



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107430118 A

(43)申请公布日 2017.12.01

(21)申请号 201480047674.5

(22)申请日 2014.06.27

(30)优先权数据

61/840,450 2013.06.27 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.02.26

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/044749 2014.06.27

(87)PCT国际申请的公布数据

WO2014/210571 EN 2014.12.31

(71)申请人 广东盛泽康华生物医药有限公司

地址 510300 广东省广州市广州开发区国际生物岛螺旋四路9号C401

(72)发明人 黄静峰

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 唐京桥 张春水

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

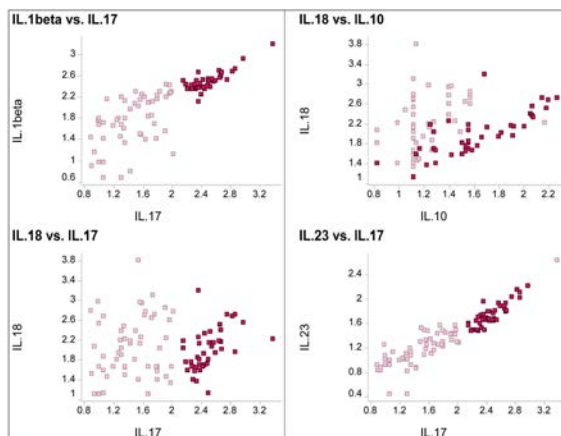
权利要求书2页 说明书28页 附图12页

(54)发明名称

对自身免疫状况的分类与管理的方法与仪器

(57)摘要

本发明提供了一种利用生物标记物诊断自身免疫疾病或炎症的免疫病理学机制的设备和方法。



1. 一种诊断自身免疫疾病或者炎症患者区分潜在免疫病理学机制的方法。包括：

a: 采用的生物样品, 如: 泪液样品, 取自己知患有或者怀疑患有自身免疫疾病或者炎症患者, 通过多个检测试剂进行检验, 每个所述检测试剂独立地与生物标记物结合, 结合的所述生物标记物分别参与所述免疫疾病或者炎症的免疫病理学机制, 不同的所述检测试剂可与不同的所述生物标记物发生特异性结合; 和

b: 使用的所述检测试剂用于确定所述自身免疫疾病或者炎症患者是否存在与所述生物标记物相关的免疫病理学机制, 用于揭示患者是否患有所述自身免疫性疾病或者炎症, 如: 干眼。

2. 根据权利要求1所述的方法, 其特征在于, 所述生物标记物选自: IL-1 $\beta$ 、IL-1 $\alpha$ 、IL-1受体拮抗剂、IL-15、IL-7、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、GM-CSF、IL-18、IL-8、IL-12p70、IL-12p40、IL-17、IL-23、CXCL-10、ICAM-1、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、补充3、 $\alpha$ 1-抗胰蛋白酶、载脂蛋白A1、载脂蛋白CIII、IgM以及所有前述物质的衍生物或片段中的一种或多种。

3. 根据权利要求1所述的方法, 其特征在于, 所述检测试剂包括抗体或者与抗原结合的抗体片段。

4. 根据权利要求3所述的方法, 其特征在于, 所述方法包括: 进行多重免疫分析。

5. 根据权利要求1所述的方法, 其特征在于, 所述方法在自身免疫疾病或者炎症患者的诊断、亚型的区分、检测疾病进展或疾病所处阶段或者检测针对自身免疫疾病或者炎症的治疗效果的应用。

6. 根据权利要求1所述的方法, 其特征在于, 与自身免疫疾病或者炎症的免疫病理机制相关的所述生物标记物, 以所述生物标记物的浓度进行衡量, 所述方法包括: 将所述生物标记物的浓度与所述生物标记物的检测阈值相比较, 根据所述生物标记物的种类, 若所述生物标记物的浓度等于、高于或者低于阈值, 则表明在该自身免疫性或者炎症疾病患者中, 存在有与所述生物标记物相应的免疫病理机制。

7. 根据权利要求1所述的方法, 其特征在于, 所述方法至少使用三种不同种类的所述检测试剂。

8. 一种用于评价自身免疫疾病或者炎症的免疫病理机制参与情况的试剂盒, 包括:

a: 所述试剂盒包括多个检测试剂, 每个所述检测试剂独立地与生物标记物结合, 所述生物标记物分别参与自身免疫疾病或者炎症的不同免疫病理机制, 不同的所述检测试剂可与不同的所述生物标记物发生特异性结合; 和

b: 所述试剂盒包括所述检测试剂的使用说明, 所述使用说明用于说明所述试剂盒适用于生物样品分析, 如: 泪液样品, 检测所述生物样品是否含有特定量的所述生物标记物从而揭示导致免疫疾病或者炎症的特定免疫病理机制。

9. 根据权利要求8所述的试剂盒, 其特征在于, 所述试剂盒中至少有一种所述检测试剂包括抗体或者与抗原结合的抗体片段。

10. 根据权利要求8所述的试剂盒, 其特征在于, 所述试剂盒中至少有一种所述检测试剂被固定于一个或多个固体底板上。

11. 一种免疫病理机制检测方法, 包括:

a: 采用的生物样品, 如: 泪液样品, 取自己知患有或者怀疑患有自身免疫疾病或者炎症患者, 通过多个检测试剂进行检验, 每个所述检测试剂独立地与生物标记物结合, 结合的所

述生物标记物分别参与所述免疫疾病或者炎症的免疫病理学机制,不同的所述检测试剂可与不同的所述生物标记物发生特异性结合;和

b:使用多个所述检测试剂,用于确定所测生物样品中是否存在所述免疫病理机制相关的生物标记物分布特征,若存在,则可以对提供上述生物样品的患者的病理机制进行确认。

12. 根据权利要求11所述的方法,其特征在于,所述生物标记物选自:IL-1 $\beta$ 、IL-1 $\alpha$ 、IL-1受体拮抗剂、IL-15、IL-7、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、GM-CSF、IL-18、IL-8、IL-12p70、IL-12p40、IL-17、IL-23、CXCL-10、ICAM-1、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、补充3、 $\alpha$ 1-抗胰蛋白酶、载脂蛋白A1、载脂蛋白CIII、IgM以及所有前述物质的衍生物或片段中的一种或多种。

13. 根据权利要求11所述的方法,其特征在于,至少有一种所述检测试剂包括抗体或者与抗原结合的抗体片段。

14. 根据权利要求13所述的方法,其特征在于,所述方法包括进行多重免疫分析。

15. 根据权利要求11所述的方法,其特征在于,所述方法用于自身免疫性或者炎症疾病的患者分层、治疗方案的选择、监测疾病进展或所处阶段,或监测针对自身免疫性或者炎症疾病的治疗效果,如:干眼。

16. 根据权利要求11所述的方法,其特征在于,所述方法的步骤包括:将所述生物标记物的浓度与所述生物标记物的检测阈值相比较,根据所述生物标记物的种类,若所述生物标记物的浓度等于或不同于阈值,则提示在所述自身免疫性或者炎症疾病中,存在有相应的免疫病理机制。

## 对自身免疫状况的分类与管理的方法与仪器

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物试剂盒领域,尤其涉及对自身免疫状况的分类与管理的方法与仪器。

### 背景技术

[0002] 以下信息可帮助了解此项发明。这并不意味着下述信息是此项发明的先有技术,明文或非明文引用的出版物也并非该发明的先有技术。

[0003] 人类的免疫系统是复杂的。先天免疫(非特异性)和适应性免疫(对抗原有特异性)2个体系协同作用,对入侵的病原体进行防御,并对组织损伤及宿主来源的应激信号作出反应。免疫系统的内在复杂性使其容易出现功能障碍,可导致癌症、自身免疫性疾病、慢性炎症、慢性感染或过敏等不良情况。

[0004] 尽管自身免疫性疾病、过敏和许多炎症性疾病是慢性病,时而复发时而缓解,但目前缺乏与病情活动相关的,能可靠地预测病情的生物标记物。许多此类疾病的致病机制和信号通路也尚不清楚。而且,许多此类疾病仍沿用非特异性的、广泛抑制炎症级联反应的治疗方法。

[0005] 系统性红斑狼疮(SLE)是一种全身性自身免疫性疾病,与自身抗体的产生和免疫复合物沉积为主要特征。系统性红斑狼疮可影响多个组织器官,最常见的临床表现为皮肤、肾脏、血管和中枢神经系统等受损。干燥综合症(SS)是一种以外分泌腺的慢性炎症性为表现的全身性自身免疫性疾病,主要累及唾液腺和泪腺,可单独或与并发于其他自身免疫性疾病,如系统性红斑狼疮和类风湿性关节炎(RA)。类似于系统性红斑狼疮,SS也存在自身抗体,抗SS-A抗体和抗SS-B抗体。SS患者的眼部受累,导致泪腺功能障碍。由于泪腺的主要功能为分泌泪膜中的浆液性泪液,因此,SS在眼部的病变会导致泪液分泌减少,眼表干燥,并最终导致干眼。非感染性葡萄膜炎是一组眼内炎症性疾病,是世界性范围内的重要致盲性眼病。

[0006] 不同形式的TNF- $\alpha$ 受体抑制剂在治疗牛皮癣、类风湿性关节炎、银屑病关节炎等疾病上获得成功,意味着阻断同一个细胞因子可对治疗不同疾病、缓解不同的临床表现有疗效。其它细胞因子受体抑制剂,如IL-6和IL-1受体抑制剂,也在RA的治疗中表现出一定作用。然而,同种疾病患者对TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1受体抑制剂疗效的个体差异,提示我们需要更加深入地研究这些疾病中所存在的不同的免疫病理机制,和这些病理机制与同一疾病不同的活动性、发展阶段、疾病亚型等的关联性以及这些不同的病理机制造成疾病患者异质性的影响。

[0007] 干燥综合症的患者,其IL-23-Th17通路被激活,B细胞活化因子(BAFF)异常表达,I型干扰素调节基因上调。多种细胞因子,包括B细胞活化因子(BAFF)、IL-6、IL-17、IL-18、I型干扰素(IFN)和TNF- $\alpha$ 都与SLE的发病机制相关。CD4+T细胞,特别是Th1和Th17细胞,以及促炎细胞因子IFN- $\gamma$ ,IL-1,IL-6和IL-8、IL-17,都被认为与干眼发病相关。而葡萄膜炎则与IL-23-Th17通路和IL-1有关。IL-1 $\beta$ ,IL-1 $\alpha$ ,IL-18是IL-1家族的成员。IL-1受体拮抗剂

(IL-1Ra)也是IL-1家族的成员,它可与IL-1受体结合,但不激活信号通路,因此它是IL-1 $\beta$ 和IL-1 $\alpha$ 的内源性拮抗剂。

[0008] CD4<sup>+</sup>效应T细胞及与其相关的细胞因子主要有三类:Th1细胞和Th1细胞相关的IFN- $\gamma$ 和IL-2;Th2细胞和Th2细胞相关的IL-10、-3、-4、-5、-13、GM-CSF;Th17细胞和Th17细胞相关细胞因子IL-17A。这些T细胞因子也可由三组对应的固有淋巴细胞(Innate lymphoid cells, ILCs)产生和分泌。1型和17型是促进炎症反应。病理性的Th17细胞被认为是一个重要的细胞类型,在许多自身免疫性疾病中可造成自身免疫反应。

[0009] I型干扰素是由病毒感染,或由含有RNA和RNA相关的自身抗原免疫复合物诱导生成的,例如系统性红斑狼疮(SLE)和综合干燥症(SS)。除了抗病毒活性,I型干扰素与IL-6可加强自身抗体分泌及B细胞分化为浆细胞。I型干扰素被证明对IL-1家族不同成员的基因表达有不同影响,因为它抑制IL-1 $\alpha$ 、1 $\beta$ 和IL-1R1的基因表达,上调IL-1Ra、IL-1R2和IL-18。净效应是抑制IL-1信号通路和增强IL-18信号通路。IL-1激活可支持Th17反应和IL-17的产生,而IL-18的激活与IFN- $\gamma$ 生成有关。

[0010] 与类风湿性关节炎、银屑病、银屑病性关节炎、强直性脊柱炎不同,目前在系统性红斑狼疮、综合干燥症、葡萄膜炎、干眼的治疗上,安全有效的治疗方法有限。此外,综合干燥症、葡萄膜炎,特别是系统性红斑狼疮的诊断、疾病活动程度评估,对医生都是巨大的挑战。针对上述疾病,研发有效、客观的诊断治疗体系,在全球范围内均有着十分重要的临床需求和临床价值。

[0011] 然而,免疫系统极为复杂,重复性高,并互相调控和影响,标准的简化还原论方法学或实验方法已不足以让我们了解人体机体系统的复杂性。因此,我们有必要采用新的策略,例如系统性分析、大数据系统分析方法,通过分析大量的数据来研究参与免疫介导性疾病的分子机制,确定患者亚型,抽提并利用相应的生物标志物特征对患者进行分层(分类),预后和治疗管理,以及筛选治疗靶点和开发新的治疗。

[0012] 为使得本发明的发明内容可以实现充分公开,先定义本本文中使用的几个术语。其他术语将在文中具体说明。除非另有规定,本规范中使用的术语即为所述含义。

[0013] “风险”一词是指某一特定事件当前发生或在未来某个时候发生的可能性。“风险层化”是指,医生通过已知的临床危险因素的组合,将患者分为发病倾向为低、中、高或最高的人群。

[0014] “诊断”是指确定、监测、确认、分型及预测相关疾病、并发症及风险。“确定”是指明确某种疾病、并发症、风险或现象(例如,生物标志物)。“监测”是指继续观察已经诊断的疾病、并发症或危险因素,例如,分析疾病进展,特定治疗对疾病或并发症进展的影响。“确认”是指加强诊断或用其他指标或生物标记物再次证实该诊断。“分类”或“分型”是指进一步诊断疾病、功能障碍或病理状态的亚型,例如,疾病的轻度、中度、或重度。“预测”是在其他症状或标记物出现或显著改变之前,指预测疾病、功能障碍或病理状态。

[0015] “受试对象”是指任何动物物种的一员,最好是哺乳动物物种,也可以是人类的。因此,本发明所描述的方法和组合物适用于人类和兽类疾病。此外,受试对象最好是活的有机体,但本发明也可用于尸检。首选的受试对象是人类,最好是“病人”,即因为某种疾病或病理情况正接受治疗的患者,包括就诊中但尚不明确病情的患者。受试对象可以是健康的个体、患者,或者是正接受治疗的患者。“参考受试对象”是个人或一个群体,应用其一个或多

个参数作为参考,评估另一个人或群体。

[0016] “正常”或“临床正常”是指这个受试对象未发现已知的、可见的或目前可检测的疾病或功能障碍,没有可检测的与自身免疫和/或炎症性疾病相关的生物标志物的增加。

[0017] “生物样品”是指用于本发明鉴定方法的样品,包括生物体液,例如全血、血清、血浆、唾液、泪液、关节液、脑脊液、支气管肺泡灌洗液、腹水、骨髓穿刺液、胸腔积液、尿液以及肿瘤组织或任何其它身体成分或任何组织培养上清液中包含的相关被分析物。样品可以通过各种恰当的方法获得。

[0018] “被分析物”是指被检测物质,推测其存在于样品中(例如,生物样品)。被分析物可以是任何物质,可与自然存在特定结合对象结合,或可与潜在的特定结合对象结合。因此,被分析物是一种在检测中,可与一个或多个特定结合对象结合的物质。

[0019] “结合伙伴”是一对结合组合中的一方,例如,一对分子中的一个结合到另一个。特异性结合者被称为“特异性结合伙伴”。除了免疫检测中抗原、抗体的结合,其它特异性结合包括有生物素-亲和素(卵白素或链),碳水化合物和外源凝集素,具有互补核苷酸序列的核酸,效应分子和受体分子,辅因子和酶,酶抑制剂和酶等。此外,特异性结合伙伴还包括原结合伙伴的类似物。免疫反应特异性结合伙伴包括抗原、抗原片段、抗体和抗体片段,单克隆抗体、多克隆抗体以及它们的复合物,上述伙伴也可是有重组合成的。

[0020] 这里所使用的术语,“表位或抗原决定基”或“目标表位”是指任意分子上可被识别并与其特异性结合伙伴上的互补位点相结合的位点。拥有表位或抗原决定基的分子及其特异性结合伙伴是特异性结合配对的一部分。例如,一个表位或抗原决定基可以是一个多肽、蛋白、半抗原、糖类抗原(包括但不限于糖脂、糖蛋白或脂多糖类)或多糖及其特异性结合伙伴(包括但不限于抗体)。通常情况下,表位包含于更大的分子结构内(例如,在蛋白质的抗原区内,表位是蛋白质可与抗体反应结合的区域或片段),并通过已知的确切的残基与特异性结合接触。已广泛证实,抗原或抗原片段可包含不止一个表位。

[0021] 此处所使用的“特异”或“特异性”是指一对特异性组合成员之间(例如,一对抗原和抗体)的选择性相动反应或相互作用。“特异性结合”及类似的名称是指自身抗体与内源性抗原的特异结合能力(也常称反应),而不与其他物质结合。能识别与干眼疾病相关的内源性抗原的抗体(包括自身抗体)或抗体片段可以通过免疫检测诊断被筛选出来,(例如,通过放射免疫测定法RIA和酶联免疫吸附测定法ELISA),或者通过表面等离子共振技术,或其它已知的诊断方法。在实例中,术语“特异性结合”或“特异性反应”代表结合的优先偏好(或亲和力),与被分析物的亲和力至少高于非特异性目标分子的2倍以上,更常见的为5倍,10倍,100倍,1000倍,一百万倍以上(例如,某随机生成的,缺乏特异性识别位点的分子)。

[0022] 某抗原,生物标志物,或其它与某疾病“相关”或“有关”,尤其是干眼,的被分析物指的是一种与干眼存在或发生相关、或与某种特定类型的干眼相关的生物标志物或其它被分析物。一般情况下,“抗原”是指与目标抗体拥有特异性免疫反应的物质。合适的抗原,特别是生物标志物,包括但不限于分子,至少拥有一个抗原表位可与抗体或含有CDR的抗体片段中的可变区或互补决定区(CDR)特异性作用。抗原通常是天然存在的或人工合成的生物大分子,如蛋白质,肽,多糖,脂类,核酸等,或含有这些成分的复合物或其它分子。

