种或多种探针: α -2-巨球蛋白、丝氨酸苏氨酸蛋白激酶TBK1、载脂蛋白B100、补体C3、维生素D结合蛋白、 α -1-B糖蛋白、血液结合素、血清白蛋白、血浆铜蓝蛋白、 α -2-抗纤维蛋白溶酶、载脂蛋白A1、补体因子H、IgG、IgG Fc结合蛋白、角蛋白、纤维蛋白原、补体C5、ApoE4或wtGSTO;或

b. 由Afamin组成的一种或多种蛋白和/或核酸序列,由 α -1-抗胰凝乳蛋白酶组成的一种或多种蛋白和/或核酸序列和另外的一种或多种选自以下的蛋白和/或核酸序列: α -2-巨球蛋白、丝氨酸苏氨酸蛋白激酶TBK1、载脂蛋白B100、补体C3、维生素D结合蛋白、 α -1-B糖蛋白、血液结合素、血清白蛋白、血浆铜蓝蛋白、 α -2-抗纤维蛋白溶酶、载脂蛋白A1、补体因子H、IgG、IgG Fc结合蛋白、角蛋白、纤维蛋白原、补体C5、ApoE4或wtGSTO。

2. 如权利要求1所述的基质,其中将探针、蛋白或核酸序列固定于表面。

3. 如权利要求1所述的基质,其中Afamin、 α -1-抗胰凝乳蛋白酶、 α -2-巨球蛋白、丝氨酸苏氨酸蛋白激酶TBK1、载脂蛋白B100、补体C3、维生素D结合蛋白、 α -1-B糖蛋白、血液结合素、血清白蛋白、血浆铜蓝蛋白、 α -2-抗纤维蛋白溶酶、载脂蛋白A1、补体因子H、IgG、IgG Fc结合蛋白、角蛋白、纤维蛋白原或补体C5的一种或多种探针是单克隆抗体。

4. 如权利要求1-3中任一项所述的基质,所述基质为生物芯片。

5. 如权利要求1-3中任一项所述的基质,其中至少一种另外的探针对于TBK1具有特异性。

6. 如权利要求1-3中任一项所述的基质,其中至少一种另外的探针对于补体C5具有特异性。

7. 如权利要求1-3中任一项所述的基质,其中至少一种另外的探针对于 α -2-巨球蛋白具有特异性。

8. 如权利要求1-3中任一项所述的基质,其中至少一种另外的探针对于载脂蛋白B100具有特异性。

9. 如权利要求1-3中任一项所述的基质,其中至少一种另外的探针对于补体C3具有特异性。

阿尔兹海默症诊断的组合物和方法

[0001] 发明背景

[0002] 阿尔兹海默症(AD)是一种慢性神经退行性疾病,目前通过导致严重痴呆的进行性认知障碍和记忆丧失来鉴定。AD是典型的老年性疾病,主要在超过65岁的人群中流行。它是老年人痴呆的主要原因,并且随着预期寿命越来越高,在该人群中的流行只会开始增加。AD不是典型的威胁生命的疾病,但是随着该疾病发展为严重痴呆,患者不能照顾自己,并且通常需要全职的专业护理。

[0003] 目前没有已知的AD的治愈,但是有可以减缓疾病进程的治疗。因此能够鉴定AD患者并可能地监测他们对治疗的反应的方法将是非常有用的检测(临床医生使用的工具)。

[0004] AD诊断的现有方法包括精神评估(如MMSE)、CT/MRI、本领域已知的与AD有关的脑脊液的特定Tau蛋白或 β -淀粉样蛋白亚型的检测,或者对遗传风险因子如载脂蛋白E4(ApoE4变体)进行基因分型;目前没有AD的临床有效的血液生物标志物。这些方法的缺陷包括缺少特异性,在解释上可能产生错误,并且可能具有强侵袭性;通常只能在尸体解剖后才能进行真正的诊断。目前没有常规使用的生物标志物方法来帮助进行AD的阳性诊断。

[0005] AD的发病机理并非完全清楚,但是对患者的病理学调查显示存在神经元纤维缠结(由Tau蛋白积聚引起)和 β -淀粉样蛋白斑块。也有广泛的神经元和突触丢失,这被认为是认知和记忆功能降低的基础。斑块的形成显示可以引起神经退行性变,但是斑块形成的原因并不知道。鉴定这些蛋白的特定亚型的诊断测试已经成为诊断分析发展的主要关注点。然而,这些蛋白的存在可能预示疾病进程已经过了可治疗阶段,因此,更早的风险标志物可能更有利。

[0006] 已有一些描述使用血液生物标志物诊断AD的方法的发明,它们包括:EP 2293075 A2和WO 2011/143597 A1。EP2293075使用2-D凝胶电泳鉴定血液血小板中表达的一些标志物,其在AD患者和对照患者中是差异表达的。这些包括可能对应于AD遗传易感性的蛋白变体。这些发明者还描述了一项发明(EP2507638),其中在算法中将这些蛋白生物标志物与基因分型结合,从而改善诊断模型。在这一算法中,与ApoE4阴性但表达两个拷贝的野生型谷胱甘肽S-转移酶1 Ω (wtGSTO)基因的患者相比,ApoE4阳性的患者更易于患有AD。在这一在先发明的内容中,wtGSTO被限定为不含有rs4825突变(其在140位残基[A140D]编码天冬氨酸而非丙氨酸)的任何GSTO基因。该发明强调将基于血液的生物标志物与基因分型组合的有效性,从而帮助疾病的诊断。WO2011/143597 A1利用多路复用分析鉴定了多种生物标志物,这些生物标志物在AD与对照患者的血清之间是差异表达的。在该发明中,当使用多种生物标志物的组合,并结合临床检测和人口统计变量时,采用随机森林法来建立分类算法,观察到了更高的诊断准确度。然而,并未发现这些方法的临床实用性,并且人们急需一种可以常规使用的方法以帮助AD的诊断。

[0007] 发明概述

[0008] 本发明涉及阿尔兹海默症诊断的方法和组合物。

[0009] 本发明鉴定和描述了相对于其在正常阶段的表达,在阿尔兹海默症阶段差异表达的蛋白。

[0010] 根据本发明第一方面,提供一种在对象中诊断阿尔兹海默症的方法,所述方法包括检测取自对象的样本中两种或更多种选自表1的差异表达的蛋白,其中这些蛋白之一为Afamin。更具体地,一种包括检测取自对象的样本中Afamin和下述蛋白中任一种的水平的方法: α -1-抗凝乳蛋白酶、 α -2-巨球蛋白、载脂蛋白B100、补体C3、丝氨酸苏氨酸激酶TBK-1、维生素D结合蛋白、 α -1-B糖蛋白、血液结合素、血清白蛋白、血浆铜蓝蛋白、 α -2-抗纤维蛋白溶酶、载脂蛋白A1、补体因子H、IgG、IgG fc结合蛋白、角蛋白、纤维蛋白原或补体C5。样本优选为血清或血浆。

[0011] 根据本发明的又一方面,将差异表达的蛋白的相对水平连同对象的ApoE或GSTO1基因型或表型一起应用,以增强区分有发展为AD风险或患有AD的患者与那些没有风险或未患有AD的患者的能力。

[0012] 根据本发明的又一方面,提供一种检测取自对象的样本中选自表1的差异表达的蛋白的方法,其中将蛋白的特定探针附于设备表面。基于样本中这些蛋白与生物素化的示踪物质竞争的能力,计算其相对水平。示踪物质是修饰的血浆,其所含的蛋白与生物素结合。

[0013] 根据本发明的又一方面,一种通过使用统计建模或机器学习方法发展分类预测模型,从而预测对象能被定义为患有或有发展为阿尔兹海默症风险的可能性的方法。此种方法可包括但不限于:感知器神经网络、支持向量机、逻辑回归、决策树和随机森林法。

附图说明

[0014] 图1-9,比较对照和AD患者中Afamin (BSI0268)、Afamin (BSI0223)、Afamin (BSI0220)、 α -1-抗胰凝乳蛋白酶 (BSI0221)、补体C5 (BSI0782)、未知 (BSI0183)、未知 (BSI0279)、补体C3 (BSI024) 和 α -1-B糖蛋白 (BSI0182) 的相对水平的箱形图。

[0015] 图10,使用Afamin (BSI0268) 来区别对照与AD患者的ROC曲线。

[0016] 图11,使用 α -1-抗胰凝乳蛋白酶 (BSI0221) 来区别对照与AD患者的ROC曲线。

[0017] 图12,使用包含Afamin (BSI0268) 和 α -1-抗胰凝乳蛋白酶 (BSI0221) 的模型来区别对照与AD患者的ROC曲线。

[0018] 图13,使用Afamin (BSI0268) 与 α -1-抗胰凝乳蛋白酶 (BSI0221) 的比例来区别对照与AD患者的ROC曲线。

[0019] 图14,使用包含Afamin (BSI0268) / α -1-抗胰凝乳蛋白酶 (BSI0221) 比例和补体C3 (BSI0217) 的模型来区别对照与AD患者的ROC曲线。

[0020] 图15,使用包含Afamin (BSI0268) / α -1-抗胰凝乳蛋白酶 (BSI0221) 比例和 α -2-巨球蛋白 (BSI0195) 的模型来区别对照与AD患者的ROC曲线。

[0021] 图16,使用包含Afamin (BSI0268) / α -1-抗胰凝乳蛋白酶 (BSI0221) 比例和丝氨酸苏氨酸蛋白激酶TBK1 (BSI0112) 的模型来区别对照与AD患者的ROC曲线。

[0022] 图17,使用包含Afamin (BSI0268) / α -1-抗胰凝乳蛋白酶 (BSI0221) 比例和补体C5 (BSI0792) 的模型来区别对照与AD患者的ROC曲线。

[0023] 图18,使用包含Afamin (BSI0268) / α -1-抗胰凝乳蛋白酶 (BSI0221) 比例和ApoE4状态的模型来区别对照与AD患者的ROC曲线。

[0024] 图19,使用ApoE4状态来区别对照与AD患者的能力的ROC曲线。

[0025] 图20,使用包含Afamin (BSI0268) / α -1-抗胰凝乳蛋白酶 (BSI0221) 比例、补体C5 (BSI0792) 和ApoE4状态的模型来区别对照与AD患者的ROC曲线。

[0026] 图21,使用Afamin (BSI0268) / α -1-抗胰凝乳蛋白酶 (BSI0221) 比例和ApoE4状态来区分对照和AD患者的决策树。

[0027] 发明详述

[0028] 本发明描述了一种帮助诊断阿尔兹海默症 (AD) 的基于生物标志物的方法。具体地,检测了取自怀疑患有AD或有发展为AD风险对象的患者的流体样本中生物标志物的相对水平或浓度对象。在本发明的内容中,将诊断AD的实用性作为一个实例。然而,本发明设想其也可被用于监测AD的进程,以及诊断和监测其它形式的痴呆和认知障碍,这些包括但不限于:帕金森痴呆、路易体痴呆、血管痴呆、轻微认知损伤、额颞痴呆。在本发明的内容中,术语“生物标志物”指存在于患者生物样本中的分子,其在所述生物流体中的水平可以指示阿尔兹海默症。这种分子可以包括肽/蛋白或核酸及其衍生物;在本发明内容中,术语“相对水平”指来自生物分析的光强度或吸光度读数(然而该发明不限于使用这些技术进行测定,技术人员将意识到其它检测生物分子的方法,这些方法不利用测定可见光的性质来确定测量),所述生物分析通过比较给定生物样本与具有已知的生物标志物浓度(此浓度可以为0)的参考材料的生物标志物水平得到,或通过生物样本中的生物标志物与已知含有所述生物标志物的参考材料直接竞争结合所述生物标志物的特定探针的水平得到,后一种方法产生与所述生物标志物的浓度负相关的水平;本发明内容中的术语“探针”指与生物标志物的区域特异性结合的合成的或生物分子;本发明内容中的术语“有发展为阿尔兹海默症的风险”指患者表现出了早期临床症状,诸如通过本领域已知的方法(如MMSE)确定的轻微的认知障碍(MCI)或血管痴呆、有阿尔兹海默症家族史、有阿尔兹海默症的遗传流行(genetic prevalence),或因为生活方式被分类为“有风险”(如年龄、饮食、总体健康状况、职业、地理位置);本发明内容中的术语“遗传流行”指患者基因组中含有某种蛋白的特定基因型,本领域已知此种蛋白在患有AD的患者中发生改变,其包括但不限于,载脂蛋白E (ApoE4) 和谷胱甘肽S-转移酶 Ω 1 (GSTO),这可以通过基因分型或鉴定患者的生物流体中表达的蛋白的疾病相关形式来测定。更具体地,应当测定编码ApoE4和野生型GSTO (wtGSTO) 变体的等位基因的数量。本发明内容中的术语wtGSTO指在基因组序列中不含有rs4825突变、或在蛋白序列的140位残基将丙氨酸替换为天冬氨酸的GSTO的任何变体。本发明描述了不同的生物标志物在诊断AD中的用途,所述生物标志物单独使用或与其它诊断方法组合使用或作为补充的生物标志物使用。本发明内容中,补充的生物标志物指可以与其它AD生物标志物一起使用的生物标志物。

