



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108184330 B

(45) 授权公告日 2021.08.06

(21) 申请号 201680037784.2

(22) 申请日 2016.06.23

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108184330 A

(43) 申请公布日 2018.06.19

(30) 优先权数据
62/185,186 2015.06.26 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2017.12.26

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2016/039029 2016.06.23

(87) PCT国际申请的公布数据
W02016/210137 EN 2016.12.29

(73) 专利权人 加利福尼亚大学董事会
地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 J·万 德 沃特 E·埃德米斯顿

(74) 专利代理机构 上海一平知识产权代理有限公司 31266

代理人 崔佳佳 徐迅

(51) Int.Cl.
C07K 7/00 (2006.01)

审查员 李倩

权利要求书3页 说明书42页
序列表23页

(54) 发明名称

抗原肽及其用于诊断和治疗自闭症的用途

(57) 摘要

本发明提供了与母体自身抗体特异性结合的肽,所述抗体在母亲或潜在母亲中针对选自下组的一种或多种内源性多肽抗原而产生:乳酸脱氢酶A(LDH A),乳酸脱氢酶B(LDH B),应激诱导磷蛋白1(STIP1),鸟嘌呤脱氨酶(GDA),Y盒结合蛋白1(YBX1),坍塌反应调节蛋白1(CRMP1)和坍塌反应调节蛋白2(CRMP2)。本文所述的肽可用于通过检测在母亲或潜在母亲的生物样本中母体自身抗体的存在,来确定后代患自闭症谱系障碍(ASD)的风险。也可以将肽或其模拟表位给母亲或潜在母亲以阻断母体自身抗体与其抗原的结合,从而中和母体自身抗体。

1. 一种分离的肽,其特征在于,所述肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:36所示。
2. 根据权利要求1所述的肽,其特征在于,所述肽与母体抗体结合,所述母体抗体与坍塌反应蛋白1 (CRMP1) 蛋白结合。
3. 根据权利要求1所述的肽,其特征在于,所述肽是模拟表位。
4. 根据权利要求3所述的肽,其特征在于,所述模拟表位包含D-氨基酸。
5. 根据权利要求1所述的肽,其特征在于,所述肽还包含标签。
6. 根据权利要求5所述的肽,其特征在于,所述标签选自生物素、荧光标记、化学发光标记和放射性标记。
7. 一种组合物,其包含权利要求1所述的肽或包括权利要求1所述肽的多种肽。
8. 根据权利要求7所述的组合物,还包含药学上可接受的载体。
9. 根据权利要求7所述的组合物,其特征在于,所述组合物还包含一种或多种氨基酸序列分别如SEQ ID NOS:9、11、12、54、66和71所示的肽。
10. 一种试剂盒,其包含权利要求1所述的肽或包括权利要求1所述肽的多种肽以及固体支持物。
11. 根据权利要求10所述的试剂盒,其特征在于,所述固体支持物是多孔板、微阵列、珠子、多孔条或硝酸纤维素滤膜。
12. 根据权利要求11所述的试剂盒,其特征在于,所述多孔板包括ELISA板。
13. 根据权利要求11所述的试剂盒,其特征在于,所述微阵列包括芯片。
14. 如权利要求10所述的试剂盒,其特征在于,所述肽或所述多种肽被固定在所述固体支持物上。
15. 根据权利要求10所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包含一种或多种氨基酸序列分别如SEQ ID NOS:9、11、12、54、66和71所示的肽。
16. 根据权利要求10所述的试剂盒,还包括使用说明书。
17. 一种权利要求1所述的肽或包含权利要求1所述肽的多种肽的用途,用于制备确定后代患自闭症谱系障碍 (ASD) 风险的试剂盒,并且,所述试剂盒用于在来自该后代的母亲或潜在母亲的生物样品中检测与所述肽或多种肽结合的母体抗体的存在或不存在,其中与所述肽或多种肽结合的母体抗体的存在表明后代患ASD的风险增加,其中,所述的生物样品选自下组:血液,血清和血浆。
18. 根据权利要求17所述的用途,其特征在于,所述试剂盒用于检测时还包括从所述母亲或潜在母亲获得所述生物样品的步骤。
19. 根据权利要求17所述的用途,其特征在于,所述试剂盒还包含一种或多种氨基酸序列分别如SEQ ID NOS:9、11、12、54、66和71所示的肽。
20. 根据权利要求17所述的用途,其特征在于,所述肽或所述多种肽附着于固体支持物。
21. 根据权利要求20所述的用途,其中所述固体支持物是多孔板、微阵列、珠子、多孔条或硝酸纤维素滤器。
22. 根据权利要求21所述的用途,其特征在于,所述多孔板包括ELISA板。
23. 根据权利要求21所述的用途,其特征在于,所述微阵列包括芯片。
24. 根据权利要求17所述的用途,其特征在于,所述母体抗体通过蛋白质印迹、斑点印

迹、ELISA、放射免疫测定、免疫沉淀、电化学发光、免疫荧光、FACS分析或多重珠测定来检测。

25. 根据权利要求17所述的用途,其特征在于,所述母亲或潜在的母亲有患有ASD的孩子。

26. 根据权利要求17所述的用途,其特征在于,所述母亲或潜在的母亲有ASD或自身免疫疾病的家族史。

27. 多种肽,其特征在于,所述多种肽的氨基酸序列分别选自下组:SEQ ID NOS:27、38和45,SEQ ID NOS:21、38和55,以及SEQ ID NOS:32、38、45、55和60。

28. 根据权利要求27所述的多种肽,其特征在于,具有SEQ ID NO.:38所示氨基酸序列的肽与母体抗体结合,所述母体抗体与CRMP1蛋白结合。

29. 根据权利要求27所述的多种肽,其特征在于,具有SEQ ID NO.:38所示氨基酸序列的肽是模拟表位。

30. 根据权利要求29所述的多种肽,其特征在于,所述模拟表位包含D-氨基酸。

31. 根据权利要求27所述的多种肽,其特征在于,具有SEQ ID NO.:38所示氨基酸序列的肽还包含标签。

32. 根据权利要求31所述的多种肽,其特征在于,所述标签选自生物素、荧光标记、化学发光标记和放射性标记。

33. 一种组合物,其包含权利要求27所述的多种肽。

34. 根据权利要求33所述的组合物,其特征在于,还包含药学上可接受的载体。

35. 一种试剂盒,其包含权利要求27所述的多种肽以及固体支持物。

36. 根据权利要求35所述的试剂盒,其特征在于,所述固体支持物是多孔板、微阵列、珠子、多孔条或硝酸纤维素滤膜。

37. 根据权利要求36所述的试剂盒,其特征在于,所述多孔板包括ELISA板。

38. 根据权利要求36所述的试剂盒,其特征在于,所述微阵列包括芯片。

39. 如权利要求35所述的试剂盒,其特征在于,所述的多种肽被固定在所述固体支持物上。

40. 根据权利要求35所述的试剂盒,其特征在于,还包括使用说明书。

41. 一种权利要求27所述多种肽的用途,其特征在于,用于制备确定后代患ASD风险的试剂盒,并且,所述试剂盒用于在来自该后代的母亲或潜在母亲的生物样品中检测与所述多种肽结合的母体抗体的存在或不存在,其中与所述多种肽结合的母体抗体的存在表明后代患ASD的风险增加,其中,所述的生物样品选自下组:血液,血清和血浆。

42. 根据权利要求41所述的用途,其特征在于,所述试剂盒用于检测时还包括从所述母亲或潜在母亲获得所述生物样品的步骤。

43. 根据权利要求41所述的用途,其特征在于,所述肽或所述多种肽附着于固体支持物。

44. 根据权利要求43所述的用途,其中所述固体支持物是多孔板、微阵列、珠子、多孔条或硝酸纤维素滤器。

45. 根据权利要求44所述的用途,其特征在于,所述多孔板包括ELISA板。

46. 根据权利要求44所述的用途,其特征在于,所述微阵列包括芯片。

47. 根据权利要求41所述的用途, 其特征在于, 所述母体抗体通过蛋白质印迹、斑点印迹、ELISA、放射免疫测定、免疫沉淀、电化学发光、免疫荧光、FACS分析或多重珠测定来检测。

48. 根据权利要求41所述的用途, 其特征在于, 所述母亲或潜在的母亲有患有ASD的孩子。

49. 根据权利要求41所述的用途, 其特征在于, 所述母亲或潜在的母亲有ASD或自身免疫疾病的家族史。

抗原肽及其用于诊断和治疗自闭症的用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2015年6月26日提交的美国临时申请号62/185,186的优先权,其内容出于所有目的通过引用的方式全文纳入本文。

[0003] 对于联邦资助研发下作出的发明的权利的声明

[0004] 本发明在国立卫生研究院授予的、基金号为ES011269的政府资助下作出。政府对本发明享有一定的权利。

[0005] 发明背景

[0006] 自闭症谱系障碍(ASD)是在儿童早期诊断的一组神经发育障碍,被分类为社会交往和沟通能力的丧失以及存在重复和限制兴趣和行为。目前,ASD影响了美国大约68分之1的儿童,估计每年社会成本高达2400亿美元。目前可用于ASD的治疗干预是行为指导或基于症状的药物治疗,仅在诊断后应用。对ASD的病因知之甚少,尽管在早期诊断后应用的某些治疗方法已经显示出前景,但目前还没有预防性替代方法。

[0007] 众所周知,胎儿早期生长期间母体免疫系统的激活可能对脑发育有负面影响。由于不清楚的原因,一些孕妇的免疫系统会产生自身抗体(由免疫系统产生的对自身组织成分的反应产生的蛋白质),这些抗体错误地将胎儿脑的部分识别为外来物质。因此,妊娠期暴露于这些母体自身抗体可能导致ASD神经发育特征的改变。事实上,23%生出ASD孩子的母亲在大脑发育中有针对7种蛋白质高表达的循环自身抗体,相反,只有1%的母亲生出正常的孩子。已知每种蛋白质在神经发育中起重要作用;干扰其中一个以上的水平或功能可以协同作用改变大脑发育的轨迹。参见美国专利第8,383,360号。

[0008] 目前,没有早期的,非遗传的,抗原决定簇特异性生物标志物来确定孕产妇患ASD的风险。通过创造高度特异性的治疗和/或干预工具,还需要迫切解决ASD的原因和治疗方法,而不仅仅是了解相关症状。在受影响的母亲中早期鉴定这些母体自身抗体将允许早期医学干预来限制胎儿暴露于自身抗体,以及随之而来的孩子患ASD的风险,从而减少ASD的流行,改善受影响儿童及其家庭的生活质量。本发明也满足了这些需求并提供了相关的优点。

发明内容

[0009] 本发明提供了与母体自身抗体特异性结合的肽(例如肽表位),这些抗体是在母亲或潜在母亲中针对选自下组的一种或多种多肽产生的:乳酸脱氢酶A(LDH A),乳酸脱氢酶B(LDH B),应激诱导磷蛋白1(STIP1),鸟嘌呤脱氨酶(GDA),Y盒结合蛋白1(YBX1),坍塌反应调节蛋白1(CRMP1)和坍塌反应调节蛋白2(CRMP2)。本文所述的肽可通过检测在母亲或潜在母亲的生物样本中母体自身抗体的存在,来确定后代患自闭症谱系障碍(ASD)的风险。还可以将肽给母亲或潜在母亲以阻断母体自身抗体与其抗原之间的结合,从而中和母体自身抗体。此外,肽可用于免疫吸附以从母体血浆中去除循环自身抗体。

[0010] 第一方面,本文提供了与SEQ ID NO:1-7和62-64中的任一个具有至少约80%序列一致性的分离肽。在一些实施例中,肽包含SEQ ID NO:1-7和62-64中任一个的至少5、6、7、

8、9、10、11、12、13、14或15个连续氨基酸。在其他实施例中，肽结合与乳酸脱氢酶A (LDH A) 蛋白结合的母体抗体。

[0011] 第二方面，本文提供了与SEQ ID NO:8-19和65-72中任一个具有至少约80%序列一致性的分离肽。在一些实施例中，肽包含SEQ ID NO:8-19和65-72中任一个的至少5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个连续氨基酸。在其他实施例中，肽结合与乳酸脱氢酶B (LDH B) 蛋白结合的母体抗体。

[0012] 第三方面，本文提供了与SEQ ID NO:20-23和73-76中的任一个具有至少约80%序列一致性的分离肽。在一些实施例中，肽包含SEQ ID NO:20-23和73-76中任一个的至少5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个连续氨基酸。在其他实施例中，肽结合与应激诱导的磷蛋白1 (STIP1) 结合的母体抗体。

[0013] 第四方面，本文提供了与SEQ ID NO:24-27和77-79中的任一个具有至少约80%序列一致性的分离肽。在一些实施例中，肽包含SEQ ID NOS:24-27和77-79中任一个的至少5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个连续氨基酸。在其他实施例中，肽结合与鸟嘌呤脱氨酶 (GDA) 蛋白结合的母体抗体。

[0014] 第五方面，本文提供了与SEQ ID NO:28-35和80-83中的任何一个具有至少约80%序列一致性的分离肽。在一些实施例中，肽包含SEQ ID NOS:28-35和80-83中任一个的至少5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个连续氨基酸。在其他实施例中，肽结合与Y盒结合蛋白1 (YBX1) 结合的母体抗体。

[0015] 第六方面，本文提供了与SEQ ID NO:36-44和84-88中的任一个具有至少约80%序列一致性的分离肽。在一些实施例中，肽包含SEQ ID NOS:36-44和84-88中任一个的至少5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个连续氨基酸。在其他实施例中，肽结合与坍塌反应调节蛋白1 (CRMP1) 结合的母体抗体。

[0016] 在第七方面，本文提供了与SEQ ID NOS:45-61和89-96中的任一个具有至少约80%序列一致性的分离肽。在一些实施例中，肽包含SEQ ID NOS:45-61和89-96中任一个的至少5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个连续氨基酸。在其他实施例中，肽结合体与坍塌反应调节蛋白2 (CRMP2) 结合的母体抗体结合。

[0017] 在某些实施例中，肽的长度约为5至45个氨基酸。在某些其他实施例中，肽的长度约为15至30个氨基酸。在其他实施例中，肽达到约25个氨基酸。

[0018] 在特定的实施例中，肽包含由SEQ ID NO:1-96中任一个组成的氨基酸序列。

[0019] 在一些实施例中，肽是模拟表位 (mimotope)。在某些实施例中，模拟表位包含D-氨基酸。在一些情况下，模拟表位中的所有氨基酸都是D-氨基酸。在其他实施例中，模拟表位包含相对于SEQ ID NO:1-96中的任何一个的一个或多个氨基酸修饰 (例如，替换)。

[0020] 在一些实施例中，本文所述的任何肽还可以包含标签，例如可检测标签。在某些情况下，标签选自生物素，荧光标签，化学发光标签和放射性标签。在某些其他情况下，标签附连在肽上 (例如，共价连接)。

[0021] 另一方面，本文提供了包括本文所述的任何一种肽或其多种的组成物。

[0022] 在一些实施例中，组合物还可以包括可药用载体。在其他实施例中，组合物中的多个肽包含至少2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,

51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95或96种不同的肽,例如选自SEQ ID NOS:1-96及其模拟表位。在某些情况下,组合物中的肽可以来自相同的抗原并结合相同的母体抗体。在其他情况下,组合物中的肽可以来自不同的抗原并结合不同的母体抗体。在其他情况下,组合物中的肽可以包含结合相同母体抗体的肽和结合一种或多种其他母体抗体的肽的组合。在一些情况下,组合物中的每种不同肽结合相同的母源抗体,例如,所有不同的肽结合抗选自LDH A,LDH B,STIP1,GDA,YBX1,CRMP1和CRMP2的单一抗原的母源抗体。在其他情况下,组合物中的每种不同的肽与至少2、3、4、5、6或7种不同的母体抗体结合,例如,不同的肽结合抗2、3、4、5、6或以下全部7种抗原的母体抗体:LDH A,LDH B,STIP1,GDA,YBX1,CRMP1和CRMP2。

[0023] 另一方面,本文提供了包括本文所述的任一种肽或其中的多个以及固体支持物的试剂盒。

[0024] 在一些实施例中,可将多种肽的肽固定在(例如,共价连接到)固体支持物上。在其他实施例中,固体支持物是多孔板,ELISA板,微阵列,芯片,珠子,多孔条或硝酸纤维素滤器。

[0025] 在一些实施例中,在试剂盒中的多个肽包含至少2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95或96种不同的肽,例如选自SEQ ID NOS:1-96及其模拟表位。在某些情况下,试剂盒中的肽可以来自相同的抗原并结合相同的母体抗体。在其他情况下,试剂盒中的肽可以来源于不同的抗原并结合不同的母体抗体。在其他情况下,试剂盒中的肽可以包含结合相同母体抗体的肽和结合一种或多种其他母体抗体的肽的组合。在一些情况下,试剂盒中的每种不同肽与相同的母源抗体结合,例如,所有不同的肽结合抗选自LDH A,LDH B,STIP1,GDA,YBX1,CRMP1,和CRMP2的单一抗原的母体抗体。在其他情况下,试剂盒中的每种不同的肽与至少2、3、4、5、6或7种不同的母体抗体结合,例如,不同的肽结合抗2、3、4、5、6或以下全部7种抗原的母体抗体:LDH A,LDH B,STIP1,GDA,YBX1,CRMP1和CRMP2。

[0026] 在某些实施例中,试剂盒还包含使用说明书。在一些情况下,使用说明书包括使固体支持物与来自母亲或潜在母亲的生物样品接触的说明。在其它情况下,使用说明书包括将与一种或多种肽结合的母体抗体的存在与患ASD的后代(例如胎儿或儿童)风险增加相关联的说明。在其他实施例中,试剂盒还包含标记的二抗,用于检测与一种或多种肽结合的母体抗体的存在。

[0027] 在其他实施例中,试剂盒还包含阴性和阳性对照样品。在一些情况下,阴性对照样品来自有典型发育(typically developing,TD)儿童的母亲。在其他情况下,生物样品和/或对照样品对以下全长抗原中的1、2、3、4、5、6或全部7个具有反应性:LDH A,LDH B,STIP1,GDA,YBX1,CRMP1和CRMP2。在其他情况下,生物样品和对照样品都不与任何全长抗原LDH A,LDH B,STIP1,GDA,YBX1,CRMP1或CRMP2反应。在进一步的实施例中,试剂盒还包含直接或间接用可检测部分标记的二体。

[0028] 另一方面,本文提供了用于确定后代患自闭症谱系障碍(ASD)的风险的方法,方法

包括：在来自该后代的母亲或潜在母亲的生物样品中检测与本文所述的任何一种肽或其多种结合的母体抗体的存在或不存在，其中与肽或其多种肽结合的母体抗体的存在表明后代患ASD的风险增加。该方法也可以包括从母亲或潜在母亲获得样本。样品可以选自血液，血清，血浆，羊水，乳汁和唾液。

[0029] 在一些实施例中，用于检测母体抗体的多种肽包含至少2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95或96种不同的肽，例如选自SEQ ID NOS:1-96及其模拟表位。在某些情况下，肽可以来自相同的抗原并结合相同的母体抗体。在其他情况下，肽可以来自不同的抗原并结合不同的母体抗体。在其他情况下，肽可以包含结合相同母体抗体的肽和结合一种或多种其他母体抗体的肽的组合。在一些情况下，每种不同肽结合相同的母源抗体，例如，所有不同的肽结合抗选自LDH A,LDH B,STIP1,GDA,YBX1,CRMP1和CRMP2的单一抗原的母体抗体。在其他情况下，每种不同的肽与至少2、3、4、5、6或7种不同的母体抗体结合，例如，不同的肽结合抗2、3、4、5、6或以下全部7种抗原的母体抗体：LDH A,LDH B,STIP1,GDA,YBX1,CRMP1和CRMP2。

[0030] 在一些实施例中，肽或其中多个肽附连于固体支持物。固体支持物的非限制性实例包括多孔板，ELISA板，微阵列，芯片，珠，多孔条和硝酸纤维素滤膜。在某些情况下，母体抗体可以通过例如ELISA，蛋白质印迹，斑点印迹，放射免疫测定，免疫沉淀，电化学发光，免疫荧光，FACS分析或多重珠测定等技术来检测。

[0031] 在一些实施例中，检测测试样品（例如来自母亲或潜在母亲的生物样品）中母体抗体的存在，而不将测试样品与对照样品进行比较。在其他实施例中，将测试样品与阳性或阴性对照样品进行比较。在一些情况下，测试样品和/或对照样品对1、2、3、4、5、6或以下全部全长抗原具有反应性：LDH A,LDH B,STIP1,GDA,YBX1,CRMP1和CRMP2。在其他情况下，测试样品和对照样品都不与任何全长抗原LDH A,LDH B,STIP1,GDA,YBX1,CRMP1和CRMP2反应。在另外一些情况下，阴性对照是从具有TD儿童的母亲获得的。

[0032] 在一些实施例中，母亲或潜在母亲有患ASD的孩子。在其他实施例中，母亲或潜在母亲有ASD或自身免疫疾病的家族史。

[0033] 在另一方面，本文提供了用于预防或降低后代患自闭症谱系障碍(ASD)的风险的方法，方法包括：向该后代的母亲或潜在母亲施用治疗有效剂量的本文所述任一种肽或其多种肽，其中所述肽或其多种与母体或潜在母亲中循环的母体抗体结合形成中和复合物，从而防止或降低后代患ASD的风险。在具体的实施例中，肽阻断母体抗体与其抗原性多肽之间的结合。

[0034] 在一些实施例中，该方法还包括从母亲或潜在母亲中除去中和复合物。在某些情况下，中和复合物通过亲和血浆除去。在其他实施例中，肽或多种肽通过静脉内施用。

[0035] 在一些实施例中，用于阻断母体抗体与其抗原结合的多种肽包含至少2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,

83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95或96种不同的肽,例如选自SEQ ID NOS:1-96及其模拟表位。在某些情况下,肽可以来自相同的抗原并结合相同的母体抗体。在其他情况下,肽可以来自不同的抗原并结合不同的母体抗体。在其他情况下,肽可以包含结合相同母体抗体的肽和结合一种或多种其他母体抗体的肽的组合。在一些情况下,每种不同肽结合相同的母体抗体,例如,所有不同的肽结合抗选自LDH A,LDH B,STIP1,GDA,YBX1,CRMP1和CRMP2的单一抗原的母体抗体。在其他情况下,每种不同的肽与至少2、3、4、5、6或7种不同的母体抗体结合,例如,不同的肽结合抗2、3、4、5、6或以下全部7种抗原的母体抗体:LDH A,LDH B,STIP1,GDA,YBX1,CRMP1和CRMP2。

[0036] 从下面的详细描述中,本发明的其它目的、特征和优点对于本领域技术人员将是显而易见的。

[0037] 附图简要说明

[0038] 无

[0039] 发明详述

[0040] 一、介绍

[0041] 自闭症谱系障碍(ASD)是严重的神经发育障碍,影响多达150分之1儿童。已经描述了在患有ASD的儿童的母亲子集中,存在分子量约为37kDa,39kDa和73kDa的对胎儿脑蛋白具有特异性的母体IgG抗体。参见例如美国专利号7,452,681。本发明根据特异性结合母体自身抗体的肽(例如肽表位)的鉴定,表明后代(如胎儿或儿童)患ASD的风险增加。本文所述的肽表位包括乳酸脱氢酶A(LDH A),乳酸脱氢酶B(LDH B),应激诱导磷蛋白1(STIP1),鸟嘌呤脱氨酶(GDA),Y盒结合蛋白1(YBX1)坍塌反应调节蛋白1(CRMP1)和坍塌反应调节蛋白2(CRMP2)。母亲或潜在母亲的生物样品中存在针对一个或多个肽表位的母体自身抗体表明后代患ASD的风险增加。也可以将肽表位或其模拟表位给予母亲或潜在母亲以阻断母体自身抗体与其抗原之间的结合,由此中和母体自身抗体,并且使用体外疗法如亲和血浆去除术可以任选去除包含与母体自身抗体结合的肽表位的中和复合物。

[0042] 二、定义

[0043] 除非另外指明,否则本文所使用的以下术语有归于它们的含义。

[0044] 术语“自闭症谱系障碍”,“自闭症谱系障碍”,“自闭症”或“ASD”是指一系列神经发育障碍,社会交往和沟通能力的丧失以及存在重复和限制兴趣和行为,其特征是受到重复和刻板行为伴随的社会交往和沟通障碍。自闭症包括一系列社会交往和沟通障碍,然而,根据社交互动和沟通障碍的程度,这种障碍大致可以分为“高功能自闭症”或“低功能自闭症”。被诊断患有“高功能自闭症”的个体具有最小但可识别的社交互动和交流障碍(即,阿斯伯格综合症)。关于自闭症谱系障碍的其他信息可以在以下文献找到,例如,自闭症谱系障碍:从业者研究综述(Autism Spectrum Disorders:A Research Review for Practitioners),Ozonoff等编,2003,American Psychiatric Pub;Gupta,儿童中的自闭症谱系障碍(Autistic Spectrum Disorders in Children),2004,Marcel Dekker Inc;Hollander,自闭症谱系障碍(Autism Spectrum Disorders),2003,Marcel Dekker Inc;《自闭症和发育障碍手册》(Handbook of Autism and Developmental Disorders),Volkmar编.,2005,John Wiley;Sicile-Kira和Grandin,自闭症谱系障碍:理解自闭症、阿斯伯格综合症、全身性发育迟缓和其它ASD的完全指南(Autism Spectrum Disorders:The

Complete Guide to Understanding Autism, Asperger's Syndrome, Pervasive Developmental Disorder, and Other ASDs), 2004, Perigee Trade; 和 Duncan 等., 自闭症谱系障碍 (Autism Spectrum Disorders) [双卷]: 双亲和职业人员手册 (A Handbook for Parents and Professionals), 2007, Praeger.

