



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107709991 A

(43)申请公布日 2018.02.16

(21)申请号 201680002035.6

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

(22)申请日 2016.10.05

代理人 彭鲲鹏

(30)优先权数据

62/237,488 2015.10.05 US

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.01.11

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2016/001528 2016.10.05

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/064555 EN 2017.04.20

(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

权利要求书3页 说明书21页 附图14页

(54)发明名称

用于诊断眼表炎症和干眼病的方法和装置

(57)摘要

提供了用于在对象中诊断和监测干眼病的方法、试剂盒和装置。所述方法包括在来自对象的样品中测量选自以下的至少一种生物标志物的水平：TNF  $\beta$ 、IL-4、IL-3、IL-10、GM-CSF、IL-13、IL-5和IL-9，和/或所述生物标志物的任意衍生物、片段或前体。

1. 在对象中诊断或监测干眼病或其易感性、或者监测对其治疗之效力的方法,所述方法包括在获自所述对象的样品中测量选自以下的至少一种生物标志物的水平:淋巴毒素 $\alpha$  (TNF $\beta$ )、白介素 (IL) -4、IL-3、IL-10、粒细胞-巨噬细胞集群刺激因子 (GM-CSF、CSF2)、IL-13、IL-5和IL-9,和/或任意上述生物标志物的任意衍生物、片段或前体,其中所述生物标志物的水平指示干眼病、其易感性或对其治疗之效力,并且其中在所述对象中的所述干眼病或其易感性或对其治疗之效力的指示包括在所述对象中与参考值相比降低水平的所述至少一种生物标志物或任意上述生物标志物的任意衍生物、片段或前体。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述降低水平的淋巴毒素 $\alpha$ 或其任意衍生物、片段或前体低于650pg/mL。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述降低水平的IL-4或其任意衍生物、片段或前体低于200pg/mL。

4. 根据权利要求1所述的方法,其中IL-13水平的下调低于300pg/mL。

5. 根据权利要求1所述的方法,其中IL-10水平的下调低于50pg/mL。

6. 根据权利要求1所述的方法,其中CSF2 (GM-CSF) 水平的下调低于150pg/mL。

7. 用于在对象中诊断或监测干眼病、其易感性或者监测对其治疗之效力的体外诊断试剂盒,其包含:

a) 对淋巴毒素 $\alpha$ 、IL-4、IL-13、IL-10、CSF2 (GM-CSF) 或IL-9中的至少一种具有特异性的检测试剂;

b) 用于使用所述检测试剂来分析获自对象之生物样品中所述淋巴毒素 $\alpha$ 、IL-4、IL-13、IL-10、CSF2 (GM-CSF) 或IL-9之水平以确定生物标志物的水平是否指示干眼病的使用说明;

c) 任选地,用于对数据进行归一化的所述淋巴毒素 $\alpha$ 、IL-4、IL-13、IL-10、CSF2 (GM-CSF) 或IL-9的参考物质;以及

d) 用于将淋巴毒素、IL-4、IL-13、IL-10、CSF2 (GM-CSF) 或IL-9的水平与指示所述对象中干眼病的所述淋巴毒素 $\alpha$ 、IL-4、IL-13、IL-10、CSF2 (GM-CSF) 或IL-9的参考水平进行比较的信息表。

8. 权利要求7所述的诊断试剂盒,其中所述生物样品是泪样品。

9. 根据权利要求7所述的诊断试剂盒,其中所述信息表表明以下一个或更多个:

i. 低于650pg/mL的淋巴毒素测量水平指示干眼病;

ii. 低于200pg/mL的IL-4测量水平指示干眼病;

iii. 低于400pg/mL的IL-3测量水平指示干眼病;

iv. 低于150pg/mL的IL-13测量水平指示干眼病;

v. 低于50pg/mL的IL-10测量水平指示干眼病;和/或

vi. 低于150pg/mL的CSF2 (GM-CSF) 测量水平指示干眼病。

10. 根据权利要求7所述的诊断试剂盒,其中所述试剂盒用于监测所述对象中干眼病的进展或状态、或者监测用于治疗干眼病之治疗的效力。

11. 根据权利要求7所述的诊断试剂盒,其中所述试剂盒用于诊断眼表炎症的存在或预测其发生、或者用于对发生角膜同种异体移植排斥进行预后。

12. 根据权利要求7所述的诊断试剂盒,其中至少一种所述检测试剂物质包含抗体或抗原结合性抗体片段。

13. 根据权利要求7所述的诊断试剂盒,其中所述检测试剂固定在固体基底上。

14. 用于在对象中诊断或监测干眼病、其易感性或者监测对其治疗之效力的侧向流免疫测定装置,其包含:基部构件和置于所述基部构件上的水平阵列,所述水平阵列包含:

i. 位于所述基部构件一端的样品接收垫,其接收泪样品;

ii. 与所述样品接收垫不同的缀合物垫,其与所述样品接收垫接触并且包含散布性结合的缀合物,所述缀合物与所述缀合物垫中泪的干眼生物标志物形成第一免疫复合物,所述缀合物包含对所述生物标志物具有特异性的第一结合剂、以及标记物;

iii. 与所述缀合物垫接触并且具有第二结合剂的芯吸膜,所述第二结合剂固定在所述芯吸膜的测试线中、对所述生物标志物具有特异性,并且与所述第一免疫复合物组合以形成固定于所述测试线的第二免疫复合物,并且从所述缀合物垫接收泪;以及

iv. 所述芯吸膜还包含第三结合剂,其不与所述生物标志物结合但与所述第一结合剂结合,并固定在所述芯吸膜的对照线中,所述对照线位于所述测试线的下游。

15. 根据权利要求14所述的装置,其中所述标记物是有色颗粒材料,有色纤维素纳米珠,金纳米颗粒,变色酶,有色、荧光或顺磁性乳胶颗粒,或者荧光材料。

16. 根据权利要求14所述的装置,其中至少一种所述干眼特异性标志物选自:ITa、IL-4、IL-13、GM-CSF、IL-3、IL-5、IL-10、IL-9和/或任意上述标志物的任意衍生物、片段或前体。

17. 根据权利要求14所述的装置,其中所述第一、第二和第三结合剂选自:抗体、抗原结合性抗体片段、核酸适配体和半抗原。

18. 根据权利要求14所述的装置,其中所述水平阵列还包含置于所述基部构件另一端上并且与所述芯吸膜接触并具有从所述芯吸膜吸收泪之孔的吸收垫。

19. 根据权利要求14所述的装置,其中所述缀合物垫由玻璃纤维垫、聚酯或人造丝的非吸收性材料制成。

20. 根据权利要求14所述的装置,其中所述第一结合剂对干眼特异性生物标志物的第一表位或第一配体具有特异性,并且所述第二结合剂对所述生物标志物的第二表位或第二配体具有特异性。

21. 根据权利要求14所述的装置,其中所述泪样品中的目标分析物包含多种分析物,所述缀合物垫浸渍有其他散布性结合的缀合物,所述缀合物包含对其他分析物具有特异性并与其结合之第四结合剂和有色颗粒材料,并且所述芯吸膜还具有置于所述测试线与所述对照线之间的其他测试线,并且与所述其他分析物具有特异性的第五结合剂固定于所述其他测试线。

22. 根据权利要求21所述的装置,其中超过一种分析物选自以下干眼特异性生物标志物:LTa、IL-4、IL-13、GM-CSF、IL-3、IL-5、IL-10、IL-9和/或任意上述生物标志物的任意衍生物、片段或前体。

23. 根据权利要求21所述的装置,其中所述一种分析物是LTa并且所述其他分析物是IL-4。

24. 用于在对象中诊断或监测眼表炎症或干眼病、其易感性或者监测对其治疗之效力的侧向流免疫测定装置,其包含:基部构件和置于所述基部构件上的水平阵列,所述水平阵列包含:

i. 置于所述基部构件一端上的缀合物垫,其包含散布性结合的缀合物,所述缀合物包含检测试剂、任选地抗体或抗原结合性抗体片段,如果存在的话,所述检测试剂特异性地结合添加至所述缀合物垫的泪样品中的具有干眼生物标志物的第一免疫复合物,所述缀合物还包含标记物;以及

ii. 与所述缀合物垫接触以从所述缀合物垫接收所述泪样品并且包含捕获试剂的芯吸膜,所述捕获试剂固定在所述芯吸膜的测试线中、对所述生物标志物具有特异性并且能与所述第一免疫复合物组合以形成固定于所述测试线的第二免疫复合物;以及

iii. 所述芯吸膜还包含第三结合剂,其不与所述生物标志物结合但与所述检测试剂结合,并且固定在所述芯吸膜的对照线中,所述对照线位于所述测试线的下游;以及

iv. 置于所述基部构件另一端上并且与所述芯吸膜接触的吸收垫。

25. 根据权利要求25所述的装置,其中所述缀合物垫还包含泪样品接收区和缓冲液接收区,所述泪样品接收区在所述缓冲液接收区的下游。

## 用于诊断眼表炎症和干眼病的方法和装置

### 技术领域

[0001] 本发明涉及用于诊断干眼病及相关眼表疾病(ocular surface disease)的装置、试剂盒和方法,以及使用通过使用这样的装置、试剂盒和方法产生的数据和信息的方法。

### 背景技术

#### [0002] 1. 简介

[0003] 以下描述包含可用于理解本发明的信息。不承认任何这样的信息是现有技术或与请求保护的本发明相关,或者任何明确或隐含引用的出版物是现有技术。

#### [0004] 2. 背景

[0005] 眼表持续暴露于可引起炎症的环境作用剂(environmental agent),例如变应原、污染物和微生物。角膜和其下的前房具有保护角膜和眼免受眼中免疫介导的炎症和免疫介导的损伤并且产生眼免疫耐受的独特属性,这被认为对于维持正常的视觉和健康的眼是必须的。

[0006] 干眼病(dry eye disease,DED)是最普遍的眼病症之一,仅是在美国就影响上百万人,并且在世界的其他地区还影响数百万人。干眼患者经常经历的眼症状包括干燥、眼刺激和/或疼痛以及视觉模糊,这些可显著影响生活质量和与工作有关的活动(work-related activity)。DED患者还报道对其环境的改变更高的敏感性和更低的耐受性。视觉功能障碍包括在阅读、驾驶、计算机使用、看电视、以及其他日常的个人活动和与工作有关的活动中的困难。对于眼病的诊断通常基于主观症状、泪破裂时间(tear break-up time,评价泪膜的质量)、眼表的活体染料染色(例如角膜荧光素染色)、希尔默试验(Schirmer test,评价泪液的质量)以及其他不太常见的临床测试,包括泪渗量(tear osmolarity)、玫瑰红染色(Rose Bengal staining,测量泪河高度(tear meniscus height))等。许多研究已经显示:临床测试与症状之间以及甚至不同临床测试之间的相关性差。干眼中发生的常见病理学变化包括杯状细胞密度降低、黏蛋白产生降低、细胞凋亡提高、以及上皮鳞状化生(epithelial squamous metaplasia)。

[0007] 阐述DED中基本炎症机制和途径之努力的成果已导致更好地理解炎症在疾病发病机理中的作用。然而,DED临床测量中精确性差、缺乏确定疾病严重程度的“金标准”、患者报道的眼症状与临床体征之间以及不同临床参数之间的不一致、以及显著的患者异质性一直是DED临床研究和临床开发治疗性处理中的主要挑战。因此,在开发可用于诊断和监测DED以及用于监测DED治疗的改进的、可靠的、客观的、稳健的且灵敏的方法、试剂和工具中仍存在显著的需要。

#### [0008] 3. 定义

[0009] 在详细描述本发明之前,将定义本发明上下文中使用的若干术语。除这些术语外,其他术语必要时在别处定义。除非本文中另有明确定义,本说明书中使用的术语将具有在其领域中公认的含义。

[0010] 术语“风险”涉及特定事件在当前或将来某个时间点发生的可能性或概率。“风险

分级”是指允许医生将患者分成发生特定疾病、障碍或病症之低、中、高或最高风险的一系列已知临床风险因素。

[0011] “诊断”包括对相关疾病、并发症或风险的确定、监测、确认、细分(subclassification)和预测。“确定”涉及意识到疾病、并发症、风险或实体(例如,生物标志物)。“监测”涉及记录已经诊断的疾病、并发症或风险因素以例如分析疾病的进展或特定治疗对疾病或并发症进展的影响。“确认”涉及强化或加强已使用其他指标或标志物进行的诊断。“分类”或“细分”涉及根据已诊断的疾病、障碍或症状的不同亚类进一步限定诊断,例如根据疾病或风险的轻微、中度或严重形式进行限定。“预测”涉及在其他症状或标志物变得明显或变得显著改变之前对疾病、障碍、病症或并发症进行预后。

[0012] “对象”是任何动物物种(优选哺乳动物物种,任选人)的成员。因此,本文中描述的方法、组合物、试剂和试剂盒适用于人疾病和兽医疾病二者。此外,尽管对象优选为活生物,本文中描述的本发明也可用于死后分析。优选的对象是人,并且最优选“患者”,如在本文中使用的,其是指正接受对疾病或病症之医疗处理的活人。这包括正接受病理学体征检查的没有确定疾病的人。对象可以是表面上健康的个体、患有疾病的个体或正接受疾病治疗的个体。“参照对象”是充当针对一个或更多个参数评估其他个体或群体之参照的个体或群体。

[0013] 术语“正常”或“临床上正常”意指对象没有已知的或明显的或当前可检出的疾病或功能障碍,并且没有与干眼病相关的生物标志物的可检出的提高或降低。

[0014] 可使用本发明方法进行测定的“样品”包括生物流体,例如全血、血清、血浆、泪、唾液、滑液、脑脊液、支气管灌洗液、腹水液、骨髓抽出物、胸腔积液、尿以及可含有目标分析物的肿瘤组织或任何其他身体组分或任何组织培养物上清液。可通过本领域中已知的任何适当的方法来获得样品。

[0015] “分析物”是指怀疑存在于样品(即生物样品)中的待检测物质。分析物可以是存在天然特异性结合配偶体(binding partner)或可制备特异性结合配偶体的任何物质。因此,分析物是在测定中可与一种或更多种特异性结合配偶体结合的物质。

[0016] “结合配偶体”是结合对(即,其中一个分子与第二分子结合的一对分子)的成员。特异性结合的结合配偶体被称为“特异性结合配偶体”。除了免疫测定中常用的抗原和抗体结合配偶体之外,其他特异性结合配偶体可包括:生物素和亲和素(或链霉亲和素)、碳水化合物和凝集素、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,特异性结合配偶体可包括作为原始特异性结合配偶体之类似物的配偶体,例如分析物类似物。免疫反应性特异性结合配偶体包括抗原、抗原片段、抗体和抗体片段(单克隆和多克隆二者)、及其复合物,包括通过重组DNA方法形成的那些。

