



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110770586 A

(43)申请公布日 2020.02.07

(21)申请号 201880039652.2

(74)专利代理机构 广州嘉权专利商标事务所有
限公司 44205

(22)申请日 2018.06.07

代理人 黄琳娟

(30)优先权数据

17001015.1 2017.06.15 EP

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.12.13

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2018/065090 2018.06.07

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/228927 EN 2018.12.20

(71)申请人 日内瓦大学

地址 瑞士日内瓦

(72)发明人 J-C·桑切斯

权利要求书1页 说明书9页 附图5页

(54)发明名称

IL-10、S100B和H-FABP标记及其在创伤性脑
损伤检测中的应用

(57)摘要

本发明涉及IL-10、S100B或H-FABP作为生物
标记或这些生物标记的组合及它们在检测创伤
性脑损伤或轻度创伤性脑损伤(mTBI)中的应用。

mTBI中排除CT扫描的单一分析物与模块

日内瓦-塞维利亚 (Geneva-Sevilla) 单一分子			
Pat -/+	111/22		
S100B	Mann U	0.000	
特异性%		18.0	
Pat -/+	111/22		
H-FABP	Mann U	0.013	
特异性%		27.9	
Pat -/+	111/22		
IL-10	Mann U	0.000	
特异性%		27.0	

日内瓦-塞维利亚 (Geneva-Sevilla) 带IL-10模块			
模块 IL-10+S100B+H-FABP+年龄	Pat -/+	111/22	
	Pos	3	56.8
特异性%			
模块 IL-10+H-FABP+年龄	Pat -/+	111/22	
	Pos	2	43.2
特异性%			
模块 S100B+IL-10+年龄	Pat -/+	111/22	
	Pos	2	49.5
特异性%			
模块 S100B+H-FABP+IL-10	Pat -/+	111/22	
	Pos	3	47.7
特异性%			
模块 S100B+IL-10	Pat -/+	111/22	
	Pos	2	38.7
特异性%			
模块 H-FABP+IL-10	Pat -/+	111/22	
	Pos	2	43.2
特异性%			
模块 IL-10+年龄	Pat -/+	111/22	
	Pos	1	27
特异性%			

1. 一种用于筛查疾病或障碍的方法,所述疾病或障碍选自由以下组成的组:样本中的TBI、短暂性脑缺血发作、脑肿瘤、痉挛、癫痫、脑脓肿、脑病和多发性硬化;所述方法包括以下步骤:

在适合的条件下使用样品,并在适合的条件下检测IL10生物标记或至少两种生物标记的组合,其中所述生物标记选自由以下组成的组:IL10、S100B、H-FABP、脂肪酸结合蛋白(FABP)、胶质纤维酸性蛋白(GFAP)、神经元特异性烯醇化酶(NSE)、神经调节蛋白(GAP43)、神经丝蛋白H(NFH)、神经丝蛋白M(NFM)、神经丝蛋白L(NFL)、Tau蛋白、血影蛋白分解产物、泛素羧基末端水解酶-L1(UCH-L1)和血管细胞粘附蛋白1(VCAM)。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中根据权利要求1所述的一种或多种生物标记与标记相结合,所述标记为年龄或定义的GCS,所述GCS优选为13-15。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中根据权利要求1所述的一种或多种生物标记用于筛查定义的年龄或年龄组或者定义的GCS组。

4. 根据权利要求2或3所述的方法,其中所述年龄组具有小于50岁、小于60岁,或大于60岁、大于70岁或大于80岁的年龄;根据权利要求2、3或4所述的方法,其中所述GCS至少为13或至少为15。

5. 根据权利要求1-4中任一项所述的方法,其中所述生物标记选自IL 10、S100B、GFAP、HFABP和UCHL-1或其片段、变体或突变体。

6. 根据权利要求1-5中任一项所述的方法,其中所述样本为血液、血浆、尿液、唾液、眼泪(泪液)或CSF。

7. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述TBI为轻度TBI(mTBI)。

8. 一种组合物,其包含至少两种标记或由至少两种标记组成,所述标记用于检测疾病或障碍,所述疾病或障碍选自由以下组成的组:个体样品中的TBI、短暂性脑缺血发作、脑肿瘤、痉挛、癫痫、脑脓肿、脑病和多发性硬化;其中所述标记选自由以下组成的组:IL10、S100B、H-FABP、脂肪酸结合蛋白(FABP)、胶质纤维酸性蛋白(GFAP)、神经元特异性烯醇化酶(NSE)、神经调节蛋白(GAP43)、神经丝蛋白H(NFH)、神经丝蛋白M(NFM)、神经丝蛋白L(NFL)、S100B、Tau蛋白、血影蛋白降解产物、泛素羧基末端水解酶-L1(UCH-L1)和血管细胞粘附蛋白1(VCAM)。

9. 一种组合物,其包含两种或更多种标记或由两种或更多种标记组成,其中所述标记选自IL10、S100B、GFAP、HFABP和UCHL1或其片段、变体或突变体。

10. 根据权利要求9所述的组合物,其中所述TBI为轻度TBI(mTBI)。

11. 一种试剂盒,其包含根据权利要求1所述的两种或更多种标记或由根据权利要求1所述的两种或更多种标记组成。

12. 一种测定装置,其包含根据权利要求1所述的两种或更多种标记或由根据权利要求1所述的两种或更多种标记组成。

13. 根据权利要求12所述的测定装置,所述测定装置包含生物芯片、生物标记模块、载体或测试条,或者由生物芯片、生物标记模块、载体或测试条组成。

14. 根据前述权利要求中任一项所述的方法、组合物、试剂盒或测定,其中灵敏度高于95%,优选为100%,且特异性高于50%,优选高于55%,更优选高于60%,更优选高于70%。

