



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110824156 A

(43)申请公布日 2020.02.21

(21)申请号 201810920313.7

(22)申请日 2018.08.14

(71)申请人 杭州欧蒙医学检验所有限公司

地址 310007 浙江省杭州市龙井路38-2号

(72)发明人 王晶 李川 李文涵 黄庆

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 张小勇

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

权利要求书2页 说明书20页

序列表5页 附图3页

(54)发明名称

神经自身免疫疾病的诊断

(57)摘要

本发明涉及用于诊断疾病的方法,其包括检测患者的包含抗体的样品中与DNM1结合的自身抗体的步骤,本发明还涉及包含DNM1或其变体的多肽,所述多肽用于诊断疾病的用途,涉及与DNM1结合的自身抗体,涉及自身抗体用于诊断疾病的用途,涉及用于分离与DNM1结合的自身抗体的方法,涉及包含根据本发明的所述多肽的药物组合物或医学装置,涉及包含所述多肽或所述医学装置的用于诊断疾病的试剂盒,以及涉及所述多肽或自身抗体用于制备试剂盒或医学装置的用途。

1. 检测针对DNM1的自身抗体的试剂在制备诊断受试者中自身免疫疾病的制剂中的用途。

2. 根据权利要求1的用途,其中该制剂用于与来自受试者的样品接触。

3. 根据权利要求2的用途,其特征在于,该试剂选自DNM1多肽或同系物或包含衍生自DNM1多肽的一个或多个表位的多肽,并且该制剂用于将来自该受试者的所述样品与DNM1多肽或同系物或包含衍生自DNM1多肽的一个或多个表位的多肽接触,并且检测抗体与该多肽或同系物的结合。

4. 根据权利要求3的用途,其特征在于,该DNM1多肽或同系物包含根据SEQ ID NO:1的序列或与其具有至少70%、至少75%、至少80%、至少90%、至少92%、至少94%、至少96%、至少98%或至少99%的序列同一性的序列。

5. 根据权利要求2的用途,其特征在于,该样品是包含抗体的体液,其选自全血、血清、脑脊液和唾液。

6. 根据权利要求3的用途,其特征在于,该DNM1多肽或同系物或包含衍生自DNM1多肽的一个或多个表位的多肽源自小脑裂解物。

7. 根据权利要求3的用途,其特征在于,将来自受试者的样品与根据本发明权利要求3的多肽或同系物的片段或所述片段的同系物接触,所述片段具有根据SEQ ID NO:1的序列的至少20、25、30、40、50、60、70、80、90或100个连续氨基酸,所述片段的同系物与其具有至少70%、至少75%、至少80%、至少90%、至少92%、至少94%、至少96%、至少98%或至少99%的序列同一性,并且检测来自该样品的抗体与该多肽或同系物的片段的结合。

8. 根据权利要求3至7中任一项的用途,其特征在于,该多肽或同系物包含其他氨基酸,其为N-末端或C-末端附接的并且促进该多肽或同系物的纯化。

9. 根据权利要求3至8中任一项的用途,其特征在于,该多肽或同系物或其片段与报告分子或固相连接。

10. 根据权利要求1的用途,其中该受试者具有选自以下的一种或多种症状或者该自身免疫疾病与选自以下的一种或多种症状相关:包括胸腰椎旁肌和腹肌、腹壁肌和近腿肌的躯干肌的进行性僵硬,强直步态,腰椎过度前凸,慢性疼痛,近端肢体和轴向肌肉痉挛,对触摸和声音敏感,过度惊骇,肌阵挛,抑郁,焦虑,恐惧症,发烧,头痛,意识错乱,构音障碍,吞咽困难,眼震,振动幻视,眩晕,恶心,共济失调,头晕,发作,癫痫和震颤。

11. 根据权利要求1的用途,其中疾病是选自僵人综合征、副肿瘤僵人综合征、具有强直和肌阵挛和脑炎的进行性脑脊髓炎(PERM)、和脑炎、和小脑炎的神经系统的自身免疫疾病。

12. 权利要求3至9任一项的DNM1多肽或同系物或包含衍生自DNM1多肽的一个或多个表位的多肽或其片段在制备诊断自身免疫疾病的药物中的用途,其特征在于,将来自受试者的样品与根据权利要求3至9任一项的多肽或同系物或片段接触,并且检测来自样品的抗体与多肽或同系物或片段的结合。

13. 根据权利要求12的用途,其特征在于,用免疫扩散技术,免疫电泳技术,光散射免疫测定,凝集技术,标记的免疫测定,优选来自放射性标记的免疫测定、酶免疫测定的那些标记的免疫测定,更优选ELISA、化学发光免疫测定和免疫荧光,优选间接免疫荧光,蛋白质阵列,发光测试和点测定,优选蛋白质印迹或斑点印迹检测来自样品的抗体与多肽或同系物或片段的结合。

14. 根据权利要求12的用途, 其中疾病是选自僵人综合征、副肿瘤僵人综合征、具有强直和肌阵挛和脑炎的进行性脑脊髓炎 (PERM)、和脑炎、和小脑炎的神经系统的自身免疫疾病。

15. 检测抗体的测试试剂盒, 其特征在于, 它包含根据权利要求3至9任一项的DNM1多肽或同系物或包含衍生自DNM1多肽的一个或多个表位的多肽或其片段。

16. 药物组合物, 其特征在于, 它包含根据权利要求3至9任一项的DNM1多肽或同系物或包含衍生自DNM1多肽的一个或多个表位的多肽或其片段。

17. 医学装置, 其包被有根据权利要求3至9任一项的DNM1多肽或同系物或包含衍生自DNM1多肽的一个或多个表位的多肽或其片段或包被有根据权利要求16的药物组合物。

18. 根据权利要求17的医学装置, 其中医学装置选自载玻片, 优选用于显微镜术, 生物芯片, 微量滴定板, 测试条, 膜, 优选线性斑点印迹 (line blot), 色谱柱和珠, 优选磁珠。

19. 根据权利要求3至9任一项的DNM1多肽或同系物或包含衍生自DNM1多肽的一个或多个表位的多肽或其片段在制备治疗受试者中自身免疫疾病的药物组合物或医学装置中的用途, 其中治疗包括以下步骤:

- a. 从受试者取血液或血浆,
- b. 将血液或血浆与根据本发明的药物组合物或根据本发明的医学装置接触, 以去除疾病相关抗体, 以及
- c. 将血液或血浆重新施用于受试者。

20. 根据权利要求19的用途, 其中疾病是选自僵人综合征、副肿瘤僵人综合征、具有强直和肌阵挛和脑炎的进行性脑脊髓炎 (PERM)、和脑炎、和小脑炎的神经系统的自身免疫疾病。

神经自身免疫疾病的诊断

技术领域

[0001] 本发明涉及一种诊断疾病的方法,该方法包括检测患者的包含抗体的样品中与DNM1结合的自身抗体的步骤,涉及包含DNM1的多肽或其变体,涉及所述多肽用于诊断疾病的用途,涉及与DNM1结合的自身抗体,涉及自身抗体用于诊断疾病的用途,涉及用于分离与DNM1结合的自身抗体的方法,涉及包含根据本发明的所述多肽的药物组合物或医学装置,涉及用于诊断疾病的试剂盒,该试剂盒包含所述多肽或所述医学装置,以及涉及所述多肽或自身抗体用于制备试剂盒或医学装置的用途。

背景技术

[0002] 开发用于神经系统疾病的诊断系统是生物医学科学中的一项持续的挑战,这在较大程度上是因为所遇到的许多症状可以由极其多样的原因(包括基因遗传疾病、药物滥用、营养不良、感染、损伤、精神性疾病、免疫缺陷和癌症)来解释说明。

[0003] 由于神经系统疾病很少与临床症状的独特的特征性模式相关联,所以通常难以仅基于受影响的患者的观察和检查或者其医疗史来提供可靠的诊断。

[0004] 早期诊断的重要性怎么强调都不为过。许多神经系统病症,最显著地,阿尔茨海默病和帕金森病以及多发性硬化,不能被治愈,但是可以用于减缓其进展的药物是可得的。此外,某些罕见类型的癌症与神经系统症状有关。诊断得越早,为了患者的充分益处而利用可获得的治疗谱的机会就越好。

[0005] 这在与自身抗体相关的神经系统疾病的情况下更是如此。在一些情况下,特异性的可检测的自身抗体与病况之间的关联足够强从而允许进行即刻的诊断。

[0006] 但是,即使不是这样,自身抗体的检测可以向主治医师指明可以用于改善患者病况的治疗手段。存在各种各样的广泛使用的免疫抑制剂,其可以不管自身抗体靶标的性质而进行使用。备选地,血液成分分离术可以用于从患者的血液中除去自身抗体。在许多情况下,患者在神经系统的自身免疫疾病的早期诊断和治疗后继续过正常的生活。

[0007] 基于自身抗体检测的诊断测定还可以确证除了与自身抗体相关的那些疾病之外的其他疾病的诊断。如果结果是血液样品没有特异性自身抗体,这可能帮助主治医师排除一系列的可能性并因此缩小似乎可能的病况的范围。

[0008] 与自身抗体的出现相一致的神经系统病况的实例包括:视神经脊髓炎(一种以视觉感知和脊髓功能的丧失为特征的疾病),和抗-NMDA受体脑炎(其与自主神经功能障碍相关),通气不足,小脑性共济失调,轻偏瘫,意识丧失,或紧张症。虽然自身抗体的参与和这些病况本身的性质以前了解得很少,但是由于基于自身抗体检测的测定的可得性,此类疾病中的许多现在可以被诊断和有效地治疗。

[0009] 因此,最重要的是开发新的方法来区分与自身抗体相关的神经系统疾病和非自身抗体相关的神经系统疾病。

[0010] W01997/021729和US 5693476公开了NSF、突触融合蛋白和VAMP蛋白用作人工形成的复合物的一部分来鉴定调节突触传递的物质,但它们没有公开与DNM1结合的自身抗体的

存在,更不用说所述自身抗体的诊断有用性。

[0011] Nicot等人报道在鼠实验性自身免疫脑炎中,STX1B的转录和蛋白水平下降(Nicot A,Ratnakar PV,Ron Y,Chen CC,Elkabes S.Regulation of gene expression in experimental autoimmune encephalomyelitis indicates early neuronal dysfunction.Brain.2003 Feb;126(Pt 2):398-412),但没有公开与DNM1结合的自身抗体的存在,更不用说所述自身抗体的诊断有用性。

[0012] Hirai等人通过针对分泌性囊泡相关蛋白质的体外转录/翻译免疫沉淀方案报道在21%的患有1型糖尿病的患者中针对VAMP2的自身抗体(Hirai H,Miura J,Hu Y,Larsson H,Larsson K,Lernmark A,Ivarsson SA,Wu T,Kingman A,Tzioufas AG,Notkins AL.Selective screening of secretory vesicle-associated proteins for autoantigens in type 1 diabetes:VAMP2 and NPY are new minor autoantigens.Clin Immunol.2008 Jun;127(3):366-74)。在同一份报道中,作者公开他们没有检测到任何针对STX1A的抗体,STX1A是一种与STX1B具有97.6%同源性的蛋白质。他们没有公开与DNM1结合的自身抗体的存在,更不用说所述自身抗体的诊断有用性。

发明内容

[0013] 作为本发明之基础的问题是提供新的试剂、装置和方法,其可以用于支持自身免疫疾病(优选神经系统的自身免疫疾病或与神经系统疾病或神经系统症状相关的自身免疫疾病,更优选选自包含僵人综合征和脑炎的组、优选脑炎)的诊断和治疗。

[0014] 作为本发明之基础的另一个问题是提供新的试剂、装置和方法,其可以用于区分自身免疫疾病(特别是神经系统的自身免疫疾病,更优选选自包含僵人综合征和脑炎的组、优选脑炎)和除了自身免疫疾病之外的其他疾病,这在较大程度上是为了确定最有希望的治疗方案,更具体地,确定免疫抑制治疗是否适度。

[0015] 作为本发明之基础的问题通过所附的独立权利要求和从属权利要求的主题而得到解决。

[0016] 在第一方面,本发明涉及检测针对DNM1的自身抗体的试剂在制备诊断受试者中自身免疫疾病的制剂中的用途。

[0017] 在优选实施方案中,该制剂用于与来自该受试者的样品接触。

[0018] 在优选实施方案中,该试剂选自DNM1多肽或同系物或包含衍生自DNM1多肽的一个或多个表位的多肽,并且该制剂用于将来自该受试者的所述样品与DNM1多肽或同系物或包含衍生自DNM1多肽的一个或多个表位的多肽接触,并且检测抗体与该多肽或同系物的结合。

[0019] 在优选实施方案中,该DNM1多肽或同系物包含根据SEQ ID NO:1的序列或与其具有至少70%、至少75%、至少80%、至少90%、至少92%、至少94%、至少96%、至少98%或至少99%的序列同一性的序列。

[0020] 在优选实施方案中,该样品是包含抗体的体液,其选自全血、血清、脑脊液和唾液。

[0021] 在优选实施方案中,该DNM1多肽或同系物或包含衍生自DNM1多肽的一个或多个表位的多肽源自小脑裂解物。

[0022] 在优选实施方案中,将来自受试者的样品与根据本发明的多肽或同系物的片段或

所述片段的同系物接触,所述片段具有根据SEQ ID NO:1的序列的至少20、25、30、40、50、60、70、80、90或100个连续氨基酸,所述片段的同系物与其具有至少70%、至少75%、至少80%、至少90%、至少92%、至少94%、至少96%、至少98%或至少99%的序列同一性,并且检测来自该样品的抗体与该多肽或同系物的片段的结合。

