



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112964883 A

(43) 申请公布日 2021.06.15

(21) 申请号 202110275818.4

G01N 33/564 (2006.01)

(22) 申请日 2015.03.24

G01N 33/50 (2006.01)

(30) 优先权数据

61/969,771 2014.03.24 US

(62) 分案原申请数据

201580016451.7 2015.03.24

(71) 申请人 艾摩科诊断公司

地址 美国纽约州

(72) 发明人 拉克什曼阿曼·苏曼什

基肖尔·马利阿万泰曼

(74) 专利代理机构 北京清亦华知识产权代理事

务所(普通合伙) 11201

代理人 宋融冰

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006.01)

权利要求书2页 说明书12页

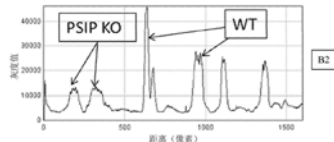
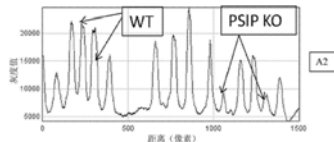
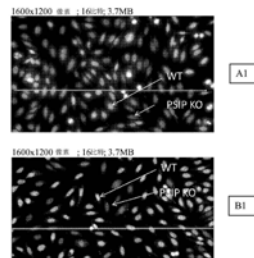
序列表7页 附图1页

(54) 发明名称

用于全身性和非全身性自身免疫紊乱的改进的抗核抗体检测和诊断

(57) 摘要

公开了用于在检测抗体中使用的含有哺乳动物细胞的组合物。对该哺乳动物细胞进行修饰从而使它们不含有LEDGF蛋白。该哺乳动物细胞固定于固体基质上。该组合物还含有包含LEDGF蛋白的哺乳动物细胞。还包括了将该细胞组合物用于诊断方法中的方法,就好像用于执行诊断测试的试剂盒。



1. 一种用于在检测抗体中使用的包括哺乳动物细胞的体外组合物,其中对所述哺乳动物细胞进行修饰从而使它们不包括LEDGF蛋白(LEDGF-细胞),其中所述哺乳动物细胞固定于固体基质上。

2. 如权利要求1所述的体外组合物,其中所述LEDGF-细胞是被杀死并透化的。

3. 如权利要求2所述的体外组合物,其中所述LEDGF-细胞中的染色体包括编码Cas9DNA的序列,或对被靶向至编码所述LEDGF蛋白的DNA序列的成簇规律间隔短回文重复(CRISPR)向导RNA编码的DNA序列,或其组合。

4. 如权利要求2所述的体外组合物,还包括包含所述LEDGF蛋白的哺乳动物细胞(LEDGF+细胞),其中所述LEDGF+细胞固定于所述固体基质上并且是被杀死并透化的。

5. 如权利要求4所述的体外组合物,其中所述LEDGF-和LEDGF+细胞是相同的哺乳动物细胞类型。

6. 如权利要求4所述的体外组合物,其中所述LEDGF+细胞中的所述LEDGF蛋白存在于具有第一抗体的复合物中。

7. 如权利要求6所述的体外组合物,其中所述第一抗体没有缀合至可检测的标签,并且其中所述第一抗体存在于具有可检测标记的第二抗体的复合物中。

8. 如权利要求1所述的体外组合物,其中所述LEDGF-细胞中一种以上的核抗原存在于具有抗体的复合物中。

9. 如权利要求4所述的体外组合物,其中所述LEDGF-细胞中的染色体包括编码Cas9DNA的序列,或对被靶向至编码所述LEDGF蛋白的DNA序列的成簇规律间隔短回文重复(CRISPR)向导RNA编码的DNA序列,或其组合。

10. 一种用于确定生物样品是否包含结合至LEDGF蛋白的抗体(抗-LEDGF Ab)的方法,所述方法包括:

i) 将所述生物样品暴露于经过修饰从而使它们不包含LEDGF蛋白的哺乳动物细胞(LEDGF-细胞),

ii) 将所述生物样品暴露于包含LEDGF蛋白的哺乳动物细胞(LEDGF+细胞),以及

iii) 将结合至所述LEDGF-细胞的抗-LEDGF Ab的量与结合至所述LEDGF+细胞的抗-LEDGF Ab的量比较,

其中确定相对于结合至所述LEDGF-细胞的抗-LEDGF Ab的量,更多的结合至所述LEDGF+细胞的抗-LEDGF Ab的量指示所述生物样品包含所述抗-LEDGF Ab,以及

其中相对于结合至所述LEDGF-细胞的抗-LEDGF Ab的量,相同或较少的结合至所述LEDGF+细胞的抗-LEDGF Ab指示所述生物样品不包含所述抗-LEDGF Ab。

11. 如权利要求10所述的方法,其中所述LEDGF-细胞是被杀死并透化的,并且固定于固体基质上。

12. 如权利要求11所述的方法,其中所述LEDGF+细胞是被杀死并透化的,并且固定于与所述LEDGF-细胞相同的固体基质上,或固定于不同的固体基质上。

13. 如权利要求12所述的方法,其中所述确定抗-LEDGF Ab的量是采用间接免疫荧光(IIF)测定法进行的。

14. 如权利要求10所述的方法,其中所述LEDGF-细胞中的染色体包括编码Cas9 DNA的序列,或对被靶向至编码所述LEDGF蛋白的DNA序列的成簇规律间隔短回文重复(CRISPR)向

导RNA编码的DNA序列,或其组合。

15. 如权利要求12所述的方法,其中所述LEDGF-和LEDGF+细胞是相同的哺乳动物细胞类型。

16. 一种在检测抗体中使用的包括哺乳动物细胞的试剂盒,其中对所述哺乳动物细胞进行修饰从而使它们不包含LEDGF蛋白(LEDGF-细胞),所述试剂盒还包括包含所述LEDGF蛋白的哺乳动物细胞(LEDGF+细胞),其中所述LEDGF-细胞和所述LEDGF+细胞固定于一个以上固体基质上,并且其中所述LEDGF-细胞和所述LEDGF+细胞是被杀死并透化的。

17. 如权利要求16所述的试剂盒,还包括包含能够结合至抗核自身抗体(ANA)的一抗的组合物。

18. 如权利要求17所述的试剂盒,还包括能够结合至所述一抗的可检测标记的二抗。

19. 如权利要求16所述的试剂盒,其中所述LEDGF-细胞包括编码Cas9 DNA的序列,或对被靶向至编码所述LEDGF蛋白的DNA序列的成簇规律间隔短回文重复(CRISPR)向导RNA编码的DNA序列,或其组合。

20. 如权利要求16所述的试剂盒,其中所述LEDGF-和LEDGF+细胞是相同的哺乳动物细胞类型。

用于全身性和非全身性自身免疫紊乱的改进的抗核抗体检测和诊断

[0001] 相关申请

[0002] 本申请是申请日为2015年03月24日、申请号为201580016451.7 (PCT/US2015/022120)、发明名称为“用于全身性和非全身性自身免疫紊乱的改进的抗核抗体检测和诊断”的分案申请。本申请要求2014年3月24日提交的申请号为61/969,771的美国临时申请的权益,该临时申请所公开的内容通过引用并入本文。

技术领域

[0003] 本发明一般涉及自身免疫疾病,并且更特别地涉及用于在检测抗核抗体中使用的组合物和方法。

背景技术

[0004] 诊断出自身免疫性疾病通常是具有挑战性的,并且具有一种自身免疫疾病的个体往往具有较高的危险发展为其它的自身免疫疾病,诸如全身性自身免疫风湿性疾病(SARD)。抗核自身抗体(ANA)的存在被视为SARD的标志,并且这种关联已被知晓了一段时间。美国风湿病协会(ACR)推荐采用HEp-2细胞通过间接免疫荧光(IIF)测定法进行针对ANA的测试,如2009年他们的立场声明中所描述的。该声明阐述了HEp-2细胞能够表达用于在ANA抗体检测中使用的100-150种相关自身抗原。因此,单层固定并保存的HEp2细胞是对ANA进行IIF检测中最常用的基质。

[0005] 采用IIF测定法进行的ANA检测可以揭示诸如同源的、细粒状、粗颗粒状、核仁型、着丝粒、核点、多形性、线粒体的众多模式以及各种细胞骨架模式。患者可以具有以各个模式不同强度的反应活性组合的一种以上模式。这些模式是结合至核抗原和胞浆抗原的特定自身抗体的结果,核抗原和胞浆抗原包括但不限于dsDNA、核小体、组蛋白、SS-ARo52/Ro60、SS-B/La、Ku、Mi-2、RNP(核蛋白:U1SnRNP 68、U1SnRNP A、U1SnRNP C、U2SnRNP等),Sc1-70、PM-Sc1、纤维蛋白、Th/To、CENP-B、CENP-A、Sp100、PCNA、Ribo-P、Jo1、AMA-M2、肌动蛋白、波形蛋白、和其它。

