

(19) 中华人民共和国国家知识产权局



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105301229 A

(43) 申请公布日 2016. 02. 03

(21) 申请号 201410350619. 5

(22) 申请日 2014. 07. 22

(71) 申请人 中国医学科学院北京协和医院
地址 100730 北京市东城区王府井帅府园 1 号

申请人 中国科学院生物物理研究所

(72) 发明人 曾小峰 阎锡蕴 张令令 李梦涛
张德玺 张莉 段红霞 罗永挺

(74) 专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314

代理人 程伟 韩文华

(51) Int. Cl.

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 33/68(2006. 01)

C12Q 1/68(2006. 01)

权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54) 发明名称

CD146 作为分子标记物在诊断、分期或预后神经精神性狼疮中的用途

(57) 摘要

本发明涉及 CD146 作为分子标记物在诊断、分期或预后神经精神性狼疮中的用途。特别地, 本发明涉及一种或多种选择性结合至 CD146 蛋白质的抗体或其抗原结合片段在制备用于诊断、分期和 / 或预后神经精神性狼疮的试剂中的用途。

1. CD146 作为分子标记物在制备用于诊断、分期和 / 或预后神经精神性狼疮的试剂中的用途。
2. 一种或多种选择性结合至 CD146 蛋白质的抗体或其抗原结合片段在制备用于诊断、分期和 / 或预后神经精神性狼疮的试剂中的用途。
3. 根据权利要求 2 所述的用途,其中抗原结合片段选自 Fv 片段、Fab 片段、Fab' 片段、F(ab)2 片段、ScFv 片段或 dAb 片段。
4. 根据权利要求 1-3 任一项所述的用途,其包括步骤:
 - a) 提供来自个体的脑脊液样品;
 - b) 确定来自步骤 a) 的脑脊液样品中可溶性 CD146 的量;其中,可溶性 CD146 量的升高是神经精神性狼疮的指征。
5. 根据权利要求 4 所述的用途,其中在所述步骤 b) 中的方法选自 Western 印迹、North-Western 印迹、免疫吸附测定法、抗体微阵列、组织微阵列、免疫沉淀、原位杂交和其他免疫组织化学技术、放射免疫测定法、免疫放射测定法和免疫酶测定法。
6. 一种或多种特异地检测编码 CD146 蛋白质的 mRNA 的表达水平的引物和 / 或探针,在制备用于诊断、分期和 / 或预后神经精神性狼疮的试剂中的用途。
7. 根据权利要求 6 所述的用途,其包括步骤:
 - a) 提供来自个体的脑脊液样品;
 - b) 确定来自步骤 a) 的脑脊液样品中编码 CD146 蛋白质的 mRNA 表达的量;其中,编码 CD146 蛋白质的 mRNA 表达量的升高是神经精神性狼疮的指征。
8. 根据权利要求 7 所述的用途,其中在所述步骤 (b) 使用选自宏阵列筛选、微阵列筛选、纳米阵列筛选、逆转录 PCR、实时 PCR 或原位 PCR 的方法进行。
9. 一种用于诊断、分期和 / 或预后神经精神性狼疮试剂盒,其包括选择性结合至 CD146 蛋白质的抗体或其抗原结合片段。
10. 一种用于诊断、分期和 / 或预后神经精神性狼疮试剂盒,其包括一种或多种特异地检测编码 CD146 蛋白质的 mRNA 的表达水平的引物和 / 或探针。

CD146 作为分子标记物在诊断、分期或预后神经精神性狼疮中的用途

技术领域

[0001] 本发明涉及神经精神性狼疮分子标记物的领域。特别地,本发明涉及 CD146 作为分子标记物在诊断、分期或预后神经精神性狼疮中的用途。

背景技术

[0002] 系统性红斑狼疮 (systemic lupus erythematosus, SLE) 是一种由自身抗体介导的多系统累及的自身免疫性疾病。而神经精神性狼疮 (Neuropsychiatric systemic lupus erythematosus, NPSLE,) 是 SLE 常见的严重并发症,可累及中枢及周围神经系统,表现为多种不同的神经病学及精神病学综合征,是 SLE 重要死因之一。目前 NPSLE 的发病机制尚不肯定,包括血管病、自身免疫性抗体、炎症介质等,参见 Boumpas DT, Austin HA, 3rd, Fessler BJ, Balow JE, Klippel JH, Lockshin MD: Systemic lupus erythematosus: emerging concepts. Part 1: Renal, neuropsychiatric, cardiovascular, pulmonary, and hematologic disease. *Annals of internal medicine* 1995, 122(12):940-950。