[0023] 在优选实施方案中,该多肽或同系物包含其他氨基酸,其为N-末端或C-末端附接的并且促进该多肽或同系物的纯化。

[0024] 在优选实施方案中,该多肽或同系物或其片段与报告分子或固相连接。

[0025] 在优选实施方案中,该受试者具有选自以下的一种或多种症状或者该自身免疫疾病与选自以下的一种或多种症状相关:躯干肌(包括胸腰椎旁肌和腹肌、腹壁肌和近腿肌)进行性僵硬,强直步态,腰椎过度前凸,慢性疼痛,近端肢体和轴向肌肉痉挛,对触摸和声音敏感,过度惊骇,肌阵挛,抑郁,焦虑,恐惧症,发烧,头痛,意识错乱,构音障碍,吞咽困难,眼震,振动幻视,眩晕,恶心,共济失调,头晕,发作,癫痫和震颤。

[0026] 在优选实施方案中,疾病是选自僵人综合征、副肿瘤僵人综合征、具有强直和肌阵挛和脑炎的进行性脑脊髓炎(PERM)、和脑炎、和小脑炎的神经系统的自身免疫疾病。

[0027] 在第二方面,本发明涉及根据本发明的DNM1多肽或同系物或包含衍生自DNM1多肽的一个或多个表位的多肽或其片段在制备诊断自身免疫疾病的药物中的用途,其特征在于,将来自受试者的样品与根据本发明的多肽或同系物或片段接触,并且检测来自样品的抗体与多肽或同系物或片段的结合。

[0028] 在优选实施方案中,用免疫扩散技术,免疫电泳技术,光散射免疫测定,凝集技术,标记的免疫测定,优选来自放射性标记的免疫测定、酶免疫测定的那些标记的免疫测定,更优选ELISA、化学发光免疫测定和免疫荧光,优选间接免疫荧光,蛋白质阵列,发光测试和点测定,优选蛋白质印迹或斑点印迹检测来自样品的抗体与多肽或同系物或片段的结合。

[0029] 在优选实施方案中,疾病是选自僵人综合征、副肿瘤僵人综合征、具有强直和肌阵挛和脑炎的进行性脑脊髓炎(PERM)、和脑炎、和小脑炎的神经系统的自身免疫疾病。

[0030] 在第三方面,本发明涉及检测抗体的测试试剂盒,其特征在于,它包含根据本发明的DNM1多肽或同系物或包含衍生自DNM1多肽的一个或多个表位的多肽或其片段。

[0031] 在第四方面,本发明涉及药物组合物,其特征在于,它包含根据本发明的DNM1多肽或同系物或包含衍生自DNM1多肽的一个或多个表位的多肽或其片段。

[0032] 在第五方面,本发明涉及医学装置,其包被有根据本发明的DNM1多肽或同系物或包含衍生自DNM1多肽的一个或多个表位的多肽或其片段或包被有根据本发明的药物组合物。

[0033] 在优选实施方案中,医学装置选自载玻片,优选用于显微镜术,生物芯片,微量滴定板,测试条,膜,优选线性斑点印迹(line blot),色谱柱和珠,优选磁珠。

[0034] 在第六方面,本发明涉及根据本发明的DNM1多肽或同系物或包含衍生自DNM1多肽的一个或多个表位的多肽或其片段在制备治疗受试者中自身免疫疾病的药物组合物或医学装置中的用途,其中治疗包括以下步骤:

[0035] a. 从受试者取血液或血浆,

[0036] b. 将血液或血浆与根据本发明的药物组合物或根据本发明的医学装置接触,以去除疾病相关抗体,以及

[0037] c.将血液或血浆重新施用于受试者。

[0038] 在优选实施方案中,疾病是选自僵人综合征、副肿瘤僵人综合征、具有强直和肌阵挛和脑炎的进行性脑脊髓炎(PERM)、和脑炎、和小脑炎的神经系统的自身免疫疾病。

[0039] 在进一步的方面,该问题通过用于诊断疾病的方法来解决,该方法包括检测患者的包含抗体的样品中与DNM1结合的自身抗体的步骤。

[0040] 在进一步的方面,该问题通过多肽来解决,该多肽包含选自包含DNM1的多肽或其变体,所述多肽优选是经固定化的,更优选固定在固体载体上。

[0041] 在进一步的方面,该问题通过根据本发明的多肽用于诊断疾病的用途来解决,该用途优选包括检测样品中与DNM1结合的自身抗体的步骤。

[0042] 在进一步的方面,该问题通过用于治疗疾病的根据本发明的多肽来解决。

[0043] 在进一步的方面,该问题通过自身抗体、优选与DNM1结合的分离的自身抗体来解决,其中所述抗体优选与根据本发明的多肽复合。

[0044] 在进一步的方面,该问题通过根据本发明的自身抗体用于诊断疾病的用途来解决。

[0045] 在进一步的方面,该问题通过用于分离自身抗体的方法来解决,所述自身抗体与DNM1结合,该方法包括以下步骤:

[0046] a)使包含该自身抗体的样品与根据本发明的多肽在与复合物形成相容的条件下相接触,其中所述自身抗体与所述多肽结合,

[0047] b)分离在步骤a)中形成的复合物,

[0048] c)解离步骤b)中分离的复合物,以及

[0049] d)将该自身抗体与该多肽分开。

[0050] 在进一步的方面,该问题通过包含根据本发明的多肽的药物组合物、或医学装置、优选诊断装置来解决。

[0051] 在进一步的方面,该问题通过用于诊断疾病的试剂盒来解决,所述试剂盒包含根据本发明的多肽或根据本发明的医学装置,其中优选该试剂盒另外包含用于检测包含根据本发明的多肽和/或与DNM1结合的抗体的复合物的工具。

[0052] 在另一方面,根据本发明的方法是用于校准诊断测试系统或用于确定用于从患者血液中去掉自身抗体的这种测试系统或治疗系统的可靠性和/或足够能力(capacity)的方法。在诊断测试系统的情况下,在待诊断患者的样品中未检测到自身抗体,但在已知组成、特别是包含与自身抗原结合的确定的浓度的自身抗体或确定浓度的重组抗体的人工溶液中检测到自身抗体。该人工溶液可用作阳性对照。如本文所用,术语“校准”可以理解为在诊断测试系统上使用与DNM1或其变体结合的抗体,以获得与相应抗原结合的抗体的定性、半定量或定量数据。优选地,抗原可以是在组织切片的细胞或用包含遗传信息的核酸分子转染以表达目的抗原的细胞中表达的DNM1或变体。诊断系统可以是允许检测样品中的自身抗体的任何系统,例如根据本发明的医学装置或诊断装置。

[0053] 在治疗系统、例如血液成分分离(apheresis)的装置的情况下,该方法可用于开发这样的系统并测试其可靠性和/或效率和/或足够能力。例如,在血液成分分离运行之后或在开始血液成分分离运行之前,可以使包含与本发明的多肽结合的确定的浓度的抗体的溶液与系统接触,并且可以使用根据本发明的方法来确认该系统能够耗尽抗体溶液。

[0054] 在优选实施方案中,患者具有一种或多种、优选两种或更多种选自包含以下的组的症状或者所述疾病与一种或多种、优选两种或更多种选自包含以下的组的症状相关:躯干肌(包括胸腰椎旁肌和腹肌、腹壁肌和近腿肌)进行性僵硬,强直步态,腰椎过度前凸,慢性疼痛,近端肢体和轴向肌肉痉挛,对触摸和声音敏感,过度惊骇,肌阵挛,抑郁,焦虑,恐惧症,发烧,头痛,意识错乱,构音障碍,吞咽困难,眼震,振动幻视,眩晕,恶心,共济失调,感觉异常,肌肉萎缩,头晕,发作,癫痫和震颤。

[0055] 在进一步的方面,该问题通过根据本发明的多肽或根据本发明的自身抗体或针对DNM1的抗体或根据本发明的医学装置用于制备试剂盒、医学装置的用途来解决,所述医学装置优选诊断装置,所述试剂盒、医学装置优选诊断装置优选用于诊断疾病。

[0056] 在优选实施方案中,疾病是神经系统疾病,优选神经系统的自身免疫疾病,更优选选自包含僵人综合征和脑炎的组,优选脑炎。在优选实施方案中,根据本发明的方法或用途旨在确定疾病、优选神经系统疾病是否具有自身免疫成分、优选适合免疫抑制治疗的成分。

[0057] 在优选实施方案中,样品是包含抗体的体液,优选选自包含全血、血清、脑脊液和唾液的组。

[0058] 在优选实施方案中,使用选自包含以下的方法组的方法来检测自身抗体或复合物:免疫扩散技术,免疫电泳技术,光散射免疫测定,凝集技术,标记的免疫测定例如来自包含放射性标记的免疫测定、酶免疫测定的组的那些的标记的免疫测定,更优选ELISA、化学发光免疫测定和免疫荧光,优选间接免疫荧光。

[0059] 在优选实施方案中,医学装置选自包含以下的组:载玻片,优选用于显微镜术,生物芯片,微量滴定板,测试条,膜,优选线性斑点印迹(line blot),色谱柱和珠,优选磁珠。

[0060] 在优选实施方案中,使用选自包含以下的方法组的方法来检测自身抗体或复合物:免疫扩散技术,免疫电泳技术,光散射免疫测定,凝集技术,标记的免疫测定例如来自包含放射性标记的免疫测定、酶免疫测定的组的那些的标记的免疫测定,更优选ELISA,化学发光免疫测定和免疫荧光,优选间接免疫荧光。

[0061] 本发明基于发明人的令人惊讶的发现,即存在针对DNM1的自身抗体并且其可以在来自许多患有神经系统症状的患者的样品中检测到,但不能在从健康受试者获得的样品中检测到。

[0062] 此外,本发明基于发明人的令人惊讶的发现,即可通过检测针对DNM1的多肽的自身抗体的方式来诊断新型神经系统疾病。

[0063] 不希望受任何理论束缚,此类自身抗体的存在表明在具有此类自体抗体的患者中DNM1和/或下游效应子的活性和功能受损,从而发生神经系统症状。

[0064] 发动蛋白1(DNM1)是细胞内外周膜蛋白,其可比于SNARE蛋白而高度表达于脑中,特别是神经元的细胞体和轴突中(Hong W, Lev S Tethering the assembly of SNARE complexes. Trends Cell Biol. 2014 24:35-43)。

[0065] DNM1与参与神经元中的突触囊泡与突触前膜的对接和/或融合的SNARE(可溶性NSF附着蛋白受体)复合物相关。因此,DNM1调节神经递质释放,包括从抑制性神经元释放 γ -氨基丁酸(GABA)和甘氨酸(Südhof TC, Rizo J. Synaptic vesicle exocytosis. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2011 Dec 1; 3(12). pii: a005637)。

[0066] DNM1是含有864个氨基酸的97kDa多肽。所述蛋白质具有用于使膜成管状和切断膜

的机械化学性质,并且涉及网格蛋白介导的内吞作用和其他囊泡运输过程。肌动蛋白和其他细胞骨架蛋白充当DNM1的结合配偶体,其也可以自组装从而导致GTP酶活性的刺激。

[0067] 本发明涉及包含哺乳动物、优选人DNM1、或与结合DNM1的自身抗体具有反应性的抗原性变体的多肽。哺乳动物DNM1包括来自人、猴、小鼠、大鼠、兔、豚鼠或猪的那些,优选人DNM1。

[0068] 在更优选实施方案中,DNM1是由数据库代码Q05193优选Q05193-1 (UniProt) 编码的多肽。相应cDNA的数据库代码是NM_004408 (NCBI)。

[0069] 本发明的教导不仅可以通过使用多肽,特别是包含DNM1的天然序列的多肽,或具有在本申请中明确地(例如通过功能、名称、序列或登录号)或隐含地提到的准确序列的核酸来实施,而且可以通过使用这样的多肽或核酸的变体来实施。

[0070] 在优选实施方案中,本文所使用的术语“变体”可以是指所提到的全长序列的至少一种片段,更具体地一种或多种相对于全长序列而言在一个或两个末端处截短了一个或多个氨基酸的氨基酸或核酸序列。这样的片段包含或编码具有原始序列或其变体的至少6、7、8、10、12、15、20、25、50、75、100、150或200个连续氨基酸的肽。变体的总长度可以为至少6、7、8、9、10、11、12、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100个或更多个氨基酸。

[0071] 在另一优选实施方案中,术语“变体”不仅是指至少一种片段,而且还指这样的多肽或其片段,所述多肽或其片段包含与所提到的参考氨基酸序列或其片段具有至少40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性的氨基酸序列,其中删除或置换除了对于生物学活性(例如,抗原结合(自身)抗体的能力)或者多肽的折叠或结构来说必需的那些氨基酸之外的其他氨基酸,和/或以保守的方式替换一个或多个这样的必需氨基酸,和/或添加氨基酸,从而使得多肽的生物学活性得到保留。现有技术包括可以用于比对两个给定核酸或氨基酸序列并计算同一性程度的各种不同的方法,参见例如Arthur Lesk (2008), Introduction to bioinformatics, Oxford University Press, 2008, 3rd edition。在优选实施方案中,使用ClustalW软件 (Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics, 23, 2947-2948), 其中采用缺省设置。

