



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780018830.5

[43] 公开日 2010年2月10日

[11] 公开号 CN 101646942A

[22] 申请日 2007.3.23

[21] 申请号 200780018830.5

[30] 优先权

[32] 2006.3.23 [33] US [31] 60/743,678

[86] 国际申请 PCT/US2007/007359 2007.3.23

[87] 国际公布 WO2007/112055 英 2007.10.4

[85] 进入国家阶段日期 2008.11.24

[71] 申请人 埃梅利塔·德古兹曼·布雷耶

地址 美国乔治亚州

[72] 发明人 埃梅利塔·德古兹曼·布雷耶

玛丽·K·鲁宾逊

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 刘 玥 黄可峻

权利要求书3页 说明书15页 附图9页

[54] 发明名称

载脂蛋白指纹图谱技术

[57] 摘要

一种在生物样本中检测载脂蛋白的修饰及其浓度的方法，所述的生物样本包括：血浆、血清和脂蛋白级分，从患者获得的样本中加入特定体积的内标，将所述样本加入到表面增强、G-蛋白涂覆、抗体结合的芯片上并去除未结合到的样本组分，通过质谱分析样本，通过内标的值来确定载脂蛋白的浓度，并评估载脂蛋白、其同种型、氨基酸取代物及其修饰物的浓度，将其作为一种用来诊断糖尿病、中风、应激、阿尔茨海默症、炎症、神经系统疾病及心血管疾病(例如，脂质紊乱、代谢综合症、肥胖、动脉硬化症等)的工具。

1. 一种获得生物样本中的至少一种选定载脂蛋白生物标志物谱图的方法，包括：

- a) 提供所述的样本；
- b) 将所述的样本施加到一个表面来测量所述的至少一种选定载脂蛋白生物标志物并且移除未结合的样本组分；
- c) 通过波谱分析样本；并且
- d) 通过分析制谱图，由此至少诊断一种疾病。

2. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于：其中所述的至少一种选定载脂蛋白生物标志物选自：载脂蛋白 CI、载脂蛋白 CII、载脂蛋白 CIII、载脂蛋白 CIV、载脂蛋白 A1、载脂蛋白 A11、载脂蛋白 AIV、载脂蛋白 AV、载脂蛋白 B48、载脂蛋白 B100、载脂蛋白 D、载脂蛋白 E、载脂蛋白 F、载脂蛋白 G、载脂蛋白 H、载脂蛋白 J、载脂蛋白 L、载脂蛋白 M、其同种型，及其组合。

3. 根据权利要求 2 所述的方法，其特征在于：其中所述的样本被施加并结合到表面增强、抗体捕获蛋白涂覆、抗体结合的表面上，并洗去未结合的样本组分。

4. 根据权利要求 2 所述的方法，其特征在于：其中所述的至少一种选定载脂蛋白生物标志物是通过激光解吸附电离飞行时间质谱或其他适当的质谱方法进行检测的。

5. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于：其中所述的样本是选自人血浆、血清和人脂蛋白级分。

6. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于：其中所述的至少一种疾病选自：糖尿病、中风、应激、阿尔茨海默氏症、心血管疾病、血脂异常症、代谢综合症、肥胖症和动脉硬化症。

7. 一种检测生物样本中的特异性载脂蛋白浓度及修饰的方法，所述的样本来自于患者，并且所述的样本包括：血浆、血清和脂蛋白级分，所述的方法包括如下步骤：

- a) 在所述的样本中加入特定体积的内标；
- b) 将所述的样本施加到表面增强、G 蛋白涂覆、抗体结合的芯片上并且移除未结合到所述的样本组分；
- c) 通过质谱分析所述的样本；并且

d) 通过内标的值, 检测所述的载脂蛋白的浓度,

其中, 该方法通过评估载脂蛋白同种型的浓度作为诊断糖尿病、中风、应激、阿尔茨海默氏症、心血管疾病、血脂异常症、代谢综合症、肥胖症和动脉硬化症的一种手段。

8. 根据权利要求 7 所述的方法, 其特征在于: 所述的特异性载脂蛋白结合在特异性抗体上。

9. 根据权利要求 8 所述的方法, 其特征在于: 其中所述的特异性抗体被固定到抗体捕获蛋白涂覆的表面上。

10. 根据权利要求 9 所述的方法, 其特征在于: 其中所述的样本被施加并允许结合到所述的抗体捕获蛋白涂覆的表面, 且洗去未结合的样本组分。

11. 根据权利要求 9 所述的方法, 其特征在于: 其中所述的载脂蛋白是通过激光解吸附电离飞行时间质谱或其他适当的质谱方法进行检测的。

12. 根据权利要求 9 所述的方法, 其特征在于: 其中所述的载脂蛋白选自: 载脂蛋白 CI、载脂蛋白 CII、载脂蛋白 CIII、载脂蛋白 CIV、载脂蛋白 A1、载脂蛋白 A11、载脂蛋白 AIV、载脂蛋白 AV、载脂蛋白 B48、载脂蛋白 B100、载脂蛋白 D、载脂蛋白 E、载脂蛋白 F、载脂蛋白 G、载脂蛋白 H、载脂蛋白 J、载脂蛋白 L、载脂蛋白 M, 并且所述的特异性抗体选自: 载脂蛋白 CI、载脂蛋白 CII、载脂蛋白 CIII、载脂蛋白 CIV、载脂蛋白 A1、载脂蛋白 A11、载脂蛋白 AIV、载脂蛋白 AV、载脂蛋白 B48、载脂蛋白 B100、载脂蛋白 D、载脂蛋白 E、载脂蛋白 F、载脂蛋白 G、载脂蛋白 H、载脂蛋白 J、载脂蛋白 L 和载脂蛋白 M 的抗体。

13. 根据权利要求 12 所述的方法, 其特征在于: 其中所述的样本选自: 人血浆、血清及人脂蛋白级分。

14. 根据权利要求 7 所述的方法, 其特征在于: 其中在生物样本中的特异性载脂蛋白的浓度值是根据内标测定的, 其中所述的内标通过选定的纯化蛋白修饰并通过高分辨率质谱法设定其参考值而得到。

15. 根据权利要求 7 所述的方法, 其特征在于: 其中所述的修饰选自: 糖基化、唾液酸化、片段化和氨基酸取代。

16. 一种在遗传药理学中用于评估危险因子、疾病状态、药物治

疗及反应的方法。

17. 一种从受试者的生物样本中获得至少一种选定载脂蛋白生物标志物的谱图的方法，包括以下步骤：

a) 从受试者中提供生物样本；

b) 施加所述的生物样本到捕获试剂的表面，所述的捕获试剂特异性地捕获至少一种载脂蛋白生物标志物，使至少一种载脂蛋白生物标志物与捕获试剂结合，并移除未结合的样本组分；

c) 通过激光解吸附/电离质谱分析被捕获的至少一种载脂蛋白，并且

d) 利用分析结果制谱图。

其中，所述的至少一种选定载脂蛋白生物标志物选自：载脂蛋白 CI、载脂蛋白 CII、载脂蛋白 CIII、载脂蛋白 CIV、载脂蛋白 A1、载脂蛋白 A11、载脂蛋白 AIV、载脂蛋白 AV、载脂蛋白 B48、载脂蛋白 B100、载脂蛋白 D、载脂蛋白 E、载脂蛋白 F、载脂蛋白 G、载脂蛋白 H、载脂蛋白 J、载脂蛋白 L、载脂蛋白 M、其同种型，及其组合。

18. 根据权利要求 17 所述的方法，其特征在于：进一步包括下述步骤：

a) 通过使用谱图来诊断受试者疾病。

载脂蛋白指纹图谱技术

本发明的背景

我们，艾米丽塔·德·古兹曼·布雷耶（Emelita De Guzman Breyer），一个居住在美国佐治亚州 30084，塔克（Tucker），利弗西街（Livesey Trail）2840 的美国公民，和玛丽·K·罗宾逊（Mary K. Robinson），一个居住在美国佐治亚州 30034，迪凯特（Decatur），樱桃山（Cherry Hill Place）3649 的美国公民，发明一种针对载脂蛋白指纹图谱技术及其相关方法的新的、有益的改进，以下是其说明书。