[0006] 已经利用了其它方法来筛选和确认ANA。然而,由于各种各样的原因,包括但不限于普遍的假阴性结果和假阳性结果、缺少测试算法(即,反射测试)的标准化、以及无法检测患有SARD的个体内普遍的不同阵列的ANA,采用HEp-2细胞作为ANA测试的基质依然是金标准。不幸的是,采用HEp-2细胞还涉及复杂的测试解释、错误的结果和专业技能,部分地是由于已经报道的多达20%明显健康的受试者由于存在识别所谓的“密集细小斑点70”(DFS70,其在本文和现有技术中也被称为晶状体上皮源性生长因子(LEDGF))抗原的自身抗体而显示出阳性ANA IIF测试结果。PSIP1/LEDGF也被称为AA408851、AU015605、Dfs70、Ledgf、Ledgfa、Ledgfb、mLEDGF、PC4和SFRS1相互作用蛋白(PSIP1)、Psp2(同种型)、p52、p75、由PSIP1基因编码的PAIP。此外,DFS IIF模式已在多达20%的ANA阳性健康受试者中有所报道,但通常在从SARD患者获得的ANA阳性血清中没有报道(Mahler和Fritzler 2012)。

既然ANA HEp-2测试的主要目的在于以用于诊断和分型SARD以及潜在的其它自身免疫疾病的工具发挥作用,抗-DFS70抗体和它们产生的DFS模式降低了ANA测试的有效性,诸如通过增加错误结果并以其它方式使测试解释变得复杂。这对于各种各样依靠对ANA精确检测以及为检测ANA抗体的患者的治疗决策具有重要影响。因此,对于检测ANA的改进的组合物和方法存在持续且未被满足的需求。本公开满足了这些需求以及其它需求。

发明内容

[0007] 本公开在多个实施方案中包括用于在检测ANA自身抗体中使用的,和/或用于确定从个体获得的或来源于个体的生物样品是否包括识别LEDGF蛋白的抗体的组合物和方法。该公开包括可以用于诊断和/或辅助诊断与ANA自身抗体的存在正相关的自身免疫紊乱的组合物和方法。还提供了用于在检测ANA自身抗体(诸如对LEDGF蛋白的抗体)中使用的包含试剂的试剂盒/产品。

[0008] 一方面,本公开包括在检测抗体中使用的经过修饰的哺乳动物细胞。对该哺乳动物细胞进行修饰从而使它们不表达或不包含LEDGF蛋白(LEDGF-细胞)。在实施方案中,本公开包括哺乳动物LEDGF-细胞和表达且包含LEDGF蛋白的哺乳动物细胞(LEDGF+细胞)的混合物。在实施方案中,该哺乳动物细胞固定于固体基质上,诸如玻璃、塑料或其它基于聚合物的基质。在实施方案中,该固体基质包括显微镜载玻片、诊断用玻片、微孔板、或由玻璃或聚合物形成的珠子。

[0009] 在实施方案中,细胞是被杀死并透化的。本领域技术人员将认识到被透化的细胞是已经暴露于可包括但不限于有机溶剂(诸如含丙酮溶液、含醇溶液和含醛溶液(如甲醛、多聚甲醛等))的有机试剂(本领域中常常称为“固定剂”)的那些细胞。通常将暴露于这些试剂的细胞称为“经过固定的”并且将用这些试剂对它们进行处理的过程称为对细胞进行“固定”。使哺乳动物细胞被透化而进行的对哺乳动物细胞的固定是致命的,并由此经过固定/透化的细胞也被视为被杀死的细胞。

[0010] 采用任何适当的技术、试剂等对LEDGF-细胞进行修饰从而不表达LEDGF蛋白或使其表达降低。在实施方案中,采用各种RNAi介导方法中的任一种来降解编码LEDGF蛋白的mRNA。在另一实施方案中,通过任何适当的技术来破坏以下被更充分描述的编码LEDGF蛋白的基因,该适当的技术包括但不限于采用成簇规律间隔短回文重复(CRISPR)体系,其包括CRISPR相关(Cas)核酸酶和CRISPR向导RNA(gRNA)。在实施方案中,对细胞的修饰包括将编码Cas酶和/或gRNA的多核苷酸序列整合到细胞(诸如LEDGF-细胞)的至少一条染色体中。

[0011] 在实施方案中,组合物和方法采用相同类型的经过修饰的LEDGF+和LEDGF-细胞,即,它们是相同类型的癌细胞,或它们是相同的细胞株,或来源于相同的细胞株。

[0012] 在实施方案中,本公开包括在诊断测定法中是有效的LEDGF+哺乳动物细胞和经过修饰的LEDGF-哺乳动物细胞混合物。该混合物可以是这样的,即在经过修饰的细胞中结合至抗原的抗体可以用于例如建立可以与采用LEDGF+细胞作为对照基质的抗体结合相比较的抗体结合的背景量。因此,在某些方面,提供了LEDGF-与LEDGF+细胞的比率。在实施方案中,该比率包括LEDGF-细胞量比LEDGF+细胞量为1:1、1:2、1:3、1:4、1:3、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、以及相反的比率。

[0013] 在实施方案中,本公开包括经过修饰的细胞(其中该修饰是这样的,即使细胞不

表达LEDGF),来源于这样的细胞的细胞培养物/细胞株,以及它们的后代。

[0014] 在实施方案中,本公开包括LEDGF+细胞,其中LEDGF+细胞中的LEDGF蛋白存在于具有抗体的复合物中,并且由此适合在各种免疫诊断测试中使用。在一个实施方案中,该抗体是第一抗体,诸如一抗。在实施方案中,结合至LEDGF+细胞中的LEDGF蛋白的一抗本身存在于具有可检测标记的二抗的复合物中。

[0015] 在实施方案中,LEDGF+和/或LEDGF-细胞包括存在于具有抗体的复合物中的一种以上核抗原。

[0016] 另一方面,本公开提供了用于确定生物样品是否包括结合至LEDGF蛋白的抗体(抗LEDGF Ab)的方法。该方法通常包括以下步骤:

[0017] i) 将该生物样品暴露于经过修饰从而使它们不包含LEDGF蛋白的哺乳动物细胞(LEDGF-细胞),

[0018] ii) 将该生物样品暴露于包含LEDGF蛋白的哺乳动物细胞(LEDGF+细胞),以及

[0019] iii) 将结合至LEDGF-细胞的抗LEDGF Ab的量与结合至LEDGF+细胞的抗LEDGF Ab的量比较,

[0020] 其中确定相对于结合至LEDGF-细胞的抗LEDGF Ab的量,更多的结合至LEDGF+细胞的抗LEDGF Ab的量指示该生物样品包括抗LEDGF Ab,以及

[0021] 其中相对于结合至LEDGF-细胞的抗LEDGF Ab的量,相同或较少的结合至LEDGF+细胞的抗LEDGF Ab指示该生物样品不包括抗LEDGF Ab。

[0022] 在实施方案中,本方法中采用的细胞是被杀死并透化的,并固定于固体基质上。在实施方案中,LEDGF-细胞和LEDGF+细胞固定于相同的固体基质上;在实施方案中,它们固定于不同的固体基质上。在实施方案中,确定抗-LEDGF Ab的量是采用间接免疫荧光(IIF)测定法进行的。

[0023] 另一方面,本公开包括试剂盒,该试剂盒包括经过修饰的LEDGF-细胞和LEDGF+细胞,其中LEDGF-细胞和LEDGF+细胞固定于一个以上的固体基质上,并且LEDGF-细胞和LEDGF+细胞是被杀死并透化的。在实施方案中,对固体基质和细胞进行干燥,并将它们提供在一个以上适当的容器中。

[0024] 在实施方案中,该试剂盒还包括组合物,该组合物包括能够结合至抗核自身抗体(ANA)的一抗。该试剂盒还包括能够结合至一抗的可检测标记的二抗。可以采用任何适当的可检测的标记,并且许多是本领域众所周知的。在实施方案中,可检测的标记是荧光标记并因此适合在例如IIF测定法中使用。

附图说明

[0025] 图1:采用经确认的人源DFS70阳性抗血清通过IIF来测试表达LEDGF的野生型Hep2和采用依据示例序列3且不表达LEDGF的PISP1破坏细胞株。上图:两个示例(A1和B1)显示出被明亮标记出的细胞(WT)和具有背景荧光信号的细胞(PSIP敲除)。下图:谱图分析(ImageJ 1.421版本,国立卫生研究所,美国)绘制出沿直线被标记的核的强度(A2是针对A1绘制的强度;B2是针对B1绘制的强度)。高峰对应于WT细胞,而低峰对应于不表达任何可检测的LEDGF蛋白的PSIP敲除(KO)细胞。

