

제 2차년도
최종보고서

면역 기능 연구
Study of Immune Function

전신성 류마티스 질환의 진단시약 개발

Development of Diagnostic Reagent in Systemic Rheumatic Disease

가톨릭 대학교

과학 기술처

제 출 문

과학 기술처 장관 귀하

본 보고서를 “전신성 류마티스 질환의 진단시약 개발에 관한 연구” 과제의
보고서로 제출합니다.

1997 년 8 월 20 일

주관 연구기관명 : 가톨릭 의과 대학교

총괄 연구책임자 : 김 호 연

연구 원 : 박 성 환

이 상 현

민 준 기

김 주 호

협동연구기관명 : (주) LG 화학

협동연구 책임자 : 김 명 진

요 약 문

I. 제목 : 전신성 류마티스 질환의 진단시약 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

전신성 류마티스 질환들은 대부분 고유의 자가항체가 발견되고 있어 각 질병의 진단에 커다란 도움이 되고 있다. 최근 분자생물학의 발달로 이 항체들의 원인 항원들이 분자생물학적으로 규명되기 시작하였고, 관련 유전자들이 밝혀지고 있다. 질병의 원인 물질에 대한 화학구조를 추정하여 그 구조 내 면역반응 장소(epitope)에 대한 특이 반응항체 검색하거나 질병을 일으키는 원인 유전자 구조를 조사하여 질병의 조기 진단, 예후 판정이나 병태생리를 밝혀려고 노력하고 있다.

본 연구는 우리나라 류마티스 질환, 특히 전신성 홍반 루푸스에서 흔히 발견되고 있는 항 Ro 항체의 질병 특이 항원성을 규명하고 이와 연관된 특이 항체 검출법을 개발하고자 한다. 그리고 류마티스 관절염 환자의 질병 관련 유전자의 특성을 규명하고 질병의 예후 판정에 관여하는 인자를 조기에 밝혀내는 검색 방법을 개발하고자 한다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

본 연구의 개발 내용과 범위는 새로운 항원 특이 항체를 검색하는 방법과 질병 예후 인자 검색법 개발로 나누어 요약한다.

특이항체 검색 방법 개발을 위해 우선 SLE 환자의 혈청에서 항 Ro 항체의 존재 빈도와 그 임상적 의의 조사한다. 그리고 이 항체가 HLA 와의 연관성을 알아 본다. 항 Ro항체 양성 형체를 Western blotting 법으로 52kd 및 60kd로 항체를 분획하여 각 분자량에 따른 임상적 의의 및 진단적 가치를 알아 본다. 지금까지 알려진 방법보다 간편하고 정확한 epitope(peptide) mapping 법 개발하여 각 epitope에 특이적으로 반응하는 항체의 빈도를 조사한다.

질병의 예후인자 검색을 위해 류마티스 관절염 환자를 대상으로 susceptible allele의 존재 유무와 그에 따른 질병 진행 정도를 알아본다. 그리고 한국인 류마티스 관절염 환자의 susceptible allele 내 질병 특이 epitope를 밝혀내고 가능하면 이에 대한 단일 크론 항체를 개발하여 임상적인 가치를 평가 하고자 한다.

IV. 연구개발결과

총 과제 연구기간의 단축으로 (3년에서 2년으로) 일부 연구과제의 결과가 나오지 않았으나 커다란 성과가 있었다. 요약하면 다음과 같다.

- * 전신성 홍반성 루푸스 (Systemic lupus erythematosus, SLE) 와 Sjogren syndrome 에서 흔히 관찰되는 Ro 항체의 임상적 의미를 규명하여 학계에 보고하였다.

- * 한국인 SLE 환자 Ro 항원의 60 kd 및 52 kd 의 conformational epitope 를 밝히고 각 epitope 간의 출현 빈도를 조사하고 HLA 유전자와의 연관성 보고하였다.

- * Ro 항원의 epitope 검색을 종래의 방법과는 달리 Ro 단백질 구조 (aminoacid sequence)를 컴퓨터에 hydrophilicity, acrophilicity, hydrophobicity 기준으로 입력하여 epitope 를 screening 하였다. 그리고 각각의 epitope 들의 peptide 를 합성하여 ELISA plate 에 epsilon-aminocapric acid 에 붙여 epitope 특이 ELISA 법을 개발하여 이를 해외학회에 보고하고 이를 국내에 특허출원하였다.

- * 본 연구결과 한국인 SLE 에서 가장 많이 발견되는 epitope 는 60 kd 내 334번째부터 343번 까지의 단백질 구조 GHGLRCKLKW으로 밝혀졌다. 그러나 이의 출현 빈도와 임상소견과는 특별한 연관관계가 발견되지 않고 있다.

- * 류마티스 관절염에서 HLA-DRB1 유전자와의 연관성을 조사하였고 한국인에서 특히 많이 관찰되는 HLA 분자내 predisposing epitope 로는 70QRRAA74 인 것이 밝혀졌다.

- * 류마티스 관절염 환자의 예후 판정에 중요한 인자(predisposing epitope)는 HLA 유전자 내 존재하고 있고 특히 한국인에서는 HLADRB1*0405 내에 있고 이 유전자의 임상적인 기능을 처음으로 밝혀 해외잡지에 보고하였다.

- * 본 연구개발 기간동안 해외에서 개발된 관절염 predisposing epitope인 70

QKRAA 74 에 대한 단일클론항체를 이용하여 한국인 HLA DR4 양성 관절염 환자와의 일치여부를 일차 조사하여 발표하였다.

* 류마티스 관절염 RA predisposing epitope 에 대한 한국인 고유의 단일클론 항체개발은 HLADRB1*0405 homozygosity 세포를 EB virus로 transformation 시켜 그 표면항원으로 항체개발을 시도하고 있다.

V. 연구개발결과의 활용계획

루푸스 환자 뿐만아니라 Sjogren's syndrome 환자에서 Ro 항원 epitope에 따른 특이항체 출현 빈도와 임상적인 의미는 계속 검사 예수를 늘려 조사해 볼 필요가 있다. 본 연구 과제에서 개발된 epitope 특이 ELISA 법은 다른 자가항체가 추현하는 면역 질환의 진단시약 개발에 응용 될 수 있다고 본다.

각종 사이토카인이나 이미 알려진 물질들의 epitope를 찾아내기 위해서는 본 연구자들이 개발해낸 방법을 software로 개량 개발하여 널리 이용 할 수 있다고 생각된다. 그리고 ELISA plate에 epsilon-aminocapric acid를 붙여 개발한 epitope 특이 ELISA 법은 세계적으로 수 없이 시판되고 있는 ELISA법에 개량 개발 하는데 응용할 수 있다고 본다. 특히 이 방법은 Journal of Immunological Method에 1997년도에 발표될 예정이어서 이에 대한 산업화가 요구된다.

끝으로 HLA 분자내 predisposing epitope에 대한 단일클론 항체 개발은 이미 캐나다에서 본 연구 과제 수행중에 일부분 제품화 되어 시판되고 있어 본 과제의 계속 수행에 때 늦은 감이 있어 아쉬움이 남는다.

Summary

Recent development in molecular biology enabled to detect the predisposing factor(s) associated with disease progression in systemic rheumatic disease. Diseases relevant autoantibodies are hallmark of rheumatic disease and give us to evaluate the pathogenesis of autoimmune disease. Anti-Ro antibody is frequently found in systemic lupus erythematosus and primary Sjogren syndrome and shown to have some pathogenic role in certain clinical subset of SLE. We determined the clinical significances of antibodies to Ro antigen and its subtypes (52 and 60 kd) in systemic lupus erythematosus. In our study the different pattern of 52 kd and 60 kd Ro autoantigen recognition was found between the SLE and primary Sjogren syndrome. The association of particular HLA allele and presence of anti-Ro antibody was also reported. Searching the immunodominant epitope of 60 kd and 52 kd Ro antigen, a peptide assumed to function as one of the epitopes of 60-kd or 52-kd Ro antigen was screened by comparing of hydrophilicity, acrophilicity and hydropathy in each amino acid sequences. The new epitope specific ELISA method was developed in our study by attaching the synthetic epsilon-aminocaproic acid modification on each amino acid. Each peptides (presumed epitope) was tested with 30 sera from SLE patients. The manuscript for this method of epitope mapping was accepted to be publication in international journal (Journal of Immunologic Methods). The epitope commonly found in SLE was shown to be ³³⁴GHGLRCKLKW³⁴³ within 60 kd, however its positivity was not associated with particular clinical manifestations.

The association of HLA-DRB1 and its clinical significances was investigated in Korean patients with RA. The predisposing epitope in Korean was ⁷⁰QRRAA⁷⁴ which originated from HLADRB1*0405. The clinical impacts of this predisposing epitope was defined in this study and reported in international journal (British Journal of Rheumatology). The clinical usefulness of monoclonal antibody against ⁷⁰QKRAA⁷⁴ to screen the patients having susceptible epitope was investigated in RA patients with HLA DR4 and the results was presented in International congress of Rheumatology (ILAR) held in Singapore. The generation of monoclonal antibody against RA predisposing epitope (HLADRB1*0405) is under

doing by using EBV transformation of B cells from patient with HLADRB1*0405 homozygosity.

여 백

목 차

제 1 장 서 론	9
제 2 장 국내외 기술 개발 현황	14
제 3 장 연구 개발 수행 내용 및 결과	17
제 4 장 연구 개발 목표의 달성도 및 대외 기여도	27
제 5 장 연구 개발 결과의 활용 계획	29
제 6 장 참고 문헌	30

제 1장 서론

1 절 : 연구개발의 목적, 필요성

전신성 류마티스 질환에는 대표적으로 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis, RA), 전신성 홍반성 루푸스(systemic lupus erythematosus, SLE)와 쇼그렌 증후군(Sjogren's syndrome)등이 있고 이들은 자가면역 질환군에 속한다.

이 질환들은 대부분 고유의 자가항체가 형성되고 있어 각 질병의 진단에 커다란 도움이 되고 있다. 예를 들면 RA에서는 rheumatoid factor(RF), SLE와 Sjogren syndrome에서는 항Sm항체, 항La 및 항Ro항체 등이다. 면역학의 발달로 이런 항체들을 보다 빨리, 더 예민하게 검색해내는 방법들이 개발되어 전신성 류마티스 질환의 진단과 다른 자가면역 질병과의 감별진단에 큰 도움이 되어왔다. 그러나 아직까지 질병의 예후 판정이나 임상 양상을 예측하는 지표나 같은 류마티스 질환군들간의 감별 진단에 도움이 되는 특이한 항체 검사법은 개발되어 있지 않다. 최근 이 항체들의 원인 항원들이 분자생물학적으로 규명되기 시작하였고, 유전학적으로 disease susceptible allele들이 인종에 따라 밝혀지게 되었다. 질병의 원인 물질로 추정되는 화학구조를 파악하고 이 구조내 epitope에 대한 특이 항체 검색이나 질병을 일으키는 원인 유전자 구조를 조사하여 질병의 예후 판정이나 임상양상을 규명하는 시도가 요구되고 있다. 이런 배경에서 우리나라 류마티스 질환의 예후 판정과 비슷한 종류의 질환들간의 감별진단에 필요한 특이 진단 시약을 개발할 필요가 있다.

가. 기술적 측면

전신성 류마티스 질환을 진단하고 각 질환들을 감별하기 위해 혈청내에 존재하는 여러 종류의 자가항체를 검사하는 각종 면역학적 방법이 널리 이용되고 있다. 전신성 류마티스 질환의 대표적인 질환인 RA의 진단 및 예후, 그리고 치료 방침을 결정하기 위하여 류마티스 인자(rheumatoid factor) 검사가 널리 이용되고 있으며 전신성 류마티스 질환, 특히 전신성 홍반성 루푸스나 쇼그렌씨 증후군에서 자가 면역 반응을 일으키는 중요한 항원의 일종인 Ro 및 La 항원에 대한 항체는 질병의 선

별 검사(screening)와 감별 진단 목적으로 이용되는 대표적 자가항체이다. 최근에는 분자 생물학적 수준에서 이러한 기존의 진단법보다 더 명확하고 질병을 이해하고 더 특이한 새로운 진단법의 개발이 시도되고 있다.

RA환자의 질병 경과를 예측하는 지표로서는 류마티스 인자 이외에도 HLA-DR4 유전자와의 관련성이 알려지고 있다. 최근 DNA형별법을 통한 HLA-DRB1 검색결과 여러 DR4 아형이 발견되었고 인종에 따라 주된 susceptible allele 형별에는 다소 차이가 있다는 사실이 밝혀졌다.

HLA-DR4 아형중 HLA-DRB1*0401, 0404, 0405 유전자가 있는 경우 관절염이 빨리 진행되고 관절의 장기 침범이 흔하다는 사실이 보고되었고, 일부 인종에서는 HLA-DRB1*0101, 1001, 1402와의 관련성도 보고되었다. 그러나 이들 유전자의 특성을 분자 생물학적으로 분석해 보면 HLA-DRB1 유전자의 3번째 과변화 부위(3rd hypervariable region)의 아미노산 70-74번까지의 배열이 QKRAA, QRRRAA 혹은, RRRRAA로 서로의 구조가 매우 유사한 epitope를 공유하는 것으로 밝혀졌다. 이러한 사실을 토대로 각각 epitope의 존재 유무를 조사하여 환자의 치료 방침 결정에 응용하려는 시도가 구미 선진국에서 진행되고 있다. DNA 형별법을 통한 HLA typing은 국내에서도 시행되고 있지만 실험에 걸리는 시간과 비용, 기술적 어려움 때문에 단지 연구실 수준에서만 시행되고 있다. RA 감수성 epitope의 존재 유무 검색과 같이 질병의 예후 예측에 도움이 되어 치료에 응용할 수 있는 검사가 연구실수준이 아니라 검사실에서 간편하게 측정할수 있는 방법이 개발된다면 RA의 질병 관리에 큰 도움이 될 것이다.

항 Ro 및 La항체는 보편적으로 이중면역확산법을 이용하여 그 존재 유무를 검사하고 있고, 특히 Ro항원은 세포내 4개의 작은 RNA와 52 kd 및 60 kd의 polypeptide 복합체로 구성되어 있다. Ro항원의 항원성이 일부 밝혀지면서 각각 52 kd, 60 kd 단백질에 대한 면역 반응 양상이 전신성 류마티스 질환의 종류에 따라 차이가 있음이 밝혀지고 있다. 최근 Ro 항원단백에 대한 아미노산 염기서열이 밝혀져 epitope mapping을 통하여 epitope으로 추정되는 부위를 합성하여 환자의 혈청과 반응 시킨 후 그 반응 양상을 조사할 수 있게 되었다. 일부 보고에 의하면 각 질환에 따라 항체 반응에 차이가 있고, 관련된 임상양상과도 차이가 있다고 한다. 그러므로 52 kd 및 60 kd 단백질에 대한 epitope 추정 부위를 확인하고 이를 합성하여 진단 시약으로 개발하려는 노력은 기술적으로나 이론적으로나 가능하리라고 본다.

La항원 역시 최근에 immunodominant epitope(amino acid 88-101)가 밝혀지고 있어 이에 대한 진단시약 개발도 가능하리라고 본다. 국내에서 분자 생물학적 수준으로 질병을 이해하고, 그에 따른 진단법을 개발하려는 시도는 다른 선진국에 비해 늦지 않다고 본다. 본연구를 시작으로 epitope mapping과 관련된 국내 기술 수준이 더욱 향상되어 추정되는 epitope를 합성하여 제작된 synthetic peptide를 진단 시약으로 사용하는 방법이 개발되면 다른 선진국 기술 수준보다 앞서게 되고 앞으로 다른 자가면역질환의 진단법에도 응용이 가능할 것으로 기대된다.

나. 경제와 산업적 측면

RA의 경우 전체 인구의 약 0.5 -1 %정도가 앓고 있다고 추정되며, SLE나 그 유사 질환도 전 인구의 0.1-0.5 % 에 이르러 이 질환에 대한 정확한 조기진단과 질병의 화 요인을 규명하는 것이 매우 중요하다. 이질환들의 진단은 대부분 임상적 소견과 혈청학적 검사에 의존하게 된다. 그러므로 더 조기에 발견되는 새로운 검사법의 개발이 요구된다.

RA의 발병 원인중 유전적 요인이 깊이 관여한다는 사실이 알려지면서 HLA-DR4 유전자, 그 아형중에서도 특정한 대립유전자(susceptible allele)가 환자의 예후와 밀접한 연관이 있다. 국내에서는 본 연구팀에 의해 처음으로 이에 대한 조사를 시행하여 susceptible allele의 분포가 외국과 상이하며 환자의 예후와 관련이 있음을 확인한 바 있다. 현재 HLADRB1 아형 (susceptible allele)은 two-step PCR, reverse dot blot hybridization 등으로 조사하고 있다. 대부분의 의료기관에서는 HLA형별을 외국에서 수입한 제품(Terasaki plate)에 의존하기 때문에 비용이 많이 들어(1건당 약 30만원) 이러한 검사는 RA환자에서 보편적으로 시행되고 있지 못한 실정이다. 더욱이 혈청학적인 검사법은 분자생물학적 방법과는 달리 RA 특이 susceptible allele를 검사하는데 정확도가 떨어지고 있다. 환자 DNA를 genotyping 하는 방법은 RA 특이 susceptible allele 에 대한 구분이 가능한 반면, 시간이 약 3일 정도 소요되며, 경제적으로는 비용이 많이 드는 단점이 있다. 연구실에서 연구 목적 외 일반적 검사로는 사용에 제한이 따르고 있어 보다 간편하고 값싸게 RA 특이 susceptible allele를 검색하는 방법의 개발이 요구되고 있다. 이미 많은 연구자들에 의해 서양인은 동양인과 질병 발생의 유전면역학적 배경에서 차이가 있음을 고려하

면, 국내에서 본 연구팀에 의해 이미 한국인의 특이 RA 특이 susceptible allele에 대한 자료를 갖고 이를 바탕으로 단일클론항체를 개발하여 보다 신속하고 경제적인 검사법을 개발하는 것은 매우 중요하다.

SLE, 쇼그렌 증후군 역시 류마티스 관절염 다음으로 많은 빈도를 보이는 전신성 류마티스 질환으로서 Ro항원과 La 항원에 대한 자가항체가 높은 빈도로 검출되고 있어 진단적 검사로 널리 이용되고 있다. 국내에서는 미국등에서 수입한 bovine spleen extract를 수입하여 이를 표준 항원으로 이용하여 이중면역확산법으로 검출하거나, Hella cell extract를 이용한 면역 블롯(Western blotting) 및 미국등에서 수입한 ELISA kit 등이 이용되고 있다. 이중면역확산법에 의해서는 Ro항원의 두 가지 peptide인 52, 60 kd 항원 각각에 대한 항체측정은 불가능하고 면역 블롯법에 의해서만 가능하다. 그러나 본 연구팀의 조사에서 나타난 것 처럼 면역 블롯법은 이중면역확산법에서 Ro항원에 대한 항체 양성반응을 보인 환자에서도 음성반응을 나타내기 때문에 민감도가 떨어지는 단점이 있고, 수입 시약을 사용하기 때문에 비용이 많이 들고, 실험과정이 복잡하여 보편적으로 시행하기 어려운 것이 문제점으로 지적되고 있다. 따라서 Ro 항원의 epitope를 합성하여 이 peptide에 대한 항체를 검사하는 방법을 개발하는 것이 현재의 방법보다 훨씬 선택적이다. 아직 선진국에서도 Ro항원이나 La 항원에서 epitope를 합성한 peptide를 이용한 특이 항체 검사법의 상품화가 많이되어있지 않는 실정이므로 이 분야에 대한 개발이 국제 경쟁력 향상에 큰 도움이 될 것으로 생각된다.

다. 사회 문화적 측면

질병을 일으키는 원인 단백질의 구조를 밝혀내고 이를 특이하게 검색하는 새로운 진단시약의 개발은 우리나라 의과학 발전에 중요한 계기가 된다고 본다. 본 검사법의 개발로 질병을 악화시키는 인자를 조기 발견하여 더 적극적으로 치료 할 수 있도록 한다. 그리고 특이항체를 조기에 검색함으로써 교원성 질환을 감별하여 효과적인 치료를 함으로써 전 인구의 약 1 - 2 % 정도되는 류마티스 환자들의 '삶의 질'을 향상시킬 수 있다고 본다.

2 절 : 연구개발의 범위

본 연구 과제의 개발 범위는 다음과 같이 여덟가지로 요약된다.

- 가. SLE 및 Sjögren's syndrome 환자의 혈청에서 항 Ro 항체의 임상적 의의 조사
- 나. Western blotting 법으로 항 Ro 항체를 조사하여 52kd 및 60kd에 대한 임상적 의의 및 진단적 가치 규명
- 다. HLA 와 항 Ro 항체 연관성 조사
- 라. 보다 간편한 Ro epitope mapping 과 epitope specific ELISA 법 개발
- 마. 한국인 SLE에서 60 kd 내 immunodominat epitope 규명
- 바. RA 에서 susceptible allele 의 진단적 가치 및 의의 규명
- 사. QKRAA 단일클론 항체의 진단적 가치 규명
- 아. RA predisposing epitope 에 대한 단일클론 항체 제작

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 외국의 경우

가. 항 Ro 항체의 52 Kd, 60 Kd 특이 항원에 대한 항 Ro 항체반응의 검색

1990년 Ben-Chetrit등이 Western blotting 법을 이용하여 대표적인 교원성 질환인 SLE와 Sjogren 증후군 환자에서 항 Ro 항체의 항원성을 조사하였다. 그 결과 SLE 환자는 60kd 과 52kd의 단백 모두 반응을 보이거나 60kd 단백 단독으로만 반응하는 경우는 있지만 52kd 단백 단독으로만 반응하는 경우는 Sjogren 증후군외에는 거의 나타나지 않기때문에 Ro항원의 특이성이 다르다는 사실을 보고하였다. Buyoun 등은 (1993) 신생아 루푸스와 선천성 심전도 장애에 52kd의 Ro항원에 대한 항체가 관련됨을 보고하였다. 1988년 Ro protein에 대한 cloning이 시작되었고 Boire G(1991)등은 60kd의 Ro 항원에 대한 면역 반응은 heterogenous하여 일부 환자의 혈청은 native Ro 단백질에 반응하지만 denatured 60kd Ro단백에는 반응하지 않는다는 사실이 발견하고 60kd의 Ro 항원은 conformational epitope를 지니고 있는 것으로 보고 있다. 그리고 이러한 native autoantigen이 아마도 자가 면역반응을 유발시킨다고 한다. Bankat등(1992)은 60kd의 Ro단백에서 5 종류의 synthetic peptide를 합성하여 primary Sjogren syndrome과 SLE 환자에서 60kd Ro 단백질에서 서로 다른 epitope을 지니고 있음을 발견하였고 21번에서 41번 사이의 아미노산 염기 서열이 primary SS과 SLE의 감별 진단에 도움이 될수 있음을 보고하였다. Daniel등 (1994) 은 Ro 항체와 연관된 3 종류의 질환에서 52 kD 및 60 kD에 각기 다른 multiple epitope 이 존재할 가능성을 시사하였고 항 Ro 항체 검출을 위해서는 면역 확산법 및 ELISA 법을 동시에 시행하는 것이 도움이 된다고 한다.

이상과 같은 연구 진행상태를 미루어 보아 각 류마티스 질환에서 52 kD, 60 kD 및 48kd의 epitope mapping 을 하여 얻은 자료를 토대로 특정 epitope부위의 peptide를 합성하여 epitope specific ELISA 법을 개발한다면 더욱 간편하고 정확한 진단법으로 활용할 수 있을 것이다.

나. RA의 predisposing epitope 검색법 개발

RA의 predisposing epitope에 대한 개념은 1987년도에 세워졌으나 이에 대한 본격적인 연구는 1990년도에 되어서 비로서 시작되었다. HLA typing이 serological typing 에서 PCR 법을 이용한 genotyping 법으로 바뀌면서 predisposing epitope에 대한 개념이 정립되기 시작하였고 초기에는 질병의 발생과의 관계를 연구하였으나 1992년 Weyand 등이 미국인 RA환자를 대상으로 질병의 진행도와 HLA DRB1유전자와의 상관관계를 보고하면서부터 질병의 진행도 및 예후 예측 표지자로서 인식되기 시작하였다. 이후 여러나라에서 관절손상정도, 골파괴의 정도가 predisposing epitope이 있는경우 더욱 심하다는 보고를 바탕으로, 연구실에서 시행하는 PCR법을 이용하여 susceptible allele 를 간편하고 손쉬우면서도 정확한 검사법개발을 시도하고 있다. 한 연구소에서는 2 단계 PCR법을 이용하여 진단에 응용하려면 그 방법은 우선 HLA-DR4에 해당하는 common primer 를 이용하여 일차 증폭한 후 epitope 양성인 control과 epitope 음성인 control 을 검사하고자 하는 시료와 함께 predisposing epitope primer를 이용하여 2차로 증폭시켜 그 반응 양상을 각각의 control과 대조하는 방법을 개발하고 있다. California 대학의 Carson 등은 triple primer solid phase PCR 방법을 응용하여 간편한 진단법을 개발하고 있다. 그리고 predisposing 단일크론항체를 이용하여 epitope을 검색하는 시도는 캐나다의 Terra Nova 연구소에서 1994년 부터 연구가 진행중이다.

2. 국내의 경우

가. 항 Ro 항체의 52 Kd, 60 Kd 특이 항원에 대한 항 Ro 항체의 검사

Ro 항원에 대한 항 Ro 항체의 측정방법은 국내에서는 현재 미국 Immunovision 사에 제조한 표준 Ro 항원을 이용하여 이중면역 확산법을 보편적으로 이용하고 있으나 침강선의 일치유무의 불확실성, 52Kd, 60 Kd peptide항원에 대한 특이성의 부족, 검사의 불편함등이 문제점으로 지적되고 있다. ELISA법은 현재 미국에서 시판되고 있는 표준 Ro 항원을 사용하여 실시하고 있지만 52 Kd, 60 Kd에 대한 특이성의 부족이 문제점으로 지적되고 있으며 RNA domain을 포함하고 있어 시약 보관에 어려움을 겪고 있다. 국내에서는 본 연구팀이 Immunoblotting 법으로 항 Ro 항체의 항원 특이성을 대한류마티스 학회지에 보고(박성환 등,1994)한 결과에

따르면 52 Kd, 60Kd에 대한 특이성은 있지만 검사방법에 많은 시간을 요구하기 때문에 연구 목적 외에 환자의 선별검사로서는 부적절하며 Immunoblot 과정에서 epitope의 변성과 RNA-단백질 complex 의 분리로 인해 ELISA 법, 이중면역 확산 법에서 양성반응을 보인 환자의 혈청에서도 음성반응을 보일수 있기 때문에 위 음성(false negative)결과가 문제점으로 지적되었다.

국내에서는 이제 시작단계인 epitope mapping 방법을 이용하여 Ro항원의 추정 epitope에 대한 synthetic peptide를 이용하여 진단시약으로 개발하고자 본 연구를 시작하게 되었다.

나. RA의 predisposing epitope 검색법 개발

류마티스 관절염의 유전면역학적배경에 대한 체계적인 연구는 김 호연(1994) 등에 의해 처음으로 보고되었고 그 임상적 의의는 민 준기(1995) 등에 의해 대한류마티스학회 1995 춘계학술대회에 구연된바 있다. RA 환자의 HLA-DR genotyping 방법에 대한 연구는 국내에서는 가톨릭대학교 골수정보은행의 한훈, 김태규등에 의해 선진국 수준의 연구 결과를 김호연등의 한국과학기술 재단보고서에 보고하였으며 HLA-DR Genotyping과 관련된 논문이 김호연 등에 의해 국제 저명 학술지에 게재되었다(Annals of rheumatic dis. 1995).

제 3장 연구개발 수행 내용 및 결과

가. SLE 및 쇼그렌 증후군(Sjögren's syndrome) 환자의 혈청에서 항 Ro 항체의 임상적 의의 조사

Ro 항원에 대한 자가항체인 항 Ro 항체는 대표적인 전신성 류마티스 질환인 전신성 홍반성 루푸스, 쇼그렌 증후군 환자에서 50-60% 이상 발견되며 선천성 루푸스, 아급성 피부 홍반성 루푸스, 쇼그렌 증후군의 확진에 도움을 주는 자가항체로 항 Ro 항체 존재와 임상 양상이 밀접한 관련이 있다고 알려져 있으나 아직 이론이 많은 실정이다. 따라서 본 연구진은 전신성 홍반성 루푸스 환자 132 명과 쇼그렌 증후군 환자 51 명의 Ro 항원에 대한 반응을 이중면역 확산법으로 조사하여 임상 증상과 비교하였다. 전신성 홍반성 루푸스 환자와 쇼그렌 증후군 환자의 항 Ro 항체와 출현 빈도는 각각 52.3 %, 64.7 % 였으며 48 kd La항원에 대한 항체의 출현 빈도는 각각 15.15 %, 29.4% 였다. 전신성 홍반성 루푸스 환자에서 항 Ro 항체 양성은 임상적으로 광과민 반응 (59 % Vs 27%), 피부 병변(80 % vs 58%), 안면 홍반 (67 % vs 49%), 백혈구 감소증(38% vs 22%)등과 연관이 관찰되었고 쇼그렌 증후군 환자에서는 혈관염, 고글로불린 혈증, 류마티스인자양성율등이 항 Ro 항체 양성반응과 의미있는 상관관계가 관찰되었다. 본 연구결과는 국내 학술지에 게재하였다. (항 Ro/SS-A 항체: 전신성 홍반성 루푸스 환자에서의 임상적 의의와 그 주된 항원 결정인자;대한 면역학회지 18;403-409:1996)(별첨 1).(Clinical significances of antibodies to Ro/SS-A autoantigens and its subtypes in primary Sjogren's syndrome; Korean Journal of Internal Medicine Vol 12, 1997) (별첨 2)

나. Western blotting 법으로 항 Ro 항체를 조사하여 52kd 및 60kd에 대한 임상적 의의 및 진단적 가치 규명

Ro 항원은 작은 ribonucleoprotein(RNP)입자로서 60-kd Ro peptide외에 52-kd peptide가 Ro 단백질의 일부분임이 밝혀졌으며 이 peptide들에 대한 항체 반응의 특이성과 임상적인 의의에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 전신성 홍반성 루푸스

환자 132 명과 쇼그렌 증후군 환자 51 명의 Ro 항원에 대한 반응을 이중면역 확산법으로 조사하였다. 항 Ro 항체 양성인 혈청을 immunoblotting 하여 60 kd, 52 Kd Ro 항원에 대한 반응을 관찰하였다. 52 kd에 대한 항체 단독 양성의 비율이 쇼그렌 증후군 환자에서 42.5 % 로 SLE 환자의 4.3% 보다 뚜렷이 높은 출현 빈도를 보였으며, 60 Kd 에 대한 항체 단독 양성의 비율은 쇼그렌 증후군 혈청에서 3.0%, 전신성 홍반성 루푸스에서 11.6 %의 출현 빈도를 보였다. 60-Kd과 52-kd peptide에 모두 양성인 38명의 환자군과 60-kd peptide에 대한 항체만 양성인 8예의 환자군에서 SLE 환자에서 관찰되는 특정 임상 양상의 출현 빈도를 조사하였으나 두 군간에 통계적으로 유의한 차이는 없었다. 60-kd과 52kd peptide에 대해 모두 양성인 13명과 52-kd에 대한 항체만 양성인 14명의 쇼그렌 환자를 대상으로 임상 양상을 비교하였으나 역시 두 군간에 차이는 없었다.

