



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111316099 A

(43)申请公布日 2020.06.19

(21)申请号 201880059091.2

(22)申请日 2018.07.05

(30)优先权数据

62/531,525 2017.07.12 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.03.11

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/040890 2018.07.05

(87)PCT国际申请的公布数据

W02019/014044 EN 2019.01.17

(71)申请人 约翰霍普金斯大学

地址 美国马里兰州

申请人 斯坦福大学

(72)发明人 达克斯·弗 成峰·梅里曼

戴宏杰 万昊

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

代理人 李敏春 郑霞

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/564(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

权利要求书2页 说明书15页

序列表6页 附图6页

(54)发明名称

用于1型糖尿病诊断的基于脂蛋白体的ZNT8
自身抗原

(57)摘要

描述了检测血清中的ZNT8抗体的方法。该方法包括脂蛋白体,其包含暴露在脂蛋白体外部的ZnT8蛋白的跨膜结构域(TMD)和胞质结构域(CTD);包含靶向ZnT8蛋白的抗体的血清;以及与ZnT8抗体结合的标记的捕获的自身抗体。

1. 一种检测血清中的ZnT8抗体的方法,所述方法包括:

提供具有内部和外部的脂蛋白体的集合,其中一些脂蛋白体在其外部具有ZnT8的跨膜结构域(TMD)的蛋白序列,而其他脂蛋白体包含暴露在其外部的ZnT8蛋白的胞质结构域(CTD)的蛋白序列;

添加包含抗体的血清,所述抗体靶向形成与所述抗体结合的脂蛋白体的TMD的蛋白序列和/或CTD的蛋白序列;

添加标记的捕获的自身抗体,所述标记的捕获的自身抗体与结合至所述脂蛋白体的所述抗体结合;以及

测量靶向所述TMD的蛋白序列和/或所述CTD的蛋白序列的与所述脂蛋白体结合的抗体的量。

2. 如权利要求1所述的方法,其中所述TMD的蛋白序列和所述CTD的蛋白序列是全长ZnT8蛋白的一部分。

3. 如权利要求2所述的方法,其中所述ZnT8蛋白是人类蛋白。

4. 如权利要求2所述的方法,其中所述全长ZnT8蛋白是人类ZnT8的325R多态性变体。

4. 如权利要求1所述的方法,其中所述脂蛋白体的集合包含内侧外翻型脂蛋白体和正常外向型脂蛋白体。

5. 如权利要求4所述的方法,其中内侧外翻型脂蛋白体在其外部包含CTD蛋白序列。

6. 如权利要求5所述的方法,其中所述CTD蛋白序列是全长ZnT8蛋白的一部分。

7. 如权利要求4所述的方法,其中所述正常外向型脂蛋白体在其外部包含TMD蛋白序列。

8. 如权利要求7所述的方法,其中所述TMD蛋白序列是全长ZnT8蛋白的一部分。

9. 如权利要求1所述的方法,其中所述脂蛋白体的集合在芯片上。

10. 如权利要求9所述的方法,其中所述芯片是pGOLD芯片。

11. 如权利要求10所述的方法,所述方法包括结合至所述芯片的一种或更多种第二蛋白。

12. 如权利要求11所述的方法,其中所述一种或更多种第二蛋白选自由IA2、GADA及其组合组成的组。

13. 如权利要求1所述的方法,其中所述血清是人类血清。

14. 如权利要求13所述的方法,其中所述人类血清用胎牛血清(FBS)进行稀释。

15. 如权利要求14所述的方法,其中所述人类血清用所述胎牛血清(FBS)以10至30倍的范围进行稀释。

16. 如权利要求1所述的方法,其中所述标记的捕获的自身抗体包含荧光标记物。

17. 如权利要求16所述的方法,其中所述测量包括通过分析所述荧光标记物的荧光强度来确定与所述ZnT8蛋白结合的所述抗体的量。

18. 如权利要求10所述的方法,其中测量与所述ZnT8蛋白结合的所述抗体包括红外扫描仪。

19. 如权利要求1所述的方法,其中所述脂蛋白体包含选自包括以下的组的脂质:1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸-(1'-rac-甘油)、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺及其组合。

20. 如权利要求1所述的方法,其中所述检测具有大于70%灵敏度和大于90%特异度的检测性能。

21. 如权利要求9所述的方法,其中所述脂蛋白体的集合被打印在芯片上。

22. 一种检测血清中的ZNT8抗体的方法,所述方法包括:

通过将具有内部和外部的脂蛋白体组合形成混合物,所述脂蛋白体包含暴露在所述脂蛋白体的外部的ZnT8蛋白的跨膜结构域(TMD)和胞质结构域(CTD)的蛋白序列;包含靶向所述蛋白序列的抗体的血清;与靶向所述蛋白序列的所述抗体结合的标记的捕获的自身抗体;以及测量与所述蛋白序列结合的抗体的量。

用于1型糖尿病诊断的基于脂蛋白体的ZnT8自身抗原

[0001] 相关申请的引用

[0002] 本申请要求2017年7月12日提交的美国临时专利申请第62/531,525号的权益,该申请特此通过引用并入用于所有目的,如同其在本文中完整阐述一样。

[0003] 政府权益的声明

[0004] 本发明根据由国立卫生研究院(the National Institute of Health)授予的批准号R01GM065137在政府支持下完成。政府对本发明享有一定的权利。

[0005] 序列表

[0006] 本申请包含序列表,该序列表已经以ASCII格式通过电子方式提交,并且特此通过引用以其整体并入。创建于2018年6月27日的所述ASCII副本被命名为P14838-02_SL.txt,并且大小为12,449字节。

[0007] 发明背景

[0008] 自20世纪60年代以来,全球儿童中的1型糖尿病(T1D)的发病率已经以每年3%至5%增长,这使得灵敏且特异的T1D诊断变得必要。T1D相关的自身抗体(autoantibody)的检测可以定量症状性T1D发作的风险程度,以及提供入选寻求预防明显疾病发展的试验。与早期建立的针对作为用于T1D诊断的三种主要生物标志物的胰岛素、胰岛抗原2(IA2)和谷氨酸脱羧酶(GAD)的自身抗体不同,最近通过生物信息学发现锌转运体8自身抗体(zinc transporter 8autoantibody;ZnT8A)是用于T1D诊断的另一种主要生物标志物,扩展了T1D诊断性自身抗体的组。在前驱糖尿病(pre-diabetic)个体中,ZnT8A出现于疾病临床发作前数月至数年的前驱期中,并且ZnT8A的检测可以提高T1D预测的准确性,使ZnT8A成为评估T1D发展风险的最重要的生物标志物之一。

[0009] ZnT8是一种专门的锌转运体,主要存在于胰腺β细胞的胰岛素分泌颗粒中⁴。它是一种多次跨越的跨膜蛋白,由两个功能模块组成,所述两个功能模块即负责锌转运的跨膜结构域以及N-末端和C-末端结构域的胞质锌传感单元(分别为NTD和CTD)。ZnT8的转运活性产生与锌离子络合的胰岛素分子的晶体包装的高度富集的颗粒状锌包含物。在胰岛素分泌期间,颗粒胞吐使ZnT8暴露于表面膜,使其跨膜结构域经受细胞外ZnT8A监测。ZnT8的胞质结构域只在β细胞被破坏后才变成ZnT8A可接近的。约一半的ZnT8结构位于六个跨膜区域内,由于在膜环境之外维持其三级结构的难度,这对开发ZnT8A检测测定提出挑战。

[0010] 迄今为止,大多数ZnT8A检测测定基于ZnT8的胞质结构域(即,CTD和NTD)的抗原或融合这两个结构域的单链分子的构建。由于以下事实,即相对于基于NTD的效率较低的检测性能,包含氨基酸(aa)275-369的CTD能够产生稳健的检测性能,因此ZnT8A检测已经集中于CTD的两个变体,它们在位置325处相差单个aa(即,精氨酸,325R或色氨酸,325W)。尽管迄今为止,CTD的两种变体的组合已经被用于有效的ZnT8A检测,但是用于ZnT8A检测的最佳候选物可以是全长ZnT8,所述全长ZnT8包含ZnT8A可接近的完整的自身反应位点(细胞内和细胞外自身反应位点两者)。然而,由于纯化的全长ZnT8蛋白在其去污剂增溶形式中的不稳定性,全长ZnT8迄今尚未被成功用于ZnT8A检测。

[0011] 其他研究人员已经试图将全长ZnT8蛋白掺入含有磷脂和载脂蛋白的合成纳米盘

中 (Janet M.Wenzlau和John C.Hutton,Curr Diab Rep.2013October;13(5):doi:10.1007/s11892-013-0405-9)。纳米盘是有助于研究膜蛋白的合成的模型膜系统。它包含磷脂的脂质双层,疏水边缘由两种两亲性蛋白遮蔽。这些蛋白被称为膜支架蛋白(MSP),并且以双带状形成的形式排列。纳米盘在结构上与高密度脂蛋白(HDL)非常相似,并且MSP是HDL中的主要成分载脂蛋白A1(apoA1)的修饰形式。纳米盘在膜蛋白的研究中是有用的,因为它们可以使膜蛋白溶解和稳定,并且与脂质体、去污剂胶束、双层膜微胞(bicelle)和amphipols相比代表更天然的环境。

[0012] 发明概述

[0013] 本发明的一种实施方案是一种检测血清中的ZnT8抗体的方法,所述方法包括:通过将具有内部(interior)和外部(exterior)的脂蛋白体(proteoliposome)组合形成混合物,所述脂蛋白体包含暴露在脂蛋白体的外部的ZnT8蛋白的跨膜结构域(TMD)和胞质结构域(CTD)的蛋白序列;包含靶向该蛋白序列的抗体的血清;与靶向该蛋白序列的抗体结合的标记的捕获的自身抗体;以及测量与该蛋白序列结合的抗体的量。跨膜结构域和胞质结构域可以来自相同的ZnT8蛋白或不同的全长ZnT8蛋白。

[0014] 本发明的另一种实施方案是一种检测血清中的ZnT8抗体的方法,所述方法包括以下步骤。提供具有内部和外部的脂蛋白体的集合,其中一些脂蛋白体在其外部具有ZnT8的跨膜结构域(TMD)的蛋白序列,而其他脂蛋白体包含暴露在其外部的ZnT8蛋白的胞质结构域(CTD)的蛋白序列。添加包含抗体的血清,所述抗体靶向形成与抗体结合的脂蛋白体的TMD的蛋白序列和/或CTD的蛋白序列;添加标记的捕获的自身抗体,所述标记的捕获的自身抗体与结合至脂蛋白体的抗体结合;以及测量靶向TMD的蛋白序列和/或CTD的蛋白序列的与脂蛋白体结合的抗体的量。

[0015] 用于本发明的合适的TMD和CTD的蛋白序列可以是例如全长ZnT8蛋白的全长TMD和CTD结构域部分。其他合适的序列包括TMD或CTD的具有抗原性并且与靶向TMD和/或CTD的抗体结合的部分(或片段)。用于本发明的合适的ZnT8蛋白包括野生型人类ZnT8蛋白及其变体。变体的实例包括含有信号序列的“a”形式的ZnT8蛋白和不具有信号序列的“b”形式的ZnT8蛋白。关于用于本发明的ZnT8蛋白序列的实例,请参见方法章节。另外,“a”形式和“b”形式的ZnT8两者都可以是R325W变体。

[0016] 用于本发明的脂蛋白体的集合可以包括“内侧外翻型(inside out)”脂蛋白体和“正常外向型(right side out)”脂蛋白体。“内侧外翻型”脂蛋白体优选地在其外部包含CTD蛋白序列。“正常外向型”脂蛋白体优选地在其外部包含TMD蛋白序列。

[0017] 用于本发明的方法中的脂蛋白体可以被放置在芯片上。请参见图1B和图5。例如,将混合物放置或打印在诸如板或芯片的平台上是合适的,其中ZnT8蛋白结合至板或芯片。合适的芯片的实例包括pGOLD芯片。使选自包括以下的组的第二蛋白(secondary protein)结合至平台:IA2、GADA及其组合。本发明中可以使用任何动物血清,诸如人类血清。如果在本发明中使用人类血清,则优选的是使用人类ZnT8蛋白来形成以上描述的混合物。对于血清,诸如人类血清,用胎牛血清(FBS)以10至30倍的范围稀释是合适的。用于本发明的标记的捕获的自身抗体可以包含例如检测探针,诸如生物素探针或荧光探针。本发明的测量步骤定量与ZnT8蛋白结合的抗体的量是合适的。与ZnT8蛋白结合的抗体的量可以通过测量由检测探针提供的信号来确定。例如,如果标记的捕获的自身抗体包含荧光标记物,则可以对

