

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-2441

(P2004-2441A)

(43) 公開日 平成16年1月8日(2004.1.8)

(51) Int.Cl.⁷

C07K 4/00

C07K 7/06

C07K 7/08

F I

C07K 4/00 ZNA

C07K 7/06

C07K 7/08

テーマコード(参考)

4H045

審査請求 有 請求項の数 1 O L (全 33 頁)

(21) 出願番号 特願2003-165758 (P2003-165758)
 (22) 出願日 平成15年6月10日 (2003.6.10)
 (62) 分割の表示 特願平5-518573の分割
 原出願日 平成5年4月13日 (1993.4.13)
 (31) 優先権主張番号 867,819
 (32) 優先日 平成4年4月13日 (1992.4.13)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 594003676
 オクラホマ メディカル リサーチ ファ
 ウンデーション
 OKLAHOMA MEDICAL RE
 SEARCH FOUNDATION
 アメリカ合衆国 オクラホマ 73104
 , オクラホマ シティ, エヌ. イー. 1
 3ティーエッチ ストリート 825
 825 N. E. 13th Stree
 t, Oklahoma City, Okl
 ahoma 73104, United
 States of America
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 自己抗体診断用の方法および試薬

(57) 【要約】

【課題】 ヒト自己抗体に対する直鎖状エピトープを形成するペプチドを提供すること。

【解決手段】 本発明は、あらかじめ特定の免疫原にさらされた個体、あるいは、Ro / S S A、La / S S B、n R N PまたはSm B / B 'ポリペプチドあるいは自己抗体の産生を誘因するエピトープ(またはそれらの免疫等価物)と反応性の自己抗体を発現する個体を同定および分類するための付加的な診断薬を提供する。本発明はさらに、自己免疫疾患(例えば、全身性エリテマトーデスおよびシェーグレン症候群)を同定および治療するための方法および組成物を提供する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下のいずれかの群から選択される、ヒト自己抗体に対する直鎖状エピトープを形成するペプチド：

(i) 40より少ないアミノ酸のペプチドの群であって、該エピトープの配列が以下からなる群より選択される列挙されたアミノ酸配列のアミノ末端のアミノ酸で始まる、ペプチドの群：

La / S S B エピトープ：

I C H Q I E Y Y F G D F N L P R D K F L K (配列番号20) ,
 Y F G D F N L P (配列番号20のアミノ酸8位~15位) , 10
 W V P L E I M I K F N R (配列番号21) ,
 V P L E I M I K (配列番号21のアミノ酸2位~9位) ,
 N R L N R L T T D F N V I V E , (配列番号23) ,
 N R L N R L T T (配列番号23のアミノ酸1位~8位) ,
 T D F N V I V E (配列番号30) ,
 D F N V I V E A (配列番号30のアミノ酸2位~9位) ,
 K T K I R R S P S K P L (配列番号22) ,
 K I R R S P S K (配列番号22のアミノ酸4位~11位) ,
 Y K N D V K N R S V Y I K G F P T (配列番号29) ,
 S V Y I K G F P (配列番号29のアミノ酸9位~16位) , 20
 Q V L N I Q M R R T L H K A F K G S (配列番号19) ,
 N I Q M R R T L H K A F K (配列番号19のアミノ酸4位~16位) ,
 R T L H K A F K (配列番号19のアミノ酸9位~16位) ,
 I F V V F D S I E (配列番号27) ,
 F V V F D S I E (配列番号27のアミノ酸2位~9位) ,
 K E T D L L I L F K D D Y F A (配列番号28) ,
 I L F K D D Y F (配列番号28のアミノ酸7位~14位) ,
 K V E A K L R A K Q (配列番号36) ,
 E A K L R A K Q (配列番号36のアミノ酸3位~10位) ;
 C L L K F S G D (配列番号34) , 30
 R E D L H I L F (配列番号33) ,
 G E I K W I D F V R G A K (配列番号24) ,
 K W I D F V R G A K (配列番号24のアミノ酸4位~13位) ,
 I D F V R G A K (配列番号24のアミノ酸6位~13位) ,
 E G I I L F K E K A K (配列番号31) ,
 E G I I L F K E (配列番号31のアミノ酸1位~8位) ,
 G N L Q L R N K E V T W (配列番号26) ,
 L R N K E V T W (配列番号26のアミノ酸5位~12位) ,
 S L N K W K S K G R R F K G K G K G N K (配列番号25) ,
 K S K G R R F K (配列番号25のアミノ酸6位~13位) , 40
 K V Q F Q G K K T K F A S D (配列番号32) ,
 K K T K F A S D (配列番号32のアミノ酸7位~14位) , および
 T G P V K R A R (配列番号35) ;
 Ro / S S A エピトープ：
 M N R L H R F L (配列番号37) ,
 L C F G S E G G T (配列番号38) ,
 C F G S E G G T (配列番号38のアミノ酸2位~9位) ,
 S E G G T Y Y I K E Q (配列番号39) ,
 E G G T Y Y I K E Q (配列番号39のアミノ酸2位~11位) ,
 G T Y Y I K E Q (配列番号39のアミノ酸4位~11位) , 50

G T Y Y I (配列番号39のアミノ酸4位~8位),
 E I K S F S Q E G R T (配列番号40),
 K S F S Q E G R (配列番号40のアミノ酸3位~10位),
 S Q E G R T T K Q (配列番号41),
 G R T T K Q E P M (配列番号42),
 S T K Q A A F K A V (配列番号43のアミノ酸2位~11位),
 I S T K Q A A F K A V S (配列番号43),
 K Q A A F K A V (配列番号43のアミノ酸4位~11位),
 A F K A V S E V C (配列番号44),
 F T F I Q F K K D L K E S M K (配列番号45), 10
 Q F K K D L K E (配列番号45のアミノ酸5位~12位),
 S M K C G M W G R A (配列番号46),
 M K C G M W G R A (配列番号46のアミノ酸2位~10位),
 G M W G R A L R K A I A (配列番号47),
 G R A L R K A I (配列番号47のアミノ酸4位~11位),
 A L A V T K Y K Q R N G W S H K D L L R L S H (配列番号48),
 T K Y K Q R N G (配列番号48のアミノ酸5位~12位),
 Q R N G W S H K (配列番号48のアミノ酸9位~16位),
 L L R L S H L K P S S (配列番号49),
 R L S H L K P S (配列番号49のアミノ酸3位~10位), 20
 T K Y I T K G W (配列番号71のアミノ酸2位~9位),
 I T K G W K E V (配列番号71のアミノ酸5位~12位),
 H E L Y K E K A (配列番号50),
 L Y K E K A L S V (配列番号51),
 K A L S V E T E K L L K Y L (配列番号52),
 T E K L L K Y L (配列番号52のアミノ酸7位~14位),
 K L L K Y L E A (配列番号53),
 L E A V E K V K R T K D E (配列番号54),
 K V K R T K D E (配列番号54のアミノ酸6位~13位),
 H L L T N H L K S K E V W K A L L Q E M P L (配列番号55), 30
 L K S K E V W K (配列番号55のアミノ酸7位~14位),
 K S K E V W K A (配列番号55のアミノ酸8位~15位),
 S K E V W K (配列番号55のアミノ酸9位~14位),
 A L L R N L G K M T A (配列番号56),
 R N L G K M T (配列番号56のアミノ酸4位~10位),
 L G K M T A N S (配列番号57),
 L C N E K L L K K A R I H P F H I (配列番号58),
 L L K K A R I (配列番号58のアミノ酸6位~12位),
 K K A R I H P F (配列番号58のアミノ酸8位~15位),
 T Y K T G H G L R G K L K W R P D E (配列番号59), 40
 Y K T G H G L (配列番号59のアミノ酸2位~8位),
 A L D A A F Y K (配列番号60),
 A A F Y K T F K T V E P T G K R F L L A (配列番号61),
 A S M N Q R V L G S (配列番号62),
 E P T G K R F L (配列番号61のアミノ酸11位~18位),
 A M C M V V T R (配列番号63),
 A F S D E M V P (配列番号64),
 V P C P V T T D (配列番号65),
 V L M A M S Q I (配列番号66),
 T D C S L P M I (配列番号67), 50

L P M I W A Q K T N T P A (配列番号 68 のアミノ酸 3 位 ~ 15 位) ,
 T F A G G V H P A I (配列番号 69) ,
 T F A G G V H P (配列番号 69 のアミノ酸 1 位 ~ 8 位) ,
 I A L R E Y R K K M D I P A K L (配列番号 70) , および
 R E Y R K K M D (配列番号 70 のアミノ酸 4 位 ~ 11 位) ;

70 k D n R N P エピトープ :

A L F A P R D P (配列番号 72) ,
 E R M E R K R R (配列番号 73) ,
 M V Y S K R S G (配列番号 74) ,
 G K K I D G R R (配列番号 75) ,
 V E R G R T V K (配列番号 76) ,
 V K G W R P R R (配列番号 77) ,
 R R S R S R D K (配列番号 78) ,
 R R R S R E R S (配列番号 79) ,
 S R E R S K D K (配列番号 80) ,
 K R R S S R S R (配列番号 81) , および
 R R S H R S E R (配列番号 82) ;

10

n R N P A ペプチドエピトープ :

L N E K I K K D (配列番号 83) ,
 K K D E L K K S (配列番号 84) ,
 S R S L K M R G (配列番号 85) ,
 P F Y D K P M R (配列番号 86) ,
 I I A K M K G T F (配列番号 87) ,
 D R K R E K R K (配列番号 88) ,
 Q E T P A T K K (配列番号 89) ,
 A L Q G F K I T (配列番号 90) , および
 M K I S F A K K (配列番号 91) ; ならびに

20

n R N P C ペプチドエピトープ :

R K H K E N V K (配列番号 92) ,
 K D Y Y Q K W M (配列番号 93) ,
 A F Q Q G K I P (配列番号 94) ,
 K I P P T P F S (配列番号 95) ,
 P P P P S L P G (配列番号 96) ,
 S L P G P P R P (配列番号 97) ,
 P P R P G M M P (配列番号 98) ,
 P P P P G M M P (配列番号 99) ,
 G P A P G M R P (配列番号 100) ,
 P P M M R P P A (配列番号 101) , および
 P G M T R P D R (配列番号 102)

30

または

40

(i i) 4 個から 25 個までのアミノ酸からなる、(i) 群に規定されたペプチドの群であって、

ただし、該ペプチドは、A I A L R E Y R K K M D I P A、V H P A I A L R、K L G L E N、K D L K、K S K E、L T A L L R、R G K L K W、L K A L D、T R T E K D S、D E M V、E Y R K K M D、A A A M、D P D D、L S H L K、R T K D E、E K D S および E V C R からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するペプチドを除き、そして該ペプチドは、M A V P E T R P N H T、R P N H T I Y I N N L N E K I K K D E L K K S L Y A I F S Q F、S Q F G Q I L D I L V S R S L K M R G Q A F V I、F V I F K E V S S A T N A L R S M Q G F P F、G F P F Y D K P M R I Q Y A K T D S D I I A K、E R D R K R E K R K P K S Q E T P A T K K A V Q G G G A T P V V G、T P V

50

V G A V Q G P V P G M P P M T Q A P R I、Q A P R I M H H M P G Q P P Y M P P、
Y M P P P G M I P P P G L A P G Q I P P G A、I P P G A M P P Q Q L M P G Q M P
P A Q P L S E N P、E N P P N H I L F L T N L P E E T N E L M L S、L S M L F N
Q F P G F K E V R L V P G R H D I A F V E F および A G A A R D A L Q G F K I T Q
N N A M K I S F A K K からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するペプチドを除き

、
そしてここで、4～7個のアミノ酸からなるペプチドは、(i)群においてエピトープの
始まりの部分として規定されたアミノ酸配列内に含まれるペプチドである、ペプチドの群

【発明の詳細な説明】

10

【0001】

【発明の属する技術分野】

(発明の背景)

本発明は、自己免疫疾患、特に全身性エリテマトーデスの予防、診断および治療の分野に
属する。

【0002】

N a t i o n a l I n s t i t u t e s o f H e a l t h A R 3 9 5 7 7、A I
2 4 7 1 7、A I 2 1 5 6 8、A I 3 1 5 8 4 および A R 0 1 8 4 4、ならびに V e t e
r a n ' s A d m i n i s t r a t i o n から の 援 助 に よ り、米 国 政 府 が 本 発 明 の 権 利 を
有する。

20

【0003】

【従来の技術】

全身性エリテマトーデス(SLE)は、自己抗体が病因および病原において重要であると
見い出されそして考えられる他の多くの疾患と類似している。SLEは、自己抗体を通常
与える疾患に分類され得るが、それに対する自己抗体の主な役割は、臨床的発現に導く病
原において、まだ十分に確立または理解されていない。このような他の疾患としては、シ
ェーグレン症候群、リウマチ様関節炎、若年性糖尿病、原発性胆汁性肝硬変、ウェーグナ
ー肉芽腫症、炎症性腸疾患、およびその他多くの疾患が挙げられる。

