



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02814978.5

[43] 公开日 2004 年 10 月 13 日

[11] 公开号 CN 1537173A

[22] 申请日 2002.5.30 [21] 申请号 02814978.5

[30] 优先权

[32] 2001. 5. 30 [33] DE [31] 10127572.2

[86] 国际申请 PCT/DE2002/002010 2002. 5. 30

[87] 国际公布 WO2002/097125 德 2002. 12. 5

[85] 进入国家阶段日期 2004. 1. 29

[71] 申请人 奥利金有限公司

地址 德国柏林

[72] 发明人 T·霍普 U·昂杰特霍姆

S·布莱斯

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所

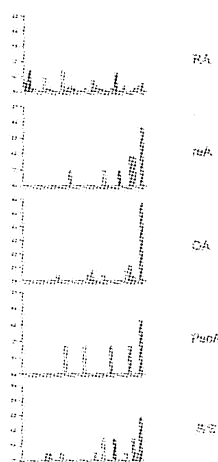
代理人 周承泽

权利要求书 3 页 说明书 44 页 附图 1 页

[54] 发明名称 慢性炎症性关节疾病的诊断、分子分辨和治疗开发的方法

[57] 摘要

本发明涉及慢性炎症性关节疾病和其它炎症性、传染性或肿瘤疾病的诊断、分子辨别和治疗药物开发的方法。根据本发明，可将基因组资料(基因组学)、蛋白组资料(蛋白组学)和免疫组资料(免疫组学)用于慢性关节炎疾病的分析和治疗开发。本发明基于利用基因序列及其衍生的 mRNA 和蛋白质，以及对这些衍生的蛋白质具有特异性的抗体，来特征鉴定炎症性和非炎症性风湿关节疾病、自身免疫病和传染病。可从进行的检查中得出迄今尚不清楚的慢性炎症性关节疾病的病因学重要致病性机理。而且可产生用于所述关节疾病分类、预后评价和治疗优化的解释算法，并可产生药物治疗和攻击部位的新策略。



1. 人慢性炎症性关节疾病和其它炎症性、传染性或肿瘤疾病的诊断、分子分辨
5 和治疗开发的方法，其特征在于，利用表 1 所述的基因和编码表 2 所述蛋白
质的基因中的单个基因、一组基因或全体基因的序列而实现这种方法。
2. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，该方法包括其序列与表 1 所述基因
或与编码表 2 所述蛋白质的基因相同的基因序列，或具有蛋白质编码区中序
列相同性至少 80%的基因序列。
3. 如权利要求 1 和 2 所述的方法，其特征在于，该方法包括其序列与表 1 所述
10 基因或与权利要求 2 所包括基因相同的序列区段或部分序列，或与所述基因
各区段序列相同性至少 80%的序列区段或部分序列。
4. 如权利要求 1 至 3 项所述的方法，其特征在于，该方法采用了：
 - 4.1 高处理量的(显微)阵列杂交方法；
 - 4.2 利用聚合酶链反应作(半)定量测定的高处理量方法。
- 15 5. 如权利要求 1 至 3 项所述的方法，其特征在于，该方法利用标记的病人样品
和第二种不同标记的对照样品，对照样品和病人的样品一起，与一(显微)阵列
进行比较性双杂交(比较性红/绿杂交)。
6. 如权利要求 1 至 5 项所述的用于诊断目的的方法，其特征在于，该方法采用
20 了从权利要求 1 至 3 项所述的基因序列推导的一种、一组或全体蛋白质或多
肽。
7. 如权利要求 6 所述的方法，其特征在于，该方法采用了表 2 所述一种、一组
或全体蛋白质。
8. 如权利要求 6 和 7 所述的方法，其特征在于，该方法采用了表 1 所述一种、
一组或全体蛋白质的部分序列。
- 25 9. 如权利要求 6 至 8 项所述的方法，其特征在于，该方法包括其序列与表 1 推
导的蛋白质或与表 2 所述蛋白质相同的,或各序列相同性至少 80%的蛋白质
或蛋白质部分序列。
10. 如权利要求 6 至 9 项所述的方法，其特征在于，该方法采用了：
 - 10.1 分析蛋白质表达(高分辨二维蛋白质凝胶电泳,MALDI 技术)的高处理量方
30 法；
 - 10.2 设计用于筛检自身抗体作为人炎症性关节炎或其它炎症性、传染性或肿
瘤疾病诊断方法的蛋白质斑点(蛋白质阵列)技术的高处理量方法；
 - 10.3 设计用于筛检自身反应性 T 细胞作为人炎症性关节炎或其它炎症性、传
染性或肿瘤疾病诊断方法的蛋白质斑点(蛋白质阵列)技术的高处理量方法；
 - 35 10.4 设计用于筛检自身反应性 T 细胞作为人炎症性关节炎或其它炎症性、传

染性或肿瘤疾病诊断方法的蛋白质斑点(蛋白质阵列)技术的非高处理量方法。

11. 如权利要求 6 至 9 项所述的方法, 其特征在于, 该方法采用了对权利要求 6 至 9 项所述蛋白质或其部分序列具有特异性的抗体。
- 5 12. 如权利要求 1 至 11 项所述的方法, 其特征在于, 该方法在动物实验分析中或对动物炎症性关节炎疾病和其它炎症性、传染性或肿瘤疾病的诊断中采用了其它种类动物的相应同源序列。
13. 如权利要求 6 至 11 项所述的方法, 可用作检测权利要求 1 至 3 项所述基因中, 或这些基因的调控序列(启动子、增强子、沉默子、结合其它调节因子的特异性序列)中的遗传性改变(突变)的诊断方法。
- 10 14. 如权利要求 6 至 11 项和 13 项所述的方法, 可检测编码表 2 所述蛋白质的基因中, 或这些基因的调控序列(启动子、增强子、沉默子、结合其它调节因子的特异性序列)中的遗传性改变(突变)。
- 15 15. 如权利要求 1 至 5 项所述的方法, 可用于人炎症性关节疾病和其它炎症性、传染性或肿瘤疾病的分子分辨, 其特征在于, 利用了权利要求 1-3 所述的基因或 DNA 序列, 或权利要求 6-9 所述的蛋白质和蛋白质部分序列推导的各蛋白质或多肽, 或它们的相应编码基因序列实现这些方法。
16. 如权利要求 1 至 5 项所述的方法, 可用于人炎症性关节疾病和其它炎症性、传染性或肿瘤疾病的治疗选择, 其特征在于, 这些方法采用了权利要求 1-3 20 所述的基因或 DNA 序列, 或各自推导的蛋白质或肽。
17. 如权利要求 1 至 5 项所述的方法, 可用于监测人炎症性关节疾病和其它炎症性、传染性或肿瘤疾病的进展/控制其治疗, 其特征在于, 这些方法采用了权利要求 1-3 所述的基因或 DNA 序列, 或各自推导的蛋白质或肽。
18. 如权利要求 1 至 5 项所述的方法, 可用作开发治疗观念的分子工具, 包括直接 25 或间接影响权利要求 1-3 所述的基因或基因序列的表达。
19. 如权利要求 1-5 和 18 项所述的方法, 可用于开发治疗观念, 包括直接或间接影响权利要求 6-9 所述的蛋白质或蛋白质部分序列的表达。
20. 如权利要求 1-5 项和 18-19 项所述的方法, 可用于开发治疗观念, 包括直接或间接影响针对权利要求 8-11 所述的蛋白质或蛋白质部分序列的自身反应性 T 30 细胞。
21. 如权利要求 1-5 项和 18-20 项所述的方法, 可用于影响权利要求 1-3 所述基因序列推导的蛋白质的生物活性。
22. 如权利要求 1-5 项和 18-21 项所述的方法, 可用于影响权利要求 1-3 所述基因和各自推导的蛋白质参与的直接分子调节环路/通路。
- 35 23. 如权利要求 1-5 项和 18-22 项所述的方法, 可用于开发关于设计和利用所述基

- 因和序列的解释算法和它们的调节机制的治疗观念，以认识或预测治疗观念、治疗效果、治疗优化或疾病预后。
24. 如权利要求 1-5 项和 18-22 项所述的方法，可利用权利要求 1-3 和 6-9 项所述基因、基因序列、基因或基因序列的调控、蛋白质、蛋白质序列、融合蛋白，
5 或利用权利要求 10-14 所述的抗体或自身反应性 T 细胞，来开发生物学活性药物(生物制品)。
25. 作为一种分子工具的阵列，由具有可比蛋白质特异性结合行为的不同抗体或分子组成，用来检测从表 1 基因推导的所有蛋白质或一组蛋白质，或检测表 2 的所有蛋白质或一组蛋白质。
- 10 26. 权利要求 1 至 24 所述的方法的用途：
26.1 在医学诊断学中分析蛋白质样品或组织样品；
26.2 用于按照实施例 1 的分析；
26.3 用于按照实施例 2 的治疗观念。

慢性炎症性关节疾病的诊断、分子分辨和治疗开发的方法

前言

本发明涉及慢性炎症性关节疾病和其它炎症性、传染性或肿瘤性疾病的诊断、分子分辨和治疗开发的方法。这些方法在慢性关节疾病的分析和治疗开发上依据基因组资料(基因组学)、蛋白组资料(蛋白组学)和免疫学资料(免疫组学)。本发明依据对基因序列及其推导的 mRNA 和蛋白质的利用,和对所推导蛋白质的特异性抗体的利用,来特征鉴定炎症性类风湿和非炎症性类风湿关节疾病、自身免疫性疾病和传染病。从本研究开始可以对迄今未能解释的慢性炎症性关节疾病在病因学上得出重要的致病性原理,而且可构建这些关节疾病的分类、预后评价和治疗优化的解释性算法,并且可以获得对新的治疗策略和治疗目标的结论。

现有技术的回顾

技术问题

慢性炎症性关节疾病的病因学尚不清楚。类风湿性关节炎(RA,见下面实施例的缩写词表)是这类疾病的典型例子,该病的主要病程发生在因炎症而改变的滑膜,因此导致慢性关节损伤。所见的临床症状非常不均一,提示有几种类型的疾病都显示了破坏性滑膜炎的共同症状。这类疾病也必须作为系统性疾病来认识,其血液中可观察到多种变化,有时可导致严重的器质性病理表现。

讨论认为是由于炎症性级联反应失调而致,炎症反应过度活跃是主要的发病机制。因此,已报道的自身免疫反应提示特异性的体液和细胞介导免疫系统在发病过程中起着作用。然而,也讨论了其它机制如酶促组织破坏、细胞和组织增殖或再生,这些因素也可能在发病中起重要作用。

迄今还不能最终确定这些发病机制是否单独地和排它地起作用,也不知道哪些参数能够同时包括所有这些变化。由于对其病理生理了解得不充分,现有的许多治疗方法,其大部分实施方案只是遵循一条基本治疗观念:集中于炎症过度这个共同特征上,因而当前的治疗目标是抑制炎症。所谓的基础治疗是进行免疫调节和缓解疾病,它们可能干预细胞代谢和细胞活动的基本机制(如甲氨喋呤、硫唑嘌呤)。然而对于关节疾病,这些治疗方法分子机制的综合性原理不完全了解。因此缺乏以不同和特异性方式实施一种基础疗法在各个病例中获得疗效的各自参数。

先前的方法

目前依据以下临床常规标准来评价关节病患者:已报告的疾病进展(既往病史),临床症状(观察到关节有患病模式,有器质性表现),炎症参数(血清电泳观察到非特异性炎症参数、沉降速率和 C 反应性蛋白),自身免疫原参数(类风湿因子、抗核抗体和一些特异性自身抗体,如抗-Ro、抗-La、抗-U1RNP、抗-Sm、抗组蛋白、

抗-Sc170、抗着丝粒、抗双链 DNA、抗磷脂抗体), 基于 HLA-标志(DR4、B27、DR3)的遗传素质(倾向性), (关节)产生的影象(X 线片中关节有破坏性变化), 借助实验室诊断学的常规参数(肝酶、肌酶、肾潴留值)充实器官诊断, 以及(如果有利的话)其它超声学、放射学和核磁共振 X 线断层术等技术。这些只能得到关于疾病预后变化或具体预测基础疗法在个体病人中能否成功的非常有限的断言。而且, 目前还没有为充分分类该最常见的关节炎病 RA 多种性表现设计出诊断标准。(1, 见实施例后的参考文献)。特别是在该疾病早期诊断困难, 不易确定。然而在该病持续一年后, 大多数病人已患有不可逆转的关节损伤。从早期关节炎研究中知道, 较早确诊并随后给予充分治疗会获得该病长期发展的根本改善。故评价临床症状外的整个分子特征的新方法和标准是极其需要的。

还有, 监测治疗是否成功可通过上述诊断方法来完成。许多这些参数只是非常慢地发生变化, 需要观察数周至数月才能得出所选疗法是否有效的结论。由于改善不充分和疾病发展常常需要改变治疗方案, 采用目前的治疗方法一般不可能治愈此病。

实验方法

为了改进 RA 的诊断已建立了许多实验性方法。

这些方法涉及对于关键性蛋白质的研究, 这些关键性蛋白质: 1)维持或预防炎症从中心部位向外扩展; 2)明确参与软骨和骨质的酶促自毁作用或抑制参与的酶; 或 3)能诱导再生和修复过程或抑制它们的拮抗剂。例如介导炎症的细胞因子肿瘤坏死因子(TNF- α)和白介素(IL-1 α), 它们的作用证明是必须的, 因而已分别引入临床治疗方法中。虽然在常用方法不能充分发挥效果的许多病例中抑制 TNF- α 可改善 RA, 但这些阳性结果不能导致治愈此病。局部上, 这种抑制如此强以致产生感染或甚至脓毒性并发症, 然而仍不能实现对关节炎的完全控制。这提示 TNF- α 介导的炎症通路至少不是唯一的中心致病机制。除了所述的这两种细胞因子外, 应研究关节炎发病中许多其它信号的作用。此外, 治疗干预逐渐集中于细胞内相应的信号转导通路。

然而, 基质金属蛋白酶和组织蛋白酶位于骨和软骨酶促自毁作用的中心。再生机制的调查正值这些研究的开始。

首先必须提到属于转化生长因子(TGF- β)家族的信号物质, 它们的大部分成员在运动器官系统的发育中起着关键作用。对滑膜组织和软骨的初步研究显示该组生长因子的成员和形态发生素在成年人滑膜组织中也能产生。对炎症性关节疾病, 我们自己的研究能显示这些因子的某一些显然相对减少。另外, 关于骨形态发生蛋白(BMP-1)还显示, 细胞对发育中的关节软骨组织的入侵受到抑制(2)。

其它关节疾病中也发现了许多上述因子和酶, 如骨关节病或活动性关节疾病, 因此认为它们自身不构成具体的诊断参数。

实验研究也集中于 RA 中自身反应性 T 和 B 细胞的升高上, 为此将 RA 归类为

自身免疫病。这种分类可追述到所谓的类风湿因子(一种针对免疫球蛋白 G 的自身抗体)的发现。然而类风湿因子只出现在约 2/3 的 RA 病人中,而且存在于其它类风湿和非类风湿病中,甚至高达 5%的健康人群(随年龄增长程度更高)中。类风湿因子的出现似乎是机体在某些病理状态下(如细菌性心内膜炎)的一种生理反应,对 IgG 有特异性的自身反应性 B 细胞似乎存在于大部人群中并可被不同机制所激活。然而术语“类风湿因子”因其只提供对 RA 的诊断和预后意义,故仍被保留。

然而,此同样的特征也可定性地用于几乎所有迄今所知的 RA 自身抗体:抗体阳性的病人频率显然不到 100%,而且对此病的部分特异性(诊断)也显然不到 100%。就此病模式而言,所声称的 RA 临床不均一性的炎症强度和周期性特征与免疫失调的不均一性相符合。此种临床和免疫学不均一性也支持以下推测:“类风湿关节炎”也许是不同疾病的统称。其典型例子是 RF 阳性和 RF 阴性(RF 类风湿因子)RA 之间的区别,对此,前者据称因较高破坏性潜力和系统性体液活性而具有更严重进程。术语“血清阴性”错误地暗示甚至缺乏自身抗体。然而,不能证实类风湿因子或其它已知的自身反应性的任何一种是产生 RA 或其假定亚型之一或恶化形式的病因。