[0003] 由于 NPSLE 临床表现的多样性,并且缺乏统一的诊断标准等多种原因,各项研究中报道的 NPSLE 的患病率并不一致,近 5 年报道的 NPSLE 的患病率为 14-39%,参见 Zhou HQ, Zhang FC, Tian XP, Leng XM, Lu JJ, Zhao Y, Tang FL, Zhang X, Zeng XF, Zhang ZL et al: Clinical features and outcome of neuropsychiatric lupus in Chinese: analysis of 240 hospitalized patients. *Lupus* 2008, 17(2):93-99; Bultink IE, Turkstra F, Dijkmans BA, Voskuyl AE: High prevalence of unemployment in patients with systemic lupus erythematosus: association with organ damage and health-related quality of life. *The Journal of rheumatology* 2008, 35(6):1053-1057; Hanly JG, Su L, Farewell V, McCurdy G, Fougere L, Thompson K: Prospective study of neuropsychiatric events in systemic lupus erythematosus. *The Journal of rheumatology* 2009, 36(7):1449-1459; Briani C, Lucchetta M, Ghirardello A, Toffanin E, Zampieri S, Ruggero S, Scarlato M, Quattrini A, Bassi N, Ermani M et al: Neurolyupus is associated with anti-ribosomal P protein antibodies: an inception cohort study. *Journal of autoimmunity* 2009, 32(2):79-84; Gonzalez LA, Pons-Estel GJ, Zhang J, Vila LM, Reveille JD, Alarcon GS, group Ls: Time to neuropsychiatric damage occurrence in LUMINA (LXVI): a multi-ethnic lupus cohort. *Lupus* 2009, 18(9):822-830。5 年和 10 年生存率分别为 63.2% 和 91.4%,参见 Mak A, Cheung MW, Chiew HJ, Liu Y, Ho RC. Global trend of survival and damage of systemic lupus erythematosus: Meta-analysis and meta-regression of observational studies from 1950s to 2000s. *Semin Arthritis Rheum* 2012; 41:830-9。

[0004] 因此, NPSLE 的早期预测、诊断和病情评估对 SLE 患者的治疗和预后有重要意义。然而,目前 NPSLE 的诊断依赖于临床诊断,即 ACR 的 19 类临床分类,参见 The American

College of Rheumatology nomenclature and case definitions for neuropsychiatric lupus syndromes. *Arthritis and rheumatism* 1999, 42 (4):599-608。尚无具有诊断价值的检查方法可应用于 NPSLE 的诊断,亦无明确的指标用于 NPSLE 的早期预测。血清学分析、心理测试、脑脊液检查、影像学检查、脑电图检查等方式有助于诊断的建立。

[0005] 需要开发一种特异性地诊断神经精神狼疮的生物标记物,以有助于除临床诊断之外的神经精神狼疮的分子标记物的诊断。

[0006] CD146 是一种细胞粘附分子,CD146 是 I 型膜蛋白,属于免疫球蛋白超家族。

发明内容

[0007] 本发明人首次提出脑脊液中可溶性 CD146 (soluble CD146, sCD146) 是神经精神狼疮诊断、分期和预后的生物标志物。实验证明,与非 NPSLE 患者相比,可溶性 CD146 在 NPSLE 患者脑脊液中的分泌水平明显升高,而 sCD146 在 NPSLE 血清中变化则不明显;NPSLE 活动期脑脊液中 sCD146 水平明显升高,经过治疗后,缓解期 NPSLE 脑脊液 sCD146 水平显著降低;NPSLE 脑脊液 sCD146 水平与评价疾病活动的指标如,血沉、C3、C4 有很好的相关性。这些结果提示 sCD146 可以作为一个诊断、分期和 / 或预后 NPSLE 的生物标志物,对今后该类疾病的诊断和疾病活动度的评价有重要意义。

[0008] 一方面,本发明提供了 CD146 作为分子标记物在制备用于诊断、分期和 / 或预后神经精神性狼疮的试剂中的用途。

[0009] 另一方面,本发明提供了一种或多种选择性结合至 CD146 蛋白质的抗体或其抗原结合片段在制备用于诊断、分期和 / 或预后神经精神性狼疮的试剂中的用途。

[0010] 根据本发明,“抗体”包括基本上完整的抗体分子以及嵌合抗体、人源化抗体、人抗体(其中至少一个氨基酸相对于天然存在的人抗体是突变的)、单链抗体、双特异性抗体、抗体重链、抗体轻链、抗体重链和 / 或轻链的同二聚体和异二聚体,以及其抗原结合片段和衍生物。

