



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106062559 A

(43)申请公布日 2016. 10. 26

(21)申请号 201580003884.9

(74)专利代理机构 北京康信知识产权代理有限公司 11240

(22)申请日 2015.06.26

代理人 沈敬亭 李海霞

(30)优先权数据

62/018,081 2014.06.27 US

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.07.06

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2015/038108 2015.06.26

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/200851 EN 2015.12.30

(71)申请人 北京新源长青生物科技有限公司

地址 100085 北京市海淀区上地佳园1号楼裙房2段2层236室

(72)发明人 章京

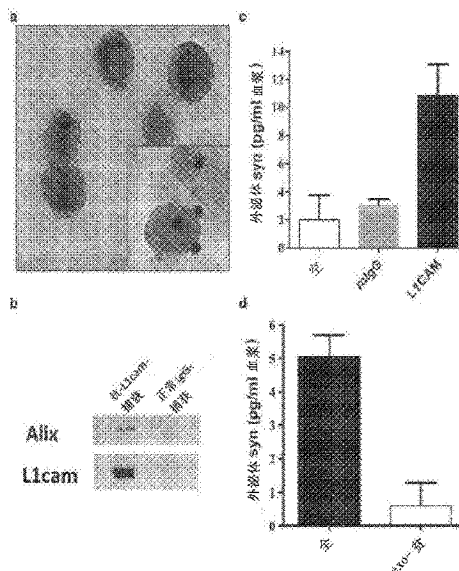
权利要求书1页 说明书8页 附图5页

(54)发明名称

用于富集CNS来源的外泌体的方法

(57)摘要

本发明涉及用于从生物体液如血液、血清、血浆、或唾液富集CNS来源的外泌体的方法。上述方法包括：使含有CNS来源的外泌体的生物体液接触抗L1CAM抗体以形成免疫复合物，通过免疫复合物将在生物体液中的CNS来源的外泌体结合于固相；以及从生物体液分离固相结合的外泌体以富集CNS来源的外泌体。可以测量来自CNS来源的外泌体的生物标记物，用于检测神经系统疾病，区分不同的神经系统疾病，监测疾病进展或客观地评价现有的和未来的医学治疗方法。



1. 一种用于从生物体液中富集CNS来源的外泌体的方法,包括:
 - (a)使含有CNS来源的外泌体的生物体液接触抗L1CAM抗体以形成免疫复合物,其中所述生物体液是血液、血清、血浆、或唾液;
 - (b)通过所述免疫复合物将在所述生物体液中的CNS来源的外泌体结合于固相;以及
 - (c)从所述生物体液中分离所述固相结合的外泌体以富集所述CNS来源的外泌体。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中,将在步骤(a)中的所述抗L1CAM抗体固定在所述固相上。
3. 根据权利要求1所述的方法,进一步包括从所述固相洗脱结合的所述外泌体的步骤(d)。
4. 一种用于在体液中检测神经系统疾病的CNS来源的生物标记物的方法,包括:
 - (a)使生物体液接触抗L1CAM抗体以形成免疫复合物,其中所述生物体液是血液、血清、血浆、或唾液;
 - (b)通过所述免疫复合物将在所述生物体液中的CNS来源的外泌体结合于固相,
 - (c)从所述生物体液中分离结合的所述外泌体,以及
 - (d)确定来自(c)的所述外泌体的所述CNS来源的生物标记物的水平,其中所述生物标记物是核酸或蛋白质。
5. 根据权利要求4所述的方法,其中,所述神经系统疾病是帕金森病,而所述生物标记物是 α -突触核蛋白或磷酸化的 α -突触核蛋白。
6. 根据权利要求4所述的方法,其中,所述神经系统疾病是阿尔茨海默病,而所述生物标记物是tau或磷酸化的tau。
7. 根据权利要求4所述的方法,其中,所述神经系统疾病是朊病毒病,而所述生物标记物是朊病毒蛋白。
8. 一种用于在受试者中检测神经系统疾病的方法,包括以下步骤:
 - (a)使来自受试者的生物体液接触抗L1CAM抗体以形成免疫复合物,其中所述生物体液是血液、血清、血浆、或唾液;
 - (b)通过所述免疫复合物将在所述生物体液中的CNS来源的外泌体结合于固相;
 - (c)从所述生物体液中分离所述固相结合的外泌体以富集所述CNS来源的外泌体,以及
 - (d)确定来自富集的所述CNS来源的外泌体的生物标记物的水平,其中,与来自没有所述神经系统疾病的受试者的对照水平比较,在所述受试者中来自所述CNS来源的外泌体的所述生物标记物的水平升高表明所述受试者患有所述神经系统疾病。
9. 根据权利要求8所述的方法,其中,所述神经系统疾病是帕金森病,而所述生物标记物是 α -突触核蛋白或磷酸化的 α -突触核蛋白。
10. 根据权利要求8所述的方法,其中,所述神经系统疾病是阿尔茨海默病,而所述生物标记物是tau或磷酸化的tau。
11. 根据权利要求8所述的方法,其中,所述神经系统疾病是朊病毒病,而所述生物标记物是朊病毒蛋白。

用于富集CNS来源的外泌体的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及用于在生物体液如血液、血清、血浆、或唾液中富集CNS(中枢神经系统)来源的外泌体(exosome)的方法。本发明进一步涉及用于通过测量在富集自生物体液的CNS来源的外泌体(CNS衍生的外泌体)中的生物标记物水平来确定CNS来源的物质(生物标记物)的水平的方法。

[0002] 美国政府利益的声明

[0003] 在NS057567和NS082137(NINDS部门)以及美国国立卫生研究院(NIH)的AG033398(NIA部门)的支持下进行本文描述的工作。因此,根据所述支持,关于本发明,美国政府可以享有一定的权利。

背景技术

[0004] 迫切需要客观的生物标记物来帮助诊断、鉴别诊断和/或监测CNS疾病的疾病进展,例如,阿尔茨海默病(AD)、帕金森病(PD)、和朊病毒病。到目前为止,表现最好的标记物均基于脑脊液(CSF),其直接接触脑和脊髓,但获得CSF是创伤性操作,其严重限制了它的常规应用。因此,迫切需要CNS疾病的外周生物标记物(例如在血液中)。然而,挑战在于,由于严格调节的各种障碍如血脑屏障,并不能在外周体液中检测所有CNS来源的(derived)材料。例如,在血浆中仅可以容易检测小部分的在人脑/CSF中看到的蛋白质(Pan et al, J. Proteome Res., 13:4535-4545, 2014)。此外,其它器官系统也产生许多CNS来源的材料。这确实是上述事实的根本的基础原因之一:尽管几十年的研究和几百万美元的花费,但针对AD、PD或朊病毒病,还没有确立外周生物标记物。另外,tau和淀粉样蛋白 β (A β)、即涉及AD的蛋白质、和 α -突触核蛋白(α -syn)、即涉及PD的关键蛋白质,的目前的测定均不能区分CNS来源的部分与那些由其它系统产生的部分。例如,血液成分(Barbour et al, Neurodegener Dis., 5(2):55-9, 2008)和肌肉(Nagao et al, Muscle&nerve., 22:61-70, 1999),其具有比CNS大得多的体积质量。换句话说,当通过现有的技术加以测量时,外周输入会显著影响CNS疾病的信号。