荧光强度进行分析,并且作为实例,通过使用红外扫描仪来测量荧光信号。例如,用于本发明的合适的脂蛋白体可以包含脂质,诸如1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine)、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸-(1'-rac-甘油)(1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol))、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine)或其组合。用于本发明的靶向ZnT8蛋白的合适的抗体包括针对ZnT8的跨膜结构域(TMD)、ZnT8的胞质C-末端结构域(CTD)或其组合的ZnT8抗体。优选的是,在本发明中使用ZnT8抗体群体,所述ZnT8抗体群体包括针对跨膜结构域(TMD)的ZnT8抗体和针对胞质C-末端结构域(CTD)的ZnT8抗体。本发明的方法具有大于70%灵敏度和大于90%特异度的检测性能。

[0018] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术术语和科学术语具有本发明所属技术领域的技术人员通常理解的含义。以下参考文献为技术人员提供了本发明中使用的许多术语的一般定义:Singleton等人,Dictionary of Microbiology and Molecular Biology(第二版,1994);The Cambridge Dictionary of Science and Technology(Walker编著,1988);The Glossary of Genetics,第5版,R.Rieger等人(编著),Springer Verlag(1991);以及Hale&Marham,The Harper Collins Dictionary of Biology(1991)。如本文使用的,除非另外指明,否则以下术语具有以下归于它们的含义。

[0019] 术语“活性”是指基因执行其功能的能力,所述功能诸如吡哆胺2,3-双加氧酶(一种氧化还原酶)催化必需氨基酸色氨酸(trp)降解为N-甲酰基-犬尿氨酸。

[0020] 如本公开内容中使用的,术语“抗体”是指免疫球蛋白或其片段或衍生物,并且包括任何包含抗原结合位点的多肽,无论其是在体外还是在体内产生的。该术语包括但不限于多克隆抗体、单克隆抗体、单特异性抗体、多特异性抗体、非特异性抗体、人源化抗体、单链抗体、嵌合抗体、合成的抗体、重组抗体、杂交抗体(hybrid antibody)、突变的抗体和接枝抗体(grafted antibody)。除非另外由术语“完整”修饰,如在“完整抗体”中一样,否则为了本公开内容的目的,术语“抗体”还包括保留了抗原结合功能即特异性结合例如PD-L1的能力的抗体片段,诸如Fab、F(ab')₂、Fv、scFv、Fd、dAb和其他抗体片段。通常,这样的片段将包含抗原结合结构域。

[0021] 术语“抗原结合结构域”、“抗原结合片段”和“结合片段”是指包含负责抗体与抗原之间的特异性结合的氨基酸的抗体分子的部分。在其中抗原较大的情况下,抗原结合结构域可以仅与抗原的一部分结合。抗原分子中负责与抗原结合结构域特异性相互作用的部分被称为“表位”或“抗原决定簇”。抗原结合结构域通常包含抗体轻链可变区(V_L)和抗体重链可变区(V_H),然而,它不必然必须包含两者。例如,所谓的Fd抗体片段仅由V_H结构域组成,但仍保留完整抗体的一些抗原结合功能。

[0022] 抗体的结合片段通过重组DNA技术或通过完整抗体的酶促裂解或化学裂解来产生。结合片段包括Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv和单链抗体。“双特异性”或“双功能性”抗体以外的抗体被理解为其结合位点的每一个都相同。用酶木瓜蛋白酶消化抗体,产生两个相同的抗原结合片段(也被称为“Fab”片段),和一个没有抗原结合活性但具有结晶能力的“Fc”片段。用酶胃蛋白酶消化抗体,产生一个F(ab')₂片段,其中抗体分子的两条臂保持连接,并包含两个抗原结合位点。F(ab')₂片段具有使抗原交联的能力。当在本文中使用时,“Fv”是指保留抗原识别位点和抗原结合位点的抗体的最小片段。当在本文中使用时,“Fab”是指包含轻

链的恒定结构域和重链的CHI结构域的抗体的片段。

[0023] “剂”是指任何小分子化学化合物、抗体、核酸分子或多肽或其片段。

[0024] “改善”是指降低、抑制、减弱、减少、阻止疾病的发展或进展或者使疾病的发展或进展稳定。

[0025] “改变”是指基因或多肽的表达水平或活性的变化(增加或降低),如通过标准技术已知方法(诸如本文描述的标准技术已知方法)检测的。如本文使用的,改变包括表达水平的10%的变化,优选地表达水平的25%的变化,更优选地表达水平的40%的变化,并且最优选地表达水平的50%或更大的变化。

[0026] “类似物”是指不相同的但具有相似的功能或结构特征的分子。例如,多肽类似物保留了对应的天然存在的多肽的生物活性,同时具有相对于天然存在的多肽增强类似物功能的某些生物化学修饰。这样的生物化学修饰可以增加类似物的蛋白酶耐受性、膜通透性或半衰期,而不改变例如配体结合。类似物可以包括非天然氨基酸。

[0027] 术语“诊断”是指鉴定病理学状况即1型糖尿病的存在或性质。诊断方法在其灵敏度和特异度方面不同。诊断测定的“灵敏度”是被测试为阳性的患病个体的百分比(“真阳性”的百分比)。通过测定未检测出的患病个体为“假阴性”。未患病并且在测定中被测试为阴性的受试者被称为“真阴性”。诊断测定的“特异度”为1减去假阳性率,其中“假阳性”率被定义为无疾病的被测试为阳性的那些个体的比例。尽管特定的诊断方法可以不提供状况的确定性诊断,但是如果该方法提供了有助于诊断的正向指示,这就足够了。

[0028] “疾病”是指损害或干扰细胞、组织或器官的正常功能的任何状况或紊乱。疾病的实例包括癌症。

[0029] “DS-ZnT8”是指经纯化的在去污剂胶束中的全长ZnT8蛋白。

[0030] “有效量”是指相对于未治疗的患者改善疾病症状所需的量。用于实践本发明以治疗性治疗疾病的活性化合物的有效量取决于施用方式、受试者的年龄、体重和总体健康状况而变化。最终,主治医师或兽医将决定适当的量和给药方案。这样的量被称为“有效”量。

[0031] “表达”是指基因表达基因产物的能力,所述基因产物包括例如基因对应的mRNA或蛋白序列。

[0032] “片段”是指多肽或核酸分子的一部分。该部分优选地包含参考核酸分子或多肽的整体长度的至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%。片段可以包含10个、20个、30个、40个、50个、60个、70个、80个、90个或100个、200个、300个、400个、500个、600个、700个、800个、900个或1000个核苷酸或氨基酸。

[0033] “杂交”是指互补核碱基之间的氢键键合,其可以是沃森-克里克氢键键合、Hoogsteen氢键键合或反向Hoogsteen氢键键合。例如,腺嘌呤和胸腺嘧啶是互补核碱基,它们通过形成氢键而配对。

[0034] “免疫测定”是指使用特异性结合抗原(例如,标志物)的抗体的测定。免疫测定的特征在于使用特定抗体的特异性结合特性来分离、靶向和/或定量抗原。

[0035] “脂质体”是指由双分子磷脂膜包围的水性区室;一种脂质囊泡。脂蛋白体是一种通常通过人工手段将一种或更多种蛋白插入其中的脂质体。

[0036] “获得”(如“获得剂”中的“获得”)是指合成、购买或以其他方式获取剂。

[0037] “mAb”是指单克隆抗体。本发明的抗体包括但不限于完整天然抗体、双特异性抗

体、嵌合抗体、Fab、Fab'、单链V区片段(scFv)、融合多肽和非常规抗体。

[0038] “标志物”是指表达水平或活性的改变与疾病或紊乱相关的任何蛋白或多核苷酸。术语“生物标志物”与术语“标志物”可互换使用。

[0039] “测量”是指这样的方法,所述方法包括检测样品中标志物的存在或不存在、定量样品中标志物的量和/或鉴定生物标志物的类型。测量可以通过本领域已知的方法和本文进一步描述的方法来实现,所述方法包括但不限于免疫测定。可以使用任何合适的方法来检测和测量本文描述的一种或更多种标志物。这些方法包括但不限于ELISA和基于珠的免疫测定(例如,单重或多重的基于珠的免疫测定、基于磁珠的免疫测定)。

[0040] “PLR-ZnT8”是指经纯化的在脂蛋白体中的全长ZnT8蛋白。

[0041] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白”在本文中可互换使用,以指氨基酸残基的聚合物。该术语适用于其中一个或更多个氨基酸残基是相应的天然存在的氨基酸的类似物或模拟物的氨基酸聚合物、以及适用于天然存在的氨基酸聚合物。多肽可以被修饰,例如,通过添加糖类残基来形成糖蛋白。术语“多肽”、“肽”和“蛋白”包括糖蛋白以及非糖蛋白。

[0042] “减少”是指至少10%、25%、50%、75%或100%的负改变。

[0043] “参考”是指标准条件或对照条件,诸如不含或基本上不含诸如一种或更多种ID01抑制剂和/或疫苗的剂的样品(人类细胞)或受试者。

[0044] “参考序列”是用作序列比较的基础的限定序列(defined sequence)。参考序列可以是指定序列的子集或整体;例如,全长cDNA或基因序列的区段,或完整的cDNA或基因序列。对于多肽,参考多肽序列的长度将通常是至少约16个氨基酸,优选地至少约20个氨基酸,更优选地至少约25个氨基酸,并且甚至更优选地约35个氨基酸,约50个氨基酸或约100个氨基酸。对于核酸,参考核酸序列的长度将通常是至少约50个核苷酸,优选地至少约60个核苷酸,更优选地至少约75个核苷酸,并且甚至更优选地约100个核苷酸或约300个核苷酸或其附近或其间的任何整数。

[0045] 如本文使用的,术语“灵敏度”是患有特定疾病的受试者的百分比。

[0046] 如本文使用的,术语“特异度”是被正确鉴定为患有特定疾病的受试者与正常或健康受试者的百分比。例如,特异度被计算为患有特定疾病的受试者与非癌症受试者(例如,正常健康受试者)相比的数。

[0047] “特异性结合”是指化合物或抗体识别和结合本发明的多肽,但该化合物或抗体基本上不识别和结合样品中的其他分子,所述样品例如天然包含本发明的多肽的生物样品。

[0048] 如本文使用的,术语“受试者”预期指对其进行本文描述的方法的任何个体或患者。通常,受试者是人类,但如本领域技术人员将理解的,受试者可以是动物。因此,其他动物,包括哺乳动物诸如啮齿类动物(包括小鼠、大鼠、仓鼠和豚鼠)、猫、犬、兔、农场动物包括牛、马、山羊、绵羊、猪等,以及灵长类动物(包括猴、黑猩猩、猩猩和大猩猩)也被包括在受试者的定义内。

[0049] 在本发明的方法中有用的核酸分子包括编码本发明的多肽或其片段的任何核酸分子。这样的核酸分子不需要与内源核酸序列100%相同,但通常将表现出实质同一性(substantial identity)。与内源序列具有“实质同一性”的多核苷酸通常能够与双链核酸分子的至少一条链杂交。在本发明的方法中有用的核酸分子包括编码本发明的多肽或其片段的任何核酸分子。这样的核酸分子不需要与内源核酸序列100%相同,但通常将表现出实

质同一性。与内源序列具有“实质同一性”的多核苷酸通常能够与双链核酸分子的至少一条链杂交。“杂交”是指在不同的严格性条件下,在互补多核苷酸序列(例如,本文描述的基因)或其部分之间配对以形成双链分子。(参见例如,Wahl,G.M.和S.L.Berger(1987) *Methods Enzymol.*152:399;Kimmel,A.R.(1987) *Methods Enzymol.*152:507)。

