



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101466732 B

(45) 授权公告日 2013.04.17

(21) 申请号 200780022028.3

C07K 16/18(2006.01)

(22) 申请日 2007.06.12

G01N 33/15(2006.01)

(30) 优先权数据

G01N 33/50(2006.01)

187186/2006 2006.06.12 JP

G01N 33/53(2006.01)

137856/2007 2007.05.24 JP

(85) PCT申请进入国家阶段日

(56) 对比文件

2008.12.12

JP 2002302457 A, 2003.05.24,

WO 2005082940 A1, 2005.10.11,

(86) PCT申请的申请数据

PCT/JP2007/061779 2007.06.12

P. Dehan et al. Identification of post-transplant anti- α 5 (IV) collagen alloantibodies in X-linked Alport syndrome. 《Nephrol Dial Transplant》. 1996, 第11卷(第10期),

(87) PCT申请的公布数据

W02007/145192 JA 2007.12.21

F. KELLER et al. Raised concentrations of the carboxy terminal propeptide of type IV (basement membrane) procollagen (NC1) in serum and urine of patients with glomerulonephritis. 《Europeun Journal of Clinical Inilestigation》. 1992, 第22卷(第3期),

(73) 专利权人 横山司甫

地址 日本东京都

(72) 发明人 横山司甫

(74) 专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事务所(普通合伙) 11277

代理人 刘新宇 李茂家

常立峻等. ELISA 定量检测IV型胶原方法的建立. 《Labeled Immunoassays & Clin Med》. 2003, 第10卷(第1期),

审查员 徐荣

(51) Int. Cl.

C07K 14/78(2006.01)

A61K 39/00(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

A61P 13/12(2006.01)

A61P 37/02(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 10 页 附图 6 页

(54) 发明名称

IV型胶原样免疫反应性多肽

数为3个以上、35个以下。

(57) 摘要

本发明提供一种对肾炎的检测有用的IV型胶原样免疫反应性多肽及其抗体、IV型胶原样免疫反应性多肽选出方法、免疫反应性抗体与免疫反应性多肽的筛选方法、肾炎模型、慢性肾炎的检测方法、以及疫苗与肾炎治疗药。一种IV型胶原样免疫反应性多肽,其与分离出的慢性肾炎来源的生物试样发生免疫反应。所述IV型胶原样免疫反应性多肽优选具有选自下组中的至少一个以上:作为结构 α 链的1链~6链中的任意1条链以上、作为结构区域的选自7S、主三螺旋区及NC1中的任意一种以上、以及作为结构多肽的氨基酸

1. 一种 IV 型胶原样免疫反应性多肽,其特征在於,与分离出的慢性肾炎来源的生物试样发生免疫反应,所述多肽为选自下述氨基酸序列中的任意一个,

1)GRGTC NYVAN SYSPW LATVD

2)SCLEE FRSPV FIECH GRGTC

3)GWDSL WIGYS FMMHT SAGAE

4)PFISR CAVCE APAVV IAVHS

5)STMPF MFCNI NNVCN FASRN

式中,A 表示丙氨酸,C 表示半胱氨酸,D 表示天冬氨酸,E 表示谷氨酸,F 表示苯丙氨酸,G 表示甘氨酸,H 表示组氨酸,I 表示异亮氨酸,L 表示亮氨酸,M 表示甲硫氨酸,N 表示天冬酰胺,P 表示脯氨酸,R 表示精氨酸,S 表示丝氨酸,T 表示苏氨酸,V 表示缬氨酸,W 表示色氨酸及 Y 表示酪氨酸,各多肽将连续的氨基酸序列从 N 端起以 5 个为单位来进行表示。

2. 根据权利要求 1 所述的 IV 型胶原样免疫反应性多肽,其中,所述分离出的慢性肾炎来源的生物试样为尿。

3. 根据权利要求 2 所述的 IV 型胶原样免疫反应性多肽,其中,所述尿在保存时冷冻保存,使用时解冻后均匀分散于磷酸缓冲生理盐水中,离心后除去沉淀,所得上清液用冻干机干燥,再溶解于磷酸缓冲生理盐水中。

IV 型胶原样免疫反应性多肽

技术领域

[0001] 本发明涉及 IV 型胶原样免疫反应性多肽及其抗体、IV 型胶原样免疫反应性多肽选出方法、免疫反应性抗体或免疫反应性多肽的筛选方法、肾炎模型、慢性肾炎的检测方法、疫苗以及肾炎治疗药。

背景技术

[0002] IV 型胶原尚未被完全阐明。IV 型胶原的众多分子相互结合,多种类的成分关联其上,由此形成组织基底膜。另外,因 IV 型胶原为组织基底膜的主要成分,从而也被称为基底膜胶原。IV 型胶原有 $\alpha 1$ 链~ $\alpha 6$ 链 6 种异构体,1 分子 IV 型胶原由 3 种 α 链构成。3 种 α 链的构成因组织而异,胎盘来源的基底膜中富含 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 链,在全身各组织的基底膜中都可看到。肾来源的基底膜特异性富含 $\alpha 3$ 链~ $\alpha 6$ 链。

