

# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00814441.9

[43] 公开日 2002 年 11 月 13 日

[11] 公开号 CN 1379858A

[22] 申请日 2000.8.16 [21] 申请号 00814441.9

[30] 优先权

[32] 1999.8.17 [33] GB [31] 9919452.4

[86] 国际申请 PCT/EP00/07973 2000.8.16

[87] 国际公布 WO01/13110 英 2001.2.22

[85] 进入国家阶段日期 2002.4.17

[71] 申请人 奥斯提奥米特生物技术公司

地址 丹麦赫利夫

[72] 发明人 P·A·C·克洛斯

S·克里斯特高

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 张广育 刘 玥

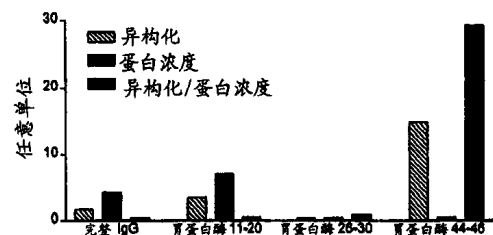
权利要求书 3 页 说明书 37 页 附图 6 页

[54] 发明名称 针对异构化/光学反转抗原决定簇的特异性自身免疫反应：在自身免疫性疾病诊断中的应用

[57] 摘要

我们发现,对异构化蛋白质具有免疫反应性的抗体和 T 淋巴细胞与自身免疫性疾病相关,所述蛋白质在天门冬氨酸、天门冬酰胺、谷氨酰胺或谷氨酸残基上存在异构化,所述自身免疫性疾病涉及对 IgG(类风湿关节炎)和髓磷脂基底蛋白(多发硬化)的自身反应性。本发明描述了对异构化蛋白序列具有自身免疫反应性的诊断方法。

选定 IgG 裂解产物合并级分的异构化模式



ISSN 1008-4274

1. 一种实验方法，包括对样本进行定量或定性检测，确定样本中是否存在 (a) 特异性识别抗原决定簇的自身反应性免疫系统组分，所述抗原决定簇包括异构化肽连接和/或光学反转氨基酸，和/或 (b) 含有所述抗原决定簇的自身抗原或其片段，和/或 (c) 含有所述抗原决定簇并能够诱导自身免疫应答的非自身抗原或其片段。

2. 权利要求 1 的方法，其中所述免疫系统组分是细胞免疫系统组分。

3. 权利要求 2 的方法，其中所述免疫系统组分是 T 淋巴细胞。

4. 权利要求 1 的方法，其中所述免疫系统组分是体液免疫系统组分。

5. 权利要求 4 的方法，其中所述抗原决定簇包括源自 IgG 的氨基酸序列，所述 IgG 含有异构化肽连接或光学反转氨基酸。

6. 权利要求 4 的方法，其中所述免疫系统组分是针对抗原决定簇的自身抗体，所述抗原决定簇包括下面任一序列含有的氨基酸\*Asx:

Trp-Leu-\*Asx-Gly-Lys-Glu-Tyr

Trp-Glu-Ser-\*Asx-Gly

His-Phe-Phe-Lys-\*Asx-Ile-Val-Thr-Pro

Pro-Ser-\*Asx-Glu-Gly-Lys-Gly-Arg

Ala-Leu-Gly-Ile-Gly-Thr-\*Asx-Ser-Val-Ile

Trp-Ser-Phe-Gly-Ser-Glu-\*Asx-Gly-Ser-Gly-\*Asx-Ser-Glu-Asn

Ala-Gly-Trp-Leu-\*Asx-Gly-Ser-Val-Arg 或

Gly-Arg-Val-Arg-Val-\*Asx-Ser-Ala-Tyr

其中\*Asx是在原始序列中通过异构化/光学反转天门冬氨酸或天门冬酰胺残基，形成的 $\alpha$ D型天门冬氨酸或天门冬酰胺，或 $\beta$ D或 $\beta$ L型天门冬氨酸。

7. 权利要求 4 的方法，其中所述免疫系统组分是针对抗原决定簇的自身抗体，所述抗原决定簇包括下面任一序列含有的氨基酸\*Asx:

Met-Glu-Val-Gly-Trp-Tyr-Arg-Pro-Pro-Phe-Ser-Arg-Val-

Val-His-Leu-Tyr-Arg-\*Asx-Gly-Lys-或

Val-Val-His-Phe-Phe-Lys-\*Asx-Ile-Val-Thr-Pro

其中\*Asx是在原始序列中通过异构化/光学反转天门冬氨酸或天门

冬酰胺残基,形成的 $\alpha$ D型天门冬氨酸或天门冬酰胺,或 $\beta$ D或 $\beta$ L型天门冬氨酸。

8. 权利要求4的方法,其中所述免疫系统组分是针对抗原决定簇的自身抗体,所述抗原决定簇包括下面任一序列含有的氨基酸\*Alx:

5 Pro-Ser-\*Glx-Gly-Lys-Gly-Arg  
Phe-Ser-Trp-Gly-Ala-\*Glx-Gly-Arg 或  
Asp-Ala-\*Glx-Gly-Thr-Leu-Ser-Lys

其中\*Glx是在原始序列中通过异构化/光学反转谷氨酸或谷氨酰胺残基,形成的 $\alpha$ D型谷氨酸或谷氨酰胺,或 $\gamma$ L或 $\gamma$ D型谷氨酸。

10 9. 权利要求1-8任一项的方法,其中检测到所述免疫系统组分或自身抗原是自身免疫性疾病的指示。

10. 权利要求9的方法,其中所述疾病是类风湿关节炎,多发硬化,胰岛素依赖性糖尿病,重症肌无力,乳糜泻,Chagas病,银屑病或克隆病。

15 11. 检测自身抗原或其片段的方法,包括检测所述自身抗原或片段与免疫结合配体的反应性,所述免疫结合配体可以特异性检测在所述自身抗原中异构化肽连接或光学反转氨基酸的存在。

12. 权利要求11的方法,其中所述免疫结合配体可以特异性针对权利要求6-8任一项定义的抗原决定簇。

20 13. 任意前述权利要求的方法,可以提供关于所述免疫系统组分或自身抗原或非自体抗原或备测抗原片段的数量的信息。

14. 在自身抗原上定位一个或多个抗原决定簇的方法,包括应用L异构型天冬氨酰(D-天冬氨酰)甲基转移酶(IAMT)以及标记甲基,将所述标记甲基引入到所述自身抗原的一个或多个异构化肽连接和/或光学反转氨基酸中,并测定该自身抗原中引入标记甲基的至少一个位点,然后建立包括该位点区域的自身抗原氨基酸序列,并检测所述氨基酸序列肽在所述部位整合了异构化或光学反转氨基酸后,与自身反应性免疫系统组分的免疫反应性。

15. 权利要求14的方法,其中自身抗体与自身免疫性疾病相关。

30 16. 权利要求14的方法,其中自身免疫性疾病是类风湿关节炎,多发硬化,胰岛素依赖性糖尿病,重症肌无力,乳糜泻,Chagas病,银屑病或克隆病。

17. 一种肽，包括能够为自身反应性免疫系统组分识别的抗原决定簇，其中抗原决定簇含有异构化肽连接和/或光学反转氨基酸。

18. 权利要求 17 的肽，含有权利要求 6 - 8 任一项定义的抗原决定簇。

- 5        19. 权利要求 18 的肽，包括变化了的氨基酸残基\*Asx 或\*Glx，以及在 N 末端和/或 C 末端方向至少 3 个侧翼氨基酸残基，其中\*Glx 是在原始序列中通过异构化/光学反转谷氨酸或谷氨酰胺残基，形成的 $\alpha$ D 型谷氨酸或谷氨酰胺，或 $\gamma$ L 或 $\gamma$ D 型谷氨酸，\*Asx 是在原始序列中通过异构化/光学反转天门冬酰胺或天门冬氨酸残基，形成的 $\alpha$ D 型天门冬氨酸
- 10 或天门冬酰胺，或 $\beta$ L 或 $\beta$ D 型天门冬氨酸。

针对异构化/光学反转抗原决定簇的特异性自身免疫反应：  
在自身免疫性疾病诊断中的应用

5 本发明涉及检测免疫系统组分如自身抗体和自身反应性 T 细胞的方法，以及发展自身免疫性疾病首次诊断和监测的诊断性免疫方法技术。

自身免疫性疾病包括一组具有共同特征的复杂疾病，在这些疾病中，机体的自身成分被免疫系统识别，并导致异常免疫应答的启动。  
10 为了发生自身免疫反应，正常维持的免疫耐受必须“停止”（Cooke 1988）（见下“参考文献”），而这种免疫耐受在正常个体中是终身持续的。发生的原因通常难以评价，因为自身免疫反应开始发生的时间通常比疾病的临床诊断早几年，并且在不同疾病中，激发事件也可能不同。假设在人体中存在大量潜在的自身抗原，值得注意的是，自  
15 身免疫性疾病似乎只局限于几个组织和抗原。假设给靶抗原和自身免疫反应的分布在机体内定位，自身免疫性疾病的分类可以是器官特异性和非器官特异性（系统性）。在每种情况下，免疫反应都可能既涉及免疫系统的体液部分（即抗体合成），又涉及细胞部分。

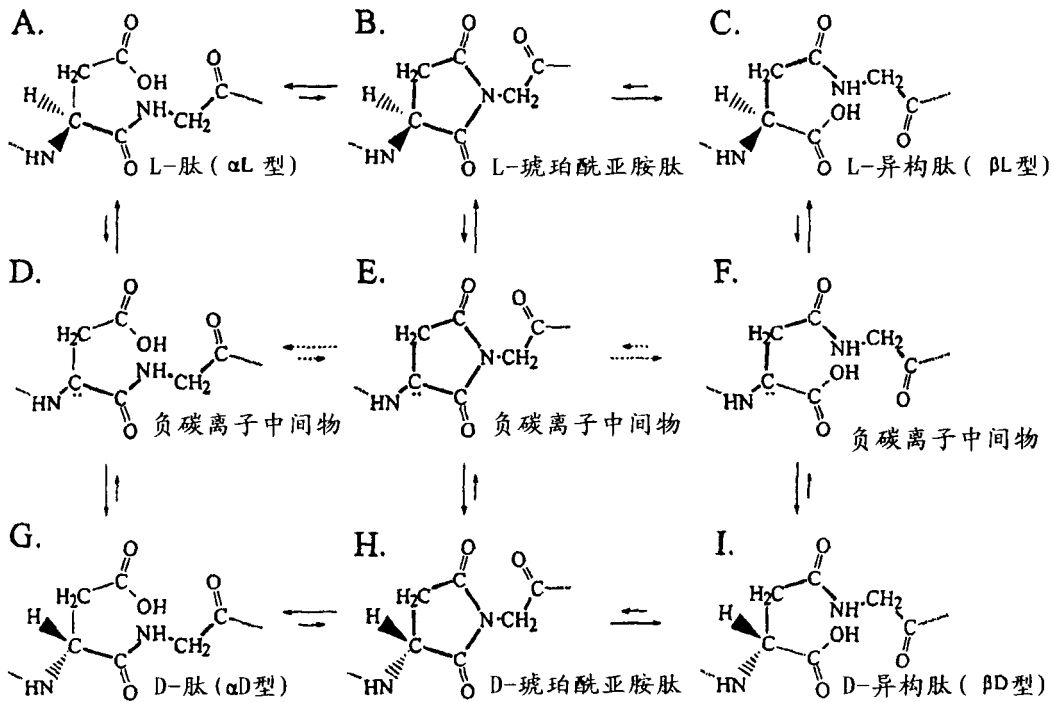
本发明还涉及刻画免疫系统组分特征的技术，用来检测、量化这  
20 些免疫系统组分和自身抗原，所述免疫系统组分如自身抗体和自身反应性 T 细胞或 B 细胞，以及与之发生相互反应的分子如自身抗原。在利用本发明应用技术的实施例中，描述了与系统性自身免疫性疾病类风湿性关节炎（RA）或多发硬化（MS）相关的自身免疫现象。但这仅仅是本发明的一个示例，并非旨在将本发明的范围限制在 RA 或 MS 上。

25

本发明的基本假说

本发明基于如下假说，蛋白质中易感残基的异构化和光学反转在自身免疫性疾病中可能对自身免疫应答的产生至关重要。在一些易感蛋白质中，天门冬氨酸和天门冬酰胺（Asx）和谷氨酸和谷氨酰胺（Glx）  
30 残基可能发生自发重排，其中，Asx 或 Glx 残基与邻近残基间的正常肽键可能从侧链正常的 $\alpha$ -羧基转变为 $\beta$ -羧基（Glx 残基则为 $\gamma$ -羧基）（Clarke 1987）。异构化反应还可通过琥珀酰亚胺介导进行，在自发

水解的基础上，该反应可导致 4 种形式：如下概括的天门冬氨酸的反应图示，正常产生的 $\alpha$ L 型，异构型 $\beta$ L 型，或两种光学反转型 $\alpha$ D 型和 $\beta$ D 型：



5

肽骨架氮原子对邻近天门冬氨酸残基侧链羧基的攻击，可以形成琥珀酰亚胺环 (A $\rightarrow$ B)。琥珀酰亚胺环倾向于水解，产生 D 和 L 构型的光学反转肽和异构肽。光学反转过程通过负碳离子中间物介导 (D, E 和 F)，可以通过直接的质子摄取 (A $\leftrightarrow$ D $\leftrightarrow$ G 或 C $\leftrightarrow$ F $\leftrightarrow$ I) 进行，也可以通过琥珀酰亚胺旁路 (B $\leftrightarrow$ E $\leftrightarrow$ H) 进行。在整幅图中，肽骨架以黑色粗线代表。该图描绘了发生在天门冬氨酸和甘氨酸序列之间的异构/光学反转反应，但该反应可以在含有任何易感 Asx 或 Glx 的抗原决定簇上发生。

10

15

但是，为了使环状酰亚胺形成 (以及异构化/光学反转) 能够发生，包绕 Asx 或 Glx 残基的三维结构必须具有光学构型和足够的弹性 (Clarke 1987)。

20

研究显示，肽和蛋白质中 Asx 残基的光学反转过程主要通过琥珀酰亚胺旁路进行 (B $\leftrightarrow$ E $\leftrightarrow$ H) (Geiger and Clarke 1987, Radkiewics et al 1996)。但是，其他旁路，如质子直接摄取或酰亚胺- $\delta$ -内酯形

成可能也对光学反转有作用 (Radkiewics et al 1996)。但普遍认为这些旁路较不重要 (Geiger and Clarke 1987, Radkiewics et al 1996)。

5 蛋白质或肽中引入这些结构变化, 对其功能、稳定性和理化特征具有深远影响。本发明描述了这些结构变化对这些分子免疫原性的影响。

10 在蛋白质中引入一个异构化和/或光学反转残基可以导致新的 $\beta$ L,  $\alpha$ D 和 $\beta$ D型的形成, 这些构型的蛋白在诱导免疫应答能力方面具有重要意义。特别是在自身免疫性疾病中, 患者自身组织或器官的组分突然作为抗原成为免疫系统的作用对象, 异构化和/或光学反转在该过程中起重要作用。

以极低速率自发发生的异构化和/或光学反转可以在分子中引入新的抗原决定簇, 通常不太可能成为免疫耐受的对象。这种新的抗原决定簇可以被免疫系统的抗原提呈细胞识别, 并因此诱导免疫应答。

15 业已提议, 与 Asx 损伤相关的“蛋白疲劳”对蛋白质性质包括免疫原性的影响, 值得进一步研究 (Galletti et al 1995)。

已有报导, 天门冬氨酸残基的光学反转可能影响短肽的免疫学特征 (Benkirane et al 1993)。

20 还有进一步报导, 血清白蛋白体外去酰胺化可以改变其抗原特性, 并成为机体免疫原, 体内发生的相似过程可能在老化机体自身免疫的发生过程中起一定作用 (Lukash et al, 1987)。