15. 根据权利要求1所述的方法,所述方法利用一种算法。

IL-10、S100B和H-FABP标记及其在创伤性脑损伤检测中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物标记以及新型生物标记,及它们在诊断脑损伤或脑部相关损伤中的应用,尤其是在诊断轻度创伤性脑损伤(mTBI)中的应用,并且涉及生物标记在个体中用于检测创伤性脑损伤的方法和装置。

背景技术

[0002] 脑损伤在全世界范围内具有很高的发病率。尤其是轻度创伤性脑损伤(mTBI)在世界上有着显著的发病率,并且造成高昂的医疗费用。相比于重度TBI,mTBI不能明显检测到,并因此通常在确诊或排除严重脑损伤之前进行计算机断层摄影(CT)扫描。

[0003] 目前为止,鉴定哪些患有很多神经损伤且尤其是轻度创伤性脑损伤(mTBI)的患者可被安全地送回家仍然是一个挑战。因此,计算机断层摄影(CT)扫描是当今检测这些患者的脑损伤的主要工具。然而,许多扫描是阴性结果且成本高昂。因此,在任何临床诊断准则中,将轻度TBI定义为格拉斯哥昏迷评分(GCS)(Jennet and Teasdale,check,1978)显示为13-15,快速可靠地鉴定颅内损伤患者对避免创伤后并发症和尽量减少继发性脑损伤至关重要(Graham,et al.,1998)。已报道了多项研究旨在采用简单的血液检测先筛查出所有轻度TBI患者以减少非必要的CT扫描次数,并使患者更快出院(Berger et al.,2007;Polido-Figueiredo et al.,2006)。在过去的几年中,S100B尤其被广泛研究并认为其作为mTBI标记具有潜在前景,并被各公司高度推广。然而,其临床应用仍存在争议。轻度TBI的成年患者中,描述了低于0.10 μ g/L临界值的S100B最大仅实现在CT扫描中减少30%。S100B未成为儿科TBI患者的相关预后指标,评估仅作为鉴定儿童患有低风险TBI的辅助手段(Tavarez et al.,2012)。

[0004] 轻度创伤性脑损伤(mTBI,也称为脑震荡,轻微头部创伤,和轻微脑/头部损伤)是一种闭合性头部损伤,定义为钝器创伤造成的结果或者加速/减速力导致精神状态的短暂变化(迷糊、定向障碍或失忆)或小于30分钟的意识丧失。通常,意识丧失非常短暂,且范围介于几秒到几分钟之间。在所有闭合性头部、脑损伤住院病例中,轻度TBI仍然占最大百分比。目前,临床环境中评估TBI患者的主要标准为格拉斯哥昏迷评分(GCS),其评估TBI后的意识水平。轻度创伤性脑损伤很可能只有在受伤或入院时当精神状态发生变化时(病人眩晕、迷糊、失去知觉,GCS得分13-15)才被诊断出来。在美国,入院时,10%的头部损伤患者被分类为重度TBI(GSC得分低于8),10%被分类为中度TBI(GSC得分9-12),剩余80%被分类为轻度TBI(GSC得分13-15)((Narayan RK, Michel ME, et al, J Neurotrauma., 2002)。世界卫生组织指出在欧洲也有类似的比例,治疗头部损伤的患者中估计有70%至90%的被分类为轻度(Cassidy JD et al,2004,Journal of Rehabilitation Medicine)。由于10%的mTBI患者可能会遭受长期的障碍,例如头痛、疲劳、思考困难、记忆问题、注意力缺陷、情绪波动、睡眠障碍、沮丧甚至癫痫发作,这仍然是一个公共健康问题(Jallo and Narayan,2000; Narayan et al,2002)。由于病因复杂,鉴定出哪些mTBI患者可无需干预治疗地安全地送回

家仍然具有挑战性 (Jagoda et al., 2008)。目前,为了应对可能的创伤后并发症和继发性脑损伤,进一步使用如计算机断层摄影 (CT) 扫描和磁共振成像 (如果可用) 等工具对mTBI患者进行诊断 (Graham et al., 1998)。在mTBI患者组中,仅有3-19%显示出异常的CT结果,从而揭示患者的急性颅内病变 (Jagoda et al., 2008; Bazarian et al., 2006; Borg et al., 2004)。这些扫描结果中的其他80%+显示了正常的头部CT结果,表明没有损伤并发症,这样不具成本效益,并且对患者和医务人员来说都是耗时的。

[0005] 应用生物标记已被提议作为一种减少不必要的CT扫描量的手段 (Berger et al. 2007; Poli-de-Figueiredo et al., 2006), 并且用于无法使用CT设备的分散地点。但是目前为止,没有可行的能够给出适当区分大多数患者的测试结果并因此适用于连续筛选的生物标记试验。