[0005] 因此,迫切需要提供一种方法来富集CNS来源的生物标记物,其是本发明的焦点。

附图说明

[0006] 图1示:(a)抗L1CAM(一种神经系统标记物)捕获的血浆外泌体(插图:L1CAM的免疫金标记)的电子显微照片;(b)通过抗L1CAM捕获、或正常小鼠IgG捕获,Alx(一般外泌体标记物)和L1CAM的Western印迹;(c)相比于在正常小鼠IgG捕获(mIgG)或“空”(无珠“捕获”)样品中的水平,在抗L1CAM-捕获血浆外泌体中的 α -syn(syn)水平;(d)利用贫外泌体血浆(exosome-poor plasma)与全血浆获得的 α -syn(syn)水平。

[0007] 图2示:在临床样品中 α -syn浓度的评估。利用Luminex来测量 α -Syn浓度并对在从血浆中分离的含有L1CAM的外泌体中的 α -syn(a)、或在血浆中的总 α -syn(b)进行比较。

[0008] 图3A和3B示:用于PD诊断的 α -syn的ROC(受试者工作特征(Receiver Operating

Characteristics))分析。图3A示出,在整个组群(267位PD患者和215位健康对照)中,针对PD与对照,血浆外泌体 α -syn提供0.654的AUC(曲线下面积)(敏感性(灵敏度)=70.1%,特异性=52.9%)。图3B示出,在可获得CSF样品的受试者的子集中(100位PD和100位对照),CSF总 α -syn提供0.724的AUC(敏感性=76.8%,特异性=53.5%),即,L1CAM富集的外泌体标记物(α -syn)的性能和通过测量CSF α -syn所提供的性能一样好。图3C示出,在PD患者中观测到($r=0.176, p=0.004$, Pearson相关)在血浆外泌体 α -syn和疾病严重性之间的显著相关性,其中上述疾病严重性以UPDRS(统一帕金森病评分量表)运动评分作为指标的。

[0009] 图4A和4B示:在将 ^{125}I 标记的tau注入脑室内(intracerebroventricule)以后的2、5、10、20和60分钟时在脑中(图4A)和血浆中(图4B)的放射性的水平。

[0010] 图4C示:在外泌体部分(exo)和在上清部分(sup)中的放射性Tau(cpm/ μI 血浆)。示出的数据是来自5只小鼠的平均值 \pm SD。CPM:每分钟计数。

具体实施方式

[0011] 定义

[0012] 如在本文中所使用的“结合对”是指被吸引到彼此和特异性地结合于彼此的两种分子。结合对的实例包括但不限于抗原和针对上述抗原的抗体、配体和其受体、核酸互补链、生物素和抗生物素蛋白、生物素和链霉亲和素、植物凝集素(凝集素,lectin)和碳水化合物。优选的结合对是生物素和链霉亲和素、生物素和抗生物素蛋白、荧光素和抗荧光素、异羟洋地黄毒苷元(digoxigenin)/抗异羟洋地黄毒苷元。

[0013] 如在本文中所使用的“CNS来源的外泌体”是指源自CNS,即,脑和/或脊髓的含有外泌体的物质(如蛋白质和核酸)。

[0014] 如在本文中所使用的“外泌体(exosome)”是40-100nm胞外囊泡,其释放自众多的细胞类型,并且执行不同的细胞功能,包括细胞间通讯、抗原呈递、和蛋白质以及核酸的转移,例如mRNA和miRNA。

[0015] 如在本文中所使用的,“固定”是指试剂被固定到固体表面。当试剂被固定到固体表面时,它是非共价结合于或共价结合于表面。

[0016] 如在本文中所使用的“L1CAM”是指由神经系统表达的细胞粘附分子。L1CAM是跨膜蛋白质,它是200-220kDa的神经元细胞粘附分子,L1蛋白家族的成员,并且参与除涉及治疗耐受性癌症的细胞迁移(在这种情况下,癌细胞是不相关的)之外的轴突导向。L1CAM还被指定为CD171(分化簇171)。

[0017] 本发明人已经发现,通过尚未确定的机制,CNS来源的外泌体可以跨越血脑屏障的多个层。本发明人已经发现,可以在血液和其它外周体液中体内检测CNS来源的外泌体,其携带独特的、疾病特异性的生物标记物。

[0018] 本发明人已经发现用于在生物体液如血液、血清、血浆、唾液、或尿液中分离和富集源自CNS的外泌体的方法。本发明人还已经发现,可以由生物体液中的源自CNS的富集的外泌体来检测和/或量化CNS来源的神经系统生物标记物,而上述结果可用于检测神经系统疾病如AD、PD、和朊病毒病。还可以将这些基于外周体液的但是CNS特异性的标志物用于鉴别诊断,监测疾病进展和/或客观地评价CNS疾病的治疗效果。

[0019] 本发明涉及用于从受试者的生物体液富集CNS来源的外泌体的方法。上述方法包

括以下步骤:(a)使含有CNS来源的外泌体的生物体液接触抗L1CAM抗体以形成免疫复合物;(b)通过免疫复合物,将在生物体液中的CNS来源的外泌体结合于固相;以及(c)从生物体液中分离固相结合的外泌体以富集CNS来源的外泌体。在一种实施方式中,将在步骤(a)中的抗L1CAM抗体固定在固相上。适用于本发明的生物体液包括血液、血清、血浆、唾液、和尿液。优选的生物体液是血液、血清、血浆、或唾液。

[0020] 为了特异性地富集源自生物体液中的CNS的外泌体,本发明使用免疫亲和捕获方法来从受试者的生物体液分离含有L1CAM的外泌体。L1CAM是在源自CNS的外泌体的表面上的标记物(Simpson et al., Journal of Extracellular Vesicles 1:18374, 2012)。神经系统特异性地表达L1CAM;它在其它器官系统(到目前为止报告的),包括血细胞和血小板中不表达。例如,抗L1CAM抗体是特异性的并且不结合于免疫系统的NK和NKT细胞,如同NCAM一样(Fiandaca et al., Alzheimer's Dementia, S1552-5260(14)02469-8, 2014),因而不会非特异性地捕获源自免疫细胞或其它器官系统的外泌体。

[0021] 用来捕获CNS来源的外泌体的抗L1CAM抗体可以是多克隆抗体、单克隆抗体、单链抗体、或含有L1CAM抗原结合域的抗体片段如Fab或F(ab')₂片段。

