

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103460044 A

(43) 申请公布日 2013. 12. 18

(21) 申请号 201280015809. 0

代理人 赵蓉民 张全信

(22) 申请日 2012. 01. 26

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

G01N 33/53(2006. 01)

61/437, 244 2011. 01. 28 US

C07K 14/195(2006. 01)

C07K 16/12(2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2013. 09. 27

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2012/022706 2012. 01. 26

(87) PCT申请的公布数据

W02012/103324 EN 2012. 08. 02

(71) 申请人 免疫科学实验室公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 A·沃佳达尼

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

公司 11245

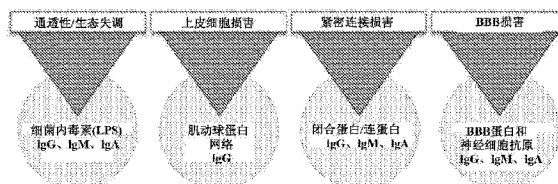
权利要求书3页 说明书18页 附图15页

(54) 发明名称

用于检测肠和血脑屏障通透性的方法及其测试材料

(57) 摘要

本发明公开的是用于测试与肠和 / 或血脑屏障通透性相关的抗原的方法、试验和装置。例如, 血液、唾液或其他体液可针对以下进行测试:(1) 结合至细菌毒素(优选脂多糖), 和(2) 结合至选自(a) 肠相关抗原和(b) 血脑屏障相关抗原中的至少一种的组织抗原。测试结果的分析可用于协助检测和诊断与肠渗漏综合征相关的疾病(由于细胞旁途径或跨细胞途径, 和由于细菌毒素或一些其他原因)和 / 或用于与过度血脑屏障通透性相关的疾病, 其在本文中考虑为包括神经性炎症和 / 或神经性自身免疫性疾病两者, 和特别是肌萎缩性侧索硬化、帕金森病、多发性硬化症、阿尔茨海默氏病或周围神经病和重性抑郁症。



1. 测试来自人的样品的方法,其包括:  
测量源于结合所述样品的第一部分至细菌毒素的第一信号;和  
测量源于结合所述样品的第二部分至天然抗原的第二信号,所述天然抗原选自(a) 肠相关抗原和(b) 血脑屏障相关抗原中的至少一种。
2. 权利要求1所述的方法,其中所述细菌毒素包括脂多糖。
3. 权利要求2所述的方法,其中所述天然肠相关抗原选自:(1) 肠结构蛋白;(2) 紧密连接蛋白;(3) 对所述紧密连接蛋白的结合受体;和(4) 细胞连接蛋白。
4. 权利要求3所述的方法,其中所述血脑屏障相关抗原选自:(1) 血脑屏障蛋白;(2) 胶质细胞原纤维酸性蛋白(GFAP);(3) 基质金属蛋白酶(MMP);(4) 脑 ZOT 结合蛋白;(5) 脑 ZOT 受体;(6) 钙卫蛋白;和(7) 髓鞘碱性蛋白。
5. 权利要求2所述的方法,其中所述肠结构抗原包括肌动蛋白/肌动球蛋白。
6. 权利要求2所述的方法,其中所述紧密连接抗原选自闭合蛋白和连蛋白。
7. 权利要求2所述的方法,其中所述结合受体包括肠 ZOT 受体。
8. 权利要求2所述的方法,其中所述结构蛋白包括基质金属蛋白酶-3(MMP-3)。
9. 权利要求1所述的方法,其中所述血脑屏障相关抗原选自:(1) 血脑屏障蛋白;(2) 胶质细胞原纤维酸性蛋白(GFAP);和(3) 基质金属蛋白酶(MMP)。
10. 诊断与肠渗漏综合征相关的疾病的方法,其包括:  
从实验室定制利用权利要求1所述方法的测试;和  
分析所述测试结果。
11. 诊断与血脑屏障通透性相关的疾病的方法,其包括:  
从实验室定制利用权利要求1所述方法的测试;和  
分析所述测试结果。
12. 测试平板,其具有作为结合肽的下述:(1) 细菌毒素;和(2) 包括(a) 肠相关抗原和(b) 血脑屏障相关抗原中的至少一种的天然抗原。
13. 权利要求12所述的测试平板,其中所述肠相关抗原选自:(1) 肠结构蛋白;(2) 紧密连接蛋白;和(3) 对所述紧密连接蛋白的结合受体;和(4) 细胞连接蛋白;
14. 权利要求13所述的测试平板,其中所述血脑屏障相关抗原选自:(1) 血脑屏障蛋白;(2) 胶质细胞原纤维酸性蛋白(GFAP);(3) 基质金属蛋白酶(MMP);(4) 脑 ZOT 结合蛋白;(5) 脑 ZOT 受体;(6) 钙卫蛋白;和(7) 髓鞘碱性蛋白。
15. 权利要求12所述的测试平板,其中所述血脑屏障相关抗原选自:(1) 血脑屏障蛋白;(2) 胶质细胞原纤维酸性蛋白(GFAP);(3) 基质金属蛋白酶(MMP);(4) 脑 ZOT 结合蛋白;(5) 脑 ZOT 受体;(6) 钙卫蛋白;和(7) 髓鞘碱性蛋白。
16. 协助诊断与解剖学屏障的过度通透性相关的疾病的方法,其包括:  
从抗体测试样板获得测试结果,所述抗体测试样板从结合来自所述患者的样品至细菌毒素和选自(a) 肠相关抗原和(b) 血脑屏障相关抗原中的至少一个的天然抗原而产生信号;和  
分析所述测试结果。
17. 权利要求16所述的方法,其中所述样品为血液样品。
18. 权利要求16所述的方法,其中所述样品为唾液样品。

19. 权利要求 16 所述的方法,其中所述分析所述测试结果的步骤包括在所述测试结果包括 IgA、IgM 和 IgG 中的任一个对脂多糖的细菌毒素的阳性结果,和全部 IgA、IgM 和 IgG 对闭合蛋白和连蛋白的阴性结果,和 IgG 对肌动球蛋白的阴性结果的情况下,认为涉及肠道菌群生态失调的诊断是可能的。

20. 权利要求 16 所述的方法,其中所述分析所述测试结果的步骤包括在所述测试结果包括 IgA、IgM 和 IgG 中的任一个对脂多糖的细菌毒素的阳性结果,和 IgA、IgM 和 IgG 中的任一个对闭合蛋白或连蛋白的阳性结果,和 IgG 对肌动球蛋白的阴性结果的情况下,认为涉及由细菌抗原通过细胞旁途径造成的肠屏障损坏的诊断是可能的。

21. 权利要求 16 所述的方法,其中所述分析所述测试结果的步骤包括在所述测试结果包括全部 IgA、IgM 和 IgG 对脂多糖的细菌毒素的阴性结果,和 IgA、IgM 和 IgG 中的任一个对闭合蛋白或连蛋白的阳性结果,和 IgA 对肌动球蛋白的阴性结果的情况下,认为涉及由非细菌抗原通过细胞旁途径造成的肠屏障损坏的诊断是可能的。

22. 权利要求 16 所述的方法,其中所述分析所述测试结果的步骤包括在所述测试结果包括 IgA、IgM 和 IgG 中的任一个对脂多糖的细菌毒素的阳性结果,和全部 IgA、IgM 和 IgG 对闭合蛋白和连蛋白的阴性结果,和 IgA 对肌动球蛋白的阳性结果的情况下,认为涉及由细菌抗原通过跨细胞途径造成的肠屏障损坏的诊断是可能的。

23. 权利要求 16 所述的方法,其中所述分析所述测试结果的步骤包括在所述测试结果包括 IgA、IgM 和 IgG 中的任一个对脂多糖的细菌毒素的阳性结果,和 IgA、IgM 和 IgG 中的任一个对闭合蛋白和连蛋白的阳性结果, IgA、IgM 和 IgG 中的任一个对血脑屏障蛋白的阳性结果,和 IgA、IgM 和 IgG 中的任一个对神经元抗原的阳性结果的情况下,认为涉及由所述细菌毒素诱导的肠和血脑屏障完整性损坏的诊断是可能的。

24. 权利要求 16 所述的方法,其中所述分析所述测试结果的步骤包括在所述测试结果包括 IgA、IgM 和 IgG 中的每一个对脂多糖的细菌毒素的阴性结果,和 IgA、IgM 和 IgG 中的任一个对闭合蛋白和连蛋白的阳性结果, IgA、IgM 和 IgG 中的任一个对血脑屏障蛋白的阳性结果,和 IgA、IgM 和 IgG 中的任一个对神经元抗原的阳性结果的情况下,认为涉及由非所述细菌毒素的因素造成的肠和血脑屏障完整性损坏的诊断是可能的。

25. 权利要求 16 所述的方法,其中所述分析所述测试结果的步骤包括在所述测试结果包括 IgA、IgM 和 IgG 中的任一个对脂多糖的细菌毒素的阳性结果,和 IgA、IgM 和 IgG 中的每一个对闭合蛋白和连蛋白的阴性结果, IgA、IgM 和 IgG 中的任一个对血脑屏障蛋白的阳性结果,和 IgA、IgM 和 IgG 中的任一个对神经元抗原的阳性结果的情况下,认为涉及肠道菌群生态失调而不损坏肠屏障完整性且损坏血脑屏障完整性的诊断是可能的。

26. 权利要求 16 所述的方法,其中所述分析所述测试结果的步骤包括在所述测试结果包括 IgA、IgM 和 IgG 中的每一个对脂多糖的细菌毒素的阴性结果,和 IgA、IgM 和 IgG 中的每一个对闭合蛋白和连蛋白的阴性结果, IgA、IgM 和 IgG 中的任一个对血脑屏障蛋白的阳性结果,和 IgA、IgM 和 IgG 中的任一个对神经元抗原的阳性结果的情况下,认为涉及损坏血脑屏障完整性、神经性炎症和神经性自身免疫而不与肠屏障或肠道菌群生态失调相关的诊断是可能的。

27. 权利要求 16 所述的方法,其中所述分析所述测试结果的步骤包括在所述测试结果包括 IgA、IgM 和 IgG 中的任一个对血脑屏障蛋白的阳性结果,和 IgA、IgM 和 IgG 中的任一

个对神经元抗原的阳性结果的情况下,认为肌萎缩性侧索硬化、帕金森病、多发性硬化症、阿尔茨海默氏病或周围神经病和重性抑郁症之一的诊断是可能的。

## 用于检测肠和血脑屏障通透性的方法及其测试材料

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求于 2011 年 1 月 28 日提交的美国临时申请号 61/437, 244 的权益, 其在此通过引用全文并入。

### 技术领域

[0003] 本发明涉及帮助检测和诊断肠和血脑屏障通透性的方法、试验和试剂盒。

### 背景技术

[0004] 与人体中的其他细胞器相比, 肠上皮细胞被暴露于巨大数量的源于摄入食物、酵母、细菌和病毒的抗原。这些细菌抗原中的一些对粘膜免疫系统不产生威胁, 而其他可对宿主有害。肠免疫系统通过允许少量分子渗透上皮——在那里, 它们与粘膜和全身免疫系统相互作用, 以便产生对这些抗原的调节的 T-细胞功能或耐受——而监测肠腔中的这些细菌抗原。然而, 肠免疫系统对这些细菌抗原的不恰当或过度暴露可引起该调节机制损坏并导致胃肠疾病 (1)。因此, 抗原摄取的生理学的理解是了解包括炎性和自身免疫反应的疾病的发病机理的中心 (2)。

[0005] 本文讨论的这些和所有其他外部材料在此通过引用全文并入。在并入的参考文献中的术语的定义或使用与本文提供的该术语的定义不一致或相反的情况下, 应用本文提供的该术语的定义, 并不应用在参考文献中的该术语的定义。

[0006] 增加的肠通透性被认为是先于数种自身免疫性疾病开始前的早期阶段 (3-6)。因为该原因, 最近已经对肠屏障功能障碍在以 GI 道以及包括神经系统的肠外器官为目标的很多病理学条件的发病机理中的作用兴趣增加 (7)。作为对炎症、自身免疫和癌症的生物学门口 (biological doorway) 的肠屏障功能的该失调在 Fasano 的评论文章 (7) 中进行讨论。在该评论文章以及早期 Fasano 文章 (4) 中, Fasano 强调胃肠道的主要功能在传统上已经被理解为限于营养物的消化和吸收, 以及限于电解质类和水稳态。然而, 胃肠道的解剖和功能性布置的更吸引人的分析提示该器官的另一个极其重要的功能为它通过屏障机制调节环境和宿主之间大分子运输的能力。肠上皮屏障和它的细胞间紧密连接, 与肠相关淋巴组织和神经内分泌网络一起, 控制对非自身抗原的耐受和免疫之间的平衡。

[0007] 连蛋白/闭合蛋白为细胞旁紧密连接 (paracellular tight junction) 的生理调节器, 其涉及大分子运输并因此涉及免疫应答和耐受之间的平衡 (7)。当精确调整的肠屏障蛋白在那些在遗传上对环境因素敏感的个体中失调时, 出现肠疾病诸如腹部疾病、克罗恩氏病和溃疡性结肠炎, 和肠外自身免疫性疾病诸如关节炎、狼疮、甲状腺炎、糖尿病和甚至多发性硬化症 (MS)、恶性肿瘤和重度抑郁症 (8-14) 两者的可能性。可有助于肠和脑屏障功能障碍的病理生理学并因此涉及肠和肠外自身免疫的主要的环境因素之一为细菌脂多糖 (LPS)。由于肠小生物群生态失调和细菌异位, LPS 明显是造成上皮细胞上 toll 样受体活化和首先导致肠屏障并随后血脑屏障功能障碍的炎性级联反应活化的原因 (14)。LPS 在诱导“肠渗漏 (leaky gut)”和“脑渗漏 (leaky brain)”综合征中的作用显示在图 1 中。