交叉引用及优先权

本申请根据专利合作条约要求优先权，要求的优先权文件：美国临时专利申请，发明名称为：载脂蛋白指纹图谱技术（APOLIPOPROTEIN FINGERPRINTING TECHNIQUE），申请日：2006 年 3 月 23 日，发明人代表：艾米丽塔·德·古兹曼·布雷耶（Emelita De Guzman Breyer）和玛丽·K·罗宾逊（Mary K. Robinson），申请号：No. 60/743,678。

背景技术

I 发明的技术领域

本发明的技术领域涉及生物样本和临床样本中载脂蛋白 (apolipoproteins) 的组成、分析及其定量。尤其是，本发明涉及在人血浆、血清和脂蛋白级分中的载脂蛋白的指纹识别、绘制谱图 (profiling)、检测和/或定量的方法、技术及方案。

II 相关技术的描述

众所周知，载脂蛋白、脂蛋白的蛋白组分，能溶解疏水性脂质和促进细胞定位及运输。这些组分在肝脏和小肠中合成，可以维持脂蛋

白颗粒的完整性，作为酶的辅助因子与脂蛋白发生作用，并促进受体介导的交互作用，消除脂质的循环。

载脂蛋白包括如下几组：A（载脂蛋白 A）、B（载脂蛋白 B）和 C（载脂蛋白 C）和 E（载脂蛋白 E）。其中，A、B 和 C 三组的每种组分由两个或两个以上不同的蛋白质组成。载脂蛋白 A 包括：载脂蛋白 A1、载脂蛋白 A11、载脂蛋白 AIV、和载脂蛋白 AV；载脂蛋白 B 包括：载脂蛋白 B48 和载脂蛋白 B100；载脂蛋白 C 包括：载脂蛋白 CI、载脂蛋白 C1i、载脂蛋白 CII 和载脂蛋白 CIV。载脂蛋白 CI、CII、CIV 和载脂蛋白 E 各包含两个或两个以上的同种型(isoform)。载脂蛋白在不同的疾病和健康状态下存在不同的功能。

载脂蛋白 CIII 是人体中的 79 个氨基酸的蛋白质，它具有三种不同的苏氨酸-74 糖基化同种型。CIII-0 型同种型是在缺乏唾液酸、半乳糖和半乳糖胺残基时唾液酸酶反应的终产物，占同种型总量的 14 %。CIII-0 型同种型是极低密度脂蛋白（VLDL）结合到脂解激活受体的抑制剂，这是一个在血浆中清除高甘油三酸酯脂蛋白的重要路线。CIII-0 型同种型与极低密度脂蛋白存在最低亲和力。CIII-1 型同种型含有 1 摩尔的唾液酸并且占同种型总量的 51 %。CIII-2 型同种型是在肝脏中合成和分泌的原始类型的 CIII，含有 2 摩尔的唾液酸，占同种型总量的 35 %。CIII-2 型同种型与极低密度脂蛋白具有较高的亲和力，是抑制极低密度脂蛋白结合到脂解激活受体的较弱抑制剂。

目前用来鉴别及定量 CIII 同种型的方法包括：在血浆中分离脂蛋白成分，对这些成分脱脂化（delipidation），并从载脂蛋白的水溶性组分中纯化 CIII。虽然，不同的纯化同种型都可以通过等电聚焦电泳、质谱和荧光波谱及吸收波谱等方法检测。但目前的方法不足是从血浆中单独分离 CIII，只有 60-80 % 的蛋白被复性，并且在目前的方法中，为临床诊断血浆中的 CIII，例如酶联免疫吸附试验（ELISA）和免疫检测中，只能检测总的 CIII。

然而，CIII 同种型基于以下几个原因而具有重要的临床意义。该同种型的变化曲线与糖尿病患者的血糖控制相关。例如，高糖化血红蛋白直接与高 CIII-0 水平相关。患有高甘油三酯的患者在极低密度脂蛋白中 CIII 的 CIII-2 型同种型的百分比会增加。当女性的热量严重缺乏时，尽管总的 CIII 维持正常水平，但其中 CIII-2 水平会增加。CIII-2

的变化与极低密度脂蛋白甘油三酯的变化正相关，而 CIII-1 的变化与极低密度脂蛋白甘油三酯的变化负相关。现有技术对准确的定量和检测 CIII 同种型的局限性，虽然对了解脂质代谢过程具有十分重要的意义，但它们在不同代谢过程的作用仍有疑义。

在文献和现有技术中有报道，不同的载脂蛋白与疾病具有不同的特征及相关性。举例来说，载脂蛋白 D 是一个多配基、多功能的转运子，并且其在阿尔茨海默病中的新生的外周神经的某个特定定位点会聚积。此外，据研究载脂蛋白 J 与几个不同的生理过程都相关，如精子成熟、脂质运输、补体抑制、组织重构、膜回收利用、细胞-细胞和细胞-基质的交互作用、在折叠感受态 (folding-competent state) 中应激蛋白质的稳定性、促进或抑制细胞凋亡。此外，载脂蛋白 H 可以紧密地结合带有负电荷的表面，并通过覆盖到带负电荷的表面来抑制血液凝固内在途径的活性并且抑制活化的血小板的凝血酶原酶活性。载脂蛋白 F 与低密度脂蛋白相关，并抑制胆固醇酯转运蛋白 (CETP) 的活性，似乎是一个重要的调节胆固醇运输的因子。载脂蛋白 F 在一定程度上与极低密度脂蛋白、载脂蛋白 A1、载脂蛋白 A11 相关。载脂蛋白 M 的拟参与脂质运输。载脂蛋白 CIV 是 14.5 kD 的载脂蛋白，在 CI 和 CII 中有同样定位，并且目前似乎还没有其相关功能的报道。

此外，根据心血管疾病与胆固醇水平的流行病学相关性，临床医生长期通过定量和标准化的测量胆固醇水平，来评估心脏疾病的风险性。脂蛋白颗粒 (LDL 和 HDL) 与胆固醇相关，也有被用来评估心血管疾病的风险。许多研究是关于脂蛋白颗粒大小及密度对健康的影响，这些研究没有得到一致的结论。

在过去的几年中，已有大量证据表明，载脂蛋白的水平与多种条件都相关，以及最近的国家心、肺及血液研究所 (NHLBI)，在最近的一次会议上与美国疾病控制中心和预防中心 (Centers for Disease Control and Prevention) 建议，在不久的将来载脂蛋白 B 的测量将被标准化。载脂蛋白与心血管疾病、糖尿病、中风、肥胖症、阿尔茨海默病、艾滋病和其他疾病都相关。由于前已述及，载脂蛋白在脂质的运输和代谢中的重要作用，这些疾病相关性是不足为奇的。纯化、检测、定量载脂蛋白的困难，使得研究这些化合物对健康的影响存在困难。

目前，使用现有技术的方法定量和测量载脂蛋白需要把脂蛋白颗粒分离的步骤，包括：分析超离心或密度梯度超离心、柱层析、电泳或沉淀。在常规临床应用中，这些传统技术过于昂贵且费时。另一个有用的技术是高效液相色谱法，虽然速度很快但更为复杂且昂贵。其他用于测量载脂蛋白 A 和 B 含量的技术包括酶免疫法（ELISA）、放射免疫法、荧光免疫、免疫扩散、比浊法、浊度法和电免疫测定。最近，表面增强激光解吸电离质谱（表面增强电离 SELDI 或表面增强激光解析电离飞行时间质谱 SELDI-TOF-MS，其中 TOF 指飞行时间，MS 指质谱）已经提供了一些在血浆、血清和脂蛋白级分中测定载脂蛋白的新方法。

因此，始终需要一种准确、快速、重复性实验来分离、鉴定和定量载脂蛋白。目前，需要改进从人血浆、血清和脂蛋白级分的样本中指纹识别、绘制谱图、检测和/或定量载脂蛋白的技术。本发明正是期望满足这些需求。

本发明的简要介绍

简而言之，本发明的技术是结合了免疫学技术与表面增强激光解吸/电离技术（SELDI），以便更检测和测量在普通血浆或血清、脂蛋白级分中的多种载脂蛋白。此外，为了量化内标，所检测和测量的已知蛋白质非常类似于目的蛋白的抗体结合特性，但却有明显的不同分子量。为了检测未知肽（或多肽）的分子量，可以检测所述的未知多肽，将性质及浓度已知的多肽分子量作为对照。