[0023] 本发明所说的与疾病相关的抗原“水平升高”是指某样品中的抗原水平高于正常水平或范围,或者高于参考样品的水平或范围(例如,先前或基线样品)。术语“水平改变”是

指某样品中的抗原水平不同于正常水平或范围(升高或降低),或者高于参考样品的水平或范围(例如,先前或基线样品)。某生物标记物的水平或范围要与标准的操作规程相符。因为某些生物标记物的水平非常低,所谓的水平改变就是存在用实验或抽样误差不能解释的水平差值。因此,一个特定样品的生物标记物的水平或范围测量,要将其与正常组织的相似样品比较。在此文中,“正常组织”为未发现干眼的个体取下的组织,“正常”是指未发现病理改变的(也称为“对照”)患者(例如受试对象)或人群。被分析物的水平“升高”是指,在正常情况下被分析物无法被检测到(例如,正常水平是零,或在普通人群的25分位至约75分位之间),但在被检测样品中可被检测到,或被测物的水平高于正常水平。

[0024] “芯片”是指一个含有底物的装置,通常其固体表面可接受和固定多个不同的蛋白质、肽和/或核酸(即捕获或检测试剂),用于确定生物样品中是否存在某些分子(例如,被分析物)和/或确定这些分子存在的量。“微芯片”是指一个芯片,其底物上有不同的检测试剂。

[0025] “固相”指的是不溶于水的材料或底板,或可通过系列反应使之不溶于水。固相具有吸引及固定目标捕获或检测反应物的内在能力。此外,固相也可通过交联剂,具有吸引和固定目标捕获或检测反应物的能力。交联剂可以是带电物质,该带电物质与目标捕获反应物本身或与其共轭的物质所带电荷相反。通常情况下,交联剂指的是可通过结合(多为特异性的)或其它反应使得目标捕获或检测反应物被固相固定(或是“粘附”)的物质。交联剂可在检测开始之前或开始时,使目标捕获物与固相间接结合。固相可以是塑料,塑料衍生品,磁性或非磁性金属,玻璃或硅等。例如,测试管,微孔板,片,珠,微粒,基因芯片和其他与上述描述相似的设备。

[0026] 本文所使用的术语“微粒”指的是可通过适当的方法回收的微小颗粒,例如,通过磁分离或链接、超高速离心等。微粒直径通常小于或等于1微米。

[0027] “捕获”或“检测”的反应物或被反应物是指与被分析物结合的结合伙伴,通常为特异性结合。捕获或检测试剂可附着于固相或与固相相连。

[0028] “标记检测试剂”是指可与被分析物结合的结合伙伴(多为特异性结合),在检测前或者检测时被标记物标记。一个“可检测标记”包含有一个可测量部分,或由一个能够被修改成可检测部分。在标记检测试剂中,“直接标记”是指通过各种方法,使可检测标记直接连接在检测试剂上(即:标记是检测试剂的一个组成部分);“间接标记”是指可检测标记与检测试剂通过特异性地识别并结合在一起。因此,间接标记含有一个组成部分可与检测试剂的一组成部分特异性结合起来,例如,生物素-抗生物素蛋白,可通过将生物素标记后的抗体与被标记后的抗生物素蛋白结合,制备成间接标记抗体。

[0029] “指示试剂”一词指任何与标记物结合而拥有的可检测信号的试剂。因此,例如,在常规的酶标记,一个酶标记后的抗体,可以与酶的一个底物结合(指示试剂),从而产生一个可检测的信号,如一个彩色反应产物。

[0030] “抗体”是指免疫球蛋白基因或其片段编码的含有一个或多个多肽的蛋白。该术语包括多克隆抗体、单克隆抗体和片段,以及免疫球蛋白基因序列生成的分子。公认的免疫球蛋白基因包括 $\kappa$ 、 $\lambda$ 、 $\alpha$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 和 $\mu$ 的恒定区基因,以及无数的抗体可变区基因。轻链分为 $\kappa$ 或 $\lambda$ ,重链分为 $\gamma$ 、 $\mu$ 、 $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ ,从而将免疫球蛋白分为IgG、IgM、IgA、IgD和IgE。抗体一般存在于体液,主要是血液中。

[0031] 典型的免疫球蛋白(抗体)的结构单元是一个四聚体。四聚体是由两个相同的多肽

链对组成,每个多肽链含有一个“轻”链(约25KD)和一个“重”链(约50-70KD)。每个链的N-末端为由100-110个或更多的氨基酸组成的主要负责识别抗原的可变区。术语“可变轻链(VL)”和“可变重链(VL)”分别指的是上述轻链和重链。

[0032] 抗体以完整的免疫球蛋白抗体或多个蛋白酶消化产生的片段的形式存在。例如,胃蛋白酶在铰链区消化抗体的二硫键产生F(ab')<sub>2</sub>,该Fab二聚体本身是通过二硫键结合的VH-CH1的轻链。F(ab')<sub>2</sub>可在温和的条件下打破铰链区的二硫键,从而将(Fab)<sub>2</sub>二聚体讲解成Fab单体。Fab单体本质是铰链区的一部分。各种抗体片段是指在完整抗体的消化产物,增加Fab片段的方法包括化学合成和DNA重组。因此,在本发明中,“抗体”还包括由完整抗体修饰而成的,或采用重组核酸方法从头合成的抗体片段。抗体包括单链抗体(抗体作为单个多肽链存在),单链Fv抗体(sFV或scFV),即由可变的重链和轻链连接而成(直接或间接通过连接肽),从而形成一个连续的多肽。单链Fv抗体是一个共价连接的VH-VL异源二聚体,由核酸中的VH-和VL编码序列表达,两者直接连接或通过一个肽编码链接器相连。VH和VL以单链的形式互相连接,VH和VL的结构域通过非共价键相连。单链Fv抗体和其他一些结构可自然聚集,而非化学分离,将轻重多肽链从抗体V区转化为三维空间结构与抗原结合位点十分相似的分子,

[0033] “分子组群”指的是一组2个或2个以上的分子种群,该种群与特定的疾病或健康状况具有相关性。这样的“分子种群”也可被称为“生物标记物”。“生物标记物”通常是指其存在或缺乏提示着一个机体处于某种特定生理状态,例如,标示着个体患有干眼(或可能发生干眼)。换言之,生物标记物可作为客观衡量和评价机体是否处于生理状态、病理状态或机体对药物等治疗性干预手段反应的指标。本文中,“检测板”或“芯片板”指的是一种典型的固态相底板,上有与之相连的捕获试剂(通常是起固定作用的),其中至少有一个捕获试剂是与干眼疾病特异性相关的生物标记物。在某实例中,检测面板包括2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、19、20或更多(例如,25,30,35,40,50,75,100,150,200,250,500等,包括任意整数,或整数范围从1到500)不同的检测试剂,单独或与其他检测试剂(例如,核酸为基础的检测试剂等)共同反应机体患有干眼与否。

[0034] “生物样品”是指取自患者或个体的生物材料样本。生物样品包括取自于体液、细胞、组织(例如取自活检)或组织制品(例如,组织切片,组织匀浆等)的样品。“体液”是指一种获得自或来自于某个体的、适用于本发明的任意流体。这种液体包括眼泪、唾液和液化后的玻璃体等。

[0035] 一个“伴随诊断”是一种诊断性测试,目的是确定那些可能会受益于特定药物、对药物有不良反应或者可能需要更改药物剂量的患者亚型。

[0036] 本文中的“药品拯救”是指用新的、改进的评价方法重新评估终止于临床实验或临床前实验的样品和/或资料。

[0037] 术语“高通量”指的是快速处理多个样品的能力。例如,本发明中提及的芯片或微芯片采用自动化和/或大规模并行的方式。此外,“重复使用”指的是单一设备或单一芯片可进行多次检测。例如,本发明中提到的重复使用的检测芯片,可在一个设备上,同时检测和/或评价多个不同的生物标记物种群。

[0038] “专利”提及的过程步骤、机器、制造的产品意味着经过分析后,符合所有法定要求的可专利性。例如,关于新颖性、隐蔽性等。如果后来的调查显示一个或多个声明中包含

的一个或多个实例,可将新颖性、隐蔽性等否定的,索赔将被限制于定义的“专利”实施方案,不包括未被授予专利的实例。同时,所附的声明被授予专利的,将被解释为所提供的最广泛的合理范围,并始终保持其有效性。此外,如果一个或多个专利性的法定要求发生变更或者一个用于评估是否满足专利条件的标准自本专利申请或授予后发生改变,声明可解读如下(1)保持其有效性;(2)在尽可能广泛的范围内提供合理解释。

[0039] “复数”指多于一个。

[0040] 术语“阳性标记物”是用于指当一个个体患有特定疾病或处于某病理状态时,相对于没有患此病或不处于该病理状态的个体,此标记物升高。术语“阴性标记”是指个体患有特定疾病或处于某病理状态时,此标记物降低,即此标记物降低标示受试者患有这种疾病或处于病理状态。

[0041] 术语“样品图谱”是指有关生物样品特征的信息表示。例如,定量记录特定泪液样品中生物分子谱或特征。

[0042] 如用于此,单数形式“一”、“一”、“”包括复数引用,除非上下文另有规定。

[0043] 本文中所使用的“约、大概”是指在给定值的 $\pm 10\%$ 的变化范围内,无论是否在文中专门提到。

## 发明内容

[0044] 本发明提供了一种检测区分自身免疫疾病或者炎症患者中所存在的免疫病理学机制的方法。包括:a:采用的生物样品,如:泪液样品,取自己知患有或者怀疑患有自身免疫疾病或者炎症患者,通过多个检测试剂进行检验,每个所述检测试剂独立地与生物标记物结合,结合的所述生物标记物分别参与所述免疫疾病或者炎症的免疫病理学机制,不同的所述检测试剂可与不同的所述生物标记物发生特异性结合;和b:使用的所述检测试剂用于确定所述自身免疫疾病或者炎症患者是否存在与所述生物标记物相关的免疫病理学机制,用于揭示患者是否患有所述病理机制的自身免疫性疾病或者炎症,如:干眼。

[0045] 优选地,所述生物标记物选自:IL-1 $\beta$ 、IL-1 $\alpha$ 、IL-1受体拮抗剂、IL-15、IL-7、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、GM-CSF、IL-18、IL-8、IL-12p70、IL-12p40、IL-17、IL-23、CXCL-10、ICAM-1、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、补充3、 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶、载脂蛋白A1、载脂蛋白CIII、IgM以及所有前述物质的衍生物或片段中的一种或多种。

[0046] 优选地,所述检测试剂包括抗体或者与抗原结合的抗体片段。

[0047] 优选地,所述方法包括:进行多重免疫分析。

[0048] 优选地,所述方法在自身免疫疾病或者炎症患者的诊断、分层、检测疾病进展或疾病所处阶段或者检测针对自身免疫疾病或者炎症的治疗效果的应用。

[0049] 优选地,与自身免疫疾病或者炎症的免疫病理机制相关的所述生物标记物,以所述生物标记物的浓度进行衡量,所述方法包括:将所述生物标记物的浓度与所述生物标记物的检测阈值相比较,根据所述生物标记物的种类,若所述生物标记物的浓度等于、高于或者低于阈值,则表明在该自身免疫性或者炎症疾病中,存在有相应的免疫病理机制。

[0050] 优选地,所述方法至少使用三种不同种类的所述检测试剂。

[0051] 本发明还提供了一种用于评价自身免疫疾病或者炎症的免疫病理机制参与情况的试剂盒,包括:a:所述试剂盒包括多个检测试剂,每个所述检测试剂独立地与生物标记物

结合,所述生物标记物分别参与自身免疫疾病或者炎症的不同免疫病理机制,不同的所述检测试剂可与不同的所述生物标记物发生特异性结合;和b:所述试剂盒包括所述检测试剂的使用说明,所述使用说明用于说明所述试剂盒适用于生物样品分析,如:泪液样品,检测所述生物样品是否含有特定量的所述生物标记物用于揭示滋生免疫疾病或者炎症中的特定免疫病理机制。

[0052] 优选地,所述试剂盒中至少有一种所述检测试剂包括抗体或者与抗原结合的抗体片段。

[0053] 优选地,所述试剂盒中至少有一种所述检测试剂被固定于一个或多个固体底板上。

[0054] 本发明还提供了一种免疫病理机制诊断方法,包括:a:采用的生物样品,如:泪液样品,取自己知患有或者怀疑患有自身免疫疾病或者炎症患者,通过多个检测试剂进行检验,每个所述检测试剂独立地与生物标记物结合,结合的所述生物标记物分别参与所述免疫疾病或者炎症的免疫病理学机制,不同的所述检测试剂可与不同的所述生物标记物发生特异性结合;和b:使用多个所述检测试剂,用于确定所述生物样品中是否存在所述免疫病理机制相关的生物标记物分布特征,若存在,则可以对提供上述生物样品的患者进行分类。

[0055] 优选地,所述生物标记物选自:IL-1 $\beta$ 、IL-1 $\alpha$ 、IL-1受体拮抗剂、IL-15、IL-7、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、GM-CSF、IL-18、IL-8、IL-12p70、IL-12p40、IL-17、IL-23、CXCL-10、ICAM-1、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、补充3、 $\alpha$ 1-抗胰蛋白酶、载脂蛋白A1、载脂蛋白CIII、IgM以及所有前述物质的衍生物或片段中的一种或多种。

[0056] 优选地,至少有一种所述检测试剂包括抗体或者与抗原结合的抗体片段。

[0057] 优选地,所述方法包括进行多重免疫分析。

[0058] 优选地,所述方法用于自身免疫性或者炎症疾病的患者分层、治疗方案的选择、监测疾病进展或所处阶段,或监测针对自身免疫性或者炎症疾病,如:干眼的治疗效果。

[0059] 优选地,所述方法的步骤包括:将所述生物标记物的浓度与所述生物标记物的检测阈值相比较,根据所述生物标记物的种类,若所述生物标记物的浓度等于或不同于阈值,则提示在所述自身免疫性或者炎症疾病中,存在有相应的免疫病理机制。

## 附图说明

[0060] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本发明的实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据提供的附图获得其他的附图。

[0061] 图1的散点图显示非干眼组(正常对照)受试对象泪液中不同蛋白标记物的相关性:泪液中IL-10、IFN- $\gamma$ , IL-2、IL-17与IL-18的相关性(A),以及与IL-1 $\beta$ 的相关性(B)。A部分包括四个散点图,显示非干眼患者泪液中IL-10、IFN- $\gamma$ 、IL-2和IL-17与IL-18的相关性。类似的,B部分包括四个散点图,显示非干眼患者泪液中IL-10、IFN- $\gamma$ 、IL-2和IL-17与IL-18的相关性。泪液中蛋白质生物标记物的浓度以log<sub>10</sub>计,且每个方格代表一只眼。

[0062] 图2的散点图显示中重度水液缺乏型干眼受试对象泪液中不同蛋白标记物的相关性:IL-1 $\beta$ 与IL-17, IL-18与IL-17, IL-18与IL-10, IL-23和IL-17。颜色较亮的方格代表泪液

中IL-17水平较高。泪液中蛋白质生物标记物的浓度以log10计,且每个方格代表一只眼。

[0063] 图3的A,B,C三部分散点图分别显示中重水液缺乏型干眼受试对象的不同亚组分型,IL-18与Log10(IL-17/IL-10),IL-1 $\beta$ 与Log10(IL-17/IL-10)、MMP3与MMP 9,补体3与IL-8。泪液中蛋白质生物标记物的浓度以log10计,且每个方格代表一只眼。

[0064] 图4的散点图为临床试验中,干眼患者配对的但无标记物的相关性;

[0065] 图5为干眼患者泪标记物的多变量分析。泪液蛋白标记物及患者的双向无监督阶层式集群分析。列:患者;行:泪液蛋白标记物。对于泪液蛋白标记物浓度,绿色=低,红色=高;组:干眼患者轻、中、重度按角膜染色的严重程度以黄、橙、红表示。中心:由灰色和红色代表的不同的研究中心。

[0066] 图6有A,B两部分,均显示主成分分析结果(PCA)。A:干眼患者泪蛋白标记物的PCA分析。B:对照组和干眼组的PCA分析。PCA点:绿色=G1,蓝色=G2,红色=G3,橙色=G4,灰色=对照。

[0067] 图7为选定的生物标记物在干眼患者亚型分组的分布;

[0068] 图8为一临床试验中,0天(黑色)和7天(灰色)时,选定生物标记物在不同干眼患者亚型分组中的浓度水平平均值及其95%置信区间。

[0069] 图9为另一临床试验中,0天(黑色)和7天(灰色)时,选定生物标记物在不同干眼患者亚型分组中的浓度水平平均值及其95%置信区间。

[0070] 表1列出了泪液中,IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 和IL-18,以及Th1、Th2和Th17相关细胞因子的皮尔森相关系数。

[0071] 表2列出了一临床研究中,干眼患者在就诊及随诊中的临床特征。

[0072] 表3列出了另一临床研究中,干眼患者在就诊及随诊中的临床特征。

## 具体实施方式

[0073] 下面将对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0074] 为了更详细说明本发明,下面结合实施例对本发明提供的,进行具体地描述。

[0075] 更具体地说,本发明在患有或可能患有自身免疫性、炎症性疾病的受试对象上,涉及通过测量一个或多个与该疾病相关的生物标记物,用以诊断、鉴别诊断、疾病分层、监测、分类和确定治疗方案的物件、设备、试剂盒和方法。

[0076] 疾病状态下生物标记物变化:细胞从生理状态变为病理状态,通常由生物标记物的水平或种类改变介导,上述生物标记物包括:蛋白质,核酸,碳水化合物和脂质等。这些生物标记物的变化可能导致几种不同的机制,包括:某些蛋白质表达水平的变化、基因转录或翻译的速率、mRNA的稳定性、蛋白质周转率或其他代谢过程。某些或所有上述或其他机制是可调控的,即:一个或多个生物标志物谱的合成和/或稳定性性的增加或减少,可通过生物样品进行检测。尤其是蛋白质,可因为单核苷酸多态性(SNPs)替代基因剪接,基因组重排,或任何其他遗传变异的机制,造成相应的基因序列改变而造成的蛋白质一级结构发生变化。也有可能是在加工和翻译后经过修饰造成蛋白质发生变化。例如,蛋白质在糖化过程中发

