



(12) 发明专利
(全文更正)

(10) 授权公告号 CN 103781919 B9

(45) 授权公告日 2017.07.04

(48) 更正文献出版日 2017.09.15

(21) 申请号 201280041358.8

审查员 马艳林

(22) 申请日 2012.06.26

(30) 优先权数据

61/501,720 2011.06.27 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014.02.25

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/044202 2012.06.26

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/003350 EN 2013.01.03

(73) 专利权人 卫材 R&D 管理有限公司

地址 日本东京都

(72) 发明人 Z·德兹索 P·库玛

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 陈文平

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68(2006.01)

权利要求书 3 页 说明书 25 页

序列表 2 页 附图 18 页

(54) 发明名称

指示阿尔茨海默氏病的微 RNA 生物标志物

(57) 摘要

本发明提供了通过测定源自受试者的样品中的至少一种 miRNA 的水平来诊断受试者中的阿尔茨海默氏病的方法,其中所述至少一种 miRNA 的水平相对于合适对照的变化指示受试者中的阿尔茨海默氏病。还提供了监测阿尔茨海默氏病的进程的方法,治疗患有阿尔茨海默氏病的受试者的方法,和用于诊断阿尔茨海默氏病的试剂盒。

1. 适合选择性地检测至少一种 miRNA 的试剂在制备诊断人受试者中的阿尔茨海默氏病的试剂盒中的用途,所述试剂用于测定得自所述受试者的血浆或血清样品中的 miR-15b 的水平,

其中相对于合适对照所确定的所述 miR-15b 的水平相对于正常人受试者的水平的降低指示所述受试者中的阿尔茨海默氏病。

2. 适合选择性地检测至少一种 miRNA 的试剂在制备诊断人受试者中的轻度认知损害 (MCI) 或阿尔茨海默氏病所导致的认知损害的试剂盒中的用途,所述试剂用于测定得自所述受试者的血浆或血清样品中的 miR-15b 的水平,

其中相对于合适对照所确定的所述 miR-15b 的水平相对于正常人受试者的水平的降低指示所述受试者中的轻度认知损害 (MCI) 或阿尔茨海默氏病所导致的认知损害。

3. 适合选择性地检测至少一种 miRNA 的试剂在制备诊断具有 0-26 的 MMSE 评分的人受试者中的认知损害的试剂盒中的用途,所述试剂用于测定得自所述受试者的血浆或血清样品中的 miR-15b 的水平,

其中相对于合适对照所确定的所述 miR-15b 的水平相对于正常人受试者的水平的降低指示所述受试者中的认知损害。

4. 适合选择性地检测至少一种 miRNA 的试剂在制备诊断具有 21-26 的 MMSE 评分的人受试者中的认知损害的试剂盒中的用途,所述试剂用于测定得自所述受试者的血浆或血清样品中的 miR-15b 的水平,

其中相对于合适对照所确定的所述 miR-15b 的水平相对于正常人受试者的水平的降低指示所述受试者中的认知损害。

5. 根据权利要求 1-4 中的任一项所述的用途,其中所述试剂用于测定所述血浆或血清样品中的选自以下的至少一种另外的 miRNA 的水平:miR-191、miR-142-3p、Let-7g、Let-7d、miR-301a、miR-545 及其组合。

6. 根据权利要求 5 所述的用途,其中所述试剂用于测定所述样品中的两种 miRNA 的水平。

7. 根据权利要求 5 所述的用途,其中所述试剂用于测定所述样品中的至少三种 miRNA 的水平。

8. 根据权利要求 5 所述的用途,其中所述试剂用于测定 miR-545、Let-7g 和 miR-15b 的水平。

9. 根据权利要求 5 所述的用途,其中所述试剂用于测定 miR-15b 和 miR-545 的水平。

10. 根据权利要求 5 所述的用途,其中所述试剂用于测定 miR-301a、miR-545、Let-7g 和 miR-15b 的水平。

11. 根据权利要求 5 所述的用途,其中所述试剂用于测定 miR-191 和 miR-15b 的水平。

12. 根据权利要求 5 所述的用途,其中所述试剂用于测定 Let-7g 和 miR-15b 的水平。

13. 根据权利要求 5 所述的用途,其中所述试剂用于测定 miR-301a、Let-7g 和 miR-15b 的水平。

14. 根据权利要求 5 所述的用途,其中所述试剂用于测定 miR-191、miR-301a、miR-545 和 miR-15b 的水平。

15. 根据权利要求 1 所述的用途,其中所述试剂盒用于:

(i) 测定得自所述受试者的血浆或血清样品中的 2 种或更多种 miRNA 的水平, 其中所述 miRNA 选自:

- (a) miR-545、Let-7g 和 miR-15b,
- (b) miR-15b 和 miR-545,
- (c) miR-301a、miR-545、Let-7g 和 miR-15b,
- (d) miR-191 和 miR-15b,
- (e) Let-7g 和 miR-15b,
- (f) miR-301a、Let-7g 和 miR-15b, 和
- (g) miR-191、miR-301a、miR-545 和 miR-15b;

(ii) 将所述血浆或血清样品中的所述 2 种或更多种 miRNA 的水平与一组数据进行对比, 所述数据代表存在于正常人受试者和患有阿尔茨海默氏病的人受试者中的相同 miRNA 的水平; 和

(iii) 基于在步骤 (ii) 中做出的对比, 确定所述受试者是否患有阿尔茨海默氏病。

16. 根据权利要求 1-4 中的任一项所述的用途, 其中通过执行软件分类算法来确定至少一种 miRNA 的水平相对于合适对照的降低。

17. 根据权利要求 1-4 中的任一项所述的用途, 其中所述样品是无微囊泡的样品。

18. 根据权利要求 1-4 中的任一项所述的用途, 其中所述样品是血浆。

19. 根据权利要求 1-4 中的任一项所述的用途, 其中所述样品是血清。

20. 根据权利要求 1-4 中的任一项所述的用途, 其中使用与 miRNA 特异性地杂交的试剂, 检测所述 miRNA 的水平。

21. 根据权利要求 1-4 中的任一项所述的用途, 其中使用扩增、杂交和 / 或测序方法, 检测 miRNA 的水平。

22. 根据权利要求 21 所述的用途, 其中使用定量 PCR 检测 miRNA 的水平。

23. 适合选择性地检测至少一种 miRNA 的试剂在制备监测人受试者中的阿尔茨海默氏病的进程的试剂盒中的用途, 其中所述试剂盒用于

(a) 测定得自人受试者的第一血浆或血清样品中的 miR-15b 的水平;

(b) 测定得自所述受试者的第二血浆或血清样品中的所述 miR-15b 的水平, 其中所述第二样品是在所述第一样品之后得到; 和

(c) 对比在步骤 (a) 和步骤 (b) 中测定的水平, 其中所述水平指示阿尔茨海默氏病进展。

24. 根据权利要求 23 所述的用途, 其中所述试剂盒用于测量所述血浆或血清样品中的至少一种另外的 miRNA 的水平, 其中所述另外的 miRNA 选自: miR-191、miR-142-3p、Let-7g、Let-7d、miR-301a、miR-545 及其组合。

25. 根据权利要求 5 所述的用途, 其中所述样品是无微囊泡的样品。

26. 根据权利要求 5 所述的用途, 其中所述样品是血浆。

27. 根据权利要求 5 所述的用途, 其中所述样品是血清。

28. 根据权利要求 5 所述的用途, 其中通过执行软件分类算法, 确定至少一种 miRNA 的水平相对于合适对照的降低。

29. 根据权利要求 5 所述的用途, 其中使用与 miRNA 特异性地杂交的试剂, 检测所述

miRNA 的水平。

30. 根据权利要求 5 所述的用途,其中使用扩增、杂交和 / 或测序方法,检测 miRNA 的水平。

31. 根据权利要求 30 所述的用途,其中使用定量 PCR 检测 miRNA 的水平。

指示阿尔茨海默氏病的微 RNA 生物标志物

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求 2011 年 6 月 27 日提交的美国临时申请号 61/501,720 的优先权,其整个内容通过引用并入本文。

背景技术

[0003] 阿尔茨海默氏病是人中枢神经系统的一种进行性疾病。它表现为痴呆(通常在老年人中),且征状包括定向障碍,记忆缺失,语言、计算或视觉-空间技能的困难,以及精神病学表现。阿尔茨海默氏病与脑的几个区域中的变性神经元有关。阿尔茨海默氏病的神经病理学的特征在于,存在淀粉样蛋白斑块、神经原纤维缠结、突触损失和选择性的神经元细胞死亡。淀粉样蛋白斑块源自异常的细胞外淀粉样蛋白 β 肽水平,而神经原纤维缠结与细胞内的过度磷酸化的 tau 蛋白的存在有关。征状通常首先在临床上表现出记忆减退和随后的其它认知功能的衰退以及异常行为。全世界大约 2400 万人患有痴呆,其中大多数 (~60%) 是由于阿尔茨海默氏病 (Ferri C.P. 等人 (2005) Lancet 366(9503):2112-2117)。据估计,超过 500 万美国人患有阿尔茨海默氏病,并且预计在本世纪中叶之前该数目将会增加至 1430 万,这代表从 2000 年开始 350% 的增加。在发达国家中日益增加的痴呆患者的数目将对社会和健康护理体系造成巨大负担。

[0004] 早期诊断是治疗阿尔茨海默氏病的一个基本步骤,因为早期诊断允许受试者接受可能减慢疾病进展的药物。目前使用临床标准的组合来诊断阿尔茨海默氏病,所述标准可能包括神经学检查、精神状态试验和脑成像。经常通过消除其它痴呆来诊断阿尔茨海默氏病。基于这些标准,准确诊断可以是困难的,特别对于患有轻度或早期阿尔茨海默氏病的患者而言。通过检查脑组织的病理学可以做出明确诊断,但是这仅仅在死后才可行。因此,需要可以用于诊断应用中的指示阿尔茨海默氏病的标志物。

发明内容

[0005] 本发明提供了新颖的 miRNA 生物标志物,其指示阿尔茨海默氏病,且其可以用于准确地诊断受试者中的阿尔茨海默氏病。这些生物标志物包括 miR-191、miR-15b、miR-142-3p、Let-7g、Let-7d、miR-301a 和 miR-545。在某些实施方案中,所述方法需要检测在合适的样品(优选血液、血浆、血清、尿或唾液)中的细胞外循环 miRNA。

[0006] 因此,在第一个方面,本发明提供了一种通过测定含有源自受试者的循环 miRNA 的样品中的至少一种 miRNA 的水平来诊断受试者中的阿尔茨海默氏病的方法,其中所述至少一种 miRNA 是 miR-191、miR-15b、miR-142-3p、Let-7g、Let-7d 或它们的组合,且其中所述至少一种 miRNA 的水平相对于正常受试者的水平的差异(如相对于合适对照所确定的)指示受试者中的阿尔茨海默氏病。例如,在一个实施方案中,所述方法包括:测定含有源自受试者的循环 miRNA 的样品中的至少一种 miRNA 的水平,其中所述至少一种 miRNA 是 miR-191、miR-15b、miR-142-3p、Let-7g、Let-7d 或它们的组合,且其中所述至少一种 miRNA 的水平相对于对照的降低指示受试者中的阿尔茨海默氏病。任选地,所述方法可以进一步包括:

基于样品中的至少一种 miRNA 的水平,提供所述受试者患有或不患有阿尔茨海默氏病的诊断。在一个实施方案中,所述方法可以进一步包括:将至少一种 miRNA 的水平相对于合适对照的差异与所述受试者中的阿尔茨海默氏病的诊断相关联。

[0007] 在一个实施方案中,所述方法包括:测定所述样品中的一种 miRNA(例如,miR-191、miR-15b、miR-142-3p、Let-7g 或 Let-7d)的水平,其中 miRNA 的水平相对于正常受试者的水平的差异是降低。

[0008] 在另一个实施方案中,所述方法包括:测定所述样品中的 2 种或更多种 miRNA 的水平。在该实施方案中,所述方法可以进一步包括:测定所述样品中的 miR-301a、miR-545 或 miR-301a 和 miR-545 的水平。例如,至少一种 miRNA 可以选自 miR-191、miR-15b、miR-142-3p、Let-7g、Let-7d 或它们的组合,且任选地,至少一种 mRNA 可以选自 miR-301a、miR-545 或 miR-301a 和 miR-545。在一个实施方案中,所述方法包括,测定下述 miRNA 组合中的一种的水平:miR-545、let7g 和 miR-15b;miR-15b 和 miR-545;miR-301a、miR-545、let-7g 和 miR-15b;miR-191 和 miR-15b;Let-7g 和 miR-15b;miR-191、miR-301a 和 miR-545;miR-301a、let-7g 和 miR-15b;和 miR-191、miR-301a、miR-545 和 miR-15b。

[0009] 在一个特定实施方案中,所述方法可以包括:测定得自受试者的含有循环 miRNA 的样品中的 2 种或更多种 miRNA 的水平,将所述样品中的 2 种或更多种 miRNA 的水平与一组数据进行对比,所述数据代表存在于正常受试者和患有阿尔茨海默氏病的受试者中的相同 miRNA 的水平,和基于所述对比,将所述受试者诊断为患有或不患有阿尔茨海默氏病。在某些实施方案中,所述 2 种或更多种 miRNA 可以包括以下组合:miR-545、let7g 和 miR-15b;miR-15b 和 miR-545;miR-301a、miR-545、let-7g 和 miR-15b;miR-191 和 miR-15b;Let-7g 和 miR-15b;miR-191、miR-301a 和 miR-545;miR-301a、let-7g 和 miR-15b;和 miR-191、miR-301a、miR-545 和 miR-15b。

[0010] 所述方法可以任选地包括:执行至少一个另外的试验,以促进阿尔茨海默氏病的诊断。在某些实施方案中,所述另外的试验可以是以下的一种或多种:弱智状态检查(MMSE)、mini-cog 试验、ADAS-cog 试验和画钟试验。任选地或另外,另外的试验可以包括:检测或评估阿尔茨海默氏病的至少一种另外的生物标志物。

[0011] 所述方法可以任选地包括:给所述受试者施用治疗有效量的至少一种阿尔茨海默氏病治疗剂。在某些实施方案中,所述阿尔茨海默氏病治疗剂可以是 **Razadyne**[®](加兰他敏)、**Exelon**[®](利凡斯的明)或 **Aricept**[®](多奈哌齐)。在一个特定实施方案中,所述阿尔茨海默氏病治疗剂是多奈哌齐或其药学上可接受的盐或酯(例如,盐酸多奈哌齐)。

[0012] 通过任意合适的方法,可以检测 miRNA 的水平。例如,使用与 miRNA 特异性地杂交的试剂,可以检测 miRNA。在某些实施方案中,使用扩增方法、杂交方法和/或测序方法,可以检测 miRNA 的水平。在一个实施方案中,使用定量 PCR,检测 miRNA 的水平。

[0013] 在另一个方面,本发明提供了一种诊断受试者中的阿尔茨海默氏病的方法,所述方法包括:测量得自受试者的血液衍生的样品中的至少一种 miRNA 的水平,其中所述至少一种 miRNA 是 miR-191、miR-15b、miR-142-3p、Let-7g、Let-7d 或它们的组合,和将所述受试者中的水平相对于合适对照的差异与所述受试者中的阿尔茨海默氏病的诊断相关联。在一个实施方案中,所述方法可以进一步包括:测量所述样品中的 miR-301a、miR-545 或

miR-301a 和 miR-545 的水平。

[0014] 在另一个方面,本发明提供了一种监测受试者中的阿尔茨海默氏病的进程的方法,所述方法包括:测定得自受试者的含有循环 miRNA 的第一样品中的至少一种 miRNA 的水平,测定得自所述受试者的含有循环 miRNA 的第二样品中的所述至少一种 miRNA 的水平,其中所述第二样品是在所述第一样品之后得到,并将在所述第一样品中测定的水平与在所述第二样品中测定的水平进行对比,其中所述水平指示阿尔茨海默氏病进展,且其中所述至少一种 miRNA 是 miR-191、miR-15b、miR-142-3p、Let-7g、Let-7d 或它们的组合。在一个实施方案中,所述方法可以进一步包括:测量所述样品中的 miR-301a、miR-545 或 miR-301a 和 miR-545 的水平。

[0015] 在另一个方面,本发明提供了一种治疗受试者中的阿尔茨海默氏病的方法,所述方法包括:测定得自所述受试者的含有循环 miRNA 的样品中的至少一种 miRNA 的水平,其中所述至少一种 miRNA 的水平相对于正常受试者的水平的差异(如相对于合适对照所确定的)指示受试者中的阿尔茨海默氏病;和,如果检测到至少一种 miRNA 的水平的差异,给所述受试者施用治疗有效量的包含阿尔茨海默氏病治疗剂的组合物。在一个实施方案中,所述至少一种 miRNA 是 miR-191、miR-15b、miR-142-3p、Let-7g、Let-7d 或它们的组合。所述方法可以任选地进一步包括:测定所述样品中的 miR-301a、miR-545 或 miR-301a 和 miR-545 的水平。

[0016] 在另一个方面,本发明提供了一种治疗患有阿尔茨海默氏病的受试者的方法,所述方法包括:鉴别患有阿尔茨海默氏病的受试者,其中得自受试者的含有循环 miRNA 的样品中的至少一种 miRNA 的水平相对于合适对照而言是不同的(例如,降低),和给所述受试者施用治疗有效量的阿尔茨海默氏病治疗剂。在一个实施方案中,所述至少一种 miRNA 是 miR-191、miR-15b、miR-142-3p、Let-7g、Let-7d 或它们的组合。所述方法可以任选地包括:鉴别受试者,其中在所述样品中的 miR-301a、miR-545 或 miR-301a 和 miR-545 的水平相对于合适对照而言也是不同的(例如,降低)。在这些方面,所述阿尔茨海默氏病治疗剂可以是 **Razadyne[®]** (加兰他敏)、**Exelon[®]** (利凡斯的明)或 **Aricept[®]** (多奈哌齐)。在一个示例性实施方案中,所述阿尔茨海默氏病治疗剂是多奈哌齐或其药学上可接受的盐或酯(例如,盐酸多奈哌齐)。

[0017] 在另一个方面,本发明提供了一种用于诊断受试者中的阿尔茨海默氏病的试剂盒,所述试剂盒含有试剂和说明书,所述试剂选择性地检测至少一种 miRNA 在得自受试者的含有循环 miRNA 的样品中的存在,其中所述至少一种 miRNA 是 miR-191、miR-15b、miR-142-3p、Let-7g、Let-7d 或它们的组合,所述说明书是关于测定所述至少一种 miRNA 的水平,其中所述至少一种 miRNA 的水平相对于正常受试者的水平的差异(如相对于合适对照所确定的)指示受试者中的阿尔茨海默氏病。这样的试剂盒可以任选地含有选择性地检测至少一种另外的 miRNA 在所述样品中的存在的试剂,其中所述另外的 miRNA 是 miR-301a、miR-545 或 miR-301a 和 miR-545。在某些实施方案中,所述试剂与 miRNA 特异性地杂交。

