

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480015987.9

[51] Int. Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

B01D 57/02 (2006.01)

C07K 1/24 (2006.01)

C07K 1/26 (2006.01)

C07K 1/113 (2006.01)

C07K 14/475 (2006.01)

[43] 公开日 2006年9月13日

[11] 公开号 CN 1832756A

[51] Int. Cl. (续)

C07K 14/765 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

G01N 33/561 (2006.01)

G01N 33/564 (2006.01)

[22] 申请日 2004.6.9

[21] 申请号 200480015987.9

[30] 优先权

[32] 2003.6.9 [33] US [31] 60/476,607

[86] 国际申请 PCT/US2004/017889 2004.6.9

[87] 国际公布 WO2004/111608 英 2004.12.23

[85] 进入国家阶段日期 2005.12.9

[71] 申请人 约翰·A·麦金太尔

地址 美国印第安纳

[72] 发明人 约翰·A·麦金太尔

[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
代理人 程泳

权利要求书3页 说明书25页 附图28页

[54] 发明名称

通过氧化还原反应改变血浆蛋白质结合专一性的方法

[57] 摘要

至少一种悬浮或溶解于液体介质中的血浆蛋白质，通过将该蛋白质暴露于足以改变其结合专一性的氧化剂或者电流来改变其结合专一性。通过将该蛋白质氧化而改变其结合专一性，可从血液或血液制品或提取物中回收屏蔽的蛋白质 (masked protein)，如自身抗体。

1. 一种包括如下步骤的方法:

提供组合物, 其含有至少一种悬浮或溶解于液体介质中的血浆蛋白质, 该
5 血浆蛋白质具有可通过改变其氧化还原状态而改变的结合专一性, 以及
将该组合物暴露于足以改变所述血浆蛋白质的结合专一性的氧化剂或者电
势中。

2. 权利要求1的方法, 其中所述液体介质是稀释或者未稀释的全血、血清
或者血浆。

10 3. 权利要求1的方法, 其中所述组合物包括悬浮或者溶解于液体介质中的
静脉内免疫球蛋白(IvIg)。

4. 权利要求1的方法, 其中所述血浆蛋白质是IgG、IgA或者IgM同种型
的抗体。

15 5. 权利要求1的方法, 其中所述血浆蛋白质是IgG、IgA或者IgM同种型
的自身抗体。

6. 权利要求1的方法, 其中所述血浆蛋白质是除抗体之外的血浆蛋白质。

7. 权利要求1的方法, 其中所述氧化剂是氯高铁血红素。

8. 权利要求1的方法, 其中所述氧化剂是 KMnO_4 。

9. 权利要求1的方法, 其中所述氧化剂是叶绿素。

20 10. 权利要求1的方法, 其中所述氧化剂是具有被还原能力的分子, 其通
过作为其它起电子供体作用的分子的电子受体而被还原。

11. 一种包括如下步骤的方法:

提供包括生物流体或者生物流体提取物的组合物, 其中该生物流体或其提
取物含有至少一种屏蔽的循环蛋白质, 该蛋白质具有这样的结合位点, 即该结
25 合位点具有可通过改变其氧化还原状态而改变的结合专一性,

将该组合物暴露于足以改变所述屏蔽的循环蛋白质的结合专一性的氧化剂
或者电势中, 由此使该循环蛋白质去屏蔽, 以及
从组合物中回收该去屏蔽的循环蛋白质。

30 12. 权利要求11的方法, 其中所述生物流体是稀释或者未稀释的全血、血
清、血浆或者胎盘脐带血。

13. 一种从含有抗体的生物流体或者含有抗体的生物流体提取物中获得并分离自身抗体的方法，所述生物流体或其提取物含有在进行该方法之前不能与自身抗原结合，因而不能通过基于受体-配体结合的测定来检测的自身抗体，该方法包括如下步骤：

5 将该生物流体或提取物暴露于足以改变该自身抗体的结合专一性的氧化剂或者 DC 电流中，使所述自身抗体变得能够与抗原结合，由此使其变得可检测，并可通过受体-配体结合分离方法从所述生物流体或者其提取物中回收，以及从所述生物流体中回收该自身抗体。

14. 权利要求 13 的方法，其中所述生物流体是稀释或者未稀释的全血、血
10 清或血浆。

15. 权利要求 13 的方法，其中含抗体的生物流体提取物是静脉内免疫球蛋白 (IvIg)。

16. 权利要求 13 的方法，其中所述氧化剂是氯高铁血红素或者叶绿素。

17. 权利要求 13 的方法，其中所述氧化剂是 KMnO_4 。

18. 一种治疗自身免疫疾病的方法，该方法包括对患有自身免疫疾病的受
15 试者施加抗氧化剂的步骤，该抗氧化剂的量足以使所述受试者体内的自身抗体失活。

19. 一种治疗自身免疫疾病的方法，该方法包括如下步骤：

从患有自身免疫疾病的受试者中抽取血液样品，

20 将所述血液样品暴露于足以使所述血液样品中的自身抗体失活的抗氧化剂或者 DC 电流中，以及

将血液样品返回受试者体内。

20. 一种包括下述步骤的方法：

25 检测取自受试者的血液、血浆或者血清样品，以测定样品中可检测的自身抗体的量和/或类型。

通过将样品暴露于氧化剂或者 DC 电流，来处理取自所述受试者的血液、血浆或者血清样品，

检测处理后的来自所述受试者的血液、血浆或者血清样品，以测定所述处理后的样品中的可检测的自身抗体的量和/或类型，以及

30 将处理步骤之前样品中可检测的自身抗体的量和/或类型与处理步骤之后

样品中可检测的自身抗体的量和/或类型相比较。

21. 一种产品，包括暴露于足以使其中包含的至少一种蛋白质的结合专一性发生改变的抗氧化剂或者DC电流之后的生物流体或者含蛋白质的生物流体提取物。

5 22. 权利要求 21 的产品，其中所述生物流体是全血、血清或者血浆。

23. 权利要求 21 的产品，其中含蛋白质的生物流体提取物是静脉内免疫球蛋白 (IvIg)。

24. 权利要求 21 的产品，其中至少一种天然产生的蛋白质是抗体。

25. 权利要求 21 的产品，其中至少一种自然产生的蛋白质是自身抗体。

10 26. 权利要求 21 的产品，其中所述氧化剂是氯高铁血红蛋白或者叶绿素。

27. 权利要求 21 的产品，其中所述氧化剂是 KMnO_4 。

通过氧化还原反应改变血浆蛋白质结合专一性的方法

5 本申请要求享有2003年6月9日申请的编号为60/476607的美国临时申请的优先权。该临时申请在此作为参考而包含于本申请中。

技术领域

本发明涉及一种改变血浆蛋白质的结合专一性的方法，该血浆蛋白质具有可通过氧化还原反应而改变的结合专一性。本发明还涉及一种通过使天然存在
10 于正常受试者的血液、血浆或血清中的自身抗体去屏蔽(unmasking)而获得自身抗体的方法。

发明背景

术语“自身免疫疾病”指的是免疫系统错误地攻击人自身身体的细胞、组织或器官的一类疾病。典型地，自身免疫疾病涉及身体自身成分，例如常见的
15 蛋白质和脂类的抗体结合。与自身化合物(或者，更典型地，与在每种生物中都存在的如此常见的化合物)结合的抗体称作自身抗体。例如，磷脂和/或磷脂结合性血浆蛋白质的自身抗体结合与以下疾病相关，例如全身性红斑狼疮(SLE)、深部静脉及复发性动脉血栓形成、肺栓塞、复发性自然流产、血小板减少症、舞蹈病、癫痫、青斑、自发性肺动脉高压、风湿状况以及许多胶原性
20 疾病。其它与自身抗体相关的疾病包括多发性硬化、克罗恩病、盘状红斑狼疮、淋巴瘤性甲状腺肿、牛皮癣、糖尿病以及类风湿性关节炎。大约有80种不同的自身免疫疾病，作为一类疾病，这些疾病影响着数百万人。

关于自身免疫疾病病原学的传统理论认为，这些疾病由在患病个体中产生了过量的自身抗体引起，可能是由于编码这些自身抗体的基因过度表达。根据
25 这一理论，受影响个体的血液含有水平升高的引起该疾病的特定自身抗体，而正常个体血液中不含这种自身抗体或者仅仅含有微不足道的量。该理论表面上得到了传统检测的支持，在这些检测中含量丰富的自身抗体可在来自患有自身免疫疾病的受试者的血液或者血液制品，如血浆或者血清中检测到，相反在来自没有患自身免疫疾病的受试者的血液或血液制品中则检测到自身抗体为零或
30 者极微量。

本发明是基于在此报道的一个惊人发现，即正常个体的血液中实际上也含有相当数量的多种类型及专一性的自身抗体。如果对血液或者血液制品进行氧化处理，例如通过用氧化剂或者电流按照这里描述的方法进行处理，就能够从正常个体的血液或血液制品中检测或分离出这些自身抗体。对于正常血液中显著数量的自身抗体的发现是以前没有报道过的，并且就发明人所知，这些自身抗体在正常血液中以显著量存在在本发明之前完全是未知的。

不受任何特定理论所限，很显然，如果自身抗体可通过处理取自没有任何自身免疫疾病症状的人的正常血液而获得，那么正常人体的免疫系统必然能常规地产生并循环这些自身抗体，但它们以其被屏蔽或阻断的某些形式存在，或者被阻止具有任何损害作用。

正常个体中显著数量的自身抗体的发现提出了一个问题，即为什么在标准的检测（通常基于抗体与其相应抗原的结合）中不能检测到自身抗体，并且为什么在正常个体中自身抗体不引起疾病。

基于这里描述的早期实验，对于正常血液中如何能含有自身免疫抗体，而这些抗体不能通过常规的筛选过程检测到，而且还不引起疾病，最初的假定解释是，正常个体中的自身抗体在其产生后以某种方式受到了隔离。例如，隔离作用可以是大分子的形式，例如低密度或高密度脂蛋白（LDL，HDL），或者一些能够隔绝自身抗体并将其与血流中的其它成分分开的其它类型的微粒、囊泡或者微团。基于这种理论，自身免疫疾病的引发不是由于自身抗体本身的产生，而是由于隔离自身抗体的大分子、微粒、囊泡或者微团的降解、破坏或者形成缺乏。该理论看起来得到了最初的试验支持，在这些试验中，对样品进行相当剧烈的处理，包括振荡和加热之后，从血液或血清样品中得到了自身抗体。

然而，如这里所述，在后来的试验中显示，本发明的更为简单的方法，例如将血液或血液制品暴露于氧化剂或者DC电流，就足以从正常血液中获得自身抗体，并且该过程是可逆的。而且，研究发现，自身抗体可通过商购的IvIg产品的处理来获得，该产品不存在任何类型的大分子隔离单元。基于这些试验，关于正常血液中如何能含有自身免疫抗体，而这些抗体不能通过常规的筛选过程检测到，而且还不引起疾病，一种更可信的理论是，自身抗体随其它抗体一道自由循环，但在正常个体中，自身抗体的抗原结合位点以某种方式被阻断或者失活。基于这种理论，通过氧化而使自身抗体的抗原结合位点去阻断，可引

发自身免疫疾病。而且，该理论提出了一种更普遍的机制，通过该机制可改变一些血浆蛋白质的结合专一性。

构成本发明基础的上述发现的一种直接实际应用是，使得可以几乎无限制地提供想要获得的自身抗体，而该自身抗体可在用于自身免疫疾病和其它 aPL 相关疾病的实验室诊断的诊断试剂盒中用做标准。以前，收集大量的自身抗体进行商业应用是十分困难的，因为人们认为自身抗体必须从患有自身免疫疾病或者在标准测定中自身抗体显示为阳性的个体中才能获得。通过对个体患者进行静脉切开放血术或者收集来自一组已知自身抗体检测为阳性的患者的血液能够获得这种血液的量是有限的。其它获得自身抗体的方法，例如在美国专利 10 US5885793 中记载的筛选噬菌体文库的方法，也是十分困难而且耗时的。

由于可预测或预示在特定个体中的氧化应激之后会出现什么抗体，因而测定血液样品中存在或不存在屏蔽的抗体具有重要的诊断价值。

发明内容

本发明的一个目的在于，提供一种改变血浆蛋白的结合专一性的方法，该 15 血浆蛋白的结合专一性可通过其氧化还原状态的变化而改变。

本发明的另一目的在于，提供一种从来自正常个体的血液、血浆或者血清中获得自身抗体的方法。

本发明的另一目的在于，提供一种通过对受试者施以足够使所述受试者体内的自身抗体失活的抗氧化剂，来治疗患有自身免疫疾病的受试者的方法。

20 本发明的另一目的在于，提供一种通过使受试者的自身抗体在体外失活来治疗所述患有自身免疫疾病的受试者的方法。

本发明的另一目的在于，提供一种包括生物流体或者含蛋白质的生物流体提取物的产品，所述流体或流体提取物曾暴露于足以改变至少一种其中所含蛋白质的结合专一性的氧化剂或者 DC 电流。

25 本发明的另一目的在于，提供一种来自于一个或多个在常规临床检测中没有检测到自身抗体存在的个体的血液、血浆或血清样品，该血液、血浆或血清样品已经过处理，从而之后证明存在有自身抗体。

30 这些以及其它的目的可通过改变生物流体中或含蛋白质的生物流体提取物中至少一种循环蛋白的结合专一性的方法来实现，该循环蛋白质带有具结合专一性的结合位点，通过将该生物流体或提取物中的蛋白质暴露于氧化剂或者直

流 (DC) 电流以使该循环蛋白质的结合专一性发生改变, 从而改变该蛋白质的氧化还原状态, 则可改变所述结合专一性。

5 这些目的还可通过包含下述步骤的方法来实现: 提供组合物, 其包括至少一种悬浮或溶解于液体介质中的血浆蛋白质, 该血浆蛋白质具有可通过改变其氧化还原状态而改变的结合专一性; 以及将该组合物暴露于足以改变该血浆蛋白质的结合专一性的氧化剂或者 DC 电势。

10 在另一实施方案中, 本发明涉及一种从生物流体或者生物流体提取物中获取自身抗体或者其他屏蔽的循环蛋白质的方法, 其通过将生物流体或其提取物中的自身抗体或者其他屏蔽的循环蛋白质暴露于足以改变自身抗体或其它屏蔽的循环蛋白质的结合专一性的氧化剂或 DC 电流, 使自身抗体或者其他屏蔽的循环蛋白质能够与抗原或配体结合, 由此变得可检测, 并可从生物流体或提取物中回收, 以及从该生物流体中回收该自身抗体或其它屏蔽的循环蛋白质来实现。

15 在另一实施方案中, 本发明涉及一种通过向患有自身免疫疾病的受试者施以足以使受试者体内自身抗体失活的量的抗氧化剂, 来治疗自身免疫疾病的方法。对患有自身免疫疾病的个体的治疗可包括在体外处理血液, 以减少未屏蔽的蛋白质并将它们替换为屏蔽的蛋白质。

20 在另一实施方案中, 本发明涉及一种方法, 即筛选正常个体的生物流体或提取物, 以确定哪些自身抗体被屏蔽, 并由此构建该个体中, 在通过氧化或电动势而被暴露或者去屏蔽的情况下, 可能引起自身免疫疾病的自身抗体的潜在抗体分布图。

25 作为特定的、非限制性的例子, 血液、血浆或血清, 或者血液提取物, 如免疫球蛋白混合物, 可被暴露于氧化剂或者 DC 电流, 以造成血液、血浆、血清或提取物中所含的至少一种自身抗体的结合专一性的变化, 使自身抗体变得在血液、血浆、血清或提取物中可检测, 并可从血液、血浆、血清或提取物中回收。

附图简述

图 1 的表格列出了通过在下面描述的许多实施例中所使用的内部 (in-house) 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 形式检测的特定抗磷脂抗体 (aPL)。

30 图 2 的表格概括了来自正常 aPL 阴性受试者的血液样品的 aPL 测定结果, 其按照在实施例的开头部分所描述的方法温育。

图 3 的组合表格概括了来自 7 位 aPL 阴性的正常个体的血液样品的 aPL 测定结果，其按照在实施例的开头部分所描述的方法温育。

图 4 的表格概括了来自正常 aPL 阴性受试者的血清样品的 aPL 测定结果，其按照在实施例的开头部分所描述的方法温育，特征是该过程中马红细胞(RBC) 5 被替换成人 RBC。

图 5 的表格概括了按照在实施例的开头部分所描述的方法进行的血清样品温育的 aPL 检测结果，但马血清被替换成人血清。

图 6 的表格概括了来自正常 aPL 阴性受试者的血液样品的 aPL 测定结果，除温育在室温下 (22°C) 进行以外，其按照在实施例的开头部分所描述的方法 10 温育。

图 7 的表格概括了来自正常 aPL 阴性受试者的血液样品的 aPL 测定结果，其按照在实施例的开头部分所描述的方法温育，特征为用 0.7mm Degalan(塑料) 小珠作为温育混合物中的颗粒状固体。

图 8 的表格概括了来自正常 aPL 阴性受试者的血液样品的 aPL 测定结果，除温育混合物保持静止而不摇动或振荡以外，其按照在实施例的开头部分所描 15 述的方法温育。

图 9 的表格概括了来自正常 aPL 阴性受试者的血液样品的 aPL 测定结果，其按照在实施例的开头部分所描述的方法温育，其中增加将温育混合物加热到 56°C 30 分钟的特征。

图 10 的表格概括了来自正常 aPL 阴性受试者的血液样品的 aPL 测定结果，其按照在实施例的开头部分所描述的方法温育，特征为采用了来自不同供应商 (Becton Dickinson, Sparks, Md) 的细菌生长培养基来取代来自 Biomerieux 20 的细菌生长培养基。

图 11 的表格概括了来自正常 aPL 阴性受试者的血液样品的 aPL 测定结果，其按照在实施例的开头部分所描述的方法温育，特征为培养在厌氧条件下进行。 25

图 12 的表格概括了来自正常 aPL 阴性受试者的血液样品的 aPL 测定结果，其按照在实施例的开头部分所描述的方法温育，特征为用 K562 细胞 (人肿瘤细胞系) 替代 RBC。

图 13 的表格概括了来自正常 aPL 阴性受试者的血液样品的 aPL 测定结果， 30 但将细菌生长培养基替换为用于培养人细胞的细胞培养基。

图 14 的表格概括了来自正常 aPL 阴性的母婴的脐带血样品的 aPL 测定结果。

图 15 的表格概括了来自正常 aPL 阴性受试者的血液样品的 aPL 测定结果，其按照在实施例的开头部分所描述的方法温育，特征为用硝普酸钠 (SNP) 替代温育混合物中的 RBC。