25 天门冬酰胺的去酰胺化可能是肽键异构化的结果, 但去酰胺化还存在很多其他过程 (Mor et al, 1992)。不象以上述反应图所示的方式通过琥珀酰亚胺介导的异构化/光学反转, 这种去酰胺化不会导致蛋白质骨架的结构变化。例如, 去酰胺化可能是酶特异性作用去除酰胺中胺-NH<sub>2</sub>基的结果, 但不改变肽键, 或涉及任何光学活性的改变。

30 已有报导, 针对含有 D-氨基酸的肽的免疫应答与针对相应的只含 L-氨基酸的肽的免疫应答不同 (Sela & Zisman 1997, Maillere et al 1995, Todome et al 1992, Sela & Fuchs 1965)。Todome et al (1992) 显示, 含有 D-丙氨酸残基的细菌蛋白质片段能够在人类中诱发免疫应答。Maillere et al (1995) 显示, 取代源于蛇毒的 T 细胞抗原决定簇中的天然 L-氨基酸, 抗原改变其与 T 细胞受体的结合和反应特性。

Sela 和 Fuchs (在 1964 年布拉格会议之前的发布会上) 指出, 在抗原决定簇/抗原中包括 D-氨基酸, 可以增强 (或减弱) 其抗原性, 与应用含 D-酪氨酸的合成寡肽进行的实验工作评价一致。Mor et al (1992) 以及 Sela 和 Zisman (1997) 在综述中进一步探讨了这些结果及一些相似  
5 的观察。

这些报导中没有一篇探讨自身抗原或自身抗原的抗原决定簇包括 D-氨基酸的可能性, 也没有一篇探讨产生 D-氨基酸诱导自身免疫应答的可能性。而且, 上述研究中没有一项涉及本发明所述通过琥珀酰亚胺旁路自发的光学反转, 他们描述的工作都是应用 D-氨基酸合成肽进  
10 行的, 但不包括 \*Glx 和 \*Asx。

### 类风湿关节炎

类风湿关节炎 (RA) 是一种严重的慢性进行性疾病, 无论发达国家还是发展中国家, 累及大约 1% 的人口。尽管环境因素、遗传因素和疾病进展因素业已暗示在 RA 病因学中有一定作用, 但目前建立的观点  
15 是, RA 是一种自身免疫性疾病 (Williams 1996)。

RA 的主要临床表现是软骨和滑膜组织的异常和退化, 导致关节润滑功能的严重减退, 并最终导致 RA 患者的运动问题。受累关节显示包括多形中性粒细胞、巨噬细胞、T 细胞和其他免疫系统细胞的浸润 (滑  
20 膜炎)。这些细胞参与了免疫过程的活化, 这些细胞的活动和它们的分泌产物介导了关节破坏 (Munthe & Natvig 1972; Harris 1993)。接着, 活动性滑膜炎导致新生毛细血管的生成 (血管生成), 以及滑膜内层细胞进入关节, 进一步损伤关节的正常功能 (Munthe & Natvig 1972)。

RA 最具特征的血清学变化是针对自体 IgG 循环抗体的存在 (Bernstein 1990)。这些抗 IgG 自身抗体又被称为类风湿因子 (RFs)。RFs 可以是 IgM, IgG, IgA 和 IgE, 但 IgM 和 IgG RFs 似乎更具临床意义, 并主要存在于 RA 患者中 (Jonsson & Valdimarsson 1993)。在 RF 应答中涉及多种免疫球蛋白类型的发现强烈提示, RF  
25 的形成是抗原驱动和 T 细胞依赖的, 并不仅仅是单克隆增生或免疫系统泛化刺激的结果 (Harris 1993; Bernstein 1990)。

RFs 并非 RA 的特异性抗体, 它们也存在于相当一部分急性炎症性

疾病患者、自身免疫性疾病患者和一些正常个体的血清中 (Chen et al 1987, Carson et al 1993, Bernstein 1990)。在滑膜组织局部形成自体相关性 RF 复合物只见于 RA 和其他系统性自身免疫性疾病, 如 Sjogrens 综合征, 系统性红斑狼疮和硬皮病 (Natvig & Munthe 1975, Winchester 1975), 提示一些异常因子或免疫应答加速了 IgG-RF 复合物在这些疾病中的累积。

与绝大多数自身免疫性疾病的情况类似, RA 的始动、致病因子尚未鉴定, 这些研究难以开展, 是因为自身免疫攻击可能在这些疾病临床表现出现前几年就开始了。业已建立的观点是, RA 易感性高与特定 MHC 基因的等位基因相关, 即 DR-1 位点的命名为 Dw4 和 Dw14 的基因 (Nepom 1990)。

RF 在疾病的始动和发病机理中的作用尚不知晓, 而且在 RA 中, RF 是疾病的中心事件还只是继发现象这一问题, 也始终没有答案。在 RA 中, RF 开始形成可能是 IgG Fc 区构型改变的结果 (Johnson et al 1975)。

Parekh et al (1985) 观察到, 在 RA 患者中分离的 IgG 显示了 Fc 段寡糖半乳糖苷化缺陷, 这一发现导致了巨大震撼, 但在 IgG-糖基化状态临床意义的进一步研究中, 却出现了相互矛盾的结果 (Parekh et al. 1988, Tomana et al. 1988)。不仅如此, IgG 半乳糖苷化缺陷还可能是自身免疫性疾病发生的普遍危险因子 (Harris 1993; Pilkington et al. 1995)。

RA 患者关节的免疫组化研究发现, 在类风湿滑膜中, 大量含 IgG 的浆细胞显示 RF 活性 (Munthe & Natvig 1972), 现在认为, RFs 与自体 IgG 反应形成大的自体集合复合物, 这些复合物可能被吞噬, 导致随后溶酶体酶的释放。有几项观察支持在 RA 中免疫激发组织损伤的机制 (Williams 1996; Carson 1993)。

RFs 涉及几种免疫球蛋白类型, IgG 涉及多个抗原决定簇, 这些不均一性也干扰了对这些分子在疾病中作用的精确评价 (Kalsi & Isenberg 1993)。与 RA 相关的 RFs, 与在其他情况下发现的 RF 不同, 它们很显然定向针对 IgG Fc 区 C<sub>H</sub>2 和 C<sub>H</sub>3 功能区的抗原决定簇 (Bonagura et al 1993)。

IgG 包括很多天门冬酰胺和天门冬氨酸 (Asx) 残基, 理论上可以

形成环状酰亚胺（异构化/光学反转）。IgG 的三维结构众所周知，并包括在一项研究人类蛋白 Asx 异构化潜在位点的理论研究中（Clarke 1987）。在假设标准键长和几何学的情况下，Clarke 基于  $\phi$ ,  $\psi$ ,  $\chi$  和  $\chi_2$  两面角，计算了包括人类 IgG 在内的多种蛋白质中骨架氮原子与 Asx 或 Glx 残基侧链  $\gamma$  羰基碳原子的距离。这些理论考虑提示，人类 IgG Fc<sub>3</sub> 区的 Asn-384 仅需要很小的构型变化，就可形成酰亚胺。因此推测，该位点倾向于异构化（Clarke 1987）。此外，Svasti 和 Milstein（1972）的研究显示，鼠 IgG 在 Fc 段的 Asn-Gly 序列存在（Svasti and Milstein 1972）异构化。Asn-384 邻近区是暴露表面，可能会对环境影响特别敏感，促进酰亚胺的形成。

### 自身免疫反应与多发硬化

多发硬化（MS）是中枢神经系统（CNS）白质的炎症性疾病，可以导致区域性脱髓鞘，以及神经功能障碍。MS 的发病机理仍然需要阐释，但相信是由于自身免疫机制导致的髓鞘损伤。

与绝大多数自身免疫性疾病的情况类似，RA 的始动、致病因子尚未鉴定，这些研究难以开展，是因为自身免疫攻击可能在这些疾病临床表现出现前几年就开始了。有几个事件一定在 MS 疾病过程到达病理水平之前就发生了。这些事件包括对正常髓鞘蛋白免疫耐受的崩溃，以及正常存在的血脑屏障的缺陷，正常状态下血脑屏障可以防止 CNS 组分与免疫系统的接触（de Vries et al 1997）。

自身抗原在该病的始动和发病机理方面的作用尚不知晓，而且在 MS 中，自身抗原形成是疾病的中心事件还只是继发现象这一问题，也始终没有答案。在 MS 中，自身抗原开始形成可能是髓鞘蛋白构型变化的结果。

几种髓鞘蛋白业已显示成为自身抗体和自身反应性 T 细胞的作用对象，包括髓鞘碱性蛋白（MBP）和髓鞘少树突细胞糖蛋白（MOG）以及  $\alpha\beta$ -晶状体球蛋白（Martin 1997, Bettadapura et al. 1998, Van Noort et al 1998）。

MBP 是 MS 中自身抗体和自身反应性 T 细胞的作用对象。MBP 的三维结构众所周知（Beniac 1997），该分子包括很多天门冬酰胺和天门冬氨酸残基，理论上可以形成环状酰亚胺（异构化/光学反转）。异构

化/光学反转似乎可以影响该蛋白的抗原性。

MOG 是位于髓鞘外表面的跨膜糖蛋白 (Linington et al. 1984)。由于 MOG 严格定位于髓鞘外表面, 它在 MS 中为自身免疫攻击提供了理想的原发靶抗原, 特别是因为抗 MOG 抗体存在于 CNS, 导致体内、体外的广泛脱髓鞘 (Adelman et al 1995)。MOG 是迄今为止描述的唯一一种髓鞘自身抗原, 能够在 EAE 模型中激发脱髓鞘抗体, 并包括致脑炎 T 细胞抗原决定簇 (Linington et al. 1993)。此外, 业已显示, 在 MS 患者的血液和 CSF 中存在抗 MOG 抗体 (Sun et al. 1991)。而且, Kerlero de Rosbo 及其同事显示, 在 MS 患者群中存在显著的针对 MOG 的 T 细胞应答 (Kerlero de Rosbo et al. 1993)。MOG 仅包括一个光学反转/异构化潜在位点。该位点包括 MOG 的 54-55 残基, 位于该分子暴露部分表面。此外, 该位点属于 MOG<sub>35-55</sub> 序列部分, 业已显示, 该部分具有很强的致脑炎性, 并是 B 细胞、T 细胞应答的强 (最强) 诱导剂 (Ichikawa et al. 1996)。

因此我们认为, MBP,  $\alpha\beta$ -晶状体球蛋白或 MOG 易感位点的潜在异构化在 MS 发病机理中发挥一定作用: 异构化/光学反转通过提供新型免疫原性抗原决定簇而直接涉及 MS 的始动相, 并成为免疫系统体液免疫和细胞免疫的作用对象。

## 20 其他自身免疫性疾病

本发明的基础理论 (即自身蛋白的异构化/光学反转形成了新的不被耐受的抗原决定簇, 导致自身免疫应答) 还可用于其他抗原驱动的自身免疫性疾病, 包括:

## 25 胰岛素依赖性糖尿病 (IDDM)

胰腺朗格罕岛中  $\beta$  细胞由于自身免疫反应而遭到破坏, 导致胰岛素依赖性糖尿病 (IDDM)。在临床症状发生前, 这种破坏作用已持续相当长一段时间 (Gorsuch et al. 1981)。在 IDDM 中, 业已鉴定了多种作为自身抗原的自体蛋白质。

30 在 IDDM 中, 神经内分泌酶谷氨酸脱羧酶 (GAD) 是一种主要的自身抗原 (Bakkeskov et al. 1990)。存在两种异型 GAD, GAD65 和 GAD67, 它们最大的差异存在于 N 末端前 100 个氨基酸中。IDDM 血清

主要与 GAD65 发生反应，但自身抗原决定簇主要位于 GAD65 与 GAD67 高度同源的区域。

业已显示，属于越膜酪氨酸磷酸酶家族的两个密切相关的蛋白 IA2 和 IA2 $\beta$  (Bonifacio et al. 1995, Lu et al. 1996)，也很可能是  
5 IDDM 的自身抗原。IDDM 患者经常显示针对这些蛋白的自身抗体 (Li et al. 1997)。

Glima38 是一种 38kDa 的胰岛细胞膜糖蛋白，也已显示是 IDDM 的一种自身抗原 (Bakkeskov et al. 1982, Aanstoot et al. 1996)。

此外，在至少半数新近确诊的 IDDM 患者中，可以检测到胰岛素自身抗体 (IAA) (Palmer et al 1983)，但是 IAA 的预测能力非常有限 (Dean 1986)。  
10

### 重症肌无力 (MG)

重症肌无力 (MG) 是一种以骨骼肌乙酰胆碱受体 (AChR) 为靶向的器官特异性自身免疫性疾病 (Berrih-Aknin 1995)。因此，绝大多数 MG 患者存在针对 AChR 的自身抗体，从而干扰神经肌肉传导。尽管 AChR 存在于胸腺，但 MG 患者缺乏对该蛋白的耐受。对该观察现象的一种解释是，MG 患者对“改变” (异构化或光学反转) 了的 AChR 产生了免疫应答，这种改变了的 AChR 包括新的抗原决定簇，从而使机体不能耐受。业已描述了几种 AChR 上的 T 细胞抗原决定簇 (Zisman et al. 1996, Yoshikawa et al. 1997, Atassi & Oshima 1997)，其中，AChR<sup>129-145</sup> 包括几个 Asx 和 Glx 残基，具有异构化/光学反转的潜在倾向性。最近，又鉴定了该病的另一种可能自身抗原：Gravin，一种 250kDa 激酶脚手架蛋白 (Nauert et al. 1997)。该蛋白中的相应  
20  
25 Asx 和 Glx 残基倾向于发生异构化/光学反转，诱导自身免疫应答。

### 乳糜泻 (C1D)

乳糜泻 (C1D) 的特征是针对肌内膜的 IgA 自身抗体和 T 细胞介导的对食物中谷蛋白的超敏反应。业已显示，麸朮是谷蛋白的免疫原部分，能够与来自 C1D 患者的 T 细胞克隆发生反应。C1D 患者的肠道炎症  
30 可以通过暴露于饮食中的小麦麸朮而迅速发生，并且与酶组织转谷氨酰胺酶 (TGase) 粘膜活性的增强有关。业已鉴定，该酶 (TGase) 是

在乳糜泻中是自身抗原 (Dieterich et al. 1997)。因此, 98% 的患者有针对 (TGase) 的 IgA 滴度增高, 而 95% 的健康对照组呈阴性 (Dieterich et al. 1998)。

## 5 Chagas 病 (CD)

感染原生动物寄生虫克氏锥虫通常导致慢性心脏、肠道相关性自身免疫性疾病, 称为 Chagas 病 (CD)。这种慢性病的特征是在心肌和神经组织有丰富的炎症浸润。在这些心脏肌球蛋白 (Abel et al. 1997), 毒蕈碱乙酰胆碱受体 (mAChR) (Goin et al. 1997), 以及小核核蛋白 (UsnRNP) (Bach-Elias et al. 1998) 中, 业已鉴定出作为 CD 自身抗原的多种自体蛋白。

## 银屑病 (Ps)

银屑病 (Ps) 是一种表皮慢性增生性疾病, 似乎具有自身免疫特征。该病的典型临床表现是肿胀的炎症性皮肤损伤, 上覆鳞状银屑病。但是疾病表现差异很大, 严重程度各不相同。Ps 患者中有 5-10% 发展为银屑病关节炎, 导致关节炎核损伤。疾病的发病机理仍有争议, 但通过众所周知的免疫抑制剂治疗和 IL-2 毒素 (选择性阻滞激活 T 细胞生长的药物) 治疗的成功, 该病的自身免疫特征已基本证实 (Gottlieb et al. 1995)。有几项研究似乎暗示, T 细胞在该病的发病机理中起一定作用 (Schon et al. 1997)。最近鉴定了一种公认的 200kDa 片状明星 Ps 自身抗原 (Chen et al. 1996)。