[0050] 例如,严格的盐浓度通常将小于约750mM NaCl和75mM柠檬酸三钠,优选地小于约500mM NaCl和50mM柠檬酸三钠,并且更优选地小于约250mM NaCl和25mM柠檬酸三钠。低严格性杂交可以在有机溶剂例如甲酰胺不存在的情况下获得,而高严格性杂交可以在至少约35%甲酰胺并且更优选地至少约50%甲酰胺存在的情况下获得。严格的温度条件通常将包括至少约30℃,更优选地至少约37℃,并且最优选地至少约42℃的温度。改变另外的参数,诸如杂交时间、去污剂例如十二烷基硫酸钠(SDS)的浓度,以及载体DNA的包含或排除,是本领域技术人员熟知的。根据需要,通过将不同的条件组合来实现不同程度的严格性。在优选的实施方案中,杂交将在30℃在750mM NaCl、75mM柠檬酸三钠和1%SDS中进行。在更优选的实施方案中,杂交将在37℃在500mM NaCl、50mM柠檬酸三钠、1%SDS、35%甲酰胺和100 μg/ml变性鲑鱼精DNA(ssDNA)中进行。在最优选的实施方案中,杂交将在42℃在250mM NaCl、25mM柠檬酸三钠、1%SDS、50%甲酰胺和200μg/ml ssDNA中进行。对这些条件进行有用的改变对本领域技术人员来说将是容易地明显的。

[0051] 对于大多数应用,杂交后的洗涤步骤在严格性方面也将有所不同。洗涤严格性条件可以通过盐浓度以及通过温度来限定。如上所述,洗涤严格性可以通过降低盐浓度或通过提高温度来提高。例如,用于洗涤步骤的严格的盐浓度将优选地小于约30mM NaCl和3mM柠檬酸三钠,并且最优选地小于约15mM NaCl和1.5mM柠檬酸三钠。用于洗涤步骤的严格的温度条件通常将包括至少约25℃,更优选地至少约42℃,并且甚至更优选地至少约68℃的温度。在优选的实施方案中,洗涤步骤将在25℃在30mMNaCl、3mM柠檬酸三钠和0.1%SDS中进行。在更优选的实施方案中,洗涤步骤将在42℃在15mM NaCl、1.5mM柠檬酸三钠和0.1%SDS中进行。在更优选的实施方案中,洗涤步骤将在68℃在15mM NaCl、1.5mM柠檬酸三钠和0.1%SDS中进行。对这些条件进行另外的改变对本领域技术人员来说将是容易地明显的。杂交技术是本领域技术人员熟知的,并且在例如以下中进行了描述:Benton和Davis(*Science* 196:180,1977);Grunstein和Hogness(*Proc.Natl.Acad.Sci.,USA* 72:3961,1975);Ausubel等人(*Current Protocols in Molecular Biology*,Wiley Interscience, New York,2001);Berger和Kimmel(*Guide to Molecular Cloning Techniques*,1987, Academic Press,New York);以及Sambrook等人,*Molecular Cloning:A Laboratory Manual*,Cold Spring Harbor Laboratory Press,New York。

[0052] “基本上相同”是指多肽或核酸分子与参考氨基酸序列(例如,本文描述的任何一个氨基酸序列)或参考核酸序列(例如,本文描述的任何核酸序列)表现出至少50%同一性。优选地,这样的序列在氨基酸水平或核酸水平与用于比较的序列至少60%、更优选地80%或85%、并且更优选地90%、95%或甚至99%相同。

[0053] 序列同一性通常使用序列分析软件来测量(例如,Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center,1710University Avenue,Madison, Wis.53705的序列分析软件包、BLAST、BESTFIT、GAP或PILEUP/PRETTYBOX程序)。这样的软件通过为不同的取代、缺失和/或其他修饰分配同源性程度来匹配相同或相似的序列。保守取

代通常包括在以下组内的取代：甘氨酸、丙氨酸；缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸；天冬氨酸、谷氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺；丝氨酸、苏氨酸；赖氨酸、精氨酸；以及苯丙氨酸、酪氨酸。在确定同一性程度的示例性方法中，可以使用BLAST程序，其中 e^{-3} 和 e^{-100} 之间的概率评分指示密切相关的序列。

[0054] 本文提供的范围被理解为该范围内所有值的简写。例如，1至50的范围被理解为包括来自以下组成的组的任何数字、数字的组合或子范围：1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50。

[0055] 如本文所用的，术语“治疗(treat)”、“治疗(treating)”、“治疗(treatment)”等是指使紊乱和/或与其相关的症状减轻或改善。应理解，尽管不排除在外，但治疗紊乱或状况不要求紊乱、状况或与其相关的症状被完全消除。

[0056] 术语“ZnT8”预期指(SLC30A8)基因和变体，以及包括由其衍生的核酸和蛋白序列的产物。ZnT8包括包含例如用于可视化的标签的经修饰的核酸和氨基酸序列。适用于本发明的ZnT8核酸和蛋白序列的实例包括：例如具有NCBI登录号KR712225.1的智人(Homo sapiens)克隆SLC30A8DNA序列和具有NCBI登录号ABQ59023.1的智人SLC30A8蛋白序列。ZnT8基因序列的一个实例是具有NCBI Gene ID:169026的SLC30A8溶质载体(solute carrier)家族30成员8[智人(人类)]。用于本发明的ZnT8可以是真核的，包括人类和动物，或者是原核的，包括细菌ZnT8转运体。

[0057] 除非特别说明或从上下文中明显的，否则如本文使用的，术语“或”被理解为包含性的。除非特别说明或从上下文中明显的，否则如本文使用的，术语“一(a)”、“一(an)”和“该/所述(the)”被理解为单数或复数。

[0058] 除非特别说明或从上下文中明显的，否则如本文使用的，术语“约”被理解为在本领域的正常公差范围内，例如在平均值的2个标准偏差内。约可以被理解为在所述值的10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%或0.01%之内。除非上下文另外说明，否则本文提供的所有数值都由术语约修饰。

[0059] 在本文的任何变量的定义中对化学组(chemical group)的列表的叙述包括该变量作为任一单个组或所列组的组合的定义。本文中对变量或方面的实施方案的叙述包括该实施方案作为任一单个实施方案或与任何其他实施方案或其部分组合。

[0060] 本文提供的任何组合物或方法可以与本文提供的任何其他组合物和方法中的一种或更多种组合。

[0061] 如本文使用的，术语“预防(prevent)”、“预防(preventing)”、“预防(prevention)”、“预防性治疗(prophylactic treatment)”等是指减少未患紊乱或状况但处于发展紊乱或状况的风险或易于发展紊乱或状况的受试者发展紊乱或状况的可能性。

[0062] 这样的治疗(手术和/或化学疗法)将被合适地施用至罹患、患有、易患胰腺癌或疾病、紊乱或其症状或处于患胰腺癌或疾病、紊乱或其症状风险的受试者，特别是人类。确定“处于风险”的那些受试者可以通过诊断测试或受试者或医疗提供者的意见(例如，遗传测试、酶或蛋白标志物、标志物(如本文定义的)、家族史等)的任何客观或主观确定来进行。

[0063] 附图简述

[0064] 图1A-图1D示出了高质量全长ZnT8抗原的制备。(A)通过SDS-PAGE凝胶的考马斯蓝

染色示出的经纯化的在去污剂胶束中的全长ZnT8 (DS-ZnT8) 或在脂蛋白体中的全长ZnT8 (PLR-ZnT8)。洋红色、红色和深棕色的箭头分别指示全长ZnT8二聚体、单体和脂质。(B) 在重构的脂蛋白体中的全长ZnT8的跨膜取向的示意图,如标记的。双层圆环、青色带、洋红色球和绿色或蓝色自身抗体分别代表脂质体、全长ZnT8、锌离子和结合至全长ZnT8的细胞外表面或细胞内表面的ZnT8A。(C) 真空干燥前(红色)和真空干燥后(蓝色)的PLR-ZnT8的尺寸排阻HPLC谱(左),以及真空干燥前(红色)和真空干燥后(蓝色)的DS-ZnT8的尺寸排阻HPLC谱(右)。洋红色和黑色的箭头分别指示全长ZnT8和脂质。(D) 不含ZnT8的脂质体和PLR-ZnT8的DLS分析。全长ZnT8重构后,脂质体的尺寸从~104nm增加至~146nm。

[0065] 图2A-图2B示出了用于ZnT8A检测的固定在pGOLD上的PLR-ZnT8。(A) 用于ZnT8A检测的固定在pGOLD上的PLR-ZnT8的示意图。基板、紫色球、青色带、红色球、黄色球、以及绿色或蓝色自身抗体分别代表pGOLD、脂质体、全长ZnT8、IRDye800荧光团、抗人类IgG的二抗、以及结合至全长ZnT8的细胞外表面或细胞内表面的ZnT8A。(B) 通过固定在pGOLD上的PLR-ZnT8检测的来自IASP提供的50名T1D患者和90名健康个体的140份人类血清的ZnT8A水平的散点图和ROC分析:~76%的灵敏度和~95%的特异度。

[0066] 图3示出了固定在pGOLD上的PLR-ZnT8用于ZnT8A检测的优越性。通过固定在pGOLD上的不同的ZnT8相关抗原检测的来自IASP和佛罗里达大学(University of Florida)提供的138名T1D患者和169名健康个体的307份人类血清的ZnT8A水平的散点图和ROC分析:PLR-ZnT8的测定性能为~76%的灵敏度和~97%的特异度;DS-ZnT8的测定性能为~2%的灵敏度和~94%的特异度;CTD的测定性能为~59%的灵敏度和~95%的特异度。所有使用的抗原都是325R变体。

[0067] 图4A-图4B示出了用于T1D诊断的自身抗体的多重检测。(A) 通过基于pGOLD的微阵列检测的来自IASP提供的50名T1D患者和90名健康个体的140份人类血清的ZnT8A、IA2A和GADA的水平的散点图和ROC分析:PLR-ZnT8的情况为~76%的灵敏度和~95%的特异度;IA2A的情况为~68%的灵敏度和~92%的特异度;GADA的情况为~50%的灵敏度和~94%的特异度。(B) 通过基于pGOLD的微阵列检测的来自IASP和佛罗里达大学提供的138名T1D患者和169名健康个体的307份人类血清的ZnT8A、IA2A和GADA的水平的散点图和ROC分析:PLR-ZnT8的情况为~76%的灵敏度和~97%的特异度;IA2A的情况为~71%的灵敏度和~95%的特异度;GADA的情况为~40%的灵敏度和~95%的特异度。

[0068] 图5示出了本发明的包含两种全长ZnT8蛋白的脂质体。A. ZnT8蛋白的跨膜结构域(TMD)表达在脂质体的外部,ZnT8蛋白的顶端(或C-末端结构域,CTD)位于脂质体的中心。针对TMD的ZnT8抗体以蓝色示出。B. ZnT8蛋白的胞质C-末端结构域(CTD)或顶端表达在脂质体的外部,ZnT8蛋白的TMD位于脂质体的内部。针对CTD的ZnT8抗体以绿色示出。

[0069] 发明详述

[0070] 本发明是检测血清中的ZnT8抗体的方法。步骤包括制备脂蛋白体的混合物,所述脂蛋白体优选地在脂蛋白体的外表面包含全长ZnT8蛋白的跨膜结构域(TMD)和胞质结构域(CTD)。具体地,本发明的方法产生具有两种不同跨膜取向的脂蛋白体的混合物。“内侧外翻型”脂蛋白体将全长ZnT8的CTD序列放置于其外表面。“正常外向型”脂蛋白体将TMD序列暴露在其外表面,因此当该脂蛋白体的混合物与靶向TMD和CTD序列的血清抗体混合时,血清抗体能够与这些序列结合。然后,标记的捕获的自身抗体结合至血清中存在的与“内侧外翻

型”和“正常外向型”脂蛋白体上的TMD和CTD序列结合的抗体。最后,测量结合至CTD和TMD蛋白序列的抗体的量。

[0071] 在脂蛋白体的外部表达CTD蛋白序列是非常困难的。出乎意料地,作为实例,本发明人能够鉴定出一种制备包含全长ZnT8的“内侧外翻型”和“正常外向型”脂蛋白体的方法。ZnT8蛋白在通过本发明的方法制备的脂质体中更具抗原性,原因如下。通过常规方法纯化多次跨越的全长ZnT8需要去污剂增溶,导致ZnT8缺乏结构稳定性,这对维持构象表位的正确折叠提出重大挑战。常规方法的苛刻的抗原处理程序(例如,干燥、再水合)进一步加剧了全长ZnT8生物活性的损失。为了克服这些限制,本发明人开发了基于脂蛋白体的方法,该方法可以显著改进保护性脂质基质中的全长ZnT8的结构稳定性和正确折叠,使得ZnT8的自身反应位点以高生物活性可被接近。