[0029] 本发明第一方面描述了在怀疑患有AD或有患AD风险的患者中诊断AD的方法,所述方法包括:得到患者的体外样本,测定Afamin和选自表1的一种或多种生物标志物的相对水平或浓度,确定Afamin和一种或多种生物标志物的相对水平或浓度的显著性。相对水平或浓度的显著性,通过将特定生物标志物的相对水平或浓度与对照值进行比较来判定。对照值来自对取自未患有AD的个体的生物样本中所述生物标志物的相对水平或浓度的测定,对象如通过临床评估所确定。对于Afamin,在患有AD的患者中,其相对水平或浓度低于对照值。本发明的一个优选实施方案使用将Afamin与至少一种其它生物标志物的组合的方法,所述其它生物标志物选自: α -1-抗胰凝乳蛋白酶、 α -2-巨球蛋白、载脂蛋白B100、补体C3、丝

氨酸苏氨酸激酶TANK结合激酶-1 (TBK1)、维生素D结合蛋白、 α -1-B糖蛋白、血液结合素、血清白蛋白、血浆铜蓝蛋白、 α -2-抗纤维蛋白溶酶、载脂蛋白A1、补体因子H、IgG、IgG fc结合蛋白、角蛋白、纤维蛋白原或补体C5。又一优选实施方案,本发明使用下述方法:将Afamin的相对水平或浓度除以 α -1-抗胰凝乳蛋白酶的相对水平或浓度,从而得到Afamin/ α -1-抗胰凝乳蛋白酶的比例。本发明实施方案内容中的术语“比例”涉及将一种生物标志物的值除以另一种的值,对这两种生物标志物而言,该值应当相同,并且可以用给定体积(浓度)中生物标志物的重量或摩尔来表示,或者用通过实验手段得到的光强度或吸光度水平(相对水平)来表示。本发明的又一个实施方案,利用Afamin/ α -1-抗胰凝乳蛋白酶的比值与一种或多种生物标志物的相对水平或浓度的组合,所述生物标志物选自: α -1-抗胰凝乳蛋白酶、 α -2-巨球蛋白、载脂蛋白B100、补体C3、丝氨酸苏氨酸激酶TBK-1、维生素D结合蛋白、 α -1-B糖蛋白、血液结合素、血清白蛋白、血浆铜蓝蛋白、 α -2-抗纤维蛋白溶酶、载脂蛋白A1、补体因子H、IgG、IgG fc结合蛋白、角蛋白、纤维蛋白原或补体C5。例如,本发明的一个优选组合为,Afamin/ α -1-抗胰凝乳蛋白酶的比例与补体C3的相对水平或浓度的组合。本发明另一优选组合为,Afamin/ α -1-抗胰凝乳蛋白酶的比例与丝氨酸苏氨酸激酶TBK-1的组合。

[0030] 本发明的又一方面针对Afamin、 α -1-抗胰凝乳蛋白酶、 α -2-巨球蛋白、载脂蛋白B100、补体C3、丝氨酸苏氨酸激酶TBK-1、维生素D结合蛋白、 α -1-B糖蛋白、血液结合素、血清白蛋白、血浆铜蓝蛋白、 α -2-抗纤维蛋白溶酶、载脂蛋白A1、补体因子H、IgG、IgG fc结合蛋白、角蛋白、纤维蛋白原或补体C5中的一种或多种作为AD的补充生物标志物的用途。作为补充生物标志物,它们可以与其它临床证据(如精神状态评估(MMSE)、神经影像学检查、 β -淀粉样多肽、磷酸化的Tau蛋白、ApoE基因型和野生型GSTO1基因型(wtGSTO))一起用于AD诊断。在本发明内容中,基于输出的检测,可以向预测模型中加入该临床证据。例如,可以通过下述方法测定患者的ApoE的状态:通过基因分型,通过鉴定在基因水平(DNA和/或RNA)表达的蛋白的疾病相关形式,或通过检测取自患者的流体样本中蛋白的特定表达形式的存在。在本发明的内容中,该输出(output)表述为二分式值(dichotomised value),由此患者为ApoE4基因或蛋白阳性或非阳性;或表述为患者基因组DNA中存在的ApoE等位基因的数量顺序输出(0-2),其可以通过取自患者的样本中基因或蛋白的相对水平来计算。

[0031] 可以通过将样本与探针接触来测定生物标志物的相对水平或浓度,优选地探针被固定于基质上,且对包含于生物标志物的组合中的每种生物标志物具有特异性。可以使用本领域熟知的不同技术来监测和量化生物标志物与其各自的探针之间的相互作用。合适的技术的一个实例为酶联免疫吸附实验(ELISA)。实施ELISA涉及对特定抗原具有特异性的至少一种抗体。将含有未知量的抗原的样本固定于固相载体上(通常为聚苯乙烯微量滴定板),固定可以是非特异性的(通过吸附至表面)或特异性的(在“三明治”ELISA中,通过被对同种抗原具有特异性的另一抗体捕获)。抗原被固定后,加入检测抗体,其与抗原形成复合物。检测抗体可以共价地与酶连接,或者可以由通过生物偶联与酶连接的第二抗体来检测自身。在每一步骤之间,通常洗涤该板以移除未特异性结合的任何蛋白或抗体。在最后的洗涤步骤后,通过添加酶底物来处理该板以产生可见信号,该信号显示样本中抗原的量。

[0032] 在本发明的一个优选实施方案中,“样本(sample)”在本文指血清或血浆,但是也可以是取自患者的任何样本,其中可以测定其生物标志物的水平或浓度。这些包括但不限于:全血、尿、唾液、脑脊液和血小板。

[0033] 所述基质包含至少两种,优选三种或四种探针,每种探针对单独一种生物标志物是特异的。本文使用的术语“特定的 (specific)”指探针只与本发明的一种生物标志物结合,而其与本发明其它生物标志物或与被分析的生物样本中其它分析物的结合可被忽略。这确保了使用本发明生物标志物的诊断分析 (assay) 和结果的完整性不因其他的结合事件而受损。

[0034] 所述基质可以是能够支撑一种或多种探针的任何表面,但优选为生物芯片。“生物芯片”是进行化学、生物化学、蛋白质组学或分子测试的反应平台的通用术语,其在医学诊断、药物检测等也可能需要。典型地,生物芯片包括惰性基质,如硅、玻璃或陶瓷(在表面区域通常为约 1cm^2 或更小),其上提供一个或多个反应位点。所述位点通常携带一种或多种配体,例如一种或多种抗体,选择其用于将实施的测试(或分析),通过与应用到芯片上的样本(如血液样本)和/或试剂结合而吸附到芯片表面被激活。可以使用很多可选的技术来检测反应,包括检测反应产生的化学发光。一些生物芯片携带大量(数百或数千)的此种测试位点,通常将其排列在一个网格或阵列中,使得使用同一样本,同时进行多个分析成为可能。当鉴定本发明中各种各样的生物标志物/蛋白时,除鉴定全长的蛋白外,鉴定蛋白的一个片段或多个片段对本领域技术人员将是显而易见的,只要允许准确地鉴定蛋白。同样地,尽管本发明的优选探针是多克隆或单克隆抗体,也可以使用其它的探针如适配子、分子印迹聚合物、噬菌体、短链抗体片段和其它的基于抗体的探针。本发明也允许使用核酸序列探针。

[0035] 优选地,本发明的方法中使用固态元件,优选生物芯片阵列技术系统(BAT)(可从Randox Laboratories Limited得到)。更优选地,可以使用Evidence Evolution和Evidence Investigator检测仪(可从Randox Laboratories得到)测定样本中的生物标志物水平。

[0036] 根据本发明使用的统计方法的准确性可以通过它们的接收器操作特征(ROC)进行最好的描述。ROC曲线显示了测试的敏感性、真阳性的数量,以及特异性、真阴性的数量。因此,生物标志物的给定组合的敏感性和特异性值是分析准确性的指示。例如,如果生物标志物组合的敏感性和特异性值为80%,通过测定生物标志物的特定组合的存在,在100名患者中将会正确地鉴定出80名作为疾病阳性,在没有疾病的100名患者中,将会有80名被正确地测试为疾病阴性。

[0037] 如果在诊断方法中使用两种或更多生物标志物,可以推导出合适的数学或机器学习分类模型,如逻辑回归方程。逻辑回归方程可以包括其它的变量,如患者的年龄和性别。可以使用ROC曲线来评估逻辑回归模型的准确性。可以独立使用或在算法中使用逻辑回归方程以帮助做出临床决策。尽管逻辑回归方程是在此种情况中常用的数学/统计学方法,在本发明中也是优选的,也可以使用其它的数学/统计学、决策树或机器学习方法。

[0038] 通过示例的方式,可以按下述计算适用于本发明的逻辑回归方程(分类截止值),其为针对所述生物标志物组合的怀疑患有或有发展为AD风险的患者中AD相对于非AD(对照)的指示:

AD 的可能性=

[0039]

$$\frac{1}{1 + e^{-\left(3.1 + 3.4 \left[\frac{\text{Afinin}}{\alpha\text{-1-抗胰凝乳蛋白酶}} \right] - 23.6 [\text{补体 C5 I}] \right)}}$$

[0040] 作为又一实例,决策树可以在决策分支从每一节点(亚群)生长的位置生长,以将群分至分类组。图19表示使用本发明的数据进行生长的树的一个实例,其可以用相对小的误差将所有的AD患者正确分类。

[0041] 方法

[0042] 1.标准化血浆/Quantiplasma™

[0043] 按照US 2009/0136966实施血浆标准化。简而言之,通过使用适当的方法移除高丰度的蛋白将人血浆标准化。首先,使用多亲和移除系统(MARS)技术移除高丰度的蛋白。然后将得到的血浆加载于多免疫亲和标准化(MIAN)柱,在此通过改变流动速率调节标准化的严密性。将流过的样本(flow-through)与洗涤样本组合以产生差异的标准化样本。然后将这些标准化血浆中的一些泛生物素化以提供示踪物质,被称为Quantiplasma™。

[0044] 2.抗体产生

[0045] 按照US 2009/0136966生产单克隆抗体。使用标准化的血浆作为免疫原以产生多克隆抗体。然后将B细胞分离并产生单克隆杂交瘤。使用ELISA进行杂交瘤的初始筛选。用鼠Ig γ -Fc特异的GAM包被板,然后与mAb杂交瘤上清孵育,洗涤步骤后将复合物与Quantiplasma™孵育,最终诱导酶-底物反应来检测生物素化的血浆(Quantiplasma™)与mAb的结合。这一选择鉴定出多于1000mAb。为了鉴定本研究中使用的单克隆抗体的靶蛋白,采用了Western印迹、免疫沉淀和质谱分析技术。然而,有些抗原当时并未鉴定出来,但是由于已知它们存在于人血浆蛋白质组中,它们已经包含在内。

[0046] 3.使用Quantiplasma™鉴定临床生物标志物

[0047] 血清样本取自19个临床确诊的阿尔兹海默症(AD)患者和19个有正常认知功能的年龄/性别匹配的对照参与者。这些样本在收集之后不久被冷冻并保存于(-80℃)直至进行分析。收集这些对象的另外的临床信息,包括基本的个人和家族病史。进一步,通过本领域已知的方法测定ApoE和GSTO的基因型。对于每个患者,分离基因组DNA,并且利用聚合酶链式反应(PCR)技术测定ApoE(E2、E3、E4)3种亚型或GSTO(野生型、突变体A140[rs4825])中每一种编码DNA的存在。进一步的分析允许通过本领域已知的方法测定每一亚型的等位基因频率。

[0048] 从第二部分产生的>1000的目录中选出一组69个mAb抗体(表1)。然后通过竞争性免疫测定对抗体进行评估。首先将它们固定于生物芯片平台(9mm×9mm),这是免疫反应的基质。使用半自动台式分析仪Evidence Investigator(EV3602,Randox Laboratories Ltd.,Crumlin,UK,专利-EP98307706、EP98307732、EP0902394、EP1227311、EP1434995和EP1354623)。测定原理基于无抗原(患者样本)和标记的示踪血浆(Quantiplasma™)对单克隆抗体结合位点的竞争。

[0049] 向生物芯片中加入样本和试剂,并将其在受控条件下进行孵育。加入基质后产生光信号,然后利用数字成像技术检测该信号。该系统包含专门的软件以自动地处理、报告和存档产生的数据。通过如下来测定患者样本中的特定蛋白的水平:比较含有样本和示踪物(测试)的生物芯片与只含有示踪物(空白)的生物芯片在各自相应的抗体位置的光信号(RLU)差异。按下述测定测试样本与对照样本的比例:

生物标志物的相对水平=

[0050]

$$1 - \frac{RLU(\text{测试})}{RLU(\text{空白})}$$

[0051] 高比例显示样本中存在相对较高水平的对各自相应mAb具有特异性的蛋白,低比例显示样本中存在相对少量的或不存在所述蛋白。针对全部mAbs测定AD患者与对照患者的比例(实例图1-9),并且进行非参数分析,以鉴定能够区分AD和对照患者的那些mAbs(表2)。针对全部mAbs计算接收器操作特征(ROC)曲线的曲线下面积(AUC),这些在表3中详细说明。

[0052] 4.疾病分类模型

[0053] 作为如何组合本研究鉴定的多种标志物以提供对疾病状况未知的病人进行分类的模型的一个实例,我们使用逻辑回归作为模型测定的方法。初始调查显示,组合使用Afamin(BSI0268)和 α -1-抗胰凝乳蛋白酶(BSI0221)的相对水平,产生了AUC为0.906的模型(图10-13),单独测定的预测能力有显著提升。为了将进一步的分析物加入模型中,在不增加维数的情况下,把Afamin(BSI0268)的函数作为 α -1-抗胰凝乳蛋白酶(BSI0221)的比例用作单一变量(AUC=0.875),并分析系统地向模型中加入全部其它分析物的效果。向模型中加入补体C3(BSI0217)、 α -2巨球蛋白(BSI0195)、丝氨酸苏氨酸蛋白激酶TBK1(BSI0112)或补体C5(BSI0782)改进了模型,AUC分别为0.889、0.906、0.892和0.920(图14-17)。进一步,当考虑患者的ApoE基因型时,也鉴定出改进。向分析中加入分类变量,由此每个患者被鉴定为没有ApoE4等位基因(0)或者有一个或多个ApoE4等位基因(1)。通过鉴定每个患者含有的ApoE4等位基因的数量(0、1或2)对其进行进一步改善。在本研究中,63%的AD患者有至少一个ApoE4等位基因,而19个对照对象中只有一个(5%)是ApoE4阳性。ApoE4基因型与Afamin/ α -1-抗胰凝乳蛋白酶的比例组合产生的AUC为0.925,当将ApoE4等位基因的数量考虑在内时其增加至0.953。此外,随着补体C5的加入,AUC增加至0.964。这些数据表明,使用本发明可能产生一个十分准确的模型。这些数据总结在表4中。维数问题限制了用这一初始数据组建立的模型中可使用的变量的数量,但是据预测,可以将本研究中包含的一些标志物进行组合以提供一个最优模型。除了逻辑回归,使用这一数据产生了其它的监督性学习模型,诸如:多层感知器神经网络、随机森林、支持向量机和决策树(图21)。这些都提供了具有与逻辑回归相似准确性的模型,并且可能被优选为添加至模型中的新分析物。

[0054] 表1:mAb ID号和发现与之结合的各自对应的蛋白

[0055]

探针ID	蛋白ID
BSI0183	未知
BSI0185	D-维生素结合蛋白
BSI0189	补体C3b(更短形式)

[0056]

BSI0198	α -1-B糖蛋白
BSI0200	α -2-巨球蛋白
BSI0203	血浆铜蓝蛋白
BSI0208	ApoB100

BSI0220	Afamin
BSI0221	α -1-抗胰凝乳蛋白酶
BSI0197	α -2-巨球蛋白
BSI0201	未知
BSI0214	ApoB100
BSI0190	补体C3
BSI0191	未知
BSI0195	α -2-巨球蛋白
BSI0223	Afamin
BSI0186	α -1-抗胰凝乳蛋白酶
BSI0196	α -1-B糖蛋白
BSI0279	未知
BSI0281	未知
BSI0217	补体C3
BSI0289	ApoB100
BSI0311	未知
BSI0144	α -1-抗胰凝乳蛋白酶
BSI0112	丝氨酸苏氨酸蛋白激酶TBK1
BSI0022	未知
BSI0002	血液结合素
BSI0032	IgG Fc结合蛋白
BSI0038	α -2-巨球蛋白
BSI0023	未知
BSI0051	D-维生素结合蛋白
BSI0095	α -2-巨球蛋白
BSI0097	血清白蛋白

[0057]

BSI0116	α -1-B糖蛋白
BSI0099	血浆铜蓝蛋白
BSI0136	ApoB100
BSI0172	α -2-巨球蛋白
BSI0177	未知
BSI0142	α -2-抗纤维蛋白溶酶
BSI0173	α -2-巨球蛋白
BSI0179	载脂蛋白A1
BSI0180	未知
BSI0181	未知
BSI0100	丝氨酸苏氨酸蛋白激酶TBK1
BSI0182	α -1-B糖蛋白

BSI0040	ApoB100
BSI0314	未知
BSI0243	补体C3
BSI0348	未知
BSI0257	D-维生素结合蛋白
BSI0263	补体C3
BSI0268	Afamin
BSI0355	未知
BSI0660	未知
BSI0670	ApoB100
BSI0747	因子H
BSI0765	补体C5
BSI0782	补体C5
BSI0225	未知 (IgG)
BSI0239	载脂蛋白A1
BSI0242	补体C3
BSI0246	未知
BSI0248	IgG

[0058]

BSI0255	角蛋白
BSI0259	未知
BSI0266	ApoB100
BSI0323	ApoB100
BSI0115	α -2-抗纤维蛋白溶酶
BSI0251	纤维蛋白原

[0059] 表2:对照(19)和AD(19)组的全部69个mAb的概括统计,p值代表通过Mann-Whitney测定的每组之间的显著差异

[0060]

蛋白 ID (mAb ID)	对照			AD			p-值
	中值	最小值	最 大 值	中值	最小值	最 大 值	
Afamin (BSI0268)	0.674	0.441	0.735	0.532	0.402	0.683	0.00021
Afamin (BSI0223)	0.508	0.319	0.599	0.405	0.230	0.477	0.00384
Afamin (BSI0220)	0.796	0.485	0.863	0.690	0.422	0.826	0.00506
α -1-抗胰凝乳蛋白酶 (BSI0221)	0.613	0.468	0.722	0.668	0.388	0.777	0.01734
补体 C5 (BSI0728)	0.592	0.497	0.656	0.559	0.429	0.656	0.02648
未知 (BSI0183)	0.571	0.240	0.699	0.475	0.231	0.614	0.02853
未知 (BSI0279)	0.484	0.132	0.702	0.409	0.210	0.621	0.03304
补体 C3 (BSI0243)	0.625	0.474	0.826	0.698	0.336	0.852	0.04245
α -1-B 糖蛋白 (BSI0182)	0.504	0.265	0.737	0.475	0.238	0.681	0.05396
α -1-抗胰凝乳蛋白酶 (BSI0144)	0.605	0.342	0.724	0.652	0.511	0.744	0.05584
ApoB100(BSI0289)	0.025	-1.623	0.779	0.291	-1.089	0.819	0.05969
α -2-抗纤维蛋白溶酶 (BSI0115)	0.302	-0.298	0.710	0.209	-0.131	0.562	0.07488
因子 H (BSI0747)	0.409	0.179	0.535	0.336	0.083	0.600	0.08493
血清白蛋白	0.725	0.643	0.756	0.701	0.583	0.772	0.08766

[0061]

(BSI0097)							
载脂蛋白 A1 (BSI0239)	0.411	0.275	0.522	0.382	0.250	0.478	0.11827
补体 C3 (BSI0263)	0.545	-0.166	0.915	0.143	-0.826	0.850	0.12534
α -2-巨球蛋白 (BSI0197)	0.544	0.168	0.670	0.444	0.101	0.660	0.15249
补体 C5 (BSI0765)	0.309	0.131	0.947	0.263	-0.144	0.865	0.15254
ApoB100 (BSI0040)	0.155	-0.125	0.560	0.261	-0.136	0.697	0.15666
α -1-B 糖蛋白 (BSI0116)	0.259	0.109	0.348	0.227	0.092	0.335	0.15679
未知 (BSI0023)	0.481	0.202	0.825	0.400	0.028	0.884	0.16104
ApoB100 (BSI0670)	0.644	0.420	0.776	0.626	0.408	0.735	0.16995
丝氨酸苏氨酸蛋白激酶 TBK1 (BSI0112)	0.576	-0.207	0.691	0.464	-0.275	0.660	0.17460
未知 (BSI0246)	0.184	0.031	0.316	0.136	-0.006	0.295	0.17460
未知 (BSI0348)	0.687	0.416	0.806	0.646	0.350	0.781	0.17924
α -1-抗胰凝乳蛋白酶 (BSI0186)	0.478	-0.195	0.868	0.365	-0.691	0.736	0.18406
补体 C3 (BSI0217)	0.141	-1.116	0.788	0.056	-0.361	0.716	0.19389
ApoB100 (BSI0323)	0.446	0.236	0.685	0.394	0.139	0.607	0.20409
α -1-B 糖蛋白 (BSI0196)	0.431	0.239	0.549	0.453	0.255	0.569	0.21469
α -2-抗纤维蛋白溶酶 (BSI0142)	0.643	0.454	0.712	0.663	0.585	0.728	0.21469
血浆铜蓝蛋白 (BSI0203)	0.367	-0.951	0.865	0.278	-1.956	0.727	0.22567
纤维蛋白原 (BSI0251)	0.457	0.222	0.717	0.426	0.211	0.608	0.24281
未知 (BSI0022)	0.530	0.331	0.895	0.492	0.256	0.898	0.26718
α -1-B 糖蛋白	0.723	0.611	0.791	0.697	0.376	0.771	0.29317

[0062]

(BSI0198)							
α -2-巨球蛋白 (BSI0172)	0.759	0.642	0.865	0.737	0.678	0.887	0.30001
D-维生素结合蛋白 (BSI0257)	0.614	0.014	0.788	0.601	0.448	0.722	0.32087
补体 C3 (BSI0190)	0.454	0.268	0.621	0.513	0.294	0.646	0.34271
α -2-巨球蛋白 (BSI0038)	0.636	0.331	0.738	0.575	0.246	0.748	0.35016
未知 (BSI0201)	0.711	0.495	0.818	0.688	0.490	0.867	0.35776
α -2-巨球蛋白 (BSI0195)	0.940	0.796	0.974	0.924	0.423	0.982	0.37323
载脂蛋白 A1 (BSI0179)	0.794	0.328	0.917	0.761	0.110	0.937	0.37323
ApoB100 (BSI0136)	0.483	0.155	0.670	0.522	0.206	0.637	0.38910
补体 C3b (较短形式) (BSI0189)	0.607	0.487	0.839	0.585	0.495	0.747	0.39711
未知 (BSI0660)	0.945	-0.223	0.975	0.947	-2.124	0.968	0.40535
ApoB100 (BSI0208)	0.572	0.202	0.694	0.595	-0.250	0.911	0.40538
IgG (BSI0248)	0.638	0.400	0.781	0.556	0.253	0.699	0.44774
血液结合素 (BSI0002)	0.567	-2.587	0.830	0.708	-1.046	0.890	0.49266
α -2-巨球蛋白 (BSI0095)	0.761	0.592	0.924	0.689	0.645	0.871	0.49266
未知 (BSI0281)	0.744	0.511	0.799	0.740	0.502	0.837	0.50189
未知 (BSI0355)	0.423	0.254	0.686	0.431	0.097	0.602	0.51126
未知 (更多候选物) (BSI0177)	0.108	-0.076	0.216	0.114	-0.051	0.296	0.55927
角蛋白 (BSI0255)	0.513	0.255	0.824	0.487	0.146	0.920	0.61962
α -2-巨球蛋白 (BSI0173)	0.692	0.482	0.836	0.661	0.567	0.833	0.63001

[0063]

D-维生素结合蛋白 (BSI0185)	0.613	0.294	0.743	0.606	0.381	0.782	0.65090
未知(IgG)(BSI0225)	0.390	0.080	0.651	0.402	0.054	0.577	0.65090
未知(BSI0314)	0.633	0.014	0.830	0.625	0.446	0.764	0.67206
ApoB100(BSI0214)	0.401	0.073	0.675	0.386	-0.090	0.666	0.69349
未知(BSI0259)	0.342	0.047	0.619	0.307	0.133	0.507	0.69349
血浆铜蓝蛋白 (BSI0099)	0.590	0.472	0.734	0.593	0.321	0.721	0.77029
未知(BSI0311)	0.344	0.020	0.506	0.351	-0.031	0.601	0.82668
补体 C3(BSI0242)	0.446	0.148	0.653	0.409	0.277	0.568	0.82668
未知(BSI0180)	0.237	0.032	0.443	0.210	0.085	0.521	0.84949
ApoB100(BSI0266)	0.528	0.303	0.704	0.516	0.216	0.648	0.84949
D-维生素结合蛋白 (BSI0051)	0.450	0.035	0.602	0.472	0.324	0.629	0.89548
未知(BSI0181)	0.502	0.350	0.708	0.556	0.227	0.926	0.90702
IgG Fc 结合蛋白 (BSI0032)	0.432	-1.988	0.826	0.431	-2.053	0.928	0.94182
α -2-巨球蛋白 (BSI0200)	0.577	0.338	0.660	0.544	0.309	0.703	0.96507
丝氨酸苏氨酸蛋白激 酶 TBK1(BSI0100)	0.767	0.174	0.839	0.768	0.680	0.815	0.96507
未知(BSI0191)	0.542	0.328	0.898	0.583	0.285	0.902	1.00000