## 克隆病 (CrD)

克隆病 (CrD) 是一种肠道的慢性炎症性疾病。最常位于小肠和大肠, 可以导致溃疡, 但 CrD 可以影响消化系统的任何部位。目前 CrD 的致病原因不清, 但疾病似乎具有自身免疫特征, 不过, 目前尚未鉴定任何自身抗原或 T 细胞抗原决定簇。

## 30 发明简述

本发明提供了一种检测方法, 包括对样本进行定量或定性测定, 确定样本中是否存在 (a) 特异性识别抗原决定簇的自身反应性免疫系

统组分，所述抗原决定簇包括异构化肽连接和/或光学反转氨基酸，和/或 (b) 含有所述抗原决定簇的自身抗原或其片段，和/或 (c) 含有所述抗原决定簇并能够诱导自身免疫应答的非自身抗原或其片段。

5 异构化可以发生于天门冬氨酸或天门冬酰胺氨基酸残基或谷氨酸或谷氨酰胺氨基酸残基。

所述免疫系统组分可以是细胞免疫系统组分，如 T 淋巴细胞。

此外，所述免疫系统组分还可以是体液免疫系统组分，如抗体。抗体可以是任何已知的抗体类型，特别是 IgG。

10 所述抗原决定簇可以包括基本上任何蛋白质的氨基酸序列，但涉及一些自身免疫性疾病，抗原决定簇可以是异构化或光学反转 IgG, MOG, MBP 或  $\alpha\beta$ -晶状体球蛋白。涉及其他一些自身免疫性疾病时，抗原决定簇可以在疾病进展过程中形成攻击蛋白的部分。

15 检测所述自身抗体优选是自身免疫性疾病的指标，例如类风湿关节炎，多发硬化，胰岛素依赖性糖尿病，重症肌无力，乳糜泻，Chagas 病，银屑病或克隆病。

所述免疫系统组分可以是针对抗原决定簇的自身抗体，所述抗原决定簇包括在任一序列中含有的氨基酸 \*Asx:

Trp-Leu-\*Asx-Gly-Lys-Glu-Tyr

20 Trp-Glu-Ser-\*Asx-Gly

His-Phe-Phe-Lys-\*Asx-Ile-Val-Thr-Pro

Pro-Ser-\*Asx-Glu-Gly-Lys-Gly-Arg

Ala-Leu-Gly-Ile-Gly-Thr-\*Asx-Ser-Val-Ile

Trp-Ser-Phe-Gly-Ser-Glu-\*Asx-Gly-Ser-Gly-\*Asx-Ser-Glu-Asn

25 Met-Glu-Val-Gly-Trp-Tyr-Arg-Pro-Pro-Phe-Ser-Arg-Val-Val-

His-Leu-Tyr-Arg-\*Asx-Asn-Gly-Lys

Val-Val-His-Phe-Phe-Lys-\*Asx-Ile-Val-Thr-Pro

Ala-Gly-Trp-Leu-\*Asx-Gly-Ser-Val-Arg 或

Gly-Arg-Val-Arg-Val-\*Asx-Ser-Ala-Tyr

30 其中 \*Asx 是在原始序列中通过异构化/光学反转天门冬氨酸或天门冬酰胺残基，形成的  $\alpha D$  型天门冬酰胺或天门冬氨酸，或  $\beta D$  或  $\beta L$  型天门冬氨酸。

所述免疫系统组分可以是针对抗原决定簇的自身抗体，所述抗原决定簇包括在任一序列中含有的氨基酸\*Glx:

Pro-Ser-\*Glx-Gly-Lys-Gly-Arg

Phe-Ser-Trp-Gly-Ala-\*Glx-Gly-Arg 或

5 Asp-Ala-\*Glx-Gly-Thr-Leu-Ser-Lys

其中\*Glx 是在原始序列中通过异构化/光学反转谷氨酸或谷氨酰胺残基，形成的 $\alpha$ D型谷氨酸或谷氨酰胺，或 $\gamma$ L或 $\gamma$ D型谷氨酸。

正在讨论的抗原决定簇可以是 T 细胞抗原决定簇，也可以是 B 细胞抗原决定簇。

10 本发明包括检测自身抗原或片段的方法，包括检测所述自身抗原或片段与免疫结合配体的反应性，所述免疫结合配体可以特异性检测所述抗原中异构化肽连接或光学反转氨基酸的存在。

优选地，所述自身抗原与自身免疫性疾病相关。

15 本发明包括检测可以诱导免疫应答的非自身抗原的方法，所述免疫应答可以与包括异构化或光学反转氨基酸的自身抗原决定簇发生交叉反应。因此，暴露于类似自体蛋白序列的非自身原始序列，可能诱导免疫应答，该免疫应答随后可能以致病方式针对自体蛋白。此外，非自身抗原还可能诱导免疫系统产生诸如炎症反应的应答，导致自体耐受的崩溃，进而产生对其他抗原决定簇的自身免疫反应，所述抗原  
20 决定簇并不存在于激惹非自身抗原上（抗原决定簇泛化）。根据本发明的这一方面，提供了一种检测非自体抗原或其片段的方法，该方法制造一个自身免疫条件，包括检测所述抗原或其片段与免疫结合配体之间的反应性，所述免疫结合配体可以特异性检测所述抗原中异构化  
肽连接或光学反转氨基酸的存在。

25 这些方法可以提供所述探测的自身反应性免疫系统组分或自身抗原或其片段的数量，也可以是纯粹定性的。

30 这些推测的针对异构化发生的免疫应答对于疾病是非常重要的，即它们可能是疾病的始动或致病因子。或者，它们在疾病发展过程中处于次要地位，是疾病发生后其他免疫或细胞过程的结果。在两种情况下，都会涉及免疫系统的体液和细胞免疫。因此，本发明的目标是开发能够检测或定量免疫系统特异性组分（如抗体）存在的诊断试剂，所述特异性组分针对特异性抗原的异构化（和/或光学反转）靶抗原决

定簇，并因此使疾病的诊断和监测变得更加容易。在疾病背景中，尚有争议的免疫应答无论是次要的还是致病的，改变的免疫应答都是诊断相关的。

5 作为本发明特定实施方案的进一步解释，我们在下面描述了特定 IgG 序列异构化在 RA 发病机理中的作用。但是，这并不意味着可以将本发明的范畴限制在不能用于其他自身免疫性疾病，在那些自身免疫性疾病中，关键抗原的异构化或光学反转也会发生，并导致与下述反应相似的反应。

10 如上所述，IgG 的 Asn-384 是异构化的潜在位点 (Clarke 1987)。但是，该残基不是 IgG Fc 区唯一可以发生异构化的表面暴露天门冬酰胺残基。在下述实施例 1 中，给出了直接证据，证明 Asn-315 也可以异构化，该残基也暴露于表面，位于 Fc<sub>2</sub> 区 (Bonagura et al 1993)。

15 Tomiyama et al (1994)发现，依赖 Asx 残基的位置，这些残基的光学反转影响 $\beta$ 淀粉样物质的聚集特性，根据这一发现，不难想象，IgG 异构化/光学反转会改变它的溶解性和亲水性，并诱导 IgG 发生自动聚集。而且，根据我们的发现，异构化/光学反转几乎可以肯定，会影响蛋白质的抗原性。IgG 血液清除减少和/或 IgG 浓度升高的个体，更倾向于发生。使该状况恶化的其他因素，如其他血清蛋白或 IgG 基因等位基因变异体可以降低其溶解性，或增加其聚集力。环境因素也可通过调节免疫系统功能而影响该状况。

20 因此，IgG 易感位点的潜在异构化/光学反转可能通过两种方式在自身免疫性疾病的发病机理中起作用：

25 A) 首先，异构化/光学反转可能通过提供新的免疫抗原决定簇而直接涉及 RA 的始动相，并成为体液免疫系统的作用对象。因此，能够识别异构化或光学反转自身 IgG 的特异性抗体出现，并通过产生大量不溶性免疫复合物在疾病过程中起始动作用，这些免疫复合物在关节的滑膜组织聚集，并激发炎症反应 (Inman & Day 1981)。而且，免疫系统的细胞组分也会针对这一新的抗原决定簇发挥作用，介导 RA 中特征性滑膜组织损伤。

30 B) 此外，RA 中 IgG 的聚集还会降低 IgG 的清除，进而使聚集的 IgG 在迟滞时段内发生功能性异构化/光学反转。尤其是清除率非常低的滑膜液，非常容易成为该过程发生的地点。因此，在这种情况下，

异构化/光学反转就成为与 RA 病程相关的 IgG 聚集的征象，但是，会如上所述，逐渐导致异型 IgG 特异性自身抗体的形成。同样，免疫系统的细胞组分会在此阶段介入。

上面概括的两种假说并非完全互相排斥，而且在两种情况下，识别异构化或光学反转 Asx 或 Glx 残基的自身抗体是疾病的特异性标志。有观点认为，易感天门冬酰胺或天门冬氨酸残基的异构化涉及以产生类风湿因子为特征的自身免疫反应，支持上述观点的观察包括：RFs 识别抗原决定簇位于所有潜在异构化位点存在的和 C<sub>H</sub>3 (Johnson and Page Faulk 1976; Nardella et al. 1981)。有几条证据提示，异常 (非正常) IgG 存在于 RA 中 (Rawson et al. 1969; Watkins et al. 1972; Johnson et al. 1974)。最后，IgG1, 2 和 4 中 C<sub>H</sub>2 区 Asn<sub>315</sub> 以及 C<sub>H</sub>3 区 Asn<sub>384</sub> 周围的空间构型和氨基酸序列非常适于酰亚胺键的形成 (Clarke 1987)，而且潜在的抗原决定簇暴露于表面。

Glant et al 业已报导，软骨聚集蛋白聚糖包括的抗原决定簇可以在鼠中产生自身免疫应答。聚集蛋白聚糖是软骨的糖蛋白组分，我们已经鉴定了其中的潜在异构化/光学反转位点，包括在聚集蛋白聚糖 G-1 功能区的氨基酸序列 Gly-Arg-Val-Arg-Val-Asn-Ser-Ala-Tyr 中。针对该序列定义的异构化和/或光学反转抗原决定簇的自身免疫应答也是本发明的目标。

软骨连接蛋白 (CLP) 在软骨中与聚集蛋白聚糖和 hyaluronan 相关，也已显示与针对该蛋白的自身免疫相关，并在动物模型中可以诱导 RA (Zhang et al 1998)。我们鉴定了作为潜在异构化和/或光学反转位点的序列，Ala-Gly-Trp-Leu-Ala-Asp-Gly-Ser-Val-Arg，可能涉及自身免疫。

通过类比，针对其他关键自身抗原如 MS 中的 MBP 或 MOG、或自身免疫性疾病中更普遍的异构化或光学反转抗原的自身免疫应答，可能在正在讨论的疾病的发病机理方面起相似的作用。

在本发明另一方面，其他自身免疫性疾病的特征在于关键抗原发生异构化或光学反转形式的易感性，并因此产生对于疾病来说首要或次要的免疫应答。因此，本发明并不限于只针对 RA 或 MS 的诊断试剂，还可以广泛用于其他自身免疫性疾病。

为了实施本发明，如果已知靶抗原，可以通过下述一个或多个步

骤，鉴定自身免疫性疾病中靶自身抗原关键抗原决定簇的异构化/光学反转。

如果靶抗原的三维结构已知，就可以鉴定其潜在异构化/光学反转位点（如，Asx-Gly序列）。它们理论上形成异构化/光学反转的倾向性可以基于两面角  $\phi$ ,  $\psi$ ,  $\chi$  和  $\chi_2$  的计算、以及含有 $\beta$ 羧基的氨基酸侧链弹性来评价（Clarke 1987）。而且，还可以评价潜在变化的残基是否暴露于表面，并能为自身抗体接近。一个非常重要的参数是该蛋白质的半衰期，因为只有具有相对较长半衰期（超过10天）的蛋白质才会发生程度显著的异构化和/或光学反转。

应该指出，本发明还可用于检测对含有\*Asx或\*Glx的抗原决定簇具有特异性的免疫系统组分，即使这种正在讨论的变化蛋白不是正在讨论的疾病的致病因素，并且自身反应性免疫系统组分只是一种症状，而非致病原因。在这些情况下，识别自身反应性组分的存在对于首次诊断和治疗监测具有价值不菲的诊断意义。

本发明还包括在自身抗原上定位一个或多个抗原决定簇的方法，包括应用L异构型天冬氨酰（D-天冬氨酰）甲基转移酶（IAMT）-EC 2.2.2.77以及标记甲基，将所述标记甲基引入到所述自身抗原的一个或多个异构化或D型天门冬氨酸中，并测定该自身抗原中引入标记甲基的至少一个位点，然后建立包括该位点区域的自身抗原氨基酸序列，并检测所述氨基酸序列肽在所述部位整合了异构化或光学反转氨基酸后，与自身反应性免疫系统组分如自身抗体的免疫反应性。

因此，感兴趣靶抗原（如I型糖尿病中的谷氨酸脱羧酶，多发硬化中的髓鞘碱性蛋白或MOG，或类风湿关节炎中的IgG）可以通过酶IAMT来分析。该酶识别 $\alpha$ D型或 $\beta$ L型Asx（但不识别 $\beta$ D型天门冬氨酸，也不识别改变的Glx），即该酶识别特定异构化或光学反转的天门冬氨酸和天门冬酰胺残基，并使 $\alpha$ 羧基甲基化。通过应用放射活性元素标记的甲基供体，与该酶共同孵育的异构化蛋白质或肽也将被放射活性元素标记，蛋白的标记可以通过测定整体放射活性来检验。

异构化位点的位置可以通过下述方法鉴定，该方法包括应用化学或蛋白水解法将感兴趣抗原分解为片段，然后应用已知的层析法纯化产生的抗原片段，再通过IAMT法分析这些片段。将通过IAMT法鉴定含有异构化序列的片段进行氨基酸排序和氨基酸分析，以明确它们在

靶抗原中的确切位置。

应用 IAMT 或其他本文描述的方法鉴定的相关异构化序列包括：

来自 IgG:

(RA)

5 Asn-315: Trp-Leu-\*Asx-Gly-Lys-Glu-Tyr, His-Gln-Asp-Trp-Leu-\*Asx-Gly, His-Gln-Asp-Trp-Leu-\*Asx-Gly-Lys-Glu-Tyr.

Asn-384: Trp-Glu-Ser-\*Asx-Gly-Gln-Pro-Glu, Val-Glu-Trp-Glu-Ser-\*Asx-Gly, Val-Glu-Trp-Glu-Ser-\*Asx-Gly-Gln-Pro-Glu.