[0018] 在本文描述的方法或试剂盒的某些实施方案中,所述受试者可以是哺乳动物,例如,人。

[0019] 在本文描述的方法或试剂盒中,通过执行软件分类算法,可以确定至少一种 miRNA

的水平相对于合适对照的差异。

[0020] 在所述方法和试剂盒的某些实施方案中,所述样品可以是体液,例如,血液、淋巴液、尿或唾液。所述样品可以是无细胞的样品和 / 或无微囊泡的样品。在一个实施方案中,所述样品是血浆。在另一个实施方案中,所述样品是血清。

[0021] 在所述方法和试剂盒的某些实施方案中,其中选择或使用一种 miRNA,所述 miRNA 是 (a) 除了 miR-191 以外的 miRNA, (b) 除了 miR-15b 以外的 miRNA, (c) 除了 miR-142-3p 以外的 miRNA, (d) 除了 Let-7g 以外的 miRNA, 和 / 或 (e) 除了 Let-7d 以外的 miRNA。

[0022] 在所述方法和试剂盒的某些实施方案中,其中所述样品是 CSF,所述 miRNA 是 (a) 除了 miR-15b 以外的 miRNA, 和 / 或 (b) 除了 miR-191 以外的 miRNA。

[0023] 附图说明和表格

[0024] 图 1A 和 1B :使用 nCounter miRNA 测定,得自组群 1 (20 个阿尔茨海默氏病 (AD) 或轻度认知损害 (MCI) 患者 (11 个 AD ;9 个 MCI) 和 20 个正常对照 (NC) 患者) 的标准化的 miRNA 表达的散布图。

[0025] 图 2 :使用 TaqMan RT-qPCR 得到的线性倍数变化值的散布图,所述值为得自组群 1 (20 个 AD 或 MCI 患者和 20 个 NC 患者) 的各个候选 miRNA 生物标志物对于平均 NC 值标准化的值。

[0026] 图 3 :使用 TaqMan RT-qPCR 得到的线性倍数变化值的散布图,所述值为得自组群 2 (20 个 AD 和 17 个 NC 患者) 的各个候选 miRNA 生物标志物对于平均对照值标准化的值。

[0027] 表 1 :可从 PrecisionMed, Inc. 得到的组群 1 中的患者的细节,包括诊断、年龄、性别、MMSE 评分和就诊次数。

[0028] 表 2 :miRNA 生物标志物和用于标准化的 miRNA 的序列和 miRBASE 登录号。

[0029] 表 3 :对于组群 1 样品 (20 个 AD 或 MCI (11 个 AD ;9 个 MCI) 和 20 个 NC), 候选 miRNA 生物标志物在 Nanostring 和 TaqMan 平台之间的平均倍数变化值的关联。

[0030] 表 4 :使用组群 1 样品的子集 (11 个 AD 和 20 个 NC), 从 TaqMan qPCR 的相对 Ct 值数据 ;使用数据来产生候选 miRNA 生物标志物的标记模式以区分 AD 和 NC 患者。

[0031] 表 5 :可从 PrecisionMed, Inc. 得到的组群 2 中的患者的细节,包括诊断、年龄、性别、MMSE 评分和就诊次数。

[0032] 表 6 :使用 TaqMan RT-qPCR miRNA 测定得到的候选 miRNA 生物标志物在组群 1 和组群 2 中的平均倍数变化值 (对于平均对照值标准化) 的关联。

[0033] 表 7 :使用组群 2 样品 (20 个 AD 和 17 个 NC) 从 TaqMan qPCR 得到的相对 Ct 值数据,将其用作使用从组群 1 数据得到的标记预测 AD 和 NC 患者状态的算法的输入 (表 4)。

[0034] 表 8A-8C :指示阿尔茨海默氏病的候选 miRNA 生物标志物标记。

[0035] 表 9A-9B :具有 >75% 的准确度的 miRNA 生物标志物标记的准确度、特异性、灵敏度和 AUC (曲线下面积)。

[0036] 表 10 :使用组群 2 样品进行预测,选择的 8 个 miRNA 标记组合的准确度、特异性、灵敏度和 AUC (曲线下面积)。

[0037] 表 11 :使用组群 2 样品进行预测,各个 miRNA 的准确度、特异性、灵敏度和 AUC (曲线下面积)。

具体实施方式

[0038] 1. 简介

[0039] 本发明提供了新颖的 miRNA 生物标志物,其指示阿尔茨海默氏病,且其可以用于准确地诊断受试者中的阿尔茨海默氏病。另外,提供了用于监测阿尔茨海默氏病的进程的方法,治疗患有阿尔茨海默氏病的受试者的方法,和用于诊断阿尔茨海默氏病的试剂盒。在某些实施方案中,所述方法需要检测合适的样品(优选血液、血浆、血清、尿或唾液)中的细胞外的循环 miRNA。

[0040] 2. 定义

[0041] 在详细阐述本发明之前,提供要在本文中使用的某些术语的定义。除非另外定义,否则在本文中使用的所有技术和科学术语具有与本领域技术人员通常理解相同的含义。

[0042] 术语“一个”和“一种”和“所述”和类似指示物在描述本发明的上下文中(特别是在下述权利要求中)的应用应当解释为覆盖单数和复数,除非在本文中另外指出或与上文明显矛盾。除非另外指出,否则术语“包含”、“具有”、“包括”和“含有”应当解释为开放式术语(即,是指“包括、但不限于”)。除非在本文中另外指出,否则本文中对值范围的列举仅仅意图充当个别地提及列举的或在范围内的每个单独值的速记方法,并且将每个单独值并入说明书中,如同个别地列举它。

[0043] 术语“受试者”意图包括,能够遭受或罹患与 CNS 障碍有关的痴呆的动物,所述 CNS 障碍包括神经变性疾病诸如阿尔茨海默氏病、或直接地或间接地涉及阿尔茨海默氏病的任意障碍。受试者的例子包括哺乳动物,例如,人类、非人灵长类动物、狗、牛、马、猪、绵羊、山羊、猫、小鼠、兔、大鼠和转基因的非人动物。在某些实施方案中,所述受试者是人,例如,遭受阿尔茨海默氏病或阿尔茨海默氏病相关的痴呆的人,处于遭受阿尔茨海默氏病或阿尔茨海默氏病相关的痴呆的风险中的人,或者潜在地能够遭受阿尔茨海默氏病或阿尔茨海默氏病相关的痴呆的人。

[0044] 术语“治疗”在本文中用于表示解除、减轻或缓解受试者中的疾病的至少一种征状。例如,关于阿尔茨海默氏病,术语“治疗”包括:解除、减轻或缓解认知损害(诸如记忆和/或定向的病损)或总体功能(所有功能,包括日常生活活动)的病损,和/或减慢或逆转总体或认知损害的进行性衰退。因此,术语“治疗”也包括:在疾病的临床表现或疾病的征状之前延迟或阻止发作,和/或减少疾病征状的发展或恶化的风险。

[0045] 治疗剂或它们的组合的“治疗有效量”是,足以治疗受试者的疾病的量。例如,就阿尔茨海默氏病治疗剂而言,治疗有效量可以是,已经被证实会提供与阿尔茨海默氏病的临床上可观察的基线征象和征状相比可观察的治疗益处的量。

[0046] 术语“约”或“大约”通常是指在给定的值或范围的 5% 内,或更优选 1% 内。

[0047] 3. 阿尔茨海默氏病的 miRNA 生物标志物

[0048] 本发明涉及这样的微 RNA (“miRNA”) 生物标志物:与“正常”受试者(即,没患阿尔茨海默氏病的受试者)相比,其被发现在得自患有阿尔茨海默氏病 (AD) 的受试者的生物样品中差别地存在。如果在样品中的一种 miRNA 生物标志物或一组 miRNA 生物标志物的表达水平之间的差异被确定为统计上显著的,那么一种 miRNA 生物标志物或一组 miRNA 生物标志物在样品之间差别地存在。统计显著性的常见试验包括、但不限于:t- 检验、ANOVA、Kniskal-Wallis、Wilcoxon、Mann-Whitney 和比值比。单独的或组合的 miRNA 生物标志物

可以用于提供受试者患有或没患阿尔茨海默氏病的相对风险的量度。

[0049] miRNA 是小型非编码 RNA,其通过不同的机制参与调节基因表达,所述机制包括翻译抑制。miRNA 最初从 DNA 转录为过长的初级 miRNA 转录物 (“初级 -miRNA”),其大小范围为数百至数千个核苷酸。初级 -miRNA 在细胞核中被酶复合物 Drosha-DGCR8 加工以形成茎 - 环前体 miRNA (“前 -miRNA”)。前 -miRNA 被蛋白输出蛋白 5 运输至细胞质,在此处它被酶 Dicer 切割以产生成熟的 (有功能的)miRNA。人基因组编码超过 1300 种 miRNA,它们已经在 “miRBase:The microRNA Database” (<http://www.mirbase.org/>) 编入目录。已经报道了在众多细胞和组织类型中的 miRNA 表达和细胞外(例如,在生物流体中)miRNA 表达。

[0050] 通过将得自患有阿尔茨海默氏病的受试者的生物样品中的 miRNA 的表达水平与得自 “正常” 受试者(即,没患 AD 的受试者)的样品进行对比,并鉴别差别地存在的 miRNA,发现了阿尔茨海默氏病的 miRNA 生物标志物。以此方式鉴别出 7 种差别地存在的 miRNA 生物标志物,令人惊讶地发现当在血浆中测量时它们会指示阿尔茨海默氏病:miR-191、miR-15b、let-7d、let-7g、miR-142-3p、miR-301a 和 miR-545(参见表 2)。这些 miRNA 生物标志物现在可以用于确定受试者(例如,以前不知道其阿尔茨海默氏病状态的受试者或疑似患有阿尔茨海默氏病的受试者)的阿尔茨海默氏病状态。这可以如下实现:测定得自受试者的生物样品中的 miR-191、miR-15b、let-7d、let-7g、miR-142-3p、miR-301a 和 miR-545 中的一种或多种或它们的组合的水平。这些 miRNA 生物标志物中的一种或多种的水平相对于得自正常受试者的生物样品中的水平的差异,指示所述受试者具有阿尔茨海默氏病。

[0051] 与正常受试者相比具有一种或多种 miRNA 生物标志物水平差异的受试者可能患有阿尔茨海默氏病,包括早期阿尔茨海默氏病、中等或中期阿尔茨海默氏病、或重度或晚期阿尔茨海默氏病。在一个实施方案中,一种或多种 miRNA 生物标志物的水平可以用于诊断具有早期阿尔茨海默氏病的特有征状的受试者中的阿尔茨海默氏病,其也被称作前驱阿尔茨海默氏病。患有早期阿尔茨海默氏病的受试者通常具有 24-30 的 MMSE 评分。经常自己报告或者由配偶和 / 或护理人员报告关于轻度记忆丧失和减退的执行复杂任务的能力的主诉。

[0052] 在另一个实施方案中,一种或多种 miRNA 生物标志物的水平可以用于诊断具有 “中等严重程度认知减退” 的特有征状的受试者中的阿尔茨海默氏病,其也被称作 “中等” 或 “中期” 阿尔茨海默氏病。中等严重程度认知减退的特征在于,重大的记忆缺失和认知功能缺陷的出现。在该阶段,指示日常活动的一些辅助。

[0053] 在另一个实施方案中,一种或多种 miRNA 生物标志物的水平可以用于诊断具有 “重度认知减退” 的特有征状的受试者中的阿尔茨海默氏病,其也被称作 “中等” 或 “中期” 阿尔茨海默氏病。在重度认知减退中,记忆困难继续恶化,显著的人格改变可能出现,且受影响的个体的常规日常活动通常需要广泛帮助。

[0054] 在另一个实施方案中,一种或多种 miRNA 生物标志物的水平可以用于诊断具有 “极重认知减退” 的特有征状的受试者中的阿尔茨海默氏病,其也被称作 “重度” 或 “晚期” 阿尔茨海默氏病。晚期阿尔茨海默氏病或极重认知减退是该疾病的最终阶段。个体通常丧失对他们的环境做出应答的能力、说话能力,并最终丧失控制活动的能力(参见,例如, <http://www.alz.org>)。

[0055] 在另一个实施方案中,一种或多种 miRNA 生物标志物的水平可以用于诊断具有

0-26 的 MMSE 评分(例如、0-10 的 MMSE 评分、0-20 的 MMSE 评分、0-26 的 MMSE 评分等)的受试者中的阿尔茨海默氏病。“MMSE”表示,在认知评估领域中使用的弱智状态检查。在 MMSE 过程中,医师或其它医学专业人员询问患者一系列问题,所述问题被设计成试验多种日常心智技能。经常询问的问题包括,例如,记忆和重复 3 种常见物体的名称,陈述年、日期、季节和星期,以 7 的步长从 100 倒计数,向后拼写词语“world”,说出检查人员指向的熟悉物体的名称,鉴别检查人员的办公室的位置,在检查人员陈述常见短语以后重复它,复制 2 个连锁的形状的图像,和遵循分成 3 个部分的系列指令(例如,捡起一块纸,将它对折,和将它放在地板上)。MMSE 检查的最大评分是 30 点。一般而言,具有 27-30 的 MMSE 评分的患者被认为不具有认知损害,具有 21-26 的 MMSE 评分的患者被认为具有轻度认知损害,具有 11-20 的 MMSE 评分的患者被认为具有中等认知损害,和具有 0-10 的 MMSE 评分的患者被认为具有重度认知损害。在某些实施方案中,具有 0-16 的 MMSE 评分的患者被认为具有高等(中等严重程度至重度)阿尔茨海默氏病。

[0056] 在一个实施方案中,一种或多种 miRNA 生物标志物的水平可以用于监测受试者中的阿尔茨海默氏病的进程。受试者的阿尔茨海默氏病状态可以随时间变化。例如,所述疾病可以随时间恶化或改善。随着这样的恶化或改善,一种或多种 miRNA 生物标志物的水平可以变化,如在得自受试者的样品中所检测到的。例如,miR-191、miR-15b、let-7d、let-7g、miR-142-3p、miR-301a 和 / 或 miR-545 中的一种或多种的水平随着阿尔茨海默氏病的发展而降低。因而,可以如下监测受试者中的阿尔茨海默氏病的进程:测定得自受试者的第一样品中的一种或多种 miRNA 生物标志物的水平,和测定得自受试者的第二样品中的一种或多种 miRNA 生物标志物的水平,其中所述第二样品是在所述第一样品之后得到。所述第二样品中的水平与所述第一样品中的水平的对比指示疾病进展。例如,miR-191、miR-15b、let-7d、let-7g、miR-142-3p、miR-301a 和 / 或 miR-545 中的一种或多种的水平从第一样品至第二样品的降低指示,所述受试者已经发展阿尔茨海默氏病,或者所述疾病已经恶化。相反,miR-191、miR-15b、let-7d、let-7g、miR-142-3p、miR-301a 和 / 或 miR-545 中的一种或多种的水平从第一样品至第二样品的增加指示,所述疾病已经改善。在一个实施方案中,所述一种或多种 miRNA 生物标志物是 miR-191、miR-15b、let-7d、let-7g、miR-142-3p 和它们的组合。

[0057] 可以如下测定得自试验受试者的生物样品中的 miRNA 生物标志物的水平是否不同于在正常受试者中存在的 miRNA 生物标志物的水平:将得自试验受试者的样品中的 miRNA 生物标志物的水平与合适对照进行对比。技术人员可以为目标测定选择适当对照。例如,合适对照可以是得自己知受试者(例如,已知为正常受试者的受试者,或已知患有阿尔茨海默氏病的受试者)的生物样品。如果合适对照得自正常受试者,试验受试者中的 miRNA 生物标志物的水平相对于合适对照的统计上显著的差异指示,所述受试者患有阿尔茨海默氏病。如果合适对照得自己知患有阿尔茨海默氏病的受试者,与这样的对照相当或低于这样的对照的水平指示阿尔茨海默氏病,反映了得自正常受试者的样品中存在的水平的差异。在一个实施方案中,miRNA 生物标志物的水平的差异是降低。合适对照也可以是参比标准。参比标准充当用于对比的参照水平,使得试验样品可以与参比标准进行对比,以便推断受试者的阿尔茨海默氏病状态。参比标准可以代表已知受试者(例如,已知为正常受试者的受试者,或已知患有阿尔茨海默氏病的受试者)中的一种或多种 miRNA 生物标志物的水

平。同样地,参比标准可以代表已知受试者群体(例如,已知为正常受试者的受试者群体,或已知患有阿尔茨海默氏病的受试者群体)中的一种或多种 miRNA 生物标志物的水平。所述参比标准可以如下得到:例如,从多个个体收集样品,并测定收集的样品中的 miRNA 生物标志物的水平,由此产生涵盖平均化的群体的标准。这样的参比标准代表一群个体中的 miRNA 生物标志物的平均水平。参比标准也可以如下得到:例如,将测定存在于得自多个个体的单个样品中的 miRNA 生物标志物的水平平均化。这样的标准也代表一群个体中的 miRNA 生物标志物的平均水平。参比标准也可以是一组值,每个值代表一群个体中的已知受试者的 miRNA 生物标志物的水平。在某些实施方案中,可以将试验样品与这样的值集合进行对比,以便推断受试者的阿尔茨海默氏病状态。在某些实施方案中,所述参比标准是绝对值。在这样的实施方案中,可以将试验样品与绝对值进行对比,以便推断受试者的阿尔茨海默氏病状态。在一个实施方案中,通过执行软件分类算法,做出样品中的一种或多种 miRNA 的水平与合适对照之间的对比。技术人员可以容易地预见到根据目标测定可以是适当的其它合适对照。前述合适对照是示例性的,且无意是限制性的。

[0058] 通常,得自试验受试者的生物样品中的 miR-191、miR-15b、let-7d、let-7g、miR-142-3p、miR-301a 和 / 或 miR-545 中的一种或多种的水平相对于代表分别在正常受试者中的 miR-191、miR-15b、let-7d、let-7g、miR-142-3p、miR-301a 和 / 或 miR-545 中的一种或多种的水平合适对照的降低,指示所述试验受试者患有阿尔茨海默氏病。在所述合适对照代表患有阿尔茨海默氏病的受试者中的 miRNA 生物标志物的水平的情况下,与这样的对照的水平相当或更低的 miR-191、miR-15b、let-7d、let-7g、miR-142-3p、miR-301a 和 / 或 miR-545 中的一种或多种的水平通常指示阿尔茨海默氏病。

[0059] 在试验受试者中测定 2 种或更多种 miRNA 生物标志物的水平的某些情况下,与合适对照相比,可以存在一种或多种 miRNA 生物标志物的水平的降低,且一种或多种另外的 miRNA 生物标志物的水平没有变化或增加。在这样的情况下,一种或多种 miRNA 生物标志物的水平相对于代表正常受试者中的 miRNA 生物标志物的水平的合适对照的差异,指示所述试验受试者患有阿尔茨海默氏病。通过执行如本文中所述的软件分类算法,可以辅助这样的差异的确定。