[0064] 表3:区分对照和AD的69种mAb中每种ROC曲线的AUC

[0065]

蛋白ID(探针)	AUC
Afamin(BSI0268)	0.852
Afamin(BSI0223)	0.774
Afamin(BSI0220)	0.766
α -1-抗胰凝乳蛋白酶(BSI0221)	0.726
补体C5(BSI0782)	0.711

[0066]

未知(BSI0183)	0.708
未知(BSI0279)	0.702

补体C3 (BSI0243)	0.693
α -1-B糖蛋白 (BSI0182)	0.683
α -1-抗胰凝乳蛋白酶 (BSI0144)	0.681
ApoB100 (BSI0289)	0.679
α -2-抗纤维蛋白溶酶 (BSI0115)	0.669
因子H (BSI0747)	0.663
血清白蛋白 (BSI0097)	0.662
载脂蛋白A1 (BSI0239)	0.648
补体C3 (BSI0263)	0.645
α -2-巨球蛋白 (BSI0197)	0.636
补体C5 (BSI0765)	0.636
ApoB100 (BSI0040)	0.634
α -1-B糖蛋白 (BSI0116)	0.634
未知 (BSI0023)	0.633
ApoB100 (BSI0670)	0.630
丝氨酸苏氨酸蛋白激酶TBK1 (BSI0112)	0.629
未知 (BSI0246)	0.629
未知 (BSI0348)	0.627
α -1-抗胰凝乳蛋白酶 (BSI0186)	0.626
补体C3 (BSI0217)	0.623
ApoB100 (BSI0323)	0.620
α -1-B糖蛋白 (BSI0196)	0.618
α -2-抗纤维蛋白溶酶 (BSI0142)	0.618
血浆铜蓝蛋白 (BSI0203)	0.615
纤维蛋白原 (BSI0251)	0.611
未知 (BSI0022)	0.605
α -1-B糖蛋白 (BSI0198)	0.600
α -2-巨球蛋白 (BSI0172)	0.598

[0067]

D-维生素结合蛋白 (BSI0257)	0.594
补体C3 (BSI0190)	0.590
α -2-巨球蛋白 (BSI0038)	0.589
未知 (BSI0201)	0.587
α -2-巨球蛋白 (BSI0195)	0.584
载脂蛋白A1 (BSI0179)	0.584
ApoB100 (BSI0136)	0.582
补体C3b (较短形式) (BSI0189)	0.580
未知 (BSI0660)	0.579
ApoB100 (BSI0208)	0.579

IgG (BSI0248)	0.572
血液结合素 (BSI0002)	0.565
α -2-巨球蛋白 (BSI0095)	0.565
未知 (BSI0281)	0.564
未知 (BSI0355)	0.562
未知 (BSI0177)	0.555
角蛋白 (BSI0255)	0.547
α -2-巨球蛋白 (BSI0173)	0.546
D-维生素结合蛋白 (BSI0185)	0.543
未知 (IgG) (BSI0225)	0.543
未知 (BSI0314)	0.540
ApoB100 (BSI0214)	0.537
未知 (BSI0259)	0.537
血浆铜蓝蛋白 (BSI0099)	0.528
未知 (BSI0311)	0.521
补体C3 (BSI0242)	0.521
未知 (BSI0180)	0.518
ApoB100 (BSI0266)	0.518
D-维生素结合蛋白 (BSI0051)	0.512
未知 (BSI0181)	0.511
[0068]	
IgG Fc结合蛋白 (BSI0032)	0.507
α -2-巨球蛋白 (BSI0200)	0.504
丝氨酸苏氨酸蛋白激酶TBK1 (BSI0100)	0.504
未知 (BSI0191)	0.500

[0069] 表4:生物标志物组合的AUC

[0070]

生物标志物组合	面积	标准误	95%置信区间	
			较低	较高
Afamin (BSI0268) 和 α -1-抗胰凝乳蛋白酶 (BSI0221)	0.906	0.052	0.804	1.000
Afamin/ α -1-抗胰凝乳蛋白酶比例*	0.875	0.063	0.752	0.998
Afamin/ α -1-抗胰凝乳蛋白酶比例、补体 C5 (BSI0782)	0.920	0.052	0.819	1.000
Afamin/ α -1-抗胰凝乳蛋白酶比例、补体 C3 (BSI0243)	0.889	0.060	0.771	1.000
Afamin/ α -1-抗胰凝乳蛋白酶比例、 α -2-巨球蛋白 (BSI0195)	0.906	0.052	0.805	1.000
Afamin/ α -1-抗胰凝乳蛋白酶比例、丝氨酸苏氨酸激酶 TBK1 (BSI0112)	0.892	0.057	0.779	1.000
Afamin/ α -1-抗胰凝乳蛋白酶比例、ApoE4 (存在/不存在)	0.925	0.042	0.844	1.000
Afamin/ α -1-抗胰凝乳蛋白酶比例、ApoE4 (0、1 或 2 个等位基因)	0.953	0.032	0.891	1.000
Afamin/ α -1-抗胰凝乳蛋白酶比例、ApoB100 (BSI0289)	0.875	0.063	0.752	0.998

[0071]

Afamin/ α -1-抗胰凝乳蛋白酶比例、未知 (BSI0183)	0.881	0.064	0.756	1.000
Afamin/ α -1-抗胰凝乳蛋白酶比例、未知 (BSI0279)	0.878	0.064	0.753	1.000
Afamin/ α -1-抗胰凝乳蛋白酶比例、补体 C5 (BSI0782)、 ApoE4 (存在/不存在)	0.958	0.028	0.903	1.000
Afamin/ α -1-抗胰凝乳蛋白酶比例、补体 C5 (BSI0782)、 ApoE4 (0、1 或 2 个等位基因)	0.964	0.028	0.910	1.000