图 16 的表格概括了按照在实施例的开头部分描述的方法温育的血液样品的狼疮抗凝血剂活性测定结果。在采用本发明的步骤使血清转化之前从血液的狼疮抗凝血剂为阴性的受试者中获得血液样品。

图 17 的表格列出了血液样品中已鉴定出的其它类型的自身抗体，所述血液样品按照在实施例的开头部分描述的方法温育。列出的抗体通过免疫荧光显微镜检术来鉴定。

图 18 的图表示，通过对密度梯度分离的人白细胞采用流式细胞术而确定的单核细胞细胞群的前向散射 (forward scatter) (大小) 和侧向散射 (side scatter) (粒度) 分布图。

图 19A-D 为流式细胞术柱状图，显示了各种血清中的单核细胞活性。在该柱状图中，如果存在的话，抗体活性可通过沿着水平轴的中值通道值 (median channel value) (对数标度) 的位移来测定。图 19A 显示了来自汇集的正常人血清 (NHS) 的单核细胞反应活性。图 19B 显示了来自单个正常受试者的血清的单核细胞活性。图 19C 显示了来自图 19B 中所示的受试者的血液样品中的单核细胞活性，其中血液样品按照在实施例的开头部分描述的方法处理。图 19D 显示了阳性对照血清的单核细胞活性。

图 20 的表格概括了采用 RELISA® 筛选测定法的各种样品的抗核抗体 (ANA) 测试结果。

图 21 的表格概括了在 tris 缓冲液中与氯高铁血红素一起温育的 IvIg 样品的 aPL 测定结果。

图 22 的图表示在一系列与氯高铁血红素一起培养的 IvIg 制品中测定的 aPS、aCL、aPE 以及 aPC 的量 (通过光密度测定, OD), 作为加入到制品中的人血清量 (以 μl 为单位) 的函数。

图 23 的图表示在一系列与氯高铁血红素一起培养的稀释的人血清制品中测定的 aPS、aCL、aPE 以及 aPC 的量 (通过光密度测定, OD), 作为加入到制品

中的氯高铁血红素量 (以 μl 为单位) 的函数。

图 24 的图显示以在一系列与氯高铁血红素和维生素 C 一起培养的 IvIg 制品中测定的 aPS、aCL、aPE 以及 aPC 的量 (作为平均值的倍数而测定, MoMs), 作为加入到制品中的维生素 C 量 (以 μl 为单位) 的函数。

5 图 25 的图表示在一系列与 NaOH 溶解的氯高铁血红素、DMSO 溶解的血叶啉 IX (hpIX)、NaOH 溶解的 hpIX、只有 NaOH、只有 DMSO 以及 DMSO 溶解的氯高铁血红素一起培养的 IvIg 制品中测定的 aPS、aCL、aPE 以及 aPC 的量 (作为平均值的倍数而测定, MoMs)。

10 图 26 的图表示在一系列与渐增量的氯高铁血红素以及渐增量的氯高铁血红素和血液结合素 (hpx) 一起培养的 IvIg 制品中测定的 aPS 的量 (通过光密度测定而测定, OD)。

图 27 显示了从三种细胞裂解产物获得的 Western 印迹, 用氯高铁血红素处理的 IvIg, 和未经处理的 IvIg 作为初级抗体, 还有其中以抗人 HRP 标记的缀合物作为对照的印迹。

15 图 28A 和 28B 的图显示在一系列 IvIg 制品中测定的 aPL 依赖型和 aPL 独立型 aPS、aCL、aPE 以及 aPC 的量 (作为平均值的倍数而测定, MoMs), 其中将连接着 9 伏特电池的电极浸入含有 IvIg 的磷酸缓冲盐溶液中 2 分钟。

20 图 29 的图表示在一系列 IvIg 制品中测定的 aPS、aCL、aPE 以及 aPC 的量 (作为平均值的倍数而测定, MoMs), 其中将连接着 6 伏特电池的电极浸入含有 IvIg 的磷酸缓冲盐溶液中 60 秒。

图 30 的图表示在一系列 IvIg 制品中测定的 aPS、aCL、aPE 以及 aPC 的量 (作为平均值的倍数而测定, MoMs), 其中将连接着 6 伏特电池的电极浸入含有 IvIg 的磷酸缓冲盐溶液中, 作为浸入时间的函数。

25 图 31A、31B 和 31C 的图分别表示, 在暴露于连接着 6 伏特电池的电极 240 秒之前和之后, 在对照溶液中测定的 aCL、aPE 以及 aPS 的量 (作为平均值的倍数而测定, MoMs)。

图 32 的图分别显示在用 PBS 稀释的 aPS 与 aCL 阳性患者血清中测定的 aPS 以及 aCL 的量 (作为平均值的倍数而测定, MoMs)。在该实验中, 将连接着 6 伏特电池的石墨电极浸入稀释的血清中不同的时间。

30 图 33 的图分别显示在用 PBS 稀释的 aPE 阳性患者血清中测定的 aPS、aCL、

aPE 以及 aPC 的量 (作为平均值的倍数而测定, MoMs)。在该实验中, 将连接着 6 伏特电池的石墨电极浸入稀释的血清中不同的时间。

图 34 的图分别显示在用 PBS 稀释的 aPE 阳性患者血清中测定的 aPS、aCL 以及 aPE 的量 (通过光密度测定, OD)。在该实验中, 通过将 6 伏特电池相连的石墨电极浸入 ABP 中不同的时间, 来处理用于测定蛋白质依赖型 aPL 结合性的 10% 的成年牛血浆 (ABP)。

实现本发明的最佳方式

本发明涉及改变生物流体或生物流体提取物中至少一种血浆蛋白质或者循环蛋白质的结合专一性的方法。

10 如这里所使用的, 术语“循环蛋白质”和“血浆蛋白质”用于指天然存在于动物循环系统中的蛋白质。循环蛋白质的例子包括抗体和其它血浆蛋白质。应当理解, 本发明的方法并不意味着对所有血浆蛋白质或循环蛋白质都适用, 而是适用于具有这样的特性的任何血浆蛋白质或者循环蛋白质, 即具有可通过改变蛋白质的氧化还原状态而改变的结合专一性。发明人发现, 存在具有这种特性的循环蛋白质, 如自身抗体, 这构成了本发明的基础。已经发现具有可通过改变氧化还原状态而改变的结合专一性的非抗体蛋白质的例子包括激肽原和凝血酶原和/或 $\beta 2$ 糖蛋白。

术语“屏蔽的循环蛋白质”是为本发明而新创造的, 其特指并描述在正常个体的血液中的循环蛋白质, 但通过基于受体-配体结合的常规结合测定是不能检测到的, 因为在正常个体中或者在取自正常个体的样品中, 其结合位点被屏蔽或者阻断, 或者被阻止与抗原相结合, 而且, 当含有屏蔽的循环蛋白质的样品通过改变其氧化还原状态进行处理时, 例如按照本发明的方法, 通过暴露于氧化剂或者电流中, 所述循环蛋白质变得能够与抗原结合, 因此在样品中变得可检测到。屏蔽的循环蛋白质的一个例子是自身抗体。如同本发明的发明人 25 人所发现的那样, 自身抗体在正常血液中以显著的量循环, 但是在基于抗体-抗原结合的常规测定中是不可测得的。如这里所探讨的那样, 当自身抗体受到足以改变其结合专一性的氧化-还原条件时, 自身抗体变得可检测并可回收。已通过氧化去屏蔽的自身抗体包括抗磷脂抗体、抗核仁 (硬皮病相关) 抗体、抗核纤层蛋白 (核孔处非常明亮的部分) 抗体、抗线粒体 (细胞质) 抗体、以及 30 抗中心粒抗体。此外还发现, 最初检测为 HCV (丙型肝炎病毒) 阴性的血液、血

清或者 IvIg 样品在按照本发明的方法处理后, 其 HCV 检测为阳性, 表明在正常个体的循环系统中存在屏蔽的抗-HCV 抗体。

术语“改变蛋白质的结合专一性”指的是使蛋白质改变或变化的过程, 例如通过氧化或者还原, 使其与先前不能专一性结合的抗原或者配体变得能够专一性结合, 或者使其与先前能专一性结合的抗原或者配体变得不能专一性结合。术语“去屏蔽”指的是改变屏蔽的循环蛋白质的结合专一性的过程, 使得该蛋白质变成可以通过基于改变了的结合专一性的结合测定而测得。

术语“自身抗体”指的是由动物免疫系统产生并与自身抗原结合的任何天然存在的抗体, 自身抗原也就是动物自身产生的化合物或者抗原。

术语“生物流体”包括任何包含循环蛋白质的体液, 包括血浆、血清和全血、唾液、尿液、乳液和其它分泌物。术语“含蛋白质的生物流体提取物”指的是任何从生物流体中收集或者分离的制品, 例如免疫球蛋白碎片。可用于本发明的血液、血清或者血浆可以是从个体中新鲜获得的, 也可以获自诸如从血库或者其他血液收集机构中获得的汇集的血液或血浆制品这样的来源。出于本发明的目的, 血液、血清或血浆还可来自过期或者被血库或血液收集机构发现为不符合标准的收集物。尽管这里的描述集中于人类血液、血浆和血清, 但本发明的相同工序也可用于动物血液, 并可获得类似的动物抗体以用于兽医学相关目的。优选地, 在本发明的方法中采用的血液或者血清应被稀释以减少血液、血浆或者血清中可能存在的任何抗氧化剂。

在本发明的方法中, 生物流体中的至少一种循环蛋白质或者血浆蛋白质的结合专一性, 通过将其暴露于氧化剂或者电流而发生改变。例如, 屏蔽的循环蛋白质的结合专一性可被改变, 从而使该蛋白质去屏蔽, 也就是说, 使其能够与在采用本发明的方法之前不能结合的抗原结合。然后通过基于专一性结合的分选方法, 将具有改变的结合专一性的蛋白质分离并回收。

如果采用氧化剂来实现本发明, 氧化剂可以是任何能够改变生物分子的氧化还原状态的化合物。更具体地, 氧化剂是能够作为其它作为电子供体的分子的电子受体而被还原的分子。氧化剂的例子包括但不限于氯高铁血红素、叶绿素或者其他含有强氧化性金属的环状化合物, 以及 KMnO_4 。通常, 当采用氧化剂时, 生物流体或其提取物与氧化剂的混合物必须温育一段时间, 通常约为一天或者过夜。使用的氧化剂的浓度应当足以改变具有可改变的结合专一性的蛋白

质的结合专一性，但其浓度又不能对蛋白质造成破坏。在自身抗体的情况下，研究发现，不同类型的自身抗体可与不同的抗氧化剂发生不同的相互作用。例如，对于 aPC 自身抗体的去屏蔽来说，与氯高铁血红素的反应结果不佳，但与 KMnO_4 的反应结果很好。

- 5 如果采用 DC 电流来实现本发明的方法，本方法可通过任何供给电流的装置来实现，例如通过将阳极和阴极电极浸入含有待处理样品的导电溶液中。通常，含有生物流体的溶液可暴露于具有足够大小和足够持续时间的电势以便能改变具有可改变的结合专一性的蛋白质的结合专一性。研究发现，通过将溶液暴露于 6-24 伏特的电势下数秒到数分钟，就可得到阳性结果。如同在实施例中所讨论的那样，在电流中的暴露时间延长可导致结合专一性的改变的可逆性。

采用 AC 电流来产生阳性结果的努力没有成功。

不束缚于特定的理论，在自身抗体的情况下，优选地，该自身抗体以足以氧化该自身抗体的 Fab 部分的抗原结合位点的量或时间暴露于氧化剂或者电流。

- 15 特定的目标蛋白质是否具有可通过改变其氧化还原状态而改变的结合专一性，以及任何改变该特定目的蛋白质的结合专一性的一系列条件的有效性，可以很容易地通过 ELISA 或者其它的配体-受体测定来检测。这些测定可在对蛋白质施加氧化还原条件之前和之后来进行，以观察该过程是否改变了该蛋白质的结合专一性。例如，回收特定自身抗体的最好氧化剂可以很容易地通过简单的实验来确定。

- 20 本发明的另一方面是通过给受试者施以足以使该受试者中的自身抗体失活的量的抗氧化剂，或者通过抽取受试者的血液样品，将该血液样品暴露于足以使所述血液样品中的自身抗体失活的抗氧化剂或者电流中，然后将血液样品返回到受试者体内，来治疗患有自身免疫疾病的受试者的可能性。

- 25 本发明的另一方面是一种方法，即筛选正常个体的生物流体或提取物以测定哪些自身抗体被屏蔽，并由此构建如果经氧化或电动势而被暴露或去屏蔽，能在该个体中引起自身免疫疾病的自身抗体的潜在抗体分布图。例如，概括地说，取自受试者的血液、血浆或血清样品可通过检测来确定样品中可检测的自身抗体的量和/或类型。其后，取自受试者的血液、血浆或血清样品可通过将样品暴露给氧化剂或者 DC 电流来进行处理，通过检测该处理后的来自受试者的血液、血浆或血清样品，可确定该处理的样品中可检测的自身抗体的量和/或类型。
- 30

其后, 可将处理步骤之前样品中可检测的自身抗体的量和/或类型, 与处理步骤之后样品中可检测的自身抗体的量和/或类型进行比较。

研究发现, 未处理的血液、血浆、血清或者 IvIg 样品和按照本发明的方法处理的血液、血浆或血清或者 IvIg 样品可以冷冻干燥并运输或者储存。当样品复原时, 它们保持各自的活性。

实施例

在对本发明已经进行了描述的情况下, 给出下列实施例来解释本发明的具体应用, 包括现在已知的实现本发明的最佳方式。这些实施例大致按时间先后循序呈现, 因此显示了对达到本发明效果的成分和步骤的认识进程。这些具体的实施例并不意味着限制了本申请中所述的发明范围。

关于这里描述的实施例 1-17 中的每一个, 除非另外指明, 通常采用下列步骤: 将取自 aPL 阴性的正常受试者的 10ml 的全血或者 5ml 的血清或血浆样品, 和 4-5ml 包装的哺乳动物红细胞, 加入到含有 30ml Biomerieux 牌细菌生长培养基 (至少含有下列成分: 蒸馏水、胰酶解豆酪蛋白培养液、酵母提取物; 葡萄糖; 蔗糖; 氯高铁血红素; 甲萘醌 (维生素 K3); 盐酸吡哆醛 (维生素 B6); 以及磺酸聚茴香脑钠 (sodium polyanetholesulfonate, SPS) 和炭) 的小瓶中。然后, 在 37°C 下以摇动或振荡的方式温育该混合物 18-22 小时。温育并离心后, 采用能提供 24 个分开的 aPL 检测结果的综合性内部 ELISA aPL 形式, 来检测温育后的血液或血清/RBC 样品中抗磷脂抗体 (aPL) 的存在。该检测步骤在下列出版物中有更为详细的描述, 这些出版物在此引用作为参考: Wagenknecht DR 等, The Evolution, Evaluation and Interpretation of Antiphospholipid Antibody Assays, Clinical Immunology Newsletter, Vol.15 No. 2/3 (1995) pp28-38 和 McIntyre JA 等, Frequency and Specificities of Antiphospholipid Antibodies (aPL) in Volunteer Blood Donors, Immunobiology 207 (1): 59-63, 2003。

图 1 显示了通过采用综合性内部 ELISA aPL 形式测得的 24 个分开的 aPL 专一性。评估了四种专一性, 1) aPS=抗磷脂酰丝氨酸, 2) aCL=抗心磷脂, 3) aPE=抗磷脂酰乙醇胺, 以及 4) aPC=抗磷脂酰胆碱。对于这些 aPL 专一性中的每一种, 都找出了三种免疫球蛋白同种型 IgG、IgA 和 IgM。分别在缓冲液稀释添加物, 10%的成年牛血浆 (ABP, 其含有磷脂结合性血浆蛋白质) 或者 1%牛血清

蛋白 (BSA, 其缺乏磷脂结合性血浆蛋白质) 存在 (依赖) 和不存在 (独立) 时, 评测每种专一性和每种同种型。受试者血液样品的最终稀释度为 1/50 到 1/100 之间。

在附图中给出了这里描述的各种实验的 24 个 aPL 专一性结果。阳性/阴性判定结果以基于来自 775 位正常血液供体的测试血浆样品的平均值的倍数 (MoM) 表示, 如在上述 McIntyre JA, Immunobiology 中所描述的。“+++” 的存在表示抗体活性强。标记 “+” 和 “++” 分别表示抗体活性低和中等。这些图中还给出了每个 aPL 专一性和同种型组合的正常范围值。

在标示为 PL 结合蛋白质 “依赖型” 的列中的阳性结果意味着, 抗磷脂抗体 (aPL) 实际上是与最初已结合于所示特定磷脂的血浆蛋白质相结合。通常可与 PS 和 CL 结合的血浆蛋白质包括如下: β_2 -糖蛋白 I、凝血酶原、蛋白 C、蛋白 S、膜联蛋白 V (annexin V) 以及补体成分因子 H 和 C4 (例如, 参见 McIntyre, J. A., Wagenknecht, D. R. 和 Faulk, W. P., Antiphospholipid antibodies: Discovery, definition, detection and disease. Prog. Lipid Res. 42 (3): 176-237, 182 页)。对于所有磷脂来说, 血浆蛋白质结合的生理特性并没有知道得很精确, 但是这种结合被认为诱导了血浆蛋白质结构的构象变化, 因此将随后被个体的自身抗体靶定的新的或者隐蔽的表位暴露出来。通常可与磷脂 PE 结合的血浆蛋白质包括如下: 高或者低分子量的激肽原, 和因子 IX 和激肽释放酶原。后两种蛋白质可通过它们与高分子量激肽原的结合中的重现精度 (fidelity) 来检测。与 PC 结合的血浆蛋白质至今还未界定。在一些实验中, 对血浆蛋白质独立型 aPL 进行了研究 (见图 3)。一种对这种活性的可能解释为, 其表示了存在残余的原始血液样品中存在的磷脂结合性血浆蛋白质。

实施例 1

将来自正常受试者的血液样品按照上述过程进行温育并检测。aPL ELISA 的结果在图 2 中显示。如图 2 所示, 与正常范围列中显示的正常、未处理的血液相比, 温育后的血液样品显示了自身抗体活性的大量存在。特别地, 对于 aPS (IgG)、aCL (所有同种型) 和 aPE (IgG) 的蛋白质依赖型种类显示了强烈的自身抗体活性。IgG aPC 的自身抗体活性低或者不存在是在较早采用氯高铁血红素作为氧化剂的实施例和过程中的一个特征性发现。该结果表明, PC 的自身抗体, 尤其是 IgG 同种型, 是不同的, 而且或许不能以与其它自身抗体相同的方式被