总血浆或血清的谱图(profile)需要制定聚类反应和图谱识别技术来检测正常和健康个体样本中的差别。在表面增强电离质谱技术中使用特异性抗体，提供了一种非常简单的分析方法。表面增强电离质谱技术中另一简化的方面在于滞留层析技术（retentate chromatography）。其中所述的目的蛋白质被固定结合到特定的表面而其他组分被洗去，通过调节 pH 值、盐浓度或有机溶剂能够使其吸附和解吸。芥子酸或其他合适的基质与新配制的含有三氟乙酸的溶液相混合，并加入到所述的芯片上，一经干燥，含有基质的待分析分子被激光吸收，从固相电离，并作为完整的分子离子被加速。

本发明首选技术中的一个实施方案是使用特异性抗体，通过 G 蛋白将其与表面增强芯片相连，有选择地直接从血浆样本中吸收载脂蛋白。G 蛋白结合到抗体的 FC 片段，在生物样本中增强抗体与所述特异性目的抗原的结合力。特异性载脂蛋白被固定到表面增强芯片上，而其他样本组分被冲洗除去。该能量吸收分子 (EAM) 溶液成分有利于载脂蛋白的激光解吸电离。电离后的载脂蛋白根据其飞行时间在不同的时间被检测器检测到，其时间差可转化为分子量。峰的强度与每个蛋白质的量相关。

在血浆和载脂蛋白级分中的载脂蛋白成分、水平及其同种型的紊乱或特殊状态与心血管疾病或其他慢性紊乱有关，例如：中风、代谢综合症、炎症、帕金森氏症、糖尿病、阿尔茨海默氏症、艾滋病和艾滋病毒患者蛋白酶抑制 (高甘油三酯症) 以及各种类型的脂蛋白血症。根据目前描述的技术进行 CIII 同种型的临床诊断，可以检查出潜在的紊乱，包括如上所述的疾病。临床研究中使用的降脂药物将受益于本发明所述的载脂蛋白指纹识别技术，并且本发明所用的技术能够有效的从血浆或不同的载脂蛋白级分中检测载脂蛋白及其同种型的水平及分布，并显示出这些参数随着不同疾病和治疗方法发生何种变化。本发明所述的技术也可在新生儿中有效的评估载脂蛋白的状况，并评价随着老化、营养、环境暴露和生活方式的变化而引起的载脂蛋白的修饰。

本发明的内容包括：确定具体疾病的载脂蛋白生物标志物或谱图，并且发展一种快速且有效的诊断或分类一或多种疾病或状态的定量分析方法。当阅读下述优选实施例的详细描述并结合本发明附图后，将更清楚地明白，本发明针对相关文献中的其他现有技术相比的上述这些特点、其他特点及优点。

附图的简要说明

通过阅读优选实施例及替代实施例的详细说明，并结合其附图，能够帮助更好的理解本发明，其中列举了典型的同种型标准物及谱图来再现本发明，其中类似的参考数字表示类似的结构并且涉及类似的原理，其中：

图 1A 是不同的 CIII 同种型标准物的分子量表格；

- 图 1B 表示不同的 CIII 同种型标准物的报告质谱及其分子量；
- 图 2 表示混合载脂蛋白 CIII (CIII-0、CIII -1、CIII-2 同种型) 谱图赛弗吉 (CIPHERGEN) Q10 芯片；
- 图 3 表示混合载脂蛋白 CIII (CIII-0、CIII -1、CIII-2 同种型) 谱图赛弗吉 CM10 芯片；
- 图 4A 是第一种 CIII 同种型谱图再现性赛弗吉抗-CIII PS 20 芯片；
- 图 4B 是第二种 CIII 同种型谱图再现性赛弗吉抗-CIII PS 20 芯片；
- 图 5 代表 CIII 同种型谱图再现性赛弗吉抗-CIII PS 20 芯片；
- 图 6 代表血浆 CIII 同种型谱图再现性；
- 图 7 代表在不同血浆稀释度中的血浆 CIII 同种型谱图；
- 图 8 代表在不同血浆稀释度中的血浆 CIII 同种型谱图；
- 图 9 代表正常和糖尿病患者的 CIII 同种型谱图的比较，赛弗吉抗-CIII PS 20 芯片；

优选实施例的详细描述

本申请根据专利合作条约要求优先权。优先权文件为美国临时专利申请，发明名称为：载脂蛋白指纹图谱技术 (APOLIPOPROTEIN FINGERPRINTING TECHNIQUE)，申请日：2006 年 3 月 23 日，发明人代表：艾米丽塔·德·古兹曼·布雷耶 (Emelita De Guzman Breyer) 和玛丽·K·罗宾逊 (Mary K. Robinson)，申请号：No. 60/743,678。

本发明提供一种敏感且快速的方法可用于心血管疾病 (例如，血脂异常、代谢综合症及动脉硬化症)、阿尔茨海默氏症、应激、中风、糖尿病，可能通过载脂蛋白的谱图进行诊断。所述的谱图与一种疾病的状态有关，并且采用本发明可以敏感且迅速地检测出某位患者的某种疾病状态。因此，本发明能够定义某种疾病的特异性载脂蛋白标志物或其谱图，并发展能快速且有效的诊断或分类的一或多种疾病或状态的定量检测方法。

尤其是，在一个说明性的实施例中，本发明提供了一种定量某个患者疾病状态的方法，包括以下步骤：

(1) 测量来自患者的生物样本中至少一种生物标志物，其中至少一种标志是选自载脂蛋白 CI、载脂蛋白 CII、载脂蛋白 CIII、载脂蛋白 CIV、载脂蛋白 A1、载脂蛋白 A11、载脂蛋白 AIV、载脂蛋白 AV、

载脂蛋白 B48、载脂蛋白 B100、载脂蛋白 D、载脂蛋白 E、载脂蛋白 F、载脂蛋白 G、载脂蛋白 H、载脂蛋白 J、载脂蛋白 L、载脂蛋白 M、其同种型，及其组合；

(2) 通过波谱分析或定量或测量样本中的至少一种生物标志物；

(3) 通过分析、定量或测量，准备所述的至少一种生物标志物谱图；并且，

(4) 通过将至少一种生物标志物与标准谱图相比较，确定疾病，即，生物样本中的至少一种生物标志物的存在或缺乏将表示疾病。

在本发明的一个相关的说明性实施例中，提供了一种确定患者疾病状态的方法，包括以下步骤：

(1) 测量来自患者的一个样本中多种生物标志物，其中 20 生物标志物选自载脂蛋白 CI、载脂蛋白 CII、载脂蛋白 CIII、载脂蛋白 CIV、载脂蛋白 A1、载脂蛋白 A11、载脂蛋白 AIV、载脂蛋白 AV、载脂蛋白 B48、载脂蛋白 B100、载脂蛋白 D、载脂蛋白 E、载脂蛋白 F、载脂蛋白 G、载脂蛋白 H、载脂蛋白 J、载脂蛋白 L、载脂蛋白 M、其同种型，及其组合；

(2) 通过波谱分析或定量或测量样本中的多种生物标志物；

(3) 通过分析、定量或测量，准备所述的至少一种生物标志物谱图；并且，

(4) 通过将多种生物标志物与标准谱图相比较，确定疾病，即，生物样本中的多种生物标志物的存在或缺乏将表示疾病。

在其他说明性的实施例中，测量步骤包括对样本中的至少一种或多种生物标志物的数量进行定量。在进一步的实施例中，本发明涉及利用包括表面增强电离质谱的方法来确定是至少一种还是多种生物标志物。

高通量蛋白谱图与有效地利用生物信息学工具，提供了一个筛选生物标志物的有用方法。本发明采用的系统最好是色谱 PROTEINCHIPO 实验室设备，也就是一种筛选样本、检测样品中待分析物的存在、鉴别样本类型及测量图谱。并且通过表面增强电离质谱 (SELDI) 合成和筛选分子阵列的仪器。固定到阵列上的蛋白质是在 PROTEINCHIPO 阵列阅读器中阅读，这就是飞行时间质谱仪。

