

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/53 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610149261.5

[43] 公开日 2007年7月4日

[11] 公开号 CN 1991366A

[22] 申请日 2006.11.21

[21] 申请号 200610149261.5

[30] 优先权

[32] 2005.12.29 [33] US [31] 11/321,516

[71] 申请人 财团法人工业技术研究院

地址 中国台湾新竹县

共同申请人 财团法人卫生研究院

财团法人新光吴火狮纪念医院

[72] 发明人 曾锱翎 郑平福 廖珮秀 邱浩彰
蔡世峰

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 张文辉 闵丹

权利要求书 2 页 说明书 30 页 附图 4 页

[54] 发明名称

诊断重症肌无力症的方法及其所用的试剂盒

[57] 摘要

本发明涉及一种检测受试者中重症肌无力症的方法，该方法是通过测量可与选自热休克蛋白 60、热休克蛋白 90 α 型、和热休克蛋白 90 β 型的一或多种自身抗原特异性结合的至少一种自身抗体的量。本发明也提供鉴定患有重症肌无力症的受试者的诊断试剂盒。

1.一种诊断受试者中重症肌无力症的方法，包括：

(a)从受试者采取生物样本；和

(b)检测该生物样本中至少一种自身抗体的量，其中该自身抗体特异性地与选自以下的至少一种蛋白质结合：热休克蛋白 60 (序列识别号：1)、热休克蛋白 90 α 异型体 (序列识别号：2)、和热休克蛋白 90 β 异型体(序列识别号：3)；其中在该生物样本中存在所述自身抗体表示该受试者患有重症肌无力症。

2.权利要求 1 的方法，其中该生物样本选自下列所组成的组：血清、血液、血浆、唾液、羊水、滑液、泪液、奶水、淋巴、尿液、和汗液。

3.权利要求 2 的方法，其中该自身抗体用选自如下一一种或一种以上的方法来测量：

(a)Western 印迹法；和

(b)酶联免疫吸附测定法。

4.权利要求 3 的方法，其中该受试者为哺乳类动物。

5.权利要求 4 的方法，其中该哺乳类动物为人类。

6.权利要求 4 的方法，其中该哺乳类动物为啮齿类动物。

7.权利要求 6 的方法，其中该啮齿类动物为小鼠。

8.权利要求 6 的方法，其中该啮齿类动物为大鼠。

9.鉴定受试者患有重症肌无力症的试剂盒，包括测量生物样本中至少一种自身抗体的量的试剂，该自身抗体特异性地与选自如下的一种或多种蛋白质结合：热休克蛋白 60(序列识别号：1)、热休克蛋白 90 α 型(序列识别号：2)、或热休克蛋白 90 β 型(isoform)(序列识别号：3)。

10.权利要求 9 的试剂盒，其中该生物样本选自下列所组成的组：血清、血液、血浆、唾液、羊水、滑液、泪液、奶水、淋巴、尿液、和汗液。

11.权利要求 10 的试剂盒，其中该自身抗体用选自下列至少一种方法来测量：

(a)Western 印迹法；和，

(b)酶联免疫吸附测定法。

12.权利要求 11 的试剂盒，其中该受试者为哺乳类动物。

- 13.权利要求 12 的试剂盒, 其中该哺乳类动物为人类。
- 14.权利要求 12 的试剂盒, 其中该哺乳类动物为啮齿类动物。
- 15.权利要求 14 的试剂盒, 其中该啮齿类动物为小鼠。
- 16.权利要求 14 的试剂盒, 其中该啮齿类动物为大鼠。

诊断重症肌无力症的方法及其所用的试剂盒

技术领域

本发明涉及免疫学领域，包括免疫耐受性的发展和自身免疫疾病的病理。本发明一般地涉及诊断器官特异性的(organ-specific)自身免疫疾病重症肌无力症的改进的方法。

背景技术

自身免疫疾病(autoimmune diseases)是由于免疫细胞功能或活性异常，造成T细胞不适当的活化，使T细胞攻击自身组织，因而促使产生导致疾病发生与发展的细胞因子(cytokines)和/或自身抗体(autoantibody) (Cotran et al., *Pathologic basis of disease* 211-212(6th ed. 1999); Scofield, "Autoantibodies as predictors of disease," *Lancet* 363:1544-1546(2004))。自身免疫指失去自身耐受性，尽管目前其机制仍不明确(同上所引)。自身免疫疾病可分为：全身性的，会影响多个器官或组织；或为局部性的，仅影响单一器官、器官系统或组织(同上所引)。

自身免疫疾病的显著特征是产生对抗自身蛋白质的高亲和性(high affinity)自身抗体(Robinson et al., "Autoantigen microarrays for multiples characterization of autoantibody responses," *Nature Med.* 8(3): 295-301(2002))。目前已知或强烈怀疑某些自身抗体参与特定疾病相关的细胞或组织损伤的发生，但大体而言，其致病性与疾病潜在病因的关系仍属未知(同上所引)。不过，对于某些疾病，如重症肌无力症，自身抗体反应的特异性和致病性突出了它们在改善自身免疫疾病的诊断、分类和治疗中的有用性。因为通常血清中的自身抗体在疾病的症状出现前许久便已出现，所以若能快速且准确测量与具体自身免疫疾病相关的自身抗体，就能实现在发病前给予预防性的治疗，甚至完全阻止疾病的发生(Scofield, 同上)。

重症肌无力症(MG)是一种神经肌肉疾病。它是由于免疫介导骨骼肌的神经肌肉接头(neuromuscular junctions)的乙酰胆碱受体(acetylcholine receptor)丧失(Cotran et al.,如上所述(1289))而引起的。全世界估计每100,000人便有约

3 至 20 以上的人为重症肌无力症患者(Cotran et al.,如上所述; Somnier, “Increasing incidence of late-onset anti-AChR antibody-seropositive myasthenia gravis,” *Neurol*, 65:928-930(2005))。而在美国则每 100,000 人中, 估计约 14 人为重症肌无力症患者, 每年约有 36,000 个病例诊断出重症肌无力症(Howard, “Myasthenia gravis: a summary,” 可见于 <http://www.myasthenia.org/information/summary.htm>, 最近登录是在 2005 年 10 月 23 日)。

早发性(early onset)重症肌无力症被限定为发生在 40 或 50 岁前, 好发于女性, 而晚发性(late onset)重症肌无力症在男性与女性发生的机率则相同(Cotran et al.,如上所述(注意“在 40 岁前发生时”MG 最常见于女性)); Somnier, 如上所述(“早发性和晚发性 MG 之间的分界被限定在 50 岁”)。女性通常在约 20 至 40 岁发病, 而男性则发生在约 50 至 60 岁, 虽然有时会发生得较早, 在两性都可能更晚发生(Cotran et al.,如上所述)。

在临床上, 约有 2/3 的重症肌无力症患者首先出现偶发性肌无力(occasional muscle weakness)的症状, 该症状大部分是发生于眼外肌(extraocular muscles)(Howard, 如上所述)。此初期症状最终会恶化至出现眼睑下垂和/或复视的情况, 经常导致患者求医(同上所引)。约有 10%的病例的肌无力局限于眼球外肌(ocular muscle)(Howard, 如上所述)。到了后期, 许多患者会发生全身性的肌无力, 其有可能每周、每天或更频繁地波动(同上所引)。全身性重症肌无力症会影响到控制面部表情、咀嚼、说话、吞咽和呼吸的肌肉; 在应用本发明新的治疗方法之前, 呼吸衰竭是导致死亡的最常见原因。(同上所引)在改进治疗方法和介入重症看护后, 超过 95%的患者在诊断后可存活约 5 年或更长的时间。(同上所引)其中约有 65%的重症肌无力症患者会伴随胸腺增生(thymic hyperplasia), 而约 15%的患者会伴随胸腺瘤(thymoma)的发生(同上所引)。

随着乙酰胆碱酯酶(cholinesterase)抑制剂的更有效应用和重症看护的进步, 重症肌无力症患者的长期结果已经得到改善, 但是, 直接减轻自身免疫反应或改变自身免疫反应对乙酰胆碱受体和神经肌肉接头的影响的疗法, 从长远看可能证明更有效果(“Treatment of autoimmune myasthenia gravis,”*Neurol*.61:1652-1661(2003))。治疗最初通常会给予重症肌无力症患者抗乙酰胆碱酯酶剂, 包括乙酰胆碱酯酶抑制剂(同上所引)。治疗方案的目

的一般是用高剂量的皮质类固醇(corticosteroids)来导致免疫缓解(immunologic remission),并常伴随静脉内注射免疫球蛋白(intravenous immunoglobulin)或血浆去除术(plasmapheresis)(同上所引)。在缓解免疫反应后,可逐渐减少皮质醇的剂量,并联合使用类固醇助减剂(steroid-sparing agent)如硫唑嘌呤(azathiopurine)或霉酚酸酯(mycophenolate)等(同上所引)。在一些病例中,也可进行胸腺切除来治疗(同上所引)。

约有 80-85%的重症肌无力症患者以攻击本身的烟碱性乙酰胆碱受体(nicotinic acetylcholine receptor(AChR))为的抗体特征(Richman et al.,如上所述; Roxanis et al., "Thymic myoid cells and germinal center formation in myasthenia gravis; possible roles in pathogenesis," *J. Neuroimmunol.* 125:185-197(2002))。这些抗体导致乙酰胆碱受体的损失并降低成熟神经肌肉接头的肌肉终板(muscle end-plate)处的受体功能,这些作用共同导致神经肌肉信号传导的破坏,从而产生全身性重症肌无力症的特征性的肌无力症状(Hoch et al., "Auto-antibodies to the receptor tyrosine kinase MuSK in patients with myasthenia gravis without acetylcholine receptor antibodies," *Nature Med.* 7(3):365-368(2001))。而对于病状程度相似的患者,其抗-AChR 的血清抗体浓度差异极大,因此不能被用来预测每一位患者的严重性(Howards, 如上所述)。

而且,并非每一位重症肌无力症的患者都会产生抗 AChR(anti-AChR)的抗体(Roxanis et al.,如上所述)。在某些病例中,有症状的患者直到症状开始后数月或更久才有可检测到的抗-AChR 抗体(同上所引)。与只患有眼肌型肌无力(ocular MG)的患者相比,抗-AChR 抗体更经常在全身性肌无力(general MG)的患者中被发现:约 74%的全身性肌无力患者和 54%的眼肌型肌无力患者在血清中可检测到抗-AChR 抗体(Howard,如上所述)。且约有 10-20%的全身性肌无力患者从来不产生可检测到的抗-AChR 抗体,而在无抗-AChR 抗体的患者中,约有 90%的人却具有针对肌肉特异性受体酪氨酸激酶(muscle-specific receptor tyrosine kinase, MuSK)的自身抗体(Hoch et al.,如上所述; Roxanis et al.,如上所述)。MuSK 在形成突触时介导聚集蛋白诱导的 AchR 集群(agrin-induced clustering of AchRs),并表达于成熟的神经肌肉接头(接点)(Hoch et al.,如上所述)。

