(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103003693 B
(45)授权公告日 2016.07.06

(21)申请号 201180028608.X
(22)申请日 2011.04.13
(30)优先权数据
61/342363 2010.04.13 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2012.12.10
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/CH2011/000077 2011.04.13
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2011/127616 EN 2011.10.20
(73)专利权人 M-LAB股份有限公司
地址 德国美因茨
(72)发明人 F·格拉斯 N·勃姆 N·菲弗尔 K·贝尔
(74)专利代理机构 北京泛华伟业知识产权代理有限公司 11280
代理人 刘丹妮
(51)Int.Cl.
G01N 33/564(2006.01)
(56)对比文件
CN 101563081 A,2009.10.21,
KR 20090105357 A,2009.10.07,
审查员 黄晓丽

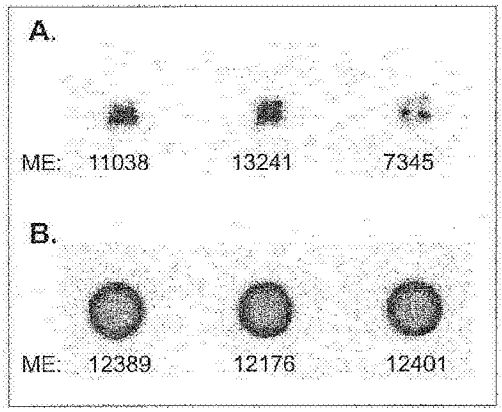
权利要求书5页 说明书29页 附图16页

(54)发明名称

青光眼的诊断方法

(57)摘要

本发明涉及第一种基于体液中抗至少一种至少部分纯化的眼部抗原样品的自身免疫反应性分析的青光眼诊断方法，其中测量抗单个抗原的自身免疫反应性并转化为青光眼得分以确定诊断结果。本发明的另一方面包括用于青光眼诊断的携带至少一种至少部分纯化的眼部抗原样品的抗原携带元件以及试剂盒。另一方面包括用于青光眼诊断方法的收集体液如泪液的方法。再一方面包括充当诊断标志物和/或用于制备治疗青光眼的药物组合物眼部抗原。本发明进一步涉及第二种青光眼的诊断方法，包括步骤：a)提供细胞的体外培养物；b)将来自测试个体的体液与所述的细胞的体外培养物进行孵育或将从测试个体的体液或人体样本中分馏的组分与所述的细胞的体外培养物进行孵育；c)分析细胞的蛋白表达和/或分析根据步骤b)处理后的细胞的生存力；和d)将步骤c)的分析结果与标准数据比较以确定诊断结果。



CN 103003693 B

1.至少一种眼部抗原样品在制备用于诊断青光眼的试剂盒中的用途，其中所述至少一种眼部抗原样品包括选自下组的至少部分纯化的眼部抗原中的至少四种抗原：肌动蛋白、白蛋白、α-1-抗胰蛋白酶、膜联蛋白I-IV、膜联蛋白V、β-2-肾上腺素能受体、脑源性神经营养因子(BDNF)、钙网蛋白、心磷脂、α-A-晶状体蛋白、α-B-晶状体蛋白、β-L-晶状体蛋白、β-S-晶状体蛋白、γ-晶状体蛋白、DNA拓扑异构酶1、纤连蛋白、α-胞衬蛋白、胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)、谷胱甘肽-S-转移酶、热休克蛋白HSP10、HSP27、HSP60、HSP70、胰岛素、jo-1、溶菌酶、髓磷脂结合蛋白(MBP)、髓鞘少突胶质细胞糖蛋白(MOG)、肌红蛋白、神经元特异性烯醇化酶(NSE)、神经营养因子3、神经营养因子4、神经营养因子5、过氧化物岐化酶、3-磷酸丝氨酸、前白蛋白、蛋白激酶C抑制剂、蛋白激酶C、超氧化物岐化酶、α-突触核蛋白、γ-突触核蛋白、甲状腺球蛋白、转铁蛋白、转甲状腺素蛋白、拓扑异构酶抑制剂、泛素、血管内皮生长因子(VEGF)和波形蛋白；并且

其中所述试剂盒通过包括以下步骤的方法进行诊断：

(a)提供至少一种样品，所述样品包括上述眼部抗原的组中的至少四种眼部抗原，

(b)将体液与步骤(a)中提供的眼部抗原样品中的至少一种进行反应，

(c)检测和/或定量步骤(b)中体液中的自身抗体与至少一种眼部抗原样品之间的反应，以测定至少一种眼部抗原样品的自身免疫反应性值，

(d)将测量的自身免疫反应性值与从青光眼患者和/或健康个体获得的标准数据进行比较，以确定至少一种眼部抗原样品的青光眼得分，和，

(e)任选地通过评估至少一种青光眼得分确定诊断结果。

2.根据权利要求1所述的用途，其中在步骤(c)-(e)的至少一个步骤中分配一个权重因子，该权重因子调节抗至少一种眼部抗原样品或抗至少一种眼部抗原的自身免疫反应性对诊断结果的贡献。

3.根据权利要求2所述的用途，其中通过在步骤(c)、(d)、(e)的至少一个步骤中应用的一种算法，向至少一种眼部抗原样品分配至少一个权重因子。

4.根据权利要求2或3所述的用途，其中通过对提供的用于与体液反应的单个眼部抗原的量进行加权而引入至少一个权重因子或者对提供的用于反应的体液量进行加权。

5.根据权利要求1所述的用途，其中所述眼部抗原样品中的至少一种样品包括选自A组24种眼部抗原中的至少2种抗原：肌动蛋白、α-1-抗胰蛋白酶、膜联蛋白V、α-A-晶状体蛋白、α-B-晶状体蛋白、β-L-晶状体蛋白、β-S-晶状体蛋白、γ-晶状体蛋白、α-胞衬蛋白、胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)、谷胱甘肽-S-转移酶、HSP27、HSP60、HSP70、jo-1、髓磷脂结合蛋白(MBP)、神经元特异性烯醇化酶(NSE)、蛋白激酶C抑制剂、超氧化物岐化酶、转铁蛋白、转甲状腺素蛋白、泛素、血管内皮生长因子(VEGF)、波形蛋白。

6.根据权利要求1所述的用途，其中所述至少一种眼部抗原样品包括选自A组和/或由如下9种眼部抗原组成的B组中的至少2种抗原：膜联蛋白I-IV、β-2-肾上腺素能受体、钙网蛋白、热休克蛋白HSP10、胰岛素、过氧化物岐化酶、蛋白激酶C、α-突触核蛋白、γ-突触核蛋白。

7.根据权利要求1所述的用途，其中所述至少部分纯化的眼部抗原的至少一种样品包括第2组中的下述36种眼部抗原中的至少一种眼部抗原：白蛋白、α-1-抗胰蛋白酶、膜联蛋白I-IV、膜联蛋白V、β-2-肾上腺素能受体、脑源性神经营养因子(BDNF)、钙网蛋白、心磷脂、

β-L-晶状体蛋白、β-S-晶状体蛋白、γ-晶状体蛋白、DNA拓扑异构酶1、纤连蛋白、热休克蛋白HSP10、胰岛素、jo-1、溶菌酶、髓鞘少突胶质细胞糖蛋白(MOG)、肌红蛋白、神经营养因子3、神经营养因子4、神经营养因子5、过氧化物岐化酶、3-磷酸丝氨酸、前白蛋白、蛋白激酶C抑制剂、蛋白激酶C、超氧化物岐化酶、α-突触核蛋白、γ-突触核蛋白、甲状腺球蛋白、转铁蛋白、转甲状腺素蛋白、拓扑异构酶抑制剂、泛素、血管内皮生长因子(VEGF)。

8.根据权利要求1所述的用途,其中所述眼部抗原样品中的至少一种样品包括少于10种的眼部抗原。

9.根据权利要求1所述的用途,其中所述部分纯化的眼部抗原样品中的至少一种样品由抗原携带元件携带,所述抗原携带元件是微阵列芯片,测流试纸条或微流控芯片。

10.根据权利要求1所述的用途,其中对体液进行收集、干燥以及任选地保存,随后重新配制以用于步骤(b)中。

11.根据权利要求1所述的用途,其中所述体液是泪液。

12.用于权利要求1-11中任一项所述的用途的一种抗原携带元件,所述抗原携带元件携带包含选自下组的至少四种抗原的至少一种样品:肌动蛋白、白蛋白、α-1-抗胰蛋白酶、膜联蛋白I-IV、膜联蛋白V、β-2-肾上腺素能受体、脑源性神经营养因子(BDNF)、钙网蛋白、心磷脂、α-A-晶状体蛋白、α-B-晶状体蛋白、β-L-晶状体蛋白、β-S-晶状体蛋白、γ-晶状体蛋白、DNA拓扑异构酶1、纤连蛋白、α-胞衬蛋白、胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)、谷胱甘肽-S-转移酶、热休克蛋白HSP10、HSP27、HSP60、HSP70、胰岛素、jo-1、溶菌酶、髓磷脂结合蛋白(MBP)、髓鞘少突胶质细胞糖蛋白(MOG)、肌红蛋白、神经元特异性烯醇化酶(NSE)、神经营养因子3、神经营养因子4、神经营养因子5、过氧化物岐化酶、3-磷酸丝氨酸、前白蛋白、蛋白激酶C抑制剂、蛋白激酶C、超氧化物岐化酶、α-突触核蛋白、γ-突触核蛋白、甲状腺球蛋白、转铁蛋白、转甲状腺素蛋白、拓扑异构酶抑制剂、泛素、血管内皮生长因子(VEGF)和波形蛋白。

13.根据权利要求12所述的抗原携带元件,其中至少部分纯化的眼部抗原的至少一种样品包含选自第2组的以下36个眼部抗原中的至少1种抗原:白蛋白、α-1-抗胰蛋白酶、膜联蛋白I-IV、膜联蛋白V、β-2-肾上腺素能受体、脑源性神经营养因子(BDNF)、钙网蛋白、心磷脂、β-L-晶状体蛋白、β-S-晶状体蛋白、γ-晶状体蛋白、DNA拓扑异构酶1、纤连蛋白、热休克蛋白HSP10、胰岛素、jo-1、溶菌酶、髓鞘少突胶质细胞糖蛋白(MOG)、肌红蛋白、神经营养因子3、神经营养因子4、神经营养因子5、过氧化物岐化酶、3-磷酸丝氨酸、前白蛋白、蛋白激酶C抑制剂、蛋白激酶C、超氧化物岐化酶、α-突触核蛋白、γ-突触核蛋白、甲状腺球蛋白、转铁蛋白、转甲状腺素蛋白、拓扑异构酶抑制剂、泛素、血管内皮生长因子(VEGF)。

14.根据权利要求12所述的抗原携带元件,其中至少部分纯化的抗原的至少一种样品包含选自A组和B组的抗原,其中所述A组为以下24种眼部抗原:肌动蛋白、α-1-抗胰蛋白酶、膜联蛋白V、α-A-晶状体蛋白、α-B-晶状体蛋白、β-L-晶状体蛋白、β-S-晶状体蛋白、γ-晶状体蛋白、α-胞衬蛋白、胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)、谷胱甘肽-S-转移酶、HSP27、HSP60、HSP70、jo-1、髓磷脂结合蛋白(MBP)、神经元特异性烯醇化酶(NSE)、蛋白激酶C抑制剂、超氧化物岐化酶、转铁蛋白、转甲状腺素蛋白、泛素、血管内皮生长因子(VEGF)、波形蛋白;并且所述B组为以下9种眼部抗原:膜联蛋白I-IV、β-2-肾上腺素能受体、钙网蛋白、热休克蛋白HSP10、胰岛素、过氧化物岐化酶、蛋白激酶C、α-突触核蛋白、γ-突触核蛋白。

15.根据权利要求12所述的抗原携带元件,其中抗原携带元件上存在加权量的单个抗

原。

16.根据权利要求12所述的抗原携带元件，其包括一个抗原区和一个体液接收区。

17.根据权利要求16所述的抗原携带元件，其中所述接收区包括收集泪液或另一种体液的吸收材料。

18.根据权利要求16或17所述的抗原携带元件，其中所述接收区被设计为直接接触患者。

19.一种青光眼诊断试剂盒，其包括根据权利要求12-18中任一项所述的抗原携带元件。

20.根据权利要求19所述的青光眼诊断试剂盒，进一步包括收集体液的辅助材料和/或计算和/或显示诊断结果的软件组件和/或处理体液样品或当体液中的自身抗体与抗原携带元件上的一组抗原反应时加入的反应物。

21.根据权利要求20所述的青光眼诊断试剂盒，其中所述收集体液的辅助材料为收集泪液的吸水纸。

22.根据权利要求1所述的用途，其中将检测的体液收集到抗原携带元件的接收区，将所述体液转移到抗原携带元件的抗原承载区以用于分析其自身免疫反应性，或将所述体液直接从吸收材料流动或扩散到抗原携带元件。

23.根据权利要求1所述的用途，其中所述用于诊断青光眼的试剂盒是用于快速检测以检测早期青光眼、确定不同类型的青光眼或监测疾病进展或药物治疗效果的试剂盒。

24.选自第2组的以下36个眼部抗原：白蛋白、α-1-抗胰蛋白酶、膜联蛋白I-IV、膜联蛋白V、β-2-肾上腺素能受体、脑源性神经营养因子(BDNF)、钙网蛋白、心磷脂、β-L-晶状体蛋白、β-S-晶状体蛋白、γ-晶状体蛋白、DNA拓扑异构酶1、纤连蛋白、热休克蛋白HSP10、胰岛素、jo-1、溶菌酶、髓鞘少突胶质细胞糖蛋白(MOG)、肌红蛋白、神经营养因子3、神经营养因子4、神经营养因子5、过氧化物岐化酶、3-磷酸丝氨酸、前白蛋白、蛋白激酶C抑制剂、蛋白激酶C、超氧化物岐化酶、α-突触核蛋白、γ-突触核蛋白、甲状腺球蛋白、转铁蛋白、转甲状腺素蛋白、拓扑异构酶抑制剂、泛素、血管内皮生长因子(VEGF)中的至少四个眼部抗原或对第2组抗原中的至少四个眼部抗原具有特异性的抗体在制备用于青光眼诊断方法中的试剂、或在用于青光眼诊断方法的抗原携带元件中的用途。

25.选自第2组的以下36个眼部抗原：白蛋白、α-1-抗胰蛋白酶、膜联蛋白I-IV、膜联蛋白V、β-2-肾上腺素能受体、脑源性神经营养因子(BDNF)、钙网蛋白、心磷脂、β-L-晶状体蛋白、β-S-晶状体蛋白、γ-晶状体蛋白、DNA拓扑异构酶1、纤连蛋白、热休克蛋白HSP10、胰岛素、jo-1、溶菌酶、髓鞘少突胶质细胞糖蛋白(MOG)、肌红蛋白、神经营养因子3、神经营养因子4、神经营养因子5、过氧化物岐化酶、3-磷酸丝氨酸、前白蛋白、蛋白激酶C抑制剂、蛋白激酶C、超氧化物岐化酶、α-突触核蛋白、γ-突触核蛋白、甲状腺球蛋白、转铁蛋白、转甲状腺素蛋白、拓扑异构酶抑制剂、泛素、血管内皮生长因子(VEGF)中的至少四个眼部抗原或对第2组中至少四个眼部抗原具有特异性的抗体在制备用于治疗性处理的试剂中的用途。

26.选自第2组的以下36个眼部抗原：白蛋白、α-1-抗胰蛋白酶、膜联蛋白I-IV、膜联蛋白V、β-2-肾上腺素能受体、脑源性神经营养因子(BDNF)、钙网蛋白、心磷脂、β-L-晶状体蛋白、β-S-晶状体蛋白、γ-晶状体蛋白、DNA拓扑异构酶1、纤连蛋白、热休克蛋白HSP10、胰岛素、jo-1、溶菌酶、髓鞘少突胶质细胞糖蛋白(MOG)、肌红蛋白、神经营养因子3、神经营养因

子4、神经营养因子5、过氧化物岐化酶、3-磷酸丝氨酸、前白蛋白、蛋白激酶C抑制剂、蛋白激酶C、超氧化物岐化酶、α-突触核蛋白、γ-突触核蛋白、甲状腺球蛋白、转铁蛋白、转甲状腺素蛋白、拓扑异构酶抑制剂、泛素、血管内皮生长因子(VEGF)中的至少四个眼部抗原或对第2组中至少四个眼部抗原具有特异性的抗体在制备用于青光眼的治疗性处理的试剂中的用途。

27.选自第2组的以下36个眼部抗原:白蛋白、α-1-抗胰蛋白酶、膜联蛋白I-IV、膜联蛋白V、β-2-肾上腺素能受体、脑源性神经营养因子(BDNF)、钙网蛋白、心磷脂、β-L-晶状体蛋白、β-S-晶状体蛋白、γ-晶状体蛋白、DNA拓扑异构酶1、纤连蛋白、热休克蛋白HSP10、胰岛素、jo-1、溶菌酶、髓鞘少突胶质细胞糖蛋白(MOG)、肌红蛋白、神经营养因子3、神经营养因子4、神经营养因子5、过氧化物岐化酶、3-磷酸丝氨酸、前白蛋白、蛋白激酶C抑制剂、蛋白激酶C、超氧化物岐化酶、α-突触核蛋白、γ-突触核蛋白、甲状腺球蛋白、转铁蛋白、转甲状腺素蛋白、拓扑异构酶抑制剂、泛素、血管内皮生长因子(VEGF)中的至少四个眼部抗原或对第2组中至少四个眼部抗原具有特异性的抗体在制备用于医学治疗或青光眼治疗的试剂中的用途。

28.抗体探针在制备用于诊断青光眼的试剂盒中的用途,其中所述抗体探针针对选自下组的至少四种眼部抗原:肌动蛋白、白蛋白、α-1-抗胰蛋白酶、膜联蛋白I-IV、膜联蛋白V、β-2-肾上腺素能受体、脑源性神经营养因子BDNF、钙网蛋白、心磷脂、α-A-晶状体蛋白、α-B-晶状体蛋白、β-L-晶状体蛋白、β-S-晶状体蛋白、γ-晶状体蛋白、DNA拓扑异构酶1、纤连蛋白、α-胞衬蛋白、胶质原纤维酸性蛋白GFAP、谷胱甘肽-S-转移酶、热休克蛋白HSP10、HSP27、HSP60、HSP70、胰岛素、jo-1、溶菌酶、髓磷脂结合蛋白MBP、髓鞘少突胶质细胞糖蛋白MOG、肌红蛋白、神经元特异性烯醇化酶NSE、神经营养因子3、神经营养因子4、神经营养因子5、过氧化物岐化酶、3-磷酸丝氨酸、前白蛋白、蛋白激酶C抑制剂、蛋白激酶C、超氧化物岐化酶、α-突触核蛋白、γ-突触核蛋白、甲状腺球蛋白、转铁蛋白、转甲状腺素蛋白、拓扑异构酶抑制剂、泛素、血管内皮生长因子(VEGF)、和波形蛋白;并且

其中所述试剂盒通过包括以下步骤的方法进行诊断:

(a)提供细胞的体外培养物;

(b)通过以测试个体的体液孵育来处理细胞培养物;

(c)对细胞的体外培养物的蛋白表达进行分析和/或对根据步骤(b)处理后的细胞的生存力进行分析;和

(d)将步骤(c)的分析结果与标准数据进行比较以确定诊断结果;

其中步骤(c)包括特异性测量至少一种生物标志物的表达的一项分析,其中已知所述生物标志物任选地与青光眼疾病或自身免疫疾病或神经退行性疾病或细胞凋亡相关;并且

其中所述分析是采用对至少一种生物标志物具有特异性的至少一种抗体探针进行的免疫分析。

29.根据权利要求28所述的用途,其中所述的体外培养物的细胞是永生化的,或原代视网膜神经节细胞,或视网膜神经节细胞的前体细胞。

30.根据权利要求28或29所述的用途,其中用于步骤(b)中处理的体液是血清或泪液。

31.根据权利要求28或29所述的用途,其中用于步骤(b)中处理的体液是预处理的或者分馏的。

32.根据权利要求31所述的用途，其中所述的预处理的或分馏的体液包括自身抗体或包括一组自身抗体或不包括特定组的抗体。

33.根据权利要求28所述的用途，其中根据步骤(c)的蛋白表达分析包括细胞裂解，回收包括胞内蛋白和/或胞外蛋白的细胞蛋白，以及任选的蛋白消化和/或蛋白纯化和/或蛋白分馏或分离。

34.根据权利要求28所述的用途，其中根据步骤(c)的蛋白表达分析包括通过质谱分析法或MLIDI TOF质谱分析法或SELDI TOF质谱分析法或轨道阱质谱分析法(orbitrap)或液相色谱质谱分析法进行的蛋白分析。

35.根据权利要求28所述的用途，其中根据步骤(c)的蛋白表达分析包括免疫分析如蛋白质印迹、微阵列、ELISA(酶联免疫吸附分析)、ELISPOT(酶联免疫斑点技术)。

36.根据权利要求28所述的用途，其中步骤(c)的蛋白表达分析在所述体外细胞培养物的细胞上原位进行。

37.根据权利要求28所述的用途，其中步骤(c)包括对细胞的生存力的分析，所述分析包括流式细胞术和/或采用膜联蛋白V和丙啶标记细胞和/或水溶性四氮唑检测或阿尔玛蓝(alamar blue)染色。

38.根据权利要求28所述的用途，其中步骤(c)包括对蛋白表达分析结果的数据处理，其中该数据处理和蛋白表达分析结果与步骤(d)中标准数据的比较在一个组合的计算过程中进行。

39.根据权利要求28所述的用途，其中将蛋白表达分析的结果与标准数据进行比较以确定步骤(d)中的诊断结果，所述标准数据来自对照运行，其中步骤(b)中的体液获得自青光眼患者和健康个体。

青光眼的诊断方法

发明领域

[0001] 本发明属于医学诊断领域，特别涉及基于自身免疫反应性的分析来诊断青光眼的方法。本发明包括两种青光眼诊断方法。第一种和第二种诊断方法都依靠青光眼患者体液中的自身免疫反应性。本发明的另一方面涉及调节青光眼患者自身免疫反应性的治疗方法。

[0002] 第一种青光眼的诊断方法是基于体液抗至少部分纯化的眼部抗原的自身免疫反应性的分析。第二种青光眼的诊断方法是基于体液中自身抗体对体外培养的视网膜神经节细胞(RGC)蛋白质表达的影响的分析。

[0003] 发明背景

[0004] 青光眼是一类以进行性丧失视网膜神经节细胞及其轴突，以及逐渐丧失视野为特征的眼部疾病。它是世界上导致失明的主要原因之一。青光眼在欧洲的普通人群中的患病率达到约1-2%。超过60岁的人群中高达3-4%受该病影响。青光眼最常见的类型是原发性开角型青光眼(POAG)，患病率为1.1%到2%。

[0005] 仅部分理解青光眼的发病机制，眼内压的升高并不是导致该疾病的唯一因素。仍认为升高的眼内压是一个主要的风险因素，但是其他的致病因素，如细胞凋亡过程、一氧化氮水平升高或者免疫系统的参与都可能是相关的。

[0006] 此外，眼内压的升高是非常普遍的(占40岁人群的10%)，然而只有一些人在几年后患上青光眼。到目前为止，没有标准的诊断测试可以确定哪些眼内压升高的人会患上青光眼。由于青光眼的早期治疗对防止视力丧失是至关重要的，因此需要一种改进的诊断工具，可以不依赖于眼内压升高而在早期检测出青光眼。

[0007] 已知眼内压的升高是导致视网膜细胞死亡和青光眼发病的主要原因。已经在体外模拟压力的升高导致细胞死亡。Agar等(Brain Res.2006.1086(1):p.191-200)将视网膜神经节细胞的体外培养物暴露于升高的静水 压力中，诱发了细胞死亡。

[0008] 然而，已知约30%的青光眼病例并未伴随眼内压升高。至少一些类型的青光眼疾病与神经退行性疾病的模式相吻合，该类疾病的神经系统出现进行性机能失调并且受影响的外周或中枢神经系统结构进行性萎缩。因此，需要讨论除眼内压升高之外的其它导致视网膜神经节细胞破坏的原因和机制，如一氧化氮水平的升高或者T-细胞介导的过程或者自身的免疫攻击。

[0009] 青光眼的早期检测方法仍然是有限的。测量眼内压可以检测一些患者，但是压力水平的波动可能导致假阴性结果。当患者意识到视力丧失时，在大多数情况下视网膜神经节细胞已经发生了严重的不可逆转的缺陷。

