



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102388307 B

(45) 授权公告日 2014. 09. 03

(21) 申请号 200980154256. 5

(22) 申请日 2009. 11. 12

(30) 优先权数据

61/113, 645 2008. 11. 12 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2011. 07. 11

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IL2009/001066 2009. 11. 12

(87) PCT国际申请的公布数据

W02010/055510 EN 2010. 05. 20

(73) 专利权人 耶达研究与发展有限公司

地址 以色列雷霍沃特

专利权人 伯莱翰女子医院公司

(72) 发明人 霍华德·L·韦纳 艾润·R·科恩

弗朗西斯科·J·昆塔纳

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理

有限公司 11262

代理人 陶贻丰 郑霞

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006. 01)

G01N 33/00 (2006. 01)

C07K 16/00 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1529617 A, 2004. 09. 15, 全文.

WO 2006/077126 A2, 2006. 07. 27, 全文.

WO 2006/117689 A, 2006. 11. 09, 全文.

CN 101218254 A, 2008. 07. 09, 全文.

WO 2007/056332 A2, 2007. 05. 18, 全文.

CN 101010098 A, 2007. 08. 01, 全文.

Lassmann H, Brück W, Lucchinetti CF..

The immunopathology of multiple sclerosis: an overview.. 《Brain Pathol》.2007, 第 17 卷 (第 2 期), 210-218.

吕继辉等. 多发性硬化患者合并症的临床介
析. 《中国临床医生杂志》. 2007, 第 35 卷 (第 10
期), 28-29.

审查员 李宏悦

权利要求书3页 说明书42页

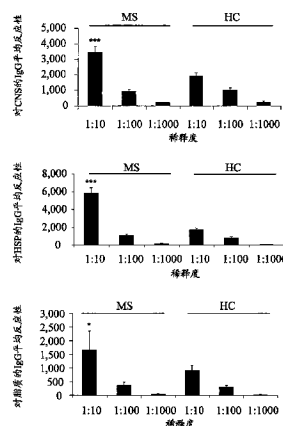
序列表86页 附图12页

(54) 发明名称

多发性硬化的诊断

(57) 摘要

本发明涉及用于诊断受试者的多发性硬化 (MS) 的方法和试剂盒。特别地, 本发明涉及用于诊断受试者的 MS 亚型的方法和试剂盒, 所述亚型选自复发缓解型 MS (RRMS)、继发进展型 MS (SPMS)、原发进展型 MS (PPMS) 以及选自 I 型 MS 病变和 II 型 MS 病变的 MS 病变的病理亚型。



1. 多种抗原在制备用于诊断受试者的多发性硬化 (MS) 亚型的试剂盒中的用途, 其中所述多种抗原选自表 1 到表 4 中列出的抗原组成的组, 且用于确定从该受试者获得的样品中的抗体对所述多种抗原的反应性, 从而确定该样品对所述多种抗原的反应性模式, 并且比较所述样品的反应性模式与对照反应性模式, 其中所述 MS 亚型选自以下组成的组:

(i) 复发缓解型多发性硬化 (RRMS), 其中所述多种抗原选自表 1 中列出的抗原组成的组;

(ii) 原发进展型多发性硬化 (PPMS), 其中所述多种抗原选自表 2 中列出的抗原组成的组;

(iii) 继发进展型多发性硬化 (SPMS), 其中所述多种抗原选自表 3 中列出的抗原组成的组; 以及

(iv) 选自 I 型病变和 II 型病变的 MS 病理亚型, 其中所述多种抗原选自表 4 中列出的抗原组成的组。

2. 如权利要求 1 所述的用途, 其中在获自该受试者的所述样品的反应性模式与对照样品的反应性模式之间的显著性差异是该受试者患 MS 亚型的指示。

3. 如权利要求 2 所述的用途, 其中使用学习与模式识别算法计算该差异。

4. 如权利要求 1 所述的用途, 其中所述试剂盒用于诊断受试者的复发缓解型多发性硬化 (RRMS), 其中所述多种抗原选自表 1 中列出的抗原, 并且所述对照反应性模式从健康受试者获得。

5. 如权利要求 4 所述的用途, 其中所述多种抗原包括表 1 中列出的抗原中的至少 5 种不同的抗原。

6. 如权利要求 4 所述的用途, 其中所述多种抗原包括表 1 中列出的所有抗原。

7. 如权利要求 1 所述的用途, 其中所述试剂盒用于诊断受试者的原发进展型多发性硬化 (PPMS), 其中所述多种抗原选自表 2 中列出的抗原, 并且所述对照反应性模式从健康受试者获得。

8. 如权利要求 7 所述的用途, 其中所述多种抗原包括表 2 中列出的抗原中的至少 5 种不同的抗原。

9. 如权利要求 7 所述的用途, 其中所述多种抗原包括表 2 中列出的所有抗原。

10. 如权利要求 1 所述的用途, 其中所述试剂盒用于诊断受试者的继发进展型多发性硬化 (SPMS), 其中所述多种抗原选自表 3 中列出的抗原, 并且所述对照反应性模式从 RRMS 受试者获得。

11. 如权利要求 10 所述的用途, 其中所述多种抗原包括表 3 中列出的抗原中的至少 5 种不同的抗原。

12. 如权利要求 10 所述的用途, 其中所述多种抗原包括表 3 中列出的所有抗原。

13. 如权利要求 1 所述的用途, 其中所述试剂盒用于在患有 MS 的受试者中诊断 I 型病变, 其中所述多种抗原选自表 4 中列出的抗原, 并且所述对照反应性模式从具有 II 型病变的受试者获得。

14. 如权利要求 1 所述的用途, 其中所述试剂盒用于在患有 MS 的受试者中诊断 II 型病变, 其中所述多种抗原选自表 4 中列出的抗原, 并且所述对照反应性模式从具有 I 型病变的受试者获得。

15. 如权利要求 1-14 中任一项所述的用途,其中所述对照选自以下组成的组:来自至少一个个体的样品、来自一组个体的一小组对照样品和来自对照个体的一组储存的数据。

16. 如权利要求 1 所述的用途,其中所述样品是血清样品。

17. 如权利要求 1 所述的用途,其中在确定所述样品中的抗体的反应性之前 1:10 稀释所述样品。

18. 如权利要求 1 所述的用途,其中所述多种抗原以抗原阵列形式使用。

19. 一种用于诊断 MS 亚型的试剂盒,该试剂盒包括:

(i) 选自由表 1 中列出的抗原组成的组的用于诊断 RRMS 的多种抗原;

(ii) 选自由表 2 中列出的抗原组成的组的用于诊断 PPMS 的多种抗原;

(iii) 选自由表 3 中列出的抗原组成的组的用于诊断 SPMS 的多种抗原;和 / 或

(iv) 选自由表 4 中列出的抗原组成的组的用于在患有 MS 的受试者中区分 I 型病变与 II 型病变的多种抗原。

20. 如权利要求 19 所述的试剂盒,所述试剂盒用于诊断 RRMS,该试剂盒包括选自由表 1 中列出的抗原组成的组的多种抗原。

21. 如权利要求 20 所述的试剂盒,该试剂盒包括表 1 中列出的所有抗原。

22. 如权利要求 20 所述的试剂盒,其中所述多种抗原包括表 1 中列出的抗原中的至少 5 种、至少 10 种或至少 15 种不同的抗原。

23. 如权利要求 19 所述的试剂盒,所述试剂盒用于诊断 PPMS,该试剂盒包括选自由表 2 中列出的抗原组成的组的多种抗原。

24. 如权利要求 23 所述的试剂盒,该试剂盒包括表 2 中列出的所有抗原。

25. 如权利要求 23 所述的试剂盒,其中所述多种抗原包括表 2 中列出的抗原中的至少 5 种、至少 10 种或至少 15 种不同的抗原。

26. 如权利要求 19 所述的试剂盒,所述试剂盒用于诊断 SPMS,该试剂盒包括选自由表 3 中列出的抗原组成的组的多种抗原。

27. 如权利要求 26 所述的试剂盒,该试剂盒包括表 3 中列出的所有抗原。

28. 如权利要求 26 所述的试剂盒,其中所述多种抗原包括表 3 中列出的抗原中的至少 5 种、至少 10 种或至少 15 种不同的抗原。

29. 如权利要求 19 所述的试剂盒,所述试剂盒用于在患有 MS 的受试者中区别 I 型病变与 II 型病变,该试剂盒包括选自由表 4 中列出的抗原组成的组的多种抗原。

30. 如权利要求 19 所述的试剂盒,其中所述试剂盒是以抗原阵列的形式。

31. 如权利要求 19 所述的试剂盒,该试剂盒还包括用于确定样品中的抗体对所述多种抗原的反应性的装置。

32. 如权利要求 19 所述的试剂盒,该试剂盒还包括用于比较不同样品中的抗体对所述多种抗原的反应性模式的装置。

33. 如权利要求 32 所述的试剂盒,其中所述用于比较反应性模式的装置包括学习与模式识别分析仪。

34. 一种抗原探针组,该抗原探针组包括表 1 中列出的所有抗原探针。

35. 一种抗原探针组,该抗原探针组包括表 2 中列出的所有抗原探针。

36. 一种抗原探针组,该抗原探针组包括表 3 中列出的所有抗原探针。

37. 一种抗原探针组,该抗原探针组包括表 4 中列出的所有抗原探针。

38. 一种制品,该制品包括权利要求 34-37 中任一项所述的抗原探针组。

39. 抗原探针组用于制备诊断 MS 亚型的诊断组合物的用途,所述抗原探针组包含选自由表 1 到表 4 之一列出的抗原组成的组的多种抗原,其中所述 MS 亚型选自由以下组成的组:

(i) RRMS,其中所述多种抗原选自由表 1 中列出的抗原组成的组;

(ii) PPMS,其中所述多种抗原选自由表 2 中列出的抗原组成的组;

(iii) SPMS,其中所述多种抗原选自由表 3 中列出的抗原组成的组;以及

(iv) 选自 I 型病变和 II 型病变的 MS 病理亚型,其中所述多种抗原选自由表 4 中列出的抗原组成的组。

40. 如权利要求 39 所述的用途,其中所述诊断组合物用于确定样品中的抗体的反应性,从而确定所述样品对所述多种抗原的反应性模式,其中在所述样品的反应性模式与对照样品的反应性模式之间的显著性差异是 MS 亚型的指示。

多发性硬化的诊断

发明领域

[0001] 本发明涉及用于诊断受试者的多发性硬化 (MS) 的方法和试剂盒。特别地,本发明涉及用于诊断受试者的 MS 亚型的方法和试剂盒,所述亚型选自复发-缓解型 MS (RRMS)、继发-进展型 MS (SPMS)、原发-进展型 MS (PPMS) 以及选自 I 型 MS 病变和 II 型 MS 病变的 MS 病变的病理亚型。

[0002] 发明背景

[0003] 多发性硬化 (MS) 是推测具有自身免疫病因的中枢神经系统 (CNS) 的慢性炎症性疾病。MS 的特征为脑和脊髓中的局灶性病变 (斑块),导致进行性神经功能异常。MS 的病因是未知的,但是认为它是由遗传因素和环境因素联合产生的。目前,没有用于诊断 MS 的特异性测试,诊断依赖于对受试者临床病史的认识。大脑和脊髓的 MRI、脑脊液的分析以及视觉途径和躯体感觉途径的诱发电位的研究可支持诊断。此外,必须排除具有相似表现的全身性病因或传染性病因。多发性硬化可以不可预测地进展和退化;然而,存在几种模式的症状。大约 85-90% 的患者开始于复发-缓解型 (RRMS) 进程并且 40% 患者最终变为进展型 (继发进展型 MS, SPMS);在 10% 患者中,MS 呈现原发进展型病程 (PPMS)。不同的 MS 亚型以过去的疾病进程 (例如,神经衰退不可预测的复发、缓解和进展) 为特征。从临床角度看,具有不同病程的患者显示不同的治疗响应。例如,具有复发-缓解型 MS 的患者相比于具有进展型病程的患者更有可能响应于免疫调节疗法 (Bitsch 和 Brück, CNS Drugs, 2002; 16(6):405-18)。因此,表征 MS 亚型不仅对于预后而且对于治疗决策而言都是重要的。

[0004] MS 不仅在其临床症状和进展速率上是多样的,而且在其对疗法的响应和组织病理学发现上也是多样的 (Lucchinetti 等人,2000, Ann Neurol 47,707-17)。在从给定 MS 患者检查的多种病变中主动脱髓鞘的模式是相同的,但在不同患者之间是多样的,暗示了致病异质性。I 型以 T 细胞 / 巨噬细胞介导的脱髓鞘为特征。II 型以抗体 / 补体相关联的脱髓鞘为特征。III 型根据远端少突胶质细胞病变 (distal oligodendrogliaopathy) 定义,IV 型以斑块周边 (periplaque) 白质中的少突胶质细胞变性为特征;迄今为止 IV 型仅在尸检病例中被鉴定。I 型病变和 II 型病变显示典型的静脉周分布和分明的边界,它们是 MS 病变的病理标志并且被认为由经典自身免疫机制产生 (Lucchinetti, 等人,2004, Ann Neurol 56,308)。MRI 通常用来观察体内 MS 病变。然而,利用 MRI 研究 MS 病变受限制,因为它不能提供关于病变的病理构成的信息。从临床观点看,已报道具有 II 型而不是 I 型的患者响应于血浆去除术 (Keegan 等人,2005, Lancet 366,579-82)。因此,对于鉴定将响应于用血浆去除术治疗的患者存在需要。

[0005] McDonald 标准作为有助于多发性硬化 (MS) 的早期诊断和准确诊断的指南于 2001 年被引入并修订于 2005 年 (Polman 等人,2006, Ann Neurol. ;59(4):727-8)。将诊断分类减少至 a) 有 MS, b) 没有 MS, 或 c) 可能有 MS。该标准的优点包括在单症状表现后或者在原发进展型进程的情况下作出确定的 MS 诊断的能力。然而,诊断分类方案和 MRI 标准仍是复杂的和繁琐的,这种复杂性限制了其在日常实践中的使用。此外,这些标准的特异性相对较低,突出了排除其他诊断的临床判断的重要性。此外,研究已观察到,标准的 MS 疾病调修

药剂 (disease-modifying medication) 能够使还不满足这些诊断标准的患者受益。最后, McDonald 标准大大减少了 MS 诊断所需的时间, 然而它对于被诊断可能患有 MS 或最终将接受 PPMS 诊断的那些个体而言仍受限制。

[0006] 尽管 MS 被认为是 T 细胞介导的疾病, 但几条证据支持 B 细胞在该病中的作用 (Archelos 等人, 2000, *Ann Neurol.* 47, 694-706)。B 细胞能够通过其分泌抗体和细胞因子或者通过充当激活致病性 T 细胞的抗原递呈细胞 (APC) 对 MS 进展产生影响。B 细胞在加工和递呈由其产生的抗体所识别的抗原上明显更为有效。因此, 在 MS 的人模型和实验模型中, 线性 B 细胞表位和 T 细胞表位共同定位于由自身免疫应答所靶向的 CNS 抗原中并不出人意料 (Meinl 等人, 2006, *Ann Neurol.* 59, 880-92; Wucherpfennig 等人, 1997, *J Clin Invest.* 100, 1114-22)。

[0007] 免疫系统生物标志

[0008] 免疫系统的先天分支和适应性分支可视为一种类型的生物健康维持系统。在生理学方面, 认为构成免疫系统的细胞和分子起作用以对付炎症 (Cohen, 2000, Academic Press, London)。炎症被经典地定义为导致痊愈的由损伤激活的共同过程。根据免疫系统发起并应付炎症的方式, 免疫系统通过愈合伤口、包含病原体、组织结缔组织的结构、生长 (血管发生) 或破坏血管、触发某些器官的再生、激活衰老细胞和具有无法修复的 DNA 损坏的细胞的凋亡、降解累积的异常分子、除去废物以及进行其他生命活动来维持身体 (Cohen, 2000)。炎症的这些不同的表现维持器官的完整性以响应于其不间断的发育后衰变, 器官不间断的发育后衰变是由于瘤形成, 环境损伤及感染, 代谢产物、废物以及其他中毒物的累积, 以及不可抗拒的熵增加。

[0009] 已详细调查在 MS 患者中产生脑脊液 (CSF) 抗体作为对髓鞘自身抗原的响应的可能性。已描述了对几种 CNS 抗原有反应性的抗体, 包括针对如下蛋白的那些抗体: 髓鞘少突胶质细胞糖蛋白 (MOG)、少突胶质细胞特异性蛋白 (OSP)、髓鞘碱性蛋白 (MBP)、蛋白脂质蛋白 (PLP)、髓鞘相关糖蛋白、2', 3' - 环核苷酸 3' 磷酸二酯酶 (CNP 酶) 以及 ab- 晶状体蛋白。当分析时, 这些抗体的亚类与促炎症免疫应答相关。这些自身抗体中许多也在血液中被检出 (Lalivie 等人, 2006, *Proc Natl Acad Sci US.* 103, 2280-5)。此外, 还在 MS 患者中发现对非髓鞘自身抗原 (Annunziata 等人, 1999, *J Neurol Sci.* 168, 32-6; Barned 等人, 1995, *Neurology.* 45, 384-5; Colaco 等人, 1987, *Clin Exp Immunol.* 68, 313-9; Roussel 等人, 2000, *J Autoimmun.* 14, 259-65; Spadaro 等人, 1999, *Mult Scler.* 5, 121-5) 有反应性和对病原体 (Cepok 等人, 2005, *J Clin Invest.* 115, 1352-60) 有反应性的高滴度抗体。

[0010] 抗体在 MS 中所起的作用仍有待进一步分类。针对 MOG 中的构象表位的抗体已从 MS 病变中被纯化并且其显示改变 CNS 细胞的生理学 (Lalivie 等人, 2006)。因此, 美国专利申请公布第 2005/0009096 号提供了利用针对髓鞘/MOG 组分的特异性表位的自身抗体的检测或定量以用于 MS 的诊断或预后的方法。

[0011] 对 CNS 抗原中的线性表位有反应性的抗体也已经从 MS 病变中分离 (Dalakas, 2006, *Pharmacol Ther.* 112, 57-70; Genain 等人, 1999, *Nat Med.* 5, 170-5), 暗示它们还在 MS 病理学中起直接作用。而且, 从 MS 患者中分离的针对 MBP 的抗体已显示具有直接的蛋白水解活性 (Ponmarenko 等人, 2006, *Proc Natl Acad Sci US.* 103, 281-6)。美国专利申请公布第 2003/0092089 号涉及用于检测 MBP 自身抗体的测定, 该测定可选地结合与 MS 及相关疾

病有关的其他生物化学标志的测量。

[0012] 生物标志是与特定的疾病状态有关的解剖学、生理学、生物化学或分子的参数。对 MS 生物标志的寻找已聚焦于炎症过程的一般活动的指示物。几种生物标志目的在于不是追踪炎症过程本身,而是追踪其后果,诸如神经变性和轴突缺失。因此,已描述神经微丝轻链、tau 和 14-3-3 蛋白的水平改变与 MS 患者的轴突缺失相关。

[0013] 因为 MS 被认为是器官特异性自身免疫疾患,所以免疫生物标志具有反映疾病活动及其对疗法的响应的潜力。几项大规模蛋白质组学研究已尝试表征 CSF 和血清中的抗体,目的是鉴定 MS 患者中还未知的自身免疫攻击的靶 (Lefran 等人,2004, J Immunol 172, 669-78)。而且,已研究特异性抗体作为 MS 的生物标志,导致鉴定针对 CSF 和 / 或血清中的髓鞘抗原的若干上调的抗体应答。然而,这些生物标志不可概括至大多数 MS 患者或者不能在独立研究中被验证 (Rinaldi 和 Gallo,2005, Neurol Sci. 26, S215-7 ;Lim 等人,2005, Mult Scler. 11, 492-4)。与其他自身免疫疾病诸如糖尿病 (Quintana 等人,2004, Proc Natl Acad Sci, 14615-21) 和系统性红斑狼疮 (Li 等人,2005, J Clin Invest. 115, 3428-39) 中观察到的类似,有可能单个生物标志将不是决定性的,而是需要形成指纹的几种生物标志的一种模式。

[0014] 抗原芯片

[0015] 抗原微阵列是用于免疫应答的高通量表征的新开发的工具 (Robinson 等人,2002, Nat Med 8, 295-301), 已用于分析免疫接种中和自身免疫疾患中的免疫应答 (Robinson 等人,2002 ;Robinson 等人,2003, Nat Biotechnol. 21, 1033-9 ;Quintana 等人,2004 ;Kanter 等人,2006, Nat Med 12, 138-43)。已经假定,多种反应性的模式可能比单一抗原-抗体关系更能说明问题 (Quintana 等人,2006, Lupus 15, 428-30), 如之前对健康和患病的小鼠 (Quintana 等人,2004 ;Quintana 等人,2001, J Autoimmun 17, 191-7) 以及人 (Merbl 等人,2007, J Clin Invest 117, 712-8 ;Quintana 等人,2003, J Autoimmun 21, 65-75) 的自身免疫所有组成部分的分析所显示的。因此,自身抗体所有组成部分具有提供对疾病发病机理的新见解和充当疾病过程的免疫生物标志的潜力 (Cohen,2007, Nat Rev Immunol. 7, 569-74)。

[0016] 抗原微阵列已用于表征系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎和视神经脊髓炎中的血清自身抗体。然而,没有报道 MS 中的高亲和力特异性抗体以某种规律存在于血清中 (Meinl 等人,2006, Ann Neurol. 59, 880-92 ;O' Connor 等人,2007, Nat Med 12, 12 ;Zhou 等人,2006, Proc Natl Acad Sci US. 103, 19057-62)。与血清中的自身抗体相反,Kanter 和同事使用微阵列来检测 CSF 中的脂质 (Kanter 等人,2006) 和 $\alpha\alpha$ B-晶状体蛋白 (Ousman 等人,2007, Nature. 448, 474-9) 反应性抗体。引人注目地,针对 α B-晶状体蛋白的抗体具有低亲和力,以 1 : 20 稀释度可检出 (Ousman 等人,2007)。

[0017] 本发明的发明人中的一些发明人的 PCT 公布第 WO 02/08755 号涉及用于对预定抗原分类并藉此鉴定它们的方法、系统和制品,所述预定抗原对源自需要诊断疾病或监测治疗的患者受试者的血清的未确定的免疫球蛋白有反应性。该' 755 公布公开了抗原阵列用于鉴定对源自患多种疾病的受试者的血清的免疫球蛋白有反应性的抗原的用途。还公布了诊断方法和可用于这些方法的系统,这些方法和系统采用对多种抗原的抗原亚组进行分类的步骤,所述抗原亚组对源自患有免疫系统受损或遭受疾病的多个患者的多种抗体有反应

性,并且将受试者的抗体与得到的类(cluster)相关联或去关联。尽管 WO 02/08755 公开了可用于诊断除其他自身免疫疾病之外的 MS 的方法,但没有公开诊断 MS 的不同亚型或监测 MS 进展。

[0018] 本发明的发明人中的一些发明人的美国专利申请公布第 2005/0260770 号公开了抗原阵列系统及其诊断用途。该申请提供了在受试者诊断免疫疾病且特别是 1 型糖尿病或免疫疾病倾向的方法,该方法包括确定受试者的免疫球蛋白特异性结合抗原探针组的每种抗原探针的能力。抗原探针组包括选自以下组成的组的多种抗原探针:细胞/组织结构分子的至少一部分、热休克蛋白的至少一部分、免疫系统分子的至少一部分、同聚多肽的至少一部分、激素的至少一部分、代谢酶的至少一部分、微生物抗原的至少一部分、软体动物抗原的至少一部分、核酸的至少一部分、植物抗原的至少一部分、血浆分子的至少一部分、以及组织抗原的至少一部分,其中受试者的免疫球蛋白的结合能力指示免疫疾病或免疫疾病倾向。然而,现有技术没有公开可提供用于诊断 MS、具体用于区别 MS 的不同亚型并预测或监测疾病进展的特异性、可靠的、准确的且区别性测定的抗原阵列。这些区别性测定在为每位患者定制适当的治疗方法上将具有高度价值。

[0019] PCT 公布第 WO 07/137410 号涉及用于诊断 MS、MS 的不同形式或另外的脱髓鞘疾患的方法。具体地说,WO 07/137410 涉及根据分子质量鉴定的、发现在临床诊断的 MS 或其他神经疾患与正常患者之间具有不同的丰度或强度的特异性代谢产物。尽管如此,WO 07/137410 既没有公开也没有提及利用测试抗体反应性模式来鉴定不同 MS 亚型中的独特特征标记(signature)模式并且区分患有 MS 的患者与患其他神经疾患的患者。

[0020] 因此,对可用于在受试者中诊断 MS 且特别是诊断 MS 亚型的改进的诊断方法和试剂盒存在需要。

[0021] 发明概述

[0022] 本发明提供了用于诊断受试者的多发性硬化(MS)的方法和试剂盒,用于实施这种诊断的抗原探针阵列以及用于产生这些阵列的抗原探针组。特别地,本发明提供了用于诊断受试者的 MS 亚型的方法和试剂盒,其中所述 MS 亚型选自复发-缓解型 MS(RRMS)、继发进展型 MS(SPMS)、原发进展型 MS(PPMS)以及选自 I 型 MS 病变和 II 型 MS 病变的 MS 病变的病理亚型。

[0023] 本发明部分地基于当使用抗原阵列测试 MS 患者的抗体反应性时获得的出人意料的结果。该分析导致自身抗体反应性的独特特征标记模式的鉴定。现在第一次公开的是,根据对中枢神经系统(CNS)抗原、热休克蛋白(HSP)和脂质抗原的反应性,独特自身抗体特征标记模式表征 MS 亚型,也就是复发-缓解型 MS(RRMS)、继发进展型 MS(SPMS)以及原发进展型 MS(PPMS)。引人注目地,独特自身抗体特征标记模式区分 MS 亚型与其他神经疾病或自身免疫驱动性疾病,包括阿尔兹海默病(AD)、肾上腺脑白质营养不良(ALD)和红斑狼疮。还公开了:根据对脂质和 CNS 来源的肽的反应性,独特的自身抗体特征标记模式表征 MS 病变的不同免疫病理学模式,由此第一次提供用于对 MS 类别和阶段进行分亚型的基于生物标志的测定。

[0024] 因此,本发明涉及用于诊断 MS 亚型的方法和试剂盒。根据本发明的原理,试剂盒包括在本文也称为抗原探针组的多种抗原。包括多种抗原的这些抗原探针组与患有 MS 的受试者的血清特异性反应。根据本发明的原理,多种抗原可有利地以抗原阵列的形式使用。

根据一些实施方案,抗原阵列便利地以抗原芯片形式排列。

[0025] 本发明鉴定了与 MS 亚型相关的抗原的类,并且确定了用测试血清相比于对照血清观察到的反应性。尽管没有鉴定凭自身足以充分诊断患有 MS 或 MS 亚型的受试者的单一抗原,但本文在以下表 1 到表 4 中详述的这些抗原的特定组合比每种单独的抗原在区别患者受试者和对照受试者上明显地更加准确和可靠。如以下详述的表 1 包含 SEQ ID NO:7、14、23-83 及 98-100,源自 SEQ ID NO:4-6、10 以及 12 的片段和非肽部分乳糖脑苷脂 (lactocerebroside)。如以下详述的表 2 包含 SEQ ID NO:7、8、13、16、22、29、42、51、60、67-71、84、85 及 101,源自 SEQ ID NO:4-6、9、10、12 以及 20 的片段,以及非肽部分明尼苏达沙门氏菌 (*S. minnesota*) LPS、大肠杆菌 LPS 和硫酸软骨素 4。如以下详述的表 3 包含 SEQ ID NO:6、7、19、21、25、26、28、29、31、32、35-38、40-42、44、48、53、55、56、64、70、73、75、85-96、100、102 及 103,源自 SEQ ID NO:4-6、10、12 及 15 的片段,以及非肽部分无唾液酸神经节苷脂 -GM2、心磷脂和胆固醇。如以下详述的表 4 包含 SEQ ID NO:17、29、43、85 及 97,源自 SEQ ID NO:5 及 12 的片段,以及非肽部分:15-酮胆甾烷、15 α -羟基胆甾烯、神经节苷脂 -GM4、15-酮胆甾烯、四唾液酸神经节苷脂 -GQ1B、脑 L- α -溶血磷脂酰丝氨酸 (L- α -lysophosphatidylserine) 和乳糖基神经酰胺。

[0026] 表 1- 区别 RRMS 与健康对照 (HC) 的抗原

[0027]

抗原	类型	序列/SEQ ID NO:
MBP 31-50	肽	源自 SEQ ID NO: 6
HSP70 481-500	肽	ANGILNVTATDKSTGKANKI (SEQ ID NO: 23)
PLP 65-84	肽	源自 SEQ ID NO: 12
GFAP	蛋白	SEQ ID NO: 14
HSP70 511-530	肽	KEEIERMVQEAEKYKADEV (SEQ ID NO: 24)
MBP 41-60	肽	源自 SEQ ID NO: 6
HSP60 286-305	肽	LVLNRLKVGLQVVAVKAPGF (SEQ ID NO: 25)
HSP60 496-515	肽	QSSSEVGYDAMAGDFVNMVE (SEQ ID NO: 26)
HSP70 151-170	肽	NDSQRQATKDAGVIAGLNVL (SEQ ID NO: 27)
HSP60 526-545	肽	RTALLDAAGVASLLTTAEVV (SEQ ID NO: 28)
MBP 11-30	肽	源自 SEQ ID NO: 6
OSP 61-80	肽	GLYHCKPLVDILILPGYVQA (SEQ ID NO: 29)
HSP70 31-50	肽	NDQGNRTTPSYVAFTDTERL (SEQ ID NO: 30)
CNP 286-305	肽	ISALFVTPKTTGARVELSEG (SEQ ID NO: 31)
HSP60 255-275	肽	QSIVPALEIANAHKPLVIAA (SEQ ID NO: 32)
HSP60 106-125	肽	NEEAGDGTTTATVLARSIK (SEQ ID NO: 33)
OSP 31-50	肽	VVTCGYTIPTCRKLDLGSK (SEQ ID NO: 34)
P2 61-80	肽	源自 SEQ ID NO: 10
MBP 84-94	肽	源自 SEQ ID NO: 6
HSP60 376-395	肽	EQLDVTTSEYEKEKLNERLA (SEQ ID NO: 35)
HSP70 286-305	肽	SLFEGIDFYTSITRARFEEL (SEQ ID NO: 36)
HSP60 136-155	肽	NPVEIRRGVMLAVDAVIAEL (SEQ ID NO: 37)
HSP70 136-155	肽	GYPVTNAVITVPAYFNDSQR (SEQ ID NO: 38)
P2 46-65	肽	源自 SEQ ID NO: 10
OSP 136-155	肽	VATIWFVCAHRETTIVSFG (SEQ ID NO: 39)
P2 1-20	肽	源自 SEQ ID NO: 10
MOG 91-110	肽	源自 SEQ ID NO: 5

[0028]

HSP60 361-380	肽	KGDKAQIEKRIQEIIIEQLDV (SEQ ID NO: 40)
HSP70 451-470	肽	KDNNLLGRFELSGIPPAPGV (SEQ ID NO: 41)
HSP70 210-229	肽	TIDDGIFEVKATAGDTHLGG (SEQ ID NO: 42)
HSP60 240-259	肽	QDAYVLLSEKKISSIQSIVP (SEQ ID NO: 43)
HSP60 271-290	肽	LVIIAEDVDGEALSTLVLR (SEQ ID NO: 44)
OSP 76-95	肽	GYVQACRALMIAASVLGLPA (SEQ ID NO: 45)
PLP 178-191	肽	源自 SEQ ID NO: 12
CNP 271-290	肽	QDVLKKSYSKAFTLTISALF (SEQ ID NO: 46)
P2 76-95	肽	源自 SEQ ID NO: 10
HSP70 631-640	肽	GSGPTIEEVD (SEQ ID NO: 47)
PLP 248-259	肽	源自 SEQ ID NO: 12
HSP60 195-214	肽	RKGVITVKDGKTLNDELEII (SEQ ID NO: 48)
CNP 61-80	肽	SGKSTLARVIVDKYRDGTKM (SEQ ID NO: 49)
MOG 196-215	肽	源自 SEQ ID NO: 5
HSP60 46-65	肽	LLADAVAVTMGPKGRTVIE (SEQ ID NO: 50)
HSP70 195-214	肽	LIFDLGGGTFDVSILTIDDG (SEQ ID NO: 51)
HSP70 436-455	肽	PGVLIQVYEGERAMTKDNNL (SEQ ID NO: 52)
HSP60 166-185	肽	EEIAQVATISANGDKEIGNI (SEQ ID NO: 53)
MBP 104-123	肽	源自 SEQ ID NO: 6
MBP 71-92	肽	源自 SEQ ID NO: 6
PLP 180-199	肽	源自 SEQ ID NO: 12
HSP70 255-275	肽	NKRAVRLRTACERAKRTLS (SEQ ID NO: 54)
MOBP 166-185	肽	源自 SEQ ID NO: 4
CNP 240-259	肽	YFGKRPPGVLHCTTKFCDYG (SEQ ID NO: 55)
HSP60 16-35	肽	RVLAPHLTRAYAKDVKFGAD (SEQ ID NO: 56)
HSP60 301-320	肽	KAPGFGDNRKNQLKDMAIAT (SEQ ID NO: 57)
MOBP 151-170	肽	源自 SEQ ID NO: 4
CNP 91-110	肽	GARGAFSEEYKRLDEDLAAY (SEQ ID NO: 58)
HSP70 106-125	肽	SYKGETKAFYPEEISSMVL (SEQ ID NO: 59)
CNP 406-421	肽	TQGSRKGGALQSCITII (SEQ ID NO: 60)
HSP60 421-440	肽	VTDALNATRAAVEEGIVLGG (SEQ ID NO: 61)
HSP60 61-80	肽	TVIIIEQSWGSPKVTKDGVTV (SEQ ID NO: 62)
AB10-20	肽	YEVHHQKLVEFF (SEQ ID NO: 98)
HSP60 511-530	肽	VNMVEKGIIDPTKVVRTALL (SEQ ID NO: 63)
乳糖脑苷脂	脂质	PubChem 物质 ID: 24892591

[0029]

HSP70 406-425	肽	AGGVMTALIKRNSTIPTKQT (SEQ ID NO: 64)
MOG 76-95	肽	源自 SEQ ID NO: 5
HSP70 316-335	肽	PVEKALRDAKLDKAQIHDLV (SEQ ID NO: 65)
HSP60 225-244	肽	SPYFINTSKGQKCEFAQDAYV (SEQ ID NO: 66)
HSP60 76-95	肽	DGVTVAKSIDLKDKYKNIGA (SEQ ID NO: 67)
MOG 106-125	肽	源自 SEQ ID NO: 5
HSP70 466-485	肽	PAPGVPQIEVTFDIDANGIL (SEQ ID NO: 68)
CNP 1-20	肽	MNRGFSRKSHTFLPKIFFRK (SEQ ID NO: 69)
HSP70 166-185	肽	GLNVLRIINEPTAAAIAYGL (SEQ ID NO: 70)
HSP70 121-140	肽	SMVLTKMKEIAEAYLGYPVT (SEQ ID NO: 71)
AB1-42	肽	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGV VIA (SEQ ID NO: 99)
MBP 89-101	肽	源自 SEQ ID NO: 6
CNP 301-320	肽	ELSEQQLQLWPSDVKLSPT (SEQ ID NO: 72)
HSP70 1-20	肽	MAKAAAVGIDLGTYSYCVGV (SEQ ID NO: 73)
MBP 51-70	肽	源自 SEQ ID NO: 6
HSP70 496-515	肽	KANKITITNDKGRLSKEEIE (SEQ ID NO: 74)
CNP 16-35	肽	IFFRKMSSSGAKDKPELQFP (SEQ ID NO: 75)
CNP 76-95	肽	DGTKMVSADAYKITPGARGA (SEQ ID NO: 76)
PLP 10-29	肽	源自 SEQ ID NO: 12
PLP 190-209	肽	源自 SEQ ID NO: 12
HSP60 346-365	肽	GEVIVTKDDAMLLKGKGDKA (SEQ ID NO: 77)
HSP60 151-170	肽	VIAELKKQSKPVTTPEEIAQ (SEQ ID NO: 78)
HSP70 376-395	肽	QAAILMGDKSENVQDLILLD (SEQ ID NO: 79)
牛 MBP	蛋白	SEQ ID NO: 7
HSP70 556-575	肽	GLKGKISEADKKKVLDKCQE (SEQ ID NO: 80)
CNP 391-410	肽	RAIFTGYGKGKPVPTQGSR (SEQ ID NO: 81)
MOG 211-230	肽	源自 SEQ ID NO: 5
PLP 220-249	肽	源自 SEQ ID NO: 12
HSP70 616-635	肽	PGPGGFQAQGPKGSGSGPT (SEQ ID NO: 82)
AB1-12	肽	DAEFRHDSGYEV (SEQ ID NO: 100)
HSP60 556-573	肽	PGMGAMGGMGGMGGMGMF (SEQ ID NO: 83)
PLP 250-269	肽	源自 SEQ ID NO: 12

