

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 01814193.5

C07K 16/28 (2006.01)
G01N 33/564 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007年3月21日

[11] 授权公告号 CN 1305906C

[22] 申请日 2001.8.8 [21] 申请号 01814193.5
[30] 优先权

[32] 2000.8.14 [33] EP [31] 00202844.7

[86] 国际申请 PCT/EP2001/009136 2001.8.8

[87] 国际公布 WO2002/014870 英 2002.2.21

[85] 进入国家阶段日期 2003.2.14

[73] 专利权人 欧加农股份有限公司

地址 荷兰奥斯

[72] 发明人 P·G·A·斯廷贝克斯

[56] 参考文献

WO9501995A 1995.1.19

CN1237981A 1999.12.8

审查员 王丽华

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 刘晓东

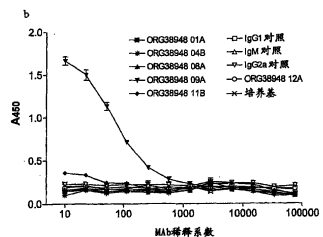
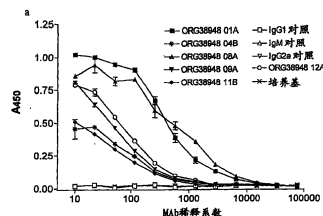
权利要求书 1 页 说明书 30 页 附图 8 页

[54] 发明名称

特异性 MHC - 肽复合物的抗体的诊断用途

[57] 摘要

本发明描述了通过检测罹患自身免疫性疾病患者的自身免疫特异性 MHC - 肽复合物的存在诊断自身免疫性疾病活性的方法。MHC - 肽复合物与类风湿性关节炎有关。也描述了用于该方法的单克隆抗体。该抗体还可以用于治疗目的。



1. 特异性结合MHC-HC-gp39衍生肽复合物的抗体或其抗原结合结构域在制备自身免疫性疾病的诊断剂中的用途，其中所述抗体或其抗原结合结构域检测罹患自身免疫性疾病患者中自身免疫特异性MHC-肽复合物的存在，其中所述复合物的MHC部分为HLA DRB1*0401、DRB1*0404、DRB1*0407或DRB1*0101型，并且所述HC gp-39衍生肽包含HC-gp39²⁶³⁻²⁷³ 或HC-gp39²⁶³⁻²⁷⁵。

2. 权利要求1的用途，其中所述MHC类型为HLA DRB1*0401。

3. 权利要求1的用途，其中所述HC gp-39衍生肽是HC-gp39²⁶³⁻²⁷³ 或HC-gp39²⁶³⁻²⁷⁵。

4. 权利要求3的用途，其中该抗体是ORG38948 08A、ORG38948 12A或ORG38948 04B，它们已经保藏于ECACC，分别具有保藏号99061728、99061729和99061730。

5. 权利要求1-4中任一项的用途中使用的抗体。

6. 包含权利要求5的抗体以及检测试剂的诊断组合物。

7. 用于治疗的权利要求5的抗体。

8. 权利要求5的抗体在制造治疗自身免疫性疾病的药物制剂中的用途。

9. 权利要求5的抗体在纯化自身免疫特异性的MHC-肽复合物中的用途。

特异性 MHC-肽复合物的抗体的诊断用途

发明领域

本发明涉及诊断自身免疫性疾病的方法、用于该方法的单克隆抗体、包含该抗体的诊断组合物以及治疗自身免疫性疾病的方法。

发明背景

自身免疫性疾病是维护人类健康的一个主要问题。某些自身免疫性疾病可能是针对一种抗原或抗原性复合物的免疫学过程的结果，而在其它自身免疫反应中可能包括可能存在于多个器官的多种抗原。

免疫系统的基本功能作用在于保护个体以防带有外来(即非自身)抗原的病原体的侵袭。为安全有效地履行这种功能，需要辨别外来抗原以及来自个体自身的自身抗原的机制。大多数个体一般耐受自身存在的物质。

相反，某些个体不能将其抗原识别为自身，而针对内源性物质、组织或成分产生免疫反应。这种免疫反应导致对包含该内源性物质的器官的极度损害。相关自身免疫性疾病的发展一般非常缓慢(以年计)，这很大程度上妨碍了及时的临床诊断和治疗。一般只有在已经引起身体明显的损害以后才能做出诊断。

诊断自身免疫性疾病，例如类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)，在疾病早期、或者涉及的关节相对较少时，最为困难，不幸的是，诊断往往在症状初起之后延误几个月。例如，此时难以辨别类风湿性关节炎和其它原因的慢性炎性关节炎或瞬时性滑膜炎综合症。常见持续性未分化的多关节炎综合症患者，最初可能难以与类风湿性关节炎相区分。许多患者表现出炎性关节炎的体征和症状，而不患有类风湿性关节炎。

个体发生自身免疫性疾病的机会与其遗传背景密切相关：主要组织相容性复合物(MHC)II类分子呈递(自身)抗原给识别MHC-肽复合物的应答性T细胞，其编码基因与疾病易感性呈现强的遗传连锁。据认为疾病早期的发病机理由T细胞介导。T细胞通过T细胞受体(TCR)

识别结合抗原性肽的特异性主要组织相容性复合物分子。MHC/肽/TCR复合物产生的信号导致T细胞活化。该三分子复合物是一般免疫应答和自身免疫的要素。目前相信，许多自身免疫性疾病的发病机理涉及MHC-结合加工的自身抗原呈递给CD4⁺ T细胞的TCR。

人软骨糖蛋白-39(HC gp-39)是在类风湿性关节炎中鉴定的一种候选自身抗原(Verheijden等人, 1997, *Arthritis and Rheum.*, 40:1115-1125)。用该蛋白质免疫BALB/c小鼠, 导致发展慢性、复发性关节炎。免疫之前于鼻内给药该蛋白质, 引起: i) DTH应答完全消失, 以及ii) 防止或延迟发病。此外, 利用半治疗方案, HC gp-39可以减少DBA/1小鼠II型胶原诱发的关节炎的发生率和严重性(Joosten等人, 2000, *Arthritis Rheum.* 43:645-655)。

HC gp-39的几种肽鉴定为可能具有自身反应性。RA患者的T细胞至少识别其中的四种肽(103-116, 259-271, 263-275和326-338)。有趣的是, RA患者比健康对照识别HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵更为显著, 提示该T细胞表位在引发或维持类风湿性关节炎中的作用。因此该肽因在RA中的治疗和诊断目的而受关注。为治疗目的, 该肽或其修饰可用于鼻内耐受(tolerization)。此外, 与DRB1*0401复合的肽可用于静脉内耐受。

与MHC分子复合的肽可以用于诊断目的。检测特异性MHC-肽复合物的常规方法有赖于带有相应TCR的T细胞的活化。然而, 这种功能性试验不能用于鉴定组织切片中带有TCR-配基的APC。

发明简述

根据本发明, 已经产生了具有自身免疫性疾病、优选类风湿性关节炎相关的MHC-肽复合物特异性的抗体。最优选来源于HC gp-39复合物的肽。

MHC-肽复合物为综合症特异的, 也就是说, 该疾病特征在于存在这种特异性MHC复合物以及自身抗原。

目前已经发现, 在能够临床确诊之前, 患者组织中经常检测到这些特异性复合物。该因此该免疫复合物预测正在发展哪种疾病。

在患者组织或血液中及时检测这些免疫复合物比较重要, 因为能因此较早地开始治疗患者, 从而延迟以至防止在疾病后期常见的严重

损害。

因此，本发明一方面提供了诊断自身免疫性疾病的方法。该方法包含检测罹患自身免疫性疾病患者中自身免疫特异性MHC-肽复合物的存在。利用特异性结合MHC-肽复合物的抗体进行检测。

发明详述

此处所用术语抗体定义为具有与相关抗原结合特性的单抗体种类或多抗体种类。抗体只识别MHC-肽复合物，而不识别单独的肽或MHC。因此，抗体必须能够识别位于MHC分子结合凹槽(binding groove)内的特异性自身免疫相关的肽。该抗体可以从包含该抗体的血清中纯化，但该抗体优选为单克隆抗体，更优选为小鼠或人单克隆抗体。因而该抗体与罹患自身免疫性疾病患者的自身免疫特异性MHC-肽复合物相结合。此特异性复合物更进一步是指MHC-肽复合物。

本领域技术人员应当清楚，仍然能够结合特异性MHC-肽复合物的抗体片段也构成本发明的一部分。因此术语片段是指包含可变结构域区域（例如Fab、F(ab')₂或Fv）的抗体部分。抗体也可能是遗传工程抗体，包括能够结合MHC-肽复合物的单链抗体或嵌合（例如双特异性）抗体。此外，抗体可能由来源于不同种类的区域组成，例如嵌合或人源化抗体。

本发明欲检测的MHC-肽复合物与自身免疫性疾病、优选类风湿性关节炎有关。该MHC复合物优选为HLA DRB 1 *0401、DRB 1 *0404、DRB 1 *0407和DRB 1 *0101型，最优选为HLA DRB 1 *0401，而复合物中的肽优选为RA相关抗原。优选利用具有来源于HC gp-39的肽的复合物制备抗体。该肽优选包含HC gp-39的氨基酸263-273或263-275(HC gp-39²⁶³⁻²⁷³或HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵)，但是氨基酸序列有可能有小的变异。这种抗体可检测HC gp-39相关的MHC-肽复合物，最可能该抗体可检测其中的肽是来自HC gp-39的MHC-肽复合物。

本领域技术人员应当清楚，肽可能在其任一侧或两侧延长，并仍然发挥相同的免疫学功能，即它在MHC相关的复合物中能够由抗体识别。延长的部分可能是类似于该蛋白质天然序列的氨基酸序列。然而，肽也可能延长为非天然序列。肽自身序列也可能稍有不同，但仍然能

够由抗体识别。

通过全序列中的氨基酸差异，或者通过在所述序列中缺失、置换、插入、颠换或添加氨基酸，可以表明序列、特别是小肽序列中存在的变异。已经描述了预期基本上不改变生物学和免疫学活性的氨基酸置换。相关氨基酸之间的氨基酸置换或者进化中时常发生的置换特别是 Ser/Ala、Ser/Gly、Asp/Gly、Asp/Asn、Ile/Val等(参见Dayhof, M.D., Atlas of protein sequence and structure, Nat. Biomed. Res. Found., Washington D.C., 1978, vol. 5, suppl. 3)。根据该资料，Lipman和Pearson开发了一种快速敏感的蛋白质比较(Science, 227:1435-1441, 1985)并确定同源多肽之间功能相似性的方法。