【0004】

代表的には、自己免疫疾患は、非常に多くの症状および臨床的徴候を示す。リボヌクレオ
タン蛋白質複合体(RNP)に対する循環性自己抗体の産生は、ある種のリウマチ性自己
免疫疾患に共通した特性である。SLEおよびそれと密接に関連した疾患において最も一
般的な抗原としては、Ro/SSA、La/SSB、nRNP、およびSmが挙げられる
。最初、これらの抗体は、二重免疫拡散を用いて見い出されたが、つい最近、高感度固相
アッセイが、自己抗体を定量するために開発された。

30

【0005】

Ro/SSA RNAタンパク質粒子は、今日まで評価された全てのヒト細胞の構成要素
であることが見い出された。シェーグレン症候群(SS)および全身性エリテマトーデス
(SLE)患者の約半数が、抗Ro/SSA沈降素を有する。亜急性皮膚エリテマトーデス
患者またはSLEに伴う補体成分C2欠損患者の約75%が、抗Ro/SSA沈降素を
有する。新生児ループス皮膚炎(neonatal lupus dermatitis)
または完全先天性心臓ブロックにかかった新生児の母体の80%を越える母体が、この自
己抗体を有する。リウマチ様関節炎、多発筋炎、および進行性全身硬化症患者の5%程度
が、抗Ro/SSAを有し、このことは、R.M.Bernsteinら、Mol.Biol.
Med. 2:105~120(1984);および、J.B.Harleyお
よびK.K.Gaither、Autoantibodies in Rheumatic
Disease Clinics of North American: Sys
temic Lupus Erythematosus 14:1,43~56(198
8)に報告されている。

40

【0006】

50

La/SSBリボヌクレオプロテイン抗原に対する自己抗体もまた、SSおよびSLEの患者に見い出され、このことは、Alspaughら、*Arthritis Rheum.* 19:216(1976)およびMattioliら、*Arthritis Rheum.* 17:421(1974)に報告されている。さらに、Horsfallら、*J. Autoimmunity* 4:165(1991)によって報告されたこれらの抗体は、抗La/SSB自己抗体を有する特定の母体において妊娠の間胎児に対する病原となると考えられ、そこでは、抗Ro/SSAと共に完全先天性心臓ブロック(CCHB)に関連する。

【0007】

全身性エリテマトーデスおよびそれに関連する疾患に見い出された多くの自己抗体が、抗原特異的応答を示すか、または、ポリクローナルな抗原非特異的応答を示すかについては、激しい議論の的であった。自己抗体がSLEおよびそれに関連する症候群の発現に重要であるという証拠は納得のいくものである。心臓ブロックの新生児における特異的な減少(Harley, J. B.ら、*Arthritis Rheum.* 28:1321~1325(1985))およびヒトの皮膚における特異的な抗Ro/SSA免疫グロブリンの沈着(Lee, L. A.ら、*J. Clin. Invest.* 83:1556~1562(1989))が示されている。特定の濃度の抗Ro/SSAが、ループス腎炎に罹患した腎臓からの腎性溶出液の免疫グロブリンにおいて示された(Maddison, P. J.およびReichlin, M., *Arthritis Rheum.* 22:858~863(1979))。抗Ro/SSAは、シェーグレン症候群および原発性胆汁性肝硬変患者の耳化腺で特異的に濃縮されることが見い出された(Penner, E.およびReichlin, M., *Arthritis Rheum.* 25:1250~1253(1982))。経胎盤的に獲得した母体のIgGを有する乳児は、新生児ループス皮膚炎および/または完全先天性心臓ブロックが進行するという観察(Harley, J. B.およびGaither, K. K.: *Autoantibodies. In Rheumatic Disease Clinics of North America: Systemic Lupus Erythematosus* 14:1, 43~56(1988))によって、胎盤を通じて運搬される母性自己抗体(抗Ro/SSAまたは抗La/SSB)が、これらの臨床課題に、十分ではないが必要な重要成分であることが強く示唆される。

【0008】

タンパク質のRo/SSAファミリーは、同定された抗原の分子量によって機能的に規定されるいくつかの分子形態を有することが示されている。主な形態は、60キロダルトン(kD)の見かけ分子量を有する。このタンパク質は、4つのhYRNAの1つと結合している。最近、抗Ro/SSA血清と結合する2つの付加的なタンパク質が、M. D. Raderら、*J. Clin. Invest.* 83:1556~1562(1989)により同定され、その分子量は52kDおよび54kDであった。48kDのタンパク質であるカルモジュリンは、抗Ro/SSA血清と結合していることが同定された(McCaulliffeら、*J. Clin. Invest.* 85:1379~1391(1990))。J. C. ChambersおよびJ. D. Keene、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:2115~2119(1985)に記載されたように、48kDのペプチドであるLa/SSBタンパク質はまた、このグループの自己抗体のメンバーであり、小RNAをポリウリジン末端に結合させる。このことは、J. E. Stephano, *Cell* 36:145~154(1984)に報告されている。La/SSBは、第三の抗Ro/SSA沈降素陽性血清と結合する。La/SSBタンパク質は、種々の組織源から精製され、そして46~50kDのモノマー性リンタンパク質であることが示され、このことは、Habetsら、*EMBO J.* 2:1625(1983)およびVenablesら、*Clin. Exp. Immunol.* 54:731(1983)に報告されている。それは、RNAポリメラーゼIII転写物と結合し(このことは、Lernerら、*Proc. Natl. Acad. Sci. U*

10

20

30

40

50

S A . 76 : 5495 (1979) および S t e i t z ら、C o l d S p r i n g Harbor Symposium Quant. Biol. 47 : 893 (1983) に報告される)、そしてこの酵素の終結因子として機能し得る(このことは、G o t t l i e b ら、E M B O J . 8 : 841 (1989) に報告される)。核酸依存性 A T P アーゼ / d A T P アーゼ 酵素活性はまた、B a c h m a n n ら、C e l l 60 : 85 (1990) によって、L a / S S B に起因するとされている。

【0009】

抗 S m 抗体は S L E としばしば関係している。これらの自己抗体は、U 1、U 2、U 4 / U 6、および U 5 R N A を含む s n R N P を沈降させる。これらの複合体は、スプライセオソームおよびスプライスヘテロ核 R N A を形成し、このことは、S h a r p、S c i e n c e 235 : 766 (1987)、および、M a n i a t i s および R e e d、N a t u r e 325 : 673 (1987) に報告されている。抗 S m 抗体は、以下の6種のポリペプチドの1つまたはその組み合わせを指向する：B (26 k D a)、B ' (27 k D a)、D (13 k D a)、E / F (11 k D a ダブレット)、および G (10 k D a 未満)。

10

【0010】

オクタロニー免疫拡散法で抗 S m 沈降素を形成するリウマチ性疾患患者の殆ど全ては、抗 n R N P 沈降素を有するか、または最終的には発現する。このことは、F i s h e r ら、A r t h r i t i s R h e u m . 28 : 1348 (1985) に報告されている。抗 S m および抗 n R N P 沈降素は、オクタロニー免疫拡散法において部分的に同一である沈降線を形成する。このことは、M a t t i o l i および R e i c h l i n、J . I m m u n o l 110 : 1318 (1973) で議論されている。この部分的に同じ抗原性の基礎は、U s n R N P 粒子の組成により説明される。抗 n R N P 沈降素に対する抗原は、U 1 s n R N P に独特である70 k D の A および C ペプチドであり、B / B ' および D ペプチドはまた U 1 s n R N P 上に見い出される。B / B ' および D A g は、70 k D の A または C ではなく、U 2、U 4 / U 6、および U 5 s n R N P に見い出される。従って、抗 S m および抗 n R N P の両方が、抗 U 1 s n R N P 活性を結合するが、抗 S m だけが U 2、U 4 / U 6、および U 5 s n R N P を結合する。

20

【0011】

J o h n B . H a r l e y による1991年1月31日出願の米国出願第07 / 648, 205号「自己免疫疾患のアッセイおよび治療」、および1990年1月31日出願の米国出願第07 / 472, 947号、発明の名称「自己免疫疾患のアッセイおよび治療」は、特定の疾患に特徴的な自己抗体産生の原因となる病因物質または抗原物質を同定するための特定の方法を記載した。例えば、1またはそれ以上の患者から単離された自己抗体を用いて、抗原がまず最初に単離される。次いで、この抗原は、重複する短いアミノ酸配列に分割され、好ましくは20個のアミノ酸またはそれ未満、最も好都合にはオクタペプチドに分割される。自己抗体と最大の反応性を有する配列が同定され、次いで、使用可能なコンピューターデータベースを用いて公知のアミノ酸配列の全てと比較する。自己抗体と最大の反応性を有する配列に相同な配列を、最大数または最大比率で有するタンパク質は、病因物質または免疫原として公知の配列決定されたタンパク質の最も適切な候補の中にある。病因物質および抗原配列が判明すると、病因物質および / または自己抗体のいずれかを有する患者の診断および治療のためのアッセイおよび試薬を設計することが可能である。

30

40

【0012】

先の出願の実施例は、S L E および S S 患者の抗血清と反応性である、60 k D a R o / S S A タンパク質および L a / S S B の配列に由来するペプチドを用いた。

【0013】

【発明が解決しようとする課題】

従って、本発明の目的は、あらかじめ特定の免疫原にさらされた個体、あるいは、R o / S S A、L a / S S B、n R N P または S m B / B ' ポリペプチドあるいは自己抗体の産

50

生を誘因するエピトープ（またはそれらの免疫等価物）と反応性の自己抗体を発現する個体を同定および分類するための付加的な診断薬を提供することである。

【0014】

本発明のさらなる目的は、自己免疫疾患（例えば、全身性エリテマトーデスおよびシェーグレン症候群）を同定および治療するための方法および組成物を提供することである。

【0015】

【課題を解決するための手段】

本発明は、一つの局面において、40より少ないアミノ酸のペプチドの群から選択されるヒト自己抗体に対する直鎖状エピトープであって、該ペプチドが、以下に示されるアミノ酸配列が続くアミノ末端から番号付けられたアミノ酸で始まる、エピトープに関する：

10

【0016】

【化1】

La/SSBエピトープ： 136, QVLNIQMRRTLHKAFKGS, 139,
 NIQMRRTLHKAFK, 144, RTLHKAFK, 17,
 ICHQIEYYFGDFNLPRDKFLK, 24, YFGDFNLP, 46,
 WVPLEIMIKFNR, 47, VPLEIMIK, 86, KKTKIRRRSPSKPL, 89,
 KIRRRSPSK, 56, NRLNRLTTDFNVIVE, 56, NRLNRLTT, 257,
 GEIKWIDFVRGAK, 260, KWIDFVRGAK, 262, IDFVRGAK, 325,
 SLNKWKSKGRRFKGKGGKGNK, 330, KSKGRRFK, 292,
 GNLQLRNKEVTW, 296, LRNKEVTW, 154, IFVVFDSE, 155,
 FVVFDSE, 176, KETDLLILFKDDYFA, 182, ILFKDDYF, 104,
 YKNDVKNRSVYIKGFPT, 112, SVYIKGFP, 63, TDFNVIVE, 64,
 DFNVIVEA, 270, EGIILFKEKAK, 270, EGIILFKE, 354,
 KVQFQGKTKFASD, 360, KTKFASD, 246, REDLHILF, 232,
 CLLKFSGD, 379, TGPVKRAR, 200, KVEAKLRAKQ, 202,
 EAKLRAKQ;

20

30

Ro/SSAエピトープ： 30, MNRLHRFL, 37, LCFGSEGGT, 38,
 CFGSEGGT, 44, SEGGTYIYKEQ, 45, EGGTYIYKEQ, 47, GTYYIYKEQ,
 47, GTYYI, 76, EIKSFSQEGR, 78, KSFSQEGR, 81, SQEGRTTKQ,
 84, GRTTKQEP, 105, STKQAAFKAV, 106, ISTKQAAFKAVS, 109,
 KQAAFKAV, 111, AFKAVSEVC, 126, FTFIQFKKDLKESMK, 130,
 QFKKDLKE, 138, SMKCGMWGRA, 139, MKCGMWGRA, 142,
 GMWGRALRKAIA, 145, GRALRKAI, 165,
 ALAVTKYKORNGWSHKDLLRLSH, 169, TKYKORNG, 173,