[0030] 表 2- 区别 PPMS 与健康对照 (HC) 的抗原

[0031]

抗原	类型	序列/SEQ ID NO:
PLP 215-232	肽	源自 SEQ ID NO: 12
mMBP	蛋白	SEQ ID NO: 8
HSP70 195-214	肽	LIFDLGGGTFDVSILTIDDG (SEQ ID NO: 51)
smLPS (明尼苏达沙门氏菌 LPS)	脂质+糖	
HSP70 210-229	肽	TIDDGIFEVKATAGDTHLGG (SEQ ID NO: 42)
硫酸软骨素 4	糖	
HSP70 166-185	肽	GLNVLRIINEPTAAAIAYGL (SEQ ID NO: 70)
牛 MBP	蛋白	SEQ ID NO: 7
PLP 137-150	肽	源自 SEQ ID NO: 12
MOG 46-65	肽	源自 SEQ ID NO: 5
CNP 406-421	肽	TQGSRKGGALQSCTII (SEQ ID NO: 60)
P2 31-50	肽	源自 SEQ ID NO: 10
CNP 1-20	肽	MNRGFSRKSHTF LPKIFFRK (SEQ ID NO: 69)
MOG 16-35	肽	源自 SEQ ID NO: 5
P2 76-95	肽	源自 SEQ ID NO: 10
神经微丝 68kDa	肽	SEQ ID NO: 16
淀粉状蛋白 β (AB)	蛋白	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIAT (SEQ ID NO: 13)
HSP70 466-485	肽	PAPGVPQIEVTFDIDANGIL (SEQ ID NO: 68)
AB 1-40	肽	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGV (SEQ ID NO: 101)
PLP 161-180	肽	源自 SEQ ID NO: 12
PLP 40-59	肽	源自 SEQ ID NO: 12
PLP 137-150	肽	源自 SEQ ID NO: 12
HSP60 76-95	肽	DGVTVAKSIDLKDKYKNIGA (SEQ ID NO: 67)
MOG 151-170	肽	源自 SEQ ID NO: 5
P2 1-20	肽	源自 SEQ ID NO: 10
OSP 61-80	肽	GLYHCKPLVDILILPGYVQA (SEQ ID NO: 29)
分泌的 APP α	肽	源自 SEQ ID NO: 20
PLP 178-191	肽	源自 SEQ ID NO: 12
gpMBP	蛋白	源自 SEQ ID NO: 9
HSP70 16-35	肽	SCVGVFQHGKVEIIANDQGN (SEQ ID NO: 84)
MBP 104-123	肽	源自 SEQ ID NO: 6

[0032]

SOD	蛋白	SEQ ID NO: 22
ecLPS (大肠杆菌 LPS)	脂质 + 糖	
HSP70 121-140	肽	SMVLTKMKEIAEAYLGYPVT (SEQ ID NO: 71)
MOBP 61-80	肽	源自 SEQ ID NO: 4
OSP 1-20	肽	MVATCLQVVGFVTSFVGWIG (SEQ ID NO: 85)

[0033] 表 3- 区别 SPMS 与 RRMS 的抗原

[0034]

抗原	类型	序列/SEQ ID NO:
MOG 61-80	肽	源自 SEQ ID NO: 5
HSP60 376-395	肽	EQLDVTTSEYEKEKLNERLA (SEQ ID NO: 35)
MOG 31-50	肽	源自 SEQ ID NO: 5
CNP 361-380	蛋白	GEEVGELSRGKLYSLGNGRW (SEQ ID NO: 86)
淀粉状蛋白 β 1-23	肽	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAED (SEQ ID NO: 102)
CNP 346-365	肽	LDLLEILRQEKGSRGEEVG (SEQ ID NO: 87)
HSP60 496-515	肽	QSSSEVGYDAMAGDFVNMVE (SEQ ID NO: 26)
OSP 1-20	肽	MVATCLQVVGFVTSFVGWIG (SEQ ID NO: 85)
HSP60 511-530	肽	VNMVEKGIIDPTKVVRTALL (SEQ ID NO: 63)
OSP 61-80	肽	GLYHCKPLVDILILPGYVQA (SEQ ID NO: 29)
HSP60 286-305	肽	LVLNRLKVGLQVVAVKAPGF (SEQ ID NO: 25)
CNP 240-259	肽	YFGKRPPGVLHCTTKFCDYG (SEQ ID NO: 55)
HSP70 601-620	肽	VCNPIISGLYQGAGGPGPGG (SEQ ID NO: 88)
HSP60 210-229	肽	ELEIIEGMKFDRGYISPYFI (SEQ ID NO: 89)
HSP60 451-470	肽	LDSLTPANEDQKIGIEIIKR (SEQ ID NO: 90)
MOBP 166-185	肽	源自 SEQ ID NO: 4
HSP60 166-185	肽	EEIAQVATISANGDKEIGNI (SEQ ID NO: 53)
MBP 138-147	肽	源自 SEQ ID NO: 6
CNP 195-214	肽	KKSSETLRKAGQVFLEELGN (SEQ ID NO: 91)
MBP 1-20	肽	源自 SEQ ID NO: 6
HSP60 526-545	肽	RTALLDAAGVASLLTTAEVV (SEQ ID NO: 28)
P2 1-20	肽	源自 SEQ ID NO: 10
HSP70 286-305	肽	SLFEGIDFYTSITRARFEEL (SEQ ID NO: 36)
MBP 155-178	肽	源自 SEQ ID NO: 6
P2 46-65	肽	源自 SEQ ID NO: 10
HSP60 195-214	肽	RKGVITVKDGKTLNDELEII (SEQ ID NO: 48)

[0035]

P2 31-50	肽	源自 SEQ ID NO: 10
HSP60 271-290	肽	LVIIAEDVDGEALSTLVLR (SEQ ID NO: 44)
HSP60 136-155	肽	NPVEIRRGVMLAVDAVIAEL (SEQ ID NO: 37)
CNP 286-305	肽	ISALFVTPKTTGARVELSEG (SEQ ID NO: 31)
HSP70 210-229	肽	TIDDGIFEVKATAGDTHLGG (SEQ ID NO: 42)
HSP70 136-155	肽	GYPVTNAVITVPAYFNDSQR (SEQ ID NO: 38)
PLP 150-163	肽	源自 SEQ ID NO: 12
HSP70 166-185	肽	GLNVLRIINEPTAAAIAYGL (SEQ ID NO: 70)
HSP60 255-275	肽	QSIVPALEIANAHKPLVITA (SEQ ID NO: 32)
HSP60 16-35	肽	RVLAPHLTRAYAKDVKFGAD (SEQ ID NO: 56)
牛 MBP	蛋白	SEQ ID NO: 7
CNP 181-199	肽	LEKDFLPLYFGWFLTKKSSE (SEQ ID NO: 92)
CNP 121-140	肽	LDDTNHERERLEQLFEMADQ (SEQ ID NO: 93)
无唾液酸神经节苷脂-GM2	脂质	
淀粉状蛋白 β 1-12	肽	DAEFRHDSGYEV (SEQ ID NO: 100)
OSP 121-140	肽	QLAGVLLILLALCALVATIW (SEQ ID NO: 94)
分泌的 APP β	蛋白	SEQ ID NO: 21
心磷脂	脂质	
HSP70 406-425	肽	AGGVMTALIKRNSTIPTKQT (SEQ ID NO: 64)
HSP60 361-380	肽	KGDKAQIEKRIQEIIIEQLDV (SEQ ID NO: 40)
淀粉状蛋白 β 17-40	肽	LVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV (SEQ ID NO: 103)
胆固醇	脂质	PubChem 物质 ID: 24893094
淀粉状蛋白 β 1-42	肽	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGV VIA (SEQ ID NO: 73)
PLP 80-99	肽	源自 SEQ ID NO: 12
PLP 65-84	肽	源自 SEQ ID NO: 12
PLP 40-59	肽	源自 SEQ ID NO: 12
PLP 1-19	肽	源自 SEQ ID NO: 12
PLP 151-173	肽	源自 SEQ ID NO: 12
HSP70 421-440	肽	PTKQTQIFTTYSNQPGLI (SEQ ID NO: 95)
huMBP	蛋白	SEQ ID NO: 6
MOBP 16-35	肽	源自 SEQ ID NO: 4
CNP 16-35	肽	IFFRKMSSSGAKDKPELQFP (SEQ ID NO: 75)
RBP	蛋白	SEQ ID NO: 19
HSP70 331-350	肽	IHDLVLVGGSTRIPKVQKLL (SEQ ID NO: 96)

[0036]

MBP 113-132	肽	源自 SEQ ID NO: 6
β 晶状体蛋白	蛋白	源自 SEQ ID NO: 15
PLP 178-191	肽	源自 SEQ ID NO: 12

[0037] 表 4- 区别 I 型病变和 II 型病变的抗原

[0038]

抗原	类型	序列/SEQ ID NO:
15-酮胆甾烷	脂质	
15 α -羟基胆甾烯	脂质	
神经节苷脂-GM4	脂质	
15-酮胆甾烯	脂质	
四唾液酸神经节苷脂-GQ1B	脂质	
脑 L- α -溶血磷脂酰丝氨酸	脂质	
乳糖基神经酰胺	脂质	
160 kDa.神经微丝	肽	SEQ ID NO: 17
HSP60 240-259	肽	QDAYVLLSEKKISSIQSIVP (SEQ ID NO: 43)
OSP 166-185	肽	VLCLVGGCVILCCAGDAQAF (SEQ ID NO: 97)
MOG 196-215	肽	源自 SEQ ID NO: 5
OSP 61-80	肽	GLYHCKPLVDILILPGYVQA (SEQ ID NO: 29)
OSP 1-20	肽	MVATCLQVVGFVTSFVGWIG (SEQ ID NO: 85)
PLP 215-232	肽	源自 SEQ ID NO: 12

[0039] 表 5- 在表 1 至表 4 中列出的蛋白的获取号和 SEQ ID NO.

[0040]

蛋白 (缩写)	蛋白	获取号	SEQ ID NO:
HSP60	60 kDa 热休克蛋白	GI:41399285	SEQ ID NO:1
HSP70	70 kDa 热休克蛋白	GI:38327039	SEQ ID NO:2
CNP	2',3'-环核苷酸 3'磷酸二酯酶	GI:94721261	SEQ ID NO:3
MOBP	髓鞘相关的少突胶质细胞碱性蛋白	GI:1408050	SEQ ID NO:4
MOG	髓鞘/少突胶质细胞糖蛋白	GI:56788381	SEQ ID NO:5
MBP/ huMBP	人髓鞘碱性蛋白	GI:68509930	SEQ ID NO:6
牛 MBP	牛 (Bos Taurus) 髓鞘碱性蛋白	GI:74268137	SEQ ID NO:7
mMBP	小鼠 (Mus musculus) 髓鞘碱性	GI:6754658	SEQ ID NO:8

[0041]

	蛋白		
gpMBP	豚鼠 (Cavia porcellus) 髓鞘碱性蛋白	GI:3309629	SEQ ID NO:9
P2	髓鞘蛋白 2	GI:4505909	SEQ ID NO:10
OSP	少突胶质细胞特异性蛋白	GI:3283415	SEQ ID NO:11
PLP	蛋白脂质蛋白	GI:41349499	SEQ ID NO:12
GFAP	胶质纤维酸性蛋白	GI:4503979	SEQ ID NO:14
β 晶状体蛋白		GI:12056461	SEQ ID NO:15
神经微丝 68kDa		GI:105990539	SEQ ID NO:16
神经微丝 160kDa		GI:157738649	SEQ ID NO:17
淀粉样蛋白 β		GI:41406057	SEQ ID NO:18
RBP	视黄醇结合蛋白 4, 血浆前体	GI:55743122	SEQ ID NO:19
APP α	淀粉样蛋白 β 蛋白前体同种型 b	GI:4502167	SEQ ID NO:20
APP β	淀粉样蛋白 β 蛋白前体同种型 a	GI:41406055	SEQ ID NO:21
SOD	超氧化物歧化酶 1	GI:4507149	SEQ ID NO:22

[0042] 根据第一方面,本发明提供了诊断受试者的多发性硬化 (MS) 亚型的方法,该方法包括:确定从该受试者获得的样品中的抗体对选自表 1 到表 4 中列出的抗原组成的组的多种抗原的反应性,从而确定该样品对该多种抗原的反应性模式,并且比较所述样品的反应性模式与对照反应性模式,其中 MS 亚型选自以下组成的组:

[0043] (i) 复发缓解型多发性硬化 (RRMS),其中所述多种抗原选自表 1 中列出的抗原组成的组;

[0044] (ii) 原发进展型多发性硬化 (PPMS),其中所述多种抗原选自表 2 中列出的抗原组成的组;

[0045] (iii) 继发进展型多发性硬化 (SPMS),其中所述多种抗原选自表 3 中列出的抗原组成的组;以及

[0046] (iv) 选自以 I 型病变和 II 型病变为特征的 MS 的 MS 病理亚型,其中所述多种抗原选自表 4 中列出的抗原组成的组。

[0047] 根据这方面的某些实施方案,在获自该受试者的所述样品的反应性模式与对照样品的反应性模式之间的显著差异是该受试者患 MS 亚型的指示。

[0048] 如本文所用,针对“多种抗原”的“样品中抗体的反应性”是指该样品中的每种抗体对选自所述多种抗原的特定抗原的免疫反应性。抗体对抗原的免疫反应性即抗体特异性结合抗原的能力可用来确定样品中抗体的量。样品的反应性模式因此反映样品中的测试抗体中的每一种的水平。

[0049] 通常,确定样品中的抗体对多种抗原的反应性是使用免疫测定进行。有利地,多种抗原可以抗原阵列形式使用。

[0050] 在反应性模式之间的“显著差异”在不同的实施方案中指统计学上显著的差异,或者在其他实施方案中指普通技术人员公认的显著差异。有利地,本发明的方法可采取学习与模式识别分析仪、聚类算法等等的使用,以区别对照受试者的反应性模式与患有 MS 亚型

的患者的反应性模式。像这样,该术语确切地包括通过如下方式测量的差异:例如,确定测试样品中的抗体对多种抗原的反应性,并且使用这些算法和/或分析仪比较得到的反应性模式与阴性对照样品和阳性对照样品(例如,分别从未患 MS 亚型的对照受试者或患测试的 MS 亚型的患者获得的样品)的反应性模式。根据某些实施方案,对照样品是从患另一 MS 亚型的患者获得(即,可能测试样品的 SPMS,而对照样品从 RRMS 患者获得)。还可以通过比较测试样品的反应性模式与以这种方式获得的预设分类规则来测量差异。

[0051] 因此,在另一个实施方案中,测试样品的反应性模式与对照样品的反应性模式之间的显著差异(其中该差异使用学习与模式识别算法来计算)指示受试者患 MS 亚型。例如,算法可包括但不限于:监督或非监督分类法,包括:统计算法,所述统计算法包括但不限于,主成分分析(PCA)、偏最小二乘法(PLS)、多元线性回归(MLR)、主成分回归(PCR)、包括线性判别分析(LDA)在内的判别函数分析(DFA)、以及包括最近邻(nearest neighbor)在内的聚类分析;人工神经网络;耦合双向聚类算法;多层感知器(MLP);广义回归神经网络(GRNN);模糊推理系统(FIS);自组织映射图(SOM);遗传算法(GAS);神经模糊系统(NFS);自适应共振理论(ART)。

[0052] 根据本发明的方法的某些实施方案,对照选自由以下组成的组:来自至少一个个体的样品、来自一组个体的一小组对照样品、和来自对照个体的一组储存数据。

[0053] 根据另外的实施方案,样品为血清样品。根据另一个实施方案,样品为脑脊液(CSF)。在其他的特定实施方案中,测试样品和对照样品可包括 IgG 和/或 IgM 抗体。在另一个实施方案中,本发明的方法和试剂盒的表 1 到表 4 包括用于确定 IgG 和 IgM 抗体反应性的双份的特定抗原(例如,表 2 中 PLP 215-232、牛 MBP 及 CNP 1-20 和表 3 中的 PLP 1-19、OSP 121-140 及 CNP 240-259)。在另一实施方案中,一种抗体对特定抗原(来自所述多种抗原)的反应性被上调。在另一实施方案中,一种抗体对特定抗原的反应性被下调。

[0054] 根据一些实施方案,所述方法还包括在确定样品中抗体的反应性之前将样品稀释例如 1:10 或更多。

[0055] 根据其他实施方案,多种抗原以抗原阵列形式使用。根据一些实施方案,抗原阵列以抗原芯片形式排列。

[0056] 根据某些实施方案,MS 亚型为复发缓解型多发性硬化(RRMS)并且多种抗原选自表 1。根据这一特定的实施方案,对照反应性模式是从健康患者或来自健康患者的一组储存数据获得。根据具体的实施方案,多种抗原包括表 1 中列出的抗原中的至少 5 种、至少 10 种、至少 15 种、至少 20 种、至少 25 种、至少 30 种、至少 35 种、至少 40 种、至少 45 种、至少 50 种、至少 55 种、至少 60 种、至少 65 种、至少 70 种、至少 75 种、至少 80 种、至少 85 种、至少 90 种不同的抗原。根据另一实施方案,多种抗原包括表 1 中列出的所有抗原。优选地,在诊断和患者病症之间提供可靠且准确的相关性所需的抗原组由不超过 100 种、优选不超过 115 种、更优选不超过 130 种、并且最优选不超过 150 种抗原组成。在另一实施方案中,多种抗原由表 1 中列出的抗原组成。每种可能性代表本发明的单独的实施方案。

[0057] 根据某些实施方案,MS 亚型为原发进展型多发性硬化(PPMS)并且多种抗原选自表 2。根据这一特定的实施方案,对照反应性模式是从健康患者或来自健康患者的一组储存数据获得。根据具体的实施方案,多种抗原包括表 2 中列出的抗原中的至少 5 种、至少 10 种、至少 15 种、至少 20 种、至少 25 种、至少 30 种、至少 35 种不同的抗原。根据另一实施方

案,多种抗原包括表 2 中列出的所有抗原。优选地,在诊断和患者病症之间提供可靠且准确的相关性所需的抗原组由不超过 50 种、优选不超过 70 种、更优选不超过 80 种、并且最优选不超过 100 种抗原组成。在另一实施方案中,多种抗原由表 2 中列出的抗原组成。每种可能性代表本发明的单独的实施方案。

[0058] 根据某些实施方案,MS 亚型为继发进展型多发性硬化 (SPMS) 并且多种抗原选自表 3。根据这一特定的实施方案,对照反应性模式选自由以下组成的组:来自患 RRMS 的至少一个个体的样品、来自患 RRMS 的一组个体的一小组对照样品、和来自患 RRMS 的对照个体的一组储存数据。根据具体的实施方案,多种抗原包括表 3 中列出的抗原中的至少 5 种、至少 10 种、至少 15 种、至少 20 种、至少 25 种、至少 30 种、至少 35 种、至少 40 种、至少 45 种、至少 50 种、至少 55 种、至少 60 种不同的抗原。根据另一实施方案,多种抗原包括表 3 中列出的所有抗原。优选地,在诊断和患者病症之间提供可靠且准确的相关性所需的抗原组由不超过 80 种、优选不超过 90 种、并且最优选不超过 100 种抗原组成。在另一实施方案中,多种抗原由表 3 中列出的抗原组成。每种可能性代表本发明的单独的实施方案。

[0059] 根据一些实施方案,MS 亚型是选自 I 型 MS 病变和 II 型 MS 病变的 MS 病理类型并且多种抗原选自表 4。根据一个实施方案,本发明提供了用于诊断患有 MS 的受试者的 I 型病变,并且对照反应性模式是从患有 II 型病变的患者获得。根据另一实施方案,本发明提供了用于诊断患有 MS 的受试者的 II 型病变的方法,并且对照反应性模式是从患有 I 型病变的患者获得。根据另一实施方案,本发明提供了用于在患 MS 的受试者中区分具有 I 型病变的受试者和具有 II 型病变的受试者的方法。根据具体的实施方案,多种抗原包括表 4 中列出的抗原中的至少 4 种、至少 6 种、至少 8 种、至少 10 种、至少 12 种不同的抗原。根据另一实施方案,多种抗原包括表 4 中列出的所有抗原。优选地,在诊断和患者病症之间提供可靠且准确的相关性所需的抗原组由不超过 20 种、优选不超过 30 种、并且最优选不超过 50 种抗原组成。在另一实施方案中,多种抗原由表 4 中列出的 14 种抗原组成。每种可能性代表本发明的单独的实施方案。

[0060] 根据某些实施方案,本发明提供了用于诊断受试者的 MS 亚型的方法,该方法包括:

[0061] (a) 确定从受试者获得的样品中的抗体对选自由表 1 中列出的抗原组成的组的多种抗原的反应性,从而确定该样品对该多种抗原的反应性模式,并且比较所述样品的反应性模式与从健康受试者获得的对照反应性模式;

[0062] (b) 确定从受试者获得的样品中的抗体对选自由表 2 中列出的抗原组成的组的多种抗原的反应性,从而确定该样品对该多种抗原的反应性模式,并且比较所述样品的反应性模式与从健康受试者获得的对照反应性模式;

[0063] (c) 确定从受试者获得的样品中的抗体对选自由表 3 中列出的抗原组成的组的多种抗原的反应性,从而确定该样品对该多种抗原的反应性模式,并且比较所述样品的反应性模式与从患 RRMS 的受试者获得的对照反应性模式;

[0064] (d) 确定从受试者获得的样品中的抗体对选自由表 4 中列出的抗原组成的组的多种抗原的反应性,从而确定该样品对该多种抗原的反应性模式,并且比较所述样品的反应性模式与从具有 I 型病变的受试者获得的对照反应性模式和 / 或与从具有 II 型病变的受试者获得的对照反应性模式;

[0065] 其中：

[0066] (i) (a) 的反应性模式与所述对照反应性模式之间的显著差异是受试者患 RRMS 的指示；

[0067] (ii) (b) 的反应性模式与所述对照反应性模式之间的显著差异是受试者患 PPMS 的指示；

[0068] (iii) (c) 的反应性模式与所述对照反应性模式之间的显著差异是受试者患 SPMS 的指示；以及

[0069] (iv) (d) 的反应性模式与从具有 I 型病变的受试者获得的对照反应性模式之间的显著差异是受试者患 II 型病变的指示，并且 (d) 的反应性模式与从具有 II 型病变的受试者获得的对照反应性模式之间的显著差异是受试者患 I 型病变的指示。

[0070] 根据一些实施方案，对于表 1 和表 2 的对照反应性模式是从健康对照受试者或来自健康对照受试者的一组储存数据获得。根据另一实施方案，对于表 3 的对照反应性模式是从患 RRMS 的受试者或来自患 RRMS 的受试者的一组储存数据获得。

[0071] 根据另一方面，本发明提供了用于诊断 MS 亚型的试剂盒，该试剂盒包括：

[0072] (i) 选自由表 1 中列出的抗原组成的组的用于诊断 RRMS 的多种抗原；

[0073] (ii) 选自由表 2 中列出的抗原组成的组的用于诊断 PPMS 的多种抗原；

[0074] (iii) 选自由表 3 中列出的抗原组成的组的用于诊断 SPMS 的多种抗原；以及

[0075] (iv) 选自由表 4 中列出的抗原组成的组的用于区别患有 MS 的受试者的 I 型病变与 II 型病变的多种抗原。

[0076] 根据某些实施方案，本发明提供了用于诊断 RRMS 的试剂盒，该试剂盒包括选自由表 1 中列出的抗原组成的组的多种抗原。根据具体的实施方案，多种抗原包括表 1 中列出的抗原中的至少 5 种、至少 10 种、至少 15 种、至少 20 种、至少 25 种、至少 30 种、至少 35 种、至少 40 种、至少 45 种、至少 50 种、至少 55 种、至少 60 种、至少 65 种、至少 70 种、至少 75 种、至少 80 种、至少 85 种、至少 90 种不同的抗原。根据另一实施方案，多种抗原包括表 1 中列出的所有抗原。每种可能性代表本发明的单独的实施方案。

[0077] 根据某些实施方案，本发明提供了用于诊断 PPMS 的试剂盒，该试剂盒包括选自由表 2 中列出的抗原组成的组的多种抗原。根据具体的实施方案，多种抗原包括表 2 中列出的抗原中的至少 5 种、至少 10 种、至少 15 种、至少 20 种、至少 25 种、至少 30 种、至少 35 种不同的抗原。根据另一实施方案，多种抗原包括表 2 中列出的所有抗原。每种可能性代表本发明的单独的实施方案。

[0078] 根据某些实施方案，本发明提供了用于诊断 SPMS 的试剂盒，该试剂盒包括选自由表 3 中列出的抗原组成的组的多种抗原。根据具体的实施方案，多种抗原包括表 3 中列出的抗原中的至少 5 种、至少 10 种、至少 15 种、至少 20 种、至少 25 种、至少 30 种、至少 35 种、至少 40 种、至少 45 种、至少 50 种、至少 55 种、至少 60 种不同的抗原。根据另一实施方案，多种抗原包括表 3 中列出的所有抗原。每种可能性代表本发明的单独的实施方案。

[0079] 根据某些实施方案，本发明提供了用于区别患有 MS 的受试者的 I 型病变与 II 型病变的试剂盒，该试剂盒包括选自由表 4 中列出的抗原组成的组的多种抗原。根据具体的实施方案，多种抗原包括表 4 中列出的抗原中的至少 4 种、至少 6 种、至少 8 种、至少 10 种、至少 12 种不同的抗原。根据另一实施方案，多种抗原包括表 4 中列出的所有抗原。每种可

能性代表本发明的单独的实施方案。

[0080] 在其他实施方案中,试剂盒还可以包括用于确定样品中的抗体对多种抗原的反应性的手段。例如,试剂盒可包含可用于测量抗体对本发明的抗原探针的特异性结合的试剂、可检测标记和/或容器。在特定的实施方案中,所述试剂盒是以抗原阵列的形式。在其他实施方案中,所述试剂盒还可以包括阴性和/或阳性对照样品。例如,阴性对照样品可包含来自至少一个健康个体或至少一个鉴定具有另一 MS 亚型的个体的样品(例如,当试剂盒为诊断测试样品中的 SPMS 的手段时,从患 RRMS 的至少一个个体获得的样品用作阴性对照)。阳性对照可包含来自患被诊断的 MS 亚型的至少一个个体的样品。其他非限制性实例是来自一组健康个体或患病个体的一小组对照样品、或者来自对照个体的一组存储数据。

[0081] 在其他实施方案中,试剂盒还可以包括用于比较不同样品中的抗体对多种抗原的反应性模式的手段。在具体的实施方案中,用于比较反应性模式的手段包括学习与模式识别分析仪(例如,利用本文详述的学习与模式识别算法)。

[0082] 根据其他实施方案,本发明的方法和试剂盒可用于监测 MS 进展。

[0083] 根据另一方面,本发明提供了包含表 1 中列出的抗原探针的抗原探针组。根据某些实施方案,抗原探针组包括表 1 中列出的抗原的亚组,如本文详述的。

[0084] 根据另一方面,本发明提供了包含表 2 中列出的抗原探针的抗原探针组。根据某些实施方案,抗原探针组包括表 2 中列出的抗原的亚组,如本文详述的。

[0085] 根据另一方面,本发明提供了包含表 3 中列出的抗原探针的抗原探针组。根据某些实施方案,抗原探针组包括表 3 中列出的抗原的亚组,如本文详述的。

[0086] 根据另一面,本发明提供了包含表 4 中列出的抗原探针的抗原探针组。根据某些实施方案,抗原探针组包括表 4 中列出的抗原的亚组,如本文详述的。

[0087] 根据另一方面,本发明提供了包含本发明的抗原探针组的制品。

[0088] 根据另一方面,本发明提供了抗原探针组用于制备诊断 MS 亚型的诊断组合物的用途,所述抗原探针组包含选自由表 1 到表 4 之一列出的抗原组成的组的多种抗原,其中 MS 亚型选自由以下组成的组:

[0089] (i) RRMS,其中所述多种抗原选自由表 1 中列出的抗原组成的组;

[0090] (ii) PPMS,其中所述多种抗原选自由表 2 中列出的抗原组成的组;

[0091] (iii) SPMS,其中所述多种抗原选自由表 3 中列出的抗原组成的组;以及

[0092] (iv) 选自 I 型病变和 II 型病变的 MS 病理亚型,其中所述多种抗原选自由表 4 中列出的抗原组成的组。

[0093] 在一个实施方案中,诊断组合物可用于确定样品中抗体的反应性,从而确定该样品对所述多种抗原的反应性模式,其中所述样品的反应性模式与对照样品的反应性模式之间的显著差异是 MS 亚型的指示。

[0094] 从以下描述和附图,本发明的其他目的、特征和优点将变得明显。

[0095] 附图简述

[0096] 图 1 显示抗原微阵列的表现。将 RRMS 或健康对照(HC)血清样品以不同的浓度在抗原微阵列上杂交,并且测量了 IgG(图 1A)和 IgM(图 1B)对点在微阵列上的 CNS、HSP 或脂质抗原的平均反应性。结果以 IgG 或 IgM 在每种稀释度对 CNS、HSP 或脂质抗原的反应性的平均值+SEM 呈现。与相同稀释度测试的 HC 样品相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 以及

*** $P < 0.001$ (双因素 ANOVA)。图 1C 显示在抗原微阵列上测量用不同浓度的 PLP261-277 或 HSP601-20 预孵育的 RRMS 血清 (1 : 10 稀释) 的 IgG 对 PLP261-277 的反应性。当与未用竞争物预孵育的样品比较时, ** $P < 0.01$ 以及 *** $P < 0.001$ (单因素 ANOVA)。

[0097] 图 2 显示在 RRMS、PPMS 和 SPMS 中的血清抗体反应性。图 2A 和图 2B 显示将 RRMS (图 2A) 或 PPMS (图 2B) 与 HC 区别的抗体反应性。在热图中每列代表患者, 该热图在底部以颜色标识指示其对应于 RRMS 样品 (图 2A)、PPMS 样品 (图 2A) 或是 HC 样品 (图 2A 和图 2B), 并且每行显示根据左侧显示的比色标 (colorimetric scale) 的针对抗原的标准化抗体反应性 (详述于以下实施例 2 和实施例 3 中)。图 2C-2D 显示在 RRMS 和 PPMS 中的抗原特异性。在 RRMS 和 PPMS 中区别性的抗体的特异性被显示为相对于 HC 在 MS 中发现被上调或下调 (分别为图 2C 和图 2D) 的 CNS、HSP 和脂质抗原的相对贡献 (相对于区别性的抗原的总数的%)。图 2E 显示描绘 SPMS 和 RRMS 样品中的抗体反应性的热图。图 2F 和图 2G 显示在 SPMS 中的抗原特异性, 其被显示为相对于 RRMS 在 SPMS 中发现被上调或下调 (分别为图 2F 和图 2G) 的 CNS、HSP 和脂质抗原的相对贡献 (相对于区别性的抗原的总数的%)。图 2H 是概括与 RRMS、SPMS 和 PPMS 相关的免疫特征标记的简图。

[0098] 图 3 显示与脑病理学相关的抗体反应性。在热图中每列代表患者, 该热图在底部以颜色标识指示其是对应于 I 型样品还是 II 型样品, 该热图显示根据左侧显示的比色标的针对抗原的标准化抗体反应性。用于构建此热图的抗体反应性在以下实施例 5 中列出。

[0099] 图 4 显示向 EAE 施用氧化的胆固醇衍生物的作用。图 4A 显示向 EAE 施用氧化的胆固醇衍生物使 EAE 恶化。图 4B-4D 描绘了 MOG₃₅₋₅₅、MOG₃₅₋₅₅+oxChol 或 MOG₃₅₋₅₅+oxChol+AIQ 小鼠的脊髓的细胞浸润 (图 4B)、脱髓鞘 (图 4C) 和轴突缺失 (图 4D) 的定量。

[0100] 发明详述

[0101] 本发明提供了诊断受试者的多发性硬化 (MS) 的方法, 所述方法使用实施这种诊断的抗原探针阵列, 并且鉴定了用于产生这种阵列的具体抗原探针组。根据一些实施方案, 本发明涉及用于 MS 的早期诊断以及用于监测 MS 进程的基于自身抗体的生物标志物测试。具体地说, 本发明的方法和试剂盒可区分受试者的 MS 形式 (也就是 RRMS、SPMS 或 PPMS)。此外, 本发明的方法和试剂盒可区分 MS 患者的病变模式, 特别是区分 I 型病变和 II 型病变。

[0102] 如本文在以下举例说明的, 自身抗体的抗原微阵列分析能够鉴定与 MS 的不同临床形式及病理亚型相关的血清和 CSF 自身抗体特征标记; 这些特征标记基于集合的自身抗体模式, 而不是单一自身抗体反应性。这些信息模式是由结合髓鞘分子和 HSP 的肽、蛋白和脂质的自身抗体呈现。而且, 这些信息模式包括自身抗体反应性相对于在 HC 中发现的自身抗体反应性的减少以及增加。

[0103] 此外, 独特的抗体模式与不同的 MS 病理学模式相关。II 型 MS 病理学与针对 HSP60、OSP、MOG 和 PLP 肽表位的 IgG 抗体增加有关, 而对神经节苷脂、乳糖基神经酰胺和 L- α -溶血磷脂酰丝氨酸的抗体反应性增加与 I 型有联系。已描述针对乳糖基神经酰胺和 L- α -溶血磷脂酰丝氨酸的抗体在 MS 患者和 EAE 小鼠的 CSF 中 (Kanter 等人, 2006)。I 型血清样品还包括针对氧化的胆固醇衍生物 (15-酮胆甾烯、15-酮胆甾烷和 15 α -羟基胆甾烯) 的抗体。在 MS 患者的 CSF 中已发现一种相关的胆固醇氧化衍生物 7-酮胆固醇的水平升高。值得注意地, 7-酮胆固醇和神经节苷脂分别通过 PARP 途径和 toll 样受体 4 依赖性途径激活小神经胶质细胞。

[0104] 本文呈现的研究的重大发现是在 MS 患者的 CSF 和血清中的抗体所有组成部分明显是有差别的。这些结果与 MS 受试者的 CSF 中的免疫应答的区室化 (compartmentalization) 是一致的。尽管已在 MS 中广泛地研究 CSF 中的抗体,但以前没有描述本文所述的独特的抗体免疫特征标记。

[0105] 最初的研究启示,独特的特征标记可能与对治疗的响应和疾病进程有关。例如,大约 50% 的 RRMS 患者变为 SPMS,这种转变与免疫机制和神经变性机制的改变有关。如本文在以下所展示的,用抗原阵列进行的 SPMS 研究揭示共享 RRMS 患者和 PPMS 患者两者的特性的抗体特征标记,暗示抗原阵列可用于监测疾病模式的这一改变。而且,如果在疾病过程的早期建立这些抗体模式,那么它们将可用于 MS 易感性的早期诊断和筛选,因为可以在少量血清中测量到它们。因此,本文提供的发现显示,血清微阵列抗体模式提供监测 MS,例如确定该病的预后并表征该病的免疫病理学机制的新途径。

[0106] 抗原探针和抗原探针组

[0107] 根据另外的实施方案,本发明提供了可用于诊断 MS 的抗原探针和抗原探针组,如本文详述的。

[0108] 根据本发明的原理,本发明还提供了在本文也称为抗原探针组的多种抗原。包括多种抗原的这些抗原探针组与患有 MS 的受试者的血清特异性反应。根据本发明的原理,多种抗原可有利地以抗原阵列的形式使用。根据一些实施方案,抗原阵列以抗原芯片形式方便地排列。

