



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102138072 B

(45) 授权公告日 2015.07.22

(21) 申请号 200980134163.6  
 (22) 申请日 2009.07.31  
 (30) 优先权数据  
 2008-223789 2008.09.01 JP  
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日  
 2011.03.01  
 (86) PCT国际申请的申请数据  
 PCT/JP2009/063633 2009.07.31  
 (87) PCT国际申请的公布数据  
 W02010/024089 JA 2010.03.04  
 (73) 专利权人 学校法人庆应义塾  
 地址 日本东京  
 (72) 发明人 桑名正隆 佐藤慎二 藤田尚志  
 (74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理  
 有限责任公司 11204  
 代理人 王达佐 洪欣  
 (51) Int. Cl.  
 G01N 33/53(2006.01)  
 (56) 对比文件  
 US 6160107 A, 2000.12.12,  
 Shinji Sato et al..RNA helicase encoded  
 by melanoma differentiation associated

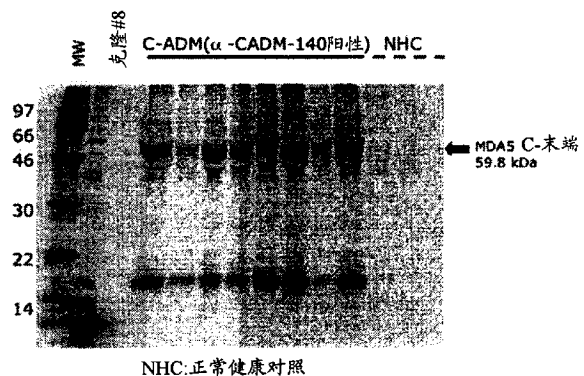
gene 5 is a major autoantigen in patients with clinically amyopathic dermatomyositis Association with rapidly progressive interstitial lung disease. 《Arthritis & Rheumatism》.2009, 第60卷(第7期),  
 Shinji Sato et al..Autoantibodies to a 140-kd polypeptide, CADM-140, in Japanese patients with clinically amyopathic dermatomyositis. 《Arthritis & Rheumatism》.2005, 第52卷(第5期),

审查员 王子晔

权利要求书1页 说明书7页  
序列表10页 附图3页

(54) 发明名称  
 皮肤炎的诊断方法和诊断试剂盒

(57) 摘要  
 本发明的目的是鉴定与抗 CADM-140 抗体相应的抗原,生产重组蛋白,并建立通过 ELISA 等的测定系统。本发明提供了诊断皮肤炎的试剂盒,该试剂盒包含由抗 CADM-140 抗体识别的 SEQ ID NO :4 所示的 MDA5 蛋白或其片段。



CN 102138072 B

1. SEQ ID NO:4 所示的 MDA5 蛋白或 SEQ ID NO:2 所示的 MDA5 蛋白 C-末端片段在制备用于诊断皮炎的试剂盒中的用途。

2. 如权利要求 1 所述的用途,其中所述皮炎为与发生急进性间质性肺疾病的高风险有关的临床无肌病性皮炎(C-ADM)。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的用途,其中所述试剂盒用于通过酶联免疫吸附测定(ELISA) 的测量。

4. 如权利要求 1 或 2 所述的用途,其中所述试剂盒包含:

(i) 抗原,所述抗原由 SEQ ID NO:4 所示的 MDA5 蛋白或 SEQ ID NO:2 所示的 MDA5 蛋白 C-末端片段组成;

(ii) 介质,所述介质适用于个体的样品与所述抗原(i) 之间的反应;

(iii) 试剂,所述试剂用于检测所述抗原(i) 与抗 CADM-140 抗体的复合物;以及任选地

(iv) 参照样品,所述参照样品不含抗 CADM-140 抗体。

5. 如权利要求 1 或 2 所述的用途,其中所述试剂盒用于诊断临床无肌病性皮炎(C-ADM) 的方法中,所述方法包括使个体的样品与 SEQ ID NO:4 所示的 MDA5 蛋白或 SEQ ID NO:2 所示的 MDA5 蛋白 C-末端片段反应;以及当在所述样品中检测到抗 CADM-140 抗体时诊断所述个体患有临床无肌病性皮炎(C-ADM)。

6. 如权利要求 5 所述的用途,其中所述样品为血液、血清或血浆样品。

7. 如权利要求 5 所述的用途,其中所述样品中的抗 CADM-140 抗体通过 ELISA 来检测。

## 皮肌炎的诊断方法和诊断试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明涉及诊断皮肌炎的方法和试剂盒,以及用于诊断皮肌炎的抗原蛋白的用途。

### 背景技术

[0002] 胶原病使其被视为自身免疫性疾病的基本特征是产生抗多种细胞组分的自身抗体。已知对应这些自身抗体的许多抗原是生命过程中必不可少的酶和调节因子。预期研究自身抗体及其对应抗原(自身抗原)的分子结构以及它们的生物学功能有助于阐明结缔组织病的病理。

[0003] 多发性肌炎/皮肌炎(PM/DM)为炎性肌病,其中主要是骨骼肌炎症所引起的近端肌无力和肌肉疼痛。特别是当观察到典型皮肤症状如向阳性皮疹和 Gottron 氏丘疹时,患者被诊断为 DM。多发性肌炎/皮肌炎是一种自身免疫性疾病,并且已知产生了多种自身抗体。已经报道了在 PM/DM 患者血清中存在抗体;这些抗体包括在肌炎患者中特别检测到的抗氨酰 tRNA 合成酶抗体(抗 ARS 抗体)、抗 SRP 抗体、抗 Mi-2 抗体和类似抗体以及抗 U1RNP 抗体、抗 SS-A 抗体和与肌炎相关的类似自身抗体。已知的是,对于相同肌炎特异性自身抗体为阳性的患者表现出相似的临床特征;这对于诊断、疾病类型分类、适当治疗方法的选择和预后评估在临床上是有用的。

[0004] 相比之下,自身抗体阴性被认为是 PM/DM 亚型临床无肌病性 DM(C-ADM) 的特征之一。C-ADM 特异性自身抗体的存在是未知的。已知 C-ADM 抵抗临床治疗,并且与不良预后的急性间质性肺疾病(RP-ILD)有关。为了挽救患有 RP-ILD 的 C-ADM 患者的生命,已报道和推荐联合利用高剂量类固醇疗法和免疫抑制药物给药的早期有效治疗的功效。因为这个原因,具有相关 RP-ILD 的 C-ADM 的早期诊断在临床上是很重要的,并且期望建立用于早期诊断的新指标。

[0005] 根据以上背景,本发明人根据免疫沉淀(IPP)法研究了正常健康对照、患有包括 C-ADM 在内的结缔组织病的患者以及患有特发性肺纤维化的患者的血清。本发明人发现 C-ADM 患者的血清中存在能够识别一种 140-kDa 蛋白的新自身抗体,并且将该新自身抗体命名为“抗 CADM-140 抗体”(非专利文献 1(NPL 1))。

[0006] 抗 CADM-140 抗体在患除 C-ADM 以外的结缔组织病患者、特发性肺纤维化患者和正常健康对照中的任一组均未检测到。临床上观察到抗 CADM-140 抗体阳性患者中 RP-ILD 显著地频繁发生,这表明抗 CADM-140 抗体与 RP-ILD 之间存在关联(非专利文件 2)。

[0007] 该现象被认为对于预后特别不良的具有相关 RP-ILD 的 C-ADM 的早期诊断和治疗选择是有用的,并因此希望改善其预后。

[0008] MDA5 具有 SNP([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp\\_ref.cgi?locusId=64135](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?locusId=64135))。其氨基酸序列和碱基序列的 NCBI 登录号为 NM\_022168。专利文献 1(PTL 1)公开了 MDA5 和癌症之间的关系。

