



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112654642 A

(43) 申请公布日 2021.04.13

(21) 申请号 201980051037.8

布里安·哈布 佩吉·M·安格尔

(22) 申请日 2019.06.03

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限公司 11240

(30) 优先权数据

代理人 曲在丹

62/679,202 2018.06.01 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(51) Int.Cl.

2021.01.29

C08B 37/00 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2019/035133 2019.06.03

(87) PCT国际申请的公布数据

W02019/232512 EN 2019.12.05

(71) 申请人 MUSC研究发展基金会

地址 美国南卡罗来纳州

申请人 范安德尔研究所

(72) 发明人 阿南德·梅赫塔

理查德·R·德雷克

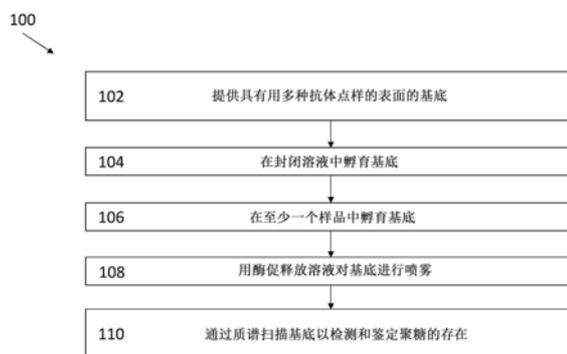
权利要求书2页 说明书33页 附图31页

(54) 发明名称

蛋白质和细胞的聚糖分析

(57) 摘要

本发明提供了用于对复杂溶液进行聚糖分析的方法和组合物,该复杂溶液包括生物样品中的蛋白质和细胞。该方法包括制备用于捕获蛋白质和细胞以进行多重分析的基底。可以通过抗体阵列、培养或直接沉积来捕获细胞和蛋白质。本发明进一步涉及蛋白质和细胞聚糖分析在诊断和筛选疾病状态和疾病进展中的用途。



1. 一种用于对至少一个样品进行聚糖分析的方法,所述方法包括以下步骤:  
提供具有用多种抗体点样的表面的基底;  
在封闭溶液中孵育所述基底;  
在至少一个样品中孵育所述基底;  
用酶促释放溶液对所述基底进行喷雾;以及  
通过质谱扫描所述基底以检测和鉴定聚糖的存在。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述至少一个样品包含至少一种蛋白质溶液。
3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述至少一个样品包含至少一个细胞群。
4. 根据权利要求3所述的方法,其中在用酶促释放溶液对所述基底进行喷雾的步骤之前将所述至少一个细胞群在固定和漂洗剂中孵育。
5. 根据权利要求4所述的方法,其中所述固定和漂洗剂选自:福尔马林、卡诺氏溶液、多聚甲醛、基于乙醇的固定剂、和基于聚乙二醇的固定剂。
6. 根据权利要求1所述的方法,其中所述基底是玻璃或塑料显微镜载玻片或多孔板。
7. 根据权利要求1所述的方法,其中所述封闭溶液是血清。
8. 根据权利要求7所述的方法,其中所述血清是在PBS和去污剂中的1%BSA。
9. 根据权利要求1所述的方法,其中所述封闭溶液通过包括3×PBS浴和1×水浴的洗涤步骤去除。
10. 根据权利要求1所述的方法,其中将所述至少一个样品在室温下在潮湿室中孵育两小时。
11. 根据权利要求1所述的方法,其中所述酶促释放溶液包含PNGase F。
12. 根据权利要求1所述的方法,其中所述质谱选自由以下各项组成的组:基质辅助激光解吸/电离成像傅里叶变换离子回旋共振(MALDI-FTICR)质谱、基质辅助激光解吸/电离飞行时间(MALDI-TOF)质谱、扫描微探针MALDI(SMALDI)质谱、红外基质辅助激光解吸电喷雾电离(MALD-ESI)质谱、表面辅助激光解吸/电离(SALDI)质谱、解吸电喷雾电离(DESI)质谱、二次离子质谱(SIMS)质谱和简易敞开式声波喷雾电离(EASI)质谱。
13. 根据权利要求12所述的方法,其中所述扫描步骤之前是用MALDI基质材料对所述基底进行喷雾的步骤。
14. 根据权利要求13所述的方法,其中MALDI基质溶液选自由以下各项组成的组:2,5-二羟基苯甲酸、 $\alpha$ -氰基-4-羟基肉桂酸、芥子酸、1,5-二氨基萘和9-氨基吡啶。
15. 根据权利要求1所述的方法,其中所述多种抗体特异性地结合选自由以下各项组成的组的蛋白质:A1AT、胎球蛋白-A、血液结合素、Apo-J、LMW激肽原、HMW激肽原、apo-H、转铁蛋白、IgG、IgM、IgA、纤连蛋白、层粘连蛋白、血浆铜蓝蛋白、腓骨蛋白、血管紧张素原、原纤维蛋白1、TIMP1、凝血酶敏感蛋白1、半乳糖凝集素-3结合蛋白、补体C1 R、丛生蛋白、半乳糖凝集素1、 $\alpha$ -2-巨球蛋白、维生素D结合蛋白、富组氨酸糖蛋白、富组氨酸糖蛋白、CD109、CEA、组织蛋白酶、AFP、GP731及它们的组合。
16. 根据权利要求14所述的方法,其中所述抗体可用于检测肝细胞癌的存在。
17. 一种用于对至少一个细胞群进行聚糖分析的方法,所述方法包括以下步骤:  
将至少一个细胞群粘附到基底表面;  
固定和漂洗所述至少一个细胞群;

用酶促释放溶液对所述基底进行喷雾;以及  
通过质谱扫描所述基底以检测和鉴定聚糖的存在。

18. 根据权利要求17所述的方法,其中通过培养、沉积、擦拭、涂抹或离心来粘附所述至少一个细胞群。

19. 根据权利要求17所述的方法,其中所述固定和漂洗剂选自:福尔马林、卡诺氏溶液、多聚甲醛、基于乙醇的固定剂、和基于聚乙二醇的固定剂。

20. 根据权利要求17所述的方法,其中所述基底是玻璃或塑料显微镜载玻片或多孔板。

21. 根据权利要求17所述的方法,其中所述基底表面包括以下中的一种或多种:氧化铟锡涂层、明胶涂层、胶原涂层、聚-L-赖氨酸涂层、聚鸟氨酸涂层、细胞外基质涂层、蛋白质涂层和表面电离。

22. 根据权利要求17所述的方法,其中所述酶促释放溶液包含PNGaseF。

23. 根据权利要求17所述的方法,其中所述质谱选自由以下各项组成的组:基质辅助激光解吸/电离成像傅里叶变换离子回旋共振(MALDI-FTICR)质谱、基质辅助激光解吸/电离飞行时间(MALDI-TOF)质谱、扫描微探针MALDI(SMALDI)质谱、红外基质辅助激光解吸电喷雾电离(MALD-ESI)质谱、表面辅助激光解吸/电离(SALDI)质谱、解吸电喷雾电离(DESI)质谱、二次离子质谱(SIMS)质谱和简易敞开式声波喷雾电离(EASI)质谱。

24. 根据权利要求23所述的方法,其中所述扫描步骤之前是用MALDI基质材料对所述基底进行喷雾的步骤。

25. 根据权利要求24所述的方法,其中所述MALDI基质溶液选自由以下各项组成的组:2,5-二羟基苯甲酸、 $\alpha$ -氰基-4-羟基肉桂酸、芥子酸、1,5-二氨基萘和9-氨基吡啶。

26. 一种用于对蛋白质样品进行聚糖分析的试剂盒,所述试剂盒包括:

至少一个基底,每个基底具有用多种抗体点样的表面;

至少一种封闭溶液;

至少一种酶促释放溶液;以及

至少一种MALDI基质材料。

27. 根据权利要求24所述的试剂盒,其中所述基底是玻璃或塑料显微镜载玻片或多孔板。

28. 根据权利要求24所述的试剂盒,其中所述封闭溶液是血清。

29. 根据权利要求24所述的试剂盒,其中所述血清是在PBS和去污剂中的1%BSA。

30. 根据权利要求24所述的试剂盒,其中所述酶促释放溶液包含PNGaseF。

31. 根据权利要求24所述的试剂盒,其中所述MALDI基质溶液是 $\alpha$ -氰基-4-羟基肉桂酸。

## 蛋白质和细胞的聚糖分析

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2018年6月1日提交的美国临时专利申请号62/679,202的优先权,该临时专利申请的内容通过引用将其整体并入本文。

[0003] 关于联邦政府赞助的研究或开发的声明

[0004] 本发明是在国家癌症研究所(National Cancer Institute)提供的资助号R21CA225474下的政府支持下进行的。美国政府对本发明拥有一定的权利。

### 背景技术

[0005] 已知细胞表面和分泌蛋白的N-连接糖基化的变化发生在许多癌症中。事实上,这些聚糖通常介导癌细胞与其环境之间的相互作用。几乎每种目前使用的癌症生物标记要么是糖蛋白(诸如癌胚抗原(CEA)),要么是聚糖本身(诸如CA-19-9)。然而,由于糖蛋白质组固有的困难,要推导出蛋白质和该蛋白质上的聚糖的同一性,大多数糖蛋白生物标记测定要么仅靶向蛋白质本身(诸如CEA的情况),要么仅靶向聚糖本身(其是CA-19-9的情况)。最近的工作表明,特定蛋白质上的特定聚糖可以作为癌症的生物标记,并且通常它们是比单独的蛋白质更好的标记。然而,获得这种聚糖信息是费力和困难的。

[0006] 目前,对单个蛋白质或大型蛋白质库(诸如血清或尿液)中的聚糖进行检查,其中获得了聚糖信息,但丢失了蛋白质信息。因此,折衷方案是可以获得具有聚糖附着位点的逐个分析的几个蛋白质的聚糖信息,或者可以获得蛋白质或聚糖组的数据(但不能同时获得两者)。试图解决此问题的一种方法是使用抗体凝集素阵列。在这种情况下,针对特定蛋白质的抗体被点在玻璃载玻片上,所捕获的糖蛋白上的聚糖被糖结合蛋白(凝集素)询问。虽然这些数据确实为特定结构基序提供了证据,但它并没有对蛋白质的聚糖多样性提供真正的见解,也没有提供真正的结构信息。

[0007] 仍然需要一种方法来传递复杂溶液中特定糖蛋白的结构聚糖信息。本发明满足此需要。

### 发明内容

[0008] 在一个方面,本发明提供了一种用于对至少一个样品进行聚糖分析的方法,该方法包括以下步骤:提供具有用多种抗体点样的表面的基底;在封闭溶液中孵育该基底;在至少一个样品中孵育该基底;用酶促释放溶液对该基底进行喷雾;以及通过质谱扫描该基底以检测和鉴定聚糖的存在。

[0009] 在一个实施方案中,该至少一个样品包含至少一种蛋白质溶液。在一个实施方案中,该至少一个样品包含至少一个细胞群。在一个实施方案中,在用酶促释放溶液对基底进行喷雾的步骤之前,将该至少一个细胞群在固定和漂洗剂中孵育。在一个实施方案中,该固定和漂洗剂选自:福尔马林、卡诺氏溶液(Carnoy's solution)、多聚甲醛、基于乙醇的固定剂和基于聚乙二醇的固定剂。

[0010] 在一个实施方案中,基底是玻璃或塑料显微镜载玻片或多孔板。在一个实施方案

中,封闭溶液是血清。在一个实施方案中,血清是在PBS和去污剂中的1%BSA。在一个实施方案中,用包含3×PBS浴和1×水浴的洗涤步骤除去封闭溶液。在一个实施方案中,该至少一个样品在室温下在潮湿室中孵育两小时。在一个实施方案中,酶促释放溶液包含PNGase F。

[0011] 在一个实施方案中,质谱选自:基质辅助激光解吸/电离成像傅里叶变换离子回旋共振(MALDI-FTICR)质谱、基质辅助激光解吸/电离飞行时间(MALDI-TOF)质谱、扫描微探针MALDI(SMALDI)质谱、红外基质辅助激光解吸电喷雾电离(MALD-ESI)质谱、表面辅助激光解吸/电离(SALDI)质谱、解吸电喷雾电离(DESI)质谱、二次离子质谱(SIMS)质谱和简易敞开式声波喷雾电离(EASI)质谱。在一个实施方案中,扫描步骤之前是用MALDI基质材料对基底进行喷雾的步骤。在一个实施方案中,MALDI基质溶液选自:2,5-二羟基苯甲酸、 $\alpha$ -氰基-4-羟基肉桂酸、芥子酸、1,5-二氨基萘和9-氨基吡啶。

[0012] 在一个实施方案中,多种抗体特异性地结合选自以下的蛋白质:A1AT、胎球蛋白-A、血液结合素、Apo-J、LMW激肽原、HMW激肽原、apo-H、转铁蛋白、IgG、IgM、IgA、纤连蛋白、层粘连蛋白、血浆铜蓝蛋白、腓骨蛋白(fibulin)、血管紧张素原、原纤维蛋白1、TIMP1、凝血酶敏感蛋白1、半乳糖凝集素-3结合蛋白、补体C1 R、丛生蛋白、半乳糖凝集素1、 $\alpha$ -2-巨球蛋白、维生素D结合蛋白、富组氨酸糖蛋白、富组氨酸糖蛋白、CD109、CEA、组织蛋白酶、AFP、GP731及其组合。在一个实施方案中,抗体可用于检测肝细胞癌的存在。

[0013] 在另一个方面,本发明提供了一种用于对至少一个细胞群进行聚糖分析的方法,该方法包括以下步骤:将至少一个细胞群粘附到基底表面;固定和漂洗该至少一个细胞群;用酶促释放溶液对该基底进行喷雾;以及通过质谱扫描该基底以检测和鉴定聚糖的存在。

[0014] 在一个实施方案中,通过培养、沉积、擦拭、涂抹或离心来粘附该至少一个细胞群。在一个实施方案中,该固定和漂洗剂选自:福尔马林、卡诺氏溶液(Carnoy's solution)、多聚甲醛、基于乙醇的固定剂和基于聚乙二醇的固定剂。

[0015] 在一个实施方案中,基底是玻璃或塑料显微镜载玻片或多孔板。在一个实施方案中,基底表面包括以下中的一种或多种:氧化铟锡涂层、明胶涂层、胶原涂层、聚-1-赖氨酸涂层、聚鸟氨酸涂层、细胞外基质涂层、蛋白质涂层和表面电离。在一个实施方案中,酶促释放溶液包含PNGase F。

[0016] 在一个实施方案中,质谱选自:基质辅助激光解吸/电离成像傅里叶变换离子回旋共振(MALDI-FTICR)质谱、基质辅助激光解吸/电离飞行时间(MALDI-TOF)质谱、扫描微探针MALDI(SMALDI)质谱、红外基质辅助激光解吸电喷雾电离(MALD-ESI)质谱、表面辅助激光解吸/电离(SALDI)质谱、解吸电喷雾电离(DESI)质谱、二次离子质谱(SIMS)质谱和简易敞开式声波喷雾电离(EASI)质谱。在一个实施方案中,扫描步骤之前是用MALDI基质材料对基底进行喷雾的步骤。在一个实施方案中,MALDI基质溶液选自:2,5-二羟基苯甲酸、 $\alpha$ -氰基-4-羟基肉桂酸、芥子酸、1,5-二氨基萘和9-氨基吡啶。

[0017] 在另一个方面,本发明涉及一种用于对蛋白质样品进行聚糖分析的试剂盒,该试剂盒包含:至少一种基底,每种基底具有用多种抗体点样的表面;至少一种封闭溶液;至少一种酶促释放溶液;以及至少一种MALDI基质材料。

[0018] 在一个实施方案中,基底是玻璃或塑料显微镜载玻片或多孔板。在一个实施方案中,封闭溶液是血清。在一个实施方案中,血清是在PBS和去污剂中的1%BSA。在一个实施方案中,酶促释放溶液包含PNGase F。在一个实施方案中,MALDI基质溶液是 $\alpha$ -氰基-4-羟基肉

桂酸。

## 附图说明

[0019] 当结合附图阅读时,将更好地理解对本发明实施方案的以下详细描述。然而,应当理解,本发明不限于附图中示出的实施方案的精确布置和仪器。

[0020] 图1描绘了本发明的示例性方法的概述。如同在传统的抗体微阵列一样,将抗体涂覆在玻璃载玻片上。在第一步骤中,用重组PNGase F对整个载玻片进行喷雾以去除抗体的固有糖基化,并且在1小时的孵育期后,将载玻片在1×PBS中洗涤。随后,将样品添加到整个载玻片中(诸如血清混合物或蛋白质),再次洗涤并用重组PNGase F进行喷雾。添加基质并进行MALDI-FTICR MS。逐点获得每种捕获蛋白质的结构聚糖信息。

[0021] 图2是本发明的示例性方法的流程图。

[0022] 图3是本发明的另一种示例性方法的流程图。

[0023] 图4描绘了聚糖-MALDI成像的实例。通过MALDI质谱成像分析遗传亚型S3原发性肝癌(分化良好;缓慢生长)。可以观察到许多聚糖在空间上位于载玻片上(组织)。

[0024] 图5A至图5C描绘了对抗体捕获的蛋白质的检测。(图5A)通过正相HPLC分析A1AT的N-连接聚糖谱。指示了主要的聚糖。(图5B)将A1AT点样在玻璃载玻片上并且通过MALDI-FTICR MS检测到N-连接聚糖。显示了核心岩藻糖基化双触角聚糖( $m/z=1809.639$ )。(图5C)在抗体捕获A1AT后检测到核心岩藻糖基化双触角聚糖。作为对照,也使用针对人胎球蛋白A的抗体。数值(0、1.0、0.1、0.01、0.001、0.0001)以所添加蛋白质 $\mu\text{g}$ 为单位。

[0025] 图6描绘了从捕获的IgG中检测N-聚糖的实验结果。N-聚糖按峰值强度(例如丰度)的顺序列出(左图)。在比较中显示了IgG的HPLC谱(右图)。

[0026] 图7描绘了多重阵列载玻片的实例。每个象限由32种针对单个蛋白质的抗体组成。象限可以是相同的,并且可以有差别地进行处理。

[0027] 图8描绘了阵列点的去糖基化。抗体去糖基化的初步证据。左图显示了没有PNGase F的阵列,并且右图显示了具有PNGase F的阵列。已经在载玻片上印刷了针对MUC5AC、MUC3、血管生成抑制剂(endorepellin)和生物素化IgG的抗体。用青枯雷尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*)凝集素检测在所附接抗体上的岩藻糖。在用PNGase F处理之后,所有固有的凝集素结合被消除。来自生物素化IgG的信号充当加载的对照。

[0028] 图9描绘了另一种多重阵列载玻片和本发明方法的示意图。

[0029] 图10描绘了直接点样在抗体上的脱唾液酸化变性A1AT的捕获结果。

[0030] 图11描绘了从7 $\mu\text{L}$ 样品中捕获的IgG,每个孔中点样有一种抗体。

[0031] 图12A至图12D描绘了通过简化的MALDI MS工作流程证明内皮细胞(EC)单细胞层的N-聚糖谱分析的实验结果。(图12A)脱脂前。(图12B)脱脂后。(图12C)从EC的单细胞层获得的复杂的N-聚糖谱。(图12D)细胞室的图像数据。注意,在细胞培养基中还看到有G1峰(处于较低的水平),其与已知的IgG图案一致。

[0032] 图13A至图13D描绘了证明在通过IMS检测的细胞培养物(SILAC)中稳定的同位素标记的实验结果。(图13A)将 $^{15}\text{N}$ 标记应用于在 $^{14}\text{N}$ 或 $^{15}\text{N}$ 谷氨酰胺培养基中培养1周的10,000个主动脉内皮细胞。(图13B)将 $^{15}\text{N}$ 掺入到复杂N-聚糖的所有4个G1cNAc残基中,质量位移为3.9895Da。(图13C)标记的N-聚糖G1F的IMS检测。(图13D)单一光谱证明对标记的N-聚

糖的强检测。

[0033] 图14A至图14C描绘了展示从免疫捕获的糖蛋白释放的N-聚糖的MALDI成像的新工作流程的图。(图14A)抗体阵列是通过将每1.5 $\mu$ L点200ng的抗体点样到硝酸纤维素涂覆的载玻片上而产生的。用BSA封闭载玻片,并且然后添加样品以通过其各自的抗体捕获糖蛋白。(图14B)通过以局部方式酶促释放N-聚糖、然后应用基质来为MALDI MSI制备载玻片阵列。(图14C)将MALDI FT-ICR MS用于对载玻片成像,以获得每个m/z峰的总光谱和单个图像,从而显示阵列中每个N-聚糖的二维丰度。

[0034] 图15描绘了通过对点样蛋白质的MALDI MSI在人A1AT和IgG上观察到的N-聚糖谱。将糖蛋白点样(每次500ng)到载玻片上,并且通过MALDI FT-ICR成像来检测每种蛋白质上的N-聚糖。通过峰下面积除以所有N-聚糖峰面积的总和来计算每种N-聚糖种类的百分比。上面显示了所有包含每种蛋白质的N-糖组(glycome)的>1%的类型的建议结构,并且在两种蛋白质之间发现的N-聚糖结构的区别是明显的。N-聚糖组合物由蓝色正方形代表N-乙酰葡萄糖胺、绿色圆圈代表甘露糖、红色三角形代表岩藻糖、以及黄色圆圈代表半乳糖。

[0035] 图16A至图16E描绘了通过对免疫捕获的A1AT的MALDI MSI检测的N-聚糖的结果。(图16A)在没有任何封闭的情况下(上图)和在在在1%BSA封闭后(下图)将A1AT(1 $\mu$ L)点样到载玻片上。所显示的成像数据来自在A1AT上观察到的最丰富的N-聚糖,其在封闭的样品中不可显著检测到。(图16B)将在100 $\mu$ L体积中的A1AT添加到含有作为相邻点的抗A1AT和抗IgG两者的孔中。添加红色和蓝色圆圈以强调抗体定位。(图16C)将A1AT标准溶液的稀释系列以100 $\mu$ L的体积一式三份添加到其抗体中。在250 $\mu$ M下采集成像数据,并将其归一化为载玻片上的总离子计数。在抗体点处看到N-聚糖信号,随着更多糖蛋白的添加,观察到颜色强度增加。(图16D)对图16C中的成像数据进行定量,计算每个样品的峰下面积。每个数据点代表三个样品的平均值 $\pm$ 标准偏差。(图16E)比较了点样与捕获的A1AT的N-聚糖谱,并且显示出很强的一致性。通过峰下面积除以所有N-聚糖峰面积的总和来计算每种N-聚糖种类的百分比。A1AT上最丰富的N-聚糖的建议结构如上所示。N-聚糖组合物由蓝色正方形代表N-乙酰葡萄糖胺、绿色圆圈代表甘露糖、红色三角形代表岩藻糖、以及黄色圆圈代表半乳糖。

[0036] 图17A至图17E描绘了从标准溶液和储备人血清中并排捕获A1AT和IgG的结果。(图17A)硝酸纤维素涂覆的显微镜载玻片上使用的24孔模块的模板。在每个孔中,将抗A1AT和抗IgG两者都以每1.5 $\mu$ L点200ng相邻地点样。(图17B、图17C)将含有A1AT和IgG标准品两者的混合物的溶液一式三份添加到含有两种抗体的孔中。添加红色和蓝色圆圈来分别展示抗A1AT和抗IgG的位置。在250 $\mu$ M下采集成像数据,并将其归一化为载玻片上的总离子计数。观察到A1AT相关的N-聚糖位于每个孔的左侧,说明抗A1AT对该糖蛋白的特异性捕获。观察到IgG相关的N-聚糖定位于每个孔的右侧,说明抗IgG对该糖蛋白的特异性捕获。(图17D、图17E)将储备人血清在PBS中稀释,并以每100 $\mu$ L孔仅1 $\mu$ L血清的量一式三份添加到每个孔中。再次检测到来自A1AT和IgG两者的N-聚糖信号定位于它们各自的抗体。N-聚糖组合物由蓝色正方形代表N-乙酰葡萄糖胺、绿色圆圈代表甘露糖、红色三角形代表岩藻糖、以及黄色圆圈代表半乳糖。

[0037] 图18A至图18D描绘了检测患者血清样品中改变的N-糖基化的结果。(图18A)如前所示,将储备人血清和从5名肝硬化患者合并的血清一式三份添加到含有抗A1AT和抗IgG两者的孔中。将1 $\mu$ L血清稀释在100 $\mu$ L PBS中以添加到每个孔中。在250 $\mu$ M下采集成像数据,并

将其归一化为载玻片上的总离子计数。与先前已经报道的储备血清相比,在肝硬化样品中观察到IgG相关的N-聚糖增加。(图18B、图18C)在储备人血清和肝硬化患者血清中的IgG N-聚糖谱展示来自图18A的非半乳糖基化岩藻糖基化双触角N-聚糖增加以及随后半乳糖基化岩藻糖基化双触角N-聚糖减少。通过峰下面积除以所有N-聚糖峰面积的总和来计算每种N-聚糖种类的百分比。(图18D) A1AT相关的N-聚糖显示该糖蛋白也从储备和肝硬化患者血清中被特异性地捕获。

[0038] 图19A至图19D描绘了A1AT和IgG的HPLC谱。(图19A、图19B)为了对N-聚糖谱进行正交比较,A1AT和IgG在溶液中用PNGase F进行消化,然后进行HPLC分析。(图19C、图19D)通过峰面积除以所有N-聚糖峰面积的总和来计算每种N-聚糖种类的百分比。

[0039] 图20A至图20D分别描绘了在图17B至图17E中观察到的N-聚糖峰的定量。获得每个区域的峰下面积值。条代表3个样品的平均值 $\pm$ 标准偏差,并且强调了从每个样品中观察到的显著的N-聚糖信号超过了抗体背景信号。

### 具体实施方式

[0040] 本发明提供了用于对复杂溶液(包括生物样品中的蛋白质和细胞)进行聚糖分析的方法和组合物。该方法包括制备用于捕获蛋白质和细胞以进行多重分析的基底。可以通过抗体阵列、培养或直接沉积来捕获细胞和蛋白质。本发明进一步涉及蛋白质和细胞聚糖分析在疾病状态和疾病进展的诊断和筛选中的用途。

#### [0041] 定义

[0042] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语的含义与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的含义相同。虽然与本文所述的那些方法和材料类似或等效的任何方法和材料可以用于测试本发明的实践中,但是本文描述了示例性材料和方法。在描述和要求保护本发明时,将使用以下术语。

[0043] 还应当理解,本文所用的术语仅用于描述具体实施方案的目的,而不意图具有限制性。

[0044] 本文中使用的冠词“一个/一种(a/an)”是指冠词的语法对象的一个或超过一个(即,是指至少一个)。通过举例的方式,“一个元件”意指一个元件或一个以上元件。

[0045] 如本文所用的“约”当是指可测量的值(诸如量、时间持续等)时,意味着涵盖与特定值的 $\pm 40\%$ 或 $\pm 20\%$ 或 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 、 $\pm 1\%$ 、或 $\pm 0.1\%$ 的非限制性变化,因为此类变化是合适的。

[0046] 术语“异常的”当用于生物体、组织、细胞或其成分的上下文中时,是指在至少一个可观察或可检测的特征(例如,年龄、治疗、一天中的时间等)上与显示“正常的”(预期的)各自特征的那些生物体、组织、细胞或其成分不同的那些生物体、组织、细胞或其成分。对于一种细胞或组织类型而言正常或预期的特征对于不同的细胞或组织类型而言可能是异常的。