[0109] 如本文所用的“探针”表示能够特异性结合组分的任何化合物。根据一方面,本发明提供了包括表 1 中列出的抗原探针的抗原探针组。根据某些实施方案,抗原探针组包括表 1 中列出的抗原的亚组。根据某些实施方案,本发明的抗原探针组包括选自表 1 的多种抗原,如本文详述的,以用于 RRMS 的诊断。优选地,多种抗原包括表 1 中列出的一组抗原。还在其他实施方案中,抗原探针组包括抗原探针组的亚组或者由抗原探针组的亚组组成,例如,各自选自表 1 中指明的名单的至少 5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90 种不同的抗原,其中每种可能性代表本发明的单独的实施方案。可选择这些亚组以便产生诊断阵列的最佳的灵敏性和 / 或特异性。在其他的实施方案中,探针组包括高达 115 种,或者在其他实施方案中高达 130 种或 150 种不同的抗原。在其他的实施方案中,由表 1 中指明的抗原组成的探针组足以区别 RRMS 患者与未患 RRMS 的健康个体。应注意,尽管认为这些探针组足以可靠地鉴定患有 RRMS 的受试者,但在某些实施方案中可以便利地以包括更大数目的抗原例如大约 130 种抗原或更多的抗原阵列的形式使用本发明的抗原探针组。

[0110] 根据另一方面,本发明提供了包括表 2 中列出的抗原探针的抗原探针组。根据某些实施方案,抗原探针组包括表 2 中列出的抗原的亚组。根据其他的实施方案,本发明的抗原探针组包括选自表 2 的多种抗原,如本文详述的,以用于 PPMS 的诊断。优选地,多种抗原包括表 2 中列出的一组抗原。还在其他实施方案中,抗原探针组包括抗原探针组的亚组或者由抗原探针组的亚组组成,例如,各自选自表 2 中指明的名单的至少 5、10、15、20、25、30、35 种不同的抗原,其中每种可能性代表本发明的单独的实施方案。可选择这些亚组以便产生诊断阵列的最佳的灵敏性和 / 或特异性。在其他的实施方案中,探针组包括高达 50 种,或者在其他实施方案中高达 70 种或 100 种不同的抗原。在其他的实施方案中,由表 2 中指

明的抗原组成的探针组足以区别 PPMS 患者与未患 PPMS 的健康个体。应注意, 尽管认为这些探针组足以可靠地鉴定患有 PPMS 的受试者, 但在某些实施方案中可以便利地以包括更大数目的抗原例如大约 100 种抗原或更多的抗原阵列的形式使用本发明的抗原探针组。

[0111] 根据另一方面, 本发明提供了包括表 3 中列出的抗原探针的抗原探针组。根据某些实施方案, 抗原探针组包括表 3 中列出的抗原的亚组。根据某些实施方案, 本发明的抗原探针组包括选自表 3 的多种抗原, 如本文详述的, 以用于 SPMS 的诊断。优选地, 多种抗原包括表 3 中列出的一组抗原。还在其他实施方案中, 抗原探针组包括抗原探针组的亚组或者由抗原探针组的亚组组成, 例如, 各自选自表 3 中指明的名单的至少 5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60 种不同的抗原, 其中每种可能性代表本发明的单独的实施方案。可选择这些亚组以便产生诊断阵列的最佳的灵敏性和 / 或特异性。在其他的实施方案中, 探针组包括高达 80 种, 或者在其他实施方案中高达 100 种或 150 种不同的抗原。在其他的实施方案中, 由表 3 中指明的抗原组成的探针组足以区别 SPMS 患者和 RRMS 患者。应注意, 尽管认为这些探针组足以可靠地鉴定患有 SPMS 的受试者, 但在某些实施方案中可以便利地以包括更大数目的抗原例如大约 130 种抗原或更多的抗原阵列的形式使用本发明的抗原探针组。

[0112] 根据另一方面, 本发明提供了包括表 4 中列出的抗原探针的抗原探针组。根据某些实施方案, 抗原探针组包括表 4 中列出的抗原的亚组。根据某些实施方案, 本发明的抗原探针组包括选自表 4 的多种抗原, 如本文详述的, 以用于区分 I 型 MS 病变与 II 型 MS 病变。优选地, 多种抗原包括表 4 中列出的一组 14 种抗原。还在其他实施方案中, 抗原探针组包括抗原探针组的亚组或者由抗原探针组的亚组组成, 例如, 各自选自表 4 中指明的名单的至少 4、5、6、7、8、9、10、11、12、13 种不同的抗原, 其中每种可能性代表本发明的单独的实施方案。可选择这些亚组以便产生诊断阵列的最佳的灵敏性和 / 或特异性。在其他的实施方案中, 探针组包括高达 20 种, 或者在其他实施方案中高达 30 种或 50 种不同的抗原。在其他的实施方案中, 由表 4 中指明的 14 种抗原组成的探针组足以区别患有 I 型 MS 病变的患者和患有 II 型 MS 病变的患者。应注意, 尽管认为这些探针组足以可靠地鉴定 MS 模式, 但在某些实施方案中可以便利地以包括更大数目的抗原例如大约 50 种抗原或更多的抗原阵列的形式使用本发明的抗原探针组。

[0113] 将在本发明的测定中使用的抗原探针可以使用本领域公知的方法来纯化或者合成。例如, 抗原性蛋白或抗原性肽可使用已知的重组方法或合成方法产生, 包括但不限于固相 (例如, Boc 或 f-Moc 化学) 和溶液相合成方法 (Stewart 和 Young, 1963; Meienhofer, 1973; Schroder 和 Lupke, 1965; Sambrook 等人, 2001)。本领域技术人员拥有获得或合成本发明的抗原探针的专业技能。一些抗原探针也可以从以下来源商购获得: 例如, Sigma (St. Louis, MO, USA)、Abnova (Taipei City, Taiwan)、Matreya LLC (Pleasant Gap, PA, USA)、Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA)、Calbiochem (San Diego, CA, USA)、Chemicon (Temecula, CA, USA)、GeneTex (San Antonio, TX, USA)、Novus Biologicals (Littleton, CO, USA)、Assay Designs (Ann Arbor, MI, USA)、ProSci Inc. (Poway, CA, USA)、EMD Biosciences (San Diego, CA, USA)、Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA)、HyTest (Turku, Finland)、Meridian Life Science (Memphis, TN USA) 和 Biodesign International (Saco, ME, USA), 如本文在以下详述的。

[0114] 应注意,本发明利用具有表 1 到表 4 中列出的氨基酸序列的抗原探针及其同源物(homolog)、片段和衍生物,只要这些同源物、片段和衍生物与这些抗原探针进行免疫交叉反应。如本文所用的术语“免疫交叉反应”是指被同一种抗体特异性结合的两种或多种抗原。如本文所用的术语“同源物”是指与抗原的氨基酸序列具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%或至少 90%同一性的肽。交叉反应性可通过许多免疫测定技术中的任何一种来确定,诸如竞争测定(测量测试抗原竞争性抑制抗体与其已知抗原结合的能力)。

[0115] 术语肽通常是指长度达大约 50 个氨基酸残基的多肽。根据特定的实施方案,本发明的抗原性肽可以为 10-50 个氨基酸长度,通常为大约 10-30 个氨基酸或大约 15-25 个氨基酸长度。

[0116] 该术语涵盖天然肽(降解产物、合成的合成肽、或重组肽),模拟肽(通常为合成的合成肽),以及肽类似物类肽(peptoid)和半类肽(semipeptoid),并且可具有例如使肽在体内更稳定或者更加能够渗透到细胞中的修饰。这些修饰包括但不限于:N 端修饰;C 端修饰;肽键修饰,包括但不限于 $\text{CH}_2\text{-NH}$ 、 $\text{CH}_2\text{-S}$ 、 $\text{CH}_2\text{-S}=\text{O}$ 、 $\text{O}=\text{C-NH}$ 、 $\text{CH}_2\text{-O}$ 、 $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-S}=\text{C-NH}$ 、 $\text{CH}=\text{CH}$ 和 $\text{CF}=\text{CH}$;骨架修饰;以及残基修饰。

[0117] 可使用具有末端羧酸的本发明的抗原,作为羧基酰胺,为还原性末端醇或者为任何药学上可接受的盐,例如,为金属盐,包括钠盐、钾盐、锂盐或钙盐,或者为有机碱的盐,或者为包括硫酸、盐酸或磷酸的无机酸的盐,或者为有机酸例如乙酸或马来酸的盐。

[0118] 官能衍生物由对所述肽的氨基酸侧链和/或羧基和/或氨基部分的化学修饰组成。这些衍生的分子包括例如如下那些分子:在所述分子中游离氨基已被衍生形成胺盐酸盐、对甲苯磺酰基基团、苄氧羰基基团、叔丁氧羰基基团、氯乙酰基基团或甲酰基基团。游离的羧基基团可被衍生形成盐、甲酯及乙酯或者其他类型的酯或酰肼。游离的羟基基团可被衍生形成 O-酰基或 O-烷基衍生物。组氨酸的咪唑氮可被衍生形成 N-im-苄基组氨酸。化学衍生物还包括如下那些多肽:所述多肽包含二十种标准氨基酸残基的一种或多种天然存在的或修饰的氨基酸衍生物。例如:4-羟基脯氨酸可代替脯氨酸;5-羟基赖氨酸可代替赖氨酸;3-甲基组氨酸可代替组氨酸;高丝氨酸可代替丝氨酸;鸟氨酸可代替赖氨酸。

[0119] 除非另外指明,否则本文所述的氨基酸残基是以“L”同分异构体形式。然而,“D”同分异构体形式的残基可代替任何 L 氨基酸残基,只要该肽基本上保留期望的抗体特异性。

[0120] 适合的类似物可通过现在标准的肽合成方法及装置或重组方法容易地合成。所有这些类似物就其氨基酸序列来说在本质上基于本发明的抗原,但是将具有缺失的、取代的或添加的一个或多个氨基酸残基。当氨基酸残基被取代时,所设想的这些保守性替换是不显著改变多肽的结构或抗原性的那些替换。例如,碱性氨基酸被其他碱性氨基酸替换,酸性氨基酸被酸性氨基酸替换,中性氨基酸被中性氨基酸替换。除了包括以上详述的保守性取代的类似物以外,还考虑包括非保守性氨基酸取代的类似物,只要这些类似物与本发明的肽进行免疫交叉反应。

[0121] 在其他方面,提供了编码这些肽的核酸、包含这些核酸的载体和包含这些核酸的宿主细胞。这些核酸、载体和宿主细胞通过本领域已知的重组方法容易地产生(见,例如, Sambrook 等人,2001)。例如,编码本发明的抗原的分离的核酸序列可以作为整个(即完整)基因或整个基因的一部分从其天然来源获得。核酸分子还可以使用重组 DNA 技术(例如,聚合酶链反应(PCR)扩增、克隆)或化学合成产生。核酸序列包括天然核酸序列及其同源物,

包括但不限于天然等位基因变体和修饰的核酸序列,在所述修饰的核酸序列中核苷酸以如下方式被插入、缺失、取代和/或倒置;所述方式使得这些修饰基本上不妨碍该核酸分子编码本发明的功能肽的能力。

[0122] 将在本发明的测定中使用的脂质抗原可使用本领域公知的方法来纯化或合成(见,例如,Biochemistry of Lipids, Lipoproteins, and Membranes(脂质、脂蛋白和膜的生物化学),第4版(2002;Vance D E和Vance, J E,编辑;Elsevier, Amsterdam, Boston);Enzymes in Lipid Modification(脂质修饰中的酶)(2000;Bornsheuer, U T,编辑;Wiley-VCH, Weinheim, N.Y.);Lipid Synthesis and Manufacture(脂质合成与制造)(1999;Gunstone, F D,编辑;Sheffield Academic Press, Sheffield, England;CRC Press, Boca Raton, Fla.);Lipid Biochemistry(脂质生物化学),第5版(2002;Gurr, M I, Harwood, J L,和Frayn, K N,编辑;Blackwell Science, Oxford, Malden, Mass)。在另一实施方案中,将在本发明的测定中使用的脂质抗原可以如本文以下详述的从商业上购买。

[0123] 诊断方法

[0124] 根据一些实施方案,本发明提供了可用于MS特别是RRMS、PPMS和SPMS的检测的诊断方法。在另一实施方案中,本发明提供了可用于区别MS脱髓鞘模式特别是I型MS病变和II型MS病变的诊断方法。

[0125] 根据一些实施方案,本发明的方法通过如下方式实施:确定从测试受试者获得的样品中的抗体对选自表1到表4中列出的抗原组成的组的多种抗原的反应性,从而确定该样品对该多种抗原的反应性模式,并且比较所述样品的反应性模式与对照反应性模式。在一个实施方案中,在所述样品的反应性模式与对照样品的反应性模式之间的显著差异指示受试者患MS。根据一个实施方案,抗原选自表1,用于诊断RRMS,并且对照反应性模式是从健康患者获得。根据另一实施方案,抗原选自表2,用于诊断PPMS,并且对照反应性模式是从健康患者获得。根据另一实施方案,抗原选自表3,用于诊断SPMS,并且对照反应性模式是从患RRMS的患者获得。根据另一实施方案,抗原选自表4,用于区别I型MS病变和II型MS病变(即,测试样品的I型MS,对照反应性模式是从患有II型MS病变的患者获得;或者测试样品的II型MS,对照反应性模式是从患有I型MS病变的患者获得)。根据特定的实施方案,抗原选自表1到表4中任一个表中列出的抗原组成的组,并且所述样品的所述反应性模式指示受试者的MS阶段,其中(i)在对照反应性模式与样品对选自表1的多种抗原的反应性模式之间的显著差异指示受试者患有RRMS;(ii)在对照反应性模式与样品对选自表2的多种抗原的反应性模式之间的显著差异指示受试者患有PPMS;(iii)在对照反应性模式与样品对选自表3的多种抗原的反应性模式之间的显著差异指示受试者患有SPMS;以及(iv)在对照反应性模式与样品对选自表4的多种抗原的反应性模式之间的显著差异指示受试者具有I型MS病变或II型MS病变。

[0126] 如本文中所使用,针对“多种抗原”的“样品中抗体的反应性”是指该样品中的每种抗体对选自多种抗原的具体抗原的免疫反应性。抗体对抗原的免疫反应性即抗体特异性结合抗原的能力可用来确定样品中抗体的量。在样品中的测试抗体的每一种的计算水平被选择性称为样品对这些抗原的反应性模式。例如,在以下实施例,每种抗原的反应性被计算并呈现为换算的每个斑点(抗原)的平均log强度。

[0127] 在其他实施方案中,所述方法包括确定获自受试者的样品中针对于选自表1到

表 4 中列出的抗原组成的组的多种抗原的抗体的水平,其中在获自该受试者的样品中的抗体水平与对照群体中的抗体水平之间的统计学显著差异是该受试者患 MS 亚型的指示,其中 MS 亚型选自以下组成的组:(i) RRMS,其中所述多种抗原选自表 1 中列出的抗原组成的组;(ii) PPMS,其中所述多种抗原选自表 2 中列出的抗原组成的组;(iii) SPMS,其中所述多种抗原选自表 3 中列出的抗原组成的组;以及 (iv) 选自 I 型病变和 II 型病变的 MS 病理亚型,其中所述多种抗原选自表 4 中列出的抗原组成的组。

[0128] 如本文所用“针对于”抗原的抗体是能够特异性结合该抗原的抗体。确定针对于多种抗原的抗体的水平包括测量样品中每种抗体的水平,其中每种抗体针对于表 1 到表 4 中列出的抗原中的具体抗原。该步骤通常利用免疫测定进行,如本文详述。

[0129] 在其他的实施方案中,所述方法包括确定获自受试者的样品中多种抗体的水平,每种抗体是针对于选自表 1 到表 4 中列出的抗原组成的组的抗原,其中在获自受试者的样品中抗体的水平与抗体的对照水平之间的显著差异是受试者患 MS 亚型的指示,所述 MS 亚型选自以下组成的组:(i) RRMS,其中所述抗原选自表 1 中列出的抗原;(ii) PPMS,其中所述抗原选自表 2 中列出的抗原;(iii) SPMS,其中所述抗原选自表 3 中列出的抗原;以及 (iv) 选自 I 型病变和 II 型病变的 MS 病理亚型,其中所述抗原选自表 4 中列出的抗原。

[0130] 在其他的实施方案中,确定所述样品中的抗体对所述多种抗原的反应性(以及样品中的测试抗体的每一种的水平)通过如下过程进行,所述过程包括:

[0131] 在可形成特异性抗原-抗体复合物的条件下使该样品与包含所述多种抗原的抗原探针组接触,并且

[0132] 对每种抗原探针形成的抗原-抗体复合物的量进行定量。抗原-抗体复合物的量指示该样品中的测试抗体的水平(或该样品与该抗原的反应性)。

[0133] 根据某些实施方案,本发明提供了用于鉴别诊断受试者的 MS 的方法,该方法包括:

[0134] (a) 确定从受试者获得的样品中的抗体对选自表 1 中列出的抗原组成的组的多种抗原的反应性,从而确定该样品对该多种抗原的反应性模式,并且比较所述样品的反应性模式与从健康受试者获得的对照反应性模式;

[0135] (b) 确定从受试者获得的样品中的抗体对选自表 2 中列出的抗原组成的组的多种抗原的反应性,从而确定该样品对该多种抗原的反应性模式,并且比较所述样品的反应性模式与从健康受试者获得的对照反应性模式;

[0136] (c) 确定从受试者获得的样品中的抗体对选自表 3 中列出的抗原组成的组的多种抗原的反应性,从而确定该样品对该多种抗原的反应性模式,并且比较所述样品的反应性模式与从患 RRMS 的受试者获得的对照反应性模式;

[0137] (d) 确定从受试者获得的样品中的抗体对选自表 4 中列出的抗原组成的组的多种抗原的反应性,从而确定该样品对该多种抗原的反应性模式,并且比较所述样品的反应性模式与从具有 I 型病变的受试者获得的对照反应性模式和/或与从具有 II 型病变的受试者获得的对照反应性模式;

[0138] 其中:

[0139] (i) (a) 的反应性模式与所述对照反应性模式之间的显著差异是受试者患 RRMS 的

指示；

[0140] (ii) (b) 的反应性模式与所述对照反应性模式之间的显著差异是受试者患 PPMS 的指示；

[0141] (iii) (c) 的反应性模式与所述对照反应性模式之间的显著差异是受试者患 SPMS 的指示；以及

[0142] (iv) (d) 的反应性模式与从具有 I 型病变的受试者获得的对照反应性模式之间的显著差异是受试者患 II 型病变的指示，(d) 的反应性模式与从具有 II 型病变的受试者获得的对照反应性模式之间的显著差异是受试者患 I 型病变的指示。

[0143] 根据一些实施方案，对于表 1 和表 2 的对照反应性模式是从健康对照受试者或来自健康对照受试者的一组储存数据获得。根据另一实施方案，对于表 3 的对照反应性模式是从患 RRMS 的受试者或来自患 RRMS 的受试者的一组储存数据获得。根据另一实施方案，本发明的方法和试剂盒的对照反应性模式是从患其他自身免疫疾病或退行性疾病（例如，SLE、ALD 和 AD）的受试者获得。根据另一实施方案，将样品的反应性模式与之前获自同一受试者的对照反应性模式（例如，作为一组储存数据而保留）进行比较，以监测疾病进展。应理解，对照样品和获自受试者的样品的抗体所有组成部分是从同一部分获得（例如，将血清对照样品的抗体所有组成部分与获自受试者血清的样品的抗体所有组成部分进行比较）。

[0144] 在另一实施方案中，提供了诊断有此需要的受试者的 MS 亚型（即，RRMS、PPMS、SPMS、I 型病变和 II 型病变）的方法，所述方法包括：

[0145] a) 从受试者获得含抗体的生物样品（例如，血清）；

[0146] b) 使该样品在可以形成抗原-抗体复合物的条件下与包括本文表 1 到表 4 中指明的多种抗原（或其免疫原性片段、类似物、衍生物和盐）的抗原探针组接触；并且

[0147] c) 确定所述样品的抗体特异性结合该抗原探针组的多种抗原的能力；

[0148] 其中在所述能力与对照样品（例如，从未患有 MS 的受试者获得的样品）的能力之间的显著差异指示该受试者患 MS 亚型。

[0149] 根据另一实施方案，本发明提供了诊断受试者的复发缓解型多发性硬化（RRMS）的方法，所述方法包括确定从该受试者获得的样品中的抗体对选自表 1 中列出的抗原组成的组的多种抗原的反应性，从而确定该样品对该多种抗原的反应性模式，并且比较所述样品的反应性模式与对照反应性模式（例如，从健康对照获得的样品），其中在从该受试者获得的所述样品的反应性模式与该对照样品的反应性模式之间的显著差异是该受试者患 RRMS 的指示。

[0150] 根据另一实施方案，本发明提供了诊断受试者的原发进展型多发性硬化（PPMS）的方法，所述方法包括确定从该受试者获得的样品中的抗体对选自表 2 中列出的抗原组成的组的多种抗原的反应性，从而确定该样品对该多种抗原的反应性模式，并且比较所述样品的反应性模式与对照反应性模式（例如，从健康对照获得的样品），其中在从该受试者获得的所述样品的反应性模式与该对照样品的反应性模式之间的显著差异是该受试者患 PPMS 的指示。

[0151] 根据另一实施方案，本发明提供了诊断受试者的继发进展型多发性硬化（SPMS）的方法，所述方法包括确定从该受试者获得的样品中的抗体对选自表 3 中列出的抗原组

成的组的多种抗原的反应性,从而确定该样品对该多种抗原的反应性模式,并且比较所述样品的反应性模式与对照反应性模式(例如,从患 RRMS 的患者获得的样品),其中在从该受试者获得的所述样品的反应性模式与该对照样品的反应性模式之间的显著差异是该受试者患 SPMS 的指示。

[0152] 根据另一实施方案,本发明提供了在患有 MS 的受试者中区别(即,区分)具有 I 型病变的受试者与具有 II 型病变的受试者的方法,该方法包括确定从受试者获得的样品中的抗体对选自表 4 中列出的抗原组成的组的多种抗原的反应性,从而确定该样品对该多种抗原的反应性模式,并且比较所述样品的反应性模式与对照反应性模式。根据某些实施方案,在抗体对选自 15-酮胆甾烷、15 α -羟基胆甾烯、神经节苷脂-GM4、四唾液酸神经节苷脂-GQ1B、脑 L- α -溶血磷脂酰丝氨酸、乳糖基神经酰胺或 160KDa 神经微丝组成的组的多种抗原的反应性上的差异是受试者具有 I 型病变的指示,并且其中在抗体对选自 HSP60、MOG、OSP 和 PLP 肽表位组成的组的多种抗原的反应性上的差异(例如,提高)是受试者具有 II 型病变的指示。在另一实施方案中,用于区别具有 I 型病变的受试者和具有 II 型病变的受试者的抗体选自 IgM 和/或 IgG 抗体。在特定的实施方案中,所有与表 4 中列出的抗原反应的抗体均为 IgG 抗体,与 160kDa 神经微丝反应的抗体除外,它为 IgM 抗体。

[0153] 在某些实施方案中,测试样品和对照样品可包括 IgG 和/或 IgM 抗体。在另一实施方案中,至少一种抗体对来自表 1 到表 4 中列出的多种抗原的具体抗原的反应性被上调。在另一实施方案中,至少一种抗体对具体抗原的反应性被下调。

[0154] 根据特定的实施方案,用于区别 RRMS 与健康患者的反应性模式由 94 种抗体反应性组成。根据一个实施方案,所述反应性模式由 90 种上调的反应性和 4 种下调的反应性组成。在另一实施方案中,从受试者获得的样品中的抗体为 IgG 抗体,其中该抗体与选自以下组成的组的抗原反应:MBP 31-50;HSP70481-500;PLP 65-84;和 GFAP。在另一实施方案中,从受试者获得的样品中的抗体为 IgM 抗体,其中该抗体与选自以下组成的组的抗原反应:HSP70 511-530;MBP 41-60;HSP60 286-305;HSP60496-515;HSP70 151-170;HSP60 526-545;MBP 84-94;OSP 61-80;HSP7031-50;CNP 286-305;HSP60 255-275;HSP60 106-125;OSP 31-50;P2 61-80;MBP 11-30;HSP60 376-395;HSP70 286-305;HSP60 136-155;HSP70136-155;P2 46-65;OSP 136-155;P2 1-20;MOG 91-110;HSP60 361-380;HSP70 451-470;HSP70 210-229;HSP60 240-259;HSP60 271-290;OSP76-95;PLP 178-191;CNP 271-290;P2 76-95;HSP70 631-640;PLP 248-259;HSP60 195-214;CNP 61-80;MOG 196-215;HSP60 46-65;HSP70 195-214;HSP70 436-455;HSP60 166-185;MBP 104-123;MBP 71-92;PLP 180-199;HSP70 255-275;MOBP 166-185;CNP 240-259;HSP60 16-35;HSP60301-320;MOBP 151-170;CNP 91-110;HSP70 106-125;CNP 406-421;HSP60 421-40;HSP60 61-80;淀粉状蛋白 β 10-20;HSP60 511-530;乳糖脑苷脂;HSP70 406-425;MOG 76-95;HSP70 316-335;HSP60 225-244;HSP60 76-95;MOG 106-125;HSP70 466-485;CNP 1-21;HSP70 166-185;HSP70 121-140;淀粉状蛋白 β 1-42;MBP 89-101;CNP 301-320;HSP701-20;MBP 51-70;HSP70 496-515;CNP 16-35;CNP 76-95;PLP 10-29;PLP 190-209;HSP60 346-365;HSP60 151-170;HSP70 376-395;牛 MBP;HSP70 556-575;CNP 391-410;MOG 211-230;PLP 220-249;HSP70616-635;淀粉状蛋白 β 1-12;HSP60 556-573;和 PLP 250-269。

[0155] 根据另外的实施方案,至少一种抗体对选自表 1 中列出的多种抗原或其亚组的具体抗原的反应性被上调,其中该抗原选自:HSP70 511-530、MBP 41-60、HSP60 286-305、HSP60 496-515、HSP70 151-170、HSP60526-545、MBP 84-94、OSP 61-80、HSP70 31-50、CNP 286-305、HSP60255-275、HSP60 106-125、OSP 31-50、P2 61-80、MBP 11-30、HSP60 376-395、HSP70 286-305、HSP60 136-155、HSP70 136-155、P2 46-65、OSP 136-155、P21-20、MOG 91-110、HSP60 361-380、HSP70 451-470、HSP70 210-229、HSP60 240-259、HSP60 271-290、OSP 76-95、PLP 178-191、CNP 271-290、P2 76-95、HSP70 631-640、PLP 248-259、HSP60 195-214、CNP 61-80、MOG 196-215、HSP60 46-65、HSP70 195-214、HSP70 436-455、HSP60166-185、MBP 104-123、MBP 71-92、PLP 180-199、HSP70 255-275、MOBP166-185、CNP 240-259、HSP60 16-35、HSP60 301-320、MOBP 151-170、CNP 91-110、HSP70 106-125、CNP 406-421、HSP60 421-40、HSP60 61-80、淀粉状蛋白 β 10-20、HSP60 511-530、乳糖脑苷脂、HSP70 406-425、MOG76-95、HSP70 316-335、HSP60 225-244、HSP60 76-95、MOG 106-125、HSP70 466-485、CNP 1-21、HSP70 166-185、HSP70 121-140、淀粉状蛋白 β 1-42、MBP 89-101、CNP 301-320、HSP70 1-20、MBP 51-70、HSP70496-515、CNP 16-35、CNP 76-95、PLP 10-29、PLP 190-209、HSP60 346-365、HSP60 151-170、HSP70 376-395、牛 MBP、HSP70 556-575、CNP 391-410、MOG 211-230、PLP 220-249、HSP70 616-635、淀粉状蛋白 β 1-12、HSP60556-573 和 PLP 250-26。根据其他的实施方案,至少一种抗体对选自表 1 中列出的多种抗原或其亚组的具体抗原的反应性被下调,其中该抗原选自 MBP 31-50、HSP70 481-500、PLP 65-84 和 GFAP。

[0156] 根据特定的实施方案,用于区别 PPMS 与健康患者的反应性模式由 39 种抗体反应性组成。在另一实施方案中,从受试者获得的样品中的抗体为 IgG 抗体,其中该抗体与选自由以下组成的组的抗原反应:PLP 215-232;HSP70 195-214;HSP70 166-185;牛 MBP;PLP 137-150;MOG 46-65;CNP 406-421;P231-50;CNP 1-20;MOG 16-35;P2 76-95;HSP70 466-485;HSP60 76-95;MOG 151-170;P21-20;OSP 61-80;PLP 178-191;HSP7016-35;HSP70 121-140;和 OSP 1-20。在另一实施方案中,从受试者获得的样品中的抗体为 IgM 抗体,其中该抗体与选自由以下组成的组的抗原反应:PLP 215-232;mMBP;smLPS;HSP70 210-229;硫酸软骨素 4;牛 MBP;神经微丝 68kDa; β 淀粉状蛋白;AB 1-40;PLP 161-180;PLP 40-59;PLP 137-150;分泌的 APP α ;gpMBP;MBP 104-123;SOD;CNP 1-20;ecLPS;和 MOBP 61-80。

[0157] 根据另外的实施方案,至少一种抗体对选自表 2 中列出的多种抗原或其亚组的具体抗原的反应性被上调,其中该抗原选自 β 淀粉状蛋白、HSP70466-485、AB 1-40、PLP 161-180、PLP 40-59、PLP 137-150、HSP60 76-95、MOG 151-170、P2 1-20、OSP 61-80、分泌的 APP α 、PLP 178-191、gpMBP、HSP70 16-35、MBP 104-123、SOD、CNP 1-20、ecLPS、HSP70 121-140、MOBP 61-80 和 OSP 1-20。根据其他的实施方案,至少一种抗体对选自表 2 中列出的多种抗原或其亚组的具体抗原的反应性被下调,其中该抗原选自 PLP 215-232、PLP 215-232、mMBP、HSP70 195-214、smLPS、HSP70210-229、硫酸软骨素 4、HSP70 166-185、牛 MBP、PLP 137-150、MOG 46-65、CNP 406-421、P2 31-50、CNP 1-20、MOG 16-35、P2 76-95 和神经微丝 68kDa。

[0158] 根据特定的实施方案,用于区别 SPMS 与健康患者的反应性模式由 66 种抗体反

应性组成。在另一实施方案中,从受试者获得的样品中的抗体为 IgM 抗体,其中该抗体与选自自由以下组成的组的抗原反应:MOG 61-80;HSP60 376-395;MOG 31-50;CNP 361-380;淀粉状蛋白 β 1-23;CNP346-365;HSP60 496-515;OSP 1-20;HSP60 511-530;OSP 61-80;HSP60286-305;CNP 240-259;HSP70 601-620;HSP60 210-229;HSP60 451-470;MOBP 166-185;HSP60 166-185;MBP 138-147;CNP 195-214;MBP 1-20;HSP60 526-545;P2 1-20;HSP70 286-305;MBP 155-178;P2 46-65;HSP60195-214;P2 31-50;HSP60 271-290;HSP60 136-155;CNP 286-305;HSP70210-229;HSP70 136-155;PLP 150-163;HSP70 166-185;HSP60 255-275;HSP60 16-35;牛 MBP;CNP 181-199;CNP 121-140;无唾液酸神经节苷脂 -GM2;淀粉状蛋白 β 1-12;OSP 121-140;分泌的 APP β ;心磷脂;HSP70406-425;和 IgM PLP 1-19。在另一实施方案中,从受试者获得的样品中的抗体为 IgG 抗体,其中该抗体与选自自由以下组成的组的抗原反应:HSP60361-380;淀粉状蛋白 β 17-40;胆固醇;淀粉状蛋白 β 1-42;PLP 80-99;PLP65-84;PLP 40-59;PLP 1-19;PLP 151-173;HSP70 421-440;huMBP;MOBP 16-35;CNP 16-35;RBP;HSP70 331-350;OSP 121-140;MBP113-132; β 晶状体蛋白;CNP 240-259;和 PLP 178-191。

[0159] 根据另外的实施方案,至少一种抗体对选自表 3 中列出的多种抗原或其亚组的具体抗原的反应性被上调,其中该抗原选自淀粉状蛋白 β 17-40、胆固醇、淀粉状蛋白 β 1-42、PLP 80-99、PLP 65-84、PLP 40-59、PLP 1-19、PLP 1-19、PLP 151-173、HSP70 421-440、huMBP、MOBP 16-35、CNP 16-35、RBP、HSP70 331-350、OSP 121-140、MBP 113-132、 β 晶状体蛋白、CNP240-259 和 PLP 178-191。根据其他的实施方案,至少一种抗体对选自表 3 中列出的多种抗原或其亚组的具体抗原的反应性被下调,其中该抗原选自 MOG 61-80、HSP60 376-395、MOG 31-50、CNP 361-380、淀粉状蛋白 β 1-23、CNP 346-365、HSP60 496-515、OSP 1-20、HSP60 511-530、OSP 61-80、HSP60 286-305、CNP 240-259、HSP70 601-620、HSP60 210-229、HSP60451-470、MOBP 166-185、HSP60 166-185、MBP 138-147、CNP 195-214、MBP 1-20、HSP60 526-545、P21-20、HSP70 286-305、MBP 155-178、P246-65、HSP60 195-214、P231-50、HSP60 271-290、HSP60 136-155、CNP286-305、HSP70 210-229、HSP70 136-155、PLP 150-163、HSP70 166-185、HSP60 255-275、HSP60 16-35、牛 MBP、CNP 181-199、CNP 121-140、无唾液酸神经节苷脂 -GM2、淀粉状蛋白 β 1-12、OSP 121-140、分泌的 APP β 、心磷脂、HSP70 406-425 和 HSP60 361-380。

[0160] 在一些实施方案中,本发明的方法采用抗原微阵列系统将抗体的信息模式以信息方式表征为 MS 亚型的特异性生物标志,如本文详述的。

[0161] 抗体、样品和免疫测定

[0162] 抗体或免疫球蛋白包括通过二硫键连接在一起的两条重链和两条轻链,每条轻链以“Y”形构型通过二硫键与对应的重链相连。每条重链在一端具有可变结构域 (VH),接着为若干恒定结构域 (CH)。每条轻链在一端具有可变结构域 (VL),在其另一端具有恒定结构域 (CL),轻链可变结构域与重链的可变结构域对齐,轻链恒定结构域与重链的第一恒定结构域 (CH1) 对齐。每对轻链和重链的可变结构域形成抗原结合位点。

[0163] 重链的同种型 (γ 、 α 、 δ 、 ϵ 或 μ) 决定免疫球蛋白的类 (分别为 IgG、IgA、IgD、IgE 或 IgM)。轻链在所有抗体类中发现具有两种同种型之一 (kappa, κ 或 lambda, λ)。

[0164] 应理解当使用术语“抗体 (antibody)”或“抗体 (antibodies)”时,旨在包括完整

的抗体诸如多克隆抗体或单克隆抗体 (mAb) 及其蛋白水解片段诸如 Fab 或 $F(ab')_2$ 片段。本发明的范围内还包括 (例如, 作为免疫测定试剂, 如本文详述) 嵌合抗体、重组抗体和工程化抗体、以及它们的片段。

[0165] 包括轻链和重链的整个可变区或基本上整个可变区的示例性功能抗体片段定义如下:

[0166] (i) Fv, 定义为由轻链可变区和重链可变区组成的遗传工程片段, 表示为两条链;

[0167] (ii) 单链 Fv (“scFv”), 包含通过适合的多肽接头连接的轻链可变区和重链可变区的遗传工程单链分子。

[0168] (iii) Fab, 通过如下方式获得的含有抗体分子的单价抗原结合部分的抗体分子片段: 用酶木瓜蛋白酶处理整个抗体产生完整的轻链和由重链的可变结构域和 CH1 结构域组成的重链 Fd 片段;

[0169] (iv) Fab', 通过用酶胃蛋白酶处理整个抗体接着还原获得的含有抗体分子的单价抗原结合部分的抗体分子片段 (每个抗体分子获得两个 Fab' 片段); 以及

[0170] (v) $F(ab')_2$, 通过用酶胃蛋白酶处理整个抗体获得的含有抗体分子的单价抗原结合部分的抗体分子片段 (即, 通过两个二硫键保持在一起的 Fab' 片段的二聚体)。