因此,仍需要一种更好的重症肌无力症检测方法。

发明内容

本发明提供一种诊断神经肌肉自身免疫疾病重症肌无力症(MG)的方法。本发明至少部分地基于这样的发现,即许多早期重症肌无力症患者具有特异性地识别热休克蛋白 60(“hsp60”)和热休克蛋白 90(“hsp 90”)的自身抗体,先前并没有把上述二种蛋白质与重症肌无力症的病因和发展联系起来。因此,本发明提供一种诊断受试者中 MG 的方法,包括采集来自该受试者的生物样本,和检测该生物样本中至少一种自身抗体的量,其中该自身抗体特异性地与选自如下的 MG 特征性自身抗原结合:热休克蛋白 60(hsp60(序列识别号: 1))、热休克蛋白 90 α 异型体(heat shock protein 90 α isoform, hsp90 α (序列识别号:2))、和热休克蛋白 90 β 异型体(heat shock protein 90 β isoform, hsp90 β (序列识别号:3))。

有许多定性和定量测定自身抗体的量的方法,本发明在某些实施方式中,以 Western 印迹法来测量自身抗体的量。在其他的实施方式中,以酶联免疫吸附测定法(ELISA)来测量自身抗体的量。

本发明也提供一种实现本发明方法的检测试剂盒。上述试剂盒采用一种或多种以上的方法来测量至少一种自身抗体的量,上述自身抗体特异性地与重症肌无力症特征性自身抗原结合。在一个方面中,上述试剂盒包括测量至少一种自身抗体的量的所有试剂,所述自身抗体特异性地与选自如下的至少一种蛋白质结合:热休克蛋白 60(HSP60(序列识别号: 1))、热休克蛋白 90 α 异型体(isoform)(HSP90 α (序列识别号:2))或热休克蛋白 90 β 异型体(HSP90 β (序列识别号:3))。

本发明的更多目的和优点,一部分将在下面的描述中提出,一部分可以由该描述而显然自明,或者可以通过实施本发明而得知。本发明的目的和优点可以借助附随的权利要求中具体指明的要素和组合来实现和达到。应当理解,前面的一般描述和下面的详细描述对本发明都只是例示性和解释性的,而不是限制性的,如声明的那样。

附图被并入该说明书并作为其一部分,其图解本发明的几个实施方式,并且,和发明叙述一起,起到说明本发明的原则的作用。

附图简述

图 1 显示:按照实施例 1 的操作规程,以 Western 印迹法分析用全身性

(generalized)MG 患者的血清探测过的细胞裂解物, 鉴定热休克蛋白 60(hsp60)特异性的自身抗体的结果。阳性印迹以“点”标明。样本取自患有胸腺增生的女性患者(HF), 患有胸腺增生的男性患者(HM), 患有胸腺瘤的女性患者(TF)和患有胸腺瘤的男性患者(TM)。

图 2 显示: 按照实施例 1 的操作规程, 以 Western 印迹法分析用全身性 MG 患者的血清探测过的细胞裂解物, 鉴定热休克蛋白 90(hsp90)特异性的自身抗体的结果。阳性印迹以“点”(dot)标明。样本取自患有胸腺增生的女性患者(HF), 患有胸腺增生的男性患者(HM), 患有胸腺瘤的女性患者(TF)和患有胸腺瘤的男性患者(TM)。

图 3 显示: 按照实施例 2 的操作规程, 用全身性 MG 症患者的血清进行酶联免疫吸附测定 (ELISAs), 鉴定 hsp60 的结果。以横条表示 OD₄₅₀ 的平均值。

图 4 显示: 按照实施例 2 的操作规程, 用全身性 MG 症患者的血清进行酶联免疫吸附测定, 鉴定 hsp90 的结果。以横条表示 OD₄₅₀ 的平均值。这些实验没有区分 hsp90 的 α 异型体和 β 异型体。

图 5 显示本发明的诊断方法正确地将患有 MG 的患者归为“试验阳性”(test positive) 而把不患有 MG 的患者归为“试验阴性”(test-negative) 的能力。试验阳性的患者具有可特异性结合 hsp60(“protein_1”)和/或 hsp90(“protein_2”)的自身抗体, 试验阴性反应的的患者则缺乏 hsp60(“protein_1”)和/或 hsp90(“protein_2”)特异性的自身抗体。

表 1 显示: 缺少 AChR 自身抗体的阶段 I 或阶段 IIa MG 患者显示 hsp60 或 hsp90 自身抗体, 如 ELISAs 测定的。

表 2 比较针对 (1) AChR; (2) hsp60; (3) hsp90; (4) hsp60 + hsp90; (5) AchR + hsp60; 或 (6) AchR + hsp90 特异性的检测的诊断灵敏度。针对只有 AchR 特异性的自身抗体的测试对于患有阶段 I(眼肌)MG 的患者显示最低灵敏度。

序列简述

序列识别号 1 为人类热休克蛋白 60(hsp60)的氨基酸序列。

序列识别号 2 为人类热休克蛋白 90 α 异型体(hsp90 α)的氨基酸序列。

序列识别号 3 为人类热休克蛋白 90 β 异型体(hsp90 β)的氨基酸序列。

具体实施方式

I 诊断自身免疫疾病 (autoimmune disorder) 的方法

本发明的一方面提供了诊断受试者中重度肌无力症的方法, 包括: 采集来自受试者的生物样本; 和检测该生物样本中至少一种自身抗体的量, 其中该自身抗体特异性地与选自下列的至少一种蛋白质结合: 热休克蛋白 60(hsp60(序列识别号: 1))、热休克蛋白 90 α 异型体(hsp90 α (序列识别号:2))、和热休克蛋白 90 β 异型体(hsp90 β (序列识别号:3))。

自身免疫性疾病是以免疫功能异常为特征, 且经常以自身抗体的存在为特征的疾病或障碍。自身抗体为任何一种同型(isotype)的免疫球蛋白(Ig, 或称为“抗体”), 如 IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁、IgA₂、IgD、IgE 或 IgM 等, 其可特异性地与目标抗原结合, 所述目标抗原来自产生该 Ig 蛋白或抗体的相同生物所产生的蛋白。以自身抗体为特征的自身免疫疾病, 包括如艾迪生病(Addison's disease)(抗 21-羟化酶的自身抗体); 乳糜泻(coeliac disease) (抗组织转谷氨酰胺酶(transglutaminase)的自身抗体); I 型胰岛素依赖型糖尿病(抗 GAD-65 和/或胰岛素的自身抗体); 格雷氏(Graves')病/甲状腺亢进(抗促甲状腺素激素受体(thyroid-stimulating-hormone receptor)的自身抗体); 桥本氏(Hashimoto's)甲状腺炎(抗甲状腺过氧化物酶(thyroid peroxidase)和/或甲状腺球蛋白(thyroglobulin)的自身抗体); 重症肌无力症(抗烟碱性乙酰胆碱受体和/或肌肉特异性受体酪氨酸激酶的自身抗体); 古德帕斯丘(Goodpasture's)综合征(抗肾小球基底膜的第 IV 型胶原蛋白的自身抗体); 天疱疮(抗桥粒芯蛋白(desmogleins)3 的自身抗体); 恶性贫血(抗 H/K ATP 酶的自身抗体); 原发型胆汁性肝硬化(抗 E2 PDS 的自身抗体); 白癜风(抗酪氨酸酶和/或 SOX-10 的自身抗体); 多发性硬化症(自身抗体攻击髓鞘碱性蛋白(myelin basic protein)和/或髓鞘寡树状糖蛋白(myelin oligodendritic glycoprotein); 系统性红斑狼疮(抗剪接体 snRNA(spliceosomal snRNA), Ro/La 核糖核颗粒(Ro/La ribonuclear particle), 组蛋白(histone)和/或天然 DNA 的自身抗体); 干燥(Sjögren's)综合征(抗 Ro/La 核糖核颗粒(Ro/La ribonuclear particle)和/或毒蕈碱样受体(muscarinic receptor)的自身抗体); 类风湿性关节炎

炎(抗环瓜胺酸肽(citrillunated cyclic peptide)和/或 IgM 的自身抗体)等(Scofield,如上所述,在 1545 页)。

本发明中所使用的“受试者”为动物,包括人类或非人类的哺乳动物,如狗、猫、小鼠、大鼠、牛、绵羊、猪、山羊、或非人的灵长类,特别是实验哺乳动物、牲畜和家养(domestic)哺乳动物。在一些实施方式中,所述哺乳类动物可以是人,在其他实施方式中,所述哺乳类动物可以是啮齿类动物,如小鼠或大鼠。

生物样本为从受试者的细胞、组织或器官采集的任何生物材料。上述生物样本的来源根据待诊断的受试者所表现的具体症状可以不同。生物样本在取得后,可立刻接受分析或被贮存。生物样本若被贮存,则必须用适当的贮存缓冲液将其平衡,并保持 4°C 、 -20°C 、 -70°C 或深冷(cyrogenic)的液体(如液态氮或液态氦)中。在一个实施方式中,生物样本可由血液、血清或血浆组成。在另一个实施方式中,生物样本可由羊水或乳汁组成。在另一个实施方式中,生物样本可由活组织检查或组织样本、组织或细胞悬液组成。在另一个实施方式中,生物样本也由唾液、脑脊液、淋巴粘液、汗、滑液、泪液或其它临床取样和样本组成。

本发明中关于“特异性结合”或类似描述的意思为二个分子形成在生理条件下维持相对稳定的复合物(complex)(如稳定的抗原/抗体复合物)。该术语也可应用于这样的情况:例如,抗原结合区(antigen-binding domain)特异性地针对特定的抗原表位(epitope),而该表位存在于多个分子中。这样,如果抗体与表位结合,该表位在多种蛋白中的每一个中都存在,则该抗体可以与所述多种蛋白特异性地结合。特异性结合的特征为选择性的相互作用,通常包括高亲和性结合和低到中度的容量(capacity)。非特异性结合通常为选择性较低的相互作用,可能具有低的亲和性和中到高度的容量。一般来说,当亲和度(affinity)至少为 10^5M^{-1} 、 10^6M^{-1} 、 10^7M^{-1} 或 10^8M^{-1} 时,认为是特异性结合。如有需要,可改变结合条件来减少非特异性结合而并不显著地影响特异性结合,这样的条件在本领域是公知的,且使用常规技术的本领域技术人员可以选择合适的条件。上述条件通常是通过确定抗体浓度、溶液中的离子强度、温度、结合时间、无关的分子(如封闭剂,如血清白蛋白、乳酪蛋白)的浓度等来限定的(Morgan et al., “The Matrix Effects on Kinetic Rate Constants of Antibody-Antigen interactions Reflects Solvent Viscosity,” *J.*