[0008] 图 1 强调 GI 道异常可损害肠屏障的完整性并增加未消化的抗原进入循环,因此攻击免疫系统。对这些抗原的反应激活免疫和炎症级联反应,导致产生促炎性细胞因子、抗体阵列和增加的肠屏障通透性(或“肠渗漏”综合征)。如果肠屏障机能障碍保持未处理,则结果可为神经性炎症、神经侵染(neuroinvasion)和神经变性。

[0009] 因此,需要对可攻击免疫系统,诱导可首先导致打开血脑屏障,然后是之后的神经性炎症和神经变性的炎症(15-25)的大抗原分子的肠通透性进行测量的非侵入的方法、装置和试验。这些需要和其他需要由本发明满足。

## 发明内容

[0010] 本发明的发明主题提供了装置、系统、试验和方法,其中可测试来自人类的样品,以协助检测和诊断肠和/或血脑屏障通透性。

[0011] 在本发明的一些方面中,样品的一个或多个部分针对以下进行测试:(1) 结合至细菌毒素,和(2) 结合至选自(a) 肠相关抗原和(b) 血脑屏障相关抗原中的至少一种的天然抗原。在一些方面中,细菌毒素可有利地包括脂多糖。

[0012] 当测试肠通透性时,天然肠相关抗原优选地选自:(1) 肠结构蛋白;(2) 紧密连接蛋白;(3) 对紧密连接蛋白的结合受体;和(4) 细胞连接蛋白。在本发明的一些方面的实例中,对肌动蛋白/肌动球蛋白、闭合蛋白和/或连蛋白、肠 ZOT 受体和基质金属蛋白酶-3(MMP-3) 中的一个或多个的抗体,进行测试。

[0013] 当测试血脑屏障通透性时,血脑屏障相关抗原优选地选自:(1) 血脑屏障蛋白;(2) 胶质细胞原纤维酸性蛋白(GFAP);(3) 基质金属蛋白酶(MMP), (4) 脑 ZOT 结合蛋白;(5) 脑 ZOT 受体;(6) 钙卫蛋白;和(7) 髓鞘碱性蛋白。在本发明的一些方面的实施例中,对(1) 血脑屏障蛋白;(2) 胶质细胞原纤维酸性蛋白(GFAP);和(3) 基质金属蛋白酶(MMP) 中的一个或多个的抗体,进行测试。

[0014] 根据诊断观点,来自先前描述的方法中的一个或多个的测试结果的分析可用于协助与肠渗漏综合征和/或过度血脑屏障通透性相关的疾病的检测和/或诊断。

[0015] 在本发明的一些方面中,可利用免疫测定,包括但不限于 ELISA 测定、RIA 测定、乳胶凝集反应、珠测定、蛋白质组测定和其他本领域技术人员已知的免疫测定实施结合至各自成分的样品的检测。

[0016] 在本发明的一些方面中,也可提供用于进行免疫测定的测试平板和试剂盒,其包括例如改进的测试平板,其具有作为结合肽的下述:(1) 细菌毒素;和(2) 包括(a) 肠相关抗原和(b) 血液天然脑屏障相关抗原中的至少一种的天然抗原。

[0017] 在用于协助检测和诊断或以其他方式鉴定与肠渗漏综合征有关的疾病的特别优选的测试平板中,肠相关抗原可有利地选自:(1) 肠结构蛋白;(2) 紧密连接蛋白;(3) 对紧密连接蛋白的结合受体;和(4) 细胞连接蛋白。

[0018] 在用于诊断或以其他方式鉴定与过度血脑屏障通透性相关的疾病的特别优选的测试平板中,血脑屏障相关抗原可有利地选自:(1) 血脑屏障蛋白;(2) 胶质细胞原纤维酸性蛋白(GFAP);(3) 基质金属蛋白酶(MMP);(4) 脑 ZOT 结合蛋白;(5) 脑 ZOT 受体;(6) 钙卫蛋白;和(7) 髓鞘碱性蛋白。

[0019] 考虑到测试试剂盒可包括共同测试第一组与肠渗漏综合征相关的抗原和第二组

与过度血脑屏障通透性相关的抗原两者的一个或多个平板。

[0020] 根据更普遍的观点,本文考虑的用于协助检测和诊断与解剖学屏障的过度通透性相关的疾病的方法和装置,包括:从抗体测试样板获得和分析测试结果,所述样板从结合来自患者的样品至细菌毒素和选自(a)肠相关抗原和(b)血液天然脑屏障相关抗原中的至少一种的天然抗原而产生信号。

[0021] 在所有这些考虑的方法和装置中,样品可包括任何合适的身体样品,包括例如全血样品、血清/多血清样品、唾液样品或来自其他体液的样品。

[0022] 还要进一步考虑的是本文考虑的方法和装置可用于协助鉴别诊断涉及(1)肠道菌群生态失调,和(2)肠屏障损坏的疾病。例如,如目前考虑的,当测试结果包括IgA、IgM和IgG中的任一个对脂多糖的细菌毒素的阳性结果,和全部IgA、IgM和IgG对闭合蛋白和连蛋白的阴性结果,和IgG对肌动球蛋白的阴性结果时,将趋向于指示涉及肠道菌群生态失调的诊断。

[0023] 也考虑通过区分由于细胞旁途径(paracellular pathway)和跨细胞途径的肠屏障损坏而协助鉴别诊断。

[0024] 关于通过细胞旁途径的损坏,当测试结果包括IgA、IgM和IgG中的任一个对脂多糖的细菌毒素的阳性结果,和IgA、IgM和IgG中的任一个对闭合蛋白或连蛋白的阳性结果,和IgG对肌动球蛋白的阴性结果时,将趋向于指示涉及通过细菌抗原造成肠屏障损坏的诊断。相比之下,当测试结果包括全部IgA、IgM和IgG对脂多糖的细菌毒素的阴性结果,和IgA、IgM和IgG中的任一个对闭合蛋白或连蛋白的阳性结果,和IgG对肌动球蛋白的阴性结果时,将趋向于指示涉及非通过细菌抗原造成肠屏障损坏的诊断。

[0025] 关于通过跨细胞途径的损坏,当测试结果包括IgA、IgM和IgG中的任一个对脂多糖的细菌毒素的阳性结果,和全部IgA、IgM和IgG对闭合蛋白和连蛋白的阴性结果,和IgG对肌动球蛋白的阳性结果时,将趋向于指示涉及通过细菌抗原造成肠屏障损坏的诊断。

[0026] 也根据本文讨论的发现,在测试结果包括IgA、IgM和IgG中的任一个对脂多糖的细菌毒素的阳性结果,和IgA、IgM和IgG中的任一个对闭合蛋白和连蛋白的阳性结果,IgA、IgM和IgG中的任一个对血脑屏障蛋白的阳性结果,和IgA、IgM和IgG中的任一个对神经元抗原的阳性结果的情况下,将趋向于指示涉及由细菌毒素诱导的肠和血脑屏障完整性两者损坏的诊断。

[0027] 相比之下,在测试结果包括IgA、IgM和IgG中的每一个对脂多糖的细菌毒素的阴性结果,和IgA、IgM和IgG中的任一个对闭合蛋白和连蛋白的阳性结果,IgA、IgM和IgG中的任一个对血脑屏障蛋白的阳性结果,和IgA、IgM和IgG中的任一个对神经元抗原的阳性结果的情况下,涉及由非细菌毒素的因素诱导的肠和血脑屏障完整性两者损坏的诊断是可能的。

[0028] 还要进一步考虑的是可发生肠道菌群生态失调而不损坏肠屏障完整性,但损坏血脑屏障完整性。例如,在测试结果包括IgA、IgM和IgG中的任一个对脂多糖的细菌毒素的阳性结果,和IgA、IgM和IgG中的每一个对闭合蛋白和连蛋白的阴性结果,IgA、IgM和IgG中的任一个对血脑屏障蛋白的阳性结果,和IgA、IgM和IgG中的任一个对神经元抗原的阳性结果的情况下,可趋向于指示涉及在那种情况下肠道菌群生态失调的诊断。

[0029] 类似地,在测试结果包括IgA、IgM和IgG中的每一个对脂多糖的细菌毒素的阴性

结果,和 IgA、IgM 和 IgG 中的每一个对闭合蛋白和连蛋白的阴性结果, IgA、IgM 和 IgG 中的任一个对血脑屏障蛋白的阳性结果,和 IgA、IgM 和 IgG 中的任一个对神经元抗原的阳性结果的情况下,涉及损坏血脑屏障完整性、神经性炎症和神经性自身免疫,而不与肠屏障或肠道菌群生态失调相关的诊断是可能的。

[0030] 关于具体的疾病,本文考虑的测试结果的分析可用于协助检测和诊断肌萎缩性侧索硬化、帕金森病、多发性硬化症、阿尔茨海默氏病、或周围神经病和重性抑郁症。在测试结果包括 IgA、IgM 和 IgG 中的任一个对血脑屏障蛋白的阳性结果,和 IgA、IgM 和 IgG 中的任一个对神经元抗原的阳性结果的情况下,这样的病症被认为是可能的。

[0031] 本发明的发明主题的多种对象、特征、方面和优点将根据以下优选实施方式的详细描述,连同附图和表变得更加显而易见。

### 附图说明

[0032] 图 1 为现有技术图,其显示了 LPS 在肠渗漏和脑渗漏综合征诱导中的目前理解的作用。

[0033] 图 2 为现有技术图,其显示了在炎性和神经免疫性疾病的发病机理中 LPS 诱导炎症和 Th17 淋巴细胞活化的目前理解的作用:LPS' 诱导炎症应答、产生细胞因子和增加循环中 Th17 阳性细胞的数量。

[0034] 图 3 为现有技术图,其显示了肠对脑功能障碍的目前理解的病因学——如果未处理,粘膜耐受的损失可怎样引发诱导肠屏障功能障碍、全身炎症、神经性炎症、神经侵染和神经变性的级联反应。

[0035] 图 4 为显示本发明提出的方案的图,其中涉及异常肠通透性和血脑通透性的引发物和机制可用于肠通透性鉴定 (IPI) 和 / 或血脑通透性鉴定 (BBPI) 的下一代测试。

[0036] 图 5 为显示根据本发明的一些方面的异常肠通透性在自身免疫性疾病的发病机理中提出的作用的图。

[0037] 图 6 为显示根据本发明的一些方面的用于进行免疫测定的样品微量滴定板布局的图,该微量滴定板具有含 12 种不同抗原和肽的 12 个不同排。

[0038] 图 7 为显示根据本发明的一些方面的样品微量滴定板布局的图,其中针对来自肠和 BBB 蛋白以及相关组织抗原的 12 种不同的抗原或肽(结合的抗原和肽是透明的)测量 IgG/IgM/IgA。

[0039] 图 8 为显示根据本发明的一些方面的样品微量滴定板布局的图,其中为了质量控制目的,每周利用阴性和阳性对照测量 IgG/IgM/IgA(结合的抗原和肽是透明的)。

[0040] 图 9 为显示 IgG、IgM 和 IgA 抵抗健康捐献者和具有胃部自身免疫的患者的细菌脂多糖和闭合蛋白 / 连蛋白的比較的图。抵抗健康捐献者的细菌脂多糖的 IgG、IgM、IgA 和 IgG+IgM+IgG 的升高百分比以左边图中的浅色条块中显示,和具有高于平均值两个标准差的胃部自身免疫的患者以左边图中的深色条块显示。抵抗健康捐献者中的闭合蛋白 / 连蛋白的 IgG、IgM、IgA 和 IgG+IgM+IgG 的升高百分比以右边图中的浅色条块显示,和具有高于平均值两个标准差的胃部自身免疫的患者以右边图中的深色条块显示。

[0041] 表 1 根据本发明的一些方面显示了针对代表第一组的三个健康对象(样品 1-3)的环境因素(LPS)、肠和 BBB 蛋白以及相关抗原的 12 种不同抗原而测试的 IgG、IgM 和 IgA

抗体水平。

[0042] 表 2 根据本发明的一些方面显示了针对代表第二组的三个健康对象（样品 4-6）的环境因素（LPS）、肠和 BBB 蛋白以及相关抗原的 12 种不同抗原而测试的 IgG、IgM 和 IgA 抗体水平。

[0043] 表 3 根据本发明的一些方面显示了针对代表第三组的三个健康对象（样品 7-9）的环境因素（LPS）、肠和 BBB 蛋白以及相关抗原的 12 种不同抗原而测试的 IgG、IgM 和 IgA 抗体水平。

[0044] 表 4 根据本发明的一些方面显示了针对代表具有腹部疾病和肠通透性的三位患者（样品 10-12）的环境因素（LPS）、肠和 BBB 蛋白以及相关抗原的 12 种不同抗原而测试的 IgG、IgM 和 IgA 抗体水平。

[0045] 表 5 根据本发明的一些方面显示了针对代表具有谷蛋白共济失调（gluten ataxia）的三位患者（样品 13-15）的环境因素（LPS）、肠和 BBB 蛋白以及相关抗原的 12 种不同抗原而测试的 IgG、IgM 和 IgA 抗体水平。

[0046] 表 6 根据本发明的一些方面显示了针对代表具有多发性硬化症（MS）的三位患者（样品 16-18）的环境因素（LPS）、肠和 BBB 蛋白以及相关抗原的 12 种不同抗原而测试的 IgG、IgM 和 IgA 抗体水平。

[0047] 表 7 根据本发明的一些方面显示了抵抗血液中 LPS、闭合蛋白 / 连蛋白和肌动球蛋白网络的一些抗体的临床说明。

[0048] 表 8 根据本发明的一些方面显示了抵抗口液中 LPS、闭合蛋白 / 连蛋白和肌动球蛋白的升高水平的一些抗体的临床说明。

[0049] 表 9 根据本发明的一些方面显示了抵抗血液中 LPS、闭合蛋白 / 连蛋白、血脑屏障蛋白和神经元抗原的升高水平的一些抗体的临床说明。

[0050] 附图详述

[0051] 抗原摄取增加是疾病发展的先决条件。已知很多病症都增加肠的通透性并因此增加抗原摄取。有可能自腔摄取免疫原性分子或抗原可导致免疫介导的活性，在肠内以 IgA 和 IgM 的形式，和在肠外产生抗原特异性的 IgA、IgM、IgG 和免疫复合物（26、27）。