来自 MBP:

10 (MS)

Asn-92: His-Phe-Phe-Lys-\*Asx-Ile-Val-Thr-Pro

Gln-103: Pro-Ser-\*Glx-Gly-Lys-Gly-Arg

Gln-119: Phe-Ser-Trp-Gly-Ala-\*Glx-Gly-Arg

Gln-143: Asp-Ala-\*Glx-Gly-Thr-Leu-Ser-Lys

15 来自 MOG:

(MS)

Asn-53: Met-Glu-Val-Gly-Trp-Tyr-Arg-Pro-Pro-Phe-Ser-Arg-Val-Val-His-Leu-Tyr-Arg-\*Asx-Gly-Lys

来自 GAD<sub>65</sub>:

20 (I 型糖尿病)

Asp-297: Ala-Leu-Gly-Ile-Gly-Thr-\*Asx-Ser-Val-Ile

Asp-15 & 19: Trp-Ser-Phe-Gly-Ser-Glu-\*Asx-Gly-Ser-Gly-\*Asx-Ser-Glu-Asn

25 其中, \*Asx 是通过光学反转/异构化天门冬氨酸或天门冬酰胺形成的  $\alpha$ D 型天门冬氨酸或天门冬酰胺, 或  $\beta$ D 型或  $\beta$ L 型天门冬氨酸。\*Glx 是通过光学反转/异构化谷氨酸或谷氨酰胺形成的  $\alpha$ D 型谷氨酸或谷氨酰胺, 或  $\gamma$ D 型或  $\gamma$ L 型谷氨酸。

30 在本发明范畴内还包括含有任一这些氨基酸序列的抗原决定簇的肽。本发明还包括其他肽, 所述肽含有应用 L 异型天冬氨酰 (D-天冬氨酰) 甲基转移酶 (IAMT) 定位的包括异构化或光学反转氨基酸的抗原决定簇。

如果感兴趣自身免疫性疾病的自身抗原尚未鉴定，就需要分析自身免疫损伤的靶组织或器官。如上所述，溶解并蛋白水解该组织，然后通过层析法或其他技术纯化产生的肽，随后应用 IAMT 法鉴定异构化/光学反转片段。这些片段再应用氨基酸排序、氨基酸分析、质谱和其他相关方法进行鉴定。

### 检测针对异构化或光学反转抗原决定簇的自身抗体

可以通过下述方法检测来自患者或动物研究对象的自身抗体，所述抗体能够识别关键自身抗原中主要抗原决定簇的异构化/光学反转的肽序列。

通常，可以采用很多已知形式和过程的免疫方法，包括 ELISA, RIA, 异源和同源法。以举例的方式，可以将合成的异构化或光学反转肽、或含有感兴趣抗原决定簇的真实抗原的蛋白水解片段包被到微量滴定板 (MTP) 的固态相上，或者与载体蛋白 (如甲状腺球蛋白或血清白蛋白) 结合或通过生物素结合进而与链霉亲和素包被的 MTP 表面结合。然后通过 MTP 孔中添加适宜稀释于实验缓冲液中的血清样本鉴定反应性自身抗体，在孔中它们可以与固定的含有抗原决定簇的物质结合。结合抗体的数量可以通过应用二级酶联抗人抗体、然后应用生色酶底物来量化。在该实验系统中必须小心，使由于吸附到 MTP 表面的 IgG 或其他血清组分而引起的非特异性反应最小化。

此外，正在讨论的抗原决定簇还可导致其他抗体的产生，这些抗体也可以固定在 MTP 表面。然后将含有正在讨论的异构化抗原决定簇的合成肽、或者含有靶抗原决定簇的真实抗原的蛋白水解片段连接到诸如过氧化物酶或碱性磷酸酶的酶上，或应用诸如生物素或地高辛配体的配体标记。然后将该试剂加入适宜的稀释剂中，与血清样本一起加入滴定板孔中。血清样本中能够与靶抗原决定簇反应的自身抗体可以阻断抗原决定簇与包被在 MTP 表面的抗体的结合，进而导致信号的减弱，该信号是在随后加入生色酶底物或链霉亲和素结合检测试剂后产生的。该信号可以量化，并用来评价研究样本中自身抗原的数量。

可以应用 MTP 平板进行另一种竞争性实验形式，所述平板包被了含有正在讨论的抗原决定簇的合成或真实肽或肽片段，如上所述，该

实验应用正在讨论的抗原决定簇导致的非人抗体。该肽可以直接包被到 MTP 表面上，或者与载体蛋白（如甲状腺球蛋白或血清白蛋白）结合或通过与生物素结合进而与链霉亲和素包被的表面结合。在 MTP 中孵育适宜稀释于实验缓冲液中的人血清样本，随后或同时加入正在讨论的抗原决定簇产生的抗体。血清样本中含有的能够与正在讨论的抗原决定簇发生反应的自身抗体可以与 MTP 表面上的抗原决定簇反应，从而取代其他抗体的结合。通过应用与非人抗体特异性反应的酶标二抗，在与生色酶底物孵育后，可以量化结合人抗体的数量，所述非人抗体是正在讨论的抗原决定簇产生的。染色的量与结合人自身抗体的量成反比。

同源实验形式还可以通过如下步骤进行，包括将适宜稀释的人血清样本与含有正在讨论的抗原决定簇的生物素结合肽、以及与适宜酶或放射活性分子如  $^{125}\text{I}$  共价标记的链霉亲和素孵育。人血清样本中存在的自身抗体可以与链霉亲和素分子上的靶抗原决定簇结合，然后应用蛋白 A 琼脂糖或其他沉淀试剂或人 IgG 特异性固相使之沉淀。在酶标链霉亲和素的情况下，结合抗体的量可以应用生色酶底物来定量，在放射同位素标记链霉亲和素的情况下，结合抗体的量可以应用闪烁计数来定量。

#### 20 检测对异构化/光学反转自身抗原的细胞免疫反应性

为了帮助疾病确诊，协助治疗选择，监测并计算患者预后，对新确诊的自身免疫性疾病患者进行体外自身免疫应答研究是非常必要的。确定涉及自身免疫应答的免疫系统分子组分间的相互作用对于勾勒疾病特征、评价抗原和细胞免疫在疾病发展过程中的重要性也是非常必要的。上面的段落阐述了对  $\beta\text{L}$  型、 $\alpha\text{D}$  型或  $\beta\text{D}$  型 Asx 残基（以及  $\gamma\text{L}$  型或  $\gamma\text{D}$  型 G1x 残基）靶抗原决定簇产生体液反应的分析。但是，为了监测疾病，针对变化的自身蛋白产生的细胞免疫应答可能同等/更重要。绝大多数自身免疫性疾病涉及免疫系统的细胞成分，包括在 RA 和 MS 中，T 细胞作为组织损失的主要介质被提及。为了确定免疫应答是主要的还是次要的，必须测定免疫系统细胞成分的作用对象。

T 细胞介导的自身免疫可以通过几种方法进行检测，如：T 细胞增殖法，ELISPOT 法，有限稀释法，或  $^{51}\text{Cr}$  释放法（对这些方法的总体

认识, 请见 C. A. Janeway & P. Travers (1997) )。下面给出了一些方法的简短概述, 可以用来研究针对异构化和/或光学反转抗原的细胞免疫应答:

## 5 T 细胞增殖法

T 细胞对抗原的特异反应性可以通过淋巴细胞增殖法测定, 所述 T 细胞分离自自身免疫性疾病患者的外周血或受累靶器官 (即 RA 患者的滑膜液/组织, 或 MS 患者的 CNS), 或者分离自自身免疫性疾病动物模型。将淋巴细胞置于适宜的细胞培养基中培养, 所述培养基中含有  $\beta$ L 型、 $\alpha$ D 型或  $\beta$ D 型的特异性抗原/抗原片段, 或者含有不相关对照抗原或根本不含抗原。将  $^3\text{H}$ -胸腺嘧啶脱氧核苷加入培养基中, 在抗原刺激下活跃分裂的淋巴细胞能够把标记的胸腺嘧啶脱氧核苷整合到 DNA 中。通过定量整合到 DNA 中的  $^3\text{H}$ -胸腺嘧啶脱氧核苷的量, 可以评价淋巴细胞对不同形式的自身抗原或自身抗原衍生性抗原决定簇的增殖反应 (Weir 1996)。抗原特异性增殖是  $\text{CD4}^+$  T 细胞特异性反应的特点。

## 有限稀释法

为了获得针对给定  $\beta$ L 型、 $\alpha$ D 型或  $\beta$ D 型 (或  $\gamma$ L 型或  $\gamma$ D 型) 自身抗原或其抗原决定簇的细胞免疫反应“滴度”的信息, 可以进行有限稀释法。该方法包括将不同数量的淋巴样细胞 (即取自外周血的细胞) 以及刺激性抗原、抗原提呈细胞或特异性生长因子加入单独的培养孔中。几天后, 检测每孔针对抗原的特异性反应, 如靶细胞的细胞毒杀伤作用或特异性增殖。含有特异性 T 细胞的孔会对其作用对象产生反应, 从 Poisson 分布曲线可以得到, 对于给定稀释度的 T 细胞, 如果 37% 的孔呈阴性, 那么在培养开始时, 每孔平均包括一个特异性 T 细胞。通过比较对照个体以及对异构化和/或外消旋性抗原显示自身免疫反应性的个体 (即 RA 或 MS 患者), 可以在两个群体间评估 T 细胞滴度的差异, 并将此差异作为衡量自身反应性细胞的抗原特异性扩张的标准, 业已显示, 这种自身反应性细胞针对抗原的特异性扩张可能在罹患自身免疫性疾病的个体中发生。

## ELISPOT 法

ELISPOT 法可以作为一种敏感方法，用来从（即）外周血样本中定量单独的淋巴细胞，所述淋巴细胞可以产生特异性抗体（B 细胞）或细胞因子，其特征是刺激抗原特异性 T 细胞。ELISPOT 法通过培养淋巴细胞进行，所述淋巴细胞分离自自身免疫性疾病患者的外周血或受累靶器官（即 RA 患者的滑膜液/组织，或 MS 患者的 CNS），或者分离自自身免疫性疾病动物模型。ELISPOT 法通过在硝酸纤维素薄膜或其他固体表面上的适宜培养基中培养淋巴细胞进行，所述其他固体表面能够保留淋巴细胞分泌的蛋白质和肽（Ronnelid & Klareskog, 1997）。如果在培养基中添加给定抗原，将会刺激特异性针对该抗原或其抗原决定簇的淋巴细胞分泌特征性淋巴因子（即 $\gamma$ -干扰素，白细胞介素 2 或白细胞介素 4）（Weir 1996, Okamoto et al 1998）。培养一段时间后，将细胞从薄膜上洗脱，然后应用特异性试剂（即抗体）检测细胞产生的淋巴因子。通过量化产生某一给定淋巴因子的细胞数量，以及产生的淋巴因子的类型，可以评价针对刺激抗原发生的反应，并了解反应特征。

本发明还应用下面的实施例来描述、举例，在实施例中，还要参考附图，附图内容见下：

图 1: (A) 显示了实施例 1 获得的结果，结果来自于胃蛋白酶降解人 IgG 的首次（片段）大小排除层析，以图的形式显示了洗脱物质的 OD280nm 吸收值，以及收集部分的 IAMT 反应性。(B) 显示了通过（片段）大小排除层析分离的胃蛋白酶降解 IgG 不同部分的特异性异构化程度；

图 2: 显示了实施例 1 获得的结果，将通过（片段）大小排除层析分离获得的低分子量 IgG 片段在阴离子交换柱上进一步分离。收集的部分池在进一步纯化后，以 a, b, c 和 d 表示；

图 3: 显示了图 2 所示的阴离子交换纯化 IgG 肽“b 池”肽进行 RP-HPLC 分离的结果。描绘了以下方面：UV 214 nm, 荧光(380/297 nm), 乙腈梯度和 IAMT 反应性；

图 4: 显示了图 3 纯化后 b 池进行第二轮 RP-HPLC 纯化的结果。图示了洗脱物质的 UV 214 nm 探测信号和 IAMT 反应性；

图 5 显示了实施例 2 获得的结果，以图的形式显示了 3 名患者组

血清样本应用 ELISA 法检测获得的信号；

图 6 显示了实施例 3 获得的结果，以条形图的形式显示了在竞争性肽存在的情况下，检测的 6 个血清样本的 ELISA 信号；

图 7: 显示了实施例 4 获得的结果，以图的形式显示了 RA 患者和  
5 健康对照样本在同源 RIA 法中获得的信号（以 CPM 为单位）；

图 8: 显示了实施例 4 获得的结果，以条形图的形式显示了在竞争性肽存在的情况下，获得的以抑制百分比表示的 RIA 信号；以及

图 9: 以散点图的形式显示了实施例 6 获得的结果，包括 A, B 和  
C。

10

### 实施例 1: 鉴定异构化易感的 IgG Fc 区 Asn-315

根据以下方法，应用胃蛋白酶消化人 IgG (Sigma cat no. I-4506)：根据生产厂商 (Pierce) 描述的步骤，应用固定的胃蛋白酶 (Pierce Cat. No. 20343) 进行消化。简而言之，将 0.125ml 的固定胃蛋白酶凝胶加入实验试管，在 0.5ml 消化缓冲液 (20 mM 醋酸钠缓冲液，pH 4.5) 中平衡。将 10 mg 纯品冻干 IgG 加入 1.0 ml 消化缓冲液中，混合物在 37°C 孵育 4 小时。通过向孵育混合物中加入 pH 7.5 的 1.5 ml 10mM Tris HCl 终止消化。然后通过离心 (1000g, 5 分钟)，从固定胃蛋白酶凝胶中分离 IgG 片段，移去含有片段的上清。  
15

通过在 Superdex 75 HR10/30 柱 (Pharmacia, Sweden) 上进行凝胶过滤，将 IgG 片段与未消化的 IgG 分离。应用 pH 8.0 的 0.2M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ，以 28 ml/h 的速度平衡柱 (2.6 × 72cm (总体积 360mL))。装载 2.75 ml 样本，收集 0.25 ml 部分。柱应用下述 Mw 标记混合物进行校准，从而可以测定洗脱部分的大小：白蛋白 (67kDa)，卵白蛋白 (43 kDa)，糜蛋白酶原 A (25 kDa)，核糖核酸酶 A (13.7 kDa) 和 Aprotinin (6.5 kDa)。从 IgG Fc 部分衍生的低分子量 (分子量小于 10 kDa) IgG 片段出现在洗脱体积 22 - 28ml (44 - 56 部分, 图 1)。  
20

将这些部分的等分试样再次溶解于磷酸盐缓冲盐溶液 (PBS) 中，然后通过酶法应用 L 异构型天冬氨酸 (D-天冬氨酸) 甲基转移酶 (IAMT) 分析异构化或光学反转 Asx 残基的存在。简而言之，该方法就是通过 IAMT 酶，应用放射活性元素 (氘) 标记的蛋氨酸探测异构化残基。该方法以下述方式进行：  
25  
30

在 600ul Eppendorf 管中加入下述试剂：含有 IAMT 活性的 15ul 牛红细胞裂解液（根据 Murray and Clarke 1984 制备），10ul 实验缓冲液（0.25M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$  pH 7.02），15ul 样本（或已知浓度的合成异构化肽溶液校准品），以及 10ul SAM 示踪剂（如下制备：将 5 3ml 冷 SAM 加入 26.1 ml 新鲜制备的 10mM HCl 中。再将 100ul “热 SAM”（Amersham TRA236, 1000  $\mu\text{mol/L}$ ）加入 20ml 上述溶液中，然后以 1ml 等分储存于  $-18^\circ\text{C}$ ）。将混合物旋转混和后，在  $37^\circ\text{C}$ （水浴）孵育小管  $60\pm 1$  分钟。加入 50 ul Quenching 溶液（0.2 M NaOH, 1% 十二烷基硫酸钠）终止反应，然后再混和。将 75ul 该溶液加到滤纸上（0.75 10  $\times 5.5$  cm, 预先折成“手风琴摺样”）。将滤纸置于含有 2.5 ml Ecoscint H 闪烁液的 6ml 闪烁管中（在管中大约半浸 1.5cm）。闪烁管在室温下放置大约 18 小时（过夜），这样，放射性甲醇可以扩散到闪烁液中。移去滤纸条，在下述终止条件下应用  $\beta$  计数器给小管计数：900 sec., 或最大 6400 CPM。可以应用标准曲线计算未知样本浓度，所述标准曲线通过测定已知浓度的合成异构肽校准品制备。 15