[0045] 术语“典型发育”和“TD”是指未被诊断为自闭症谱系障碍 (ASD) 的受试者。典型发育儿童不会表现出与 ASD 相关的沟通能力受损, 社会交往受损, 或重复和/或刻板行为, 其严重程度通常与 ASD 的诊断相关。虽然典型发育儿童可能会出现一些被诊断患有 ASD 的儿童所显示的行为, 但通常典型发育儿童不会显示诊断为 ASD 的行为的属性/或严重程度。

[0046] 术语“乳酸脱氢酶”或“LDH”是指催化丙酮酸和乳酸的相互转换并伴随 NADH 和 NAD⁺ 互变的酶。乳酸脱氢酶存在于四种不同的酶类中。其中两种是细胞色素 c 依赖性酶, 每种酶都作用于 D-乳酸 (EC 1.1.2.4) 或 L-乳酸 (EC 1.1.2.3)。另外两种是 NAD(P)-依赖性酶, 每一种都作用于 D-乳酸 (EC 1.1.1.28) 或 L-乳酸 (EC 1.1.1.27)。LDH 酶由 4 个亚基组成, 其中亚基是“M”或“H”。LDH A 基因编码 M 亚基, 可称为 LDH-M 或 LDH A。LDH B 基因编码 H 亚基, 可称为 LDH-H 或 LDH B。有五种 LDH 同工酶, 每种含有四个亚基。骨骼肌和肝脏的主要 LDH 同工酶, LDH-5 (M₄) 具有四个肌 (M) 亚基; 而 LDH-1 (H₄) 是大多数物种心肌的主要同工酶, 含有四个心脏 (H) 亚基。其他变体含有两种亚基, 例如网状内皮系统中的 LDH-2 (H₃M₁) - 肺中的 LDH-3 (H₂M₂) - 和肾中的 LDH-4 (H₂M₂)。LDH-2 是血清中的主要形式。LDHA 又称为 LDH1, LDH 肌亚基, LDH-M, EC 1.1.1.27, 肾癌抗原 NY-REN-59, 细胞增殖诱导基因 19 蛋白, PIG19 和 L-乳酸脱氢酶 A 链; LDHB 也被称为 LDH2 或 LDH-H 或 TRG-5; LDHC 是睾丸特异性的。在 GenBank 登录号中列出了 LDH A 氨基酸序列的非限制性实例, Nos. AAP36496.1, BAD96798.1, NM_005566.3-->NP_005557.1 (isoform 1), NM_001135239.1-->NP_001128711.1 (isoform 2), NM_001165414.1-->NP_001158886.1 (isoform 3), NM_001165415.1-->NP_001158887.1 (isoform 4), and NM_001165416.1-->NP_001158888.1 (isoform 5)。在 GenBank 登录号 NM_002300.6-->NP_002291.1 (变体 1) 和 NM_001174097.1-->NP_001167568.1 (变体 2) 中列出了 LDH B 氨基酸序列的非限制性实例。

[0047] 术语“坍塌反应调节蛋白 1”或“CRMP1” (也称为 DRP1; DRP-1; CRMP-1; DPYSL1; ULIP-3) 是指已知在神经元分化和轴突诱导中起作用的胞质磷脂蛋白。CRMP1 是在神经系统中唯一表达的细胞溶质磷酸蛋白家族的成员。所编码的蛋白质被认为是神经发育过程中牵涉到信号素诱导的生长锥塌陷的信号素信号转导途径的一部分。GenBank 登录号 NM_001014809.1-->NP_001014809.1 (同种型 1) 和 NM_001313.3-->NP_001304.1 (同种型 2) 中列出了 CRMP1 氨基酸序列的非限制性实例。

[0048] 术语“坍塌反应调节蛋白 2”或“CRMP2” (也称为 DRP2; DRP-2; CRMP-2; DPYSL2; ULIP-2) 是指已知在神经元发育和极性, 轴突生长和引导, 神经元生长锥塌陷和细胞迁移中起作用的细胞溶质磷酸蛋白。CRMP2 是仅在神经系统中表达的细胞溶质磷酸蛋白家族的成员。所编码的蛋白质被认为是神经发育过程中牵涉到信号素诱导的生长锥塌陷的信号素信号转导途径的一部分。GenBank 登录号 NM_001386.4-->NP_001377.1 和 BAD92432 中列出了 CRMP2 氨基酸序列的非限制性实例。

[0049] 术语“应激诱导的磷酸蛋白 1”或“STIP1” (也称为 Hsp70/Hsp90 组织蛋白 (HOPI), STI1, STILL, IEF-SSP-3521 和 P60) 是指有助于 HSP70 和 HSP90 折叠的衔接蛋白。STIP1 还刺激

HSP70的ATP酶活性,同时抑制HSP90的ATP酶活性,表明有调节作用。此外,STIP1与细胞肌蛋白PrPc结合并调节短期和长期记忆巩固。GenBank登录号NM_006819.2→NP_006810.1中列出了STIP1氨基酸序列的非限制性实例。

[0050] 术语“鸟嘌呤脱氨酶”和“GDA”(也称为西平-Cypin,鸟嘌呤酶,KIAA1258,MGC9982和内达星-Nedasin)是指催化鸟嘌呤水解脱氨基的酶,产生黄嘌呤和氨。GDA也被证明可以调节PSD-95突触后靶向。GenBank登录号NM_004293.3--->NP_004284.1中列出了GDA氨基酸序列的非限制性实例。

[0051] 术语“Y盒结合蛋白1”和“YBX1”(也称为BP-8,CSDA2,CSDB,DBPB,MDR-NF1,MGC104858,MGC110976,MGC117250,NSEP-1,NSEP1,YB-1和YB1)指介导前体mRNA选择性剪接调节的蛋白质。YBX1与pre-mRNA中的剪切位点结合并调节剪切位点的选择;结合并稳定细胞质mRNA;有助于通过调节mRNA与真核起始因子之间的相互作用来调节翻译;结合含有Y盒(5'-CTGATTGGCCAA-3')的启动子,例如,在HLA II类基因中发现;并促进含有错配或被顺铂修饰的DNA链的分离。GenBank登录号NM_004559.3→NP_004550.2中列出了YBX1氨基酸序列的非限制性实例。

[0052] 当应用于核酸或蛋白质时,术语“分离的”表示在自然状态下核酸或蛋白质基本上不含与其相关的其他细胞组分。它优选处于均匀状态。它可以在干燥或水溶液中。纯度和均一性通常使用分析化学技术如聚丙烯酰胺凝胶电泳或高效液相色谱来确定。存在于制剂中的主要物质的蛋白质基本上被纯化。特别地,将分离基因与侧翼基因的开放阅读框分开,并编码除目的基因外的蛋白质。术语“纯化的”表示核酸或蛋白质在电泳凝胶中基本上产生一条带。特别地,这意味着核酸或蛋白质纯度至少为85%,更优至少95%纯,最优至少99%纯。

[0053] 术语“核酸”或“多核苷酸”是指单链或双链形式的脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)及其聚合物。除非特别限定,否则该术语涵盖含有天然核苷酸的已知类似物的核酸,其具有与核酸标准物相似的结合特性,并且以类似于天然核苷酸的方式被代谢。除非另外指出,否则特定的核酸序列也隐含地包括其保守修饰的变体(例如简并密码子取代),等位基因,直系同源物,SNP和互补序列以及明确指出的序列。具体而言,简并密码子取代可通过产生其中一个或多个选定(或全部)密码子的第三位置被混合基和/或脱氧肌苷残基取代的序列来实现(Batzer等,Nucleic Acid Res.19:5081(1991);Ohtsuka等,J.Biol.Chem.260:2605-2608(1985);和Rossolini等,Mol.Cell.Probes8:91-98(1994))。

[0054] 术语“多肽”,“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用,是指氨基酸残基的聚合物,或氨基酸残基的多个聚合物的组合。这些术语适用于其中一个或多个氨基酸残基是相应天然存在的氨基酸的人造化学模拟物的氨基酸聚合物,以及天然存在的氨基酸聚合物和非天然存在的氨基酸聚合物。

[0055] 术语“氨基酸”包括天然存在的 α -氨基酸及其立体异构体,以及非天然存在的氨基酸及其立体异构体。氨基酸的“立体异构体”是指氨基酸的镜像异构体,如L-氨基酸或D-氨基酸。例如,天然存在的氨基酸的立体异构体是指天然存在的氨基酸的镜像异构体,即D-氨基酸。

[0056] 天然存在的氨基酸是由遗传密码编码的那些氨基酸,以及后来被修饰的那些氨基酸,例如,羟脯氨酸, γ -羧基谷氨酸和O-磷酸丝氨酸。天然存在的 α -氨基酸包括但不限于丙氨酸(Ala),半胱氨酸(Cys),天冬氨酸(Asp),谷氨酸(Glu),苯丙氨酸(Phe),甘氨酸(Gly),

组氨酸(His), 异亮氨酸(Ile), 精氨酸(Arg), 赖氨酸(Lys), 亮氨酸(Leu), 蛋氨酸(Met), 天冬酰胺(Asn), 脯氨酸(Pro), 谷氨酰胺(Gln), 丝氨酸(Ser), 苏氨酸(Thr) (Val), 色氨酸(Trp), 酪氨酸(Tyr) 及其组合。天然存在的 α -氨基酸的立体异构体包括但不限于D-丙氨酸(D-Ala), D-半胱氨酸(D-Cys), D-天冬氨酸(D-Asp), D-谷氨酸(D-Glu), D-苯丙氨酸(D-Phe), D-组氨酸(D-His), D-异亮氨酸(D-Ile), D-精氨酸(D-Arg), D-赖氨酸(D-亮氨酸), D-蛋氨酸(D-Met), D-天冬酰胺(D-Asn), D-脯氨酸(D-Pro), D-谷氨酰胺(D-Gln), D-丝氨酸, D-苏氨酸(D-Thr), D-缬氨酸(D-Val), D-色氨酸(D-Trp), D-酪氨酸(D-Tyr) 及其组合。

[0057] 非天然(非天然存在的)氨基酸包括但不限于氨基酸类似物, 氨基酸模拟物, 合成氨基酸, N-取代甘氨酸和N-甲基氨基酸, 以与天然存在的氨基酸类似的方式起作用的L-或D-构型。例如, “氨基酸类似物”是具有与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构的非天然氨基酸, 即与氢键合的 α 碳, 羧基, 氨基, 但具有改性的R(即侧链)基团或修饰的肽骨架, 例如高丝氨酸, 正亮氨酸, 甲硫氨酸亚砷, 甲硫氨酸甲基砷。“氨基酸模拟物”是指具有与氨基酸的一般化学结构不同的结构, 但以类似于天然存在的氨基酸的方式起作用的化学化合物。

[0058] 氨基酸在本文中可以通过其公知的三字母符号或由IUPAC-IUB生物化学命名委员会推荐的单字母符号来提及。例如, L-氨基酸在本文中可以通过其公知的三字母符号(例如Arg代表L-精氨酸)或大写的单字母氨基酸符号(例如R代表L-精氨酸)代表。本发明的D-氨基酸可用其公知的三字母符号(例如D-Arg代表D-精氨酸)或小写的单字母氨基酸符号(例如r代表D-精氨酸)代表。

[0059] 就氨基酸序列而言, 本领域技术人员将认识到, 对改变、增加或删除编码序列中单个氨基酸或小百分比氨基酸的肽、多肽或蛋白质序列的个别取代, 添加或缺失是“保守性修饰的变体”, 其中改变导致用化学性质类似的氨基酸取代氨基酸。化学性质类似的氨基酸包括但不限于天然存在的氨基酸例如L-氨基酸, 天然存在的氨基酸的立体异构体如D-氨基酸和非天然氨基酸, 如氨基酸类似物, 氨基酸模拟物, 合成氨基酸, N-取代甘氨酸和N-甲基氨基酸。

[0060] 提供功能上相似的氨基酸的保守置换表是本领域众所周知的。例如, 可以进行取代, 其中脂肪族氨基酸(例如G, A, I, L或V)被该组的另一个基团取代。类似地, 诸如C, S, T, M, N或Q的脂族极性不带电荷的基团可以被另一个基团和碱性残基取代, 例如K, R或H, 可以相互替代。在一些实施例中, 具有酸性侧链(例如E或D)的氨基酸可分别用其不带电荷的对应物例如Q或N取代; 反之亦然。以下八组中的每一组包含彼此保守取代的其他示例性氨基酸:

[0061] 1) 丙氨酸(A), 甘氨酸(G);

[0062] 2) 天冬氨酸(D), 谷氨酸(E);

[0063] 3) 天冬酰胺(N), 谷氨酰胺(Q);

[0064] 4) 精氨酸(R), 赖氨酸(K);

[0065] 5) 异亮氨酸(I), 亮氨酸(L), 甲硫氨酸(M), 缬氨酸(V);

[0066] 6) 苯丙氨酸(F), 酪氨酸(Y), 色氨酸(W);

[0067] 7) 丝氨酸(S), 苏氨酸(T); 和

[0068] 8) 半胱氨酸(C), 蛋氨酸(M)

[0069] (参见Creighton, Proteins, 1993)。

[0070] 术语“氨基酸修饰”或“氨基酸改变”是指一个或多个氨基酸的取代、缺失或插入。

[0071] 通过在比较窗口上比较两个最佳比对的序列来确定“序列同一性的百分比”，其中相比于不包含添加或缺失的参考序列，比较窗口中的序列部分（例如，本发明的肽）可以包括添加或缺失（即空位），用于两个序列的最佳比对。通过确定在两个序列中出现相同氨基酸残基的位置数来计算百分比，以产生匹配位置数，将匹配位置数除以比较窗口中位置的总数，并将结果乘以100得到序列同一性的百分比。

[0072] 在两个或更多个多肽或肽序列的上下文中，术语“相同”或百分比“同一性”是指两个或更多个是相同序列的序列或子序列。如果两个序列具有相同的氨基酸残基百分比（即在特定的区域上，或者当没有指定时，在参考序列的整个序列上具有70%，75%，80%，85%，90%，95%，96%，97%，98%或99%序列一致性），当在比较窗口或指定区域上进行比较和对齐以获得最大对应性时，使用以下序列比较算法之一或通过手动对齐和目视检查来测量。关于氨基酸序列，同一性或基本同一性可以在长度为至少5、10、15或20个氨基酸的区域上存在，任选至少约25、30、35、40、50、75或100个氨基酸的区域的长度，任选至少约150、200或250个氨基酸长度，或在参考序列的全长上。对于较短的氨基酸序列，例如具有20个或更少的氨基酸的氨基酸序列，根据本文定义的保守取代，当一个或两个氨基酸残基被保守取代时，存在基本同一性。

[0073] 对于序列比较，通常一个序列作为参考序列，与测试序列进行比较。当使用序列比较算法时，将测试序列和参考序列输入计算机，必要时指定子序列坐标，并指定序列算法程序参数。可以使用默认的程序参数，或者可以指定替代参数。序列比较算法，然后根据程序参数计算测试序列相对于参考序列的序列同一性百分比。适用于确定百分比序列同一性和序列相似性的算法的两个例子是BLAST和BLAST 2.0算法，其在Altschul等. (1977) *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402, 和Altschul等. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410, 分别有描述。进行BLAST分析的软件可以通过国家生物技术信息中心公开获得。

[0074] 当第一多肽或肽与针对第二多肽或肽产生的抗体发生免疫交叉反应时，表明两个多肽或肽序列基本上相同。因此，第一多肽或肽与第二多肽或肽基本上相同，例如，其中两个序列仅通过保守取代而不同。

[0075] 术语“抗原性片段”是指与抗体结合的多肽的连续子序列。抗原性片段可以是或不是免疫原性的，即它可以诱导或不诱导免疫应答。

[0076] 术语“构象抗原性片段”是指多肽或四聚体的空间上连续的区域，其可以由或不由连续的子序列形成。构象抗原片段可能是或不是免疫原性的。

[0077] 术语“表位”或“抗原决定簇”是指B和/或T细胞应答的肽或多肽上的位点。B细胞表位可以由连续的氨基酸或由蛋白质的三级或四级折叠并置的非连续氨基酸形成。由连续氨基酸形成的表位通常在暴露于变性溶剂时保留，而通过三级或四级折叠形成的表位（即构象确定的）通常在用变性溶剂处理时丢失。表位通常在独特的空间构象中包含至少3个，更通常地至少5或8-10个氨基酸。确定表位空间构象的方法包括例如X射线晶体学和2维核磁共振。参见《分子生物学方法中的表位作图》(Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology), Vol. 66, Glenn E. Morris编, (1996)。识别相同表位的抗体可以在简单的免疫测定中鉴定，显示一种抗体阻断另一种抗体与靶抗原结合的能力（例如电化学发光测定，竞争性ELISA，固相放射免疫测定 (SPRIA) 或阻断Western印迹）。T细胞识别CD8细胞的约9个氨基酸的连续表位或CD4细胞的约13-15个氨基酸的连续表位。识别表位的T细胞可

通过测量抗原依赖性增殖的体外测定来鉴定,如通过引发的T细胞响应于表位的³H-胸苷掺入所测定的(Burke等.,J.Inf.Dis.170,1110-19(1994)),通过抗原依赖性杀伤(细胞毒性T淋巴细胞测定(cytotoxic T lymphocyte assay),Tigges等.,J.Immunol.(1996)156:3901-3910)或通过细胞因子分泌来测定。人类睾丸特异性乳酸脱氢酶的表位已经从cDNA序列推断出来。参见Millan等.,Proc.Natl Acad Sci,(1987),84(15):5311-5315。

[0078] 术语“特异性结合”或“特异性针对”是指与其他肽/多肽相比,T细胞受体和/或抗体全部或部分与靶肽/多肽或其抗原性片段之间的优先结合。当然,抗体或T细胞受体与非靶肽/多肽之间可能发生一定程度的非特异性相互作用。尽管如此,特异性结合可通过特异性识别靶肽/多肽或其抗原性片段而被区分。通常,特异性结合或特异性定向的免疫应答导致靶肽/多肽与针对靶肽/多肽或T细胞受体的抗体之间的结合强于针对靶肽/多肽或T细胞的抗体受体和非靶肽/多肽。与缺乏靶多肽表位的细胞或组织相比,特异性结合通常导致针对靶多肽的结合抗体(每单位时间)的结合抗体量增加至携带靶多肽的细胞或组织的量的大于约10倍并且最优选地大于100倍。靶多肽和针对靶多肽的抗体之间的特异性结合通常意指至少 10^6M^{-1} 的亲和力。亲和力大于 10^8M^{-1} 是首选。可以使用本领域已知的用于抗体结合的任何测定来确定特异性结合,包括但不限于Western印迹,斑点印迹,ELISA,流式细胞术,电化学发光,多重珠测定(例如使用Luminex或荧光微珠)和免疫组织化学。特异地针对靶多肽的表位的T细胞通常显示响应于靶多肽的抗原诱导的增殖,其比抗原诱导大于约2倍,更优选大于约5倍或10倍响应于非靶多肽而增殖。本领域已知的T细胞增殖测定可以通过掺入³H-胸苷来测量。

[0079] 术语“样品”是指从受试者(例如人受试者)获得的任何生物样品。样品包括但不限于全血,血浆,血清,红细胞,白血细胞,唾液,尿液,粪便,痰液,支气管灌洗液,眼泪,乳头吸出物,母乳,任何其他体液,组织样品如胎盘的活组织检查样品及其细胞提取物。在一些实施例中,样品是全血或其部分组分,例如血浆,血清或细胞团块。

[0080] 术语“受试者”、“个体”或“患者”通常包括人,但也可以包括其他动物,例如其他灵长类动物,啮齿动物,犬科动物,猫科动物,马科动物,绵羊,猪等。在优选的实施方案中,受试者是人类受试者。

[0081] 术语“患ASD的风险增加”是指与未暴露于针对所述一种或多种抗原的抗体,或暴露于低于预定阈值水平的针对所述一种或多种抗原的抗体水平的胎儿或儿童的风险、可能性或概率相比,暴露于与本文所述的一种或多种抗原(例如,乳酸脱氢酶A(LDH A),乳酸脱氢酶B(LDH B),应激诱导磷蛋白1(STIP1),鸟嘌呤脱氨酶(GDA),Y盒结合蛋白1(YBX1),坍塌反应调节蛋白1(CRMP1)和坍塌反应调节蛋白2(CRMP2))结合的抗体,或暴露于高于预定阈值水平的针对上述一种或多种抗原的抗体水平的胎儿或儿童产生ASD症状的可能性或概率增加。