[0047] 术语“生物标记”和“标记”在本文中可互换使用。它们是指作为生物过程、生物事件和/或病理状况的独特指标的物质。

[0048] 短语“身体样品”或“生物样品”在本文中以其最广泛的意义使用。样品可以从其可以测定本发明的生物标记的任何生物组织或流体。此类样品的实例包括但不限于血液、唾液、口腔涂片、粪便、淋巴、尿液、妇科流体、活检、羊水和涂片。本质上是液体的样品在文

中被称为“体液”。身体样品可以通过各种技术(包括例如通过刮擦或擦拭区域或通过使用针来抽吸体液)从患者中获得。收集各种身体样品的方法在本领域中是熟知的。通常,样品将是“临床样品”,即源自于患者的样品。此类样品包括但不限于可能包含或可能不包含细胞的体液,例如血液(例如全血、血清或血浆)、尿液、唾液、组织或细针活检样品,以及具有已知诊断、治疗和/或结果历史的档案样品。生物或身体样品也可包括组织切片,诸如出于组织学目的而获取的冷冻切片。样品还涵盖通过处理生物或身体样品衍生的任何材料。衍生材料包括但不限于从样品中分离的细胞(或其后代)、从样品中提取的蛋白质或核酸分子。生物或身体样品的处理可能涉及以下中一种或多种:过滤、蒸馏、提取、浓缩、干扰组分的灭活、试剂的添加等。

[0049] 如本文所用,术语“碳水化合物”旨在包括多元醇的醛或酮衍生物中的任何一类。因此,碳水化合物包括淀粉、纤维素、树胶和糖。尽管为了说明,术语“糖”或“聚糖”在本文的其他地方使用,但这并不意味着是限制性的。据预期,本文提供的方法可能针对任何碳水化合物,并且特定碳水化合物的使用并不意味着仅限于该碳水化合物。

[0050] 如本文所用,术语“细胞表面糖蛋白”是指糖蛋白,其至少一部分存在于细胞的外表面。在一些实施方案中,细胞表面糖蛋白是定位于细胞表面上使得至少一种聚糖结构存在于细胞的外表面上的一种蛋白质。

[0051] 在本发明的上下文中,术语“对照”,当用于表征受试者时,通过非限制性举例的方式,是指健康的受试者,是指原本尚未被诊断患有疾病的患者。术语“对照样品”是指从健康受试者或从非疾病组织诸如正常结肠中获得的一个或多于一个样品。

[0052] 术语“对照或参考标准”描述了不包含本发明的一种或多种标记(或生物标记)的一种或多种标记(或生物标记)表达产物,或者包含正常水平、低水平或高水平的本发明一种或多种标记(或生物标记)的一种或多种标记(或生物标记)表达产物,使得对照或参考标准可以用作样品可以与之进行比较的比较物。

[0053] “差异增加的水平”是指与对照相比生物标记水平为至少1%、2%、3%、4%、5%、10%或更多,例如5%、10%、20%、30%、40%、或50%、60%、70%、80%、90%更高或更多,和/或0.5倍、1.1倍、1.2倍、1.4倍、1.6倍、1.8倍更高或更多。

[0054] “差异降低的水平”是指与对照相比生物标记水平为至少1%、2%、3%、4%、5%、10%或更多,例如5%、10%、20%、30%、40%、或50%、60%、70%、80%、90%更低或更少,和/或0.9倍、0.8倍、0.6倍、0.4倍、0.2倍、0.1倍或更少。

[0055] “疾病”是动物的一种健康状态,其中该动物不能维持体内平衡,并且其中如果该疾病没有得到改善,则该动物的健康继续恶化。相比之下,动物的“障碍”是一种健康状态,其中该动物能够维持体内平衡,但是动物的健康状态比不存在该障碍的情况下更为不利。如果不进行治疗,障碍不一定会导致动物的健康状态进一步下降。

[0056] 如果疾病或障碍的体征或症状的严重性、患者经历这种体征或症状的频率、或两者都降低,则该疾病或障碍被“减轻”。

[0057] 术语“有效量”和“药物有效量”是指足以提供所需生物学结果的药剂的量。该结果可以是疾病或障碍的体征、症状或原因的减少和/或缓解、或生物系统的任何其他期望的改变。本领域普通技术人员可以使用常规实验来确定任何个别情况下的适当有效量。

[0058] 如本文所用,“内源性”是指来自或产生于生物体、细胞、组织或系统内部的任何物

质。

[0059] 如本文所用,术语“表达”被定义为由其启动子驱动的特定核苷酸序列的转录和/或翻译。

[0060] 一种或多种生物标记的“水平”意指样品中生物标记的绝对或相对量或浓度。术语“水平”也是指样品中生物标记的糖基化的绝对或相对量。

[0061] 如本领域所知和本文所用,“聚糖”是糖(例如寡糖和多糖)。聚糖可以是典型地通过糖苷键(glycosidic bond)(在本文中也称为键(linkage))连接的糖残基单体或聚合物。在一些实施方案中,术语“聚糖”、“寡糖”和“多糖”可以用于是指糖缀合物的碳水化合物部分(例如糖蛋白、糖脂或蛋白聚糖)。聚糖可以包括天然糖残基(例如,葡萄糖、N-乙酰葡萄糖胺、N-乙酰神经氨酸、半乳糖、甘露糖、岩藻糖、己糖、阿拉伯糖、核糖、木糖等)和/或经修饰的糖(例如,2'-氟核糖、2'-脱氧核糖、磷酸甘露糖、6'-磺基N-乙酰葡萄糖胺等)。术语“聚糖”包括糖残基的均聚物和异聚物。术语“聚糖”还涵盖糖缀合物的聚糖组分(例如糖蛋白、糖脂、蛋白聚糖等的)。该术语还涵盖游离聚糖,包括从糖缀合物中切割或释放的聚糖。

[0062] 如本文所用,术语“抗体阵列”是指用于鉴定在蛋白质上的与连接到阵列基底的许多不同抗体中的任何一种相互作用的聚糖的工具。在一些实施方案中,抗体阵列包含许多固定的抗体,在本文中称为“抗体点”。在一些实施方案中,聚糖阵列包含至少2个、至少5个、至少10个、至少20个、至少30个、至少40个、至少50个、至少60个、至少70个、至少80个、至少90个、至少100个、至少150个、至少350个、至少1000个或至少1500个抗体点。在一些实施方案中,可以定制抗体阵列以呈现期望的一组抗体点。

[0063] 如本文所用,术语“糖缀合物”涵盖其中至少一个糖部分与至少一个其他部分共价连接的所有分子。该术语具体涵盖所有具有共价衔接糖部分的生物分子,包括例如N-连接的糖蛋白、O-连接的糖蛋白、糖脂、蛋白聚糖等。

[0064] 术语“糖型”在本文中用来指糖缀合物的特定形式。也就是说,当作为糖缀合物的一部分的相同骨架部分(例如,多肽、脂质等)有可能被连接到不同的聚糖或聚糖组时,那么糖缀合物的每个不同版本(即,在骨架被连接到特定的聚糖组的情况下)被称为“糖型”。

[0065] 如本文所用,术语“糖苷酶”是指切割在聚糖中的连续糖之间或在糖与骨架部分之间(例如在糖蛋白的糖与肽骨架之间)的共价键的药剂。在一些实施方案中,糖苷酶是酶。在某些实施方案中,糖苷酶是包含一个或多个多肽链的蛋白质(例如,蛋白质酶)。在某些实施方案中,糖苷酶是化学切割剂。

[0066] 如该术语在本文中使用的,术语“糖蛋白制剂”是指一组单个糖蛋白分子,每个糖蛋白分子包含具有特定氨基酸序列(该氨基酸序列包括至少一个糖基化位点)的多肽和共价附接到该至少一个糖基化位点的至少一个聚糖。在糖蛋白制剂中特定糖蛋白的单个分子典型地具有相同的氨基酸序列,但是可能在至少一个糖基化位点的占据和/或与至少一个糖基化位点连接的聚糖的同一性方面有所不同。也就是说,糖蛋白制剂可以仅含有特定糖蛋白的单一糖形,但更典型地含有多个糖形。同一糖蛋白的不同制剂可能在存在的糖形的身份(例如,在一种制剂中存在的糖形可能不存在于另一种制剂中)和/或不同糖形的相对量方面有所不同。

[0067] 如本文所用,术语“凝集素”涵盖对碳水化合物具有特异性结合亲和力的任何基于氨基酸和肽键的化合物。典型地,它涉及在自然界中发现的特征在于特异性碳水化合物结

合的非抗体多肽。术语“凝集素”包括功能片段及其衍生物,后一术语的定义类似于在抗体的上下文中使用的相同术语。

[0068] “测量”(“measuring”或“measurement”)或者可替代地“检测”(“detecting”或“detection”)意指评估在临床或受试者衍生的样品中给定物质的存在、缺失、数量或量(其可以是有效量),包括此类物质的定性或定量浓度水平的推导,或者以其他方式评价受试者临床参数的值或分类。

[0069] 如本文所用,术语“N-聚糖”是指已经从糖缀合物中释放出但以前通过氮键与糖缀合物连接的糖聚合物。N-连接的聚糖是在N/X(除脯氨酸之外的任何氨基酸)/S或T(丝氨酸或苏氨酸)的保守蛋白质结构基序中的天冬酰胺残基处通过氮键连接到糖缀合物的聚糖。存在多种多样的N-连接聚糖,但典型地基于共同的核心五糖(Man)<sub>3</sub>(GlcNAc)(GlcNAc)。

[0070] “自然发生”当应用于物体时是指该物体可以在自然界中找到的事实。例如,存在于生物体(包括病毒)中的、可以从自然界的来源中分离出来并且尚未被人类有意地修饰的多肽或多核苷酸序列是天然存在的序列。

[0071] “核酸”意指任何核酸,无论是由脱氧核糖核苷还是由核糖核苷构成,以及无论是由磷酸二酯键还是由经修饰的键(诸如磷酸三酯、氨基磷酸酯、硅氧烷、碳酸酯、羧基甲基酯、氨基乙酸酯、氨基甲酸酯、硫醚、桥接氨基磷酸酯、桥接亚甲基磷酸酯、硫代磷酸酯、甲基磷酸酯、二硫代磷酸酯、桥接硫代磷酸酯或砷键、以及此类键的组合)构成。术语核酸还特别包括由除五种生物存在的碱基(腺嘌呤、鸟嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶和尿嘧啶)以外的碱基构成的核酸。术语“核酸”典型地是指大的多核苷酸。

[0072] 本文使用常规符号来描述多核苷酸序列:单链多核苷酸序列的左端是5'-端;双链多核苷酸序列的左手方向被称为5'-方向。

[0073] 新生RNA转录物中核苷酸的5'至3'添加方向被称为转录方向。与mRNA具有相同序列的DNA链被称为“编码链”;在DNA链上位于DNA的参考点的5'的序列被称为“上游序列”;在DNA链上位于DNA的参考点的3'的序列被称为“下游序列”。

[0074] 如本文所用,术语“O-聚糖”是指已经从糖缀合物中释放出但以前通过氧键与糖缀合物连接的糖聚合物。O-连接聚糖是通过氧键连接到糖缀合物的聚糖。O-连接聚糖典型地通过N-乙酰-D-半乳糖胺(GalNAc)或通过N-乙酰-D-葡萄糖胺(GlcNAc)与L-丝氨酸(Ser)或L-苏氨酸(Thr)的羟基基团附接到糖蛋白上。一些O-连接聚糖也具有修饰诸如乙酰化和硫酸化。在一些情况下,O-连接聚糖通过岩藻糖或甘露糖与L-丝氨酸(Ser)或L-苏氨酸(Thr)的羟基基团附接到糖蛋白上。

[0075] 术语“癌前”或“瘤前”及其等同物应理解为意指正在经历恶性转变的任何细胞增殖性障碍。在结肠直肠细胞增殖性障碍的上下文中,此类病症的实例包括具有高度发育异常的细胞增殖性障碍以及下列种类的腺瘤:级别1:在息肉头内恶性腺体穿过肌层粘膜进入粘膜下层;级别2:相同的粘膜下层侵袭,但出现在头部与茎的连接处;级别3:茎的侵袭;和级别4:在与结肠壁的连接处侵袭茎的基部。在一些情况下,将瘤前用于描述将形成肿瘤的正常组织。

[0076] 如本文所用,“易感性”是指易患细胞增殖性障碍的特性。具有细胞增殖性障碍的易感性的受试者不具有细胞增殖性障碍,但为患有细胞增殖性障碍的可能性增加的受试者。

[0077] “多核苷酸”意指核酸的单链或平行和反平行链。因此，多核苷酸可以是单链或双链核酸。在本发明的上下文中，使用以下常见核酸碱基的缩写。“A”是指腺苷，“C”是指胞苷，“G”是指鸟苷，“T”是指胸苷，并且“U”是指尿苷。

[0078] 术语“寡核苷酸”典型地是指短的多核苷酸，通常不大于约60个核苷酸。应当理解，当核苷酸序列由DNA序列（即，A、T、G、C）表示时，这也包括其中“U”代替“T”的RNA序列（即，A、U、G、C）。

[0079] 如本文所用，术语“提供预后”是指提供结肠直肠癌的可能病程和结果的预测，包括严重性、持续时间、恢复机会等的预测。该方法还可以用于设计合适的治疗计划，例如，通过指示病症是否仍处于早期阶段或病症是否已发展到积极治疗无效的阶段。

[0080] 生物标记的“参考水平”意指生物标记的水平，例如指示特定疾病状态、表型或其缺乏的聚糖类型的水平，以及疾病状态、表型或其缺乏的组合。生物标记的“阳性”参考水平意指指示特定疾病状态或表型的水平。生物标记的“阴性”参考水平意指指示缺乏特定疾病状态或表型的水平。

[0081] 如本文所用，术语“糖”是指包含一个或多个单糖基团的聚合物。因此，糖包括单糖、二糖、三糖和多糖（或聚糖）。聚糖可以是分支的或支链的。可以发现多糖共价连接到非糖部分，诸如脂质或蛋白质（作为糖缀合物）。这些共价缀合物包括糖蛋白、糖肽、肽聚糖、蛋白聚糖、糖脂和脂多糖。这些术语中的任何一个的使用也不旨在限制，因为该描述是为了说明的目的而提供的。除了作为糖缀合物的一部分发现的聚糖之外，聚糖也可以是游离形式（即，与另一部分分离且不与之缔合）。

[0082] 如本文所用，术语“特异性地结合”意指识别并结合另一分子或特征但基本上不识别或结合样品中的其他分子或特征的分子（诸如抗体）。

[0083] 如本文所用，“标准对照值”是指预定的聚糖水平。标准对照值适合于本发明方法的使用，以便比较样品中存在的感兴趣的聚糖的量。用作标准对照的已建立样品提供了感兴趣的聚糖的平均量，其对于具有合理匹配背景（例如，性别、年龄、种族和病史）的普通健康人而言是典型的。标准对照值可以根据感兴趣的生物标记和样品的性质而变化。

[0084] 如本文所用，术语“受试者”是指人类或另一种哺乳动物（例如，灵长类动物、狗、猫、山羊、马、猪、小鼠、大鼠、兔等）。在本发明的许多实施方案中，受试者是人类。在此类实施方案中，受试者通常被称为“个体”或“患者”。术语“个体”和“患者”不表示特定的年龄。

[0085] 范围：在整个本公开中，本发明的各个方面可以以范围的形式呈现。应理解，以范围形式描述仅是出于方便和简洁，而不应认为是对发明范围的呆板限制。因此，对范围的描述应认为是已具体公开了所有可能的子范围以及该范围内的各个数值。例如，对诸如1至6的范围的描述应理解为已具体公开了诸如1至3、1至4、1至5、2至4、2至6、3至6等的子范围，以及该范围内的各个数值，例如1、2、2.7、3、4、5、5.3和6。这种适用性与范围的广度无关。

#### [0086] 描述

[0087] 本发明部分基于新的方法和装置，其允许对在复杂混合物中发现的成百上千种单独的蛋白质和细胞进行聚糖分析。该方法涉及使用抗体阵列捕获特定蛋白质，用高活性重组PNGase F处理所捕获的蛋白质，以及通过质谱逐点地对特定捕获的蛋白质进行聚糖分析。该方法还涉及使用抗体阵列捕获细胞或将细胞沉积到基底上，固定和处理细胞，以及通过质谱对细胞进行聚糖分析。在某些情况下，该方法可用作检测与各种疾病或障碍相关的

生物标记的诊断平台。因此,本发明提供了供聚糖分析的组合物和方法用于进行疾病检测、诊断和预后(诸如癌症)。

[0088] 在各种实施方案中,使用质谱分析蛋白质和细胞。在另一个实施方案中,使用基质辅助激光解吸/电离(MALDI)对蛋白质和细胞进行分析。在另一个实施方案中,使用质谱来表征蛋白质和细胞。在另一个实施方案中,使用MALDI傅立叶变换离子回旋共振(MALDI-FTICR)质谱来表征蛋白质和细胞。在另一个实施方案中,使用MALDI飞行时间(MALDI-TOF)质谱来表征蛋白质和细胞。

#### [0089] 抗体阵列中蛋白质的聚糖分析

[0090] 本发明提供了部分抗体阵列,其允许为数百个单独的糖蛋白靶标产生结构聚糖信息。抗体阵列利用允许对特定蛋白质的捕获,用高活性重组PNGase F处理所捕获的蛋白质,以及通过质谱逐点地对特定捕获的蛋白质进行聚糖分析的有效的工作流程。本发明还提供了用于从可以在抗体阵列上捕获的尽可能多的蛋白质中确定结构聚糖信息的一个平台。

[0091] 现在参考图1和图2,分别描绘了列出用于对蛋白质进行聚糖分析的示例性工作流程的方法100的步骤的示意图和流程图。方法100从步骤102开始,其中提供了具有用多种抗体点样的表面的基底。基底可以是任何合适的基底,诸如玻璃或塑料显微镜载玻片或多孔板。在步骤104中,在封闭溶液中孵育基底。封闭溶液可以是血清溶液,诸如在PBS和去污剂中的1%BSA,并且孵育可以持续1小时。在步骤106中,在至少一个样品中孵育基底。在一些实施方案中,样品是蛋白质样品。可以将蛋白质样品在室温下在潮湿室中孵育2小时。在步骤108中,用酶促释放溶液对基底进行喷雾。基底可以用PNGase F进行喷雾,并孵育过夜。在步骤110中,通过质谱扫描基底以检测和鉴定聚糖的存在。在某些实施方案中,在步骤之间洗涤基底,诸如用PBS浴、PBS和去污剂浴、水浴及它们的组合洗涤。

[0092] 在基底上点样的抗体阵列允许对数百到数千种不同蛋白质的捕获和聚糖分析。因此,本发明的抗体阵列可以包含数百至数千种不同的抗体,每种抗体对一种感兴趣的蛋白质具有特异性。在某些实施方案中,本发明的抗体阵列特异性地结合感兴趣的分泌蛋白。

[0093] 抗体的点样可以通过任何合适的技术来实现,该技术包括但不限于喷墨印刷、精细印刷点样、在功能化基底上的流动图案化、在功能化玻璃基底上的接触印刷、在涂覆的基底(诸如硝酸纤维素涂层)上孵育、或用具有非常精细特征分辨率的印刷针或印刷条使用环氧树脂涂覆的玻璃基底或聚胺玻璃基底进行微印刷。

[0094] 抗体阵列可以以任何期望的网格或图案布置。在某些实施方案中,单个抗体点在行和/或列的阵列中横向和纵向隔开。在一个实施方案中,单个抗体点以约10-100 $\mu\text{m}$ 的间隔规则地间隔开。在一个实施方案中,抗体阵列包含约10-1,000,000个单个抗体点。在另一个实施方案中,抗体阵列包含约500-500,000个单个抗体点。在另一个实施方案中,抗体阵列包含约100-100,000个单个抗体点。在一个实施方案中,抗体阵列包含密度为每 $\text{cm}^2$ 约200个抗体点至每 $\text{cm}^2$ 约20,000个抗体点的抗体点。在各种实施方案中,抗体点的排列可以借助于一个或多个网格的使用,诸如孔载玻片模块。

[0095] 在某些实施方案中,每个点包含单一特异性抗体。在另一个实施方案中,每个点包含2、3、5、10或更多种不同的抗体。在这些实施方案中,可以通过在第二组捕获剂上使用不同的可检测标记(其中每个标记对应于特定抗体)来确定与特征内特定抗体的特异性结合。

[0096] 在各种实施方案中,抗体阵列可以包括抗体、抗体片段或其组合。此类抗体包括多

克隆抗体、单克隆抗体、其Fab和单链Fv(scFv)片段、双特异性抗体、异缀合物、人和人源化抗体。此类抗体可以以多种方式产生,该方式包括杂交瘤培养、在细菌或哺乳动物细胞培养物中的重组表达、以及在转基因动物中的重组表达。制造方法的选择取决于几个因素,包括所需的抗体结构、在抗体上碳水化合物部分的重要性、培养和纯化的容易程度、以及成本。使用标准表达技术可以产生许多不同的抗体结构,包括全长抗体、抗体片段(诸如Fab和Fv片段)、以及包含来自不同物种的组分的嵌合抗体。

[0097] 可以使用任何合适的质谱成像技术。非限制性实例包括基质辅助激光解吸/电离成像傅里叶变换离子回旋共振(MALDI-FTICR)质谱、基质辅助激光解吸/电离飞行时间(MALDI-TOF)质谱、扫描微探针MALDI(SMALDI)质谱、红外基质辅助激光解吸电喷雾电离(MALD-ESI)质谱、表面辅助激光解吸/电离(SALDI)质谱、解吸电喷雾电离(DESI)质谱、二次离子质谱(SIMS)质谱、简易敞开式声波喷雾电离(EASI)质谱等。在各种实施方案中,可以在质谱成像之前用基质溶液对基底进行喷雾。可以使用任何合适的溶液,包括但不限于2,5-二羟基苯甲酸、 $\alpha$ -氰基-4-羟基肉桂酸、芥子酸、1,5-二氨基萘、9-氨基吡啶等。

[0098] 虽然该方法描述了抗体阵列的使用,但是应当理解,如本领域技术人员所理解的,可以使用对感兴趣的蛋白质具有亲和力的任何合适的捕获分子来捕获蛋白质。例如,可以用一种或多种抗原、适体、亲和体(affibodies)、蛋白质、肽、核酸、碳纳米管及其片段来替代或补充抗体。捕获分子也不限于阵列图案,并且可以以任何期望的形状或形式提供。

#### [0099] 对细胞群的聚糖分析

[0100] 本发明还部分提供了允许从至少一个细胞群中产生结构聚糖信息的方法。在一些实施方案中,通过本文别处描述的抗体阵列的方式选择性地捕获至少一个细胞群。在一些实施方案中,该至少一个细胞群粘附到基底上。在各种实施方案中,该方法利用有效的工作流程,该工作流程固定至少一个细胞群和将其脱脂,用高活性的重组PNGase F处理该至少一个细胞群,并通过质谱逐点地对该至少一个细胞群进行聚糖分析。

[0101] 参考图2,方法100可以适用于细胞分析,其中步骤102中的多种抗体可以被选择用于结合所需的细胞群,并且步骤106中的至少一个样品包含至少一个细胞群。例如,可以将抗CD4抗体用于从样品中捕获CD4阳性T细胞,并且可以将抗CD8抗体用于从样品中捕获CD8阳性T细胞。在步骤106之后和步骤108之前,固定并漂洗该至少一个细胞群。固定和漂洗剂可以是任何合适的药剂,包括但不限于福尔马林、卡诺氏溶液、多聚甲醛、基于乙醇的固定剂、基于聚乙二醇的固定剂等。漂洗有助于清除掉未捕获的颗粒以及选择性去除分析物,从而提高对N-聚糖的检测。例如,合适的药剂在不破坏细胞形态的情况下固定细胞并使其脱脂。

[0102] 现在参考图3,描绘了列出粘附细胞群的聚糖分析的示例性工作流程的方法200的步骤的流程图。方法200从步骤202开始,其中至少一个细胞群粘附到基底表面。该至少一个细胞群可以以任何合适的方式粘附,该任何合适的方式包括但不限于培养、细胞浆沉积、擦拭、涂抹、离心(例如Cytospin)等。基底可以是任何合适的基底,诸如玻璃或塑料显微镜载玻片或多孔板。在各种实施方案中,基底表面可以被功能化或涂覆以增强细胞粘附。例如,基底表面可以包括氧化铟锡涂层、明胶涂层、胶原涂层、聚-L-赖氨酸涂层、聚鸟氨酸涂层、细胞外基质涂层、蛋白质涂层(诸如钙粘蛋白、免疫球蛋白、选择素、粘蛋白、整合素等)、表面电离等。在步骤204中,固定并漂洗该至少一个细胞群。合适的固定和漂洗剂包括但不限

于福尔马林、卡诺氏溶液、多聚甲醛、基于乙醇的固定剂、基于聚乙二醇的固定剂等。在步骤206中,用酶促释放溶液对基底进行喷雾。基底可以用PNGase F进行喷雾,并孵育过夜。在步骤208中,通过质谱扫描基底以检测和鉴定聚糖的存在。在某些实施方案中,在步骤之间洗涤基底,诸如用PBS浴、PBS和去污剂浴、水浴及其组合洗涤。

[0103] 该至少一个细胞群可以从任何期望的来源获得,该任何期望的来源包括但不限于血液、淋巴、尿液、妇科流体、组织活检、羊水、骨髓抽吸物等。细胞群也可以从具有疾病或障碍的来源获得,该疾病或障碍包括但不限于:白血病、膀胱癌、骨癌、脑和脊髓肿瘤、脑干神经胶质瘤、乳腺癌、肺癌、淋巴瘤、宫颈癌、结肠癌、结肠直肠癌、食管癌、胃肠癌、肝细胞(肝)癌、肾(肾细胞)癌、黑色素瘤、口腔癌、卵巢癌、前列腺癌等。

[0104] 在各种实施方案中,可以培养该至少一个细胞群以扩大细胞计数、将该至少一个细胞群粘附到基底表面、或者两者。如本领域技术人员所理解的,直接沉积可以用于贴壁和悬浮细胞系,而在基底表面上培养细胞适合于贴壁细胞系。典型地,将细胞与培养基接触生长。培养基通常包含基础培养基,任选地补充有另外的组分。基础培养基是为细胞供应碳和/或维生素和/或矿物质的基本来源的培养基。基础培养基可以是或不是不含蛋白质的。支持细胞生长的培养基配方包括但不限于:伊格尔最低必需培养基(Minimum Essential Medium Eagle)、ADC-1、LPM(不含牛血清白蛋白)、F10(HAM)、F12(HAM)、DCCM1、DCCM2、RPMI 1640、BGJ培养基(有或没有费顿-杰克逊(Fitton-Jackson)改良)、伊格尔基础培养基(BME-添加厄尔氏盐基础)、达尔伯克改良的伊格尔培养基(Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM-不含血清)、Yamane、IMEM-20、格拉斯哥改良伊格尔培养基(Glasgow Modification Eagle Medium,GMEM)、莱博维茨(Leibovitz)L-15培养基、McCoy's 5A培养基、培养基M199(M199E-具有厄尔氏盐基础)、培养基M199(M199H-具有厄尔氏盐基础)、伊格尔最低必需培养基(MEM-E-具有厄尔氏盐基础)、伊格尔最低必需培养基(MEM-H-具有厄尔氏盐基础)、和伊格尔最低必需培养基(MEM-NAA,具有非必需氨基酸)等。进一步认识到,可以向培养基中添加另外的组分。此类组分包括但不限于抗生素、抗真菌剂、白蛋白、生长因子、氨基酸和细胞培养领域已知的其他组分。可以添加到培养基中的抗生素包括但不限于青霉素和链霉素。然而,本发明决不应被解释为限于用于培养本发明细胞的任何一种培养基。相反,可以使用能够在组织培养中支持本发明细胞的任何培养基。可以将细胞以任何期望的密度培养,该任何期望的密度包括但不限于约100个细胞/mL、500个细胞/mL、1,000个细胞/mL、5,000个细胞/mL、10,000个细胞/mL、15,000个细胞/mL、20,000个细胞/mL等。