活化。在后来的实验中，研究发现，在采用 KMnO_4 处理的样品中也能检测到明显的 aPC 水平（数据未显示）。

实施例 2

5 将从 7 位健康的受试者上采集的血液样品按照上述步骤温育并检测。特别地，所有 7 位受试者的血液均在 20 分钟的时间段内抽取，并在相同的条件下温育 20 小时。图 3 是表示这 7 份样品的 aPL 血清转化范围的综合表格。这些结果表明，测得的 aPL 水平是变化的，同时在不同个体之间存在同种型。然而，如同本发明所显示的那样，每个个体都具有在温育后可测得的 aPL 抗体。

实施例 3

10 在第一个试验中，将来自正常受试者的血清样品按照上述基本步骤进行温育并检测。在温育混合物中，采用马红细胞（RBC）来代替人 RBC。aPL ELISA 的结果显示于图 4 中。如图 4 所示，得到了明显的 aPL 活性，特别是与 aPS（IgG 和 IgM）和 aCL（IgA 和 IgM）相关的活性。

15 在第二个试验中，按照上述基本步骤，以马血清替代人血清与人 RBC 一起温育，并进行检测。aPL ELISA 的结果显示于图 5 中。如图 5 所示，没有检测到 aPL 活性。（用于该试验的 ELISA 采用人抗体专一性碱性磷酸酶标记的抗体探针来检测 aPL，因此温育的样品中是否存在马 aPL 是未知的。）

20 图 4 和 5 中显示的概括结果清楚地表明，在本发明的血清转化步骤过程中得到的所有 aPL 均来源于人血清，而且不是由人 RBC 释放出来的，因为第一个试验中采用了缺乏人抗体的马 RBC 来替代人 RBC，但仍然显示了阳性结果，相反，在第二个试验中在存在人 RBC 的情况下使用马血清，但显示了阴性结果。

实施例 4

25 将来自正常受试者的血液样品按照上述基本步骤温育并检测，除温育在室温（22℃）下进行，来代替较高的温度以外。图 6 显示，当在室温下温育时，样品没有发生血清转化。这些结果表明，血清转化步骤可能是温度敏感的。

实施例 5

30 将来自正常受试者的血液样品按照上述基本步骤温育并检测，其特征在于采用 0.7mm Degalan（塑料）小珠作为温育混合物中的颗粒状固体来代替炭。由于在最初显示血清转化的试验中采用了炭，进行该试验用于测定炭是否在血清转化过程中起着特殊的作用。图 7 显示，即使是使用塑料小珠来替代炭，样品

也表现出了血清转化。这些结果表明，本质上，炭的作用是机械的，而不是化学的，而且任何颗粒状固体都可采用，例如塑料、树脂或者玻璃珠。不限于任何特定理论，可以推理出该颗粒状成分起到了RBC膜的磨料的作用，通过与RBC AB1/Band 3蛋白或者SNO-血红蛋白转运分子相互作用，或者与二者都相互作用，可能引起NO离子从RBC中释放。这种机械磨损的可能性得到了实施例6中的观察结果的支持，其中未摇动或振荡的温育混合物显示了阴性检测结果。特定的固相还起到帮助自身抗体释放的机械作用。

实施例6

将来自正常受试者的血液样品按照上述基本步骤温育并检测，但温育混合物保持静止，而不是振荡或者摇动。图8显示，当保持静止时样品没有发生血清转化。这些结果表明，运动可有助于固体颗粒与RBC之间的相互作用。静止的温育条件不促进aPL的释放，尽管少量的运动，例如将样品转移到培养箱中，可导致少量aPL的释放。

实施例7

将来自正常受试者的血液样品按照上述基本步骤温育并检测，但增加的特征为在温育以及离心除去RBC和炭后，将温育混合物加热到56℃ 30分钟。图9显示通过该过程，检测到的aPL的量明显增加。

实施例8

将来自正常受试者的血液样品按照上述基本步骤温育并检测，其特征在于采用来自不同供应商(Becton Dickinson, Sparks, MD)的细菌生长培养基来代替来自Biomerieux的细菌生长培养基。图10显示在Becton Dickinson培养基中的样品表现出血清转化，表明本发明的方法不依赖于来自特定供应源的细菌生长培养基。

实施例9

将来自正常受试者的血液样品按照上述基本步骤温育并检测，其特征在于以厌氧条件下(氮气条件下)的温育来代替需氧条件下(氧气和CO₂存在条件下)的温育。图11显示，即使是在厌氧条件下，样品也表现出血清转化，因此本发明的方法不依赖于需氧的环境。

实施例10

将来自正常受试者的血液样品按照上述基本步骤温育并检测，其特征在于

采用 K562 细胞 (人类造血肿瘤细胞系) 来代替红细胞。此外, 与在本发明的方法中通常采用 3-4ml 包装的 RBC 相比, 在培养基中仅存在 1130 万个 K562 细胞。图 12 显示, 样品呈现出血清转化。

其它实验显示, 与其它分离的细胞类型, 淋巴细胞, 单核细胞以及嗜中性粒细胞一起温育的样品通常不呈现 aPL 血清转化。特别地, 不仅淋巴和骨髓系列的白细胞不支持 aPL 的释放, 而且称为 L14 的猪 B 淋巴细胞的细胞系也不支持其释放 (数据未显示)。这些结果表明, 血红蛋白可能是温育混合物中的关键成分, 因为 K562 细胞和 RBC 都含有血红蛋白, 而淋巴细胞、单核细胞和嗜中性粒细胞不含。

10 实施例 11

将来自正常受试者的血液样品按照上述基本步骤温育并检测, 但除细菌生长培养基被用于生长人细胞的细胞培养基 RPMI 代替以外。图 13 显示没有血清转化发生。该试验表明了用于本发明目的的细菌培养基中的一些成分的重要性。而 RPMI 是一种设计为培养人细胞的培养基, 但当其代替小瓶培养液时, 它不能支持 aPL 的释放。这两种不同的微生物小瓶培养液 (microbiology vial broth) 与 RPMI 的成分列表和比较表明, RPMI 中缺少氯高铁血红素和称为维生素 K3 的甲萘醌 (一种人工制备的前维生素 K)。众所周知, 氯高铁血红素是源自 RBC 的 (Fe⁺⁺⁺) 离子的卟啉螯合剂, 甲萘醌是一种脂溶性维生素。这表明在自身抗体的释放中, 氧化还原反应可能起作用。

20 实施例 12

将胎盘脐带血样品按照上述基本步骤培养并检测。胎盘脐带血在婴儿出生后和胎盘与子宫壁分离前抽取。在传统的实验室测定中, 母亲的血液和婴儿脐带血中都没有显示有 aPL 存在。当按照这里描述的本发明的方法处理后, 证明了脐带血样品中存在强的 aPL 抗体活性, 如图 14 所示。这些抗体仅为 IgG, 这一观察结果是与抗体来源于母体相一致的。由于在出生前母亲将 IgG 输送到胎儿体内, 该实验似乎表明, 通过滋养层上的特定 Fc γ 受体 (Fc γ Rn) 传递给胎儿的屏蔽的母体自身抗体, 在胎儿血液中仍然保持被胎儿屏蔽。由于在通过本发明的方法进行血清转化之前, 母亲的血液和脐带血都显示为 aPL 阴性, 而且由于没有检测到 IgM 或 IgA 免疫球蛋白的存在, 因此这些结果支持了在血清转化之后脐带血中观察到的 IgG aPL 是来源于母体的观点。而且有趣的是, 表

达 Fc γ Rn 的滋养层并没有表达 HLA 抗原。

实施例 13

将来自正常受试者的血浆样品按照上述基本步骤温育并检测，其特征在于用硝普酸钠 (SNP, 200 μ M) 代替温育混合物中的 RBC。图 15 显示样品表现出了血清转化。

由于 SNP 是强的一氧化氮 (NO) 供体，因此这些结果给出了在自身抗体释放过程中涉及 NO 自由基的支持证据，并进一步支持了 RBC 和固体颗粒起到从 RBC 供给 NO⁻作用的理论。除硝普酸钠以外的其它自由基介导的反应也可引起自身抗体释放。

10 实施例 14

将来自正常受试者的血液样品按照上述基本步骤温育，并检测其狼疮抗凝血剂活性。狼疮抗凝血剂或者抑制剂是另一种类型的 aPL，通常仅能通过功能性实验室测定而被检测到。图 16 中的结果显示，在取自狼疮抑制剂阴性的个体并按照本发明的方法处理的血清转化的血液中有强的狼疮抗凝血剂 (LA) 活性。

15 在 dRVVT 测定中当通过将正常血浆加入到血清转化的培养液中以进行初始校正时，温育 1-2 小时会导致抑制剂的重新出现。建议该时间帧 (time frame) 为 LA 或者未屏蔽的抗体与通过混合研究所引入的相关磷脂结合血浆蛋白质结合所花费的时间。由于按 1: 1 的混合提供了足够的凝血因子水平来校正凝血因子不足

20 的样品中的凝血时间，因而其还排除了凝血因子不足的可能性。正常血浆存在时，稀释的凝血酶原时间 (dPT) 不校正，并在用正常血浆温育后观察到凝血时间延长，表明了强狼疮抑制剂的存在。

实施例 15

将来自 5 位正常受试者的血液样品按照上述基本步骤温育，并通过荧光显微镜检术来检测其它类型的自身抗体的存在。在按照本发明的教导处理之前，

25 来自这 5 位个体的血清和血浆样品为阴性。图 17 中列出了采用 Hep-2 细胞系鉴定的另外的自身抗体的专一性。鉴定了抗核仁 (硬皮病相关)、抗核纤层蛋白 (在核孔处非常亮)、抗线粒体 (细胞质) 以及抗中心粒抗体。结果显示，根据本发明的方法释放的自身抗体还可通过不同的检测方法，如与基于 ELISA 的检测相对的荧光显微镜检术来检测。结果证实，除 aPL 以外还有许多种类型的自身抗

30 体，在其血清和血浆于常规的实验室分析中对于这些抗体检测为阴性的个体的

血液中被屏蔽。

从这些结果可以预期，还有更多的自身抗体专一性等待通过检测经本发明处理的血液来发现。

实施例 16

5 将来自正常受试者的血液样品按照上述基本步骤温育，并采用流式细胞术和荧光缀合的抗人 IgG 抗体来检测其与单核细胞的反应性。采用未处理的集中的 (untreated-pooled) 正常人血清 (NHS)，来自本发明使用的同一正常受试者的血清，和阳性对照人血清进行对比试验。(处理后的血液显示没有与淋巴细胞以及嗜中性粒细胞的自身反应性；这些数据没有显示。) 图 18 示出了通过流
10 式细胞术确定的正常受试者的单核细胞细胞群的前向散射 (尺寸) 和侧向散射 (粒度) 分布图。该单核细胞细胞群通过显示与 CD14 单克隆抗体的反应性来确定。图 19A 显示了与 NHS 的抗单核细胞反应性。在线性标尺上显示的中值反应性 (median reactivity) 为 743.50。图 19B 显示了正常受试者血清的自身-抗-单核细胞活性；该受试者不具有对自身单核细胞的抗体活性。显示的中值反应性为 737.00。图 19C 显示了按照本发明的方法处理后，取自图 19B 中显示的受
15 试者的血液样品的自身-抗-单核细胞活性。中值显示为 864.00，表明存在强的自身-抗-单核细胞活性。尽管按照本发明的教导处理的血浆按 1/8 的稀释度使用，但与未稀释的阳性对照血清相比，其显示了更高的与单核细胞的反应性。因此，该实施例表明，按照本发明的方法处理的血液或者血清样品释放了以单
20 核细胞作为专一性靶标的自身抗体。当按照本发明的教导进行处理时，同样的结果也来自其他个体的另外 4 份样品中得到了证实。

实施例 17

采用 RELISA® 筛选测定法，就抗-核-抗体 (ANA) 的存在进行对比试验：未处理的脐带血清；按照本发明的方法进行无摇动温育的脐带血；按照本发明的
25 方法进行处理并摇动的脐带血；来自 ANA-阴性健康供体 (鉴定为 ACS) 的未处理血清；以及来自相同 ANA-阴性健康供体并按照本发明的方法温育的血清。如图 20 中所示，在按照本发明的方法处理的脐带血和血清样品中检测到了显著数量的 ANA。根据图 16 和 17 中的结果，可以预计还有更多的自身抗体专一性等待
30 通过检测经本发明处理的血液来发现。

实施例 18

为了弄清红细胞在自身抗体释放现象中的作用，设计了采用可模仿红细胞行为的更简单的成分来取代红细胞的实验。在本实验中，红细胞和炭被硝普酸钠 (SNP) 和三氯化铁所替代。由于硝普酸钠是强的一氧化氮制造者，而且众所周知 RBC 是 NO^- 的载体，因而进行这种替代。加入三氯化铁 (FeCl_3 母液, 25 μM) 5 作为血红蛋白中铁离子的替代物。

将装有细菌生长培养基和 5ml 人血浆或血清以及各种浓度的硝普酸钠 (SNP, 200 μM) 和外源三氯化铁 (终浓度为 4.1 μM) (用于代替红细胞和炭) 的培养瓶, 37 $^\circ\text{C}$ 下温育然后加热到 56 $^\circ\text{C}$ 30 分钟。样品显示了 aPL 的血清转化现象, 但仅有 IgG (数据未显示)。

10 该结果表明, 在抗体去屏蔽时可能涉及 NO^- , 并表明培养瓶中的固相材料的机械作用使红细胞破碎并释放 NO^- 。或者, NO 的释放和改变可导致血红蛋白分子参与氧化还原反应。

实施例 19

为了确定将自身抗体去屏蔽的效果是否是由于血清或者血液中含自身抗体的大分子结构的降解引起, 或者是否由抗体本身的结合专一性的直接改变所引起, 进行了一系列采用商业静脉内免疫球蛋白 (IvIg) 来代替人血浆或者血清的实验。商业 IvIg 是来自多个供体的集中的血浆的酒精沉淀级分, 通常来自 1000-10000 个供体。典型地, IvIg 主要包含 IgG, 并通常没有 IgA、IgM 和其它血浆蛋白质。当通过 ELISA 测试来测定未处理的 IvIg 中的自身抗体的存在时, 20 检测结果为阴性。由于其制备方式, IvIg 还不含脂蛋白微球、囊泡或其它大分子结构。因此, 如果温育处理后 IvIg 的自身抗体的存在检测为阳性, 则必然该自身抗体是通过已经存在于 IvIg 制品中的 IgG 抗体的改变而获得的, 而不是通过隐藏自身抗体的结构或者囊泡的降解来获得的。

在下面的实施例中, 使用的商业 IvIg 制品为冻干的 IvIg (Immune Globulin 25 Intravenous (Human) Gammar-PI. V., Aventis Behring, Kankakee, Illinois)。

5 克商业的冻干 IvIg 的制品在无菌磷酸缓冲盐溶液 (PBS, 100mg/ml) 中复原。将 1.7ml 复原的 IvIg 溶液加入到装有细菌生长培养基 (不含红细胞和炭) 的培养瓶中, 并于 37 $^\circ\text{C}$ 温育 20 小时。经温育的混合物显示了血清转化和 aPL IgG 的存在 (数据未显示)。(如同预期的那样, 仅检测到 IgG, 而没有检测到 IgA 30 或者 IgM)。

在相似的试验中，在室温下于摇瓶中温育的混合物中检测到了自身抗体，但结果不象在 37 度下的那么好（结果未示出）。

将 IvIg-细菌生长培养基混合物加热到 37°C 以上并不能带来自身抗体的进一步增加。

- 5 作为对照，直接将 IvIg 从培养瓶中取出来检测 aPL 和其它自身抗体，结果为阴性。

实施例 20

- 10 在实施例 19 中，表明自身抗体可通过在细菌生长培养基中温育商业 IvIg 制品来获得。下一步是试图测定细菌生长培养基中哪些成分在产生可检测的自身抗体中起着作用。

首先，将 2% 胰豚豆豚培养液 (TSB) (其含有酪蛋白的胰消化物 (pancreatic digest): 大豆的木瓜消化物 (papaya digest) = 17: 3 的蛋白胨) (余量为水) 中的 IvIg 在 37°C 下振荡温育 20 小时。检测经温育的混合物中 aPL 的存在，结果为阴性。

- 15 接着，将 IvIg 在含有大豆培养液、硝普酸钠 (SNP) 和氯高铁血红素 (一种含铁 (三价铁) 的原卟啉) 的试管中于 37°C 下振荡温育 20 小时。采用的量为在总量为 1ml 的大豆培养液中含 60 微升的 IvIg, 5 微升的 SNP 和 5 微升的氯高铁血红素。经温育的混合物中 aPL 的存在测定为阳性，特别是 aPS (15MoM) 和 aPE (41MoM)。(数据未显示)。

20 实施例 21

进行了一系列实验来测定只使用氯高铁血红素的温育是否足以在 IvIg 中或者在血浆或血清中引起自身抗体的出现。

- 25 将复原的冻干 IvIg (浓度为 100mg/ml) 加入含有氯高铁血红素的磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 中并在 37°C 下温育 20 小时。使用量为 300 μ l 的 IvIg 溶液, 5 μ l 的氯高铁血红素溶液 (75 μ g), 总体积为 1ml。

如图 21 所示，经温育的混合物显示了显著量的 aPS 和 aPE 的 IgG, 以及少量的 aCL 的 IgG。

当血清或者血浆与氯高铁血红素在相似的条件温育时，没有检测到自身抗体。

30 实施例 22

当 IvIg 与氯高铁血红素一起培养可获得自身抗体存在的阳性结果, 相反, 当血清或者血浆与氯高铁血红素一起培养却获得阴性结果, 这一事实表明, 血清或者血浆可能含有抑制或者干扰获得自身抗体的过程的物质。

在一系列实验中, 与实施例 21 中的步骤相似, IvIg 在 Tris 缓冲液中与氯高铁血红素一起在 37°C 下温育 20 小时, 但增加了在温育前将逐渐增加量的人血清 (发明人的) 加入到这些批料 (batch) 中这样的特征。检测每一批中 aPS、aCL、aPE 和 aPC 自身抗体的存在, 结果显示于图 22 中。图 22 中显示的结果表明, 增加量的血清对抗磷脂抗体的释放具有抑制效应。当以血浆代替血清时显示了相似的结果 (数据未显示)。对于这些结果的一种可能的解释是, 含有三价铁状态的铁分子并已知可作为活性氧化剂的氯高铁血红素, 可起到氧化某些免疫球蛋白分子的结合位点的作用, 从而使改变的结合位点能够与自身的抗原结合。该过程可被血液中的某些物质, 可能是抗氧化剂所抑制。