[0017] 本文中使用的术语“表位”或“目标表位”是指任何分子上被识别且能够与其特异性结合配偶体上的互补位点结合的位点。带有表位的分子和特异性结合配偶体是特异性结合对的一部分。例如,表位可以是多肽、蛋白质、半抗原、碳水化合物抗原(例如但不限于糖脂、糖蛋白或脂多糖)或多糖,并且其特异性结合配偶体可以是但不限于抗体。通常来说,表位包含在更大的分子框架内(例如,在蛋白质抗原区域的情况下,表位是具有能够被针对该表位有反应性的抗体结合之结构的蛋白质区域或片段)并且是指已知接触特异性结合配偶体的精确残基。如已知的,抗原或抗原性片段可含有多于一个表位。

[0018] 本文中在特异性结合对(例如,抗原和抗体)的成员之间相互作用的情况下使用的“特异的”或“特异性”是指相互作用的选择性反应性。短语“与……特异性结合”及其类似术语是指抗体与内源性抗原特异性结合(例如,优先与其反应)而不与其他实体特异性结合。例如,可通过诊断性免疫测定(例如,放射免疫测定(“RIA”)和酶联免疫吸附测定(“ELISA”))、表面等离子共振(surface plasmon resonance)或本领域技术人员已知的其他技术鉴定与干眼病相关的内源性抗原特异性结合的抗体(包括自身抗体)或抗体片段。在一个实施方案中,术语“特异性结合”或“特异性反应性”表明对靶分析物的结合偏好(例如,亲和力)为非特异性靶分子(例如,随机产生的缺乏特异性识别位点的分子)的至少约2倍,更优选至少约5倍、10倍、100倍、1000倍、100万倍或更多倍。

[0019] 与疾病(特别是干眼病)“相关联”或“相关”的抗原、生物标志物或其他分析物是指与一般干眼病或特定干眼病(如上下文中所要求的)的存在或发生正相关的生物标志物或其他分析物。通常来说,“抗原”是表现出与靶抗体具有特异性免疫反应性的任何物质。合适的抗原(特别是生物标志物)可包括但不限于包含至少一个能够与抗体或含有CDR之抗体片段的可变区或互补决定区(CDR)特异性相互作用之抗原表位的分子。抗原通常是天然或合成的生物大分子,例如蛋白质、肽、多糖、脂质或核酸,或者含有这些或其他分子的复合物。

[0020] 本文中关于疾病相关抗原(或与干眼病相关联的其他分析物)使用的术语“升高的水平”是指样品中高于正常水平或范围或者高于其他参考水平或范围(例如,较早或基线样品)的水平。术语“改变的水平”是指样品中相对于正常水平或范围或者相对于其他参考水平或范围(例如较早或基线样品)改变(升高或降低)的水平。特定生物标志物的正常水平或范围根据标准实践定义。因为在一些实例中生物标志物的水平将非常低,所以当相对于正常水平或范围或者参考水平或范围有任何净改变不能被实验误差或样品变化进行解释时,所谓的改变的水平或改变可被认为已发生。因此,在特定样品中测量的水平将与正常组织的类似样品中确定的水平的水平或范围进行比较。在该情况下,“正常组织”为来自未检出干眼病理状况之个体的组织,并且“正常”(有时称为“对照”)患者(即,对象)或群体是没有表现出可检出病理状况的那些。当分析物通常不可检出(例如,正常水平为零,或在正常群体的约25至约75百分位数的范围内)但在受试样品中检出时,以及当所述分析物在所述受试样品中以高于正常水平存在时,分析物的水平被称为“升高的”。

[0021] 术语“阵列”是指由基底(substrate)组成的装置,所述基底通常是具有适于接受并固定可用于确定生物样品(例如,血液)中其他分子(即,分析物)的存在和/或量的多种不同蛋白质、肽和/或核酸物质(即,捕获或检测试剂)之表面的固体支持物。“微阵列”是指其中不同检测试剂置于网格(grid)或其他样式之基底上的阵列。

[0022] 术语“固相”是指不可溶或通过后续反应使其不可溶的任何材料或基底。可选择固相的吸引和固定捕获或检测试剂的内在能力。或者,固相可以已向其附加能够吸引和固定捕获剂的连接剂。例如,连接剂可包括与捕获剂本身或缀合于捕获剂之带电物质带相反电荷的带电物质。通常来说,连接剂可以是任何结合配偶体(优选特异性的),其固定在(称为“附着于”)固相上并且通过结合或其他缔合反应(associative reaction)而具有固定期望的捕获或检测试剂的能力。在进行测定之前或在进行测定期间,连接剂可使捕获剂能够与固相材料间接结合。所述固相可以是例如塑料、衍生塑料、磁性或非磁性的金属、玻璃或硅,包括例如试管、微量滴定孔(microtiter well)、片(sheet)、珠、微粒、芯片、以及本领域普

通技术人员已知的其他构造。

[0023] 本文中使用的术语“微粒”是指可通过任何合适的方法回收的小颗粒,例如磁性分离或缔合、超速离心等。微粒通常具有约1微米或更小级别的平均直径。

[0024] “捕获”或“检测”剂或试剂是指与分析物(优选特异性)结合的结合配偶体。捕获或检测试剂可与固相结合或以其他方式与固相缔合。

[0025] 术语“经标记检测剂”是指与分析物(优选特异性)结合的结合配偶体,并且用可检测标记物进行标记或在用于测定期间变得用可检测的标记物进行标记。“可检测标记物”包括可检测的或使其可检测的部分(moiety)。关于经标记检测剂,“直接标记物”是通过任何手段与检测剂结合的可检测标记物,而“间接标记物”是特异性地结合检测剂的可检测标志物。因此,间接标志物包括检测剂之部分的特异性结合配偶体的部分。生物素和亲和素是可采用的此类部分的实例,例如通过接触具有经标记亲和素之生物素化抗体以产生间接标记的抗体。

[0026] 术语“指示试剂”是指与标记物接触以产生可检测信号的任何试剂。因此,例如,在常规酶标记中,用酶标记的抗体可与底物(指示试剂)接触以产生可检测的信号,例如有色反应产品。

[0027] “抗体”是指由一种或更多种实质上由免疫球蛋白基因或免疫球蛋白基因片段编码的多肽组成的蛋白质。该术语涵盖多克隆抗体、单克隆抗体、及其片段,以及由免疫球蛋白基因序列改造的分子。公认的免疫球蛋白基因包括 $\kappa$ 、 $\lambda$ 、 $\alpha$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\mu$ 恒定区基因以及无数免疫球蛋白可变区基因。轻链分类为 $\kappa$ 或 $\lambda$ 。重链分类为 $\gamma$ 、 $\mu$ 、 $\alpha$ 、 $\delta$ 或 $\epsilon$ ,这进而分别定义免疫球蛋白分类:IgG、IgM、IgA、IgD和IgE。抗体通常存在于体液(主要是血液)中。

[0028] 已知典型的免疫球蛋白(抗体)结构单元包含四聚物。每个四聚物由两个相同多肽链对构成,每对具有一个“轻”链(约25kD)和一个“重”链(约50-70kD)。每个链的N末端确定主要负责抗原识别的约100至110或更多个氨基酸的可变区。术语“可变轻链(VL)”和“可变重链(VH)”分别是指这些轻链和重链。

[0029] 抗体作为完整的免疫球蛋白或者作为通过用多种肽酶消化产生的许多良好表征的片段存在。因此,例如,胃蛋白酶在铰链区中的二硫键下面消化抗体以产生 $F(ab')_2$ (Fab的二聚物),Fab本身为通过二硫链与VH-CH1连接的轻链)。 $F(ab')_2$ 可以在温和条件下还原以破坏铰链区中的二硫键,从而将 $(Fab')_2$ 二聚物转化成Fab'单体。Fab'单体实质上是带有铰链区一部分的Fab。虽然多种抗体片段是以完整抗体的消化来定义的,技术人员将理解此类Fab'片段可以以化学方式或通过使用重组DNA法从头合成。因此,在本发明的情况中,术语“抗体”还包括由整个抗体修饰产生或使用重组DNA法从头合成的抗体片段。抗体包括单链抗体(作为单多肽链存在的抗体)、单链Fv抗体(sFv或scFv),其中可变重链和可变轻链连接在一起(直接地或通过肽接头)以形成连续的多肽。单链Fv抗体是共价连接的VH-VL异二聚体,其可由包含直接连接或通过肽编码接头连接的VH和VL编码序列的核酸表达。虽然VH和VL作为单多肽链彼此连接,但是VH和VL结构域非共价缔合。scFv抗体和许多其他结构从抗体V区将天然聚集但在化学上分离的轻和重多肽链转化成折叠为三维结构的分子,所述结构基本上与本领域技术人员已知的抗原结合位点的结构类似。

[0030] “系列(paneI)”是指已示出指示特定疾病或健康状况或者以其他方式与其相关联的两个或更多个独特分子物质(molecular species)的组。这样的“分子物质”可称为“生物

标志物”，而术语“生物标志物”被理解为意指生物分子，其存在与否作为特定生物状态的指标，例如对象中干眼病的发生(或存在的可能性)。换句话说，生物标志物是可作为正常生物学过程、致病过程或对治疗性介入之药理学应答的指标进行客观测量和评价的特征。在本发明的情况中，“测定系列(assay panel)”或“阵列系列(array panel)”是指通常为具有与其缔合(通常通过固定化)之捕获试剂系列的固相基底的用品(article)，其中至少一种捕获试剂与干眼病相关生物标志物具有特异性反应性。在一些实施方案中，测定系列包含与对象中干眼病的存在相关的单独或与其他检测试剂(例如，基于核酸的检测试剂等)组合的2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更多种(例如，25、30、35、40、50、75、100、150、200、250、500等，包括1至500的任何整数或整数范围)不同的检测试剂。

[0031] “生物样品”是从患者或对象获取的生物材料样品。生物样品包括获自体液、细胞和组织(例如，通过活检)或组织制备物(例如，组织切片、匀浆等)的样品。“体液”是适合根据本发明使用的从对象获得的或来自于对象的任何流体。这样的流体包括泪。

[0032] “伴随诊断(companion diagnostic)”是设计成鉴定患者亚组的诊断测试，所述患者可以或可以不从特定药物获益、可具有对药物的不良反应或可需要不同的药物剂量。

[0033] 术语“药物抢救(drug rescue)”是指用新的或改进的评价方法对来自自己停止的临床试验或临床前开发的样品和/或数据进行再评价的情况中的药物或药物候选物。

[0034] 术语“高通量”是指以自动化和/或大规模平行方式迅速处理多个标本的能力，例如根据本发明的阵列或微阵列。另一方面，术语“多重(multiplex)”是指在单个装置上或在单个测定中同时进行多个实验。例如，使用根据本发明阵列的多重测定允许在单个装置上同时检测和/或测量多个不同的生物标志物物质(biomarker species)。

[0035] 根据本发明的“可专利”方法、机器或生产用品意指该主题在进行分析时满足可专利性的所有法定要求。例如，对于新颖性、非显而易见性等，如果后来的调查显示一个或更多个权利要求涵盖一个或更多个可否认新颖、非显而易见性等的实施方案，受“可专利”实施方案定义限制的权利要求特别地排除不可专利的实施方案。此外，本文中所附权利要求书将被解释为提供最宽的合理范围并且保持其有效性。此外，如果一个或更多个对于可专利性的法定要求被修改或者如果用于评估对于可专利性的特定法定要求是否被满足的标准从提交该申请或授予专利时改变成一个或更多个所附权利要求的有效性被质疑时，将这样解释权利要求书：(1) 保留其有效性，以及(2) 提供在该情况下最宽的合理解释。

[0036] “多个”意指多于一个。

[0037] 本文中使用的术语“正向(positive going)”标志物是指在患有疾病或病症的对象中确定相对于未患有该疾病或病症的对象升高的标志物。本文中使用的术语“负向”标志物是指在患有疾病或病症的对象中确定相对于未患有该疾病或病症的对象降低的标志物。

[0038] 术语“标本分析(sample profiling)”是指与生物样品的特征有关的信息呈现，例如以定量方式记录泪液以确定特定样品中生物分子的模式或识别标志(signature)。

[0039] 除非上下文中明确地另有说明，否则没有数量词修饰的名词表示一个/种或更多介/种。

[0040] 本文中使用的术语“约”是指相对于所表述值大约 $\pm 10\%$ 的变化。要理解的是，无论是否特别地提及，这样的变化总是包含在本文中提供的任何给定值中。

[0041] 发明概述

[0042] 本发明的目的是提供用于在对象中诊断或监测干眼病症、其易感性 (predisposition) 或者监测对其治疗之效力的用品、装置、试剂盒和方法。如本文中所描述的,对获自对象的生物样品 (特别是泪液) 中与干眼病相关的一种或更多种天然生物标志物物质的评估可用于在患有或有风险患有干眼病或其复发的对象中以及在药物开发的情况下进行诊断 (例如,筛选初发、复发、进展等)、疾病分类 (即基于潜在的分子机制和/或途径来鉴定对象)、分级、监测 (例如,评估对象是否随时间经历临床状态的恶化或改善)、预后 (例如,预测将来的医学结果,例如疾病改善或恶化、发病风险降低或升高、或对特定治疗方案的应答性)、分类以及对进一步诊断和治疗方案的确定。

[0043] 因此,在一方面中,本发明涉及DED诊断方法。通常来说,这些方法包括:从对象获得样品并在所述样品中测量至少一种生物标志物的水平,所述至少一种生物标志物选自2型细胞因子、已知诱导初始T细胞或调节性T细胞浸润或增殖的细胞因子、或者与调节性T细胞相关的细胞因子,并且特别地优选地选自:淋巴毒素 $\alpha$  (LT- $\alpha$ 、TNF $\beta$ )、白介素 (IL)-4、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF、CSF2)、IL-13、IL-3、IL-10、IL-5和IL-9和/或任意上述生物标志物的任意衍生物、片段或前体,其中所述生物标志物的水平指示DED、其易感性或对其治疗的效力,并且其中所述对象中DED或其易感性的指示包括所述对象中特定生物标志物相对于至少一种参考值或阈值的水平改变 (即,降低或升高)。