[0105] 该至少一个细胞群可以以任何期望的网格或图案布置。在某些实施方案中,将单个细胞群布置在行和/或列的阵列中的横向和纵向隔开的区域中。在一个实施方案中,将单个细胞群布置在分隔约10-100 $\mu$ m的规则间隔的区域中。在一个实施方案中,细胞区域包含约10-1,000,000个单独的细胞区域。在另一个实施方案中,细胞区域包含约500-500,000个单独的细胞区域。在另一个实施方案中,细胞区域包含约100-100,000个单独的细胞区域。在一个实施方案中,细胞区域包含密度为约100个细胞/区域至约100,000个细胞/区域的细胞。在各种实施方案中,细胞区域的排列可以借助于一个或多个网格的使用,诸如孔载玻片模块。

[0106] 细胞培养可用于扩增细胞或细胞群,以产生足够数量的细胞用于所需的分析方法,例如基因组或表达分析。

[0107] 可以使用任何合适的质谱成像技术。非限制性实例包括基质辅助激光解吸/电离成像傅里叶变换离子回旋共振 (MALDI-FTICR) 质谱、基质辅助激光解吸/电离飞行时间 (MALDI-TOF) 质谱、扫描微探针MALDI (SMALDI) 质谱、红外基质辅助激光解吸电喷雾电离 (MALD-ESI) 质谱、表面辅助激光解吸/电离 (SALDI) 质谱、解吸电喷雾电离 (DESI) 质谱、二次离子质谱 (SIMS) 质谱、简易敞开式声波喷雾电离 (EASI) 质谱等。在各种实施方案中,可以在质谱成像之前用基质溶液对基底进行喷雾。可以使用任何合适的溶液,包括但不限于2,5-二羟基苯甲酸、 $\alpha$ -氰基-4-羟基肉桂酸、芥子酸、1,5-二氨基萘、9-氨基吡啶等。

#### [0108] 聚糖分析

[0109] 对N-连接的聚糖的分析最通常涉及对纯化的单个蛋白质或复杂的蛋白质混合物的分析。聚糖在许多生物学过程中起着多方面的作用,并且异常糖基化与许多疾病相关。聚糖是蛋白质的翻译后修饰,其参与细胞生长、胞质分裂、分化、转录调节、信号转导、配体-受体结合、和细胞与其他细胞的相互作用、细胞外基质以及细菌和病毒感染等功能。聚糖失调和结构改变发生在影响人类的大多数疾病中。

[0110] 本发明可检测的聚糖包括直链和支链寡糖以及天然存在的和合成的聚糖。例如,聚糖可以是糖氨基酸、糖肽、糖脂、糖胺聚糖 (GAG)、糖蛋白、全细胞、细胞组分、糖缀合物、糖模拟物、糖磷脂锚、糖基磷脂酰肌醇 (GPI) 连接的糖缀合物、细菌脂多糖和内毒素。聚糖还可以包括N-聚糖、 $\beta$ -聚糖、糖脂和糖蛋白。

[0111] 在一些情况下,本发明可检测的聚糖包括两个或更多个糖单元。本发明的聚糖中可以存在任何类型的糖单元,包括例如阿洛糖、阿卓糖、阿拉伯糖、葡萄糖、半乳糖、古洛糖、岩藻糖、果糖、艾杜糖、来苏糖、甘露糖、核糖、塔罗糖、木糖或其他糖单元。此类糖单元可以具有多种修饰和取代基。例如,糖单元可以具有多种取代基来代替羟基、羧酸根 (carboxylate) 和亚甲基羟基取代基。因此,低级烷基部分可以替代本发明聚糖中的糖单元的羟基、羧酸和亚甲基羟基取代基的任何氢原子。例如,氨基乙酰基可以替代本发明聚糖中的糖单元的羟基、羧酸和亚甲基羟基取代基的任何羟基或氢原子。

[0112] 在一些实施方案中,本发明的方法可以包括确定糖蛋白的糖谱。该特性可以通过分析完整糖蛋白的聚糖来确定。可以被确定的聚糖特性包括:部分或全部糖结构的质量、糖的化学单元的电荷、糖的化学单元的身份、糖的化学单元的确认、糖的总电荷、糖的硫酸盐的总数、乙酸盐的总数、磷酸盐的总数、羧酸盐的存在和数量、醛或酮的存在和数量、糖的染料结合、糖的取代基的组成比率、阴离子糖与中性糖的组成比率、糖醛酸的存在、酶促敏感性、糖的化学单元之间的连接、电荷、分支点、分支数量、每个分支中的化学单元数量、分支或非分支糖的核心结构、每个分支的疏水性和/或电荷/电荷密度、分支糖的核心中G1cNAc和/或岩藻糖的存在或不存在、分支糖的延伸核心中甘露糖的数量、糖的支链上唾液酸的存在或不存在、糖的支链上半乳糖的存在或不存在。

[0113] 可以通过本领域已知的任何手段来鉴定聚糖的特性。例如,可以通过包括质谱法在内的几种方法来确定分子量。使用质谱来确定聚糖的分子量在本领域中是熟知的。因为质谱在报告所产生(例如,通过酶促切割)片段的质量方面的准确性并且还因为只需要很小的样品浓度,所以质谱已被用作表征聚合物诸如聚糖的有力工具。

[0114] 用于分析聚糖以便表征它们的任何分析方法可以在聚糖的任何样品上进行,此类分析方法包括本文所述的那些。如本文所用,“表征”聚糖或其他分子意指获得可以用于确

定其身份、结构、组成或数量的数据。当该术语用于指糖缀合物时，它还可以包括确定糖基化位点；糖基化位点的占有；糖缀合物的聚糖和/或非糖部分的身份、结构、组成或数量；以及特定糖形的身份和数量。这些方法包括例如质谱、核磁共振 (NMR) (例如2D-NMR)、电泳和色谱方法。质谱方法的实例包括快速原子轰击质谱 (FAB-MS)、液相色谱质谱 (LC-MS)、液相色谱串联质谱 (LC-MS/MS)、基质辅助激光解吸/电离质谱 (MALDI-MS)、基质辅助激光解吸/电离串联质谱 (MALDI-MS/MS) 等。NMR方法可以包括例如相关光谱法 (COSY)、二维核磁共振光谱学 (TOCSY)、核奥弗豪泽效应光谱学 (Nuclear Overhauser effect spectroscopy, NOESY)。电泳可以包括例如具有激光诱导荧光的毛细管电泳 (CE-LIF)、毛细管凝胶电泳 (CGE)、毛细管区带电泳 (CZE)、COSY、TOCSY和NOESY。

[0115] 质谱成像是一种强有力的工具，其已被用于将组织切片中的各种肽、蛋白质、脂质和代谢物与其潜在的组织病理学相关联。利用质谱学的快速发展，质谱成像可以推动糖组学研究的极限。质谱成像提供了支持其作为凝集素组织化学的补充技术的一些优于传统方法的优势。一个显著的优点是基质辅助激光解吸/电离 (MALDI) 成像结合串联质谱揭示了关于样品中聚糖的详细结构信息。通过质谱成像可以检测大范围的分子量。而且，高质量分辨率允许区分分子量相近的两个峰，这随后改善了检测特异性。此外，在一张单一图像中，可以在毫微微克分子 (femtomole) 水平上检测到几十甚至几百种聚糖，从而允许检测到低浓度的分子。因此，MALDI成像有助于组织聚糖的高通量分析。MALDI成像也可以用于进行定量测定。MALDI成像的另一个显著优点是，其具有在没有任何分析物先验知识的情况下检测未知化合物的能力。因此，此技术特别适合于生物标记发现研究。

[0116] MALDI是一种软电离质谱技术，其适合用于分析当通过常规电离方法电离时倾向于为脆弱的和片段的生物分子诸如蛋白质、肽、糖等。

[0117] 通常，MALDI包括两步骤过程。在第一步骤中，由紫外 (UV) 激光束触发解吸。基质材料吸收UV激光辐射，其导致基质材料上层烧蚀，从而产生热羽流。热羽流含有许多种类：中性和离子化的基质分子、质子化和去质子化的基质分子、基质簇和纳米液滴。在第二步骤中，分析物分子在热羽流中被离子化，例如质子化或去质子化。

[0118] 基质材料包含能够吸收UV激光辐射的结晶分子。常见的基质材料包括但不限于 $\alpha$ -氰基-4-羟基肉桂酸、2,5-二羟基苯甲酸、2,5-二羟基苯甲酸/2-羟基-5-甲氧基苯甲酸、2,4,6-三羟基苯乙酮、6-氮杂-2-硫代胸腺嘧啶、3-羟基吡啶甲酸、3-氨基喹啉、邻氨基苯甲酸、5-氯-2-巯基苯并噻唑、2,5-二羟基苯乙酮、阿魏酸、和2-(4-羟基苯基偶氮) 苯甲酸。在高纯度的水和有机溶剂诸如乙腈或乙醇中制备基质材料的溶液。在一些实施方案中，也可以向溶液中添加少量三氟乙酸 (TFA)。

[0119] 然后将基质溶液与分析物 (例如蛋白质样品) 混合。然后将此溶液沉积在MALDI板上，其中溶剂蒸发，仅留下包含嵌入MALDI晶体中的分析物分子的重结晶基质。

[0120] 通过此方法检测的聚糖的特性也可以是聚糖或单元的任何结构特性。例如，聚糖的特性可以是聚糖的分子量或长度。在其他实施方案中，该特性可以是取代基或单元的组成比率、多糖的基本结构单元的类型、疏水性、酶促敏感性、亲水性、二级结构和构象 (即螺旋位置)、取代基的空间分布、化学单元之间的连接、分支点的数量、分支多糖的核心结构、一组修饰与另一组修饰的比率 (即每个位置处的硫酸化、乙酰化或磷酸化的相对量) 以及蛋白质的结合位点。

[0121] 鉴定其他类型的特性的方法对于本领域技术人员而言是容易鉴定的,并且通常可能取决于特性的类型和聚糖的类型;此类方法包括但不限于毛细管电泳(CE)、NMR、质谱(MALDI和ESI两者)和具有荧光检测的高效液相色谱(HPLC)。例如,可以使用反相高压液相色谱(RP-HPLC)来确定疏水性。可以通过将聚糖暴露于酶并确定在这种暴露之后存在的片段数量来鉴定酶促敏感性。可以使用圆二色性来确定手性。可以通过质谱、等温量热法和NMR来确定蛋白质结合。可以使用NMR和/或毛细管电泳来确定连接。可以用类似于酶促降解的方式(即通过将基底暴露于酶并使用MALDI-MS来确定基底是否被修饰)来确定酶促修饰(不是降解)。例如,磺基转移酶可以将硫酸基团转移到寡糖链上,该寡糖链具有80Da的伴随增加。可以通过建模和核磁共振(NMR)来确定构象。硫酸化的相对量可以通过组分分析来确定,或者通过拉曼光谱来近似确定。

[0122] 根据一个实施方案,本发明提供了一种质谱成像技术,其已被开发用于对来自抗体阵列捕获的蛋白质中的聚糖的谱分析。可以将释放剂在所捕获的蛋白质上进行喷雾以释放聚糖。常见的酶促释放剂包括但不限于胰蛋白酶、内切糖苷酶H(Endo H)、内切糖苷酶F(EndoF)、N-聚糖酶F(PNGase F)、PNGase A、O-聚糖酶和/或一种或多种蛋白酶(例如,胰蛋白酶或LysC)、或化学释放剂(例如,使用无水肼(N)或者还原性或非还原性 $\beta$ -消除(O))。

[0123] 在其他实施方案中,特别是当MALDI-MS用于分析时,可以将聚糖修饰以改善聚糖的电离。此类修饰包括过甲基化。另一种增加聚糖电离的方法是将聚糖与疏水性化学物质(诸如AA、AB标记)缀合用于进行MS或液相色谱检测。在其他实施方案中,可以采用点方法来改善信号强度。

[0124] 如本发明所观察到的,包含大多数重要信号的实用 $m/z$ 范围可能比这些更有限。实用范围包括约 $m/z$  400、约 $m/z$  500、约 $m/z$  600、和约 $m/z$  700的下限;以及约 $m/z$  4000、约 $m/z$  3500(特别是对于负离子模式)、约 $m/z$  3000(特别是对于负离子模式)、以及特别是至少约 $m/z$  2500(负离子或正离子模式)以及对于正离子模式至约 $m/z$  2000(对于正离子模式分析)的上限。该范围取决于样品聚糖的尺寸,具有高分支或多糖含量或高唾液酸化水平的样品可以在包含更高上限(如对于负离子模式所描述)的范围内进行分析。可以组合该上下限以形成最大尺寸和最小尺寸的范围、或者最低下限与最低上限的范围、以及按照尺寸增加的顺序类似地形成其他极限的范围。

[0125] 可以将本公开的方法应用于从多种生物样品中获得的蛋白质样品。在根据本公开进行分析之前或之后,生物样品可以经历一个或多个分析和/或纯化步骤。例如,在一些实施方案中,用一种或多种可检测标记或可以有助于通过例如质谱或NMR进行分析的其他药剂来标记生物样品中的聚糖。根据本公开,可以对生物样品应用多种分离(separation和/或isolation)步骤中的任何一种。

#### [0126] 诊断方法

[0127] 糖基化的改变与许多疾病相关。通常,这些变化是通过对复杂蛋白质混合物的聚糖分析或通过对一些特定的单个蛋白质的分析来观察的。在各种实施方案中,本发明还提供了通过检测其存在或水平(无论是绝对的还是相对的)可能与特定的疾病状态(包括对特定疾病的易感性)相关的一种或多种特定的聚糖和/或此类聚糖的浓度随时间的变化来诊断疾病状态或障碍状态或者疾病状态或障碍状态的进展的方法。

[0128] 可以将检测到的聚糖和检测到的糖基化变化用于检测、治疗和/或预防多种早期

疾病和/或癌症。在一些实施方案中,此类聚糖的存在指示了癌症的存在,并且可以提供关于这种疾病的预后的信息,例如,该疾病是否正在缓解或正在变得更具侵袭性。具有癌症家族史并且因此患上该疾病的风险更高的患者可以定期检测以监测他们的疾病倾向。

[0129] 在一些实施方案中,本发明的方法提供了诊断受试者的疾病或病症的方法,该方法包括以下步骤:检测来自受试者的生物样品中存在的聚糖,建立受试者的聚糖谱,将来自受试者的聚糖谱与来自正常样品或疾病样品的聚糖谱进行比较,以及确定受试者是否患有该疾病或病症,其中使用本文别处所描述的目前公开的方法检测该聚糖。

[0130] 例如,在一些实施方案中,该方法提供了用于捕获具有指示肝细胞癌(HCC)的糖基化模式的感兴趣蛋白质的抗体阵列。因此,抗体阵列可以包括但不限于特异性地结合以下中的一种或多种的抗体:A1AT、胎球蛋白-A、血液结合素、Apo-J、LMW激肽原、HMW激肽原、apo-H、转铁蛋白、IgG、IgM、IgA、纤连蛋白、层粘连蛋白、血浆铜蓝蛋白、腓骨蛋白(fibulin)、血管紧张素原、原纤维蛋白1、TIMP1、凝血酶敏感蛋白1、半乳糖凝集素-3结合蛋白、补体C1 R、丛生蛋白、半乳糖凝集素1、 $\alpha$ -2-巨球蛋白、维生素D结合蛋白、富组氨酸糖蛋白、富组氨酸糖蛋白、CD109、CEA、组织蛋白酶、AFP和GP73。从受试者的生物样品中捕获蛋白质并随后进行聚糖分析可以确定受试者是否患有HCC以及HCC进展的当前阶段。

[0131] 可以对患有或被认为患有疾病或病症的人进行诊断。也可以对被认为有患上疾病或病症的风险的人进行诊断。“处于风险中的人”是具有患上疾病或病症的遗传倾向的人,或者是已经暴露于可能增加其患上疾病或病症的风险的因素的人。

[0132] 癌症的早期检测对其有效治疗至关重要。尽管诊断技术取得了进步,但许多癌症病例直到恶性细胞已经侵入周围组织或转移到全身后才得到诊断和治疗。尽管目前的诊断方法对癌症的检测做出了重大贡献,但它们仍然存在灵敏度和特异性的问题。

[0133] 根据本发明的一个或多个实施方案,应当理解,使用本文提供的方法可以进行的癌症诊断的类型不一定受到限制。出于本文的目的,癌症可以是任何癌症。如本文所用,术语“癌症”意指由异常和不受控制的细胞分裂引起的任何恶性生长或肿瘤,该任何恶性生长或肿瘤可以通过淋巴系统或血流扩散到身体的其他部分。

[0134] 癌症可以是转移性癌症或非转移性(例如,局限性)癌症。如本文所用,术语“转移性癌症”是指癌症细胞已经转移的癌症,例如,该癌症的特征在于癌细胞的转移。如本文所述,转移可以是局部转移或远处转移。

[0135] 根据一个实施方案,本发明提供了使用本文所公开的方法制备的聚糖谱用于诊断受试者的疾病或病症的用途,该诊断包括将受试者的聚糖谱与正常样品或患病样品的聚糖谱进行比较,以及确定受试者的样品是否患有疾病或病症。

[0136] 根据本发明的方法,术语“癌症”或“肿瘤”还包括但不限于肾上腺腺癌、胆道癌;膀胱癌,脑癌;乳腺癌;宫颈癌;绒毛膜癌;结肠癌;子宫内膜癌;食管癌;肝外胆管癌;胃癌;头颈癌;上皮内肿瘤;肾癌;白血病;淋巴瘤;肝癌;肺癌(例如小细胞和非小细胞);黑色素瘤;多发性骨髓瘤;神经母细胞瘤;口腔癌;卵巢癌;胰腺癌;前列腺癌;直肠癌;肉瘤;皮肤癌;小肠癌;睾丸癌;甲状腺癌;子宫癌;尿道癌和肾癌,以及其他癌和肉瘤。

[0137] 癌症类型的广泛列表包括但不限于急性成淋巴细胞白血病(成人)、急性成淋巴细胞白血病(儿童)、急性骨髓性白血病(成人)、急性骨髓性白血病(儿童)、肾上腺皮质癌、肾上腺皮质癌(儿童)、AIDS相关癌症、AIDS相关淋巴瘤、肛门癌、星形细胞瘤(儿童小脑)、星形

细胞瘤(儿童大脑)、基底细胞癌、胆管癌(肝外)、膀胱癌、膀胱癌(儿童)、骨癌(骨肉瘤/恶性纤维组织细胞瘤)、脑干神经胶质瘤(儿童)、脑瘤(成人)、脑瘤—脑干神经胶质瘤(儿童)、脑瘤—小脑星形细胞瘤(儿童)、脑瘤—大脑星形细胞瘤/恶性神经胶质瘤(儿童)、脑瘤—室管膜瘤(儿童)、脑瘤—髓母细胞瘤(儿童)、脑瘤—幕上原始神经外胚层肿瘤(儿童)、脑瘤—视路和视下丘脑神经胶质瘤(儿童)、乳腺癌(女性、男性、儿童)、支气管腺瘤/类癌(儿童)、伯基特淋巴瘤、类癌肿瘤(儿童)、类癌肿瘤(胃肠道)、原发部位不明癌(成人和儿童)、中枢神经系统淋巴瘤(原发性)、小脑星形细胞瘤(儿童)、大脑星形细胞瘤/恶性神经胶质瘤(儿童)、宫颈癌、慢性淋巴细胞性白血病、慢性髓细胞性白血病、慢性骨髓增生性障碍、结肠癌、结肠直肠癌(儿童)、皮肤t细胞淋巴瘤、子宫内膜癌、室管膜瘤(儿童)、食管癌、食管癌(儿童)、尤文家族肿瘤、颅外生殖细胞肿瘤(儿童)、性腺外生殖细胞肿瘤、肝外胆管癌、眼癌(眼内黑色素瘤和视网膜母细胞瘤)、胆囊癌、胃(gastric/stomach)癌、胃(gastric/stomach)癌(儿童)、胃肠道类癌肿瘤、胃肠道间质瘤(gist)、生殖细胞肿瘤(颅外(儿童)、性腺外、卵巢)、妊娠滋养层肿瘤、神经胶质瘤(成人)、神经胶质瘤(儿童:脑干、大脑星形细胞瘤、视路和视下丘脑)、毛细胞白血病、头颈癌、肝细胞(肝)癌(成人原发性和儿童原发性)、霍奇金淋巴瘤(成人和儿童)、妊娠期霍奇金淋巴瘤、下咽癌、下丘脑和视路神经胶质瘤(儿童)、眼内黑色素瘤、胰岛细胞癌(内分泌胰腺)、卡波西肉瘤、肾(肾细胞)癌、肾癌(儿童)、喉癌、喉癌(儿童)、急性淋巴细胞性白血病(成人和儿童)、急性骨髓性白血病(成人和儿童)、慢性淋巴细胞性白血病、慢性髓细胞性白血病、毛细胞白血病、唇癌和口腔癌、肝癌(成人原发性和儿童原发性)、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、AIDS相关淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、皮肤t细胞淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤(成人、儿童和妊娠期)、非霍奇金淋巴瘤(成人、儿童和妊娠期)、原发性中枢神经系统淋巴瘤、华氏巨球蛋白血症、骨恶性纤维组织细胞瘤/骨肉瘤、髓母细胞瘤(儿童)、黑色素瘤、眼内(眼)黑色素瘤、梅克尔细胞癌(Merkel cell carcinoma)、间皮瘤(成人)、间皮瘤(儿童)、转移性鳞状颈癌伴隐匿原发性、多发性内分泌瘤综合征(儿童)、多发性骨髓瘤/浆细胞瘤、蕈样霉菌病、脊髓发育不良综合征、脊髓发育不良/骨髓增生性疾病、慢性髓细胞性白血病、急性骨髓性白血病(成人和儿童)、多发性骨髓瘤、慢性骨髓增生性障碍、鼻腔和鼻窦癌、鼻咽癌、鼻咽癌(儿童)、神经母细胞瘤、非小细胞肺癌、口腔癌(儿童)、口腔和唇癌、口咽癌、骨肉瘤/骨恶性纤维组织细胞瘤、卵巢癌(儿童)、卵巢上皮癌、卵巢生殖细胞肿瘤、卵巢低恶性潜能肿瘤、胰腺癌、胰腺癌(儿童)、胰岛细胞胰腺癌、鼻窦和鼻腔癌、甲状旁腺癌、阴茎癌、嗜铬细胞瘤、松果体母细胞瘤和幕上原始神经外胚层肿瘤(儿童)、垂体肿瘤、浆细胞瘤/多发性骨髓瘤、胸膜肺母细胞瘤、妊娠和乳腺癌、原发性中枢神经系统淋巴瘤、前列腺癌、直肠癌、肾细胞(肾)癌、肾细胞(肾)癌(儿童)、肾盂和输尿管—移行细胞癌、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤(儿童)、唾液腺癌、唾液腺癌(儿童)、肉瘤—尤文家族肿瘤、卡波西肉瘤、软组织肉瘤(成人和儿童)、子宫肉瘤、塞扎里综合征、皮肤癌(非黑色素瘤)、皮肤癌(儿童)、皮肤癌(黑色素瘤)、皮肤癌—梅克尔细胞、小细胞肺癌、小肠癌、软组织肉瘤(成人和儿童)、鳞状细胞癌、鳞状颈癌伴隐匿性原发转移、胃(gastric/stomach)癌、胃(gastric/stomach)癌(儿童)、幕上原始神经外胚层肿瘤(儿童)、睾丸癌、胸腺瘤(儿童)、胸腺瘤和胸腺瘤、甲状腺癌、甲状腺癌(儿童)、肾盂和输尿管移行细胞癌、滋养层肿瘤、妊娠期输尿管和肾盂移行细胞癌、尿道癌、子宫内膜癌、子宫肉瘤、阴道癌、视路和视下丘脑神经胶质瘤(儿童)、外阴癌、华氏巨球蛋白血症和肾母细胞瘤(Wilms' tumor)。

[0138] 附接至特定聚糖的聚糖载体蛋白

[0139] 本发明进一步涉及通过蛋白质的特异性纯化(例如通过亲和方法诸如免疫沉淀)或者通过测序、通过质谱测序、包括糖肽的测序和识别肽并因而捕获与聚糖连接的蛋白质来鉴定附接至由本发明抗体阵列诸如从完整(细胞结合/跨膜)癌组织或细胞释放的蛋白质中捕获的任何蛋白质上的聚糖并且根据特定载体蛋白质分配聚糖结构的方法。

[0140] 在一些实施方案中,所确定的癌症糖基化标记可以用于鉴定和分离一种或多种糖蛋白生物标记,即对特定类型的癌症特异的糖蛋白。疾病的糖蛋白生物标记携带癌症的糖基化标记。可以使用凝集素或单克隆抗体进行癌症的糖蛋白生物标记的分离。

[0141] 蛋白质的糖基化可以指示正常或疾病状态。因此,提供了基于对所捕获蛋白质或一组所捕获蛋白质的糖基化(诸如总糖组)的分析的诊断目的的方法。本文提供的方法可以用于诊断由特定蛋白质糖基化或糖基化模式引起或导致特定蛋白质糖基化或糖基化模式的改变的任何疾病或病症。然后将这些模式与“正常”和/或“疾病”模式进行比较,以开发对受试者的诊断和治疗。例如,所提供的方法可以用于诊断癌症、炎症疾病、良性前列腺增生(BPH)等。

[0142] 可以对患有或被认为患有疾病或病症的人进行诊断。也可以对被认为有患上疾病或病症的风险的人进行诊断。“处于风险中的人”是具有患上疾病或病症的遗传倾向的人,或者是已经暴露于可能增加其患上疾病或病症的风险的因素的人。

[0143] 本发明提供了与癌症相关的糖基化标记。在一个实施方案中,糖基化标记是与另一种表型状态(例如,没有疾病)的个体相比在取自一种表型状态(例如,患有疾病)的个体的样品中差异地存在的有机生物分子。如果生物标记在不同个体中的平均或中值表达水平(包括糖基化水平)被计算为具有统计学显著性,则生物标记在两个个体之间差异地存在。生物标记,单独或组合,提供了个体属于一种表型状态或另一种表型状态的相对风险的度量。因此,它们可用作疾病诊断、疾病严重性、药物治疗效果和药物毒性的标记。

[0144] 在一个实施方案中,本发明的方法通过以下步骤进行:从源自于测试个体的生物样品中获得多个生物标记的一组测量值,从源自于对照个体的生物样品中获得多个生物标记的一组测量值,比较测试样品与对照样品之间的每个生物标记的测量值,以及鉴定测试值与对照值(也称为参考值)之间显著不同的生物标记。

[0145] 比较测量值和参考值的过程可以以适合于本发明生物标记的测量值和参考值的类型的任何方便的方式进行。例如,“测量”可以使用定量或定性测量技术来执行,并且比较测量值和参考值的模式可以根据所采用的测量技术而变化。例如,当使用定性比色测定来测量生物标记水平时,该水平可以通过在视觉上比较有色反应产物的强度,或者通过比较来自有色反应产物的光密度测量或光谱测量的数据(例如,比较源自于测量设备的数字数据或图形数据,诸如条形图)来比较。然而,预期在本发明的方法中使用的测量值最通常将是定量值(例如,浓度的定量测量)。在其他实例中,测量值是定性的。与定性测量一样,可以通过检查数字数据或通过检查数据的表示(例如,检查图形表示,诸如条形图或折线图)来进行比较。