[0052] I. 细菌毒素和炎性细胞因子对血脑屏障破裂和神经性炎症的诱导的作用

[0053] 血脑屏障（BBB）保持中枢神经系统的内部环境和稳定性。对 BBB 的结构和功能性的改变可导致自身免疫性疾病，特别是神经自身免疫性疾病诸如多发性硬化症（28）。

[0054] BBB 分离血液白细胞，其正常地响应来自脑实质的坏死性伤害，在脑实质中，坏死性细胞死亡可响应环境因素诸如感染、毒素、兴奋性中毒或创伤而发生（23）。BBB 由两层组成。第一层由微管内皮细胞组成，其具有大量紧密连接，与肠上皮细胞的结构类似（24、28）。第二层为胶质界膜，其由胶质足突形成（29）。内皮细胞和星形胶质细胞之间的血管周围间隙由巨噬细胞填充（populate），其表现得像未成熟的树突细胞（29）。因此，能够打开上皮 TJ 屏障的因素能够破坏 BBB 和神经元组织两者（30-33）。这包括细菌内毒素，促炎性细胞因子，酶和效应细胞 Th1、Th17，其对中枢神经系统炎症是必不可少的（29、34-35）。

[0055] 确信由内毒素、细胞因子、趋化因子、粘着分子和其他产生的 BBB 破裂，和自体反应性 T- 细胞从全身区室（compartment）进入中枢神经系统的运输，对 MS 损害的发展起到重要作用（36-38）。然而，当在人 Th1 对 Th17 淋巴细胞之间进行比较时，与 Th1 淋巴细胞相

比,人 Th17 淋巴细胞更快地迁移穿过 BBB。确实,大量表达 IL-17<sup>-</sup> 和 IL-22 的 CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> 记忆淋巴细胞在它们迁移穿过 BBB 后,表达了 IL-17<sup>+</sup> 和 IL-22<sup>+</sup> 标记,其证实了 Th17 淋巴细胞在体外和体内穿过 BBB 的能力 (35)。BBB 内皮细胞表达 IL-17R 和 IL-22R,其由 Th17 淋巴细胞使用,以浸润 BBB 内皮细胞 (ECS)。当 IL-17 和 IL-22 被添加至单层人 BBB-ECS 时,显著增强了细胞或抗原诸如牛血清白蛋白 (BSA)——一种大分子——穿过 BBB 的扩散。BBB-ECS 的该增强的通透性与闭合蛋白和连蛋白——两种重要的紧密连接蛋白——表达的降低有相关性 (39)。

[0056] 这些结果强烈提示由 LPS 和引起血脑屏障内皮细胞上 IL-17 和 IL-22 受体的 Th17 淋巴细胞表达的活化的其他细菌毒素诱导的炎症导致 Th17 结合至 BBB 紧密连接。这破裂了紧密连接,导致 Th17 和自体反应性 T 细胞穿过 BBB 的变移,通过 Th17 的粒酶 -B 的释放,和通过 CD4 细胞的干扰素 - $\gamma$  的释放,这产生神经元细胞破坏,释放神经元细胞抗原和 BBB 蛋白进入循环 (通过 IL-17 和 IL-22 的作用共表达 IL-17、IL-22 和粒酶 B 的细胞) 在 BBB 的诱导和破坏以及 BBB 对循环的 CD4<sup>+</sup> 淋巴细胞和导致 CNS 炎症的可溶分子的透化作用中起到重要作用 (40-44)。Th17 淋巴细胞在炎性和神经免疫学疾病的发病机理中的作用显示在图 2 中。基于该作用机制,肠通透性的细菌毒素诱导和 BBB 蛋白结构的破裂可导致不仅抵抗 LPS 而且抵抗紧密连接蛋白和 BBB 蛋白的抗体产生。因此,根据本发明的一些方面的处理 (tackle) 神经性炎症的步骤开始于测试 LPS、闭合蛋白、密蛋白、BBB 蛋白、紧密连接蛋白、酶诸如基质金属蛋白酶和相关受体抗体,基于其,临床医生可计划修复胃肠屏障机能障碍,随后是抑制全身炎症并以恢复血脑屏障结束。

[0057] 血脑屏障内皮细胞上 IL-17 和 IL-22 受体的表达导致 Th17 细胞结合至 BBB 紧密连接。这破裂了紧密连接,导致自体反应性 CD4 细胞和神经变性。Th17 细胞随后变移通过 BBB,使处于通过释放粒酶 B 杀死神经元的阶段。该神经细胞抗原的释放导致神经性自身免疫和神经变性的恶性循环。

[0058] 基于这里提出的信息,假定肠是很多神经变性疾病的起点。它以释放丰富量的脂多糖 (LPS) 的不均衡小生物群开始。大量 LPS 内毒素诱导促炎性细胞因子 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  的上调,导致 TJ 和它们的蛋白——包括闭合蛋白和连蛋白——的降解或分离。随后是行进至 BBB 的血流中的炎症。该炎症打开 BBB,引起神经 - 浸润、神经性炎症、神经性自身免疫和最终神经变性。图 3 代表了导致神经变性的病理生理学;如果不解决人的肠屏障机能障碍,则人随时间可患神经性炎症和可能的神经变性。很多自身免疫性疾病具有多个引发物 (trigger)、症状和系统机能障碍。在神经性自身免疫的情况下,其中很多个体产生对 LPS、TJ 和对 BBB 蛋白的高水平的抗体,包括免疫和神经系统。这两个系统的共同点为 GI 道,已经论述了其重要性 (43)。

[0059] 因此,在本发明的一些方面中,抵抗 TJ 蛋白诸如闭合蛋白、细菌内毒素诸如 LPS 和 BBB 蛋白的抗体的检测和测量是最好的方式,其不仅估计 GI 和肠屏障完整性,而且确定和/或诊断全身炎症、神经性炎症、神经侵染和神经变性的根本原因。同时,必须迅速修复肠上皮的任何损害。否则,这将允许膳食蛋白、共生性和病原菌渗透入循环,驱动将导致复杂的自身免疫和神经免疫性疾病的炎性级联反应。

[0060] II. 小糖对大抗原分子的通透性的测量

[0061] 目前用于估计肠通透性的方法使用乳酮糖和甘露醇。在过去的 40 年中,它已经成

为有用的临床工具。乳酮糖吸收提示肠屏障的撕裂,和因此提示肠通透性。与普遍的观念相反,该小分子的吸收实际上指示微小渗漏而不是撕裂。乳酮糖具有相对低的分子大小,和该物质通过肠膜的转移不反映食物或其他蛋白的转移,以及针对它们的免疫应答的情况。此外,乳酮糖 / 甘露醇测试测量了仅小分子转移通过细胞旁途径而不通过跨细胞途径。

[0062] 因此,大分子肠通透性鉴定 (LMIPI) 应利用大分子诸如细菌内毒素 (与食物蛋白的大小相当) 进行估计,所述大分子为抗原性的并攻击免疫系统。此外,关于 BBB 通透性,尽管数个证据系已经显示 BBB 通透性的变化是 MS 和实验性自身免疫脑脊髓炎 (EAE) 的主要开始因素 (45-50),但目前没有用于测量 BBB 通透性的公认的血液测试。然而,在动物模型中,已经通过利用连蛋白 / 闭合蛋白测量屏障损害损伤,证明 BBB 中的形态学和功能变化 (7、11、28)。

[0063] 如图 4 所示,本发明的方法的重点是具有抗原性的大分子,并且在它们从屏障释放后,其具有攻击免疫系统的能力,导致产生抵抗它们的特异性的 IgG、IgM 和 / 或 IgA 抗体,所述抗体在血液、血清和 / 或唾液样品中进行检测。

[0064] 对大抗原性分子诸如细菌内毒素和膳食蛋白的肠屏障通透性的估计在理解胃肠和自身免疫性疾病的发病机理中变得重要。科学证据指示很多胃肠和自身免疫性疾病通过增加的来自需氧和厌氧细菌的内毒素和其他细菌毒素通过肠壁的异位来完成 (7, 51-55)。该增加的异位和与它相关的炎症可诱导紧密连接蛋白的降解和随后针对紧密连接蛋白诸如闭合蛋白 / 连蛋白和细菌内毒素诸如 LPS 的免疫应答。的确地,暴露于细菌毒素或麦醇溶蛋白的大鼠和人上皮细胞分泌显著量的连蛋白。该连蛋白释放之后是蛋白 ZO-1 与紧密连接复合体的脱离,这产生通过细胞旁途径的肠通透性 (7、51)。并且,很多慢性病症通过抵抗 LPS 和病原菌的其他抗原的 IgA 和 IgM 的血清水平的增加来完成 (24、25)。这些病症引起肠炎症和粘膜屏障通透性,由此在肠壁细胞之间扩大的间隙和紧密连接蛋白的解离可诱导肌动球蛋白网络和保护性屏障的损失。该保护性屏障的损失可增加细菌异位并因此提高血清内毒素、紧密连接蛋白和肌动球蛋白的浓度。

[0065] 根据本发明的一些方面,抵抗 LPS、紧密连接蛋白 (闭合蛋白 / 连蛋白) 和肌动球蛋白的增加的血清 IgA 和 IgM 指示存在肠屏障通透性和运输大分子穿过屏障。细菌的内毒素可通过用作对 T 淋巴细胞的超抗原的细菌毒素,或通过被称为分子拟态的机制引起自身免疫。很多细菌具有非常类似于人组织抗原——包括神经元组织——的抗原性位点。如果肠屏障通透性保持非检查,则随后是抗原的炎性级联反应和抵抗它们而产生的抗体将进入变成多种组织,并首先引发炎症和随后引发自身免疫——包括神经性自身免疫。因此,如果允许抗原性肠屏障通透性任其发展,则继续变性可引发全身炎症,随后是诱导抗原性的和细胞的血脑屏障通透性,带来导致神经性炎症、神经侵染和神经变性的伴随的额外免疫反应。

[0066] 因此,根据本发明的一些方面,应通过测量抵抗细菌 LPS、紧密连接蛋白和肌动球蛋白的 IgA、IgG 和 / 或 IgM,针对对大抗原性分子的增加的肠通透性的存在,检查具有慢性炎性和自身免疫性疾病的患者。最终,除了测量抵抗 LPS 和闭合蛋白 / 连蛋白的 IgA、IgG 和 / 或 IgM 抗体,这些抗体也应针对具有神经免疫性疾病的患者的 BBB 蛋白、酶、相关受体和神经元抗原进行测量。在图 5 中说明了该通过细菌毒素 TJ 降解和产生抵抗释放的 TJ 蛋白、LPS 和其他细菌抗原的抗体的多步骤方法,其产生导致组织损害和自身免疫。

[0067] 根据本发明的一些方面,抵抗 TJ 蛋白和 LPS 的口液中的 IgA 和 IgM 和血液中 IgG、IgM 和 IgA 的检测和测量将为用于估计肠屏障功能的最好试验,同时 LPS、闭合蛋白 / 连蛋白和其他紧密连接蛋白,加上血液中的 BBB 蛋白和神经细胞抗体 (IgG、IgM 和 IgA) 的检测和测量将为用于估计肠 /BBB 通透性和神经性自身免疫的最好方法。

[0068] 细菌抗原 (LPS) 诱导紧密连接降解和连蛋白释放,引起打开紧密连接和闭合蛋白和 LPS 通过紧密连和随后迁移入粘膜下层,在那里闭合蛋白和 LPS 呈递至巨噬细胞和树突细胞。巨噬细胞将这些抗原呈递至 T 和 B 细胞;这之后为异常免疫应答,两者为体液的 (抵抗闭合蛋白和 LPS 的 IgA、IgM 和 IgG 抗体) 和细胞 - 介导的。体液的免疫和细胞 - 介导的免疫之间的该相互作用是最终造成以肠上皮和其他组织抗原为目标的自身免疫过程的原因,导致以自身免疫性疾病为代表的组织损害。

[0069] 以下是对于一些测试患者的试验和它们的使用和分析的示例性描述。尽管类似于或等同于本文描述的这些的其他材料和方法可用于本发明的实践或测试,但现在,在试验的示例性描述中描述优选的方法和材料,以进一步根据一些方面说明本发明。

#### [0070] ELISA 测定

##### [0071] A. 材料和方法——平板和样品制备:

[0072] 从 Sigma-Aldrich, ST.Louis, MO 购买来自大肠杆菌 (*E. coli*)055:85、大肠杆菌 K-235、绿脓假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*)、肠炎沙门氏菌 (*Salmonella enteritidis*)、鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*)、肺炎克雷伯氏杆菌 (*Klebsiella pneumonia*)、摩氏摩根菌 (*Morganella morganii*)、蜂房哈夫尼菌 (*Hafnia alvei*)、克氏柠檬酸杆菌 (*Citrobacter koseri*) 的脂多糖,肌动蛋白,肌球蛋白,髓鞘碱性蛋白和  $\alpha$ -B 晶体蛋白。胶质细胞原纤维酸性蛋白 (GFAP) 从 Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN 购买。同时使用的是连蛋白肽 1、2、3、肠 ZOT 受体、髓鞘碱性蛋白肽 87-106、细胞连接蛋白、基质金属蛋白酶 -3、在该研究中被命名的 S100-B 的钙结合区、BBB-1 MSELEKAMVA LIDVFHQYSG REGDKHKLKK、BBB-2 SELKELINNE LSHFLEEIKE QEVVDKVMET、BBB-3 LDNDGDGEC D FQEFMAFVAM VTTACHEFFE HE、脑 ZOT 结合蛋白 -1、-2、钙卫蛋白 (MRP-8) 和脑 ZOT 受体。

