



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102792163 A

(43) 申请公布日 2012. 11. 21

(21) 申请号 201180012118. 0

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2011. 01. 04

G01N 33/53 (2006. 01)

(30) 优先权数据

G01N 33/68 (2006. 01)

61/292, 031 2010. 01. 04 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 09. 03

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2011/020114 2011. 01. 04

(87) PCT申请的公布数据

W02011/082416 EN 2011. 07. 07

(71) 申请人 梅约医学教育与研究基金会

地址 美国明尼苏达州

(72) 发明人 V · A · 伦农 J · 张伯伦 - 巴诺布

T · J · 克雷泽 S · J · 皮托克

A · M · 奥普雷斯库

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 韦东

权利要求书 1 页 说明书 16 页

序列表 6 页 附图 6 页

(54) 发明名称

作为神经系统和内分泌疾病标记的外周蛋白
特异性自身抗体

(57) 摘要

本发明提供检测外周蛋白特异性自身抗体的
方法和材料,所述抗体与神经系统和内分泌疾病
有关。

1. 一种检测来自个体的生物样品中是否存在外周蛋白特异性自身抗体的方法,所述方法包括:

用外周蛋白多肽或其片段接触所述生物样品;和

检测所述外周蛋白多肽或其片段是否在所述生物样品中与所述外周蛋白特异性自身抗体结合。

2. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述生物样品中存在所述外周蛋白特异性自身抗体与所述个体中家族性自主神经异常或细纤维神经病、内分泌病或一种或多种其他神经学表现有关。

3. 如权利要求2所述的方法,其特征在于,所述家族性自主神经异常选自胃肠道(GI)动力障碍、促汗功能异常、副交感神经功能异常或肾上腺素功能异常。

4. 如权利要求2所述的方法,其特征在于,所述内分泌病选自糖尿病、甲状腺疾病或过早闭经。

5. 如权利要求2所述的方法,其特征在于,所述一种或多种神经学表现选自横贯性脊髓炎、非特异性脊髓病、感觉运动性神经病、视觉和其他颅神经病、脑炎、小脑共济失调或重症肌无力。

6. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述外周蛋白多肽或其片段是细胞裂解物。

7. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述外周蛋白多肽在选自下组的固体组织中:脑、脑神经、肾脏、胃或含外周神经元件的其他组织。

8. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述生物样品选自下组:血清、血浆、脑脊液和血液。

9. 一种制品,所述制品包括外周蛋白多肽或其片段和在个体中使用所述外周蛋白多肽检测抗外周蛋白自身抗体的说明。

10. 如权利要求9所述的制品,其特征在于,所述制品用于诊断所述个体中是否存在外周蛋白相关自身免疫疾病。

11. 如权利要求9所述的制品,其特征在于,所述制品还包括对外周蛋白多肽或其片段有特异结合亲和性的单克隆抗体。

12. 一种治疗患有外周蛋白相关自身免疫疾病的个体的方法,所述方法包括:

从所述对个体中取出体液,其中所述体液含有结合外周蛋白的一种或多种自身抗体;

从体液中移除很大部分自身抗体;和

将体液返回到所述对象中。

13. 一种治疗患有外周蛋白相关自身免疫疾病的个体的方法,所述方法包括:给予所述个体外周蛋白多肽。

14. 如权利要求13所述的方法,其特征在于,所述给予是通过选自下组的方法:口服、静脉内和胃肠道外。

作为神经系统和内分泌疾病标记的外周蛋白特异性自身抗体

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求 2010 年 1 月 4 日提交的美国临时申请序列号 61/292,031 的优先权。在先申请的公开内容被认为是本申请公开的部分(且通过引用纳入本文)。

[0003] 联邦资助研究或开发

[0004] 本发明是在国立卫生研究院(National Institutes of Health)授予的基金号 DK71209 和 DK68055 下由政府资助完成。政府对本发明拥有某些权利。

技术领域

[0005] 本公开通常涉及神经系统和内分泌疾病,且更具体地涉及鉴定外周蛋白特异性自身抗体作为所述神经系统和内分泌疾病的标记。

[0006] 背景

[0007] 神经限制的自身抗体作为获得性神经障碍(特发性和副肿瘤性)的血清生物标记出现。目前鉴定的自身抗原在神经元、神经胶质或骨骼肌中表达。质膜自身抗原是致病性 IgG 的潜在靶标且示例为通道蛋白。这些包括神经电压门控钾通道和脑病中的 NMDA 和 AMPA 受体、眼脑脊髓病中的星形水通道、重症肌无力中的肌肉乙酰胆碱受体 [AChR] 和自主免疫性自主神经节病中的神经元 AChR。识别细胞内自身抗原的抗体不是完整细胞的病原体。这些包括与神经元和神经胶质的胞质及核蛋白有反应性的 IgG,如全身肌强直综合征、小脑炎和脑脊髓病中的谷氨酸脱羧酶 -65(GAD65)、和多灶性副肿瘤失调中的抗神经元和神经胶质的核自身抗体。

发明内容

[0008] 外周蛋白特异性自身抗体已被鉴定为患自身免疫性神经障碍的个体中的血清生物标记(具体靶向外周自身和体细胞神经系统、脊髓和视神经),常见于内分泌疾病的环境中,有时伴有癌症。外周特异性自身抗体的检测可用于支持患有自身免疫神经系统和内分泌疾病个体的诊断。

[0009] 在一个方面,提供一种检测来自个体的生物样品中是否存在外周蛋白特异性自身抗体的方法。该方法通常包括以下步骤:用外周蛋白多肽或其片段接触生物样品;和检测所述外周蛋白多肽或其片段是否在所述生物样品中与所述外周蛋白特异性自身抗体结合。通常,外周蛋白特异性自身抗体存在于生物样品中与所述个体中家族性自主神经异常或细纤维神经病、内分泌病、脊髓病、视觉损伤或其他神经学表现有关。在某些实施方式中,外周蛋白多肽或其片段在细胞裂解液中;在其他实施方式中,所述外周蛋白多肽在选自下组的固体组织中:脑(如后脑)、肾脏、胃或含外周神经元件的其他组织中。

[0010] 家族性自主神经异常的代表示例包括胃肠道(GI)动力障碍、促汗功能异常、副交感神经功能异常、或肾上腺素功能异常。内分泌病的代表示例包括糖尿病、甲状腺疾病、或过早闭经。神经学表现的代表示例包括横贯性脊髓炎、非特异性脊髓病、视觉神经病、脑炎、

腰骶神经丛病、感觉运动性神经病、小脑共济失调或重症肌无力。在一些实施方式中,生物样品选自下组:血清、血浆、脑脊液和血液。

[0011] 在另一方面,提供一种制品。该制品通常包括外周蛋白多肽或其片段和在个体中使用所述外周蛋白检测抗外周蛋白自身抗体的说明。通常,所述制品用于诊断个体中是否存在外周蛋白相关自身免疫病。在某些实施方式中,所述制品还包括具有对外周蛋白多肽或其片段有特异结合亲和性的单克隆抗体。

[0012] 在另一方面,提供治疗患外周蛋白相关自身免疫病的个体的方法。该方法一般包括从所述对象中取出体液,其中所述体液含有结合外周蛋白的一种或多种自身抗体;从体液中移除很大部分的自身抗体;和将体液返回到所述对象中。

[0013] 在另一方面,提供治疗患外周蛋白相关自身免疫病的个体的方法。该方法一般包括给予所述个体外周蛋白多肽。在一些情况中,给予是通过选自下组的方法:口服、静脉内和胃肠道外。

[0014] 除非另外定义,本文中使用的所有技术和科学术语具有本发明所属领域普通技术人员通常所理解的同样含义。虽然在本发明的实施或测试中可以采用类似于或等同于本文所述的那些方法和材料,但是下面描述了合适的方法和材料。此外,材料、方法和实施例都仅是说明性,并不构成限制。本文中述及的所有出版物、专利申请、专利和其他参考文献都通过引用全文纳入本文。在抵触的情况下,以本说明书(包括定义在内)为准。

[0015] 在附图和以下描述中详细说明了本发明的一种或多种实施方式。通过附图和详述以及权利要求书,不难了解本发明的其它特征、目的和优点。

附图说明

[0016] 图 1 是人外周蛋白的核苷酸(SEQ ID NO:1)和氨基酸(SEQ ID NO:2)序列。

[0017] 图 2 是小鼠外周蛋白的核苷酸(SEQ ID NO:3)和氨基酸(SEQ ID NO:4)序列。

[0018] 图 3 的照片显示新 IgG 自身抗体结合小鼠胃和肾脏区段中的神经元件和中后脑中的不连续纤维束。用荧光偶联的抗人 IgG 观察结合的 IgG。该自身抗体的特征染色模式是在肠神经系统中的肠肌层神经中枢、神经纤维和神经干(上图)、胃黏膜下层和肾脏中毗邻微动脉的交感神经干和纤维(中图)和中后脑中的不连续神经束(下图)中显著。G: 神经节;NT: 神经干;NF: 神经纤维;SN: 交感神经。

[0019] 图 4 的照片显示与本文所述新自身抗体有关的抗原局限在神经元中。用不同的细胞系作为底物:嗜铬细胞瘤(PC12;左图)、星细胞(CG4;中图)和骨骼肌(L6;右图)。有用的 IgG 探针(自上)包括:神经丝(神经元)、GFAP(神经胶质)和条纹(骨骼肌肌节)、和个体患者血清。仅神经元细胞系与个体患者血清有免疫反应。

[0020] 图 5 的结果显示新 IgG 自身抗体结合限制在神经元细胞骨架中的具有 55-60kDa Mr 的蛋白。(A) 用 PC12 裂解物作为抗原来源,蛋白进行分离、免疫印迹并用个体患者或正常人血清探测。个体血清(泳道 1-4)中 IgG 显示出常见条带(约 55kDa,参考分子量标准),但对人血清(泳道 5-6)中的 IgG 没有显示。为了验证特异性,个体 IgG 在推定的抗原条带和对照条带上进行亲和纯化。推定抗原条带(B)和对照条带(C)中的洗脱物再应用到复合小鼠组织底物载玻片上,并与肠神经纤维上个体全血清 IgG 的原始免疫染色模式(D)作比较。推定抗原条带的洗脱物中观察到相同的染色模式。为了测定抗原的亚细胞分布,通

过差异性去污剂萃取来分馏 PC12 裂解物。各部分中的蛋白经电泳分辨、转印、并用个体血清 (E) 探测。IgG 专有结合细胞骨架部分中的蛋白。

[0021] 图 6 是将外周蛋白鉴定为抗原的结果。PC12 细胞的细胞骨架部分的一式两份制品,用顺序凝胶电泳和等电聚焦分离。一种凝胶用银染(A),复制品经转印并用个体血清探测(B)。从常见点(编号 1-4)的银染凝胶通过凝胶内消化产生的独特肽将抗原鉴定为外周蛋白。

[0022] 图 7 的照片显示脑和内分泌器官中个体 IgG 与外周蛋白免疫反应性共定位。从 6-8 周龄的雌性小鼠中收获组织(脑 [A-C]、甲状腺 [D-F]、脾 [G-I]、卵巢 [J-L] 和肝 [M-O]),切割低温断面(8 μ m)并用兔抗外周蛋白 IgG (左列)和个体患者 IgG (中列)染色。所有合并图像(右列)显示除了胰腺的核 DAPI 染色(蓝),其中内分泌岛细胞(I)用对 β -细胞转录因子 PDX-1 特异的 IgG 鉴定(伪紫色(pseudo-colored purple))。

[0023] 发明详述

[0024] 在有家族性自主神经异常(如胃肠道(GI)动力障碍、促汗功能异常、副交感神经功能异常或肾上腺素功能异常)、内分泌病(如糖尿病、甲状腺疾病或过早闭经)和其他神经障碍(如特定的脊髓病、视觉和其他颅神经病、小脑性共济失调和感觉主导型神经病,还有腰骶神经丛病、脑炎或重症肌无力)个体血清中鉴定到特异 IgG 自身抗体标记。重要的是,脊髓病或视力缺损患者的临床表现模拟多发性硬化。该新自身抗体的靶标鉴定为外周蛋白,这是一种单独或与其他神经丝蛋白复合形成网络的 III 型神经元中间纤维蛋白。其在神经元发育和修复中发挥作用,并在外周神经系统中广泛分布。在中枢神经系统中,其局限在向外周发射的区域中。