[0011] “抗原结合片段”意思是能够结合至 CD146 蛋白质的抗体的功能性片段。

[0012] 优选地,抗原结合片段选自 Fv 片段(例如单链 Fv 和二硫键合的 Fv)、Fab 样片段(例如 Fab 片段、Fab' 片段和 F(ab)2 片段)、单可变结构域(例如 VH 和 VL 结构域)和结构域抗体(dAb,包括单和双的格式[即 dAb-连接子-dAb])。

[0013] 使用抗体片段而不是整个抗体有多个优点。片段的较小尺寸可以引起改善的药理学性质,如对固体组织更好的穿透性。另外,抗原结合片段如 Fab、Fv、ScFv 和 dAb 抗体片段可以在大肠杆菌(E. coli)中表达并从大肠杆菌中分泌,因此允许促进大量所述片段的产生。

[0014] 进一步地,根据本发明的上述用途,其包括步骤:

[0015] c) 提供来自个体的脑脊液样品;

[0016] d) 确定来自步骤 a) 的脑脊液样品中可溶性 CD146 的量;

[0017] 其中,可溶性 CD146 量的升高是神经精神性狼疮的指征。

[0018] 特别地,在所述步骤 b) 中的优选方法包括 Western 印迹、North-Western 印迹、免疫吸附测定法(ELISA)、抗体微阵列、组织微阵列(TMA)、免疫沉淀、原位杂交和其他免疫组织化学技术、放射免疫测定法(RIA)、免疫放射测定法(IRMA)和免疫酶测定法(IEMA),包括

使用单克隆和 / 或多克隆抗体的三明治测定法。载玻片上的细胞抗体染色可以用于细胞学实验室诊断测试中熟知的方法中,如本领域技术人员熟知的。

[0019] 另一方面,本发明提供了一种或多种特异地检测编码 CD146 蛋白质的 mRNA 的表达水平的引物和 / 或探针,在制备用于诊断、分期和 / 或预后神经精神性狼疮的试剂中的用途。

[0020] 根据本发明,“分期”指判断 NPSLE 的活动期或缓解期。

[0021] 根据本发明,“预后”指判断经治疗后 NPSLE 的活动期或缓解期。

[0022] 进一步地,根据本发明的上述用途,其包括步骤:

[0023] c) 提供来自个体的脑脊液样品;

[0024] d) 确定来自步骤 a) 的脑脊液样品中编码 CD146 蛋白质的 mRNA 表达的量;

[0025] 其中,编码 CD146 蛋白质的 mRNA 表达量的升高是神经精神性狼疮的指征。

[0026] 特别地,在所述步骤 (b) 使用选自宏阵列筛选、微阵列筛选、纳米阵列筛选、逆转录 PCR、实时 PCR 或原位 PCR 的方法进行。

[0027] 另一方面,本发明提供了用于诊断、分期和 / 或预后神经精神性狼疮试剂盒,其包括选择性结合至 CD146 蛋白质的抗体或其抗原结合片段。

[0028] 另一方面,本发明提供了用于诊断、分期和 / 或预后神经精神性狼疮试剂盒,其包括一种或多种特异地检测编码 CD146 蛋白质的 mRNA 的表达水平的引物和 / 或探针。

附图说明

[0029] 从下面结合附图的详细描述中,本发明的上述特征和优点将更加明显,其中:

[0030] 图 1:神经精神狼疮患者脑脊液中可溶性 CD146 显著增加(病人 VS 正常: 25.88 ± 1.40 VS 10.52 ± 0.71 ng/ml, $P < 0.001$)。

[0031] 图 2:神经精神狼疮患者血清中可溶性 CD146 无明显变化(病人 VS 正常: 144.8 ± 10.04 VS 149.7 ± 11.67 ng/ml, $P > 0.05$)。

[0032] 图 3:与非神经精神狼疮患者相比,神经精神狼疮患者脑脊液中可溶性 CD146 显著增加(NPSLE VS 非 NPSLE: 26.54 ± 2.10 VS 11.06 ± 0.91 ng/ml, $P < 0.001$)。

[0033] 图 4:神经精神狼疮患者治疗后脑脊液中可溶性 CD146 显著减少(32.54 ± 4.11 vs 19.12 ± 1.60 ng/ml $P < 0.001$)。

[0034] 图 5A- 图 5C:神经精神狼疮患者脑脊液 sCD146 水平与评价疾病活动的指标血沉、C3、C4 有很好的相关性。

[0035] 应当了解,所附附图并非按比例地显示了本发明的基本原理的图示性的各种特征的略微简化的画法。本文所公开的本发明的具体设计特征包括例如具体尺寸、方向、位置和外形将部分地由具体所要应用和使用的环境来确定。