可以利用公知的有机化学肽合成方法(例如J. Amer. Chem. Soc. 85:2149 (1963)和Int. J. Peptide Protein Res. 35:161-214 (1990)所描述的固相肽合成)制备(较小)肽。

可以通过C和/或N端修饰降低外肽酶催化的水解作用而使肽稳定。修饰可包括：C端酰化(例如乙酰化= Ac-肽)、N端引入酰胺(例如肽-NH₂)、联合酰基化和引入酰胺(例如Ac-肽-NH₂)以及引入D-氨基酸代替L-氨基酸。(Powell等人, J. Pharm. Sci., 81:731-735, 1992)。

其它修饰集中在防止内肽酶水解作用。这些修饰的例子有：引入D-氨基酸代替L-氨基酸、修饰的氨基酸、肽内环化、引入修饰的肽键，例如还原的肽键 ψ [CH₂NH]以及例如类肽(peptoid)(N-烷基化甘氨酸衍生物)(Adang等人, Recl. Trav. Chim. Pays-Bas, 113:63-78, 1994以及Simon等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:9367-9371, 1992)。

可以根据标准方法制备单克隆抗体。在有或没有合适佐剂的存在下，用包含MHC-肽复合物的制剂免疫动物。然后，利用适当的融合技术，优选PEG融合(Kohler和Milstein, Nature 256; 495-497, 1975)或电融合(Van Duijn等人, Exp. Cell Research, 183, 463-472, 1989)，将免疫动物的B细胞与骨髓瘤细胞融合产生杂交瘤。单克隆抗体的制备手册(例如Harlow和Lane, Antibodies : a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory 1988或者Coligan等人, Current Protocols in

Immunology, John Wiley and Sons Inc. 1992) 详细描述了免疫、融合、杂交瘤选择、杂交瘤的克隆和扩增、以及单克隆抗体纯化的标准方法。

抗原特异性B细胞可以在B细胞培养体系、优选EL-4 B细胞培养体系中, 于有限稀释条件下选择并生长。各个B细胞克隆然后进行融合, 以获得产单克隆抗体的杂交瘤, 如此处引入以供参考的EP448470和US6,020,170所述。

还可以根据本领域公知的技术产生人单克隆抗体或抗体片段。对适当的小鼠单克隆抗体进行嵌合或人源化, 可以产生人抗体或抗体片段。另一众所周知的产生人抗体或抗体片段的技术是噬菌体展示技术。还可以通过EBV转化体内致敏的B细胞、通过体外免疫的B细胞永生化、或者通过表达人免疫球蛋白所有组成成分的免疫的转基因小鼠B细胞永生生化产生人单克隆抗体。

用适当的复合物免疫可以利用如实施例1所述分离的MHC-肽复合物进行。作为复合物的来源, 也可利用抗原递呈细胞(APC), 例如具有适当的MHC复合物并带有特定自身抗原(例如通过将HC gp-39提供给APC)的单核细胞、树突状细胞和B细胞。将完全目的蛋白质提供给APC的替代方法是可提供其子序列。子序列的长度并不重要, 只要其包含为相关MHC分子所识别的表位。这些肽优选具有9-55个氨基酸残基的氨基酸序列。该肽更优选具有9-35、特别是9-25个氨基酸残基的氨基酸序列。更加优选的肽具有9-15个氨基酸残基的氨基酸序列。最优选的肽是HC-gp39²⁶³⁻²⁷³或HC-gp39²⁶³⁻²⁷⁵。

因此, 本发明的目的也在于提供自身免疫性疾病、优选类风湿性关节炎相关的MHC-肽复合物的特异性抗体。该MHC复合物类型优选为HLA DRB1*0401、DRB1*0404、DRB1*0407和DRB1*0101, 最优选HLA DRB1*0401, 而复合物中的肽优选为RA相关抗原。最优选的肽来源于HC gp-39。该肽优选包含HC gp-39的263-273或263-275位氨基酸(HC-gp39²⁶³⁻²⁷³或HC-gp39²⁶³⁻²⁷⁵), 但是氨基酸序列有可能有小的变异。最优选抗体是ORG3 8948 08A、ORG3 8948 12A或ORG3 8948 04B。

本发明目的还在于提供与特异性MHC-肽复合物（其中肽由较小的RA相关肽的多聚体、例如二聚体或三聚体组成）反应的抗体。多聚体可以是由许多相同的肽组成的同聚体，或者是由不同的肽组成的异聚体。

本发明的另一目的在于提供与自身免疫特异性复合物（其中的肽与MHC分子相连，因此结合凹槽由肽占据）反应的抗体。柔性的接头分子（优选也由氨基酸序列组成）可连接肽。MHC亚基也可能直接或通过柔性间隔区(spacer)以共价键相连。它们可能以单体或二聚体的Ig分子为“支架”(scaffold)进行构造。MHC分子不必具有其恒定结构域，可能只由其可变结构域组成，彼此直接共价连接或者通过柔性接头相连。可以利用常规重组DNA技术制备这种抗体或其片段。以IgG为支架的二聚体MHC/肽复合物如Lebowitz等人(1999) *Cellular Immunology* 192:175-184所述。

MHC I的四聚体MHC/肽复合物如Davis等人(1996) *Science* 274:94-99所述，MHC II的四聚体MHC/肽复合物如Gutgemann等人(1998) *Immunity* 8:667-673和Kotzin等人(2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:291-296所述。

本发明的抗体可用于鉴定自身免疫特异性复合物（例如组织切片中APC上的HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵）以及定量MHC-肽复合物（例如各个APC上的DRB1*0401/HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵复合物）。利用特异性抗体定量MHC-肽复合物为监控疾病活性提供了机会。抗体能够另外用于定位病理组织内的APC。

依靠抗体，即MHC-肽复合物的特异性，能够诊断几种自身免疫性疾病，例如胰岛素依赖性糖尿病、多发性硬化、重症肌无力、牛皮癣或类风湿性关节炎。此外，利用RA相关的MHC-肽复合物的特异性抗体，能够区分类风湿性关节炎和其它原因的慢性炎性疾病，例如多关节炎(polyarthritits)、牛皮癣关节炎、脊柱关节病(spondyloarthropathy)或骨关节炎。

若干技术利用抗体或抗体片段检测特异性MHC-肽复合物。这些

技术包括但不限于：免疫组织化学、FACS、免疫沉淀反应以及Western印迹。抗体或抗体片段可未标记使用或缀合酶、放射性同位素、荧光色素、顺磁颗粒或生物素分子使用。

本发明的另一目的在于提供用于通过例如亲和层析纯化MHC-肽自身免疫复合物的抗体。为此目的，利用本领域公知技术将抗体偶联至固体基质，例如Sephrose小珠、硅石(silica)小珠或顺磁小珠。为此目的使用的抗体为本发明诊断方法所述的抗体。

此外，这种抗体可用来抑制T细胞体外和体内对自身抗原肽的应答。

本发明的另一目的在于提供治疗所用抗体。本发明因此还提供通过给予针对自身免疫复合物（更具体而言是MHC-肽复合物，优选MHC-HC gp-39子序列复合物，更优选DRB1*0401, DRB1*0404, DRB1*0101或DRB1*0407/HC gp-39²⁶³⁻²⁷³或HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵复合物）的抗体治疗自身免疫性疾病（例如胰岛素依赖性糖尿病、多发性硬化、牛皮癣、重症肌无力和类风湿性关节炎，最优选疾病为类风湿性关节炎）的方法。最优选抗体为抗体ORG38948 08A、ORG38948 12A或ORG38948 04B。如前所述抗体的变体也可用于治疗目的。因此，本发明的单克隆抗体可用于制造自身免疫性疾病、更优选类风湿性关节炎的治疗药物。通过给予本发明的抗体阻断T细胞活化，可以减少炎症。

为避免对抗体的抗原性反应，优选使用人抗体。如果抗体是非人来源，则优选人源化抗体。已知人源化抗体的方法，例如CDR移植(Jones等人, Nature 321, 522-525, 1986)。

抗体ORG38948 08A、ORG38948 12A或ORG38948 04B已经保藏在ECACC, Salisbury, Wiltshire SP4 OJG, UK, 登录号分别为99061728; 99061729和99061730。按照布达佩斯条约(Budapest Treaty)的条款进行这些保藏。

下列实施例说明本发明，决不应理解为限制本发明的范畴。

附图说明

图1 Org38948的单克隆抗体不与DRBI*0401分子反应。

在包被纯化的 Org38948(a) 或 DRB1*0401(b) 的微孔 elisa (microelisa) 板上测定单克隆抗体滴度。平板然后与山羊抗小鼠HRP温育, 利用标准ELISA方法进行显色反应。

图2 免疫沉淀反应确定抗Org38948 MAb识别MHC II类分子。

上部: 印迹1; 非还原条件下进行SDS/PAGE, 利用L243进行印迹。
下部: 印迹2; 还原条件下进行SDS/PAGE, 利用L227进行印迹。

泳道1: 分子量标志, 泳道2: ORG38948 01A (IgG1, κ), 泳道3: ORG38948 04B (IgA, κ), 泳道4: ORG38948 08A(IgG1, κ), 泳道5: ORG38948 09A(IgA, κ), 泳道6: ORG38948 11B(IgG1, κ), 泳道7: ORG38948 12A(IgG1, κ), 泳道8: ZP(19-38)1A(IgG1对照), 泳道9: L243(抗HLA-DR), 泳道10: ZP 1A(IgA对照)。注意: ORG38948 09A是与Org38948和DRB 1*0401两者都反应的抗体。

图3a 抗Org38948 MAb识别带有HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵的DRB1*0401阳性BSM上的HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵复合物。

FACS分析带有HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵的BSM细胞(————), 用抗Org38948抗体染色, 与空载细胞(non-loaded)(-----)的染色相比较。抗HLA/DR, L243, 用作存在DR分子的阳性对照。同型对照抗体用作阴性对照(.....)。

图3b: 抗Org38948 MAb识别带有HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵的DRBI *0401阳性Priess上的HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵复合物。

FACS分析带有HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵的Priess细胞(————), 用抗Org38948抗体染色, 与空载细胞(-----)染色相比较。抗HLA/DR, L243, 用作存在DR分子的阳性对照。同型对照抗体用作阴性对照(.....)。

图4: Org38948的抗体通过Org38948抑制T细胞杂交瘤的活化。

包被Org38948复合物, 并与逐渐升高浓度的MAb以及目的T细胞杂交瘤温育。37°C温育两天后, 确定IL-2的生成。每个数值代表三份培养物的平均计数。a)杂交瘤5G11, b)杂交瘤4G11, 以及c)杂交瘤

8B12.