实施例 23

用 Tris 缓冲液将人血清 (发明人的) 稀释至 1/10。在一系列实验中, 1ml 为一批的这种稀释的血清与逐渐增加量的氯高铁血红素一起温育, 具体是, 0 μ l、10 μ l、25 μ l、50 μ l。(以前发现氯高铁血红素本身不足以引起自身抗体从血液或血清中释放, 尽管其足以引起从 IvIg 中的释放。因此, 对血清进行稀释的目的是稀释任何血液中的干扰物质的影响, 例如抗氧化剂。)测定这些批中 aPS、aCL、aPE、aPC 自身抗体的存在, 结果显示于图 23 中。图 23 中显示的结果表明, 尽管当加入 0 或者 10 μ l 的氯高铁血红素时, 没有检测到明显量的自身抗体, 但加入 25 μ l 的氯高铁血红素时, 可以检测到明显量的自身抗体。出于未知的原因, 加入 50 μ l 的氯高铁血红素时, 检测到的自身抗体的量较少。

实施例 24

设计了下一系列试验来测定血液中的诸如维生素 C 的抗氧化剂是否能抑制自身抗体的释放。在一系列实验中, IvIg 在 Tris 缓冲液中与氯高铁血红素一起温育, 但增加了在加入 IvIg 之前和温育前将逐渐增加量的抗坏血酸 (维生素 C) 加入到含氯高铁血红素的缓冲液中并使其混合 30 分钟这样的特征。如图 24 中所示, 大约有 78% 的氯高铁血红素诱导的 aPE 的释放被 1mg 的维生素 C 抑制, 该维生素 C 的量代表了维生素 C 的生理浓度。存在 aPS 释放的双相曲线 (biphasic curve), 其增加了低浓度的维生素 C 可作为氧化剂, 但在高浓度时

变成抗氧化(还原)剂的可能性。

实施例 25

设计了下一系列试验来测定氯高铁血红素溶解于其中的载体是否对获得的结果有影响, 以及氯高铁血红素中的铁原子是否必须。在一系列实验中, IvIg 在 Tris 缓冲液中与氯高铁血红素或其它添加剂一起温育。特别地, 在一个例子中, 氯高铁血红素用 NaOH 溶解。在另一个例子中, 其用 DMSO 溶解。在其他例子中, 采用一种与氯高铁血红素相同但不含铁(Fe^{+++})的分子, 血卟啉IX (hpIX) 来替代氯高铁血红素, 并用 NaOH 或 DMSO 溶解。在其它例子中, 以 NaOH 和 DMSO 作为对照进行检测(不加氯高铁血红素或者 hpIX)。如图 25 所示, 使用 NaOH 溶解的氯高铁血红素产生了自身抗体存在的阳性结果, 而氯高铁血红素 + DMSO、hpIX+NaOH、hpIX+DMSO、只有 NaOH 和只有 DMSO 都不产生阳性结果。

实施例 26

为了进一步确认氯高铁血红素引起抗体的氧化, 将等摩尔量的血红素结合蛋白(Hpx)加入到 IvIg PBS 氯高铁血红素混合物中。Hpx 是一种对血红素铁具有极高结合亲和力的抗氧化分子。购自 SciPac (Kent, England) 的冻干 Hpx 以 10mg/ml 在 PBS 中复原。图 26 中显示的为加入逐渐增加浓度的氯高铁血红素到 IvIgG 中, 并相应地加入等摩尔浓度的 Hpx 而得到的 aPS 的氧化还原数据。由于氯高铁血红素和 Hpx 的结合相互作用为 1: 1, 所以 Hpx 能够消除氯高铁血红素中存在的铁离子的氧化还原能力。

实施例 27

为了说明可通过 IvIg 氧化处理得到的自身抗体的广泛范围和活性, 采用氯高铁血红素处理的 IvIg 或者未处理的 IvIg 作为一级抗体, 并采用抗-人 HRP 标记的缀合物作为对照(HRP=辣根过氧化物酶), 使用来自 3 种不同的细胞系的细胞裂解产物建立了一系列免疫印迹实验。印迹显示于图 27 中。“B”裂解产物是取自淋巴瘤患者的称为 Raja 的 B 淋巴细胞系。“T”裂解产物是再次取自白血病患者称为 Jurkat 的 T 淋巴细胞来源的细胞系。U87MG 裂解产物为恶性胶质瘤母细胞系(脑癌)。还原的裂解产物以 50mg/ml 的浓度在凝胶中进行电泳。为了获得氯高铁血红素处理的 IvIg 制品, 将 75 μ g 的氯高铁血红素与 1ml 含有 6mg IvIgG 的 PBS 结合。在 37 度下温育 20 小时。在图 27 中, 将其中采用氯高铁血红素处理的 IvIg 作为一级抗体的印迹标记为“测试 IgG”; 其中采用未处理的

IvIg 作为一级抗体的印迹标记为“对照”，而将不采用一级抗体而施加了抗-人 HRP-标记的缀合物的印迹标记为“Secondary”。氯高铁血红素处理和未处理的 IgG 制品分别稀释 1/1000。采用的抗-人 HRP-标记的缀合物稀释度为 1/5000。

5 这些数据清楚的显示，与不显示活性的未处理的 IvIgG 和缀合物对照相比，氯高铁血红素处理的 IvIg 对人细胞成分具有丰富的活性。

实施例 28

进行了下一实验来测定除氯高铁血红素之外的氧化剂，特别是不含铁的氧化剂是否能有效地使自身抗体去屏蔽。将 25 μg 高锰酸钾 (KMnO_4) 以 100 μM 的浓度和 2mg 的 IvIg 加入总体积为 1ml 的磷酸缓冲盐溶液中，将该混合物于 10 37°C 下温育过夜。在经温育的混合物中，可检测到 aPC 和 aPS。aCL 通常能检测到，但不能检测到 aPE (数据未显示)。后来确定了为什么未检测到 aPE 的原因是由于 KMnO_4 改变了在 ELISA 检测中使用的 PE 磷脂抗原。

实施例 29

15 在说明了自身抗体可通过氧化反应去屏蔽以后，下一问题是是否电化学方法，例如电池提供的电动势能够达到同样的效果。

将 IvIg 溶解于磷酸缓冲盐溶液中，并且在每个试验中，将镀锌钢、铜、或者不锈钢电极与 9 伏电池的正极和负极端子连接，并浸入到溶液中 1-2 分钟。在该过程中，在溶液中观察到起泡现象，而且 PBS 溶液的颜色发生了改变 (当采用铜导线时为蓝色，采用不锈钢导线时为棕色，采用镀锌钢导线时为绿色)。20 如图 28A 和 28B 中所示，处理的溶液在 aPL 依赖型测试中检测到 aPS、aCL、aPE 和 aPC 自身抗体的存在为阳性，在 aPL 独立型测试中检测到 aPS、aPE 和 aPC 自身抗体的存在为阳性。

实施例 30

25 为了避免金属与溶液相互作用从而确定只有电流的影响，采用石墨电极来代替金属电极。石墨是惰性的，但能够将电子传递到导电溶液中而不参与反应。

将 IvIg 溶解于磷酸缓冲盐溶液中，并将与 6 伏电池的正极和负极端子连接的石墨电极浸入到溶液中 60 秒。如图 29 所示，处理的溶液检测到 aPS、aPE 和 aPC 自身抗体的存在为阳性。

实施例 31

30 在涉及将电流施加到磷酸缓冲盐溶液中的 IvIg 溶液中的实验之中，我们注

意到 pH 明显增加，可能是由于形成了 NaOH。为了保持反应在生理 pH 水平下进行反应，采用细胞培养基 RPMI 来代替磷酸缓冲盐溶液。

进行了下一系列实验来测定暴露于电流中的时间对自身抗体的去屏蔽的影响。将 IvIg 溶解于 RPMI 这种细胞培养基中，将与 6 伏电池的正极和负极端子连接的石墨电极以各种时间长度浸入溶液中。如图 30 所示，在暴露于电流中 60 秒后得到了依赖型 aPL 的最大释放。奇怪的是，在 2 分钟到 4 分钟的时间内，aPL 的量下降或者消失。

实施例 32

由于前面的实验表明 aPL 抗体能通过将 IvIg 暴露于电流后获得，但进一步暴露于电流中后 aPL 抗体会消失，因此下一问题是，自身抗体的去屏蔽是否能通过电流来逆转。也就是说，阳性对照血清是否能处理成不再能检测到自身抗体呢？

在每个实验中，通过将 6 伏电池的正极和负极端子连接的石墨电极浸入到按 1: 400 稀释的 aCL 阳性对照血清、按 1: 75 稀释的 aPE 阳性对照血清和按 1: 400 稀释的 aPS 中至多 240 秒，使它们暴露于电流中。如图 31A-31C 所示，每种对照血清各自的专一性都变成了阴性。

实施例 33

基于实施例 32 中的结果，下一要问的问题是，如果将患者的血清暴露于电流中，患有自身免疫疾病的患者的自身抗体是否能够被重新屏蔽。将取自具有升高水平的 aPS 和 aCL 的患者的血清用磷酸缓冲盐溶液按 1/400 稀释（在 PBS 中的稀释的量以能使 OD 值在 10-15 分钟内达到 1.000 为准），并将与 6 伏电池的正极端子和负极端子相连的石墨电极浸入到溶液中不同的时间。如图 32 所示，在自身免疫患者血清样品中可检测到的 aCL 和 aPS 的量在 30 秒后明显下降，在 2 分钟之后不再能够检测到。这些实验采用其他患者的抗体重复进行，并得到了相同的结果（数据未显示）。

实施例 34

在早期的实验中，将取自具有非常专一和高的滴度 IgA aPE 的患者的血液样品暴露于常规微生物培养瓶中的氯高铁血红素。我们观察到在暴露于氯高铁血红素之后，她的 IgA aPE 消失了，并在 aPL ELISA 中检测到出现了 IgG aPS、aCL，而且更惊人的是，还有 IgG aPE。那时，对这种现象的解释还不那么容易

弄清楚。

在发现采用电流能更快地去屏蔽之后，使得通过另一位具有高 aPE 的患者来证明早期的结果成为可能。在本实验中，将取自具有高 aPE 患者的血清在 PBS 中按 1/75 稀释，并将与 6 伏电池的正极和负极端子相连的石墨电极浸入到溶液中不同时间。如图 33 所示，在施加 6 伏的 DC 电流 30 秒内，伴随着去屏蔽和检测到 aPS 和 aCL IgG，aPE 变得不可检测（被屏蔽）。刚刚去屏蔽的 aPL 的峰值出现仅仅大约 30 秒，在暴露 2-4 分钟后又再次被屏蔽。

上述试验所提出的一个重要的技术方面在于，对患者的 PE 进行处理使其从测定中所采用的血浆蛋白稀释液中除去，在本发明的情况下，血浆蛋白稀释液为 10% 的成年牛血浆 (ABP)。在其他未显示的实验中，在加入 ELISA 稀释液中使用的血浆蛋白质之前，将稀释的患者血清暴露于 6 伏 EMF 条件下。这些实验的重要方面在于，表明了 EMF 影响患者的抗体，而不是稀释液中使用的血浆蛋白质的 EMF 改变。

这些实验数据支持了氧化还原反应决定了不同抗体专一性的出现和消失这一观察结果。从这些实验中我们还认识到，氧化还原作用似乎局限于抗体结合位点，即抗体分子的 Fab 部分。这是因为，在缀合物持续识别抗体分子的不同抗体重链靶标 (Fc 部分) 时，在 ELISA 中使用的异源抗人抗体标记的缀合物没有受到影响。因此，当人抗体没有被氧化还原消耗或者破坏时，最令人信服的解释是，抗体分子的 Fab 部分中的抗体结合位点带有可获得的电子，其参与了氧化/还原过程。

实施例 35

进行了下面的实验来观察除了自身抗体之外的其它血浆蛋白质的结合专一性是否能被氧化-还原所改变。在这些实验中，将 10% 成年牛血浆 (ABP) 溶液，即已用于测定蛋白质依赖型 aPL 结合的含有磷脂结合性蛋白质的相同溶液，暴露于 6 伏特电池的电流中不同时间。然后将处理后的 ABP 样品用于 aPS、aCL 和 aPE 阳性患者血清的 ELISA 测定，来观察对 ABP 的处理是否对 ELISA 结果有影响。如图 34 所示，在时间为零时 (未处理的 ABP)，阳性患者的血清给出了通常见到的在 ABP 中的 aPL 响应。当 10% 的 ABP 暴露于氧化-还原 (EMF) 一段时间时，检测到的 aPL 的量减少，2 分钟后，aPE 阳性血清不再为阳性。这些结果表明，对患者 aPL 反应性负责的血浆蛋白质通过暴露于电流中而发生了改变。例如，由

于激肽原是负责为 aPE 依赖型反应提供阳性 ELISA 信号的血浆蛋白质 (激肽原与 PE 结合, 然后抗体与激肽原结合, 然而 aPE 将不会与 PE 或者激肽原单独结合), 因而这表明 ABP 样品中的激肽原通过氧化还原暴露而发生了改变。在暴露 240 秒时 aCL 也呈现阴性, 并且由于该患者血清需要凝血酶原和/或 $\beta 2$ 糖蛋白 (或者两种物质都涉及) 以在 aPL ELISA 中产生阳性信号, 因而这两种蛋白质也 5 也必须通过氧化还原反应来改变。同样的两种蛋白质均在 aPS 实施例中提到。

显然, 鉴于上述教导, 可对本发明进行许多改变和变化。因此应理解, 在所附的权利要求书的范围内, 可采取与特定描述不同的方式来实践本发明。

内部 aPL ELISA*

<u>PS</u>	<u>CL</u>	<u>PE</u>	<u>PC</u>
IgG	IgG	IgG	IgG
IgA	IgA	IgA	IgA
IgM	IgM	IgM	IgM

*在磷脂结合血浆蛋白存在（依赖型）和不存在（独立）时

图1

无条件培养液 + 血液

抗磷脂抗体 (aPL) 结果

		<u>PL 结合蛋白</u>		<u>正常范围</u>
		<u>依赖型</u>	<u>独立型</u>	
aPS	IgG	24 MoM +++	3 MoM	≤ 4 MoM
	IgA	8 MoM +	2 MoM	≤ 3 MoM
	IgM	8 MoM +	1 MoM	≤ 5 MoM
aCL	IgG	12 MoM +++	2 MoM	≤ 4 MoM
	IgA	12 MoM +++	2 MoM	≤ 4 MoM
	IgM	16 MoM +++	1 MoM	≤ 6 MoM
aPE	IgG	36 MoM +++	7 MoM +	≤ 4 MoM
	IgA	7 MoM +	2 MoM	≤ 3 MoM
	IgM	8 MoM +	3 MoM	≤ 5 MoM
aPC	IgG	2 MoM	4 MoM	≤ 4 MoM
	IgA	1 MoM	3 MoM	≤ 3 MoM
	IgM	6 MoM +	5 MoM +	≤ 4 MoM

图2

7位健康者的aPL范围

抗磷脂抗体 (aPL) 结果

		<u>PL 结合蛋白</u>		<u>正常范围</u>
		<u>依赖型</u>	<u>独立型</u>	
aPS	IgG	17-26 +++	5-14 ++	≤ 4 MoM
	IgA	4-14 ++	4-8 +	≤ 3 MoM
	IgM	5-16 ++	3-13 ++	≤ 5 MoM
aCL	IgG	7-10 ++	1-3	≤ 4 MoM
	IgA	6-19 ++	2-7 +	≤ 4 MoM
	IgM	6-17 ++	2-13 ++	≤ 6 MoM
aPE	IgG	22-33 +++	7-20 ++	≤ 4 MoM
	IgA	3-7 +	1-5 +	≤ 3 MoM
	IgM	2-7 +	2-8 +	≤ 5 MoM
aPC	IgG	1-2	1-4	≤ 4 MoM
	IgA	1-4+	5-20 ++	≤ 3 MoM
	IgM	1-8 +	4-17 ++	≤ 4 MoM

图 3

马RBC, 人血清, 培养液

抗磷脂抗体 (aPL) 结果

		<u>PL 结合蛋白</u>		<u>正常范围</u>
		<u>依赖型</u>	<u>独立型</u>	
aPS	IgG	14 MoM +++	1 MoM	≤ 4 MoM
	IgA	5 MoM +	1 MoM	≤ 3 MoM
	IgM	19 MoM +++	1 MoM	≤ 5 MoM
aCL	IgG	2 MoM	1 MoM	≤ 4 MoM
	IgA	13 MoM +++	1 MoM	≤ 4 MoM
	IgM	27 MoM +++	1 MoM	≤ 6 MoM
aPE	IgG	1 MoM	2 MoM	≤ 4 MoM
	IgA	1 MoM	1 MoM	≤ 3 MoM
	IgM	1 MoM	4 MoM	≤ 5 MoM
aPC	IgG	1 MoM	1 MoM	≤ 4 MoM
	IgA	1 MoM	1 MoM	≤ 3 MoM
	IgM	1 MoM	1 MoM	≤ 4 MoM

图 4

人RBC, 马血清, 培养液				
抗磷脂抗体 (aPL) 结果				
PL 结合蛋白				正常范围
		依赖型	独立型	
aPS	IgG	1 MoM	1 MoM	≤ 4 MoM
	IgA	1 MoM	1 MoM	≤ 3 MoM
	IgM	1 MoM	1 MoM	≤ 5 MoM
aCL	IgG	1 MoM	1 MoM	≤ 4 MoM
	IgA	1 MoM	1 MoM	≤ 4 MoM
	IgM	1 MoM	1 MoM	≤ 6 MoM
aPE	IgG	1 MoM	1 MoM	≤ 4 MoM
	IgA	1 MoM	1 MoM	≤ 3 MoM
	IgM	1 MoM	1 MoM	≤ 5 MoM
aPC	IgG	1 MoM	1 MoM	≤ 4 MoM
	IgA	1 MoM	1 MoM	≤ 3 MoM
	IgM	1 MoM	1 MoM	≤ 4 MoM

图5

22℃ 摇瓶培养的血液				
抗磷脂抗体 (aPL) 结果				
PL 结合蛋白				正常范围
		依赖型	独立型	
aPS	IgG	6 MoM +	3 MoM	≤ 4 MoM
	IgA	1 MoM	1 MoM	≤ 3 MoM
	IgM	1 MoM	1 MoM	≤ 5 MoM
aCL	IgG	2 MoM	2 MoM	≤ 4 MoM
	IgA	1 MoM	1 MoM	≤ 4 MoM
	IgM	1 MoM	1 MoM	≤ 6 MoM
aPE	IgG	4 MoM	1 MoM	≤ 4 MoM
	IgA	1 MoM	1 MoM	≤ 3 MoM
	IgM	1 MoM	1 MoM	≤ 5 MoM
aPC	IgG	2 MoM	2 MoM	≤ 4 MoM
	IgA	1 MoM	1 MoM	≤ 3 MoM
	IgM	1 MoM	6 MoM +	≤ 4 MoM