[0072] 随着被发现是1型糖尿病(T1D)诊断的主要生物标志物,锌转运体8自身抗体(ZnT8A)已经显示出用于疾病风险分期和疾病诊断的前景。然而,由于难以维持全长ZnT8蛋白在其天然膜环境之外的正确折叠,因此现有的ZnT8自身抗体(ZnT8A)的测定局限于通过ZnT8的可溶性结构域进行检测。通过生物工程和纳米技术的组合开发了本发明,本发明使用新的基于脂蛋白体的全长ZnT8自身抗原(全长ZnT8脂蛋白体,PLR-ZnT8)用于在等离子体金芯片(pGOLD)上进行有效的ZnT8A检测。本发明的脂蛋白体的保护性脂质基质改进了全长ZnT8的正确折叠和结构稳定性,促进了固定在pGOLD上的PLR-ZnT8(PLR-ZnT8/pGOLD)实现以高亲和力捕获来自T1D血清的ZnT8A。本发明的PLR-ZnT8/pGOLD产生了用于T1D诊断的有效的ZnT8A检测,具有~76%的灵敏度和~97%的特异度($n=307$),其优于基于去污剂增溶的全长ZnT8(DS-ZnT8)和ZnT8的C-末端结构域(CTD)的测定。还开发了使用pGOLD的多重测定,用于同时检测ZnT8A、胰岛抗原2自身抗体(IA2A)和谷氨酸脱羧酶自身抗体(GADA),以通过评估组合的三种自身抗体进行T1D诊断。

[0073] 本发明人已经证明,全长ZnT8的单个变体(即,325R)可以用于金等离子体芯片上的高度灵敏和特异的ZnT8A检测。通过在人类胚肾细胞293(HEK293)中表达、对单分散的全长ZnT8蛋白进行纯化以及随后在脂质体中重构,获得了具有高生物活性的全长ZnT8脂蛋白体的复合物(PLR-ZnT8)(~146nm),具有>95%的高纯度。当被固定在pGOLD上时,脂质体可以维持全长ZnT8的正确折叠,使得自身反应位点是ZnT8A可接近的。由于新的PLR-ZnT8和近红外(NIR)荧光增强的pGOLD平台⁸⁻¹³,本发明人使用来自138名T1D患者和169名健康个体的307份人类血清实现了ZnT8A检测的优异的测定性能,对于T1D诊断,具有~76%的灵敏度和~97%的特异度。该结果优于基于其他ZnT8相关抗原的测定的性能(对于基于DS-ZnT8和CTD的测定,分别为~2%的灵敏度/~94%的特异度和~59%的灵敏度/~94%的特异度)。此外,基于pGOLD的微阵列还显示出用于未来T1D诊断的ZnT8A、IA2A和GADA的多重检测的潜力。

[0074] 高质量脂蛋白体PLR-ZnT8的制备

[0075] 人类ZnT8由胰腺β细胞中表达的SLC30A8基因编码,产生两种蛋白同种型。同种型-1是全长369-aa的蛋白,而同种型-2是N-末端缺失49aa的可变剪接的产物。ZnT8的N-末端结构域在同种型-2中大部分缺失。人类ZnT8的位置325(325R)处的主要精氨酸变异是ZnT8A的免疫反应决定因素。本发明人在HEK293细胞中过表达人类同种型-2的325R变体,并且纯化在去污剂胶束中的重组全长ZnT8(DS-ZnT8)或在脂蛋白体中的重组全长ZnT8(PLR-ZnT8,图

1A,详细实验程序参见方法)。DS-ZnT8在水性溶液中仅稳定几个小时,然后形成不溶性蛋白聚集体,伴随有锌转运活性的不可逆损失。另一方面,PLR-ZnT8在冰上持续几天保持功能活性,并且可以在液氮中无限期地储存。用去污剂对PLR-ZnT8再增溶产生了良好折叠的DS-ZnT8,其经历快速变性,如通过尺寸排阻高效液相色谱上的初始单分散的蛋白群体的逐渐损失表明的(HPLC,支持信息中的图S1)。脂蛋白体采用了两种不同的跨膜取向(图1B)。内侧外翻型脂蛋白体模拟了胰岛素颗粒,其中全长ZnT8的胞质结构域被暴露以进行ZnT8A结合。正常外向型脂蛋白体使跨膜结构域暴露以进行ZnT8A结合,其方式与活的 β 细胞上的表面展示的ZnT8的抗原呈递相同¹⁶。与水性溶液中的DS-ZnT8不同,PLR-ZnT8是一种固相抗原,其可以通过超速离心与水相分离,并以脂质样团状物的形式储存。固体PLR-ZnT8团状物的去污剂提取物的分析性尺寸排阻HPLC分析揭示了主要的单分散的全长ZnT8物质,随后是脂质峰,表明全长ZnT8在湿的脂质基质中保存良好的结构完整性(图1C)。为了进一步检查全长ZnT8在完全干燥的脂质基质中的结构完整性,我们使PLR-ZnT8真空干燥,并且然后使脂蛋白体再水合,以模拟随后基于pGOLD微阵列的测定的实验条件。HPLC分析表明,大部分全长ZnT8在干燥和再水合后保持完整(图1C)。与之形成明显对比的是,DS-ZnT8寿命短,丧失了单分散的HPLC谱(图1C)。这些结果表明,脂蛋白体的脂质基质增强了重构的全长ZnT8的生物稳定性。根据动态光散射分析(DLS),不含ZnT8的脂质体的尺寸集中于 $\sim 104\text{nm}$,分布窄,并且在全长ZnT8的重构后增加至 $\sim 146\text{nm}$ (图1D)。

[0076] 固定在pGOLD上的PLR-ZnT8用于有效的ZnT8A检测

[0077] 此前,本发明人开发了用于近红外荧光增强(NIR-FE)生物检测的等离子体金基板,并且使用少量人类血清和全血诸如手指点刺样品(finger-prick sample)进行了T1D自身抗体测定的初步研究¹⁰。在此,我们采用了该pGOLD(来自Nirmidas Biotech, Inc)平台来评估PLR-ZnT8用于数百份人类血清样品的ZnT8A检测的能力。[可以展开本章节]对于简单打印在pGOLD载玻片上的PLR-ZnT8,脂蛋白体呈现出大量不与金表面直接接触或相互作用的全长ZnT8,有效维持了全长ZnT8的正确折叠,并且因此使得自身反应位点是ZnT8A可接近的。pGOLD上的金纳米岛(nano-island)结构以相邻岛的边缘彼此一致这样的方式排列,以用于产生支持强电场增强的丰富的纳米间隙。这种结构和表面等离子体共振与NIR荧光团激发态的耦合提供了增加的辐射发射并且因此荧光增强了 ~ 100 倍¹⁰,提高了基于NIR的生物测定的灵敏度。使用固定在pGOLD上的PLR-ZnT8(PLR-ZnT8/pGOLD)来捕获用胎牛血清(FBS)稀释20倍的人类血清样品中的ZnT8A,并且随后捕获的自身抗体用NIR荧光团缀合的二抗(即,抗人类IgG-IRDye800)来标记。然后通过荧光团的荧光强度来分析ZnT8A的量(图2A)。

[0078] 首先,本发明人参与了2016年的胰岛自身抗体标准化项目(IsletAutoantibody Standardization Program; IASP)研讨会,以评估PLR-ZnT8/pGOLD用于ZnT8A检测的能力。对于来自50名T1D患者和90名健康个体的140份人类血清,通过盲法测试,PLR-ZnT8/pGOLD实现了 $\sim 66\%$ 的灵敏度和 $\sim 100\%$ 的特异度。根据受试者工作特征(ROC)曲线分析,通过降低截止值,可以将测定性能调整至 $\sim 76\%$ 的灵敏度和 $\sim 95\%$ 的特异度(图2B, $P=5.0 \times 10^{-7}$)。这些结果优于使用单一CTD变体的ZnT8A检测,并且与在2016年IASP研讨会中的所有参与的测定中使用两种CTD变体的基于其他方法(即,放射免疫测定、萤光素酶免疫沉淀系统和酶联免疫吸附测定)的最佳ZnT8A检测相当(支持信息中的表S1)。

[0079] 随后,将另一组来自佛罗里达大学提供的88名T1D患者和79名健康个体的167份人类血清与来自IASP的血清样品组合,以形成大数目样品,用于进一步评估通过PLR-ZnT8/pGOLD的ZnT8A检测(即,总计307份人类血清,包括138份T1D血清和169份非糖尿病血清)。使用这个组合的血清集合,我们的PLR-ZnT8/pGOLD测定仍然实现了~76%的灵敏度和~97%的特异度,有效地区分了T1D样品与非糖尿病样品(图3, $P=4.2 \times 10^{-22}$),并使其成为先前报道^{2,17}的ZnT8A测定中最好的ZnT8A测定之一。为了确认我们的PLR-ZnT8/pGOLD测定的可重复性,本发明人重复了两次血清筛查,并且发现两组ZnT8A测量值之间存在良好的相关性($R^2=0.87$,支持信息中的图S2)。

[0080] 为了进行比较,与PLR-ZnT8平行地,还将DS-ZnT8和CTD固定在pGOLD上(除非另外说明,否则我们使用的所有ZnT8相关抗原都是325R变体)。在相同的实验条件下,DS-ZnT8未提供有用的ZnT8A检测能力,可能是由于在测定期间结构完整性的丧失,而CTD提供的灵敏度比PLR-ZnT8提供的灵敏度低~17%(图3)。通过PLR-ZnT8检测的ZnT8A水平的ROC曲线分析显示出曲线下面积(AUC)为0.85,大于CTD和DS-ZnT8的曲线下面积(AUC),它们分别为0.77和0.51(图3)。对通过PLR-ZnT8和CTD检测的ZnT8A水平的进一步相关性分析显示,PLR-ZnT8和CTD之间的ZnT8A检测行为存在差异($R^2=0.45$,支持信息中的图S3),表明PLR-ZnT8含有更多的ZnT8A可接近的自身反应位点,从而导致了提高的灵敏度。最后,对于通过不含ZnT8的脂质体进行ZnT8A检测的情况,AUC值为~0.5,表明脂质体对ZnT8A检测具有最低程度的贡献(支持信息中的图S4)。

[0081] 对于单纯ZnT8A测定,与传统的ZnT8A检测方法(例如,酶联免疫吸附测定¹⁸、放射免疫测定¹⁹、电化学发光法²⁰、萤光素酶免疫沉淀系统²¹)相比,我们在此开发的PLR-ZnT8/pGOLD测定显示出提高的灵敏度和特异度(对于307份人类血清样品,~76%的灵敏度和~97%的特异度)、快速的测定过程(~4h)、低样品体积要求(5 μ L)和低成本(每份样品~10美元)(详细实验程序参见方法)。

[0082] 用于T1D诊断的自身抗体的多重检测

[0083] 除了PLR-ZnT8之外,我们还使用自动化打印的IA2抗原(来自Kronus Inc.的包含604-979aa的片段)和GAD抗原(来自Diamyd Medical Inc.的重组蛋白)的微阵列同时进行IA2A和GADA检测,IA2A和GADA是用于T1D诊断的另外两种主要生物标志物。在与用100 μ L FBS稀释的5 μ L人类血清一起孵育后,洗掉多余的生物分子,并且用抗人类IgG-IRDye800缀合物标记,基于荧光强度对由对应抗原捕获的自身抗体进行定量。

[0084] 对于来自IASP的样品(即,50份T1D血清和90份非糖尿病血清),针对IA2A检测,我们获得了~68%的灵敏度和~92%的特异度,而针对GADA检测,我们获得了相对差的~50%的灵敏度和~94%的特异度(图4A)。对于组合的IASP样品和来自佛罗里达大学的样品(即,307份人类血清,包括138份T1D血清和169份非糖尿病血清),IA2A的检测性能仍然达到~71%的灵敏度和~95%的特异度,但是对于GADA检测只达到~40%的灵敏度和~95%的特异度(图4B)。包括PLR-ZnT8检测结果在内,这三种自身抗体的组合通过该大的样品集合得到的用于T1D诊断的测定性能为~89%的灵敏度和~93%的特异度。显然,对于我们的平台,改进GADA测定还存在很大的空间。鉴于其高盛行率,在发病时ZnT8A明显与GADA和IA2A重叠²。在反应性水平方面进行分析,ZnT8A与GADA弱相关($R^2=0.19$,支持信息中的图S5),并且ZnT8A与IA2A中等相关($R^2=0.46$,支持信息中的图S5),表明ZnT8A可能是独立的T1D生物