[0146] 如果测量值是参考值的值的至少约95%,则通常认为该测量值基本上等于或大于参考值。如果测量值小于参考值的约95%,则认为该测量值小于参考值。如果测量值比参考值大了至少超过约5%,则认为该测量值大于参考值。

[0147] 比较的过程可以是手动的(诸如由方法的实践者进行目视检查),也可以是自动的。例如,测定装置(诸如用于测量化学发光信号的光度计)可以包括电路和软件,使其能够将测量值与期望的生物标记的参考值进行比较。可替代地,可以使用单独的设备(例如,数字计算机)来比较一个或多个测量值和一个或多个参考值。用于比较的自动化设备可以包括被测量的一种或多种生物标记的存储参考值,或者它们可以将一个或多个测量值与源自于同时测量的参考样品的参考值进行比较。

[0148] 上述用于筛选生物标记的方法可以发现在癌症中以及在进展为癌症的组织的各种发育不良阶段中差异地糖基化的生物标记。筛选出的生物标记可以用于癌症筛选、风险评估、预后、疾病鉴定、疾病阶段的诊断、和治疗靶标的选择。

[0149] 根据本发明的方法,可以通过确定从样品中获得的一种或多种生物标记的糖基化阶段来诊断在不同阶段或时期的癌症进展。通过将来自每个癌症阶段的样品的生物标记的糖基化阶段与从其中不存在组织的细胞增生性障碍的样品中分离的一种或多种生物标记的糖基化阶段进行比较,可以检测样品中癌症的特定阶段。在一个实施方案中,糖基化阶段可以是超糖基化。在另一个实施方案中,糖基化阶段可以是低糖基化。

#### [0150] 生物样品

[0151] 本发明涉及对源自生物样品的蛋白质溶液的分析。在一些实施方案中,感兴趣的生物样品来源于癌性组织,诸如良性和/或恶性癌组织或肿瘤。

[0152] 在一个实施方案中,组织是人体组织或组织部分,诸如液体组织、细胞和/或固体多细胞肿瘤,并且在另一个实施方案中,是可以被加工成组织溶液的固体人体组织。该组织可以用于分析和/或靶向来自组织的特定聚糖标记结构,包括细胞内和细胞外的,诸如细胞表面相关的定位标记。单个细胞类型癌症或肿瘤包括血液来源的肿瘤诸如白血病和淋巴瘤,而实体瘤包括来源于实体组织诸如胃肠道组织、其他内部器官诸如肝、肾、脾、胰腺、肺、性腺及相关器官包括卵巢、睾丸和前列腺的实体瘤。本发明进一步揭示了来自单独或多细胞呈现的癌细胞的标记。癌细胞包括从肿瘤/癌症和血细胞衍生的癌症诸如白血病和/或淋巴瘤中释放的转移细胞。来自实体组织肿瘤的转移形成了具有特定特征的一类单独的癌症样品。

[0153] 根据本发明待分析的癌症组织材料在本发明中也被称为组织材料或简称为细胞,因为所有组织都包含细胞,然而本发明可以针对单细胞地和多细胞地表达的癌细胞和/或作为单独特征的实体瘤。本发明进一步揭示了待与癌症材料进行比较的正常组织材料。本发明具体地涉及根据本发明的用于当与转化组织或疑似癌症样品相关的信号的特定结构的表达与估计对应于正常组织中的表达的表达式水平相比较或者与来自相同组织的标准样品(诸如来自相同患者的相同组织的健康部分的组织样品)中的表达式水平相比较时揭示该转化组织或疑似癌症样品的状态的方法。

[0154] 在一些实施方案中,本发明涉及分析来自同一患者的癌症组织和对应的正常组织两者的标记结构和/或聚糖谱,因为部分糖基化包括例如与罕见的糖基化相关疾病(诸如先天性(糖蛋白/碳水化合物的)糖基化障碍和/或聚糖存储疾病)相关的个体变化。本发明此外还涉及通过根据本发明的方法来验证分析在特定癌症和/或任选地具有特定状态的癌症亚型(例如,原发性癌症、转移性癌症、与癌症相关的良性转化)中的糖组中的特定结构/结构基团或聚糖基团的重要性的和/或变化的方法。

### [0155] 诊断测试

[0156] 在一个实施方案中,使用本发明的生物标记(例如,聚糖)的诊断测试表现出至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%和约100%的灵敏度和特异性。在一些情况下,本发明的筛选工具表现出至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%和约100%的高灵敏度。

[0157] 在一个实施方案中,灵敏度是从约75%至约99%、或从约80%至约90%、或从约80%至约85%。在其他实施方案中,特异性是从约75%至约99%、或从约80%至约90%、或从约80%至约85%。

[0158] 在另一个实施方案中,本发明能够筛选出风险人群以早期检测癌症,例如胰腺癌。此外,在某些方面,本发明能够区分肿瘤性(例如恶性)与良性(即非癌性)细胞增殖性障碍。

[0159] 预后方法可以用于鉴定患有癌症或有患上癌症风险的患者。可以为这类患者提供另外的合适的治疗或预防选择,包括内窥镜息肉切除术或切除术,以及在指明时,外科手术、化疗、放疗、生物反应调节剂或其他疗法。此类患者还可以接受进一步诊断或监测程序的建议,该进一步诊断或监测程序包括但不限于增加结肠镜检查、虚拟结肠镜检查、视频胶囊内窥镜检查、PET-CT、分子成像或其他成像技术的频率。

[0160] 根据本发明的方法对受试者进行诊断后,可以针对该疾病对被诊断患有癌症或有患上增殖性疾病(诸如癌症)风险的受试者进行治疗。受试者可以在整个治疗过程中接受诊断测试,以监测进展和效果。

### [0161] 实验实施例

[0162] 参考以下实验实施例进一步详细描述本发明。这些实施例仅仅是为了说明的目的而提供的,并且除非另有说明,否则这些实施例不意图进行限制。因此,本发明决不应被解释为限于以下实施例,而是应被解释为涵盖由于本文提供的教导而变得明显的任何和所有变化。

[0163] 没有进一步的描述,据信本领域普通技术人员可以使用前面的描述和下面的说明性实施例来制备和利用本发明的化合物并实施所要求保护的方法。因此,以下工作实施例具体地指出了本发明的示例性实施方案,并且不应被解释为以任何方式限制本公开的其余部分。

### [0164] 实施例1:使用MALDI成像质谱(MALDI-IMS)的聚糖分析

[0165] 以下研究提供了一种使用MALDI-IMS对组织进行聚糖分析的新方法。该方法无需在分析之前对组织蛋白进行显微切割和增溶。MALDI-IMS已被广泛审查并通常采用一种方案,其中基质溶液(诸如芥子酸或二羟基苯甲酸(DHB))直接沉积在组织切片上并且可溶性分子从组织中提取出并与基质共结晶。该基质被应用于整个组织切片,使得解吸可以靶向网格图案中的特定“点”,并且数据被光栅化。然后,所得光谱可以用于直接从组织切片表面产生数百种分析物的二维分子图谱。这些分子图谱显示了这些分子的相对丰度和空间分布。因此,MALDI组织谱分析具有将质谱的分子细节与分子组织学关联的能力,从而产生与薄组织切片中已知位置相关的质谱。MALDI-IMS的大多数应用集中在蛋白质、脂质和药物代谢物而不是聚糖的谱分析上。在这里,将重组内切糖苷酶PNGase F的分子涂层在福尔马林固定的石蜡包埋(FFPE)组织上进行喷雾,并用于从组织中去除N-连接聚糖。图4呈现了HCC组织和邻近组织的这种方法的实例,仅显示了6个鉴定的N-连接聚糖(100多个中的6个)。可

以清楚地看到与恶性组织相关的特定聚糖模式是可观察的。重要的是，它们定位在组织内，并且可以将每种聚糖的定位水平赋予组织中的特定区域。

[0166] 聚糖在组织上的空间定位使得能够鉴定在载玻片的特定区域上捕获的聚糖。基本方法如图1所示。这种方法的关键特征是特异性蛋白质的抗体捕获和通过MALDI-FTICR分析N-连接聚糖(在用PNGase F酶促释放之后)。为了确定如何可以容易地检测到点样到玻璃载玻片上的纯蛋白质，通过将纯的糖蛋白点样到玻璃载玻片上、然后进行MALDI-FTICR MS来确定系统的绝对灵敏度。图5A至图5C呈现了关于聚糖检测灵敏度的初步证据。利用点样的 $\alpha$ 1抗胰蛋白酶(A1AT)，因为这是一种具有重要结构聚糖信息的糖蛋白。图5A显示了A1AT的HPLC聚糖谱，突出了具有0、1或2个唾液酸的双触角聚糖的存在。此外，存在少量的核心岩藻糖基化双触角聚糖。图5B显示了在直接点样到玻璃载玻片上之后检测到的这个较小峰，即核心岩藻糖基化双触角聚糖( $m/z=1809.639$ )。重要的是，在0.1ng的点样蛋白中，可以检测到这种聚糖。应注意的是，检测到A1AT上最丰富的聚糖—二唾液酸化双触角峰与核心岩藻糖基化双触角聚糖的比率为约12:1。

[0167] 图5C强调了在使用抗体捕获的A1AT上检测聚糖的能力。简言之，将针对A1AT的抗体以每点300ng的浓度点样，将载玻片用在PBS中的2%BSA洗涤并封闭过夜。作为特异性对照，将针对人胎球蛋白A的抗体也以300ng/点的浓度点样。用PNGase F对载玻片进行喷雾以去除捕获抗体的固有糖基化并洗涤。将点用不同量的A1AT(从1.0 $\mu$ g至0.0001 $\mu$ g)覆盖，并允许孵育1小时，其后将载玻片用PBS洗涤，用PNGase F进行喷雾，再次孵育1小时，喷洒基质，并通过MALDI-FTICR MS进行分析。如图5C所示，可以从0.1ng捕获的A1AT中检测到核心岩藻糖基化双触角聚糖(1809.639)。当没有添加A1AT(标记为0)或当A1AT被点样在涂覆有针对胎球蛋白A的抗体(一种非特异性蛋白质)的区域时，看到有非常弱的信号。与纯蛋白质一样，观察到单唾液酸化和二唾液酸化双触角聚糖与核心岩藻糖基化双触角峰的比率为12:1(未示出)。还应注意的是，即使是最低水平的蛋白质的信噪比也是极好的，双触角聚糖的MS强度为超过100,000，而阴性对照点的MS强度基本上为零。此点不含有蛋白质，而“阴性对照”点将含有去糖基化的蛋白质。

[0168] 图6中显示了从正常血清捕获的免疫球蛋白G中检测到的最丰富类型的N-聚糖。这些聚糖预期将被鉴定(主要是平分型和双触角)，并与针对慢性疾病评估的聚糖组一致。为了进行比较，在图6的右图中显示了通过HPLC从被PNGaseF消化且被2-AA标记的纯化(变性)IgG中检测到的最丰富的N-聚糖。此凝胶变性工作流程需要2天的准备时间。总体而言，通过抗体阵列方法载玻片捕获IgG的方法产生了与已经报道的数据一致的数据，其中使用了最少的样品(1 $\mu$ L)、低成本抗体、以及快速的制备和测定时间(短至6小时)。可以容易地检测到更多的炎性N-聚糖(例如，G0组)和已知调节IgG功能的唾液酸化N-聚糖。

[0169] 进行<100ng免疫捕获的糖蛋白的N-连接聚糖分析的能力，与在溶液评价中相比具有等效的聚糖分析能力(如通过成对学生T检验和布兰德-奥特曼检验(Bland-Altman test)逐峰地确定的)。另外，信噪比为至少10倍。

[0170] 在本研究中，对系统进行了优化，并确定了点样抗体的正确水平和MS条件，以实现最大水平的灵敏度、特异性和与直接聚糖分析的一致性。本研究中的实验变量包括：所点样抗体的量；添加到洗涤条件中的抗原的量；PNGase F浓度；和孵育条件(时间)。前两种感兴趣的蛋白质包括人IgG(hIgG)和A1AT。hIgG具有单一的非常好表征的糖基化位点。A1AT

具有三个糖基化位点,并且已相似地表征。如图5B和图5C所示,将针对A1AT或hIgG的抗体以300ng降低至0.1ng的浓度点样到玻璃载玻片上。在以前的抗体阵列工作中,参数包括约80-100 $\mu$ m的点大小、350pL的沉积体积、和每点约70ng抗体的最终浓度。在PNGase F处理以去除捕获抗体的固有糖基化之后,抗体点(A1AT或hIgG)被它们各自的蛋白质或另一种蛋白质覆盖以控制特异性(IgG对A1AT抗体的控制,反之亦然)。在所有情况下,使用荧光标记(IRE-800染料)蛋白质,这允许通过在扫描仪上成像来快速确定蛋白质是否已经结合到抗体上。此外,尽管添加到载玻片上的抗原水平将改变,但在所有情况下最终都将使用饱和量的蛋白质。这里的逻辑是从抗体捕获的蛋白质的饱和量来看聚糖。使用几种方法洗涤载玻片。最初的实验只使用1 $\times$ PBS,但是PBS用高达0.5%的tween-20进行测试(最终洗涤总是用水)。准确的洗涤条件根据经验确定,并且最佳条件根据结合的最大程度和结合的特异性来选择(例如,没有A1AT结合到抗-IgG区域,反之亦然)。这是使用Li-Cor Odyssey CLx阅读器检测的,因为蛋白质是用IRE-800染料标记的。

[0171] 随后,使用HTX™喷雾器用PNGase F(0.1 $\mu$ g/ $\mu$ L)对载玻片进行喷雾,并在37 $^{\circ}$ C在高湿度下孵育1小时至过夜的时间范围。最佳时间是提供最低水平的点对点变异性、同时保持与游离蛋白质观察到的聚糖谱相同的聚糖谱的孵育期。

[0172] 使用TM喷雾器用MALDI基质CHCA(在50%ACN/0.1%TFA中的7mg/mL)对载玻片进行喷雾。随后,使用MALDI FTICR(7T solariX,Bruker Daltonics)检测聚糖(宽带模式m/z 495-5000;正离子模式;空间分辨率20 $\mu$ m;每个点的激光照射次数:20;使用fleximaging软件版本4.1查看数据)。在所有情况下,以20个重复(最少)分析样品,并且将平均值用于比较。在溶液中,聚糖分析是通过在MALDI FT-ICR的直接分析和通过正相HPLC(在用荧光染料标记聚糖之后)两者来进行分析的。类似地,这是以20个重复进行的,以匹配基于载玻片的分析。最初的工作涉及在PBS中稀释蛋白质,但也将利用动物血清来测试任何潜在的血清效应,并优化血清使用的洗涤条件。

[0173] 为了确定从抗体捕获的抗原中获得准确的聚糖信息所需的条件,将结果与溶液中消化的方法和直接MS分析(其被认为是用于此目的的“金标准”)进行比较。为此,对于每种蛋白质(A1AT或hIgG),前10种聚糖被赋予一个百分位数,使得每种聚糖被赋予总聚糖的一个百分比。例如,在图5A的HPLC分析中,二唾液酸化双触角聚糖占总聚糖库的45%,而单唾液酸化双触角聚糖占31%,以此类推(10个峰的总和为100%)。对于通过HPLC、直接MS和通过本研究分析的聚糖,聚糖的此百分位数已完成。在所有情况下,因为分析是以20个重复(至少)进行的,所以在逐峰的基础(针对所有10个峰)上使用描述性统计来比较方法。最初,通过布兰德和奥特曼图(BA-A图)来检查数据分布、偏差和变异。随后,使用成对学生T检验(使用Graph-pad Prism 7.0)比较每种方法的每个聚糖峰的平均值。此外,将每种方法的每个峰的重复用于确定每种方法的变异系数(CV)。20%的CV被认为是可接受的。在对所有值进行对数转换之后对所有峰进行检查(以帮助归一化数据,因为一些峰比其他峰丰富得多),并使用相关系数分析(皮尔逊相关系数)并使用B-A图比较了对直接MS分析和本方法的所有峰的分析。在所有情况下, $p < 0.05$ 将被认为是显著的。

[0174] 通过用IRE-800染料标记hIgG和A1AT来实现对捕获的确认。这样,可以使用Li-Cor Odyssey CLx板阅读器显示抗原与抗体的结合。

[0175] 唾液酸:基于传统MALDI-TOF的方法的一个主要问题是电离期间唾液酸的损失。在

MALDI-FTICR中由于源结构和冷却气体这种损失是最小的,但是具有超过两种唾液酸的结构难以检测到。为了解决本方法的这个问题,使用了最近开发的方法,其包括对用于FFPE组织的N-聚糖质谱成像的唾液酸进行连接特异性原位乙基化衍生。此方法允许以连接特异性的方式成功稳定唾液酸,从而不仅增加了检测范围,而且还增加了生物学相关性。这是一种温和的化学反应,其对于糖蛋白制剂可以在溶液中或在载玻片上轻松完成。

[0176] 点对点扩散:一个值得关注的问题是点密度和聚糖信息从一个点到下一个点的扩散。这是通过使用并行捕获A1AT或hIgG来测试的。使用这两种蛋白质的逻辑是,它们具有非常不同的聚糖谱。人IgG有约30%的核心岩藻糖基化双触角聚糖缺乏半乳糖残基,还有很大一部分只有一个单一的半乳糖残基。在A1AT上没有发现这些结构,并且因此该结构可以用作没有发生点交叉污染的指标。使用TM喷雾器来应用PNGase F预期有助于减少扩散问题。

[0177] 发生抗体的有效去糖基化的证据:为了确保抗体的有效去糖基化并因此看不到来自捕获抗体的信号,利用没有添加样品的捕获载玻片充当聚糖检测特异性的对照。

[0178] 抗体特异性的证据:为了检测抗体特异性,代替用PNGase F喷雾以去除聚糖,用胰蛋白酶喷雾允许进行逐点蛋白质分析。这也被用于帮助确认抗体结合的特异性。肽谱通过MALDI-FTICR进行评价,或通过LC-MS (Orbitrap Elite) 进行载玻片下评估。

[0179] 与载玻片下分析的相关性:在载玻片上和载玻片下的蛋白质之间建立了相关性。这是通过改变喷雾的PNGase F的量和孵育时间以及抗体点大小和抗体浓度来优化的。

[0180] 实际点样的变化:使用IRE-800染料标记的抗体以一式六份检查抗体的点样,从而能够在Li-Cor Odyssey CLx板读数器上直接检查以确定抗体的点样有多均匀。

[0181] 特别是对于分支和多岩藻糖基化的种类,多种N-聚糖异构体是可能的。最初的工作利用外切糖苷酶来帮助解析异构体(例如,核心与外臂岩藻糖基化等)。外切糖苷酶可以用于溶液中的游离聚糖和蛋白质微阵列中的糖蛋白两者。使用离子迁移MS方法是另外的选择。

[0182] 质谱平台:MALDI-FTICR仪器提供了最大的灵敏度。一旦条件被优化,就可以在测定中使用能够进行线性和/或反射体测量的MALDI-TOF (Autoflex III;一种普通的MALDI-TOF仪器),包括rapiflex MALDI-TOF(一种具有5微米和更低激光光斑尺寸能力的新平台)。

[0183] 聚糖分析的灵敏度与用阵列抗体捕获的抗原水平直接相关。在初步结果中,从1ng抗体中可检测到聚糖。点大小可以进一步平衡以确保可以捕获至少1-10ng的蛋白质。

[0184] 实施例2:抗体捕获血清蛋白的质谱分析

[0185] 以下研究检查了32种特别感兴趣的蛋白质,因为它们的糖基化在肝细胞癌(HCC)中发生了改变。8x4阵列使得能够创建一张具有可以用不同的方式处理的四个象限的单一载玻片。第一个象限不用PNGase F喷雾,而第二个象限用胰蛋白酶代替PNGase F喷雾以允许确认蛋白质捕获。第三个象限在没有血清的情况下孵育,以控制点样抗体的有效去糖基化。第四个象限用作完整的实验组。蛋白质是从复杂的混合物(人血清)中捕获的,并且聚糖数据是从单个捕获的蛋白质中产生的。N-连接聚糖分析可以从20次健康血清运行中获得,多次运行的峰定量变化小于20%(以逐峰为基础)。

[0186] 实验设计:使用机器人排列器(2470,Aushon Biosystems,Billerica,MA),将抗体涂覆在显微镜载玻片上(PATH,Grace Bio-Laboratories,Bend,OR)。每张载玻片含有布置在阵列之间间隔2.25mm的8x4网格中的128个点。印刷后,疏水性边界被印在载玻片上

(SlideIm-printer, The Gel Company, San Francisco, CA) 以分离阵列并允许在每张载玻片上进行多次单独的样品孵育。如图7所示, 对于其他载玻片上的蛋白质鉴定, 前三个象限可以用于一式三份分析, 而最后一个阵列用于非PNGase F对照或胰蛋白酶对照。使用多张载玻片进行分析, 并在载玻片之间比较聚糖。

[0187] 统计考虑: 这项研究的目标是确保捕获蛋白质的可再现性分析。20个重复蛋白质样品分析产生从一个点到另一个点以及从一个载玻片到另一个载玻片的重复数据。前10种聚糖的分析用于确定每种聚糖的百分位数, 并且值用于确定再现性和CV。对于此分析, 20% CV被认为是可接受的。

[0188] 糖蛋白: 载玻片上排列的抗体列表包括A1AT、胎球蛋白-A、血液结合素、Apo-J、LMW激肽原、HMW激肽原、apo-H、转铁蛋白、IgG、IgM、IgA、纤连蛋白、层粘连蛋白、血浆铜蓝蛋白、腓骨蛋白 (fibulin)、血管紧张素原、原纤维蛋白1、TIMP1、凝血酶敏感蛋白1、半乳糖凝集素-3结合蛋白、补体C1 R、丛生蛋白、半乳糖凝集素1、 $\alpha$ -2-巨球蛋白、维生素D结合蛋白、富组氨酸糖蛋白、富组氨酸糖蛋白、CD109、CEA、组织蛋白酶、AFP和GP73。

[0189] 血清: 除了一组来自HCC患者 (n=9) 的存档血清外, 还使用了商业购买的正常人血清 (Sigma, Chemicals), 其中先前进行了对纯化A1AT的聚糖分析。对照血清以20次重复使用, 以建立测定再现性。

[0190] 质谱: 总体方法和工作流程如图1所示。唯一的区别是, 代替将蛋白质点样在载玻片的特定位置, 将整个载玻片与稀释的血清一起孵育。简言之, 将人血清稀释2倍至缓冲液 (含有0.1% Tween-20、0.1% Brij-35、物种特异性封闭抗体和蛋白酶抑制剂的1×PBSS) 中, 并在抗体阵列上于4℃孵育过夜。随后, 将载玻片在1×PBS中洗涤3次并如图1进行处理。如前所述, 阵列切片“未用PNGase F进行处理”以显示聚糖特异性。

[0191] 聚糖分析的验证: 在这个更大的阵列中, 通过纯化蛋白质的溶液中聚糖分析来验证聚糖数据。大多数蛋白质可以通过商业供应商购买, 使溶液内分析能够提供对基于载玻片的分析的验证。还将通过MALDI-FTICR MS的结果与通过使用凝集素微阵列系统的凝集素分析观察到的结果进行了比较。

[0192] 数据分析: 为每种抗体捕获的蛋白质产生了MS光谱。将数据导入SCiLS软件包中, 以确定每次复制的聚糖分布。由此, 确定每个峰的变异系数 (CV)。

[0193] 进行调整以避免包括含唾液酸聚糖的检测、信号从一个点到另一个点的渗出以及抗体特异性证据在内的问题。在含唾液酸蛋白质的情况下, 这是通过唾液酸的连接特异性原位乙基化衍生来处理的。通过在允许比较已知聚糖 (诸如IgG和A1AT) 的位置放置点来监测点与点之间污染的问题。此外, 用胰蛋白酶对重复阵列 (其他象限) 进行喷雾, 以允许获得逐点蛋白质捕获信息。使用不太严格的洗涤条件可以增加背景。对于观察到的高水平的非特异性结合, 以含有0.001至0.1% tween-20的PBS的形式使用更严格的洗涤条件, 随后在mill-Q水中进行最终漂洗。作为对照, 在没有添加血清的情况下测试阵列, 以控制来自捕获抗体的聚糖信号 (类似于图8中所示的)。

[0194] 本研究在小范围内验证了可以对由玻璃载玻片上的抗体捕获的多种蛋白质进行聚糖分析。这样做的能力对生物标记的发现和验证有巨大的影响, 因为在癌症中观察到的许多聚糖变化不能容易地被凝集素检测到。此外, 这种测定的简单且快速的性质具有巨大的转化潜力, 并且具有成为一个独立的生物标记平台的潜力。

**[0195] 实施例3:开发应用于免疫细胞亚型的N-聚糖分析**

[0196] 白细胞的聚糖分析仍然局限于主要的单个细胞系,例如THP-1单核细胞,并且没有报道将允许与IgG谱分析类似的免疫细胞聚糖谱分析的方法。以下研究提供了一种细胞N-聚糖谱分析的方法,称为Glyco-Cell Typer,并且涉及使用定向抗体捕获在载玻片上捕获特定细胞类型,随后使用既定的工作流程进行聚糖释放和分析。本研究利用了明确定义的B、T和巨噬细胞细胞系。还评价了通过Ficoll收集从血液中分离的总白细胞。

[0197] 针对特定细胞靶标的抗体最初以不同的水平(100-500ng)应用于载玻片,用于捕获特定细胞类型。将抗CD4(MABF417,抗CD4抗体(人),PE,克隆OKT4)用于捕获CD4+T细胞,将抗CD8(MABF1676,抗CD8(人),PE,克隆SK1抗体)用于捕获CD8+T细胞,将抗CD19(CBL582,抗CD19抗体,克隆HD37)用于捕获B细胞,并且将抗CD14用于捕获单核细胞(MAB1219,抗CD14抗体,克隆2D-15C)。

[0198] 最初的工作是用培养的细胞系进行的。CD4+T细胞是Sup-T1细胞(ATCC#SUP-T1 [VB] (ATCC®CRL-1942))。CD8细胞是TALL-104细胞(ATCC®CRL-11386)。B细胞是C1R-neo细胞(ATCC®CRL-2369™)。单核细胞是THP-1细胞系(ATCC®TIB-202™)。使用Ficoll-Paque收集管和差速离心从血浆中分离总白细胞(即PBMC的)。

[0199] 使用本文别处描述的工作流程将抗体附着到载玻片上。在与细胞群一起孵育之后,将载玻片最初在PBS中漂洗。下一步是用中性缓冲福尔马林固定,随后用卡诺氏溶液漂洗,卡诺氏溶液既是固定剂又是去脂溶液并且不会破坏细胞形态。涂抹来自Ficoll层的总PBMC并直接在载玻片上干燥,类似于细胞培养载玻片。通过将细胞涂片(如上固定和洗涤)的N-聚糖特征与更传统的通过HPLC进行的糖组学分析进行比较,评估培养细胞的抗体富集的有效性。对于大多数评价的抗体,PBMC的Ficoll级分可以用于同时对组成免疫细胞群进行糖分型。

[0200] 该研究确定了捕获细胞和聚糖检测所需的最小抗体量。分析一式三份进行,并且计算每个峰(来自每种糖蛋白)的变异系数(CV)。10%的CV被认为是可接受的。

[0201] 该研究还将阵列结果与溶液相分析的结果进行了比较。细胞类型的聚糖分析是在“载玻片下”进行的,并通过MALDI FT-ICR以与它们在载玻片上检查的方式相同的方式进行检查。结果预期将证明与聚糖存在100%一致,复制点之间的CV为15%<(使用平均值)。也就是说,如果在基于溶液的分析中观察到聚糖,则该聚糖应该“在载玻片上”被检测到。在所有情况下,基于溶液的分析都是比较的黄金标准。15%<CV被认为是可接受的,因为这是基于溶液的分析通常观察到的范围。