이상의 결과로 Ro 항체 양성 환자는 immunoblotting pattern의 반응 양상에 따라 이들 두 질환을 감별하는데 중요한 정보를 제공하고 있음을 알수 있었다. 본 연구 결과는 대한 내과학회지에 게재예정이다(in press). (Clinical significances of antibodies to Ro/SS-A autoantigens and its subtypes in primary Sjogren's syndrome; Korean Journal of Internal Medicine Vol 12, 1997) (별첨 2)

다. HLA 와 항 Ro 항체 연관성 및 기초 조사

MHC class II molecule중 HLA-DR3, HLA-DR2, HLA-DQw1, HLA-DQw2등이 항 Ro 항체 양성과 연관성이 있다고 알려져 있으며 HLA-DQ alpha chain의 34번째 아미노산이 glutamine이고 DQ beta chain의 26번째 아미노산 서열이 leucine으로 구성되어 있으면 항 Ro 항체 양성율이 높은 것으로 보고되고 있다. 그러나 HLA은 민족에 따른 차이가 있어 국내 환자를 대상으로한 연구가 필요하나 아직 이에대한 연구는 미비한 실정이다. 본 연구진은 76명의 SLE환자와 정상인 281명의 혈청을 ELISA방법을 이용하여 Ro 항체 양성 여부를 조사하였고 역점적 교잡법을 통해 HLA 형별을 조사한 결과 SLE 환자 중 Ro 항체 양성인 환자에서 HLA-DR15 양성율은 31.0%(13/24)로 Ro 항체 음성군의 14.7%(5/34), 정상인 18.2%(51/281)에 비해 높았으나 DQA1과 DQB1은 차이가 없었다(Table 1, 2, 3).

Table 1. 항 Ro 항체와 HLA-DR 아형과의 관계

	SLE (n = 76)		Control (n= 281)
	Ro (+) N = 42	Ro (-) N = 34	
DR1	4(9.5%)	3(8.8%)	33 (11.7%)
DR15	13(31.0%)*	5(14.7%)	51 (18.2%)
DR16	3(7.1%)	2(5.9%)	10 (3.6%)
DR3	0	3(8.8%)	6(2.1%)
DR4	9(21.4%)	6(17.6%)	88(31.3%)
DR11	2(4.8%)	5(14.7%)	30(10.9%)
DR12	1(2.3%)	1(2.9%)	39(13.9%)
DR7	6(14.3%)	5(14.7%)	32(11.4%)
DR8	8(19.0%)	6(17.6%)	59(21%)
DR9	6(14.3)	9(26.5%)	62(22.1%)
DR10	0(0.0%)	1(2.9%)	9(3.2%)
DR13	1(2.3%)	2(5.9%)	66(23.5%)
DR14	7(16.7%)	3(8.8%)	44 (15.7%)

* p<0.05

Table 2. 항 Ro 항체와 DQA1과의 관계

	SLE (n = 76)		Control (n= 204)
	Ro (+) N = 42	Ro (-) N = 34	
DQA1*1	21(50.0%)	17(50.0%)	150(73.5%)
DQA1*2	5(11.9%)	5(14.7%)	28(13.7%)
DQA1*3	14(33.3%)	13(38.2%)	112(54.9%)
DQA1*4	2(4.7%)	1(2.9%)	7(3.4%)
DQA1*5	4(9.5%)	11(32.3%)	30(14.7%)
DQA1*6	1(2.3%)	0(0.0%)	22(10.7%)

Table 3. 항 Ro 항체와 DQB1과의 관계

	SLE (n = 76)		Control (n= 200)
	Ro (+) N = 42	Ro (-) N = 34	
DQB1*02	6(14.3%)	8(23.5%)	25(15.0%)
DQB1*03	17(40.5%)	18(52.9%)	93(51.6%)
DQB1*04	4(9.5%)	3(8.8%)	22(12.2%)
DQB1*05	9(21.4%)	7(20.5%)	51(28.3%)
DQB1*06	15(37.7%)	13(38.2%)	81(47.2%)

본 연구 결과는 추후 국내 잡지에 게재 될 예정이다.

라. 간편한 Ro epitope mapping 및 epitope specific ELISA 법 개발

1988 년 Deutscher 와 1989년 Ben-Chetrit 등에 의해 60 Kd Ro 항원의 cDNA sequence 가 보고되었고 1991 년 Chan 등에 의해 52 Kd Ro항원의 cDNA sequence 가 보고되었다. 이 Ro 항원의 cDNA 를 이용하여 recombinant Ro protein 을 합성 하고 합성된 Ro 단백질로 ELISA법이 개발되었다. 그러나 비용이 비싸고 예민도와 특이도가 항 Ro 항체의 일반 검사보다 우수하지 못해 새로운 검사법의 개발이 요구되고 있다. 이러한 약점을 보완하기 위해 Ro protein내에 항체 반응을 일으키는 epitope을 알아내고 이 epitope 특이 ELISA를 개발하게 되었다. 538 개의 아미노산 으로 구성된 60kd Ro protein 과 475 개의 아미노산으로 이루어진 52kd Ro protein 각각의 epitope mapping을 full length 의 sequence를 합성한 후 몇개의 분 절로 나누어 시행하던 기존의 방법과는 다른 방법을 이용하여 서울대 화학과와 공동연구로 진행하였다. 즉 60 kd, 52 kd Ro 항원의 전체 sequence 를 computer program 에 입력하여 각 아미노산의 hydrophilicity, acrophilicity, hydrophathy 를 기준으로 이미 보고된 epitope를 일부 입력하고 나머지 epitpe 부위를 예측하고 이 를 합성, 확인하는 방법을 채택하였다. 이런 방법으로 보다 간편하고 빠르게 epitope mapping 을 할수 있게 되었고 예정보다 빠르게 60 kd 및 52 kd Ro 항원에 대한 epitope mapping 을 성공하게 되었다.

60 kd, 52 kd Ro antigen 의 epitope mapping 을 시행하여 60 kd epitope 7개 (EP60-01, EP60-02, EP60-03, EP60-04, EP60-05, EP60-06, EP60-07) 와 52 kd epitope 4개 (EP52-01, EP52-02, EP52-03, EP52-04) 의 결과를 얻었다. (별첨 3, 4)

가) 본 연구 결과에서 결정된 Ro 항원 60 kd epitope 는 다음과 같다.

EP60-01:⁴⁶ YYIKEQKLGL⁵⁵

EP60-02:¹⁰⁰ SQCSDISTK¹⁰⁸

EP60-03:¹²⁸FIQFKKDLKE¹³⁷

EP60-04:¹⁶⁸VTKYKQRNG¹⁷⁶

EP60-05:²²⁸YLEAVEKVKR²³⁷

EP60-06:³³⁴GHGLRGKWK³⁴³

EP60-07:³⁵¹KALDAAFYK³⁵⁹

나) Ro 항원 52 kd epitope

EP52-01:⁶¹KNLRPNRQLA⁷¹

EP52-02:⁷⁴NNLKEISQEAREGTQGE⁹⁰

EP52-03:¹¹⁵QSRKHRDHA¹²⁴

EP52-04:³⁵⁸VCRDSVRRKGH³⁶⁸

이와같이 기존에 epitope mapping 방법에 비해 간편하고 빠르게 epitope mapping 을 할수 있는 법을 개발하여 이를 국내에 특허 출원하였다. (별첨 5)

* 발명의 명칭 : 전신성홍반성 루프스병의 진단에 사용할수 있는 60 kd 및 52 kd Ro/SS-A 항원의 항원결정기를 포함하는 펩티드.

* 출원번호: 1996 년 특허출원 제 36690

합성 peptide (epitope) 를 기존 방법보다 빠르고 정확하게 ELISA 로 확인하기 위해 96 well polystyrene plate 에 epsilon-aminoacid를 이용하여 epitope 에 해당하는 short peptide을 coating 하는 새로운 방법의 ELISA 법을 개발하였으며 그 연구 내용을 다음과 같이 특허 출원하였다. (별첨 6)

1. 발명의 명칭 ; epsilon-아미노산이 결합된 짧은 펩티드를 이용하는 개선된 ELISA법

2. 출원번호 : 1996 년 특허출원 제 36689 호

50 명의 SLE 환자의 혈청을 대상으로 각각의 60 kd 의 putative epitope 와의 결합을 본 연구팀에 의해 개발된 ELISA 법에 의해 조사한 결과 epsilon aminocapric acid를 이용하여 합성된 peptide 의 양단을 plate 에 고정시킴으로서 hydrophobicity를 유지할수 있게 함으로서 기존의 ELISA 법에 의한 결합에 비해 안정도와 예민도를 증가 시킬수 있었다. 이 내용은 1996 년 대한 면역학회 추계학술대회에서 구연발표하였고 (epitope mapping of 60 kd Ro protein in SLE) 또한 저명국제학술지 Journal of Immunological Method에 submit 하였으며 게재증명 확인을 받은 상태이다. (제목 :Modification of short peptide using epsilon-aminocapric acid for improved coating efficiency in indirect

enzyme-linked immunosorbent assay) (별첨 7; 게재증명확인서 및 manuscript).

마. 한국인 SLE 환자에서 60 kd 의 Epitope specific ELISA 법에 의한 immunodominant epitope 조사

50명의 한국인 SLE 환자에서 epitope specific ELISA 방법에 의해 46-56, 100-106, 127-137, 168-178, 228-237, 334-343 domain 이 SLE에서 60 kd Ro 항체와의 결합에 중요한 부위임이 밝혀졌으며 6개의 분절중 334-343 domain (³³³GHGLRCTKLKW³⁴³)에 대한 결합이 SLE 혈청의 74%에서 관찰된데 비해 정상인의 혈청에서는 검출되지 않았다. 이러한 사실은 Ro 단백질 중 아미노산 343부터 343 까지의 분절이 한국인 SLE 환자에서 가장 immunodominant epitope 였으며 이러한 결과는 구미의 결과와 상이한 것으로서 이는 인종에 따른 면역유전학적인 차이에 의한 것으로 생각되었다. 그러나 이의 출현 빈도와 임상소견과는 특별한 연관 관계가 발견되지 않았다. 이 결과는 금년도 미국 류마티스학회인 American college of rheumatology 에 발표를 위해 영문초록을 제출한 상태이다. (Epitope mapping with synthetic peptides of 60-kd Ro(SSA) protein in Korean patients with SLE) (별첨 8)

바. RA 에서 susceptible allele 의 진단적 가치 및 예후와의 관계

류마티스 관절염의 발병에는 유전면역학적 요인이 중요한 요소이며 인종에 따라 차이가 있는 것으로 알려져있다. 본 연구자들은 102명의 한국인 류마티스 관절염 환자를 대상으로 제 11 차 International HLA workshop and conference 에서 제시된 HLA-DRB1 유전자의 primer 를 합성하여 PCR and reverse dot hybridization 방법을 이용한 genotyping을 실시하였다. 즉 RA 환자의 말초혈액 임파구를 분리한 후 DNA 를 추출하고 specific DNA flanking primers 를 이용하여 DNA 를 증폭하였다. 한국인 환자에는 서양인과 달리 HLA-DRB1*0405 유전자가 45.09 % 로 가장 많은 빈도로 나타나며 다음으로 HLA-DRB1 *0101 12.74% 로 나타났다. 류마티스 관절염의 predisposition에 관련된 HLA DRB1 의 특정 유전자 (RA susceptible allele) 를 분자 생물학적으로 분석한 결과 HLA- DRB1 내 항원 결합 장소인 제 3

과변화부위(제70-74 위치)의 아미노산 구조가 QRRAA 또는 QKRAA 로 구성되어 있는 것이 밝혀지면서 RA predisposing epitope 에 대한 관심이 증가되었다. 본 연구팀이 Annals of rheumatic diseases, 1995 (54), 998-990 에 발표한 내용에서도 DR4 positive 환자의 91.2% 가 QRRAA 또는 QKRAA를 보유하고 있다. 본 연구 결과로 한국인 류마티스관절염 환자의 predisposing epitope 은 DRB1 내 항원 결합 장소인 제 3 과변화부위(제70-74 위치)의 아미노산 구조가 QRRAA로 이루어져 있는 사실을 발견하였으며 이는 서양인의 주된 epitope인 QKRAA와는 아주 다른 사실이다.

RA predisposing epitope이 존재하는 환자 66명과 존재하지 않는 환자 33 명을 대상으로 질병의 경과를 비교하였다. RA predisposing epitope 이 존재하는 환자군에서 관절의 변형정도 및 관절외증상의 빈도가 흔히 관찰되었다($p < 0.05$). 골미란의 정도는 양측 손과 손목 관절을 기준으로 골미란 점수를 질병 이환 기간으로 나눈 결과 RA predisposing epitope이 존재하는 경우는 0.4970 으로 존재하지 않는 경우의 0.2736에 비해 골미란점수가 의미있게 높았다. 이상의 결과로 RA predisposing epitope이 존재하는 환자가 질병의 진행정도가 심하며 예후가 불량하다는 사실을 알수 있다. 그러므로 한국인 류마티스 관절염 환자에서 predisposing epitope을 조사하는 것은 질병의 심한 경과의 예측 인자로 유용한 목표 물질임을 알수있고 이를 치료에 응용할수 있으라 기대된다

Table 1. Disease severity according to the presence of RA susceptible allele and HLA-DRB1*0405

Disease group severity	two RA susceptible allele			one RA susceptible allele			no RA susceptible allele
	0405/0405 (N=10)	0405/RA LA(n=3)	total	0405/X (n=33)	RALA/X (n=20)	total	X/X
Joint deformity	4 ^a	3	7(53.8%) ^o	21	6	27(50.9%)	11(30.6%)
extraarticular manifestation	6 ^a	1	7(53.8%) ^o	18	3	21(19.4%)	7(19.4%)
subcutaneous nodule	4	2	6(46.1%)	12	6	18(33.9%)	9(25.0%)

RA LA: RA susceptible allele X: no RA susceptible allele

a: $P < 0.05$, Mantel-Haentzel test. b: $P < 0.05$, Bartholomew's test

한국인 RA 환자에서 HLA-DRB1*0405 의 임상적 의미에 대한 결과는 1996 년 Auatralia 의 Malborune에서 열린 EULAR 국제학회에서 발표하였으며 (The impact of HLA-DRB1*0405 on disease severity in Korean seropositive RA), 이 내용이 해외잡지에 게재되었다.(The impact of HLA-DRB1*0405 on disease severity in Korean patients with seropositive rheumatoid arthritis, British Journal of Rheumatology 1997; 36: 440-443).(별첨 9)

사. 단일클론 항체를 이용한 RA predisposing epitope 의 확인

류마치스 관절염의 발병 및 불량한 예후인자와 관련된 HLA-DRB1*0405 에 대한 단일클론 항체의 연구개발 기간동안 해외에서 개발된 관절염 predisposing epitope 인 70 QKRAA 74 (shared epitope) 에 대한 단일클론항체를 구입하여 한국인 HLA DR4 양성 관절염 환자와의 일치여부를 일차 조사하였다.

RA 의 shared epitope를 flow cytometry 분석을 이용한 결과를 DNA oligotyping (PCR-SSCP) 방법과 비교하였다. 27 명의 RA 환자를 대상으로 조사하였으며 환자의 말초혈액을 각각 HLA-DRB1*04, shared epitope (QKRAA/QRRAA) 에 대한 단일클론항체로 fluorecent stain 하였으며 염색된 세포는 flow cytometry 방법에 의해 분석하였다. HLA-DRB1*0405, 0401, 0404, 0101 에 의해 나타나는 shared epitope 는 DNA typing 으로 27 명중 17 명에서 관찰되었으며, HLA-DRB1*04 분자는 27 명중 15 명에서 존재하여 flow cytometry 의해 shared epitope 의 분석은 DNA oligotyping 에 의한 결과와 유사하였다. 이러한 결과는 RA shared epitope를 인지하는 단일클론항체를 통한 flow cytometry 방법은 유용한 방법으로 생각되었으며 이방법을 통한 shared epitope 의 간편하고 신속한 분석은 DNA typing 이 필요한 대상을 선별할수 있고 중증 경과를 보일 RA 환자군 조기에 찾아내는데 유용한 방법으로 이용될수 있음을 확인하였다. 이 결과는 제 1 차 한일류마티스 학회에 발

표하였다. (Flow cytometric analysis of rheumatoid shared epitope“QR(K)RAA”
using monoclonal antibody) (별첨 10)

아. RA associated shared epitope 에 대한 단일클론항체의 제작
류마티스 관절염 RA predisposing epitope 에 대한 한국인 고유의 단일클론 항체개
발은 HLADRB1*0405 homozygosity 세포를 EB virus로 transformation 시켜 이미
cell line을 확보하였으며 그 표면항원으로 항체개발을 시도하고 있다.

제 4장 연구개발목표 달성도 및 대외 기여도

1 절 : 연구 개발 목표의 달성도

구 분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위	(달성도 %)
제 1차 년도 (1995. 10.1- 1996. 7. 31)	- 한국인 RA predisposing epitope 조사와 질병예후와의 관계정립	- HLADRB1 genotyping으로 RA susceptible allele 조사와 predisposing epitope 확인	100 %
	- 교원성 질환에서 항 52 kd, 60 kd Ro 항체 의 빈도 조사 및 임상적 의의 조사	- 교원성 질환(SLE, primary Sjogren syndrome) 에서 Ro 항원에 대한 항체의 검색과 임상적 의의 조사 - 교원성질환 (SLE, primary Sjogren syndrome)에서 Ro 항원중 각각의 subtype 인 52 kd, 60 kd 항체의 검색과 임상적 의의조사	100 % 100 %
제 2 차 년도 (1996.8.1- 1997.7.31)	- RA 의 예후판정지표로서 predisposing epitope 의 임상적 의의 규명과 predisposing epitope 에 대한 단일클론 항체 생산과 정제	- predisposing epitope의 존재가 불량한 예후의 예측 인자임을 조사 - 단일클론항체를 이용하여 flow cytometer 법에 의해 RA predisposing epitope (shared epitop)의 rapid screening	100 % 100 %
		- predisposing epitope 에 대한 단일클론 항체 제작	50 %
	- Ro 항원의 epitope mapping	- 52 kd, 60 kd Ro protein epitope mapping 및 epitope을 이용한 새로운 ELISA법 개발	120%
		- 한국인 SLE 에 있어 60 kd Ro 항원 중 immunodominat epitope 의 규명	100 %

2 절 : 대외 기여도

가. 기술적 측면

전신성 류마티스 질환의 진단 및 치료방침 결정에 있어서 최근 선진국에서 연구하고 있는 epitope mapping 기술을 개량 응용하여 항원 특이 항체반응 진단시약을 개발하는 획기적인 계기가 되었다. 그리고 다른 면역질환의 진단시약 개발에 응용될 수 있을 것으로 기대된다. 합성 peptide에 대한 항체 검사를 ELISA kit로 개발하는데 큰 도움이 될 것이다.

나. 경제. 산업적 측면

본 연구로 개발되는 진단시약은 선진국에서도 현재 연구상태이기 때문에 상품화 시기에 따라서는 물질특허를 획득할 수도 있으며 질병의 predisposing epitope가 동일하거나 유사한 한국, 중국, 일본, 동남아 등의 해외수출의 전망이 밝다. 또한 류마티스 질환을 조기에 발견하고 치료에 응용함으로써 류마티스 질환으로 인한 관절변형으로 인한 노동력상실, 활동기 젊은 여성의 질병으로 인한 국가 산업 경제적 손실을 막을 수 있는 효과가 있다.

다. 산업기술에 미치는 파급효과 분석

본 연구과정에서 개발되는 epitope mapping을 통한 epitope의 구조분석 및 이를 응용한 진단시약 개발은 최근에 활발히 연구되고 있는 질병의 원인 및 예후판정 등에 관련된 epitope를 이용하여 새로운 진단시약개발에 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

제 5장 연구개발결과의 활용계획

면역 반응에 이상이 있는 자가 면역 질환(전신성 류마티스 질환 포함)에서 원인 물질을 명확히 밝혀내지는 못하더라도 그 epitope가 무엇인지가 epitope mapping 기술을 활용하여 하나 둘씩 밝혀지고 있다. 본 연구에서 epitope mapping 기술이 활용되고 새로 발견된 epitope를 이용하여 특이 항체 검색이나 epitope specific 단일 클론 항체를 만들어 의학진단시약 개발 분야에서 크게 응용할 수 있다. 기존 방법보다 간편하고 특이하게 검사가 가능해지며 새로운 epitope 발견으로 질병의 원인 물질과 질병의 병인을 밝혀내고 이에 대한 면역학적 연구가 크게 발전할 수 있다고 본다. 본 연구 과제에서 개발된 epitope 특이 ELISA 법은 다른 자가 항체가 추천하는 면역 질환의 진단시약 개발에 응용 될 수 있다고 본다. 각종 사이토카인이나 이미 알려진 물질들의 epitope를 찾아내기 위해서는 본 연구자들이 개발해낸 방법을 software로 개량 개발하여 널리 이용 할 수 있다고 생각된다. 그리고 ELISA plate에 epsilon-aminocaproic acid를 붙여 개발한 epitope 특이 ELISA 법은 세계적으로 수 없이 시판되고 있는 ELISA법을 개량 개발 하는데 응용할 수 있다고 생각되어 이에 대한 산업화가 요구된다. 류마티스 관절염의 predisposing epitope 이 존재하는 환자, 특히 한국인 RA 에서 가장 많은 빈도를 차지하는 HLA-DRB1*0405 의 존재는 불량한 예후와 관련이 있다는 사실은 본 연구결과로 밝혀지게 되었다. 그러므로 이 epitope에 대해 단일 클론 항체를 만들면 DNA 을 이용한 HLA typing을 하지 않고도 간단하게 screening 할수 있는 시약이 개발될수 있다. 본 연구 과제에서 개발된 epitope 특이 ELISA 법은 다른 여러 자가항체가 추천하는 자가면역 질환의 새로운 진단시약 개발에 응용 될 수 있다고 본다.

제 6장 참고 문헌

1. Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ: The shared epitope hypothesis: an approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 30:1205,1987
2. Weyand CM, Hicok KC, Conn DL, Goronzy JJ: The influence of HLA-DRB1 genes on disease severity in rheumatoid arthritis. *Ann Intern Med* 117:801,1992
3. Yoshigata T, Yoshokata M, Shigeo A, Hiroshi S, Yoshiki M, Hideki N, Seizaburo A, Yoshinobu S, Ryokei O: Rheumatoid-susceptible alleles of HLA-DRb1 are genetically recessive to non-susceptible alleles in the progression of bone destruction in the wrists and fingers of patients with RA. *Ann Rheum Dis* 53:587,1994
4. Saiki RK, Walsh PS, Levenson CH, Erlich HA: Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 86:6320,1989
5. Stastny P: Association of the B cell alloantigen DRw4 with rheumatoid arthritis. *N Eng J Med* 298:869,1978
6. Okubo H, Ito K, Tanaka S, Watanabe N, Kashiwagi N, Obata F: Analysis of the HLA-DR gene frequencies in Japanese cases of juvenile rheumatoid arthritis by oligonucleotide DNA typing. *Rheumatol Int* 13:65,1993
7. Nepom GT, Ehrlich HI: MHC class II molecules and autoimmunity. *Ann Rev Immunol* 9:493,1991
8. Wordworth BP, Lanchbury JSS, Sakkas LI, Welsh KI, Panayi GS, Bell JI: HLA-DR4 subtype frequencies in rheumatoid arthritis indicate that DR beta 1 is the major susceptibility locus within HLA class II region. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:10049-10053, 1989
9. Takeuchi F, Matsuta K, Watanabe Y, Tokunaga K, Juji T, Miyamoto T: Susceptibility epitope on HLA-DR beta chain for rheumatoid arthritis and the effect of the possibility on the clinical features. *J Immunogenetics* 16: 475-483, 1990
10. 한훈, 유문간, 김태규, 정연준: Two step polymerase chain reaction 을 이용한 HLA-DR 유전자의 유전형별. *대한 미생물학회지* 25:445-453,1990
11. 김호연 외 : 한국인 류마티스 관절염의 유전면역학적 배경. 1994, *한국과학기술재단 연구 보고서*

- 12.민준기,김호연 : 한국인 류마티스 관절염환자에서 susceptible allele 가 질병 진행정도에 미치는 영향. *대한 류마티스학회지* 2:초록(29) 1995
- 13.Bozic B,et al : Sera from patients with rheumatic diseases recognize different epitope regions on the 52-kD Ro/SS-A protein. *Clin Exp Immunol* 94(2):227,1993
- 14.Ben-Chetrit, et al : Dissociation of immune responses to the SS-A(Ro) 52-kd and 60-kd polypeptides in systemic lupus erythematosus and Sjogren's syndrome. *Arthritis rheum* 33(3):349,1990
- 15.김호연,박동준,이경식,김부성,김동집:전신성 홍반루푸스에서 항 ENA 항체의 출현빈도및 임상적 의의. *대한내과학회잡지* 33(2):172,1987
- 16.Daniel P, et al : Autoimmune sera react with multiple epitopes on recombinant 52 and 60 kDa Ro(SSA) proteins. *J Rheumatol* 21:1073,1994
- 17.Frank M B, et al : Epitope mapping of the 52-kD Ro/SSA autoantigen. *Clin Exp Immunol* 95:390,1994
- 18.Barakat S, et al :IgG antibodies from patients with primary Sjogren's syndrome and systemic lupus erythematosus recognize different epitopes in 60-D SSA/Ro protein. *Clin Exp Immunol* 89:38,1992
- 19.Hal Scofield et al : A common autoepitope near the carboxy terminus of the 60-kD Ro ribonucleoprotein:sequence similarity with a viral protein. *J Clin Immunol* 11:378,1991
- 20.Buyon JP et al : Identification of mothers at risk for congenital heart block and other neonatal lupus syndromes in their children. *Arthritis rheum* 36:1263,1993
- 21.Wallace DJ, Hann BH: Dubois' lupus erythematosus.4th ed, 1993 *Lea & Febiger*. p216-232
- 22.Clark G, Rechlin M, Tomasi TB:Characterization of a soluble cytoplasmic antigen reactive with sera from patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol*. 102:117-120 1969
- 23.배상철,송관규,이인홍,유대현,김성운,김신규:전신성 류마티스 질환에서 항 ENA 항체에 관한 연구. *대한내과학회지* 45:422-436,1993
- 24.홍연식,조철수,박동준,김호연,김동집:전신성 홍반성 낭창과 Sjogren 씨 증후군에서 항 Ro항체 양성 환자의 임상적 고찰. *대한내과학회 추계학술 대회 초록*,1991

25. Harley JB, Rechlin M, Arnett FC, Alexander EL, Bias WB, Provost TT: Gene interaction at the HLA-DQ locus enhances autoantibody production in primary sjogren syndrome. *Science* 232: 1145, 1986
26. 박성환, 이상현, 조철수, 김호연: 전신성 홍반성 낭창환자에서 Immunoblot 법에 의한 항 ENA 항체 조사
27. Ricchiuti V, et al: Epitope mapping with synthetic peptides 52-kd SSA/Ro protein reveals heterogenous antibody profiles in human autoimmune sera. *Clin Exp Immunol* 95:397, 1994
28. J.C. Pyun, A.S. Jang, J.S. Park: Facile enzyme immobilization technique and assay method using PEI-cellulose TLC as a solid support. *Enzyme and Microbial Technology*. (in press), 1995
29. J.C. Pyun, A.S. Jang, J.S. Park: A new solid supporter for peptide synthesis having sequence tagging recognizable with naked eye. *International Journal of peptide and protein research*. (in press), 1995
30. J.C. Pyun, H.S. Choi, J.S. Park: Stopped lower buffer flow electrofractionation. *Anal Biochem*. 223:59, 1994
31. Atkinson J, Travis W, Slocum L, Ebbs W, Fox PC: Serum anti-SS B/La and IgA rheumatoid factor are markers of salivary gland disease activity in primary Sjogren's syndrome. *Arthritis rheum*. 35:1868, 1992
32. Mcneilage J, Macmillan E, Whittingham S: Mapping of epitopes on the La(SS-B) autoantigen of primary Sjogren's syndrome: identification of a cross-reactive epitope. *J Immunol*. 145:3829, 1990
33. Mcneilage J, Umapathysivam K, Macmillan E, Guidolin A, Whittingham S, Gordon T: Definition of a discontinuous immunodominant epitope at the NH2 terminus of the La/SS-B ribonucleoprotein autogene. *J Clin Invest*. 89:1652, 1992
34. Weng YM, McCluskey J, Mcneilage J, Gordon T, Topfer F: Identification of a human specific epitope in a conserved region of the La/SS-B autoantigen. *J Clin Invest*. 92:1104, 1993

- 별첨 1 -

항 Ro/SS-A 항체: 전신성 홍반성 루푸스환자에서의 임상적 의의와 그 주된 항원 결정인자*

가톨릭 의과대학 내과학교실, 강남 성모병원 루푸스 클리닉

민도준 · 노대근 · 민준기 · 홍연식 · 이상현 · 박성환 · 조철수 · 김호연

=Abstract=

Anti-Ro Antibody: Its Clinical Significance and Major Antigenic Determinant in Patients with Systemic Lupus Erythematosus

Do Jun Min, Dae Keun Lo, Jun Ki Min, Yeon Sik Hong, Sang Heon Lee, Sung Hwan Park, Chul Soo Cho and Ho Youn Kim

Lupus Clinic, Kangnam St. Mary's Hospital, Department of Internal Medicine, Catholic University Medical College, Seoul, Korea

Objectives: Anti-Ro antibody is one of the prominent anti-nuclear antibodies in patients with systemic lupus erythematosus(SLE). This study was designed to determine whether this antibody reacts with certain antigenic determinants and to evaluate the frequency and clinical associations of anti-Ro antibody in patients with SLE.