[0022] 抗L1CAM抗体可以被固定在固相上,或者当接触生物体液中的CNS来源的外泌体以形成免疫复合物时,它可以在液相中,然后将抗L1CAM结合的外泌体结合于固相,其是借助于能够捕获抗L1CAM的试剂加以固定。

[0023] 在一种优选实施方式中,当接触生物体液时,将抗L1CAM结合于固相。用来将试剂固定于固相的方法在免疫化学中是常见的并且涉及在固相和试剂之间共价、疏水性或静电键的形成。可以将抗L1CAM直接固定在固相上。或者,可以通过结合对将抗L1CAM间接固定在固相上。例如,可以通过吸附到固体表面或通过共价结合于涂布在固体表面上的氨基丙基硅烷来首先固定结合对的第一成员(例如,链霉亲和素、抗荧光素等)。然后可以通过生物素-链霉亲和素或荧光素和抗荧光素(结合对)的结合,将用结合对的第二成员(例如,生物素、荧光素等)标记的抗L1CAM结合于固体表面。

[0024] 在借助于固相并通过L1CAM和抗L1CAM免疫复合物来特异性地捕获CNS来源的外泌体以后,从生物体液分离外泌体以富集CNS来源的外泌体。可以直接使用固相结合的外泌体或者可以将它们从固相洗脱,供进一步使用和/或测量。

[0025] 如通过电子显微镜或其它测量所证明的,通过本发明的免疫捕获方法产生的在生物体液中的含有L1CAM的外泌体显示具有与通过其它外泌体分离技术(包括目前的“金标准”,超速离心加密度梯度)所获得的类似的质量。因为我们的步骤不涉及超速离心,所以本发明的方法更加实用于常规临床检查(在进一步优化以后)。此外,超速离心并不提供仅源自CNS的外泌体的特异性。

[0026] 本发明人已经发现,在生物体液中的CNS来源的外泌体中含有的生物标记物的测量结果可用于检测神经系统疾病。生物标记物可以是蛋白质或核酸如DNA或RNA。例如,在CNS来源的外泌体中的 α -syn或磷酸化 α -syn(例如,丝氨酸129- α -syn,在残基丝氨酸-129或pS129处 α -syn的磷酸化)是用于PD的生物标记物。在CNS来源的外泌体中,tau或酸化tau,例如,p-tau 181,是AD的生物标记物。在CNS来源的外泌体中的朊病毒蛋白或磷酸化朊病毒蛋白是朊病毒病如克-雅病(Creutzfeldt-Jakob Disease)的生物标记物。

[0027] 在CNS来源的外泌体中含有的作为AD的生物标记物的RNA包括那些RNA,其与基因

UBAP2L、YBX1、SERF2、UBE2B、RPL10A、H3F3AP4、PPP2CA、NMD3、RNF7、RPLP0、SPARC、WTAP、HNRNPU、LINC00265、INMT、SLC35E2、CT60、SYNCRIP、RGS2、SMC6、ARSA、SPDYE7P、SMIM17、TRAF3IP2-AS1、KCNC2、SLC24A1、HLCS、GOSR1、MN1、MGAT5、NBPF14、FBXO31、WDR52、TBC1D2B、ZNF648、NBPF16、PAGR1、AQP2、PRKCI、SCN2B、DPYSL3、TMM26、TSPAN11、ELL2、FAM186A、CD59、THSD4、GOLGA6B、ARHGEF5、PKD1、BPTF、FLG、POM121L10P、NXPH3、H3F3A、SH3TC2、GGCX、和 GREB1 关联。

[0028] 在 CNS 来源的外泌体中含有的作为 PD 的生物标记物的 RNA 包括那些 RNA，其与基因 BLOC1S1、UBE2L3、RNF149、FAM89B、LCE6A、NT5DC2、PPP1CC、CCL5、HDLBP、HNRNPAB、NXN、SLC9A4、EIF2AK1、PAPOLA、TRIM50、SIX4、RAB3IP、VANGL2、DHRSX、FOXP4、SYNM、ZNF543、ATF6、LOC100132832、和 BLOC1S1-RDH5 关联。

[0029] 当被捕获在固相上时，或在从固相洗脱以后，可以在富集的外泌体中测量蛋白质生物标记物。对于被暴露在外泌体的表面上的蛋白质生物标记物，可以测量它而无需外泌体裂解。对于包含在外泌体内的蛋白质生物标记物，可以在外泌体裂解以后测量它。可以通过本领域技术人员已知的任何方法来测量蛋白质生物标记物。免疫测定如 ELISA、Luminex、和最近的 Quanterix 是用于测量蛋白质生物标记物的优选方法。

[0030] 对于核酸生物标记物，在测量核酸生物标记物以前，需要裂解捕获的外泌体。可以通过本领域技术人员已知的任何方法，例如，DNA 或 RNA 探针，或任何已知的测序技术，来检测核酸。

[0031] 本发明还涉及用于在受试者中检测神经系统疾病或用于鉴别诊断的方法。上述方法包括以下步骤：(a) 使来自受试者的生物体液接触抗 L1CAM 抗体以形成免疫复合物，其中生物体液是血液、血清、血浆、唾液、或尿液；(b) 通过免疫复合物，将在生物体液中的 CNS 来源的外泌体结合于固相；(c) 从生物体液分离固相结合的外泌体以富集 CNS 来源的外泌体；(d) 确定来自富集的外泌体的生物标记物的水平，其中，与来自正常受试者（用于诊断）或来自患有另一种神经系统疾病的受试者（用于鉴别诊断）的对照水平比较，在受试者中来自 CNS 来源的外泌体的生物标记物的水平升高表明受试者患有神经系统疾病（例如，AD、PD 或 朊病毒病）。在一种实施方式中，生物标记物是 α -syn 或磷酸化 α -syn 以及神经系统疾病是 PD。在另一种实施方式中，生物标记物是 tau、磷酸化 tau 或 A β 物质以及神经系统疾病是 AD。在另一种实施方式中，生物标记物是 朊病毒蛋白以及神经系统疾病是 朊病毒病。

[0032] 本发明进一步涉及用于在受试者中监测神经系统疾病的进展的方法。上述方法包括以下步骤：(a) 在不同时间点（例如，在时间零点、6 个月、1 年、或 2 年时）从受试者获得生物体液样品，其中生物体液是血液、血清、血浆、唾液、或尿液；(b) 使每个样品接触抗 L1CAM 抗体以形成免疫复合物；(c) 通过免疫复合物，使在每种生物体液中的 CNS 来源的外泌体结合于固相；(d) 从每个样品分离固相结合的外泌体以富集 CNS 来源的外泌体；(e) 在来自每个样品的富集的外泌体中确定生物标记物的水平，其中在稍后时间点的样品中的水平进一步升高表明疾病是进行性的。在一种实施方式中，生物标记物是 α -syn 或磷酸化 α -syn 以及神经系统疾病是 PD。在另一种实施方式中，生物标记物是 tau 或磷酸化 tau 或 A β 物质以及神经系统疾病是 AD。在另一种实施方式中，生物标记物是 朊病毒蛋白或磷酸化 朊病毒蛋白以及神经系统疾病是 朊病毒病。