此外，本发明所述的方法可以提高芯片检测蛋白修饰（蛋白的糖基化，等）和蛋白降解的能力。同时，本发明也能检测经过翻译前和/或翻译后修饰的载脂蛋白。翻译前修饰同种型包括等位基因变异、剪接变体和 RNA 编辑形式。翻译后修饰包括形式产生的截短，蛋白裂解（例如，母本蛋白的片段化）、糖基化、脂化、半胱氨酰化、谷胱甘肽化、磷酸化、异戊烯化、酰化、乙酰化、甲基化、硫化、磺化、羟基化、豆蔻酰化、法尼基化（farnesylation）、氧化和泛素化。本发明所述的任何生物蛋白标志物的修饰后同种型，及其自身，都可能被用做生物标志物。

所述的谱图可以包括从血浆中或脂蛋白级分中提取后得到的包括载脂蛋白的组成、水平及其同种型，它们可能是一些疾病、紊乱或症状的决定因素。本文所使用的术语疾病：包括紊乱和症状，特别涉及心血管疾病和其他慢性疾病，例如中风、代谢综合症、糖尿病、阿尔茨海默氏症、艾滋病及不同类型的脂蛋白血症、前列腺癌、以及各种其他癌症。例如，在临床研究中使用降脂药物与治疗疾病，将受益于本发明所述的载脂蛋白指纹技术。作为进一步举例来说，使用本发明所述的指纹技术能在血浆和不同脂蛋白级分中监测载脂蛋白及其同种型的水平及分布，并显示这些参数如何随不同疾病及其治疗方法的改变而改变。另一个例子是，本发明所述的技术可用于评估新生儿的载脂蛋白状况以及评估在老化、营养、环境暴露及生活方式改变时载脂蛋白的修饰。

在另一个例子，本发明提供确定疾病状态的试剂盒，该试剂盒可以根据本发明所测量的所述的生物标志物。例如，试剂盒可以用来衡量任何一或多种的上述生物标志物，这些标志物在来自患病病人和正常机体的不同样本中的微量存在。另一个例子是，试剂盒也可以用来监测病人的在一个疗程的治疗中的反应，使医生能够根据实验结果调整治疗方案。另一个例子是，试剂盒可用于确定在体外或体内的疾病动物模型中调控所述的一或多种上述生物标志物表达的化合物。

本发明优选技术中的一个实施方案是使用特异性抗体，通过 G 蛋白耦合到表面增强的芯片上，直接从血浆样本中有选择地吸收载脂蛋白。G 蛋白结合到抗体的 FC 片段上，因而可以提高在生物样本中抗体与特异性目的抗原的结合力。

所述表面增强芯片的表面上保留了特异性载脂蛋白，而其他样品组分被冲走。能量吸收分子（EAM）溶液样本有利于载脂蛋白的激光解吸附电离。电离后的载脂蛋白根据其飞行时间在不同的时间被检测器检测到，其时间差可转化为分子量。峰的强度与每种蛋白质的量相关。此处使用的术语抗体，包括：抗体片段、免疫球蛋白、affybodies等。

测量生物标志物的优选方法包括使用一生物芯片。生物芯片在本发明中的应用包括蛋白质和核酸芯片。所述的一或多种生物标志物被生物芯片所捕获，并通过激光电离检测所述的生物标志物的分子量。通过一或多种生物标志物的分子量比标准化的起始强度比总的离子流来分析所述的生物标志物。更优选的是，使用对数变换来降低峰值强度的范围，以限制所检测的生物标志物的数量。

在本发明的优选方法中，准备生物标志物谱图的步骤和对比生物标志物与一种疾病状态的步骤是由一个软件分类运算完成的。优选的是，固定在生物芯片上的患者样本数据被（1）生物芯片发送到激光电离质谱，并通过质量/电荷比检测信号的强度；（2）将数据转换成计算机可读形式；并且（3）执行运算，根据用户为检测信号所输入的参数将数据分类，所述的生物标志物是存在于患者中且未存在于非患病机体对照中的。步骤（1）最优选的使用表面增强激光解析电离飞行时间质谱，一般来说其包括：（a）提供适合质谱仪使用的探针，包括吸附其上的吸附剂；（b）使患者样本与吸附剂相接触；（c）将探针上的生物标志物解吸附并电离；并且（d）通过质谱检测电离后的生物标志物。

在一个实施例中，赛弗吉生物标志物图谱软件（CIPHERGEN BIOMARKER PATTERNSTM）是一种对来自赛弗吉蛋白芯片（CIPHERGEN PROTEINCHIP®）阵列质谱分析仪的激光解吸附电离飞行时间质谱数据进行分类，并通过检测获得的波谱图来鉴定蛋白质性质及其结构的化学分析（synthesizers）的软件。使用一种分类模型，将数据通过谱图识别过程进行分类。一般来说，为了研究分类法则，波谱数据将至少代表来自两个不同组的样本。例如，该组可以选自：病理与非病理（例如，癌症与非癌症）、药物应答与药物非应答、毒

性反应与非毒性反应、病状发展与病状未发展或表型条件 (phenotypic condition) 与非表型条件。

在本发明所述的实施例中步骤 (1) 产生的波谱数据可采用一种应用了分类模型的图谱识别过程进行分类。在一些实施例中, 通过使用“已知样本”获得的波谱数据 (例如, 质谱或时间飞行质谱谱), 可以用来“训练”一种分类模型。一种“已知样本”是被预分类的样本 (例如, 癌症或非癌症)。通过使用“已知的样本”获得的波谱数据 (例如, 质谱或飞行时间质谱), 可以用来“训练”一种分类模型。一种“已知样本”是被预分类的样本。来源于波谱并被用作建立分类模型的数据, 可被称作“训练数据集”。一旦被训练, 分类模型即可识别未知样本产生的波谱的数据模式 (图谱) (patterns)。所述的分类模型能将未知样本归类。这对预测某种特异性生物样本是否与某种特定的生物学状态相关 (例如, 患病与未患病) 是非常有用的。

被用来建立分类模型的训练数据集可能包括原始数据或预处理过的数据。在一些实施例中, 可从飞行时间谱或质谱中直接获得原始数据, 然后选择任何合适的方式进行“预处理”。例如, 选择高于某一预设信噪比的信号使得在一个波谱中选择一些峰群, 而非选择波谱中所有的峰。在另一个例子中, 可以选择峰“族”数在一个预设的正常值范围内的峰 (例如, 是一种特定的飞行时间值或质量/电荷比值)。例如, 从训练数据集中删除在一组质谱中的质量/电荷比值小于 50% 的质谱峰。这些预处理步骤, 可降低用于训练分类模型的数据量。

通过任何适当的统计分类 (或“学习”) 方法建立的分类模型, 试图根据数据中存在的某一客观的参数从一组数据中单独分离某一数据。所述的分类方法可以是监督分类或非监督分类。监督分类或非监督分类方法的举例参见: Jain, “统计性模式识别: 综述”, IEEE 模式分析和机器智能学报 (Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence), Vol. 22, No. 1, January 2000, 此处该文章的全部内容被纳入本申请。

在监督分类中, 包含已知分类样本的训练数据被用于一种学习机制, 学习一个或一系列定义每种已知分类组的关系。对新的数据应用所述的学习机制, 并根据学到的关系对新的数据进行分类。监督分类过程包括线性回归过程 (例如, 多元线性回归 (MLR)、偏最小二乘

回归 (PLS) 和主成分回归 (PCR))、二元决策树 (例如, 递归分类过程, 如 CART-分类和回归树)、人工神经网络, 如倒传递网路、判别分析(例如, 贝叶斯分类器 (Bayesian classifier) 或菲舍尔分析 (Fischer analysis)、逻辑分类器及支持向量分类器 (支持向量机)。

一旦一个生物芯片或抗体被基质捕获, 则可以应用任何合适的方法来检测在生物样本中的生物标志物。例如, 生物标志物可以通过各种检测方法被检测和/或测量, 包括例如, 气相离子质谱法、光学方法、电化学方法、原子力显微镜法和射频方法。使用这些方法, 可检测样本中的一或多种生物标志物。

在本发明的优选方法中, 可测定多种生物标志物。使用多种生物标志物提高了实验的预测率, 并为诊断、毒理学、患者分层和患者监护等方面提供了更为有效的手段。这一被称为“图谱识别”的过程检测多种生物标志物所形成的图谱, 大大提高了预期药物的临床蛋白质组学中的灵敏度和特异性。来自临床样本数据的微小变化, 例如通过表面增强电离质谱获得的数据显示, 某些蛋白表达的特定图谱能预测表现型, 例如: 存在或缺乏某种特定的疾病、病情发展的某一特定阶段或药物治疗的积极或不良反应。