[0060] 4. 生物样品

[0061] 可以在得自受试者的生物样品中测定一种或多种 miRNA 生物标志物的表达水平。得自受试者的样品是源自受试者的样品。可以在从受试者得到以后进一步加工这样的样品。例如,可以从样品分离出 RNA。在该实施例中,从样品分离出的 RNA 也是得自受试者的样品。可以从基本上任意来源得到可用于测定一种或多种 miRNA 生物标志物的水平的生物样品,因为已经报道了在遍布于体内的细胞、组织和流体中的 miRNA 表达。但是,在本发明的一个方面,可以非侵袭性地在得自受试者的样品中检测指示阿尔茨海默氏病的一种或多种生物标志物的水平。经常在得自脑脊液 (CSF) 或脑组织的样品中测量阿尔茨海默氏病的现有生物标志物 (例如, $A\beta_{1-42}$ 、p-tau 等)。最常见地,通过腰椎穿刺术得到 CSF,所述腰椎穿刺术是伴有危险因素(包括流血进椎管中、脊柱性头痛和感染)的疼痛操作。对脑组织样品的生物标志物检测目前就诊断活受试者中的阿尔茨海默氏病而言是不实用的,且主要用于在死后证实通过其它方式做出的诊断。因此,优选的是,所述样品得自脑组织以外的来源。本文描述的 miRNA 生物标志物指示阿尔茨海默氏病,且可以在非侵袭性地得到的生物

样品中检测出。

[0062] 在一个优选的实施方案中,用于测定一种或多种 miRNA 生物标志物的水平的生物样品是含有循环 miRNA (例如,细胞外 miRNA) 的样品。细胞外 miRNA 会在众多生物学材料中自由循环,所述生物学材料包括体液,诸如得自循环系统的流体,例如,血液样品或淋巴样品,或得自其它体液诸如 CSF、尿或唾液。因此,在某些实施方案中,用于测定一种或多种 miRNA 生物标志物的水平的生物样品是体液,例如,血液、其级分、血清、血浆、尿、唾液、泪水、汗液、精液、阴道分泌物、淋巴液、支气管分泌、CSF 等。在某些实施方案中,所述样品是非侵袭性地得到的样品。在某些实施方案中,所述样品得自除了 CSF 以外的体液。

[0063] 循环 miRNA 包括在细胞中的 miRNA (细胞 miRNA)、在微囊泡中的细胞外 miRNA (微囊泡相关的 miRNA) 和与细胞或微囊泡无关的细胞外 miRNA (细胞外的非囊泡的 miRNA)。在某些实施方案中,用于测定一种或多种 miRNA 生物标志物的水平的生物样品 (例如,含有循环 miRNA 的样品) 可以含有细胞。在其它实施方案中,所述生物样品可以不含有或基本上不含有细胞 (例如,血清样品)。所述样品同样可以不含有或基本上不含有微囊泡。例如,不含有或基本上不含有微囊泡的样品是这样的样品:其中所述样品的微囊泡含量低至足以避免干扰准确地测定所述样品中的非囊泡 miRNA 的水平的能力。在某些实施方案中,含有循环 miRNA (例如,细胞外 miRNA) 的样品是血液衍生的样品。示例性的血液衍生的样品类型包括,例如,血浆样品、血清样品、血液样品等。在其它实施方案中,含有循环 miRNA 的样品是淋巴样品。循环 miRNA 也存在于尿和唾液中,且源自这些来源的生物样品同样适合用于测定一种或多种 miRNA 生物标志物的水平。

[0064] 5. 测定样品中的 miRNA 生物标志物的水平

[0065] 通过任意合适的方法,可以测定生物样品中的一种或多种 miRNA 生物标志物的水平。可以使用任意可靠的用于测量样品中的 miRNA 的水平或量的方法。通常,可以从样品 (包括其级分) 检测和定量 miRNA,所述样品例如是通过关于 mRNA 已知的多种方法分离的 RNA 的样品,所述方法包括:例如,基于扩增的方法 (例如,聚合酶链式反应 (PCR)、实时聚合酶链式反应 (RT-PCR)、定量聚合酶链式反应 (qPCR)、滚环扩增等)、基于杂交的方法 (例如,杂交阵列 (例如,微阵列)、NanoString 分析、RNA 印迹分析、支链 DNA (bdNA) 信号放大、原位杂交等) 和基于测序的方法 (例如,下一代测序方法,例如,使用 Illumina 或 IonTorrent 平台)。其它示例性的技术包括核糖核酸酶保护测定 (RPA) 和质谱法。

[0066] 在某些实施方案中,在分析之前,将 RNA 转化成 DNA (cDNA)。可以使用常规技术通过分离的 miRNA 的反转录来制备 cDNA。miRNA 反转录试剂盒是已知的和商购可得的。合适的试剂盒的例子包括、但不限于 mirVana™ **TaqMan®miRNA** 转录试剂盒 (Ambion, Austin, TX) 和 **TaqMan®miRNA** 转录试剂盒 (Applied Biosystems, Foster City, CA)。通用引物或特异性引物 (包括 miRNA- 特异性的茎-环引物) 是已知的和商购可得的,例如,可得自 Applied Biosystems。在某些实施方案中,在测量之前扩增 miRNA。在其它实施方案中,在扩增过程中测量 miRNA 的水平。在其它实施方案中,在测量之前不扩增 miRNA 的水平。在下面更详细地描述了一些示例性的适合用于测定样品中的 miRNA 的水平的方法。这些方法仅仅通过例证来提供,并且技术人员会明白,同样可以使用其它合适的方法。

[0067] A. 基于扩增的方法

[0068] 存在许多用于检测 miRNA 核酸序列的水平的基于扩增的方法,包括、但不限于,PCR、RT-PCR、qPCR 和滚环扩增。其它基于扩增的技术包括,例如,连接酶链式反应、多路可连接的探针扩增、体外转录 (IVT)、链置换扩增、转录介导的扩增、RNA (Eberwine) 扩增和本领域技术人员已知的其它方法。

[0069] 一种典型的 PCR 反应包括多个选择性地扩增靶核酸物质的步骤或循环:变性步骤,其中使靶核酸变性;退火步骤,其中使一组 PCR 引物(即,正向和反向引物)与互补 DNA 链对合;和延伸步骤,其中热稳定的 DNA 聚合酶延伸所述引物。通过重复这些步骤多次,扩增 DNA 片段以产生与靶序列对应的扩增子。典型的 PCR 反应包括 20 个或更多个变性、退火和延伸的循环。在许多情况下,退火和延伸步骤可以并行地进行,在该情况下,所述循环仅含有 2 个步骤。在 PCR 扩增之前,可以执行反转录反应(其产生与 miRNA 具有互补性的 cDNA 序列)。反转录反应包括使用例如基于 RNA 的 DNA 聚合酶(逆转录酶)和引物。

[0070] 用于 miRNA 的定量实时 PCR 的试剂盒是已知的,且是商购可得的。合适的试剂盒的例子包括、但不限于:**TaqMan®miRNA** Assay (Applied Biosystems) 和 mirVana™ qRT-PCR miRNA 检测试剂盒 (Ambion)。可以在逆转录酶之前将 miRNA 连接至含有通用引物序列、聚腺苷酸化的序列或衔接子序列的单链寡核苷酸,并使用与通用引物序列互补的引物、聚(T)引物、或包含与衔接子序列互补的序列的引物进行扩增。

[0071] 在某些情况下,可以开发定制的 qRT-PCR 测定,用于测定 miRNA 水平。例如,使用包含延伸的反转录引物和锁定核酸修饰的 PCR 的方法,可以开发用于测量生物样品(例如,体液)中的 miRNA 的定制 qRT-PCR 测定。可以如下试验定制的 miRNA 测定:在化学合成的与靶序列相对应的 miRNA 的系列稀释液上运行该测定。这允许确定每个测定的定量的检测限度和线性范围。此外,当用作标准曲线时,这些数据允许估测在生物样品中测得的 miRNA 的绝对丰度。

[0072] 可以任选地检查扩增曲线,以证实在每个扩增图的线性范围内评估 Ct 值。通常,线性范围跨几个数量级。对于每种测定的候选 miRNA,可以得到化学合成形式的 miRNA,并在稀释系列中进行分析,以确定测定的灵敏度限度和定量的线性范围。例如,可以根据如下所述文献中描述的 $2(-\Delta \Delta C(T))$ 方法来确定相对表达水平: Livak 等人, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2(-\Delta \Delta C(T))$ Method*. *Methods* (2001) Dec; 25 (4): 402-8。

[0073] 在某些实施方案中,在单个反应体积中扩增 2 种或更多种 miRNA。例如,多路 q-PCR, 诸如 qRT-PCR, 能够在单个反应体积中同时扩增和定量至少 2 种目标 miRNA, 其中使用超过一对引物和 / 或超过一种探针。所述引物对包含至少一种特异性地结合每种 miRNA 的扩增引物,且所述探针被标记,使得它们可彼此辨别开,从而允许同时定量多种 miRNA。

[0074] 滚环扩增是一种由 DNA-聚合酶驱动的反应,其可以在等温条件下以线性或几何动力学复制环化的寡核苷酸探针(参见,例如, Lizardi 等人, *Nat. Gen.* (1998) 19 (3): 225-232; Gusev 等人, *Am. J. Pathol.* (2001) 159 (1): 63-69; Nallur 等人, *Nucleic Acids Res.* (2001) 29 (23): E118)。在有 2 种引物(一种与 DNA 的 (+) 链杂交,另一种与 (-) 链杂交)存在下,链置换的复杂模式会导致在 90 分钟或更短的时间内产生每种 DNA 分子的超过 10^9 个拷贝。使用单一引物,可以形成闭环 DNA 分子的串联连接的拷贝。

所述过程还可以使用基质相关的 DNA 来实现。可以逆转录用于滚环扩增的模板。该方法可以用作在非常低的 miRNA 浓度的 miRNA 序列和表达水平的高敏指示（参见，例如，Cheng 等人，*Angew Chem. Int. Ed. Engl.* (2009) 48 (18) :3268-72; Neubacher 等人，*Chembiochem.* (2009) 10 (8) :1289-91)。

[0075] B. 基于杂交的方法

[0076] 可以使用基于杂交的方法来检测 miRNA，所述方法包括、但不限于杂交阵列（例如，微阵列）、NanoString 分析、RNA 印迹分析、支链 DNA (bdNA) 信号放大和原位杂交。

[0077] 微阵列可以用于同时测量大量 miRNA 的表达水平。可以使用多种技术来制造微阵列，所述技术包括：将细尖针印刷在载玻片上，使用预制的掩模的照相平板印刷术，使用动态微镜装置的照相平板印刷术，喷墨印刷，或在微电极阵列上的电化学。也可使用微流体 TaqMan 低密度阵列，其基于微流体 qRT-PCR 反应阵列，以及有关的基于微流体 qRT-PCR 的方法。

[0078] 在微阵列检测的一个例子中，以约 20 μ M 的终浓度，将与人有义 miRNA 序列对应的不同寡核苷酸（例如，200+5' -氨基修饰的 C6 寡物）印迹在三维 CodeLink 载玻片（GE 健康 /Amersham Biosciences）上，并根据生产商的推荐进行处理。使用 Enzo BioArray 末端标记试剂盒（Enzo LifeSciences Inc.），用生物素化的 ddUTP 标记从 20 μ g TRIzol 纯化的总 RNA 合成的第一链 cDNA。可以根据改进的 Affymetrix Antisense 基因组阵列方案执行杂交、染色和洗涤。

[0079] Axon B-4000 扫描仪和 Gene-Pix Pro4.0 软件或其它合适的软件可以用于扫描图像。除去背景减去以后的非阳性点和通过 ESD 操作检测到的离群值。将得到的信号强度值标准化为前芯片中位值，然后用于得到每个 miRNA 的几何平均值和标准误差。可以将每个 miRNA 信号转化成 2 基对数 (\log base2)，并可以进行单样品 t 检验。可以在芯片上执行每个样品的独立杂交，其中将每个 miRNA 印迹多次以增加数据的稳健性。

[0080] 微阵列可以用于疾病中的 miRNA 的表达绘图。例如，可以从样品提取 RNA，并任选地，从总 RNA 中按照尺寸选择 miRNA。可以将寡核苷酸接头连接至 miRNA 的 5' 和 3' 末端，并将得到的连接产物用作 RT-PCR 反应的模板。有义链 PCR 引物可以具有与它的 5' 末端连接的荧光团，由此标记 PCR 产物的有义链。将 PCR 产物变性，然后与微阵列杂交。与阵列上的对应 miRNA 捕获探针序列互补的 PCR 产物（被称作靶核酸）将经由碱基配对与连接有捕获探针的点杂交。然后当使用微阵列激光扫描仪激发时，所述点将发荧光。

[0081] 然后使用许多阳性和阴性对照和阵列数据标准化方法，以特定 miRNA 的拷贝数的方式评价每个点的荧光强度，这将导致特定 miRNA 的表达水平的评估。

[0082] 还可以不经 miRNA 的尺寸选择直接使用从体液样品提取的含有 miRNA 的总 RNA。例如，使用 T4RNA 连接酶和荧光团标记的短 RNA 接头，可以在 3' 末端标记 RNA。与阵列上的对应 miRNA 捕获探针序列互补的荧光团标记的 miRNA 将经由碱基配对与连接有捕获探针的点杂交。然后使用许多阳性和阴性对照和阵列数据标准化方法，以特定 miRNA 的拷贝数的方式评价每个点的荧光强度，这将导致特定 miRNA 的表达水平的评估。

[0083] 可以采用几种类型的微阵列，包括、但不限于，印点的寡核苷酸微阵列、预制的寡核苷酸微阵列或印点的长寡核苷酸阵列。

[0084] 还可以使用 nCounter 分析系统（NanoString Technologies, Seattle, WA）不经扩

增地检测 miRNA。该技术采用 2 种基于核酸的在溶液中杂交的探针（例如，报告探针和捕获探针）。杂交以后，除去多余的探针，并根据生产商的方案分析探针 / 靶标复合物。可从 NanoString Technologies 得到 nCounter miRNA 测定试剂盒，其能够以极大特异性区分高度类似的 miRNA。

[0085] 还可以使用分支 DNA (bdNA) 信号放大来检测 miRNA (参见，例如，Urdea, Nature Biotechnology (1994), 12:926-928)。基于 bdNA 信号放大的 miRNA 测定是商购可得的。一种这样的测定是 **QuantiGene[®]** 2.0 miRNA Assay (Affymetrix, Santa Clara, CA)。

[0086] RNA 印迹和原位杂交也可以用于检测 miRNA。适合用于执行 RNA 印迹和原位杂交的方法是本领域已知的。

[0087] C. 基于测序的方法

[0088] 同样可以使用可得到的先进的测序方法。例如，可以使用 **Illumina[®]** 下一代测序（例如，合成测序或 TruSeq 方法，其中使用例如 HiSeq、HiScan、GenomeAnalyzer 或 MiSeq 系统 (Illumina, Inc., San Diego, CA)）来检测 miRNA。还可以使用 Ion Torrent 测序 (Ion Torrent Systems, Inc., Gulliford, CT) 或其它合适的半导体测序方法来检测 miRNA。

[0089] D. 其它 miRNA 检测工具

[0090] 使用 RNA 酶绘图，可以使用质谱法来定量 miRNA。可以用具有高特异性的 RNA 内切核酸酶 (RNA 酶) (例如，RNA 酶 T1，其在所有未修饰的鸟苷残基的 3' - 侧切割) 酶促地消化分离的 RNA，然后通过 MS 或串联 MS (MS/MS) 方案来分析它们。开发的第一种方案利用内切核酸酶消化物的在线色谱分离，其中使用与 ESI-MS 直接联接的反相 HPLC。相对于基于 RNA 序列预见到的质量的质量偏移，可以揭示转录后修饰的存在。然后可以分离具有异常质荷比值的离子用于串联 MS 测序，以定位转录后修饰的核苷的序列布局。

[0091] 基质辅助的激光解吸 / 电离质谱法 (MALDI-MS) 也已经被用作得到关于转录后修饰的核苷的信息的分析方案。通过分离步骤可以将基于 MALDI 的方案与基于 ESI 的方案区分开。在 MALDI-MS 中，使用质谱仪来分离 miRNA。

[0092] 为了分析有限量的完整 miRNA，可以采用与 nanoESI-MS 偶联的毛细管 LC 系统，其中使用线性离子阱 - 轨道离子阱杂合质谱仪 (LTQ Orbitrap XL, Thermo Fisher Scientific) 或串联四极飞行时间质谱仪 (**QSTAR[®]XL**, Applied Biosystems)，其配有定制纳米喷雾离子源、Nanovolume Valve (Valco Instruments) 和无分流纳米 HPLC 系统 (DiNa, KYA Technologies)。将分析物 / TEAA 加载到纳米 -LC 阱柱上，脱盐，然后浓缩。从阱柱洗脱完整 miRNA，并直接地注射进 C18 毛细管柱，并使用递增极性的溶剂梯度通过 RP-HPLC 色谱分离。使用允许以负极性模式扫描离子的电离电压，从连接至毛细管柱的喷雾器尖部喷洒色谱洗脱液。

[0093] 用于 miRNA 检测和测量的其它方法包括，例如，链侵入测定 (Third Wave Technologies, Inc.)、表面等离子体共振 (SPR)、cDNA、MTDNA (金属 DNA; Advance Technologies, Saskatoon, SK) 和单分子方法，诸如由 US Genomics 开发的方法。使用新颖的组合表面酶反应和纳米颗粒扩增的 SPR 成像 (SPRI) 的方案，可以以微阵列形式检测多种 miRNA。聚腺苷酸聚合酶的表面反应会在杂交于锁定核酸 (LNA) 微阵列上的 miRNA 上产生聚腺苷酸尾巴。然后将 DNA 修饰的纳米颗粒吸附到聚腺苷酸尾巴上，并用 SPRI 检测。该超

灵敏的纳米颗粒扩增的 SPRI 方法学可以用于在 attamole 水平的 miRNA 绘图。

[0094] E. 扩增的或未扩增的 miRNA 的检测

[0095] 在某些实施方案中,使用标记、染料或标记的探针和 / 或引物来检测扩增的或未扩增的 miRNA。技术人员基于检测方法的灵敏度和靶标的丰度会认识到哪种检测方法是适当的。取决于检测方法的灵敏度和靶标的丰度,在检测之前可能需要或不需要扩增。本领域技术人员会认识到其中 miRNA 扩增为优选的检测方法。

[0096] 探针或引物可以包括标准的 (A、T 或 U、G 和 C) 碱基或修饰的碱基。修饰的碱基包括、但不限于 AEGIS 碱基 (得自 Eragen Biosciences),其已经描述在例如美国专利号 5,432,272、5,965,364 和 6,001,983 中。在某些方面,通过天然的磷酸二酯键或不同的化学键连接碱基。不同的化学键包括、但不限于肽键或锁定核酸 (LNA) 键,后者描述在例如美国专利号 7,060,809 中。