[0003] 1 分子 IV 型胶原分为三个区域,从 N 末端起的具有三螺旋结构的 7S 和主三螺旋区 (TH)、位于 C 末端区域的非螺旋结构的 NC1。从生物体组织中提取时,根据不同处理方法所得的区域不同,一般方法为:用胃蛋白酶处理得到三螺旋区域,用细菌来源的胶原酶处理得到 NC1 (非专利文献 1)。

[0004] 另一方面,肾炎根据症状大致分为“急性肾炎”与“慢性肾炎”,各种各样的详细分类的肾疾病由专科医生命名。因通常称为肾炎的疾病指“慢性肾炎”,本发明中在无特别说明的情况下将“肾炎”与“慢性肾炎”作为同义使用。“慢性肾炎”包括所谓的慢性肾炎、IgA 肾病、微小病变型肾病、膜性肾病、继发性肾病中的糖尿病性肾病、高血压性肾病等,但限定于此。肾炎每年新增透析案例 3 万人,无论是对于病人的生活质量 (QOL)、还是对于国民医疗费 (每 1 例透析费用为 600 万日元/年) 都是极大的负担。透析的技术不断进步,但在发病的早期确定肾病变、直接治疗肾炎的药剂尚不存在。其原因很大程度上是由于肾炎的发病机制尚未被阐明。

[0005] 另外,肾炎存在肾炎特有的抗原,世界上正在对各种抗原物质进行研究 (非专利文献 2)。若抗原得到确定,就可望以之为靶标物质进行诊断试剂与肾炎治疗剂的开发。已确定抗原的唯一例子有肺出血-肾炎综合症 (Goodpasture's syndrome) (狭义的抗肾小球基底膜 (GBM) 抗体肾炎)。有报告指出:该抗原存在于 $\alpha 3$ 链 NC1 的 C 末端 36 位氨基酸残基与 N 末端起的氨基酸序列 17-31、以及 127-141 (非专利文献 3) 等,任意一种抗原的该部位都位于 $\alpha 3$ 链上。另外, $\alpha 3$ 链上的 17-31 (氨基酸残基数 15 个) 以及 127-141 (氨基酸残基数 15 个) 为从嵌合型 $\alpha 1/\alpha 3$ NC1 检索到的。

[0006] 作为罕见的肾炎的肺出血-肾炎综合症属于“急性肾炎”,因典型情况下 2 周左右即发展为重症状态,必须迅速进行确诊。确诊中,使用肾活检的免疫组化染色,根据抗 GBM 的自身抗体免疫球蛋白 IgG 有无沉淀来判断。

[0007] 非专利文献 1: Extracellular Matrix IRL PRESS/OXFORDUNIVERSITY PRESS Oxford New York

[0008] 非专利文献 2: 腎と透析 (肾与透析) 2005 July Vol159 No.1 东京医学社

[0009] 非专利文献 3 :J. Biol Chem(1993) 268, 26033-26036

发明内容

[0010] 发明要解决的问题

[0011] 然而该检验存在如下问题 :在样品采集时对患者造成痛苦并具危险性,免疫组化染色中需要病理学专家的高度诊断能力。

[0012] 因此,作为简便方法,可使用对血中出现的自身抗体进行检测的 ELISA(酶联免疫吸附试验)试剂盒(商品名:ネフロスカラー・GBM、进口商ニツシヨ一股份有限公司、销售商ニプロ股份有限公司)。然而,根据上述 ELISA 试剂盒附带的说明书以及所引用的文献(臨床機器・試薬(临床设备・试剂)、Vo1. 20 No. 3、367-374(1997)),只有肺出血-肾炎综合症的自身抗体被高浓度地检测到,其他肾炎时仅能检测到与健康者同样的低水平。根据该说明书,使用的抗原为牛 GBM 抗原,GBM 由以 IV 型胶原为主要成分的多种成分组成,考虑大小的话,为 GBM>IV 型胶原 >NC1> α 3 链的 NC1> 上述的各氨基酸残基(抗原)。使用牛 GBM 作为抗原时,该巨大区域中没有其他的肾炎的抗原,作为肾炎的检测是不充分的。另外,现在虽为日本唯一获得许可并在医保范围内的诊断试剂,但存在因价格昂贵且为进口商品而使用困难的问题。

[0013] 因此本发明的目的在于提供对肾炎的检测有用的 IV 型胶原样免疫反应性多肽及其抗体、IV 型胶原样免疫反应性多肽选出方法、免疫反应性抗体与免疫反应性多肽的筛选方法、肾炎模型、慢性肾炎的检测方法、以及疫苗与肾炎治疗药。

