



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108603885 A

(43)申请公布日 2018.09.28

(21)申请号 201680079536.4

(22)申请日 2016.11.17

(30)优先权数据

62/256,624 2015.11.17 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.07.16

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/062469 2016.11.17

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/087634 EN 2017.05.26

(71)申请人 科罗拉多大学评议会公司

地址 美国科罗拉多州

(72)发明人 L·余 M·罗尔斯 A·米歇尔斯

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 张全信 董志勇

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/566(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

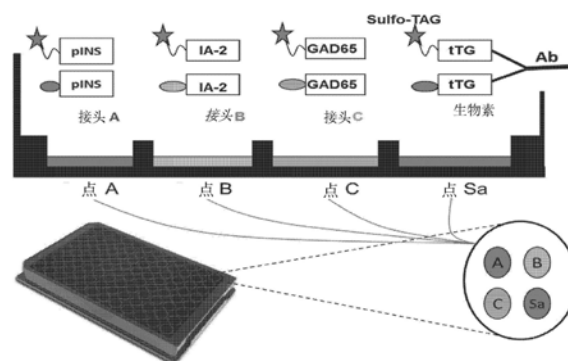
权利要求书3页 说明书15页 附图16页

(54)发明名称

诊断或评估哺乳动物中的疾病或紊乱的新型多重分析

(57)摘要

本发明包括可以用于同时测定多种抗体中的抗体是否存在于样品中的方法和试剂盒。在某些实施方式中,抗体的至少一种包括自身抗体。在其它实施方式中,本发明的方法和试剂盒可以被用于同时测定对象是否可能发展或已经发展多种疾病或紊乱的每一种。



1. 一种同时检测样品中多种抗体的每一种的存在或不存在的方法,所述方法包括如下步骤:

(1) 使一定体积的所述样品与所述多种抗体的每一种的抗原接触,其中每种抗原包括利用可检测标签衍生的抗原(第一衍生的抗原)和利用标记标签衍生的抗原(第二衍生的抗原),从而形成第二溶液,其中,如果选自所述多种抗体的给定抗体存在于所述样品中,则对应的第一衍生的抗原-给定抗体-第二衍生的抗原复合物在所述第二溶液中形成;

(2) 使所述第二溶液与包括多个非重叠区域的固体表面接触,其中所述多个非重叠区域的每个利用特异性地结合至所述标记标签之一的捕获分子衍生,其中所述标记标签的每一个不与所述多个非重叠区域的多于一个结合,从而如果存在于所述第二溶液中,则在不同的非重叠区域(其从而已知为与所述给定抗体相关联)中固定所述第一衍生的抗原-给定抗体-第二衍生的抗原复合物的每种;和

(3) 通过测定固定至与所述给定抗体相关联的所述非重叠区域的所述可检测标签的存在或不存在,检测所述第一衍生的抗原-给定抗体-第二衍生的抗原复合物的每一种的存在或不存在。

2. 权利要求1所述的方法,其中所述多种抗体的至少一种包括自身抗体。

3. 权利要求1所述的方法,其中所述多种抗体的每一种包括自身抗体。

4. 权利要求1所述的方法,其中所述样品包括来自哺乳动物的生物学样品。

5. 权利要求4所述的方法,其中来自所述哺乳动物的所述生物学样品包括选自尿、血液、血清、血浆和唾液的至少一种。

6. 权利要求1所述的方法,其中所述可检测标签包括电化学发光(ECL)标签。

7. 权利要求6所述的方法,其中所述ECL标签包括钌络合物。

8. 权利要求7所述的方法,其中所述ECL标签包括 $[\text{Ru}(\text{BPY})_3]^{2+}$ 。

9. 权利要求1所述的方法,其中对于所述多种抗体的每一种独立地,步骤(1)包括下列步骤的一个:

(a) 使所述样品与所述多种抗体之一的抗原接触,其中所述抗原包括利用可检测标签衍生的抗原,因而形成第一溶液;和随后使所述第一溶液与相同抗体的抗原接触,其中所述抗原包括利用标记标签衍生的抗原;

(b) 使所述样品与所述多种抗体之一的抗原接触,其中所述抗原包括利用标记标签衍生的抗原,因而形成第一溶液;和随后使所述第一溶液与相同抗体的抗原接触,其中所述抗原包括利用可检测标签衍生的抗原;和

(c) 使所述样品与所述多种抗体之一的抗原接触,其中所述抗原包括利用标记标签衍生的抗原和利用可检测标签衍生的抗原。

10. 权利要求1所述的方法,其中所述标记标签包括选自生物素、糖类、和免疫球蛋白或其片段的至少一种。

11. 权利要求1所述的方法,其中所述捕获分子包括选自抗生物素蛋白、链霉亲和素、凝集素、蛋白A/G和适配体的至少一种。

12. 权利要求1所述的方法,其中所述多种抗体包括至少四种抗体。

13. 权利要求12所述的方法,其中所述多种抗体包括至少六种抗体。

14. 权利要求13所述的方法,其中所述多种抗体包括至少八种抗体。

15. 权利要求14所述的方法,其中所述多种抗体包括至少十种抗体。

16. 权利要求1所述的方法,其中所述样品的体积在大约6 μ L至大约20 μ L的范围内。

17. 权利要求1所述的方法,其中所述多种抗体包括选自下列的至少一种:IAA(胰岛素自身抗体)、GADA(谷氨酸脱羧酶自身抗体)、IA-2A(胰岛抗原2自身抗体)、TGA(转谷氨酰胺酶自身抗体)、TPOA(甲状腺过氧化物酶自身抗体)、ThgA(甲状腺球蛋白自身抗体)、IFN α A(干扰素 α 自身抗体)、ZnT8A(8型锌转运蛋白自身抗体)、21-羟化酶自身抗体、环瓜氨酸肽(CCP)自身抗体、抗双链DNA(dsDNA)自身抗体、抗核抗体(ANA)、ATP酶自身抗体和抗髓鞘碱性蛋白(MBP)自身抗体。

18. 权利要求17所述的方法,其中所述多种抗体包括IAA、GADA、IA-2A、TGA、TPOA、ThgA、IFN α A和ZnT8A。

19. 权利要求1所述的方法,其中所述哺乳动物是人。

20. 一种同时测定哺乳动物是否可能发展或已经发展多种疾病或紊乱的每一种的方法,其中所述多种疾病或紊乱的每一种的特征在于在所述哺乳动物的生物样品中存在至少一种自身抗体,所述方法包括:

(1) 使所述样品与多种抗原接触,其中所述多种抗原的每种特异性地,并且彼此排他性地,结合至与所述多种疾病或紊乱之一相关联的一种自身抗体,其中每种抗原包括利用可检测标签衍生的抗原(第一衍生的抗原)和利用标记标签衍生的抗原(第二衍生的抗原),从而形成第二溶液,其中,如果与所述多种疾病或紊乱之一相关联的给定自身抗体存在于所述样品中,则对应的第一衍生的抗原-给定自身抗体-第二衍生的抗原复合物被形成;

(2) 使所述第二溶液与包括多个非重叠区域的固体表面接触,其中所述多个非重叠区域的每个利用特异性地结合至所述标记标签之一的捕获分子衍生,其中所述标记标签的每一个不与所述多个非重叠区域的多于一个结合,从而如果存在于所述第二溶液中,则在不同的非重叠区域(其从而已知为与所述给定自身抗体相关联)中固定所述第一衍生的抗原-给定自身抗体-第二衍生的抗原复合物的每种;和

(3) 通过测定与所述给定自身抗体相关联的所述非重叠区域中的所述可检测标签的存在或不存在,检测所述第一衍生的抗原-给定自身抗体-第二衍生的抗原复合物的每一种的存在或不存在;

其中在与所述自身抗体相关联的所述非重叠区域中存在第一衍生的抗原-给定自身抗体-第二衍生的抗原表明所述哺乳动物可能发展或已经发展与所述自身抗体相关联的疾病或紊乱。

21. 权利要求20所述的方法,其中所述疾病或紊乱包括自身免疫疾病。

22. 权利要求20所述的方法,其中所述疾病或紊乱包括选自下列的至少一种:急性运动轴索神经病(AMAN)、阿狄森病、抗NMDA受体脑炎、抗磷脂综合征、自身免疫性胃炎、自身免疫性肝炎、1型自身免疫性多内分泌综合征(APS-1)、乳糜泻、舞蹈指痉病、舞蹈病、慢性自身免疫性肝炎、慢性甲状腺炎和其它自身免疫性甲状腺疾病、丘-施二氏综合征、CREST综合征、疱疹样皮炎、1型糖尿病(T1D)、脑脊髓炎、肉芽肿性多血管炎、格雷夫斯病、桥本甲状腺炎、炎性肌病、伊萨克综合征(自身免疫性神经性肌强直)、朗-伊二氏肌无力综合征、边缘系脑炎、显微镜下多血管炎、米-费二氏综合征、混合结缔组织病、伴有传导阻滞的多灶性运动神经病(MMN)、多发性硬化、重症肌无力、新生儿心脏传导阻滞、视神经脊髓炎(德维克综合

征)、斜视眼肌阵挛综合征、视神经病变、与链球菌相关联的儿科自身免疫性神经精神性疾病(PANDAS)、副肿瘤性小脑变性、副肿瘤性小脑综合征、多肌炎/皮肌炎、原发性胆汁性肝硬化、原发性干燥综合征、类风湿性关节炎、硬化性肌炎、硬皮病、僵人综合征、亚急性感觉神经元病、西登哈姆舞蹈病、系统性红斑狼疮、系统性硬化病和系统性血管炎。

23. 权利要求20所述的方法,其中所述疾病或紊乱包括选自1型糖尿病、乳糜泻、自身免疫性甲状腺炎和ASP-1的至少一种。

24. 权利要求20所述的方法,其中所述疾病或紊乱包括1型糖尿病和/或乳糜泻。

25. 一种用于测定哺乳动物是否可能发展或已经发展多种疾病或紊乱的每一种的试剂盒,其中所述多种疾病或紊乱的每一种的特征在于在所述哺乳动物的生物样品中存在至少一种自身抗体,所述试剂盒包括:

多种抗原,其中所述多种抗原的每种特异性地,并且彼此排他性地,结合至与所述多种疾病或紊乱之一相关联的一种自身抗体,其中每种抗原包括利用可检测标签衍生的抗原(第一衍生的抗原)和利用标记标签衍生的抗原(第二衍生的抗原);和

含有多个非重叠区域的固体表面,其中所述多个非重叠区域的每一个利用与所述标记标签之一结合的捕获分子衍生,其中所述标记标签的每一种结合至所述固体表面上的所述多个非重叠区域的仅一个。

26. 权利要求25所述的试剂盒,其中所述固体基底表面包括选自硅片、玻璃、金属、塑料、陶瓷、金属合金和聚合物的至少一种。

诊断或评估哺乳动物中的疾病或紊乱的新型多重分析

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请根据35U.S.C.§119(e)要求2015年11月17日提交的美国临时申请号62/256,624的优先权,该申请通过引用以其全部并入本文。

[0003] 关于联邦资助的研究或研发的声明

[0004] 本发明在由国立卫生研究院授予的DK32083下利用政府支持完成。政府享有本发明中的某些权利。

背景技术

[0005] 自身抗体是由哺乳动物的免疫系统产生并针对哺乳动物的自身蛋白质中一种或多种的抗体。许多自身免疫疾病(尤其是红斑狼疮)由这些自身抗体引起。正常地,免疫系统能够识别并忽略身体的自身健康蛋白质、细胞和组织,不与环境中的非威胁性物质比如食物过度反应。但是,免疫系统有时可能停止识别身体的正常组分中的一种或多种为“自身的”,导致产生病理学自身抗体。这些自身抗体攻击身体的自身健康细胞、组织和/或器官,引起炎症和损害。自身抗体也可以起非病理性作用。例如,它们可以帮助身体破坏癌症和消除废物。自身抗体也可以在正常免疫功能中起作用。

[0006] 自身抗体产生的起因是多样化的并且未被充分了解。一些自身抗体产生是由于遗传易感性与环境诱因(例如,病毒性疾病或长期暴露于某些有毒化学品)的结合。虽然家庭可能易受自身免疫病症的影响,但是单个家庭成员可能具有不同的自身免疫紊乱,或者从来都不会发展自身免疫病症。

[0007] 1型糖尿病(T1D)——免疫介导形式的糖尿病——的发病率在过去20年中已经加倍,尤其是在幼儿中。仅在美国,T1D影响预计 1.4×10^6 个人,其中相等数目的人患有临床前疾病,其特征在于多种胰岛自身抗体(iAb),但是仍然具有正常葡萄糖稳态。iAb的存在、它们的数目和水平当前被用于评估糖尿病风险(或糖尿病发展阶段)和作为预防试验的入选标准。几乎所有对iAb——其针对选自胰岛素(IAA)、谷氨酸脱羧酶(GADA)、胰岛抗原2(IA-2A)和锌转运蛋白8(ZnT8A)的两种或更多种靶标——阳性的儿童发展为临床T1D。当在症状开始之前被鉴定时,这些儿童可以避免威胁生命的糖尿病酮症酸中毒和住院治疗,以及参加阻止T1D的试验或定义T1D的起因的研究。

[0008] 此外,三分之一的患者在诊断T1D时存在有自身免疫甲状腺炎或腹腔自身免疫。乳糜泻的患病率在欧洲和北美为约1:100。但是,大多数患者未被诊断或者在显著延迟的情况下被诊断。无麸质饮食是有效的治疗,并且通过测量转谷氨酰胺酶自身抗体(TGA)的早期检测已经被广泛地推荐。乳糜泻和T1D共享II类HLA和非HLA遗传易感性,并且在多达10%的患者中同时发生。美国糖尿病协会推荐在T1D诊断的时候进行乳糜泻的例行筛查。临床前T1D和乳糜泻的组合群体筛查将是合理搭配。T1D的预防试验在进行中并且可能扩展至多重候选干预;但是,对合格对象的大规模筛查仍然是艰难的瓶颈。

[0009] 因此,在本领域中存在对于鉴定处于发展自身免疫疾病或紊乱的风险下或者已经发展自身免疫疾病或紊乱的患者的新型方法的需要。多重自身抗体分析的可利用性可以极

大地简化T1D的诊断和对相关自身免疫病症的筛查。本发明解决并满足了该需要。

发明内容

[0010] 本发明提供了同时检测样品中多种抗体的每一种的存在或不存在的方法。本发明进一步提供了同时测定哺乳动物是否可能发展或已经发展多种疾病或紊乱的每一种的方法,其中多种疾病或紊乱的每一种的特征在于在哺乳动物的生物样品中存在至少一种自身抗体。本发明进一步提供了用于测定哺乳动物是否可能发展或已经发展多种疾病或紊乱的每一种的试剂盒,其中多种疾病或紊乱的每一种的特征在于在哺乳动物的生物样品中存在至少一种自身抗体。