[0097] 在另一个方面,存在于扩增反应中的寡核苷酸探针或引物适合用于监测作为时间的函数而产生的扩增产物的量。在某些方面,使用具有不同单链特性 (相对于双链特性) 的探针来检测核酸。探针包括、但不限于:5' - 外切核酸酶测定 (例如, TaqMan™) 探针 (参见美国专利号 5,538,848)、茎 - 环分子信标 (参见,例如,美国专利号 6,103,476 和 5,925,517)、无茎的或线性的信标 (参见,例如, W09921881、美国专利号 6,485,901 和 6,649,349)、肽核酸 (PNA) 分子信标 (参见,例如,美国专利号 6,355,421 和 6,593,091)、线性 PNA 信标 (参见,例如美国专利号 6,329,144)、非 -FRET 探针 (参见,例如,美国专利号 6,150,097)、Sunrise™/AmplifluorB™探针 (参见,例如,美国专利号 6,548,250)、茎 - 环和双链体 Scorpion™探针 (参见,例如,美国专利号 6,589,743)、凸环探针 (参见,例如,美国专利号 6,590,091)、假结探针 (参见,例如,美国专利号 6,548,250)、cyclicon (参见,例如,美国专利号 6,383,752)、MGB Eclipse™探针 (Epoch Biosciences)、发夹探针 (参见,例如,美国专利号 6,596,490)、PNA 照亮探针、抗引物淬灭探针 (Li 等人, Clin. Chem. 53:624-633 (2006))、自装配纳米颗粒探针和在例如美国专利号 6,485,901 中描述的二茂铁改性的探针。

[0098] 在某些实施方案中,在扩增反应中的一种或多种引物可以包括标记。在其它实施方案中,不同的探针或引物包含可彼此辨别开的可检测标记。在某些实施方案中,可以用 2 种或更多种可辨别的标记来标记核酸,诸如探针或引物。

[0099] 在某些方面,将标记连接至一个或多个探针,且所述标记具有下述性能中的一种或多种:(i) 提供可检测信号;(ii) 与第二标记相互作用以修饰由所述第二标记提供的可检测信号,例如,FRET (荧光共振能量转移);(iii) 稳定化杂交,例如,双链体形成;和 (iv) 提供结合复合物或亲和集合的成员,例如,亲和力、抗体 - 抗原、离子络合物、半抗原 - 配体 (例如,生物素 - 抗生物素蛋白)。在其它方面,使用大量已知技术中的任一种,可以完成标记的使用,所述技术采用已知的标记、连接、连接基团、试剂、反应条件以及分析和纯化方法。

[0100] 可以通过直接或间接方法来检测 miRNA。在一种直接检测方法中,通过与核酸分子连接的可检测标记物,检测一种或多种 miRNA。在这样的方法中,可以在与探针结合之前标记 miRNA。因此,通过筛选与探针结合的标记的 miRNA,检测结合。所述探针任选地在反应体积中连接至珠子。

[0101] 在某些实施方案中,通过与标记的探针的直接结合来检测核酸,随后检测所述探针。在本发明的一个实施方案中,使用 FLEXMAP 微球 (Luminex) 来检测核酸,诸如扩增的 miRNA,所述 FLEXMAP 微球与缀合有探针以捕获期望的核酸。一些方法可以包括:例如,用荧光标记修饰的多核苷酸探针进行检测,或分支 DNA (bdNA) 检测。

[0102] 在其它实施方案中,通过间接检测方法来检测核酸。例如,可以将生物素化的探针与抗生物素蛋白-缀合的染料组合以检测结合的核酸。抗生物素蛋白分子会结合扩增的 miRNA 上的生物素标记,并通过检测与抗生物素蛋白分子连接的染料分子来检测结合的 miRNA。在一个实施方案中,所述抗生物素蛋白-缀合的染料分子包含 **Phycolink®** 抗生物素蛋白 R-藻红蛋白 (PROzyme)。其它缀合的染料分子是本领域技术人员已知的。

[0103] 标记包括、但不限于:发射光的、散射光的和吸收光的化合物,其产生或淬灭可检测的荧光的、化学发光的或生物发光的信号(参见,例如, Kricka, L., *Nonisotopic DNA Probe Techniques*, Academic Press, San Diego (1992) 和 Garman A., *Non-Radioactive Labeling*, Academic Press (1997))。在某些实施方案中,使用包括报告物荧光团和猝灭剂荧光团的双重标记的荧光探针。应当理解,选择具有具有独特发射波谱的荧光团对,使得它们可以容易地区分开。

[0104] 在某些实施方案中,标记是用于增强、稳定或影响双链体的杂交的杂交稳定化部分,例如,嵌入剂和嵌入染料(包括、但不限于,溴化乙锭和 SYBR-Green)、小沟结合剂和交联官能团(参见,例如, Blackburn 等人, 编“DNA and RNA Structure” in *Nucleic Acids in Chemistry and Biology* (1996))。

[0105] 在其它实施方案中,可以使用依赖于杂交和/或连接来定量 miRNA 的方法,包括寡核苷酸连接 (OLA) 方法和允许将与靶核酸序列杂交的可辨别探针与未结合的探针分离开的方法。作为一个例子,如在美国公开号 2006/0078894 中公开的 HARP-样探针可以用于测量 miRNA 的量。在这样的方法中,在探针和靶向核酸之间杂交以后,修饰所述探针以将杂交的探针与未杂交的探针区分开。此后,可以扩增和/或检测所述探针。一般而言,探针灭活区域包含在探针的靶杂交区域内的核苷酸的子集。为了减少或防止未与它的靶核酸杂交的 HARP 探针的扩增或检测并因此允许靶核酸的检测,使用能够区分开与它的靶核酸序列杂交的 HARP 探针和对应的未杂交的 HARP 探针的试剂进行杂交后探针灭活步骤。所述试剂能够灭活或修饰未杂交的 HARP 探针,使得它不可被扩增。

[0106] 也可以使用探针连接反应来定量 miRNA。在多路连接依赖性的探针扩增 (MLPA) 技术 (Schouten 等人, *Nucleic Acids Research* 30:e57 (2002)) 中,在靶核酸的存在的驱动下,使在靶核酸上彼此紧邻地杂交的探针对彼此连接到一起。在某些方面,MLPA 探针具有侧接 PCR 引物结合位点。当连接时,会特异性地扩增 MLPA 探针,从而允许检测和定量 miRNA 生物标志物。

[0107] 6. 使用 miRNA 生物标志物确定阿尔茨海默氏病状态

[0108] 本文描述的 miRNA 生物标志物可以个别地或联合地用于诊断试验中以评估受试者的阿尔茨海默氏病状态。疾病状态包括阿尔茨海默氏病的存在或不存在。疾病状态还可以包括监测阿尔茨海默氏病的进程,例如,监测疾病进展。基于受试者的阿尔茨海默氏病状态,可以指示其它操作,包括、例如,其它诊断试验或治疗操作。

[0109] 通常以测定的准确度、测定的灵敏度、测定的特异性或“曲线下面积”(AUC) (例如,

在受试者操作特征 (ROC) 曲线下的面积) 的方式, 测量诊断试验的正确预测疾病状态的能力。本文中使用的准确度是错误分类的样品的比例的量度。可以将准确度计算为, 正确分类的样品的总数除以样品的总数 (例如在试验群体中)。灵敏度是通过试验预测为阳性的“真阳性”的量度, 且可以计算为正确鉴别的阿尔茨海默氏病样品的数目除以阿尔茨海默氏病样品的总数。特异性是通过试验预测为阴性的“真阴性”的量度, 且可以计算为正确鉴别的正常样品的数目除以正常样品的总数。AUC 是受试者操作特征曲线下的面积的量度, 所述曲线是灵敏度相对于假阳性率的图 (1- 特异性)。AUC 越大, 试验的预测值越有效。试验的实用性的其它有用的量度包括“阳性预测值” (它是试验为阳性的实际阳性的百分比) 和“阴性预测值” (它是试验为阴性的实际阴性的百分比)。在一个优选的实施方案中, 在源自具有不同阿尔茨海默氏病状态的受试者的样品中的一种或多种 miRNA 生物标志物的水平表现出与正常受试者相比至少 $p \leq 0.05$ (例如, $p \leq 0.05$ 、 $p \leq 0.01$ 、 $p \leq 0.005$ 、 $p \leq 0.001$ 等) 的统计上显著的差异 (如相对于合适对照所确定的)。在其它优选的实施方案中, 个别地或组合地使用本文描述的 miRNA 生物标志物的诊断试验表现出至少约 75% 的准确度, 例如, 至少约 75%、约 80%、约 85%、约 90%、约 95%、约 97%、约 99% 或约 100% 的准确度。在其它实施方案中, 个别地或组合地使用本文描述的 miRNA 生物标志物的诊断试验表现出至少约 75% 的特异性, 例如, 至少约 75%、约 80%、约 85%、约 90%、约 95%、约 97%、约 99% 或约 100% 的特异性。在其它实施方案中, 个别地或组合地使用本文描述的 miRNA 生物标志物的诊断试验表现出至少约 75% 的灵敏度, 例如, 至少约 75%、约 80%、约 85%、约 90%、约 95%、约 97%、约 99% 或约 100% 的灵敏度。在其它实施方案中, 个别地或组合地使用本文描述的 miRNA 生物标志物的诊断试验表现出各自至少约 75% 的特异性和灵敏度, 例如, 至少约 75%、约 80%、约 85%、约 90%、约 95%、约 97%、约 99% 或约 100% 的特异性和灵敏度 (例如, 至少约 80% 的特异性和至少约 80% 的灵敏度, 或例如, 至少约 80% 的特异性和至少约 95% 的灵敏度)。

[0110] 与正常受试者相比, 在表 2 中列出的每种生物标志物差别地存在于源自患有阿尔茨海默氏病的受试者的生物样品中, 因而每种可个别地用于促进试验受试者中的阿尔茨海默氏病的确定。这样的方法包括: 测定源自受试者的样品中的生物标志物的水平。测定样品中的生物标志物的水平可以包括: 使用任意合适的方法, 例如, 本文阐述的方法, 测量、检测或测定样品中的生物标志物的水平。测定样品中的生物标志物的水平还可以包括, 检查测定的结果, 所述测定测量、检测或测定样品中的生物标志物的水平。所述方法还可以包括: 将样品中的生物标志物的水平与合适对照进行对比。使用合适对照评估的生物标志物的水平相对于正常受试者中的水平的变化, 指示受试者的阿尔茨海默氏病状态。可以使用生物标志物的诊断量, 其代表这样的生物标志物的量: 在该量以上或以下, 将受试者分类为具有特定阿尔茨海默氏病状态。例如, 如果与正常个体相比在源自具有阿尔茨海默氏病的个体的样品中的生物标志物被减量调节, 测量的低于诊断截止值的量会提供阿尔茨海默氏病的诊断。通常, 与得自正常个体的样品相比, 在表 2 中的各个 miRNA 生物标志物在阿尔茨海默氏病样品中被减量调节。如本领域众所周知的, 调节在测定中使用的特定诊断截止值, 允许人们根据需要调节诊断测定的灵敏度和 / 或特异性。可以如下确定特定诊断截止值: 例如, 在统计上显著数目的得自具有不同阿尔茨海默氏病状态的受试者的样品中, 测量生物标志物的量, 并在期望的准确度、灵敏度和 / 或特异性水平绘制截止值。在某些实施方案中, 可以在如本文中所述的分类算法辅助下确定诊断截止值。

[0111] 因此,提供了用于诊断受试者中的阿尔茨海默氏病的方法,所述方法包括:测定得自受试者的含有循环 miRNA 的样品中的至少一种 miRNA 的水平,其中所述至少一种 miRNA 的水平相对于正常受试者的水平的差异(如相对于合适对照所确定的)指示受试者中的阿尔茨海默氏病。所述至少一种 miRNA 优选地包括 miR-191、miR-15b、miR-142-3p、Let-7g 和 Let-7d 中的一种或多种,且可以任选地包括 miR-301a、miR-545 或 miR-301a 和 miR-545。例如,本发明提供了一种测定含有源自受试者的循环 miRNA 的样品中的至少一种 miRNA 的水平的方法,其中所述至少一种 miRNA 的水平相对于对照的降低指示受试者中的阿尔茨海默氏病。

[0112] 任选地,所述方法可以进一步包括:基于样品中的至少一种 miRNA 的水平,提供所述受试者患有或不患有阿尔茨海默氏病的诊断。另外或可替换地,所述方法可以进一步包括:将至少一种 miRNA 的水平相对于合适对照的差异与所述受试者中的阿尔茨海默氏病的诊断相关联。在某些实施方案中,可以将这样的诊断直接提供给受试者,或者可以将它提供给参与受试者护理的另一方。

[0113] 尽管各个 miRNA 生物标志物可用于阿尔茨海默氏病的诊断应用中,如本文证实的,与单独使用的 miRNA 生物标志物相比,miRNA 生物标志物的组合可以提供阿尔茨海默氏病状态的更大预测值。具体地,多个 miRNA 生物标志物的检测可以增加诊断试验的准确度、灵敏度和/或特异性。示例性的 miRNA 生物标志物和生物标志物组合显示在表 8A-8C 中。在表 9A-9B 中显示了表现出 75% 的总准确度的 miRNA 生物标志物和生物标志物组合。本发明包括在这些表中阐述的各个生物标志物和生物标志物组合和它们在本文描述的方法和试剂盒中的用途。

[0114] 因此,提供了用于诊断受试者中的阿尔茨海默氏病的方法,所述方法包括:测定得自受试者的含有循环 miRNA 的样品中的 2 种或更多种 miRNA 的水平,其中 miRNA 的水平相对于正常受试者的水平的差异(如相对于合适对照所确定的)指示受试者中的阿尔茨海默氏病。miRNA 优选地包括 miR-191、miR-15b、miR-142-3p、Let-7g 和 Let-7d 中的一种或多种,且可以任选地包括 miR-301a、miR-545 或 miR-301a 和 miR-545。2 种或更多种 miRNA 生物标志物的示例性组合包括,例如,miR-545、let7g 和 miR-15b ;miR-15b 和 miR-545 ;miR-301a、miR-545、let-7g 和 miR-15b ;miR-191 和 miR-15b ;Let-7g 和 miR-15b ;miR-191、miR-301a 和 miR-545 ;miR-301a、let-7g 和 miR-15b ;和 miR-191、miR-301a、miR-545 和 miR-15b。

[0115] 还提供了一种诊断受试者中的阿尔茨海默氏病的方法,所述方法包括:测定得自受试者的含有循环 miRNA 的样品中的 2 种或更多种 miRNA 的水平,将所述样品中的 2 种或更多种 miRNA 的水平与一组数据进行对比,所述数据代表存在于正常受试者和患有阿尔茨海默氏病的受试者中的相同 miRNA 的水平,和将所述受试者诊断为患有或不患有阿尔茨海默氏病基于所述对比。在这样的方法中,所述数据集合充当合适对照或参比标准,用于与得自受试者的样品进行对比。分类算法可以辅助得自受试者的样品与所述数据集合的对比,所述分类算法计算在样品中的 2 种或更多种 miRNA 的集合水平之间是否存在统计上显著的差异以及存在于正常受试者或患有阿尔茨海默氏病的受试者中的相同 miRNA 的水平。

[0116] 7. 用于定量阿尔茨海默氏病状态的分类算法的产生

[0117] 在某些实施方案中,使用诸如“已知样品”等样品产生的数据然后可以用于“训练”分类模型。“已知样品”是已经预分类的样品,例如,分类为源自正常受试者或源自患有阿尔

茨海默氏病的受试者。源自所述谱且用于形成分类模型的数据可以被称作“训练数据集”。训练后,所述分类模型可以识别数据的模式,所述数据源自使用未知样品产生的谱。然后可以使用分类模型来将未知样品分类。这可以用于例如预测特定生物样品是否与特定生物条件(例如,患病相对于未患病)有关。

[0118] 在某些实施方案中,用于形成分类模型的训练数据集的数据可以直接得自定量 PCR(例如,使用 $\Delta \Delta Ct$ 方法得到的 Ct 值)或得自高通量表达绘图,诸如微阵列分析(例如,得自 miRNA 表达测定(例如, nCounter miRNA 表达测定)的总计数或标准化计数)。

[0119] 使用任意合适的统计分类(或“学习”)方法可以形成分类模型,所述方法尝试基于在数据中存在的客观参数而将数据集分类。分类方法可以是有监督的或无监督的。有监督的和无监督的分类过程的例子描述在 Jain, “Statistical Pattern Recognition: A Review”, IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence, 第 22 卷, 第 1 期, 2000 年 1 月, 其教导通过引用并入。

[0120] 在有监督的分类中,将含有已知分类的例子的训练数据呈现给学习机制,所述学习机制学习一个或多个限定每个已知类别的关联的集合。然后可以将新数据应用于学习机制,其然后使用学习的关联分类新数据。有监督的分类过程的例子包括线性回归过程(例如,多重线性回归 (MLR)、部分最小二乘法 (PLS) 回归和主成分分析法 (PCR))、二元判定树(例如,递归分割过程诸如 CART— 分类和退化树)、人工神经网络诸如反向传播网络、判别式分析(例如,贝叶斯分类器或 Fischer 分析)、逻辑分类器和支持载体分类器(支持载体机)。

[0121] 在其它实施方案中,使用无监督的学习方法,可以形成产生的分类模型。无监督的分类尝试基于训练数据集中的相似性来学习分类,无需预先分类得到训练数据集的谱。无监督的学习方法包括聚类分析。聚类分析尝试将数据分成这样的“簇”或组:其理想地应当具有彼此非常类似的成员,且与其它簇的成员非常不同。然后使用一些距离度量来测量相似性,所述距离度量测量数据项目之间的距离,并将彼此更靠近的数据项目簇集在一起。聚类技术包括 MacQueen 的 K-means 算法和 Kohonen 的自组织图谱(Self-Organizing Map)算法。

[0122] 被宣称用于分类生物信息的学习算法描述在,例如, PCT 国际公开号 W001/31580 (Barnhill 等人, “Methods and devices for identifying patterns in biological systems and methods of use thereof”)、美国专利申请号 20020193950A1 (Gavin 等人, “Method or analyzing mass spectra”)、美国专利申请号 20030004402A1 (Hitt 等人, “Process for discriminating between biological states based on hidden patterns from biological data”) 和美国专利申请号 20030055615A1 (Zhang 和 Zhang, “Systems and methods for processing biological expression data”)。前述专利申请的内容通过引用整体并入本文。

[0123] 可以在任意合适的数字计算机上形成和使用所述分类模型。合适的数字计算机包括使用任何标准或专门操作系统(诸如基于 Unix、Windows™或 Linux™的操作系统)的微型(micro)、小型(mini)或大型计算机。