40

【0017】

【化2】

ORNGWSHK, 182, LLRLSHLKPSS, 184, RLSHLKPS, 198,
 TKYITKGW, 201, ITKGWKEV, 210, HELYKEKA, 212, LYKEKALSV,
 215, KALSVETEKLLKYL, 221, TEKLLKYL, 224, KLLKYLEA, 229,
 LEAVEKVKRTKDE, 234, KVKRTKDE, 257,
 HLLTNHLKSKEVWKALLQEMPL, 263, LKSKEVWK, 264,
 KSKEVWKA, 265, SKEVWK, 280, ALLRNLGKMTA, 283, RNLGKMT,
 285, LGKMTANS, 308, LCNEKLLKKARIHPFHI, 313, LLKKARI, 315,
 KKARIHPF, 330, TYKTGHGLRGKWKWRPDE, 331, YKTGHGL, 352,
 ALDAAFYK, 355, AAFYKTFKTVEPTGKRFLLA, 362,
 ASMNORVLGS, 365, EPTGKRFL, 398, AMCMVVTR, 414,
 AFSDEMVP, 420, VPCPVTTD, 433, VLMAMSQI, 445, TDCSLPMI,
 449, LPMIWAQKTNTPA, 453, TFAGGVHPAI, 472, TFAGGVHPAI,
 472, TFAGGVHP, 482, IALREYRKKMDIPAKL, 484, REYRKKMD;

10

20

Sm B/B' エピトープ : 20, IGTFKAFD, 21, GTFKAFDK, 22,
 TFKAFDKH, 29, GTFKAFDK, 30, TFKAFDKHM, 44, DCDEFKRI, 45,
 CDEFKIK, 45, CDEFKIKPKNAKQP, 46, DEFKJKP, 47,
 EFRKIKPK, 76, FRKJKPKN, 77, RKIKPKNA, 78, KIKPKNAK, 79,
 IKPKNAKQ, 80, KPKNKOP, 81, PKNAKQPE, 83, EGPPPKDT, 88,
 KDTGIARV, 94, RVPLAGAA, 101, AGGPGVGRAAGRGVPAG, 104,
 PGVGRAAG, 120, IPQAPAGLAG, 125, AGLAGPVRGVGGPSQ, 131,
 VRGVGGPS, 139, QQVMTPQG, 140, QVMTPQGR, 141, VMTPOGRG,
 144, POGR, 142, MTPQGBGT, 143, TPQGRGTV, 144, PQGRGTVA,
 145, QGRGTVAA, 164, APTQYPPG, 165, PTQYPPGR, 166,
 TQYPPGRG, 167, QYPPGRGT, 168, YPPGRGTP, 169, PPGRGTTP,
 170, PGRGTPPP, 171, GRGTTPPP, 172, RGTPPPP, 173, GTPPPV,
 174, TTPPPVGRATPPPGI, 175, PPPVGRA, 184, PPPGIMAP, 188,
 IMAPPPGM, 189, MAPPPGMRPPM, 189, MAPPPGMR, 191, PPPGMR,
 190, APPPGMRP, 191, PPPGMRPP, 192, PPGMRPPM, 202,
 PIGLPPARGTPIGMPP, 206, PPARGTPI, 212, PIGMPPPG, 213,

30

40

【 0 0 1 8 】

【 化 3 】

IGMPPPGM, 214, GMPPPGMB, 216, PPPGMB, 215, MPPPGMRP, 216,
 PPPGMRPP, 217, PPGMRPPP, 220, MRPPPPGI, 221, RPPPPGIR, 221,
 RPPPPGIRGPP, 223, PPPGIR, 222, PPPPGIRG, 223, PPPGIRGP, 224,
 PPGIRGPP, 228, RGPPPPGM, 228, RGPPPPGMRPPR, 229,
 GPPPPGMR, 230, PPPPGMRP, 231, PPPGMRPP, 231, PPPGMR, および
 232, PPGMRPPR。

10

本発明の上記エピトープの好ましい実施形態では、上記エピトープは、4から25の間のアミノ酸からなる。

【0019】

本発明の上記エピトープの好ましい実施形態では、上記エピトープは、抗Ro/SSAポリクローナル抗体と反応性である。

【0020】

本発明の上記エピトープの好ましい実施形態では、上記エピトープは、抗SMB/B'ポリクローナル抗体と反応性である。

【0021】

本発明の上記エピトープの好ましい実施形態では、上記エピトープは、抗La/SSBポリクローナル抗体と反応性である。

20

【0022】

本発明の上記エピトープの好ましい実施形態では、前記ペプチドが以下からなる群またはそれらの混合物から選択される：

【0023】

【化4】

29, GTFKAFDK, 45, CDEFKIKPKNAKQP, 94,
 RVPLAGAA, 101, AGGPGVGRAAGRGVPAG, 125,
 AGLAGPVRGVGGPSQ, 140, QVMTPOGRGTVA, 165,
 PTQYPPGRGTPPPV, 174, TPPPVGRATPPPGI, 184, PPPGIMAP,
 189, MAPPPGMRPPM, 202, PIGLPPARGTPIGMPP, 212, PIGMPPPG,
 221, RPPPPGIRGPP, 228, RGPPPPGMRPPR, 30, TFKAFDKHM,
 83, EGPPPKDT, 88, KDTGIARV, および 120, IPQAPAGLAG,

30

本発明の上記エピトープの好ましい実施形態では、上記エピトープは、患者へ投与するために薬学的キャリアと組み合わせられる。

【0024】

本発明の上記エピトープの好ましい実施形態では、上記エピトープは、循環性自己抗体を中和するために患者へ投与するのに有効な濃度である。

40

【0025】

患者へ投与するために薬学的キャリアをさらに含有する上記エピトープの好ましい実施形態では、該キャリアおよび配列の濃度は宿主に投与したとき免疫応答を誘導する。

【0026】

本発明の上記エピトープの好ましい実施形態では、上記エピトープは、色素、蛍光ラベル、化学発光ラベル、酵素、および放射活性ラベルからなる群から選択される化合物でラベルされる。

【0027】

50

本発明の上記エピトープの好ましい実施形態では、上記エピトープは、基質上に固定化される。

【0028】

さらに本発明は、自己免疫疾患の患者をスクリーニングする方法であって、生物学的試料を、40より少ないアミノ酸のペプチドの群またはそれらの混合物から選択されるエピトープと反応させる工程を包含し、該ペプチドが以下に示されるアミノ酸配列が続くアミノ末端から番号付けられたアミノ酸で始まる、方法に関する：

【0029】

【化5】

La/SSBエピトープ： 136, QVLNIQMRRTLHKAFKGS, 139,
 NIQMRRTLHKAFK, 144, RTLHKAFK, 17,
 ICHQIEYYFGDFNLPRDKFLK, 24, YFGDFNLP, 46,
 WVPLEIMIKFNR, 47, VPLEIMIK, 86, KKTKIRRSPSKPL, 89,
 KIRRSPSK, 56, NRLNRLTTDFNVIVE, 56, NRLNRLTT, 257,
 GEIKWIDFVRGAK, 260, KWIDFVRGAK, 262, IDFVRGAK, 325,
 SLNKWWSKGRRFKGGKGNK, 330, KSKGRRFK, 292,
 GNLQLRNKEVTW, 296, LRNKEVTW, 154, IFVVFDSIE, 155,
 FVVFDSIE, 176, KETDLLILFKDDYFA, 182, ILFKDDYF, 104,
 YKNDVKNRSVYIKGFPT, 112, SVYIKGFP, 63, TDFNVIVE, 64,
 DFNVIVEA, 270, EGILFKEKAK, 270, EGILFKE, 354,
 KVQFQGKKTGFASD, 360, KKTKGFASD, 246, REDLHILF, 232,
 CLLKFSGD, 379, TGPVKRAR, 200, KVEAKLRAKQ, 202,
 EAKLRAKQ;

10

20

30

【0030】

【化6】

Ro/SSAエピトープ : 30, MNRLHRFL, 37, LCFGSEGGT, 38,
 CFGSEGGT, 44, SEGGTYIYKEQ, 45, EGGTYIYKEQ, 47, GTYYIYKEQ,
 47, GTYYI, 76, EIKSFSQEGRT, 78, KSFSQEGR, 81, SQEGRTTKQ,
 84, GRTTKQEPM, 105, STKQAAFKAV, 106, ISTKQAAFKAVS, 109,
 KQAAFKAV, 111, AFKAVSEVC, 126, FTFIQFKKDLKESMK, 130,
 QFKKDLKE, 138, SMKCGMWGRA, 139, MKCGMWGRA, 142, 10
 GMWGRALRKAIA, 145, GRALRKAI, 165,
 ALAVTKYKORNGWSHKDLLRLSH, 169, TKYKORNG, 173,
 ORNGWSHK, 182, LLRLSHLKPS, 184, RLSHLKPS, 198,
 TKYITKGW, 201, ITKGWKEV, 210, HELYKEKA, 212, LYKEKALSV,
 215, KALSVETEKLLKYL, 221, TEKLLKYL, 224, KLLKYLEA, 229,
 LEAVEKVKRTKDE, 234, KVKRTKDE, 257, 20
 HLLTNHLKSKEVWKALLQEMPL, 263, LKSKEVWK, 264,
 KSKEVWKA, 265, SKEVWK, 280, ALLRNLGKMTA, 283, RNLGKMT,
 285, LGKMTANS, 308, LCNEKLLKKARIHPFHI, 313, LLKKARI, 315,
 KKARIHPF, 330, TYKTGHGLRGKWKWRPDE, 331, YKTGHGL, 352,
 ALDAAFYK, 355, AAFYKTFKTVEPTGKRFLLA, 362,
 ASMNORVLGS, 365, EPTGKRFL, 398, AMCMVVTR, 414,
 AFSDDEMVP, 420, VPCPVTTD, 433, VLMAMSQI, 445, TDCSLPMI, 30
 449, LPMIWAQKTNTPA, 453, TFAGGVHPAI, 472, TFAGGVHPAI,
 472, TFAGGVHP, 482, IALREYRKKMDIPA KL, 484, REYRKKMD;

【 0 0 3 1 】

【 化 7 】

Sm B/B' エピトープ : 20, IGTFKA FD, 21, GTFKA FD K, 22, TFKAFDKH, 29, GTFKA FD K, 30, TFKAFDKHM, 44, DCDEF RKI, 45, CDEF AKIK, 45, CDEF RKIKPKNAKQP, 46, DEF RKJKP, 47, EFRKIKPK, 76, FRKJKPKN, 77, RKIKPKNA, 78, KIKPKNAK, 79, IKPKNAKQ, 80, KPKN AKOP, 81, PKNAKQPE, 83, EGPPPKDT, 88, KDTGIARV, 94, RVPLAGAA, 101, AGGPGV GRAAGRGVPAG, 104, PGV GRAAG, 120, IPQAPAGLAG, 125, AGLAGPVRGVGGPSQ, 131, VRGVGGPS, 139, QQVMTPQG, 140, QVMTPQGR, 141, VMTPOGRG, 144, POGR, 142, MTPQGBGT, 143, TPQGRGTV, 144, PQGRGTVA, 145, QGRGTVA A, 164, APTQYPPG, 165, PTQYPPGR, 166, TQYPPGRG, 167, QYPPGRGT, 168, YPPGRGTP, 169, PPGRGTPP, 170, PGRGTPPP, 171, GRGTPPPP, 172, RGTTPPPV, 173, GTPPPVVG, 174, TPPPVGRATPPPGI, 175, PPPVGRA, 184, PPPGIMAP, 188, IMAPPPGM, 189, MAPPPGMRPPM, 189, MAPPPGMR, 191, PPPGMR, 190, APPPGMRP, 191, PPPGMRPP, 192, PPGMRPPM, 202, PIGLPPARGTPIGMPP, 206, PPARGTPI, 212, PIGMPPPG, 213, IGMPPPGM, 214, GMPPPGMB, 216, PPPGMB, 215, MPPPGMRP, 216, PPPGMRPP, 217, PPGMRPPP, 220, MRPPPPGI, 221, RPPPPGIR, 221, RPPPPGIRGPP, 223, PPPGIR, 222, PPPPGIRG, 223, PPPGIRGP, 224, PPGIRGPP, 228, RGPPPPGM, 228, RGPPPPGMRPPR, 229, GPPPPGMR, 230, PPPPGMRP, 231, PPPGMRPP, 231, PPPGMR, みたび 232, PPGMRPPR,

本発明の上記方法の好ましい実施形態では、前記エピトープが、色素、蛍光ラベル、化学発光ラベル、酵素、および放射活性ラベルからなる群から選択される化合物でラベルされる。