具体实施方式

[0026] 本公开提供了组合物以及用于将组合物用于检测ANA自身抗体的方法,和/或用于确定从个体获得的或来源于个体的生物样品是否包括识别LEDGF蛋白的抗体的方法,以及用于诊断和/或辅助诊断与ANA自身抗体的存在正相关的自身免疫紊乱的方法。这种紊乱包括但不限于全身性自身免疫风湿性疾病(SARD)。还提供了用于在检测ANA自身抗体中使用的包括试剂的试剂盒/产品。

[0027] 一般地,本公开提供了降低和/或消除经常为对ANA进行IIF分析的特点的DFS模式的方法,其在目前测试中通常依赖于作为基质的HEp-2细胞,同时该DFS模式包括含有相对未修饰的HEp-2细胞具有较少LEDGF表达的、经过修饰的哺乳动物的体外组合物,还提供了利用这种经过修饰的细胞检测ANA自身抗体的方法。然而,本公开提供了含有任何来源的哺乳动物细胞的组合物,而限于经过修饰的HEp-2细胞,其中已经对该细胞进行了修饰以成为用于ANA和/或LEDGF测试的经过改进的基质。因此,在多个实施方案中,本公开涉及含有PSIP1基因,并且在至少一些程度上表达由PSIP1基因编码的LEDGF蛋白,但在如以下进行充分描述的修饰之后相对于相同类型的未修饰的细胞表达较少LEDGF蛋白的哺乳动物细胞,或者不表达任何可检测的LEDGF蛋白的哺乳动物细胞。本领域技术人员将认识到大多数哺乳动物细胞表达LEDGF,并由此预期本公开的组合物和方法中采用的细胞可以包括任何哺乳动物细胞株的细胞,或来源于任何哺乳动物细胞株或任何其它适当来源的细胞。在实施方案中,该细胞是固定化的。在实施方案中,该细胞是来源于诸如肿瘤的癌症的细胞株的后代。在实施方案中,该细胞是多倍体并正因为如此具有至少一条染色体的多于两个拷贝。在实施方案中,该细胞包括含有PSIP1基因的染色体的多于两个拷贝,该PSIP1基因如以下进一步描述的编码了LEDGF蛋白。在实施方案中,该细胞是非整倍体,并且可以为伪亚三倍体。在实施方案中,该细胞来源于人源化细胞并且包括多于23条不同染色体。在实施方案中,本公开提供了被改变从而降低或消除LEDGF蛋白表达的经过修饰的细胞株。在实施方案中,本公开提供了对已知细胞株的修饰,诸如可以单层生长并被固定的细胞株,包括但不限于HEp-2和HeLa细胞。在实施方案中,可以进行修饰以用于本公开的细胞类型是从诸如美国模式菌种收集中心(ATCC)来源市售可得的。在非限制性的实施方案中,该细胞是HEp2或HeLa细胞。这些细胞购自ATCC,HEp2的产品编号为#CCL-23,而HeLa贴壁和悬浮培养物的产品编号分别为CCL-2或CCL-2.2。如以上所描述的,在实施方案中,本公开包括进行修饰从而使它们表达不可检测的LEDGF蛋白的细胞,或比同类型的细胞表达较少LEDGF蛋白的细胞。因此,将认识到相同类型的细胞可以包括作为一个非限制性的示例的HEp2细胞,其中该经过修饰的HEp2细胞比未经过修饰的HEp2细胞表达较少的LEDGF蛋白,其中该HEp2细胞是所描述“类型”的细胞。同样地应用于任何其它哺乳动物细胞,其中未修饰的细胞表达可检测的LEDGF,包括但不限于HeLa细胞,以及来源于例如血浆细胞、单核细胞、中性粒细胞、T淋巴细胞、血小板、T细胞白血病细胞、髓系白血病细胞、淋巴细胞性白血病细胞、肾细胞、肾癌细胞、肝细胞、肝癌细胞、肺细胞、肺癌细胞、结肠细胞、结肠癌细胞、心脏细胞、骨细胞、骨癌细胞、脑细胞、脑癌细胞、卵巢细胞、卵巢癌细胞、前列腺细胞、前列腺癌细胞、宫颈细胞、宫颈癌细胞、黑色素瘤、乳腺组织细胞、乳腺癌细胞、皮肤细胞、黑色素瘤细胞、胰腺细胞和胰腺癌细胞的其它细胞株以及其它。

[0028] 本公开中提供的免疫诊断测定法的方法涉及对哺乳动物细胞进行修饰以使得

PSIP1/LEDGF基因产物下调或消除,还涉及将经过修饰的细胞用于自身免疫测定法的方法。本公开还包括经过修饰的细胞、和包括该经过修饰的诸如细胞培养物的组合物。还提供了在测定法中使用的试剂盒。

[0029] 如上所述,DFS模式在本领域中是众所周知的,并且包括来自特异性结合至LEDGF蛋白的自身抗体的密集细小斑点模式(Ayaki,Sueno等人,1999)。LEDGF蛋白的自身抗体首先是与特应性皮炎和诸如哮喘、间质性膀胱炎(Ochs,Muro等人,2000)、秃头症(Okamoto,Ogawa等人,2004)和0-20%健康个体(Watanabe,Kodera等人,2004,Mahler,Parker等人,2012)的其它病症联合被报道的。LEDGF属于被细胞死亡期间裂解所靶向的一组选定的自身抗原,并且已经提出半胱天冬酶诱导的LEDGF裂解和对蛋白质的自身抗体的产生可有助于与下调的细胞凋亡有关的各种人源化异位炎性紊乱(Ganapathy,Daniels等人,2003,Ganapathy和Casiano 2004)。LEDGF蛋白也被牵连在HIV整合中,并且已将LEDGF瞬时(采用siRNA)和稳定(采用shRNA然后进行选择)敲除掉,这导致HeLaP4细胞中HIV1复制减少了3-5倍(Vandekerckhove,Christ等人,2006)。

[0030] LEDGF蛋白的氨基酸序列是本领域已知的并且此处提供了如SEQ ID NO:1的规范序列:

[0031] MTRDFKPGDLIFAKMKGYPHWPARVDEVPDGAVKPPTNKLPIDFFFGTHETAFLGPKDIFPYSENKEKY GKPNKRKGFNEGLWEIDNPNKVKFSSQQAATKQSNASSDVEVEEKETS SVKEDTDHEEKASNEVDTKAVDITTPKA ARRGRKRKAQVETEEAGVVTTATASVNLKVSPKRGRPAATEVKIPKPRGRPKMVKQPCPSESDIITEEDKSKKK GQEEKQPKKQPKKDEEGQKEEDKPRKEPKKEGKKEVESKRKNLAKTGVSTSDSEEEGDDQEGEKKRKGRNFQT AHRRNMLKGQHEKEAADRKRKQEEQMETEQNKDEGKKPEVKKVEKKRETSMSDRLQRIHAEIKNSLKDNLVDNR CIEALDELASLQVTMQQAQKHTEMITTLKKIRRFKVSQVIMEKSTMLYNKFKNMFLVGE GDSVITQVLNKS LAEQR QHEEANKTKDQGGKGPNNKLEKEQTGSKTLNGGSDAQDGNQPQHNGESNEDSKDNHEASTKKKPSSEERETEISLK DSTLDN (SEQ ID NO:1)。本领域知晓包括与规范序列不同的突变体的其它异构体和截断版本。特别地,基因库(NCBI)条目NP_001121689.1、NM_001128217.1、[075475-1]、NP_066967.3、NM_021144.3、[075475-2]、NP_150091.2、NM_033222.3、[075475-1]、XP_005251413.1提供了LEDGF,同时通过参考将描述于这些数据库条目中的多核苷酸和氨基酸序列如递交本申请或专利时它们所存在的那样并入本文, XM_005251356.1、[075475-2]、XP_005251415.1、XM_005251358.1和[075475-3]。

[0032] 已将SEQ ID NO:1的免疫反应性序列报道为从SEQ ID NO:2中描述的氨基酸第349至455位的多肽(Ogawa,Sugiura等人,2004)。

[0033] DSRLQRIHAEIKNSLKDNLVDNRCIEALDELASLQVTMQQAQKHTEMITTLKKIRRFKVSQVIMEKS TMLYNKFKNMFLVGE GDSVITQVLNKS LAEQRQHEEANK (SEQ ID NO:2)。