[0072] *对于所有Afamin/ α -1-抗胰凝乳蛋白酶比例组合,使用探针BSI0268和BSI0221。

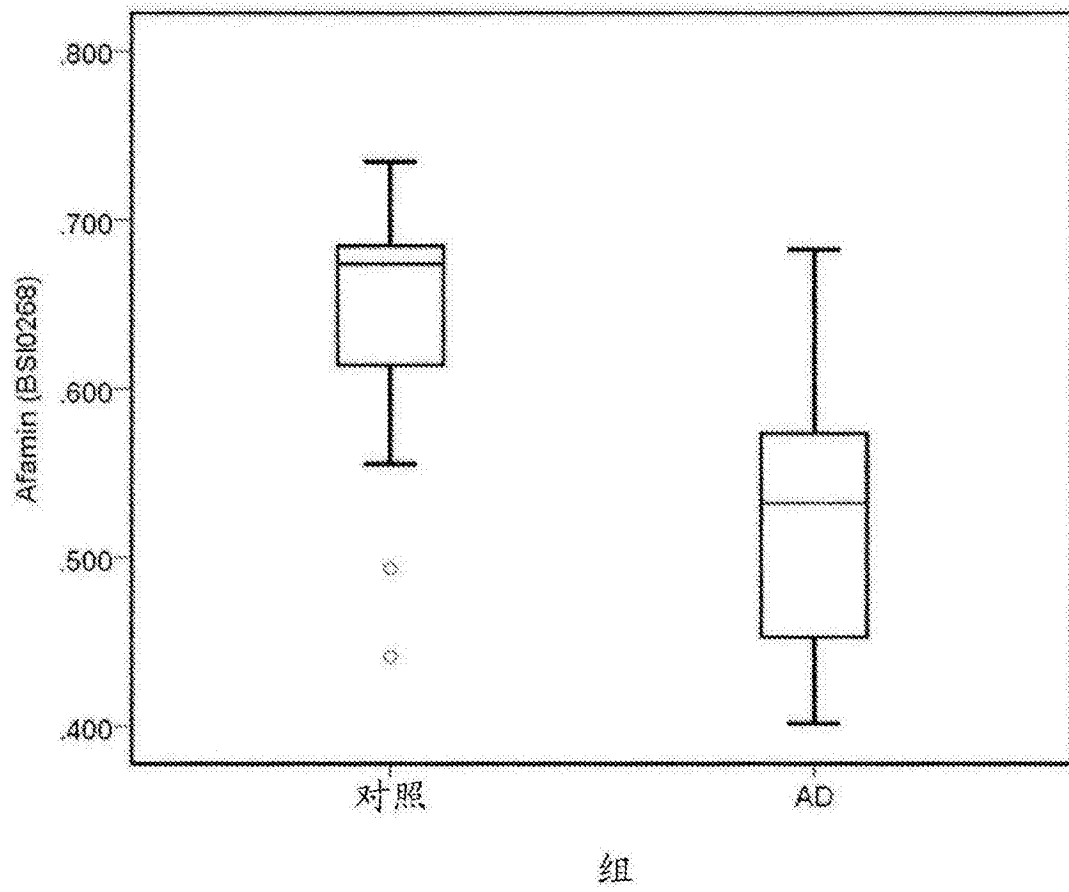


图1

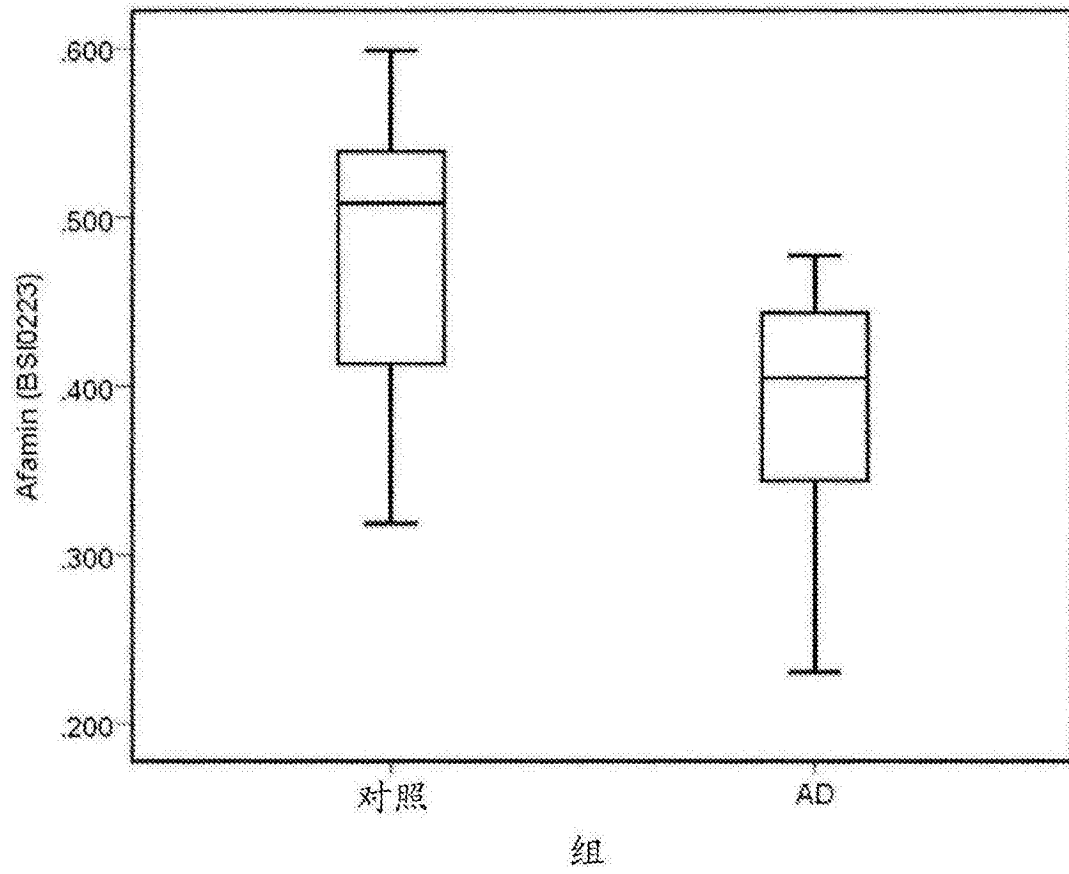


图2

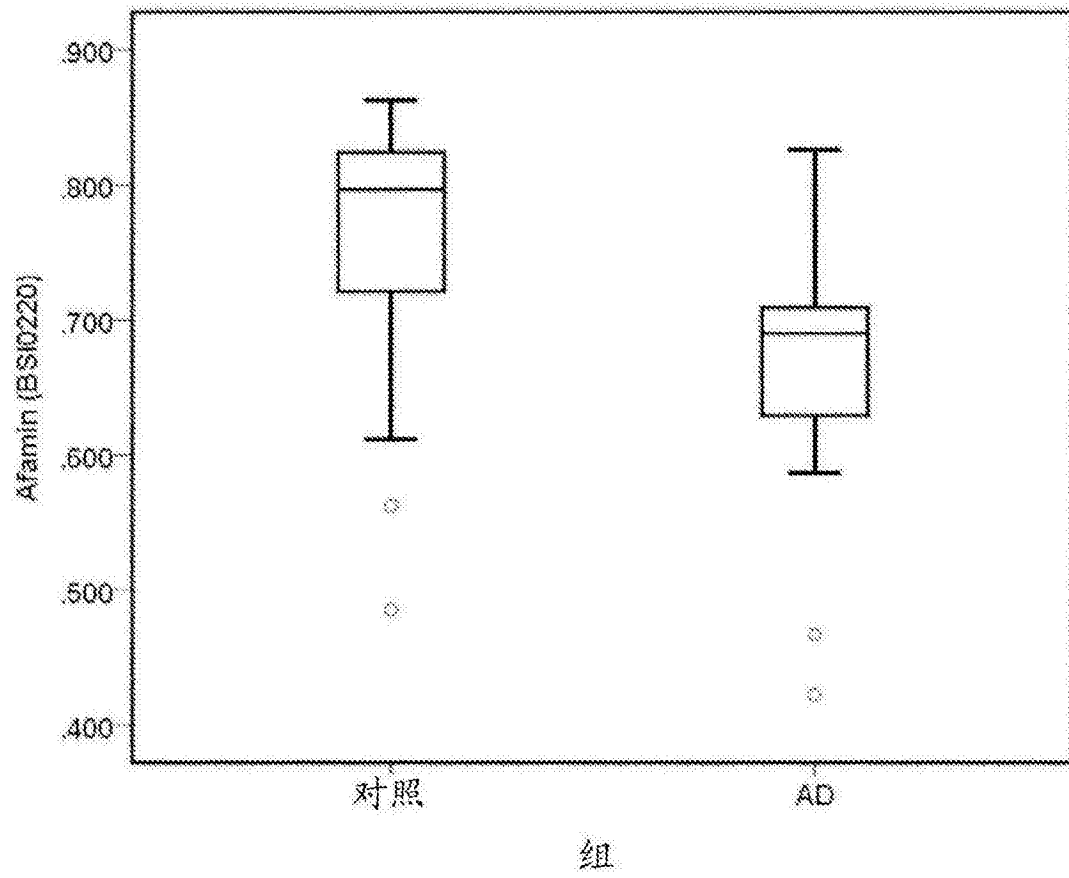


图3

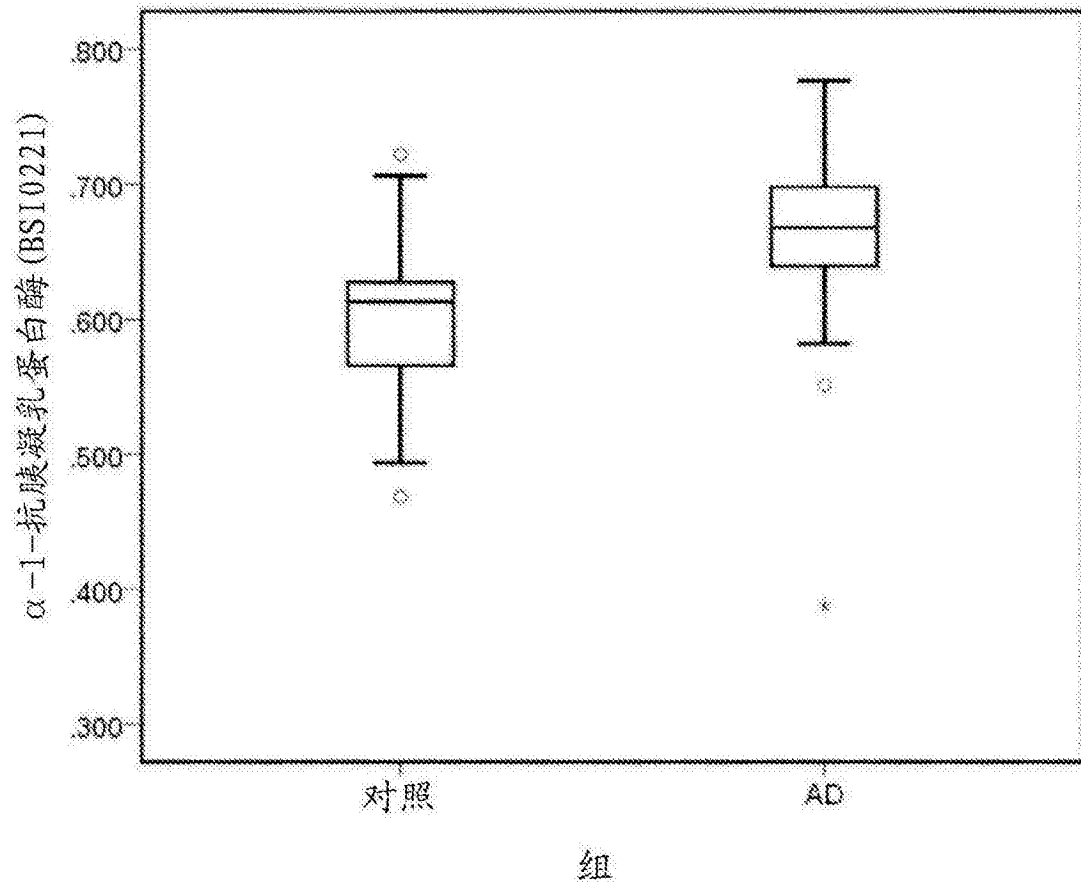


图4

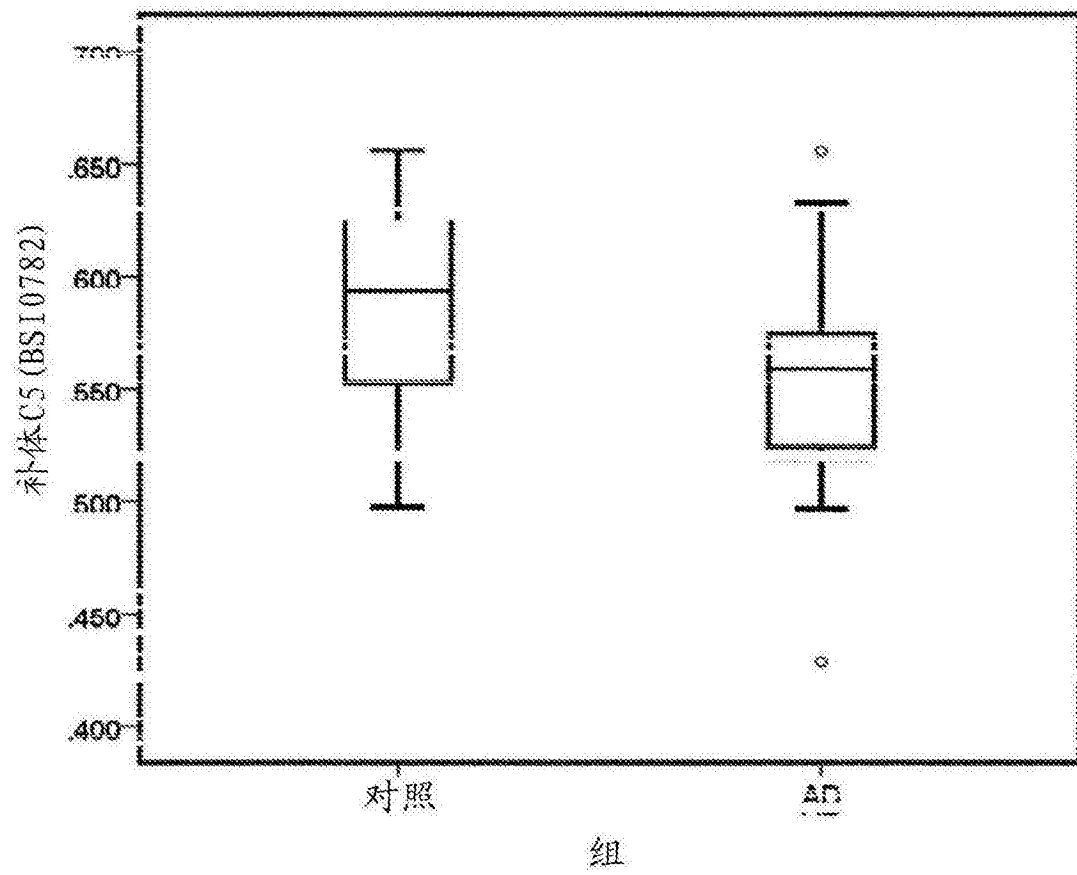