【0032】

本発明の上記方法の好ましい実施形態では、前記ペプチドは基質上に固定化される。

【0033】

本発明の上記方法の好ましい実施形態では、上記方法は、患者試料中の自己抗体を検出する工程をさらに包含する。

【0034】

本発明の上記方法の好ましい実施形態では、上記方法は、前記患者試料の前記エピトープとの反応性に基づいて患者の予後を予測する工程をさらに包含する。

【0035】

さらに本発明は、自己免疫疾患の患者を治療する方法であって、40より少ないアミノ酸のペプチドの群またはそれらの混合物から選択されるエピトープを自己免疫応答をブロックする有効量で患者に投与する工程を包含し、該ペプチドが以下に示されるアミノ酸配列

10

20

30

40

50

が続くアミノ末端から番号付けられたアミノ酸で始まる、方法に関する：

【 0 0 3 6 】

【 化 8 】

La/SSBエピトープ： 136, QVLNIQMRRTLHKAFKGS, 139,
NIQMRRTLHKAFK, 144, RTLHKAFK, 17,
ICHQIEYYFGDFNLPRDKFLK, 24, YFGDFNLP, 46,
WVPLEIMIKFNR, 47, VPLEIMIK, 86, KKTKIRRSPSKPL, 89,
KIRRSPSK, 56, NRLNRLTTDFNVIVE, 56, NRLNRLTT, 257,
GEIKWIDFVRGAK, 260, KWIDFVRGAK, 262, IDFVRGAK, 325,
SLNKWKSKGRRFKGKGKGNK, 330, KSKGRRFK, 292,

10

【 0 0 3 7 】

【 化 9 】

GNLQLRNKEVTW, 296, LRNKEVTW, 154, IFVVFDSE, 155,
 FVVFDSE, 176, KETDLLILFKDDYFA, 182, ILFKDDYF, 104,
 YKNDVKNRSVYIKGFPT, 112, SVYIKGFP, 63, TDFNVIVE, 64,
 DFNVIVEA, 270, EGILFKEKAK, 270, EGILFKE, 354,
 KVQFQGGKTKFASD, 360, KKTKFASD, 246, REDLHILF, 232,
 CLLKFSGD, 379, TGPVKRAR, 200, KVEAKLRAKQ, 202,
 EAKLRAKQ;

10

Ro/SSAエピトープ : 30, MNRLHRFL, 37, LCFGSEGGT, 38,
 CFGSEGGT, 44, SEGGTYIKEQ, 45, EGGTYIKEQ, 47, GTYYIKEQ,
 47, GTYYI, 76, EKSFSQEGRT, 78, KSFSQEGR, 81, SQEGRTTKQ,
 84, GRTTKQEPM, 105, STKQAAFKAV, 106, ISTKQAAFKAVS, 109,
 KQAAFKAV, 111, AFKAVSEVC, 126, FTFIQFKKDLKESMK, 130,
 QFKKDLKE, 138, SMKCGMWGRA, 139, MKCGMWGRA, 142,
 GMWGRALRKAIA, 145, GRALRKAI, 165,
 ALAVTKYKORNGWSHKDLLRLSH, 169, TKYKORNG, 173,
 ORNGWSHK, 182, LLRLSHLKPS, 184, RLSHLKPS, 198,
 TKYITKGW, 201, ITKGWKEV, 210, HELYKEKA, 212, LYKEKALSV,
 215, KALSVETEKLLKYL, 221, TEKLLKYL, 224, KLLKYLEA, 229,
 LEAVEKVKRTKDE, 234, KVKRTKDE, 257,
 HLLTNHLKSKEVWKALLQEMPL, 263, LKSKEVWK, 264,
 KSKEVWKA, 265, SKEVWK, 280, ALLRNLGKMTA, 283, RNLGKMT,
 285, LGKMTANS, 308, LCNEKLLKKARIHPFHI, 313, LLKKARI, 315,
 KKARIHPF, 330, TYKTGHGLRGKWKRPDE, 331, YKTGHGL, 352,
 ALDAAFYK, 355, AAFYKTFKTVEPTGKRFLA, 362,

20

30

40

【 0 0 3 8 】

【 化 1 0 】

ASMNORVLGS, 365, EPTGKRFL, 398, AMCMVVTR, 414,
AFSDDEMVP, 420, VPCPVTTD, 433, VLMAMSQI, 445, TDCSLPMI,
449, LPMIWAQKTNTPA, 453, TFAGGVHPAI, 472, TFAGGVHPAI,
472, TFAGGVHP, 482, IALREYRKKMDIPAKL, 484, REYRKKMD;

Sm B/B' エピトープ : 20, IGTFKAFD, 21, GTFKAFDK, 22, 10
TFKAFDKH, 29, GTFKAFDK, 30, TFKAFDKHM, 44, DCDEFKRI, 45,
CDEFKIK, 45, CDEFKIKPKNAKQP, 46, DEFKJKP, 47,
EFRKIKPK, 76, FRKJKPKN, 77, RKIKPKNA, 78, KIKPKNAK, 79,
IKPKNAKQ, 80, KPKNAKOP, 81, PKNAKQPE, 83, EGPPPKDT, 88,
KDTGIARV, 94, RVPLAGAA, 101, AGGPGVGRAAGRGVPAG, 104,
PGVGRAAG, 120, IPQAPAGLAG, 125, AGLAGPVRGVGGPSQ, 131,
VRGVGGPS, 139, QQVMTPQG, 140, QVMTPQGR, 141, VMTPOGRG, 20
144, POGR, 142, MTPQGBGT, 143, TPQGRGTV, 144, PQGRGTVA,
145, QGRGTVAA, 164, APTQYPPG, 165, PTQYPPGR, 166,
TQYPPGRG, 167, QYPPGRGT, 168, YPPGRGTP, 169, PPGRGTPP,
170, PGRGTPPP, 171, GRGTPPPP, 172, RGTPPPPV, 173, GTPPPPVG,
174, TPPPPVGRATPPPGI, 175, PPPVGRA, 184, PPPGIMAP, 188,
IMAPPPGM, 189, MAPPPGMRPPM, 189, MAPPPGMR, 191, PPPGMR, 30
190, APPPGMRP, 191, PPPGMRPP, 192, PPGMRPPM, 202,
PIGLPPARGTPIGMPP, 206, PPARGTPI, 212, PIGMPPPG, 213,
IGMPPPGM, 214, GMPPPGMB, 216, PPPGMB, 215, MPPPGMRP, 216,
PPPGMRPP, 217, PPGMRPPP, 220, MRPPPPGI, 221, RPPPPGIR, 221,

【 0 0 3 9 】

【 化 1 1 】

RPPPPGIRGPP, 223, PPPGIR, 222, PPPPGIRG, 223, PPPGIRGP, 224, 40
PPGIRGPP, 228, RGPPPPGM, 228, RGPPPPGMRPPR, 229,
GPPPPGMR, 230, PPPPGMRP, 231, PPPGMRPP, 231, PPPGMR, あいひ
232, PPGMRPPR,

本発明の上記方法の好ましい実施形態では、前記エピトープが自己免疫疾患に対するワクチンとして作用する。

【 0 0 4 0 】

本発明の上記方法の好ましい実施形態では、前記エピトープが前記自己抗体に結合して前 50

記自己免疫応答をブロックする。

【0041】

本発明の上記方法の好ましい実施形態では、前記エピトープが組み合わせて投与され、一つ以上の自己抗体を含む自己免疫応答をブロックする。

【0042】

【発明の実施の形態】

(発明の要旨)

多くのオクタペプチドを、SLEおよびSS患者の血清中に存在する自己抗体に対する直鎖状(linear)エピトープを表す、60kDaRo/SSAペプチド、La/SSB自己抗原、70kD核リボヌクレオプロテイン(nRNP)、およびSm B/B'ポリペプチドをコードする配列から生成した。

【0043】

例えば、Sm B/B'に由来する最も重要な抗原ペプチドは、

【0044】

【化12】

(29) GTFKAFDK, (45) CDEFKIKPKNAKQP, (94)

RVPLAGAA, (101) AGGPGVGRAAGRGVPAG, (125)

AGLAGPVRGVGGPSQ, (140) QVMTPOGRGTVA, (165)

PTQYPPGRGTPPPPV, (174) TPPPVGRATPPPGI, (184) PPPGIMAP,

(189) MAPPPGMRPPM, (202) PIGLPPARGTPIGMPP, (212)

PIGMPPPG, (221) RPPPPGIRGPP, および (228) RGPPPPGMRPPR

である。

別の反応性ペプチドは、

【0045】

【化13】

(30) TFKAFDKHM, (83)

EGPPPKDT, (88) KDTGIARV, および (120) IPQAPAGLAG

に由来し得る。これらは結合性研究により測定された。PPPGMRPPは特に抗原性であり、そしてB/B'配列中で3回繰り返される。他のペプチドの抗原性が測定され、そしてより短いペプチドPPPGMRPおよびPPPGMRを含む。置換研究もまた実施された。その他の共通の天然に存在する19のアミノ酸のすべてが、特定位置のアミノ酸を置き換える。例えば、PPPGMRPPの6位のアルギニンは、F、G、H、I、K、S、T、V、W、およびYで置換され得る。

【0046】

これらのペプチドは、これらの自己抗体の存在により特徴付けられる患者に対する固相アッセイにおいて有用であり、そしてSLEに伴う特定の条件の進行の可能性に関して患者を分類するのに使用され得る。ペプチドはまた、固定化ペプチドを用いるこれらの患者の治療において自己抗体を取り除き、自己抗体と自己抗体に反応性の患者の分子との結合をブロックし、またはワクチン成分として潜在的に有用である。

【0047】

(発明の詳細な説明)

SLEおよび他の自己免疫疾患に特徴的なヒト自己抗体と結合する、多くのペプチド(好ましくは8個のアミノ酸からなる)が開示される。これらのペプチドは、公知の自己抗原

である R o / S S A、L a / S S B、n R N P、および S m B / B ' の公表されたアミノ酸配列に基づいて合成的に得られる。これらは種々の用途を有し、例えば、診断用アッセイ（潜在可能的に治療法として）、そしてこれらの自己免疫疾患の潜在的な原因の研究における成分としての用途を有する。

【0048】

（直鎖状エピトープの定義および合成方法）

本明細書中で用いるペプチドは、100個未満のアミノ酸からなるペプチドとして定義され、一般にはオクタペプチドである。40個のアミノ酸までのペプチド、さらに好ましくは4個と25個との間のアミノ酸のペプチドが、当業者に公知の任意の方法を用いて合成され得る。好ましい方法は、実施例で詳細に記載される。本明細書の実施例に記載のオクタペプチドは、自己抗原をコードする公表された配列から誘導される。括弧内の数字は、結合する最初のオクタペプチドの最初のアミノ酸残基配列中の位置である。配列のアンダーラインを引いた部分は、最大の結合性を有するオクタペプチドである。

10

【0049】

特定の配列を参照して記載されるが、天然または合成のアミノ酸を用いる多くの置換がペプチド中で行われ得、開示された配列と機能的に等価である、直鎖状エピトープとして作用するペプチドを生成する。このことは、実施例3および4で示される。従って、特定の配列で定義されるように、直鎖状エピトープという用語は、本明細書中では、等価の様式または等価な程度で抗体と結合するペプチドを生成する置換を有するペプチドを包含して用いられる。

20

【0050】

例えば、S m B / B ' のペプチド抗原決定基に対するモノクローナル抗体を用いた置換研究によって、A、G、およびSが、1つの抗体K S m 3の結合において、P P P G M R P P中のRを置換し得ることが示された。同様に、F、H、T、V、およびYは、K S m 3の結合においてP P P G I R G P中のIを置換し得る。

【0051】

モノクローナル抗体は有益である大きな可能性を有するが、患者から得られたポリクローナル自己免疫血清は、さらに複雑な結合現象に至ることを実現するために重要である。

【0052】

（自己抗体への結合によるペプチドのスクリーニング）

自己抗体のペプチドへの固相結合は、連続した直鎖状エピトープを試験することおよびエピトープ構造の重要な残基を規定するのに有用であることが示されたが、直鎖状だが連続でない2つまたはそれ以上のエピトープが三次構造によりもたらされる構造のエピトープまたは領域を規定することにおいてはより有用でないと考えられる。さらに、多くのペプチドは、溶液中において、天然タンパク質構造中には見い出されない構造をとる傾向にあるが、真のエピトープは、この方法によってなお脱直鎖状化され得る。天然分子に見い出される構造と類似の構造を有する傾向にあるこれらのペプチドは、天然タンパク質上の類似配列を結合する自己抗体のより大きい割合と結合し得、そしてより大きな親和性でさえ結合し得る。

30

【0053】

以下の実施例は、ペプチドが、結合のためにどのように合成およびスクリーニングされ得るのかを詳細に記載している。

40

【0054】

（患者の治療および分類におけるペプチドの使用）

抗原ペプチドのサブセットは、特有の臨床徴候で危険な状態にある患者、または特有の予後徴候グループにある患者を識別する可能性を有する。本明細書中で開示するペプチドは、アッセイ（例えば、固相アッセイ）において組み合わせる用いられることにより患者を分類し得る。