[0025] 因此,该公开提供在有家族性自主神经异常、脊髓病、视觉损伤、内分泌病、感觉主导型神经病或其他神经障碍的个体中检测外周蛋白特异性自身抗体的方法。在糖尿病环境中,外周蛋白特异性自身抗体的存在可用于评估个体发展神经系统并发症(如细纤维神经病)的风险。在多发性硬化或多发性硬化样环境中,存在外周蛋白特异性自身抗体可用于评估个体从免疫抑制治疗中获益的可能性。

[0026] 外周蛋白多肽和抗外周蛋白抗体

[0027] 外周蛋白多肽可用于本文所述方法(如检测外周蛋白特异性自身抗体)。外周蛋白多肽序列的示例(和编码该多肽的核酸)可参见 GenBank 登录号:BC046291;NM_001001235;NM_006262;NM_012633;BC100656;NM_001087060;和 NM_131054。其他外周蛋白序列可在例如公开数据库中找到。代表性人外周蛋白序列示于图 1(SEQ ID NO:1 和 2;分别为 DNA 和蛋白),且代表性小鼠外周蛋白序列示于图 2(SEQ ID NO:3 和 4;分别为 DNA 和蛋白)。

[0028] 外周蛋白多肽可像其他中间纤维一样不可溶。然而,外周蛋白多肽已充分研究,且文献中有许多报道描述用外周蛋白研究的方法。参见例如 Portier 等.(1983-4, Dev. Neurosci., 6(6):335-44);Landon 等.(2000, Biol. Cell., 92(6):397-407);McLean 等.(2008, J. Neurochem., 104(6):1663-73);Puertas 等.(2007, J. Immun., 178(10):6533-39);和 Aletta 等.(1989, J. Biol. Chem., 264(8):4619-27)。此外,本领域技术人员已知能用于增加多肽溶解度的方法。参见例如 Trimpin 和 Brizzard, 2009, BioTechniques, 46(6):409-19。

[0029] 外周蛋白多肽可获自表达重组外周蛋白核酸的人、小鼠或其他哺乳动物神经组

织、神经元细胞系或转染细胞(如哺乳动物、大肠杆菌(*E. coli*)或酵母),或外周蛋白多肽可以是合成的。多肽可纯化。“纯化的”多肽指在组分混合物中构成主要组分的多肽,如重量的30%或更多、40%或更多、50%或更多、60%或更多、70%或更多、80%或更多、90%或更多、95%或更多、或99%或更多。多肽可用包括亲和色谱或免疫吸收亲和柱的方法纯化。该方法可由本领域技术人员改良以增加所述多肽的溶解度,且可用常规方法检测纯化多肽的免疫原性。

[0030] 给定外周蛋白多肽序列(参见例如 SEQ ID NO:2 和 4),可用已知方法(如多肽的蛋白水解切割或化学合成)生成几乎任何多肽片段。本领域技术人员应理解外周蛋白片段可具有与全长外周蛋白多肽不同的溶解度。外周蛋白多肽的片段可包含一种或多种表位位点。外周蛋白多肽内有关 T 细胞活化和抑制的表位位点(如 MHC-I 和 MHC-II 结合表位)可用通过直接调查或用计算机算法测定。参见例如, Parker 等. (*J. Immunol.*, 152:163(1994)) 和 Southwood 等. (*J. Immunol.*, 160:3363(1998))。通常,所述表位位点需要在抗原性方面与其他紧密关联的抗原(如多肽家族的其他成员)不同。

[0031] 外周蛋白多肽或其片段可改良或不改良用于检测外周蛋白特异性抗体如外周蛋白特异性自身抗体。多肽可通过用提供检测信号的第二底物共价或非共价结合所述多肽来标记。本领域已知各种标记和偶联技术且在科学和专利文献中广泛报道。所述标记中的一些包括放射性同位元素、酶、底物、辅因子、抑制剂、荧光剂、化学发光剂、磁性颗粒等。

[0032] 外周蛋白多肽或其片段可用于各种免疫学技术以检测外周蛋白特异性抗体。例如,外周蛋白多肽可用在免疫试验中检测生物样品内的外周蛋白特异性自身抗体。免疫试验中所用的外周蛋白多肽可在细胞裂解物中(如全细胞裂解物或细胞部分),或者在外周蛋白特异性抗体(如外周蛋白特异性自身抗体)识别的至少一种抗原位点保持结合可能时,可使用纯化的外周蛋白多肽或其片段。根据样品的特性,可使用免疫试验和免疫细胞化学染色技术之一或二者都使用。酶联免疫吸附试验(ELISA)、Western 印迹和放射免疫试验是本领域所用方法,且可如本文所述用于检测生物样品中外周蛋白特异性自身抗体的存在。

[0033] 本文所用的“生物样品”通常是来自个体的样品。生物样品的非限制性示例包括血液、血清、血浆或脑脊液。此外,可使用固体组织例如脊髓或脑活检。

[0034] 本公开还提供含一种或多种外周蛋白多肽或其片段的制品(如试剂盒)。包括在本文所述制品中的外周蛋白多肽或其片段可在细胞中、其可溶的溶液中提供,或者所述外周蛋白多肽或其片段可以冻干形式提供。在某些实施方式中,本文所述的制品还可包括一种或多种用于提高多肽溶解度的化合物(如加溶剂)。所述试剂盒还可包括例如提供检测信号的第二底物。此外,试剂盒可包括使用所述外周蛋白多肽的说明和/或实施本文所述方法的说明(即检测生物样品中的外周蛋白特异性自身抗体)。

[0035] 本公开还提供检测外周蛋白多肽的方法。检测多肽通常用抗体(本文指抗外周蛋白抗体)进行,以从个体免疫系统产生的外周蛋白特异性自身抗体中区分动物生成或重组生成的抗体。本公开还提供对外周蛋白多肽或其抗原片段具有特异结合亲和性的抗体,包括单克隆抗体。

[0036] 本文所述外周蛋白多肽可用于生产对外周蛋白多肽具有特异结合亲和性的单克隆或多克隆抗外周蛋白抗体。可使用本领域普通技术人员已知的技术来生产该抗体。如本文所用,对外周蛋白多肽或其片段具有“特异结合亲和性”的抗外周蛋白抗体定义为优选结

合外周蛋白多肽或其片段但不结合非外周蛋白多肽或对其亲和性非常低的那些抗体。虽然本文所述外周蛋白特异性自身抗体是 IgG 抗体,但重组生成的“抗外周蛋白抗体”可为任何类别的全抗体(如 IgG, IgA, IgM)、具有所需特异亲和性的全抗体部分或片段(如 Fab 或 (Fab)₂ 片段)、工程改造的单链 Fv 分子或嵌合分子如含一种抗体的结合特异性(如鼠源)和另一抗体剩余部分(如人源)的抗体。

[0037] 抗外周蛋白抗体可经改良或不改良用于检测外周蛋白多肽。抗外周蛋白抗体可直接或间接标记,且包括放射性同位素、酶、底物、辅因子、抑制剂、荧光剂、化学发光剂和磁性颗粒在内的各种标记以及偶联技术已知且在科学和专利文献中广泛报道。本公开还提供对偶联成像剂的外周蛋白多肽具有特异结合亲和性的抗外周蛋白抗体。合适的成像剂包括但不限于放射性同位素如 ³²P、⁹⁹Tc、¹¹¹In 和 ¹³¹I。

[0038] 本文所述抗外周蛋白抗体可用于各种免疫学技术以检测外周蛋白多肽。已完善抗体在蛋白结合试验中的应用。根据样品特性,可使用免疫试验(如放射免疫试验)和/或免疫组化/免疫细胞化学染色技术。液相免疫试验(如竞争性抑制放射免疫试验)或固相免疫试验(如抗原-捕获或 Western 印迹分析)也可用于检测外周蛋白多肽。此外,本领域常规实施酶联免疫吸附实验(ELISA),且可用于检测外周蛋白多肽的存在。

[0039] 本公开还提供含对外周蛋白多肽或其抗原片段具有结合亲和性的抗外周蛋白抗体的试剂盒。该试剂盒还可包括外周蛋白多肽或其片段以用作结合对照或用于生成标准定量曲线。该试剂盒还可包括提供检测标记的第二底物。试剂盒通常包括使用抗外周蛋白抗体的说明(如检测或纯化外周蛋白多肽)。

[0040] 外周蛋白核酸和构建体

[0041] 如本文所用,核酸(如外周蛋白核酸)指 RNA 或 DNA。如本文所用,涉及核酸时,“分离的”指(i)编码部分或所有外周蛋白多肽的核酸序列,但不含基因组中编码外周蛋白的核酸序列一侧或两侧的正常侧接编码序列;或(ii)纳入载体或生物体基因组 DNA 的核酸,从而得到的分子与任何天然产生的载体或基因组 DNA 都不同。

[0042] 代表性外周蛋白核酸示于图 1 和 2(SEQ ID NO:1 和 3)以及本文提供的 GenBank 登录号。外周蛋白核酸还可包括外周蛋白核酸序列的片段。如本文所用,片段指对应于比完整外周蛋白序列短的核酸或多肽。核酸片段可包括那些长约 10-50 核苷酸的片段、长约 20-100 核苷酸的片段、或长约 100-数百核苷酸的片段。所述片段可例如编码外周蛋白多肽片段或具有作为杂交探针或扩增引物的实用性。

[0043] 给定外周蛋白核苷酸序列(参见例如 SEQ ID NO:1 和 3),可用已知方法(如限制性酶切、聚合酶链式反应)生成几乎任何核酸片段,且若需要其可表达产生相应的多肽片段。外周蛋白核酸序列内的各种限制性酶位点确定可以各种组合用于生成有用核酸片段的位置。

[0044] 外周蛋白核酸或核酸片段可具有衍生自野生型外周蛋白序列(如 SEQ ID NO:1 和 3)的序列,有时指变体序列。例如,变体核酸序列可与野生型外周蛋白(如 SEQ ID NO:1 和 3)具有至少 80% 的序列相同性。在一些实施方式中,变体核酸序列可与野生型外周蛋白(如 SEQ ID NO:1 和 3)具有至少 85% 的序列相同性、90% 的序列相同性、95% 的序列相同性、或至少 99% 的序列相同性。变体核酸序列可设计为编码例如与野生型多肽或其片段相比溶解度增加的变体外周蛋白多肽或其片段。

[0045] 通过测定比对核酸或多肽序列中匹配位置的数目,用匹配位置的数目分别除以比对核苷酸或氨基酸的总数目,并乘以 100 来计算序列相同性百分比。匹配位置指在比对序列同一位置具有相同核苷酸或氨基酸的位置。比对核苷酸或氨基酸的总数指比对第二序列必需的外周蛋白核苷酸或氨基酸的最小数量,且不包括与非外周蛋白序列如那些融合外周蛋白的序列的比对(如被动比对)。比对核苷酸或氨基酸的总数可与完整外周蛋白序对应或可与本文所述全长外周蛋白序列的片段对应。

[0046] 可用 Altschul 等.(1997, *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-3402) 所述的算法比对序列,纳入互连网站 ncbi.nlm.nih.gov 上可得的 BLAST (局部比对搜索基本工具) 程序中。可进行 BLAST 搜索或比对以用 Altschul 等的算法确定外周蛋白核酸分子和任何其他序列或其部分之间的序列相同性百分比。BLASTN 是用于比对和比较核酸序列之间相同性的程序,而 BLASTP 是用于比对和比较氨基酸序列之间相同性的程序。利用 BLAST 程序计算外周蛋白序列和另一序列之间的相同性百分比时,使用各程序的默认参数。

[0047] 编码外周蛋白多肽的核酸获自例如人或大鼠细胞系制作的 cDNA 库,或可通过其他方法获得,包括但不限于聚合酶链式反应(PCR)。PCR 指扩增靶核酸的程序或技术。PCR 可用于从 DNA 以及 RNA 中扩增特定序列,包括总基因组 DNA 或总细胞 RNA 的序列。各种 PCR 方法如 PCR Primer:A Laboratory Manual (《PCR 引物:实验室手册》), Dieffenbach 和 Dveksler 编,冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press), 1995 所述。通常,用感兴趣区域末端或超出其的序列信息来设计寡核苷酸引物,其与待扩增模板相反链的序列相同或相似。

[0048] 外周蛋白核酸可用例如以下方法检测:Southern 或 Northern 印迹分析(即杂交)、PCR、或原位杂交分析。核酸分子之间的杂交在 Sambrook 等.(1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 《分子克隆:实验室手册》第二版,冷泉港实验室出版社,纽约冷泉港;第 7.37-7.57、9.47-9.57、11.7-11.8 和 11.45-11.57 部分) 中详细描述。