图5: Org38948的抗体通过HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵脉冲的BSM细胞抑制T细胞杂交瘤的活化。

HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵脉冲的BSM细胞与10 µg/ml MAb以及或T细胞杂交瘤5G11(左图)或14G11(右图)温育。37°C温育两天后, 确定IL-2的生成。每个数值代表三份培养物的平均计数+标准差。

实施例

实施例1

Org38948的制备

Org38948是DRB1*0401(DRA, DRB1*0401)二聚体与包含HC gp-39的263-275位氨基酸的肽的复合物, 溶于0.05%十二烷基麦芽糖苷(dodecylmaltoside)的去污剂溶液中。

如Nag等人所述(J. Immunol. (1993) 150: 1558-1564)稍作改变纯化DRB1*0401分子。简言之, EBV转化的成淋巴样(lymphoblastoid)细胞系BSM(NIGMS; GM06821)于包含10% FCS、2 g/l葡萄糖、4 mM L-谷氨酰胺的RPMI 1640培养基中培养。收获细胞以后, 用0.5 % Triton X100的PBS提取DRB1*0401分子。然后溶解产物经过滤澄清, 再用10 kD超滤膜浓缩。浓缩的Triton X100溶解产物上样偶联L243的Sepharese-4B柱, 用0.05%十二烷基麦芽糖苷、pH 11.3的PBS洗脱结合的DRB1*0401。组分立即用20%磷酸二氢钠缓冲液中和, 通过0.05%十二烷基麦芽糖苷、pH 7.3的PBS的DEAE离子交换柱收集DRB1*0401分子。

在GMP条件下, 于Diosynth利用fmoc化学合成对应于HC gp-39的263-275位氨基酸残基的肽。

通过摩尔过量50倍的HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵与纯化的DRB1*0401分子于0.05%十二烷基麦芽糖苷、pH 7.0的PBS中37°C温育72-80 h制备MHC-肽复合物。最后通过S-300/S-200串联的分子大小排阻柱层析去除游离

肽，纯化的复合物保存在0.05%十二烷基麦芽糖苷、pH 7.2的PBS中。

实施例2

产生Org38948的单克隆抗体

按照表1所示时间表免疫六周龄的雌性BALB/c小鼠。在免疫程序的第48天，通过眼眶(*orbital puncture*)取血样。此时发现高滴度的Org38948和DRB1*0401抗体(介于22,000-46,000)。在使用的免疫程序之间没有发现显著差别。末次注射5天后，处死小鼠，如前所述制备去除红细胞的脾细胞群体(Steenbakkers, 1992 *J. Immunol. Methods* 152:69; Steenbakkers, 1994, *Molecular Biology Reports* 19:125)。这些脾细胞群体冷冻于-140°C，或直接地用来产生MAb。

为产生MAb，混合小鼠1、小鼠2和小鼠3的 2×10^7 去除红细胞的脾细胞，在塑料培养瓶中于DMEM/HAM's F12(Gibco BRL, Paisly, UK, cat.no. 041-91825)、10%小牛血清(Hyclone, Logan, UT, USA)37°C温育1 h，以去除大部分单核细胞。非贴壁细胞随后在DRB1*0401包被的培养皿中进行三轮连续淘选(*panning*)，如Steenbakkers等人所述(1994, *Molecular Biology Reports* 19:125)。这些步骤从细胞悬液中去除了针对HLA-DRB1*0401的B细胞。然后将得到的细胞悬液在Org38948包被的培养皿上37°C温育90 min，以选择针对DRB1*0401/HC gp39²⁶³⁻²⁷⁵复合物的B细胞。仔细洗涤去除未结合细胞，最后经胰蛋白酶处理收集结合细胞。

如前所述，通过克隆扩增和微型电融合(*mini-electrofusion*)，从这些选择的B细胞中得到产单克隆抗体的杂交瘤(Steenbakkers等人, 1994 *Molecular Biology Reports* 19:125)。简言之，选择的B细胞与T细胞上清液以及50,000照射的(2500 rad)EL-4 B5细胞在96孔平底组织培养板、终体积为200 μ l的DMEM/HAM's F12、10%小牛血清中混合。第8天，上清液利用DRB1*0401或Org38948包被的平板进行ELISA测试。将产生可与Org38948反应而不与DRB1*0401反应的MAb的B细胞培养物进行微型电融合程序。这些培养物中的特异性B细胞与 10^6 NS-1

骨髓瘤细胞混合，经DMEM/HAM's F12洗涤去除血清。然后细胞用链霉蛋白酶溶液处理3 min，接着用融合培养基洗涤。在50 μ l融合杯中，通过交流电场30 s、2MHz、400V/cm，继之以10 μ s、3kV/cm的矩形强电场脉冲，并再次以30s、2MHz、400 V/cm的交流电场进行电融合。最后，融合杯中内容物转到选择培养基(DMEM/HAM's F12、10 % FCS、 10^{-4} M次黄嘌呤(Sigma[®])、 1.6×10^{-5} M胸苷(Sigma[®])、0.4 μ M氨基蝶呤(Life Technologies[®])、1 %人膀胱癌T24条件培养基(ATCC HTB 4))，有限稀释条件下接种96孔微量滴定板。融合后第13天，检查培养物的杂交瘤生长，并利用DRB1*0401或Org38948包被的平板再次进行ELISA筛选。

在B细胞培养及微型电融合以后，发现5种抗体(ORG38948 01A、ORG38948 04B、ORG38948 08A、ORG38948 11B和ORG38948 12A) ELISA显示与Org38948的反应性，而不与DRB1*0401反应(图1a和1b)。这些Mab也不与聚苯乙烯板上包被的HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵ 反应，Org38948的反应性不受游离的HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵抑制，因此这些Mab针对DRB1*0401和HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵ 的联合表位。BIAcore实验证实不与肽HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵结合。

为进一步证明Mab的特异性，我们利用Org38948进行免疫沉淀反应。简言之，10 μ g Org38948与 6×10^6 预先加入1 ml杂交瘤上清液的绵羊抗小鼠Ig偶联的顺磁小珠(Dynal[®] 110.02, Oslo, Norway)，在300 μ l 0.1% BSA的PBS中4 $^{\circ}$ C温育2 h。然后用PBS洗涤免疫沉淀物三次，在样品缓冲液中煮沸，非还原和还原条件下进行10%凝胶的SDS-PAGE。利用标准方法将蛋白质电泳转移到PVDF膜。用PBS、0.5% Tween20[®]、5%脱脂奶粉封闭印迹上游离的结合部位以后，在0.5% Tween20[®]、1% BSA、1%正常山羊血清的PBS中，将印迹与抗DR MAb(20 ml 2 μ g/ml L243或12.5 ml 1.1 μ g/ml L227)室温下温育1 h。然后在相同缓冲液中，将印迹与结合碱性磷酸酶的山羊抗小鼠Ig温育1 h。最后，利用BCIP[®]和NBT为生色底物进行印迹显色。这些实验表明，该Mab能够免疫沉淀60 kD的分子，其在还原条件下进行SDS/PAGE时，分离为33 kD和

28 kD的两个分子(图2)。该分子量证实, 该Mab与MHC II类分子的反应性, 其由两个非共价键相连的多肽链组成(α 链32kD, β 链28kD)。

实施例3

Org38948的Mab识别带有HC gp39²⁶³⁻²⁷⁵的DRB1*0401阳性BLCL上的DRB1*0401/HC gp39²⁶³⁻²⁷⁵复合物。

利用FACS分析, 确定Mab结合不同的、经多种肽脉冲的、表达MHC的EBV转化B细胞系(BLCL)。利用自动化Milligen 9050合成仪, 通过固相肽合成方法合成肽, 并经反相HPLC纯化。

简言之, 10^6 BLCL与40 ug肽在DMEM/HAM's F12或空白培养基中37°C温育4 h。温育后, 用2% FCS、0.02% 叠氮钠的PBS洗涤细胞。大约 2×10^5 细胞与130 ul包含Mab的杂交瘤上清液(外加20 ul 20% FCS、0.02% 叠氮钠的PBS)4°C温育1 h。细胞用2% FCS、0.02% 叠氮钠的PBS洗涤两次后, 其与50 ul、20% FCS、0.02% 叠氮钠(外加10 ul山羊抗小鼠Ig/FITC(Beckton & Dickinson))的PBS 4°C温育1 h。细胞随后用2% FCS、0.02% 叠氮钠的PBS洗涤三次, 最后重悬于400 ul 2% p-甲醛的PBS。细胞与生物素化的HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵温育, 并用链亲和素/PE(Beckton & Dickinson)染色, 作为肽结合的对照。用抗HLA/DR L243(从杂交瘤ATCC HB 55中纯化的Ig)进行染色, 作为HLA-DR表达的对照。用FACScanTM(Beckton & Dickinson)分析染色的细胞。在各种情况下, 利用前向和侧向散射分析排除死细胞和碎片, 以进一步分析。

两种DRB1*0401纯合的BLCL(BSM和Priess)带有HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵, 抗体对这些细胞的反应性与不带有该肽的细胞相比较。图3a和b表明, 除ORG38948 11B之外的所有Org38948特异性抗体能区分带有和不带肽的BLCL。用ORG38948 01A、ORG38948 08A和ORG38948 12A获得DRB1*0401/HCg p-39²⁶³⁻²⁷⁵复合物的最好染色。但是, 其中两种抗体(01A和08A)对一种BLCL(BSM)出现染色背景, 可能使其用处不大。

实施例4

Org38948的Mab的表位定位

通过在DRB1*0401的情况下研究结合多种HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵的修饰和截短的肽,我们定位了抗体识别表位。将抗体的反应性与通过小鼠T细胞杂交瘤8B12(在HLA-DRB1*0401的情况下,识别HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵的小鼠T细胞杂交瘤。如Cope等人,1999 Arthritis and Rheumatism 42:1597-1507所述,该杂交瘤由HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵免疫的HLA-DRB1*0401^{+/+}、人CD4^{+/+}、I-A β ^{-/-}转基因小鼠产生) TCR的识别相比。