【0055】

特に、特定の疾患（例えば、腎疾患または中枢神経系に関する疾患）で特徴付けられた患

50

者の自己抗体と結合するペプチドが、アッセイ（例えば、この特定のペプチド集団を結合する自己抗体集団を検出するための試験としてのELISA）において選択および組み合わせられる。単一の自己抗原または単一のペプチドを用いた場合と比較して、ペプチドの混合物を用いると、このようなアッセイの有効性および信頼性が増大し得る。

【0056】

ペプチドは、標準的な技術を用いて（例えば、市販の臭化シアンを用いて）、溶液中で用いられ得るか、または固体基質（例えば、アフィニティークロマトグラフィに適切なゲル、またはマルチウェルプレート（multiwell plate））に固定化され得る。

【0057】

ペプチドは、薬学的に受容可能なキャリアと組み合わせて治療に用いられ得る。ペプチドは、免疫応答を誘因することにより、自己抗体をブロックするのに効果的な用量で投与され得るか、または自己抗体をブロックするためのワクチンとして投与され得る。ペプチドは、抗体と結合することにより、免疫細胞を刺激または活性化しない機能的アンタゴニストとして作用し、そしてそれによって自己抗原に対する免疫応答をブロックする。

【0058】

薬学的キャリアは、当業者に公知であり、経口投与用化合物のカプセル化を包含し、例えば、腸溶コーティング、またはバインダー（例えば、ステアレートまたはラクトース）と組み合わせて、あるいは溶液で用いられる。受容可能な溶液としては、滅菌水、生理食塩水、および生理的pHの緩衝溶液が挙げられる。ワクチンとして用いられるペプチドは、経口、筋肉内、または皮下投与され得る。他の化合物は、当業者に用いられる標準的手法に従って投与される。本明細書中で定義するように、薬学的キャリアは、通常それ自身は不活性であるが、生物学的活性を有し得る。例えば、ワクチンは、アジュバントと組み合わせた免疫原性ペプチドまたはタンパク質から構成され得る。

【0059】

あるいは、治療に用いられるペプチドは、同定された抗原配列に相同なペプチドを包含し得る。これらのペプチド（キャリアと結合しているか、または結合していない）が、特定の特異性を有する循環性抗体の量を減少するために患者に送達され得る。さらに、外来抗原と自己抗原との間で交差反応するエピトープの知見により、耐性の再誘導を考慮し得る。免疫応答の実験的モデルにおいて、抗原を用いた処置により応答が抑制され得、そして耐性が誘導され得ることは周知である。交差反応性配列を用いたペプチド治療は、自己免疫疾患の可能な治療であり得る。

【0060】

アミノ酸配列はまた、当業者に公知の方法を用いて、循環性抗体を中和するための薬剤を合成するために用いられ得るか、または自己抗体を特異的に除去するための体外デバイスで基質上に固定化され得る。

【0061】

本発明は、以下の非限定的な実施例を参照してさらに理解され得る。

【0062】

【実施例】

（実施例1：La/SSB自己抗原の直鎖状エピトープの同定）

（患者および方法）

（ペプチド合成） cDNAクローンのヌクレオチド配列から推定されたLa/SSBアミノ酸配列が、Chambersら、J. Biol. Chem. 263: 18043 (1988)およびSturgesら、J. Immunol. 140: 3212 (1988)により報告されており、これらの教示は本明細書中に援用されている。推定上の完全な408アミノ酸La/SSBペプチド配列を用いて、連続したオクタペプチドを同時に構築した。それぞれの配列は、ポリスチレンのピン上で、隣の配列と7アミノ酸が重なっていた。La/SSBタンパク質の完全アミノ酸配列を、8×12型の96個のピンの5つのブロック上で合成した。それぞれのピンのブロック上で、3つの同一の陽性コントロールのオクタペプチドを、配列EYRKKMDIとして合成した。これは、

10

20

30

40

50

ヒト60kD Ro / S S Aタンパク質のカルボキシル末端配列由来の主要なエピトープを表す。それぞれのアッセイを行っている間中、これらのコントロールピンの上で抗Ro / S S A関連血清の希釈物をインキュベートし、プレート間およびアッセイ間での比較を可能にした。

【0063】

(固相抗ペプチドアッセイ) ピンのブロックをマイクロタイタープレートウェル中に浸すことにより、全ての工程を行った。ピンを、ブロッキング緩衝液(リン酸緩衝化生理食塩水(PBS)、pH7.2中の1%ウシ血清アルブミン(BSA))中で室温で1時間インキュベートし、次いで、湿らせたコンテナ中で、希釈剤(PBS中の1%BSAおよび0.05% Tween)で1:100に希釈した血清中で40分で終夜インキュベートした。ピンのブロックを、洗浄用緩衝液(PBS中の0.05% Tween)で10分間攪拌しながら4回洗浄し、次いで、希釈剤で1:1000に希釈したアルカリホスファターゼ(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)結合したアフィニティー精製ヤギ抗ヒト鎖特異的抗体に、室温で1時間浸した。上記のように洗浄した後、ピンをパラニトロフェニルリン酸溶液で37分で2時間インキュベートした。色の展開をDynatech MR5000 ELISAプレート読みとり機上で410nmで読みとった。

10

【0064】

(ピンの再生) 基質展開後、ピンのブロックを、用時調製の1%ドデシル硫酸ナトリウム、および0.1% 2-メルカプトエタノールを含む水浴で1時間、50~60音波に当てながらインキュベートした。次いで、ピンを蒸留水で2回洗浄し、50~60分で予備加熱し、そして最後に沸騰メタノール中に2分間浸し、風乾した。

20

【0065】

(結果の表現) それぞれのブロック上に存在するRo / S S Aペプチド陽性コントロールピンを基準とすることにより、アッセイ内およびアッセイ間の変動を標準化した。このピンは、3:1000に希釈した抗Ro / S S Aリファレンス血清と共に A_{410} で0.175の一定値になるまでインキュベートさせた。従って、全ての吸光度のデータを、変換因子 $A_{obs} / 0.175$ を掛け算することにより標準化した。ここで、 A_{obs} は、あらゆるアッセイについて3:1000抗Ro / S S Aリファレンス血清でインキュベートしたRo / S S Aコントロールピンにより示された観測 A_{410} である。それぞれのオクタペプチドの吸光度を、VAX8250 / VMSコンピュータの拡大シートプログラム(AOK.abc Version 2.4)を用いてプロットした。

30

【0066】

(試料) 5人の正常で健康な提供者、および主要なSSおよび/またはSLEを有する10人の患者由来の血清を、La / S S Bオクタペプチドに結合する抗体に対するピンELISAによりスクリーニングした。これらの10人の患者のうち8人は、抗Ro / S S Aおよび抗La / S S B沈降素の両方を形成する自己抗体を有しており、これらの8人のうち7人は、先天性心臓ブロック(CCHB)児を産んでいた。2人の患者は、Ro / S S Aだけに対する抗体を有した。抗La / S S B抗体を、Horsfallら、J. Immunol. Meth. 104:43 (1987)により記載されているLa / S S B架橋免疫吸収剤上で、2人の患者の血清からアフィニティー精製した。

40

【0067】

(直鎖状配列エピトープの評価) バックグラウンド結合を、La / S S B配列全体に対する、5つの正常血清の全平均反応性(A_{410})により定義した($O.D. = 0.333 \pm 0.128$ 標準偏差)。バックグラウンド結合より3.5の標準偏差(正規分布の0.9998に等しい)以上高い反応性であり、そして少なくとも3人の患者の血清が結合した領域は、La / S S Bエピトープの可能性を示した。エピトープを、最も反応性が多いエピトープから最も少ないエピトープの順に番号付けした。操作上、血清間の保存の程度の基準として通常平均より3.5の標準偏差以上高い結合する患者の数により、これを最初に定義した。二次的な尺度として、推定上のエピトープの領域における患者間のピー

50

ク反応性の平均マグニチュードを用いて、等しい患者血清結合数を有するエピトープを分類した。ある場合では、エピトープは単一オクタペプチドであり得、そしてそれ以外の場合は、数個のオクタペプチドにわたる広い領域での反応性が観察された。これら後者のいくつかの場合、1つより多くの推定上のエピトープが同定された。

【0068】

(結果)

(La/SSBオクタペプチドに対する抗La/SSB抗体の結合) 8人の抗La/SSB陽性患者の血清の全てが、アミノ末端からカルボキシル末端までの領域の配列全体に及ぶLa/SSBオクタペプチドと選択的に強く結合した。正常な血清も結合するが、非常に低いレベルである。他の高力価の自己抗体を有するが抗La/SSB抗体を欠損する血清もまた、La/SSB配列に対して低い反応性を示し、これはバックグラウンド応答と一致した。これらの研究で用いたヤギ抗ヒトガンマ鎖特異的抗体結合体は、ヒト血清の非存在下ではオクタペプチドと有意に結合しない。

10

【0069】

(患者由来の抗La/SSB血清により定義されるエピトープ) 陽性の反応性を、La/SSB完全配列由来の重複オクタペプチドに対する5つの正常血清の平均反応性より3.5標準偏差以上高い反応性と定義した。1つまたは2つの自己免疫血清と反応する領域もまたエピトープを構成し得るが、3つ以上の抗La/SSB血清により認識されたそれらの領域を本研究ではエピトープの可能性有りとして定義した。

【0070】

試験した8つの血清全てが結合したエピトープはなかった；しかし、この方法で定義した18個のエピトープのうち13個は、少なくとも4つの血清が結合した。さらに、それぞれのエピトープ内でのピーク反応性は、患者の血清間で変化する傾向があり、それぞれの応答をもたらす。従って、3人の患者がエピトープ18のオクタペプチドと結合したが、それらの最も強い結合が、同じオクタペプチドとの結合で生じないことが見いだされた。陽性血清はこの基準によりLa/SSB配列と結合したが、コントロール血清もまたこの基準によりLa/SSB配列と最小に結合した。しかし、もっと重要なことには、検出可能な抗La/SSB抗体を有さない2つの他の自己免疫血清は、正常血清の平均より3.5標準偏差上のマグニチュードでLa/SSB配列由来のどのオクタペプチドとも結合しない。

20

30

【0071】

エピトープは、表Iに示したように、第一に血清反応数を考慮して、そして第二に応答の相対マグニチュードを考慮して、一番大きい方から小さい方へ順番に番号を付けた。これらのエピトープの内いくつかは、K y t e a n d D o o l i t t l eプロット、J. Mol. Biol. 157:105 (1982)により推定された高い抗原指数または親水性の領域と一致する。

【0072】

(表1. La/SSB自己エピトープ)

【0073】

【表1】

40

番号	位置	配列	
1	136-153	<u>QVLNIOMRRTLHKAFKGS</u>	
2	17-37	<u>ICHQIEYYFGDFNLPRDKFLK</u>	
3	46-57	<u>WVPLEIMIKFNR</u>	
4	86-97	<u>KKTKIRRSPSKPL</u>	
5	56-67	<u>NRLNRLITDFNVIVE</u>	
6	257-269	<u>GEIKWIDFVRGAK</u>	10
7	325-344	<u>SLNKWKSKGRRFKGKKGKGNK</u>	
8	292-303	<u>GNLQLRNKEVTW</u>	
9	154-162	<u>IFVVFDSIE</u>	
10	176-190	<u>KETDLLILFKDDYFA</u>	
11	104-120	<u>YKNDVKNRSVYIKGEPT</u>	
12	63-71	<u>TDFNVIVEA</u>	
13	270-280	<u>EGILFKEKAK</u>	
14	354-367	<u>KVQFQGKKTKFASD</u>	
15	246-253	<u>REDLHILF</u>	
16	232-239	<u>CLLKFSGD</u>	20
17	379-386	<u>TGPVKRAR</u>	
18	200-209	<u>KVEAKLRAKO</u>	

位置は、N末端から番号付けしたLa/SSB配列中のアミノ酸を指す。エピトープは、少なくとも3つの抗La/SSB患者血清中のバックグラウンドより少なくとも3.5標準偏差上の反応性を有すると定義する。エピトープを結合の程度順に一番大きい方から小さい方へ番号付けする。各推定エピトープの最も強く結合するオクタペプチドに下線を引いている。特定のエピトープ内の2つのオクタペプチドが非常によく似た結合を有する場合、両方の位置に下線を引いている。

30

【0074】

(アフィニティー精製抗La/SSB抗体の結合)