图5

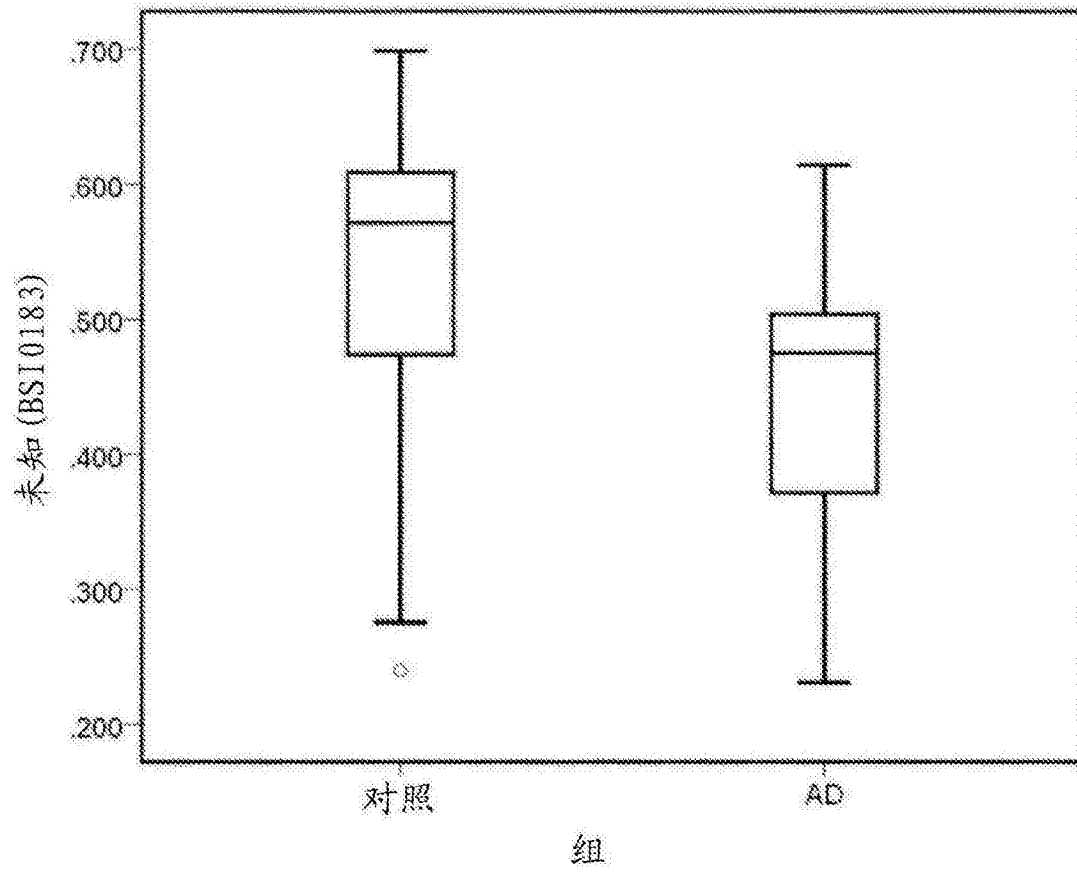


图6

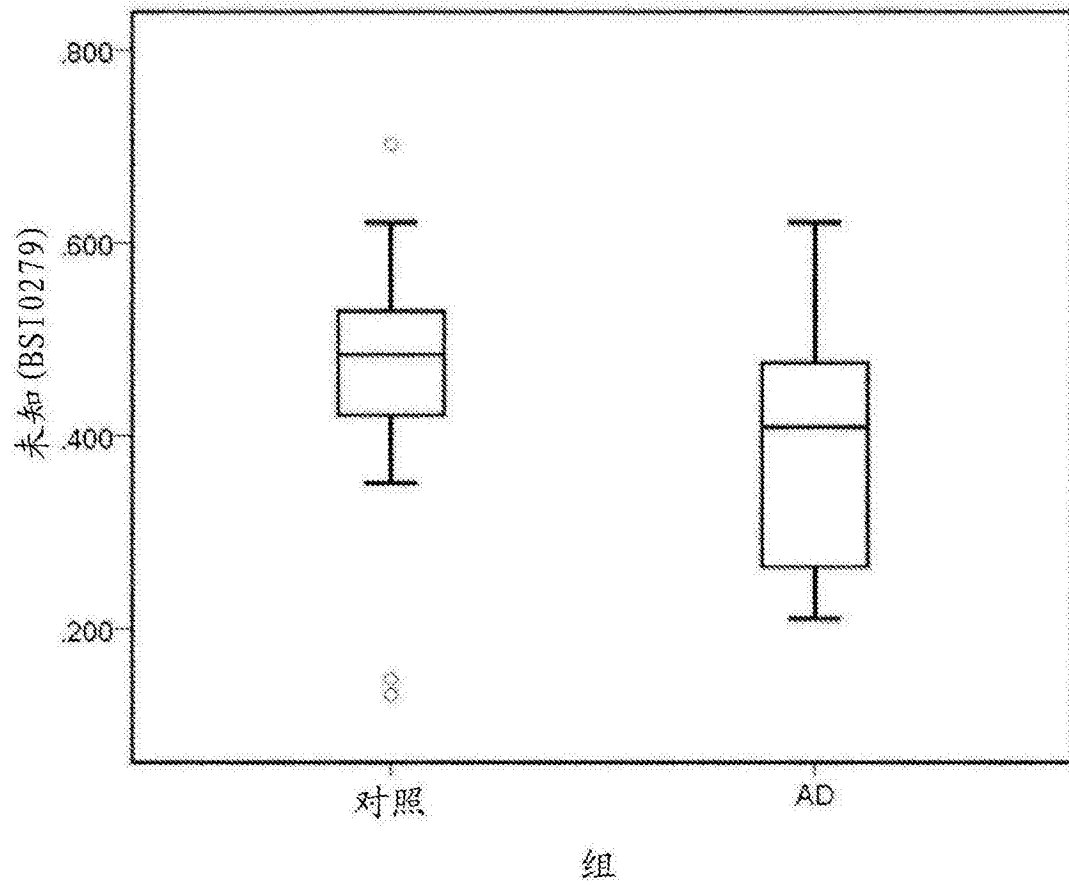


图7

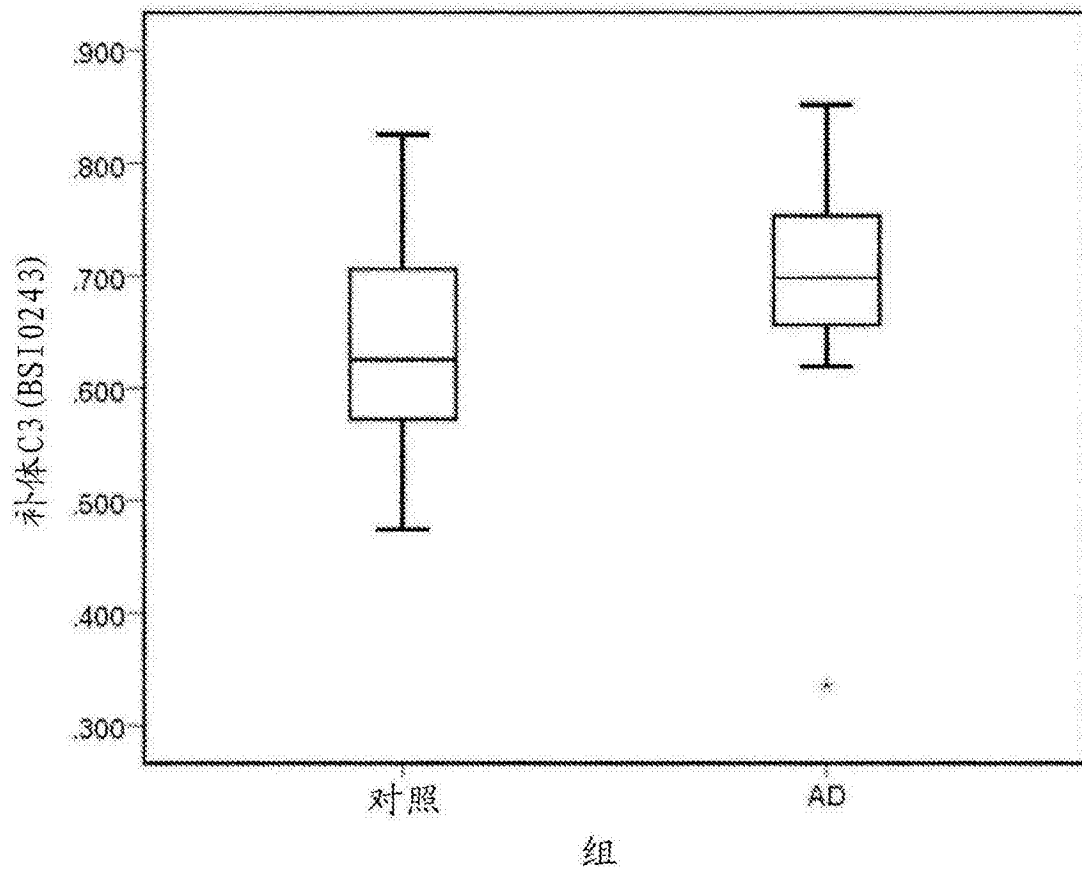


图8

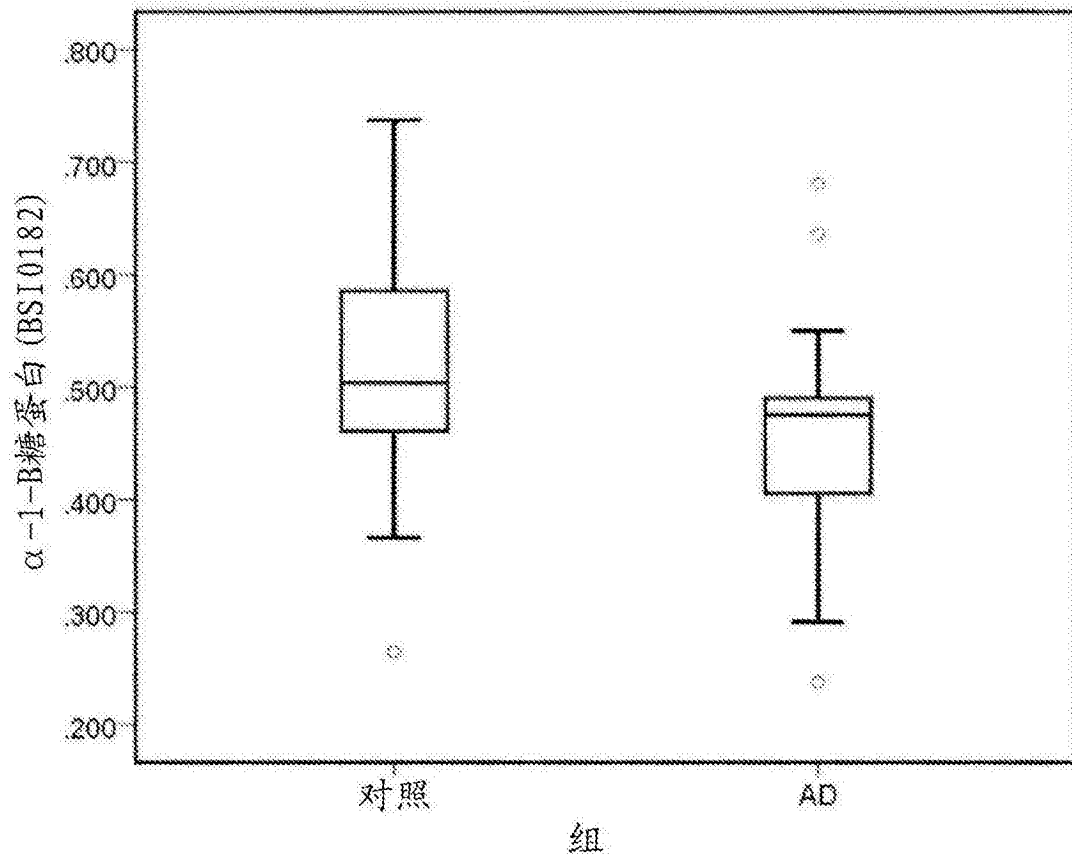


图9

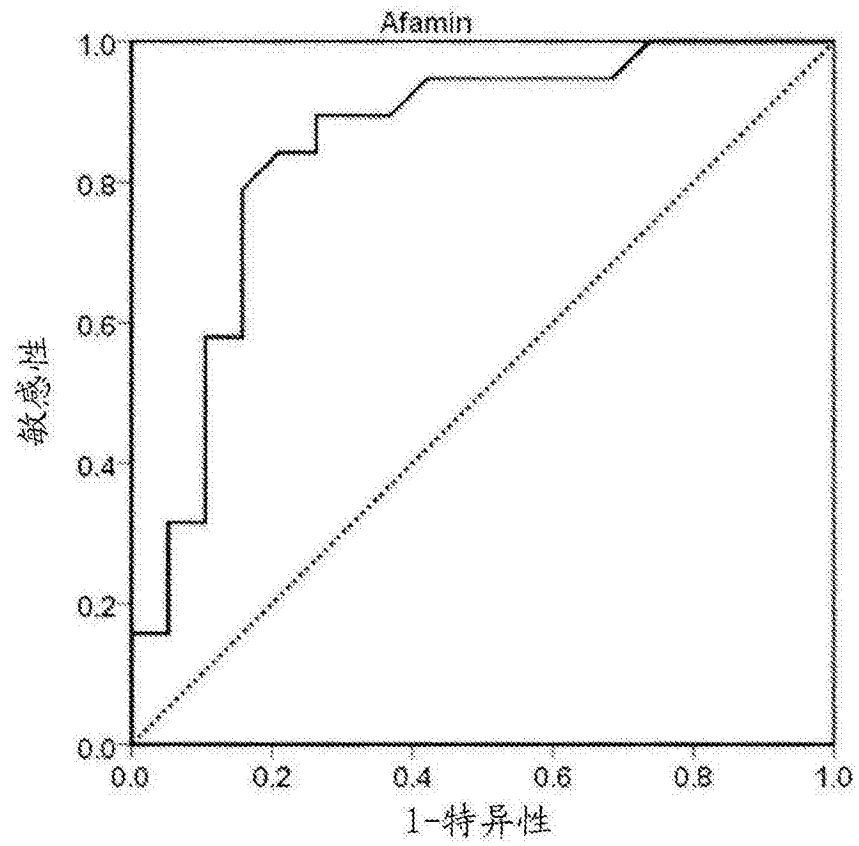


图10

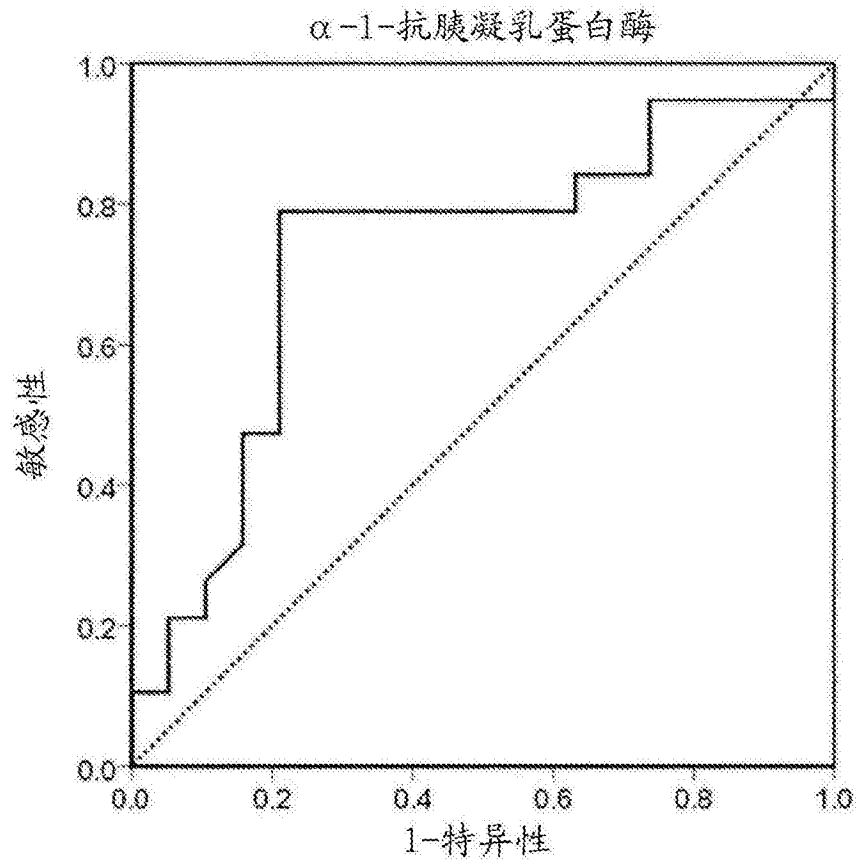