图6

代替炭：0.7mm Degalan

抗磷脂抗体 (aPL) 结果

		<u>PL 结合蛋白</u>		<u>正常范围</u>
		<u>依赖型</u>	<u>独立型</u>	
aPS	IgG	31 MoM +++	3 MoM	≤ 4 MoM
	IgA	3 MoM	1 MoM	≤ 3 MoM
	IgM	2 MoM	1 MoM	≤ 5 MoM
aCL	IgG	7 MoM +	2 MoM	≤ 4 MoM
	IgA	5 MoM +	2 MoM	≤ 4 MoM
	IgM	10 MoM +++	1 MoM	≤ 8 MoM
aPE	IgG	8 MoM +	1 MoM	≤ 4 MoM
	IgA	2 MoM	1 MoM	≤ 3 MoM
	IgM	1 MoM	1 MoM	≤ 5 MoM
aPC	IgG	2 MoM	1 MoM	≤ 4 MoM
	IgA	1 MoM	1 MoM	≤ 3 MoM
	IgM	1 MoM	4 MoM	≤ 4 MoM

图 7

37°C 下在静止的培养瓶中的血液

抗磷脂抗体 (aPL) 结果

		<u>PL 结合蛋白</u>		<u>正常范围</u>
		<u>依赖型</u>	<u>独立型</u>	
aPS	IgG	1 MoM	1 MoM	≤ 4 MoM
	IgA	1 MoM	1 MoM	≤ 3 MoM
	IgM	2 MoM	1 MoM	≤ 5 MoM
aCL	IgG	1 MoM	1 MoM	≤ 4 MoM
	IgA	1 MoM	1 MoM	≤ 4 MoM
	IgM	7 MoM +	1 MoM	≤ 6 MoM
aPE	IgG	1 MoM	1 MoM	≤ 4 MoM
	IgA	1 MoM	1 MoM	≤ 3 MoM
	IgM	4 MoM	3 MoM	≤ 5 MoM
aPC	IgG	1 MoM	3 MoM	≤ 4 MoM
	IgA	1 MoM	1 MoM	≤ 3 MoM
	IgM	3 MoM	7 MoM +	≤ 4 MoM

图 8

56°C 下加热的影响

抗磷脂抗体 (aPL) 结果

		<u>PL 结合蛋白</u>		<u>正常范围</u>
		<u>加热前</u>	<u>加热后</u>	
aPS	IgG	47 MoM +++	69 MoM +++	≤ 4 MoM
	IgA	12 MoM +++	18 MoM +++	≤ 3 MoM
	IgM	3 MoM	1 MoM	≤ 5 MoM
aCL	IgG	13 MoM +++	16 MoM +++	≤ 4 MoM
	IgA	16 MoM +++	22 MoM +++	≤ 4 MoM
	IgM	12 MoM +++	16 MoM +++	≤ 6 MoM
aPE	IgG	48 MoM +++	44 MoM +++	≤ 4 MoM
	IgA	8 MoM +	8 MoM +	≤ 3 MoM
	IgM	2 MoM	1 MoM	≤ 5 MoM
aPC	IgG	6 MoM +	6 MoM +	≤ 4 MoM
	IgA	1 MoM	2 MoM	≤ 3 MoM
	IgM	1 MoM	3 MoM	≤ 4 MoM

图 9

Becton Dickinson* 培养瓶

抗磷脂抗体 (aPL) 结果

		<u>PL 结合蛋白</u>		<u>正常范围</u>
		<u>依赖型</u>	<u>独立型</u>	
aPS	IgG	11 MoM +++	3 MoM	≤ 4 MoM
	IgA	failure	failure	≤ 3 MoM
	IgM	4 MoM	1 MoM	≤ 5 MoM
aCL	IgG	6 MoM +	4 MoM	≤ 4 MoM
	IgA	5 MoM +	5 MoM +	≤ 4 MoM
	IgM	9 MoM +	1 MoM	≤ 6 MoM
aPE	IgG	32 MoM +++	1 MoM	≤ 4 MoM
	IgA	2 MoM	1 MoM	≤ 3 MoM
	IgM	10 MoM +++	1 MoM	≤ 5 MoM
aPC	IgG	1 MoM	1 MoM	≤ 4 MoM
	IgA	1 MoM	1 MoM	≤ 3 MoM
	IgM	1 MoM	1 MoM	≤ 4 MoM

*代替Biomerieux

图 10

厌氧培养瓶培养液+血液

抗磷脂抗体 (aPL) 结果

		<u>PL 结合蛋白</u>		<u>正常范围</u>
		<u>依赖型</u>	<u>独立型</u>	
aPS	IgG	16 MoM +++	10 MoM +++	≤ 4 MoM
	IgA	3 MoM	2 MoM	≤ 3 MoM
	IgM	9 MoM +	5 MoM	≤ 5 MoM
aCL	IgG	8 MoM +	3 MoM	≤ 4 MoM
	IgA	4 MoM	1 MoM	≤ 4 MoM
	IgM	17 MoM +++	3 MoM	≤ 5 MoM
aPE	IgG	33 MoM +++	10 MoM +++	≤ 4 MoM
	IgA	4 MoM +	1 MoM	≤ 3 MoM
	IgM	9 MoM +	3 MoM	≤ 5 MoM
aPC	IgG	1 MoM	2 MoM	≤ 4 MoM
	IgA	1 MoM	1 MoM	≤ 3 MoM
	IgM	3 MoM	5 MoM +	≤ 4 MoM

图 11

用 K562 * 替代 RBC

抗磷脂抗体 (aPL) 结果

		<u>PL 结合蛋白</u>		<u>正常范围</u>
		<u>依赖型</u>	<u>独立型</u>	
aPS	IgG	10 MoM +++	6 MoM +	≤ 4 MoM
	IgA	5 MoM +	1 MoM	≤ 3 MoM
	IgM	1 MoM	1 MoM	≤ 5 MoM
aCL	IgG	3 MoM	1 MoM	≤ 4 MoM
	IgA	7 MoM +	1 MoM	≤ 4 MoM
	IgM	2 MoM	1 MoM	≤ 6 MoM
aPE	IgG	14 MoM +++	4 MoM	≤ 4 MoM
	IgA	7 MoM +	2 MoM	≤ 3 MoM
	IgM	1 MoM	1 MoM	≤ 5 MoM
aPC	IgG	1 MoM	2 MoM	≤ 4 MoM
	IgA	1 MoM	3 MoM	≤ 3 MoM
	IgM	1 MoM	3 MoM	≤ 4 MoM

总细胞数 11.3×10^6

图 12

用RPMI和小珠替代培养液

抗磷脂抗体 (aPL) 结果

		<u>PL 结合蛋白</u>		<u>正常范围</u>
		<u>依赖型</u>	<u>独立型</u>	
aPS	IgG	1 MoM	1 MoM	≤ 4 MoM
	IgA	1 MoM	1 MoM	≤ 3 MoM
	IgM	2 MoM	2 MoM	≤ 5 MoM
aCL	IgG	1 MoM	2 MoM	≤ 4 MoM
	IgA	1 MoM	1 MoM	≤ 4 MoM
	IgM	2 MoM	2 MoM	≤ 6 MoM
aPE	IgG	1 MoM	1 MoM	≤ 4 MoM
	IgA	1 MoM	1 MoM	≤ 3 MoM
	IgM	2 MoM	4 MoM	≤ 5 MoM
aPC	IgG	1 MoM	1 MoM	≤ 4 MoM
	IgA	1 MoM	1 MoM	≤ 3 MoM
	IgM	3 MoM	5 MoM +	≤ 4 MoM

图 13

胎盘脐带血+培养液

抗磷脂抗体 (aPL) 结果

		<u>PL 结合蛋白</u>		<u>正常范围</u>
		<u>依赖型</u>	<u>独立型</u>	
aPS	IgG	42 MoM +++	27 MoM +++	≤ 4 MoM
	IgA	1 MoM	1 MoM	≤ 3 MoM
	IgM	1 MoM	1 MoM	≤ 5 MoM
aCL	IgG	14 MoM +++	6 MoM +	≤ 4 MoM
	IgA	1 MoM	1 MoM	≤ 4 MoM
	IgM	2 MoM	1 MoM	≤ 6 MoM
aPE	IgG	38 MoM +++	23 MoM +++	≤ 4 MoM
	IgA	1 MoM	1 MoM	≤ 3 MoM
	IgM	1 MoM	1 MoM	≤ 5 MoM
aPC	IgG	1 MoM	6 MoM +	≤ 4 MoM
	IgA	1 MoM	1 MoM	≤ 3 MoM
	IgM	1 MoM	1 MoM	≤ 4 MoM

图 14

用硝酸普酸钠替代RBC

抗磷脂抗体 (aPL) 结果

		<u>PL 结合蛋白</u>		<u>正常范围</u>
		<u>依赖型</u>	<u>独立型</u>	
aPS	IgG	18 MoM +++	5 MoM +	≤ 4 MoM
	IgA	8 MoM +	4 MoM +	≤ 3 MoM
	IgM	1 MoM	1 MoM	≤ 5 MoM
aCL	IgG	7 MoM +	1 MoM	≤ 4 MoM
	IgA	7 MoM	1 MoM	≤ 4 MoM
	IgM	1 MoM	1 MoM	≤ 6 MoM
aPE	IgG	23 MoM +++	9 MoM +	≤ 4 MoM
	IgA	3 MoM	4 MoM +	≤ 3 MoM
	IgM	1 MoM	1 MoM	≤ 5 MoM
aPC	IgG	1 MoM	2 MoM	≤ 4 MoM
	IgA	2 MoM	1 MoM	≤ 3 MoM
	IgM	1 MoM	1 MoM	≤ 4 MoM

*200μM

图 15

狼疮抗凝血剂活性 全血培养液

	<u>立即混合</u>	<u>温育后混合</u>
	1:1	1:1 1-2 小时
dRVVT	46.7 sec*	104.4 sec
dPT	42.5 sec†	48.7 sec

* 正常值 = 28 - 49 sec † 正常值 = 29.6 - 41.8

图 16

通过免疫荧光法鉴定的自身抗体

在Hep-2细胞系上观察到的荧光图式

- 抗核仁（硬皮病相关）
- 抗核纤层蛋白（核孔处非常亮）
- 抗线粒体（细胞质）
- 抗中心粒（未知意义）

图17

流式细胞术选通的（gated）单核细胞
前向散射对侧向散射的散点图

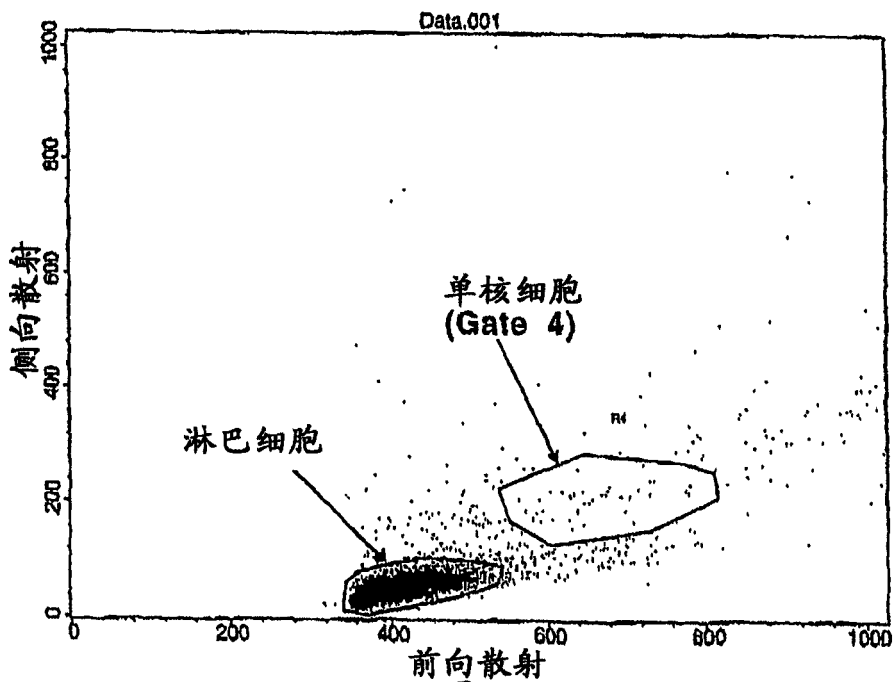


图18

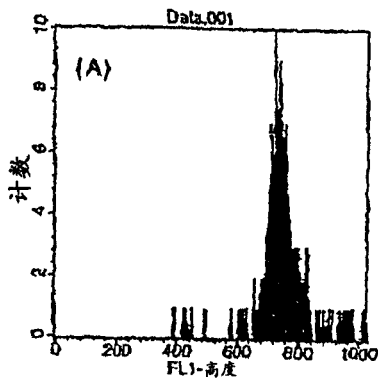
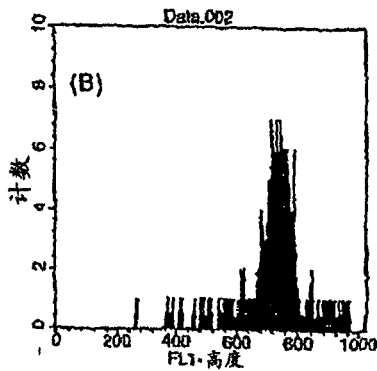


图 19A

柱状图统计
 对数数据单位: 通道值
 患者ID: xxx 细胞
 Gate: G4
 总事件: 10000 (集中的 NHS)

% 总数	平均值	Geo平均值	CV	中值
3.78	748.20	744.62	9.60	743.50



柱状图统计
 对数数据单位: 通道值
 患者ID: xxx 细胞
 Gate: G4 (正常人血清)
 总事件: 10000

% 总数	平均值	Geo平均值	CV	中值
4.13	732.09	726.99	10.96	737.00

图 19B

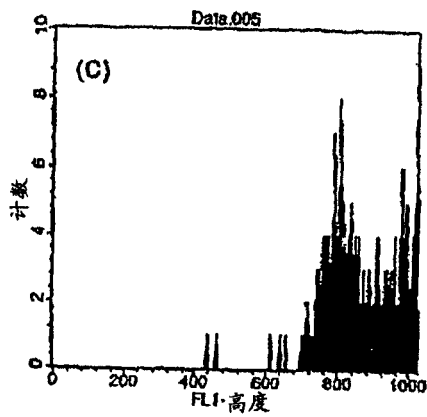


图 19C

柱状图统计

对数数据单位: 通道值
 患者ID: xxx 细胞 (经本发明方法处理
 Gate: G4 的正常人的血清)
 总事件: 10000

%总数	平均值	Geo平均值	CV	中值
4.72	872.61	866.72	11.38	864.00

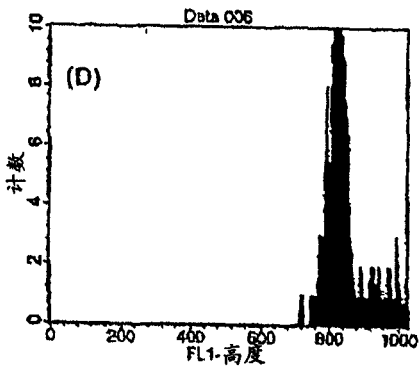


图 19D

柱状图统计

对数数据单位: 通道值
 患者ID: . xxx 细胞 (阳性对照)
 Gate: G4
 总事件: 10000

%总数	平均值	Geo平均值	CV	中值
5.18	834.75	833.53	5.54	827.50

通过ImmunoConcepts Laboratories*
鉴定的ANA抗体
采用 RELISA® 筛选测定 †

<u>样品</u>	<u>单位</u>
脐带血清	0
静止的脐带血	27
经振荡的脐带血	75
ACS 血清	0
ACS 振荡 + 加热	90

*Sacramento, California † < 10 单位 = neg 10-15 单位 = 分界线

图 20

图21

抗磷脂抗体 (aPL) 结果

		PL 结合蛋白		正常范围	
		依赖型	独立型		
aPS	IgG	31 MoM +++	4 MoM	VI	4 MoM
	IgA	1 MoM	1 MoM	VI	3 MoM
	IgM	1 MoM	1 MoM	VI	5 MoM
aCL	IgG	7 MoM +	1 MoM	VI	4 MoM
	IgA	1 MoM	1 MoM	VI	4 MoM
	IgM	1 MoM	1 MoM	VI	6 MoM
aPE	IgG	32 MoM +++	3 MoM	VI	4 MoM
	IgA	1 MoM	1 MoM	VI	3 MoM
	IgM	1 MoM	1 MoM	VI	5 MoM
aPC	IgG	5 MoM +	1 MoM	VI	4 MoM
	IgA	1 MoM	1 MoM	VI	3 MoM
	IgM	1 MoM	1 MoM	VI	4 MoM