允许在肽主链和侧链有多种修饰,而不影响ORG38948 12A或8B12的识别(表II)。就识别的表位而论,抗体ORG38948 01A和ORG38948 08A的识别似乎更重要,因为对修饰识别得不好(ORG38948 08A)或根本不识别(ORG38948 01A)。ORG38948 12A不与N端伸长两个氨基酸的肽(DRB1*0401/HC gp-39²⁶¹⁻²⁷⁵)反应。

另一实验中,测试多种截短的HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵以确定ORG38948 12A所识别的DRB1*0401的最小表位。去除C端两个氨基酸不失去结合,但N端不允许截短(表III)。所以,ORG38948 12A识别的最小表位是DRB1*0401/HC gp-39²⁶³⁻²⁷³。ORG38948 12A识别的表位不同于杂交瘤8B12识别的表位。除C端截短两个氨基酸之外,杂交瘤8B12允许去除N端的两个氨基酸。

实施例5

Org38948的Mab的精细特异性

利用如实施例3所述的相同方法,研究是否1) 抗Org38948 Mab与带有一套不同肽的DRB1*0401交叉反应,以及2) 在DRB1*0401的情况下,ORG38948 12A的结合仅限于HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵,或者也识别其它的HLA-DR/HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵复合物。

附1) 用与DRB1*0401结合良好的肽脉冲Priess细胞。表IV总结的数据表明,未观察到与带有组成DRB1*0401结合基序的其它HC gp-39

衍生肽的DRB1*0401交叉反应。也未发现与带有来自流感血细胞凝集素(*Influenza Heamagglutinin*)和麻疯杆菌(*Mycobacterium Leprae*)的无关肽的DRB1*0401交叉反应。

ORG38948 12A也识别生物素化的HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵，而抗体ORG38948 01A、ORG38948 04B和ORG38948 08A不识别。由于生物素偶联到肽的N端，这提示后者Mab识别的表位接近复合物中肽的N端。

附2)为研究DRB1*0401/HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵外ORG38948 12A与其它HLA-DR/HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵复合物的交叉反应性，使用下列表征清楚的、纯合的、EBV转化的或B淋巴样细胞系(BLCL)：

- Priess: DRA, DRB1*0401
- BSM: DRA*0101, DRB1*0401, DRB4*0101, DQA1*0301, DQB1*0302, DPA1*01, DPB1*01012.
- YAR: DRA*0101, DRB1*0402, DRB4*0101, DQA1*0301, DQB1*0302, DPA1*01, DPB1*0401
- SA9001: DRA, DRB1*0101, DQ1, DP4.
- BM92: DRA*0101, DRB1*0404, DRB4*0101, DQA1*0301, DQB1*0302, DPA1*01, DPB1*0402.
- MGAR: DRA*0102, DRB1*1501, DRB5*0101, DQA1*0102, DQB1*0602, DPA1*01, DPB1*0401.
- JHAF: DRB1*0407, DRB4*0101, DQA1*0301, DQB1*0301, DPA1*01, DPB1*0301.
- AMALA: DRA*0102, DRB1*1402, DRB3*0101, DQA1*0501, DQB1*0301, DPA1*01, DPB1*0402.
- EK: DRA*0102, DRB1*1401, DRB3*0202, DQA1*0101, DQB1*0503, DPA1*01, DPB1*0402.

这些纯合的BLCL带有HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵，随后用ORG38948 12A染色。在一系列实验中，ORG38948 12A在DRB1*0401和DRB1*0407的情况下，都染色HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵(表V)。通常浓度的抗体下，在DRB1*0101、DRB1*0404、DRB1*1402 (RA易感型单倍型)、DRB1*0402、DRB1*1301、DRB1*1401 (紧密相关，非RA易感型单倍

型)以及DRB1*1501 (更远相关, 非RA易感型单倍型)的情况下未观察到肽的染色。在非常高的抗体浓度时, 在DRB1*0101, DRB1*0404, DRB1*1301和DRB1*1401的情况下也发现与HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵较弱的反应性。在这些实验的对照中, 表明i) ORG38948 12A不结合空载的BLCL, ii) HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵结合BLCL, 以及iii)所有BLCL均显示高水平表达DR(数据未显示)。

实施例6

Org38948的MAb通过Org38948和HC gp39²⁶³⁻²⁷⁵脉冲的DRB1*0401阳性BLCL抑制T细胞杂交瘤的活化。

利用两种不同的分析测定抗Org38948 MAb对抗原诱导的T细胞杂交瘤活化的抑制。在一个分析中, 用MHC/肽-复合物刺激T细胞杂交瘤。在另一个分析中, 利用带有HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵的EBV转化的B细胞刺激T细胞杂交瘤5G11、8B12和14G11(在HLA-DRB1*0401的情况下, 识别HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵的小鼠T细胞杂交瘤, 如Cope等人, 1999 *Arthritis and Rheumatism* 42:1597-1507所述, 这些杂交瘤由HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵免疫的HLA-DRB1*0401^{+/+}、人CD4^{+/+}、I-A β ^{-/-}转基因小鼠产生)。

为了利用MHC/肽复合物刺激, 用100ul PBS中浓度为200 ng/ml Org38948 4℃过夜包被平底微孔。用PBS洗涤两次, 去除过量的复合物。然后, 各孔与100 ul DMEM/HAM's F12、10% FCS中的各种浓度MAB, 于37℃温育1 h。与MAB预温育以后, 加入100 ul DMEM/HAM's F12、10% FCS中的T细胞杂交瘤悬浮液(5G11和14G11为2 x 10⁴ c/孔; 8B12为10⁴ c/孔)。培养物于37℃温育两天, 最后收集上清液, 测定小鼠IL-2。图4a表明, 所有MAB均以剂量相关方式抑制杂交瘤5G11的活化。与对照IgG MAB相比, 利用ORG38948 01A获得部分抑制。相反, 与ORG38948 08A和ORG38948 12A温育, 浓度为25 ug/ml时完全抑制。与抗HLA/DR MAB L243相比, 复合物特异性抗体是T细胞杂交瘤活化的低效抑制剂, 这可能由于抗体的亲合力有差别。利用杂交瘤14G11获得类似结果(图4b)。杂交瘤8B12受抑制较少(图4c), 与我们先前的观

察结果—该杂交瘤需较少复合物成为完全刺激—相一致。

在另一个分析中, 1.2×10^6 细胞与 $10 \mu\text{g}$ 肽在 1 ml DMEM/HAM's F12 中 37°C 温育 5 h , 使 BSM 细胞带有 HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵。然后洗掉过量的肽, 用 $15,000 \text{ rad}$ 剂量照射细胞。随后在圆底微孔中, 2×10^4 带有肽的 BSM 细胞与 $10 \mu\text{g/ml}$ MAb 37°C 预温育 1 h , 终体积为 $100 \mu\text{l}$ DMEM/HAM's F12。然后在 $100 \mu\text{l}$ DMEM/RAM's F12、 20% FCS 中加入 2×10^4 T 细胞杂交瘤。 37°C 温育两天以后, 收集上清液, 测定小鼠 IL-2。从图 5 可以推断, 发现所有抗体在 $10 \mu\text{g/ml}$ 浓度下均抑制肽诱导的杂交瘤 5G11 和 14G11 的活化。抗 HLA/DR MAb L243 再次获得较强抑制。

注意: 利用抗小鼠 IL-2 (Pharmingen 18161D) 捕获、抗小鼠 IL-2/生物素 (Pharmingen 18172D) 为第二抗体, 在双夹心 ELISA 测定小鼠 IL-2。缀合铈 (Europium) 的链亲和素 (WallacTM 1244-360) 用于在时间解析荧光计 (time-resolved fluorometer) 中检测 IL-2 结合。

实施例 7

RA 患者滑液的 APC 上存在 DRB1*0401/HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵ 复合物

如 Baeten 等人所述 (2000, Arthritis 和 Rheumatism 43:1233-1243) 进行滑液切片的免疫组织化学分析。简言之, 滑液活检于液氮速冻, 制成 $5 \mu\text{m}$ 低温切片。丙酮固定 10 min 后, 用 1% 过氧化氢阻断内源性过氧化物酶, 切片与 3 种不同的抗 HC gp-39 MAb (06A、08B 和 10B) 的混合物或者 ORG38948 12A 温育 30 min 。用无关的同型匹配 MAb 温育平行切片作为阴性对照。切片随后与生物素化的抗小鼠第二抗体温育, 继之以链亲和素-过氧化物酶复合物 (Dako, Glostrup, Denmark) 温育。利用 3-氨基-9-乙基吖唑 (AEC) 生色底物进行显色反应。最后切片用苏木精 (haematoxylin) 复染。染色的滑液切片是双育的 (blinded), 由两个观察者独立计数。

19 名 RA 患者、10 名 SpA 患者、3 名 PsA 患者、2 名 OA 患者、1 名假性痛风患者以及迄今仍未确诊的 3 名患者的滑液组织切片, 分

别利用一套三种抗 HC gp-39 MAb 以及 ORG38948 12A, 通过免疫组织化学测试其 HC gp-39 表达, 并用 ORG38948 12A 染色。15 名共有表位阳性的 RA 患者中, 有 10 名检测到 DR4/HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵ 或 DRB1*0101/HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵ 复合物(表 VIa)。与 DRB1*0404/HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵ 和 DRB1*0101/HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵ 的反应性和 ORG38948 12A 在 DRB1*0404 和 DRB1*0101 的情况下也识别 HC gp39²⁶³⁻²⁷⁵ 的观察结果相一致(表 V)。ORG38948 12A 染色仅限于处在或邻近淋巴浸润的树突状样细胞(数据未显示)。该定位显然不同于表达 HC gp-39 细胞的定位, 这提示表达 MHC/HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵ 的细胞不是产生 HC gp-39 细胞。发现罹患各种疾病的 19 名对照患者中未有 ORG38948 12A MAb 染色(表 VIb)。其中 5 名患者因表达共有表位(DR4 或 DR1)为相关对照, 6 名为共有表位阴性, 其它患者的 HLA-DR 类型仍然未知。同型对照抗体的染色一直是阴性。