[0082] 术语“患ASD的风险降低”是指与暴露于针对所述抗原的抗体,或暴露于高于预定阈值水平的针对所述一种或多种抗原的抗体水平,并且其母亲没有接受治疗干预的胎儿或儿童产生ASD症状的可能性或概率相比,暴露于抗本文所述一种或多种抗原(例如,LDH A,LDH B,STIP1,GDA,YBX1,CRMP1和CRMP2)的抗体,或暴露于高于预定阈值水平的一种或多种抗原的抗体水平,并且其母亲已接受治疗性干预,例如阻断,失活或除去结合抗原的抗体的胎儿或儿童产生ASD症状的可能性或概率降低。

[0083] 术语“肽表位”或“抗原性肽”是指模拟表位(例如,被针对抗原的抗体结合)的本文所述一种或多种抗原(例如LDH A,LDH B,STIP1,GDA,YBX1,CRMP1和CRMP2)的肽或片段,尽管这种肽表位的结构或序列与天然抗原的表位之间可能不存在明确的同源性。相反,肽表位的模拟依赖于物理化学性质和类似空间组织的相似性。肽表位的筛选和构建是本领域已知的。例如,肽表位可以通过序列修饰从已知的表位衍生,或使用肽的组合肽文库从头开发,例如结合抗一种或多种抗原的抗体。参见Yip和Ward,Comb Chem High Throughput Screen (1999) 2 (3):125-128;Sharav等,Vaccine (2007) 25 (16):3032-37;和Knittelfelder等.,Expert Opin Biol Ther (2009) 9 (4):493-506.。

[0084] 术语“家族史”是指在家庭成员中存在疾病状况(例如,ASD或自身免疫性疾病)。家庭成员可以是直系亲属,例如父母,小孩或祖父母或近亲,例如兄弟姐妹,阿姨或叔父,表亲。通常家庭成员具有共同基因遗传的血液。

[0085] 术语“治疗有效剂量”是指能够达到治疗效果或期望结果的本发明肽的量(即足够量的肽来阻断针对抗原的抗体与靶抗原的结合),最好副作用最低或无副作用。在一些实施例中,治疗可接受的量不会诱导或引起不希望的副作用。治疗有效剂量可以通过先用低剂量,然后递增地增加该剂量直到达到所需的效果来确定。本发明的抗体阻断剂的“预防有效剂量”和“治疗有效剂量”可以预防ASD的发作或导致ASD严重程度的降低。“预防有效剂量”和“治疗有效剂量”也可以分别预防或改善由母体抗体活性引起的障碍和疾病引起的损伤或失能。

[0086] 术语“可药用载体”是指可用于制备安全,无毒且既不是生物学上也非其它方面不合需要的药物组合物的化合物,化学品或分子,并且包括可用于受试者的药物使用的化合物,化学品或分子。合适的药物载体在本文和E.W.Martin的“雷明顿药物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)”中有描述。

[0087] 如本文所用,术语“给药”包括口服给药,局部接触,作为栓剂,静脉内,腹膜内,肌肉内,病灶内,鞘内,鼻内或皮下给药,或者植入缓释装置,例如微型渗透泵给受试者。通过任何途径施用,包括肠胃外和透粘膜(例如,口腔,舌下,腭,牙龈,鼻,阴道,直肠或透皮)。肠胃外给药包括例如静脉内,肌内,小动脉内,皮内,皮下,腹膜内,心室内和颅内。其他递送模式包括但不限于使用脂质体制剂,静脉内输注,透皮贴剂等。本领域技术人员将知道用于施用治疗有效剂量的本发明的肽的其他方法,用于预防或缓解与母体抗体的存在或活性有关的一种或多种症状。“共同施用”是指给药第二种药物的同时、恰在之前或之后施用本发明的肽。

[0088] 如本文所用,术语“治疗”是指治疗或改善病理或病症的任何成功的标记,包括任何客观或主观参数,如减轻,缓解,减少症状或使病理或病况对患者更可耐受,减缓或降低退化速率,使退化的最终点减弱,或改善患者的身体或精神健康。症状的治疗或改善可根据客观或主观参数,包括体格检查,组织病理学检查(例如活检组织分析),尿,唾液,组织样本,血清,血浆或血液的实验室分析的结果或成像。

[0089] 术语“特异性抑制”是指试剂(例如肽表位)抑制针对一种或多种抗原(例如,LDH A,LDH B,STIP1,GDA,YBX1,CRMP1和CRMP2)的抗体结合的能力。相比于背景,特异性抑制通常导致至少约2倍的抑制,例如,对靶抗原的抗体结合的抑制大于约10倍,20倍,50倍,例如通过与没有药物存在下的抗体结合相比。在一些实施例中,抗体与靶抗原的结合被肽表位

完全抑制或阻断。通常,使用合适的统计检验,特异性抑制是抗体与靶抗原结合在统计学上有意义的减少(例如, $p < 0.05$)。

[0090] 术语“药剂”包括肽表位,模拟表位,多肽(例如配体,抗体),核酸,小有机化合物等。

[0091] 术语“固体支持物”是指适于执行本发明方法的任何材料,例如塑料或玻璃管,珠,载玻片,微量滴定板,多孔过滤器或膜,无孔过滤器或膜,非磁性珠粒,微珠,载玻片,微阵列等。

[0092] 术语“中和复合物”是指包含与特定肽表位结合的母体抗体的复合物,其阻止/抑制/阻断母体抗体结合其抗原(例如,LDH A,LDH B,STIP1,GDA,YBX1,CRMP1,和CRMP2)。例如,特异性识别CRMP1抗原的母体自身抗体(例如由NCBI RefSeq No.:NP_001304.1代表的CRMP1蛋白)可与本文所述的CRMP1肽表位或其模拟表位形成中和复合物,使得母体自身抗体不结合CRMP1抗原。

[0093] 术语“亲和性血浆去除术”是指用于从受试者的血浆去除有害物质(例如,致病因子)的体外血液净化程序。

[0094] 三、实施例的具体描述

[0095] 本发明提供了特异性结合抗内源性自身抗原的母体自身抗体的肽(例如,肽表位和模拟表位),所述自身抗原包括乳酸脱氢酶A(LDH A),乳酸脱氢酶B(LDH B),应激诱导磷蛋白1(STIP1),鸟嘌呤脱氨酶(GDA),Y盒结合蛋白1(YBX1),坍塌反应调节蛋白1(CRMP1)和坍塌反应调节蛋白2(CRMP2)。本发明还提供了包含本文所述的肽的组合物和试剂盒。此外,本发明提供了通过使用本文所述的肽检测母亲或潜在母亲的生物样品中母体自身抗体的存在来确定儿童或未来后代患自闭症谱系障碍(ASD)的风险的方法。本发明还提供了预防或减少后代患ASD的风险的方法,其通过将治疗有效剂量的本文所述的肽给予该后代的母亲或潜在母亲以阻断母体自身抗体与其抗原之间的结合。

[0096] A.肽表位

[0097] 本发明提供了与母体自身抗体特异性结合的分离的肽,这种抗体在母亲或潜在母亲中针对一种或多种选自乳酸脱氢酶A(LDH A),乳酸脱氢酶B(LDH B),应激诱导磷蛋白1(STIP1),鸟嘌呤脱氨酶(GDA),Y盒结合蛋白1(YBX1),坍塌反应调节蛋白1(CRMP1)和坍塌反应调节蛋白2(CRMP2)的多肽而产生。

[0098] 第一方面,所述肽与SEQ ID NO:1-7和62-64中任一个的氨基酸序列具有至少约50%,例如约50%,55%,60%,65%,70%,75%,80%,85%,90%,95%,96%,97%,98%或99%的序列同一性。在一些实施例中,所述肽包含SEQ ID NO:1-7和62-64中任一个的氨基酸序列的至少约5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个连续氨基酸。在其他实施例中,所述肽(例如其抗原性片段)具有SEQ ID NO:1-7和62-64中任何一个氨基酸序列长度的至少约50%,例如约50%,55%,60%,65%,70%,75%,80%,85%,90%,95%,96%,97%,98%或99%。在一些实施例中,该肽包含含有SEQ ID NO:1-7和62-64中任一个的氨基酸序列或由其组成的氨基酸序列。在其他实施例中,该肽在氨基末端和/或羧基末端包含对应于乳酸脱氢酶A(LDH A)多肽序列中那些位置的氨基酸残基的一个或多个额外的氨基酸残基。在某些实施例中,所述肽包含选自VDVIEDK或VHPVSTMIK的氨基酸序列。在具体的实施例中,所述肽结合与LDH A多肽结合的母体抗体。

[0099] 第二方面,所述肽与SEQ ID NO:8-19和65-72中任一个的氨基酸序列具有至少约50%,例如约50%,55%,60%,65%,70%,75%,80%,85%,90%,95%,96%,97%,98%或99%的序列同一性。在一些实施例中,所述肽包含SEQ ID NO:8-9和65-72中任一个的氨基酸序列的至少约5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个连续氨基酸。在其他实施例中,所述肽(例如其抗原性片段)具有SEQ ID NO:8-9和65-72中任何一个氨基酸序列长度的至少约50%,例如约50%,55%,60%,65%,70%,75%,80%,85%,90%,95%,96%,97%,98%或99%。在一些实施例中,该肽包含含有SEQ ID NO:8-9和65-72中任一个的氨基酸序列或由其组成的氨基酸序列。在其他实施例中,该肽在氨基末端和/或羧基末端包含对应于乳酸脱氢酶B(LDH B)多肽序列中那些位置的氨基酸残基的一个或多个额外的氨基酸残基。在某些实施例中,所述肽包含选自PVAEEEEATVPNN,IIIVSNPVDILT,TPKIVADKDYSVT或MLKNLSRIHPVST的氨基酸序列。在具体的实施例中,所述肽结合与LDH B多肽结合的母体抗体。

[0100] 第三方面,所述肽与SEQ ID NO:20-23和73-76中任一个的氨基酸序列具有至少约50%,例如约50%,55%,60%,65%,70%,75%,80%,85%,90%,95%,96%,97%,98%或99%的序列同一性。在一些实施例中,所述肽包含SEQ ID NO:20-23和73-76中任一个的氨基酸序列的至少约5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个连续氨基酸。在其他实施例中,所述肽(例如其抗原性片段)具有SEQ ID NO:20-23和73-76中任何一个氨基酸序列长度的至少约50%,例如约50%,55%,60%,65%,70%,75%,80%,85%,90%,95%,96%,97%,98%或99%。在一些实施例中,该肽包含含有SEQ ID NO:20-23和73-76中任一个的氨基酸序列或由其组成的氨基酸序列。在其他实施例中,该肽在氨基末端和/或羧基末端包含对应于应激诱导磷蛋白1(STIP1)多肽序列中那些位置的氨基酸残基的一个或多个额外的氨基酸残基。在某些实施例中,所述肽包含选自VDLGSMDEEEE或PPPPPKKETKPEPME的氨基酸序列。在具体的实施例中,所述肽结合与STIP1多肽结合的母体抗体。

[0101] 第四方面,所述肽与SEQ ID NO:24-27和77-79中任一个的氨基酸序列具有至少约50%,例如约50%,55%,60%,65%,70%,75%,80%,85%,90%,95%,96%,97%,98%或99%的序列同一性。在一些实施例中,所述肽包含SEQ ID NO:24-27和77-79中任一个的氨基酸序列的至少约5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个连续氨基酸。在其他实施例中,所述肽(例如其抗原性片段)具有SEQ ID NO:24-27和77-79中任何一个氨基酸序列长度的至少约50%,例如约50%,55%,60%,65%,70%,75%,80%,85%,90%,95%,96%,97%,98%或99%。在一些实施例中,该肽包含含有SEQ ID NO:24-27和77-79中任一个的氨基酸序列或由其组成的氨基酸序列。在其他实施例中,该肽在氨基末端和/或羧基末端包含对应于鸟嘌呤脱氨酶(GDA)多肽序列中那些位置的氨基酸残基的一个或多个额外的氨基酸残基。在具体的实施例中,所述肽结合与GDA多肽结合的母体抗体。

[0102] 第五方面,所述肽与SEQ ID NO:28-35和80-83中任一个的氨基酸序列具有至少约50%,例如约50%,55%,60%,65%,70%,75%,80%,85%,90%,95%,96%,97%,98%或99%的序列同一性。在一些实施例中,所述肽包含SEQ ID NO:28-35和80-83中任一个的氨基酸序列的至少约5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个连续氨基酸。在其他实施例中,所述肽(例如其抗原性片段)具有SEQ ID NO:28-35和80-83中任何一个氨基酸序列长度的至少约50%,例如约50%,55%,60%,65%,70%,75%,80%,85%,90%,95%,96%,97%,98%或99%。在一些实施例中,该肽包含含有SEQ ID NO:28-35和80-83中任一个的氨基酸序列

或由其组成的氨基酸序列。在其他实施例中,该肽在氨基末端和/或羧基末端包含对应于Y盒结合蛋白1(YBX1)多肽序列中那些位置的氨基酸残基的一个或多个额外的氨基酸残基。在某些实施例中,所述肽包含选自TVKWFNVRN,FNVRN或FNVRNGYGFIN的氨基酸序列。在具体的实施例中,所述肽结合与YBX1多肽结合的母体抗体。

[0103] 第六方面,所述肽与SEQ ID NO:36-44和84-88中任一个的氨基酸序列具有至少约50%,例如约50%,55%,60%,65%,70%,75%,80%,85%,90%,95%,96%,97%,98%或99%的序列同一性。在一些实施例中,所述肽包含SEQ ID NO:36-44和84-88中任一个的氨基酸序列的至少约5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个连续氨基酸。在其他实施例中,所述肽(例如其抗原性片段)具有SEQ ID NO:36-44和84-88中任何一个氨基酸序列长度的至少约50%,例如约50%,55%,60%,65%,70%,75%,80%,85%,90%,95%,96%,97%,98%或99%。在一些实施例中,该肽包含含有SEQ ID NO:36-44和84-88中任一个的氨基酸序列或由其组成的氨基酸序列。在其他实施例中,该肽在氨基末端和/或羧基末端包含对应于坍塌反应调节蛋白1(CRMP1)多肽序列中那些位置的氨基酸残基的一个或多个额外的氨基酸残基。在某些实施例中,所述肽包含选自VPATPKYATPAP或TSFEK的氨基酸序列。在具体的实施例中,所述肽结合与CRMP1多肽结合的母体抗体。

[0104] 第七方面,所述肽与SEQ ID NO:45-61和89-96中任一个的氨基酸序列具有至少约50%,例如约50%,55%,60%,65%,70%,75%,80%,85%,90%,95%,96%,97%,98%或99%的序列同一性。在一些实施例中,所述肽包含SEQ ID NO:45-61和89-96中任一个的氨基酸序列的至少约5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个连续氨基酸。在其他实施例中,所述肽(例如其抗原性片段)具有SEQ ID NO:45-61和89-96中任何一个氨基酸序列长度的至少约50%,例如约50%,55%,60%,65%,70%,75%,80%,85%,90%,95%,96%,97%,98%或99%。在一些实施例中,该肽包含含有SEQ ID NO:45-61和89-96中任一个的氨基酸序列或由其组成的氨基酸序列。在其他实施例中,该肽在氨基末端和/或羧基末端包含对应于坍塌反应调节蛋白2(CRMP2)多肽序列中那些位置的氨基酸残基的一个或多个额外的氨基酸残基。在某些实施例中,所述肽包含选自VPEPGTSLAAFDQ、KTISAKTHNSSLEY、HNSLLEY、RGVPRGLYDGPVC、VPRGLYDGPVC或VPRGLYDGPVCEVS的氨基酸序列。在具体的实施例中,所述肽结合与CRMP2多肽结合的母体抗体。

[0105] 在一些实施例中,所述肽的长度在约5至约45个氨基酸之间,约8至约45个氨基酸长度,约8至约25个氨基酸长度,约12至约45个氨基酸长度,约5至约40个氨基酸长度,约10至约40个氨基酸长度,约15至约30个氨基酸长度,约15至约25个氨基酸长度,或约45、40、35、30、25、20、15、10或5个氨基酸长度。例如,所述肽可以是约5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45或更多个氨基酸长度的氨基酸序列。通常,所述肽不应当超过允许形成三级结构的长度,如果以孤立分子存在,则所述三级结构大于45个氨基酸。然而,如果与更大的分子(例如抗体或另一种蛋白质或大分子)相融合,肽可能超过45个氨基酸,这可能阻止肽内三级结构的形成。如果肽是具有结合不同母体抗体的第一和第二肽片段的二价肽,那么该肽也可以超过45个氨基酸。在具体的实施例中,所述肽的长度最多达约15、20、25、30、35、40或45个氨基酸。

[0106] 在一些实施例中,所述肽还包含标签,例如可检测标签。在某些情况下,标签选自

生物素,荧光标签,化学发光标签和放射性标签。在某些其他情况下,标签共价连接到肽上。

[0107] 在其它实施例中,所述肽包括进一步修饰以改进它们对蛋白水解降解的抗性或优化溶解度性质或使其更适合作为治疗剂的变体。例如,肽还包括含有天然存在的L-氨基酸以外的残基的类似物,例如D-氨基酸或非天然存在的合成氨基酸。D-氨基酸可以取代一些或全部氨基酸残基。

[0108] 在某些实施例中,肽包含天然存在的氨基酸和/或非天然氨基酸。非天然氨基酸的例子包括但不限于,D-氨基酸,鸟氨酸,二氨基丁酸鸟氨酸,正亮氨酸鸟氨酸,吡喃丙氨酸,噻吩基丙氨酸,萘基丙氨酸,苯基甘氨酸, α 和 α -二取代的氨基酸,N-烷基氨基酸,乳酸,天然存在的氨基酸的卤化物衍生物(例如三氟酪氨酸,对氯苯丙氨酸,对溴苯丙氨酸,对苯丙氨酸等),L-烯丙基甘氨酸, β -丙氨酸,La-氨基丁酸,Lg-氨基丁酸,La-氨基异丁酸,L-氨基己酸,7-氨基庚酸,L-甲硫氨酸砷,L-正亮氨酸,L-正缬氨酸,对硝基-L-苯丙氨酸,L-羟脯氨酸,L-硫代脯氨酸,苯丙氨酸的甲基衍生物(例如1-甲基-Phe,五甲基-Phe,L-Phe(4-氨基),L-Tyr(甲基),L-Phe(4-异丙基),L-Tic(1,2,3,4-四氢异喹啉-3-羧酸),L-二氨基丙酸,L-Phe(4-苄基)等)。该肽可以被进一步修饰。例如,一个或多个酰胺键可以被酯或烷基主链键取代。可能存在N-或C-烷基取代基,侧链修饰或约束,例如二硫键或侧链酰胺或酯键。

[0109] 在一些实施方案中,所述肽包括修饰的肽和合成的肽类似物。可以修饰肽以改善制剂和储存性质,可以修饰肽以改善配方和储存性能,通过掺入非肽类结构来保护不稳定的肽键。

[0110] 在其他实施例中,肽可以被环化。本领域众所周知的方法是,将环状结构引入肽中以选择并提供对结构的构象约束,从而导致稳定性增强。例如,可以将C-或N-末端半胱氨酸添加到肽中,使得当被氧化时将含有二硫键,产生环肽。其他肽环化方法包括形成硫醚和羧基和氨基末端酰胺和酯。已经开发了许多合成技术来产生合成环肽(参见Tarn等.,*Protein Sci.*,7:1583-1592(1998);Romanovskis等.,*J.Pept.Res.*,52:356-374(1998);Camarero等.,*J.Amer.Chem.Soc.*,121:5597-5598(1999);Valero等.,*J.Pept.Res.*,53(1):56-67(1999))。通常,环化肽的作用是双重的:(1)减少体内水解;(2)热动力学破坏了展开状态,促进二级结构形成。

[0111] 在一些实施例中,本发明包含多种肽,所述多种肽包括共价或非共价连接的相同肽或不同肽中的至少两种。例如,在一些实施例中,至少两个,三个,四个,五个或六个相同的肽或不同的肽被共价连接,例如使得它们将具有合适的大小和/或结合特性,但是避免不想要的聚集体。

[0112] 本发明的肽可以通过本领域已知的或以后发现的任何合适的方法来生产,例如体外合成的,从天然来源纯化或基本上纯化的,由真核或原核细胞重组产生的等等。

[0113] 可以使用本领域已知的常规方法通过体外合成来制备肽。例如,肽可以通过化学合成来生产,如使用固相技术和/或自动肽合成仪。在某些情况下,可以使用9-苄基甲氧基羰基(Fmoc)化学方法在自动化多肽合成仪(Abimed AMS422)上使用固相技术合成肽。然后通过反相HPLC纯化肽并冻干。通过使用合成器,天然存在的氨基酸可以被非天然氨基酸取代。制备的具体顺序和方式将取决于方便性,经济性,所需的纯度等。或者可以通过切割更长的肽或全长蛋白质序列来制备肽。

[0114] 还可以根据重组合成的常规方法分离和纯化肽。可以由表达宿主制备裂解物,并

使用HPLC,排阻色谱,凝胶电泳,亲和色谱或其他纯化技术纯化裂解物。本领域技术人员熟知的方法可用于构建含有编码序列和合适的转录/翻译控制信号的表达载体。这些方法包括,例如重组。或者,可以化学合成能够编码目的肽的RNA。本领域技术人员可以容易地使用密码子表和合成方法来为本发明的任何肽提供合适的编码序列。参见Sambrook和Russell,《分子克隆:实验室手册》(Molecular Cloning:A Laboratory Manual),第3版,2001,冷泉港实验室出版社;和Ausubel等,《最新分子生物学方法》(Current Protocols in Molecular Biology),1987-2009,John Wiley Interscience。。

[0115] 在其它方面,本发明提供了包含本文所述的任何一种肽或其多种的组合物。如非限制性实例,组合物含有结合抗STIP1的母体抗体的多种肽或结合抗CRMP2的母体抗体的多种肽。如进一步的非限制性实例,组合物含有结合抗多种抗原的母体抗体的多种肽,所述多种抗原选自:CRMP2和GDA,CRMP2和STIP1,LDH B和YBX1,YBX1和STIP1,CRMP1,CRMP2和GDA,CRMP1,CRMP2和STIP1,CRMP1,CRMP2和YBX1以及LDH A,LDH B,GDA和YBX1。如另外的非限制性实例,组合物含有选自以下的肽的一种或多种组合:SEQ ID NOS:20和21,SEQ ID NOS:27和55,SEQ ID NOS:20和55,SEQ ID NOS:45和55,SEQ ID NOS:9和28,SEQ ID NOS:20和32,SEQ ID NOS:NOS:27,38和45,SEQ ID NOS:21,38和55,SEQ ID NOS:32,38,45,55和60以及SEQ ID NOS:3,12,27和28。如进一步的非限制性实例,组合物包含对应于SEQ ID NO:9,11,12,36,54,66,71或其组合的肽。

[0116] B. 模拟表位

[0117] 在某些方面,本发明提供了免疫学上模拟本文所述的肽表位的模拟表位(例如,与结合选自LDH A,LDH B,STIP1,GDA,YBX1,CRMP1和CRMP2的靶多肽的自身抗原的母体抗体结合的肽)。在一些实施例中,模拟表位是免疫学上模拟肽表位并与抗原位点具有序列同源性的肽序列。在其他实施例中,模拟表位是免疫学上模拟肽表位并具有类似于抗原位点的三维构象而非序列同源性的肽序列。