这些测定显示，胃蛋白酶降解 IgG 的低分子量部分具有高度 IAMT 活性，显然含有完整 IgG 分子的大部分异构化位点（44 - 56 部分，图 1）。这些部分通过反相高效液相层析（RP-HPLC）进一步纯化。

收集经（片段）大小排除层析柱处理的含有 IAMT 反应肽（44 - 56 20 部分）的部分，将体积调整至 9.5 ml，然后加入 20 ul TFA。Sep-Pak C18 柱（3cc, 500 mg, Waters）应用 10 ml 80% 甲醇条件化，再应用 10 ml 0.2% TFA 平衡。将样本装柱，应用 20 ml 1% TFA 洗柱。最后，应用 10 ml 40% 乙腈，0.1% TFA 洗脱结合肽。收集洗脱液，冷冻并冻干。将洗脱液再次溶解于 pH 7.88 的 2 ml 20mM Tris 缓冲液中。将 25 100 ul 该溶液储存，用于测定 IAMT 活性，其余的（1900 ul）用于离子交换层析。

应用 1 ml mono-Q HR 5/5 柱（Pharmacia 52-1622-00）进行阴离子交换层析。该柱用 pH 7.88 的 20mM Tris 以 1ml/min 的流速平衡。样本通过手工注射器环装载，然后应用线性梯度的 NaCl（0.0 - 0.3M NaCl, 共进行 30 分钟）洗柱。然后应用 0.3 - 1M 的线性梯度 NaCl 洗脱 1 分钟。应用 1M 的 NaCl 持续洗脱 1 分钟，最后应用 1 - 0M 的线性梯度 NaCl 洗脱 1 分钟。应用该缓冲液持续洗脱 2 分钟。应用 280 nm 30

处的 UV 吸收值检测洗脱肽，收集 0.5 ml 部分（30 秒）。应用 IAMT 法分析这些部分的等分试样，结果在图 2 给出。集中收集 4 - 6 部分是 a，集中收集 25 - 27 部分是 b，集中收集 29 - 31 部分是 c，储存以备进一步分析。

5 如上所述，应用 Sep-Pak C18 柱缓冲交换集中收集的部分，然后再溶解于 200  $\mu$ l 0.1% w/w 三氟醋酸（TFA）中，并通过 RP-HPLC 进一步纯化。第一轮 RP-HPLC 在 C-18 柱（Nova-Pak C-18 4  $\mu$ m 3.9  $\times$  150 mm HPLC 柱，Waters）上进行，应用 0 - 40% 的线形梯度乙腈以 1 ml/min 的流速洗脱 40 分钟，所述乙腈溶解于 0.1%（w/w）三氟醋酸  
10 （TFA）中。通过在 214 nm 处的 UV 吸收值、以及荧光（在 380 nm（发射），应用 297 nm 光激发）检测洗脱肽，收集 0.5 ml 部分（30 秒），并冻干，以备 IAMT 法分析。

对于从阴离子交换柱获得的“a”池，绝大多数 IAMT 反应性物质是在 22 - 23.5 分钟洗脱的（图 3）。集中收集这些部分，如上所述，  
15 应用 Sep-Pak C-18 柱浓缩这些部分中的肽。样本再次溶解于 200  $\mu$ l 0.05% 七氟丁酸（HFBA）中。该样本在相同的柱上进行第二轮 RP-HPLC，进一步纯化，但这一次应用溶解于 0.05% 七氟丁酸（HFBA）中的 5 - 30% 的线形梯度乙腈，洗脱 80 分钟，然后收集 0.5 ml 部分。该部分  
20 通过在 214 nm 处的 UV 吸收值、以及荧光（在 380 nm（发射），应用 297 nm 光激发）监测，并将冻干的该部分再次溶解，进行 IAMT 法分析。

从图 4 可以很明显地看出，从阴离子交换柱获得的“b”池（图 2）经第二轮 HPLC 纯化，获得的一个主峰包括绝大部分异构化 Asx 残基（图 4）。根据生产厂商的说明书，应用 Applied Biosystems model 477A  
25 序列分析仪对含有该峰的部分进行氨基酸序列分析。推导出下列序列：

“b 池”：His-Gln-Asp-Trp-Leu

“c 池”：Thr-Val (Leu/Val) His-Gln-Asp-Trp-Leu-Asp-Gly-Lys-Glu-Tyr-Lys-Cys-Lys-Val-Ser-Asn-Lys (Ala/Gly) Leu-Pro

30 C<sub>n</sub>2； Thr-Val (Leu/Val) His-Gln-Asp-Trp-Leu-Asn-Gly-Lys-Glu-Tyr-Lys-Cys-Lys-Val-Ser-Asn-Lys (Ala/Gly) Leu-Pro (Ala/Ser) (Pro/Ser) Ile-Glu-Lys-Thr-Ile-Ser-Lys (Ala/Thr) Lys

因此，分离的异构化肽来自 C<sub>H</sub>2 区，但通过胃蛋白酶降解，产生不同的长度。C<sub>H</sub>2 区的公开序列如上，很显然，所有三个肽都与该序列匹配。以黑体给出的天门冬酰胺残基就是 Asn-315。残基 308 在 IgG<sub>2</sub> 中是缬氨酸，在其他 IgG 亚类中是亮氨酸。以斜体给出的“c 池”肽序列是从氨基酸分析推出的（见后）。根据该残基与随后甘氨酸之间的肽键，重排后从  $\alpha$  羧基变为  $\beta$  羧基，给出的残基 315 是天冬氨酸，而非天门冬酰胺。

所有的分离肽应用异构天冬氨酸特异性 IAMT 酶识别，它们的序列都不超过 Asn-315 残基 N 末端的亮氨酸残基。这一点强烈提示，Asn-315 残基发生了异构化反应，因此，侧链肽键重排，从正常的  $\alpha$  羧基变为  $\beta$  羧基，并伴随氨基的水解消失。肽序列分析不能超过 315 残基与以前的结果一致，说明异构化反应导致通过正常 Edman 降解法进行的肽序列分析，不能超过易感位点 (Fledelius et al 1997)。

#### 15 实施例 2: 检测与 Asn-315 具有反应性的自身抗体

发明人员研究了自身抗体是否能够识别 Asn-315 衍生的区隔肽，以及这种自身抗体是否具有类风湿关节炎的特性。为了进行此项研究，人工合成了 IgG Fc Asn-315 衍生的 ( $\beta$ L) 区隔肽，Trp-Leu-Asp- $\beta$ -Gly-Lys-Glu-Tyr。所用的肽是线性 ( $\alpha$ L 型) 肽制剂 Trp-Leu-Asn-Gly-Lys-Glu-Tyr，通过下述步骤经加热促进异构化产生。将该肽溶解于缓冲液中，90℃ 加热 4 小时，促进异构化和/或光学反转产生。获得的异构化 ( $\beta$ L)、光学反转 ( $\alpha$ D 和  $\beta$ D) 和线性 ( $\alpha$ L) 肽混合物经 RP-HPLC 分析，在 RP-HPLC 中，应用溶解于 0.1% TFA 的 15-35% 的梯度乙腈以 1 ml/min 流速洗脱 10 分钟，然后如上所述，应用氨基酸分析研究获得峰的异构化状态。该肽以 5 mg/ml 溶解于 pH 9.2 的 0.2 M 磷酸钠中。通过下述方法，应用戊二醛 (GA) (Fluka 49626 lot 43381/1) 使该肽与胸腺球蛋白 (Sigma lot 66H7085) 结合。

溶解于 pH 8.0 的 0.1 M 磷酸钠缓冲液中的胸腺球蛋白 (30 mg/ml) 0.5 ml，在持续混匀的情况下，逐滴 (持续 2 分钟) 加入 0.5 ml 下述溶液中：10% GA，40% H<sub>2</sub>O，50% pH 8.0 的 0.2 M 磷酸钠。容器在室温持续混匀的情况下孵育过夜。通过凝胶过滤 (NAP-10 柱，Pharmacia) 去除多余的 GA，缓冲液换成 PBS。终体积调整至 1.5 ml (每

种制剂载体蛋白 10 mg/ml)。500 u1 载体蛋白与 500 u1 5mg/ml 的肽溶液孵育。容器在室温持续混匀的情况下孵育 24 小时。多余的肽通过凝胶过滤 (NAP-10 柱, Pharmacia) 转移到 PBS 缓冲液中。终体积调整至 1500 u1, 应用 BioRad 蛋白法, 根据生产厂商的使用说明, 测定蛋白浓度。

将 Thy-GA- Trp-Leu-\*Asx-Gly-Lys-Glu-Tyr 结合体溶解于 PBS, 终浓度为 10 ug/ml, 并将 100 u1 该溶液移加到微量滴定板 (MTP, 平底, 有机聚合物担体, Nunc) 的孔中。如述 (Bonde et al 1994) 封闭平板, 加入在下述溶液中稀释 100 倍的血清样本: 10 mM 磷酸钠、140 mM NaCl、0.1% tween-20、1% BSA pH 7.4 (实验缓冲液)。在 20℃ 旋转混和器上放置 MTP 1 小时±5 分钟。通过手工平板清洗器, 应用清洗缓冲液 (25 mM tris, 140 mM NaCl, 0.1% tween-20, pH 7.4) 洗板 5 次。每孔加入 100 u1 实验缓冲液, 所述缓冲液中含有 1000 倍稀释的过氧化物酶结合的兔抗人 λ 链 (Dako 063) 和 κ 链 (Dako 013)。在 20℃ 旋转混和器上再次孵育 MTP 1 小时±5 分钟。清洗 5 次后, 加入 100 u1 过氧化物酶底物 (3, 3', 5, 5' 四甲对二氨基联苯二盐酸 (TMB), Kirkegaard & Perry Laboratories, USA), 室温下 (18 - 22℃) 避光孵育 15±2 分钟。加入 0.18 M 硫酸后, 在 450 nm 处测定吸收值。

在比较类风湿因子阳性的 RA 血清、类风湿因子阴性的 RA 血清和对照血清时发现, RA RF+ 患者较其他两组反应性显著升高 (图 5)。在应用其他不相关 Thy-GA 结合体 (Thy-GA-Glu-Lys-Ala-His-\*Asx-Gly-Gly- Arg) 进行的平行实验中, 虽然遵循相同的实验步骤, 但结果发现, 两组间没有差异。该实验说明, 在 RF 阳性的 RA 患者中, 针对 IgG Fc Asn-315 衍生序列 Trp-Leu-\*Asx-Gly-Lys-Glu-Tyr 的自身抗体反应性, 存在升高现象。

### 实施例 3: 识别异构化 Asn-315 的特异性自身抗体与合成肽的竞争性结合

如上所述, RA 自身抗体与 Thy-GA-Trp-Leu-\*Asx-Gly-Lys-Glu-Tyr 包被平板之间的结合, 可以通过如下方法而被竞争性抑制, 即应用溶液中含有 Trp-Leu-\*Asx-Gly-Lys-Glu-Tyr 肽的血清预孵育平板。该实验如下进行。血清样本在 10 mM 磷酸钠、140 mM NaCl、0.1%

tween-20、1% BSA pH 7.4 (实验缓冲液) 中稀释 100 倍。将 200  $\mu$ l 加入 1.5 ml 聚丙烯试管中, 然后再加入 50  $\mu$ l 溶解于实验缓冲液中的浓度为 50  $\mu$ g/ml 的下述试剂:

- 5 1. Trp-Leu-Asp- $\beta$ -Gly-Lys-Glu-Tyr ( $\beta$ L 型抗原决定簇)
2. Trp-Leu-Asn-Gly-Lys-Glu-Tyr ( $\alpha$ L 型抗原决定簇)
3. Thy-GA-Trp-Leu-\*Asx-Gly-Lys-Glu-Tyr 结合体 (如实施例 2 所述制备)。
4. 单独的实验缓冲液。

10

试管置于 4 $^{\circ}$ C 17 小时, 然后将 100  $\mu$ l 混合物加入包被有 Thy-GA-Trp-Leu-\*Asx-Gly-Lys-Glu-Tyr 结合体的 MTP。在如上实施例 2 所述条件下, 进行实验。

15 结果如图 6 所示。很显然, 异构化肽 (1) 以及 Thy-GA-Trp-Leu-\*Asx-Gly-Lys-Glu-Tyr 结合体 (3) 能够与 6 份 RA 分析血清竞争性结合。该研究强烈提示, RA 患者中能够识别残基 315 周围 7 个氨基酸抗原决定簇的自身抗体, 是主要的异构型 ( $\beta$ L) 抗原决定簇的特异性抗体。

#### 20 实施例 4: 同源放免法评价与异构化 IgG Fc Asn-315 衍生肽具有反应性的自身抗体的检测

为了测定与 IgG C<sub>H</sub>2 区衍生的异构型抗原决定簇 Trp-Leu-Asn-Gly-Lys-Glu-Tyr 具有反应性的自身抗体, 发展了同源 RIA 法。该方法包括以下步骤: 将血清样本与  $^{125}$ I Thy-GA-Trp-Leu-\*Asx-Gly-Lys-Glu-Tyr 孵育过夜, 然后应用蛋白 A 琼脂糖凝胶沉淀免疫复合物。

25 血清样本在 IMP 缓冲液中以 1: 200 稀释 (IMP 缓冲液: 10 mM 磷酸钠, pH 7.4, 140 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, 0.1% BSA, 10  $\mu$ g/ml 大豆胰蛋白酶抑制剂)。如实施例 2 所述制备 Thy-GA-Trp-Leu-\*Asx-Gly-Lys-Glu-Tyr 结合体, 根据氯胺 T 方法应用  $^{125}$ I 碘化所述结合体: 在 0.25 M 磷酸钠溶液中稀释 100  $\mu$ g 结合体, 30 至总体积 140  $\mu$ l。加入 1.5 mCi 的 Na $^{125}$ I, 随后再加入 10  $\mu$ l 氯胺 T (1 mg/ml, 新鲜制备)。旋转混和该溶液 30 秒, 加入 150  $\mu$ l 蛋氨酸

(1 mg/ml), 立即旋转混和 120 秒。在 (片段) 大小排除柱 (类型: BIOSEP SEC S-2000, 大小: 300 × 7.80 mm) 上纯化示踪剂, 所述柱应用含有 1% BSA 的 PBS 以流速 1.0 ml/min 平衡。收集 500 u1 部分, 在闪烁计数器 ( $\gamma$  计数器) 上分析。收集含有示踪剂的部分, 用于同源 RIA 法分析。

在 IMP 缓冲液中稀释  $^{125}\text{I}$  Thy-GA-Trp-Leu-\*Asx-Gly-Lys-Glu-Tyr 示踪剂, 在密封的聚丙烯试管中, 将 75 u1 200 倍稀释的血清样本与 25 u1 肽/链霉亲和素溶液混和。试管在 4℃ 孵育过夜 (16 - 18 小时)。称量蛋白 A 琼脂糖 (PAS) (20 u1/样本试管), 并用 10 ml IMP 清洗缓冲液清洗 3 次, 然后应用转发移液枪将其转移到 1.5 ml Eppendorf 管中。1000 RPM 离心 2 分钟, 沉淀 PAS, 用吸液长颈瓶或移液枪吸取上清。抗体/抗原溶液孵育 3 小时后, 转移到 PAS 沉淀上, 在摇动台上室温再孵育 30 分钟。1000 RPM 离心 2 分钟, 沉淀 PAS。应用 750 u1 IMP 清洗缓冲液清洗 PAS 沉淀 5 次。每次清洗后, 都应用 1000 RPM 离心 2 分钟, 沉淀 PAS, 用吸液长颈瓶或移液枪吸取上清。最后, 在 milli-Q 水中再悬 PAS 沉淀至 100 u1 悬液, 转移到 4 ml 聚丙烯试管中, 应用  $\gamma$  计数器计数。如上异源 ELISA 法所述, 应用无意肽进行对照实验。