[0036] 在这些图形中,贯穿附图的多幅图形,附图标记引用本发明的同样的或等同的部分。

具体实施方式

[0037] 细胞粘附分子在炎症因子刺激下可以从内皮细胞脱落下来,为了检测脑脊液中可溶性 CD146 水平与神经精神狼疮的关系,我们用 ELISA 的方法检测了神经精神狼疮患者、正

常人及非神经精神狼疮患者脑脊液中可溶性 CD146 水平,我们发现可溶性 CD146 在神经精神狼疮患者脑脊液中显著增加。

[0038] 主要材料:经临床明确诊断的神经精神狼疮患者脑脊液及血清(45例),正常人脑脊液及血清(22例),非神经精神狼疮患者脑脊液(20例,主要包括病毒性脑炎,脑部肿瘤,周围神经病变及系统性红斑狼疮非脑部受累患者)。本说明书中使用的抗体 AA98、AA1 等可根据中国专利申请号 99107586.2、中国专利申请号 200810057260.7 的描述获得,该专利申请的内容全文引入本申请中。

[0039] 主要试剂:0.02M PB(pH7.25)、抗 CD146 抗体 AA1、生物素标记的抗 CD146 抗体 AA98,链亲和素-HRP、TMB 底物(200ng/ml TMB、0.03% H₂O₂, pH4.5)。

[0040] 实施例:检测 sCD146 双抗夹心 ELISA

[0041] 1) 包被:将抗 CD146AA1 抗体以 0.02M PB(pH7.25) 稀释至 2.5 μg/ml,充分混合后以每孔 50 μl 加入 96 孔酶标板中,4℃过夜。

[0042] 2) 封闭:甩去包被液,控干,以 2% BSA-PBS 每孔 200 μl 加入 96 孔酶标板中,37℃ 封闭 2h。

[0043] 3) 加样:甩去封闭液,0.1%吐温 20-PBS(PBST) 清洗 3 次,控干;每孔加入患者或者正常人脑脊液或者血清样本 50 μl 每孔,室温孵育 2 小时,PBST 洗 5 次,洗去非特异性结合。

[0044] 4) 检测抗体生物素标记的 AA98 以 2% BSA-PBS 稀释至 2 μg/ml,50 μl 每孔室温孵育 2 小时。

[0045] 5) 洗去抗体,加入合适浓度的链亲和素-HRP,50 μl 每孔,37℃孵育 45min。

[0046] 6) TMB 显色:样品板 PBST 清洗三次,控干,现配的 TMB 显色液每孔 50 μl 室温避光显色 3-5min。

[0047] 7) H₂SO₄ 终止显色:每孔 50 μl 终止液终止显色。

[0048] 8) 450nm 读板,分析储存数据。

[0049] 结果显示,神经精神狼疮患者脑脊液中可溶性 CD146 显著高于正常人和非神经精神狼疮患者,脑脊液中可溶性 CD146 高于 15ng/ml 可认为是异常。