[0072] 在优选实施方案中,所述变体是线性、非折叠的多肽,其任选为变性的。

[0073] 在优选实施方案中,所述多肽和其变体还可以包含化学修饰,例如同位素标记,或者共价修饰例如糖基化、磷酸化、乙酰化、脱羧、瓜氨酸化、甲基化、羟基化等等。本领域技术人员熟悉修饰多肽的方法。对任何修饰如此地进行设计,从而使得其不消除变体的生物学活性。

[0074] 此外,变体还可以通过与其他已知多肽或其变体相融合来产生,并且包含具有活性的部分或结构域,优选地,所述具有活性的部分或结构域当与参考序列的具有活性的部分进行比对时,具有至少70%、75%、80%、85%、90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性,其中本文所使用的术语“具有活性的部分”是指比全长氨基酸序列短的氨基酸序列,或在核酸序列的情况下编码比全长氨基酸序列短的氨基酸序列,和/或是天然序列的变体,但保留了至少一些生物学活性。

[0075] 在优选实施方案中,术语核酸的“变体”包括这样的核酸,所述核酸的互补链与参考核酸或野生型核酸杂交,优选在严紧条件下杂交。杂交反应的严紧性是本领域普通技术人员可容易地确定的,并且通常是取决于探针长度、洗涤温度和盐浓度的根据经验的计算。通常,较长的探针需要较高的用于适当退火的温度,而较短的探针则需较低的温度。杂交通常取决于变性的DNA与在环境中存在的互补链在低于其解链温度的温度下再退火的能力:探针和可杂交序列之间的所希望的同源性程度越高,可以使用的相对温度就越高。因此,较高的相对温度将会倾向于使反应条件更严紧,而较低的反应温度将会更不严紧。关于杂交反应的严紧性的另外的细节和解释,参见Ausubel,F.M. (1995),*Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley&Sons, Inc.此外,本领域技术人员可以遵循在手册Boehringer Mannheim GmbH(1993)*The DIG System Users Guide for Filter Hybridization*,Boehringer Mannheim GmbH,Mannheim,Germany中和在Liebl,W., Ehrmann,M.,Ludwig,W.,and Schleifer,K.H. (1991)*International Journal of Systematic Bacteriology* 41:255-260中所给出的关于如何借助于杂交来鉴定DNA序列的指导。在优选实施方案中,将严紧条件应用于任何杂交,即只有如果探针与靶序列具有70%或更高的同一性的情况下,杂交才出现。相对于靶序列而言具有较低的同源性程度的探针可以杂交,但此类杂交体是不稳定的并且将会在严紧条件下的洗涤步骤中被去除,例如降低盐浓度至 $2\times\text{SSC}$ 或,任选地和随后,至 $0.5\times\text{SSC}$,而温度为(以优选度渐增的顺序)大约 50°C - 68°C ,大约 52°C - 68°C ,大约 54°C - 68°C ,大约 56°C - 68°C ,大约 58°C - 68°C ,大约 60°C - 68°C ,大约 62°C - 68°C ,大约 64°C - 68°C ,大约 66°C - 68°C 。在特别优选实施方案中,温度为大约 64°C - 68°C 或大约 66°C - 68°C 。可能的是,调节盐浓度至 $0.2\times\text{SSC}$,或甚至 $0.1\times\text{SSC}$ 。可以分离出具有至少70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%的相对于参考序列或野生型序列而言的同一性程度的核酸序列。在优选实施方案中,本文所使用的术语核酸序列的变体是指任何这样的核酸序列,其按照遗传密码的简并性而编码与参考核酸序列所编码的相同的氨基酸序列及其变体。

[0076] 该多肽的变体具有生物学活性。在优选实施方案中,这样的生物学活性是结合于与DNM1结合的如在患有自身免疫疾病的患者中发现的自身抗体的能力,所述自身免疫疾病与这种自身抗体相关,优选与神经系统疾病如僵人综合征、副肿瘤僵人综合征、具有强直和肌阵挛和脑炎的进行性脑脊髓炎相关,优选与这种自身抗体相关的僵人综合征。例如,可以通过确定目标变体是否结合来自患者样品的自身抗体(所述自身抗体结合野生型DNM1)来检查DNM1的变体是否具有这样的生物学活性,优选如本申请实验部分所述的通过使用表达DNM1哺乳动物细胞的间接免疫荧光测定的那样。

[0077] 当用于实施本发明的教导时,根据本发明的包含DNM1或其变体的多肽(包括根据本发明的自身抗体),可以以任何形式和以任何纯化程度来提供,从以内源形式包含所述多肽的液体样品、组织或细胞,更优选地,过表达所述多肽的细胞,此类细胞的粗制的或经富集的裂解物,直至经纯化的和/或分离的多肽,其任选地是基本上纯的。在优选实施方案中,所述多肽是天然多肽,其中本文所使用的术语“天然多肽”是指经折叠的多肽,更优选是指从组织或细胞中,更优选从哺乳动物细胞或组织中,任选地从非重组的组织或细胞中纯化出的经折叠的多肽。在另一优选实施方案中,所述多肽是重组的蛋白质,其中本文所使用的术语“重组的”是指通过使用基因工程方法在生产过程的任何阶段而产生的多肽,例如通过

将编码所述多肽的核酸与用于在细胞或组织中过表达的强启动子相融合或者通过改造所述多肽本身的序列。本领域技术人员熟悉用于改造核酸和所编码的多肽的方法(例如,在Sambrook,J.,Fritsch,E.F.和Maniatis,T.(1989),*Molecular Cloning*,CSH中或在Brown T.A.(1986),*Gene Cloning-an introduction*,Chapman&Hall中所描述的)和用于产生和纯化天然或重组多肽的方法(例如,由GE Healthcare Life Sciences公开的手册“Strategies for Protein Purification”,“Antibody Purification”,“Purifying Challenging Proteins”(2009/2010),其在Burgess,R.R.,Deutscher,M.P.(2009),*Guide to Protein Purification*中)。在优选实施方案中,如果在各自样品中至少60%、70%、80%、90%、95%或99%的多肽由所述多肽组成,如通过SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳以及随后的考马斯蓝染色和可视化检定所判断的,则多肽是纯的。

[0078] 如果本发明的多肽以组织的形式来提供,那么优选的是,所述组织为哺乳动物组织,例如人、大鼠、灵长类、驴、小鼠、山羊、马、绵羊、猪或奶牛组织,更优选脑组织,最优选小脑。如果使用细胞裂解物,那么优选的是,所述细胞裂解物包含与细胞表面相关的膜或者实际上是膜中富集的级分。如果所述多肽以重组细胞的形式来提供,那么优选的是,所述重组细胞为真核细胞例如酵母细胞,更优选来自多细胞真核生物例如植物、哺乳动物、蛙或昆虫,最优选来自哺乳动物例如大鼠、人、灵长类、驴、小鼠、山羊、马、绵羊、猪或奶牛的细胞。

[0079] 用于实施本发明的教导的多肽(包括任何变体)优选设计为使得其包含至少一个表位,所述表位由与DNM1结合的自身抗体识别和/或与结合DNM1的自身抗体特异性结合。与除了针对DNM1的自身抗体以外的抗体相比,任何表位更优选是仅由这种自身抗体识别的表位。在一个实施方案中,此类表位包含来自DNM1的6、7、8、9、10、11、12、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100或更多个、优选至少9个但不超过16个连续氨基酸。本领域技术人员熟悉用于设计具有足够的免疫原性的肽的指导方针,例如在Jackson,D.C.,Fitzmaurice,C.J.,Brown,L.E.,Zeng,W.(1999),*Preparation and properties of totally synthetic immunogenes*,*Vaccine*,第18卷,第3-4期,1999年9月,第355-361页;和Black,M.,Trent,A.,Tirrell,M.和Olive,C.(2010),*Advances in the design and delivery of peptide subunit vaccines with a focus on Toll-like receptor agonists*,*Expert Rev Vaccines*,2010年2月,9(2):157-173中所描述的那些。简而言之,期望的是,肽尽可能多地满足下列要求:(a)它具有高的亲水性程度;(b)它包含选自包含天冬氨酸、脯氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸的组的一个或多个残基;(c)为了更高的特异性,它与其他已知的肽或多肽不具有同源性或具有很低的同源性;(d)它需要是足够可溶的;和(e)它不包含糖基化或磷酸化位点,除非由于特殊原因需要。或者,可以遵循生物信息学方法,例如由Moreau,V.,Fleury,C.,Piquer,D.,Nguyen,C.,Novali,N.,Villard,S.,Laune,D.,Granier,C.和Molina,F.(2008),*PEPOP:Computational design of immunogenic peptides*,*BMC Bioinformatics* 2008,9:71所描述的那些。

[0080] 当根据本发明使用时,可以以任何种类的构象提供包含DNM1或其变体的本发明多肽。例如,所述多肽可以是基本上未折叠的、部分折叠的或完全折叠的多肽。在优选实施方案中,所述多肽在这样的意义上进行折叠,即对于与本发明的自身抗体的结合来说必需的表位或者该蛋白质或其变体以其整体采取由天然蛋白质在其天然环境中所采取的折叠。本领域技术人员熟悉适合于测定多肽是否是折叠的,和如果是折叠的,那么它具有哪种结构

的方法,例如有限蛋白酶解、核磁共振波谱、圆二色光谱或X射线晶体学(参见例如Banaszak L.J. (2008), *Foundations of Structural Biology*, Academics Press; 或Teng Q. (2013), *Structural Biology: Practical Applications*, Springer), 优选地, 使用圆二色光谱。

[0081] 本发明的多肽可以是融合蛋白, 其包含除了取自DNM1的那些之外的其他氨基酸序列, 特别是C-末端或N-末端标签, 优选C-末端标签, 其在优选实施方案中如本文所使用的为具有功能的额外的序列基元或多肽, 其具有一些生物学或物理功能和可以例如用于纯化、固定化、沉淀或鉴定本发明的多肽。在更优选实施方案中, 所述标签是能够与配体特异性地结合的序列或结构域, 例如选自包含以下的组: His标签、硫氧还蛋白、麦芽糖结合蛋白、谷胱甘肽S-转移酶的标签、荧光标签, 例如选自包含绿色荧光蛋白的组。

[0082] 本发明的多肽可以是经固定化的多肽。在优选实施方案中, 本文所使用的术语“经固定化的”是指结合至在水溶液中不可溶的固体载体的分子, 更优选通过共价键、静电相互作用、包囊或包载(例如通过使球状多肽在凝胶中变性)、或通过疏水相互作用、最优选通过一个或多个共价键结合。各种不同的合适载体, 例如纸、聚苯乙烯、金属、硅或玻璃表面、微流控通道、膜、珠粒例如磁珠、柱色谱法介质、生物芯片、聚丙烯酰胺凝胶等等, 已在文献中进行了描述, 例如在Kim, D. 和Herr, A.E. (2013), *Protein immobilization techniques for microfluidic assays*, *Biomicrofluidics* 7 (4), 041501中。如此, 可以以直截了当的方式将经固定化的分子连同不可溶的载体一起与水溶液分开, 例如通过过滤、离心或透析。经固定化的分子可以是以可逆或不可逆的方式进行固定化的。例如, 如果分子与载体通过可以经由添加高浓度的盐而掩蔽的离子相互作用来进行相互作用, 或如果分子通过可裂开的共价键例如二硫桥(其可以通过添加含巯基的试剂来进行裂开) 进行结合, 那么固定化是可逆的。相反地, 如果分子通过不能在水溶液中裂开的共价键(例如, 通过经常用于将赖氨酸侧链偶联至亲和柱的环氧化物基团和胺基团的反应而形成的键) 而拴系至载体, 那么固定化是不可逆的。蛋白质可以间接地进行固定化, 例如通过使抗体或其他对于该分子具有亲和力的实体固定化, 随后是复合物的形成, 以致于分子-抗体复合物被固定化。各种不同的用于使分子固定化的方式描述在文献中, 例如在Kim, D., Herr和A.E. (2013), *Protein immobilization techniques for microfluidic assays*, *Biomicrofluidics* 7 (4), 041501中。另外, 各种不同的用于固定化反应的试剂和试剂盒是商购可得的, 例如购自Pierce Biotechnology。

[0083] 必要的是, 用于按照根据本发明的自身抗体的检测进行诊断的样品包含抗体, 其也称为免疫球蛋白。典型地, 体液样品包含代表性的一全套受试者的免疫球蛋白。但是, 一旦提供了, 可以使样品经历进一步的加工, 其可以包括分级分离、离心、富集或分离受试者的全体免疫球蛋白或任何免疫球蛋白类别, 这可以影响各种不同类别的免疫球蛋白的相对分布。

[0084] 在本申请全文中所描述的试剂、装置、方法和用途可以用于疾病诊断。在优选实施方案中, 所述疾病为神经系统疾病。在更优选实施方案中, 本文所使用的术语“神经系统疾病”是指任何与神经系统的缺陷相关的疾病, 在另一优选实施方案中, 如本文所用, 术语“PNS”(副肿瘤性神经综合征的缩写) 是指由于存在肿瘤而间接引起的全身性病症, 例如由于物质如通常不产生的激素或细胞因子的产生释放通过肿瘤起源的细胞或以增加的浓度产生或产生和释放生物活性细胞。肿瘤可能太小而无法检测。