2人の患者由来の抗La/SSB抗体を、La/SSB架橋免疫吸着剤上でアフィニティー精製した。患者E11由来のアフィニティー富化抗La/SSB調製物は、調製物由来の血清と比較して抗La/SSB結合活性が特異的に増加する。アフィニティー富化調製物は、エピトープ17(オクタペプチド379)以外の予め同定した18個のエピトープの内17個と結合する；しかし、この調製物はエピトープ17と隣り合ったオクタペプチド、特にオクタペプチド380および382と結合する。結合が最も富化されたそれらの推定上のエピトープは、エピトープ2、3、6、9、10、12、13、および15を包含する。これらの同じエピトープは、それぞれの推定上のエピトープに対する反応性のピークまたは平均を比較しても、富化されているようである。本質的に同じ結果が、第二の患者由来の抗La/SSBのアフィニティー富化調製物から得られた。このように抗La/SSB特異的活性が増加した結合の増強が示されたことは、少なくともこれらのペプチド配列が、抗La/SSB自己免疫応答の直鎖状エピトープを表すという強力な証拠である。

40

【0075】

(La/SSBピンELISAの再現性)

Ro/SSAオクタペプチド(EYRKKMDI)陽性コントロールピンに結合する抗Ro/SSAリファレンス血清の再現性が、研究を通じて得られ、1:100および3:100抗Ro/SSAリファレンス血清でインキュベートしたピンに対しそれぞれ14.0

50

%および16.3%のアッセイ間の平均標準偏差を得た。抗La/SSB抗体を伴う血清および伴わない血清もまた、ピンELISAで繰り返した場合、等しく一致した結果を示した。

【0076】

(強心性関連タンパク質との共通配列) 連続したアミノ酸配列の同一性は、ヒト心臓の - ミオシンのH鎖とLa/SSB配列の3つの直鎖状領域との間で同じであり、それらの内2つはLa/SSBエピトープと一致する。エピトープ13(La/SSBアミノ酸277から280)内の4つのアミノ酸配列は、心臓の - ミオシン(配列残基453から456)と同じであり、一方エピトープ18(204から208)および心臓の - ミオシン(619から623)ではペントペプチドが同じである。5つの相同配列の内3つは、La/SSBエピトープ内を襲う、リウマチ性心疾患に關与する細菌のStreptococcus pyogenesのM6タンパク質と同じである。特に、2つのペントペプチドの一致が、La/SSBエピトープ5(59から63)および18(203から207)で生じ、一方テトラペプチドの一致が、エピトープ13(276から279)内で生じる。厳密に言えば、エピトープ13および18はまた、ラミニンのB1鎖、心臓の筋細胞膜を含む全ての基底膜に見いだされた粘着性の糖タンパク質とアミノ酸配列が同じである。エピトープ13内の領域は、ラミニンB1(1202から1205、および1367から1370)に一致する2つの重なり合ったテトラペプチドを含有し、これらはLa/SSBアミノ酸残基277から280、および275から278にそれぞれ一致する; 一方La/SSBエピトープ18(202から207)は、ラミニンB1(1467から1472)と、連続した6アミノ酸が同じである。これらのエピトープに結合する抗体が、CCHBの子どもがいる患者由来の7つの血清それぞれにおいて見いだされた。

【0077】

(実施例2: 60kD Ro/SSAタンパク質の直鎖状エピトープの同定) 60kDタンパク質への直鎖状エピトープを表すペプチドを、先の出願でもともと存在していた多くを含めて、表2に示す。これらのデータは、7つの正常血清、4つの抗Ro/SSA沈降素陽性血清、および同じ4つの抗Ro/SSA沈降素陽性患者血清由来の抗Ro/SSAアフィニティー精製自己抗体からの結果の平均を表す。データにそれぞれの場合の定数をかけ算し、これらの結果において結合のマグニチュードを一定IgG濃度の100μg IgG/mlで比較し得た。

【0078】

本研究は、抗Ro/SSAペプチド結合活性が、同時に天然の分子に対する抗Ro/SSA活性を伴って富化されることを証明する。抗原ペプチドおよびRo/SSA抗原の両方に対する特異的結合活性が、アフィニティー富化手順により約3倍増加した。これは、ペプチド結合が抗Ro/SSA応答全体の一部であることを示す。

【0079】

表2の最初と2番目の縦欄は、 A_{410} が0.3の閾より上で結合する配列を識別する。ペプチドは $A_{410} = 0.3$ より大きい平均で正常血清により結合されないの、この閾を選んだ。表2の最初の縦欄は、4つの抗Ro/SSA沈降素血清の平均に由来し、そして2番目の縦欄は、アフィニティー富化抗Ro/SSAに由来する。3番目の縦欄中にあるのは、抗原オクタペプチドを構成する抗原配列である。上付きの星印「*」で、少なくとも0.3の A_{410} で全ての隣接したコレクションのどれとも最も強く結合するオクタペプチドのオクタペプチド番号を識別する。この部分の配列にはまた下線を引く。2つのオクタペプチドが、互いに1%以内の A_{410} を有する場合、次いで、2つのオクタペプチドを星印で識別し、そして両方のオクタペプチドに提供されているオクタペプチドに下線を引く。

【0080】

(表2. 0.3の A_{410} より大きい60Kd Ro/SSAペプチドの配列から構築したオクタペプチドに対する4つの抗Ro/SSA血清およびアフィニティー富化抗Ro/SSA調製物の結合平均)

10

20

30

40

50

【 0 0 8 1 】

【 表 2 A 】

抗 Ro/SSA 血清 (オクサハ'フ'チト' 番号)	77イニティ- 精製 抗 Ro/SSA (オクサハ'フ'チト' 番号)	配列	
	30*	<u>MNRLHRFL</u>	
	37-38*	<u>LCFGSEGGT</u>	
45*	45*-48	<u>SEGGTYIKEQ</u>	10
47-48*			
	76-78*-79	<u>EIKSFSOEGRT</u>	
81-82	81-82*	<u>SOEGRTTKQ</u>	
	84*-85	<u>GRTTKOEPM</u>	
106-108*	105-108*-109	<u>ISTKOA AFKAVS</u>	
	111*-112	<u>AFKAVSEVC</u>	
126-130*-133	126-130*-133	<u>FTFIQFKKDLKESMK</u>	
139*-140	138-139*-140*	<u>SMKCGMWGRA</u>	
143-145*-146	142-145*-146	<u>GMWGRALRKAIA</u>	
165-169*-170	165-173*-180	<u>ALAVTKYKORNGWSHKDLLRLSH</u>	20
172-173*			
183-184*	182-184*-185	<u>LLRLSHLKPSS</u>	
	210*	<u>HELYKEKA</u>	
212*	212*-213	<u>LYKEKALSV</u>	
222*	215-222*	<u>KALSVETEKLLKYL</u>	
	224*	<u>KLLKYLEA</u>	
231-234*	229-234*	<u>LEAVEKVKRTKDE</u>	
257*-261	257*-263*-271	<u>HLLTNHLKSKEVWKALLQEMPL</u>	

【 0 0 8 2 】

【 表 2 B 】

30

表 2 続き

抗 Ro/SSA 血清 (オクタペプチド 番号)	77インテグ 精製 抗 Ro/SSA (オクタペプチド 番号)	配列	
263-264*-265*-266 280*-283	280*-283 285*	<u>ALLRNLGKMTA</u> <u>LGKMTANS</u>	10
308-313*-315*-316 330-331*-339	308-313*-315*-317 330-331*-340 352*	<u>LCNEKLLKKARIHPFHI</u> <u>TYKTGHGLRGKLGKLRPDE</u> <u>ALDAAFYK</u>	
355*-357 362*-365*-366	355*-367 379*-381 398* 414* 420* 433* 445*	<u>AAFYKTEKTVEPTGKRFLA</u> <u>ASMNORVLGS</u> <u>AMCMVVTR</u> <u>AFSDEMVP</u> <u>VPCPVTTD</u> <u>VLMAMSOI</u> <u>TDCSLPMI</u>	20
449*-450	447-449*-454	<u>CSLPMIWAOKTNTPA</u>	
453*	472*-474	<u>TFAGGVHPAI</u>	
482-484*-489	481-484*-489	<u>IALREYRKKMDIPAKL</u>	
<hr/>			
197-201*-203	197-198*-205	<u>NTKYITKGWKEVHEL</u>	

30

(実施例 3 : 70 kD 核リボヌクレオプロテインの直鎖状エピトープの同定)
 70 kD の核リボヌクレオプロテイン (nRNP) の配列が、Nucleic Acid
 S Res. 24 : 10373 - 10391 (1987) の中で、R. A. Sp
 ritz らにより報告されており、この教示は本明細書中に援用されている。データ分析
 を、Ro/SSA および La/SSB 抗原に対して行ったのと同様に行った。それぞれの
 同定配列は、固相アッセイにおける任意の基準を越えるオクタペプチドに対する抗体の結
 合を表す。同定した抗原領域は、正常血清の平均より 2 標準偏差よりも高く、そして半分
 より多い患者が結合する。70 kD ペプチドへの結合では、アッセイにおける閾は、A₄
 10 が 0.380 である。かっこの中の番号は、閾を越える最初のオクタペプチド中の最
 初のアミノ酸の配列位置である。それぞれの同定配列は、1 つ以上のオクタペプチドで構
 成される。それぞれの配列におけるオクタペプチドの番号は、配列の長さ引く 8 である。
 配列の下線部分は、患者の血清によりほとんどが結合されるオクタペプチドである。いく
 つかの場合では、他のオクタペプチドが本質的に等価であるが、下線は引いていない。

40

【0083】

70 kD の nRNP の抗原配列は :

【0084】

【化14】

(11)

ALFAPRDP, (65) ERMERKRREK, (133) HMVYSKRSGPRGY, (161)
YVKHADGKKIDGRRVL, (178) VERGRTVK, (186) VKGWRPRR, (264)
RRSRSDK, (274) RRSRERS, (277) SRERSKDK, (282)
KDKDRDRKRRSSRSR, および (355) RRSHRSER。

n R N P の A ペプチドは、以下の抗原オクタペプチドを有する：

【0085】

【化15】

916) NLNEKIKKD, (21) IKKDELKKSL, (44*) LVSRLKMRGOAF, (73)
QGFPEYDKPMRI, (93) ILAKMKGTE, (103*) ERDRKREKRKPKS, (116)
OETPATKKA, (263) ALOGFKIT, および (274) AMKISFAKK。

平均より2標準偏差上であると定義された閾は、標準化 A_{410} が 0.400 であり、(*) により識別したオクタペプチド配列が、試験した血清のサブセットにより結合される。この結果に基づく配列は、Sillekensら、EMBOJ. 6: 3841-3848 (1987) 中に見いだされ、その教示は本明細書中に援用されている。

【0086】

n R N P の C ペプチドは、以下の抗原オクタペプチドを有する：

【0087】

【化16】

(19) SVRKTHCSGRKHKENVKD, (35) KDYQKWM, (56)
AFOOGKIPP, (61) KIPPTPFS, (78) PPPSLPG, (82) SLPGPPRP, (85)
GPPRPGMMPA, (108) PPPPGMMP, (117) GPAPGMRPP, (136)
PPMMRPPA, および (152) PGMTRPDR。

これらのオクタペプチドの結合に対する閾は、 A_{410} が 0.440 である。この結果に基づく配列は、Sillekensら、Nucleic Acids Res. 25: 8307-8321 (1988) にあり、その教示は本明細書中に援用されている。

【0088】

(実施例3: Sm B / B' ポリペプチドの直鎖状エピトープマッピング)

Sm B / B' ペプチドに結合する自己抗体は、一般的に Sm B / B' の重なり合ったオクタペプチドに結合する SLEIGG 抗体に関連している。ここで、Sm B / B' は、抗 Sm および抗 n R N P 沈降素を有する 10 人の患者で、他の自己免疫血清学を伴う 5 人の患者で、そして 4 つの正常ヒト血清で評価した。正常コントロールおよび抗 Sm 沈降素を有さない患者のどちらも Sm B / B' オクタペプチドのいずれとも全く結合しない。抗 Sm 沈降素を含有する試験した全ての血清は、Sm B / B' 配列の 8 つの領域由来のオクタペプチドと強く結合する。これらの 8 つの領域の内 3 つは、同じオクタペプチド配列 (P P P G M R P P) を共有し、この配列は一貫して Sm B / B' 由来の最も免疫反応性なオクタペプチドである。欠失および置換ペプチドへの結合に加え、類似の P P P G I R G P と結合するため、モチーフ P P P G (I , M) (R , K) がこの結合を最も良く定義するようであることが示唆される。n R N P C ペプチド中の P A P G M R P P は、P P P G M R P P と同程度に抗原性であり、そして Sm 自己抗体と n R N P 自己抗体との間で示される交差反応に対する部分的な説明を提供し得る。しかし、n R N P A 由来の配列 P P P G M I P P は、抗原性ではない。これらのデータは、Sm B / B' タンパク質