[0014] 用于解决问题的手段

[0015] 本发明人为解决上述问题,在伴随肾病、其他疾病的继发性肾病的治疗药开发与早期检测方法上经长期努力专心研究,通过使用慢性肾炎来源的生物试样找出肾炎的抗原部位,确立了 IV 型胶原样免疫反应性多肽及其抗体、IV 型胶原样免疫反应性多肽选出方法、免疫反应性抗体与免疫反应性多肽的筛选方法、肾炎模型、慢性肾炎的检测方法、以及疫苗与肾炎治疗药,完成了本发明。

[0016] 即,本发明的 IV 型胶原样免疫反应性多肽,其特征在于,与分离出的慢性肾炎来源的生物试样发生免疫反应。

[0017] 另外,本发明的 IV 型胶原样免疫反应性多肽的抗体,其特征在于,与上述 IV 型胶原样免疫反应性多肽发生免疫反应。

[0018] 此外,本发明的 IV 型胶原样免疫反应性多肽选出方法,其特征在于,所述方法以分离出的慢性肾炎来源的生物试样为配体,选出与上述慢性肾炎来源的生物试样发生免疫反应的上述 IV 型胶原样免疫反应性多肽。

[0019] 此外,本发明的免疫反应性抗体的筛选方法,其特征在于,使用上述 IV 型胶原样免疫反应性多肽。

[0020] 此外,本发明的免疫反应性多肽的筛选方法,其特征在于,使用上述 IV 型胶原样免疫反应性多肽的抗体。

[0021] 此外,本发明的肾炎模型,其特征在于,以选自上述 IV 型胶原样免疫反应性多肽及上述 IV 型胶原样免疫反应性多肽的抗体中的任意一种以上为引发原。

[0022] 此外,本发明的慢性肾炎的检测方法,其特征在于,使用选自上述 IV 型胶原样免

疫反应性多肽及上述 IV 型胶原样免疫反应性多肽的抗体中的任意一种以上。

[0023] 此外,本发明的疫苗,其特征在于,使用选自上述 IV 型胶原样免疫反应性多肽及上述 IV 型胶原样免疫反应性多肽的抗体所组成的组中的任意一种以上。另外,肾炎治疗药,其特征在于,含有该疫苗。

[0024] 发明效果

[0025] 通过本发明,可提供对肾炎的检测有用的 IV 型胶原样免疫反应性多肽及其抗体、IV 型胶原样免疫反应性多肽选出方法、免疫反应性抗体与免疫反应性多肽的筛选方法、肾炎模型、慢性肾炎的检测方法、以及疫苗与肾炎治疗药。

附图说明

[0026] 图 1 为示意健康者与尿中白蛋白值高者的比较(抗 NC1 抗体)的图。

[0027] 图 2 为示意不同疾病抗 NC1 抗体的一览的图。

[0028] 图 3 为示意同一肾炎患者抗三链抗体与抗 NC1 抗体的关联的图。

[0029] 图 4 为示意慢性肾炎 TD38、糖尿病性肾炎 TD42 与健康者(TD31 ~ 37、TD39 ~ 41)的测定比较数据(抗 NC1 抗体)的图。

[0030] 图 5 为示意人 NC1 的 α 3 链、 α 4 链、 α 5 链、 α 6 链的图。

[0031] 图 6 为示意慢性肾炎 No38、糖尿病性肾炎 No42、IgA 肾病与健康者 No31、32、33 的 NC1 样抗原性的比较的图。

具体实施方式

[0032] 以下对本发明的 IV 型胶原样免疫反应性多肽进行说明。

[0033] 本发明的 IV 型胶原样免疫反应性多肽特征在于与分离出的慢性肾炎来源的生物试样发生免疫反应。所述免疫反应为 IV 型胶原样免疫反应性多肽为抗原,分离出的慢性肾炎来源的生物试样为抗体的免疫反应。免疫反应不限定于酶免疫反应,另外还含 AB 法、RIA,免疫发光法、沉淀反应、凝集反应等,酶标记抗体可为多克隆抗体或单克隆抗体,另外也可为将其用放射性物质、发光物质标记后的标记物、无标记物。反应形式不限定于夹心法(sandwich method),也可为竞争法等。作为反应板的替代,可使用玻璃、磁性物质、乳胶,也可没有载体不使用固相法。

[0034] 另外,本发明中“慢性肾炎”包括所谓的慢性肾炎、IgA 肾病、微小病变型肾病、膜性肾病、继发性肾病中的糖尿病性肾病、高血压性肾病等,但不限定于此。

[0035] 此外,本发明的 IV 型胶原样免疫反应性多肽只要与慢性肾炎来源的生物试样发生免疫反应即可,此外不受特别限定,但优选具有选自下组中的至少一个以上:作为结构 α 链的 1 链~6 链中的任意 1 条链以上、作为结构区域的选自 7S、主三螺旋区及 NC1 中的任意一种以上、以及作为结构多肽的氨基酸数为 3 个以上、35 个以下。更优选为 α 5 链,更优选结构区域为 NC1。另外,从费用与效率出发,优选该 IV 型胶原样免疫反应性多肽的多肽长度为 3 个以上、35 个以下氨基酸,同时考虑抗体制备的容易性,最优选为 10 个~20 个。

