

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl<sup>6</sup>

C07K 14/47  
C07K 14/705

## [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 97199833.7

[43]公开日 1999年12月8日

[11]公开号 CN 1237981A

[22]申请日 97.9.18 [21]申请号 97199833.7

[30]优先权

[32]96.9.18 [33]DE [31]19638108.8

[86]国际申请 PCT/EP97/05124 97.9.18

[87]国际公布 WO98/12221 德 98.3.26

[85]进入国家阶段日期 99.5.18

[71]申请人 格希尔德·韦尔纳

地址 联邦德国慕尼黑

[72]发明人 格希尔德·韦尔纳

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 罗宏 杨厚昌

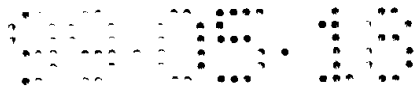
权利要求书 4 页 说明书 38 页 附图页数 1 页

[54]发明名称 用于自身免疫性疾病的诊断及治疗的肽

[57]摘要

本发明述及由 HLA-B27 的  $\alpha 1, \alpha 2$  功能域或人类角蛋白 VI 衍生而来的肽, 以及这种特定的由 HLA-B27 $\alpha 1, \alpha 2$  功能域或人类角蛋白 VI 衍生而来的肽在 HLA-依赖性自身免疫疾病的诊断及治疗中的应用。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4



## 权 利 要 求 书

1. 含有以下用来诊断和/或治疗 HLA - 依赖自身免疫性疾病的下列通式序列的一个或多个肽的应用:

5                   BL<sub>1</sub>-X-BL<sub>2</sub>-Y-BL<sub>3</sub>-Z                   或  
                    BL<sub>1</sub>-X-BL<sub>2</sub>-Y-BL<sub>3</sub>Z-BL<sub>4</sub>-W-BL<sub>5</sub>

其中 BL<sub>1</sub> 表示 1 到 2 个氨基酸,

X 表示天冬氨酸,

10 BL<sub>2</sub> 表示 4 到 5 个氨基酸,

Y 表示异亮氨酸,

BL<sub>3</sub> 表示 3 到 4 个氨基酸,

Z 表示 Lys-Ala-Gln 或 Lys-Ala-Glu ,

BL<sub>4</sub> 表示 6 到 8 个氨基酸,

15 W 表示精氨酸,

BL<sub>5</sub> 表示 1 到 2 个氨基酸,

单个氨基酸或相对较小的氨基酸集团的插入, 删除, 替代, 修饰和转换 ( Inversion ) 也包括在内, 合适的话, 包括 C - 末端和/或 N - 末端呈现相应的氨基酸残基, 糖基, 脂肪酸残基或烷基/链烯残基  
20 ( C<sub>1</sub> - C<sub>16</sub> ), 和/或在 C - 末端和/或 N - 末端截除相应的一个或多个氨基酸。

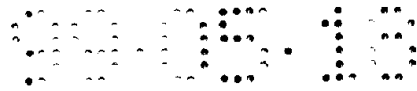
2. 权利要求 1 的用途, 其中, 肽

Trp-Asp-Arg-Glu--Thr-Gln-Ile-Cys-Lys-Ala-Lys-Ala-Gln-Thr-Asp-Arg-Glu-  
25 Asn-Leu-Arg-Thr

或由上文提及的序列通过替代, 修饰, 删除, 插入和/或末端加入单个氨基酸或相对较小的氨基酸集团衍生而来的肽的应用。

3. 权利要求 1 的用途, 其中, 肽

30 Trp-Asp-Arg-Glu--Thr-Gln-Ile-Cys-Lys-Ala-Lys-Ala-Gln



或由上文提及的序列通过替代, 修饰, 删除, 插入和/或末端加入单个氨基酸或相对较小的氨基酸集团衍生而来的肽的应用。

4. 权利要求 1 的用途, 其中, 肽

5 Leu-Asp-Leu-Asp-Ser-Ile-Ile-Ala-Glu-Val-Lys-Ala-Gln-Tyr-Glu-Glu-Ile-Ala-Asn-Arg-Ser

或由上文提及的序列通过替代, 修饰, 删除, 插入和/或末端加入单个氨基酸或相对较小的氨基酸集团衍生而来的肽的应用。

10 5. 含有以下用来诊断和/或治疗 HLA - 依赖自身免疫性疾病的通式序列的一个或多个肽的应用:

BL<sub>6</sub>-O-BL<sub>7</sub>-M-BL<sub>8</sub>

15 其中 BL<sub>6</sub> 表示 1 到 5 个氨基酸,

O 表示 Leu-Arg,

BL<sub>7</sub> 表示 1 个氨基酸,

M 表示酪氨酸, 及

BL<sub>8</sub> 表示 0 到 6 个氨基酸,

20 单个氨基酸或相对较小的氨基酸集团的插入, 删除, 替代, 修饰和转换也包括在内, 合适的话, 包括 C - 末端和/或 N - 末端呈递相应的氨基酸残基, 糖基, 脂肪酸残基或烷基/链烯残基 ( C<sub>1</sub> - C<sub>16</sub> ), 和/或在 C - 末端和/或 N - 末端截除相应的一个或多个氨基酸。

6. 权利要求 5 的应用, 其中, 肽

25

Leu-Leu-Arg-Gly-Tyr-His-Gln-Asp-Ala-Tyr

或由上文提及的序列通过替代, 修饰, 删除, 插入和/或末端加入单个氨基酸或相对较小的氨基酸集团衍生而来的肽的应用。

30 7. 权利要求 5 的应用, 其中, 肽



Arg-Val-Ala-Glu-Gln-Leu-Arg-Ala-Tyr-Leu-Glu-Gly-Glu-Cys-Val

或由上文提及的序列通过替代, 修饰, 删除, 插入和/或末端加入单个氨基酸或相对较小的氨基酸集团衍生而来的肽的应用。

5           8. 权利要求 1 到 7 中定义的用于 HLA - 依赖自身免疫性疾病诊断和/或治疗的一个或多个肽以合适的顺序的结合应用。

          9. 权利要求 1 到 7 中定义的用于 HLA-I 类相关或 HLA-II 类相关的依赖自身免疫性疾病诊断和/或治疗的一个或多个肽的应用。

10          10. 权利要求 10 的, 权利要求 1 到 7 中定义的用于以下非-HLA-B27 相关自身免疫性疾病诊断和/或治疗的一个或多个肽的应用。这些疾病包括: 虹膜炎, 眼色素层炎, 银屑病或风湿病。

          11. 权利要求 10 的, 权利要求 1 到 7 中定义的用于风湿病综合征如关节炎, 银屑病关节炎或青少年类风湿关节炎的诊断和/或治疗的一个或多个肽的应用。

15          12. 权利要求 1 到 7 中定义的用于 HLA-B27 相关自身免疫性疾病诊断和/或治疗的一个或多个肽的应用。

          13. 权利要求 12 的, 权利要求 1 到 7 中定义的用于关节强直性脊椎炎 ( Bechterew's 疾病), 银屑病关节炎, 青少年类风湿关节炎, 虹膜炎, 眼色素层炎或银屑病的诊断和/或治疗的一个或多个肽的应  
20 用。

          14. 以含有给予权利要求 1 到 7 中定义的一个或多个肽为特点的, 治疗患有 HLA - 依赖的自身免疫性疾病病人的治疗方法。

          15. 以含有给予人体权利要求 1 到 7 中定义的一个或多个肽为特点的, 体内诊断人 HLA - 依赖的自身免疫性疾病的方法。

25          16. 用于诊断 HLA - 依赖性自身免疫性疾病的试剂盒, 其中包括权利要求 1 到 7 中定义的一个或多个肽以及测试中所需的其它试剂。

          17. 具有下列序列的肽

30 Trp-Asp-Arg-Glu-Thr-Gln-Ile-Cys-Lys-Ala-Lys-Ala-Gln-Thr-Asp-Arg-Glu-Asn-Leu-Arg-Thr



或具有由上文提及的序列通过替代，修饰，删除，插入和/或末端加入单个氨基酸或相对较小的氨基酸集团衍生而来序列的肽。

18. 具有下列序列的肽

5 Trp-Asp-Arg-Glu-Thr-Gln-Ile-Cys-Lys-Ala-Lys-Ala-Gln

或具有由上文提及的序列通过替代，修饰，删除，插入和/或末端加入单个氨基酸或相对较小的氨基酸集团衍生而来序列的肽。

19. 具有下列序列的肽

10

Leu-Asp-Leu-Asp-Ser-Ile-Ile-Ala-Glu-Val-Lys-Ala-Lys-Ala-Gln-Tyr-Glu-Glu-Ile-Ala-Asn-Arg-Ser

或具有由上文提及的序列通过替代，修饰，删除，插入和/或末端加入单个氨基酸或相对较小的氨基酸集团衍生而来序列的肽。

15

20. 具有下列序列的肽

Leu-Leu-Arg-Gly-Tyr-His-Gln-Asp-Ala-Tyr

20 或具有由上文提及的序列通过替代，修饰，删除，插入和/或末端加入单个氨基酸或相对较小的氨基酸集团衍生而来序列的肽。

21. 具有下列序列的肽

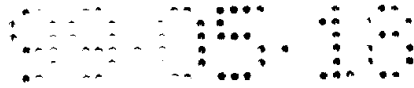
Arg-Val-Ala-Glu-Gln-Leu-Arg-Ala-Tyr-Leu-Glu-Gly-Glu-Cys-Val

25

或具有由上文提及的序列通过替代，修饰，删除，插入和/或末端加入单个氨基酸或相对较小的氨基酸集团衍生而来序列的肽。

22. 通过常规方式按正确顺序将氨基酸连接起来，制备按照权利要求 18 到 22 之一的肽的方法。

30



## 说明书

### 用于自身免疫性疾病的 诊断及治疗的肽

5

本发明述及由 HLA-B27 的  $\alpha 1$  ,  $\alpha 2$  功能域或人类角蛋白 VI 衍生而来的肽, 以及这种特定的由 HLA-B27 $\alpha 1$  ,  $\alpha 2$  功能域或人类角蛋白 VI 衍生而来的肽在 HLA-依赖性自身免疫疾病的诊断及治疗中的应用。