根据该方法进行实验, 血清可以获得高特异性信号。在分组基础上, RF+ RA 患者较对照个体的血清样本反应性更高 (图 7)。

通过加入 25 u1 含有 100, 1000 或 10,000 ng/ml 下述肽的溶液, 可以进行竞争性实验。所述肽包括: Trp-Leu-Asp- $\beta$ -Gly-Lys-Glu-Tyr, Trp-Leu-Asx-Gly-Lys-Glu-Tyr, Glu-Lys-Ala-His-Asp- $\beta$ -Gly-Gly-Arg 和 Glu-Lys-Ala-His-Asp-Gly-Gly-Arg 肽, 以及“无意”对照肽 His-Thr-Ala-Arg -Gln-Met-Ala-Trp-Ala-Lys, 以及 Thy-GA-Trp-Leu-\*Asx-Gly-Lys-Glu-Tyr 和 Thy-GA-Glu-Lys-Ala-His-\*Asx-Gly-Gly-Arg 结合体。在编辑所有实验观察到的反应性、并在分组基础上计算反应性时发现, 在最高浓度下, 针对 Trp-Leu-Asp- $\beta$ -Gly-Lys-Glu-Tyr 肽 (以及 Thy-GA-Trp-Leu-\*Asx-Gly-Lys-Glu-Tyr 结合体) 具有显著的反应性 (采用 Student's T 检验,  $P=0.01$ ), 但是与其他肽却没有反应性 (图 8)。这一结果与前面实施例所述 ELISA 法的观察一致。

实施例 5: 对含有人 IgG Asn-315 的免疫反应性抗原决定簇进行绘图分析, 所述抗原决定簇还能与 RA 患者经免疫亲和纯化的自身抗体发生反应

IgM 自身抗体分析为在自身抗体分析前从血清中去除内源性 IgG 揭示了可能性。实际上, 业已建立的结论性观点认为, 正常个体和 RA 患者都存在显著数量的循环异构化/光学反转 IgG, 可以想象, 任何公认的抗异构型 IgG 自身抗体都可能由于这些分子的存在而被几乎完全封闭, 因此, 阻碍了与实验固相的结合。下面的实施例描述了一种纯化人自身抗体的方法, 所述自身抗体能够与来自人 IgG 的异构化靶抗原决定簇发生反应, 并通过与合成肽孵育, 检测针对该抗原决定簇的反应性, 所述合成肽是在无活性纤维素支持物上合成的。

通过免疫亲和层析在 IgG 柱上纯化来自人血清样本的 RF

应用的实验方法如下:

1. 应用生产厂商提供的使用说明 (Pharmacia, Upsala, Sweden), 使 IgG 与 CNBr 激活的琼脂糖结合。
2. 将 IgG 琼脂糖装到适宜的柱中 (即可以任意使用的 DG10 柱, BioRad laboratories, Richmond, CA)。该柱应用至少 10 倍柱体积的 PBS 和 10 倍柱体积 pH 3.5 的 0.1 M 醋酸钠、0.15 M 氯化钠洗柱, 最后在 PBS 中平衡。
3. RA 患者血清在 PBS 中稀释 10 倍, 然后上柱。应用 PBS 洗柱, 直至洗脱液的吸收值 (OD 280 nm) 达到基线水平。
4. 应用 pH 3.5 的 0.1 M 醋酸钠、0.15 M 氯化钠洗脱结合的 RF。
5. 在 Sephadex G-200 柱上, 应用 pH 3.5 的 0.1 M 醋酸钠、0.15 M 氯化钠, 通过凝胶过滤将 IgM 与 IgG、IgA 分离,
6. 洗脱的 IgM 在 PBS-BT 中稀释到 1 ug/ml, 如下所述进行分析。

合成纤维素结合肽

应用前述过程 (Frank, 1992, Kramer et al 1994), 通过 Whatman 540 paper (Maidstone, UK), 采用斑点合成技术, 合成了跨越 Asn-315 的七氨基酸肽。该肽通过斑点合成法自动制备 (Abimed, Langenfeld, FRG)。下述肽被合成, 并通过羧基末端共价粘附:

- I. Thr-Val-Leu-His-Gln-Asp-Trp...  
 II. Val-Leu-His-Gln-Asp-Trp-Leu...  
 III. Leu-His-Gln-Asp-Trp-Leu-Asp- $\beta$ ...  
 IV. His-Gln-Asp-Trp-Leu-Asp- $\beta$ -Gly...  
 5 V. Gln-Asp-Trp-Leu-Asp- $\beta$ -Gly-Lys...  
 VI. Asp-Trp-Leu-Asp- $\beta$ -Gly-Lys-Glu...  
 VII. Trp-Leu-Asp- $\beta$ -Gly-Lys-Glu-Tyr...  
 VIII. Leu-Asp- $\beta$ -Gly-Lys-Glu-Tyr-Lys...  
 IX. Asp- $\beta$ -Gly-Lys-Glu-Tyr-Lys-Cys...  
 10 X. Gly-Lys-Glu-Tyr-Lys-Cys-Lys...

Asp- $\beta$ : 表示异构化的 Asp 残基, 其中肽连接是通过 $\beta$ -羧基, 而非正常的 $\alpha$ -羧基 ( $\beta$ L 型)。

表示粘附于纤维素支持物。

15

含有这些肽的纤维素膜与上述通过免疫亲和纯化的 RA 自身抗体共同孵育。如 (Kramer et al 1994) 所述, 应用传统免疫印迹技术进行结合抗体的孵育和目测。

该实验显示, 对肽 IV 和 VII 的反应性很强。这一点强烈提示, 从  
 20 RA 患者血清纯化的自身抗体可以识别异构化 ( $\beta$ L 型) 的包绕 Asn-315 残基的七氨基酸抗原决定簇。

#### 实施例 6: 检测与 Pro-Ser-Glu- $\gamma$ -Gly-Lys-Gly-Arg-Gly 具有反应性的自身抗体

25 研究罹患多发硬化的患者自身抗体是否能够识别髓鞘基底蛋白 (MBP) 衍生性八肽 Pro-Ser-Glu- $\gamma$ -Gly-Lys-Gly-Arg-Gly。

为达成这一目的, 通过标准 FMOC 化学法人工合成了 MBP 衍生性八肽 Pro-Ser-Glu- $\gamma$ -Gly-Lys-Gly-Arg-Gly ( $\gamma$ L 型)。根据生产厂商的使用说明, 通过 Bis-[sulfosuccinimidyl]suberate (BS<sup>3</sup>), 将该肽连  
 30 接于牛血清白蛋白 (BSA) 上, 然后如实施例 4 所述, 通过氯胺 T 方法应用 <sup>125</sup>I 碘化该肽。

9 名 MS 患者和 8 名健康人血清与 <sup>125</sup>I-BSA-BS<sup>3</sup>-Pro-Ser-Glu- $\gamma$ -

Gly-Lys-Gly-Arg-Gly 反应过夜，然后通过蛋白 A 琼脂糖凝胶沉淀免疫复合物。将血清样本在 IMP 缓冲液中以 1: 200 稀释。<sup>125</sup>I BSA-BS<sup>3</sup>-Pro-Ser-Glu-γ-Gly-Lys-Gly-Arg-Gly 示踪剂也在 IMP 缓冲液中稀释（至活性为 100000 CPM/25ul）。75ul 稀释血清样本与 25ul 示踪剂、及 25ul IMP 缓冲液或游离（未结合/未标记）Pro-Ser-Glu-γ-Gly-Lys-Gly-Arg-Gly 肽（溶解于 IMP 缓冲液中，浓度为 10 ug/ml）混和。该混合物在 4℃ 孵育过夜。称量 20 ul/样本试管的蛋白 A 琼脂糖凝胶（PAS），应用 10 ml IMP 清洗缓冲液清洗 3 次，然后应用转发移液枪将其转移到 1.5 ml Eppendorf 管中。通过 2000 RPM 离心 2 分钟沉淀 PAS，应用吸移装置（或移液枪）吸取上清。抗体/抗原溶液孵育过夜后，转移到 PAS 沉淀上，在摇动台上室温孵育 3 小时。2000 RPM 离心 2 分钟，沉淀 PAS。应用 750 ul IMP 清洗缓冲液清洗 PAS 沉淀 5 次。每次清洗后，都吸取上清。最后，在 milli-Q 水中再悬 PAS 沉淀至 100 ul 悬液，转移到 4 ml 聚丙烯试管中，应用 γ 计数器计数。根据该方法进行实验，可以应用血清获得特异性信号。在分组基础上，MS 血清显示了较对照研究组血清样本更高的反应性（P=0.0078，两尾非参数 t 检验），图 9A。而且，通过添加“游离”的 Pro-Ser-Glu-γ-Gly-Lys-Gly-Arg-Gly 肽，可以特异性抑制 <sup>125</sup>I-BSA-BS<sup>3</sup>-Pro-Ser-Glu-γ-Gly-Lys-Gly-Arg-Gly 结合体与人免疫球蛋白的结合。因此，与对照血清相比，MS 血清的免疫球蛋白结合抑制 % 显著为高（P=0.008，两尾非参数 t 检验），图 9C。因此，MS 患者具有的抗体可以针对含有异构化（γL）谷氨酸的 MBP 衍生性抗原决定簇。

结果如图 9 所示，其中 3 个小图如下：

图 A，多发硬化患者（MS）和健康对照组（CO）血清中，人免疫球蛋白与 <sup>125</sup>I-BSA-BS<sup>3</sup>-Pro-Ser-Glu-γ-Gly-Lys-Gly-Arg-Gly 的结合（没有添加游离肽作为拮抗剂）。

图 B，多发硬化患者（MS）和健康对照组（CO）血清中，人免疫球蛋白与 <sup>125</sup>I-BSA-BS<sup>3</sup>-Pro-Ser-Glu-γ-Gly-Lys-Gly-Arg-Gly 的结合（添加游离的 Pro-Ser-Glu-γ-Gly-Lys-Gly-Arg-Gly 肽作为拮抗剂）。

图 C，多发硬化患者（MS）和健康对照组（CO）血清中，人免疫球蛋白与 <sup>125</sup>I-BSA-BS<sup>3</sup>-Pro-Ser-Glu-γ-Gly-Lys-Gly-Arg-Gly 结合的抑制百分比。

## 参考文献

1. Aanstoot HJ, Kang SM, Kim J, Lindsay LA, Roll U, Knip M, Atkinson M, Mose-Larsen P, Fey S, Ludvigsson J, Madsen O, & Baekkeskov S. *J. Clin. Invest.* (1996) June 15; 97 (12); 2772-83 鉴定并刻画糖基化胰岛细胞膜抗原 glima 38 的特征, 该抗原与 GAD 65、IA2 共同标志 I 型糖尿病中早期自身免疫应答
2. Abel LC, Kalil J, Cunha Neto E (1997) *Braz. J. Med. Biol. Res.* (1997) 心肌肌球蛋白与克氏锥虫抗原 B13 之间的分子相似性: 鉴定 B13 驱动的能够识别心肌肌球蛋白的人 T 细胞克隆
3. Adelman M, Wood J, Benzel I, Fiori P, Lassman H, Matthieu J-M, Gardinier MV, Dornmair K, Linnigton C (1995) 髓鞘少突细胞糖蛋白 (MOG) 的 N 末端功能区在 Lewis 大鼠中诱导实验性急性脱髓鞘性自身免疫性脑脊髓炎。 *J. Neuroimmunol.* 63: 17-27
4. Atassi MZ, Oshima M (1997) 针对乙酰胆碱受体的自身免疫应答: T、B 细胞的协同作用以及通过合成肽的操作。 *Crit. Rev. Immunol.* 17 (5-6): 481-495
5. Bach-Elias M, Bahia D, Teixeira DC, Cicarelli RM (1998) 在 Chagas 患者血清中存在针对小核核蛋白抗原决定簇的自身抗体。 *Parasitol Res.* 84 (10): 796-799
6. Beniac DR, Luckevich MD, Czarnota GJ, Tompkins TA, Ridsdale RA, Ottensmeyer FP, Moscarello MA, Harauz G (1997) 髓鞘基底蛋白的三维结构。 I. 通过随机定向单颗粒的有角重组进行重建。 *J. Biol. Chem.* 272 (7): 4261-4268
7. Benkirane N, Friede M, Guichard G, Briand J-P, Van Regenmorte MHV, Muller S. (1993) 含有 D 氨基酸残基的改良合成肽的抗原性和免疫原性。 针对 D 对映体结构的抗体确实能够识别亲本 L 型六肽, 相反亦成立。 *J. Biol Chem* 268: 26279-26285
8. Bernstein RM (1990) 综述: 系统性红斑狼疮中的体液自身免疫。 *J Royal Col. Phys. London.* 24: 18-25
9. Bettadapura J, Menon KK, Moritz S, Liu J, Bernard CCA (1998) 重组人髓鞘少突细胞糖蛋白的表达、纯化和致脑炎性。 *J Neurochem* 70: 1593-1599

10. Bakkeskov S, Nielson JH, Marner B, Bilde T, Ludvigsson J, Lernmark A (1982) 新确诊糖尿病儿童的自身抗体可以与人胰岛细胞蛋白发生免疫沉淀反应。Nature 298: 167-169
11. Bakkeskov S, Aanstoot H-J, Christgau S, Reetz A, Solimena M, Cascalho M, Folli, F, Richter-Olesen H, and De-Camilli P (1990) 在胰岛素依赖性糖尿病中鉴定作为 GABA-合成酶谷氨酸脱羧酶的 64K 自身抗原。Nature 347 (6287): 151-156
12. Berrih-Aknin S. (1995) 重症肌无力, 一种器官特异性自身免疫性疾病模型。J. Autoimmun 8(2): 139-143
13. Bonagura VR, Artandi SE, Davidson A, Randen I, Agostino N, Thompson K, Natvig J, Morrison SL (1993) 绘图研究发现了位于 IgG 上的能够被类风湿关节炎衍生性单克隆类风湿因子识别的独特型抗原决定簇。J Immunol. 151: 3840-3852
14. Bonde M, Qvist P, Fledelius C, Riis BJ, C. Christiansen C. 1994 在备检尿液中定量 I 型胶原降解产物的免疫方法。Clin. Chem. 40, 2022-2025
15. Bonifacio E, Lampasona V, Genovese S, Ferrari M, Bosi E, (1995) 鉴定作为胰岛素依赖性糖尿病相关的 37/40K 自身抗原和胰岛细胞自身抗体作用对象的蛋白质酪氨酸磷酸酶样 IA2(胰岛细胞抗原 512)。J. Immunol. 155 (11): 5419-5426
16. Carson DA (1993). In: Kelley WN, Harris ED, Ruddy S, Sledge CB (Eds.). 风湿学教科书; 1: 155-163, WB Saunders, London.
17. Chen KR, Shimizu S, Miyakawa S, Ishiko A, Shimizu H, Hashimoto T (1996) 银屑病与 IgG 介导的不寻常表皮下大疱性皮肤病共同存在: 鉴定新型 200-kDa 低片状明星靶抗原。Br J Dermatol 134 (2): 340-346
18. Chen P, Fong S, Carson DA. (1987) 类风湿因子。Rheum. Dis. Clin. North Am. 13: 575
19. Clarke S (1987) 在细胞蛋白中天冬氨酰和天冬酰残基自发形成琥珀酰亚胺的倾向性。Int. J. Peptide Protein Res. 30: 808-821