[0073] 具有大于 90% 纯度的所有 HPLC 级肽由 EZ Biolab of Carmel, IN 合成。在该申请中,除非上下文指定相反,则本文说明的所有范围应被解释为包括它们的端点,和开放端范围应被解释为包括商业上的实践值。类似地,所有的数值列表都应被考虑为包括中间值,除非上下文指示相反。

[0074] 将抗原和肽以浓度 1.0mg/mL 溶解在甲醇中,随后以 1:100 在 0.1M 碳酸盐 - 重碳酸盐缓冲液中稀释, pH9.5, 并且将 50  $\mu$ l 添加至聚苯乙烯平底 ELISA 平板的每个孔,如图 6 所示。

[0075] 平板在 4°C 下温育过夜,并随后用含 0.05% 吐温 20 的 200  $\mu$ l Tris- 缓冲盐水 (TBS) (pH7.4) 清洗三次。通过在 TBS 中添加 200mL 的 2% 牛血清白蛋白 (BSA) 防止免疫球蛋白的非特异性结合,并将其在 4°C 下温育过夜。清洗平板并在质量中心 (QC) 后保持在 4°C 直到使用。

[0076] 酶交联物包括:亲和纯化抗体磷酸酶标记的山羊抗 - 人 IgG (Jackson ImmunoResearch, Cat#109-055-008);亲和纯化抗体磷酸酶标记的山羊抗 - 人 IgA (Jackson

ImmunoResearch, Cat#109-055-011) ; 和亲和纯化抗体磷酸酶标记的山羊抗 - 人 IgM(Jackson ImmunoResearch, Cat. #109-055-043)。

[0077] 如本文进一步描述的, 包括在方法中的其他额外的试剂和材料包括: 磷酸盐 - 缓冲盐水粉末 (Sigma, Cat#P3813-10PAK)、牛血清白蛋白 (Biocell, Cat#3203-00)、叠氮化钠 (Sigma, Cat#S-2002)、吐温 20(Sigma, Cat#P1379-1000ML)、甘油 (Sigma, Cat#G5516-500ML)、氢氧化钠 (Sigma, Cat#S-5881)、氯化镁 (Sigma, Cat#8266)、二乙醇胺 (Sigma, Cat#D-8885)、1.0N 盐酸溶液 (Sigma, Cat#H3162-1GA)、5mg 底物片剂:p-NPP(磷酸对硝基苯酯) (Sigma, Cat#S-0942) 和蒸馏水 (D. H<sub>2</sub>O)。

[0078] 微孔平板被制备并包被有 12 种不同的肠 - 脑 - 相关抗原或肽, 如图 6 所示。校准物 (calibrator) 和阳性对照以及稀释的患者样品被添加至孔, 并且识别不同抗原的自身抗体在第一温育期间结合。在清洗孔以去除所有的未结合蛋白后, 纯化的碱性磷酸酶标记的兔抗 - 人 IgG/IgM/IgA 的未结合交联物通过进一步的清洗步骤去除。

[0079] 结合的交联物利用磷酸对硝基苯酯 (PNPP) 底物可视化, 其给出了黄色反应产物, 其强度与样品中的自身抗体浓度成比例。氢氧化钠被添加至每个孔, 以停止反应。在 405nm 下读出颜色强度。

[0080] 川红 (plain red) 顶或虎皮红 (red tiger) 顶 (SST 管) 用于样本收集, 尽管在一些方面中, 对于该试验考虑其他样本收集装置。

[0081] 血液样品利用无菌静脉穿刺技术收集, 并且血清利用标准程序获得。在一些方面中, 优选最少 100 微升的血清用于试验, 其因此对应于大约 1ml 或更多的血液。

#### [0082] B. 测试试验程序

[0083] 现在讨论用于抵抗 LPS、肠和 / 或 BBB 蛋白的 IgG、IgM 和 / 或 IgA 抗体的分析程序。在一些方面中, 允许所有试剂在测试试验开始前达到室温。测试试验程序包括制备具有期望数量和类型的抗原和 / 或肽的期望数量的包被孔或平板。一旦制备微量滴定孔, 则大约 100  $\mu$  l 的 1:100 稀释的对照校准物被添加至微量滴定板的 A 和 B 排, 如图 7 所示, 其可利用多通道移液管进行。大约 100  $\mu$  l 的 1:100 稀释的患者的测试样品——这里是血清, 被添加至第一临床样本 C 和 D 排的双孔, 第二临床样本 E 和 F 排的双孔和第三临床样本 G 和 H 排的双孔, 如图 7 所示。

[0084] 在单独的平板上, 进行类似于一式两份临床样本的周期的 (即, 每周) 阴性和阳性对照, 如图 8 所示。

[0085] 平板随后在室温下温育大约 60 分钟。在温育后, 孔随后被倒空, 并利用 ELISA 洗涤器, 用 PBS 清洗 4 次。大约 100  $\mu$  l 最佳稀释的碱性磷酸酶标记的山羊抗 - 人 IgA 被添加至 IgA 平板, 或大约 100  $\mu$  l 的酶标记的 IgG 被添加至 IgG 平板, 和抗 - IgM 以最佳的稀释被添加至 IgM 平板。

[0086] 各个平板随后在室温下温育大约 30 至大约 60 分钟。在交联物 - 温育结束前大约 10 分钟, 底物溶液通过将大约 5mg 的磷酸对硝基苯酯片剂与大约 5ml 的底物缓冲液混合制备, 其充分混合, 直到片剂完全溶解。重复利用 ELISA 洗涤器, 用 PBS 清洗 4 次。随后, 大约 100  $\mu$  l 的底物溶液被添加至每个孔。该平板随后在室温下温育大约 30 分钟, 避免对直射阳光的任何暴露。通过添加大约 50  $\mu$  l 的 3N NaOH 停止反应。孔颜色强度利用微量滴定板读出器在 405nm 下针对空白孔读出, 记录校准物、对照和未知样品的吸光率值。

## [0087] C. 结果计算

[0088] 在平板在 405nm 下读出以获得光密度值 (OD<sub>405</sub>) 后, 阴性对照的平均 OD、阳性对照的平均 OD 和每个临床样本的平均 OD 除以 A 和 B 排上的校准物的平均 OD, 以获得每个指数值 (IV)。

[0089] 针对 12 种不同的抗原, 通过将每个复制样品的平均 OD 除以校准物对照值的平均 OD (例如, 将孔 C1 和 D1 的平均 OD 除以孔 A1 和 B1 的平均 OD, 将孔 C2 和 D2 的平均 OD 除以孔 A2 和 B2 的平均 OD, 将孔 C3 和 D3 的平均 OD 除以孔 A3 和 B3 的平均 OD 等), 计算每个抗体的指数值 (IV)。

[0090] 结果随后与确立的参考范围相比较。

[0091]

$$\text{指数} = \frac{\text{患者的平均 OD}}{\text{校准物的平均 OD}}$$

[0092]

连蛋白/闭合蛋白的指数计算	
Cal 1(OD)	0.48
Cal 2(OD)	0.50
样品 3A(OD)	3.4
样品 3B(OD)	3.2
指数	6.7

## [0093] D. 结果说明

[0094] i. 具有腹部疾病、谷蛋白免疫反应性和敏感性和克罗恩氏病的患者的 IgG/IgM/IgA 抗体的模式:

[0095] 9 位健康对象的 IgG、IgM 和 IgA 抗体模式的实施例 (表 1-3) 和与他们具有腹部疾病和肠通透性的 3 位患者 (表 4)、具有谷蛋白共济失调的 3 位患者 (表 5) 和具有多发性硬化症的 3 位患者 (表 6) 的比较分别显示在表 1-6 中。

[0096] 腹部疾病和谷蛋白免疫反应性 / 敏感性 / 自身免疫之间的数据说明和实验室差异显示在表 7-9 中。

[0097] ii. 抵抗具有腹部疾病和肠通透性、谷蛋白共济失调的患者和具有 MS 的患者中的肠、BBB 蛋白和相关抗原的 IgG、IgM 和 IgA 抗体模式。

[0098] 基于指数的计算, 9 位健康对照对象 (表 1-3)、具有腹部疾病和肠通透性的 3 位患者 (表 4)、具有谷蛋白共济失调的 3 位患者 (表 5) 和具有多发性硬化症的 3 位患者 (表 6) 中 IgG、IgM 和 IgA 抗体模式分别显示在表 1-6 中。注意到在所有健康对象中, 除了 LPS 和 MBP——其抗体指数可高于 1.5 但不显著大于 2.0, 抵抗其他抗原的抗体指数低于或远低于 1.5 (表 1-3)。

[0099] 如由抵抗脱酰胺基的  $\alpha$ -麦醇溶蛋白 33-mer 肽、组织转谷氨酰胺酶 (tTg) 和麦醇溶蛋白-tTg 复合体的 IgG 和 IgA 确定的, 在具有腹部疾病的患者中, 抗体模式在患者之间不同。

[0100] 例如, 表 4 中的样品 10, 这些抗体显著升高, 抵抗 LPS、连蛋白 / 闭合蛋白、肠 ZOT 受体、细胞连接蛋白、MMP-3、 $\alpha$ -B 晶体蛋白和髓鞘碱性蛋白, 这指示除了升高的肠通透性之

外,患者还可能遭受 BBB 通透性。表 4 中的样品 11 显示了抵抗细胞连接蛋白和肠 ZOT 受体的抗体的显著升高,和抵抗 LPS 但不抵抗 BBB 蛋白和神经抗原的抗体的中等升高,这指示除了腹部疾病之外,患者还可能遭受肠通透性、BBB 通透性、神经性自身免疫和可能的其他自身免疫。

[0101] 抵抗代表具有谷蛋白共济失调的 3 位患者(样品 13-15)中肠-至-脑的 12 种不同抗原的 IgG、IgM 和 IgA 抗体水平显示在表 5 中。通过抵抗脱酰胺基的  $\alpha$ -麦醇溶蛋白 33-mer 肽、tTg-2、麦醇溶蛋白-tTg 复合体、tTg-6 和小脑抗原的 IgG 和 IgA 抗体的存在,证实这些患者中的谷蛋白共济失调。在这些患者中,针对 ZOT 结合蛋白、脑 ZOT 受体、 $\alpha$ -B 晶体蛋白、钙卫蛋白、GFAP 和细胞连接蛋白的抗体模式显著更高,这证实屏障损害损伤。

[0102] 具有 MS 的 3 位患者(样品 16-18)中抵抗 12 种测试抗原的这些抗体水平概括在表 6 中。除了异常 MRI 之外,MS 的诊断也基于针对 MBP、髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白(MOG)、 $\alpha$ -B 晶体蛋白、蛋白脂质蛋白、淋巴细胞活化和促炎性细胞因子产生的抗体检测进行(44)。针对神经元抗原、BBB 蛋白和连蛋白/闭合蛋白,检测抗体水平的显著升高。这指示具有 MS 的患者确实遭受 BBB 机能障碍。

[0103] iii. 抵抗具有胃部自身免疫的患者中细菌脂多糖和闭合蛋白/连蛋白的 IgG、IgM 和 IgA 抗体的测量。

[0104] 肠通透性在胃肠自身免疫性疾病中是显著的(4)。图 9 显示了比较抵抗细菌内毒素(脂多糖)的抗体升高和健康对照和具有胃部自身免疫的患者中紧密连接结构(闭合蛋白/连蛋白)的图。

[0105] 抗原性大分子穿过肠上皮的增加的进入可启动多炎性细胞因子和全身慢性炎症的产生和使多炎性细胞因子和全身慢性炎症持续不断的增加(56)。这似乎为对于导致最终自身免疫性疾病(基因易损性、环境暴露和肠通透性)的三个(trio)因素的需要的组成部分。

[0106] 根据本发明的一些方面,本文假定对 LPS、闭合蛋白/连蛋白和肌动球蛋白网络的升高的抗体是鉴定健康的肠屏障损坏的生物标记,和对 LPS、闭合蛋白/连蛋白、其他细胞连接蛋白、BBB 蛋白加上神经抗原(例如,MBP、 $\alpha$ -B 晶体(crystalline)、GFAP、钙卫蛋白和脑 ZOT 蛋白)的升高的抗体不仅指示健康的肠屏障的损坏,还指示 BBB 完整性的破坏。

[0107] 根据本发明的一些方面,抵抗口液中 LPS、闭合蛋白/连蛋白和肌动球蛋白的抗体升高水平的临床说明显示在表 8 中。

[0108] 根据本发明的一些方面,抵抗 LPS、闭合蛋白/连蛋白、血脑屏障蛋白和神经抗原的抗体的升高的血液水平的临床说明显示在表 9 中。

[0109] 病例研究实施例

[0110] 如下提供两个不同的病例报告,第一个针对具有腹部疾病的患者和第二个针对具有多发性硬化症的患者。

[0111] A. 病例报告 #1:具有腹部疾病和肠屏障机能障碍的患者

[0112] 内科医师检查 38 岁的妇女,高 5' 4", 重 106lbs, 患有 GI 疾病,包括便秘、腹泻和全身疼痛,伴随纤维肌痛样综合征和减重(在最后 6 个月期间每月 1-2lbs)。实验室研究显示异常 CBC,其具有 9.9g/dl 的血红蛋白、77fL 的 MCV、54mm/1<sup>st</sup> hr 的红细胞沉降率,具有低浓度的叶酸和维生素 B-12,但高水平的肝脏酶和高灵敏的 C-反应蛋白。进行包括 ANA、类