Immunol. Meth. 217:51-60(1998); 和 Zhuang et al., "Measurement of Association Rate Constant of Antibody-Antigen Interaction in Solution Based on Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, " *J. Biosci. Bioeng.* 92(4):330-336(2001))。

A. 自身抗体的测量

根据本发明的方法确定抗体的量，包括定性和定量的检测方法。定性方法仅测量生物样本中是否存在特定的自身抗体。定量方法除了确定生物样本中是否存在特定的自身抗体，也可确定其以多大的量存在。上述定性及定量方法都是公知技术。例如，Western 印迹法、免疫印迹法(immunoblotting)、免疫荧光法(immunofluorescence)、酶联免疫吸附测定法(ELISA)及其它类似技术。

1. Western 印迹法

Western 印迹法首先为电泳步骤；该步骤利用聚丙烯酰胺凝胶(polyacrylamide gel)，根据蛋白质的大小及所带电荷，将目的蛋白质分离，然后将所述蛋白质转移到带电荷的膜上。完成转移后开始进行杂交步骤，先以封闭(blocking)步骤将膜上未反应的结合位置封闭，以抑制抗体的非特异性吸附，之后加入第一抗体并孵育以与一或多个目标抗原结合，最后加入第二抗体并孵育，其中利用放射显影(radiographic)、产色(chromogenic)或化学发光(chemiluminescent)材料测量在第一抗体孵育中所形成的抗原-抗体复合物。第二抗体通常可特异性地识别所有同型免疫球蛋白共有的恒定区(Fc)。第二抗体可来自于多种哺乳类动物，包括但不限于兔子、绵羊、山羊、小鼠及大鼠。

为了通过 Western 印迹法测量可特异性地识别 MG 特征性自身抗原的自身抗体的量，将纯化或重组的一或多种 MG 特征性自身抗原的制备物，先用公知技术进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)(参照 Sambrook et al., *Molecular cloning: A laboratory manual* A8.40-A8.45(2001))(介绍许多用 SDS-PAGE 进行蛋白质电泳的试剂及方法)。之后，将凝胶中的内容物转移到硝化纤维素(nitrocellulose)、尼龙(nylon)、聚偏二氟乙烯(PVDF)，或其他适用于固定及 Western 印迹法的其它膜或滤纸，上述固定及 Western 印迹法的标准技术在本技术领域是同样公知的。上述转移方法可为湿式(immersion)或半干式(semi-dry)转移法，也可为其它类似的公

知技术。

或者，纯化或重组的一或多种自身抗原的制备物可以直接点样 (spot) 到硝化纤维素、尼龙、聚偏二氟乙烯(PVDF)等其它的膜或其它适用于固定及 Western 印迹法的膜或滤纸上。若无法得到纯化或重组的目标自身抗原制备物，也可以公知标准技术从细胞裂解物或组织匀浆获得自身抗原。

接着所述膜或滤纸被固定，以避免在后续 Western 印迹法的多次杂交、洗涤、和染色步骤中流失目标蛋白。固定可通过加热、紫外线交联 (cross-linking with ultraviolet light) 或其它公知的方法来实现(参照 Sambrook et al., 3 Molecular cloning: A laboratory manual A8.52-A8.55(介绍许多免疫印迹及检测抗原/抗体复合物的方法))。

用缓冲溶液(如磷酸盐缓冲盐水(phosphate-buffer saline, PBS)等其它类似溶液)来封闭经固定的膜或滤纸上的非特异性抗体结合位点，上述缓冲溶液中含有封闭剂，如 0.5%(w/v)的低脂奶粉(dry milk)或 5%(w/v)的牛血清白蛋白(BSA)等。封闭后，对膜或滤纸进行第一抗体孵育，其中该膜或滤纸与取自待诊断自身免疫疾病的受试者的生物样本共同孵育。

在与第一抗体孵育(incubation)完成后，洗涤上述膜或滤纸，并用第二抗体检测自身抗体/自身抗原复合物，上述第二抗体上标记有能显色(chromogenic)、发荧光(fluorogenic)或化学发光(chemiluminescent)的材料。上述的自身抗体/自身抗原复合物可以用比色法(如辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase)和 TMB)或放射自显影法(如碱性磷酸酶)测量。若利用比色法或化学发光法，则此颜色或荧光的量可用发光计(luminometer)、分光光度计(spectrophotometer)或其它类似仪器来测量。若为放射自显影法，则结合抗体量可以光密度计或其它类似仪器测量曝光的 X 光片得知(参照 Sambrook et al., Molecular Cloning: A laboratory manual A8.52-A8.55(介绍许多免疫印迹及测量抗原/抗体复合物的方法))。

用于定性或定量分析的第二抗体，不管是单克隆还是多克隆抗体，都可用配体(如生物素)或可测量的标记(如荧光或酶)以常规技术标记。较适合的标记包括荧光团(fluorophores)、生色团(chromophores)、电子致密试剂(electron-dense reagents)(如金或银)、酶，和具有特定的结合伙伴(binding partners)的配体。酶，例如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶，通常利用其活性来检测。例如，辣根过氧化物酶可利用其使四甲基联苯胺(TMB)转变成蓝色

的能力来检测,该反应可用分光光度计定量。其它较适合的配体和/或可测量的标记包括生物素、亲和素(avidin)、或链霉亲和素(streptavidin)、IgG、蛋白质 A 及其他众多已知的受体-配体对。以公知技术进行的其它置换及可能性对本领域的一般技术人员都是显而易见的,而且都被认为是本发明范围内的等价形式。

在本发明的一个实施方式中,以 Western 印迹法测量至少一种可特异性地与自身抗原结合的自身抗体的量,上述自身抗原选自:热休克蛋白 60(hsp 60)、热休克蛋白 90 α 异型体(hsp90 α)、和热休克蛋白 90 β 异型体(hsp90 β)。

标准的 Western 印迹操作规程有很多通常的变化形式,如 Far Western 印迹法,定量印迹法,及其他许多方法。本领域的一般技术人员可根据需检测的自身抗体、所使用的自身抗原、检测中所用自身抗原和/或第一自身抗体的来源、及任何其它实验相关参数,选择适合的操作规程。以公知技术进行的其它置换及可能性对本领域的一般技术人员都是显而易见的,而且都是被认为本发明范围内的等价形式。

2. 酶联免疫吸附测定法(ELISA)

某些酶联免疫吸附测定法是定性的,其仅检测是否存在特定的抗原或抗体;但其他的酶联免疫吸附测定法是定量的,能精确地测量抗原或抗体的浓度。因为酶联免疫吸附测定法易于操作和自动化,所以酶联免疫吸附测定法一般常用于从大量的抗原或抗体中筛选特定的结合特异性。

酶联免疫吸附测定法一开始为抗原吸附(adsorption)步骤,其中一种或多种目标抗原吸附于微量滴定板(microtiter plate)的孔中(参照 Kirkegaard & Perry laboratories, Inc., Technical Guide for ELISA 9-13(2003), 可见于 <http://www.kpl.com/home.cfm#>(最近登录是在 2005 年 11 月 3 日)(介绍 ELISA 的各种微量滴定板和多种将蛋白质吸附到孔中的方法及试剂)。最常用的吸附缓冲液包括 50 mM 碳酸盐, pH=9.6; 10 mM Tris-HCl, pH=8.5; 和 10 mM PBS, pH=7.2。上述缓冲液适合用于多种蛋白质。若上述一种或多种抗原无法轻易地吸附于微量滴定板的表面,也可使用一般商品化的微量滴定板,其表面经过修饰或衍生化(derivatize),从而可利用各种化学方法使蛋白质以共价键方式结合于其表面上。时间及温度是影响蛋白质吸附量的最重要的影响因素。

将目标抗原包被在微量滴定板上后,以封闭缓冲液洗涤微量滴定板来去

除非特异性结合并最大程度地降低假阳性结果的发生(如上所引, 13-14页)(介绍封闭的方法及试剂)。一般常用的封闭试剂或者是蛋白质溶液, 如BSA(常用浓度为约1%至5%(w/v), 溶于pH=7.0的PBS)、脱脂奶粉、酪蛋白(脱脂奶粉的主要蛋白质组分)或酪蛋白酸盐(caseinate)(酪蛋白的一种更易溶的形式, 由氢氧化钠部分消化而产生)、一般的血清(常用浓度为约1%至5%(v/v))及明胶(常用浓度约1%至5%(w/v)), 或者是非离子型去污剂, 如Tween-20™及Triton X-100™。

从常规的洗涤剂中选择具有这样能力的洗涤剂, 其可以破坏多个反应组分之间的低亲和性相互作用, 所述相互作用可能影响特定的抗原-抗体相互作用的检测(参见, 例如同上所引14-15页(介绍洗涤微量滴定板的各种方法及试剂))。洗涤溶液通常含有生理缓冲液(physiological buffer)以避免抗原及同源抗体(cognate antibodies)变性, 并维持酶的活性。常使用与中性pH的缓冲液, 如PBS、Tris-盐水、咪唑缓冲盐水(imidazole-buffered saline)等。通常根据特定测量试验所用的检测方法选择特定缓冲液。同时, 洗涤缓冲液也应含有浓度在0.01%至0.05%(v/v)的非离子型去污剂如Tween-20™和Triton X-100™等, 以破坏反应成分间低亲和性、非特异性的相互作用。

在封闭步骤后, 洗涤微量滴定板的孔, 然后对吸附的抗原进行第一抗体孵育, 其中该抗原与生物样本共同孵育, 所述生物样本取自待诊断自身免疫疾病的受试者。在第一抗体孵育完成后, 洗涤孔并加入已标记显色物质(如辣根过氧化物酶及TMB)、发光物质或化学发光物质(如碱性磷酸酶)的第二抗体来检测自身抗原-自身抗体的复合物(同上所引15-21页(介绍抗体的制备及使用, 和一般常用的检测分子))。最后利用发光计、分光光度计等其它类似仪器来测量颜色与荧光的量。

标准酶免疫分析操作规程有种种改变, 如竞争性ELISA法、夹心ELISA法等。本领域的一般技术人员可根据要测量的抗体、所使用的抗原、抗原和/或第一抗体的来源、和实验上相关的参数选用适合的操作规程。以公知技术进行的其它置换及可能性对于本领域的一般技术人员都是显而易见的, 而且都被认为是本发明范围内的等价形式。

B.重症肌无力症的临床类型

Osserman 和 Genkins 等人将成人的重症肌无力症患者分为 4 大类 (Osserman, K.E. 和 Genkins, G., "Studies in myasthenia gravis: review of a

twenty-year experience in over 1200 patients,” *Mt. Sinai J. Med.* 38(6):497-537(1971); “Myasthenia Gravis,” 可见于http://www.neuroland.com/nm/myas_gra.htm (最近登录是在 2005 年 12 月 1 日))。接近 20%的患者被诊断为第 I 型，30%为第 IIA 型，20%为第 IIB 型，11%为第 III 型，9%为第 IV 型。其余的 10%的患者一般为源自儿童型(Osserman and Genkins,如上所述在 502 页)。