图11

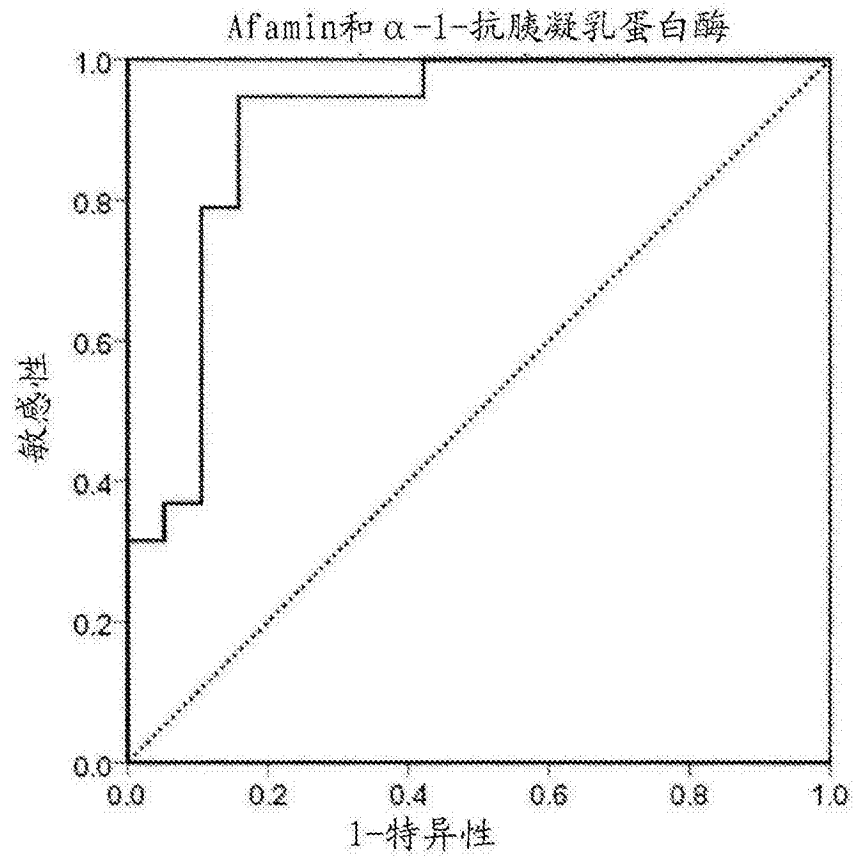


图12

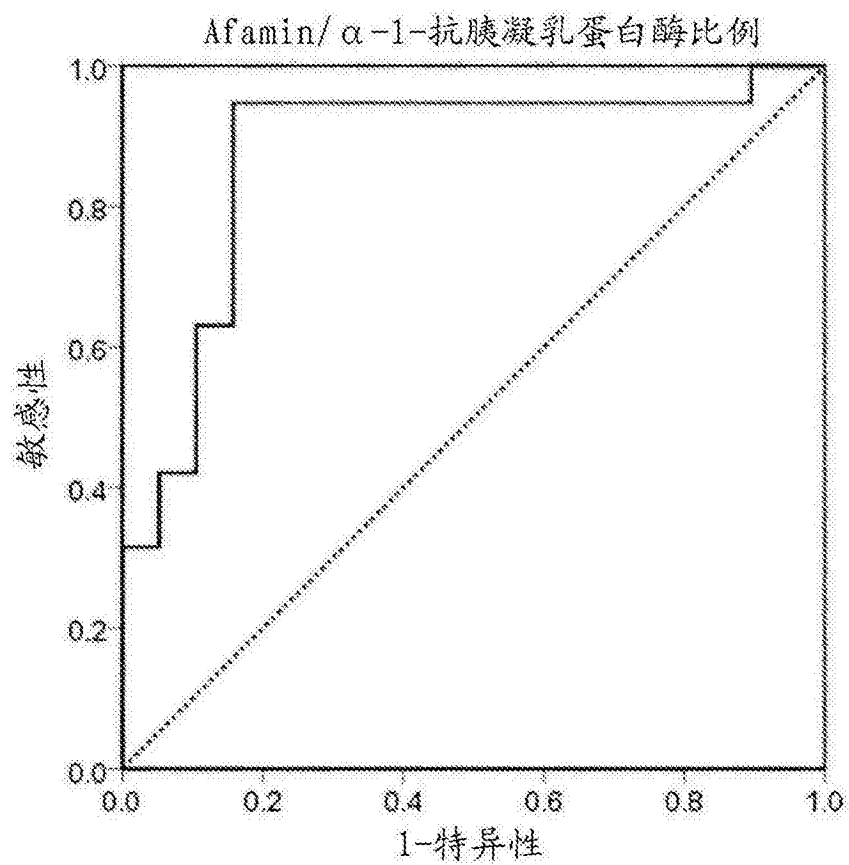


图13

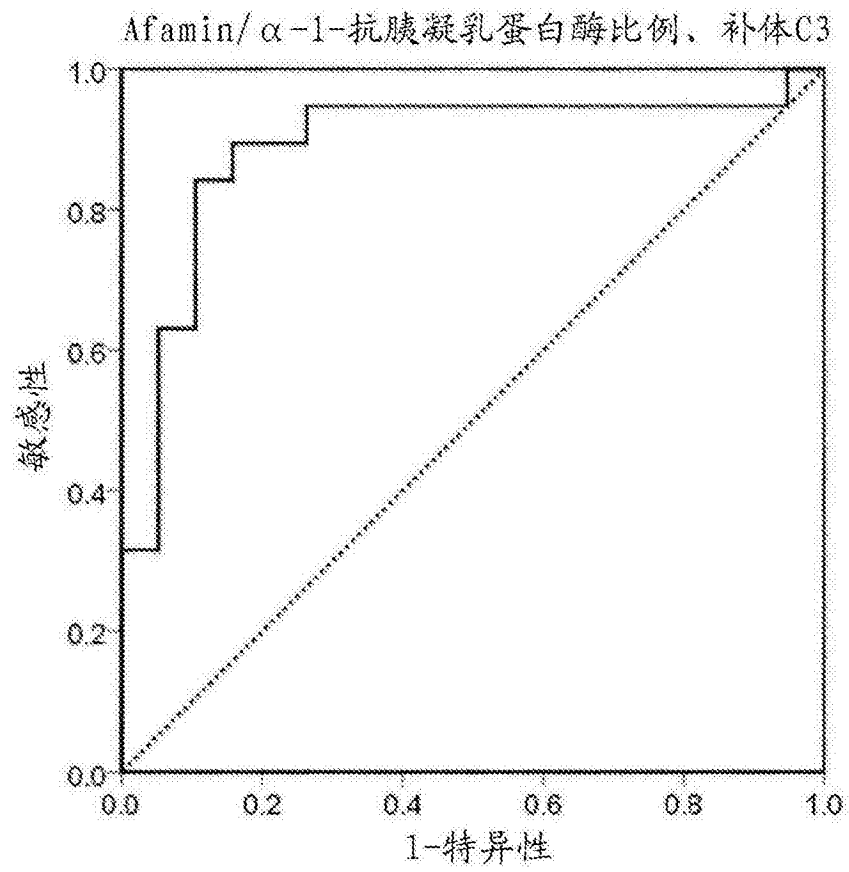


图14

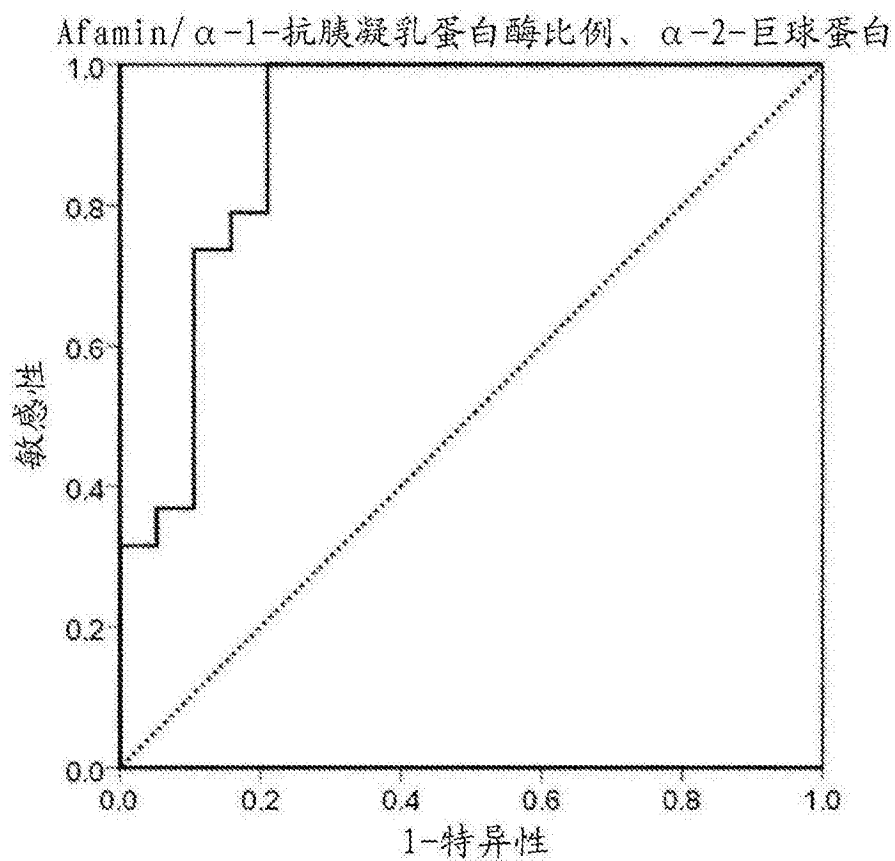


图15

Afamin/ α -1-抗胰凝乳蛋白酶比例、丝氨酸苏氨酸激酶TBK1

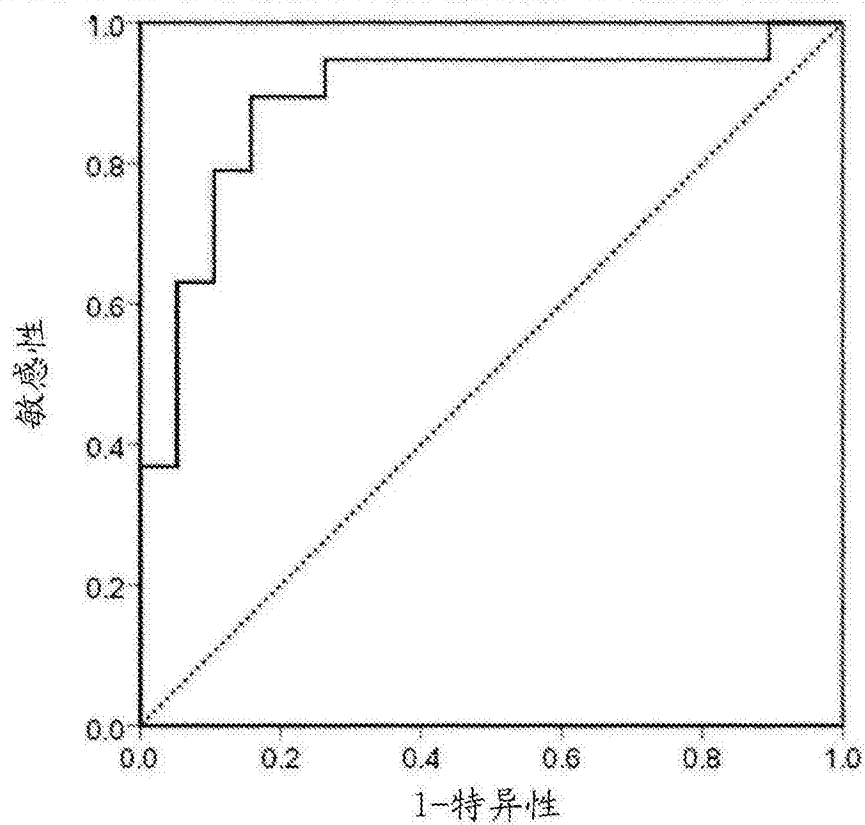


图16