[0044] 结膜上皮杯形细胞密度降低和黏蛋白的产生降低是DED中眼表中一些公认的病理变化。本发明基于令人惊讶且出人意料地发现,在DED中眼表中存在降低水平或下调的与2型免疫 (以及Th2辅助性T细胞) 或调节性T细胞相关的细胞因子。这些细胞因子中的一些包括淋巴毒素 $\alpha$  (也称为TNF $\beta$ )、IL-4、IL-13、IL-10、IL-3、GM-CSF (也称为CSF2)、IL-5和IL-9。已知淋巴毒素 $\alpha$  (TNF $\beta$ ) 可诱导初始T细胞或调节性T细胞向局部黏膜组织的募集和归巢 (homing),并且诱导透明质酸的产生和组织创伤愈合。编码GM-CSF和2型免疫相关细胞因子 (例如,IL-3、IL-4、IL-5、IL-13和IL-9) 的基因均位于或非常接近染色体5q31区域,并且其基因表达倾向于被共同调节。据报道,通过激活组织驻留单核细胞 (tissue resident monocyte),GM-CSF可通过上调IL-4、IL-10和IL-13而吸引T细胞并向2型T细胞分化塑造T细胞。公知的是,2型免疫环境有利于组织修复和伤口愈合和炎症调节。在黏膜组织中,IL-13对于诱导黏蛋白的产生很重要,并且还已知IL-13对于诱导结膜上皮中杯状细胞增殖和黏蛋白的产生很重要。IL-10是关键免疫调节细胞因子,并且对于诱导/扩增调节性T细胞很重要。调节性T细胞在调节适应性免疫以限制过度炎症并防止炎症引起的组织损害中具有不可缺少的作用,因此保持健康正常眼中的眼免疫耐受性。因此,综合起来,临床样品 (包括泪液或眼样品,例如结膜印迹细胞学样品 (conjunctival impression cytology sample)) 中与2型免疫 (以及Th2辅助性T细胞) 或调节性T细胞相关的降低水平或下调水平的细胞因子指示DED或其易感性。

[0045] 在另一方面中,本发明提供了在对象中监测干眼病的装置和方法,所述方法包括:从所述对象获得样品;在所述样品中测量淋巴毒素 $\alpha$  (TNF $\beta$ )、IL-4、GM-CSF (CSF2)、IL-13、IL-3、IL-10、IL-5和IL-9和/或其任意衍生物、片段或前体的水平;以及将所述水平与至少一个阈值相比较以确定特定生物标志物的测量水平是否指示DED,因此提供对DED的监测。

[0046] 在另一方面中,本发明提供了在对象中监测对于干眼治疗之效力的装置和方法,所述方法包括:从所述对象获得样品;在所述样品中测量淋巴毒素 $\alpha$  (TNF $\beta$ )、IL-4、GM-CSF

(CSF2)、IL-13、IL-3、IL-10、IL-5和IL-9和/或其任意衍生物、片段或前体的水平；并将所述水平与至少一个阈值相比较以确定特定生物标志物的测量水平是否指示DED，因此提供在所述对象中对DED治疗之效力的监测。

[0047] 在另一方面中，本发明提供了在对象中预测角膜同种异体移植排斥 (allograft rejection) 风险的装置和方法，所述方法包括：从所述对象获得样品；在所述样品中测量淋巴毒素 $\alpha$  (TNF $\beta$ )、IL-4、GM-CSF (CSF2)、IL-13、IL-3、IL-10和/或其任意衍生物、片段或前体的水平；并将所述水平与至少一个阈值相比较以确定特定生物标志物的测量水平是否指示DED，因此提供用于在所述对象中预测角膜同种异体移植排斥风险的方法。

[0048] 在上述一些方面中，所述至少一个阈值可由不表现出任何干眼体征或经历干眼症状的统计学上显著数目的正常对照对象确定。所述样品可以是流体，例如泪液。生物标志物的水平可通过至少一种生物标志物的量或浓度测量。可通过基于抗体的免疫测定进行测量。

[0049] 在另一方面中，本发明提供了用于诊断干眼的生物标志物系列，所述系列包含具有至少一个阈值的淋巴毒素 $\alpha$  (TNF $\beta$ )、IL-4、GM-CSF (CSF2)、IL-13、IL-3、IL-5、IL-10和IL-9和/或其衍生物、片段或前体。与来自仅一个或一些其他生物标志物的结果相比，所述系列可提供更详细的病症分析，产生诊断和预后信息二者。

[0050] 在多个相关方面中，本发明还涉及用于进行本文中所述方法的装置和试剂盒。合适的试剂盒包含能够与至少一种生物标志物结合或反应的至少一种检测试剂物质，所述生物标志物优选地选自：淋巴毒素 $\alpha$  (LT- $\alpha$ 、TNF $\beta$ )、IL-4、GM-CSF (CSF2)、IL-3、IL-10、IL-13、IL-5、IL-9和任意上述生物标志物的衍生物、片段或前体，以及用于使用所述检测试剂物质来分析从对象获得的样品以确定所述样品是否含有低于(或高于)指示干眼病之阈值的降低(或提高)水平之所述生物标志物的使用说明(instruction)。检测试剂物质优选包含抗体或抗原结合性抗体片段(antigen-binding antibody fragment)。虽然优选单克隆抗体，但也可使用多克隆抗体。试剂盒中的一种或更多种检测试剂物质可固定在一个或多个固体基底上。诊断试剂盒也可与合适的阅读器或目视一起(例如，光度测定、荧光、放射性等)测量。可使用定性、半定量和定量分析法。诊断试剂盒可以是快速体外诊断测试。因此，合适的试剂盒包含足以进行根据本发明测定的试剂，以及用于进行所描述浓度计算、相关性分析和/或阈值比较的使用说明和算法。

[0051] 在一些实施方案中，可使用两种或更多种不同的检测试剂物质，在该情况下，每种检测试剂物质优选地结合不同的生物标志物物质。然而，在一些实施方案中，两种或更多种检测试剂物质可靶向同一生物标志物上的相同或不同表位。诊断试剂盒还可包含与使用所述试剂盒相关的信息。

[0052] 通常来说，使用说明包括将从怀疑患有或已知患有干眼病的对象获得的临床样品与结合或与干眼病相关生物标志物反应的检测试剂接触。然后使用检测试剂来确定与干眼病相关的生物标志物是否以指示干眼病的量存在于所述样品中。

[0053] 通过以下附图、发明详述和所附权利要求书，本发明的特征和优势将是明显的。

[0054] 附图简述

[0055] 以下提供了对本说明书中附图和表格的简述。本申请含有至少一幅彩图。一旦提出请求并支付必要的费用，可提供带有彩图的本申请副本。

[0056] 图1是DED患者中泪标志物的多元分析。泪蛋白质标志物和患者的双向无监督分层聚类(2-way unsupervised hierarchical clustering)。列:患者,行:泪蛋白质标志物。

[0057] 图2是主成分分析(principal component analysis,PCA)。A:使用泪蛋白质标志物的干眼患者的PCA。B:对照对象和干眼患者二者的PCA。PCA图:绿色=G1,蓝色=G2,红色=G3,橙色=G4,灰色=对照。

[0058] 图3是比较从正常对照对象和干眼患者收集的泪液中淋巴毒素 $\alpha$  (TNF $\beta$ )水平的散点图。

[0059] 图4是比较从正常对照对象和干眼患者收集的泪液中IL-4水平的散点图。

[0060] 图5是比较从正常对照对象和干眼患者收集的泪液中IL-10水平的散点图。

[0061] 图6是比较从正常对照对象和干眼患者收集的泪液中GM-CSF (CSF2)水平的散点图。

[0062] 图7是比较从正常对照对象和干眼患者收集的泪液中IL-3水平的散点图。

[0063] 图8是当使用淋巴毒素 $\alpha$  (TNF $\beta$ )作为干眼生物标志物时的ROC曲线。准确度(ROC曲线下面积)为89.4%。

[0064] 图9是当使用IL-4作为干眼生物标志物时的ROC曲线。准确度(ROC曲线下面积)为99.0%。

[0065] 图10是当使用IL-10作为干眼生物标志物时的ROC曲线。准确度(ROC曲线下面积)为98.4%。

[0066] 图11是当使用GM-CSF (CSF2)作为干眼生物标志物时的ROC曲线。准确度(ROC曲线下面积)为98.5%。

[0067] 图12是当使用IL-3作为干眼生物标志物时的ROC曲线。准确度(ROC曲线下面积)为98.3%。

[0068] 图13是代表性的根据本发明的侧向流条(lateral flow strip)诊断装置的图。所述侧向流条包含具有样品接收区(sample receiving area)的缀合物垫(conjugate pad)、具有相应抗体的一个或更多个测试线(test line)和对照线(control line)的芯吸膜(wicking membrane)。

[0069] 表1为干眼患者组与正常对照组之间的比较:组几何平均值、中位值、范围、来自T检验的P值、以及ROC曲线的AUC(曲线下面积)。生物标志物浓度值(pg/mL)经log10转换。

[0070] 发明详述

[0071] 如本领域技术人员将理解的,以下发明详述详细地描述了本发明的某些优选实施方案,并因此仅是代表性的而非描绘本发明的实际范围。在详细地描述本发明之前,要理解的是,本发明并不限于所描述的特定方面和实施方案,因为这些可发生变化。还要理解的是,本文中使用的术语仅用于描述特定的实施方案,而并不旨在限制由所附权利要求书所限定的本发明的范围。

[0072] 更具体地,本发明涉及用于通过测量与疾病相关的一种或更多种生物标志物在患有或有风险患有干眼病的对象中进行诊断、差别诊断、疾病分类、监测、分类和治疗方案确定的用品、装置、试剂盒和方法。

[0073] 疾病中生物标志物的变化

[0074] 标志从健康状态向疾病状态转变的细胞改变通常(如果不是总是的话)由构成的

生物标志物(包括蛋白质、核酸、碳水化合物和脂质)的水平或类型的变化介导。这些变化可由若干不同的机制引起,其包括某些蛋白质的丰度或表达水平的变化、DNA向mRNA转录或mRNA向蛋白质翻译的速率、mRNA稳定性、蛋白质周转速率或者其他代谢过程。可调节一种、一些或所有这些以及其他机制,结果是一种或更多种生物标志物物质的合成和/或稳定性以可在生物样品测定中检测的方式提高或降低。特别是对于蛋白质来说,由于单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)、选择性mRNA剪接、基因组重排或任何若干其他遗传变异机制,还可存在相应基因序列中的改变所赋予的蛋白质一级序列的变化。蛋白质的加工和翻译后修饰中也可有改变。例如,蛋白质可被差异糖基化,使得可检测到替代性糖型(glycoform)。

#### [0075] 分析物检测

[0076] 靶分析物(例如,与干眼病相关的生物标志物)的存在和/或量可在生物样品(特别是泪)中检测或测量,所述生物样品通过任何合适的方法从对象获得,包括直接从对象的眼中以及通过活检、拭子(swab)、清洗或可用于从患者收集生物流体或细胞样品的其他技术获得少量的泪。特别优选的生物样品是泪样品,因为泪液通常是可通过相对非侵入性的取样技术获得的易得到的溶液。

[0077] 生物标志物一般使用固定在基底(例如固体支持物)上的生物标志物-反应性试剂物质进行检测。生物标志物检测试剂物质是与目前已知或后来发现与干眼病相关之生物标志物的表位特异性反应的那些。因此,检测试剂物质是指与生物标志物抗原的特定表位特异性反应的试剂。优选的检测试剂物质包含多克隆抗体并且甚至更优选单克隆抗体,或者此类抗体的抗原结合片段。检测试剂还可包含一个或更多个其他部分,例如可检测标记物。

[0078] 在本发明中,一种或更多种检测试剂物质被固定在侧向流装置等的检测区的表面上的合适基底(例如,塑料珠)上。这样,可使检测试剂与小的生物样品(例如,约1纳升(nL)至约5微升(μL)的泪液)接触以确定其是否含有一种或更多种与干眼病或相关障碍(例如,舍格伦综合征(Sjogren syndrome))相关的生物标志物。如果所述样品含有目标生物标志物,所述检测试剂物质与其结合以在所述检测试剂物质与该特定检测试剂物质所靶向的生物标志物(或分析物)之间形成复合物。

[0079] 本发明的生物标志物检测阵列(或固定在一个或更多个基底上的多种检测试剂物质的其他构造)也可包含与生物样品中的生物分子反应的其他部分。例如,也包含与疾病相关的代谢物、蛋白质和/或对其进行编码的核酸反应的检测试剂。用于这些和/或其他疾病相关生物标志物的检测试剂也可包含在根据本发明的系列中或阵列上。

[0080] 在一些优选的实施方案中,本发明的阵列包含至少两种检测试剂物质,其各自对应于(例如,导向或靶向结合)特定的生物标志物。

[0081] 如本领域技术人员将理解的,免疫测定形式特别优选用于实施本发明。免疫测定可提供定性、半定量或定量的输出。免疫测定是使用抗体与其抗原的反应在生物样品(例如,小量的泪液)中测量一种或更多种物质(即,分析物(例如,生物标志物如蛋白质、核酸等))之存在和/或水平的生物化学测试。所述测定利用抗体与其抗原的特异性结合以形成抗体-抗原复合物(检测试剂-生物标志物复合物的代表性实例)。抗原或抗体可被检测或测量。在本发明的情况中,检测的一般是生物标志物物质。

[0082] 许多免疫测定形式是本领域技术人员已知的,所述本领域技术人员理解,从免疫

测定获得的信号是一种或更多种抗体(优选的检测试剂组分)与含有抗体与其结合之必需表位的多肽(生物标志物的代表性种类)之间形成的复合物的直接结果。本文中使用的术语“将信号与分析物的存在或量相关联”反映了该理解。如已描述的,通常通过使用已知目标分析物浓度计算的标准曲线将测定信号与分析物的存在或量相关联。如术语在本文中所使用的,如果测定可产生指示生理学相关浓度之分析物的存在或量的可检测信号,测定被“配置成检测”分析物。

[0083] 一般来说,免疫测定涉及将含有或怀疑含有目标生物标志物的样品与至少一种与所述生物标志物特异性结合的抗体(或抗原结合性抗体片段或其他试剂,例如适配体(aptamer)、结合所述生物标志物的受体或受体片段等)接触。然后产生指示所述样品中生物标志物与抗体(或其他种类的检测试剂)结合形成的复合物之存在或量的信号。然后,将该信号与样品中生物标志物的存在或量相关联。用于检测和分析生物标志物的许多方法和装置是本领域技术人员公知的。参见例如美国专利号6,143,576、6,113,855、6,019,944、5,985,579、5,947,124、5,939,272、5,922,615、5,885,527、5,851,776、5,824,799、5,679,526、5,525,524和5,480,792,以及The Immunoassay Handbook, David Wild, ed., Elsevier 2005,其各自通过引用整体(包括所有的表格、附图和权利要求)并入本文。

[0084] 在一些优选的实施方案中,本领域中已知的测定装置和方法可使用多种夹心竞争性或非竞争性免疫测定形式中经标记的分子来产生与目标生物标志物之存在或量相关的信号。其他合适的测定形式还包括色谱法、质谱法和蛋白质“印迹”法。另外,可使用某些方法和装置(例如生物传感器和光学免疫测定)来确定分析物的存在或量,而不需要经标记的分子。参见例如美国专利5,631,171和5,955,377,其各自通过引用整体(包括所有的表格、附图和权利要求)并入本文。本领域技术人员还认识到,机器人仪表(robotic instrumentation)(包括但不限于Beckman ACCESS<sup>®</sup>、Abbott AXSYM<sup>®</sup>、Roche ELECSYS<sup>®</sup>和Dade Behring STRATUS<sup>®</sup>系统等)也是能够进行免疫测定的免疫测定分析仪。但是,可使用任何合适的免疫测定,例如酶联免疫测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)、竞争性结合测定等。