10

自身免疫性疾病, 如风湿, 银屑病, 多发性硬化, 溃疡性结肠癌及自身免疫性眼色素层炎, 是当机体防御系统(免疫系统)不再耐受作为机体自身一部分的结构, 而是将其作为外侵病原体来攻击时产生的一种疾病。将导致机体自身组织损伤甚至损毁, 引起疼痛及生理功能失常的症状: 例如风湿病中出现关节僵化; 银屑病中出现炎症, 皮肤剥落甚至有时出现大面积皮肤损伤; 多发性硬化中出现遗传性低角质化, 意志丧失及语言障碍; 溃疡性结肠癌中出现的严重腹泻及营养失调, 甚至致命的肠穿孔; 眼色素层炎中出现的视力减退甚至导致失明。

15

多数自身免疫病症为慢性进程, 有时能够维持在某一病程期, 有时则持续恶性发展。免疫系统损毁的组织很少能够再生。风湿病中, 自身攻击免疫反应导致疼痛的关节炎及关节退化, 最终导致功能丧失。银屑病中出现的皮肤损伤, 有时是大面积的, 有强烈的搔痒感并且十分明显, 常引起病人心理问题, 给人际交往带来问题。

20

这些自身免疫性疾病发生的原因大多还未知。一些病例中, 伴有细菌或病毒感染, 因而误导免疫系统, 这也许是引起自身免疫性疾病的主要原因。在风湿病和银屑病的病理形成过程中, 细胞免疫反应起着重要作用, 与此同时, 也能检测到抗体反应。

25

传统用于自身免疫性疾病治疗的手段不但影响免疫系统自身反应(自身攻击)部分, 同时抑制了抵抗外侵病原体或肿瘤细胞的免疫反应细胞。传统的免疫抑制剂如皮质类固醇, 环孢霉素 A 及细胞生长抑制剂不但引起全身免疫抵抗力下降, 肿瘤发病率增加, 而且有许多非免疫的, 有时危及生命的副作用。

30



自身免疫性疾病的遗传素因可能与特定的主要组织相容性抗原 ( MHC ) 或称 HLA ( 人类白细胞抗原, 最初是以移植抗原而发现的 ) 间存在统计学关系。其机制应建立在免疫系统将病原抗原 ( 细菌和病毒 ) 与自身 HLA 抗原混淆的基础上。

- 5 HLA-B27 抗原是一个特例, 它经常与特定的某些自身免疫性疾病如虹膜炎, 银屑病及风湿病如 Bechterew's 病 ( 关节强硬性脊椎炎 ), 银屑病性关节炎以及男孩常发的青少年类风湿关节炎伴随出现。

在自身免疫性眼色素层炎疾病中已发现 (G.Wildner, &R.Thurau, Eur. J. Immunol. 24, 2579-2585(1994)) HLA-I 类抗原在病理形成过程中并不作为抗原呈递因子, 而是本身作为抗原, 以肽的形式, 由 HLA-II 类或其它分子呈递。自身攻击免疫反应中的组织特异性也可以用与特异自身抗原交叉反应来解释。(例如, 眼色素层炎疾病中的视黄醛 S 抗原)

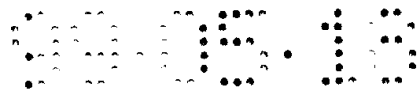
- 15 与本发明相联系, HLA 抗原在病理形成中起主要作用的自身免疫性疾病称之为“HLA - 依赖”自身免疫性疾病。

在风湿病综合征 ( 关节强硬性脊椎炎, 反应性关节炎及银屑病关节炎 ) 中的 HLA - 依赖疾病中, 迄今为止, 最可能的抗原是由 HLA-I、 II 类分子呈递的细菌蛋白, 有时倾向于 HLA-B27, 或其它 ( 关节特异性 ) II 型胶原, 而它与 HLA-B27 间的联系尚未建立起来。链球菌蛋白及角化细胞蛋白可能是银屑病中的抗原。

20 风湿病及银屑病患者对 HLA-B27 和/或皮肤角质素序列肽的细胞免疫反应表明这些肽是潜在的自身抗原肽, 即不再被识别为自体肽或自身肽。对 HLA-B27 前两个功能域的免疫反应在 1986 年即有报道 (G.Wildner et al., Abstract 2.33.13, Sixth Intenational Congress of Immunology, Toronto, Canada, 6 to 11 July 1986; G. Wildner, dissipation, LMU munich, 1987; G.wildner et al., Mol.Immunol.26,33-40,1989)。

- 30 近年来, 为恢复存在于自身耐受与病原体抵抗间的正常平衡, 进行了许多免疫系统控制的尝试。着眼点不再是非特异的抑制所有的免疫反应, 而是只影响作用于自身攻击的免疫反应。因此, 其副作用如增加感染几率或肿瘤形成率很有希望能够避免。

在此联系中, 比较已知的能引起自身免疫性疾病或急性慢性移植排斥的生理机制十分重要。这些机制曾为寻求治疗这些病症的方法而



深入研究过。现在认为细胞毒作用，特别是 CD8 阳性细胞毒性 T 淋巴细胞，在急性移植排斥中起主要作用，而在慢性移植排斥中细胞毒作用作为次等重要因素。CD4 阳性 T 淋巴细胞，尤其是辅助性 T 淋巴细胞和抑制性 T 淋巴细胞，细胞因子在细胞免疫反应水平上更为重要。

5 以目前的知识，自身免疫性疾病与慢性移植排斥的情况类似。

与抑制急性移植排斥方法不同，治疗自身免疫性疾病的方法不需要由调节细胞毒性 T 淋巴细胞活性主导，而是可以在细胞和体液免疫反应两种水平进行更广泛的尝试。

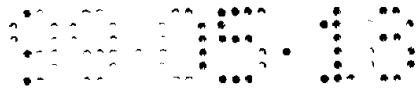
10 作为解决上文所述与 HLA - 依赖自身免疫性疾病相关的方法，特别是 HLA-I 类相关、HLA-II 类相关的自身免疫性疾病，尤其是些特异与 HLA-B27 相关者，对于本发明而言，包括应用特定的由 HLA-B27  $\alpha 1$ ， $\alpha 2$  功能域或人类角蛋白 VI 衍生而来的肽来诊断及治疗 HLA-依赖性自身免疫疾病的方法。

15 1986，1987 及 1989 年，G.Wildner 等人(loc. cit.)描述了包含由 HLA-B27  $\alpha 1$ ， $\alpha 2$  功能域衍生蛋白的融合蛋白。由 HLA-I 类分子  $\alpha 1$ ， $\alpha 2$  功能域衍生而来的肽被 Krensky 等人在 WO 88/05784 中，C.A. Clayberger 和 A.M.Krensky 在 WO 93/17699 中，C.A. Clayberger 等人的 WO 95/26979 中描述，并为 C.A. Claybergeh 和 A.M. Krensky 在 Current Opinion in Immunology 7, 644-648(1995)，E. Nossner 等人在 J. Exp. Med. 183, 339-348, (1996)上发表。

20 文件 WO 88/05784，WO 93/17699，WO 95/26979，Current Opinion in Immunology (1995，loc.cit) 和 J. Exp. Med. (1996, loc.cit) 发表的特定类肽是为：

- 调节病人的细胞毒性 T 细胞的细胞毒性/细胞溶解活性，特别是细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL)，对于病人来说，称为
  - 抑制 CTL 活性，
    - 通过将肽结合到 CTL 上，特别是通过 T 细胞受体，抑制由 CTL 引起的靶细胞溶解 (可能是通过与 CTL 正常结合的配体的竞争 (Current Opinion Immunol.(1995), a. a. O.)和/或
    - 30 • 通过与 HSP70 热休克蛋白家族成员，与其它免疫调节复合物如 FK506 和环孢霉素 A 行为类似的方式结合，这是因为探测与相关 T 细胞表面有关的热休克蛋白并不容易(J.Exp.Med.(1996),





正如前文所述及，本发明所基于的物质是在由 HLA-B27  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  功能域或人类角蛋白 VI 衍生而来的肽在 HLA-依赖性自身免疫疾病的诊断及治疗中的应用中获得的。

5 这里所考虑的自身免疫性疾病包括 HLA-I 类相关和 HLA-II 类相关  
自身免疫性疾病，特别是，但并不排除，风湿病综合征的疾病，例如  
关节炎，类风湿和反应性关节炎，银屑病关节炎和青少年类风湿关节  
炎，以及虹膜炎，银屑病及眼色素层炎。本发明上文定义的肽能够应  
用于 HLA-B27 相关自身免疫性疾病的诊断与治疗，这种病也将述及。  
病症中存在与 HLA-B27 抗原的联系，例如，关节强硬性脊椎炎  
10 ( Bechterew's 病) 和上文述及的风湿病综合征特殊病症，特别是青少  
年类风湿关节炎和银屑病关节炎，以及虹膜炎，眼色素层炎和银屑病的  
特殊病症。需要强调的是上文定义的肽，其适用性并不局限于诊断  
和治疗和/或抑制 HLA-B27 相关自身免疫性疾病。相反，它可以扩展  
15 到那些与 I 类 HLA 抗原相关的自身免疫性疾病，例如非 HLA-B27 相关  
的青少年类风湿关节炎和银屑病关节炎。其适用性也可以扩展到 HLA-  
II 类相关自身免疫性疾病，例如特异的 HLA-II 类相关的关节炎。

本发明所用的肽包括由 HLA-B27  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  功能域或人类角蛋白 VI  
衍生而来的肽，更精确的说，是核心序列 B27PA, B27PA\*, B27PB,  
B27PC 和 Ker333 或其衍生物:

20

肽 B27PA :

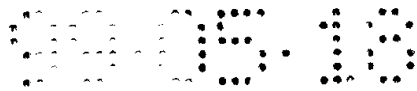
Trp-Asp-Arg-Glu-Thr-Gln-Ile-Cys-Lys-Ala-Lys-Ala-Gln-Thr-Asp-  
Arg-Glu-Asn-Leu-Arg-Thr,

25 肽 B27PA\*:

Trp-Asp-Arg-Glu-Thr-Gln-Ile-Cys-Lys-Ala-Lys-Ala-Gln,

30 肽 B27PB :

Leu-Leu-Arg-Gly-Tyr-His-Gln-Asp-Ala-Tyr



肽 B27PC :