Method: Double immunodiffusion(DID) were used to detect anti-Ro antibody with sera from 151 patients with SLE. Western blot analysis was done in 57 patients who were positive for anti-Ro antibody in DID to find out the major antigenic determinant of Ro antigen. We evaluated the presence of anti-Ro antibody and associations with clinical features in SLE.

Result:

1) Anti-Ro by DID were positive in 56% (84 of 151 cases) of patients with SLE.

2) Photosensitivity(59% versus 27%, $P=0.0001$), cutaneous lesion of all types (80% versus 58%, $P=0.004$), malar rash (67% versus 49%, $P=0.025$), leukopenia (38% versus 22%, $P=0.036$) were closely associated with anti-Ro positivity. But there was no significant difference between anti-Ro positive and negative patients in other clinical findings such as sicca complex, thrombocytopenia and nephritis

3) In Western blot analysis, 38 of 57 Ro positive sera had antibodies to the 60-kD and the 52-kD peptide, 8 cases of them revealed antibody to the 60-kD peptide without concomitant antibody to the 52-kD, and only one had isolated presence of antibody to 52-kD peptide. Ten of immunodiffusion defined anti-Ro sera were not reactive with the Ro proteins by Western blot analysis.

Conclusions: In patients with SLE, the presence of anti-Ro antibody is closely associated with photosensitive cutaneous lesion and leukopenia, and the major antigenic determinant of anti-Ro sera in SLE is 60-kD peptide.

Key Words: Anti-Ro antibody, Major antigenic determinant, Systemic lupus erythematosus

서 론

전신성 홍반성 루푸스(systemic lupus erythematosus: SLE)는 명확한 발병원인은 밝혀지지 않았으나 다양한 자가항체와 면역복합체에 의해 전신의 조직과 세포의 손상이 발생하는 자가 면역 질환이다.

자가항체 중 항핵항체(antinuclear antibody)는 SLE를 비롯한 여러 교원성 질환에서 흔히 나타나며, 진단 및 질병활성도 판정에 중요한 지표가 될 뿐 아니라 질환의 발생에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다^{1,2}. 항Ro 항체는 SLE와 Sjgren 증후군 환자에서 나타나는 항핵항체의 하나로, SLE 환자에서 광과민성 피부발진³, 신병변⁴, sicca complex⁵, rheumatoid factor⁶, 임파구감소⁷ 등과 연관이 있는 것으로 보고되고 있으나, 그 임상적 의의에 관해서는 아직 이론이 많은 실정이다.

Ro 항원은 작은 ribonucleoprotein(RNP) 입자로서 60-kD Ro peptide 외에 52-kD peptide가 Ro 단백질의 일부임이 밝혀졌으며⁸, 이 peptide들에 대한 항체 반응의 특이성과 임상적인 의의에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다⁹.

국내에서도 SLE 환자에서 항Ro/SS-A 항체의 출현 빈도를 이중 면역확산법으로 조사하여 보고한 바 있으나¹⁰, 그 임상적 의의 및 항원결정 인자 등에 관한 연구보고가 없는 실정이다. 본 연구는 SLE 환자들을 대상으로 항Ro 항체의 빈도와 임상양상과의 관계를 분석하고, Western blot 법으로 항Ro 항체의 주된 항원결정 인자를 규명하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상

가톨릭 의대 부속 강남성모병원 루푸스 클리닉에 내원한 SLE 환자 중 미국 류마티스학회가 규정한 분류기준¹¹에 합당하고 혈청검사 및 임상 기록이 유용했던 환자 151명을 대상으로 하였다. 환자들의 평균연령은 32.2세(연령분포; 16-68세)였으며, 남자가 3명이었고 여자가 148명이었다.

2. 방법

151명의 환자 혈청으로 이중 면역확산법(double immunodiffusion)을 시행하여 항Ro 항체

를 조사하였으며, 57명의 항Ro 항체 양성 혈청으로 Western blot 법을 실시하였다. 그리고 대상 환자의 임상기록을 조사하여 항Ro 항체의 임상과의 연관성을 분석하였다.

1) 이중 면역확산법을 이용한 항Ro 항체의 검사

항원은 우비장추출항원(bovine spleen extract)를 사용하였고 항원 농도는 20µmg/dl 이었다. 면역확산법을 위한 agarose plate는 다음과 같은 방법으로 만들어 사용하였다.

agar(0.4gm), 0.1(vo/v) sodium azide, 100ml PBS(0.01M, pH 7.2, cold)를 flask에 넣어 magnetic stirrer로 저으면서 가열하였다. 이때 용액이 맑아지면서 끓기 시작하면 여과지로 거른 후 warm agar를 petri dish(1×5cm)에 각각 7ml 씩 넣어 냉장보관하였다. 중심 well에 항원을 100µl 넣고, 주변 well에 환자의 혈청을 동량 넣어 실온에 방치하여 48시간 혹은 72시간 후에 침전선(precipitin line)의 생성 유무를 확인하였다. 이때 주변 well에는 항Ro 항체 표준 대조 혈청(100µl)을 동시에 넣어 침전선의 일치여부를 관찰하였다.

2) Western blot 법에 의한 항Ro 항체의 항원 결정인자의 조사

HeLa cell extract (1mg/ml)를 항원으로 이용하여 Laemli¹²의 방법으로 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (이하 SDS-PAGE)를 시행한 후 nitrocellulose membrane에 전기이동시키고 1:500으로 희석한 항Ro 양성인 혈청과 반응시켰다. 이차항체로 horse radishperoxidase-conjugated antihuman IgG를 이용하여 검출하며, 기질로는 4-chloro-1-naphtol을 이용하여 발색시켰다.

3. 통계

통계학적 유의성은 x²-contingency table test로 분석하였다.

결 과

1. 항Ro 항체의 출현빈도

이중 면역확산법을 이용하여 항Ro 항체를 검출한 결과 전체 151예중 84예(56%)에서 양성으로 나타났다.

2. 항Ro 항체의 임상양상과의 연관성

광과민성이 항Ro 항체 양성군에서 59%로 음

ANTI-RO ANTIBODY IN SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS PATIENTS

Table 1. Clinical association of anti-Ro antibody in SLE patients (n=151)

	Anti-Ro antibody		Positive group	Negative group
	Relative risk	P value		
Photosensitivity	59%	27%	3.94	0.0001*
Cutaneous lesion, all types	80%	58%	2.85	0.004*
Malar rash	67%	49%	2.20	0.025*
Oral ulcer	29%	36%	0.71	0.337
Arthralgia	72%	71%	1.03	0.929
Nephritis	43%	54%	0.64	0.186
CNS involvement	12%	22%	0.46	0.082
Sicca complex	13%	14%	0.88	0.791
Serositis	14%	16%	0.86	0.744
Myositis	6%	13%	0.42	0.141
Leukopenia	38%	22%	0.18	0.036*
Thrombocytopenia	10%	13%	0.80	0.672

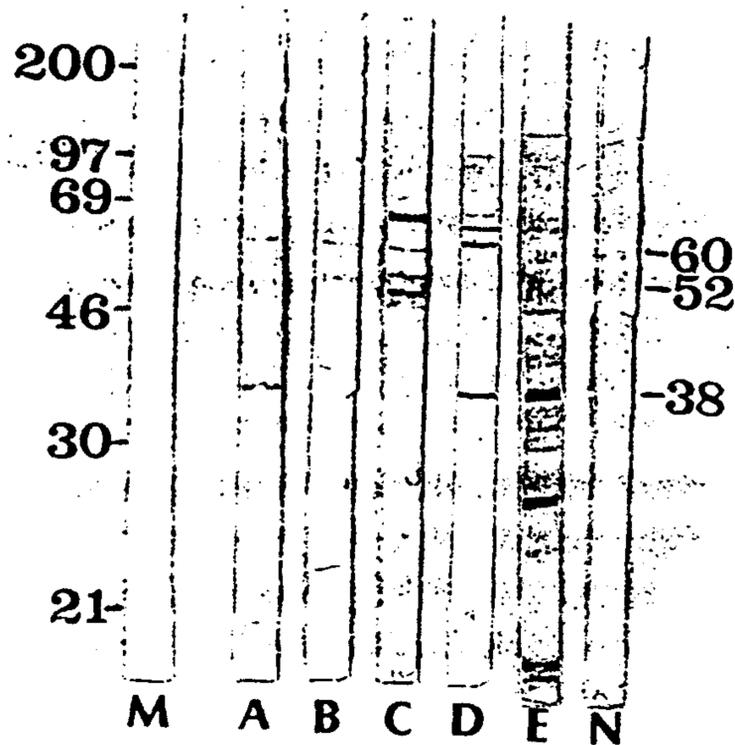


Figure 1. Immunoblotting of sera from patients with SLE(lanes A-E,M,N). Hela cell extract was used as an antigenic source. Lane M is the column of molecular weight marker and Lane N is the column of normal control.

Some of the SLE sera contained antibodies to both 60-kD and 52-kD antigens(Lanes B, C), while the others contained antibodies to only 60-kD antigen(Lanes A, D). Some of anti-Ro positive serum by DID shows negative for 52-KD and 60-KD by western blot analysis(Lane E)

성군의 27%보다 통계적으로 의미있게 높은 빈도를 보였으며(P=0.0001), 피부병변(80% vs 58%,

P=0.004), malar rash(67% vs 49%, P=0.025), 백혈구감소(38% vs 22%, P=0.036) 등도 항Ro 항체 양성군에서 음성군에 비해 그 빈도가 유의하게 높았다. 그러나 sicca complex, 혈소판감소, nephritis, 구강점막 궤양, 관절통, 중추신경병변, serositis, 근염 등은 양군간에 통계학적으로 유의한 차이가 없었다(Table 1).

3. Western blot 법에 의한 항Ro 항체의 항원 결정인자(antigenic determinants)

이중 면역확산법에서 항Ro 항체 양성으로 나타난 혈청중 Western blot 검사를 시행한 57 예에서 60-kD 과 52-kD peptide 에 대한 항체가 모두 양성인 경우는 38예(66.7%)이었고, 60-kD peptide 에 대한 항체만 양성인 경우는 8예(14.0%)이었다. Western blot 법에 의한 항Ro 항체 양성 혈청중 대부분 (47예 중 46예, 97.8%)에서 60-kD peptide에 대한 항체가 발견되었으며, 한 환자(1.8%)의 혈청에서만 52-kD peptide에 대한 항체가 단독으로 발견되었다. 또한 이중 면역확산법에서 항Ro 항체 양성으로 나타났으나 Western blot 법에서 60-kD 및 52-kD peptide에 대한 항체가 모두 음성인 경우는 10예(17.5%)이었다(Table 2, Fig 1).

4. 항 Ro 항체의 항원 결정인자 (antigenic determinants)와 임상양상과의 관계

60-kD 과 52-kD peptide 에 대한 항체가 모두

Table 2. Western blot analysis of double immunodiffusion defined anti-Ro sera

Result	No. of patient(%)
Positive for 60 & 52 KD	38 (66.7)
Positive for 60 kD only	8 (14.0)
Positive for 52 kD only	1 (1.8)
Negative for 52 & 60 kD	10 (17.5)
Total	57 (100)

Table 3. Correlation between antibody profile and clinical features in patients with SLE (n=46)

	52 kD & 60 kD positive group (n=38) (%)	60 kD positive group (n=8) (%)
Photosensitivity	22(57.9)	4(50.0)
Discoïd rash	13(34.2)	2(25.0)
Malar rash	31(81.6)	6(75.0)
Oral ulcer	19(50.0)	3(37.5)
Arthralgia	28(73.7)	8(100)
Nephritis	19(50.0)	4(50.0)
CNS involvement	6(15.8)	0(0.0)
Sicca complex	6(15.8)	2(25.0)
Serositis	13(34.2)	2(25.0)
Myositis	2(5.3)	1(12.5)
Leukopenia	22(57.9)	4(50.0)
Thrombocytopenia	5(13.2)	1(12.5)

양성인 38 명의 환자군과 60-kD peptide에 대한 항체만 양성인 8 예의 환자군에서 SLE 환자에서 관찰되는 특정 임상 양상의 출현 빈도를 조사하였으나 두군간에 통계적으로 유의한 차이는 관찰되지 않았다($p>0.05$, Table 3).

고 찰

항핵항체는 핵산 및 핵단백에 대한 자가항체로서 특히 SLE를 비롯한 교원성 질환 환자의 혈청에서 흔히 발견되며, 이들 질환의 발생에 중요한 역할을 할 것으로 보고되고있다¹³⁾.

항핵항체들과 반응하는 세포내 항원들은 DNA, histone, non-histone protein, non-histone protein/RNA complexes, nucleolar antigens 등이 있다. 이 핵항원들 중 염분으로 추출이 가능한 항원(extractable nuclear antigen: ENA)으로는 Sm 항원, UIRNP 항원, Ro 항원, La 항원, proliferating cell nuclear antigen

(PCNA), Scl-70 항원, PM-1 항원등이 있다¹⁴⁾.

ENA 중 Ro 항원에 대한 항체는 SLE 와 Sjgren 증후군에서 일어나는 자가면역 반응의 중요한 특징 중하나이다^{14,15)}. 항Ro 항체는 서구의 SLE 환자들에서 이중 면역확산법을 이용하여 검출하였을 때 약 25-50%에서 양성으로 나타나는 것으로 보고되고있다^{16,17,18)}. 본 연구에서는 이중 면역확산법에 의하여 항Ro 항체를 검출한 결과 56%의 양성율을 보여 서구의 SLE 환자들보다 약간 높은 빈도로 관찰되었으며, 김 등¹⁹⁾의 연구결과와 큰 차이가 없었다.

항Ro 항체의 임상적 의의에 관해서는 아직 논란이 많으나, 아급성 피부루푸스 (subacute cutaneous lupus)의 광과민성²⁰⁾, 신생아 루푸스 (neonatal lupus)의 원판형 피부발진 및 선천성 방실전도장애 등과 밀접한 관련이 있는 것으로 보고되고 있다^{21,22)}. 그리고 항핵항체 음성 루푸스 (ANA negative lupus) 환자중 60% 이상에서 이중 면역확산법에 의해 항Ro 항체가 검출되고 이들 환자들은 광과민성 피부염의 발생율이 높은 반면 신병변과 신경병변의 빈도는 적다고 한다²³⁾. SLE 환자에서 항Ro 항체는 광과민성 피부발진²⁴⁾, 신병변²⁵⁾, sicca complex²⁶⁾, rheumatoid factor²⁷⁾, 임파구감소 및 혈소판감소²⁸⁾, hypergammaglobulinemia²⁹⁾등과 연관이 있는 것으로 보고되고 있다.

본 연구에서는 광과민성, 피부병변, malar rash 및 백혈구감소증 등이 항Ro 항체 양성군에서 음성군에 비해 그 빈도가 유의하게 높았으나, nephritis, sicca complex, 혈소판 감소 등의 임상양상들은 양군간에 유의한 차이가 없었다. 서구의 환자들을 대상으로 했던 이전의 연구보고들과 다소 차이를 보이는데 이는 본 연구의 대상환자들이 서구의 환자들과는 면역·유전적 배경이 다른데에 기인할 것이라 생각된다.

Ro 항원은 Clark 등³⁰⁾에 의해 처음 보고되었으며 그 분자구조는 작은 ribonucleoprotein 입자로 구성되어 있고 4개의 작은 RNA(hY RNA) 중 하나와 결합하고있는 60-kD peptide로 되어있다³¹⁾. Ro 항원은 핵과 세포질내에 모두 존재할 수 있지만 세포질 내에 더 풍부히 존재하며 그 기능은 아직 밝혀지지 않은 상태이다. 최근에 52-kD peptide가 Ro ribonucleoproteins의 일부분임이 규명되었으며³²⁾ 이는 60-kD peptide와 동질성이 없는 amino acid sequence로 이루어져 있음이 밝혀졌으나³³⁾, Ro-RNA와의 연관성은 아직 명확치 않

다. 그 외 Ro peptide에서 또 다른 면역항원들이 존재하는 것이 밝혀졌는데, 적혈구의 60-kD peptide, 적혈구 및 혈소판의 54-kD peptide^{26,27} 및 calcium 결합 단백질인 calreticulin과 구조가 동일한 또 하나의 60-kD Ro protein이 확인되었다²⁸. 이 단백질의 기능 및 임상적 의의는 명확치 않으나, Reichlin²⁹은 항Ro 항체 양성인 환자에서 나타나는 임상증상의 다양성을 여러가지 Ro 항원에 대한 이질적 면역 반응의 결과로 설명하고 있다.

Ben-Chetrit 등¹²은 60-kD과 52-kD peptide에 대한 항체가 SLE 및 Sjögren 증후군 환자들에서 모두 나타날 수 있지만, 60-kD peptide에 대한 항체만 단독으로 나타나는 경우는 SLE에 국한되고, 역으로 52-kD peptide에 대한 항체만 단독으로 나타나는 경우는 Sjögren 증후군에 국한된다고 주장하고 있다. 본 연구에서는 이중 면역확산법에서 항Ro 항체 양성으로 확인된 혈청 중 Western blot 법에서 60-kD과 52-kD peptide에 대한 항체가 모두 양성인 경우가 66.7% 이었고, 60-kD peptide에 대한 항체만 양성인 경우는 14.1% 이었으며, 한 환자의 혈청에서 52-kD peptide에 대한 항체가 단독으로 발견되었다. 이 결과는 Ben-Chetrit 등¹²이 SLE에서는 52-kD에 대한 항체가 단독으로 나타나지 않는다는 보고와는 다소 차이가 있다. 이러한 차이의 원인으로서는 항 Ro 항체의 검사 방법의 차이를 고려할 수 있다. 즉 본 연구에서는 denatured 형태의 Ro 항원을 이용하는 immunoblotting 법인데 비하여 Ben-Chetrit 등¹²은 nature 형태의 Ro 항원을 이용하는 immunoprecipitation 방법이었다. 한편 이중 면역확산법에서 항Ro 항체 양성이었으나 Western blot 법에서 60-kD 및 52-kD peptide에 대한 항체가 모두 음성인 경우가 17.5%로 나타났다. 이는 Western blot 검사를 시행시 SDS-PAGE 과정에서 native protein에 포현되어 있는 epitope가 변성을 일으키기 때문인 것으로 생각된다¹².

항Ro 항체의 중요한 항원 결정인자(antigenic determinants)로 알려진 60-kD 항원에 대한 항체가 단독으로 양성인 환자군과 52-kD, 60-kD항원 모두에 대한 항체 양성인 환자군의 특정 임상 양상의 출현 빈도에는 통계적으로 유의한 차이가 관찰되지 않았다.

따라서 본 연구의 결과와 지금까지의 관련 문헌을 고찰해 보면 Ro 항원의 60-kD, 52-kD peptide에 대한 특이항체 존재 유무가 SLE와 Sjögren

증후군의 감별진단에 큰 도움이 될 것으로 생각되며, 특정 임상 양상과의 관련성을 명확히 규명하기 위해서는 항 Ro 항체 양성인 대상 환자수를 늘리고 다른 자가항체와의 관계등도 함께 조사해야 될것으로 생각한다.

요약하면 한국인 SLE 환자에서 항Ro 항체의 출현은 광과민성 피부 병변 및 백혈구감소 등의 임상양상과 연관이 있는 것으로 관찰되었다. SLE에서 항Ro 항체의 주된 항원결정인자는 60-kD peptide로 다른 질환에서 발견되는 항Ro 항체와의 감별에 도움이 되며, Ro 면역항원에 대한 특이 항체들의 임상적, 면역학적인 의미는 앞으로 계속 연구가 이루어져야 할 것으로 본다.

결 론

목적: 항Ro 항체는 전신성 홍반성 루푸스와 Sjögren 증후군 환자에서 나타나는 중요한 항체 항체의 하나이다. 본 연구는 전신성 홍반성 루푸스 환자에서 항Ro 항체와 임상양상과의 연관성을 조사하고 항Ro 항체의 주된 항원결정인자를 규명하고자 하였다.

방법: 전신성 홍반성 루푸스 환자 151명의 혈청으로 이중 면역확산법을 시행하여 항Ro 항체를 검사하였으며, 환자의 임상양상을 조사하여 항 Ro 항체와의 연관성을 분석하였다. 그리고 항Ro 항체 양성이었던 혈청 57예에서 Western blot 검사를 실시하여 주된 항원결정인자를 조사하였다.

결과: 이중 면역확산법에 의해 항Ro 항체를 검출한 결과 56%(151예 중 84예)에서 양성으로 나타났다. 광과민성(59% versus 27%, P=0.0001), 피부병변(80% vs 58%, P=0.004), malar rash(67% vs 49%, P=0.025), 백혈구감소(38% vs 22%, P=0.036) 등이 항Ro 항체 양성군에서 음성군에 비해 그 빈도가 의미있게 높았다. 그러나 sicca complex, 혈소판 감소 혹은 nephritis 등의 임상양상들은 양군간에 유의한 차이가 없었다. 항Ro 항체 양성 혈청을 Hela cell extract로 Western blot 검사를 시행한 결과 60-kD과 52-kD peptide에 대한 항체가 모두 양성인 경우는 66.7%(57예 중 38예), 60-kD peptide에 대한 항체만 양성인 경우는 14.0%(8예)이었다. 대부분의 항Ro 항체 양성(47예 중 46예, 97.8%)에서 60-kD peptide에 대한 항체가 발견되었으며, 한 환자의 혈청에서만 52-kD peptide에 대한 항체가 단독으로 발견되었다. 열명의 환자

혈청(17.5%)에서 이중 면역확산법으로 항Ro 항체 양성이었으나 Western blot에서 Ro 단백질에 대한 항체가 나타나지 않았다.

결론: 한국인 전신성 홍반성 루푸스 환자에서 항Ro 항체의 출현은 광과민성 피부병변 및 백혈구 감소 등의 임상양상과 연관이 있는 것으로 관찰되었으며, Ro 항체의 주된 항원 결정인자는 60-kD peptide 이었다.

REFERENCES

1. Tan E.M: Autoantibodies to nuclear antigens (ANA): their immunobiology and medicine. *Advances in immunology* 33: 167, 1978
2. Horman CE: Antinuclear antibodies in autoimmune disease: significance and pathogenicity. *Med Clin North America* 69:547, 1985
3. Christian CL, Elkon KB: Autoantibodies to intracellular proteins: clinical and biologic significance. *Am J Med* 80: 53, 1986
4. Mond CB, Peterson MGE, Rothfield NF: Correlation of anti-Ro antibody with photosensitivity rash in systemic lupus erythematosus patients. *Arthritis Rheum* 32: 202, 1989
5. Maddison PJ, Reichlin M: Deposition of antibodies to a soluble cytoplasmic antigen in the kidneys of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 22:858, 1979
6. Wasicek CA, Reichlin M: Clinical and serological differences between systemic lupus erythematosus patients with antibodies to Ro versus patients with antibodies to Ro and La. *J Clin Invest* 69:835, 1982
7. Hamilton RG, Harley JB, Bias WB, Roebber M, Reichlin M, Hochberg MC, Arnett FC: Two Ro (SS-A) autoantibody responses in systemic lupus erythematosus. Correlation of HLA-DR/DQ specificities with quantitative expression of Ro(SS-A) autoantibody. *Arthritis Rheum* 31: 496, 1988
8. Clark G, Reichlin M, Tomasi TB: Characterization of a soluble cytoplasmic antigen reactive with sera from patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 102:117, 1969
9. Bell DA, Komar R, Chodirker WB, Block J, Cairns E: A comparison of serologic reactivity among SLE patients with or without anti-Ro (SSA) antibodies. *J Rheumatol* 11:315, 1984
10. Harley JB, Alexander EL, Bias WB: Anti-Ro/SSA and anti-La/SSB in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 29:196, 1986
11. Ben-Chetrit E, Chan EKL, Sullivan KF: A 52-kD protein is a novel component of the SS-A/Ro antigenic particle. *J Exp Med* 167:1560, 1988
12. Ben-Chetrit E, Fox RI, Tan EM: Dissociation of immune responses to the SS-A(Ro) 52-kD and 60-kD polypeptides in systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 33:349, 1990
13. 김호연, 박동준, 이경식, 김부성, 김동집: 전신성홍반루푸스에서 항ENA 항체의 출현 빈도 및 임상적 의의. *대한내과학회잡지* 32: 172, 1987
14. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, Mcshane DJ, Rothfield NF, Scaller JG, Talal N, Winchester RT: The revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 25:1271, 1982
15. Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680, 1970
16. Maddison PJ, Skinner RP, Vlachoyiannopoulos P, Brennan DM, Hough D: Antibodies to nRNP, Sm, Ro(SSA) and La(SSB) detected by ELISA. *Clin Exp Immunol* 62:337, 1985
17. Reichlin M, Harley JB: Antibodies to Ro(SSA) and the heterogeneity of systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 14(Suppl.13):112, 1987
18. Scopelitis E, Biundo JJ, Alspaugh MA: Anti-SS-A antibody and other antinuclear antibodies in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 6:189, 1980
19. Reichlin M: Significance of the Ro antigen system. *J Clin Immunol* 6:339, 1986
20. Callen JP, Klein J: Subacute cutaneous lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 31: 1007, 1988
21. Buyon JP, Winchester R: Congenital complete

ANTI-RO ANTIBODY IN SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS PATIENTS

- heart block. A human model of passively acquired autoimmune injury. *Arthritis Rheum* 33:609, 1990
22. Mevorach D, Raz E, Shalev O, Steiner I, Ben-Chetrit E: Complete heart block and seizures in an adult with systemic lupus erythematosus. A possible pathophysiologic role for anti-SS-A/Ro and anti-SS-B/La autoantibodies. *Arthritis Rheum* 36:259, 1993
 23. Maddison PJ, Mogavero H, Provost TT, Reichlin M: The clinical significance of autoantibodies to a soluble cytoplasmic antigen in systemic lupus erythematosus and other connective tissue diseases. *J Rheumatol* 6:189, 1979
 24. Wolin SL, Steitx JA: The Ro small cytoplasmic RNPs: identification of the antigenic protein and its binding site on Ro RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:1996, 1984
 25. Chan EKL, Hamel JC, Buyon JP: Molecular definition and sequence motifs of the 52-kD component of human SS-A/Ro autoantigen. *J Clin Invest* 87:68, 1991
 26. Rader MD, O'Brien C, Liu YS, Harley JB, Reichlin M: Heterogeneity of the Ro/SSA antigen. Different molecular forms in lymphocytes and red blood cells. *J Clin Invest* 83:1293, 1989
 27. Itoh Y, Rader MD, Reichlin M: Heterogeneity of the Ro/SSA antigen and autoanti-Ro/SSA response: evidence of the four antigenically distinct forms. *Clin Exp Immunol* 81:45, 1990
 28. Itoh Y, Reichlin M: Ro/SS-A antigen in human platelets. *Arthritis Rheum* 34: 888, 1991
 29. McCauliffe DP, Zappi E, Lieu TS, Michalak M, Sontheimer RD, Capra JD: A human Ro/SS-A autoantigen is the homologue of calreticulin and is highly homologous with onchocercal RAL-1 antigen and an alysia "memory molecule". *J Clin Invest* 86:332, 1990
 30. Reichlin M: Molecular definition of the Ro (SSA) particle(s): a frequent target of autoimmunity in systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome. *British J Rheum* 30(supple 1):58, 1991

- 별첨 2 -

Clinical significances of antibodies to Ro/SS-A autoantigens and its subtypes in Primary Sjogren's syndrome.

Chul-Soo Cho, Sung-Hwan Park, Jun-Ki Min, Sang-Heon Lee, Ho-Youn Kim

*Rheumatology Clinic, Department of Medicine, Kangnam St. Mary's hospital,
Catholic University Medical College, Seoul, Korea.*

Corresponding author: Ho-Youn Kim

Department of Internal Medicine

Kangnam St. Mary's hospital

Catholic University Medical College

#505, Banpo-dong, Seocho-ku

Seoul, Korea

Acknowledgment: This work was supported by grants from the industrial utilization of biological function(Biotech 2000) and catholic medical center.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the patterns of Ro autoantigen recognition in Korean patients with primary Sjogren's syndrome (SS) and to investigate its clinical significance in SS.

Methods. Sera from primary SS (n=51) and systemic lupus erythematosus (SLE) (n=132) were tested by double immunodiffusion test and immunoblotting for reactivity with 60-kDa and 52-kDa Ro/SS-A proteins. Clinical manifestations were evaluated on the basis of presence of anti-Ro/SS-A antibodies and anti-60 kDa/52 kDa proteins.

Results. The prevalence of anti-Ro/SS-A antibodies in Korean patients with primary SS was 64.7%. In immunoblotting analysis, the incidence of anti-60 kDa without anti-52 kDa was lower in patients with SS (3.0% vs 11.6%, $p>0.05$), whereas anti-52 kDa without anti-60 kDa was more common in SS patients than in SLE patients (42.5% vs 4.3%, $p<0.001$). The patients with anti-Ro antibody was significantly associated with presence of vasculitis, hyperglobulinemia, rheumatoid factor in primary SS ($p<0.05$)

Conclusion The patterns of 52 kDa and 60 kDa Ro autoantigen recognition was quite different in the SLE and primary SS. Anti-52 kDa without anti-60 kDa antibody may be used as a diagnostic marker for primary SS. Although the presence of anti-Ro/SS-A antibody was closely associated with certain clinical features in SS, we could not find any related findings between antibodies against each 52 kDa and 60 kDa proteins. Extended studies with large population are required to determine the clinical correlation of autoantibodies against each peptides or epitopes of Ro/SS-A proteins.

Key Indexing Words: Sjogren syndrome, Systemic lupus erythematosus, anti-Ro antibody, 52 kDa and 60 kDa Ro proteins.