生改变,而相应的糖基可被检测到。

[0077] 被分析物检测:目标被分析物的存在和/或量,例如,与干眼疾病相关的生物标记物,可在生物样品中被检测或测量,尤其是泪液,可用恰当的方式直接从受试者获得,例如从眼表采集,也可通过活检、拭子、洗涤或其它用于从患者收集生物液体或细胞样品的技术。优选的生物学样品包括泪液,因为泪液易于采用相对无创的技术直接获取。

[0078] 通常将生物标记物的反应试剂固定于固体底板上,随后进行生物标记物的检测。生物标记物的检测试剂可与生物标记物的表位特异性地相结合,而生物标记物则为已知的或后来发现的与干眼疾病相关的物质。因此,检测试剂是指与特定生物标记物抗原表位特异性反应的试剂。常用的检测试剂种类很多,包括:多克隆抗体,更优选的,单克隆抗体,或此些抗体分子的抗原结合片段。检测试剂还可以包括一个或多个其它成分,例如,可被检测的标记物。

[0079] 在本发明中,一个或多个检测试剂固定于合适的底板上,例如,在免疫层析检测卡检测区表面的塑料小珠子等。用此方法,检测试剂可与少量的生物样品接触反应(例如,从约1纳升(NL)约500微升(UL)的泪液),从而确定它是否含有与某个免疫病理机制或是另外一个免疫病理机制有关的生物标记物。

[0080] 本发明的生物标记物检测组(或其它固定在一个或多个底板上的多个检测试剂)还可以包括其它与生物样品中的生物分子发生反应的成分。例如,能与疾病相关的代谢产物、蛋白质、或编码蛋白的核酸发生反应的检测试剂。依据本发明,检测这些和/或其他分子病理机制相关的生物标记物也可以包含在检测试剂组合中。

[0081] 一般来说,本发明的芯片至少有2种检测试剂,而每一个试剂对应特定的生物标记物。

[0082] 本领域技术人员都可以清楚的得出,免疫检测是实现本发明一个现成和快速的例子。免疫检测可提供定性、半定量和定量的结果输出。免疫检测,是通过抗原抗体识别反应来检测生物样品(例如少量泪液)中一个和/或多个物质(被分析物即生物标记物,如蛋白质、核酸等)的存在与否和/或水平的一种生化试验。该检测方法利用抗原抗体的特异性结合原理,形成抗原-抗体复合物,典型例子是可检测的试剂-生物标记物的复合物。因此,可以检测抗原或抗体。在本发明中主要是检测生物标记物。

[0083] 众多的免疫检测形式中,免疫检测信息均来自一个或多个抗体(优选检测试剂)与含有抗原决定基的多肽(代表性的生物标记物类别)之间特异结合所形成的复合物。在此,被分析物的“存在与否或存在量”的术语反映的就是这个信息。正如已经描述的,通常检测信号的存在与否或存在量是通过用被测物的标准浓度曲线计算得到的。在此处使用的术语,一个检测是“配置测量”一种分析物的,是指如果一个检测所测量得到的信号,标示着被分析物的存在并且其存在量与生理浓度关的。

[0084] 在一般情况下,免疫检测需要含有或可能含有目标生物标记物的样品与至少一种抗体(或抗原结合的抗体片段)进行接触,并且抗体要能与目标生物标记物特异性结合。所产生的信号标示着样品中的多肽与抗体结合的复合物(是否生成或生成量多少)。该信息与样品中的生物标记物的存在或存在量有关。许多已知的方法和设备可用于生物标记物的检测与分析,此处的方法与设备属于本领域技术人员都熟知的内容,在此不再赘述。

[0085] 检测所用的设备、方法可利用通过夹心法(三明治法)、竞争法或非竞争法标记的

方法来产生与目标生物标记物存在与否或存在量相关的信号。其他可用的检测方法还包括色谱、质谱、蛋白质印迹等方法。此外，一定的方法和设备，如传感器和光学检测，可用于确定无标记被分析物分子的存在与否或存在量。许多已知的方法和设备可用于生物标记物的检测与分析，此处的方法与设备属于本领域技术人员都熟知的内容，在此不再赘述。

[0086] 本领域的机器设备，包括但不限于，Beckman ACCESS<sup>®</sup>，Abbott AXSYM<sup>®</sup>，Roche ELECSYS<sup>®</sup>，Dade Behring STRATUS<sup>®</sup>系统，可进行免疫检测分析。同时，也可采用其它任何适用的免疫检测方法，例如，酶联免疫测定法 (ELISA)、放射免疫测定法 (RIA)，竞争结合试验等。

[0087] 抗体或其它多肽可被固定在各种用于检测的固体载体上。固相可用来固定特异结合成员，包括正在研发的和/或已用于固相结合试验中的固相。常用的固相包括滤过膜、纤维素膜、微球 (包括聚合物、乳液、顺磁颗粒)、玻璃、硅片、微粒、纳米颗粒、TentaGels、Agrogels、PEGA凝胶、SPOCC凝胶和多孔板。抗体或其他检测试剂可直接或间接绑定到检测设备的特定区域。在本发明的实施例中，抗体或其他多肽可以固定在颗粒或其他固体载体上，而固体载体固定在设备表面上。

[0088] 生物检测需要测量方法，其中一种最常用的定量测量方法是把可检测标记物与蛋白质、核酸共轭，而该蛋白质或核酸与被研究的生物系统中的其中一个成分需要具有亲和力。

[0089] 可检测标记物包括可被检测分子本身 (例如，荧光基团、电化学标签，ECL (电化学发光) 标签、金属螯合物、胶体金属颗粒，放射性标记等)，或者通过生成可被检测的反应产物后进行间接测量 (酶等，例如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶) 以及通过使用自身可被检测的特异性结合分子 (例如，与二抗结合的标记抗体、生物素、地高辛、麦芽糖、寡聚糖、2,4-二硝基苯、乙酸苯酯、单链DNA以及双链DNA等)。

[0090] 可通过各种光学、声学 and 电化学方法产生信号。检测模式的例子包括：荧光、化学检测、反射、吸收、电流分析法、电导、阻抗、干涉仪和椭偏仪等。在这些方法中，有些是固相抗体与传感器耦合 (例如，衍射光栅、电化学传感器等) 产生信号；有些传感器产生信号时，其空间上与固相抗体分隔 (例如，采用荧光激发光源和光探测器)。包括但不限于列表内容。以抗体为基础的生物传感器也可以被用来确定的被分析物的存在与否或存在量，便可选择性的去除标记分子。

[0091] 固相和可检测标签结合的制备通常采用化学交联剂的方法。交联试剂含有至少两个反应活性基团，并大体可分为单一功能交联剂 (含有相同的活性基团) 和多功能交联剂 (含不同的活性基团)。多功能交联剂，通过胺、巯基或其它非特异性反应交联而成，有很多市售产品。马来酰亚胺、烷基、芳基卤化物， $\alpha$ -haloacyls 和巯基反应形成乙醚硫醇联接。同时，吡啶基二硫化物与硫醇基团的反应活性。马来酰亚胺、烷基和芳基卤化物， $\alpha$ haloacyls 与巯基反应形成硫醚键，而吡啶基二硫化物与巯基反应生成混合二硫化物。吡啶基二硫化物产物可发生裂解。亚氨酸酯也常用于蛋白质交联。市场上也可购买到各种异型双功能交联剂，可与不同的物质结合。

[0092] 要获得定量或半定量的结果，必须将结果与已知浓度 (一个或多个标准曲线) 进行比较。首先确定未知反应在横坐标上的位置，而后查看对应的浓度。

[0093] 检测一个特定蛋白质或其他生物标记物的数量，可以通过多种方法来实现，均可

用于本发明。酶联免疫吸附法常用于检测抗体或抗原的水平,其中最常见的方法是用酶、放射性同位素或荧光等进行定量。其他适用的技术包括凝集、流式细胞仪、Luminex检测、流式微球芯片和免疫层析,初次之外,还有很多研发中或将要进行研发的技术。

[0094] 免疫检测可采用“三明治”(夹心法)方法来检测被分析物(例如:发现泪液中的蛋白质与干眼发病相关)。被分析物与其他两个物质联接,例如,捕获试剂固定在底板上,并与目标生物标记物特异性结合,同时目标生物标记物的另一个表位又和标记的反应检测试剂特异性结合。以这种方式,“三明治”(夹心)法可用于检测与捕获试剂和检测试剂之间的生物标记物的量。夹心检测法尤其在检测被分析物浓度很低或在含有其他高浓度分子的复合溶液(例如泪液)中具有重要价值。众所周知,在这些分析检测中,“捕获”试剂固定在固相上(即底板上),如玻璃、塑料条或微粒等。一种已知或怀疑含有目标生物标记物的液体生物样品(例如泪液样品),与含有被固定捕获试剂的复合物接触反应。未结合的物质被清除,随后检测试剂与生物标记物联接并被底板上的捕获试剂“捕获”,从而完成了“三明治”的结构。这些相互作用可以用来定量检测生物样品中生物标记物的含量。

[0095] 多个不同的干眼相关捕获试剂(例如:5、10、25、50、100或更多)可以固定在某一个基板上(或在不同的基板上,例如,可区别的不同微粒),使之在一次多重检测中,通过“捕获”同时检测多个不同的生物标记物。在一个基板上的不同芯片区域,单个芯片上的多路检测可同时检测多种被分析物(例如,不同的生物标记物分布特征)。另外,本发明中的面板可延伸至多个基板,例如,可区分出固定于基板上的不同干眼相关捕获剂或检测试剂(如不同标签的微球可用于Luminex检测),多重标签地址可被区分。

[0096] 因此,在某些特定的情况下,本发明采用免疫检测的方法进行试验。在某些特定的情况下,进行此项试验的反应试剂由分析装置提供,而该分析装置又存在于试剂盒中。优选的试剂包括两个或两个以上的独立固相检测试剂,固定于基板上(即:任何合适的固体支撑物),且每个固相又包括与目标生物标记物特异性结合的抗原试剂。对于夹心法免疫检测,其反应试剂还包括一个或多个可被检测的标签抗体,含有可检测标签,并于目标生物标记物特异性结合。额外可选组件、设备在后续检测设备的章节中详细描述。目前已有许多方法和设备可方便的用于对生物标记物进行检测和分析,这些内容对于本领域技术人员都是明确的,在此不再赘述。

[0097] 底板、固相、可检测标签的制备通常采用化学交联的方法。交联试剂包含至少两个活性基团,分为单一功能的交联剂(含有相同活性基团)和多功能的化学交联剂(含有不同活性基团)。双功能交联剂,通过胺、巯基或其它非特异性反应交联而成,存在很多市售产品。马来酰亚胺、烷基、芳基卤化物, $\alpha$ -haloacyls和巯基反应形成乙醚硫醇联接。同时,吡啶基二硫化物与硫醇基团的反应活性。马来酰亚胺、烷基和芳基卤化物, $\alpha$ haloacyls与巯基反应形成硫醚键,而吡啶基二硫化物与巯基反应生成混合二硫化物。吡啶基二硫化物产物可发生裂解。亚氨酸酯也常用于蛋白质交联。市场上也可购买到各种异型双功能交联剂,可与不同的物质结合。

[0098] 本发明含有试剂盒。试剂盒包括生物标记物检测面板,这些面板可进行发明中所述的检测方法。试剂盒中也含有设备以及说明。说明可以是标签,包括所附的所有的书面材料和记录,或其它在生产、运输、销售或使用过程中与之相关的材料。例如,广告彩页、手册、包装材料、介绍、多媒体材料和其它手写或在试剂盒上打印的材料。

[0099] 在优选实施例中,本发明的组合还包括对照组,最好包含一个阳性对照和一个阴性对照,但至少要有有一个阳性对照。可以选择各种合适的对照组合。

[0100] 本发明中的生物标记物检测可与其它临床指标相结合。生物标记物与干眼疾病相关。其它临床指标,包括患者的一般信息(例如,体重、性别、年龄、种族、吸烟是否),病史(如家族史、手术类型、现有的或曾经患有的疾病),以及遗传信息。结合试验结果和临床指标进行分析,可采用包括多变量逻辑回归、对数线性模型、神经网络分析、N-M分析、决策树分析等方法,包括并不限于上述方法。

[0101] 本文中“诊断”所使用的方法是指,本领域技术人员可以估计和/或确定患者是否患有某种疾病或处于某种病理状态的概率(“可能性”)。在本发明所涉的情况下,“诊断”包括使用检测结果,优选为免疫检测方法,并且在本发明中,最好同时结合其他临床指标,得出受试对象的是否发生疾病及其潜在发生机制的诊断。这种“验证”的诊断并不意味着诊断是100%准确的。许多生物标记物可指示多种病理情况。有经验的医生并不使用生物标记物,造成信息缺失,但采用检测结果与其他临床指标作为诊断依据,做出诊断。因此,预先确定的生物标记物水平在诊断阈值的一边(高于或低于),相比生物标记物水平在阈值的另一边(低于或高于),提示受试对象有大的概率患有某种疾病。

[0102] 同样,风险预测提示某情况或结果发生的概率(“可能性”)。一个风险预测因子的水平或水平改变,可与患病的概率增加(病情恶化)有关,即某受试对象出现不良后果的“风险增加的指标”。

[0103] 在首选的诊断实施方案中,本发明的方法可用于诊断疾病的发生与否,特别是干眼,且检测结果与疾病的发生与否相关。例如,每个检测的生物标记物水平(例如,浓度)可与阈值比较,但每个生物标记物分布(或被分析物,或生物标记物)的阈值可有所不同。这里所说的术语“相关”、“有关”、“与之相关”是指对患者生物标记物的存在与否或生物标记物量与处于或高危处于某给定病理情况的对象进行比较。通常,在这种情况下,通常对测得的生物标记物浓度与预设的作为具有提示是否患病或将来患病可能性的阈值进行比较。

[0104] 在本文中,“病”指的是具部分人群具有一种病理特征特征(出现某种疾病或病理状态或某种结果),“无病”指的是缺乏特定病理特征的人群。一个单一的决策阈值是这种方法最简单的应用,而多个决策阈值也同样可被使用。例如,在第一个阈值以下,不患有某疾病的可能性相对较高,在第二个阈值以上,患有某疾病的可能性相对较高。两阈值之间则被认为是不确定的。仅以此作为例子。

[0105] 许多方法可用于确定诊断阈值的数值。例如,以正常受试对象生物标记物浓度的75%、85%、90%、95%或99%作为阈值参考。或者,阈值的数值也可从“患病”人群确定,例如患有干眼或有干燥倾向,包括复发、进展等,选择其患病群体中该生物标记物浓度的75%、85%、90%、95%或99%作为阈值参考。在另一种情况下,也可以同一受试对象中的前次检测结果作为“基线”,用来检测生物标记物水平的暂时性变化;也就是说,受试对象中生物标记物水平的暂时性变化,可用来进行诊断和/或预后的目的。

[0106] 然而,上述讨论并不意味着本发明中,测得的生物标志物水平,必须与该个体的阈值相比。综合实验结果的方法包括多元逻辑回归、对数线性模型、神经网络分析、N-M分析、决策树分析、标记比率计算等,包括但不限于上述方法。在这些方法中,由个体生物标记物资料 and 结果共同组成的综合结果若经过验证,可被作为一个指标。也就是说,生物标记物的

阈值可以是此处所说的综合结果,而且可将所有个体患者的综合结果与最终确定的阈值相比较。

[0107] 人群研究也可用于选择一个决策阈值。接受者工作特征(“ROC”)起源于二战期间的雷达图像分析的信号检测理论领域,且ROC分析经常被用来选择一个阈值,用以区分“有病”和“无病”亚群。在这种情况下的假阳性,是指当一个受试对象的检测呈阳性,但实际上没有这种疾病。假阴性,是指该受试对象的检测为阴性,理论上说明他们健康的,但他们实际上是患病的。绘制ROC曲线,真阳性率(TPR)和假阳性率(FPR)是由连续变化的决策阈值确定的。由于TPR代表灵敏度,而FPR等于1减去特异度,因此ROC图有时称为灵敏度与(1-特异度)图。一个完美的检测其ROC曲线下方面积为1;随机检测的ROC曲线下面积为0.5。阈值的选择,是为了提供可接受的特异度和敏感度。

[0108] 因此,利用ROC分析,可通过某种特定的检测将人群分为2群。例如,“第一亚群”的ROC曲线倾向于未来患有疾病或出现疾病相关的变化,第二个亚群并无明显倾向性。ROC曲线下面积可作为该检测的检测质量评价标准,本文所述的检验的ROC曲线下面积应大于0.5,而大于0.6、0.7、0.8、0.9及0.95则逐个更优。

[0109] 在某些方面,一个或多个目标生物标记物(例如,疾病相关的血清自身抗体),或复合检测结果,可被视为连续变量。例如,任何特定的浓度可以被转换成受试对象某些结果的相应发生率。另一种情况中,确定的某阈值可提供可接受的诊断特异度和敏感度水平,并把人群分为“bins”,如“第一亚群”(例如,倾向于产生疾病状态中的一个或多个改变,疾病的发生或复发,疾病的分类或分层等),以及无明显倾向性的“第二亚群”。

[0110] 如上所述,在下述评判标准中,合适的检测有一个或多个结果:特异度至少为0.5,大于0.6,0.7,0.8,0.9,0.95则逐个更优;相应的灵敏度至少为0.2,大于0.3,0.4,0.5,0.6,0.7,0.8,0.9,0.95则逐个更优。灵敏度至少为0.6,大于0.7,0.8,0.9,0.95则逐个更优;相应的特异度至少为0.2,大于0.3,0.4,0.5,0.6,0.7,0.8,0.9,0.95则逐个更优。敏感度大于75%,联合特异度大于75%;ROC曲线下面积大于0.5,且0.6,0.7,0.8,0.9,0.95逐个更优。优势比至少为1,2以上或0.5以下尤佳,同理3以上或0.33以下,4以上或0.25以下,5以上或0.2以下,10以上或0.1以下,逐个更优。阳性似然比(灵敏度/(1-特异度))应大于1,若大于2,3,5,10,则逐个更优;阴性似然比(灵敏度)/(1-特异度)应小于1,若小于0.5,0.3,0.1,则逐个更优。