Arg-Val-Ala-Glu-Gln-Leu-Arg-Ala-Tyr-Leu-Glu-Gly-Glu-Cys-Val

5 肽 Ker333 :

Leu-Asp-Leu-Asp-Ser-Ile-Ile-Ala-Glu-Val-Lys-Ala-Gln-Tyr-Glu-  
Glu-Ile-Ala-Asn-Arg-Ser

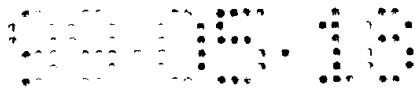
依照由 H.Szots, G.Riethmuller, E. Weiss 和 T.Meo 在 Proc. Natl.  
10 Acad. Sci. USA83, 1428-1432(1986) 提供的 HLA-B27 氨基酸序列 ,  
- 肽 B27PA 与 HLA-B27 的 $\alpha$ 1 功能域内 60 - 80 氨基酸相对应,  
- 肽 B27PA\*与 HLA-B27 的 $\alpha$ 1 功能域内 60 - 72 氨基酸相对应,  
- 肽 B27PB 与 HLA-B27 的 $\alpha$ 2 功能域内 109 - 118 氨基酸相对应, 和  
- 肽 B27PC 与 HLA-B27 的 $\alpha$ 2 功能域内 151 - 165 氨基酸相对应。

15 本发明发现仅有所述核心序列中不连续分布的有限数量的氨基酸  
是抑制或治疗 HLA - 依赖性自身免疫性疾病的肽活性所必需的。因  
此, 在这方面不重要的氨基酸位点可以被进一步删除, 插入, 转换及  
替代, 而不损坏肽所述及的生物学活性。基本的氨基酸的衍生及修饰  
(甲基化, 酰胺化, 糖基化, 结合脂肪酸残基(饱和及不饱和脂肪酸  
20 残基), 等)也包括在本文中。

肽相对于核心序列的改变的关键是使形成的肽表现出一种空间或  
称三维结构, 基于本发明之目的。此结构并不比上文定义序列形成的  
带电和/或表面结构逊色。更优越的是这种改变肽的空间结构在其表面  
结构和电荷分布上与上文述及核心肽或至少其中为生物活性所必需的  
25 核心肽之片段是一致的。

因此, 本发明可用的肽及由 B27PA,B27PA\*和 Ker333 而来的衍生物  
可用下文的公式表示:  $BL_1-X-BL_2-Y-BL_3-Z-BL_4-W-BL_5$  和  $BL_1-X-$   
 $BL_2-Y-BL_3-Z$

30 简写 BL 代表与下文表中所给信息相关的氨基酸嵌段, 可以包括 1  
- 8 个氨基酸。单独的氨基酸或氨基酸集团 (X, Y, Z 和 W) 定  
位在这些氨基酸之间, 它们很有特点并且很可能在上文述及生物活性  
中起重要作用。肽 B27PAh 和 Ker333 是以 X, Y, Z 和 W 的氨基酸



位置为基础分别从其全序列中选出来的。

但是，还需考虑到在核心序列中的其它氨基酸在肽的生物学活性中也很重要。正如上文所述及的，在本文中很重要的是所得肽的空间或三维结构与上文述及核心肽或至少一部分一致。

5 在上文所提及 B27PA 和/或 B27PA\*的核心序列中：

- X (在肽的 2 位；相当于 Szots 等人报道的 61 位(a. a. O.)) 相当于天冬氨酸 (Asp)，

- Y (在肽的 7 位；相当于 Szots 等人报道的 66 位 (a. a. O.)) 相当于异亮氨酸 (Ile)，

10 - Z (在肽的 11 - 13 位；相当于 Szots 等人报道的 70 - 72 位 (a. a. O.)) 相当于三肽序列 Lys-Ala-Gln，或 Lys-Ala-Glu，

- W (在肽的 20 位；相当于 Szots 等人报道的 79 位 (a. a. O.)) 相当于精氨酸 (Arg)，

15 所有这些在替代中优先考虑同系 (例如，结构和化学性质相近的) 的氨基酸或氨基酸集团。

在上文提及的 Ker333 核心序列中，残基 X，Y，Z 和 W 对应于由 B27PA 和 B27PA\* 衍生而来的肽中相同的氨基酸，例如，

- X (在肽的 2 位；) 相当于天冬氨酸 (Asp)，

- Y (在肽的 7 位；) 相当于异亮氨酸 (Ile)，

20 - Z (在肽的 11 - 13 位；) 相当于三肽序列 Lys-Ala-Gln，或 Lys-Ala-Glu，

- W (在肽的 20 位；) 相当于精氨酸 (Arg)，

所有这些在替代中优先考虑同系的 (例如，结构和化学性质相近的) 的氨基酸或氨基酸集团。

25 在下文表中给出的嵌段序列 BL 的氨基酸和肽与肽 B27PA，

B27PA\* 和 Ker333 中相同位置的氨基酸一致；其中 BL1 是 1 到 2 个氨基酸的嵌段，如 Trp 或 Leu，正如在肽 B27PA，B27PA\* 和 Ker333 的同样位置上所出现的。设计的 BL2 包括一个含有 4 到 5 个氨基酸的嵌段。还可以想象这两个嵌段的进一步转换，修饰和替代结果。同样情

30 况，BL3 到 BL5 肽嵌段分别含有 3 到 4 个，6 到 8 个和 1 到 2 个氨基酸。尽管在 BL 的位置上，可以在维持所需生物学活性的同时进行更广泛的替代，但在这种情况下，替代中仍优先考虑 B27PA，B27PA\*



和 Ker333 核心序列的同系氨基酸,

正如前文多次述及的, 最重要的是产生空间结构, 此结构的并不比上文定义序列形成带电和/或表面结构逊色, 更优越的是这种修饰肽的空间结构在整体上, 或至少在长度上多于 6, 最好是 8 个氨基酸, 其表面结构和电荷分布上与上文述及核心肽或相关片段的是一致的。

BL <sub>1</sub>	X	BL <sub>2</sub>	Y	BL <sub>3</sub>	Z	BL <sub>4</sub>	W	BL <sub>5</sub>	名称
1-2 as	(2)	4-5 as	(7)	3-4 as	(11,12,13)	6-8 as	(20)	1-2 as	
	Asp		Ile	Lys-Ala-Gln 或 Lys-Ala-Glu		Arg			
Trp	"	Arg-Glu -Thr-Gln	"	Cys-Lys-Ala	"	Thr-Asp- Arg-Glu- Asn-Leu	"	Thr 或 Ile	B27PA
Trp	"	Arg-Glu -Thr-Gln	"	Cys-Lys-Ala	"	-	-	-	B27PA*
Leu	"	Leu-Asp -Ser-Ile	"	Ala-Glu-Val	"	Thr-Glu- Glu-Ile- Ala-Asn	"	Ser	Ker333

由上文述及核心序列 B27PA 衍生而来的肽中, BL4 也可以特异表达以下其中一个氨基酸集团:

10

Thr-Asp-Arg-Glu-Asp-Leu

或

Thr-Asp-Arg-Glu-Ser-Leu

或

15



Thr-Tyr-Arg-Glu-Asn-Leu

或

Thr-Tyr-Arg-Glu-Asp-Leu

或

5 Thr-Tyr-Arg-Glu-Ser-Leu

这也同样适用于由上文述及的核心序列 B27PB 和 B27PC 衍生的及含有以下序列的肽。

10 BL<sub>6</sub>-O-BL<sub>7</sub>-M-BL<sub>8</sub>

肽 B27PB 和 B27PC 在设计 O 和 M 肽位点是一致的。

优选的，在上文述及的核心序列 B27PB 中

- 15 - O (在肽的 2 - 3 位; 相当于 Szots 等人报道的 110 - 111 位 ( a. a. O.)) 相当于二肽序列 Leu-Arg, 和
- M (在肽的 5 位; 相当于 Szots 等人报道的 113 位 ( a. a. O.)) 相当于酪氨酸 ( Tyr )。

在上文述及的核心序列 B27PC 中

- 20 - O (在肽的 6 - 7 位; 相当于 Szots 等人报道的 156 - 157 位 ( a. a. O.)) 同样相当于二肽序列 Leu-Arg, 和
- M (在肽的 9 位; 相当于 Szots 等人报道的 159 位 ( a. a. O.)) 相当于酪氨酸 ( Tyr )。

25 这种情况下, O 和 M 位点, 及 BL 位点在替代中优先考虑同系 (例如, 结构和化学性质相近的) 的氨基酸或氨基酸集团。氨基酸的替换, 修饰, 转换, 删除和插入可能处于这样的程度之内: 基于本发明的目的, 这些改变不会不利地影响以上定义序列造成的电荷和/或表面结构。优选地, 基于表面结构的空间结构和电荷分布与核心片段的至少一部分, 在长度上多于 6, 最好是多于 8 个氨基酸的, 对肽的生物学活性至关重要的片段一致。

30 下表主要通过举例说明在基本核心序列 B27PB 和 B27PC 中找到的相应氨基酸或肽序列位点。

名称	BL <sub>6</sub>	O	BL <sub>7</sub>	M	BL <sub>8</sub>
	1-5 as	2 as	1 as	1 as	0-6 as
		Leu-Arg		Tyr	
B27PB	Leu	"	Gly	"	His-Gln-Asp-Ala-Tyr
B27PC	Arg-Val-Ala-Glu-Glu	"	Ala	"	Leu-Glu-Gly-Glu-Cys-Val

但是，必须强调的是由上文述及一般公式中得来的肽并不需要有同样的所研究的活性谱，例如，HLA - 依赖自身免疫性疾病治疗活性。单个或仅仅一些氨基酸变异足以使之能够作为成功治疗 HLA - 依赖自身免疫性疾病的肽，如虹膜炎，银屑病及风湿病如 Bechterew's 病（关节强硬性脊椎炎），银屑病性关节炎以及男孩常发的青少年类风湿关节炎，它与开始用的肽不同。

上文所示序列中由 8 - 20 个，较好的是 10 - 18 个，更好的是 12 - 16 个氨基酸氨基酸组成的肽也是本发明述及的与上文描述的应用于诊断和治疗的肽。