[0036] 本发明的 IV 型胶原样免疫反应性多肽,与 IV 型胶原同样与分离出的慢性肾炎来源的生物试样发生免疫反应。另外,优选与该 IV 型胶原的 α 5 链的氨基酸序列有同源性。

[0037] 此外,本发明的 IV 型胶原样免疫反应性多肽的结构区域优选含有 NC1 来源的下述

氨基酸序列中的任意一个以上，

[0038] 1)GRGTC NYNAN SYSPW LATVD No. yp13

[0039] 2)SCLEE FRSAP FIECH GRGTC No. yp12

[0040] 3)GWDSL WIGYS FMMHT SAGAE No. yp10

[0041] 4)PFISR CAVCE APAVV IAVHS No. yp08

[0042] 5)STMPF MFCNI NNVCN FASRN No. yp05

[0043] (式中, A 表示丙氨酸, C 表示半胱氨酸, D 表示天冬氨酸, E 表示谷氨酸, F 表示苯丙氨酸, G 表示甘氨酸, H 表示组氨酸, I 表示异亮氨酸, L 表示亮氨酸, M 表示甲硫氨酸, N 表示天冬酰胺, P 表示脯氨酸, R 表示精氨酸, S 表示丝氨酸, T 表示苏氨酸, V 表示缬氨酸, W 表示色氨酸及 Y 表示酪氨酸, 各多肽将连续的氨基酸序列从 N 端起以 5 个为单位来进行表示), 优选与上述氨基酸序列中的 3 个以上的氨基酸的序列有同源性。予以说明, 对于氨基酸序列 1) ~ 5) 分别给予了特定的编号 (No. yp13 等)。

[0044] 此外, 上述分离出的慢性肾炎来源的生物试样有抗 IV 型胶原抗体, 并与具有选自下述所组成的组中的至少一个以上的 IV 型胶原发生免疫反应: 结构 α 链为 1 链~6 链中的任意的 1 条链以上, 结构区域为选自 7S、主三螺旋区及 NC1 中的任意一种以上, 以及结构多肽的氨基酸数为 3 个以上、35 个以下。另外, 该分离出的慢性肾炎来源的生物试样只要为肾炎来源的生物试样即可, 不仅可为人肾炎来源, 也可为动物肾炎来源, 包括尿、血清、肾脏、肾脏的提取物及培养物等、但优选为尿。动物来源的情况下, 优选与人慢性肾炎的“分离出的肾炎来源的生物试样”对比来使用。

[0045] 所述的尿在保存时优选冷冻保存, 使用时解冻后均匀分散于磷酸缓冲生理盐水 (以下称 PBS) 中, 离心后除去沉淀, 所得的上清液用冻干机干燥, 再溶解于 PBS (pH7.4) 中。另外, 也可使用生理盐水或注射用蒸馏水代替 PBS, 为了不使滴度降低, 还要进行灭菌、除菌等其他操作, 即特别留心处理生物来源的制剂时操作人员应注意之处, 由此能制成注射剂或内服剂。另外, 也可将结合有 NC1 抗原的亲合色谱分离柱纯化后的抗体及用硫酸铵沉淀等所得的抗体再次稀释以满足浓度要求, 也可从血清或肾脏纯化抗体的免疫球蛋白。

[0046] 另外, 本发明的 IV 型胶原样免疫反应性多肽的抗体, 其特征在于, 与上述 IV 型胶原样免疫反应性多肽发生免疫反应, 对于 IV 型胶原样免疫反应性多肽, 显示出与分离出的慢性肾炎来源的生物试样相同的免疫反应。

[0047] 另外, 本发明的 IV 型胶原样免疫反应性多肽选出方法, 其特征在于, 以分离出的慢性肾炎来源的生物试样为配体, 选出与上述慢性肾炎来源的生物试样发生免疫反应的上述 IV 型胶原样免疫反应性多肽。通过使用分离出的慢性肾炎来源的生物试样为配体, 能选出对肾炎检测有用的 IV 型胶原样免疫反应性多肽。

[0048] 本发明的 IV 型胶原样免疫反应性多肽选出方法中的上述分离出的慢性肾炎来源的生物试样及 IV 型胶原可使用与前面记载相同的物质。另外, 选出的 IV 型胶原样免疫反应性多肽也可使用与前面记载相同的物质。

[0049] 本发明的免疫反应性抗体的筛选方法, 其特征在于, 使用上述 IV 型胶原样免疫反应性多肽, 优选上述 IV 型胶原样免疫反应性多肽的氨基酸数为 3 个以上、35 个以下, 更优选为 10 个~20 个。具体来说, 使用抗 α 5 链 NC1 抗体或抗 α 5 链 NC1 来源的多肽抗体代替上述慢性肾炎来源的生物试样, 能够筛选出免疫反应性抗体。通过此方法, 可筛选对肾炎检