[0033] 本发明进一步涉及用于在受试者中监测神经系统疾病的药物治疗的方法。上述方

法包括以下步骤:(a)在药物治疗前后,从受试者获得生物体液样品,其中生物体液是血液、血清、血浆、唾液、或尿液;(b)使每个样品接触抗L1CAM抗体以形成免疫复合物;(c)通过免疫复合物,将在每种生物体液中的CNS来源的外泌体结合于固相;(d)从每个样品分离固相结合的外泌体以富集CNS来源的外泌体;(e)在来自每个样品的富集的CNS来源的外泌体中确定生物标记物的水平,其中在药物治疗以后样品中的水平降低表明药物治疗是有效的。在一种实施方式中,生物标记物是 α -syn或磷酸化 α -syn以及神经系统疾病是PD。在另一种实施方式中,生物标记物是tau或磷酸化tau或A β 物质以及神经系统疾病是AD。在另一种实施方式中,生物标记物是朊病毒蛋白或磷酸化朊病毒蛋白以及神经系统疾病是朊病毒病。

[0034] 本发明的受试者是哺乳动物受试者如人、马、和狗,其中人是优选的受试者。

[0035] 以下实施例进一步说明本发明。这些实施例仅旨在说明本发明而不应被解释为限制性的。

[0036] 实施例

[0037] 实施例1. 外泌体分离

[0038] 按照修改自Tauro et al(Methods 56:293-304,2012)的协议并利用抗体包被的超顺磁微珠,从小鼠或人血浆分离外泌体。简要描述:将10 μ g抗L1CAM抗体(克隆UJ127, Abcam,Cambridge,MA,USA)、或抗CD63抗体(克隆H5C6,BD Biosciences,San Diego,CA, USA)、或正常小鼠IgG(Santa Cruz Biotechnology,Dallas,TX,USA)(作为阴性对照)涂布在一组(1mg)M-270环氧珠上,其中根据制造商的说明,利用DYNABEADS[®] 抗体偶联试剂盒(Life Technologies,Grand Island,NY,USA)。在37 $^{\circ}$ C下快速解冻(在2分钟内)以后,在2,000 x g下离心血浆样品(>300 μ L)15分钟,接着在12,000 x g下离心30分钟,然后用磷酸盐缓冲盐水(PBS)(pH7.4)1:3. 稀释上清。在4 $^{\circ}$ C下,借助于温和旋转,温育一组抗体包被的珠和900 μ L稀释血浆约24小时。然后用1mL的0.1%牛血清白蛋白(BSA)/PBS(pH7.4)洗涤珠四次并转移到新管。

[0039] 借助于60 μ L的0.1%BSA/PBS(pH7.4)和固定缓冲液(4%多聚甲醛/5%戊二醛)的1:1混合物,从珠洗脱外泌体,用于电子显微镜检测。或者,在室温下,借助于轻轻摇动,通过在0.1%BSA/PBS(pH7.4)中在110 μ L的1%Triton X-100加10%蛋白酶抑制剂混合物(P2714,Sigma-Aldrich,St Louis,MO,USA;在10mL的H₂O中制备)中温育珠1小时来裂解外泌体,用于Luminex测量和其它分析。

[0040] 分批提取在临床血浆样品中的外泌体,并将PD和对照样品分配到每个批次。将汇集自30个健康对照的两个参比血浆样品加入每一批次以有助于消除批次变化。

[0041] 为了质量控制和测定发展,还在PBS中稀释一些参比血浆样品(汇集自健康年老对照),然后经受超速离心(100,000 x g,3小时,在4 $^{\circ}$ C下),然后再悬浮沉淀物(peIlet),加载到OptiPrep[™]密度梯度,并在4 $^{\circ}$ C于100,000 x g下离心18小时,以获得外泌体,如在Tauro et al(上述)中描述的。在两步超速离心(180,000 x g,3小时,在4 $^{\circ}$ C下, x 2)以后,通过除去外泌体来制备贫外泌体血浆样品。

[0042] 实施例2. 来自人血浆的抗L1CAM捕获的外泌体的表征

[0043] Luminex测定

[0044] 借助于已建立的Luminex协议(Brain 133:713-726,2010),100 μ L的外泌体制备品(提取自300 μ L血浆)用来量化 α -syn。

[0045] 电子显微镜检查

[0046] 将以1:1与4%(v/v)多聚甲醛和5%(v/v)戊二醛混合的分离的外泌体制备品分层在福尔姆华膜(formvar)/碳涂布的300目铜网格(PolySciences, Warrington, PA, USA)上,并允许在室温下干燥20分钟。为了直接成像,然后用水洗涤网格两次,时间为两分钟,接着在室温下用在水中的2%(w/v)乙酸双氧铀(Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA)染色20分钟。为了免疫金染色,在利用1%BSA/5%正常山羊血清/PBS缓冲液封闭30分钟以前,用PBS洗涤网格。用PBS再洗涤网格,在室温下在封闭缓冲液中在有或没有1:50稀释度的抗L1CAM抗体(abcam)的情况下温育两小时,然后在室温下用18-nm金结合的山羊抗小鼠IgG抗体(abcam)温育60分钟。再次洗涤网格并放置在室温下以在用乙酸双氧铀显影(contrast)以前干燥。用JEOL(Peabody, MA, USA)1230透射电子显微镜进行成像。

[0047] Western印迹分析

[0048] 遵循标准协议,进行Western印迹。用Laemmli样品缓冲液来溶解外泌体样品(~10 μg蛋白质)并在转移到聚偏氟乙烯膜以前在1D SDS-PAGE凝胶上分离。借助于以下一抗:小鼠抗人L1CAM(Abcam, 1:500)和小鼠抗人Alix(Cat#ABC40, Millipore, Billerica, MA, USA; 1:1000)来探测上述膜。

[0049] 为了检查L1CAM在人血细胞中的表达,使用来自红细胞和血小板的细胞裂解液(100 μg蛋白质),以及连同人大脑皮质(100 μg蛋白质)匀浆液作为对照,用抗L1CAM抗体来探测膜。

[0050] 结果

[0051] 图1(a)示:抗L1CAM捕获的血浆外泌体的电子显微照片(插图:L1CAM的免疫金标记)。图1(b)的Western印迹表明,Alix,一种常见的外泌体标记物,和L1CAM,借助于抗L1CAM捕获来富集,但借助于正常IgG捕获则不能富集。

[0052] 图1(c)表明:在抗L1CAM捕获的血浆外泌体中的α-syn水平高于在正常小鼠IgG捕获(mIgG)的血浆外泌体或“空捕获”(无珠)血浆外泌体中的水平。在抗L1CAM捕获血浆外泌体中的α-syn信号不大可能来自于游离的α-syn污染,这是因为来自正常小鼠IgG捕获的或“空捕获”样品的信号是最小的。