在本发明方法中，肽的 N - 末端和/或 C - 末端进行替换；例如：

脂肪酸和磷酸脂，

糖基和

15 C<sub>1</sub> - C<sub>12</sub> - 烷基或 C<sub>1</sub> - C<sub>12</sub> - 链烯残基

所需偶联制剂和偶联方法为技术熟练人员所知。用甲基二硫苯甲酸（MDTB）通过肽的 NH<sub>2</sub> 基团，与激活的烯烃结合，运用双功能连接试剂，如 MBSE，戊二醛和甲基二硫苯甲酸（MDTB）与磷酸脂如磷酸酰胆碱或磷酸酰乙醇胺偶联可作为例子。

本发明方法中肽直接或通过取代基或偶联系统（如生物素/结合素）与有机或无机支持物，或如下文将详细介绍的通过直接或间接可探测的标记物结合或吸附。

25 上文定义的肽可以进行很多改变而不丢失其基本功能，例如：

1) 肽可在 N - 末端或 C - 末端扩展。

2) 肽可在 N - 末端或 C - 末端截短, 然而仅限于至少含有 6 个氨基酸的肽, 最好是至少 8 个氨基酸。

尤其是在由 B27PA 和 Ker333 衍生的肽中, 几个特征性氨基酸之外 N - 末端或 C - 末端的截除可以不引起上文定义的生物学活性的丢失。举一个 C - 末端截除的例子, B27PA 衍生肽 B27PA\*, 如同上文所述及, 含有由 Szots 等人( a.a.O.) 编号的 HLA-B27 序列中 60 - 72 的氨基酸。

本发明还包括以下用在本发明中的肽:

10 肽 B27PA :

Trp-Asp-Arg-Glu-Thr-Gln-Ile-Cys-Lys-Ala-Lys-Ala-Gln-Thr-Asp-Arg-Glu-Asn-Leu-Arg-Thr,

肽 B27PA\*:

15 Trp-Asp-Arg-Glu-Thr-Gln-Ile-Cys-Lys-Ala-Lys-Ala-Gln,

肽 B27PB :

20 Leu-Leu-Arg-Gly-Tyr-His-Gln-Asp-Ala-Tyr,

肽 B27PC :

25 Arg-Val-Ala-Glu-Gln-Leu-Arg-Ala-Tyr-Leu-Glu-Gly-Glu-Cys-Val,

肽 Ker333 :

30 Leu-Asp-Leu-Asp-Ser-Ile-Ile-Ala-Glu-Val-Lys-Ala-Gln-Tyr-Glu-Glu-Ile-Ala-Asn-Arg-Ser.

本发明还与由上文述及肽序列衍生、和本申请所具有的 HLA - 依赖自身免疫性疾病治疗活性具有可比性的肽相关, 可比活性是指高达

200 %，某些情况下高达 300 %，或低于 25 % 的活性。本发明所述由上文述及序列衍生的肽主要是由单一氨基酸或较小的氨基酸集团替代序列衍生而来的。这些肽优选以下方法衍生：

- 5 - 少量，不超过 4 或 5 个氨基酸，单一或小集团被一个或几个，最好是同系氨基酸替代，和/或
- 少量，不超过 3 个氨基酸的特定氨基酸加至 N - 末端和/或 C - 末端，和/或
- 肽在 N - 末端和/或 C - 末端截除一小部分氨基酸；一般只在含多于 6，最好是 8 个氨基酸的肽中截除。

10 正如前文所述，肽 B27PA 和 Ker333 是根据与某些特定位点氨基酸序列同源性，由各自全序列中选择出来的。现认为至少一些特异氨基酸位点在肽的生物学活性中很重要。在以下核心序列 B27PA 和 Ker333，和通过 C - 末端截除衍生于 B27PA 的核心序列 B27PA\*中，具有相同的单个氨基酸，下文用下划线表示：

15

肽 B27PA：

Trp-Asp-Arg-Glu-Thr-Gln-Ile-Cys-Lys-Ala-Lys-Ala-Gln-Thr-Asp-Arg-Glu-Asn-Leu-Arg-Thr,

20 肽 Ker333:

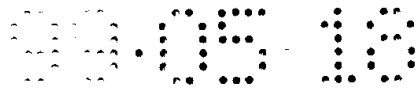
Leu-Asp-Leu-Asp-Ser-Ile-Ile-Ala-Glu-Val-Lys-Ala-Gln-Tyr-Glu-Glu-Ile-Ala-Asn-Arg-Ser,

肽 B27PA\*:

25

Trp-Asp-Arg-Glu-Thr-Gln-Ile-Cys-Lys-Ala-Lys-Ala-Gln.

30 同系氨基酸的替代优先在下划线的氨基酸位点上进行，反之非同系氨基酸的替代以一定的程度可能发生在其余位点上。但是，必须考虑到肽序列中其它氨基酸位点对肽的生物学活性也很重要。正如前文述及多次，肽形成的三维结构对肽的生物学功能至关重要，结构的变化，只要是对于上文定义序列的带电和/或表面结构，最好是修饰肽的



三维结构与核心序列的或生物学功能必需的核心序列之段的结构保持基本不变，即为可行。

5 上文所述在 HLA - 依赖自身免疫性疾病诊断中具有可比应用性，和/或治疗中具有可比活性的方案，基于上述声明中肽的空间结构，除替代之外，同样也包括本发明中通过对上文述及序列的个别氨基酸或相对较小的氨基酸集团修饰（例如，甲基，脂肪酸或糖基基团的修饰）转换，删除和/或插入的肽结构。

另外，本发明还涉及按照正确顺序和已知方法通过连接氨基酸及其衍生物产生上文定义肽的方法。

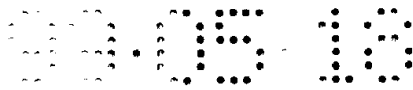
10 按照上文所述核心序列产生肽的策略包括依照核心序列或这些核心序列片段的空间结构设计的特异方法。以上文所述同系氨基酸的替代为例来说明计算机辅助分子模型，以建立影响所得肽空间结构最大可能的氨基酸替代，修饰，删除或插入为目的。肽构建学的概念，以产生非肽类似物为目的，是建立与所给原始肽十分类似的三维结构，  
15 对上文述及核心序列或其片段而言，提供一个与“正常”氨基酸形成嵌段所不同的替代方案。

与上文定义相似的肽还包括上文述及的与之结合的标记物质，此标记物并不显著影响肽诊断 HLA - 依赖性自身免疫性疾病的适用性。

20 本发明中可用的肽，或发明中的肽，可由多种制备方法。例如，化学合成可以用自动或手动操作市售肽合成仪，例如， Beckman 或实用性 Biosystems 公司。这种情况下，肽合成的操作按照仪器制造商所提供的包括在方法容许条件下所用试剂的明确介绍。

其它的可能性包括在手工操作化学合成中。以下是一些关于技术熟练人员所知方法的参考文献， R.B. Merrifield 所用的固相方法  
25 （“固相合成”， Science232,341-347(1986)），此方法是通过用二环己碳二亚胺（ DCCI ）激活原始氨基酸复合物的羧基或所需结构的原始肽部分序列的羧基，和通过一定复合物或最终肽中定位于相同位点的片段中的氨基官能团激活具有活化羧基末端的复合物。后一种方法中，需要封闭在同等条件下具有活性的反应物的基团；例如，用三-  
30 丁氧羰基基团（ t-BOC 基团）处理氨基。

肽可以由自然来源分离，特别是某些由 DNA 编码肽转染的细菌或真核细胞，在这些细胞中可以表达 DNA。所用方法为技术熟练人员所



掌握，例如 DNA 扩增，转染和肽纯化分离，例如用层析方法，（离子交换层析和免疫亲和层析，胶滤过等）和电泳。这种由自然来源分离的肽十分适用于 HLA - 依赖自身免疫性疾病的治疗。

正如前文所述，本发明特别包括所述肽在 HLA - 依赖自身免疫性  
5 疾病的诊断和治疗中的应用。

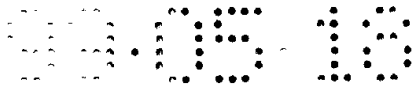
#### a) HLA - 依赖自身免疫性疾病的诊断

由 HLA-B27 和角蛋白 VI 衍生而来的肽用于诊断中，来检测细胞和体液免疫反应。这使临床综合征的免疫分类更为精确，使特异治疗  
10 成为可能。在所描绘的基础上，这些肽呈递了更为特异的抗原而非相对完整抗原。另外，对角蛋白来说，与蛋白不同，肽的可溶性在应用上更为优越。

这里所述的自身免疫性疾病包括 HLA-I 类相关和 HLA-II 类相关的自身免疫性疾病，特别是，并不限于，风湿病复合征，如关节炎，类风湿和反应性关节炎，银屑病关节炎和青少年类风湿关节炎，还有虹膜炎，银屑病和眼色素层炎。还提及可用于 HLA-B27 相关自身免疫性疾病  
15 诊断和治疗的本发明上文定义的肽。在关节强硬性脊椎炎（Bechterew's 疾病）以及上文提及风湿病复合征的某些情况下，存在与 HLA-B27 抗原的联系，特别是某些青少年类风湿关节炎和银屑病关节炎，及某些虹膜炎，眼色素层炎和银屑病。必须强调的是，上文定义的肽并不限于适用于 HLA - B27 相关自身免疫性疾病的诊断和治疗  
20 和/或抑制 HLA - B27 - 相关自身免疫性疾病。相反，还可以用在与其它 HLA-I 类抗原相关的自身免疫性疾病，如非 - HLA - B27 - 相关青少年类风湿关节炎和银屑病关节炎。另外，其实用性还可扩展到  
25 HLA-II 类相关自身免疫性疾病，如特异 HLA-II 类相关关节炎。

这些肽特别适用于作为检测抗体的体外测试系统的抗原，如在酶联免疫吸收测试（ELISA）或免疫荧光测试，和适用于细胞免疫反应，如 T 细胞刺激测试。

在这些测试中，肽可以直接在溶解状态或吸附或共价结合于支持  
30 物上使用。所用肽与可探测的标记底物直接或间接结合。如技术熟练人员所知，这些标记底物包括荧光底物，酶，含放射活性元素（ $^3\text{H}$ ， $^{13}\text{C}$ ， $^{32}\text{P}$ ， $^{35}\text{S}$ ， $^{125}\text{I}$ ，等）的基团或分子，和磁性粒子，通过直接