[0049] 对于少于约 100 核苷酸的寡核苷酸,Sambrook 等在第 11.45-11.46 部分中公开了合适的 Southern 印迹条件。长度少于 100 核苷酸的序列和第二序列之间的 T_m 可用第 11.46 部分中提供的公式计算。Sambrook 等还公开了用多于约 100 核苷酸的寡核苷酸探针进行 Southern 印迹的预杂交和杂交条件(参见 9.47-9.52 部分)。用多于约 100 核苷酸的寡核苷酸的杂交通常在低于 $T_m 15-25^{\circ}\text{C}$ 下进行。长度大于 100 核苷酸的序列和第二序列之间的 T_m 可用 Sambrook 等在第 9.50-9.51 部分中提供的公式计算。此外,Sambrook 等推荐 9.54 部分中所示的条件来清洗用多于约 100 核苷酸的寡核苷酸探测的 Southern 印迹。

[0050] 含核酸的膜预杂交和杂交的条件以及含核酸的膜清洗以移除过量和非特异结合探针的条件可在杂交的严谨性中发挥重要作用。所述杂交可在合适的时候于中度或高度严谨条件下进行。该条件例如 Sambrook 等第 11.45-11.46 部分所述。例如,可通过降低清洗溶液的盐浓度和/或提高进行清洗的温度来使清洗条件更严谨。此外,解读杂交量可受例如经标记寡核苷酸的特异活性、与探针杂交的模板核酸上探针结合位点的数量和放射自显影或其他检测介质的曝光量的影响。

[0051] 本领域技术人员容易理解尽管任何数量的杂交和清洗条件可用于检测探针核酸分子与固定靶核酸的杂交,但更重要的是在相同的杂交、清洗和曝光条件下检测探针与靶核酸的杂交。所述靶核酸优选在同一膜上。

[0052] 若与第一核酸的杂交是与第二核酸的杂交的至少 5 倍(如至少 6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、10 倍、20 倍、50 倍或 100 倍),则核酸分子被认为与第一靶核酸杂交,但不与第二靶核酸杂交。杂交量可在膜上或从放射自显影照片上直接定量,使用例如磷屏成像仪(PhosphorImager)或密度仪(Densitometer)(分子动力学公司(Molecular Dynamics),加利福尼亚州萨尼维尔)。

[0053] 本文还提供的载体含外周蛋白核酸(参见例如 SEQ ID NO:1 和 3)或其互补物、外周蛋白核酸片段或其互补物和那些与外周蛋白核酸或其产生的片段(或其互补物)具有至少 80% 序列相同性的那些核酸。克隆载体市售可得且为本领域普通技术人员常规使用。载体还可包含表达可操作连接外周蛋白核酸序列所需的元件。“表达所需的元件”包括启动子序列,还可包括调控外周蛋白核酸序列表达的调节元件如增强子序列、响应元件或诱导型元件。本文所用的“可操作连接”指将启动子和 / 或其他调控元件以指导或调节外周蛋白核酸表达的方式置于有关外周蛋白核酸序列的构建体中。该构建体市售可得(如表达载体)和 / 或通过本领域常规的重组 DNA 技术方法生产。表达系统的选择取决于数种因素,包括但不限于:复制效率、选择能力、诱导能力、靶向、所需表达水平、回收容易程度和宿主进行翻译后修饰的能力。可获得能提高表达多肽溶解度的克隆载体。参见,例如美国专利 7,501,484 和 7,524,648。

[0054] 本文所用的术语“宿主”或“宿主细胞”不仅包括原核生物如大肠杆菌,还包括真核生物,例如酵母、昆虫、植物和动物细胞。动物细胞包括例如 COS 细胞和 HeLa 细胞。使用本领域普通技术人员已知的任何技术如磷酸钙或乙酸锂沉淀、电穿孔、脂质转染和颗粒轰击,宿主细胞可用 DNA 分子(如载体或构建体)转化或转染。含本文所述载体的宿主细胞可用于诸如增殖载体、生产外周蛋白核酸(如 DNA、RNA、反义 RNA)、或表达外周蛋白多肽或其片段等目的。

[0055] 提供从外周蛋白核酸生产外周蛋白多肽的方法。生产外周蛋白多肽的方法包括但不限于,在允许外周蛋白表达的条件下培养含外周蛋白表达载体的宿主细胞,并回收(如纯化)外周蛋白多肽。培养细菌并回收包括不溶性多肽在内的表达多肽的方法为本领域普通技术人员熟知。

[0056] 治疗方法

[0057] 本公开还提供治疗免疫系统产生外周蛋白特异性自身抗体的个体的方法。该外周蛋白相关自身免疫病的治疗可包括但不限于血液成分分离和 / 或基于 T 细胞受体的免疫治疗。

[0058] 用于血液成分分离(即从个体中取出血液、从该血液中移除组分并将血液或一种或多种组分被消耗的血液返回所述个体的过程)的方法和体外系统为本领域已知(参见例如美国专利号 4,708,713;5,258,503;5,386,734;和 6,409,696)。本公开提供从个体体液中移除外周蛋白特异性自身抗体的方法。所述方法包括从对象中取出体液;从该液体中移除很大部分的外周蛋白特异性自身抗体;并将该液体返回所述对象。移除的抗体可为任何类别,如 IgG(例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)、IgM、IgD、IgA、或 IgE 抗体。

[0059] 本文所用的“很大部分”表示移除至少 20%(如至少:20%;30%;40%;50%;60%;65%;70%;75%;80%;85%;90%;93%;95%;96%;97%;98%;99%;99.5%;99.8%;或甚至 100%)的移除前体液中存在的外周蛋白特异性自身抗体。体液可为血浆或任何其他体液,如淋巴液或脑脊液。

如本文所述的方法,从患外周蛋白相关自身免疫病的个体中消除外周蛋白特异性自身抗体可使一种或多种症状减轻或降低。

[0060] 移除外周蛋白特异性自身抗体一般通过用体液接触外周蛋白多肽或其片段来进行。外周蛋白多肽或其片段可结合固体支持物。该固体支持物可为但不限于膜、纤维、球形珠粒或颗粒且可与水不溶性(优选多孔的)生物相容材料一起制备,如有机聚合物如琼脂糖、右旋糖苷和聚丙烯酰胺,或者无机多孔材料如多孔玻璃或多孔硅胶。该材料适于或调整(如用合适的化学基团衍生化)为结合外周蛋白多肽。

[0061] 当所述体液是血液时,所述血浆和/或白细胞可从红细胞(如红细胞(erythrocytes))中分离且含或不含白细胞的红细胞可返回所述个体。通常,返回个体的血细胞具有人工而非其原始血浆。“替换液体”(如生理盐水)可在移除所述液体后给予所述个体。或者,外周蛋白特异性自身抗体可在血液成分分离的过程中从血浆中选择移除且所述血细胞可与消除外周蛋白特异性自身抗体的血浆混合,然后作为混合物再输注到所述个体中。

[0062] 所述系统可为连续系统,其中例如血液泵出血管(例如动脉或静脉)穿过用外周蛋白多肽衍生化的固体支持物并直接泵回所述个体的血管中。作为非连续系统,血浆穿过所述固体支持物前血细胞可从血浆中分离。

[0063] 除了血液成分分离外,T细胞受体治疗的方法为本领域已知。参见例如 Fujio 等.,2007,Ann. N. Y. Acad. Sci.,1110:222-32;Offner 等.,2008,Rev. Neurosci.,19:327-39;和 Bendle 等.,2009,Curr. Opin. Immunol.,21:209-14。对负责诱导和维持外周蛋白特异性自身抗体生产的T细胞群上的外周蛋白受体或其他标记表达的抗原具有特异结合亲和性的单克隆或多克隆抗体可用于消除或抑制一种或多种致病性T细胞。T细胞受体的CDR3谱型可用于鉴定自身免疫病相关的T细胞受体(Matsumoto等,同上;和 Jambou 等.,2003,J. Clin. Invest.,112:254-74)。此外,个体中T细胞的活化可通过给予细胞因子或对细胞因子具有特异结合亲和性的抗体来抑制。例如,为了降低Th1-型免疫应答,给予个体细胞因子如白介素(IL)-4、IL-10、或IL-13,或者对细胞因子如IL-12或IFN- γ 特异的抗体。相似地,为了抑制Th2-型免疫应答,可给予个体细胞因子如IL-12或IFN- γ 或者对IL-4、IL-10、或IL-13特异的抗体。

[0064] 还提供从个体中列举或分离外周蛋白特异T细胞的方法。本方法可用于例如监控个体免疫应答或使用外周蛋白特异细胞毒性T细胞的免疫治疗。所述方法包括用含淋巴细胞的生物样品接触具有相同外周蛋白多肽或其片段的可溶四聚体I型或II型主要组织相容性复合物(MHC)。接头分子如抗生物素蛋白和生物素用于生产外周蛋白多肽-MHC四聚体复合物,随后其可用指示分子标记从而那些识别外周蛋白多肽-MHC四聚体复合物的T细胞被列举或分离(如用FACS分析)。参见例如 Schwartz,1998,New England J. Med.,339:1076-8,和其中的参考文献。

[0065] 除了血液成分分离和T细胞受体治疗外,治疗方法可包括给予个体有效量的药物组合物(例如外周蛋白多肽或核酸如反义寡核苷酸或编码外周蛋白多肽的核酸)。有效量是偏离个体的外周蛋白介导的免疫应答,从而调控所述个体中自身免疫病的量。如本文所用,“调控”自身免疫病可指降低一种或多种症状的严重性、消除所有症状或其间任何水平的症状。

[0066] 外周蛋白多肽可直接或通过给予适当表达编码外周蛋白多肽的核酸的载体来递送到个体。用于递送编码生物学上有用蛋白的核酸到个体中的载体为本领域已知且包括例如腺病毒、腺相关病毒、逆转录病毒、慢病毒、痘苗病毒、疱疹病毒和牛乳头瘤病毒核酸。本文所用的“给予”指递送组合物(如外周蛋白多肽、编码外周蛋白多肽的核酸、或与部分编码外周蛋白多肽的核酸特异性杂交的反义寡核苷酸)给个体的方法。给予途径包括但不限于:口服、经鼻、静脉内、肌肉内、腹膜内、皮下、鞘内、皮内或局部给予。给予组合物的量取决于许多因素,包括给予途径和制剂(如固体、液体或乳剂)。制备和后续给予治疗组合物的方法为本领域技术人员已知。参见例如 Remington, 2000, The Science and Practice of Pharmacy (《药物科学和实践》), 第 20 版, Gennaro 和 Gennaro 编辑, Lippincott, Williams 和 Wilkins。

[0067] 还提供在个体中成像外周蛋白多肽表达细胞的方法。所述方法包括给予所述个体对标记有成像剂例如 ^{32}P 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 或 ^{131}I 的外周蛋白多肽具有特异结合亲和性的有效量抗外周蛋白抗体,以结合细胞中释放或可进入细胞的外周蛋白多肽并检测形成的任何复合物。本领域普通技术人员熟知抗外周蛋白抗体的适合量是有效成像细胞的任何量如约 0.1mCi-约 50.0mCi。此外,有效量的抗外周蛋白抗体可为约 0.01mg-约 100mg 的量。给予成像剂的合适方法如上所述且可如上所述被靶向(如到脑中)。成像方法取决于所用试剂且为本领域技术人员熟知。

[0068] 以下实施例描述了代表性材料和方法,其不限制权利要求书所述的本发明范围。

实施例

[0069] 实施例 1- 预筛选

[0070] 本研究由梅约基金审查委员会(Mayo Foundation Institutional Review Board)批准进行(IRB#06-007020)。在 1998 年 1 月 1 日和 2008 年 12 月 31 日之间,梅约临床神经免疫学实验室就神经系统自身免疫的证据预筛选了约 160000 个体的血清。除了用于阳离子通道自身抗体的免疫沉淀试验外,通过间接免疫荧光就 IgG 选择性结合小鼠脑、内脏和肾脏组织的复合底物中神经元件来筛选血清(Pittock 等., 2004, Mayo Clin. Proc., 81:1207-14)。在一些情况中,检测中枢和外周神经系统中结合分离纤维状元件的 IgG。前 5 个体中的临床关联性回顾表明与自身功能障碍的显著关联,尤其是胃肠道动力障碍。为了更严格定义新自身抗体的临床伴随,预收集了其他 21 个体,其血清产生此免疫染色模式且可获得足够的临床信息。回顾血清反应阳性个体的记录,并提取和列表相关历史、身体检查结果和实验室报告(成像、电生理、生理[自主反射筛选和体温调节发汗测试]和自身免疫血清学)。