在质谱中生成的数据来源于通过上述离子检测器对离子的检测。撞击到离子检测器的离子产生一个电势, 被可捕捉模拟信号的高速时间阵列记录仪所数字化。所述的赛弗吉蛋白芯片阵列系统采用了模拟-数字转换器 (ADC) 来完成上述过程。所述的模拟-数字转换器将一特定间隔时间的检测输出装置整合到时间依赖性 bins 上。所述的间隔时间通常是 1 至 4 纳秒。此外, 飞行时间谱分析通常并不代表一个样本电离能量的单脉冲信号, 而是一系列脉冲信号的总和。这将降低噪声并提高动态范围。在赛弗吉蛋白芯片阵列软件中, 数据处理主要包括飞行时间与质核比的转换、基线的校正及高频的噪声滤波器。在这个步骤中, 信号从时间转换为质量。

基线校正通过消除扰乱波谱的人为的、重复性的仪器偏差, 提高了数据质量。其涉及一种合并峰宽的参数后减去质谱基线的算法。来自一或多个波谱的峰值数据可做进一步分析, 例如, 创建一个电子数据表, 其中每一行代表一个特定的质谱, 每一列代表用于质谱中定义质量的峰, 每一格包含在特定的质谱中峰的强度。可以对所述的数据

使用各种统计或图谱识别方法。如上所述，赛弗吉蛋白标志物图谱软件用来检测波谱中所产生的图谱。这些数据被图谱识别过程通过一种分类模型被分类。一般来说，所述的波谱代表建立分类算法所需的来自两个不同组的样本。

可以收集来自患者或期望确定不同疾病状况的其他机体的样本。所述的患者可能是某些特定的人，特别是认为其自身患有或可能高风险的患有某些类型的疾病，例如，根据他们的病史。其他机体可能是一些已经患有某种特定疾病的人，并希望监测其治疗的有效性。此外，可以通过一部分常规检查从患者获得样本。

任何生物标志物，个别地，有益于帮助确定疾病状态。首先，在一个患者样本中通过本文描述的方法检测被选定的生物标志物，例如，捕获到表面增强电离质谱生物芯片，通过质谱进行检测。然后，测量结果与诊断值或对照相比较，从非疾病状态中辨别出这种疾病状态。所述的诊断值将反映这一特异性生物标志物在某种疾病状态下与非疾病状态相比是上调或下降。更好的理解本文，所述的特异性诊断值可以根据诊断医生的偏好进行调整，以提高诊断试验的灵敏度或特异性。测定值与诊断值相比后显示出疾病状态。

实施例

以下披露的方法是使用本发明所述的优选实施例的具有代表性的方法。在这些方法中，血清样本可以收集自病人，然后使用阴离子交换树脂进行分离。所述的样本中的生物标志物被铜离子固定金属亲和色谱（IMAC）蛋白质芯片阵列所捕获。通过表面增强电离质谱检测所述的生物标志物。将检测结果输入计算机系统，所述的计算机系统包含一种算法，使用与最初测定生物标志物的学习算法和分类算法中相同的参数。该算法根据收到的与每种生物标志物相关的数据产生一个诊断结果。参见图 1A 至 9，关于 CIII 同种型与心血管疾病和糖尿病之间相互关系的实验数据。如前所述，各种载脂蛋白与各种疾病的类似的相关性，已经在文献中被确定。

通过检测表面增强电离质谱产生的数据及利用分类算法的诊断方法可以促进生物标志物的应用。分类算法取决于用来检测生物标志物的实验方案中的详细步骤。这些详细步骤包括，例如是：样本的准备、

芯片的类型和质谱仪的参数。如果所述的实验参数发生改变，则所述的算法也必须发生改变。类似的，如果所述的算法发生改变，则所述的实验方案也可以改变。

本发明的优选实施例，使用 PG-20 蛋白质芯片表面对纯化的载脂蛋白、来自正常机体的血浆样本及来自糖尿病患者的血浆样本进行分析。根据本发明所述的方法，被分析的特异性载脂蛋白在血浆、血清和脂蛋白级分中具有不同的水平。每种载脂蛋白的存在都通过每种载脂蛋白的抗体特异性进行检测。

下面披露的实验方案被限制在可被目前的质谱技术所分析的分子量范围内。首先，脂蛋白 B100 (500 kD) 和 B48 (约 250 kD) 均被结合到抗体-表面而首次分离、释放、化学或酶解片段通过质谱分析或直接消化，结合到如下方案所述的 PG20 芯片上。

1. 样本制备

在进行表面增强激光解析电离飞行时间质谱之前，按照如下方法用缓冲液 5 稀释血浆样本并将抗体偶联到蛋白质芯片®上：

血浆样本的制备：

(1) 准备 U9 缓冲液 (9M 尿素、50 mM 4-羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲液 (HEPES)、0.5% 3-[(3-胆酰氨基丙基)二甲氨基]丙磺酸盐 (CHAPS)，pH 7)；以及

(2) 用 U9 缓冲液稀释血浆样本 (1:2) 和低温下漩涡混匀 30 分钟。

将抗体偶联到蛋白质芯片® 阵列上

- (1) 稀释抗体至 0.2 mg/ml，并加 2 μ l 到芯片的点 (spot) 上；
- (2) 将芯片转移到湿度箱并在室温下孵育 1 小时；
- (3) 不接触点的表面并吸起抗体；
- (4) 在 15mL 的锥形管中，用 8ml 的洗涤缓冲液清洗芯片 10 分钟；
- (5) 弃去液体并用 8mL 的磷酸盐缓冲液洗涤 5 分钟，并重复；并且
- (6) 在过量的磷酸盐缓冲液 (PBS) 中印记到芯片表面。

2. 表面增强激光解析电离飞行时间质谱过程

- (1) 在每个点加入 2 μl 的血浆样本;
- (2) 将芯片转移到湿度箱并在室温下孵育 1 小时;
- (3) 在 15mL 的锥形管中, 用 8ml 的洗涤缓冲液清洗芯片 10 分钟;
- (4) 弃去液体并用 8mL 的磷酸盐缓冲液洗涤 5 分钟, 并重复;
- (5) 弃去液体并用 8mL 1mM 的 4-羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲液 (HEPES) 洗涤 1 分钟, 并重复;
- (6) 从试管中移出芯片, 弃去液体, 并在空气中干燥 10 分钟;
- (7) 准备能量吸收分子 (EAM) 溶液, 加入 100 μl 的 99.8 % 乙腈和 100 μl 1.0 % 三氟乙酸到 1 小瓶 (10mg) 的芥子酸粉末中, 漩涡混匀 5 分钟使粉末溶解, 并且
- (8) 加入 5 μl 能量吸收分子溶液到每个点, 并在空气中干燥 5 分钟, 重复, 并在空气中干燥 10 分钟。

所述的步骤可以因为使用生物处理器而被修改, 所述的生物处理器允许大量并自动添加样本和试剂。实验中通常包括阳性及阴性对照。因而, TNF- α (肿瘤坏死因子 α) 的抗体和抗原在这个试剂盒中。

3. 产生指纹图谱

在血浆样本中及纯化的载脂蛋白产生指纹图谱的过程如下所述:

(1) 用蛋白质芯片®阵列读取器和软件 (赛弗吉生物系统公司 Ciphergen Biosystems, Inc.) 产生所述的谱图。

(2) 用点的方案(protocol)产生或使用来制作芯片。

(3) 必须通过每种抗原根据其分子量来校正数据收集参数。参见, 赛弗吉生物系统公司提供的蛋白质芯片®阵列抗体捕获试剂盒的说明书。

(4) 分析数据并生成载脂蛋白的指纹图谱, 例如, 将数据与自身相比较及将数据与非自身的某个标准相比较, 例如与对照机体相比较。

另外, 本发明可以将抗体耦合到胶珠上, 将载脂蛋白捕获到胶珠上, 从胶珠上洗脱纯化的蛋白质, 然后通过各种质谱进行检测, 包括基质辅助激光解吸电离 (MALDI) 质谱和电喷雾质谱的方法。将抗体耦合到胶珠的方法是众所周知的并且这些方法都适合于本发明。基质辅助激光解吸电离质谱是一种基于激光的软电离方法, 其中所述的样本被嵌入到化学基质中, 极大地促进了大的、非挥发性的及热不稳定