标志物,这与先前的文献一致²。

[0085] 认为ZnT8A是构象特异性的,主要识别呈其天然构象的ZnT8自身抗原。多次跨越的全长ZnT8的纯化需要去污剂增溶,但是DS-ZnT8缺乏结构稳定性,这对维持构象表位的正确折叠提出了重大挑战。当将全长ZnT8固定在pGOLD上时,苛刻的抗原处理程序(例如,干燥、再水合)进一步加剧了生物活性的损失。为了克服这些限制,在一系列优化工作之后,本发明人开发了基于脂蛋白体的方法,该方法可以显著改进保护性脂质基质中的全长ZnT8的结构稳定性和正确折叠,使得自身反应位点以高生物活性可被ZnT8A接近¹³。即使在严格的干燥和再水合实验条件下,PLR-ZnT8中的大部分全长ZnT8仍然保持完整,这与相同实验条件下DS-ZnT8中的全长ZnT8的结构完整性完全丧失形成明显对比。

[0086] 根据文献,通过CTD检测到的主要的ZnT8A是由β细胞在其被破坏后释放的ZnT8A,揭示晚期T1D。在这点上,通过CTD捕获的ZnT8A的检测可以证实T1D,但是可能缺乏在疾病最早期预测T1D的能力。我们的结果表明,PLR-ZnT8可以提供CTD之外的另外的自身反应位点以捕获更多的ZnT8A,有助于提高测定灵敏度。这些自身抗体被假定来自细胞外基质,其可能代表T1D早期由β细胞或免疫应答形成的产物。

[0087] 总之,利用PLR-ZnT8的新结构,我们开发了有效的用于T1D自身抗体检测的基于微阵列的测定。脂蛋白体有效地维持全长ZnT8的正确折叠,使ZnT8A能够接近自身反应位点。对于来自138名T1D患者和169名健康个体的307份人类血清,固定在pGOLD上的PLR-ZnT8实现的ZnT8A检测性能为~76%的灵敏度和~97%的特异度,其优于基于DS-ZnT8和CTD的ZnT8A检测性能,它们分别为~2%的灵敏度和~94%的特异度,以及~59%的灵敏度和~94%的特异度。此外,还将pGOLD应用于来自多于300份血清样品的其他T1D相关自身抗体IA2A和GADA的多重检测,结果分别为~71%的灵敏度和~95%的特异度,以及~40%的灵敏度和~95%的特异度;通过评估组合的三种自身抗体,产生了~89%的灵敏度和~93%的特异度的整体多重测定性能。

[0088] 我们当前的工作建立了pGOLD上的脂蛋白体作为用于ZnT8A检测的有前景的平台,具有高灵敏度和高特异度。未来的方向是改进GADA检测,并且优化多重测定用于筛查处于风险的人群的症状前T1D的整体性能。在较早期诊断出疾病将为预防提供安全和有效的治疗选择。

[0089] 本公开内容的试剂盒

[0090] 本文描述的任何组合物可以被包含在试剂盒中。在非限制性实例中,试剂盒中可以包含具有内部和外部的脂蛋白体诸如PLR-ZnT8,所述脂蛋白体包含ZnT8蛋白,所述ZnT8蛋白的胞质结构域暴露在脂蛋白体的外部。

[0091] 例如,试剂盒可以包含合适的等分试样的脂蛋白体,该脂蛋白体包含本发明的ZnT8,诸如PLR-ZnT8,以及在一些情况下,包含一种或更多种另外的剂,诸如芯片或与靶向ZnT8的抗体结合的捕获的自身抗体。试剂盒的组分可以在水性介质中或呈冻干形式被包装。试剂盒的容器装置/工具(means)通常将包括至少一个小瓶、试管、烧瓶、瓶、注射器或其他容器装置/工具,组分可以放置并且优选地,合适地等分在所述容器装置/工具中。在试剂盒中存在多于一种组分的情况下,试剂盒通常还将包含第二、第三或其他另外的容器,另外的组分可以单独放置在所述容器中。然而,小瓶中也可以包含成分的多种组合。本发明的试剂盒通常还将包含用于容纳本发明的包含ZnT8的脂蛋白体的装置/工具和用于商业销售的

呈紧密限制形式的任何其他试剂容器。这样的容器可以包括在其中保存期望的小瓶的注射或吹塑模制的塑料容器。

[0092] 当试剂盒的组分在一种和/或更多种液体溶液中提供时,液体溶液是水性溶液,无菌水性溶液是特别优选的。然而,试剂盒的组分也可以作为干燥粉末提供。当作为干燥粉末提供试剂和/或组分时,粉末可以通过添加合适的溶剂来重构。设想溶剂也可以被提供在另一容器装置/工具中。

[0093] 方法/实施例

[0094] 以下实施例已经被包括以向本领域普通技术人员提供用于实践本公开的主题的代表性实施方案的指导。根据本公开内容和本领域技术的一般水平,本领域技术人员可以理解,以下实施例仅意图是示例性的,并且可以采用许多变化、修改和改变而不偏离本公开的主题的范围。以下实施例通过说明的方式而非通过限制的方式来提供。

[0095] 方法

[0096] 材料。Hyclone胎牛血清(FBS)购自Fisher Chemicals。IRDye800-NHS酯购自Licor Biosciences。GAD65购自Diamyd Medical,且IA2(ICA512)购自Kronus Inc.。山羊抗人类IgG抗体购自Vector Lab。等离体金芯片(pGOLD)购自Nirmidas Inc.。人类血清机构审查委员会(Human serum Institutional Review Board)对本研究的批准从斯坦福大学获得。并且人类血清样品由佛罗里达大学和胰岛自身抗体标准化项目(IASP)提供。将样品等分并储存在-80℃直至进行处理。

[0097] 蛋白序列。以下是用于本发明的四种ZnT8蛋白序列的实例。其中两种是“a”形式,并且其中两种是“b”形式。“a”形式和“b”形式都具有R325W变体。野生型ZnT8蛋白是R325,它基于“a”形式。W325形式是变体。

[0098] WT,ZnT8a形式R325:

MEFLERTYLVNDKAAKMYAFTLESVELQQKPVNKDQCPRERPEELESSGGMYHCHSGSKPTEK
GANEYAYAKWKLCSASAICFIFMIAEVVGHHIAGSLAVVTDAAHLLIDLTSFLLSLFSLWLS
SKPPSKRLTFGWHRAEILGALLSILCIWVVTGVLVYLACERLLYPDYQIQATVMIIVSSCAV
[0099] AANIVLTVVLHQRCLGHNHKEVQANASVRAAFVHALGDLFQSSISVLISALIIYFKPEYKIAD
PICTFIFSIILVLASTITILKDFSILMEGVPKSLNYSVGKELILAVDGVLSVHSLHIWSLTM
NQVILSAHVATAASRDSQVVRREIAKALSKSFTMHS~~LT~~IQ
MESPVDQDPDCLFCEDPCD (SEQ ID NO: 1)

[0100] ZnT8a形式W325:

MEFLERTYLVNDKAAKMYAFTLESVELQQKPVNKDQCPRERPEELESSGGMYHCHSGSKPTEK
GANEYAYAKWKLCSASAICFIFMIAEVVGHHIAGSLAVVTDAAHLLIDLTSFLLSLFSLWLS
SKPPSKRLTFGWHRAEILGALLSILCIWVVTGVLVYLACERLLYPDYQIQATVMIIVSSCAV
[0101] AANIVLTVVLHQRCLGHNHKEVQANASVRAAFVHALGDLFQSSISVLISALIIYFKPEYKIAD
PICTFIFSIILVLASTITILKDFSILMEGVPKSLNYSVGKELILAVDGVLSVHSLHIWSLTM
NQVILSAHVATAASWDSQVVRREIAKALSKSFTMHS~~LT~~IQMESPVDQDPDCLFCEDPCD
(SEQ ID NO: 2)

[0102] WT,ZnT8b形式R325:

[0103] MYHCHSGSKPTEKGANEYAYAKWKLCSSASAICFI FMIAEVVGGHIAGSLAVVTDAHLLIDL
TSFLLSLFSLWLSSKPPSKRLTFGWHRAEILGALLSILCIWVVTGVLVYLACERLLYPDYQI
QATVMIIVSSCAVAANIVLTVVLHQRCGLGHNHKEVQANASVRAAFVHALGDLFQSI SVLISA
LIIYFKPEYKIADPICTFIFSI LVLASTITILKDFSILLMEGVPKSLNYSGVKELILAVDGV
LSVHSLHIWSLTMNQVILSAHVATAASRDSQVVRREIAKALSKSFTMHSLTIQMESPVDQDP
DCLFCEDPCD (SEQ ID NO: 3)

[0104] ZnT8b形式W325:

[0105] MYHCHSGSKPTEKGANEYAYAKWKLCSSASAICFI FMIAEVVGGHIAGSLAVVTDAHLLIDL
TSFLLSLFSLWLSSKPPSKRLTFGWHRAEILGALLSILCIWVVTGVLVYLACERLLYPDYQI
QATVMIIVSSCAVAANIVLTVVLHQRCGLGHNHKEVQANASVRAAFVHALGDLFQSI SVLISA
LIIYFKPEYKIADPICTFIFSI LVLASTITILKDFSILLMEGVPKSLNYSGVKELILAVDGV
LSVHSLHIWSLTMNQVILSAHVATAASWDSQVVRREIAKALSKSFTMHSLTIQMESPVDQDP
DCLFCEDPCD (SEQ ID NO: 4)

[0106] 重组抗原的制备。在HEK293细胞中过表达人类ZnT8同种型-2的325R多态性变体,并且如先前描述的纯化在重构脂蛋白体中。简而言之,将全长ZnT8用n-十二烷基β-D-麦芽糖苷(DDM)增溶,经由针对C-末端聚组氨酸标签的Ni-NTA亲和力来部分地纯化,并且然后通过重构为脂蛋白体来进一步纯化(将含有比例为2:1:1的1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸-(1'-rac-甘油)和1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺的脂质预混合,干燥,声处理,并且用DDM进行去污剂去稳定化,然后进行全长ZnT8的重构),随后用不含去污剂的测定缓冲液(20mM HEPES、100mM NaCl、1mM TCEP, pH 7.0)洗涤脂蛋白体。将325R变体的C-末端结构域(275-369aa)加His标签,在HEK293细胞中过表达,并且进行Ni-NTA亲和纯化,随后针对测定缓冲液进行透析。将纯化的在脂蛋白体中的全长ZnT8悬浮于相同的测定缓冲液中。在去污剂胶束中的全长ZnT8通过在测定缓冲液用0.1% DDM使脂蛋白体增溶来制备。将纯化的在去污剂胶束或脂蛋白体中的全长ZnT8通过SDS-PAGE用考马斯蓝染色进行分析。

[0107] 真空干燥的全长ZnT8的HPLC分析。通过氮气蒸发使纯化的在去污剂胶束或脂蛋白体中的全长ZnT8干燥,或者然后在真空下保持60min以上以去除痕量液体。通过添加ddH₂O和0.1%月桂基麦芽糖-新戊二醇(LMNG)和0.1mM荧光素-5-马来酰亚胺(FM)(一种硫醇反应性荧光标记物),使完全干燥的全长ZnT8样品再水合。通过使再水合的混合物通过用测定缓冲液预平衡的脱盐柱来去除未反应的FM。将所得的LMNG增溶的且FM标记的全长ZnT8使用FM荧光读数,通过尺寸排阻HPLC进行分析,以便于检测全长ZnT8和脂质。将测定缓冲液中的脂蛋白体悬浮液或DS-ZnT8的等分试样并行地进行HPLC分析作为对照。

[0108] 在pGOLD上制备T1D相关抗原微阵列。使用GeSiM Nano-Plotter 2.1将制备好的PLR-ZnT8(0.2mg/mL)、IA2(0.088mg/mL)和GAD(0.13mg/mL)抗原打印到pGOLD上。每个微阵列由PLR-ZnT8、IA2和GAD抗原的三个点组成。将~5nL的抗原溶液递送至每个点。微阵列遵循3×3布局。点直径为~400μm,并且每个点之间的距离为~1000μm。在每个pGOLD上形成16个相同的微阵列。制备好的pGOLD在使用前是真空密封的并储存在-20℃。在不同的微阵列制备过程中,还在与PLR-ZnT8相同的实验条件下,将如前所制备的DS-ZnT8和CTD固定在pGOLD上,用于抗体检测。