[0111] 除了比较阈值,根据相关检验结果对病人进行分类的方法(患病与否,可能的结果等)还包括决策树、规则集、贝叶斯方法和神经网络方法。这些方法可以产生一个概率值,该概率值代表了受试对象可能属于某分类系统中的某个分类的可能性。

[0112] 检测的精确性评价可从Fischer et al., Intensive Care Med. 29:1043-51, 2003, 处查阅,且用来指导给定生物标记物有效性的确定。这些措施包括敏感度和特异度,预测值,似然比,诊断比值比,和ROC曲线面积。ROC曲线下面积(AUC)等于随机选择的病例试验结果比随机选择的对照试验结果更有可能患有某种疾病的概率。ROC曲线下的面积可被看作与Mann-Whitney U检验等效,用来检验两组连续变量的中位数的区别,或等级秩和检验。

[0113] 抗体:此处描述的用于免疫分析的抗体(或抗原结合的抗体片段等),一般是指与生物标记物特异性结合的抗体。术语“特异性结合”并非指抗体仅和目标蛋白结合,因为抗

体特异性结合的对象为抗原决定基(或者称为“表位”),因为抗体可与所有含有此种抗原决定基的蛋白结合。抗体与其目标蛋白“特异性结合”的亲合力与不含有相应抗原决定基的非目标分子相比要大5倍。抗体与目标分子的亲合力与抗体与非目标分子的亲合力相比,至少为5倍,且10倍、25倍、50倍、100倍,逐个更优。在优选的实例中,抗体结合的亲合力至少在 $106M^{-1}$ 或 $107M^{-1}$ 至 $1012M^{-1}$ 之间,最好在 $108M^{-1}$ 至 $109M^{-1}$ 之间,或 $109M^{-1}$ 至 $1010M^{-1}$ 之间,或 $1010M^{-1}$ 至 $1012M^{-1}$ 之间。

[0114] 亲和力的计算公式为 $K_d = K_{aff}/K_{on}$  ( $K_{aff}$ 为解离速率常数, $K_{on}$ 为结合速率常数, $K_d$ 为平衡常数)。亲合力可以通过测量平衡时不同浓度( $c$ )的标记配位的结合比例( $r$ )而获得。利用Scatchard方程画图: $r/c = K(n-r)$ ;  $r$  = 配体结合摩尔数/平衡时受体摩尔数; $c$  = 平衡时自由配体浓度; $K$  = 平衡结合常数; $n$  = 每受体分子配体结合位点数量。通过图形分析, $r/c$ 是绘制在Y轴上, $r$ 则在X轴上,从而产生Scatchard散点图。通过Scatchard分析测定抗体的亲合力是常见的方法。

[0115] 许多出版物讨论使用噬菌体展示技术来生成和筛选多肽库,用以结合至所选的被分析物。例如美国专利5571698号。噬菌体展示技术的基本原理是建立一个待筛选的DNA编码多肽与多肽之间的物理关系。此物理关联由噬菌体颗粒提供,它展示的多肽为噬菌体基因组编码的外壳蛋白的一部分。展示出于目标分子有亲和力的噬菌体,可与目标分子结合,且这些噬菌体通过与目标分子亲合力筛选的方式不断扩充。从它们各自的基因组中,可以确定这些噬菌体展示的多肽种类。通过与目标被分析物的亲合力,可确定所需的多肽,并通过传统方法,合成大量此类多肽。详见美国专利6057098号。

[0116] 这些方法所生成的抗体,可以通过亲和力和特异性结合与纯化的目标生物标记物结合的方法进行筛选。必要情况下,可比较希望被筛选在外的抗体与生物标记物的亲和力和特异性结合的结果。筛选程序包括在微量滴定板的不同孔内固定纯化的生物标记物,在不同微孔内滴入含有潜在一个或多个抗体的溶液,孵育约30分钟至2小时。被微孔清洗后,加入被标记的第二抗体(如抗小鼠抗体共轭碱性磷酸酶,若之前的抗体为小鼠来源),孵育30分钟后洗净。添加底物入小孔内,若存在被固定多肽的抗体存在,则会出现显色反应。

[0117] 确定的抗体将在选择的设计试验中进一步分析其亲和力和特异性。在目标蛋白或其它类型生物标记物的免疫检测研发过程中,常以纯化的目标被分析物为标准,来判断免疫检测的敏感度和特异度。由于各种抗体的亲合力不同,且某些抗体配对(例如夹心法)与别的抗体配对在空间上存在互相干扰等原因,相比单纯的抗体亲和力和特异度评价,对抗体的检测性能进行综合评价可能更为重要。

[0118] 本发明的检测试剂、组合、芯片以及试剂盒有许多应用,包括监测、预测、诊断、治疗受试对象或患者的自身免疫性或炎症性疾病,例如,干眼等。

[0119] 本发明的芯片可用于评估患者的生物样品,而此类患者已知患有、怀疑患有,或曾被诊断某种疾病,和/或接受相应治疗,例如干燥综合征导致的干眼、以及其它之前未被发现或未被怀疑患有某种疾病的患者。在筛选时,受试对象或患者可能是有症状或无症状的。与部分或全部的生物反应试剂种类、抗原有关的,位于组合中或芯片上的生物标记物水平可用于对疾病预后进行判断。例如,判断患者的疾病是对某种特定治疗有效,可监测疾病进展和/或治疗的有效性,评估疾病的恶性程度,和/或判断复发的可能性。本发明的组合或芯片也可用于诊断和筛选用途。例如,组合或芯片可用于诊断一种或多种干眼亚型。

[0120] 本发明的设备和芯片也可作为伴随诊断,例如,确定患者对某种特定药物或治疗方案有效的可能性或者无效性,同时,利用生物标记物在疾病不同阶段的改变对患者疾病进行分期。例如,肿瘤在不同阶段表达不同的蛋白(从而产生不同抗原)以满足其生长需求。类似地,自身免疫性疾病在不同阶段发出不同“信号”。

[0121] 从疾病样本获取的数据集,也可以与临床数据进行关联分析。抗体组合可以用来预测疾病的严重程度或临床结果,对预后判断有重要意义。由于给定样品的生物标记物谱在疾病的不同阶段有所不同,因此可用生物标记物面板对疾病的不同阶段进行评估,同时也可采用最有效的治疗方案

[0122] 本发明的设备和芯片也可用于药物研发,包括发现阶段和临床研发阶段,特别对于生物药,如抗体和其它重组蛋白以及以细胞或囊泡为基础的给药系统。至少在某些情况下,这类药物可以引起免疫反应,这类反应可以是有利的(对疫苗的反应)或有害的(严重的自身免疫性的不良反应)。类似地,由于小分子药物治疗可导致免疫反应,源于药物治疗后的细胞和组织改变。对生物和小分子药物在临床试验中产生免疫反应的监测能力非常重要。不仅需要监测细胞免疫反应,还要监测体液免疫反应,并在治疗前和治疗后比较血清抗体谱的区别,从而有助于预测出理想的药物反应。对某种药物产生阳性反应的患者将表现出不同的基线体液免疫状态。这在免疫调节剂类药物通过调控现有的免疫反应,而非引发新的免疫反应中是有重要意义的。通过比较无应答者和对特定药物(或药物组合)有正向或负向反应的患者,得到的数据资料提示,面板可用于分析不同自身抗体组合。这样的面板有利于识别对某特定治疗有良好反应的患者群体。类似的,无应答者和应答者对于特定生物标记物的响应曲线差异,可以用来评估患者是否可受益于特定的治疗方案。

[0123] 通过不同的临床研究设计,研发不同的生物标记物组,用以满足研发药物和治疗方法的不同需求。例如,通过使用基于反应预测性的生物标记物面板进行辅助诊断,可在治疗开始前确定应答者及无应答者,并选出前者。类似的,在临床试验患者入组之前根据生物标记物谱筛选患者,选择预测会对药物出现反应的患者入组。这将确保只有合适的观察对象被入组,这对新药研发早期获得核准有十分重要的作用。此外,药物无应答的相关资料信息,有利于监管机构进行药物审批或审批后(第四阶段的临床试验)的监测。

[0124] 药物研发的另一个领域,即此发明在“药物拯救”领域的应用,是通过确定患者中可能对治疗方案有效或无效的亚群,甚至更为重要的,是确定对该治疗方案产生不良反应的亚群。也就是说,候选药物在临床试验阶段失败者,对其患者样本进行回顾性分析,可确定生物标记物谱(或分布特征),并对确定产生正向反应的药物具有提示性意义。该信息可以被用来确定随后的患者分租,用于进一步的研究和治疗。在之前传统临床药物研发过程中,因为缺乏药物有效性证据而失败的案例,可重复使用上述方法,有可能可得出不同的结果,从而“拯救”该候选药物。生物标志物面板的蛋白谱提示的正向药物反应,可用于重新选择可能有反应的受试对象,并可重新对之前失败的候选药物进行临床评估,从而使该药物最终获批的可能性大大增加。

[0125] 实施例1

[0126] 干眼中潜在的不同的免疫病理机制

[0127] 1.1简介

[0128] 该案例描述的研究,是涉及发现和分析存在于自身免疫性或炎症性疾病中的,例

如干眼,与病理表现及临床表征相关的各种不同潜在炎症级联反应。这项研究在分子水平,对于干眼患者和正常对照组的泪液蛋白生物标记物分布进行了分析。本发明开发了新的方法来识别和确认在自身免疫性及炎症疾病中,造成患者在分子水平病理机制异质性的不同分子组成及潜在免疫病理机制。

[0129] 1.2目的

[0130] 此项研究的主要目的是识别与病理机制、疾病活动情况、患者亚组分类(无论是亚型或不同的疾病阶段、状态)相关的生物标记物和生物标记物特征,建立生物标记物分布特征并应用于对患者分类、分层和治疗,也应用于选择特异性的治疗靶点和信号通路。

[0131] 1.3材料与amp;方法

[0132] 从22位无症状对照组受试者和59位水液缺乏型干眼患者收集泪液,并对泪液中的43种蛋白质生物标记物进行系统性分析。这些生物标记物均为已知的免疫介质或与免疫病理机制具有潜在相关性的蛋白因子。采用以微珠为基础的多指标免疫检测对每份泪液里的生物标记物进行检测,并采用对每个标记物第二个不同的抗体为基础的检测试剂进行测量。

[0133] 1.4结果

[0134] 1.4.1

[0135] IL-18和Th2型细胞因子水平有很强的正相关性,IL-18和Th1型细胞因子在稳态下,有很强的正相关性。

[0136] 在对照组非干眼者,泪液中IL-18水平与IL-10、IL-4、IL-5、IL-3和GM-CSF有强烈的正相关性;IL-18水平也与IFN-g、IL-2和TNF- $\alpha$ 正相关,但与IL-17相关性较小;IL-1 $\beta$ (和IL-1 $\alpha$ ,程度较低)与IL-17强正相关;IL-23与IL-17也强正相关。此外,IL-1与IL-18正相关,Th2型细胞因子( $r > 0.90$ )与Th1型细胞因子( $r > 0.85$ )、IL-17( $r: 0.71-0.83$ )强正相关。详见表1和图1。这些结果提示在稳态下,IL-18活性和2型、1型相关细胞因子生成密切相关。因此,IL-18增加1型和2型反应,而IL-1支持IL17反应。IL-18和IL-1之间,2型和1型T细胞因子间,以及2型和17型细胞因子间的良好相关性,保证了稳态下,促炎1型,17型细胞免疫,以及2型细胞免疫之间的平衡。

[0137] 表1:泪液中IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 和IL-18与Th1、Th2和Th17相关细胞因子的皮尔森相关系数

[0138]

<b>Pearson Correlation Coefficient</b>	<b>IL-18</b>	<b>IL-1alpha</b>	<b>IL-1beta</b>
<b>IFNgamma</b>	0.821	0.565	0.609
<b>IL-2</b>	0.878	0.664	0.726
<b>TNF alpha</b>	0.856	0.596	0.636
<b>IL-10</b>	0.866	0.745	0.819
<b>GM-CSF</b>	0.841	0.717	0.810
<b>IL-3</b>	0.829	0.692	0.780
<b>IL-4</b>	0.843	0.677	0.773
<b>IL-5</b>	0.879	0.617	0.683
<b>IL-17</b>	0.733	0.854	0.952
<b>IL-18</b>	1.000	0.709	0.736
<b>IL-1 alpha</b>	0.709	1.000	0.855
<b>IL-1beta</b>	0.736	0.855	1.000

[0139] 1.4.2

[0140] 自身免疫性或炎症状态下, IL-18和IL-1, 以及2型和17型细胞型免疫的相关性和平衡被改变。

[0141] 中重度水液缺乏型干眼患者, 泪液中IL-18水平与IL-1 ( $r < 0.30$ , IL-10 ( $r = 0.35$ ) 或其它Th2相关细胞因子无强相关性; IL-18与IFN- $\gamma$  ( $r = 0.53$ ) 和IL-2 ( $r = 0.50$ ) 呈弱相关性; IL-1 $\beta$ 、IL-23和IL-17具有相关性。绘制IL-18与IL-10, IL-18与IL-17的散点图, 存在一个以上的人群, 尤其是IL-17水平较高的患者亚群, 其IL-1 $\beta$ 和IL-23的水平也更高。详见图3。泪液IL-10水平在这个患者亚组中与IL-18水平呈正相关。非此亚组中的患者, IL-18水平较高, 但Th1 (IFN- $\gamma$  和IL-2) 和Th2相关细胞因子 (IL-10, -5, -4, -3) 的水平较低或缺如。研究结果显示, 中到重度的干眼患者, 其IL-18和IL-1, 2型和17型细胞因子, IL-18和2型细胞免疫状态之间的稳态会被改变。

[0142] IL-1 $\beta$ 主要由巨噬细胞生成, IL-1 $\alpha$ , IL-1受体拮抗剂 (IL-1Ra) 由上皮细胞生成。IL-18可由包括巨噬细胞和上皮细胞在内的几种类型的细胞生成。非干眼患者的IL-1和IL-18的产生可能由相同机制调控, 由驻留型巨噬细胞分泌。中重度干眼患者, 有多种机制和细胞类型可产生IL-18, 具体取决于患者所属亚型, 但仅有一种亚型保留拥有IL-18、IL-10和其它Th2细胞因子的相关性。

[0143] 1.4.3

[0144] 分子水平的疾病异质性: 基于生物标记物谱或多个生物标记物水平, 例如IL-1、IL-17、IL-10和IL-18, 用分子病理机制, 将患者分为不同亚型。

[0145] 在此研究中的中重度水液缺乏型干眼患者, 主要可分为三种亚型: 致病性IL-17 (高IL-17/IL-10比率) 亚型, 伴随IL-1 $\beta$ 水平升高和IL-18水平降低; 两种非T细胞介导亚型

(IL-10和IL-17水平降低),其中一个亚型伴有IL-18和IL-1 $\beta$ 水平降低,另一个亚型则伴有IL-18和IL-1Ra水平升高。详见图3。

[0146] 中重度干眼患者的三个亚型也在MMPs,补体3和IL-8的表达水平上有所不同:致病性IL-17亚型的MMP-9和MMP-3水平最高,但补体3和IL-8的水平较低;非T细胞、低IL-18亚型的MMP-9、MMP-3水平较低,补体3和IL-8的表达位于中等水平;非T细胞、高IL-18亚型的MMP-9和MMP-3的表达位于中等水平,补体3和IL-8水平最高。详见图3。研究结果显示,在中到重度水液缺乏型干眼患者的不同亚型存在不同的潜在致病机制。相关的免疫病理学分子机制和信号通路包括:IL-1和IL-23驱动的致病性IL-17、高MMP-9和MMP-3机制,可导致眼表上皮和眼表屏障损伤;非T细胞驱动、补体3和IL-8/中性粒细胞介导的机制,可导致微血管渗漏和眼表组织损伤。

[0147] 目前由致病性Th17细胞介导的致病机制被认为在多种自身免疫性疾病中起重要作用。由TLR激活或I类干扰素诱导上皮细胞分泌产生的IL-18和IL-1Ra及其紧密相关性,和自身抗体诱导的IL-8的生成和补体的激活,都在自身免疫性疾病中被观察到,例如系统性红斑狼疮SLE和干燥综合征SS。因此,干眼患者在分子水平的异质性很可能是因为不同的免疫病理机制的结果。这可能与不同的致病机制,或不同的疾病阶段相关,或者不同的致病机制及其疾病状态相关。例如,非T细胞介导、高IL-18亚型的干眼患者,其致病机制可与非T细胞驱动、低IL-18亚型患者的相同,但前者可能处于疾病活动期,而后者处于非活动期。

[0148] 1.5讨论

[0149] 通过从干眼患者和对照组受试者获取泪液并分析其免疫介质和蛋白标记物标志因子,发现了在不同亚型的干眼患者中所存在的不同免疫病理机制。因此,基于病理机制分子水平的异质性,可将中重度水液缺乏型干眼患者根据其分子机制分成传统临床方法无法区分的三个干眼亚型。

[0150] 1.6结论

[0151] 在自身免疫性疾病及炎症病理状态下,生物标记物的分布揭示出不同的免疫病理机制,及因此而造成的分子机制水平上的疾病异质性,尤其是IL-1与IL-18的作用,以及两种不同的病理机制:一种是IL-1、IL-23、致病性IL-17、Th17细胞、MMP-9、MMP-3;另外一种是非T细胞驱动、低IL-18亚型患者的相同,但前者可能处于疾病活动期,而后者处于非活动期。

[0152] 实施例2

[0153] 干眼患者分子机制异质性所对应的生物标记物组水平(图谱)