自身抗体可用于其它类风湿自身免疫病,如系统性红斑狼疮(SLE)为主要成员的胶原性疾病的诊断性分类。这些自身抗体的主要致病性已经过长期和反复讨论。可肯定在此病周期性发作和随后形成免疫复合物及补体激活期间,与无序过度释放的自身抗原结合的高滴度自身抗体与器官损伤特别是肾损伤以及脉管炎特征相关联。然而尚没确定 RA 中自身反应性 B 和 T 细胞的作用,而是始终提到新的自身抗原为 RA 中自身反应性免疫应答的靶标。这些抗原中某一些的生化和抗原性特征已明确确定,然而对其余抗原只了解到几个参数。对这些自身抗体中的一些,曾认为有非常好的应用前景,因为 B 或/和 T 细胞应答反应看来对 RA 是高度特异性的。然而,当在其它自身免疫性疾病中也检测到相同的自身反应性时,对这些抗体的兴趣迅速消失。同时,发现 RA 有许多 T 细胞相关的自身反应性,但只有很少几种是 RA 特异性的。

热休克蛋白

不久就怀疑 RA 是一种传染病。因此,研究了大多数细菌或病毒病例中异种抗原来源的多样性,以检测起着自身反应性触发剂作用的潜在性病原体。可能的 RA 诱导剂之一是结核分枝杆菌,因为它在动物模型中可诱生佐剂性关节炎,一种在某些方面类似于人 RA 的疾病。分枝杆菌的热休克蛋白 65(mt-Hsp65)或该抗原的特异性 T 细胞也能诱生此实验性疾病。热休克蛋白支持天然蛋白质产生其正确的三维结构,从而产生三级和四级结构。mt-Hsp65 与哺乳动物中必须的 Hsp60 同源。关于 RA 病人滑液中的 mt-Hsp65 特异性 T 细胞和抗体的报道提示,高度同源性的 Hsp60 可能在 RA 病人中被识别为一种抗原,然而这些抗体不是 RA 特异性的,它们也出现在患赖特(Reiter)综合征、SLE 和活动性结核病病人以及健康人中。

虽然对 mt-Hsp65 的反应性在 RA 中似乎不起主要作用, 但人 Hsp60 在 RA 发病中可能是重要的。在其氨基酸序列中人 Hsp60 的 11-12 氨基酸区域与某些蛋白质如细胞角蛋白和 Hsp90 相同。因此可以想到针对这些蛋白质的自身反应性 T 细胞或抗体来源于天然存在但严格调节的 Hsp60 的反应性。

Dna J

细菌应激蛋白 Dna J 与哺乳动物 Hsp70 同源, 其氨基酸序列 QKRRA 以“共享表位”命名而较有名, 赋予了对 RA 的易感性(3)。该表位也见于 EB 病毒(EBV)编码的蛋白质 gp110 中。Dna J 是 RA 病例中自身反应性 T 细胞的靶子, 但不存在于健康人中(4)。虽然仍不知道此共享表位以何种方式赋予对 RA 的易感性, 但可想到的一种机制可能是从非 MHC-蛋白质产生了该共享表位肽, 然后在 MHC 类分子上提呈, 因而诱导了对外来 EBV-gp110 和自身 MHC 类分子的免疫应答反应。

EBV 编码的核抗原

不久即怀疑 EB 病毒(EBV)引起了 RA, 虽然最近才可能在 RA 病人的滑液中检测到该病毒。针对 EBV 编码的核抗原(EBNA-1)的抗体显示与 RA 患者滑膜间皮细胞的 p62 蛋白质强烈反应。EBNA-1 含有富含甘氨酸-丙氨酸的重复序列(IR-3), 其可为 RA、SLE、全身性硬皮病(SSc)和传染性单核细胞增多症患者中的自身抗体所识别, 但在健康个体中也以相当的频率出现。EBNA-1 显示能与许多人体蛋白质发生交叉反应, 通常是通过该 IR-3 序列。其中, 基本的例子是 p62 和 p542, 后者主要为传染性单核细胞增多症病人的但也为 RA 病人的抗体所识别。由于 p542 与命名为“Raly”的小鼠 hnRNP 的序列高度相同性和与人 hmRNPC2 相似, 最近被鉴定为 hnRNP 的 71k 组分。

Sa-抗原: Filaggrin, 瓜氨酸化的肽/蛋白质

Sa-抗原(5)和 filaggrin 是最近发现的两种抗原, 不存在于发炎的关节中, 但因其引起 RA 特异性高免疫应答反应而引人注目。Sa-抗原是人脾脏和胎盘产生的一种 50k 蛋白质。Sa-特异性抗体出现于 43%的 RA 病人, 具有 78%-99%疾病特异性。Filaggrin 是一种 42k 蛋白质, 负责交联中间性纤丝(特别是在细胞角蛋白中)并且存在于内皮中。Filaggrin 特异性抗体显然与很早以前报道的“抗核周(间)隙因子”和所谓的抗角蛋白抗体相同。抗 Filaggrin 抗体所识别的该表位主要决定簇是瓜氨酸, 一种翻译后修饰的精氨酸(6,7)。这些抗体的灵敏度在 36%-91%之间, 特异性在 66%-100%之间, 虽然 filaggrin 只存在于关节外, 但在滑膜细胞中已同时成功地检测到瓜氨酸。

胶原 II

II 型胶原是关节软骨的主要成分, 似乎易被接受为 RA 自身抗原, 因此许多研究从事于这种胶原的特异性免疫应答反应。能与牛 II 型胶原反应的小鼠 T 细胞, 对也出现在人 II 型胶原中的一个表位有特异性, 该表位与患胶原诱生关节炎的小鼠的一个重要的 T 细胞表位重叠。II 型胶原是一种胞外基质成分, 其本身由更大的

前胶原经加工而由相同的原胶原亚基形成三个螺旋。对胶原具有特异性的 B 细胞似乎以更显著的方式出现在 RA 病人的发炎关节中。II 型胶原特异性 T 细胞见于 RA 病人和健康个体中。

胶原反应性在 RA 的口服抗原耐受性研究中引起了特别关注。动物模型中, 可通过(自身免疫性)炎症腔室中存在的但其本身不一定参与炎症过程的抗原来诱导口服耐受性。如果口服给予这种抗原可使对所服食抗原具有特异性的 T 细胞显著地耐受, 能通过抑制性细胞因子如 IL-10 和 TGF- β 在另一部位即发炎关节中, 产生所谓的旁观者(Bystander)抑制。II 型胶原特异性 T 细胞能下调 RA 中的炎症, 然而三次安慰剂实验的口服耐受双盲研究, 不能证明应用 II 型胶原时此病活动性有显著改善。类似结果也见于采用 Hsp65 的肽所作的临床研究(Subreum)。

软骨细胞抗原 65(CH65)

据报道软骨细胞膜是 RA 和关节病患者中自身反应性 T 细胞的靶子(8), 而正常供体的 T 细胞不显示这种反应。此外, 70%RA 病人的自身抗体能识别软骨细胞膜, 这种抗原是软骨特异性的 CH65, 它与分枝杆菌 Hsp65 和某些细胞角蛋白有序列相似性。CH65 有高比例的甘氨酸, 此与 Hsp 相似但不相同。虽然与角蛋白的序列相似, 但它们对角蛋白是完全非典型的。这种类似性引起了人/分枝杆菌 Hsp 和其它蛋白质之间有分子模拟的想法。然而 CH65、细胞角蛋白或 Hsp65 特异性单克隆抗体之间未发现有交叉反应, 只研究了 T 细胞对非纯化软骨细胞膜的反应性。

HC gp39

只在小部分病人和对照人群中测到滑液中存在许多抗原。一个例子是人软骨糖蛋白(HC gp39), 一种由关节软骨细胞、滑膜细胞、分化晚期巨噬细胞和嗜中性白细胞分泌的重要产物。退行性关节病患者血清和滑液中的 gp39 水平比健康个体升高。后来显示其滴度的升高不仅见于骨关节病病例, 也见于结肠直肠癌、酒精引起的肝硬化和乳腺癌病例中。gp39 不仅在组织再生和胞外基质降解中起作用, 还是 RA 自身反应性 T 细胞的靶子。因此, 也测试了衍生自 gp39 序列的肽结合 HLA-DR4(DRB1*0401)和刺激 T 细胞的能力。在 18 位 RA 病人中有 8 个和 11 位健康人中有 3 个测到 gp39 反应性 T 细胞。动物模型中, 免疫 Balb/c 小鼠导致间歇性发作的慢性关节炎, 但经鼻给予 gp39 能治愈。

类风湿因子

RA 中了解得最清楚同时无组织特异性但可能几乎普遍存在的自身抗原, 是免疫球蛋白 G(IgG)成为所谓的类风湿因子(RF)抗体的靶子。类风湿因子仍然是包括在美国类风湿学会标准(ACR-标准)中的唯一血清学参数。RF 与 RA 的病理学关系仍有争论, 因为 RF 也见于 SLE、Sjögren 综合征、心内膜炎和肝病病人中, 甚至健康人中。RF-滴度并不与 RA 的临床或血清学活性或与关节破坏程度严格相关。

hnRNPA2-蛋白质(RA33)

属于人的核内核糖核蛋白质(hnRNP)的 A2-蛋白质是一种普遍存在的蛋白质,

最初描述为 RA33 自身抗原。随后,显示了它与 A2-组分的相同性和它与 SLE、混合性胶原病(混合性结缔组织病, MCTD)和其它疾病病人血清的反应性。A2 与许多代表细胞核中 hnRNP 的其它因子形成复合物而存在。不清楚 A2 的确切功能,虽然有人提出它有剪接人核内核糖核酸(hnRNA)的功能。因此, A2 提供了两个 RNA 结合功能域和核输入/输出信号。RA 和 SLE 病人的抗体针对 RNA 结合功能域之间的区域;而 MCTD(混合结缔组织疾病)病人的抗体识别由两个 RNA 结合功能域组成的一个不连续性表位。尚不清楚免疫系统怎样接触 A2。然而,从侏儒观点看, hnRNP 是 RA 的优良候选抗原。迄今只可能推测在某些情况下 A2 可能到达细胞表面,如在炎症过程中细胞衰退时。

钙蛋白酶抑制蛋白(Calpastatin)

钙蛋白酶抑制蛋白是一种遍在的胞质蛋白质,分子量 72k,具有 4 个钙蛋白酶抑制功能域。钙蛋白酶(Calpain)包括一个半胱氨酸蛋白酶家族,该家族怀疑参与类风湿病的关节破坏。钙蛋白酶存在于胞质中,其激活受钙离子严格调节,并受钙蛋白酶抑制蛋白的抑制。细胞激活后,钙蛋白酶抑制蛋白也出现于细胞外,因而可被抗体接触。RA、SLE、多肌炎/皮肌炎(PM/DM)、MCTD、活动性关节病和静脉血栓形成患者的自身抗体可识别钙蛋白酶抑制蛋白。在钙蛋白酶抑制蛋白缺陷大鼠的动物模型上不能诱导关节炎症状。RA 和 OA 病人的发炎关节中存在有钙蛋白酶抑制蛋白、钙蛋白酶和钙蛋白酶抑制蛋白特异性抗体,它们可能参与这些疾病的发病过程。

肌钙网蛋白(Calreticulin)

肌钙网蛋白是一种内质网(ER)遍在性蛋白质,在某些情况下也出现在细胞核、胞质中和细胞表面。它构成了高度保守的 Ca^{++} 结合蛋白质。肌钙网蛋白在许多不同的自身免疫病或炎症性疾病中,主要在 SLE 和盘尾丝虫病中,以及在 RA 中,是自身抗体的靶子。而且 RA 相关的单元型 DR4Dw4/DR53 能结合肌钙网蛋白衍生的肽。

BiP(重链结合蛋白)

RA 侏儒的另一种有希望的靶抗原是遍在性 BiP(结合蛋白),它最初被描述为重链结合蛋白,因为它能与免疫球蛋白的重链相互反应。BiP 本身是 ER 常驻蛋白参与在正常情况下防止蛋白质输出的一种肽序列。同时已揭示 BiP 是一种所谓的分子伴侣蛋白,其作用是与大多数蛋白质相互反应,从而将蛋白质引入内质网(ER)进入分泌通路。除了这种基本的功能特性外, BiP 在应激因素如重金属离子或影响细胞内钙离子水平或蛋白质生物合成完整性的物质的作用下过度表达。这些情况下甚至可在核中以及细胞表面检测到 BiP。

BiP 在 66%的 RA 病人中是自身反应性抗体的靶子。其原先在 RA 中描述为 p68,这些自身抗体的疾病特异性为 99%,极高。该抗原是 O-糖基化的,有人提出这种修饰可能具有调节功能,象许多其它蛋白质中的单体 O-GlcNAc 那样。这些蛋白质

中,从 O-GlcNAc 转变成 O-磷酸修饰与活化状态或细胞区室的变化有关。以类似方式,应激可诱导 BiP 从内质网转移到细胞核或细胞表面,可能是一种病理相关性转变。BiP 存在于细胞表面是非常不一般的,可能起着报警信号或其它细胞和免疫系统细胞激活的作用。RA 中这种激活可能发生于局部感染或炎症对组织的破坏。因细胞或组织损伤, BiP 可能到达受损细胞表面成为自身反应性 T 细胞的靶子。这提示,这些 BiP 反应性 T 细胞也存在于天然情况下,此时调节性 T 细胞在诱导条件终止后下调了这些反应性 T 细胞。该调节性细胞是抗原特异性和 HLA 限制性的。因此 HLA 对调节性 T 细胞的限制显然不同于 HLA 对效应 T 细胞的限制,从而受到特异性抑制。在本文中,表位 O-GlcNAc 可能还具有重要作用,可以充分想象,该表位不仅是自身抗体应答的靶子,也是 T 细胞应答的靶子。

从滑液中分离得到的另一种蛋白质是 p205 抗原,然而其功能大大超过此区室,它是 RA 病人中自身反应性 T 细胞的靶子。也在 p205 滑膜中表达,可能构成了整个 RA 中具有最高 T 细胞刺激能力的抗原,部分达到 T 细胞的增殖速率,它获自滑液或甚至借助植物血凝素(PHA)而获得。p205 抗原的功能尚不清楚,然而它含有一种 11 个氨基酸的序列,与 IgG 的恒定区 CH2 和 CH3 之间的区域(类风湿因子结合区域)的一段相同。p205 的该区域是单克隆类风湿因子的结合区,也为自身反应性 T 细胞所识别。另外,当 p205 特异性 T 细胞受同源抗体刺激时,对分泌类风湿因子的 B 细胞有支持作用,这样必须假定,对于首次发现的这个具有 T 细胞反应性的抗原,还能支持 IgG 特异性 B 细胞的亲和力成熟。与此假定相反,迄今未能发现 T 细胞对完整 IgG 或 IgG 片段的反应性。有可能 p205 的这个氨基酸序列所构成的肽在体内 IgG 加工过程中不产生或不能充分产生。因此似乎有可能是对 p205 的自身反应性在 RA 中诱导产生了类风湿因子。

RA 相关的自身反应性的这个概述显示,许多不同的自身抗原在 RA 过程中可成为免疫系统的靶子。这些自身抗原在其它类风湿和非类风湿疾病病人,甚至健康人中也不同程度地成为免疫系统的靶子。因此,必须声明,根据目前的知识,既非早期阶段也非其进程中,无自身反应性本身适合于改进 RA 的诊断或监测各种治疗过程。

本发明的特征

本发明的目的是改进和支持慢性炎症性关节疾病的诊断和治疗。这个目的通过提供“慢性炎症性关节疾病和其它炎症性、传染性或肿瘤性疾病的诊断、分子分辨和治疗开发的方法”来实现。这些方法描述如下。

高通量方法,如 DNA 阵列或蛋白质阵列技术能同时检测大量不同的参数(9)。可借助 DNA 阵列通过标记的 RNA 或 cDNA 样品的杂交在 mRNA 水平上,和通过含有选择的蛋白质特异性抗体的阵列在蛋白质水平上,分析基因表达(10)。而且,可利用含有选择的抗原阵列来评估免疫反应性(11)。

首先,必须确定与该病相关的并可用于评价的基因和蛋白质。

设计用于炎症性关节疾病诊断和治疗开发的本发明方法,基于如此明确选出的参数(表 1 和 2)。采用本文给定的基因通过阵列方法作基因表达分析,为一种基本上新的诊断方法预作了准备。