[0118] 在一些实施例中,模拟表位引起类似于肽表位引发的抗体应答。在某些情况下,模拟表位的抗体应答对应于与肽表位结合的母体抗体上同一抗原位点的结合。模拟表位作为分子模拟物与母体抗体结合的能力可用于阻断抗体与其原始靶抗原(例如,LDH A,LDH B,STIP1,GDA,YBX1,CRMP1和CRMP2)的结合。

[0119] 在一些实施例中,通过生物淘选从噬菌体肽库获得模拟表位。适于筛选和鉴定候选模拟表位的噬菌体肽库通常是多种噬菌体,其表达长度少于100个氨基酸,少于75个氨基酸,少于50个氨基酸,少于25个氨基酸,特别是在可被抗体结合的位置上约3至约25个氨基酸的范围内的随机氨基酸序列。

[0120] 在其他实施例中,通过筛选肽库获得模拟表位。在一些情况下,肽库是重叠肽库。在其他情况下,肽文库是截头肽库,其可以用于鉴定活性所需的最短氨基酸序列。在其他情况下,通过丙氨酸扫描获得模拟表位,其中使用丙氨酸依次替换每个残基以鉴定负责肽活性的特定氨基酸残基。在进一步的情况下,通过位置扫描法获得模拟表位,其在单个位点鉴定目的氨基酸,一次取代所有其他天然氨基酸以鉴定该位置上优选的氨基酸残基以提高肽的活性。在相关实例中,位置扫描可以包括两个位置组合扫描或三个位置组合扫描。用于设计,筛选和确定模拟表位的其他方法描述于例如美国专利号4,833,092中,出于所有目的通过引用将其公开内容整体并入。

[0121] 在进一步的实施方案中,模拟表位可包含比序列的线性形式在结构上更受约束的肽序列。未被取代的线性肽,如游离在溶液中的,通常将能够呈现大量不同的构象。相反,由于具有一个或通常两个或更多个取代基而在结构上受到限制的肽,所述取代基的数量减少了其可能的构象,这也在本发明的范围内。

[0122] 取代基例如共价键连接到其他肽链或分子内键将在结构上限制肽。例如,肽可以形成含有该肽的氨基酸序列的较大多肽的一级结构的一部分。在某些情况下,肽包含环肽。

[0123] 其他取代基包括与其他基团的共价键连接,例如包括生物学和非生物学结构的大分子结构。生物结构的实例包括但不限于载体蛋白。非生物结构的例子包括脂质囊泡,如脂质体,胶束,脂质纳米颗粒等。

[0124] 在一些实施例中,载体蛋白偶联到模拟表位。为此目的已知许多载体,包括各种蛋白质载体,例如白蛋白(如牛血清白蛋白(BSA)),钥孔血蓝蛋白(KLH),卵白蛋白(OVA),破伤风类毒素(TT),高分子量蛋白质(HMP),来自不可分型的流感嗜血杆菌,白喉类毒素或细菌外膜蛋白,所有这些都可以从生化或药物供应公司获得或通过标准方法制备。

[0125] 在其他实施例中,模拟表位是疫苗的组分。疫苗可掺入一个或多个模拟表位,其中每个模拟表位能够结合相同或不同的母体抗体以阻断抗体与其原始靶抗原(例如,LDH A, LDH B, STIP1, GDA, YBX1, CRMP1和CRMP2)。多个模拟表位可以共轭在一起,例如,使用每个模拟表位缀合的聚赖氨酸。

[0126] 在具体的实施例中,使用单个氨基酸取代设计肽模拟表位,接着对每个肽构建体进行亲和力测试以确定哪个肽模拟物具有阻断自闭症特异性母体自身抗体的能力。当合成肽模拟表位时使用D-氨基酸,因为由D-氨基酸合成的肽更耐蛋白水解消化,并具有更长的体内半衰期。在其它情况下,将每种自身抗原的肽模拟表位与聚乙二醇(PEG)支架融合,这导致产生能够中和自闭症特异性母体自身抗体的异多聚体。参见Kessel等., Chem Med Chem. 4 (8):1364-70, 2009.。

[0127] 由于PEG支架上的肽比单独的肽具有更低的免疫原性,所以与PEG支架连接的模拟表位肽可用作抗体阻断剂。肽模拟表位通过使用自动肽合成仪(Pioneer; Applied Biosystems; 福斯特城,加利福尼亚州)可以用适当的聚乙二醇(PEG)-PS树脂(GenScript Corporation; 皮斯卡塔韦,新泽西州)上的9-苄基-甲氧基-羰基-保护的氨基酸化学合成。可通过使用具有清除剂的三氟乙酸来进行肽从树脂上的切割和从侧链上除去保护基团。可以通过使用具有一个梯度的溶剂A[95%/5%, H₂O (0.1%三氟乙酸)/乙腈]和溶剂B(100%乙腈)预备C₁₈柱的反相高效液相色谱来纯化粗肽。然后通过使用分析C₁₈柱的高效液相色谱分析肽的纯度。合成肽的鉴定也可以通过基质辅助激光解吸电离/飞行时间质谱确认。在某些情况下,肽模拟表位可以使用涉及肽上特定残基的可逆保护的策略进行聚乙二醇化。这个过程对于肽来说是可能的,只是因为它们通常只含有少量的亲核基团,并且比全长蛋白质更稳定地用于在该过程中涉及的苛刻的化学处理。该方法包括三个步骤:(1)通过合适的试剂保护已知对活性重要的残基,并最终纯化所需的异构体;(2)在单独的未保护的反应性靶残基的水平上进行聚乙二醇化;(3)除去所有保护基团。

[0128] 为了确定多聚肽模拟表位是否结合患者血清中的抗脑自身抗体,可以使用ELISA测定法。ELISA分析也可用于确定多聚肽模拟表位是否抑制针对天然抗原蛋白的抗原-抗体相互作用。这可以通过在进行ELISA之前将母体抗体阳性血浆与异多聚体预温育来完成。

[0129] 可以使用动物模型来检查肽模拟表位在体内的功效,安全性和/或药代动力学性质。如非限制性实例,可以使用母体自身抗体相关(MAR)自闭症的小鼠模型。参见例如实施例5。MAR自闭症和对照动物(即,怀孕的雌性小鼠)可以被随机分配到两种治疗条件之一:妊娠模拟表位治疗或盐水对照。一旦MAR自闭症动物的耐受性被破坏,分配给治疗组的动物可以通过静脉内注射施用模拟表位肽。模拟表位在体内的功效可以通过每24小时向动物施用200 μ g模拟表位来确定,总共4次注射。可以使用针对整个靶抗原蛋白的ELISA测定来确定在处理通过肽模拟表位还原鼠自身抗体效价。可以进行一系列治疗试验以确定在妊娠期间减少/阻断鼠类母体抗体需要多少治疗。在确定理想的治疗方案后,动物可能会培育后代进行后续的行为分析。

[0130] 在具体的实施例中,该肽是相对于SEQ ID NO:1-96中任一个的氨基酸序列,在氨基酸序列中的一些或全部位置包含D-氨基酸和/或在氨基酸序列中的一个或多个位置(例如至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10)包含氨基酸修饰(例如,取代),的模拟表位。

[0131] C、试剂盒

[0132] 本发明还提供用于诊断或预测后代(诸如胎儿或儿童)是否具有患自闭症谱系障碍(ASD)风险增加的试剂盒。相关的,这些试剂盒也可用于诊断或预测母亲或潜在母亲生患ASD的孩子的风险是否增加。

[0133] 可以在试剂盒中提供执行这些各种方法的材料和试剂以促进方法的执行。如本文所使用的,术语“试剂盒”包括促进过程,测定,分析或操作的物品的组合。特别地,包含本发明的肽或组合物的试剂盒可用于广泛的应用,包括例如诊断,预后,免疫治疗等。

[0134] 在具体的实施例中,试剂盒包含特异性结合针对抗原性多肽的母体抗体的本文所述任何一种或多种肽(例如,肽表位和其模拟表位),所述抗原性多肽包括乳酸脱氢酶A(LDH A),乳酸脱氢酶B(LDH B),应激诱导磷蛋白1(STIP1),鸟嘌呤脱氨酶(GDA),Y盒结合蛋白1(YBX1),坍塌反应蛋白1(CRMP1)和坍塌反应蛋白2(CRMP2)。在一些情况下,试剂盒包含对应于SEQ ID NO:9、11、12、36、54、66、71的肽(例如,肽表位及其模拟表位)及其组合。

[0135] 在一些实施例中,固体支持物包含至少一种肽,例如至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95或96个肽。在某些情况下,固体支持物包含选自LDH A肽表位,LDH B肽表位,GDA肽表位,STIP1肽表位,YBX1肽表位,CRMP1肽表位,CRMP2肽表位的肽及其组合。在一些实施例中,固体支持物包含与本文所述的肽具有至少约80%,85%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%或100%同一性的一种或多种肽,例如与SEQ ID NO:1-96中任一个的氨基酸序列。在其他实施例中,固体支持物包含一种或多种具有SEQ ID NO:1-96中任一个所示氨基酸序列的肽或其片段。

[0136] 在一些实施例中,肽或多个肽可以固定在固体支持物上。在其他实施例中,固体支持物是多孔板,ELISA板,微阵列,芯片,珠子,多孔条或硝酸纤维素滤器。固定可以通过共价或非共价结合。在一些实施例中,固定是通过特异性结合一种或多种肽的包被抗体。在某些情况下,提供了用一种或多种固定化肽制备的试剂盒中的固体支持物。

[0137] 在某些实施例中,试剂盒中的多个肽包含至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、

14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95或96种不同的肽,例如选自SEQ ID NOS:1-96及其模拟表位。在某些情况下,试剂盒中的每种不同肽与相同的母源抗体结合,例如,所有不同的肽都与针对选自LDH A,LDH B,STIP1,GDA,YBX1,CRMP1和CRMP2的单一抗原的母体抗体结合。在某些其他情况下,试剂盒中的每种不同肽与至少2、3、4、5、6或7种不同的母体抗体结合,例如,不同的肽结合抗2、3、4、5、6或以下全部7种抗原的母体抗体:LDH A,LDH B,STIP1,GDA,YBX1,CRMP1和CRMP2。

[0138] 在具体的实施方案中,试剂盒中的多个肽构成一个或多个组,其中每个组包含与抗以下1、2、3、4、5、6或7个抗原的母体抗体结合的肽的组合:LDH A,LDH B,STIP1,GDA,YBX1,CRMP1和CRMP2。如非限制性实例,每个组包含结合抗STIP1或CRMP2的母体抗体的肽的组合。如进一步的非限制性实例,每个组包含结合抗多种抗原的母体抗体的肽的组合,所述多种抗原选自:CRMP2和GDA,CRMP2和STIP1,LDH B和YBX1,YBX1和STIP1,CRMP1,CRMP2和GDA,CRMP1,CRMP2和STIP1,CRMP1,CRMP2和YBX1和LDH A,LDH B,GDA和YBX1。如另外的非限制性实例,试剂盒含有选自以下的一种或多种肽的组合:SEQ ID NOS:20和21,SEQ ID NOS:27和55,SEQ ID NOS:20和55,SEQ ID NOS:45和55,SEQ ID NOS:9和28,SEQ ID NOS:20和32,SEQ ID NOS:NOS:27、38和45,SEQ ID NOS:21、38和55,SEQ ID NOS:32、38、45、55和60以及SEQ ID NOS:3、12、27和28。

[0139] 试剂盒可以含有化学试剂以及其他组分。另外,本发明的试剂盒可以包括但不限于,试剂盒使用者的说明书,用于样品收集和/或纯化的装置和试剂,用于产品收集和/或纯化的装置和试剂,用于细菌细胞转化的试剂,真核细胞转染试剂,预先转化或转染的宿主细胞,样品管,支架,托盘,架子,碟子,盘子,溶液,缓冲液或其他化学试剂,用于标准化,正常化和/或对照样品的合适样品。本发明的试剂盒也可以被包装以方便储存和安全运输,例如在有盖子的盒子中。

[0140] 在一些实施例中,试剂盒还包含用于检测结合一种或多种肽的母体自身抗体存在的标记的二抗。二抗结合免疫球蛋白IgM,IgD,IgG,IgA和IgE的不同类别或同种型的恒定区或“C”区。通常,针对IgG恒定区的二抗包含在试剂盒中,例如针对IgG亚类之一(例如IgG1,IgG2,IgG3和IgG4)的二抗。二抗可以用任何直接或间接可检测的部分标记,包括荧光团(例如荧光素,藻红蛋白,量子点,Luminex珠,荧光珠),酶(例如过氧化物酶,碱性磷酸酶),放射性同位素(例如³H,³²P,¹²⁵I)或化学发光部分。标记信号可以使用生物素和生物素结合部分的复合物(例如抗生物素蛋白,链霉抗生物素蛋白,中性抗生物素蛋白)来扩增。荧光标记的抗人IgG抗体购自Molecular Probes,尤金,俄勒冈州。酶标记的抗人IgG抗体可从Sigma-Aldrich(圣路易斯,密苏里州)和Chemicon(蒂梅丘拉,加利福尼亚州)购买获得。

[0141] 试剂盒还可以包含使固体支持物与来自母亲或潜在母亲的生物样品接触,并将母体抗体的存在或母体抗体水平高于阈值水平同母亲或潜在母亲的胎儿或孩子患ASD的可能性增加相关联的说明书。

[0142] 在一些实施例中,试剂盒还含有用于检测母体抗体的阴性和阳性对照样品。在某些情况下,阴性对照样品来自具有TD儿童的母亲。在其他情况下,阴性和/或阳性对照样品

对以下全长抗原中的1、2、3、4、5、6或全部7个具有反应性:LDH A,LDH B,STIP1,GDA,YBX1,CRMP1和CRMP2。在又一些情况下,阴性和/或阳性对照样品不与全长抗原LDH A,LDH B,STIP1,GDA,YBX1,CRMP1或CRMP2中的任一种反应。在一些实施方案中,试剂盒包含用于制备样品中母体抗体的滴定曲线的样品,以帮助评估测试生物样品中抗体的定量水平。在具体的实施例中,试剂盒包含SEQ ID NO:1-96中所述的一种或多种肽,例如,SEQ ID NOS:1-96所述肽中的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95或96种。

[0143] 该试剂盒可用于为任何育龄妇女提供诊断或预后。可以在怀孕之前,期间或之后确定诊断或预后。母体抗体的检测可以在妊娠的第一,第二和/或第三个孕期中的一个或多个中进行。在一些实施例中,检测母体抗体是对怀有大脑开始发育的胎儿的妇女的生物样品进行的,例如在怀孕约12周后。在一些实施例中,母体抗体的存在或不存在,或母体抗体的定量水平,在产后一次或多次评估,例如在出生后的头四周和/或母亲正在母乳喂养孩子。在一些实施例中,母体抗体的存在或母体抗体的定量水平在怀孕前或在未怀孕的女性中评估一次或多次。

[0144] D、受诊断或治疗的患者

[0145] 本发明的方法可以在任何哺乳动物上进行,例如,人类,非人灵长类动物,实验室哺乳动物(例如,小鼠,大鼠,兔子,仓鼠),家养哺乳动物(例如猫,狗)或农业哺乳动物(例如牛,羊,猪,马)。在一些实施例中,患者是女性和人。

[0146] 任何能够生育孩子的女性都可以从本发明的方法中受益。可以怀有或未怀有孩子,也就是说,女人可以但不必怀孕。在一些实施例中,该女性有一个新生儿。在一些实施例中,该女性是生育年龄的,例如,她已经开始月经但是没有到更年期。

[0147] 在一些实施例中,本发明的诊断和预防和/或治疗方法在携带胎儿的女性上进行(即怀孕的人)。这些方法可以在怀孕期间随时进行。在一些实施例中,所述方法是对携带脑开始发育的胎儿的妇女进行的。例如,胎儿可能在妊娠12周左右或更晚。在一些实施例中,接受治疗或诊断的妇女处于妊娠的第二或第三个月。在一些实施例中,受治疗或诊断的妇女处于怀孕的头三个月。在一些实施例中,该妇女是产后,例如在分娩后6个月内。在一些实施例中,该妇女是产后并在哺乳期。

[0148] 从现有方法中受益的妇女可能但不需要有ASD或自身免疫疾病的家族史。例如,妇女可能有自闭症或有患有自闭症的家庭成员(例如,父母,小孩,祖父母)。在一些实施例中,妇女患有自身免疫性疾病,或有患有自身免疫性疾病的家庭成员(例如,父母,小孩,祖父母)。

[0149] 在一些实施例中,本发明的方法包括确定诊断或治疗适合于患者的步骤,例如,根据之前的病史或家族病史或怀孕状态或任何其他相关标准。

[0150] E、确定产生自闭症谱系障碍风险的方法

[0151] 在某些方面,本发明提供了用于确定胎儿或儿童将发生自闭症谱系障碍(ASD)的可能性或风险的方法,包括在来自胎儿或儿童的母亲或潜在母亲的生物样品中鉴定与本文所述的靶多肽抗原的1、2、3、4、5、6或7种结合的母亲自身抗体的存在,如乳酸脱氢酶A(LDH

A), 乳酸脱氢酶B (LDH B), 应激诱导磷蛋白1 (STIP1), 鸟嘌呤脱氨酶 (GDA), Y盒结合蛋白1 (YBX1), 坍塌反应蛋白1 (CRMP1) 和坍塌反应蛋白2 (CRMP2)。所述方法包括在生物样品中检测与本文所述的任一种肽或其多肽结合的母体自身抗体的存在或不存在, 其中与所述肽或其多种肽结合的母体自身抗体的存在表明胎儿或儿童将患ASD的可能性或风险增加。

[0152] 对于从母亲或潜在母亲采集的生物样品, 可以使用任何含有抗体的流体样品。例如, 生物样品可以是血液, 血清, 血浆, 羊水, 尿液, 母乳或唾液。当然, 可以评估一种或多种不同的体液中特异性结合一种或多种肽的抗体。

[0153] 在具体的实施例中, 评估生物样品中母体抗体的存在, 所述母体抗体特异性结合本文所述的至少一种或多种肽 (例如, SEQ ID NOS:1-96), 例如, 如SEQ ID NOS:1-96所示的至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95或96种肽。在一些情况下, 评估生物样品中是否存在特异性结合对应于SEQ ID NO:9、11、12、36、54、66、71及其组合的肽的母体抗体。在一些实施例中, 在样品中使用一种或多种本文所述的肽 (例如, SEQ ID NOS:1-96) 检测特异性结合一种或多种靶多肽自身抗原 (例如1、2、3、4、5、6或7种靶多肽自身抗原), 包括LDH A, LDH B, STIP1, GDA, YBX1, CRMP1, CRMP2或其任何组合的母体抗体的存在。如非限制性实例, 一种或多种肽, 例如, 可以用SEQ ID NOS:1-96所示的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95或96种不同肽来检测样品中是否存在母体抗体。

[0154] 在某些情况下, 每种不同的肽结合相同的母体抗体, 例如, 所有不同的肽都与针对选自LDH A, LDH B, STIP1, GDA, YBX1, CRMP1和CRMP2的单一多肽自身抗原的母体抗体结合。在某些其他情况下, 每种不同的肽与至少2、3、4、5、6或7种不同的母体抗体结合, 例如, 不同的肽结合抗以下多肽自身抗原的2、3、4、5、6或全部7种的母体抗体: LDH A, LDH B, STIP1, GDA, YBX1, CRMP1和CRMP2。

[0155] 在一些实施例中, 检测针对1种多肽自身抗原, 例如选自LDH A, LDH B, STIP1, GDA, YBX1, CRMP1和CRMP2的任何单一自身抗原的母体抗体的存在。如非限制性实例, 使用包含与抗STIP1或CRMP2组合的母体抗体结合的多种肽的组进行检测。如另外的非限制性实例, 所述组包含选自由SEQ ID NOS:20和21以及SEQ ID NOS:45和55组成的组的肽的组合。

[0156] 在一些实施例中, 检测针对2种不同的多肽自身抗原, 例如选自LDH A和LDH B, LDH A和STIP1, LDH A和GDA, LDH A和YBX1, LDH A和CRMP1, LDH A和CRMP2, LDH B和STIP1, LDH B和GDA, LDH B和YBX1, LDH B和CRMP1, LDH B和CRMP2, STIP1和GDA, STIP1和YBX1, STIP1和CRMP1, STIP1和CRMP2, GDA和YBX1, GDA和CRMP1, GDA和CRMP2, YBX1和CRMP1, YBX1和CRMP2, 或者CRMP1和CRMP2的自身抗原的任何组合的母体抗体的存在。如非限制性实例, 包含多种肽的组用于检测, 所述多种肽结合抗CRMP2和GDA, CRMP2和STIP1, LDH B和YBX1或YBX1和STIP1的组合的母体抗体。如另外的非限制性实例, 所述组包含选自以下的肽的组合: SEQ ID NOS:27和55, SEQ ID NOS:20和55, SEQ ID NOS:9和28以及SEQ ID NOS:20和32。

[0157] 在一些实施例中,检测针对3种不同的多肽自身抗原,例如选自LDH A,LDH B,STIP1,GDA,YBX1,CRMP1和CRMP2的任何3种自身抗原的组之母体抗体的存在。如非限制性实例,使用包含多种肽的组进行检测,所述多种肽与抗CRMP1,CRMP2和GDA,CRMP1,CRMP2和STIP1,或CRMP1,CRMP2和YBX1的组之母体抗体结合。如另外的非限制性实例,所述组包含选自以下的肽的组合:SEQ ID NOS:27、38和45,SEQ ID NOS:21、38和55以及SEQ ID NOS:32、38、45、55和60。

[0158] 在一些实施例中,检测针对4种不同的多肽自身抗原,例如选自LDH A,LDH B,STIP1,GDA,YBX1,CRMP1和CRMP2的任何4种自身抗原的组之母体抗体的存在。如非限制性实例,使用包含多种肽的组进行检测,所述多种肽与抗LDH A,LDH B,GDA和YBX1的组之母体抗体结合。如另外的非限制性实例,该组包含由SEQ ID NO:3、12、27和28组成的肽的组合。

[0159] 在一些实施例中,检测针对5种不同的多肽自身抗原,例如选自LDH A,LDH B,STIP1,GDA,YBX1,CRMP1和CRMP2的任何5种自身抗原的组之母体抗体的存在。

[0160] 在一些实施例中,检测针对6种不同的多肽自身抗原,例如选自LDH A,LDH B,STIP1,GDA,YBX1,CRMP1和CRMP2的任何6种自身抗原的组之母体抗体的存在。