[0034] 本领域还知晓编码LEDGF的cDNA序列,并且如SEQ ID NO:3提供于此。ATGACTCGCG ATTTCAAACCTGGAGACCTCATCTTCGCCAAGATGAAAGGTTATCCCCATTGGCCAGCTCGAGTAGACGAAGTTCC TGATGGAGCTGTAAAGCCACCCACAAACAACTACCCATTTTCTTTTTTGGAACTCATGAGACTGCTTTTTTAGGA CCAAAGGATATATTTCTTACTCAGAAAATAAGGAAAAGTATGGCAAACCAAATAAAAAGAAAAGGTTTTAATGAAG GTTTATGGGAGATAGATAACAATCCAAAAGTGAAATTTTCAAGTCAACAGGCAGCAACTAAACAATCAAATGCATC ATCTGATGTTGAAGTTGAAGAAAAGGAACTAGTGTTTTCAAAGGAAGATACCGACCATGAAGAAAAGCCAGCAAT GAGGATGTGACTAAAGCAGTTGACATACTACTCCAAAAGCTGCCAGAAGGGGGAGAAAAGAGAAAGGCAGAAAAAC

AAGTAGAACTGAGGAGGCAGGAGTAGTGACAACAGCAACAGCATCTGTTAATCTAAAAGTGAGTCCTAAAAGAGGACGACCTGCAGCTACAGAAGTCAAGATTCCTAAAACCAAGAGGCAGACCCAAAATGGTAAAACAGCCCTGTCCTTCAGAGTGACATCATTACTGAAGAGGACAAAAGTAAGAAAAAGGGCAAGAGGAAAAACAACCTAAAAGCAGCCTAAGAAGGATGAAGAGGGCCAGAAGGAAGAAGATAAGCCAAGAAAAGAGCCGGATAAAAAAGAGGGGAAGAAAGAAGTGAATCAAAAAGGAAAAATTTAGCTAAAACAGGGGTTACTTCAACCTCCGATTCTGAAGAAGAAGGAGATGATCAAGAAGGTGAAAAGAAGAGAAAAGGTGGGAGGAACCTTCAGACTGCTCACAGAAGGAATATGCTGAAAGGCCAACATGAGAAAAGAAGCAGCAGATCGAAAACGCAAGCAAGAGGAACAAATGGAAAAGTGAAGCAGCAGAATAAAGATGAAGGAAAGAAGCCAGAAGTTAAGAAAAGTGGAGAAGAAGCGAGAAACATCAATGGATTCTCGACTTCAAAGGATACATGCTGAGATTAATAAATTCCTCAAAAATTGATAATCTTGATGTGAACAGATGCATTGAGGCCCTGGATGAACCTGCTTCACTTCAGGTCAATGCAACAAGCTCAGAAACACACAGAGATGATTACTACTGAAAAAATACGGCGATTCAAAGTTAGTCAGGTAATCATGGAAAAGTCTACAATGTTGTATAACAAGTTAAGAACATGTTCTTGGTTGGTGAAGGAGATTCCGTGATCACCCAAGTGCTGAATAAATCTCTTGTGAACAAAGACAGCATGAGGAAGCGAATAAAACCAAAGATCAAGGGAAGAAAGGGCCAAAACAAAAGCTAGAGAAGGAACAAACAGGGTCAAAGACTCTAAATGGAGGATCTGATGCTCAGATGGTAATCAGCCACAACATAACGGGGAGAGCAATGAAGACAGCAAAGACAACCATGAAGCCAGCACGAAGAAAAGCCATCCAGTGAAGAGAGAGAGACTGAAATATCTCTGAAGGATTCTACTAGATAACTAG (SEQ ID NO:3)。

[0035] 为了提供用于针对全身性和非全身性自身免疫疾病(器官特异性自身免疫疾病、异位皮炎、秃头症等)的改进的ANA和/或LEDGF抗体检测并从无疾病人群中区分出来的组合物和方法,鉴于本公开内容的益处,可以以各种方式对任何适当的哺乳动物细胞(包括但不限于HEp-2、HeLa、HEK293或适合培养为贴壁(单层)或悬浮形式的细胞株)进行修饰。在多个实施方案中,通过降低编码LEDGF蛋白的mRNA来减少经过修饰的细胞中的LEDGF蛋白。在另一种方法中,本公开包括通过敲除或靶向突变来从制备蛋白质中破坏PSIP1基因。本公开还包括制备和使用以LEDGF蛋白减少或消除为特征的经过修饰的细胞。在实施方案中,还将经过修饰的细胞设计为表达可检测的标记物,诸如荧光蛋白或可以采用特定二抗(包括但不限于本领域中已被很好表征的多组氨酸标签、c-Myc标签、FLAG标签等)而被进一步检测的免疫反应性蛋白。

[0036] 一方面,本公开包括在经过修饰的哺乳动物细胞中减少LEDGF mRNA,以及由此减少LEDGF蛋白。在一个方法中,这一方面包括将能够抑制LEDGF mRNA翻译、和/或能够参与和/或促进RNAi介导的LEDGF mRNA的降低的多核苷酸引入适当的哺乳动物细胞。在一个实施方案中,将反义多核苷酸用于抑制LEDGF mRNA的翻译。反义核酸可以为与LEDGF mRNA的至少一部分互补的DNA或RNA分子。在实施方案中,约15个核苷酸的寡聚物和/或与AUG起始密码子杂交的那些将是特别有效的。可以在某些实施方案中对用于在靶向LEDGF mRNA中使用的本文所描述的多核苷酸进行修饰,诸如以对核酸酶耐受。

[0037] 在实施方案中,本公开提供了用于以编码可检测的标记物(诸如荧光蛋白)的序列来替换PSIP1基因或将这样的序列整合到PSIP1基因中从而破坏该基因,或将这样的序列整合到细胞基因组中其它位置。通过替换PSIP1或将编码可检测的蛋白质的序列整合到其中,本公开提供了用于标记不表达LEDGF的经过修饰的哺乳动物细胞。这是有价值的,因为可以选择表达可检测的蛋白质的那些细胞以用于在本发明的免疫测定法中使用,同时用于包括在意图在这种免疫测定法中使用的产品中。在实施方案中,以编码荧光蛋白的序列破坏PSIP1基因将允许以含有LEDGF破坏的细胞来富集细胞群,诸如通过采用FACS将含有破坏的

细胞与不含有破坏的那些细胞分离开,从而提供不表达LEDGF的经过修饰的细胞的分离群和/或纯化群。可检测的标记物可以为能够被检测到的任何蛋白质,并且优选为荧光蛋白。可以采用任何荧光蛋白。在实施方案中,该荧光蛋白选自GFP、eGFP、红色荧光蛋白或其变体(诸如tRFP、dsRED、mCherry、tdTomato等)或不干扰例如检测自身抗体的IIF方法中使用的缀合物的任何荧光蛋白。因此,在实施方案中,本公开包括以具有被破坏或被敲除的PSIP1基因为特征的细胞。在实施方案中,该敲除包括通过引入(敲入)可检测的蛋白质来破坏基因。

[0038] 在实施方案中,本公开包括引入能够抑制LEDGF蛋白并且还可以表达可检测的标记物的表达载体。例如可以采用具有两个不同启动子或双向启动子的表达载体来表达被靶向到PSIP1的shRNA并表达该可检测的标记物。在可选的实施方案中,为了这个目的可以采用两个不同的表达载体。在实施方案中,该载体可以稳定或瞬时存在于细胞中。在实施方案中,将其中一个或两个载体、或编码shRNA和可检测的标记物的单个载体整合到哺乳动物细胞内染色体中的至少一个位置。

[0039] 另一方面,本公开包括RNAi介导的LEDGF mRNA的降低。采用被靶向到LEDGF mRNA的任何适当的RNA多核苷酸可以实现基于RNAi的抑制作用。在实施方案中,可以将单链或双链RNA(其中至少一个链与LEDGF mRNA互补)引入细胞中以促进基于RNAi的LEDGF mRNA降解。在另一实施方案中,可以采用被靶向到LEDGF mRNA的微小RNA(miRNA)。在另一实施方案中,可以采用能够特异性裂解LEDGF mRNA的核糖酶。在又一实施方案中,可以采用小干扰RNA(siRNA)。可以将siRNA(或核糖酶)例如作为双链siRNA复合物直接引入或通过采用经过修饰的表达载体(诸如慢病毒载体)以产生shRNA。如本领域所知晓的,shRNA具有典型的发卡二级结构,该结构含有成对正义和反义部分以及成对正义和反义部分之间的短环序列。将shRNA递送至细胞质中,在细胞质中通过DICER将shRNA加工成siRNA。siRNA由RNA诱导的沉默复合物(RISC)识别,并且一旦被整合至RISC中,siRNA促进被靶向mRNA的裂解和降解。在实施方案中,用于抑制LEDGF表达的shRNA多核苷酸可以包括45-100个核苷酸或者由45-100个核苷酸组成,包含本数并且包含45至100之间的所有整数。与LEDGF mRNA互补的shRNA的部分mRNA可以为21-29个核苷酸,包含本数并且包含21-29之间的所有整数。