[0109] T1D相关自身抗体的多重检测。将制备好的pGOLD集成在模块中,模块中每个生物芯片上的16个相同的微阵列被分隔到16个孔中以处理16份样品。将每个孔与用100 μ L FBS稀释(20倍)的5 μ L人类血清一起孵育1.5h,然后与用FBS稀释的终浓度为4nM的抗人类IgG-IRDye800缀合物一起孵育45min。在每次孵育程序之间,用洗涤缓冲液洗涤每个孔。将14份样品与两份参考样品(一份针对GAD的IgG呈阳性的血清样品,以及一份具有对所有T1D相关抗原结合呈阴性的IgG的血清样品)一起施加至每个生物芯片。该测定系统包含pGOLD载玻片上打印的抗原阵列、载玻片架、缓冲液、板洗涤器和双通道(700/800nm)扫描仪,其可容易地部署在临床和公共卫生实验室中。

[0110] 数据分析。在测定过程之后,用MidaScan-IR近红外扫描仪扫描每个生物芯片。MidaScan-IR是一种双通道(700nm和800nm)近红外共聚焦显微镜扫描仪,用于对标准玻璃或等离子体载玻片上的组织、细胞和微阵列进行成像。生成IRDye680和IRDye800荧光图像,并且通过MidaScan软件定量每个微阵列点上每个通道的中值荧光信号。对于每个样品、每个抗原和每个通道,计算三个点的三个中值荧光信号的平均值,并且通过两点校准针对参考样品归一化。在每个pGOLD上,我们添加了一份T1D阳性样品,以用作其他样品的MFI信号归一化的参考,以减弱实验条件引起的差异。截止值通过ROC曲线分析确定。对本工作中呈现的所有值进行了三次测量。

[0111] 本文引用的所有参考文献,包括出版物、专利申请和专利均通过引用并入本文,其程度如同每个参考文献被单独和具体指出通过引用并入本文并且其全文在本文中被列出一样。

[0112] 除非本文中另外指明或上下文中另外明显冲突,否则在描述本发明的上下文中(特别是在所附权利要求书的上下文中)使用的术语“一(a)”和“一(an)”以及“所述/该(the)”和相似的指示物,被解释为覆盖单数和复数两者。除非另外说明,否则术语“包含/包括(comprising)”、“具有(having)”、“包括/包含(including)”和“包含/含有(containing)”被解释为开放式术语(即,意为“包括但不限于”)。除非本文中另外指明,否则本文的值的范围的叙述仅意图用作单独提及落在该范围内的每个单独的值的简写方法,并且每个单独的值都被并入本说明书中,如同其在本文中被单独叙述一样。除非本文中另外指明或上下文中另外明显冲突,否则本文描述的所有方法可以以任何合适的顺序进行。除非另外要求,否则本文提供的任何和所有实例或示例性语言(例如,“诸如”)的使用仅意图更好地阐明本发明,而不对本发明的范围构成限制。本说明书中的语言不应被解释为表示任何未要求保护的要素对本发明的实施是必需的。

[0113] 本文描述了本发明的优选的实施方案,包括本发明人已知的实施本发明的最佳方式。在阅读上述描述后,对于本领域普通技术人员而言,这些优选的实施方案的变化可以变得明显。本发明人预期技术人员视情况利用这些变化,并且本发明人预期本发明以与本文具体描述的不同方式被实施。相应地,本发明包括适用法律允许的在此所附权利要求书中叙述的主题的所有修改和等效物。此外,除非本文中另外指明或上下文中另外明显冲突,否则本发明涵盖上文描述的要素的所有可能变化形式的任何组合。

序列表

<110> 约翰霍普金斯大学

<120> 用于1型糖尿病诊断的基于脂蛋白体的ZNT8自身抗原

<130> P14838-02

<140>

<141>

<150> 62/531,525

<151> 2017-07-12

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 369

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 1

```

Met Glu Phe Leu Glu Arg Thr Tyr Leu Val Asn Asp Lys Ala Ala Lys
1           5           10           15
Met Tyr Ala Phe Thr Leu Glu Ser Val Glu Leu Gln Gln Lys Pro Val
          20           25           30
Asn Lys Asp Gln Cys Pro Arg Glu Arg Pro Glu Glu Leu Glu Ser Gly
          35           40           45
Gly Met Tyr His Cys His Ser Gly Ser Lys Pro Thr Glu Lys Gly Ala
          50           55           60
Asn Glu Tyr Ala Tyr Ala Lys Trp Lys Leu Cys Ser Ala Ser Ala Ile
65           70           75           80
Cys Phe Ile Phe Met Ile Ala Glu Val Val Gly Gly His Ile Ala Gly
          85           90           95
Ser Leu Ala Val Val Thr Asp Ala Ala His Leu Leu Ile Asp Leu Thr
          100          105          110
Ser Phe Leu Leu Ser Leu Phe Ser Leu Trp Leu Ser Ser Lys Pro Pro
          115          120          125
Ser Lys Arg Leu Thr Phe Gly Trp His Arg Ala Glu Ile Leu Gly Ala
          130          135          140
Leu Leu Ser Ile Leu Cys Ile Trp Val Val Thr Gly Val Leu Val Tyr
145          150          155          160
Leu Ala Cys Glu Arg Leu Leu Tyr Pro Asp Tyr Gln Ile Gln Ala Thr
          165          170          175
Val Met Ile Ile Val Ser Ser Cys Ala Val Ala Ala Asn Ile Val Leu

```

180	185	190
Thr Val Val Leu His Gln Arg Cys Leu Gly His Asn His Lys Glu Val		
195	200	205
Gln Ala Asn Ala Ser Val Arg Ala Ala Phe Val His Ala Leu Gly Asp		
210	215	220
Leu Phe Gln Ser Ile Ser Val Leu Ile Ser Ala Leu Ile Ile Tyr Phe		
225	230	235
Lys Pro Glu Tyr Lys Ile Ala Asp Pro Ile Cys Thr Phe Ile Phe Ser		
245	250	255
Ile Leu Val Leu Ala Ser Thr Ile Thr Ile Leu Lys Asp Phe Ser Ile		
260	265	270
Leu Leu Met Glu Gly Val Pro Lys Ser Leu Asn Tyr Ser Gly Val Lys		
275	280	285
Glu Leu Ile Leu Ala Val Asp Gly Val Leu Ser Val His Ser Leu His		
290	295	300
Ile Trp Ser Leu Thr Met Asn Gln Val Ile Leu Ser Ala His Val Ala		
305	310	315
Thr Ala Ala Ser Arg Asp Ser Gln Val Val Arg Arg Glu Ile Ala Lys		
325	330	335
Ala Leu Ser Lys Ser Phe Thr Met His Ser Leu Thr Ile Gln Met Glu		
340	345	350
Ser Pro Val Asp Gln Asp Pro Asp Cys Leu Phe Cys Glu Asp Pro Cys		
355	360	365

Asp

<210> 2

<211> 369

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的多肽

<400> 2

Met Glu Phe Leu Glu Arg Thr Tyr Leu Val Asn Asp Lys Ala Ala Lys		
1	5	10
Met Tyr Ala Phe Thr Leu Glu Ser Val Glu Leu Gln Gln Lys Pro Val		
20	25	30
Asn Lys Asp Gln Cys Pro Arg Glu Arg Pro Glu Glu Leu Glu Ser Gly		
35	40	45
Gly Met Tyr His Cys His Ser Gly Ser Lys Pro Thr Glu Lys Gly Ala		
50	55	60

Asn	Glu	Tyr	Ala	Tyr	Ala	Lys	Trp	Lys	Leu	Cys	Ser	Ala	Ser	Ala	Ile
65					70					75					80
Cys	Phe	Ile	Phe	Met	Ile	Ala	Glu	Val	Val	Gly	Gly	His	Ile	Ala	Gly
				85						90					95
Ser	Leu	Ala	Val	Val	Thr	Asp	Ala	Ala	His	Leu	Leu	Ile	Asp	Leu	Thr
			100					105					110		
Ser	Phe	Leu	Leu	Ser	Leu	Phe	Ser	Leu	Trp	Leu	Ser	Ser	Lys	Pro	Pro
		115					120					125			
Ser	Lys	Arg	Leu	Thr	Phe	Gly	Trp	His	Arg	Ala	Glu	Ile	Leu	Gly	Ala
	130					135					140				
Leu	Leu	Ser	Ile	Leu	Cys	Ile	Trp	Val	Val	Thr	Gly	Val	Leu	Val	Tyr
145					150					155					160
Leu	Ala	Cys	Glu	Arg	Leu	Leu	Tyr	Pro	Asp	Tyr	Gln	Ile	Gln	Ala	Thr
				165					170					175	
Val	Met	Ile	Ile	Val	Ser	Ser	Cys	Ala	Val	Ala	Ala	Asn	Ile	Val	Leu
				180				185					190		
Thr	Val	Val	Leu	His	Gln	Arg	Cys	Leu	Gly	His	Asn	His	Lys	Glu	Val
		195					200					205			
Gln	Ala	Asn	Ala	Ser	Val	Arg	Ala	Ala	Phe	Val	His	Ala	Leu	Gly	Asp
	210					215					220				
Leu	Phe	Gln	Ser	Ile	Ser	Val	Leu	Ile	Ser	Ala	Leu	Ile	Ile	Tyr	Phe
225					230					235					240
Lys	Pro	Glu	Tyr	Lys	Ile	Ala	Asp	Pro	Ile	Cys	Thr	Phe	Ile	Phe	Ser
				245					250				255		
Ile	Leu	Val	Leu	Ala	Ser	Thr	Ile	Thr	Ile	Leu	Lys	Asp	Phe	Ser	Ile
		260					265					270			
Leu	Leu	Met	Glu	Gly	Val	Pro	Lys	Ser	Leu	Asn	Tyr	Ser	Gly	Val	Lys
		275					280					285			
Glu	Leu	Ile	Leu	Ala	Val	Asp	Gly	Val	Leu	Ser	Val	His	Ser	Leu	His
	290					295					300				
Ile	Trp	Ser	Leu	Thr	Met	Asn	Gln	Val	Ile	Leu	Ser	Ala	His	Val	Ala
305					310					315					320
Thr	Ala	Ala	Ser	Trp	Asp	Ser	Gln	Val	Val	Arg	Arg	Glu	Ile	Ala	Lys
			325						330				335		
Ala	Leu	Ser	Lys	Ser	Phe	Thr	Met	His	Ser	Leu	Thr	Ile	Gln	Met	Glu
		340					345					350			
Ser	Pro	Val	Asp	Gln	Asp	Pro	Asp	Cys	Leu	Phe	Cys	Glu	Asp	Pro	Cys
		355					360					365			

Asp

<210> 3

<211> 320

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 3

Met	Tyr	His	Cys	His	Ser	Gly	Ser	Lys	Pro	Thr	Glu	Lys	Gly	Ala	Asn
1			5					10						15	
Glu	Tyr	Ala	Tyr	Ala	Lys	Trp	Lys	Leu	Cys	Ser	Ala	Ser	Ala	Ile	Cys
			20					25						30	
Phe	Ile	Phe	Met	Ile	Ala	Glu	Val	Val	Gly	Gly	His	Ile	Ala	Gly	Ser
			35					40						45	
Leu	Ala	Val	Val	Thr	Asp	Ala	Ala	His	Leu	Leu	Ile	Asp	Leu	Thr	Ser
			50					55				60			
Phe	Leu	Leu	Ser	Leu	Phe	Ser	Leu	Trp	Leu	Ser	Ser	Lys	Pro	Pro	Ser
65					70				75					80	
Lys	Arg	Leu	Thr	Phe	Gly	Trp	His	Arg	Ala	Glu	Ile	Leu	Gly	Ala	Leu
					85				90					95	
Leu	Ser	Ile	Leu	Cys	Ile	Trp	Val	Val	Thr	Gly	Val	Leu	Val	Tyr	Leu
			100					105						110	
Ala	Cys	Glu	Arg	Leu	Leu	Tyr	Pro	Asp	Tyr	Gln	Ile	Gln	Ala	Thr	Val
			115					120						125	
Met	Ile	Ile	Val	Ser	Ser	Cys	Ala	Val	Ala	Ala	Asn	Ile	Val	Leu	Thr
			130					135						140	
Val	Val	Leu	His	Gln	Arg	Cys	Leu	Gly	His	Asn	His	Lys	Glu	Val	Gln
145					150					155				160	
Ala	Asn	Ala	Ser	Val	Arg	Ala	Ala	Phe	Val	His	Ala	Leu	Gly	Asp	Leu
					165				170					175	
Phe	Gln	Ser	Ile	Ser	Val	Leu	Ile	Ser	Ala	Leu	Ile	Ile	Tyr	Phe	Lys
			180					185						190	
Pro	Glu	Tyr	Lys	Ile	Ala	Asp	Pro	Ile	Cys	Thr	Phe	Ile	Phe	Ser	Ile
			195					200						205	
Leu	Val	Leu	Ala	Ser	Thr	Ile	Thr	Ile	Leu	Lys	Asp	Phe	Ser	Ile	Leu
			210					215						220	
Leu	Met	Glu	Gly	Val	Pro	Lys	Ser	Leu	Asn	Tyr	Ser	Gly	Val	Lys	Glu
225					230					235				240	
Leu	Ile	Leu	Ala	Val	Asp	Gly	Val	Leu	Ser	Val	His	Ser	Leu	His	Ile
					245					250				255	
Trp	Ser	Leu	Thr	Met	Asn	Gln	Val	Ile	Leu	Ser	Ala	His	Val	Ala	Thr
			260						265					270	