结合或结合系统（如生物素/抗生物素蛋白）来结合。另外，肽的游离或相应修饰形式可以以试剂盒的形式获得，其中包括检测方法中所需的其它试剂。

肽也可以直接用于人类诊断。在这种情况下，可通过皮内或皮下注射以溶液或吸收或结合于支持物形式存在的肽产生免疫反应，然后测定。肽尤其适用于作为在健康受试者身上引起的延迟性免疫反应的诊断研究方法，或用于特殊诊断的病人。肽通过传统途径给予，如口服。静脉注射，皮下注射，肌内注射，等，以包括添加或辅助成分的形式给予，这是由技术熟练人员所熟悉的应用。

10

#### b) HLA - 依赖自身免疫性疾病的抑制/治疗

上文定义的由 HLA - B27 和角蛋白 VI 衍生而来的肽，可以以 a) 中例子中的方法作为以上所列 HLA - 依赖自身免疫性疾病的治疗剂。

本发明还与抑制或治疗 HLA - 依赖自身免疫性疾病的肽的应用，特别是为抑制和/或治疗 HLA - 依赖自身免疫性疾病制备制剂的应用有关。

本发明还与治疗人类 HLA - 依赖自身免疫性疾病的方法有关，包括给予上文定义的肽。

本发明中，给予所述肽的目的是为使受试对象耐受作为免疫活性引起的免疫反应靶体的不同自身抗原。在这种情况下，肽产生特异免疫反应，包括特异 - T 细胞的耐受，灭活或消除。但是，耐受也可以由封阻消化性（professionell）或非特定抗原呈递细胞上的抗原呈递限制因子而引起。

如上文所述，与自身免疫性疾病相关的免疫系统的反应并不局限在血淋巴细胞中。体液免疫反应，通过抗体，巨噬细胞和其它免疫系统细胞，也应包括本发明中肽的可能靶体。

病人和正常志愿者的实验发现可以用于确定肽的治疗强度。一方面，例如，体外检测 Bechterew's 疾病（关节强硬性脊椎炎）病人和正常志愿者的外周血（PBL）中分离的淋巴细胞。这些淋巴细胞用不同的蛋白和肽及反应进行孵育，细胞扩增增加，用  $^3\text{H}$  - 胸腺嘧啶掺入检测。在此联系中发现，Bechterew's 疾病病人的淋巴细胞与正常志愿者不同，对肽 B27PA\* 的反应强于肽 B27PD（与上文定义不同）。可以

通过肽的一级结构（氨基酸序列）推论淋巴细胞表现的交叉反应活性正是自身免疫反应的原因。

另外，用肽 B27PA\*和 Ker333 在大鼠上作免疫实验，引起类似银屑病关节炎的指关节肿胀例数分别为四个中有一个，两个中有一个。

- 5 这些发现同时表明在反应动物中，肽能够表现出与正常存在于指关节区的表位的交叉反应活性。此交叉反应活性为自身免疫性疾病的原因。如果能够获得这方面的结果，那么正如前文举例描述，将相同肽包括在诊断和进一步判定自身免疫性疾病的类型就很有价值。

- 10 在自身免疫眼色素层炎中，前文已经提到交叉反应活性直接提供了治疗方法（见，如，WO 95/29194; S.R. Thureau, 等人, Immunology Letters 57, 193-201 (1997))。肽免疫反应活性的知识在治疗病人中有诊断重要性，因为此反应活性直接提供这些肽用于治疗的可能性，如，通过它们调节自身攻击免疫反应。

- 15 可以通过静脉注射，皮下或肌内给予，特别是，向予粘膜表面如鼻腔气管区，肺或胃肠道（特别是口服给予）上文定义的肽，或含有这些肽的制备物，产生耐受。

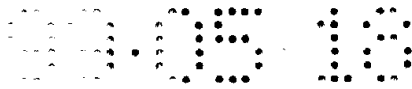
在此联系中，要考虑到单个给予或两个或多个上文定义的肽结合给予。当两个或多个肽给予时，可以同时或次序给予。

- 20 制备包括所述肽可以干粉，溶液，悬浊液或气溶胶，如鼻喷雾或吸入喷雾形式给予。制备包括活性底物和传统的辅助和携带底物。肽可以每日 10 微克到 1000 微克每公斤体重的剂量给予。

- 25 本发明中的优选给予模式是通过粘膜，特别是鼻腔，肺和胃肠道粘膜，用鼻腔或吸入喷雾或口服给予肽。口服，鼻或吸入产生耐受机制还属未知，目前的知识认为细胞效应并不重要，至少不通过 CTL 的途径。由给予粘膜抗原产生的调节细胞还未完全分辨或功能定性。

- 30 口服给予时，可以用释放系统，如，胶囊，肽可以通过它在特定的胃肠道部位释放，如小肠的某段区域，通过这种释放，在其特定位置，持续一个相对较长的时间。这样可以，例如，使制备物免于与胃中的攻击性，酸性物质接触。植入的缓释设计也可用于皮下给予。技术熟练人员对上文所述类型的缓释设计很熟悉。

虽然本文并不排除以治疗为目的通过皮肤给予肽，以目前的知识它并不作为优选方案。例如，在银屑病中，皮肤溃疡处的自身攻击 T



淋巴细胞能够将皮肤给予的肽识别为已制备的在相应 MHC 条件下的抗原，如，蛋白水解裂解，这样会加强自身攻击反应。

与目前一些中心所尝试的用完整蛋白诱导耐受的方法相比，用上文所述肽诱导耐受在 HLA - 依赖自身免疫性疾病中有很多优越性，

5 如：

1) 肽可以用蛋白化学相对简单的合成。

2) 肽并不由天然组织中分离得到。减少了组织可能感染的病毒，病原体或细菌感染的可能性，和由相应（逆）病毒或细菌 DNA 引起的二次感染的可能性。

10 3) 作为由动物物质分离蛋白的替代方法的重组产生方法并不需要，因为很费力且产量相对低。

4) 肽在干粉状态有很长的保存寿命，且并不需要如何特殊的储存条件。

15 5) 与蛋白相比较，以食物或接触过敏为形式的敏化危险，在肽中并不出现，因为它不能与浆细胞或嗜酸性细胞表面的 IgE 发生交联效应。

6) 如上文描述，肽在免疫系统中有调节效应。

### 实施例

20 本发明中，上文定义的肽，用作测定细胞免疫反应的体外探测系统抗原的适用性，由肽 B27PA\* 一系列检测来例证。

### 肽：

25 所测试肽是上文提及的肽 B27PA\*，它是由 B27PA 的核心序列的 C - 末端截除 8 个氨基酸所得，其包括 Szots 等人（Loc. cit.）所述 HLA - B27 序列中的 60 - 72 氨基酸：

### B27PA\*：

30 Trp-Asp-Arg-Glu-Thr-Gln-Ile-Cys-Lys-Ala-Lys-Ala-Gln

及对照肽 B27PD，它与本发明可用的肽情况不同，包含 Szots 等人（Loc. cit.）所述 HLA - B27 序列中的 125 - 138 氨基酸：

B27PD:

Ala-Leu-Asn-Glu-Asp-Leu-Ser-Ser-Trp-Thr-Ala-Ala-Asp-Thr.

5 肽 B27PD 在实验性自身免疫眼色素层炎 ( EAU ) 大鼠模型中引起眼色素层炎 ( WO 95/29194; G. Wildner & S.R. Thurau, Eur. J. Immunol. 24,2579-2585(1994) ) 。

肽 B27PA\*是在半自动肽合成仪上按照制造商说明书制备的。肽 B27PD 由 Neosystems, Strasbourg, France 制备。肽由未添加 RPMI - 1640 溶解。

10

病人:

所探测的外周血 T 淋巴细胞 ( PBL ) 来源于有关节强硬性脊椎炎 ( AS ) 的 HLA - B27 + 病人, 其它脊椎关节病 HLA - B27 + 病人, 有类风湿关节炎 ( RA ) 的 HLA - B27 - 病人, 健康 HLA -  
15 B27 + 对照主体和健康 HLA - B27 - 对照主体。

有关节强硬性脊椎炎 ( AS ) 的 HLA - B27 + 病人:

20 本研究中有关节强硬性脊椎炎 ( AS ) 的 55 个病人完全符合 New York 修正的关于准确 AS 的定义 ( S. Vander Linden, H.A. Valkenburg, A. Cats, Arthritis Rheum. 27, 361-368,(1984) ) : ( 36 男性和 19 女性; 平均年龄: 40.9 年, 年龄范围: 18 - 71 岁 )。所有病人符合临床 “急性” 病的前提条件。

其它脊椎关节病 HLA-B27 + 病人:

25 本研究中的 28 个患有其它脊椎关节病 HLA-B27 + 病人包括 5 个有反应性关节炎, 10 个有银屑病关节炎和 13 个有肠病关节炎并发 Crohn's 疾病或溃疡性大肠炎 ( 15 男性和 13 女性; 平均年龄: 42.4 年, 年龄范围: 22-76 岁 ) 的病人。

30 健康 HLA-B27 + 对照主体:

本研究中包括 30 个主体 ( 18 男性和 12 女性; 平均年龄: 46.2 年, 年龄范围: 20-78 岁 )。

健康 HLA - B27 - 对照主体:

本研究中包括 22 个主体 ( 10 男性和 12 女性; 平均年龄: 30.8 年, 年龄范围: 22-53 岁)。

5 有类风湿关节炎 ( RA ) 的 HLA - B27 - 病人:

本研究中包括 7 个急性类风湿关节炎 ( RA ) 的 HLA - B27 - 病人 ( 1 个男性和 4 个女性; 平均年龄: 56.8 年, 年龄范围: 30-72 岁)。

10 对照血捐献者中没有人有脊椎关节炎个人或家族发病史, 也没有近期发生过胃肠道或泌尿生殖道感染。

外周血淋巴细胞 ( PBL ) 的分离:

15 由肝素化外周血获得的 PBLs 是用 Ficoll-Hypaque 梯度标准离心, 三次清洗并重悬于 RH10 培养基中 ( 含 2 mM L-谷氨酰胺, HEPES, 100U/ml 青霉素, 100ug/ml 链霉素和 10 % 热灭活人类 AB 血清的 RPMI - 1640 基质)。

淋巴细胞扩增检测:

20 用或不用刺激物, 用 RH10 培养基在 96 孔圆底微孔板 (Nunc,Roskilde, Denmark)上制备  $5 \times 10^4$  PBLs, 终体积为 10ul。所用肽终浓度为 10ug/ml。所有实验重复三次。培养物在潮湿环境 ( 5% CO<sub>2</sub>, 95 % 空气) 下 37 摄氏度孵育 6 天。第 5 天, 向每孔加入 0.25uCi 3H-胸腺嘧啶 ( 3H - TdR;Amersham, Braunschweig, Germany )。第 6 天, 细胞用标准收集法通过玻璃滤纸收集。3H - TdR 掺入用液闪计数定量。结果以刺激结果 ( [有刺激物的 cpm - 无刺激物的 cpm]: [无刺激物的 cpm]) 表示。

肽 B27PA\*剂量/反应曲线的测定:

30 与 B27PA\*反应的来源于病人 ( AS1 ) 的  $1 \times 10^5$  PBLs 在不含或含 0.1 到 50.0ug/ml 不同浓度的合成肽 B27PA\*的 100ulRH10 培养基中孵育 6 天, 在第 5 天用 0.25uCi 的 3H - 胸腺嘧啶 ( 3H-TdR ) 刺

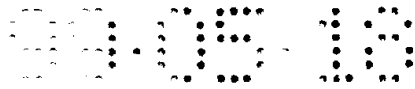
激，第6天用玻璃滤纸收集。结果用每分平均计数(cpm) $\pm$ 三次重复结果的标准误差。

B27PA\*特异 T 细胞系的产生:

5         $3 \times 10^6$  PBLs 在含 10ug 肽 B27PA\*/ml 的总体积为 2ml 的 RH10 培养基的 12 孔板上孵育。PBLs 由有关节强硬性脊椎炎的 AS1 和 AS2 病人和健康 HLA - B27 + ( H1 ) 血液捐献者分离得到，所有测试者在开始淋巴细胞扩增鉴定 ( 见“结果” ) 中表现出对 B27PA\* 明显的淋巴细胞增殖反应；有关节强硬性脊椎炎，AS2，而不表现出增殖反应的病人的 PBLs 作为对照。经过 3 天的培养，培养基由新鲜添加 20U 重组 IL-2 ( rIL - 2 , Boehringer Ingelheim, Germany ) /ml 的 RH10 替代。在第 10 天，培养物用自体，照射(4000rads)过的 PBLs 作为饲养细胞，添加了 10ug 的 B27PA\*肽/ml 和 rIL-2 的 RH10 清洗和再刺激。再刺激过程中，每  $1 \times 10^6$  反应者细胞用  $2 \times 10^6$  饲养细胞，所得 T 15 细胞系用淋巴细胞增殖检测进行功能定性，其中用  $1 \times 10^4$  T 细胞为反应细胞和  $1 \times 10^4$  自身 E - ( 例如，通过绵羊红细胞玫瑰花形成实验由自身 PBLs 中分离单核细胞/B 细胞侵蚀部分 ) 作为饲养细胞，总体积为 150ulRH10，以上方法在 E. Hermann, B. Fleischer, W.-J. Mayet, T. Poralla, K.-H Meyer zum Buschenfelde, Clin Exp. Immunol. 20 75,365-370(1989) 中描述过。肽 B27PA\*( 10 或 1ug/ml ) 和 B27PD ( 10ug/ml ) 作为刺激剂，植物血凝素 ( PHA ; 1ug/ml ) 作为阳性肽。为了检测单克隆抗体 ( Mabs ) 阻断肽 - 特异 T 细胞增殖的能力，Mabs w6/32(抗 - HLA - I 类, 1 : 400), DA6.231(抗-HLA-II; 1:400) 和 1ug/ml TCR- $\delta$  1 (  $\gamma$   $\delta$  - TCR 的  $\delta$  - 链上片段决定簇特异性; T Cell Sciences, Cmbridge, MA, USA ) 加入含 B27PA\*的培养物。25 培养的第 3 天，细胞用 0.25uCi 的  $^3$ H - TdR 刺激并按上文描述收获和计数。

肽刺激 T 细胞系的表现型分析 ( FACS ) :

30        在培养第 8 和 20 天的培养物中 T 细胞系，及未刺激的 PBLs 用细胞分类器分析。每次实验开始  $3 \times 10^5$  细胞用未结合 Mabs 抗 - CD3 ( OKT3 ) ， 抗 - CD4 ( OKT4 ) ， 抗 - CD8 ( OKT8 ) ( 混合上



清液) BMA.031 ( TCR- $\alpha\beta$  上片段决定簇特异性) 和 TCR -  $\delta$  1 标记, 然后用 RPMI - 1640/10%胎牛血清中荧光素异硫氰酸盐结合的多克隆羊抗小鼠 - IgG 抗体 ( Medac,Hamburg, Germany ) 标记。用荧光活化细胞分类器 ( FACStar, Becton Dickinson ) 进行细胞荧光测定分析, 每个样品中 6000 个细胞计数。结果用单克隆抗体 ( Mabs ) - 描述阳性染色细胞的百分比比上所有 CD3 - 阳性 T 细胞百分比来表示。

## 结果

### PBLs 对 HLA - B27 - 衍生肽的增殖反应:

10 如表 1 所示, B27PA\*在 17/55 有 AS ( SI 在 2.5 和 17 之间) 的测试病人和 3/30 正常 HLA - B27 + 血液捐赠者 ( SI 在 2.5 和 9.8 ) 中引起明显 PBL 扩增 (  $SI \geq 2.5$  )。有 AS 的测试病人和 3/30 正常 HLA - B27 + 血液捐赠者组间有明显差异 (  $p=0.0135$ ; Mann-Whitney rank sum test; Stat Exact Programme )。在 2/28 其它 HLA - B27 - 相关脊椎关节炎和 2/22 正常 HLA - B27-对照主体中只有轻微 PBL 增殖 (  $SI = 2.5$  )。

15 由于已知一些 T 细胞对抗原反应时可以被刺激后分泌细胞因子而不增殖, 对肽反应 ( AS1 ) 或不反应 ( AS2 ) 的病病人的 PBLs 中分泌 IFN -  $\gamma$  的 T 细胞比例用酶联免疫点印迹 ( ELISPOT ) 测定 (按 D.M. Klinman, T.B. Nutman 修正的, “ ELISPOT assay to detect cytokine-secreting murine and human cells”, in : Current Protocols in Immunology, 7th edition, Eds.: J.E. Coligan, A.M. Kruisbeek, D.H. Margulies, E.M. Shevach, W. Strober, Brooklyn, New York, Greene Publishing Associates,1994 ) 灵敏的 ELISPOT 技术表明  $10E5$  的 AS1 病人 PBLs 中的 8 个和  $10E5$  的 AS2 病人 PBLs 中的 1 个表现出 B27PA\* - 刺激 T 细胞产生 IFN -  $\gamma$  的特异性。

RA 病人 PBLs 并不被这两种所用肽刺激。

20 有趣的是, 健康的 HLA - B27 + 血液捐赠者 ( 称为 H1 ) , 健康的 HLA - B27 + 实验主体组中一个 30 岁男性血液捐赠者对 B27PA\* 肽 (  $SI = 9.8$  ) 表现出最强的 PBL 扩增反应, 在我们取血样 8 个月  
25 后, 表现出炎症类型的后期疼痛, 僵直持续 1h 。不幸的是, 此人, H1, 并未为风湿病学者进行病理检查。

如下表所示，一个 AS 病人的 PBLs 的 B27PA\* 特异反应（为 PBLs 对肽的反应），是剂量依赖并在培养基终浓度为 10ug/ml 时达到最大。

肽终浓度 (ug/ml)	B27PA*: cpm ± 标准误
0	165 ± 20
0.1	218 ± 25
1.0	565 ± 47
5.0	1576 ± 70
7.5	2492 ± 72
10.0	2718 ± 76
20.0	2695 ± 88
50.0	2733 ± 84

5

这些结果表明有 HLA - B27 序列合成的肽，如 B27PA\*，被有关节硬化脊椎炎 HLA - B27 + 病人的 PBLs 作为自身抗原特异识别，至少还能为 HLA - B27 + 对照主体以较低程度识别。

10 尽管 HLA - B27 衍生肽 B27PA\* 和 B27PD 对 PBL 捐赠者为外源，在 HLA - B27 - 对照主体中不诱导增殖或仅有轻微增殖。缺乏与这些 HLA - B27 决定簇反应的对照 PBLs 的增殖可以解释为这种反应活性表现出的“间接共识别”，其特点是宿主 MHC - 限制性 T 细胞共反应固定地指向外源 MHC 抗原上单一或一些主要决定簇。(G. Benichou, R.C. Tam, L.R.B. Loares, E.V. Fedoseyeva, *Immunol. Today* 15 18:67-71(1997)) 另外，在本研究中所检测的肽并不表现出与可能在 HLA - B27- 志愿者中引起共反应 T 细胞反应的 HLA - B27 分子相同的决定簇。

#### B27PA\*- 特异 T 细胞系的功能鉴定:

20 如上文所描述，3 个不同的 B27PA\*- 特异 T 细胞系通过培养和再刺激含 B27PA\* 肽的来源于病人 AS1 和 AS3 及健康 HLA - B27 + 血液捐赠者 ( H1 ) 的 PBLs 而产生。AS1 和 AS3 是其 PBLs 在与肽

B27PA\*反应时强烈增殖的病人 ( AS1: SI = 17.5; AS3:SI=15.4) 。血液捐献者 H1 的 PBLs 用 B27PA\* ( SI = 9.8 ) 刺激。对照 T 细胞系 B27PA\* - AS2 由与 B27PA\*(SI=1)反应不增殖的 PBLs 衍生而来。T 细胞系在培养第 20 天分析。如下表所示, 细胞系 B27PA\* - AS1 ,

5 B27PA\* - AS3 , B27PA\* - H1 与 B27PA\*肽反应特异性增殖, 而对照细胞系 B27PA\* - AS2 并不如此。不可能用抗 - MHC - I 类 Mabs(w6/32)或抗 MHC - II 类 Mabs(DA6.231)抑制这种特异的 T 细胞增殖。而单克隆抗体 TCR -  $\delta$  1 抗 -  $\gamma \delta$  - TCR ) 可以阻断大于 50% 的用 1 $\mu$ g/mlB27PA\*刺激的培养物中 B27PA\*特异性增殖反应, 而对