[0171] 如本文所用的术语“抗原”是能够被抗体结合的分子或分子的一部分。抗原通常能够诱导动物产生能够结合该抗原的表位的抗体。抗原可具有一个或多个表位。以上提到的特异性反应旨在表示该抗原将以高度选择性方式与其对应的抗体反应而不与可能由其他抗原激发的许多其他抗体反应。“抗原性肽”是能够特异性结合抗体的肽。

[0172] 在另一实施方案中, 可通过对特异性抗原-抗体复合物的形成进行定量来执行抗体特异性结合抗原探针的能力的检测。如本文所用的术语“特异性结合”表示抗体与抗原探针的结合不因不相关分子的存在而被竞争抑制。

[0173] 在某些实施方案中, 通过确定本发明的肽特异性结合分离自受试者的 IgG 同种型抗体或在其他实施方案中 IgM 或 IgE 同种型抗体的能力来执行本发明的方法。

[0174] 从受试者获得适合的含抗体的生物样品的方法完全在本领域技术人员的能力之内。通常, 适合的样品包括全血和源自全血的产物, 诸如血浆和血清。在其他的实施方案中, 可使用其他含抗体的样品, 例如, CSF、尿和唾液样品。从测试受试者获得血清样品的非限制性实例呈现在以下的实施例部分中。

[0175] 依据本发明, 任何适合的免疫测定可用于受试肽。这些技术是本领域技术人员公知的, 并且被描述在许多标准的免疫学手册和教科书中。在某些优选的实施方案中, 确定抗体特异性结合抗原探针的能力是使用基于抗原探针阵列的方法而进行。优选地, 将阵列与适当稀释的受试者血清 (例如, 1 : 10 稀释) 孵育以允许在该血清中包含的抗体与固定的抗原探针之间的特异性结合, 从该阵列中洗出未结合的血清, 将该洗涤后的阵列与期望同种型的抗体的可检测标记耦联的配体孵育, 从该阵列中洗出未结合的标记, 并且测量与每种抗原探针结合的标记的水平。

[0176] 根据一些方面, 本发明的方法可使用在本发明的发明人中的一些发明人的 WO 02/08755 和 U. S. 2005/0260770 中公开的抗原阵列来实施。WO02/08755 涉及用于分类从而鉴定与源自需要诊断疾病或监测治疗的患者受试者的血清的未确定的免疫球蛋白反应的预定抗原的系统 and 制品。还公开了诊断方法和可用于这些方法的系统, 这些方法和系统采

用将多种抗原的抗原亚组分类的步骤,所述抗原亚组与源自多个患者的多种抗体反应,并且将受试者的抗体与得到的类相关联或去关联。本发明的发明人中的一些发明人的美国专利申请公布第 2005/0260770 号公开了抗原阵列系统及其诊断用途。该申请提供了在受试者诊断免疫疾病特别是 1 型糖尿病或免疫疾病倾向的方法,该方法包括确定受试者的免疫球蛋白特异性结合抗原特征组的每种抗原探针的能力。所述公开内容的教导以整体并入本文就如同在本文完全列出一样。

[0177] 在其他的实施方案中,可使用各种其他的免疫测定,包括但不限于:酶联免疫吸附测定(ELISA)、带有多重微珠的流式细胞术(诸如由 Luminex 制造的系统)、表面等离子体共振(SPR)、椭圆光度法,以及采用例如激光扫描、光检测、借助光电倍增管的光子检测、用基于数码相机的系统或视频系统摄影、辐射计数、荧光检测、电子检测、磁性检测和允许定量测量抗原-抗体结合的任何其他系统的多种其他的免疫测定法。

[0178] 已研制了多种方法用于制备适合于本发明的方法的阵列。现有技术方法包括使用机器人装置将含有抗原探针的不同溶液施加或“点”至平面支持体表面上的紧密间隔的特定的可寻址位置,所述平面支持体通常为玻璃支持体,诸如显微镜载玻片,随后通过适合的热处理和/或化学处理对该平面支持体进行处理以使抗原探针附着于该支持体的表面。便利地,首先通过化学处理活化玻璃表面,所述化学处理在表面上留下一层反应性基团诸如环氧基团,该反应性基团共价地结合含有游离的胺或硫醇基团的任何分子。适合的支持体还可以包括硅、硝酸纤维素、纸、纤维素支持体等等。

[0179] 优选地,将附着于阵列的特定可寻址位置的本发明的每种抗原探针或抗原探针的不同亚组独立地附着于该阵列的至少两个、更优选至少三个单独的特定可寻址位置以便使得能够产生统计学上稳健的数据。

[0180] 除了本发明的抗原探针以外,阵列可有利地包括对照抗原探针或其他标准化学产品。这些对照抗原探针可包括标准化对照探针。从标准化对照探针获得的信号为结合条件、标记强度、“读取”效率和可引起给定的结合抗体-探针配体相互作用的信号改变的其他因素的变化提供对照。例如,将从抗原探针阵列的所有其他抗原探针读取的信号诸如荧光强度除以来自标准化对照探针的信号(例如,荧光强度),从而使测量结果标准化。标准化对照探针能够与抗原探针阵列上的多个可寻址位置结合来控制抗体-配体探针效率的空间变化。优选地,标准化对照探针位于阵列的角或边缘来控制边缘效应,以及位于阵列的中间。

[0181] 标记的抗体配体可以为多种适合的抗体配体类型中的任何一种。优选地,抗体配体为能够特异性结合所用的受试者的抗体的 Fc 部分的抗体。例如,在受试者的抗体为 IgM 同种型时,抗体配体优选为能够特异性结合受试者的 IgM 抗体的 Fc 部分的抗体。

[0182] 受试者的抗体的配体可与各种可检测标记类型中的任何一种吻合。优选地,标记为荧光团,最优选为 Cy3。可选地,荧光团可以为各种荧光团中的任何一种,包括 Cy5、异硫氰酸荧光素(FITC)、藻红蛋白(PE)、若丹明、德克萨斯红等等。对特定的同种型抗体具有特异性的适合的荧光团吻合的抗体可广泛地购自商业供应商,其生产方法已充分地建立。

[0183] 取决于应用和目的,可以分离受试者的抗体以用于以各种方法中的任何一种分析其抗原探针结合能力。尽管受试者的抗体可以适当地且便利地以血清或血浆形式或血清和血浆的稀释形式(例如,1:10 稀释),但在测试抗体特异性结合抗原探针的能力之前可对

抗体进行任何期望程度的纯化。可使用受试者的整个抗体或包含抗体可变区的受试者的抗体片段来实施本发明的方法。

[0184] 数据分析

[0185] 有利地,本发明的方法可采取学习与模式识别分析仪的使用、聚类算法等等,以便区别患有 MS 亚型的患者的反应性模式与对照受试者的反应性模式。例如,所述方法可包括确定测试样品中的抗体对多种抗原的反应性,并且利用这些算法和 / 或分析仪比较得到的模式与阴性对照和阳性对照样品的反应性模式。

[0186] 在某些实施方案中,一种或多种算法或计算机程序可用于对照预设截断值 (cutoff) (或对照若干预设截断值) 来比较测试样品中量化的每种抗体的量。可选地,可提供用于人们手动执行必要步骤的一种或多种说明。

[0187] 用于确定和比较模式分析的算法包括但不限于:主成分分析、Fischer 线性分析、神经网络算法、遗传算法、模糊逻辑模式识别等等。在完成分析后,得到的信息可以例如展示在显示器上,传递至主计算机,或者储存在储存设备上用于后面的检索。

[0188] 这些算法中许多为基于神经网络的算法。神经网络具有输入层、处理层和输出层。神经网络中的信息被分布遍及处理层。处理层由结点 (node) 组成,通过其结点互连来模拟神经元。与揭示数据收集集中的潜在模式 (underlying pattern) 的统计分析相似,神经网络基于预设标准对数据收集集中的一致模式 (consistent pattern) 定位。

[0189] 适合的模式识别算法包括但不限于:主成分分析 (PCA)、Fisher 线性判别分析 (FLDA)、簇类独立软模式法 (soft independent modeling of class analogy, SIMCA)、K 近邻法 (KNN)、神经网络、遗传算法、模糊逻辑以及其他模式识别算法。在一些实施方案中,使用 Fisher 线性判别分析 (FLDA) 和典型判别分析 (CDA) 及其组合来比较输出签名 (output signature) 与来自数据库的可用数据。

[0190] 在其他的实施方案中,使用主成分分析。主成分分析 (PCA) 包括将若干相关变量转化成少量不相关变量的数学方法。少量不相关变量称为主成分。第一主成分或特征向量尽可能多地解释数据变化性,每个后继成分尽可能多地解释余下变化性。PCA 的主要目标是减少数据集的维度并且鉴定新的潜在变量 (underlying variable)。

[0191] 主成分分析以分层方式比较两个或多个协方差矩阵的结构。例如,除了一个矩阵的每个元素乘以单个常数以外,该矩阵可与另一个矩阵相同。这些矩阵因此彼此成比例。更具体地说,这些矩阵共有相同的特征向量 (或主成分),但它们的特征值的差别在于常数。矩阵之间的另一种关系是它们拥有共同的主成分,但是它们的特征值不同。在主成分分析中使用的数学方法被称作特征分析 (eigenanalysis)。与最大的特征值相关的特征向量具有与第一主成分相同的方向。与第二大特征值相关的特征向量决定第二主成分的方向。特征值之和等于方阵的迹 (trace) 并且特征向量的最大数目等于这个矩阵的行数。

[0192] 在另一个实施方案中,算法为分类法。一种类型的分类法是通过用来自训练集的数据“训练”算法而创建,并且它的表现用测试集数据评估。与本发明一起使用的分类法的实例为判别分析、决策树分析、受试者工作曲线 (receiver operator curve) 或裂区及评分分析 (split and score analysis)。

[0193] 术语“决策树”是指分类采用的具有流程图样树结构的分类法。决策树由成为子集的数据集的重复裂区组成。每个裂区由应用至一个变量的简单规则组成,例如,“如果“变

量 1” 的值大于“阈值 1”；那么向左走，否则向右走”。因此，给定的特征空间被划分成一组矩形，其中每个矩形被指定为一类。

[0194] 术语“测试集”或“未知集”或“验证集 (validation set)”是指由未包括在训练集中的那些输入条目 (entry) 组成的整个可用数据集的子集。应用测试数据来评估分类法表现。

[0195] 术语“训练集”或“已知集 (known set)”或“参考集”是指相应整个可用数据集的子集。这种子集通常被随机选择，并且只用于分类法构建的目的。

[0196] 有利地，区别患有 MS 形式（例如，亚型）的患者与对照个体（例如，健康个体或患另一 MS 形式的个体）在多维空间中进行。例如，用由本文表 1 中列出的抗原组成的抗原阵列进行的诊断测试在 94 维中进行。便利地，通过将空间划分成患者特征性的区域来进行这种分析，并且一个分析用于对照个体，如以下举例说明的。

[0197] 提供以下实施例以便更完整地阐述本发明的一些实施方案。然而，不应以任何方式将它们解释为限制本发明的宽范围。

实施例

[0198] 程序

[0199] ELISA

[0200] 将抗原（对于蛋白来说在磷酸盐缓冲盐水中 1mg/ml，对于脂质来说在乙醇中 5mg/ml）包被在 96 孔 Maxisorp ELISA 板 (NalgeNunc, Rochester, NY) 中，并且按照描述进行 ELISA (Quintana 等人, J Autoimmun 21, 65-75, 2003)。

[0201] 抗原微阵列芯片

[0202] 将稀释于 PBS 中的抗原以 0.1-1mg/ml 浓度放在 384 孔板中。使用具有 0.2mm 直径的固体点样针的机器人 MicroGrid 阵列器 (arrayer) (BioRobotics, Cambridge, U. K.) 将抗原点到 ArrayIt SuperEpoxi 微阵列基质载玻片上 (TeleChem, Sunnyvale, CA)。每种抗原以三个或四个重复点样。将点样的微阵列储存于 4℃。

[0203] 用 PBS 洗涤芯片，用 1% BSA 在 37℃ 封闭 1h，并且将其在湿环境中的盖玻片之下与封闭缓冲液中 1 : 10 稀释的测试血清在 37℃ 孵育 2 小时。然后洗涤阵列并将其与山羊抗人 IgG Cy3 耦合的抗体和与 Cy5 耦合的山羊抗人 IgM (两种抗体均购自 Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) 的 1 : 500 稀释的混合物在 37℃ 孵育 45min。用 ScanArray 4000X 扫描仪 (GSI Luminomics, Billerica, Massachusetts, USA) 扫描阵列，分别记录 IgM 和 IgG 的结果。将结果记录为 TIFF 文件。

[0204] 图像和数据处理

[0205] 通过使用直方图分割来鉴定 TIFF 文件中每个斑点包含的像素和局部背景。将每个斑点的强度及其局部背景计算为对应像素强度的平均值。含有抗原的斑点均未显示饱和。通过目视检查鉴定技术上有缺陷的斑点并将其从数据集中移除。对于每个斑点来说，从斑点强度中减去局部背景强度。将具有负强度的斑点从数据集中除去。

[0206] 强度以 2 为底的 log 转换在所有强度水平产生适当恒定的变化性。将每种抗原的 log 强度计算为每个载玻片上重复样品的 log 强度的平均值。在每个阵列上的重复样品之间的变化性的系数在 10% 以下。为了消除阵列之间强度的总体差异，通过减去阵列上所有

抗原的平均 log 强度的中位数来换算每个阵列上的每种抗原的平均 log 强度。换算的抗原平均 log 强度表示抗原的反应性。

[0207] 使用 Gene Spring 软件 (Silicon Genetics, Redwood City, CA) 对原始数据进行标准化并分析。将抗原反应性定义为与微阵列上该抗原的重复样品结合的平均强度。使用具有 0.05 (分析 RRMS 和 PPMS 样品) 或 0.2 (分析免疫病理学 I 型和 II 型样品) 错误发现率的 Benjamini 和 Hochberg 的方法, 用非参数的 Wilcoxon-Mann-Whitney 测试分析数据以确定显著性。在训练集中的留一交叉验证分析 (LOOCV) 和对测试集样品的分类使用支持向量机来执行, 该支持向量机基于对训练集被鉴定为区别性的抗体反应性对样品进行分类。

[0208] 患者和血清样品

[0209] 在 Partners MS Center 从临床缓解过程中的未治疗的 RRMS、PPMS 患者或 HC 中收集血清样品。这些患者没有呈现出患有其他自身免疫疾患。从属于 MS 病变项目 (MSLP) 的 780 个中枢神经系统炎性脱髓鞘疾病 (CNS IDD) 活组织检查病例的原始同期群组中鉴定患有活组织检查证明的 CNS 炎性脱髓鞘疾病的六十二位患者。MSLP 数据库由具有详细的病理材料、临床材料、成像材料和血清学材料的活组织检查证明的 CNS IDD 病例的独特集合组成 (NMSS RG3184-B-3-02)。基于之前公布的标准, 将活动性的脱髓鞘病变分为 I 型或 II 型 (Lucchinetti 等人, 2000)。在随访时对所有包括的患者获得血清和面对面神经学评价。在塞维利亚大学医学院的大学医院 (University Hospital, School of Medicine, University of Sevilla) 从具有证实的鞘内 IgG 分泌和 IgG 寡克隆条带的 RRMS 患者中收集成对的 CSF 和血清样品。患者、病理同期群组和健康对照的临床特征列在本文下面的表 6 中。对照样品对于年龄、性别和种族而言是成对匹配的。

[0210] 表 6- 患者和健康对照 (HC) 的特征

[0211]

组	N	性别 (F/M)	年龄	疾病持续时间	EDSS
RRMS (美国)	39	31/8	42 (22 - 58)	13.0 (6.0 - 27.0)	1.5 (0.0 - 3.5)
RRMS (西班牙同期 群组)	51	33/17	44 (20 - 55)	2.3 (0.0 - 24.0)	1.3 (0.0 - 3.5)
SPMS	30	23/7	50 (31 - 64)	8 (2.0 - 27.0)	6.0. (1.5 - 8.5)
PPMS	37	20/17	55 (34 - 73)	4.5 (0.0 - 25.0)	6.0. (1.5 - 9.5)
I 型	15	10/5	42 (20 - 70)	4.1 (1.4 - 16.1)	3 (0.0 - 7.0)
II 型	53	25/28	44 (20 - 71)	3.3 (0.6 - 37.8)	2 (0.0 - 8.0)
HC	30	18/12	51 (20 - 72)	未获得	未获得

[0212] 如本文所用“EDSS”是指 Kurtzke 扩展的残疾状态量表 (Kurtzke Expanded Disability Status Scale, EDSS), 它在本领域中已知是用于对多发性硬化中的残疾进行定量的方法。EDSS 对八个功能系统 (即, 锥体系统、小脑系统、脑干系统、感觉系统、肠和膀胱系统、视觉系统、大脑系统和其他系统) 中的残疾进行定量, 并且允许神经学家指定每个系统中的功能系统评分。EDSS 等级 1.0 到 4.5 是指完全能行走的患有 MS 的人。EDSS 等级 5.0 到 9.5 界定行走受损。

[0213] 来自阿尔兹海默病患者的血清样品和 CSF 样品由马萨诸塞州, 波士顿, 哈佛医学院, 布莱根妇女医院, 神经病学中心 (Center for Neurologic Diseases, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA) 的 Denis Selkoe 博士提供。来自 SLE 患者的血清样品由马萨诸塞州, 波士顿, 布莱根妇女医院, 风湿病学 / 免疫学系的 Peter H. Schur 博士提供。

[0214] 采集样品如下: 将血液样品采集到无菌测试管中, 通过将测试管放在室温 30 分钟使血液样品凝固。接下来, 将试管以 2000g 离心 15 分钟。将液相转移至新的测试管中, 分成等份并储存于 $\leq -20^{\circ}\text{C}$ 。

[0215] 抗原

[0216] 在哈佛医学院 (HMS) 的生物化学与分子药理学系的生物聚合物实验室合成肽。重组蛋白和脂质从以下来源购买: Sigma (St. Louis, MO, USA)、Abnova (Taipei City, Taiwan)、Matreya LLC (Pleasant Gap, PA, USA)、Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA)、Calbiochem (San Diego, CA, USA)、Chemicon (Temecula, CA, USA)、GeneTex (San Antonio, TX, USA)、Novus Biologicals (Littleton, CO, USA)、Assay Designs (Ann Arbor, MI, USA)、ProSci Inc. (Poway, CA, USA)、EMD Biosciences (San Diego, CA, USA)、Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA)、HyTest (Turku, Finland)、Meridian Life Science (Memphis, TN USA) 和 Biodesign International (Saco, ME, USA)。

[0217] 在抗原微阵列的构建中使用的抗原如下: 热休克蛋白 27kDa (HSP27)、HSP32、HSP40、HSP47、HSP60、结核分枝杆菌 (*M. tuberculosis*) HSP65、HSP70、结核分枝杆菌 HSP71、HSP90 和 GroEL (全部购自 Stressgen); 由氨基酸 106-125、1-20、121-140、136-155、151-170、16-35、166-185、181-199、195-214、210-229、225-244、240-259、255-275、271-290、286-305、301-320、31-50、316-335、331-350、346-365、361-380、376-395、391-410、406-425、421-440、436-455、451-470、466-485、46-65、481-500、496-515、511-530、526-545、541-560、556-573、61-80、76-95 和 91-110 组成的 HSP60 肽 (全部在 HMS 生物聚合物实验室合成); 由氨基酸 106-125、1-20、121-140、136-155、151-170、16-35、166-185、181-199、195-214、210-229、225-244、240-259、255-275、271-290、286-305、301-320、31-50、316-335、331-350、346-365、361-380、376-395、391-410、406-425、421-440、436-455、451-470、466-485、46-65、481-500、496-515、511-530、526-545、541-560、556-575、571-590、586-605、601-620、616-635、61-80、631-640、76-95 和 91-110 组成的 HSP70 肽 (全部在 HMS 生物聚合物实验室合成)。

[0218] 由氨基酸 106-125、1-20、121-140、136-155、151-170、16-35、166-185、181-200、195-215、211-230、226-245、241-260、256-275、271-290、286-305、301-320、31-50、316-335、331-350、346-365、361-380、376-395、391-410、406-421、46-65、61-80、76-95 和 91-110 组成的 CNS 蛋白 2', 3' - 环核苷酸 3' - 磷酸二酯酶肽 (CNP) (全部在 HMS 生物聚合物实验室合成); 乙酰胆碱酯酶、ADAM-10、 β - 晶状体蛋白、牛髓鞘碱性蛋白、脑提取物 I、脑提取物 II、脑提取物 III、豚鼠髓鞘碱性蛋白、人髓鞘碱性蛋白 (全部购自 Sigma Aldrich); α - 晶状体蛋白 (购自 Stressgen); 胶质纤维酸性蛋白 (GFAP) (购自 Research Diagnostic); 由氨基酸 106-125、1-20、121-140、136-155、151-170、16-35、166-185、181-200、31-50、46-65、61-80、76-95 和 91-110 组成的髓鞘相关的少突胶质细

胞碱性蛋白 (MOBP) 肽 (全部在 HMS 生物聚合物实验室合成); 由氨基酸 106-125、1-20、121-140、136-155、151-170、16-35、166-185、181-200、196-215、211-230、226-247、31-50、35-55、46-65、61-80、76-95 和 91-110 组成的髓鞘 / 少突胶质细胞糖蛋白 (MOG) 肽 (全部在 HMS 生物聚合物实验室合成); 鼠髓鞘碱性蛋白 (mMBP) 和髓鞘相关糖蛋白 (购自 Sigma Aldrich); 由氨基酸 104-123、11-30、113-132、1-20、121-138、124-142、138-147、141-161、143-168、155-178、26-35、31-50、41-60、51-70、61-80、71-92、84-94、89-101 和 93-112 组成的髓鞘碱性蛋白 (MBP) 肽 (全部在 HMS 生物聚合物实验室合成); 由氨基酸 106-125、1-20、121-132、16-35、31-50、46-65、61-80、76-95 和 91-110 组成的髓鞘蛋白 2 (P2) 肽 (在 HMS 生物聚合物实验室合成); 神经微丝 160kd、神经微丝 200kd、神经微丝 68kd (全部购自 Chemicon); 神经元烯醇化酶 (购自 Calbiochem); Nicastrin (购自 GeneTex); NMDA 受体 (购自 Novus Biologicals); NOGO (购自 Sigma Aldrich); 由氨基酸 106-125、1-20、121-140、136-155、151-170、16-35、166-185、181-199、195-217、31-50、46-65、61-80、76-95 和 91-110 组成的少突胶质细胞特异性蛋白 (OSP) 肽 (全部在 HMS 生物聚合物实验室合成); 蛋白脂质蛋白 (Abnova); 由氨基酸 100-119、10-29、110-129、1-19、125-141、137-150、137-154、150-163、151-173、158-166、161-180、178-191、180-199、190-209、20-39、205-220、215-232、220-239、220-249、248-259、250-269、265-277、35-50、40-59、50-69、65-84、80-99 和 91-110 组成的蛋白脂质蛋白肽 (全部在 HMS 生物聚合物实验室合成); 视黄醇结合蛋白、超氧化物歧化酶、 β 突触核蛋白、 γ 突触核蛋白 (Sigma Aldrich); 和 S100 β 蛋白 (Assay Designs)。

[0219] 组织抗原 (购自 ProSci Inc.): 杏仁核、杏仁核 AD、脑裂解物、脑组织膜、小脑脚、大脑脑膜、脑胼胝体、脑胼胝体 AD、间脑、胎脑、额叶、额叶 AD、海马、海马 AD、岛叶、枕叶、枕叶 AD、嗅区、视神经、顶叶、顶叶 AD、脑桥、脑桥 AD、中央后回、中央后回 AD、中央前回、中央前回 AD、脊髓、颞叶、颞叶 AD、丘脑和丘脑 AD。

[0220] AD 相关抗原: 淀粉状蛋白 β (AB)、AB 10-20、AB 1-12、AB 12-28、AB 1-23、AB 1-38、AB 17-40、AB 25-35、AB 34-42、淀粉状蛋白 bri 蛋白前体 227、淀粉状蛋白 DAN 蛋白片段 1-34、淀粉状蛋白前体蛋白、无 AB 组分的淀粉状蛋白、分泌的淀粉状蛋白前体蛋白 (SAP) β 、Tau 同种型变体 0N3R、Tau 同种型变体 1N3R、Tau 同种型变体 0N4R、Tau 同种型变体 2N3R、Tau phospho Ser412、Tau phospho Ser441 和 Tau phospho Thr181 (全部购自 Sigma Aldrich); 以及人 Tau 蛋白 (购自 EMD Biosciences)。

[0221] 脂质抗原: 1 棕榈酰 -2-(5' 氧代 - 戊酰基) -sn- 甘油基 -3- 磷酸胆碱、15 α - 羟基胆甾烯、15- 酮胆甾烷、15- 酮胆甾烯、1- 棕榈酰 -2-(9' 氧代 - 壬酰) -sn- 甘油基 -3- 磷酸胆碱、1- 棕榈酰 -2- 壬二酰 -sn- 甘油基 -3- 磷酸胆碱、1- 棕榈酰 -2- 戊二酰 -sn- 甘油基 -3- 磷酸胆碱、5 α - 胆甾烷 -3 β , 15 α - 二醇、脑神经酰胺、脑 D- 赤鞘氨醇、脑溶血磷脂酰乙醇胺、脑 L- α - 溶血磷脂酰丝氨酸、脑 L- α - 磷脂酰胆碱、脑 L- α - 磷脂酰 - 乙醇胺、脑 L- α - 磷脂酰丝氨酸、脑极性脂质提取物、脑鞘磷脂、脑硫脂、脑总脂质提取物、无唾液酸神经节四糖基神经酰胺 -GM1、总脑神经节苷脂和总脑苷脂 (全部购自 Avanti Polar Lipids); 9(S)-HODE、(±)9-HODE、异前列腺素 (Isoprostane) F2I (Cayman Chemical); 无唾液酸神经节苷脂 -GM1、无唾液酸神经节苷脂 -GM2、心磷脂、神经酰胺、神经酰胺 1- 磷酸、胆固醇、二唾液酸神经节苷脂 -GD1B、二唾液酸神经节苷脂 -GD2、二唾液酸神经节苷脂

GD1a、半乳糖脑苷脂、神经节苷脂混合物、HDL、二十六烷酸 (26)、羟基脂肪酸神经酰胺、乳糖脑苷脂、LDL、来自肠道沙门氏菌 (*Salmonella enterica*) 的二磷酸类脂 A、来自大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 的脂多糖、来自铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 的脂多糖、来自肠道沙门氏菌的脂多糖、单唾液酸神经节苷脂 GM1、单唾液酸神经节苷脂 GM2、N- 己酰基 -D- 鞘氨醇、无羟基脂肪酸神经酰胺、磷脂酰肌醇 -4 磷酸、角鲨烯、硫脂、二十四烷酸 (24)、TNPAL 半乳糖脑苷脂和三唾液酸神经节苷脂 -GT1B(Sigma Aldrich) ;二唾液酸神经节苷脂 GD3 和三唾液酸神经节苷脂 GT1a(HyTest) ;岩藻糖基 -GM1、神经节苷脂 -GM4、乳糖基神经酰胺、溶血 -GM1 和四唾液酸神经节苷脂 -GQ1B(Calbiochem) ;和单唾液酸神经节苷脂 GM3(全部购自 Meridian)。

[0222] 实施例 1

[0223] 检测 MS 中的特异性微阵列自身抗体的条件

[0224] 使用 362 种髓鞘和炎症相关抗原 (本文在以上列出) 构建抗原微阵列, 所述抗原包括怀疑与 MS 相关的 CNS 抗原、怀疑与其他神经疾病相关的 CNS 抗原以及热休克蛋白 (HSP)。按之前所述 (Quintana 等人, 2004), 使用机器人阵列器将抗原点在环氧玻璃载玻片上。

[0225] 将抗原微阵列技术的灵敏性与使用商购的针对 CNS、HSP 和脂质抗原的单克隆抗体和多克隆抗体的标准 ELISA 技术的灵敏性进行比较。抗原微阵列在 $\log_{10}$ 稀释度检测抗原反应性, 比通过使用 ELISA 方法检测的反应性大 1-2 个 $\log$ 值 (表 7)。因此, 抗原微阵列表现为比标准 ELISA 测定更灵敏。

[0226] 表 7- 抗原微阵列与 ELISA 的比较

稀释度	HSP60-1		HSP60-2		HSP60-3	
	阵列	ELISA	阵列	ELISA	阵列	ELISA
1: 100	最大值	1.98	最大值	1.77	45,693	1.64
1: 1,000	最大值	1.24	最大值	1.29	23,731	0.73
1: 10,000	48,930	0.64	39,837	0.83	5,375	0.29
1: 100,000	31,513	0	3,489	0.17	1,858	0
1: 1,000,000	2,380	0	742	0	0	0
1: 10,000,000	0	0	0	0	0	0
	MBP		PLP		GM4	
	阵列	ELISA	阵列	ELISA	阵列	ELISA
1: 100	最大值	1.51	最大值	2.31	最大值	3.13
1: 1,000	46,314	1.09	最大值	1.16	29,857	1.61
1: 10,000	26,384	0.75	42,084	0.53	16,749	0.5
1: 100,000	14,423	0.31	12,294	0.3	7,313	0
1: 1,000,000	6,916	0	6,837	0	1,598	0
1: 10,000,000	1,810	0	1,332	0	0	0

[0229] 为了确定哪个血清稀释度对调查 MS 的免疫特征标记是最佳的, 对于 IgG 和 IgM 抗

体以 1 : 10、1 : 100 和 1 : 1000 的稀释度分析健康对照 (HC) 和 RRMS 受试者的反应性。如图 1A 所示,在 MS 中,相比于 1 : 100 和 1 : 1000,在 1 : 10 时对 CNS 抗原、脂质和热休克蛋白 (HSP) 的平均 IgG 抗体反应性最高,在 1 : 1000 观察到最小反应性 ($P < 0.0001$, 双因素 ANOVA)。在 1 : 10 稀释度时平均 IgG 反应性在 HC 中也是最高的 ($P < 0.0001$, 双因素 ANOVA),但是这种反应性比 MS 受试者中表现的反应性小 (对 CNS 抗原、脂质和热休克蛋白分别为 $P < 0.001$ 、 $P < 0.001$ 和 $P < 0.05$, 双因素 ANOVA);实际上,在 1 : 100 和 1 : 1000 的稀释度,在 MS 与 HC 的 IgG 反应性量值之间没有差异。对照中的 IgM 反应性如果不比 MS 受试者中的 IgM 反应性高的话,就与其一样高 (图 1B)。这与如下观察结果一致:健康人出生时带有针对髓鞘抗原和热休克蛋白的 IgM 自身抗体 (Merbl 等人,2007, J Clin Invest 117,712-8)。因为 MS 受试者在 1 : 10 稀释度表现出显著升高的血清 IgG 自身抗体,所以使用这个稀释度研究抗原微阵列的血清抗体模式。

[0230] 为了确认在 1 : 10 稀释度检测的反应性是特异性的,进行抑制实验,该实验显示针对抗原阵列上的 PLP₂₆₁₋₂₇₇ 的反应性可受血清与过量未结合的 PLP₂₆₁₋₂₇₇ 预孵育抑制,但不受血清与对照肽 HSP60₁₋₂₀ 预孵育抑制 (图 1C)。

[0231] 实施例 2

[0232] 自身抗体模式分析鉴定 RRMS 的免疫特征标记

[0233] 为了调查是否能鉴定 RRMS 中的独特的抗体特征标记,对 38 位患有 RRMS 的患者和 30 位健康对照 (HC) 受试者中的抗体所有组成部分进行研究。将样品分派到训练集 (24 个 RRMS 和 20 个对照) 和随机选择的测试集 (14 个 RRMS 和 10 个对照) 中。使用训练集来确定是否可以鉴定能够区别 RRMS 与对照样品的抗体反应性模式。如果发现这些模式,就将它们对测试集验证。使用 Wilcoxon-Mann-Whitney 测试分析训练集;使用 Benjamini 和 Hochberg 的方法控制错误发现率 (Cohen, I. R., 2007, Nat Rev Immunol. 7,569-74)。在表 6 中列出了患者和 HC 的临床特征。

[0234] 如图 2A 中的热图所示,鉴定了区分 RRMS 与 HC 的反应性模式 ($P < 0.0001$, Fisher 精确检验)。图 2A 所示的热图中包括的抗体反应性在此列出 (以与热图中相同的次序,即,从上到下):IgG_MBP 31-50;IgG_HSP70481-500;IgG_PLP 65-84;IgG_GFAP;IgM_HSP70 511-530;IgM_MBP41-60;IgM_HSP60 286-305;IgM_HSP60 496-515;IgM_HSP70 151-170;IgM_HSP60 526-545;IgM_MBP 84-94;IgM_OSP 61-80;IgM_HSP70 31-50;IgM_CNP 286-305;IgM_HSP60 255-275;IgM_HSP60 106-125;IgM_OSP31-50;IgM_P2 61-80;IgM_MBP 11-30;IgM_HSP60 376-395;IgM_HSP70286-305;IgM_HSP60 136-155;IgM_HSP70 136-155;IgM_P2 46-65;IgM_OSP 136-155;IgM_P21-20;IgM_MOG 91-110;IgM_HSP60 361-380;IgM_HSP70 451-470;IgM_HSP70 210-229;IgM_HSP60 240-259;IgM_HSP60 271-290;IgM_OSP 76-95;IgM_PLP 178-191;IgM_CNP271-290;IgM_P2 76-95;IgM_HSP70 631-640;IgM_PLP 248-259;IgM_HSP60 195-214;IgM_CNP 61-80;IgM_MOG 196-215;IgM_HSP6046-65;IgM_HSP70 195-214;IgM_HSP70 436-455;IgM_HSP60 166-185;IgM_MBP 104-123;IgM_MBP 71-92;IgM_PLP 180-199;IgM_HSP70255-275;IgM_MOBP 166-185;IgM_CNP 240-259;IgM_HSP60 16-35;IgM_HSP60 301-320;IgM_MOBP 151-170;IgM_CNP 91-110;IgM_HSP70106-125;IgM_CNP 406-421;IgM_HSP60 421-40;IgM_HSP60 61-80;IgM_淀粉状蛋白 β 10-20;IgM_HSP60 511-530;IgM_乳糖脑苷脂;IgM_HSP70406-425;

IgM_MOG 76-95 ;IgM_HSP70 316-335 ;IgM_HSP60 225-244 ;IgM_HSP60 76-95 ;IgM_MOG 106-125 ;IgM_HSP70 466-485 ;IgM_CNP1-21 ;IgM_HSP70 166-185 ;IgM_HSP70 121-140 ; IgM 淀粉状蛋白 β 1-42 ;IgM_MBP 89-101 ;IgM_CNP 301-320 ;IgM_HSP70 1-20 ;IgM_MBP 51-70 ;IgM_HSP70 496-515 ;IgM_CNP 16-35 ;IgM_CNP 76-95 ;IgM_PLP 10-29 ;IgM_PLP 190-209 ;IgM_HSP60 346-365 ;IgM_HSP60 151-170 ;IgM_HSP70376-395 ;IgM 牛 MBP ; IgM_HSP70 556-575 ;IgM_CNP 391-410 ;IgM_MOG211-230 ;IgM_PLP 220-249 ;IgM_HSP70 616-635 ;IgM 淀粉状蛋白 β 1-12 ;IgM_HSP60 556-573 ;和 IgM_PLP 250-269。

[0235] 这种模式由 94 种抗体反应性组成。在这 94 种模式中,相比于对照 (HC),在 MS 中 90 种被上调,4 种被下调。因此,RRMS 与特定自身反应性的获得和缺失有关。在上调的反应性中,50%为与 CNS 抗原的肽结合的 IgM 抗体,49%为与热休克蛋白的肽结合的 IgM 抗体。在 1 : 100 或 1 : 1000 的稀释度没有观察到区别 MS 与对照的能力。

[0236] 为了验证图 2A 中所示的区别性的模式,在训练集中进行留一交叉验证分析 (LOOCV) (Stekel, D., 2003, Microarray Bioinformatics (微阵列生物信息学), Cambridge University Press, Cambridge), 然后对测试集验证该分析。对于训练集中的 LOOCV 来说, 计算真实 (正确) 分类和错误 (不正确) 分类的数目来估计训练集中的成功率、阳性预测值 (PPV)、阴性预测值 (NPV)。LOOCV 揭示了阳性预测值 (PPV) - 定义为 RRMS 患者按其抗原微阵列反应性被鉴定为 RRMS 的分数 - 为 0.75, 以及阴性预测值 (NPV) - 定义为 HC 按其抗原微阵列反应性被鉴定为 HC 的分数 - 为 0.90 ;成功率为 0.83 ($P < 0.0001$)。最严密的验证是测试训练集中鉴定的模式以确定它们是否能够在测试集中区别 MS 受试者与 HC。类似地, 在训练集中鉴定的模式能够以 0.85 的 PPV、0.80 的 NPV 且以 0.83 的成功率 ($P = 0.004$, Fisher 精确检验) 对测试集的样品分类。