[0040] 为了借由shRNA递送siRNA,鉴于本公开的益处,根据标准技术可以制备并使用经过修饰的慢病毒载体。进一步地,表达被靶向至许多人源mRNA的shRNA的慢病毒载体是市售可得的。此外,可以从例如Thermo-Dharmacon获得定制siRNA或shRNA用于引起LEDGF水平暂时降低的瞬时转染。可选地,可以从Thermo Dharmacon获得表达被靶向到shRNA的人源PSIP11的慢病毒构建体。这些慢病毒能够稳定永久感染靶标细胞,诸如通过整合至细胞内的染色体中。然而,如由以下描述中将明显的,RNAi介导的用于破坏LEDGF蛋白表达的方法可能不是最佳的。例如,我们将编码针对PSIP1基因而设计的shRNA的DNA序列引入并将它们克隆到U6启动子下游的慢病毒载体中。将具有能够产生靶标shRNA或阴性对照的DNA插入物的慢病毒用于感染HEp2细胞。通过在所有被感染细胞中表达的整合RFP(红色荧光蛋白)标记物来测量病毒的传染性和效价。还将该RFP标记物融合至嘌呤霉素(抗生素)抗性因子,其用于对将构建体稳定整合至HEp2细胞基因组的细胞进行选择。以下为被测试序列的示例,其中提供了shRNA序列的DNA等同物:

[0041] shRNA(h PSIP1)示例序列#1:AGACAGCATGAGGAAGCGA(SEQ ID NO:4)。

[0042] 克隆的shRNA发卡序列:

[0043] AGACAGCATGAGGAAGCGAttcaagagaTCGCTTCCTCATGCTGTCT (SEQ ID NO:5)

[0044] shRNA (h PSIP1) 示例序列#2:AGTTCCTGATGGAGCTGTAAA (SEQ ID NO:6)

[0045] 克隆的shRNA发卡序列:

[0046] AGTTCCTGATGGAGCTGTAAAcgagTTTACAGCTCCATCAGGAACT (SEQ ID NO:7)

[0047] hPSIP1) 示例序列#3:GCAATGAAGACAGCAAAGACA (SEQ ID NO:8)

[0048] 克隆的shRNA发卡序列:

[0049] GCAATGAAGACAGCAAAGACcgagTGTCTTTGCTGTCTTCATTGC (SEQ ID NO:9)

[0050] shRNA-阴性-对照:

[0051] GTCTCCACGCGCAGTACATTT (SEQ ID NO:10)

[0052] 克隆的shRNA-阴性发卡序列:

[0053] GTCTCCACGCGCAGTACATTTcgagAAATGTACTGCGCGTGGAGAC (SEQ ID NO:11)

[0054] 采用以上序列的IIF分析 (慢病毒转导程序,接着对抗性菌落进行挑选) 利用DFS70 特异性抗血清显示出低水平的PSIP1/LEDGF水平减少。采用相同程序的阴性对照没有显示出PSIP1/LEDGF水平的任何降低。进一步地,虽然siRNA可以产生mRNA水平的强烈降低,该作用通常是瞬时的。因此,尽管shRNA技术兼容于挑选过程,并使得稳定表达短发卡RNA的菌落分离出来,这进一步有助于在细胞的后续生成中特定互补mRNA的降解,如前面提及的方法中所观察到的,mRNA水平上的PSIP1水平的降低不足以为在检测针对ANA的自身抗体中使用的IIF分析提供改进的基质。因此,本公开包括用于破坏LEDGF蛋白产生的可替换的方法。在这方面,本公开还包括破坏具有突变的PSIP1基因从而不表达LEDGF mRNA和蛋白。在一个实施方案中,可以通过被靶向的突变生成来破坏PSIP1基因。在实施方案中,通过例如靶向PSIP1基因中CRISPR (成簇规律间隔短回文重复) 位点来实现被靶向的突变生成。本领域知晓针对靶向特定基因组序列而设计的所谓CRISPR体系,并且可适于破坏PSIP1基因以制备本公开所包括的经过修饰的细胞。一般而言,该CRISPR体系包括编码至少靶向RNA的一种以上表达载体以及编码CRISPR相关核酸酶的多核苷酸序列,诸如Cas9,但也可以采用其它Cas核酸酶。针对被靶向的哺乳动物染色体序列的破坏的CRISPR体系是市售可得的,并且鉴于本公开的益处可适于破坏HEp-2细胞中的PSIP1基因。

[0055] 在实施方案中,由CRISPR体系编码的靶向RNA可以为CRISPR RNA (crRNA) 或向导RNA,诸如sgRNA。该靶向RNA的序列具有与PSIP1基因中任何CRISPR位点相同或互补的片段。在这方面,靶标序列包括其3'端的特定序列,被称为前间区序列邻近基序或“PAM”。在一个实施方案中,采用CRISPR II型体系,并且靶标序列由此与公知的N12-20NGG基序一致,其中NGG为PAM序列。因此,在实施方案中,靶标RNA将包括长度为12-20核苷酸的片段或由长度为12-20核苷酸的片段组成,该片段与PSIP1基因中DNA靶标序列 (间隔) 相同或互补。该针对间隔序列的12-20核苷酸将存在于靶向RNA中,无论该靶向RNA是否为crRNA或向导RNA。在实施方案中,可以将单独的反式激活态crRNA (tracrRNA) 用于协助被靶向到PSIP1基因的crRNA的成熟化。将CRISPR体系引入HEp-2细胞中将使得靶向RNA/Cas9复合物结合至PSIP1靶标序列,从而使得Cas9可切断DNA的双链而引起双链断裂。分别通过非同源末端连接DNA修复或通过同源导向的修复通路 (这会引入断裂位点处的插入或缺失),或通过采用修复模板以引入突变,可以对双链断裂进行修复。通过在细胞中表达转录激活子样效应器核酸酶 (TALEN)

还可以将双链断裂引入PSIP1基因。TALEN为通过将TAL效应器DNA结合域融合至DNA裂解域而生成的人工限制酶,并且是本领域所知晓的,同时可适于在本公开的实施方案中使用。在又一方法中,可以在细胞中表达锌指核酸酶(ZFN)以靶向PSIP1基因。ZFN为通过将锌指DNA结合域融合至DNA裂解域而产生的人工限制酶。可以将ZF域设计为靶向PSIP1基因DNA序列,其中锌指核酸酶使该序列裂解,从而破坏该基因。在另一实施方案中,将序列的特定位置点基因整合或靶向整合至基因内的特定整合位点可以通过采用市售体系来完成,诸如从Thermo Fisher Scientific有限公司市售可得的Jump-In™或Flp-In™体系。通过Jump-In™ Fast体系中的PhiC31可以靶向多个整合位点。如本领域技术人员将认识到的,基因整合需要靶标基因组中的FRT位点(34bp),并且其可以通过来源于Flp-In™技术的特定市售细胞株来提供。

[0056] 在待实践的非限制性减少中,我们采用了CRISPR-CAS-9体系以设计具有向导RNA(gRNA)和前间区序列邻近基序(PAM)序列上游的互补区域的特定构建体以在靶标PSIP1基因中产生双链断裂。然后,我们选择了在PSIP1基因的断裂位点处具有纯合破坏的菌落。诸如HEp2的细胞株可以具有多个拷贝的PSIP1基因并且由此重要的是将PSIP1基因的所有拷贝已被破坏的克隆分离出来,从而从细胞中消除LEDGF蛋白。以下描述了PSIP1基因破坏的5个CRISPR-CAS9示例。存在跨越PSIP1基因的外显子和内含子的许多PAM位点,然而外显子是编码区域中CRISPR-CAS9诱导的突变或破坏的优选靶标。

[0057] 以下各个代表性序列包括U6启动子序列、gRNA靶向位点、和PAM序列上游的gRNA支架,其与提供给细胞的CAS9酶组合联合作为相同载体的一部分或不同载体将产生能够在基因组的被靶向区域产生双链断裂的功能性CRISPR复合体。

[0058] 示例序列1:

[0059] 5' GTACAAAAAAGCAGGCTTTAAAGGAACCAATTCAGTCGACTGGATCCGGTACCAAGGTCGGGCAGG AAGAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAGAGAGATAATTAGAATTA TTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTT TTTAAAATTATGTTTTAAAATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAAGTATTCGATTTCTTGGCTTTATATA TCTTGTGGAAAGGACGAAACACCGTAATCAGCCACAACATAACGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAG GCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTCTAGACCCAGCTTTCTTGTACAAAGT TGGCATT 3' (SEQ ID NO:12):

[0060] 示例序列2:

[0061] 5' TGTACAAAAAAGCAGGCTTTAAAGGAACCAATTCAGTCGACTGGATCCGGTACCAAGGTCGGGCAG GAAGAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAGAGAGATAATTAGAATTA ATTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGT TTTAAAATTATGTTTTAAAATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAAGTATTCGATTTCTTGGCTTTATAT ATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCGACGCTCTGCGGCAGCTGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAA GGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTCTAGACCCAGCTTTCTTGTACAAAG TTGGCATT 3' (SEQ ID NO:13):

[0062] 示例序列3:

[0063] 5' TGTACAAAAAAGCAGGCTTTAAAGGAACCAATTCAGTCGACTGGATCCGGTACCAAGGTCGGGCAG GAAGAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAGAGAGATAATTAGAATTA

ATTTGACTGTAAACACAAAAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGT
TTTAAAATTATGTTTTAAAATGGACTATCATATGCTTACCCTAAGTAAAGTATTTCGATTTCTTGGCTTTATAT
ATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCCGAGGTAGACGAAGTTCCTGAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAA
GGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCCGAGTCGGTGCTTTTTTTCTAGACCCAGCTTTCTTGTACAAAG
TTGGCATTAA3' (SEQ ID NO:14)

[0064] 示例序列4 (SEQ ID NO:15) :

[0065] 5' TGTACAAAAAGCAGGCTTTAAAGGAACCAATTCAGTCGACTGGATCCGGTACCAAGGTCGGGCAG
GAAGAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAGAGAGATAATTAGAATTA
ATTTGACTGTAAACACAAAAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGT
TTTAAAATTATGTTTTAAAATGGACTATCATATGCTTACCCTAAGTAAAGTATTTCGATTTCTTGGCTTTATAT
ATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCCGAACTACCCATTTTCTTTTTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAA
GGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCCGAGTCGGTGCTTTTTTTCTAGACCCAGCTTTCTTGTACAAAG
TTGGCATTAA3'

[0066] 示例序列5:

[0067] 5' TGTACAAAAAGCAGGCTTTAAAGGAACCAATTCAGTCGACTGGATCCGGTACCAAGGTCGGGCAG
GAAGAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAGAGAGATAATTAGAATTA
ATTTGACTGTAAACACAAAAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGT
TTTAAAATTATGTTTTAAAATGGACTATCATATGCTTACCCTAAGTAAAGTATTTCGATTTCTTGGCTTTATAT
ATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCCGAGTGCTTTTTTAGGACCAAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAA
GGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCCGAGTCGGTGCTTTTTTTCTAGACCCAGCTTTCTTGTACAAAG
TTGGCATTAA3' (SEQ ID NO:16)

[0068] 对于示例序列3,将破坏靶向至PSIP1基因的外显子1,从而消除制备部分LEDGF蛋白的可能性。进一步地,我们分离出如由DNA测序所确定的所有拷贝的PSIP1基因都被破坏的HEp2细胞的单个菌落。由DNA测序确定后,将来自菌落的细胞与WT细胞以1:1的比例混合,并采用对DFS70模式特异性阳性且由针对DFS70抗血清 (ImmcoStripe ANA-Advanced LIA, Immco Diagnostics有限公司, Buffalo, NY) 进行的LIA (条带免疫测定法) 或条带印迹测定法确定的一组抗血清进行IIF分析。图1中描述了该结果。因此,本公开包括哺乳动物细胞培养物,其包括哺乳动物细胞,其中破坏该细胞中PSIP1基因的每个拷贝,并且由此使该细胞不表达LEDGF蛋白。在一个实施方案中,该细胞不表达可检测的LEDGF蛋白,其中通过IIF进行检测。在实施方案中,当采用CRISPR方法来破坏PSIP1基因时,该细胞还可以包括对被整合至细胞染色体中一个以上位置的区域编码的Cas9蛋白,并且还可包括对被整合至该细胞染色体中的gRNA编码的序列。

[0069] 另一方面,本公开包括用于检测ANA抗体和/或LEDGF抗体的方法。该方法包括从个体获得生物样品,将样品与本文所描述的经过修饰的细胞混合,以及进行诸如IIF测定法的免疫测定法以确定上述抗体。这些抗体的存在是对诸如SARD的自身免疫疾病的诊断或辅助诊断,同时ANA抗体的缺失指示没有自身免疫疾病。因此,本公开提供了在本方法的步骤中采用新试剂的诊断方法。在实施方式中,LEDGF+细胞中对LEDGF的抗体的存在指示有必要对个体进行进一步的诊断测试。

[0070] 如上所述,采用HEp-2细胞作为基质以检测ANA抗体的IIF测定法是本领域所众所

周知的,并且可以用于本公开的经过修饰的细胞而无需修改此公知的程序。测定法中采用的生物样品可以为任何生物样品,包括但不限于血液、血清、精液、胸膜液、脑脊液、唾液、尿液、外来体或组织。可以直接采用生物样品,或可以使其在暴露于上述细胞前进行加工步骤。可以将抗体(如果存在)的量与用于例如校正背景或用于对与抗体正相关的自身免疫疾病的程度和/或严重性进行分期的任何适当的参照进行比较。在实施方案中,本公开包括测试LEDGF+和LEDGF-细胞的组合以确定样品是否包含接合至LEDGF的抗体,并且由此可以提供对使得常常导致ANA自身抗体假阳性结果的先前可用方法复杂化的背景的校正。

[0071] 另一方面,本公开包括用于在检测ANA抗体中使用而制造的试剂盒和制品。该试剂盒可以包括将本公开的经过修饰的细胞保存在其中的至少一个容器。可以采用任何适当的试剂来保藏该细胞,并且可以例如以小球的形式提供该细胞。该试剂盒可以包括用于在IIF测定法中使用的试剂,以及描述该经过修饰的细胞的说明书,诸如通过提供如何对它们进行修饰或已经对它们进行了修饰以降低DFS的描述,以及针对在IIF测定法中使用该细胞的说明书。在实施方案中,该试剂盒包括固定至一个以上适当的固体基质的LEDGF+和LEDGF-细胞。可以采用任何适当的方法(其中许多是本领域众所周知的)对该细胞进行透化,并且由此该细胞是死亡细胞。在实施方案中,对该固定化在固体基质上的经过固定的细胞进行干燥。

[0072] 前述的本公开包括本文所描述的经过修饰的细胞、用于制造该经过修饰的细胞的方法、包括经过该修饰的细胞的细胞培养物、以及用于在设计为检测ANA抗体谱所包括的多个抗体的任一个或任意组合的任何测定法中使用该经过修饰的细胞的所有方法将是明显的形式。

[0073] 参考文献

[0074] Ayaki, M., T. Sueno, D. P. Singh, L. T. Chylack, Jr. 和 T. Shinohara (1999). "Antibodies to lens epithelium-derived growth factor (LEDGF) kill epithelial cells of whole lenses in organ culture." *Exp Eye Res* 69 (1):139-142.

[0075] Ganapathy, V. 和 C. A. Casiano (2004). "Autoimmunity to the nuclear autoantigen DFS70 (LEDGF): what exactly are the autoantibodies trying to tell us?" *Arthritis Rheum* 50 (3):684-688.

[0076] Ganapathy, V., T. Daniels 和 C. A. Casiano (2003). "LEDGF/p75: a novel nuclear autoantigen at the crossroads of cell survival and apoptosis." *Autoimmun Rev* 2 (5):290-297.

[0077] Mahler, M. 和 M. J. Fritzler (2012). "The Clinical Significance of the Dense Fine Speckled Immunofluorescence Pattern on HEp-2 Cells for the Diagnosis of Systemic Autoimmune Diseases." *Clin Dev Immunol* 2012:494356.

[0078] Mahler, M., T. Parker, C. L. Peebles, L. E. Andrade, A. Swart, Y. Carbone, D. J. Ferguson, D. Villalta, N. Bizzaro, J. G. Hanly 和 M. J. Fritzler (2012). "Anti-DFS70/LEDGF Antibodies Are More Prevalent in Healthy Individuals Compared to Patients with Systemic Autoimmune Rheumatic Diseases." *J Rheumatol*.

[0079] Ochs, R. L., Y. Muro, Y. Si, H. Ge, E. K. Chan 和 E. M. Tan (2000). "Autoantibodies to DFS70kd/transcription coactivator p75 in atopic dermatitis and other

conditions."J Allergy Clin Immunol 105(6Pt 1):1211-1220.

[0080] Ogawa,Y.,K.Sugiura,A.Watanabe,M.Kunimatsu,M.Mishima,Y.Tomita和Y.Muro (2004). "Autoantigenicity of DFS70 is restricted to the conformational epitope of C-terminal alpha-helical domain."J Autoimmun 23(3):221-231.

[0081] Okamoto,M.,Y.Ogawa,A.Watanabe,K.Sugiura,Y.Shimomura,N.Aoki,T.Nagasaka,Y.Tomita和Y.Muro (2004). "Autoantibodies to DFS70/LEDGF are increased in alopecia areata patients."J Autoimmun 23(3):257-266.