对用于测定关节疾病中特异性 mRNA 表达模式的 DNA 阵列,表 1 给出了可整体利用的基因,以及编码表 2 所述蛋白质的所有基因。而且可利用表 1 列出的这些基因或单个基因的部分序列或选择这些基因/部分序列,以及编码表 2 所述蛋白质的这些基因或单个基因的部分序列/部分序列或选择这些基因/部分序列。

为了特征鉴定自身免疫反应性,可全盘利用表 2 所述的蛋白质,以及表 1 基因所编码的蛋白质,而且也可采用这些蛋白质的有限选择,这些蛋白质的选择部分(寡肽或多肽形式)或其修饰形式。在蛋白质水平上,还必须特别考虑翻译后修饰(如糖基化、磷酸化等)可能与风湿病之间的差别有关,可将这些蛋白质、部分蛋白质序列、修饰的蛋白质和修饰的部分蛋白质序列,分别或组合在一起施加在合适的载体基质上以测定病人的抗体对这些成分之一或几种的反应性。结果获得了病人的反应性或无反应性概貌图。现有技术的诊断方法和本文提出的诊断方法之间的关键性区别是,现有技术的方法测定和分析各个病例中的一种自身反应性,而本发明是测定和分析多种自身反应性。本发明利用了以下出乎意料的发现:即将几种自身反应性组合成一个或多个模式图(当单独考虑时它们不会产生)而得以区别,因为此方法可在 100%病例中鉴别 RA 和非 RA(即其他风湿性疾病和非风湿性疾病及健康状态)。分类成不同的概貌图可通过适当的算法来实现,最佳形式是通过自身学习(self-learning)算法,该算法还可能包括后面的发现。

为了测定蛋白质表达模式,已从蛋白质特异性抗体开发了阵列系统。通过标记样品蛋白质抽提物中的蛋白质,在特异性结合于该阵列中的相应抗体后,可定量测定这些蛋白质(10)。因此,本发明意义上的分子工具定义为一种阵列,该阵列由具有相当的蛋白质特异性结合能力的不同抗体或分子组成,设计用来测定从表 1 那些基因推导的所有蛋白质或选择的蛋白质,或测定表 2 的所有蛋白质或选择的蛋白质。

该诊断方法采用滑膜组织、滑液、血细胞、血清或血浆的活检样品作各种不同的阵列分析。该方法中可分析液体样品的体液自身反应性、血细胞或滑膜组织细胞中的细胞自身反应性。可分析所有上述样品的蛋白质表达,滑膜组织、滑液细胞或血细胞中 mRNA 水平的基因表达。

为了用 DNA 阵列分析,需提取组织或血液、滑液中细胞样品的 RNA。制备供 DNA 阵列杂交的样品,采用标准的扩增程序(12),标记衍生的 cDNA 或 cRNA(12)。

表中所述基因通过其已知序列(见登录号 GeneBank-<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)提供了产生各个基因特异性探针的基础。以特定的印制方法(14)加入制备的探针或在固相上以光刻法位点特异性合成(15,16)将这些探针组合在一个阵列中。

标记的样品在阵列上的杂交，通过位点和基因特异性结合提供了定量信号：可将这些信号翻译成表达概貌/模式。将这些模式与已建立的评价方法包括组织学特征和分类相关连，再与不同的关节疾病如骨关节炎、牛皮癣相关性关节炎、反应性关节炎疾病以及其它(部分还是)非分化性关节炎疾病相比较，从而得以将病人按照各自的表达概貌分成不同的组。

本方法的新颖性

为了确定该阵列分析用于关节疾病分类和评价的值得信任的参数，进行了广泛的比较研究。为此目的，研究了不同的关节疾病并选择了不同方法彼此部分互补的一种崭新组合。

分析了 RA、骨关节病和健康关节的滑膜组织。为了进行基因表达的差异性分析，首先进行了“代表性差异分析”(17,18)。此技术的优点是包括了样品中存在的所有 RNA，即使不知道它们的序列。缺点是要对最强烈显示的表达差异作深入细致的选择。作为补充，我们还通过两种不同的 DNA 阵列杂交方法测定基因表达：一种是 cDNA 过滤阵列(19)，另一种是寡核苷酸显微阵列(美国专利号 5445934, 5744305, 5700637 和 5945334 以及欧洲专利号 619321 和 373203)，这些基于当前知识的显微阵列使得能测定几乎所有的已知人类基，并进行这些基因中的每一种在组织样品之间的表达比较分析。最后，通过半定量聚合酶链反应(PCR，实时 PCR)综合验证大样本中所选基因的差异性基因表达。

而且，对组织作组织学特征鉴定，按照组织学分类并与各自的差异性基因表达模式作比较。表 1 中的基因鉴定为不同的慢性关节疾病之间和与正常滑膜组织比较差异性表达的基因。因而，这些基因对于特征鉴定慢性关节疾病是重要的。

用于鉴定相关基因的该选择方法也具有新颖性。已鉴定基因的该表还显示，大多数基因是迄今与炎症性类风湿关节疾病无关的，还显示了诊断、病理生理研究和治疗慢性关节疾病的新的评价标准。

本发明的特征由权利要求各要素和说明书加以公开和详细说明，一种特征和几种特征以组合形式构成了优选的实施方案，本说明书申请对其进行法律保护。这些特征包括已知的各要素，即表 1 所述的基因或部分序列和表 2 所述的编码诸蛋白质的基因和部分序列，以及新的要素，即以利用明确选定的参数(表 1 和表 2)为基础的新的工具-它们组合形成了本发明的方法，利用上述基因以阵列方法进行基因表达分析，从而产生了一种从根本上说是新的诊断炎症性关节疾病和治疗开发手段的方法。

本发明的方法是基于(显微)阵列杂交的高处理量方法和/或采用聚合酶链反应技术进行(半)定量的高处理量方法。

这些方法的其它特征是基于采用标记的病人样品和采用第二种不同标记的对照样品，用于与病人样品一起进行(显微)阵列比较性(红/绿)双杂交。也可以在不同阵列上分析这些样品，然后作比较。根据本发明，这些用于诊断目的的方法是依据

利用：

-权利要求 1 到 3 所述诸基因序列推导的一种蛋白质或多肽，选择的一组蛋白质或多肽，或其全体；

-表 2 所述的各个蛋白质，从所有蛋白质中选出的一组蛋白质；和

-来自表 1 所述各个蛋白质、一组蛋白质或所有蛋白质的部分序列。

这些方法包括与表 1 推导的蛋白质序列相同的或与表 2 所述蛋白质序列相同的、或显示各自序列相同性至少 80%的蛋白质或部分蛋白质序列。这些方法的其它特征基于采用：

-分析蛋白质表达的高处理量方法(高分辨率的二维蛋白质凝胶电泳，MADLI 技术)；

-蛋白质斑点技术(蛋白质阵列)领域中设计用来筛检自身抗体的高处理量方法，作为人炎症性关节疾病和其它炎症性、传染性或肿瘤性疾病的诊断工具；

-蛋白质斑点技术(蛋白质阵列)领域中设计用来筛检自身反应性 T 细胞的非高处理量方法，作为人炎症性关节疾病和其它炎症性、传染性或肿瘤性疾病的诊断工具；和

-蛋白质斑点技术领域设计中设计用来筛检自身反应性 T 细胞的非高处理量方法，作为人炎症性关节疾病和其它炎症性、传染性或肿瘤性疾病的诊断工具。

本发明的方法还基于采用：

-针对权利要求 6 至 9 所述的蛋白质或部分序列的特异性抗体；和

-用于动物实验分析或动物炎症性关节疾病和其它炎症性、传染性或肿瘤性疾病诊断的其它种系的各自同源性序列。

本发明的方法可用作检测以下遗传改变(突变)的诊断工具：

-权利要求 1 至 3 所述基因中的基因或调控序列(启动子、增强子、沉默子、结合其它调节因子的特定序列)中的遗传改变(突变)；

-编码表 2 所述蛋白质的基因中的基因或调控序列(启动子、增强子、沉默子、结合其它调节因子的特殊序列)中的遗传改变(突变)。

此外，这些方法也适合于作为人炎症性关节疾病和其它炎症性、传染性或肿瘤性疾病的分子分辨工具，利用权利要求 1 至 3 所述的基因、DNA 序列或推导的相应蛋白质或多肽和权利要求 6 至 9 所述的蛋白质和部分蛋白质序列或各自的编码基因序列。

本发明的方法还可作以下应用：

-采用权利要求 1 至 3 所述的基因、DNA 序列或推导的相应蛋白质或肽，对人炎症性关节疾病和其它炎症性、传染性或肿瘤性疾病的诊断选择；

-采用权利要求 1 至 3 所述的基因、DNA 序列或推导的相应蛋白质或肽，人炎症性关节疾病和其它炎症性、传染性或肿瘤性疾病的进程/治疗效果的监测；

-开发治疗观念的分子工具，包括直接或间接影响权利要求 1 至 3 所述基因或

基因序列的表达;

-开发治疗观念,包括直接或间接影响权利要求6至9所述诸蛋白质或部分蛋白质序列的表达;

-开发治疗观念,包括直接或间接影响针对权利要求8至11所述诸蛋白质或部分蛋白质序列的自身反应性T细胞;

-影响权利要求1至3所述基因序列推导的蛋白质的生物学作用;

-影响权利要求1至3所述基因序列及其推导的蛋白质的直接分子调节通路/环路;

-开发建立和利用解释算法的治疗观念,从而利用上述基因和序列以及它们的调节机制以认识或预计治疗观念、治疗效果、治疗优化或疾病预后;

-利用权利要求1至3和6至9所述的基因、基因序列、基因或基因序列的调控、或利用蛋白质、蛋白质序列、融合蛋白质、或利用权利要求10至14所述抗体或自身反应性T细胞开发生物活性药物(生物制品)。

发现本发明要求保护的方法可用于

-在医学诊断中分析血液样品或组织样品,

-应用于按照实施例1的分析,和

-应用于按照实施例2的治疗概念。

材料和方法

病人和组织评估

所有病人按RA(1)和OA(2)的ACR标准选择,将滑膜组织立即在含青霉素、链霉素各100U/ml的RPMI培养液(RPMI,常规细胞培养液、稀释的RPMI 1640; Moore GE等 J.Am. Assoc.199,519~524,1967)中从手术室转运至实验室。制得滑膜后将样品立即冻存于液氮中。然后,存放在-80℃直至使用。作为用于代表性差异分析(RDA)、Unigene 滤膜阵列(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/>)和 Affymetrix 阵列杂交的样品,我们采用了正常供体(ND)、骨关节炎(OA)和类风湿性关节炎(RA)的滑膜组织样品。

分离 RNA

将各样品制成匀浆以提取RNA:用研钵和捣锤,同时用液氮冷却,将50mg以下的组织破碎成粉末,然后溶于含异硫氰酸胍的溶液(RLT-缓冲液, Qiagen, Hilden, Germany, www.qiagen.com/literature/hankboods/rna/rny96/1019545_PR_EHB_RNY96_prot2.pdf)中。较大量的组织块则用组织匀浆机(IKA-UItra-Turrax T25; Jahnke & Kunkel, Staufen)在冰冷的含异硫氰酸胍的溶液 RLT-缓冲液, (Qiagen, Hilden, Germany)中破碎。用改良的Chomczynski(21)酚-氯仿抽提法分离RNA,然后用QIAGEN的RNA试剂盒(见制造商的手册: <http://www.qiagen.com/literature/rnalit.asp#mini>)立即从水相中分离出RNA。按制造商程序使用此试剂盒。以30-100微升无RNA酶的水洗脱RNA。

为控制质量,测定 260nm 处光密度(OD260),测定 OD260/ OD280nm 比值并作 1%琼脂糖凝胶电泳。如需要,可在凝胶中或在第一次标准合成后在 PCR 中用甘油醛-3 一磷酸脱氢酶(GAPDH)的内含子引物测定 DNA 污染。在这些特殊情况时,我们也用 DNA 酶消化,按照 QIAGEN 方案的说明书进行。

第一次链合成

采用含有 Invitrogen/Life Technologies (Karlsruhe.Germany ; <http://www.invitrogen.com>)的 5X 反应缓冲液的 Superscript II 逆转录酶(RT)进行 cDNA 合成。半定量 PCR 所用的 RNA 量为 3-5 微克, RDA 为 10-20 微克,并在 20 微升最终体积中作阵列杂交。转录成为 cDNA 的反应混合物含有以下成分: 500 纳克各个引物寡核苷酸(Oligo(dT)₁₂₋₁₈, T7-Oligo(dT)₂₄), 50mM Tris(pH8.3), 75mM KCl, 3mM MgCl₂, 10mM 二硫苏糖醇, 脱氧核苷三磷酸(dNTP)与最终浓度为 1mM 的各核苷酸的混合物, 40U 的 RNA 酶抑制剂和 20U 的 Superscript™ II RT。培育 1.5 小时, 然后将样品加热至 72℃ 15 分钟, 灭活酶。

第二次链合成

用移液器将下述成分加入 cDNA: 90 微升蒸馏水, 30 微升 5X 第二链缓冲液(500mM KCl, 50 mM 醋酸氨, 25 mM MgCl₂, 0.75 mM β-烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(β-NAD)和 0.25mg/ml 牛血清白蛋白(BSA), 3 微升 10mM dNTP 溶液, 以及以下活性和量的酶溶液: 1 微升大肠杆菌连接酶(10U/微升), 4 微升 DNA 聚合酶 I(10U/微升)和 1 微升 RNA 酶 H(2U/微升)(Invitrogen/Life Technologies, Karlsruhe.Germany)。16℃ 培育 2 小时, 加入 2 微升 T4DNA 聚合酶(5U/微升)后再 16℃ 培育 30 分钟。

扣除杂交和 RDA

按 RCR 选择试剂盒(Clontech,Palo.Alto,USA; <http://www.clontech.com/pcr-select/index.shtml>)厂商的说明书进行 RCR 抑制性扣除杂交(SSH)(22)。用斑点园红假单胞菌的限制性酶 RsaI 消化双链 cDNA。对于 RDA, 用肺炎双球菌的限制性酶 DPNII(20U/100 微升)切割双链 cDNA(18), 然后, 连接于衔接子引物(RBg112, RBg124), 再按公布的方案(17、18)扩增。通过在第二轮扣除中连接于另一衔接子寡核苷酸(JBg112 和 JBg124 或 NBg112 和 NBg124(18))进一步限制性消化后, 获得测试者一扩增子。

杂交后将属于测试者的序列以 PCR 选择性扩增并积累在两方法的扣除产物中。

扣除样品的描述

如此改进 RDA 程序使之有可能鉴定以较弱方式和以较显著方式表达 RA、OA 和正常组织供体样品中的基因。

在这个程序中:

1、从 RA(测试者)中减去 OA(驱动器), 以获得显示在 RA 组织中比在 OA 组织

中更强表达的序列。

2、从 ND(测试者)中减去 RA(驱动者), 以获得显示在 RA 样品中比在 ND 样品中更弱表达的序列。

3、从 OA(测试者)中减去 ND(驱动者), 以获得显示在 OA 组织中比在 ND 组织中更强表达的序列。

执行扣除库克隆, 序列确定和与数据库的比较

将 SSH 样品的扣除产物克隆入 pCRII 载体 (TA- 克隆试剂盒 Invitrogen, Heidelberg, Germany, <http://www.invitrogen.com>) 中。将 RDA 的扣除产物克隆入事先已用淀粉液化杆菌的限制性酶 BamHI 切割、然后脱磷酸化并纯化的 pBluescript KS⁺ II 载体 (Stratagene, La Jolla, USA; <http://www.stratagene.com/vectors/selectim/plasmid.htm>) 中。分离得到约 150 个克隆并用 ABI 377 测序仪 (Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany; <http://home.appliedbiosystems.com>) 测序。采用 T7 引物按厂商 Dye Terminator Chemistry 的程序进行序列测定。

去除载体序列后, 用 Genebank 和 NCBI 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 进行序列的比较分析。