[0237] 为了进一步验证这些发现,对从西班牙塞维利亚大学获得的 51 位未治疗的 RRMS 进行分析以确定使用来自另一机构和地理区域的独立同期群组的样品是否可以区分 RRMS 与 HC。鉴定的模式能够在这个独立的同期群组中以 0.69 的成功率、0.73 的 PPV 和 0.58 的 NPV ($P = 0.01$, Fisher 精确检验) 区别 RRMS 与 HC。

[0238] 作为在 MS 中检测的模式特异性对照,调查了来自患有系统性红斑狼疮 (SLE)、肾上腺脑白质营养不良 (ALD) 和阿尔兹海默病 (AD) 的患者的血清。SLE 为以针对宽范围的自身抗原的循环抗体为特征的慢性自身免疫疾病。ALD 为退行性疾患,其特征为极长链脂肪酸的积累和与 MS 共有特征的中枢神经炎症过程。AD 不被认为是自身免疫疾病;然而,已报道了对 β -淀粉状蛋白来源的肽的免疫应答。显著地,在抗原微阵列上检测的抗体模式区别 RRMS 与 SLE、ALD 和 AD 样品 ($P < 0.0001$, Fisher 精确检验)。

[0239] 实施例 3

[0240] 自身抗体模式分析鉴定 PPMS 的免疫特征标记

[0241] PPMS 具有不同于 RRMS 的临床过程,并且已表明 PPMS 可能包括不同于 RRMS 的疾病机制 (Miller & Leary, 2007, Lancet Neurol. 6, 903-12)。研究了训练集中的 24 位 PPMS 以及 25 位年龄和性别匹配的 HC, 以及测试集样品中的 13 位 PPMS 和 12 位对照。

[0242] 图 2B 所示的热图中包括的抗体反应性在此列出 (以与热图中相同的次序,即,从上到下): IgM_PLP 215-232 ;IgG_PLP 215-232 ;IgM_mMBP ;IgG_HSP70 195-214 ;IgM_smLPS ;IgM_HSP70 210-229 ;IgM_硫酸软骨素 4 ;IgG_HSP70166-185 ;IgG_牛 MBP ;IgM_

牛 MBP ;IgG_PLP 137-150 ;IgG_MOG 46-65 ;IgG_CNP 406-421 ;IgG_P231-50 ;IgG_CNP 1-20 ;IgG_MOG 16-35 ;IgG_P2 76-95 ;IgM_神经微丝 68kDa ;IgM_β 淀粉状蛋白 ;IgG_HSP70 466-485 ;IgM_AB 1-40 ;IgM_PLP 161-180 ;IgM_PLP 40-59 ;IgM_PLP 137-150 ;IgG_HSP6076-95 ;IgG_MOG 151-170 ;IgG_P21-20 ;IgG_OSP 61-80 ;IgM_分泌的 APP α ;IgG_PLP 178-191 ;IgM_gpMBP ;IgG_HSP70 16-35 ;IgM_MBP 104-123 ;IgM_SOD ;IgM_CNP 1-20 ;IgM_ecLPS ;IgG_HSP70 121-140 ;IgM_MOBP 61-80 ;和 IgG_OSP 1-20。

[0243] 热图 (图 2B) 显示了抗体反应性通过了显著性检验并且能够在训练集 ($P < 0.0001$, Fisher 精确检验) 和测试集 ($P < 0.01$, Fisher 精确检验) 中区别 PPMS 和 HC。学习集的 LOOCV 揭示 86% 的总效率, $PPV = 0.87$ 并且 $NPV = 0.85$ 。测试集的效率为 72%; $PPV = 0.79$ 且 $NPV = 0.75$ 。正如 RRMS 一样, 抗原微阵列能够在 1 : 10 稀释度区别 PPMS 与对照受试者, 但在 1 : 100 或 1 : 1000 的稀释度不能。此外, 正如 RRMS 一样, 抗原微阵列分析区别 PPMS 与其他疾病 (SLE、ALD、AD; $P < 0.001$, Fisher 精确检验)。

[0244] 在 PPMS 中区别性的反应性是 IgG (51%) 和 IgM (49%) 并且主要是针对 CNS 抗原 (图 2B-2D)。PPMS 免疫特征标记中的 CNS 抗原不同于 RRMS 特征标记中的那些 CNS 抗原。RRMS CNS 特征标记命名为 CNS¹, PPMS CNS 特征标记命名为 CNS² (图 2H 和表 8)。RRMS 与 PPMS 的进一步比较揭示了在 RRMS 中针对 HSP60 或 HSP70 的明显反应性, 在 PPMS 中没有观察到这种反应性 (图 2A-2D)。此外, 在 PPMS 中 46% 区别性的反应性由与 HC 相比在 PPMS 中减少的抗体组成, 而在 RRMS 中仅 4% 区别性的抗体与 HC 相比减少 (图 2B-2D 及表 8 和表 9)。在区别 PPMS 与 HC 的反应性和区别 RRMS 与 HC 的反应性之间只有微小重叠。这一发现与如下观点相容: 在这两种 MS 形式中发生不同的免疫过程 (Miller & Leary, 2007)。

[0245] 实施例 4

[0246] 自身抗体模式分析鉴定 SPMS 的免疫特征标记

[0247] 大约 50% 的 RRMS 患者变为进展型的 (SPMS)。尽管对转变成 SPMS 所牵涉的机制没有达成共识, 几项研究表明炎症应答的本质改变和神经变性过程的出现发生在 MS 的继发进展阶段。已经鉴定了 RRMS 中的自身抗体特征标记, 其由对 HSP 增加的反应性和对 CNS 抗原的独特反应性模式 (CNS¹) 组成, 通过比较 37 份 RRMS 样品与 30 份 SPMS 样品中的抗体反应性研究了与 SPMS 相关的抗体特征标记 (图 2E)。

[0248] 图 2E 所示的热图中包括的抗体反应性在此列出 (以与热图中相同的次序, 即, 从上到下): IgM_MOG 61-80 ;IgM_HSP60376-395 ;IgM_MOG31-50 ;IgM_CNP 361-380 ;IgM_淀粉状蛋白 β 1-23 ;IgM_CNP 346-365 ;IgM_HSP60496-515 ;IgM_OSP 1-20 ;IgM_HSP60511-530 ;IgM_OSP61-80 ;IgM_HSP60 286-305 ;IgM_CNP 240-259 ;IgM_HSP70 601-620 ;IgM_HSP60 210-229 ;IgM_HSP60 451-470 ;IgM_MOBP 166-185 ;IgM_HSP60 166-185 ;IgM_MBP 138-147 ;IgM_CNP 195-214 ;IgM_MBP1-20 ;IgM_HSP60 526-545 ;IgM_P21-20 ;IgM_HSP70 286-305 ;IgM_MBP155-178 ;IgM_P2 46-65 ;IgM_HSP60 195-214 ;IgM_P2 31-50 ;IgM_HSP60271-290 ;IgM_HSP60 136-155 ;IgM_CNP 286-305 ;IgM_HSP70 210-229 ;IgM_HSP70 136-155 ;IgM_PLP 150-163 ;IgM_HSP70 166-185 ;IgM_HSP60255-275 ;IgM_HSP60 16-35 ;IgM_牛 MBP ;IgM_CNP 181-199 ;IgM_CNP121-140 ;IgM 无唾液酸神经节苷脂 -GM2 ;IgM 淀粉状蛋白 β 1-12 ;IgM_OSP 121-140 ;IgM_分泌的 APP β ;IgM_心磷脂 ;IgM_HSP70 406-425 ;IgG_HSP60 361-380 ;IgG_淀粉状蛋白 β 17-40 ;IgG_

胆固醇;IgG_淀粉状蛋白 β 1-42;IgG_PLP 80-99;IgG_PLP 65-84;IgG_PLP 40-59;IgG_PLP1-19;IgM_PLP 1-19;IgG_PLP 151-173;IgG_HSP70 421-440;IgG_huMBP;IgG_MOBP 16-35;IgG_CNP 16-35;IgG_RBP;IgG_HSP70 331-350;IgG_OSP 121-140;IgG_MBP 113-132;IgG_ β 晶状体蛋白;IgG_CNP240-259;和 IgG_PLP 178-191。

[0249] 结果显示可将 SPMS 与 RRMS 区别,成功率为 71% ($P = 0.0073$)。SPMS 以针对 HSP60 和 HSP70 的 IgM 抗体减少为特征,这些特征在 RRMS 中被发现(图 2E 及表 8 和表 9)。因此,SPMS 和 PPMS 的相似之处在于对 HSP 都只具有最小的反应性。SPMS 中 CNS 反应性的检验揭示在 RRMS 中上调的 CNS IgM 抗体的减少,以及 CNS 反应性 IgG 抗体的增加。SPMS 的 CNS 特征标记与 RRMS 和 PPMS 不同,命名为 CNS³(图 2E-2H,表 8)。

[0250] 表 8:在 RRMS、PPMS 和 SPMS 中对 CNS 抗原的反应性

[0251]

IgM				IgG			
抗原	RRMS (CNS1)	PPMS (CNS2)	SPMS (CNS3)	抗原	RRMS (CNS1)	PPMS (CNS2)	SPMS (CNS3)
IgM β 淀粉状蛋白		s		IgG_CNP 1-20		t	
IgM β 淀粉状蛋白 1-12	s		t	IgG_CNP 406-421		t	
IgM β 淀粉状蛋白 1-23			t	IgG_GFAP	t		
IgM β 淀粉状蛋白 10-20	s			IgG_牛MBP		t	
IgM β 淀粉状蛋白 12-28				IgG_huMBP			s
IgG β 淀粉状蛋白 17-40			s	IgG_MBP 31-50	t		
IgM β 淀粉状蛋白 1-42	s		s	IgG_MBP 113-132			s
IgM β 淀粉状蛋白 1-40		s		IgG_PLP 65-84	t		
IgG β 晶状体蛋白			s	IgG_MOBP 16-35			s
IgM_牛MBP	s	t		IgG_MOG 16-35		t	
IgM_CNP 1-20	s	s		IgG_MOG 46-65		t	
IgM_CNP 16-35	s		s	IgG_MOG 151-170		s	
IgM_CNP 61-80	s			IgG_OSP 1-20		s	
IgM_CNP 76-95	s			IgG_OSP 61-80		s	
IgM_CNP 91-110	s			IgG_OSP 121-140			s
IgM_CNP 121-140			t	IgG_P2 1-20		s	
IgM_CNP 181-199			t	IgG_P2 31-50		t	
IgM_CNP 195-214			t	IgG_P2 76-95		t	
IgM_CNP 240-259	s		t	IgG_PLP 1-19			s
IgM_CNP 271-290	s			IgG_PLP 40-59			s
IgM_CNP 286-305	s		t	IgG_PLP 65-84			s
IgM_CNP 301-320	s			IgG_PLP 137-150		t	
IgM_CNP 346-365			t	IgG_PLP 151-173			s
IgM_CNP 361-380			t	IgG_PLP 178-191		s	s
IgM_CNP 376-395				IgG_PLP 215-232		t	
IgM_CNP 391-410	s						
IgM_CNP 406-421	s						
IgM_神经微丝 68kDa		t					
IgM_gpMBP		s					
IgM_牛MBP			t				
IgM_mMBP		t					
IgM_MBP 1-20			t				
IgM_MBP 11-30	s						
IgM_MBP 41-60	s						
IgM_MBP 51-70	s						
IgM_MBP 71-92	s						
IgM_MBP 84-94	s						
IgM_MBP 89-101	s						
IgM_MBP 104-123	s	s					
IgM_MBP 138-147			t				
IgM_MBP 155-178			t				
IgM_MOBP 61-80		s					
IgM_MOBP 151-170	s						
IgM_MOBP 166-185	s		t				
IgM_MOG 31-50			t				
IgM_MOG 61-80			t				
IgM_MOG 106-125	s						
IgM_MOG 196-215	s						
IgM_MOG 211-230	s						

[0252] 表 9- 在 RRMS、SPMS 和 PPMS 中对 HSP 的反应性

	抗原	RRMS	PPMS	RRMS 相对于 SPMS
[0253]	IgM_HSP60 16-35	s		t
	IgM_HSP60 46-65	s		
	IgM_HSP60 106-125	s		
	IgM_HSP60 136-155	s		t
	IgM_HSP60 151-170	s		
	IgM_HSP60 166-185	s		t
	IgM_HSP60 195-214	s		t
	IgM_HSP60 210-229			t
	IgM_HSP60 225-244	s		
	IgM_HSP60 240-259	s		
	IgM_HSP60 255-275	s		t
	IgM_HSP60 271-290	s		t
	IgM_HSP60 286-305	s		t
	IgM_HSP60 301-320	s		
	IgM_HSP60 346-365	s		
	IgM_HSP60 361-380	s		
	IgM_HSP60 376-395	s		t
	IgM_HSP60 421-440	s		
	IgM_HSP60 451-470			t
	IgM_HSP60 496-515	s		t
	IgM_HSP60 511-530	s		t
	IgM_HSP60 526-545	s		t
	IgM_HSP60 556-573	s		
	IgM_HSP60 61-80	s		
	IgM_HSP60 76-95	s	s	
	IgM_HSP70 1-20	s		
	IgM_HSP70 31-50	s		
	IgM_HSP70 106-125	s		
	IgM_HSP70 121-140	s	s	
	IgM_HSP70 136-155	s		t
	IgM_HSP70 151-170	s		
	IgM_HSP70 166-185	s	t	t
	IgM_HSP70 195-214	s	t	
	IgM_HSP70 210-229	s	t	t
	IgM_HSP70 255-275	s		
	IgM_HSP70 286-305	s		t
	IgM_HSP70 316-335	s		
	IgM_HSP70 376-395	s		
	IgM_HSP70 406-425	s		t
	IgM_HSP70 436-455	s		
	IgM_HSP70 451-470	s		
	IgM_HSP70 466-485	s	s	
	IgM_HSP70 496-515	s		
	IgM_HSP70 511-530	s		
	IgM_HSP70 556-575	s		

[0254] 将表 8 和表 9 中的分别针对 CNP 和 HSP 的抗体反应性的显著变化的检测显示为黑色方格,其中‘s’表示相对于 HC(对于 RRMS 和 PPMS 来说)或 RRMS(对于 SPMS 来说)的上调,‘t’显示下调。

[0255] 实施例 5

[0256] 自身抗体模式区别 MS 病理亚型

[0257] Lucchinetti、Bruck 和 Lassman 已定义了四种 MS 免疫病理学类型 (Lucchinetti 等人,2000 ;Lucchinetti 等人,2004)。对在脑活组织检查时从 15 位 I 型受试者和 30 位 II 型受试者取得的血清进行研究。

[0258] 图 3 所示的热图中包括的抗体反应性在此列出(以与热图中相同的次序,即,从上

到下):IgG₁₅-酮胆甾烷;IgG₁₅α-羟基胆甾烯;IgG_{神经节苷脂-GM4};IgG₁₅-酮胆甾烯;IgG_{四唾液酸神经节苷脂-GQ1B};IgG_{脑L-α-溶血磷脂酰丝氨酸};IgG_{乳糖基神经酰胺};IgM_{160kDa.神经微丝};IgG_{HSP60 240-259};IgG_{OSP 166-185};IgG_{MOG 196-215};IgG_{OSP61-80};IgG_{OSP 1-20};和IgG_{PLP 215-232}。如图3所示,自身抗体模式能够区分I型与II型($P = 0.0082$,Fisher精确检验)。为了验证这一发现,对与23份新的II型样品随机混合的包含用于以上分析的15份I型样品的盲集进行分析。在这项验证测试中,将I型与II型区别($P = 0.0017$,Fisher精确检验)。学习集的LOOCV揭示0.78的成功率,PPV = 0.78且NPV = 0.67,测试集的成功率为0.78;PPV = 0.82且NPV = 0.73。

[0259] 区分I型与II型的免疫特征标记由针对脂质、HSP和CNS抗原的13种IgG反应性和1种IgM反应性组成(图3)。II型受试者显示针对HSP60、MOG、OSP和PLP肽表位的IgG反应性提高。值得注意的是,在I型受试者中的上调反应性是针对7种脂质的IgG抗体;这些脂质中的3种为胆固醇的氧化衍生物(15-酮胆甾烯、15-酮胆甾烷和15α-羟基胆甾烯)。

[0260] 实施例6

[0261] 胆固醇衍生物使实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)恶化

[0262] 已推测胆固醇的氧化衍生物7-酮胆固醇通过借助多聚(ADP-核糖)-聚合酶-1酶(PARP)依赖性途径激活小神经胶质细胞促成MS病理学。为了探寻针对氧化胆固醇衍生物(oxChol)的自身抗体与疾病病理学的关系,对MS免疫模型EAE检验实施例5中发现的脂质的作用。

[0263] 在C57BL/6小鼠中用MOG₃₅₋₅₅诱导EAE,在EAE诱导后第0、4、7和10天施用15-酮胆甾烯、15-酮胆甾烷和15α-羟基胆甾烯(10 μg/小鼠)。每天向腹膜内施用AIQ(60 μg/小鼠)。在这些小鼠中EAE的病程显示为EAE平均得分+标准误(MOG₃₅₋₅₅ n = 22, MOG₃₅₋₅₅+oxChol n = 24, MOG₃₅₋₅₅+oxChol+AIQ n = 18)。

[0264] 在第19天取得脊髓,用苏木精和曙红、坚牢蓝或银染染色来分别对细胞浸润、脱髓鞘和轴突缺失进行定量。每个柱代表由至少8个切片的分析得到的平均值±SEM。oxChol的施用如临床测量的那样增强了EAE(图4A, $P < 0.0001$,双因素ANOVA)并增加了炎症浸润(图4B; $P < 0.05$,单因素ANOVA)、脱髓鞘(图4C; $P < 0.01$,单因素ANOVA)和轴突缺失(图4D; $P < 0.001$,单因素ANOVA);这些作用被AIQ处理所抑制($P < 0.001$,单因素ANOVA)。

[0265] 进行进一步研究来确定oxChol对EAE的作用是否被PARP介导。使用PARP抑制剂5-氨基异喹啉酮(AIQ),发现AIQ从临床上($P < 0.0001$,双因素ANOVA)和组织病理学上($P < 0.001$,单因素ANOVA)(图4A-D)消除了由oxChol引起的EAE的恶化,但是不影响通过细胞因子(IFN-γ和IL-17)或增殖所测量的T细胞对MOG₃₅₋₅₅的应答。此外,从oxChol处理的小鼠转移血清不增强EAE。综观来说,这些结果表明,oxChol对EAE的作用是由于oxChol通过PARP而作用,不是通过诱导抗脂质抗体或影响对MOG₃₅₋₅₅的适应性T细胞应答而作用。

[0266] 以上描述的具体实施方案如此完全地揭示本发明的一般本质,以至于其他人能够通过运用当前知识容易地针对各种应用修改和/或改变这些具体实施方案而无需过多实验且不偏离总概念,并且因此,这些改变和修改应该且旨在被包括在公开的实施方案的等同物的含义和范围之内。应理解本文所采用的措辞或术语是为描述的目的而非限制。用于实现各种公开的功能的手段、材料和步骤可采用多种替代形式而不偏离本发明。

[0001]

序列表

<110> 耶达研究与发展有限公司
伯莱翰女子医院公司

<120> 多发性硬化的诊断

<130> SAHAR/002 PCT

<150> US PROV 61/113645

<151> 2008-11-12

<160> 103

<170> PatentIn 3.5 版

<210> 1

<211> 573

<212> PRT

<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 1

Met Leu Arg Leu Pro Thr Val Phe Arg Gln Met Arg Pro Val Ser Arg
1 5 10 15

Val Leu Ala Pro His Leu Thr Arg Ala Tyr Ala Lys Asp Val Lys Phe
20 25 30

Gly Ala Asp Ala Arg Ala Leu Met Leu Gln Gly Val Asp Leu Leu Ala
35 40 45

Asp Ala Val Ala Val Thr Met Gly Pro Lys Gly Arg Thr Val Ile Ile
50 55 60

Glu Gln Ser Trp Gly Ser Pro Lys Val Thr Lys Asp Gly Val Thr Val
65 70 75 80

Ala Lys Ser Ile Asp Leu Lys Asp Lys Tyr Lys Asn Ile Gly Ala Lys
85 90 95

[0002]

Leu Val Gln Asp Val Ala Asn Asn Thr Asn Glu Glu Ala Gly Asp Gly
100 105 110

Thr Thr Thr Ala Thr Val Leu Ala Arg Ser Ile Ala Lys Glu Gly Phe
115 120 125

Glu Lys Ile Ser Lys Gly Ala Asn Pro Val Glu Ile Arg Arg Gly Val
130 135 140

Met Leu Ala Val Asp Ala Val Ile Ala Glu Leu Lys Lys Gln Ser Lys
145 150 155 160

Pro Val Thr Thr Pro Glu Glu Ile Ala Gln Val Ala Thr Ile Ser Ala
165 170 175

Asn Gly Asp Lys Glu Ile Gly Asn Ile Ile Ser Asp Ala Met Lys Lys
180 185 190

Val Gly Arg Lys Gly Val Ile Thr Val Lys Asp Gly Lys Thr Leu Asn
195 200 205

Asp Glu Leu Glu Ile Ile Glu Gly Met Lys Phe Asp Arg Gly Tyr Ile
210 215 220

Ser Pro Tyr Phe Ile Asn Thr Ser Lys Gly Gln Lys Cys Glu Phe Gln
225 230 235 240

Asp Ala Tyr Val Leu Leu Ser Glu Lys Lys Ile Ser Ser Ile Gln Ser
245 250 255

Ile Val Pro Ala Leu Glu Ile Ala Asn Ala His Arg Lys Pro Leu Val
260 265 270

[0003]

Ile Ile Ala Glu Asp Val Asp Gly Glu Ala Leu Ser Thr Leu Val Leu
275 280 285

Asn Arg Leu Lys Val Gly Leu Gln Val Val Ala Val Lys Ala Pro Gly
290 295 300

Phe Gly Asp Asn Arg Lys Asn Gln Leu Lys Asp Met Ala Ile Ala Thr
305 310 315 320

Gly Gly Ala Val Phe Gly Glu Glu Gly Leu Thr Leu Asn Leu Glu Asp
325 330 335

Val Gln Pro His Asp Leu Gly Lys Val Gly Glu Val Ile Val Thr Lys
340 345 350

Asp Asp Ala Met Leu Leu Lys Gly Lys Gly Asp Lys Ala Gln Ile Glu
355 360 365

Lys Arg Ile Gln Glu Ile Ile Glu Gln Leu Asp Val Thr Thr Ser Glu
370 375 380

Tyr Glu Lys Glu Lys Leu Asn Glu Arg Leu Ala Lys Leu Ser Asp Gly
385 390 395 400

Val Ala Val Leu Lys Val Gly Gly Thr Ser Asp Val Glu Val Asn Glu
405 410 415

Lys Lys Asp Arg Val Thr Asp Ala Leu Asn Ala Thr Arg Ala Ala Val
420 425 430

Glu Glu Gly Ile Val Leu Gly Gly Gly Cys Ala Leu Leu Arg Cys Ile
435 440 445

[0004]

Pro Ala Leu Asp Ser Leu Thr Pro Ala Asn Glu Asp Gln Lys Ile Gly
450 455 460

Ile Glu Ile Ile Lys Arg Thr Leu Lys Ile Pro Ala Met Thr Ile Ala
465 470 475 480

Lys Asn Ala Gly Val Glu Gly Ser Leu Ile Val Glu Lys Ile Met Gln
485 490 495

Ser Ser Ser Glu Val Gly Tyr Asp Ala Met Ala Gly Asp Phe Val Asn
500 505 510

Met Val Glu Lys Gly Ile Ile Asp Pro Thr Lys Val Val Arg Thr Ala
515 520 525

Leu Leu Asp Ala Ala Gly Val Ala Ser Leu Leu Thr Thr Ala Glu Val
530 535 540

Val Val Thr Glu Ile Pro Lys Glu Glu Lys Asp Pro Gly Met Gly Ala
545 550 555 560

Met Gly Gly Met Gly Gly Gly Met Gly Gly Gly Met Phe
565 570

<210> 2
<211> 840
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 2

Met Ser Val Val Gly Ile Asp Leu Gly Phe Gln Ser Cys Tyr Val Ala
1 5 10 15

[0005]

Val Ala Arg Ala Gly Gly Ile Glu Thr Ile Ala Asn Glu Tyr Ser Asp
20 25 30

Arg Cys Thr Pro Ala Cys Ile Ser Phe Gly Pro Lys Asn Arg Ser Ile
35 40 45

Gly Ala Ala Ala Lys Ser Gln Val Ile Ser Asn Ala Lys Asn Thr Val
50 55 60

Gln Gly Phe Lys Arg Phe His Gly Arg Ala Phe Ser Asp Pro Phe Val
65 70 75 80

Glu Ala Glu Lys Ser Asn Leu Ala Tyr Asp Ile Val Gln Leu Pro Thr
85 90 95

Gly Leu Thr Gly Ile Lys Val Thr Tyr Met Glu Glu Glu Arg Asn Phe
100 105 110

Thr Thr Glu Gln Val Thr Ala Met Leu Leu Ser Lys Leu Lys Glu Thr
115 120 125

Ala Glu Ser Val Leu Lys Lys Pro Val Val Asp Cys Val Val Ser Val
130 135 140

Pro Cys Phe Tyr Thr Asp Ala Glu Arg Arg Ser Val Met Asp Ala Thr
145 150 155 160

Gln Ile Ala Gly Leu Asn Cys Leu Arg Leu Met Asn Glu Thr Thr Ala
165 170 175

Val Ala Leu Ala Tyr Gly Ile Tyr Lys Gln Asp Leu Pro Ala Leu Glu
180 185 190

[0006]

Glu Lys Pro Arg Asn Val Val Phe Val Asp Met Gly His Ser Ala Tyr
195 200 205

Gln Val Ser Val Cys Ala Phe Asn Arg Gly Lys Leu Lys Val Leu Ala
210 215 220

Thr Ala Phe Asp Thr Thr Leu Gly Gly Arg Lys Phe Asp Glu Val Leu
225 230 235 240

Val Asn His Phe Cys Glu Glu Phe Gly Lys Lys Tyr Lys Leu Asp Ile
245 250 255

Lys Ser Lys Ile Arg Ala Leu Leu Arg Leu Ser Gln Glu Cys Glu Lys
260 265 270

Leu Lys Lys Leu Met Ser Ala Asn Ala Ser Asp Leu Pro Leu Ser Ile
275 280 285

Glu Cys Phe Met Asn Asp Val Asp Val Ser Gly Thr Met Asn Arg Gly
290 295 300

Lys Phe Leu Glu Met Cys Asn Asp Leu Leu Ala Arg Val Glu Pro Pro
305 310 315 320

Leu Arg Ser Val Leu Glu Gln Thr Lys Leu Lys Lys Glu Asp Ile Tyr
325 330 335

Ala Val Glu Ile Val Gly Gly Ala Thr Arg Ile Pro Ala Val Lys Glu
340 345 350

Lys Ile Ser Lys Phe Phe Gly Lys Glu Leu Ser Thr Thr Leu Asn Ala
355 360 365

[0007]

Asp Glu Ala Val Thr Arg Gly Cys Ala Leu Gln Cys Ala Ile Leu Ser
370 375 380

Pro Ala Phe Lys Val Arg Glu Phe Ser Ile Thr Asp Val Val Pro Tyr
385 390 395 400

Pro Ile Ser Leu Arg Trp Asn Ser Pro Ala Glu Glu Gly Ser Ser Asp
405 410 415

Cys Glu Val Phe Ser Lys Asn His Ala Ala Pro Phe Ser Lys Val Leu
420 425 430

Thr Phe Tyr Arg Lys Glu Pro Phe Thr Leu Glu Ala Tyr Tyr Ser Ser
435 440 445

Pro Gln Asp Leu Pro Tyr Pro Asp Pro Ala Ile Ala Gln Phe Ser Val
450 455 460

Gln Lys Val Thr Pro Gln Ser Asp Gly Ser Ser Ser Lys Val Lys Val
465 470 475 480

Lys Val Arg Val Asn Val His Gly Ile Phe Ser Val Ser Ser Ala Ser
485 490 495

Leu Val Glu Val His Lys Ser Glu Glu Asn Glu Glu Pro Met Glu Thr
500 505 510

Asp Gln Asn Ala Lys Glu Glu Glu Lys Met Gln Val Asp Gln Glu Glu
515 520 525

Pro His Val Glu Glu Gln Gln Gln Gln Thr Pro Ala Glu Asn Lys Ala
530 535 540

[0008]

Glu Ser Glu Glu Met Glu Thr Ser Gln Ala Gly Ser Lys Asp Lys Lys
545 550 555 560

Met Asp Gln Pro Pro Gln Ala Lys Lys Ala Lys Val Lys Thr Ser Thr
565 570 575

Val Asp Leu Pro Ile Glu Asn Gln Leu Leu Trp Gln Ile Asp Arg Glu
580 585 590

Met Leu Asn Leu Tyr Ile Glu Asn Glu Gly Lys Met Ile Met Gln Asp
595 600 605

Lys Leu Glu Lys Glu Arg Asn Asp Ala Lys Asn Ala Val Glu Glu Tyr
610 615 620

Val Tyr Glu Met Arg Asp Lys Leu Ser Gly Glu Tyr Glu Lys Phe Val
625 630 635 640

Ser Glu Asp Asp Arg Asn Ser Phe Thr Leu Lys Leu Glu Asp Thr Glu
645 650 655

Asn Trp Leu Tyr Glu Asp Gly Glu Asp Gln Pro Lys Gln Val Tyr Val
660 665 670

Asp Lys Leu Ala Glu Leu Lys Asn Leu Gly Gln Pro Ile Lys Ile Arg
675 680 685

Phe Gln Glu Ser Glu Glu Arg Pro Lys Leu Phe Glu Glu Leu Gly Lys
690 695 700

Gln Ile Gln Gln Tyr Met Lys Ile Ile Ser Ser Phe Lys Asn Lys Glu
705 710 715 720

[0009]

Asp Gln Tyr Asp His Leu Asp Ala Ala Asp Met Thr Lys Val Glu Lys
725 730 735

Ser Thr Asn Glu Ala Met Glu Trp Met Asn Asn Lys Leu Asn Leu Gln
740 745 750

Asn Lys Gln Ser Leu Thr Met Asp Pro Val Val Lys Ser Lys Glu Ile
755 760 765

Glu Ala Lys Ile Lys Glu Leu Thr Ser Thr Cys Ser Pro Ile Ile Ser
770 775 780

Lys Pro Lys Pro Lys Val Glu Pro Pro Lys Glu Glu Gln Lys Asn Ala
785 790 795 800

Glu Gln Asn Gly Pro Val Asp Gly Gln Gly Asp Asn Pro Gly Pro Gln
805 810 815

Ala Ala Glu Gln Gly Thr Asp Thr Ala Val Pro Ser Asp Ser Asp Lys
820 825 830

Lys Leu Pro Glu Met Asp Ile Asp
835 840

<210> 3
<211> 421
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 3

Met Asn Arg Gly Phe Ser Arg Lys Ser His Thr Phe Leu Pro Lys Ile
1 5 10 15

[0010]

Phe Phe Arg Lys Met Ser Ser Ser Gly Ala Lys Asp Lys Pro Glu Leu
20 25 30

Gln Phe Pro Phe Leu Gln Asp Glu Asp Thr Val Ala Thr Leu Leu Glu
35 40 45

Cys Lys Thr Leu Phe Ile Leu Arg Gly Leu Pro Gly Ser Gly Lys Ser
50 55 60

Thr Leu Ala Arg Val Ile Val Asp Lys Tyr Arg Asp Gly Thr Lys Met
65 70 75 80

Val Ser Ala Asp Ala Tyr Lys Ile Thr Pro Gly Ala Arg Gly Ala Phe
85 90 95

Ser Glu Glu Tyr Lys Arg Leu Asp Glu Asp Leu Ala Ala Tyr Cys Arg
100 105 110

Arg Arg Asp Ile Arg Ile Leu Val Leu Asp Asp Thr Asn His Glu Arg
115 120 125

Glu Arg Leu Glu Gln Leu Phe Glu Met Ala Asp Gln Tyr Gln Tyr Gln
130 135 140

Val Val Leu Val Glu Pro Lys Thr Ala Trp Arg Leu Asp Cys Ala Gln
145 150 155 160

Leu Lys Glu Lys Asn Gln Trp Gln Leu Ser Ala Asp Asp Leu Lys Lys
165 170 175

Leu Lys Pro Gly Leu Glu Lys Asp Phe Leu Pro Leu Tyr Phe Gly Trp
180 185 190

[0011]

Phe Leu Thr Lys Lys Ser Ser Glu Thr Leu Arg Lys Ala Gly Gln Val
195 200 205

Phe Leu Glu Glu Leu Gly Asn His Lys Ala Phe Lys Lys Glu Leu Arg
210 215 220

Gln Phe Val Pro Gly Asp Glu Pro Arg Glu Lys Met Asp Leu Val Thr
225 230 235 240

Tyr Phe Gly Lys Arg Pro Pro Gly Val Leu His Cys Thr Thr Lys Phe
245 250 255

Cys Asp Tyr Gly Lys Ala Pro Gly Ala Glu Glu Tyr Ala Gln Gln Asp
260 265 270

Val Leu Lys Lys Ser Tyr Ser Lys Ala Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ala
275 280 285

Leu Phe Val Thr Pro Lys Thr Thr Gly Ala Arg Val Glu Leu Ser Glu
290 295 300

Gln Gln Leu Gln Leu Trp Pro Ser Asp Val Asp Lys Leu Ser Pro Thr
305 310 315 320

Asp Asn Leu Pro Arg Gly Ser Arg Ala His Ile Thr Leu Gly Cys Ala
325 330 335

Ala Asp Val Glu Ala Val Gln Thr Gly Leu Asp Leu Leu Glu Ile Leu
340 345 350

Arg Gln Glu Lys Gly Gly Ser Arg Gly Glu Glu Val Gly Glu Leu Ser
355 360 365

[0012]

Arg Gly Lys Leu Tyr Ser Leu Gly Asn Gly Arg Trp Met Leu Thr Leu
370 375 380

Ala Lys Asn Met Glu Val Arg Ala Ile Phe Thr Gly Tyr Tyr Gly Lys
385 390 395 400

Gly Lys Pro Val Pro Thr Gln Gly Ser Arg Lys Gly Gly Ala Leu Gln
405 410 415

Ser Cys Thr Ile Ile
420

<210> 4
<211> 183
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 4

Met Ser Gln Lys Pro Ala Lys Glu Gly Pro Arg Leu Ser Lys Asn Gln
1 5 10 15

Lys Tyr Ser Glu His Phe Ser Ile His Cys Cys Pro Pro Phe Thr Phe
20 25 30

Leu Asn Ser Lys Lys Glu Ile Val Asp Arg Lys Tyr Ser Ile Cys Lys
35 40 45

Ser Gly Cys Phe Tyr Gln Lys Lys Glu Glu Asp Trp Ile Cys Cys Ala
50 55 60

Cys Gln Lys Thr Arg Thr Ser Arg Arg Ala Lys Pro Pro Gln Arg Pro
65 70 75 80

Lys Gln Gln Pro Ala Ala Pro Pro Ala Val Val Arg Ala Pro Ala Lys
85 90 95

[0013]

Pro Arg Ser Pro Pro Arg Ser Glu Arg Gln Pro Arg Ser Pro Pro Arg
100 105 110

Ser Glu Arg Gln Pro Arg Ser Pro Pro Arg Ser Glu Arg Gln Pro Arg
115 120 125

Ser Pro Pro Arg Ser Glu Arg Gln Pro Arg Pro Arg Pro Glu Val Arg
130 135 140

Pro Pro Pro Ala Lys Gln Arg Pro Pro Gln Lys Ser Lys Gln Gln Pro
145 150 155 160

Arg Ser Ser Pro Leu Arg Gly Pro Gly Ala Ser Arg Gly Gly Ser Pro
165 170 175

Val Lys Ala Ser Arg Phe Trp
180

<210> 5
<211> 247
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 5

Met Ala Ser Leu Ser Arg Pro Ser Leu Pro Ser Cys Leu Cys Ser Phe
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gln Val Ser Ser Ser Tyr Ala Gly Gln Phe
20 25 30