[0011] 在某些实施方式中,方法包括如下步骤:(1)使一定体积的样品与多种抗体的每一种的抗原接触,其中每种抗原包括利用可检测标签衍生的抗原(第一衍生的抗原)和利用标记标签衍生的抗原(第二衍生的抗原),从而形成第二溶液,其中,如果选自多种抗体的给定抗体存在于样品中,则对应的第一衍生的抗原-给定抗体-第二衍生的抗原复合物在第二溶液中形成;(2)使第二溶液与包括多个非重叠区域的固体表面接触,其中多个非重叠区域的每个利用特异性地结合至标记标签之一的捕获分子衍生,其中标记标签的每个不与多个非重叠区域的多于一个结合,从而如果存在于第二溶液中,则在不同的非重叠区域(其从而已知为与给定抗体相关联)中固定第一衍生的抗原-给定抗体-第二衍生的抗原复合物的每种;和(3)通过测定固定至与给定抗体相关联的非重叠区域的可检测标签的存在或不存在检测第一衍生的抗原-给定抗体-第二衍生的抗原复合物的每种的存在或不存在。

[0012] 在某些实施方式中,多种抗体的至少一种包括自身抗体。在其它实施方式中,多种抗体的每一种包括自身抗体。

[0013] 在某些实施方式中,样品包括来自哺乳动物的生物样品。在其它实施方式中,来自哺乳动物的生物样品包括选自尿、血液、血清、血浆和唾液的至少一种。

[0014] 在某些实施方式中,可检测标签包括电化学发光(ECL)标签。在其它实施方式中,ECL标签包括钌络合物。在又其它实施方式中,ECL标签包括 $[\text{Ru}(\text{BPy})_3]^{2+}$ 。

[0015] 在某些实施方式中,对于多种抗体的每一种独立地,步骤(1)包括下列步骤的一个:(a)使样品与多种抗体之一的抗原接触,其中抗原包括利用可检测标签衍生的抗原,因而形成第一溶液;和随后使第一溶液与相同抗体的抗原接触,其中抗原包括利用标记标签衍生的抗原;(b)使样品与多种抗体之一的抗原接触,其中抗原包括利用标记标签衍生的抗原,因而形成第一溶液;和随后使第一溶液与相同抗体的抗原接触,其中抗原包括利用可检测标签衍生的抗原;和(c)使样品与多种抗体之一的抗原接触,其中抗原包括利用标记标签衍生的抗原和利用可检测标签衍生的抗原。

[0016] 在某些实施方式中,标记标签包括选自生物素、糖类和免疫球蛋白或其片段的至少一种。在其它实施方式中,捕获分子包括选自抗生物素蛋白、链霉亲和素、凝集素、蛋白A/G和适配体的至少一种。在又其它实施方式中,多种抗体包括至少四种抗体。在又其它实施方式中,多种抗体包括至少六种抗体。在又其它实施方式中,多种抗体包括至少八种抗体。在又其它实施方式中,多种抗体包括至少十种抗体。在又其它实施方式中,样品体积在大约6 μL 至大约20 μL 、大约6 μL 至大约18 μL 、大约6 μL 至大约16 μL 、大约6 μL 至大约14 μL 、大约6 μL 至大约12 μL 、大约6 μL 至大约10 μL 、或大约6 μL 至大约8 μL 的范围内。

[0017] 在某些实施方式中,多种抗体包括选自下列的至少一种:IAA(胰岛素自身抗体)、GADA(谷氨酸脱羧酶自身抗体)、IA-2A(胰岛抗原2自身抗体)、TGA(转谷氨酰胺酶自身抗体)、TPOA(甲状腺过氧化物酶自身抗体)、ThgA(甲状腺球蛋白自身抗体)、IFN α A(干扰素 α 自身抗体)、ZnT8A(8型锌转运蛋白自身抗体)、21-羟化酶自身抗体、环瓜氨酸肽(CCP)自身抗体、抗双链DNA(dsDNA)自身抗体、抗核抗体(ANA)、ATP酶自身抗体和抗髓鞘碱性蛋白(MBP)自身抗体。在其它实施方式中,多种抗体包括IAA、GADA、IA-2A、TGA、TPOA、ThgA、IFN α A和ZnT8A。

[0018] 在某些实施方式中,哺乳动物是人。

[0019] 在某些实施方式中,方法包括:(1)使样品与多种抗原接触,其中多种抗原的每种特异性地,并且彼此排他性地,结合至与多种疾病或紊乱之一相关联的一种自身抗体,其中每种抗原包括利用可检测标签衍生的抗原(第一衍生的抗原)和利用标记标签衍生的抗原(第二衍生的抗原),从而形成第二溶液,其中,如果与多种疾病或紊乱之一相关联的给定自身抗体存在于样品中,则对应的第一衍生的抗原-给定自身抗体-第二衍生的抗原复合物被形成;(2)使第二溶液与包括多个非重叠区域的固体表面接触,其中多个非重叠区域的每个利用特异性地结合至标记标签之一的捕获分子衍生,其中标记标签的每个不与多个非重叠区域的多于一个结合,从而如果存在于第二溶液中,则在不同的非重叠区域(其从而已知为与给定自身抗体相关联)中固定第一衍生的抗原-给定自身抗体-第二衍生的抗原复合物的每种;和(3)通过测定与给定自身抗体相关联的非重叠区域中的可检测标签的存在或不存在检测第一衍生的抗原-给定自身抗体-第二衍生的抗原复合物的每种的存在或不存在;其中在与自身抗体相关联的非重叠区域中存在第一衍生的抗原-给定自身抗体-第二衍生的抗原表明哺乳动物可能发展或已经发展与自身抗体相关联的疾病或紊乱。

[0020] 在某些实施方式中,疾病或紊乱包括自身免疫疾病。在其它实施方式中,疾病或紊乱包括选自下列的至少一种:急性运动轴索神经病(AMAN)、阿狄森病、抗NMDA受体脑炎(anti-NMDA receptor encephalitis)、抗磷脂综合征、自身免疫性胃炎、自身免疫性肝炎、1型自身免疫性多内分泌综合征(autoimmune polyendocrine syndrome type 1)(APS-1)、乳糜泻、舞蹈指痉病(choreathetosis)、舞蹈病、慢性自身免疫性肝炎、慢性甲状腺炎和其它自身免疫性甲状腺疾病、丘-施二氏综合征、CREST综合征、疱疹样皮炎、1型糖尿病(T1D)、脑脊髓炎、肉芽肿性多血管炎(granulomatosis with polyangiitis)、格雷夫斯病、桥本甲状腺炎、炎性肌病、伊萨克综合征(Isaac's Syndrome)(自身免疫性神经性肌强直)、朗-伊二氏肌无力综合征、边缘系脑炎、显微镜下多血管炎、米-费二氏综合征、混合结缔组织病、伴有传导阻滞的多灶性运动神经病(multifocal motor neuropathy with conduction block)(MMN)、多发性硬化、重症肌无力、新生儿心脏传导阻滞(neonatal heart block)、视神经脊髓炎(德维克综合征)、斜视眼肌阵挛综合征(opsoclonus myoclonus syndrome)、视神经病变、与链球菌相关联的儿科自身免疫性神经精神性疾病(paediatric autoimmune neuropsychiatric disease associated with Streptococcus)(PANDAS)、副肿瘤性小脑变性、副肿瘤性小脑综合征、多肌炎/皮炎、原发性胆汁性肝硬变、原发性干燥综合征、类风湿性关节炎、硬化性肌炎、硬皮病、僵人综合征、亚急性感觉神经元病、西登哈姆舞蹈病、系统性红斑狼疮、系统性硬化病和系统性血管炎(systemic vasculitides)。

[0021] 在某些实施方式中,疾病或紊乱包括选自1型糖尿病、乳糜泻、自身免疫性甲状腺

炎和APS-1的至少一种。在其它实施方式中,疾病或紊乱包括1型糖尿病和/或乳糜泻。

[0022] 在某些实施方式中,试剂盒包括多种抗原,其中多种抗原的每种特异性地,并且彼此排他性地,结合至与多种疾病或紊乱之一相关联的一种自身抗体,其中每种抗原包括利用可检测标签衍生的抗原(第一衍生的抗原)和利用标记标签衍生的抗原(第二衍生的抗原)。在其它实施方式中,试剂盒包括含有多个非重叠区域的固体表面,其中多个非重叠区域的每个利用与标记标签之一结合的捕获分子衍生,其中标记标签的每种结合至固体表面上的多个非重叠区域的仅一个。

[0023] 在某些实施方式中,固体基底表面包括选自硅片、玻璃、金属、塑料、陶瓷、金属合金和聚合物的至少一种。

附图说明

[0024] 当连同附图一起阅读时,将更好地理解本发明的示例性实施方式的下列详细描述。出于说明本发明的目的,在附图中示出了示例性实施方式。但是,应当理解,本发明不限于在附图中示出的实施方式的精确布置、许多组合的布置和仪器。

[0025] 图1是示例性多重分析的非限制性图解。血清中的自身抗体分别将每种Sulfo-标记的抗原连接至其对应的接头-标志的抗原,其然后在QuickPlex4-Spot板的固体相上捕获。在某些实施方式中,板-捕获的Sulfo-标记的抗原的检测利用电化学发光(ECL)完成。

[0026] 图2A-2B是图解在40名新诊断患有T1D的患者之中使用多重ELC分析和放射分析测定的4种自身抗体的水平的一系列图:(图2A) IAA、(图2A) IA-2A、(图2B) GADA和(图2B) TGA。两个分析是相关性的($P<0.0001$),但是在50名健康对照中,ECL-IAA和ECL-TGA分析与放射分析相比以100%特异性在患者中检测到更多阳性。

[0027] 图3A-3B是图解在40名新诊断患有T1D的患者之中使用多重ELC分析和单一ECL分析测定的4种自身抗体的水平的一系列图:(图3A) IAA、(图3A) GADA、(图3B) IA-2A和(图3B) TGA。两个分析具有极好相关性($p<0.0001$),同时在单一ECL分析中阴性的在多重ECL中的两个低的IAA和一个低的IA-2A可能是由来自另一种抗体的非常高的信号的信号干扰引起的假阳性。

[0028] 图4A-4C图解在非限制性U-Plex板上的多重ECL分析的工作流程图。血清中的自身抗体将每种Sulfo-标记的抗原连接至其对应的生物素标志的抗原,其然后分别被其对应的接头标志的链霉亲和素结合。每种复合物然后在多点UPlex板的固体相上被捕获,并且利用电化学发光完成板-捕获的Sulfo-标记的抗原的检测。在UPlex板上的多重ECL分析在新发病的T1D患者($n=168$)和健康对照($n=118$)中证实。对于所有自身抗体的阳性截止在118名对照的第100百分位处设定。多重ECL分析保留对所有自身抗体的100%灵敏度。

[0029] 图5A包括图解使用非限制性多重(U-Plex板)分析与GADA放射分析测量168名新发病的T1D患者上的GADA水平的相关性的图。两个分析是相关性的($P<0.0001$)。

[0030] 图5B包括图解使用非限制性多重(U-Plex板)分析与IA-2A放射分析测量168名新发病的T1D患者上的IA-2A水平的相关性的图。两个分析是相关性的($P<0.0001$)。

[0031] 图5C包括图解使用非限制性多重(U-Plex板)分析与IAA放射分析测量168名新发病的T1D患者上的IAA水平的相关性的图。两个分析是相关性的($P<0.0001$)。

[0032] 图5D包括图解使用非限制性多重(U-Plex板)分析与TGA放射分析测量168名新发

病的T1D患者上的TGA水平的相关性的图。两个分析是相关性的 ($P < 0.0001$)。

[0033] 图5E包括图解使用非限制性多重 (U-Plex板) 分析与甲状腺过氧化物酶自身抗体 (TPOA) 放射分析测量168名新发病的T1D患者上的TPOA水平的相关性的图。两个分析是相关性的 ($P < 0.0001$)。

[0034] 图5F包括图解使用非限制性多重 (U-Plex板) 分析与甲状腺球蛋白自身抗体 (ThgA) 放射分析测量新发病的T1D患者上的ThgA水平的相关性的图。两个分析是相关性的 ($P < 0.0001$)。

[0035] 图5G包括图解使用非限制性多重 (U-Plex板) 分析与干扰素 α 自身抗体 (IFN α A) ELISA测量新发病的T1D患者上的IFN α A水平的相关性的图。两个分析是相关性的 ($P < 0.0001$)。

[0036] 图5H包括图解使用ECL单一分析与ZnT8A放射分析测量48个样品上的ZnT8A水平的相关性的图。两个分析是相关性的 ($P < 0.0001$)。ZnT8A ECL分析可以被加入至多重ECL分析。

具体实施方式

[0037] 本发明包括方法和试剂盒,其可以被用于同时测定多种抗体中的任一种抗体是否存在于样品中。在某些实施方式中,抗体中的至少一种包括自身抗体。在其它实施方式中,所有抗体是自身抗体。

[0038] 在某些实施方式中,本文中报道的新型多重自身抗体分析代表对于T1D和/或其它自身免疫疾病的大规模群体筛查的简化的重大进步。在某些实施方式中,与用于TrialNet、青少年糖尿病的环境决定因素 (TEDDY)、免疫耐受网络 (ITN)、1型糖尿病遗传聚生 (Genetic Consortium) (T1DGC)、青少年糖尿病自身免疫力研究 (DAISY) 及其他研究的当前“金标准”单一自身抗体分析的组合相比,基于ECL的多重分析具有许多吸引人的特征。

[0039] 本发明不应当被解释为限于ECL检测,其在本文中以非限制性方式示例。分子(比如抗原和/或抗体)可以标志有任何已知的或可适用的可检测标签(比如但不限于SULFO-TAG®)、任何可适用的酶(比如但不限于萤光素酶、硫酸酯酶、磷酸酶和/或过氧化物酶)、荧光化合物、核苷酸序列等,如本文所描述的或如本领域技术人员已知的。

[0040] 在一方面,使用具有用于每种标志的抗原的单独接头的QuickPlex 4-Spot板,可以在具有小量血清样品 (6 μ l) 的单一孔中完成四种不同的自身抗体分析。在某些实施方式中,多重ECL分析的灵敏度和特异性比得上在患者对正常对照的阳性方面的金标准放射分析测量。在其它实施方式中,关于IAA,在患者中鉴定更多阳性。在某些实施方式中,分析要求的生物学样品小于或等于大约50 μ l、小于或等于大约40 μ l、小于或等于大约30 μ l、小于或等于大约20 μ l、小于或等于大约10 μ l、小于或等于大约9 μ l、小于或等于大约8 μ l、小于或等于大约7 μ l、小于或等于大约6 μ l、或小于或等于大约5 μ l。在其它实施方式中,分析要求的生物学样品等于大约50 μ l、等于大约40 μ l、等于大约30 μ l、等于大约20 μ l、等于大约10 μ l、等于大约9 μ l、等于大约8 μ l、等于大约7 μ l、等于大约6 μ l、或等于大约5 μ l。