[0154] 2.1介绍

[0155] 干眼(DED)是美国及世界上许多其它国家和地区最常见的眼科疾病,影响全球几千万患者的生活质量。干眼可出现眼部刺激症状和视觉不良症状,具体包括眼部疼痛、砂砾感、眼表刺感及干燥感,以及视力波动、视物模糊,常常显著影响患者的生活质量及工作。专业名字干眼(DED),也叫泪膜功能障碍,包括一组存在异质性的病理状态,每个病理状态与不同的病因有关,如系统性自身免疫性疾病干燥综合征(SS)可导致眼表干燥,或睑板腺功能障碍(MGD)可导致泪膜成分改变和质量降低及眼表损伤。随着病情发展,还可出现各种临床体征和病理改变,包括泪液分泌减少,泪膜不稳定,角膜表面不规则,结膜杯状上皮细胞丢失、增生,角膜神经末梢高敏感性,角膜上皮病变。

[0156] 干眼的病因不明。然而,根据在干眼患者眼表观察到的CD4+T细胞的渗透及促炎调节因子水平的升高,目前认为眼表炎症是由CD4+T细胞介导的。根据既往的研究报告,通过对干眼患者的泪液进行免疫检测分析,发现细胞因子及趋化因子的浓度升高,包括IL-1、IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$ 和MMP-9等。通过收集干燥综合症或干眼患者的结膜上皮细胞进行检测,发现IL-1b、TNF- $\alpha$ 、IL-6、MMP-9的基因编码RNA转录增加,且通过RT-PCR检测到趋化因子CCR5的存在。临床前研究显示,干眼的致病机制与Th17和Th1细胞有关,且出现Treg细胞功能障碍,致病性T效应细胞对Treg细胞调控的抵抗,尤其是Th17细胞,在实验干眼模型中,表现出对Treg细胞的抑制作用。用抗IL-17抗体阻断IL-17,可缓解改善实验干眼模型的眼表病理损害。

[0157] 然而,干眼患者人群存在着显著的异质性,限制了不同临床指标的相关性、临床研究之间的可重复性,使之成为干眼临床研究和药物研发的重大挑战。

[0158] 2.2目的

[0159] 为了识别和描述干眼免疫病理机制所涉及的分子和细胞组成,对干眼患者泪液中大量的免疫介质和其它潜在免疫病理相关的蛋白因子进行图谱分析,并应用多元系统生物学方法对潜在病理机制和患者异质性的特征进行分析和描述。

[0160] 2.3方法

[0161] 前瞻性研究,在两个研究中心进行单次访视,85名干眼患者入组,用眼表疾病指数(OSDI $\geq$ 13)进行眼表症状评分,并进行角膜荧光素染色(CS)。入组干眼患者中,有31名的角膜荧光素染色评分范围在0到3( $<4$ );6名患者的范围从4到6( $\geq 4$ 和 $<7$ );22名患者大于7( $>7$ )。在第0天的访视,即通过筛选后的1-3天,以及第7天的访视,用毛细吸管采集双眼泪液,并采用以微珠为基础的多指标免疫检测,对与潜在免疫病理机制相关的43种免疫蛋白调节因子或标记物进行分析。此外,在每次访视时,也对患者的临床症状、体征进行检查,用以评价疾病特点。

[0162] 2.4结果

[0163] 2.4.1蛋白标记物之间的关系

[0164] 在第0天访视时,对个体泪液蛋白标记物的相关性进行配对检验,采用回归分析,去除年龄效应的影响后,计算其部分相关系数( $r$ )。图4为部分配对标记物相关性的散点图。

[0165] 泪液中IL-17A、IL-1b、IL-23和IL-15的水平具有高度相关性( $r > 0.85, P < 0.0001$ )。IL-17A是促炎Th17细胞生成的;由树突状细胞和巨噬细胞生成的IL-23和IL-1 $\beta$ 对Th17细胞的极化和增殖有重要作用;IL-15被认为可诱导Th17细胞生成IL-17A。这组细胞因子和标记物成为“IL-17集群”。此外,还有别的免疫调节因子与IL-17集群有良好的相关性( $r > 0.75, P < 0.0001$ ),包括IL-12p70、干细胞因子(SCF)、嗜酸性粒细胞趋化因子和因子7。

[0166] 泪液中IFN- $\gamma$ 、IL-2和TNF $\alpha$ 之间也具有强相关性( $r > 0.90, P < 0.0001$ )。IFN- $\gamma$ 是典型的Th1型细胞因子,由炎性Th1细胞产生,可诱导TNF- $\alpha$ 生成。同样的,IL-4、-5、-3、-10、GM-CSF具有强相关性( $r > 0.90, P < 0.0001$ )。GM-CSF、IL-3、-4、-5、-13的基因编码均定位于染色体5q31区。IL-4、IL-5、IL-13和IL-10是Th2相关细胞因子,而Th2细胞主要与过敏有关。(IL-13在此项研究中并未涉及)。这两组细胞因子分别被称为“Th1集群”和“Th2集群”。有趣的是,在这项研究中,Th1和Th2集群的细胞因子具有强相关性( $r > 0.85, P < 0.0001$ ),但与IL-17细胞因子集群相关性较弱( $r < 0.65$ )。例如,IL-5和IFN- $\gamma$ 之间的相

相关性为0.91,而IL-17A和IFN- $\gamma$ 之间仅0.56,IL-17A和IL-5之间为0.67。IL-18也与Th1集群的相关性较高( $r>0.80$ , $P<0.0001$ )。

[0167] 泪液中IL-18水平与IL-1 ( $r<0.30$ )、IL-10 ( $R=0.35$ ) 或其它Th2型相关细胞因子无明显相关性;IL-18与IFN- $\gamma$  ( $r=0.53$ ) 和IL-2 ( $R=0.50$ ) 有弱相关性;另一方面,IL-1 $\beta$ 和IL-23与IL-17有良好相关性。

[0168] 泪液补体3 (C3)、IgA、IgM、 $\alpha$ -1抗胰蛋白酶(AAT)、载脂蛋白(Apo)H、A1和CIII彼此具有良好的相关性( $r>0.80$ , $P<0.0001$ ),因此合称为“C3集群”。

[0169] 这些强正相关性的生物标记物揭示,它们的生成应是互相依赖的、共同交接的,或来源相同,例如都来源于干眼患者眼表的某个特殊细胞类型。

[0170] 有趣的是,IL-17集群与C3集群存在弱的负相关性:C3与IL-15,IL-17A与IL-1 $\beta$ 之间的相关性系数 $r$ 的范围为-0.48至-0.44(图4)。

[0171] 2.4.2患者集群分析

[0172] 基于患者泪液标记物分布,去除了因浓度太低在25%以上的泪液样品中无法检测的蛋白因子(12种标记物)以及样品间无明显变异的蛋白(7种标记物)后,对患者进行无监督的测试分析。许多Th1和Th2型细胞因子,包括IFN- $\gamma$ 、IL-2、TNF $\alpha$ 、IL-5和IL-3都因浓度水平,在25%的泪液样品中无法检测,而没被列入研究分析范围。剩下的24个标记物被用于集群分层分析,根据数据资料可将患者分为2大组,其中第一大组60人,第二大组25人,其中第一大组又可分为第一小组31人和第二小组29人,第二大组可分为第三小组5人和第四小组20人。详见图5。值得一提的是,即便使用不同集群的算法(平均联动或完全联动),这样的患者分组也可被识别的。这些患者的分组与所处研究中心或筛选时的定义无关。详见图5。无论是对患者研究眼(根据角膜染色检查,预先将其定义为临床表现较重的眼睛)或者双眼的平均水平进行分析,都可以获得相似的集群分析结果。与干眼为双眼性疾病的认知一致,同意患者的双眼的临床参数和泪液细胞因子、蛋白质标记物都是可比的、接近的。因此,如图5和其它地方所述,我们将个体的双眼平均水平共同纳入分析。

[0173] 基于生物标记物分布,对85名干眼患者进行主要成分分析(PCA),发现根据集群分析分组的患者与PCA结果也相同。参见图6。

[0174] 2.4.3亚组间泪液蛋白标记物的表达差异

[0175] 随后对四小组患者的蛋白标记物的差异化表达进行了研究,采用协方差分析方法(ANCOVA)调整了年龄、性别、研究中心可能造成的差异。对后测配对检验的P值进行了多重假设检验修正。所选的细胞因子和免疫介质如图7所示。

[0176] 小组1和2患者的IL-17集群的泪液细胞因子水平显著高于小组3和4( $P<0.0001$ )。小组1中水平最高,并显著高于小组2( $P<0.0001$ );小组3和4的水平接近( $P>0.05$ )。因此,小组1的患者IL-17水平高,小组2中等水平,小组3和4的水平低。如图4所示,小组1的IL-17平均浓度(236.26 $\mu$ g/ml,95%置信区间:199.25-280.15)比小组2高出近4倍(59.59 $\mu$ g/ml,95%置信区间:43.63-81.39, $P<0.0001$ ),是小组3的33倍(7.12 $\mu$ g/ml,95%置信区间:5.82-8.71, $P<0.0001$ ),是小组4的50倍(4.7 $\mu$ g/ml,95%置信区间:3.33-6.62, $P<0.0001$ )。小组2的IL-17水平分别是小组3和4的8倍和12倍( $P<0.0001$ ),而小组3和4则接近( $P=0.76$ )。

[0177] 与IL-17细胞因子集群不同,在Th1和Th2集群的泪液细胞因子水平仅在小组1中较

高,在小组2,3,4中都不高( $P < 0.0001$ ) (图7)。因此,小组1的患者表现为高IL-17/高Th1Th2,而小组2则表现为中IL-17/低Th1Th2。

[0178] 相反,小组3中的C3/血清集群的许多泪液标记物水平最高,其次是小组4,而小组1和2最低。如图7所示,小组3的C3平均水平(69.83ug/ml,95%置信区间:40.15-121.46)显著高于小组1(22.9ug/ml,95%置信区间:18.58-28.23, $P = 0.0004$ ),小组2(17.01ug/ml,95%置信区间:13.92-20.79, $P < 0.0001$ ) ,和小组4(43.85ug/ml,95%置信区间:38.71-49.68, $P = 0.065$ ) ;同时,小组4的C3水平显著高于小组2( $P = 0.0002$ ) 和小组1( $P = 0.0351$ )。小组3和4的患者分别表现为高水平的C3,中度水平的C3。

[0179] 有趣的是,小组3的泪液中的IL-8水平(CXCL-8)也明显高于(3.59ng/ml,95%置信区间:2.22-5.8)小组1(0.39ng/ml,95%置信区间:0.32-0.46),小组2(0.37ng/ml,95%置信区间:0.28-0.48)和小组4(0.51ng/ml,95%置信区间:0.35-0.72) ( $P < 0.0001$ )。详见图7。

[0180] 综上所述,通过对泪液细胞因子谱资料的无监督聚类分析,本研究中的干眼患者可被分为四个小组,各自表现不同的分子标记物谱:高IL-17/高Th1Th2/低C3(小组1),中IL-17/低Th1Th2/低C3(小组2),低IL-17/低Th1Th2/高C3/高IL-8(小组3)和低IL-17/低Th1Th2/中C3/低IL-8(小组4)。

[0181] 2.4.4泪液标记物谱的稳定性超过1周

[0182] 干眼患者泪液活性因子的表达差异显示,第0天的访视数据和第7天的访视数据十分接近。图5显示第0天和第7天,4个小组所选蛋白标记物的平均浓度和95%置信区间。

[0183] 2.4.5患者亚型(各小组)的临床特点

[0184] 记录患者的一般情况,并采用协方差分析修正了潜在的年龄、性别、研究中心等对数据的影响后,比较4小组干眼患者的临床数据。对后测配对检验的P值进行了多重假设检验修正。各小组的平均值、标准差和P值详见表2。

[0185] 平均而言,小组3的患者临床表现最重,其次是小组4:角膜和结膜染色评分较高,泪液分泌试验分数较低,泪膜破裂时间短,由OSDI及OCI量表测得的眼表症状最重。特别的,角结膜染色评分小组3最高,显著高于小组1( $P < 0.0001$ ),小组2( $P < 0.0001$ )、小组4( $P < 0.01$ ),而小组1、2、4之间无显著性差异。无麻醉的泪液分泌试验,小组3和4的分泌量小于小组1和2( $P < 0.05$ )。小组4的患者的检查结果稍差于小组1( $P = 0.006$ )和小组2( $P = 0.016$ ),且结膜染色评分高于小组1( $P = 0.001$ )。小组1和2之间唯一的显著性区别为泪膜破裂时间TBUT,小组1短于(泪液对眼表的保护作用较差)小组2( $P = 0.003$ )。

[0186] 2.5结论

[0187] 实施例2表明,干眼患者泪膜中存在的蛋白生物标记物分布特征包括IL-1b/IL-23-1L-17A级联、补体3/血浆蛋白和IL-8/中性粒细胞等。这些生物标志物特征分别揭示了在干眼患者眼表出现的树突状细胞、巨噬细胞、IL-17生成细胞的渗透和激活,微血管渗漏,中性粒细胞的渗透。这些泪液标记物分布提示可以根据患者在分子机制水平和生物标记物分布的异质性,将患者区别及分层分为2-3组以上的不同亚型。干眼患者的其中一个亚型是泪液中高IL-17A、IL-1、IL-12、IL-15、IL-23和MMP-9水平,表明生成IL-1beta/IL-23/IL-12的树突状细胞和巨噬细胞的激活,和产生IL-17A的细胞在眼表面的渗透和激活(高IL-1beta/高IL-23/高IL-12/高IL-17A);而另一个亚型是低IL-1 $\beta$ 、IL-23和IL-17A水平,但补体3水平升高(低IL-1beta/低IL-23/低IL-17A/高C3),具有存在自身抗体的潜在迹象,这组

IL-17和高C3患者,其中再细分的小组其IL-8和血清蛋白水平升高(AAT载脂蛋白A1和H)(IL-1blow/IL-23low/IL-17A/高C3/高IL-8/高AAT),表明炎症导致血管扩张和血浆渗出。

[0188] 表2:患者一般情况及每个亚组在第0天访视时的临床特征

[0189]

---

G 1	G 2	G 3	G 4	P
-----	-----	-----	-----	---

---

[0190]

	(n=31)	(n=29)	(n=5)	(n=2 0)	Over all	G2- G1	G3- G1	G4 -G 1	G3- -G G2 2	G4 -G 3	G4 -G 3
Age (yr)	46.7	47.9	56.2	51.8	0.45						
(range)	(19 – 85)	(18 – 88)	(44 – 70)	(26 – 70)	7						
Female/ Male	24/7	18/11	2/3	14/6	0.17						
					4						
Corneal	4.3 (0.32)	4.2	8.5	5.2	<0.0	0.99	<0.0	0.2	<0.0	0.1	0.0
Staining (NEI)		(0.29)	(0.76)	(0.4)	001	4	001	31	001	67	03
Conjunctival	0.9 (0.13)	1.5	3.4	1.6	<0.0	0.14	<0.0	0.0	<0.0	0.1	0.0
Staining		(0.19)	(0.92)	(0.27	001	2	001	01	001	32	05
(Oxford)				)							
STT. w/o	18.9	17.9	6.1	11.1	0.00	0.99	0.03	0.0	0.05	0.0	0.8
anesthesia	(1.49)	(1.53)	(0.93)	(1.31	1	1	8	06	1	16	43
(mm)				)							
STT.w/	16.9	18.7	7.3	16.2	<0.0	0.16	0.03	0.3	0.00	0.0	0.2
anesthesia	(1.28)	(1.27)	(1.53)	(1.8)	001	6	6	78	1	07	77

[0191]

(mm)

TBUT            3.4 (0.18)    4.3        2.9        3.4    0.00    0.00    0.99    0.4    0.19    0.4    0.6

(second)                    (0.16)    (0.41)    (0.28    4        3        2        52    7        40    96

)

Tear            304.0        300.8        305.5        305.7    0.05    0.57    0.70    0.4    0.32    0.0    0.9

Osmolarity        (2.04)        (1.25)        (3.24)        (1.82    8        2        8        17    7        54    97

)

AT dose            2.2 (0.26)        2.4        2.8        3.3    0.10    0.76    0.77    0.0    0.96    0.3    0.9

(0.28)    (0.33)    (0.44    1        9        4        61    6        81    50

)

OSDI            43.0        41.5        50.5        47.47    0.19    0.99    0.51    0.3    0.43    0.3    0.9

(2.25)    (2.51)    (10.68)    (3.14    8        4        3        97    0        02    62

)

NEI-VFQ-25        71.38(1.99    73.74(    74.67(    73.91    0.69    0.66    0.96    1.0    1.00    0.8    0.9

)        2.14)    4.37)    (1.94    5        3        7        00    0        33    79

)

OCI            42 (1.15)        45.56        52.27        46.77    0.01    0.09    0.02    0.2    0.29    1.0    0.2

(1.75)    (2.69)    (2.01    3        6        5        26    0        0        94

[0192]

)

[0193] NEI:国家眼科协会分级标准;结膜染色:丽丝胺绿,评分标准为Oxford法;STT.w/o anesthesia:泪液分泌试验,无麻醉;STT.w/anesthesia:泪液分泌试验,有麻醉;TBUT:泪膜破裂时间;P值:修正年龄、性别、研究中心的影响后,采用ANCOVA方法进行组间多重比较的P值;AT dose:患者日记记录的平均人工泪液使用量;OSDI:眼表疾病指数;NEI-VFQ-25:国家眼科研究所视觉功能问卷-25;OCI:眼部舒适度指数。

[0194] 2.6结论

[0195] 这项研究表明,干眼是一组异质性的疾病,存在不同的免疫病理机制,可通过泪液标记物对干眼患者的不同分子机制进行检测和鉴别,从而将疾病(患者)分层,更好地进行诊断、监测和治疗方案的选择。

[0196] 在这项研究中,通过泪液蛋白标记物的分布对干眼患者进行了分组。不同小组的患者可以因免疫激活的成分不同而进行区别,提示有不同的免疫病理机制患者的眼表疾病中起作用。尽管不希望被现有理论束缚,其中的一个机制涉及IL-1,促炎和T细胞驱动。另外,此前还没有在人类干眼中被确认过的,即干眼与补体激活,IL-8驱动和非T细胞介导有关。这些不同的干眼亚型也可能是干眼发病的不同阶段,这可以解释患者的临床体征和自诉症状之间有时候无法完全对应。将干眼患者以生物标记物分布特征为基础进行分类(或分层,单独或与症状和/或临床症状结合定义),在靶向治疗方案的患者选择上十分重要,同时,在干眼药物研发中,可有效地选择临床观察指标,降低风险。