[0010] 大致30%的青光眼病例没有伴随眼内压的升高，称之为正常眼压性青光眼。传统的检测眼内压升高的方法对这些患者无效。考虑到缺少正常眼压性青光眼的诊断方法以及缺少早期青光眼的检测方法，开发一种不依赖眼内压升高的青光眼检测方法是非常必要的。多个研究表明血清抗体抗眼部抗原，从而证明自身免疫是青光眼的一个重要因素。例如，与健康受试者相比，热休克蛋白HSP27、HSP60、α-B-晶状体蛋白，γ-烯醇化酶，α-胞衬蛋白、谷

胱甘肽-S-转移酶和糖胺聚糖在青光眼患者中具有不同水平的结合反应性(例如Joachim,S.C.等人,Curr.Eye Res.2007,32(6):p.501-9)。有趣的是,青光眼患者的体液的特征是不仅可能具有自身攻击性影响的抗体反应性升高,而且对某些抗原的自身免疫反应性降低。此外,还显示在细胞培养方法中直接施用抗-HSP抗体可以导致视网膜神经节细胞的凋亡(Tezel G等人.Invest Ophthalmol.Vis.Sci.1998;39:2277-2287)。

[0011] 先前已经披露了基于青光眼患者的特定自身免疫反应性模式的诊断方法。例如,WO2004/036620披露了通过分析体液如血清、眼泪、房水或唾液中抗眼部抗原的复杂自身抗体谱来诊断青光眼的方法。使用了作为眼部抗原来源视网膜抗原、视神经抗原和其它的粗混合物并且检测了复杂的自身免疫反应性模式。公开了用于自身免疫反应性模式的检测和测量的多种免疫分析技术,包括蛋白质印迹试验、化学发光分析,ELISA,放射免疫分析,以及用于数字图像检测、加工和分析的方法用于生成和比较分析受试个体,健康个体和青光眼患者的自身免疫反应模式。文献WO2004/036220教导了依靠抗眼部抗原的自身免疫反应性模式的青光眼诊断方法,但是并没有从大量眼部抗原的复杂混合物中分离出所述眼部抗原,并且大部分所述眼部抗原尚未确定。受试个体、健康个体和青光眼患者体液的自身免疫反应性模式的差异产生诊断结果。然而,涉及其他疾病如癌症的诊断领域的研究表明,基于抗未知性质的生物标志物的自身免疫反应性的诊断通常是不可靠的。因此需要一种可靠的不依赖于眼内压升高的青光眼的诊断方法。

[0012] 本发明的一个目的是提供替代的、改进的和可靠的不依赖于升高的眼内压的通过体液分析检测青光眼的诊断方法。本发明的另一个目的是提供具有可选择的灵敏度和特异性程度的检测青光眼的诊断方法,用于快速检测和专业实验室检测。本发明的另一目的包括提供用于青光眼诊断的抗原携带元件和试剂盒,以及充当青光眼诊断的生物标志物和充当青光眼的治疗性处理的阻断剂的新确定的眼部抗原。

[0013] 发明概述

[0014] 本发明的一个方面涉及第一种基于体液中抗至少一种样品的自身免疫反应性分析的青光眼诊断方法,所述样品包含至少一种至少部分纯化的眼部抗原,其中测量抗一种或多种已知眼部抗原的自身免疫反应性,并针对所测量的自身免疫反应性对诊断结果的优选加权的贡献,将其变换为青光眼得分。

[0015] 本发明的另一个方面包括携带至少一种部分纯化的眼部抗原的抗原携带元件及制备这些抗原携带元件的方法,以及将其用于青光眼的诊断。另一方面包括包含抗原携带元件以及任选的辅助材料的用于诊断青光眼的试剂盒。另一个方面包括收集用于青光眼诊断方法的体液如泪液的方法。再一方面包括充当青光眼诊断的生物标志物或充当青光眼的治疗性处理中的治疗剂,或者用于制备结合所述眼部抗原的特异性抗体的眼部抗原在诊断或治疗方法或组合物中的应用。

[0016] 第一种青光眼的诊断方法包括步骤:(a)提供至少一种样品,所述样品包括至少一种至少部分纯化的眼部抗原;(b)将体液与至少一种眼部抗原样品进行反应;(c)检测和/或定量步骤b中体液中的自身抗体与至少一种眼部抗原样品之间的反应,以测定自身免疫反应性值,d)将测量的自身免疫反应性值与由青光眼患者和/或健康个体中获得的标准数据进行比较,以确定至少一种抗原样品的青光眼得分,和e)可选地通过评估至少 一项青光眼得分确定诊断结果。

[0017] 在本申请的上下文中，术语人类个体或动物的体液包括但不限于血清，泪液，唾液，尿，房水，眼玻璃体或脑脊髓液及其部分，或人类个体或动物的组织样本匀浆及其部分。在青光眼诊断方法的优选实施方式中，使用血清或泪液。

[0018] 眼部抗原是指在眼中出现的任意抗原，并且以下明确提及的某些该眼部抗原显然是普遍存在的。眼中存在的眼部抗原特别包括视网膜抗原，视神经抗原，视神经乳头抗原，小梁网抗原，葡萄膜抗原。已知青光眼相关抗原并不局限于存在于视网膜神经节细胞中的蛋白，还包括邻近细胞如神经胶质细胞或细胞骨架成分特有的抗原。

[0019] 此外，本申请中的术语眼部抗原，包括所有以下提及的具体命名的眼部抗原，不仅适用于各蛋白的生理、天然形式，也适用于翻译后修饰形式以及任意其它天然或人工衍生物如多肽，以及标记的、剪切的、化学修饰的或包括所提及修饰的组合的形式。

[0020] 至少部分纯化的眼部抗原是指采用标准蛋白纯化技术通过至少部分蛋白纯化从其生理环境下的蛋白的复杂混合物中分离的眼部抗原。也认为本文的上下文中可用的商业纯的眼部抗原是用于青光眼诊断方法的至少部分纯化的眼部抗原。所述的部分纯化产生以总蛋白重量计至少70%，优选至少80%，更优选至少90%，最优选至少95%的一种或多种所需的眼部抗原。

[0021] 术语眼部抗原样品是指一种包括一种或多种至少部分纯化的眼部抗原的样品。在本发明所述方法的优选实施方式中，眼部抗原样品仅包括一种眼部抗原，并且由每种部分纯化的抗原分别确定青光眼得分。在另一优选的实施方式中，两种或多种的部分纯化的眼部抗原与至少一种眼部抗原样品合并。对于此类眼部抗原样品，测量的自身免疫反应性相当于抗两种或多种眼部抗原的组合的自身免疫反应，可以产生一个青光眼得分。与未从生理环境中分离的抗原如眼部细胞裂解物不同，可控制抗原组合中各组分的相对含量。这样一个可控的抗原组合也可以导致加权，即权重因子的影响，用于调节所测量的特定眼部抗原的自身免疫反应性对检测结果的贡献。

[0022] 在本文中，术语“眼部抗原”或“抗原”通常交互使用，且可以代替较长表述“至少部分纯化的眼部抗原”或“至少部分纯化的眼部抗原样品”。

[0023] 在本文的上下文中的自身免疫反应性，或可交互使用的免疫反应性和自身抗体反应性是指在与体液孵育时，体液中存在的自身抗体对至少部分纯化的眼部抗原的结合活性。

[0024] 用于检测和测量自身免疫反应性的方法包括标准的免疫学分析技术如蛋白印迹分析，化学发光分析，ELISA，放射免疫分析，微阵列及其他。将抗原涂覆并固定于抗原携带元件上，然后用包含待检测的自身抗体的体液进行孵育。随后确定结合的自身抗体来测定自身免疫反应性。确定的方法包括例如对待分析的样品进行预标记，加入一种能够与结合了抗原的自身抗体或间接标记物例如标记的羊抗人免疫球蛋白等结合的二级抗体。其它方法包括分析可寻址元件如珠子，纳米颗粒，标记物等。检测方法也可以包括不需要标记的方法，如SELDI-TOF-type(表面增强激光解析/电离飞行时间质谱)，MALDI(基质辅助激光解吸附/电离质谱)或其它抗体芯片技术。

[0025] 本发明所述的第一种青光眼诊断方法依靠在健康人群和青光眼患者中抗某些眼部抗原的平均自身免疫反应性的差异。因此，体液中自身抗体的抗某些眼部抗原的特定效价用作青光眼疾病的诊断证据。

[0026] 本发明的一个方面涉及新确定的眼部抗原，其中健康个体和青光眼患者中的自身抗体对所述眼部抗原具有不同的结合活性，并且所述眼部抗原是检测青光眼疾病和治疗性处理的有用的诊断标志物(或生物标志物)。

[0027] 将测量的自身免疫反应性的信号或数值与标准数据比较以从抗眼部抗原样品的自身免疫反应性的测量信号中提取信息，在优选的实施方式中，对每种眼部抗原样品分别进行步骤d)的比较。在优选的实施方式中，标准数据包括测量的健康对照和青光眼患者的抗每种眼部抗原样品的自身免疫反应性的平均值。在其它优选的实施方式中，标准数据包括测量的抗特定疾病阶段所特有的每种眼部抗原样品的自身免疫反应性的平均值。因此，对青光眼疾病的不同阶段的诊断和对青光眼疾病进展的监测都在本发明所述方法的精神之内。在另一优选的实施方式中，自身免疫反应性的标准数据包括青光眼疾病的特定形式的亚型特有的自身免疫反应。

[0028] 可以通过用于诊断健康个体和青光眼患者的体液的青光眼的方法的步骤(a)-(c)的对照反应生成该标准数据，其中采用检测样品平行进行所述对照反应，或者该标准数据可以源自不同时间相同条件下进行的对照反应的存储数据。

[0029] 在优选的实施方式中，通过将测试个体的测量值与标准数据相关联并将测量的自身免疫反应性数值转化为青光眼得分，由测量的自身免疫反应性数值推出每种眼部抗原样品的青光眼得分。在一个简化的实施例中，在0-100的典型青光眼诊断量表上根据对每个个体的眼部抗原样品测量的自身免疫反应性确定青光眼得分，其中0对应于所测量的抗健康人群中的特定眼部抗原的自身免疫反应性的平均值，而100对应于所测量的抗青光眼患者中的该抗原的自身免疫反应性的平均值。

[0030] 在根据本发明方法的另一优选实施方式中，中采用多元统计技术的标准方法的算法、树算法、或人工神经网络用于计算步骤d)所述的从测量的自身免疫反应性值到相应的青光眼得分的转化。相似的，在步骤(e)中，在一些优选实施方式中使用算法对所测定的每种眼部抗原样品的青光眼得分进行分析以确定诊断结果，并且在另一优选实施方式中在两个步骤中都使用算法。在又一个变体中，所述至少一个步骤d的青光眼得分是第一种青光眼诊断方法的最后一个步骤。根据这些变体，第一种青光眼的诊断方法不包括步骤e，但是步骤e可以由从青光眼得分推导出诊断结果的医务人员进行。

[0031] 根据本发明的青光眼诊断方法的一个主要优点是诊断结果基于对已知特性的部分纯化的抗原的青光眼得分的分析。

[0032] 在一个优选的实施方式中，对至少一种眼部抗原样品分配一个权重因子。该权重因子调节抗一种特定眼部抗原样品的自身免疫反应性对诊断结果的贡献。在优选的实施方式中，计算性地将权重因子引入第一种诊断方法的步骤(c)或(d)或(e)中，然而在一些优选实施方式中，将权重因子引入步骤(a)或(b)中，在另一实施方式中，将权重因子引入步骤(a)-(e)中的一个以上步骤中。权重因子具有调节诊断结果的作用而不依赖于它们所引入的步骤。一个加权的青光眼得分产生于一个在步骤(a)-(e)中的任一个或一个以上步骤中引入的权重因子。

[0033] 根据诊断结果基于加权青光眼得分的优选实施方式，当在单一检测工具如光学阅读器中检测和测量自身抗体与单个抗原结合所发出的信号时，将特定的权重因子引入计算步骤中。

[0034] 根据另一优选实施方式，通过对暴露于与自身免疫抗体反应的单个抗原的量进行逐差加权和/或通过对用于检测和测量对单个抗原的自身免疫反应性的一个或多个分析步骤进行加权而引入权重因子。该实施方式的实 例包括使用对不同抗原具有特异性的珠子检测自身免疫反应性，可以通过抗原特异性珠子的标记的差分强度或通过检测仪器的差分分级灵敏度实现加权。

[0035] 例如这样对青光眼得分进行加权以使具有较高诊断相关性的眼部抗原样品的青光眼得分对诊断结果的贡献更大。在一个简化的实例中，一种引起在青光眼患者或健康个体间差值较大的自身免疫反应性并且标准数据来自标准偏差较低的平均值的眼部抗原样品X，则通常比眼部抗原样品Y具有更高的诊断相关性，其中所述眼部抗原样品Y引起在青光眼患者或健康个体间差异较小的自身免疫反应性，并且其平均标准值具有较高的标准偏差。相应的和特别的，在一个用于最大化特异性的青光眼测试中，与抗原样品Y的青光眼得分相比，对抗原样品X的青光眼得分进行更重的加权，以分别调节其对诊断结果的贡献。

[0036] 第一种青光眼诊断方法的另一优点是，步骤a)中提供的眼部抗原样品中包含的已知的部分纯化的眼部抗原和/或可以选择的任意分配的权重因子可以根据青光眼的特定诊断测试目的而选择。例如，在用于在疾病早期诊断青光眼的筛选试验中，需要使灵敏度最大化。对于这种诊断检测的应用，认为一定数量的假阳性是可以接受的，但应避免假阴性。

[0037] 第一种诊断方法的优选实施方式的另一优点是，从在特定患者中产生高青光眼得分的抗原的生理作用的信息中，可以提取出更多的诊断信息，从而丰富诊断结果。

[0038] 由于对于疾病的进展如何与抗眼部抗原的自身免疫反应性相关知道的越来越多，那些特定时期特别是早期所特有的抗原可以用作生物标志物以监测疾病进展，包括监测医学治疗在降低和阻止疾病进展中的有效性。临床上，为了在视网膜神经节细胞不可逆死亡之前开始治疗，在眼内压升高的个体中确定会发展为青光眼的个体是非常重要的。

[0039] 在青光眼诊断方法的步骤a)的优选实施方式中，在所述一种或多种至少部分纯化的眼部抗原样品中包含由下述48个眼部抗原组成的第1组中的至少2种部分纯化的眼部抗原，或至少3或4或5或6或7或8或9种抗原，或优选至少2种且少于5种或10种抗原：肌动蛋白、白蛋白、α-1-抗胰蛋白酶、膜联蛋白I-IV、膜联蛋白V、β-2-肾上腺素能受体、脑源性神经营养因子(BDNF)、钙网蛋白、心磷脂、α-A-晶状体蛋白、α-B-晶状体蛋白、β-L-晶状体蛋白、β-S-晶状体蛋白、γ-晶状体蛋白、DNA拓扑异 构酶1、纤连蛋白、α-胞衬蛋白(=血影蛋白)、胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)、谷胱甘肽-S-转移酶、热休克蛋白HSP10(=伴侣蛋白)、HSP27、HSP60、HSP70、胰岛素、jo-1、溶菌酶、髓磷脂结合蛋白(MBP)、髓鞘少突胶质细胞糖蛋白(MOG)、肌红蛋白，神经元特异性烯醇化酶(NSE)、神经营养因子3、神经营养因子4、神经营养因子5、过氧化物岐化酶、3-磷酸丝氨酸、前白蛋白、蛋白激酶C抑制剂、蛋白激酶C、超氧化物岐化酶、α-突触核蛋白、γ-突触核蛋白、甲状腺球蛋白、转铁蛋白、转甲状腺素蛋白、拓扑异构酶抑制剂、泛素、血管内皮生长因子(VEGF)、波形蛋白。

[0040] 上述抗原的如下亚组，称为第2组，第一次被确定为青光眼的诊断标志物。在青光眼诊断方法的步骤a)的优选实施方式中，在一种或多种至少部分纯化的眼部抗原样品中包括由下述36种眼部抗原组成的第2组中的至少1种部分纯化的眼部抗原，或至少2或3或4或5或6或7或8或9种抗原，或优选至少2种且少于5种或10或20种抗原：白蛋白、α-1-抗胰蛋白酶、膜联蛋白I-IV、膜联蛋白V、β-2-肾上腺素能受体、脑源性神经营养因子(BDNF)、钙网蛋

白、心磷脂、β-L-晶状体蛋白、β-S-晶状体蛋白、γ-晶状体蛋白、DNA拓扑异构酶1、纤连蛋白、热休克蛋白HSP10(=伴侣蛋白)、胰岛素、jo-1、溶菌酶、髓鞘少突胶质细胞糖蛋白(MOG)、肌红蛋白、神经营养因子3、神经营养因子4、神经营养因子5、过氧化物岐化酶、3-磷酸丝氨酸、前白蛋白、蛋白激酶C抑制剂、蛋白激酶C、超氧化物岐化酶、α-突触核蛋白、γ-突触核蛋白、甲状腺球蛋白、转铁蛋白、转甲状腺素蛋白、拓扑异构酶抑制剂、泛素、血管内皮生长因子(VEGF)。

[0041] 现有技术已知,抗上述第1组中一些抗原的自身抗体反应性在青光眼患者和健康个体中不同。这些已经被证实(见实施例和附图)并且它们的自身抗体反应性也与青光眼的诊断相关。这些第3组的眼部抗原是:肌动蛋白、α-A-晶状体蛋白、α-B-晶状体蛋白、α-胞衬蛋白(=血影蛋白)、胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)、谷胱甘肽-S-转移酶、HSP27、HSP60、HSP70、髓磷脂结合蛋白(MBP)、神经元特异性烯醇化酶(NSE)、波形蛋白。

[0042] 将第1组的抗原分为A,B和C三个亚组。根据实施例和附图中描述的检测抗健康个体和青光眼患者中的不同眼部抗原的自身免疫反应性的方法,对诊断相关性或抗原进行了评估。包含于至少一种眼部抗原样品中的C组的抗原或优选的B组的抗原或更优选的A组的抗原用于第一种青 光眼诊断方法。

[0043] 已确定下组24种部分纯化的眼部抗原是与青光眼高度相关的诊断标志物并归为A组抗原:肌动蛋白、α-1-抗胰蛋白酶、膜联蛋白V、α-A-晶状体蛋白、α-B-晶状体蛋白、β-L-晶状体蛋白、β-S-晶状体蛋白、γ-晶状体蛋白、α-胞衬蛋白(=血影蛋白)、胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)、谷胱甘肽-S-转移酶、HSP27、HSP60、HSP70、jo-1、髓磷脂结合蛋白(MBP)、神经元特异性烯醇化酶(NSE)、蛋白激酶C抑制剂、超氧化物岐化酶、转铁蛋白、转甲状腺素蛋白、泛素、血管内皮生长因子(VEGF)、波形蛋白。在优选的实施方式中,步骤a)提供的至少一种眼部抗原样品包括至少2种选自A组眼部抗原的抗原。

[0044] 已确定下组9种部分纯化的眼部抗原是与青光眼高度相关的诊断标志物并归为B组抗原:膜联蛋白I-IV、β-2-肾上腺素能受体、钙网蛋白、热休克蛋白HSP10(=伴侣蛋白),、胰岛素、过氧化物岐化酶、蛋白激酶C、α-突触核蛋白、γ-突触核蛋白。另一优选的实施方式中,步骤a)提供的至少一种眼部抗原样品包括至少2种选自A组和/或B组眼部抗原的抗原。

[0045] 另外,已确定下述C组的14种部分纯化的眼部抗原为与青光眼相关的诊断标志物:白蛋白、脑源性神经营养因子(BDNF)、心磷脂、DNA拓扑异构酶I、纤连蛋白、溶菌酶、髓鞘少突胶质细胞糖蛋白(MOG)、肌红蛋白、神经营养因子3、神经营养因子4、神经营养因子5、3-磷酸丝氨酸、甲状腺球蛋白、拓扑异构酶抑制剂。

[0046] 在另一优选的实施方式中,至少一种至少部分纯化的眼部抗原样品包括至少一种抗原,或优选至少2种或3种或4种或5种或6种或7种或8种或9种抗原,或优选至少1种且少于5种或10种抗原,或优选至少2种且少于20种,或全部抗原,所述抗原属于第2组抗原或者同时属于第2组和A组,该组分类为2-A组抗原,或属于第二组且同时属于A组或B组,该组分类为2-AB组。

[0047] 本发明的另一方面涉及一种抗原携带元件,所述抗原携带元件携带至少一种包括至少一种至少部分纯化的眼部抗原的样品。抗原携带元件的优选实施方式包括微阵列芯片,侧流试纸条和微流控芯片。在一些优选实施方式中,所述抗原携带元件包括预定的抗原区,所述预定的抗原区是纸条或玻片或板等之上的表面区域,或者一个装置中用于眼部抗

原样品点样或微点样的预定表面。在其它优选实施方式中，抗原携带元件还包括一个体 液接收区。在另一优选实施方式中，抗原携带元件包括包被了眼部抗原样品的珠子或其它基材。在另一优选实施方式中，抗原携带元件携带加权量的眼部抗原样品，在另一实施方式中，抗原携带元件包括选自第1组、或第2组、或A组、或A组和B组、或2-A组的眼部抗原。使用根据本发明的抗原携带元件的上述特征的组合也当然在本发明的精神之内。

[0048] 在第一种青光眼诊断方法的一个优选实施方式中，携带眼部抗原样品中的至少一种样品的元件是抗原微阵列芯片。将所述的至少一种眼部抗原样品以二维或三维的矩阵点的形式在抗原携带元件上点样组成抗原阵列或抗原微阵列，所述抗原携带元件为例如玻片、板、或芯片、或硝酸纤维素玻片、或水凝胶玻片等。通过将至少2种，优选3-5种，或3-9种或3-12种适用的上述特定组的至少部分纯化的眼部抗原样品点样于携带元件如硝酸纤维素膜包被的玻片上来制备蛋白质阵列。该阵列与适当稀释的体液样品如血清、泪液或房水进行孵育。例如根据本领域已知的已建立的技术如通过采用荧光标记的抗IgG抗体处理，然后进行荧光扫描对阵列上的自身抗体-抗原反应进行显影来检测自身免疫反应性。将二级抗体发出的信号数字化；测量斑点强度以及可选地采用多元统计技术与来自对照个体的体液结果进行比较。检测自身抗体反应性的替代方案包括通过偶联于酶的抗人IgG抗体进行显影，所述酶与抗原携带元件上加入的或存在的组分反应并导致颜色的出现或者导致颜色的改变。在一些应用中这样的颜色变化可以直接观察或采用检测器工具如光阅读机检测。在另一优选实施方式中，采用竞争分析检测自身免疫反应性，所述竞争分析是另一种建立的免疫分析技术：例如对某些眼部抗原具有特异性的市售单克隆荧光抗体与步骤b)的体液中存在的自身抗体竞争，其中所述步骤b)的体液中存在的自身抗体用于与步骤a)中提供的至少部分纯化的眼部抗原反应。在该分析中，由于体液中未标记的自身抗体阻止荧光标记的市售抗体与抗原结合，因此体液中抗特定眼部抗原的较强的自身免疫反应性产生较弱的信号。显然，本发明并不限于这些仅作为示例在此提及的本领域公知的标准免疫分析的实例，还包括本领域公知的可用于测量体液中抗至少部分纯化的眼部抗原的自身免疫反应性的任意标准免疫学分析。

[0049] 在一些优选的应用中，例如通过在微阵列上使用不同量的抗原点样，或通过对与单个抗原结合的抗体发出的信号进行逐差权重来引入分配给各个抗原的权重因子以调节它们在诊断结果中的贡献。在进一步优选的实 施方式中，改变点样于微阵列上的抗原的量以调节自身免疫反应性的期望信号强度，使其位于检测器工具的信号检测的线性范围内。如实施例7中所进一步提出的，仅选择5个至少部分纯化的眼部抗原的青光眼检测导致区分青光眼患者和健康个体的特异性和灵敏度达到约90%。因此，在进一步优选的实施方式中，眼部抗原样品的数量限于一个小的数目如10个，或者8个，或6个，或5个，或少于5个以提供一种用于大量个体的大量筛选的分析简单且生产成本较低的检测。

[0050] 在第一种青光眼诊断方法的进一步优选的实施方式中，携带眼部抗原样品中至少一种样品的元件是侧流试纸条。在这些实施方式的优选变体中，抗原携带元件包括一个预定的抗原携带区和一个预定的体液接收区。在进一步优选的变体中该侧流试纸条可选地包括多个含有亚区的区。将一组至少部分纯化的眼部抗原涂覆于抗原区。可以根据方法的一些变体将单个眼部抗原样品涂覆于不同的亚区或混合入一个区或几个亚区。在随后的步骤中，将可选的适当预处理和/或稀释的体液样品涂覆于试纸条的接收区。抗原区或接收区或