[0006] 如上所述,由于用于TBI检测的已知生物标记的可靠性不足和高比例的假阴性结果,如今选择的方法是CT扫描。一种这样的已知生物标记是S100B。

[0007] 近年来,S100B作为mTBI的潜在有前景的血液标记而得到了广泛研究 (Ruan S et al., 2009; Goyal et al. 2013)。然而,其临床应用仍有争议。在mTBI的成年患者中,描述了低于0.10 μ g/L临界值的S100B最大仅实现在CT扫描中减少30% (参考自研究人员)。S100B未成为儿科TBI患者的相关预后指标,评估仅作为鉴定儿童患有低风险TBI的辅助手段 (Tavarez et al., 2012; Filippidis et al., 2010)。

[0008] S100B是一种低分子量 (9-13kDa) 的非普遍存在的Ca²⁺调节蛋白,涉及例如酶活性、细胞骨架元素稳态、细胞生长和分化以及Ca²⁺体内平衡的调节 (Donato R., 2003)。它主要在中枢神经系统 (CNS) 中被发现,并由胶质细胞分泌 (Donato R., 2003)。由于其参与钙稳态,它具有神经保护功能,例如在缺乏葡萄糖的情况下通过增加细胞钙浓度防止线粒体衰歇和细胞死亡 (Barger et al., 1995),或者促进神经突起生长和星形细胞增殖 (Reeves et al., 1994)。显著提升的S100B水平与严重的TBI相关,并可反映损伤后持续的结构损伤和细胞死亡 (Ingebrigtsen et al. 2002; Missler et al., 1999)。

[0009] 在类似mTBI的损伤中,如果出现mTBI的患者被允许离开医院然后遭受严重的并发症,或甚至由于误诊而死亡,鉴于不利后果,人们不能冒巨大百分比的假阴性风险。因此,为这类测试定义的临界值需要偏向于非常高的特异性 (接近100%),这样则可能因而导致非常低的灵敏度。这种限制已使得已知的mTBI个体生物标记对于临床机构中的常规诊断而言是不可行的。

[0010] 鉴于医疗保健方面的成本压力以及CT扫描的高昂费用,找到一种可替代、可靠并具有成本效益的途径来区分潜在的mTBI患者是非常可取和长期迫切需要的。

[0011] 因此,本申请一个目标是提供一种可替代或新型的可行的生物标记,用于检测或/和分类任何与大脑相关的创伤状态,尤其是mTBI,及用于有用和可靠的试验方法和装置并因此用于可在临床或非临床环境中使用的mTBI诊断,或者用于改进已知的神经或mTBI筛查和分析的方法。

发明内容

[0012] 一方面,本发明提供了通过使用生物标记IL 10或标记的组合来分类或检测脑损伤或障碍或疾病的方法、组合物、试剂盒、测定,所述脑损伤或障碍或疾病为例如TBI、短暂

性脑缺血发作、脑肿瘤、痉挛、癫痫、脑脓肿、脑病和多发性硬化,所述标记为例如IL 10、脂肪酸结合蛋白(FABP)、胶质纤维酸性蛋白(GFAP)、神经元特异性烯醇化酶(NSE)、神经调节蛋白(GAP43)、神经丝蛋白H(NFH)、神经丝蛋白M(NFM)、神经丝蛋白L(NFL)、S100B、Tau蛋白、血影蛋白分解产物、泛素羧基末端水解酶-L1(UCH-L1)和血管细胞粘附蛋白1(VCAM)。

[0013] 另一方面,本发明提供了生物标记IL 10或选择血脑生物标记IL 10的组合,可选地与已知(特异性不足)的S100B组合,用于可靠地检测如疾病或障碍的脑损伤,所述脑损伤选自由以下组成的组:样本中的TBI、短暂性脑缺血发作、脑肿瘤、痉挛、癫痫、脑脓肿、脑病和多发性硬化,并且尤其是用于mTBI检测。尤其是,将这些生物标记在模块(panels)中组合并调整,以在固定灵敏度为95%或100%下获得50%以上的特异性。这将允许临床医生以及现场医疗急救人员更好地管理检测到的疾病或障碍,尤其是轻度TBI患者,从而潜在地减少了CT扫描,还减少了与脑损伤延迟诊断相关的后果。

[0014] 在另一方面,本发明涉及至少两种生物标记的组合,其中所述生物标记选自IL 10、S100B、GFAB、HFABP和UCHL-1或其片段、变体或突变体。

[0015] 在另一方面,本发明涉及装置,例如,生物标记模块,以更好地检测早期创伤性脑损伤(TBI)病变,或者补充S100B以排除轻度TBI患者的CT扫描。

[0016] 在其它方面,本发明涉及用于检测如TBI和mTBI等患者身体状况的方法和装置。

[0017] 在另一方面,本发明涉及利用算法对样本中个体的身体状况进行检测的方法和装置。

附图说明

[0018] 图1示出了IL-10(27%)、H-FABP(27%)和S100b(18%)的特异性比较结果。灵敏度设置为100%。这证实了H-FABP先前的结果,其比S100b具有更好的排除CT阴性患者的性能,同时也证实了IL-10比S100b具有更优的能力。当各分子组合成三个分子的模块时,特异性增加至57%(S100b、HFABP、IL-10和年龄),当两个分子(S100b、IL-10和年龄)组合时,特异性增加至49%。