INTRODUCTION

Anti-SS-A(Ro) antibodies is found in 35 to 60 % of active and/or subacute systemic lupus erythematosus (SLE) and 60-70% of patients with primary Sjogren syndrome (SS)^{1,2)}. Anti-SS-A (Ro) antibody in these diseases has been claimed to be in the pathogenesis of certain clinical features³⁾. However, the mechanism by which this antibody lead to tissue injury is unknown. Anti-Ro/SS-A antibodies have classically been identified by immunodiffusion in agarose gel. Using immunoprecipitaion and immunoblot analysis, anti-Ro/SS-A antibodies was shown to target 60-kDa and 52-kDa Ro/SS-A proteins. Previous studies in enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunoblotting assay have described different patterns of anti-60-kDa and anti-52-kDa Ro responses between patients with primary SS and patients with SLE. In the present study we evaluate the antibody responses of 60-kDa and 52-kDa Ro proteins and their clinical significances in Korean patients with primary SS.

Patients and Methods

Patients. Fifty-one patients with primary Sjogren's syndrome and 132 patients with SLE who were seen in Rheumatology clinic of Kangnam St. Mary's hospital were studied. Patients were classified as having primary SS if they met at least 3 of the Fox criteria⁸⁾. The diagnosis of SLE was established by the criteria of American College of Rheumatology⁹⁾. The mean age of Sjogren's syndrome and SLE patients were 41 years (21 - 65 years) and 32 years (14 - 53 years) respectively. Clinical data were obtained by review of hospital records.

Double immunodiffusion. Antibodies to Ro/SS-A antigens were identified by double immunodiffusion using bovine spleen extract as antigen (BSE-1000, Immunovision, Springdale, AR, USA)

Immunoblotting analysis. The Hela cell extract were separated on 10% polyacrylamide gels by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred to nitrocellulose membrane and tested for immunoreactivity using standard immunoblotting methods¹⁰⁾. The nitrocellulose strips were then incubated with a 1: 500 dilution of serum and washed for 1 hour in PBS-Tween. Horseradish peroxidase conjugated goat anti-human IgG(Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA) was used as the second antibody.

Statistical analysis. Chi-square testing with Yates' correction was used to evaluate the frequency of antibody to 60-kDa and 52-kDa Ro proteins in patients with primary SS and SLE and investigate the correlation between clinical manifestation and autoantibodies. P value less than 0.05 were considered significant.

Results

1. Frequency of antibodies against the 52 kDa and 60 kDa Ro/SS-A antigen

The frequency of anti-Ro/SS-A antibody positivity of the primary SS and SLE patients was listed in Table I. Anti-Ro/SS-A antibody detected by double immunodiffusion method were 64.7 % in primary SS and 52.3 % in SLE respectively. Anti-La/SS-B antibodies were noted in 29.4 % of sera with primary SS and 12 % of sera with SLE respectively.

To determine the pattern of antibody response against Ro/SS-A antigen, anti-Ro/SS-A positive sera in double immunodiffusion test were studied by immunoblot analysis. The pattern of reactivity against to denatured 60-kDa and 52-kDa Ro antigen was shown in table 1. Out of the 33 primary SS patients, 13 (39.5%) patients showed positivity to both proteins, whereas only one (3 %) had antibodies to 60-kDa antigen only. Fourteen (42.5 %) of the patients with primary SS had antibodies to 52-kDa protein only, and 5 (15 %) had no reactivity to 52-kDa or 60-kDa proteins. In patients with SLE, forty (58 %) sera reacted with both 60-kDa and 52-kDa proteins, eight (11.6 %) reacted with 60-kDa protein only. Antibodies to 52-kDa protein only were detected in 3 sera (4.3 %), while 18(26%) were nonreactive to both the proteins. The incidence of anti-52 kDa without anti-60 kDa was more common in patients with primary SS than in those with SLE(42.5% vs 4.3%, $p < 0.001$)

2. Correlation between antibody profile and clinical features in patients with primary SS.

On the basis of association between anti-Ro/SS-A antibody and clinical manifestations of Sjogren's syndrome, as shown in Fig.1, anti-Ro/SS-A antibody positive group were closely associated with the presence of hyperglobulinemia(17/33 versus 2/18, $p = 0.004$), rheumatoid factor positivity(26/33 versus 8/18, $p = 0.029$) and anti-La/SS-B antibodies positivity (13/33 versus 2/18, $p = 0.012$) and cutaneous vasculitis (7/33 versus 0/18, $p = 0.036$).

However, no significant differences could be demonstrated between anti-52-kDa only positive group and both anti-60 and 52 kDa positive group, which are the two major antibodies to Ro/SS-A antigen regarding the prevalence of hyperglobulinemia(7/14 versus 5/13), rheumatoid factor positivity(11/14 versus 12/13) or cutaneous vasculitis (3/14 versus 3/13) (fig 2). Anti-52-kDa antibody only was more commonly associated with the

anti-La/SS-B antibodies(7/14 versus 4/13, $p>0.05$), but this was also not statistically significant.

DISCUSSIONS

Anti-SS-A/Ro autoantibodies are found in the sera of patients with SLE and SS. The percentages in different studies reported in the literature range from 38 % to 96 % in primary SS and from 12 to 69 % in SLE^{6,11}. In the present study, using immunodiffusion, the frequency of anti-Ro antibody was 64.7 % in primary SS patients and 52.3 % in SLE patients. The frequency of anti-SS-A antibodies in Sjogren's syndrome seen in our study may seem low but compares well with recent results reported by Chan et al¹². However, in the Korean patients with SLE, the prevalence of anti-Ro antibody was higher than that of Caucasian or Western countries¹³⁻¹⁵. Ben-Chetrit et al. reported that prevalence of anti-Ro antibody was 57 % which is in keeping the prevalence of this study. The prevalences of anti-Ro/SS-A antibodies in Korean patients with SLE were very similar to those of the Ben-Chetrit et al study, but different from those of Maddison et al¹⁵ (20%). Pertinent to the reason of different prevalence are selection bias, different genetic background and detection methods including antigen extract. It has been demonstrated that occurrence of anti-Ro antibody are associated with certain HLA alleles although differences are exist. Previous study reported that the HLA DR3, which was linked to the occurrence of anti-Ro/SS-A antibody, was not common in oriental SLE including Korean^{16,17}. The relatively high prevalence of anti-Ro/SS-A in our SLE patients deserves further study to determine the possible involvement of genetic factors in the development of anti-Ro/SS-A antibody.

Anti-Ro positive sera contain two sets of antibody populations, directed to the 60-kd and the 52-kd polypeptide component of Ro proteins. It has been reported that that disease state influenced autoantigen recognition from the findings of different serum antibody responses to 60-kDa and 52-kDa Ro proteins in primary SS and SLE.

Simultaneous detection of antibodies to 60-kDa and 52-kDa was revealed by immunoblotting analysis with sera whose anti-Ro/SS-A antibody were positive by DID. The frequency of antibodies to 52-kDa and 60-kDa by immunoblot analysis were shown in table 1. The prominent patterns associated with primary SS were antibodies to both the 60-kDa and 52-kDa Ro proteins and 52-kDa Ro alone. Anti-52-kDa Ro without anti-60-kDa Ro was a response that occurred more commonly in primary SS than SLE sera. Our results also

confirm the reports of Ben-Chetrit et al⁴⁾ and Tsuzaka et al²⁰⁾ that there are differences between primary SS and SLE in their immune responses to the SS-A/Ro particle. Previous reports demonstrate that anti-52 kDa without anti-60 kDa antibody was found only in SS and was not detected in the SLE¹⁸⁻²²⁾. This difference might depend on the method that detects Ro/SS-A antigens. We defined anti-Ro/SS-A antibodies by immunoblots, which detect antibodies to denatured Ro/SS-A antigens, while the report of Ben-Chetrit et al. was performed by the immunoprecipitation method, in which Ro/SS-A antigen is in native form.

Anti-SS-A/Ro antibodies have been demonstrated to be related to subacute cutaneous lupus erythematosus, photosensitive rash, xerophthalmia, congenital heart block in patients with SLE, although controversy exists regarding the association of antibodies against the SS-A/Ro antigen and particular features of SLE. Several studies have been shown correlations between clinical manifestations of SS and the presence of anti-Ro/SS-A antibodies. In patients with SS, as shown in figure 1, anti-Ro/SS-A antibody positive group were correlated with the clinical manifestations of cutaneous vasculitis, hyperglobulinemia, rheumatoid factor and anti-La/SS-B antibody positivity. These findings are similar with the reports of Alexander et al. and Harley et al²³⁾²⁴⁾.

In the patients with anti-Ro/SS-A antibody positive sera, when we compare the clinically significant manifestations in SS patient with anti-Ro/SS-A antibodies and anti-60-kDa and anti-52-kDa, we could not notice the difference between anti-52 kDa only positive group and both anti-60 and 52-kDa positive group which are the major determinant of anti-Ro antibodies. However, the number of patients with extraglandular manifestation observed in our study was not large enough to enable significant conclusions to be drawn.

In summary, the pattern of Ro/SS-A autoantigen recognition was different in the SLE and primary SS. Anti-52-kDa Ro without anti-60-kDa Ro was a response that occurred more commonly in primary SS than SLE sera, and possibly served to distinguish the two disease entities. Although anti-Ro antibody was associated with the presence of some clinical manifestation in patients with primary SS, these findings were not correlated with the presence of antibodies against 60 kDa or 52 kDa protein. Additional studies are required to determine the exact correlation between antibodies against each peptide of 52 kDa or 60 kDa Ro/SS-A protein and certain clinical manifestations.

References

1. Barakar S, Meyer O, Torterotot F, Youinou P, Briand JP, Kahn MF. IgG antibodies from patients with primary Sjogren's syndrome and systemic lupus erythematosus recognize different epitopes in 60-kD SS-A/Ro protein. *Clin Exp Immunol* 89 : 38-45, 1992
2. Chan EKL, Tan EM. Epitopic targets for autoantibodies in systemic lupus erythematosus and Sjogren syndrome. *Curr Op Rheumatol* 1: 376-381, 1989
3. Meilof J F. Autoantibodies against small cytoplasmic ribonucleoproteins : the anti-Ro/SS-A and anti-La/SS-B autoimmune response. *Rheumatol Int* 12 : 129-140, 1992
4. Ben-Chetrit E, Fox RI, Tan EM. Dissociation of immune responses to the SS-A(Ro) 52-kd and 60-kd polypeptides in systemic lupus erythematosus and Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 33 : 349-55, 1990
5. Meilof JF, Bantjes I, De Jong J, Van Dam AP, Smeenk RJT. The detection of anti-Ro/SS-A and anti-La/SS-B antibodies. *J Immunol Methods* 133 : 215-226, 1990
6. Bozic B, Pruijn G J M, Rozman B, Van Venrooij WJ. Sera from the patients with rheumatic diseases recognize different epitope regions on the 52-kD Ro/SS-A protein. *Clin Exp Immunol* 94 : 227-235, 1993
7. McCauliffe DF, Yin H, Wang L, Lucas L. Autoimmune sera react with multiple epitopes on recombinant 52 and 60 kDa Ro(SSA) proteins. *J Rheumatol* 21: 1073-80, 1994
8. Fox RI, Robinson CA, Curd JG, Kozin F, Howell FV. Sjogren's syndrome : proposed criteria for classification. *Arthritis Rheum* 29 : 577-585, 1986
9. Tan EM, Cohen AS, Fries JP, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, Schaller JG, Talal N, Winchester RJ. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 25 : 1271-1277, 1982

10. Towbin H, Staehelin T, Gordon J : Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA 76:4350-4354, 1979
11. Reichlin M. Significance of the Ro antigen system. J Clin Immunol 6:339-348, 1986
12. Chan EKL, Andrade LEC. Antinuclear antibodies in Sjogren's syndrome. Rheum Dis Clin North Am 18:551-570, 1992
13. Kim HY, Park DJ, Lee KS, Kim BS, Kim DJ: The frequencies and clinical significances of autoantibodies to extractable nuclear antigens in systemic lupus erythematosus. Korean J Int Med 32: 172-9, 1987
14. Boey ML, Peebles CL, Tsay G, Feng PH, Tan EM, Clinical and autoantibody correlations in orientals with systemic lupus erythematosus. Ann Rheum Dis 47: 918-923, 1988
15. Maddison PJ, Mogavero H, Provost TT, Reichlin M. Antibodies to Ro(SSA). The clinical significance of autoantibodies to a soluble cytoplasmic antigen in systemic lupus erythematosus and other connective tissue disease. J Rheumatol 6:189-195, 1979
16. Hong KH, Kim HY, Takeuchi F, Nakano K, Yamada H, Matsuta H, Han H, Tokunaga K, Ito K, Park KS, Association of complement C4 and HLA-DR alleles with systemic lupus erythematosus in Korean. J Rheumatol 21:442-447, 1994
17. Hartung K, Ehrfeld H, Lakomek HJ, Coldeway R, Lang B, Krapf F, Muller R, Schendel D, Deicher H, Seelig HP. The genetic basis of Ro and La antibody formation in systemic lupus erythematosus. Results of a multicenter study. Rheumatol Int 11:243-249, 1992
18. Ricchiuti V, Briand JP, Meyer O, Isenberg DA, Pruijn G, Muller S. Epitope mapping with synthetic peptides of 52-kD SS-A/Ro protein reveals heterogeneous antibody profiles in human autoimmune sera. Clin Exp Immunol 95:397-407, 1994

19. Boire G, Lopez-Longo F, Lapointe S, Menard H. sera from patients with autoimmune disease recognize conformational determinants on the 60-kd Ro/SS-A protein. *Arthritis Rheum* 34:722-730, 1991
20. Tsuzaka K, Fujii T, Akiuki M, Mimori T, Tojo T, Fujii H, Tsukatani Y, Kubo A, Homma M. Clinical significance of antibodies to native or denatured 60-kd or 52-kd Ro/SS-A protein in Sjogren syndrome. *Arthritis Rheum* 37:88-92, 1994
21. Slobbe RL, Pruijn GJM, Damen WGM, Van der Kemp JWCM, Van venrooij WJ. Detection and occurrence of the 60-kd and 52-kd Ro(SS-A) antigens and of autoantibodies against these proteins. *Clin Exp Immunol* 86:99-105, 1991
22. Frank MB, Itoh K, McCubbin V. Epitope mapping of the 52 kDa Ro/SS-A autoantigen. *Clin Exp Immunol* 95: 390-396, 1994
23. Alexander EL, Arnett FC, Provost TT, Stevens MB. Sjogren's syndrome: association of anti-Ro(SS-A) antibodies with vasculitis, hematologic abnormalities and serologic hyperactivity. *Ann Intern Med* 98:155-159, 1983
24. Harley JB, Alexander EL, Bias WB, Fox OF, Provost TT, Reichlin M, Yamagata H, Arnett FC. Anti-SS-A(Ro) and anti-SS-B(La) in patients with Sjogren syndrome. *Arthritis Rheum* 29: 196-206, 1986

Table 1. Frequencies of antibodies to Ro protein and La protein in patients with primary SS and SLE

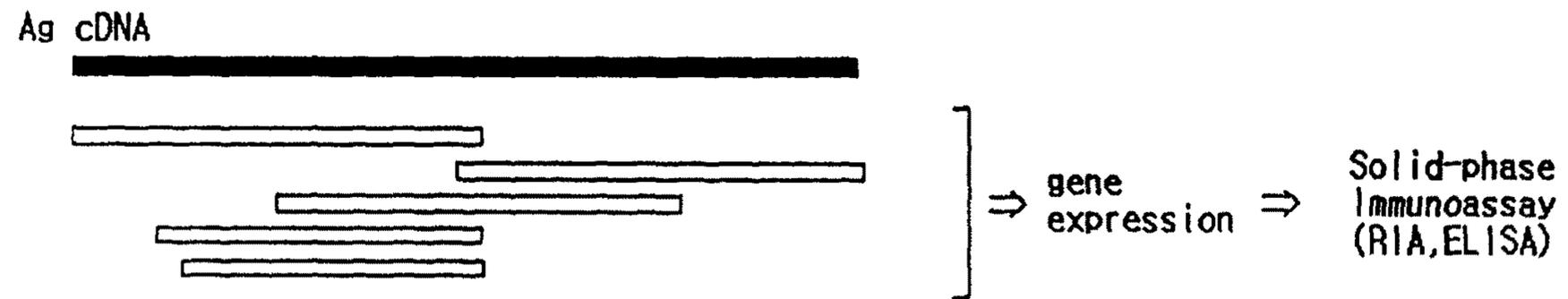
	primary SS	S L E
Immunodiffusion	n=51 (%)	n=132 (%)
anti-Ro/SS-A	33 (64.7)	69 (52.3)
anti-La/SS-B	15 (29.4)	16 (12.0)
Immunoblotting	n= 33 (%)	n= 69 (%)
60kDa(+)/52kDa(+)	13 (39.5)	40 (58.0)
60kDa(+)/52kDa(-)	1 (3.0)	8 (11.6)
60kDa(-)/52kDa(+)	14 (42.5)*	3 (4.3)
60kDa(-)/52kDa(-)	5 (15.0)	18 (26.0)

*: p <0.001, Odds ratio: 16.21, Fisher exact test was performed

- 별첨 3 -

Epitope mapping

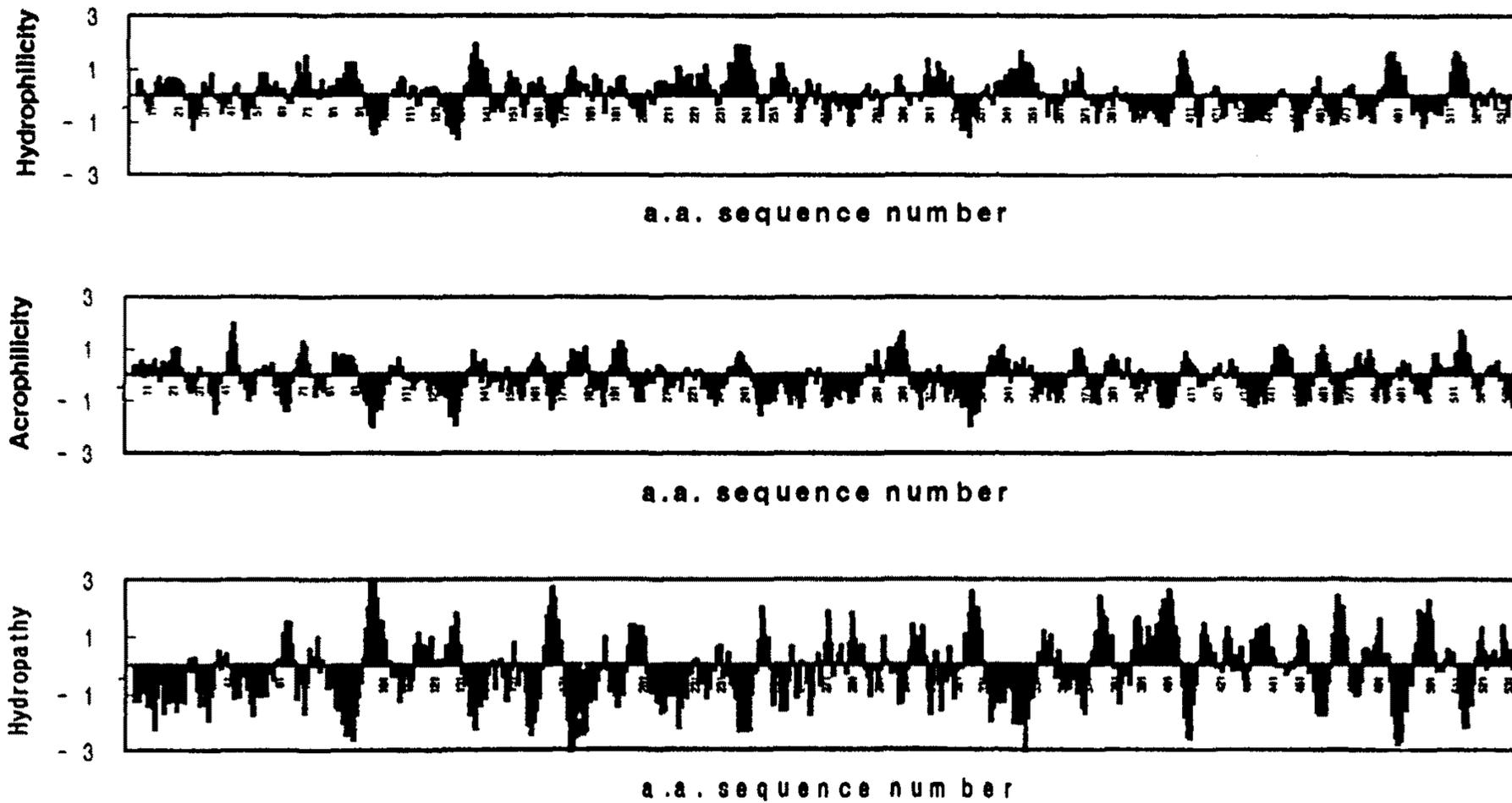
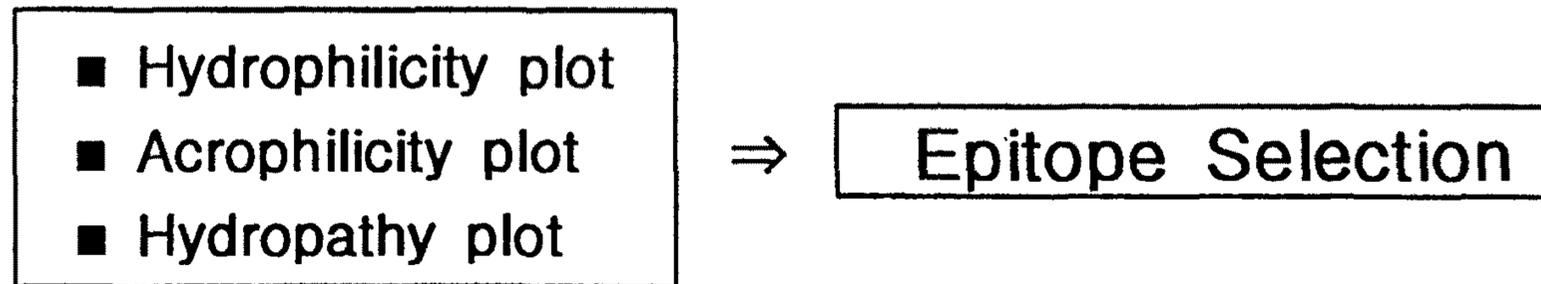
■ Method using recombinant technique



■ Method using sequential overlapping peptide



Prediction of epitopes by simple computer analysis



Selected Epitopes by computer analysis

1 MEESVNQMQP LNEKQIANSQ DGYVWQVTDM NRLHRFLCFG SEGGT⁴⁶YYIKE
EP60_01

51 QKLGL⁵⁵ENAEA LIRLIEDGRG CEVIQEIKSF SQEGRTTKQE PMLFALAIC¹⁰⁰S

101 QCSDISTK¹⁰⁸QA AFKAVSEVCR IPTHLFT¹²⁸FIQ FKKDLKE¹³⁷SMK CGMWGRALRK
EP60_02 **EP60_03**

151 AIADWYNEKG GMALALA¹⁶⁸VTK YKQRNG¹⁷⁶WSHK DLLRLSHLKP SSEGLAIVTK
EP60_04

201 YITKGWKEVH ELYKEKALSV ETEKLLK²²⁸YLE AVEKVKR²³⁷TKD ELEVHILIEE
EP60_05

251 HRLVREHLLT NHLKSKEVWK ALLQEMPLTA LLRNLGKMTA NSVLEPGNSE

301 VSLVCEKLCN EKLLKKARIH PFHILIALET YKT³³⁴GHGLRGK LKW³⁴³RPDEEIL
EP60_06

351 KALDAAFYKT FKTVEPTGKR FLLAVDVSAS MNQRVLGSIL NASTVAAAMC

401 MVVTRTEKDS YVAFSDEM VPCPVTTDMTL QQVLMAMSQI PAGGTDCSLP

451 MIWAQKTNTP ADVFIVFTDN ETFAGGVHPA IALREYRKKM DIPAKLIVCG

501 MTSNGFTIAD PDDRGMLDMC GFDTGALDVI RNFTLDMI

Antigen	Peptide Antigen	Peptide Antigen modified with ϵ -aminocaproic acid (Ahx)
		
	<ul style="list-style-type: none"> ● peptide coating ==> overnight ! ● glutaraldehyde, poly-L-lysine, CNBr treatment is needed. ● modified microplates with chemical functional groups are needed. 	<p>enhanced hydrophobicity by Ahx ==> only 1hr is needed when coating.</p>
<ul style="list-style-type: none"> ● conformational change when adsorbed to the solid phase ● epitope masking 	<p>conformation as in a soluble antigen is conserved ?</p>	<p>conserved conformation as in a soluble antigen because both terminals are fixed by Ahxs</p>

■ 60kD Ro-SSA Antigen

■ Total Sequence & its Continuous Epitopes

1 MEESVNQMQP LNEKQIANSQ DGYVWQVTDM NRLHRFLCFG SEGGT⁴⁶YYIKE
EP60101

51 QKLGL⁵⁵ENAEA LIRLIEDGRG CEVIQEIKSF SQEGRTTKQE PMLFALAIC¹⁰⁰S

101 QCSDISTK¹⁰⁸QA AFKAVSEVCR IPTHLFT¹²⁸FIQ FKKDLKE¹³⁷SMK CGMWGRALRK
EP60102 **EP60103**

151 AIADWYNEKG GMALALA¹⁶⁸VTK YKQRNG¹⁷⁶WSHK DLLRLSHLKP SSEGLAIVTK
EP60104

201 YITKGWKEVH ELYKEKALSV ETEKLLK²²⁸YLE AVEKVKR²³⁷TKD ELEVHILIEE
EP60105

251 HRLVREHLLT NHLKSKEVWK ALLQEMPLTA LLRNLGKMTA NSVLEPGNSE

301 VSLVCEKLCN EKLLKKARIH PFHILIALET YKT³³⁴GHGLRGK LKW³⁴³RPDEEIL
EP60106

351 ³⁵¹KALDAAFYK³⁵⁹T FKTVEPTGKR FLLAVDVSAS MNQRVLGSIL NASTVAAAMC
EP60107

401 MVVTRTEKDS YVVAFSDEM VPCPVTTDMTL QQVLMAMSQI PAGGTDCSLP

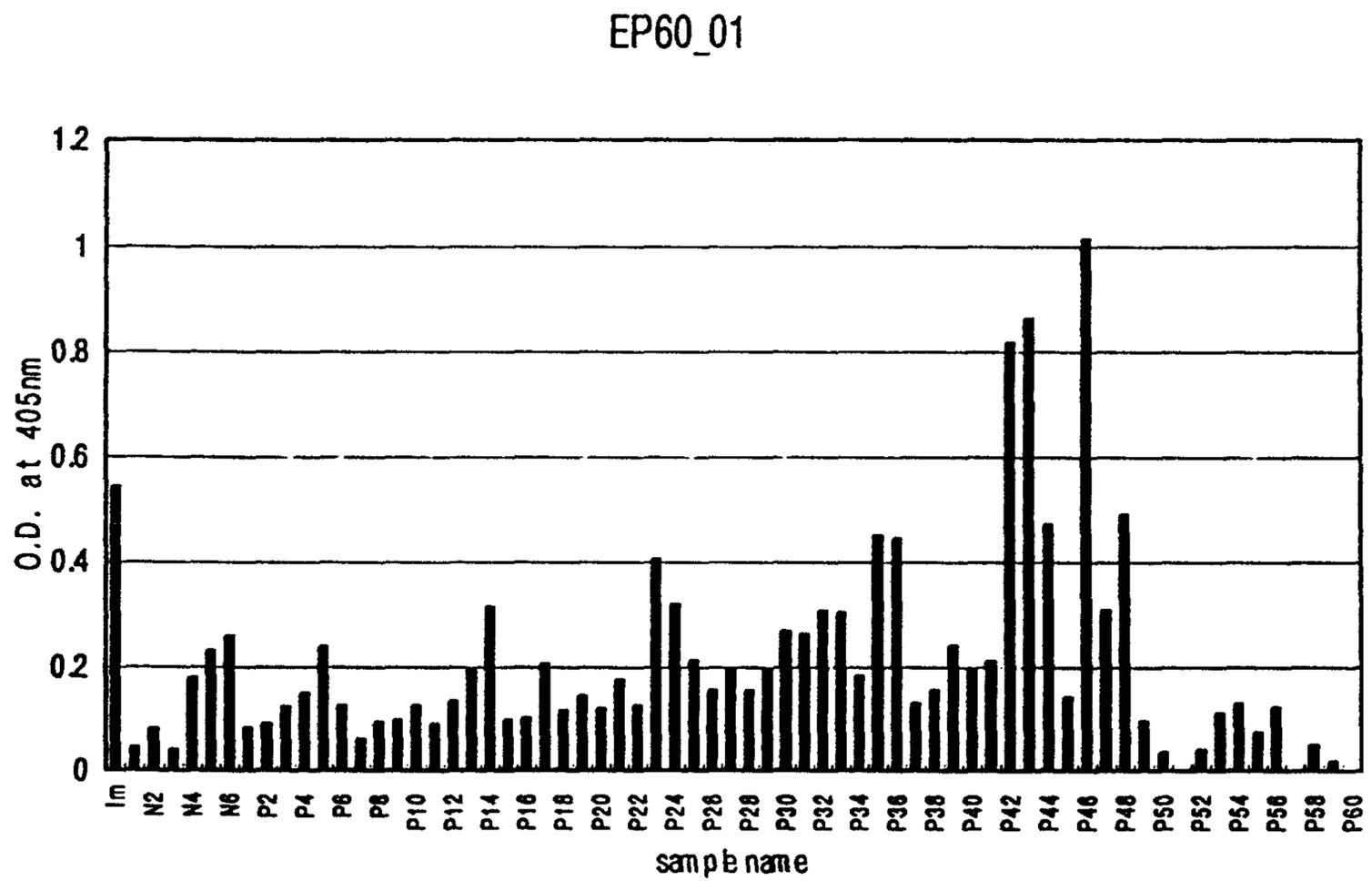
451 MIWAQKTNTP ADVFIVFTDN ETFAGGVHPA IALREYRKKM DIPAKLIVCG

501 MTSNGFTIAD PDDRGMLDMC GFDTGALDVI RNFTLDMI

■ Epitope Name : EP60_01

■ Sequence of EP60_01 ;