两者可以同时包括用于对与抗原结合的自身抗体进行显影的反应物。可选的，在结合步骤之后可将含有结合的自身抗体的试纸条与用于显影的反应物孵育。可以使用或不使用分析工具如产生数字化输出的图像阅读器测量检测步骤如显影。在优选的应用中，例如通过在试纸条的抗原区涂覆不同量的抗原或通过逐差加入反应物或通过对与单个抗原结合的抗体发出的信号进行逐差权重来引入根据单个抗原对诊断结果的贡献分配给单个抗原的权重因子。显然，以上采用微阵列的方法的实施方式中描述的一些特征及特征的组合也同样适用于侧流试纸条的优选实施方式。

[0051] 侧流试纸条的进一步优选的实施方式设计为以检测试纸条的接收区直接接触患者从而收集体液如泪液。相似的收集体液的接收区也为抗原携带元件的其它实施方式的一部分，所述抗原携带元件的其它实施方式如微流控芯片或者包括吸收材料的接收区的具有抗原携带珠子的柱子。

[0052] 现有技术水平已知对某些抗原的自身免疫反应性的缺乏或降低也预示着青光眼。因此，设计一些优选实施方式以使自身免疫抗体对所选择抗原的结合的缺乏或降低有助于诊断结果或作为诊断基础。例如，在一些侧流试纸条的实施方式中，使用不具有预示疾病的自身免疫反应性的抗原点样于一个或多个抗原亚区，而使用在青光眼患者中产生的自身免疫反应性 比健康个体中低的抗原，和/或使用在青光眼患者中产生的自身免疫反应比健康个体中高的抗原，和/或使用不具有预示无青光眼的自身免疫反应性的抗原和上述组合的有利变体点样于其它亚区。

[0053] 在第一种青光眼诊断方法的进一步优选的实施方式中，用于至少一种抗原样品的抗原携带元件是微流控芯片或芯片实验室(lab-on-a-chip)设备，其中优选在单独的微通道内提供单个抗原。将体液装载至微流控芯片，或由芯片上的体液接收区接收。随后，例如通过一个压力控制单元使体液移动至微流控芯片的微通道系统中。在优选的实施方式中采用荧光标记的二级抗体以及标准光学阅读器或配备有相机的计算机检测自身免疫反应性，随后根据描述进行定量并转化为青光眼得分。显然将提及的其它抗原携带元件如微阵列芯片和侧流试纸条的特征与用于本申请所述的方法和装置的抗原携带元件的其它实施方式的微流控芯片的特征进行组合也在本发明的精神之内。这包括微流控芯片，所述微流控芯片具有针对在青光眼患者中比健康个体中的自身免疫反应性更高的抗原的亚区以及针对在青光眼患者中比健康个体中的自身免疫反应性更低的抗原的其它亚区。

[0054] 本发明的另一方面涉及用于第一种青光眼诊断方法的检测试剂盒以及试剂盒的组件，所述试剂盒包括一个携带眼部抗原样品中的至少一种样品的元件以及任选的辅助材料。在根据该方面的一些实施方式中，该试剂盒包括一个抗原携带元件，所述抗原携带元件根据诊断检测的目的携带眼部抗原样品中的至少一种抗原样品的不同变体。在一些试剂盒的优选实施方式中，抗原携带元件包括选自第1组、或第2组、或A组、或A组和B组、或2-A组的眼部抗原，其中在某些该优选实施方式中，对抗原携带元件上装载的抗原量进行加权。在一些试剂盒的优选实施方式中，该抗原携带元件是微阵列芯片、侧流试纸条或微流控芯片或其部分。在该检测试剂盒的另一实施方式中，包括辅助材料如分析工具和/或软件，包括分析工具如图像阅读器和/或用于使图像阅读器产生测试结果的数字化输出的软件，其中在定量所检测的自身免疫反应性、计算青光眼得分或诊断结果的一个或多个步骤中使用该软件。在进一步优选的实施方式中包括用于接收体液样品的辅助材料。该辅助材料是例如用

于接收泪液的吸水纸。进一步优选的实施方式包括用于检测和测量抗原携带元件与体液孵育后的自身免疫反应性的反应物和/或反应容器，或用于与抗原携带元件孵育前处理体液样品或用于从收集体液的吸收材料上洗脱体液的反应物。在青光眼诊断方法 的上下文中，上述特征的任意组合可以组合为进一步优选的试剂盒的实施方式以实施诊断青光眼的方法。

[0055] 在第一种青光眼诊断方法的进一步优选的实施方式中，首先将体液样本干燥，然后在与眼部样品中的至少一种样品反应之前重新溶解或洗脱。可以在专业或者家庭装置中收集体液样本。在某些变体中将其收集在一片吸收材料如纸条上或直接收集于抗原携带元件的接收区或任意的体液接收容器中。体液样本可以被干燥并且在例如室温下保存。经验显示体液储存长达一周或特别地在低温下保存更长时间或冷冻后，可以采用例如缓冲液或生理盐溶液对存在于干燥体液样本中的自身抗体进行复溶或者从吸收材料上洗脱下来。因此，该实施方式的一个优点是可以例如由病人在家自行收集需收集的体液样本并邮寄到实验室用于分析。在第一种青光眼诊断方法的进一步优选的实施方式中，干燥并且在分析前进行复溶的体液是泪液或血清。

[0056] 在检测泪液的自身免疫反应性的第一种青光眼诊断方法优选实施方式中，采用任意标准方法如吸管或吸水纸条如Schirmer纸条或其它合适的吸收材料收集泪液。任选的，将泪液干燥并在例如室温下保存长达一周，或在0-5°C下保存更久，或冷冻后保存更久。随后，采用缓冲液例如磷酸盐缓冲液将自身抗体从干燥的或湿的纸条上洗脱下来。在进一步优选的实施方式中，例如通过将试纸条暴露于眼中的泪液，将泪液直接收集到侧流试纸条上。显然，采用泪液代替例如血清的一个优点是可以非侵入性地获得泪液样品。对于没有相应的专业训练的医务人员的条件下如在眼科医生或验光员的办公室中以及自己进行检测特别有优势。

[0057] 第一种青光眼诊断方法的另一方面涉及在视力丧失之前在常规筛查中使用快速检测对青光眼进行早期检测。优选的实施方式为例如低成本的诊断检测，将所述诊断检测设计为非常灵敏的，以使常规筛查中假阴性的可能性降至最低。因此，随后的随访、更复杂的检测例如依赖于大量的眼部抗原并且设计为能够从在快速检测中得到阳性检测结果的个体中确定出假阳性个体。例如上述各个实施方式中描述的侧流试纸条，微流控芯片或简单的微阵列芯片可用于该快速检测。

[0058] 用第一种青光眼诊断方法的用途的另一方面涉及其在疾病进展的监测以及医学治疗效果监测中的应用。在这些方面的优选实施方式中，一组抗原和/或分配给它们的权重因子的用于监测抗青光眼的特定阶段所特有 的抗原的自身免疫反应性。

[0059] 本发明的另一方面涉及一种将抗原携带元件的接收区与患者接触以收集患者的体液例如患者眼中的泪液的方法。在优选的实施方式中，将包括吸收材料的抗原携带元件的接收区与患者接触，其中接收区本身没有抗原，但体液流向抗原携带区。例如，将具有包括吸水纸的接收区的试纸条如Schimer试纸条的接收区与人眼接触以收集泪液。随后泪液扩散至抗原区从而参与到青光眼诊断方法的步骤b中。

[0060] 本发明的另一方面涉及下述第2组眼部抗原中的任一眼部抗原或一个或多个眼部抗原的任意组合在青光眼诊断方法中的应用，或置于抗原携带元件上的所述抗原或组合在青光眼诊断方法中的应用：白蛋白、α-1-抗胰蛋白酶、膜联蛋白I-IV、膜联蛋白V、β-2-肾上

腺素能受体、脑源性神经营养因子(BDNF)、钙网蛋白、心磷脂、β-L-晶状体蛋白、β-S-晶状体蛋白、γ-晶状体蛋白、DNA拓扑异构酶1、纤连蛋白、热休克蛋白HSP10(=伴侣蛋白)、胰岛素、jo-1、溶菌酶、髓鞘少突胶质细胞糖蛋白(MOG)、肌红蛋白、神经营养因子3、神经营养因子4、神经营养因子5、过氧化物岐化酶、3-磷酸丝氨酸、前白蛋白、蛋白激酶C抑制剂、蛋白激酶C、超氧化物岐化酶、α-突触核蛋白、γ-突触核蛋白、甲状腺球蛋白、转铁蛋白、转甲状腺素蛋白、拓扑异构酶抑制剂、泛素、血管内皮生长因子(VEGF)。

[0061] 本发明的另一方面涉及下述第2组眼部抗原中的任一眼部抗原或一个或多个眼部抗原的任意组合,或眼部抗原的衍生物如片段,或修饰的眼部抗原,或配体,如对第2组中任一眼部抗原具有特异性的抗体,在青光眼的治疗性处理中的应用,或在用于医学治疗的组合物中的应用,以及特别的在治疗青光眼的组合物中的应用。

[0062] 在使用含有眼部抗原的药物组合物治疗青光眼的优选实施方式中,将它们用作与存在于青光眼患者中的水平升高的自身抗体结合的阻断剂。特别地,已发现许多在青光眼患者中升高的自身免疫反应性是针对细胞骨架蛋白的,例如肌动蛋白和肌动蛋白结合蛋白如膜联蛋白V、α-胞衬蛋白、髓磷脂结合蛋白、HSP27。已知当抗细胞骨架结构如f-肌动蛋白网的自身抗体被视网膜神经节细胞摄入后,可以破坏肌动蛋白网并诱导细胞死亡。因此根据本发明的这一方面,提供一种药物组合物,用于防止视网膜神经节细胞的死亡。包括第2组眼部抗原中至少一种的组合物通过结合至自身抗体并阻断其对青光眼患者的视网膜神经节细胞的破坏作用而阻止青光 眼的进展。

[0063] 第一种不依赖于升高的眼内压的青光眼诊断方法依靠确定的眼部抗原的生物标志物谱,第二种不依赖于升高的眼内压的该诊断方法依靠体液对细胞培养物作用的体外分析。

[0064] 第二种青光眼诊断方法包括步骤a),提供一种体外细胞培养物;b)将来自测试个体的体液与所述的体外细胞培养物进行孵育;c)通过所述体外细胞培养物分析蛋白表达和/或分析根据步骤(b)处理后的细胞的生存力;和d)将步骤c)的分析结果与标准数据进行比较以确定诊断结果。

[0065] 对于步骤a),优选提供人或动物的原代或永生化细胞的体外培养物,更优选地提供哺乳动物细胞如来自市售的永生化细胞系的细胞。优选地提供神经细胞,更优选地提供视网膜神经节细胞或视网膜神经节细胞的前体细胞。

[0066] 可以区分暴露于来自健康个体和不同类型青光眼的患者或眼高压患者的体液中的视网膜神经节细胞的蛋白表达模式、特异性生物标记物蛋白的表达以及生存力。因此青光眼诊断方法的各种优选实施方式的特别的优点在于它可以区分不同类型青光眼的患者以及那些患有青光眼或发展为青光眼的风险提高的眼高压患者。因此,本方法不依赖于监测眼高压,提供合理的正常眼压性青光眼的早期诊断以及进一步区分那些患有或未患有青光眼的眼高压患者。

[0067] 在另一优选实施方式中,步骤b)中的处理用的体液或样本或组分可以例如通过冷冻和/或干燥,或加入防腐剂如血清管中通常使用的防腐剂保存。储存不同的时期后,将适当地重新配制的体液样品用于第二种诊断方法的步骤b)中的处理。

[0068] 在第二种诊断方法的进一步优选的实施方式中,对体液进行物理或化学预处理以稳定或增强它们在诊断检测的步骤b)中的作用。例如,可以对体液进行部分纯化,以将可能

以与青光眼无关的方式干扰步骤a)提供的体外细胞培养物的细胞生长或蛋白表达的物质从体液中除去，或者为了显示步骤a)中提供的细胞与体液的亚组分的特异性反应。

[0069] 在该实施方式的进一步优选的变体中，预处理或分离产生体液组分，所述体液组分包括或富含预定的一组抗体，如已知对与青光眼相关的或与特定类型的青光眼疾病相关的抗原具有特异性的抗体或自身抗体。在进一步优选的变体中，至少将一种抗体从体液中除去。在这些变体的某些中，在用于步骤b)前将一组抗体从体液中除去可用于除去一种或者多种抗体，所述抗体以与青光眼无关的方式抑制细胞生长或影响细胞的蛋白表达并且可能掩盖诊断结果。在另一实施方式中，该移除可用于清除已知对特定类型的青光眼具有特异性的自身抗体。在进一步优选的实施方式中，将细胞与移除的抗体孵育以产生所使用的血清类型特有的细胞反应。

[0070] 根据本领域已知的标准孵育技术进行步骤b)中的孵育。在步骤b)的优选实施方式的不同变体中，孵育时间，孵育温度以及施加的静水压力水平是不同的。

[0071] 在步骤c)中分析了在步骤b)中的孵育过程中体液对步骤a)中提供的细胞的影响。在步骤c)的第一组优选实施方式中对蛋白表达模式进行分析，在步骤c)的第二组优选实施方式中对特定蛋白如生物标志物的表达或抗原进行分析，在第三组优选实施方式中对细胞的生存力进行分析，并且在步骤c)的进一步优选的实施方中采用一种以上的上述方法进行分析。在所有步骤c)的实施方式中，分析的结果用于步骤d)以确定诊断结果。

[0072] 在步骤c)的第一组优选实施方式的优选实施方式中，采用全蛋白如完整蛋白以及例如采用从体外细胞培养物中获得的消化的或片断化的蛋白进行蛋白表达分析。例如，在某些变体中，细胞内和细胞上的蛋白以及细胞外蛋白的全部范围包括细胞释放到培养基中的蛋白。在步骤c)的优选实施方式中，通过细胞裂解并通过例如沉淀进行回收而从体外细胞培养物红获得用于蛋白表达分析的蛋白，任选的通过例如蛋白质消化，蛋白片断化和/或分离和/或纯化步骤进行预处理，并采用本领域公知的标准蛋白分析技术进行分析。本领域公知的可用的方法的实例包括但不限于丙酮沉淀，胰蛋白酶消化，凝胶电泳，HPLC等。

[0073] 在步骤c)的第一组优选实施方式的进一步优选的实施方式中，采用本领域公知的标准蛋白质指纹图谱分析技术如质谱技术进行分析，包括MALDI-TOF TOF MS(基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱)、轨道肼质谱、LC-MS(液相色谱-质谱)、HPLC-MS(高压液相色谱-质谱)以及SELDI-TOF-MS(表面增强飞行时间质谱)。

[0074] 在步骤c)的第一组优选实施方式的进一步优选的实施方式中，采用数字图像分析系统或本领域公知的其它用于数字化的装置对蛋白表达数据如蛋白表达模式或指纹图谱进行处理。在优选的实施方式中，随后通过 多元统计技术如判别分析，分类/回归树，和/或人工神经网络对数字化的数据进行处理。

[0075] 在步骤c)的第二组优选实施方式中，分析了特定蛋白的表达。在这些实施方式的优选变体中，步骤c)中蛋白表达的分析包括针对至少一个特定蛋白或生物标志物的分析。在该实施方式的优选变体中，所述生物标志物是已知与青光眼疾病或自身免疫疾病或神经退行性疾病或细胞凋亡相关的蛋白。在一个优选的实施方式中，对生物标志物的分析基于免疫分析，例如基于化学发光或荧光的免疫分析，以及ELISA、Elispot或蛋白阵列，所述免疫分析使用至少一种优选地对已知与青光眼疾病或自身免疫疾病或神经退行性疾病或细胞凋亡相关的该生物标记具有特异性的抗体探针。在优选的变体中，抗体是单克隆抗体。

[0076] 在第二种诊断方法的步骤c)中使用免疫分析进行的蛋白表达分析的优选实施方式中，使用的抗体是抗本申请的第一发明中披露的第1组的48个抗原中的一种或多种抗原的特异性抗体。与健康个体相比，已知所有这些抗原在青光眼患者中的表达水平升高或降低：肌动蛋白、白蛋白、α-1-抗胰蛋白酶、膜联蛋白I-IV、膜联蛋白V、β-2-肾上腺素能受体、脑源性神经营养因子BDNF、钙网蛋白、心磷脂、α-A-晶状体蛋白、α-B-晶状体蛋白、β-L-晶状体蛋白、β-S-晶状体蛋白、γ-晶状体蛋白、DNA拓扑异构酶1、纤连蛋白、α-胞衬蛋白(=血影蛋白)、胶质原纤维酸性蛋白GFAP、谷胱甘肽-S-转移酶、热休克蛋白HSP10(=伴侣蛋白)、HSP27、HSP60、HSP70、胰岛素、jo-1、溶菌酶、髓磷脂结合蛋白MBP、髓鞘少突胶质细胞糖蛋白MOG、肌红蛋白、神经元特异性烯醇化酶NSE、神经营养因子3、神经营养因子4、神经营养因子5、过氧化物岐化酶、3-磷酸丝氨酸、前白蛋白、蛋白激酶C抑制剂、蛋白激酶C、超氧化物岐化酶、α-突触核蛋白，γ-突触核蛋白、甲状腺球蛋白、转铁蛋白、转甲状腺素蛋白、拓扑异构酶抑制剂、泛素、血管内皮生长因子(VEGF)、波形蛋白。

[0077] 在第二种青光眼诊断方法的步骤c)中使用免疫分析进行的蛋白表达分析的进一步优选的实施方式中，使用的抗体是抗本申请的第一发明中披露的第2组的36个抗原中的一种或多种抗原的特异性抗体，其中36个抗原是：白蛋白、α-1-抗胰蛋白酶、膜联蛋白I-IV、膜联蛋白V、β-2-肾上腺素能受体、脑源性神经营养因子BDNF、钙网蛋白、心磷脂、β-L-晶状体蛋白、β-S-晶状体蛋白、γ-晶状体蛋白、DNA拓扑异构酶1、纤连蛋白、 热休克蛋白HSP10(=伴侣蛋白)、胰岛素、jo-1、溶菌酶、髓鞘少突胶质细胞糖蛋白MOG、肌红蛋白、神经营养因子3、神经营养因子4、神经营养因子5、过氧化物岐化酶、3-磷酸丝氨酸、前白蛋白、蛋白激酶C抑制剂、蛋白激酶C、超氧化物岐化酶、α-突触核蛋白、γ-突触核蛋白、甲状腺球蛋白、转铁蛋白、转甲状腺素蛋白、拓扑异构酶抑制剂、泛素、血管内皮生长因子(VEGF)。

[0078] 在第二种青光眼诊断方法的步骤c)中使用免疫分析进行的蛋白表达分析的进一步优选的实施方式中，使用的抗体是抗本申请的第一发明中披露的A组的24个抗原中的一种或多种抗原的特异性抗体，其中24个抗原是：肌动蛋白、α-1-抗胰蛋白酶、膜联蛋白V、α-A-晶状体蛋白、α-B-晶状体蛋白、β-L-晶状体蛋白、β-S-晶状体蛋白、γ-晶状体蛋白、α-胞衬蛋白(=血影蛋白)、胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)、谷胱甘肽-S-转移酶、HSP27、HSP60、HSP70、jo-1、髓磷脂结合蛋白(MBP)、神经元特异性烯醇化酶(NSE)、蛋白激酶C抑制剂、超氧化物岐化酶、转铁蛋白、转甲状腺素蛋白、泛素、血管内皮生长因子(VEGF)、波形蛋白。

[0079] 在第二种青光眼诊断方法的步骤c)中使用免疫分析进行的蛋白表达分析的进一步优选的实施方式中，使用的抗体是抗本申请的第一发明中披露的A组或B组的33个抗原中的一种或多种抗原的特异性抗体，所述抗原是：肌动蛋白、α-1-抗胰蛋白酶、膜联蛋白V、α-A-晶状体蛋白、α-B-晶状体蛋白、β-L-晶状体蛋白、β-S-晶状体蛋白、γ-晶状体蛋白、α-胞衬蛋白(=血影蛋白)、胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)、谷胱甘肽-S-转移酶、HSP27、HSP60、HSP70、jo-1、髓磷脂结合蛋白(MBP)、神经元特异性烯醇化酶(NSE)、蛋白激酶C抑制剂、超氧化物岐化酶、转铁蛋白、转甲状腺素蛋白、泛素、血管内皮生长因子(VEGF)、波形蛋白、膜联蛋白I-IV、β-2-肾上腺素能受体、钙网蛋白、热休克蛋白HSP10(=伴侣蛋白)、胰岛素、过氧化物岐化酶、蛋白激酶C、α-突触核蛋白、γ-突触核蛋白。

[0080] 在步骤c)中采用免疫分析对进行蛋白表达分析的进一步优选的实施方式中，裂解细胞并且采用蛋白印迹法、或ELISA、或ELISPOT、或微阵列对例如全部蛋白谱或特定蛋白组

分进行分析。

[0081] 在包括微阵列的实施方式的优选变体中，将可为单克隆抗体的抗体或用于所选择的标志物的其它捕获剂沉积到携带元件如芯片表面，包括但不限于载玻片、硅或硝酸纤维素表面，随后将该芯片与细胞裂解物或从根据 步骤b)处理后的细胞中获得的蛋白制备物进行孵育。在其它优选变体中，携带捕获剂的元件是微流控芯片或试纸条。

[0082] 在进一步优选的实施方式中，步骤c)中的蛋白分析在细胞的体外培养物中原位进行。所述的原位蛋白表达分析包括但不限于：标记或不标记的方法，以及比色法，如细胞内或细胞外蛋白的荧光或化学发光标记，Elispot(酶联免疫斑点)方法的应用，通过细胞内或细胞上的蛋白标记以及培养基中的蛋白检测吸收的改变等。原位蛋白表达分析优选在步骤b)中除去体液后在细胞培养容器中的细胞上进行。

[0083] 在步骤c)的第三组优选实施方式中，对细胞的生存力进行分析。细胞生存力的分析包括但不限于：采用例如流式细胞仪进行细胞计数和/或对细胞的生长模式进行分析，和/或监测生存力和/或细胞凋亡和/或监测细胞坏死。优选的方法包括但不限于：采用膜联蛋白V和碘化丙啶标记细胞以检测细胞的坏死和凋亡以及采用WST测试(水溶性四唑)或阿尔玛蓝(alamar-blue)染色以检测细胞的生存力。在优选的实施方式中，将不同的生存力分析方法的结果与标准数据进行比较并根据步骤d)进行结合以确定诊断结果。在进一步优选的实施方式中，也将包括蛋白表达分析的步骤c)的第一组和/或第二组的优选实施方式的结果与包括细胞生存力分析的步骤c)的第三种实施方式的结果相结合。

[0084] 在步骤d)中，将步骤c)中细胞的蛋白表达分析或细胞生存力分析的结果与标准数据比较以确定诊断结果。在步骤d)的优选实施方式中，采用本领域公知的计算方法对检测细胞的蛋白表达与标准数据进行计算比较。

[0085] 在一些优选实施方式中，步骤d)中使用的标准数据来自平行进行的青光眼诊断方法的步骤(a)-(c)的对照运行。对照运行包括一个或多个且不限于下述样品：采用青光眼患者的体液处理的细胞，包括来源于特定已知类型的青光眼患者诸如NTG(正常眼压性青光眼)或POAG(原发性开角型青光眼)或疾病特定阶段的青光眼患者如疾病早期的体液，以及采用健康个体的体液处理的细胞。在另一优选实施方式中，该标准数据可来自在不同时间进行的对照运行的存储数据。

[0086] 在步骤c)的第一组优选实施方式中，根据测试个体中分析的细胞所表达的蛋白的复杂蛋白谱，在步骤d)中确定的诊断结果可通过蛋白表达分析区分将健康个体和青光眼患者区分开。

[0087] 在步骤c)的第二组优选实施方式中，根据步骤b)采用体液处理后的细胞表达的蛋白中选择的生物标志物，在步骤d)中确定的诊断结果可通过蛋白表达分析将健康个体和青光眼患者区分开。

[0088] 在步骤c)的第三组的优选实施方式中，根据步骤b)中以体液处理后的细胞的细胞生存力，在步骤d)中确定的诊断结果可将健康个体和青光眼患者区分开。

[0089] 根据本发明的方法的进一步优选的实施方式，计算处理步骤结合了步骤c)中来自蛋白表达分析和/或细胞生存力分析结果的数据处理和步骤d)中将蛋白表达分析的结果与标准数据的比较。

[0090] 在步骤d)的一些优选实施方式中，基于本领域公知的计算方法对步骤c)中的蛋白

表达分析和/或细胞生存力分析的结果进行计算比较。步骤b)中的测试个体的体液处理的细胞在步骤c)中的结果与在步骤b)中以来自对照组如患者或健康个体的各临床组的体液处理的细胞在步骤c)中的结果的相应标准数据具有相似性最高的模式。在优选的变体中，标准数据由平行进行的对照运行获得，在其它变体中标准数据源自在不同时间进行的对照运行。