显微阵列杂交

采用了两种不同的芯片技术: 1) 采用其上点样了 UNIGENE 库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/>) cDNA 克隆的 PCR 产物的滤片。用 Oligo(dT)₍₁₂₋₁₈₎ 第一次链合成后, 于 65°C 与 ³²P-标记的 cDNA 样品进行杂交 (23,24)。2) 与 Affymetrix (Affymetrix Inc., Santa Clara, USA; www.affymetrix.com) 的显微阵列 (HU95A、HU95B、HU95C、HU95D 和 HU95E) 进行杂交。这些阵列是其碱基序列衍生自总共 12000 个已知基因和 24000 个表达的序列标记 (EST) 的寡核苷酸阵列。标记样品的合成按厂商的技术手册 (Affymetrix Inc, Santa Clara, USA) 进行。

用含有 T7 聚合酶结合位点的 Oligo-dT₂₄ 引物转录后合成了荧光标记样品。标记反应用 T7 RNA 聚合酶和生物素化 dNTP 按厂商程序进行 (ENZO-Biochem, New York, USA; <http://www.enzo.com/entrance.html>)

在两种芯片分析中, 使待测样品和参比样品分别与滤膜杂交。标准化后进行信号强度比较。

芯片结果的评价-判定矩阵

标准化后, 借助用于各自阵列的开发软件和按照 Tukey's Biweight 方法 (<http://mathworld.wolfram.com/TukeysBiweight.html>) 测定各样品的强度值, 进行信号强度的评价。

为了评价 Unigene 滤片阵列, 在 Berlin-Dahlem 的 Max-Planck 分子遗传学研究所开发了算法 (<http://algorithms.molgen.mpg.de/>)。就 Affymetrix 的芯片而言, MicroArraySuite 5.0 软件 (<http://www.affymetrix.com/products/software/specific/mas.affx>) 包括采用厂商的标准参数或先决条件。

为了评价 Affymetrix 阵列, 将靶子的强度设定为 100, 标准化系数设定为 1, 以使数据标准化。并计算出各样品的换算系数。比较性分析中包括了具有可比换算系数(系数<4)的芯片。将基因检测的判定标准(判定 P 值)设为<0.05。各阵列的比较性分析用 Affymetrix 的 DMT 3.0 软件进行 (<http://www.affymetrix.com/products/software/specific/dmt.affx>)。

精确匹配和精确与错配强度之间的差异用 Wilcoxon 检验 (<http://faculty.vassar.edu/comry/wilcoxon.html>)计算, 并与判定标准截留值(γ 值<0.04)比较。在各芯片比较结果的说明中以对数形式标出变化的得分(Change-Call)(增加、数量级增加、无变化、降低)和信号的对数比率(系数变化的一种衡量)。

判定标准

对所有样品进行了各种比较性分析(每一样品与其它组: ND、OA、RA 的每一样品比较)。

就 Unigene 滤片杂交而言, 4 次比较至少有 3 次的信号差异>2, 故考虑判定信号的 P 值<0.01。

Affymetrix 阵列的程序如下: 在表达增加和降低的方向上将每一个 RA 样品与每一个 OA 样品比较。选出这些比较中 80%显示“增加”或“降低”离差规律系数(regulation factor)>2(信号的对数比率>1)的基因作为候选基因, 以 U95A 芯片为例, 确定其选择标准为规律系数>3。

半定量 RCR

从测定的序列区开始, 我们选择具有类似退火温度和产物长度的引物。为了搜寻引物采用了 DNASTAR 引物选择软件(DNASTAR Inc., Madison, USA; <http://www.dnastar.com/>), 在 Gibco-Life Technologies (Karlsruhe, Germany)进行了引物合成。对于 PCR 产物的半定量测定, 采用了实时 PCR-System GeneAmp5700 和 Sybr-Green-PCR-Core 试剂盒 (Applied Biosystems, Weiterstedt, Germany; <http://europe.appliedbiosystems.com/>)

借助 GAPDH 特异性引物实时括增的结果, 将所有样品的 cDNA 量置于同一等级, 将 GAPDH 特异性产物作为内标进行了其它几种基因产物的定量测定。作为对照, 扩增了作为第二管家基因的 α -肌动蛋白并与所有样品作平行分析。

基因名称	登录号	引物位置	产物长度(bp)
VDUP1	NM006472	665...684/863...840	199
TIMP4	U76456	142...159/336...317	194
GPX3	NM002084	424...443/528...510	105
α 肌动蛋白	X00351	654...675/841...819	188
MMP1	X05231	874...875/1080...1057	207

MMP3	X05232	973...996/1157...1136	185
LTBP4	M22490	511...534/760...737	250
GADD45	M60974	457...475/573...557	116
CLU	NM001831	1384...1404/1509...1489	126
Ca12	NM001218	930...949/1049...1031	196

用滑膜样品作组织病理学评价。制备长 6 微米的冰冻切片，空气干燥并用丙醇和甲醇的 1:1 混合液固定。按标准方法作苏木精染色并按组织病理学评价标准分类(25)。

免疫分析的方法和结果

测定了 T 细胞和 B 细胞水平上的 RA 特异性自身反应模式，并以此鉴别该病与其它风湿性或非风湿性疾病。关于 RA 特异性免疫的知识对开发诊断工具有非常重要的意义，可早得多地和更有把握地识别关节炎疾病是 RA 或显示此关节炎病不是 RA，这在当今是可能的。这得以在发生不可逆关节和骨损伤之前通过适当的药物控制 RA。

为此目的，采用了蛋白组学技术，以高分辨二维电泳来产生建立特异性蛋白质模式。用免疫组学筛检已知和未知的自身反应性。通过测序和 MALDI-TOF(26)鉴定具有有效灵敏度和特异性的蛋白质斑点，从而筛选同组中引起 T 细胞自身反应性的那些蛋白。

本发明已建立了 RA 完全特异性的自身反应性模式。在这个分析中，极其重要的是没有单一一种自身反应性表明此特异性，因此只能通过几种自身反应性的组合来达到。可以明确鉴别 RA 病人与其它风湿或非风湿病人的这类模式包括自身抗原瓜氨酸化肽(Cit)、IgG、BiP(重链结合蛋白)、钙蛋白酶抑制蛋白(Calp)、RA33(hnRNPA2)和肌钙网蛋白(Calr)。下表显示了这样的五种自身反应性(RF、Cit、BiP、RA33 和 Calp)的所有可能的组合及“阳性”和“阴性”两种可能情况。RA 中只表达重点示出的模式(统计学相关性 $p < 0.01$, Whitney U 检验; <http://faculty.vassar.edu/lowry/utest.html>)。图 1 显示所有可能的组合对 RA 和对照组二者的灵敏度。该 RA 特异性模式以类似于表 1 的方式重点示出，主要包括各种参数的四倍和五倍阳性。这些自身反应性模式的组合只发生在 RA 中，特异性为 54%。

针对 IgG、Cit 和 BiP 的三种自身反应性的独特 RA 表达模式(RF+ Cit+BiP+和 RF-Cit+BiP+)的总灵敏度为 43%。针对 IgG、Cit、BiP 和 RA33 的四种自身反应性(RF+ Cit+BiP+RA33+, RF+Cit+BiP-RA33+和 RF+Cit+BiP+RA33-)的独特 RA 模式显示总灵敏度为 40%。六种模式的分析灵敏度达到了 60%。

根据第一个研究，这些模式也与早期 RA 病人相关。其它已作过特征鉴定的候选抗原包括 Sa-抗原(5)，它可能由 α -烯醇化酶和瓜氨酸化波形蛋白组成。

RA 免疫反应的鉴定不仅有诊断意义，而且有病因相关性。当鉴定到这些 T 细胞自身反应性引起了早期 RA 时，看来有可能开发出显示特异性效果的治疗方案。

	RF	瓜氨酸	BiP	钙蛋白酶抑制蛋白	RA33
1	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	-
3	+	+	-	+	+
4	-	+	+	+	+
5	+	-	+	+	+
6	+	+	+	-	+
7	+	-	-	+	+
8	-	-	+	+	+
9	+	-	+	+	-
10	-	+	+	+	-
11	+	+	-	+	-
12	-	+	-	+	+
13	+	+	+	-	-
14	+	+	-	-	+
15	-	+	+	-	+
16	+	-	+	-	+
17	-	-	+	+	-
18	-	-	-	+	+
19	-	+	-	+	-
20	+	-	-	+	-
21	+	-	-	-	+
22	-	-	+	-	+
23	+	-	+	-	-
24	-	+	+	-	-
25	+	+	-	-	-
26	-	+	-	-	+
27	-	-	-	+	-
28	-	-	+	-	-
29	-	-	-	-	+
30	-	+	-	-	-
31	+	-	-	-	-
32	-	-	-	-	-

方案 1: 对 RF、瓜氨酸、BiP、钙蛋白酶抑制蛋白和 RA33 自身反应性的模式。

所示为对 IgG(RF)、瓜氨酸、BiP、钙蛋白酶抑制蛋白和 RA33 自身反应性的所有 32 种可能的五种组合。像图 1 一样, RA 特异性组合用颜色重点示出。

优点:

包括了复杂的分子模式, 可通过数学计算式将这些模式分类成组和相宜的等

级。可派生出的分类和与疾病持续时间、临床疾病活动性(疾病活性评分(Ref))、从C反应蛋白增高或沉降速率测得的炎症活动性、放射学上的关节损坏和药物的特殊影响相关的知识,使得从阵列分析中得出以下结论:把临床症状归属于明确的诊断和得以在分子水平上分类的亚组、评价疾病的活动性和预计结局(预后评价)、展望不同的治疗形式、推荐合适的治疗方法(如用氨甲喋呤代替 Leflunomide 或联用柳氮磺胺吡啶和氨甲喋呤代替单用氨甲喋呤),最后监测治疗效果。

在明确实施医学治疗之前和治疗期间采用这些方法,可确定所用基因的哪一些受到药物的影响。从而衡量该药物如何影响受到疾病典型方式改变的基因表达。从这点出发可得出结论:哪一些疾病相关的分子改变不顾这种治疗而仍然有效发生。关于这些病理活性基因功能的知识原则上使我们能够阐明关节疾病的病理生理过程并导出新的治疗观念。

基因的组合

表 1

登录号	单基因整理	基因名	方法	规律
X57809	Hs.181125		RDA	RA>OA
			Affymetrix	
X58141			RDA	RA>OA
X63527	Hs.252723	核糖体蛋白 L19	RDA	RA>OA
U10362	Hs.75864	染色体 5 开放读框 8	RDA	RA>OA
M80244	Hs.184601	NM_003486	RDA	RA>OA
M24594	Hs.20315	具有四个 23 肽重复序列 1 的 干扰素诱生蛋白	RDA	OA>RA
U01244	Hs.79732	fibulin1 同工型 C 前体 NM_006485	RDA	RA>OA
X02761	Hs.287820	纤连蛋白 1, 同工型 1 前原蛋白	RDA	RA>OA OA>NS
L01124	Hs.165590	核糖体蛋白 S13	RDA	NS>RA
M65062	Hs.107169	胰岛素样生长因子结合蛋白 5	RDA	
M15330	Hs.126256	白介素 1 α		
L13210	Hs.79339	Galectin3 结合蛋白	RDA	
X05232	Hs.83326	基质金属蛋白酶 3 前原蛋白		RA>NS, OA
M22490	Hs.68879	骨形态发生蛋白 4	RDA, Affymetrix	NS>RA
AL034397			RDA	OA>NS

M22806			RDA	OA>NS
X06256	Hs.149609	整合素- α 5 前体	Unigene	NS>RA
L49169	Hs.75678	FBJ 小鼠骨肉瘤病毒原癌基因同源物 B	Unigene	NS>RA
AB002409	Hs.57907	小的可诱导细胞因子亚家族 A(Cys- Cys)成员 21	Unigene	RA> NS
X03473	Hs.226117	H1 组蛋白家族成员 0	RDA	OA>NS
M92843	Hs.343586	锌指蛋白 36, C3H 型, 同源物 (小鼠)	Unigene	NS>RA
M21121	Hs.241392	小的可诱导细胞因子 A5 (RANTES)	Affymetrix	RA>OA
U05259			Affymetrix	RA>OA
U80114	Hs.247987		Affymetrix	RA>OA
U81234	Hs.164021	小的可诱导细胞因子亚家族 B (Cys-X-Cys)成员 6(粒细胞趋化)	Affymetrix	RA>OA
D11086	Hs.84	白介素 2 受体 β 链,前体	Affymetrix	RA>OA
X97267			Affymetrix	RA>OA
U23852			Affymetrix	RA>OA
AA522530	Hs.111244	RTP801	Affymetrix	RA>OA
AF037335	Hs.5338	碳酸脱水酶 XII,前体	Affymetrix	RA>OA
U97145	Hs.19317	GDNF 家族受体 α 2	Affymetrix	RA>OA
AA919102	Hs.95327	CD3D 抗原 δ 多肽(TiT3 复合物)	Affymetrix	RA>OA
M63928	Hs.180841	CD27 抗原	Affymetrix	RA>OA
Z49194	Hs.2407	POU 结构域 2 类,相关因子 1	Affymetrix	RA>OA
AL031983			Affymetrix	RA>OA
D15050	Hs.232068		Affymetrix	RA>OA
X92997	Hs.342651		Affymetrix	RA>OA
J03910			Affymetrix	RA>OA
J04132	Hs.97087	T 细胞受体 β 链前体	Affymetrix	RA>OA
M55153	Hs.8265	谷氨酰胺转移酶 2(C 多肽,蛋白-谷氨酰胺- β -谷氨酰胺转移酶)	Affymetrix	RA>OA
M12959	Hs.74647		Affymetrix	RA>OA
AF031815	Hs.89230	钾中间体	Affymetrix	RA>OA

L31584			Affymetrix	RA>OA
X54489			Affymetrix	RA>OA
AF043129			Affymetrix	RA>OA
X59871	Hs.169294	转录因子 7(T 细胞特异性, HMG 盒)	Affymetrix	RA>OA
AI743134	Hs.21858	三核苷酸重复序列含 3 个	Affymetrix	RA>OA
Y13323	Hs.145296	去整合素蛋白酶	Affymetrix	RA>OA
U77735	Hs.80205	Pim-2 原癌基因	Affymetrix	RA,OA> NS
U58515	Hs.154138	壳多糖酶 3 样 2	Affymetrix	RA,OA> NS
M17016	Hs.1051	颗粒酶 B 前体	Affymetrix	RA >OA
X03066	Hs.1802	主要组织相容性复合物,II 类,DO□	Affymetrix	RA,OA> NS
M28170	Hs.96023	CD19 抗原	Affymetrix	RA,OA> NS
L24564	Hs.1027	与糖尿病相关的 Ras	Affymetrix	NS>RA
M68840	Hs.183109	单胺氧化酶 A	Affymetrix	NS>RA
U76456	Hs.190787	金属蛋白酶 4 的组织抑制剂 金属蛋白酶 4 前体	Affymetrix	OA>RA
D13814	Hs.89472	血管紧张素受体 1 NM_004835	Affymetrix	NS>RA
AA420624	Hs.183109	单胺氧化酶 A	Affymetrix	OA>RA
X51757	Hs.3268	热休克 70kD 蛋白 6 (HSP70B')	Affymetrix	NS>RA
U29344	Hs.83190	脂肪酸合成酶	Affymetrix	NS>RA
L19871	Hs.460	激活性转录因子 3 长同工型 NM_004024	Affymetrix	NS>RA
J02611	Hs.75736	载脂蛋白 D 前体	Affymetrix	NS>RA
M12272	Hs.2523	I 类酒精脱 氢酶,□ 亚基	Affymetrix	NS>RA
L34041	Hs.348601	甘油-3-磷酸脱氢酶 1(可溶性)	Affymetrix	NS>RA
L12760	Hs.1872	烯醇丙酮酸磷酸羧化激酶(可溶 性)	Affymetrix	OA>RA
M63978			Affymetrix	RA>OA