图 22

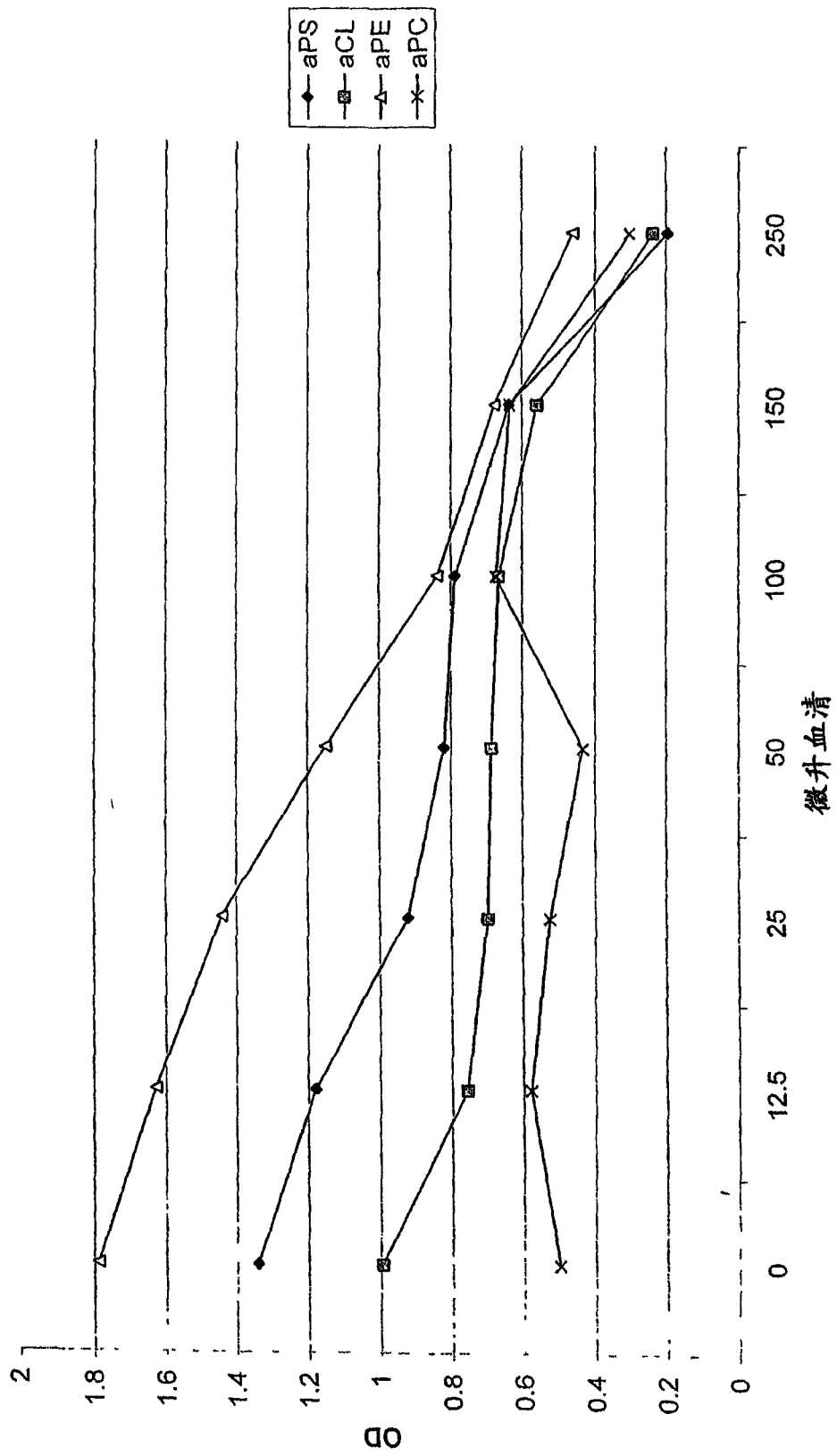
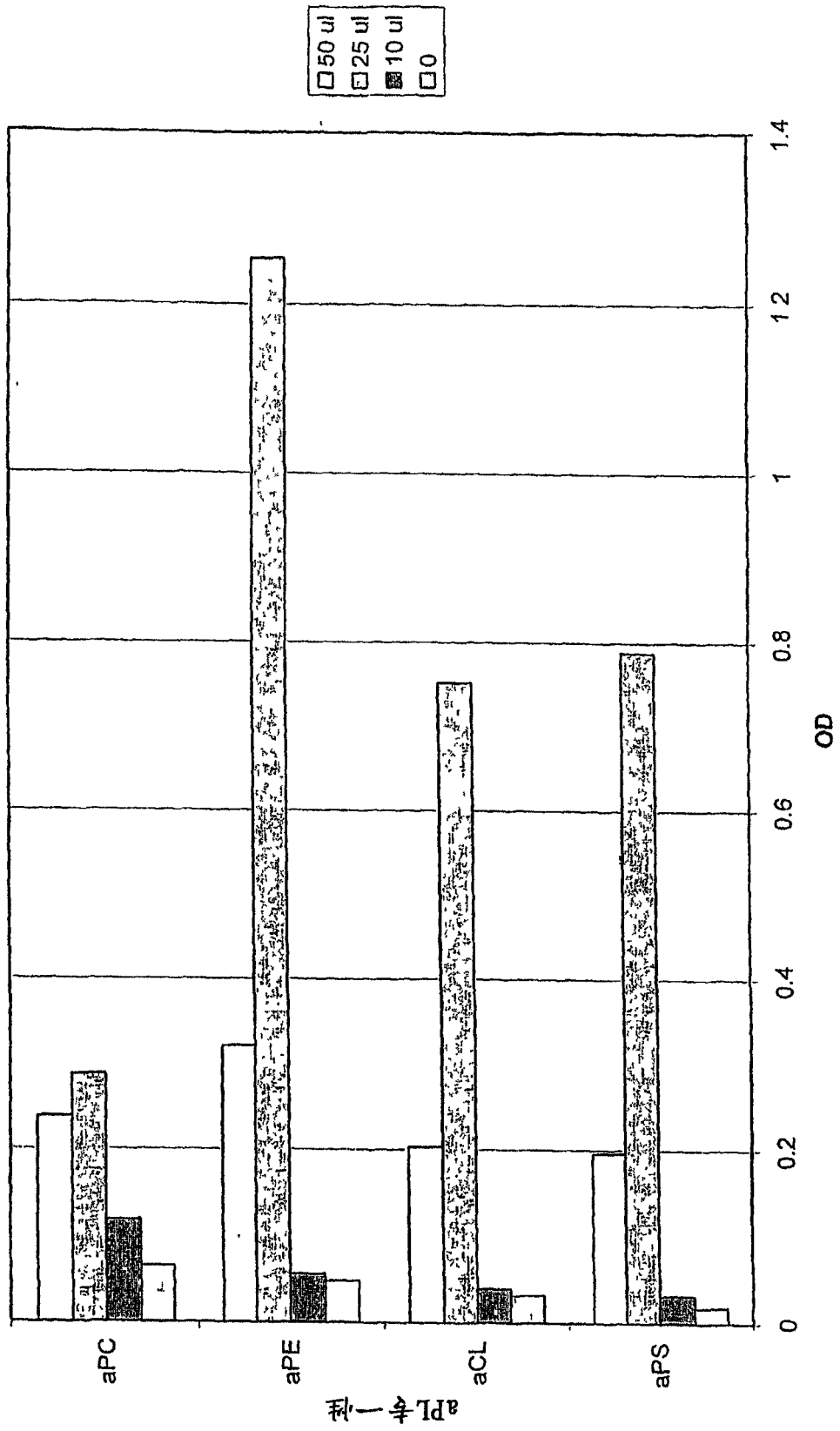