[0091] 在步骤d)的计算比较的优选变体中，使用人工神经网络，其中根据经验而不是根据程序学会区分不同的临床组。适于步骤d)的人工神经网络技术的实例包括多层前向反馈网络(MLFN)、具有自传播程序的人工神经网络以及其它类型的训练算法，剪枝技术以及遗传算法。

[0092] 本发明的方法不仅包括在步骤d)中演示的计算技术，还包括相似技术，例如使用其它模式匹配技术，其它分类统计技术，或其它比较蛋白表达结果与标准数据的方法—既用于复杂的蛋白表达谱或蛋白组分谱的比较，也用于有限数量的生物标志物或抗原的表达比较，或细胞生存力分析的比较。

[0093] 在一些实施方式中，通过第一种和第二种青光眼诊断方法获得的诊断结果是患者可以理解的诊断结果，或者在其它实施方式中，诊断结果包括一个或多个需要医学专家解释的诊断值。

[0094] 附图的简要说明

[0095] 图1：通过接触印刷(A)和压电点样技术(B)生成的抗人IgG/A/M的重复样点。

[0096] 图2A：在研究微阵列上逐条列举的眼部抗原的变异系数(CV)。

[0097] 图2B：研究微阵列上逐条列举的不同抗原的标准偏差(SD)。

[0098] 图3：来自4种不同抗原的不同数据处理的数据的比较：列出的是：原始数据(A)，AUC-数据(B)和Z-得分-数据(C)和使用IgG-归一化变换的数据(D)。

[0099] 图4：与对照个体(CTRL)和原发性开角型青光眼(POAG)患者的血清(A)和房水(B)孵育的20个抗原的平均抗原强度的分布图。

[0100] 图5：健康对照个体(CTRL)和青光眼患者(POAG)抗人IgG/A/M的箱线图。

[0101] 图6：用于通过对血清(6A)和房水(6B)的抗体反应性检测青光眼的受试者工作特征(ROC)曲线。

[0102] 图7：对照组(7A)和POAG样品(7B)的血清和房水的免疫反应性值的个体间比较。

[0103] 图8：通过在研究组之间的血清样品中显示显著差异的眼部抗原的超几何模型的计算，通过GO注释的生物学功能分析显示了几个过度代表的项。

[0104] 图9：青光眼患者的典型抗体模式。

[0105] 图10：微阵列数据每周的重现性

[0106] 图11显示了第二种青光眼诊断方法的优选实施方式中的方案的简单概述，所述方案用于实施例1-3中：神经视网膜神经节细胞铺于试验板中并加入含有10%的健康个体或患有POAG(原发性开角型青光眼)、NTG(正常眼压性青光眼)或OHT(高眼压)的患者的血清的培养基。37°C下在常压或在15000帕斯卡的升高的压力下孵育细胞48小时。裂解细胞并采用丙酮沉淀分离蛋白。使用SELDI-TOF质谱测定蛋白谱然后进行统计分析

[0107] 图12a显示了部分测定的蛋白谱。全蛋白谱具有约400个不同的蛋白质簇。在显示的部分图谱中，x-轴表示以道尔顿为单位的分子量，y-轴表示细胞中蛋白表达水平的强度。

在SELDI-TOF质谱检测的非常复杂的全蛋白谱中，蛋白簇的分子量为3078道尔顿(Da)到183222Da。此处显示的部分为4943Da到21934Da，并且给出了细胞中蛋白复杂度的概况。

[0108] 图12b显示了几个单次测量，其显示了通过对图谱的单纯的视觉分析来确定差异的难度。样品的图谱来源于在升高的压力存在或不存在下以健 康的或POAG血清处理的细胞。X-轴表示以道尔顿为单位的蛋白质分子量，Y轴表示细胞中测量的蛋白的强度。由于图谱中显示了数百个蛋白，因此不可能仅通过视觉观察来分析实验组之间的差异。

[0109] 图13：显示了分子量为9192、12390和12314道尔顿的生物标志物的几个变异性图。x-轴表示细胞的不同处理组。y-轴表示通过SELDI TOF质谱测定的蛋白的强度。图中每个三角形代表特定组中的一种样品。变异性图显示与健康血清孵育的细胞相比，在与POAG血清孵育的细胞中这3个生物标志物的蛋白表达水平发生改变(升高或降低)。

[0110] 图14：图表显示了方差分析。图14a显示了对细胞进行的各种处理-以健康个体的血清或POAG患者的血清处理以及在常压或升高的压力下处理-对细胞蛋白表达谱的影响。明显的，血清型对蛋白谱具有非常大的影响，为59.1%，在此基础上，当与升高的压力结合时增加另外14%(组合1+2)。压力本身对细胞的蛋白谱的影响为11.6%。图14b中的图表显示了关于选定的特定生物标记物9192的不同处理的影响的方差。影响非常相似。

[0111] 图15a：显示方差分析(ANOVA)计算出POAG血清中抗体的存在对蛋白谱的影响为50.5%。血清型，即POAG血清或来自健康对照的血清，具有额外的13.4%的影响。

[0112] 图15b：马氏距离显示了以含有或不含有抗体的POAG血清孵育的细胞与以对照血清孵育的细胞的全蛋白谱的比较，其中距离零点距离的增加表明以POAG患者血清孵育的细胞的蛋白谱与以健康血清孵育的细胞的蛋白谱之间的差异增加。与除去抗体的POAG血清(POAG-抗体)孵育的细胞的蛋白谱(马氏距离显示约为20)相比，以POAG血清孵育的细胞的蛋白谱与以对照血清孵育的蛋白表达谱之间的差异显著提高(马氏距离显示约为55)。

[0113] 图16a显示了在压力存在或不存在下测定的与健康、POAG或NTG血清孵育的细胞的蛋白谱的一部分。x-轴表示以道尔顿为单位的蛋白分子量，y-轴表示测定的细胞中蛋白的强度。与POAG血清相比，细胞显然对NTG血清的反应不同。

[0114] 图16b显示了在9207道尔顿处的生物标志物。x-轴表示实验组，y-轴表示测定的样品中蛋白的强度。青光眼组包括与青光眼血清，即POAG或NTG血清孵育的所有细胞。显然，9207道尔顿的生物标记物在与青光 眼血清孵育的细胞中发生上调。

[0115] 图17显示了根据测定的与青光眼血清即POAG或NTG血清孵育的细胞的蛋白谱计算的受试者工作特征(ROC)曲线。显示了青光眼血清与非青光眼血清之间的区别，灵敏度为88%，特异性为90%。曲线下面积为r：0.92，其为测试准确度的参数。

[0116] 图18：显示了RGC5细胞在与不同浓度的14-3-3抗体孵育并在1.5μM星型孢菌素(sta)下应激处理后的生存力。x-轴表示实验组，y-轴表示细胞生存力的百分比。在没有细胞应激或抗体的条件下孵育对照细胞(深灰色条)。星型孢菌素孵育的细胞生存力下降16.1%。与星型孢菌素孵育的细胞相比，星型孢菌素孵育并且与14-3-3抗体预孵育的细胞显示生存力发生显著($p<0.05$)至高度显著($p<0.01$)的的升高，高达11.6%(抗体浓度为0.5μg/ml)。

[0117] 图19：显示了RGC5细胞在与不同浓度的γ-突触核蛋白抗体孵育并在50μM H2O2(1h)下应激处理后的生存力。x-轴表示实验组，y-轴表示细胞生存力的百分比。对照细胞为

在没有细胞应激或抗体的条件下孵育。H2O2孵育的细胞生存力下降17.9%。与H2O2孵育的细胞相比，H2O2孵育并且与γ-突触和蛋白抗体预孵育的细胞显示生存力发生显著($p<0.05$)到高度显著($p<0.01$)的升高，高达15.3%(抗体浓度为0.05μg/ml)。

[0118] 图20：显示了RGC5细胞在与不同浓度的GFAP抗体孵育并在50μMH2O2(1h)下应激处理后的生存力。x-轴表示实验组，y-轴表示细胞生存力的百分比。在没有细胞应激或抗体的条件下孵育对照细胞。H2O2孵育的细胞生存力下降7.4%。与H2O2孵育的细胞相比，H2O2孵育并且与GFAP抗体预孵育的细胞显示生存力显著($p<0.05$)升高，高达9.8%(抗体浓度为0.5μg/ml)。

[0119] 发明详述

[0120] 涉及第一种青光眼诊断方法的实施例和详细描述：

[0121] 实施例1：比较血清和房水的自身免疫反应性的抗原微阵列，在青光眼患者和健康个体中具有特征性差异：

[0122] 原发性开角型青光眼患者(POAG；n=13)和健康对照(CTRL；n=13) 的血清和房水用于抗体分析。通过将40-100种不同的纯化抗原(已知的生物标志物)点样在纤维素膜包被的载玻片上来制备蛋白质阵列。将该阵列分别与血清(1：250)和房水(1：20)进行孵育。为了使抗体-抗原反应可视化，采用荧光标记的抗人IgG抗体处理阵列，然后进行荧光扫描。将二级抗体发出的信号数字化，并采用多元统计技术对斑点强度进行比较。

[0123] 结果：个体内的比较显示出血清和房水的抗体模式之间既存在一致性也存在差异。在血清和房水中，POAG患者显示对α-1-抗胰蛋白酶和膜联蛋白V的抗体反应性比健康受试者升高2倍以上($P \leq 0.001$)。不同的是，β-L-晶状体蛋白显示在POAG患者的房水中，的平均(ME)反应性显著升高(POAG：ME=5049；SD=1638；CTRL：ME=2119；SD=673；$P \leq 0.01$)，而在血清中的反应性降低($P \leq 0.01$)。所包括的研究受试者的房水中均未显示对7种抗原的免疫反应性。分别采用来自每种体液的10种抗体/抗原的生物标志物组，并采用特定的算法，我们能够区分POAG和CTRL，特异性和灵敏度约为90%(ROC曲线；血清：r=0.91；房水：r=0.93)。这些结果证实了青光眼患者的血清和房水中抗体反应性的上调和下调。此外，房水中抗体反应性比血清中的升高表明在眼中局部抗体的产生。

[0124] 实施例2：血清和房水样品的获得

[0125] 样品的获得按照赫尔辛基宣言中涉及人类的生物医学研究的要求进行操作。血液和房水收集自提供知情同意的所有志愿者。血液样品在1000g下离心，血清在-80°C下保存并用于后续分析。房水样品在取样后直接在-80°C下保存。所有的参加者均在眼科学系(美茵茨大学，德国)进行全面的眼科检查，包括Goldmann压平眼压，眼压测量，光学相干断层成像(OCT)，海德堡视网膜断层扫描(HRT)，并且按照欧洲青光眼学会的指南对他们进行分组。本研究中包括31名平均年龄为73(SD±10)并且进行了白内障手术的患者以及37名原发性开角型青光眼患者(POAG，平均年龄：67，SD±10)。与其它研究42一致，没有原发性或继发性青光眼或者除白内障外的其他眼科疾病的临床症状的白内障患者作为对照组(CTRL)。POAG患者未经治疗时的IOP(眼内压)>21mmHg(由Goldmann压平眼压计测定)，患有典型的视野缺损(由视野计检查，OCTOPUS101视野计，Haag-Streit，Wedel，Germany)以及视神经盘凹陷。自身免疫疾病或者患神经病学疾病如帕金森病的患者被排除在本研究之外。

[0126] 实施例3：微阵列的制备

[0127] 我们采用购自Sigma-Aldrich(德国)和BioMol(汉堡,德国)的高度纯化的蛋白作为抗原。采用包含1.5%海藻糖的PBS缓冲液将抗原稀释至1μg/μl以作为最佳的印刷条件。采用基于压电分配的非接触式印刷技术(sciFLEXARRAYER S3,Scienion,柏林,德国)和常用的针式接触印刷技术(OmniGrid100,Digilab Genomic Solutions,Ann Arbor,USA)两种方法进行抗原的点样。根据光斑形态和光斑之间的变异性对结果进行对比评估。采用压电点样技术对全套研究微阵列进行印刷。每种抗原在纤维素膜片(Oncyte,硝酸纤维素16多层载玻片,Grace Bio-Labs,Bend,USA)上一式三份进行点样。采用鼠抗人IgG/A/M(10μg/μl)和点样缓冲液作为阳性对照和阴性对照。点样过程在室温(RT)下和30%的湿度下进行。通过将250pl精确地点样于相同位置四次而将1nl的每种抗原稀释液涂覆在硝酸纤维素表面。在每种抗原的点样过程前后,采用sciDrop-VOLUME和自动滴液检测(autodrop-detection)软件(Scienion,柏林,德国)对点样体积的正确度以及液滴的准确位置进行监测。

[0128] 4°C下,在定轨摇床(Titramax 100,Heidolph,Schwabach,德国)上进行孵育和洗涤步骤。载玻片上覆盖16层FAST框架杂交腔室(Whatmann,Maidstone,UK)并采用包含4%BSA的PBS封闭1小时。然后,采用包含0.5%Tween的PBS(PBS-T)洗涤载玻片三次。采用PBS对患者血清进行1:250的稀释,房水与PBS的比例为1:10。随机地将120μl的这些稀释液在制备的抗原载玻片上孵育过夜。经过几次PBS-T的洗涤步骤后,将载玻片与Cy-5荧光标记的二级抗体(采用PBS-T进行1:500的稀释,羊抗人IgG,Jackson ImmunoResearch Laboratories,West Grove,USA)在暗室中孵育1小时。PBS-T洗涤两次后,采用HPLC-级水进行最后两次洗涤步骤。在采用微阵列扫描仪(Affymetrix 428 TM阵列扫描仪,High Wycombe,UK)进行扫描前对所有的微阵列进行风干。采用Spotfinder3.1.1软件(TM4,Dana-Faber Cancer Institute,Boston,USA)对生成的载玻片的16-位TIFF(标记图像文件格式)图像进行分析。根据如下公式进行背景扣除:斑点强度=平均强度SP-((总bkg-总top5bkg)/(像素SP数-像素top5bkg数)),其中SP代表任意斑点,bkg代表相应背景,top5bkg代表背景像素最高的5个。变异系数(CV)采用如下方式计算:CV=SDSP3/平均SPS…SPn,其中SDSP3代表一种样品中一种抗原的三个重复斑点的标准偏差,平均SPX…SPn代表所有斑点强度的平均值。

[0129] 实施例4:数据的统计分析

[0130] 为了对数据归一化和处理过程中的偏差产生的结果进行偏移比较,我们首先将两种不同的数据变换—曲线下面积(AUC)和Z-得分与原始数据进行对比。为了对研究数据进行分析,我们根据公式:Z-分数=(强度SP-平均强度SP1…SPX)/SDSPX…SPn采用Z-得分变换,其中SP代表任意斑点强度,SP1…SPX代表全部斑点46的总强度。采用不同的统计学技术检测潜在的生物标志物以及评估抗体反应性的显著变化。对于组间比较,我们分别对两种样品采用单因素ANOVA和多元分析判别(例如,马氏距离,标准根)。在第二步中,进行人工神经网络(ANN)以确定来自特定的抗原组的自身抗体模式的分类效力。因此,将数据组随机分为两部分,每组具有相等数量的患者。一半用于ANN的训练,另一半用来测试训练的ANN的分类效力。因此,列入训练数据组的样品未被用于分类的目的。通过绘制灵敏度-特异性曲线(ROC-曲线)使结果直观化。用于统计分析的方法的详细描述可以参考我们课题组之前发表的文献。为了个体内对比和使房水抗体水平与来自相应血清样品的抗体水平的比例具体化,我们根据每一个患者的血清数值计算了两者的百分差异,接着计算不同患者组的全部个体的平均值。血清和房水中的差异大于100%时被认为是显著的。另外,我们将测量的数据

与收集的临床记录之间建立关联。采用Statistica8.0(Statsoft,Tulsa,AZ,USA)进行统计学分析。

[0131] 实施例5:GO分析

[0132] 为了深入研究在患者组之间具有显著性差异的抗原的生物学过程,我们将Cytoscape 2.6.2和Bingo 2.3 plugin 50联合使用。为了将基因本体(GO)注释分配给每种抗原,利用完整GO注释数据库并且针对生物体/注释选择了智人。超几何模型和Benjamini&Hochberg错误发现率校正(P≤0.05)确定了过度代表的蛋白功能的显著性。

[0133] 实施例6:测定青光眼得分的示例性方法的方案

[0134] 在确定青光眼得分的第一步中,计算检测样品和参照样品的自身抗体反应性的归一化强度值之间的百分比差异。将这些百分比差异用作神经网络分析的输入值从而确定一个青光眼得分。根据所需的青光眼诊断方法的灵敏度和特异性,步骤b)中的血清与三种典型样品选项之一进行孵育:根据第一种诊断方法的步骤a)的方式提供的1)或2)或3):

[0135] 样品1)包括第1组的所有48种至少部分纯化的眼部抗原,样品2) 和样品3)分别包括12和15种至少部分纯化的眼部抗原。

[0136] 与预期一样,步骤a)的样品中包含的眼部抗原的数量越多,第一种诊断方法的灵敏度和特异性就越好。在只含有5种眼部抗原的样品3)中,仍然获得了约90%的灵敏度和特异性。

[0137] 此外,对于青光眼得分的计算,样品1,2和3中的每个抗原都被分配了不同的权重因子,以使高权重的抗原(例如A组的抗原)对青光眼得分具有更高的影响。

[0138] 当青光眼得分与定义的参考值不同时,例如,超过定义的阈值,确定那些检测样品,其中体液收集自青光眼患者。

[0139] 自身抗体反应性的归一化强度值

[0140] 

[0141] 采用如下公式计算强度值与参考值的百分比差异:

[0142] $$\%差异=\frac{(强度值_{患者}-强度值_{参考})*100}{|强度值_{参考}|}$$

[0143] 青光眼得分

[0144] 以计算出的百分比差异作为数据输入,采用神经网络算法评估青光眼得分:

[0145] 1)基于所有检测抗原评分

[0146] 灵敏度:96%

[0147] 特异性:97%

[0148] 2)基于12个检测抗原的亚组评分,所述抗原包括:

[0149] MBP、GST、HSP27、蛋白激酶抑制剂C、GFAP、Jo-1、泛素、肌动蛋白、β-S-晶状体蛋白、HSP70、超氧化物歧化酶、转甲状腺素蛋白

[0150] 灵敏度:92%

[0151] 特异性:94%

[0152] 3)基于5个检测抗原亚组的得分:

[0153] HSP70,肌动蛋白,β-S-晶状体蛋白,HSP27,GFAP

[0154] 灵敏度:91%

[0155] 特异性:88%

[0156] 根据抗原对青光眼诊断的影响以及考虑来自统计学分析如事后比较或判别分析的数据,将抗原细分为在青光眼得分的计算中具有不同权重的 三个不同组。显示非常强的组间差异的抗原归为A组,具有很强差异的抗原归为B组,具有明显的组间差异的抗原归为C组:

[0157] A组(非常高度相关):

[0158] 肌动蛋白、α-1-抗胰蛋白酶、膜联蛋白V、α-A-晶状体蛋白、α-B-晶状体蛋白、β-L-晶状体蛋白、β-S-晶状体蛋白、γ-晶状体蛋白、α-胞衬蛋白(=血影蛋白)、胶质原纤维酸性蛋白GFAP、谷胱甘肽-S-转移酶、HSP27、HSP60、HSP70、Jo-1、髓磷脂结合蛋白MBP、神经元特异烯醇化酶NSE、蛋白激酶C抑制剂、超氧化物歧化酶、转铁蛋白、转甲状腺素蛋白、泛素、血管内皮生长因子(VEGF)、波形蛋白

[0159] B组(高度相关):

[0160] 膜联蛋白I-IV、β-2-肾上腺素能受体、钙网蛋白、热休克蛋白HSP10、胰岛素、过氧化物歧化酶、蛋白激酶C、α-突触核蛋白,γ-突触核蛋白

[0161] C组(相关抗原):

[0162] 白蛋白、脑源性神经营养因子BDNF、心磷脂、DNA拓扑异构酶I、纤连蛋白、溶菌酶、髓鞘少突胶质细胞糖蛋白MOG、肌红蛋白、神经营养因子3、神经营养因子4、神经营养因子5、3-磷酸丝氨酸、甲状腺球蛋白、拓扑异构酶抑制剂

[0163] 在青光眼的诊断中显示出非常高的相关性的抗原给予比来自B组和C组的抗原更强的权重,导致对青光眼得分具有更高的影响。显示出高相关性的抗原给予比来自C组的抗原更强的权重,导致对青光眼得分具有中等的影响。相关抗原对评估的青光眼得分具有最小的影响。

[0164] 

[0165] 超过定义的阈值的受试者被诊断为青光眼患者。

[0166] 图1:显示了通过接触式印刷(A)和压电式点样技术(B)生成的抗人IgG/A/M的三次重复斑点。数字代表每个光斑各自的平均像素强度。A:所有斑点的平均强度为7173.32+/-1473.27单位。变异系数(CV)为0.21。B:平均强度为11716+/-374.78单位。CV为0.03。

[0167] 为了找出用于具有不同物理性质的蛋白质的以可重现方式的特定点样的最好方法,我们比较了两种不同的点样技术。用于描述重复斑点的斑点强度变化的常用方法是测定变异系数45。我们采用针式接触印刷技术可使所有抗原的三个重复斑点的平均CV达到0.32。斑点形态和强度在重复斑点之间有所不同,如图1A所示。相反,采用非接触-压电式点样技术点 样的微阵列显示低于10倍以上的斑点间变化性(平均CV=0.029),并且斑点形态的一致性更好(图1B)。这些发现的结果与sciDrop-VOLUME和自动滴液检测软件获得的结果一致。软件检测到的液滴体积在所有抗原间的变异仅为0.8%(相当于250pl液滴中的2pl)。因此,选择非接触印刷技术用于全套研究微阵列载玻片的印刷以确保以完全相同体积的抗原溶液进行点样。与点样技术验证的CV的估算相似,我们计算了研究微阵列的技术重复斑点的平均变异系数。这些微阵列显示变异系数为0.031,标准偏差为0.061(对于单个抗原的CV分布可参见附图2.A),而所有样品的重复斑点的测量的强度值的平均标准偏差根据抗原及其平均斑点强度在44-480之间变化(见图2.B)。

[0168] 图2A和图2B：图2A描述了研究微阵列中列出的每个抗原的原始数据的变异系数(CV)。x-轴表示不同的抗原，y-轴表示CV值。所有抗原的平均CV为0.031+/-0.061。图2B显示了研究微阵列中列出的不同抗原的原始数据的标准偏差(SD)。x-轴表示不同的抗原，y-轴表示标准偏差(SD)值。

[0169] 对于试验患者和测试个体的抗体谱，数据归一化的不同算法的比较显示Z-得分变换最适于我们的方法，这是由于其在研究组之间的比例的偏差小(图3)并且具有以定量方式对不同试验和青光眼检测的测量值进行比较的可能性。

[0170] 图3：4种不同抗原的不同数据处理获得的数据比较。列出了：原始数据(A)、AUC-数据(B)和Z-得分数据(C)和采用Ig-G归一化变换的数据(D)。

[0171] 在血清和房水中，我们可以检测所有研究患者中复杂的抗体反应性模式以及青光眼患者和对照受试者之间的多种差异(图4A和B)。我们发现IgG/A/M的水平和患者的年龄或性别没有相关性，并且我们也没有发现研究组的血清($P \geq 0.9$，图5A)和房水($P \geq 0.6$，图5B)中的IgG/A/M水平的显著差异。

[0172] 图4：血清(A)和房水(B)中平均抗体强度的图谱。显示了对照受试者(CTRL)和原发性开角型青光眼(POAG)患者中20个抗原的平均强度。线条图形表示患者组(红色=POAG，蓝色=CTRL)，X-轴表示在组间显示最强差异的20种抗体的亚组，Y轴描述了计算的Z-得分的值。

[0173] 图5：显示了抗人IgG/A/M测定值的箱线图。X-轴表示不同的组(对 照组(CON)；青光眼组(POAG))，y-轴表示测量并归一化的强度(Z-得分)。在血清(5A)和房水(5B)中检测到两组之间无显著性差异。