S95936	Hs.284176	转铁蛋白前体	Affymetrix	NS>RA
U42031	Hs.7557	FK506 结合蛋白 5	Affymetrix	NS>RA
Z97171			Affymetrix	NS>RA
S69790			Affymetrix	NS>RA
U41843	Hs.295362	DR1-相关蛋白 1(阴性辅因子 2□)	Affymetrix	OA,NS>RA
AL049653			Affymetrix	NS>RA
M31682	Hs.1735	抑制素 □B 亚基前体	Affymetrix	NS>RA
AF009767	Hs.132898	脂肪酸去饱和酶 1	Affymetrix	NS>RA,OA
X02910	Hs.241570	肿瘤坏死因子(恶液质素)		
AB023152	Hs.12183		Affymetrix	NS>RA,OA
U37283	Hs.300946	微原纤维相关糖蛋白-2	Affymetrix	OA,NS>RA
X05451	Hs.159295		Affymetrix	OA,NS>RA
W26480	Hs.132898	脂肪酸去饱和酶 1	Affymetrix	NS>RA
D14874	Hs.394	肾上腺髓质素	Affymetrix	RA>NS
M12174	Hs.204354	ras 同源基因家族成员 B	Affymetrix	NS>RA
M60974	Hs.80409	生长停滞和 DNA 损伤可诱导 □	Affymetrix	NS>RA
S62138			Affymetrix	NS>RA
X16706	Hs.301612	FOS 样抗原 2	Affymetrix	NS>RA
X56667	Hs.106857	钙结合蛋白 2, 全长蛋白同工型 NM_007087	Affymetrix	NS>RA
H15814			Affymetrix	NS>RA
AL021977			Affymetrix	NS>RA
U80055			Affymetrix	NS>RA
U09564	Hs.75761	SFRS 蛋白酶 1	Affymetrix	RA>OA
U14407	Hs.168132	白介素 15	Affymetrix	RA>OA
U27185	Hs.82547	视黄酸受体效应器(他佐罗订诱导的)1	Affymetrix	RA>OA
Z35278	Hs.170019	侏儒相关转录因子 3	Affymetrix	RA>OA
M12886	Hs.303157		Affymetrix	RA>OA
L05424			Affymetrix	RA>OA

L09230	Hs.301921	趋化因子(C-C 基序)受体 1	Affymetrix	RA>OA
L22075	Hs.1666	鸟嘌呤核苷酸结合蛋白(G 蛋白) α 13	Affymetrix	RA>OA
M28130			Affymetrix	RA>OA
M29696	Hs.237868	白介素 7 受体	Affymetrix	RA>OA
M31165	Hs.29352	肿瘤坏死因子 α 诱导的蛋白 6	Affymetrix	RA>OA
M16038	Hs.80887	v-yes-1 Yamaguchi 肉瘤病毒相关原癌基因同源物	Affymetrix	RA>OA
X83490			Affymetrix	RA>OA
D13666	Hs.136348	成骨细胞特异因子 2 (成束蛋白 1 样)	Affymetrix	RA>OA
L10717	Hs.211576	IL-2 可诱导的 T 细胞激酶	Affymetrix	RA>OA
X04500	Hs.126256	白介素 1 α	Affymetrix	RA>OA
U24153	Hs.30692	p21(CDKN1A)活化的激酶 2	Affymetrix	RA>OA
M32315	Hs.256278	肿瘤坏死因子受体 2(75kD)	Affymetrix	RA>OA
U51903	Hs.78993	含 IQ 基序的 GTP 酶活化蛋白 2	Affymetrix	RA>OA
AF002700	Hs.19317	GDNF 家族受体 α 2	Affymetrix	RA>OA
U37518	Hs.83429	肿瘤坏死因子(配体)超家族成员 10	Affymetrix	RA>OA
HG1003-HT1003			Affymetrix	RA>OA
HG3521-HG3715			Affymetrix	RA>OA
AF024710			Affymetrix	RA>OA
U01134	Hs.138671	fms 相关酪氨酸激酶 1 (血管内皮生长因子)	Affymetrix	RA>OA
U27467	Hs.227817	BCL2 相关蛋白 A1	Affymetrix	RA>OA
M79321	Hs.80887	v-yes-1 Yamaguchi 肉瘤病毒相关原癌基因同源物	Affymetrix	RA>OA
J04765	Hs.313	分泌的磷蛋白 1(骨桥蛋白、骨涎蛋白 1, 早期 T 淋巴细胞)	Affymetrix	RA>OA
M21154	Hs.262476	S-腺苷甲硫氨酸脱羧酸 1 前体	Affymetrix	RA>OA
AF098641	Hs.306278		Affymetrix	RA>OA
D63789	Hs.174228	小的可诱导细胞因子亚家族 C,	Affymetrix	RA>OA

		成员 2		
S68134	Hs.351252	cMAP 效应元件调节剂	Affymetrix	RA>OA
AB014515	Hs.323712	KIAA0615 基因产物	Affymetrix	RA>OA
AI800499	Hs.161002		Affymetrix	RA>OA
Y13710	Hs.16530	小的可诱导细胞因子亚家族 A (Cys-Cys)成员 18, 肺的和活化物	Affymetrix	RA>OA
AJ011916	Hs.184376	突触小体相关蛋白 23K	Affymetrix	RA>OA
AF030339	Hs.286229	神经丛素 C1	Affymetrix	RA>OA
X17042	Hs.1908	蛋白聚糖 1, 分泌性颗粒	Affymetrix	RA>OA
AF059214	Hs.194687	胆固醇 25 羟化酶	Affymetrix	RA>OA
D42043	Hs.79123		Affymetrix	RA>OA
M24283	Hs.168383	胞间粘附分子 1 前体	Affymetrix	RA>OA
AF042729	Hs.171776	肌醇(肌)-1(或 4)-单磷酸酶 1	Affymetrix	RA>OA
M64595	Hs.173466	ras-相关 C3 肉毒毒素底物 2	Affymetrix	RA>OA
AA868382	Hs.198253	主要组织相容性复合物 II 类 DQ α 1	Affymetrix	RA>OA
AB006746	Hs.198282	磷脂拼凑酶	Affymetrix	RA>OA
X00437	Hs.303157		Affymetrix	RA>OA
M59287			Affymetrix	RA>OA
AA725102	Hs.51305	v-maf 肌腱膜纤维肉瘤原癌基因同源物 F(禽)	Affymetrix	RA>OA
M97935	Hs.21486	信号转导子和转录活化剂 1, 91kD	Affymetrix	RA>OA
X54134	Hs.31137	蛋白酪氨酸磷酸酶, 受体 E 型	Affymetrix	RA>OA
U89942	Hs.83354	赖氨酰氧化酶样-2	Affymetrix	RA>OA
AF099935	Hs.17839	TNF 诱生蛋白	Affymetrix	RA>OA
M93056			Affymetrix	RA>OA
M97936			Affymetrix	RA>OA
AI887421	Hs.82547	视黄酸受体效应器(他佐罗订诱导的)1	Affymetrix	RA>OA
D50532	Hs.54403	巨噬细胞凝集素 2(钙依赖性)	Affymetrix	RA>OA
AI813532	Hs.256278	肿瘤坏死因子受体 2(75kD)	Affymetrix	RA>OA
U02020	Hs.239138	前 B 细胞集落增强因子	Affymetrix	RA>OA

X05276	Hs.250641	原肌球蛋白 4	Affymetrix	RA>OA
AF006516	Hs.24752	血影蛋白 SH3 结构域结合蛋白 1	Affymetrix	RA>OA
AB018301	Hs.22039		Affymetrix	RA>OA
AB010812	Hs.22900	核因子(红细胞系衍生的)样 3	Affymetrix	RA>OA
AF052124	Hs.313	分泌的磷蛋白 1(骨桥蛋白、骨涎蛋白 1, 早期 T 淋巴细胞)	Affymetrix	RA>OA
AB008775	Hs.104624	Aquaporin 9	Affymetrix	RA>OA
AF024714	Hs.105115	黑素瘤 2 中缺乏	Affymetrix	RA>OA
M28696	Hs.278443	IgG 的 Fc 段, CD32 的低亲和力 IIb 受体	Affymetrix	RA>OA
X62573			Affymetrix	RA>OA
X07834	Hs.318885	超氧化物歧化酶 2, 线粒体	Affymetrix	RA>OA
AL050267	Hs.23889	DKFZP564A032 蛋白	Affymetrix	RA>OA
U83461	Hs.24030	溶质载体家族 31(铜转运蛋白)成员 2	Affymetrix	RA>OA
AB018285	Hs.321707		Affymetrix	RA>OA
AF007875	Hs.5085	多萜基磷酸甘露糖基转移酶多肽 1	Affymetrix	RA>OA
X78686	Hs.89714	小的可诱导细胞因子亚家族 B (Cys-X-Cys)成员 5 (上皮衍生的)	Affymetrix	RA>OA
AF053712	Hs.115770		Affymetrix	RA>OA
AF006083	Hs.5321	ARP3 肌动蛋白相关蛋白 3 同源物	Affymetrix	RA>OA
AL050025	Hs.5344	衔接子相关蛋白复合物 1, α 1 亚基	Affymetrix	RA>OA
M17017	Hs.624	白介素 8	Affymetrix	RA>OA
AI651024	Hs.15780		Affymetrix	RA>OA
AF038172			Affymetrix	RA>OA
M55542	Hs.62661	鸟苷酸结合蛋白 1, 干扰素可诱导的, 67kD	Affymetrix	RA>OA

U11276	Hs.169824	杀伤细胞凝集素样受体亚家族 B, 成员 1	Affymetrix	RA>OA
Z19585	Hs.75774	血小板反应蛋白 4	Affymetrix	OA > RA
L27560			Affymetrix	OA > RA
M98539			Affymetrix	OA > RA
J00153			Affymetrix	OA > RA
M25079	Hs.155376	血红蛋白 α	Affymetrix	OA > RA
M80482	Hs.170414	成对的碱性氨基酸切割系统 4	Affymetrix	OA > RA
L48215	Hs.155376	血红蛋白 α	Affymetrix	OA > RA
AA524547	Hs.160318	Phospholemman 同工型 b 前体 NM_005031	Affymetrix	OA > RA
AL038340			Affymetrix	OA > RA
AI381790	Hs.74120	脂肪特异性 2	Affymetrix	OA > RA
X00129	Hs.76461	视黄醇结合蛋白 4, 血浆前体	Affymetrix	OA > RA
U66619	Hs.71622	SWI	Affymetrix	OA > RA
M30038	Hs.334455	α 类胰蛋白酶 I 前体	Affymetrix	OA > RA
U13666	Hs.184907	G 蛋白偶联受体 1	Affymetrix	OA > RA
L05144	Hs.1872	烯醇丙酮酸磷酸羧化激酶 1(可 溶性)	Affymetrix	OA > RA
U39447	Hs.198241	含铜胺氧化酶 3 前体	Affymetrix	OA > RA
AL049313			Affymetrix	OA > RA
AL050125			Affymetrix	OA > RA
D12485			Affymetrix	OA > RA
X78416	Hs.3155	酪蛋白 α	Affymetrix	OA > RA
AB028998	Hs.6147		Affymetrix	OA > RA
AB020629	Hs.38095	ATP 结合盒, 亚家族 A 成员 8	Affymetrix	OA > RA
X03350	Hs.4	I 类酒精脱氢酶 α 亚基	Affymetrix	OA > RA
AJ224677	Hs.7122	羊搔痒症反应性蛋白 1	Affymetrix	OA > RA
AB018317	Hs.22201		Affymetrix	OA > RA
AF009314			Affymetrix	OA > RA
L77730			Affymetrix	OA > RA
D76435	Hs.41154	Zic 家族成员 1(奇数成对同源 物,果蝇)	Affymetrix	OA > RA
W28828	Hs.133988		Affymetrix	OA > RA

M73720			Affymetrix	OA > RA
M55150	Hs.73875	富马酰乙酰乙酸酶	Affymetrix	OA > RA
U13616	Hs.75893	锚蛋白 3, 同工型 2 NM_020987	Affymetrix	OA > RA
AB005293	Hs.103253	脂滴相关蛋白	Affymetrix	OA > RA
L07765	Hs.76688	羧基酯酶 1(单核细胞)	Affymetrix	OA > RA
X82209	Hs.268515	脑膜瘤 1	Affymetrix	OA > RA
J03507	Hs.78065	补体组分 7 前体	Affymetrix	OA > RA
AF013570	Hs.78344	平滑肌肌球蛋白重链 11, 同工型 SM1 NM_022870	Affymetrix	OA > RA
U70370	Hs.84136	成对样同源域转录因子 1	Affymetrix	OA > RA
U75744	Hs.88646	脱氧核糖核酸酶 I 样 3	Affymetrix	OA > RA
M60278	Hs.799	白喉毒素受体(肝素结合上皮生长因子样生长 f)	Affymetrix	OA > RA
AF042166	Hs.81008	细丝蛋白 B, □(肌动蛋白结合蛋白 278)	Affymetrix	OA > RA
J00123			Affymetrix	OA > RA
AI207842	Hs.7282	前列腺素 D2 合酶(21kD, 脑)	Affymetrix	OA > RA
AA128249	Hs.83213	脂肪酸结合蛋白 4, 脂肪细胞	Affymetrix	OA > RA
AA152406	Hs.114346	细胞色素 C 氧化酶, 亚基 VIIa 多肽 1(肌肉)前体	Affymetrix	OA > RA
AF093118	Hs.11494	Fibulin5	Affymetrix	OA > RA
L38486	Hs.296049		Affymetrix	OA > RA
U66689			Affymetrix	OA > RA
AF049884	Hs.350266	Arg	Affymetrix	OA > RA
AB011089	Hs.12372	三联基序蛋白 TRIM2	Affymetrix	OA > RA
AF060568			Affymetrix	OA > RA
AF059293	Hs.114948	细胞因子受体样因子 1	Affymetrix	OA > RA
AC003107	Hs.1584	软骨寡聚基质蛋白前体	Affymetrix	OA > RA
J05037	Hs.76751	丝氨酸脱水酶	Affymetrix	OA > RA
D45371	Hs.80485	脂肪最丰富基因转录物 1	Affymetrix	OA > RA
U78190			Affymetrix	OA > RA
U24578	Hs.444	丝氨酸	Affymetrix	OA > RA

M15856	Hs.180878	脂蛋白脂肪酶前体	Affymetrix	OA > RA
AF055033	Hs.107169	胰岛素样生长因子结合蛋白 5	Affymetrix	OA > RA
AA976838	Hs.268571	载脂蛋白 C-I 前体	Affymetrix	OA > RA
L13698	Hs.65029	生长停滞特异性 1	Affymetrix	OA > RA
AB020316	Hs.134015	糖醛基-2-磺基转移酶	Affymetrix	OA > RA
U32324	Hs.64310	白介素 11 受体 α	Affymetrix	OA > RA
S67070	Hs.78846	热休克 27kD 蛋白 2	Affymetrix	OA > RA
M12529	Hs.169401	载脂蛋白 E	Affymetrix	OA > RA
D50495	Hs.80598	转录延伸因子 A(SII)2	Affymetrix	OA > RA
D00632	Hs.336920	血浆谷胱甘肽过氧化酶 3 前体	Affymetrix	OA > RA
AI760613	Hs.29283		Affymetrix	RA > OA
AW014646	Hs.303157		Affymetrix	RA > OA
W74027	Hs.132906	19A24 蛋白	Affymetrix	RA > OA
W72338	Hs.23703		Affymetrix	RA > OA
AI805006	Hs.8882		Affymetrix	RA > OA
W67655			Affymetrix	RA > OA
AA631460	Hs.285814		Affymetrix	RA > OA
AI741321	Hs.10760	asporin(LRR 1 类)	Affymetrix	RA > OA
AI983115	Hs.132781	I 类细胞因子受体	Affymetrix	RA > OA
AI535730	Hs.262958		Affymetrix	RA > OA
AA977937	Hs.102308	钾内流通道, 亚家族 J, 成员 8	Affymetrix	RA > OA
AA447232	Hs.334838		Affymetrix	RA > OA
AI720806	Hs.49943		Affymetrix	RA > OA
W23237	Hs.296162		Affymetrix	RA > OA
AI762695	Hs.146381	RNA 结合基序蛋白, X 染色体	Affymetrix	RA > OA
AI653211	Hs.96657		Affymetrix	RA > OA
AA633405	Hs.1101	POU 结构域, 2 类, 转录因子 2	Affymetrix	RA > OA
N78018	Hs.267566	假设的蛋白质 FLJ20371	Affymetrix	RA > OA
AI625959	Hs.112242		Affymetrix	RA > OA
T66196	Hs.111554	ADP 核糖基化因子样 7	Affymetrix	RA > OA
AI697841	Hs.20450	BCM 样膜蛋白前体 NM_014036	Affymetrix	RA > OA
AA569128	Hs.283021	氯化物胞内通道 5	Affymetrix	OA > RA
R53594	Hs.260164		Affymetrix	OA > RA