[0041] 在由DAISY、TrialNet预防途径和TEDDY研究获得的样品中广泛地证实IAA和GADA的单一ECL分析。ECL-IAA优于当前标准mIAA放射分析,由于其在幼儿中更高的灵敏度和更早的鉴定iAb血清转化。不希望受任何理论限制,在某些实施方式中,这是由于ECL分析检测在所有免疫球蛋白类别——包括IgM——中的自身抗体的能力。单一ECL-TGA分析与标准

TGA (IgA) 放射分析相比也是更灵敏的并且在DAISY幼儿——其转化为TGA阳性并且通过活组织检查被确认患有临床乳糜泻——中与TGA放射分析相比更早地鉴定TGA血清转化。ECL-IAA和ECL-GADA分析二者区别高亲和力、高风险自身抗体与在没有发展为T1D的对象中的那些“低风险”、低亲和力信号。但是,在本发明内考虑的检测方法不限于ECL。事实上,对于使用最小量的生物样品同时探测的多种抗体提供足够的空间分辨率的任何检测方法可以在本发明的方法内使用,如本文其他地方描述的。

[0042] 在本研究中的分析条件类似于在单一ECL分析方案中的那些分析条件。一种自身抗体的背景和信号不干扰在某一范围中相邻点的自身抗体测量。与单一ECL测量相比,观察到三个假阳性结果(在160个测量中)。两个假阳性IAA结果可能由来自相邻点的非常高的信号(都高于25,000计数)的干扰引起。组合分析中的一个假阳性IA-2A水平也可能由于来自其相邻点的极高信号(>40,000计数)。一般而言,小于20,000计数的信号不彼此干扰。在某些实施方式中,反应条件的优化可以涵盖调节两种或更多种不同标志的抗原蛋白的比率和量。可选地,如果优化不是理想的,则可以使用单一自身抗体分析再测试具有很高信号的样品。这样的测试可以在按照一般群体筛查仅大约0.2%的样品对于iAb阳性中要求。

[0043] 如所预期的,与放射分析结果相比,在新发病的T1D患者之中,多重ECL分析不失去iAb阳性。而且,多重分析在50名健康对照中对于所有4种自身抗体保持完美特异性。

[0044] 基于ELISA的ElisaRSR™3Screen ICA™可得自RSR Limited (Cardiff, 英国)。该组合分析在单独孔中检测GADA、IA-2A和ZnT8A。本ECL多重分析与3Screen ICA™分析相比的非限制性优点包括:检测儿童中IAA——主要iAb——的能力;筛查两种疾病——临床前T1D和乳糜泻——的能力;和对于重复测量,要求少得多的血清体积——12μl对150μl。进一步,本分析是无放射性的和高通量的。

[0045] 在某些实施方式中,分析检测哺乳动物的生物样品中ZnT8A的存在。在其它实施方式中,分析不检测哺乳动物的生物样品中ZnT8A的存在。单独的ZnT8A存在于仅1%随后至临床糖尿病的对象中,并且在两个大的研究(TrialNet和TEDDY)中,ZnT8A不被用于初期筛查,并且仅如果另一种iAb是阳性,进行ZnT8A分析。在某些实施方式中,TGA在T1D患者中比iAb更流行。在其它实施方式中,对于iAb和TGA的组合筛查与对于单独的iAb的筛查相比是更有治疗价值的和更有吸引力的。

[0046] 通过在来自MesoScale Discovery的平台上使用ECL检测,研发多重分析以在单一孔中使用小血液体积精确地测量所有四种自身抗体。这种分析促进同时用于T1D和乳糜泻风险的大规模、一般群体筛查。

[0047] 在另一方面,如本文所证明的,在来自MesoScale Discovery的UPlex的平台上使用ECL检测,进行多重测量是可能的,在单一孔中多达10种抗体。如本文所证明的,本研究成功地组合IAA、GADA、IA-2A、TPOA、ThgA、TGA、IFNαA和ZnT8A以发展8-重分析,其允许同时筛查在患有T1D的儿童中频繁可见的T1D和乳糜泻、自身免疫性甲状腺炎和ASP-1。

[0048] 本发明进一步考虑使用允许检测自身免疫疾病的另外的自身抗体。这些抗体的非限制性实例包括阿狄森病的21-羟化酶自身抗体;类风湿性关节炎(RA)的环瓜氨酸肽(CCP)自身抗体;SLE(系统性红斑狼疮;也被称为狼疮)、硬皮病、干燥综合征、多肌炎/皮肌炎、混合结缔组织病和自身免疫性肝炎的抗双链DNA(dsDNA)自身抗体和抗核抗体(ANA);自身免疫性胃炎的ATP酶自身抗体;和/或多发性硬化(MS)的抗髓鞘碱性蛋白(MBP)自身抗体。定义

[0049] 除非另有限定,本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同含义。虽然与本文描述的那些类似或等价的任何方法和材料可以用于实践或测试本发明,但是描述了优选的方法和材料。

[0050] 如本文所使用,下列术语的每个具有与其在该章节中相关联的含义。

[0051] 如本文所使用,冠词“一个”和“一种”被用于指一个或多个(即,至少一个)该冠词的语法对象。举例而言,“一个要素”意思是一个要素或多个要素。

[0052] 当在生物体、组织、细胞或其成分的背景下使用时,术语“异常”指的是在至少一种可观察的或可检测的特征(例如,年龄、处理、时间等)方面与展示“正常”(预期的)各自特征的那些生物体、组织、细胞或其成分不同的那些生物体、组织、细胞或其成分。对于一种细胞或组织类型正常或预期的特征对于不同细胞或组织类型可能是异常的。

[0053] 如本文所使用,当提及可测量的值比如量、时距等时,“大约”意思是涵盖距离规定值的 $\pm 20\%$ 或 $\pm 10\%$ 、更优选地 $\pm 5\%$ 、甚至更优选地 $\pm 1\%$ 和仍更优选地 $\pm 0.1\%$ 的变化,因为这些变化适合于执行公开的方法。

[0054] 如果疾病或紊乱的症状的严重性、患者经历这种症状的频率或二者降低,则疾病或紊乱被“减轻”。

[0055] 如本文所使用,术语“ANA”直的是抗核抗体。

[0056] 如本文所使用,术语“抗体”指的是能够特异性地结合至抗原上的特定表位的免疫球蛋白分子。抗体可以是衍生自天然来源或者衍生自重组来源的完整免疫球蛋白并且可以是完整免疫球蛋白的免疫反应性部分。本发明中的抗体可以以多种形式存在,包括,例如,多克隆抗体,单克隆抗体,细胞内抗体(“胞内抗体”),Fv,Fab和F(ab)2,以及单链抗体(scFv),重链抗体,比如骆驼科抗体、合成抗体、嵌合抗体和人源化抗体(Harlow,et al.,1999,Using Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,NY;Harlow,et al.,1989,Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor,New York;Houston,et al.,1988,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883;Bird,et al.,1988,Science 242:423-426)。

[0057] 如本文所使用,术语“CCP”指的是环瓜氨酸肽。

[0058] 如本文所使用,术语“组合物”或“药物组合物”指的是在本发明内有用的至少一种化合物与药学上可接受的运载体的混合物。药物组合物促进化合物施用至患者或对象。本领域中存在施用化合物的多种技术,包括但不限于静脉内、口服、气溶胶、肠胃外、眼部、鼻部、肺部和外用施用。

[0059] “可检测标签”意思是当连接至感兴趣分子时,致使感兴趣分子经由光谱学、光化学、生物化学、免疫化学或化学手段可检测的组成。例如,可检测标签包括放射性同位素、磁珠、金属珠、胶粒、荧光染料、电子致密试剂、酶(例如,如在ELISA中通常使用的)、生物素、洋地黄毒苷或半抗原。抗原的标志可以通过任何公知方法实施。本领域技术人员已知的可检测标签的实例包括荧光染料、酶、辅酶、化学发光物质或放射性物质。具体实例可以包括放射性同位素(^{32}P 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{131}I 等)、荧光素、若丹明、丹磺酰氯、伞形酮、萤光素酶、过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、 β -葡糖苷酶、辣根过氧化物酶、葡糖淀粉酶、溶菌酶、糖类氧化酶、微过氧化物酶、生物素等。

[0060] 如本文所使用,“疾病”是动物的健康状态,其中动物不能维持稳态,并且其中如果

疾病得不到改善,则动物的健康继续恶化。

[0061] 如本文所使用,动物中的“紊乱”是如此健康状态:其中动物能够维持稳态,但是其中动物的健康状态与其不处于紊乱下相比是不太有利的。不治疗,紊乱不一定引起动物健康状态的进一步降低。

[0062] 如本文所使用,术语“dsDNA”指的是双链DNA。

[0063] 如本文所使用,术语“ECL”指的是电化学发光。

[0064] 如本文所使用,术语“有效量”、“药学有效量”和“治疗有效量”指的是提供期望生物学结果的药剂的无毒但是足够量。该结果可以是疾病的征兆、症状或起因的降低和/或减轻,或者生物学系统的任何其他期望的改变。在任何个案中的适合治疗量可以使用常规实验由本领域普通技术人员确定。

[0065] 如本文所使用,术语“片段”当运用于核酸时,指的是较大核酸的子序列。核酸“片段”的长度可以是至少大约15个核苷酸;例如,至少大约50个核苷酸至大约100个核苷酸;至少大约100个核苷酸至大约500个核苷酸;至少大约500个核苷酸至大约1000个核苷酸;至少大约1000个核苷酸至大约1500个核苷酸;大约1500个核苷酸至大约2500个核苷酸;或大约2500个核苷酸(和其间的任何整数值)。如本文所使用,术语“片段”当运用于蛋白质或肽时,指的是较大蛋白质或肽的子序列。蛋白质或肽的“片段”可以是至少大约20个氨基酸的长度;例如,至少大约50个氨基酸的长度;至少大约100个氨基酸的长度;至少大约200个氨基酸的长度;至少大约300个氨基酸的长度;或至少大约400个氨基酸的长度(和其间的任何整数值)。

[0066] 如本文所使用,术语“GADA”指的是谷氨酸脱羧酶自身抗体。

[0067] 如本文所使用,术语“iAb”指的是胰岛自身抗体。

[0068] 如本文所使用,术语“IA-2A”指的是胰岛抗原2自身抗体。

[0069] 如本文所使用,术语“IAA”指的是胰岛素自身抗体。

[0070] 如本文所使用,术语“IFN α ”指的是干扰素 α 自身抗体。

[0071] 如本文所使用,“免疫分析”指的是任何结合分析,其使用能够特异性地结合至靶分子的抗体检测和量化靶分子。

[0072] 如本文所使用,术语“免疫球蛋白”或“Ig”被定义为起抗体功能的一类蛋白质。由B细胞表达的抗体有时被称为BCR(B细胞受体)或抗原受体。包含在该类蛋白质中的五个成员是IgA、IgG、IgM、IgD和IgE。IgA是存在于呼吸和泌尿生殖道的身体分泌物——比如唾液、泪液、乳汁、胃肠分泌物和粘液分泌物——中的主要抗体。IgG是最通常的循环抗体。IgM是在大多数对象中在初次免疫应答中产生的主要免疫球蛋白。其是在凝集、补体固定和其它抗体应答中的最有效的免疫球蛋白,并且在防御细菌和病毒中是重要的。IgD是没有已知抗体功能的免疫球蛋白,但是可以用作抗原受体。IgE是如此免疫球蛋白,其通过在暴露于过敏原之后引起从肥大细胞和嗜碱粒细胞释放介体来介导速发过敏性。

[0073] 如本文所使用的术语“指导材料”包括出版物、记录、图表或任何其他表达媒介,其可以被用于在试剂盒中传达本发明的组合物和/或化合物的有用性。试剂盒的指导材料可以,例如,贴附至包含本发明的化合物和/或组合物的容器或者与包含该化合物和/或组合物的容器一起运送。可选地,指导材料可以与容器分开运送,目的是接受者合作地使用指导材料和化合物。指导材料的递送可以例如通过物理递送传达试剂盒的有用性的出版物或其

它表达媒介,或者可以通过电子传输实现,例如借助于计算机,比如通过电子邮件或从网站下载。

[0074] “隔离”意思是从天然状态改变或除去。例如,天然存在于活动物中的核酸或多肽不是“隔离的”,但是与其天然状态的共存物质部分或完全分离的相同核酸或多肽是“隔离的”。隔离的核酸或蛋白质可以以基本上纯化形式存在,或者可以存在于非原生环境,比如例如宿主细胞中。

[0075] 如本文所使用,术语“MBP”指的是抗髓鞘碱性蛋白。

[0076] 如本文所使用,术语“MS”指的是多发性硬化。

[0077] 术语“患者”、“对象”或“个体”在本文中可交换地使用,并且指的是服从本文描述的方法的任何动物或其细胞,不管是体外的或原位的。在非限制性实施方式中,患者、对象或个体是人。

[0078] 如本文所使用,术语“药学可接受的”指的是物质,比如运载体或稀释剂,其不废除化合物的生物学活性或性质,并且是相对无毒的,即,该物质可以被施用至个体而不以有害方式与包含其的组合物的任何组分引起不期望的生物学影响或相互作用。

[0079] 如本文所使用,术语“预防(prevent、preventing、prevention)”意思是避免或延迟对象中与疾病或病症相关联的症状的发作,在施用药剂或化合物开始时对象还没有发展出这些症状。

[0080] 如本文所使用,术语“RA”指的是类风湿性关节炎。

[0081] 如本文所使用,“样品”或“生物学样品”意思是从对象隔离的生物学物质。生物学样品可以包含适合于检测对象中生理学或病理学过程的mRNA、多肽或其它标志物的任何生物学物质,并且可以包括由个体获得的体液、组织、细胞和/或非细胞物质。

[0082] 如本文所使用,术语“SLE”指的是系统性红斑狼疮或狼疮。

[0083] 如本文关于抗体所使用的术语“特异性结合”意思是识别特异性抗原,但是基本上不识别或结合样品中的其它分子的抗体。例如,特异性地结合至来自一个物种的抗原的抗体也可以结合至来自一个或多个物种的那种抗原。但是,这种物种交叉反应性其自身不改变抗体的类别为特异性的。在另一个实例中,特异性地结合至抗原的抗体也可以结合至抗原的不同等位基因形式。但是,这种交叉反应性其自身不改变抗体的类别为特异性的。在一些情况下,术语“特异性结合”或“特异性地结合”可以被用于提及抗体、蛋白质或肽与第二化学种类的相互作用,指的是该相互作用依赖于化学种类上的特定结构(例如,抗原决定簇或表位)的存在;例如,抗体识别并结合至特定的蛋白质结构而非一般地结合至蛋白质。如果抗体对于表位“A”是特异性的,则在包含标志的“A”和抗体的反应中存在包含表位A(或游离的、未标志的A)的分子将降低结合至抗体的标志的A的量。