[0174] 在血清中，与CTRL受试者相比，POAG患者显示数个升高的免疫反应性，但同时也显示一些降低的反应性(图4A)。正如所证明的那样，与对照组相比，HSP27、HSP70、髓鞘碱性蛋白(MBP)或膜联蛋白V显示在POAG患者中的抗体反应性升高。对于其它抗原，如胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)或泛素，POAG患者显示出比健康受试者更低的抗体反应性。肌红蛋白，髓鞘少突胶质细胞糖蛋白(MOG)和DNA拓扑异构酶I的强度为很少或非常少的，直至不能检测到。单因素ANOVA和多元分析判别不仅显示在POAG患者和健康对照的血清中的全抗体反应性存在显著性差异($P \leq 0.002$)，还显示几个单一抗原具有统计学的显著差异。例如，POAG患者显示抗MBP($P \leq 0.0028$)、HSP27($P \leq 0.019$)、HSP70($P \leq 0.0033$)或α-胞衬蛋白($P \leq 0.0027$)的反应性显著升高(表3.)。观察到GFAP($P \leq 0.001$)、泛素($P \leq 0.0038$)和β-L-晶状体蛋白($P \leq 0.03$)的抗体反应性显著降低。

[0175] 在可能使用自身抗体反应性作为青光眼检测工具的情况下，我们使用人工神经网络(ANN)检测它们的分类效力。采用一个亚组的患者(CTRL，N=18，POAG=17)和9个最显著的血清抗体-抗原反应性(14-3-3、α-1-抗胰蛋白酶、β-L-晶状体蛋白、GFAP、HSP 27、HSP 70、MBP、α-胞衬蛋白、泛素)对网络进行训练。随后，训练的网络用于未知的血清样品。将通过ANN显示组分类的每个患者的个性化的ANN输出值作为组合抗体得分(CTRL ≥ 0.5，POAG ≤ 0.5)。由血清训练数据组的样品计算出的抗体得分显示与由相同患者的房水样品计算出的得分具有很强的正相关性($R \leq 0.74$，$P \leq 0.001$，图6A)。对于未包含在训练数据组内的预期样品(CTRLN=13，POAG N=20；测试数据)，我们检测到血清和房水的抗体得分存在相关性($R \leq 0.72$，$P \leq 0.001$，图6B)。使用计算的抗体得分进行患者分类，只有一个受试者(CTRL)通过

血清和房水的抗体得分被错误的分为POAG受试者(图6B)。两种样品类型的计算的得分之间的强正相关性强调了通过个体内比较检测到的血清和房水免疫反应性之间的微小差异。用于判别预期的青光眼和对照受试者的灵敏度和特异性达到93%(图6C;AUCr=0.93)。

[0176] 图6:A,B:血清和房水抗体反应性的散点图。X-轴显示血清抗体得 分的数值,Y轴显示房水样品的数值。每个点代表一个单一的病人(蓝色点=POAG,红色点=CTRL)。A:用于训练数据样品的散点图(R=0.74),B:所有样品的散点图(R=0.72)。C:预期血清样品的受试者工作特征曲线(X轴:1-特异性;Y轴:灵敏度;r=0.93)。

[0177] 同样地,对房水样品的检查显示研究组之间具有一些差异(图4B)。但是不同于血清样品,仅出现少量降低的反应性。大部分抗原,如POAG组的MBP、HSP70、膜联蛋白V或谷胱甘肽-S-转移酶显示出增强的反应性,并且其中的几个与血清样品是一致的。对于其它抗原,如胰岛素B链或MOG,在房水样品中只能检测到很少的抗体反应性并且在一定程度上这些与在血清中显示很少反应性的抗原是相同的(如MOG或DNA拓扑异构酶1,表3)。而且,统计学分析证实了两种样品类型的相似性的出现。由此获得的数据显示例如在房水中MBP的$P \leq 0.022$,膜联蛋白V的$P \leq 0.03$,两种抗原在POAG患者血清中的数值也都显著增加。与在POAG和CTRL组间的单因素统计显著差异的较低数量一致,在房水样品中确定的分类效力低于血清样品的分类效力(ROC-曲线;AUC r=0.7)。

[0178] 图7:血清和房水免疫反应性的个体内比较。抗原列于X-轴,Y轴代表测定的Z-得分值。零线以上的条表示在房水中较高的免疫反应性,零线以下的条表示在血清样品中具有较高的强度。显示了对照组(7A)和POAG样品(7B)的结果。总的来说,可以观察到只有少量的抗原显示免疫反应性差异高于100%(=增加2倍)。

[0179] 血清样品的免疫反应性与相应的房水样品的免疫反应性的个体内比较仅显示少许显著性差异。对于CTRL受试者(图7A),可以观察到与相应的房水样品相比,血清抗体反应性(如MBP、HSP60、GFAP)水平显著升高,房水的免疫反应性也显著升高(如α-1-抗胰蛋白酶)。但是,整体而言,在对照受试者的血清和房水中,超过80%的检测抗原显示出几乎相同的免疫反应性。POAG患者也显示在血清和房水间具有一些显著差异(图7B)。例如,白蛋白和α-1-抗胰蛋白酶在血清样品中显示出较高的免疫反应性,并且在后一种情况下这与对照样品相反,其中所述对照样品显示的房水中的α-1-抗胰蛋白酶具有较高的免疫反应性。与相应的血清样品(例如纤连蛋白、转甲状腺素蛋白)相比,青光眼组的房水样品显示出一些更高的抗体反应性。但是与对照组一样,青光眼组中的血清和房水的免疫反应性之间仅出现了少许显著差异,并且80%以上的检测抗原显示出几 乎相同的抗体模式。

[0180] 图8:通过GO注释对生物学功能的分析显示了几个过度代表的项。对抗原采用超几何模型计算显示出在血清样品中研究组之间的显著差异。在x-轴上显示了归于不同功能组的蛋白的数量。功能组列于y-轴上。蓝色条代表在POAG受试者中具有较高免疫反应性的抗原,红色条代表在青光眼患者中具有较低免疫反应性的抗原。星号表示也可以在房水中存在的功能组。

[0181] 有趣的是,项目如应激反应,细胞骨架,囊泡运输和细胞凋亡都发生显著的过度代表(图8)。项目如细胞骨架或者囊泡运输与神经过程是紧密相关的,其它的如应激反应或者细胞凋亡必须考虑与神经退行性疾病相关联。

[0182] 图9:A:一个青光眼患者的典型的自身抗体模式。采用磷酸盐缓冲液从干燥的

Schirmer条上洗脱获得泪液蛋白，接着在蛋白质微阵列上进行样品孵育。B)受试者工作特征曲线(ROC曲线)。来自青光眼患者和健康受试者的泪液自身抗体模式用于青光眼患者模式识别的人工神经网络的训练。y-轴表示灵敏度，x-轴表示1-特异性。采用这些自身抗体模式可以达到≥90%的特异性和灵敏度(曲线下面积:r=0.93)。

[0183] 图10:微阵列数据每周的变化性。将标准血清进行连续七周的孵育，然后计算变异系数(CV)。描述了几个不同抗原的包括标准偏差的变异系数(黑色条)。

[0184] 本领域已知，采用蛋白质微阵列方法可以确定青光眼患者的血清和房水中抗体反应性的差异。此外，发现了几个对青光眼有影响的新抗原，如α-1-抗胰蛋白酶或膜联蛋白V。与对照受试者相比，我们检测到POAG患者的血清和房水中显著升高的免疫反应性以及青光眼受试者的血清中显著降低的反应性。对于几个抗原，例如膜联蛋白V、伴侣蛋白、HSP27、HSP60、HSP70或者MBP，在青光眼患者的房水和血清样品中可以观察到患者组间相同类型的差异，第一次提示了两种样品类型之间的相似性。总之，对照受试者和青光眼患者之间的差异在房水样品中似乎较少，两组之中只能检测到8个单变量的显著差异，而在血清样品中可以检测到11个显著差异。房水和血清的个体内比较显示仅有少数抗原，例如MBP、GFAP或α-1-抗胰蛋白酶，显示对照受试者的两种样品类型之间的免疫反应性显著不同。另外，在青光眼受试者的样品中，很少的抗原，例如白蛋白或转 甲状腺素蛋白，显示在两种体液的免疫反应性模式之间具有统计学显著的差异。与血清样品相比，转甲状腺素蛋白在POAG患者的房水中显示较高的自身抗体反应性，考虑到POAG患者中的房水中存在较大量的转甲状腺素蛋白这一事实，该结果是非常有趣的。整体而言，高于80%的抗原-抗体反应性在健康受试者和POAG患者的两种体液中是一致的。这个结果表明，对于抗体来说，在眼部体液如与视网膜即青光眼的发病部位密切接触的房水中的免疫反应性与血清中的系统免疫反应性的差异没有那么大。因此，这些研究结果强调了在青光眼患者的血清抗体模式中检测到的变化的特异性，并且对其它眼部疾病也是很重要的。

[0185] 涉及第二种青光眼诊断方法的详细说明和实施例：

[0186] 根据第二种青光眼检测方法的优选实施方式，步骤a)中提供了神经视网膜细胞系R28或视网膜前体细胞系RGC 5的细胞培养物，在步骤b)中在常压或15000帕斯卡(Pa)的升高的压力下采用来自对照个体和原发性开角型青光眼(POAG)患者、正常眼压性青光眼(NTG)和高眼压症(OHT)患者的血清处理细胞。高眼压症患者(OHT)的眼内压高于正常，但是没有青光眼的症状如视神经损伤或视野丧失。

[0187] 实施例中采用以下材料和方法。但是，本发明并不局限于如下所述的材料和方法的组合，并且可以采用用于相应目的的可选的方法替换如下所述的方法。

[0188] 细胞培养:使用了神经视网膜细胞系R28[由G M.Seigel;Ross Eye Institute, University of Buffalo提供]。该神经视网膜细胞系来自出生后6天的Sprague-Dawley大鼠并且采用E1A基因的12S部分永生化。该细胞系显示视网膜前体细胞如视网膜神经节细胞，感光细胞，Müller细胞以及神经胶质细胞的特征[Seigel,G.M.,A.L.Mutchler,和E.L.Imperato,Expression of glial markers in a retinal precursor cell line.Mol Vis,1996.2:p.2]。将培养物置于包含10%胎牛血清(FBS,Cambrex Bioscience,Verviers, Belgien)、5mg/ml庆大霉素-谷氨酰胺溶液(Sigma-Aldrich GmbH,Steinheim)，10%MEM维生素(100x(Invitrogen))和10%MEM非必须氨基酸(100x(Invitrogen))的Dulbecco改良Eagle

培养基(DMEM)中。每隔4-5天采用非酶细胞消化液(Sigma-Aldrich GmbH,Steinheim)对 细胞进行传代,并于37°C下在含95%空气和5%CO_2的潮湿气氛中培养。视网膜前体细胞系RGC5[由N.Agarwal,UNT Health Science Center,Fort Worth提供]是一个采用E1A基因的12S部分永生化的视网膜细胞系,其表达神经元细胞以及视网膜细胞的标志物[Krishnamoorthy,R.R.,P.Agarwal等人.(2001)."Characterization of a transformed rat retinal ganglion cell line."Brain Res Mol Brain Res 86(1-2):1-12;Van Bergen N.J.,J.P.Wood等人.(2009)."Recharacterization of the RGC-5 retinal ganglion cell line."Invest Ophthalmol Vis Sci 50(9):4267-4272.]。将培养物置于包含10%FBS、100U/ml青霉素、100μg/ml链霉素和2mM谷氨酰胺的Dulbecco改良Eagle培养基(DMEM)中并在37°C下,5%CO_2的潮湿气氛中培养。每隔4-5天采用非酶细胞分离液对细胞进行传代。

[0189] 细胞裂解物的制备:在一些实验中48小时后弃去培养液,用5ml磷酸盐缓冲液(PBS;Invitrogen)清洗生长于5ml实验皿底部的细胞两次。将以400:1的比例加入蛋白酶抑制剂混合物(P 1860(Sigma-Aldrich GmbH,Steinheim)的100μl裂解缓冲液(尿素9.5M,Chaps 2%,DTT 1%)滴加于细胞上。将这些从培养皿中取出并置于冰块冷却的Eppeddorf管中。然后采用超声脉冲回波仪(Labsonic®M(Sartorius, Göttingen))在80%的振幅和0.5的频率/周期下裂解细胞3x25次。采用150μl PBS对清洗24-孔板中的细胞两次后,加入60μl添加了蛋白酶抑制剂混合物的Seldi缓冲液。再次将细胞从孔的底部取出并且按上述方法进行裂解。采用超声脉冲回波仪进行每个裂解循环后将细胞置于冰上。采用Lowry法测定从5ml的实验孔板上获得的细胞裂解物中的蛋白质浓度[Lowry,O.H.等人.,Protein measurement with the Folin phenol reagent.J Biol Chem,1951.193(1):p.265-75]。

[0190] 在进一步的实验中,弃去培养液并用温的无钙PBS清洗细胞。然后采用非酶细胞分离液将细胞从细胞培养皿上分离。分离的细胞在4°C,300g下离心10分钟。弃去上清液并且用PBS清洗细胞沉淀。再次将细胞离心,弃去上清液并在-80°C下冷冻细胞。冷冻的细胞解冻后,加入含0.1%十二烷基-D-β麦芽糖苷和蛋白酶抑制剂的裂解缓冲液。将细胞与裂解缓冲液置于冰冷却的超声波浴中1分钟以促进细胞裂解。同样采用Lowry法测定蛋白质浓度。

[0191] 由细胞裂解物制备总蛋白:为了测量细胞的蛋白质谱,从上述制备的 细胞裂解物中取出150μg蛋白的等价物,向样品中加入8倍体积的-80°C的丙酮并在冰上孵育30分钟使蛋白沉淀。然后样品在4°C下以14000rpm离心30分钟。弃去丙酮,向蛋白沉淀中加入PBS,使蛋白的最终浓度达到8μg/μl。为了使蛋白在PBS中溶解,将管置于超声波冰浴中30分钟。然后将2μl的样品点样于Seldi-Tof-MS蛋白质芯片上。

[0192] 肽片段的轨道阱质谱(Orbitrap)分析:从使用十二烷基-D-β麦芽糖苷的方法制备的细胞裂解物中取出60μg蛋白质,并使用12%的Bis-Tris凝胶电泳(Invitrogen)进行分离。泳道被分为16个大小相等的片段并且采用胰蛋白酶消化片段中的蛋白。消化后,从凝胶中提取蛋白,并且采用C18 ZipTips将每个片段中的蛋白进一步分为8个不同的组分。在ZipTips中上样后,采用10%到50%的乙腈梯度将多肽从Tip中洗脱下来。将洗脱的组分上样于轨道阱靶上并覆盖芥子酸基质。根据生产商的方案采用Orbitrap对多肽进行测定。将信息例如关于通过Orbitrap测定多肽获得的多肽的质量发送到几个数据库中,并与数据库中注册蛋白的已知肽片段进行比较。产生了一系列测定的蛋白。生成并比较不同实验组中测

定的蛋白质的强度。

[0193] 采用Seldi-Tof-质谱分析细胞总蛋白:为了分析蛋白表达谱,使用表面增强激光解吸/电离飞行时间质谱仪PBS-II SELDI-TOF(可购自如BioRad Hercules,CA,USA或Ciperhgen Biosystems Inc Fremont)。该质谱仪使用具有不同化学表面的蛋白质芯片。每种样品上样于具有弱阳离子交换表面(CM10)或反相表面(H50)的几个八点芯片上(根据生产商的方案处理这些芯片后)。样品干燥后,在每个斑点上滴加两次1μl的能量吸收分子芥子酸基质(20mg芥子酸,750μl ACN,750μl H2O-HPLC,15μl TFA),并一直允许其结晶。采用具有蛋白芯片阵列自动加样仪(protein Chip Array Auto Loader)的PBS-IIc蛋白芯片阅读器(Protein Chip Reader)对样品进行分析,使用蛋白芯片软件3.2版(Protein Chip Software version 3.2)一次可以分析24块芯片。在激光强度为200,偏转器设置为2800Da,检测器灵敏度为9,分子量检测范围为3000-200000Da,优选3000-15000Da的条件下检测样品。

[0194] 测定蛋白表达谱的峰值检测:将测定蛋白质的表达谱发送至Ciphergen Express Data Manager Software version 3.0(CE;Ciphergen Biosystems)。扣除基线并按照生产商的方案检测峰值。

[0195] 由检测的峰生成每个实验装置的一系列峰簇。将该簇列表输出到统计分析程序(Statistica,ver.8.0;Statsoft,Tulsa,OK)。该程序用于根据多个生物标志物峰的组合来计算多元判别分析。它可以显示出哪些蛋白峰在单个试验组中显著不同并且可以用于组间的区分。在比较POAG血清孵育的细胞和健康者血清孵育的细胞的第一项研究中,检测到10个蛋白质量的生物标志物组,显示这些峰最能用于不同组间的区分。

[0196] 采用统计分析来比较在升高的压力存在或不存在下与不同血清孵育的细胞的蛋白表达分析结果:采用统计学,计算方差分量和混合模型ANOVA以用来确定因变量(血清型/压力高度)以及自变量对细胞蛋白表达谱的影响。该计算基于生物标志物组的标准根。对于每一个单一的蛋白生物标志物,也要计算变量的影响。该分析中也用于计算血清中抗体对蛋白质表达谱的影响。另外,计算马氏距离以显示除去抗体后蛋白表达谱改变的方向。

[0197] 使用计算出的生物标志物计算受试者工作曲线(ROC)。它能证明青光眼血清检测的灵敏度为88%,特异性为90%。如图17所示,曲线下面积为r:0.92。

[0198] 此外生成了神经网络。这是一个由蛋白表达谱的峰信息反馈的统计数据建模工具。如果数据是显著的/足够有说服力的,该网络具有学习区分试验组的能力并且能够定位/关联新样品到相应组。

[0199] 蛋白鉴定:使用Maldi-Tof-Tof MS鉴定由Seldi-Tof MS测定的蛋白生物标志物。经丙酮沉淀制备后,每次运行使用200μg蛋白的等价物通过SDS-Page分离细胞裂解物中的蛋白。将剩余的沉淀溶解于15μl H2O稀释的5μl NuPage®LDS 4x样品缓冲液中(Invitrogen)。在90°C下变性蛋白5min后,使用 NuPage®MES SDS运行缓冲液20x Invitrogen以12%Bis-Tris凝胶(Invitrogen)对其进行分离。运行后,根据生产商的方案将凝胶与固定液(40ml H2O,50ml甲醇,10ml乙酸)孵育10分钟,接着与染色溶液(胶体蓝染色试剂盒,Invitrogen)(55ml H2O,20ml甲醇,20ml染色剂A,5ml染色剂B)孵育过夜。根据如下方案将含有生物标志物的凝胶条带中的蛋白洗脱:从凝胶上切下2x1mm的条带部分,转移入100μl洗涤液中(甲醇50%,H2O 40%,乙酸10%)并在在剧烈振摇下孵育30分钟,然后使用100%

ACN脱水20分钟。然后向干燥的凝胶块中加入50μl的洗脱溶液(甲酸50%,ACN 25%,异丙醇15%,H2O 10%)并孵育4小时。使 用Seldi-Tof MS测量2μl的样品以显示洗脱的蛋白。Seldi-MS显示出蛋白后进行消化。将余下的条带切割为小块并加入50μl ACN处理15分钟。短暂离心后弃去ACN,使用快速-Vac干燥器(speed-Vac dryer)干燥凝胶块10分钟并加入50μl的胰蛋白酶缓冲液(50mM NH4HCO3,14.8ng/μl胰蛋白酶)在37°C下放置约12小时。将20μl 25mM的NH4HCO3加入消化的蛋白中,随后通过与20μl的抽提液(5%甲酸;50%ACN;45%H2O)孵育30分钟来提取消化的蛋白。使用双层法采用2x0.5μl肉桂酸基质将1μl消化的蛋白上样于MALDI的固定靶。根据生产商的方案采用Maldi-TofTofMS(Bruker Ultra Flex II)对细分的蛋白进行检测。

[0200] 根据一个优选实施方式的青光眼的诊断检测的实施例1-4中的方案概括于图11中。按照如上所述的细胞培养条件,在5ml的试验皿(细胞培养皿(nunclon)表面)中进行实施例1。实施例2和3在24孔板中进行并且细胞培养条件作轻微变动:以约40%的汇合将细胞铺于培养皿中并使用上述包含10%的实验血清而不是FBS的DMEM培养基处理细胞。然后在37°C下在15000帕斯卡(112mmHg)的升高的压力存在或不存在下,在95%空气和5%CO2的潮湿环境中孵育细胞48小时。为了产生升高的[静水]压力,我们使用了特别设计的玻璃压力室。将其置于37°C的培养箱内并且与一个含有95%合成空气以及5%CO2(AirLiquide,Ludwigshafen)的压缩空气供应装置相连。按照如上所述的细胞培养条件在10ml细胞培养皿中培养实施例4中的细胞。

[0201] 实施例A

[0202] 实施例A在5ml(细胞培养皿表面)实验皿中进行。将在常压或者升高的压力下与健康者血清孵育的细胞的蛋白谱与POAG患者血清孵育细胞的蛋白谱进行比较。每组中样品的数量为n=8,使用4种不同的血清样品。患者按照欧洲青光眼协会的指南进行分类(欧洲青光眼协会,青光眼术语和指南,http://www.eugs.org.2004)。

[0203] 分析判别显示了一个根据在蛋白谱分析前对细胞的处理而在细胞中显著上调或下调的10个蛋白的组:A:用来自健康个体的血清以及在压力下处理;B:用来自健康个体的血清以及在无压力条件下处理;C:用POAG患者的血清以及在压力下处理;D:用POAG患者的血清以及在无压力条件下处理。图13显示了3个分子量分别为9192、12390、12314Da的蛋白生物标志物的实例,并且在一些组中都显示显著差异。图13显示了 9192Da(p=0.000058)的生物标志物,所述生物标志物在压力存在或不存在下,在POAG患者血清处理的细胞中上调。如图13所示,12390道尔顿的生物标志物仅在那些与POAG血清以及在15000pa的升高的压力下孵育的细胞中显著下调(p=0.000086)。分析判别也显示了在与血清型无关的压力处理的那些细胞中显著下调(p=0.000000)的生物标志物。如图13所示的12314道尔顿处的分子标志物。

[0204] 图14a中显示了如上所述的不同处理A、B、C或D对蛋白谱差异的贡献。通过考虑血清型、压力以及血清型和压力的组合对细胞蛋白谱的总体影响来计算方差分析。图14表明血清型对蛋白谱的影响最大即59.1%。压力本身对蛋白谱的影响为11.6%。因此,如蛋白谱差异所证明,与采用升高的压力和环境压力处理细胞的比较相比,采用POAG患者的血清而不是采用健康个体的血清处理细胞对蛋白表达具有更大的影响。

[0205] 不仅能够从全蛋白谱中观察到对血清型的重要影响,而且从选择的生物标志物的

方差分析计算中也可以观察到。例如图14b显示了对9192道尔顿的生物标志物的方差分析：进一步表明血清型的影响是最重要的且显示其显著影响达到55.1%。

[0206] 实施例1的这些结果表明，与健康个体和/或POAG患者的血清处理的细胞相比的测试个体血清处理细胞的蛋白谱的分析可以充当POAG疾病诊断的灵敏度测试。

[0207] 如上所述，在优选的变体中选择生物标志物或抗原，其中已知与健康个体或其它自身免疫或神经退行性疾病或相对于正常细胞生长的凋亡过程相比，它们的表达水平在青光眼患者中升高或降低。一个这样的生物标志物的实例是组蛋白H4：实施例A(图13)中的9192道尔顿的蛋白经MALDI-TOF-TOF-MS鉴定为组蛋白H4蛋白的片段。

[0208] 在实施例1中，在那些与青光眼患者血清孵育的细胞中，组蛋白H4，即9292道尔顿的生物标志物的表达水平显著提高。在升高的压力下进一步培养可以增强该作用。

[0209] 组蛋白H3和H4属于核心组蛋白，其在真核细胞中可以装配染色体的核小体核心颗粒，并且参与基因调控。组蛋白，尤其是H3和H4可以翻译后修饰，例如乙酰化或甲基化。医学研究结果表明组蛋白表达水平、修饰和定位的改变与数种其它的神经退行性疾病相关，例如阿尔茨海默病和帕金森病。有趣的是，组蛋白不仅参与数种神经退行性疾病的病理机制，同时也参与组蛋白表达和修饰改变所影响的癌细胞，如结肠癌细胞。考虑到组蛋白的生理学作用，组蛋白表达水平的改变可能导致细胞凋亡。这与青光眼伴随着视网膜神经节细胞的凋亡是一致的。因此已知与青光眼疾病相关或更普遍的与自身免疫疾病或神经退行性疾病或细胞凋亡相关的生物标志物或抗原为步骤c)中针对所选择的生物标志物的蛋白表达分析的有希望的候选物。

[0210] 另一个有趣的发现是，与POAG血清孵育的细胞中，有35%的细胞在升高的压力下孵育48小时后丧失生存力，而与健康的血清孵育的细胞只有约10%发生死亡。

[0211] 实施例B

[0212] 实施例B在24孔板中进行。将与健康者的血清孵育的细胞的蛋白谱作为对照，并与原发性开角型青光眼(POAG)患者、正常眼压青光眼(NTG)和高眼压症患者(OHT)的血清孵育的细胞的蛋白谱进行比较。