[0085] 在优选实施方案中,本文所使用的术语“诊断”是指任何类型的旨在下列目的的程序:获得在评估患者是否在过去、在诊断之时或在未来罹患或可能罹患或比平均或比较受试者(其优选具有相似的症状)更可能罹患某种疾病或病症之中有帮助的信息;发现疾病正在如何进展或在未来可能如何进展;或者评价患者对于某一治疗(例如,施用免疫抑制药物)的应答性。换言之,术语“诊断”不仅包括诊断,而且还包括预测和/或监测疾病或病症的过程。

[0086] 在许多情况下,单纯的检测(换言之,测定样品中是否存在可检测水平的抗体)对于诊断来说是足够的。如果可以检测到自身抗体,那么这将是对于临床医师的诊断来说有帮助的信息,并且指明了增加的患者罹患疾病的可能性。在优选实施方案中,如果可以使用选自包含免疫沉淀、间接免疫荧光、ELISA或线性斑点印迹的组的一种或多种方法、优选免疫沉淀检测自身抗体,则该自身抗体被认为是可检测的。实验细节在本申请的实验部分中描述,或者如在本申请的优先权日期可获得的教科书或实践手册中所述。在优选实施方案中,可以测定相比于在平均健康受试者中可以发现的水平而言的在血清中抗体的相对浓度。尽管在许多情况下测定自身抗体在样品中是否存在或可检测可以是足够的,但是为了获得对于诊断来说有帮助的信息而实施的方法可以包括测定浓度是否以至少0.1倍,优选以0.2、0.5、1、2、5、10、20、25、50、100、200、500、1000、10000或100000倍比在平均健康受试者中所发现的浓度高。在优选实施方案中,使用选自包含半定量免疫沉淀、半定量间接免疫荧光、ELISA或半定量线性斑点印迹的组的一种或多种方法,优选ELISA测定自身抗体的相对浓度。实验细节在本申请的实验部分中描述,或者如在本申请的优先权日期可获得的教科书或实践手册中所述。

[0087] 本领域技术人员将会意识到,临床医师通常并不仅仅基于单一的诊断参数来对患者是否罹患或可能罹患疾病、病况或病症作出结论,而是需要考虑其他方面,例如其他自身抗体、标志物的存在、血液参数、患者症状的临床评估或者医学成像或其他非侵入性方法(例如,多导睡眠描记法)的结果,以便达到结论性的诊断。参见Baenkler H.W. (2012), General aspects of autoimmune diagnostics, Renz, H., Autoimmune diagnostics, 2012, de Gruyter, 第3页。诊断试剂或方法的价值也可以在于可能排除一种疾病,因此允许间接诊断另一种疾病。在优选实施方案中,贯穿本申请提及的任何症状或疾病的含义与在本申请的申请日或优选最早的优先权日之时本领域技术人员理解的一致,如由教科书和科学出版物证明的。

[0088] 因此,术语“诊断”优选不是暗示根据本发明的诊断方法或试剂对于基于单一测试(更不必说参数)来完成诊断来说将会是确定的和足够的,而是可以是指对于所谓的“鉴别诊断”(即基于一系列诊断参数考虑了一系列可能病况的可能性的系统诊断程序)的贡献。因此,本发明的方法、多肽或用途(其任选地用于确定患者是否罹患疾病)可以包括:从患者(优选人患者)中获得样品;测定在所述样品中是否存在与DNM1结合的自身抗体,其中所述测定通过下述方式来进行,使样品与本发明的多肽相接触并检测在所述多肽和所述自身抗体之间是否出现结合,优选通过使用经标记的二抗来进行检测,其中所述自身抗体如果存在于样品中则与所述多肽相结合;和如果测定到自身抗体存在于样品中,则将患者诊断为罹患或更可能罹患所述神经系统病症。

[0089] 在优选实施方案中,根据本发明的方法包括除了检测针对DNM1的自身抗体之外检

测来自包含针对多肽NSF、STX1B、VAMP2、GAD65、GAD67、IA-2、ZNT8和双载蛋白中的每一个的自身抗体的组的超过一种自身抗体。在更优选实施方案中,该另外的检测步骤可以涉及:a)检测来自包含针对多肽GAD65、GAD67、IA-2、ZNT8和双载蛋白中的每一个、优选GAD65和GAD67的自身抗体的组的自身抗体,并且b)检测来自包含针对多肽NSF、STX1B、VAMP2中的每一个、优选NSF的自身抗体的组的自身抗体。

[0090] 术语“诊断”还可以是指用于在两个或更多个与相似或相同的症状相关的病况之间进行区分的方法或试剂。

[0091] 术语“诊断”还可以是指用于为患者选择最有希望的治疗方案的方法或试剂。换言之,所述方法或试剂可以涉及为受试者挑选治疗方案。例如,检测到自身抗体可以表明,将会选择免疫抑制疗法,其可以包括向患者施用一种或多种免疫抑制药物。

[0092] 本发明涉及包含与本发明的多肽相结合的抗体(优选地,自身抗体)的复合物。作为用于诊断疾病的方法的一部分,可以使用或检测这样的复合物。如果待检测针对DNM1的自身抗体,来自受试者的包含抗体的液体样品可以用于实施所述方法。这样的液体样品可以是任何来自受试者的包含具有代表性的一组抗体的体液,优选来自受试者的包含IgG免疫球蛋白类别的抗体的样品。例如,样品可以是脑脊液(CSF)、血液或血清、淋巴、组织液,优选是血清或CSF,更优选是血清。

[0093] 使包含抗体的液体样品与本发明的多肽相接触的步骤可以通过下述方式来进行:在包含抗体的样品存在下,在与包含各自多肽和结合本发明多肽的抗体(优选自身抗体)的复合物形成相容的条件下,孵育固定化形式的所述多肽。随后,可以移除在那时耗尽了与本发明的多肽相结合的抗体的液体样品,接着是一个或多个洗涤步骤。最后,可以检测包含所述抗体和所述多肽的复合物。在优选实施方案中,术语“与复合物形成相容的条件”是这样的条件,其允许特异性的抗原-抗体相互作用从而建立包含所述多肽和所述抗体的复合物。在优选实施方案中,此类条件可以包括将所述多肽在于PBS缓冲液中以1:100稀释的样品中在25℃下孵育30分钟。在优选实施方案中,本文所使用的术语“自身抗体”是指与产生所述自身抗体的动物(优选哺乳动物)的内源性分子特异性地结合的抗体,其中与普通健康人或未患该疾病的人、优选健康人相比,这种抗体的水平更优选升高。在最优选的实施方案中,自身抗体是与DNM1结合的自身抗体。

[0094] 根据本发明的方法优选为体外方法。

[0095] 在优选实施方案中,用于根据本发明的预后、诊断、方法或测试试剂盒的复合物的检测包括使用选自包含以下的方法:免疫扩散技术,免疫电泳技术,光散射免疫测定,凝集技术,标记免疫测定例如选自包含放射性标记免疫测定、酶免疫测定、优选ELISA、化学发光免疫测定和免疫荧光、优选间接免疫荧光技术的那些。本领域技术人员熟悉这些方法,其也描述在现有技术中,例如在Zane,H.D.(2001),Immunology-Theoretical&Practical Concepts in Laboratory Medicine,W.B.Saunders Company中,特别是在第14章中。

[0096] 或者,可以使用除了液体样品之外的包括包含本发明多肽的组织样品。所述组织样品优选来自表达内源性DNM1的组织,优选以与相应生物体、优选人体中的平均组织相比增加的水平表达所述多肽。然后,可以使这样的样品(其可以以固定在载体例如用于显微分析的载玻片上的组织切片的形式)与结合本发明多肽的本发明抗体(优选自身抗体)相接

触。优选地,对所述抗体进行标记以允许与结合本发明多肽的内源性抗体相区分,从而使得可以对新形成的复合物进行检测,和任选地进行定量。如果所形成的复合物的量低于在取自健康受试者的样品中所发现的量,那么受检查样品所取自的受试者可能罹患疾病。

[0097] 可以将任何证明包含抗体和本发明多肽的复合物存在或不存在的与参考数据相关联。例如,检测到所述复合物指示,提供所分析样品的患者已经罹患、正在罹患或在未来可能罹患疾病。如果患者以前已被诊断并且再次运行用于获得在诊断上有关的信息的方法,那么可以将在这两次运行中检测到的复合物的量相关联以获悉有关疾病进展和/或治疗成功的信息。例如,如果发现复合物的量增加,那么这暗示病症正在进展从而可能在未来显现症候,和/或所尝试的任何治疗是不成功的。

[0098] 在优选实施方案中,使用微滴定板、膜、斑点印迹或线性斑点印迹之类的印迹来实施根据本发明的诊断方法。本领域技术人员熟悉实验设置,其描述在现有技术 (Raoult, D. 和 Dasch, G. A. (1989), *The line blot: an immunoassay for monoclonal and other antibodies. Its application to the serotyping of gram-negative bacteria*. *J. Immunol. Methods*, 125 (1-2), 57-65; W02013041540) 中。

[0099] 在另一优选实施方案中,按照本发明教导的预后、诊断、方法或测试试剂盒考虑使用间接免疫荧光。本领域技术人员熟悉此类技术和合适样品的制备,其描述在现有技术 (US4647543; Voigt, J., Krause, C., **Rohwäder**, E., Saschenbrecker, S., Hahn, M., Danckwardt, M., Feirer, C., Ens, K., Fechner, K., Barth, E., Martinetz, T. 和 **Stöcker**, W. (2012), *Automated Indirect Immunofluorescence Evaluation of Antinuclear Autoantibodies on HEp-2 Cells*, "Clinical and Developmental Immunology, vol. 2012, doi:10.1155/2012/65105; Bonilla, E., Francis, L., Allam, F. et al., *Immunofluorescence microscopy is superior to fluorescent beads for detection of antinuclear antibody reactivity in systemic lupus erythematosus patients*, *Clinical Immunology*, vol. 124, no. 1, pp. 18-21, 2007) 中。合适的试剂、装置和软件包是商购可得的,例如购自 EUROIMMUN, Lübeck, Germany。

[0100] 可以对样品进行测试以仅确定是否存在与 DNM1 结合的自身抗体,但是优选诊断方法、测试、装置等考虑确定是否存在针对一种或多种其他多肽的自身抗体,所述多肽优选与神经系统自身免疫疾病相关,优选选自包含以下的组: Hu、Yo、Ri、CV2、PNMA1、PNMA2、DNER/Tr、ARHGAP26、ITPR1、ATP1A3、NBC1、神经软骨蛋白、CARPVIII、Zic4、Sox1、Ma、MAG、MP0、MBP、GAD65、双载蛋白、恢复蛋白、GABA A 受体 (EP13189172.3)、GABA B 受体 (EP2483417)、甘氨酸受体、桥蛋白 (gephyrin)、IgLON5 (2016/0349275)、DPPX (US2015/0247847)、水孔蛋白-4、MOG、NMDA 受体、AMPA 受体、GRM1、GRM5、LGI1、VGCC 和 mGluR1 和 CASPR2, 该抗原优选是经固定化的,例如固定在医学装置例如线性斑点印迹上。在更优选实施方案中,检测针对 DNM1 的自身抗体和针对 GAD65 的自身抗体。已经在现有技术中描述了可以另外检测针对诊断相关标志物神经软骨蛋白 (EP15001186)、ITPR1 (EP14003703.7)、NBC1 (EP14003958.7)、ATP1A3 (也称为人神经元 Na⁺/K⁺ ATP 酶的 $\alpha 3$ 亚基 (EP14171561.5))、Flotillin1/2 (EP3101424) 和 RGS8 (EP17000666.2) 的一种或多种的自身抗体。

[0101] 根据本发明的教导,提供用于疾病诊断的与本发明的多肽相结合的抗体、优选自身抗体。本领域技术人员熟悉用于纯化抗体的方法,例如在 Hermanson, G. T., Mallia, A. K.