[0161] 在一些实施方案中,检测抗全部7种以下多肽自身抗原的母体抗体的存在:LDH A,LDH B,STIP1,GDA,YBX1,CRMP1和CRMP2。

[0162] 在某些情况下,可以使用SEQ ID NO:1-7和62-64所示的1、2、3、4、5、6、7、8、9或10种肽或其抗原性片段检测抗LDH A的母体抗体的存在。可以使用SEQ ID NO:8-19和65-72所示的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20种肽或其抗原性片段检测抗LDH B的母体抗体的存在。可以使用SEQ ID NO:20-23和73-76所示的1、2、3、4、5、6、7或8种肽或其抗原性片段检测抗STIP1的母体抗体的存在。在一些情况下,可以使用SEQ ID NO:24-27和77-79所示的1、2、3、4、5、6或7种肽或其抗原性片段检测抗GDA的母体抗体的存在。在其他情况下,可以使用SEQ ID NO:28-25和80-83所示的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12种肽或其抗原性片段检测抗YBX1的母体抗体的存在。可以使用SEQ ID NO:36-44和84-88所示的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14种肽或其抗原性片段检测抗CRMP1的母体抗体的存在。在一些情况下,可以使用SEQ ID NO:45-61和89-96所示的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25种肽或其抗原性片段检测抗CRMP2的母体抗体的存在。

[0163] 在一些实施例中,检测母体抗体的存在(相对于不检测母体抗体)表明胎儿或儿童具有或将要产生ASD的可能性增加。

[0164] 在一些实施例中,将生物样品中母体抗体的水平或滴度与阈值水平或滴度进行比较。生物样品中抗体的水平或滴度大于阈值水平或滴度表明胎儿或儿童具有或将产生ASD的概率增加。同样,生物样品中抗体的水平或滴度小于阈值水平或滴度,不表示胎儿或儿童具有或将产生ASD的概率增加(即,没有增加概率)。可以通过评估孕妇群体中母体抗体的水平并将孩子产生ASD的母亲生物液体中的抗体水平或滴度与孩子没有产生ASD的母亲生物液体中的抗体水平或滴度作比较来确定特定生物液体中母体抗体的阈值水平或滴度。阈值水平或滴度也可以在怀孕期间的不同时间点确定,例如胎儿怀孕期间每四周,每两周或每周。在儿童出生后也可以测量阈值抗体水平或效价,例如在出生后的头四周和/或母亲正

在母乳喂养孩子的时候。

[0165] 针对本文所述的靶多肽自身抗原的母体抗体的存在或针对靶多肽自身抗原的母体抗体的定量水平可以在怀孕之前,期间或之后确定。在怀孕期间确定时,可以在妊娠过程中的任何时间适当地进行一次,两次,三次,四次或更多次母体抗体的检测。例如,母体抗体的检测可以在妊娠的第一,第二和/或第三个月的一个或多个中进行。在一些实施例中,母体抗体的检测是对携带大脑开始发育的胎儿的妇女的生物样品进行的,例如在怀孕约12周后。在一些实施例中,母体抗体的存在或不存在或母体抗体的定量水平在产后一次或多次确定,例如在出生后的头四周和/或母亲正在母乳喂养孩子的时候。在一些实施例中,母亲抗体的存在或不存在或母体抗体的定量水平在怀孕前或在未怀孕的女性中鉴定一次或多次。

[0166] 根据需要或期望,母体抗体的存在可以确定一次或多次。在一些实施例中,母体抗体的存在或不存在或母体抗体的定量水平在怀孕期间每四周,每两周或每周进行评估,或者经常或多或少地进行评估。

[0167] 在一些实施例中,在不将测试样品(即来自母亲或潜在母亲的生物样品)与对照样品进行比较的情况下进行母体抗体的存在的试验。在其他实施例中,将测试样品与对照进行比较。对照可以来自同一个人在不同的时间点。例如,可以在怀孕期间采集测试样本,并且在怀孕之前可以从同一个体采集对照样本。在一些情况下,测试样品将在妊娠期相对晚些时候采集,并且对照样品将在妊娠早期从同一个体采集。在这种情况下,如果测试样品中的母体抗体水平高于对照样品中的水平,则胎儿或儿童患ASD的风险增加。如果在妊娠过程中对多个样本进行评估,妊娠期间母体抗体水平或滴度的升高表明胎儿或儿童患ASD的风险增加。类似地,母体抗体在怀孕期间缺乏或降低的水平或滴度表明胎儿或儿童将患ASD的风险低或降低。

[0168] 对照也可以来自具有母体抗体存在的已知状态的不同个体。对照还可以是来自具有已知母体抗体存在状态的个体群体的计算值。对照可以是阳性对照或阴性对照。在某些情况下,阴性对照是从有TD孩子的母亲获得的。在其他情况下,阴性和/或阳性对照样品与以下全长抗原中的1、2、3、4、5、6或全部7种反应:LDH A,LDH B,STIP1,GDA,YBX1,CRMP1和CRMP2。在其他情况下,阴性和/或阳性对照样品不与全长抗原LDH A,LDH B,STIP1,GDA,YBX1,CRMP1或CRMP2中的任一种反应。

[0169] 在一些实施例中,对照是来自另一个体或个体群体的阴性对照。如果对照样本的已知状态对于抗体是阴性的,那么测试样品中的母体抗体水平高于阴性对照样品,表明胎儿或儿童患ASD的风险增加。测试样品中与阴性对照样品相似水平的母体抗体表明胎儿或儿童没有增加患ASD的风险,即具有低或降低的风险。

[0170] 在一些实施方案中,所述对照是来自另一个体或个体群体的阳性对照,或者所述对照反映预定阈值水平的抗体。如果对照样品的已知状态对于抗体是阳性的,则测试样品中的母体抗体水平与阳性对照样品中相似或更高的水平表明胎儿或儿童患ASD的风险增加。测试样品中的母体抗体水平低于对照样品,表明胎儿或儿童没有增加患ASD的风险,即具有低或降低的风险。

[0171] 对照样品或值与测试样品之间的差异只需足以被检测即可。在一些实施方式中,当抗体水平与阴性或先前测量的对照相比,至少为例如10%,25%,50%,1倍,2倍,3倍,4倍

或更多时,确定测试样品中母体抗体的水平升高,因此患ASD的风险增加。

[0172] 出于诊断胎儿或儿童患ASD的可能性增加的目的,可以确定针对一种或多种靶多肽自身抗原(例如,LDH A,LDH B,GDA,STIP1,YBX1,CRMP1和/或CRMP2)的任何亚型,同种型或同工酶的母体抗体的存在。

[0173] 母体抗体可以使用本领域已知的任何方法检测。示例性的方法包括但不限于Western印迹,斑点印迹,酶联免疫吸附测定(ELISA),放射免疫测定(RIA),电化学发光和多重珠测定(例如使用Luminex或荧光微珠)。

[0174] 肽可以是靶多肽自身抗原的抗原性片段。肽可以来自自身抗原的已知抗原性表位,其中一个或多个氨基酸被取代,缺失,添加或以其他方式修饰。肽可以从天然来源纯化或基本纯化,或重组或合成产生。在一些实施例中,用于检测母体抗体的肽可以固定在固体支持物上。固体载体可以是例如多孔板,微阵列,芯片,珠子,多孔条或硝酸纤维素滤器。固定可以通过共价或非共价结合。在一些实施例中,固定化是通过特异性结合靶表位的捕获抗体。

[0175] 为了检测母体抗体,可以在足以允许特异性结合样品中存在的一种或多种靶抗原的任何抗体发生特异性结合的条件下(例如,时间,温度,样品浓度)将样品与本文所述的一种或多种肽一起温育。一种或多种肽可以结合到固体支持物上。例如,一种或多种肽可以暴露于样品约0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0小时或过夜约8、10、12、14或16小时。然而,培养时间可以多少取决于,例如一种或多种肽的组成,一种或多种靶抗原的组成,样品的稀释度和温育温度。用较少的稀释样品和较高温度可以在较短的时间内进行培养。培养通常在室温(约25℃)或生物温度(约37℃)下进行,并且可以在冰箱(约4℃)下进行。根据已知的免疫测定方法,在加入二抗之前洗涤去除未结合的样品。

[0176] 标记的二抗通常用于检测样品中已经结合一种或多种本文所述的肽的抗体。二抗结合免疫球蛋白IgM,IgD,IgG,IgA和IgE的不同类别或同种型的恒定区或“C”区。通常,在本方法中使用针对IgG恒定区的二抗。针对IgG亚类,例如IgG1,IgG2,IgG3和IgG4的二抗也可用于本发明的方法中。二抗可以用任何直接或间接可检测的部分标记,包括荧光团(例如荧光素,藻红蛋白,量子点,Luminex珠,荧光珠),酶(例如过氧化物酶,碱性磷酸酶),放射性同位素(例如³H,³²P,¹²⁵I)或化学发光部分。标记信号可以使用生物素和生物素结合部分的复合物(例如抗生物素蛋白,链霉抗生物素蛋白,中性抗生物素蛋白)来扩增。荧光标记的抗人IgG抗体购自Molecular Probes,尤金,俄勒冈州。酶标记的抗人IgG抗体可从Sigma-Aldrich(圣路易斯,密苏里州)和Chemicon(蒂梅丘拉,加利福尼亚州)购买获得。

[0177] 检测样品中自身抗体的存在或不存在或差异存在的方法将对应于二级抗体标记的选择。例如,如果将本文所述的一种或多种肽转移到适合于免疫印迹的膜基质上,可以使用数字成像器(如果使用酶标记的话)或者X射线胶片显影剂(如果使用放射性同位素标记的话)对定量测定可检测信号(即印迹)。在另一个实例中,如果将本文所述的一种或多种肽转移至多孔板,可以使用能够检测和量化荧光,化学发光和/或比色信号的自动读板仪对可检测信号进行定量。这种检测方法在本领域中是众所周知的。

[0178] 一般免疫测定技术在本领域中是众所周知的。参数优化的指导可以参见,例如Wu,《定量免疫测定:试验设定、故障处理和临床应用的实践指南》(Quantitative Immunoassay:A Practical Guide for Assay Establishment,Troubleshooting,and

Clinical Application), 2000, AACCC出版社;《免疫测定的原理和实践》(Principles and Practice of Immunoassay), Price和Newman编., 1997, Groves Dictionaries, Inc.;《免疫测定手册》(The Immunoassay Handbook), Wild编., 2005, Elsevier Science Ltd.; Ghindilis, Pavlov和Atanassov,《免疫测定方法和方案》(Immunoassay Methods and Protocols), 2003, Humana Press; Harlow和Lane,《利用抗体:实验室手册》(Using Antibodies: A Laboratory Manual), 1998, 冷泉港实验室出版社;和《免疫测定自动化:系统的升级指南》(Immunoassay Automation: An Updated Guide to Systems), Chan编., 1996, 学术出版社。

[0179] 在某些实施例中,母体抗体的存在或存在增加由免疫测定中的可检测信号(例如印迹,荧光,化学发光,颜色,放射性)指示,其中来自母亲或潜在母亲的生物样品与本文所述的一种或多种肽接触。该可检测信号可以与来自对照样本的信号或阈值进行比较。在一些实施例中,当检测样品中母体抗体的可检测信号与对照样品中母体抗体的信号或预定阈值相比多至少约10%, 20%, 30%, 50%, 75%时,检测到存在增加,并且表明ASD的风险增加。在一些实施例中,当检测样品中母体抗体的可检测信号与对照样品中母体抗体的信号或预定阈值相比多至少约1倍, 2倍, 3倍, 4倍, 或更多时,检测到存在增加,并且表明ASD的风险增加。

[0180] 在一些实施例中,将母体抗体测定的结果记录在有形介质中。例如,可以记录本诊断测定的结果(例如观察母体抗体的存在或增加)和确定ASD风险是否增加的诊断,例如在纸上或在电子介质上(例如,录音带,计算机磁盘,CD,闪存驱动器等)。

[0181] 在其它实施例中,所述方法还包括根据母体抗体测定的结果向患者(即,母亲或潜在母亲)提供诊断是否存在患者的胎儿或儿童将患ASD的风险增加的步骤。

[0182] F、通过施用肽表位降低风险的方法

[0183] 在某些方面,本发明提供了通过向母亲或潜在母亲体内施用选自以下的阻断剂或多种阻断剂来预防和/或降低胎儿或儿童中患自闭症谱系障碍(ASD)的风险的方法:LDH A肽表位,LDH B肽表位,STIP1肽表位,GDA肽表位,YBX1肽表位,CRMP1肽表位,CRIMP2肽表位及其任何组合或其模拟表位,其特异性结合与ASD相关的母体自身抗体。阻断剂可以防止母体抗体特异性结合存在于胎儿或儿童中的内源性多肽自身抗原。

[0184] 在一些实施例中,所述方法包括向母亲或潜在母亲施用至少一种阻断剂,其包含至少一种或多种本文所述的肽(例如,SEQ ID NOS:1-96)或其模拟表位,例如,如SEQ ID NOS:1-96所示的至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95或96种肽或其模拟表位。在某些情况下,阻断剂包含对应于SEQ ID NO:9、11、12、36、54、66、71及其组合的肽或其模拟表位。在某些情况下,阻断剂特异性结合识别抗原LDH A, LDH B, STIP1, GDA, YBX1, CRMP1或CRMP2的母体抗体。在一些实施例中,所述方法包括向母亲或潜在母亲施用由1、2、3、4、5、6或7种不同的母体抗体识别的一种或多种肽或其模拟表位。在某些情况下,每种不同的肽或模拟表位结合相同的母体抗体,例如,所有不同的肽或模拟表位结合抗选自LDH A, LDH B, STIP1, GDA, YBX1, CRMP1和CRMP2的单一抗原的母体抗体。在某些其他情

况下,每种不同的肽或模拟表位与至少2、3、4、5、6或7种不同的母体抗体结合,例如,不同的肽或模拟表位结合针对以下抗原中的2、3、4、5、6或全部7种的母体抗体:LDH A,LDH B,STIP1,GDA,YBX1,CRMP1和CRMP2。

[0185] 如非限制性实例,阻断剂包含结合抗STIP1或CRMP2的母体抗体的肽的组合。如进一步的非限制性实例,阻断剂包含与抗多种抗原的母体抗体结合的肽的组合,所述多种抗原选自:CRMP2和GDA,CRMP2和STIP1,LDH B和YBX1,YBX1和STIP1,CRMP1,CRMP2和GDA,CRMP1,CRMP2和STIP1,CRMP1,CRMP2和YBX1以及LDH A,LDH B,GDA和YBX1。如另外的非限制性实例,阻断剂包含选自以下的肽的一种或多种组合:SEQ ID NOS:20和21,SEQ ID NOS:27和55,SEQ ID NOS:20和55,SEQ ID NOS NOS:45和55,SEQ ID NOS:9和28,SEQ ID NOS:20和32,SEQ ID NOS:27,38和45,SEQ ID NOS:21、38和55,SEQ ID NOS:32、38、45、55和60以及SEQ ID NOS:3、12、27和28。

[0186] 使用一种或多种阻断剂的本发明的预防和/或治疗方法可以在怀孕之前,期间或之后提供给女性。在一些实施例中,可以在妊娠过程中的任何时间酌情给予一种或多种阻断剂一次,两次,三次,四次或更多次。例如,一种或多种阻断剂可以在妊娠的第一,第二和/或第三期中的一项或多项中施用。在一些实施例中,将阻断剂给予携带大脑开始发育的胎儿的妇女,例如在怀孕约12周后。在一些实施例中,一种或多种阻断剂在产后一次或多次施用,例如在出生后的头四周和/或母亲正在母乳喂养孩子的时候。在一些实施例中,阻断剂在怀孕前一次或多次施用,例如,一名已经检测出母体抗体呈阳性的女性以及正准备怀孕的女性。

[0187] 在一些实施方案中,施用包含两种或更多种肽或其模拟表位的多种试剂。多种药剂可以分开或一起施用。多种药剂可以是单个肽或模拟表位的库。在一些实施方案中,具有不同表位的两种或更多种肽或模拟表位被化学连接在一起。多个抗原表位可以来自相同或不同的抗原性多肽。这种情况下的化学连接可以通过用化学支架或接头直接连接肽或键。在一些实施方案中,具有不同肽表位的两种或更多种肽或模拟表位融合在一起。肽表位融合体可以重组表达或化学合成。

[0188] 在一些实施例中,所述方法还包括向母亲或潜在母亲施用一种或多种阻断剂(例如,一种或多种SEQ ID NOS:1-96所示肽或其模拟表位)的治疗或预防方案以减少、抑制或预防母体自身抗体与1、2、3、4、5、6或7种靶多肽抗原结合(例如,选自LDH A,LDH B,STIP1,GDA,YBX1,CRMP1和CRMP2)。

[0189] 在一些实施例中,施用一种或多种阻断剂以减少、抑制或防止母体抗体与选自LDH A,LDH B,STIP1,GDA,YBX1,CRMP1和CRMP2的1种多肽自身抗原的结合。

[0190] 在一些实施例中,施用一种或多种阻断剂以减少、抑制或防止母体抗体与2种不同的多肽自身抗原的结合,例如选自LDH A和LDH B,LDH A和STIP1,LDH A和GDA,LDH A和YBX1,LDH A和CRMP1,LDH A和CRMP2,LDH B和STIP1,LDH B和GDA,LDH B和YBX1,LDH B和CRMP1,LDH B和CRMP2,STIP1和GDA,STIP1和YBX1,STIP1和CRMP1,STIP1和CRMP2,GDA和YBX1,GDA和CRMP1,GDA和CRMP2,YBX1和CRMP1,YBX1和CRMP2,和CRMP1和CRMP2的抗原的任何组合。

[0191] 在一些实施例中,施用一种或多种阻断剂以减少、抑制或防止母体抗体与3种不同的多肽自身抗原的结合,例如选自LDH A,LDH B,STIP1,GDA,YBX1,CRMP1和CRMP2的任何3种

抗原的组合。

[0192] 在一些实施例中,施用一种或多种阻断剂以减少、抑制或防止母体抗体与4种不同多肽自身抗原的结合,例如选自LDH A,LDH B,STIP1,GDA,YBX1,CRMP1和CRMP2的任何4种抗原的组合。

[0193] 在一些实施例中,施用一种或多种阻断剂以减少、抑制或防止母体抗体与5种不同多肽自身抗原的结合,例如选自LDH A,LDH B,STIP1,GDA,YBX1,CRMP1和CRMP2的任何5种抗原的组合。

[0194] 在一些实施例中,施用一种或多种阻断剂以减少、抑制或防止母体抗体与6种不同多肽自身抗原的结合,例如选自LDH A,LDH B,STIP1,GDA,YBX1,CRMP1和CRMP2的任何6种抗原的组合。

[0195] 在一些实施例中,施用一种或多种阻断剂以减少、抑制或防止母体抗体与全部7种不同的以下多肽自身抗原的结合:LDH A,LDH B,STIP1,GDA,YBX1,CRMP1和CRMP2。

[0196] 在某些情况下,减少、抑制或防止母体抗体与LDH A多肽结合的施用的阻断剂或多种阻断剂包含SEQ ID NO:1-7和62-64中列出的1、2、3、4、5、6、7、8、9或10种肽或其抗原性片段或模拟表位。在其它情况下,减少、抑制或防止母体抗体与LDH B多肽结合的施用的阻断剂或多种阻断剂包含SEQ ID NO:8-19和65-72中列出的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20种肽或其抗原性片段或模拟表位。在另一些情况下,减少、抑制或防止母体抗体与STIP1多肽结合的施用的阻断剂或多种阻断剂包含SEQ ID NO:20-23和73-76中列出的1、2、3、4、5、6、7或8种肽或其抗原性片段或模拟表位。在进一步的情况下,减少、抑制或防止母体抗体与GDA多肽结合的施用的阻断剂或多种阻断剂包含SEQ ID NO:24-27和77-79中列出的1、2、3、4、5、6或7种肽或其抗原性片段或模拟表位。在其他情况下,减少、抑制或防止母体抗体与YBX1多肽结合的施用的阻断剂或多种阻断剂包含SEQ ID NO:28-35和80-83中列出的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12种肽或其抗原性片段或模拟表位。在另外一些情况下,减少、抑制或防止母体抗体与CRMP1合的施用的阻断剂或多种阻断剂包含SEQ ID NO:36-44和84-88中列出的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14种肽或其抗原性片段或模拟表位。在进一步的情况下,减少、抑制或防止母体抗体与CRMP2合的施用的阻断剂或多种阻断剂包含SEQ ID NO:45-61和89-96中列出的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25种肽或其抗原性片段或模拟表位。

[0197] 施用的阻断剂可以含有修饰以减少或最大程度降低其免疫原性。肽或模拟表位中氨基酸的修饰包括但不限于酰胺部分或焦谷氨酰残基或聚乙二醇链的加成(聚乙二醇化)。这些修饰可能有助于降低形成 β -片构象的倾向,或可能有助于肽稳定性、溶解性和降低的免疫原性。在一些情况下,需要更稳定、可溶且免疫原性较低的肽。C-末端用CONH₂(酰胺)基团修饰的许多肽似乎对羧肽酶的攻击具有抗性,并且在N-末端具有焦谷氨酰残基的许多肽对广泛的特异性氨基肽酶的攻击更具抗性。与未修饰的肽相比,聚乙二醇化肽已显示具有增加的血浆半衰期和降低的免疫原性。此外,阻断剂的序列分析将允许通过保守修饰使已知的T细胞表位最小化。本发明的肽也包括对羧肽酶和氨肽酶均有抗性的环肽。另外,阻断剂的口服给药可以有助于最大程度降低免疫原性。

[0198] 在一些实施例中,预防和/或治疗方法包括,首先使用本文所述的检测方法确定母亲或潜在母亲中与一种或多种靶多肽自身抗原结合的母体抗体的存在或存在增加的步骤。

检测阳性或高于阈值水平的母体抗体存在的女性是接受特异性结合母体抗体的阻断剂的候选者。检测阴性或低于阈值水平的母体抗体存在的妇女不需要接受特异性结合母体抗体的阻断剂。

[0199] 适用于本发明的药物组合物包括其中含有治疗有效量的活性成分的组合物。当然,施用的组合物的量将取决于所治疗的受试者、受试者的体重、痛苦的严重程度、施用方式和处方医师的判断。有效量的确定完全在本领域技术人员的能力范围内,特别是根据本文提供的详细公开内容。通常,首先通过施用低剂量或少量的阻断剂来确定一种或多种母体抗体阻断剂的有效或有效量,然后逐渐增加施用的剂量或剂量,和/或根据需要添加第二种阻断剂,直到在受治疗的受试者中观察到所需效果,例如,消除未结合或游离母体抗体的存在或减少到低于预定的阈值水平,同时具有最小的或没有毒性或不期望的副作用。用于确定施用本发明的药物组合物的合适剂量和给药时间表的适用方法描述于,例如,《古德曼和吉尔曼:治疗学的药理学基础》(Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics),第11版.,Brunton等编.,McGraw-Hill (2006),和《雷明顿:药科学和实践》(Remington:The Science and Practice of Pharmacy),第21版.,费城科技大学 (University of the Sciences in Philadelphia (USIP)),2005,Lippincott,Williams and Wilkins。

[0200] 可以单独调节剂量和间隔以提供足以维持治疗效果的阻断剂的血浆或组织水平。包含有效量的一种或多种阻断剂的组合物的单次或多次施用可以以治疗医师选择的剂量水平和模式进行。剂量和给药时间表可以根据母亲或潜在母亲体中的母体抗体水平来确定和调整,其可以在整个治疗过程中根据临床医师或本文所述的那些实践方法来监测。在一些实施例中,治疗水平将通过施用单日剂量来实现。在其他实施例中,给药方案可以包括多日剂量时间表。在其他实施例中,每隔一天、半周或每周给药包括在本发明中。