(Ahx)₂-Thr-⁴⁶Tyr-Tyr-Ile-Lys-Glu-Gln-Lys-Leu-Gly-Leu⁵⁵-Trp-(Ahx)₂

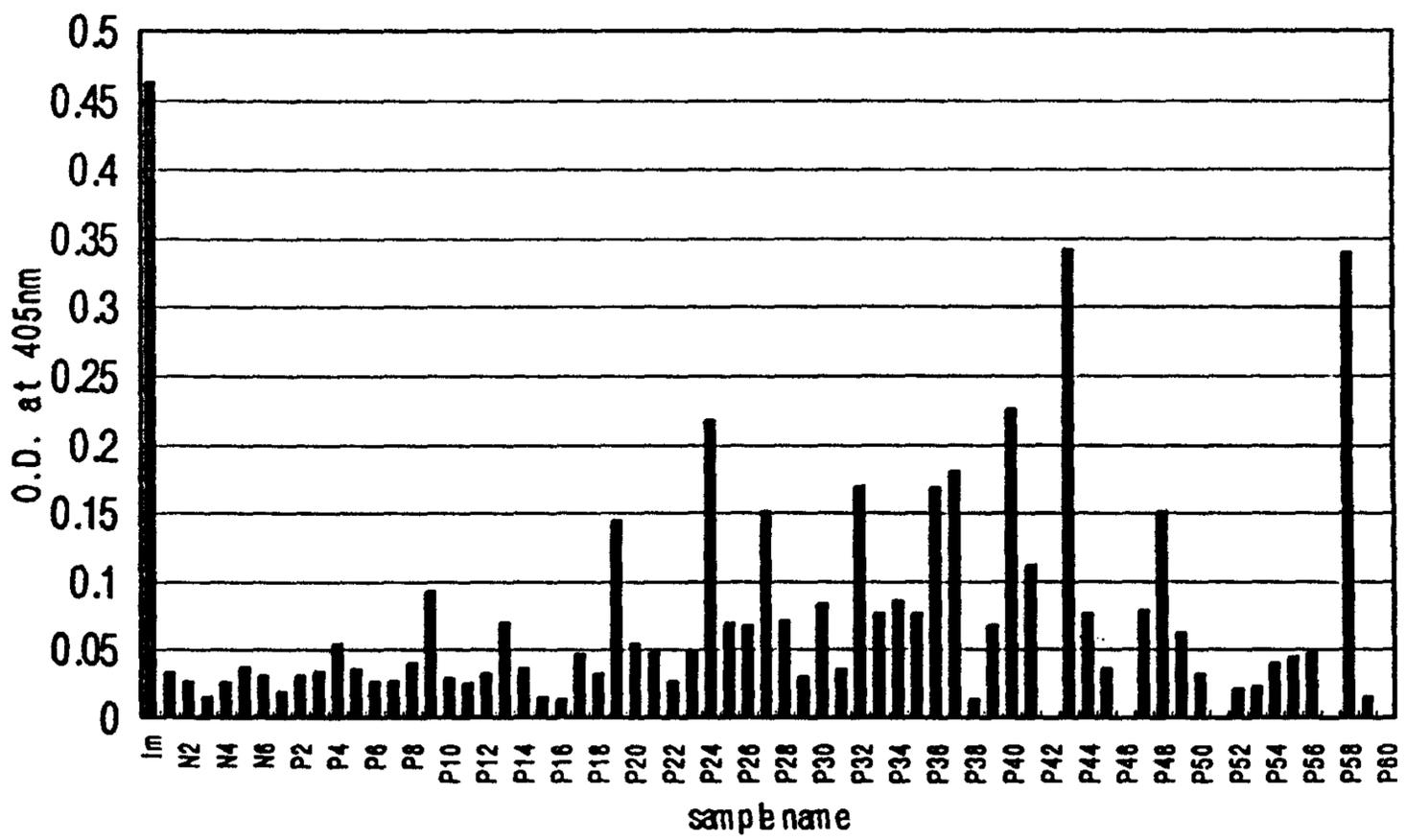


■ Epitope Name : EP60_02

■ Sequence of EP60_02 ;

(Ahx)₂-Trp-Cys⁻¹⁰⁰Ser-Gln-Cys-Ser-Asp-Ile-Ser-Thr-Lys¹⁰⁸-(Ahx)₂

EP60_02

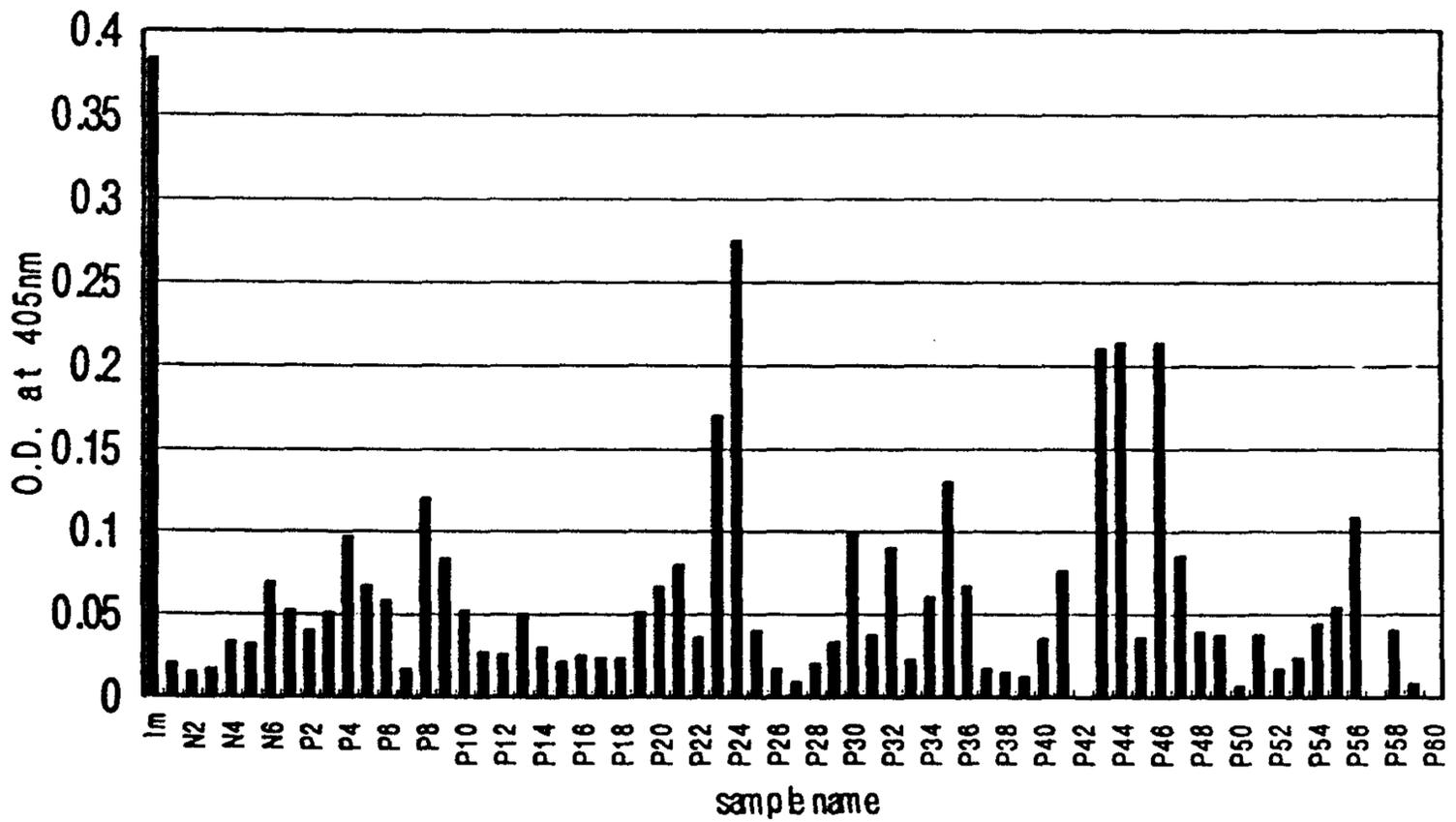


■ Epitope Name : EP60_03

■ Sequence of EP60_03 ;

(Ahx)₂-Trp-Thr-¹²⁸Phe-Ile-Gln-Phe-Lys-Lys-Asp-Leu-Lys-Glu¹³⁷-(Ahx)₂

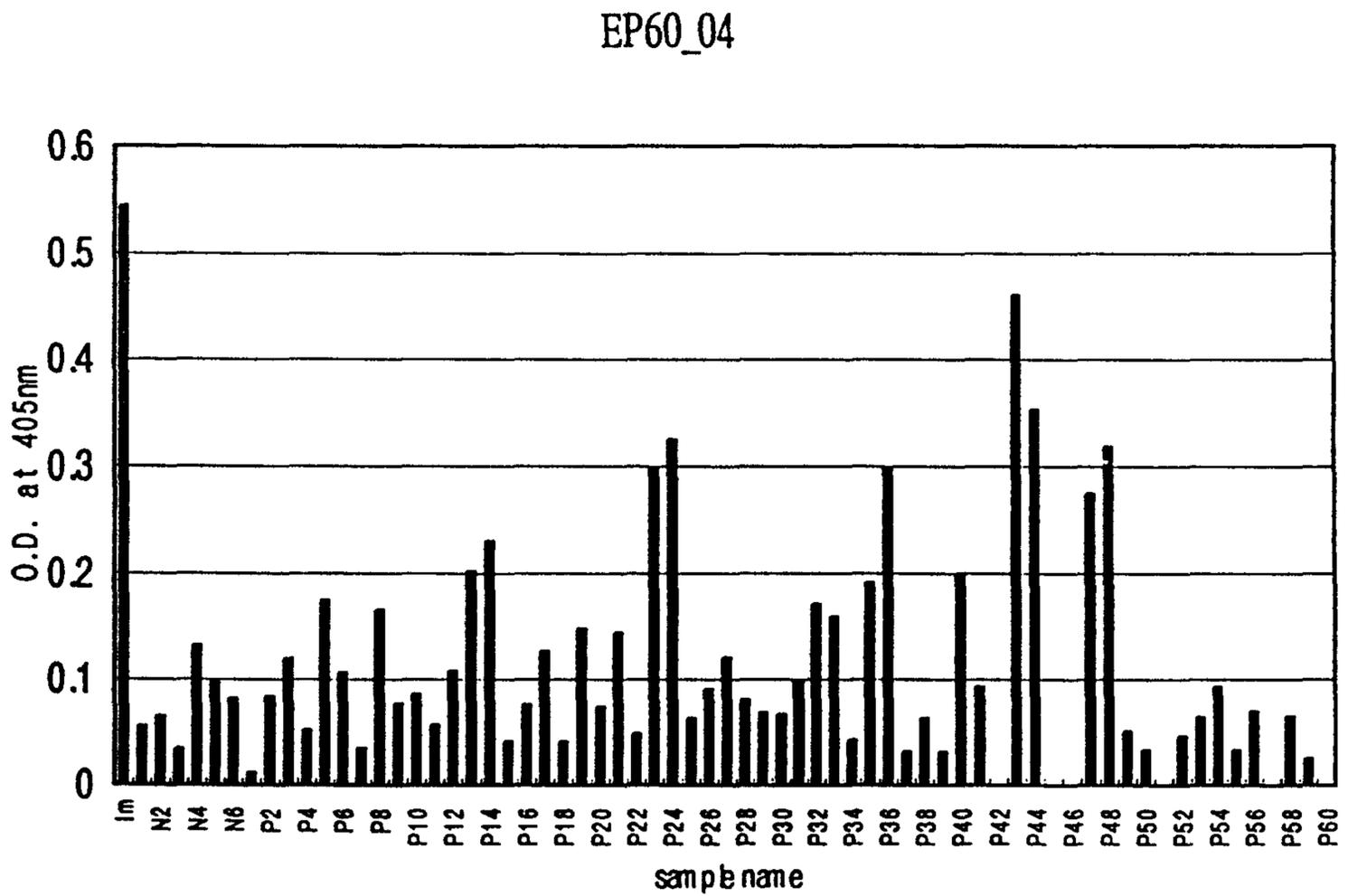
EP60_03



■ Epitope Name : EP60_04

■ Sequence of EP60_04 ;

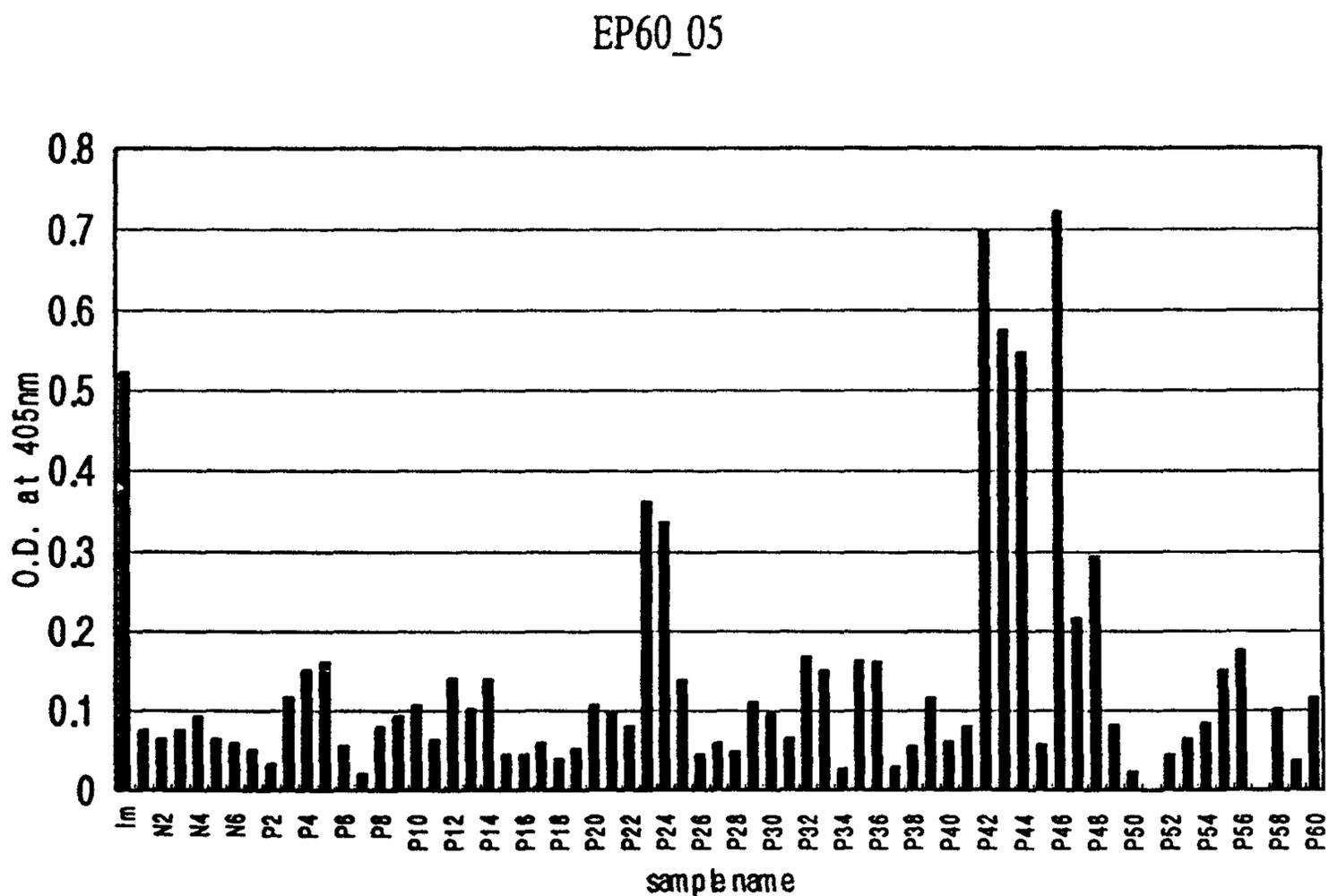
(Ahx)₂-Trp-Ala-¹⁶⁸Val-Thr-Lys-Tyr-Lys-Gln-Arg-Asn-Gly¹⁷⁶-(Ahx)₂



■ Epitope Name : EP60_05

■ Sequence of EP60_05 ;

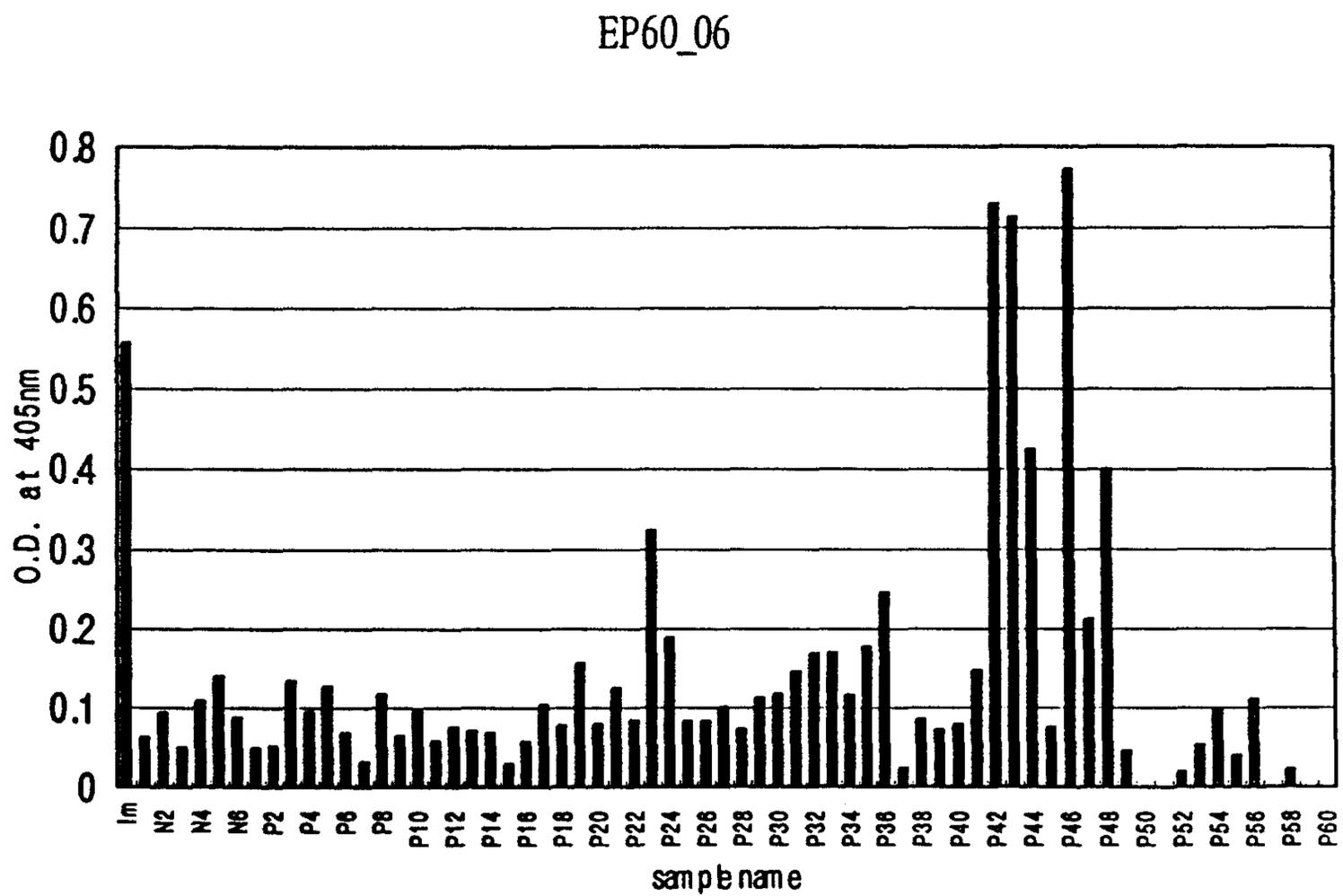
(Ahx)₂-Lys-²²⁸Tyr-Leu-Glu-Ala-Val-Glu-Lys-Val-Lys-Arg²³⁷-Trp-(Ahx)₂

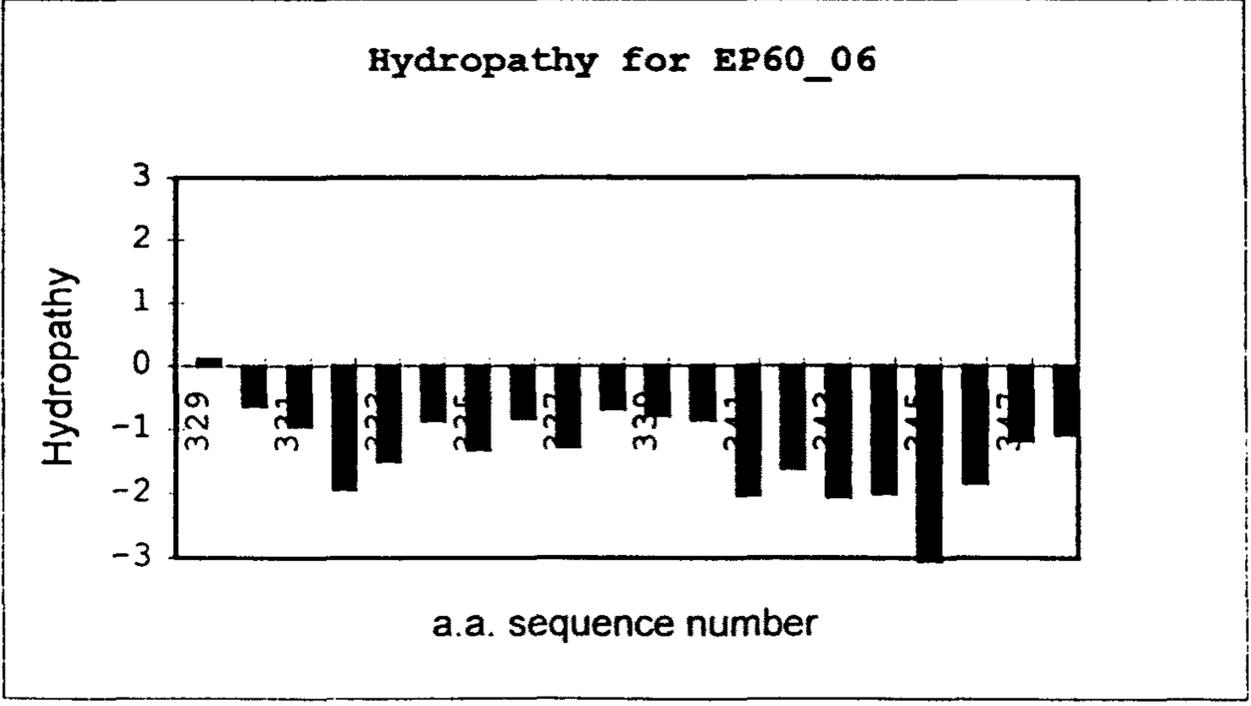
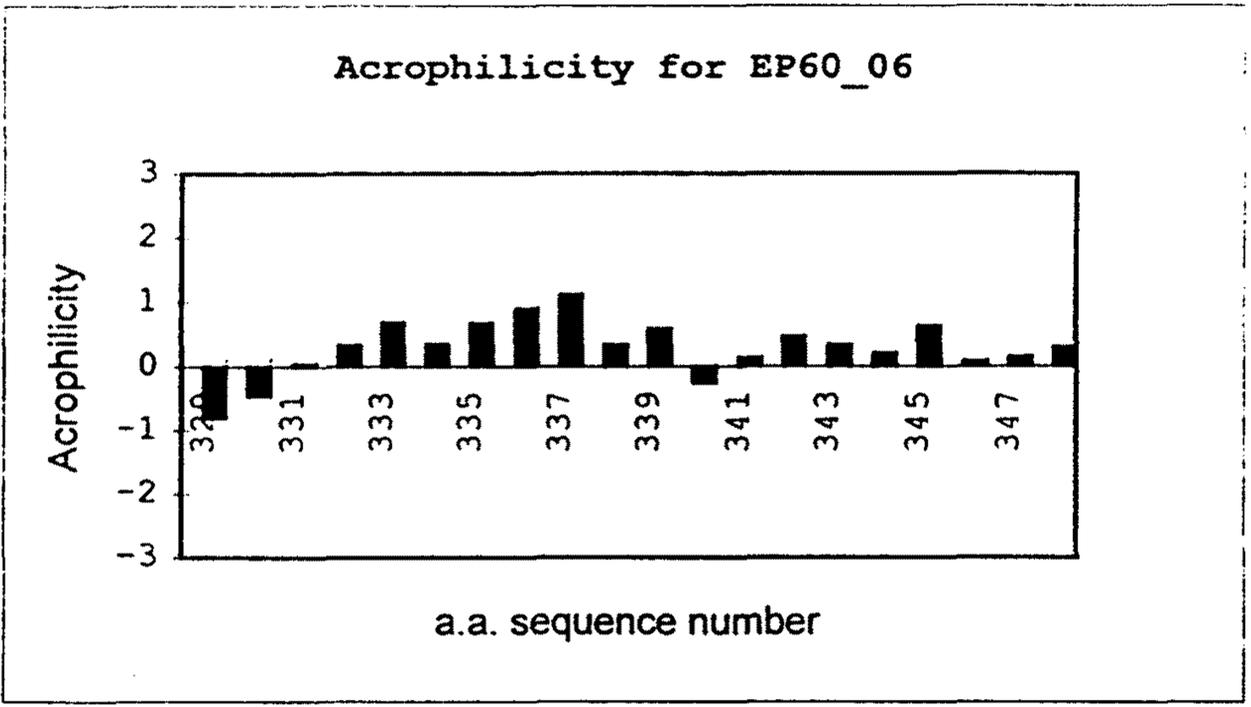
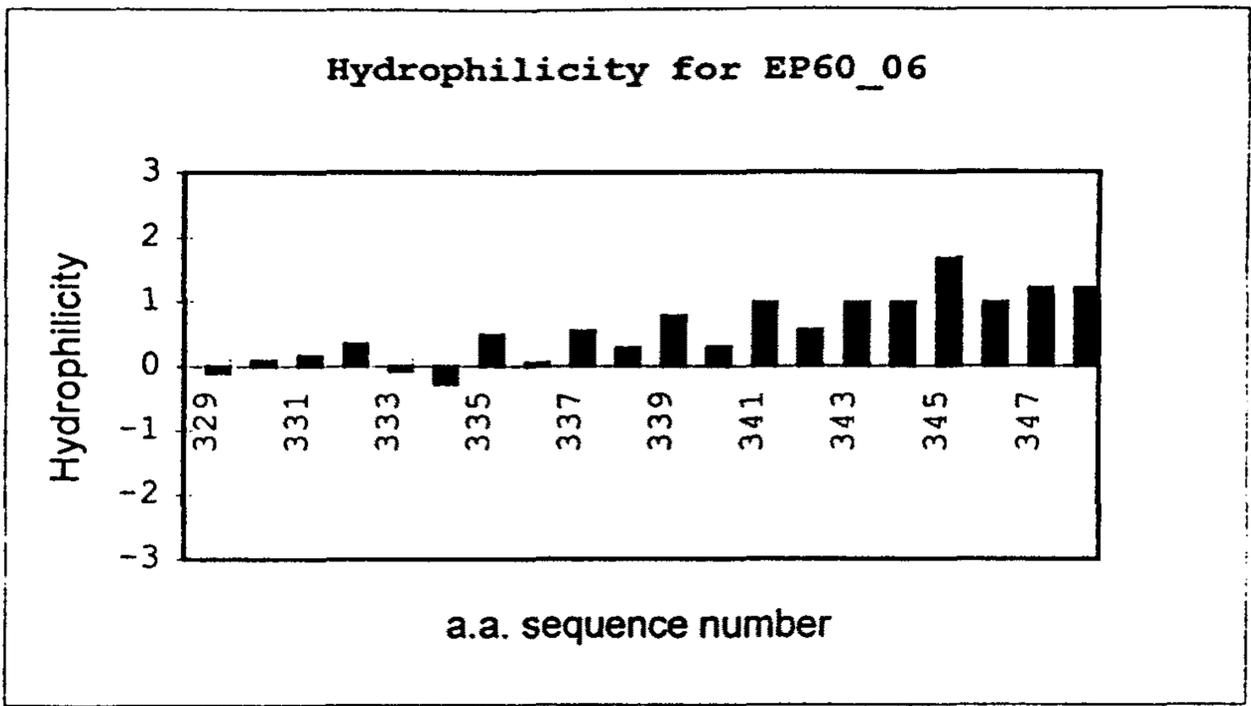


■ Epitope Name : EP60_06

■ Sequence of EP60_06 ;

(Ahx)₂-³³⁴Gly-His-Gly-Leu-Arg-Gly-Lys-Leu-Lys-Trp³⁴³-Arg-Pro-(Ahx)₂



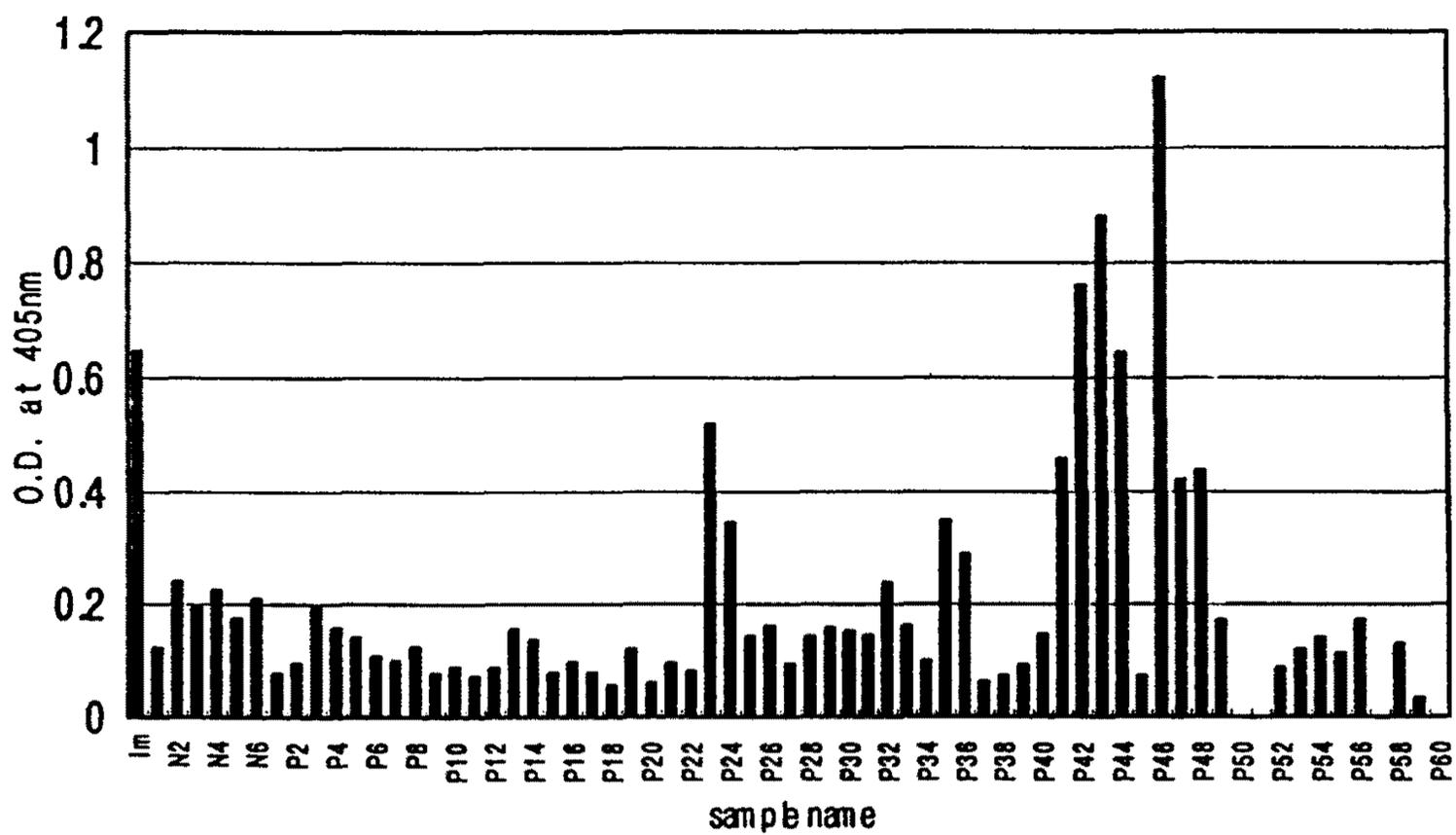


■ Epitope Name : EP60_07

■ Sequence of EP60_07 ;