[0053] 为了进一步证实α-syn信号是来自外泌体,利用超速离心来产生贫外泌体血浆。相比于常规血浆,在此贫外泌体血浆中在含有L1CAM的外泌体中的α-syn信号被降低超过10倍(图1d)。

[0054] 还检查了在血细胞中的L1CAM表达,并且结果表明,在红细胞和血小板中L1CAM是不可检测的。

[0055] 实施例3. 在临床样品中血浆外泌体α-syn的评估

[0056] 收集一大队列的267位PD和215位年龄和性别匹配的健康对照血浆样品并利用Luminex测定(见实施例1)来测量在血浆含有L1CAM的外泌体中以及在全血浆中它们的α-syn浓度。结果示于图2。图2a表明,相比于健康对照,在PD患者中,在血浆含有L1CAM的外泌体中α-syn浓度显著较高($p < 0.0001$)。

[0057] 图2b示出,在PD与对照中,总血浆α-syn浓度没有显著差异($p = 0.134$, t检验)。

[0058] 为了进一步评估在含有L1CAM的外泌体中血浆α-syn有助于PD诊断的潜力,在267位PD患者和215位健康对照中生成用于分析物的ROC(受试者工作特征)曲线,以表征在区别

PD与健康对照受试者中它们的敏感性(灵敏度)和特异性。发现血浆外泌体 α -syn的性能是适度的(AUC=0.654,敏感性=70.1%,特异性=52.9%)(图3A)。在受试者的子集中还借助于可获得的CSF样品(100位PD和100位对照)进行ROC分析;图3B表明,CSF总 α -syn提供0.724的AUC(敏感性=76.8%,特异性=53.5%)。以上结果表明,比较血浆外泌体 α -syn与CSF总 α -syn(其是到目前为止描述的PD的最好的分子生物标记物(MoIlenhauer et al., *Exp Neuro* 213(2):315-325, 2008)),已实现基本等效的诊断性能(敏感性和特异性)。

[0059] 另外,检查了在血浆外泌体 α -syn和PD疾病严重性之间的相关性。观测到在含有L1CAM的外泌体中的血浆 α -syn($r=0.176, p=0.004$, Pearson相关;见图3C)或血浆外泌体(exo)/总 α -syn比率($r=0.130, p=0.035$)与UPDRS运动评分之间的显著相关性。结果表明,血浆外泌体 α -syn显示与疾病严重性(UPDRS运动)的显著的、虽然微弱的、相关性,这表明血浆外泌体 α -syn可用于监测或预测疾病进展。为此,应当强调的是,几个组没有观测到CSF α -syn与PD严重性的这种相关性(例如, Hong et al, *Brain*, 133:713-26, 2010)。因此,在与PD严重性关联方面以及还可能在与PD进展关联方面,血浆外泌体 α -syn的性能优于CSF α -syn。

[0060] 实施例4. 在抗L1CAM富集的外泌体中tau的测量

[0061] 对小鼠脑室内注射 ^{125}I -标记tau2N4R(I-tau)。然后在注射后的2、5、10、20和60分钟时收集脑和血浆。利用 γ 计数器来确定在脑(图4A)和血浆(图4B)中放射性的水平。结果表明,tau被从脑转运到血液。

[0062] 在注射后60分钟时收集血液,接着,从无血小板血浆提取含有L1CAM的外泌体(见实施例1)。在全血浆、外泌体部分(Exo)、和少外泌体(exosome-less)部分(在免疫亲和捕获以后的上清)中测量放射性的水平。示出在外泌体部分中和在上清部分中(图4C)放射性tau(cpm/ μL 血浆)的结果。结果表明,tau,用于AD的关键标记物,相对于对照外泌体(空外泌体或小鼠IgG抗体连接的外泌体),在通过抗L1CAM所富集的外泌体中可很好地检测。在人血液中tau物质也是可容易检测的(数据未示出)。

[0063] 实施例5. 在人唾液中检测的L1CAM

[0064] 按照由Devic et al(*Brain*.134(Pt 7):e178.doi:10.1093brain/awr015.Epub 2011Feb 24)描述的程序来收集来自正常受试者的人唾液。简要地,在9-11AM之间,从没有预先存在的健康担忧的个体收集唾液样品。为了除去不溶性物质和碎片,在4 $^{\circ}\text{C}$ 和15,000g下离心样品15分钟。将10%(v/v)蛋白酶抑制剂混合物立即加入上清,然后借助于20%(v/v)的TCA在冰上沉淀蛋白质1小时。在4 $^{\circ}\text{C}$ 和15,000g下离心混合物15分钟。除去上清并用冰冷的丙酮洗涤沉淀物两次。借助于BCA蛋白测定试剂盒(Thermo Scientific Pierce)并采用BSA作为标准来评估蛋白质浓度,然后将样品存储在-20 $^{\circ}\text{C}$ 下直至分析。依据在实施例1中描述的协议,借助于抗L1CAM抗体涂覆的珠或正常小鼠IgG涂覆的珠(阴性对照)来温育上清。

[0065] 依据在实施例2中描述的协议,裂解捕获的外泌体,用于Western印迹分析。借助于小鼠抗人Alix来探测膜。Alix(一种常见的外泌体标记物)在由抗L1CAM捕获的外泌体中是明显可检测的,并具有95千道尔顿(kDa)的预期分子量,但在由正常小鼠IgG(阴性对照)捕获的外泌体中是不可检测的。除分别具有50kDa和25kDa的适当分子量的人IgG的已知重链和轻链以外,不存在其它非特异性带。

[0066] 在抗L1CAM捕获的外泌体中,通过如在实施例3描述的但针对在人唾液中的 α -syn

测定所优化的Luminex方法(Devic et al Brain 2011Jul;134(Pt 7):e178.doi 10.1093/brain/awr015.Epub 2011Feb 24), α -syn也是可检测的。

[0067] 实施例6.提取自L1CAM外泌体的核酸

[0068] 为了分离CNS来源的核酸,依据在实施例1中描述的方法,从总共72位受试者的血浆(24位患有AD,24位患有PD以及24位是年龄匹配的健康对照)中富集L1CAM-外泌体。在RNAseq分析以前,将每个类别(AD、PD和正常对照)分成三个小组(pool)(n=8/组)。

[0069] 核酸提取自L1CAM外泌体。按照单细胞RNA seq协议(Tang et al, Nat. Protoc. 5, 516-535, 2010),将提取的RNA反转录为cDNA。借助于通用引物,将这些cDNA预扩增到约50-80纳克。