测有用的免疫反应性抗体。

[0050] 另外、本发明的免疫反应性多肽的筛选方法,其特征在于,使用上述 IV 型胶原样免疫反应性多肽的抗体,优选 IV 型胶原样免疫反应性多肽的氨基酸数为 3 个以上、35 个以下,更优选为 10 个~20 个。具体来说,通过使用候补免疫反应性多肽代替 $\alpha 5$ 链 NC1 来源的合成多肽,能筛选出免疫反应性多肽。通过此方法,可筛选出对肾炎检测有用的免疫反应性多肽。

[0051] 此外,本发明的肾炎模型,其特征不在于,以选自上述 IV 型胶原样免疫反应性多肽及上述 IV 型胶原样免疫反应性多肽的抗体中的任意一种以上作为引发原。以往一直使用肾小球基底膜 (GBM)、肾小球来源的 NC1 作为肾炎引发抗原。然而其为急性肾炎的模型,对人的慢性肾炎的模型来说并不适合。另外,也有 $\alpha 3$ 链来源的多肽的例子,但也为急性肾炎模型。本发明的肾炎模型通过使用 IV 型胶原样免疫反应性多肽,廉价地得到一定的抗原,适合于制作慢性肾炎的实验模型。

[0052] 另外,以往使用抗抗原的抗体 (抗血清) 的肾炎引发例可举出抗 GBM、NC1、 $\alpha 3$ 链的抗体例,但均为急性肾炎模型。此外,尚未看到抗 $\alpha 5$ 链的抗体,尤其是尚未看到使用抗人 $\alpha 5$ 链的多肽的抗体的例子。与此相对,本发明的 IV 型胶原样免疫反应性多肽的抗体作为人的慢性肾炎模型是有用的,且能够适用。

[0053] 该肾炎引发抗原特别优选 $\alpha 5$ 链的 NC1。肾小球来源的 NC1 引发的肾炎模型为急性肾炎的一种,因此,其抗 NC1 抗体大部分与急性肾炎的肺出血-肾炎综合症的自身抗体接近,优选与人慢性肾炎的“分离出的肾炎来源的生物试样”对比来使用。也可使用动物的糖尿病模型、高血压模型来源的生物试样,但与上述同样优选与人慢性肾炎的“分离出的肾炎来源的生物试样”对比来使用。

[0054] 此外,本发明的慢性肾炎的检测方法,其特征不在于,使用选自上述 IV 型胶原样免疫反应性多肽及上述 IV 型胶原样免疫反应性多肽的抗体中的任意一种以上。另外,优选为使用 ELISA 法的试剂盒,通过其可进行肾炎的早期诊断。

[0055] 此外,本发明的疫苗,其特征不在于,使用选自上述 IV 型胶原样免疫反应性多肽及上述 IV 型胶原样免疫反应性多肽的抗体所组成的组中的任意一种以上,可作为肾脏疾病的预防药或治疗药使用。另外,肾炎治疗药的特征在于,含有该疫苗。本发明的疫苗或肾炎治疗药只要含上述 IV 型胶原样免疫反应性多肽或上述 IV 型胶原样免疫反应性多肽的抗体即可,不受特别限制,举个例子,例如将 yp12 等溶解于水,通过给予该溶解剂能抑制肾炎等。

[0056] 此外,本发明涉及肾炎血液 (也包括血清、血浆) 的净化器具,可作为医疗器具使用。原理为:使肾炎血液中的目标抗体或目标抗原与固定于载体上的有吸附作用的配体 (对应的抗原或抗体) 接触从而吸附除去。肾炎血液中的目标抗体为抗 IV 型胶原抗体、抗其结构区域抗体、抗其结构多肽 (与结构多肽的长度无关) 抗体时,对应的配体抗原使用与分离出的慢性肾炎来源的生物试样发生反应的 IV 型胶原样多肽。

[0057] 肾炎血液中的目标抗原为 IV 型胶原、其结构区域、结构多肽 (与结构多肽的长度无关) 时,对应的配体抗体为抗 IV 型胶原样多肽抗体。

[0058] 配体优选与目标抗原对应的抗体,与目标抗体对应的抗原,也可用蛋白质 A 及蛋白质 G 来代替与目标抗体对应的抗原,但也存在目标抗体以外的免疫球蛋白从血液中被除

去的可能性。

[0059] 肾炎血液的净化中,优选暂时将血液从肾炎患者的上臂静脉取出后,用血浆分离膜(或分离机)分离为血浆成分与血细胞成分。当然也可保持血液的状态而不分成血浆成分与血细胞成分,但靶标物质以外的白蛋白等正常成分在体外会与额外的物质接触。使分离出的血浆成分通过内部具有载体的柱子,且所述载体上固定了具有吸附作用的配体(与靶标物质对应的抗原或抗体),吸附除去靶标物质后,与血细胞成分合并,回输至体内。这一系列的血液净化操作无菌、机械化地进行,可作为医疗用具使用。予以说明,柱子可以分为与目标抗原对应的的抗体柱、与目标抗体对应的抗原柱。