第 I 型 MG 又称为眼肌型重症肌无力症，症状一般局限于单眼或双眼的肌肉。其特征为上睑 (ptosis) 下垂及复视，但若 2 年内上述症状不发展至其它肌肉，则此型重症肌无力症通常不会发展。此型的重症肌无力症患者只有 55%具有可特异性地识别 AChR 的自身抗体(Osserman, K.E. and Genkins, G., 如上所述在 501; “Myasthenia Gravis,” 可见于http://www.neuroland.com/nm/myas_gra.htm (最近登录是在 2005 年 12 月 1 日))。

第 IIa 型 MG 又称为轻度全身性重症肌无力症，其症状倾向于发展缓慢，有时开始于眼球外肌但逐渐地发展至骨骼肌和延髓肌。但呼吸系统的肌肉通常不会被影响到。此型患者约有 80%具有可特异性地识别 AChR 的自身抗体。第 IIb 型 MG 又称为中度全身性重症肌无力症，其症状发展缓慢，一般开始于眼球外肌且逐渐地发展至骨骼肌和延髓肌。此型的症状通常较第 IIa 型 MG 严重，呼吸系统的肌肉仍然不受影响(spared)(Osserman, K.E. and Genkins, G., 如上所述 at 501-02; “Myasthenia Gravis,” 可见于http://www.neuroland.com/nm/myas_gra.htm(最近登录是在 2005 年 12 月 1 日))。

第 III 型 MG 又为称急性暴发型重症肌无力症，此型相当严重或急性，症状在骨骼肌和延髓肌中快速地出现，且较早地影响到呼吸系统的肌肉。第 III 型的重症肌无力症患者一般会发生胸腺瘤。疾病的进展通常在 6 个月内完成。第 III 型 MG 患者死亡率高。此型的患者几乎 100%都具有可特异性地识别 AChR 的自身抗体(Osserman, K.E. G.,如上所述在 502; “Myasthenia Gravis,” 可见于http://neuroland.com/nm/myas_gra.htm (最近登录是在 2005 年 12 月 1 日))。

第 IV 型 MG 又称为晚发性严重型重症肌无力症，此型为慢性、严重的病症，一般在第 I 和类似 II 型症状发生后 2 年以上才发展至此型 MG。此型

的重症肌无力症患者约有 89%具有可特异性地识别 AChR 的自身抗体 (Osserman, K.E. and Genkins, G.,如上所述在 502; “Myasthenia Gravis,” 可见于 http://neuroland.com/nm/myas_gra.htm (最近登录是在 2005 年 12 月 1 日))。

于重症肌无力症的患者身上常常 (regularly) 观察到至少 2 种的胸腺病变会发生。约 50%的 MG 患者患有不同程度的胸腺增生。约 15%的患者最终发生胸腺瘤。在一些病例中, 重症肌无力症患者可以进行胸腺切除来成功治疗, 胸腺切除的结果是 50%以上的重症肌无力症患者的症状可得到持续的改善, 虽然在年老患者中的效果要差一些 (Osserman, K.E. and Genkins, G.,如上所述在 515-23)。

C. 与重症肌无力症有关的自身抗体

目前已有多种可鉴别与特定的自身免疫疾病相关的候选自身抗原的方法, 包括, 例如记载在 2005 年 6 月 9 日公开的美国专利公开号 US-2005/0124076-A1 号中的方法, 该公开专利并入本申请作为参考。依照上述方法, 从健康个体和患自身免疫疾病(如重症肌无力症)的个体的血清样本中纯化血清抗体。将纯化的免疫球蛋白以共价键的方式结合层析介质, 制备亲和层析柱。然后分析从患有 MG 的受试者中纯化的蛋白质样品, 例如来自参与该疾病的病因学和进展的器官、组织或细胞类型的蛋白质样品。

例如, 为了鉴定与 MG 相关的候选自身抗原, 可以使用来自成熟神经肌肉接头的肌肉终板的蛋白质样本, 所述肌肉终板处发生了 MG 特征性的免疫介导 (immune-mediated) 的乙酰胆碱受体损失。先将上述蛋白质样本通过含有分离自健康个体的免疫球蛋白的层析柱, 然后将不结合的蛋白质通过含有从 MG 患者分离的免疫球蛋白的层析柱, 所有结合于第二个层析柱的蛋白质都是候选的自身抗原, 洗脱后可用于后续的分析, 如质谱 (mass spectrometry), 以鉴定各种分离的蛋白质。

由上述方法, hsp60 和 hsp90 被鉴定为两种新的重症肌无力症患者的候选自身抗原。由 ELISA 分析的结果发现, 在重症肌无力症的早期(第 I 和 IIa 期)患者中, 并无特异性结合 AChR 的自身抗体, 但却有特异性结合 hsp60 及 hsp90 的自身抗体。通过检测这些自身抗体可提供针对重症肌无力症的新型诊断方法, 尤其是在缺少 MG 最常见的相关自身抗体——AChR 自身抗体的早期 MG 患者中诊断 MG 的方法(参照例如图 5)。

此外, 也可用其它方法来鉴定重症肌无力症的候选自身抗原, 如筛选

cDNA 表达基因库或通过消减噬菌体展示。为了通过这些方法鉴定可能的自身抗原,利用分离自与 MG 病因及疾病发展相关的器官、组织或细胞种类(如成熟神经肌肉接头的肌肉终板)的 mRNA 来构建噬菌体展示系统或其它的蛋白质表达数据库。用免疫球蛋白筛选这些文库,其中所述免疫球蛋白是从待了解的自身免疫疾病个体的血清样本中纯化的,并将结果与使用从健康者血清中纯化的免疫球蛋白所得结果作比较。

除了上面列出的以外,标准的自身抗原筛选步骤还有很多的变化形式。本领域的一般技术人员可根据要研究的自身免疫性疾病、所使用的自身抗原、筛选候选自身抗体的生物样本的来源、及任何其它实验相关参数,选择适合的操作规程。以公知技术进行的其它置换及可能性对本领域的一般技术人员都是显而易见的,而且都是被认为本发明范围内的等价形式。

1. 热休克蛋白(Heat-Shock Proteins)

在环境温度突然升高或出现其它恶劣条件时,生物体会因此应激合成一小组进化上保守的蛋白质,称为热休克蛋白。在演变过程中,热休克反应的性质及各种热休克蛋白家族成员的氨基酸序列都高度保守。例如,真核生物与原核生物的热休克蛋白 70(hsp70)在氨基酸水平上具有约 50%的同一性(Parsell et al., "The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged protein," *Ann. Rev. Genet.* 27:437-496(1993))。热休克蛋白家族各种不同成员的在保护生物体免于环境应激中起不同作用。

a. 热休克蛋白 60(60 kD Heat-Shock Protein)

热休克蛋白 60(hsp60)主要存在于粒线体基质,其占线粒体基质所有蛋白质的 1%(Parsell et al.,如上所述在 465 页)。人类 hsp 60(氨基酸序列:1)与其大肠杆菌同源物 GroEL 在氨基酸序列上具有约 60%同一性(同上所引)。上述二种蛋白质有相同的寡聚体结构(oligomeric structure),其由单个 7 元环(seven-membered ring)构成,有时则可形成双 7 元环(two seven-membered rings)的双环(double doughnut)结构(同上所引)。hsp60 具有随温度升高而增加的 ATP 酶活性;ATP 的结合导致所述寡聚体结构发生显著的构象改变(同上所引)。

hsp60 不同于其它的热休克蛋白,它在正常的温度下行使功能(同上所引,第 465-66 页),其在所有的温度下对生长都是必需的(同上所引)。hsp60

以高度的亲和性结合去折叠(unfolded)或变性的蛋白质,并促使它们进行适当的折叠。变性蛋白质在与 hsp60 结合时开始具有二级结构的元件,尽管更复杂的结构元件的形成被阻止。

b. 热休克蛋白 90(90 kD Heat-Shock Protein)

热休克蛋白 90(hsp90)在迄今为止被研究的所有真核生物的细胞质及细胞核中都有发现,但仍未发现存在于细胞器的 hsp90 类物质(Parsell et al., 同上在 470)。hsp90 在细胞质中具有两种异型体(isoform)结构,分别为受诱导表达的、占多数的类型 hsp90 α (序列识别号: 2)和组成性表达的、占少数的类型 hsp90 β (序列识别号: 3)(Sreedhar et al., “hsp90 isoform: functions, expression and clinical importance,” *FEBS Letters* 562:11-15(2004))。 α 和 β 异型体难于通过生化的方式来分离,因此目前都是使用二者的混合物来进行 hsp90 的生物功能的相关研究。

人类的 hsp90 α 与其大肠杆菌中的同源物 HtpG 在氨基酸序列上具有约 40%同一性(Parsell,如上所述)。HtpG 在正常温度时可维持相当的丰度,在高温时可被大量诱导产生,但它并不是必需的:在将其基因删除后,并不会影响大肠杆菌在正常温度的生长,只稍微影响它在高温的生长(同上所引)。相反, hsp90 是真核细胞中丰度最高的蛋白质之一,在非应激条件下,它占总细胞蛋白质的 1-2%。若将真核生物的 hsp90 基因删除,会导致生物体的死亡,表示真核生物的 hsp90 具有在原核生物没有的、关键性的新功能(Sreedhar et al.,如上所述; Parsell et al.,如上所述)。

hsp90 可与细胞中许多其他蛋白质反应,包括酪蛋白激酶 II(casein kinaseII)、血红素调节的 eIF-2 α 激酶(heme-regulated eIF-2 α kinase)多种类固醇激素受体如雌激素(estrogen)、黄体酮(progesterone)、雄激素(androgen)、糖皮质激素类固醇(glucocorticoid)和二噁英(dioxin)的受体,src 家族的致癌酪氨酸激酶(oncogenic tyrosine kinases of the src family)、钙调理素(calmodulin)、肌动蛋白(actin)和微管蛋白(tubulin)等(Parsell et al.,如上所述在 471)。经实验发现,在细胞的分化及发育中, hsp90 具有多种功能,如调控肌肉发育、早期胚胎发育和程序性细胞死亡(programmed cell death)或细胞凋亡(apoptosis)(Sreedhar et al.,如上所述在 12)。此外,一些证据提示 hsp90 与例如胰脏癌、乳腺肿瘤等多种肿瘤,及白血病(同上所引,第 13 页)相关。另外,在全身性红斑狼疮患者中伴随有 hsp90 β 的转录升高;红斑狼疮为自身免疫