[0124] 通过数字计算机执行或使用的计算机代码,可以具体化训练数据集和分类模型。所述计算机代码可以存储在任意合适的计算机可读介质(包括光学或磁学的盘、棒、带等)

上,且可以用任意合适的计算机编程语言(包括 C、C++、visual basic 等)书写。

[0125] 上述的学习算法可以用于开发针对阿尔茨海默氏病的 miRNA 生物标志物的分类算法。所述分类算法又可以通过提供单独地或组合地使用的生物标志物的诊断值(例如,截止点)而用于诊断试验中。

[0126] 8. 其它诊断试验

[0127] 指示阿尔茨海默氏病的 miRNA 生物标志物的水平可以用作受试者中的阿尔茨海默氏病的独立诊断指标。任选地,所述方法可以包括:执行至少一个另外的试验以促进阿尔茨海默氏病的诊断。例如,除了测定一种或多种 miRNA 生物标志物的水平以外,可以执行其它试验以便促进阿尔茨海默氏病的诊断。可以与本文描述的 miRNA 生物标志物联合使用在临床实践中用于促进阿尔茨海默氏病的诊断的任意其它试验或试验组合。

[0128] 例如,除了测定源自受试者的样品中的一种或多种 miRNA 生物标志物的水平以外,临床医师可以对受试者执行精神状态试验。这样的试验可以包括、但不限于:弱智状态检查(MMSE)、mini-cog 试验、ADAS-cog 试验和/或画钟试验。这些试验常规地用于临床实践中以促进阿尔茨海默氏病的诊断。

[0129] 同样地,可以对受试者执行脑成像试验,例如,MRI 或 CT 扫描。主要执行这些试验来排除可能造成与阿尔茨海默氏病类似的征状的其他病症,诸如脑中的肿瘤、中风或流体。

[0130] 可以对受试者执行神经学检查,其中试验诸如受试者的反射、协调、肌肉强度、眼活动、讲话和/或感觉等状况。

[0131] 也可以针对遗传因素来筛选受试者,所述遗传因素指示受试者可能具有增强的发展阿尔茨海默氏病的风险。同样可以针对至少一种指示阿尔茨海默氏病其它生物标志物的存在、缺失或水平来筛选受试者。

[0132] 9. 治疗方法

[0133] 在某些实施方案中,在通过本文所述的方法诊断出患有阿尔茨海默氏病的受试者的情况下,本发明另外提供了治疗这样的被鉴别为患有阿尔茨海默氏病受试者的方法。因此,在一个实施方案中,本发明涉及一种治疗受试者中的阿尔茨海默氏病的方法,所述方法包括:测定源自受试者的样品中的至少一种 miRNA 生物标志物的水平,其中至少一种 miRNA 生物标志物的水平相对于正常受试者的水平的差异(如相对于合适对照所确定的)指示受试者中的阿尔茨海默氏病,和给所述受试者施用治疗有效量的阿尔茨海默氏病治疗剂。在另一个实施方案中,本发明涉及一种治疗患有阿尔茨海默氏病的受试者的方法,所述方法包括:鉴别患有阿尔茨海默氏病的受试者,其中源自受试者的样品中的至少一种 miRNA 生物标志物的水平相对于正常受试者的水平而言是不同的(例如,降低)(如相对于合适对照所确定的),和给所述受试者施用治疗有效量的阿尔茨海默氏病治疗剂。

[0134] 术语“阿尔茨海默氏病治疗剂”包括,例如,被美国食品和药品管理局批准用于治疗阿尔茨海默氏病的物质。这样的物质包括,例如,**Razadyne[®]**(加兰他敏)、**Exelon[®]**(利凡斯的明)和**Aricept[®]**(多奈哌齐)。在一个示例性实施方案中,所述阿尔茨海默氏病治疗剂是多奈哌齐或其药学上可接受的盐或酯(例如,盐酸多奈哌齐)。

[0135] 可以使用药物组合物将阿尔茨海默氏病治疗剂施用给受试者。合适的药物组合物包含阿尔茨海默氏病治疗剂(或其药学上可接受的盐或酯),且任选地包含药学上可接受

的载体,诸如包含加兰他敏、利凡斯的明、多奈哌齐或前述任一种的药学上可接受的盐或酯(例如,氢溴酸加兰他敏、酒石酸利凡斯的明、盐酸多奈哌齐)的药物组合物。在某些实施方案中,这些组合物任选地进一步包含一种或多种另外的治疗剂。

[0136] 本文中使用的术语“药学上可接受的盐”表示这样的盐:其在合理的医学判断范围内,适合用于接触人类和低等动物的组织,而没有不适当的毒性、刺激、变应性应答等,且与合理的收益/风险比相称。胺、羧酸和其它类型的化合物的药学上可接受的盐是本领域众所周知的。例如, S. M. Berge, 等人在 *J. Pharmaceutical Sciences*, 66:1-19(1977) (其通过引用并入本文) 中详细描述了药学上可接受的盐。所述盐可以在本发明的化合物的最终分离和纯化过程中原位制备,或者通过使游离碱或游离酸官能团与合适的试剂反应来单独制备。例如,可以使游离碱官能团与合适的酸反应。此外,在所述化合物携带酸性部分的情况下,其合适的药学上可接受的盐可以包括:金属盐诸如碱金属盐,例如钠或钾盐;和碱土金属盐,例如钙或镁盐。

[0137] 本文中使用的术语“药学上可接受的酯”表示在体内水解的酯,且包括在人体内容易地分解以剩下母体化合物或其盐的那些酯。合适的酯基包括,例如,源自药学上可接受的脂族羧酸(特别是链烷酸、链烯酸、环链烷酸和烷二酸)的那些,其中每个烷基或烯基部分有利地具有不超过6个碳原子。

[0138] 如上所述,所述药物组合物可以另外包含药学上可接受的载体。术语载体包括适合用于制备期望的特定剂型的任意和所有溶剂、稀释剂或其它液体媒介物、分散体或混悬助剂、表面活性剂、等张剂、增稠剂或乳化剂、防腐剂、固体粘合剂、润滑剂等。Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 第十六版, E. W. Martin (Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1980) 公开了用于配制药物组合物的不同载体及其已知的制备技术。可以充当药学上可接受的载体的材料的一些例子包括、但不限于:糖诸如乳糖、葡萄糖和蔗糖;淀粉,诸如玉米淀粉和马铃薯淀粉;纤维素及其衍生物诸如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和醋酸纤维素;黄蓍胶粉末;麦芽;明胶;滑石粉;赋形剂诸如可可脂和栓剂蜡;油诸如花生油、棉籽油;红花油、芝麻油;橄榄油;玉米油和大豆油;二醇类;诸如丙二醇;酯类诸如油酸乙酯和月桂酸乙酯;琼脂;缓冲剂诸如氢氧化镁和氢氧化铝;海藻酸;无热原水;等张盐水;林格氏溶液;乙醇和磷酸盐缓冲溶液,以及其它无毒的相容的润滑剂诸如月桂基硫酸钠和硬脂酸镁,以及根据配制者的判断,着色剂、释放剂、包衣剂、甜味剂、矫味剂和芳香剂、防腐剂和抗氧化剂也可以存在于所述组合物中。

[0139] 可以将用于本发明中的组合物配制成具有任意浓度的期望的阿尔茨海默氏病治疗剂。在优选的实施方案中,配制所述组合物,使得它包含治疗有效量的阿尔茨海默氏病治疗剂。

[0140] 10. 用于检测 miRNA 生物标志物的试剂盒

[0141] 在另一个方面,本发明提供了用于诊断受试者中的阿尔茨海默氏病状态的试剂盒,所述试剂盒可用于测定 miR-191、miR-15b、let-7d、let-7g、miR-142-3p、miR-301a 和 miR-545 中的一种或多种和它们的组合的水平。在一个实施方案中,所述一种或多种 miRNA 选自:miR-191、miR-15b、let-7d、let-7g、miR-142-3p。试剂盒可以包括:适合选择性地检测 miRNA 或 miRNA 集合的存在材料和试剂,所述 miRNA 指示源自受试者的样品中的阿尔茨海默氏病。例如,在一个实施方案中,所述试剂盒可以包括与 miRNA 特异性地杂交的试

剂。这样的试剂可以是适合用于检测 miRNA (例如, 探针或引物) 的形式的核酸分子。所述试剂盒可以包括可用于执行测定以检测一种或多种 miRNA 的试剂, 例如, 可以用于在 qPCR 反应中检测一种或多种 miRNA 的试剂。所述试剂盒同样可以包括可用于检测一种或多种 miRNA 的微阵列。

[0142] 在另一个实施方案中, 所述试剂盒可以含有标签或产品插页形式的关于合适的操作参数的说明书。例如, 所述说明书可以包括关于如何收集样品、如何测定样品中的一种或多种 miRNA 生物标志物的水平、或者如何将样品中的一种或多种 miRNA 生物标志物的水平与受试者的阿尔茨海默氏病状态相关联的信息或指示。

[0143] 在另一个实施方案中, 所述试剂盒可以含有一个或多个容器, 所述容器装有 miRNA 生物标志物样品, 所述样品将用作参比标准、合适对照或用于校准测定以检测试验样品中的 miRNA 生物标志物。

[0144] 下述实施例进一步例证了本发明, 所述实施例不应解释为限制性的。在本申请中引用的所有参考文献、专利和公开的专利申请的整个内容特此通过引用整体并入。

[0145] 实施例

[0146] 实施例 1: 候选 miRNA 生物标志物的鉴别和验证

[0147] 该研究的目的是, 从人血液的血浆级分产生 miRNA 谱, 并确定在诊断出阿尔茨海默氏病 (AD) 的患者和正常对照 (NC) 之间是否存在 miRNA 含量和表达水平的显著差异。

[0148] 人血浆样品购自 PrecisionMed, Inc. (Solano Beach, CA-USA)。组群 1 含有得自 11 个 AD 患者、9 个轻度认知损害 (MCI) 患者和 20 个 NC 患者的样品。组群 1 的患者的年龄、性别、诊断和弱智状态检查 (MMSE) 评分提供在表 1 中。从血浆样品 (1mL) 提取总 RNA, 并加入混入 (spike-in) 合成 miRNA (Ath-159a 和 Neg-A) 以控制提取效率和标准化, 如下所述。

[0149] 然后使用 nCounter miRNA 表达测定 (Nanostring Technology, Seattle, WA-USA), 一式三份地将每个样品用于高通量表达绘图, 如下所述。标准化和背景校正以后, 针对 AD/MCI 和 NC 样品将最终线性计数平均化, 并确定倍数变化值。选择这样的候选 miRNA: 其在 AD/MCI 和 NC 样品的平均表达值之间具有至少 1.5 倍差异, 且其具有 >200 的平均标准化计数。将 miRNA106a (Hsa-miR-106a) 鉴别为潜在内源对照, 其在所有 AD/MCI 和 NC 样品中表现出最小变异。

[0150] 鉴别出了 227 种至少具有 >100 的平均表达计数的 miRNA (认为相对于背景显著地表达)。在所述 227 种 miRNA 中, 我们鉴别出 13 种具有至少 1.5 倍差异且具有 >200 标准化线性计数的平均值的 miRNA (图 1A 和 1B)。这些包括 hsa-let-7d、hsa-let-7g、hsa-miR-15b、hsa-miR-126、hsa-miR-142-3p、hsa-miR-191、hsa-miR-301a、hsa-miR-453、hsa-miR-545、hsa-miR-563、hsa-miR-600、hsa-miR-1274a 和 hsa-miR-1975。

[0151] 使用高通量 Nanostring 平台鉴别出候选 miRNA 生物标志物, 然后使用茎-环 TaqMan RT-qPCR miRNA 测定 (Life Technologies) 进行验证。制备所有 40 个组群 1 样品的总 RNA 的 1:10 稀释液, 并如下所述对每个样品执行 TaqMan 测定。使用 $\Delta\Delta C_t$ 分析方法 (Life Technologies), 使用 Ath-159a (混入) 和 miR-106a (内源 miRNA) 值标准化所有样品的值。在试验的 13 种 miRNA 中, 没有证实 6 种 miRNA 的存在。这些包括 hsa-miR-126、hsa-miR-453、hsa-miR-563、hsa-miR-600、hsa-miR-1274a 和 hsa-miR-1975。

[0152] 剩余的 7 种 miRNA (miR-191、miR-15b、let-7d、let-7g、miR-142-3p、miR-301a 和

miR-545) 表现出通过 Nanostring 和通过 TaqMan 记录的平均倍数变化之间的非常强关联 (图 2、表 3)。miRNA 序列和 miRBase 登录号提供在表 2 中。例如, 根据 Nanostring 分析, AD 样品中的 miR-191 被减量调节约 3.1 倍, 而通过 TaqMan 分析, 发现它被减量调节约 3.7 倍 (参见表 3)。关于所有剩余的 miRNA (miR-15b、let-7d、let-7g、miR-142-3p、

[0153] miR-301a 和 miR-545) 观察到该接近趋势。所有倍数变化值具有 <0.005 的 p - 值。

[0154] 值得注意的是, 通过 TaqMan 分析没有证实的所有候选 miRNA (除了 miR-126 以外) 具有小于 500 的标准化的线性计数 (如通过 Nanostring 所确定的)。另一方面, 每种经过验证的 miRNA 的平均计数高于 3,000。这提示, 为 Nanostring 实验设定更高的阈值可用于减少假阳性候选物的数目。

[0155] 材料和方法

[0156] 总 RNA 提取

[0157] 使用描述的改进的 miRvana PARIS 方案 (Life Technologies; AM1556) (Mitchell, P. S. 等人. PNAS. 2008 年 7 月 29 日; 105(30):10513-8), 提取总 RNA。将 1mL 人血浆加入等量的 2x 变性缓冲液中, 然后与 10 μ l 10.05 μ M ath-159a 和 40pM Neg-A (UUGUGCGAGCGGAAUGGAAU) (用于标准化和提取效率对照的合成 miRNA) 混合。按照推荐方案 (AM1556), 进行苯酚提取 2 次, 并最后在 70 μ l 水中洗脱总 RNA。

[0158] miRNA 的高通量表达绘图

[0159] 将 45 μ l 纯化的总 RNA 浓缩至 9 μ l, 并用作 nCounter miRNA 表达测定 (Nanostring Technology, Seattle, WA-USA) 的模板。一式三份地使用 3 μ l 浓缩的总 RNA 作为所有样品的起始量, 按照推荐 (Nanostring; C-0009-02) 建立样品制备。由于回收的总 RNA 的量不足以使用标准的基于谱的仪器 (诸如 Nanodrop) 可靠地检测, 采用了一种等体积方案, 其中使用 3 μ l 浓缩的总 RNA 作为所有基于 Nanostring 的测定的起始原料 (也用在 Mitchell, P. S. 等人. PNAS. 2008 年 7 月 29 日; 105(30):10513-8 中)。将反应设置成在 65°C 杂交过夜 16 小时。次日, 根据生产商的方案的推荐, 通过 nCounter Prep Station (Nanostring Technology, Seattle, WA-USA, v. 20081003) 处理样品, 随后通过 nCounter 数字分析仪 (Nanostring Technology, Seattle, WA-USA, v. 20081009) 进行处理。将分析仪分辨率设定在 600FOV。下载数据, 并根据推荐 (nCounter 数据分析指南) 在 Excel 上分析。简而言之, 首先使用提供的阳性测定对照, 针对泳道至泳道变异将数据标准化。这之后使用最高 100 个 miRNA 表达器的计数, 进行总均值标准化。然后检查每个标准化的值, 以确保它比记录的该泳道的背景信号平均值高至少 2 个 SD。将低于该值的任何值转化成零。通过取各个 miRNA 的所有 AD/MCI 和 NC 样品表达值的平均值, 计算倍数变化值。

[0160] 使用 TaqMan qPCR 验证候选生物标志物 miRNA

[0161] 使用高通量 Nanostring 平台鉴别出候选 miRNA 生物标志物, 然后使用茎-环 TaqMan RT-qPCR miRNA 测定 (Life Technologies) 进行验证。简而言之, 用在 1x TE 中的 0.05x 终浓度的特异性 miRNA RT 引物 (miR-301a、miR-1975、miR-191、miR-15b、miR-126、let-7g、let-7d、miR-545、miR-1274、miR-142-3p、miR-600、miR-453、miR-563、miR-106a 和 ath-159a), 建立 RT 引物池。miRNA-特异性的引物和探针购自 Life Technologies。建立含有 6 μ l RT 引物池、0.3 μ l dNTPS (100mM)、3 μ l Multiscribe RT (50U/ μ l)、1.5 μ l 10x 反转录缓冲液和 0.2 μ l RNaseIN (20U/ μ l) 和水的 15 μ l RT 反应物。所有反转录组分被

包含在 miRNA RT 试剂盒 (Life Technologies; #4366596) 中。加入 3 μ l 总 RNA (1:10 稀释) 作为每个样品的模板, 并将反应物在冰上温育 5min, 随后在 16 $^{\circ}$ C 温育 30min、在 42 $^{\circ}$ C 温育 30min 和在 85 $^{\circ}$ C 温育 5min 进行酶灭活。然后在 4 $^{\circ}$ C 储存反应物。然后用相同测定的每种 PCR 引物探针 (20x) 建立第二池预扩增引物, 以 0.2x 的终浓度在 1x TE 中混合。建立含有 2x 预扩增主混合物 (Life Technologies; #4391128)、3.75 μ l 定制的预扩增引物池和水 (将反应体积补足至 22.5 μ l) 的预扩增反应物。然后加入 2.5 μ l RT 产物, 并通过预扩增计划 [在 95 $^{\circ}$ C 保持 10min、在 55 $^{\circ}$ C 保持 2min 和在 72 $^{\circ}$ C 保持 2min, 随后是 12 个在 95 $^{\circ}$ C 保持 15 秒和在 60 $^{\circ}$ C 保持 4min 的循环] 进行循环。这之后在 99.9 $^{\circ}$ C 温育 10min, 然后通过加入 175 μ l 10.1xTE (pH8.0) 来稀释反应物, 并通过倒转进行混合。然后按照在 ABI7500 仪器上的标准方案 (Life Technologies; P/N4364031-Rev D), 将 2 μ l 预扩增产物用于各个标准 TaqMan qPCR 反应 (一式两份)。通过为单个研究 (SDS2.4, Life Technologies) 中的所有反应设定 0.2 的手工阈值和自动基线, 计算 Ct 值, 用于均匀分析。

[0162] 使用 $\Delta\Delta$ Ct 方法 (Life Technologies, 也参见 Livak KJ, Schmittgen TD, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. Methods. (2001) Dec; 25(4):402-8) 进行分析, 用 hsa-miR-106a 和 ath-159a 的几何平均值作为内源对照, 并用 NC 患者的平均相对 Ct 值校准所有单个值。然后计算线性倍数变化, 并使用 Prism (GraphPad Prism Software, San Diego, CA-USA) 绘制在散布图上 (注: 组群 2 的标记验证 (参见实施例 2) 完全如上所述进行, 但是仅使用标记和标准化对照特异性的引物 (miR-301a、miR-191、miR-15b、let-7g、let-7d、miR-545、miR-142-3p、miR-106a 和 ath-159a) 制备 RT 和预扩增引物池。miRNA-特异性的引物和探针在目录编号 000464 (miR-142-3p)、001289 (miR-545)、000380 (let-7d)、000490 (miR-191)、000528 (miR-301a)、000383 (let-7g)、000390 (miR-15b)、000578 (miR-106a) 和 000338 (ath-159a) 下购自 Applied Biosystems)。