[0082] Vandekerckhove,L.,F.Christ,B.Van Maele,J.De Rijck,R.Gijsbers,C.Van den Haute,M.Witvrouw和Z.Debyser (2006). "Transient and stable knockdown of the integrase cofactor LEDGF/p75 reveals its role in the replication cycle of human immunodeficiency virus."J Virol80(4):1886-1896.

[0083] Watanabe,A.,M.Kodera,K.Sugiura,T.Usuda,E.M.Tan,Y.Takasaki,Y.Tomita和Y.Muro (2004). "Anti-DFS70 antibodies in 597healthy hospital workers."Arthritis Rheum 50(3):892-900.

[0084] 尽管已经参照具体实施方案对本公开进行了特别显示和描述,本领域的技术人员应理解在不脱离如本文所公开的本公开的精神和范围的情况下,可以在其中在形式和细节上进行各种改变。

序列表

<110> 艾摩科诊断公司

<120> 用于全身性和非全身性自身免疫紊乱的改进的抗核抗体检测和诊断

<130> 019657.00056

<150> 61/969,771

<151> 2014-03-24

<160> 16

<170> PatentIn 3.5版本

<210> 1

<211> 530

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

```

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

```

195	200	205
Asp Ile Ile Thr Glu Glu Asp	Lys Ser Lys Lys Lys Gly	Gln Glu Glu
210	215	220
Lys Gln Pro Lys Lys Gln Pro	Lys Lys Asp Glu Glu Gly	Gln Lys Glu
225	230	235
Glu Asp Lys Pro Arg Lys Glu	Pro Asp Lys Lys Glu Gly	Lys Lys Glu
245	250	255
Val Glu Ser Lys Arg Lys Asn	Leu Ala Lys Thr Gly	Val Thr Ser Thr
260	265	270
Ser Asp Ser Glu Glu Glu Gly	Asp Asp Gln Glu Gly	Glu Lys Lys Arg
275	280	285
Lys Gly Gly Arg Asn Phe Gln	Thr Ala His Arg Arg	Asn Met Leu Lys
290	295	300
Gly Gln His Glu Lys Glu Ala	Ala Asp Arg Lys Arg	Lys Gln Glu Glu
305	310	315
Gln Met Glu Thr Glu Gln Gln	Asn Lys Asp Glu Gly	Lys Lys Pro Glu
325	330	335
Val Lys Lys Val Glu Lys Lys	Arg Glu Thr Ser Met	Asp Ser Arg Leu
340	345	350
Gln Arg Ile His Ala Glu Ile	Lys Asn Ser Leu Lys	Ile Asp Asn Leu
355	360	365
Asp Val Asn Arg Cys Ile Glu	Ala Leu Asp Glu Leu	Ala Ser Leu Gln
370	375	380
Val Thr Met Gln Gln Ala Gln	Lys His Thr Glu Met	Ile Thr Thr Leu
385	390	395
Lys Lys Ile Arg Arg Phe Lys	Val Ser Gln Val Ile	Met Glu Lys Ser
405	410	415
Thr Met Leu Tyr Asn Lys Phe	Lys Asn Met Phe Leu	Val Gly Glu Gly
420	425	430
Asp Ser Val Ile Thr Gln Val	Leu Asn Lys Ser Leu	Ala Glu Gln Arg
435	440	445
Gln His Glu Glu Ala Asn Lys	Thr Lys Asp Gln Gly	Lys Lys Gly Pro
450	455	460
Asn Lys Lys Leu Glu Lys Glu	Gln Thr Gly Ser Lys	Thr Leu Asn Gly
465	470	475
Gly Ser Asp Ala Gln Asp Gly	Asn Gln Pro Gln His	Asn Gly Glu Ser
485	490	495
Asn Glu Asp Ser Lys Asp Asn	His Glu Ala Ser Thr	Lys Lys Lys Pro
500	505	510

Ser Ser Glu Glu Arg Glu Thr Glu Ile Ser Leu Lys Asp Ser Thr Leu
 515 520 525

Asp Asn
 530

<210> 2

<211> 107

<212> PRT

<213> 智人

<400> 2

Asp Ser Arg Leu Gln Arg Ile His Ala Glu Ile Lys Asn Ser Leu Lys
 1 5 10 15
 Ile Asp Asn Leu Asp Val Asn Arg Cys Ile Glu Ala Leu Asp Glu Leu
 20 25 30
 Ala Ser Leu Gln Val Thr Met Gln Gln Ala Gln Lys His Thr Glu Met
 35 40 45
 Ile Thr Thr Leu Lys Lys Ile Arg Arg Phe Lys Val Ser Gln Val Ile
 50 55 60
 Met Glu Lys Ser Thr Met Leu Tyr Asn Lys Phe Lys Asn Met Phe Leu
 65 70 75 80
 Val Gly Glu Gly Asp Ser Val Ile Thr Gln Val Leu Asn Lys Ser Leu
 85 90 95
 Ala Glu Gln Arg Gln His Glu Glu Ala Asn Lys
 100 105

<210> 3

<211> 1593

<212> DNA

<213> 智人

<400> 3

atgactcgcg atttcaaacc tggagacctc atcttcgcca agatgaaagg ttatcccat 60
 tggccagctc gagtagacga agttcctgat ggagctgtaa agccaccac aaacaaacta 120
 cccatcttct tttttggaac tcatgagact gcttttttag gaccaaagga tatatttctt 180
 tactcagaaa ataaggaaaa gtatggcaaa ccaataaaa gaaaaggttt taatgaaggt 240
 ttatgggaga tagataacaa tccaaaagtg aaatcttcaa gtcaacaggc agcaactaaa 300
 caatcaaatg catcatctga tgttgaagtt gaagaaaagg aactagtgt ttcaaaggaa 360
 gataccgacc atgaagaaaa agccagcaat gaggatgtga ctaaagcagt tgacataact 420
 actccaaaag ctgccagaag ggggagaaaag agaaaggcag aaaaacaagt agaaactgag 480
 gaggcaggag tagtgacaac agcaacagca tctgttaatc taaaagttag tcctaaaaga 540
 ggacgacctg cagctacaga agtcaagatt ccaaaaccaa gaggcagacc caaatggta 600
 aaacagccct gtccttcaga gagtgacatc attactgaag aggacaaaag taagaaaaag 660

gggcaagagg aaaacaacc taaaagcag cctaagaagg atgaagagg ccagaaggaa 720
 gaagataagc caagaaaaga gccgataaa aaagagggga agaaagaagt tgaatcaaaa 780
 aggaaaaatt tagctaaaac aggggttact tcaacctccg attctgaaga agaaggagat 840
 gatcaagaag gtgaaaagaa gagaaaaggt gggaggaact ttcagactgc tcacagaagg 900
 aatatgctga aaggccaaca tgagaaagaa gcagcagatc gaaaacgcaa gcaagaggaa 960
 caaatggaaa ctgagcagca gaataaagat gaaggaaaga agccagaagt taagaaagt 1020
 gagaagaagc gagaaacatc aatggattct cgacttcaa ggatacatgc tgagattaa 1080
 aattcactca aaattgataa tcttgatgtg aacagatgca ttgaggcctt ggatgaactt 1140
 gcttcacttc aggtcacaat gcaacaagct cagaaacaca cagagatgat tactacactg 1200
 aaaaaaatac ggcgattcaa agttagtcag gtaatcatgg aaaagtctac aatgttgtat 1260
 aacaagttta agaacatggt cttggttggg gaaggagatt cegtgatcac ccaagtgctg 1320
 aataaatctc ttgctgaaca aagacagcat gaggaagcga ataaaaccaa agatcaaggg 1380
 aagaaagggc caaacaaaaa gctagagaag gaacaaacag ggtcaaagac tctaaatgga 1440
 ggatctgatg ctcaagatgg taatcagcca caacataacg gggagagcaa tgaagacagc 1500
 aaagacaacc atgaagccag cacgaagaaa aagccatcca gtgaagagag agagactgaa 1560
 atatctctga aggattctac actagataac tag 1593

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> shRNA序列的DNA等同物

<400> 4

agacagcatg aggaagcga 19

<210> 5

<211> 47

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> shRNA序列的DNA等同物

<400> 5

agacagcatg aggaagcgat tcaagagatc gcttctcat gctgtct 47

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> shRNA序列的DNA等同物

<400> 6

agttcctgat ggagctgtaa a 21
<210> 7
<211> 46
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shRNA序列的DNA等同物
<400> 7

agttcctgat ggagctgtaa acgagtttac agctccatca ggaact 46
<210> 8
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shRNA序列的DNA等同物
<400> 8

gcaatgaaga cagcaaagac a 21
<210> 9
<211> 46
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shRNA序列的DNA等同物
<400> 9

gcaatgaaga cagcaaagac acgagtgtct ttgctgtctt cattgc 46
<210> 10
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shRNA序列的DNA等同物
<400> 10

gtctccacgc gcagtacatt t 21
<210> 11
<211> 46
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> shRNA序列的DNA等同物