[0071] 实施例 2—大鼠细胞系

[0072] 细胞置于聚 L-赖氨酸包被的玻璃盖玻片上(BD BioCoat 354085)并在 5-7%CO₂/95-93% 空气的湿润大气中于 37°C 保持。用 1mM L-谷氨酰胺(西格玛-艾尔德里奇公司(Sigma-Aldrich)G8540-100G)和青霉素/链霉素(英杰公司(Invitrogen)15140-163)补充培养基。PC12 大鼠嗜铬细胞瘤细胞(ATCC CRL-1721)维持在补充有 10% 胎牛血清(阿特拉斯生物公司(Atlas Biologicals)目录号 F-0500-A)和 10% 马血清(海克隆公司(HyClone Labs)目录号 A-3311-L)的 DMEM 4.5(英杰公司 12100-061)中。为了促进分

化,每隔一天加入小鼠神经生长因子(2.5S;阿拉萌实验室(Alamone Laboratory),目录号N-100)持续7天(100ng/mL)。L6骨骼肌细胞(ATCC,CRL-1458)维持在补充有10%马血清的DMEM 4.5中。为了促进分化,2%胎牛血清可取代3天;通过显微镜检查确认肌管形成。CG4少突胶质-星形胶质祖细胞(Charles Howe博士提供,明尼苏达州洛切斯特的梅约诊所神经科)在增殖培养基中生长并如前述分化(Hinson等.,2008,J. Exp. Med.,205:2473-81)。

[0073] 实施例3:抗体探针

[0074] 如所示获得兔抗神经丝M(开米康公司(Chemicon)AB1987)、偶联的鸡抗GFAP-Cy3(西格玛(Sigma)C9205)、兔抗外周蛋白(开米康公司AB1987)、鼠抗外周蛋白(开米康公司MAB1527)、羊抗PDX-1(阿柏堪穆公司(Abcam)ab47383)和含与骨骼肌收缩蛋白(重症肌无力个体,83-4868)反应的IgG的人血清。偶联荧光物或辣根过氧化物酶的物种特异性抗IgG抗体获自SBA公司(Southern Biotechnology Associates, Inc.)。

[0075] 实施例4—免疫荧光

[0076] 个体血清先在含1%BSA的PBS中稀释(1:240),并用牛肝粉预吸附。临床底物-3种组织(成年小鼠小脑/中脑/内脏和肾脏)的复合冷冻部分(4- μ m厚)用10%福尔马林后固定。结合盖玻片的细胞底物用PBS清洗、在95%乙醇/5%乙酸中固定(-20°C,15分钟)、在PBS中冲洗、并通过暴露于0.05%曲通X1003分钟来透化。所有底物用正常羊血清封闭(PBS中的10%;15分钟)。市售抗体探针在封闭缓冲液中稀释。应用一抗(45分钟)和清洗后,应用物种合适的二抗(45分钟)、冲洗底物、应用ProLong抗荧光淬灭培养基(分子探针公司(Molecular Probes)P36935)并安装盖玻片。产生阳性结果的个体血清在双倍稀释液中滴定,测定抗体检测的终点。

[0077] 实施例5—多抗原标记

[0078] 雌性小鼠(6-8周龄)的组织在OCT中定向并在异戊烷中速冻。冰冻切片(8 μ m)经空气干燥、在含10%正常羊血清或1%BSA的PBS中(30分钟)、一抗中(45分钟)和二抗中(45分钟)顺序孵育。清洗后,将其装在含DAPI的ProLong抗荧光淬灭试剂中并用共聚焦显微分析。动物研究得到梅约机构动物管理和使用委员会(Mayo Institutional Animal Use and Care Committee)的批准(A36207)。

[0079] 实施例6—蛋白提取和Western印迹

[0080] PC12细胞(100 μ L包装体积)在含1%NP40、0.1%SDS和蛋白酶抑制剂(Complete™,罗氏(Roche)11697498001)的2mL缓冲液(0.15M NaCl、0.01M NaPO₄、2mM EDTA、pH 7.2)中提取。振荡后(4°C,1小时),在2%SDS和2-巯基乙醇中煮沸(5分钟)蛋白使之变性并还原,在10%聚丙烯酰胺凝胶电泳中分离,并转移到硝酸纤维素膜上用于Western印迹。分子量标准包括生物素化的宽范围标记(伯乐公司(BioRad)161-0322)或预染色的SDS-PAGE标准(伯乐公司161-0374)。

[0081] 实施例7—个体IgG的亲合纯化

[0082] PC12裂解蛋白转印到硝酸纤维素膜上。结合抗原性蛋白通过切割垂直边缘条的Western印迹染色定位。含抗原的水平插入条和缺少感兴趣抗原的对照水平条用个体血清探测。二者都在高盐缓冲液(含500mM NaCl的50mMTris-HCl、pH 7.4)中清洗3次,低盐缓冲液(100mM NaCl)中清洗一次。结合的IgG在冰醋酸中洗脱、中和、并在PBS、0.02%叠氮钠中透析,应用于复合小鼠组织底物以评估免疫荧光染色模式。

[0083] 实施例 8—亚细胞分离

[0084] 用亚细胞蛋白质组提取试剂盒(卡巴开公司(Calbiochem)539790)从 PC12 细胞中制备四种组分(细胞溶质、质膜、核和细胞骨架)。在变性的 10% 聚丙烯酰胺凝胶中电泳后,蛋白转印到硝酸纤维素膜上并用阳性个体血清探测。

[0085] 实施例 9—二维 (2D) 凝胶电泳, 凝胶内胰蛋白酶消化和质谱

[0086] 含推定抗原的组分用公开的方法(12)由 2D 凝胶电泳分离。用银染和免疫印迹观察蛋白质。切割显著的抗原点并进行凝胶内消化和用串联质谱分析(Jimenez 等., 1998, Current Protocols in Protein Science(《最新蛋白质科学实验指南》), S14, 约翰韦利森公司(John Wiley&Sons, Inc.))。用 MASCOT 搜索算法鉴定肽(Kapp 等., 2007, Current Protocols in Protein Science(《最新蛋白质科学实验指南》), S49, 约翰韦利森公司)。

[0087] 实施例 10—新神经自身抗体的临床—血清学关联

[0088] 最初鉴定到总计 26 个血清阳性个体鉴定, 可获得其临床记录(16 女, 10 男)。在 173 个年龄匹配的健康对照对象中任何一个都没有检测到所述新自身抗体。表 1 概括了个体的临床和实验室信息和血清学数据。血清阳性个体的年龄中值为 46 岁(范围为 21-86); 且新 IgG 的滴定中值为 3840(范围为 240-30720)。所有均在梅约诊所评估, 除了 8 个例外。25 个有神经学主述; 且 19 (73%) 个具有家族性自主神经异常或内分泌病。

[0089] 记载了个体中不同的神经学表现: 感觉运动性神经病、腰骶神经丛病、横贯性脊髓炎、非特异性脊髓病、视觉神经病、脑炎、小脑共济失调和重症肌无力。6 个患者(23%)具有 1 种或多种共存的神经自身抗体(电压门控神经钙通道或钾通道, GAD 65[3 个体], 神经节乙酰胆碱受体, CRMP-5)。

[0090] 家族性自主神经异常是最常记载的临床伴随(14 个体; 54%)。其广义为 2 个且狭义为 12 个; 8 个患胃肠道 (GI) 动力障碍, 6 个有促汗功能、副交感神经功能或肾上腺素功能异常。GI 动力障碍用内窥镜检查法、压力测量法或转运研究确认。

[0091] 9 个体(35%)具有临床记载的内分泌病, 内分泌自身免疫标记抗体或二者都有。7 个体记载内分泌学失调, 包括糖尿病(2 个体具有对 GAD65 和岛抗原 -2[IA-2] 特异的自身抗体)、甲状腺失调和过早闭经。2 个体具有甲状腺自身抗体(甲状腺过氧化物酶 [2] 或甲状腺球蛋白 [1]) 但没有记载甲状腺功能障碍。

[0092] 在继续的实验中, 外周蛋白 -IgG 逐渐被识别为模拟多发性硬化的炎症自身免疫 CNS 失调患者亚组的生物标记(由 3 个原始患者概括; 表 1 中的数字 11、15 和 26)。“MS 模拟表型”的 9 名患者示于表 2。

[0093] 表 1. 血清阳性个体中的临床—血清学关联

[0094]

患者 #	年龄* (岁)/ 性别/种族	周 外 白 蛋 白 IgG 滴度, IF	家族性自主神经异常征兆			其他神经学症状或征兆	内分泌 病
			广 义	狭义			
					胃肠	其他 [†]	
1 [‡]	79/M/U	240	—	弛缓不能, 胃轻瘫, 体重下降	—	—	—
2 [‡]	60/F/C	240	—	弛缓不能, 体重下降	—	—	—
3 [‡]	38/F/C	1,920	—	吞咽困难, 体重下降	—	—	—

[0095]

4	26/F/AA	1,920	+	胃轻瘫, 肠道运输 延迟	ART 异常	—	糖尿病
5 [‡]	46/F/C	3,840	—	—	直立性低血压 (ART 和 TST 异常)	足部麻木, 尿急, 失禁	—
6 [‡]	39/F/C	240	—	胃肠运输 延迟	—	—	—
7 ^{‡,§}	70/M/C	480	—	—	直立性低血压 有昏厥(ART 异常)	枕骨转移引起的右侧偏盲 [§]	—
8 [‡]	35/F/U	3840	—	—	ART 与 POTS 一致 (姿势性 直立心动过速 症)	疲劳, 扩散性肌肉硬变, 双 手和足部麻木; 纤维肌痛	—
9 [‡]	43/F/C	3,840	—	—	— (ART 正常)	麻木, 麻刺感, 足部和手疼 痛	甲状腺 功能减 退, 过早 闭经
10 [‡]	40/F/U	1,920	—	—	—	感觉运动性神经病	甲状腺 功能减 退; 过早 闭经
11	43/F/U	3,840	—	—	—	视觉神经病	—
12 [‡]	39/F/C	960	—	小肠移动 性运输延 迟	— (ART 正 常)	头晕, 心悸	—
13 ^{‡,§}	70/F/C	1,920	—	— (仅 体重下降)	轻度直立眩晕 (ART 和 TST 异 常)	左腿虚弱, 疼痛; 左腰骶神 经丛病	甲状腺 功能亢 进, 糖尿 病
14 [‡]	45/M/C	7,680	—	—	—	—	糖尿病
15 [‡]	47/M/C	1,920	—	—	—	横贯性脊髓炎(脊髓中 C5 水 平脊髓损伤加重)	甲状腺 功能减 退
16 [‡]	46/F/C	3,840	—	—	—	颈部痛	—
17 [‡]	66/M/U	3,840	—	—	—	重症肌无力	糖尿病, 甲状腺 功能减 退症
18 [‡]	47/F/C	960	—	弛缓不能, 体重下降	—	—	—
19	27/M/C	30,720	—	—	轻度强直	多发性神经根性神经炎 (IVIG 治疗后改善)	—
20	59/M/C	7,680	—	—	—	姿势性直立性战栗	—
21	47/M/C	7,680	+	吞咽困难, 恶心, 呕 吐, 体重 下降	ART: 细纤维 神经病	勃起功能障碍	—
22	86/M/C	15,360	—	—	—	小脑共济失调	—
23 [§]	52/F/C	30,720	—	—	低血压, 焦虑	—	—
24	40/F/H	7,680	—	—	—	脑炎发作	—
25 [‡]	21/M/C	3,840	—	—	—	广义身体疼痛, 角弓反张性 痉挛 (opisthotonic spasms); 广泛评价仍无诊断	—
26	60/F/C	30,720	—	—	—	脊髓病	—

[0096] * 自身抗体检测的年龄; 性别: M, 男; F, 女; 种族划分: C, 高加索人; AA, 非洲裔美国人; H, 西班牙人; U, 未知。† 8 名患者进行自主实验室评估神经节后促汗、副交感神经