[0163] 实施例 2: 标记产生和预测模型建立

[0164] 选择被鉴别和验证为在组群 1 的 AD 和 NC 样品之间具有显著不同表达 (倍数变化 >1.5, p 值 <0.005) 的 miRNA 用于预测模型建立。使用得自组群 1 中的每个 AD (n=11) 和 NC (n=20) 样品的 7 种 miRNA (let-7d、miR-191、miR-301a、miR-545、let-7g、miR-15b、miR-142-3p) 的表达值作为标记建立模型的输入。具体地, 使用得自组群 1 样品的 Taqman qPCR 的 7 种 miRNA 中的每一种的相对 Ct 值 (观察到的各个 miRNA 的 Ct 值减去 Ath-159a 和 miR-106a Ct 值的几何平均值) 建立线性分类器, 以将 AD 样品与 NC 样品分离 (相对 Ct 值显示在表 4 中)。将 7 种 miRNA 的所有可能的非零子集 (127 种标记) 用于线性判别分析 (LDA)。对于 LDA, 在 R 版 2.12.2 的 windows 执行中使用 MASS 软件包 (Venables, W. N. & Ripley, B. D. (2002) Modern Applied Statistics with S. 第 4 版. Springer, New York. ISBN0-387-95457-0)。该包的源代码可得自: <http://cran.r-project.org/web/packages/MASS/index.html>。可以使用或开发其它合适的软件包。还使用软件包“验证” (源代码可得自: <http://cran.r-project.org/web/packages/verification/index.html>; 也参见 Mason, S. J. 和 N. E. Graham. “Areas beneath the relative operating characteristics (ROC) and relative operating levels (ROL) curves: Statistical significance and interpretation,” Q. J. R. Meteorol. Soc. 30 (1982) 291-303), 在

R(2.12.2 版) 中计算曲线下面积 (AUC) 数目。可以使用或开发其它合适的软件包。

[0165] 下面阐述了用于计算预测准确度、灵敏度、特异性和 AUC 数目的输入文件的样品代码和描述。该代码显示了如何使用 3 种 miRNA (“miR-545”、“let-7g”、“miR-15b”) 的代表性标记将未知样品分类为 AD 或正常。基于 7 种经验证的 miRNA 的任意组合来执行分类的代码是类似的, 且应当理解, 可以使用基于这 7 种 miRNA 的任意组合的标记。对于任意组合或对于选自 7 种经验证的 miRNA 的单一 miRNA, 我们可以如下建立线性判别模型: 基于得自组群 1 的训练数据, 确定 LDA 模型的系数。一旦我们已经基于组群 1 确定模型, 我们可以针对任意新样品预测所述样品的来源个体是 AD 个体还是正常个体。为了针对新样品做出预测, 我们需要针对标记中的每种单独 miRNA 测定 miRNA 表达水平。基于这些值, 模型将返回所述新样品是得自具有 AD 的个体的 (“后验”) 概率。该概率的截止值决定了该模型的灵敏度和特异性。就我们的预测而言, 我们确定了在 0.5 的阈值的准确度、灵敏度和特异性 (也就是说, 如果样品为 AD 的概率大于 0.5, 我们的模型将它归类为 AD)。

[0166] 示例性的输入文件可以是 train.txt、validation.txt、train_an.txt 和 validation_an.txt 的形式。“Train.txt”是含有矩阵形式的组群 1 表达谱的文件, 其中各行是样品, 且各列是 miRNA。第一行含有 miRNA 的名称, 且第一列含有样品的名称。“train_an.txt”文件含有样品的注释。存在 2 个列, 其中第一列含有样品的名称, 且第二列含有样品的注释 (在该情况下, “正常”和“AD”)。文件“validation.txt”和“validation_an.txt”含有完全相同格式的组群 2 的数据和注释。变量 prediction\$class 和 prediction\$posteri 含有得自组群 2 的样品的预测的注释和对应的概率。

[0167] 可以用于计算预测准确度、灵敏度、特异性和 AUC 数目的示例性代码如下:

```
[0168] read.file<-function(file, inv)
[0169] {
[0170] data.tmp=read.csv(file, sep="\t", header=T)
[0171] mat<-matrix(0, nrow=nrow(data.tmp), ncol=ncol((data.tmp))-1)
[0172] rownames(mat)=data.tmp[, 1]
[0173] colnames(mat)=colnames(data.tmp)[2:ncol(data.tmp)]
[0174] for(i in 1:nrow(data.tmp))
[0175] {
[0176] mat[i,]=as.numeric(data.tmp[i, 2:ncol(data.tmp)])
[0177] }
[0178] if(inv==T) {mat=t(mat)}
[0179] mat
[0180] }
[0181] library(MASS)
[0182] library(verification)
[0183] train=read.file("train.txt", F)
[0184] validation=read.file("validation.txt", F)
[0185] train_an=read.table("train_an.txt")
[0186] validation_an=read.table("validation_an.txt")
```

```

[0187] validation_an=as.factor(validation_an[,1])
[0188] train_an=as.factor(train_an[,1])
[0189] obs=NULL
[0190] obs[validation_an=="normal"]=0
[0191] obs[validation_an=="AD"]=1
[0192] set=c("miR.545","let.7g","miR.15b")
[0193] train_sp=train[,set]
[0194] ldatrain=lda((train_sp),train_an)
[0195] validation_sp=validation[,set]
[0196] prediction=predict(ldatrain,validation_sp)
[0197] tb=table(validation_an,prediction$class)
[0198] nr=tb[1,1]+tb[2,2]
[0199] accuracy=nr/sum(tb)
[0200] sensitivity=tb[1,1]/(tb[1,1]+tb[1,2])
[0201] specificity=tb[2,2]/(tb[2,1]+tb[2,2])
[0202] auc=roc.area(obs,prediction$posteri[,1])$A

```

[0203] 为了基于 7 种经验证的 miRNA 的任意组合执行分类,可以使用与上面显示的代码类似的样品代码。可替换地,可以使用可用于预测或用于从数据集计算预测准确度、灵敏度、特异性和 AUC 的其它软件代码替代上述的样品代码。

[0204] 实施例 3:miRNA 生物标志物将受试者状态预测为正常或患有阿尔茨海默氏病

[0205] 基于得自含有 20 个 AD 和 17 个 NC 患者的第二组群(“组群 2”) (其得自 PrecisionMed, Inc.) 的人血浆样品的分类结果,评价了如在实施例 2 中所述的使用 7 种经验证的 miRNA (let-7d、let-7g、miR-15b、miR-142-3p、miR-191、miR-301a 和 miR-545) 的所有非零子集的预测模型的性能。组群 2 中的患者的年龄、性别、诊断和 MMSE 评分提供在表 5 中。基于准确度、特异性、灵敏度和曲线下面积 (AUC) 数目,评价预测模型的性能。

[0206] 仅使用 500 μ l 血浆(得自如在实施例 1 中所述的每个组群 2 样品),进行总 RNA 提取,随后进行 TaqMan RT-qPCR 分析。我们实现了显著关联,其中标记 miRNA 在 2 个组群之间的平均倍数变化被非常密切地复制,且具有优良的 p- 值(图 3, 表 6)。

[0207] 然后使用得自每个组群 2 样品的候选 miRNA (let-7d、let-7g、miR-15b、miR-142-3p、miR-191、miR-301a 和 miR-545) 中的每一种的相对 Ct 值(观察到的各个 miRNA 的 Ct 值减去 Ath-159a 和 miR-106a Ct 值的几何平均值)作为标记 miRNA 预测算法的输入(表 7),所述算法基于如上所述的组群 1 数据而开发。所有潜在标记列出在表 8 中。具有 >75% 准确度的标记显示在表 9 中,而具有 >89% 准确度的标记显示在表 10 中。将全部标记准确度计算为错误分类的样品 (AD 或 NC) 的比例。灵敏度表征了预测模型的鉴别真阳性的能力,其在该研究中被计算为正确鉴别的 AD 样品的数目除以 AD 样品的总数。另一方面,特异性为正确分类的 NC 样品(真阴性)的数目除以 NC 样品的总数。将 AUC 计算为在受试者操作特征 (ROC) 曲线下方的面积,该曲线是灵敏度相对于假阳性率的图 (1-特异性)。通过改变预测概率的阈值,产生 ROC 曲线。

[0208] miR-545、let-7g 和 miR-15b 的组合产生了最高特异性 (94.1%)、灵敏度 (95%)

和 AUC(0.953)。标记组合的范围从仅 2 种 miRNA(例如 miR-15b 和 miR-545)一直到 7 种 miRNA(例如 miR-191、miR-301a、miR-545、let-7g、let-7d、miR-15b 和 miR-142-3p)(参见表 8A-8C)。每种标记具有候选 miRNA 生物标志物的不同组合,并产生不同的特异性和灵敏度(参见表 9A-9B)。另外,我们还检查了各个 miRNA 的标记准确度(表 11)。与组合标记相比,各个 miRNA 的标记准确度更低。在特异性方面最佳的独立 miRNA 为 miR-142-3p 和 miR-301a,二者都具有 100% 特异性。但是,与 miR-301a 的 25% 灵敏度相比,miR-142-3p 具有更好的灵敏度(65%)。Let-7g 和 miR-191 具有 95% 的最佳灵敏度,但是仅 miR-191 具有 76% 的增强特异性。miR-191、miR-15b 和 let-7d 具有独立 miRNA 的最佳总准确度。

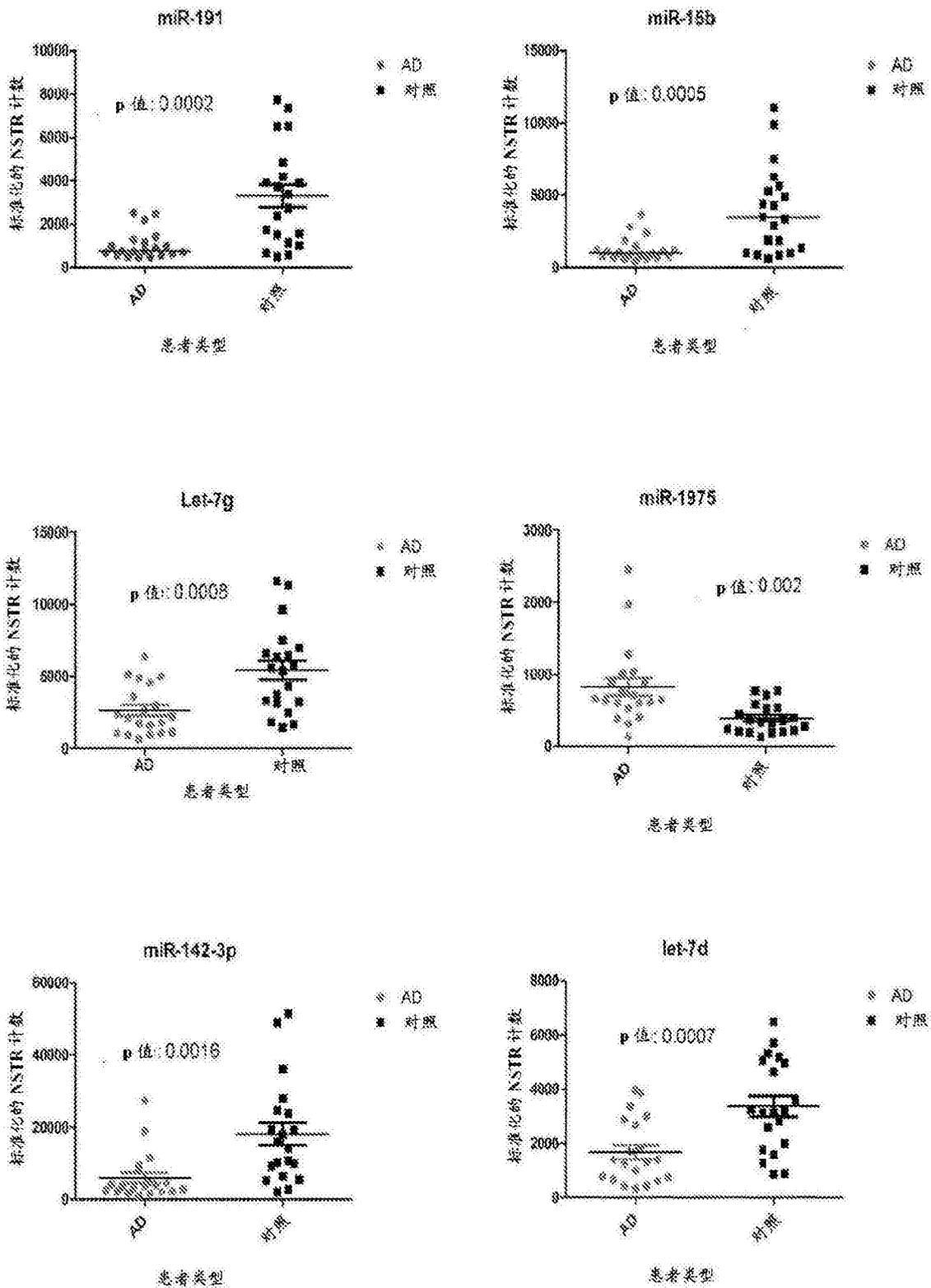
[0001]

序列表

<110> EISAI R&D MANAGEMENT CO., LTD.	
<120> 指示阿尔茨海默氏病的微RNA生物标志物	
<130> ESN-122PC	
<140> PCT/US2012/044202	
<141> 2012-06-26	
<150> 61/501,720	
<151> 2011-06-27	
<160> 10	
<170> PatentIn 3.5版	
<210> 1	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /note="人工序列的描述: 合成的寡核苷酸"	
<400> 1	
uuguggcgag cggauggaa u	21
<210> 2	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> 智人	
<400> 2	
uguaguuuu ccuacuuuu gga	23
<210> 3	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 智人	
<400> 3	
ucagcaaaca uuuuuugugu gc	22
<210> 4	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 智人	
<400> 4	
agagguagua gguugcauag uu	22
<210> 5	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> 智人	
<400> 5	
caacgaauc ccaaaagcag cug	23
<210> 6	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> 智人	
<400> 6	
cagugcaaua guuuuguca agc	23

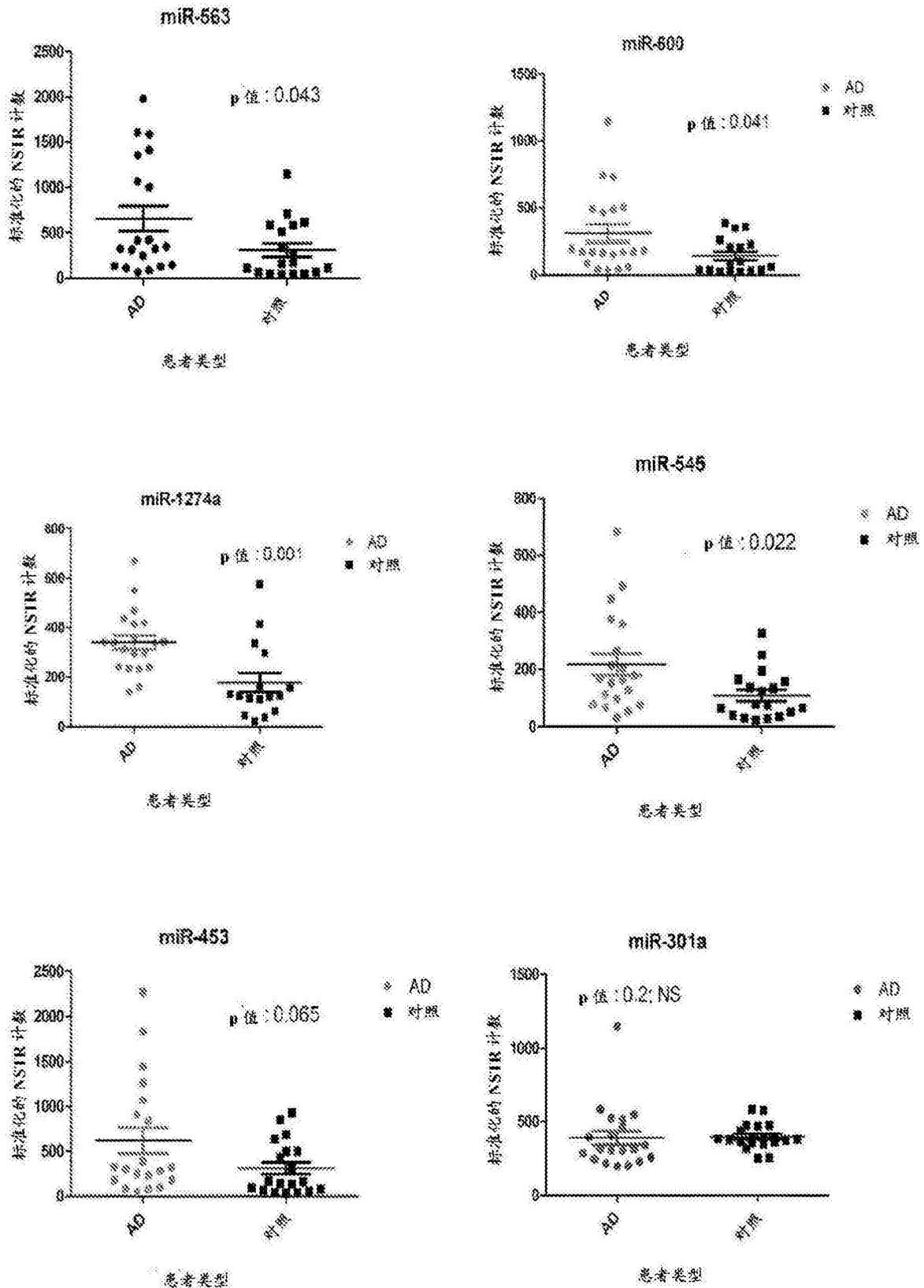
[0002]

<210> 7	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 智人	
<400> 7	
ugagguagua guuuguacag uu	22
<210> 8	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 智人	
<400> 8	
uagcagcaca ucaugguuuu ca	22
<210> 9	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> 智人	
<400> 9	
aaaagugcuu acagugcagg uag	23
<210> 10	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 拟南芥	
<400> 10	
uuuggauuga agggagcucu a	21