AI970898	Hs.234898		Affymetrix	OA > RA
AI972390	Hs.348493		Affymetrix	OA > RA
N23769	Hs.26691		Affymetrix	OA > RA
AI806324	Hs.28625		Affymetrix	OA > RA
N28741	Hs.75354		Affymetrix	OA > RA
AL040912	Hs.31595	少突胶质细胞跨膜蛋白	Affymetrix	OA > RA
AI681917	Hs.3321		Affymetrix	OA > RA
AW006235	Hs.415502	假设的蛋白质 FLJ21276	Affymetrix	OA > RA
W73819	Hs.352100		Affymetrix	OA > RA
T77033	Hs.182364		Affymetrix	OA > RA
AW015787	Hs.237331		Affymetrix	OA > RA
N30858	Hs.44234	髓样细胞 2 上表达的触发受体	Affymetrix	OA > RA
AI810669	Hs.44829		Affymetrix	OA > RA
N49922	Hs.1787	蛋白脂质蛋白 1(家族性中叶硬化病, 痉挛性截瘫 2, 无并发症)	Affymetrix	OA > RA
AA082546	Hs.48516		Affymetrix	OA > RA
AI694320	Hs.6295		Affymetrix	OA > RA
AI632283	Hs.47448			
AA039324	Hs201925		Affymetrix	OA > RA
AA877186	Hs.90250		Affymetrix	OA > RA
R42166	Hs.94000		Affymetrix	OA > RA
AI631882	Hs.6510	促甲状腺素释放激素降解胞外酶	Affymetrix	OA > RA
W68636	Hs.168640	关节强硬渐进同源物 NM_054027 关节强硬渐进同源物	Affymetrix	OA > RA
AA700227	Hs.10119		Affymetrix	OA > RA
AI948584	Hs.350495		Affymetrix	OA > RA
AI678080	Hs.141693		Affymetrix	OA > RA
AI732274	Hs.11006		Affymetrix	OA > RA
AI341383	Hs.349764		Affymetrix	OA > RA
Z99386	Hs.173638		Affymetrix	OA > RA
W95023	Hs.173933		Affymetrix	OA > RA

AI860775	Hs.98506		Affymetrix	OA > RA
AA464846	Hs.103262		Affymetrix	OA > RA
AI751698	Hs.184907	G 蛋白偶联受体 1	Affymetrix	OA > RA
AA545730	Hs.293821		Affymetrix	OA > RA
AA181060	Hs.349283		Affymetrix	OA > RA
AA195184			Affymetrix	OA > RA
AI680541	Hs.23767	假设的蛋白质 FLJ12666	Affymetrix	OA > RA
AI659533	Hs.348490		Affymetrix	OA > RA
AI750575	Hs.173933		Affymetrix	OA > RA
AI870335	Hs.32450		Affymetrix	OA > RA
AA160945	Hs.14479		Affymetrix	OA > RA
AI936699	Hs.193784		Affymetrix	OA > RA
AI130027	Hs.239539		Affymetrix	OA > RA
AA081093	Hs.68055		Affymetrix	OA > RA
AA142913	Hs.71721		Affymetrix	OA > RA
AI984000	Hs.37482	非网格蛋白包膜蛋白 α -COP 的 COPZ2	Affymetrix	OA > RA
AI864898	Hs.43125		Affymetrix	OA > RA
AI670876	Hs.44276	同源盒 C10	Affymetrix	OA > RA
AA543787	Hs.23837		Affymetrix	OA > RA
AA775711	Hs.348392		Affymetrix	OA > RA
AI659927	Hs.6634		Affymetrix	OA > RA
AI084224	Hs.53542		Affymetrix	OA > RA
AI123555	Hs.81796		Affymetrix	OA > RA
W73230	Hs.7913		Affymetrix	OA > RA
W27376	Hs.8395	假设的蛋白质 FLJ10781	Affymetrix	OA > RA
AW022607	Hs.12482	磷酸甘油 O-酰基转移酶	Affymetrix	OA > RA
W70242	Hs.58086		Affymetrix	OA > RA
W25528	Hs.89319		Affymetrix	OA > RA
AA947123	Hs.8861		Affymetrix	OA > RA
AA528821	Hs.235857		Affymetrix	OA > RA
AA131648	Hs.23767	假设的蛋白质 FLJ12666	Affymetrix	OA > RA
R12398	Hs.21075	含 GTF2I 重复结构域,同工型 1	Affymetrix	OA > RA

		NM_005685		
W52683	Hs.107260	假设的蛋白质 DKFZp586H0623	Affymetrix	OA > RA
W72194	Hs.108924	桥脑蛋白 NM_015385	Affymetrix	OA > RA
AA885516	Hs.104627		Affymetrix	OA > RA
W68796	Hs.237731		Affymetrix	OA > RA
AI879337	Hs.323432	哺乳动物肌醇六磷酸激酶 2	Affymetrix	OA > RA
W45581	Hs.23133		Affymetrix	OA > RA
N98637	Hs.7759		Affymetrix	OA > RA
AI809953	Hs.123933		Affymetrix	OA > RA
T68423	Hs.11873		Affymetrix	OA > RA
AL044670	Hs.182364		Affymetrix	OA > RA
AA779895	Hs.19339		Affymetrix	OA > RA
AI719167	Hs.12731		Affymetrix	OA > RA
T99215	Hs.168640	关节强硬渐进同源物 NM_054027	Affymetrix	OA > RA
AA534296	Hs.20953	关节强硬渐进同源物	Affymetrix	OA > RA
AI819043	Hs.21342		Affymetrix	RA > OA
AI762879	Hs.86437		Affymetrix	RA > OA
W61000	Hs.238730		Affymetrix	RA > OA
AL043192	Hs.103378		Affymetrix	RA > OA
AI741313	Hs.103657		Affymetrix	RA > OA
AI031674	Hs.236494	ras 相关 GTP 结合蛋白	Affymetrix	RA > OA
AA670193			Affymetrix	RA > OA
AW005250	Hs.238936		Affymetrix	RA > OA
AA682496	Hs.270737	肿瘤坏死因子(配体)超家族成 员 13b	Affymetrix	RA > OA
AI128225	Hs.914		Affymetrix	RA > OA
AW026543	Hs.238936		Affymetrix	RA > OA
AI991095	Hs.293441		Affymetrix	RA > OA
AI872510	Hs.181125		Affymetrix	RA > OA
AI828404	Hs.300697		Affymetrix	RA > OA
AI807353	Hs.237868	白介素 7 受体	Affymetrix	RA > OA
AL048481	Hs.11571		Affymetrix	RA > OA
AW014626	Hs.10949		Affymetrix	RA > OA

AI400414			Affymetrix	RA > OA
AI655221	Hs.16179	假设的蛋白质 FLJ23467	Affymetrix	RA > OA
AI936345	Hs.95549	假设的蛋白质	Affymetrix	RA > OA
AI961907	Hs.179573	I型Ⅱ胶原前原蛋白	Affymetrix	RA > OA
AI743730	Hs.30822	假设的蛋白质 FLJ11110	Affymetrix	RA > OA
AI990512	Hs.34192		Affymetrix	RA > OA
AI741715	Hs.1466	甘油激酶	Affymetrix	RA > OA
T66305	Hs.12920	假设的蛋白质 FLJ20668	Affymetrix	RA > OA
AA424160	Hs.165909		Affymetrix	RA > OA
AI075407	Hs.296083		Affymetrix	RA > OA
AA811088	Hs.24143	WASP 相互反应蛋白	Affymetrix	RA > OA
AI978918	Hs.179608	视黄醇脱氢酶同源物	Affymetrix	RA > OA
AA740831	Hs.193514		Affymetrix	RA > OA
W84421	Hs.349096		Affymetrix	RA > OA
AA233208	Hs.91165	假设的蛋白质	Affymetrix	RA > OA
AA886976	Hs.95821	破骨细胞刺激因子 1	Affymetrix	RA > OA
AA864400	Hs.71215	停靠蛋白 2,56kD	Affymetrix	RA > OA
AI073984	Hs.14453	干扰素共有序列结合蛋白 1	Affymetrix	RA > OA
AI983633	Hs.179573	I型Ⅱ胶原前原蛋白	Affymetrix	RA > OA
AI564488	Hs.300697		Affymetrix	RA > OA
AI655781	Hs.237868	白介素 7 受体	Affymetrix	RA > OA
AA814195	Hs.184465	假设的蛋白质 FLJ11259	Affymetrix	RA > OA
AI916783	Hs.234149	假设的蛋白质 FLJ20647	Affymetrix	RA > OA
AA829355	Hs.267993	假设的蛋白质 FLJ10143	Affymetrix	RA > OA
N66595	Hs.24283		Affymetrix	RA > OA
AA165400	Hs.10927		Affymetrix	RA > OA
AI478759	Hs.234149	假设的蛋白质 FLJ20647	Affymetrix	RA > OA
AI655719	Hs.2157	威-奥综合征蛋白	Affymetrix	RA > OA

N63815	Hs.110121	SEC7 同源物	Affymetrix	RA > OA
AW001184	Hs.44672	假设的蛋白质 FLJ10470	Affymetrix	RA > OA
N21390	Hs.5888		Affymetrix	RA > OA
AA587944	Hs.259737	FN5 蛋白	Affymetrix	RA > OA
AI951459	Hs.7337	假设的蛋白质 FLJ10936	Affymetrix	RA > OA
AA464464	Hs.10949		Affymetrix	RA > OA
AI692538	Hs.11135		Affymetrix	RA > OA
AI817147	Hs.181301	组织蛋白酶 S	Affymetrix	RA > OA
AI263085	Hs.17914	C20 样前体	Affymetrix	RA > OA
W58252	Hs.182793	高尔基体磷蛋白	Affymetrix	RA > OA
AA056180	Hs.70704		Affymetrix	RA > OA
AA224174	Hs.111099		Affymetrix	OA > RA
AI571452	Hs.11169	基因 33	Affymetrix	OA > RA
AA155951	Hs.349303		Affymetrix	OA > RA
W68504	Hs.191098		Affymetrix	OA > RA
AI200456	Hs.48516		Affymetrix	OA > RA
AW003093	Hs.349764		Affymetrix	OA > RA
AI190027	Hs.38034		Affymetrix	OA > RA
R52934	Hs.8562	假设的蛋白质 FLJ20374	Affymetrix	OA > RA
W44633	Hs.301296		Affymetrix	OA > RA
AW024474	Hs.44276	同源盒 C10	Affymetrix	OA > RA
AI806502	Hs.334800		Affymetrix	OA > RA
AI492370	Hs.105606	假设的蛋白质 FLJ20512	Affymetrix	OA > RA
AW021179	Hs.90443	NADH 脱氢酶(辅酶 Q)铁-硫蛋白 8(23KD)(NADH 辅酶 Q 还原酶)	Affymetrix	OA > RA
AI679110	Hs.323067		Affymetrix	OA > RA
R85633			Affymetrix	OA > RA
N91161	Hs.117176	聚(A)结合蛋白,核性 1	Affymetrix	OA > RA
AW020657			Affymetrix	OA > RA

AI871043	Hs.173233	假设的蛋白质 FLJ10970	Affymetrix	OA > RA
N39237	Hs.44977		Affymetrix	OA > RA
AI949833	Hs.21914		Affymetrix	OA > RA
AA679297	Hs.109494	功能未知的分泌性蛋白	Affymetrix	OA > RA
AI962647	Hs.182364		Affymetrix	OA > RA
AL037611	Hs.285902		Affymetrix	OA > RA
AI871278	Hs.301804		Affymetrix	OA > RA
AI357650	Hs.28847	AD026 蛋白	Affymetrix	OA > RA
AI149793	Hs.38034		Affymetrix	OA > RA
AI797684	Hs.39619	假设的蛋白质 LOC57333	Affymetrix	OA > RA
R52250	Hs.348297		Affymetrix	OA > RA
AI669738	Hs.128856	CSR1 蛋白	Affymetrix	OA > RA
AA058770	Hs.18987		Affymetrix	OA > RA
AI039005	Hs.164680		Affymetrix	OA > RA
AI936560	Hs.6136		Affymetrix	OA > RA
AA521373	Hs.9469	含血小板-白细胞 C 激酶底物同源结构域,家族 A(磷酸肌苷结合特异性)	Affymetrix	OA > RA
H15888	Hs.27621	Sema 结构域,七个血小板反应蛋白重复性(1 型和 1 型样)	Affymetrix	OA > RA
AI333793	Hs.337062		Affymetrix	OA > RA
AA523172	Hs.103135		Affymetrix	OA > RA
AI860960	Hs.352081		Affymetrix	OA > RA
AI355848	Hs.35841	核因子 I	Affymetrix	OA > RA
AI982754	Hs.75106	成簇蛋白(补体溶解抑制剂 SP-40,40,硫酸糖蛋白 2,睾丸	Affymetrix	OA > RA
AI800218	Hs.289019	潜伏转化生长因子 α 结合蛋白 3	Affymetrix	OA > RA
AW016356	Hs.126857		Affymetrix	OA > RA
AA968552	Hs.25523		Affymetrix	OA > RA
AI634557	Hs.28107		Affymetrix	OA > RA

AW025494	Hs.95867	假设的蛋白质 EST00098	Affymetrix	OA > RA
AA628405	Hs.339352		Affymetrix	OA > RA
AI810399	Hs.55940		Affymetrix	OA > RA
AA029735	Hs.159993		Affymetrix	OA > RA
AA723927	Hs.209569		Affymetrix	OA > RA
AI799784	Hs.49696		Affymetrix	OA > RA
AI817330	Hs.110477	磷酸长醇甘露糖基转移酶多肽 3	Affymetrix	OA > RA
AI990803	Hs.293782		Affymetrix	OA > RA
AA034418	Hs.30627		Affymetrix	OA > RA
AA115295	Hs.284208	DKFZP434N161 蛋白	Affymetrix	OA > RA
AI673281	Hs.181444	假设的蛋白质	Affymetrix	OA > RA
W63805	Hs.84344	CGI-135 蛋白	Affymetrix	OA > RA
AA427597		TGF β 诱导早期生长反应 2	Unigene	NS>RA
AA806239		IG-ALPHA2-C REGION	Unigene	RA>NS
AB014518		KIAA0618	Unigene	RA>NS
AB021871		AK1	RDA,Unigene	RA>OA, RA>NS
AF000984		DBY 交替转录物 2	Affymetrix	NS>RA
AF001691		角化包膜前体	Affymetrix	NS>RA
AF005058		CXC		
AF0605668		白血病锌指 PLZF	Affymetrix	NS>RA
AF068293		HDCMB07P/PCM-1	Unigene	RA>NS
AF105036		GKLF	RDA	OA>NS
AF182035		α 肌动蛋白	RDA	OA>NS
AF182035		肌球蛋白轻链	RDA	OA>NS
AF216292		BIP		
AF218004		CSNK1A1	Unigene	RA>NS
AJ000542		自然杀伤细胞受体 p58	RDA	RA>OA
J05008		EDN1	Affymetrix	NS>RA
L08187		细胞因子受体 EBI 3	RDA	RA>OA
L31581		EBI1/CCR7	Affy	RA>NS
L37036		ENA-78	=Affymetrix	RA>OA

M10988		TNF α		
M19997		延伸因子 2	RDA	RA>OA
M29469		Ig 重排 K 链(VJ 区)	RDA, Affymetrix	RA>OA
M31164		TSG6	RDA,Unigene	RA>OA RA>NS
M83248		OSTP(骨桥蛋白)	RAD Affymetrix	RA>OA
NM_002450		金属甲硫氨酸	Unigene	NS>RA
NM_003573		TGF β -BP4	Unigene	RA>NS
NM_000362		TIMP-3	RDA	NS>RA
NM_000396		组织蛋白酶 K	RDA	RA>OA OA>NS
NM_000609 1		SDF1	RDA	OA>NS
NM_001908		组织蛋白酶 B	RDA	OA>NS
NM_002084		谷胱甘肽过氧化酶 3	RDA	NS>RA
NM_002229		Jun B	Unigene	NS>RA
NM_002989		SLC	Unigene	RA > NS
NM_003966		SEMA5A	RDA	RA>OA
NM_004039		膜联蛋白 II	RDA	RA>OA OA>NS
NM_005368		肌红蛋白	RDA	OA>NS
NM_006472		VDUP1	RDA,Unigen e	NS>RA
NM_007016		Mysin 轻链多肽 2	RDA	OA>NS
NM_015675		GADD45B/MYD118	RDA,Unigen e	NS>RA
R75775		EGR1	Unigene	NS>RA
U070136		原始巨核细胞 刺激因子	RDA,Unigen e	NS>RA
U34690		CORO1A/p57	Unigene	RA > NS
U93569		L1 元件	RDA,Unigen e	RA>OA;