Arg Val Ile Gly Pro Arg His Pro Ile Arg Ala Leu Val Gly Asp Glu
35 40 45

[0014]

Val Glu Leu Pro Cys Arg Ile Ser Pro Gly Lys Asn Ala Thr Gly Met
50 55 60

Glu Val Gly Trp Tyr Arg Pro Pro Phe Ser Arg Val Val His Leu Tyr
65 70 75 80

Arg Asn Gly Lys Asp Gln Asp Gly Asp Gln Ala Pro Glu Tyr Arg Gly
85 90 95

Arg Thr Glu Leu Leu Lys Asp Ala Ile Gly Glu Gly Lys Val Thr Leu
100 105 110

Arg Ile Arg Asn Val Arg Phe Ser Asp Glu Gly Gly Phe Thr Cys Phe
115 120 125

Phe Arg Asp His Ser Tyr Gln Glu Glu Ala Ala Met Glu Leu Lys Val
130 135 140

Glu Asp Pro Phe Tyr Trp Val Ser Pro Gly Val Leu Val Leu Leu Ala
145 150 155 160

Val Leu Pro Val Leu Leu Leu Gln Ile Thr Val Gly Leu Ile Phe Leu
165 170 175

Cys Leu Gln Tyr Arg Leu Arg Gly Lys Leu Arg Ala Glu Ile Glu Asn
180 185 190

Leu His Arg Thr Phe Asp Pro His Phe Leu Arg Val Pro Cys Trp Lys
195 200 205

Ile Thr Leu Phe Val Ile Val Pro Val Leu Gly Pro Leu Val Ala Leu
210 215 220

[0015]

Ile Ile Cys Tyr Asn Trp Leu His Arg Arg Leu Ala Gly Gln Phe Leu
225 230 235 240

Glu Glu Leu Arg Asn Pro Phe
245

<210> 6
<211> 197
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 6

Met Ala Ser Gln Lys Arg Pro Ser Gln Arg His Gly Ser Lys Tyr Leu
1 5 10 15

Ala Thr Ala Ser Thr Met Asp His Ala Arg His Gly Phe Leu Pro Arg
20 25 30

His Arg Asp Thr Gly Ile Leu Asp Ser Ile Gly Arg Phe Phe Gly Gly
35 40 45

Asp Arg Gly Ala Pro Lys Arg Gly Ser Gly Lys Val Pro Trp Leu Lys
50 55 60

Pro Gly Arg Ser Pro Leu Pro Ser His Ala Arg Ser Gln Pro Gly Leu
65 70 75 80

Cys Asn Met Tyr Lys Asp Ser His His Pro Ala Arg Thr Ala His Tyr
85 90 95

Gly Ser Leu Pro Gln Lys Ser His Gly Arg Thr Gln Asp Glu Asn Pro
100 105 110

[0016]

Val Val His Phe Phe Lys Asn Ile Val Thr Pro Arg Thr Pro Pro Pro
115 120 125

Ser Gln Gly Lys Gly Arg Gly Leu Ser Leu Ser Arg Phe Ser Trp Gly
130 135 140

Ala Glu Gly Gln Arg Pro Gly Phe Gly Tyr Gly Gly Arg Ala Ser Asp
145 150 155 160

Tyr Lys Ser Ala His Lys Gly Phe Lys Gly Val Asp Ala Gln Gly Thr
165 170 175

Leu Ser Lys Ile Phe Lys Leu Gly Gly Arg Asp Ser Arg Ser Gly Ser
180 185 190

Pro Met Ala Arg Arg
195

<210> 7
<211> 179
<212> PRT
<213> 牛 (Bos taurus)

<400> 7
Ser Asp Glu Leu Gln Thr Ile Gln Glu Asp Ser Ala Ala Ala Pro Gly
1 5 10 15

Ala Val Asp Ala Met Ala Ala Gln Lys Arg Pro Ser Gln Arg Ser Lys
20 25 30

Tyr Leu Ala Ser Ala Ser Thr Met Asp His Ala Arg His Gly Phe Leu
35 40 45

Pro Arg His Arg Asp Thr Gly Ile Leu Asp Ser Leu Gly Arg Phe Phe
50 55 60

[0017]

Gly Ser Asp Arg Gly Ala Pro Lys Arg Gly Ser Gly Lys Asp Gly His
65 70 75 80

His Ala Ala Arg Thr Thr His Tyr Gly Ser Leu Pro Gln Lys Ala Gln
85 90 95

His Gly Arg Pro Gln Asp Glu Asn Pro Val Val His Phe Phe Lys Asn
100 105 110

Ile Val Thr Pro Arg Thr Pro Pro Pro Ser Gln Gly Lys Gly Ala Glu
115 120 125

Gly Gln Lys Pro Gly Phe Gly Tyr Gly Gly Arg Ala Ser Asp Tyr Lys
130 135 140

Ser Ala His Lys Gly Leu Lys Gly His Asp Ala Gln Gly Thr Leu Ser
145 150 155 160

Lys Ile Phe Lys Leu Gly Gly Arg Asp Ser Arg Ser Gly Ser Pro Met
165 170 175

Ala Arg Arg

<210> 8

<211> 250

<212> PRT

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 8

Met Gly Asn His Ser Gly Lys Arg Glu Leu Ser Ala Glu Lys Ala Ser
1 5 10 15

[0018]

Lys Asp Gly Glu Ile His Arg Gly Glu Ala Gly Lys Lys Arg Ser Val
20 25 30

Gly Lys Leu Ser Gln Thr Ala Ser Glu Asp Ser Asp Val Phe Gly Glu
35 40 45

Ala Asp Ala Ile Gln Asn Asn Gly Thr Ser Ala Glu Asp Thr Ala Val
50 55 60

Thr Asp Ser Lys His Thr Ala Asp Pro Lys Asn Asn Trp Gln Gly Ala
65 70 75 80

His Pro Ala Asp Pro Gly Asn Arg Pro His Leu Ile Arg Leu Phe Ser
85 90 95

Arg Asp Ala Pro Gly Arg Glu Asp Asn Thr Phe Lys Asp Arg Pro Ser
100 105 110

Glu Ser Asp Glu Leu Gln Thr Ile Gln Glu Asp Pro Thr Ala Ala Ser
115 120 125

Gly Gly Leu Asp Val Met Ala Ser Gln Lys Arg Pro Ser Gln Arg Ser
130 135 140

Lys Tyr Leu Ala Thr Ala Ser Thr Met Asp His Ala Arg His Gly Phe
145 150 155 160

Leu Pro Arg His Arg Asp Thr Gly Ile Leu Asp Ser Ile Gly Arg Phe
165 170 175

Phe Ser Gly Asp Arg Gly Ala Pro Lys Arg Gly Ser Gly Lys Asp Ser
180 185 190

[0019]

His Thr Arg Thr Thr His Tyr Gly Ser Leu Pro Gln Lys Ser Gln His
195 200 205

Gly Arg Thr Gln Asp Glu Asn Pro Val Val His Phe Phe Lys Asn Ile
210 215 220

Val Thr Pro Arg Thr Pro Pro Pro Ser Gln Gly Lys Gly Gly Arg Asp
225 230 235 240

Ser Arg Ser Gly Ser Pro Met Ala Arg Arg
245 250

<210> 9
<211> 150
<212> PRT
<213> 豚鼠 (*Cavia porcellus*)

<400> 9

Ser Gln Arg His Gly Ser Lys Tyr Leu Ala Thr Ala Ser Thr Met Asp
1 5 10 15

His Ala Arg His Gly Phe Leu Pro Arg His Arg Asp Thr Gly Ile Leu
20 25 30

Asp Ser Ile Gly Arg Phe Phe Gly Ser Asp Arg Ala Ala Pro Lys Arg
35 40 45

Gly Ser Gly Lys Asp Ser His His Ala Ala Arg Thr Thr His Tyr Gly
50 55 60

Ser Leu Pro Gln Lys Ser Gln Arg Ser Gln Asp Glu Asn Pro Val Val
65 70 75 80

[0020]

His Phe Phe Lys Asn Ile Val Thr Pro Arg Thr Pro Pro Pro Ser Gln
85 90 95

Gly Lys Gly Arg Gly Leu Ser Leu Ser Arg Phe Ser Trp Gly Ala Glu
100 105 110

Gly Gln Lys Pro Gly Phe Gly Tyr Gly Gly Arg Ala Asp Tyr Lys Ser
115 120 125

Lys Gly Phe Lys Gly Ala His Asp Ala Gln Gly Thr Leu Ser Lys Ile
130 135 140

Phe Lys Leu Gly Gly Arg
145 150

<210> 10
<211> 132
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 10
Met Ser Asn Lys Phe Leu Gly Thr Trp Lys Leu Val Ser Ser Glu Asn
1 5 10 15

Phe Asp Asp Tyr Met Lys Ala Leu Gly Val Gly Leu Ala Thr Arg Lys
20 25 30

Leu Gly Asn Leu Ala Lys Pro Thr Val Ile Ile Ser Lys Lys Gly Asp
35 40 45

Ile Ile Thr Ile Arg Thr Glu Ser Thr Phe Lys Asn Thr Glu Ile Ser
50 55 60

Phe Lys Leu Gly Gln Glu Phe Glu Glu Thr Thr Ala Asp Asn Arg Lys
65 70 75 80

[0021]

Thr Lys Ser Ile Val Thr Leu Gln Arg Gly Ser Leu Asn Gln Val Gln
85 90 95

Arg Trp Asp Gly Lys Glu Thr Thr Ile Lys Arg Lys Leu Val Asn Gly
100 105 110

Lys Met Val Ala Glu Cys Lys Met Lys Gly Val Val Cys Thr Arg Ile
115 120 125

Tyr Glu Lys Val
130

<210> 11
<211> 217
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 11

Val Ala Thr Cys Leu Gln Val Val Gly Phe Val Thr Ser Phe Val Gly
1 5 10 15

Trp Ile Gly Val Ile Val Thr Thr Ser Thr Asn Asp Trp Val Val Thr
20 25 30

Cys Gly Tyr Thr Ile Pro Thr Cys Arg Lys Leu Asp Glu Leu Gly Ser
35 40 45

Lys Gly Leu Trp Ala Asp Cys Val Met Ala Thr Gly Leu Tyr His Cys
50 55 60

Lys Pro Leu Val Asp Ile Leu Ile Leu Pro Gly Tyr Val Gln Ala Cys
65 70 75 80

[0022]

Arg Ala Leu Met Ile Ala Ala Ser Val Leu Gly Leu Pro Ala Ile Leu
85 90 95

Leu Leu Leu Thr Val Leu Pro Cys Ile Arg Met Gly Gln Glu Pro Gly
100 105 110

Val Ala Lys Tyr Arg Arg Ala Gln Leu Ala Gly Val Leu Leu Ile Leu
115 120 125

Leu Ala Leu Cys Ala Leu Val Ala Thr Ile Trp Phe Pro Val Cys Ala
130 135 140

His Arg Glu Thr Thr Ile Val Ser Phe Gly Tyr Ser Leu Tyr Ala Gly
145 150 155 160

Trp Ile Gly Ala Val Leu Cys Leu Val Gly Gly Cys Val Ile Leu Cys
165 170 175

Cys Ala Gly Asp Ala Gln Ala Phe Gly Glu Asn Val Ser Thr Thr Leu
180 185 190

Arg Ala Leu Ala Pro Arg Leu Met Arg Arg Val Pro Thr Tyr Lys Arg
195 200 205

Ala Ala Arg Leu Pro Thr Glu Val Leu
210 215

<210> 12
<211> 277
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 12

[0023]

Met Gly Leu Leu Glu Cys Cys Ala Arg Cys Leu Val Gly Ala Pro Phe
1 5 10 15

Ala Ser Leu Val Ala Thr Gly Leu Cys Phe Phe Gly Val Ala Leu Phe
20 25 30

Cys Gly Cys Gly His Glu Ala Leu Thr Gly Thr Glu Lys Leu Ile Glu
35 40 45

Thr Tyr Phe Ser Lys Asn Tyr Gln Asp Tyr Glu Tyr Leu Ile Asn Val
50 55 60

Ile His Ala Phe Gln Tyr Val Ile Tyr Gly Thr Ala Ser Phe Phe Phe
65 70 75 80

Leu Tyr Gly Ala Leu Leu Leu Ala Glu Gly Phe Tyr Thr Thr Gly Ala
85 90 95

Val Arg Gln Ile Phe Gly Asp Tyr Lys Thr Thr Ile Cys Gly Lys Gly
100 105 110

Leu Ser Ala Thr Val Thr Gly Gly Gln Lys Gly Arg Gly Ser Arg Gly
115 120 125

Gln His Gln Ala His Ser Leu Glu Arg Val Cys His Cys Leu Gly Lys
130 135 140

Trp Leu Gly His Pro Asp Lys Phe Val Gly Ile Thr Tyr Ala Leu Thr
145 150 155 160

Val Val Trp Leu Leu Val Phe Ala Cys Ser Ala Val Pro Val Tyr Ile
165 170 175

[0024]

Tyr Phe Asn Thr Trp Thr Thr Cys Gln Ser Ile Ala Phe Pro Ser Lys
180 185 190

Thr Ser Ala Ser Ile Gly Ser Leu Cys Ala Asp Ala Arg Met Tyr Gly
195 200 205

Val Leu Pro Trp Asn Ala Phe Pro Gly Lys Val Cys Gly Ser Asn Leu
210 215 220

Leu Ser Ile Cys Lys Thr Ala Glu Phe Gln Met Thr Phe His Leu Phe
225 230 235 240

Ile Ala Ala Phe Val Gly Ala Ala Ala Thr Leu Val Ser Leu Leu Thr
245 250 255

Phe Met Ile Ala Ala Thr Tyr Asn Phe Ala Val Leu Lys Leu Met Gly
260 265 270

Arg Gly Thr Lys Phe
275

<210> 13
<211> 43
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 13

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
20 25 30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr
35 40

[0025]

<210> 14
<211> 432
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 14

Met Glu Arg Arg Arg Ile Thr Ser Ala Ala Arg Arg Ser Tyr Val Ser
1 5 10 15

Ser Gly Glu Met Met Val Gly Gly Leu Ala Pro Gly Arg Arg Leu Gly
20 25 30

Pro Gly Thr Arg Leu Ser Leu Ala Arg Met Pro Pro Pro Leu Pro Thr
35 40 45

Arg Val Asp Phe Ser Leu Ala Gly Ala Leu Asn Ala Gly Phe Lys Glu
50 55 60

Thr Arg Ala Ser Glu Arg Ala Glu Met Met Glu Leu Asn Asp Arg Phe
65 70 75 80

Ala Ser Tyr Ile Glu Lys Val Arg Phe Leu Glu Gln Gln Asn Lys Ala
85 90 95

Leu Ala Ala Glu Leu Asn Gln Leu Arg Ala Lys Glu Pro Thr Lys Leu
100 105 110

Ala Asp Val Tyr Gln Ala Glu Leu Arg Glu Leu Arg Leu Arg Leu Asp
115 120 125

Gln Leu Thr Ala Asn Ser Ala Arg Leu Glu Val Glu Arg Asp Asn Leu
130 135 140

[0026]

Ala Gln Asp Leu Ala Thr Val Arg Gln Lys Leu Gln Asp Glu Thr Asn
145 150 155 160

Leu Arg Leu Glu Ala Glu Asn Asn Leu Ala Ala Tyr Arg Gln Glu Ala
165 170 175

Asp Glu Ala Thr Leu Ala Arg Leu Asp Leu Glu Arg Lys Ile Glu Ser
180 185 190

Leu Glu Glu Glu Ile Arg Phe Leu Arg Lys Ile His Glu Glu Glu Val
195 200 205

Arg Glu Leu Gln Glu Gln Leu Ala Arg Gln Gln Val His Val Glu Leu
210 215 220

Asp Val Ala Lys Pro Asp Leu Thr Ala Ala Leu Lys Glu Ile Arg Thr
225 230 235 240

Gln Tyr Glu Ala Met Ala Ser Ser Asn Met His Glu Ala Glu Glu Trp
245 250 255

Tyr Arg Ser Lys Phe Ala Asp Leu Thr Asp Ala Ala Ala Arg Asn Ala
260 265 270

Glu Leu Leu Arg Gln Ala Lys His Glu Ala Asn Asp Tyr Arg Arg Gln
275 280 285

Leu Gln Ser Leu Thr Cys Asp Leu Glu Ser Leu Arg Gly Thr Asn Glu
290 295 300

Ser Leu Glu Arg Gln Met Arg Glu Gln Glu Glu Arg His Val Arg Glu
305 310 315 320

[0027]

Ala Ala Ser Tyr Gln Glu Ala Leu Ala Arg Leu Glu Glu Glu Gly Gln
325 330 335

Ser Leu Lys Asp Glu Met Ala Arg His Leu Gln Glu Tyr Gln Asp Leu
340 345 350

Leu Asn Val Lys Leu Ala Leu Asp Ile Glu Ile Ala Thr Tyr Arg Lys
355 360 365

Leu Leu Glu Gly Glu Glu Asn Arg Ile Thr Ile Pro Val Gln Thr Phe
370 375 380

Ser Asn Leu Gln Ile Arg Glu Thr Ser Leu Asp Thr Lys Ser Val Ser
385 390 395 400

Glu Gly His Leu Lys Arg Asn Ile Val Val Lys Thr Val Glu Met Arg
405 410 415

Asp Gly Glu Val Ile Lys Glu Ser Lys Gln Glu His Lys Asp Val Met
420 425 430

<210> 15
<211> 215
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 15

Met Glu Thr Gln Ala Glu Gln Gln Glu Leu Glu Thr Leu Pro Thr Thr
1 5 10 15

Lys Met Ala Gln Thr Asn Pro Thr Pro Gly Ser Leu Gly Pro Trp Lys
20 25 30

[0028]

Ile Thr Ile Tyr Asp Gln Glu Asn Phe Gln Gly Lys Arg Met Glu Phe																	
35							40						45				
Thr Ser Ser Cys Pro Asn Val Ser Glu Arg Ser Phe Asp Asn Val Arg																	
50							55						60				
Ser Leu Lys Val Glu Ser Gly Ala Trp Ile Gly Tyr Glu His Thr Ser																	
65							70					75				80	
Phe Cys Gly Gln Gln Phe Ile Leu Glu Arg Gly Glu Tyr Pro Arg Trp																	
						85						90				95	
Asp Ala Trp Ser Gly Ser Asn Ala Tyr His Ile Glu Arg Leu Met Ser																	
						100						105				110	
Phe Arg Pro Ile Cys Ser Ala Asn His Lys Glu Ser Lys Met Thr Ile																	
						115						120				125	
Phe Glu Lys Glu Asn Phe Ile Gly Arg Gln Trp Glu Ile Ser Asp Asp																	
						130						135				140	
Tyr Pro Ser Leu Gln Ala Met Gly Trp Phe Asn Asn Glu Val Gly Ser																	
145												150				155	160
Met Lys Ile Gln Ser Gly Ala Trp Val Cys Tyr Gln Tyr Pro Gly Tyr																	
						165						170				175	
Arg Gly Tyr Gln Tyr Ile Leu Glu Cys Asp His His Gly Gly Asp Tyr																	
						180						185				190	
Lys His Trp Arg Glu Trp Gly Ser His Ala Gln Thr Ser Gln Ile Gln																	
						195						200				205	

[0029]

Ser Ile Arg Arg Ile Gln Gln
210 215

<210> 16
<211> 543
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 16
Met Ser Ser Phe Ser Tyr Glu Pro Tyr Tyr Ser Thr Ser Tyr Lys Arg
1 5 10 15

Arg Tyr Val Glu Thr Pro Arg Val His Ile Ser Ser Val Arg Ser Gly
20 25 30

Tyr Ser Thr Ala Arg Ser Ala Tyr Ser Ser Tyr Ser Ala Pro Val Ser
35 40 45

Ser Ser Leu Ser Val Arg Arg Ser Tyr Ser Ser Ser Ser Gly Ser Leu
50 55 60

Met Pro Ser Leu Glu Asn Leu Asp Leu Ser Gln Val Ala Ala Ile Ser
65 70 75 80

Asn Asp Leu Lys Ser Ile Arg Thr Gln Glu Lys Ala Gln Leu Gln Asp
85 90 95

Leu Asn Asp Arg Phe Ala Ser Phe Ile Glu Arg Val His Glu Leu Glu
100 105 110

Gln Gln Asn Lys Val Leu Glu Ala Glu Leu Leu Val Leu Arg Gln Lys
115 120 125

His Ser Glu Pro Ser Arg Phe Arg Ala Leu Tyr Glu Gln Glu Ile Arg
130 135 140

[0030]

Asp Leu Arg Leu Ala Ala Glu Asp Ala Thr Asn Glu Lys Gln Ala Leu
145 150 155 160

Gln Gly Glu Arg Glu Gly Leu Glu Glu Thr Leu Arg Asn Leu Gln Ala
165 170 175

Arg Tyr Glu Glu Glu Val Leu Ser Arg Glu Asp Ala Glu Gly Arg Leu
180 185 190

Met Glu Ala Arg Lys Gly Ala Asp Glu Ala Ala Leu Ala Arg Ala Glu
195 200 205

Leu Glu Lys Arg Ile Asp Ser Leu Met Asp Glu Ile Ser Phe Leu Lys
210 215 220

Lys Val His Glu Glu Glu Ile Ala Glu Leu Gln Ala Gln Ile Gln Tyr
225 230 235 240

Ala Gln Ile Ser Val Glu Met Asp Val Thr Lys Pro Asp Leu Ser Ala
245 250 255

Ala Leu Lys Asp Ile Arg Ala Gln Tyr Glu Lys Leu Ala Ala Lys Asn
260 265 270

Met Gln Asn Ala Glu Glu Trp Phe Lys Ser Arg Phe Thr Val Leu Thr
275 280 285

Glu Ser Ala Ala Lys Asn Thr Asp Ala Val Arg Ala Ala Lys Asp Glu
290 295 300

Val Ser Glu Ser Arg Arg Leu Leu Lys Ala Lys Thr Leu Glu Ile Glu
305 310 315 320

[0031]

Ala Cys Arg Gly Met Asn Glu Ala Leu Glu Lys Gln Leu Gln Glu Leu
325 330 335

Glu Asp Lys Gln Asn Ala Asp Ile Ser Ala Met Gln Asp Thr Ile Asn
340 345 350

Lys Leu Glu Asn Glu Leu Arg Thr Thr Lys Ser Glu Met Ala Arg Tyr
355 360 365

Leu Lys Glu Tyr Gln Asp Leu Leu Asn Val Lys Met Ala Leu Asp Ile
370 375 380

Glu Ile Ala Ala Tyr Arg Lys Leu Leu Glu Gly Glu Glu Thr Arg Leu
385 390 395 400

Ser Phe Thr Ser Val Gly Ser Ile Thr Ser Gly Tyr Ser Gln Ser Ser
405 410 415

Gln Val Phe Gly Arg Ser Ala Tyr Gly Gly Leu Gln Thr Ser Ser Tyr
420 425 430

Leu Met Ser Thr Arg Ser Phe Pro Ser Tyr Tyr Thr Ser His Val Gln
435 440 445

Glu Glu Gln Ile Glu Val Glu Glu Thr Ile Glu Ala Ala Lys Ala Glu
450 455 460

Glu Ala Lys Asp Glu Pro Pro Ser Glu Gly Glu Ala Glu Glu Glu Glu
465 470 475 480

Lys Asp Lys Glu Glu Ala Glu Glu Glu Glu Ala Ala Glu Glu Glu Glu
485 490 495

[0032]

Ala Ala Lys Glu Glu Ser Glu Glu Ala Lys Glu Glu Glu Glu Gly Gly
500 505 510

Glu Gly Glu Glu Gly Glu Glu Thr Lys Glu Ala Glu Glu Glu Glu Lys
515 520 525

Lys Val Glu Gly Ala Gly Glu Glu Gln Ala Ala Lys Lys Lys Asp
530 535 540

<210> 17
<211> 916
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 17

Met Ser Tyr Thr Leu Asp Ser Leu Gly Asn Pro Ser Ala Tyr Arg Arg
1 5 10 15

Val Thr Glu Thr Arg Ser Ser Phe Ser Arg Val Ser Gly Ser Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Phe Arg Ser Gln Ser Trp Ser Arg Gly Ser Pro Ser Thr Val
35 40 45

Ser Ser Ser Tyr Lys Arg Ser Met Leu Ala Pro Arg Leu Ala Tyr Ser
50 55 60

Ser Ala Met Leu Ser Ser Ala Glu Ser Ser Leu Asp Phe Ser Gln Ser
65 70 75 80

Ser Ser Leu Leu Asn Gly Gly Ser Gly Pro Gly Gly Asp Tyr Lys Leu
85 90 95

[0033]

Ser Arg Ser Asn Glu Lys Glu Gln Leu Gln Gly Leu Asn Asp Arg Phe
100 105 110

Ala Gly Tyr Ile Glu Lys Val His Tyr Leu Glu Gln Gln Asn Lys Glu
115 120 125

Ile Glu Ala Glu Ile Gln Ala Leu Arg Gln Lys Gln Ala Ser His Ala
130 135 140

Gln Leu Gly Asp Ala Tyr Asp Gln Glu Ile Arg Glu Leu Arg Ala Thr
145 150 155 160

Leu Glu Met Val Asn His Glu Lys Ala Gln Val Gln Leu Asp Ser Asp
165 170 175

His Leu Glu Glu Asp Ile His Arg Leu Lys Glu Arg Phe Glu Glu Glu
180 185 190

Ala Arg Leu Arg Asp Asp Thr Glu Ala Ala Ile Arg Ala Leu Arg Lys
195 200 205

Asp Ile Glu Glu Ala Ser Leu Val Lys Val Glu Leu Asp Lys Lys Val
210 215 220

Gln Ser Leu Gln Asp Glu Val Ala Phe Leu Arg Ser Asn His Glu Glu
225 230 235 240

Glu Val Ala Asp Leu Leu Ala Gln Ile Gln Ala Ser His Ile Thr Val
245 250 255

Glu Arg Lys Asp Tyr Leu Lys Thr Asp Ile Ser Thr Ala Leu Lys Glu
260 265 270

[0034]

Ile Arg Ser Gln Leu Glu Ser His Ser Asp Gln Asn Met His Gln Ala
275 280 285

Glu Glu Trp Phe Lys Cys Arg Tyr Ala Lys Leu Thr Glu Ala Ala Glu
290 295 300

Gln Asn Lys Glu Ala Ile Arg Ser Ala Lys Glu Glu Ile Ala Glu Tyr
305 310 315 320

Arg Arg Gln Leu Gln Ser Lys Ser Ile Glu Leu Glu Ser Val Arg Gly
325 330 335

Thr Lys Glu Ser Leu Glu Arg Gln Leu Ser Asp Ile Glu Glu Arg His
340 345 350

Asn His Asp Leu Ser Ser Tyr Gln Asp Thr Ile Gln Gln Leu Glu Asn
355 360 365

Glu Leu Arg Gly Thr Lys Trp Glu Met Ala Arg His Leu Arg Glu Tyr
370 375 380

Gln Asp Leu Leu Asn Val Lys Met Ala Leu Asp Ile Glu Ile Ala Ala
385 390 395 400

Tyr Arg Lys Leu Leu Glu Gly Glu Glu Thr Arg Phe Ser Thr Phe Ala
405 410 415

Gly Ser Ile Thr Gly Pro Leu Tyr Thr His Arg Pro Pro Ile Thr Ile
420 425 430

Ser Ser Lys Ile Gln Lys Pro Lys Val Glu Ala Pro Lys Leu Lys Val
435 440 445

[0035]

Gln His Lys Phe Val Glu Glu Ile Ile Glu Glu Thr Lys Val Glu Asp
450 455 460

Glu Lys Ser Glu Met Glu Glu Ala Leu Thr Ala Ile Thr Glu Glu Leu
465 470 475 480

Ala Val Ser Met Lys Glu Glu Lys Lys Glu Ala Ala Glu Glu Lys Glu
485 490 495

Glu Glu Pro Glu Ala Glu Glu Glu Glu Val Ala Ala Lys Lys Ser Pro
500 505 510

Val Lys Ala Thr Ala Pro Glu Val Lys Glu Glu Glu Gly Glu Lys Glu
515 520 525

Glu Glu Glu Gly Gln Glu Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu Gly Ala Lys
530 535 540

Ser Asp Gln Ala Glu Glu Gly Gly Ser Glu Lys Glu Gly Ser Ser Glu
545 550 555 560

Lys Glu Glu Gly Glu Gln Glu Glu Gly Glu Thr Glu Ala Glu Ala Glu
565 570 575

Gly Glu Glu Ala Glu Ala Lys Glu Glu Lys Lys Val Glu Glu Lys Ser
580 585 590

Glu Glu Val Ala Thr Lys Glu Glu Leu Val Ala Asp Ala Lys Val Glu
595 600 605

Lys Pro Glu Lys Ala Lys Ser Pro Val Pro Lys Ser Pro Val Glu Glu
610 615 620

[0036]

Lys Gly Lys Ser Pro Val Pro Lys Ser Pro Val Glu Glu Lys Gly Lys
625 630 635 640

Ser Pro Val Pro Lys Ser Pro Val Glu Glu Lys Gly Lys Ser Pro Val
645 650 655

Pro Lys Ser Pro Val Glu Glu Lys Gly Lys Ser Pro Val Ser Lys Ser
660 665 670

Pro Val Glu Glu Lys Ala Lys Ser Pro Val Pro Lys Ser Pro Val Glu
675 680 685

Glu Ala Lys Ser Lys Ala Glu Val Gly Lys Gly Glu Gln Lys Glu Glu
690 695 700

Glu Glu Lys Glu Val Lys Glu Ala Pro Lys Glu Glu Lys Val Glu Lys
705 710 715 720

Lys Glu Glu Lys Pro Lys Asp Val Pro Glu Lys Lys Lys Ala Glu Ser
725 730 735

Pro Val Lys Glu Glu Ala Val Ala Glu Val Val Thr Ile Thr Lys Ser
740 745 750

Val Lys Val His Leu Glu Lys Glu Thr Lys Glu Glu Gly Lys Pro Leu
755 760 765

Gln Gln Glu Lys Glu Lys Glu Lys Ala Gly Gly Glu Gly Gly Ser Glu
770 775 780

Glu Glu Gly Ser Asp Lys Gly Ala Lys Gly Ser Arg Lys Glu Asp Ile
785 790 795 800

[0037]

Ala Val Asn Gly Glu Val Glu Gly Lys Glu Glu Val Glu Gln Glu Thr
805 810 815

Lys Glu Lys Gly Ser Gly Arg Glu Glu Glu Lys Gly Val Val Thr Asn
820 825 830

Gly Leu Asp Leu Ser Pro Ala Asp Glu Lys Lys Gly Gly Asp Lys Ser
835 840 845

Glu Glu Lys Val Val Val Thr Lys Thr Val Glu Lys Ile Thr Ser Glu
850 855 860

Gly Gly Asp Gly Ala Thr Lys Tyr Ile Thr Lys Ser Val Thr Val Thr
865 870 875 880

Gln Lys Val Glu Glu His Glu Glu Thr Phe Glu Glu Lys Leu Val Ser
885 890 895

Thr Lys Lys Val Glu Lys Val Thr Ser His Ala Ile Val Lys Glu Val
900 905 910

Thr Gln Ser Asp
915

<210> 18
<211> 695
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 18

Met Leu Pro Gly Leu Ala Leu Leu Leu Leu Ala Ala Trp Thr Ala Arg
1 5 10 15

[0038]

Ala Leu Glu Val Pro Thr Asp Gly Asn Ala Gly Leu Leu Ala Glu Pro
20 25 30

Gln Ile Ala Met Phe Cys Gly Arg Leu Asn Met His Met Asn Val Gln
35 40 45

Asn Gly Lys Trp Asp Ser Asp Pro Ser Gly Thr Lys Thr Cys Ile Asp
50 55 60

Thr Lys Glu Gly Ile Leu Gln Tyr Cys Gln Glu Val Tyr Pro Glu Leu
65 70 75 80

Gln Ile Thr Asn Val Val Glu Ala Asn Gln Pro Val Thr Ile Gln Asn
85 90 95

Trp Cys Lys Arg Gly Arg Lys Gln Cys Lys Thr His Pro His Phe Val
100 105 110

Ile Pro Tyr Arg Cys Leu Val Gly Glu Phe Val Ser Asp Ala Leu Leu
115 120 125

Val Pro Asp Lys Cys Lys Phe Leu His Gln Glu Arg Met Asp Val Cys
130 135 140

Glu Thr His Leu His Trp His Thr Val Ala Lys Glu Thr Cys Ser Glu
145 150 155 160

Lys Ser Thr Asn Leu His Asp Tyr Gly Met Leu Leu Pro Cys Gly Ile
165 170 175

Asp Lys Phe Arg Gly Val Glu Phe Val Cys Cys Pro Leu Ala Glu Glu
180 185 190

[0039]

Ser Asp Asn Val Asp Ser Ala Asp Ala Glu Glu Asp Asp Ser Asp Val
195 200 205

Trp Trp Gly Gly Ala Asp Thr Asp Tyr Ala Asp Gly Ser Glu Asp Lys
210 215 220

Val Val Glu Val Ala Glu Glu Glu Glu Val Ala Glu Val Glu Glu Glu
225 230 235 240

Glu Ala Asp Asp Asp Glu Asp Asp Glu Asp Gly Asp Glu Val Glu Glu
245 250 255

Glu Ala Glu Glu Pro Tyr Glu Glu Ala Thr Glu Arg Thr Thr Ser Ile
260 265 270

Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Glu Ser Val Glu Glu Val Val Arg
275 280 285

Val Pro Thr Thr Ala Ala Ser Thr Pro Asp Ala Val Asp Lys Tyr Leu
290 295 300

Glu Thr Pro Gly Asp Glu Asn Glu His Ala His Phe Gln Lys Ala Lys
305 310 315 320

Glu Arg Leu Glu Ala Lys His Arg Glu Arg Met Ser Gln Val Met Arg
325 330 335

Glu Trp Glu Glu Ala Glu Arg Gln Ala Lys Asn Leu Pro Lys Ala Asp
340 345 350

Lys Lys Ala Val Ile Gln His Phe Gln Glu Lys Val Glu Ser Leu Glu
355 360 365

[0040]

Gln Glu Ala Ala Asn Glu Arg Gln Gln Leu Val Glu Thr His Met Ala
370 375 380

Arg Val Glu Ala Met Leu Asn Asp Arg Arg Arg Leu Ala Leu Glu Asn
385 390 395 400

Tyr Ile Thr Ala Leu Gln Ala Val Pro Pro Arg Pro Arg His Val Phe
405 410 415

Asn Met Leu Lys Lys Tyr Val Arg Ala Glu Gln Lys Asp Arg Gln His
420 425 430

Thr Leu Lys His Phe Glu His Val Arg Met Val Asp Pro Lys Lys Ala
435 440 445

Ala Gln Ile Arg Ser Gln Val Met Thr His Leu Arg Val Ile Tyr Glu
450 455 460

Arg Met Asn Gln Ser Leu Ser Leu Leu Tyr Asn Val Pro Ala Val Ala
465 470 475 480

Glu Glu Ile Gln Asp Glu Val Asp Glu Leu Leu Gln Lys Glu Gln Asn
485 490 495

Tyr Ser Asp Asp Val Leu Ala Asn Met Ile Ser Glu Pro Arg Ile Ser
500 505 510

Tyr Gly Asn Asp Ala Leu Met Pro Ser Leu Thr Glu Thr Lys Thr Thr
515 520 525

Val Glu Leu Leu Pro Val Asn Gly Glu Phe Ser Leu Asp Asp Leu Gln
530 535 540

[0041]

Pro Trp His Ser Phe Gly Ala Asp Ser Val Pro Ala Asn Thr Glu Asn
545 550 555 560

Glu Val Glu Pro Val Asp Ala Arg Pro Ala Ala Asp Arg Gly Leu Thr
565 570 575

Thr Arg Pro Gly Ser Gly Leu Thr Asn Ile Lys Thr Glu Glu Ile Ser
580 585 590

Glu Val Lys Met Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val
595 600 605