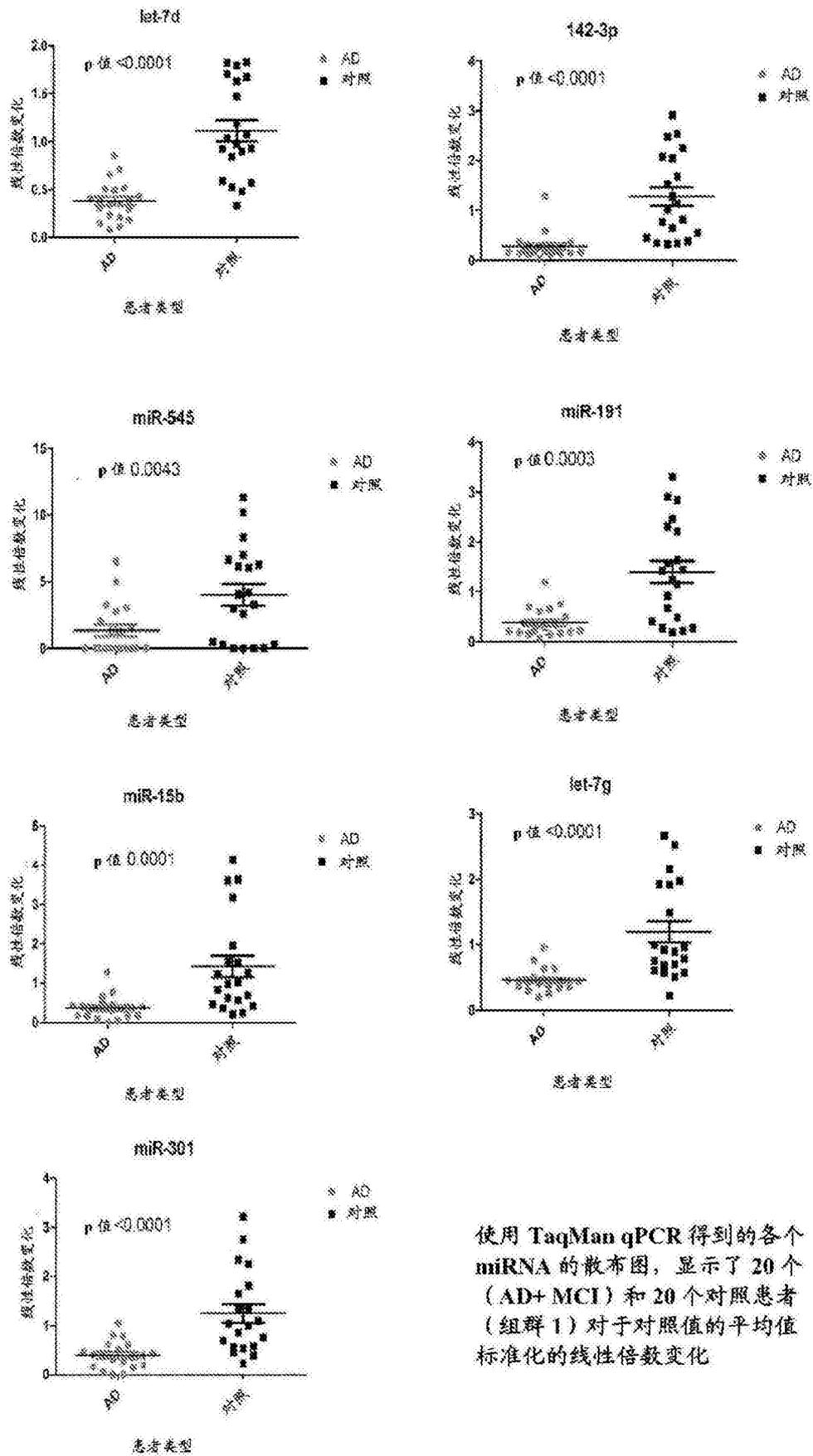
使用 Nanostring 将 20 个 (AD+MCI) 和 20 个对照患者 (组群 1) 标准化以后, 各个 miRNA 值的散布图

图 1A



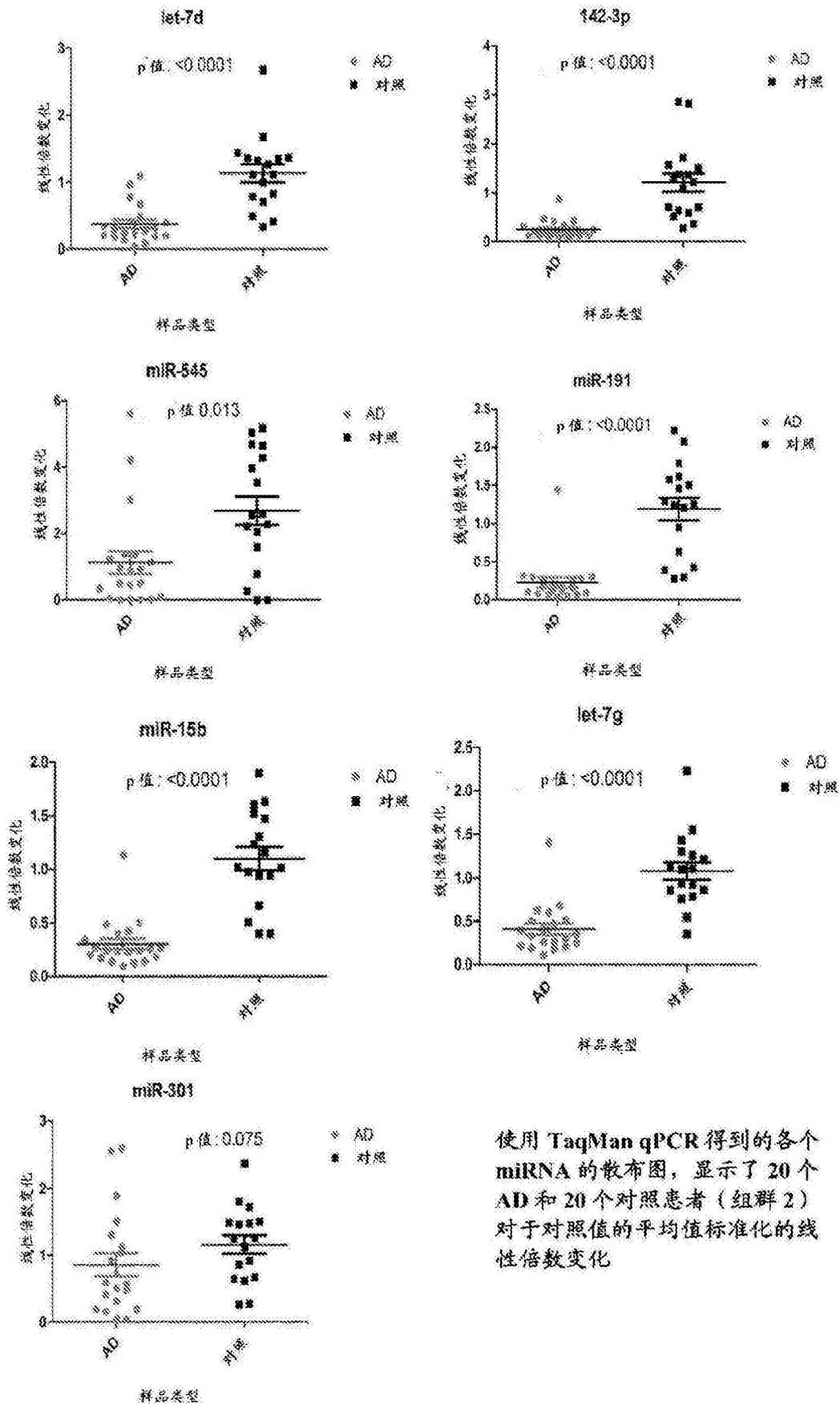
使用 Nanostring 将 20 个 (AD+ MCI) 和 20 个对照患者 (组群 1) 标准化以后, 各个 miRNA 值的散布图

图 1B



使用 TaqMan qPCR 得到的各个 miRNA 的散布图，显示了 20 个 (AD+MCI) 和 20 个对照患者 (组群 1) 对于对照值的平均值标准化的线性倍数变化

图 2



使用 TaqMan qPCR 得到的各个 miRNA 的散布图，显示了 20 个 AD 和 20 个对照患者（组群 2）对于对照值的平均值标准化的线性倍数变化

图 3

表 1: 组群 1 患者样品

样品 ID	诊断	MMSE	就诊	年龄	性别
1	阿尔茨海默氏病 (AD)	17	就诊 3	83	男性
2	阿尔茨海默氏病 (AD)	17	就诊 3	80	男性
3	阿尔茨海默氏病 (AD)	22	就诊 3	91	男性
4	阿尔茨海默氏病 (AD)	16	就诊 3	78	女性
5	阿尔茨海默氏病 (AD)	23	就诊 2	74	男性
6	轻度认知障碍 (MCI)	23	就诊 1	82	女性
7	轻度认知障碍 (MCI)	23	就诊 2	80	女性
8	轻度认知障碍 (MCI)	27	就诊 2	79	女性
9	阿尔茨海默氏病 (AD)	24	就诊 2	88	男性
10	阿尔茨海默氏病 (AD)	18	就诊 2	76	女性
11	轻度认知障碍 (MCI)	26	就诊 1	63	女性
12	阿尔茨海默氏病 (AD)	14	就诊 2	78	女性
13	轻度认知障碍 (MCI)	23	就诊 2	79	女性
14	阿尔茨海默氏病 (AD)	15	就诊 2	74	男性
15	轻度认知障碍 (MCI)	25	就诊 1	80	男性
16	轻度认知障碍 (MCI)	26	就诊 1	74	女性
17	轻度认知障碍 (MCI)	26	就诊 1	84	男性
18	轻度认知障碍 (MCI)	23	就诊 1	76	男性
19	阿尔茨海默氏病 (AD)	15	就诊 2	72	女性
20	阿尔茨海默氏病 (AD)	16	就诊 2	82	女性
21	正常对照 (NC)	30	就诊 4	60	女性
22	正常对照 (NC)	30	就诊 3	71	男性
23	正常对照 (NC)	27	就诊 4	60	男性
24	正常对照 (NC)	30.0	就诊 2	63	女性
25	正常对照 (NC)	30.0	就诊 4	68	女性
26	正常对照 (NC)	30.0	就诊 1	60	男性
27	正常对照 (NC)	30.0	就诊 4	64	男性
28	正常对照 (NC)	27.0	就诊 4	77	男性
29	正常对照 (NC)	30.0	就诊 2	69	男性
30	正常对照 (NC)	30.0	就诊 2	60	女性
31	正常对照 (NC)	30.0	就诊 1	72	男性
32	正常对照 (NC)	30.0	就诊 1	66	女性
33	正常对照 (NC)	30.0	就诊 3	71	男性
34	正常对照 (NC)	29.0	就诊 2	60	女性
35	正常对照 (NC)	30.0	就诊 2	61	男性
36	正常对照 (NC)	30.0	就诊 2	69	男性
37	正常对照 (NC)	30.0	就诊 2	74	女性
38	正常对照 (NC)	30.0	就诊 1	71	女性
39	正常对照 (NC)	27.0	就诊 1	63	男性
40	正常对照 (NC)	30.0	就诊 1	74	女性

表2: miRNA序列和登录号

miRNA 名称	miRBASE#	序列	分类
hsa-miR-142-3p	MIMAT0000434	UGUAGUGUUUCCUACUUAUGGA	生物标志物
hsa-miR-545	MIMAT0003165	UCAGCAAACAUUUAUUGUGUC	生物标志物
hsa-let-7d	MIMAT0000065	AGAGGUAGUAGGUUGCAUAGUU	生物标志物
hsa-miR-191	MIMAT0000440	CAACGGAAUCCCAAAGCAGCUG	生物标志物
hsa-miR-301a	MIMAT0000688	CAGUGCAAUAGUAUUGUCAAGC	生物标志物
hsa-let-7g	MIMAT0000414	UGAGGUAGUAGUUUGUACAGUU	生物标志物
hsa-miR-15b	MIMAT0000417	UAGCAGCACAUCAUGGUUUACA	生物标志物
hsa-miR-106a	MIMAT0000103	AAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG	内源标准化
ath-159a	MIMAT0000177	UUUGGAUUGAAGGGAGCUCUA	混入标准化

表3: 对于组群1样品(20个AD或MCI和20个对照),
候选miRNA生物标志物在Nanostring和TaqMan平台
之间的平均倍数变化值的关联

miRNA 名称	倍数变化 (AD 或 MCI 对照)		p-值 (TaqMan 验证)
	Nanostring	Singleplex TaqMan (验证)	
miR-191	0.316	0.27	0.0003
miR-15b	0.324	0.26	0.0001
Let-7g	0.487	0.39	<0.0001
miR-1975	2.1	ND	-
miR-142- 3p	0.330	0.22	<0.0001
Let-7d	0.498	0.34	<0.0001
miR-563	2.0	ND	-
miR-600	2.15	ND	-
miR- 1274a	2.0	ND	-
miR-545	2.0	0.34	0.0043
miR-453	2.0	ND	-
miR-301a	0.98	0.32	<0.0001
miR-126	0.5	ND	-

表4: 使用组群1样品(11个AD和20个NC)从TaqMan qPCR得到的相对Ct值

样品ID	诊断	let-7d	miR-142-3p	miR-545	miR-191	miR-15b	let-7g	miR-301a
1	阿尔茨海默氏病(AD)	8.540791	2.01874076	10.40079	0.363541	6.302791	3.080041	7.398741
2	阿尔茨海默氏病(AD)	8.987076	3.85737609	11.25863	1.114926	7.078176	3.666526	8.732426
3	阿尔茨海默氏病(AD)	9.023966	3.13166583	11.11847	0.977966	6.820116	3.666466	7.797966
4	阿尔茨海默氏病(AD)	8.654064	3.79946354	11.68221	1.624964	7.634964	3.380114	8.619664
5	阿尔茨海默氏病(AD)	9.792346	4.80644563	22.07135	2.925596	8.910896	4.545396	9.141346
9	阿尔茨海默氏病(AD)	10.48618	5.06017738	20.62383	3.207077	8.149977	4.396227	8.960277
10	阿尔茨海默氏病(AD)	11.15515	7.64369649	20.1158	4.643996	11.05585	4.961646	20.1158
12	阿尔茨海默氏病(AD)	9.416403	4.72435258	12.09635	2.262453	7.971353	4.289153	8.752953
14	阿尔茨海默氏病(AD)	9.344	4.6593001	11.0176	2.2575	8.91005	4.0972	8.44855
19	阿尔茨海默氏病(AD)	11.605	5.29145381	20.56	3.048704	9.079354	4.128504	9.454554
20	阿尔茨海默氏病(AD)	10.2997	5.17454576	19.2392	3.316046	8.943146	4.184996	19.2392
21	正常	7.273151	1.32550086	10.12855	-0.9376	4.593301	1.686081	6.252251
22	正常	8.078551	2.02195104	11.3447	0.394851	5.821251	3.063451	7.484751
23	正常	7.939583	1.34528261	10.10233	-0.05252	7.694383	5.124883	8.397333
24	正常	7.487848	1.76244769	9.922598	-0.1038	5.837348	2.445198	6.760498
25	正常	8.155692	2.19534238	10.71304	0.076742	6.152942	3.517942	7.052242
26	正常	8.142765	2.65471547	11.00932	0.722665	6.426765	3.360265	7.357215
27	正常	7.171389	1.20833879	9.993589	-0.90111	4.602389	1.912039	6.311339
28	正常	7.177904	1.07655392	10.07705	-1.117	4.405304	1.608854	5.801854
29	正常	8.202322	2.35257153	9.674122	0.098522	6.103872	3.173272	7.053222
30	正常	7.29832	0.83892007	9.37852	-0.50273	4.78577	2.03822	7.88337
31	正常	7.785341	2.75779064	13.70764	0.297941	6.460341	3.131991	7.424641
32	正常	8.846498	4.02119775	18.1417	2.786098	7.889448	3.975748	8.281548
33	正常	7.998234	3.52878449	10.65888	1.656234	7.126034	3.020084	8.020384
34	正常	8.962006	3.79490644	14.42796	2.494706	8.515456	3.729506	8.306006
35	正常	8.288766	3.91951614	20.72537	2.491266	8.714366	3.813466	9.563516
36	正常	7.337816	1.63681634	11.15697	-0.54093	5.485716	2.079266	6.623316
37	正常	9.629814	3.90871352	19.87646	3.008464	7.576264	3.809114	8.826014
38	正常	9.100729	3.00967889	14.51308	1.160629	6.719479	3.409629	7.697779
39	正常	7.202129	1.04167868	9.225629	-0.69757	6.967829	2.073929	6.024629
40	正常	8.798427	3.25992712	19.86573	1.904427	7.270777	3.539177	8.613227

表5: 组群2患者样品

样品 ID	诊断	MMSE	就诊	年龄	性别
1	阿尔茨海默氏病 (AD)	14	1	78	女性
2	阿尔茨海默氏病 (AD)	15	1	76	男性
3	阿尔茨海默氏病 (AD)	17	2	75	男性
4	阿尔茨海默氏病 (AD)	13	2	76	女性
5	阿尔茨海默氏病 (AD)	22	2	61	男性
6	阿尔茨海默氏病 (AD)	18	2	70	女性
7	阿尔茨海默氏病 (AD)	9	2	77	女性
8	阿尔茨海默氏病 (AD)	21	1	66	女性
9	阿尔茨海默氏病 (AD)	18	2	67	女性
10	阿尔茨海默氏病 (AD)	15	1	70	女性
11	阿尔茨海默氏病 (AD)	6	2	71	女性
12	阿尔茨海默氏病 (AD)	18	2	74	男性
13	阿尔茨海默氏病 (AD)	17	1	72	男性
14	阿尔茨海默氏病 (AD)	18	1	69	女性
15	阿尔茨海默氏病 (AD)	18	1	76	男性
16	阿尔茨海默氏病 (AD)	15	1	62	男性
17	阿尔茨海默氏病 (AD)	20	1	63	男性
18	阿尔茨海默氏病 (AD)	22	1	59	女性
19	阿尔茨海默氏病 (AD)	18	1	62	男性
20	正常对照 (NC)	30	2	62	男性
21	正常对照 (NC)	30	2	63	女性
22	正常对照 (NC)	30	2	66	男性
23	正常对照 (NC)	30	2	64	女性
24	正常对照 (NC)	29	2	62	女性
25	正常对照 (NC)	30	2	75	女性
26	正常对照 (NC)	24	2	75	男性
27	正常对照 (NC)	30	2	63	女性
28	正常对照 (NC)	30	2	60	女性
29	正常对照 (NC)	30	2	69	男性
30	正常对照 (NC)	30	2	68	男性
31	正常对照 (NC)	30	2	66	男性
32	正常对照 (NC)	30	1	64	女性
33	正常对照 (NC)	30	1	60	女性
34	正常对照 (NC)	30	1	63	男性
35	正常对照 (NC)	29	1	67	男性
36	正常对照 (NC)	30	1	68	男性
37	阿尔茨海默氏病 (AD)	16	2	62	男性