				RA>NS
X03754		SCYA3(MIP a)/GOS19	Unigene	RA>NS
X0523		MMP1		
X14723		成簇蛋白/SP40	RDA,Unigene	NS>RA
X15332		胶原 IIIa1	RDA,Unigene	RA>OA
X54629		c-myc	RDA,Unigene	NS>RA
X54629		pHL-1 基因	RDA	NS>RA
X58122		伴肌动蛋白	RDA	OA>NS
X62996		线粒体 mRNA	RDA	OA>NS
X63596		RTE-2	RDA	RA>OA
X65968		PMP22	Unigene	RA>NS
X88971		HLA DRB1	RDA	RA>OA
X94771		EMP3	Unigene	RA>NS
XM008868		潜伏转化生长因子 α 结合蛋白 LTBP4	RDA,Unigene	NS>RA
XM_031289		白介素 8	=Affymetrix	RA>OA
XM012651		胶原 Ia1	RDA	RA>OA

蛋白质的组合

表 2:

蛋白质	可得到的例子
78kDa 葡萄糖调节蛋白质前体(GRP78)(免疫球蛋白重链结合蛋白 BIP)(内质网腔 Ca^{2+} 结合蛋白 grp78)	P11021
瓜氨酸化肽(含精氨酸脱亚氨基形式的肽[瓜氨酸])	
Sa-抗原	P22626
RA33/异质性细胞核核糖核蛋白 A2/B1(hnRNP A2/hnRNP B1)	P20810
钙蛋白酶抑制剂(钙蛋白酶抑制蛋白)(精液 BS-17 组分)	P27797
钙网蛋白前体(CRP55)(Calregulin)(HACBP)(ERp60)	P80697
滑液刺激蛋白 p205	P20930
丝聚蛋白前体	
血纤蛋白	P02671
血纤蛋白原 α / β -E 链前体[含:血纤肽 A]	P02675

血纤蛋白原 α 链前体[含:血纤肽 B]	P02679
血纤蛋白原 α 链前体(PRO2061)	
DnaJ	P01857
Ig κ -1 链 C 区	P01859
Ig κ -2 链 C 区	P01860
Ig κ -3 链 C 区(重链疾病蛋白)(HDC)	P01861
Ig κ -4 链 C 区	P01809
60KDa 热休克蛋白, 线粒体前体 (Hsp60)(60kDa 伴侣蛋白)(CPN60)(热休克蛋白 60)(HSP-60)(线粒体基质蛋白 P1)(P60 淋巴细胞蛋白)(HuCHA60)	P03211
EBNA-1 核蛋白	
IR-3,内部重复区(在 EBNA-1 中, 如蛋白质)	P36222
壳多糖酶 3 样蛋白 1 前体(软骨蛋白-39)(GP-39)(39kDa 滑液蛋白)(YKL-40)	P02458
胶原 α 1(II)链前体[含:软骨钙素]	
CH65,软骨细胞抗原 65	P50454
胶原结合蛋白 2 前体(胶原素 2)(类风湿关节炎相关抗原 RA-A47)	P29043
47kDa 热休克蛋白前体(胶原结合蛋白 1)(胶原素 1)	Q15782
壳多糖酶 3 样蛋白 2 前体(YKL-39)(软骨细胞蛋白 39)	Q15783
壳多糖酶 3 样蛋白 2 前体(YKL-39)(软骨细胞蛋白 39)	Q15749
壳多糖酶 3 样蛋白 2 前体(YKL-39)(软骨细胞蛋白 39)	P04075
果糖二磷酸醛缩酶 A(肌肉型醛缩酶)(肺癌抗原 NY-LU-1)	P10915
蛋白聚糖连接蛋白前体(软骨连接蛋白)(LP)	Q99542
基质金属蛋白酶-19 前体(MMP-19)(基质金属蛋白酶 RASI)	CAA63299
MMP-19(基质金属蛋白酶)	P16112
软骨聚集蛋白聚糖核心蛋白前体(软骨特异性蛋白聚糖核心蛋白)(CSPCP)(硫酸软骨素蛋白聚糖核心蛋白 1)	P15311
埃兹蛋白(p81)(细胞绒毛蛋白)(绒毛蛋白 2)	P35241
根蛋白	P26038
膜突蛋白(膜组织性外突蛋白)	

现在通过实施例描述本发明,但实施例并不限制本发明。

实施例

实施例 1 临床诊断中的应用

一位病人有 4 个月的关节症状,手指 2 个远端关节和一中部关节及右腕关节不对称肿胀和疼痛,清晨僵硬持续约 30 分钟, X 光片显示脚趾一远端关节早期侵蚀

性改变，C 反应蛋白在正常范围内，沉降速率轻度升高，类风湿因子和 HLA-DR4 阴性。没有炎症性类风湿病家族史。

门诊随访时，以最少侵害性关节镜术分离得到右腕关节滑膜的活检样品。4 个样品各重约 10 毫克。以福尔马林固定小块样品随后作组织学评价，其余样品置入 RNA 裂解缓冲液中，按标准方法破碎并抽提 RNA。逆转录成 cDNA 后进行构成 cDNA 转录的体外转录为生物素标记的 cRNA，将该 cRNA 片段化，然后与 DNA 阵列杂交。

由生产 DNA 阵列的商业公司如 Affymetrix 生产出该阵列。从表 1 序列和从编码表 2 蛋白质的基因序列推导出合适的寡核苷酸。这些寡核苷酸可与各自 cRNA 序列特异性杂交。合成这些序列的寡核苷酸，然后印制在阵列载体上，或在载体上用照相平板印刷方法直接合成。

按照厂商说明书进行杂交，用扫描仪读取 DNA 阵列，用标准软件如 Affymetrix 的“Micro-Array Suite”将光信息翻译成表达信号。即获得了表 1 和表 2 所列基因 RNA 表达量或蛋白质的信号。从这种用于关节疾病诊断评估和开发治疗基因的选定开始，将临床和组织学特征已鉴定的组织样品进行分类，并在初步测试中，分类归并分析后以分等级方式彼此相关连。由于与临床发现有可比的相关性，这种分类具体依赖于疾病类型(关节病、反应性关节炎、类风湿关节炎、类风湿关节炎亚组)、疾病的活动性，预后和所用药物影响病理改变基因表达的可能性。将上述病人的信号数据与该数据库比较，从而有可能将其分配到这些组中的一组，可获得相应的临床相关性信息。这样，可获得各位病人的诊断、活动性、预后和治疗看法的证据。

实施例 2 对于治疗评估的应用

一位病人，患慢性关节炎 5 年，诊断为类风湿关节炎，显示几个指关节中有进行性特异性 X 线改变、伴有几个指关节、左肘关节和右踝关节疼痛和肿胀，尽管最近作过基础治疗每周服用 15 毫克氨甲喋呤。走访时，以最小侵害性关节镜术分离得到左肘关节滑膜活检样品。将总重约 30 毫克的几份样品置入裂解缓冲液中，破碎，抽提 RNA，以类似实施例 1 的方式制备样品。分析采用与实施例 1 同样的 DNA 芯片。杂交后，将杂交结果转为图片数据文件，再将结果翻译成各测试基因的信号信息，分配成明确的表达模式。在初步测试中测定这些模式，采用本说明书中表 1 和表 2 所确定的基因选择。依据已受到确定浓度所用药物影响的各种关节疾病分析样品表达模式的改变。给表达模式按等级分类，从而考虑与所用药物、所用剂量的关系。当将病人样品与这些已明确的表达模式比较时，将其分配到特定模式，与其相关的治疗效果信息有可能估计，所用药物氨甲喋呤是否高剂量时有效，或是否有理由更换药物，该药物的活性状况能很好地影响个体病例的病理变化。

实施例 3 RA 中的自身反应性概貌

在自身抗体产生方面 RA 不同于其它风湿性和炎症性疾病。因此，一种抗体反应性不能提供 RA 和非 RA 之间的区别。但几种自身反应性的不同模式却可能。因

此,可获得救助性诊断以控制治疗进程和根据测定的 RA 特异性自身反应性概貌进行预防性检查。

在特异性抗体-抗原反应时,针对抗原更确切说针对表位的抗体被其互补位结合。表位定义为抗原与抗体(即与其互补位)特异性相互作用的区域。通常将一个表位理解为蛋白质的一段肽序列,此肽序列包含约 16-20 个氨基酸,该序列可以是连续性(连续表位)或间断性(不连续表位)的。然而,抗体和抗原之间的特异性相互作用通常只需几个氨基酸,罕见情况时只需一个氨基酸即足够。同时已知甚至核酸也可起抗原作用。特别重要的是越来越归因于翻译后修饰,如磷酸化、酰化、糖基化、甲基化、脱亚氨基化等,因为这些修饰常具有调节功能,它们似乎特别令人感兴趣作为抗原的靶结构,特别是在病理情况下,对于某些 RA 相关的自身抗原,已证明特异性的翻译后修饰产生了自身抗体(识别)的表位,因此必须对此特别关注,在测试系统中识别这些结构。

表 2 所列蛋白质被描述为 RA 相关性自身抗原,然而这些单一组分的大多数对 RA 诊断关系不大或不明显,这同样适用于表 1 所列的 mRNA 水平上过度表达的基因,这些组分本身不适合于显著改进 RA 的诊断。事实证明,表 1 和表 2 所列大多数蛋白质实际上不能用于这一目的,只有少数几种蛋白质特性上估计与 RA 相关,例如:蛋白质 BiP(重链结合蛋白)就有效,它是 RA 中免疫反应的靶子。这里必须考虑翻译后糖基化修饰形式,因为这种修饰是一种表位组分,对于 RA 自身抗体的识别及 RA 自身抗体的区别都是必须的。而且,翻译后从精氨酸转为瓜氨酸,这种氨基酸被描述为 RA 相关自身抗体(识别)所必需的表位(6)。类似地, Sa 抗原(5)、RA33 抗原和钙蛋白酶抑制蛋白(的修饰)对 RA 的诊断有效是很重要的。

然而,这些组分本身不适合于明确 RA 诊断或甚至不适合监测治疗效果。本发明所述的新方法指 RA 的免疫状态。RA 的免疫状态包括 RA 中存在的全部自身反应性抗体,也包括这些抗体所识别的全部自身抗原或自身表位。出乎意料发现,通过分析 RA 相关自身抗体的组合有可能第一次明确诊断 RA 这样的疾病,有可能第一次证明只有 RA 中才存在的自身抗体的不同模式。这些模式还包括本身看来对 RA(诊断)不重要的那些自身抗原和自身反应性。甚至更令人惊奇的是,因为其它研究小组各自的首次测定并未导致这种发现,虽然强调说他们采用了八种不同人体自身免疫性疾病的最重要的自身抗原(11)。采用与另一风湿病系统性红斑狼疮(SLE)相关的自身抗原同样如此。显然,已发表的这些方法和本文所述方法之间存在着本质差异,一方面是根据分析的类型(多个随机变量),另一方面是根据自身抗原的组成。只有足够数量的 RA 相关自身抗体才能够明确诊断。因此在其它应用中,全部 RA 相关自身抗体和自身抗原组成的信息与其它技术(蛋白质阵列技术(27)、数据处理)一起可用作 RA 诊断和分类的工具。甚至该领域的专家也不能通过类似的推论断定这种利用程度。可利用 RA 的免疫状态和只利用其几个部分来明确鉴别 RA 与其它疾病或健康状态。而且出乎意料的本发明的商业应用,只是由于最近可得到的

或仍在开发的高处理量技术而成为可能。这具体指自身反应性的多参数分析，因为此时必须采用病人的微小尺寸样品进行多种平行分析。

为了产生自身反应性概貌图、合成和提供了表 2 所列诸成分的蛋白质或蛋白质部分序列及表 1 所列基因所编码的蛋白质和蛋白质部分序列，包括区别 RA 和非 RA 可能需要的翻译后修饰。可用分子生物学的任一已知方法或蛋白质化学的任一方法进行这种合成。另外，按照该领域的状况，部分人工(体外翻译)或人工合成方法适合于制备所述蛋白质或蛋白质部分序列。

蛋白质阵列/肽阵列(28)

采用表 2 或表 1 的蛋白质或蛋白部分序列的全部或仅作为适合于临床症状免疫鉴别的一种选择，以产生一种适合于测定个体自身反应性的试验选项。这具体指选择瓜氨酸、BiP、p205、IgG、钙蛋白酶抑制蛋白、RA33、Sa 抗原和钙网蛋白。为此目的，将这些蛋白分别加到载体基质上，其位置可以空间分辨。每种固定化的蛋白质、肽、修饰蛋白或修饰肽的位置和身份是已知的。显微格式可平行检测亚微升水平人血清中的几千种不同抗原和/或自身抗原(蛋白质/肽)，优化的选择是制备高密度滤片、高密度玻璃载体或以高密度方法产生的其它基质的蛋白质阵列，将这种基质以包被或非包被形式与蛋白质或蛋白质部分序列偶联。例如，可将蛋白质或蛋白质部分序列印制在衍生的或包被的/激活的玻璃载体上，或通过喷墨法以毛细方式施加，或用照相平板印刷面罩或数字显微反射仪在阵列上直接合成。除玻璃载体外也可使用膜和滤片、聚苯乙烯基质、纳米孔板和微粒(29)。

将蛋白质阵列与适当稀释的病人血清或病人关节渗出液一起培育。培育期间可能存在的抗一种或几种蛋白组分的特异性抗体可结合这些蛋白质抗原，然后洗涤去除残存的游离抗体和血清组分。将样品与第二抗体一起培育，适当的第二抗体能结合第一抗体从而表明已发生抗原-抗体反应，并引入适当的标记通过共价交联的荧光染料或共价交联的酶(能使前体底物产生颜色)得以显现和定量分析。然后再经洗涤除去残存的游离第二抗体。

悬浮阵列(30)

悬浮阵列采用塑料颗粒作为基质，用上述蛋白质包被塑料颗粒。这可实施如下，即与特异性蛋白质交联的颗粒的光学特性与交联另一种蛋白质颗粒的光学特性不同。以类似方式与病人血清或其它体液一起培育进行免疫分析，通过与适当的第二抗体反应，直接或间接地产生进一步的光学(荧光)信号，在多色荧光激活细胞(FAC)扫描仪中进行分析。

时间分辨蛋白质阵列(31)

将聚苯乙烯表面与表 1 和表 2 的不同蛋白质或蛋白质部分序列交联。将待分析的病人血清抗体用活化生物素酯生物素化，或也可采用对人抗体特异的生物素化第

二抗体以避免生物素化效率不同所引起的病人之间的离差。然后将病人抗体与交联了蛋白质的聚苯乙烯表面一起培育，经后续洗涤，用交联了荧光辅复合物的链霉亲和素进行检测。洗涤和干燥后用激光激发的时间分辨固相荧光分析法进行评价。

数据模式和多因素分析

尽可能完全地测定诸参数(如获得的对表1和表2所列蛋白质/自身抗原的自身反应性，如自身反应性 RF/瓜氨酸/BiP/钙蛋白酶抑制蛋白/钙网蛋白/RA33)。分析中先剔除6个值缺失2个以上值的个体病例的数据模式。

解释该免疫检测系统对各病人和各种自身反应性所产生的阴性和阳性结果。另一种选择是将连续值(蛋白质阵列,ELISA)人工地(数学上)或用对照组相关的截断值(与适当的对照组，如年龄和性别相匹配的健康人对照或患另一种疾病的病人对照相比进行分析)分成阳性或阴性。用 CLASSIF1 程序系统(32)分析各数据模式并分类。