表I: 用Org38948免疫

小鼠 编号	第 0 天	第 20 天	第 41 天	第 48 天	第 59 天	第 63 天
1	100 μ g i.p.	100 μ g i.p.	100 μ g i.p.	血样	100 μ g i.p.	血样 ; 脾细胞
2	25 μ g i.p.	25 μ g i.p.	25 μ g i.p.	血样	25 μ g i.p.	血样 ; 脾细胞
3	100 μ g cFA; s.c.	100 μ g iFA; s.c.	100 μ g iFA; s.c.	血样	100 μ g i.p.	血样 ; 脾细胞
4	25 μ g cFA; s.c.	25 μ g iFA; s.c.	25 μ g iFA; s.c.	血样	25 μ g i.p.	血样 ; 脾细胞

cFA=弗氏完全佐剂; iFA=弗氏不完全佐剂

i.p.=腹膜内; s.c.=皮下

表II: Org38948的单克隆抗体的表位定位

HC gp-39 肽	识别经由				
	Mab 01A	Mab 08A	Mab 12A	8B12	
RSFTLASSETGVG	+	+	+	+	
Ac-RSFTLASSETGVG	-	-	+	+	
HOCH ₂ -(CHOH)4-CH ₂ -RSFTLASSETGVG	+/-	+/-	+	+	
Ac-RSFTLASSETGV-ψ-[CH ₂ NH]-G-NH ₂	-	+/-	+	+	
Ac-R-NhSer-FTLASSETGVG-NH ₂	-	+/-	+	+	
Ac-R-NhSer-FTLASSETGV-ψ-[CH ₂ NH]-G-NH ₂	-	+/-	+	+	
FGRSFTLASSETGVG	-	+/-	-	?	
Ac-RSFTLASSETGVG-NH ₂	-	+/-	+	+	

表III: 单克隆抗体ORG3894812A的表位定位

DRB1*0401 中的 HC gp-39 肽	结合	识别经由
		Mab 12A 8B12
RSFTLASSETGVG 263-275	+++	+
RSFTLASSETGV 263-274	+++	+
RSFTLASSETG 263-273	+++	+/-
RSFTLASSET 263-272	++	-
FTLASSETGVG 265-275	+++	+/-
TLASSETGVG 266-275	-	-
SFTLASSETGV 264-274	+++	+
FTLASSETG 265-273	+	-

表IV: Org38948 MAbs对带有不同肽的Priess细胞上DRA/DRBI*0401的特异性。

肽	IC50	01A	04B	08A	11B	12A
无	-	-	-	+/-	+/-	-
HC gp-39 ²⁶³⁻²⁷⁵	0.08	+	+/-	+	+/-	+
HC gp-39 ²⁶³⁻²⁷⁵ -bio	n.d.	-	-	+/-	+/-	+
HC gp-39 ¹⁰³⁻¹¹⁶	0.08	-	-	+/-	+/-	-
HC gp-39 ²⁵⁹⁻²⁷¹	0.04	-	-	+/-	+/-	-
IHA ³⁰⁷⁻³¹⁹ F	0.56	-	-	+/-	+/-	-
IHA ³⁰⁷⁻³¹⁹ F-bio	n.d.	-	-	+/-	+/-	-
MLep 18K ³⁸⁻⁵¹	0.3	-	-	+/-	+/-	-

IC50: 对DRBI*0401的相对结合亲和力; IHA: 流感血细胞凝集素; MLep; 麻疹杆菌

-: 不结合抗体 (荧光强度: 0-4)

+/: 中等结合抗体 (荧光强度: 4-40)

+: 强结合抗体 (荧光强度: 40-400)

表V: 通过单克隆抗体ORG38948 12A识别带有HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵的HLA-DR分子

BLCL	HLA DR 单倍型	RA 易感性	由 ORG38948 12A 识别
			3 µg/ml 200-500 µg/ml
BSM	DRB1*0401	DR4 Dw4	++ ++
Priess	DRB1*0401	DR4 Dw4	++ ++
SA 9001	DRB1*0101	DR1 Dw1	- +/-
BM92	DRB1*0404	DR4 Dw14	- +
AMALA	DRB1*1402	DR6 Dw16	- -
YAR	DRB1*0402	DR4 Dw10	- -
CB6B	DRB1*1301	DR6a	- +/-
EK/OH	DRB1*1401	DR6b	- +/-
MGAR	DRB1*1501	DR2 Dw2	- -
JHAF	DRB1*0407	DR4 Dw13	++ ++

各种BLCL带有HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵, 随后用ORG38948 12A染色。确认在对照中, i) ORG38948 12A不结合空载的BLCL, ii) HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵结合BLCL, 以及iii)所有BLCL显示高水平表达DR。

表VIa:RA患者的滑液中表达MHC/HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵复合物。

患者	年龄	诊断	病程	HLA-DR	MHC-肽
1	57	RA	1年	B1*0404	+
2	74	RA	2年	B1*0401	-
3	53	RA	6年	B1*0401	+
4	60	RA	7年	B1*0401	+
5	67	RA	19年	B1*0101	-
6	78	RA	20年	B1*0401	-
7	70	RA	22年	B1*0401	+
8	64	RA	25年	B1*0101	-
9	50	RA	2月	B1*04	+
10	39	RA	3月	?	-
11	50	RA	4月	B1*04	-
12	52	RA	9月	B1*04	+
13	24	RA	1年	B1*0101	+
14	33	RA	3年	B1*04	+
15	82	RA	4年	?	-
16	48	RA	6年	B1*0401,B1*0404	+
17	36	RA	8年	-/-	-
18	64	RA	15年	?	-
19	58	RA	20年	B1*04	+

RA: 类风湿性关节炎

表VIb:非RA对照的滑液中表达MHC/HC gp-39²⁶³⁻²⁷⁵复合物。

患者	年龄	诊断	病程	HLA-DR	MHC-肽
1	30	SpA	2月	?	-
2	36	SpA	3月	-/-	-
3	37	SpA	6月	?	-
4	56	SpA	6月	B1*0401	-
5	28	SpA	6月	-/-	-
6	52	SpA	8月	-/-	-
7	19	SpA	9月	-/-	-
8	22	SpA	2年	B1*0401	-
9	35	SpA	3年	?	-
10	41	SpA	12年	B1*0401	-
1	48	PsA	1月	?	-
2	60	PsA	1月	-/-	-
3	52	PsA	2年	?	-
1	73	CC	2年	-/-	-
2	76	OA			-
3	66	OA			-
4	67	?	9月	B1*04	-
5	80	?	1月	?	-
6	38	?	30年	B1*0101	-

CC: 假性痛风; SpA: 脊柱关节病; PsA: 牛皮癣关节炎;

OA: 骨关节炎

 序列表

<110> Akzo Nobel N.V.

<120> 特异性MHC-肽复合物抗体的用途

<130>

<140>

<141>

<160> 20

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<220>

<223> HC gp-39 AA 263-273

<400> 1

Arg	Ser	Phe	Thr	Leu	Ala	Ser	Ser	Glu	Thr	Gly
1				5					10	

<210> 2

<211> 13

<212> PRT

<213> 人

<220>

<223> HC gp-39 AA 263-275

<400> 2

Arg	Ser	Phe	Thr	Leu	Ala	Ser	Ser	Glu	Thr	Gly	Val	Gly
1				5					10			

<210> 3

<211> 12

<212> PRT

<213> 人

<220>

<223> HC gp-39 AA 263-274

<400> 3
Arg Ser Phe Thr Leu Ala Ser Ser Glu Thr Gly Val
1 5 10

<210> 4
<211> 10
<212> PRT
<213> 人

<220>
<223> HC gp-39 AA 263-272

<400> 4
Arg Ser Phe Thr Leu Ala Ser Ser Glu Thr
1 5 10

<210> 5
<211> 11
<212> PRT
<213> 人

<220>
<223> HC gp-39 AA 265-275

<400> 5
Phe Thr Leu Ala Ser Ser Glu Thr Gly Val Gly
1 5 10

<210> 6
<211> 10
<212> PRT
<213> 人

<220>
<223> HC gp-39 AA 266-275

<400> 6
Thr Leu Ala Ser Ser Glu Thr Gly Val Gly
1 5 10

<210> 7
<211> 11
<212> PRT
<213> 人

<210> 11
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列描述: N端连接乙酰基; C端连接NH₂; 12位Xaa是NH-CH(CH(CH₃)₂)-CH₂

<400> 11
 Arg Ser Phe Thr Leu Ala Ser Ser Glu Thr Gly Xaa Gly
 1 5 10

<210> 12
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列描述: N端连接乙酰基; C端连接NH₂; 2位Xaa是N[(CH₂)₂-OH]-CH₂-C(O)

<400> 12
 Arg Xaa Phe Thr Leu Ala Ser Ser Glu Thr Gly Val Gly
 1 5 10

<210> 13
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列描述: N端连接乙酰基; C端连接NH₂; 2位Xaa是N[(CH₂)₂-OH]-CH₂-C(O); 12位Xaa是NH-CH(CH(CH₃)₃)₂-CH₂

<400> 13
 Arg Xaa Phe Thr Leu Ala Ser Ser Glu Thr Gly Xaa Gly
 1 5 10

<210> 14
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人

<220>
 <223> HC gp-39 AA 261-275

<400> 14
 Phe Gly Arg Ser Thr Leu Ala Ser Ser Glu Thr Gly Val Gly
 1 5 10

<210> 15
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列描述; N端连接乙酰基; C端连接 NH2

<400> 15
 Arg Ser Phe Thr Leu Ala Ser Ser Glu Thr Gly Val Gly
 1 5 10

<210> 16
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 流感病毒

<220>
 <223> 血细胞凝集素 AA 307-319

<400> 16
 Pro Lys Phe Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr
 1 5 10