[0060] 抗体柱优选抗 $\alpha 5$ 链抗体柱,更优选抗 $\alpha 5$ 链 NC1 抗体柱,更加优选对应于与分离出的慢性肾炎来源的生物试样发生免疫反应的、 $\alpha 5$ 链来源的多肽的抗体柱。

[0061] 抗原柱优选 $\alpha 5$ 链柱,更优选 $\alpha 5$ 链 NC1 柱,更加优选与分离出的慢性肾炎来源的生物试样发生免疫反应的 $\alpha 5$ 链来源的多肽的柱。

[0062] 以下结合实施例详细说明本发明。

[0063] 实施例

[0064] 1. 抗 NC1 抗体测定法

[0065] 基于 ELISA 开发 NC1(牛肾小球来源,收率 0.0025%)作为抗原的抗 NC1 抗体测定法,测定了血清及尿。图 1 为示意健康者与尿中白蛋白值高者的比较(抗 NC1 抗体)的图。图 1 中,虚线示意临界值(0.072),设定为尿白蛋白正常血糖也正常的 7 例的平均 OD(0.028)+2SD(0.044)。图 1 的左侧(A1b(mg/mL)<30)的 12 例中,除尿白蛋白正常血糖也正常的例子(7 例)外,包括尿白蛋白正常但血糖值高的例子(5 例)。结果不仅肺出血-肾炎综合症的血清,从尿中白蛋白值高者的血清及尿(图 1)、透析患者的血清中都高频度地检测出抗 NC1 抗体。

[0066] 因此,以已诊断为肾炎的尿为样品进行了测定。以健康者的测定平均值+2SD 作为临界值,肾炎样品 80%以上显示阳性。由该结果,得出 NC1 并非仅是肺出血-肾炎综合症的抗原,也有为肾炎共同的抗原的可能性。

[0067] 接着,与上述同样地测定了各不同疾病抗 NC1 抗体的检测。图 2 为示意不同疾病抗 NC1 抗体的一览的图。慢性肾炎的发展通常缓慢地以年至十年以上为单位缓慢恶化,但与该慢性肾炎同样通常缓慢发展的继发性肾病中的糖尿病性肾病等也检测到了抗 NC1 抗体,诊断名与抗 NC1 抗体水平看不出有特别关系(图 2)。由此,可认为肾炎有共同的抗原部位存在。

[0068] 此外,将牛肾来源的具有 IV 型胶原三螺旋结构的三链区域(7S 与主三螺旋区(TH),以下称三链)纯化,代替 NC1 作为抗原,测定了抗三链抗体。图 3 为示意同一肾炎患者的抗三链抗体与抗 NC1 抗体关联的图。抗 NC1 抗体与抗三链抗体显示 90%以上的关联。NC1 与三链虽具有完全不同的结构和氨基酸序列,但对肾炎发生相同的免疫反应,表明对于同一 α 链,抗原可为形成三链的 7S 或主三螺旋区(TH)(图 3)。

[0069] 2. 将分离出的慢性肾炎来源的生物试样(以下称生物试样)作为检测抗体,通过 IV 型胶原找出发生反应的抗原部位的方法。

[0070] 直接使用尿作为检测抗体的生物试样,但也可用肾炎来源的试样中的血清、肾脏(也可使用肾脏的提取物、培养物等),此外也可用调整过的免疫球蛋白。另外,生物试样不

仅可采用人肾炎来源,也可采用动物肾炎来源(別冊・医学のあゆみ、腎疾患(増刊・医学进展,腎疾病)state of arts2003-2005 医歯薬出版社)。对于发生反应的抗原的多肽制备,示出一级序列的合成多肽,但也可为嵌合型多肽、重组、其他的方法。氨基酸序列使用了 $\alpha 5$ 链的 NC1,但也可为其他 α 链的 NC1,只要与生物试样发生反应即可。另外,氨基酸序列为三链(7S 及 / 或主三螺旋区)时优选 $\alpha 5$ 链,但只要与生物试样反应则也可为其他的 α 链来源。从费用与效率出发,优选抗原的多肽的长度为 3 个以上、35 个以下氨基酸,同时考虑抗体制备的容易性,最优选为 10 个~20 个。予以说明,本检索方法与结果不限于 $\alpha 5$ 链,适用于 IV 型胶原所有 α 链的检索及检索的结果。