10

20

30

40

50

の直鎖状配列自己抗原性を定義する。それらはまた、有力な自己免疫エピトープは、抗原性が破壊されるより前に多様性の制限を可能にするプロリンに富む配列であることを証明する。

【0089】

Sm B / B' の2つの配列が報告されている。Rokeachら、J. Biol. Chem. 264: 5024 (1989)は、リンパ芽球細胞(Raji)ライブラリーから配列を得た。それは、Sharpeら、FEB Lett. 250: 585 (1989)により報告されたHeLa細胞由来のクローンの一部分と同一であり、そしてSchmaussら、Nucleic Acids Res. 17: 1733 (1989)により報告されたヒト小脳ライブラリー由来のSm Nと同一である。Sm BおよびSm B'は、非常によく似たアミノ酸配列を有する(van Damら、EMBO J. 8: 3853 (1989))。確かに、Sm BおよびSm B'は、同じmRNA前駆体から互いにスプライシングした生成物である。

10

【0090】

本研究において、Sm B / B' 両配列のコード化領域である重複オクタペプチドを、固相ペプチド合成により合成した。それぞれのオクタペプチドの抗原性を、SLE患者由来の種々の血清および正常コントロールを用いて決定した。

【0091】

(材料および方法)

(血清) SLEに対する米国リウマチ協会(American Rheumatism Association)の分類基準を満たす患者由来、または正常な、年齢が一致し、性別が一致するコントロール由来のヒト血清を、本研究に用いた。狼瘡の患者由来の15個の血清を試験した。試験したこれらの血清のうちの10個が、SmおよびnRNPの両方と強い沈降素線を形成する抗体を含み、3個がnRNPのみと沈降素線を形成し、1個がRo/SSAおよびLa/SSBと沈降素線を形成し、そして1個がRo/SSAのみと沈降素線を形成した。これらの血清の知見の全てを、個々の血清によって免疫プロットで結合している報告された抗原に対する適切な分子量バンドによって確認した。

20

【0092】

(固相非開裂性ペプチド合成) 公表されたSm B / B' 配列を、全ての可能な重複オクタペプチドを構築するのに用いた。ペプチド合成に用いたアミノ酸は、Fmoc保護した第1級アミノ基、およびt-ブチル(または他の適切な基)保護した側鎖を有した。重複オクタペプチドは、96ウェルのマイクロリットルプレート(Cambridge Research Biochemicals, Cambridge, UK and Coselco Mimotopes Pty Ltd, Victoria, Australia)のフォーマット中で配列された放射線で誘導化したポリエチレン製のピンの丸められた末端で同時に合成した。Fmoc、t-ブチルアミノ酸溶液(30mM)の活性エステルを、30mMの最終濃度に添加され、そしてマイクロリットルプレートのウェル中に分配された10のヒドロキシベンゾトリアゾールを有するDMF中で溶解した。Raji Sm B / B' 配列の240個のアミノ酸によって決定されたように各アミノ酸を添加した。18時間のインキュベーションの後、ピンをDMF中で5分間、メタノールで各2分間4回、そしてもう一度DMFで5分間洗浄した。次いで、Fmoc保護基を、30分間、20%ピペリジン/DMF浴により新たに添加したアミノ酸から取り除いた。これらの工程を、8つのアミノ酸の全てが添加されるまで繰り返した。最終のアミノ酸を添加した後、各ペプチドのアミノ末端基を、室温で90分間、DMF:無水酢酸:トリエチルアミンの5:2:1(v/v/v)混合物中でピンをインキュベーションすることによりアセチル化した。この工程の後、ピンを再びDMFで2分間、メタノールで各2分間4回洗浄し、次いで10分間空気乾燥した。最終的に、側鎖アミノ保護基を、95:2:5:2.5(v/w/v)のトリフルオロ酢酸:フェノール:エタンジチオールによって取り除いた。洗浄工程は、塩化メチレン中で2分間、5%ジイソプロピルエチレン/塩化メチレン中で各5分間を2回、そして最終の塩化メチレンの5分間洗浄を含んだ。10分間乾燥した後、

30

40

50

ピンを蒸留水中に2分間置き、メタノール浴に移して18時間置き、そして真空下で18時間乾燥させた。この手順を繰り返して、カルボキシル末端の36個のオクタペプチドの別のセットを合成し、先のデータを実証した。さらに他のオクタペプチド(van Dam / Ohosone Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 4249 (1989) 配列に記載のアミノ酸変化を含む)もまた合成した。選択された置換および欠失配列(他のタンパク質からの類似の配列とともに)をまた構築した。SmまたはnRNP抗原配列中のいずれにも存在しないランダムな配列にあるアミノ酸から構成されるコントロールピンを調製した。さらに、陽性のコントロールピンを、公知の反応性の配列であるLa/SSBペプチドから合成した。

【0093】

(固相開裂性ペプチド合成) Coselco Mimotopes Pty Ltd. は、開裂性ペプチドの生成方法を開発した。これらのペプチドは、付加的なプロリン-リシン-アラニン配列を含む開裂性リンカーアセンブリを含むポリエチレンピン上で合成される。上記のようにペプチドを合成した後、最終的に15分の超音波処理が、0.1% HCl (1:1のメタノール/ddH₂O中)中で加えられる。ピンを、等量の0.1Mのクエン酸および0.1Mのリン酸緩衝液の溶液(pH 3.0)中で、静かに攪拌して3時間インキュベートする。これは全ての残存不純物を取り除く。次いで、これらのペプチドを、環化およびジケトピペラゾールの形成を引き起こす0.1Mのリン酸緩衝液(pH 7.0)中でインキュベートすることによりピンから開裂する。次いで、これらのペプチドをアミノ酸含量について分析した。上記のように4個のオクタペプチドを構築し、そして、適切な比で正確なアミノ酸が、試験された全てのペプチド中に存在した。

【0094】

(固相抗ペプチドアッセイ) 洗浄工程およびインキュベーションを密封したプラスチック容器中で行った。他のアッセイ工程を、マイクロリットルプレートウェル中へピンを低下することにより行った。最初に、ピンを室温で1時間、PBS中にて3%の低脂肪ミルクを用いてブロックした。次いで、ピンを加湿された密封容器中で、4に於て一晩0.05% Tweenを含む3%ミルク/PBS中で血清を1/100に希釈してインキュベートした。次いで、ピンブロックを、激しく攪拌して各10分間、0.05% Tweenを含むPBSを用いて4回洗浄した。次に、各ピンを、ヤギで産生させ、アフィニティ精製し、そしてアルカリホスファターゼ(Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA)に結合された抗ヒトガンマ鎖特異的IgGと、1/10,000希釈でインキュベートした。パラニトロフェニルホスフェートジナトリウムを、アルカリホスファターゼの基質として用い、そしてプレートをMicroelisa Reader (Dynatech, Alexandria, VA)を用いて405nmで読み取った。次いで、各プレートに対する結果を、陽性のコントロールピンと比較することにより標準化した。同一のコントロールピンを全てのプレートについて用い、そして既知の濃度の標準コントロール血清を用いて、特定のODにまで展開させた。

【0095】

アッセイの完了後、ピンを超音波処理緩衝液(40gのSDS、4mlのβ-メルカプトエタノール、および62.4gのリン酸ナトリウムを4リットルにする)中で2時間、超音波処理して、抗体、結合体、および基質を取り除いた。超音波処理の後、ピンを熱水中で2回洗浄し、そしてメタノール中で2分間煮沸した。次いで、ピンを最短10分間空気乾燥させ、そして乾燥剤と共に保存するか、あるいは別のアッセイに用いた。

【0096】

(Sm/B/B'のエピトープマッピング) ペプチドを、最初、抗ヒトIgG結合体単独との反応性についてスクリーニングした。抗ヒトIgG結合体とではバックグラウンドは示されなかった。4つの正常なヒト血清もまた、特異的な抗原領域が示されることなく、最小のバックグラウンド反応性を示した。抗Sm、抗nRNP以外の自己免疫血清病(serology)のSLE患者もまた、任意のオクタペプチドと確信的な特異的反応性

10

20

30

40

50

を示さなかった。試験した他のリユーマチ血清病では、R o / S S A、ならびにR o / S S AおよびL a / S S B A gの両方と沈降素を形成した血清を含んでいた。しかし、S mおよびn R N Pを沈殿したいずれの患者も、S m B / B ' タンパク質の種々の領域とかなりの反応性を示した。10個のS m、n R N P血清が試験され、そして全てが類似の結合パターンを有していた。かなりの反応性が、タンパク質のプロリンリッチのカルボキシル末端領域で示された。繰り返しモチーフ (m o t i f) であるP P P G M R P Pが、S m B / B ' ポリペプチドの3つの領域で見い出され、そしてそれぞれが同様に抗原性である。さらに、密接に関連する第4の領域、P P P G I R G Pに、試験した全てのS m、n R N P血清が結合する。

【0097】

いくつかの他の抗原性領域がまた、ポリペプチドの最初の部分、および中間部分で検出された。これらの領域は、試験した全ての血清中でそれほど反応性が強くなかった；しかし、それらはB / B ' A gに対する自己免疫応答を有する個体間の微細な特異性の差を規定することにより重要であり得る。

【0098】

どのアミノ酸が反応性に必須であるかを解明するために、各表明されたエピトープの周囲の平均結合を、各々の相応したオクタペプチドの配列と共に図1に表す。アミノ酸29で始まるオクタペプチド (G T F K A F D K) は、反応性において8つの残基の全てを必要とする。しかし、オクタペプチド45の領域内の反応性領域の抗原性は、挿入された (i n t e r c a l a t e d) アミノ酸スペーサーを有する2つのリシンを必要とすることに基づくようである。挿入スペーサーを有する2つのリシンが除去される際に、結合は、オクタペプチド44および53で失われる。

【0099】

オクタペプチド140~145からの配列は全て、適度に高められた平均結合を有した。各々は、結合に重要であると思われるP Q G R配列を共有する。他方、オクタペプチド169の周りの反応性部位は、特異的配列により容易に説明されない。オクタペプチド191、216、223、および231で見い出された繰り返しP P P G M R P P、および類似のP P P G I R G Pは、ヘキサマーP P P G X Rを共有し、ここで、Xは最も大きい結合を有する全てのオクタペプチド中の未決定のアミノ酸を示す。この繰り返しモチーフは、S m B / B ' の直鎖状エピトープへの抗S mの結合において重要であるように思われる。

【0100】

(P P P G M R P P を用いる欠失実験) P P P G M R P 配列の欠失実験は、図2aに示すように、試験された6人の患者血清で8個のアミノ酸の全てが抗原性に必要ではないことを示した。カルボキシル末端アミノ酸を欠失し、ヘプタマーP P P G M R P、ヘキサマーP P P G M R、ペントマーP P P G M、ならびにP P P G、P P G M、P G M R、G M R P、およびP P P Pを含む種々のテトラマーを残したペプチドを合成した。結合には、顕著な反応性が失われる前に、少なくともヘキサマーP P P G M Rを必要とするように思われる。第6位のアルギニンが除かれたとき、P P P G M R P Pモチーフに対する反応性の60%以上が破壊される。カルボキシル末端のプロリンの除去は、試験した6人の患者中の結合を顕著に改変するようには見えない。さらに、単独で試験したポリプロリン配列 (P P P P P、P P P P、P P P、P P) は、これらの血清との反応性を示さなかった。抗S mおよび抗n R N Pを含む10個の血清のうち6個が、これらの欠失したペプチドで試験され、そして類似の結果を得た。正常な血清は、任意のこれらのペプチドを結合しなかった。

【0101】

(P P P G M R P P 抗原性配列の置換実験) アルギニン (R) と他の19の天然に存在するアミノ酸との置換は、図2bに示すように、試験された6個の血清との反応性の変化するレベルを示した。他の正に荷電したアミノ酸リシン (K) によるアルギニンの置換は、元の反応性の75%以上を保持する。9個の

10

20

30

40

50

アミノ酸 (F、G、H、I、S、T、V、W、および Y を含む) の別のサブセットは、元の結合の約 50% ~ 65% を保持し、これに反して、他の 9 個のアミノ酸は、25% 未満に結合を減少させる。