[0070] 在借助于Covaris S2系统的cDNA片段化以后,借助于DNA文库构建试剂盒(NEB# E7370L),将片段化cDNA应用于文库构建体。

[0071] 通过比较在3个小组中确定的基因,在AD样品中,但不在PD或健康对照样品中存在58种唯一识别的基因。这58种基因是:UBAP2L、YBX1、SERF2、UBE2B、RPL10A、H3F3AP4、PPP2CA、NMD3、RNF7、RPLP0、SPARC、WTAP、HNRNPU、LINC00265、INMT、SLC35E2、CT60、SYNCRIP、RGS2、PSMC6、ARSA、SPDYE7P、SMIM17、TRAF3IP2-AS1、KCNC2、SLC24A1、HLCS、GOSR1、MN1、MGAT5、NBPF14、FBXO31、WDR52、TBC1D2B、ZNF648、NBPF16、PAGR1、AQP2、PRKCI、SCN2B、DPYSL3、TMEM26、TSPAN11、ELL2、FAM186A、CD59、THSD4、GOLGA6B、ARHGEF5、PKD1、BPTF、FLG、POM121L10P、NXPH3、H3F3A、SH3TC2、GGCX、和GREB1。

[0072] 在PD样品中,但不在AD或健康对照样品中,存在唯一识别的25种基因。这25种基因是:BLOC1S1、UBE2L3、RNF149、FAM89B、LCE6A、NT5DC2、PPP1CC、CCL5、HDLBP、HNRNPAB、NXN、SLC9A4、EIF2AK1、PAPOLA、TRIM50、SIX4、RAB3IP、VANGL2、DHRSX、FOXP4、SYNM、ZNF543、ATF6、LOC100132832、和BLOC1S1-RDH5。