10 PHA 诱导的增殖没有效应。

T - 细胞系					
	B27PA*-AS1	B27PA*-AS3	B27PA*-H1	B27PA*-AS2	
T + 培养基	72 ± 5	75 ± 8	68 ± 8	86 ± 9	
T + E- + 培养基	89 ± 9	96 ± 11	85 ± 10	114 ± 16	
T + E- + B27PA* (10 µg/ml)	1548 ± 34	1120 ± 48	1368 ± 58	134 ± 18	
+ w6/32	1576 ± 55	1105 ± 41	1379 ± 67	n. best.	
+ DA6.231	1513 ± 102	1077 ± 83	1322 ± 117	n. best.	
+ TCR-δ1	855 ± 85	635 ± 64	893 ± 82	n. best.	
T + E- + B27PA* (1 µg/ml)	912 ± 90	725 ± 48	816 ± 55	126 ± 22	
+ w6/32	925 ± 82	730 ± 50	827 ± 69	n. best.	
+ DA6.231	896 ± 77	695 ± 55	803 ± 53	n. best.	
+ TCR-δ1	411 ± 42	304 ± 29	410 ± 40	n. best.	
T + E- + B27PD (10 µg/ml)	101 ± 16	95 ± 10	94 ± 21	125 ± 12	
T + E- + PHA (1 µg/ml)	3689 ± 177	4248 ± 124	3480 ± 145	4068 ± 170	
+ TCR-δ1	3650 ± 158	4268 ± 135	3538 ± 170	4103 ± 182	

n. b. = 未确定

B27PA\*特异性 T 细胞系的流式细胞分析:

从上表可以看出, 与未刺激的 PBLs ( 0 天) 或仅用 rIL-2 刺激的 PBLs 系相比较, B27PA\*特异性 T 细胞系 B27PA\*-AS1, B27PA\*-AS3, B27PA\*-H1 ( 培养第 8 和 20 天的产物) 表现型源于 B27PA\*-刺激细胞系中  $\gamma \delta$ -TCR + 淋巴细胞的扩展。在第 20 天,  $\gamma \delta$ -TCR + 淋巴细胞在所有 CD3 阳性细胞中分别含有 25.5%(志愿者 AS1), 30.4%(志愿者 AS3), 32.7%(志愿者 H1)。相反, B27PA\*-刺激对照细胞系 B27PA\*-AS2 仅含 7.4%  $\gamma \delta$ -TCR+细胞。下表数据以占总 CD3 - 阳性 T 细胞的百分比形式给出。

10

	TCR- $\alpha\beta$ (%)	CD4 (%)	CD8 (%)	TCR- $\gamma\delta$ (%)
供体 AS1				
新鲜分离的 PBLs	93.5	69.8	24.6	5.3
B27PA*刺激, 第 8 天	84.9	52.9	28.2	13.7
B27PA*刺激, 第 20 天	73.6	45.1	30.5	25.5
rIL-2 刺激, 第 20 天	93.0	67.7	26.7	6.3
供体 AS3				
新鲜分离的 PBLs	93.3	71.0	22.4	5.8
B27PA*刺激, 第 8 天	83.6	63.5	21.3	15.5
B27PA*刺激, 第 20 天	59.2	34.4	25.6	30.4
rIL-2 刺激, 第 20 天	92.2	75.8	16.6	7.2
供体 H1				
新鲜分离的 PBLs	95.7	73.1	22.3	4.1
B27PA*刺激, 第 8 天	85.2	58.4	26.5	14.0
B27PA*刺激, 第 20 天	67.1	34.9	31.5	32.7
rIL-2 刺激, 第 20 天	93.7	75.0	18.4	6.0
供体 AS2				
新鲜分离的 PBLs	94.1	66.3	27.4	5.3
B27PA*刺激, 第 8 天	92.3	68.6	24.0	7.2
B27PA*刺激, 第 20 天	91.9	70.2	21.4	7.8
rIL-2 刺激, 第 20 天	92.1	74.3	18.5	7.4

5 用 Mabs 阻断 B27PA\* - 特异性 T 细胞系的 FACScan 分析和实验数据表明  $\gamma\delta$  - TCR + T 细胞, 比起 CD4 - 阳性  $\alpha\beta$  - TCR + T 细胞, 在与 HLA - B27 - 衍生肽体外孵育后刺激和膨胀细胞中占多数。在此联系中, 值得一提的是自身反应  $\gamma\delta$  - TCR + 细胞可能与一些人类自身免疫性疾病有关 ( J. Soderstrom, E. Halapi, e. Nisson, A.



Gronberg, J. van Embden, L. Klareskog, R. Kiessling, Scand. J. Immunol. 32, 503-515(1990)), 包括类风湿关节炎, 尽管在 RA 病人的外周血或滑液和膜中  $\gamma\delta$ -TCR<sup>+</sup> 细胞的相对数量并不增加。(M. Smith, B. Broker, L. Moretta, E. Ciccone, C.E. Grossi, J.C.W. Edwards, F. Yuksel, B. Colaco, C. Worman, L. Mackenzie, R. Kinne, G. Weseloh, K. GLuckert, P.M. Lydyard, Scand. J. Immunol. 32, 585-593(1990)) 在脊柱关节炎中, Klebsiella 肺炎中增殖的  $\gamma\delta$ -TCR<sup>+</sup> 细胞 (E. Hermann, B. Sucke, U. Droste, K.-H. Meyer zum Buschenfelde, Arthritis Rheum. 38, 1277-1282, (1995)) 或对自身靶体, Daudi 细胞系或感染了肠细菌的 B 细胞系表现出细胞毒性的  $\gamma\delta$ -TCR<sup>+</sup> 细胞 (E. Hermann, B. Ackermann, R. Duchmann, K.-H. Meyer zum Buschenfelde, Clin. Exp. Rheumatol. 13, 187-191, (1995)) 由滑液中分离得到。按照脊柱关节炎的病理机制推论,  $\gamma\delta$ -TCR<sup>+</sup> 细胞可能在抗感染致关节炎的细菌的细胞或自身相同的炎症“应激”组织的早期防御机制中起作用 (E. Hermann, B. Ackermann, R. Duchmann, K.-H. Meyer zum Buschenfelde, Clin. Exp. Rheumatol. 13, 187-191, (1995))。另一个着眼于 HLA - B27 肽特异性  $\gamma\delta$ -TCR<sup>+</sup> 细胞作用的观察是在实验自身免疫眼色素层炎 (EAU) 的动物模型中进行。从由口服产生眼色素层炎自身抗性 S - Ag 肽或交叉反应肽 B27PD 诱导耐受的大鼠转移出来的  $\gamma\delta$ -TCR<sup>+</sup> 细胞能够以抗原特异的形式抑制眼色素层炎 (G. Wildner, T. Hunig, S. Thureau, Eur. J. Immunol. 26, 2140-48, (1996))。在结果中能够获得具有对源于 HLA - B 抗原 B27 肽的特异性的  $\gamma\delta$ -TCR<sup>+</sup> 细胞, 其中与疾病有关的 HLA - B 抗原 B27 可能与免疫调节, 甚至下调人类关节强硬性脊椎炎中的炎症有关。这项在以上文描述检测方法进行的观察中, 健康者, HLA - B27 阳性血捐献者的周边 T 细胞与 B27PA\* 肽反应这一现象与后期可能性并不矛盾。

序列表

(1) 一般信息:

(i) 申请人:

- (A) 名称: Wildner, Gerhild
- (B) 街道: Rupperechtstrasse 8a
- (C) 城市: Munich
- (E) 国家: Germany
- (F) 邮编: (ZIP): 80636

(ii) 发明题目: 用作自身免疫疾病的诊断和治疗剂的肽

(iii) 序列数: 11 个

(iv) 计算机可读形式:

- (A) 媒体类型: Floppy disk
- (B) 计算机: IBM PC 兼容机
- (C) 操作系统: PC-DOS/MS-DOS
- (D) 软件: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPO)

(V) 目前申请数据:

申请号: PCT/EP97/05124

(VI) 先有申请数据:

(A) 申请号: DE 196 38 108.08

(B) 申请日: 18-SEP-1996

(2) SEQ ID NO:1 信息:

(i) 序列描述:

(A) 长度: 21 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型:

(D) 拓扑学: 线型

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假说的: 非

(v) 片段类型: 内部的

(vi) 原始来源:

(A) 生物: 人类

(ix)特征:

(A)名称/关键词: 肽

(B)位置: 1...21

(D)其它信息: / 标记 = 来自 HLA - B27 的  $\alpha$  - 1 - 结构域  
的肽 B27PA (氨基酸 60 - 80)

(xi) SEQ ID NO: 1 的序列描述:

```

Trp Asp Arg Glu Thr Gln Ile Cys Lys Ala Lys Ala Gln Thr Asp Arg
1          5          10          15
Glu Asn Leu Arg Thr
                20
    
```

(2) SEQ ID NO:2 信息:

(i) 序列描述:

(A) 长度: 13 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型:

(D) 拓扑学: 线型

(ii)分子类型: 肽

(iii)假说的: 非

(v) 片段类型: 内部的

(vi)原始来源:

(B) 生物: 人类

(ix)特征:

(A)名称/关键词: 肽

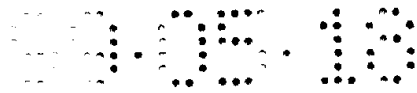
(B)位置: 1...13

(D)其它信息: / 标记 = 来自 HLA - B27 的  $\alpha$  - 1 - 结构域的肽  
B27PA\* (氨基酸 60 - 72)

(xi) SEQ ID NO: 2 的序列描述:

```

Trp Asp Arg Glu Thr Gln Ile Cys Lys Ala Lys Ala Gln
1          5          10
    
```



(2) SEQ ID NO:3 信息:

(i) 序列描述:

- (A) 长度: 10 个氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (C) 链型:
- (D) 拓扑学: 线型

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假说的: 非

(v) 片段类型: 内部的

(vi) 原始来源:

- (C) 生物: 人类

(ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 肽

- (B) 位置: 1...10

(D) 其它信息: / 标记 = 来自 HLA - B27 的  $\alpha$  - 2 - 结构域的肽  
B27PB (氨基酸 109 - 118)