<210> 17
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 麻疯分枝杆菌

<220>
 <223> 18K 蛋白质 AA 38-51

<400> 17

Glu Glu Phe Val Val Glu Phe Asp Leu Pro Gly Ile Lys Ala
1 5 10

<210> 18

<211> 14

<212> PRT

<213> 人

<220>

<223> HC gp-39 AA 103-116

<400> 18

Ser Gln Arg Phe Ser Lys Ile Ala Ser Asn Thr Gln Ser Arg
1 5 10

<210> 19

<211> 13

<212> PRT

<213> 人

<220>

<223> HC gp-39 AA 259-271

<400> 19

Pro Thr Phe Gly Arg Ser Phe Thr Leu Ala Ser Ser Glu
1 5 10

<210> 20

<211> 13

<212> PRT

<213> 人

<220>

<223> HC gp-39 AA 326-338

<400> 20

Val Gly Tyr Asp Asp Gln Glu Ser Val Lys Ser Lys Val
1 5 10

图1

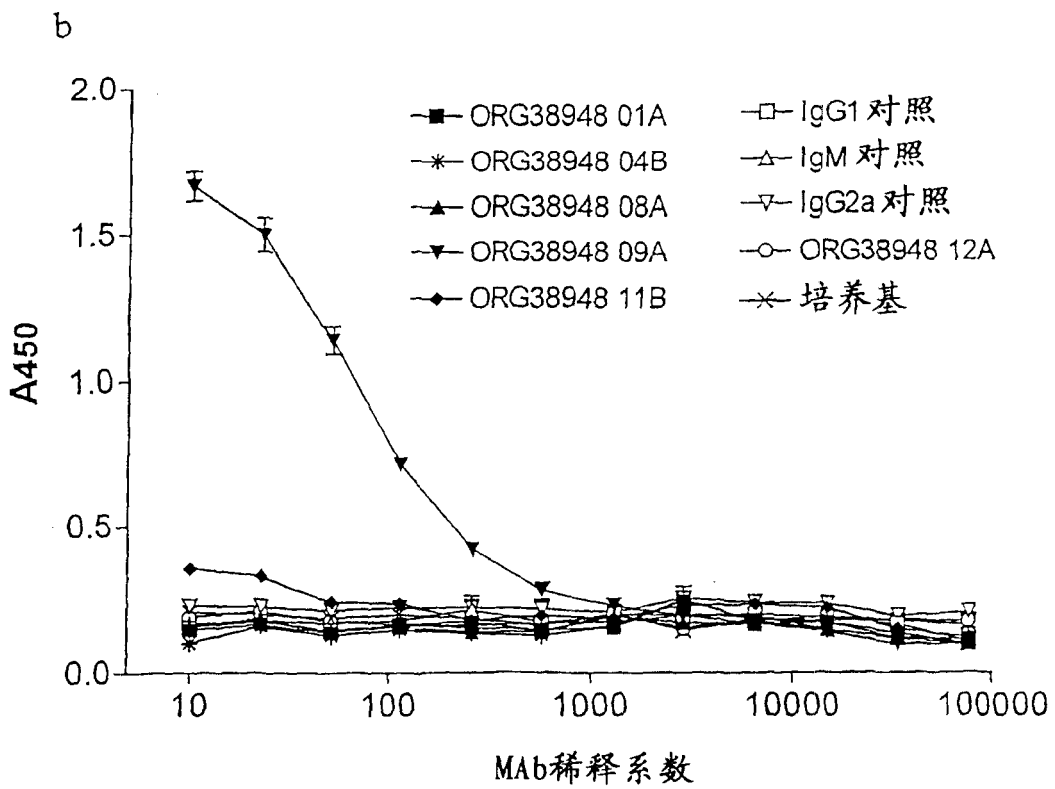
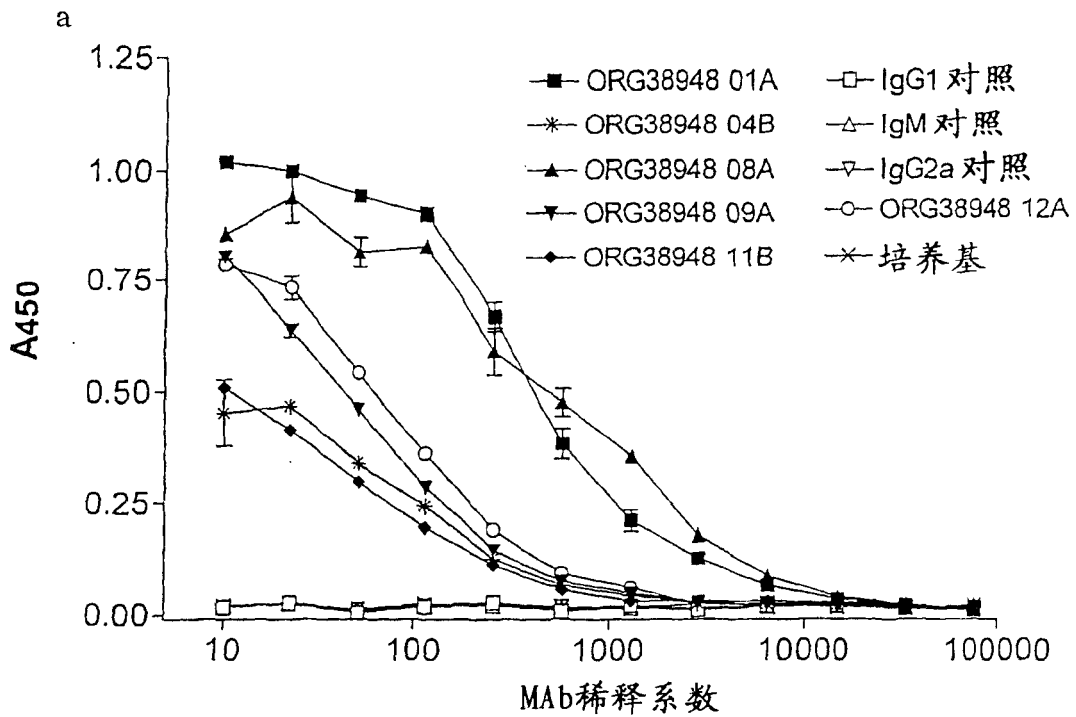


图 2

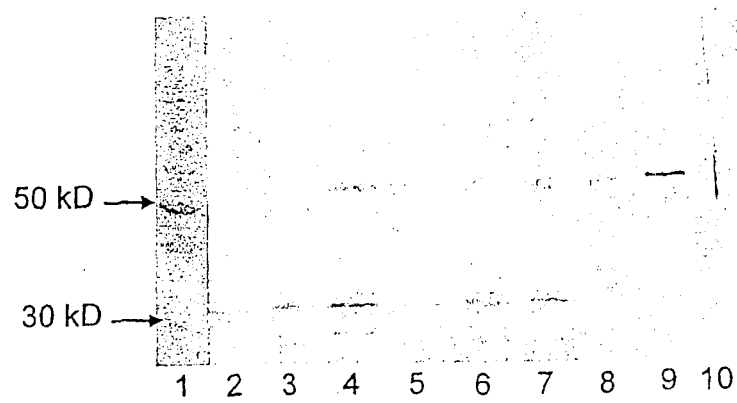
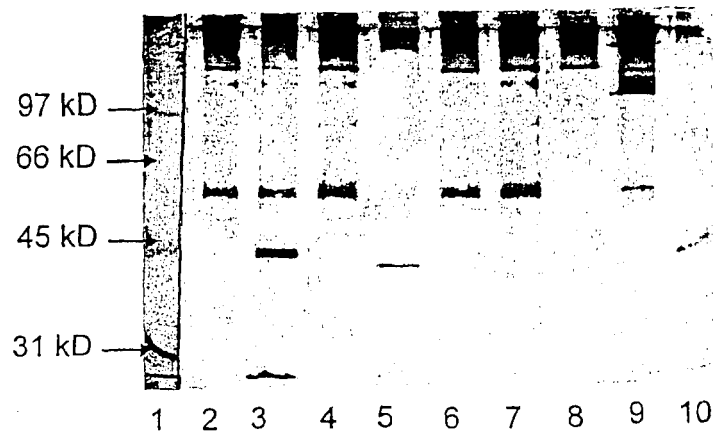


图 3a

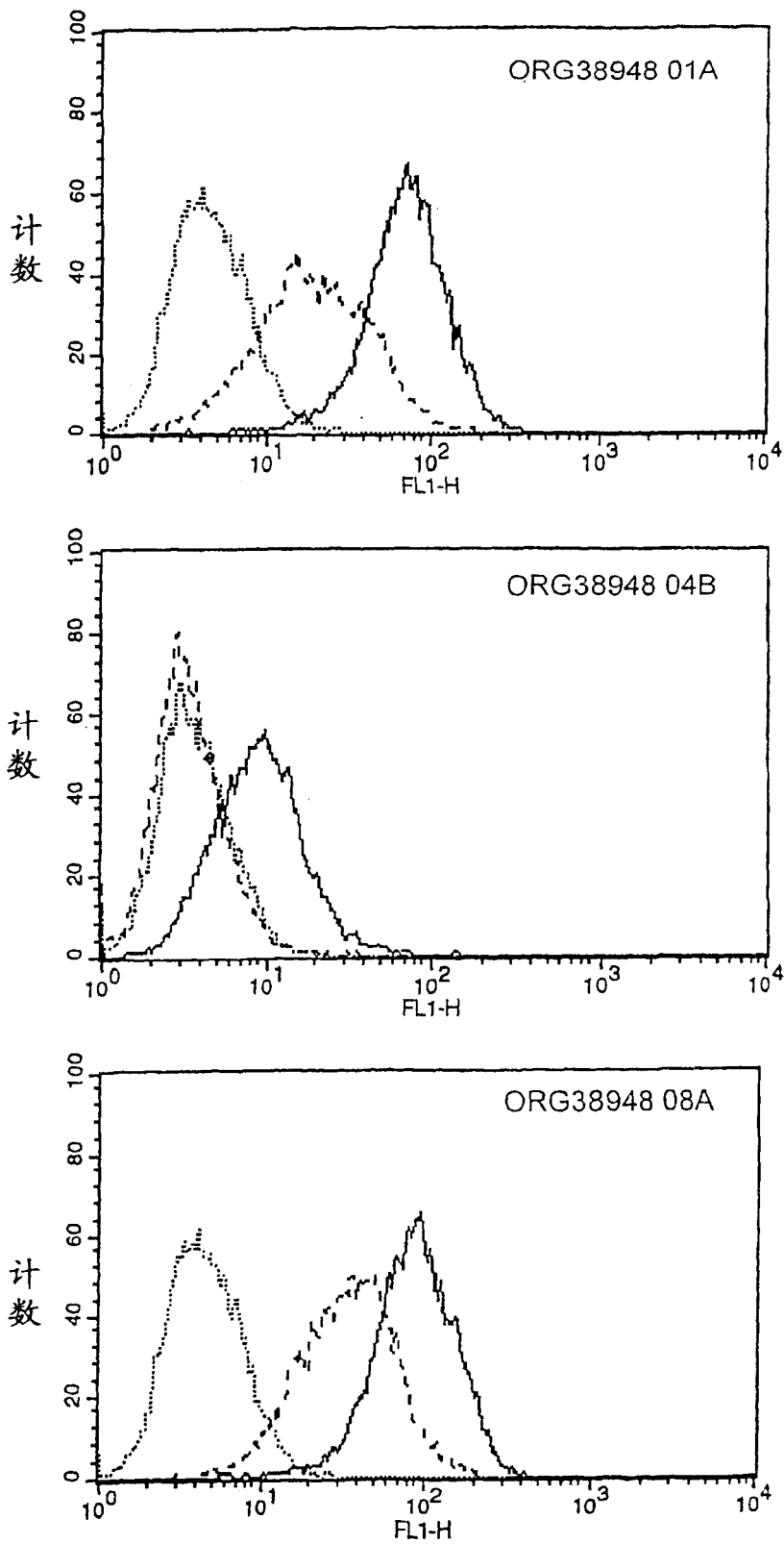


图3a (续)