[0009] 本发明人发表了非专利文献 3(NPL 3),其公开了本发明所涉及的技术。

[0010] 引文目录

[0011] 专利文献

[0012] PTL 1:日本未经审查的专利文件 2003-531581 号

[0013] 非专利文献

[0014] NPL 1:Arthritis Rheum. 46(9):S398,2003

[0015] NPL 2:Arthritis Rheum. 52(5):1571-1576,2005

[0016] NPL 3:Arthritis Rheum. 60(7):2193-2200,2009

[0017] 发明概述

[0018] 技术问题

[0019] 根据 IPP 方法,利用 S<sup>35</sup>标记的白血病来源的 K562 细胞提取物或 HeLa 细胞对抗 CADM-140 抗体进行了一般测量。虽然这是具有高灵敏度和高特异性的可靠测量方法,但是该方法使用同位素并需要复杂的程序。因此,该测量方法仅在数量有限的实验室中使用。

[0020] 为了将抗 CADM-140 抗体的测量应用到实际临床诊断中,亟需建立能够容易地测量大量样品的测量系统。鉴定与抗 CADM-140 抗体相应的抗原、制备重组蛋白及建立通过 ELISA 的测量系统等对于建立该系统是重要的。

[0021] 问题的解决方案

[0022] 本发明人利用 HeLa 细胞 cDNA 文库克隆与抗 CADM-140 抗体相应的抗原基因,并且研究了该相应抗原蛋白的分子序列。结果,本发明人发现 MDA5(黑色素瘤分化相关基因 5)为与抗 CADM-140 抗体相应的抗原,并在这一发现的基础上完成本发明。

[0023] 本发明提供了用于皮肤科诊断的试剂盒和方法,如下逐项所述。

[0024] 项 1. 用于诊断皮肤科炎的试剂盒,其包含由抗 CADM-140 抗体识别的 SEQ ID NO:4 所示的 MDA5 蛋白或其片段。

[0025] 项 2. 根据项 1 的用于诊断皮肤科炎的试剂盒,其包含由抗 CADM-140 抗体识别的 SEQ ID NO:2 所示的 MDA5 蛋白 C-末端片段或其片段。

[0026] 项 3. 根据项 1 的试剂盒,其中所述皮肤科炎为与发生急进性间质性肺疾病的高风险有关的临床无肌病性皮肤科炎(C-ADM)。

[0027] 项 4. 根据项 1 的试剂盒,其用于通过酶联免疫吸附测定(ELISA)的测量。

[0028] 项 5. 根据项 1 的试剂盒,其包含:

[0029] (i) 抗原,其包含 MDA5 蛋白或其免疫原性肽;

[0030] (ii) 介质,其适用于个体的样品与所述抗原(i)之间的反应;

[0031] (iii) 试剂,其用于检测所述抗原(i)与抗 CADM-140 抗体的复合物;以及任选的

[0032] (iv) 参照样品,其不含抗 CADM-140 抗体。

[0033] 项 6. 用于诊断皮肤科炎的方法,其包括使个体的样品与由抗 CADM-140 抗体识别的 MDA5 蛋白或其片段反应;以及当在所述样品中检测到抗 CADM-140 抗体时诊断该个体患有皮肤科炎。

[0034] 项 7. 根据项 5 的方法,其中所述样品为血液、血清或血浆样品。

[0035] 项 8. 根据项 6 的方法,其中所述样品中的抗 CADM-140 抗体通过 ELISA 来检测。

[0036] 项 9. 根据项 6 的方法,其包括以下步骤:

[0037] (i) 将特定量的本发明的肽组合物沉积在微量滴定板的多个孔上;

- [0038] (ii) 将疑似患有皮炎的个体的样品稀释,并将稀释后的样品添加至所述孔;
- [0039] (iii) 孵育后洗涤所述微量滴定板;
- [0040] (iv) 将标记的抗人免疫球蛋白抗体引入所述微量滴定板的孔;并且
- [0041] (v) 通过与对照比较来检测与抗体结合的标记的量。

[0042] 项 10. 由抗 CADM-140 抗体识别的 MDA5 蛋白或其片段用于诊断皮炎的用途。

[0043] 发明的有益效果

[0044] 根据本发明可以高准确性地检测预后特别不良的临床无肌病性皮炎,其与发生预后特别不良的急性间质性肺疾病的高风险有关。

[0045] 本发明能够快速测量许多样品中的抗 CADM-140 抗体。这对于具有相关 RP-ILD 的 C-ADM 的早期诊断和治疗选择是有益的,并且期望改善该疾病的预后,该疾病的治疗方法尚未建立并且被认为是预后特别不良的疾病。此外,抗 CADM-140 抗体阳性样品的累积使得能够分析外源性抗原,诸如为特异性自身抗体靶标的病毒,并且有助于阐明具有相关 RP-ILD 的 C-ADM 的发病机理。

[0046] 附图简述

[0047] 图 1 示出了根据免疫沉淀法研究作为抗原的克隆 #8(MDA5) 蛋白与 C-ADM 患者血清之间反应的结果,该研究在纯化克隆 #8(MDA5) 蛋白并利用体外转录/翻译系统证实该蛋白表达后进行。克隆 #8(MDA5) 与所有抗 CADM-140 抗体阳性血清样品反应,但它不与正常健康对照血清反应。

[0048] 图 2 示出了根据免疫沉淀法研究作为抗原的克隆 #8(MDA5) 重组蛋白与抗 CADM-140 抗体阳性 C-ADM 患者、患有其他结缔组织病的患者以及正常健康对照的血清之间反应的结果,该研究在纯化克隆 #8(MDA5) 蛋白并利用体外转录/翻译系统证实该蛋白表达后进行。该重组蛋白不与正常健康对照的血清或除抗 CADM-140 抗体阳性的 C-ADM 患者以外患者的血清反应。

[0049] 图 3 示出了 IPP-IB 的结果。当抗 CADM-140 抗体与表达 MDA5 的非洲绿猴肾细胞来源的 COS7 细胞提取物反应时,产生的 140-kDa 免疫沉淀物与山羊抗 MDA5 抗体反应。

[0050] 图 4 示出了抗 CADM-140 抗体阳性患者和正常健康对照的血清的免疫印迹结果,该结果是通过利用重组 RIG-I、重组 MDA5 和重组 LGP-2 作为抗原得到的。抗 CADM-140 抗体阳性患者的血清仅与重组 MDA5 反应,而正常健康对照 (NHC) 的血清完全不反应。

[0051] 图 5 示出了抗 CADM-140 抗体阳性的 C-ADM 患者、抗 CADM-140 抗体阴性的 C-ADM 患者、PM/DM 患者、硬皮病 (SSc) 患者、系统性红斑性狼疮 (SLE) 患者、ILD 患者和正常健康对照的血清 ELISA 结果,该结果是通过利用 MDA5 作为抗原底物得到的。截断值通过水平线来显示。该 ELISA 系统的分析灵敏度和分析特异性分别为 85% 和 100%。

[0052] 实施方案描述

[0053] 本发明的特征是由抗 CADM-140 抗体特异性识别的抗原 (MDA5),这被本发明人发现。MDA5 是 RIG-I 家族蛋白的一种类型。RIG-I 家族蛋白参与包括生成 I 型干扰素的特异性免疫应答。RIG-I 家族蛋白高度同源并含有 DexD/H 盒解旋酶结构域。除 MDA5 之外,已知 RIG-I 和 LGP-2 也为 RIG-I 家族蛋白。这些蛋白的序列和结构非常相似,并因此可能交叉反应。因此还研究了抗 CADM-140 抗体与 RIG-I 家族蛋白之间的反应性。抗 CADM-140 抗体与 MDA5 的结合依赖于抗原的构象,并且抗 CADM-140 抗体优先地与天然结构部分修饰的