[0197] 实施例3

[0198] 中重度水液缺乏型干眼患者免疫病理机制异质性相关的生物标记物分布特征的确证。

[0199] 3.1介绍

[0200] 本实例介绍和描述了干眼疾病中,造成眼表疾病病理和临床表现异质性的潜在分子机制及组成。此项研究中,在分子水平上,通过泪液蛋白标记物谱来描述中重度水液缺乏型干眼的特点。

[0201] 3.2目的

[0202] 干眼,又称泪液功能障碍,包括一组眼表异质性病理状态,每种状态都与不同的原因相关,例如系统性自身免疫性疾病干燥综合征(SS)可导致眼部干涩,或睑板腺功能障碍(MGD)中的睑板腺阻塞导致的泪膜的成分变化和分泌量减少,并引起眼表损害。此外,随着眼部症状加剧,可伴随出现各种临床体征和病理变化,包括泪液分泌减少,泪膜不稳定,角膜表面不规则,结膜上皮杯状细胞减少,角膜神经末梢增生及敏感性提高,与角膜上皮病变发展。

[0203] 根据国际干眼研讨会的报告(DEWS),将分为两个主要类型:水液缺乏型和蒸发过强型干眼。水液缺乏型干眼主要包括SS干眼(原发性和继发性)和非SS型干眼。SS是一种影响泪腺和唾液腺的系统性自身免疫性疾病,可单独发病或其它自身免疫性疾病(如系统性红斑狼疮SLE,类风湿关节炎RA)共同发病。SS干眼患者的泪腺损伤,分泌功能受损(泪腺为人体分外分泌腺体,负责分泌泪膜的水液成分),导致泪液分泌的显著减少和眼表干燥。大多数水液缺乏型干眼患者为非SS干眼,病因不明。此类患者有干眼症状,泪液分泌减少,以及其它眼临床症状,但没有明显的全身性疾病。蒸发过强型干眼的常见原因是MGD,MGD患者因睑板腺炎症、阻塞等原因导致睑板腺分泌物的正常脂质成分改变,导致泪膜的组成及

功能异常,从而使泪膜破裂时间(TBUT)缩短、眼表损伤,以及干眼症状。水液缺乏型和蒸发过强型干眼都十分常见,有不少干眼患者同时存在这两方面的问题。

[0204] 在此项多中心干眼临床研究中,通过不同纳入和排除标准筛选出中重度水液缺乏型干眼患者,在分子水平检测了泪液蛋白标记物谱,并评估相似的分子分布是否可用来识别疾病的异质性。

[0205] 3.3方法

[0206] 研究设计与患者。3个临床中心共入组59名中重度的水液缺乏型干眼患者,年龄在18岁以上,被诊断为干眼超过6个月。入选患者满足一系列入选和排除标准,用以筛选入组中度至严重的水液缺乏型干眼:无麻醉的Schirmer泪液分泌试验: $\geq 1\text{mm}$ 和 $\leq 7\text{mm}/5\text{min}$ ;角膜荧光素染色总分 $\geq 4$ 分(NEI标准);眼表舒适度指数OCI:16个问题中至少有4个得分不小于3分,即要求患者对下述8个常见干眼症状的频率和程度评分:眼睛干涩、砂砾感、刺痛、疲劳、疼痛、瘙痒、视物模糊、畏光。

[0207] 在2周洗脱期后的基线访视,收集患者的非刺激性泪液,并分析43种蛋白质生物标记物,方法如前所述。此外,对患者的临床症状和体征进行评估,包括角膜荧光素染色(NEI),丽丝胺绿染色(Oxford标准),麻醉和无麻醉下的泪液分泌试验,泪膜破裂时间(TBUT)。

[0208] 统计分析。蛋白标记物在最小可检测剂量(LLD)以下者,或测量值丢失率高于25%者,或样品间无明显差别者(变异系数 $CV < 10\%$ )者,被排除在无监督聚类分析以外。通过聚类分析,若患者泪液蛋白标记物水平在组间出现差异,则采用协方差分析(ANCOVA),以年龄、性别、临床研究中心等作为协变量进行评估。通过一般的线性假设,对患者亚群进行事后配对检验,并对P值进行多重修正。统计学意义设为0.05;P的取值均为双向。

[0209] 3.4结果

[0210] IL-17集群内的细胞因子之间具有良好的相关性( $r > 0.80, P < 0.0001$ ),同样,C3集群内的蛋白因子之间也是。泪液中IL-17A、IL-23、IL-1beta、IL-15和MMP-9的水平具有良好的相关性( $r > 0.80, P < 0.0001$ );C3、AAT、载脂蛋白A1和其它血清蛋白也具有良好相关性( $r > 0.85, P < 0.0001$ )。泪液中IL-8水平与AAT( $r > 0.80, P < 0.0001$ )和此项研究中的其它血浆蛋白也具有正相关性。

[0211] 应用分层聚类分析,59例患者被分为3组,3组间差异表达的标记物采用ANCOVA修正年龄、性别和研究中心造成的影响,同时对事后比较的P值进行多重分析修正。其中第一组有32例患者其IL-17集群细胞因子水平明显较高,而IL-8和C3集群标记物的水平明显低于其它两组( $P < 0.05$ ) (即,高IL-17/低C3/低IL-8)。该分布与第一个研究中的小组1和2是相似的,由于Th1和Th2细胞因子的平均值与其它两个小组的患者有明显不同,因而被称为小组1/2(图9)。第二组患者( $N=9$ )与第一个研究中的小组3表现出相似的集群特征,尤其是IL-8和C3集群中的蛋白因子水平最高( $P < 0.05$ ) (低IL-17/高C3/高IL-8)。第三组的患者( $N=18$ )与之前实验的小组4相似:IL-17A、IL-23、IL-1beta、MMP-3、MMP-9的水平最低( $P < 0.01$ ) ,IL-8、C3和AAT的水平处于中间水平( $P < 0.05$ ) (低IL-17/中C3/中IL-8) (图9)。

[0212] 三组患者的干眼临床体征和症状的比较采用方差分析(表2)。与第一项研究不同,干眼的临床体征:CS、结膜染色、泪液分泌试验、TBUT,在患者组间无显著性差异( $P > 0.05$ );高IL-17/低C3/低IL-8患者组的OSDI症状评分差于( $P < 0.001$ )低IL-17/中C3/中IL-8患者

组。值得注意的是,第二次实验中,低IL-17/高C3/高IL-8干眼患者组(26.63±2.65)和低IL-17/中C3/中IL-8干眼患者组(27.81±2.33)的OSDI平均得分低于第一次临床实验的相应值(50.5±10.68;47.47±3.14),同时高IL-17/低C3/低IL-18干眼患者组平均OSDI得分(48.86±3.3)与第一次临床研究的相应值较为接近(43±2.25;41.5±2.51)。见表3,如下。

[0213] 表3:中重度水液缺乏型干眼患者在相互独立的临床研究中,各个亚型的临床症状和体征评分

[0214]

	Mean		P Value				
	G(1+2)(n=32)	G3(n=9)	G4(n=18)	Overall	G3 - G(1+2)	G4 - G(1+2)	G4 - G3
Corneal Staining	5.04 (0.17)	5.08 (0.34)	5.32 (0.35)	0.74 1	0.980	0.716	0.940
Conj. Staining	1.58 (0.18)	0.75 (0.22)	1.5 (0.3)	0.44 6	0.516	0.957	0.414
STT.w/o	6.18 (0.45)	6.25 (0.94)	6.86 (0.92)	0.68 7	0.999	0.680	0.853
STT.w/	8.7 (0.62)	16.3(2.35)	12.0(1.21)	0.00 1	0.001	0.076	0.086

[0215]

	3.92	3.56	3.88	0.11			
TBUT	(0.1)	(0.18)	(0.12)	3	0.090	0.802	0.220
				<			
	48.86	26.63	27.81	0.00			
OSDI	(3.3)	(2.65)	(2.33)	1	0.127	< 0.001	0.744
	47.44	49.52	43.89	0.07			
OCI	(1.15)	(1.77)	(1.38)	1	0.449	0.285	0.074

[0216] STT:w/o anesthesia:泪液分泌试验,无麻醉;STT.w/anesthesia:泪液分泌试验,有麻醉;TBUT:泪膜破裂时间;P值:修正年龄、性别、研究中心的影响后,采用ANCOVA方法进行组间多重比较的P值;OSDI:眼表疾病指数;OCI:眼部舒适度指数。

[0217] 3.5结论

[0218] 对从不同临床试验获得的中重度水液缺乏型干眼患者的泪液蛋白标记物的数据集进行分析,证实泪液标记物分布特征相似,确认了干眼的免疫病理机制在不同的临床试验中具有有一致性,也确认了这些泪液生物标记物及其分布图谱在未来可能的应用价值。

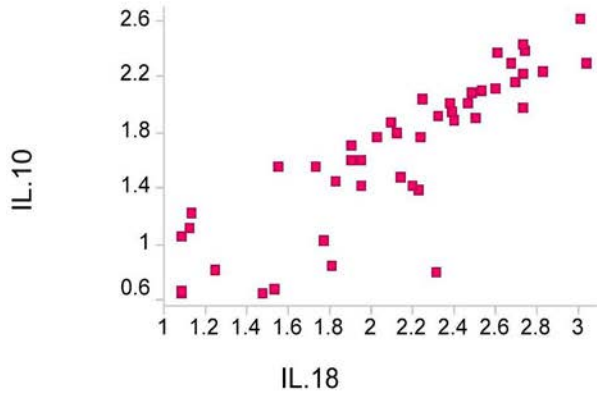
[0219] 基于本发明所披露的,这里所描述的和声称的所有成分,用品,设备,系统和方法,不需要过分的试验都可以制备和实施。尽管所描述的成分,用品,设备,系统和方法是本发明的一个明显的优选例子,那些熟识本行业技能的人清楚在不背离本发明的精髓和范围基础上,可以在成分,用品,设备,系统和方法上有各种各样的变化。所有的变异和变化,无论是现在或以后发生,只要是依照以下所附声称定义的那样,对于熟识本行业技能的人都应清楚,是属于本发明的的精髓和范围内的。

[0220] 详述中所提到的所有专利,专利申请,出版物都是提示与本发明有关的行业和技术水平。所有的专利,专利申请和出版物都被整理完整地编排到参考资料中。

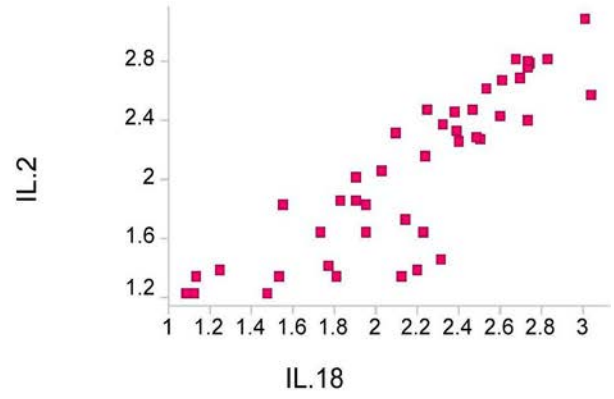
[0221] 在没有任何所披露的要素前提下,本发明中用作说明的描述也可以被单独地运用。因此,例如,在每个实例中的“包括”、“包含”、“由…组成”,和“基本组成”都可以被任何其它一个替换。这里表达的条款和使用的术语是用于描述性的而不是限制性的,也没有意向要排除任何其它在使用上相等的、相当的表达特征,只是在本发明声称的或本发明范围内的各种修改都公认是可以的。因此,虽然本发明透过优选的体现和可选择特性具体披露的(已公开),但是求助于或由行业内熟识技能的人对所披露的概念所进行的改性与变异,在这种情况下,同样应该是默认为本发明的范围和定义内。