【0102】

(種々の類似のエピトープの合成) PPPGMRPP モチーフとかなりの相同性を示した種々のタンパク質の短い配列もまた、ポリエチレンのピン上で合成した。これらの配列およびそれらの反応性は、最初の実験からの抗 Sm および抗 nRNP で沈降素を有する 6 つの異なる患者の血清によって測定したように測定された。nRNPA (23)、nRNPC (24)、および EBV 核 Ag - 1 (25) 由来のオクタペプチドを調製した。nRNPA および 1 つの nRNPC 配列は、相対的に反応性を示さなかった ; しかし、第 2 の nRNPC 配列 (P A P G M R P P) は、元の結合の 90% 以上を示した。さらに、EBV 配列 (必要な抗原性部分 PPPGMRPP と 6 つのアミノ酸のうち 5 つの相同性を有する) はまた、Sm、nRNP 沈降素陽性の患者により顕著に結合される。

10

【0103】

本研究で決定された全ての抗原性部位が、正に荷電したアミノ酸を必要とする。これらの部位のサイズは、2 つの非連続的な塩基性アミノ酸から、完全なオクタペプチドまで変化する。PPPGMRPP モチーフは試験されたすべての Sm、nRNP 血清において主要な直鎖状抗原性エピトープであるようである ; しかし、この配列は、抗 nRNP 沈降素の不在下では抗 Sm 沈降素を含む血清によって結合されないようである。Sm 沈降素単独の患者は、Sm B / B ' の 2 つの領域を結合する。

20

【0104】

PPPGMRPP モチーフのカルボキシル末端ジプロリンは、抗原性に必要ではない。他の欠失研究はまた、これらの自己抗体の抗原性が、ポリプロリン領域に特異的に関連しないことを示した。2 個 ~ 6 個のポリプロリンを含むペプチドは、本研究で用いた血清との反応性を示さなかった。さらに、アミノ酸配列 175 ~ 186、および 85 ~ 92 の天然に存在するオクタペプチドは、3 個または 4 個の連続的なプロリンを含む : これらの領域のいずれもが抗原性ではない。また、酷似する PPPGMIPPOCTA ペプチドは、Sm および nRNP を沈降する血清に結合しない。

【0105】

置換実験は、1 つのアミノ酸の変化が配列の反応性の 90% 以上を減少し得ることを示した。他の 19 個の天然に存在するアミノ酸による PPPGMRPP 配列の 6 位のアミノ酸アルギニン (R) 置換は、これらのアミノ酸を 3 つの別の群に分けた。リシン (K) (別の塩基性アミノ酸) は、結合の 75% 以上の平均を維持する唯一の置換である。試験された各血清で、このアミノ酸置換は、普遍的に最も反応性である。しかし、反応性は 9 個のアミノ酸で 25% 未満まで失われる。このセットは、酸性アミノ酸およびそのアミン、硫黄含有アミノ酸、ならびに疎水性のロイシン、プロリン、およびアラニンを含む。他の 9 個のアミノ酸は、元の結合の 42% ~ 65% の部分を保持する。フェニルアラニンは、この群のうち、一貫して最も反応性であった。それにもかかわらず、アルギニンに置換するリシンの能力は、この位置で正に荷電したアミノ酸が、この配列の抗原性に好適であるという仮説を導く。

30

40

【0106】

(実施例 4 : Sm B / B ' のペプチド抗原決定基に対するモノクローナル抗体の結合) Sm B および B ' ペプチド (B / B ') を結合する自己抗体は、ヒト、および MRL lpr / lpr マウスにおける全身性エリテマトーデスに共通して関係する。KSm 3 および KSm 5 モノクローナル抗体を、ハイブリドーマモノクローナル抗体技術を用いて未操作の MRL lpr / lpr マウスから得た。KSm 3 および KSm 5 モノクローナル抗体を含有する上澄液を、10% の胎児ウシ血清、グルタミン、ペニシリン、およびストレプトマイシンを含有する RPMI 1640 中でクローン化マウスハイブリドーマ細胞株から集めた。これらのモノクローナル自己抗体は、両方の Ig G 2 a サブクラスである。これらの 2 つの抗 Sm B / B ' マウスモノクローナル自己抗体の直鎖的な抗原領域

50

を、重複オクタペプチドを用いてマップした。特有のエピトープを各モノクローナルにより同定する。モノクローナル抗体 K S m 5 は、S m B ポリペプチド中で3度繰り返されるペプチド (P P P G M R P P) を認識する。K S m 3 は2つの酷似した、ほぼ近傍にあるオクタペプチドである、P P P G I R G P および P G I R G P P P と最も結合する。この2つのモノクローナル抗体は交差反応しない。S m B / B ' のこれらの領域の両方は、ヒト抗 S m 自己抗体に対する抗原性の主要領域である。抗原性オクタペプチド中のアミノ酸の欠失および置換は、K S m 5 エピトープへの結合がほんのわずかな改変で失われることを示す。P P P G M R P P の第6位におけるアルギニンが置換される際に、K S m 5 結合がオクタペプチドの予期しないサブセットにおいて見い出される。分子動力学モデル化は、結合が置換アミノ酸の電荷または疎水性よりもむしろ、共有するペプチド骨格構造に関連し得ることを示唆する。対照的に、P P P G I R P P に対する K S m 3 の結合は、第6位のアルギニンが任意の他のアミノ酸で置換される際になくなる。これら2つのマウス自己抗体は、S m B / B ' の別個の直鎖状エピトープを結合し、それらはまた、ヒト抗 S m B / B ' 自己抗体によって結合される。結合したエピトープはプロリンリッチであり、そして第4位、または第6位にアルギニンを含む。従って、アルギニンでの置換、およびモデル化実験は、K S m 3 および K S m 5 に対する結合が非常に異なることを示唆する。オクタペプチド P P P G M R P P の6位でいくつかのアミノ酸側鎖により与えられる特定のペプチド骨格構造は、K S m 5 結合に含まれ得る。一方、K S m 3 結合は、アルギニン側鎖の特異性を必要とする。天然に産生する自己抗体は、類似のペプチド構造の全く異なる構造と結合し得る。P P P G I R G P の第5位または第6位のアミノ酸いずれかと他の19個の天然に存在するアミノ酸との置換は、独自のパターンの反応性を示す。第6位のアミノ酸アルギニン (R) の置換は、いずれのアミノ酸も結合の程度を許容しないことを示す。第5位のイソロイシン (I) が置換される際に、20個のアミノ酸のうち6つ (フェニルアラニン (F)、ヒスチジン (E)、トレオニン (T)、バリン (V) およびチロシン (Y)) は、元のオクタペプチドで示された結合の50%以上を許容した。これらのうち、トレオニンは、元のオクタペプチドよりも大きな反応性を有する。

【0107】

抗原性の群のいずれかのペプチドに共通の構造モチーフを決定するために、分子動力的シミュレーションを K S m 5 または K S m 3 に抗原性である選択されたペプチドについて行った。ちょうどナノ秒定角軌道 (*nanosecond trajectory*) を示す全部で2500個の構造を、各ペプチドについて蓄積し、そして骨格二面角をモニターすることにより解析した。少なくとも1つの有力な一致する構造を、安定したセットの骨格二面角によって観察されたように全てのペプチドに対して選択し得た。8つの残基の骨格原子について、K S m 3 陽性ペプチド P P P G I R G P と P G I R G P P P との差の二乗平均4.87Åは、これら2つのペプチドに共通の骨格がないことを示す。

【0108】

対照的に、P P P G M R P P 中の第6位でアルギニン (R) を置換したペプチドに対する K S m 5 の結合は、全く異なる結合の要求性を示唆する。側鎖が $-(CH_3)_3-NH-C-NHNH_2$ 、 $-CH_3$ 、 $-OH$ 、および $-H$ を有するアミノ酸全ては、K S m 5 によって結合されるその能力においておおそ等価であった。電荷または疎水性の特徴はこれらのアミノ酸によって共有されない。また、リシンおよびヒスチジン (通常、アルギニンに最も類似すると考えられているアミノ酸) は、結合を置換および保持し得なかった。1つまたはそれより多いアミノ酸によっていずれかの方向にオフセットされた天然ペプチド P P P G M R P P に共通の重要な骨格構造の可能性は、O V R L A P 18を用いて除外された。最良の一致が、オフセットなしに骨格の最初の数個の残基に対して見い出された。従って、この構造は結合においてある役割を果たし得る。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、S m B / B ' の抗原領域およびそれらの周辺オクタペプチドを、0.50より大きい吸光度を示すオクタペプチド結合性でグラフ化している。

【図2a】図2は、S m B / B ' エピトープ P P P G M R P P に関する欠失研究の結果を

グラフにしている：図 2 a は、エピトープからのアミノ酸の除去による結合の減少を示している。

【図 2 b】図 2 は、Sm B / B' エピトープ PPPGMRPP に関する欠失研究の結果をグラフにしている：図 2 b は、6 位アルギニンの置換効果を示している。

【図 1】

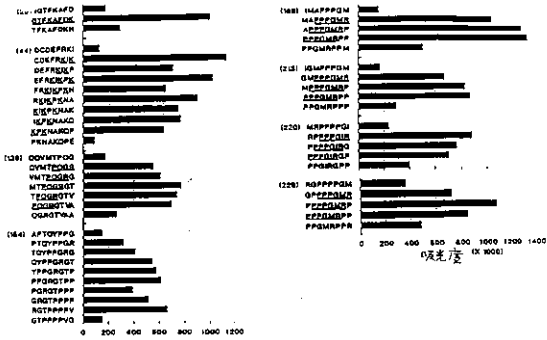


FIGURE 1

【図 2 b】

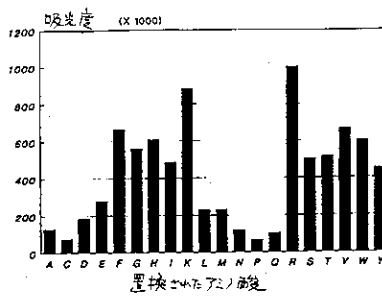


FIGURE 2b

【図 2 a】

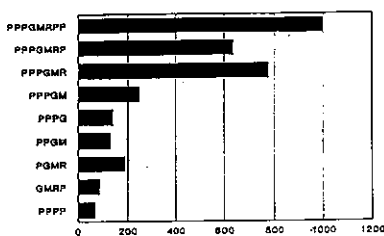


FIGURE 2a

フロントページの続き

(72)発明者 ジョン ビー． ハーレー

アメリカ合衆国 オクラホマ 73103, オクラホマ シティ, エヌ．ダブリュー． トウェ
ンティース ストリート 439

Fターム(参考) 4H045 AA10 BA13 BA14 BA15 BA16 BA17 BA18 BA19 DA86 EA50

FA20

专利名称(译)	用于自身抗体诊断的方法和试剂		
公开(公告)号	JP2004002441A	公开(公告)日	2004-01-08
申请号	JP2003165758	申请日	2003-06-10
[标]申请(专利权)人(译)	俄克拉荷马医学研究基金会		
申请(专利权)人(译)	俄克拉何马医学研究基金会		
[标]发明人	ジョンビーハーレー		
发明人	ジョン ビー. ハーレー		
IPC分类号	C07K4/00 A61K38/00 A61K39/00 A61P37/00 C07K7/06 C07K7/08 C07K14/47 C07K19/00 G01N33/53 G01N33/564		
CPC分类号	A61K38/00 A61K39/00 A61P37/00 C07K14/4713 G01N2800/24		
FI分类号	C07K4/00.ZNA C07K7/06 C07K7/08		
F-TERM分类号	4H045/AA10 4H045/BA13 4H045/BA14 4H045/BA15 4H045/BA16 4H045/BA17 4H045/BA18 4H045/BA19 4H045/DA86 4H045/EA50 4H045/FA20		
优先权	07/867819 1992-04-13 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供形成人自身抗体线性表位的肽。本发明涉及先前暴露于特定免疫原或表位（或触发Ro / SSA，La / SSB，nRNP或SmB / B'多肽或自身抗体产生的表位）的个体。用于鉴定和分类表达与之反应的自身抗体（免疫等效物）的个体的其他诊断剂。本发明进一步提供了用于鉴定和治疗自身免疫疾病，例如系统性红斑狼疮和干燥综合征的方法和组合物。 [选择图]无

【图 2 b】

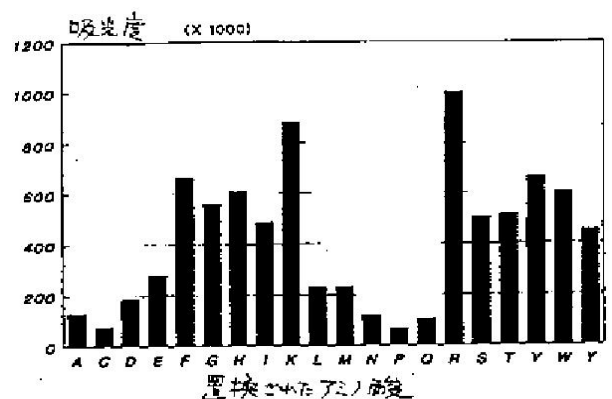


FIGURE 2b