Ala Ala Ser Arg Asp Ser Gln Val Val Arg Arg Glu Ile Ala Lys Ala
 275 280 285

Leu Ser Lys Ser Phe Thr Met His Ser Leu Thr Ile Gln Met Glu Ser
 290 295 300

Pro Val Asp Gln Asp Pro Asp Cys Leu Phe Cys Glu Asp Pro Cys Asp
 305 310 315 320

<210> 4
 <211> 320
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 人工序列的描述:合成的多肽
 <400> 4

Met Tyr His Cys His Ser Gly Ser Lys Pro Thr Glu Lys Gly Ala Asn
 1 5 10 15

Glu Tyr Ala Tyr Ala Lys Trp Lys Leu Cys Ser Ala Ser Ala Ile Cys
 20 25 30

Phe Ile Phe Met Ile Ala Glu Val Val Gly Gly His Ile Ala Gly Ser
 35 40 45

Leu Ala Val Val Thr Asp Ala Ala His Leu Leu Ile Asp Leu Thr Ser
 50 55 60

Phe Leu Leu Ser Leu Phe Ser Leu Trp Leu Ser Ser Lys Pro Pro Ser
 65 70 75 80

Lys Arg Leu Thr Phe Gly Trp His Arg Ala Glu Ile Leu Gly Ala Leu
 85 90 95

Leu Ser Ile Leu Cys Ile Trp Val Val Thr Gly Val Leu Val Tyr Leu
 100 105 110

Ala Cys Glu Arg Leu Leu Tyr Pro Asp Tyr Gln Ile Gln Ala Thr Val
 115 120 125

Met Ile Ile Val Ser Ser Cys Ala Val Ala Ala Asn Ile Val Leu Thr
 130 135 140

Val Val Leu His Gln Arg Cys Leu Gly His Asn His Lys Glu Val Gln
 145 150 155 160

Ala Asn Ala Ser Val Arg Ala Ala Phe Val His Ala Leu Gly Asp Leu
 165 170 175

Phe Gln Ser Ile Ser Val Leu Ile Ser Ala Leu Ile Ile Tyr Phe Lys
 180 185 190

Pro Glu Tyr Lys Ile Ala Asp Pro Ile Cys Thr Phe Ile Phe Ser Ile
 195 200 205

Leu	Val	Leu	Ala	Ser	Thr	Ile	Thr	Ile	Leu	Lys	Asp	Phe	Ser	Ile	Leu
210						215					220				
Leu	Met	Glu	Gly	Val	Pro	Lys	Ser	Leu	Asn	Tyr	Ser	Gly	Val	Lys	Glu
225					230					235					240
Leu	Ile	Leu	Ala	Val	Asp	Gly	Val	Leu	Ser	Val	His	Ser	Leu	His	Ile
				245					250					255	
Trp	Ser	Leu	Thr	Met	Asn	Gln	Val	Ile	Leu	Ser	Ala	His	Val	Ala	Thr
			260						265					270	
Ala	Ala	Ser	Trp	Asp	Ser	Gln	Val	Val	Arg	Arg	Glu	Ile	Ala	Lys	Ala
		275					280					285			
Leu	Ser	Lys	Ser	Phe	Thr	Met	His	Ser	Leu	Thr	Ile	Gln	Met	Glu	Ser
		290					295				300				
Pro	Val	Asp	Gln	Asp	Pro	Asp	Cys	Leu	Phe	Cys	Glu	Asp	Pro	Cys	Asp
305					310					315					320