[0019] 图2示出了IL10在一组mTBI患者中用于100%灵敏度的结果(特异性27%)。

[0020] 图3示出了IL10在一组mTBI患者中用于100%灵敏度的结果(特异性28%)。

[0021] 图4示出了S100b在一组mTBI患者中用于100%灵敏度的结果(特异性28%)。

[0022] 图5示出了S100b与IL10组合在一组mTBI患者中用于100%灵敏度的结果(特异性39%)。

[0023] 图6示出了HFABP与IL10组合在一组mTBI患者中用于100%灵敏度的结果(特异性43%)。

[0024] 图7示出了S100b与HFABP组合在一组mTBI患者中用于100%灵敏度的结果(特异性46%)。

[0025] 图8示出了S100b、HFABP与IL-10组合在一组mTBI患者中用于100%灵敏度的结果(特异性57%)。

具体实施方式

[0026] 本发明涉及用于筛查疾病或障碍的方法,所述疾病或障碍选自由以下组成的组:

在样品(样本)的TBI、短暂性脑缺血发作、脑肿瘤、痉挛、癫痫、脑脓肿、脑病和多发性硬化；所述方法包括以下步骤：在适合的条件下使用样品，并在适合的条件下检测IL10或至少两种生物标记，其中所述生物标记选自由以下组成的组：IL10、S100B、H-FABP、脂肪酸结合蛋白(FABP)、胶质纤维酸性蛋白(GFAP)、神经元特异性烯醇化酶(NSE)、神经调节蛋白(GAP43)、神经丝蛋白H(NFH)、神经丝蛋白M(NFM)、神经丝蛋白L(NFL)、S100B、Tau蛋白、血影蛋白分解产物、泛素羧基末端水解酶-L1(UCH-L1)和血管细胞粘附蛋白1(VCAM)。

[0027] 本发明有潜力对脑损伤(尤其是mTBI)管理中的临床实践产生世界性的广泛影响。本发明可以提供使用简便、可靠且安全的标记诊断模块。

[0028] 以下对含有IL10、S100B、GFAP、UCHL-1和H-FABP这些分子中的至少两种的模块的描述结果强调了，护理测试点(POCT)或阵列可以方便地用于诊断目的。创伤性脑损伤(TBI)是全世界40岁以下成人和儿童死亡和残疾的主要原因。准确测定脑部损伤后的初期脑损伤对于建立神经系统预后和平衡治疗方案的风险和益处至关重要。本发明有利地提供了这种工具和方法。

[0029] 在优选实施例中，本发明涉及一种方法，其中所述的生物标记选自IL10、S100B、GFAP、UCHL-1和H-FABP或其片段、变体或突变体。两种或三种标记的组合尤其有用。

[0030] 出乎意料且令人惊讶的是，发明人发现通过采用本发明至少两种标记的组合，可以提供一种可靠和使用简便的方法，以可靠地分析样品，从而排除以mTBI为特征的个体的脑损伤并发症，从而避免昂贵的CT扫描或者甚至移送到能进行CT扫描的中心。

[0031] 特别地，本发明显示，血液IL-10单独或与其他已知TBI生物标记物(例如H-FABP、S100b、GFAP、UCHL-1)和临床数据(GCS、年龄)结合用，将允许临床医生能够更好地管理轻度TBI患者，从而潜在地减少CT扫描(灵敏度100%的特异性约为60%)。

[0032] 未曾预测的是，本发明的标记与某些标记的特定选择或/和某些标记的组合可应用于提供一种可靠和特异的方法以测定本文所述的脑损伤或障碍或疾病或医疗并发症，尤其是TBI和mTBI。本发明不仅在这种分析且尤其是mTBI分析的成本方面具有积极影响，而且代表了在该医疗领域内的一种使用简便且快速的方法。

[0033] 特别地，本发明的优点在于其提供了使用IL10模块，或IL10、S100B、GFAP、H-FABP和UCHL-1中的至少两种标记的模块，用于灵敏度100%下提高特异性(>50%)以排除脑损伤或其他并发症和轻度TBI患者的CT扫描。

[0034] 将本领域标记与本发明标记的可用状态进行直接比较，使得本发明的优点尤为明显：根据本发明的优选实施例，采用至少2种新的生物标记模块，在灵敏度100%下，相较于单独的S100B标记分析的18%，56%的mTBI患者可以直接出院。

[0035] 另一个有利实施例为将如本文所述的分子标记与如年龄或GCS等其它标记相结合。特别地，在特征为GCS得分13以上或15以上的特定患者组中或者在特定的年龄组(例如60岁以上，65岁以上，70岁以上)中，根据本发明应用和采用这些标记，将产生显著阳性和高度可靠的测试结果。尤其如此的是，以这种方式，本发明明确实现了通过使用较少分子标记就能够获得可靠的测试结果，这不仅具有技术优势，而且从成本角度而言也是有利的。

[0036] 本发明提供了意想不到的优点：本文所述的脑损伤和具体医疗并发症不仅可在设备齐全的医院进行鉴定和筛查，而且可在任何地方使用简单的测试装置进行鉴定和筛查，且无需使用合格的医务人员。