<400> 11

gtctccacgc gcagtacatt tcgagaaatg tactgcgcgt ggagac 46

<210> 12

<211> 454

<212> DNA

<213> 智人

<400> 12

gtacaaaaaa gcaggcttta aaggaaccaa ttcagtcgac tggatccggt accaaggctc 60
 ggcaggaaga gggcctatth cccatgattc cttcatatth gcatatacga tacaaggctg 120
 ttagagagat aattagaatt aatttgactg taaacacaaa gatattagta caaaatacgt 180
 gacgtagaaa gtaataatth cttgggtagt ttgcagthtt aaaattatgt tttaaaatgg 240
 actatcatat gcttaccgta acttgaaagt atttcgattt cttggcttta tatactttgt 300
 ggaaaggacg aaacaccgta atcagccaca acataacgth ttagagctag aaatagcaag 360
 ttaaaataag gctagtccgt tatcaacttg aaaaagtggc accgagtcgg tgctthtttt 420
 ctagaccag ctttcttgta caaagttggc atta 454

<210> 13

<211> 455

<212> DNA

<213> 智人

<400> 13

tgtacaaaaa agcaggctth aaaggaacca attcagtcga ctggatccgg taccaaggctc 60
 gggcaggaag agggcctatt tcccatgatt cttcatatth tgcatatacag atacaaggct 120
 gttagagaga taattagaat taatttgact gtaaacacaaa agatattagat acaaaatacag 180
 tgacgtagaa agtaataatt tcttgggtag tttgcagthtt taaaattatg ttttaaaatg 240
 gactatcata tgcttaccgt aacttgaaag tatttcgatt tcttggctth atatatcttg 300
 tggaaaggac gaaacaccga cgctctgcg gcagctgggt tttagagcta gaaatagcaa 360
 gttaaaataa ggctagtccg ttatcaactt gaaaagtgg caccgagtcg gtgctthtttt 420
 tctagacca gctthcttgt acaaagttgg catta 455

<210> 14

<211> 455

<212> DNA

<213> 智人

<400> 14

tgtacaaaaa agcaggctth aaaggaacca attcagtcga ctggatccgg taccaaggctc 60
 gggcaggaag agggcctatt tcccatgatt cttcatatth tgcatatacag atacaaggct 120
 gttagagaga taattagaat taatttgact gtaaacacaaa agatattagat acaaaatacag 180
 tgacgtagaa agtaataatt tcttgggtag tttgcagthtt taaaattatg ttttaaaatg 240
 gactatcata tgcttaccgt aacttgaaag tatttcgatt tcttggctth atatatcttg 300
 tggaaaggac gaaacaccga ggtagacgaa gttcctgagt tttagagcta gaaatagcaa 360

gttaaaataa ggctagtccg ttatcaactt gaaaaagtgg caccgagtcg gtgctttttt 420
tctagaccca gctttcttgt acaaagttgg catta 455

<210> 15

<211> 455

<212> DNA

<213> 智人

<400> 15

tgtacaaaaa agcaggcttt aaaggaacca attcagtcga ctggatccgg taccaaggtc 60
gggcaggaag agggcctatt tcccatgatt cttcatatt tgcataatcg atacaaggct 120
gttagagaga taattagaat taatttgact gtaaacacaa agatattagt acaaaatagc 180
tgacgtagaa agtaataatt tcttgggtag tttgcagttt taaaattatg ttttaaaatg 240
gactatcata tgcttaccgt aacttgaaag tatttcgatt tcttggcttt atatatcttg 300
tggaaaggac gaaacaccga actaccatt ttctttttgt tttagagcta gaaatagcaa 360
gttaaaataa ggctagtccg ttatcaactt gaaaaagtgg caccgagtcg gtgctttttt 420
tctagaccca gctttcttgt acaaagttgg catta 455

<210> 16

<211> 455

<212> DNA

<213> 智人

<400> 16

tgtacaaaaa agcaggcttt aaaggaacca attcagtcga ctggatccgg taccaaggtc 60
gggcaggaag agggcctatt tcccatgatt cttcatatt tgcataatcg atacaaggct 120
gttagagaga taattagaat taatttgact gtaaacacaa agatattagt acaaaatagc 180
tgacgtagaa agtaataatt tcttgggtag tttgcagttt taaaattatg ttttaaaatg 240
gactatcata tgcttaccgt aacttgaaag tatttcgatt tcttggcttt atatatcttg 300
tggaaaggac gaaacaccga gtgctttttt aggaccaagt tttagagcta gaaatagcaa 360
gttaaaataa ggctagtccg ttatcaactt gaaaaagtgg caccgagtcg gtgctttttt 420
tctagaccca gctttcttgt acaaagttgg catta 455

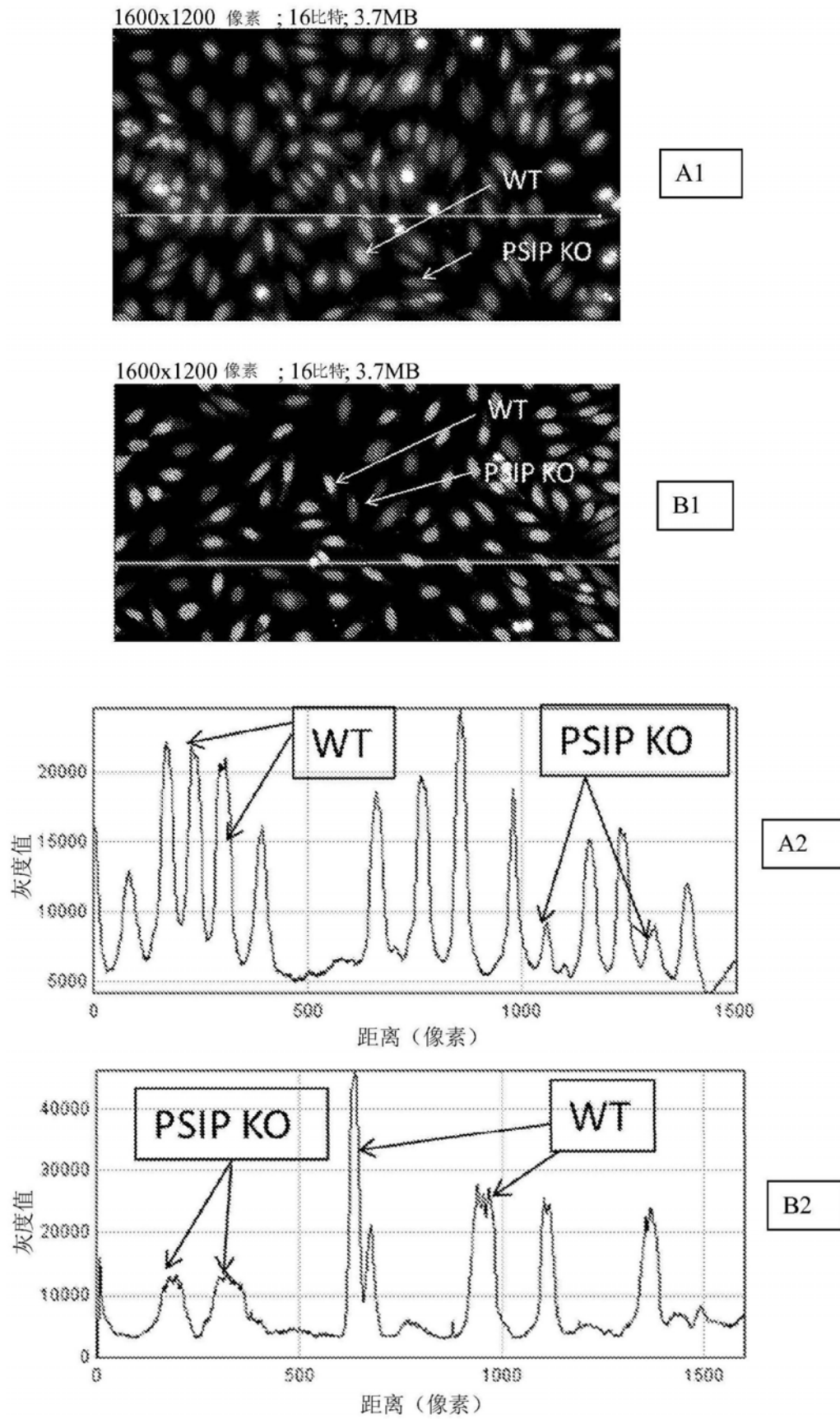


图1