风湿因子、T3、T4 和 TSH 水平的详细的生物化学和免疫学概况 (profile), 并且所有测试都处于正常范围内。在重复关于 GI 不适、轻度的发烧和头痛的抱怨后, 患者被送至进行 GI 评估。进行结肠镜检查 and 十二指肠活检, 并且免疫组织学评估显示具有 Marsh III 分级的完全的绒毛萎缩 (villous atrophy)。在这点上, 检查抵抗麦醇溶蛋白和转谷氨酰胺酶的 IgG 和 IgA 浓度。抵抗麦醇溶蛋白和转谷氨酰胺酶的 IgG 和 IgA 两者都比参考范围高 3-5 倍。

[0113] 鉴于绒毛萎缩, 进行腹部疾病的麦醇溶蛋白和转谷氨酰胺酶的阳性诊断。该患者被输血、增加抗炎性药物并开始无谷蛋白饮食。三个月后, 尽管她的总体 GI 不适已经改善, 并且她已经增加 4 磅, 她的 CRP 仍然是升高的, 并且身体疼痛和轻度发烧继续。鉴于此和为了确定炎症和轻度发烧的根本原因, 检查抵抗 LPS、连蛋白 / 闭合蛋白和细胞连接蛋白的抗体。结果显示在表 4 中, 样品 10 显示与健康的对象相比, 患者 (样品 10) 抵抗 LPS、连蛋白 / 闭合蛋白和细胞连接蛋白的 IgG、IgM 和 IgA 抗体水平增加 3-6 倍, 这指示除了腹部疾病之外, 该患者还遭受细菌异位、紧密连接损害和对大抗原性分子的肠渗漏综合征。

[0114] 因此, 除了无谷蛋白饮食, 患者还通过进行无凝集素饮食加益生菌谷氨酰胺、N-乙酰半胱氨酸、EPA/DHA、维生素 D、乳铁蛋白、木糖醇和乳香酸治疗肠渗漏综合征。在开始该益生菌方法加无凝集素和无谷蛋白饮食后 30 天, 该患者的临床病情已经显著改善: 她的发烧降至 37°C, 并且她已经获得额外的 6lbs。60 天后, 肠渗漏的治疗简化为仅益生菌, 但无谷蛋白饮食继续。1 年后, 重复所有的实验室测试, 和对于麦醇溶蛋白、转谷氨酰胺酶、CRO、LPS 和连蛋白 / 闭合蛋白的重复测试处于正常范围内, 其进一步指示肠渗漏处理加无谷蛋白饮食在遭受腹部疾病和肠渗漏综合征的该患者的治疗中是有效的。

[0115] 讨论: 在文献中已经确立除了绒毛萎缩之外, 大多数具有腹部疾病的患者还遭受肠渗漏综合征。出于该原因, 大约仅 50% 的具有腹部疾病的患者通过无谷蛋白饮食得到改善, 他们的绒毛结构在 6 个月这样的治疗后返回正常。在腹部疾病中诱导肠渗漏综合征的机制是由于以下事实: 在一些个体中, 特异性的麦醇溶蛋白肽结合至上皮细胞并引起对紧密连接蛋白的损害, 引起连蛋白 / 闭合蛋白和密蛋白从粘膜下层释放进入血液。在该具体病例中, 一些患者的症候学通过无谷蛋白饮食得到改善, 但无谷蛋白饮食不改进由 LPS 异位和增强的肠通透性诱导的炎性级联反应。然而, 在进行无谷蛋白饮食加利用自然治疗法修复紧密连接蛋白的治疗后 30-90 天 (57-61), 临床症候学和实验室测试结果两者都回到正常。因此, 推断具有腹部疾病的患者应针对具有抗原性的大分子筛查肠渗漏, 并且不仅治疗腹部疾病, 而且修复肠屏障。本发明的发明性主题提供了该能力。

[0116] B. 病例报告 #2: 具有多发性硬化症、肠和血脑屏障通透性的患者

[0117] 38 岁的男人, 高 5' 8", 重 182lbs, 在 3 周的进展性颈部、背部和肌肉疼痛以及四肢虚弱的病史后, 被送至神经病学家。在送至前这天, 他产生排尿困难, 伴随他的躯干和腿的发麻和知觉障碍, 其程度为他不能爬楼梯。就在入院之前 2 年, 该患者具有家庭问题并变得非常抑郁, 因此他没有寻求任何帮助。他全部的过去病史是寻常的, 除了不能解释的轻微的小红细胞性贫血, 其已经用维生素 B-12 和铁补充剂进行治疗。

[0118] 为了弄清患者是否可能已经遭受轻度中风或正在遭受一些神经病学或自身免疫性疾病, 开始一系列免疫学概况和神经病学检查。

[0119] 实验室研究显示血红蛋白结果为 10.8g/dl 的正常的化学和 CBC。包括 ANA、类风湿因子、免疫复合体、全免疫球蛋白、心脂质抗体和甲状腺功能测试的免疫学概况处于正常

范围内。

[0120] 在进一步的研究期间,脑脊髓液和血液被收集并检验分枝杆菌 (mycobacteria)、包柔氏螺旋体属 (*Borrelia*)、CMV、EBV、疱疹 6 型、HTLV-1 和 -2 和梅毒,所有都是阴性的。CSF 蛋白为 0.7g/L,和葡萄糖 2.3mMol/L。

[0121] 神经病学检查显示减少的矫正视力,右眼 6/48 和左眼 6/36,眼球移动正常。该患者双腿具有椎体虚弱,伴随轻度基础的 (mildly-based) 步态。针刺检查证明两侧上单侧觉水平在 D10 以下。

[0122] 脑的 MRI 扫描显示轻微的白质异常,伴随轻微的广义萎缩,其已经在具有 MS 的患者中观察到。

[0123] 然而,为了排除谷蛋白敏感的可能性,进行腹部疾病和肠渗漏综合征、AGA、tTg 抗体和乳酮糖 / 甘露醇测试。腹腔筛查显示 IgG 和 IgA 抗 - 麦醇溶蛋白抗体两者高于参考范围 3-6 倍,但对抵抗转谷氨酰胺酶的 IgG 和 IgA 是完全阴性的。此外,乳酮糖 / 甘露醇测试结果是高度异常的。因此,进行以下额外的测试:抵抗 LPS、连蛋白 / 闭合蛋白、肠 ZOT 受体、细胞连接蛋白、MMP-3、脑 ZOT 结合蛋白、脑 ZOT 受体、钙卫蛋白、GFAP、 $\alpha$ -B 晶体蛋白、BBB 蛋白和 MBP 的 IgG、IgM 和 IgA 抗体。结果概括在表 6 中,样品 17 显示针对 MBP 和 GFAP 的抗体水平显著升高,这证实异常的 MRI 发现和 MS 的诊断。此外,针对连蛋白 / 闭合蛋白、钙卫蛋白和 BBB 蛋白的抗体的显著升高指示涉及该患者中增强的肠和 BBB 通透性的 GI 道 (表 6)。基于这些测试结果,给予该患者 1g 静脉内甲基强的松龙,持续 5 天,具有一些产生的临床改善。在这点上,该患者增加  $\beta$ - 血清子,在十五天后显示显著的改善。此外,给予 200mg 的二甲胺四环素 IV 谷胱甘肽,加上益生菌谷氨酰胺、N- 乙酰半胱氨酸、EPA/DHA、维生素 D、乳铁蛋白、木糖醇和乳香酸,用于修复损害的 BBB 和肠屏障。在该方案 3 个月后,该患者的总体健康已经显著改善。

[0124] 应当对本领域技术人员显而易见的是除了那些已经描述的,更多修改是可能的,而不脱离本文的发明性的概念。因此,该发明主题不被限制,除了在权利要求的范围中。此外,在解释说明书和权利要求书两者中,所有的术语都应以与上下文一致的最宽泛可能的方式进行解释。特别地,术语“包括 (comprise)”和“包括 (comprising)”应被解释为以非排他方式涉及要素、成分或步骤,指示引用的要素、成分或步骤可存在,或被利用,或与没有明确引用的其他要素、成分或步骤联合。在说明书权利要求涉及选自 A、B、C……和 N 中的至少一种的情况下,正文应被解释为仅要求来自该组中的一种要素,而不是 A 加 N 或 B 加 N 等。

[0125] 参考文献

[0126] 1. Walker WA, Sanderson IR. Epithelial barrier function to antigens. *Ann NY Acad Sci.* 664:10-17, 1992.

[0127] 2. Walker WA, Isselbacher KJ. Uptake and transfer of macromolecules by the intestine. *Gastroenterol.* 67:531-550, 1974.

[0128] 3. Arrieta MC, Bistritz L, Meddings JB. Alterations in intestinal permeability. *Gut.* 55:1512-1520, 2006.

[0129] 4. Fasano A, Shea-Donohue T. Mechanisms of disease: the role of intestinal barrier function in the pathogenesis of gastrointestinal autoimmune diseases.

Nat Clin Prac Gastroenterol Hepatol. 2(9):416-422, 2005.

[0130] 5. Sapone A, Lammers KM, Mazzarella G, et al. Differential mucosal IL-17 expression in two gliadin-induced disorders: gluten sensitivity and the autoimmune enteropathy celiac disease. *Int Arch Allergy Immunol.* 152:75-80, 2010.

[0131] 6. Sapone A, Lammers KM, Casolaro V, et al. Divergence of gut permeability and mucosal immune gene expression in two gluten-associated conditions: celiac disease and gluten sensitivity. *BMC Med.* 9:23, 2011.

[0132] 7. Fasano A. Zonulin and its regulation of intestinal barrier function: the biological door to inflammation, autoimmunity and cancer. *Physiol Rev*, 91:151-175, 2011.

[0133] 8. Shor DB, Barzilai O, Ram M, et al. Gluten sensitivity in multiple sclerosis: experimental myth or clinical truth? *Ann NY Acad Sci*, 1173:343-349, 2009.

[0134] 9. Vojdani A, O' Bryan T, Green JA, et al. Immune response to dietary proteins, gliadin and cerebellar peptides in children with autism. *Nutr Neurosci.* 7(3):151-161, 2004.

[0135] 10. Correale J, Villa A. The blood-brain-barrier in multiple sclerosis: functional roles and therapeutic targeting. *Autoimmunity.* 40:148-160, 2007.

[0136] 11. Morgan L, Shah B, Rivers LE, et al. Inflammation and dephosphorylation of the tight junction protein occludin in an experimental model of multiple sclerosis. *Neurosci.* 147:664-673, 2007.

[0137] 12. Skardelly M, Armbruster FP, Meixensberger J, et al. Expression of zonulin, c-kit, glial fibrillary acidic protein in human gliomas. *Transl Oncol.* 2:117-120, 2009.

[0138] 13. Yacyshyn B, Meddings J, Sadowski D, et al. Multiple sclerosis patients have peripheral blood CD45RO+B cells and increased intestinal permeability. *Dig Dis Sci.* 41(12):2493-2498, 1996.

[0139] 14. Garate I, Garcia-Bueno B, Madrigal, JLM et al. Origin and consequences of brain toll-like receptor 4 pathway stimulation in an experimental model of depression. *J Neuroinflamm.* 8:151, 1-31, 2011.

[0140] 15. Al-Sadi RM, Ma TY. IL-1 $\beta$  causes an increase in intestinal epithelial tight junction permeability. *J Immunol.* 178:4641-4649, 2007.

[0141] 16. Matysiak-Budnik T, Thomas-Collignon A, Megraud F, Heyman M. Alterations of epithelial permeability by *Helicobacter* and IL-1 $\beta$  in vitro: protective effect of rebamipide. *Dig Dis Sci*, 2001;46:1558-1566.

[0142] 17. Turner JR. "Putting the squeeze" on the tight junction: understanding cytoskeletal regulation. *Semin Cell Dev Biol*, 2000;11:301-308.

- [0143] 18. Ma TY, Hoa NT, Tran DD, Bui V, Pedram A, Mills S, Merryfield M. Cytochalasin B modulation of Caco-2 tight junction barrier: role of myosin light chain kinase. *Am J Physiol*, 2000; 279: G875-G885.
- [0144] 19. Ma TY, Tran D, Hoa N, Nguyen D, Merryfield M, Tarnawski A. Mechanism of extracellular calcium regulation of intestinal epithelial tight junction permeability: role of cytoskeletal involvement. *Microsc Res Tech*, 2000; 51: 156-168.
- [0145] 20. Al-Sadi R, Ye D, Dokladny K, Ma TY. Mechanism of IL-1 $\beta$ -induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability. *J Immunol*. 2008; 180: 5653-5661.
- [0146] 21. Shen L, Black ED, Witkowski ED, Lencer WI, Guerriero V, Schneeberger EE, Turner JR. Myosin light chain phosphorylation regulates barrier function by remodeling tight junction structure. *J Cell Sci*, 2006; 119: 2095-2106.
- [0147] 22. Hecht G, Pestic L, Nikcevic G, Koutsouris A, Tripuraneni J, Lorimer Dd, Nowak G, Guerriero, Jr V, Elson El, Lanerolle PD. Expression of the catalytic domain of myosin light chain kinase increases paracellular permeability. *Am J Physiol*, 1996; 271: C1678-1684.
- [0148] 23. Ma TY, Boivin MA, Ye E, Pedram A, Said HM. Mechanism of TNF- $\alpha$  modulation of Caco-2 intestinal epithelial tight junction barrier: role of myosin light-chain kinase protein expression. *Am J Physiol*, 2005; 288: G422-G430.
- [0149] 24. Mae M, Kudera M, Leunis JC. The gut-brain barrier in major depression: intestinal mucosal dysfunction with an increased translocation of LPS from gram negative bacteria (leaky gut) plays a role in the inflammatory pathophysiology of depression. *Euro Endocrinol Lett*, 2008; 29: 117-124.
- [0150] 25. Mae M, Coucke F, Ategis JC. Normalization of the increased translocation of endotoxin from gram negative enterobacteria (leaky gut) is accompanied by a remission of chronic fatigue syndrome. *Neuro Endocrinol Lett*, 2007; 28(6): 101-116.
- [0151] 26. Walker-Smith JA, Ford RP, Phillips AD. The spectrum of gastrointestinal allergies to food. *Ann Allergy*, 1984; 53: 629-636.
- [0152] 27. Juvonen P, Jakobsson I, Lindberg T. Macromolecular absorption and cow's milk allergy. *Arch Dis Child*, 1990; 65: 300-303.
- [0153] 28. Huang XN, Fu J, Wang WZ. The effects of Fasudil on the permeability of the rat blood-brain barrier and blood-spinal cord barrier following experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*. 239: 61-67, 2011.
- [0154] 29. Lassmann H, Zimprich F, Vass K, Hickey WF. Microglial cells are a component of the perivascular glia limitans. *J Neurosci Res*, 1991; 28: 236-243.
- [0155] 30. Schneeberger EE, Lynch RD. The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004; 286: C1213-C1228.