- [0037] 在下文中,对本发明的特定术语作出更详细的定义。
- [0038] “脑损伤”是指对头部或个体的突然冲击所造成的患者或个体的任何状态。具体的脑损伤为TBI或mTBI。
- [0039] “TBI”在本发明的意义上是指参考现有技术由上述创伤事件造成的任何脑损伤。
- [0040] “识别”或“鉴定”或“分类”在本发明的意义上是指对个体样本的分析,以评估个体是否有脑损伤,尤其是TBI或mTBI;例如,TBI和mTBI的鉴定可以通过使用CT扫描或MRI分析进行验证。
- [0041] “诊断方法”或“诊断”在本发明的意义上是指,本领域通常已知的用于检测、可视化和/或定量测试结果的具有合适方法步骤顺序的任何有用的方法。
- [0042] “测定”在本发明的意义上是指,本领域通常已知的用于检测TBI或mTBI的任何方法,如ELISA或用于检测生物标记的任何其它标准方法。
- [0043] “装置”在本发明的意义上是指根据本发明可用于测定TBI或mTBI检测的生物标记或生物标记模块的组合。实例为载板、测试条、生物芯片阵列或者本领域已知的类似物。
- [0044] “标记”或“生物标记”或“分子标记”或“分子生物标记”在本发明的意义上是指检测样本中脑损伤的任何有用的生物标记,所述样本优选为血液、血浆、唾液、泪液、脑脊液或尿液;脑损伤优选为创伤性脑损伤(TBI)或如下文所述的其它障碍;优选地,至少两种标记的组合适用于检测轻度TBI(mTBI);所述标记在合适的测定装置中使用,其中优选地,选择性设定为100%,特异性优选高于40%,甚至更优选高于50%,高于55%,高于58%、60%或70%。
- [0045] 胶质细胞、神经细胞或血管细胞的任何标记都符合作为本发明意义上的标记。本发明优选的标记为:
- [0046] IL10(白细胞介素-10)
- [0047] 脂肪酸结合蛋白(FABP)
- [0048] 胶质纤维酸性蛋白(GFAP)
- [0049] 神经元特异性烯醇化酶(NSE)
- [0050] 神经调节蛋白(GAP43)
- [0051] 神经丝蛋白H(NFH)
- [0052] 神经丝蛋白M(NFM)
- [0053] 神经丝蛋白L(NFL)
- [0054] S100B
- [0055] TAU
- [0056] 血影蛋白降解产物
- [0057] 泛素羧基末端水解酶-L1(UCH-L1)
- [0058] 血管细胞粘附蛋白1(VCAM)
- [0059] 除了上述“标记”之外,一种、两种、三种甚至更多标记可与年龄或GCS评分相结合以定义患者或个体,这也在本发明的范围内。因此,在本发明的意义中,年龄和GCS可表示为“标记”。在本发明的意义中,年龄和GCS等这样的标记也可用于定义患者亚组或个体亚组。优选的年龄组为50岁、60岁、70岁以下,或者超过50岁、60岁、65岁、70岁。GCS得分13到15可优选地用于定义患者亚组,并且可与本文定义的任何其他标记结合使用。以这种方式,可将

个体分层，并可形成患者组，以适应和提高测试性能，或者以减少实现可靠的测试结果所需的标记，以及优选地调整检测方法的特征或者测试试剂盒的组分。

[0060] 标记“模块”在本发明的意义上是指至少两种生物标记的组合，优选两种或三种标记，在合适的装置或设备中组合使用。

[0061] “灵敏度”在本发明的意义上是指TBI或mTBI分析中的真阳性测定结果。优选地，根据本发明测定中的灵敏度设定为95%至100%，或100% (即无假阴性诊断)。

[0062] “特异性”在本发明的意义上是指在鉴定TBI或mTBI的测定中所谓的真阴性率。特异性优选目标为至少50%，优选更高，例如58%，60%，65%，70%。

[0063] “样本”或“样品”在本发明的意义上是指，用于进行鉴定TBI (优选鉴定mTBI) 的测定或检测方法的任何有用的液体或组织。优选地，所述样本为取自个体的血液、血浆或尿样本。根据通常已知的方法处理样本以保持或使其可用于根据本发明的标记分析。

[0064] 在下文中将描述本发明的优选实施例。

[0065] 在优选实施例中，本发明涉及一种方法，其中样本为血液、血浆、唾液、泪液、CFS或尿液。血液取样是非常简单的样本采集方法，因此，采用简单的方式就能很容易实施根据本发明的方法。

[0066] 根据本发明方法可应用于本文所述的所有障碍、疾病或医疗并发症，并且对于TBI 尤其对于轻度TBI (mTBI) 特别有用。

[0067] 在替代实施例中，本发明涉及一种组合物，包含至少两种可用于个体样本的TBI检测的标记或由至少两种可用于个体样本的TBI检测的标记组成，其中所述的标记选自由以下组成的组：IL10、脂肪酸结合蛋白 (FABP)、胶质纤维酸性蛋白 (GFAP)、神经元特异性烯醇化酶 (NSE)、神经调节蛋白 (GAP43)、神经丝蛋白H (NFH)、神经丝蛋白M (NFM)、神经丝蛋白L (NFL)、S100B、Tau蛋白、血影蛋白降解产物、泛素羧基末端水解酶-L1 (UCH-L1) 和血管细胞粘附蛋白1 (VCAM)。

[0068] 有利地，所述组合物包含两种或三种标记或由两种或三种标记组成，其中所述标记选自IL10、S100B、GFAP、HFABP和UCHL1或其片段、变体或突变体。

[0069] 在替代实施例中，本发明涉及一种试剂盒，包含上述标记中任意两种或三种标记或者由上述标记中任意两种或三种标记组成。

[0070] 进一步地，本发明涉及一种测定装置，包含上述标记中任意两种或三种标记或者由上述标记中任意两种或三种标记组成。优选地，所述测定装置包含生物芯片、载体上的生物标记模块或测试条，或者由生物芯片、载体上的生物标记模块或测试条组成。