图23 氯高铁血红素剂量响应



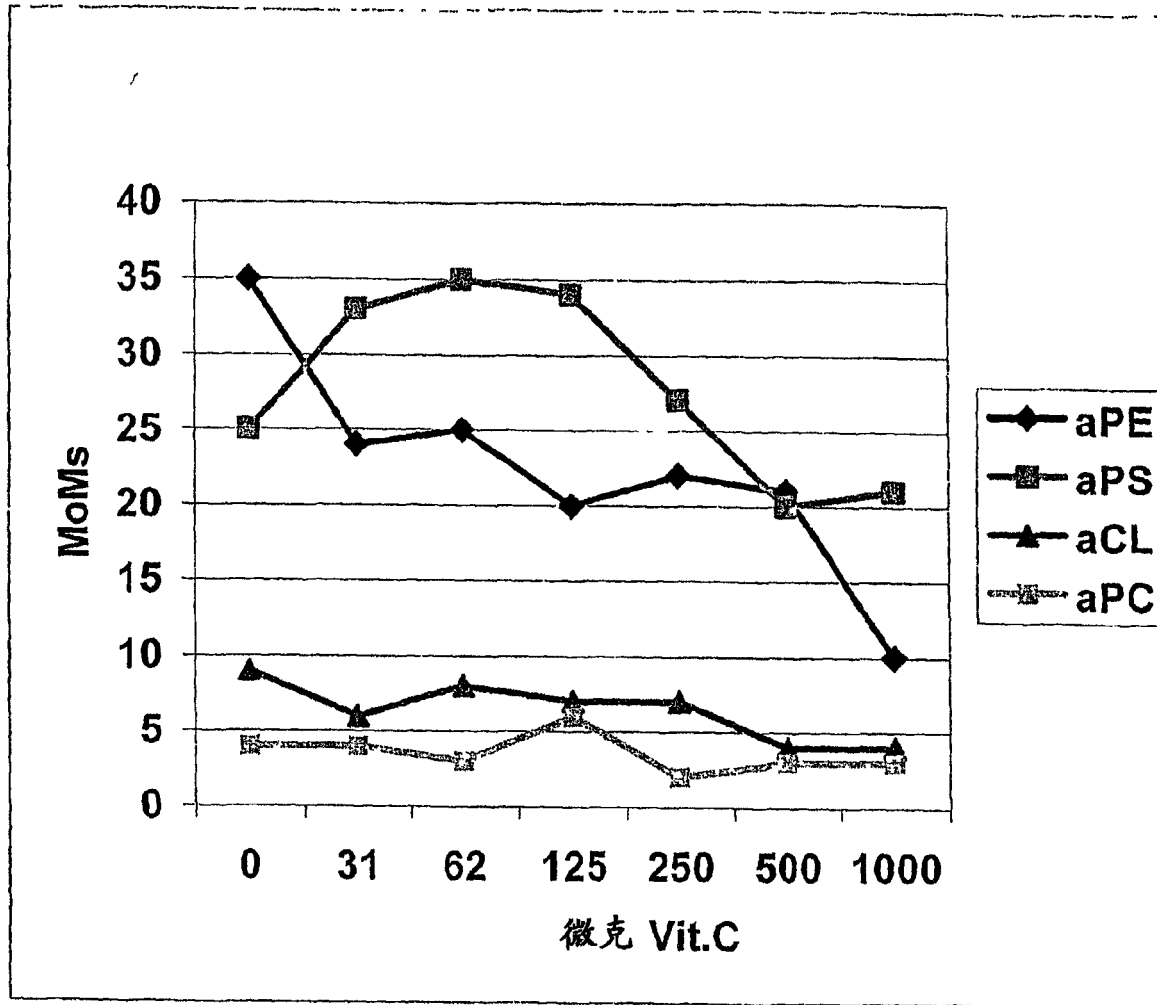


图 24

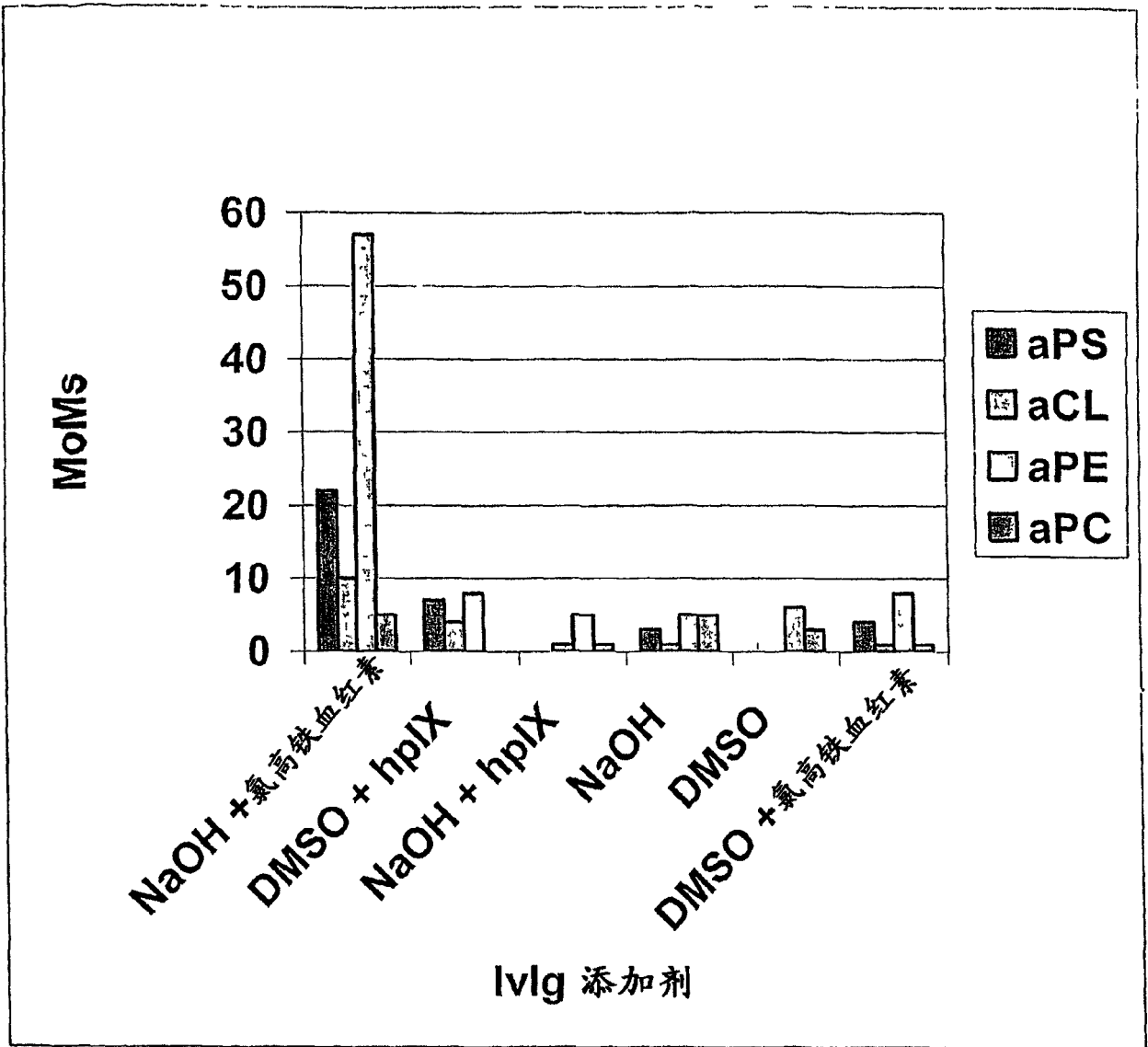


图 25

氯高铁血红素-血红素结合蛋白对氯高铁 血红素 IVIg aPS 转化的影响

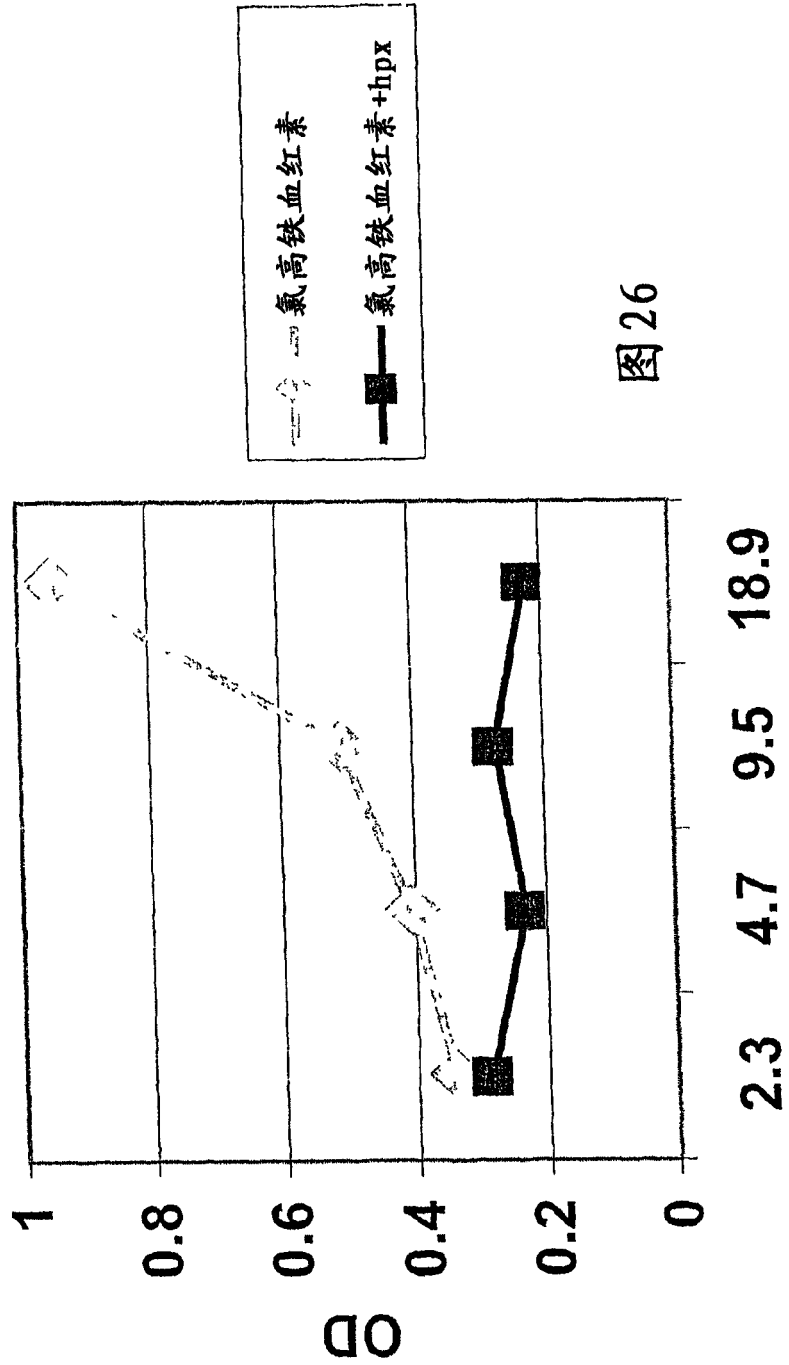
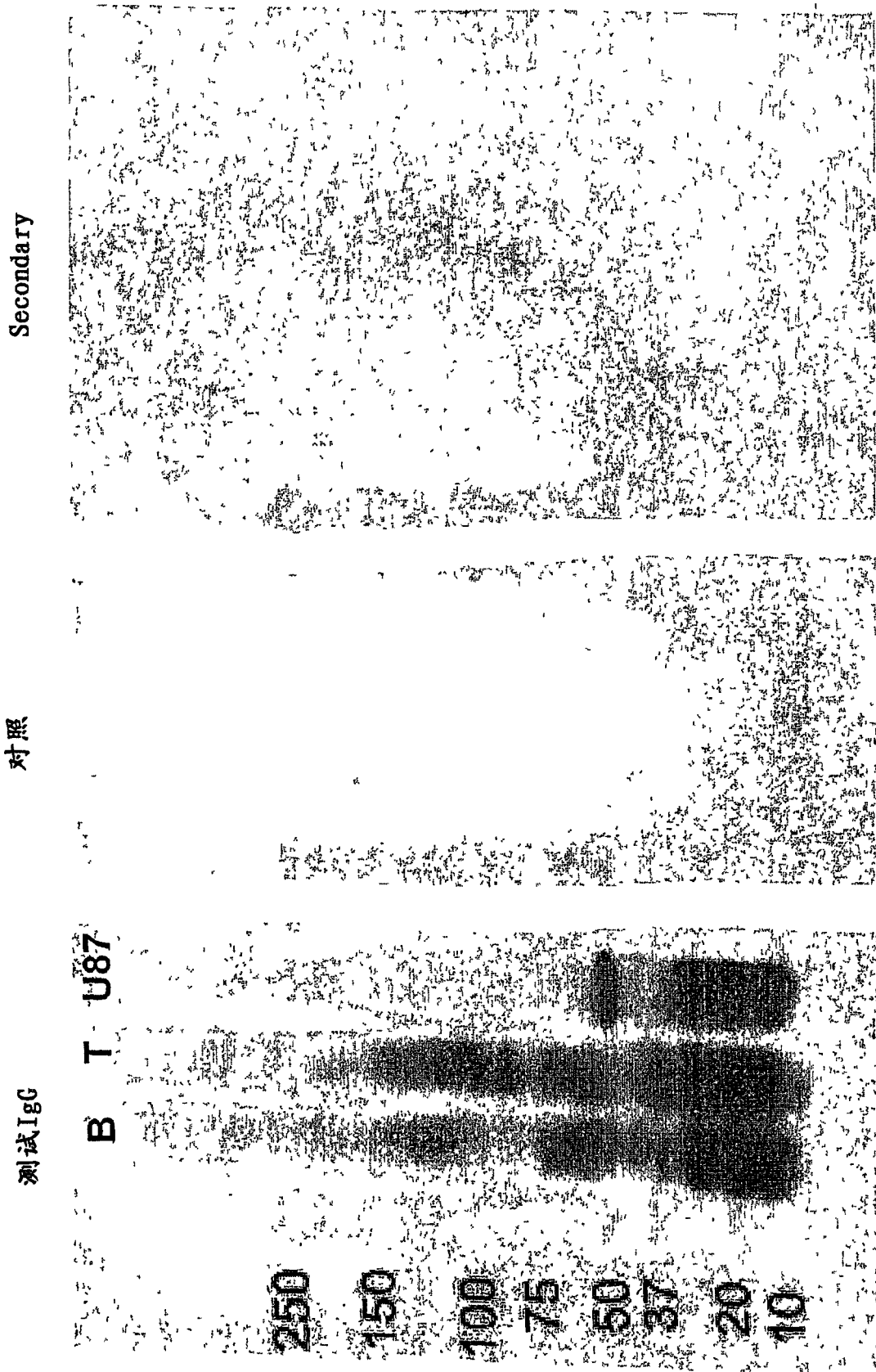
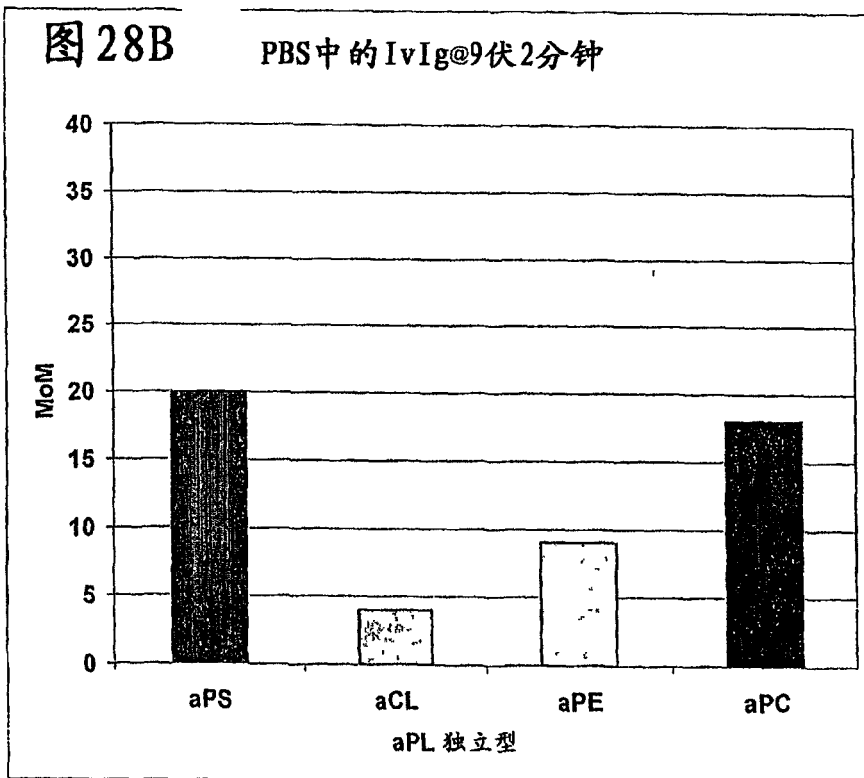
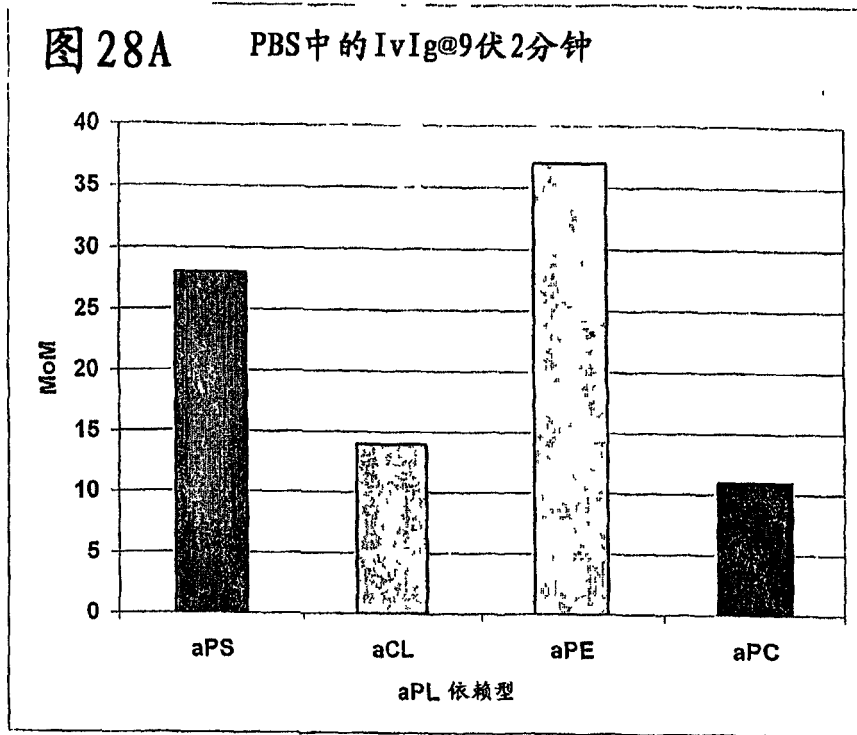


图 26

微克氯高铁血红素

图27





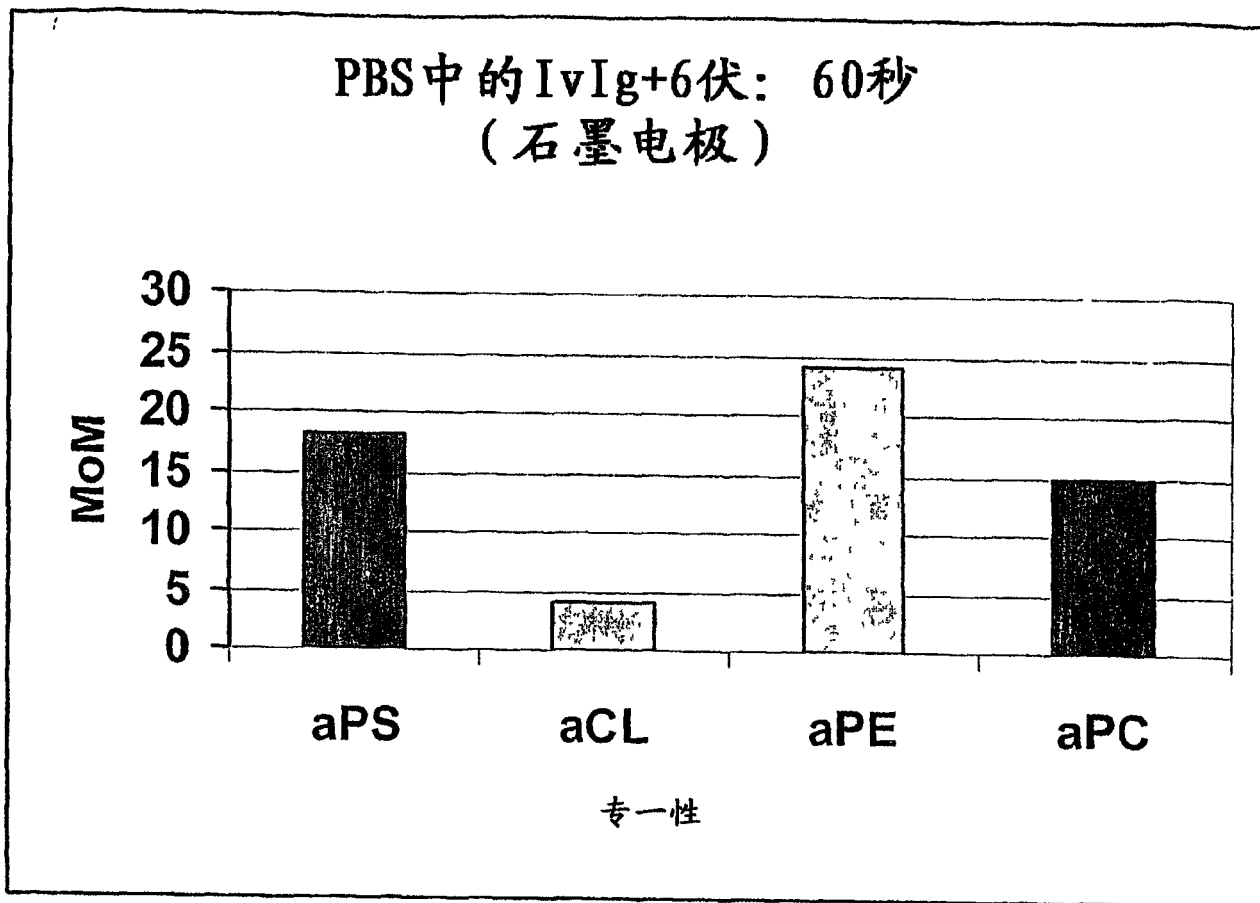


图 29

IVIg*6-伏时间释放 (依赖型aPL)

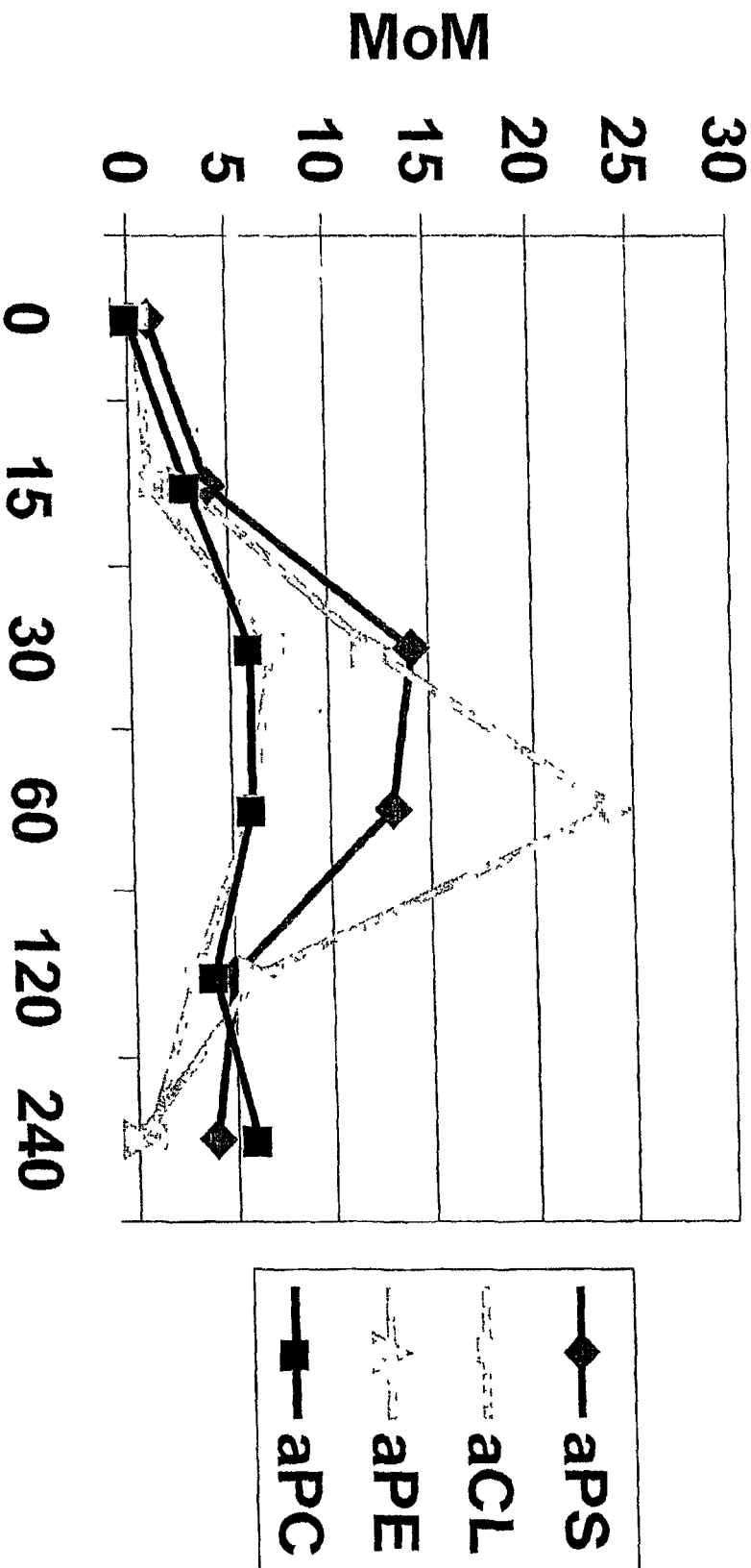
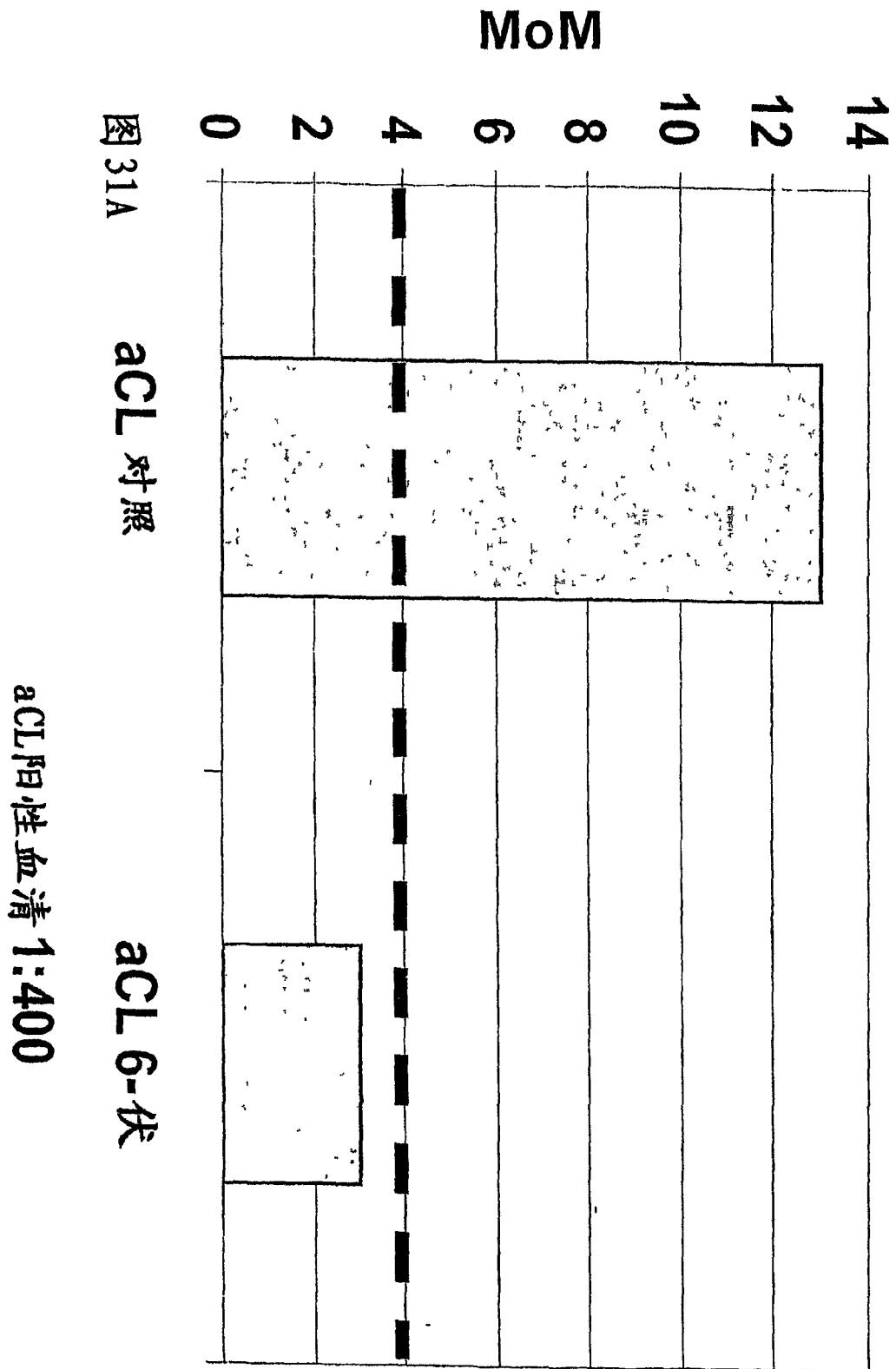
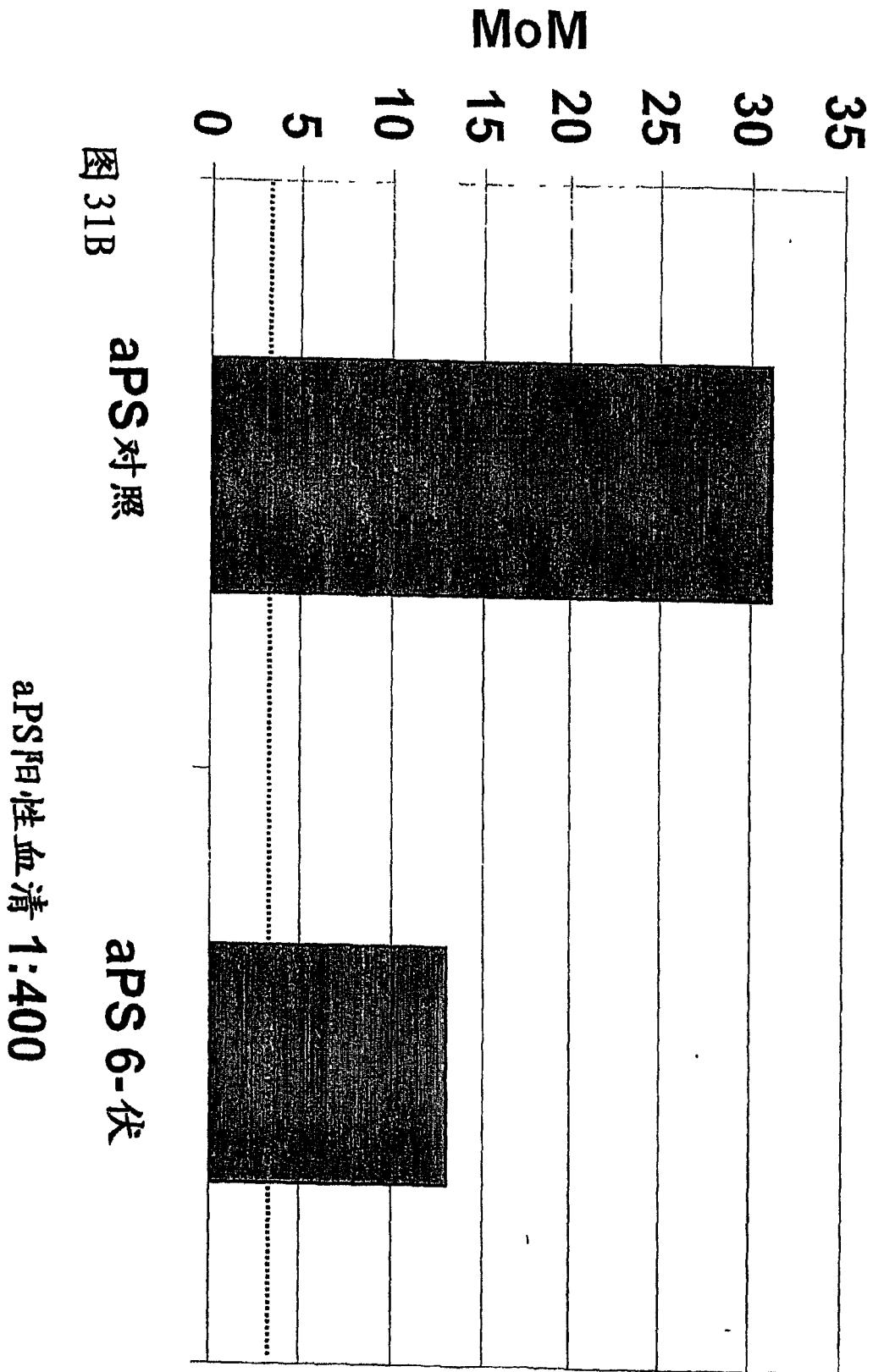
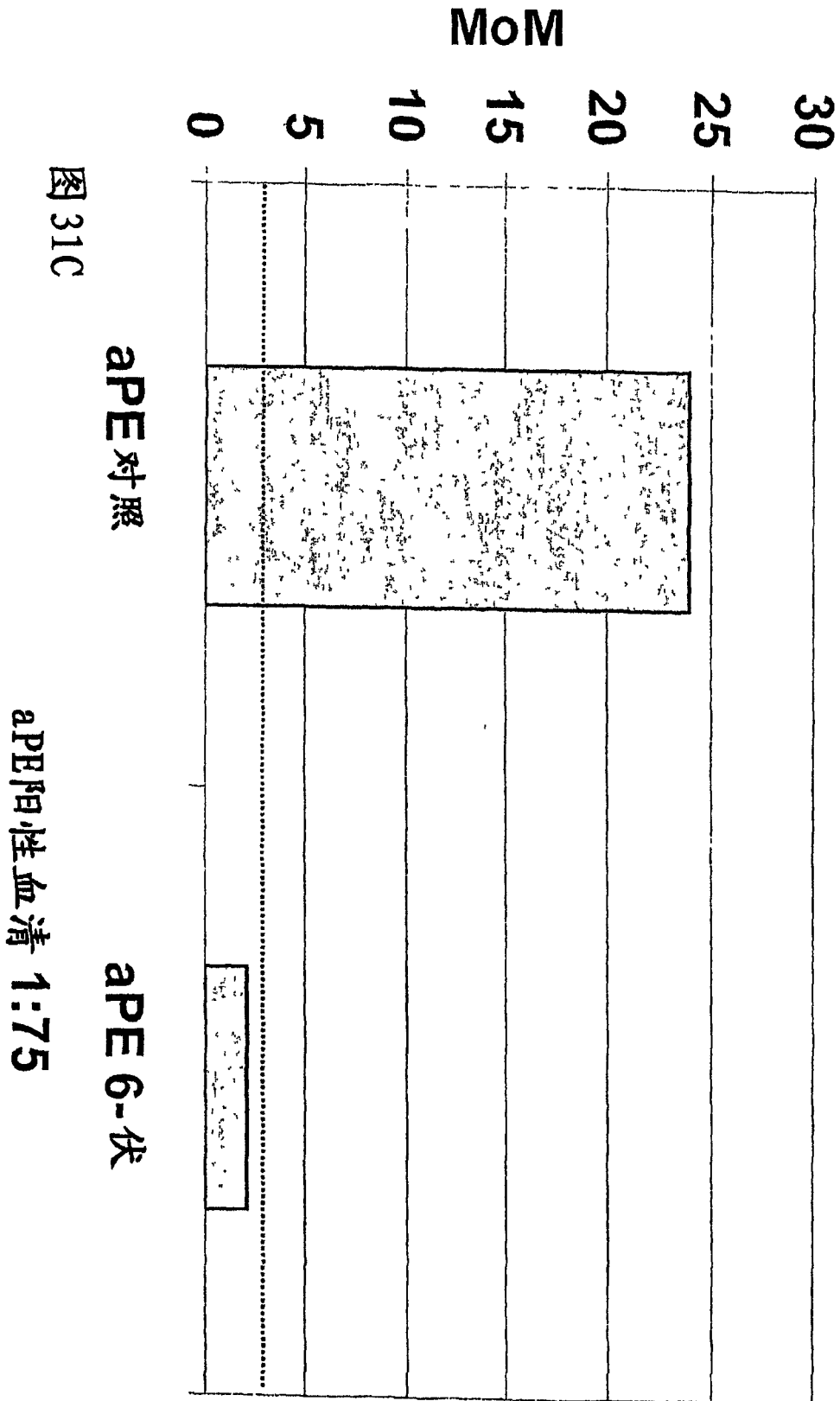