- [0156] 31. Chen ML, et al. Disruption of tight junctions and induction of proinflammatory cytokine responses in colonic epithelial cells by *Campylobacter jejuni*. *Infect Immun*, 2006;74:6581-6589.
- [0157] 32. LaPierre LA. The molecular structure of the tight junction. *Adv Drug Deliv*, 2000;41:255-264.
- [0158] 33. Wong V, Gumbiner BM. A synthetic peptide corresponding to the extracellular domain of occludin perturbs the tight junction permeability barrier. *J Cell Biol*, 1997;136(2):399-409.
- [0159] 34. Engelhardt B, Raschhoff RM. The ins and outs of the T-lymphocyte trafficking to the CNS: anatomical sites and molecular mechanisms. *Trends Immunol*, 2005;26(9):485-495.
- [0160] 35. Aloisi F, Ria F, Adorini L. Regulation of T-cell responses by CNS antigen-presenting cells: different roles for microglia and astrocytes. *Immunol Today*, 2000;21(3):141-147.
- [0161] 36. Ghirnikar RS, Lee YL, Eng LF. Inflammation in traumatic brain injury: role of cytokines and chemokines. *Neurochem Res*, 1998;23(3):329-340.
- [0162] 37. Kebir H, Kreymborg K, Ifergan I, Dodelet-Devillers A, Cayrol R, Bernard M, Biuliani F, Arbour N, Becher B, Prat A. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med*, 2007;13:173-176.
- [0163] 38. Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol*, 2005;23:683-747.
- [0164] 39. Biernacki K, Prat A, Blain M, Antel JP. Regulation of Th1 and Th2 lymphocyte migration by human adult brain endothelial cells. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2001;60(12):1127-1136.
- [0165] 40. Wosik K, Cayrol R, Dodelet-Devillers A, Berthelet F, Bernard M, Moudjian R, Bouthillier A, Reudelhuber TL, Prat A. Angiotensin II controls occluding function and is required for blood-brain barrier maintenance: relevance to multiple sclerosis. *J Neurosci*, 2007;27(34):9032-9042.
- [0166] 41. Kawanokuchi J, Shimizu K, Nitta A, Yamada K, Mizuno T, Takeuchi H, Suzumura A. Production and function of IL-17 in microglia. *J Neuroimmunol*, 2008;194:54-61.
- [0167] 42. Ganor Y, Teichberg VI, Levite M. TCR activation eliminates glutamate receptor GLUR3 from the cell surface of normal human T cells via an autocrine/paracrine granzyme B-mediated proteolytic cleavage. *J Immunol*, 2007;178:683-692.
- [0168] 43. Vojdani A, Lambert J. A gut feeling for immune dysregulation and neuroinflammation. *The Autism File USA*, 2009;31:56-64.
- [0169] 44. Vojdani A, Vojdani E, Cooper EL. Antibodies to myelin basic protein, myelin oligodendrocyte peptides,  $\alpha$ - $\beta$ -crystallin, lymphocyte

activation and cytokine production in patients with multiple sclerosis. *J Internal Med*, 2003;254:363-74.

[0170] 45. Kirk J, Plumb J, Mirakhor M, et al. Tight junctional abnormality in multiple sclerosis white matter affects all calibers of vessel and is associated with blood-brain barrier leakage and active demyelination. *J Pathol*. 2003;201:319-327.

[0171] 46. Hawkins BT, Davis TP. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev*, 2005;57:173-185.

[0172] 47. Leech S, Kirk J, Plumb J, et al. Persistent endothelial abnormalities and blood-brain barrier leak in primary and secondary progressive multiple sclerosis. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2007;33:86-98.

[0173] 48. Persidsky Y, Ramirez SH, Haorah J, et al. Blood-brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2006, 1:223-236.

[0174] 49. Reijerkerk A, Kooij G, van der Pol SM, et al. Tissue-type plasminogen activator is a regulator of monocyte diapedesis through the brain endothelial barrier. *J Immunol*, 2008;181:3567-3574.

[0175] 50. Wosik K, Cayrol R, Dodelet-Devillers A, et al. Angiotension II controls occluding function and is required for blood-brain barrier maintenance: relevance to multiple sclerosis. *J Neurosci*, 2007;27:9032-9042.

[0176] 51. El Asmar, Panigrahi P, Bamford P, et al. Host-dependent zonulin secretion causes the impairment of the small intestine barrier function after bacterial exposure. *Gastroenterol*, 2002;123:1607-1615.

[0177] 52. Balkovetz DF, Katz J. Bacterial invasion of paracellular route: divide and conquer. *Microbes Infect*, 2003;5:613-619.

[0178] 53. Kuula H et al. Local systemic responses in matrix metalloproteinase 8-deficient mice during *Porphyromonas gingivalis*-induced periodontitis. *Infect Immun*, 2009;77(2):850-859. 54. Cywes C, Wessels M. R. Group A *Streptococcus* tissue invasion by CD44-mediated cell signalling. *Nature*, 2001;414:648-652.

[0179] 55. Y Xu, Q Yu. E-cadherin negatively regulated CD44-hyaluronan interaction and CD44-mediated tumor invasion and branching morphogenesis. *J Biol Chem*, 2003;278:8661-8668.

[0180] 56. Garrote J, Gomez-Gonzalez E, Bernardo D, Arranz E, Chirido F. Celiac disease pathogenesis: the proinflammatory cytokine network. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2008;47(Suppl 1).

[0181] 57. Maldonado Galdeano C, Perdigon G. The probiotic bacillus *Lactobacillus casei* induces activation of the mucosal immune system through innate immunity. *Clin Vaccine Immunol*, 2006, 13(2):219-226.

[0182] 58. Wakabayashi H, Takakura N, Yamauchi K, et al. Modulation of

immunity-related gene expression in small intestine of mice by oral administration of lactoferrin. *Clin Vaccine Immunol*, 2006;13(2):239-245.

[0183] 59. Han S, Jeong SY, Nam YJ, et al. Xylitol inhibits inflammatory cytokine expression induced by lipopolysaccharides from *Porphyromonas gingivalis*. *Clin Diag Lab Immunol*, 2005;12(11):1285-1291.

[0184] 60. Chevrier MR, Ryan AE, Lee DY-W, et al. *Boswellia carterii* extract inhibits the cytokines and promotes Th2 cytokines in vitro. *Clin Diag Lab Immunol*, 2005;575-580.

[0185] 61. Syrovets T, Buchele B, Krauss C, et al. Acetyl-boswellic acids inhibit lipopolysaccharide-mediated TNF- $\alpha$  induction in monocytes by direct interaction with I  $\kappa$  B kinases. *J Immunol*, 2005;174:498-506.