和肾上腺素功能 (ART, 自主反射检测 ;TST, 体温调节发汗测试)。*梅约诊所患者。.[§] 癌症检测 : 患者 7, 自身抗体检测 8 年前腺鳞癌细胞肺肿瘤转移到左侧枕叶 ; 患者 13, 垂体腺瘤 (全垂体机能减退后切除) ; 患者 23, 乳腺癌。8 名患者具有共存的器官特异性自身抗体或疾病 : 电压门控性钙通道、N- 型 (患者 4) ; 电压门控性钾通道 (患者 24) ; 谷氨酸脱羧酶 -65 (患者 4、14 和 24) ; IA-2 岛细胞抗原 (患者 4 和 14) ; 肌肉乙酰胆碱受体 (患者 17) ; 神经节乙酰胆碱受体 (患者 19) ; 甲状腺素蛋白 (患者 5、14 和 24) ; 甲状腺过氧化物酶 (患者 5) ; 坍塌反应调节蛋白 (CRMP)-5 (患者 17) ; 牛皮癣 (患者 18) ; 干燥综合征 (患者 9)。

[0097] 表 2. 炎症自身免疫 CNS 失调亚组的生物标记外周蛋白 -IgG, 用前视觉通路 (视神经) 和脊髓 (多发性硬化拟态) 的主要病变表示, 患和不患内分泌病 (均用 Western 印迹确认)。

[0098]

患者 #	性别	CNS 症状发作时年龄	外周蛋白 -IgG 滴度 (免疫荧光)*	发现			其他	内分泌病
				脊髓	视神经	脑		
1	M	47	>480	脊髓病-前角细胞病变	无	MRI: 皮层脊髓束信号异常	小脑共济失调, 外周神经病, 勃起功能障碍	1 型 DM, 甲状腺功能减退
2	F	16	>480	正常	双侧视神经炎; 类固醇-响应	正常 MRI	-	-
3	F	39	960	进行性脊髓病	-	MRI: 脱髓鞘	-	-
4	M	33	960	脊髓病	单侧视神经炎, 部分影响左眼和右眼	MRI: 脱髓鞘	-	-
5	F	38	1920	脊髓病-MRI 正常	复发单侧视神经炎; 类固醇-响	正常 MRI	-	甲状腺功能亢进

[0099]

					应性			
6	F	35	>480	脊髓病-仅感觉-MRI 纵向延伸的 C2-C8 损伤	-	正 常 MRI	-	-
7	M	74	32 (CSF)	TM-截瘫-MRI 显示纵向延伸的 T9-圆锥损伤		MRI: 脱髓鞘	-	DM, 甲状腺机能减退
8	F	28	15,360	TM-截瘫-MRI 显示纵向延伸的损伤-CSF 中单纯疱疹病毒 PCR 阳性; 用阿昔洛韦改良	-	正 常 MRI	-	-
9	F	39	61,440	TM→进行性 脊髓病-MRI 显示宫颈(上和下) 和 胸(T6-T8) 髓损伤	光学相干断层摄像: 视网膜神经纤维薄层, 右	MRI: 脱髓鞘	-	-

[0100] 实施例 11—免疫组化特征

[0101] 图 3 显示小鼠组织上人 IgG 免疫染色的不同模式。胃中（上图），免疫反应元件主要在平滑肌(肠神经节和神经干)、黏膜和粘膜下层(神经纤维) 的神经元件中。肾中(中图)，免疫反应局限于动脉和微动脉附近的交感神经干和纤维。中后脑(下图)含有分离的免疫反应神经束。

[0102] 实施例 12—神经元含丰富自身抗原

[0103] 为了明确鉴定表达免疫反应性的细胞类型，用个体 IgG 和定义的 IgG 探针研究一组大鼠细胞系，所述探针检测 PC12 嗜铬细胞瘤性细胞、CG4 神经胶质细胞和 L6 骨骼肌细胞中细胞类型适当的纤丝(图 4)（分别为神经丝、GFAP 中间纤维和肌节条纹抗原 (Williams 等., 1991, Clin. Immunol. Newsletter, 11:161-170)。新型人自身抗原结合限于 PC12 神经元细胞胞质中的纤丝。然后用 PC12 神经元细胞作为自身抗原的来源用于免疫化学和分子分析。

[0104] Western 印迹确定个体血清中的 IgG（所检测 18 个中的 18 个）结合 Mr 约 55kDa 的 PC12 裂解物蛋白(图 5A)。为了确认该蛋白代表免疫染色所定义的抗原，电泳分离的蛋白转至硝酸纤维素膜上且边缘条用个体 IgG 探测以鉴定免疫反应条带。含免疫反应性的水平条加上含低分子量蛋白的不相关条被切割并暴露于个体血清或对照人血清。充分清洗后，洗脱结合的 IgG 并应用于小鼠三组织底物。从约 55kDa 蛋白条中而非不相关蛋白条中洗脱的 IgG 产生用个体原始血清观察到的特征染色模式（图 5B-D）。

[0105] 实施例 13—神经元自身抗原的鉴定

[0106] 细胞溶质、膜、核或细胞骨架富集的 PC12 裂解物组分的 Western 印迹分析表明个体血清中的 IgG 广泛结合细胞骨架蛋白(图 5E)。最初纯化抗原的尝试受到其不可溶性的限制，但 2D 电泳、免疫印迹和质谱分析的组合可产生纯化抗原。银染和免疫印迹都显示 4 种相同的点(图 6)。凝胶内消化和质谱对各点的分析产生 41、47、38 和 36 种含外周蛋白独特序列的独特肽。

[0107] 实施例 14—外周蛋白在多种内分泌组织中表达

[0108] 兔抗外周蛋白 IgG、个体血清和成年小鼠组织用于研究外周蛋白在内分泌组织中

的分布,其中本报告中 35%的外周蛋白 -IgG 阳性个体有自身免疫的临床或血清证据,即甲状腺、胰腺和卵巢。脑作为阳性对照组织,且肝脏作为阴性对照组织(McLean 等., 2008, J. Neurochem., 104:1663-73)。个体 IgG 确定的脑中自身抗原和外周蛋白共定位(图 7)。免疫反应性在朗格汉斯岛周围的神经纤维、甲状腺小囊之间空隙组织中的神经纤维和邻近卵泡的纤维中显著。免疫反应性在肝中没有检测到。

[0109] 实施例 15—外周蛋白特异性自身抗体的临床关联

[0110] 为了估计血清阳性在临床相关诊断类别中附带检测(表 1)的患者内外周蛋白特异性自身抗体的频率,选择下述临床相关诊断组中储存的患者血清用于免疫荧光和 Western 印迹(如上所述使用 PC12 细胞裂解物)。

[0111] 第 1 组 1 型糖尿病 :n=28(中值年龄 20, 年龄范围 3-65);

[0112] 第 2 组 1 型糖尿病、过早闭经、甲状腺炎、胸腺瘤、垂体瘤的各种组合 :n=9; 和

[0113] 第 3 组具有 / 不具有自主神经病的细纤维外周神经病、过早闭经或 1 型糖尿病 :n=12。

[0114] 三组中任一组的所有患者都非 IF 阳性。组 1 或组 2 中患者的 Western 印迹都不是阳性,而组 3 中 4 个患者(33%)的 Western 印迹为阳性。这些结果总结在表 3 中。

[0115] 表 3. 根据临床诊断类别选择的患者组储存血清中的外周蛋白 -IgG 的频率

[0116]

诊断组	患者数			年龄, 岁 ^a		外周蛋白-IgG 阳性 (%)	
	F	M	总数	中值	范围	免疫荧光	Western 印迹
糖尿病, 1 型, 无神经障碍	18	10	28	20	3-65	0	0
胸腺瘤(7) 或脑膜瘤(1), 有或没有一种或多种内分泌病(1 型糖尿病, 过早闭经, 甲状腺炎)	8	1	9	54	19-75	0	0
细纤维神经病, 有/无自主病变, 过早闭经或 1 型糖尿病	8	4	12	37	16-66	0	33

[0117] ^a 取血年龄

[0118] 这些发现表明外周蛋白特异性自身抗体可为 1 型糖尿病和 / 或甲状腺病患者中细纤维外周神经病 / 自主神经病在诊断上的有用标记,且可预测内分泌自身免疫患者的细纤维外周神经病的发展。

[0119] 其他实施方式

[0120] 应理解虽然本发明已结合其详述进行描述,但以上描述意在说明而不是限制本发明的范围,该范围由所附权利要求的范围限定。其他方面、优势和修改在以下权利要求的范围内。

[0001]

序列表

<110> 梅约医学教育与研究基金会(Mayo Foundation for Medical Education and Research)

<120> 作为神经系统和内分泌疾病标记的外周蛋白特异性自身抗体

<130> 07039-0953W01

<150> 61/292,031

<151> 2010-01-04

<160> 4

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 1833

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 1

```
cctcgcagcg gtctgcgget ccttcccagc ccccggccta gctctgcgaa cggtagactgc 60
ccatecttgg ccgaatgag ccaccaccg tegggcctcc ggcccggett cagctccacc 120
tcataccgcc gtaccttcgg tccaccgcc tcaactatcc ccggggcctt ctctactcgc 180
tccagctccc gcttctccag cagccgcctg ctgggctccg cgtccccgag ctctcggtg 240
cgctgggca gcttccgtag cccccgagcg ggagcgggcg cctcctgcg cctgccctcg 300
gagcgctcg acttctccat ggccgagggc ctcaaccagg agttcctggc cacgcgcagc 360
aacgagaagc aggagctgca ggagctcaac gaccgcttcg ccaacttcat cgagaaggta 420
cgtttcttgg agcagcagaa cggggcctg cggggggagc tgagccaagc ccggggccag 480
gagccggcgc gcgccgacca gtgtgccag caggagctgc gcgagctgcg gcgagagctg 540
gagctgttgg gccgcgagcg tgaccgggtg caggtggagc gcgacgggct ggccgaggac 600
ctggcggcgc tcaagcagag gttggaggag gagacgcgca agcgggagga cgcggagcac 660
aacctcgtgc tcttccgcaa ggacgtggac gatgccactc tgtcccgcct ggaactagag 720
cgcaagattg agtctctgat ggatgagatt gatttctca agaagctgca cgaggaggag 780
ctgcgagacc tgcaggtgag tgtggagagc cagcaggtgc agcaggtgga ggtggaagcc 840
acggtgaagc ccgagctgac ggcagcgtg agggacatcc gcgcgcagta cgagagcacc 900
gccgcgaaga acctgcagga ggccgaggag tggtacaagt ccaagtacgc ggacctgtcc 960
gacgtgcc aaccgaacca cgagccctg cgccaggcca agcaggagat gaacgagtcc 1020
```

[0002]

```

cgacgccaga tccagagtct aacgtgcgag gtggacgggc tgcgcggcac gaacgaggcg 1080
ctgctcaggc agttgagaga gctggaggag cagttcgccc tggaggcggg gggctaccag 1140
gcgggcgctg cgcggctcga ggaggagctg cgacagctaa aagaggagat ggcgcggcac 1200
ctgagggagt accaggagct cctcaacgtc aagatggccc tggacatcga gatcgccacc 1260
taccgcaagc tgetggaggg egaggagagc cggatctccg tgeccgtcca ttcttttgcc 1320
tcettaaata taaagacgac tgtgectgag gtggagcctc cccaggacag ccacagccgg 1380
aagacggttc tgatcaagac cattgagacc cggaatgggg aggtggtgac agagtcccag 1440
aaggagcagc gcagtgagct ggacaagtct tctgccaca gttactgaac cccttggtcc 1500
ggagccttga ctctgcccta ggcctgctca aagcccaaac cctaagacca ctccgaatt 1560
gtctcctctc cctctgcatg tgtctaaaag gtggtaccag geatcccttt cctggcttat 1620
ggccaagccc taccggcca gcagtcgctg ggcctctccc tgcctgaca cttgatgtga 1680
cctatgtgct tcccttttca tgtcccgata agaagccaat gatcccccet caggacaaat 1740
ctactccagc cacgatgaga agtgggtgag ccagggtctg agtttcacat ttgaacaaaa 1800
taaaatgctg tcaagagaaa actctccagt gca 1833