[0085] 抗体或其他多肽(或其他类型的检测试剂,例如适配体)可固定在用于测定的多种固体支持物上。可用于固定特异性结合成员的固相包括在固相结合测定中作为固相开发和/或使用的那些。合适固相的实例包括膜过滤器、基于纤维素的纸、珠(包括聚合物颗粒、胶乳颗粒和顺磁性颗粒)、玻璃、硅片(silicon wafer)、微粒、纳米颗粒、TentaGel、AgroGel、PEGA凝胶、SPOCC凝胶和多孔板。抗体或其他检测试剂可通过与测定装置表面直接缀合或通过间接结合来与测定装置的特定区域结合。在后一种情况的一个实例中,抗体或其他多肽可固定在颗粒或其他固体支持物上,并且该固体支持物固定于装置表面。

[0086] 生物测定需要检测方法,并且量化结果的最常用方法之一是将可检测标记物与具有对所研究的生物体系中组分(例如,目标生物标志物)之一具有亲和力的蛋白质或核酸(或其他种类的检测试剂)缀合。可检测标记物可包括本身可被检测的分子(例如,荧光部分、电化学标记物、ecI(电化学发光(electrochemical luminescence))标记物、金属螯合剂、胶体金属颗粒、放射性标记物等)、以及可通过产生可检测的反应产物(例如,酶,例如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶等酶等)或通过使用本身可被检测的特异性结合分子(例如,与二抗结合的经标记抗体、生物素、地高辛、麦芽糖、寡聚组氨酸(oligohistidine)、2,4-二硝

基苯、苯基砷酸盐 (phenylarsenate)、ssDNA、dsDNA等) 间接检测的分子。可直接或间接检测的标记物可称为“信号产生元件 (signal development element)”。

[0087] 从信号产生元件产生信号可使用本领域中公知的多种光学、声学 and 电化学方法进行。检测模式的实例包括荧光、放射化学检测、反射比 (reflectance)、吸光度、电流分析 (amperometry)、电导 (conductance)、阻抗 (impedance)、干涉测量 (interferometry)、椭圆偏振测量 (ellipsometry) 等。在这些方法的某些中, 固相抗体与用于产生信号的换能器 (例如, 衍射光栅 (diffraction grating)、电化学传感器等) 耦合, 而在另一些方法中, 通过与固相抗体 (例如, 使用激发光源和光检测器的荧光计) 在空间上分开的换能器产生信号。该列表不意在限制。基于抗体的生物传感器也可用于确定分析物的存在或量, 这任选地消除了对经标记分子的需要。

[0088] 固相和可检测标记物缀合物 (即, 含有与检测试剂物质缀合的可检测标记物的分子) 的制备经常包括使用化学交联剂。交联试剂含有至少两个反应性基团, 并且通常分为单官能交联剂 (含有相同的反应性基团) 和杂官能交联剂 (含有不同的反应性基团)。通过胺、巯基或非特异性反应偶联的单官能交联剂可从许多商业来源获得。马来酰亚胺、烷基和芳基卤化物、 $\alpha$ -卤代酰基和吡啶基二硫化物是硫醇反应性基团。马来酰亚胺、烷基和芳基卤化物、以及  $\alpha$ -卤代酰基与巯基反应以形成硫醇醚键, 而吡啶基二硫化物与巯基反应以产生混合的二硫化物。吡啶基二硫化物产物可是切割的。亚氨酸酯 (imidoester) 对于蛋白质-蛋白质交联也非常有用。多种杂官能交联剂 (各自组合不同的用于成功缀合的属性) 是商购可得的。

[0089] 为了获得定量或半定量的结果, 必须将结果与已知浓度的标准进行比较。这通常通过使用一条或更多条标准曲线来完成。然后检查应答于未知物的曲线位置, 因此获得未知物的量。

[0090] 检测特定蛋白质或其他生物标志物物质的量可通过多种方法实现, 其中任一种可很容易地适用于实施本发明。ELISA 是用于检测抗体或抗原水平的常用技术。最常用的方法之一是用酶、放射性同位素或者荧光来标记抗原或抗体。其他合适的技术包括凝集、流式细胞术、Luminex 测定、细胞计数珠阵列 (cytometric bead array) 和横向流以及目前已知或以后开发的其他技术。

[0091] 免疫测定可涉及“夹心”法, 其中待检测的分析物 (例如, 存在于泪中的与干眼病相关的蛋白质) 被两种其他实体结合, 例如通过固定在基底上且对靶生物标志物物质具有特异性的捕获试剂和与所靶向的生物标志物物质上的其他表位结合的经标记检测试剂。这样, “夹心”可用于测量捕获试剂与检测试剂之间结合的生物标志物的量。夹心测定对于检测以低浓度存在的或在含有高浓度其他分子物质的复合溶液 (例如泪) 中的分析物尤其有价值。如所知的, 在这些类的测定中, “捕获”试剂固定在固相上 (即, 在基底上), 例如载玻片、塑料条或微粒。然后添加已知或怀疑含有所靶向生物标志物的液体生物样品 (例如泪样品), 并使其与固定的捕获试剂复合。除去未结合的产物, 随后添加检测试剂, 并使其与已被捕获试剂“捕获”在基底上的生物标志物物质结合, 从而完成“夹心”。这些相互作用可随后用于量化被捕获生物样品中存在的生物标志物物质的量。

[0092] 如将理解的那样, 多种不同的干眼病相关捕获试剂物质 (例如, 2、5、10、25、50、100 或更多种捕获试剂物质) 可固定在基底上 (或不同的基底 (例如, 不同的可分辨微粒

(distinguishable microparticle))上),以便通过“捕获”来检测单个多元测定中多种不同的生物标志物物质。为了允许在单个测定中同时检测多种生物标志物物质,可使用多元测定形式。多元形式提供了允许在单个基底上的多个阵列地址(array address)处同时检测多种分析物(例如,不同的生物标志物物质)之不同部分的阵列。或者,当本发明的系列散布在多个基底上时,例如,在其中不同的干眼病相关捕获或检测试剂物质固定在可被辨识的基底(例如,配置成用于在Luminex测定中的差异标记的微粒)上的一些实施方案中,多阵列地址仍可很容易地辨识。

[0093] 因此,在某些实施方案中,本发明的测定方法利用免疫测定。在某些实施方案中,用于进行此类测定的试剂在测定装置中提供,并且此类测定装置可包含在这样的试剂盒中。优选的试剂可包含两种或更多种独立选择的固相检测试剂,其各自包含对其固定在相同或不同基底(在此为任何合适的固体支持物)上的靶生物标志物具有特异性的抗原试剂物质。在夹心免疫测定的情况中,这样的试剂还可包含一种或更多种可检测标记的抗体,所述可检测标记的抗体包含检测与可检测标志物结合的预期生物标志物靶标的抗体。下文中描述了可作为测定装置的一部分来提供另外的任选要素。用于检测和分析生物标志物的许多方法和装置是技术人员公知的。参见例如美国专利6,143,576、6,113,855、6,019,944、5,985,579、5,947,124、5,939,272、5,922,615、5,885,527、5,851,776、5,824,799、5,679,526、5,525,524和5,480,792,以及The Immunoassay Handbook, David Wild, ed. Stockton Press, New York, 1994。

[0094] 本发明的某些方面涉及诊断试剂盒。这样的试剂盒包含根据本发明的生物标志物检测系列,以允许进行本发明的方法。这样的试剂盒还可包含用于进行本文中描述的一个或更多个方法的装置和使用说明。所述使用说明可以是标签的形式,其是指在试剂盒的制造、运输、销售或使用期间帖附于或以其他方式伴随试剂盒的任何书面材料或记录材料。例如,术语标签涵盖广告传单和小册子、包装材料、使用说明、计算机存储媒介以及直接印在试剂盒上的文字。

[0095] 在一些优选的实施方案中,本发明的系列还将包含对照,优选至少一个阳性对照和一个阴性对照。可选择任何合适组的对照。

[0096] 另外的临床征候(clinical indicia)可与本发明的生物标志物测定结果相组合。这些包括与干眼病相关或相关联的其他生物标志物。还可与本发明的测定结果相组合的其他临床征候包括患者人口统计信息(例如,体重、性别、年龄、种族、吸烟状态)、病史(例如,家族史、手术类型、预先存在或先前的疾病)、以及遗传学信息。以这种方式将测定结果/临床征候相组合可包括使用多元逻辑回归(multivariate logistical regression)、对数线性建模(loglinear modeling)、神经网络分析(neural network analysis)、n-of-m分析、决策树分析(decision tree analysis)等。该列表并不意在是限制性的。

[0097] 本文中使用的术语“诊断”是指技术人员可评估和/或确定患者是否患有给定疾病或病症之概率(“可能性”)的方法。在本发明的情况中,“诊断”包括使用本发明的测定(最优免疫测定)的结果(任选地与其他临床特性一起),以实现对其获得样品并进行检测之对象的干眼病进行诊断。“确定”这样的诊断并不意在表明诊断为100%准确。许多生物标志物指示多种病症。熟练的临床医师不在信息真空的情况下使用生物标志物结果,而是与其他临床征候一起使用以实现诊断。因此,在预先确定的诊断阈值一侧上的测量的生物标志

物水平表明,与预先确定的诊断阈值另一侧上的测量水平相比,对象中发生疾病的可能性更大。

[0098] 类似地,预后风险表明将发生给定过程或结果的概率(“可能性”)。预后指标的水平或水平变化(其继而与发病概率提高相关(例如,特定疾病或病症的恶化))被认为是“指示对象中不利结果的可能性提高”。

[0099] 在一些优选的诊断实施方案中,本发明的方法允许诊断疾病(特别是干眼病)的发生或未发生,并且测定结果与特定疾病的发生或未发生相关联。例如,各测量的生物标志物水平(例如,浓度)可与阈值相比较,其对于每种生物标志物物质(或者待在给定测定中研究的其他分析物或生物标志物)可以不同。本文中关于使用生物标志物使用的术语“相关联”、“与……相关联”和“与……相关”是指将患者中生物标志物的存在或量与其在已知患有给定病症或已知存在给定病症风险的人或在已知没有给定病症的人中的存在或量进行比较。通常,这采取以下形式:将生物标志物浓度形式的测定结果与预先确定的选择用于指示疾病发生或未发生或者一些未来结果可能性的阈值进行比较。

[0100] 在本文上下文中,“患病”意指具有一种特征(存在疾病或病症或者发生一些结果)的群体,并且“未患病”意指缺乏该特征的群体。虽然单一的决定阈值是此类方法的最简单应用,但是可使用多重决定阈值。例如,低于第一阈值,可以以相对高的置信度确定不存在疾病;而高于第二阈值,也可以以相对高的置信度确定存在疾病。在两个阈值之间可认为不确定。这实质是仅意在是示例性的。

[0101] 选择诊断阈值涉及对疾病概率的考虑、在不同测试阈值时正确和错误诊断的分布、以及在诊断的基础上对治疗(或治疗失败)结果的评估等。例如,当考虑施用高效并且低风险水平的特定治疗时,则需要很少的测试,因为临床医师和患者愿意接受实际上的诊断不确定性。另一方面,在其中治疗选择不太有效并且风险较大的情况中,临床医师和患者在采用特定治疗方案之前,常要求更高层次的诊断确定性。因此,在选择诊断阈值中涉及成本/效益分析。

[0102] 可使用多种方法以达到用于这些方法的期望阈值。例如,阈值可通过选择代表在这样的正常对象中测量的生物标志物的第75、85、90、95或99百分位数(percentile)的浓度从正常对象的群体确定。或者,阈值可通过选择代表在这样的对象中测得的生物标志物的第75、85、90、95或99百分位数的浓度从“患病”对象群体(例如,患有疾病(例如干眼病)或具有干眼病易感性、其复发或进展的那些)确定。在另一个替代方案中,阈值可从同一对象的生物标志物的先前测量中确定,其中先前的“基线”结果用于监测生物标志物水平的暂时改变;也就是说,对象中生物标志物水平的暂时改变可用于诊断和/或预后目的。

[0103] 然而,上述讨论并不意在表明本发明测定中测量的生物标志物水平必须与相应的个体阈值进行比较。用于组合测定结果的方法可包括使用多元逻辑回归、对数线性建模、神经网络分析、n-of-m分析、决策树分析、计算标志物比例等。该列表并不意在是限制性的。在这些方法中,通过将单个生物标志物数据或结果组合而确定的复合结果可本身如同一个标志物来处理;也就是说,对于个体生物标志物,可如本文中所述确定复合结果的阈值,并且个体患者的复合结果与该阈值进行比较。

[0104] 也可使用群体研究来选择决定阈值。受试者操作特性(“receiver operating characteristic,ROC”)源自第二次世界大战期间为进行雷达图像分析而开发的信号检测

理论领域,并且ROC分析经常用于选择能够最好地从“未患病”亚群中区分“患病”亚群的阈值。当对象测试为阳性但实际上没有患病时,在这种情况下发生假阳性。另一方面,当人测试为阴性时(表明他们是健康的),当他们实际上确实患有疾病时,发生假阴性。为了绘制ROC曲线,随着决定阈值持续发生变化确定真阳性率(true positive rate,TPR)和假阳性率(false positive rate,FPR)。因为TPR与敏感性相等同,并且FPR等于1-特异性,ROC图有时被称为敏感性-(1-特异性)图。完美的测试将具有1.0的ROC曲线下面积;随机测试将具有0.5的面积。选择阈值来提供可接受的特异性和敏感性水平。

[0105] 因此,可使用ROC分析确立特定测试区分两个群体的能力。例如,从“第一”亚群(其倾向于将来疾病或疾病相关变化)和从“第二”亚群(其无这种倾向)确立的ROC曲线可用于计算ROC曲线,而曲线下面积提供测试质量的量度。优选地,本文中描述的测试提供大于0.5、优选至少0.6、更优选0.7、还更优选至少0.8、甚至更优选至少0.9、并且最优选至少0.95的ROC曲线面积。

[0106] 在某些方面中,一个或多个靶生物标志物(例如,与疾病相关的血清自身抗体)的测量浓度或者结果的复合可作为连续变量处理。例如,任何特定的浓度可转换成对象的一些结果的相应概率。在另一个替代方案中,在将对象群体分离到“类别(bin)”(例如“第一”亚群(例如,其倾向于疾病状态的一种或更多种未来的改变、疾病的发生或复发、疾病分类或分级等)和不如此倾向的“第二”亚群)中,阈值可提供可接受水平的特异性和敏感性。