和Smith,P.K.(1992), Immobilized Affinity Ligand Techniques, San Diego: Academic Press中所描述的那些方法。简而言之,将与目的抗体(其抗原是本发明的多肽)特异性地结合的抗原固定化,并用于经由亲和色谱来从适当的来源中纯化出目的抗体。来自罹患疾病的患者的包含抗体的液体样品可以用作来源。

[0102] 根据本发明,提供能够与本发明的多肽特异性地结合的抗体,例如自身抗体。在优选实施方案中,本文所使用的术语“抗体”是指任何基于免疫球蛋白的结合部分,更优选包含至少一个免疫球蛋白重链和至少一个免疫球蛋白轻链的结合部分,其包括但不限于单克隆和多克隆抗体以及抗体的变体,特别是片段,所述结合部分能够与各自的抗原相结合,更优选与之特异性地结合。在优选实施方案中,本文所使用的术语“特异性地结合”表示,所述结合比以 $1 \times 10^{-5} \text{M}$,更优选 $1 \times 10^{-7} \text{M}$,更优选 $1 \times 10^{-8} \text{M}$,更优选 $1 \times 10^{-9} \text{M}$,更优选 $1 \times 10^{-10} \text{M}$,更优选 $1 \times 10^{-11} \text{M}$,更优选 $1 \times 10^{-12} \text{M}$ 的解离常数为特征的结合反应更强,所述解离常数通过使用Biacore设备在 25°C 下在pH 7的PBS缓冲液中通过表面等离子体共振来测定。所述抗体可以是自身抗体制备物的一部分,所述自身抗体制备物是异源的或可以是同源的自身抗体,其中异源制备物包含许多不同的自身抗体种类,如通过从人供者血清进行制备而可获得的,例如通过使用经固定化的抗原进行亲和层析以纯化任何能够与所述抗原相结合的自身抗体。所述抗体可以是经糖基化的或非糖基化的。本领域技术人员熟悉可以用于鉴定、产生和纯化抗体及其变体的方法,例如在EP 2423226A2以及其中的参考文献之中所描述的那些方法。所述抗体可以用作诊断试剂,单独地,或相组合地,例如与本发明的多肽复合。

[0103] 本发明提供了用于分离与本发明的多肽相结合的抗体(优选自身抗体)的方法,其包括下列步骤:a)使包含该抗体的样品与本发明的多肽相接触,从而形成复合物,b)分离在步骤a)中形成的复合物,c)解离在步骤b)中分离的复合物,和d)将该抗体与本发明的多肽分开。可以将来自罹患由发明人所鉴定的新的神经系统病症的患者的样品用作抗体的来源。合适的方法描述在现有技术中,例如在由GE Healthcare Life Sciences公开的手册“Affinity chromatography”、“Strategies for Protein Purification”和“Antibody Purification”(2009/2010)中,和在Philips,Terry,M.,Analytical techniques in immunochemistry,1992,Marcel Dekker,Inc中。

[0104] 本发明提供了包含本发明的多肽的药物组合物,所述组合物优选适合于向受试者,优选哺乳动物受试者,更优选人进行施用。这样的药物组合物可以包含药学上可接受的载体。所述药物组合物可以例如经口服途径、经肠胃外途径、通过吸入喷雾剂、经局部途径、通过滴眼剂、经直肠途径、经鼻途径、经颊途径、经阴道途径或经由植入型储器进行施用,其中本文所使用的术语“经肠胃外途径”包括皮下、皮内、静脉内、肌肉内、关节内、滑膜内、胸骨内、鞘内、损伤内和颅内注射或输注技术。所述药物组合物可以以合适的剂型来提供,例如胶囊、片剂以及水性悬浮液和溶液,优选以无菌的形式。它可以在治疗疾病的方法中进行使用,所述方法包括向受试者施用有效量的本发明的多肽。在优选实施方案中,本发明提供了包含本发明的多肽的疫苗,其任选地包含辅助试剂例如佐剂或缓冲液;和本发明的多肽用于制备疫苗的用途。

[0105] 在本发明的范围内,提供了包含优选包被有用于检测本发明(自动)抗体和/或本发明多肽的试剂的医疗或诊断装置。优选地,这样的医疗或诊断装置包含本发明的多肽,其形式允许以直接的方式使其与水溶液、更优选液体人样品接触。特别地,包含的本发明的多

肽可以固定在载体的表面上,所述载体优选选自包含以下的组:玻璃板或载玻片,生物芯片,微量滴定板,珠,例如磁珠,血液成分分离(apheresis)装置,色谱柱,膜等。示例性医学装置包括线性斑点印迹,微量滴定板,显微镜用载玻片,珠,优选磁珠,和生物芯片。除了本发明的多肽之外,医疗或诊断装置可以包含另外的多肽,例如阳性或阴性对照,例如包含或不包含与目标多肽结合的抗体的样品,或与诊断价值的自身抗体结合的已知的其他抗原,特别是涉及与一种或多种相同或类似症状相关的其他疾病的那些。

[0106] 本发明的教导提供了试剂盒,其优选用于诊断疾病。这样的试剂盒可以包含详细说明如何使用该试剂盒的说明书,和用于使本发明的多肽与来自受试者(优选人受试者)的体液样品相接触的工具,例如线性斑点印迹,其中本发明的多肽被固定化在线性斑点印迹上。进一步地,所述试剂盒可以包含阳性对照,例如一批已知与本发明的多肽相结合的自身抗体或重组抗体;和阴性对照,例如与本发明的多肽不具有可检测的亲力的蛋白质例如牛血清白蛋白。最后,这样的试剂盒可以包含用于制备校准曲线的抗体或抗原的标准溶液。

[0107] 在优选实施方案中,所述试剂盒包含用于检测与本发明的多肽相结合的自身抗体的工具,所述检测优选通过检测包含本发明的多肽和与本发明的多肽相结合的抗体的复合物来进行。这样的工具优选是这样的试剂,所述试剂与所述复合物相结合并且修饰该复合物或者携带标记从而使得该复合物可检测。例如,所述工具可以是经标记的抗体,其在除了被一抗所识别的结合位点之外的其他结合位点处与所述多肽相结合或者与一抗的恒定区相结合。备选地,所述工具可以是与所述自身抗体的恒定区相结合的二抗,优选对于哺乳动物IgG类抗体来说特异的二抗。许多用于检测此类复合物的方法和工具在现有技术中已有描述,例如在Philips,Terry,M.,Analytical techniques in immunochemistry,1992, Marcel Dekker, Inc中。

[0108] 包含DNM1的多肽或其变体的本发明的多肽可以以包含和/或表达编码所述多肽的核酸的细胞的形式来产生或提供。如果使用包含编码本发明的多肽或其变体的序列的核酸,那么这样的核酸可以是未修饰的核酸。在优选实施方案中,所述核酸为这样的核酸,其本身不在自然界中出现,并且相比于天然核酸而言包含至少一个修饰,例如同位素内容物或化学修饰,例如甲基化、序列修饰、标记等,其指示了合成来源。在优选实施方案中,所述核酸为重组核酸,和在更优选实施方案中,为载体的一部分,在所述载体中它可以与允许所述核酸表达(优选过表达)的启动子功能性地相连接。本领域技术人员熟悉各种各样的合适的载体,其是商购可得的,例如购自Origene。例如,可以使用编码具有C-末端GFP的融合构建体的载体。所述细胞可以是真核或原核细胞,优选真核细胞,例如酵母细胞,和更优选为哺乳动物细胞,更优选人细胞例如HEK293细胞。哺乳动物细胞的实例包括HEK293、CHO或COS-7细胞。包含编码本发明的多肽的核酸的细胞可以是重组细胞或分离的细胞,其中术语“分离的”表示,所述细胞是经富集的,从而使得相比于所述细胞的野生型的环境而言,存在很少的其他分化或种类的细胞或者实际上不存在这样的其他细胞。

[0109] 本发明的教导可以不仅用于诊断,而且还用于预防或治疗疾病,更特别地,用于预防或治疗疾病的方法,其包括下列步骤:a)降低在受试者血液中与本发明的多肽相结合的自身抗体的浓度,和/或b)施用一种或多种免疫抑制药物质,其优选选自包含以下的组:利妥昔单抗、波尼松、甲波尼龙、环磷酰胺、吗替麦考酚酯、静脉内免疫球蛋白、他克莫司、环孢菌素、氨甲蝶呤、硫唑嘌呤,和/或药物组合物。

[0110] 在优选实施方案中,本发明提供了用于检测针对DNM1的自身抗体或检测编码DNM1的核酸或变体或包含所述核酸的载体或细胞的工具在用于制备用于诊断疾病如僵人综合征的试剂盒中的用途。在另一个优选实施方案中,本发明提供了用于检测针对DNM1的自身抗体,或检测编码DNM1的核酸或其变体或者包含所述核酸的载体或细胞的试剂在用于制备用于诊断疾病如僵人综合征的试剂盒中的用途。

[0111] 在优选实施方案中,根据本发明的任何方法或用途可用于非诊断用途,即用于除诊断患者之外确定针对DNM1的自身抗体的存在。例如,所述方法或用途可以用于体外测试医学装置的效率,所述医学装置设计用于从患者血液中去掉自身抗体,其中所述测试是对患者血液以外的液体进行的。在优选实施方案中,根据本发明的任何方法或用途可用于产生自身抗体谱,优选用于检测哺乳动物、优选人的疾病。在优选实施方案中,任何方法或用途可以用于检测来自神经系统疾病患者的样品中的疾病相关标志物。

附图说明

[0112] 图1显示了在总裂解物免疫沉淀后蓝色银染色凝胶的图像,以证明患者血清对DNM1的拉下(pull-down)。

[0113] 图2显示了蓝色银染色凝胶的图像,显示冷冻免疫沉淀后DNM1的拉下。

[0114] 图3显示了患者的血清表现出针对从小脑富含DNM1的反应性。

[0115] 图4显示了与对照相比,患者队列描绘了针对DNM1的AAb显著更高的患病率(prevalence)。

[0116] 本发明包括一系列序列,更具体地

[0117] SEQ ID NO:19 (DNM1)

[0118] MGNRGMEDLIPLVNRLQDAFSAIGQNADLDLPQIAVVGGSAGKSSVLENFVGRDFLPRGSGIVTRRPL
VLQLVNATTEYAEFLHCKGKKFTDFEEVRLEIEAETDRVTGTNGISPVPINLRVYSPHVLNLTLDLPGMTKVPVG
DQPPDIEFQIRDMLMQFVTKENCLILAVSPANSDLANSALKVAKEVDPQGQRTIGVITKLDLMDEGTDARDVLENK
LLPLRRGYIGVVNRSQKDIDGKKDITAALAAERKFFLSHPYSYRHLADRMGTPYLQKVLNQQLTNHIRDTPGLRNKL
QSQLLSIEKEVEEYKNFRPDDPARKTKALLQMVQQFAVDFEKRIEGSGDQIDTYELSGGARINRIFHERFPFELVKM
EFDEKELRREISYAIKNIHGIRTGLFTPDMAFETIVKKQVKKIREPCLKCVDMMVISELISTVRQCTKKLQQYPRLRE
EMERIVTTHIREREGRTKEQVMLLIDIELAYMNTNHEDFIGFANAQQRSNQMNKKKTSGNQDEILVIRKGWLTINNI
GIMKGSKEYWFVLTAENLSWYKDDEEKEKKYMLSVDNLKLRDVEKGFMSKHIFALFNTEQRNVYKDYRQLELACE
TQEEVDSWKASFLRAGVYPERVGDKEKASETEENGSDSFMHSM DPQLERQVETIRNLVDSYMAIVNKTVRDLMPKTI
MHLMINNTKEFIFSELLANLYSCGDQNTLMEESAEQAQRREMLRMYHALKEALSIIGDINTTTVSTPMPPPVDDSW
LQVQSVPAARRSPTSSPTPQRRAPAVPPARPGSRGPAPGPPAGSALGGAPPVPSRPGASDPFGPPPQVPSRPNRA
PPGVPSRSGQASPSRPESPRPPFDL

[0119] SEQ ID NO:20

[0120] gggcgggggccccgcggcgagcagtcctggcgcgcgcgctgcagcgggcgagccggagtcggagccg
ggagcgctagcggcagccggatcgagcctgcggggccccgcgcagccatgggcaaccgcggcatggaagatctca
tcccgctggtcaaccggctgcaagacgccttctctgccatcgccagaacgcggacctgcacctgccgcagatcg
tgtggtggcgccagagcgccggcaagagctcggtgctcgagaatttcgtaggcagggacttcttgccctcgagga
tctggcattgtcaccgcagctccccctggtcttgcagctggtcaatgcaaccacagaatatgccgagttcctgcact