[0202] 聚糖分析的灵敏度与用阵列抗体捕获的细胞数量直接相关。在初步结果中,可以从1ng抗体中检测到来自糖蛋白标准品的聚糖。对细胞数量进行滴定,以确定每种培养细胞类型的LOI,并用实现这一点所需点样的抗体量进行评估。抗体结合之后通过福尔马林固定实现在PNGaseF处理前的捕获和漂洗过程中保持细胞完整性。

**[0203] 实施例4:细胞系在载玻片上的直接N-聚糖分析**

[0204] 可从培养中的细胞的简化样品制剂中获得N-聚糖谱。将原代主动脉内皮细胞(ATCC)在带有八个细胞生长室的载玻片上生长。细胞以5k、10k和20k/mL的密度铺板。让细胞增殖7天。将细胞固定在中性缓冲福尔马林中,通过显微镜成像,并使用卡诺氏溶液(一种也去脂的固定剂)去脂(图12A至图12D)。数据显示细胞在载玻片上保持原位,不会破坏形

态。然后向细胞涂覆一层薄薄的PNGase F (HTX Technologies) 分子层,消化两小时,并且涂覆一层薄薄的MALDI基质涂层。通过偶联到傅里叶变换离子回旋共振 (FT-ICR) 质谱仪上的MALDI以正离子宽带模式在499-5,000的质荷比范围内以1.20秒瞬态分析细胞。图12C显示可从单层细胞获得复杂的N-聚糖谱。大多数N-聚糖不出现在培养基空白中(图12D)。更高空间分辨率的飞行时间仪器允许对来自培养物的单细胞进行靶向成像。

[0205] 在细胞培养物中检查稳定的同位素标记,其可通过MALDI IMS从单细胞层检测到(图13A至图13D)。制备内皮细胞,并将其以10k/mL铺板。然而,将N15标记的谷氨酰胺(酰胺侧链)用于将稳定的同位素结合到所有GlcNac、唾液酸和GalNac上。细胞显示在5天后的增殖没有差异(图13A)。 $m/z$  1809G2F的天然和稳定同位素显示检测到完全结合。对单个光谱的检查表明,单个光谱水平的强度与总强度相似。这表明可以使用通过MALDI IMS检测的简化工作流程的组合来检测N-糖基化的定量变化。

#### [0206] 实施例5:用于直接聚糖测量的载玻片上培养细胞的分析

[0207] 以下研究分析了培养或捕获的HEk293、CHO和人主动脉内皮细胞,并从在固体基底上培养或捕获的最少量细胞产生出聚糖谱。这种工作流程消除了产生聚糖谱所需的冗长工作,并显著减少了所需的细胞数量。在所有情况下,将细胞总数与来自所有类型的N-聚糖的信号进行比较,这允许快速确定细胞类型的聚糖谱;根据初步数据,预期检测到最少50种N-聚糖。对于细胞培养,接种到板上的细胞从1,000个细胞/mL变化到20,000个细胞/mL。对于捕获的细胞,研究常规的组织学技术(诸如细胞浆、擦拭、涂抹和Cytospin)以将细胞应用于固体基底。

[0208] 对于培养或捕获的细胞,可检测性由与细胞培养相容的涂层和细胞在显微镜载玻片区域的附着来确定。评价玻璃和氧化铟锡涂层载玻片(用于MALDI TOF)在所有实验室中的广泛应用。将可移除的粘附网放置在载玻片上(例如, FlexWell, Electron Microscopy Sciences),随后涂覆细胞培养物,诸如明胶、胶原或促进细胞附着的化学物质(聚-L-赖氨酸、聚鸟氨酸)。限制检测N-聚糖的分析物的选择性去除是使用洗涤技术(诸如使用卡诺氏溶液)来完成的,卡诺氏溶液既是固定剂又是去脂溶液并且不会破坏细胞形态。不破坏细胞形态的其他溶液包括中性缓冲福尔马林、多聚甲醛以及基于乙醇和聚乙二醇的细胞学固定剂。

[0209] 该研究还调查了在细胞层上喷雾的PNGase F的效果、消化时间和基质涂层。在每个步骤之前和之后检查细胞,以确保细胞保持形态。这也有利于细胞的下游高空间分辨率成像。将信号与通过标准方案对细胞沉淀进行谱分析获得的信号进行比较。典型地,对于65×25mm的载玻片面积,检测聚糖谱需要不到一个小时。对于细胞培养工作,进行至少六次重复测试,该至少六次重复在单独的培养皿中独立地生长。对于通过组织学方法捕获的细胞,以来自相同来源的六个一组检查重复进行比较。

[0210] 研究了靶聚糖的简化定量方法的适应性。针对可通过IMS检测细胞培养,测试了稳定同位素标记和无标记方法;这有助于详细研究受遗传操作或合成途径改变影响的聚糖谱。使用在酰胺位点用<sup>15</sup>N标记的谷氨酰胺(Cambridge Isotopes)使原代细胞生长。这将<sup>15</sup>N标记结合到GlcNAc残基、唾液酸和N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)中。这种方法标记了涉及新的N-聚糖更新、新的经修饰的GlcNAc和SIA帽化以及新的GalNAc延伸(主要是O-连接的)的所有核心GlcNAc,导致每个残基变化0.9970Da的位移。在细胞培养条件下进行<sup>15</sup>N标记,用于通

过IMS的下游检测。图13A至图13D展示了在人原代内皮细胞培养物中<sup>15</sup>N标记的IMS检测。

[0211] 通过将掺入重同位素标记的聚糖作为单一目标聚糖或作为重同位素标记的聚糖的混合物添加到基质喷雾剂中并在载玻片上捕获的细胞上喷雾作为内标来测试无标记定量方法。这允许跨细胞条件相对于一种或多种标准品进行定量。其次,常见聚糖的混合物被点样为校准曲线。这种方法将点样在细胞(没有聚糖释放)上的标准聚糖与作为独立的外部校准曲线点样的标准聚糖进行比较。点样在细胞上并与细胞外信号进行比较允许评价由于样品基质引起的离子抑制效果。基于细胞的工作的无标记方法的灵敏度是使用通过IMS的细胞靶向和调节激光尺寸以包括特定数量的细胞,并逐渐减少细胞数量以确定检测极限、定量极限和再现性来确定的。相对于总蛋白质含量和/或细胞数量外推聚糖量。

[0212] 本研究证明了产生在组织上获得的等效谱的最小细胞量。在初步数据中,从5,000个细胞中检测到复杂的信号,该细胞需要培养一周至60%融合以进行生物工作。这提供了来自FT-ICR的3.3E6的信号计数。对于细胞密度实验和细胞捕获实验期间的聚糖谱的评估,≤15%的CV被认为是可接受的,与当前的组织上和溶液中结果相匹配。检测极限按固体基底上的细胞密度计算。

[0213] 实施例6:通过抗体阵列的质谱成像从患者生物流体中发现多重N-糖蛋白生物标记的新平台

[0214] 描述了一种使用基质辅助激光解吸/电离质谱成像(MALDI MSI)工作流程和抗体阵列分析血清中N-糖蛋白的新平台。血清N-糖蛋白可以被玻璃载玻片上的抗体特异性地免疫捕获,以允许以蛋白质特异性和多重方式进行N-聚糖分析。这项技术的发展集中在表征两种丰富且研究充分的人血清糖蛋白、 $\alpha$ -1-抗胰蛋白酶和免疫球蛋白G。使用纯化的标准溶液和1微升人血清,两种糖蛋白都可以被免疫捕获,并随后通过PNGase F释放N-聚糖。在MALDI FT-ICR质谱仪上以浓度依赖性方式检测N-聚糖,同时保持捕获的特异性。重要的是,通过基于载玻片的抗体捕获检测到的N-聚糖与通过直接分析点样的标准品确定的相同。作为概念的证明,该工作流程应用于肝硬化个体的血清样品,以准确地检测IgG N-聚糖的特征性增加。这种从抗体阵列进行蛋白质特异性N-聚糖分析的新方法可以进一步扩展以包括任何存在有效抗体的糖蛋白。另外,此平台可以适用于分析可以通过抗体阵列分析的任何生物流体或生物样品。

[0215] 糖基化是最常见的翻译后修饰之一,并且通常包括将寡糖(聚糖)共价添加到天冬酰胺(N-连接)或丝氨酸/苏氨酸(O-连接)残基上。N-连接聚糖已被确立会随着癌症和其他疾病的进展而改变(Kailemia MJ等人,Analytical and bioanalytical chemistry,2017,409(2),395-410;Adamczyk B等人,Biochimica et Biophysica Acta(BBA)-General Subjects,2012,1820(9),1347-1353;Kuzmanov U等人,BMC medicine,2013,11(1),31;Ohtsubo K等人,Cell,2006,126(5),855-867),并且研究表明糖蛋白的N-聚糖组分可能比单独的蛋白质更能充当特定疾病的生物标记(Adamczyk B等人,Biochimica et Biophysica Acta(BBA)-General Subjects,2012,1820(9),1347-1353;Meany DL等人,Clinical proteomics,2011,8(1),7)。这一点已通过岩藻糖基化甲胎蛋白(AFP)成功作为肝癌生物标记得到证明(Taniguchi N,Proteomics,2008,8(16),3205-3208;Aoyagi Y等人,Cancer:Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society,1998,83(10),2076-2082),然而蛋白质生物标记上存在的大多数N-聚糖仍未被探

索。目前用于分析N-聚糖及其载体蛋白的技术通常耗时或需要大量的样品 (Kailemia MJ等人, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2017, 409 (2), 395-410; Kuzmanov U等人, *BMC medicine*, 2013, 11 (1), 31; Mariño K等人, *Nature chemical biology*, 2010, 6 (10), 713; Geyer H等人, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 2006, 1764 (12), 1853-1869), 这限制了为发现新的疾病生物标记而分析大量的患者样品的能力。高通量方法也利用不同的凝集素结合来鉴定碳水化合物结构基序 (Reatini BS等人, *Analytical chemistry*, 2016, 88 (23), 11584-11592; Chen S等人, *Nature methods*, 2007, 4 (5), 437; Hirabayashi J等人, *Journal of biochemistry*, 2008, 144 (2), 139-147)。这些方法仅限于大多数凝集素的可变和低结合亲和力, 并且它们不能用于报告真实的结构组成或聚糖载体 (即N-聚糖、O-聚糖或鞘糖脂) 信息 (Reatini BS等人, *Analytical chemistry*, 2016, 88 (23), 11584-11592; Chen S等人, *Nature methods*, 2007, 4 (5), 437; Hirabayashi J等人, *Journal of biochemistry*, 2008, 144 (2), 139-147)。

[0216] 近几十年来, 基质辅助激光解吸/电离 (MALDI) 质谱成像 (MSI) 技术已经成为一种跨组织切片进行分析物检测和定位的强大技术 (Caprioli RM等人, *Analytical chemistry*, 1997, 69 (23), 4751-4760; Seeley EH等人, *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286 (29), 25459-25466; Buchberger AR等人, *Analytical chemistry*, 2017, 90 (1), 240-265; Balluff B等人, *Histochemistry and cell biology*, 2011, 136 (3), 227; Walch A等人, *Histochemistry and cell biology*, 2008, 130 (3), 421)。这种技术创建了跨组织样品的分析物强度的二维热图。一种先前开发的用于空间分析组织切片中的N-聚糖的方法已经被世界各地的许多实验室实施和改编。 (Powers TW等人, *PloS one*, 2014, 9 (9), e106255; Drake RR等人, *In Advances in cancer research*, 2017, (第134卷, 第85-116页). Academic Press; Powers TW等人, *Analytical chemistry*, 2013, 85 (20), 9799-9806; Powers T等人, *Biomolecules*, 2015, 5 (4), 2554-2572; Heijs B等人, *Analytical chemistry*, 2016, 88 (15), 7745-7753; Gustafsson OJ等人, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2015, 407 (8), 2127-2139) 如依赖于酶促释放N-聚糖的任何方法一样, 将N-聚糖特征与其载体蛋白连接仍然是费力的并且需要广泛的另外分析 (Heijs B等人, *Analytical chemistry*, 2016, 88 (15), 7745-7753; Angel PM等人, *In Tissue Proteomics*, 2017, (第225-241页). Humana Press, New York, NY)。利用MALDI MSI可以从载玻片上组织的固体表面检测N-聚糖, 假设可以从基于载玻片的抗体微阵列上捕获的靶标糖蛋白检测N-聚糖谱。这将弥合将N-聚糖特征与其蛋白质连接的差距, 因为检测到的N-聚糖沿阵列的位置将指示它们从哪个免疫捕获的糖蛋白中释放出来。下面的研究报告了一个通过将MALDI MSI的定位与用于患者样品的抗体阵列的蛋白质捕获特异性相结合发现糖蛋白生物标记的新平台。

[0217] 现在描述材料和方法。

[0218] 材料

[0219] 硝酸纤维素涂覆的显微镜载玻片 (PATH微阵列载玻片) 和孔载玻片模块 (ProPlate多阵列载玻片系统, 24孔) 从Grace Bio-Labs (Bend, OR) 获得。三氟乙酸、 $\alpha$ -氰基-4-羟基肉桂酸、辛基- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷、人 $\alpha$ -1-抗胰蛋白酶和储备人血清从Sigma Aldrich (St. Louis, MO) 获得。HPLC级水、HPLC级乙腈、牛血清白蛋白 (BSA) 和磷酸盐缓冲液 (PBS)

从Fisher Scientific (Hampton, NH) 获得。用于蛋白质标记的ICG NHS酯作为定制的IRDye 800CW衍生物从Li-cor Biosciences (Lincoln, NE) 获得。如前所述在内部克隆、表达和纯化肽-N-糖苷酶F (PNGase F) Prime™ (Powers TW等人, Analytical chemistry, 2013, 85 (20), 9799-9806)。从Genway Biotech (San Diego, CA) 获得抗人A1AT。人免疫球蛋白G从Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA) 获得, 并且抗人IgG从Bethyl Laboratories (Montgomery, TX) 获得。肝硬化患者血清从Amit Singal博士 (德克萨斯大学西南医学中心 (University of Texas Southwestern Medical Center), Dallas, TX) 获得。血清样品通过由UTSW机构审查委员会 (Institutional Review Board) 批准的研究方案获得, 并获得每名受试者的书面知情同意书。肝硬化的诊断是基于肝脏组织学或者肝失代偿或门静脉高压的临床、实验室和成像证据。每名患者都具有正常的超声波; 如果血清AFP升高, 则CT或MRI显示没有肝脏肿块。关于这些样品的进一步的患者细节可以在Wang M等人, Journal of immunological methods, 2018, 462, 59-64中找到。

#### [0220] 微阵列制备

[0221] 获得硝酸纤维素涂覆的显微镜载玻片, 并且用夹在载玻片上的24孔载玻片模块创建孔。以每1.5μL点200ng在孔中手动点样抗体。然后点在4°C的潮湿室中粘附过夜, 潮湿室由内衬有Wypall×60纸巾和2卷浸透蒸馏水的KimWipes的12×9×3.5cm的蛋白质印迹 (western blot) 孵育箱制成。然后载玻片在室温下风干, 并用在1×PBS中的0.1% 辛基-β-D-吡喃葡萄糖苷 (以下称为“PBS-OGS”) 漂洗, 以从载玻片上除去任何未结合的蛋白质。

#### [0222] 样品制备和聚糖释放

[0223] 将载玻片用1% BSA (在PBS-OGS中制备) 封闭一小时, 轻轻摇动。然后将载玻片在PBS (3分钟×2个浴) 和双蒸水 (1分钟×1个浴) 浴中洗涤, 并风干。一旦干燥, 将样品添加孔中并在室温下在潮湿室中伴随轻轻摇动孵育2小时。所有样品均在PBS中稀释, 向孔中添加100μL的样品体积。然后将载玻片在PBS-OGS (1分钟×1个浴)、PBS (3分钟×2个浴) 和双蒸水 (1分钟×1个浴) 浴中洗涤, 并风干。从载玻片上移除孔模块之后进行额外的水漂洗, 以除去任何残留的盐。为了从捕获的蛋白质中切割N-聚糖, 使用自动喷雾器 (M3™ 喷雾器, HTX Technologies, Chapel Hill, NC) 应用PNGaseF Prime™ (0.1μg/μL, 在HPLC级水中制备) 以保持定位, 喷雾参数为在45°C、10psi、流速25μL/min和1200mm/min的速度下通过15次。然后, 将载玻片在37°C的潮湿室中孵育过夜, 潮湿室在细胞培养皿中用Wypall×60纸巾和2卷浸透蒸馏水的KimWipes制成。

#### [0224] 质谱样品制备和成像

[0225] 使用相同的自动喷雾器 (M3™ 喷雾器, HTX Technologies, Chapel Hill, NC) 将MALDI基质α-氰基-4-羟基肉桂酸 (CHCA, 在50% 乙腈/0.1% 三氟乙酸中的7mg/mL) 应用到载玻片上。应用参数是在77°C、10psi、1300mm/min的速度和100μL/min的流速下2次通过。将载玻片在配备有基质辅助激光解吸/电离 (MALDI) 源的solarix Legacy 7T FT-ICR (Bruker Daltonics) 质谱仪上成像。使用在2000Hz下操作、具有25μm激光光斑尺寸的SmartBeam II激光器进行采样。使用智能行走模式在250μm光栅上以每个像素200次激光拍摄来收集图像。在正离子宽带模式下使用跨越m/z范围500-5000的512kword时域分析样品。计算出在m/z 1501下58,000的载玻片上分辨能力。

#### [0226] 数据分析

[0227] 使用FlexImaging v4.1 (Bruker Daltonics) 对N-聚糖定位和强度的图像进行可视化,将数据输入FlexImaging中,将其降低至0.98ICR降噪阈值。将图像归一化为总离子电流,并根据其理论质量值手动选择N-聚糖峰。然后将数据输入SCiLS Lab软件2017a (Bruker Daltonics) 中,用于定量单个点的峰。每个点被指定为一个独特的区域,并且将感兴趣的物质的峰下面积值从每个区域导出到微软Excel中。

[0228] HPLC正交确认

[0229] 如前所述,使用Waters Alliance HPLC系统对释放的标记的N-聚糖进行HPLC分析 (Comunale MA等人,PloS one,2010,5 (8),e12419)。

[0230] 现在描述结果。

[0231] 在图14A至图14C中展示了特异性糖蛋白捕获和质谱成像 (MSI) 的新工作流程。该工作流程是基于类似的用于组织上N-聚糖成像的MALDI MSI工作流程发现的 (Powers TW等人,Analytical chemistry,2013,85 (20),9799-9806),并且包括三个主要步骤。第一个步骤(如图14A所示)涉及抗体点样和定位于其抗体点的糖蛋白捕获。第二个步骤(图14B)包括以局部方式酶促释放N-聚糖和载玻片的基质涂覆,将释放的聚糖截留在其释放区域。图14C显示了载玻片的MALDI MSI分析的第三个步骤,其中利用与每个m/z峰相关的图像获得总光谱。从MALDI MSI获得的图像用颜色强度描绘了载玻片上N-聚糖的丰度,为检测到的每种N-聚糖创建了热图。这允许从免疫捕获的糖蛋白中释放的N-聚糖以阵列类型形式可视化,其中感兴趣的N-聚糖可以连接回它们的蛋白质载体上。

[0232] 最初的实验是使用人 $\alpha$ -1-抗胰蛋白酶 (A1AT) 和免疫球蛋白G (IgG) 进行的,因为它们是人血清中丰富的糖蛋白,具有良好表征的N-糖基化位点 (Comunale MA等人,PloS one,2010,5 (8),e12419;Clerc,F等人,Glycoconjugate journal,2016,33 (3),309-343;McCarthy C等人,Journal of proteome research,2014,13 (7),3131-3143;Mittermayr S等人,Journal of proteome research,2011,10 (8),3820-3829;Saldiva R等人,Journal of proteome research,2015,14 (10),4402-4412)。如图15和图19A至图19D所示,这些糖蛋白具有彼此不同的N-聚糖谱,正交HPLC确认显示独特的N-聚糖谱。图15中的N-聚糖谱是从点样的A1AT和IgG的MALDI MSI获得的,显示所有检测到的N-聚糖包含超过1%的总聚糖信号。显示了这些N-聚糖的建议结构,其中IgG N-聚糖上的核心岩藻糖连接基于此糖蛋白的正交HPLC特征(图19A至图19D)以及其他文献来源 (Mittermayr S等人,Journal of proteome research,2011,10 (8),3820-3829;Saldiva R等人,Journal of proteome research,2015,14 (10),4402-4412) 进行分配。与其他阵列形式中使用的免疫测定程序相似地进行糖蛋白的抗体捕获 (Chen S等人,Nature methods,2007,4 (5),437;Wang J等人,PROTEOMICS-Clinical Applications,2013,7 (5-6),378-383)。抗体以每个点200ng手动移液,每个点1.5 $\mu$ L体积。用夹式孔模块创建孔并将抗体点样到孔内。载玻片用1%BSA封闭,以防止与载玻片或其他抗体的非特异性结合。图16A展示了当将蛋白质直接点样在载玻片上,然后洗涤除去未结合的蛋白质时,载玻片被充分封闭以防止A1AT结合。如图16B所示,当将A1AT作为100 $\mu$ L样品添加到孔中时,可以看到对其抗体的捕获特异性,其中A1AT N-聚糖定位于抗A1AT而不是邻近的抗IgG点。添加圆圈来指示孔内点样的抗A1AT (红色) 和抗IgG (蓝色) 的位置。图16C含有添加到其抗体的A1AT稀释系列,展示了糖蛋白的成功捕获和定位于捕获点的N-聚糖检测。主要的N-聚糖特征来自m/z 2289.7346 (Hex5HexNAc4NeuAc2+3Na),

其描绘于图16C。此聚糖代表A1AT上总聚糖库的大约47%，并且在50ng的捕获蛋白质下可以容易地观察到此峰。这与大约16毫微微克分子的该聚糖相关，这突出了此平台的灵敏度。使用峰下面积定量每个点内的N-聚糖信号强度。如图16D所示，来自免疫捕获的A1AT的N-聚糖信号以浓度依赖性方式被检测到，随着抗体（以200ng点样）变得饱和，观察到信号平稳状态。在这种捕获糖蛋白上检测到的最丰富的N-聚糖的谱显示与点样糖蛋白上观察到的非常一致（图16E）。然而， $m/z$  1809.6923的N-聚糖（Hex5dHex1HexNAc4+Na）被排除在此分析之外，因为它在捕获抗体上高度丰富并且因此会混淆点样的和捕获的谱的比较。在HPLC上进行A1AT的N-聚糖谱的正交分析（图19A至图19D）。

[0233] 为了说明此平台成为同时分析多种糖蛋白靶标的多重阵列的潜力，测试了两种糖蛋白的并排捕获。如图17A所描绘，使用人A1AT和IgG，并且在每个孔中并排点样针对两种蛋白质的抗体。将含有A1AT标准品和IgG标准品两者的混合物以100 $\mu$ L体积一式三份添加到孔中，浓度如图17B和17C所示，添加红色和蓝色圆圈以指示抗体位置。从定位于其各自捕获点的两种糖蛋白中检测到N-聚糖，其中图4B（ $m/z$  2289.7898, Hex5HexNAc4NeuAc2+3Na）中示出了A1AT独有的N-聚糖特征，并且图4C（ $m/z$  1485.5335, Hex3dHex1HexNAc4+Na）中示出了IgG独有的N-聚糖特征。这些图像的蛋白质信号与抗体背景信号的比较的定量示于图20A至图20D中。通过在相反的抗体以及周围的载玻片本身上缺乏蛋白质特异性N-聚糖信号来观察捕获的特异性。由于此平台的目标是应用至用于生物标记发现的生物样品，储备人血清也用于从更复杂的混合物中并排捕获糖蛋白A1AT和IgG。如前所示，将商业获得的人血清稀释在PBS（1:100）中，并添加到含有A1AT和IgG抗体两者的孔中。图17D和图17E描绘了与仅从1 $\mu$ L血清中捕获的两种糖蛋白相关的N-聚糖特征，再次显示了捕获的高度特异性。

[0234] 此新平台的应用是发现从患者生物流体样品中捕获的蛋白质上的N-聚糖的疾病特异性变化。作为概念的证明，合并5名肝硬化患者的血清，并将1 $\mu$ L合并的样品以一式三份添加到阵列中。在添加到孔中之前，血清样品在PBS中以1:100稀释。糖蛋白再次被它们的抗体特异性地捕获，具有可检测水平的不同N-聚糖，图18A至图18D显示了成像数据和IgG的总N-聚糖谱。值得注意的是，与储备人血清相比，在肝硬化血清中观察到IgG非半乳糖基化N-聚糖 $m/z$  1485.5328（Hex3dHex1HexNAc4+Na）的增加（图18A至图18C）。这种特殊的N-聚糖以前曾被描述为在肝硬化血清中增加（Mehta AS等人, *Journal of virology*, 2008, 82 (3), 1259-1270; Lamontagne A等人, *PloS one*, 2013, 8 (6), e64992）并且此新平台显示出与那些发现一致。随后还观察到半乳糖基化双触角N-聚糖（ $m/z$  1809.6293Hex5dHex1HexNAc4+Na和1647.5545Hex4dHex1HexNAc4+Na）的减少（图18B和图18C）。如图18D所示，还成功地从这些肝硬化样品中捕获了A1AT而没有丧失结合特异性。此实验展示了此平台应用于患者样品检测疾病相关的N-聚糖变化以达到生物标记目的的未来潜力。总之，这些结果展示了新的MALDI MSI平台的开发，该新的MALDI MSI平台以临床相关的方式从生物流体样品中进行蛋白质特异性N-聚糖分析，只需最少的样品消耗。

[0235] 这里描述了一种新的质谱成像（MSI）平台用于以蛋白质特异的方式从生物样品中多重检测N-聚糖。此技术的开发是基于从MALDI MSI组织切片中酶促释放N-聚糖的已确立方案（Powers TW等人, *PloS one*, 2014, 9 (9), e106255; Powers TW等人, *Analytical chemistry*, 2013, 85 (20), 9799-9806）。通过MSI检测的二维分析允许将N-聚糖信号沿着基于载玻片的抗体阵列映射到它们的载体蛋白。在此平台上，抗体对于从复杂的生物混合物

中特异性地捕获糖蛋白靶标至关重要,类似于ELISA。然而与ELISA不同,这种方法不需要第二抗体或凝集素,因为质谱提供了对不同N-聚糖的灵敏性和特异性检测。抗体捕获还消除了MS分析前样品清理的需要,样品清理可能是广泛的(Kailemia MJ等人,Analytical and bioanalytical chemistry,2017,409(2),395-410;Kuzmanov U等人,BMC medicine,2013,11(1),31;Song T等人,Analytical chemistry,2015,87(15),7754-7762;Ruhaak LR等人,Analytical chemistry,2008,80(15),6119-6126;Reiding KR等人,Analytical chemistry,2014,86(12),5784-5793)。另外,没有观察到由于患病血清中存在嗜异性抗体而导致特异性丧失的典型问题,这是此技术的一个重要优势(Bolstad N等人,Best practice&research Clinical endocrinology&metabolism,2013,27(5),647-661)。抗体捕获先前曾用于捕获单个靶蛋白进行MALDI MS分析(Darebna P等人,Clinical chemistry,2018,64(9),1319-1326;Pompach P等人,Clinical chemistry,2016,62(1),270-278),然而,本发明的新型多重技术可以扩展到在一次成像运行中可能分析数百种或数千种不同的N-糖蛋白。每次运行产生大量数据,因为光谱显示可能有数百种N-聚糖物质聚集并定位到阵列上的每种糖蛋白上。因此,此方法具有同时表征许多靶蛋白中的N-糖基化的强大能力。