MDA5 反应。这些因素使得难以确定抗 CADM-140 抗体是 MDA5 的抗体。

[0054] 为了鉴定抗 CADM-140 抗体,本发明人纯化了与其相应的抗原蛋白并试图通过质谱分析法来鉴定抗原蛋白。然而,不可能纯化足量的抗原蛋白,并且鉴定是困难的。这被认为是由于血清中抗原量少或由于抗原-抗体反应的亲和力。

[0055] 此外,在 C-ADM 早期,难以区分该疾病与其他类型皮炎,因为 C-ADM 难以诊断并且需要继续小心地确定是否存在肌肉症状。

[0056] 然而,本发明人鉴定了抗 CADM-140 抗体特异性识别的 MDA5。结果,很显然皮炎(C-ADM)的 ELISA 测定的临床灵敏度和临床特异性分别为 69%和 99.6%。虽然抗 CADM-140 抗体阳性的 C-ADM 患者以前难以诊断或诊断通常花很多时间,但是本发明使其能够快速诊断。

[0057] 在本说明书中,“皮炎”包括被称为 DM 以及 DM 的亚型-临床无肌病性皮炎(C-ADM),但不包括多发性肌炎 PM。因此,本发明提供了用于诊断个体是否患有 DM 或 C-ADM 或其他疾病的试剂盒和方法。DM 为炎性肌病,其中主要为特征性皮肤症状如向阳性皮疹和 Gottron 氏丘疹、以及由骨骼肌炎症引起的近端肌无力和/或肌肉疼痛。DM 通常是根据 Bohan & Peter 的诊断标准(Bohan A, Peter JB. Polymyositis and dermatomyositis. N Engl J Med 1975;292:344)来诊断的。然而,C-ADM 不满足 Bohan & Peter 的标准,并且是不可诊断的,所述 C-ADM 指其中表现出 DM 的皮肤损害特征但未表现出肌无力的情况。在 2002 年, Sontheimer 提出新分类标准,其中将无肌无力的典型皮肤损害的情况称为“C-ADM”(临床无肌病性皮炎),并且将“C-ADM”归类为 DM 的亚型 [Sontheimer RD: Would a new name hasten the acceptance of amyopathic dermatomyositis (dermatomyositis sine myositis) as a distinctive subset within the idiopathic inflammatory dermatomyopathies spectrum of clinical illness? J Am Acad Dermatol 2002; 46:626-36]。根据本发明诊断的靶标 DM 包括满足 Bohan & Peter 诊断标准的或满足 Sontheimer 分类标准的那些。

[0058] 本发明的诊断试剂盒和诊断方法利用由抗 CADM-140 抗体识别的 MDA5 蛋白或其片段来检测抗 CADM-140 抗体(以下“由抗 CADM-140 抗体识别的片段”有时简称为“免疫原性肽”)。因为 SEQ ID NO:4 所示的 MDA5 蛋白的 C-末端 523 氨基酸序列片段 (SEQ ID NO:2) 与抗 CADM-140 抗体结合,所以抗 CADM-140 抗体识别的表位存在于 MDA5 蛋白的 C-末端区域。只要维持该表位,MDA5 蛋白或其免疫原性肽可以为在其非表位区域中具有一个或多个氨基酸缺失、替代、添加或插入的修饰的 MDA5 蛋白或其免疫原性肽。该表位通常由约 5 至约 10 个氨基酸组成,并且特别是约 5 至约 8 个氨基酸。例如,MDA5 的表位可以通过以下方法来确定:合成特定数量的肽(例如一次 10 个肽),同时从 SEQ ID NO:2 所示的 MDA5 C-末端片段的 N-末端位移固定数量的氨基酸(例如 5 个氨基酸)(例如,制备由第一个至第十个氨基酸组成的肽,由第六个至第十五氨基酸组成的肽,由第十一至第二十个氨基酸组成的肽,由第十六个至第二十五个氨基酸组成的肽,...),然后研究各个肽片段与抗 CADM-140 抗体的反应性。当表位确定或表位的位置缩小后,由抗 CADM-140 抗体识别的 MDA5 蛋白(免疫原性肽)片段可以缩短。较短的免疫原性肽从易于生产的角度来看是优选的。由 40 个或更少氨基酸、30 个或更少氨基酸、或者 20 个或更少氨基酸、特别是约 5 至约 10 个氨基酸组成的肽是优选的。RNA 解旋酶是由 MDA5 编码的。

[0059] 已知MDA5有SNP。本发明所使用的MDA5蛋白或免疫原性肽可以具有任何类型的SNP。SEQ ID NO :3表示MDA5的碱基序列。SEQID NO :1表示编码SEQ ID NO :2所示的MDA5片段的C-末端片段的碱基序列。然而,具有与SNP相关的其他氨基酸序列/碱基序列的MDA5或MDA5的等位基因也包括在本说明书的“MDA5”范围内。

[0060] 可以将本发明的MDA5或免疫原性肽表达为重组蛋白,并通过基因工程来生产,或者可以通过化学合成来生产。特别地,当免疫原性肽具有短序列,其由优选的50个或更少氨基酸、更优选的30个或更少、甚至更优选的20个或更少以及尤其为5至10个氨基酸组成时,优选地利用化学合成(固相或液相合成)生产该肽。MDA5或其免疫原性肽可以单体形式使用,也可以通过诸如戊二醛的多官能团交联剂交联,或者能够通过利用其中免疫原性肽串联连接的编码肽的DNA的基因工程来生产。

[0061] 抗CADM-140抗体可以从任何样品中获得,所述样品例如个体的血液、血清、血浆、脑脊液和淋巴。血液、血清和血浆是优选的,并且作为样品的血清是特别优选的。

[0062] 本发明用于诊断皮炎的试剂盒包含MDA5蛋白或其免疫原性肽。该试剂盒可以包含用于检测MDA5蛋白或其免疫原性肽与抗CADM-140抗体的抗原-抗体复合物的物质。此类物质的实例包括用下述标记的抗人免疫球蛋白抗体,并且特别是用下述标记的抗人IgG抗体:诸如辣根过氧化物酶(HRP)的过氧化物酶,诸如 $\beta$ -半乳糖苷酶、碱性磷酸酶和荧光素酶的酶标记,诸如FITC(异硫氰酸荧光素)和RITC(异硫氰酸四甲基罗丹明)的荧光标记,或任何其他合适的标记。

[0063] 免疫测定优选地用于本发明的诊断试剂盒和诊断方法。免疫测定的实例包括酶免疫测定(EIA)、ELISA、荧光免疫测定(FIA)、化学发光免疫测定、免疫印迹(IB)、蛋白印迹、免疫染色以及类似方法。

[0064] 本发明使用的MDA5蛋白或免疫原性肽优选地结合于固相。此类固相的实例包括琼脂糖、微量滴定板的孔、乳胶颗粒等。ELISA法的具体实例包括竞争性免疫测定、夹心免疫测定等。

[0065] 根据本发明的诊断皮炎的方法,使获得自个体的样品与MDA5蛋白或其免疫原性肽接触以通过物理或化学方法来检测MDA5或其免疫原性肽与抗CADM-140抗体的抗原-抗体复合物存在或不存在。

[0066] 例如,本发明的诊断皮炎的方法包括以下步骤:

[0067] (i) 将特定量的本发明的肽组合物沉积在微量滴定板的多个孔上;

[0068] (ii) 将疑似患有皮炎的个体的血液样品(血清或血浆)稀释,然后将稀释的样品添加至所述孔;

[0069] (iii) 孵育后洗涤微量滴定板;

[0070] (iv) 将用酶标记、荧光标记等标记的人免疫球蛋白(例如IgG)添加至所述微量滴定板的孔;然后

[0071] (v) 与对照比较,检测与人免疫球蛋白结合的标记的量(在人免疫球蛋白用酶标记标记的情况下,与酶作用的底物的量)。

[0072] 在优选的实施方案中,本发明的诊断试剂盒可以含有:

[0073] (i) 抗原,其包含MDA5蛋白或其免疫原性肽(抗原可以附着在微量滴定板等的孔中,并且还可以用封闭剂来封闭,所述封闭剂如脱脂乳,或者诸如牛血清白蛋白(BSA)或I