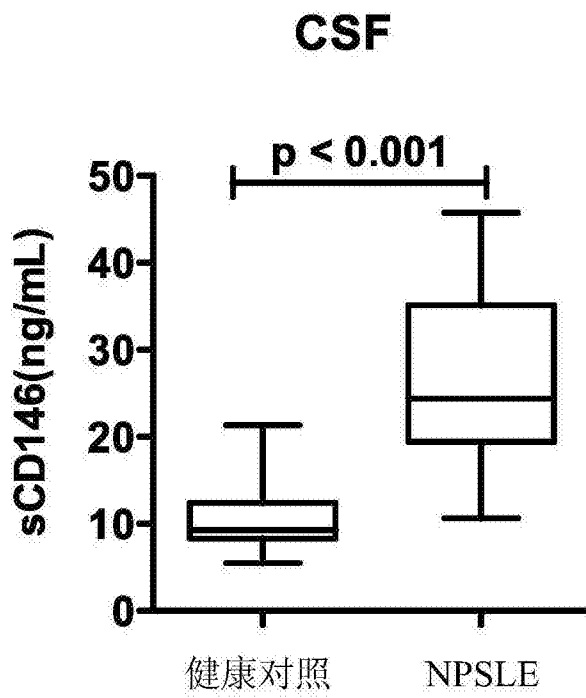


图 1

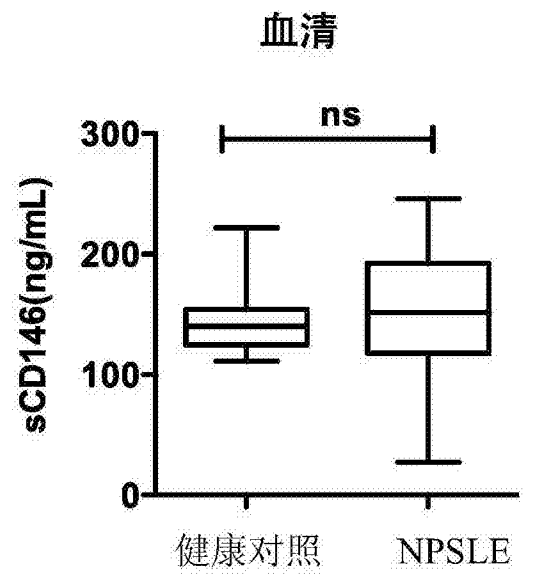


图 2

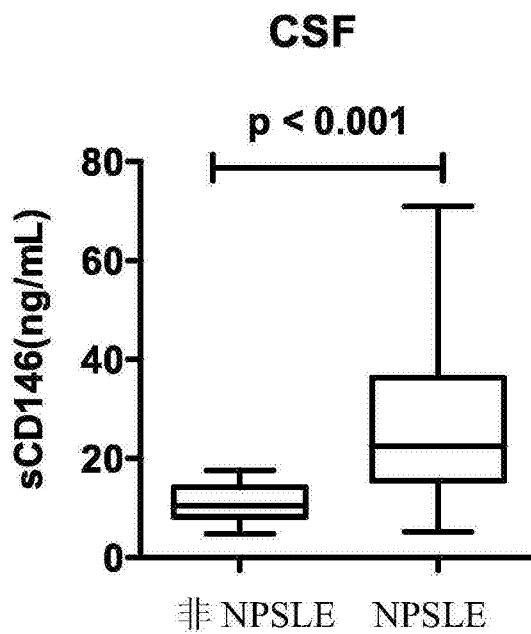


图 3

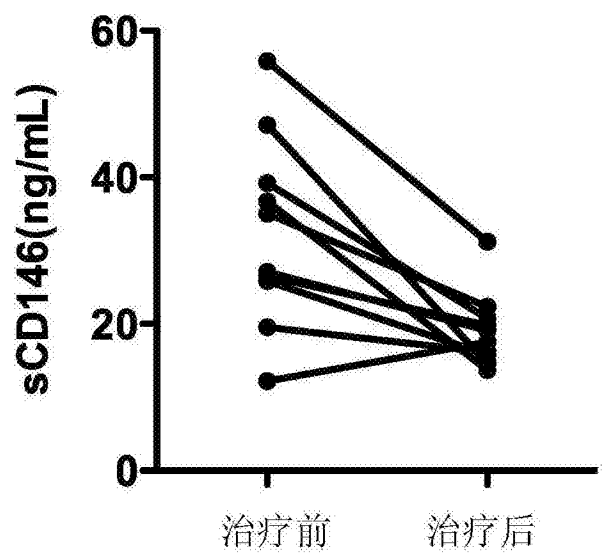


图 4

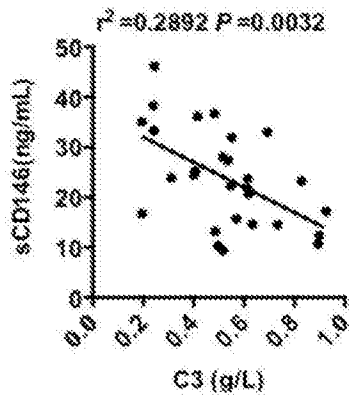


图 5A

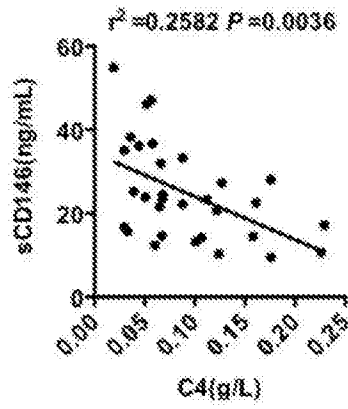


图 5B

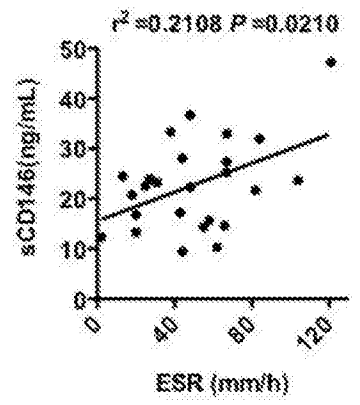


图 5C