[0084] 如本文所使用,“基本上纯化的”指的是基本上不含其它组分。例如,基本上纯化的多肽是已经与在其天然存在状态下正常地与其缔合的其它组分分离的多肽。

[0085] 如本文所使用,术语“T1D”指的是1型糖尿病。

[0086] 如本文所使用,术语“TGA”指的是转谷氨酰胺酶自身抗体。

[0087] “治疗性”处理是施用至展现病理征兆的对象的处理,目的是减少或消除那些征兆。

[0088] 如本文所使用,术语“治疗(treatment,treating)”被定义为应用或施用治疗剂即

本发明的化合物(单独或与另一种药剂组合)至患者,或者应用或施用治疗剂至来自患者的隔离的组织或细胞系(例如,用于诊断或离体应用),该患者具有本文考虑的病症、本文考虑的病症的症状或者发展本文考虑的病症的可能性,目的是治愈、痊愈、减轻、解除、改变、补救、缓解、改善或影响本文考虑的病症、本文考虑的病症的症状或者发展本文考虑的病症的可能性。这些治疗可以基于由药物基因组学领域获得的知识被特定地定制或修改。

[0089] 如本文所使用,术语“ThgA”指的是甲状腺球蛋白自身抗体。

[0090] 如本文所使用,术语“TPOA”指的是甲状腺过氧化物酶自身抗体。

[0091] 如本文所使用,术语“ZnT8A”指的是8型锌转运蛋白自身抗体。

[0092] 如本文所使用,术语“野生型”指的是由天然存在来源隔离的基因或基因产品。野生型基因是如此基因:其在群体中最频繁地被观察到并且因而被任意地设计该基因的“正常”或“野生型”形式。相比之下,术语“修饰的”或“突变体”指的是与野生型基因或基因产品相比时,在序列和/或功能性质(例如,改变的特性)方面展现修饰的基因或基因产品。要注意,天然存在的突变体可以被隔离;当与野生型基因或基因产品相比时,这些可以由它们具有改变的特性(包括改变的核酸序列)的事实来鉴定。

[0093] 遍及本公开内容,本发明的各个方面可以以范围形式呈现。应当理解,以范围形式的描述仅仅出于方便和简洁,并且不应当被解释为对本发明范围的僵化的限制。因此,范围的描述应当被视为已经具体地公开了在那个范围内的所有可能的子范围以及单个数值。例如,比如从1到6的范围的描述应当被视为已经具体地公开了子范围比如从1到3、从1到4、从1到5、从2到4、从2到6、从3到6等,以及在那个范围内的单个数字,例如,1、2、2.7、3、4、5、5.1、5.3、5.5和6。不管范围的宽度如何,这都适用。

[0094] 方法

[0095] 本发明提供了同时检测样品中多种抗体的每种存在或不存在的方法。

[0096] 在某些实施方式中,方法包括(1)使样品与多种抗体的每一种的抗原接触,其中每种抗原包括利用可检测标签衍生的抗原(第一衍生的抗原)和利用标记标签衍生的抗原(第二衍生的抗原),从而形成第二溶液,其中如果对应抗体存在于样品中,则第一衍生的抗原-抗体-第二衍生的抗原复合物被形成。在其他实施方式中,方法包括(2)使用可检测标签的检测来检测第一衍生的抗原-抗体-第二衍生的抗原复合物的每一种的存在或不存在。

[0097] 在某些实施方式中,多种抗体的至少一种包括自身抗体。在其它实施方式中,多种抗体的每种包括自身抗体。

[0098] 在某些实施方式中,样品包括来自哺乳动物的生物学样品。在其它实施方式中,生物学样品包括来自哺乳动物的尿、血液、血清、血浆和/或唾液。

[0099] 在某些实施方式中,步骤(2)包括使第二溶液与包括多个非重叠区域的固体表面接触,其中多个非重叠区域的每个利用特异性地结合至标记标签之一的捕获分子衍生,其中标记标签的每个不与多个非重叠区域的多于一个结合,从而如果存在于第二溶液中,则在固体表面的不同的非重叠区域中固定第一衍生的抗原-抗体-第二衍生的抗原复合物的每种。

[0100] 在某些实施方式中,对于多种抗体的每一种独立地,步骤(1)包括下列步骤的一个:(a)使样品与多种抗体之一的抗原接触,其中抗原包括利用可检测标签衍生的抗原,因而形成第一溶液;和随后使第一溶液与相同抗体的抗原接触,其中抗原包括利用标记标签

衍生的抗原；(b)使样品与多种抗体之一的抗原接触，其中抗原包括利用标记标签衍生的抗原，因而形成第一溶液；和随后使第一溶液与相同抗体的抗原接触，其中抗原包括利用可检测标签衍生的抗原；和(c)使样品与多种抗体之一的抗原接触，其中抗原包括利用标记标签衍生的抗原和利用可检测标签衍生的抗原。

[0101] 在某些实施方式中，可检测标签包括电化学发光(ECL)标签、酶[比如但不限于荧光素酶、硫酸酯酶、磷酸酶(例如，碱性磷酸酶)、 β -半乳糖苷酶、葡糖淀粉酶、 β -葡糖苷酶、溶菌酶、糖类氧化酶、微过氧化物酶和/或过氧化物酶(例如，辣根过氧化物酶)]、荧光团和/或核苷酸序列。在其它实施方式中，可检测标签包括放射性同位素(比如但不限于 ^{32}P 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{131}I 等)、磁珠、金属珠、胶粒、荧光染料、电子致密试剂、化学发光染料、酶、辅酶、生物素、洋地黄毒苷和/或半抗原。染料的非限制性实例包括荧光素、若丹明、丹磺酰氯和伞形酮。

[0102] 在某些实施方式中，可检测标签包括ECL标签。在其它实施方式中，ECL标签包括钌络合物。在其它实施方式中，ECL标签包括 $[\text{Ru}(\text{BPy})_3]^{2+}$ ，其中BPy是2,2'-二吡啶。

[0103] 在某些实施方式中，标记标签包括生物素、糖类、免疫球蛋白或其片段、或其任何组合。在其它实施方式中，捕获分子包括抗生物素蛋白、链霉亲和素、凝集素、蛋白A/G、适配体或其任意组合。

[0104] 在某些实施方式中，多种抗体包括至少四种抗体。在其它实施方式中，多种抗体包括至少六种抗体。在又其它实施方式中，多种抗体包括至少八种抗体。在又其它实施方式中，多种抗体包括至少十种抗体。

[0105] 在某些实施方式中，多种抗体包括选自IAA、GADA、IA-2A、TPOA、ThgA、TGA、IFN α A和ZnT8A的至少一种。

[0106] 在某些实施方式中，多种抗体包括选自IAA、GADA、IA-2A、TPOA、ThgA、TGA、IFN α A、ZnT8A、21-羟化酶自身抗体、CCP自身抗体、抗dsDNA自身抗体、ANA、ATP酶自身抗体和抗MBP自身抗体的至少一种。

[0107] 在某些实施方式中，多种抗体包括IAA、GADA、IA-2A、TPOA、ThgA、TGA、IFN α A和/或ZnT8A。在某些实施方式中，多种抗体包括IAA、GADA、IA-2A、TPOA、ThgA、TGA、IFN α A和ZnT8A。在又其它实施方式中，多种抗体包括IAA、GADA、IA-2A和TGA。

[0108] 在某些实施方式中，哺乳动物是人。

[0109] 本发明进一步提供了测定哺乳动物是否可能发展或已经发展多种疾病或紊乱的每一种的方法，其中多种疾病或紊乱的每一种的特征在于在哺乳动物的生物学样品中存在至少一种自身抗体。在某些实施方式中，方法包括：(1)使样品与多种抗原接触，其中多种抗原的每种特异性地，并且彼此排他性地，结合至与多种疾病或紊乱之一相关联的自身抗体，其中每种抗原包括利用可检测标签衍生的抗原(第一衍生的抗原)和利用标记标签衍生的抗原(第二衍生的抗原)，从而形成第二溶液；和(2)使用ECL检测来检测每种第一衍生的抗原-自身抗体-第二衍生的抗原复合物的存在或不存在。

[0110] 在某些实施方式中，第一衍生的抗原-自身抗体-第二衍生的抗原的存在表明哺乳动物可能发展或已经发展与自身抗体相关联的疾病或紊乱。

[0111] 在某些实施方式中，疾病或紊乱包括自身免疫疾病。在其它实施方式中，疾病或紊乱包括选自下列的至少一种：急性运动轴索神经病(AMAN)、阿狄森病、抗NMDA受体脑炎、抗

磷脂综合征、自身免疫性胃炎、自身免疫性肝炎、1型自身免疫性多内分泌综合征 (APS-1)、乳糜泻、舞蹈指痉病、舞蹈病、慢性自身免疫性肝炎、慢性甲状腺炎和其它自身免疫性甲状腺疾病、丘-施二氏综合征、CREST综合征、疱疹样皮炎、1型糖尿病 (T1D)、脑脊髓炎、肉芽肿性多血管炎、格雷夫斯病、桥本甲状腺炎、炎性肌病、伊萨克综合征 (自身免疫性神经性肌强直)、朗-伊二氏肌无力综合征、边缘系脑炎、显微镜下多血管炎、米-费二氏综合征、混合结缔组织病、伴有传导阻滞的多灶性运动神经病 (MMN)、多发性硬化、重症肌无力、新生儿心脏传导阻滞、视神经脊髓炎 (德维克综合征)、斜视眼肌阵挛综合征、视神经病变、与链球菌相关联的儿科自身免疫性神经精神性疾病 (PANDAS)、副肿瘤性小脑变性、副肿瘤性小脑综合征、多肌炎/皮肌炎、原发性胆汁性肝硬变、原发性干燥综合征、类风湿性关节炎、硬化性肌炎、硬皮病、僵人综合征、亚急性感觉神经元病、西登哈姆舞蹈病、系统性红斑狼疮、系统性硬化病和系统性血管炎。在又其它实施方式中,疾病或紊乱包括T1D或乳糜泻。在又其它实施方式中,疾病或紊乱包括T1D和乳糜泻。在又其它实施方式中,疾病或紊乱包括T1D、乳糜泻、自身免疫性甲状腺炎和APS-1。

[0112] 在某些实施方式中,如果哺乳动物可能发展或已经发展疾病或紊乱之一,则给哺乳动物施用预防或治疗疾病或紊乱的药物和/或疗法。

[0113] 在某些实施方式中,如果哺乳动物可能发展或已经发展疾病或紊乱之一,则建议哺乳动物寻求预防或治疗疾病或紊乱的药物和/或疗法。

[0114] 本发明进一步提供了同时测定哺乳动物是否可能发展或已经发展多种疾病或紊乱的每一种的试剂盒,其中多种疾病或紊乱的每一种的特征在于在哺乳动物的生物样品中存在至少一种自身抗体。在某些实施方式中,试剂盒包括多种抗原,其中多种抗原的每种特异性地,并且彼此排他性地,结合至与多种疾病或紊乱之一相关联的一种自身抗体,其中每种抗原包括利用可检测标签衍生的抗原 (第一衍生的抗原) 和利用标记标签衍生的抗原 (第二衍生的抗原)。在某些实施方式中,试剂盒包括含有多个非重叠区域的固体表面,其中多个非重叠区域的每个利用与标记标签之一结合的捕获分子衍生,其中标记标签的每种结合至固体表面上的多个非重叠区域仅一个。

[0115] 在某些实施方式中,固体基底表面包括硅片、玻璃、金属、塑料、陶瓷、金属合金、聚合物或其任意组合。

[0116] 本领域技术人员仅仅使用常规实验将认识到或能够确定本文描述的具体程序、实施方式、权利要求书和实施例的众多等价方案。这些等价方案被视为在本发明的范围内并且由所附权利要求书覆盖。例如,应当理解,利用本领域公知的替代方案和仅仅使用常规实验修改反应条件,包括但不限于反应时间、反应大小/体积和实验试剂比如溶剂、催化剂、压力、大气条件——例如,氮气氛——和还原/氧化剂,在本申请的范围內。

[0117] 将理解,在本文提供值和范围的任何地方,由这些值和范围涵盖的所有值和范围意味着包含在本发明的范围内。而且,落入这些范围内的所有值,以及值的范围的上限或下限也由本申请所考虑。

[0118] 下列实施例进一步阐明了本发明的方面。但是,它们绝不是对本文陈述的本发明的教导或公开内容的限制。

[0119] 实施例

[0120] 现在参照下列实施例描述本发明。仅出于说明的目的提供这些实施例并且本发明

绝不应当被解释为限于这些实施例,而是应当被解释为涵盖由于本文提供的教导而变得显而易见的任何和所有变化。

[0121] 材料和方法

[0122] 对象:

[0123] 从40名新诊断的T1D患者和50名健康对照获得血清样品。通过标准放射分析,所有T1D患者对于至少一种iAb是阳性的,并且通过放射分析,19/40是TGA阳性的。健康对象具有与病例类似的年龄并且通过放射分析,对于所有iAb和TGA是阴性的。

[0124] 多种自身抗体多重ECL分析:

[0125] 先前描述的单独ECL IAA和GADA分析适合于测量四种抗体,如在图1中图解的。简言之,将12 μ l的患者血清(对于重复测量足够的量)与14.5 μ l的500mM醋酸混合,其有助于IAA测定。在室温下培育45分钟之后,将25 μ l酸处理的血清溶液转移至含有在PBS中具有5%BSA(v/v)的新鲜制备的抗原/中和溶液的96孔板,该溶液由如下组成:8.3 μ l的1M Tris-HCl(pH=9.0)和35 μ l的标记的抗原混合物(在100ng/ml浓度下的Sulfo-TAG和接头-A标记的胰岛素原;分别在125和250ng/ml浓度下的Sulfo-TAG和接头-B标记的IA-2;分别在125和500ng/ml浓度下的Sulfo-TAG和接头-C标记的GAD65;分别在100和400ng/ml浓度下的Sulfo-TAG和生物素标记的转谷氨酰胺酶)。