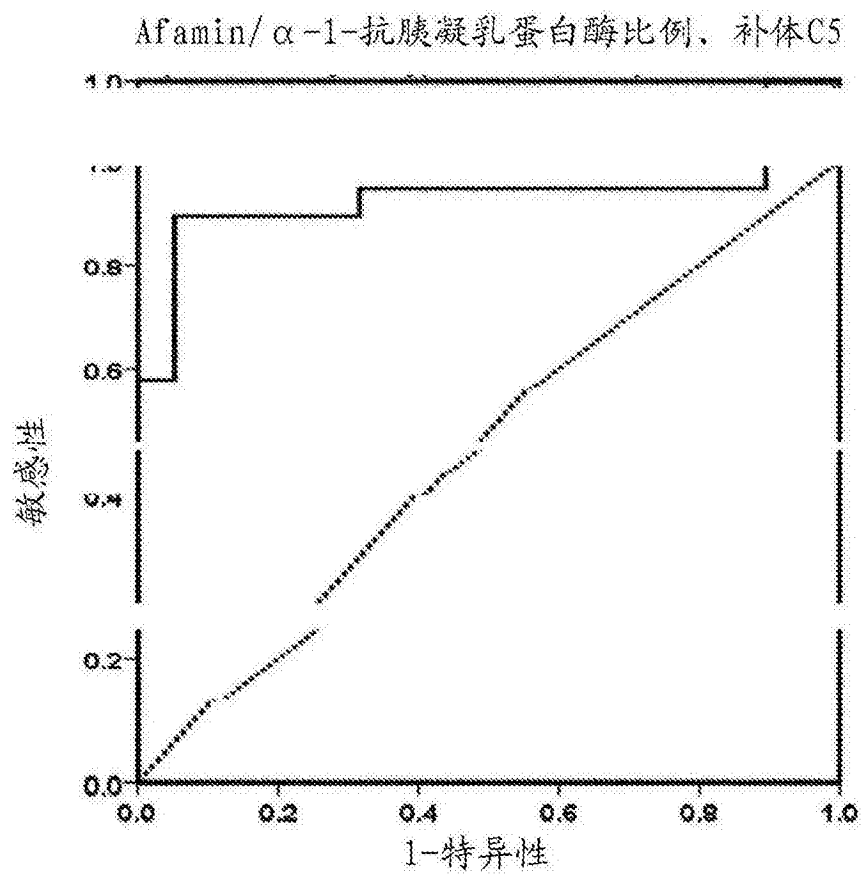


图17

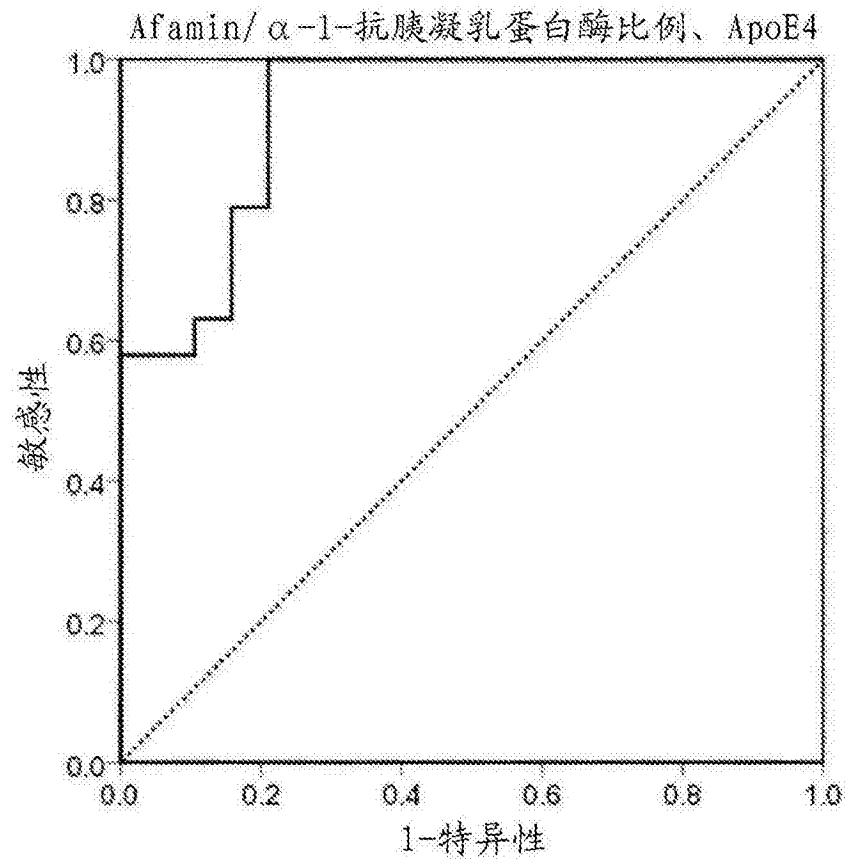


图18

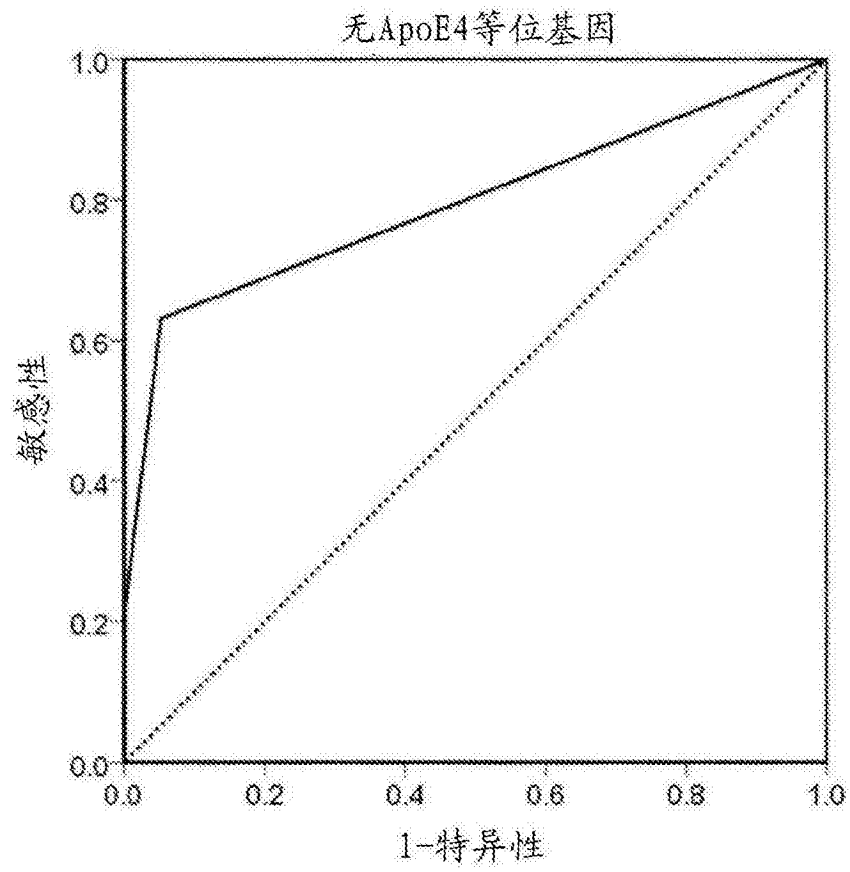


图19

Afamin/ α -1-抗胰凝乳蛋白酶比例、补体C3/C5、ApoE4
(0、1或2个等位基因)

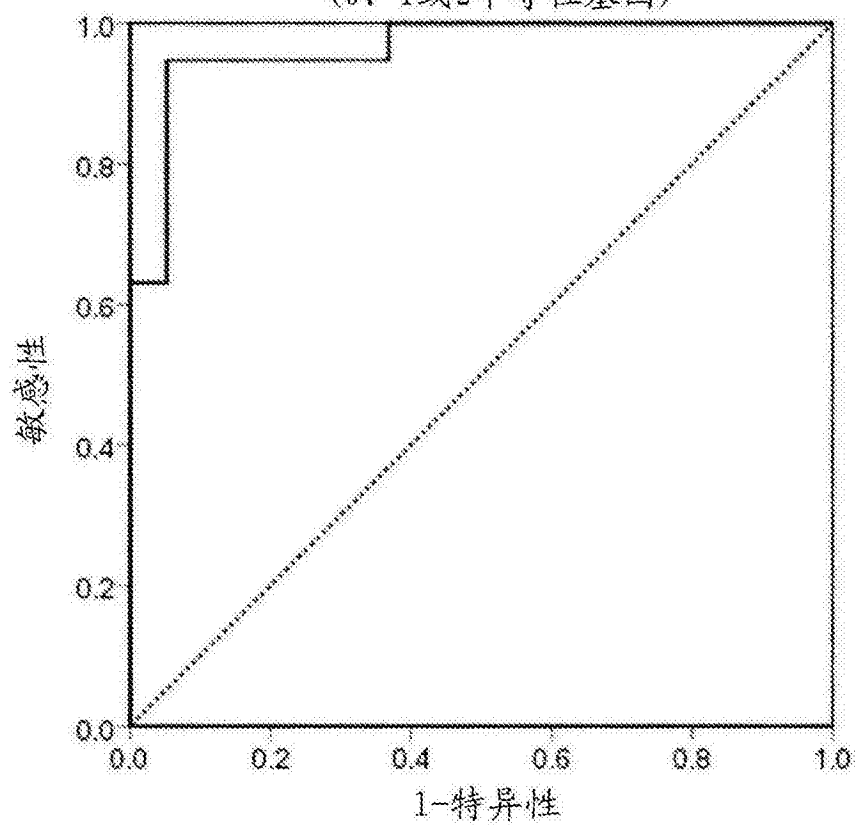


图20

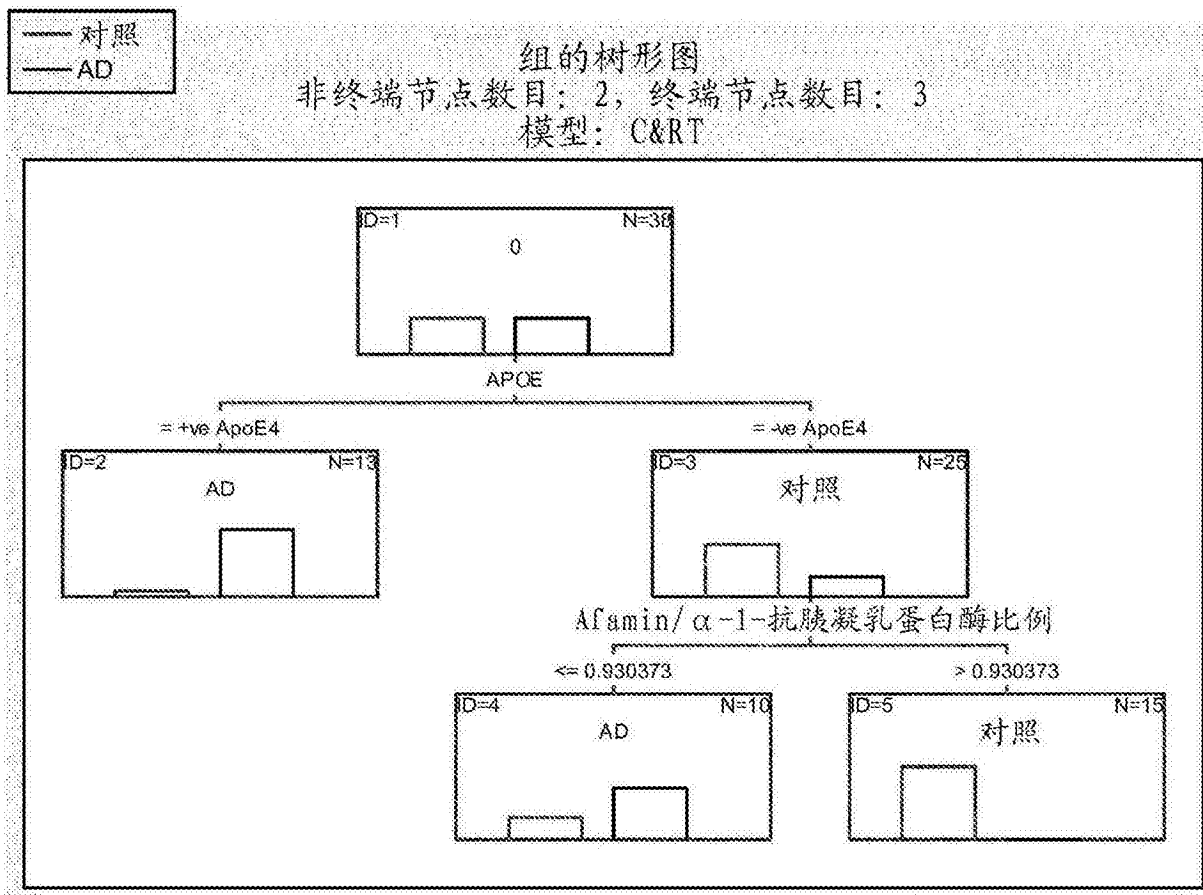


图21