的白蛋白)。

[0074] (ii) 介质,其适合用于个体样品与抗原(i)之间的反应(例如,诸如PBS的缓冲液);

[0075] (iii) 试剂,其用于检测抗原(i)与抗CADM-140抗体的复合物(例如,与抗CADM-140抗体结合的标记的抗人免疫球蛋白抗体);以及任选的

[0076] (iv) 参照样品,其不含抗CADM-140抗体。

[0077] “不含抗CADM-140抗体的参照样品”包括例如正常健康对照的血液、血清和血浆样品。

[0078] 当抗人免疫球蛋白抗体用过氧化物酶标记时,抗CADM-140抗体可以通过以下方法来检测,该方法包括加入诸如四甲基联苯胺的显色底物;用 $H_2SO_4$ 终止反应;以及用酶标仪测量吸光度(450nm:OD450)。

[0079] 通过用本发明的诊断试剂盒测试大量样品并将获得的结果与其他临床观测结果进行比较,能够建立基于测量的抗CADM-140抗体量的用于确定个体是否患有DM的更准确的标准。

## 实施例

[0080] 下文对本发明进行了更详细地描述。

[0081] 实施例1:C-ADM早期诊断方法

[0082] 通过使用表达利用HeLa细胞cDNA文库制备的 $\lambda$ ZAP噬菌体的大肠杆菌(XL1-Blue MRF)来在大肠杆菌中表达抗原蛋白。将表达的蛋白转移至硝酸纤维素膜,并与抗CADM-140抗体阳性血清反应以分离阳性克隆。然后,研究了获得的阳性克隆与抗CADM-140抗体阳性C-ADM患者的10个血清样品、抗CADM-140抗体阴性个体的14个血清样品(2个C-ADM样品,2个PM样品,系统性红斑性狼疮、硬皮病和间质性肺疾病各1个样品,以及7个正常健康对照样品)的反应性。在获得的9个克隆中,克隆#8以高频数与抗CADM-140抗体阳性血清样品反应,即10个抗CADM-140抗体阳性C-ADM血清样品中的9个。在蛋白纯化并且利用体外转录/翻译测定确认表达以后,通过免疫沉淀研究了C-ADM患者的血清与作为抗原的蛋白的反应性。克隆#8与所有抗CADM-140抗体阳性血清样品反应,但不与正常健康对照的血清反应(图1)。此外,克隆#8不与结缔组织病患者的血清反应,抗CADM-140抗体阳性C-ADM除外(图2)。此外,为了确定克隆#8的碱基序列,从获得克隆的噬菌体DNA切下质粒DNA。将质粒DNA纯化以确定碱基序列。最后,对所得碱基序列进行同源性检索,并且该序列与MDA5C-末端序列完全匹配。

[0083] 通过IPP-IB方法,将抗CADM-140抗体阳性血清与表达MDA5的非洲绿猴肾细胞来源的COS7细胞提取物反应。研究了140kDa的获得的免疫沉淀物与山羊抗MDA5抗体的反应性。当表达MDA5时,该免疫沉淀物与山羊抗MDA5抗体反应(图3)。此外,研究了抗CADM-140抗体阳性血清及正常健康对照血清与作为抗原的RIG-I家族RIG-I、MD5和LGP-2重组纯化蛋白之间的反应性。抗CADM-140抗体阳性患者的血清仅与重组MDA5反应,而正常健康对照的血清不与重组MDA5反应(图4)。由以上结果清楚看到,与抗CADM-140抗体相应的抗原为MDA5。

[0084] 此外,本发明人用纯化的重组MDA5作为抗原来包被96孔板以建立用于抗

CADM-140 抗体测定的 ELISA。研究了抗 CADM-140 抗体测定方法的诊断灵敏度和诊断特异性。

[0085] 更具体地,将重组 MDA5 以  $0.05 \mu\text{g}/\text{孔}$  的量固定在 96 孔 ELISA 板上,并且用 3% BSA 封闭。将血清样品(各作 250 倍稀释)以  $100 \mu\text{l}$  每孔的量分配到板上,并使其在室温下反应 2 小时。作为二抗,使用 5000 倍稀释的过氧化物酶偶联的山羊抗人 IgG。加入四甲基联苯胺 ( $1\text{mg}/\text{ml}$ ) 作为显色底物,并且用  $\text{H}_2\text{SO}_4$  终止反应。用酶标仪 ( $450\text{nm}:\text{OD}_{450}$ ) 测量吸光度。利用该测定系统,测量了包含 C-ADM 的胶原疾病患者的血清样品、间质性肺疾病 (ILD) 患者的血清样品和正常健康对照的血清样品。结果显示抗 CADM-140 抗体阳性 PM/DM 患者血清的反应性高于抗 CADM-140 抗体阴性 PM/DM 患者、硬皮病 (SSc) 患者、系统性红斑性狼疮 (SLE) 患者、ILD 患者及正常健康对照的血清 (图 5)。当将正常健康对照的平均值 + 高达标准偏差的 10 倍定义为正常截断范围时,该 ELISA 测定系统测量的分析灵敏度和分析特异性分别为 85% 和 100%。因此,这些结果清楚地表明该测定是具有优异的灵敏度和特异性的抗 CADM-140 抗体检测方法。

[0001]

## 序列表

<110> KEIO UNIVERSITY  
 <120> 皮肤炎的诊断产品  
 <130> P09-69  
 <150> JP 2008-223789  
 <151> 2008-9-1  
 <160> 4  
 <170> PatentIn version 3.4  
 <210> 1  
 <211> 1706  
 <212> DNA  
 <213> 人  
 <400> 1  
 gaagaacaca ttttaaaact atgtgccaat cttgatgcat ttactattaa aactgttaaa 60  
 gaaaaccttg atcaactgaa aaaccaaata caggagccat gcaagaagtt tgccattgca 120  
 gatgcaacca gagaagatcc atttaaagag aaacttctag aaataatgac aaggattcaa 180  
 acttattgtc aatgagtc aatgtcagat tttggaactc aaccctatga acaatgggcc 240  
 attcaaatgg aaaaaaagc tgcaaaagaa ggaaatcgca aagaacgtgt ttgtgcagaa 300  
 catttgagga agtacaatga ggcctacaa attaatgaca caattcgaat gatagatgcg 360  
 tatactcatc ttgaaacttt ctataatgaa gagaaagata agaagtttgc agtcatagaa 420  
 gatgatagtg atgagggtgg tgatgatgag tattgtgatg gtgatgaaga tgaggatgat 480  
 ttaaagaaac cttgaaact ggatgaaaca gatagatttc tcatgacttt atttttgaa 540  
 aacaataaaa tgttgaaaag gctggctgaa aaccagaat atgaaaatga aaagctgacc 600  
 aaattaagaa ataccataat ggagcaatat actaggactg aggaatcagc acgaggaata 660  
 atctttacaa aaacacgaca gaggatcatat gcgcttcc agtggattac tgaaaatgaa 720  
 aaatttgctg aagtaggagt caaagcccac catctgattg gagctggaca cagcagtgag 780  
 ttcaaacca tgacacagaa tgaacaaaa gaagtcatta gtaaatttcg cactggaaaa 840  
 ataaatctgc ttatcgctac cacagtggca gaagaaggtc tggatattaa agaatgtaac 900  
 attgttatcc gttatggtct cgtcaccaat gaaatagcca tgggccaggc ccgtggctga 960  
 gccagagctg atgagagcac ctacgtcctg gttgctcaca gtggttcagg agttatcgaa 1020  
 catgagacag ttaatgattt ccgagagaag atgatgtata aagctataca ttgtgttcaa 1080  
 aatatgaaac cagaggagta tgctcataag attttggaaat tacagatgca aagtataatg 1140  
 gaaaagaaaa tgaaaacca gagaaatatt gccaaagcatt acaagaataa cccatcacta 1200