[0213] 蛋白谱仍显示非常复杂的模式，图16显示了一系列检测的蛋白质的放大视图。分析判别显示了一组重要的生物标志物。在以POAG血清进行的第一项研究中发现的几个生物标志物在该实验中也被发现，显示与如上所见的上调或下调相同的效果。这些生物标志物中有一个在9207道尔顿处，可以看作是仅采用POAG血清的第一次实验中发现的9192道尔顿处的生物标志物的等价物，并且在与青光眼患者的血清孵育的细胞中增加。该生物标志物示于图16中。如前述实施例所示，生物标志物在与青光眼血清孵育的细胞中发生上调。

[0214] 实施例B产生了另一个有趣的结果：采用OHT患者的血清处理的细胞的蛋白表达谱与健康个体的血清处理的细胞的完整蛋白谱以及选定的生物标志物的表达谱非常相似。这个结果与临床观察是一致的，即眼内压升高的人群中只有1%发展为青光眼，根据本发明的方法的优点在于该方法可以确定那些会发展为青光眼的高眼压人群。

[0215] 实施例C

[0216] 实施例C在24孔板中进行。将与健康血清孵育的细胞的蛋白谱作为对照，与POAG患者血清孵育的细胞的蛋白谱进行比较，其中所述POAG患者的血清中仍含有抗体或抗体已从血清中除去。采用包被了免疫球蛋白亲和基质的蛋白G磁珠(Dynabeads®Protein G;

Dynal Biotech ASA,Oslo,Norway)除去抗体。20μl珠子用于纯化35μl血清。为了使用珠子，采用 600μl pH5的NaAc洗涤两次，时间为2分钟，再洗涤一次，时间为5分钟。然后将珠子加入到血清中并在12°C下在定轨摇床中孵育6小时。

[0217] 与健康个体的血清处理的细胞的蛋白谱相比，以POAG患者血清和如上所述除去抗体的POAG患者的血清处理的细胞的蛋白谱变化的方差分析示于图15中。抗体对蛋白谱的影响高达50.5%。对马氏距离的计算显示除去抗体的POAG血清孵育的那些细胞的蛋白谱显著改变并接近那些健康血清孵育的细胞：POAG血清孵育的细胞的蛋白谱与健康血清孵育的细胞的蛋白谱差异更大，其马氏距离约为55。除去抗体的POAG血清(POAG-抗体)孵育的细胞的蛋白谱与健康血清孵育的细胞的蛋白谱的差异较小，其马氏距离约为20。

[0218] 这些结果与根据源自青光眼患者和健康对照个体的体液的自身免疫反应性差异而用于青光眼诊断的第一种方法中显示的数据是一致的。

[0219] 实施例D：

[0220] 实施例D在10ml的细胞培养皿中进行，将RGC 5细胞与POAG或健康血清孵育24小时。采用轨道阱质谱(Orbitrap)检测蛋白或肽模式。细胞裂解物非常复杂，在初步研究中采用轨道阱质谱对150多个蛋白进行检测。在对轨道阱质谱检测的蛋白的强度差异进行分析后，我们能够检测到在实验组间存在显著差异。我们能够检测到与健康者血清孵育的那些细胞中显著上调的蛋白质，如热休克蛋白60，细丝蛋白B或β-肌动蛋白，以及在与POAG患者血清孵育的那些细胞中也上调的蛋白，例如延伸因子1α，T-复合蛋白亚基α-B，磷酸甘油酸激酶1。

[0221]

蛋白质	健康者	POAG
细丝蛋白 B(FLN-B)(β-细丝蛋白)(肌动蛋白结合样蛋白)(ABP-280-样蛋白)-(小鼠)	16042	9315
激动蛋白，细胞质 1(β-肌动蛋白)-(小鼠)	28305	15835
60 kDa 热休克蛋白，线粒体前体(Hsp60)	16857	9368

[0222]

（60 kDa 伴侣蛋白）（CPN60）（热休克蛋白 60）（HSP-60）（线粒体基质蛋白 P1）（HSP-65）-（小鼠）		
延伸因子 1-α 1（EF-1-α-1）（延伸因子 1 A-1）（eEF1A-1）（延伸因子 Tu（）EF-Tu）-小家鼠-（小鼠）	12445	38739
T-复合蛋白 1 亚基 αB（TCP-1-α）（CCT-α）（无尾复合多肽 1B）（TCP-1-B）-小家鼠（小鼠）	9592	20470
磷酸甘油酸激酶 1（EC 2.7.2.3）-小家鼠（小鼠）	12914	29310

[0223] 涉及用于青光眼的抗体的治疗应用的实施例：

[0224] 实施例i：

[0225] 将RGC5细胞以每孔45000个细胞的数量铺于24孔板中。然后采用不同浓度的已知具有青光眼诊断潜能的(第1组的抗体)14-3-3(蛋白激酶c抑制剂)抗体预孵育细胞3小时。为了促进细胞应激和细胞死亡，将RGC5细胞与1.5μM的星形孢菌素进行孵育。5小时后采用结晶紫检测细胞的生存力。当与不同浓度的14-3-3抗体孵育时，我们能够检测到应激细胞的生存力显著以及非常显著的提高。可检测到与1μg/ml的14-3-3抗体孵育的细胞的生存力显著提高7.4%($p<0.05$)。检测到与0.5μg/ml 14-3-3抗体孵育的细胞的生存力更显著地提高11.6%($p<0.01$)(图18)。

[0226] 实施例ii：

[0227] 将RGC5细胞以每孔45000个细胞的数量铺于24孔板中。然后采用不同浓度的已知具有青光眼诊断潜能的(第1组的抗体)γ-突触核蛋白抗体预孵育细胞3小时。为了促进细胞应激和细胞死亡，将RGC5细胞与50μM的H2O2进行孵育。1小时后采用结晶紫检测细胞的生存力。当与不同浓度的γ-突触核蛋白抗体孵育时，我们能够检测到应激细胞的生存力显著

以及非常显著的提高。检测到与不同浓度的γ-突触核蛋白抗体(0.05;0.5;1和5μg/ml)孵育的细胞的生存力显著提高15.3%(P<0.05)。检测到与1μg/ml γ-突触核蛋白抗体孵育的细胞的生存力更显著地提高13.2%(p<0.01)(图19)。

[0228] 实施例iii:

[0229] 将RGC5细胞以每孔45000个细胞的数量铺于24孔板中。然后采用不同浓度的已知具有青光眼诊断潜能的(第1组的抗体)GFAP抗体预孵育细胞3小时。为了促进细胞应激和细胞死亡,将RGC5细胞与50μM的H2O2进行孵育。1小时后采用结晶紫检测细胞的生存力。当与不同浓度GFAP抗体孵育时,我们能够检测到应激细胞的生存力显著提高。可检测到与不同浓度的GFAP抗体(0.1;0.5和1μg/ml)孵育的细胞的生存力显著提高9.8%(P<0.05)(图20)。

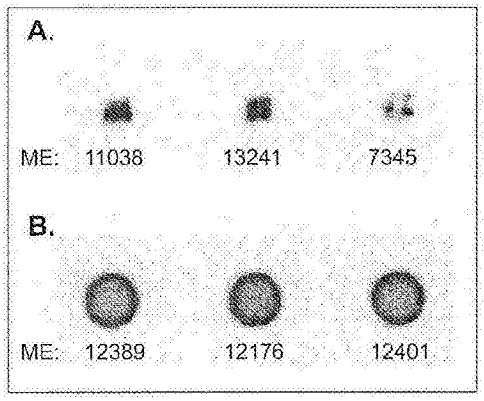
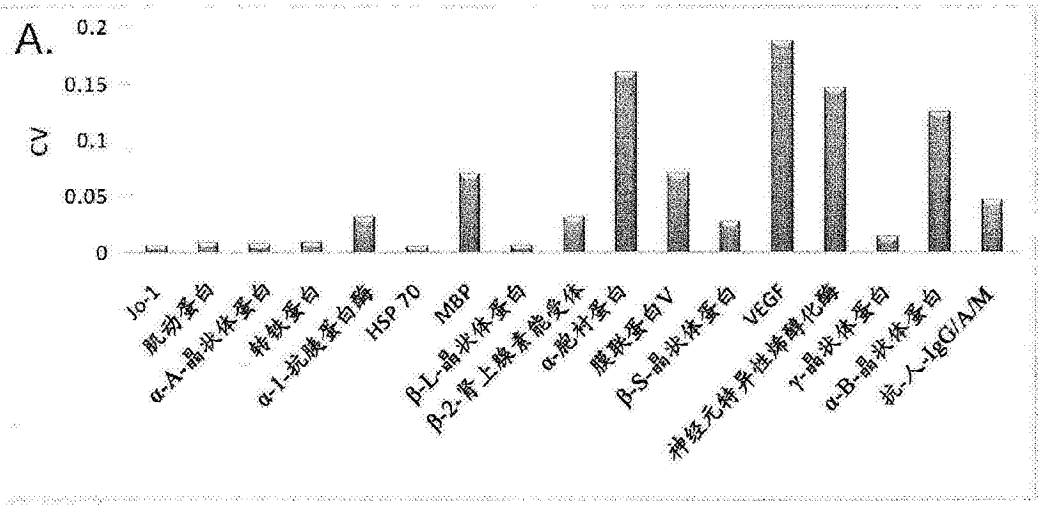

A.
ME: 11038 13241 7345
B.
ME: 12389 12176 12401

图1


A.
CV
0.2
0.15
0.1
0.05
0
Jo-1
肌动蛋白
α-A-晶状体蛋白
转铁蛋白
α-1-抗胰蛋白酶
HSP 70
MBP
β-L-晶状体蛋白
β-2-肾上腺素能受体
α-胞衬蛋白
膜联蛋白V
β-S-晶状体蛋白
VEGF
神经元特异性烯醇化酶
γ-晶状体蛋白
α-B-晶状体蛋白
抗-人-IgG/A/M

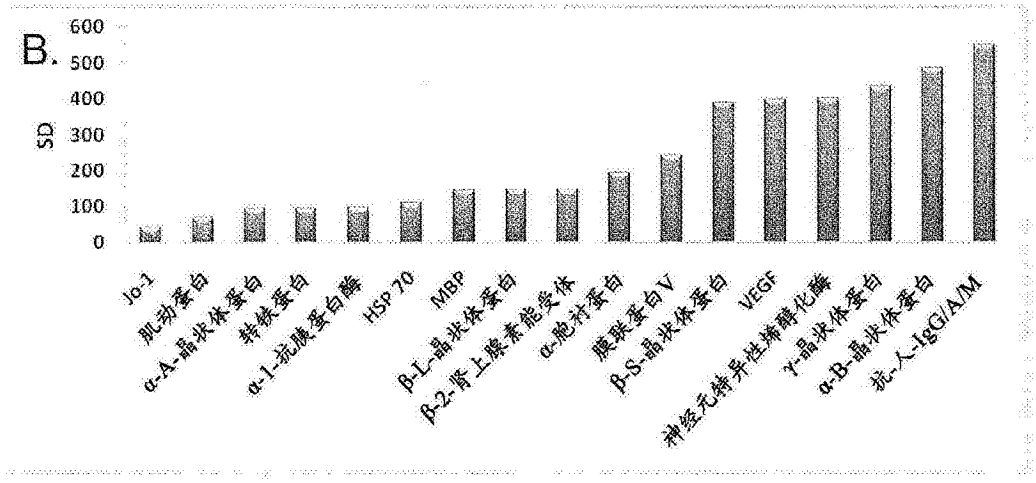

B.
SD
600
500
400
300
200
100
0
Jo-1
肌动蛋白
α-A-晶状体蛋白
转铁蛋白
α-1-抗胰蛋白酶
HSP 70
MBP
β-L-晶状体蛋白
β-2-肾上腺素能受体
α-胞衬蛋白
膜联蛋白V
β-S-晶状体蛋白
VEGF
神经元特异性烯醇化酶
γ-晶状体蛋白
α-B-晶状体蛋白
抗-人-IgG/A/M

图2A和图2B

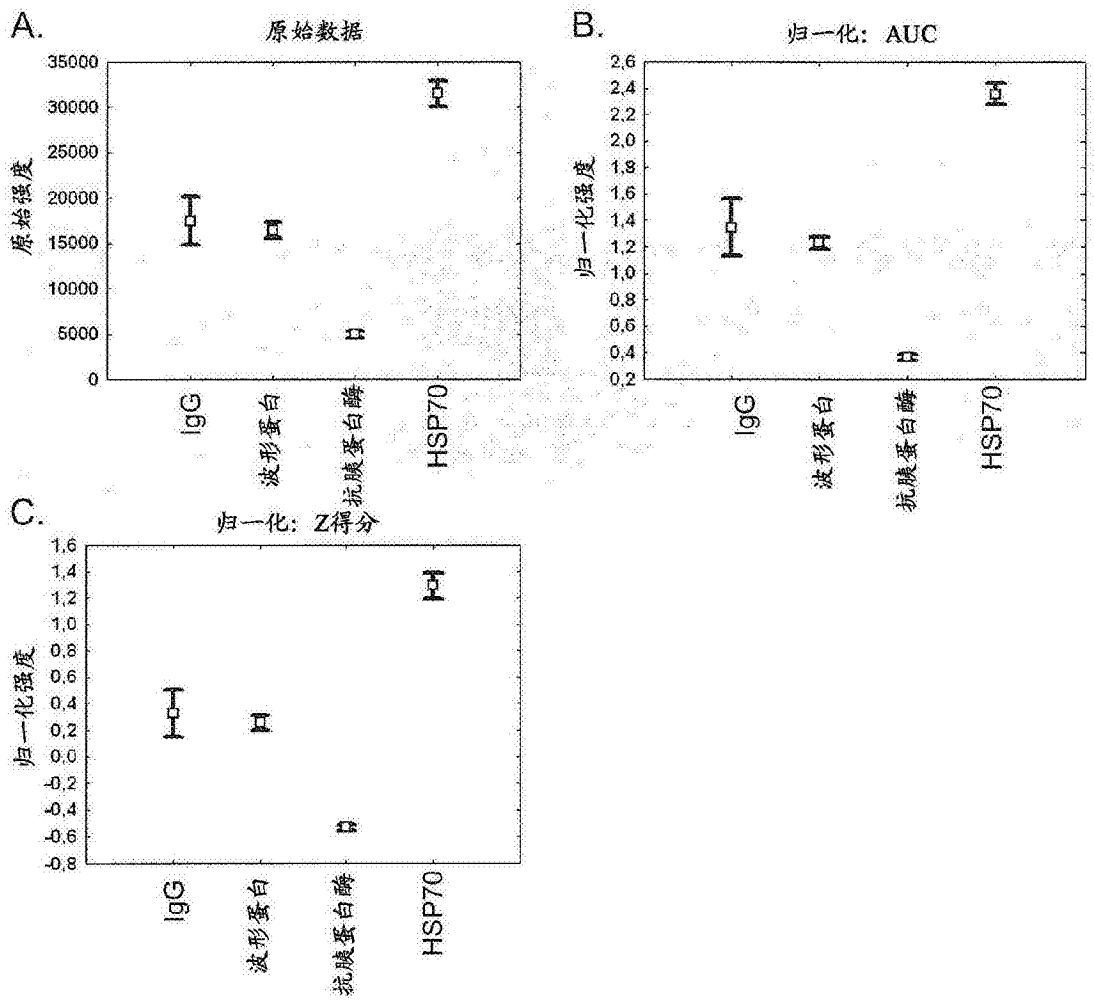

A.
原始数据
原始强度
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
IgG
波形蛋白
抗胰蛋白酶
HSP70
B.
归一化：AUC
归一化强度
2,6
2,4
2,2
2,0
1,8
1,6
1,4
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
IgG
波形蛋白
抗胰蛋白酶
HSP70
C.
归一化：Z得分
归一化强度
1,6
1,4
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
-0,2
-0,4
-0,6
-0,8
IgG
波形蛋白
抗胰蛋白酶
HSP70

图3

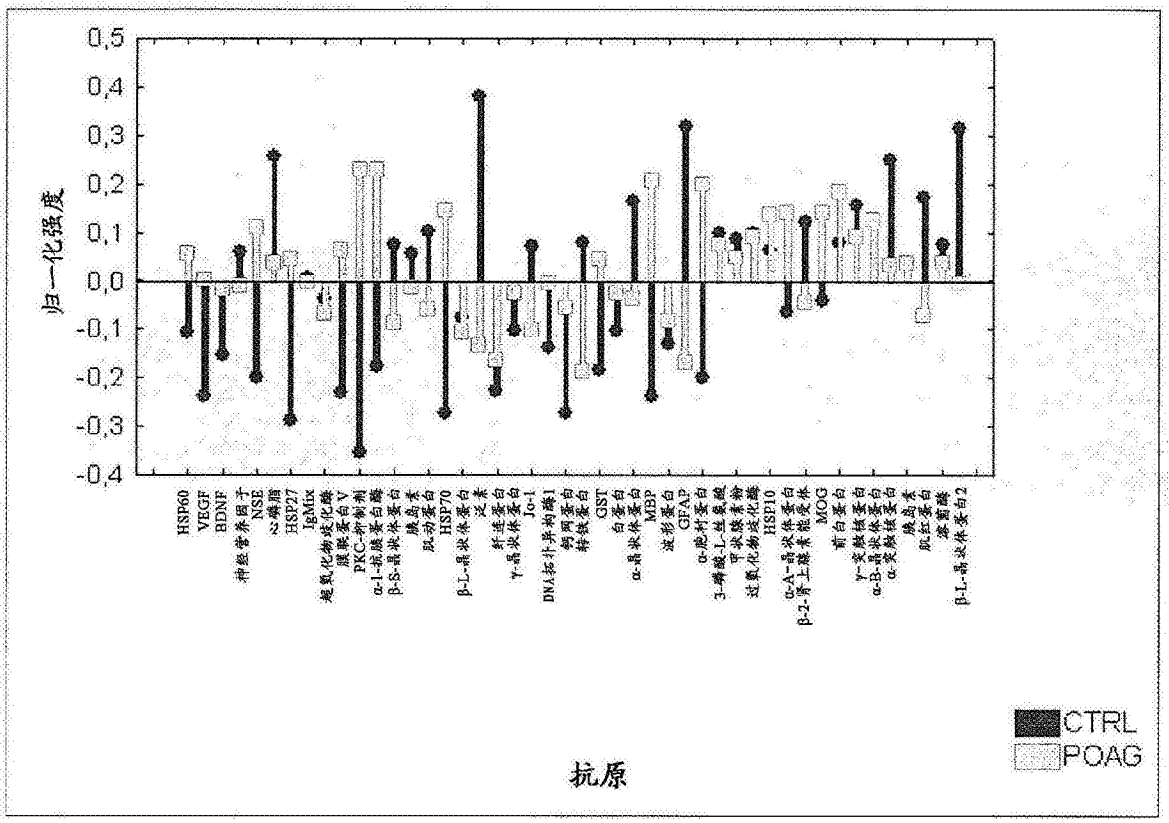

归一化强度
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0,0
-0,1
-0,2
-0,3
-0,4
HSP60
VEGF
BDNF
神经营养因子
NSE
S100
HSP27
IgMix
超氧化物歧化酶
膜联蛋白V
PKC-种制剂
α-1-抗胰蛋白酶
β-S-晶状体蛋白
胰岛素
肌动蛋白
HSP70
β-L-晶状体蛋白
泛素
纤连蛋白
γ-晶状体蛋白
Jo-1
DNA拓扑异构酶1
钙网蛋白
特殊蛋白
GST
白蛋白
α-晶状体蛋白
MBP
波形蛋白
GFAP
α-肌动蛋白
3-磷酸-L-丝氨酸
甲状腺素前
过氧化物歧化酶
HSP10
α-A-晶状体蛋白
β-2-肾上腺素能受体
MOG
前白蛋白
γ-突触核蛋白
α-B-晶状体蛋白
α-突触核蛋白
胰岛素
肌红蛋白
泛素酶
β-L-晶状体蛋白2
CTRL
POAG
抗原

图4A

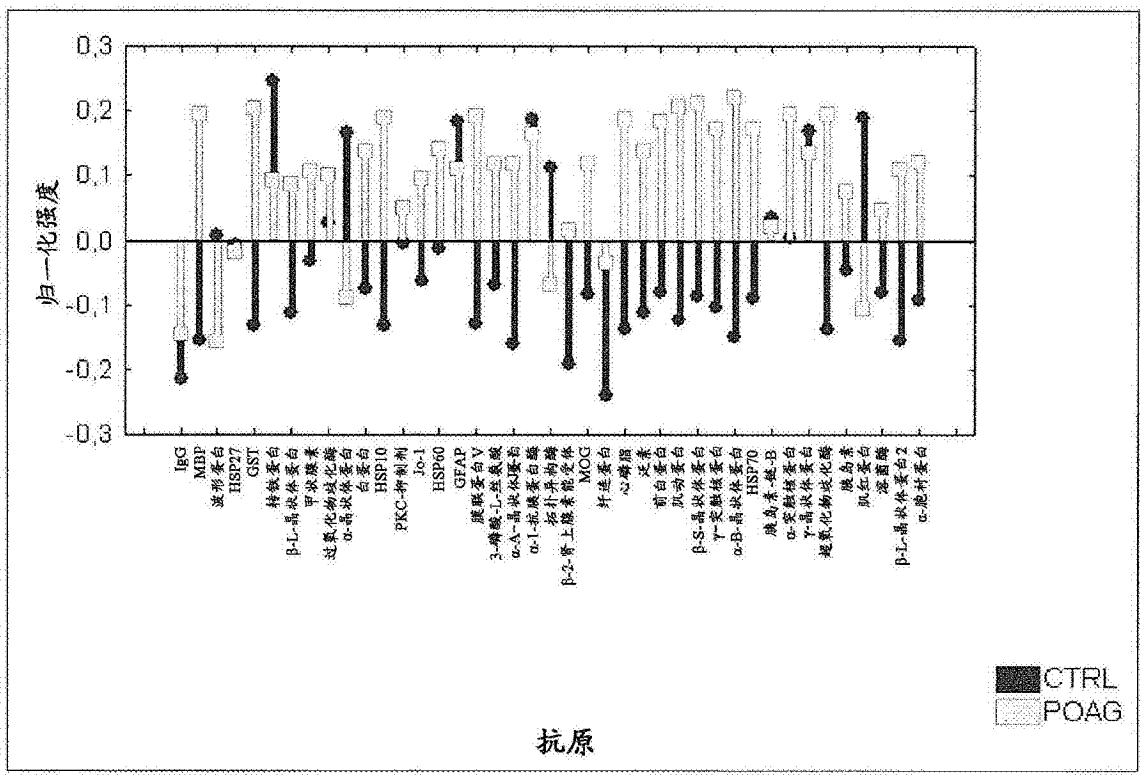

归一化强度
0,3
0,2
0,1
0,0
-0,1
-0,2
-0,3
IgG
MBP
波形蛋白
HSP27
GST
特殊蛋白
β-L-晶状体蛋白
甲状腺素
过氧化物歧化酶
α-晶状体蛋白
白蛋白
HSP10
PKC-种制剂
Jo-1
HSP60
GFAP
膜联蛋白V
3-磷酸-L-丝氨酸
α-A-晶状体蛋白
α-1-抗胰蛋白酶
拓扑异构酶
β-2-肾上腺素能受体
MOG
纤连蛋白
心磷脂
泛素
前白蛋白
肌动蛋白
β-S-晶状体蛋白
γ-突触核蛋白
α-B-晶状体蛋白
HSP70
胰岛素-链-B
α-突触核蛋白
γ-晶状体蛋白
超氧化物歧化酶
胰岛素
肌红蛋白
泛素酶
β-L-晶状体蛋白2
α-肌动蛋白
CTRL
POAG
抗原