```

<210> 2

<211> 470

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 2

```

Met Ser His His Pro Ser Gly Leu Arg Ala Gly Phe Ser Ser Thr Ser
 1                5                10                15
Tyr Arg Arg Thr Phe Gly Pro Pro Pro Ser Leu Ser Pro Gly Ala Phe
 20                25                30
Ser Tyr Ser Ser Ser Ser Arg Phe Ser Ser Ser Arg Leu Leu Gly Ser
 35                40                45
Ala Ser Pro Ser Ser Ser Val Arg Leu Gly Ser Phe Arg Ser Pro Arg
 50                55                60
Ala Gly Ala Gly Ala Leu Leu Arg Leu Pro Ser Glu Arg Leu Asp Phe
 65                70                75                80
Ser Met Ala Glu Ala Leu Asn Gln Glu Phe Leu Ala Thr Arg Ser Asn
 85                90                95
Glu Lys Gln Glu Leu Gln Glu Leu Asn Asp Arg Phe Ala Asn Phe Ile
 100               105               110
Glu Lys Val Arg Phe Leu Glu Gln Gln Asn Ala Ala Leu Arg Gly Glu
 115               120               125
Leu Ser Gln Ala Arg Gly Gln Glu Pro Ala Arg Ala Asp Gln Leu Cys
 130               135               140
Gln Gln Glu Leu Arg Glu Leu Arg Arg Glu Leu Glu Leu Leu Gly Arg
 145               150               155               160

```

[0003]

Glu Arg Asp Arg Val Gln Val Glu Arg Asp Gly Leu Ala Glu Asp Leu			
	165	170	175
Ala Ala Leu Lys Gln Arg Leu Glu Glu Glu Thr Arg Lys Arg Glu Asp			
	180	185	190
Ala Glu His Asn Leu Val Leu Phe Arg Lys Asp Val Asp Asp Ala Thr			
	195	200	205
Leu Ser Arg Leu Glu Leu Glu Arg Lys Ile Glu Ser Leu Met Asp Glu			
	210	215	220
Ile Glu Phe Leu Lys Lys Leu His Glu Glu Glu Leu Arg Asp Leu Gln			
225	230	235	240
Val Ser Val Glu Ser Gln Gln Val Gln Gln Val Glu Val Glu Ala Thr			
	245	250	255
Val Lys Pro Glu Leu Thr Ala Ala Leu Arg Asp Ile Arg Ala Gln Tyr			
	260	265	270
Glu Ser Ile Ala Ala Lys Asn Leu Gln Glu Ala Glu Glu Trp Tyr Lys			
	275	280	285
Ser Lys Tyr Ala Asp Leu Ser Asp Ala Ala Asn Arg Asn His Glu Ala			
	290	295	300
Leu Arg Gln Ala Lys Gln Glu Met Asn Glu Ser Arg Arg Gln Ile Gln			
305	310	315	320
Ser Leu Thr Cys Glu Val Asp Gly Leu Arg Gly Thr Asn Glu Ala Leu			
	325	330	335
Leu Arg Gln Leu Arg Glu Leu Glu Glu Gln Phe Ala Leu Glu Ala Gly			
	340	345	350
Gly Tyr Gln Ala Gly Ala Ala Arg Leu Glu Glu Glu Leu Arg Gln Leu			
	355	360	365
Lys Glu Glu Met Ala Arg His Leu Arg Glu Tyr Gln Glu Leu Leu Asn			
	370	375	380
Val Lys Met Ala Leu Asp Ile Glu Ile Ala Thr Tyr Arg Lys Leu Leu			
385	390	395	400
Glu Gly Glu Glu Ser Arg Ile Ser Val Pro Val His Ser Phe Ala Ser			
	405	410	415
Leu Asn Ile Lys Thr Thr Val Pro Glu Val Glu Pro Pro Gln Asp Ser			
	420	425	430
His Ser Arg Lys Thr Val Leu Ile Lys Thr Ile Glu Thr Arg Asn Gly			
	435	440	445
Glu Val Val Thr Glu Ser Gln Lys Glu Gln Arg Ser Glu Leu Asp Lys			
	450	455	460
Ser Ser Ala His Ser Tyr			
465	470		

[0004]

<210> 3

<211> 1774

<212> DNA

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 3

```

cccggcctag ttctgccaag egctgaatgc catcttccgc cagcatgagc catcateact 60
cgctcgggcct gcggteccag atcagctcca cctcgtaacc ccggaccttt gggccgccgc 120
cctcactgtc ccccggggct ttctcctact cgteccagtc tcgcttctcc agcagccgcc 180
tgctgggctc ggggtccccg agctcctcgg cgcggctggg cagcttccgt gcccctcgag 240
cgggggcact gcgcttgccc tcggagcgcc tcgatttctc catggccgag gccctcaacc 300
aagagttcct ggccactcgg agcaacgaga agcaagagtt acaggagctc aacgaccgct 360
tcgccaactt catcgagaag gtgcgcttct tggagcagca gaacgcagcc ctgcgcgggg 420
agctgagcca ggcgcggggc caggagccgg cgcgcgccga ccagctttgc cagcaggagc 480
tgccgagctc gcggcgcgaa ctggagctgc tgggccggga gcgcgaccgg gtgcaggtag 540
agcgggacgg gctggcggag gacctagcgg cgtcaagca gaggttagaa gaagaaaccc 600
gcaagcggga ggatgcggag cacaacctgg tgctcttccg taaggacgtg gacgaccca 660
ctctgtcccc cctagaactg gagecgcaaga ttgagtctct gatggatgaa attgagtccc 720
tcaagaagct acacgaagag gaacttcgag acctgcaggt gagecgtagag agccagcagg 780
tgcagcaggt ggaggtagag gcaacagtga agccagagct gacggcggcg ctgagggaca 840
tccgtgcaca gtacgagaac atcgcggcaa agaattctga ggaggcagag gagtggatata 900
agtcgaaata tgctgacctg tcggacgccg ccaaccgcaa ccatgaggcc ctacgccagg 960
ccaagcaaga gatgaacgag tctcgacgtc agatccagag tctgacgtgc gaggtaggat 1020
ggctgcgagg cacgaatgag gcgctgctca gacagctgcg ggagctggaa gacgagttcg 1080
ccctggagge tggagggtag caagcaggcg cagcaggct ggaggaagag ctctgacage 1140
tgaaggaaga gatggcgagg cacctgcgag agtaccagga gctcctaac gtcaagatgg 1200
ccctggacat cgagatagcc acctacagga agctactgga aggggaggag agccggatct 1260
cagtgccggt tcattecttt gcctctctaa gtttaaagac gactgtgcct gagatggagc 1320
ctctccagga tagccacage aagaagatgg ttctgatcag gacaattgag acccgggatg 1380
gggagaaggt ggtgacagag tcccagaagg aacagcacag tgacctggac aagtcttcta 1440
tccacageta ctgaggcctc agccagagct ctgacctga tctcagceta ttctaagct 1500
tggccctccc cagcaccagt ctgtatccag tctgtctctg catgccacag ccctgcctg 1560
ccaagcaage gccagcctga tccagaggt gggcctcttc ccgatgcata ggtgtgaccc 1620
atagctttct tgtecttgta agaggtggat aaagataccc aggacagcaa atctactcaa 1680
gaatgacccc atggtctgtg ggggtgggcca gagtgtggga ctcaactctga gtcaaataaa 1740
actgctactg agagaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa 1774

```

<210> 4

<211> 475

<212> PRT

[0005]

<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)

<400> 4

Met Pro Ser Ser Ala Ser Met Ser His His His Ser Ser Gly Leu Arg
 1 5 10 15
 Ser Ser Ile Ser Ser Thr Ser Tyr Arg Arg Thr Phe Gly Pro Pro Pro
 20 25 30
 Ser Leu Ser Pro Gly Ala Phe Ser Tyr Ser Ser Ser Ser Arg Phe Ser
 35 40 45
 Ser Ser Arg Leu Leu Gly Ser Gly Ser Pro Ser Ser Ser Ala Arg Leu
 50 55 60
 Gly Ser Phe Arg Ala Pro Arg Ala Gly Ala Leu Arg Leu Pro Ser Glu
 65 70 75 80
 Arg Leu Asp Phe Ser Met Ala Glu Ala Leu Asn Gln Glu Phe Leu Ala
 85 90 95
 Thr Arg Ser Asn Glu Lys Gln Glu Leu Gln Glu Leu Asn Asp Arg Phe
 100 105 110
 Ala Asn Phe Ile Glu Lys Val Arg Phe Leu Glu Gln Gln Asn Ala Ala
 115 120 125
 Leu Arg Gly Glu Leu Ser Gln Ala Arg Gly Gln Glu Pro Ala Arg Ala
 130 135 140
 Asp Gln Leu Cys Gln Gln Glu Leu Arg Glu Leu Arg Arg Glu Leu Glu
 145 150 155 160
 Leu Leu Gly Arg Glu Arg Asp Arg Val Gln Val Glu Arg Asp Gly Leu
 165 170 175
 Ala Glu Asp Leu Ala Ala Leu Lys Gln Arg Leu Glu Glu Glu Thr Arg
 180 185 190
 Lys Arg Glu Asp Ala Glu His Asn Leu Val Leu Phe Arg Lys Asp Val
 195 200 205
 Asp Asp Ala Thr Leu Ser Arg Leu Glu Leu Glu Arg Lys Ile Glu Ser
 210 215 220
 Leu Met Asp Glu Ile Glu Phe Leu Lys Lys Leu His Glu Glu Glu Leu
 225 230 235 240
 Arg Asp Leu Gln Val Ser Val Glu Ser Gln Gln Val Gln Gln Val Glu
 245 250 255
 Val Glu Ala Thr Val Lys Pro Glu Leu Thr Ala Ala Leu Arg Asp Ile
 260 265 270
 Arg Ala Gln Tyr Glu Asn Ile Ala Ala Lys Asn Leu Gln Glu Ala Glu
 275 280 285
 Glu Trp Tyr Lys Ser Lys Tyr Ala Asp Leu Ser Asp Ala Ala Asn Arg
 290 295 300

[0006]

Asn His Glu Ala Leu Arg Gln Ala Lys Gln Glu Met Asn Glu Ser Arg		
305	310	315 320
Arg Gln Ile Gln Ser Leu Thr Cys Glu Val Asp Gly Leu Arg Gly Thr		
325	330	335
Asn Glu Ala Leu Leu Arg Gln Leu Arg Glu Leu Glu Glu Gln Phe Ala		
340	345	350
Leu Glu Ala Gly Gly Tyr Gln Ala Gly Ala Ala Arg Leu Glu Glu Glu		
355	360	365
Leu Arg Gln Leu Lys Glu Glu Met Ala Arg His Leu Arg Glu Tyr Gln		
370	375	380
Glu Leu Leu Asn Val Lys Met Ala Leu Asp Ile Glu Ile Ala Thr Tyr		
385	390	395 400
Arg Lys Leu Leu Glu Gly Glu Glu Ser Arg Ile Ser Val Pro Val His		
405	410	415
Ser Phe Ala Ser Leu Ser Leu Lys Thr Thr Val Pro Glu Met Glu Pro		
420	425	430
Leu Gln Asp Ser His Ser Lys Lys Met Val Leu Ile Arg Thr Ile Glu		
435	440	445
Thr Arg Asp Gly Glu Lys Val Val Thr Glu Ser Gln Lys Glu Gln His		
450	455	460
Ser Asp Leu Asp Lys Ser Ser Ile His Ser Tyr		
465	470	475