[0071] 除了上述实施例之外，还可在患者上将本发明的方法和装置与非标记观察结果相结合，作为决策矩阵的一部分，例如脑损伤评分、瞳孔扩张、认知测试等等，这将致使作出关于使个体住院或出院的可靠决策。

[0072] 本发明还包括在可实现的测试结果方面具有优势的标记组合的亚组。这些亚组为两种、三种、四种或五种标记的组合，所述标记选自由IL10与由以下任何一种结合组成的组：FABP、GFAP、NSE、GAP43、NFH、NFM、NFL、S100B和VCAM。特别地优选为IL10、FABP、GFAP、NSE、GAP43、NFH、NFM、NFL、S100B和VCAM中的两种标记的组合，更优选的组合为IL10、S100B、VCAM与H-FABP，或IL10、FABP与GFAP，或IL10、UCHL-1、VCAM与H-FABP，或GFAP、VCAM与H-FABP，或UCHL-1、VCAM与H-FABP，或IL10、S100B、VCAM与UCHL-1，或S100B、IL10与H-FABP，或

IL10、NSE、GAP43与NFH,或NFM、NFL与S100B,或IL10、FABP、GFAP与NSE,或GAP43、NFH与NFM,或NFL、S100B与UCHL-1,或IL10、GAP43、NFH与NFM,或NFL、S100B与UCHL-1,或MO、GFAP、NSE与GAP43。

[0073] 令人惊讶的是,结果显示模块中IL-10、H-FABP、S100b和年龄中的至少两种的组合,可以在灵敏度100%下提高特异性约60%,以排除轻度TBI患者的CT扫描。

[0074] 本发明使用IL-10、S100b、HFABP和年龄中的两种或3种标记组合的模块,在灵敏度100%下提高特异性(>50%)以排除轻度TBI患者的CT扫描。

[0075] 本发明将在以下实施例中进行更详细说明,以下实施例旨在说明并无任何限定,并且其仅代表本发明的优选实施例。

[0076] 从描述本发明的实验部分可以明显看出,本发明的优势是实现了非常可靠的测试结果。根据优选的实施例,其提供了一种方法、组合物、试剂盒或测定,其中灵敏度高于95%,优选为100%,且特异性高于50%,优选高于55%,更优选高于60%,更优选高于70%。

[0077] 在替代实施例中,本发明提供了用于在样品中分析身体状况的方法或系统,其中在适当的条件下应用本文所述的医疗装置,利用本文所述的任何生物标记以分析本发明的任何障碍或疾病,并且利用算法,其中测试结果通过算法进一步定义,例如,定量算法。

[0078] 在优选实施例中,这种方法或系统的步骤如下:

[0079] 该方法和系统能够在个体样本中分析至少两种测试结果,用于诊断身体状况(如脑损伤),该系统包括:

[0080] (a) 至少两个数据库,包含:

[0081] (i) 从第一诊断测试收集的第一测试结果;

[0082] (ii) 从不同于第一诊断测试的第二诊断测试收集的第二测试结果;

[0083] (iii) 可选地,从不同于先前诊断测试的后续诊断测试收集的后续测试结果;

[0084] (iv) 可选地,次级受试者观察结果或测量结果;

[0085] (v) 与第一诊断测试、第二诊断测试、后续诊断测试以及受试者观察结果或测量结果相关联的一个或多个诊断临界值,其中这种临界值被共同整合以评估脑损伤状态的概率。

[0086] (b) 一个或多个可操作地编码为自动运行的处理器:

[0087] (i) 基于测试结果的数据库,应用解释算法来生成受试者结果坐标。

[0088] (ii) 可选地,应用第二解释算法来生成受试者结果坐标中的错误概率。

[0089] 实施例

[0090] 以下实施例旨在更详细地说明本发明,而不能理解为任何意义上的限定。

[0091] 在TBI发病后的6小时内对患者的血液IL10、H-FABP和S100B含量进行量化并采用ELISA分析进行比较,所述患者在CT扫描中呈现或不呈现脑损伤,格拉斯哥昏迷评分>13。研究人群总共由97个人组成。

[0092] 采用来自Mesoscale (US) 的IL10、来自Hycult (NL) 的H-FABP和来自Abnova (TW) 的S100B进行ELISA。每一份血浆样本均一式两份测定并随机分布在平板上。

[0093] 蛋白质水平先以相对荧光单位(RFU)表示,并使用重组蛋白在相同板上得到的校准曲线计算浓度。使用版本19.0.0的IBM SPSS统计软件(IBM公司, NY, USA)进行统计分析。为评估蛋白质区分不同群体的能力,进行了非参数测试。对年龄和性别匹配的数据进行了

Wilcoxon匹配对测试,对非匹配数据进行Mann-Whitney测试。对于包含两个以上组的数据,使用单因素方差分析Kruskal-Wallis检验。对受试者工作特征(ROC)曲线进行分析,并从曲线获得临界(CO)点。选择最佳临界值以提供灵敏度100%下的最高特异性。利用多元逻辑回归分析与作为CT扫描排除标记的血浆S100B、H-FABP和IL10水平值进行比较。

[0094] 在这些实验中,发明人成功提供了在临床环境中很有用的生物标记或生物分子的模块(即两种或三种构成的一小组)。我们可以表明,模块的每个成员提供不同的诊断角度,并集合它们致使更准确的预测。模块每个成员符合几个标准:首先,其本身必须具有预测能力,即其必须能够在某程度上区分疾病类型。其次,它必须易于测量且具有高重现性。再次,它应该在由网络分析发现的生物进程中发挥重要作用。