图4B

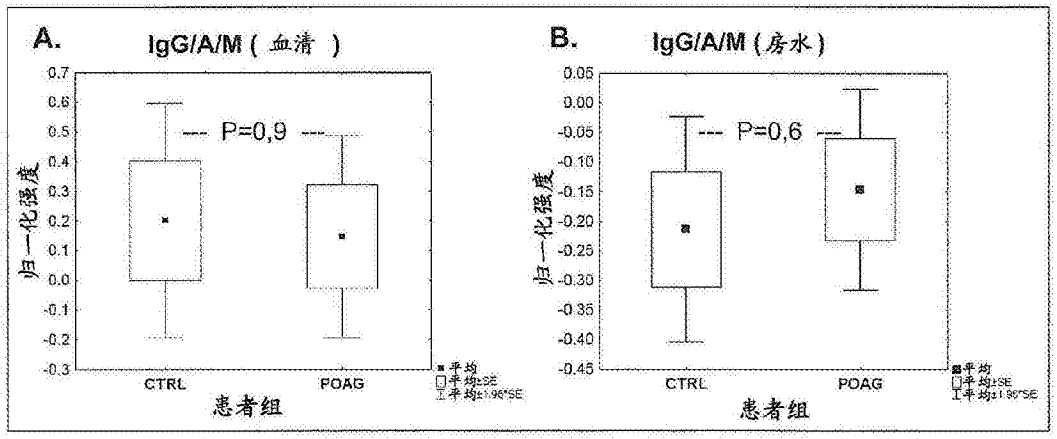

A.
IgG/A/M (血清)
P=0,9
归一化强度
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
-0.1
-0.2
-0.3
CTRL
POAG
患者组
平均
平均±SE
平均±1.96*SE
B.
IgG/A/M (房水)
P=0,6
归一化强度
0.05
0.00
-0.05
-0.10
-0.15
-0.20
-0.25
-0.30
-0.35
-0.40
-0.45
CTRL
POAG
患者组
平均
平均±SE
平均±1.96*SE

图5

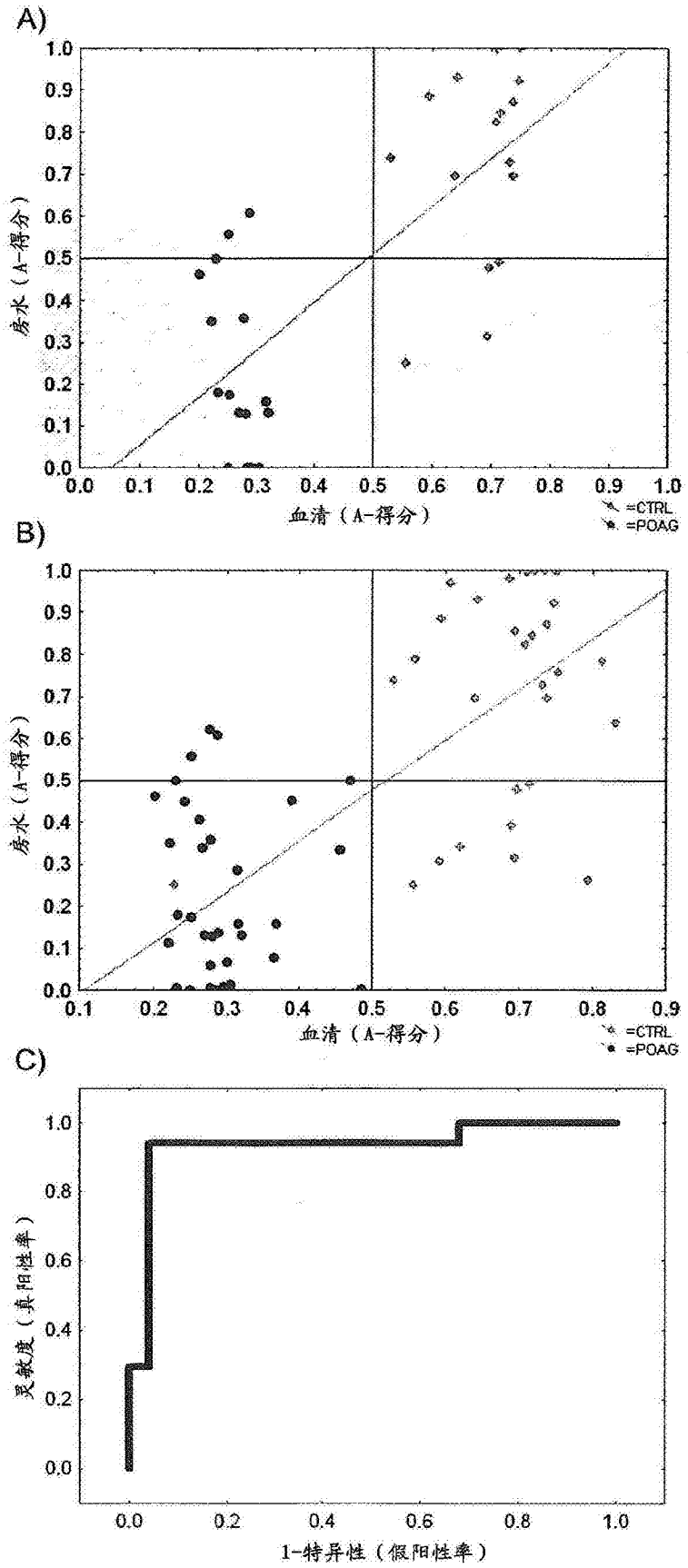

A)
房水（A-得分）
血清（A-得分）
=CTRL
=POAG
B)
房水（A-得分）
血清（A-得分）
=CTRL
=POAG
C)
灵敏度（真阳性率）
1-特异性（假阳性率）

图6A,B,C

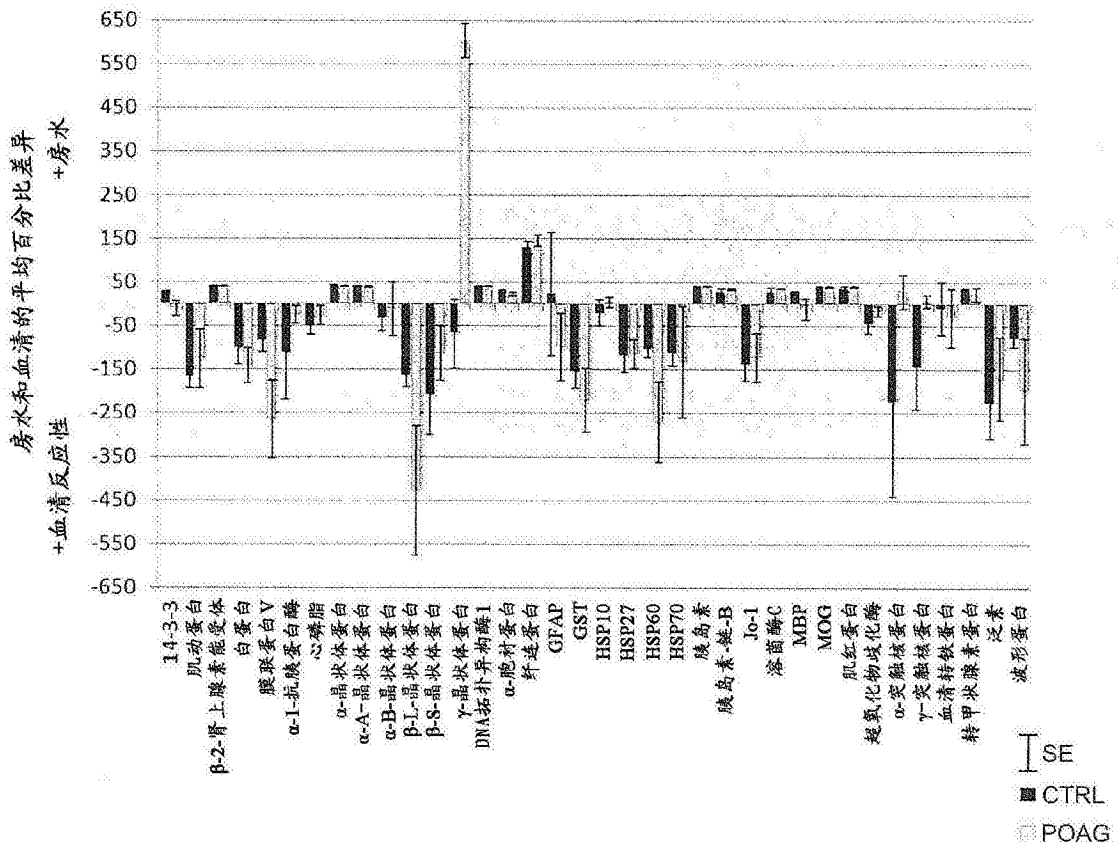

房水和血清的平均百分比差异
+房水
+血清反应性
650
550
450
350
250
150
50
-50
-150
-250
-350
-450
-550
-650
14-3-3
肌动蛋白
β-2-肾上腺素能受体
白蛋白
膜联蛋白V
α-1-抗胰蛋白酶
ζ-磷脂
α-晶状体蛋白
α-A-晶状体蛋白
α-B-晶状体蛋白
β-L-晶状体蛋白
β-S-晶状体蛋白
γ-晶状体蛋白
DNA拓扑异构酶1
α-胞衬蛋白
纤连蛋白
GFAP
GST
HSP10
HSP27
HSP60
HSP70
胰岛素
胰岛素-链-B
Jo-1
溶菌酶C
MBP
MOG
肌红蛋白
超氧化物歧化酶
α-突触核蛋白
γ-突触核蛋白
血清转铁蛋白
转甲状腺素蛋白
泛素
波形蛋白
SE
CTRL
POAG

图7

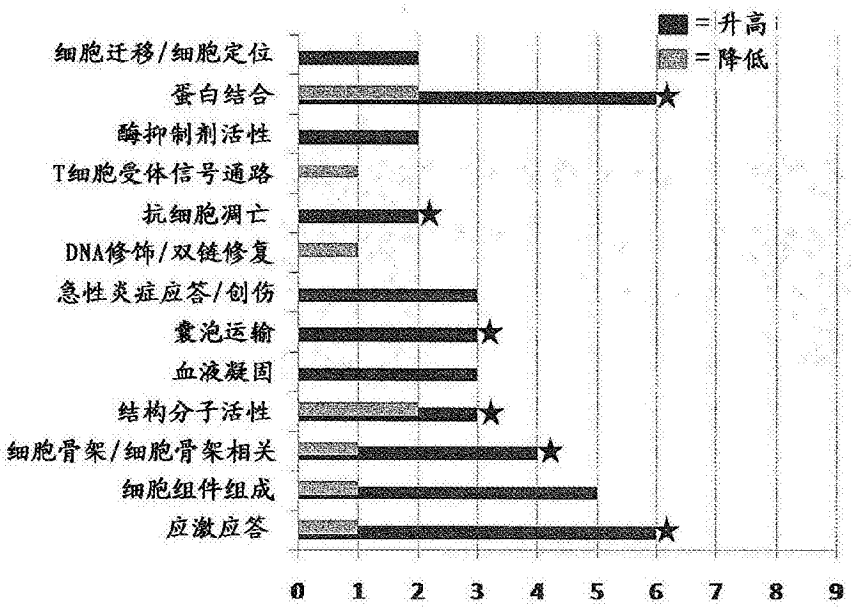

= 升高
= 降低
细胞迁移/细胞定位
蛋白结合
酶抑制剂活性
T细胞受体信号通路
抗细胞凋亡
DNA修饰/双链修复
急性炎症应答/创伤
囊泡运输
血液凝固
结构分子活性
细胞骨架/细胞骨架相关
细胞组件组成
应激应答
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9

图8

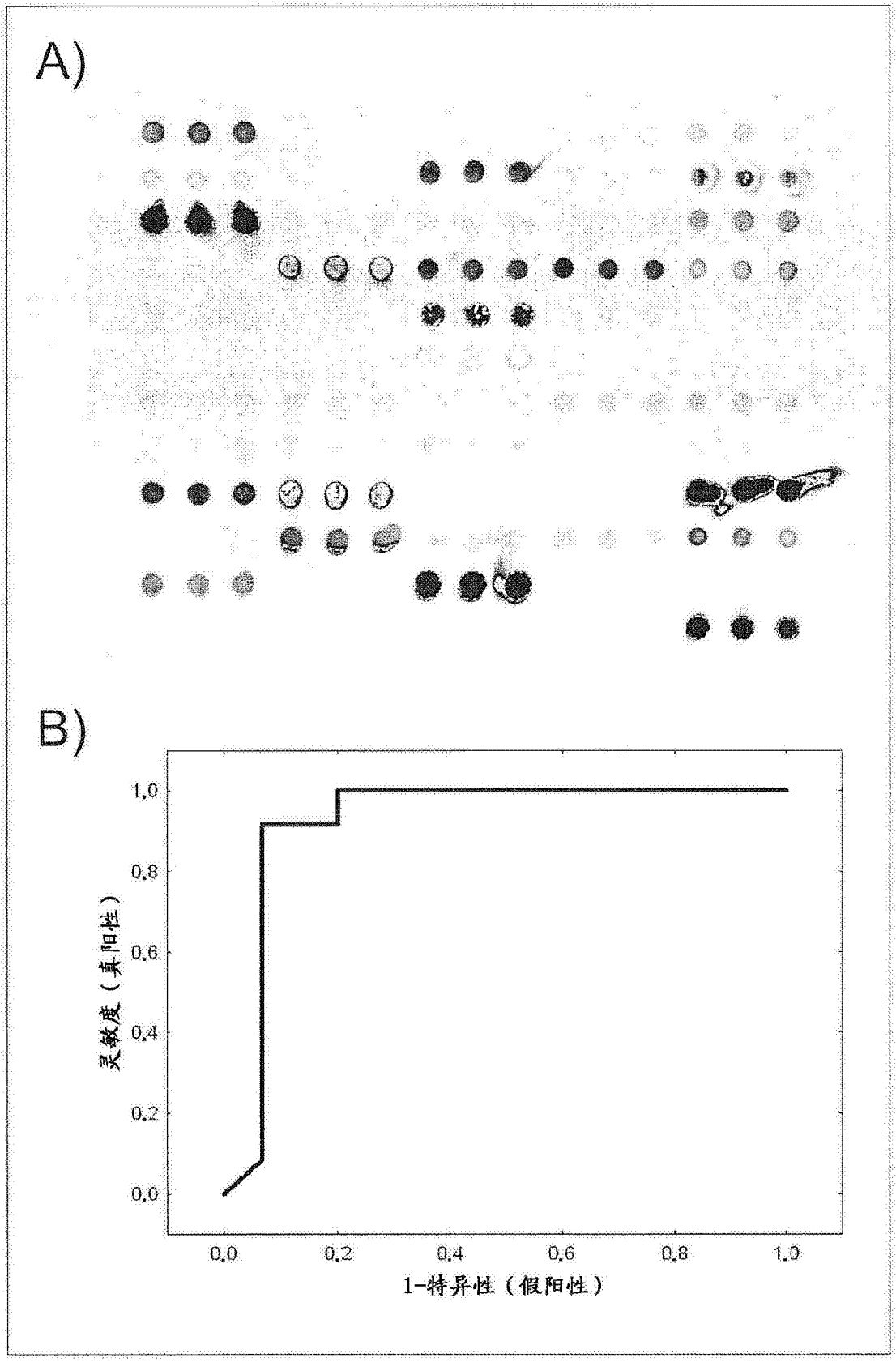


图9

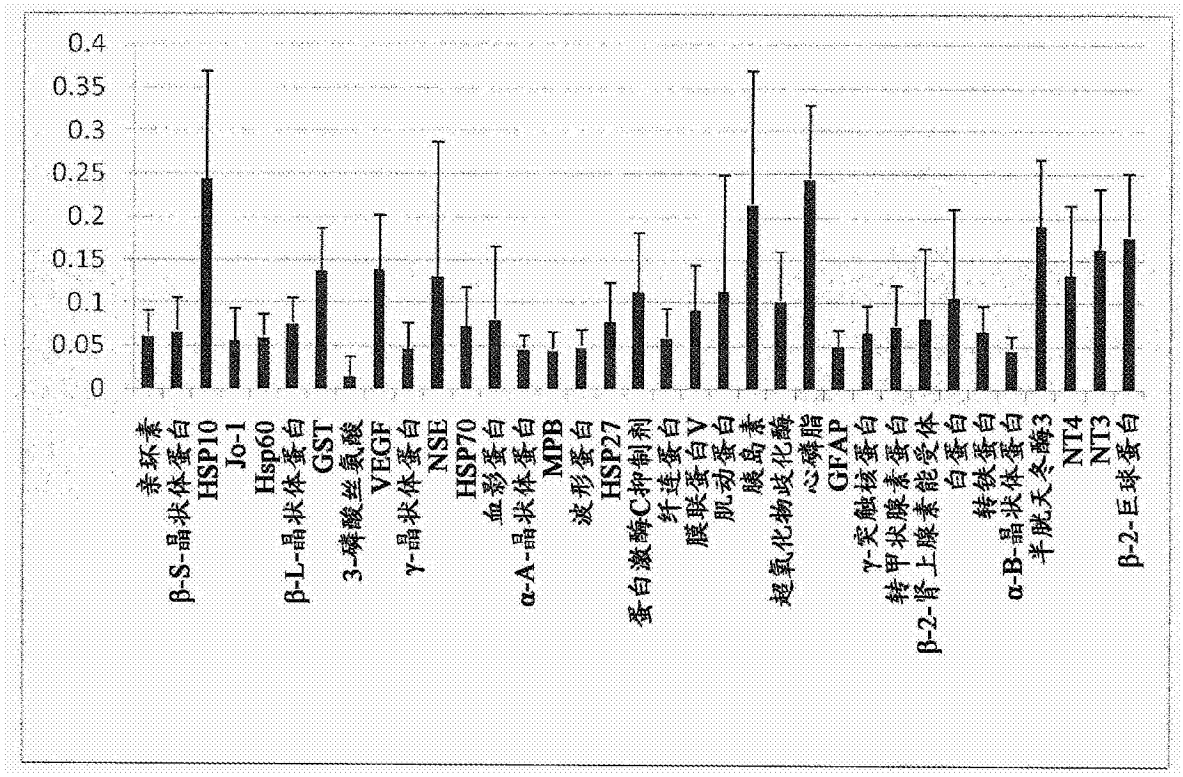

0.4
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
亲环素
β-S-晶状体蛋白
HSP10
Jo-1
Hsp60
β-L-晶状体蛋白
GST
3-磷酸丝氨酸
VEGF
γ-晶状体蛋白
NSE
HSP70
血影蛋白
α-A-晶状体蛋白
MPB
波形蛋白
HSP27
蛋白激酶C抑制剂
纤连蛋白
膜联蛋白V
肌动蛋白
胰岛素
超氧化物歧化酶
心磷脂
GFAP
γ-突触核蛋白
转甲状腺素蛋白
β-2-肾上腺素能受体
白蛋白
转铁蛋白
α-B-晶状体蛋白
半胱天冬酶3
NT4
NT3
β-2-巨球蛋白

图10

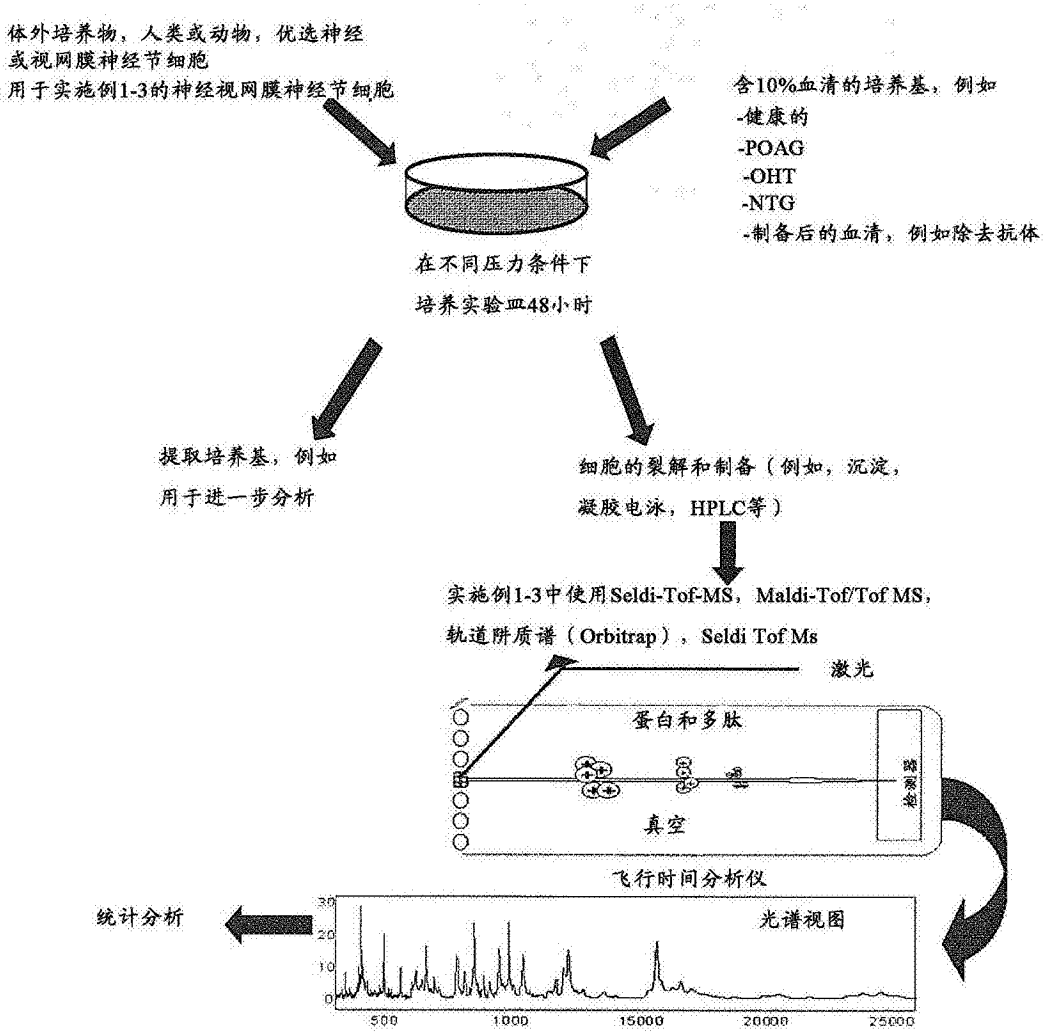

体外培养物，人类或动物，优选神经
或视网膜神经节细胞
用于实施例1-3的神经视网膜神经节细胞
含10%血清的培养基，例如
-健康的
-POAG
-OHT
-NTG
-制备后的血清，例如除去抗体
在不同压力条件下
培养实验皿48小时
提取培养基，例如
用于进一步分析
细胞的裂解和制备（例如，沉淀，
凝胶电泳，HPLC等）
实施例1-3中使用Seldi-Tof-MS，Maldi-Tof/Tof MS，
轨道阱质谱（Orbitrap），Seldi Tof Ms
激光
蛋白和多肽
真空
飞行时间分析仪
统计分析
光谱视图
30
20
10
0
500
1000
15000
20000
25000

图11

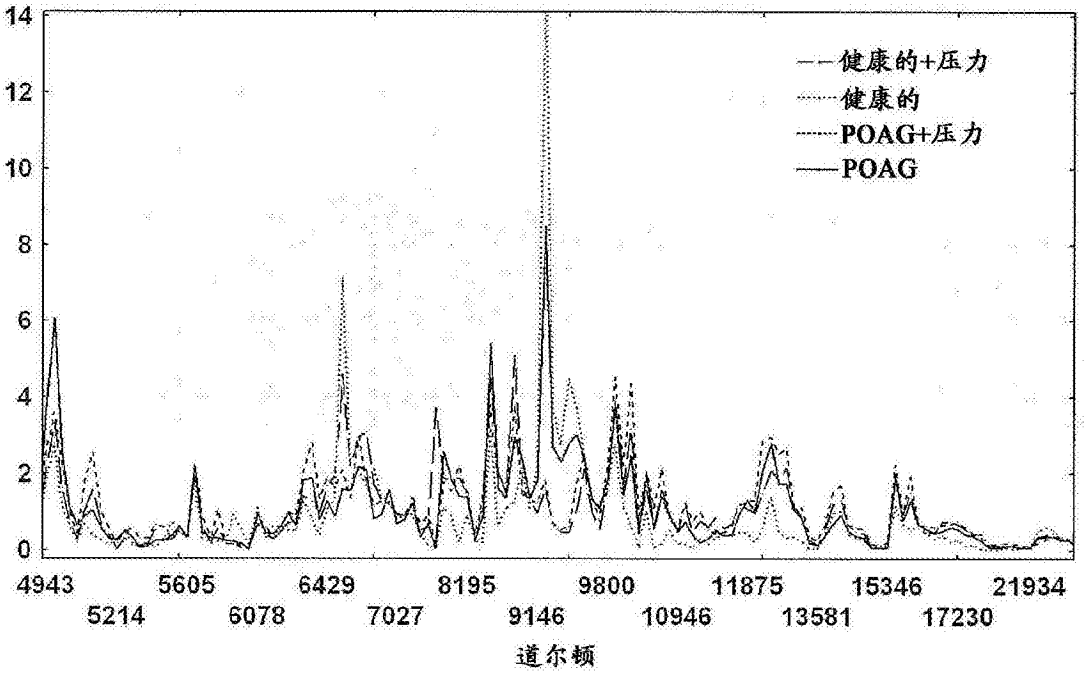

14
12
10
8
6
4
2
0
健康的+压力
健康的
POAG+压力
POAG
4943
5214
5605
6078
6429
7027
8195
9146
9800
10946
11875
13581
15346
17230
21934
道尔顿