20. Cooke A (1988) 自身免疫的发病机理。Diabetic Med. 5: 782-788
21. Dean BM, Becker F, McNally JM, Tarn AC, Schwartz G, Gale EA, Bottazzo GF (1986) 在前糖尿病期的胰岛素自身抗体: 与  
5 胰岛细胞抗体和糖尿病发生的相互关系。Diabetologica 29: 339-342
22. De Vries HE, Kuiper J, De Boer AG, Van Berkel TJC and Breimer DD, Pharmacological Reviews (1997) Vol. 49, No. 2, 143
23. Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, Donner P, Volta U, Riecken EO, Schuppan D (1997) 鉴定作为乳糜泻自身抗原的组织转  
10 谷氨酰胺酶。Nature Med. 3 (7): 797-801
24. Dieterich W, Laag E, Schopper H, Volta U, Ferguson A, Gillet H, Riecken EO, Schuppan D (1998) 针对组织转谷氨酰胺酶的自身抗体可以作为乳糜泻的预测因子。Gastroenterology 115 (6): 1317-1321
- 15 25. Fledelius C, Johnsen A, Cloos P, Bonde M, Qvist P. 1997 尿 C 末端端肽降解产物的特征。鉴定 I 型胶原 C 末端 $\alpha_1$ 链中天冬氨酰残基的 $\beta$ 异构化。J. Biol. Chem. 272: 9755-9763
26. Frank, R (1992) 斑点合成: 在膜支持物上能够定位的与化学合成平行简易方法。Tetrahedron 48: 9217-9232
- 20 27. Galletti P, Ingrosso D, Manna C, Clemente G, Zappia V. (1995) 真核细胞中蛋白质损伤和甲基化介导的修复。Biochem J. 305: 313-325
28. Geiger T, Clarke S (1987) 肽中天冬酰和天冬氨酰残基的脱酰胺、异构化和外消旋作用。J. Biol. Chem. 262: 785-794
- 25 29. Glant TT, et al. 在糖蛋白诱导的关节炎中绘制软骨聚集蛋白聚糖的致关节炎/自身免疫抗原决定簇。Scand J Rheumatol 1995: 24 (Suppl. 101) 43-49
- 30 30. Goin JC, Leiros CP, Borda E, Serin-Borda L (1997) 人南美锥虫 IgG 与人心脏毒蕈碱乙酰胆碱受体第二个细胞外环之间的相互作用: 功能和病理学启示。FASEB J. 11 (1): 77-83
31. Gorsuch AN, Spencer KM, Lister J, McNally JM, Dean BM, Bottazzo GF, Cudworth AH (1981) I 型 (胰岛素依赖性) 糖尿病长

期前糖尿病期的证据。Lancet 2 (8260-61): 1363-1365

32. Gottlieb SL, Gilleaudeau P, Johnson R, Estes L, Woodworth TG, Gottlieb AB, Krueger JG (1995) 银屑病对淋巴细胞选择性毒素 (DAB289IL-2) 的反应提示具有原发免疫但非角化细胞的病理基础。Nat. Med. 1(5): 442-447

33. Harris ED (1993) 类风湿关节炎的病因学和发病机理。In: Kelley WN, Harris ED, Ruddy S, Sledge CB (Eds.). 风湿学教科书; 1: 833-873, WB Saunders, London.

34. Ichikawa M, Johns TG, Jiu J, Bernard CC (1996) Lewis 大鼠注射致脑炎性髓鞘少突细胞糖蛋白肽 35-55, 分析在多发硬化样疾病的慢性/复发期纯粹 B 细胞特异性。J. Immunol. 157: 919-926

35. Inman RD, Day NK (1981) 免疫复合物疾病的免疫和临床特征。Am. J. Med. 70: 1097

36. Janeway CA Jr. Travers P, Hunt S, "Immuno Biology" (1997) 3<sup>rd</sup> ed. Current Biology Ltd. (London) pp 226-235

37. Johnson PM, Page Faulk W (1976) 类风湿因子: 在类风湿关节炎中的性质、特异性和产生。Clin. Immun. Immunopath. 6: 414-430

38. Johnson PM, Watkins J, Scopes PM, Tracey BM (1974) 健康和类风湿患者中血清 IgG 的结构差异。Ann. Rheum Dis. 33: 366

39. Johnson PM, Watkins J, Holbrow EJ (1975) 在类风湿关节炎中针对变化了的 IgG 产生的抗球蛋白。The Lancet, 1 (7907): 611-613

40. Johnson T, Valdimarsson H (1993) 检测同型类风湿因子有临床用途吗? Ann. Rheum. Diseases 52: 161-164

41. Kalsi J, Isenberg D (1993) 类风湿因子: 在 RA 发病机理中是原发事件还是继发事件? Int. Arch. Allergy Immunol. 102: 209-215

42. Kerlero de Rosbo N, Milo R, Lees MB, Burger D, Bernard CCA, Ben-Nun A (1993) 在多发硬化中对髓鞘抗原的反应性。外周血淋巴细胞主要针对髓鞘少突细胞糖蛋白发生反应。J. Clin. Invest. 92: 2602-2608

43. Kerlero de Rosbo N, Ben-Nun A (1998) 在多发硬化中对髓鞘抗原的 T 细胞应答: 与主要针对髓鞘少突细胞糖蛋白的自身免疫反应的相关性。J Autoimmun. 11: 287-299

44. Kramer A, Schuster A, Reineke U, Malin R, Volkmer-Engert R, Landgraf C and Schneider-Mergener J (1994) 纤维素结合肽组合文库: 鉴定能够与预先定义的特异性配体结合的肽的筛选工具。Comp. Meth. Enzymol. 6: 388-395

45. Li Q, Borovitskaya AE, DeSilva MG, Wasserfall C, MacLaren NK, Notkins AL, Lan MS (1997) 胰岛素依赖性糖尿病的自身抗原: 人 IA-2  $\beta$  的分子克隆和性质。Proc. Assoc. Am Physicians 109 (4) L 420-439

46. Linington C, Webb M, Woodhams P (1984) 在 Lewis 大鼠体内介导实验性过敏性神经炎的永久性鼠 T 细胞系。J. Neuroimmunol. 6: 387-396

47. Linington C, Berger T, Perry L, Weerth S, Hinze-Selch D, Zhang Y, Lu H-C, Lassmann H, Werkele H. (1993) 针对髓鞘少突细胞糖蛋白的特异性 T 细胞可以在中枢神经系统介导不寻常的自身免疫性炎症反应。Eur. J. Immunol. 23: 1364-1372

48. Lu J, Li Q, Xie H, Chen ZJ, Borovitskaya AE, Maclaren NK, Notkins AL, Lan MS (1996) 鉴定作为胰岛素依赖性糖尿病自身抗原的第二个跨膜蛋白酪氨酸磷酸酶 IA-2  $\beta$ : 37-kDa 胰蛋白酶片段前体。Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93(6): 2307-2311

49. Lukash AI, Pushkina NV, Tibulsky IE. “血清白蛋白脱氨基后的自身抗原特性” Immunologiya 68: 1987

50. Martin R (1997) 实验性过敏性脑脊髓炎和多发硬化的免疫学特征及其在新治疗策略方面的应用。J. Neural Transm. 49: 53-67

51. Mor A, Amiche M, Nicolas P (1992) 进入翻译后修饰的新领域: 基因编码肽中的 D 氨基酸。Elsevier Science Publishers (UK) Dec. 1992 481-485

52. Munthe E and Natvig JB (1972) 在类风湿血浆细胞中类风湿因子 IgG 的补体固定细胞内复合物。Scand. J. Immunol. 1: 217

53. Murrey DE Jr. & Clarke S, *Jnl of Biological Chemistry* (1984) Vol. 259, No. 17, Sept. 10 pp 10722-10732 “在异构化 L-天冬氨酰残基上检测新的甲基化位点”

54. Nardella FA, Teller DC, Mannik M (1981) 在自体相关性 IgG 类风湿因子中研究抗原决定物质。 *J. Exp. Med.* 154: 112-125

55. Natvig JB, Munthe E (1975) 自体相关性 IgG 类风湿因子代表血浆细胞在类风湿炎症组织中的主要反应。 *Ann. NY Acad. Sci.* 156: 88-95

56. Nauert JB, Klauck TM, Langenberg LK, Scott JD (1997) 重症肌无力患者血清识别的自身抗原 gravin 是一种激酶脚手架蛋白。 *Curr. Biol.* 7 (1): 52-62

57. Nepom GT (1990) HLA 相关性疾病中的 MHC 基因。 *Curr. Opinion in Immunology* 2: 588-592

58. Noritake DT, Colburn KK, Chan G, Weisbart RH (1990) 急性类风湿关节炎特异性类风湿因子。 *Annals of the Rheumatic Diseases* 49: 910-915

59. Okamoto Y, Abe T, Niwa T, Mizuhashi S, Nishida M (1998) 研发同时检测鼠 1 型辅助 T 细胞和 2 型辅助 T 细胞的双色酶联免疫斑点法。 *Immunopharmacology* 39: 107-116

60. Palmer JP, Asplin CM, Clemens P, Lyen K, Tatpati O, Raghu PK, Paquette TL (1983) 在胰岛素治疗前胰岛素依赖性糖尿病的胰岛素抗体。 *Science* 222: 1337-1339

61. Parekh RB, Dwek RA, Sutton BJ, Fernandes DL, Leung A, Stanworth D, Rademacher TW, Mizuochi T, Taniguchi T, Matsuta K (1985) 类风湿关节炎和原发骨关节炎与总血清 IgG 糖基化模式改变的相关性。 *Nature* 316: 452-457

62. Parekh RB, Isenberg DA, Ansell BM, Roitt IM, Dwek RA, Rademacher TW (1988) IgG 相关性寡糖的半乳糖苷化在成年和青少年类风湿关节炎中降低, 并与疾病活动性相关。 *Lancet* 1: 966-999

63. Pilkington C, Yeung E, Isenberg D, Lefvert AK, Rook GAW (1995) 在类风湿关节炎、结核、系统性红斑狼疮和重症肌无力中的特异性半乳糖 IgG 和抗体。 *Autoimmunity.* 22: 107-111

64. Rawson AJ, Hollander JL, Quismorio FP, Abelson NM (1969) Ann. N. Y. Acad. Sci. 168: 188

65. Ronnelid J, Klareskog L. (1997) ELISPOT 法检测细胞因子生成细胞的比较: 应用 ELISA 平板较硝酸纤维素膜更敏感, 特异性更高。J Immunol. Meth. 200: 17-26

66. Schon MP, Detmar M, Parker CM (1997) 初生 CD4+ T 细胞诱导的鼠银屑病样紊乱。Nat. Med. 3(2): 183-188

67. Sela MS, Fuchs (1964) 电荷和光学构型在抗原性方面的作用。Sec. Chem. Immunol. Pp 43-56

68. Sela M, Zisman E (1997) 在免疫现象中 D 氨基酸的不同作用。Dept. of Immunol. Rehovot pp 449-456

69. Sun J, Link H, Olsson T, Xiao BG, Andersson G, Ekre HP, Linington C, Diener P (1991) J. Immunol. 146: 1490-1495

70. Svasti J and Milstein C (1972) 鼠 $\kappa$ 轻链的完全氨基酸序列。Biochem. J. 128: 427-444

71. Todome Y, Ohkuni H, Mizuse M, Furuya M, Fujikawa S, Tanaka S, Watanabe N, Fujii K, Zabriskie J (1992) 在风湿性疾病中检测针对链球菌肽聚糖和肽亚单位 (合成四-D-丙酰基-牛血清白蛋白复合物) 的抗体。Int. Arch Allergy Immunol 1992: 301-307

72. Tomana M, Schrohenloher RE, Koopman WJ, Alarcon GS and Paul WA (1988) 慢性炎症性疾病患者血清 IgG 的异常糖基化。Arthritis and Rheumatism. 31: 333-338

73. Tomiyama T, Asano S, Furiya Y, Shirasawa T, Endo N, and Morrirt, Jnl of Biological Chemistry (1994) Vol. 289, No. 14, April 9, pp 10205-10208 “Asp<sup>23</sup> 残基的外消旋对阿尔茨海默病中 $\beta$ 淀粉样蛋白类似物沉积特性的影响”

74. Van Noort JM, van Sechel AC, van Stipdonk MJB, Bajaramovic JJ (1998) “小型热休克蛋白 $\alpha\beta$ -晶状体球蛋白作为多发硬化的关键自身抗原” In “Progress in brain research” Vol 117 (eds: Van Leuwen FW, Salehi, Giger RJ, Holtmaat AJGD, Verhaagen J) Elsevier Science, Amsterdam

75. Watkins J, Turner MW, Roberts A (1972) In: Peeters H

(ed.) *Protides of the Biological Fluids*, 19<sup>th</sup> Colloquium, Oxford: 468

76. Weir, D (ed.) (1996). *实验免疫性手册*, vol 1., 5<sup>th</sup> edn. Blackwell Scientific Publication, Oxford

5 77. Williams RC (1996) 类风湿关节炎发病机理中涉及的自身免疫机制。 *Adv. Dent. Res.* 10: 47-51

78. Winchester RJ (1975) 类风湿关节炎患者 IgG 复合物的特征。 *Ann. NY Acad. Sci.* 256: 73-81

10 79. Yoshikawa H, Lambert EH, Walser-Kuntz DR, Yasukawa Y, McCormick DJ, Lennon VA (1997) 乙酰胆碱受体的 17-Mer 自体肽可以与 B 细胞 MHC II 类抗原结合, 激活辅助 T 细胞, 刺激自身抗体的产生和重症肌无力电生理征象的出现。 *J. Immunol.* 159 (3): 1570-1577

15 80. Zhang Y, Guerassimov A, Leroux JY, Cartman A, Webber C, Lalic R, de Miguel E, Rosenberg G, Poole AR, 1998. 软骨连接蛋白在 Balb C 小鼠中诱导关节炎: 涉及 T、B 淋巴细胞识别的特异区。 *Am. J. Pathol.* 153: 1283-1291

20 81. Zisman E, Kztz-Levy Y, Dayan M, Kirshner SL, Paas-Rozner M, Karni A, Abramsky O, Brautbar C, Fridkin M, Sela M, Mozes E. (1996) 人乙酰胆碱受体  $\alpha$  亚单位致病抗原决定簇的肽类似物可以作为重症肌无力的潜在介导剂。 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (9): 4492-4497