[0002]

ataactttcc ttgcaaaaa ctgcagtggtg ctagcctggt ctggggaaga tatccatgta 1260  
 attgagaaaa tgcacacgt caatatgacc ccagaattca aggaacttta cattgtaaga 1320  
 gaaaacaaag cactgcaaaa gaagtgtgcc gactatcaaa taaatgggta aatcatctgc 1380  
 aaatgtggcc aggcttgggg aacaatgatg gtgcacaaag gcttagattt gccttgtctc 1440  
 aaaataagga atttttagt gttttcaaa aataattcaa caaagaaaca atacaaaaag 1500  
 tgggtagaat tacctatcac atttccaat cttgactatt cagaatgctg tttatttagt 1560  
 gatgaggatt agcacttgat tgaagattct tttaaatac tatcagttaa acatttaata 1620  
 tgattatgat taatgtattc attatgctac agaactgaca taagaatcaa taaaatgatt 1680  
 gttttactct gcaaaaaaaaa aaaaaa 1706

<210> 2  
 <211> 523  
 <212> PRT  
 <213> 人

<400> 2

Glu Glu His Ile Leu Lys Leu Cys Ala Asn Leu Asp Ala Phe Thr Ile  
 1 5 10 15

Lys Thr Val Lys Glu Asn Leu Asp Gln Leu Lys Asn Gln Ile Gln Glu  
 20 25 30

Pro Cys Lys Lys Phe Ala Ile Ala Asp Ala Thr Arg Glu Asp Pro Phe  
 35 40 45

Lys Glu Lys Leu Leu Glu Ile Met Thr Arg Ile Gln Thr Tyr Cys Gln  
 50 55 60

Met Ser Pro Met Ser Asp Phe Gly Thr Gln Pro Tyr Glu Gln Trp Ala  
 65 70 75 80

Ile Gln Met Glu Lys Lys Ala Ala Lys Glu Gly Asn Arg Lys Glu Arg  
 85 90 95

Val Cys Ala Glu His Leu Arg Lys Tyr Asn Glu Ala Leu Gln Ile Asn  
 100 105 110

Asp Thr Ile Arg Met Ile Asp Ala Tyr Thr His Leu Glu Thr Phe Tyr  
 115 120 125

Asn Glu Glu Lys Asp Lys Lys Phe Ala Val Ile Glu Asp Asp Ser Asp  
 130 135 140

[0003]

Glu Gly Gly Asp Asp Glu Tyr Cys Asp Gly Asp Glu Asp Glu Asp Asp  
 145 150 155 160  
 Leu Lys Lys Pro Leu Lys Leu Asp Glu Thr Asp Arg Phe Leu Met Thr  
 165 170 175  
 Leu Phe Phe Glu Asn Asn Lys Met Leu Lys Arg Leu Ala Glu Asn Pro  
 180 185 190  
 Glu Tyr Glu Asn Glu Lys Leu Thr Lys Leu Arg Asn Thr Ile Met Glu  
 195 200 205  
 Gln Tyr Thr Arg Thr Glu Glu Ser Ala Arg Gly Ile Ile Phe Thr Lys  
 210 215 220  
 Thr Arg Gln Ser Ala Tyr Ala Leu Ser Gln Trp Ile Thr Glu Asn Glu  
 225 230 235 240  
 Lys Phe Ala Glu Val Gly Val Lys Ala His His Leu Ile Gly Ala Gly  
 245 250 255  
 His Ser Ser Glu Phe Lys Pro Met Thr Gln Asn Glu Gln Lys Glu Val  
 260 265 270  
 Ile Ser Lys Phe Arg Thr Gly Lys Ile Asn Leu Leu Ile Ala Thr Thr  
 275 280 285  
 Val Ala Glu Glu Gly Leu Asp Ile Lys Glu Cys Asn Ile Val Ile Arg  
 290 295 300  
 Tyr Gly Leu Val Thr Asn Glu Ile Ala Met Val Gln Ala Arg Gly Arg  
 305 310 315 320  
 Ala Arg Ala Asp Glu Ser Thr Tyr Val Leu Val Ala His Ser Gly Ser  
 325 330 335  
 Gly Val Ile Glu His Glu Thr Val Asn Asp Phe Arg Glu Lys Met Met  
 340 345 350  
 Tyr Lys Ala Ile His Cys Val Gln Asn Met Lys Pro Glu Glu Tyr Ala  
 355 360 365  
 His Lys Ile Leu Glu Leu Gln Met Gln Ser Ile Met Glu Lys Lys Met  
 370 375 380  
 Lys Thr Lys Arg Asn Ile Ala Lys His Tyr Lys Asn Asn Pro Ser Leu  
 385 390 395 400

[0004]

Ile Thr Phe Leu Cys Lys Asn Cys Ser Val Leu Ala Cys Ser Gly Glu  
 405 410 415

Asp Ile His Val Ile Glu Lys Met His His Val Asn Met Thr Pro Glu  
 420 425 430

Phe Lys Glu Leu Tyr Ile Val Arg Glu Asn Lys Ala Leu Gln Lys Lys  
 435 440 445

Cys Ala Asp Tyr Gln Ile Asn Gly Glu Ile Ile Cys Lys Cys Gly Gln  
 450 455 460

Ala Trp Gly Thr Met Met Val His Lys Gly Leu Asp Leu Pro Cys Leu  
 465 470 475 480

Lys Ile Arg Asn Phe Val Val Val Phe Lys Asn Asn Ser Thr Lys Lys  
 485 490 495

Gln Tyr Lys Lys Trp Val Glu Leu Pro Ile Thr Phe Pro Asn Leu Asp  
 500 505 510

Tyr Ser Glu Cys Cys Leu Phe Ser Asp Glu Asp  
 515 520

<210> 3  
 <211> 3434  
 <212> DNA  
 <213> 人

<400> 3  
 gccccgctgc ccacctgccc gcctgcccac ctgcccaggt gcgagtgcag ccccgcgcgc 60  
 cggcctgaga gccctgtgga caacctcgtc attgtcagge acagagcggg agacctgct 120  
 tctctaagtg ggcagcggac agcggcacgc acatttcacc tgtcccgcag acaacagcac 180  
 catctgcttg ggagaaccct ctcccttctc tgagaaagaa agatgtcgaa tgggtattcc 240  
 acagacgaga atttccgcta tctcatctcg tgcttcaggg ccagggtgaa aatgtacatc 300  
 cagggtggagc ctgtgctgga ctacctgacc tttctgcctg cagaggtgaa ggagcagatt 360  
 cagaggacag tcgccacctc cggaacatg caggcagttg aactgctgct gagcaccttg 420  
 gagaagggag tctggcacct tggttggact cgggaattcg tggaggccct cgggagaacc 480  
 ggcagccctc tggccgcccg ctacatgaac cctgagctca cggacttgcc ctctccatcg 540  
 tttgagaacg ctcatgatga atatctccaa ctgctgaacc tccttcagcc cactctgggtg 600  
 gacaagcttc tagttagaga cgtcttggat aagtgcattg aggaggaact gttgacaatt 660