[0095] 根据本发明,将IL10,或IL10与S100B或H-FABP的组合鉴定为在这样一种模块分析中特别有用。我们开发了PanelomiX工具箱,它能够从少量分子中提取最佳模块,并提供用于疾病类型分类的简单的容易解释的阈值规则集。基于规则的分类仅对通过特定的阈值分子的数量进行计数。它模拟许多临床评分所建立的方式,并因此易于让临床环境中工作的人所理解。简单来说,使用所有可用的参数通过迭代排列反应计算获得优化的临界值。每个临界值按2%增量分位数进行迭代变化,每次迭代后测定特异性直至在100%灵敏度下实现了最大的特异性。

[0096] 结果

[0097] 下图1(左)显示了IL-10(27%)、H-FABP(27%)和S100b(18%)的特异性比较结果。灵敏度设定为100%。这证实了先前关于H-FABP在排除CT阴性患者方面比S100b具有更好表现的结果,同时也证实了IL-10比S100b表现好的能力。

[0098] 当分子组合成三个分子的模块时,特异性增加至57%(S100b、H-FABP、IL-10和年龄),当两个分子组合时(S100b、IL-10和年龄),特异性增加至49%。

[0099] 在mTBI中排除CT扫描的单一分析物与模块

日内瓦-塞维利亚 (Geneva-Sevilla) 单一分子		
S100B	Pat -/+ Mann U 特异性%	111/22 0.000 18.0
H-FABP	Pat -/+ Mann U 特异性%	111/22 0.013 27.9
IL-10	Pat -/+ Mann U 特异性%	111/22 0.000 27.0

日内瓦-塞维利亚 (Geneva-Sevilla) 带IL-10模块		
模块 IL-10+S100B+H-FABP+年龄	Pat -/+ Pos 特异性%	111/22 3 56.8
模块 IL-10+H-FABP+年龄	Pat -/+ Pos 特异性%	111/22 2 43.2
模块 S100B+IL-10+年龄	Pat -/+ Pos 特异性%	111/22 2 49.5
模块 S100B+H-FABP+IL-10	Pat -/+ Pos 特异性%	111/22 3 47.7
模块 S100B+IL-10	Pat -/+ Pos 特异性%	111/22 2 38.7
模块 H-FABP+IL-10	Pat -/+ Pos 特异性%	111/22 2 43.2
模块-IL-10+年龄	Pat -/+ Pos 特异性%	111/22 1 27

[0100]

[0101] 上述关于IL10单独或与S100B和H-FABP中的至少一种组合的模块的结果(所述模块为这些分子中至少两种)或所示三种分子的组合的结果,突出说明了它们可以在POCT或者连续诊断阵列中简便使用。

[0102] 因此,令人惊讶和意想不到的优势是,使用S100B、HFABP和IL10中两种或三种标记,在灵敏度100%下具有提高的特异性(>50%),以排除轻度TBI患者的CT扫描。

在 mTBI 中排除 CT 扫描的单一分析物与模块

日内瓦-塞维利亚 (Geneva-Sevilla) 单一分子		
S100B	Pat -/+ Mann U	111/22 0.000
	特异性%	18.0
H-FABP	Pat -/+ Mann U	111/22 0.013
	特异性%	27.9
IL-10	Pat -/+ Mann U	111/22 0.000
	特异性%	27.0
日内瓦-塞维利亚 (Geneva-Sevilla) 带 IL-10 模块		
模块 IL-10+S100B+H-FABP+年龄	Pat -/+ Pos 特异性%	111/22 3 56.8
模块 IL-10+H-FABP+年龄	Pat -/+ Pos 特异性%	111/22 2 43.2
模块 S100B+IL-10+年龄	Pat -/+ Pos 特异性%	111/22 2 49.5
模块 S100B+H-FABP+IL-10	Pat -/+ Pos 特异性%	111/22 3 47.7
模块 S100B+IL-10	Pat -/+ Pos 特异性%	111/22 2 38.7
模块 H-FABP+IL-10	Pat -/+ Pos 特异性%	111/22 2 43.2
模块-10+年龄	Pat -/+ Pos 特异性%	111/22 1 27