[0107] 如上所讨论,合适的测试可在这些不同的量度中显示以下结果的一个或多个:特异性大于0.5、优选至少0.6、更优选至少0.7、还更优选至少0.8、甚至更优选至少0.9并且最优选至少0.95,对应的敏感性大于0.2、优选大于0.3、更优选大于0.4、还更优选至少0.5、甚至更优选0.6、也更优选大于0.7、还更优选大于0.8、更优选大于0.9并且最优选大于0.95;敏感性大于0.5、优选至少0.6、更优选至少0.7、还更优选至少0.8、甚至更优选至少0.9并且最优选至少0.95,对应的特异性大于0.2、优选大于0.3、更优选大于0.4、还更优选至少0.5、甚至更优选0.6、也更优选大于0.7、还更优选大于0.8、更优选大于0.9并且最优选大于0.95;与至少75%的特异性相组合的至少75%敏感性;ROC曲线面积大于0.5、优选至少0.6、更优选0.7、还更优选至少0.8、甚至更优选至少0.9并且最优选至少0.95;比值比(odd ratio)不同于1、优选至少约2或更大或者约0.5或更小、更优选至少约3或更大或者约0.33或更小、还更优选至少约4或更大或者约0.25或更小、甚至更优选至少约5或更大或者约0.2或更小并且最优选至少约10或更大或者约0.1或更小;阳性似然比(likelihood ratio)(作为敏感性/(1-特异性)来计算)为大于1、至少2、更优选至少3、还更优选至少5并且最优选至少10;和/或阴性似然比(作为(1-敏感性)/特异性来计算)为小于1、小于或等于0.5、更优选小于或等于0.3并且最优选小于或等于0.1a

[0108] 除阈值比较之外,用于将测定结果与患者分类(疾病的发生或未发生、结果的可能性等)相关联的其他方法包括决策树、规则集(rule set)、贝叶斯法(Bayesian method)和神经网络法。这些方法可产生代表对象属于多种类别中一种类别之程度的概率值。

[0109] 测试准确度的量度可如Fischer,et al.,Intensive Care Med.29:1043-51,2003中所述获得,并且用于确定给定生物标志物的有效性。这些量度包括敏感性和特异性、预测值、似然比、诊断比值比以及ROC曲线面积。ROC图的曲线下面积(“AUC”)等于分类器将排列随机选择的阳性实例的概率(高于随机选择的阴性实例的概率)。ROC曲线下面积可被认为

是等同于曼-惠特尼U检验 (Mann-Whitney U test) (其检验在所考虑的两个组中获得的得分之间的中位数差异), 或者等同于威尔科克森秩检验 (Wilcoxon test of ranks)。

#### [0110] 抗体

[0111] 在本文中描述的免疫测定中使用的抗体(或抗原结合性抗体片段等)优选与本发明的与DED相关或相关联的生物标志物特异性结合。术语“特异性结合”并不旨在表明抗体与其预期的靶标排他性地结合, 因为抗体能够与展示出与抗体结合之表位的任何分子结合。而是当与不展示出合适表位的非靶标分子的亲和力相比时, 如果其与预期靶标的亲和力高约5倍, 则抗体“特异性结合”。优选地, 抗体对靶标分子的亲和力比其对非靶标分子的亲和力将至少高约5倍、优选10倍、更优选25倍、甚至更优选50倍并且最优选100倍或更多倍。在一些优选的实施方案中, 优选的抗体以至少约 $10^6\text{M}^{-1}$ 或 $10^7\text{M}^{-1}$ 至约 $10^{12}\text{M}^{-1}$ 并且优选约 $10^8\text{M}^{-1}$ 至约 $10^9\text{M}^{-1}$ 、约 $10^9\text{M}^{-1}$ 至约 $10^{10}\text{M}^{-1}$ 或约 $10^{10}\text{M}^{-1}$ 至约 $10^{12}\text{M}^{-1}$ 的亲和力结合。

[0112] 亲和力作为 $K_d = k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$  ( $k_{\text{off}}$ 是离解速率常数,  $k_{\text{on}}$ 是缔合速率常数, 并且 $K_d$ 是平衡常数) 计算。通过测量不同浓度(c)的经标记配体的结合分数(r)可确定平衡时的亲和力。使用斯卡查德方程 (Scatchard equation) 为数据做图:  $r/c = K(n-r)$ ; 其中r = 结合配体的摩尔数/平衡时受体的摩尔数; c = 平衡时的游离配体浓度; K = 平衡缔合常数; n = 每个受体分子的配体结合位点数目。通过图解分析, r/c在y轴上相对于r在x轴上进行作图, 由此产生斯卡查德图。通过斯卡查德分析来测量抗体亲和力是本领域中公知的。

[0113] 许多出版物讨论使用噬菌体展示技术来产生和筛选用于与所选分析物结合的多肽文库。参见例如美国专利no. 5, 571, 698。噬菌体展示法的基本概念是在待筛选的编码多肽之DNA与所述多肽之间建立物理联系。这种物理联系由噬菌体颗粒提供, 其将多肽作为包封编码多肽之噬菌体基因组的壳体的一部分来展示。多肽与其遗传物质之间建立物理联系允许同时大量筛选非常大数目的带有不同多肽的噬菌体。展示对靶标具有亲和力之多肽的噬菌体与所述靶标结合, 并且这些噬菌体通过针对所述靶标的亲和力筛选而富集。由这些噬菌体展示的多肽的身份可从其各自的基因组确定。使用这些方法确认对期望的靶分析物具备结合亲和力的多肽可随后通过常规手段大批合成。参见例如美国专利no. 6, 057, 098。

[0114] 通过这些方法产生的抗体可随后通过以下进行选择: 首先用经纯化的目标生物标志物筛选亲和力和特异性并且(如果需要的话)将结果与抗体与期望排除结合之生物标志物的亲和力和特异性进行比较。筛选程序可涉及在微量滴定板的独立孔中固定经纯化的生物标志物。然后将含有潜在抗体或抗体组的溶液置于各自的微量滴定孔中并孵育约30分钟至2小时。然后清洗微量滴定孔并将经标记的二抗(例如, 如果培养的抗体是小鼠抗体, 则为与碱性磷酸酶缀合的抗小鼠抗体)添加到孔中并孵育约30分钟, 然后清洗。向孔中添加底物, 当存在针对所固定之多肽的抗体时, 将出现显色反应。

[0115] 如此鉴定的抗体可随后在所选择的测定设计中进一步分析亲和力和特异性。在靶蛋白质或其他类型生物标志物之免疫测定的开发中, 经纯化靶分析物充当使用已选择的抗体来判断免疫测定之敏感性和特异性的标准。因为不同抗体的结合亲和力可不同, 并且由于某些抗体对(例如, 在夹心测定中)可在空间上彼此干扰等, 所以抗体的测定性能可以是比抗体的绝对亲和力和特异性更为重要的量度。

#### [0116] 应用

[0117] 本发明的检测试剂、系列、阵列和试剂盒有许多应用, 包括对患有干眼病的对象或

患者进行监测、预后、诊断或联合治疗。

[0118] 本发明的阵列可用于评估来自已知患有、怀疑患有或先前已诊断和/或治疗患有特定疾病(例如干眼病(例如(舍格伦综合征))的患者的生物样品,以及用于筛选不先前已知或怀疑患有特定疾病的对象。在筛选时,对象或患者可以是有症状的或无症状的。与置于阵列上的生物标志物反应性试剂物质或抗原的一些或全部相对应的生物标志物水平可预后性地用于例如确定患者的疾病是否适于特定治疗、监测疾病进展和/或治疗方案的有效性、评估疾病的侵袭性和/或确认复发的可能性。本发明的阵列还可用于诊断和筛选目的。例如,阵列可配置成用于诊断干眼病的一种或更多种亚型。

[0119] 本发明的装置和阵列还可用作例如伴随诊断以鉴定患者为特定药物治疗或其他治疗方案的可能的应答者或非应答者,以及用于评估作为生物标志物谱的患者疾病阶段可能在疾病进展过程中发生变化。例如,肿瘤表达不同的蛋白质(并因此产生不同的抗原)以满足在开发的每个阶段的不同要求。类似地,自身免疫病可在不同的时间“突然爆发(flare)”。

[0120] 来自疾病样品的数据集也可以与临床数据相关联。抗体谱可用于预测疾病的严重程度或临床结果,这将可用于预后应用。生物标志物系列的使用将允许评估疾病的不同阶段,因为给定样品的生物标志物谱将允许辨别给定疾病的特定阶段,从而允许使用最有效的治疗性干预。

[0121] 本发明的装置和阵列也可用于药物的开发(在发现和临床开发阶段),特别用于生物药物,例如抗体和其他重组蛋白质以及基于细胞或囊泡的药物递送系统。至少在一些情况下,这类药物可引起可以是有利的(例如,对疫苗的阳性应答)或有害的(例如,严重的不良自身免疫反应)的免疫应答。类似地,由于施用药物后细胞和组织的改变,免疫应答也可由施用小分子药物引起。在临床试验中监测对生物药物和小分子药物之免疫应答的能力从未如此重要。不仅监测细胞免疫应答而且监测体液免疫应答是有价值的,并且将治疗之前与之后的血清抗体谱进行比较可帮助预测有利的药物应答。对药物的阳性应答者将展示出对于其疾病来说不同的基线体液免疫状态。这在通过调节现有免疫应答而不是刺激从头(de novo)免疫应答来发挥作用之免疫调节剂类药物的情况下是尤其有价值的。通过将来自无应答者与对特定药物(或药物组合)阳性或阴性应答者的数据组,可定义用于分析不同组自身抗体的系列。这样的系列将允许鉴定可能对特定治疗有应答的患者。类似地,应答者与非应答者之间针对特定生物标志物的应答谱的差异可用于评估患者是否从特定治疗方案受益。

[0122] 如将理解的那样,不同的临床研究设计将允许开发解决药物开发和治疗中的不同需求的生物标志物系列。例如,鉴定应答者和非应答者将允许临床医师在治疗之前通过使用基于应答预测性生物标志物系列谱的伴随诊断测试来选择应答者。类似地,为了在临床试验中选择患者群组(cohort),预测阳性药物应答的生物标志物谱可用于在将对象招募到临床试验之前对其进行筛选。这将确保只有合适的候选人入选,而且它还可用于尽早获得对药物的批准。此外,关于药物无应答的信息可在考虑批准药物期间或在批准后监督期间(即,在IV期临床试验期间)对管理机构有帮助。

[0123] 在其中将可应用本发明的另一药物开发领域是在通过以下的“药物抢救”领域中:帮助限定适于成功治疗的患者群体以及不太可能发生应答的那些,或者也许甚至更重要的

是,如果施用所述药物将经历不良反应的那些。换句话说,对来自在临床开发的某一点失败的药物候选物的患者样品的回顾性分析可用于限定预测阳性药物应答的生物标志物系列谱(或识别标志)。然后该信息可用于限定随后的用于进一步研究和治疗的患者群组。可反复进行的该过程可复活已经由于差的或不充足的效力证据而放弃常规临床开发的药物。预测阳性药物应答的生物标志物系列谱可随后用于选择可能的应答者,这可导致进一步地临床评价先前失败的药物候选物,但具有大得多的最终实现药物批准的可能性。

#### [0124] 实施例

[0125] 提供以下实施例来举例说明本发明的某些方面,并帮助本领域技术人员实施本发明。这些实施例绝不能被认为是以任何方式限制本发明的范围,在适用领域中具备普通或更高技能的技术人员将很容易认识到,本说明书对本发明作了详尽描述并且可很容易地用于实现目标并获得所提及的结果和优势以及本文中固有的那些。

#### [0126] 实施例1

##### [0127] 干眼的体外诊断测试:在患有干眼之对象的泪膜中检测干眼生物标志物的水平

#### [0128] 1. 简介

[0129] 本实施例描述了使用在泪液中测量生物标志物水平的体外诊断测试对作为用于诊断怀疑患有干眼之对象的生物标志物的淋巴毒素 $\alpha$ 、GM-CSF、IL-4、IL-3和IL-10进行调查。在该研究中,基于临床参数和症状评估招募干眼患者和正常对照对象,并且测试其泪液中的生物标志物水平并进行比较。

#### [0130] 2. 目的

[0131] 公知的是,DED的标准临床测量变异性大且可靠性差,并且用于DED诊断和监测的很多临床操作在很大程度上不可重复。此外,临床体征经常与主观的患者报道之症状相关性差。

[0132] 干眼病中眼症状与临床体征之间以及不同临床客观度量之间较差的相关性或完全不一致一直是疾病研究和药物开发中的主要挑战。导致眼表疾病病理学和表现之异质性的可用于基础性分子和细胞组分之IVD测试的生物标志物鉴定和确认具有重大意义。

[0133] 在该实施例中,对患有干眼病的患者和正常对照进行在泪膜中测量生物标志物水平的体外诊断测试,并且与其他临床评价方法联合评价生物标志物用于诊断干眼的效用。

#### [0134] 3. 方法和材料

##### [0135] 患者

[0136] 第一生物标志物数据集包含来自85位干眼患者和15位正常对照对象的生物标志物测试结果。临床诊断测试结果包括主观症状(眼表疾病指数、OSDI、干眼症状评估调查问卷)、希尔默测试(无麻醉)结果、泪破裂时间(tear break-up time, TBUT)测试结果、角膜染色、结膜染色、以及其他一般性眼科检查,例如视敏度(visual acuity)和裂隙灯(slit lamp)检查。在该数据集里,正常对照对象的OSDI得分小于13, TBUT等于或大于5秒,并且角膜荧光素染色得分小于4(NEI量表)。干眼患者的OSDI得分等于或大于23,并且TBUT短于7秒。

[0137] 第二生物标志物数据集包含来自研究33位临床诊断的干眼患者眼的生物标志物测试结果。这些干眼患者的OSDI得分等于或大于23, TBUT短于7秒,并且角膜染色得分至少为3(NEI量表)。

[0138] 泪收集

[0139] 对于生物标志物研究,使用玻璃微毛细管(无麻醉)从结膜下穹(inferior fornix)的横向结膜囊内的泪湖(tear lake)收集非刺激性泪液(约3 $\mu$ l)。

[0140] 生物标志物检测

[0141] 对于每种生物标志物,用基于抗体的免疫测定对泪液中的生物标志物水平进行测量。对于每种生物标志物使用不同的基于抗体的检测试剂。目标生物标志物中包括淋巴毒素、IL-4、IL-3、CSF2 (GM-CSF) 和IL-10等蛋白质分析物。

[0142] 统计分析

[0143] 生物标志物浓度值首先进行对数转换。然后确定几何平均值、中位值、范围和来自T检验的P值。计算特异性、敏感性(真实阳性率(true positive rate), TPR)以及假阳性率(false positive rate, FPR)。生成准确度和ROC图。

[0144] 4. 结果

[0145] DED患者的聚类分析和主成分分析(PCA)

[0146] 使用分层聚类分析的无监督方法被用于基于其泪标志物谱分析DED患者。在数据集内,明显存在四(4)个不同的患者亚组(图1)。第1、2、3、4亚组中分别存在31位、29位、5位和20位DED对象。使用来自研究每位患者眼(基于角膜染色在筛选随访时预期地定义为最差的眼)的数据或将两个对侧眼取平均来进行聚类分析时,观察到相似的图案。与为双侧眼病症的DED一致,先前发现临床参数和许多泪细胞因子及蛋白质标志物在对侧眼之间是相当的。