gcaagggaaagaaattcaccgacttcgaggaggtgcgcttgagatcgaggccgagaccgacagggtcaccggcac
caacaagggcatctcgccggtgcctatcaacctccgcttactcgccgcacgtgctgaacctgacctgggtggac
ctgcccggaatgaccaaggtcccgggtgggggaccaacctcccgacatcgagttccagatccgagacatgcttatgc
agtttgtaccaaggagaactgcctcatcctggccgtgtcccccgccaactctgacctggccaattctgacgcct
caaggtcgccaaggaggtggacccccaggggcagcgacccatcggggtcatcaccaagctggacctgatggacgag
ggcacagatgcccgtgatgtgctggagaacaagctgctccccctgcgagaggctacattggagtggtgaaccgga
gccagaaggacattgatggcaagaaggacattaccgcccgttggtgctgaacgaaagtcttctctccatcc
atcttatcgccacttggtgacctatgggcacgcctacctgcagaaggtcctcaatcagcaactgacgaaccac
atccgggacacactgcccgggctgcggaacaagctgcagagccagctactgtccattgagaaggaggtggaggaat
acaagaacttccgccctgatgaccagctcgcaagaccaaggccctgctgcagatggtccagcagttcgccgtaga
ctttgagaagcgcattgagggtcaggagatcagatcgacacctacgaactgtcagggggagcccgcattaaccga
atcttccacgagcgcttcccttctgagctgggtcaagatggagtttgatgagaaggaaactccgaaggagatcagct
atgctatcaagaatatccatggcattagaacggggctgtttaccccagacatggcctttgagaccattgtgaaaaa
gcaggtgaagaagatccgagaaccgtgtctcaagtgtgtggacatggttatctcgagctaatcagcaccttaga
cagtgaccaagaagctccagcagtagccgcggtacgggaggagatggagcgcacgtgaccacccacatccggg
agcgcgagggccgcactaaggagcaggtcatgttctcatcgatatcgagctggcttacatgaacaccaacctga
ggacttcataggtttgccaatgtcagcagaggagcaaccagatgaacaagaagaagacttcagggaaccaggat
gagattctgggtcatccgcaagggtggctgactatcaataatattggcatcatgaaagggggctccaaggagtact
ggtttgtgctgactgctgagaatctgtcctgggtacaaggatgatgaggagaaagagaagaatacatgctgtctgt
ggacaacctcaagctgcccggacgtggagaagggtttatgtcgagcaagcatatctttgccctctttaacacggag
cagaggaatgtctacaaggattatcggcagctggagctagcctgtgagacacaggaggaggtggacagctggaagg
cctccttctgagggtggcgtgtacctgagcgtgttggggacaaagagaaagccagcgagaccgaggagaatgg
ctccgacagcttcatgcattccatggaccacagctggaacggcaagtggagaccatccggaatcttgtggactca
tacatggccattgtcaacaagaccgtgagggacctcatgcccagaccatcatgcacctcatgattaacaatacca
aggagtcatcttctcgagctgctggccaacctgtactcgtgtggggaccagaacacgctgatggaggagtggc
ggagcaggcacagcggcgcgacgagatgctgcgcatgtaccacgcactgaaggaggcgtcagcatcatcgcgac
atcaacacgaccaccgtcagcacgcccattgccccgcccgtggacgactcctggctgcaggtgcagagcgtaccgg
ccggagcgaggctgcccacgtccagccccacgcccagcgccgagcccccgccgtgccccagccccggccgggtc
gcggggccctgctcctgggctccgctgctgggtccgcccctggggggggcgcccccgctgccctccaggccgggg
gcttccccctgacctttcgccctccccctcaggtgccctcgcccccaaccgcgccccgcccgggtccccagcc
gatcgggtcaggcaagtccatcccgtcctgagagccccagcccccttcgacctctaaacagatccctcctcttc
tcggagacctccctttccaagctgctggacggctgttctgtgacttgacagtggtccccagccccaaagcca
gcccccttcatctgtgacttaatctgttgtagtgggtgagctgatacattcaggtgtgaccttggtgaaaacttgt
gcccccttctgtggtatgcccttgccctgttctataaatactctataaatactcataatatatacacacctacacatgg
ccaaccgcctcgcccttagcgtgggaatcagtcactgtgctatccttgtggagtcttgtggcccaactaccagag
aacgtgtcccccgacatccactccaaagtgtgccacctccagtgagcctccttgtcatgcccggcctgtggaca
gccagccccgcatccctcccacccccctaccaagcatgggggtgctgtgcaggcagccgtgtggcctgacagttt
ctaccagtctgtgtccctcggtgagaataaaacccatttctggatgatggggaatgtcaaaaaaaaaaaaaaa

[0121] 通过以下非限制性实施例进一步说明本发明,可以从这些实施例中取得本发明的

其它特征、实施方案、方面和优点。

具体实施方式

[0122] 实施例

[0123] 概要

[0124] 方法:对两个患有特发性脑炎和具有自身免疫背景的患者(P1-P2)进行血清学调查。为此,来自两个患者的血清和来自P2的匹配的脑脊液(CSF)通过间接免疫荧光测定(IFA)和免疫印迹进行全面的自身抗体筛选。用小脑裂解物进行免疫沉淀接着进行质谱(MS)用来鉴定自身抗原,其通过用针对各自靶抗原的单特异性动物抗体的蛋白质印迹(WB)以及通过HEK293细胞中的重组表达和使用免疫分析中的重组蛋白来进行验证。此外,针对自身抗体筛选具有神经系统症状和确定的抗神经自身抗体的患者血清、具有与患者1和2相似的染色模式而没有已知自身抗体反应性的血清以及阴性对照血清。另外用作为底物的其他重组SNARE复合物蛋白通过IFA或蛋白质印迹分析所有血清。

[0125] 患者

[0126] 对照组包括45个健康供体,33个患有神经系统症状和具有确定的抗神经自身抗体的患者(3x抗CASPR2、3x抗NMDAR、3x抗LGI1、3x抗Hu、3x抗Ri、2x抗Yo/抗Ri、3x抗Yo、3x抗AQP4、10x抗GAD65)和10种具有与P1和P2相似的染色模式而没有已知自身抗体反应性的血清。

[0127] 间接免疫荧光测定(IFA)

[0128] 使用具有脑组织冰冻切片(大鼠的海马、大鼠和猴的小脑)的生物芯片阵列的载玻片与分别表达30种不同的脑抗原的重组HEK293细胞组合进行IFA,所述30种不同的脑抗原为Hu、Yo、Ri、CV2、PNMA2、ITPR1、Homer 3、CARP VIII、ARHGAP26、ZIC4、DNER/Tr、GAD65、GAD67、双载蛋白、恢复蛋白、GABA_B受体、甘氨酸受体、DPPX、IgLON5、谷氨酸受体(类型NMDA、AMPA、mGluR1、mGluR5、GLURD2)、LGI1、CASPR2、AQP4(M1和M23)、MOG、ATP1A3、NCDN(EUROIMMUN,FA 111a-1003-51,FA 1112-1003-50,FA-1128-1003-50,FA112d-1003-1,FA 112m-1003-50,FA 1151-1003-50,Miske R,Hahn S,Rosenkranz T,Müller M,Dettmann IM,Mindorf S,Denno Y,Brakopp S,Scharf M,Teegen B,Probst C,Melzer N,Meinck HM,Terborg C,**Stöcker**W,Komorowski L.,2016,Autoantibodies against glutamate receptor δ 2 after allogenic stem cell transplantation.Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.,3(4):e255;Scharf M,Miske R,Heidenreich F,Giess R,Landwehr P,**Blöcker**IM,Begemann N,Denno Y,Tiede S,**Dährich**C,Schlumberger W,Unger M,Teegen B,**Stöcker**W,Probst C,Komorowski L,2015,Neuronal Na⁺/K⁺ATPase is an autoantibody target in paraneoplastic neurologic syndrome,Neurology;84(16):1673-9;Miske R,Gross CC,Scharf M,Golombeck KS,Hartwig M,Bhatia U,Schulte-Mecklenbeck A,**Bönte**K,Strippel C,**Schöls**L,Synofzik M,Lohmann H,Dettmann IM,Deppe M,Mindorf S,Warnecke T,Denno Y,Teegen B,Probst C,Brakopp S,Wandinger KP,Wiendl H,**Stöcker**W,Meuth SG,Komorowski L,Melzer N,2016,Neurochondrin is a neuronal target antigen in autoimmune cerebellar degeneration,Neurol

Neuroimmunol Neuroinflamm.;4(1):e307))。将每个生物芯片镶嵌体(biochip mosaic)与70 μ L经PBS稀释的样品在室温下孵育30分钟,用PBS-Tween洗涤并浸入PBS-Tween中5分钟。在第二步中,应用Alexa488标记的山羊抗人IgG(Jackson Research,Suffolk,United Kingdom)或异硫氰酸荧光素(FITC)标记的山羊抗人IgG(EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG,Lübeck)并在室温孵育30分钟。用PBS-Tween冲洗再次洗涤载玻片,然后浸入PBS-Tween中5分钟。将载玻片埋在PBS缓冲的含甘油的DABCO(每个视野约20 μ L)中并通过荧光显微镜检查。包括阳性和阴性对照。与未转染的细胞和对照样品直接比较,根据转染细胞的荧光强度将样品分类为阳性或阴性。终点效价是指能够显示可见荧光的最后稀释度。

[0129] 由两个独立观察员使用EUROSTAR II显微镜(EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG,Lübeck,Germany)评估结果。如果没有另外指定,从Merck,Darmstadt,Germany和Sigma-Aldrich,Heidelberg,Germany获得试剂。

[0130] 猪小脑裂解物的制备

[0131] 屠宰动物后解剖猪的小脑,并在-80 $^{\circ}$ C下快速冷冻直至进一步使用。如Miske等人(Miske等人,2017)所述,裂解物制备在4 $^{\circ}$ C下进行。简言之,将组织在冷冻状态下称重,解冻,并用手术刀切成小块。将捣碎的组织转移到离心管(falcon tube)(Sarstedt AG&Co,Germany)中,每克组织加入5倍体积的基于洗涤剂的增溶缓冲液和蛋白酶抑制剂混合物(cocktail)。然后使用MICCRA D-9匀浆器将混合物均化成浆。均化步骤进行两次(C级),每个循环之间有5分钟的暂停。随后,使用具有两种不同研杵(柱塞)尺寸的Dounce匀浆器进一步裂解细胞,每种实施10次。研杵尺寸“大”用于产生均匀混合物,并且研杵尺寸“小”用于产生最大摩擦和细胞破碎。在使小脑裂解物混合物均化时,小心注意避免过多的起泡。然后将该匀浆在台式转子上于4 $^{\circ}$ C孵育3小时。孵育后,将匀浆在21,000 $\times$ g,4 $^{\circ}$ C下离心15分钟,小心地移取含有溶解的蛋白质的澄清上清液并转移到新鲜的Eppendorf微量离心管(Eppendorf GmbH,Germany)中并在-80 $^{\circ}$ C下储存直至进一步使用。

[0132] 总裂解物免疫沉淀

[0133] 在IFA之后,实施总裂解物免疫沉淀以鉴定患者AAb靶向的未知抗原。如Miske等人先前所述进行该测试(Miske等,2017)。

[0134] 冷冻免疫

[0135] 称为“冷冻免疫沉淀”的免疫沉淀分析的另一种变体作为前一方法的互补进行。如Scharf等人所述,该方案是对Histo-免疫沉淀的略微修改(Scharf等,2015)。与先前的技术类似,解剖猪小脑并在液氮中瞬间冷冻(shock-frozen)。然后使用Leitz 1720 Cryostat切片机将小脑连续切成25 $\times$ 25 μ m的冷冻切片,并加入到每孔含有3ml冷冻-IP-PBS缓冲液的四孔板(Sarstedt AG&Co,Germany)中。总共将来自患者与对照的30 μ l血清加入各自的孔中,并在摇床上在4 $^{\circ}$ C下孵育3小时。随后,将每个孔的内容物转移到新鲜的2ml Eppendorf管中,并在4 $^{\circ}$ C下以2500rpm离心5分钟。弃去上清液,随后用1ml PBS/Tween洗涤沉淀三次,每次循环之间进行类似的离心步骤。然后将沉淀用1ml溶解缓冲液加蛋白酶-抑制剂混合物溶解,并用移液管充分匀浆。将混合物在4 $^{\circ}$ C下孵育1小时,并在4 $^{\circ}$ C下以16,000 $\times$ g离心20分钟。将上清液收集在分开的Eppendorf管中,并将沉淀储存在-20 $^{\circ}$ C下用于分析。如在先前方法中所进行的,将50 μ l **Dynabeads®**蛋白G珠与上清液在4 $^{\circ}$ C孵育过夜以捕获免疫复合

物。孵育后,如前所述洗涤珠并洗脱。

[0136] 抗原的鉴定

[0137] 解剖大鼠的小脑并在液氮中快速冷冻。用Micra D-8 (Roth,Karlsruhe,Germany)和手动匀浆器 (Sartorius, **Göttingen**,Germany) 在含有蛋白酶抑制剂 (Complete mini, Roche Diagnostics,Penzberg,Germany) 的增溶缓冲液 (100mmol/L tris-HCl pH 7.4、150mmol/L氯化钠、2.5mmol/L乙二醇四乙酸、0.5% (w/v) 脱氧胆酸钠、1% (w/v) Triton X-100) 中将组织在4℃下匀浆。将组织裂解物在4℃下以21,000×g离心15分钟,并将澄清上清液与患者血清 (1:16.7稀释) 在4℃一起孵育过夜。然后将样品与蛋白G Dynabeads (ThermoFisher Scientific,Dreieich,Germany) 在4℃孵育3小时以捕获免疫复合物。珠粒用PBS洗涤3次,并用含有25mmol/L二硫苏糖醇的NuPage LDS样品缓冲液 (ThermoFisher Scientific,Schwerte,Germany) 在70℃洗脱10分钟。用59mM碘乙酰胺 (Bio-Rad,Hamburg,Germany) 进行脲甲基化 (carbamidomethylation), 然后进行SDS-PAGE (NuPAGE, ThermoFisher Scientific,Schwerte,Germany)。用考马斯亮蓝 (G-250) (Merck) 使分离的蛋白质可视化,并通过质谱分析对其进行鉴定。

[0138] 质谱

[0139] 从考马斯亮蓝G-250染色凝胶中切下可见的蛋白条带。脱色和胰蛋白酶消化后,提取肽并用 α -氰基-4-羟基肉桂酸点样到MTP AnchorChip™ 384 TF靶体上。

[0140] 使用flexControl 3.4软件,使用Autoflex III smartbeam TOF/TOF200系统进行MALDI-TOF/TOF测量。以质量范围为600Da-4,000Da和以用4,000-10,000个轰击 (shot) 的正离子反射器模式记录肽质量指纹图谱 (PMF) 的质谱图。质谱用商购可得的Peptide Calibration Standard II进行外部校准,用flexAnalysis 3.4进行处理,峰值列表用BioTools 3.2进行分析。

[0141] Mascot搜索引擎Mascot Server 2.3 (Matrix Science,London,UK) 用于通过对NCBI或SwissProt数据库限于哺乳动物 (Mammalia) 进行检索来进行蛋白质鉴定。检索参数如下:质量容忍度设定为80ppm,接受一个错过的切割位点,并且半胱氨酸残基的脲甲基化以及甲硫氨酸残基的氧化分别设定为固定和可变修饰。为了评估蛋白质命中,选择 $p < 0.05$ 的显著性阈值。