[0222] 改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

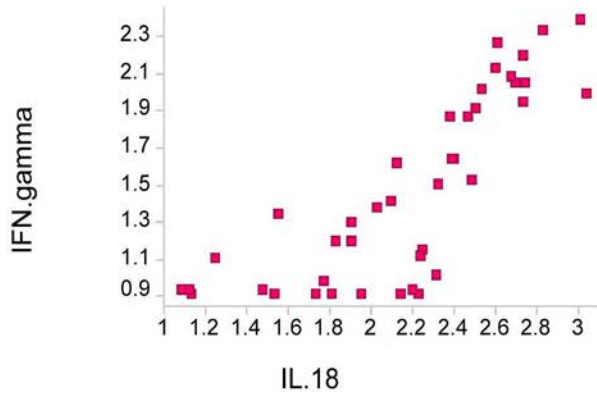
IL.10 vs. IL.18



IL.2 vs. IL.18



IFN.gamma vs. IL.18



IL.17 vs. IL.18

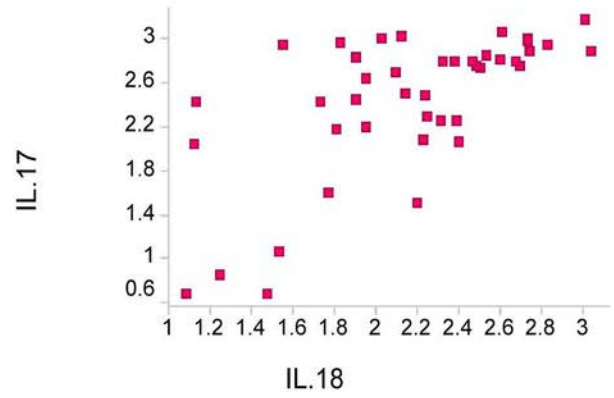


图1A

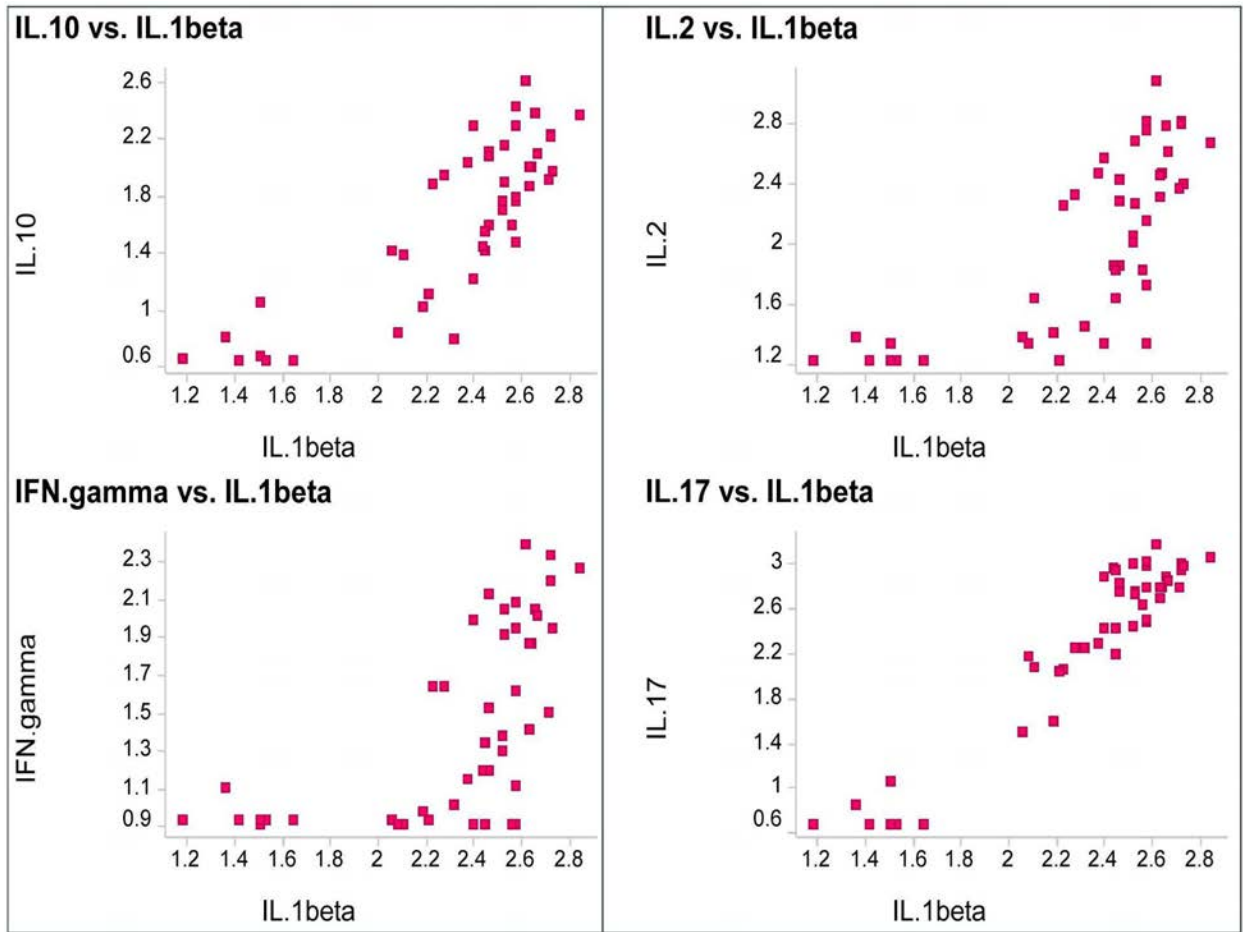


图1B

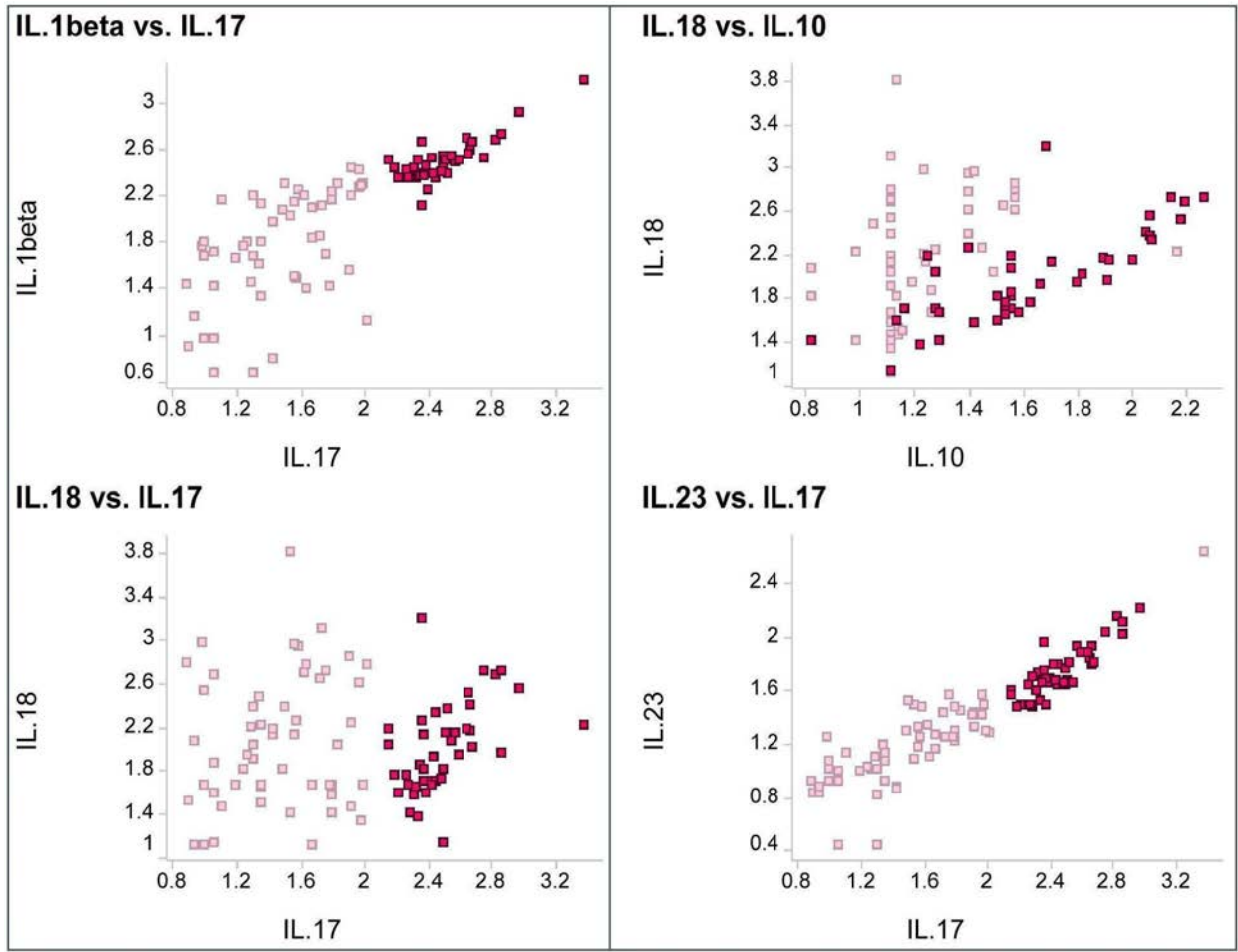


图2

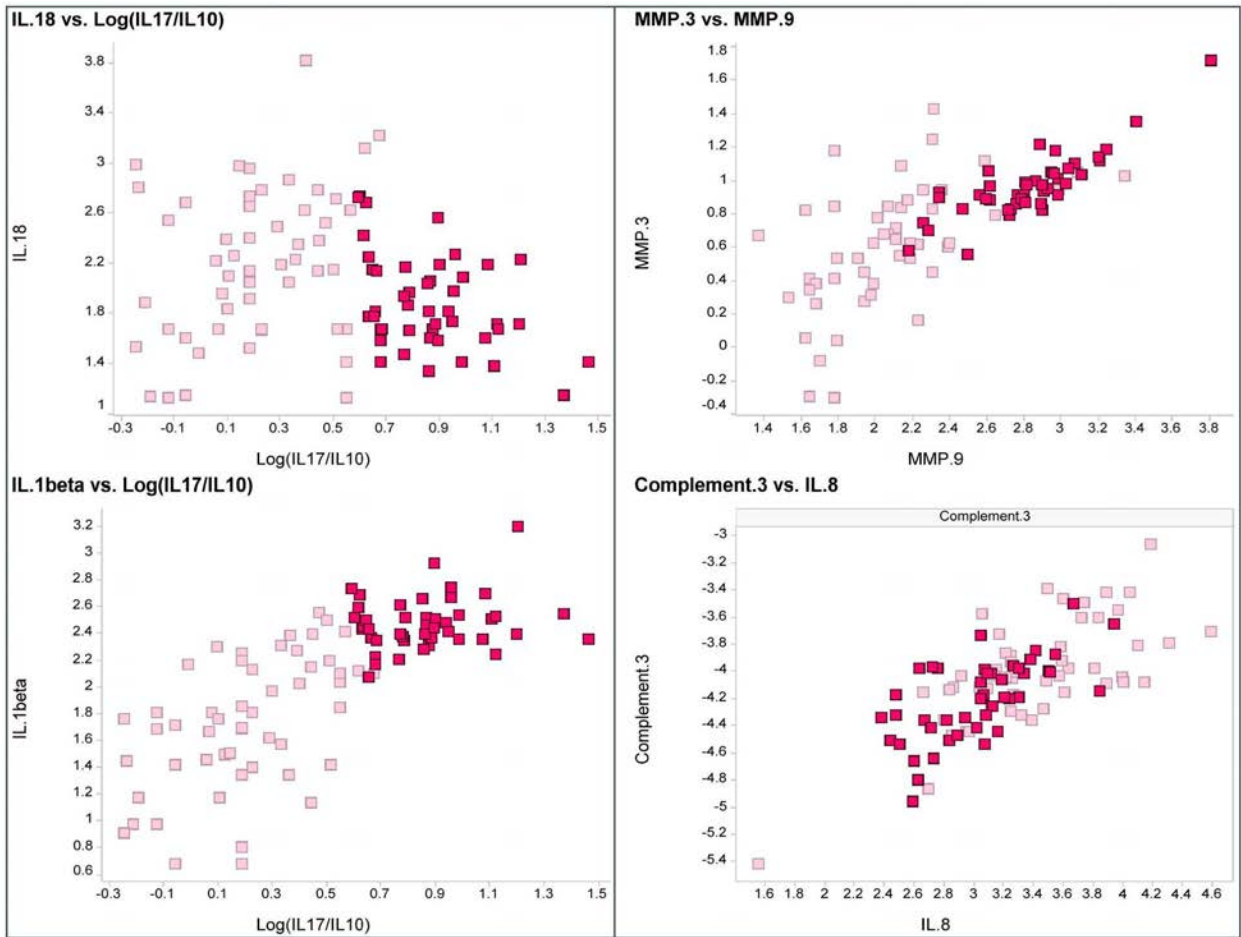


图3A

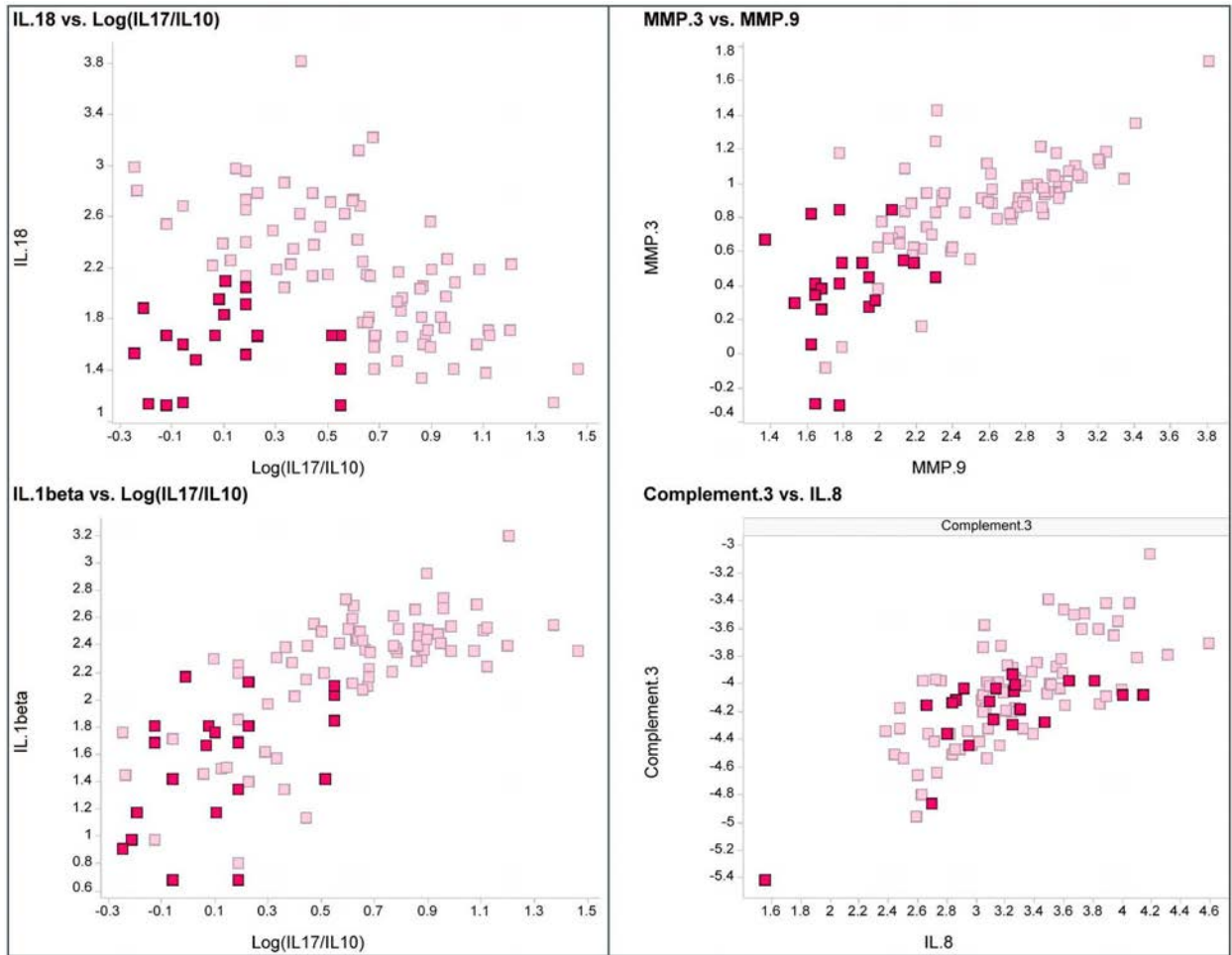


图3B

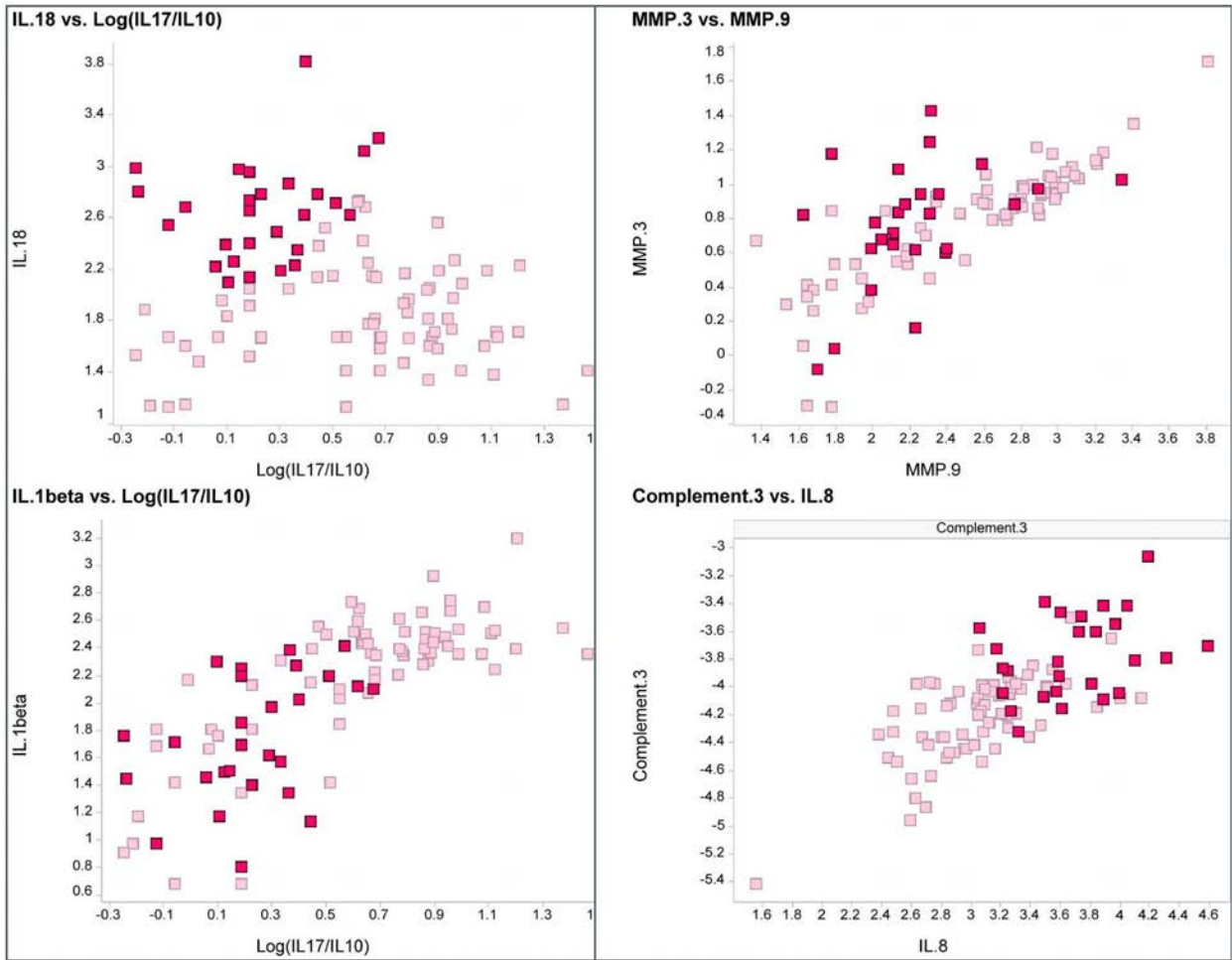


图3C

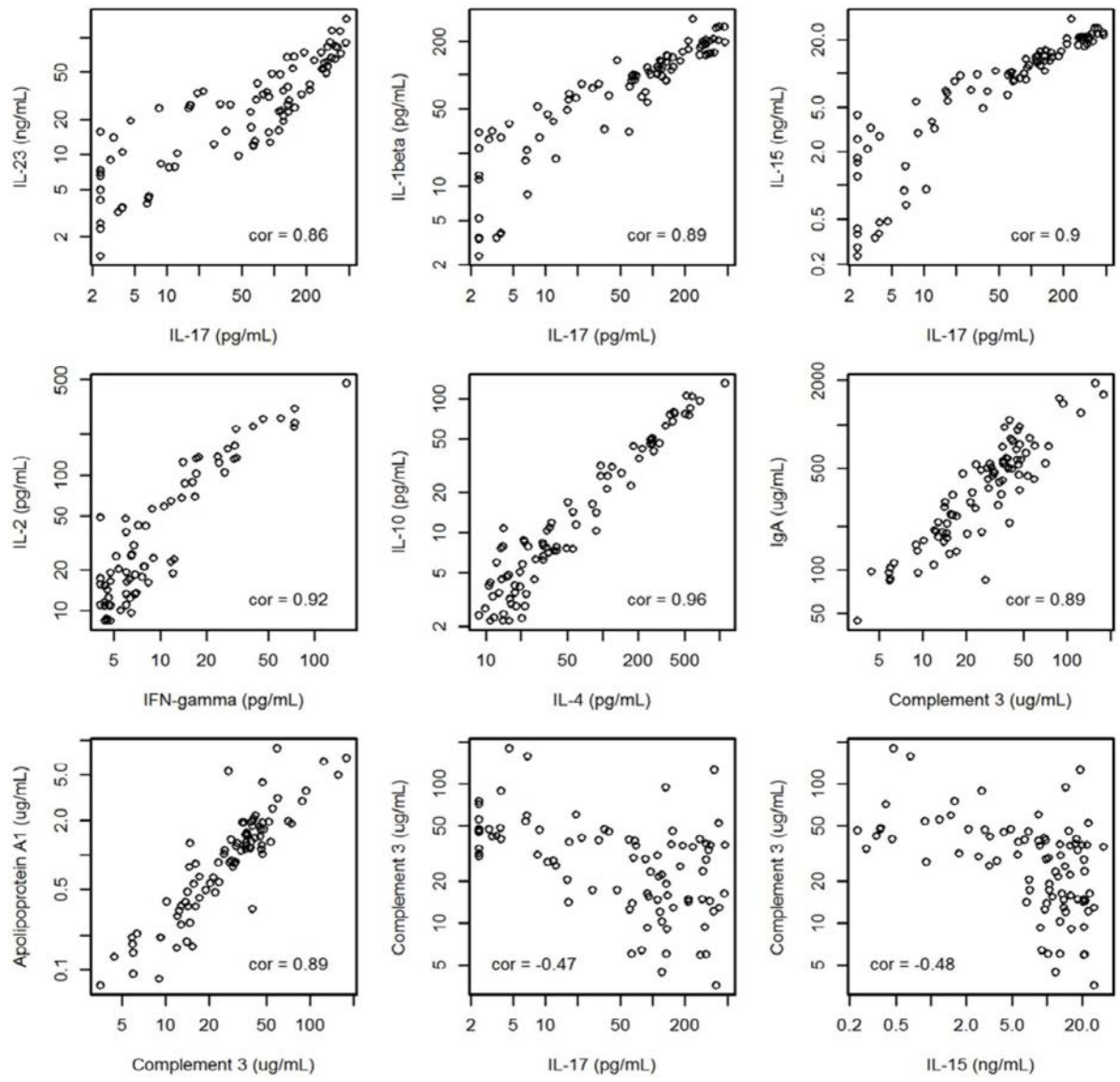


图4

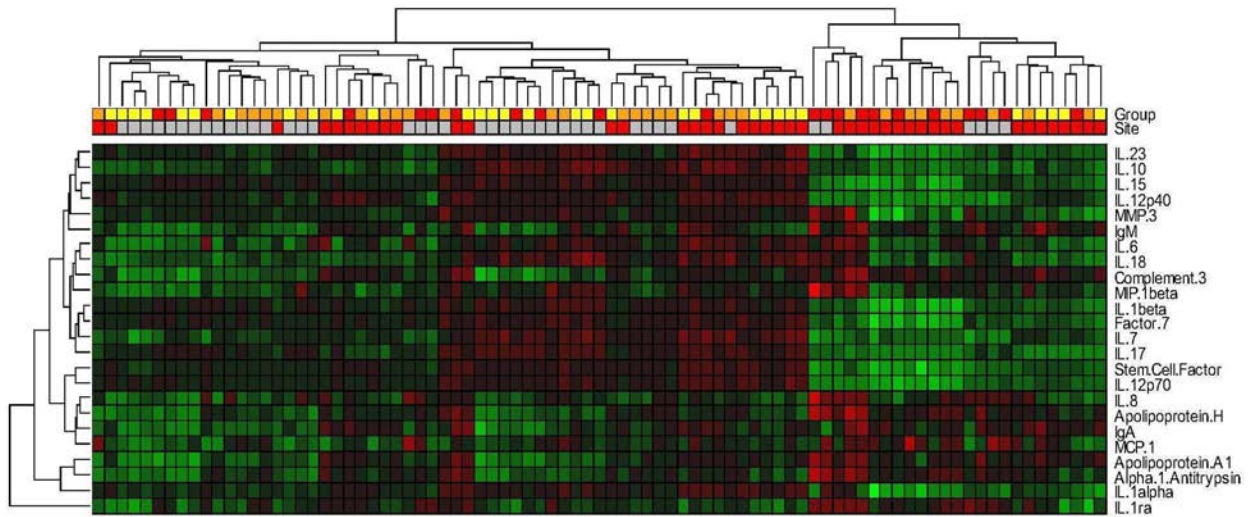


图5

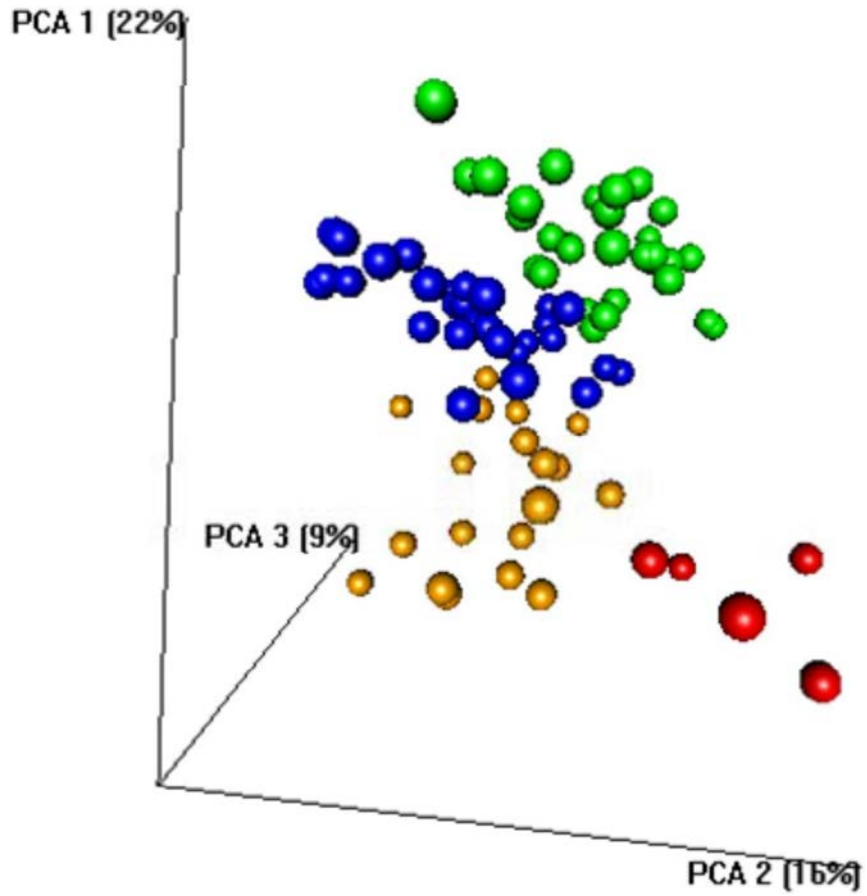


图6A