[0126] 在室温下伴随搅拌培育混合物2小时,然后在4 $^{\circ}$ C下培育过夜(>16小时)。在同一天,在4 $^{\circ}$ C下利用150 μ l的3%封闭剂A(MSD)/孔封闭QuickPlex 4-Spot板过夜。在第二天,将封闭的4-Spot板利用PBST(含有0.05%吐温-20的PBS)洗涤三次,然后添加过夜培育的血清混合物。将来自每个孔的组分在4-Spot板上分入两个孔,30 μ l/孔。在室温下培育1小时,接着利用PBST进行3次洗涤以去除过量的标记的抗原之后,加入150 μ l/孔的2 $\times$ Read缓冲液(MSD)并且将板在MSD Sector Imager 2400(MSD,Rockville,MD)上计数。小鼠单克隆胰岛素抗体-125(由Dr.Tom Thomas,Vanderbilt提供)、小鼠单克隆GAD65抗体(GAD-6,Abcam,Cambridge,MA)、标准内部IA-2A阳性血清和标准内部TGA阳性血清分别被用作4种自身抗体的分析内标阳性对照,并且所有四种自身抗体的结果被表达为指数(指数=[信号_{样品}-信号_{阴性对照}]/[信号_{阳性对照}-信号_{阴性对照}])。在该多重ECL分析中4种自身抗体的分析截止被称为它们的对应的单一ECL分析。

[0127] 放射分析

[0128] 在本研究中使用的mIAA、GADA、IA-2A和TGA的放射分析都如在Bao,et al.,1999,J.Autoimmun.13:143-148;Yu,et al.,2000,Proc Natl Acad Sci.97:1701-1706;Bonifacio,et al.,2010,J.Clin.Endocrinol.Metab.95:3360-3367中描述的进行。分别在500个正常对照样品——对于GADA和IA-2A——和106个对照——对于mIAA——的第99百分位处设定放射分析截止。在184个正常对照样品的第100百分位处设定TGA放射分析的截止。

[0129] 统计学

[0130] 在PRISM 6.0软件(GraphPad Software Inc.,San Diego,CA)中使用相关分析、秩和或费舍尔精确检验进行统计学分析。p-值<0.05被视为统计学上显著的。

[0131] 实施例1:

[0132] 该非限制性实施例涉及使用电化学发光(ECL)检测对自身抗体IAA、GADA、IA-2A和TGA的多重检测,作为同时筛查T1D和乳糜泻风险的方式。在某些实施方式中,本方法可以被

用于大规模筛查大的群体。

[0133] 在患有T1D的40名新诊断的患者中,19名患者、31名患者、24名患者和19名患者分别对于mIAA、GADA、IA-2A和TGA是阳性的。ECL多重分析分别在26名患者、31名患者、26名患者和31名患者中检测到IAA、GADA、IA-2A和TGA。因而,与放射分析相比,ECL多重分析在更多患者中检测到mIAA、IA-2和TGA(但是没有GADA)。患者中阳性的增加对于IAA(26对19; $p=0.17$)和TGA(31对19; $p=0.01$)是尤其明显的。所有对照样品在ECL多重分析中测试对于所有iAb和TGA阴性。

[0134] 在ECL多重分析中的自身抗体的水平与对应的单一抗体放射分析良好地相关(图2A-2B),即使ECL-IAA和ECL-TGA分析检测到更多阳性。

[0135] 为了评估来自相邻点的可能信号干扰,将在多重ECL分析中的每种抗体测量与单独抗体ECL分析比较(图3A-3B)。仅3/160配对的比较显示可以归因于信号干扰的差异:对于IAA两个(图A)和对于IA-2A一个(图B)。在多重ECL分析中对应于阴性单一ECL抗体分析的所有三个阳性结果处于低水平下并且在相同孔中伴随另一种高自身抗体信号。这三个低水平阳性非常可能是在多重ECL分析中由信号干扰引起的假阳性。

[0136] 在当前时间,多种候选干预被提出以废除或减慢胰岛自身抗体(iAb)阳性对象中1型糖尿病(T1D)的进展,但是大规模筛查合格对象和一般群体仍然是费力的和无效的过程。如在本文中证明的,使用电化学发光(ECL)检测研发验证的非放射性iAb分析,与金标准放射分析相比,其具有优异的灵敏度和特异性。在来自MesoScale Discovery(MSD)的平台上使用ECL检测允许在单孔中使用小血液体积(6 μ l)测量至少四种抗体。在本研究中,使用MSD QuickPlex 4-Spot板,胰岛素(IAA)、GAD65(GADA)和IA-2(IA-2A)的三种iAb成功地在96孔板的单孔中与组织转谷氨酰胺酶自身抗体(TGA)结合。测试40名新发病的T1D患者,通过放射分析,对于至少一种iAb都是阳性的和它们中的一半对于TGA是阳性的,以及50名健康对照。与对应的标准放射分析相比,在患者对正常对照中鉴定的阳性方面,多重分析对于所有四种自身抗体保留100%灵敏度和100%特异性。对于IAA和TGA,多重ECL分析与当前的放射分析相比能够鉴定更多阳性。该多重分析的研发促进在一般群体中高通量筛查T1D和乳糜泻风险。

[0137] 实施例2:

[0138] 研发7-重电化学发光(ECL)分析,在单孔中结合并且使用仅6 μ l血清,测试IAA、GADA和IA-2A,甲状腺过氧化物酶(TPOA)、甲状腺球蛋白(ThgA)、转谷氨酰胺酶(TGA)和干扰素 α (IFN α A)的自身抗体。TGA和IFN α A分别是乳糜泻和1型自身免疫性多腺体综合征的标志物。

[0139] 简言之,将12 μ l的患者血清(发现对于重复测量足够的量)与14.5 μ l的500mM醋酸混合,其对于IAA测定是必需的。在室温下培育45分钟之后,加入8.8 μ l的1M Tris-HCl(pH=9.0)用于中和。同时如下平行制备标志的抗原混合物,但是不同于利用QuickPlex板对于多重ECL分析:具有其最优量的每种生物素标志的抗原分别与其对应的接头-链霉亲和素混合,在室温下培育30分钟;然后,加入停止液,然后分别以其最优量加入其对应的Sulfo-标记的抗原,所有7种抗原制品混合在一起,最终体积2ml。将35 μ l的抗原混合物/孔转移入血清制备孔。

[0140] 在室温下伴随搅拌培育混合物2小时,然后在4 $^{\circ}$ C下培育过夜(>16小时)。在同一

天,在4℃下利用150μl的3%封闭剂A (MSD) /孔封闭UPlex板过夜。在第二天,将封闭的UPlex板利用PBST (含有0.05%吐温-20的PBS) 洗涤三次,然后添加过夜培育的血清混合物。将来自每个孔的组分在UPlex板上分入两个孔,30μl/孔。在室温下培育1小时,接着利用PBST进行3次洗涤以去除过量的标志的抗原之后,加入150μl/孔的2×Read缓冲液 (MSD),并且将板在MSD Sector Imager 2400 (MSD,Rockville,MD) 上计数。小鼠单克隆胰岛素抗体-125 (由Dr.Tom Thomas,Vanderbilt提供)、小鼠单克隆GAD65抗体 (GAD-6,Abcam,Cambridge,MA)、标准内部IA-2A阳性血清、标准内部TGA阳性血清、标准内部TPOA阳性血清、标准内部ThgA阳性血清和标准内部INFαA阳性血清分别被用作7种自身抗体的分析内标阳性对照,并且所有7种自身抗体的结果被表达为指数 (指数=[信号样品-信号阴性对照]/[信号阳性对照-信号阴性对照])。在该多重ECL分析中7种自身抗体的分析截止被称为它们的对应的单一ECL分析。

[0141] 在具有胰岛Ab+的新发病的T1D患者 (n=168) 和具有胰岛Ab-的健康对照 (n=118) 中验证7-重分析。在118名对照的第100百分位处设定所有自身抗体的阳性截止。将来自7-重分析的结果与来自对应的单一自身抗体ECL和RIA分析和标准ELISA分析——对于INFαA——的那些比较。在T1D患者之中,7-重分析在水平方面与每种对应的单一抗体RIA良好地相关 (对于IAA、GADA、IA-2A、TPOA、ThgA、TGA和INFα——利用ELISA,分别 $R^2=0.74$ 、 0.75 、 0.75 、 0.66 、 0.64 、 0.62 和 0.51 ,对于所有 $p<0.0001$)。对于所有自身抗体,7-重分析保留100%灵敏度,并且在168名T1D患者中的7-重分析和它们的对应的RIA或ELISA的阳性在表1中总结。

[0142] 在对于118名健康对象的特异性方面,这些样品的每种对于所有7种Ab是阴性的。在7-重与放射分析/ELISA之间观察到极好相关性。ZnT8A ECL单一分析被验证并且显示了与ZnT8ARIA的良好相关性,并且可以被加入至UPlex分析。

[0143] 几种不一致的样品处于低水平下,接近于截止。总之,该新型多重分析促进在大规模一般群体中使用少至6μl血清筛查T1D、乳糜泻、自身免疫性甲状腺炎和ASP-1。

[0144] 表1:在7-重分析和它们的对应的RIA或ELISA#中阳性的对象的数目

[0145]

	IAA	GADA	IA-2A	TGA	TPOA	ThgA	INFαA [#]
RIA	101	95	102	19	55	51	11
7-重	107	97	110	26	57	55	11

[0146] 本文引用的每篇专利、专利申请和出版物的公开内容在此通过引用以其全部并入本文。

[0147] 虽然已经参照具体实施方式公开了本发明,但是显而易见的是本发明的其它实施方式和变化可以由本领域技术人员设计而不背离本发明的真实精神和范围。所附权利要求意欲被解释为包括所有这样的实施方式和等价变化。