疾病,其特征为抗自身的剪接体 snRNA, Ro/La 核糖核颗粒(Ro/La ribonuclear particle), 组蛋白 (histone)和/或天然 DNA 等的自身抗体(同上所引)。

II、诊断自身免疫疾病的试剂盒

本发明的检测方法可由检测试剂盒来进行,上述检测试剂盒包含一或多种上述检测自身抗体的技术,所述自身抗体特异性地与至少一种重症肌无力症的特征性自身抗原结合。例如,在一个实施方式中,上述试剂盒以 Western 印迹法分析上述自身抗体的量。在一个方面中,上述试剂盒包含多个试纸条(test strips),其上固定了等份的本发明的两种新自身抗原 hsp60 和 hsp90 α /hsp90 β 的每一种。

在一个实施方案中,上述检测试剂盒还包含:对每个自身抗原特异的对照抗体(control antibodies);第二抗体,其以直接或间接的方式与辣根过氧化物酶或任何有助于使自身抗原-自身抗体复合物可见的试剂偶联;以及在 Western 印迹法的封闭、洗涤、杂交和检测等步骤中所有需要的试管、容器或反应器、缓冲液和试剂。上述对照抗体蛋白可以以溶于合适的缓冲液或溶剂,或冷冻干燥粉末等形式来提供。类似地,所述缓冲液和其他试剂可以以预混合的形式提供,或者以干燥形式提供,若为干燥的形式,使用者必须将其复溶(reconstitute)。此外,该检测试剂盒还包含其它成分、包装、说明书或其他可帮助检测自身抗体的材料。

在另一个实施方式中,上述试剂盒可以用 ELISA 来测量自身抗体的量。在一个方面,上述试剂盒包含多个微量滴定板,所述微量滴定板用本发明的二种新自身抗原 hsp60 和 hsp90 α /hsp90 β 中的每一种包被。

在一个实施方式中,上述试剂盒还包括对各自身抗原特异性的对照抗体,第二抗体,其以直接或间接的方式与辣根过氧化物酶或任何有助于使自身抗原-自身抗体复合物可见的试剂偶联;以及在 ELISA 的封闭、洗涤、杂交和检测等步骤中所有需要的试管、容器或反应器、缓冲液和试剂。上述对照抗体蛋白可以以溶于合适的缓冲液或溶剂,或冷冻干燥粉末等形式来提供。类似地,所述缓冲液和其他试剂可以以预混合的形式提供,或者以干燥形式提供,若为干燥的形式,使用者必须将其复溶。此外,该检测试剂盒还包含其它成分、包装、说明书或可帮助检测自身抗体的材料。

实施例

实施例 1: 以 Western 印迹法鉴定自身抗体

血清样本取自中华民国台湾新光医院 209 位重症肌无力症患者。可将这些患者依其胸腺的病理分为四大类：其中 37 位患者有不同程度的胸腺萎缩(thymic atrophy); 121 位的患者出现胸腺瘤(thymoma); 40 位患者有一定程度的胸腺增生(thymic hyperplasia); 且 11 位患者有未知的胸腺病理。此外, 76 位患者为第 I 型 MG, 81 位为第 IIa 型 MG, 38 位为第 IIb 型 MG, 14 位为第 III 或第 IV 型 MG。阴性对照组(negative control)的血清样本为来自台中荣民总医院的 54 位患者, 他们患有另一种不相关的、非源于自身免疫的疾病膜状肾小球肾炎(Membranous glomerulonephritis, MGN)。

将 HepG2/C3A 细胞的细胞裂解物通过 10%的 SDS-PAGE 凝胶分离, 上样为每条泳道 20 μg 的细胞提取物和每条泳道 2 μg 的 hsp60 或 hsp90 蛋白。电泳过程中, 样本在积层(stacking)凝胶时给予 80 V 的电压, 而进行至分离凝胶时给予 120 V 的电压。被分级的(fractionated)蛋白质可利用 TE70 系列半干式转移单位转移器(TE70 Series Semi-dry Transfer Unit)(Amersham Bioscience)根据制造商的指示转移到 PVDF 上。所使用的转移缓冲液为 Towbin Buffer(1 倍的浓度为: 25 mM Tris-HCl, pH=8.30, 192 mM 甘氨酸和 20%(v/v)甲醇)。

上述 PVDF 膜在含 5%脱脂奶粉的 PBST 缓冲液(80 mM Na_2HPO_4 , 20 mM NaH_2PO_4 , 100 mM NaCl, 0.05%-0.1%(v/v) Tween-20)中于室温反应 1 小时或置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜来进行封闭。将患者血清以 1: 1000 的比例稀释于含 5%脱脂奶粉的 PBST 缓冲液中, 并在室温下与经封闭的 PVDF 膜共孵育 1 小时。与第一抗体孵育后, 以 PBST 缓冲液洗涤上述 PVDF 膜。然后该膜在室温与第二抗体共孵育 1 小时, 上述第二抗体为与辣根过氧化物酶偶联的抗人 IgG(anti-human IgG), 它以 1: 5000 稀释于含 5%脱脂奶粉的 PBST 缓冲液中。上述第二抗体为辣根过氧化物酶偶联的 Fc_γ 特异性的鼠抗人 IgG(horseradish peroxidase-conjugated mouse anti-human IgG)(Jackson immunoResearch Laboratories, Inc.), 它购自 Biosource International, of Camarillo, CA.USA。与固定化抗原结合的自身抗体通过酶联化学发光检测, 使用 ECL 印迹底物(Amersham Pharmacia Biotech)根据制造商的指示进行。

图 1 和 2 显示了上述实验的结果, 样本取自患有胸腺增生的女性患者(HF), 患有胸腺增生的男性患者(HM), 患有胸腺瘤的女性患者(TF)和患有胸腺瘤的男性患者(TM)。hsp60 或 hsp90 特异性抗体阳性的样本以“点”标明,

即具有可识别热休克蛋白 60、热休克蛋白 90 的自身抗体。这些实验显示许多处于 MG 较晚阶段的患者具有 hsp60 和 hsp90 特异性的自身抗体。

实施例 2: 以酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 测量自身抗体

以酶联免疫吸附测定法对实施例 1 的血清样本等份进行进一步分析。ELISA 微孔板(Corning Life Sciences, New York, NY, USA)用溶于 0.1 M NaHCO_3 pH = 8.6 中的 0.2 μg 的人 hsp60(纯化自大肠杆菌)或 hsp90(纯化自酿酒酵母 (*S.cerevisiae*)) 在 4°C 下包被过夜。上述两种重组热休克蛋白购自 Sigama-Aldrich Co。将已包被的微孔板用 PBS 洗涤 3 次, 每次 1 分钟, 然后在 37°C 与 200 μl 的封闭溶液(5 mg/ml 的 BSA 的 PBST 溶液)共孵育 1 小时, 每个孔用 PBST 洗涤 6 次, 每次 1 分钟。之后将该板与以 1:100 到 1:800 稀释在封闭溶液中的患者血清在 37°C 反应 1 小时 30 分钟。与第一抗体孵育后, 再用封闭溶液将微孔板洗涤 6 次, 每次 1 分钟, 然后与第二抗体在室温下共孵育 1 小时, 上述第二抗体为辣根过氧化物酶偶联的 Fc_γ 特异性的小鼠抗人 IgG (Jackson immunoResearch Laboratories, Inc.), 它以 1: 10,000 稀释于含 5 mg/ml BSA 的 PBST 缓冲液中。然后将微孔板在室温用含 5 mg/ml BSA 的 PBST 缓冲液洗涤 6 次, 并加入 100 μl 的 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (tetramethylbenzidine)(TMB)溶液显色。上述 TMB 溶液以 50 mM 的柠檬酸磷酸盐(citrate phosphate)制备。在加入 TMB 溶液后, 于室温孵育 30 分钟, 依照仪器的操作手册以 MRX Microplate Reader(Dynex Technologies)测量波长 450 nm 时的吸光度。

这些实验的结果如图 3(hsp60)和图 4(hsp90)显示, 其比较对照组与 MG 患者组的 ELISA 分析结果, 该 MG 患者组包括处于该病所有阶段的患者。波长 450 nm 的吸光度平均值以水平线表示。这些实验并未区分 hsp90 α 和 hsp90 β 异型体。上述结果表明所有阶段的重症肌无力症患者都具有 hsp60 和 hsp90 特异性的自身抗体。

表 1 显示, 通过检测可特异性结合 hsp60 及 hsp90 的自身抗体的存在, MG 在缺乏 AChR 自身抗体的第 I 和 IIa 型 MG 患者中可以得到准确的诊断。用 ELISA 对 40 位患者进行 hsp60 和 hsp90 特异性的自身抗体的检测, 患者中 24 位被诊断为第 I 型 MG, 16 位诊断为第 IIa 型 MG。检测按照实施例 2 所述的操作规范进行。吸收值的读数按照标准方法转换成蛋白质浓度。分界点 (cutoff points) 为: (1) $\text{OD}_{450} = 0.2(\text{AChR})$; (2) $\text{OD}_{450} = 0.375(\text{hsp60})$; (3)

OD₄₅₀ = 0.232(hsp90)。所有 40 位患者都没有可检测到的 AChR 自身抗体(表中称为“AChR”的列), 而其中 28 位患者具有可测量水平的 hsp60 自身抗体(24 位第 I 型患者中有 18 位, 16 位第 IIa 型患者中有 10 位)。33 位患者具有可测量水平的 hsp90 自身抗体(24 位第 I 型患者中有 21 位, 16 位第 IIa 型患者中有 12 位, 称为“hsp90”的列)。

表 1

患者编号 和 MG 阶 段	AChR	AChR	hsp60	hsp60	hsp90	hsp90
I-1	< 0.2	-	0.539	+	0.609	+
I-2	< 0.2	-	0.593	+	0.293	+
I-3	< 0.2	-	0.328	-	0.467	+
I-4	< 0.2	-	0.716	+	0.498	+
I-5	< 0.2	-	1.063	+	1.088	+
I-6	< 0.2	-	0.907	+	0.898	+
I-7	< 0.2	-	0.484	+	0.376	+
I-8	< 0.2	-	0.724	+	0.644	+
I-9	< 0.2	-	0.608	+	0.539	+
I-10	< 0.2	-	0.61	+	0.495	+
I-11	< 0.2	-	0.96	+	1.156	+
I-12	< 0.2	-	0.412	+	0.365	+
I-13	< 0.2	-	0.771	+	0.678	+
I-14	< 0.2	-	0.769	+	0.743	+
I-15	< 0.2	-	0.321	-	0.196	-
I-16	< 0.2	-	0.623	+	0.632	+
I-17	< 0.2	-	0.197	-	0.246	+
I-18	< 0.2	-	0.309	-	0.236	+
I-19	< 0.2	-	0.476	+	0.398	+
I-20	< 0.2	-	0.708	+	0.175	-
I-21	< 0.2	-	0.293	-	0.344	+