人外周蛋白

```

cctcgcagcg gtctgcegget ccttcccagc ccccggccta gctctgcgaa cgggtgactgc
ccatcettgg ccgcaatgag ccaccacceg tcgggectec gggcgggett cagctccacc
tcataacgcc gtaccttcgg tccaccgccc tcaactatccc ccggggcett ctectactcg
tccagctccc gcttctccag cagccgcctg ctgggctccg cgtccccgag ctectcggtg
cgcttgggca gcttccgtag cccccgagcg ggagcgggag ccctcctgcg cctgcctcgc
gagcgccctg acttctccat ggccgagggc ctcaaccagg agttcctggc cagcgcagc
aacgagaagc aggagctgca ggagctcaac gaccgcttcg ccaacttcat cgagaaggta
cgctttctgg agcagcagaa cgcggccctg cgcggggagc tgagccaagc ccggggccag
gagccggcgc gcgcccagca gctgtgccag caggagctgc gcgagctgcg gcgagagctg
gagctgttgg gccgcgagcg tgaccgggtg caggtggagc gcgacgggct ggccgaggaac
ctggcgggcg tcaagcagag gttggaggag gagacgcgca agcgggagga cgcgagcac
aacctcgtgc tcttccgcaa ggacgtggac gatgccactc tgtcccgcct ggaactagag
cgcaagattg agtctctgat ggatgagatt gagttcctca agaagctgca cgaggaggag
ctgcgagacc tgcaggtgag tgtggagagc cagcaggtgc agcaggtgga ggtggaagcc
acggtgaagc ccgagctgac ggcagcgctg agggacatcc gcgcgcagta cgagagcatc
gccgcgaaga acctgcagga ggccgaggag tggtaacaagt ccaagtacgc ggacctgtcc
gacgctgcca accggaacca cgaggcctcg ccccaggcca agcaggagat gaacgagtcc
cgacgccaga tccagagtct aacgtgcgag gtggacgggc tgcgcggcac gaacgaggcg
ctgctcaggg agttgagaga gctggaggag cagttcgccc tggaggcggg gggctaccag
gcgggcgctg cgcggctcga ggaggagctg cgacagctaa aagaggagat ggccgggcac
ctgagggagt accaggagct cctcaacgtc aagatggccc tggacatcga gatcgccacc
taccgcaagc tgctggaggg cgaggagagc cggatctccg tgcccgtcca ttcttttgcc
tccttaaata taaagacgac tgtgcctgag gtggagcctc cccaggacag ccacagccgg
aagacggttc tgatcaagac cattgagacc cggaatgggg aggtggtgac agagtcccag
aaggagcagc gcagtgaget ggacaagtct tctgcccaca gttactgaac cccttggtcc
ggagccttga ctctgcctta ggctgctca aagcccaaac cctaagacca ctectgaatt
gtctcctctc cctctgcatg tgtctaaaag gtggtaccag gcateccttt cctggcttat
ggccaagccc taccgggcca gcagtcgctg ggcctctccc tgccctgaca cttgatgtga
cctatgtgct tcccttttca tgtcccgata agaagccaat gatccccctt caggacaaat
ctactccagc cagcatgaga agtgggtgag ccagggtctg agtttcacat ttgaaccaa
taaatgctg tcaagagaaa actctccagt gca (SEQ ID NO:1)

```

```

MSHHPSGLRAGFSSTSYRRTFGPPPSLSPGAFSYSSSSRFSSSRLLSASPSSSVRLGSRSPRAGA
GALLRLPSERLDFSMAEALNQEFLLATRSNEKQELQELNDRFANFIEKVRFLQQNAALRGELSQARG
QEPARADQLCQQLRELRLRELELLGREDRVQVERDGLAEDLAALKQRLLEEETRKREDAEHNVLVFR
KDVDATLSRLELERKIESLMDEIEFLKKLHEEELRDLQVSVESQQVQQVEVEATVKPELTAALRDI
RAQYESIAAKNLQEAEEWYKSKYADLSDAANRNHEALRQAKQEMNESRRQIQSLTCEVDGLRGITNEA
LLRQLRELEEQFALEAGGYQAGAAARLEEEELRQLKEEMARHLREYQELLNKMLDIEIATYRKLLLEG
EESRISVPVHSFASLNKTTVPEVEPPQDSHSRKTVLIKTIETRNGEVVTESQKEQRSELDKSSAHS
Y (SEQ ID NO:2)

```

图 1

小鼠外周蛋白

```

cccggcctag ttctgccaag cgetgaatgc catcttccgc cagcatgagc catcatcact
cgteggggcct gcggtccagc atcagctcca cctcgtaccg ccggaccttt gggccgccgc
cctcactgtc ccccggggct ttctcctact cgtccagctc tgccttctcc agcagccgcc
tgctgggctc ggggtccccg agctcctcgg cgcggctggg cagcttccgt gccctcagag
cgggggcact gcgcttgccc tcggagcgcc tcgatttctc catggccgag gccctcaacc
aagagttcct ggccactcgg agcaacgaga agcaagagtt acaggagctc aacgaccgct
tcgccaactt catcgagaag gtgcgcttct tggagcagca gaacgcagcc ctgcgcgggg
agctgagcca ggcgcggggc caggagccgg cgcgcgccga ccagctttgc cagcaggagc
tgcgcgagct gcggcgcgaa ctggagctgc tgggcccggg gcgcgaccgg gtgcaggtgg
agcgggacgg gctggcggag gacctagcgg cgtccaagca gaggttagaa gaagaaaccc
gcaagcgagg ggatgcggag cacaacctgg tgctcttccg taaggacgtg gacgaccca
ctctgtcccg cctagaactg ggcgcgaaga ttgagtctct gatggatgaa attgagttcc
tcaagaagct acacgaagag gaacttcgag acctgcaggt gagcgtagag agccagcagg
tgcagcaggt ggaggtagag gcaacagtga agccagagct gacggcggcg ctgagggaca
tccgtgcaca gtacgagaac atcgcggcaa agaactctga ggaggcagag gagtgggtata
agtcgaaata tgctgacctg tcggacgccc ccaaccgcaa ccatgaggcc ctacgccagg
ccaagcaaga gatgaacgag tctcgacgtc agatccagag tctgacgtgc gaggtggatg
ggctgcgagg cacgaatgag gcgctgctca gacagctgcg ggagctggaa gacgagttcg
ccctggaggc tggagggtac caagcaggcg cagcacggct ggaggaagag cttcgacagc
tgaaggaaga gatggcgagg cacctgcgag agtaccagga gctccttaac gtcaagatgg
ccctggacat cgagatagcc acctacagga agctactgga aggggaggag agccggatct
cagtgcgggt tcattccttt gcctctctaa gtttaaagac gactgtgcct gagatggagc
ctctccagga tagccacagc aagaagatgg ttctgatcag gacaattgag acccgggatg
gggagaaggt ggtgacagag tcccagaagg aacagcacag tgacctggac aagtcttcta
tccacagcta ctgaggcctc agccagagct ctgacctga tctcagccta ttcctaagct
tgccctccc cagcaccagt ctgtatccag tcttgccttg catgccacag cccctgctg
ccaagcaagc gccagcctga tccagaggct gggcctcttc ccgatgcata ggtgtgacct
atagctttct tgtccttgta agaggtggat aaagataccc aggacagcaa atctactcaa
gaatgacccc atggtctgtg ggggtggcca gagtgtggga ctcactctga gtcaaataaa
actgctactg agagaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa (SEQ ID NO:3)

```

```

MPSSASMSHHHSSGLRSSISSTSYRRTFGPPPSLSPGAFSYSSSSRFSSSRLLGSGSPSSSARLGSF
RAPRAGALRLPSERLDFSMAEALNQEFLLATRSNEKQELQELNDRFANFIEKVRFLQQAALRGELS
QARGQEPARADQLCQQLRELRLRELELLGRERDRVQVERDGLAEDLAALKQRLEEETRKREDAEHLN
VLFRKDVDDATLSRLELERKIESLMDEIEFLKKLHEEELRLDLQSVSVESQQVQQVEVEATVKPELTAA
LRDIRAQYENIAAKNLQEAEEWYKSKYADLSDAANRNHEALRQAKQEMNESRRQIQSLTCEVDGLRG
TNEALLRQLRELEEQFALEAGGYQAGAARLEEELRQLKEEMARHLREYQELLNKVMALDIEIATYRK
LLEGEESRISVPVHSFASLSLKTTPPEMEPLQDSHSKKMVLRTIETRDGEKVVTESQKEQHSDLDK
SSIHSY (SEQ ID NO:4)