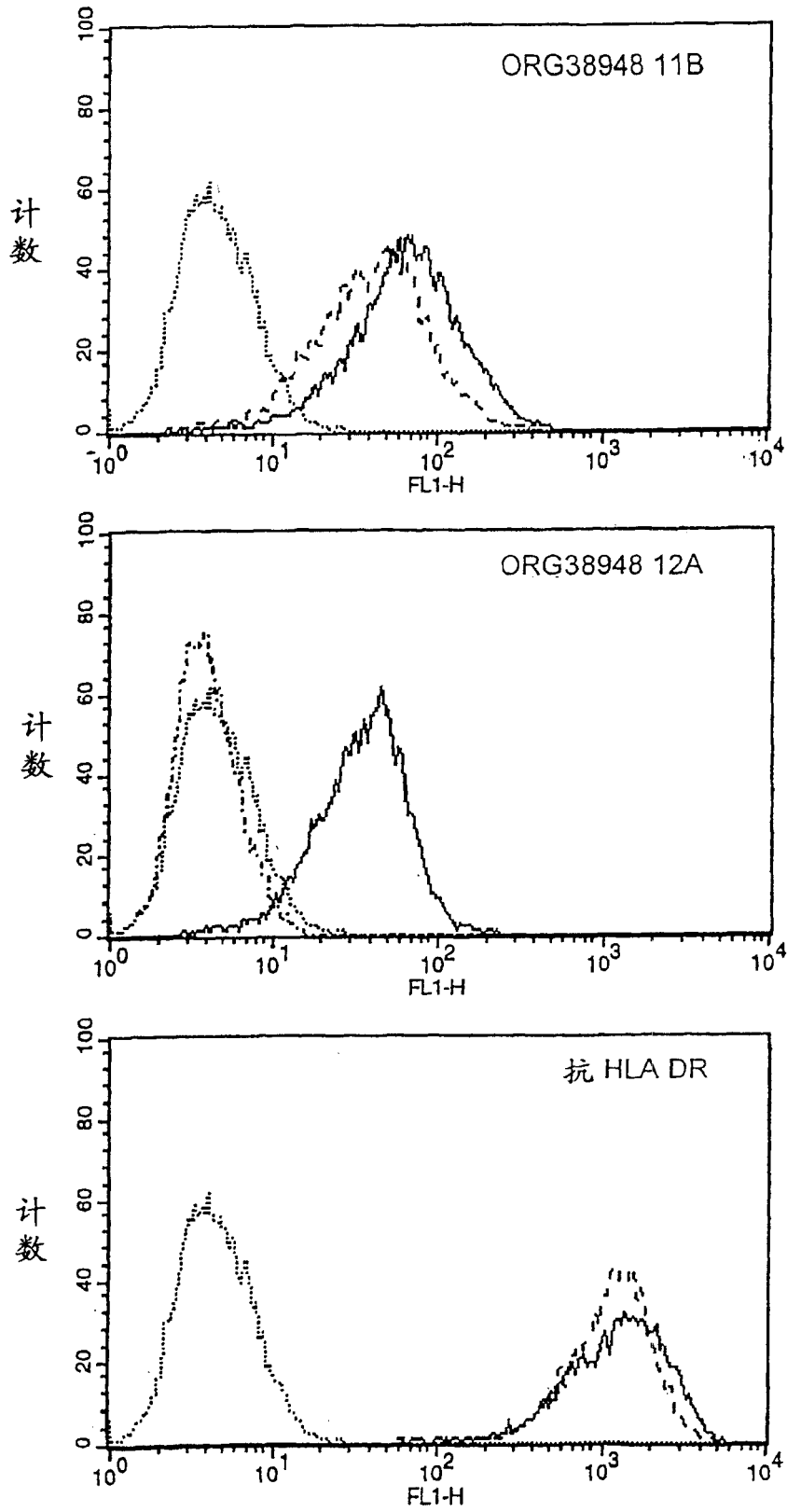


图 3b

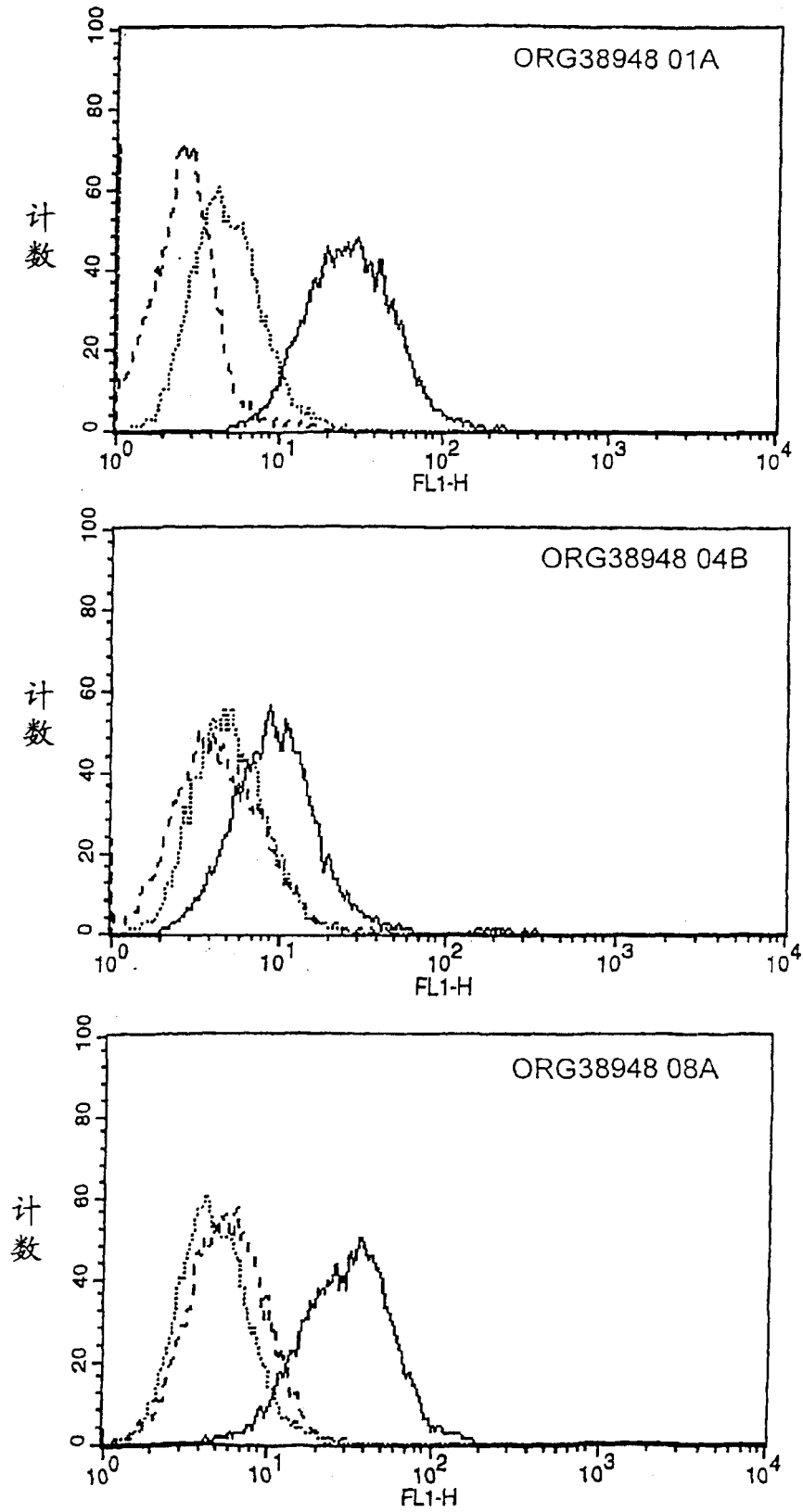


图3b (续)