I-22	< 0.2	-	0.711	+	0.708	+
I-23	< 0.2	-	0.251	-	0.217	-
I-24	< 0.2	-	0.535	+	0.34	+
IIa-1	< 0.2	-	0.811	+	2.626	+
IIa-2	< 0.2	-	0.542	+	0.497	+
IIa-3	< 0.2	-	0.306	-	0.306	+
IIa-4	< 0.2	-	0.498	+	0.324	+
IIa-5	< 0.2	-	0.406	+	0.261	+
IIa-6	< 0.2	-	0.169	-	0.162	-
IIa-7	< 0.2	-	0.734	+	0.75	+
IIa-8	< 0.2	-	0.313	-	0.226	-
IIa-9	< 0.2	-	0.776	+	1.199	+
IIa-10	< 0.2	-	0.214	-	0.106	-
IIa-11	< 0.2	-	1.201	+	0.918	+
IIa-12	< 0.2	-	0.193	-	0.138	-
IIa-13	< 0.2	-	0.351	-	0.258	+
IIa-14	< 0.2	-	0.552	+	0.8	+
IIa-15	< 0.2	-	0.498	+	0.642	+
IIa-16	< 0.2	-	1.051	+	0.783	+

表 1 显示：以 ELISA 分析重症肌无力症患者，发现在第 I 或 IIa 时期并无可识别 AChR 的自身抗体，但具有可识别 hsp60 或 hsp90 的自身抗体。

图 5 显示本发明有助于重症肌无力症的“灵敏(sensitivity)”与“特异性(specific)”的诊断。“灵敏度”(sensitivity)衡量的是诊断为 MG 的患者中，对特异性结合 hsp60(“protein_1”)或 hsp90(“protein_2”)的自身抗体检测为阳性的比例(Hennekens et al., Epidemiology in medicine 331-335(1st ed.1987))。“特异性”衡量的是非 MG 患者中，对特异性结合 hsp60(“protein_1”)或 hsp90(“protein_2”)的自身抗体检测为阴性的比例(同上所引)。该实验证明，在缺乏可与 AChR 特异性结合的自身抗体的眼肌型肌无力症(第 I 型)及轻度、全身性(第 IIa 型)MG 患者中，有 76% 的患者具有与 hsp60 特异性结合的自身抗体，且 86% 的患者具有与 hsp90 特异性结合的自身抗体；此外，在非重症

肌无力症患者中，有 91% 的患者的 hsp60 自身抗体检测为阴性，有 86% 的患者的 hsp90 自身抗体检测为阴性。

表 2 显示，相比于只检测对 AChR 特异性的自身抗体，检测特异性地结合 hsp60、hsp90、hsp60+hsp90、AChR+hsp60、或 AChR+hsp90 等的自身抗体能够更灵敏地鉴定阶段 I（眼肌型）MG。表 2 总结的数据得自 73 位阶段 I 的 MG 患者的样本，使用如表 1 所讨论的 ELISA 分析和分界(cutoff)值。

表 2

自身抗原	对阶段 I 的 MG 患者的灵敏度(%)
AChR	67.1
HSP60	78.1
HSP90	86.3
HSP60+HSP90	98.6
AChR+HSP60	91.7
AChR+HSP90	95.9

表 2 显示：分别比较(1)AChR；(2)hsp60；(3)hsp60+hsp90；(4)hsp60+hsp90；(5)AChR+hsp60；(6)AChR+hsp90 的不同鉴定方法的灵敏度。结果显示可识别 AChR 的自身抗体仅出现在第 I 期的眼肌型肌无力症患者，且灵敏度最低。

本发明通过 hsp60 和/或 hsp90 提供了一种新型、灵敏、特异性的诊断重症肌无力症，尤其是在该病的早期阶段的患者中诊断重症肌无力症的方法，上述早期阶段的患者缺少该疾病最常用的相关临床标记(clinical marker)——抗 AChR 的自身抗体。

本说明书当根据本说明书中所引文献的教导充分地理解。本说明书中的实施方式部分提供对本发明的实施方式的说明，不应被理解为对本发明范围的限制。本领域的技术人员很容易认识到，其他实施方式也为本发明所包括。本公开中引用的所有出版物和专利都被以全文引入作为参考。至于当任何通用词典、技术词典或被引入作为参考的材料与该说明书冲突或者不一致时，本说明书当优先于任何这样的材料。本文中对任何参考文献的引用并非承认该文献为本发明的现有技术。

除非另有说明，所有表示本说明书包括权利要求中所用的成分的量、反应条件等等的数字，应被理解为在一切情况下均被术语“大约”所修饰。因此，除非另有相反的说明，数字表示的参数都是近似值，而且可能根据本发

明寻求获得的所希望的性质而变化。在最低程度上，并且不作为将等同原则的适用限制于权利要求的范围的企图，每个数字表示的参数应该根据有效位数和普通的舍入方法来理解。

除非另有说明，位于一系列元素前面的术语“至少”应当理解为指的是该系列中的每一个元素。本领域的技术人员仅利用常规实验就将认识到或者能够发现本文中描述的该发明的具体实施方式的等价方案。这些等价方案当为下面的权利要求所涵盖。

参考文献

- [001] COTRAN ET AL., PATHOLOGIC BASIS OF DISEASE 211-212, 1289 (W.B. Saunders Co., Philadelphia, PA; 6th ed. 1999).
- [002] HENNEKENS ET AL., EPIDEMIOLOGY IN MEDICINE 331-335 (1ST ED. 1987).
- [003] Hoch et al., “Auto-antibodies to the receptor tyrosine kinase MsSK in patients with myasthenia gravis without acetylcholine receptor antibodies,” *Nature Med.* 7(3):365-368 (2001).
- [004] Howard, “Myasthenia gravis: a summary,” available at <http://www.myasthenia.org/information/summary.htm> (last accessed October 23, 2005).
- [005] KIRKEGAARD & PERRY LABORATORIES, INC., TECHNICAL GUIDE FOR ELISA 9-21 (2003), available at <http://www.kpl.com/home.cfm#> (last accessed November 3, 2005).
- [006] Luo et al., “Regulation of AChR clustering by dishevelled interacting with MuSK and PAK1,” *Neuron* 35:489-505 (2002).
- [007] Morgan et al., “The Matrix Effects on Kinetic Rate Constants of Antibody-Antigen Interactions Reflect Solvent Viscosity,” *J. Immunol. Meth.* 217:51-60 (1998).
- [008] “Myasthenia Gravis,” available at http://www.neuroland.com/nm/myas_gra.htm (last accessed December 1, 2005).

[009] Osserman, K.E. and Genkins, G., "Studies in myasthenia gravis: review of a twenty-year experience in over 1200 patients," *Mt. Sinai J. Med.* 38(6):497-537 (1971).

[010] Parsell et al., "The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins," *Ann Rev. Genet.* 27:437-496 (1993).

[011] Ragheb et al., "Myasthenia gravis patients, but not healthy subjects, recognize epitopes that are unique to the ϵ -subunit of the acetylcholine receptor," *J. Neuroimmunol.* 159:137-145 (2005).

[012] Richman et al., "Treatment of autoimmune myasthenia gravis," *Neurol.* 61:1652-1661 (2003).

[013] Robinson et al., "Autoantigen microarrays for multiplex characterization of autoantibody responses," *Nature Med.* 8(3):295-301 (2002).

[014] Roxanis et al., "Thymic myoid cells and germinal center formation in myasthenia gravis; possible roles in pathogenesis," *J. Neuroimmunol.* 125:185-197 (2002).

[015] SAMBROOK ET AL., 3 MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL A8.40-A8.45 and A8.52-A8.55 (Cold Spring Harbor Laboratories Press, Cold Spring Harbor, NY, 3d ed. 2001).

[016] Scofield, "Autoantibodies as predictors of disease," *Lancet* 363:1544-1546 (2004).

[017] Somnier, "Increasing incidence of late-onset anti-AChR antibody-seropositive myasthenia gravis," *Neurol.* 65:928-930 (2005).

[018] Sreedhar et al., "Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance," *FEBS Letters* 562:11-15 (2004).

[019] Zhuang et al., "Measurement of Association Rate Constant of Antibody-Antigen Interaction in Solution Based on Enzyme-Linked Immunosorbent Assay," *J. Biosci. Bioeng.* 92(4):330-336 (2001).

序列表

<110> 财团法人工业技术研究院(Industrial technology research institute)

<120> 诊断重症肌无力症的方法及其所用的试剂盒

<130> 09708.0005-00000

<160> 3

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 573

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 1

```

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

```

Asp Ala Tyr Val Leu Leu Ser Glu Lys Lys Ile Ser Ser Ile Gln Ser
 245 250 255
 Ile Val Pro Ala Leu Glu Ile Ala Asn Ala His Arg Lys Pro Leu Val
 260 265 270
 Ile Ile Ala Glu Asp Val Asp Gly Glu Ala Leu Ser Thr Leu Val Leu
 275 280 285
 Asn Arg Leu Lys Val Gly Leu Gln Val Val Ala Val Lys Ala Pro Gly
 290 295 300
 Phe Gly Asp Asn Arg Lys Asn Gln Leu Lys Asp Met Ala Ile Ala Thr
 305 310 315 320
 Gly Gly Ala Val Phe Gly Glu Glu Gly Leu Thr Leu Asn Leu Glu Asp
 325 330 335
 Val Gln Pro His Asp Leu Gly Lys Val Gly Glu Val Ile Val Thr Lys
 340 345 350
 Asp Asp Ala Met Leu Leu Lys Gly Lys Gly Asp Lys Ala Gln Ile Glu
 355 360 365
 Lys Arg Ile Gln Glu Ile Ile Glu Gln Leu Asp Val Thr Thr Ser Glu
 370 375 380
 Tyr Glu Lys Glu Lys Leu Asn Glu Arg Leu Ala Lys Leu Ser Asp Gly
 385 390 395 400
 Val Ala Val Leu Lys Val Gly Gly Thr Ser Asp Val Glu Val Asn Glu
 405 410 415
 Lys Lys Asp Arg Val Thr Asp Ala Leu Asn Ala Thr Arg Ala Ala Val
 420 425 430
 Glu Glu Gly Ile Val Leu Gly Gly Gly Cys Ala Leu Leu Arg Cys Ile
 435 440 445
 Pro Ala Leu Asp Ser Leu Thr Pro Ala Asn Glu Asp Gln Lys Ile Gly
 450 455 460
 Ile Glu Ile Ile Lys Arg Thr Leu Lys Ile Pro Ala Met Thr Ile Ala
 465 470 475 480
 Lys Asn Ala Gly Val Glu Gly Ser Leu Ile Val Glu Lys Ile Met Gln
 485 490 495
 Ser Ser Ser Glu Val Gly Tyr Asp Ala Met Ala Gly Asp Phe Val Asn
 500 505 510
 Met Val Glu Lys Gly Ile Ile Asp Pro Thr Lys Val Val Arg Thr Ala
 515 520 525
 Leu Leu Asp Ala Ala Gly Val Ala Ser Leu Leu Thr Thr Ala Glu Val
 530 535 540
 Val Val Thr Glu Ile Pro Lys Glu Glu Lys Asp Pro Gly Met Gly Ala
 545 550 555 560
 Met Gly Gly Met Gly Gly Gly Met Gly Gly Gly Met Phe
 565 570