```

图 2

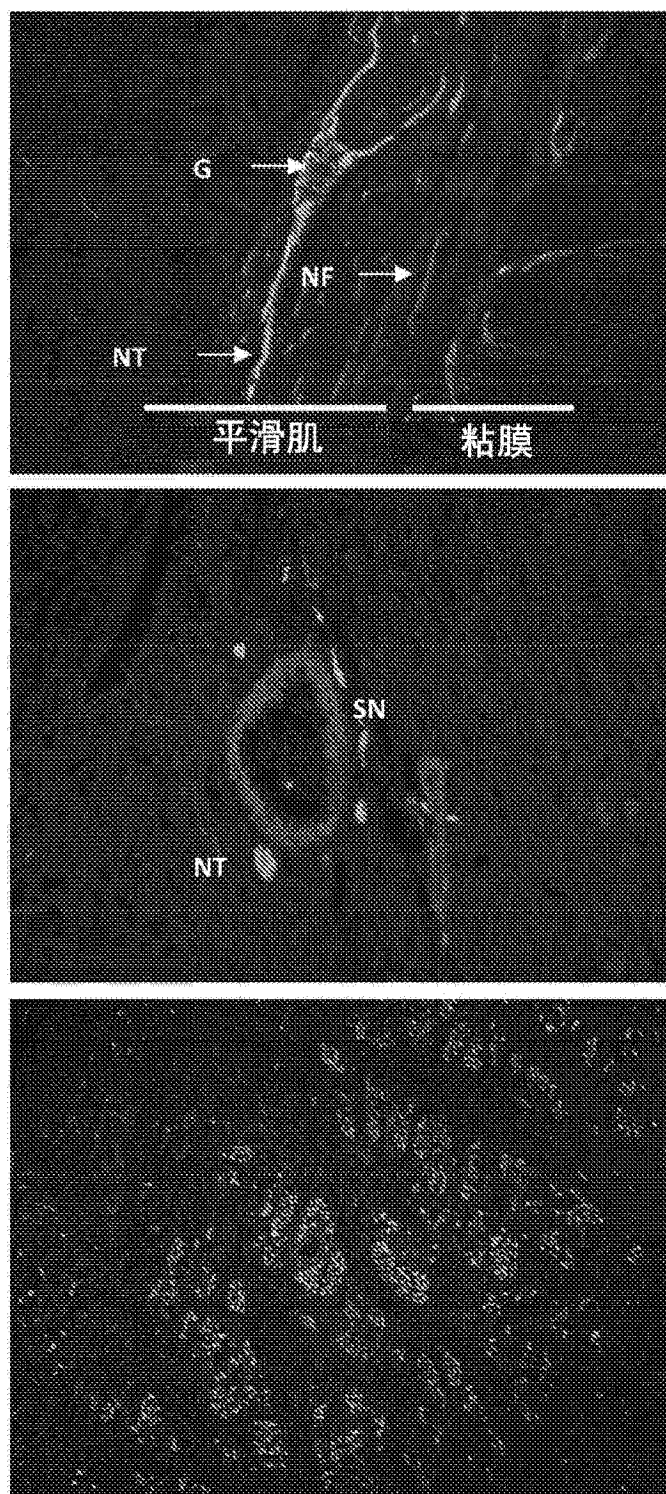


图 3

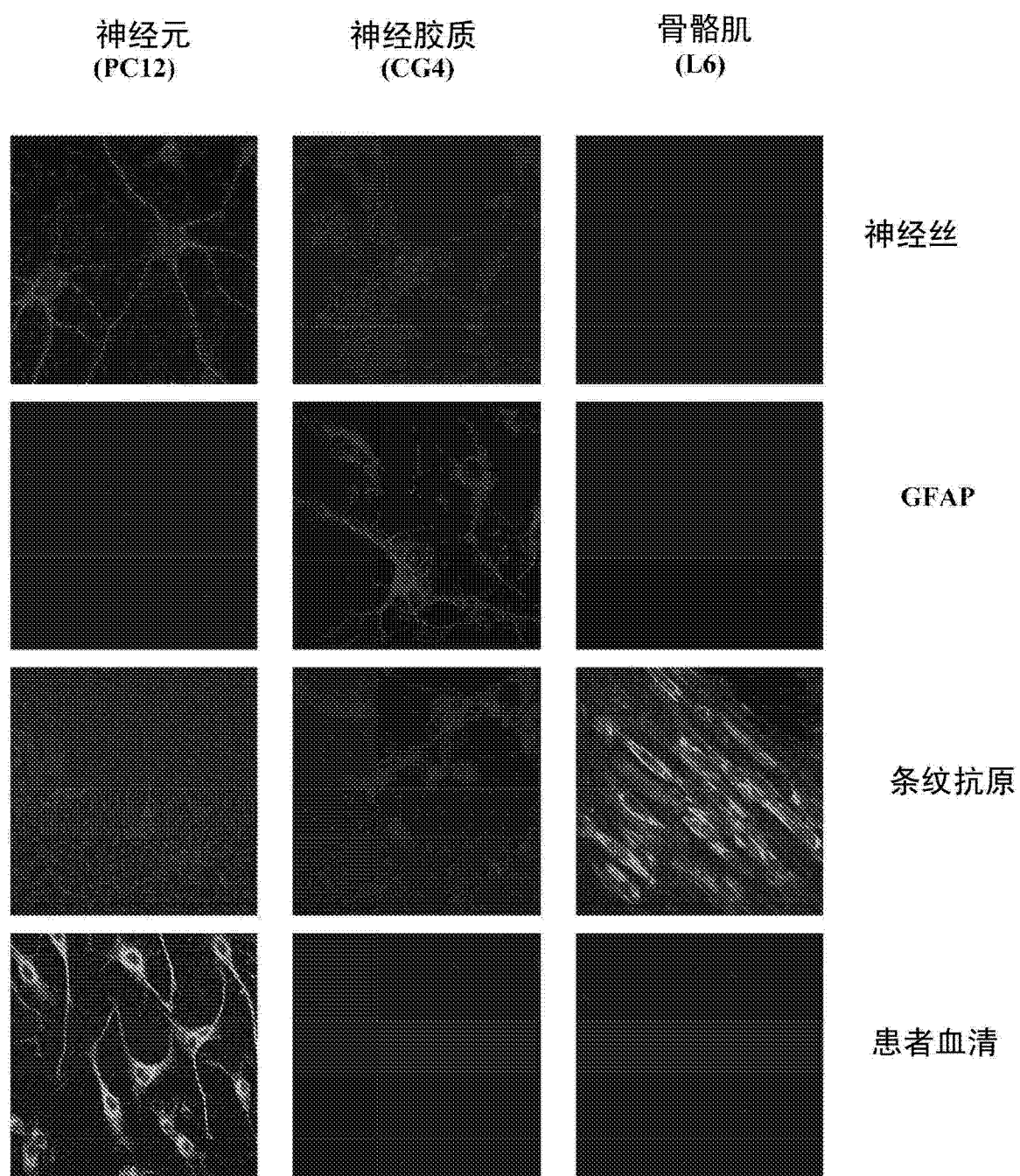


图 4

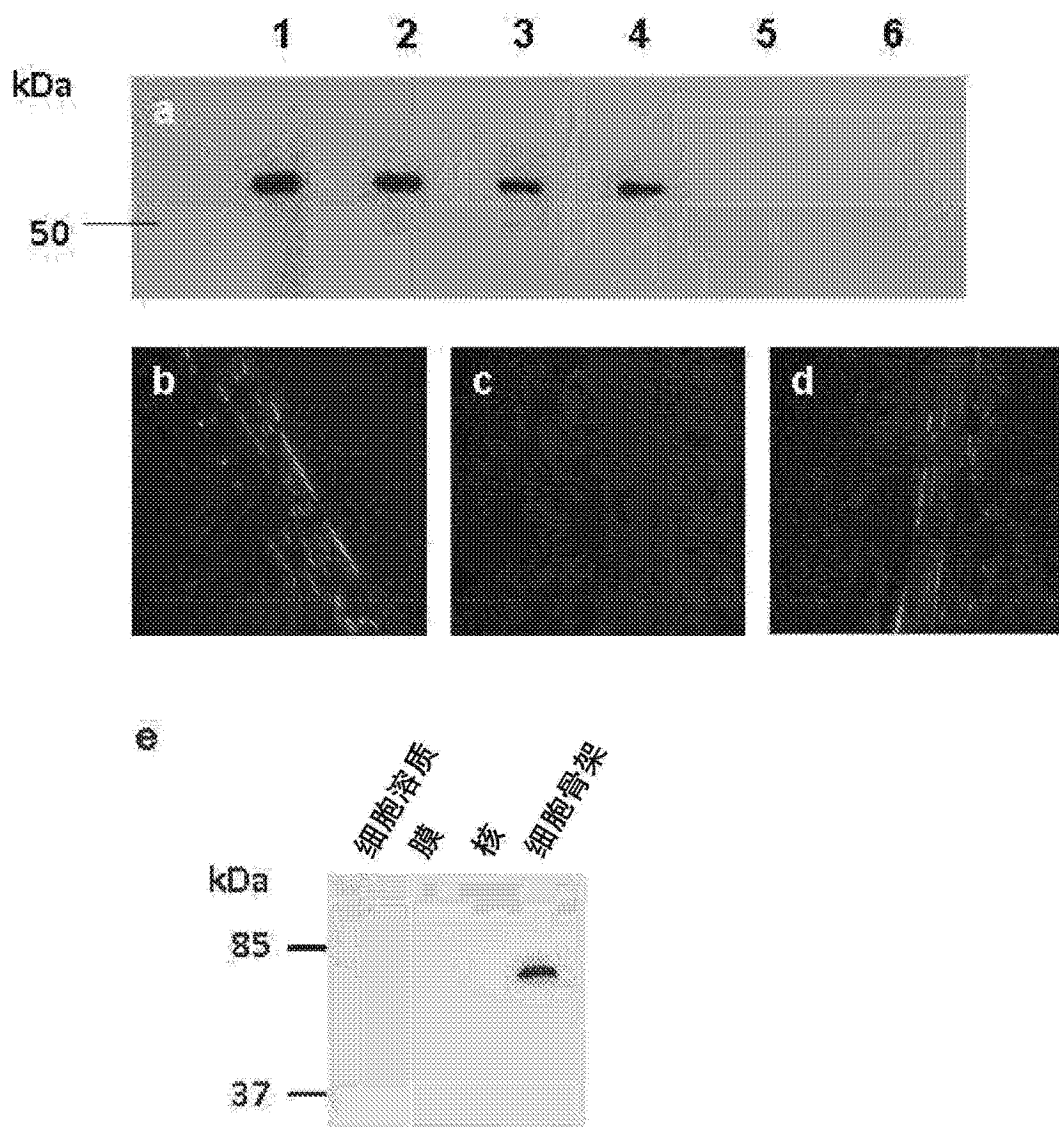


图 5

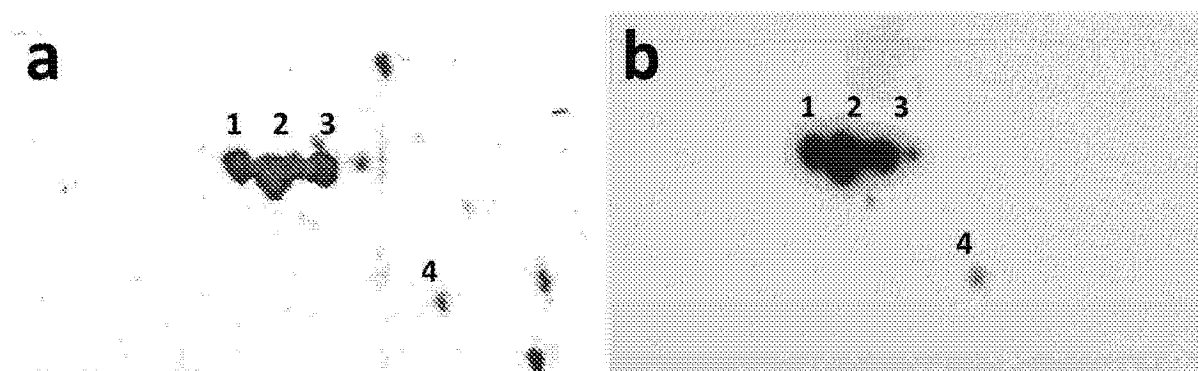


图 6

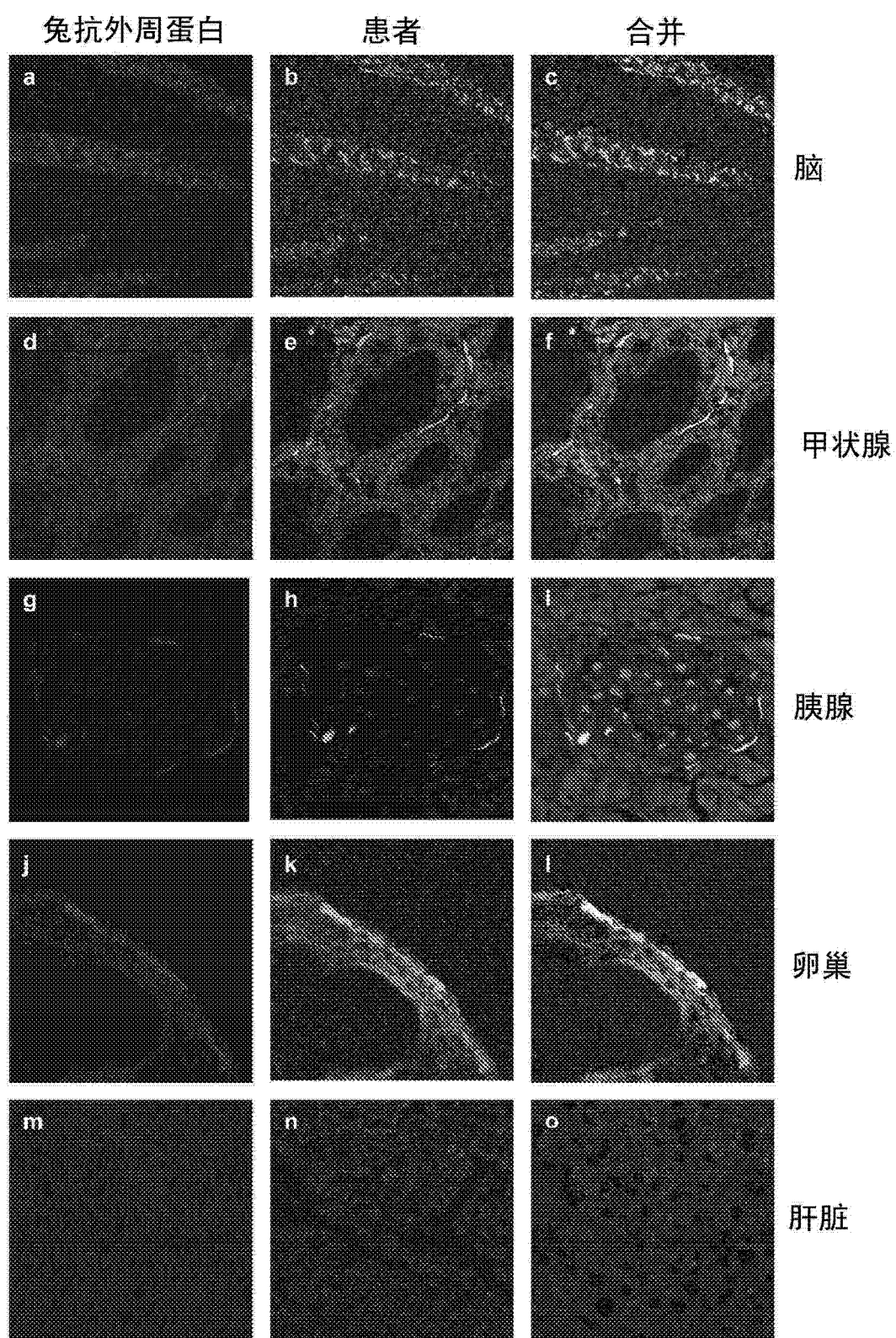


图 7

专利名称(译)	作为神经系统和内分泌疾病标记的外周蛋白特异性自身抗体		
公开(公告)号	CN102792163A	公开(公告)日	2012-11-21
申请号	CN201180012118.0	申请日	2011-01-04
[标]申请(专利权)人(译)	梅约医学教育与研究基金会		
申请(专利权)人(译)	梅约医学教育与研究基金会		
当前申请(专利权)人(译)	梅约医学教育与研究基金会		
发明人	V·A·伦农 J·张伯伦-巴诺布 T·J·克雷泽 S·J·皮托克 A·M·奥普雷斯库		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/68		
CPC分类号	G01N2800/28 G01N2800/042 G01N33/564 G01N2800/362 A61P37/06 G01N2800/04		
代理人(译)	韦东		
优先权	61/292031 2010-01-04 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供检测外周蛋白特异性自身抗体的方法和材料，所述抗体与神经系统和内分泌疾病有关。

患者 #	年龄* (岁)/ 性别/种族	抗体滴度, IF	家族性自主神经异常征兆		其他神经学症状或征兆	内分泌病
			广义	狭义		
				胃肠	其他 [†]	
1 [‡]	79/M/U	240	-	弛缓不能, 胃轻瘫, 体重下降	-	-
2 [‡]	60/F/C	240	-	弛缓不能, 体重下降	-	-
3 [‡]	38/F/C	1,920	-	吞咽困难, 体重下降	-	-