[0236] 此新方法扩展了现有的N-聚糖生物标记检测技术的能力。凝集素微阵列已被用于检测生物标记设置中的N-聚糖的变化(Chen S等人,Nature methods,2007,4(5),437;Yue T等人,Molecular&Cellular Proteomics,2009,8(7),1697-1707;Nagaraj VJ等人,Biochemical and biophysical research communications,2008,375(4),526-530;Patwa TH等人,Analytical chemistry,2006,78(18),6411-6421),然而,本发明的新的MSI检测方法显著增加了可以从这种分析中获得的信息量。虽然凝集素与N-聚糖结构基序结合,但MALDI MSI检测为N-聚糖提供了潜在的组成信息。该方法可以容易地适应于其他手段(例如离子迁移率)的使用,这将允许报告N-糖形的构型。另外,MALDI MSI获得了每个糖蛋白捕获点的完整质谱,从而允许每个糖蛋白靶标探测数百个N-聚糖质量,而不是用靶向凝集素分析探测选定的几个。对每种蛋白质上存在的聚糖异质性的检测可以用于计算聚糖比率,这可能代表临床上可以利用的蛋白质的总糖基化的重要改变(Callewaert N等人,Nature medicine,2004,10(4),429;Verhelst X等人,Clinical Cancer Research,2017,23(11),2750-2758)。如前所述,组织上的MSI分析已被用于阐明疾病存在下的N-聚糖变化(Powers T等人,Biomolecules,2015,5(4),2554-2572;Kunzke T等人,Oncotarget,2017,8(40),68012;West CA等人,Journal of proteome research,2018,17(10),3454-3462;Scott DA等人,PROTEOMICS-Clinical Applications,2019,13(1),1800014)。虽然基于组织的分析通常用于预后和病理检查,但它不像血清或其他生物流体那样是疾病早期检测的可获得材料。本发明的新的生物标记发现和验证平台已准备好用于容易获得的患者生物流体,诸如血清或尿液。

[0237] 可以添加更多的抗体,以便每次分析可以探测更多的糖蛋白。这种改善将受到这些抗体质量的限制——无论是结合亲和力还是特异性。抗体上存在的N-聚糖可以被去除以限制背景信号。此技术可应用于其他质谱平台以获得检测到的聚糖的另外结构信息、以及临床上更容易获得的MSI仪器。然而不仅仅是N-聚糖的质谱成像可以用于确认在每种抗体下的糖蛋白结合特异性。

[0238] 本研究中研究的MSI平台证明了其作为生物标记发现工具、以及在容易获得的临床生物流体样品中对许多疾病进行筛查的新平台的实用性。此平台能够检测仅从1 $\mu$ L人血清中捕获的糖蛋白上的N-聚糖,说明其在非常少的患者样品消耗下的有效性。N-聚糖及其在疾病进展中的作用正迅速成为生物医学研究的一个重要新领域。然而,这种新技术的应用不仅仅局限于N-聚糖和生物流体样品:这种平台可以用于液体(诸如细胞上清液)或探测其他类别的聚糖或翻译后修饰。

[0239] 本文引用的每个和每篇专利、专利申请和出版物的公开内容通过引用以其整体特此并入本文。虽然已经参考特定实施方案公开了本发明,但是很明显,在不脱离本发明的真实精神和范围的情况下,本领域的其他技术人员可以设计出本发明的其他实施方案和变化。所附权利要求旨在被解释为包括所有此类实施方案和等同变化。