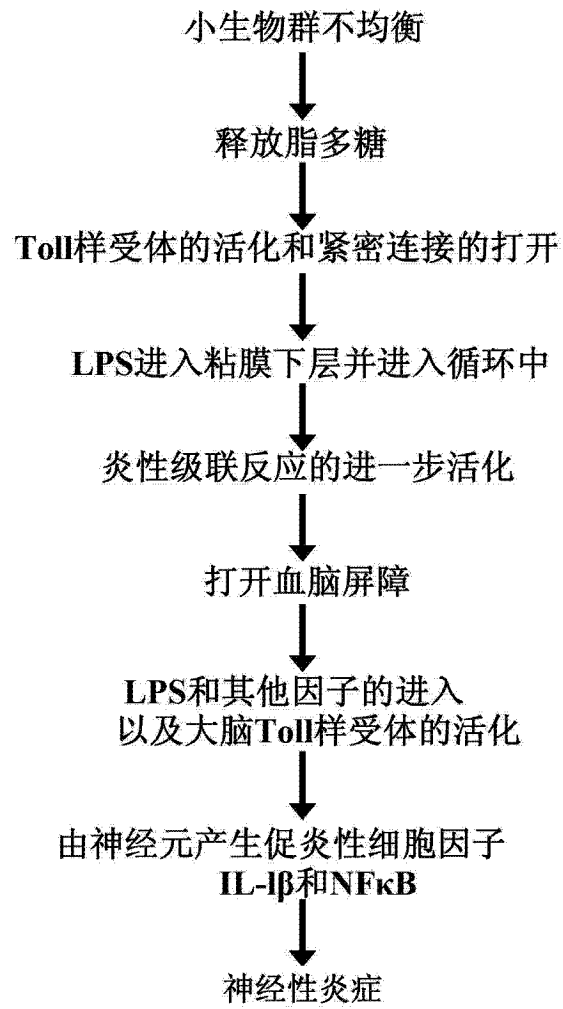


图 1

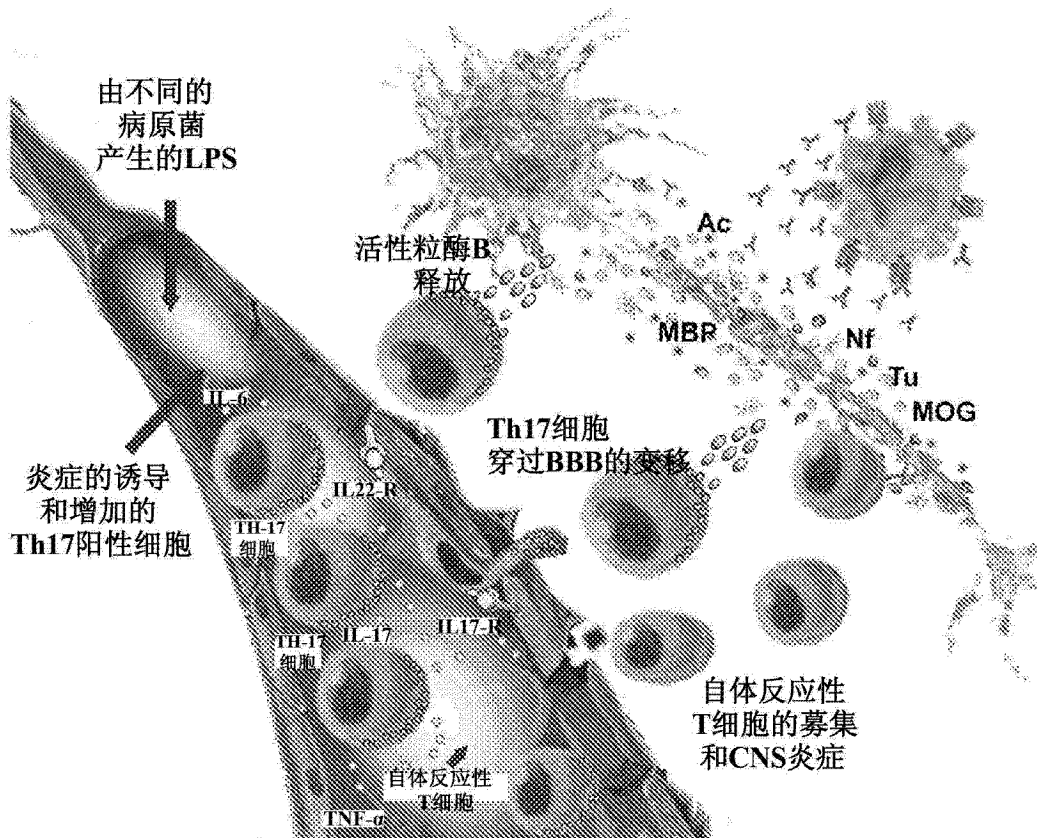


图 2

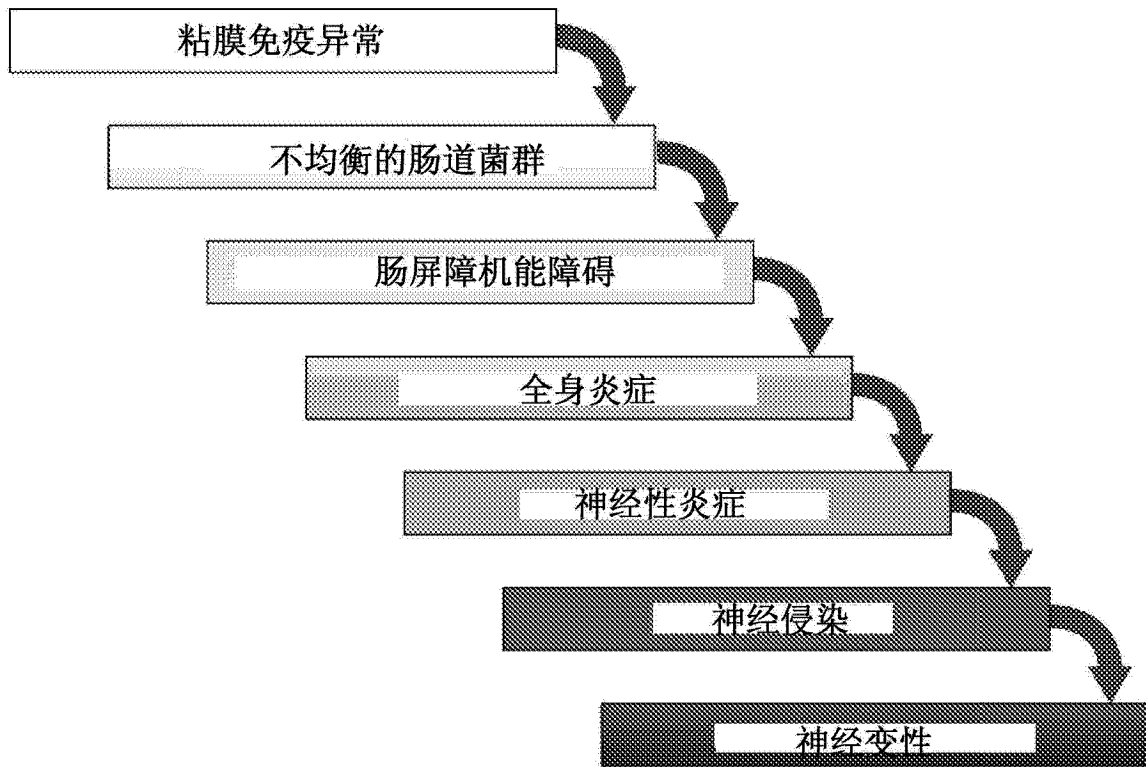


图 3

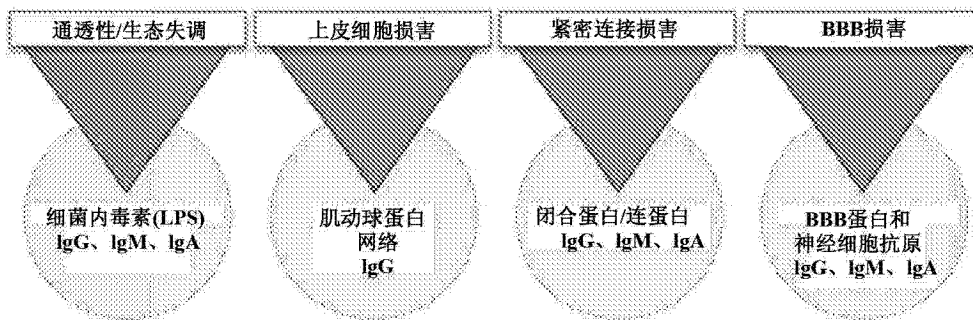


图 4

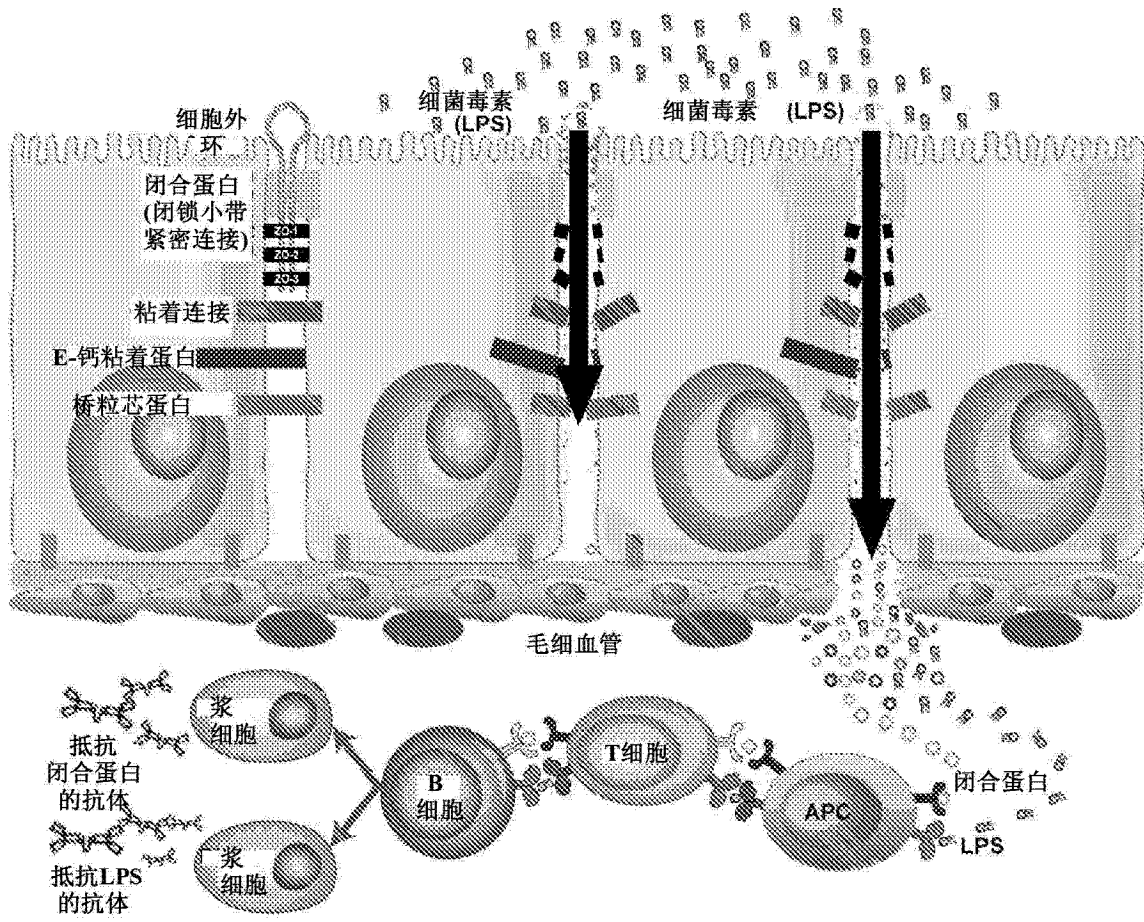


图 5

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	脂多糖	连蛋白/闭合蛋白	肠ZOT受体	细胞连接蛋白	基质金属蛋白酶	脑ZOT结合蛋白	脑ZOT受体	钙卫蛋白	胶质细胞原纤维酸性蛋白	$\alpha$ -B晶体蛋白	BBB蛋白	髓鞘碱性蛋白
B	脂多糖	连蛋白/闭合蛋白	肠ZOT受体	细胞连接蛋白	基质金属蛋白酶	脑ZOT结合蛋白	脑ZOT受体	钙卫蛋白	胶质细胞原纤维酸性蛋白	$\alpha$ -B晶体蛋白	BBB蛋白	髓鞘碱性蛋白
C	脂多糖	连蛋白/闭合蛋白	肠ZOT受体	细胞连接蛋白	基质金属蛋白酶	脑ZOT结合蛋白	脑ZOT受体	钙卫蛋白	胶质细胞原纤维酸性蛋白	$\alpha$ -B晶体蛋白	BBB蛋白	髓鞘碱性蛋白
D	脂多糖	连蛋白/闭合蛋白	肠ZOT受体	细胞连接蛋白	基质金属蛋白酶	脑ZOT结合蛋白	脑ZOT受体	钙卫蛋白	胶质细胞原纤维酸性蛋白	$\alpha$ -B晶体蛋白	BBB蛋白	髓鞘碱性蛋白
E	脂多糖	连蛋白/闭合蛋白	肠ZOT受体	细胞连接蛋白	基质金属蛋白酶	脑ZOT结合蛋白	脑ZOT受体	钙卫蛋白	胶质细胞原纤维酸性蛋白	$\alpha$ -B晶体蛋白	BBB蛋白	髓鞘碱性蛋白
F	脂多糖	连蛋白/闭合蛋白	肠ZOT受体	细胞连接蛋白	基质金属蛋白酶	脑ZOT结合蛋白	脑ZOT受体	钙卫蛋白	胶质细胞原纤维酸性蛋白	$\alpha$ -B晶体蛋白	BBB蛋白	髓鞘碱性蛋白
G	脂多糖	连蛋白/闭合蛋白	肠ZOT受体	细胞连接蛋白	基质金属蛋白酶	脑ZOT结合蛋白	脑ZOT受体	钙卫蛋白	胶质细胞原纤维酸性蛋白	$\alpha$ -B晶体蛋白	BBB蛋白	髓鞘碱性蛋白
H	脂多糖	连蛋白/闭合蛋白	肠ZOT受体	细胞连接蛋白	基质金属蛋白酶	脑ZOT结合蛋白	脑ZOT受体	钙卫蛋白	胶质细胞原纤维酸性蛋白	$\alpha$ -B晶体蛋白	BBB蛋白	髓鞘碱性蛋白

图 6

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A													校准物
B													校准物
C													临床样本#1
D													临床样本#2
E													临床样本#3
F													
G													
H													

IgG/IgM/IgA抗体

图 7

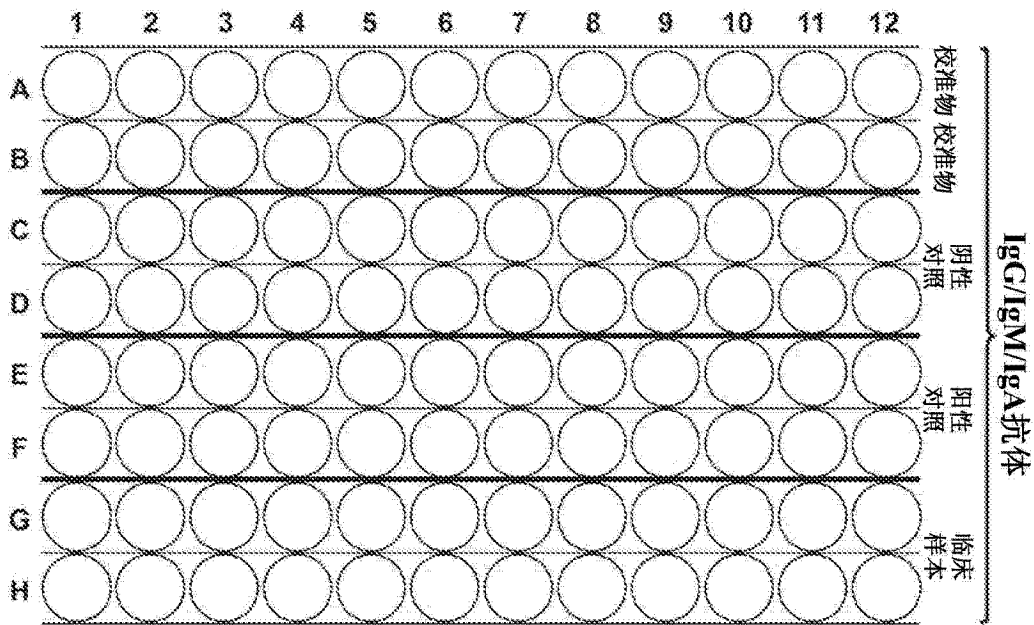
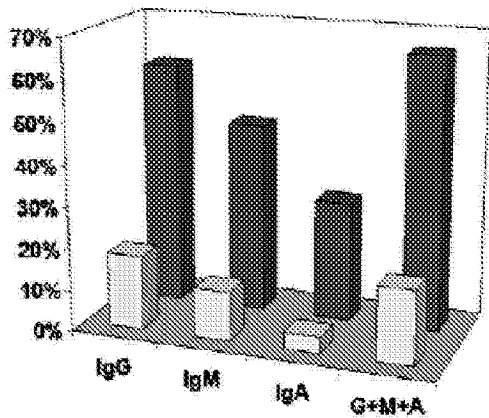
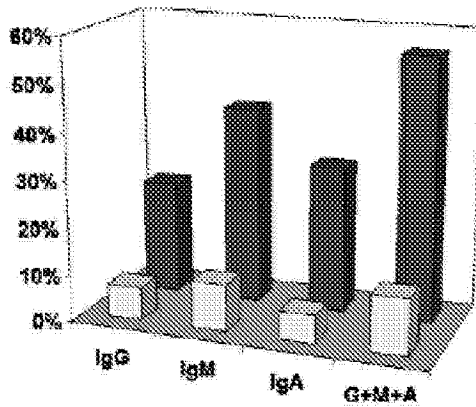


图 8



抵抗健康血液捐献者□和具有高于平均值2SD的胃部自身免疫的患者■中细菌脂多糖的IgG、IgM、IgA和IgG+IgM+IgA的升高%



抵抗健康血液捐献者□和具有高于平均值2SD的胃部自身免疫的患者■中闭合蛋白/连蛋白的IgG、IgM、IgA和IgG+IgM+IgA的升高%

图 9

表1-针对代表健康对象编号1-3中的环境因素(LPS)、肠BBB蛋白和相关抗原的12种不同抗原测试的IgG、IgM和IgA抗体水平

	*LPS	连蛋白- 闭合蛋白	肠 ZOT 受体	细胞 连接 蛋白	**MMP 3	脑 ZOT 结合 蛋白	脑 ZOT 受体	钙卫 蛋白	***GFAP	$\alpha$ -B 晶体蛋白	BBB 蛋白	髓鞘 碱性 蛋白
Cal 1	0.743	0.752	0.532	0.764	0.551	0.535	0.757	0.762	0.542	0.763	0.546	0.78
Cal 2	0.658	0.678	0.539	0.694	0.542	0.539	0.677	0.688	0.543	0.695	0.556	0.703
样品 1 (OD)	1.482	0.379	0.39	1.034	0.39	0.391	0.37	0.882	0.362	0.377	0.396	0.828
指数	2.10	0.52	0.72	1.25	0.69	0.91	0.51	1.14	0.69	0.52	0.69	1.03
样品 2 (OD)	0.844	0.324	0.334	0.326	0.334	0.589	0.322	0.314	0.371	0.32	0.335	0.783
指数	1.04	0.41	0.56	0.39	0.54	0.79	0.41	0.38	0.63	0.40	0.54	0.93
样品 3 (OD)	1.287	0.253	0.715	0.25	0.658	0.229	0.388	0.218	0.219	0.209	0.229	2.02
指数	1.87	0.31	1.23	0.31	0.99	0.41	0.49	0.29	0.38	0.28	0.39	2.24