[0071] 用 ELISA 法测定了使用 IV 型胶原 NC1 的生物试样的选定。在用 100u1/孔 (10ug/mL) 牛肾小球来源的 NC1 包被过的 96 孔微量反应板中,加入用 PBS(pH7.4) 稀释 4 倍的生物试样(本实施例中为尿),23°C 下(以下温度相同)经 2 小时孵育后用 PBS 洗涤,加入酶(HRP)标记抗人 IgG 抗体液,孵育 1 小时后洗涤,加入底物液(TMB),5~30 分钟的规定时间后(本实验中为 10 分钟)加入反应终止液(1N 硫酸溶液),立即测定 450nm 处的吸光度(OD)。

[0072] 图 4 为示意慢性肾炎 TD38、糖尿病性肾炎 TD42 与健康者(TD31~37、TD39~41)的测定比较数据(抗 NC1 抗体)的图,本实验测定尿中的抗 NC1-IgG 抗体,用酶标记抗人 IgG 抗体(人 HRP326)4000 倍反应 60 分钟。图中临界值为 OD. 0. 443(健康者 /n = 10 ;平均 0. 255+2SD. 0. 188),慢性肾炎(以下记为 A)为 1. 008,糖尿病性肾病(以下记为 B)为 2. 696。由该结果,将抗 NC1 抗体水平高而被选择的尿直接作为“分离出的肾炎来源的生物试样(生物试样)”使用,一部分分成小份冷冻保存。

[0073] 分离出的肾炎来源的生物试样(生物试样)的制备

[0074] 因酸性尿中抗体发生劣化,于 18°C 下摇一夜解冻以使冷冻保存的尿试样与沉淀物一起均匀分散。接着准确地用 PBS 稀释至 4 倍量,在 18°C 下摇 24 小时,制成均一分散液。将其在约 3000G 下离心 5 分钟,除去沉淀。测量上清液量,用冻干机干燥,加入前面测量的量的已灭菌的 PBS(pH7.4),洗涤容器,回收 PBS。通过重复该操作 4 次~5 次,可得到 pH 置换为中性且稳定的“生物试样”。随后,再次测量抗 NC1 抗体水平,测定的 OD 值作为 1mL 的滴度。也可使用生理盐水或注射用蒸馏水代替 PBS,但为了不使滴度降低,还要进行灭菌、除菌等其他操作,即特别留心处理生物来源的制剂时操作人员应注意之处,由此能制成注射剂或内服剂。另外,也可作为肾炎模型的引发原使用。此外,“生物试样”也可将结合有 NC1 抗原的亲色谱柱纯化所得的抗体及用硫酸铵沉淀等获得的抗体再次稀释以满足浓度要求,也可从血清或肾脏纯化抗体的免疫球蛋白。尤其是用从肾炎患者自身得到的生物试样再对自身给药,由于亲和性好,即使作为注射剂也不易引起异常免疫反应。另外,口服药剂也因口服免疫耐受性而优选。

[0075] 另外,也可使用动物来源的生物试样。引发原特别优选 $\alpha 5$ 链的 NC1。由肾小球来源的 NC1 引发的肾炎模型为急性肾炎的一种,其抗 NC1 抗体大部分与急性肾炎的肺出血-肾炎综合症的自身抗体相近,因而优选与人慢性肾炎的“分离出的肾炎来源的生物试样”对比来进行。也可使用动物的糖尿病模型及高血压模型来源的生物试样,但与上述相同,优选与人慢性肾炎的“分离出的肾炎来源的生物试样”对比来进行。

[0076] 使用分离出的肾炎来源的生物试样(生物试样)选出 IV 型胶原原样 NC1 免疫反应

性多肽的方法

[0077] 公布的氨基酸序列有多种,但本发明人按照 Ninomiya 等的文献 (pp235-260 In Extra cellular matrix-cellular interaction:Molecules to diseases. (胞外基质-细胞相互作用:从分子到疾病) ed by Ninomiya Y et al, Japan Sci Press, Tokyo/S Karger, Basel. 1998.) 中所记载示出的序列 (图 5)。1 条 α 链中的 NC1 的氨基酸残基数约为 230。 α 链有 6 条, NC1 总计调查 1380 个氨基酸残基即可。

[0078] 预实验

[0079] 上述 ELISA 法中,用合成多肽代替包被抗原的 NC1 进行了预实验。测定条件为:抗原浓度 $10 \mu\text{g/mL}$ (10mM PBS), $100 \mu\text{L}$ /孔,封闭 (blocking) 液:Block Ace (大日本制药制) 稀释至 25%, $250 \mu\text{L}$ /孔,尿:人来源、20 ~ 100 倍稀释,第二抗体 (酶标记抗人 IgG 抗体): $\times 800$,底物液:TMB (+) (DAKO 公司制)。样品的稀释与以 NC1 为抗原时稀释 4 倍不同,需稀释 20 ~ 100 倍。结果样品 A (慢性肾炎)、B (糖尿病性肾病) 都显示抗原 501 (α 5 链 NC1 上由 N 端开始连续的 20 个氨基酸残基) 比抗原多肽 301 (α 3 链 NC1 上由 N 端开始连续的 20 个氨基酸残基) 的免疫反应要强。因此用 α 5 链的 NC1 进行本实验。予以说明, 301 含电脑软件指出的肺出血-肾炎综合症 (Goodpastures' syndrome) 的 α 3 链上的 N 端 5 ~ 18 位的氨基酸序列。另外,与 301 同样地对 α 5 链以外的链进行了调查。此外,301 与 501 的任意一个由于肾炎尿比健康者的尿抗体水平显著高、可充分识别,因而可作为肾炎检测试剂使用。