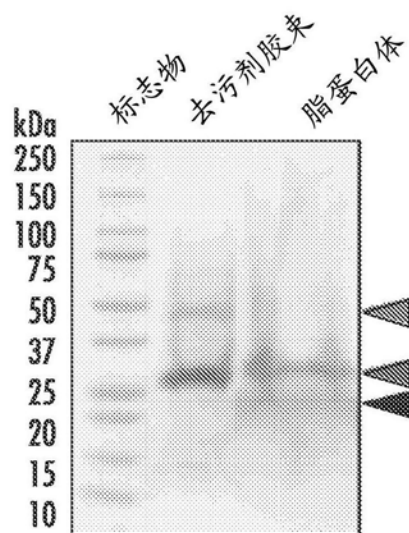


图1A

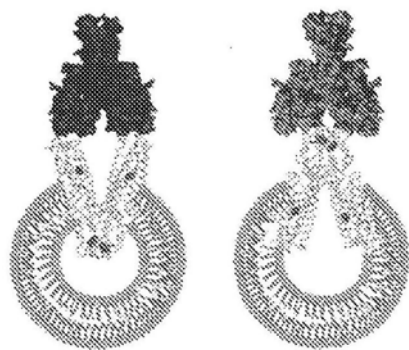


图1B

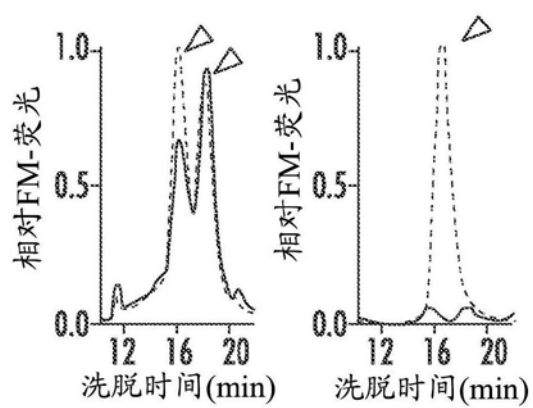


图1C

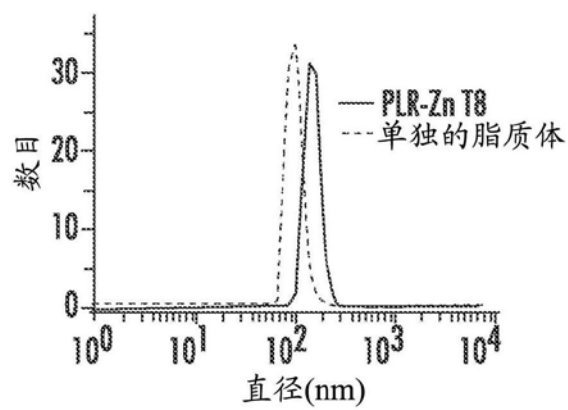


图1D

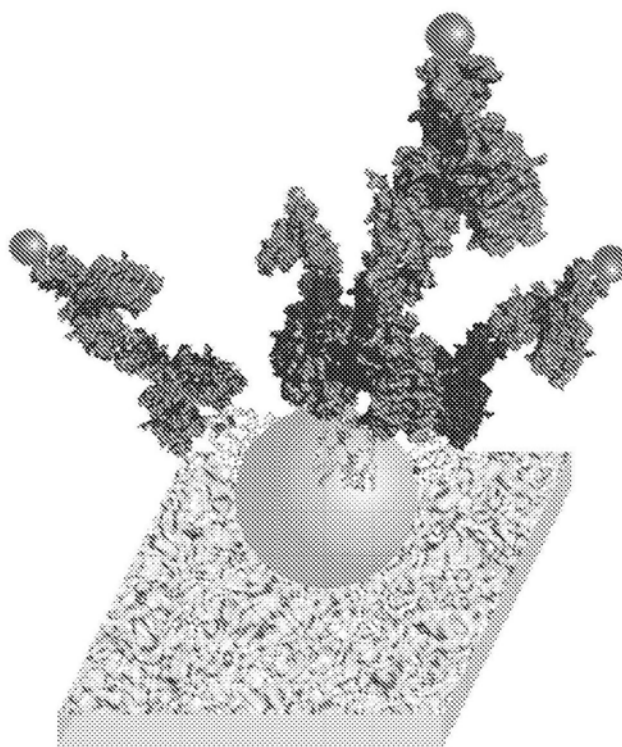


图2A

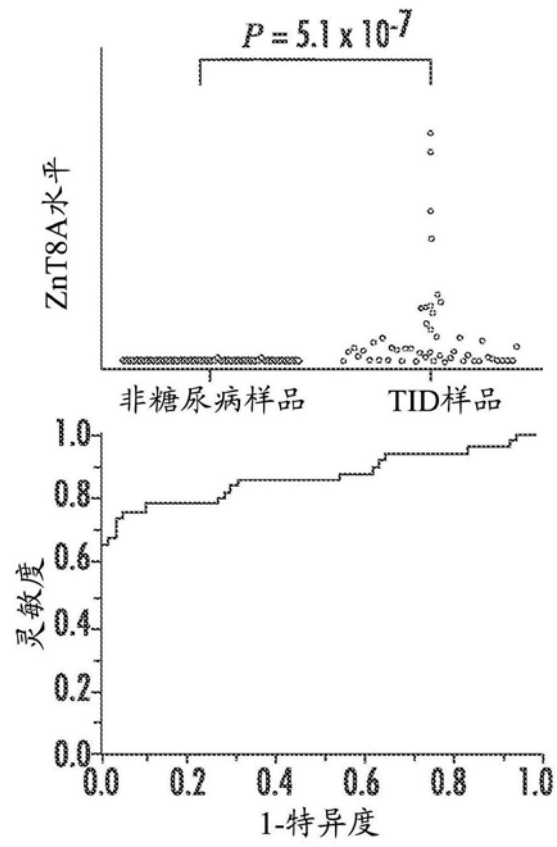


图2B

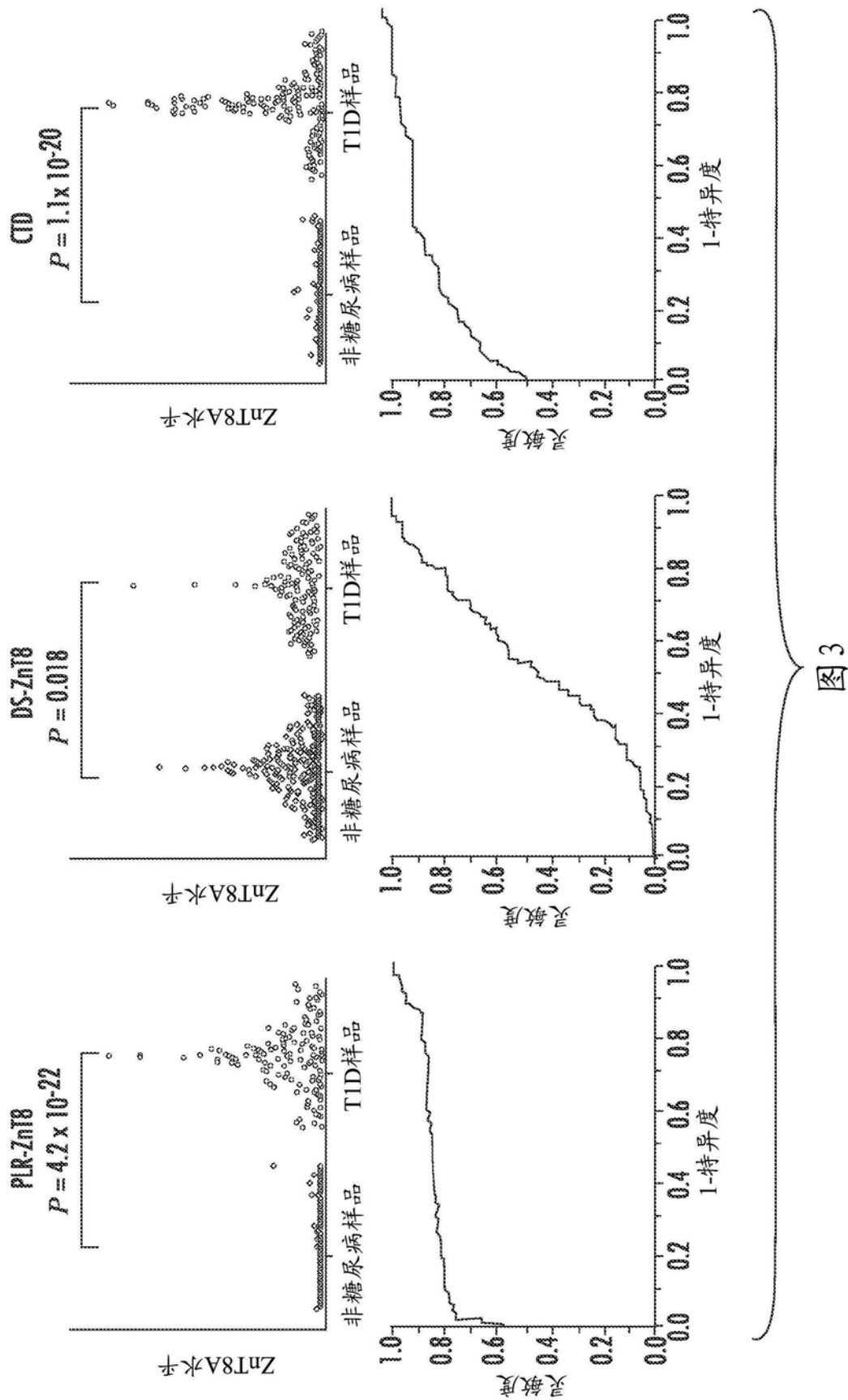


图3

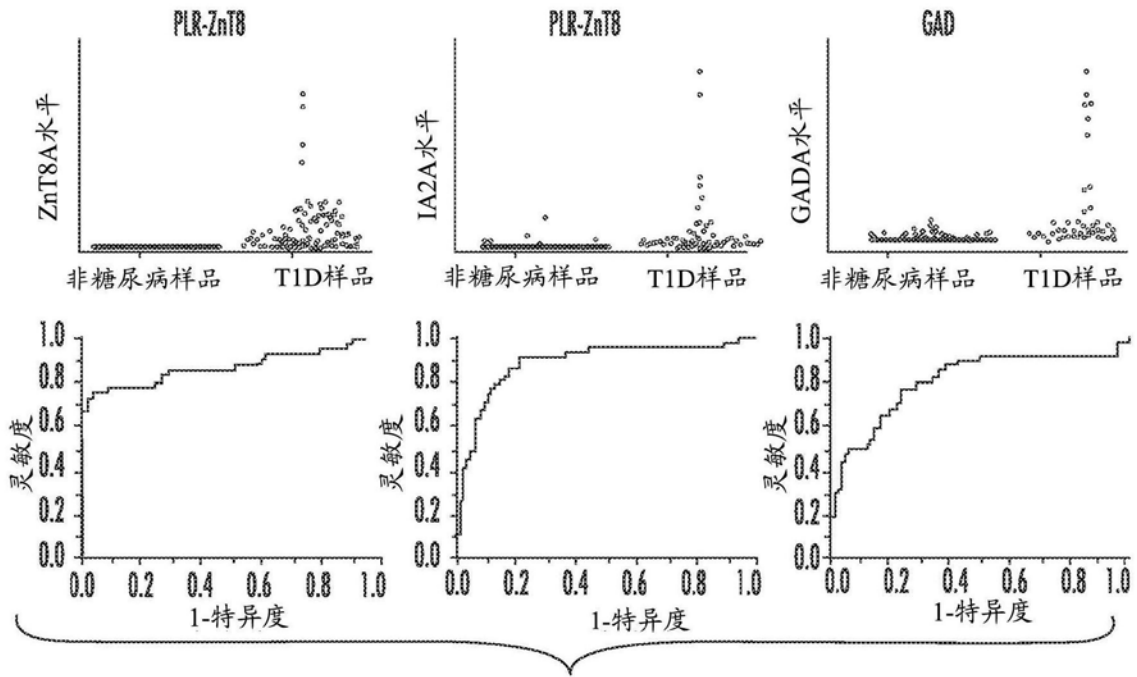


图4A

图4A

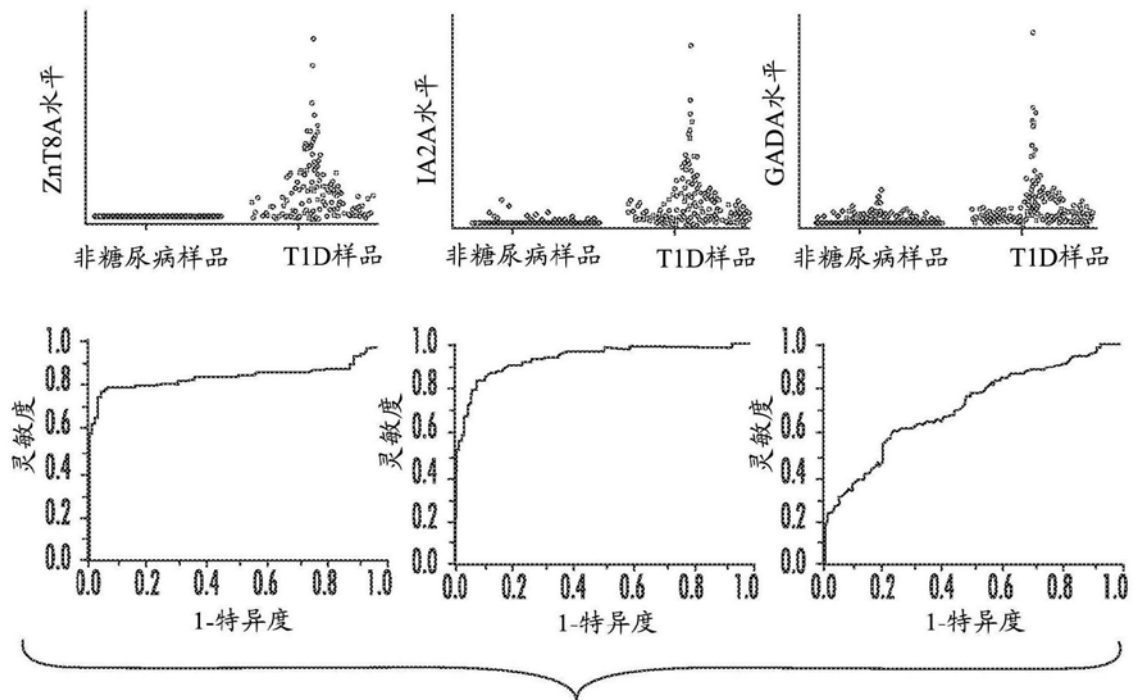
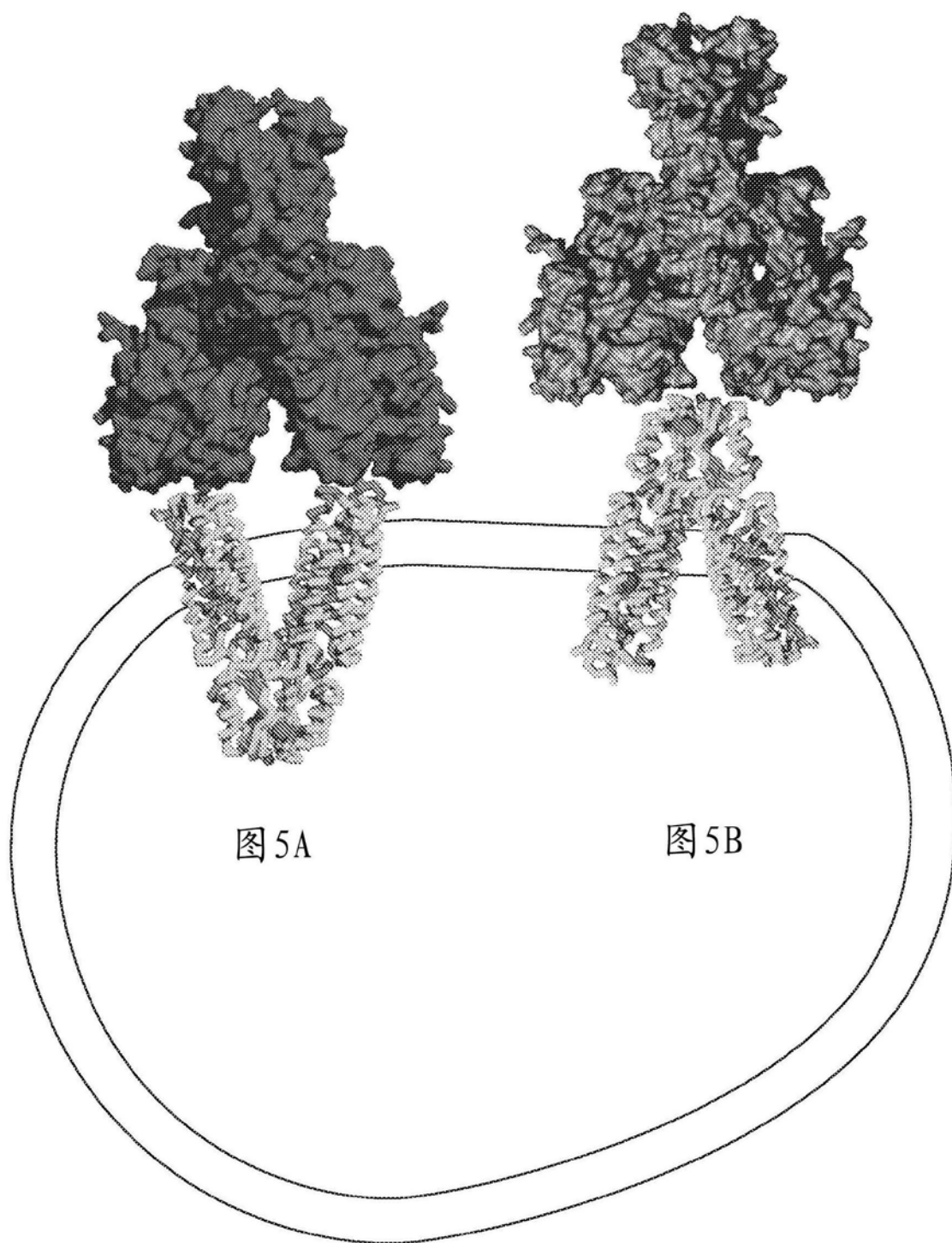


图4B

图4B



专利名称(译)	用于1型糖尿病诊断的基于脂蛋白体的ZNT8自身抗原		
公开(公告)号	CN111316099A	公开(公告)日	2020-06-19
申请号	CN201880059091.2	申请日	2018-07-05
[标]申请(专利权)人(译)	约翰霍普金斯大学 斯坦福大学		
申请(专利权)人(译)	约翰霍普金斯大学 斯坦福大学		
当前申请(专利权)人(译)	约翰霍普金斯大学 斯坦福大学		
[标]发明人	戴宏杰 万昊		
发明人	达克斯·弗 成峰·梅里曼 戴宏杰 万昊		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/564 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/564 G01N33/68 G01N21/6428 G01N33/6893 G01N2021/6439 G01N2800/042		
代理人(译)	李敏春 郑霞		
优先权	62/531525 2017-07-12 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

描述了检测血清中的ZNT8抗体的方法。该方法包括脂蛋白体，其包含暴露于脂蛋白体外部的ZnT8蛋白的跨膜结构域(TMD)和胞质结构域(CTD)；包含靶向ZnT8蛋白的抗体的血清；以及与ZnT8抗体结合的标记的捕获的自身抗体。

MEFLERTYLVNDKAAKMYAFTLESVELQKQPVNKDQCPRERPEELESGGMYHCHSGSKPTEK
 GANEYAYAKWKLCSASAICFTFMIAEVVGGHAGSLAVVTDAAHLLIDLTSFLLSLFLWLS
 SKPPSKRITFGWRAEILGALLSILCIWVVTGVLVYLACERLLYPDYQIQATVMIIVSSCAV
 AANIVLTVVLHQRCGLGHNHKEVQANASVRAAFVHALGDLFQSISVLISALIIYFKPEYKIAD
 PICTFISILVLASTITILKDFSILLMEGVPKSLNYSVKEILAVDGVLSVHSLHIWSLTM
 NQVILSAHVATAASRDSQVVRREIAKALSFSFTMHSITIQ
 MESPDQDPDCLFCEDPCD (SEQ ID NO: 1)