[0005]

gaagacagaa accggattgc tgctgcagaa aacaatggaa atgaatcagg tgtaagagag	720
ctactaaaaa ggattgtgca gaaagaaaac tggttctctg catttctgaa tgttcttctg	780
caaacaggaa acaatgaact tgtccaagag ttaacaggct ctgattgctc agaaagcaat	840
gcagagattg agaatttata acaagttgat ggtcctcaag tggagagca acttctttca	900
accacagttc agccaaatct ggagaaggag gtctggggca tggagaataa ctcatcagaa	960
tcatcttttg cagattcttc tgtagtttca gaatcagaca caagtttggc agaaggaagt	1020
gtcagctgct tagatgaaag tcttgacat aacagcaaca tgggcagtga ttcaggcacc	1080
atgggaagtg attcagatga agagaatgtg gcagcaagag catccccgga gccagaactc	1140
cagctcaggc cttaccaaat ggaagttgcc cagccagcct tggagggaa gaatatcatc	1200
atctgcctcc ctacaggag tggaaaacc agagtggctg tttacattgc caaggatcac	1260
ttagacaaga agaaaaagc atctgagcct ggaaaagtta tagttcttgt caataaggta	1320
ctgctagttg aacagctctt ccgcaaggag ttccaacat ttttgaagaa atggtatcgt	1380
gttattggat taagtggatg tacccaactg aaaatatcat ttccagaagt tgcaagtcc	1440
tgtgatatta ttatcagtac agctcaaate cttgaaaact ccctcttaa cttggaaaat	1500
ggagaagatg ctggtgttca attgtcagac ttttcctca ttatcattga tgaatgtcat	1560
cacaccaaca aagaagcagt gtataataac atcatgagge attatttgat gcagaagttg	1620
aaaaacaata gactcaagaa agaaaacaaa ccagtgatc cccttctca gatactggga	1680
ctaacagctt cacctgggtg tggaggggcc acgaagcaag ccaaagctga agaacacatt	1740
ttaaaactat gtgccaatct tgatgcattt actattaaaa ctgttaaaga aaaccttgat	1800
caactgaaaa accaaataca ggagccatgc aagaagttg ccattgcaga tgcaaccaga	1860
gaagatccat ttaaagagaa acttctagaa ataatgacaa ggattcaaac ttattgtcaa	1920
atgagtccaa tgtcagattt tggaactcaa ccctatgaac aatgggcat tcaaatggaa	1980
aaaaaagctg caaaagaagg aatcgcacaa gaacgtgtt gtgcagaaca tttgaggaag	2040
tacaatgagg ccctacaaat taatgacaca attcgaatga tagatgcgta tactcatctt	2100
gaaactttct ataatagaaga gaaagataag aagtttgcag tcatagaaga tgatagtgat	2160
gagggtggtg atgatgagta ttgtgatggt gatgaagatg aggatgattt aaagaaacct	2220
ttgaaactgg atgaaacaga tagatttctc atgactttat tttttgaaaa caataaaatg	2280
ttgaaaagge tggtgaaaa ccagaatat gaaaatgaaa agctgaccaa attaagaaat	2340
accataatgg agcaatatac taggactgag gaatcagcac gaggaataat cttacaaaa	2400
acacgacaga gtgcatatgc gctttccag tggattactg aaaatgaaaa atttgctgaa	2460
gtaggagtca aagcccacca tctgattgga gctggacaca gcagtgagtt caaacccatg	2520

[0006]

```

acacagaatg acaaaaaaga agtcattagt aaatttcgca ctggaaaaat aaatctgctt 2580
atcgctacca cagtggcaga agaaggtctg gatattaaag aatgtaacat tgttatccgt 2640
tatggctctg tcaccaatga aatagccatg gtccaggccc gtggctgagc cagagctgat 2700
gagagcacct acgtcctggt tgctcacagt ggttcaggag ttatcgaaca tgagacagtt 2760
aatgatttcc gagagaagat gatgtataaa gctatacatt gtgttcaaaa tatgaaacca 2820
gaggagtatg ctcataagat tttggaatta cagatgcaaa gtataatgga aaagaaaatg 2880
aaaaccaaga gaaatattgc caagcattac aagaataacc catcactaat aactttcctt 2940
tgcaaaaact gcagtgtgct agcctgttct ggggaagata tccatgtaat tgagaaaatg 3000
catcacgtca atatgacccc agaattcaag gaactttaca ttgtaagaga aaacaaagca 3060
ctgcaaaaaga agtgtgccga ctatcaaata aatggtgaaa tcatctgcaa atgtggccag 3120
gcttggggaa caatgatggt gcacaaagc ttagatttgc cttgtctcaa aataaggaat 3180
tttglagtgg ttttcaaaaa taattcaaca aagaacaat acaaaaagtg ggtagaatta 3240
cctatcacat ttccaatct tgactattca gaatgctgtt tatttagtga tgaggattag 3300
cacttgattg aagattcttt taaaatacta tcagttaaac atttaatatg attatgatta 3360
atgtattcat tatgctacag aactgacata agaatcaata aatgattgt tttactctgc 3420
aaaaaaaaaa aaaa 3434

```

```

<210> 4
<211> 1025
<212> PRT
<213> 人

```

<400> 4

Met Ser Asn Gly Tyr Ser Thr Asp Glu Asn Phe Arg Tyr Leu Ile Ser  
1 5 10 15

Cys Phe Arg Ala Arg Val Lys Met Tyr Ile Gln Val Glu Pro Val Leu  
20 25 30

Asp Tyr Leu Thr Phe Leu Pro Ala Glu Val Lys Glu Gln Ile Gln Arg  
35 40 45

Thr Val Ala Thr Ser Gly Asn Met Gln Ala Val Glu Leu Leu Leu Ser  
50 55 60

Thr Leu Glu Lys Gly Val Trp His Leu Gly Trp Thr Arg Glu Phe Val  
65 70 75 80

Glu Ala Leu Arg Arg Thr Gly Ser Pro Leu Ala Ala Arg Tyr Met Asn  
85 90 95

[0007]

Pro Glu Leu Thr Asp Leu Pro Ser Pro Ser Phe Glu Asn Ala His Asp  
 100 105 110

Glu Tyr Leu Gln Leu Leu Asn Leu Leu Gln Pro Thr Leu Val Asp Lys  
 115 120 125

Leu Leu Val Arg Asp Val Leu Asp Lys Cys Met Glu Glu Glu Leu Leu  
 130 135 140

Thr Ile Glu Asp Arg Asn Arg Ile Ala Ala Ala Glu Asn Asn Gly Asn  
 145 150 155 160

Glu Ser Gly Val Arg Glu Leu Leu Lys Arg Ile Val Gln Lys Glu Asn  
 165 170 175

Trp Phe Ser Ala Phe Leu Asn Val Leu Arg Gln Thr Gly Asn Asn Glu  
 180 185 190

Leu Val Gln Glu Leu Thr Gly Ser Asp Cys Ser Glu Ser Asn Ala Glu  
 195 200 205

Ile Glu Asn Leu Ser Gln Val Asp Gly Pro Gln Val Glu Glu Gln Leu  
 210 215 220

Leu Ser Thr Thr Val Gln Pro Asn Leu Glu Lys Glu Val Trp Gly Met  
 225 230 235 240

Glu Asn Asn Ser Ser Glu Ser Ser Phe Ala Asp Ser Ser Val Val Ser  
 245 250 255

Glu Ser Asp Thr Ser Leu Ala Glu Gly Ser Val Ser Cys Leu Asp Glu  
 260 265 270

Ser Leu Gly His Asn Ser Asn Met Gly Ser Asp Ser Gly Thr Met Gly  
 275 280 285

Ser Asp Ser Asp Glu Glu Asn Val Ala Ala Arg Ala Ser Pro Glu Pro  
 290 295 300

Glu Leu Gln Leu Arg Pro Tyr Gln Met Glu Val Ala Gln Pro Ala Leu  
 305 310 315 320

Glu Gly Lys Asn Ile Ile Ile Cys Leu Pro Thr Gly Ser Gly Lys Thr  
 325 330 335

[0008]

Arg Val Ala Val Tyr Ile Ala Lys Asp His Leu Asp Lys Lys Lys Lys  
 340 345 350

Ala Ser Glu Pro Gly Lys Val Ile Val Leu Val Asn Lys Val Leu Leu  
 355 360 365

Val Glu Gln Leu Phe Arg Lys Glu Phe Gln Pro Phe Leu Lys Lys Trp  
 370 375 380

Tyr Arg Val Ile Gly Leu Ser Gly Asp Thr Gln Leu Lys Ile Ser Phe  
 385 390 395 400