图12a

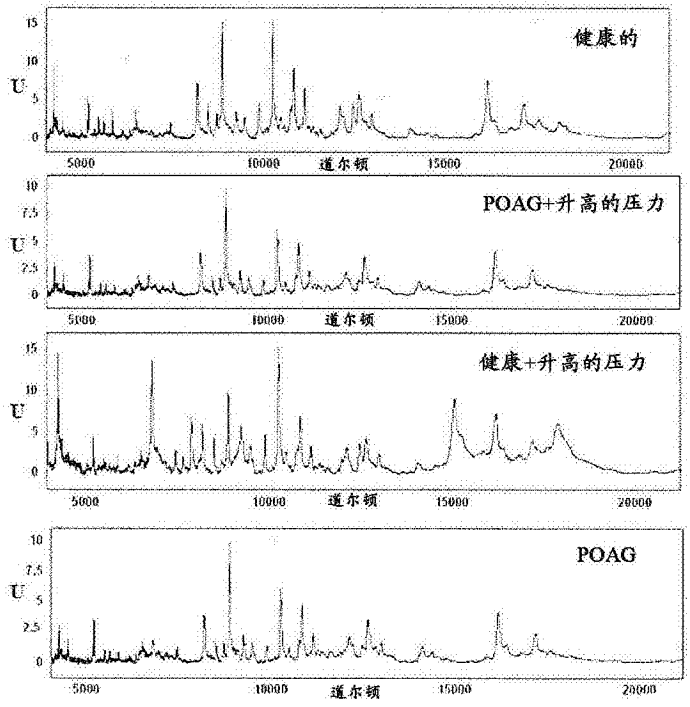

健康的
POAG+升高的压力
健康+升高的压力
POAG
U
5000
10000
15000
20000
道尔顿

图12b

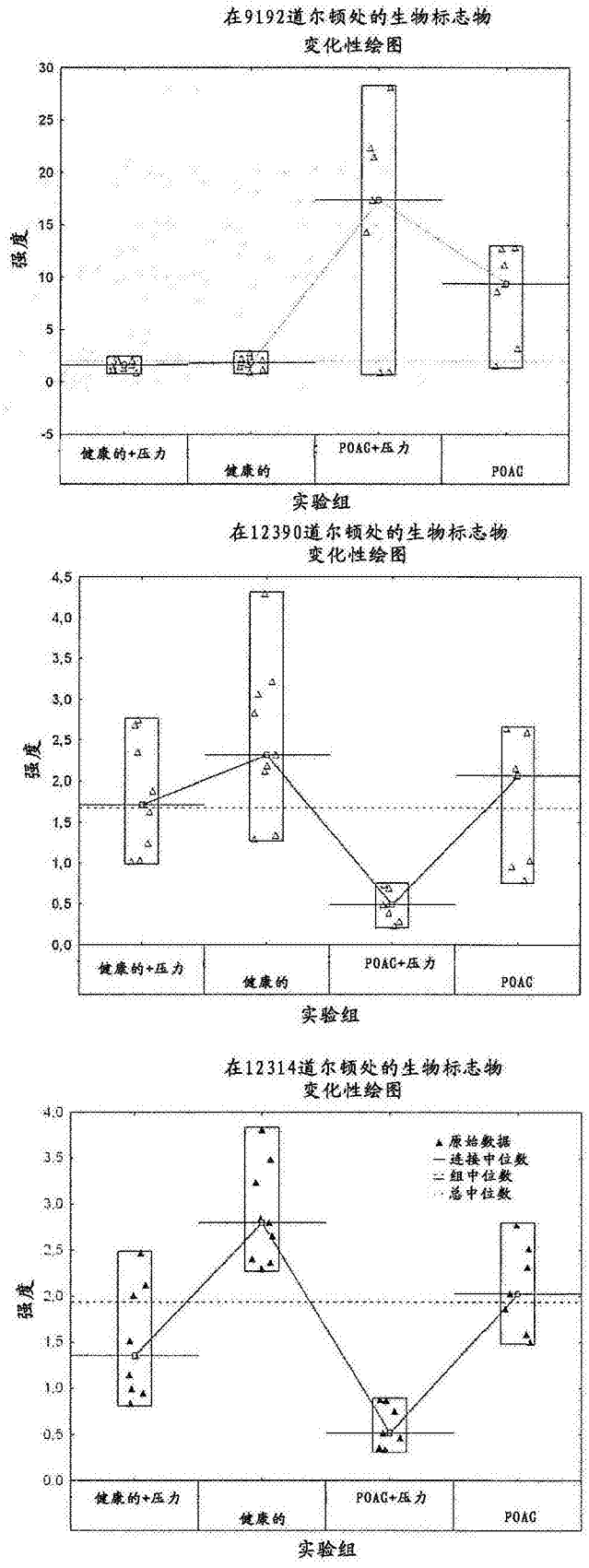

在9192道尔顿处的生物标志物
变化性绘图
强度
30
25
20
15
10
5
0
-5
健康的+压力
健康的
POAC+压力
POAC
实验组
在12390道尔顿处的生物标志物
变化性绘图
强度
4,5
4,0
3,5
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
健康的+压力
健康的
POAC+压力
POAC
实验组
在12314道尔顿处的生物标志物
变化性绘图
强度
4,0
3,5
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
原始数据
连接中位数
组中位数
总中位数
健康的+压力
健康的
POAC+压力
POAC
实验组

图13

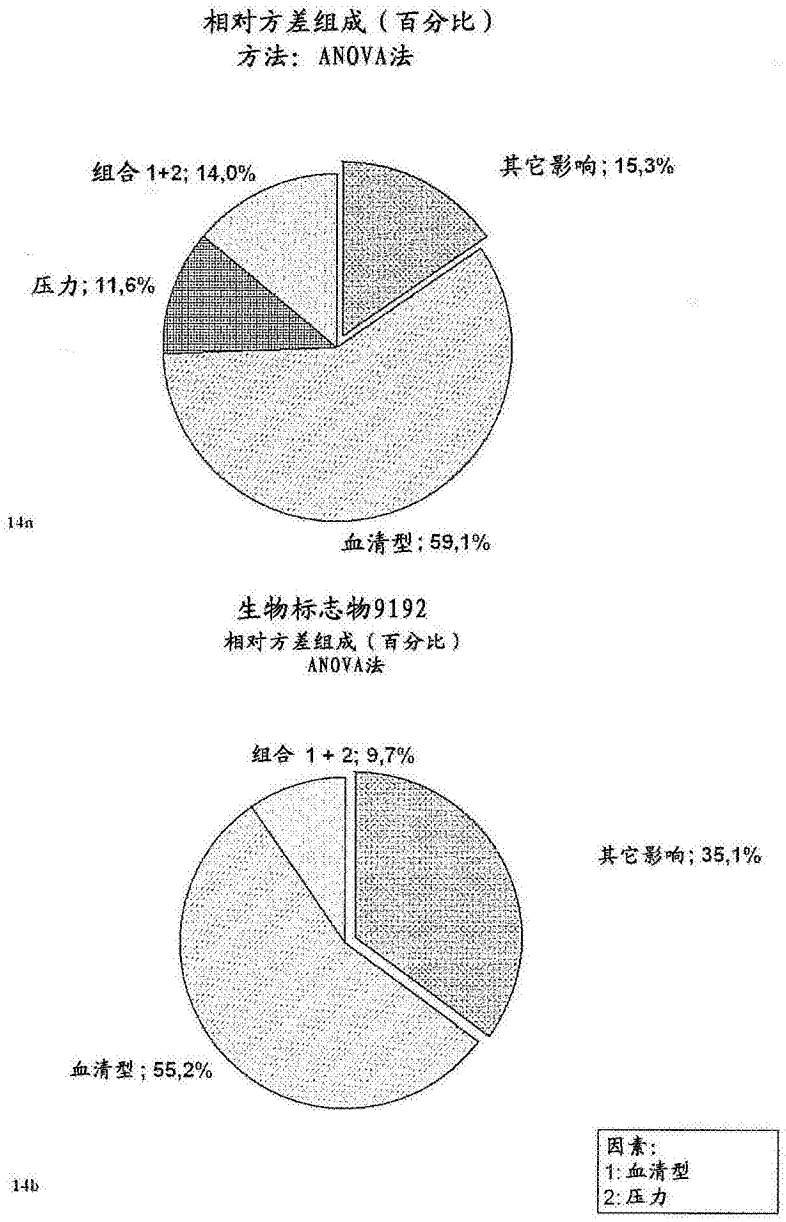
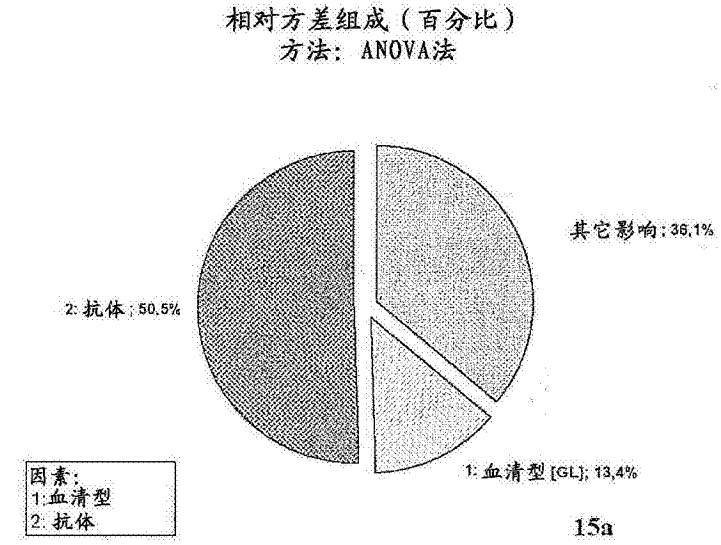

相对方差组成（百分比）
方法：ANOVA法
组合 1+2; 14,0%
其它影响; 15,3%
压力; 11,6%
血清型; 59,1%
14a
生物标志物9192
相对方差组成（百分比）
ANOVA法
组合 1 + 2; 9,7%
其它影响; 35,1%
血清型; 55,2%
因素:
1:血清型
2:压力
14b

图14a，b


相对方差组成（百分比）
方法：ANOVA法
2: 抗体 ; 50,5%
其它影响 ; 36,1%
1: 血清型 [GL]; 13,4%
因素：
1:血清型
2: 抗体
15a

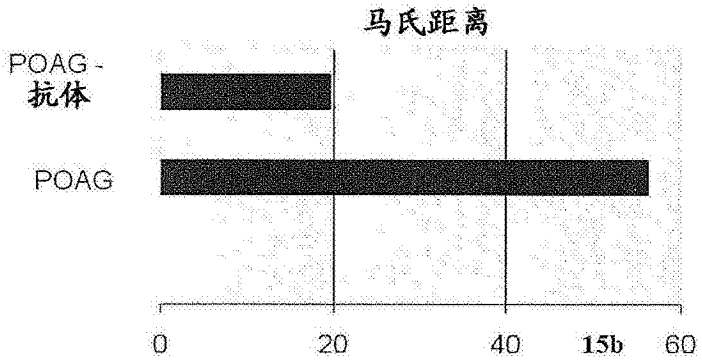

马氏距离
POAG - 抗体
POAG
0
20
40
15b
60

图15a,b

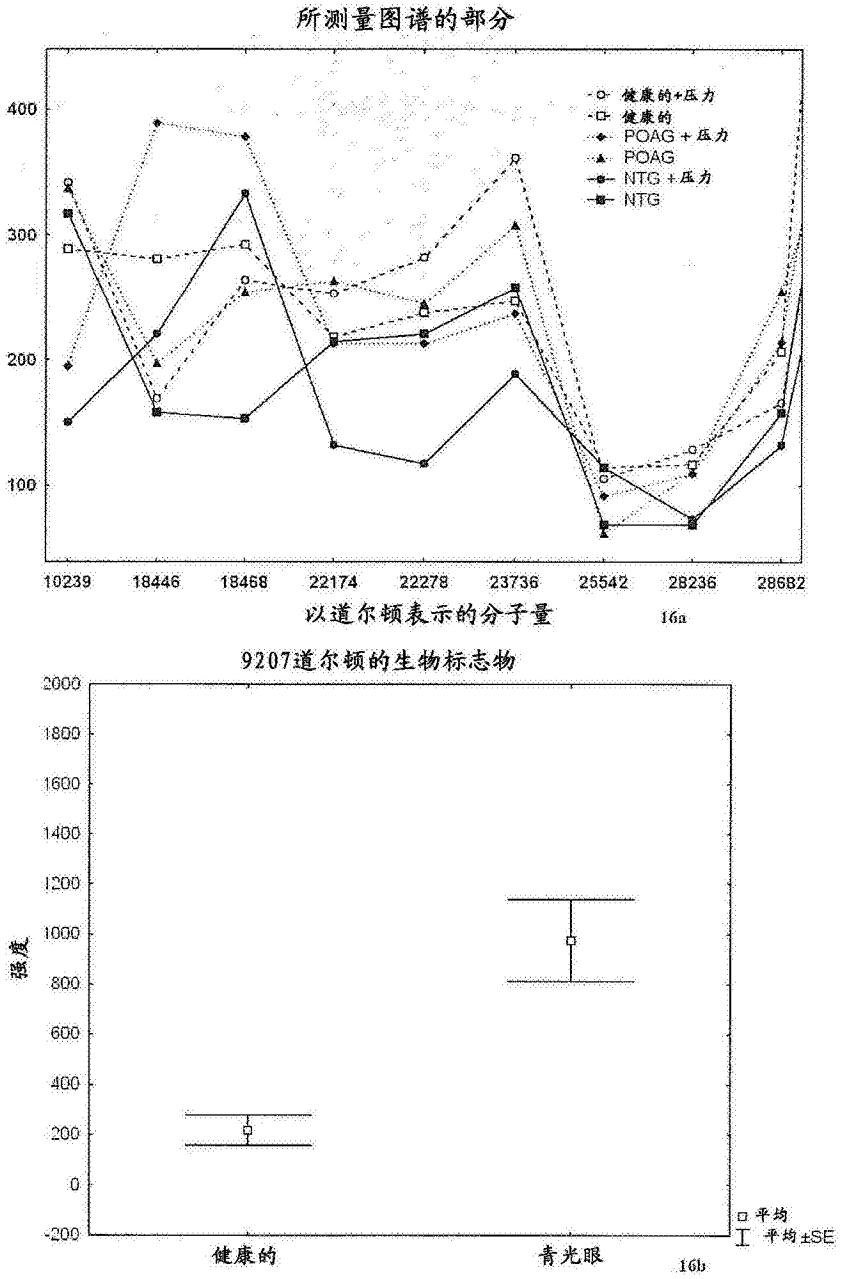

所测量图谱的部分
健康的+压力
健康的
POAG + 压力
POAG
NTG + 压力
NTG
400
300
200
100
10239
18446
18468
22174
22278
23736
25542
28236
28682
以道尔顿表示的分子量
16a
9207道尔顿的生物标志物
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
-200
强度
健康的
青光眼
平均
平均±SE
16b

图16a,b

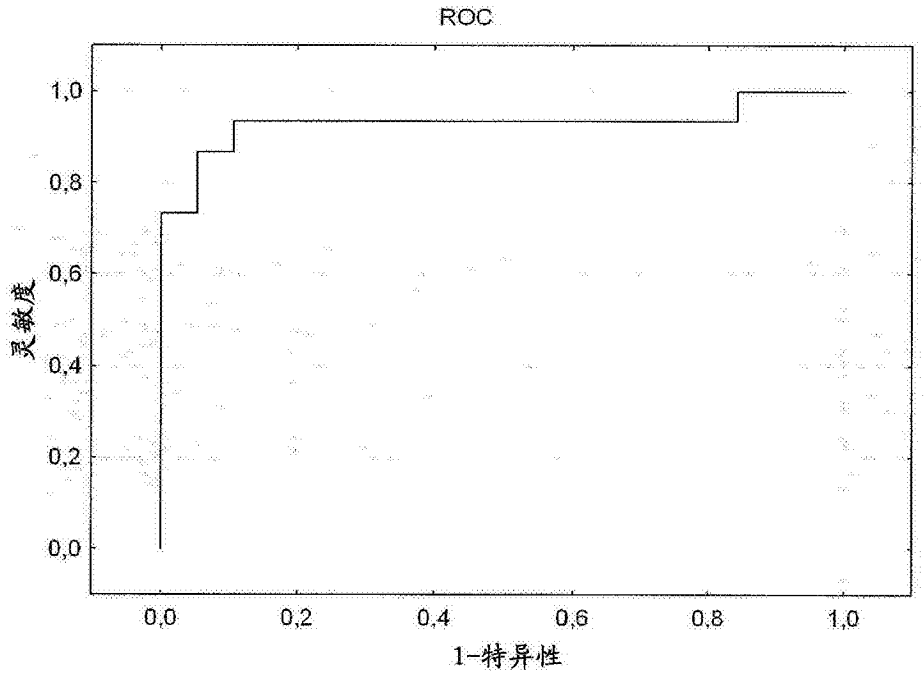

ROC
灵敏度
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
0,0
0,2
0,4
0,6
0,8
1,0
1-特异性

图17

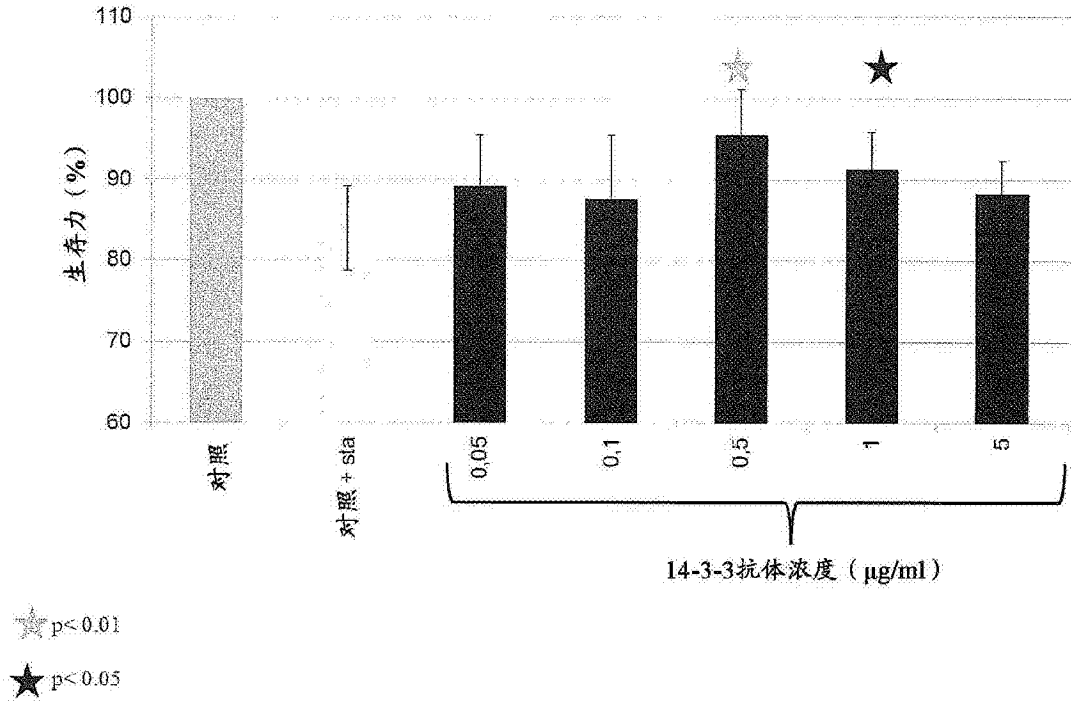

生存力（%）
110
100
90
80
70
60
对照
对照 + sta
0,05
0,1
0,5
1
5
14-3-3抗体浓度（μg/ml）
p< 0.01
p< 0.05

图18

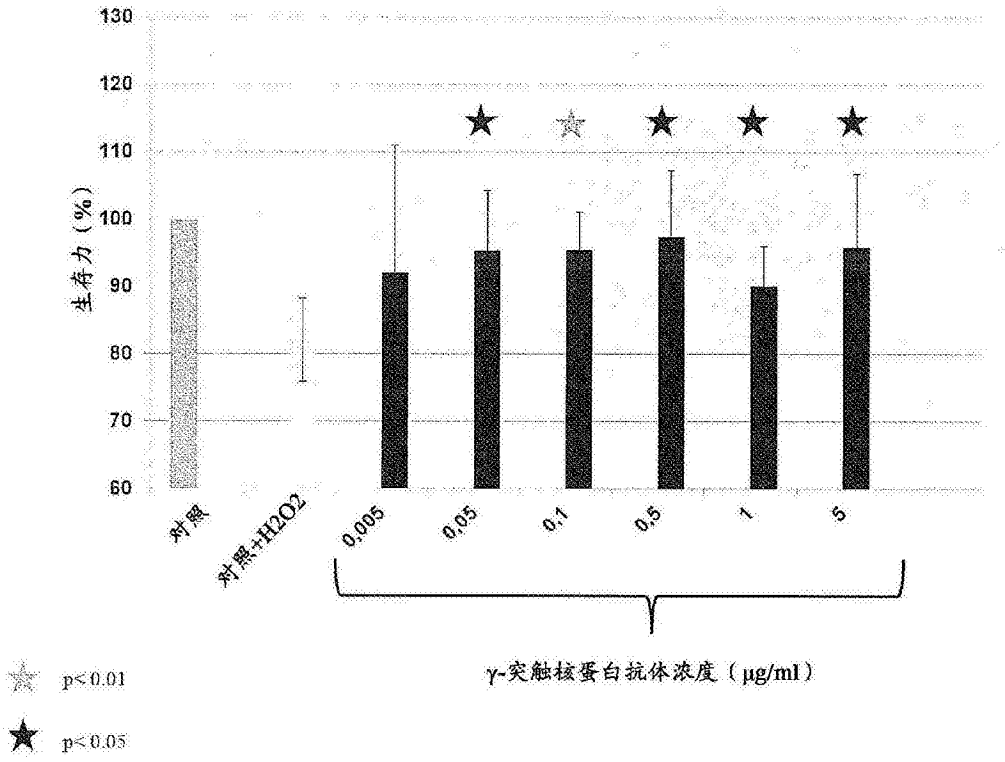

130
120
110
100
90
80
70
60
生存力（%）
对照
对照+H2O2
0,005
0,05
0,1
0,5
1
5
γ-突触核蛋白抗体浓度（μg/ml）
p<0.01
p<0.05

图19

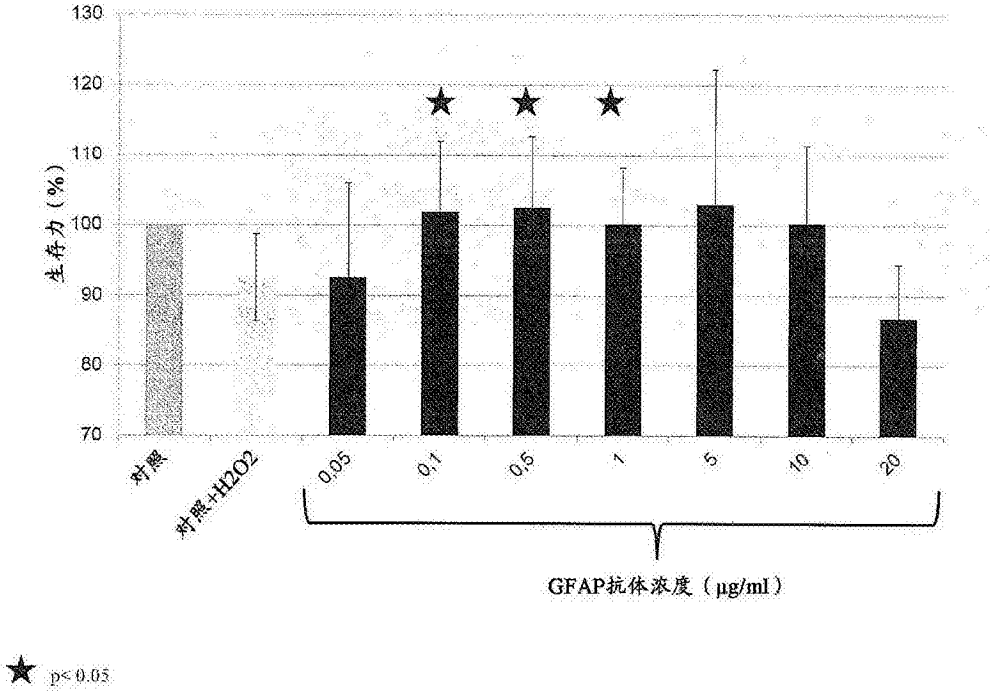

130
120
110
100
90
80
70
生存力（%）
对照
对照+H2O2
0,05
0,1
0,5
1
5
10
20
GFAP抗体浓度（μg/ml）
p<0.05

图20