<210> 2
 <211> 732
 <212> PRT
 <213> 人(Homo sapiens)

<400> 2

Met Pro Glu Glu Thr Gln Thr Gln Asp Gln Pro Met Glu Glu Glu Glu
 1 5 10 15

Val Glu Thr Phe Ala Phe Gln Ala Glu Ile Ala Gln Leu Met Ser Leu
 20 25 30

Ile Ile Asn Thr Phe Tyr Ser Asn Lys Glu Ile Phe Leu Arg Glu Leu
 35 40 45

Ile Ser Asn Ser Ser Asp Ala Leu Asp Lys Ile Arg Tyr Glu Ser Leu
 50 55 60

Thr Asp Pro Ser Lys Leu Asp Ser Gly Lys Glu Leu His Ile Asn Leu
 65 70 75 80

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

Gly Met Thr Lys Ala Asp Leu Ile Asn Asn Leu Gly Thr Ile Ala Lys
 100 105 110

Ser Gly Thr Lys Ala Phe Met Glu Ala Leu Gln Ala Gly Ala Asp Ile
 115 120 125

Ser Met Ile Gly Gln Phe Gly Val Gly Phe Tyr Ser Ala Tyr Leu Val
 130 135 140

Ala Glu Lys Val Thr Val Ile Thr Lys His Asn Asp Asp Glu Gln Tyr
 145 150 155 160

Ala Trp Glu Ser Ser Ala Gly Gly Ser Phe Thr Val Arg Thr Asp Thr
 165 170 175

Gly Glu Pro Met Gly Arg Gly Thr Lys Val Ile Leu His Leu Lys Glu
 180 185 190

Asp Gln Thr Glu Tyr Leu Glu Glu Arg Arg Ile Lys Glu Ile Val Lys
 195 200 205

Lys His Ser Gln Phe Ile Gly Tyr Pro Ile Thr Leu Phe Val Glu Lys
 210 215 220

Glu Arg Asp Lys Glu Val Ser Asp Asp Glu Ala Glu Glu Lys Glu Asp
 225 230 235 240

Lys Glu Glu Glu Lys Glu Lys Glu Glu Lys Glu Ser Glu Asp Lys Pro
 245 250 255

Glu Ile Glu Asp Val Gly Ser Asp Glu Glu Glu Glu Lys Lys Asp Gly
 260 265 270

Asp Lys Lys Lys Lys Lys Lys Ile Lys Glu Lys Tyr Ile Asp Gln Glu
 275 280 285

Glu Leu Asn Lys Thr Lys Pro Ile Trp Thr Arg Asn Pro Asp Asp Ile
 290 295 300

Thr Asn Glu Glu Tyr Gly Glu Phe Tyr Lys Ser Leu Thr Asn Asp Trp
 305 310 315 320
 Glu Asp His Leu Ala Val Lys His Phe Ser Val Glu Gly Gln Leu Glu
 325 330 335
 Phe Arg Ala Leu Leu Phe Val Pro Arg Arg Ala Pro Phe Asp Leu Phe
 340 345 350
 Glu Asn Arg Lys Lys Lys Asn Asn Ile Lys Leu Tyr Val Arg Arg Val
 355 360 365
 Phe Ile Met Asp Asn Cys Glu Glu Leu Ile Pro Glu Tyr Leu Asn Phe
 370 375 380
 Ile Arg Gly Val Val Asp Ser Glu Asp Leu Pro Leu Asn Ile Ser Arg
 385 390 395 400
 Glu Met Leu Gln Gln Ser Lys Ile Leu Lys Val Ile Arg Lys Asn Leu
 405 410 415
 Val Lys Lys Cys Leu Glu Leu Phe Thr Glu Leu Ala Glu Asp Lys Glu
 420 425 430
 Asn Tyr Lys Lys Phe Tyr Glu Gln Phe Ser Lys Asn Ile Lys Leu Gly
 435 440 445
 Ile His Glu Asp Ser Gln Asn Arg Lys Lys Leu Ser Glu Leu Leu Arg
 450 455 460
 Tyr Tyr Thr Ser Ala Ser Gly Asp Glu Met Val Ser Leu Lys Asp Tyr
 465 470 475 480
 Cys Thr Arg Met Lys Glu Asn Gln Lys His Ile Tyr Tyr Ile Thr Gly
 485 490 495
 Glu Thr Lys Asp Gln Val Ala Asn Ser Ala Phe Val Glu Arg Leu Arg
 500 505 510
 Lys His Gly Leu Glu Val Ile Tyr Met Ile Glu Pro Ile Asp Glu Tyr
 515 520 525
 Cys Val Gln Gln Leu Lys Glu Phe Glu Gly Lys Thr Leu Val Ser Val
 530 535 540
 Thr Lys Glu Gly Leu Glu Leu Pro Glu Asp Glu Glu Glu Lys Lys Lys
 545 550 555 560
 Gln Glu Glu Lys Lys Thr Lys Phe Glu Asn Leu Cys Lys Ile Met Lys
 565 570 575
 Asp Ile Leu Glu Lys Lys Val Glu Lys Val Val Val Ser Asn Arg Leu
 580 585 590
 Val Thr Ser Pro Cys Cys Ile Val Thr Ser Thr Tyr Gly Trp Thr Ala
 595 600 605
 Asn Met Glu Arg Ile Met Lys Ala Gln Ala Leu Arg Asp Asn Ser Thr
 610 615 620
 Met Gly Tyr Met Ala Ala Lys Lys His Leu Glu Ile Asn Pro Asp His
 625 630 635 640
 Ser Ile Ile Glu Thr Leu Arg Gln Lys Ala Glu Ala Asp Lys Asn Asp

Ile Gly Tyr Pro Ile Thr Leu Tyr Leu Glu Lys Glu Arg Glu Lys Glu
 210 215 220
 Ile Ser Asp Asp Glu Ala Glu Glu Glu Lys Gly Glu Lys Glu Glu Glu
 225 230 235 240
 Asp Lys Asp Asp Glu Glu Lys Pro Lys Ile Glu Asp Val Gly Ser Asp
 245 250 255
 Glu Glu Asp Asp Ser Gly Lys Asp Lys Lys Lys Lys Thr Lys Lys Ile
 260 265 270
 Lys Glu Lys Tyr Ile Asp Gln Glu Glu Leu Asn Lys Thr Lys Pro Ile
 275 280 285
 Trp Thr Arg Asn Pro Asp Asp Ile Thr Gln Glu Glu Tyr Gly Glu Phe
 290 295 300
 Tyr Lys Ser Leu Thr Asn Asp Trp Glu Asp His Leu Ala Val Lys His
 305 310 315 320
 Phe Ser Val Glu Gly Gln Leu Glu Phe Arg Ala Leu Leu Phe Ile Pro
 325 330 335
 Arg Arg Ala Pro Phe Asp Leu Phe Glu Asn Lys Lys Lys Lys Asn Asn
 340 345 350
 Ile Lys Leu Tyr Val Arg Arg Val Phe Ile Met Asp Ser Cys Asp Glu
 355 360 365
 Leu Ile Pro Glu Tyr Leu Asn Phe Ile Arg Gly Val Val Asp Ser Glu
 370 375 380
 Asp Leu Pro Leu Asn Ile Ser Arg Glu Met Leu Gln Gln Ser Lys Ile
 385 390 395 400
 Leu Lys Val Ile Arg Lys Asn Ile Val Lys Lys Cys Leu Glu Leu Phe
 405 410 415
 Ser Glu Leu Ala Glu Asp Lys Glu Asn Tyr Lys Lys Phe Tyr Glu Ala
 420 425 430
 Phe Ser Lys Asn Leu Lys Leu Gly Ile His Glu Asp Ser Thr Asn Arg
 435 440 445
 Arg Arg Leu Ser Glu Leu Leu Arg Tyr His Thr Ser Gln Ser Gly Asp
 450 455 460
 Glu Met Thr Ser Leu Ser Glu Tyr Val Ser Arg Met Lys Glu Thr Gln
 465 470 475 480
 Lys Ser Ile Tyr Tyr Ile Thr Gly Glu Ser Lys Glu Gln Val Ala Asn
 485 490 495
 Ser Ala Phe Val Glu Arg Val Arg Lys Arg Gly Phe Glu Val Val Tyr
 500 505 510
 Met Thr Glu Pro Ile Asp Glu Tyr Cys Val Gln Gln Leu Lys Glu Phe
 515 520 525
 Asp Gly Lys Ser Leu Val Ser Val Thr Lys Glu Gly Leu Glu Leu Pro
 530 535 540

Glu Asp Glu Glu Glu Lys Lys Lys Met Glu Glu Ser Lys Ala Lys Phe
 545 550 555 560
 Glu Asn Leu Cys Lys Leu Met Lys Glu Ile Leu Asp Lys Lys Val Glu
 565 570 575
 Lys Val Thr Ile Ser Asn Arg Leu Val Ser Ser Pro Cys Cys Ile Val
 580 585 590
 Thr Ser Thr Tyr Gly Trp Thr Ala Asn Met Glu Arg Ile Met Lys Ala
 595 600 605
 Gln Ala Leu Arg Asp Asn Ser Thr Met Gly Tyr Met Met Ala Lys Lys
 610 615 620
 His Leu Glu Ile Asn Pro Asp His Pro Ile Val Glu Thr Leu Arg Gln
 625 630 635 640
 Lys Ala Glu Ala Asp Lys Asn Asp Lys Ala Val Lys Asp Leu Val Val
 645 650 655
 Leu Leu Phe Glu Thr Ala Leu Leu Ser Ser Gly Phe Ser Leu Glu Asp
 660 665 670
 Pro Gln Thr His Ser Asn Arg Ile Tyr Arg Met Ile Lys Leu Gly Leu
 675 680 685
 Gly Ile Asp Glu Asp Glu Val Ala Ala Glu Glu Pro Asn Ala Ala Val
 690 695 700
 Pro Asp Glu Ile Pro Pro Leu Glu Gly Asp Glu Asp Ala Ser Arg Met
 705 710 715 720
 Glu Glu Val Asp