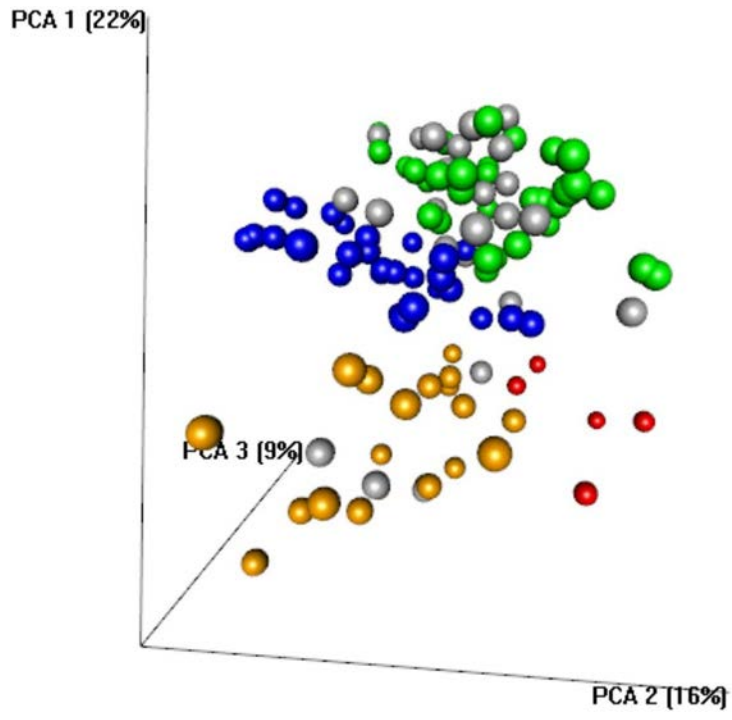


图6B

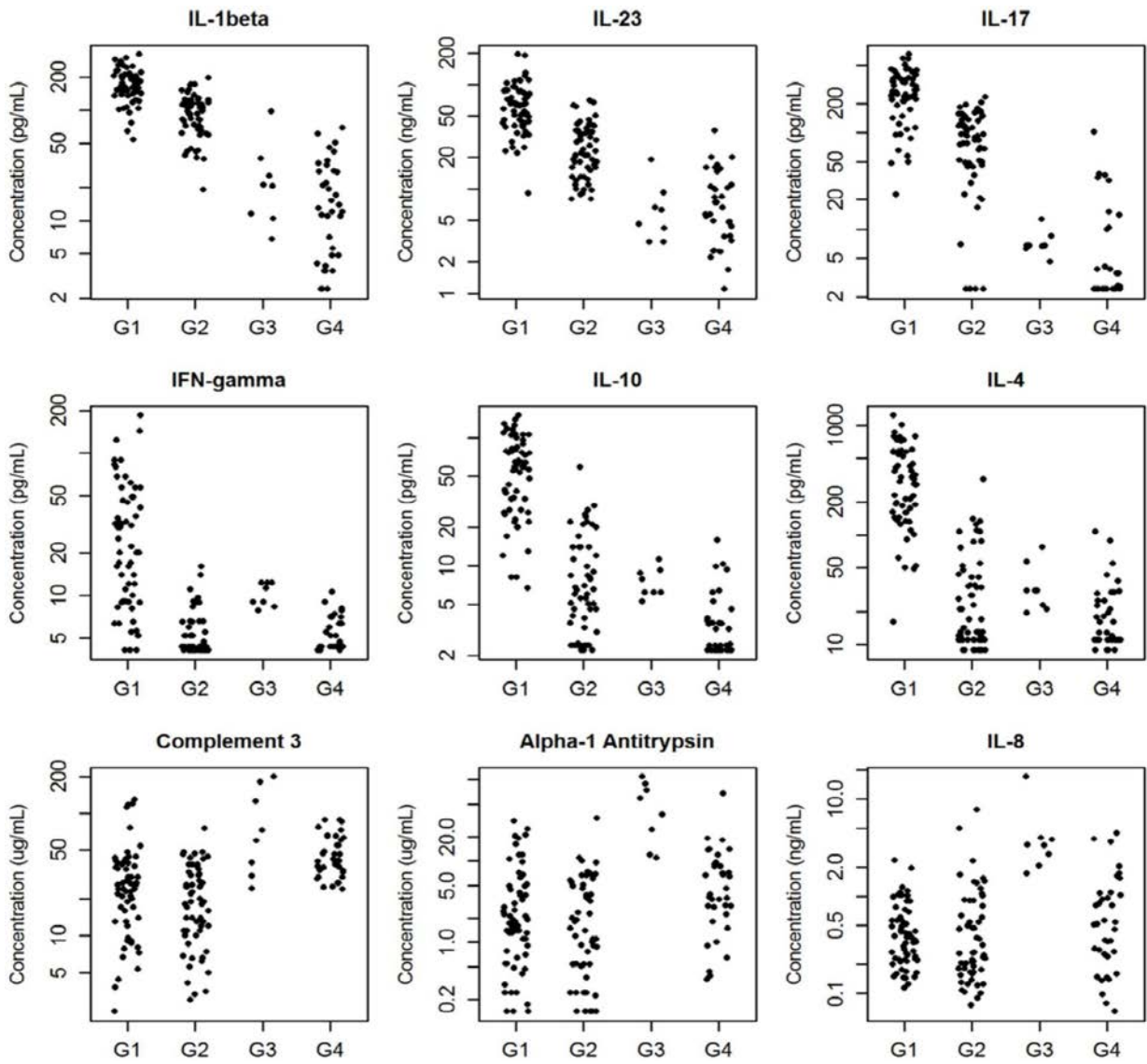


图7

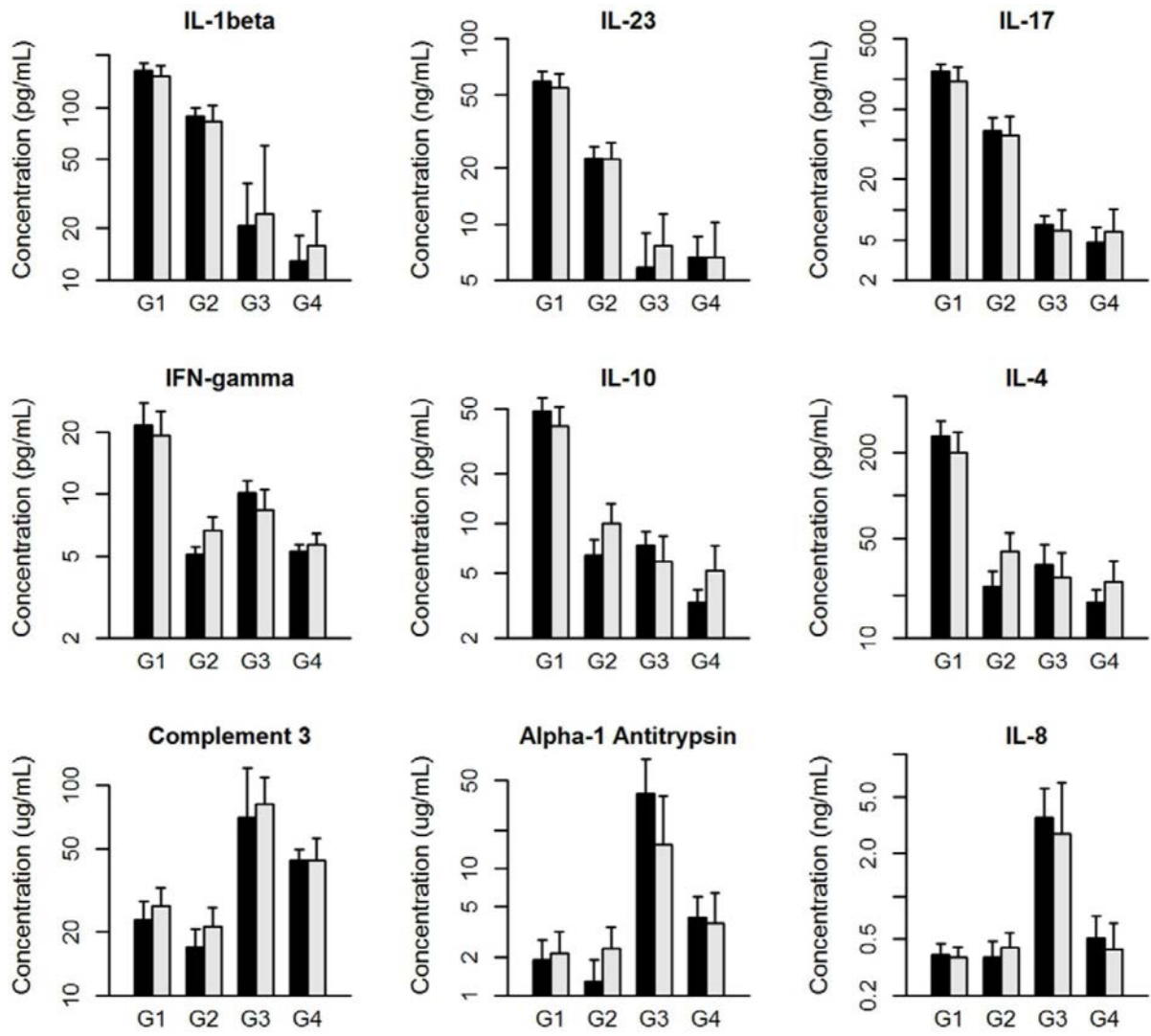


图8

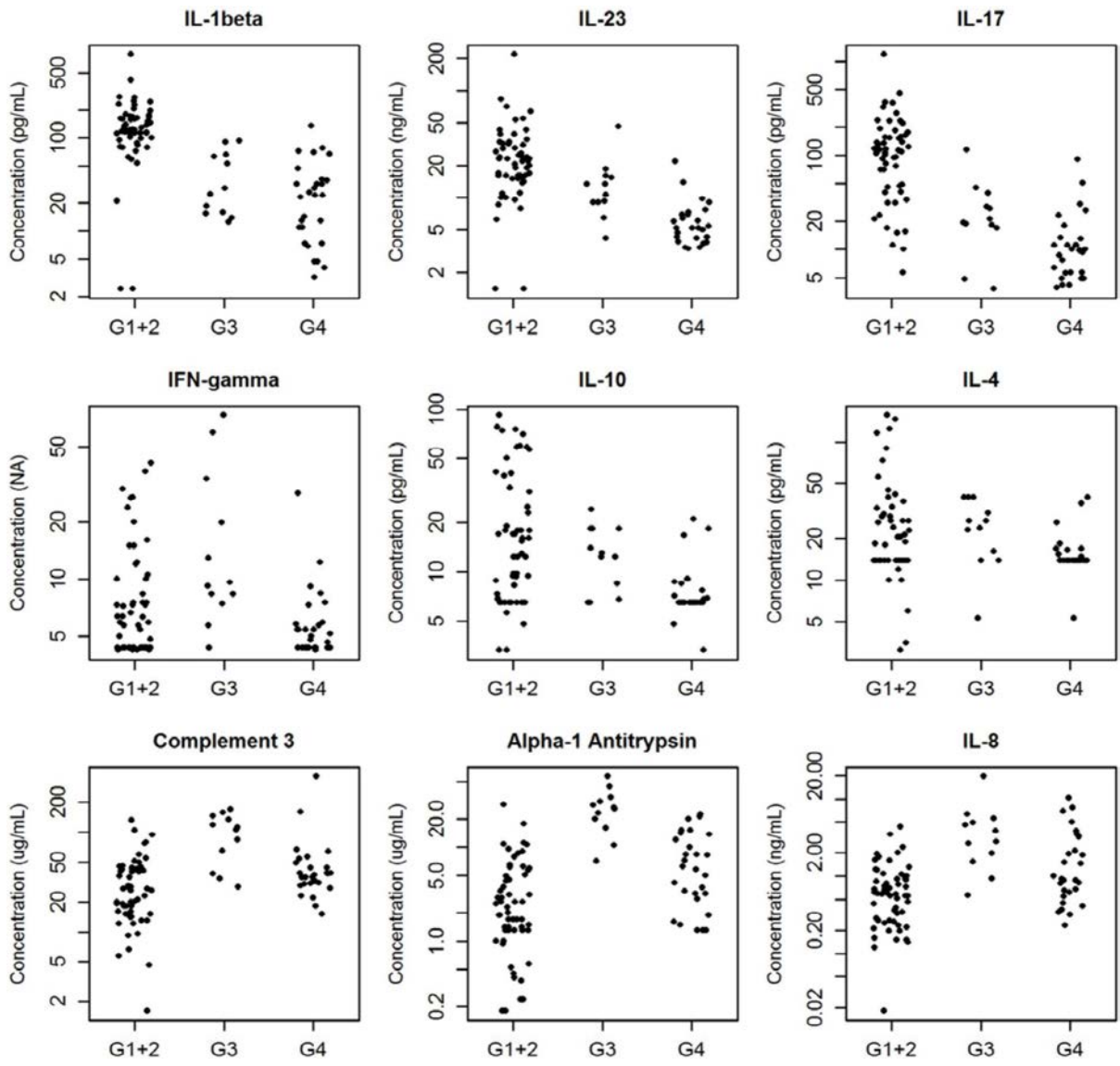


图9

专利名称(译)	对自身免疫状况的分类与管理的方法与仪器		
公开(公告)号	<a href="#">CN107430118A</a>	公开(公告)日	2017-12-01
申请号	CN201480047674.5	申请日	2014-06-27
[标]申请(专利权)人(译)	广东盛泽康华生物医药有限公司		
申请(专利权)人(译)	广东盛泽康华生物医药有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	广东盛泽康华生物医药有限公司		
发明人	黄静峰		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/6863 G01N2800/16		
代理人(译)	张春水		
优先权	61/840450 2013-06-27 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供了一种利用生物标记物诊断自身免疫疾病或炎症的免疫病理学机制的设备和方法。