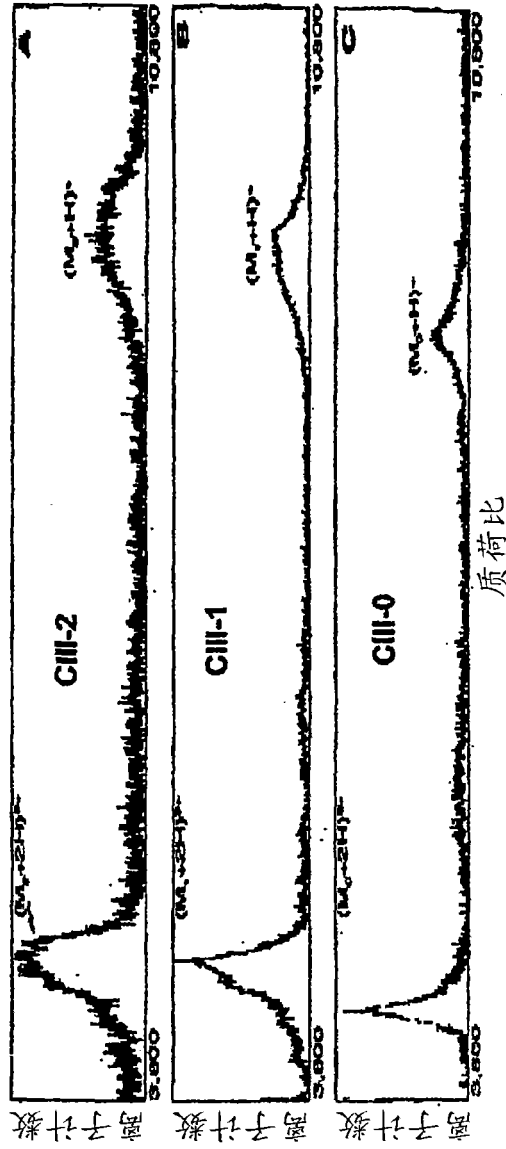
的化合物，如蛋白质、寡核苷酸、合成聚合物和大的无机化合物等发生气相电离。所述的基质在这一技术中起关键作用，其通过吸收激光能量并引起一小部分目标液体的蒸发。

上述关于本发明的优选实施例及附图的详细描述仅作为示范性的举例及描述的目的，而不是为了详尽或限制本发明的范围及内涵。所选的及所描述的实施例最好用来解释本发明的原理及其实际应用。本文中一个普通的技术存在的多种变形，都被本发明的说明书所披露，并且不偏离本发明的范围及内涵。

不同的CIII同种型标准的据报道的质谱的分子量

表1. apoC-III的计算的和测量的分子量(道尔顿)

计算的 M_r	测量的 M_r		
	受试者1	受试者2	受试者3
ApoC-III ₁ 8764.2	8763.9 (-0.3)	8764.9 (+0.7)	8765.5 (+1.3)
ApoC-III ₂ 9420.8	9420.6 (-0.2)	9420.0 (-0.8)	9422.2 (+1.4)
ApoC-III ₃ 9712.1	≈ 9700.2 (-11.9)		