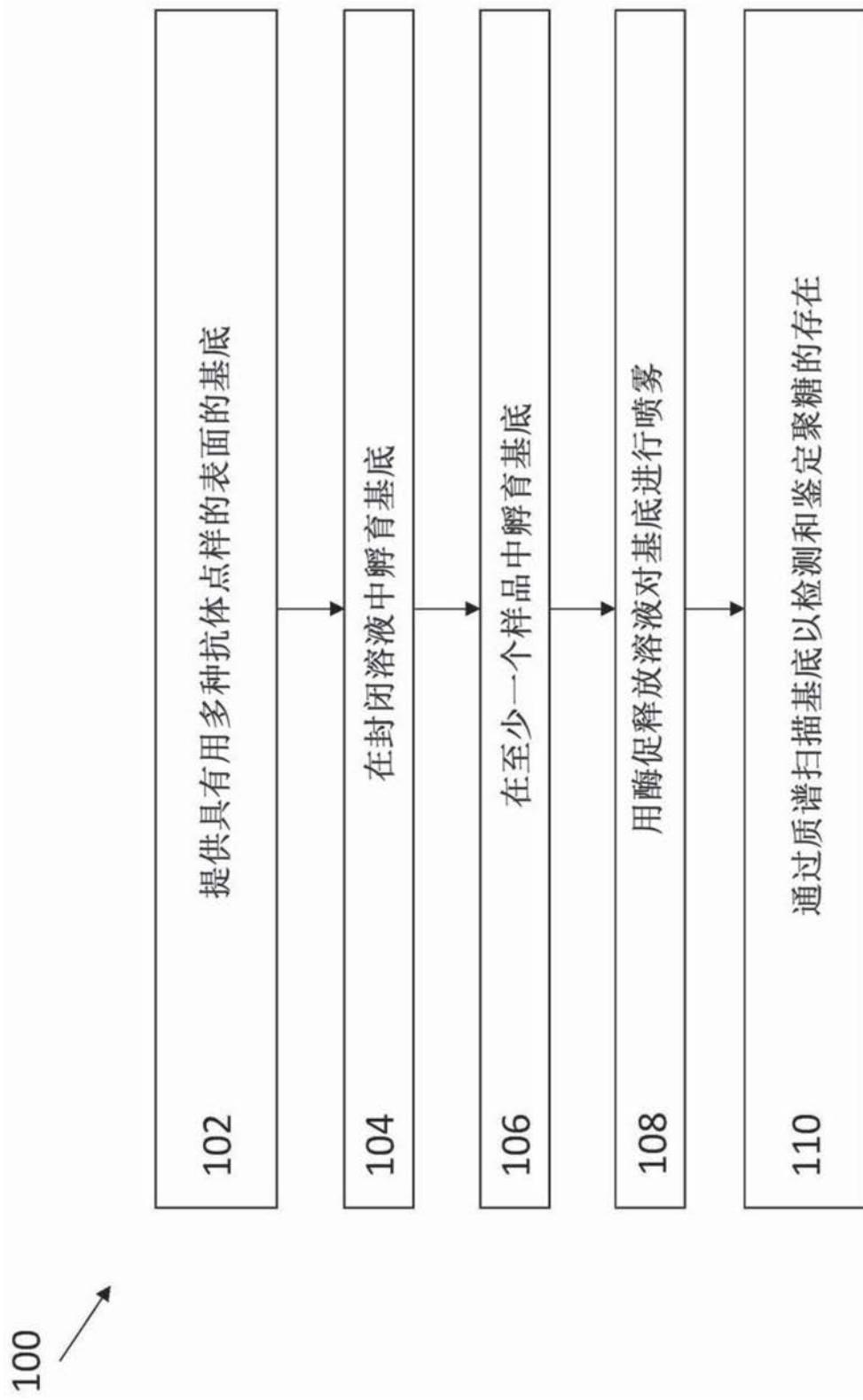


图2

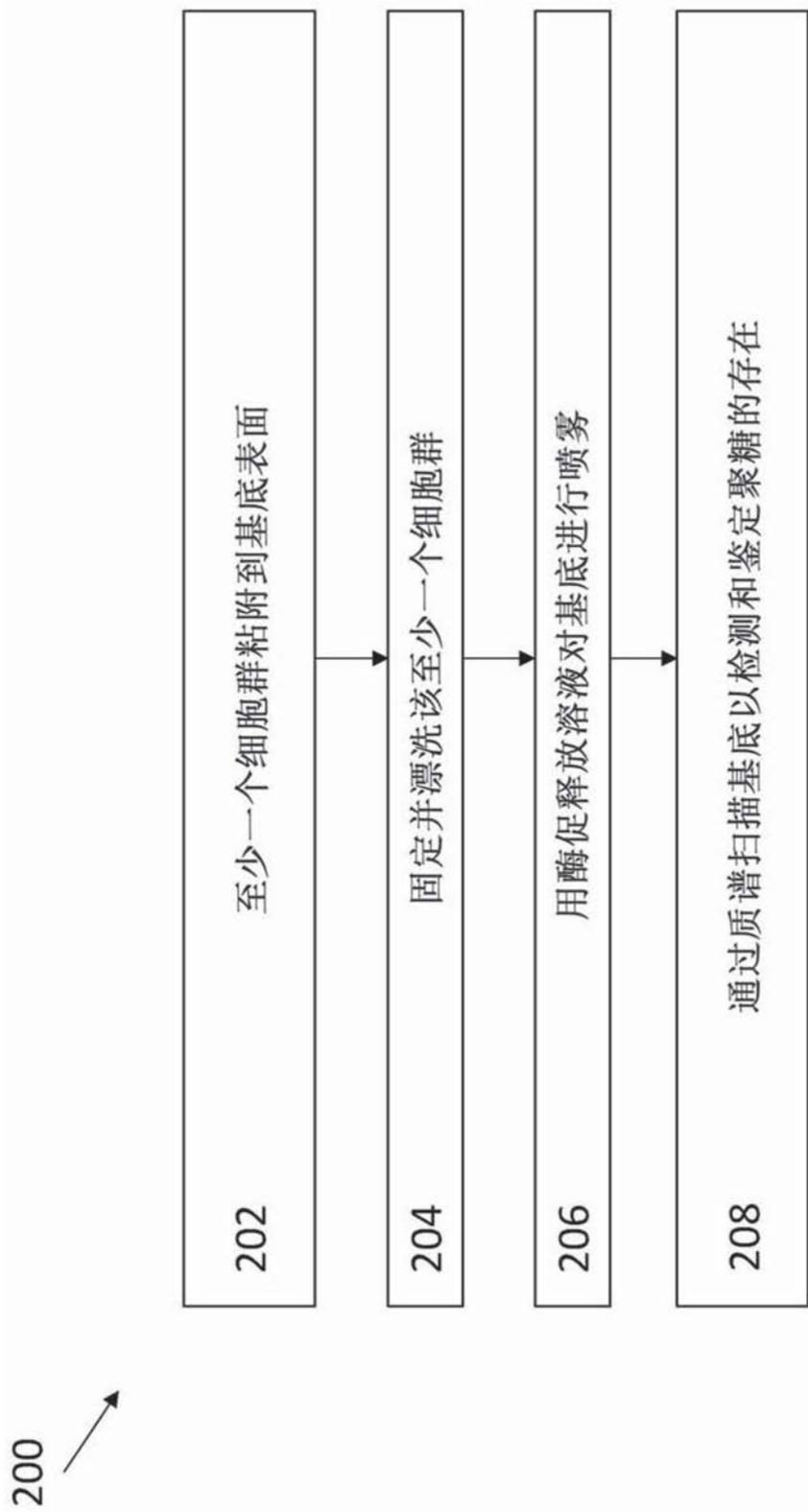


图3

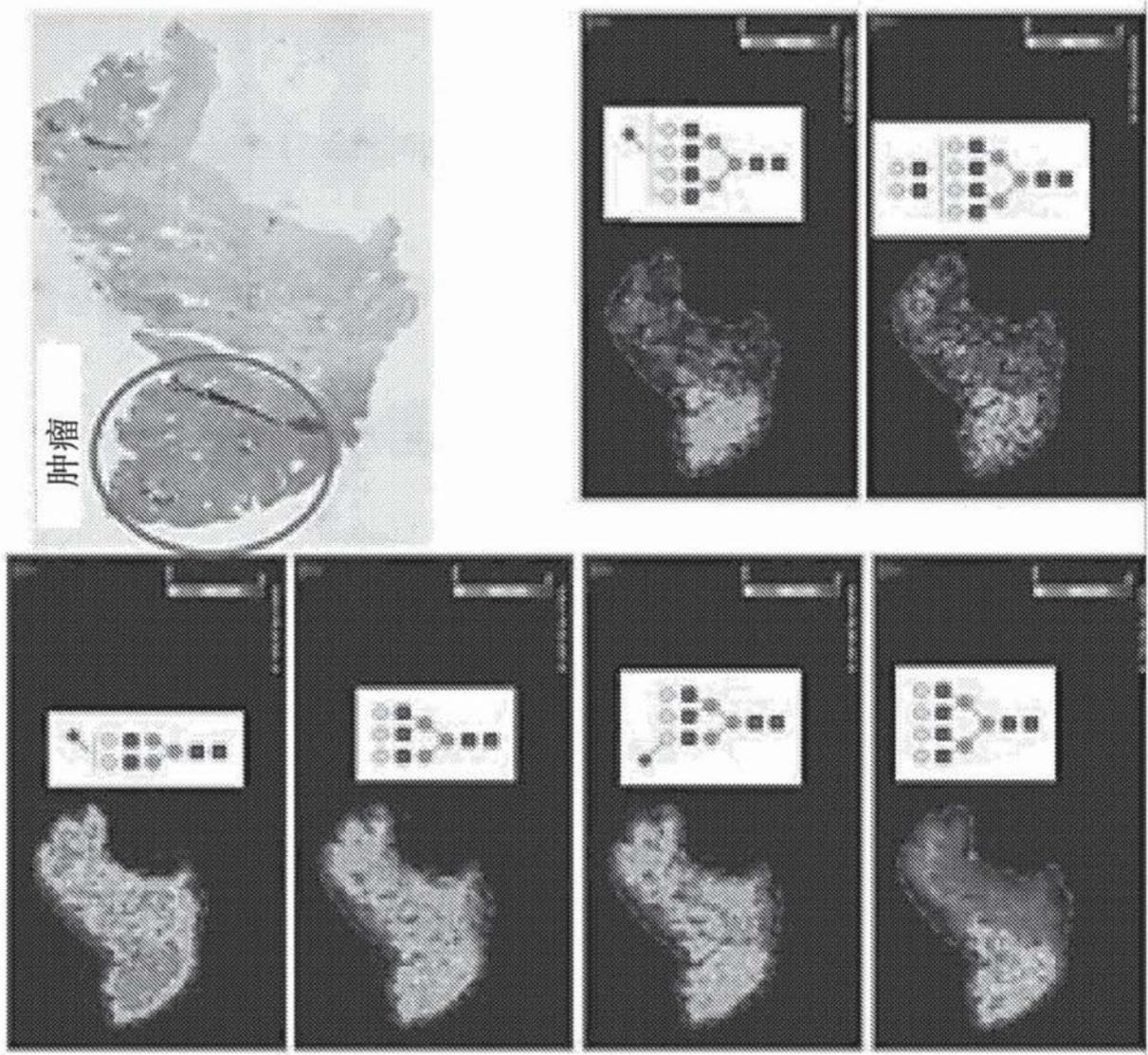


图4

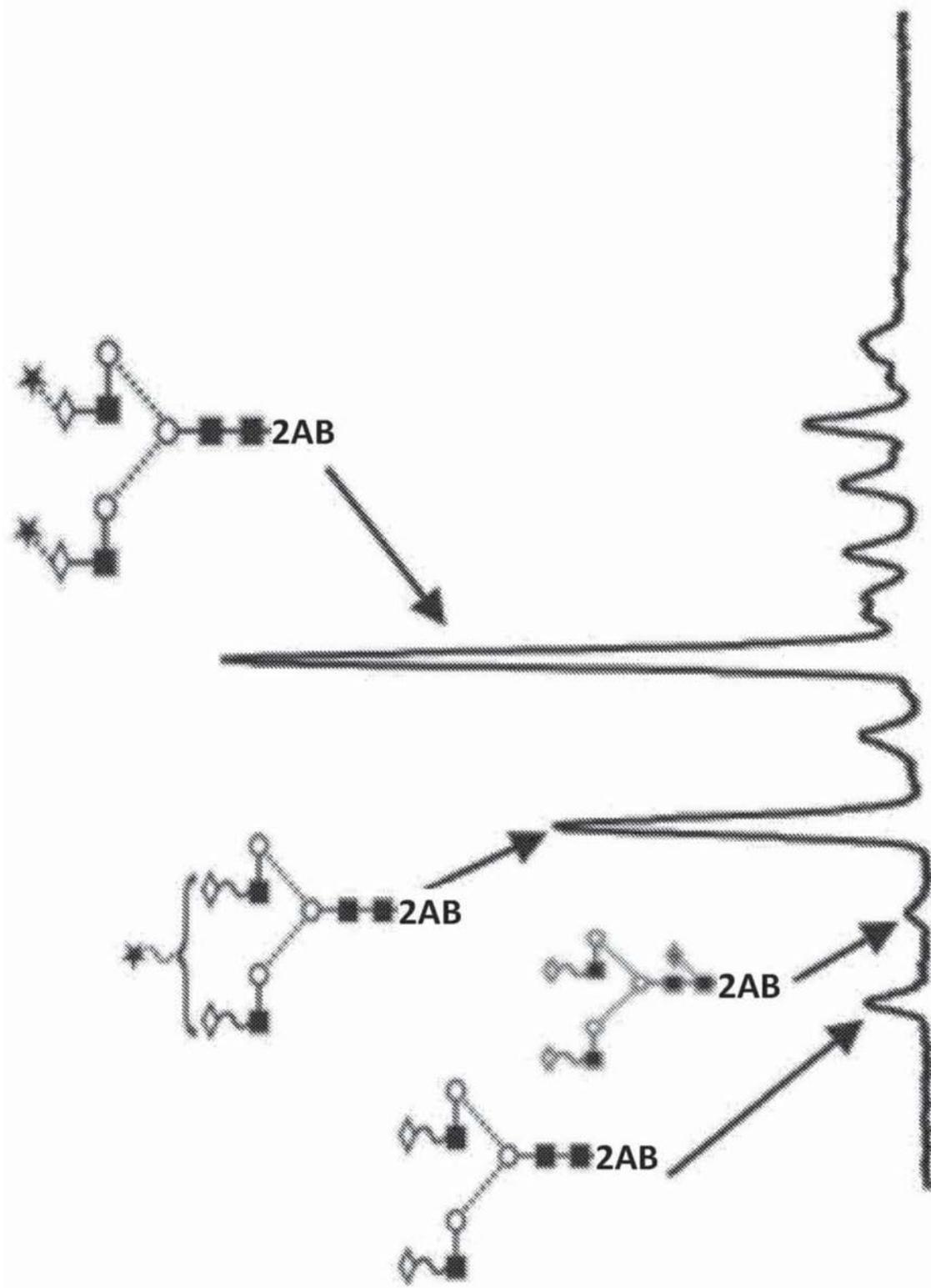


图5A

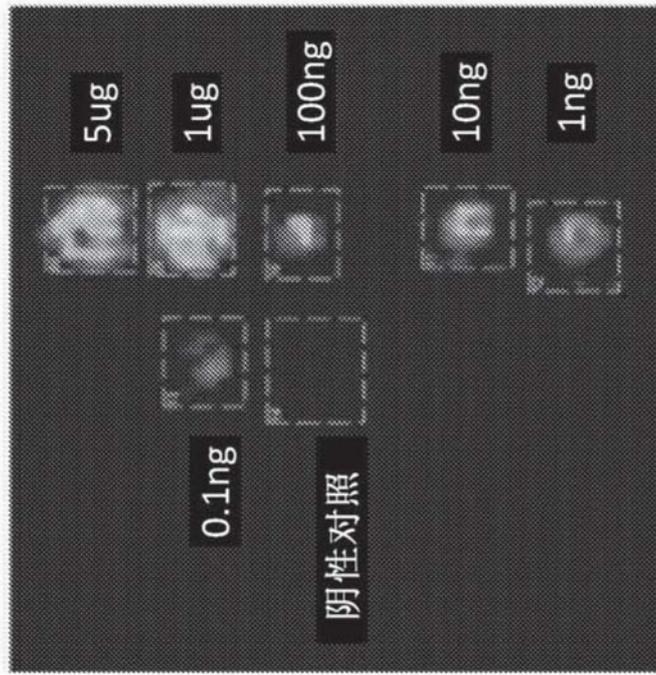


图5B

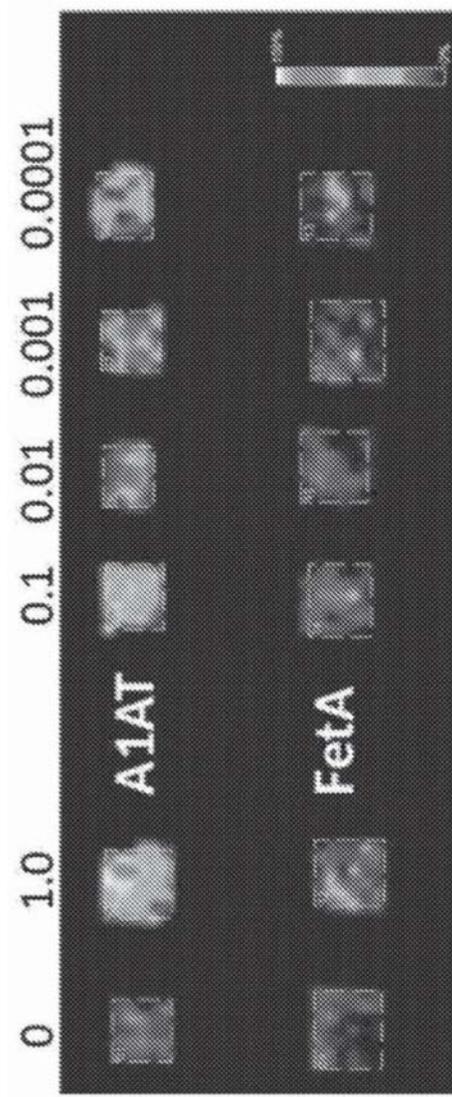


图5C

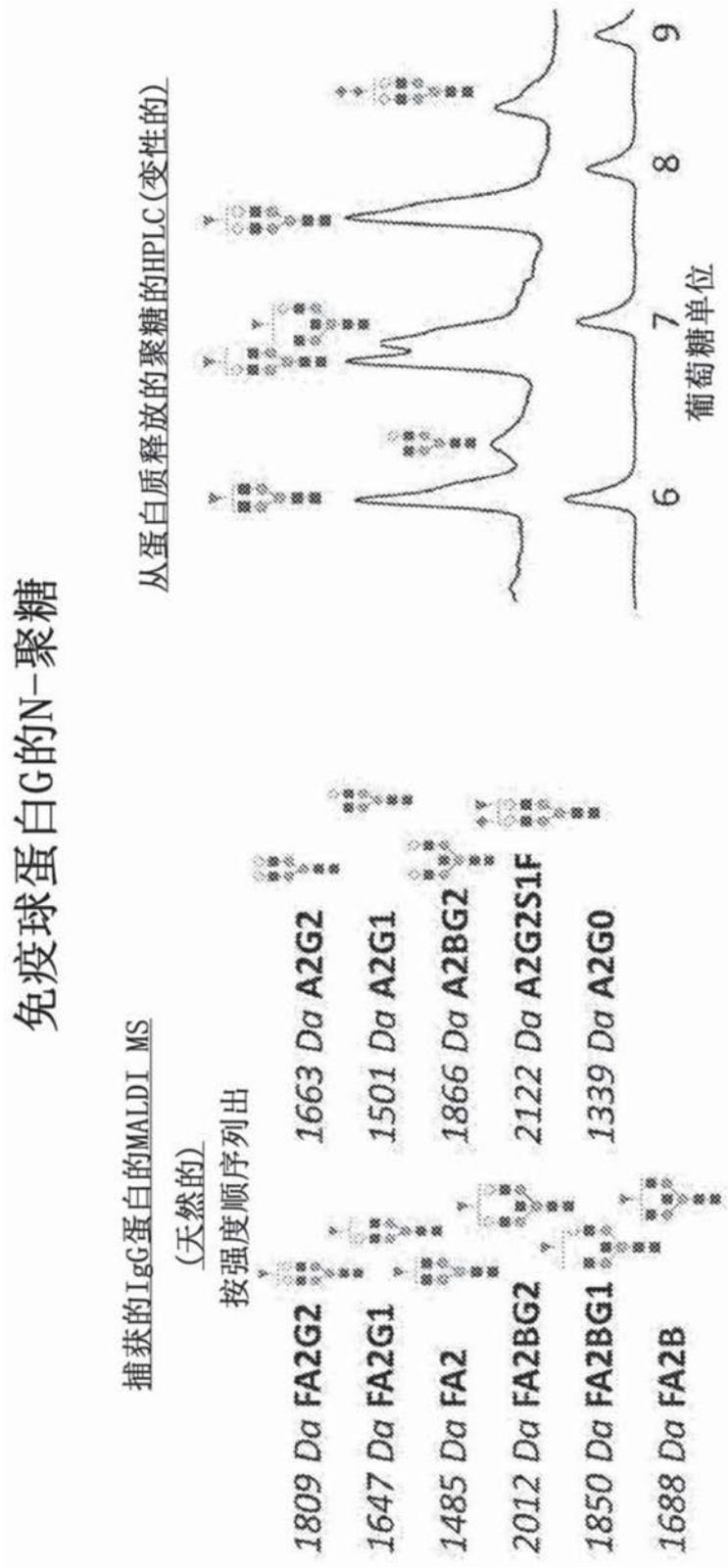


图6

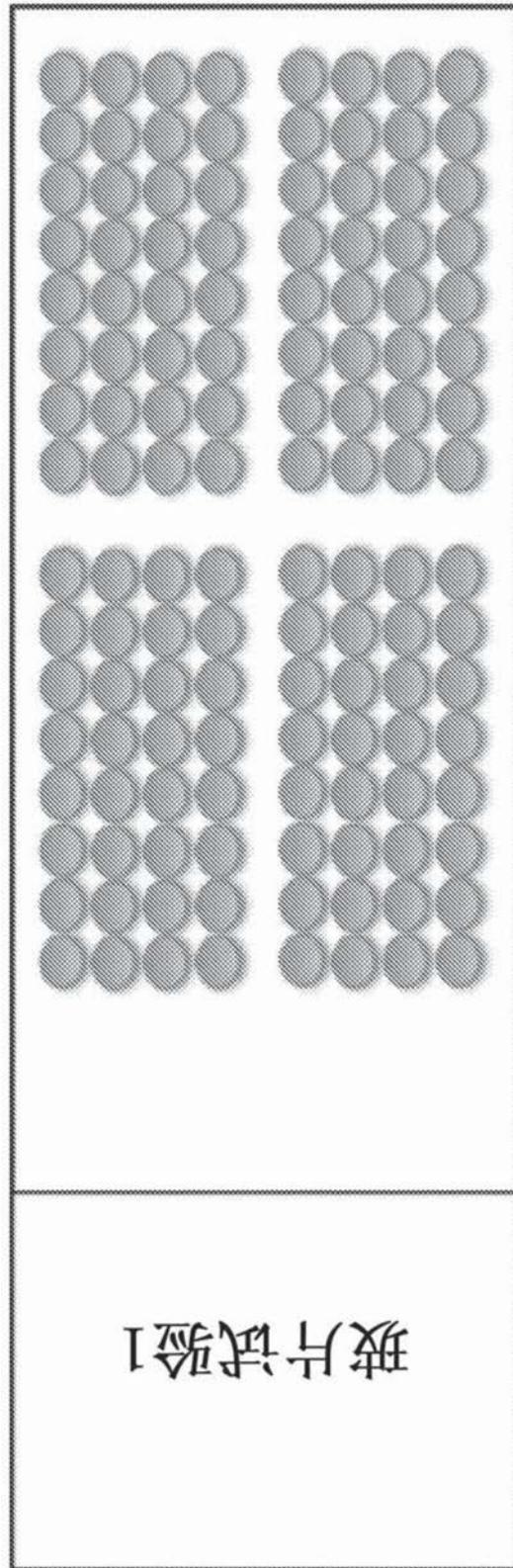


图7

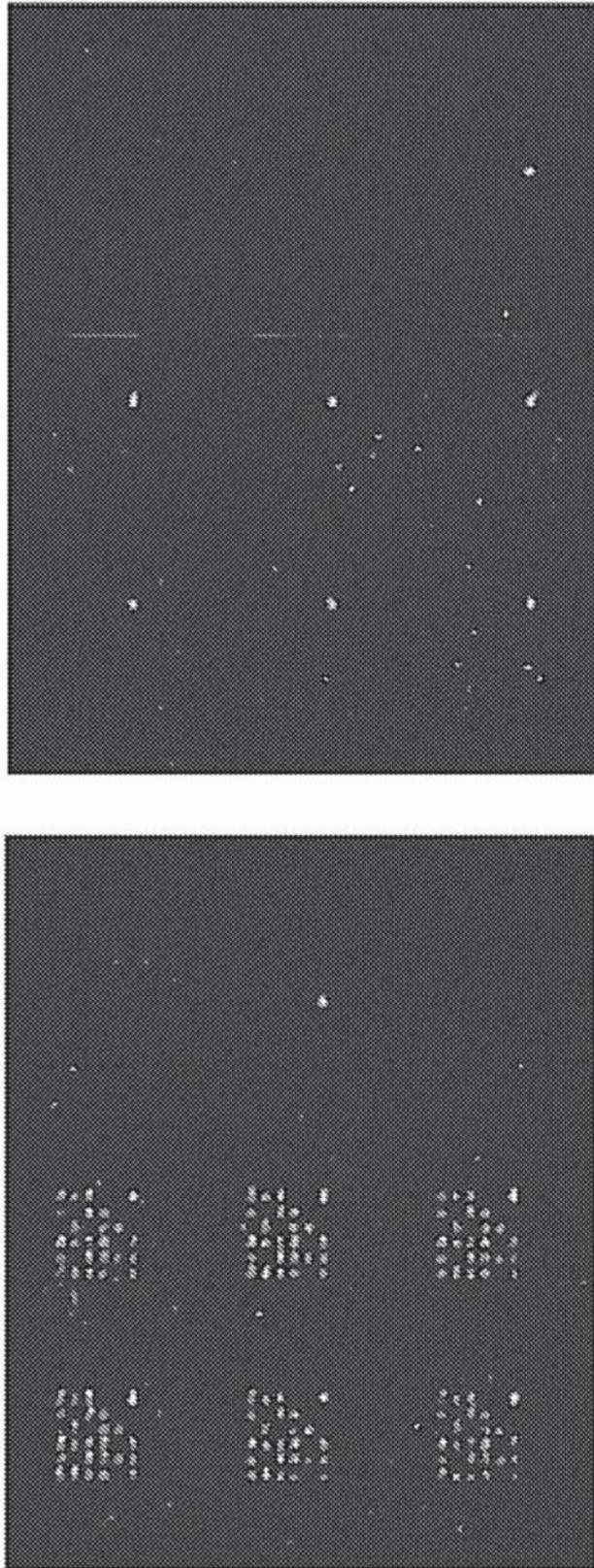


图8

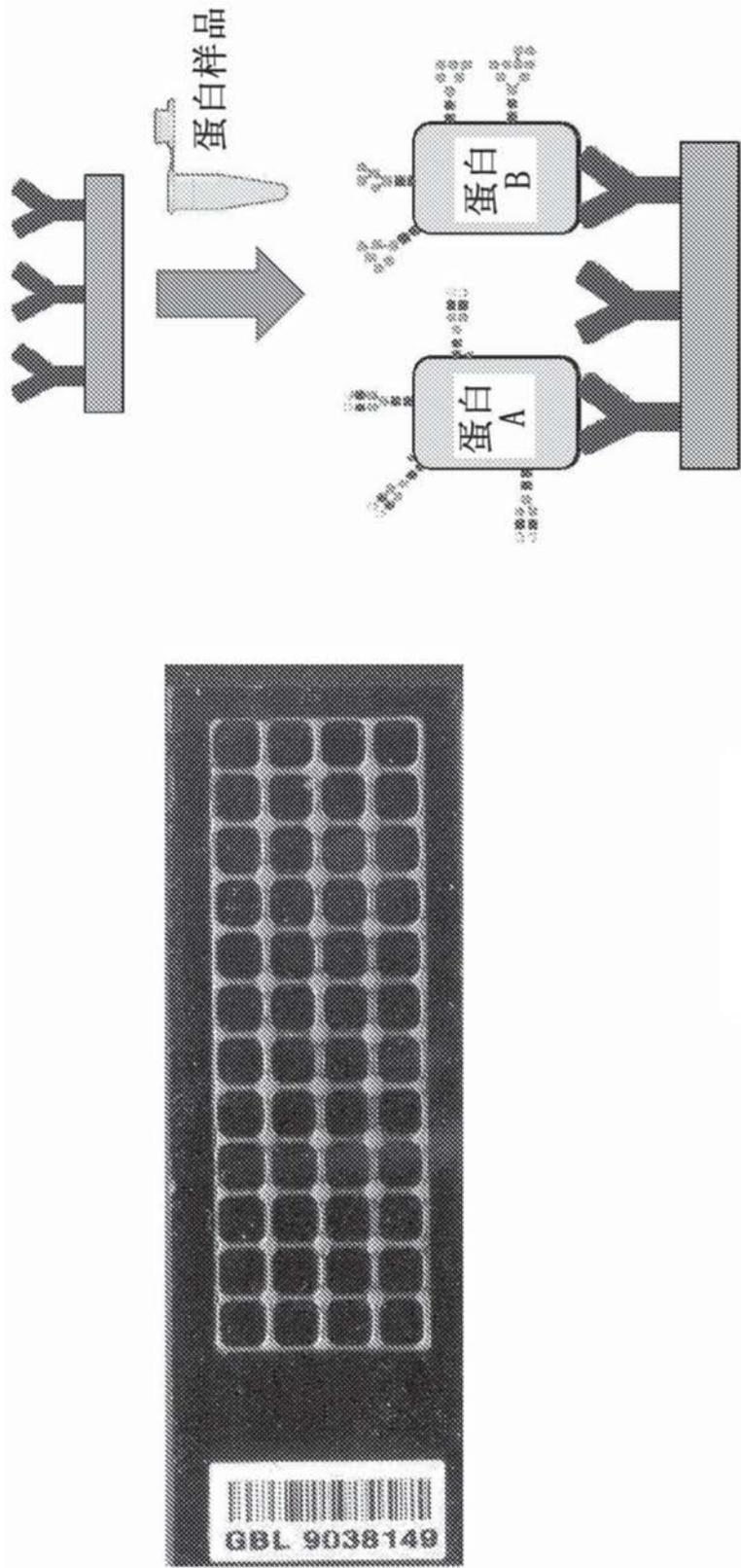


图9

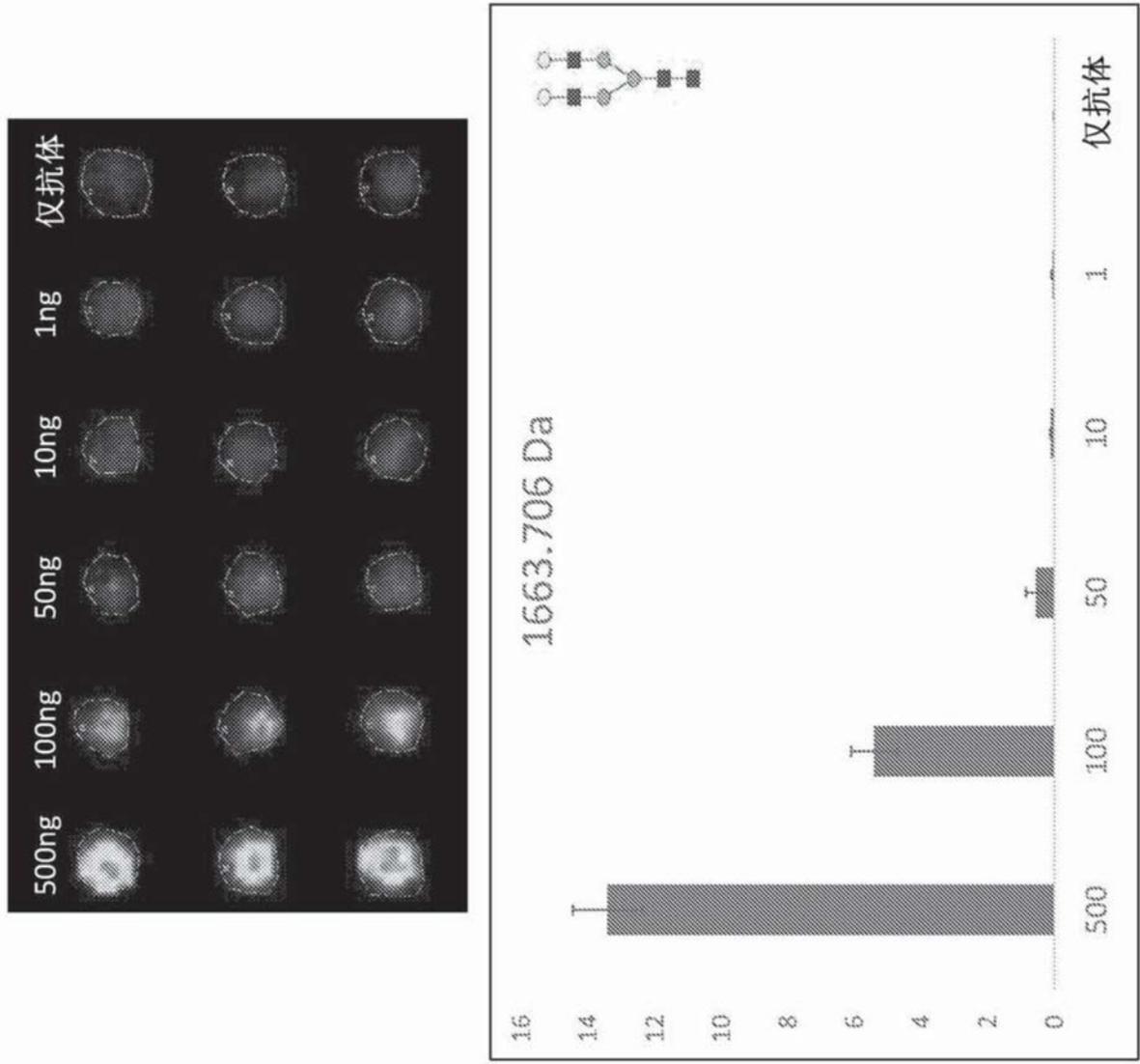


图10

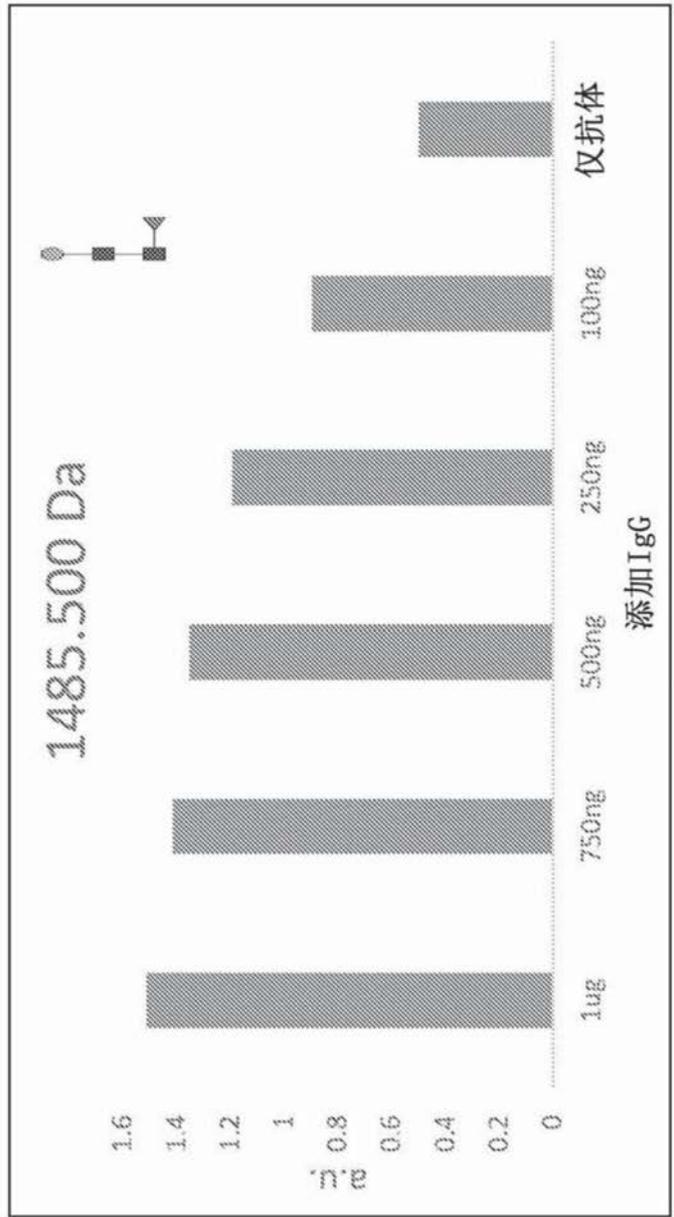
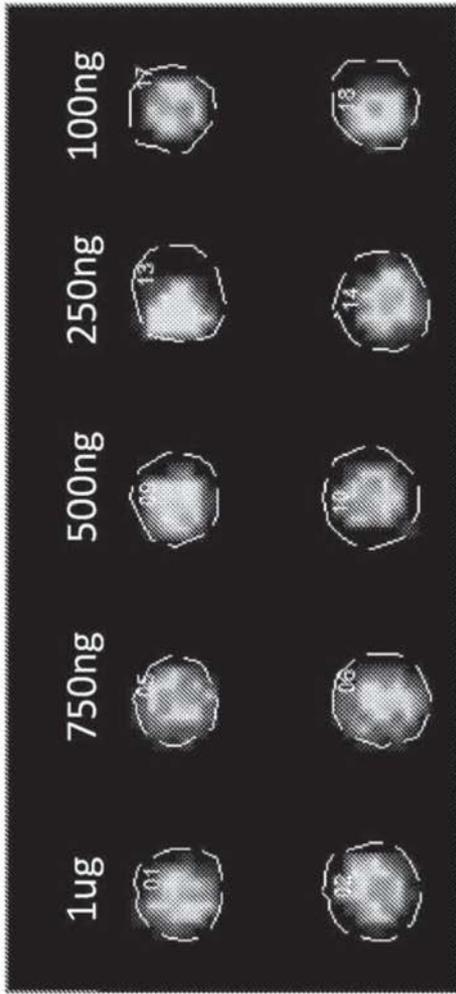


图11

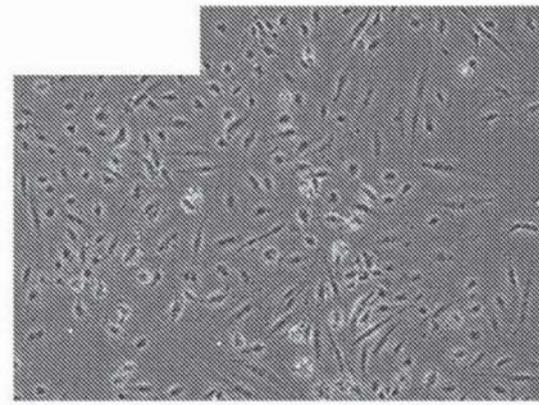


图12A

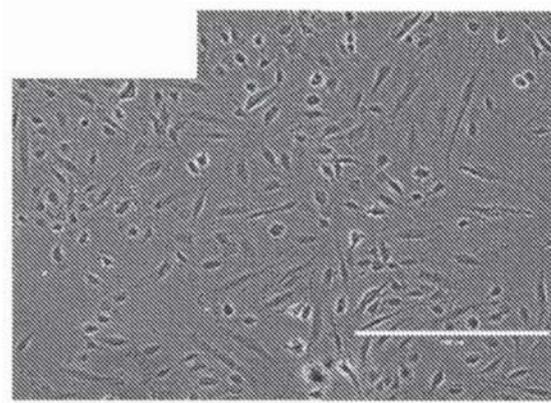


图12B

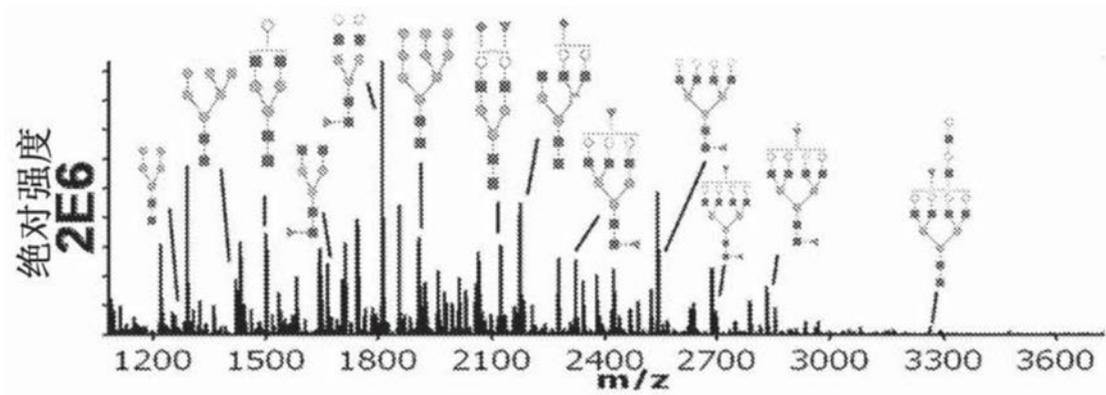


图12C

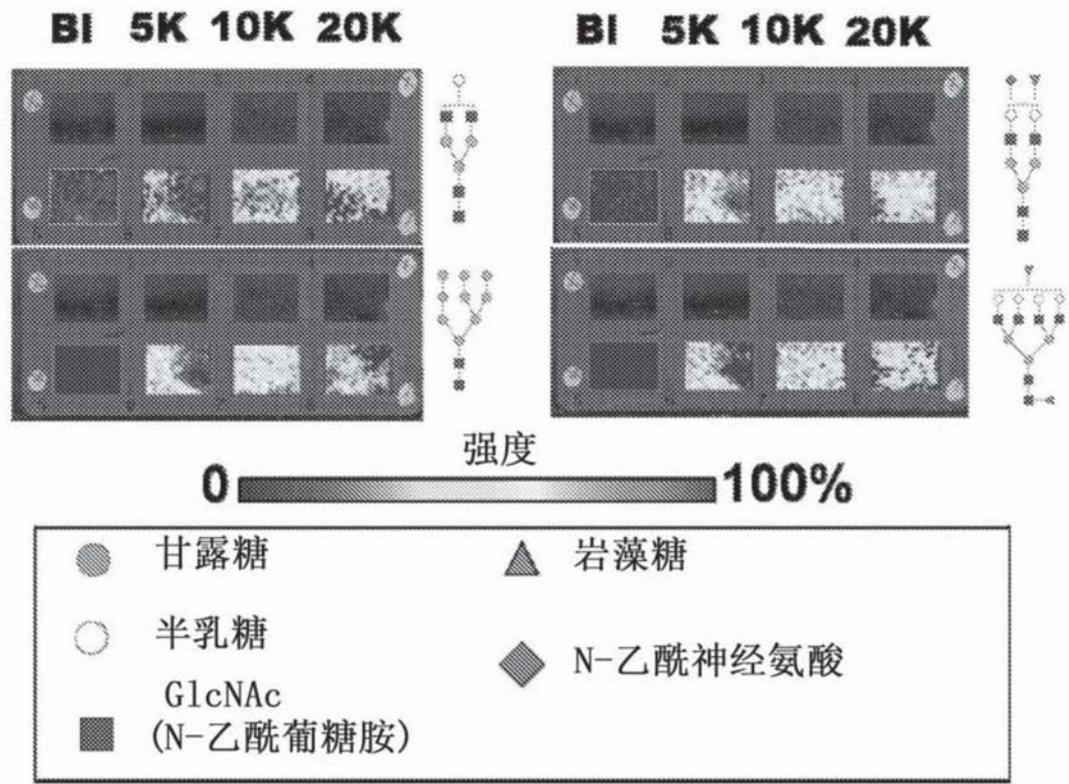


图12D

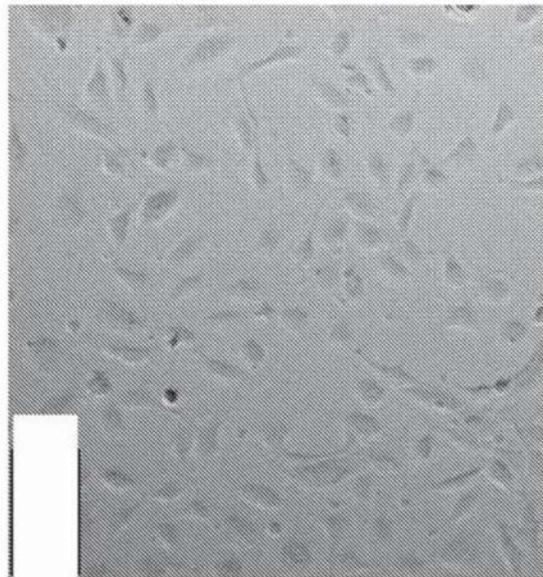


图13A

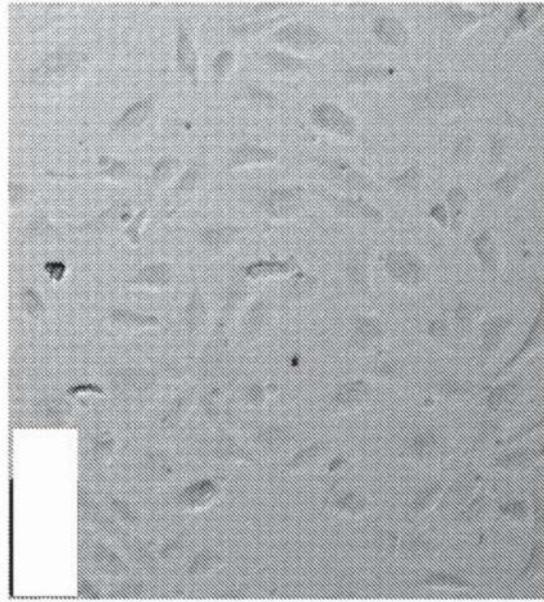
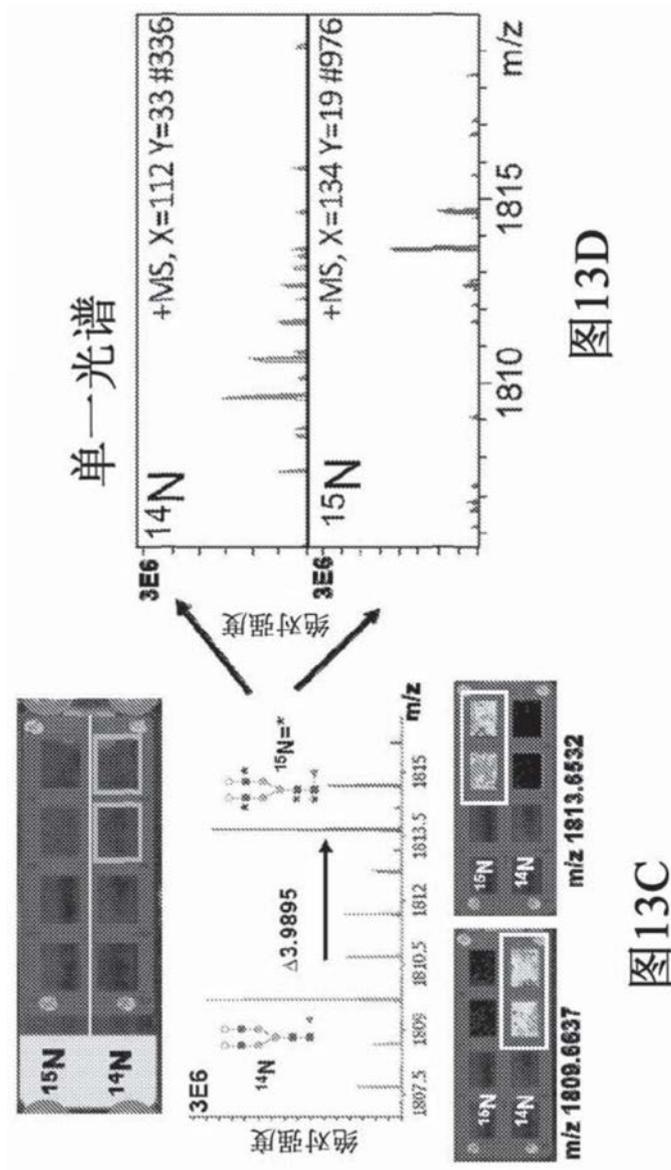