(xi) SEQ ID NO: 3 的序列描述:

```
Leu Leu Arg Gly Tyr His Gln Asp Ala Tyr  
1           5           10
```

(2) SEQ ID NO:4 信息:

(i) 序列描述:

- (A) 长度: 15 个氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (C) 链型:
- (D) 拓扑学: 线型

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假说的: 非

(v) 片段类型: 内部的

(vi)原始来源:

(D) 生物: 人类

(ix)特征:

(A)名称/关键词: 肽

(B)位置: 1...15

(D)其它信息: / 标记 = 来自 HLA - B27 的  $\alpha$  - 2 - 结构域的肽  
B27PC (氨基酸 151 - 165)

(xi) SEQ ID NO: 4 的序列描述:

Arg	Val	Ala	Glu	Gln	Leu	Arg	Ala	Tyr	Leu	Glu	Gly	Glu	Cys	Val
1				5					10					15

(2) SEQ ID NO:5 信息:

(i) 序列描述:

(A) 长度: 21 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型:

(D) 拓扑学: 线型

(ii)分子类型: 肽

(iii)假说的: 非

(v) 片段类型: 内部的

(vi)原始来源:

(E) 生物: 人类

(ix)特征:

(A)名称/关键词: 肽

(B)位置: 1...13

(D)其它信息: / 标记 = 来自人类角蛋白 VI 的肽 Ker 333

(xi) SEQ ID NO: 5 的序列描述:

```

Leu Asp Leu Asp Ser Ile Ile Ala Glu Val Lys Ala Gln Tyr Glu Glu
1           5           10           15
Ile Ala Asn Arg Ser
                20
    
```

(2) SEQ ID NO:6 信息:

(i) 序列描述:

- (A) 长度: 11 个氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (C) 链型:
- (D) 拓扑学: 线型

(ii) 分子类型: 肽

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 区域

(B) 位置: 1

(D) 其它信息: / 标记 "Xaa=1-2 个氨基酸, 例如, 由 B27PA 衍生的肽中的 Trp 或, 例如由 Ker33 衍生的肽中的 Leu 。

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 区域

(B) 位置: 3

(D) 其它信息: / 标记 "Xaa=4-5 个氨基酸, 例如, 由 B27PA 衍生的肽中的 Cys-Lys-Ala 或, 例如由 Ker33 衍生的肽中的 Ala-Gly-Val 。

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 区域

(B) 位置: 9

(C) 其它信息: / 标记 "Xaa=6-8 个氨基酸, 例如, 由 B27PA 衍生的肽中的 Thr-Asp/Tyr-arg-Glu-Asn/Asp/Ser-Leu 或, 例如由 Ker33 衍生的肽中的 Tyr-Glu-Glu-Ile-Ala-Asn 。

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 区域

(B) 位置: 11

(D) 其它信息: / 标记 "Xaa=1-2 个氨基酸, 例如, 由 B27PA 衍

生的肽中的 Thr or Ile 或，例如由 Ker33 衍生的肽中的 Ser。

(ix)特征:

(A)名称/关键词: 肽

(B)位置: 1...11

(D)其它信息: / 标记 = 衍生于肽 B27PA 或肽 Ker333 的肽, 如果合适, 在其 C 或 N 端延长或截短 (截短通常限于至少 6 个氨基酸的肽)

(xi) SEQ ID NO: 6 的序列描述:

Xaa	Asp	Xaa	Ile	Xaa	Lys	Ala	Gln	Xaa	Arg	Xaa
1			5						10	

(2) SEQ ID NO:7 信息:

(i) 序列描述:

(A) 长度: 11 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型:

(D) 拓扑学: 线型

(ii) 分子类型: 肽

(ix)特征:

(A)名称/关键词: 区域

(B)位置: 1

(D)其它信息: / 标记 "Xaa=1-2 个氨基酸, 例如, 由 B27PA 衍生的肽中的 Trp 或, 例如由 Ker33 衍生的肽中的 Leu。

(ix)特征:

(A)名称/关键词: 区域

(B)位置: 3

(D)其它信息: / 标记 "Xaa=4-5 个氨基酸, 例如, 由 B27PA 衍生的肽中的 Arg-Glu-Thr-Gln 或, 例如由 Ker33 衍生的肽中的 Leu-Asp-Ser-Ile。

(ix)特征:

(A)名称/关键词: 区域

(B)位置: 5

(D)其它信息: / 标记 “Xaa=3-4 个氨基酸, 例如, 由 B27PA 衍生的肽中的 Cys-Lys-Ala 或, 例如由 Ker33 衍生的肽中的 Ala-Glu-Val .

(ix)特征:

(A)名称/关键词: 区域

(B)位置: 9

(D)其它信息: / 标记 “Xaa=6-8 个氨基酸, 例如, 由 B27PA 衍生的肽中的 Thr-Asp/Tyr-Arg-Glu-Asn/Asp/Ser-Leu 或, 例如由 Ker33 衍生的肽中的 Tyr-Glu-Glu-Ile-Ala-Asn .

(ix)特征:

(A)名称/关键词: 区域

(B)位置: 11

(D)其它信息: / 标记 “Xaa=1-2 个氨基酸, 例如, 由 B27PA 衍生的肽中的 Thr or Ile 或, 例如由 Ker33 衍生的肽中的 Ser .

(ix)特征:

(A)名称/关键词: 肽

(B)位置: 1…11

(D)其它信息: / 标记 = 衍生于肽 B27PA 或肽 Ker333 的肽, 如果合适, 在其 C 或 N 端延长或截短 (截短通常限于至少 6 个氨基酸的肽)

(xi) SEQ ID NO: 7 的序列描述:

```
Xaa Asp Xaa Ile Xaa Lys Ala Glu Xaa Arg Xaa
1           5           10
```

(2) SEQ ID NO:8 信息:

(i) 序列描述:

(A) 长度: 8 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型:

(D) 拓扑学: 线型

(ii)分子类型: 肽

(ix)特征:

(A)名称/关键词: 区域

(B)位置: 1

(D)其它信息: / 标记 "Xaa=1-2 个氨基酸, 例如, Trp.

(ix)特征:

(A)名称/关键词: 区域

(B)位置: 3

(D)其它信息: / 标记 "Xaa=4-5 个氨基酸, 例如, Arg-Glu-Thr-Gln.

(ix)特征:

(A)名称/关键词: 区域

(B)位置: 5

(D)其它信息: / 标记 "Xaa=3-4 个氨基酸, 例如 Cys-Lys-Ala .

(ix)特征:

(A)名称/关键词: 肽

(B)位置: 1...8

(D)其它信息: / 标记 = 衍生于肽 B27PA\* 如果合适, 在其 C 或 N 端延长或截短 (截短通常限于至少 6 个氨基酸的肽)

(xi) SEQ ID NO: 8 的序列描述:

```
Xaa Asp Xaa Ile Xaa Lys Ala Gln
1           5
```

(2) SEQ ID NO:9 信息:

(i) 序列描述:

(A) 长度: 8 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型:

(D) 拓扑学: 线型

(ii)分子类型: 肽

(ix)特征:

(A)名称/关键词: 区域

(B)位置: 1

(D)其它信息: / 标记 "Xaa=1-2 个氨基酸, 例如, Trp.

(ix)特征:

(A)名称/关键词: 区域

(B)位置: 3

(D)其它信息: / 标记 "Xaa=4-5 个氨基酸, 例如, Arg-Glu-Thr-

Gln.

(ix)特征:

(A)名称/关键词: 区域

(B)位置: 5

(D)其它信息: / 标记 "Xaa=3-4 个氨基酸, 例如 Cys-Lys-Ala .

(ix)特征:

(A)名称/关键词: 肽

(B)位置: 1...8

(D)其它信息: / 标记 = 衍生于肽 B27PA\* 如果合适, 在其 C 或 N 端延长或截短 (截短通常限于至少 6 个氨基酸的肽)

(xi) SEQ ID NO: 9 的序列描述:

```
Xaa Asp Xaa Ile Xaa Lys Ala Glu
1           5
```

(2) SEQ ID NO:10 信息:

(i) 序列描述:

(A) 长度: 6 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型:

(D) 拓扑学: 线型

(ii)分子类型: 肽

(ix)特征:

(A)名称/关键词: 区域

(B)位置: 1

(D)其它信息: / 标记 “Xaa=1-5 个氨基酸, 例如, 衍生于 B27PB 的肽中的 Leu, 或, 衍生于 B27PC 的 Arg-Val-Ala-Glu-Gln.

(ix)特征:

(A)名称/关键词: 区域

(B)位置: 4

(D)其它信息: / 标记 “Xaa=1 个氨基酸, 例如, 衍生于 B27PB 的肽中的 Gly,或, 衍生于 B27PC 的 Ala.

(ix)特征:

(A)名称/关键词: 区域

(B)位置: 1

(D)其它信息: / 标记 “Xaa=0-6 个氨基酸, 例如, 衍生于 B27PB 的肽中的 His-Gln-Asp-Ala-Tyr,或, 衍生于 B27PC 的 Leu-Glu-Gly-Glu-Cys-Val.

(ix)特征:

(A)名称/关键词: 肽

(B)位置: 1...6

(D)其它信息: / 标记 = 衍生于肽 B27PB 或肽 B27PC, 如果合适, 在其 C 或 N 端延长或截短 (截短通常限于至少 6 个氨基酸的肽)

(xi) SEQ ID NO: 10 的序列描述:

```
Xaa Leu Arg Xaa Tyr Xaa
1           5
```

(2) SEQ ID NO:11 信息:

(i) 序列描述:

(A) 长度: 14 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型:

(D) 拓扑学: 线型

(ii)分子类型: 肽

(iii)假说的: 非

(v) 片段类型: 内部的

(vi)原始来源:

(A)生物: 人类

(ix)特征:

(A)名称/关键词: 肽

(B)位置: 1...14

(D)其它信息: / 标记 = 可比于肽 B27PD

(X)公开信息:

(A)作者: Wildner, Gerhild

Thurau Stephan

(C) 杂志: Eur.J, Immunol.

(D) 卷: 24

(E) 页: 2579-2585

(F) 日期: 1994

(xi) SEQ ID NO: 11 的序列描述:

```
Ala Leu Asn Glu Asp Leu Ser Ser Trp Thr Ala Ala Asp Thr
1           5           10
```