** 来自血浆的纯化的CIII同种型的质谱

图 1

合并的载脂蛋白CIII (CIII-0, CIII-01和CIII-2同种型) 谱图
赛弗吉Q10芯片

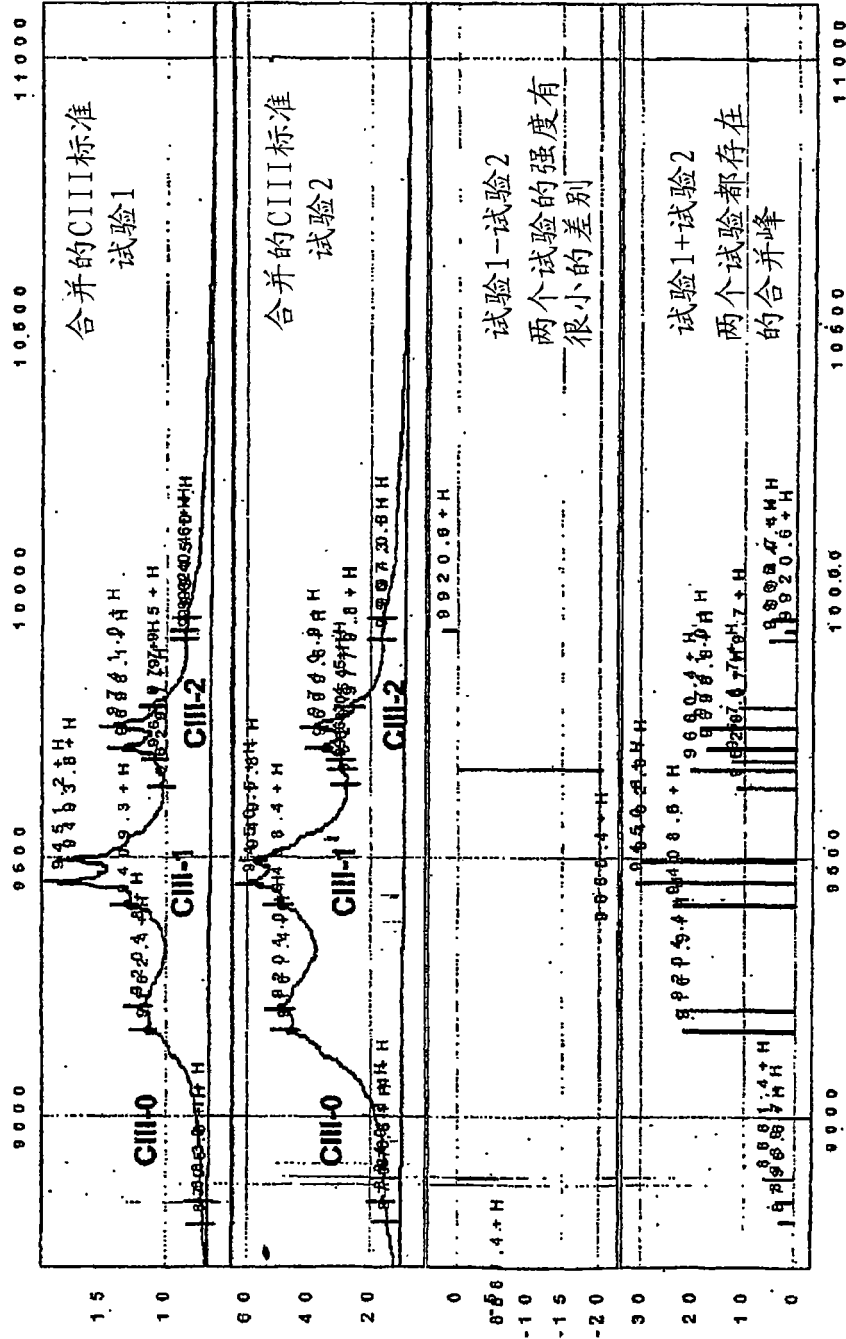


图 3

同种型谱图再现率
赛弗吉抗-CIII PS 20芯片

抗-CIII PS 20芯片2

抗-CIII PS 20芯片1

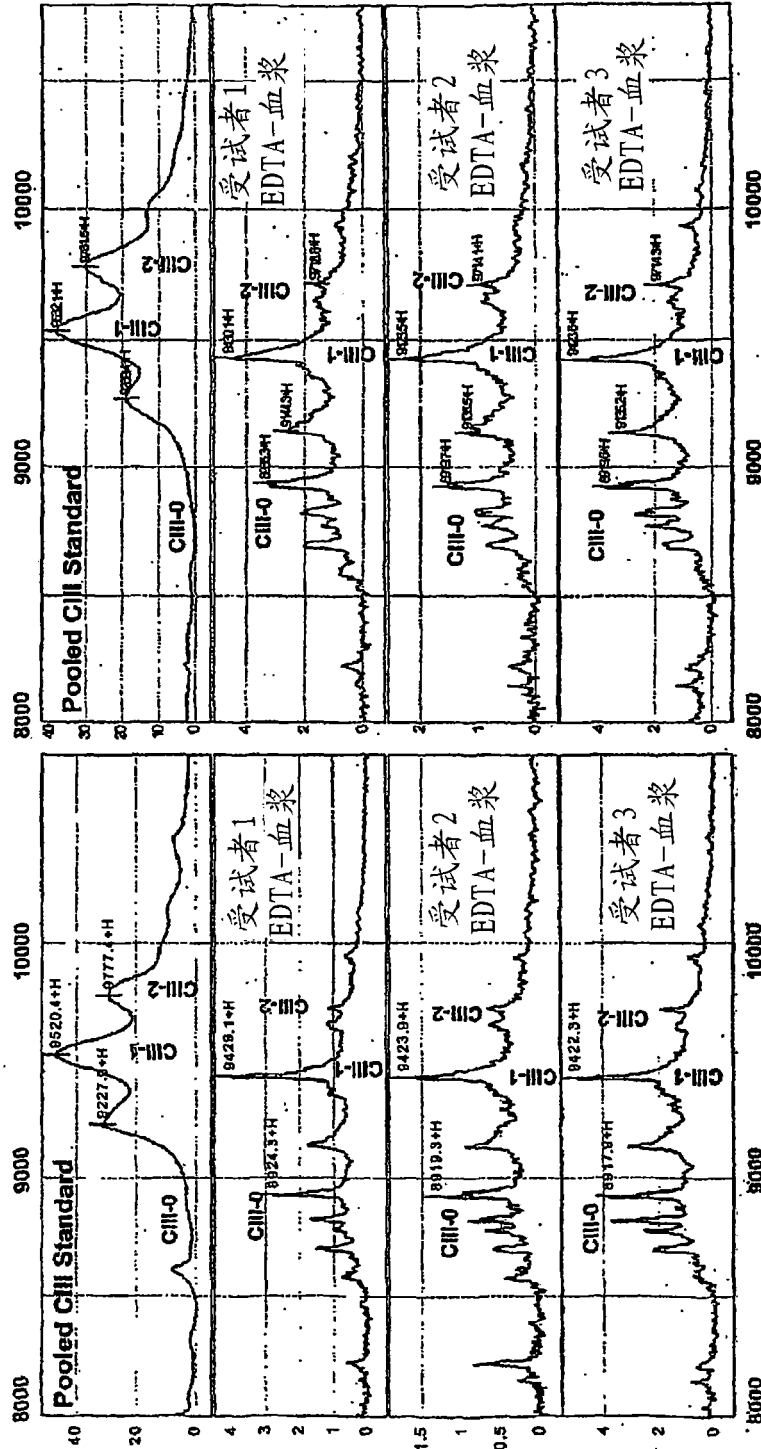


图 4

同种型谱图再现率
赛弗吉抗-CIII PS 20芯片

抗-CIII PS 20芯片2

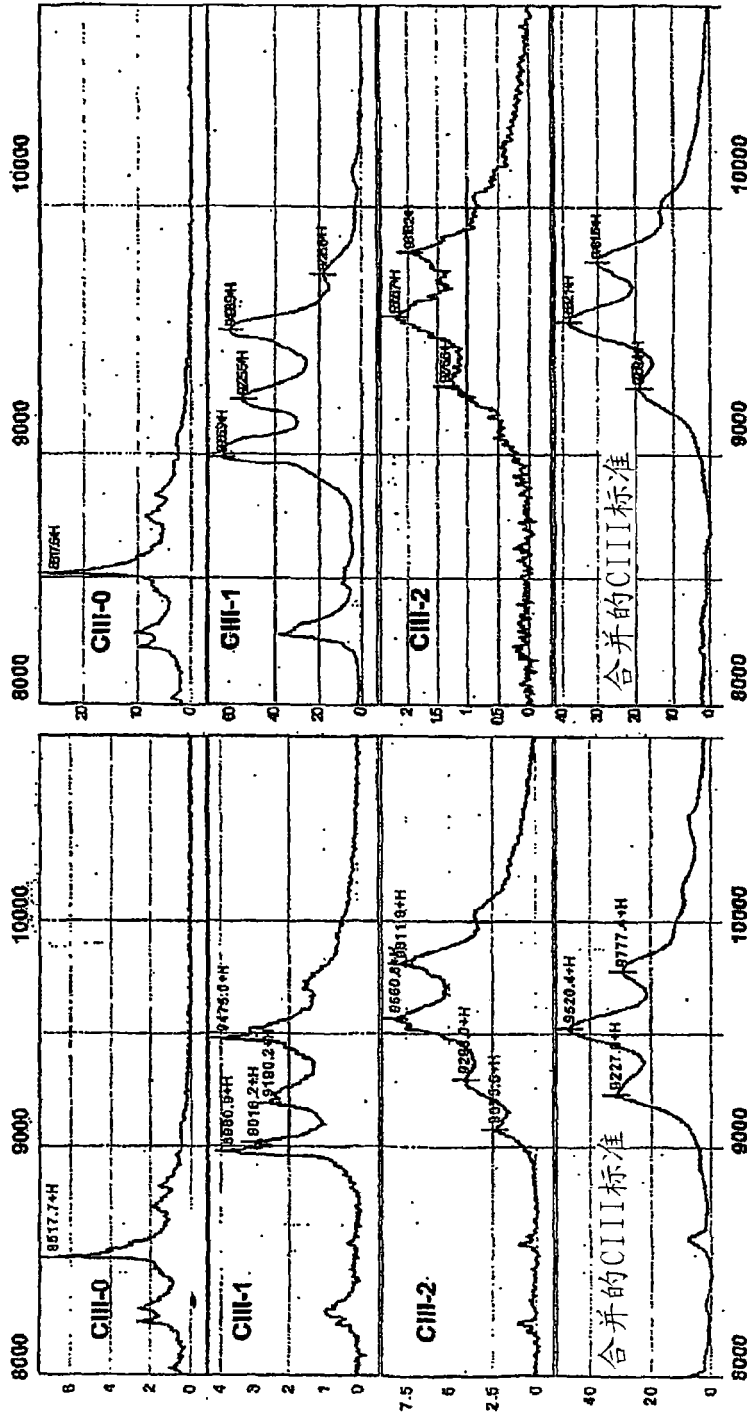
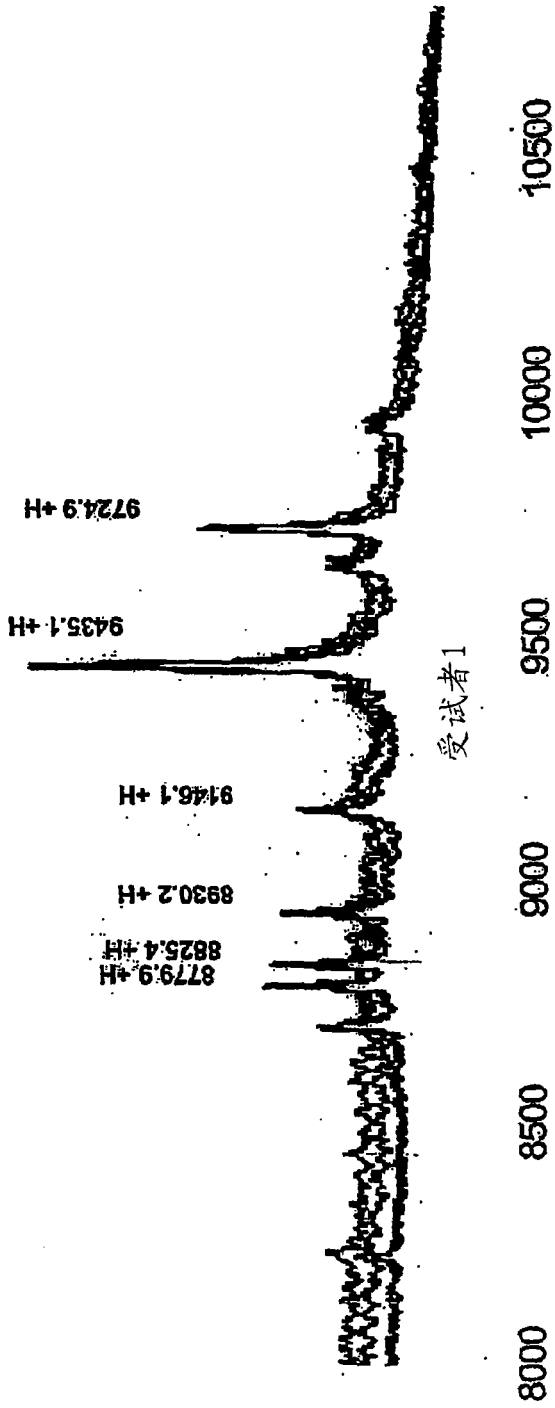