[0147] 通过聚类分析揭示的这些患者亚组也可通过基于其泪标志物谱的主成分分析(PCA)进行分辨(图2)。有趣的是,在PCA中,亚组1(图2,绿色)不可与正常对照组(图2,银色)区分。因此,亚组1中的患者被称为正常样对象,其中与非DED对照对象组的泪标志物谱没有明显差别,并且他们因此在随后的用于选择DED生物标志物的差异分析中从DED组排除。

[0148] 干眼组与正常对照组之间的比较

[0149] 在干眼患者组与正常对照组之间用T检验对生物标志物测试结果进行比较。鉴定与正常对照组相比DED组中显著下调的DED生物标志物( $P < 0.0001$ , T检验), 下调前5位的生物标志物候选物的散点图示于图3-7中,包括淋巴毒素 $\alpha$ 、IL-4、IL-3、CSF2 (GM-CSF) 和IL-10。平均降低为约10倍或更高(以 $\log_{10}$ 间隔的 $\Delta$ 为1)。表1中列出了所选的5种生物标志物的T检验的几何平均值、中位值、范围和P值。

[0150] 干眼生物标志物的ROC曲线

[0151] 分别对这5种作为干眼诊断测试的生物标志物中的每一种计算特异性和敏感性。对于每种生物标志物,使用TPR和FPR生成ROC曲线(参见图8-12)。ROC曲线对泪液中每种生物标志物的多个截断值的真阳性率(敏感性)相对于假阳性率(1-特异性)作图。还计算了ROC曲线下面积(AUC),并且该面积是准确度。ROC曲线可用于比较不同测试的性能。准确度ROC的AUC为89.4%(对于淋巴毒素 $\alpha$ )、99.0%(对于IL-4)、98.3%(对于IL-3)、98.5%(对于CSF2)和98.4%(对于IL-10)(参见表1)。

[0152] 干眼生物标志物的截断阈值

[0153] 在该数据集中,如果将800pg/mL淋巴毒素 $\alpha$ 设为使用泪进行干眼诊断测试的截断阈值,则测试的特异性和敏感性将分别为91%和96%。阳性预测值为0.8%并且阴性预测值

为76.9%。如果将1L-4的200pg/mL泪水平设为截断阈值,则特异性和敏感性将分别为97.6%和90.9%。阳性预测值为98.8%并且阴性预测值为83.3%。如果将1L-10的45pg/mL泪水平设为截断阈值,则特异性和敏感性分别为90.9%和96.4%,并且阳性预测值和阴性预测值分别为98.8%和76.9%。如果将1L-3的300pg/mL泪水平设为截断阈值,则特异性和敏感性分别为90.9%和91.7%,并且阳性预测值和阴性预测值分别为98.7%和58.8%。

#### [0154] 干眼生物标志物测试的确认研究

[0155] 在第二次且单独进行的包含来自33位干眼患者的临床和生物标志物数据的临床研究中,对上述生物标志物测试进行了评价。在该确认研究数据集中,干眼患者(所研究的眼)满足以下临床标准:OSDI分数等于或大于23,TBUT等于或短于5秒,并且角膜染色(NEI)为3或更高。与临床诊断相比,分别使用泪液中淋巴毒素 $\alpha$ 的800pg/mL截断阈值正确地预测了33位干眼患者中的28位(28/33,敏感性是84.8%);泪液中1L-4的200pg/mL截断值正确地预测了31位患者(31/33,敏感性是93.9%);泪液中1L-10的45pg/mL截断值正确地预测了27位患者(27/33,敏感性是81.8%);泪液中1L-3的300pg/mL截断值正确地预测了29位患者(29/33,敏感性是87.9%);并且泪液中CSF2的150pg/mL截断值正确地预测了26位患者(26/33,敏感性是78.8%)。

#### [0156] 实施例2

##### [0157] 用于使用酶联免疫吸附测定(ELISA)检测干眼的体外诊断(IVD)试剂盒

[0158] 使用ELISA的干眼IVD测试试剂盒可包含结合指至少一种本发明生物标志物的至少一种检测试剂物质。泪样品中生物标志物可非特异性地(通过吸附于表面)或特异性地(通过在“夹心”ELISA中由对同一抗原具有特异性的其他抗体捕获)固定在固体支持物(通常为聚苯乙烯96孔或384孔微量滴定板)上。生物标志物分析物被固定之后,添加与同一生物标志物结合的二抗或检测抗体,形成与抗原的复合物。检测抗体可与酶(例如,辣根过氧化物酶)共价结合,或其自身可由通过生物缀合与酶结合的二抗检测。添加显色底物(例如TMB),并且用吸光度板阅读器测量由测定产生的信号。

#### [0159] 实施例3

##### [0160] 用于检测干眼的多元系列IVD试剂盒

[0161] 用于干眼的多元系列IVD测试试剂盒可使用同时分析多个干眼特异性生物标志物的Meso Scale diagnostics (MSD) 电化学发光检测技术、Luminex多元珠阵列测定或蛋白质微阵列(抗体阵列)技术通过检测本发明的多于一种生物标志物来诊断怀疑患有干眼的对象。一个实例是用于同时检测泪中的LT- $\alpha$ 和1L-4以及诊断干眼的IVD试剂盒。

#### [0162] 实施例4

##### [0163] 用于迅速检测干眼的床边检测(Point of Care,POC)侧向流免疫测定诊断装置

[0164] 在该实施例中,所选的用于测试的干眼生物标志物是LT- $\alpha$ ,其用有色纤维素纳米珠标记。

##### [0165] A. 侧向流免疫测定条的制备

[0166] 缀合物垫:抗LT $\alpha$ 单克隆抗体与有色颗粒(在该实施例中,有色纤维素纳米珠(colored cellulose nanobead,CNB))缀合。经纯化CNB颗粒标记的抗LT $\alpha$ Mab缀合物(0.025%)以10ul/cm喷洒到18mm玻璃纤维缀合物垫上,然后干燥。

[0167] 硝酸纤维素(nitrocellulose,NC)膜:在NC膜上,用抗LT $\alpha$ 单克隆抗体以1mg/ml分

散测试线。对于对照线,1mg/ml的山羊抗小鼠抗体分散在所述测试线下游的膜上,使NC膜干燥。

[0168] 将NC膜、缀合物垫、样品垫、芯(wick)和衬底(backing)组装成卡(card)。将卡切割成5mm的条(strip),并将条组装成盒(cassette)。

#### [0169] B. 泪测试

[0170] 从怀疑患有干眼的对象收集3 $\mu$ L的泪样品,并将其施加至LT $\alpha$ 测试盒中的缀合物垫。然后将50 $\mu$ L的缓冲液施加至施加样品处上游的缀合物垫。在缀合物垫上,泪样品与用抗LT $\alpha$ 抗体标记的有色颗粒(CNB)接触。泪样品中存在的LT $\alpha$ 与经标记的LT $\alpha$ 抗体结合。然后将样品进一步移至包含具有抗LT $\alpha$ 抗体之测试线的NC膜检测区,从而捕获被经CNB标记的抗LT $\alpha$ 抗体结合的LT $\alpha$ 并阻止有色复合物移动通过,因此在测试线中形成浓集的经LT $\alpha$ 标记的有色颗粒并产生有色带。10分钟后,可检测的信号开始在测试线中出现。这可目视或用阅读装置检测。在样品中不存在LT $\alpha$ 下,所有经标记为抗LT $\alpha$ 抗体移动通过检测区而不形成有色带。没有可检测的信号表明从其收集泪样品的对象患有干眼。

[0171] 尽管上文仅详细描述了本发明的一些实施方案,本领域技术人员会很容易认识到,可对这些实施方案进行许多修改而不实质上背离本发明的新教导和优点。因此,这样的修改旨在包括在本发明的范围内。

[0172] 作为本发明的一个修改,泪样品首先与缓冲液混合,然后将混合物施加至缀合物垫。

[0173] 作为本发明的另一个修改,泪样品中的目标分析物包含多种待检测的分析物;缀合物垫浸渍有包含对其他分析物具有特异性并与其结合之第四结合剂和有色颗粒材料(例如不同的有色CNB颗粒)的其他分散结合的缀合物;NC膜还在测试线与对照线之间布置有其他测试线,并且对所述其他分析物具有特异性的第五结合剂固定于所述其他测试线。例如,第一分析物是LT $\alpha$ ,并且所述其他分析物是IL-4。

[0174] 作为本发明的另一个修改,测试结果可基于在测试线处色带的强度用阅读装置进行量化。

[0175] 对于本领域技术人员将是明显的是,本发明也可用于哺乳动物用兽药。

[0176] \* \* \*

[0177] 虽然已经提供了实施本发明的具体实施例,但是要理解的是,本领域技术人员可对其进行多种修改和改进而不背离本发明的精神和范围。

[0178] 可根据本公开内容制备和实施本文中描述和请求保护的所有装置、方法和组合物而无需过度实验。虽然本发明的装置、方法和组合物已经依据一些优选的实施方案进行描述,对于本领域来说明显的是,可对所述组合物和方法进行改变。对于本领域技术人员明显的所有这样的类似的替代方案和修改被认为是在由所附权利要求书所限定的本发明的精神和范围内。

[0179] 本说明书中提及的所有专利、专利申请和出版物指示本发明所属领域普通技术人员的水平。所有专利、专利申请和出版物(包括要求其优先权或其他权益的那些)通过引用并入本文,其程度如同各单独出版物具体地且单独地指明通过引用并入。

[0180] 本文中举例说明性描述的本发明可合适地在不存在本文中具体公开的任何要素下实施。因此,例如,在本文中每种情况下,任何术语“包含/包括”、“基本由.....组成”和

“由.....组成”可由另两个术语之一替换。已使用的术语和词语用作描述而非限制的术语,并且没有意图在使用这样的术语和词语中排除所显示和描述之特征或其一部分的任何等价物,但公认的是多种修改可在请求保护的发明的范围内。因此,应理解的是,尽管本发明已通过一些优选的实施方式和任选的特征具体公开,本领域技术人员可采用本文中公开的概念的修改和改变,并且这样的修改和改变被认为是在由所附权利要求书所限定的发明的范围内。