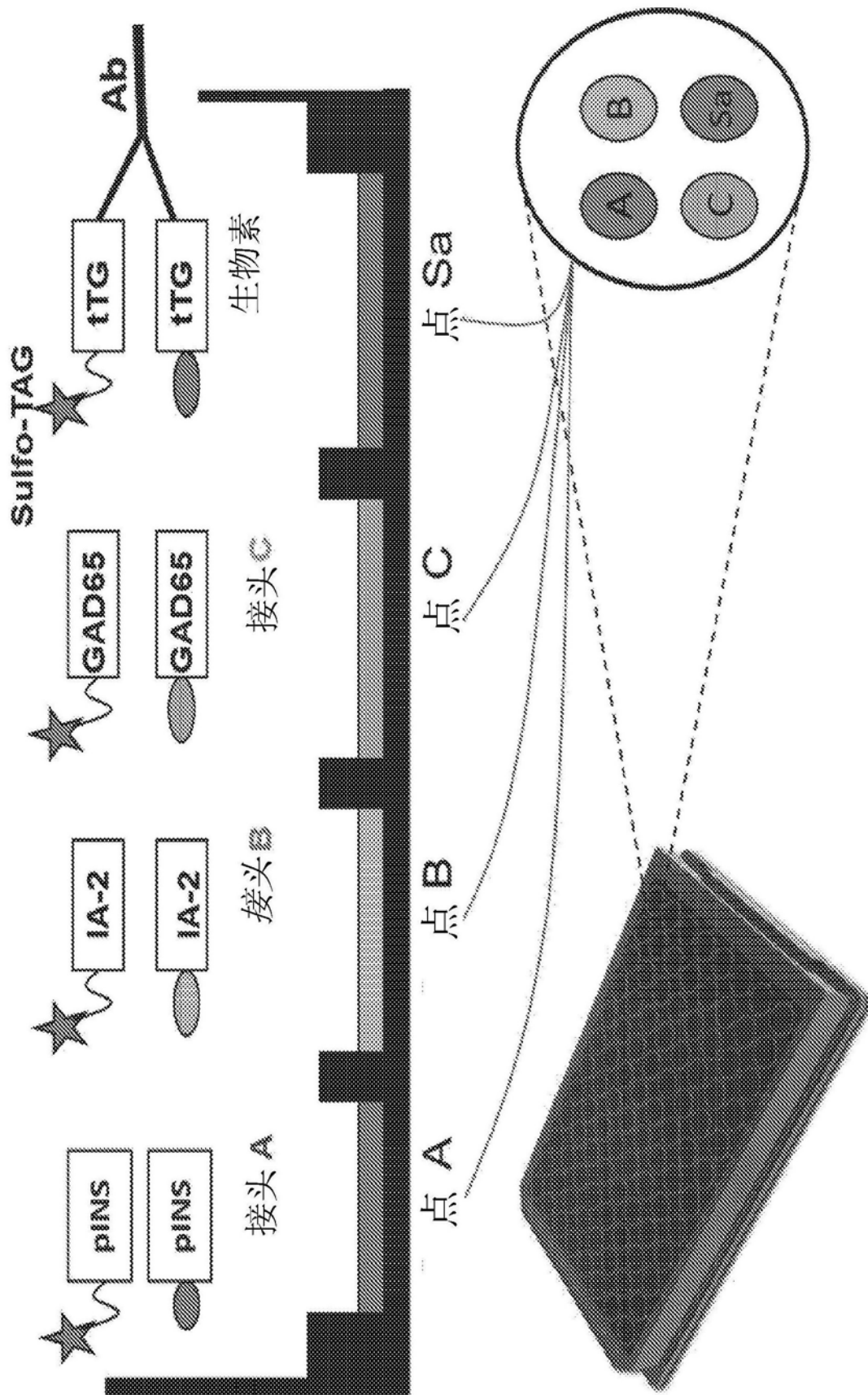


图1

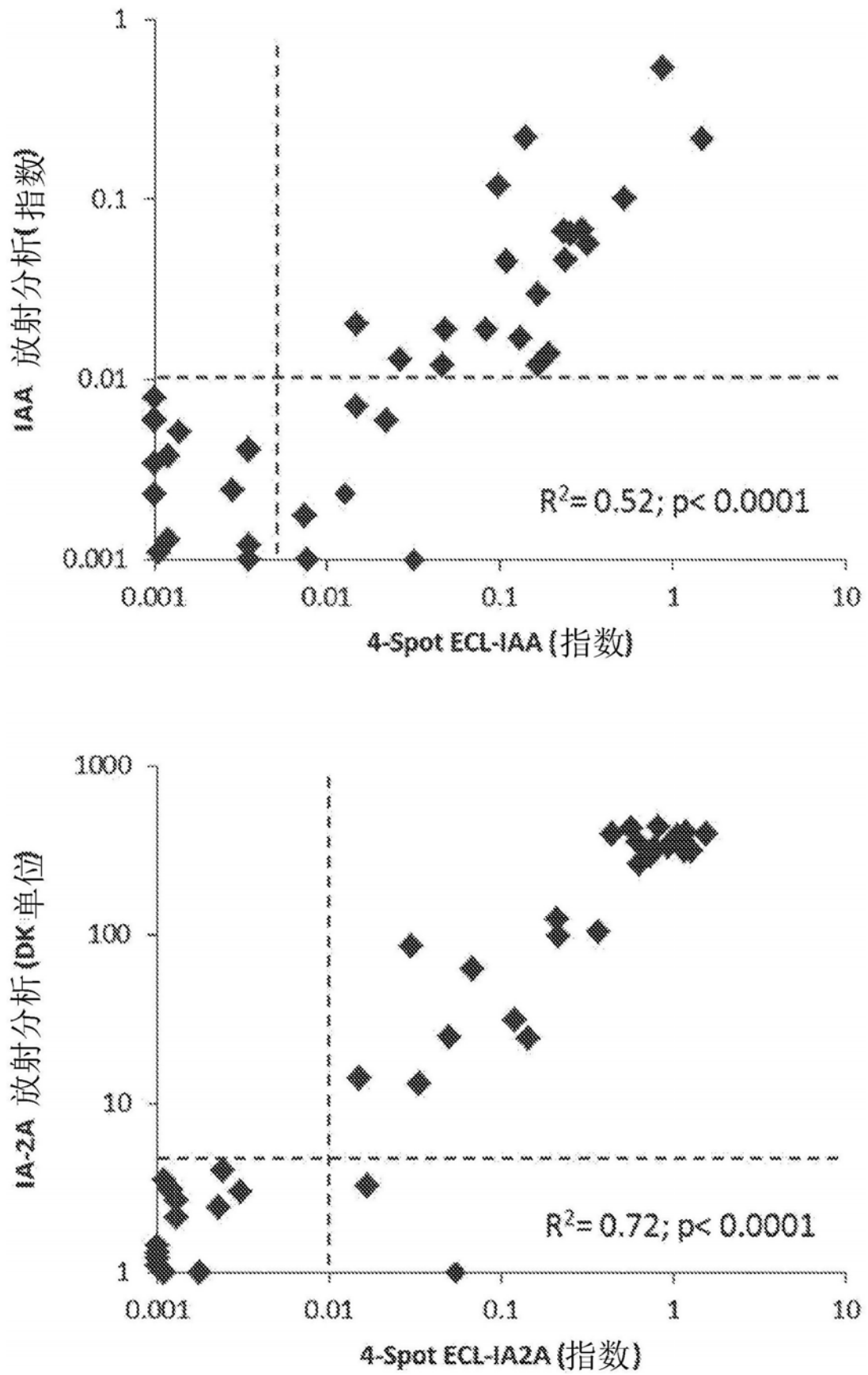


图2A

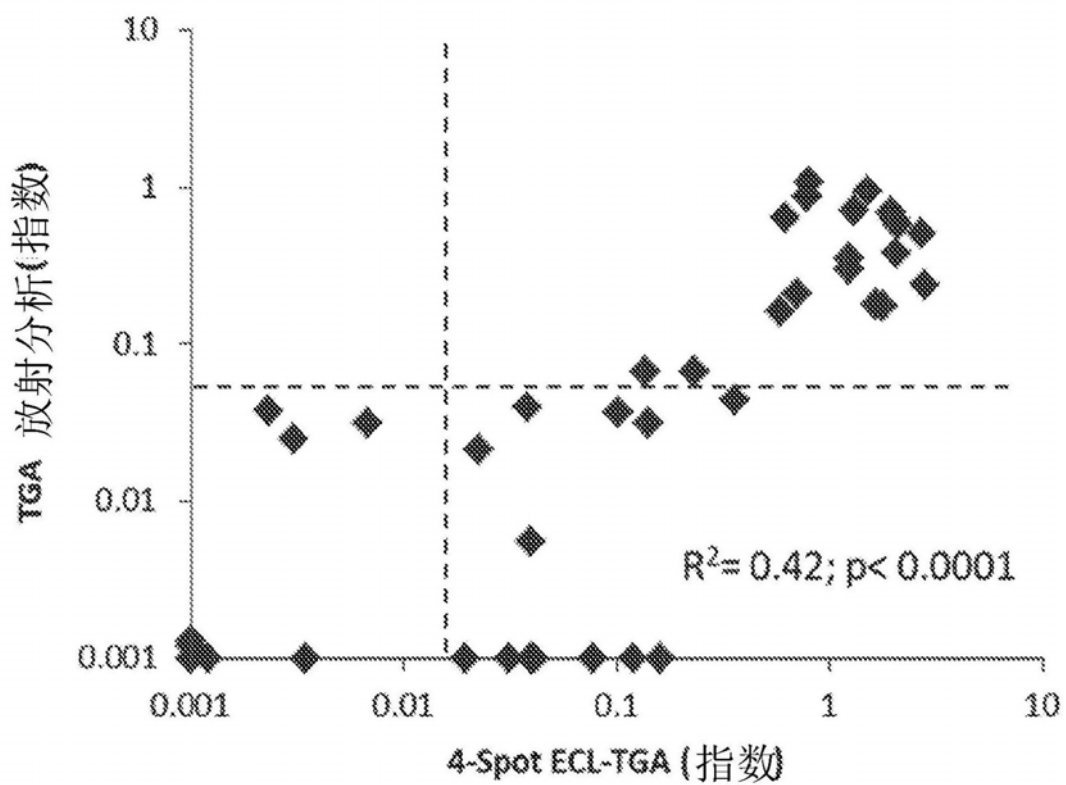
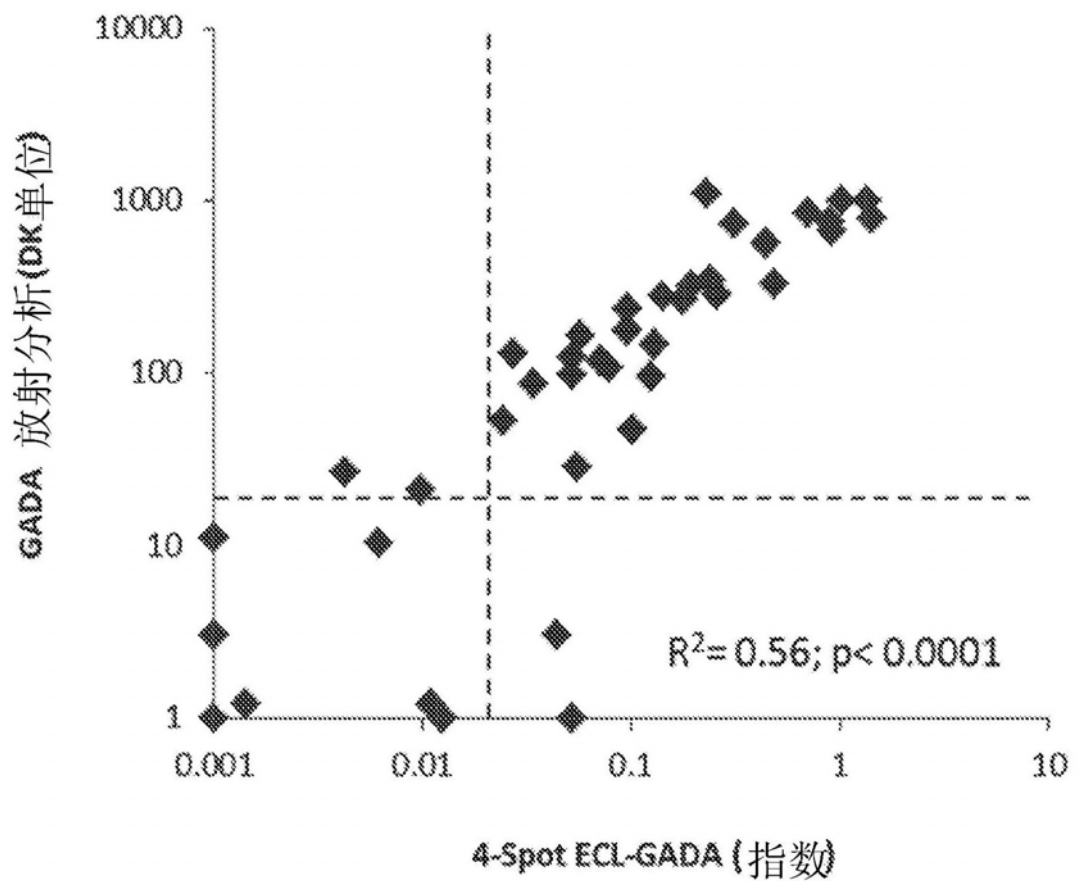