[0142] 为了进一步确认PMF命中,使用BioTools的WARP反馈机制选择每个鉴定蛋白质的2至5个肽用于MS/MS测量。分别用400和1000个轰击记录母体和碎片质量。用0.7Da的碎片质量容忍度如上所述处理和分析质谱。

[0143] 患者血清免疫沉淀来自小脑的发动蛋白1

[0144] 使用患者的血清和猪小脑裂解物进行免疫沉淀分析以鉴定另外的靶自身抗原。在每次制备期间通过BCA测定确定的猪小脑裂解物的总蛋白质浓度为 $\approx 20-23\text{mg/ml}$ 。

[0145] 通过总裂解物免疫沉淀进行分析。然后通过凝胶电泳解析免疫沉淀的蛋白质并用蓝色银染色剂染色以鉴定与对照相比患者血清特有的条带,随后通过MS鉴定。总裂解物免疫沉淀后蓝色银染色凝胶的图像显示在图1中。

[0146] 在该实验中,包括与2名健康对照相比的来自6名抗GAD65和抗GAD67 AAb阳性患者的血清。在凝胶染色后,在所有患者的血清泳道中观察到主要靶抗原GAD65和GAD67分别在 $\approx 65\text{kDa}$ 和 $\approx 67\text{kDa}$ 的位置的拉下 (图1,线箭头),但在对照血清中没有观察到。另外,患者血

泳道特有的另一条带在位置 $\approx 97\text{kDa}$ 时被鉴定为发动蛋白1 (DNM1) (图1, 肘状箭头)。

[0147] 该结果通过第二种免疫沉淀方法即冷冻免疫沉淀证实。在该方法中, 使用猪小脑冷冻切片代替组织裂解物。与上述方法可比的是, 免疫沉淀的蛋白质在凝胶中解析并用蓝色银染色剂染色 (图2)。在该实验中, 为了代表的目的, 除了来自健康对照的三份血清之外, 还包括四名患者的抗GAD65和抗GAD67Aab阳性血清和一种抗GAD65和抗GAD67Aab阴性血清。两种免疫沉淀方法的结果具有可比性。除了其中拉下较弱的一个 (图2, 泳道5) 之外, 在所有抗GAD AAb阳性患者的血清中观察到DNM1的强烈拉下 ($\approx 97\text{kDa}$) (图2, 箭头)。此外, 健康对照组没有DNM1的拉下。在该测试中, 在总裂解物免疫沉淀中DNM1拉下阴性的患者血清 (图1, 泳道6) 在该测试中也是阴性的。

[0148] 用患者血清免疫印迹检测针对小脑富集DNM1的AAb

[0149] 通过凝胶电泳分离IMAC富集的SNARE蛋白质级分并转移到硝酸纤维素膜上。实验结果如图3所示。将膜垂直切成条状, 并用含有抗DNM1 (1:1000)、抗NSF (1:1000) 和抗STX1B (1:2000) 的抗体混合物 (Ab, 泳道2)、作为阳性对照的来自Euroimmun AG的针对GAD、NSF和STX1B的AAb为阳性的内部参考患者血清 (1:350) (PC, 泳道3) 和来自患者的一组血清 (1:350) (泳道: 4-8) 与神经系统对照 (泳道: 9-12) 和健康 (泳道: 13-15) 对照进行孵育。在基于细胞的测定中, 内部参考血清针对NSF和STX1B具有免疫反应性 (数据未显示)。用抗体和参考血清 (泳道: 2和3, 红色箭头) 观察到针对DNM1 ($\approx 97\text{kDa}$)、NSF ($\approx 82\text{kDa}$) 和STX1B ($\approx 33\text{kDa}$) 的反应性。此外, 患者的血清描绘了针对DNM1的反应性 (泳道: 4-8)。除了一个 (泳道14) 之外, 没有神经系统对照 (泳道: 9-12) 或健康对照描绘了针对DNM1的任何反应性。

[0150] 将富集的DNM1级分在凝胶中解析并用患者血清 ($n=100$) 与神经系统 ($n=65$) 对照和健康 ($n=70$) 对照进行免疫印迹。将每个条带的相对强度相对于参考血清进行标准化, 并表示为获得的相对强度的百分比。通过使用Graph Pad prism 5软件实施Kruskal-Wallis检验然后Dunn的多重比较来比较这些值。将参考血清 (第二上的点) 指定为100的值, 并且仅为了筛选的目的计算高于健康对照的平均值3SD的截止值 (虚线; 相对强度: $\sim 15\%$)。总体而言, 患者队列中的23名患者血清, 神经系统对照 (NC) 中的0名患者血清和健康对照 (HC) 中的1名受试者, 表现出高于DNM1截止值 (15%) 的相对强度值。因此, 与对照组相比, 患者队列中针对DNM1的AAb的患病率显著更高 ($***p<0.0001$)。图代表每组的平均值 $\pm$ SD。

[0151] 在针对DNM1的AAb阳性的患者血清中, 抗GAD AAb阳性的患者血清数为15。值得注意的是, 8名抗GAD AAb阴性的患者血清中针对DNM1的AAb呈阳性。总之, 与抗GAD AAb阴性的患者相比, 抗-GAD AAb阳性患者可能具有针对NDM1的AAb的更高的患病率。来自没有抗GAD AAb的患者的值较低但不是阴性。就个体病症而言, 与患有其他相关运动病症的患者相比, 患有SPS、PERM和小脑炎的患者中针对DNM1的AAb患病率更高。

序列表

<110> 杭州欧蒙医学检验所有限公司

<120> 神经自身免疫疾病的诊断

<130> 17PP067CN2

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 864

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

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

Asn	Asn	Ile	Gly	Ile	Met	Lys	Gly	Gly	Ser	Lys	Glu	Tyr	Trp	Phe	Val
530						535					540				
Leu	Thr	Ala	Glu	Asn	Leu	Ser	Trp	Tyr	Lys	Asp	Asp	Glu	Glu	Lys	Glu
545					550					555					560
Lys	Lys	Tyr	Met	Leu	Ser	Val	Asp	Asn	Leu	Lys	Leu	Arg	Asp	Val	Glu
				565					570					575	
Lys	Gly	Phe	Met	Ser	Ser	Lys	His	Ile	Phe	Ala	Leu	Phe	Asn	Thr	Glu
			580					585						590	
Gln	Arg	Asn	Val	Tyr	Lys	Asp	Tyr	Arg	Gln	Leu	Glu	Leu	Ala	Cys	Glu
	595						600						605		
Thr	Gln	Glu	Glu	Val	Asp	Ser	Trp	Lys	Ala	Ser	Phe	Leu	Arg	Ala	Gly
	610					615					620				
Val	Tyr	Pro	Glu	Arg	Val	Gly	Asp	Lys	Glu	Lys	Ala	Ser	Glu	Thr	Glu
625					630					635					640
Glu	Asn	Gly	Ser	Asp	Ser	Phe	Met	His	Ser	Met	Asp	Pro	Gln	Leu	Glu
				645					650					655	
Arg	Gln	Val	Glu	Thr	Ile	Arg	Asn	Leu	Val	Asp	Ser	Tyr	Met	Ala	Ile
			660					665						670	
Val	Asn	Lys	Thr	Val	Arg	Asp	Leu	Met	Pro	Lys	Thr	Ile	Met	His	Leu
	675						680						685		
Met	Ile	Asn	Asn	Thr	Lys	Glu	Phe	Ile	Phe	Ser	Glu	Leu	Leu	Ala	Asn
	690					695					700				
Leu	Tyr	Ser	Cys	Gly	Asp	Gln	Asn	Thr	Leu	Met	Glu	Glu	Ser	Ala	Glu
705					710					715					720
Gln	Ala	Gln	Arg	Arg	Asp	Glu	Met	Leu	Arg	Met	Tyr	His	Ala	Leu	Lys
				725					730					735	
Glu	Ala	Leu	Ser	Ile	Ile	Gly	Asp	Ile	Asn	Thr	Thr	Thr	Val	Ser	Thr
			740					745					750		
Pro	Met	Pro	Pro	Pro	Val	Asp	Asp	Ser	Trp	Leu	Gln	Val	Gln	Ser	Val
	755						760						765		
Pro	Ala	Gly	Arg	Arg	Ser	Pro	Thr	Ser	Ser	Pro	Thr	Pro	Gln	Arg	Arg
	770					775					780				
Ala	Pro	Ala	Val	Pro	Pro	Ala	Arg	Pro	Gly	Ser	Arg	Gly	Pro	Ala	Pro
785					790					795					800
Gly	Pro	Pro	Pro	Ala	Gly	Ser	Ala	Leu	Gly	Gly	Ala	Pro	Pro	Val	Pro
				805					810					815	
Ser	Arg	Pro	Gly	Ala	Ser	Pro	Asp	Pro	Phe	Gly	Pro	Pro	Pro	Gln	Val
			820					825						830	
Pro	Ser	Arg	Pro	Asn	Arg	Ala	Pro	Pro	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Ser	Gly

835	840	845
Gln Ala Ser Pro Ser Arg Pro Glu Ser Pro Arg Pro Pro Phe Asp Leu		
850	855	860
<210> 2		
<211> 3260		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 2		
gggcgggggc cccgcggcgc aggcagtctg ggcgcgcggc tgcagcggcg gagccggagt 60		
cggagccggg agcgctagcg gcagccggat cgcagcctgc ggggcccgcc gcagccatgg 120		
gcaaccgcgg catggaagat ctcatcccgc tggteaaccg gctgcaagac gccttctctg 180		
ccatcggcca gaacgcggac ctgcacctgc cgcagatcgc tgtggtgggc ggccagagcg 240		
ccggcaagag ctcggtgctc gagaatttcg taggcaggga cttcttgctc cgaggatctg 300		
gcattgtcac ccgacgtccc ctggtcttgc agctggtcaa tgcaaccaca gaatatgccg 360		
agttcctgca ctgcaaggga aagaaattca ccgacttcga ggaggtgcgc cttgagatcg 420		
aggccgagac cgacagggtc accggcacca acaaggcat ctgccggtg cctatcaacc 480		
tccgctcta ctgccgcac gtgctgaacc tgaccctggt ggacctgcc ggaatgacca 540		
aggtcccgtt gggggaccaa cctcccga ca tcgagttcca gatccgagac atgcttatgc 600		
agtttgtcac caaggagaac tgcctcatcc tggcctgtc ccccgccaac tctgacctgg 660		
ccaattctga cgccctcaag gtcgccaagg aggtggacct ccagggccag cgcaccatcg 720		
gggtcatcac caagctggac ctgatggacg agggcacaga tgcccgtgat gtgctggaga 780		
acaagctgct cccctgcgc agaggctaca ttggagtggg gaaccggagc cagaaggaca 840		
ttgatggcaa gaaggacatt accgccgcct tggctgctga acgaaagttc ttcctctccc 900		
atccatctta tcgccacttg gctgaccgta tgggcacgcc ctacctgcag aaggtcctca 960		
atcagcaact gacgaaccac atccgggaca cactgccggg gctgcggaac aagctgcaga 1020		
gccagctact gtccattgag aaggaggtgg aggaatacaa gaacttccgc cctgatgacc 1080		
cagctcgcaa gaccaaggcc ctgctgcaga tggctccagca gttcgccgta gactttgaga 1140		
agcgcatgta gggctcagga gatcagatcg acacctacga actgtcaggg ggagcccga 1200		
ttaaccgaat cttccacgag cgcttccctt tcgagctggt caagatggag tttgatgaga 1260		
aggaactccg aaggagatc agctatgcta tcaagaatat ccatggcatt agaacggggc 1320		
tgtttacccc agacatggcc tttgagacca ttgtgaaaaa gcaggtgaag aagatccgag 1380		
aaccgtgtct caagtgtgtg gacatggtta tctcgagct aatcagcacc gttagacagt 1440		
gcaccaagaa gctccagcag taccgcggc tacgggagga gatggagcgc atcgtgacca 1500		
cccacatccg ggagcgcgag ggccgcacta aggagcaggt catgcttctc atcgatatcg 1560		
agctggctta catgaacacc aacctagagg acttcatagg ctttgccaat gctcagcaga 1620		
ggagcaacca gatgaacaag aagaagactt cagggaacca ggatgagatt ctggtcatcc 1680		
gcaagggtct gctgactatc aataatattg gcatcatgaa agggggctcc aaggagtact 1740		
ggtttgtgct gactgctgag aatctgtcct ggtacaagga tgatgaggag aaagagaaga 1800		
aatacatgct gtctgtggac aacctcaagc tgcgggacgt ggagaagggc tttatgtcga 1860		

gcaagcatat ctttgccctc tttaacacgg agcagaggaa tgtctacaag gattatcggc 1920
agctggagct agcctgtgag acacaggagg aggtggacag ctggaaggcc tccttcctga 1980
gggctggcgt gtaccctgag cgtgttgggg acaaagagaa agccagcgag accgaggaga 2040
atggctccga cagcttcatg cattccatgg acccacagct ggaacggcaa gtggagacca 2100
tccggaatct tgtggactca tacatggcca ttgtcaacaa gaccgtgagg gacctcatgc 2160
ccaagaccat catgcacctc atgattaaca ataccaagga gttcatcttc tcggagctgc 2220
tggccaacct gtactcgtgt ggggaccaga acacgctgat ggaggagtcg gcggagcagg 2280
cacagcggcg cgacgagatg ctgcgcatgt accacgcact gaaggaggcg ctcagcatca 2340
tcggcgacat caacacgacc accgtcagca cgcccatgcc cccgcccgtg gacgactcct 2400
ggctgcaggt gcagagcgta ccggccggac gcaggtcgcc cacgtccagc cccacgccgc 2460
agcgcggagc ccccgccgtg ccccagccc ggcccgggtc gcggggccct gctcctgggc 2520
ctccgcctgc tgggtccgcc ctgggggggg cgcccccggt gccctccagg ccgggggctt 2580
cccctgacct ttctggccct cccctcagg tgccctcgcg cccaaccgc gccccgccg 2640
gggtccccag ccgatcgggt caggcaagtc catcccgtec tgagagcccc aggccccct 2700
tcgacctcta aacagatccc tcctcttctc ggagacctcc ctttccaagc ctgcctggac 2760
ggctgttctg tgacttgaca gtggtcccc cagccccaaa gccagcccc ttcatctgtg 2820
acttaatctg ttgtagtgt gagctgatac attcaggtgt gaccgttggt gaaaacttgt 2880
gccccctctg tggatatgcc ttgccctgtt ctataaatat ctataaatac tcatatatat 2940
acacacctac acatggccaa ccgcctcgcc tctagcgctg ggaatcagtc actgtgctat 3000
ccttgtggag tcttgtggcc caactaccag agaacgctgt ccccgacat cccactccaa 3060
agtgtgccac ctccagtgag cctccttgct atgcccggcc tgtggacagc cagccccgc 3120
catccctccc acccctacc aagcatgggg gtgctgtgca ggcagccgtg tggcctgaca 3180
gtttctacca gtctgtctgt ccctcggctg agaataaaac ccatttctgg atgatgggga 3240
atgtcaaaaa aaaaaaaaaa 3260