His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys
610 615 620

Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr Val
625 630 635 640

Ile Val Ile Thr Leu Val Met Leu Lys Lys Lys Gln Tyr Thr Ser Ile
645 650 655

His His Gly Val Val Glu Val Asp Ala Ala Val Thr Pro Glu Glu Arg
660 665 670

Ile Leu Ser Lys Met Gln Gln Asn Gly Tyr Glu Asn Pro Thr Tyr Lys
675 680 685

Phe Phe Glu Gln Met Gln Asn
690 695

<210> 19
<211> 201
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

[0042]

<400> 19

Met Lys Trp Val Trp Ala Leu Leu Leu Leu Ala Ala Leu Gly Ser Gly
1 5 10 15

Arg Ala Glu Arg Asp Cys Arg Val Ser Ser Phe Arg Val Lys Glu Asn
20 25 30

Phe Asp Lys Ala Arg Phe Ser Gly Thr Trp Tyr Ala Met Ala Lys Lys
35 40 45

Asp Pro Glu Gly Leu Phe Leu Gln Asp Asn Ile Val Ala Glu Phe Ser
50 55 60

Val Asp Glu Thr Gly Gln Met Ser Ala Thr Ala Lys Gly Arg Val Arg
65 70 75 80

Leu Leu Asn Asn Trp Asp Val Cys Ala Asp Met Val Gly Thr Phe Thr
85 90 95

Asp Thr Glu Asp Pro Ala Lys Phe Lys Met Lys Tyr Trp Gly Val Ala
100 105 110

Ser Phe Leu Gln Lys Gly Asn Asp Asp His Trp Ile Val Asp Thr Asp
115 120 125

Tyr Asp Thr Tyr Ala Val Gln Tyr Ser Cys Arg Leu Leu Asn Leu Asp
130 135 140

Gly Thr Cys Ala Asp Ser Tyr Ser Phe Val Phe Ser Arg Asp Pro Asn
145 150 155 160

Gly Leu Pro Pro Glu Ala Gln Lys Ile Val Arg Gln Arg Gln Glu Glu
165 170 175

[0043]

Leu Cys Leu Ala Arg Gln Tyr Arg Leu Ile Val His Asn Gly Tyr Cys
180 185 190

Asp Gly Arg Ser Glu Arg Asn Leu Leu
195 200

<210> 20
<211> 770
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 20

Met Leu Pro Gly Leu Ala Leu Leu Leu Ala Ala Trp Thr Ala Arg
1 5 10 15

Ala Leu Glu Val Pro Thr Asp Gly Asn Ala Gly Leu Leu Ala Glu Pro
20 25 30

Gln Ile Ala Met Phe Cys Gly Arg Leu Asn Met His Met Asn Val Gln
35 40 45

Asn Gly Lys Trp Asp Ser Asp Pro Ser Gly Thr Lys Thr Cys Ile Asp
50 55 60

Thr Lys Glu Gly Ile Leu Gln Tyr Cys Gln Glu Val Tyr Pro Glu Leu
65 70 75 80

Gln Ile Thr Asn Val Val Glu Ala Asn Gln Pro Val Thr Ile Gln Asn
85 90 95

Trp Cys Lys Arg Gly Arg Lys Gln Cys Lys Thr His Pro His Phe Val
100 105 110

[0044]

Ile Pro Tyr Arg Cys Leu Val Gly Glu Phe Val Ser Asp Ala Leu Leu
115 120 125

Val Pro Asp Lys Cys Lys Phe Leu His Gln Glu Arg Met Asp Val Cys
130 135 140

Glu Thr His Leu His Trp His Thr Val Ala Lys Glu Thr Cys Ser Glu
145 150 155 160

Lys Ser Thr Asn Leu His Asp Tyr Gly Met Leu Leu Pro Cys Gly Ile
165 170 175

Asp Lys Phe Arg Gly Val Glu Phe Val Cys Cys Pro Leu Ala Glu Glu
180 185 190

Ser Asp Asn Val Asp Ser Ala Asp Ala Glu Glu Asp Asp Ser Asp Val
195 200 205

Trp Trp Gly Gly Ala Asp Thr Asp Tyr Ala Asp Gly Ser Glu Asp Lys
210 215 220

Val Val Glu Val Ala Glu Glu Glu Glu Val Ala Glu Val Glu Glu Glu
225 230 235 240

Glu Ala Asp Asp Asp Glu Asp Asp Glu Asp Gly Asp Glu Val Glu Glu
245 250 255

Glu Ala Glu Glu Pro Tyr Glu Glu Ala Thr Glu Arg Thr Thr Ser Ile
260 265 270

Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Glu Ser Val Glu Glu Val Val Arg
275 280 285

[0045]

Glu Val Cys Ser Glu Gln Ala Glu Thr Gly Pro Cys Arg Ala Met Ile
290 295 300

Ser Arg Trp Tyr Phe Asp Val Thr Glu Gly Lys Cys Ala Pro Phe Phe
305 310 315 320

Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Arg Asn Asn Phe Asp Thr Glu Glu Tyr
325 330 335

Cys Met Ala Val Cys Gly Ser Ala Met Ser Gln Ser Leu Leu Lys Thr
340 345 350

Thr Gln Glu Pro Leu Ala Arg Asp Pro Val Lys Leu Pro Thr Thr Ala
355 360 365

Ala Ser Thr Pro Asp Ala Val Asp Lys Tyr Leu Glu Thr Pro Gly Asp
370 375 380

Glu Asn Glu His Ala His Phe Gln Lys Ala Lys Glu Arg Leu Glu Ala
385 390 395 400

Lys His Arg Glu Arg Met Ser Gln Val Met Arg Glu Trp Glu Glu Ala
405 410 415

Glu Arg Gln Ala Lys Asn Leu Pro Lys Ala Asp Lys Lys Ala Val Ile
420 425 430

Gln His Phe Gln Glu Lys Val Glu Ser Leu Glu Gln Glu Ala Ala Asn
435 440 445

Glu Arg Gln Gln Leu Val Glu Thr His Met Ala Arg Val Glu Ala Met
450 455 460

[0046]

Leu Asn Asp Arg Arg Arg Leu Ala Leu Glu Asn Tyr Ile Thr Ala Leu
465 470 475 480

Gln Ala Val Pro Pro Arg Pro Arg His Val Phe Asn Met Leu Lys Lys
485 490 495

Tyr Val Arg Ala Glu Gln Lys Asp Arg Gln His Thr Leu Lys His Phe
500 505 510

Glu His Val Arg Met Val Asp Pro Lys Lys Ala Ala Gln Ile Arg Ser
515 520 525

Gln Val Met Thr His Leu Arg Val Ile Tyr Glu Arg Met Asn Gln Ser
530 535 540

Leu Ser Leu Leu Tyr Asn Val Pro Ala Val Ala Glu Glu Ile Gln Asp
545 550 555 560

Glu Val Asp Glu Leu Leu Gln Lys Glu Gln Asn Tyr Ser Asp Asp Val
565 570 575

Leu Ala Asn Met Ile Ser Glu Pro Arg Ile Ser Tyr Gly Asn Asp Ala
580 585 590

Leu Met Pro Ser Leu Thr Glu Thr Lys Thr Thr Val Glu Leu Leu Pro
595 600 605

Val Asn Gly Glu Phe Ser Leu Asp Asp Leu Gln Pro Trp His Ser Phe
610 615 620

Gly Ala Asp Ser Val Pro Ala Asn Thr Glu Asn Glu Val Glu Pro Val
625 630 635 640

[0047]

Asp Ala Arg Pro Ala Ala Asp Arg Gly Leu Thr Thr Arg Pro Gly Ser
645 650 655

Gly Leu Thr Asn Ile Lys Thr Glu Glu Ile Ser Glu Val Lys Met Asp
660 665 670

Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu
675 680 685

Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly
690 695 700

Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr Val Ile Val Ile Thr Leu
705 710 715 720

Val Met Leu Lys Lys Lys Gln Tyr Thr Ser Ile His His Gly Val Val
725 730 735

Glu Val Asp Ala Ala Val Thr Pro Glu Glu Arg His Leu Ser Lys Met
740 745 750

Gln Gln Asn Gly Tyr Glu Asn Pro Thr Tyr Lys Phe Phe Glu Gln Met
755 760 765

Gln Asn
770

<210> 21
<211> 751
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 21

[0048]

Met Leu Pro Gly Leu Ala Leu Leu Leu Leu Ala Ala Trp Thr Ala Arg
1 5 10 15

Ala Leu Glu Val Pro Thr Asp Gly Asn Ala Gly Leu Leu Ala Glu Pro
20 25 30

Gln Ile Ala Met Phe Cys Gly Arg Leu Asn Met His Met Asn Val Gln
35 40 45

Asn Gly Lys Trp Asp Ser Asp Pro Ser Gly Thr Lys Thr Cys Ile Asp
50 55 60

Thr Lys Glu Gly Ile Leu Gln Tyr Cys Gln Glu Val Tyr Pro Glu Leu
65 70 75 80

Gln Ile Thr Asn Val Val Glu Ala Asn Gln Pro Val Thr Ile Gln Asn
85 90 95

Trp Cys Lys Arg Gly Arg Lys Gln Cys Lys Thr His Pro His Phe Val
100 105 110

Ile Pro Tyr Arg Cys Leu Val Gly Glu Phe Val Ser Asp Ala Leu Leu
115 120 125

Val Pro Asp Lys Cys Lys Phe Leu His Gln Glu Arg Met Asp Val Cys
130 135 140

Glu Thr His Leu His Trp His Thr Val Ala Lys Glu Thr Cys Ser Glu
145 150 155 160

Lys Ser Thr Asn Leu His Asp Tyr Gly Met Leu Leu Pro Cys Gly Ile
165 170 175

[0049]

Asp Lys Phe Arg Gly Val Glu Phe Val Cys Cys Pro Leu Ala Glu Glu
180 185 190

Ser Asp Asn Val Asp Ser Ala Asp Ala Glu Glu Asp Asp Ser Asp Val
195 200 205

Trp Trp Gly Gly Ala Asp Thr Asp Tyr Ala Asp Gly Ser Glu Asp Lys
210 215 220

Val Val Glu Val Ala Glu Glu Glu Glu Val Ala Glu Val Glu Glu Glu
225 230 235 240

Glu Ala Asp Asp Asp Glu Asp Asp Glu Asp Gly Asp Glu Val Glu Glu
245 250 255

Glu Ala Glu Glu Pro Tyr Glu Glu Ala Thr Glu Arg Thr Thr Ser Ile
260 265 270

Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Glu Ser Val Glu Glu Val Val Arg
275 280 285

Glu Val Cys Ser Glu Gln Ala Glu Thr Gly Pro Cys Arg Ala Met Ile
290 295 300

Ser Arg Trp Tyr Phe Asp Val Thr Glu Gly Lys Cys Ala Pro Phe Phe
305 310 315 320

Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Arg Asn Asn Phe Asp Thr Glu Glu Tyr
325 330 335

Cys Met Ala Val Cys Gly Ser Ala Ile Pro Thr Thr Ala Ala Ser Thr
340 345 350

[0050]

Pro Asp Ala Val Asp Lys Tyr Leu Glu Thr Pro Gly Asp Glu Asn Glu
355 360 365

His Ala His Phe Gln Lys Ala Lys Glu Arg Leu Glu Ala Lys His Arg
370 375 380

Glu Arg Met Ser Gln Val Met Arg Glu Trp Glu Glu Ala Glu Arg Gln
385 390 395 400

Ala Lys Asn Leu Pro Lys Ala Asp Lys Lys Ala Val Ile Gln His Phe
405 410 415

Gln Glu Lys Val Glu Ser Leu Glu Gln Glu Ala Ala Asn Glu Arg Gln
420 425 430

Gln Leu Val Glu Thr His Met Ala Arg Val Glu Ala Met Leu Asn Asp
435 440 445

Arg Arg Arg Leu Ala Leu Glu Asn Tyr Ile Thr Ala Leu Gln Ala Val
450 455 460

Pro Pro Arg Pro Arg His Val Phe Asn Met Leu Lys Lys Tyr Val Arg
465 470 475 480

Ala Glu Gln Lys Asp Arg Gln His Thr Leu Lys His Phe Glu His Val
485 490 495

Arg Met Val Asp Pro Lys Lys Ala Ala Gln Ile Arg Ser Gln Val Met
500 505 510

Thr His Leu Arg Val Ile Tyr Glu Arg Met Asn Gln Ser Leu Ser Leu
515 520 525

[0051]

Leu Tyr Asn Val Pro Ala Val Ala Glu Glu Ile Gln Asp Glu Val Asp
530 535 540

Glu Leu Leu Gln Lys Glu Gln Asn Tyr Ser Asp Asp Val Leu Ala Asn
545 550 555 560

Met Ile Ser Glu Pro Arg Ile Ser Tyr Gly Asn Asp Ala Leu Met Pro
565 570 575

Ser Leu Thr Glu Thr Lys Thr Thr Val Glu Leu Leu Pro Val Asn Gly
580 585 590

Glu Phe Ser Leu Asp Asp Leu Gln Pro Trp His Ser Phe Gly Ala Asp
595 600 605

Ser Val Pro Ala Asn Thr Glu Asn Glu Val Glu Pro Val Asp Ala Arg
610 615 620

Pro Ala Ala Asp Arg Gly Leu Thr Thr Arg Pro Gly Ser Gly Leu Thr
625 630 635 640

Asn Ile Lys Thr Glu Glu Ile Ser Glu Val Lys Met Asp Ala Glu Phe
645 650 655

Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe
660 665 670

Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val
675 680 685

Gly Gly Val Val Ile Ala Thr Val Ile Val Ile Thr Leu Val Met Leu
690 695 700

[0052]

Lys Lys Lys Gln Tyr Thr Ser Ile His His Gly Val Val Glu Val Asp
705 710 715 720

Ala Ala Val Thr Pro Glu Glu Arg His Leu Ser Lys Met Gln Gln Asn
725 730 735

Gly Tyr Glu Asn Pro Thr Tyr Lys Phe Phe Glu Gln Met Gln Asn
740 745 750

<210> 22
<211> 154
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 22
Met Ala Thr Lys Ala Val Cys Val Leu Lys Gly Asp Gly Pro Val Gln
1 5 10 15

Gly Ile Ile Asn Phe Glu Gln Lys Glu Ser Asn Gly Pro Val Lys Val
20 25 30

Trp Gly Ser Ile Lys Gly Leu Thr Glu Gly Leu His Gly Phe His Val
35 40 45

His Glu Phe Gly Asp Asn Thr Ala Gly Cys Thr Ser Ala Gly Pro His
50 55 60

Phe Asn Pro Leu Ser Arg Lys His Gly Gly Pro Lys Asp Glu Glu Arg
65 70 75 80

His Val Gly Asp Leu Gly Asn Val Thr Ala Asp Lys Asp Gly Val Ala
85 90 95

Asp Val Ser Ile Glu Asp Ser Val Ile Ser Leu Ser Gly Asp His Cys
100 105 110

[0053]

Ile Ile Gly Arg Thr Leu Val Val His Glu Lys Ala Asp Asp Leu Gly
115 120 125

Lys Gly Gly Asn Glu Glu Ser Thr Lys Thr Gly Asn Ala Gly Ser Arg
130 135 140

Leu Ala Cys Gly Val Ile Gly Ile Ala Gln
145 150

<210> 23
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成肽

<400> 23

Ala Asn Gly Ile Leu Asn Val Thr Ala Thr Asp Lys Ser Thr Gly Lys
1 5 10 15

Ala Asn Lys Ile
20

<210> 24
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成肽

<400> 24

Lys Glu Glu Ile Glu Arg Met Val Gln Glu Ala Glu Lys Tyr Lys Ala
1 5 10 15

[0054]

Glu Asp Glu Val
20

<210> 25
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成肽

<400> 25

Leu Val Leu Asn Arg Leu Lys Val Gly Leu Gln Val Val Ala Val Lys
1 5 10 15

Ala Pro Gly Phe
20

<210> 26
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成肽

<400> 26

Gln Ser Ser Ser Glu Val Gly Tyr Asp Ala Met Ala Gly Asp Phe Val
1 5 10 15

Asn Met Val Glu
20

<210> 27
<211> 20

[0055]

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成肽

<400> 27

Asn Asp Ser Gln Arg Gln Ala Thr Lys Asp Ala Gly Val Ile Ala Gly
1 5 10 15

Leu Asn Val Leu
20

<210> 28

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成肽

<400> 28

Arg Thr Ala Leu Leu Asp Ala Ala Gly Val Ala Ser Leu Leu Thr Thr
1 5 10 15

Ala Glu Val Val
20

<210> 29

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成肽

<400> 29

[0056]

Gly Leu Tyr His Cys Lys Pro Leu Val Asp Ile Leu Ile Leu Pro Gly
1 5 10 15

Tyr Val Gln Ala
20

<210> 30
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成肽

<400> 30

Asn Asp Gln Gly Asn Arg Thr Thr Pro Ser Tyr Val Ala Phe Thr Asp
1 5 10 15

Thr Glu Arg Leu
20

<210> 31
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成肽

<400> 31

Ile Ser Ala Leu Phe Val Thr Pro Lys Thr Thr Gly Ala Arg Val Glu
1 5 10 15

Leu Ser Glu Gly
20

[0057]

<210> 32

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成肽

<400> 32

Gln Ser Ile Val Pro Ala Leu Glu Ile Ala Asn Ala His Arg Lys Pro
1 5 10 15

Leu Val Ile Ile Ala
20

<210> 33

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成肽

<400> 33

Asn Glu Glu Ala Gly Asp Gly Thr Thr Thr Ala Thr Val Leu Ala Arg
1 5 10 15

Ser Ile Ala Lys
20

<210> 34

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成肽

[0058]

<400> 34

Val Val Thr Cys Gly Tyr Thr Ile Pro Thr Cys Arg Lys Leu Asp Glu
1 5 10 15

Leu Gly Ser Lys
20

<210> 35

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成肽

<400> 35

Glu Gln Leu Asp Val Thr Thr Ser Glu Tyr Glu Lys Glu Lys Leu Asn
1 5 10 15

Glu Arg Leu Ala
20

<210> 36

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成肽

<400> 36

Ser Leu Phe Glu Gly Ile Asp Phe Tyr Thr Ser Ile Thr Arg Ala Arg
1 5 10 15

Phe Glu Glu Leu
20

[0059]

<210> 37
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成肽

<400> 37

Asn Pro Val Glu Ile Arg Arg Gly Val Met Leu Ala Val Asp Ala Val
1 5 10 15

Ile Ala Glu Leu
20

<210> 38
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成肽

<400> 38

Gly Tyr Pro Val Thr Asn Ala Val Ile Thr Val Pro Ala Tyr Phe Asn
1 5 10 15

Asp Ser Gln Arg
20

<210> 39
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工的

<220>

[0060]

<223> 合成肽

<400> 39

Val Ala Thr Ile Trp Phe Pro Val Cys Ala His Arg Glu Thr Thr Ile
1 5 10 15

Val Ser Phe Gly
20

<210> 40

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成肽

<400> 40

Lys Gly Asp Lys Ala Gln Ile Glu Lys Arg Ile Gln Glu Ile Ile Glu
1 5 10 15

Gln Leu Asp Val
20

<210> 41

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成肽

<400> 41

Lys Asp Asn Asn Leu Leu Gly Arg Phe Glu Leu Ser Gly Ile Pro Pro
1 5 10 15

[0061]

Ala Pro Gly Val
20

<210> 42
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成肽

<400> 42

Thr Ile Asp Asp Gly Ile Phe Glu Val Lys Ala Thr Ala Gly Asp Thr
1 5 10 15

His Leu Gly Gly
20

<210> 43
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成肽

<400> 43

Gln Asp Ala Tyr Val Leu Leu Ser Glu Lys Lys Ile Ser Ser Ile Gln
1 5 10 15

Ser Ile Val Pro
20

<210> 44
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工的

[0062]

<220>

<223> 合成肽

<400> 44

Leu Val Ile Ile Ala Glu Asp Val Asp Gly Glu Ala Leu Ser Thr Leu
1 5 10 15

Val Leu Asn Arg
20

<210> 45

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成肽

<400> 45

Gly Tyr Val Gln Ala Cys Arg Ala Leu Met Ile Ala Ala Ser Val Leu
1 5 10 15

Gly Leu Pro Ala
20

<210> 46

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成肽

<400> 46

Gln Asp Val Leu Lys Lys Ser Tyr Ser Lys Ala Phe Thr Leu Thr Ile
1 5 10 15

[0063]

Ser Ala Leu Phe
20

<210> 47
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成肽

<400> 47

Gly Ser Gly Pro Thr Ile Glu Glu Val Asp
1 5 10

<210> 48
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成肽

<400> 48

Arg Lys Gly Val Ile Thr Val Lys Asp Gly Lys Thr Leu Asn Asp Glu
1 5 10 15

Leu Glu Ile Ile
20

<210> 49
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工的

<220>

[0064]

<223> 合成肽

<400> 49

Ser	Gly	Lys	Ser	Thr	Leu	Ala	Arg	Val	Ile	Val	Asp	Lys	Tyr	Arg	Asp
1				5					10					15	

Gly	Thr	Lys	Met
			20

<210> 50

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成肽

<400> 50

Leu	Leu	Ala	Asp	Ala	Val	Ala	Val	Thr	Met	Gly	Pro	Lys	Gly	Arg	Thr
1				5					10					15	

Val	Ile	Ile	Glu
			20

<210> 51

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成肽

<400> 51

Leu	Ile	Phe	Asp	Leu	Gly	Gly	Gly	Thr	Phe	Asp	Val	Ser	Ile	Leu	Thr
1				5					10					15	

[0065]

Ile Asp Asp Gly
20

<210> 52
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成肽

<400> 52

Pro Gly Val Leu Ile Gln Val Tyr Glu Gly Glu Arg Ala Met Thr Lys
1 5 10 15

Asp Asn Asn Leu
20

<210> 53
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成肽

<400> 53

Glu Glu Ile Ala Gln Val Ala Thr Ile Ser Ala Asn Gly Asp Lys Glu
1 5 10 15

Ile Gly Asn Ile
20

<210> 54
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工的

[0066]

<220>

<223> 合成肽

<400> 54

Asn Lys Arg Ala Val Arg Arg Leu Arg Thr Ala Cys Glu Arg Ala Lys
1 5 10 15

Arg Thr Leu Ser
20

<210> 55

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成肽

<400> 55

Tyr Phe Gly Lys Arg Pro Pro Gly Val Leu His Cys Thr Thr Lys Phe
1 5 10 15

Cys Asp Tyr Gly
20

<210> 56

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成肽

<400> 56

Arg Val Leu Ala Pro His Leu Thr Arg Ala Tyr Ala Lys Asp Val Lys
1 5 10 15

[0067]

Phe Gly Ala Asp
20

<210> 57
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成肽

<400> 57

Lys Ala Pro Gly Phe Gly Asp Asn Arg Lys Asn Gln Leu Lys Asp Met
1 5 10 15

Ala Ile Ala Thr
20

<210> 58
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成肽

<400> 58

Gly Ala Arg Gly Ala Phe Ser Glu Glu Tyr Lys Arg Leu Asp Glu Asp
1 5 10 15

Leu Ala Ala Tyr
20

<210> 59
<211> 20

[0068]

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成肽

<400> 59

Ser	Tyr	Lys	Gly	Glu	Thr	Lys	Ala	Phe	Tyr	Pro	Glu	Glu	Ile	Ser	Ser
1				5					10					15	

Met	Val	Leu	Thr
			20

<210> 60

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成肽

<400> 60

Thr	Gln	Gly	Ser	Arg	Lys	Gly	Gly	Ala	Leu	Gln	Ser	Cys	Thr	Ile	Ile
1				5					10					15	

<210> 61

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成肽

<400> 61

Val	Thr	Asp	Ala	Leu	Asn	Ala	Thr	Arg	Ala	Ala	Val	Glu	Glu	Gly	Ile
1				5					10					15	

[0069]

Val Leu Gly Gly
20

<210> 62
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成肽

<400> 62

Thr Val Ile Ile Glu Gln Ser Trp Gly Ser Pro Lys Val Thr Lys Asp
1 5 10 15

Gly Val Thr Val
20

<210> 63
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成肽

<400> 63

Val Asn Met Val Glu Lys Gly Ile Ile Asp Pro Thr Lys Val Val Arg
1 5 10 15

Thr Ala Leu Leu
20

<210> 64
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工的

[0070]

<220>

<223> 合成肽

<400> 64

Ala	Gly	Gly	Val	Met	Thr	Ala	Leu	Ile	Lys	Arg	Asn	Ser	Thr	Ile	Pro
1				5					10					15	

Thr	Lys	Gln	Thr
			20

<210> 65

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成肽

<400> 65

Pro	Val	Glu	Lys	Ala	Leu	Arg	Asp	Ala	Lys	Leu	Asp	Lys	Ala	Gln	Ile
1				5					10					15	

His	Asp	Leu	Val
			20

<210> 66

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成肽

<400> 66

Ser	Pro	Tyr	Phe	Ile	Asn	Thr	Ser	Lys	Gly	Gln	Lys	Cys	Glu	Phe	Gln
1				5					10					15	

[0071]

Asp Ala Tyr Val
20

<210> 67
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成肽

<400> 67

Asp	Gly	Val	Thr	Val	Ala	Lys	Ser	Ile	Asp	Leu	Lys	Asp	Lys	Tyr	Lys
1				5				10						15	

Asn Ile Gly Ala
20

<210> 68
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成肽

<400> 68

Pro	Ala	Pro	Gly	Val	Pro	Gln	Ile	Glu	Val	Thr	Phe	Asp	Ile	Asp	Ala
1				5				10						15	

Asn Gly Ile Leu
20

<210> 69
<211> 20

[0072]

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成肽

<400> 69

Met Asn Arg Gly Phe Ser Arg Lys Ser His Thr Phe Leu Pro Lys Ile
1 5 10 15

Phe Phe Arg Lys
20

<210> 70

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成肽

<400> 70

Gly Leu Asn Val Leu Arg Ile Ile Asn Glu Pro Thr Ala Ala Ala Ile
1 5 10 15

Ala Tyr Gly Leu
20

<210> 71

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成肽

<400> 71

[0073]

Ser Met Val Leu Thr Lys Met Lys Glu Ile Ala Glu Ala Tyr Leu Gly
1 5 10 15

Tyr Pro Val Thr
20

<210> 72
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成肽

<400> 72

Glu Leu Ser Glu Gln Gln Leu Gln Leu Trp Pro Ser Asp Val Asp Lys
1 5 10 15

Leu Ser Pro Thr
20

<210> 73
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成肽

<400> 73

Met Ala Lys Ala Ala Ala Val Gly Ile Asp Leu Gly Thr Thr Tyr Ser
1 5 10 15

Cys Val Gly Val
20

[0074]

<210> 74
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成肽

<400> 74

Lys Ala Asn Lys Ile Thr Ile Thr Asn Asp Lys Gly Arg Leu Ser Lys
1 5 10 15

Glu Glu Ile Glu
20

<210> 75
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成肽

<400> 75

Ile Phe Phe Arg Lys Met Ser Ser Ser Gly Ala Lys Asp Lys Pro Glu
1 5 10 15

Leu Gln Phe Pro
20

<210> 76
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成肽

[0075]

<400> 76

Asp Gly Thr Lys Met Val Ser Ala Asp Ala Tyr Lys Ile Thr Pro Gly
1 5 10 15

Ala Arg Gly Ala
20

<210> 77

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成肽

<400> 77

Gly Glu Val Ile Val Thr Lys Asp Asp Ala Met Leu Leu Lys Gly Lys
1 5 10 15

Gly Asp Lys Ala
20

<210> 78

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成肽

<400> 78

Val Ile Ala Glu Leu Lys Lys Gln Ser Lys Pro Val Thr Thr Pro Glu
1 5 10 15

Glu Ile Ala Gln
20

[0076]

<210> 79
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成肽

<400> 79

Gln Ala Ala Ile Leu Met Gly Asp Lys Ser Glu Asn Val Gln Asp Leu
1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp
20

<210> 80
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成肽

<400> 80

Gly Leu Lys Gly Lys Ile Ser Glu Ala Asp Lys Lys Lys Val Leu Asp
1 5 10 15

Lys Cys Gln Glu
20

<210> 81
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工的

<220>

[0077]

<223> 合成肽

<400> 81

Arg	Ala	Ile	Phe	Thr	Gly	Tyr	Tyr	Gly	Lys	Gly	Lys	Pro	Val	Pro	Thr
1				5				10				15			

Gln	Gly	Ser	Arg
			20

<210> 82

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成肽

<400> 82

Pro	Gly	Pro	Gly	Gly	Phe	Gly	Ala	Gln	Gly	Pro	Lys	Gly	Gly	Ser	Gly
1				5				10						15	

Ser	Gly	Pro	Thr
			20

<210> 83

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成肽

<400> 83

Pro	Gly	Met	Gly	Ala	Met	Gly	Gly	Met	Gly	Gly	Gly	Met	Gly	Gly	Gly
1				5				10						15	

[0078]

Met Phe

<210> 84

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成肽

<400> 84

Ser Cys Val Gly Val Phe Gln His Gly Lys Val Glu Ile Ile Ala Asn
1 5 10 15

Asp Gln Gly Asn
20

<210> 85

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成肽

<400> 85

Met Val Ala Thr Cys Leu Gln Val Val Gly Phe Val Thr Ser Phe Val
1 5 10 15

Gly Trp Ile Gly
20

<210> 86

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工的

[0079]

<220>

<223> 合成肽

<400> 86

Gly	Glu	Glu	Val	Gly	Glu	Leu	Ser	Arg	Gly	Lys	Leu	Tyr	Ser	Leu	Gly
1				5					10					15	

Asn	Gly	Arg	Trp
			20

<210> 87

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成肽

<400> 87

Leu	Asp	Leu	Leu	Glu	Ile	Leu	Arg	Gln	Glu	Lys	Gly	Gly	Ser	Arg	Gly
1				5					10					15	

Glu	Glu	Val	Gly
			20

<210> 88

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成肽

<400> 88

Val	Cys	Asn	Pro	Ile	Ile	Ser	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Ala	Gly	Gly	Pro
1				5					10					15	

[0080]

Gly Pro Gly Gly
20

<210> 89

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成肽

<400> 89

Glu Leu Glu Ile Ile Glu Gly Met Lys Phe Asp Arg Gly Tyr Ile Ser
1 5 10 15

Pro Tyr Phe Ile
20

<210> 90

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成肽

<400> 90

Leu Asp Ser Leu Thr Pro Ala Asn Glu Asp Gln Lys Ile Gly Ile Glu
1 5 10 15

Ile Ile Lys Arg
20

<210> 91

<211> 20

[0081]

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成肽

<400> 91

Lys Lys Ser Ser Glu Thr Leu Arg Lys Ala Gly Gln Val Phe Leu Glu
1 5 10 15

Glu Leu Gly Asn
20

<210> 92

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成肽

<400> 92

Leu Glu Lys Asp Phe Leu Pro Leu Tyr Phe Gly Trp Phe Leu Thr Lys
1 5 10 15

Lys Ser Ser Glu
20

<210> 93

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成肽

<400> 93

[0082]

Leu Asp Asp Thr Asn His Glu Arg Glu Arg Leu Glu Gln Leu Phe Glu
1 5 10 15

Met Ala Asp Gln
20

<210> 94
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成肽

<400> 94

Gln Leu Ala Gly Val Leu Leu Ile Leu Leu Ala Leu Cys Ala Leu Val
1 5 10 15

Ala Thr Ile Trp
20

<210> 95
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成肽

<400> 95

Pro Thr Lys Gln Thr Gln Ile Phe Thr Thr Tyr Ser Asp Asn Gln Pro
1 5 10 15

Gly Val Leu Ile
20

[0083]

<210> 96
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成肽

<400> 96

Ile His Asp Leu Val Leu Val Gly Gly Ser Thr Arg Ile Pro Lys Val
1 5 10 15

Gln Lys Leu Leu
20

<210> 97
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成肽

<400> 97

Val Leu Cys Leu Val Gly Gly Cys Val Ile Leu Cys Cys Ala Gly Asp
1 5 10 15

Ala Gln Ala Phe
20

<210> 98
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成肽

[0084]

<400> 98

Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe
1 5 10

<210> 99

<211> 42

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成肽

<400> 99

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
20 25 30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
35 40

<210> 100

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成肽

<400> 100

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val
1 5 10

<210> 101

<211> 40

[0085]

<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成肽

<400> 101

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
20 25 30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val
35 40

<210> 102
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成肽

<400> 102

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp
20

<210> 103
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工的

<220>

[0086]