[0201] 例如,根据需要可以每月,每两周,每周或每天施用阻断剂。在一些实施例中,监测母亲或潜在母亲中母体抗体的水平,如果母体抗体存在或以高于预定阈值水平存在,则施用阻断剂。根据情况,封闭剂可以施用约1、2、3、4、5、10、12、15、20、24、30、32、36周或更长或更短。例如,如果母体抗体水平低于预定的阈值水平,则可以停止施用阻断剂。阻断剂可以在妊娠的整个时间内,或在怀孕的第一,第二或第三个月的一个或多个期间施用。施用可以在受孕前开始,并可以在出生后继续,例如,母亲在母乳喂养孩子的时候。

[0202] 在阻断剂是肽或其模拟表位的一些实施例中,通常的剂量范围可以为约0.1 μ g/kg体重到约1 μ g/kg体重,例如,约1 μ g/kg体重至约500mg/kg体重。在一些实施例中,肽或模拟表位的剂量为约1、2、3、4、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90或100mg/kg体重。

[0203] 确切的剂量将取决于本文所述的各种因素,包括特定的抑制剂,疾病的严重程度和给药途径。精确的治疗有效剂量可以由临床医生确定而无需实验,并且可以包括在上面公开的范围内的任何剂量。

[0204] 阻断剂通过给药途径给药,使得所述药剂结合母体抗体并防止所述抗体结合患ASD风险相关的内源性自身抗原,并尽可能降低所述药剂的免疫应答。通常该药剂是系统给药的。在一些实施例中,所述药剂肠胃外施用,例如静脉内或羊膜内(例如直接进入羊膜囊)。另外,所述药剂可以口服给药。

[0205] 配制阻断剂可以用于通过注射进行肠胃外施用,例如通过快速浓注或连续输注。

对于注射,可以通过将封闭剂溶解、悬浮或乳化在水性或非水性溶剂如植物油或其它类似的油、合成的脂肪酸甘油酯、高级脂肪酸或丙二醇的酯中来将阻断剂配制成制剂,如果需要的话,用常规添加剂如增溶剂、等渗剂、悬浮剂、乳化剂、稳定剂和防腐剂。在一些实施例中,可将阻断剂的组合配制在水溶液中,优选在生理相容的缓冲液如Hanks溶液,Ringer溶液或生理盐水缓冲液中。注射制剂可以以单位剂量形式存在,例如在安瓿中或在多剂量容器中,加入防腐剂。所述组合物可以采取在油性或水性载体中的悬浮液、溶液或乳液形式,并且可以含有配制剂如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。

[0206] 用于肠胃外给药的药物制剂包括水溶形式的阻断剂的水溶液。另外,可以将适当的油性注射悬浮液制备阻断剂的悬浮液。合适的亲脂性溶剂或载体包括脂肪油,如芝麻油或合成脂肪酸酯如油酸乙酯或甘油三酯或脂质体。含水注射悬浮液可以含有增加悬浮液粘度的物质,如羧甲基纤维素钠、山梨糖醇或葡聚糖。任选地,悬浮液还可以含有合适的稳定剂或增加化合物溶解度以允许制备高度浓缩溶液的试剂。或者,阻断剂(一种或多种)可以呈粉末形式用于与合适的载体构成,例如无菌无热原水。

[0207] 与施用阻断剂之前相比,施用阻断剂后,如果积极结合一种或多种内源性自身抗原的母体抗体的水平或滴度在来自个体的生物样品中减少或消除,则用阻断剂治疗被认为是有效的。例如,在一次或多次施用阻断剂后,至少约10%,25%,50%,75%或100%的样品中积极结合一种或多种内源性自身抗原的母体抗体减少,表明阻断剂的施用是有效的。在已经确定阈值水平的情况下,如果积极结合一种或多种内源性自身抗原的母体抗体的水平或滴度降低至阈值水平以下,则用阻断剂治疗被认为是有效的。可以使用本领域已知的任何方法(包括本文所述的那些方法)测量主动结合一种或多种内源性自身抗原的母体抗体。

[0208] G、通过去除母体抗体降低风险的方法

[0209] 在某些方面,本发明提供了通过从母体或潜在母体的离体生物流体中去除母体抗体来预防或降低后代,如胎儿或儿童患自闭症谱系障碍(ASD)的风险的方法,然后将母体抗体水平降低或消除的生物流体返回给母亲或潜在母亲。

[0210] 在一些实施例中,可以从母亲或潜在母亲中取出含有母体抗体的生物流体,并与本文所述的一种或多种肽接触。在其他实施例中,可将本文所述的一种或多种肽给予母亲或潜在母亲,以阻断母体自身抗体与其生物流体中的自身抗原之间的结合,从而中和母体自身抗体,并且使用体外疗法去除存在于生物流体中的中和复合物,如亲和血浆除去。

[0211] 在一些实施例中,来自母亲或潜在母亲的生物流体与固定在固体支持物上的一种或多种肽接触。固体载体可以是例如多孔板,ELISA板,微阵列,芯片,珠子,柱子,多孔条,膜或硝化纤维素滤器。固定可以通过共价或非共价结合。在一些实施例中,固定相是通过特异性结合靶肽表位的捕获抗体。附着于固体支持物的肽是固定相,其捕获生物学流体中的母体抗体,允许具有降低或消除的母体抗体水平的生物流体与固体支持物分离,例如,作为流动相返回给母亲孕妇。

[0212] 在一些实施例中,离体处理的生物流体是血浆,并通过血浆去除法去除母体抗体,这是本领域公知的方法。血浆与含一种或多种固定的肽的固体载体接触。血浆中的母体抗体与固定的肽结合。然后母体抗体水平降低或消除的血浆返回给母亲或潜在母亲。

[0213] 母体抗体的离体去除可以在怀孕之前,期间或之后对女性进行。在一些实施例中,母体抗体在怀孕期间的任何时间适当地从生物流体中移除一次,两次,三次,四次或更多

次。例如,母体抗体可以在妊娠的第一,第二和/或第三期的一个或多个中被移除。在一些实施例中,母体抗体从携带大脑已经开始发育的胎儿的妇女中移除,例如在妊娠约12周后。在一些实施例中,母体抗体在产后一次或多次除去,例如在出生后的头四周和/或母亲正在母乳喂养孩子的时候。在一些实施例中,孕前一次或多次去除母体抗体,例如,已经检测出母体抗体呈阳性的女性以及正准备怀孕的女性。

[0214] 根据需要,可以进行一次,两次,三次,四次或更多次体外母体抗体去除的过程,以消除或减少来自母亲或潜在母亲的母体抗体。母体抗体的体外去除可按需要每天,每周,每两周,每月,每两个月进行一次。在一些实施例中,监测母亲或潜在母亲中母体抗体的水平,如果母体抗体的存在高于预定阈值水平,则进行离体母体抗体去除。视情况而定,可以在1、2、3、4、5、10、12、15、20、25、35、36周或更长或更短的时间段内进行离体母体抗体去除。例如,如果母体抗体的水平低于预定的阈值水平,可以中断母体抗体的体外去除。体外母体抗体去除可以在妊娠的整个持续时间内进行,或者在妊娠的第一,第二或第三个妊娠的一个或多个期间进行。母体抗体清除可以在受孕前开始,并可以在出生后继续,例如,母亲正在母乳喂养孩子的时候。

[0215] 含有母体抗体的生物流体通常是血液,血清,血浆或乳汁。在一些实施例中,生物流体是羊水。

四、实施例

[0216] 提供以下实施例来说明而不是限制要求保护的发明。

[0217] 实施例1. 鉴定与自闭症谱系障碍相关的母体抗体的天然肽表位。

[0218] 本实施例描述了为确定自闭症特异性母体抗体靶向的自身抗原的肽序列而进行的研究,包括乳酸脱氢酶A和B(LDH A和LDH B),应激诱导磷蛋白1(STIP1),坍塌反应蛋白1和2(CRMP1和CRMP2),鸟嘌呤脱氨酶(GDA)和Y-盒结合蛋白(YBX1)。

[0219] 存储的母体血浆样品由加州大学戴维斯分校遗传与环境研究所儿童自闭症风险提供。在这项研究中,使用的血浆来自患有自闭症儿童的母亲(ASD;n=55)和典型发育儿童的母亲(TD;n=31),所有这些表征为对胎儿脑蛋白的反应性。加州大学戴维斯分校M.I.N.D研究所确诊所有入选儿童。

[0220] 为了描绘特定的抗体结合肽表位,使用重叠肽扫描方法。每个候选自身抗原的氨基酸序列从NCBI蛋白质数据库中获得。利用PEPperPrint®(德国海德堡)将每种蛋白质转为由重叠肽序列组成的肽阵列。每个肽含有15个氨基酸,其中14个氨基酸的肽-肽重叠。另外,每个肽在N端和C端用中性GSGSGSG接头伸长以避免截短的肽并确保肽彼此分离。

[0221] 为实验合成了两种不同的发现微阵列:一个微阵列(方案1)含有乳酸脱氢酶A(LDH A,GenBank登录号AAH67223),应激诱导的磷蛋白1(STIP1GenBank登录号AAH39299)和坍塌反应蛋白1(CRMP1,GenBank登录号NP_001014809)。另一个微阵列(方案2)包含乳酸脱氢酶B(LDH B,GenBank登录号CAA32033),鸟嘌呤脱氨酶(GDA,GenBank登录号AAH53584),Y盒结合蛋白1(YBX1,GenBank登录号AAI06046)和坍塌反应蛋白2(CRMP2,GenBank登录号NP_001184222)。微阵列方案#1含有一式两份打印的1,537种不同的肽(总共3074个点),方案#2含有一式两份打印的1,810种不同的肽(总共3620个点)。阵列也设计了FLAG(DYKDDDDKGG)和HA(YPYDVPDYAG)对照肽。为各微阵列合成三到六个载玻片,并将其与母体血浆样品一起

培育。通过蛋白质印迹法预先确定血浆样品对所有微阵列蛋白质具有反应性,或者母体血浆样品的组合,其中发现每个样品对至少一种自身抗原具有高度反应性。

[0222] 如下处理每个微阵列:在与样品温育之前,将载玻片在标准缓冲液中预温育10分钟,并在封闭缓冲液中于室温下温育45分钟。将母体血浆样品(在染色缓冲液中1:250稀释)与载玻片一起在4℃振荡温育过夜。然后将微阵列在标准缓冲液中温育10分钟,然后在室温下用标记的抗体如HA和FLAG对照抗体处理30分钟(抗HA-Cy5和抗-FLAG-Cy5,分别在染色缓冲液中以1:1000稀释)或DyLight680(Rockland#609-144-123)标记的二级F(ab')₂山羊抗人IgG(H+L)抗体(在染色缓冲液中1:5,000稀释)。如上所述的肽微阵列染色使用PEPPERCHIP®染色试剂盒进行。使用Rockland封闭缓冲液MB-070,含有0.05%吐温20的磷酸盐缓冲盐水和含有0.05%吐温20和10%Rockland封闭缓冲液的磷酸盐缓冲盐水分别用于封闭、洗涤和染色。

[0223] 使用GenePix 4000B®微阵列扫描仪检测微阵列的发光。使用PepSlide分析仪进行光斑强度的定量测定和肽注释。该软件提供了将每个点的荧光强度分解为原始信号,前景信号和背景信号的算法。计算的中值前景强度反映了抗体与选择的肽结合的程度。使用双截尾Fisher精确检验获得P-值。如果满足以下两个标准,则给定样品称肽为阳性(反应性):

[0224] 1、根据红色原始平均数据计算的切比雪夫不等式(CI) p-值对于该肽的两个斑点均小于0.05。

$$[0225] \quad \text{CI-p-值} = \begin{cases} 1 & Y_k \leq \bar{X} + s \\ \left(\frac{s}{(Y_k - \bar{X})} \right)^2 & Y_k > \bar{X} + s \end{cases}$$

[0226] 其中 Y_k 是观察到的点的荧光, s 是阵列上对照点的样品标准偏差, $\bar{X}$ 是阵列上的对照点的样本平均值。

[0227] 2、重复点之间的变异系数小于50%。

[0228] 检测了构建微阵列的HA和FLAG对照肽的预期(对照)光斑形状。看到由相邻的多行肽形成的明显可检测的表位样光斑形状。表1表示通过微阵列研究鉴定的抗原性肽。表2表示在重叠的氨基酸序列组合后,每个靶抗原的肽表位。例如,表2中的SEQ ID NO:62是通过组合表1中列出的SEQ ID NOS:2和3的重叠序列而得到的肽表位。

[0229] 表1. 各个靶抗原的肽表位

[0230]

抗原	SEQ ID NO	氨基酸序列
LDH A	SEQ ID NO:1	DLADELALVDVIEDK
	SEQ ID NO:2	ADELALVDVIEDKLLK
	SEQ ID NO:3	VDVIEDKLLKGEMMDL
	SEQ ID NO:4	FLRTPKIVSGKDYNV
	SEQ ID NO:5	MKNLRRVHPVSTMIK
	SEQ ID NO:6	VHPVSTMIKGLYGIK
	SEQ ID NO:7	CHGWVLGEHGDSSVP
LDH B	SEQ ID NO:8	LIAPVAEEEEATVPNN
	SEQ ID NO:9	PVAEEEEATVPNNKIT
	SEQ ID NO:10	LQTPKIVADKDYSVT
	SEQ ID NO:11	TPKIVADKDYSVTAN
	SEQ ID NO:12	DCHIVVSNPVDILT
	SEQ ID NO:13	CHIVVSNPVDILTY
	SEQ ID NO:14	IIVVSNPVDILTYVT

[0231]

	SEQ ID NO:15	VAGVSLQELNPEMGT
	SEQ ID NO:16	ESMLKNLSRIHPVST
	SEQ ID NO:17	MLKNLSRIHPVSTMV
	SEQ ID NO:18	VSTMVKGMYGIENEV
	SEQ ID NO:19	VFLSLPCILNARGLT
STIP1	SEQ ID NO:20	VLLGVDLGSMDEEEEE
	SEQ ID NO:21	VDLGSMDEEEEEIATP
	SEQ ID NO:22	PPPPPPKKETKPEPM
	SEQ ID NO:23	TNQAAVYFEKGDYNK
GDA	SEQ ID NO:24	PPLAHIFRGTFVHST
	SEQ ID NO:25	SSIDLPLEWLTKYT
	SEQ ID NO:26	ATIHTDSSLLLADIT
	SEQ ID NO:27	MDLNDFPEYKETTE
YBX1	SEQ ID NO:28	PAAPPAAPALSAADT
	SEQ ID NO:29	ATKVLGTVKWFNVRN
	SEQ IDNO:30	TVKWFNVRNGYGFIN
	SEQ ID NO:31	FNVRNGYGFINRNDT
	SEQ ID NO:32	ETVEFDVVEGEKGAE
	SEQ ID NO:33	GAEAAANVTGPGGVPV
	SEQ ID NO:34	RRPYRRRRFPPYYMR
	SEQ ID NO:35	PPRQRQPREDGNEED
CRMP1	SEQ ID NO:36	VVPEPGSSLLTSFEK
	SEQ ID NO:37	TSFEKWHEAADTKSC
	SEQ ID NO:38	VDITSWYDGVREELE
	SEQ ID NO:39	VTSPPLSPDPTTPDY
	SEQ ID NO:40	MDENQFVAVTSTNAA

[0232]

	SEQ ID NO:41	VGSDADVVIWDPDKL
	SEQ ID NO:42	VYEVPA TP KYATPAP
	SEQ ID NO:43	VPATPKYATPAPSAK
	SEQ ID NO:44	QSNFSLSGAQIDDNN
CRMP2	SEQ ID NO:45	MAERKQSGKAAEDEE
	SEQ ID NO:46	VNDDQSFYADIYMED
	SEQ ID NO:47	GENLIVPGGVKTIEA
	SEQ ID NO:48	VVPEPGTSLLA AFDQ
	SEQ ID NO:49	VPEPGTSLLA AFDQW
	SEQ ID NO:50	QKAVGKDNFTLIPEG
	SEQ ID NO:51	TSPPLSPDPTTPDFL
	SEQ ID NO:52	VGSDADLVIWDPDSV
	SEQ ID NO:53	VKTISAKTHNSSLEY
	SEQ ID NO:54	KTISAKTHNSSLEYN
	SEQ ID NO:55	HNSSLEYNIFEGMEC
	SEQ ID NO:56	ELRGVPRGLYDGPVC
	SEQ ID NO:57	LRGVPRGLYDGPVCE
	SEQ ID NO:58	RGVPRGLYDGPVCEV
	SEQ ID NO:59	GVPRGLYDGPVCEVS
	SEQ ID NO:60	VPRGLYDGPVCEVSV
	SEQ ID NO:61	SLSGAQIDDNIPRRT

[0233] 表2. 各靶抗原的组合肽表位

[0234]

抗原	SEQ ID NO	氨基酸序列
LDH A	SEQ ID NO:62	ADELALVDVIEDKLKGEMMDL
	SEQ ID NO:63	FLRTPKIVSGKDYNV
	SEQ ID NO:64	MKNLRRVHPVSTMIKGLYGIK

[0235]

LDH B	SEQ ID NO:65	EKLIAPVAEEEEATVPNNKIT
	SEQ ID NO:66	IAPVAEEEEATVPNNKIT
	SEQ ID NO:67	DCIIIVVSNPVDILTYVT
	SEQ ID NO:68	VAGVSLQELNPEMGT
	SEQ ID NO:69	NEVFLSLPCILNARGLT
	SEQ ID NO:70	FLQTPKIVADKDYSVTAN
	SEQ ID NO:71	LQTPKIVADKDYSVTAN
	SEQ ID NO:72	ESMLKNLSRIHPVSTMVKGMYGIEV
STIP1	SEQ ID NO:73	VLLGVDLGSMDEEEIAT
	SEQ ID NO:74	PPPPPPPKKETKPEPME
	SEQ ID NO:75	PPPPPPPKKETKPEPME
	SEQ ID NO:76	TNQAAVYFEKGDYNK
GDA	SEQ ID NO:77	PPLAHIFRGTFVHST
	SEQ IDNO:78	SSIDLPLEWLTKYT
	SEQ ID NO:79	ATIHTDSSLLLADIT
YBX1	SEQ ID NO:80	ATKVLGTVKWFNVRNGYGFNRNDT
	SEQ ID NO:81	ETVEFDVVEGEKGAEAAANVTGPGGVPV
	SEQ ID NO:82	RRPYRRRRFPPYYMR
	SEQ ID NO:83	PPRQRQPREDGNEED
CRMP1	SEQ ID NO:84	SFEKWHEAADTKSC
	SEQ ID NO:85	MDENQFVAVTSTNAA
	SEQ ID NO:86	VPATPKYATPAPSAK
	SEQ ID NO:87	VTSPPLSPDPTTPDYL
	SEQ ID NO:88	QSNFSLSGAQIDDNN
CRMP2	SEQ ID NO:89	VNDDQSFYADIYMED
	SEQ ID NO:90	GENLIVPGGVKTIEA

[0236]

	SEQ ID NO:91	QKAVGKDNFTLIPEG
	SEQ ID NO:92	VKTISAKTHNSSLEYNIFEGMEC
	SEQ ID NO:93	ELRGVPRGLYDGPVCEVSV
	SEQ ID NO:94	VVPEPGTSLLAAFDQW
	SEQ ID NO:95	TSPPLSPDPTTPDFL
	SEQ ID NO:96	SLSGAQIDDNIPRRT

[0237] 实施例2.区分从诊断有自闭症谱系障碍儿童的母亲获得的样品与典型发育儿童的母亲获得的样品

[0238] 该实施例描述了一项研究,其证明本发明的肽可用于区分从患有自闭症谱系障碍(ASD)的儿童的母亲获得的血浆样品与从典型发育(TD)儿童的母亲获得的血浆样品。特别地,实施例表明本发明的肽可以用于通过检测来自小孩的母亲(或孕妇)的样品中自身抗体的存在来确定小孩患ASD的风险,其自身抗体与一种或多种(例如多种)肽结合。

[0239] 对于这些实验,构建相同的验证微阵列,每个含有表1和2中列出的肽。在实施例1描述的实验中,每个微阵列还含有几种未被任何母体血浆样品结合的肽作为阴性对照。另外,将来自脊髓灰质炎病毒(KEVPALTAVETGAT)的肽用作阳性对照。每个相同的微阵列以随机分布包含一式两份的肽,并且设计了FLAG(DYKDDDDKGG)和HA(YPYDVPDYAG)对照肽。

[0240] 验证微阵列如实施例1所述进行处理。将验证微阵列与通过蛋白质印迹和ELISA预先确定对至少一种候选自身抗原具有高度反应性的母体血浆样品培育。如实施例1中所述测量和分析来自微阵列的光发射。

[0241] 表3显示,表1和表2中的一些肽可用于区分从患有诊断为ASD的儿童的母亲获得的样本和从有TD孩子的母亲获得样本。当微阵列与来自患有ASD的儿童的血浆样品培育时,由SEQ ID NO:9、11、12、36、54、66和71表示的肽仅与自身抗体结合(即,当微阵列与从TD小孩的母亲获得的样品培育时,没有肽与抗体结合)。与将微阵列与从TD儿童的母亲获得的样品培育时相比,当微阵列与来自其孩子诊断为ASD的母亲的血浆样品培育时,其他肽更经常与自身抗体结合。

[0242] 另外,表4显示表3中列出的肽的组合可以用于区分从TD儿童的母亲获得的样品和从ASD儿童的母亲获得的样品。当用于分析时,一种或多种,三种或更多种,四种或更多种或五种或更多种肽的特定组合能够具有统计学显著性地区分从ASD患儿的母亲获得的样品与从TD儿童的母亲获得的样品。表5列出了来自表1的肽的组合的一些实例,其中在从ASD儿童的母亲获得的样品中检测到自身抗体的结合,但在从TD儿童的母亲获得的样品中未检测到自身抗体的结合。在某些情况下,给定组合中的所有肽均来自相同的自身抗原。在其他情况下,使用来自两种,三种或四种不同自身抗原的肽。

[0243] 这些结果还表明,这些肽可用于检测结合相同自身抗原的不同区域的抗体。这些肽在这些情况下提供了额外的信息,其中样品不显示与相应的全长自身抗原本身结合的抗体,或者测试样品和对照样品(例如来自具有TD儿童的母亲的血浆样品)都显示与特定自身抗原结合的抗体。