Pro Glu Val Val Lys Ser Cys Asp Ile Ile Ile Ser Thr Ala Gln Ile  
 405 410 415

Leu Glu Asn Ser Leu Leu Asn Leu Glu Asn Gly Glu Asp Ala Gly Val  
 420 425 430

Gln Leu Ser Asp Phe Ser Leu Ile Ile Ile Asp Glu Cys His His Thr  
 435 440 445

Asn Lys Glu Ala Val Tyr Asn Asn Ile Met Arg His Tyr Leu Met Gln  
 450 455 460

Lys Leu Lys Asn Asn Arg Leu Lys Lys Glu Asn Lys Pro Val Ile Pro  
 465 470 475 480

Leu Pro Gln Ile Leu Gly Leu Thr Ala Ser Pro Gly Val Gly Gly Ala  
 485 490 495

Thr Lys Gln Ala Lys Ala Glu Glu His Ile Leu Lys Leu Cys Ala Asn  
 500 505 510

Leu Asp Ala Phe Thr Ile Lys Thr Val Lys Glu Asn Leu Asp Gln Leu  
 515 520 525

Lys Asn Gln Ile Gln Glu Pro Cys Lys Lys Phe Ala Ile Ala Asp Ala  
 530 535 540

Thr Arg Glu Asp Pro Phe Lys Glu Lys Leu Leu Glu Ile Met Thr Arg  
 545 550 555 560

Ile Gln Thr Tyr Cys Gln Met Ser Pro Met Ser Asp Phe Gly Thr Gln  
 565 570 575

Pro Tyr Glu Gln Trp Ala Ile Gln Met Glu Lys Lys Ala Ala Lys Glu  
 580 585 590

[0009]

Gly Asn Arg Lys Glu Arg Val Cys Ala Glu His Leu Arg Lys Tyr Asn  
 595 600 605

Glu Ala Leu Gln Ile Asn Asp Thr Ile Arg Met Ile Asp Ala Tyr Thr  
 610 615 620

His Leu Glu Thr Phe Tyr Asn Glu Glu Lys Asp Lys Lys Phe Ala Val  
 625 630 635 640

Ile Glu Asp Asp Ser Asp Glu Gly Gly Asp Asp Glu Tyr Cys Asp Gly  
 645 650 655

Asp Glu Asp Glu Asp Asp Leu Lys Lys Pro Leu Lys Leu Asp Glu Thr  
 660 665 670

Asp Arg Phe Leu Met Thr Leu Phe Phe Glu Asn Asn Lys Met Leu Lys  
 675 680 685

Arg Leu Ala Glu Asn Pro Glu Tyr Glu Asn Glu Lys Leu Thr Lys Leu  
 690 695 700

Arg Asn Thr Ile Met Glu Gln Tyr Thr Arg Thr Glu Glu Ser Ala Arg  
 705 710 715 720

Gly Ile Ile Phe Thr Lys Thr Arg Gln Ser Ala Tyr Ala Leu Ser Gln  
 725 730 735

Trp Ile Thr Glu Asn Glu Lys Phe Ala Glu Val Gly Val Lys Ala His  
 740 745 750

His Leu Ile Gly Ala Gly His Ser Ser Glu Phe Lys Pro Met Thr Gln  
 755 760 765

Asn Glu Gln Lys Glu Val Ile Ser Lys Phe Arg Thr Gly Lys Ile Asn  
 770 775 780

Leu Leu Ile Ala Thr Thr Val Ala Glu Glu Gly Leu Asp Ile Lys Glu  
 785 790 795 800

Cys Asn Ile Val Ile Arg Tyr Gly Leu Val Thr Asn Glu Ile Ala Met  
 805 810 815

Val Gln Ala Arg Gly Arg Ala Arg Ala Asp Glu Ser Thr Tyr Val Leu  
 820 825 830

[0010]

Val Ala His Ser Gly Ser Gly Val Ile Glu His Glu Thr Val Asn Asp  
           835                                  840                                  845

Phe Arg Glu Lys Met Met Tyr Lys Ala Ile His Cys Val Gln Asn Met  
       850                                  855                                  860

Lys Pro Glu Glu Tyr Ala His Lys Ile Leu Glu Leu Gln Met Gln Ser  
   865                                  870                                  875                                  880

Ile Met Glu Lys Lys Met Lys Thr Lys Arg Asn Ile Ala Lys His Tyr  
                                   885                                  890                                  895

Lys Asn Asn Pro Ser Leu Ile Thr Phe Leu Cys Lys Asn Cys Ser Val  
                                   900                                  905                                  910

Leu Ala Cys Ser Gly Glu Asp Ile His Val Ile Glu Lys Met His His  
                                   915                                  920                                  925

Val Asn Met Thr Pro Glu Phe Lys Glu Leu Tyr Ile Val Arg Glu Asn  
       930                                  935                                  940

Lys Ala Leu Gln Lys Lys Cys Ala Asp Tyr Gln Ile Asn Gly Glu Ile  
   945                                  950                                  955                                  960

Ile Cys Lys Cys Gly Gln Ala Trp Gly Thr Met Met Val His Lys Gly  
                                   965                                  970                                  975

Leu Asp Leu Pro Cys Leu Lys Ile Arg Asn Phe Val Val Val Phe Lys  
                                   980                                  985                                  990

Asn Asn Ser Thr Lys Lys Gln Tyr Lys Lys Trp Val Glu Leu Pro Ile  
                                   995                                  1000                                  1005

Thr Phe Pro Asn Leu Asp Tyr Ser Glu Cys Cys Leu Phe Ser Asp  
       1010                                  1015                                  1020