表6: 使用TaqMan qPCR得到的候选miRNA生物标志物
在组群1和组群2之间的平均倍数变化值(对于平均对照值
标准化)的关联

miRNA 名称	倍数变化 (平均) 对照		p-值 (组群 2)
	Singleplex TaqMan (组群 1)	Singleplex TaqMan (组群 2)	
miR-191	0.27	0.2	<0.0001
miR-15b	0.26	0.27	<0.0001
miR- 142-3p	0.22	0.2	<0.0001
Let-7g	0.39	0.38	<0.0001
Let-7d	0.34	0.3	<0.0001
miR- 301a	0.32	0.7	0.075
miR-545	0.34	0.42	0.013

表7: 使用组群2样品(20个AD和17个NC)从TaqMan qPCR得到的相对Ct值

	样品ID	let-7d	miR-191	miR-301a	miR-545	let-7g	miR-15b	miR-142-3p
AD	1	9.824295	3.098545	6.976695	18.7577	5.202645	8.820145	4.099645
AD	2	12.89131	4.622906	8.268856	21.82076	6.257256	9.206956	5.283656
AD	3	10.52676	5.147009	8.432209	16.36401	5.782509	9.066209	5.114409
AD	4	10.92046	4.689505	9.087305	13.52616	5.633905	9.793255	4.450655
AD	5	11.6412	3.934905	9.312455	13.4799	5.857755	9.294355	4.289305
AD	6	10.35952	3.218769	7.737069	12.19887	5.350119	8.726569	3.922869
AD	7	10.42707	2.989324	7.439774	12.60472	4.944774	7.737674	2.931624
AD	8	9.120479	2.975929	6.952529	12.54638	4.571929	8.295279	3.727279
AD	9	10.16382	5.406315	10.69702	22.67052	6.290865	10.12647	5.468315
AD	10	9.805652	3.448502	9.156852	14.09495	5.438552	8.792552	3.973952
AD	11	8.117455	3.774155	9.433655	10.90145	4.812105	8.654655	3.231055
AD	12	8.645876	2.920626	7.949176	12.03438	4.845676	7.780126	2.740676
AD	13	9.641232	3.356682	8.810432	17.63533	4.512332	8.080632	3.316432
AD	14	9.340862	4.311362	9.979162	12.04816	5.784462	8.785662	4.125662
AD	15	8.436459	3.708709	8.162859	12.67881	4.411259	7.979409	2.895409
AD	16	9.406506	5.208356	10.57176	10.42276	5.118006	9.577656	4.690756
AD	17	9.9741	4.8933	12.92685	21.51865	7.0431	8.6345	4.6715
AD	18	10.24597	4.318268	11.00422	13.65562	6.088668	8.856068	4.787318
AD	19	7.943852	0.738802	9.593602	10.009	3.351652	6.555602	1.829852
对照	20	7.615908	0.954308	7.540308	10.27971	4.076908	6.346108	1.246608
对照	21	7.538733	0.724883	8.446883	10.26723	3.465433	6.172333	1.047233
对照	22	7.724992	0.936692	8.541842	11.45884	3.970342	6.816892	2.280492
对照	23	7.317299	0.682199	7.735899	10.51125	3.703249	6.764599	2.131749
对照	24	7.630084	0.428384	7.473584	10.67928	3.936634	6.050384	0.981734
对照	25	9.104217	1.340517	8.891017	14.40147	4.064617	6.708767	2.137517
对照	26	7.908233	0.121183	8.033333	11.14918	3.514683	6.703883	0.851033
对照	27	7.910885	0.215295	8.152195	11.30549	3.211795	6.021045	1.358545
对照	28	7.612373	0.996223	7.756173	11.12332	3.675973	6.520023	1.516723
对照	29	9.364145	3.015545	10.2347	11.8139	5.328945	8.050045	3.499895
对照	30	9.666285	3.083535	9.025385	20.51988	4.704485	8.046835	3.117535
对照	31	8.413839	2.617189	8.951839	12.85379	4.197289	7.335889	2.402489
对照	32	8.558735	2.492235	10.18563	24.08808	4.250335	7.707735	2.604835
对照	33	8.339448	0.579248	7.936598	10.1653	3.573948	6.122248	0.138598
对照	34	7.666189	0.903339	7.761739	10.40154	3.324539	6.429139	1.181639
对照	35	6.645039	0.617089	7.084739	10.12354	2.686589	5.804439	0.117289
对照	36	8.074962	1.928062	7.731412	11.35086	3.708162	6.809062	1.180012
AD	37	10.51991	6.314958	12.35451	12.31906	6.176558	9.642558	4.850308

表8A: 候选miRNA生物标志物标记

miRNA 标记
miR-545 let-7g miR-15b
miR-545 miR-15b
miR-301a miR-545 let-7g miR-15b
miR-191 miR-15b
let-7g miR-15b
miR-191 miR-301a miR-545
miR-301a let-7g miR-15b
miR-191 miR-301a miR-545 miR-15b
miR-191
miR-15b
miR-191 miR-301a
miR-191 miR-545
miR-191 let-7g
miR-301a let-7g
miR-191 miR-301a let-7g
miR-191 miR-545 miR-15b
miR-191 let-7g miR-15b
miR-191 miR-301a miR-545 let-7g
miR-191 miR-301a let-7g miR-15b
miR-191 miR-545 let-7g miR-15b
miR-191 miR-301a miR-545 let-7g miR-15b
let-7d miR-545
let-7d miR-301a miR-545
let-7d miR-545 miR-15b
miR-191 miR-301a miR-15b
miR-191 miR-545 let-7g
miR-301a miR-545 miR-15b
let-7d miR-301a miR-545 miR-15b
let-7d
miR-142-3p
let-7d miR-301a
let-7d miR-142-3p
miR-301a miR-15b
miR-301a miR-142-3p
let-7g miR-142-3p
let-7d miR-191 miR-545
let-7d miR-301a miR-142-3p
let-7d miR-545 miR-142-3p
let-7d let-7g miR-142-3p
miR-301a miR-545 let-7g
miR-301a let-7g miR-142-3p
miR-545 let-7g miR-142-3p
let-7d miR-301a miR-545 miR-142-3p
let-7d miR-301a let-7g miR-142-3p
let-7d miR-545 let-7g miR-15b
let-7d miR-545 miR-15b miR-142-3p
let-7d let-7g miR-15b miR-142-3p
miR-301a miR-545 let-7g miR-142-3p
miR-545 let-7g miR-15b miR-142-3p

表8B: 候选miRNA生物标志物标记

let-7d miR-301a miR-545 let-7g miR-15b
let-7d miR-301a miR-545 miR-15b miR-142-3p
let-7d miR-301a let-7g miR-15b miR-142-3p
miR-301a miR-545 let-7g miR-15b miR-142-3p
let-7d let-7g
let-7d miR-15b
miR-545 miR-142-3p
let-7d miR-301a let-7g
let-7d miR-301a miR-15b
let-7d miR-545 let-7g
let-7d let-7g miR-15b
let-7d miR-15b miR-142-3p
miR-301a miR-545 miR-142-3p
let-7g miR-15b miR-142-3p
let-7d miR-191 miR-301a miR-545
let-7d miR-191 miR-545 let-7g
let-7d miR-191 miR-545 miR-15b
let-7d miR-301a miR-545 let-7g
let-7d miR-301a miR-15b miR-142-3p
miR-301a let-7g miR-15b miR-142-3p
let-7d miR-191 miR-301a miR-545 let-7g
let-7d miR-191 miR-301a miR-545 miR-15b
let-7d miR-191 miR-545 let-7g miR-15b
let-7d miR-191 miR-301a miR-545 let-7g miR-15b
let-7g
miR-545 let-7g
miR-545 miR-15b miR-142-3p
let-7d miR-301a let-7g miR-15b
let-7d miR-545 let-7g miR-142-3p
miR-301a miR-545 miR-15b miR-142-3p
let-7d miR-301a miR-545 let-7g miR-142-3p
let-7d miR-545 let-7g miR-15b miR-142-3p
let-7d miR-301a miR-545 let-7g miR-15b miR-142-3p
let-7d miR-191 let-7g
let-7d miR-191
miR-15b miR-142-3p
miR-301a miR-15b miR-142-3p
let-7d miR-191 miR-15b
let-7d miR-191 miR-301a let-7g
let-7d miR-191 miR-301a
let-7d miR-191 miR-301a miR-15b
let-7d miR-191 miR-545 miR-142-3p
let-7d miR-191 let-7g miR-15b
let-7d miR-191 miR-301a miR-545 miR-142-3p
let-7d miR-191 miR-301a let-7g miR-15b
let-7d miR-191 miR-545 let-7g miR-142-3p
let-7d miR-191 miR-545 miR-15b miR-142-3p
let-7d miR-191 miR-301a miR-545 let-7g miR-142-3p
let-7d miR-191 miR-301a miR-545 miR-15b miR-142-3p
let-7d miR-191 miR-545 let-7g miR-15b miR-142-3p

表8C: 候选miRNA生物标志物标记

let-7d miR-191 miR-301a miR-545 let-7g miR-15b miR-142-3p
miR-301a
miR-301a miR-545
miR-545
let-7d miR-191 miR-142-3p
let-7d miR-191 miR-301a miR-142-3p
let-7d miR-191 let-7g miR-142-3p
let-7d miR-191 miR-15b miR-142-3p
let-7d miR-191 miR-301a let-7g miR-142-3p
let-7d miR-191 miR-301a miR-15b miR-142-3p
let-7d miR-191 let-7g miR-15b miR-142-3p
miR-191 miR-545 let-7g miR-15b miR-142-3p
let-7d miR-191 miR-301a let-7g miR-15b miR-142-3p
miR-191 miR-301a miR-545 let-7g miR-15b miR-142-3p
miR-191 let-7g miR-15b miR-142-3p
miR-191 miR-301a let-7g miR-15b miR-142-3p
miR-191 miR-142-3p
miR-191 miR-301a miR-142-3p
miR-191 miR-545 miR-142-3p
miR-191 let-7g miR-142-3p
miR-191 miR-15b miR-142-3p
miR-191 miR-301a miR-545 miR-142-3p
miR-191 miR-301a let-7g miR-142-3p
miR-191 miR-301a miR-15b miR-142-3p
miR-191 miR-545 let-7g miR-142-3p
miR-191 miR-545 miR-15b miR-142-3p
miR-191 miR-301a miR-545 let-7g miR-142-3p
miR-191 miR-301a miR-545 miR-15b miR-142-3p

表9A: 使用组群2样品进行预测, 具有>75%的准确度的

miRNA标记的准确度、特异性、灵敏度和AUC (曲线下面积)

miRNA 标记	准确度 (%)	灵敏度 (%)	特异性 (%)	AUC
miR-545 let-7g miR-15b	94.5946	95	94.11765	0.952941
miR-545 miR-15b	91.8919	90	94.11765	0.964706
miR-301a miR-545 let-7g miR-15b	91.8919	95	88.2353	0.964706
miR-191 miR-15b	89.18919	95	82.35294	0.961765
let-7g miR-15b	89.18919	95	82.35294	0.941177
miR-191 miR-301a miR-545	89.18919	95	82.35294	0.955882
miR-301a let-7g miR-15b	89.18919	95	82.35294	0.932353
miR-191 miR-301a miR-545 miR-15b	89.18919	95	82.35294	0.955882
miR-191	86.48649	95	76.47059	0.952941
miR-15b	86.48649	85	88.2353	0.955882
miR-191 miR-301a	86.48649	95	76.47059	0.929412
miR-191 miR-545	86.48649	95	76.47059	0.952941
miR-191 let-7g	86.48649	95	76.47059	0.938235
miR-301a let-7g	86.48649	95	76.47059	0.920588
miR-191 miR-301a let-7g	86.48649	95	76.47059	0.932353
miR-191 miR-545 miR-15b	86.48649	95	76.47059	0.952941
miR-191 let-7g miR-15b	86.48649	95	76.47059	0.95
miR-191 miR-301a miR-545 let-7g	86.48649	95	76.47059	0.95
miR-191 miR-301a let-7g miR-15b	86.48649	95	76.47059	0.935294
miR-191 miR-545 let-7g miR-15b	86.48649	95	76.47059	0.952941
miR-191 miR-301a miR-545 let-7g miR-15b	86.48649	95	76.47059	0.95
let-7d miR-545	83.78378	80	88.2353	0.932353
let-7d miR-301a miR-545	83.78378	80	88.2353	0.935294
let-7d miR-545 miR-15b	83.78378	80	88.2353	0.938235
miR-191 miR-301a miR-15b	83.78378	85	82.35294	0.944118
miR-191 miR-545 let-7g	83.78378	95	70.58824	0.952941
miR-301a miR-545 miR-15b	83.78378	75	94.11765	0.967647
let-7d miR-301a miR-545 miR-15b	83.78378	80	88.2353	0.935294
let-7d	81.08108	75	88.2353	0.923529
miR-142-3p	81.08108	65	100	0.955882
let-7d miR-301a	81.08108	75	88.2353	0.923529
let-7d miR-142-3p	81.08108	75	88.2353	0.929412
miR-301a miR-15b	81.08108	70	94.11765	0.941177
miR-301a miR-142-3p	81.08108	65	100	0.955882
let-7g miR-142-3p	81.08108	65	100	0.955882
let-7d miR-191 miR-545	81.08108	75	88.2353	0.929412
let-7d miR-301a miR-142-3p	81.08108	75	88.2353	0.932353
let-7d miR-545 miR-142-3p	81.08108	70	94.11765	0.958824
let-7d let-7g miR-142-3p	81.08108	70	94.11765	0.926471
miR-301a miR-545 let-7g	81.08108	95	64.70588	0.926471
miR-301a let-7g miR-142-3p	81.08108	65	100	0.955882
miR-545 let-7g miR-142-3p	81.08108	70	94.11765	0.967647

表9B: 使用组群2样品进行预测, 具有>75%的准确度的 miRNA标记的准确度、特异性、灵敏度和AUC (曲线下面积)

miRNA 标记	准确度 (%)	灵敏度 (%)	特异性 (%)	AUC
let-7d miR-301a miR-545 miR-142-3p	81.08108	70	94.11765	0.958824
let-7d miR-301a let-7g miR-142-3p	81.08108	70	94.11765	0.932353
let-7d miR-545 let-7g miR-15b	81.08108	70	94.11765	0.923529
let-7d miR-545 miR-15b miR-142-3p	81.08108	70	94.11765	0.958824
let-7d let-7g miR-15b miR-142-3p	81.08108	75	88.2353	0.935294
miR-301a miR-545 let-7g miR-142-3p	81.08108	70	94.11765	0.967647
miR-545 let-7g miR-15b miR-142-3p	81.08108	70	94.11765	0.964706
let-7d miR-301a miR-545 let-7g miR-15b	81.08108	70	94.11765	0.923529
let-7d miR-301a miR-545 miR-15b miR-142-3p	81.08108	70	94.11765	0.958824
let-7d miR-301a let-7g miR-15b miR-142-3p	81.08108	75	88.2353	0.935294
miR-301a miR-545 let-7g miR-15b miR-142-3p	81.08108	70	94.11765	0.961765
let-7d let-7g	78.37838	70	88.2353	0.911765
let-7d miR-15b	78.37838	75	82.35294	0.902941
miR-545 miR-142-3p	78.37838	65	94.11765	0.967647
let-7d miR-301a let-7g	78.37838	70	88.2353	0.908824
let-7d miR-301a miR-15b	78.37838	75	82.35294	0.905882
let-7d miR-545 let-7g	78.37838	70	88.2353	0.926471
let-7d let-7g miR-15b	78.37838	70	88.2353	0.9
let-7d miR-15b miR-142-3p	78.37838	70	88.2353	0.935294
miR-301a miR-545 miR-142-3p	78.37838	65	94.11765	0.967647
let-7g miR-15b miR-142-3p	78.37838	65	94.11765	0.952941
let-7d miR-191 miR-301a miR-545	78.37838	70	88.2353	0.920588
let-7d miR-191 miR-545 let-7g	78.37838	70	88.2353	0.926471
let-7d miR-191 miR-545 miR-15b	78.37838	70	88.2353	0.920588
let-7d miR-301a miR-545 let-7g	78.37838	70	88.2353	0.926471
let-7d miR-301a miR-15b miR-142-3p	78.37838	70	88.2353	0.935294
miR-301a let-7g miR-15b miR-142-3p	78.37838	65	94.11765	0.952941
let-7d miR-191 miR-301a miR-545 let-7g	78.37838	70	88.2353	0.920588
let-7d miR-191 miR-301a miR-545 miR-15b	78.37838	70	88.2353	0.920588
let-7d miR-191 miR-545 let-7g miR-15b	78.37838	65	94.11765	0.914706
let-7d miR-191 miR-301a miR-545 let-7g miR-15b	78.37838	65	94.11765	0.905882
let-7g	75.67568	95	52.94118	0.926471
miR-545 let-7g	75.67568	95	52.94118	0.926471
miR-545 miR-15b miR-142-3p	75.67568	60	94.11765	0.967647
let-7d miR-301a let-7g miR-15b	75.67568	70	82.35294	0.9
let-7d miR-545 let-7g miR-142-3p	75.67568	60	94.11765	0.952941
miR-301a miR-545 miR-15b miR-142-3p	75.67568	60	94.11765	0.967647
let-7d miR-301a miR-545 let-7g miR-142-3p	75.67568	60	94.11765	0.952941
let-7d miR-545 let-7g miR-15b miR-142-3p	75.67568	60	94.11765	0.955882
let-7d miR-301a miR-545 let-7g miR-15b miR-142-3p	75.67568	60	94.11765	0.955882

表10: 使用组群2样品进行预测, 前8个miRNA
标记组合的准确度、特异性、灵敏度和AUC (曲线下面积)

miRNA 标记	准确度	特异性	灵敏度	AUC (曲线下 面积)
miR-545, let7g 和 miR-15b	94.6%	94.1%	95%	0.953
miR-15b 和 miR- 545	91.9%	94.1%	90%	0.96
miR-301a, miR-545, let-7g 和 miR-15b	91.9%	88.2%	95%	0.96
miR-191 和 miR- 15b	89.2%	82.3%	95%	0.96
Let-7g 和 miR-15b	89.2%	82.3%	95%	0.94
miR-191, miR-301a 和 miR-545	89.2%	82.3%	95%	0.96
miR-301a, let-7g 和 miR-15b	89.2%	82.3%	95%	0.93
miR-191, miR-301a, miR-545 和 miR- 15b	89.2%	82.3%	95%	0.96

表11: 使用组群2样品(20个AD和17个对照)进行预测, 每个候选miRNA单独的准确度、特异性、灵敏度和AUC (曲线下面积, 最大可能值为1)

单个miRNA 标记	准确度	灵敏度	特异性	AUC (曲线下 面积)
miR-191	86.5%	95%	76%	0.95
miR-15b	86.5%	85%	88%	0.95
miR-142-3p	81.1%	65%	100%	0.95
Let-7g	75.7%	95%	53%	0.92
Let-7d	81.1%	75%	88%	0.92
miR-301a	59.5%	25%	100%	0.67
miR-545	51.4%	20%	88%	0.74