\* 脂多糖      \*\* 基质金属蛋白酶3      \*\*\* 胶质细胞原纤维酸性蛋白

$$\text{指数} = \frac{\text{患者的平均OD}}{\text{校准物的平均OD}}$$



表3-针对代表健康对象编号7-9中的环境因素(LPS)、肠BBB蛋白和相关抗原的12种不同抗原测试的IgG、IgM和IgA抗体水平

	*LPS	连蛋白- 闭合蛋白	肠 ZOT 受体	细胞 连接 蛋白	**MMP 3	脑 ZOT 结合 蛋白	脑 ZOT 受体	钙卫 蛋白	**GFAP	$\alpha$ -B 晶体蛋白	BBB 蛋白	髓鞘 碱性 蛋白
Cal 1	0.786	0.778	0.557	0.787	0.551	0.557	0.795	0.807	0.546	0.814	0.57	0.832
Cal 2	0.708	0.738	0.54	0.636	0.555	0.558	0.746	0.75	0.559	0.772	0.51	0.77

样品 7 (OD)	0.293	0.26	0.278	0.845	0.281	0.262	0.285	0.409	0.255	0.245	0.27	0.282
指数	<b>0.38</b>	<b>0.33</b>	<b>0.47</b>	<b>0.96</b>	<b>0.48</b>	<b>0.46</b>	<b>0.34</b>	<b>0.49</b>	<b>0.47</b>	<b>0.29</b>	<b>0.45</b>	<b>0.35</b>

样品 8 (OD)	0.189	0.201	0.174	0.623	0.203	0.176	0.167	0.181	0.204	0.137	0.182	0.139
指数	<b>0.26</b>	<b>0.25</b>	<b>0.37</b>	<b>0.80</b>	<b>0.37</b>	<b>0.36</b>	<b>0.23</b>	<b>0.24</b>	<b>0.37</b>	<b>0.22</b>	<b>0.35</b>	<b>0.22</b>

样品 9 (OD)	1.307	0.237	0.889	0.238	0.251	0.238	0.248	0.226	0.233	0.228	0.239	1.026
指数	<b>1.72</b>	<b>0.31</b>	<b>1.38</b>	<b>0.33</b>	<b>0.43</b>	<b>0.41</b>	<b>0.30</b>	<b>0.29</b>	<b>0.40</b>	<b>0.28</b>	<b>0.42</b>	<b>1.22</b>

\* 脂多糖                      \*\* 基质金属蛋白酶3                      \*\*\* 胶质细胞原纤维酸性蛋白

$$\text{指数} = \frac{\text{患者的平均OD}}{\text{校准物的平均OD}}$$

表4-针对代表具有腹部疾病和肠通透性的患者中的环境因素(LPS)、肠BBB蛋白和相关抗原的12种不同抗原测试的IgG、IgM和IgA抗体水平

	*LPS	连蛋白- 闭合蛋白	肠 ZOT 受体	细胞 连接 蛋白	**MMP 3	脑 ZOT 结合 蛋白	脑 ZOT 受体	钙卫 蛋白	***GFAP	$\alpha$ -B 晶体蛋白	BBB 蛋白	髓鞘 碱性 蛋白
Cal 1	0.698	0.527	0.703	0.541	0.707	0.719	0.704	0.537	0.697	0.53	0.718	0.706
Cal 2	0.68	0.524	0.67	0.526	0.679	0.685	0.681	0.525	0.678	0.535	0.674	0.689
样品 10 (OD)	3.789	3.741	2.146	3.745	2.13	0.466	1.217	0.758	0.598	1.285	1.009	2.127
指数	3.8	3.769	1.896	3.762	2.089	0.39	0.975	0.921	0.528	1.166	0.98	1.695
						<b>0.61</b>	<b>1.58</b>	<b>1.58</b>	<b>0.82</b>		<b>1.43</b>	
样品 11 (OD)	1.396	0.621	2.017	3.11	0.694	0.418	0.53	0.419	0.495	0.406	0.466	0.444
指数	1.237	0.572	1.973	2.713	0.651	0.393	0.444	0.453	0.455	0.442	0.375	0.433
	<b>1.91</b>	<b>1.14</b>			<b>0.97</b>	<b>0.58</b>	<b>0.70</b>	<b>0.82</b>	<b>0.69</b>	<b>0.80</b>	<b>0.60</b>	<b>0.63</b>
样品 12 (OD)	3.56	3.775	1.454	1.943	1.985	3.765	2.012	3.827	2.674	3.713	3.76	2.02
指数	3.648	3.773	1.727	1.941	1.952	3.735	2.012	3.837	3.498	2.894	3.789	2.051

\* 脂多糖

\*\* 基质金属蛋白酶3

\*\*\* 胶质细胞原纤维酸性蛋白

$$\text{指数} = \frac{\text{患者的平均OD}}{\text{校准物的平均OD}}$$

表5-针对代表具有谷蛋白共济失调的患者中的环境因素(LPS)、肠BBB蛋白和相关抗原的12种不同抗原测试的IgG、IgM和IgA抗体水平

	*LPS	连蛋白- 闭合蛋白	肠 ZOT 受体	细胞 连接 蛋白	**MMP 3	脑 ZOT 结合 蛋白	脑 ZOT 受体	钙卫 蛋白	***GFAP 晶体蛋白	α-B 晶体蛋白	BBB 蛋白
Cal 1	0.722	0.513	0.709	0.514	0.722	0.695	0.52	0.716	0.525	0.714	0.729
Cal 2	0.696	0.515	0.692	0.512	0.697	0.699	0.523	0.697	0.527	0.7	0.716
样品 13 (OD)	1.911	0.801	0.344	1.575	0.284	3.772	3.676	1.577	3.612	0.723	3.603
	1.886	0.713	0.281	1.53	0.221	3.759	3.686	1.257	3.674	0.481	3.63
指数	1.47	0.45	0.36	2.01	0.36	3.76	2.01	0.85	0.85	0.85	0.85
样品 14 (OD)	1.674	0.351	0.742	0.281	1.532	2.538	1.335	3.708	1.336	3.701	0.579
	1.644	0.283	0.625	0.202	1.553	2.454	1.226	3.692	1.264	3.648	0.516
指数	0.62	0.98	0.47	2.37	2.37	3.58	2.37	2.37	2.37	2.37	0.76
样品 15 (OD)	1.205	1.564	0.321	0.744	0.285	3.636	0.469	0.638	3.668	1.296	1.25
	1.18	1.536	0.266	0.735	0.276	3.657	0.489	0.486	3.679	1.254	1.281
指数	1.68	0.42	1.44	0.40	3.35	0.92	0.92	0.80	0.80	1.80	1.75













\* 脂多糖

\*\* 基质金属蛋白酶3

\*\*\* 胶质细胞原纤维酸性蛋白

$$\text{指数} = \frac{\text{患者的平均OD}}{\text{校准物的平均OD}}$$

表6-针对代表具有多发性硬化症(MS)的患者中的环境因素(LPS)、肠BBB蛋白和相  
关抗原的12种不同抗原测试的IgG、IgM和IgA抗体水平

	*LPS	连蛋白- 闭合蛋白	肠 ZOT 受体	细胞 连接 蛋白	**MMP 3	脑 ZOT 结合 蛋白	脑 ZOT 受体	钙卫 蛋白	***GFAP	$\alpha$ -B 晶体蛋白	BBB 蛋白
Cal 1	0.692	0.498	0.493	0.705	0.69	0.694	0.506	0.697	0.519	0.704	0.723
Cal 2	0.649	0.469	0.508	0.721	0.721	0.721	0.516	0.719	0.54	0.726	0.748
样品 16 (OD)	1.855	3.82	0.445	0.349	1.447	1.478	0.508	1.287	3.705	3.804	3.834
指数	1.882	3.83	0.291	0.227	1.244	1.259	0.35	1.218	3.704	3.828	3.845
			<b>0.52</b>	<b>0.58</b>	<b>1.89</b>	<b>1.93</b>	<b>0.84</b>	<b>1.77</b>			
样品 17 (OD)	0.467	3.814	0.266	0.244	0.385	0.517	3.677	3.653	0.525	3.834	3.782
指数	0.398	3.827	0.152	0.253	0.437	0.451	3.693	3.704	0.466	3.834	3.778
	<b>0.65</b>		<b>0.30</b>	<b>0.50</b>	<b>0.58</b>	<b>0.68</b>		<b>5.20</b>	<b>0.94</b>		
样品 18 (OD)	0.618	0.439	0.353	0.221	0.662	1.226	0.405	1.273	3.665	3.84	2.721
指数	0.458	0.292	0.38	0.194	0.528	1.31	0.29	1.306	3.726	3.848	2.77
	<b>0.80</b>	<b>0.76</b>	<b>0.52</b>	<b>0.41</b>	<b>0.83</b>	<b>1.79</b>	<b>0.68</b>	<b>1.82</b>			

\* 脂多糖      \*\* 基质金属蛋白酶3      \*\*\* 胶质细胞原纤维酸性蛋白

$$\text{指数} = \frac{\text{患者的平均OD}}{\text{校准物的平均OD}}$$

表7-抵抗血液中LPS、闭合蛋白/连蛋白和肌动球蛋白网络的抗体的说明

<b>LPS IgA</b>	+	+	-	+	-
<b>LPS IgM</b>	+	+	-	+	-
<b>LPS IgG</b>	+	+	-	+	-
闭合蛋白/ 连蛋白 <b>IgG</b>	-	+	+	-	-
闭合蛋白/ 连蛋白 <b>IgM</b>	-	+	+	-	-
闭合蛋白/ 连蛋白 <b>IgA</b>	-	+	+	-	-
肌动球蛋白 <b>IgG</b>	-	-	-	+	+
临床 指示	肠道菌群 生态失调	由细菌抗原 通过细胞旁 途径造成的 肠屏障完整 性损坏	由非细菌抗 原的因素通 过细胞旁途 径造成的肠 屏障完整性 损坏	由细菌抗原 通过跨细胞 途径造成的 肠屏障完整 性损坏	针对在慢性 活动性肝炎 和原发性胆 汁性肝硬化 中发现的粘 膜上皮细胞 和其他组织 细胞骨架的 自身免疫

表8-抵抗口液中LPS、闭合蛋白/连蛋白和肌动球蛋白网络的抗体的说明

LPS IgA+IgM	+	+	-	+	-
闭合蛋白/ 连蛋白 IgA	-	+	+	-	-
肌动球蛋白 IgA	-	-	-	+	+
临床 指示	肠道菌群 生态失调	由细菌抗原 通过细胞旁 途径造成的 肠屏障完整 性损坏	由非细菌抗 原的因素通 过细胞旁途 径造成的肠 屏障完整性 损坏	由细菌抗原 通过跨细胞 途径造成的 肠屏障完整 性损坏	针对粘膜上 皮细胞和其 他组织细胞 骨架的自身 免疫

表9-抵抗血液中LPS、闭合蛋白/连蛋白、  
血脑屏障蛋白和神经元抗原的抗体的说明

LPS IgA	+	+	-	+	-
LPS IgM	+	+	-	+	-
LPS IgG	+	+	-	+	-
闭合蛋白/ 连蛋白 IgG	-	+	+	-	-
闭合蛋白/ 连蛋白 IgM	-	+	+	-	-
闭合蛋白/ 连蛋白 IgA	-	+	+	-	-
BBB 蛋白 IgG, IgM, IgA	-	+	+	+	+
神经元 抗原 IgG, IgM, IgA	-	+	+	+	+
临床 指示	肠道菌群 生态失调	可能由细 菌毒素诱 导的肠和B BB完整性的 损坏， 其导致神 经炎症和 神经自身 免疫	可能由非 细菌毒素 的因素诱 导的肠和 BBB完整 性的损坏 ，其导致 神经炎症 和神经自 身免疫	肠道菌群生 态失调，伴 随或不伴随 肠屏障完整 性的损坏， 但伴随BBB 的损坏，导 致神经自身 免疫	BBB的损坏， 神经炎症和神 经自身免疫， 与肠屏障或肠 道菌群生态失 调无关

专利名称(译)	用于检测肠和血脑屏障通透性的方法及其测试材料		
公开(公告)号	<a href="#">CN103460044A</a>	公开(公告)日	2013-12-18
申请号	CN201280015809.0	申请日	2012-01-26
[标]申请(专利权)人(译)	免疫科学实验室公司		
申请(专利权)人(译)	免疫科学实验室公司		
当前申请(专利权)人(译)	免疫科学实验室公司		
[标]发明人	A沃佳达尼		
发明人	A·沃佳达尼		
IPC分类号	G01N33/53 C07K14/195 C07K16/12		
CPC分类号	G01N33/6893 G01N2333/195 G01N2800/06 G01N2800/709 G01N33/564 G01N33/53		
代理人(译)	张全信		
优先权	61/437244 2011-01-28 US		
其他公开文献	CN103460044B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开的是用于测试与肠和/或血脑屏障通透性相关的抗原的方法、试验和装置。例如，血液、唾液或其他体液可针对以下进行测试：(1)结合至细菌毒素(优选脂多糖)，和(2)结合至选自(a)肠相关抗原和(b)血脑屏障相关抗原中的至少一种的组织抗原。测试结果的分析可用于协助检测和诊断与肠渗漏综合征相关的疾病(由于细胞旁途径或跨细胞途径，和由于细菌毒素或一些其他原因)和/或用于与过度血脑屏障通透性相关的疾病，其在本文中考虑为包括神经性炎症和/或神经性自身免疫性疾病两者，和特别是肌萎缩性侧索硬化、帕金森病、多发性硬化症、阿尔茨海默氏病或周围神经病和重症抑郁症。

连蛋白/闭合蛋白的指数计算	
Cal 1(OD)	0.48
Cal 2(OD)	0.50
样品 3A(OD)	3.4
样品 3B(OD)	3.2
指数	6.7