(Ahx)₂-³⁵¹Lys-Ala-Leu-Asp-Ala-Ala-Phe-Tyr-Lys³⁵⁹-Thr-Trp-(Ahx)₂

EP60_07



- 별첨 4 -

Contents

52kD Ro-SSA antigen

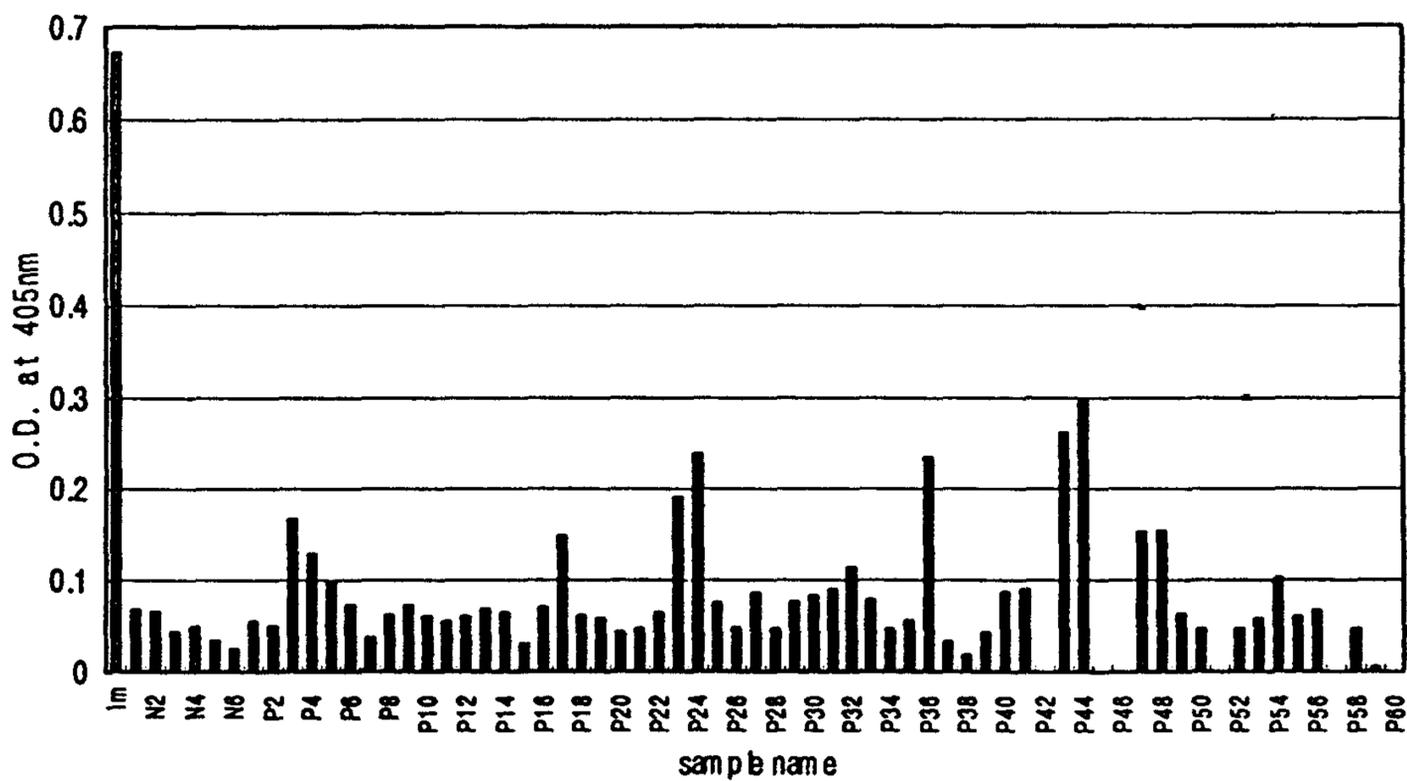
Total Sequence & its Continuous Epitopes	-----	4
Hydrophilicity, Acrophilicity, Hydropathy Plot	-----	5
EP52_01	-----	6
EP52_02	-----	10
EP52_03	-----	14
EP52_04	-----	18

■ Epitope Name : EP52_01

■ Sequence of EP52_01 ;

(Ahx)₂-⁶¹Lys-Asn-Leu-Arg-Pro-Asn-Arg-Gln-Leu-Ala-Asn⁷¹-Trp-(Ahx)₂

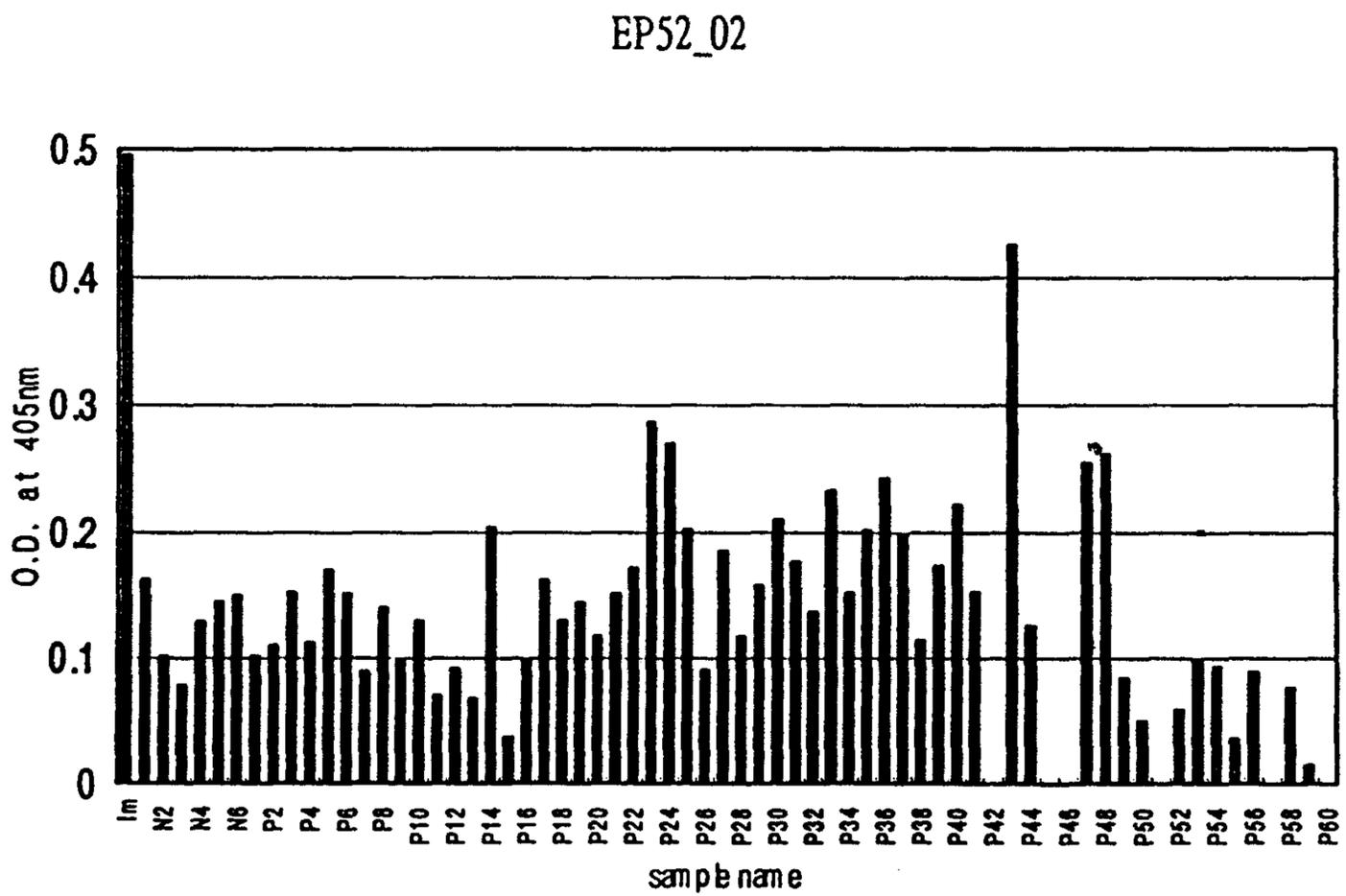
EP52_01



■ Epitope Name : EP52_02

■ Sequence of EP52_02 ;

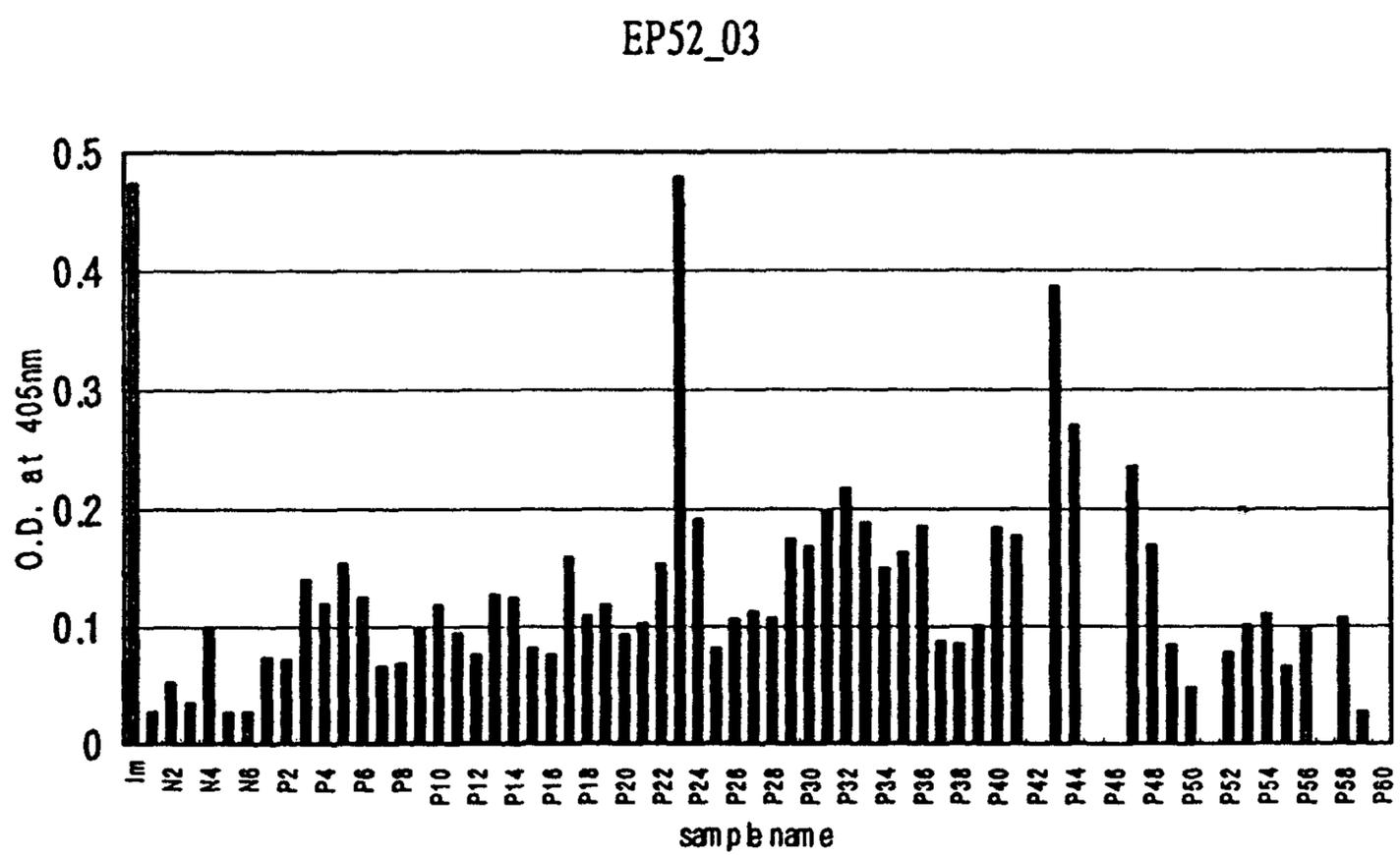
(Ahx)₂⁻⁷⁴Asn-Asn-Leu-Lys-Glu-Ile-Ser-Gln-Glu-Ala-Arg-Glu-Gly-Thr-Gln-Gly-Glu⁹⁰-Trp-(Ahx)₂



■ Epitope Name : EP52_03

■ Sequence of EP52_03 ;

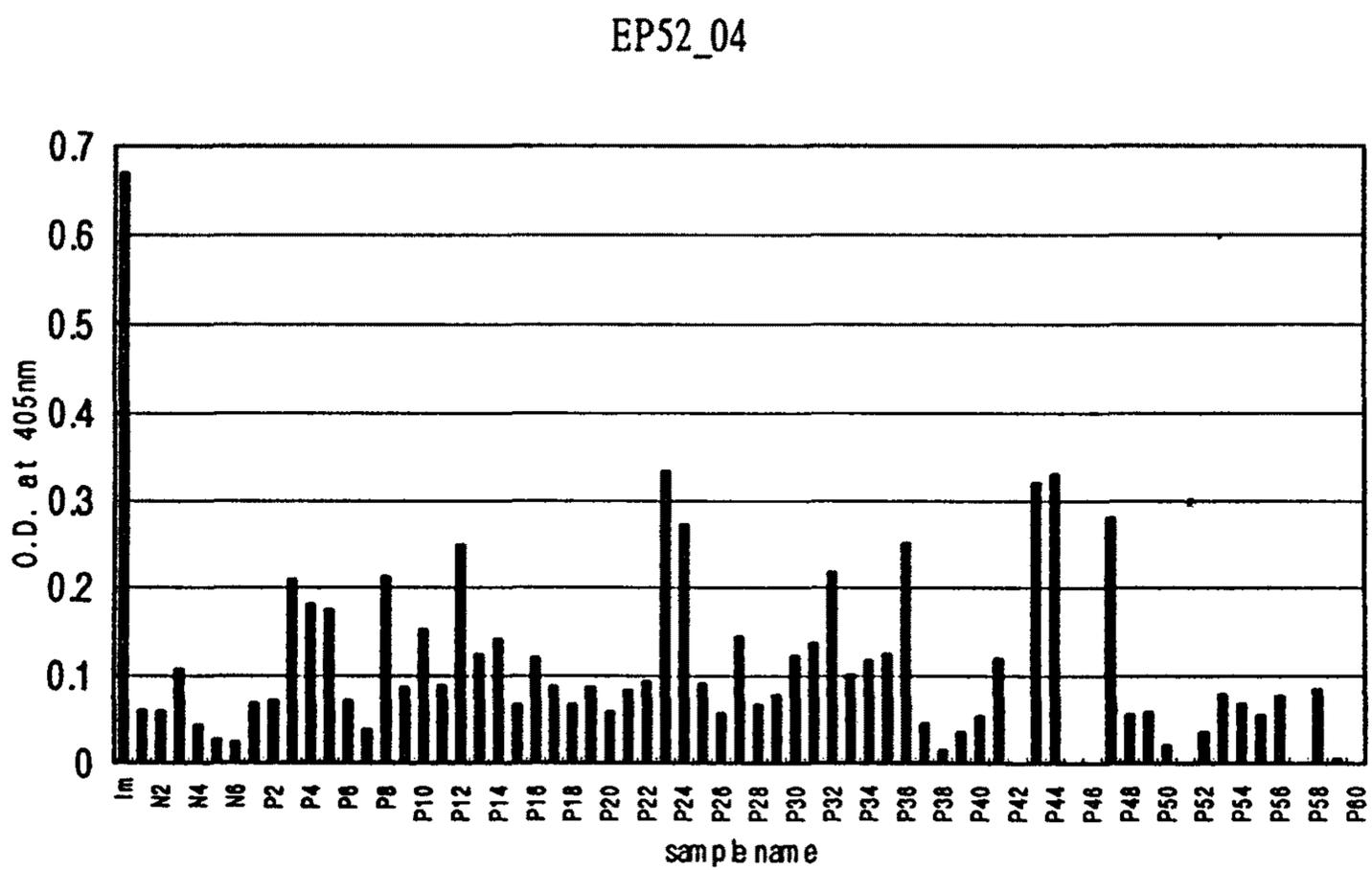
(Ahx)₂-¹¹⁵Ala-Gln-Ser-Arg-Lys-His-Arg-Asp-His-Ala¹²⁴-Trp-(Ahx)₂



■ Epitope Name : EP52_04

■ Sequence of EP52_04 ;

(Ahx)₂-³⁵⁸Val-Cys-Arg-Asp-Ser-Val-Arg-Arg-Lys-Gly-His³⁶⁸-Trp-(Ahx)₂



- 별첨 5,6 -

IPC 분류기호	주분류		방 신 심 사 관	출원번호 :	
	부분류			답	당

접수인 칸

특허출원서

출원인	성명	김 호 연	주민등록번호		국적	대한민국
	주소	()				
	성명	박 중 상	주민등록번호		국적	대한민국
	주소	()				
	성명	변 재 철	주민등록번호		국적	대한민국
	주소	()				
	성명	박 성 환	주민등록번호		국적	대한민국
	주소	()				

대리인	성명	이 한 영	대리인 코드	H350
	주소		전화번호	

발명자	성명	김 호 연	주민등록번호		국적	대한민국
	주소	()				
	성명	박 중 상	주민등록번호		국적	대한민국
	주소	()				
	성명	변 재 철	주민등록번호		국적	대한민국
	주소	()				
	성명	박 성 환	주민등록번호		국적	대한민국
	주소	()				
	성명	정 민 영	주민등록번호		국적	대한민국
	주소	()				

발명 의 명 칭 : 전신홍반성 루푸스병의 진단에 사용될 수 있는 60kDa 및 52kDa Ro/SSA 항원의 항원결정기를 포함하는 펩티드

150 출원번호 기호	주분류	방식 실사 칸	출원번호 :	
	부분류		당	당

특허출원서

출원인	성명	김희연	주민등록번호		국적	대한민국
	주소	()				
	성명	박종삼	주민등록번호		국적	대한민국
	주소	()				
	성명	전재남	주민등록번호		국적	대한민국
	주소	()				
대리인	성명	이한영	대리인 코드	H350		
	주소		전화번호			
발명자	성명	김희연	주민등록번호		국적	대한민국
	주소	()				
	성명	박종삼	주민등록번호		국적	대한민국
	주소	()				
	성명	전재남	주민등록번호		국적	대한민국
	주소	()				
	성명	박성환	주민등록번호		국적	대한민국
	주소	()				
	성명	정민영	주민등록번호		국적	대한민국
주소	()					

발명의 명칭 : ε-아미노카프론산이 결합된 짧은 펩티드를 이용하는 개선된 ELISA 방법

특허법 제 42 조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다.
 1996 년 8 월 30
 대리인 변리사 이 한 

특허청장 귀하

특허법 제 60 조의 규정에 의하여 위와 같이 출원실사를 청구합니다.
 대리인 변리사 이 한 

특허청장 귀하

특허법 제 64 조의 규정에 의하여 위와 같이 출원공개를 신청합니다.
 대리인 변리사 이 한 

특허청장 귀하

첨부서류: 1. 특허출원서 2. 발명실시예 3. 요약 4. 도면 5. 의견서	특허청장 장 장	부 부 부 부 부	각 1 장	수수료				
				출원료	기본	20 면	20,000원	
					가산	5 면	3,500원	
				심사청구료		5 항	143,000원	
				합계				166,500원

- 별첨 7 -

journal of immunological methods

Professor M W Turner
Immunobiology Unit
Institute of Child Health
30 Guilford Street
University of London
LONDON WC1N 1EH
U.K.
Tel: 0171 242 9789 Ext: 2215
Fax: 0171 813 8494
International fax: +44 171 813 8494
E-mail: mwtedjim@ich.ucl.ac.uk
m.turner@ich.ucl.ac.uk

Professor J-S Park
Department of Chemistry
Seoul National University
Seoul 151-742
Korea

16 July 1997

Dear Professor Park

Manuscript Number: 6293R

Thank you for revising the above manuscript for the Journal of Immunological Methods. I am pleased to be able to let you know that your paper is now accepted for publication.

Sub-editorial corrections have now been made to your manuscript and you are asked to check these carefully for any changes to your intended meaning.

In order to facilitate publication please produce a copy on disk (indicating which program has been used) and send this, together with the present corrected version, directly to:

JIM
Log-in Department
PO Box 2759
1000 CT Amsterdam
The Netherlands.

Please ensure that you also enclose top quality examples of all the figures.

You should receive an acknowledgement of your final version within one month of dispatch. If not, please contact the Log-in Department on the following fax number +31 20 485 3239. For all other post-editorial enquiries contact Gillian House on fax number +31 20 485 2431.

The proofs will be sent to you directly from Amsterdam.

Thank you for your co-operation.

Yours sincerely



M W Turner
Editor



Please make
sure that your
REVISED manuscript is
accompanied by a
MATCHING
diskette!

Street address for courier delivery:

*Ms C van der Krogt-Cohen
Log-in Department
Sara Burgerhartstraat 25
1055 KV Amsterdam
The Netherlands.*

Title :

**Modification of short peptides using
 ϵ -aminocaproic acid for improved coating
efficiency in indirect enzyme-linked
immunosorbent assays (ELISA)**

**Jae-Chul Pyun^{1)†}, Min-Young Cheong¹⁾, Sung-Hwan Park²⁾,
Ho-Youn Kim²⁾, and Jong-Sang Park^{1)*}**

(* : To whom correspondence should be addressed)

ADDRESS : 1) Department of Chemistry,
College of Natural Sciences,
Seoul National University,
Seoul, 151-742, Korea.
Phone : 82-2-880-6660
Fax : 82-2-889-1568
E-mail : pfjspark@plaza.snu.ac.kr

2) Department of Internal Medicine,
Kangnam St. Mary's Hospital,
Medical College of Catholic University,
Seoul, 137-040, Korea.

1) † ; Present Address
Fraunhofer Institute of Biomedical Technology (IBMT),
Department of Sensorsystems/Microsystems ,
Ensheimerstr. 49 , D-66386 St. Ingbert, Germany

ABSTRACT

The hydrophobicity of short synthetic peptides of 5-10 residues was enhanced for high coating efficiency as antigens in indirect ELISA.

To obtain enhanced hydrophobicity, coupling of ϵ -aminocaproic acids to the synthetic peptides was carried out during solid phase peptide synthesis. As a short peptide model, three analogues of a streptavidin binding peptide consisting of 5 amino acid residues were prepared with four ϵ -aminocaproic acid residues. HPLC analysis showed a dramatic increase in hydrophobicity after modification, and the modified peptides showed a better adsorption ability than the unmodified peptides in indirect ELISA. The whole process from antigen coating to color development was carried out within 2.5 to 3 h by dissolving the peptide in methyl alcohol and evaporating the solvent in each well of the microplate. As an application of this method, a peptide assumed to function as one of the epitopes of the human 60kDa Ro/SSA antigen was selected from hydrophilicity, acrophilicity and hydrophobicity plots. The peptide was synthesized having an ϵ -aminocaproic acid modification at both N and C terminal ends and was tested with 30 sera from patients with systemic lupus erythematosus (SLE), 20 normal sera and a standard anti-Ro/SSA serum. The ELISA results revealed that the method gave a high signal-to-background ratio without altering the specificity of the assay. Moreover, our process was far simpler and more rapid than conventional methods used in indirect ELISA. Thus this method could be useful in the development of techniques for the diagnosis of SLE.

* keywords : ELISA, ϵ -aminocaproic acid, SLE, epitope, peptide, Ro/SSA

* Abbreviations used : ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; SLE, systemic lupus erythematosus; RIA, radioimmunoassay; Fmoc, 9-fluorenylmethoxycarbonyl; HBTU, benzotriazolylhexafluorophosphate; HOBT, hydroxybenzotriazole ; TFA, trifluoroacetic acid; NMP, 1-methyl-2-pyrrolidinone; pNPP, p-nitrophenyl phosphate; DMF, dimethylformamide; DCM, dichloromethane; PBS, phosphate-buffered saline

INTRODUCTION

A number of immunoassay techniques have been developed using either an antigen or an antibody bound to a solid support. Widely used immunoassay techniques such as enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and radioimmunoassay (RIA) were designed to use microplates made of polystyrene or polypropylene from a variety of solid phase carriers. Proteins, either antigens or antibodies, are adsorbed to the plastic surface of the microplate as a result of interactions between hydrophobic regions of the protein and the nonpolar plastic surface. Even though only small amounts of protein can be adsorbed to each well of a microplate, the sensitivity of ELISA or RIA is such that only a small amount of antigen or antibody is needed. Each well of microplate has an actual binding capacity of 0.2-0.3 μ g protein (Winston et al., 1989).

However, there are some limitations in using short synthetic peptides of 5-10 residues as an antigen in ELISA procedures. First of all, peptides must, in general, be at least 15 residues long in order to be adsorbed on the plastic surface after overnight incubation in the microplate (Plaue et al., 1988). Moreover, very short peptides may be partially lost during normal ELISA washing stages leading to loss of precision. Some authors have recommended the pretreatment of polystyrene plates with direct coupling agents, such as glutaraldehyde (Corthier et al., 1981; Kasprzyk et al., 1988; Suter et al., 1982), cyanogen bromide (Lehtonen et al., 1980), poly-L-lysine or poly-L-aspartate (Brennand et al., 1986) to improve the attachment of peptide to the solid-phase. Modified microplates with chemical functional groups are now commercially available. Another problem of the short synthetic peptide is that the conformation of the peptide may be so altered by its interaction with the plastic as to diminish interactions with antibody. So, in spite of the numerous advantages of solid-phase assays, it should always be born in mind that (a) the surface of any polypeptide immobilized on a solid phase will only be partially available for binding to the antibody, (b) adsorption of a polypeptide on a polymer surface will alter its conformation, (c) the kinetics and equilibrium characteristics observed in the liquid-phase antigen-antibody interaction change when one of the reactants is immobilized (Stevens et al., 1986).

Using streptavidin binding peptide as a short peptide model, we have

attempted to show that the problem of poor adsorption and conformational alteration of short peptides can be solved by modification with ϵ -aminocaproic acids. ϵ -Aminocaproic acid having an n-pentyl group as its side chain was chosen to increase the hydrophobicity of short peptides and function as an anchor for the peptide to be fixed on the surface of the microplate.

We designed a simple and rapid ELISA procedure to improve the coating of the modified peptides to the solid support and examined the immobilization of the short peptides modified in various ways. We also examined the sensitivity and the specificity of the assay compared to a conventional method. Finally, we evaluated the value of our ELISA procedure in the diagnosis of systemic lupus erythematosus (SLE).

MATERIALS and METHODS

Materials

Chemicals

Fmoc-amino acids, HBTU, HOBt were purchased from AnaSpec (San Jose, CA). N- α -Fmoc- ϵ -aminocaproic acid was purchased from Nova biochem (La Jolla, CA). p-Alkoxybenzyl alcohol resin, anti-human IgG conjugated with alkaline phosphatase, and streptavidin conjugated with alkaline phosphatase were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Microplates (ref.3912) were purchased from Falcon Plastics (Oxnard, CA). TFA, NMP, piperidine and other solvents for peptide synthesis were purchased from Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI). p-Nitrophenyl phosphate was purchased from Fluka Chemical Co. (Buchs, Switzerland). HPLC grade acetonitrile, methyl alcohol were purchased from Fisher Chemical Co.(Fair Lawn, NJ).

Systemic lupus erythematosus (SLE) patient sera

Thirty sera from patients with SLE and twenty normal sera were obtained from the Clinic of Rheumatism in Kang-nam St. Mary's Hospital (Seoul, Korea). All patients with SLE fulfilled the American Rheumatism Association classification criteria for the disease. For use as a positive control in the ELISA test, a reference human anti-Ro/SSA autoantibody was purchased from Immunovision (Springdale, AR).