图13B



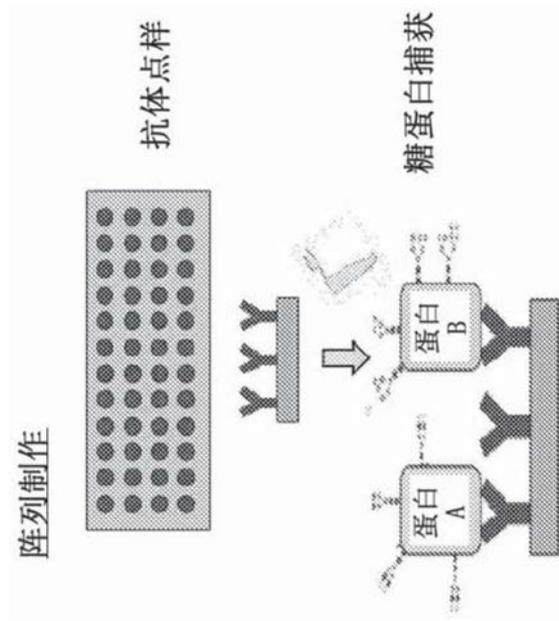


图14A

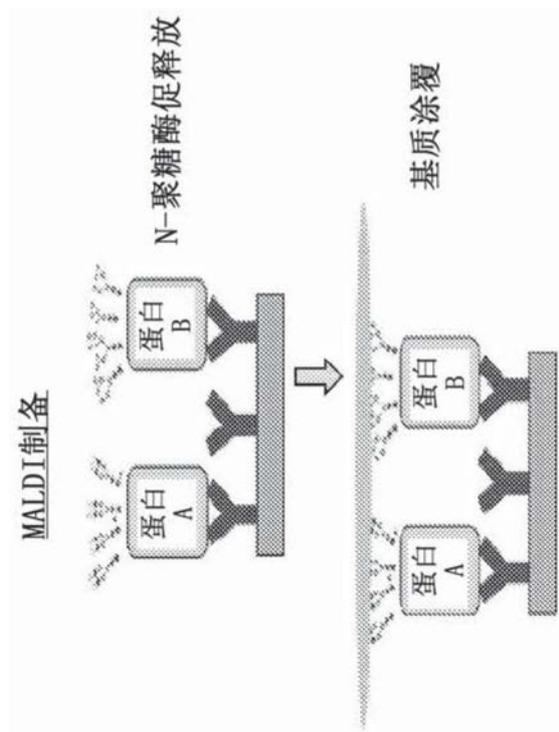


图14B

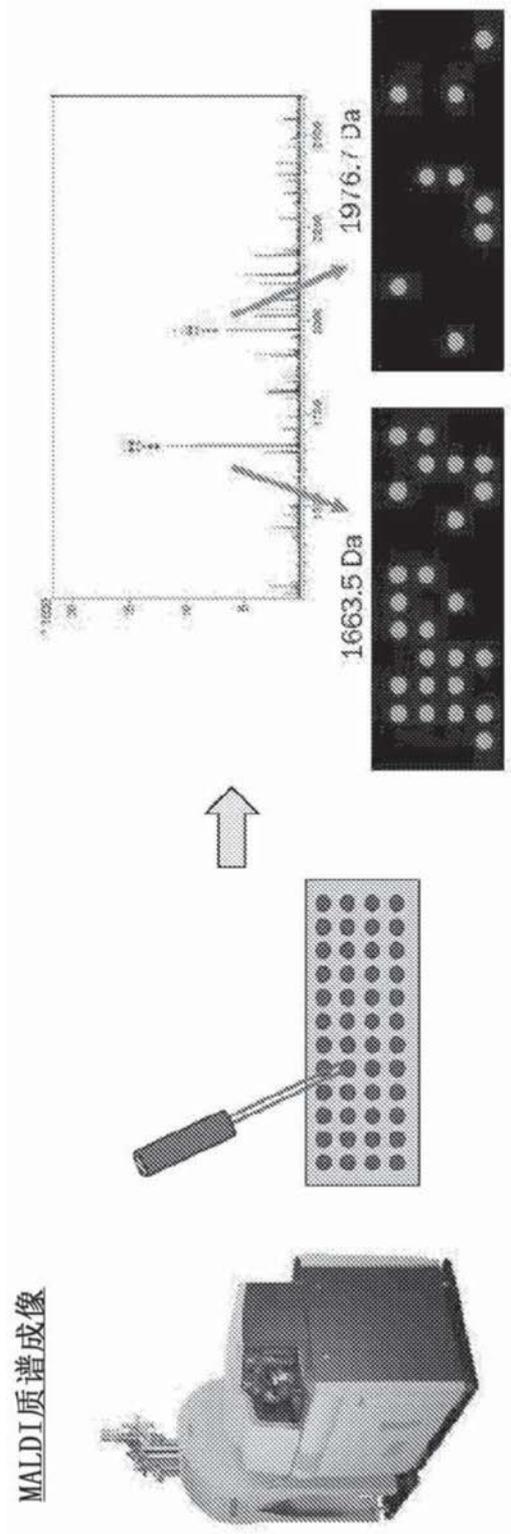


图14C

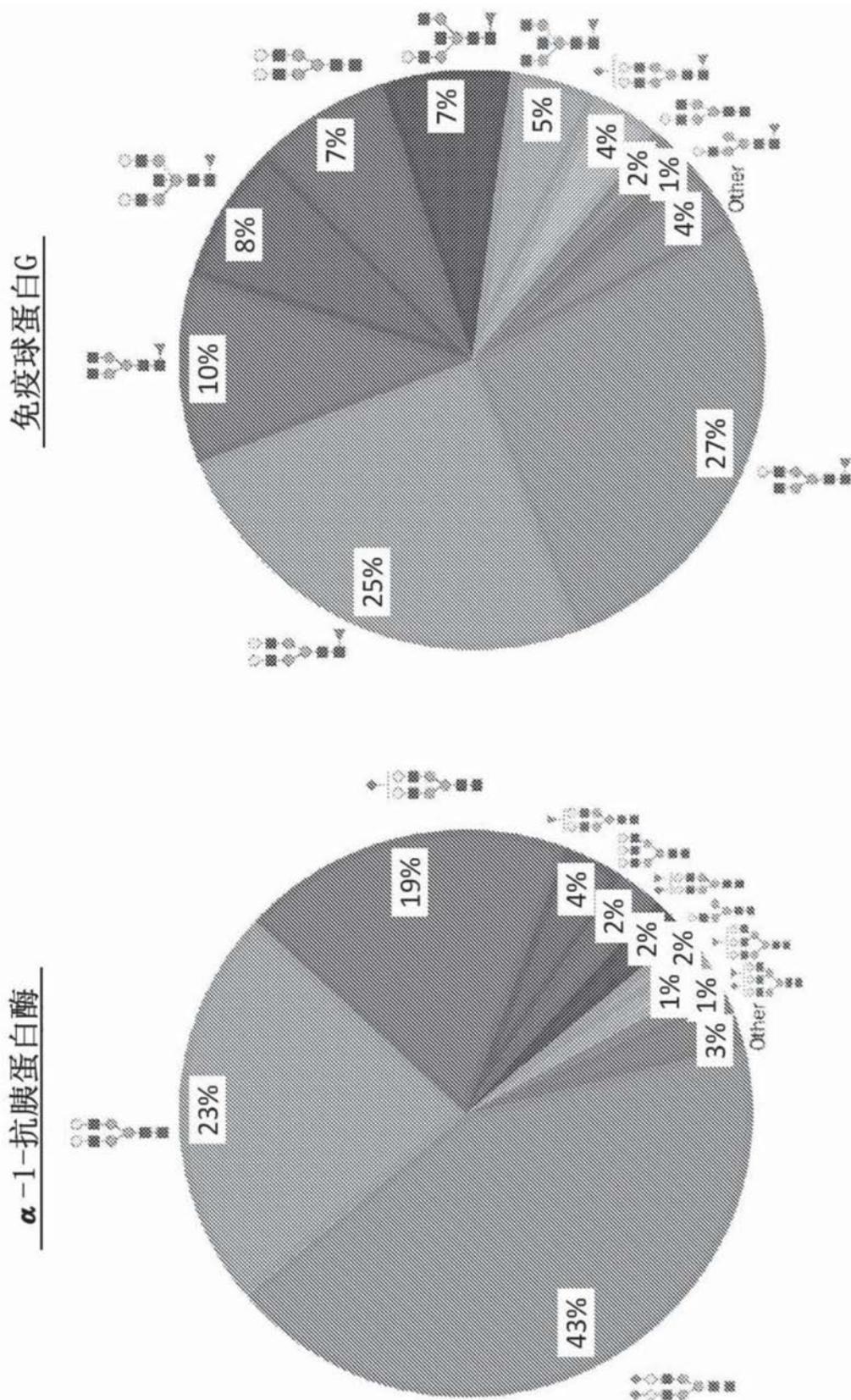


图15

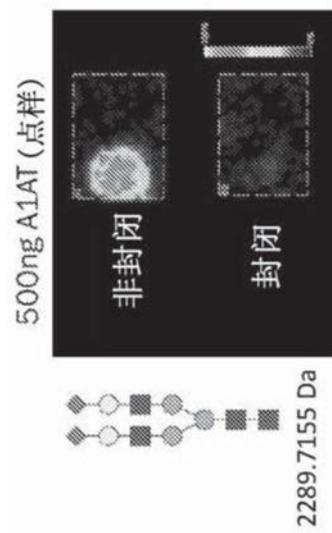


图16A

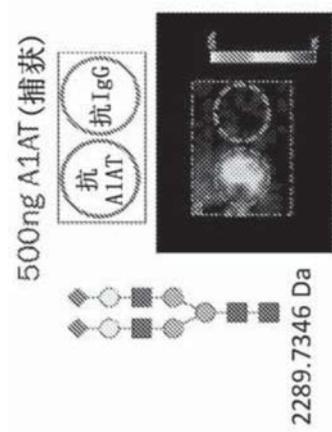


图16B



图16C

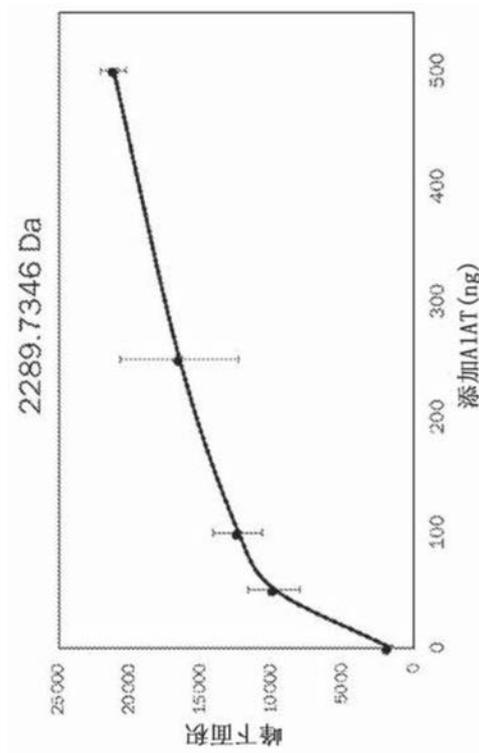


图16D

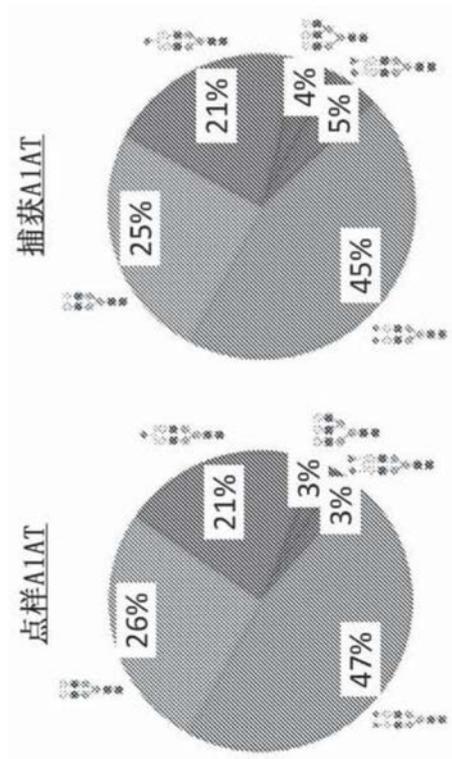


图16E

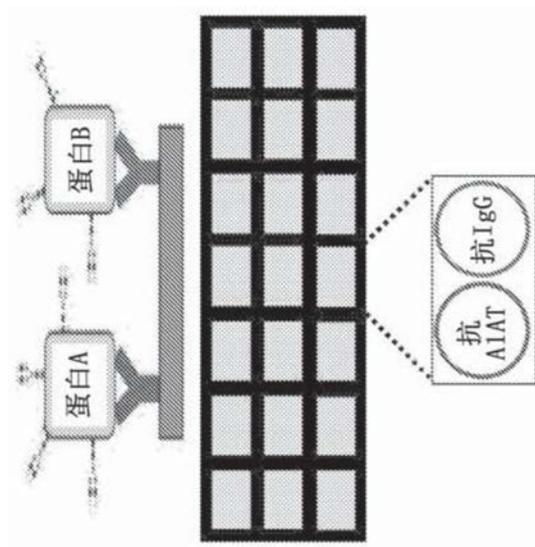


图17A

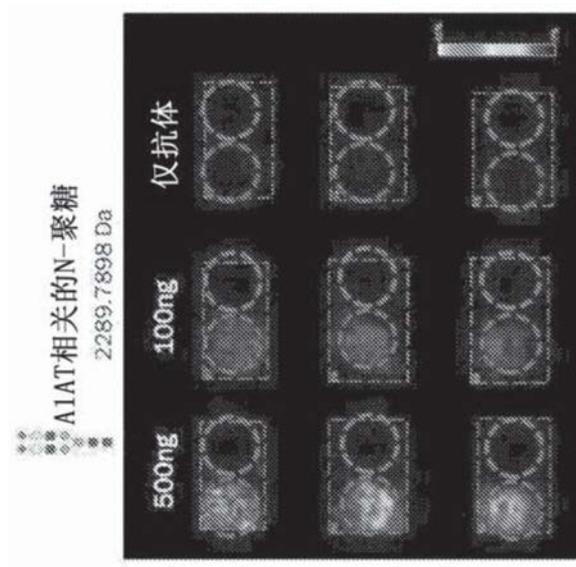


图17B

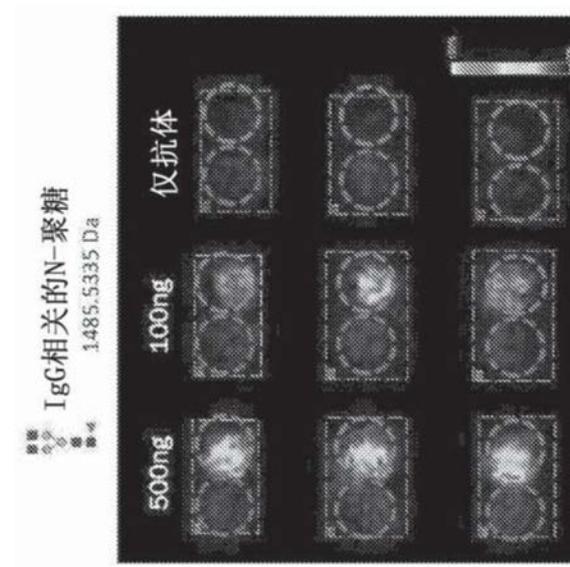


图17C

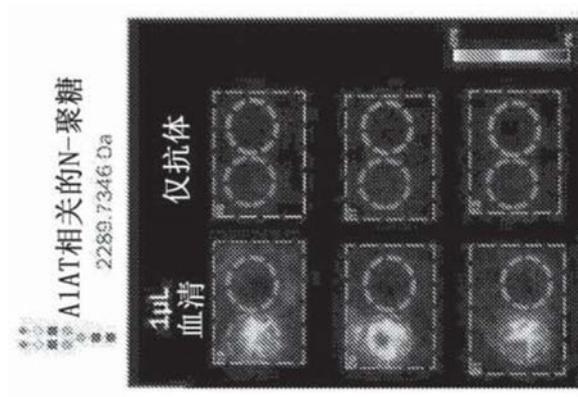


图17D

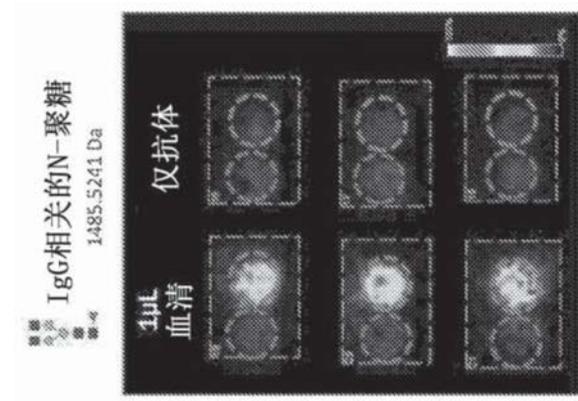


图17E

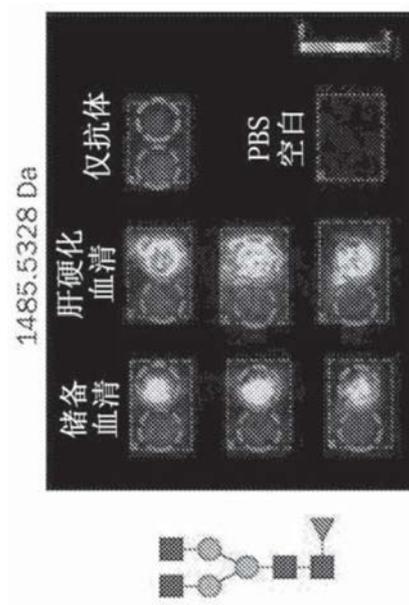


图18A

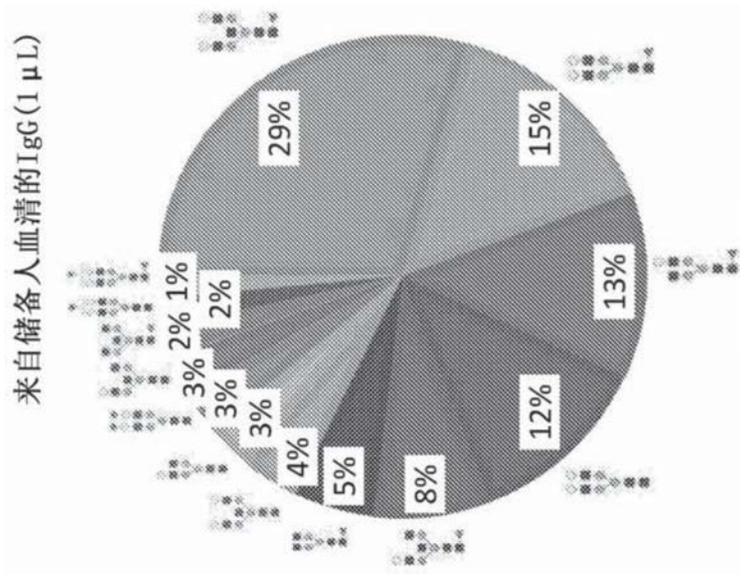


图18B

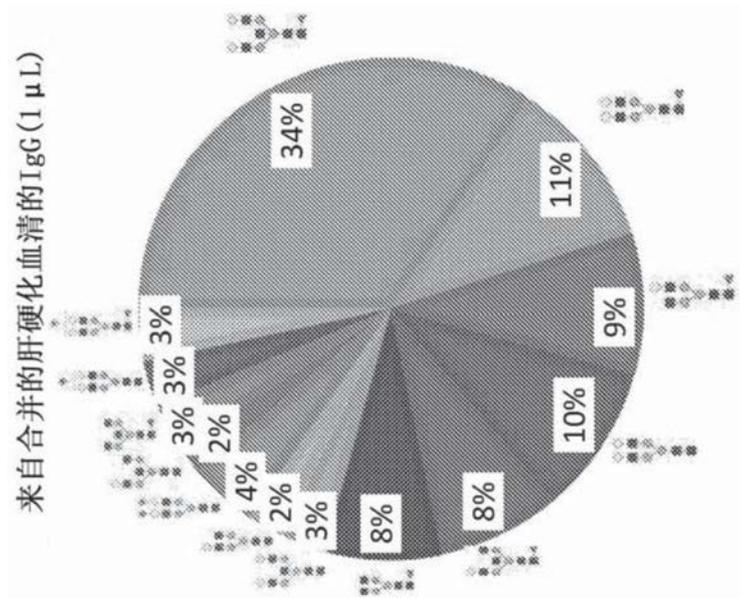


图18C

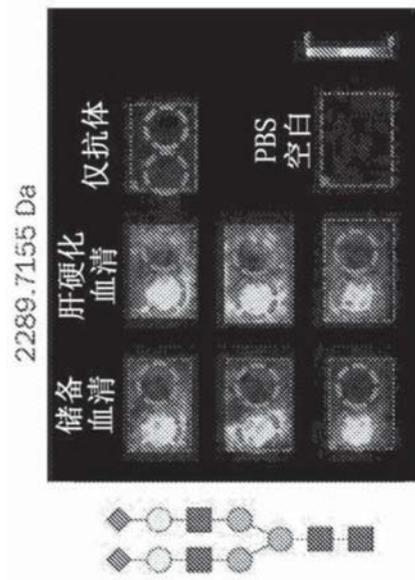


图18D

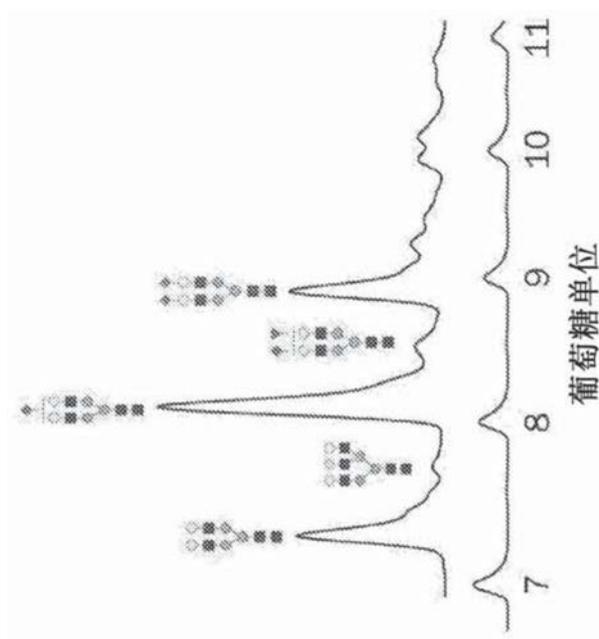


图19A

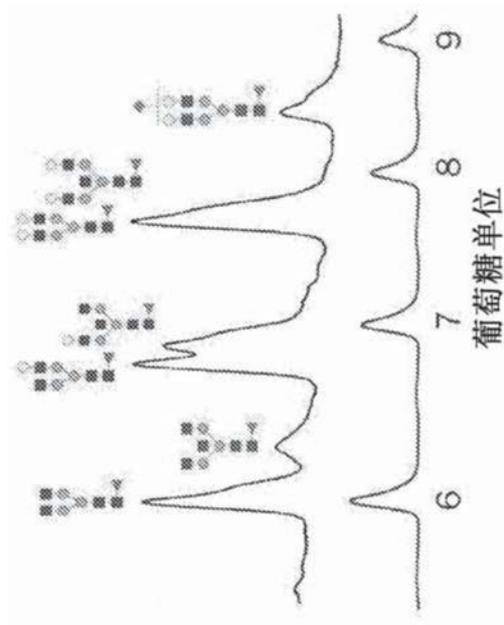


图19B

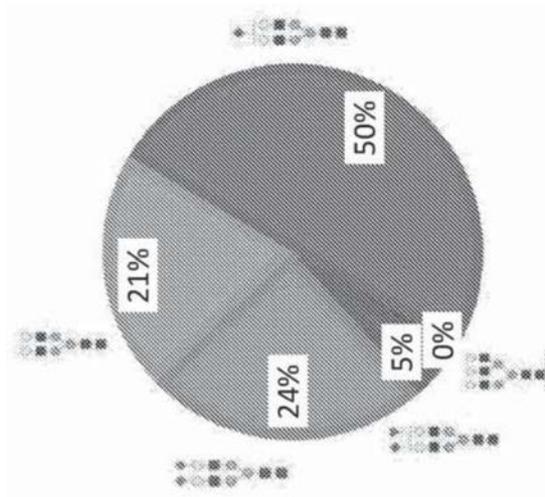


图19C

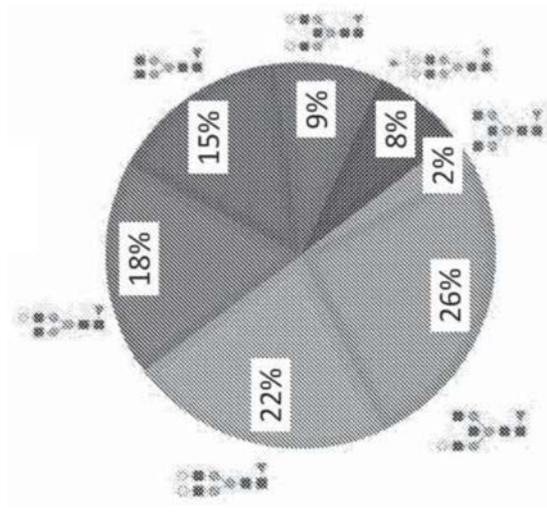


图19D

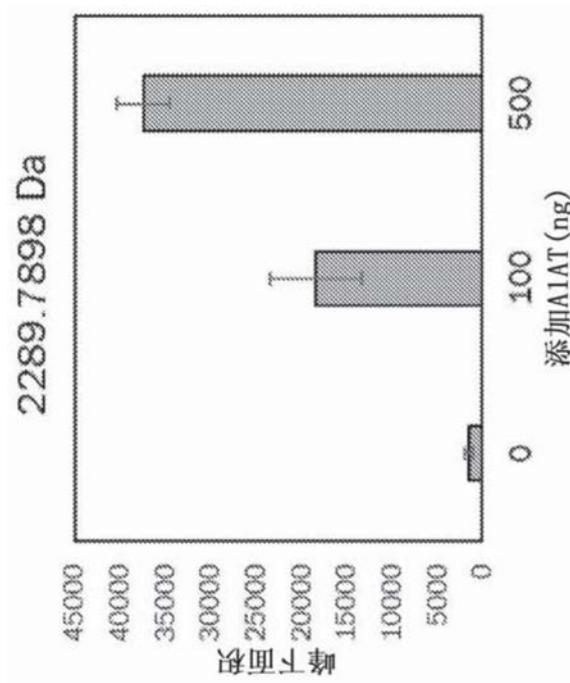


图20A

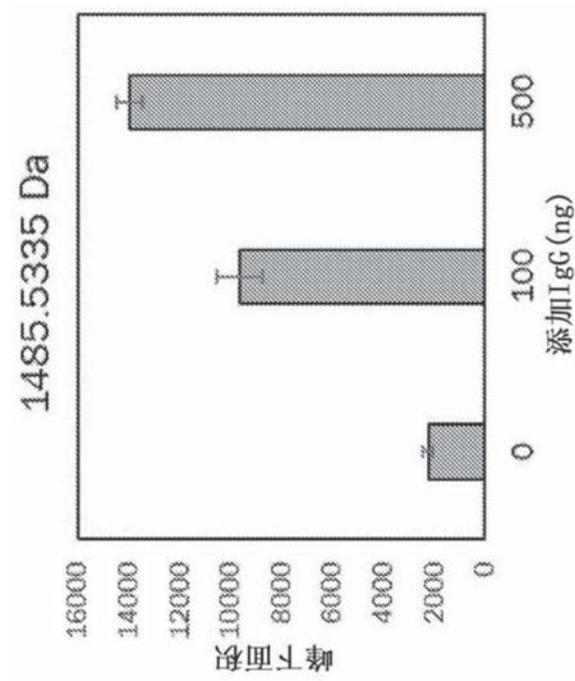


图20B

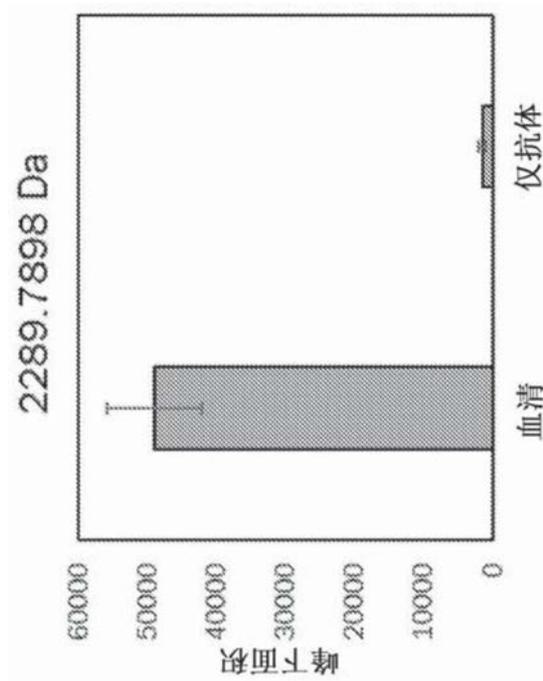


图20C

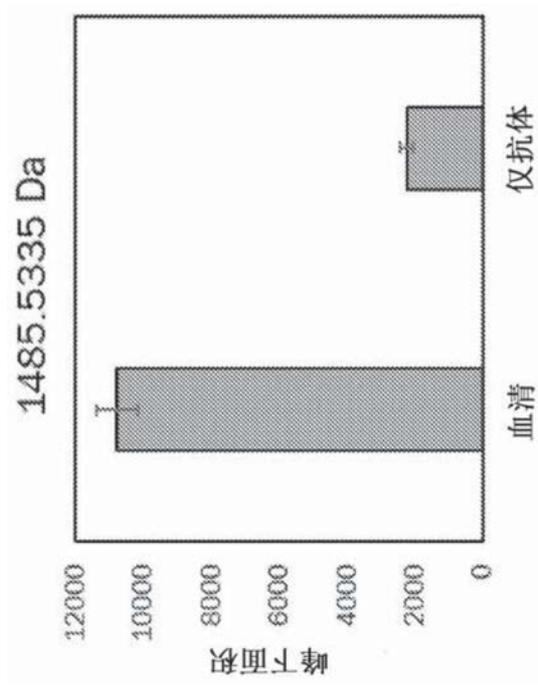


图20D