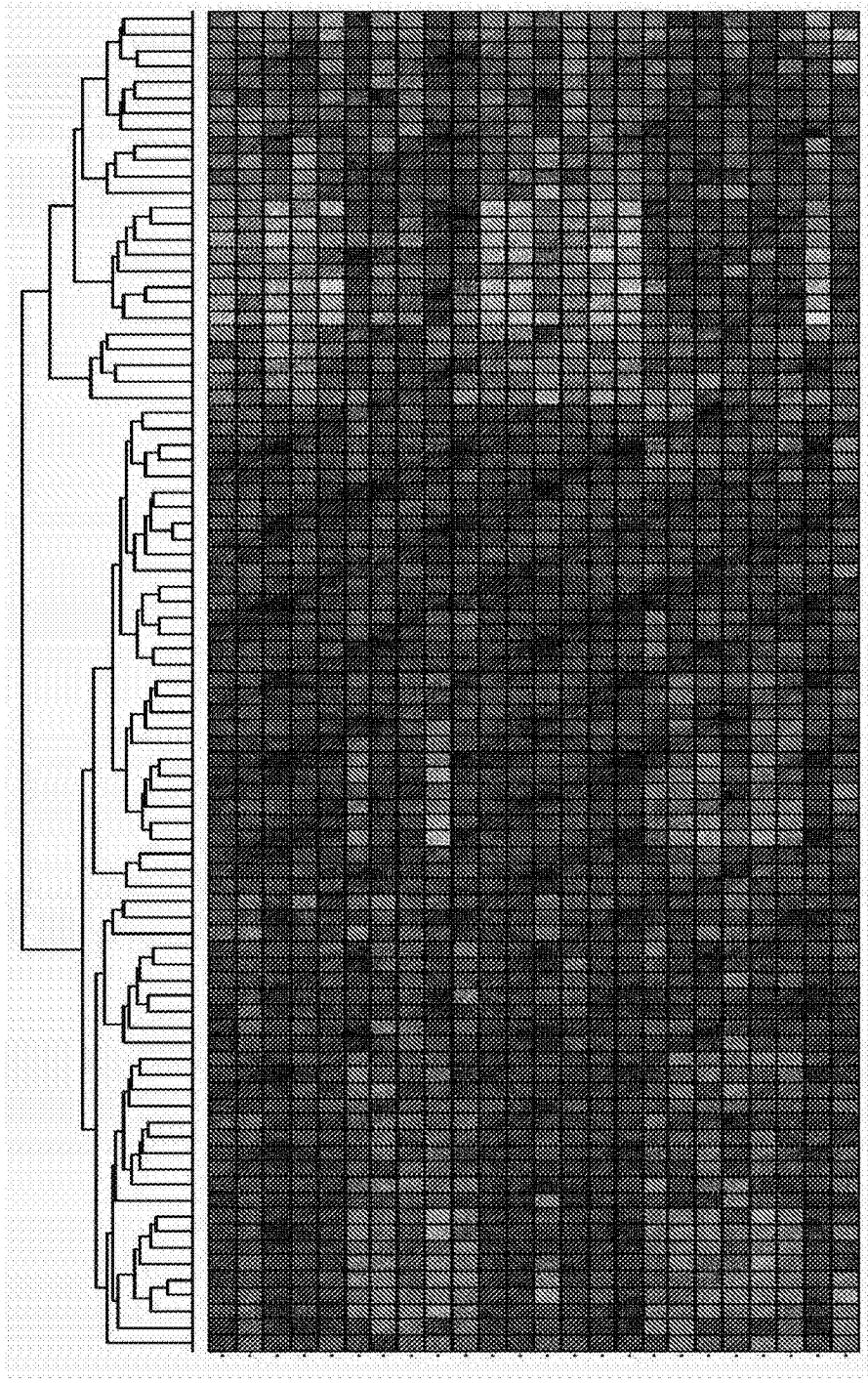


图1

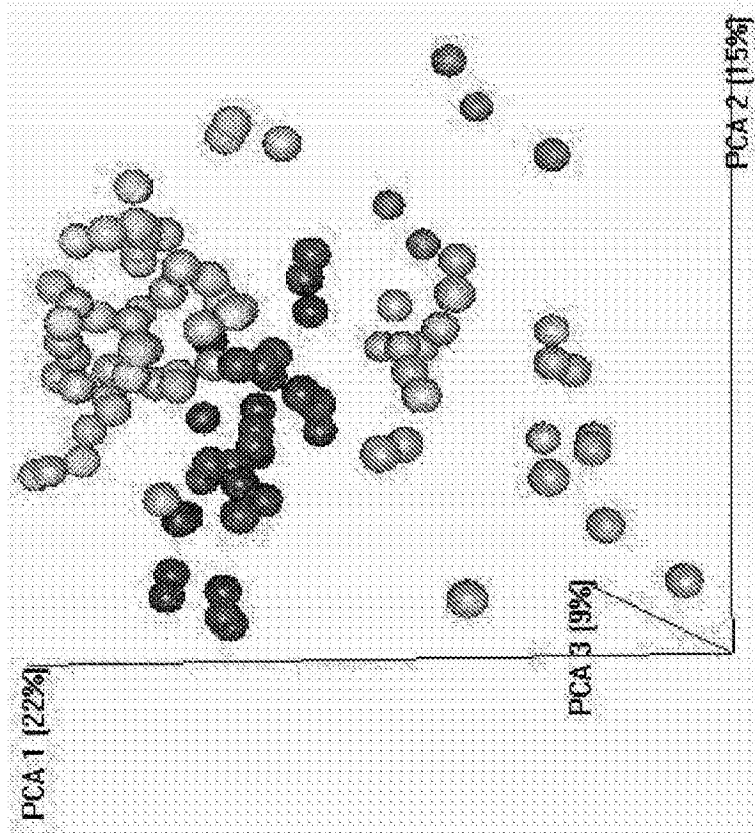


图2

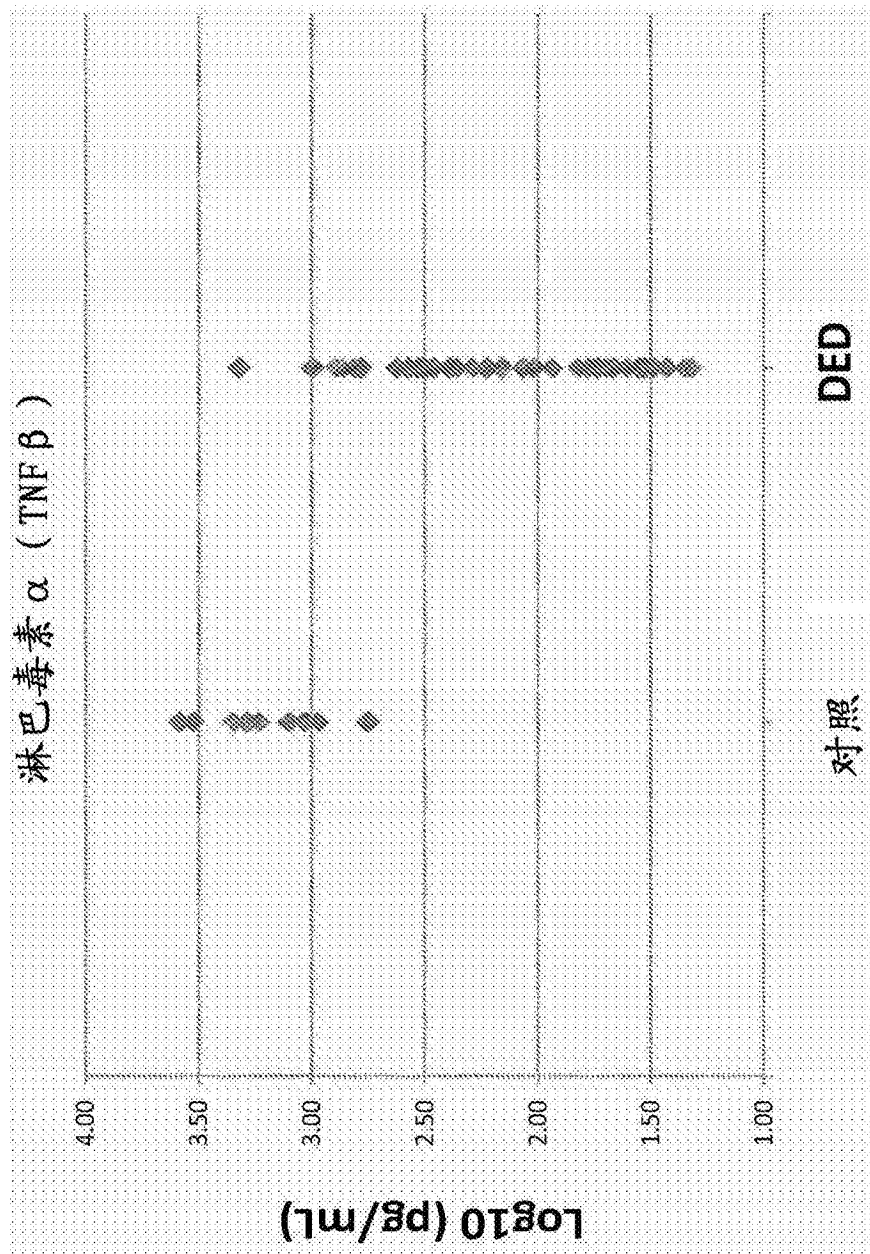


图3

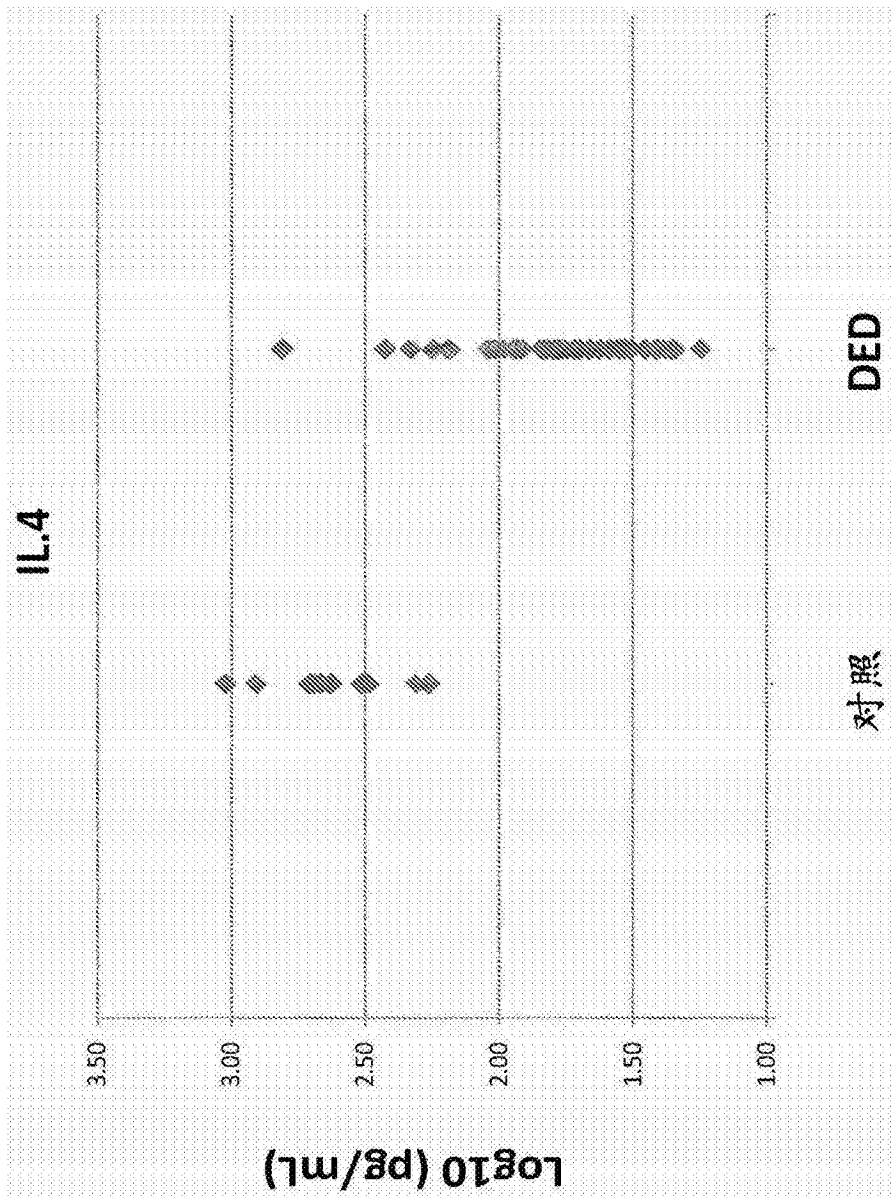


图4

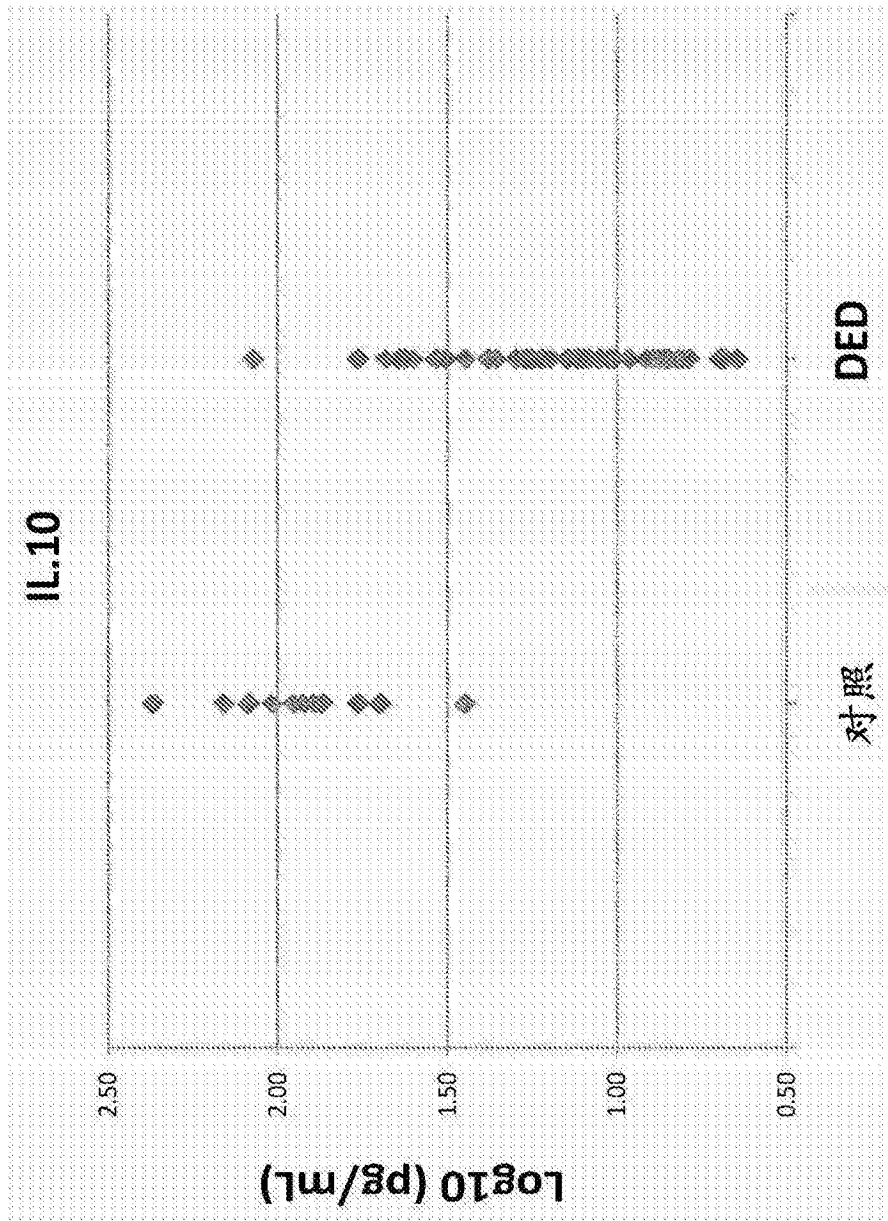


图5





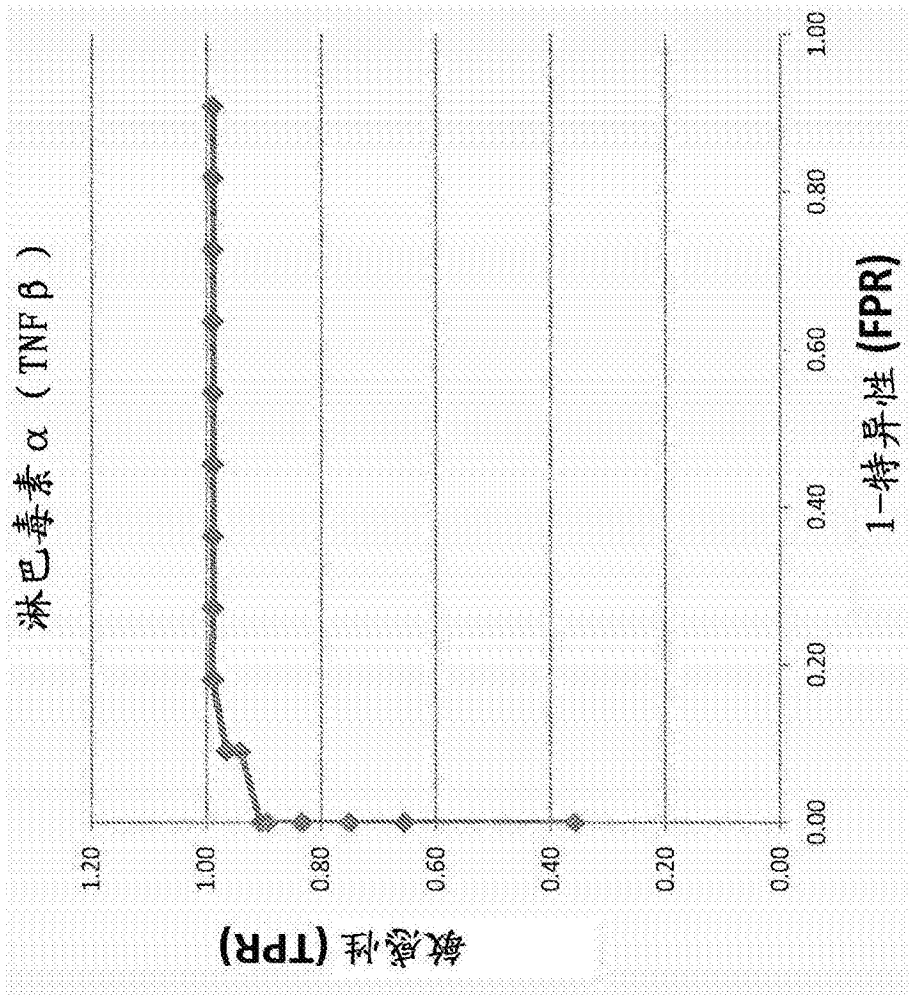


图8

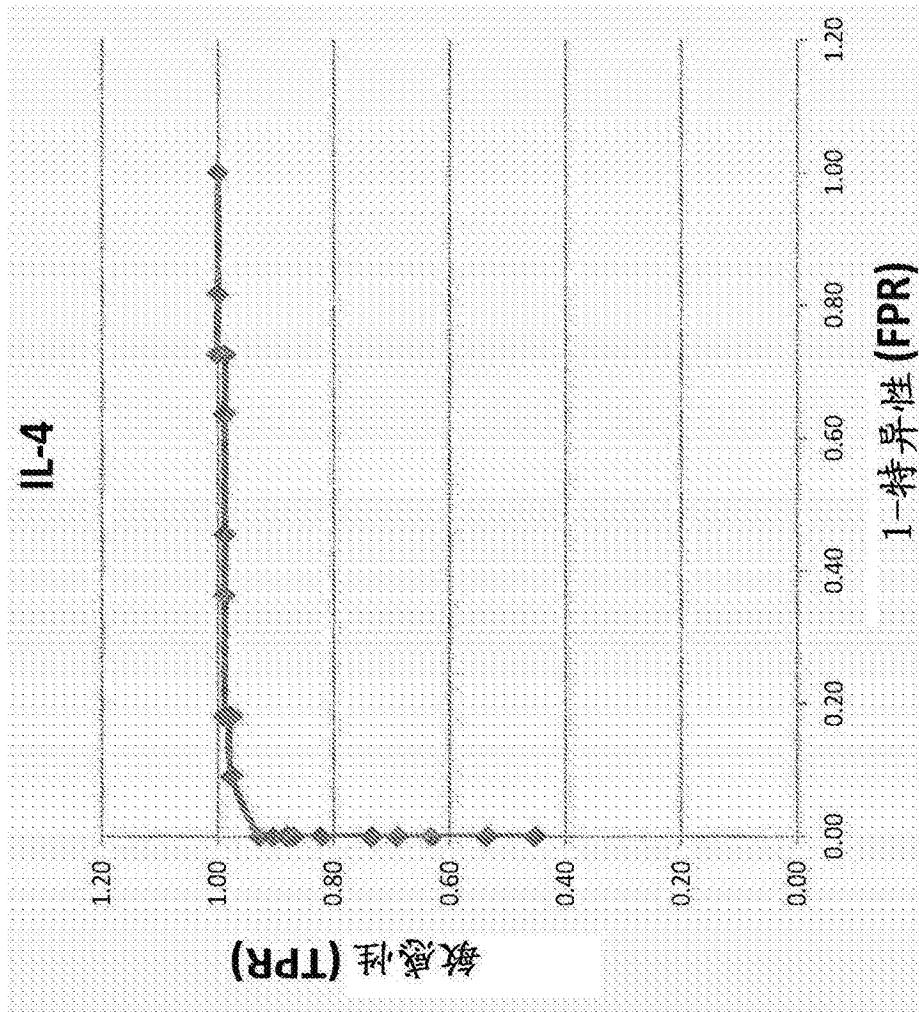


图9

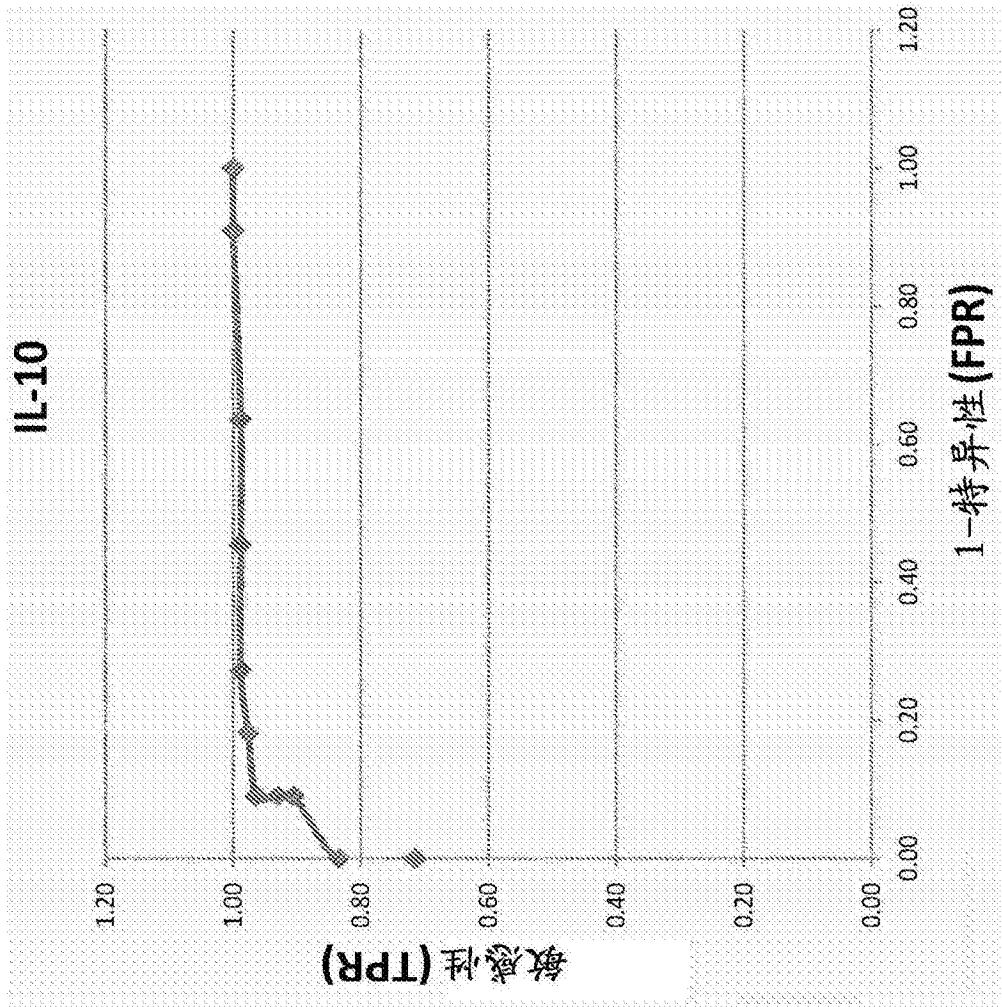


图10

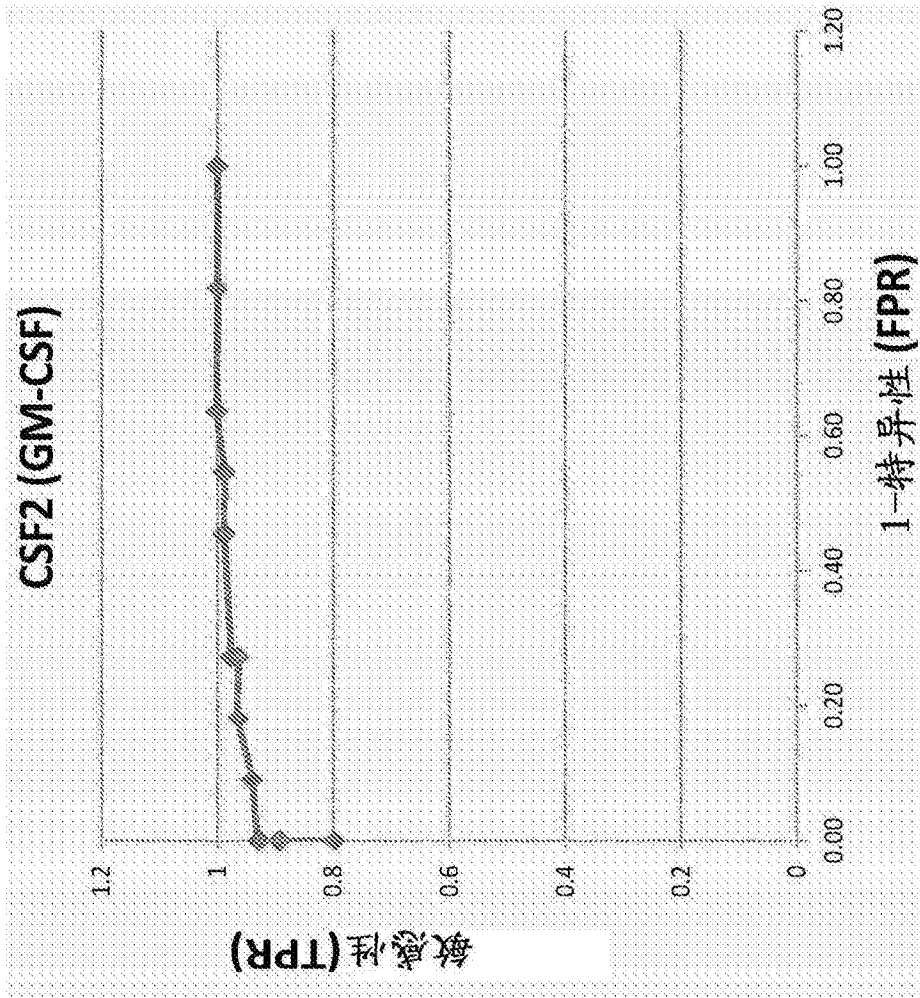


图11

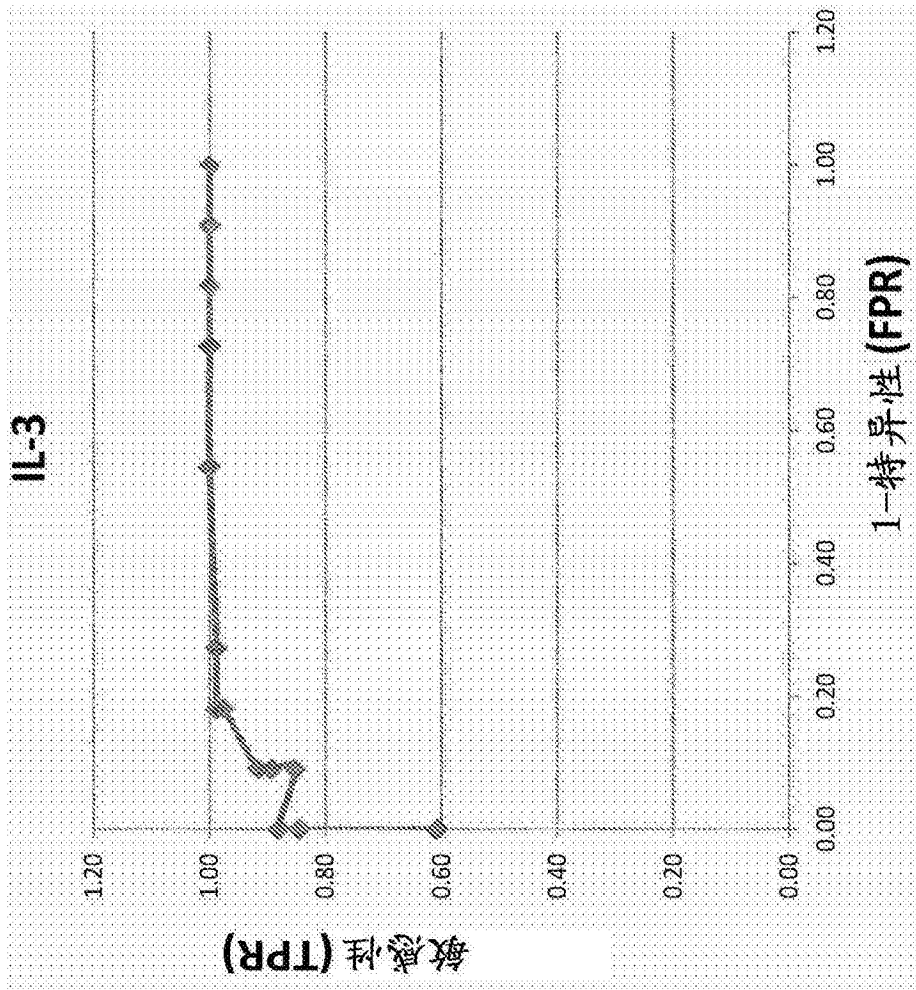


图12

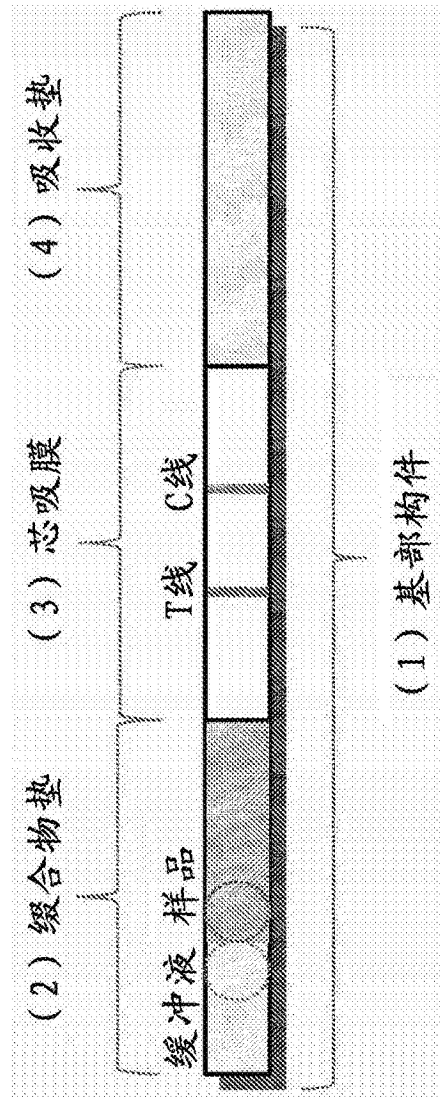


图13

表1. 干眼组与对照组之间的比较。  
生物标志物浓度值 (pg/mL) 经log10转换。

	IL-1α	IL-3	IL-4	IL-5	IL-10
对照的几何平均值	3.244	2.655	2.851	2.576	1.925
DED的几何平均值	1.837	1.617	1.842	1.588	1.003
对照的中位值	3.281	2.665	2.892	2.611	1.924
DED的中位值	1.699	1.541	1.731	1.474	0.964
对照的最大值	3.584	3.021	3.127	2.814	2.369
DED的最大值	3.322	2.810	2.892	2.688	2.072
对照的最小值	2.751	2.260	2.342	2.210	1.447
DED的最小值	1.322	1.246	1.447	1.255	0.643
未过筛实验的P值	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
AUC(ROC), 准确度	0.894	0.990	0.983	0.985	0.984

专利名称(译)	用于诊断眼表炎症和干眼病的方法和装置		
公开(公告)号	<a href="#">CN107709991A</a>	公开(公告)日	2018-02-16
申请号	CN201680002035.6	申请日	2016-10-05
[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		
[标]发明人	黄静峰		
发明人	黄静峰		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/6869 G01N33/6863 G01N33/6893 G01N2333/535 G01N2333/5403 G01N2333/5406 G01N2333/5428 G01N2800/16 G01N2800/24 G01N2800/245 G01N2800/50 G01N2800/52		
优先权	62/237488 2015-10-05 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

提供了用于在对象中诊断和监测干眼病的方法、试剂盒和装置。所述方法包括在来自对象的样品中测量选自以下的至少一种生物标志物的水平：TNFβ、IL-4、IL-3、IL-10、GM-CSF、IL-13、IL-5和IL-9，和/或所述生物标志物的任意衍生物、片段或前体。