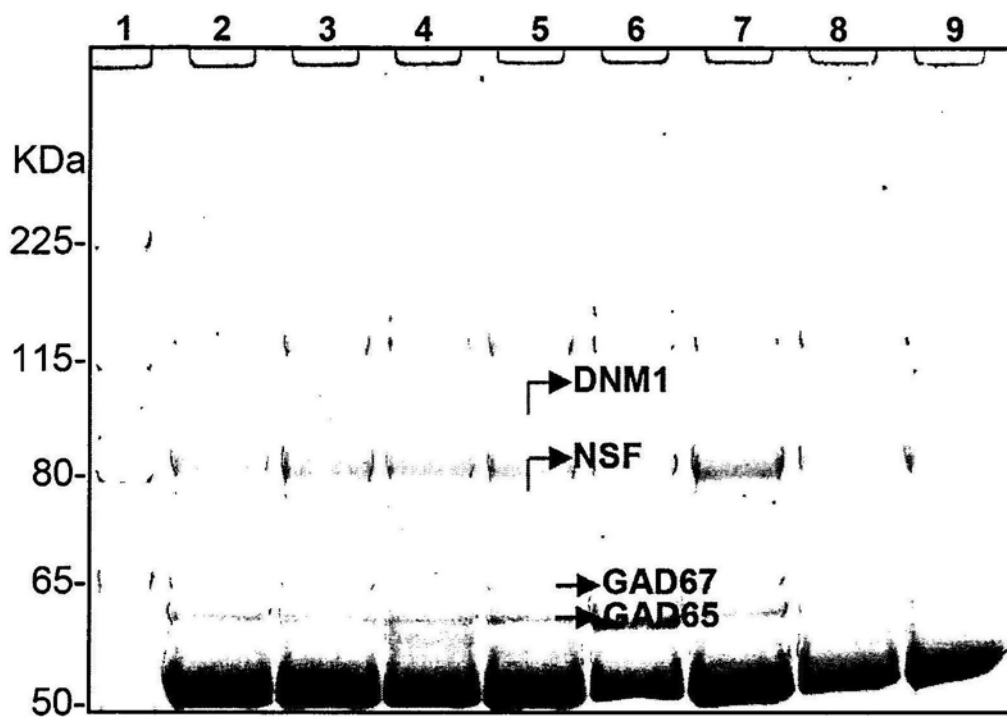


图1

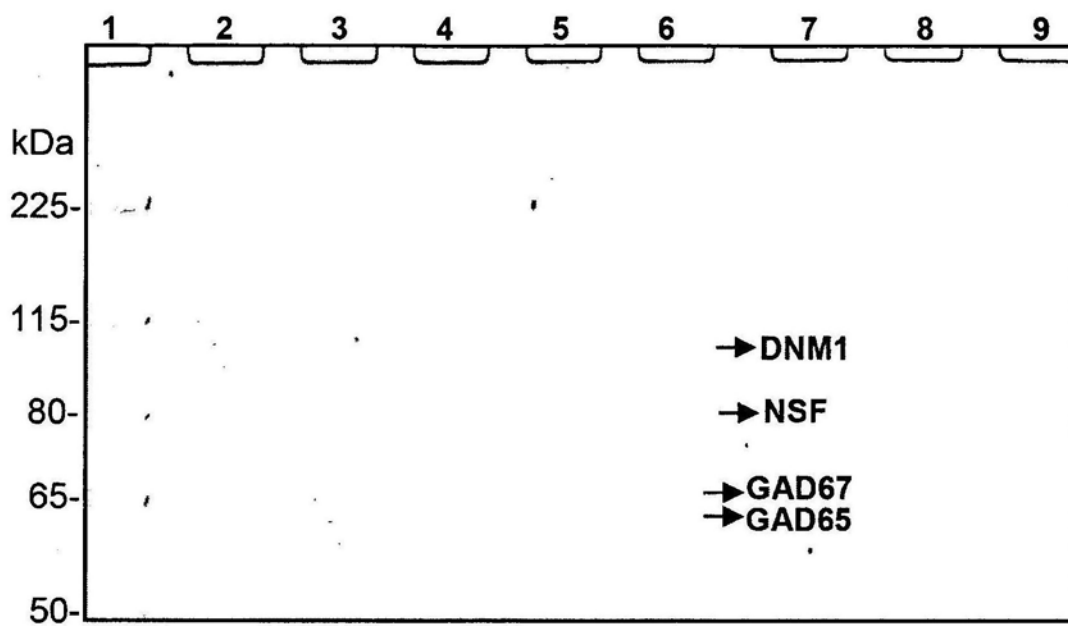


图2

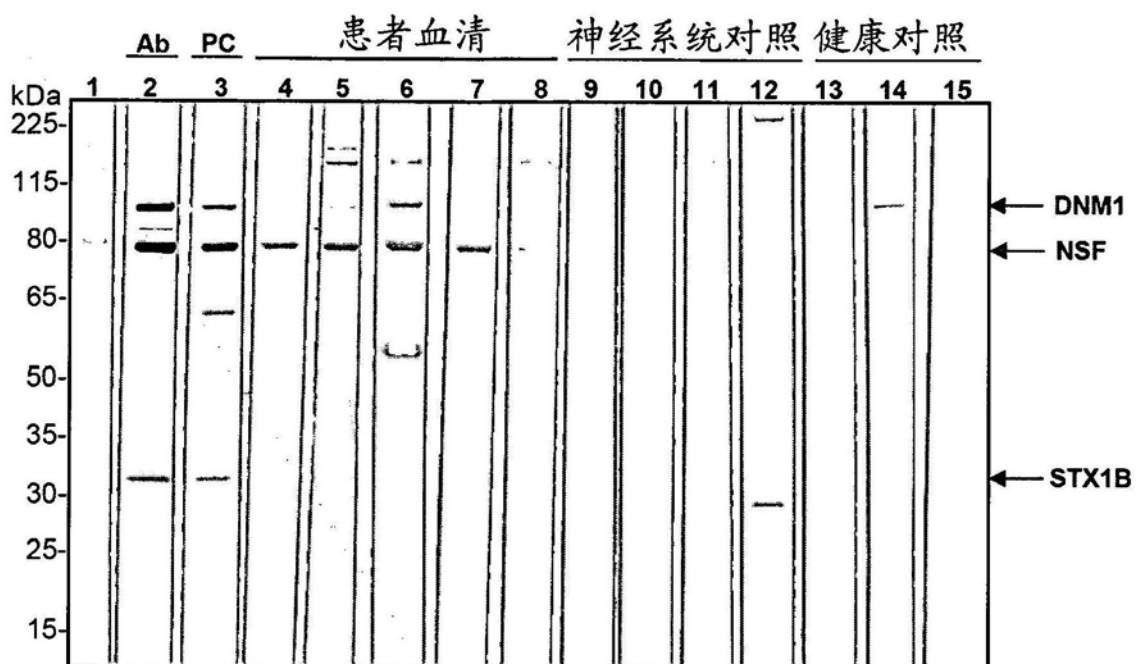


图3

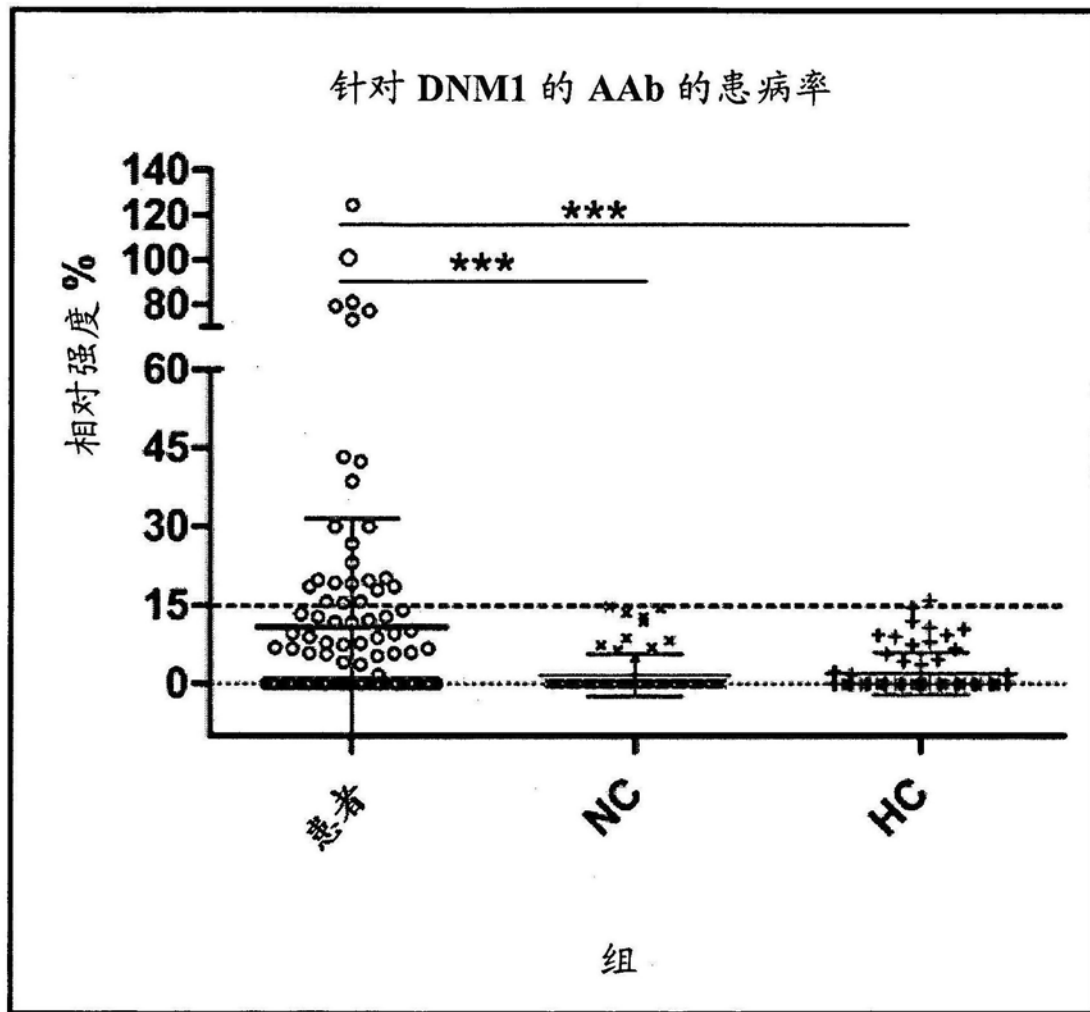


图4

专利名称(译)	神经自身免疫疾病的诊断		
公开(公告)号	CN110824156A	公开(公告)日	2020-02-21
申请号	CN201810920313.7	申请日	2018-08-14
[标]发明人	王晶 李川 李文涵 黄庆		
发明人	王晶 李川 李文涵 黄庆		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/53 G01N33/6893 G01N2800/24		
代理人(译)	张小勇		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及用于诊断疾病的方法，其包括检测患者的包含抗体的样品中与DNM1结合的自身抗体的步骤，本发明还涉及包含DNM1或其变体的多肽，所述多肽用于诊断疾病的用途，涉及与DNM1结合的自身抗体，涉及自身抗体用于诊断疾病的用途，涉及用于分离与DNM1结合的自身抗体的方法，涉及包含根据本发明的所述多肽的药物组合物或医学装置，涉及包含所述多肽或所述医学装置的用于诊断疾病的试剂盒，以及涉及所述多肽或自身抗体用于制备试剂盒或医学装置的用途。