Glu Asp  
       1025

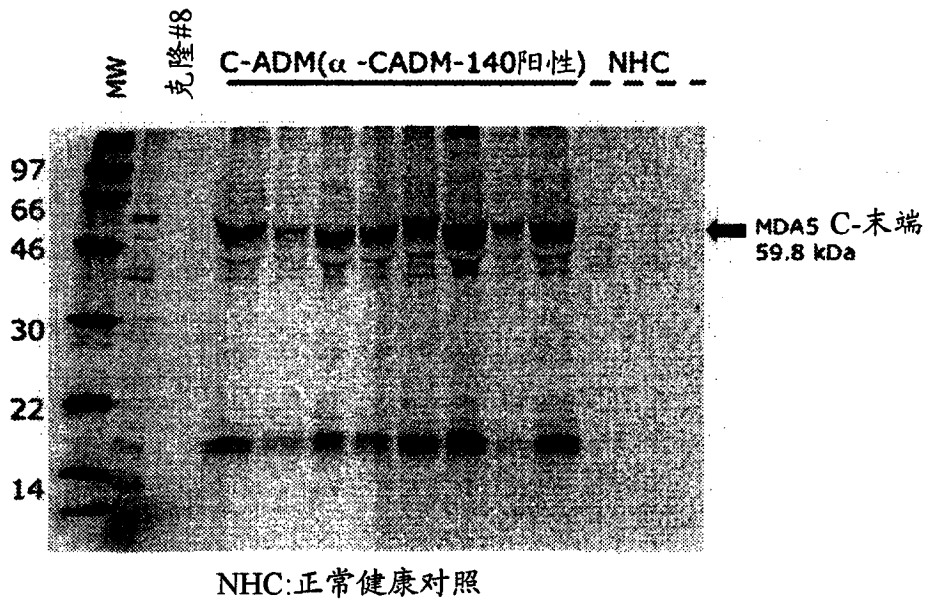


图 1

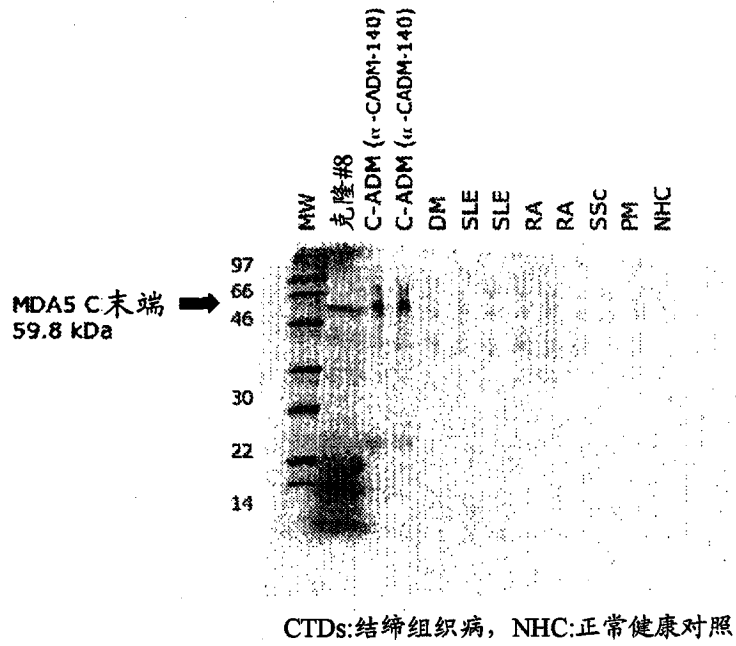


图 2

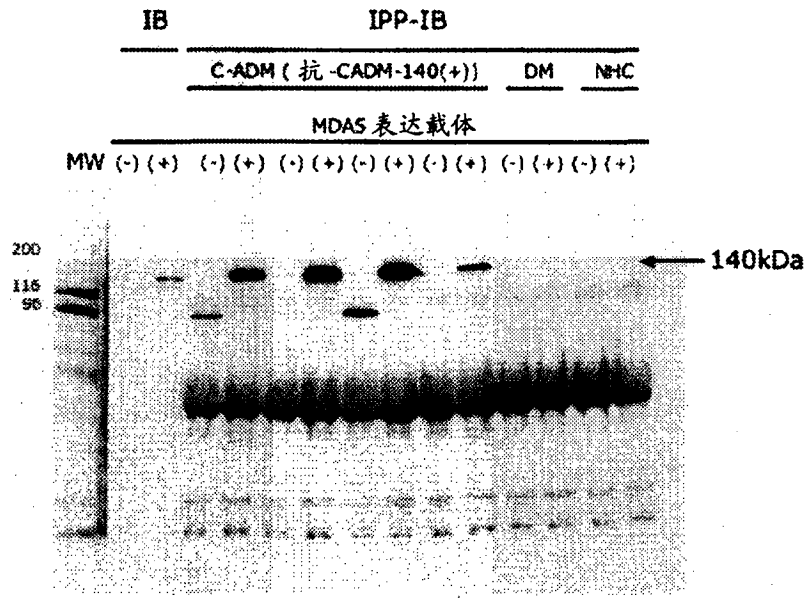


图 3

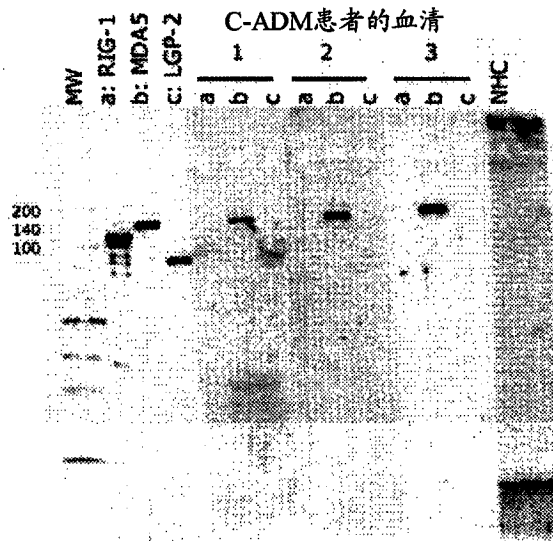


图 4

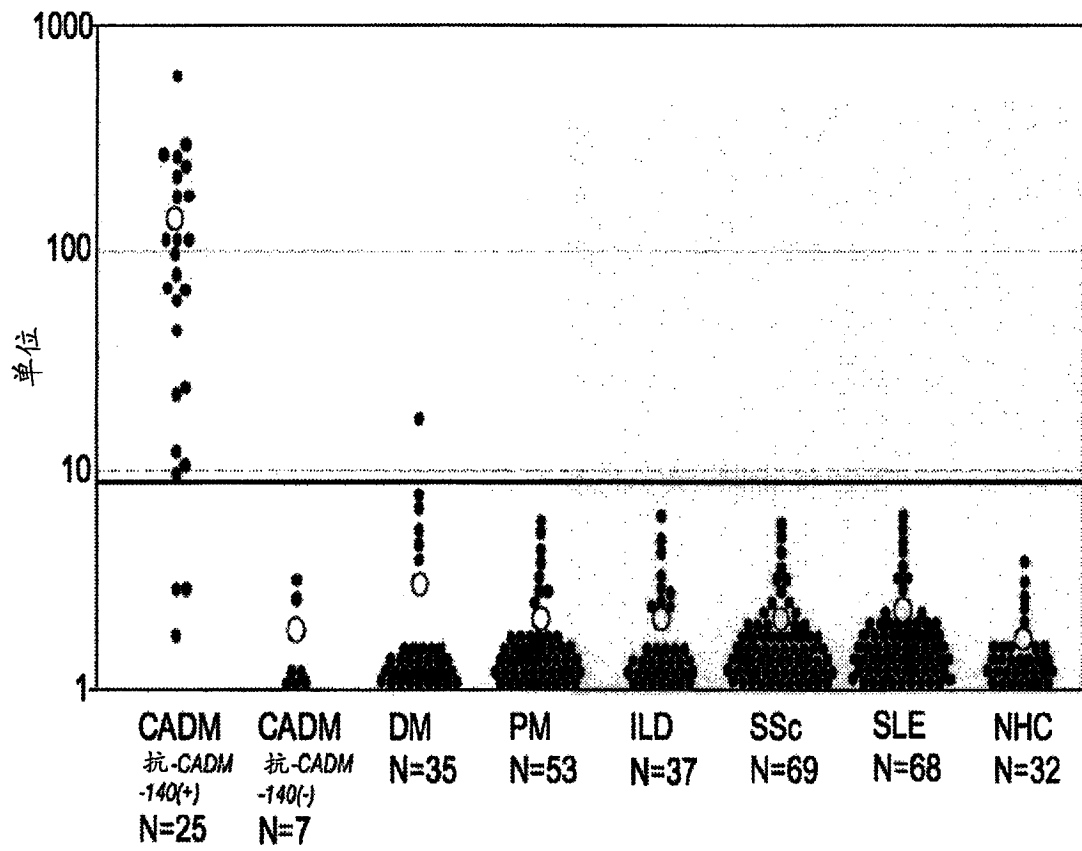


图 5

专利名称(译)	皮肤炎的诊断方法和诊断试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN102138072B</a>	公开(公告)日	2015-07-22
申请号	CN200980134163.6	申请日	2009-07-31
[标]申请(专利权)人(译)	学校法人庆应义塾		
申请(专利权)人(译)	学校法人庆应义塾		
当前申请(专利权)人(译)	学校法人庆应义塾		
[标]发明人	桑名正隆 佐藤慎二 藤田尚志		
发明人	桑名正隆 佐藤慎二 藤田尚志		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/5743 G01N33/6854		
代理人(译)	洪欣		
优先权	2008223789 2008-09-01 JP		
其他公开文献	CN102138072A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明的目的是鉴定与抗CADM-140抗体相应的抗原，生产重组蛋白，并建立通过ELISA等的测定系统。本发明提供了诊断皮肤炎的试剂盒，该试剂盒包含由抗CADM-140抗体识别的SEQ ID NO：4所示的MDA5蛋白或其片段。