图 5

血浆CIII同种型谱图再现性



用PS-20芯片和CIII抗体得到的受试者1 (N=4) 一式四份血浆 (1:2稀释) 的重叠谱图。峰值标记是四轮的平均值。没有在芯片上进行分子量校正。

估算的分子量

CIII同种型

- CIII-0 8764.2
- CIII-1 9420.8
- CIII-2 9712.1

图 6

在不同的血浆稀释度下血浆CIII同种型谱图



图 7

在不同的血浆稀释度下血浆CIII同种型谱图

Trial	CIII-0 pk1	CIII-0 pk2	CIII-0 pk3	CIII-0 pk4	CIII -1	CIII -2
Chip 1	8780.7	8826.3	8931.1	9146.3	9436.4	9726.1
Chip 2	8780.6	8826.3	8931.3	9147.7	9435.9	9725.8
Chip 3	8779.7	8825.1	8929.7	9145.3	9434.8	9724.9
Chip 4	8778.8	8823.9	8928.7	9145.2	9433.4	9723.0
平均	8780.0	8825.4	8930.2	9146.1	9435.1	9725.0
Std Dev	0.889	1.149	1.227	1.162	1.330	1.396
预期值	8764.4				9420	9712

目前开发的用于CIII同种型测试的抗CIII PS 20芯片的优点

- 首次检测了血浆中CIII-0同种型的几种形式
- 不同CIII同种型的直接血浆鉴定
- 这些同种型精确定量的可能性

图 8

正常和糖尿病受试者的CIII同种型谱图的比较
 赛弗吉抗-CIII PS 20芯片

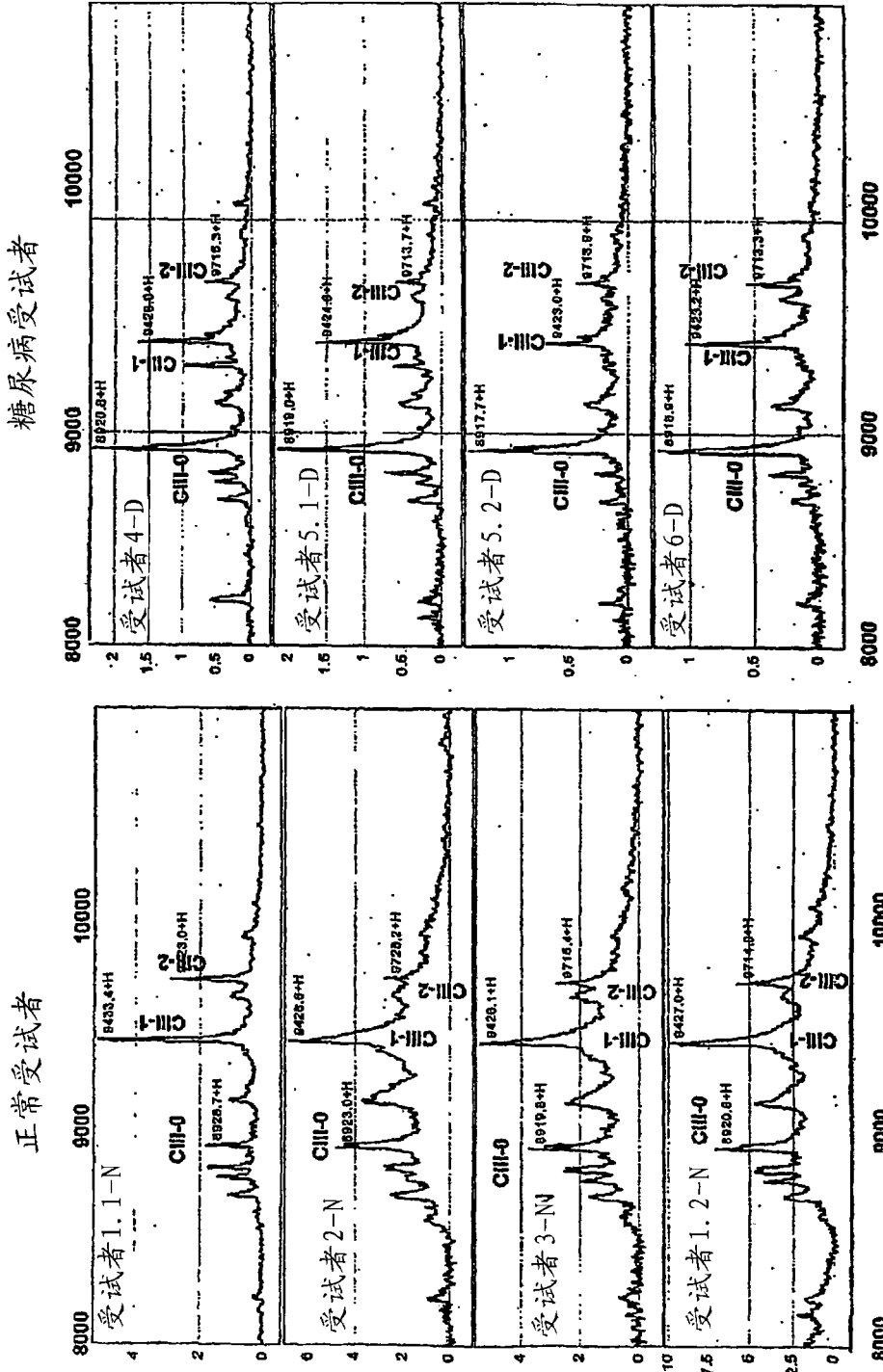


图 9

专利名称(译)	载脂蛋白指纹图谱技术		
公开(公告)号	CN101646942A	公开(公告)日	2010-02-10
申请号	CN200780018830.5	申请日	2007-03-23
[标]发明人	埃梅利塔·德古兹曼·布雷耶 玛丽·K·鲁宾逊		
发明人	埃梅利塔·德古兹曼·布雷耶 玛丽·K·鲁宾逊		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N2333/775 G01N33/5091		
代理人(译)	刘玥		
优先权	60/743678 2006-03-23 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

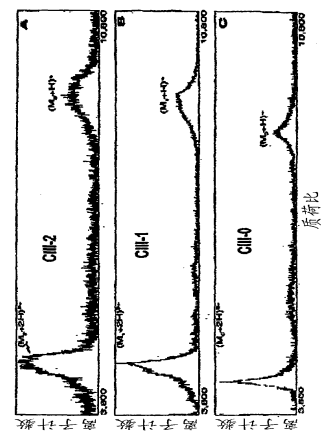
摘要(译)

一种在生物样本中检测载脂蛋白的修饰及其浓度的方法，所述的生物样本包括：血浆、血清和脂蛋白级分，从患者获得的样本中加入特定体积的内标，将所述样本加入到表面增强、G-蛋白涂覆、抗体结合的芯片上并去除未结合到的样本组分，通过质谱分析样本，通过内标的值来确定载脂蛋白的浓度，并评估载脂蛋白、其同种型、氨基酸取代物及其修饰物的浓度，将其作为一种用来诊断糖尿病、中风、应激、阿尔茨海默症、炎症、神经系统疾病及心血管疾病(例如，脂质紊乱、代谢综合症、肥胖、动脉硬化症等)的工具。

不同的CIII同种型标准的描述的质量的分子

表1. apoC-III的计算机和测量的分子量(道尔顿)

计算的M _r	测量的M _r		
	受试者1	受试者2	受试者3
ApoC-III ₆ 8761.2	8763.9 (-0.3)	8764.9 (+0.7)	8765.5 (+1.5)
ApoC-III ₈ 9420.8	9420.6 (-0.2)	9420.0 (-0.8)	9421.2 (+1.4)
ApoC-III ₈ 9712.1	≥ 9703.2 (-11.9)		



** 来自血浆的纯化的CIII同种型的质谱