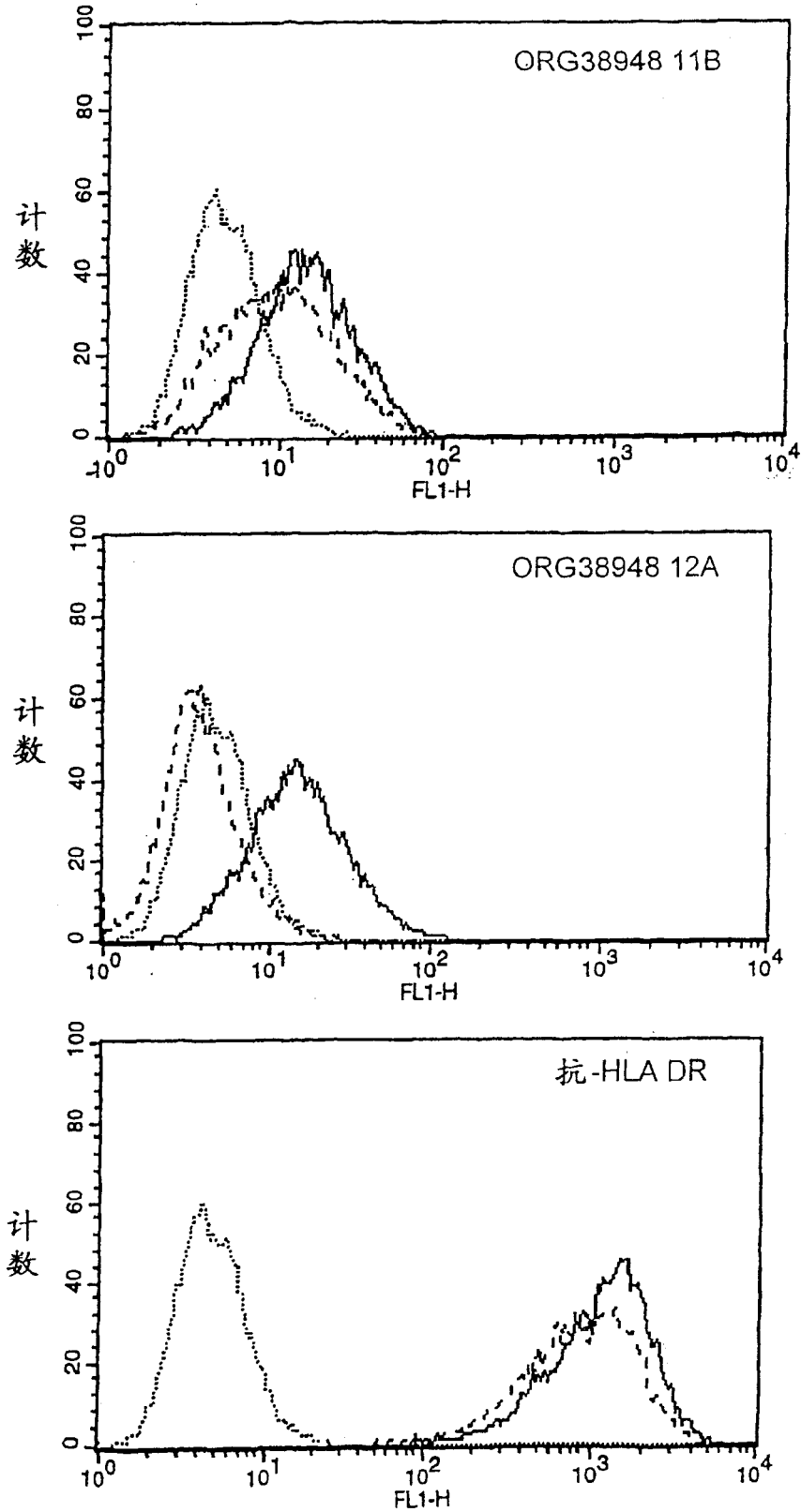


图 4

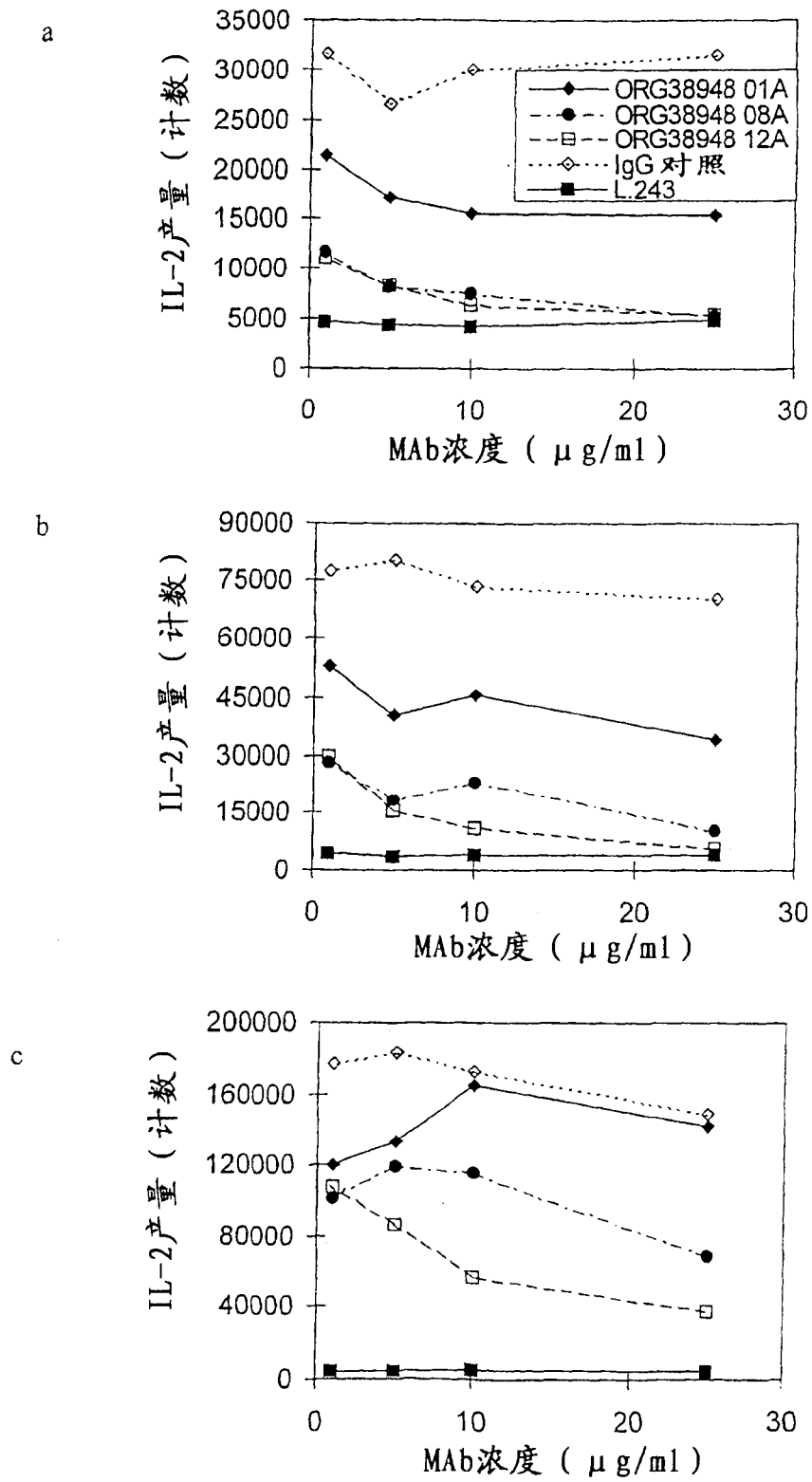
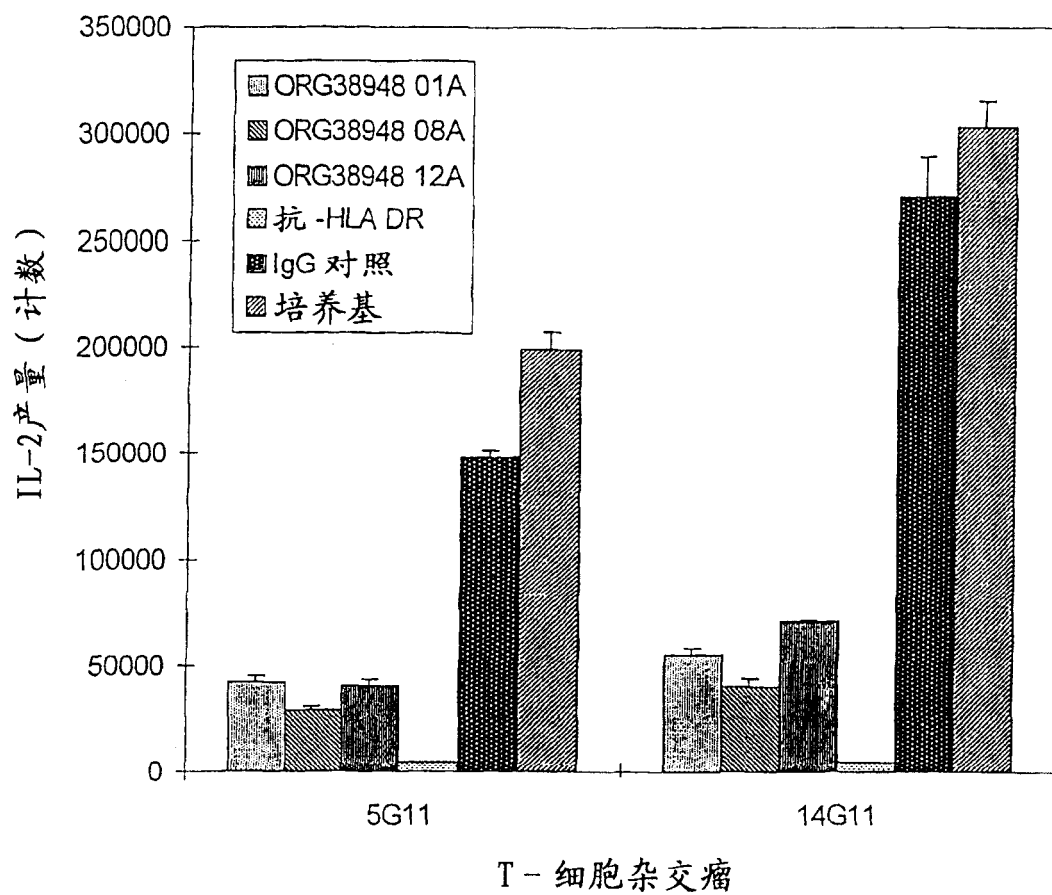


图5



专利名称(译)	特异性MHC - 肽复合物的抗体的诊断用途		
公开(公告)号	CN1305906C	公开(公告)日	2007-03-21
申请号	CN01814193.5	申请日	2001-08-08
[标]申请(专利权)人(译)	阿克佐诺贝尔公司		
申请(专利权)人(译)	阿克佐诺贝尔公司		
当前申请(专利权)人(译)	欧加农股份有限公司		
[标]发明人	PGA斯廷贝克斯		
发明人	P·G·A·斯廷贝克斯		
IPC分类号	C07K16/28 G01N33/564 G01N33/569 G01N33/68 G01N33/53 A61K39/395 A61K45/00 A61P19/02 A61P29/00 A61P37/06 C07K14/47 C07K16/18		
CPC分类号	Y10S530/866 G01N33/564 Y10S530/868 G01N2800/24 A61P19/02 A61P29/00		
代理人(译)	刘晓东		
优先权	2000202844 2000-08-14 EP		
其他公开文献	CN1447919A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明描述了通过检测罹患自身免疫性疾病患者的自身免疫特异性MHC-肽复合物的存在诊断自身免疫性疾病活性的方法。MHC-肽复合物与类风湿性关节炎有关。也描述了用于该方法的单克隆抗体。该抗体还可以用于治疗目的。