[0073] 应当理解的是,上述描述了本发明的优选实施方式并且可在其中进行修改而没有偏离如在权利要求中阐述的本发明的范围。

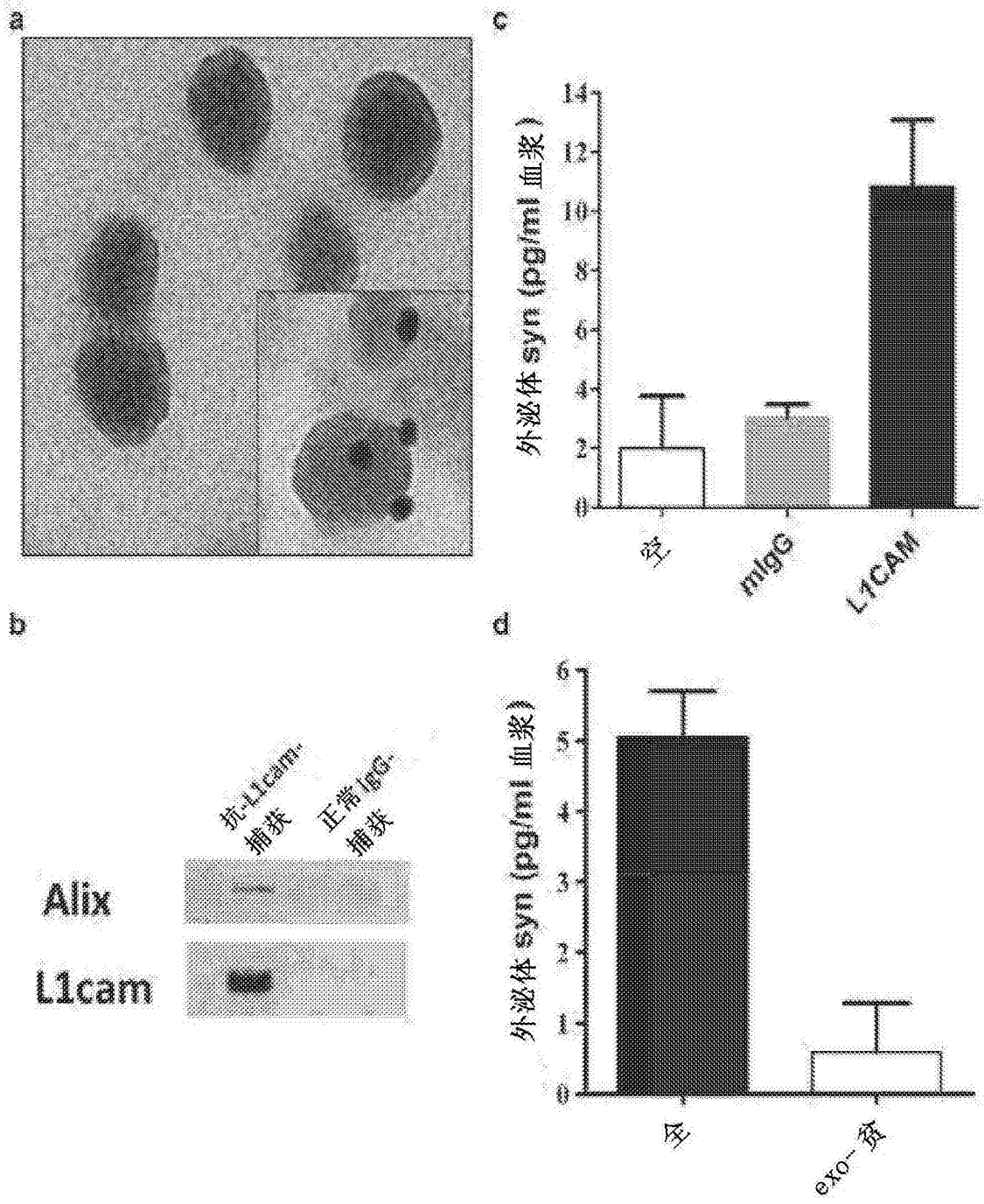


图1

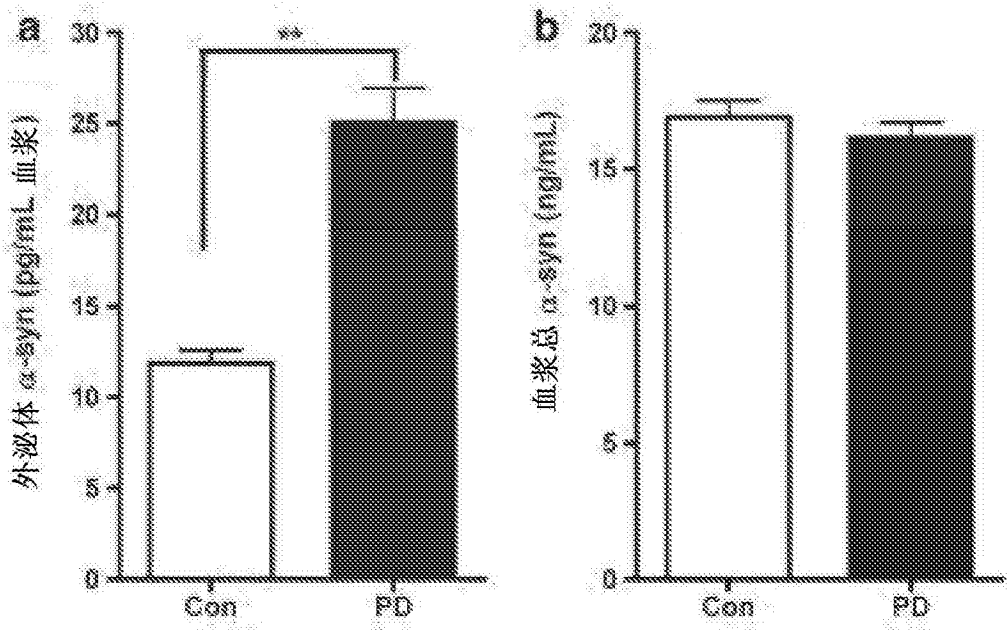


图2

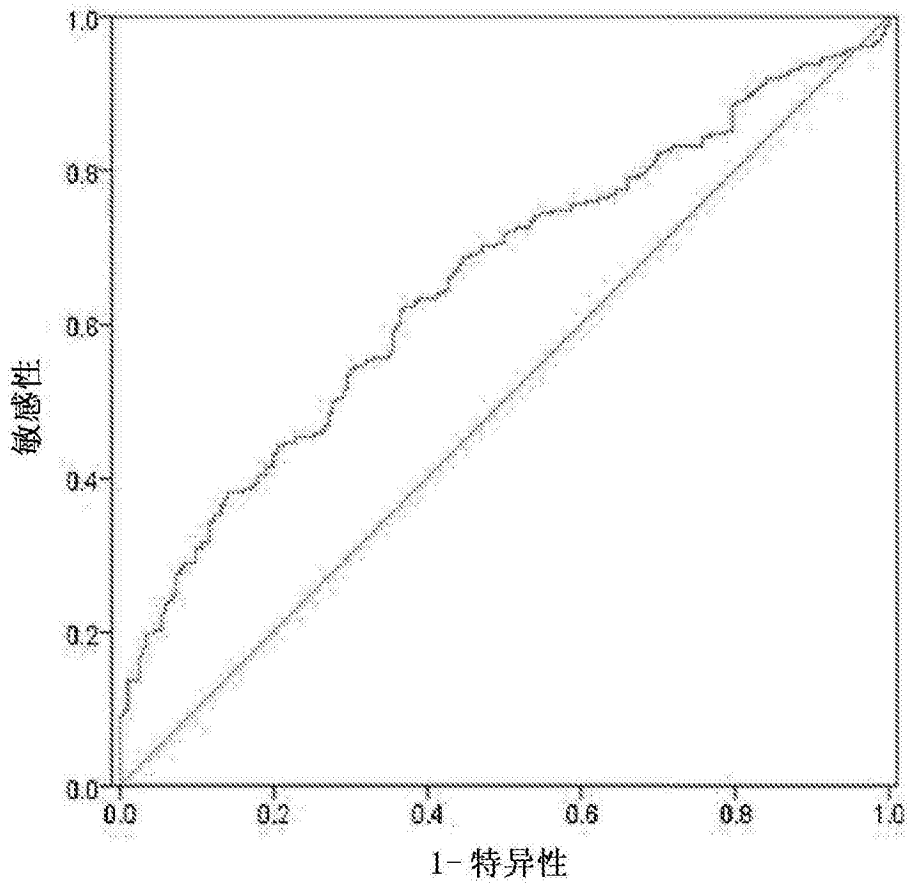


图3A

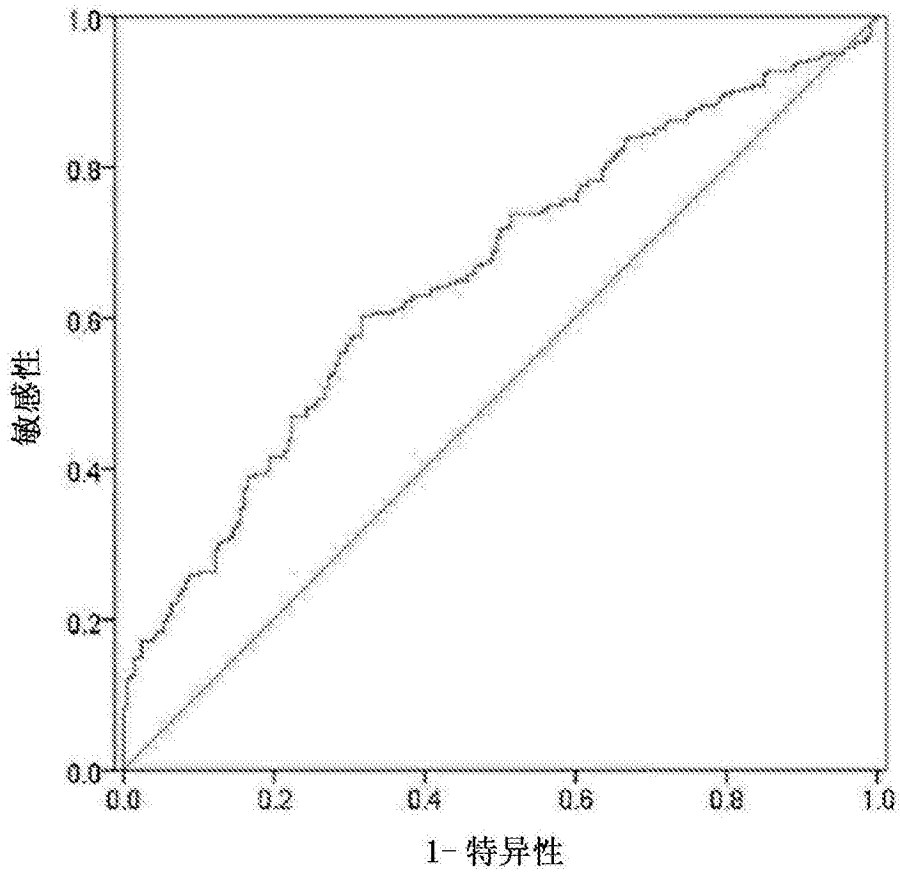


图3B

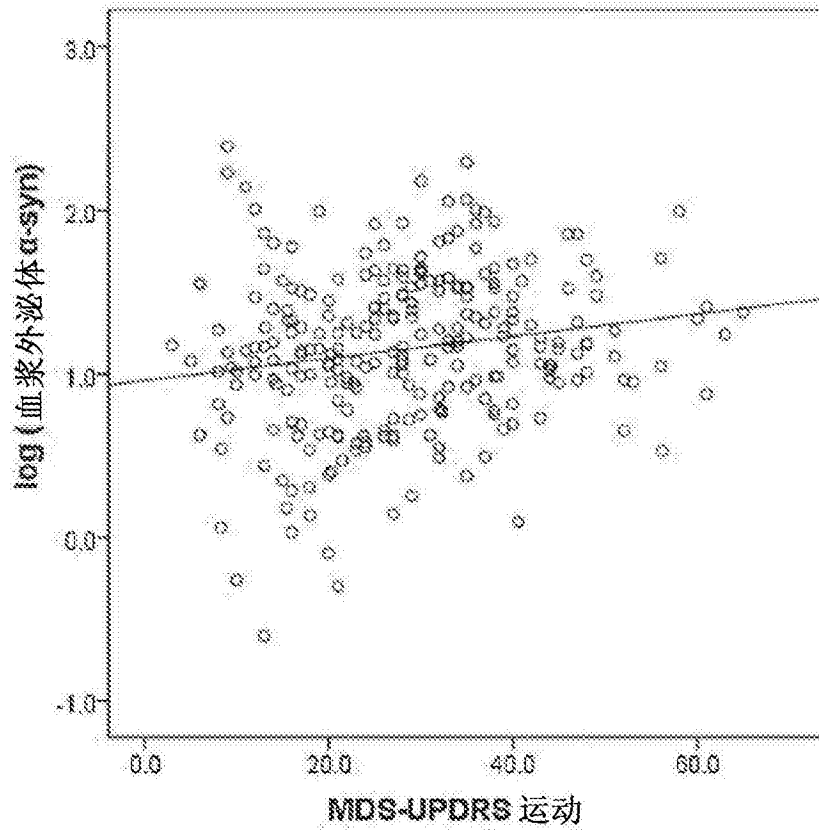


图3C

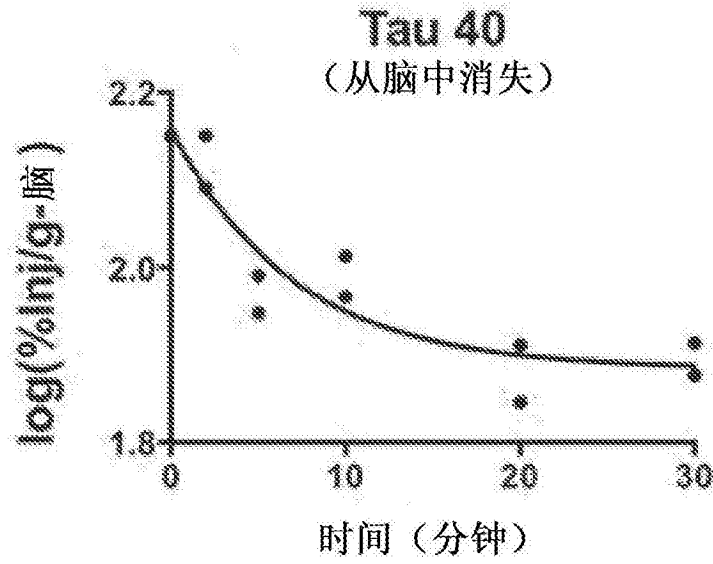


图4A

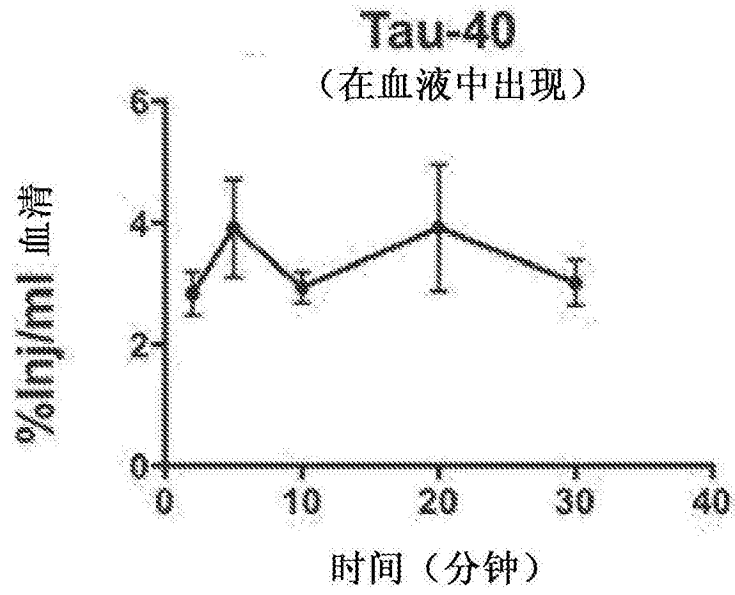


图4B

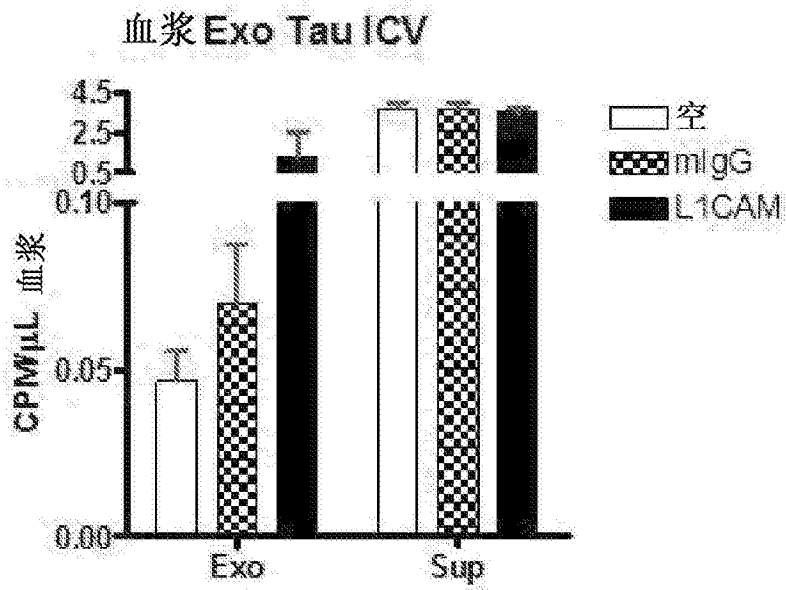


图4C

专利名称(译)	用于富集CNS来源的外泌体的方法		
公开(公告)号	CN106062559A	公开(公告)日	2016-10-26
申请号	CN201580003884.9	申请日	2015-06-26
[标]申请(专利权)人(译)	北京新源长青生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京新源长青生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京新源长青生物科技有限公司		
[标]发明人	章京		
发明人	章京		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/6896 G01N2800/2821 G01N2800/2828 G01N2800/2835		
代理人(译)	李海霞		
优先权	62/018081 2014-06-27 US		
其他公开文献	CN106062559B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及用于从生物体液如血液、血清、血浆、或唾液富集CNS来源的外泌体的方法。上述方法包括：使含有CNS来源的外泌体的生物体液接触抗L1CAM抗体以形成免疫复合物，通过免疫复合物将在生物体液中的CNS来源的外泌体结合于固相；以及从生物体液分离固相结合的外泌体以富集CNS来源的外泌体。可以测量来自CNS来源的外泌体的生物标记物，用于检测神经系统疾病，区分不同的神经系统疾病，监测疾病进展或客观地评价现有的和未来的医学治疗方法。