图 30 秒







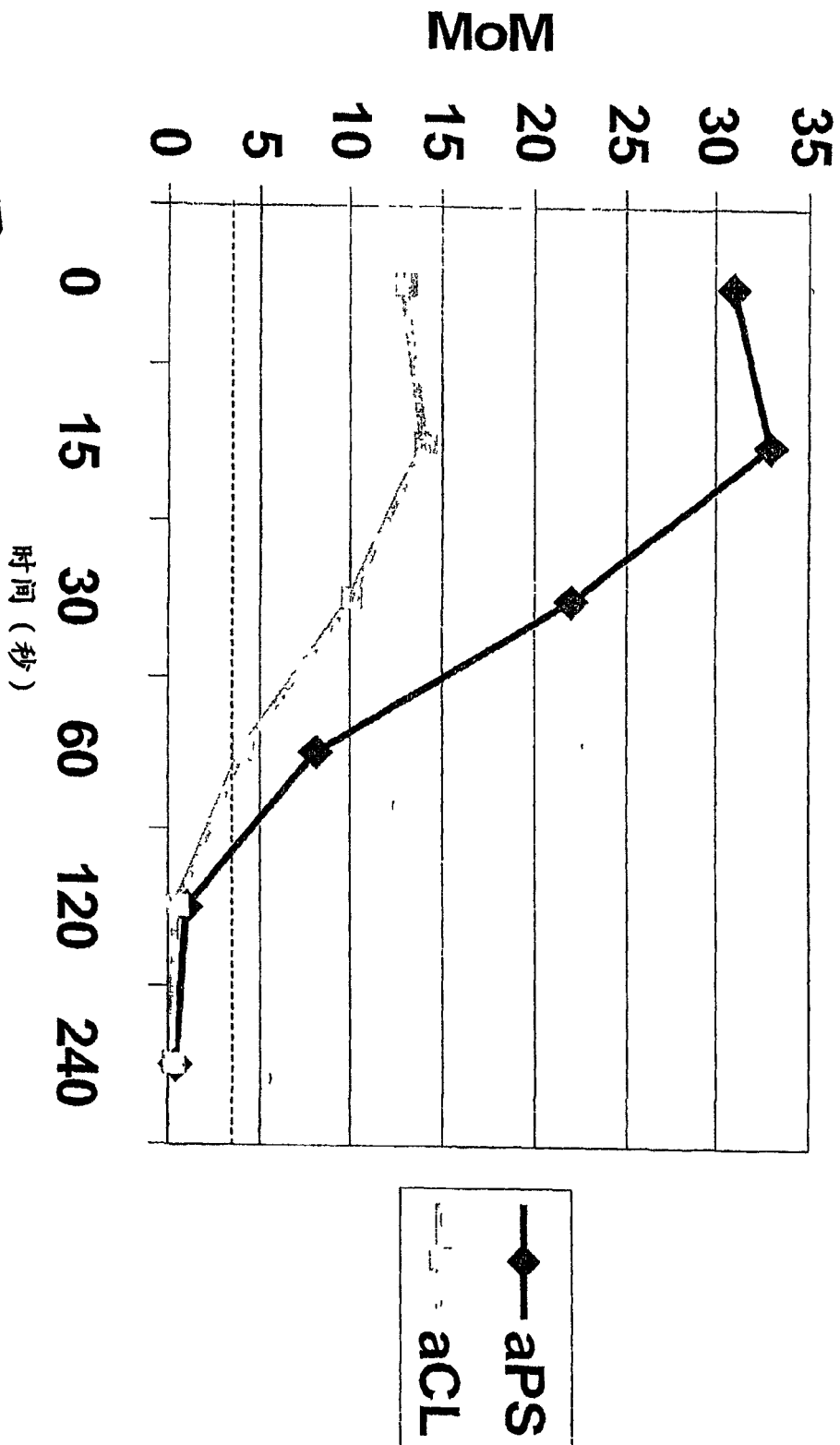
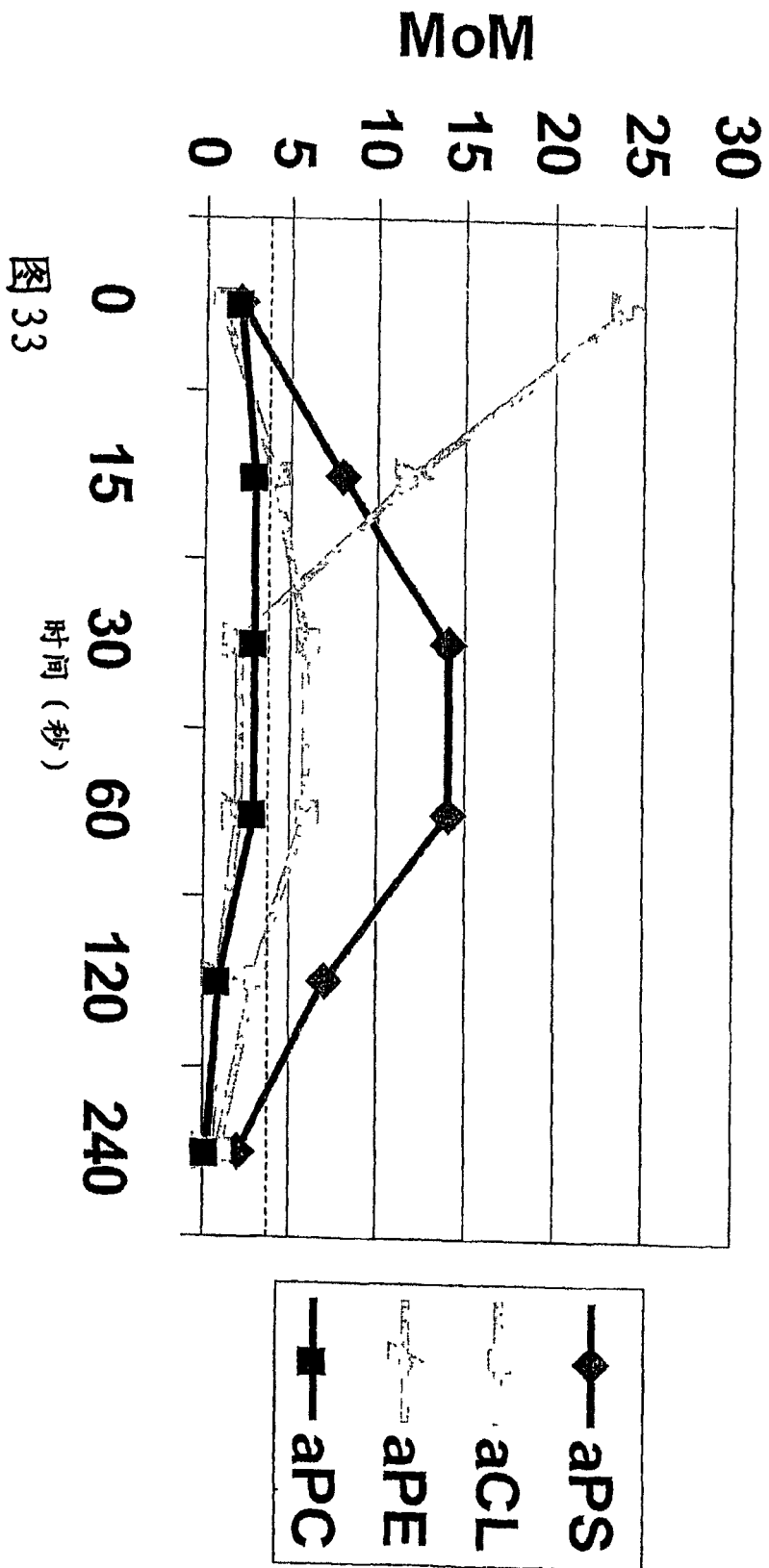
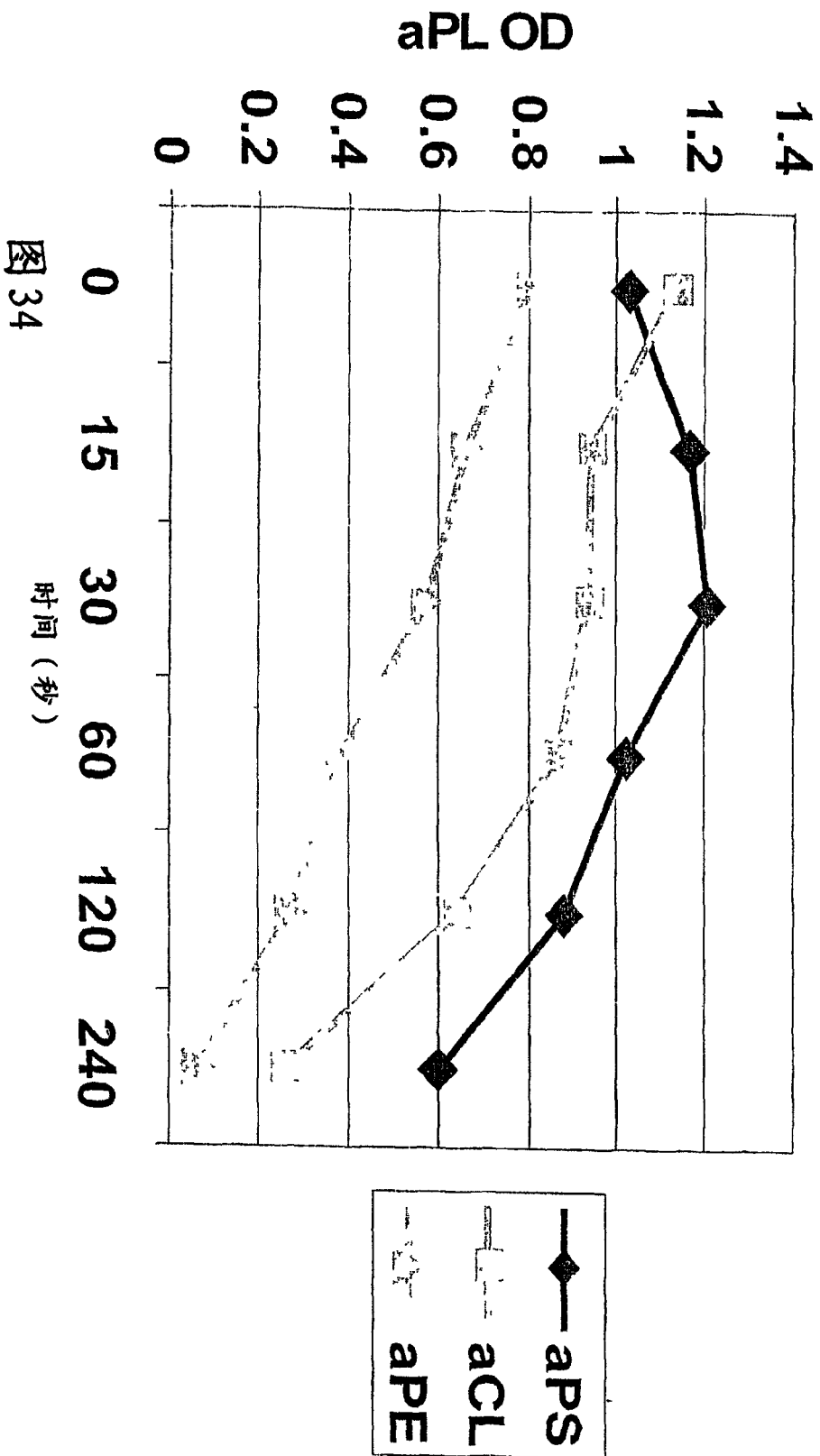


图 32





专利名称(译)	通过氧化还原反应改变血浆蛋白质结合专一性的方法		
公开(公告)号	CN1832756A	公开(公告)日	2006-09-13
申请号	CN200480015987.9	申请日	2004-06-09
[标]发明人	约翰A麦金太尔		
发明人	约翰·A·麦金太尔		
IPC分类号	A61K39/395 B01D57/02 C07K1/24 C07K1/26 C07K1/113 C07K14/475 C07K14/765 C07K16/00 G01N33/561 G01N33/564 C07K16/18 C12N15/01 G01N G01N33/53		
CPC分类号	C07K16/18 G01N33/5306 C07K16/00 C07K2317/21 G01N33/5375 G01N33/564 A61P1/04 A61P5/14 A61P7/02 A61P7/04 A61P9/12 A61P11/00 A61P15/06 A61P17/00 A61P17/06 A61P19/02 A61P19/04 A61P25/00 A61P25/10 A61P25/14 A61P29/00 A61P37/02 A61P37/06 G01N33/6854 Y10S424/81 Y10S436/825 Y10S530/868		
代理人(译)	程泳		
优先权	60/476607 2003-06-09 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

至少一种悬浮或溶解于液体介质中的血浆蛋白质，通过将该蛋白质暴露于足以改变其结合专一性的氧化剂或者电流来改变其结合专一性。通过将该蛋白质氧化而改变其结合专一性，可从血液或血液制品或提取物中回收屏蔽的蛋白质(masked protein)，如自身抗体。