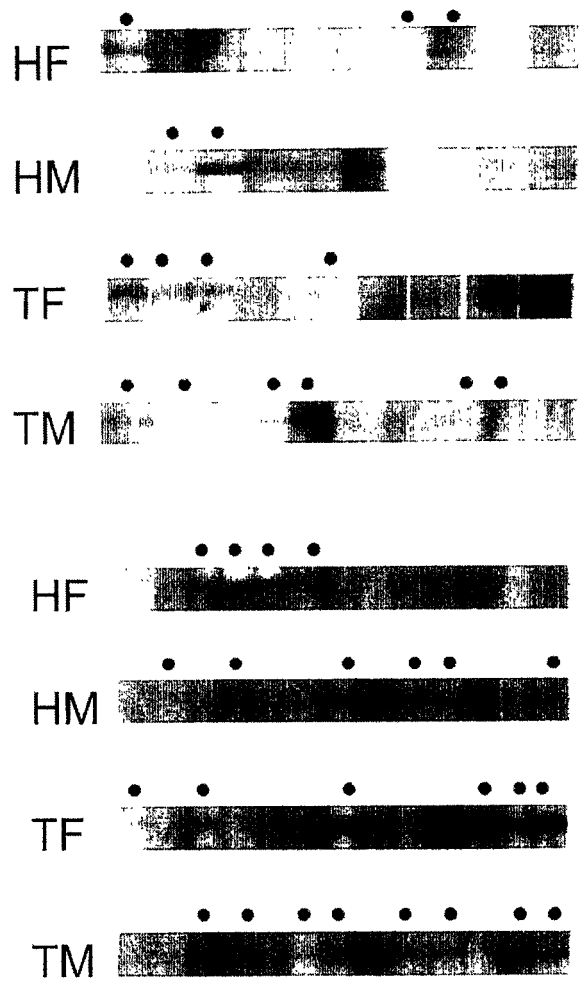


图 1

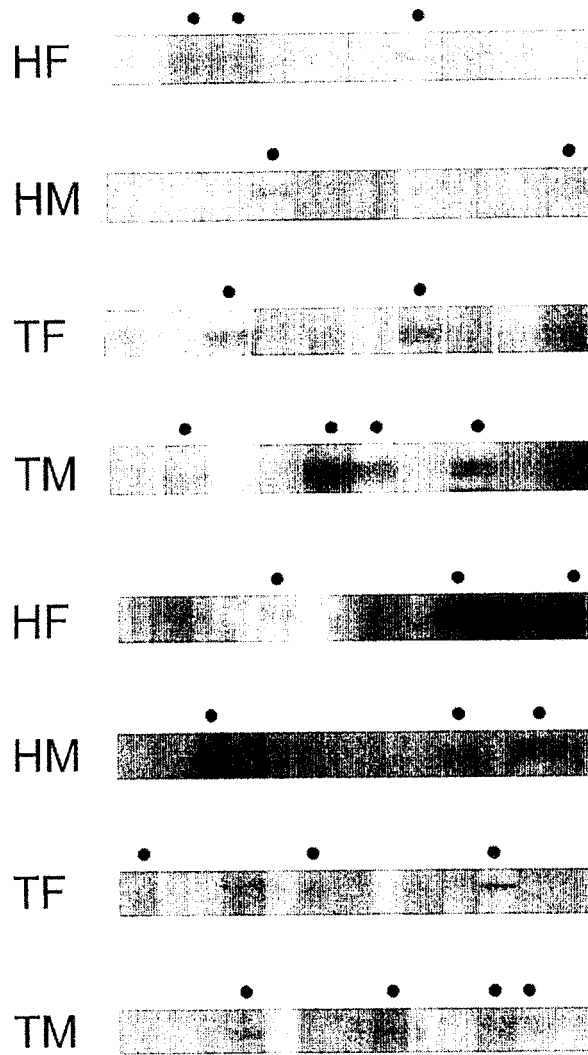


图 2

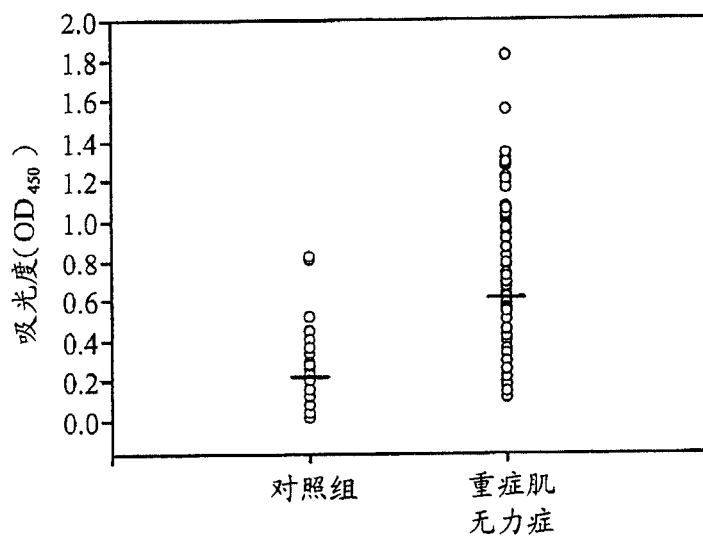


图 3

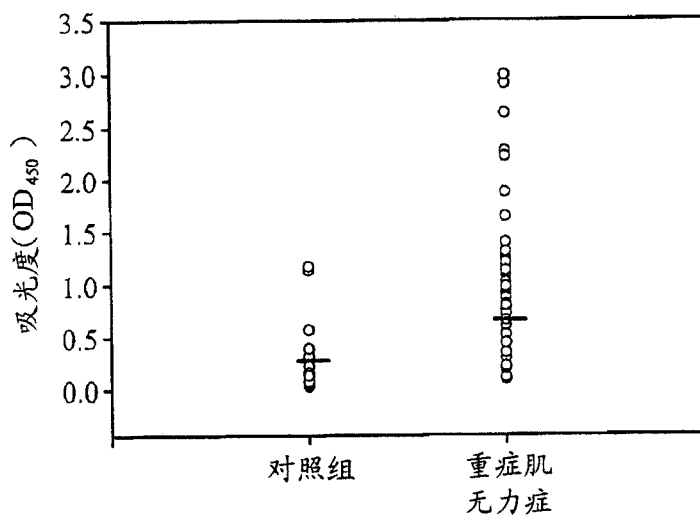


图 4

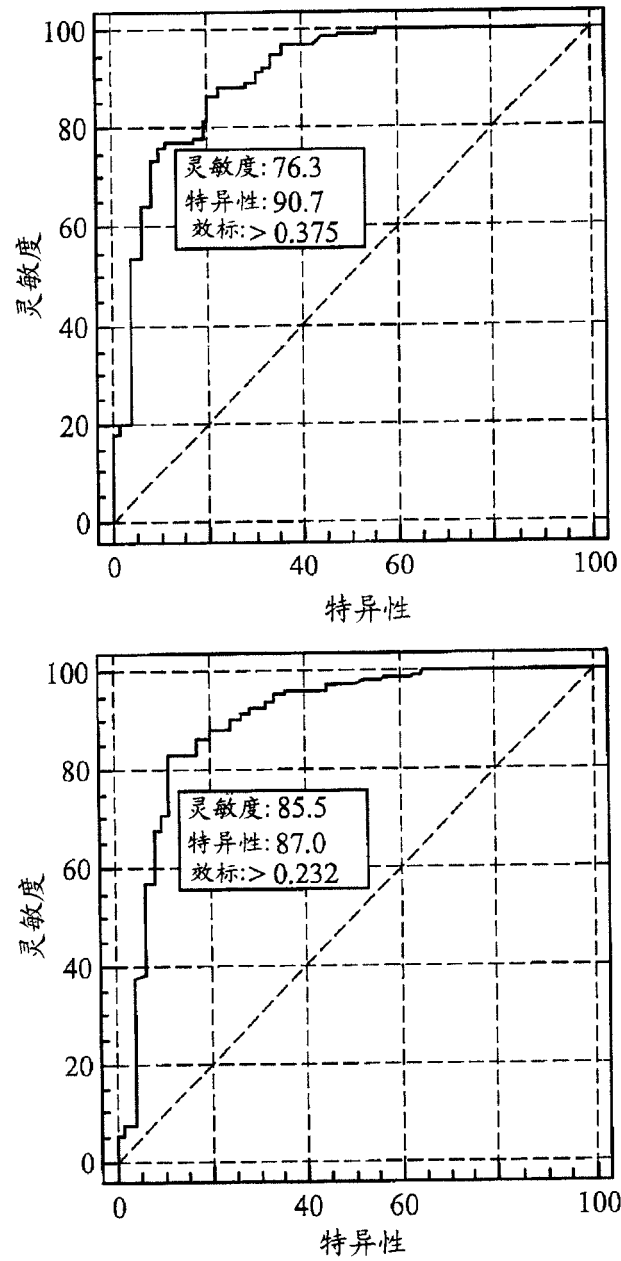


图 5

专利名称(译)	诊断重症肌无力症的方法及其所用的试剂盒		
公开(公告)号	CN1991366A	公开(公告)日	2007-07-04
申请号	CN200610149261.5	申请日	2006-11-21
[标]申请(专利权)人(译)	财团法人工业技术研究院 财团法人国家卫生研究院		
申请(专利权)人(译)	财团法人工业技术研究院 财团法人卫生研究院 财团法人新光吴火狮纪念医院		
当前申请(专利权)人(译)	财团法人工业技术研究院 财团法人卫生研究院 财团法人新光吴火狮纪念医院		
[标]发明人	曾镛翎 郑平福 廖珮秀 邱浩彰 蔡世峰		
发明人	曾镛翎 郑平福 廖珮秀 邱浩彰 蔡世峰		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N2800/28 G01N2800/2835 G01N33/564 G01N33/6854 G01N2800/10		
代理人(译)	张文辉 闵丹		
优先权	11/321516 2005-12-29 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种检测受试者中重症肌无力症的方法，该方法是通过测量可与选自热休克蛋白60、热休克蛋白90α型、和热休克蛋白90β型的一或多种自身抗原特异性结合的至少一种自身抗体的量。本发明也提供鉴定患有重症肌无力症的受试者的诊断试剂盒。

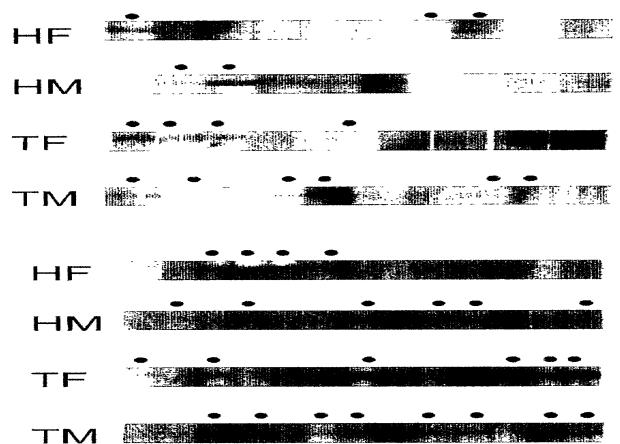


图 1