Methods

Peptide preparation

Peptides were synthesized manually by standard methods on a solid support using Fmoc-chemistry. (Gloor et al., 1994). p-Alkoxybenzyl alcohol resin (Wang resin, 60mg) was used as a solid support. Coupling of the Fmoc amino acids including N- α -Fmoc aminocaproic acid was performed with 0.25M HBTU/HOBt/NMP. For Fmoc deprotection, 30% piperidine in DMF was used. The coupling and deprotecting steps were then repeated as necessary until the desired sequence had been constructed. After synthesis, the resin was washed with DMF, DCM, methyl alcohol, and dried under vacuum for at least 6 h. The cleavage of the peptides from the resin and side chain deprotection were carried out using 82.5% TFA, 5% thioanisole, 5% distilled water, 5% phenol and 2.5% 1,2-ethanedithiol. Each peptide was then isolated by several ether precipitations. After

removal of the ether, each peptide was dissolved in distilled water and lyophilized. All crude peptide preparations were stored desiccated at 4 °C until purification. Peptides that failed to produce a single homogeneous peak by analytical C-18 reverse phase column, 6.5 μ m (4.6 x 250mm, SynChrom, Inc., WI), were further purified with a preparative C-18 reverse phase column, 10 μ m (22 x 250mm, Vydac, CA). The programmed gradient elution was eluted at a flow rate of 0.7 ml/min for analysis and 8.0 ml/min for purification, and the gradient at 0 to 21 min was 10 to 45% solvent B, at 21 to 23 min was 45 to 100% solvent B, 27 to 29 min was 100 to 10 % solvent B. Solvent A was 0.1% TFA in water, solvent B was 0.1% TFA in acetonitrile. About 10mg of final peptide were obtained and purity was over 95%.

Modification of the streptavidin binding peptide

Among various streptavidin binding pentapeptides, GHPQG was chosen as the short peptide model, and some modifications were performed. HPQ#1 had no modification at each terminal. HPQ#2 and HPQ#3 had four ϵ -aminocaproic acid residues at amino and carboxyl terminals, respectively. HPQ#4 had two ϵ -aminocaproic acid residues at both terminals. Because the four peptides had no lysine residue, peptide quantification was performed with ninhydrin tests (Sarin et al., 1981), and the peptide concentration for the indirect ELISA was adjusted to 30 μ M.

Selection of an epitope of 60kDa Ro/SSA antigen

Amino acid sequences assumed to function as epitopes of the human 60kDa Ro/SSA antigen was selected from the hydrophilicity, acrophilicity, flexibility plots (Hopp et al., 1985; Van Regenmortel et al., 1985). The plots were made by averaging the index values of each amino acid and the three flanking residues before and after it. The results from these plots were then compared with the ELISA results of sequential overlapping octapeptides from human 60kDa Ro/SSA antigen with a reference human anti-Ro/SSA serum (Scofield et al., 1991). Among several candidates, one selected contained four amino acid residues (K¹³³DLK¹³⁶) which are part of a central antigenic octapeptide of the reference anti-Ro/SSA serum (Table I). Two peptides for the selected residues 127-137, were prepared, one of which was designed to have two ϵ -aminocaproic acid residues at each terminal. To facilitate peptide quantification, a tryptophan residue was

inserted into each peptide (Grant et al., 1992). Peptide quantification was performed at 278nm using a spectrophotometer (UVikon 930, Kontron Instruments, Inc., Switzerland).

The unmodified peptide (EP) and modified peptide (MEP) of the selected epitope have the peptide sequence of the 60kDa Ro/SSA antigen, $T^{127}FIOFKKDLKE^{137}W$ and $(Ahx)_2T^{127}FIOFKKDLKE^{137}W(Ahx)_2$, respectively.

ELISA

The ELISA used to measure the binding of autoantibodies from human sera was performed as follows: for the modified peptide (MEP), each well of microplate was coated with 100 μ l of a 200 μ M peptide solution, and the plate was gently shaken at 37°C. The solvent (methyl alcohol) was completely evaporated over 1 h. Thereafter the microplate was rinsed twice with the washing buffer (0.02M PBS, 0.05% Tween 20, 0.01% NaN₃). Thirty sera from SLE patients and twenty normal sera diluted 1/100 in 0.02M PBS were added 100 μ l per well, and the reference human anti-Ro/SSA antiserum was also added to the plate as a positive control. After 1 h incubation at 37°C, the plate was rinsed twice with the washing buffer. Anti-human IgG conjugated with alkaline phosphatase diluted 1/5000 in 0.02M PBS was added to the microplate. After 30 min incubation at 37°C, the plate was washed four times with the washing buffer. 100 μ l of p-nitrophenyl phosphate solution (1mg/ml) were added to each well of the microplate. The color development was quenched after 10 min with an equal volume of 3M NaOH, and absorbance values were measured at 405nm using a microplate reader (Emax, Molecular Devices, Inc., Germany). As a negative control, an ELISA procedure for an unmodified peptide (EP) was performed simultaneously. For the coating of EP, a 200 μ M peptide solution dissolved in 0.05M carbonate buffer, pH 9.6, was added to the microplate, followed by overnight incubation at 4 °C. Further steps of the assay were as described above. For the modified GHPQG, 30 μ M peptide solutions were used, and 100 μ l of alkaline phosphate conjugate of streptavidin diluted at a ratio of 1/1000 were incubated at 37°C for 1 h.

RESULTS and DISCUSSION

Modification of ELISA methods

A more facile and rapid ELISA procedure was designed for the peptides modified with ϵ -aminocaproic acids. Though simple adsorption of peptides to standard ELISA plates from carbonate buffer, pH 9.6, overnight at 4°C or 37°C is a commonly used procedure (Barakat et al., 1990), a new peptide-coating method was used for the modified peptides. Among water, methyl alcohol, ethyl alcohol, acetonitrile, and their mixtures, methyl alcohol had the optimum properties for the coating of modified peptides with ϵ -aminocaproic acids - high solubility of peptides and fast evaporation at 37°C. In conventional ELISA procedures, blocking with BSA or non-fat dried milk has been regarded as an essential step in preventing nonspecific binding of antibodies. In this new procedure, however, on the basis of the duplicate and triplicate test results of the ELISA (data not shown), the blocking step only lowered the absorbance values without influencing the trends of the results, and there was little effect on the nonspecific binding of antibodies. Even in the case of short peptides of 5 residues, the blocking step seemed to hinder the appropriate exposure of the peptide needed for the interaction with antibodies.

When the new ELISA was performed as described above, the total assay time from antigen coating to color development was only about 2.5 to 3 h.

The effect of ϵ -aminocaproic acid residues on the hydrophobicity of the peptide

It was suggested that ϵ -aminocaproic acid residues inserted in short peptides could increase hydrophobicity because they have an n-pentyl group as a side chain. In order to prove that the short peptides coupled with ϵ -aminocaproic acid residues have an enhanced coating efficiency for polystyrene microplates, we chose streptavidin binding peptides as a model system and coupled them with ϵ -aminocaproic acids. Among the streptavidin binding peptides consisting of 5 residues, GHPQG was selected as a short peptide model (Lam et al., 1991). Four peptides, a streptavidin binding peptide, GHPQG, and three peptides modified with ϵ -aminocaproic acids, were analyzed with HPLC using a C-18 reverse phase column. As shown in Fig. 1., the elution times of GHPQG (HPQ#1) and the peptides modified with ϵ -aminocaproic acid residues (HPQ#2,

HPQ#3, HPQ#4) were about 5min and 13-15min, respectively. As can be seen from the elution times, the three peptides with ϵ -aminocaproic acid modifications have highly increased hydrophobicity compared with the unmodified peptide, HPQ#1. But, no significant difference in elution time was found between peptides having four ϵ -aminocaproic acid residues at the N- or C-terminal end of GHPQG and a peptide having two ϵ -aminocaproic acid residues at each terminal. From the hydrophobicity change results, one could assume that similar amounts of the three modified peptides (HPQ#2,3,4) would attach to the well of microplate. Nevertheless, the ELISA results of the peptides modified with ϵ -aminocaproic acid residues (HPQ#2, HPQ#3, HPQ#4) were very interesting. As shown in Fig. 2, the reactivity of the peptide with ϵ -aminocaproic acid modification at the C-terminal end (HPQ#3) was even higher than the peptides with ϵ -aminocaproic acid modification at both terminals (HPQ#4) or only at the N-terminal end (HPQ#2). Surprisingly, HPQ#2 had hardly any affinity for streptavidin conjugated with alkaline phosphatase. We conclude that these results reflect the screening condition of the streptavidin binding peptides with a pentapeptide library (Lam et al., 1991). The library was prepared using resins binding the C-terminal of each peptide, and only the N-terminus of each peptide was freely exposed to streptavidin as the HPQ#3. Thus, among the modified peptides, HPQ#3 had a conformation most similar to the peptide used in the pentapeptide library. Though the N-terminus of HPQ#4 was fixed, HPQ#4 had a greater affinity for streptavidin than HPQ#2 following fixation of the C-terminal to the wall of microplate together with the N-terminal. Accordingly, the HPQ#2 of which only the N-terminal was fixed had a conformation which resembled HPQ#3 less than it resembled HPQ#4. On the basis of this, we conclude that the ϵ -aminocaproic acid residues inserted in short peptides not only contribute to the enhanced hydrophobicity of the modified peptides, but also act as a conformational anchor in adsorption to the solid phase. In addition, from these results, we were able to confirm that our method worked well even with the short peptides consisting of only 5 residues.

ELISA results using the peptides selected to function as epitopes against 60kDa Ro/SSA antigen

We have described a simple and rapid assay using the short peptides

modified with ϵ -aminocaproic acids. Short synthetic peptides, in conjunction with ELISA procedures, have become a major tool to define and characterize B-cell epitopes owing to their usefulness for epitope mapping. To examine the value of our ELISA procedure, we applied the method to the diagnosis of systemic lupus erythematosus (SLE). In this study, we attempted to show that ϵ -aminocaproic acids in peptides consisting of about 10 residues could function as a hydrophobic anchor without augmenting non-specific signals or altering the specificity of the assay.

On the grounds that anti-Ro/SSA antibodies of SLE patients react with multiple epitopes on 60kDa Ro/SSA protein (Daniel et al., 1994), we prepared a peptide assumed to function as one of the epitopes of the human 60kDa Ro/SSA antigen. In a study using synthetic peptides, the sequence of 21-41 was already known to be the 1st epitope site of 60kDa Ro/SSA antigen (Barakat et al., 1992). Likewise, we selected another amino acid sequence assumed to function as an epitope of the 60kDa Ro/SSA antigen on the basis of hydrophilicity, acrophilicity and flexibility plots (Hopp et al., 1985; Van Regenmortel et al., 1985). The results from these plots were then compared with the ELISA results of sequential overlapping octapeptides from human 60kDa Ro/SSA antigen with a reference human anti-Ro/SSA serum (Scofield et al., 1991). Among several candidates, one representing residues 127-137, was so selected as to contain the sequence, KDLK, which is part of a central antigenic octapeptide of the reference anti-Ro/SSA serum as shown in Table I. Though the streptavidin binding peptide was screened with its C-terminus fixed, epitopes of the 60kDa Ro/SSA antigen were assumed to have fixed N- and C-termini in the 60kDa Ro/SSA antigen molecule. Accordingly, this peptide was prepared with ϵ -aminocaproic acid modifications at both ends.

The ELISA result for this peptide (MEP) was compared with the result of the conventional ELISA method using the unmodified peptide (EP). For the coating of EP, 0.05M carbonate buffer, pH 9.6, was added to the microplate, followed by overnight incubation at 4 °C. First, an optimal peptide-coating concentration was determined in the range characterized by (a) linearity between the log scale of peptide concentration and the linear scale of absorbance and (b) low levels of negative background readings. As shown in Fig. 3(a), non-specific binding was minimized when both peptides were coated at a concentration of 0.2 mg/ml. Then, serial dilutions of a standard anti-Ro/SSA serum and a control normal serum

were carried out with a peptide-coating concentration of 0.2mg/ml. As shown in Fig. 3(b), both peptides appeared to work as epitopes for anti-human Ro/SSA antibody when the ELISA results of the positive control serum were compared with the results of a control normal serum. It was especially noticeable that the ELISA using MEP gave a much higher signal-to-background ratio than the conventional method used.

As an application of our method, these peptides were tested with 30 sera from SLE patients and 20 normal sera. In order to determine the threshold values for the diagnosis of SLE, a series of 20 sera from healthy individuals were tested for each peptide. Sera were considered positive when the absorbance values were higher than the average absorbance value plus two standard deviations of the 20 normal sera. The threshold values for EP and MEP were 0.028 and 0.048, respectively. Depending on the techniques used, anti-Ro/SSA antibodies are known to be found in 15-70% sera of patients with SLE (Slobbe et al., 1991). In this test, about 60% of sera from 30 patients with SLE were found to react with both EP and MEP. However, the signal difference between negative and positive sera was far more evident for MEP than for EP as can be seen from the bar graphs in Fig. 4. This efficient ELISA result could be achieved by the improved coating efficiency and conserved conformation of the modified peptide (MEP) as mentioned previously for the streptavidin binding peptides.

Application of new ELISA procedure

To improve the attachment of peptide to the solid-phase, some authors have recommended the pretreatment of polystyrene plates with glutaraldehyde (Corthier et al., 1981; Kasprzyk et al., 1988; Suter et al., 1982), cyanogen bromide (Lehtonen et al., 1980), poly-L-lysine or poly-L-aspartate (Brennan et al., 1986). Such methods have certain limitations in that (a) the conformation of the peptide may be so altered by its interaction with polystyrene plastic as to diminish the interaction with antibody when it is simply adsorbed to the plastic, (b) the covalent attachment of the peptide is restricted to certain specific orientations depending on the coupling agents used, and (c) the introduction of chemical functional groups in polystyrene usually involves severe chemical treatment (Chin et al., 1977; Rubin et al., 1980; Neurath et al., 1981). Furthermore, no method can be applied in every case and workers should be prepared to evaluate several methods for their particular application.

Here, we have described a simple and rapid assay using short peptides

modified with ϵ -aminocaproic acids. In comparison with the conventional methods described above, the main advantages of our method are (a) peptide-coating is very simple and rapid, (b) it gives a higher signal-to-background ratio without any significant increase of non-specific binding, and (c) it is applicable to a variety of synthetic peptides, especially, short peptides. Most of all, when compared with the conventional ELISA method, it is noticeable that the conformational problem of the short peptides can be solved by using an ϵ -aminocaproic acid as a hydrophobic anchor. N-, C-, or both terminals, if necessary, can be anchored simply by coupling ϵ -aminocaproic acids into the peptides. Moreover, the microplates coated with the modified peptide in this technique were stable for several weeks at 4 °C.

If diagnostic kits are prepared adopting this technique, a reduction in both test time and cost can be achieved. Although diagnostic kits in which microplates are coated with the Ro/SSA antigen molecule are already commercially available, using our method would be a low cost alternative solution. In addition to SLE, our method should constitute an alternative to the common ELISA procedure in detecting antibodies of autoimmune sera.

REFERENCES

- Barakat, S., Briand, J.P., Weber, J.C., Van Regenmortel, M.H.V. and Muller, S. (1990) Recognition of synthetic peptides of Sm-D autoantigen by lupus sera. *Clin. exp Immunol.* 81, 256-262
- Barakat, S., Meyer, O., Torterotot, F., Youinou, P., Briand, J.P., Kahn, M.F. and Muller, S. (1992) IgG antibodies from patients with primary Sjogren's syndrome and systemic lupus erythematosus recognize different epitopes in 60-kD SSA/Ro protein. *Clin. exp. Immunol.* 89, 38.
- Brennand, D.M., Danson, M.J. and Hough, D.W. (1986) A comparison of ELISA screening methods for the production of monoclonal antibodies against soluble protein antigens. *J. Immunol. Methods.* 93, 9.
- Chin, N.W. and Lanks, K.W. (1977) Covalent attachment of lactoperoxidase to polystyrene tissue culture flasks. *Anal. Biochem.* 83, 709-719.
- Corthier, G. and Franz, J. (1981) Detection of antirotavirus immunoglobulin A, G, and M in swine colostrum, milk, and feces by enzyme-linked immunosorbent assay. *Infect. Immunol.* 31, 833.
- Daniel, P.M., Hongliang, Y., Li-xiang, W. and Lisa, L. (1994) Autoimmune sera react with multiple epitopes on recombinant 52 and 60kD Ro(SSA) proteins. *J. Rheumatol.* 21, 1073-1080.
- Deutscher, S.L., Harley, J.B. and Keene, J.D. (1988) Molecular analysis of the 60-kD human Ro ribonucleoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 85, 9479-9483.
- Gloor, A.P., Hoare, S.M., Lawless, K., Steinauer, R.A., White, P. and Yong, C.W. (1994) Synthesis notes. In : 1994/95 Catalog and peptide synthesis handbook, Calbiochem-Novabiochem Corp., California, p.S1-S42.
- Grant, G.A. (1992) Initial criteria for evaluation of synthetic peptides, In : Grant, G.A. (Eds.) *Synthetic peptides*, W.H. Freeman and Company, New York, p.220-223.
- Hopp, T.P. (1985) Prediction of protein surfaces and interaction sites from amino acid sequences, In : Alitalo, K., Partanen, P. and Vaheri, A. (Eds.) *Synthetic peptides in biology and medicine*, Elsevier Science publishers, New York, p.3.
- Kasprzyk, P.G., Cuttitta, F., Avis, I., Nakanish, Y., Treston, A., Wong, H., Walsh, J.H. and Mulshine, J.L. (1988) Solid phase peptide quantification assay using labeled monoclonal antibody and glutaraldehyde fixation. *Anal. Biochem.* 174, 224-234.
- Lam, K.S., Salmon, S.E., Hersh, E.M., Hruby, V.J., Kazmierski, W.M. and Knapp, R.J. (1991) A new type of synthetic peptide library for identifying ligand-binding activity. *Nature.* 354, 82.

- Lehtonen, O.P. and Viljanen, M.K. (1980) Antigen attachment in ELISA. *J. Immunol. Methods.* 34, 61.
- Neurath, A.R. and Stick, N. (1981) Enzyme-linked fluorescence immunoassays using β -galactosidase and antibodies covalently bound to polystyrene plates. *J. Virol. Methods.* 3, 155-165.
- Plaue, S. and Briand, J.P. (1988) Solid-phase peptide synthesis, In : Van Regenmortel, M.H.V., Briand, J.P., Muller, S. and Plaue, S. (Eds.) *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*, Vol. 19, Elsevier Science publishing company, Inc., New York, p.74-94.
- Rubin, R.L., Hardtke, M.A. and Carr, R.I. (1980) The effect of high antigen density on solid-phase radioimmunoassays for antibody regardless of immunoglobulin class. *J. Immunol. Methods.* 33, 277-292.
- Sarin, V.K., Kent, S.B.H., Tam, J.P. and Merrifield, R.B (1981) Quantitative monitoring of solid-phase peptide synthesis by the ninhydrin reaction. *Anal. Biochem.* 117, 147.
- Scofield, R.H. and Harley, J.B. (1991) Autoantigenicity of Ro/SSA antigen is related to a nucleocapsid protein of vesicular stomatitis virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 3343.
- Slobbe, R.L., Pruijn, G.J.M. and Van Venrooij, W.J. (1991) Ro (SS-A) and La (SS-B) ribonucleoprotein complexes : structure, function and antigenicity. *Ann. Med. Interne.* 142, 592-600.
- Stevens, F.J., Jwo, J., Carperos, W., Kohler, H. and Schiffer, M. (1986) Relationships between liquid- and solid-phase antibody association characteristics: implications for the use of competitive ELISA techniques to map the spatial location of idiotopes. *J. Immunol.* 137, 1937.
- Suter, M. (1982) A modified ELISA technique for anti-hapten antibodies. *J. Immunol. Methods.* 53, 103.
- Van Regenmortel, M.H.V. (1985) Operational aspects of the definition of epitopes in peptides and proteins. In : Alitalo, K., Partanen, P. and Vaheri, A. (Eds.) *Synthetic peptides in biology and medicine*, Elsevier Science Publishers, New York, p.67.
- Winston, S.E., Fuller, S.A. and Hurrell, G.R. (1989) ELISA for detection of antigens, In : Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K. (Eds.) *Current protocols in molecular biology*, Wiley and Sons, Inc., New York, p.11.2.8-11.2.9.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by the Center for Molecular Catalysis, Korean Science and Engineering Foundation, and the Ministry of Education of Korea. We especially thanks for the Il-Ju academic and cultural research foundation.

Table I

Synthetic peptides assumed to function as epitopes of the human 60kDa Ro/SSA antigen

Name	Amino acid positions	Sequence ^a
EP	127-137	TFIQFKKDLKEW
MEP	127-137	(Ahx) ₂ TFIQFKKDLKEW(Ahx) ₂
Ro/SSA	133-136	KDLK ^b

^a Amino acid residues are represented by the single-letter code except ϵ -aminocaproic acid (Ahx) and in their order on the 60kDa Ro/SSA sequence.

^b Amino acid residues in the Ro/SSA sequence which are part of a central antigenic octapeptide of the reference anti-Ro/SSA serum are indicated by bold letters (Scofield et al., 1991).

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. HPLC analysis of the modified streptavidin binding peptides. 'Ahx' represents the ϵ -aminocaproic acid residue. HPQ#1, HPQ#2, HPQ#3, HPQ#4 represent GHPQG, (Ahx)₄-GHPQG, GHPQG-(Ahx)₄, (Ahx)₂-GHPQG-(Ahx)₂, respectively. The HPLC profiles were obtained at 215nm using a reverse phase C18 column as explained in the text.

Fig. 2. Tests using the modified streptavidin binding peptides. HPQ#1, HPQ#2, HPQ#3, HPQ#4 represent GHPQG, (Ahx)₄-GHPQG, GHPQG-(Ahx)₄, (Ahx)₂-GHPQG-(Ahx)₂, respectively. Five 3-fold serial dilutions were carried out for each peptide as noted with the bar graphs. Original solutions for each peptide were prepared as 30 μ M solutions.

Fig. 3. (a) Test for peptide coating concentration for indirect ELISA. Microplates were coated with various concentrations of EP and MEP. EP and MEP represent the peptide sequence of 60kDa Ro/SSA antigen, T¹²⁷FIOFKKDLKE¹³⁷W, (Ahx)₂T¹²⁷FIOFKKDLKE¹³⁷W(Ahx)₂, respectively. Optimal coating concentrations for EP and MEP were determined with the anti-sera diluted 1/100 in PBS.

(b) Reciprocal serial dilutions of anti-sera. The peptides, both EP and MEP, were coated at a concentration of 0.2mg/ml. The standard anti-Ro-SSA serum was tested for binding to its target peptides. A control normal human serum was also tested as a negative control. Six 2-fold serial dilutions of these anti-sera were evaluated for each peptide.

In (a) and (b), ■, MEP was tested with the standard anti-Ro/SSA serum; ●, EP was tested with the standard anti-Ro/SSA serum; □, MEP was tested with a control normal serum; ○, EP was tested with a control normal serum.

Fig. 4. ELISA using the unmodified and modified peptides assumed to function as epitopes of the 60kDa Ro/SSA antigen. Sample sera from N1 to N20 represent the normal sera, and those from P1 to P30 represent the sera of SLE patients. Sera were considered positive when the absorbance values were higher than the threshold values. The threshold values for the diagnosis of SLE were 0.028 and 0.048 for EP and MEP, respectively. The results are averages of duplicate determinations with standard deviations being less than 5% for each bar.

EP and MEP represent the peptide sequence of 60kDa Ro/SSA antigen, T¹²⁷FIQFKKDLKE¹³⁷W, (Ahx)₂T¹²⁷FIQFKKDLKE¹³⁷W(Ahx)₂, respectively.

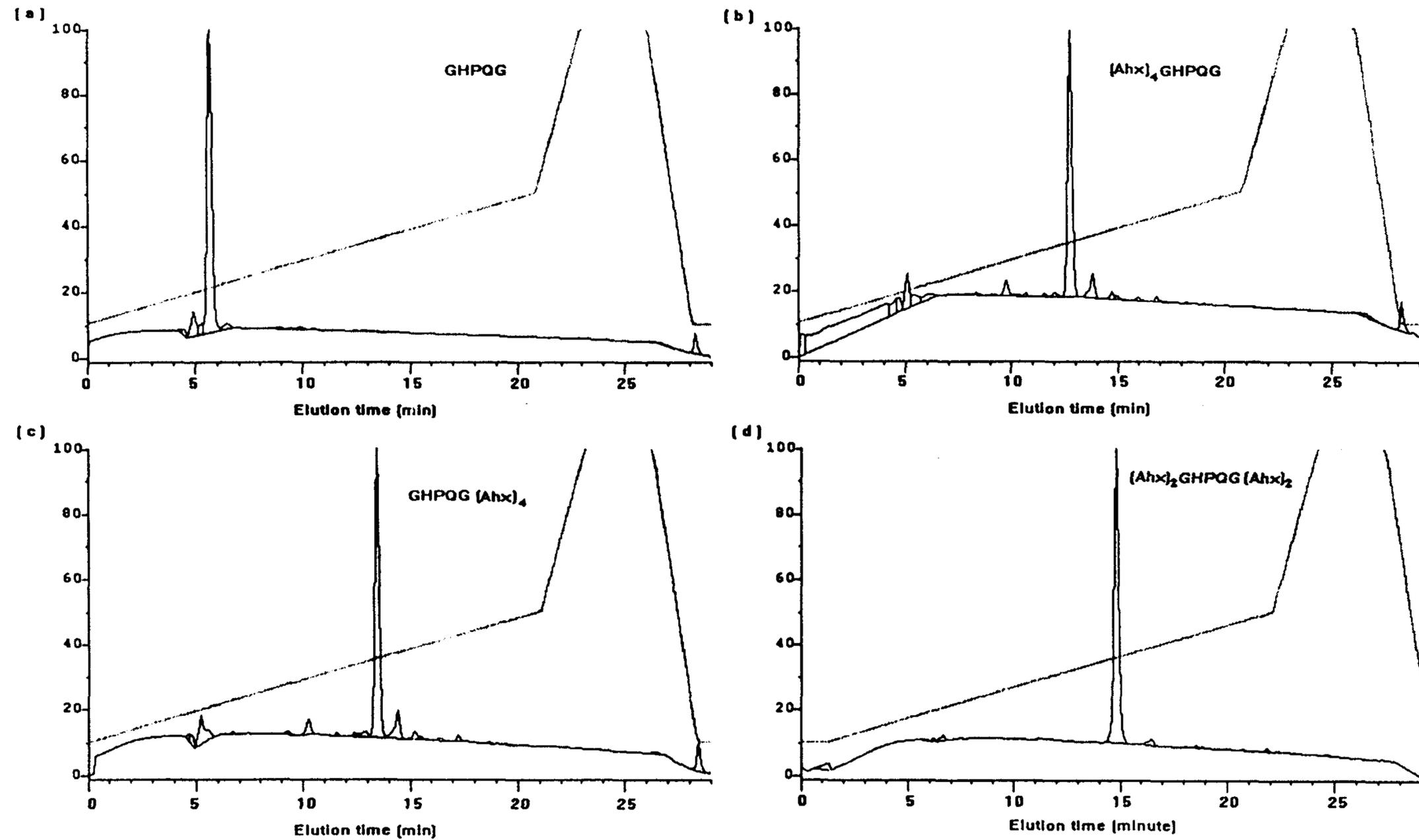


Fig. 1. HPLC analysis of the modified streptavidin binding peptides. 'Ahx' represents the ϵ -aminocaproic acid residue. HPQ#1, HPQ#2, HPQ#3, HPQ#4 represent GHPQG, (Ahx)₄-GHPQG, GHPQG-(Ahx)₄, (Ahx)₂-GHPQG-(Ahx)₂, respectively. The HPLC profiles were obtained at 215nm using a reverse phase C18 column as explained in the text.

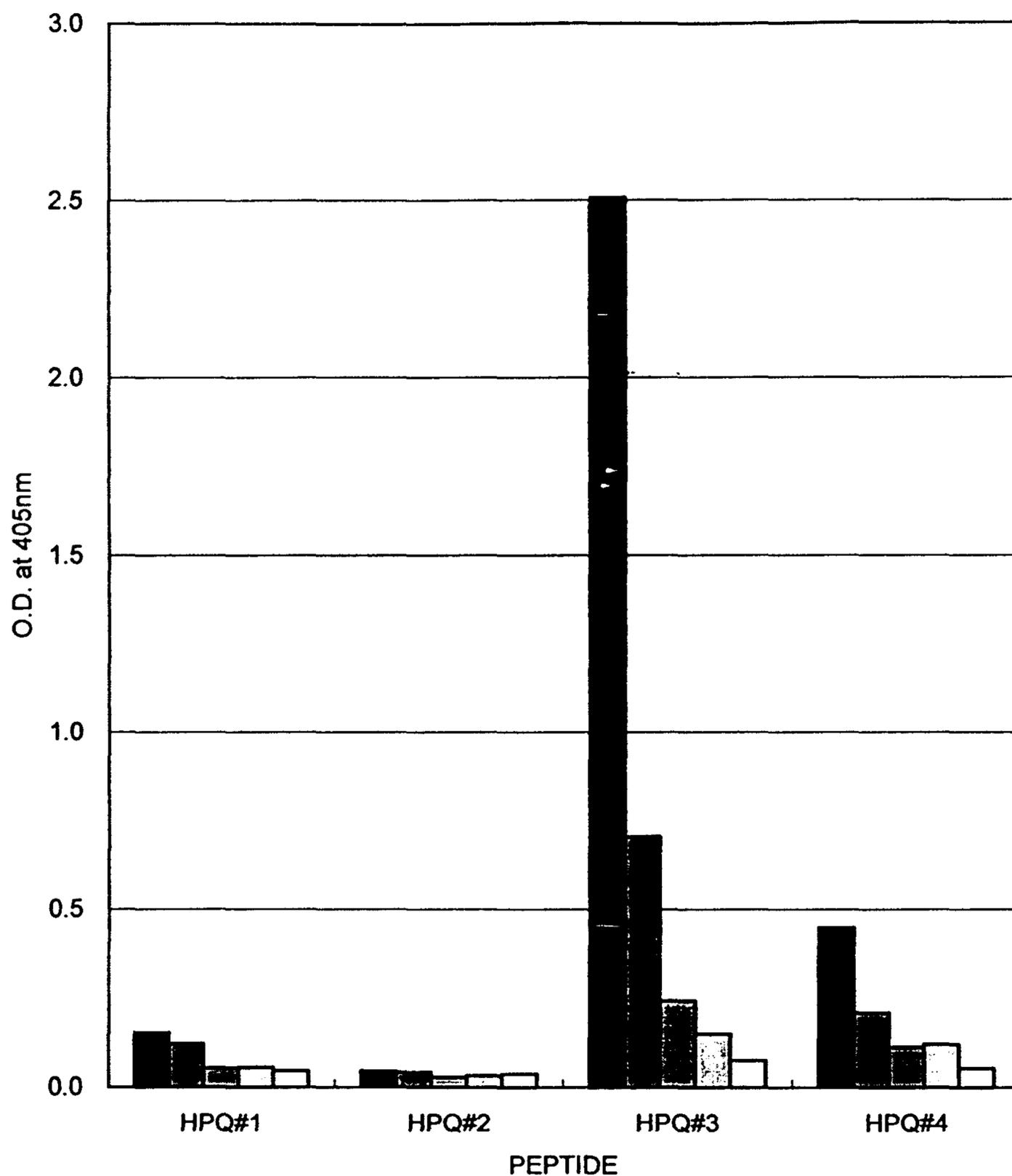


Fig. 2. Tests using the modified streptavidin binding peptides. HPQ#1, HPQ#2, HPQ#3, HPQ#4 represent GHPQG, (Ahx)₄-GHPQG, GHPQG-(Ahx)₄, (Ahx)₂-GHPQG-(Ahx)₂, respectively. Five 3-fold serial dilutions were carried out for each peptide as noted with the bar graphs. Original solutions for each peptide were prepared as 30μM solutions.