第一步，将各临床诊断类别的三矩阵特征输入第一参数分类光刻掩模(mask)，然后按照病人掩模和临床参比掩模之间的位码身份(识别码)的最高等级给每个病人分类。

第二步，消除那些对所有参比掩模显示三矩阵特征为“0”的数据栏，因为它们不能区别存在的疾病。

第三步，用 CLASSIF1 算法暂时性去除分类过程所有交换中单个参数或二参数的组合，然后重新分类设置的总数据。因其暂时性去除而影响分类结果的参数是提供信息的参数，因为显然不可丢失必须的信息。各参数的信息内容通过该算法间断性提供，操作后再引入，及暂时性抽出下一参数或下一对参数并以相似方式分析。进行间断性删除和再引入，直到单独或组合显示所有参数的信息内容。去除证明单独或与另一参数组合不能提供信息的参数，留下的能提供信息的参数序列构成了各临床预测类别的参比分类掩模

第四步，通过将百分比截断值分类为 10/90%，15/85%，20/80%，25/75%和 30/70%优化该分类。然后选出显示最佳鉴别性能的一对。通常在 10/90%和 25/75%百分比对范围之间达到最佳分类结果。模糊矩阵(Confusion Matrix)中的阴性和阳性预测值提供了所用模式如何优良地鉴别参比样品和待测样品的信息。此外，对每位病例的数据模式作多因素分析。可将所有可能组合的不同参数相乘或相除，然后将5个数据栏按照 RA 参比组的平均值进行标准化，来获得五参数模式的多因素(分析)。确定其它病人组(如 OA, reA, PsoA 等)各参数的平均值。当各病人组的参数平均值比参比值(RA)高时用乘法，低时用除法，确定所有参数交换的多因素。

该多因素数据库包括已测定的 RF/瓜氨酸/BiP/钙蛋白酶抑制蛋白/钙网蛋白/RA33 的参数。通过 CLASSIF1 算法给 26 种多因素作了分类，将数据库各栏的所有数字转换成“-”(少于参比病人[RA]测定值分布的低百分率)、“0”(在高低百分率

之间) 或者 “+”(大于高百分率)三矩阵特征。数据库各栏转换后, 即在临床诊断和计算机分类之间设立了模糊矩阵。

该模糊矩阵的对角线值代表了参比样品的特异性和待测样品的灵敏度, 在以后的迭代学习过程中可对其进一步优化。当所有样品已正确分类时, 即该模糊矩阵的所有对角线值达到 100%和非对角线区段值为 0%时, 就实现了最优分类。学习过程的作用是去除不能提供信息的参数, 从而集聚了具有鉴别性能的参数。

附图说明

图 1: RA33、RF、瓜氨酸、BiP 和钙蛋白酶抑制蛋白的自身反应性模式说明对 RA(类风湿关节炎、reA(反应性关节炎)、OA(骨关节炎)、PsoA(牛皮癣相关关节炎)等疾病的 IgG(RF)、瓜氨酸、BiP、钙蛋白酶抑制蛋白、RA33 和钙网蛋白的自身反应性的所有 32 种可能的组合。

缩写词名单

ACR	美国风湿病学会
BiP	结合蛋白, 重链给合蛋白
BSA	牛血清白蛋白
CAIp	钙蛋白酶抑制蛋白
Calr	钙网蛋白
cDNA	互补 DNA, DNA 副本
CH	软骨细胞抗原
Cit	瓜氨酸化肽
CrP	C 反应蛋白
DNA	脱氧核糖核酸
DPNII	来自肺炎双球菌
dNTP	脱氧核苷酸三磷酸(dATP,dCTP,dGTP,dTTP 的等摩尔混合物)
dNTP	脱氧核苷酸三磷酸
EBNA-1	EB 病毒核抗原-1
EBV	EB 病毒
ER	内质网
FACS	荧光激活细胞分选仪
GAPDH	甘油醛磷酸脱氢酶
HC	人软骨
HCgp39	人软骨糖蛋白 39
HLA-system	HLA-组织相容性抗原(人白细胞抗原)
HLA-DR4	HLA 特征, 显示与类风湿关节炎相关性增加

hnRNP	异质性核糖核蛋白(RA33)
Hsp	热休克蛋白
Ig	免疫球蛋白
IgG	免疫球蛋白 G
IL-	白介素
IR-3	内部重复区 3
MCTD	混合性结缔组织病(混合性胶原病)
MHC-	主要组织相容性复合物
MMP	基质金属蛋白质酶
mRNA	信使核糖核酸
NAD	烟酰胺-腺嘌呤二核苷酸
NCBI	全国生物技术信息中心
ND	正常供体
OA	骨关节病
O-GlcNAc	O-N-乙酰葡萄糖胺
PCR	聚合酶链反应
PHA	植物血凝素
PM/DM	多肌炎/皮肌炎
PsoA	牛皮癣相关关节炎
RA	类风湿关节炎
RA-A47	关节炎相关抗原
RA33	hnRNP A2
RDA	代表性差异分析
ReA	反应性关节炎
RF	类风湿因子
RNA	核糖核酸
RPMI	商业上可获得的常规细胞培养基，稀释培养基 RPMI1640(Moore,G.E 等.;J Am.Assoc.199,519-524, 1967)
RsaI	球杆红假单胞菌的 DNA 限制性内切酶 RsaI
RT	逆转录酶(RT)
Sa-抗原	人脾脏和胎盘 50k 蛋白质
SLE	系统性红斑狼疮
SSH	抑制性扣除杂交
TGF	转化生长因子
UNIGENE	UniGene 是一种将 GeneBank 序列自动化分配成基因取向簇的 非冗余系列的实验系统

YKL-39 人软骨相关蛋白

参考文献

1. Arnett, F.C., S.M. Edworthy, D.A. Blich, et al : 美国风湿协会 1987 年为类风湿关节炎修订的标准, *Arthritis Rheum* 31 :315, 1987。
2. Kaps, C., C. Bramlage, H. Smolian, et al : 骨形态发生蛋白促进软骨分化并保护工程化人造软骨免遭纤维母细胞的入侵和破坏, *Arthritis Rheum* 46 :149, 2002。
3. Roudier, J., G. Rhodes, J. Peterson 等: EB 病毒糖蛋白 gp110, 一种 HLA DR4, HLA DR1 和类风湿关节炎之间的分子联系, *Scand J Immunol* 27 :367, 1988。
4. Albani, S., E.C. Keystone, J.L. Nelson 等: 自身免疫的阳性选择: 早期类风湿关节炎病人中对细菌 dnaj 抗原决定簇的异常免疫应答反应, *Nat Med* 1 :448, 1995。
5. Despres, N., G. Boire, F.J. Lopez-longo, and H.A. Menard: Sa 抗原系统, 一种类风湿关节炎特异性的新抗原抗体系统, *J Rheumatol* 21 :1027, 1994。
6. Schellekens, G.A., B.A. de Jong, F.H. van den Hoogen, et al : 瓜氨酸是类风湿关节炎特异性自身抗体所识别的抗原簇的基本组分, *J Clin Invest* 101 :273, 1998。
7. Girbal-Neuhauser, E., J.J. Durieux, M. Arnaud 等: 翻译后精氨酸残基脱亚胺基在前丝聚蛋白的不同部位上产生了类风湿关节炎抗丝聚蛋白自身抗体所靶向的表位, *J Immunol* 162 :585, 1999。
8. Alsalameh, S., J. Mollenhauer, N. Hain 等: 对人关节软骨细胞的细胞免疫应答反应: 破坏性关节疾病中 T 细胞对软骨细胞和成纤维细胞膜的反应性, *Arthritis Rheum* 33 :1477, 1990。
9. DeRisi, J., L. Penland, P.O. Brown 等: 运用 cDNA 显微阵列分析人癌症中的基因表达模式 *Nat Denet* 14 :457, 1996。
10. Haab, B.B., M.J. Dunham, and P.O. Brawn: 用于高度平行检测和定量测定复杂溶液中特异性蛋白质和抗体的显微阵列, *Genome Biol* 2 :RESEARCH0004, 2001。
11. Robinson, W.H., C. DiGennaro, W. Hueber 等: 用于自身抗体应答反应的多种特征鉴定的自身抗原显微阵列, *Hat Med* 8:295, 2002
12. Eberwire, J.: 采用固定化的 Oligo(dT)-T7 引导的 cDNA 产生的 RNA 扩增 mRNA 群, *Biotechniques* 20 :584, 1996。
13. Cook, A.F., E. Vuocolo and C.L. Brakel: 一系列生物素化寡核苷酸的合成和杂交, *Nucleic Acids Res* 16 :4077, 1998。
14. Okamoto, T., T. Suzuki and N. Yamamoto: 用水泡喷雾技术共价结合 DNA 的显微阵列制作, *Nat Biotechnol* 18: 438, 2000。
15. Fodor, S.P., J.L. Read, M.C. Pirrung : 光指导的空间寻址平行化学合成, *Science*, 251 :767, 1991。

16. Barone,A.D.,J.E.Beecher,P.A.Bury 等:高密度寡核苷酸探针阵列的照相平板印刷术, *Nucleoside Nucleotides Nucleic Acids* 20 :525,2001。
17. Hubank,M.,and D.G.Schatz: 用 cDNA 的代表性差异分析鉴定 mRNA 表达的差异, *Nucleic Acids Res* 22 :5640,1994。
18. Listsyn,N.,and M.Wigler: 克隆两种复杂基因组之间的差异, *Science* 259 :946,1993。
19. Bussow,K.,E.Nordhoff,C.Lubbert 等:用于高通量蛋白质表达筛选的人 cDNA 文库, *Genomics* 65 :1,2000。
20. Altman,R.,G.Alarcon,D.Appelrouth,D.Bloch 等:风湿学分类标准和骨关节病芯片报告, *Arthritis Rheum* 34 :505,1991。
21. Chomczynski,P.,and N.Sacchi: 采用酸性硫氰酸胍-苯酚-氯仿抽提 RNA 的一步方法, *Anal Biochem* 162 :156,1987。
22. Diatchenko,L.,Y.F.Lau,A.P.Campbell 等:抑制性扣除杂交:一种产生差异性调节的或组织特异性 cDNA 探针和文库的方法, *Proc Natl Acad Sci USA* 93 :6025,1996。
23. Gress,T.M.,J.D.Hoheisel,G.G.Lennon 等:高密度 cDNA 文库阵列与全体组织 cDNA 池的杂交指印, *Mamm Genome* 3 :609,1992。
24. Lennon,G.G.,and H.Lehrach: 形成阵列的 cDNA 文库的杂交分析, *Trend Genet* 7 :314,1991。
25. Krenn,V.,A.Konig,F.Hensel 等:类风湿滑膜组织的类风湿因子(RF)阴性 B 细胞杂交瘤的分子分析:受选出的高突变 IgVH 和低突变 IgVL/ λ 基因抗原诱导的刺激证据, *Clin Exp Immunol* 115 :168,1999。
26. Leushner,J: MALDITOF 质谱:一种基因组学和诊断学平台, *Expert Rev Mol Diagn* 1 :11,2001。
27. MacBeath,G.和 S.L.Schreiber: 印制蛋白质作为高处理量功能测定的显微阵列, *Science* 289 :1760,2000。
28. Walter,G.,K.Bussow,D.Cahill 等:用于基因表达和分子反应筛检的蛋白质阵列, *Curr Opin Microbiol* 3 :298,2000。
29. Spiro,A.,M.Lowe and D.Brown: 采用流式细胞仪多重鉴定和定量测定 DNA 序列的微珠方法, *Appl Environ Microbiol* 66 :4258,2000。
30. Nolan,J.P.,and F.F.Mandy: 悬浮阵列技术:基因和蛋白质分析的新工具, *Cell Mol Biol(Noisy-le-grand)* 47 :1241,2001。
31. Madersbacher,S.和 P.Berger: 抗体和免疫试验, *Methods* 21 :41,2000。
32. Valet,G.,M.Valet,D.Tschope 等:白细胞和血小板疾病:采用 CLASSIF1 程序系统的标准化自学流式细胞列表模式数据分类, *Ann N Y Acad Sci* 677 :233,1993。

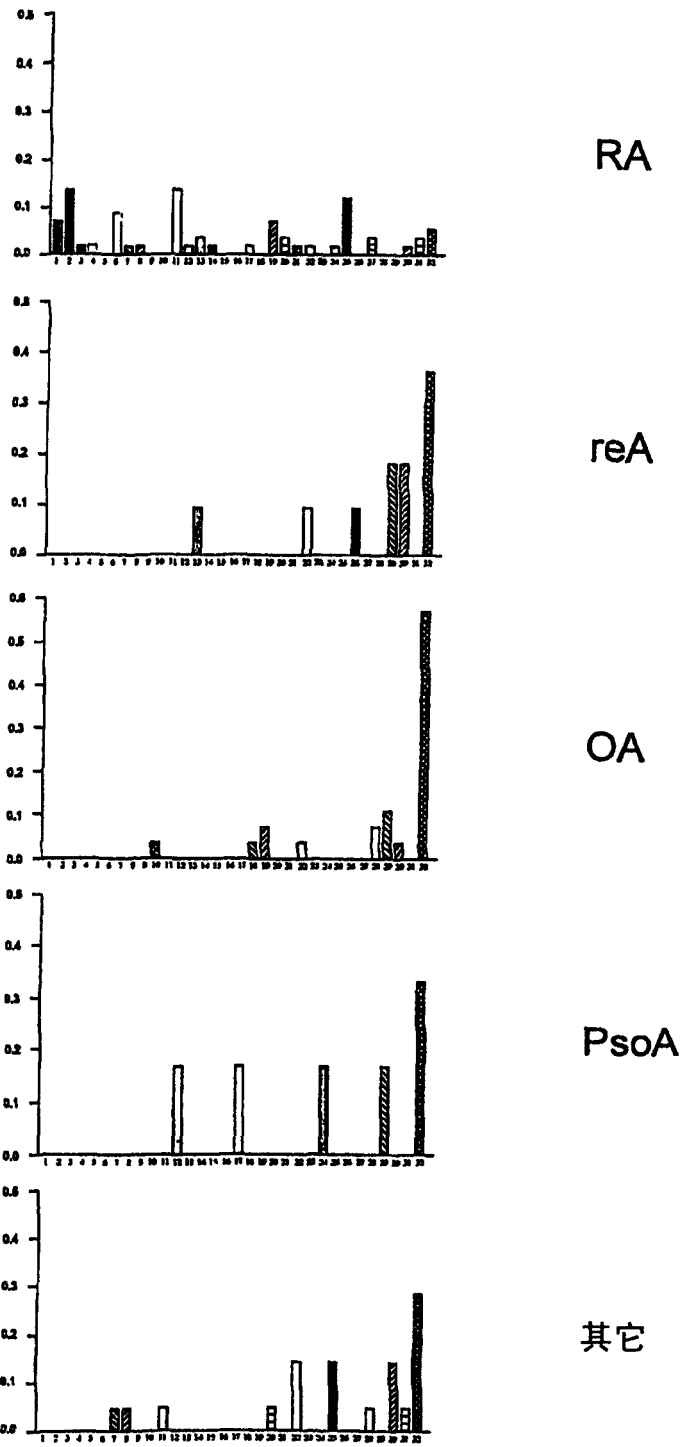


图 1

专利名称(译)	慢性炎症性关节疾病的诊断、分子分辨和治疗开发的方法		
公开(公告)号	CN1537173A	公开(公告)日	2004-10-13
申请号	CN02814978.5	申请日	2002-05-30
[标]发明人	T霍普 U昂杰特霍姆 S布莱斯		
发明人	T·霍普 U·昂杰特霍姆 S·布莱斯		
IPC分类号	G01N33/50 A61K48/00 C12N15/09 C12Q1/68 C12Q1/6883 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/564 G01N33/566		
CPC分类号	C12Q2600/158 C12Q1/6883		
代理人(译)	周承泽		
优先权	10127572 2001-05-30 DE		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及慢性炎症性关节疾病和其它炎症性、传染性或肿瘤疾病的诊断、分子辨别和治疗药物开发的方法。根据本发明，可将基因组资料(基因组学)、蛋白组资料(蛋白组学)和免疫组资料(免疫组学)用于慢性关节炎疾病的分析和治疗开发。本发明基于利用基因序列及其衍生的mRNA和蛋白质，以及对这些衍生的蛋白质具有特异性的抗体，来特征鉴定炎症性和非炎症性风湿关节疾病、自身免疫病和传染病。可从进行的检查中得出迄今尚不清楚的慢性炎症性关节疾病的病因学重要致病性机理。而且可产生用于所述关节疾病分类、预后评价和治疗优化的解释算法，并可产生药物治疗和攻击部位的新策略。