<223> 合成肽

<400> 103

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
1 5 10 15

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val
20

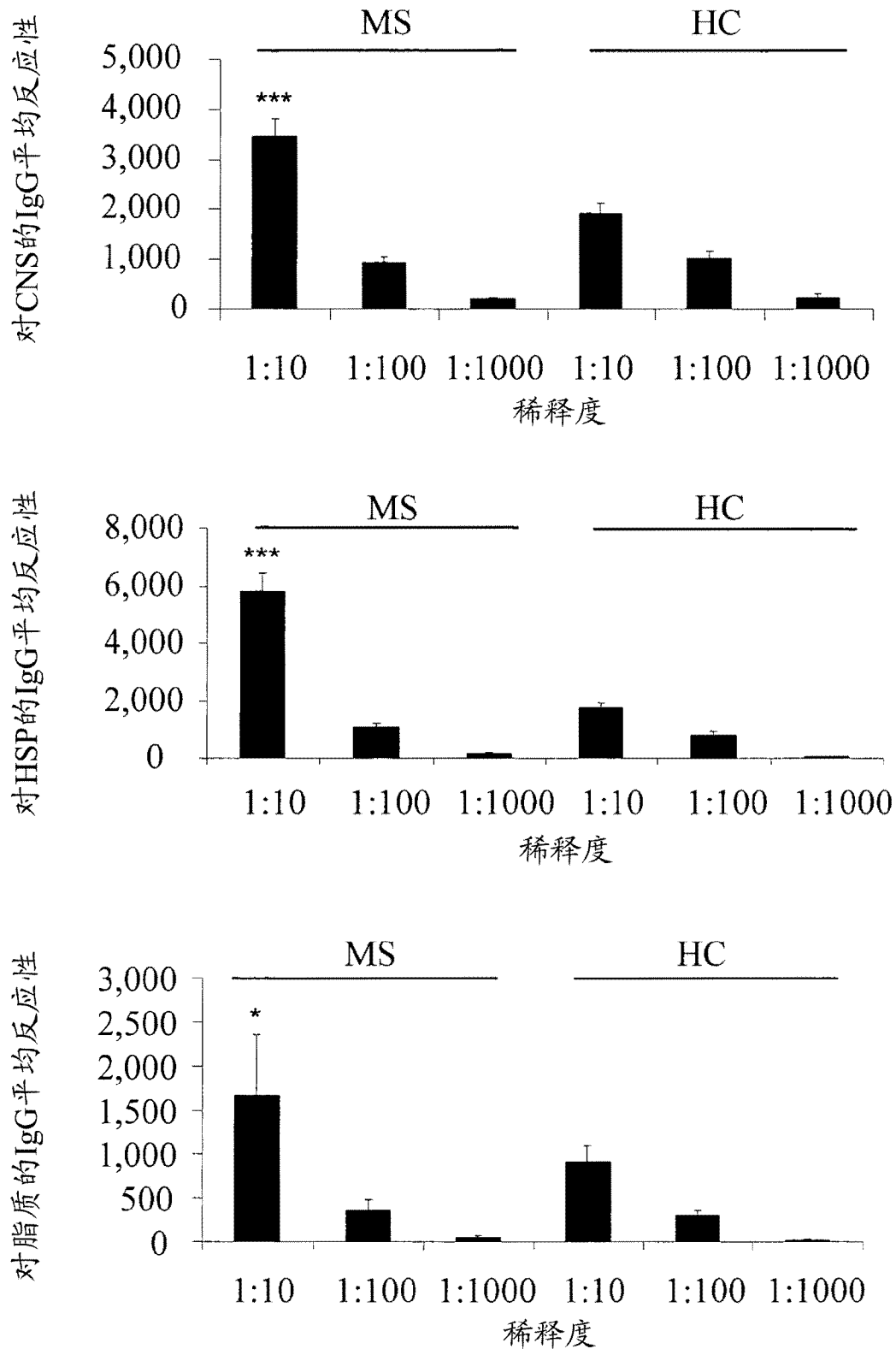


图 1A

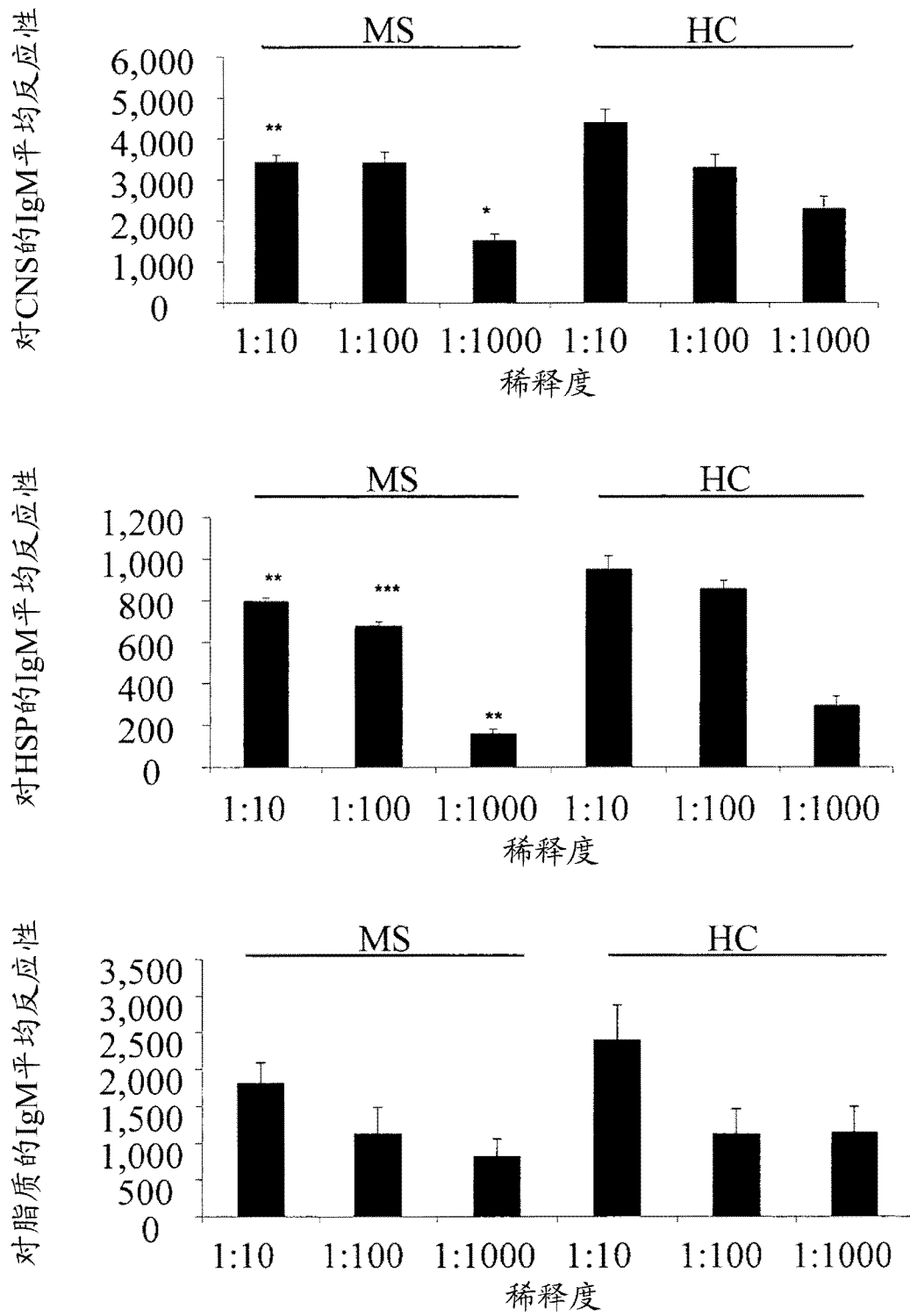


图 1B

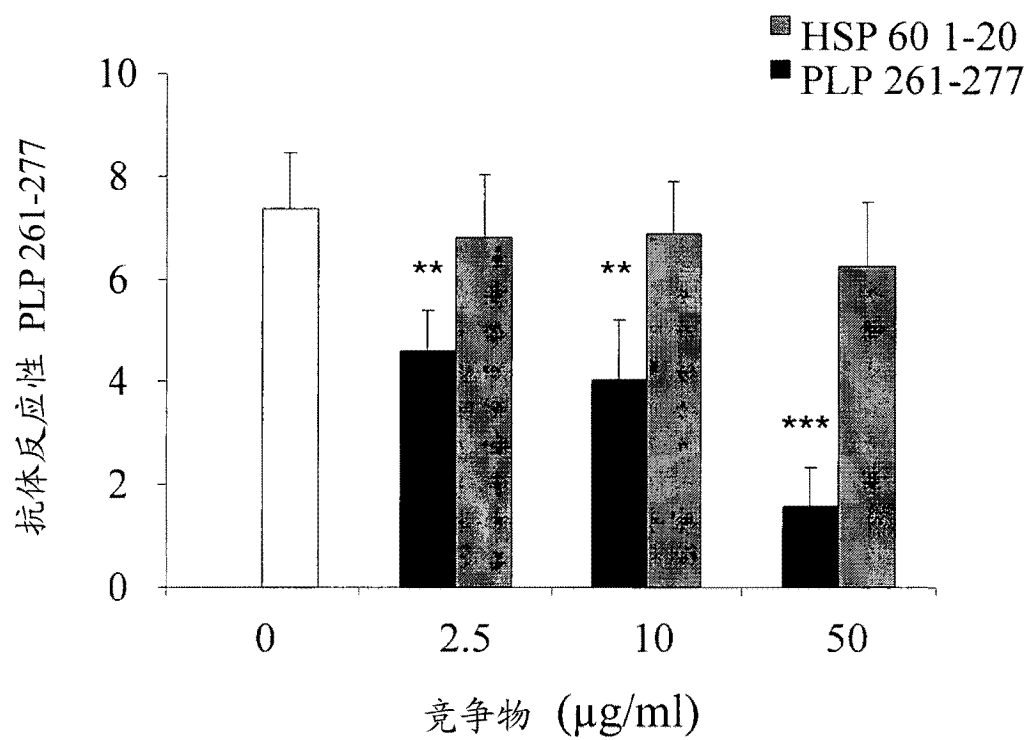


图 1C

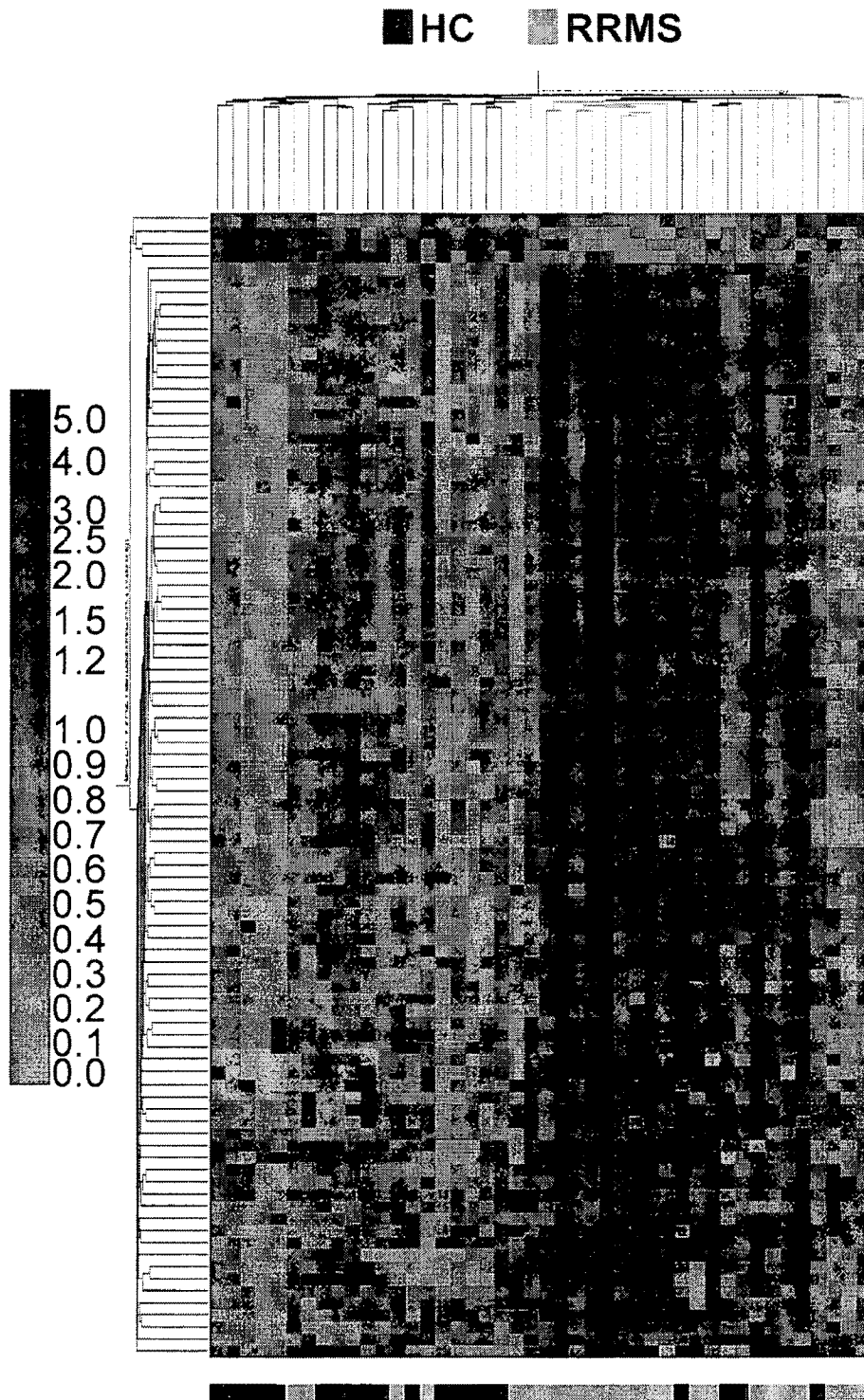


图 2A

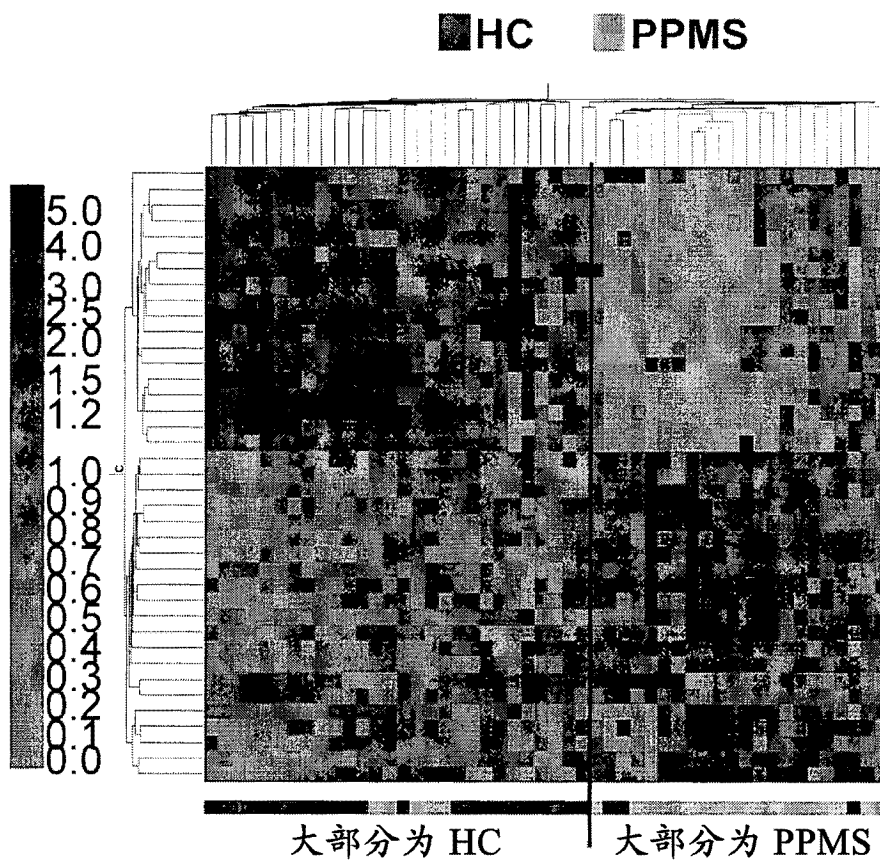


图 2B

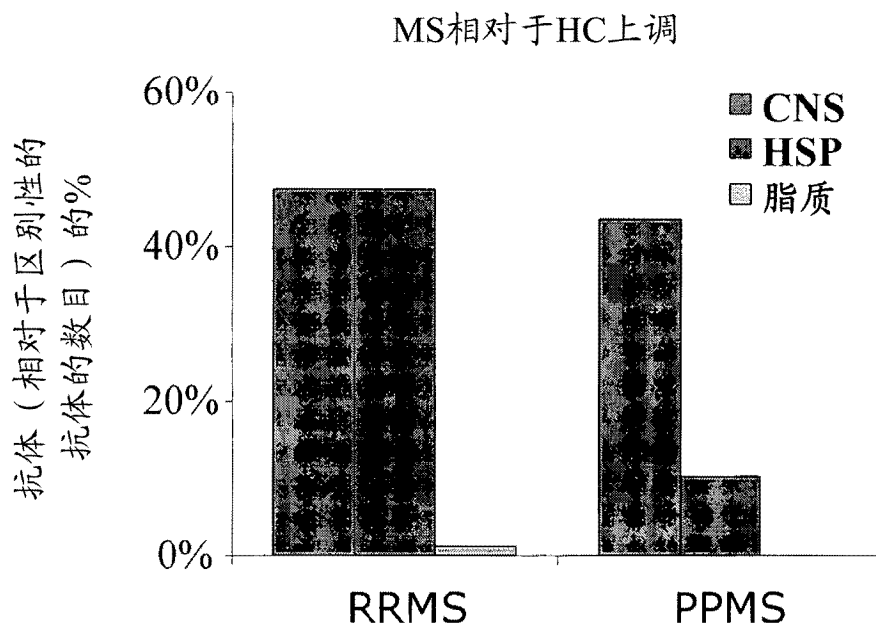


图 2C

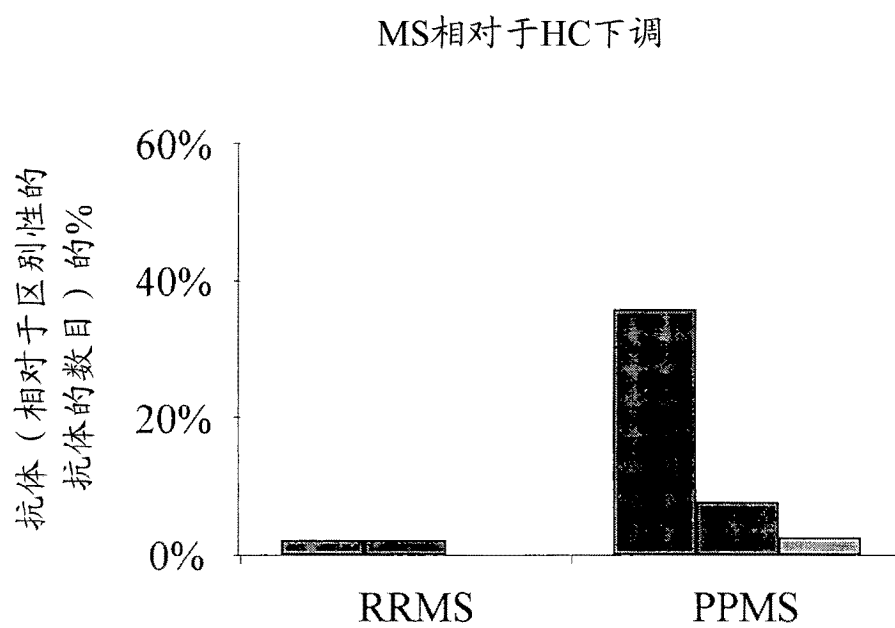


图 2D

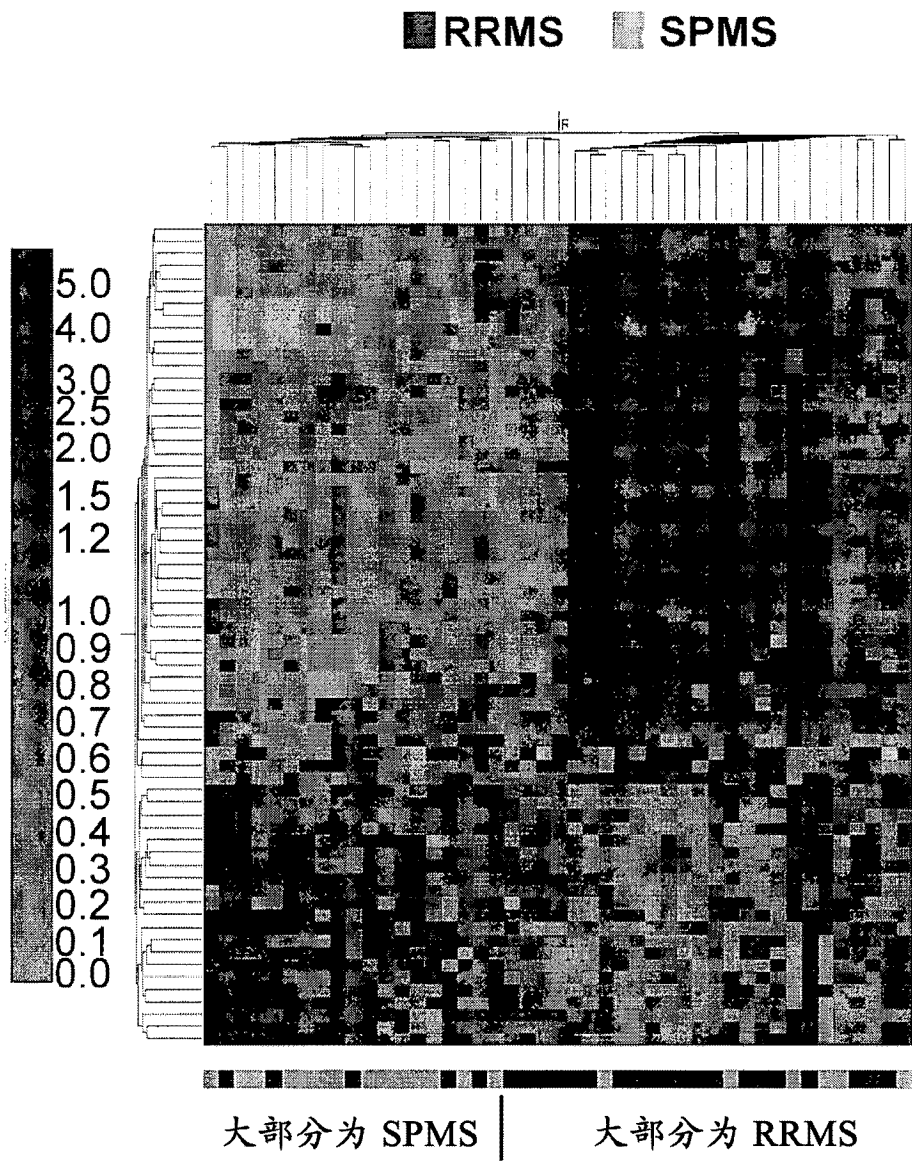


图 2E

RRMS相对于SPMS上调

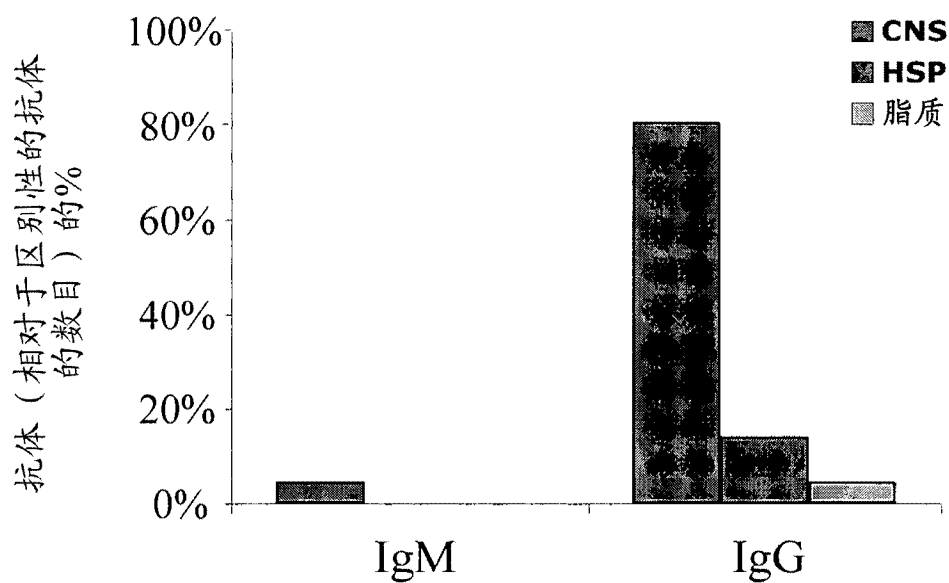


图 2F

RRMS相对于SPMS下调

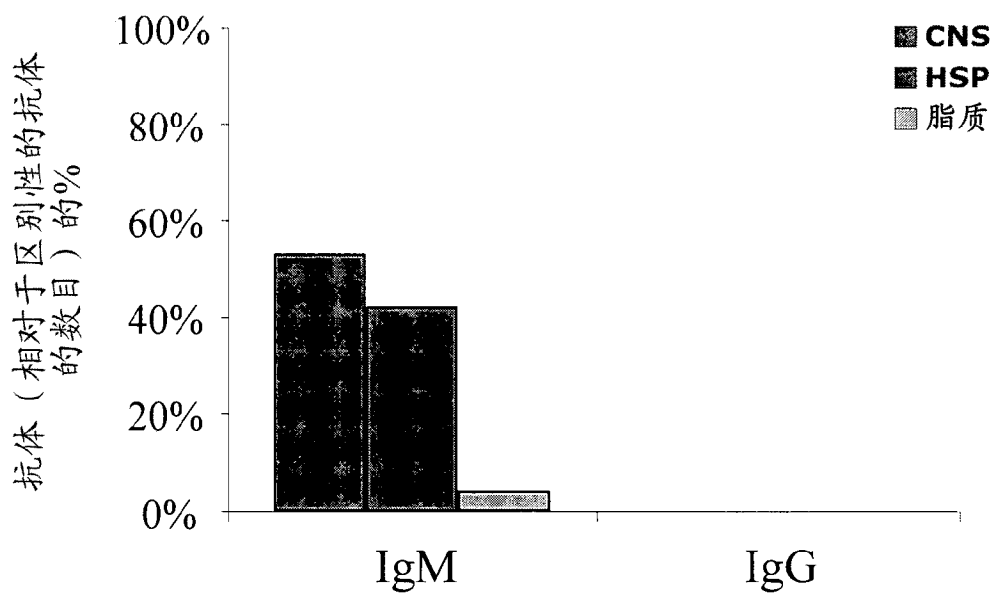


图 2G

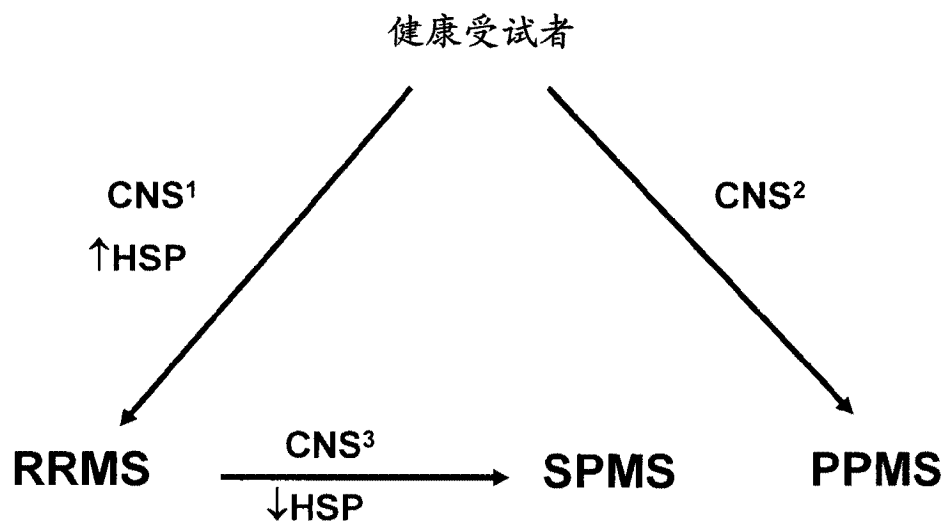


图 2H

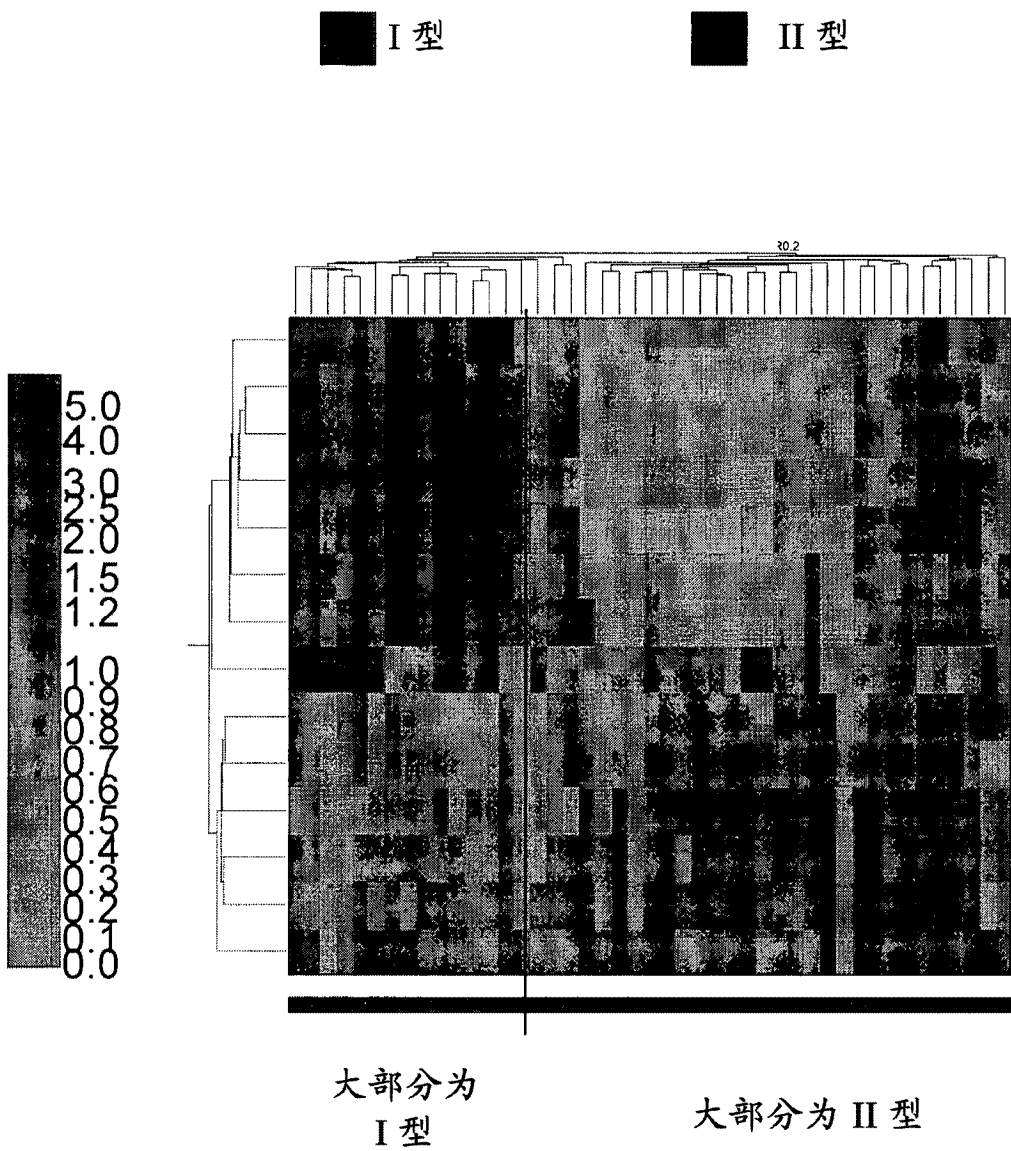


图 3

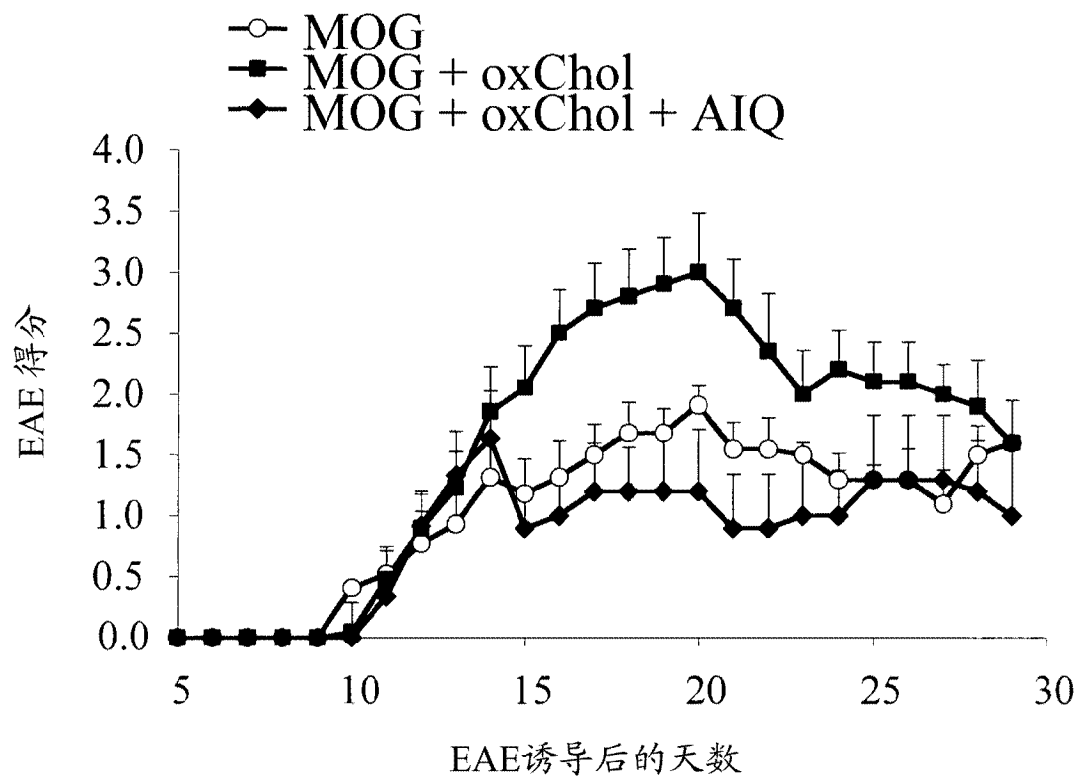


图 4A

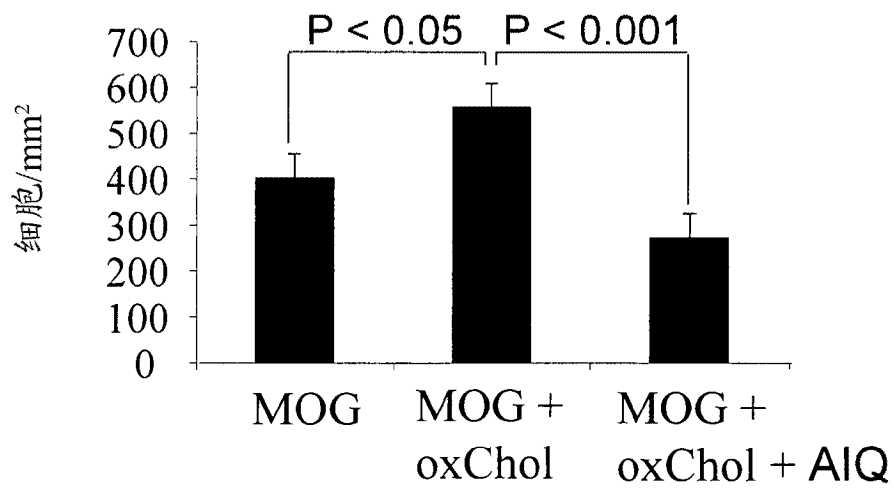


图 4B

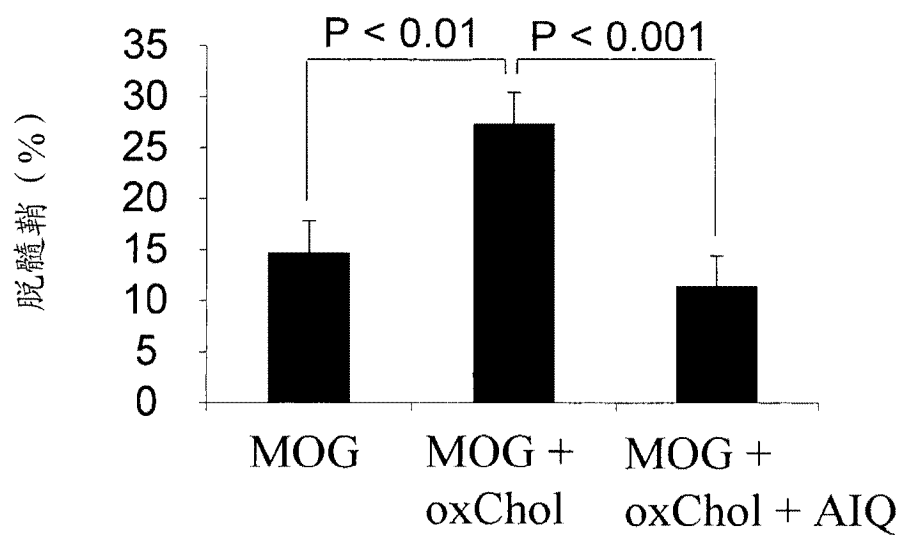


图 4C

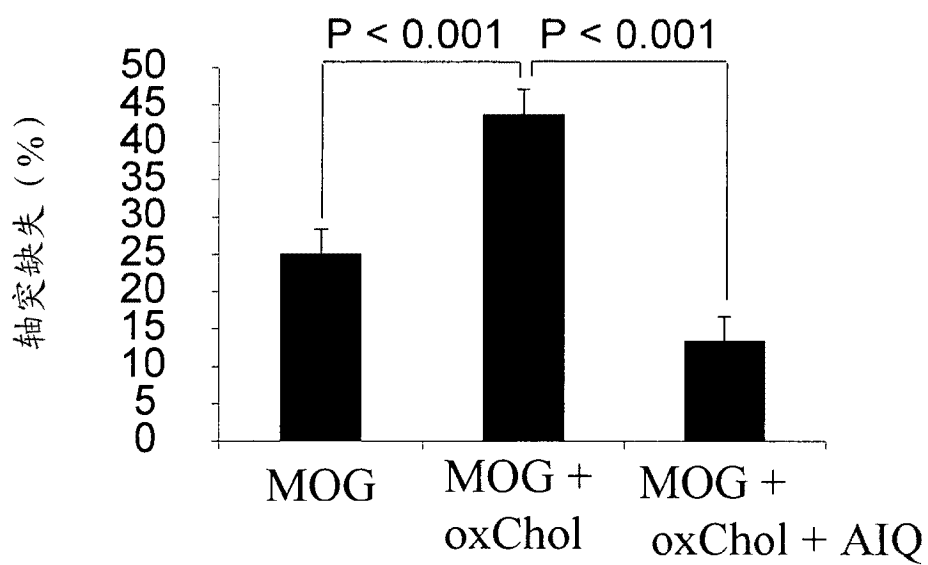


图 4D

本发明涉及用于诊断受试者的多发性硬化(MS)的方法和试剂盒。特别地,本发明涉及用于诊断受试者的MS亚型的方法和试剂盒,所述亚型选自复发缓解型MS(RRMS)、继发进展型MS(SPMS)、原发进展型MS(PPMS)以及选自I型MS病变和II型MS病变的MS病变的病理亚型。