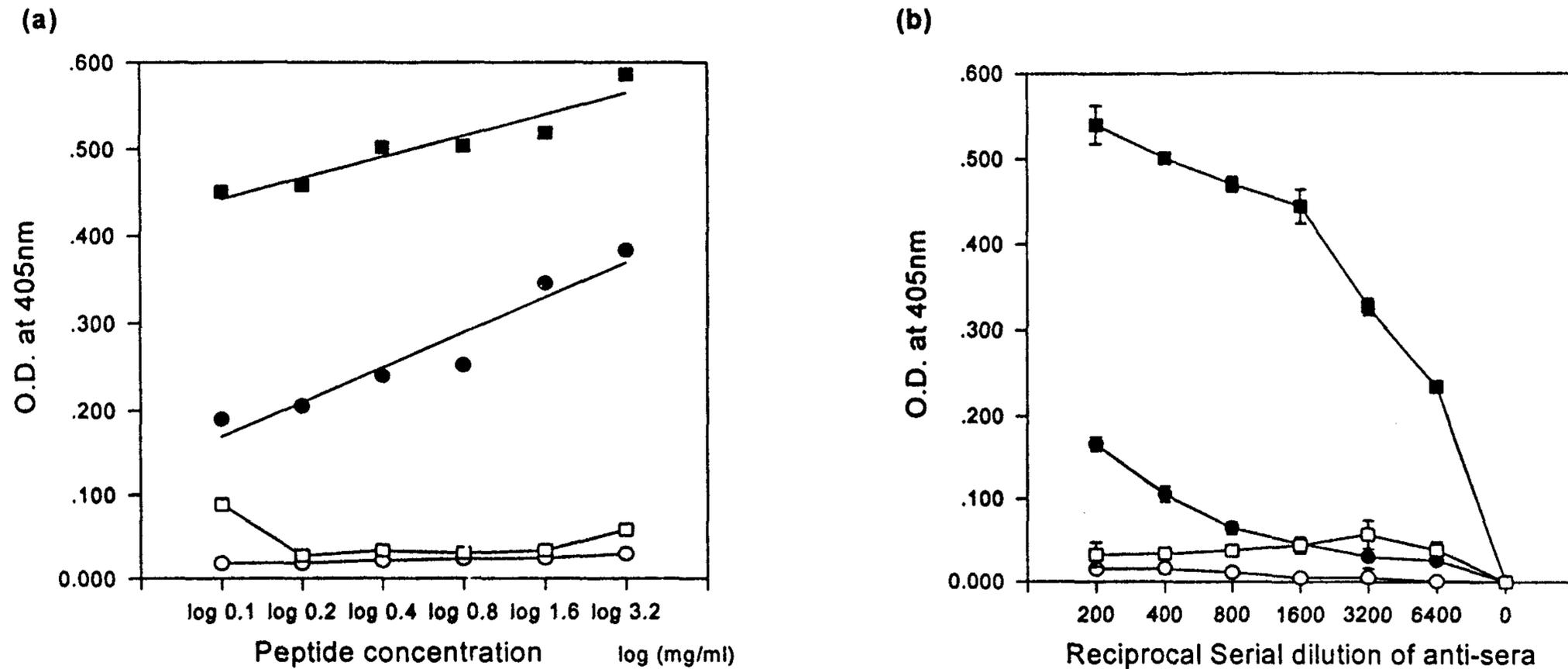


Fig. 3. (a) Test for peptide coating concentration for indirect ELISA. Microplates were coated with various concentrations of EP and MEP. EP and MEP represent the peptide sequence of 60kD Ro/SSA antigen, $T^{127}FIOFKKDLKE^{137}W$, $(Ahx)_2T^{127}FIOFKKDLKE^{137}W(Ahx)_2$, respectively. Optimal coating concentrations for EP and MEP were determined with the anti-sera diluted 1:100 in PBS.

(b) Reciprocal serial dilutions of anti-sera. The peptides, both EP and MEP, were coated at a concentration of 0.2mg/ml. The standard anti-Ro-SSA serum was tested for binding to its target peptides. A control normal human serum was also tested as a negative control. Six 2-fold serial dilutions of these anti-sera were carried out for each peptide.

In (a) and (b), ■, MEP was tested with the standard anti-Ro/SSA serum; ●, EP was tested with the standard anti-Ro/SSA serum; □, MEP was tested with a control normal serum; ○, EP was tested with a control normal serum.

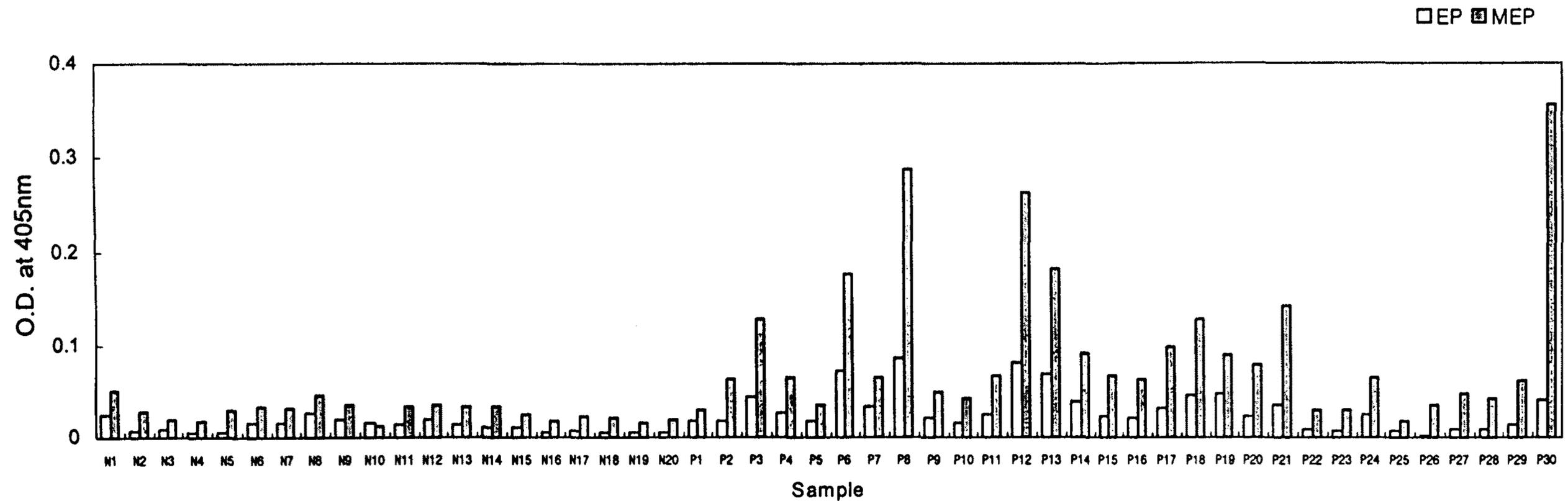


Fig. 4. ELISA using the unmodified and modified peptides assumed to function as epitopes of the 60kD Ro/SSA antigen. Sample sera from N1 to N20 represent the normal sera, and those from P1 to P30 represent the SLE patient sera. Sera were considered positive when the O.D. values were higher than the threshold values. The threshold values for the diagnosis of SLE were 0.028 and 0.048 for EP and MEP, respectively. The results are averages of duplicate determinations with standard deviations being less than 5% for each bar. EP and MEP represent the peptide sequence of 60kD Ro/SSA antigen, $T^{127}FIQFKDLKE^{137}W$, $(Ahx)_2T^{127}FIQFKDLKE^{137}W(Ahx)_2$, respectively.

- 별첨 8 -

EPITOPE MAPPING WITH SYNTHETIC PEPTIDES OF 60-KD(SSA) PROTEIN IN KOREAN PATIENTS WITH SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS(SLE)
Sung-Hwan Park, Jae-Chul Pyun*, Min-Young Cheong*, Jong-Sang Park*, Jun-Ki Min, Jae-Ho Park, Sang-Heon Lee, Yeon-Sik Hong, Chul-Soo Cho, and Ho-Youn Kim. Dept. of Internal medicine, Catholic University Medical College, Dept. of Chemistry*, College of Natural Science, Seoul National University, Seoul, Korea

Autoantibodies to Ro/SSA are commonly found in sera of patients with SLE. Primary Sjogren syndrome and highly associated with HLA class II DR3 alleles in Caucasians and DR15 in Orientals. Recent several studies have demonstrated that anti Ro-60 autoantibodies recognize conformational epitopes on the Ro 60kD antigen. We have investigated the number and location of epitopes of 60 kD Ro/SSA antigen recognized by Korean patients with SLE using short peptides conserved conformation. Seventy sera, fifty Korean SLE patients who fulfilled the ARA criteria and twenty normal, were obtained from the clinic of Rheumatism in Kangnam St. Mary's hospital. The peptides assumed to function as epitopes of 60kD Ro antigen. were selected by analyzing hydrophilicity, acrophilicity, hydropathy plots. To make a more stable, accurate results of peptide(epitope) specific ELISA, peptides (epitope) on the conserved conformation in 60kD antigen were prepared to ϵ -aminocaproic acid in each terminal. Six domains representing residues 46-56, 100-106, 127-137, 168-178, 228-237, 334-343 were essential for reactivity with the 60 kD Ro antibodies in SLE. Among these six fragments, the peptide representing residues 334-343, was recognized by 74 % of SLE sera and none of normal control. We demonstrated that the peptide located between aminoacids 334 and 343 was the most immunodominant epitope in Korean patients with SLE. This is quite differnt from Caucasian data. This difference may be derived from immunogenetic difference between Korean and Caucasians.

- 별첨 9 -

THE IMPACT OF HLA-DRB1*0405 ON DISEASE SEVERITY IN KOREAN PATIENTS WITH SEROPOSITIVE RHEUMATOID ARTHRITIS

HO-YOUN KIM, JUN-KI MIN, HYUNG-IN YANG, SUNG-HWAN PARK, YEON-SIK HONG, WON-HEE JEE,* SANG-HEON LEE, CHUL-SOO CHO, TAI-GYU KIM† and HOON HAN†

Department of Internal Medicine, Division of Rheumatology/Immunology, Rheumatism Centre of Kangnam St Mary's Hospital and *Department of Radiology and †Department of Microbiology, Catholic University Medical College, Seoul, Korea

SUMMARY

Many reports have described HLA-DRB1 genes as having an influence on disease severity and susceptibility in rheumatoid arthritis (RA). Studies were undertaken to define the effect of RA-associated alleles on disease severity in Korean patients with seropositive RA. The results indicate that the most common RA susceptibility allele, HLA-DRB1*0405, is significantly associated with bony erosion, joint deformity and extra-articular manifestations. However, RA-associated alleles in Koreans have less effect on nodular disease than in Caucasians. This suggests that the presence of RA-associated alleles, especially HLA-DRB1*0405, seems to be a prognostic marker for severe erosive disease in Koreans.

KEY WORDS: DRB1*0405, Disease severity, Seropositive, Rheumatoid arthritis, Koreans.

THE association between HLA-DRB1 and genetic susceptibility to rheumatoid arthritis (RA) is well established in different ethnic groups. HLA-DRB1*0401, *0404, *0405, *0101, *1001 and *1402 are known as RA-associated alleles, which share a common epitope on the third hypervariable region in the HLA-DR molecule [1]. In Caucasians, patients with HLA-DRB1*0404 are more likely to have nodular disease and/or major organ involvement [2]. HLA-DRB1*0405, one of the subtypes of DR4, is most frequently seen in Asian patients with RA. However, little is known about the clinical significance of HLA-DRB1*0405 in disease progression.

The present study was designed to investigate whether extra-articular manifestations and joint destruction are increased in Korean RA patients with HLA-DRB1*0405.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

One hundred and two patients diagnosed with RA fulfilling the 1987 American College of Rheumatology criteria [3] were recruited for this study. Patients had a disease duration of at least 2 yr and were followed at the Rheumatism Center of Kangnam St Mary's Hospital in Seoul, Korea. Venous blood was drawn for collection of peripheral mononuclear cells for the isolation of genomic DNA [4].

The clinical records of patients were reviewed by three investigators for the following variables: age at

disease onset, duration of disease, presence of articular complications including joint deformity and history of operation for joint dysfunction, rheumatoid nodules, additional extra-articular manifestations including rheumatoid vasculitis, rheumatoid lung disease, anaemia (haemoglobin levels below 10.0 g/dl for more than 6 months excluding other causes for the anaemia), secondary Sjögren's syndrome and neuropathy. Joint deformities included swan neck deformities, Boutonniere deformities, atlantoaxial subluxation of the cervical spine, foot deformities, severe (more than grade 3) limitation of motion and complete loss of joint function. All reconstructive joint surgeries were also evaluated, including total knee or hip joint replacements, reconstruction of rheumatoid foot or wrist deformities and cervical spine fusions. Synovectomies, *per se*, were not included. All patients had been treated with disease-modifying anti-rheumatic drugs (DMARDs) during the course of the disease.

Radiological evaluation

An erosive score was estimated by Sharp's method [5] with minor modification. The hand X-ray films were evaluated for bony erosion, joint deformity and bony ankylosis by three different observers, including one bone radiologist. The number of bony erosions was counted at 17 joints instead of 29 joints in each AP view of the hand which included the carpal bones and the radio-ulna joints [6]. Since, in most instances, more than four lesions could not clearly be distinguished, no attempt was made to determine the number of erosions beyond four individual lesions. One point was assigned to each erosion without attempting to evaluate the size of the erosion. A destroyed articular surface or joint ankylosis was assigned five points. Seventeen joint

Submitted 17 June 1996; revised version accepted 7 October 1996.

Correspondence to: Ho-Youn Kim, Rheumatology/Immunology, Department of Internal Medicine, Kangnam St Mary's Hospital, Catholic University Medical College, # 505 Banpo-Dong, Seocho-Ku, Seoul, 137-040, Korea.

areas were read for erosive changes, giving a maximum possible erosive score of 170. We did not score narrowing of the joint space. The erosive score was obtained by dividing the total number of erosions on a single film by the maximum erosive score of 170.

Analysis of HLA-DRB1 locus

Each HLA-DRB1 allele was genotyped by reverse dot hybridization. The primers and probes for genotyping of generic DR types and DR4 subtypes were designed according to the Eleventh International Histocompatibility Workshop and Conference [7].

Statistical analysis

One-way ANOVA (Scheffe's test) was applied to determine the statistical significance of the bony erosion score, age, and duration of disease according to the number of HLA-DRB1*0405 and RA-associated alleles.

Spearman correlation coefficients were used to investigate the gene dose effect on erosion score. Linear trend of frequency of joint deformity, nodules and extra-articular manifestations associated with RA-associated alleles was assessed by Bartholomew's test [8] and association of weighting HLA-DRB1*0405 by Cochran-Mantel-Haenszel test among the group.

RESULTS

Distribution of the RA-associated HLA-DRB1 alleles in Korean patients with RA

By DNA-based HLA typing for DRB1, the genotypes of 102 subjects recruited to this study were as shown in Table I. Patients were divided into three groups based on the presence of RA-associated alleles: HLA-DRB1*0401, *0404, *0405, *0408, *0101, *1402 or *1001. Group A included 13 patients with two of the RA-associated alleles, group B consisted of 53 patients with one of these alleles and group C included 36 patients without any RA-associated alleles. Ten of the patients in group A were homozygous for the DRB1*0405 allele, whereas 33 in group B had one allele (heterozygous for DRB1*0405). Age and

TABLE I
Distribution of RA-associated alleles; HLA-DRB1*04, *01 and *10 genotypes in Korean patients with rheumatoid arthritis

Two alleles (Group A)	total number	13
	DRB1*0401/0404	0
	DRB1*0401/0101	0
	DRB1*0405/0101	3
	DRB1*0404/0101	0
	DRB1*0405/0405	10
One allele (Group B)	total number	53
	DRB1*0101/X	10
	DRB1*0401/X	2
	DRB1*0404/X	6
	DRB1*0405/X	33
	DRB1*1001/X	2
No allele (Group C)	X/X	36

X, not RA-associated allele.

TABLE II
(A) Demographics of patients

No. of patients (n = 102)	Group A (n = 13)	Group B (n = 53)	Group C (n = 36)
Mean age in yr (range)	40.3 (23-64)	38.5 (18-66)	35.9 (23-62)
Mean duration of disease in months (range)	111.5 (32-353)	104.5 (24-388)	104.7 (24-284)

(B) Demographics of patients by the presence of the HLA-DRB1*0405 alleles

No. of patients (n = 79)	Homozygous (n = 10)	Heterozygous (n = 33)	None (n = 36)
Mean age in yr (range)	43.9 (25-64)	39.4 (18-66)	35.9 (23-62)
Mean duration of disease in months (range)	112 (32-353)	122 (24-388)	103 (24-284)

duration of illness of the patients are shown in Table IIA and B. There are no significant differences among different groups.

Disease severity according to RA-associated alleles

The incidence of joint deformity (group A:B:C = 53.8%:50.9%:30.6%; $P < 0.05$, Bartholomew's test) and extra-articular manifestations (group A:B:C = 53.8%:39.6%:19.4%; $P < 0.05$) were significantly correlated with the number of RA-associated alleles, but we could not find a significant association between the presence of s.c. nodules and RA-associated alleles (group A:B:C = 46.1%:33.9%:25.0%; $P > 0.05$) (Table III). High erosive scores were found in patients with two or one RA-associated alleles (two, one, none: 0.3325, 0.2298 vs 0.1568, respectively; $P < 0.05$) (Fig. 1).

Disease severity according to the presence of HLA-DRB1*0405

Because the presence of non-HLA-DRB1*0405 RA-associated alleles could influence the gene dose effect of *0405, three patients who had DRB1*0405/0101 in group A and 20 patients without *0405 in group B were excluded in the analysis of the impact of *0405 on disease severity. After adjusting each group for even distribution of DRB1*0405, as the dose of the DRB1*0405 gene increases, the incidence of joint deformity also increases (two alleles, one, none: 40.0, 63.6 and 30.5%, respectively; $P = 0.013$, Cochran-Mantel-Haenszel method of testing association). However, patients in group B with one DRB1*0405 allele had the highest incidence of joint deformity. Analysis of the effect of DRB1*0405 on RA progression shows that extra-articular manifestations were present in 60% of those with two DRB1 alleles (homozygosity), in 54.5% with one allele (homozygosity) and in 19.4% in patients without this allele.

TABLE III
Disease severity according to the presence of RA-associated alleles and HLA-DRB1*0405

Disease severity	Group A (two RA-associated alleles)			Group B (one RA-associated allele)			Group C (no RA-associated allele)
	0405/0405 (n = 10)	0405/RALA (n = 3)	Total	0405/X (n = 33)	RALA/X (n = 20)	Total	X/X (n = 36)
Joint deformity	4*	3	7 (53.8%)†	21	6	27 (50.9%)	11 (30.6%)
EAM	6*	1	7 (53.8%)†	18	3	21 (39.6%)	7 (19.4%)
Subcutaneous nodule	4	2	6 (46.1%)	12	6	18 (33.9%)	9 (25.0%)

RALA, RA-associated alleles excluding *0405.

X, no RA-associated alleles.

EAM, extra-articular manifestations.

* $P < 0.05$. Cochran-Mantel-Haenszel test.

† $P < 0.05$. Bartholomew's test.

The presence of s.c. nodules increased when the number of DRB1*0405 alleles increased, but no statistically significant difference was found among the groups (two alleles, one allele, none: 40.0, 36.3 and 25.0%, respectively; $P = 0.66$; Table III). Erosive scores were increased in patient groups with one or two HLA-DRB1*0405 alleles compared to the group with no alleles (two, one, none: 0.2856, 0.2376 vs 0.1568; $P < 0.05$) (Fig. 1).

A significant gene dose effect was found for extra-articular manifestations, joint deformity and bony erosions. Nodular disease increases when HLA-DRB1*0405 increases, but does not reach statistical significance.

DISCUSSION

RA is known to have genetic associations with HLA-DRB1 alleles which play an important role in RA severity and susceptibility [9, 10], but the phenotype of HLA-DR associated with RA is racially different. Immunogenetic studies indicated that structures of the antigen binding epitope on the third hypervariable region in these RA-associated alleles are either similar or the same (shared epitope hypothesis) [1]. In Caucasians, the presence of HLA-DRB1*0401 or *0404 is associated with the highest relative risk for RA susceptibility [11] and these alleles were proven to have a gene dose effect on disease severity [2, 12]. According to Weyand and Goronzy's study of Caucasians [12], homozygosity for HLA-DRB1*0404 is strongly associated with nodular disease and/or major organ involvement. Heterozygotes for HLA-DRB1*04 and *01 or *1402 have a higher association with nodular disease and/or extra-articular manifestations compared to patients without RA-associated alleles.

In our study, patients were divided into three groups (A, B and C) based on the number of RA-associated alleles (HLA-DRB1*0401, *0404, *0405, *1402, *0101 and *1001). The extra-articular involvement, the number of bony erosions on hand and wrist X-ray and/or joint deformity were found to be significantly increased in the patients who have RA-associated alleles. Increased gene dose is associated with disease severity. Our finding of a gene dose effect is somewhat similar to that reported in Caucasians. The association between the presence of s.c. nodules and RA-associated alleles was not found in our study. We reported that the prevalence of HLA-DRB1*0405 is 11.9% in the general population, 44.2% in patients with RA and 73.7% in DR4-positive patients [13]. HLA-DRB1*0405 is the most prominent RA-associated allele in Koreans.

Data from the Japanese [14] and southern Chinese [15] also show a similar prevalence, but little is known about the effect of HLA-DRB1*0405 on disease severity. The search for an association of this gene has focused on bone destruction, joint deformity and extra-articular manifestations. Homozygosity and/or heterozygosity of DRB1*0405 were significantly

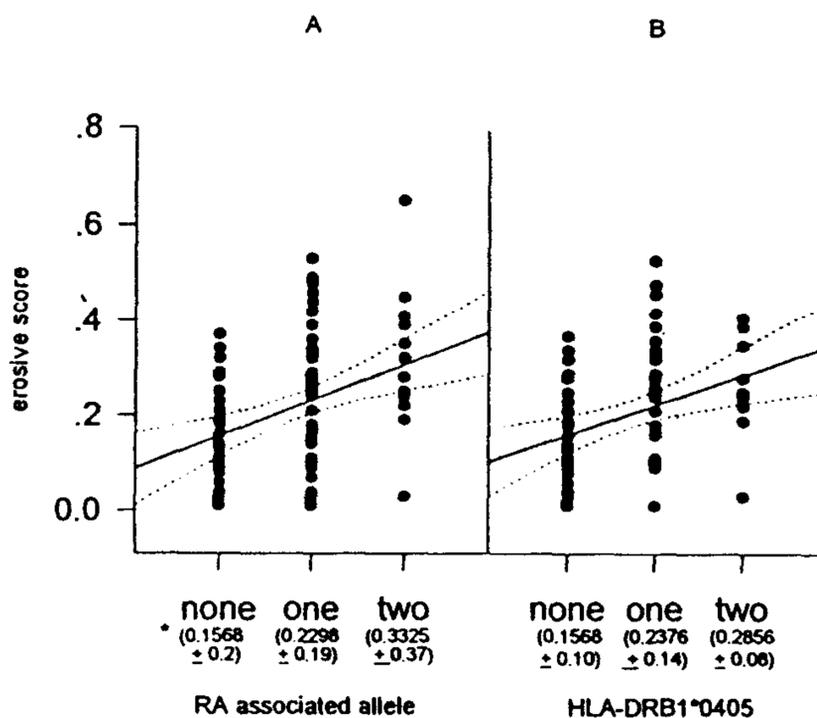


FIG. 1.—Correlations between erosive score and the number of RA-associated alleles (A) and HLA-DRB1*0405 (B). The erosive score has a positive correlation with the number of RA-associated alleles (Spearman correlation coefficient 0.3650) and HLA-DRB1*0405 (Spearman correlation coefficient 0.3877). *The mean \pm S.E. of the erosive score was represented in each group. Two, two RA-associated alleles or DRB1*0405; one, one RA-associated allele or DRB1*0405; none, no RA-associated allele or DRB1*0405. Middle straight line, predicted regression curve; dotted line, 95% CI.

associated with bony erosion and extra-articular manifestations. This could be an earlier and initial piece of data on the effect of the DRB1*0405 allele on the disease severity of RA.

In conclusion, a significant gene dose effect of RA-associated alleles, especially HLA-DRB1*0405, on disease severity was found in Korean patients with RA. This association involved bony erosions, joint deformity and extra-articular manifestations. However, this allele does not seem to be associated with nodules of rheumatic disease, unlike in Caucasians. The presence of HLA-DRB1*0405 can be a useful marker with implications for a poor prognosis in Koreans.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the Biotech 2000 (G025538), KOSEF and the Catholic Medical Centre. We are grateful to Professor H.-H. Song for consultation regarding statistical analysis.

REFERENCES

1. Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ. The shared epitope hypothesis: An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1987;30:1205-13.
2. Weyand CM, Hicok KC, Conn DL, Goronzy JJ. The influence of HLA-DRB1 genes on disease severity in rheumatoid arthritis. *Ann Intern Med* 1992;117:801-6.
3. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA *et al.* The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988;31:315-8.
4. Jondal M, Holm G, Wigzell H. Surface markers on human T and B lymphocytes: A large population of lymphocytes forming nonimmune rosettes with sheep red blood cells. *J Exp Med* 1972;136:207-15.
5. Sharp JT, Lidsky MD, Collins LC, Moreland J. Methods of scoring the progression of radiologic changes in rheumatoid arthritis. Correlation of radiologic, clinical and laboratory abnormalities. *Arthritis Rheum* 1971;14:706-20.
6. Toda Y, Minamikawa Y, Akagi S. Rheumatoid-susceptible alleles of HLA-DRB1 are genetically recessive to non-susceptible alleles in the progression of bone destruction in the wrists and fingers of patients with RA. *Ann Rheum Dis* 1994;53:587-92.
7. Tsuji K, Aizawa M, Sasazuki T (eds) HLA 1991. Proceedings of the eleventh international histocompatibility workshop and conference. Oxford: Oxford University Press. 1992:83-108.
8. Bartholomew DJ. A test of homogeneity for ordered alternatives *Biometrika* 1959;46:36-48.
9. McMahon MJ, Hillarby MC, Clarkson RWE, Hollis S, Grennan DM. Major histocompatibility and articular disease severity in rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* 1993;32:899-902.
10. Nunez G, Moore SE, Ball GV, Hurd ER, Stastny P. Study of HLA antigens in ten multiple-case rheumatoid arthritis families. *J Rheumatol* 1984;11:129-35.
11. Worsworth BP, Lanchbury JS, Sakkas LI, Welsh KI, Panayi GS, Bell JI. HLA-DR4 subtype frequencies in rheumatoid arthritis indicate that DRB1 is the major susceptibility locus with HLA class II region. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:10049-53.
12. Weyand CM, Goronzy JJ. Inherited and noninherited risk factors in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 1995;7:206-13.
13. Kim HY, Kim TG, Park SH, Lee SH, Cho CS, Han H. Predominance of HLA-DRB1*0405 in Korean patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1995;54:988-90.
14. Tsuchiya K. Immunogenetic analysis of rheumatoid arthritis in the Japanese population. *Fukuoka Acta Med* 1993;84:68-78.
15. Molkenin J, Gregersen PK, Lin X *et al.* Molecular analysis of HLA-DRB and DQB polymorphisms in Chinese with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1993;52:610-2.

- 별첨 10 -

Flow cytometric analysis of rheumatoid arthritis shared epitope “QR(K)RAA” using monoclonal antibodies

Sung-Hwan Park, Soon-Ja Lim, Jun-Ki Min, Sang-Heon Lee, Yeon-Sik Hong, Chul-Soo Cho, Ho-Youn Kim, Tai-Gyu Kim¹⁾, Hoon Han¹⁾

Dept of Int. Med, Dept of Microbiology¹⁾, Catholic University Medical College, Seoul, Korea

Objective : Rheumatoid arthritis shared epitope coded by several HLA class II DRB1 allele contributes to the severity and outcome of rheumatoid arthritis(RA) and is a useful prognostic marker in early RA.

It has been suggested to determine the shared epitope and RA associated HLA subtypes by using monoclonal antibodies(Mab) which has been generated recently.

To evaluate the usefulness of flow cytometric analysis for identifying the shared epitope of rheumatoid arthritis, we compared the results of flow cytometry and DNA oligotyping(PCR-SSCP) of HLA DR molecules in the patients with RA.

Methods : Twenty seven seropositive patients were studied using both techniques. Peripheral blood B lymphocytes were stained with Mab which recognize the HLA-DRB1*04 molecule [(Mab NFLD.D1, DRB1*04, Terra Nova Biotech, Newfoundland, Canada) and the shared epitope [(Mab NFLD.D2, (QKRAA/QRRAA)]. Mab stained cells were analysed by flow cytometry. Genomic DNA was prepared from PBMNC and used for HLA-DR genotyping.

Results : Shared epitope encoded by HLA-DRB1*0405, *0401, *0404, *0101 was indentified in 17/27 cases by DNA typing. By the flow cytometry, The shared epitope was identified in 17 out of 27 cases and the presence of an HLA-DRB1*04 molecule was in 15 out of 27 cases and The shared epitope determined by flow cytometry gave identical results to those from DNA oligotyping.

Conclusion : Flow cytometric analysis with Mab recognising rheumatoid shared epitope and HLA-DR4 molecules is promising for detection of shared epitope. Rapid analysis of the shared epitope by flow cytometry is helpful to select patients needing DNA typing and these results will aid in the early stratification of high risk patients for severe RA.