[0244] 表3. 利用母体自身抗体反应性区分ASD与TD

SEQ ID NO	氨基酸序列	抗原	ASD 阳性数量 (n=46)	(%) ASD 阳性数量	TD阳性数量 (n=21)	(%) TD 阳性数量
SEQ ID NO: 3	VDVIEDKLKGEMMDL	LDH A	7	15%	2	10%
SEQ ID NO: 12	DCIHVVSNPVDILT	LDH B	5	11%	0	0%
SEQ ID NO: 9	PVAEEEEATVPNNKIT	LDH B	3	7%	0	0%
SEQ ID NO: 66	IAPVAEEEEATVPNNKIT	LDH B	2	4%	0	0%
SEQ ID NO: 71	LQTPKIVADKDYSVTAN	LDH B	1	2%	0	0%
SEQ ID NO: 11	TPKIVADKDYSVTAN	LDH B	1	2%	0	0%
SEQ ID NO: 32	ETVEFDVVEGEKGAE	YBX1	5	11%	1	5%
SEQ ID NO: 28	PAAPPAAPALSAADT	YBX1	19	41%	6	29%
SEQ ID NO: 27	MDLNDTFPEYKETTE	GDA	8	17%	1	5%
SEQ ID NO: 21	VDLGSMDEEEIATP	STIP1	6	13%	1	5%
SEQ ID NO: 20	VLLGVDLGSMDEEEE	STIP1	14	30%	4	19%
SEQ ID NO: 38	VDITSWYDGVREELE	CRMP1	12	26%	3	14%
SEQ ID NO: 36	VVPEPGSSLLTSFEK	CRMP1	2	4%	0	0%
SEQ ID NO: 55	HNSSLEYNIFEGMEC	CRMP2	16	35%	4	19%
SEQ ID NO: 54	KTISAKTHNSSLEYN	CRMP2	1	2%	0	0%
SEQ ID NO: 45	MAERKQSGKAAEDEE	CRMP2	10	22%	1	5%
SEQ ID NO: 60	VPRGLYDGPVCEVSV	CRMP2	8	17%	1	5%

[0246] 表4. 与来自ASD和TD儿童母亲血浆母体自身抗体结合的肽的组合

母体自身抗体结合的肽的数量	ASD (%) (n=46)	TD (%) (n=21)
≥ 1	41 (89%)	13 (62%)
≥ 2	28 (61%)	9 (43%)
≥ 3	23 (50%)	2 (10%)
≥ 4	14 (30%)	0 (0%)
≥ 5	8 (18%)	0 (0%)
≥ 6	3 (7%)	0 (0%)
≥ 7	2 (4%)	0 (0%)
≥ 8	1 (2%)	0 (0%)

[0249] 表5. 区分ASD与TD样品的特定肽组合

[0250]

组合	SEQ ID NO	氨基酸序列	抗原	ASD	TD
1	SEQ ID NO: 21 SEQ ID NO: 20	VDLGSMDEEEIATP VLLGVDLGSMDEEEE	STIP1 STIP1	4	0
2	SEQ ID NO: 55 SEQ ID NO: 27	HNSSLEYNIFEGMEC MDLNDTFPEYKETTE	CRMP2 GDA	4	0
3	SEQ ID NO: 55 SEQ ID NO: 20	HNSSLEYNIFEGMEC VLLGVDLGSMDEEEE	CRMP2 STIP1	4	0
4	SEQ ID NO: 55 SEQ ID NO: 45	HNSSLEYNIFEGMEC MAERKQSGKAAEED	CRMP2 CRMP2	2	0
5	SEQ ID NO: 9 SEQ ID NO: 28	PVAEEEEATVPNNKIT PAAPPAAPALSAADT	LDH B YBX1	2	0
6	SEQ ID NO: 32 SEQ ID NO: 20	ETVEFDVVEGEKGAE VLLGVDLGSMDEEEE	YBX1 STIP1	2	0
7	SEQ ID NO: 45 SEQ ID NO: 38 SEQ ID NO: 27	MAERKQSGKAAEED VDITSWYDGVREELE MDLNDTFPEYKETTE	CRMP2 CRMP1 GDA	2	0
8	SEQ ID NO: 38 SEQ ID NO: 55 SEQ ID NO: 21	VDITSWYDGVREELE HNSSLEYNIFEGMEC VDLGSMDEEEIATP	CRMP1 CRMP2 STIP1	2	0
9	SEQ ID NO: 3 SEQ ID NO: 12 SEQ ID NO: 27 SEQ ID NO: 28	VDVIEDKLKGEMMDL DCHIVVSNPVDILT MDLNDTFPEYKETTE PAAPPAAPALSAADT	LDH A LDH B GDA YBX1	3	0
10	SEQ ID NO: 32 SEQ ID NO: 38 SEQ ID NO: 55 SEQ ID NO: 45 SEQ ID NO: 60	ETVEFDVVEGEKGAE VDITSWYDGVREELE HNSSLEYNIFEGMEC MAERKQSGKAAEED VPRGLYDGPVCEVSV	YBX1 CRMP1 CRMP2 CRMP2 CRMP2	2	0

[0251] 实施例3.检测母体样品中特异性结合抗原性肽的抗体的ELISA试验

[0252] 该实施例描述了进行ELISA测定以检测结合抗原性肽的母体抗体的方法。母亲或潜在母亲中母体抗体的存在与患有自闭症谱系障碍儿童的风险有关。本实施例还说明了ELISA测定鉴定有风险的母亲或潜在母亲的应用。

[0253] 合成具有接头的表2的肽并作生物素化。特别地,每个生物素化的肽是具有SGSS作为间隔物和肽的C末端处具有二酮哌嗪(DKP)基团的生物素-SGSS-肽-DKP。用PBST洗涤Pierce®NeutrAvidin®蛋白包被的微孔板(Thermo Scientific),从孔中取出过量的缓冲液。生物素化的肽在纯溶剂(例如DMSO或DMF)或溶剂/水混合物中重构。将重建的肽在超纯水中以1:250稀释至终浓度为5μg/ml。将100μl稀释的生物素化肽分配到孔中,并在室温下温育1小时或在4℃下在缓慢摇床上过夜。参比孔未涂覆,但装满缓冲液。通过与200μl的5% Pierce®Superblock™ PBS溶液在室温下孵育2小时来阻断非特异性结合位点。随后,用自动洗板机用PBST洗涤板6次。

[0254] 以下方法改编自Sanchez等人(Cancer Chemother.Pharmacol.,66:919-925 (2010))用于检测抗上述ELISA测定的一种或多种肽的母体抗体:获得母体血浆样品,包括

在测定中预先确定与肽的全长抗原反应的样品。将测试样品稀释在样品稀释液(例如PBST中的2.5% **Pierce®** Superblock™)中,并将100μl的每个样品加入到测定板的孔中。所有样品均在肽涂布和未涂布的孔中一式两份进行分析。将稀释的样品在室温下温育1小时。然后用PBST洗涤板6次。将标记的二抗溶液(例如,辣根过氧化物酶缀合的山羊抗人IgG,英杰公司)加入孔中,并在室温下温育30分钟。再次用PBST洗涤平板8次。然后将平板用不含吐温的PBS洗涤两次。将BD Opt EIA™底物(BD Biosciences Pharmingen,圣地亚哥,加利福尼亚州)加入孔中并在室温下温育10分钟。加入终止溶液(2N H₂SO₄),并使用490nm的参比滤器在450nm读取平板。

[0255] 实施例4.母体样品对STIP1肽反应性的测定

[0256] 该实施例说明,与全长STIP1多肽相比,母体血浆样品对本发明的STIP1肽表现出更高的反应性。具体而言,用以下肽ELISA方案测试四个母体血浆样品对具有氨基酸序列PPPPPKKETKPEPM (SEQ ID NO:22)的STIP1肽的反应性:

[0257] 1.将所有试剂置于室温。

[0258] 2.将来自肽储备液(1mg/mL)的肽在超纯水中稀释至终浓度为5μg/mL。

[0259] 3.将100μl的每种肽加入96孔NeutrAvidin包被板上的相应孔中。

[0260] 4.在室温下温育板1小时。

[0261] 5.用含0.05%吐温的PBS洗板6次。

[0262] 6.每孔加入200μl 5% Superblock,室温温育2小时。

[0263] 7.用含0.05%吐温的PBS洗板6次。

[0264] 8.将样品缓冲液(含有0.05%吐温的PBS中的2.5% Superblock)稀释1:400的母体血浆样品。

[0265] 9.将100μl稀释的血浆样品加入孔中并在室温下温育1小时。

[0266] 10.用含0.05%吐温的PBS洗板6次。

[0267] 11.用含0.05%吐温的PBS稀释山羊抗人抗体1:2,500。

[0268] 12.加100μl稀释的山羊抗人抗体,室温孵育30分钟。

[0269] 13.用含有0.05%吐温的PBS洗涤平板8次,并用PBS Neat洗涤两次。

[0270] 14.每孔加入100μl BD Opt EIA底物。

[0271] 15.在室温下在黑暗中温育板10分钟。

[0272] 16.每孔加入50μl H₂SO₄以停止化学反应。

[0273] 17.用分光光度计在450nm处,以490nm为参比在减小的设置下读板。

[0274] 样品重复运行,吸光度值取平均值。表6显示样品号1190对STIP1肽特别具有反应性(最终吸光度=2.045)。相反,使用具有全长STIP1多肽的ELISA获得的同样样品的吸光度值接近1.0。这样,该实施例证明,本发明的肽显示出对母体样品中存在的自身抗体的高反应性,并且相对于全长多肽序列提供了改进的灵敏度。

[0275] 表6. STIP1肽ELISA数据

[0276]

样品号99 (中等反应性)	
平均值	1.482
标准偏差	0.042
%CV	2.816
空白	0.999
最终	0.483
样品号142 (阴性)	
平均值	1.295

[0277]

标准偏差	0.004
%CV	0.328
空白	1.202
最终	0.093
样品号1190 (高反应性)	
平均值	2.442
标准偏差	0.103
%CV	4.199
空白	0.397
最终	2.045
样品号1887 (低反应性)	
平均值	2.101
标准偏差	0.110
%CV	5.218
空白	1.972
最终	0.129

[0278] 实施例5. 母体抗体相关自闭症谱系障碍的小鼠模型。

[0279] 本实施例说明了母体抗体相关自闭症谱系障碍 (MAR-ASD) 小鼠模型的创建和表征,其可用于检查本发明的肽或其模拟表位在体内的功效,安全性和/或药代动力学性质。通过用乳酸脱氢酶A (LDH-A),乳酸脱氢酶B (LDH-B),坍塌反应蛋白1 (CRMP1) 和应激诱导磷酸蛋白1 (STIP1) 的肽免疫成年雌性小鼠来建立MAR-ASD小鼠,这些肽与其中赖氨酸残基用作支架核心的支链骨架缀合。在饲养之前,动物总共接受5次免疫接种。在每次免疫接种时,给动物注射100μL肽-佐剂-盐水混合物。除了第四次免疫接种以外,每次免疫接种同时施用8.4μg的LDH A、LDH B和CRMP肽以及16.4μg的STIP1肽。除佐剂外,第四次免疫接种含有25μg的STIP1肽和15μg的STIP1蛋白。对照动物仅注射含有100μL生理盐水的类似数量的注射剂。如通过ELISA测定所证实的,在育种之前成功地破坏了雌性动物中对各MAR-ASD肽表位的耐受性。在MAR-ASD动物中测定所有肽的免疫反应性的光密度测量显着高于对照动物(大约四倍) ($p < 0.001$)。

[0280] 在MAR-ASD小鼠的后代中检查发育标志,并与对照的后代比较。在22只MAR-ASD后代和17只对照后代中测量体重和头宽。暴露于自闭症特异性母体抗体的后代在出生后第4、6、8、10、12和14天的体重明显更大($p=0.009$)。此外,在出生后第12天和第14天,MAR-ASD后代的头宽显著大于对照($p<0.001$)。当调整整体身长时,观察到的头宽增加仍然显著,表明头部大小的差异与身体总体大小无关。

[0281] MAR-ASD后代也表现出一些与自闭症有关的行为异常,包括神经发育的改变、重复性自我修饰行为增加、超声波发声减少、以及社交互动的缺陷。评估青少年互惠社交互动(JRSI)以及男女社交互动(MFSI)。

[0282] 为了评估JRSI,在出生后第25天,在与年龄和性别匹配的新C57BL/6J陌生动物进行的十分钟玩耍中检查MAR-ASD后代的几种行为。将24只MAR-ASD后代的行为与22只对照进行比较。MAR-ASD后代在许多行为中表现出明显的缺陷,包括鼻对鼻($p=0.021$)和肛门生殖器嗅探($p=0.029$)的减少、推爬(push-crawl) ($p<0.001$)、前伸(front approach) ($p<0.001$)和跟随行为($p=0.043$)的减少和自我理毛的增加(约3倍; $p<0.001$)。

[0283] 在五分钟的玩耍期间检查MFSI,其中成年雄性后代与不熟悉的年龄匹配的发情期雌性置于一起(MAR-ASD, $n=12$; 对照, $n=11$)。与对照组相比,MAR-ASD后代在一些行为方面表现出显著的缺陷,包括鼻-肛($p=0.044$)和身体嗅探($p=0.041$)的减少,前伸前路($p=0.017$)和跟随行为($p<0.001$)的减少,和自我理毛($p=0.005$)的增加。

[0284] 除了上述发育异常之外,与对照相比,暴露于自闭症特异性母体抗体的后代在成年大脑中显示出几种神经解剖学差异,如通过MRI所评估的。与MAR-ASD雄性大脑和对照组的雄性和雌性大脑相比,MAR-ASD雌性脑总体积显著增大。相对于对照组,在MAR-ASD成年大脑中观察到几个皮质区域(主要在眼眶和视觉皮层)和白质束(包括喉前联合,扣带回,胼胝体和内囊)的大小增加,观察到的差异主要由MAR-ASD雌性驱动。

[0285] 可以理解的是,这里描述的示例和实施例仅用于说明的目的,对于本领域技术人员将建议对其进行各种修改或改变,并且将被包括在所附权利要求的本申请和范围内。出于所有目的,本文引用的所有出版物、专利、专利申请和序列登录号均通过引用整体并入本文。

[0001]	序列表
[0002]	<110> 加利福尼亚大学董事会
[0003]	<120> 抗原肽及其用于诊断和治疗自闭症的用途
[0004]	<130> 1013172
[0005]	<140> PCT/US2016/039029
[0006]	<141> 2016-06-23
[0007]	<150> US 62/185,186
[0008]	<151> 2015-06-26
[0009]	<160> 118
[0010]	<170> PatentIn version 3.5
[0011]	<210> 1
[0012]	<211> 15
[0013]	<212> PRT
[0014]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0015]	<400> 1
[0016]	Asp Leu Ala Asp Glu Leu Ala Leu Val Asp Val Ile Glu Asp Lys
[0017]	1 5 10 15
[0018]	<210> 2
[0019]	<211> 15
[0020]	<212> PRT
[0021]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0022]	<400> 2
[0023]	Ala Asp Glu Leu Ala Leu Val Asp Val Ile Glu Asp Lys Leu Lys
[0024]	1 5 10 15
[0025]	<210> 3
[0026]	<211> 15
[0027]	<212> PRT
[0028]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0029]	<400> 3
[0030]	Val Asp Val Ile Glu Asp Lys Leu Lys Gly Glu Met Met Asp Leu
[0031]	1 5 10 15
[0032]	<210> 4
[0033]	<211> 15
[0034]	<212> PRT
[0035]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0036]	<400> 4
[0037]	Phe Leu Arg Thr Pro Lys Ile Val Ser Gly Lys Asp Tyr Asn Val
[0038]	1 5 10 15

[0039]	<210>	5
[0040]	<211>	15
[0041]	<212>	PRT
[0042]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0043]	<400>	5
[0044]	Met Lys Asn Leu Arg Arg Val His Pro Val Ser Thr Met Ile Lys	
[0045]	1	5 10 15
[0046]	<210>	6
[0047]	<211>	15
[0048]	<212>	PRT
[0049]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0050]	<400>	6
[0051]	Val His Pro Val Ser Thr Met Ile Lys Gly Leu Tyr Gly Ile Lys	
[0052]	1	5 10 15
[0053]	<210>	7
[0054]	<211>	15
[0055]	<212>	PRT
[0056]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0057]	<400>	7
[0058]	Cys His Gly Trp Val Leu Gly Glu His Gly Asp Ser Ser Val Pro	
[0059]	1	5 10 15
[0060]	<210>	8
[0061]	<211>	15
[0062]	<212>	PRT
[0063]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0064]	<400>	8
[0065]	Leu Ile Ala Pro Val Ala Glu Glu Glu Ala Thr Val Pro Asn Asn	
[0066]	1	5 10 15
[0067]	<210>	9
[0068]	<211>	15
[0069]	<212>	PRT
[0070]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0071]	<400>	9
[0072]	Pro Val Ala Glu Glu Glu Ala Thr Val Pro Asn Asn Lys Ile Thr	
[0073]	1	5 10 15
[0074]	<210>	10
[0075]	<211>	15
[0076]	<212>	PRT
[0077]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)

[0078]	<400> 10
[0079]	Leu Gln Thr Pro Lys Ile Val Ala Asp Lys Asp Tyr Ser Val Thr
[0080]	1 5 10 15
[0081]	<210> 11
[0082]	<211> 15
[0083]	<212> PRT
[0084]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0085]	<400> 11
[0086]	Thr Pro Lys Ile Val Ala Asp Lys Asp Tyr Ser Val Thr Ala Asn
[0087]	1 5 10 15
[0088]	<210> 12
[0089]	<211> 15
[0090]	<212> PRT
[0091]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0092]	<400> 12
[0093]	Asp Cys Ile Ile Ile Val Val Ser Asn Pro Val Asp Ile Leu Thr
[0094]	1 5 10 15
[0095]	<210> 13
[0096]	<211> 15
[0097]	<212> PRT
[0098]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0099]	<400> 13
[0100]	Cys Ile Ile Ile Val Val Ser Asn Pro Val Asp Ile Leu Thr Tyr
[0101]	1 5 10 15
[0102]	<210> 14
[0103]	<211> 15
[0104]	<212> PRT
[0105]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0106]	<400> 14
[0107]	Ile Ile Val Val Ser Asn Pro Val Asp Ile Leu Thr Tyr Val Thr
[0108]	1 5 10 15
[0109]	<210> 15
[0110]	<211> 15
[0111]	<212> PRT
[0112]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0113]	<400> 15
[0114]	Val Ala Gly Val Ser Leu Gln Glu Leu Asn Pro Glu Met Gly Thr
[0115]	1 5 10 15
[0116]	<210> 16

[0117]	<211> 15
[0118]	<212> PRT
[0119]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0120]	<400> 16
[0121]	Glu Ser Met Leu Lys Asn Leu Ser Arg Ile His Pro Val Ser Thr
[0122]	1 5 10 15
[0123]	<210> 17
[0124]	<211> 15
[0125]	<212> PRT
[0126]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0127]	<400> 17
[0128]	Met Leu Lys Asn Leu Ser Arg Ile His Pro Val Ser Thr Met Val
[0129]	1 5 10 15
[0130]	<210> 18
[0131]	<211> 15
[0132]	<212> PRT
[0133]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0134]	<400> 18
[0135]	Val Ser Thr Met Val Lys Gly Met Tyr Gly Ile Glu Asn Glu Val
[0136]	1 5 10 15
[0137]	<210> 19
[0138]	<211> 15
[0139]	<212> PRT
[0140]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0141]	<400> 19
[0142]	Val Phe Leu Ser Leu Pro Cys Ile Leu Asn Ala Arg Gly Leu Thr
[0143]	1 5 10 15
[0144]	<210> 20
[0145]	<211> 15
[0146]	<212> PRT
[0147]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0148]	<400> 20
[0149]	Val Leu Leu Gly Val Asp Leu Gly Ser Met Asp Glu Glu Glu Glu
[0150]	1 5 10 15
[0151]	<210> 21
[0152]	<211> 15
[0153]	<212> PRT
[0154]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0155]	<400> 21

[0156]	Val Asp Leu Gly Ser Met Asp Glu Glu Glu Glu Ile Ala Thr Pro
[0157]	1 5 10 15
[0158]	<210> 22
[0159]	<211> 15
[0160]	<212> PRT
[0161]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0162]	<400> 22
[0163]	Pro Pro Pro Pro Pro Pro Lys Lys Glu Thr Lys Pro Glu Pro Met
[0164]	1 5 10 15
[0165]	<210> 23
[0166]	<211> 15
[0167]	<212> PRT
[0168]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0169]	<400> 23
[0170]	Thr Asn Gln Ala Ala Val Tyr Phe Glu Lys Gly Asp Tyr Asn Lys
[0171]	1 5 10 15
[0172]	<210> 24
[0173]	<211> 15
[0174]	<212> PRT
[0175]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0176]	<400> 24
[0177]	Pro Pro Leu Ala His Ile Phe Arg Gly Thr Phe Val His Ser Thr
[0178]	1 5 10 15
[0179]	<210> 25
[0180]	<211> 15
[0181]	<212> PRT
[0182]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0183]	<400> 25
[0184]	Ser Ser Ile Asp Leu Pro Leu Leu Glu Trp Leu Thr Lys Tyr Thr
[0185]	1 5 10 15
[0186]	<210> 26
[0187]	<211> 15
[0188]	<212> PRT
[0189]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0190]	<400> 26
[0191]	Ala Thr Ile His Thr Asp Ser Ser Leu Leu Leu Ala Asp Ile Thr
[0192]	1 5 10 15
[0193]	<210> 27
[0194]	<211> 15

[0195]	<212>	PRT
[0196]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0197]	<400>	27
[0198]	Met Asp Leu Asn Asp Thr Phe Pro Glu Tyr Lys Glu Thr Thr Glu	
[0199]	1 5 10 15	
[0200]	<210>	28
[0201]	<211>	15
[0202]	<212>	PRT
[0203]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0204]	<220>	
[0205]	<223>	合成肽表位
[0206]	<400>	28
[0207]	Pro Ala Ala Pro Pro Ala Ala Pro Ala Leu Ser Ala Ala Asp Thr	
[0208]	1 5 10 15	
[0209]	<210>	29
[0210]	<211>	15
[0211]	<212>	PRT
[0212]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0213]	<400>	29
[0214]	Ala Thr Lys Val Leu Gly Thr Val Lys Trp Phe Asn Val Arg Asn	
[0215]	1 5 10 15	
[0216]	<210>	30
[0217]	<211>	15
[0218]	<212>	PRT
[0219]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0220]	<400>	30
[0221]	Thr Val Lys Trp Phe Asn Val Arg Asn Gly Tyr Gly Phe Ile Asn	
[0222]	1 5 10 15	
[0223]	<210>	31
[0224]	<211>	15
[0225]	<212>	PRT
[0226]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0227]	<400>	31
[0228]	Phe Asn Val Arg Asn Gly Tyr Gly Phe Ile Asn Arg Asn Asp Thr	
[0229]	1 5 10 15	
[0230]	<210>	32
[0231]	<211>	15
[0232]	<212>	PRT
[0233]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)

[0234]	<400> 32
[0235]	Glu Thr Val Glu Phe Asp Val Val Glu Gly Glu Lys Gly Ala Glu
[0236]	1 5 10 15
[0237]	<210> 33
[0238]	<211> 15
[0239]	<212> PRT
[0240]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0241]	<400> 33
[0242]	Gly Ala Glu Ala Ala Asn Val Thr Gly Pro Gly Gly Val Pro Val
[0243]	1 5 10 15
[0244]	<210> 34
[0245]	<211> 15
[0246]	<212> PRT
[0247]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0248]	<400> 34
[0249]	Arg Arg Pro Tyr Arg Arg Arg Arg Phe Pro Pro Tyr Tyr Met Arg
[0250]	1 5 10 15
[0251]	<210> 35
[0252]	<211> 15
[0253]	<212> PRT
[0254]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0255]	<400> 35
[0256]	Pro Pro Arg Gln Arg Gln Pro Arg Glu Asp Gly Asn Glu Glu Asp
[0257]	1 5 10 15
[0258]	<210> 36
[0259]	<211> 15
[0260]	<212> PRT
[0261]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0262]	<400> 36
[0263]	Val Val Pro Glu Pro Gly Ser Ser Leu Leu Thr Ser Phe Glu Lys
[0264]	1 5 10 15
[0265]	<210> 37
[0266]	<211> 15
[0267]	<212> PRT
[0268]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0269]	<400> 37
[0270]	Thr Ser Phe Glu Lys Trp His Glu Ala Ala Asp Thr Lys Ser Cys
[0271]	1 5 10 15
[0272]	<210> 38