图2B

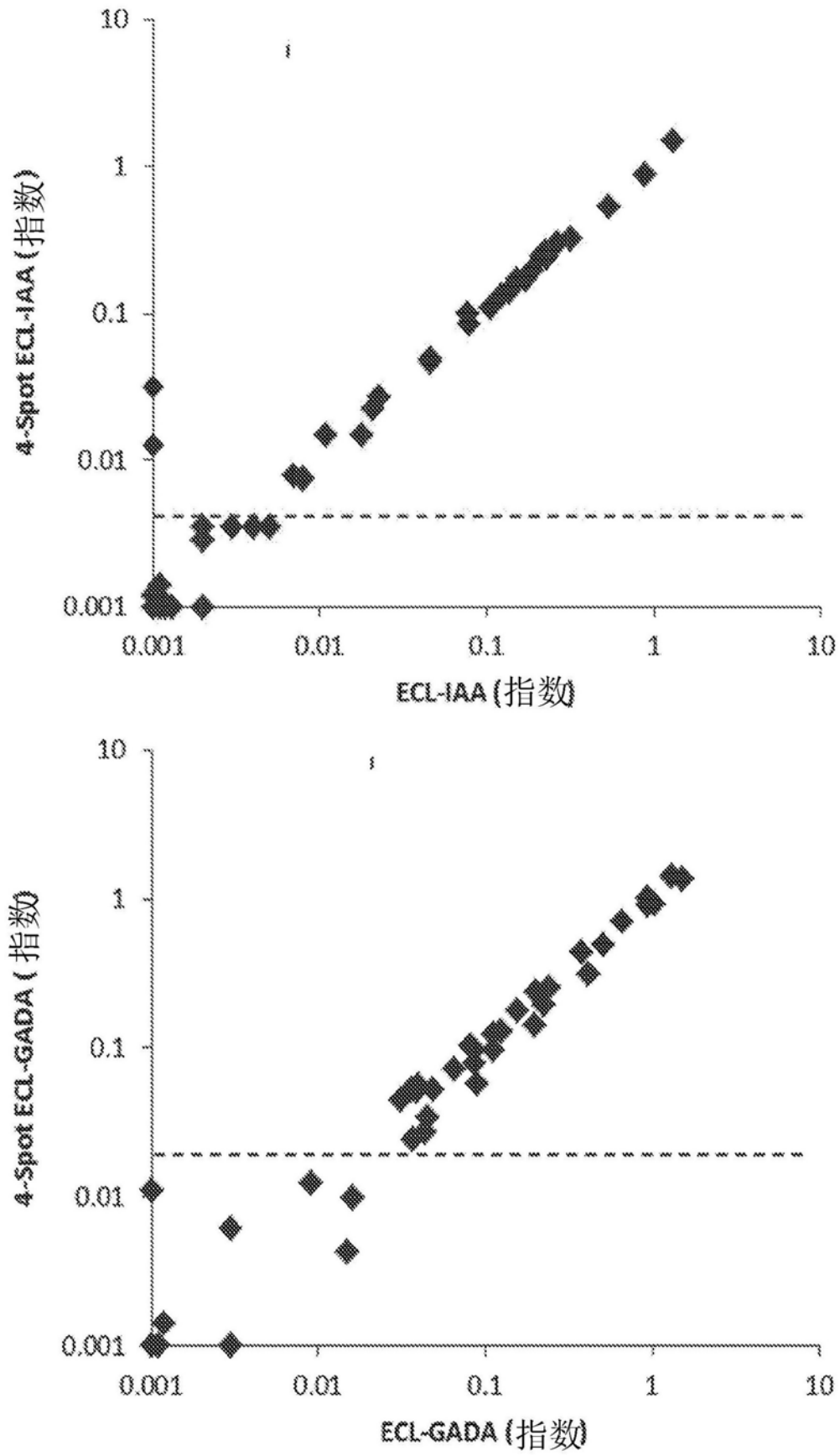


图3A

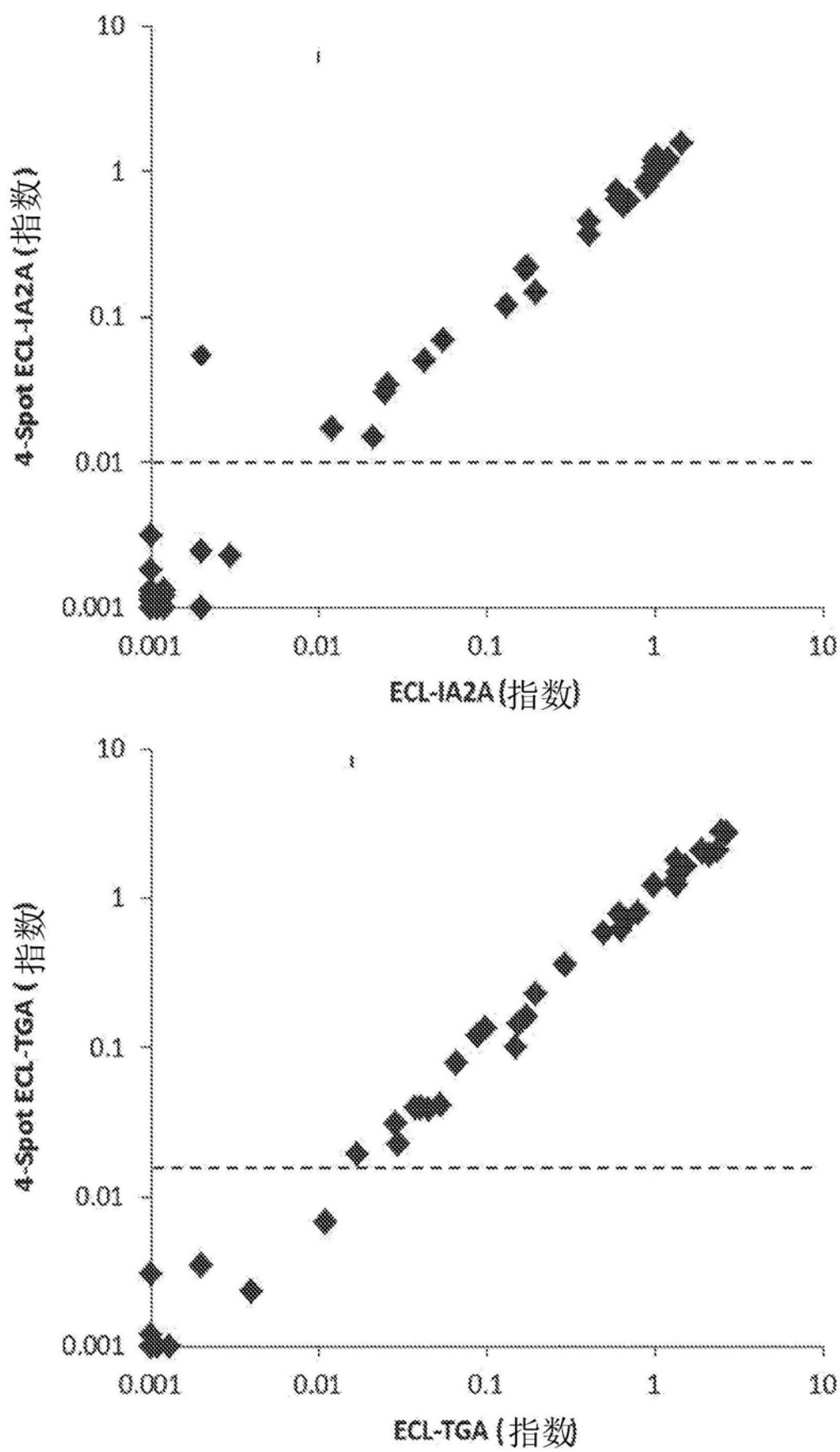


图3B

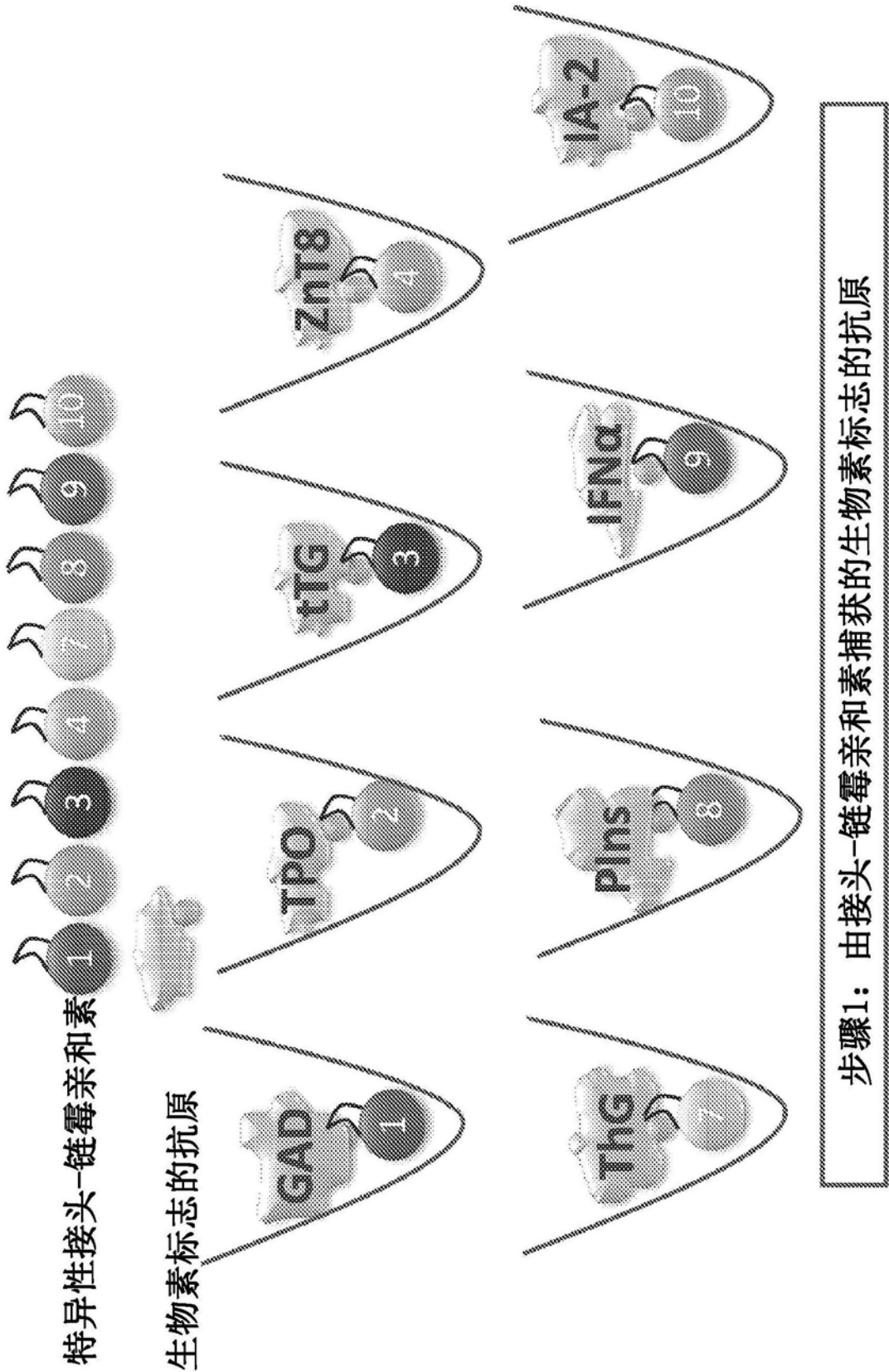


图4A

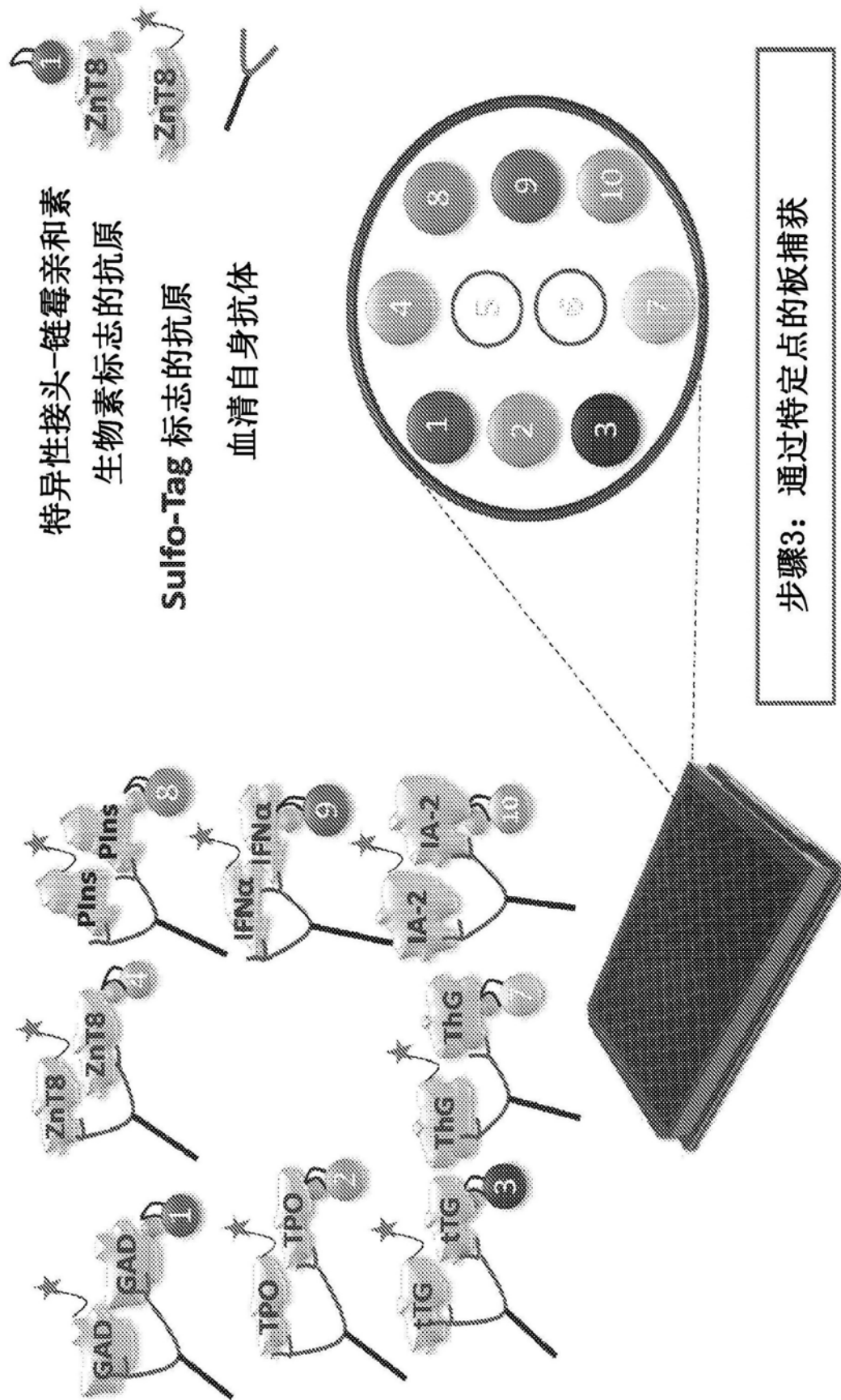


图4C

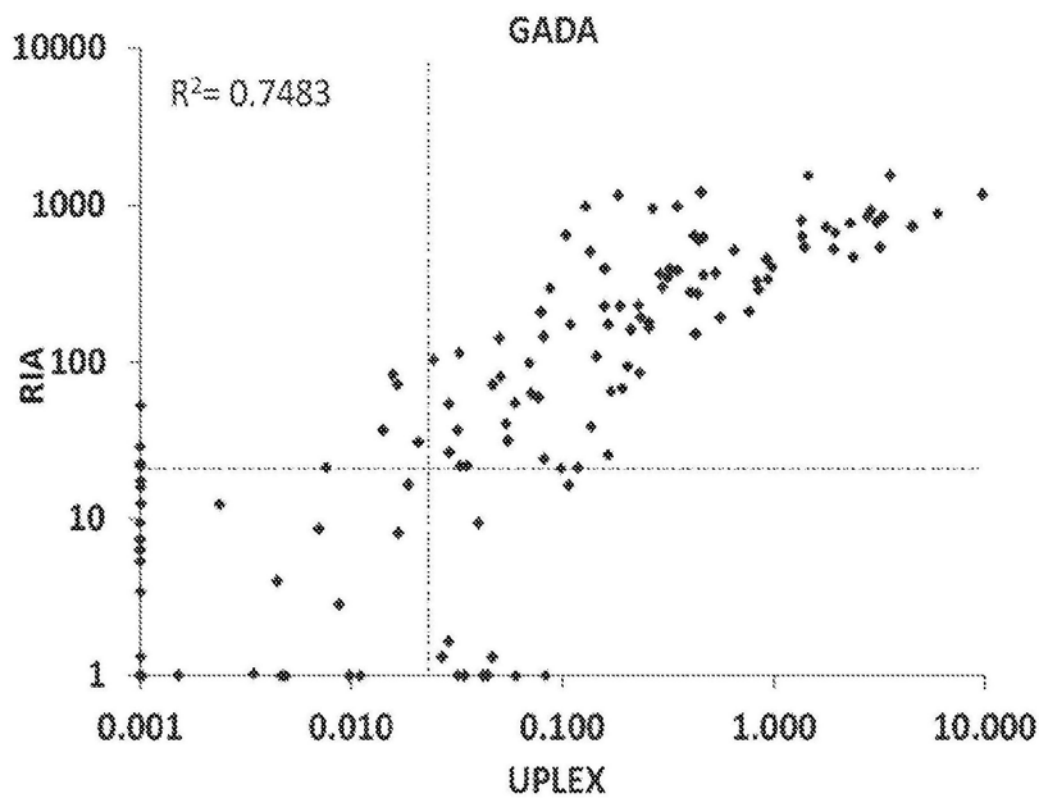


图5A

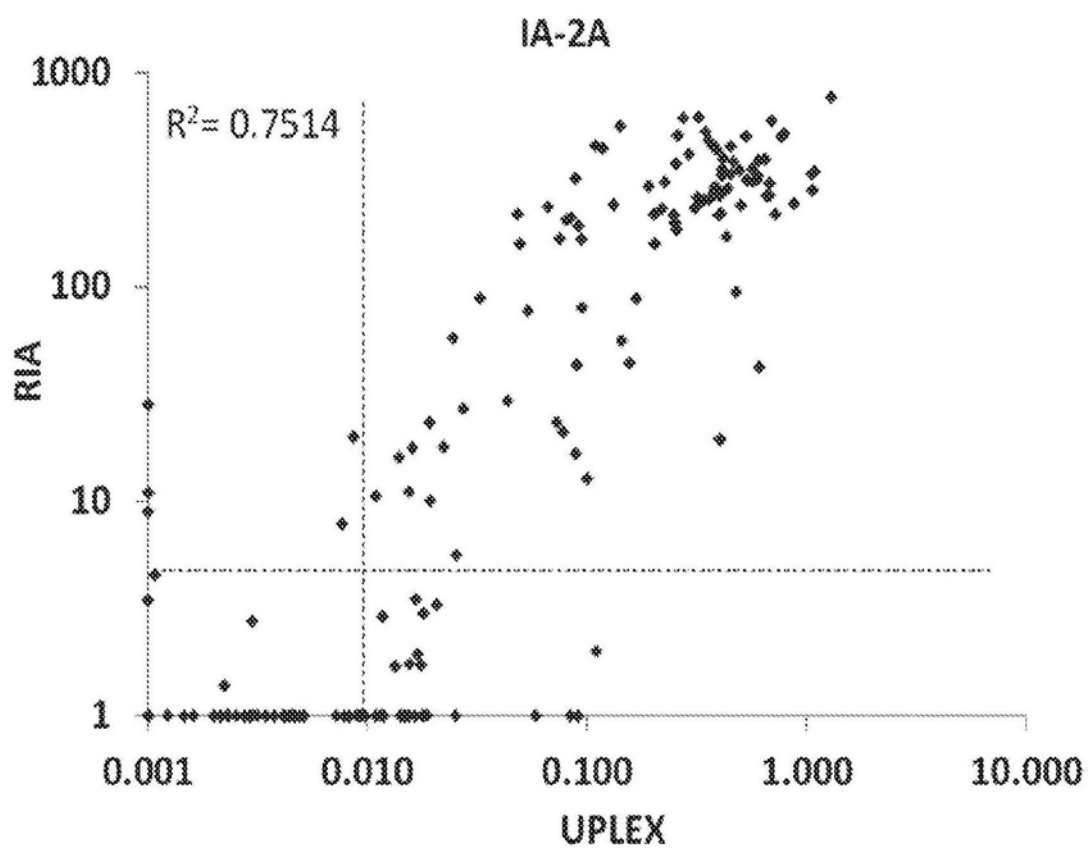


图5B

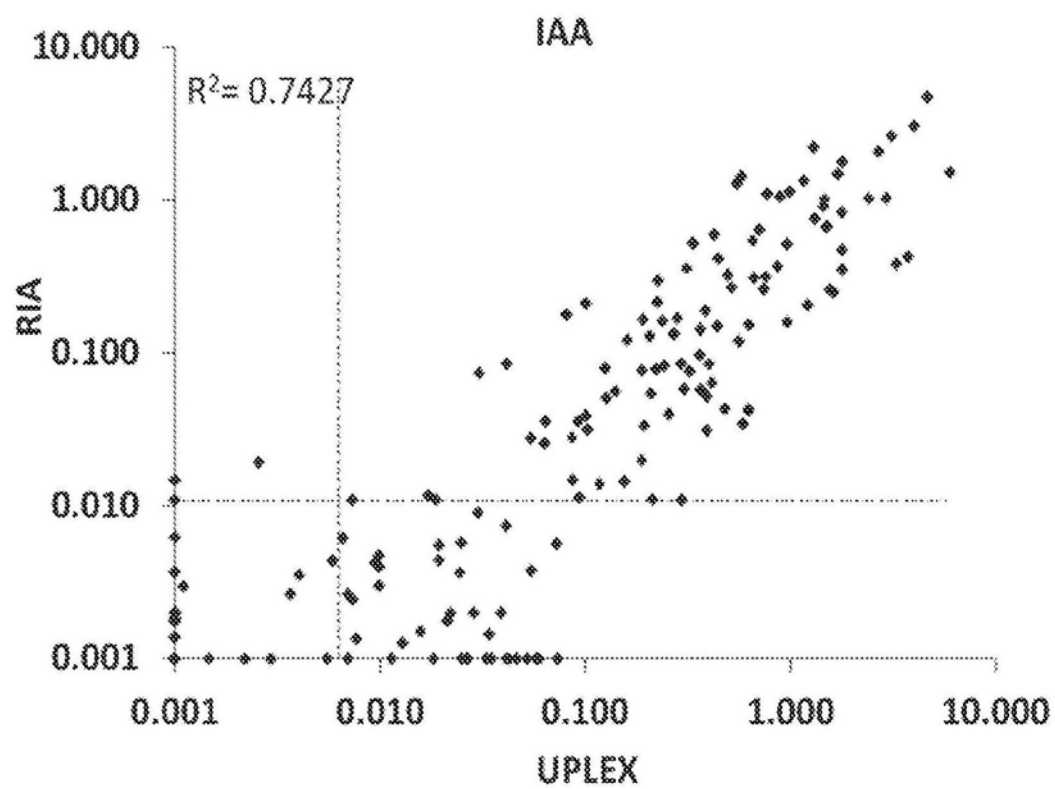
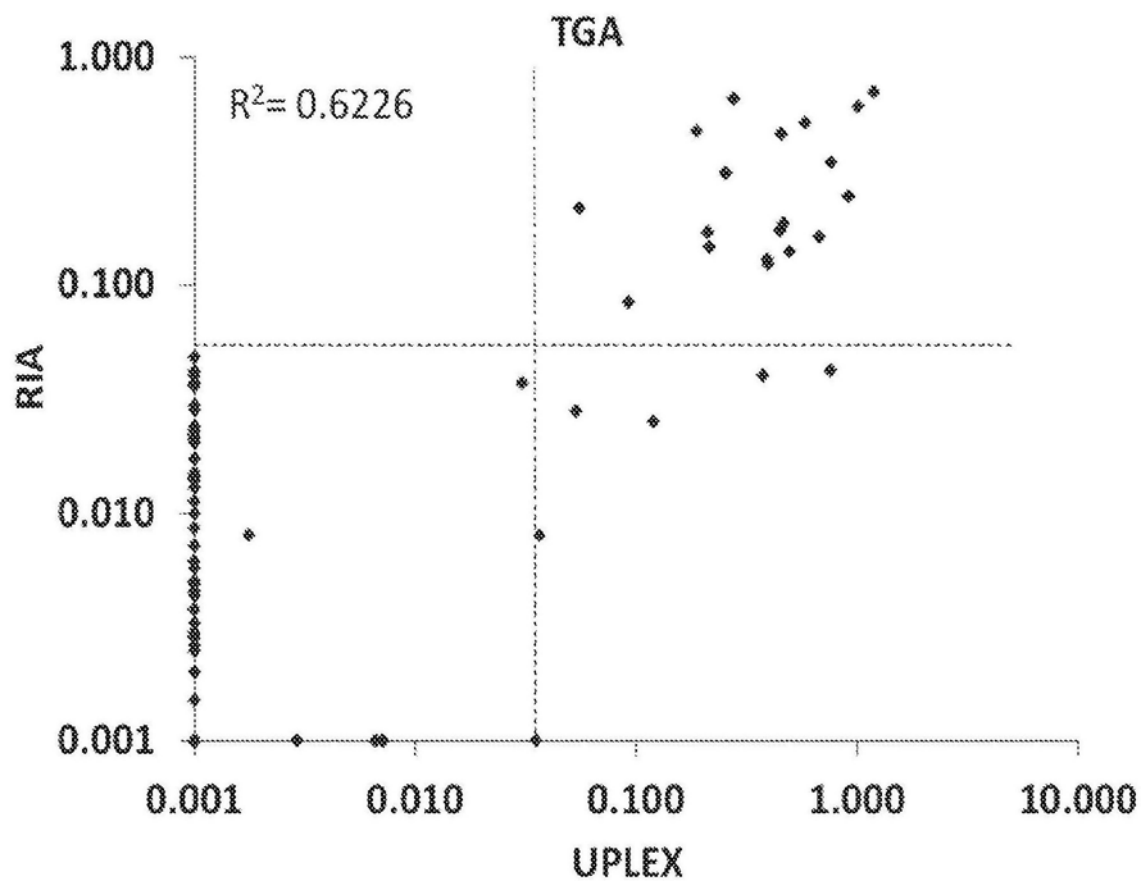


图5C



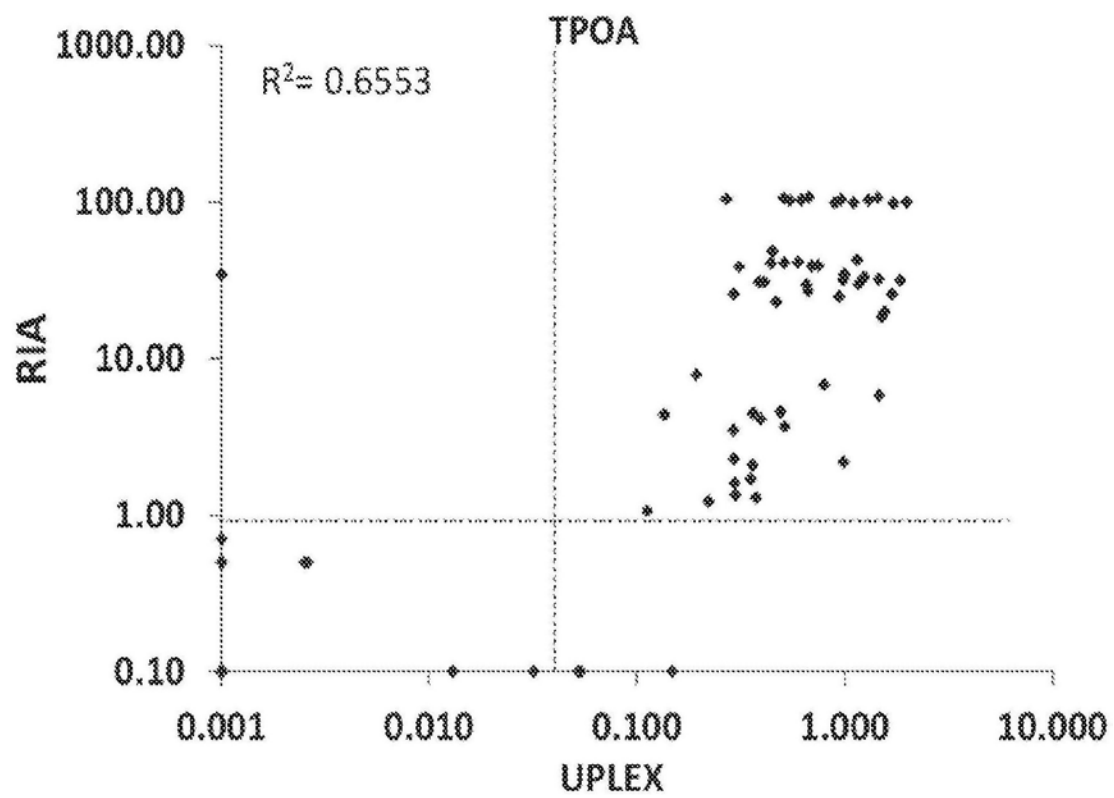


图5E

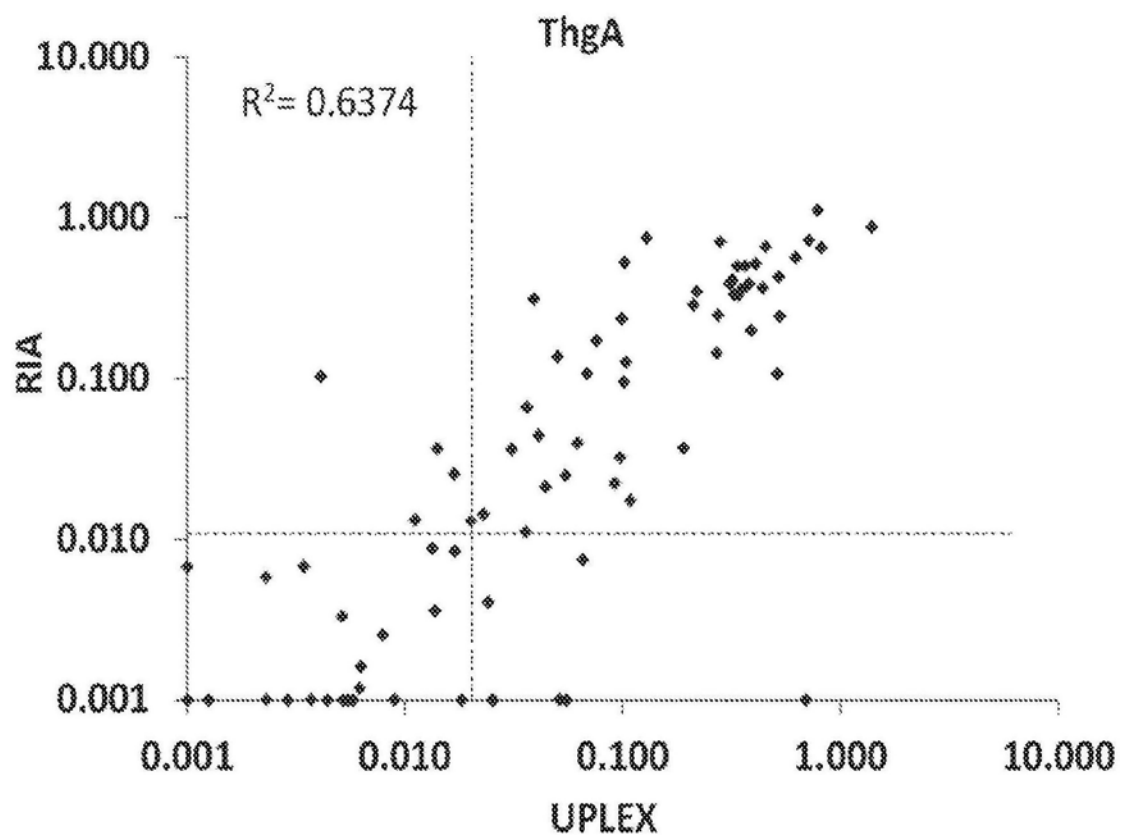


图5F

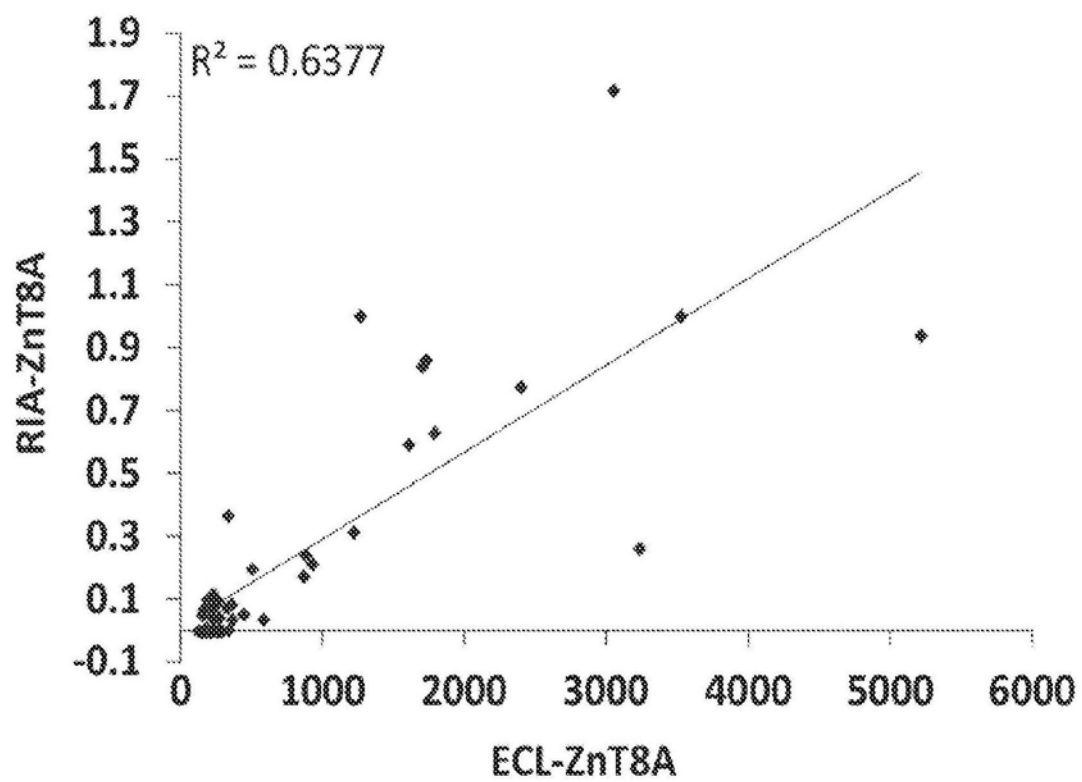


图5H

专利名称(译)	诊断或评估哺乳动物中的疾病或紊乱的新型多重分析		
公开(公告)号	CN108603885A	公开(公告)日	2018-09-28
申请号	CN201680079536.4	申请日	2016-11-17
[标]申请(专利权)人(译)	科罗拉多大学评议会		
申请(专利权)人(译)	科罗拉多大学评议会公司		
当前申请(专利权)人(译)	科罗拉多大学评议会公司		
[标]发明人	L余 M罗尔斯 A米歇尔斯		
发明人	L·余 M·罗尔斯 A·米歇尔斯		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/566 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/54306 G01N33/564 G01N33/6854 G01N2800/24		
代理人(译)	张全信 董志勇		
优先权	62/256624 2015-11-17 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明包括可以用于同时测定多种抗体中的抗体是否存在于样品中的方法和试剂盒。在某些实施方式中，抗体的至少一种包括自身抗体。在其它实施方式中，本发明的方法和试剂盒可以被用于同时测定对象是否可能发展或已经发展多种疾病或紊乱的每一种。