图1: IgG片段的大小排除层析

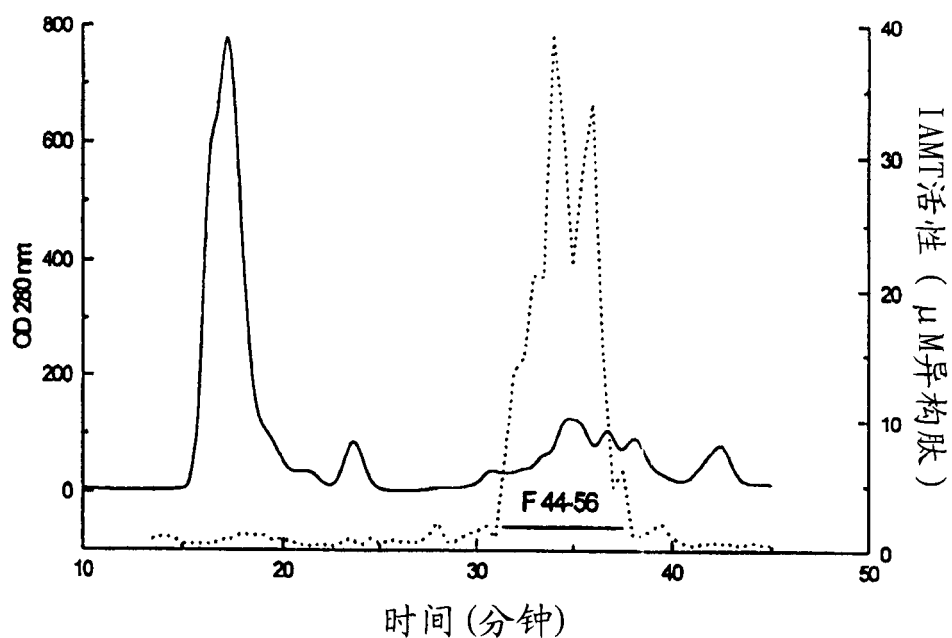


图 1A

选定IgG裂解产物合并级分的异构化模式

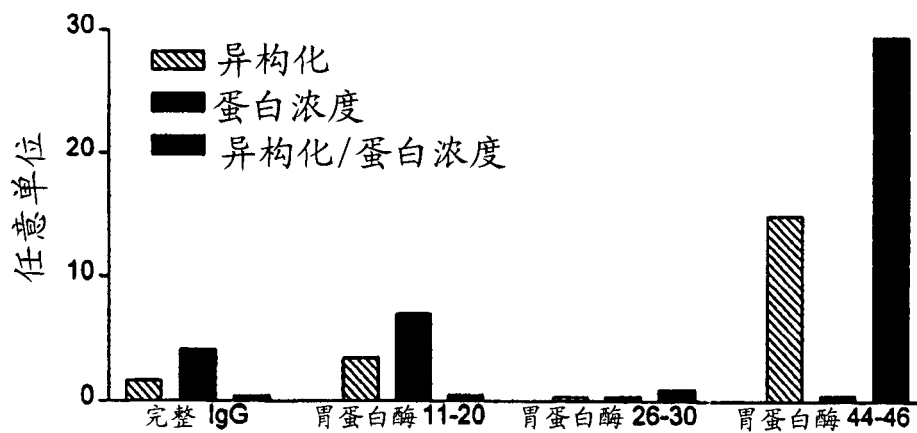


图 1B

图2: IgG片段的阴离子交换层析

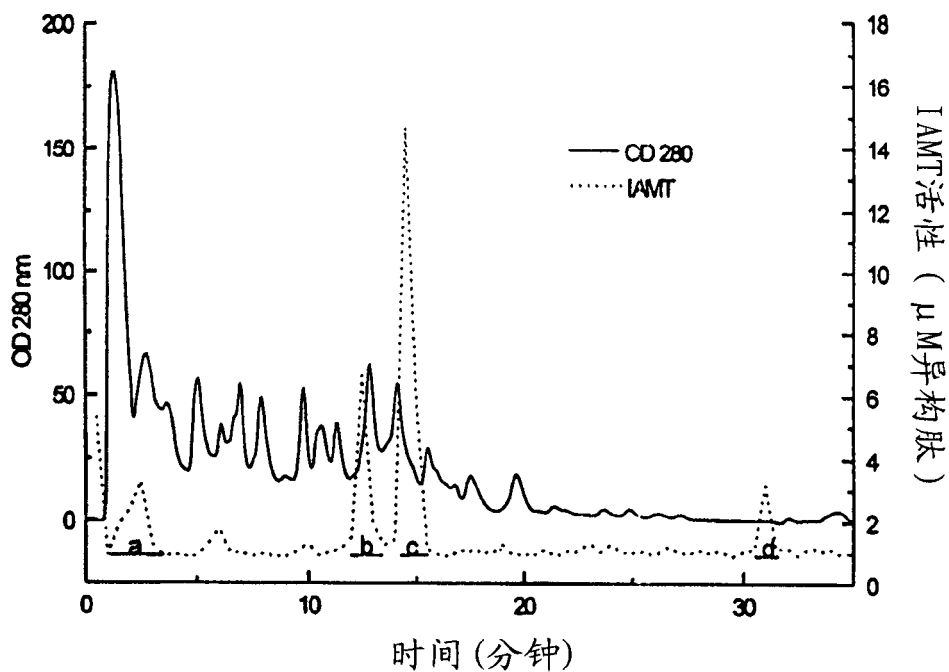


图 2

图3: b池首次进行反相HPLC

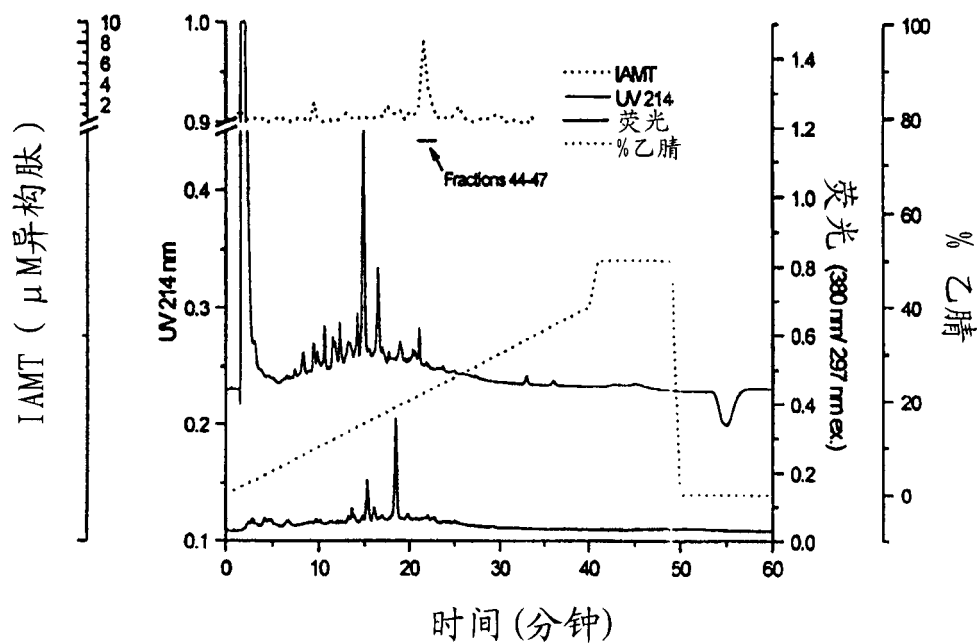


图 3

图4: 合并级分b进行第2轮反相HPLC

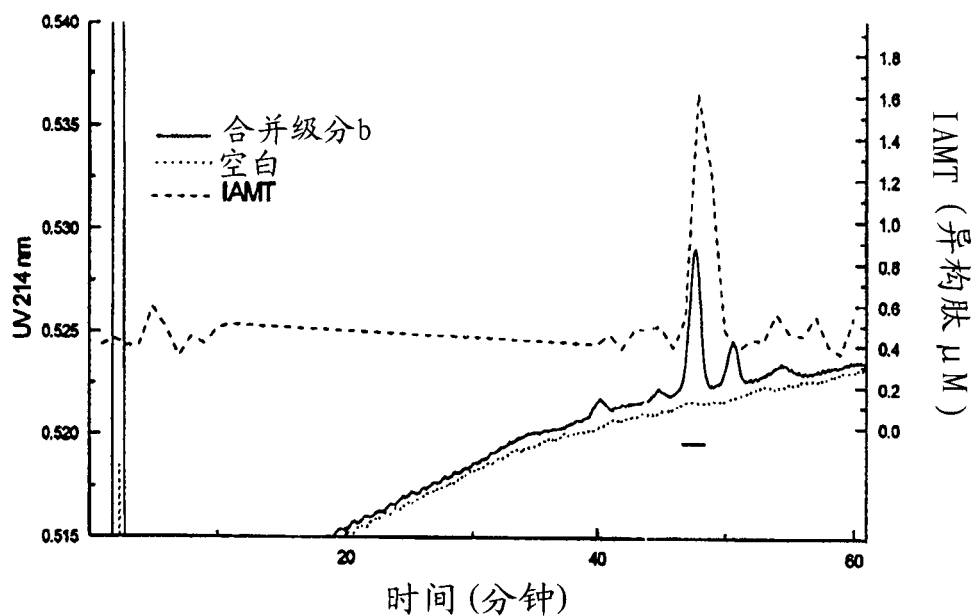


图 4

在直接结合法中, 针对IgG衍生性抗原  
决定簇WLD- $\beta$ -GKEY的自身抗体的反应

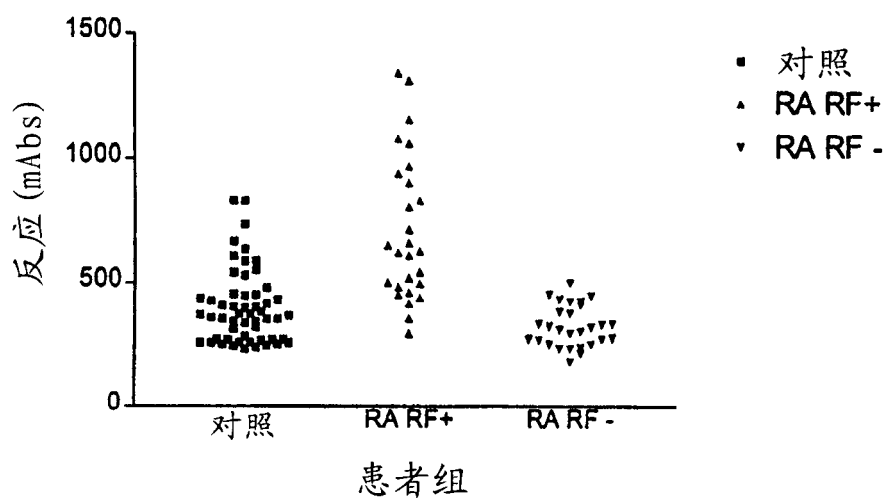


图 5

在Thy-GA-WLD-β-GKEY包被的平板上,  
抗体在直接结合ELISA中的结合竞争性

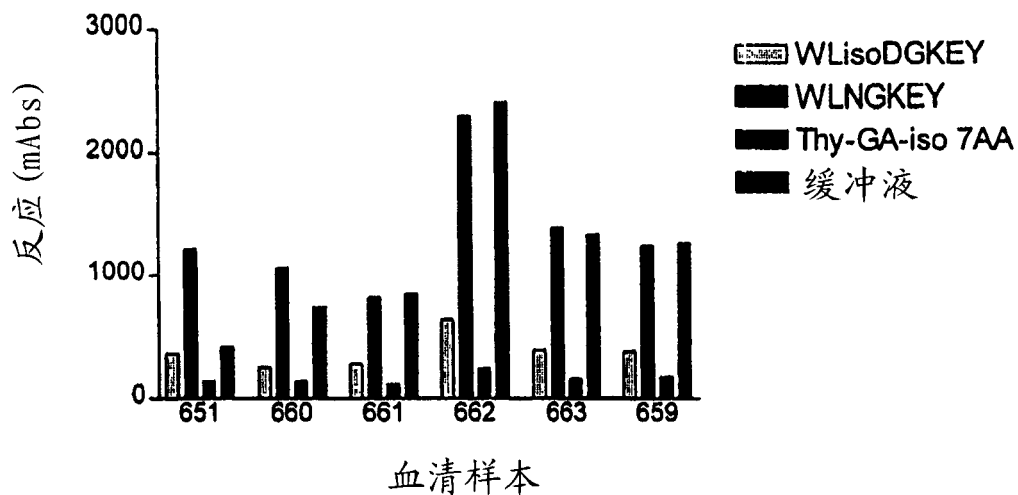


图 6

在同源免疫法中,针对IgG衍生性抗原  
决定簇WLD-β-GKEY的自身抗体的反应

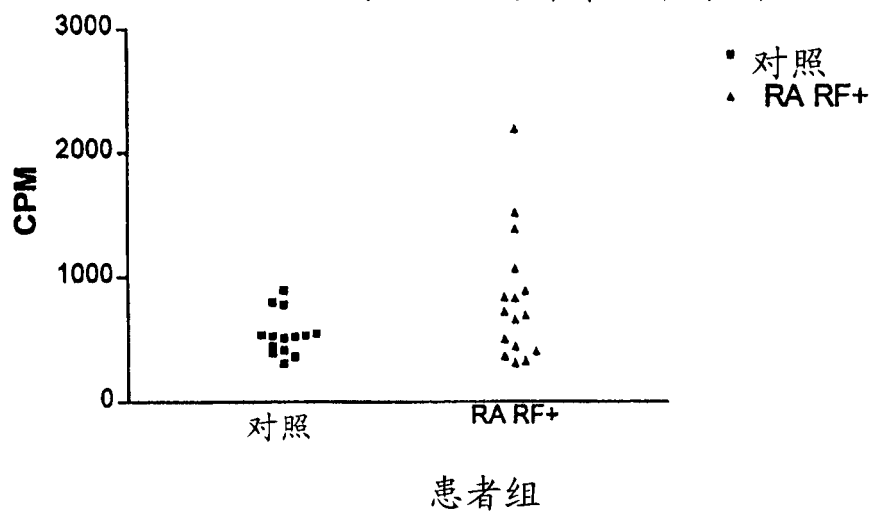


图 7

在同源法中,抑制自身抗体与IgG衍生性  
抗原决定簇WLD- $\beta$ -GKEY的结合

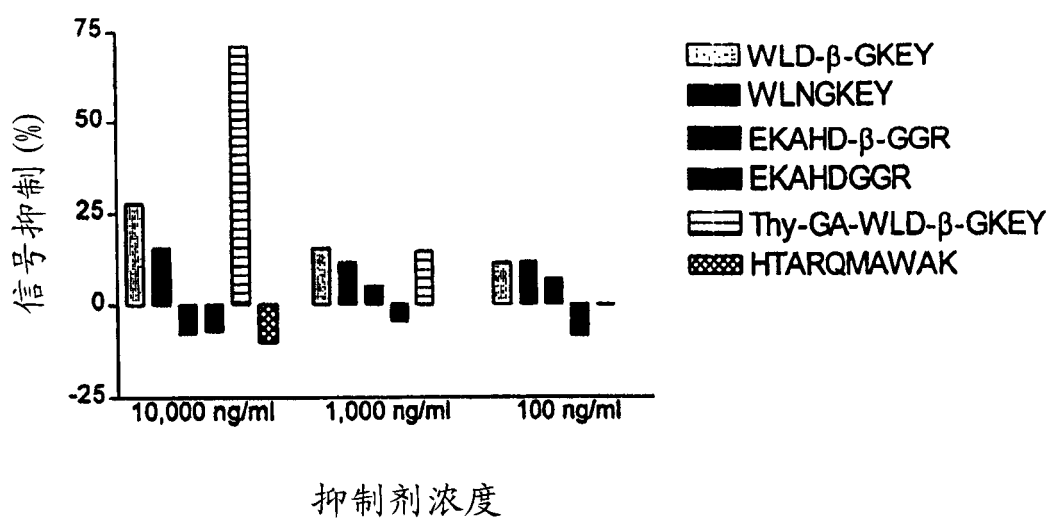


图 8



专利名称(译)	针对异构化/光学反转抗原决定簇的特异性自身免疫反应:在自身免疫性疾病诊断中的应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN1379858A</a>	公开(公告)日	2002-11-13
申请号	CN00814441.9	申请日	2000-08-16
[标]发明人	PAC克洛斯 S·克里斯特高		
发明人	P·A·C·克洛斯 S·克里斯特高		
IPC分类号	G01N33/53 C07K7/06 C07K7/08 C07K16/18 G01N33/564 C07K14/47		
CPC分类号	G01N33/564 G01N2800/24 G01N2800/285		
代理人(译)	刘玥		
优先权	1999019452 1999-08-17 GB		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

我们发现,对异构化蛋白质具有免疫反应性的抗体和T淋巴细胞与自身免疫性疾病相关,所述蛋白质在天门冬氨酸、天门冬酰胺、谷氨酰胺或谷氨酸残基上存在异构化,所述自身免疫性疾病涉及对IgG(类风湿关节炎)和髓磷脂基底蛋白(多发硬化)的自身反应性。本发明描述了对异构化蛋白序列具有自身免疫反应性的诊断方法。