图1

IL-10
GCS 15 + 1 s \leq 6h
灵敏度100%下特异性27%

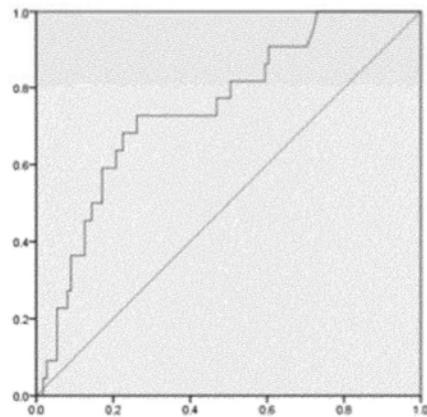


图2

H-FABP
GCS 15 + 1 s \leq 6h
灵敏度100%下特异性28%

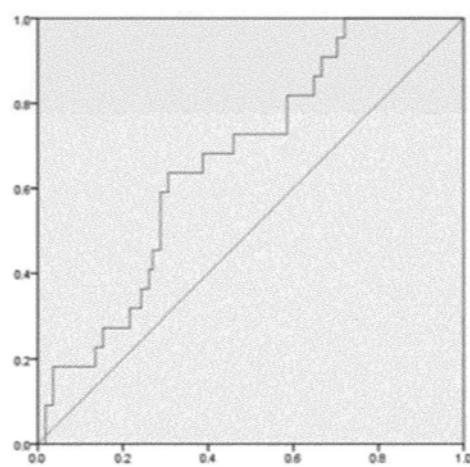


图3

S100B
GCS 15 + 1 s \leq 6h
灵敏度100%下特异性18%

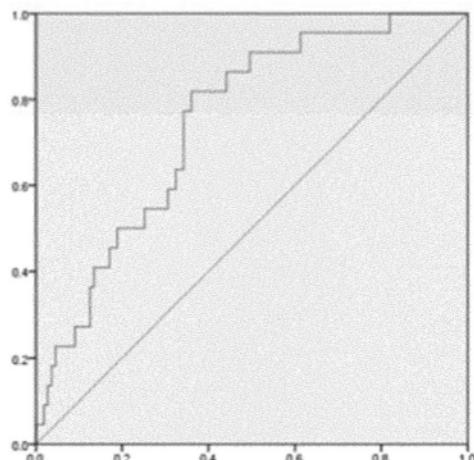


图4

模块 S100B IL-10
GCS 15 + 1 s \leq 6h
灵敏度100%下特异性39%

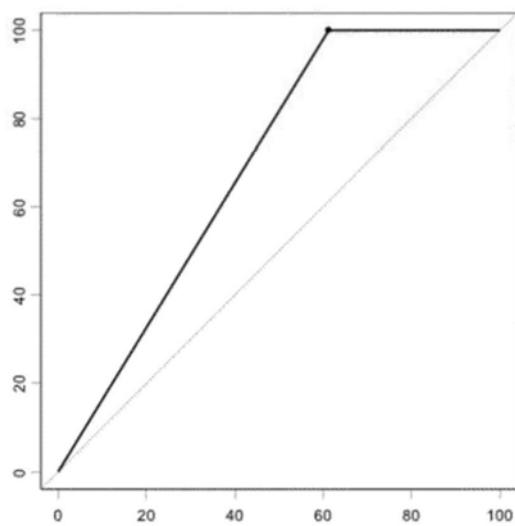


图5

模块 HFABP IL-10
GCS 15 + 1 s \leq 6h
灵敏度100%下特异性43%

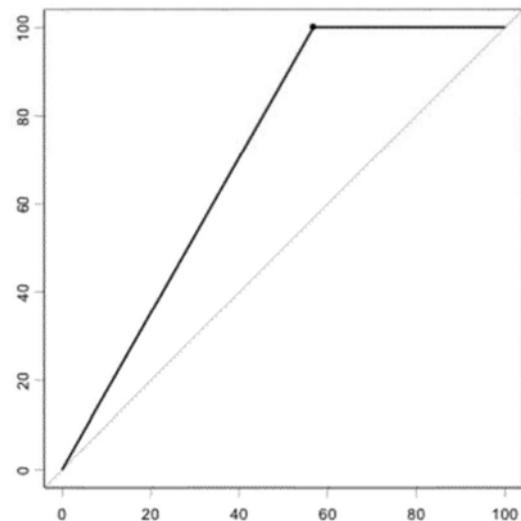


图6

模块 年龄 S100B HFABP
GCS 15 + 1 s \leq 6h
灵敏度100%下特异性46%

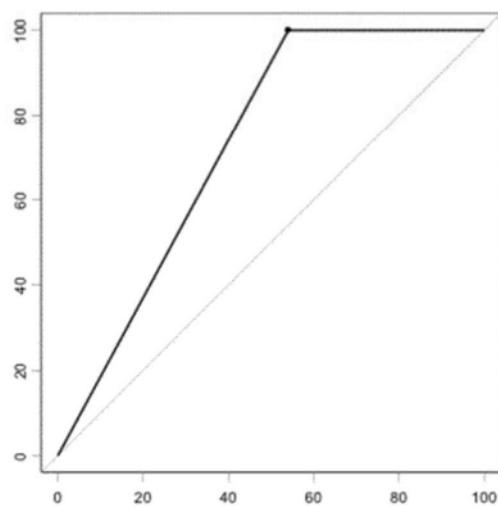


图7

模块 年龄 S100B HFABP IL-10
GCS 15 + 1 s ≤6h
灵敏度100%下特异性57%

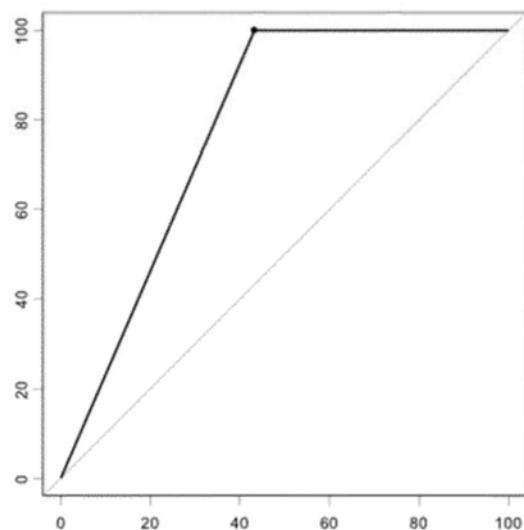


图8