[0273]	<211>	15
[0274]	<212>	PRT
[0275]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0276]	<400>	38
[0277]	Val Asp Ile Thr Ser Trp Tyr Asp Gly Val Arg Glu Glu Leu Glu	
[0278]	1 5 10 15	
[0279]	<210>	39
[0280]	<211>	15
[0281]	<212>	PRT
[0282]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0283]	<400>	39
[0284]	Val Thr Ser Pro Pro Leu Ser Pro Asp Pro Thr Thr Pro Asp Tyr	
[0285]	1 5 10 15	
[0286]	<210>	40
[0287]	<211>	15
[0288]	<212>	PRT
[0289]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0290]	<400>	40
[0291]	Met Asp Glu Asn Gln Phe Val Ala Val Thr Ser Thr Asn Ala Ala	
[0292]	1 5 10 15	
[0293]	<210>	41
[0294]	<211>	15
[0295]	<212>	PRT
[0296]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0297]	<400>	41
[0298]	Val Gly Ser Asp Ala Asp Val Val Ile Trp Asp Pro Asp Lys Leu	
[0299]	1 5 10 15	
[0300]	<210>	42
[0301]	<211>	15
[0302]	<212>	PRT
[0303]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0304]	<400>	42
[0305]	Val Tyr Glu Val Pro Ala Thr Pro Lys Tyr Ala Thr Pro Ala Pro	
[0306]	1 5 10 15	
[0307]	<210>	43
[0308]	<211>	15
[0309]	<212>	PRT
[0310]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0311]	<400>	43

[0312]	Val Pro Ala Thr Pro Lys Tyr Ala Thr Pro Ala Pro Ser Ala Lys
[0313]	1 5 10 15
[0314]	<210> 44
[0315]	<211> 15
[0316]	<212> PRT
[0317]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0318]	<400> 44
[0319]	Gln Ser Asn Phe Ser Leu Ser Gly Ala Gln Ile Asp Asp Asn Asn
[0320]	1 5 10 15
[0321]	<210> 45
[0322]	<211> 15
[0323]	<212> PRT
[0324]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0325]	<400> 45
[0326]	Met Ala Glu Arg Lys Gln Ser Gly Lys Ala Ala Glu Asp Glu Glu
[0327]	1 5 10 15
[0328]	<210> 46
[0329]	<211> 15
[0330]	<212> PRT
[0331]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0332]	<400> 46
[0333]	Val Asn Asp Asp Gln Ser Phe Tyr Ala Asp Ile Tyr Met Glu Asp
[0334]	1 5 10 15
[0335]	<210> 47
[0336]	<211> 15
[0337]	<212> PRT
[0338]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0339]	<400> 47
[0340]	Gly Glu Asn Leu Ile Val Pro Gly Gly Val Lys Thr Ile Glu Ala
[0341]	1 5 10 15
[0342]	<210> 48
[0343]	<211> 15
[0344]	<212> PRT
[0345]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0346]	<400> 48
[0347]	Val Val Pro Glu Pro Gly Thr Ser Leu Leu Ala Ala Phe Asp Gln
[0348]	1 5 10 15
[0349]	<210> 49
[0350]	<211> 15

[0351]	<212>	PRT		
[0352]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)		
[0353]	<400>	49		
[0354]	Val Pro Glu Pro Gly Thr Ser Leu Leu Ala Ala Phe Asp Gln Trp			
[0355]	1	5	10	15
[0356]	<210>	50		
[0357]	<211>	15		
[0358]	<212>	PRT		
[0359]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)		
[0360]	<400>	50		
[0361]	Gln Lys Ala Val Gly Lys Asp Asn Phe Thr Leu Ile Pro Glu Gly			
[0362]	1	5	10	15
[0363]	<210>	51		
[0364]	<211>	15		
[0365]	<212>	PRT		
[0366]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)		
[0367]	<400>	51		
[0368]	Thr Ser Pro Pro Leu Ser Pro Asp Pro Thr Thr Pro Asp Phe Leu			
[0369]	1	5	10	15
[0370]	<210>	52		
[0371]	<211>	15		
[0372]	<212>	PRT		
[0373]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)		
[0374]	<400>	52		
[0375]	Val Gly Ser Asp Ala Asp Leu Val Ile Trp Asp Pro Asp Ser Val			
[0376]	1	5	10	15
[0377]	<210>	53		
[0378]	<211>	15		
[0379]	<212>	PRT		
[0380]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)		
[0381]	<400>	53		
[0382]	Val Lys Thr Ile Ser Ala Lys Thr His Asn Ser Ser Leu Glu Tyr			
[0383]	1	5	10	15
[0384]	<210>	54		
[0385]	<211>	15		
[0386]	<212>	PRT		
[0387]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)		
[0388]	<400>	54		
[0389]	Lys Thr Ile Ser Ala Lys Thr His Asn Ser Ser Leu Glu Tyr Asn			

[0390]	1	5	10	15
[0391]	<210> 55			
[0392]	<211> 15			
[0393]	<212> PRT			
[0394]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[0395]	<400> 55			
[0396]	His Asn Ser Ser Leu Glu Tyr Asn Ile Phe Glu Gly Met Glu Cys			
[0397]	1	5	10	15
[0398]	<210> 56			
[0399]	<211> 15			
[0400]	<212> PRT			
[0401]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[0402]	<400> 56			
[0403]	Glu Leu Arg Gly Val Pro Arg Gly Leu Tyr Asp Gly Pro Val Cys			
[0404]	1	5	10	15
[0405]	<210> 57			
[0406]	<211> 15			
[0407]	<212> PRT			
[0408]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[0409]	<400> 57			
[0410]	Leu Arg Gly Val Pro Arg Gly Leu Tyr Asp Gly Pro Val Cys Glu			
[0411]	1	5	10	15
[0412]	<210> 58			
[0413]	<211> 15			
[0414]	<212> PRT			
[0415]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[0416]	<400> 58			
[0417]	Arg Gly Val Pro Arg Gly Leu Tyr Asp Gly Pro Val Cys Glu Val			
[0418]	1	5	10	15
[0419]	<210> 59			
[0420]	<211> 15			
[0421]	<212> PRT			
[0422]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[0423]	<400> 59			
[0424]	Gly Val Pro Arg Gly Leu Tyr Asp Gly Pro Val Cys Glu Val Ser			
[0425]	1	5	10	15
[0426]	<210> 60			
[0427]	<211> 15			
[0428]	<212> PRT			

[0429]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0430]	<400> 60
[0431]	Val Pro Arg Gly Leu Tyr Asp Gly Pro Val Cys Glu Val Ser Val
[0432]	1 5 10 15
[0433]	<210> 61
[0434]	<211> 15
[0435]	<212> PRT
[0436]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0437]	<400> 61
[0438]	Ser Leu Ser Gly Ala Gln Ile Asp Asp Asn Ile Pro Arg Arg Thr
[0439]	1 5 10 15
[0440]	<210> 62
[0441]	<211> 21
[0442]	<212> PRT
[0443]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0444]	<400> 62
[0445]	Ala Asp Glu Leu Ala Leu Val Asp Val Ile Glu Asp Lys Leu Lys Gly
[0446]	1 5 10 15
[0447]	Glu Met Met Asp Leu
[0448]	20
[0449]	<210> 63
[0450]	<211> 15
[0451]	<212> PRT
[0452]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0453]	<400> 63
[0454]	Phe Leu Arg Thr Pro Lys Ile Val Ser Gly Lys Asp Tyr Asn Val
[0455]	1 5 10 15
[0456]	<210> 64
[0457]	<211> 21
[0458]	<212> PRT
[0459]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0460]	<400> 64
[0461]	Met Lys Asn Leu Arg Arg Val His Pro Val Ser Thr Met Ile Lys Gly
[0462]	1 5 10 15
[0463]	Leu Tyr Gly Ile Lys
[0464]	20
[0465]	<210> 65
[0466]	<211> 20
[0467]	<212> PRT

[0468] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0469] <400> 65
[0470] Glu Lys Leu Ile Ala Pro Val Ala Glu Glu Glu Ala Thr Val Pro Asn
[0471] 1 5 10 15
[0472] Asn Lys Ile Thr
[0473] 20
[0474] <210> 66
[0475] <211> 17
[0476] <212> PRT
[0477] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0478] <400> 66
[0479] Ile Ala Pro Val Ala Glu Glu Glu Ala Thr Val Pro Asn Asn Lys Ile
[0480] 1 5 10 15
[0481] Thr
[0482] <210> 67
[0483] <211> 18
[0484] <212> PRT
[0485] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0486] <400> 67
[0487] Asp Cys Ile Ile Ile Val Val Ser Asn Pro Val Asp Ile Leu Thr Tyr
[0488] 1 5 10 15
[0489] Val Thr
[0490] <210> 68
[0491] <211> 15
[0492] <212> PRT
[0493] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0494] <400> 68
[0495] Val Ala Gly Val Ser Leu Gln Glu Leu Asn Pro Glu Met Gly Thr
[0496] 1 5 10 15
[0497] <210> 69
[0498] <211> 17
[0499] <212> PRT
[0500] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0501] <400> 69
[0502] Asn Glu Val Phe Leu Ser Leu Pro Cys Ile Leu Asn Ala Arg Gly Leu
[0503] 1 5 10 15
[0504] Thr
[0505] <210> 70
[0506] <211> 18

[0507]	<212>	PRT
[0508]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0509]	<400>	70
[0510]	Phe	Leu Gln Thr Pro Lys Ile Val Ala Asp Lys Asp Tyr Ser Val Thr
[0511]	1	5 10 15
[0512]	Ala	Asn
[0513]	<210>	71
[0514]	<211>	17
[0515]	<212>	PRT
[0516]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0517]	<400>	71
[0518]	Leu	Gln Thr Pro Lys Ile Val Ala Asp Lys Asp Tyr Ser Val Thr Ala
[0519]	1	5 10 15
[0520]	Asn	
[0521]	<210>	72
[0522]	<211>	25
[0523]	<212>	PRT
[0524]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0525]	<400>	72
[0526]	Glu	Ser Met Leu Lys Asn Leu Ser Arg Ile His Pro Val Ser Thr Met
[0527]	1	5 10 15
[0528]	Val	Lys Gly Met Tyr Gly Ile Glu Val
[0529]		20 25
[0530]	<210>	73
[0531]	<211>	18
[0532]	<212>	PRT
[0533]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0534]	<400>	73
[0535]	Val	Leu Leu Gly Val Asp Leu Gly Ser Met Asp Glu Glu Glu Glu Ile
[0536]	1	5 10 15
[0537]	Ala	Thr
[0538]	<210>	74
[0539]	<211>	17
[0540]	<212>	PRT
[0541]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0542]	<400>	74
[0543]	Pro	Pro Pro Pro Pro Lys Lys Glu Thr Lys Pro Glu Pro Met
[0544]	1	5 10 15
[0545]	Glu	

[0546]	<210>	75
[0547]	<211>	16
[0548]	<212>	PRT
[0549]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0550]	<400>	75
[0551]	Pro Pro Pro Pro Pro Pro Lys Lys Glu Thr Lys Pro Glu Pro Met Glu	
[0552]	1	5 10 15
[0553]	<210>	76
[0554]	<211>	15
[0555]	<212>	PRT
[0556]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0557]	<400>	76
[0558]	Thr Asn Gln Ala Ala Val Tyr Phe Glu Lys Gly Asp Tyr Asn Lys	
[0559]	1	5 10 15
[0560]	<210>	77
[0561]	<211>	15
[0562]	<212>	PRT
[0563]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0564]	<400>	77
[0565]	Pro Pro Leu Ala His Ile Phe Arg Gly Thr Phe Val His Ser Thr	
[0566]	1	5 10 15
[0567]	<210>	78
[0568]	<211>	15
[0569]	<212>	PRT
[0570]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0571]	<400>	78
[0572]	Ser Ser Ile Asp Leu Pro Leu Leu Glu Trp Leu Thr Lys Tyr Thr	
[0573]	1	5 10 15
[0574]	<210>	79
[0575]	<211>	15
[0576]	<212>	PRT
[0577]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0578]	<400>	79
[0579]	Ala Thr Ile His Thr Asp Ser Ser Leu Leu Leu Ala Asp Ile Thr	
[0580]	1	5 10 15
[0581]	<210>	80
[0582]	<211>	25
[0583]	<212>	PRT
[0584]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)

[0585] <400> 80
 [0586] Ala Thr Lys Val Leu Gly Thr Val Lys Trp Phe Asn Val Arg Asn Gly
 [0587] 1 5 10 15
 [0588] Tyr Gly Phe Ile Asn Arg Asn Asp Thr
 [0589] 20 25
 [0590] <210> 81
 [0591] <211> 27
 [0592] <212> PRT
 [0593] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0594] <400> 81
 [0595] Glu Thr Val Glu Phe Asp Val Val Glu Gly Glu Lys Gly Ala Glu Ala
 [0596] 1 5 10 15
 [0597] Ala Asn Val Thr Gly Pro Gly Gly Val Pro Val
 [0598] 20 25
 [0599] <210> 82
 [0600] <211> 15
 [0601] <212> PRT
 [0602] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0603] <400> 82
 [0604] Arg Arg Pro Tyr Arg Arg Arg Arg Phe Pro Pro Tyr Tyr Met Arg
 [0605] 1 5 10 15
 [0606] <210> 83
 [0607] <211> 15
 [0608] <212> PRT
 [0609] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0610] <400> 83
 [0611] Pro Pro Arg Gln Arg Gln Pro Arg Glu Asp Gly Asn Glu Glu Asp
 [0612] 1 5 10 15
 [0613] <210> 84
 [0614] <211> 14
 [0615] <212> PRT
 [0616] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0617] <400> 84
 [0618] Ser Phe Glu Lys Trp His Glu Ala Ala Asp Thr Lys Ser Cys
 [0619] 1 5 10
 [0620] <210> 85
 [0621] <211> 15
 [0622] <212> PRT
 [0623] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0624]	<400> 85
[0625]	Met Asp Glu Asn Gln Phe Val Ala Val Thr Ser Thr Asn Ala Ala
[0626]	1 5 10 15
[0627]	<210> 86
[0628]	<211> 15
[0629]	<212> PRT
[0630]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0631]	<400> 86
[0632]	Val Pro Ala Thr Pro Lys Tyr Ala Thr Pro Ala Pro Ser Ala Lys
[0633]	1 5 10 15
[0634]	<210> 87
[0635]	<211> 16
[0636]	<212> PRT
[0637]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0638]	<400> 87
[0639]	Val Thr Ser Pro Pro Leu Ser Pro Asp Pro Thr Thr Pro Asp Tyr Leu
[0640]	1 5 10 15
[0641]	<210> 88
[0642]	<211> 15
[0643]	<212> PRT
[0644]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0645]	<400> 88
[0646]	Gln Ser Asn Phe Ser Leu Ser Gly Ala Gln Ile Asp Asp Asn Asn
[0647]	1 5 10 15
[0648]	<210> 89
[0649]	<211> 15
[0650]	<212> PRT
[0651]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0652]	<400> 89
[0653]	Val Asn Asp Asp Gln Ser Phe Tyr Ala Asp Ile Tyr Met Glu Asp
[0654]	1 5 10 15
[0655]	<210> 90
[0656]	<211> 15
[0657]	<212> PRT
[0658]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0659]	<400> 90
[0660]	Gly Glu Asn Leu Ile Val Pro Gly Gly Val Lys Thr Ile Glu Ala
[0661]	1 5 10 15
[0662]	<210> 91

[0663]	<211>	15		
[0664]	<212>	PRT		
[0665]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)		
[0666]	<400>	91		
[0667]	Gln Lys Ala Val Gly Lys Asp Asn Phe Thr Leu Ile Pro Glu Gly			
[0668]	1	5	10	15
[0669]	<210>	92		
[0670]	<211>	23		
[0671]	<212>	PRT		
[0672]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)		
[0673]	<400>	92		
[0674]	Val Lys Thr Ile Ser Ala Lys Thr His Asn Ser Ser Leu Glu Tyr Asn			
[0675]	1	5	10	15
[0676]	Ile Phe Glu Gly Met Glu Cys			
[0677]		20		
[0678]	<210>	93		
[0679]	<211>	19		
[0680]	<212>	PRT		
[0681]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)		
[0682]	<400>	93		
[0683]	Glu Leu Arg Gly Val Pro Arg Gly Leu Tyr Asp Gly Pro Val Cys Glu			
[0684]	1	5	10	15
[0685]	Val Ser Val			
[0686]	<210>	94		
[0687]	<211>	16		
[0688]	<212>	PRT		
[0689]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)		
[0690]	<400>	94		
[0691]	Val Val Pro Glu Pro Gly Thr Ser Leu Leu Ala Ala Phe Asp Gln Trp			
[0692]	1	5	10	15
[0693]	<210>	95		
[0694]	<211>	15		
[0695]	<212>	PRT		
[0696]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)		
[0697]	<400>	95		
[0698]	Thr Ser Pro Pro Leu Ser Pro Asp Pro Thr Thr Pro Asp Phe Leu			
[0699]	1	5	10	15
[0700]	<210>	96		
[0701]	<211>	15		

[0702]	<212>	PRT
[0703]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0704]	<400>	96
[0705]	Ser Leu Ser Gly Ala Gln Ile Asp Asp Asn Ile Pro Arg Arg Thr	
[0706]	1	5 10 15
[0707]	<210>	97
[0708]	<211>	7
[0709]	<212>	PRT
[0710]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0711]	<400>	97
[0712]	Val Asp Val Ile Glu Asp Lys	
[0713]	1	5
[0714]	<210>	98
[0715]	<211>	9
[0716]	<212>	PRT
[0717]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0718]	<400>	98
[0719]	Val His Pro Val Ser Thr Met Ile Lys	
[0720]	1	5
[0721]	<210>	99
[0722]	<211>	12
[0723]	<212>	PRT
[0724]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0725]	<400>	99
[0726]	Pro Val Ala Glu Glu Glu Ala Thr Val Pro Asn Asn	
[0727]	1	5 10
[0728]	<210>	100
[0729]	<211>	12
[0730]	<212>	PRT
[0731]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0732]	<400>	100
[0733]	Ile Ile Val Val Ser Asn Pro Val Asp Ile Leu Thr	
[0734]	1	5 10
[0735]	<210>	101
[0736]	<211>	13
[0737]	<212>	PRT
[0738]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0739]	<400>	101
[0740]	Thr Pro Lys Ile Val Ala Asp Lys Asp Tyr Ser Val Thr	

[0741]	1	5	10
[0742]	<210> 102		
[0743]	<211> 13		
[0744]	<212> PRT		
[0745]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0746]	<400> 102		
[0747]	Met Leu Lys Asn Leu Ser Arg Ile His Pro Val Ser Thr		
[0748]	1	5	10
[0749]	<210> 103		
[0750]	<211> 11		
[0751]	<212> PRT		
[0752]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0753]	<400> 103		
[0754]	Val Asp Leu Gly Ser Met Asp Glu Glu Glu Glu		
[0755]	1	5	10
[0756]	<210> 104		
[0757]	<211> 15		
[0758]	<212> PRT		
[0759]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0760]	<400> 104		
[0761]	Pro Pro Pro Pro Pro Lys Lys Glu Thr Lys Pro Glu Pro Met Glu		
[0762]	1	5	10 15
[0763]	<210> 105		
[0764]	<211> 9		
[0765]	<212> PRT		
[0766]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0767]	<400> 105		
[0768]	Thr Val Lys Trp Phe Asn Val Arg Asn		
[0769]	1	5	
[0770]	<210> 106		
[0771]	<211> 5		
[0772]	<212> PRT		
[0773]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0774]	<400> 106		
[0775]	Phe Asn Val Arg Asn		
[0776]	1	5	
[0777]	<210> 107		
[0778]	<211> 11		
[0779]	<212> PRT		

[0780]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0781]	<400> 107
[0782]	Phe Asn Val Arg Asn Gly Tyr Gly Phe Ile Asn
[0783]	1 5 10
[0784]	<210> 108
[0785]	<211> 12
[0786]	<212> PRT
[0787]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0788]	<400> 108
[0789]	Val Pro Ala Thr Pro Lys Tyr Ala Thr Pro Ala Pro
[0790]	1 5 10
[0791]	<210> 109
[0792]	<211> 5
[0793]	<212> PRT
[0794]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0795]	<400> 109
[0796]	Thr Ser Phe Glu Lys
[0797]	1 5
[0798]	<210> 110
[0799]	<211> 14
[0800]	<212> PRT
[0801]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0802]	<400> 110
[0803]	Val Pro Glu Pro Gly Thr Ser Leu Leu Ala Ala Phe Asp Gln
[0804]	1 5 10
[0805]	<210> 111
[0806]	<211> 14
[0807]	<212> PRT
[0808]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0809]	<400> 111
[0810]	Lys Thr Ile Ser Ala Lys Thr His Asn Ser Ser Leu Glu Tyr
[0811]	1 5 10
[0812]	<210> 112
[0813]	<211> 7
[0814]	<212> PRT
[0815]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0816]	<400> 112
[0817]	His Asn Ser Leu Leu Glu Tyr
[0818]	1 5

[0819]	<210> 113
[0820]	<211> 13
[0821]	<212> PRT
[0822]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0823]	<400> 113
[0824]	Arg Gly Val Pro Arg Gly Leu Tyr Asp Gly Pro Val Cys
[0825]	1 5 10
[0826]	<210> 114
[0827]	<211> 11
[0828]	<212> PRT
[0829]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0830]	<400> 114
[0831]	Val Pro Arg Gly Leu Tyr Asp Gly Pro Val Cys
[0832]	1 5 10
[0833]	<210> 115
[0834]	<211> 14
[0835]	<212> PRT
[0836]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0837]	<400> 115
[0838]	Val Pro Arg Gly Leu Tyr Asp Gly Pro Val Cys Glu Val Ser
[0839]	1 5 10
[0840]	<210> 116
[0841]	<211> 10
[0842]	<212> PRT
[0843]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0844]	<400> 116
[0845]	Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Gly Gly
[0846]	1 5 10
[0847]	<210> 117
[0848]	<211> 10
[0849]	<212> PRT
[0850]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0851]	<400> 117
[0852]	Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Gly
[0853]	1 5 10
[0854]	<210> 118
[0855]	<211> 14
[0856]	<212> PRT
[0857]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0858] <400> 118

[0859] Lys Glu Val Pro Ala Leu Thr Ala Val Glu Thr Gly Ala Thr

[0860] 1 5 10