[0080] α 5 链 NC1 上的抗原部位的筛选

[0081] 使用上述 ELISA 法,用合成多肽代替包被抗原的 NC1,其他的测定条件完全相同地进行实验。图 6 为示意慢性肾炎 No38、糖尿病性肾炎 No42、IgA 肾病与健康者 No31、32、33 的 NC1 样抗原性的比较的图。

[0082] α 5 链的多肽如下制备。将 α 5 链 NC1 从 N 端开始,以 20 氨基酸残基为单位,相互间有 5 氨基酸残基重叠,由此将 α 5 链 NC1 的全区域以 20 氨基酸残基为单位制成 15 种合成多肽 (以下称 yp01 ~ yp15 (图 6 中 H4NA5-1 ~ 5-15), yp15 包括超过 20 个的氨基酸)。其结果,样品 A (慢性肾炎:No38) 与 yp05、08、13、10、12 反应强,样品 B (糖尿病性肾病:No42) 与 yp10、13、08、05、12 反应强, IgA 肾病与 yp08、05、10、13、12 反应强,因高水平的多肽群一致,该 5 种多肽为病因不同的样品 A、样品 B 及 IgA 肾病的共同的抗原部位。如上所述对于肾炎尿,牛肾小球来源的 NC1 与三链的反应性大致相同,可认为其任意一种都是肾炎的共同的抗原, α 5 链三链 (7S 或 / 及主三螺旋区) 以及其多肽都可作为候补免疫反应性多肽。予以说明, α 5 链整体也可以作为抗原使用但较为麻烦。

[0083] 如上所述,“生物试样”是对筛选 NC1 样免疫反应性多肽有效的配体,找出的多肽及其抗体同样可作为相应抗体或抗原多肽检测的配体使用。尤其是通过免疫反应性多肽制备的抗体,不论是单克隆抗体还是多克隆抗体,均可代替“生物试样”在新的免疫反应性多肽的检测中发挥作用。对于通过 α 5 链找出的多肽的任意一种,肾炎尿与健康者间的反应差别都很大 (图 6)、可在肾炎检测的试剂盒中使用。本发明的免疫反应性多肽为对“生物试样”具有 IV 型胶原样免疫反应性的多肽,并不限定于 α 5 链来源。

[0084] 3. 新型的 α 5 链 NC1 样免疫反应性多肽的筛选方法

[0085] 候补免疫反应性多肽的筛选中,使用候补免疫反应性多肽代替上述 α 5 链 NC1 来

源的合成多肽。也可使用抗 $\alpha 5$ 链 NC1 抗体代替生物试样,也可用抗 $\alpha 5$ 链 NC1 来源的多肽抗体来代替。该情况下,使用对应于抗体来源动物的标记抗体。

[0086] 用作候补免疫反应性多肽的多肽只需为与 $\alpha 5$ 链 NC1 来源的呈递多肽有同等以上的免疫反应性的多肽即可,可为任意的序列,不限于 IV 型胶原。另外,也可为将呈递多肽缩短、增加、改变、置换、修饰、也可为合并后的氨基酸序列。例如为 yp12 与 yp13 的合并。改变呈递多肽的一部分时,也可简易地使用动物来源的序列。另外,只要是使用了 $\alpha 5$ 链 NC1 的一部分氨基酸序列的多肽、并与从生物体提取纯化的 NC1 相比有免疫反应性,即可使用任意氨基酸序列。

[0087] 本发明适用于含三链(7S 及 / 或主三螺旋区)的 $\alpha 5$ 链的全部氨基酸序列。优选为相对于 $\alpha 5$ 链全区域更小的区域,在类三链及 NC1 样免疫反应性优秀的多肽中,更优选为更短、显示更佳免疫反应性的多肽,从费用与效果出发,优选多肽的长度为 3 个以上、35 个以下,其选定方法可通过已示意过的 ELISA 法进行,但不限于于此。

[0088] 因以上对于其他 α 链也可同样适用,作为生物试样的替代,也可使用各种抗体,例如抗 NC1、7S、主三螺旋区等的各区域、各 α 链、IV 型胶原来源的各多肽等等的抗体。生物试样以外的动物种属的情况下,将上述的人用试剂成分依动物种属进行调整。另外,应用于其他的 α 链时,优选预先确认与分离出的肾炎来源的生物试样的反应性。

[0089] 免疫反应不限于酶免疫反应,还包括 AB 法、RIA,免疫发光法、沉淀反应、凝集反应等,酶标记抗体可为多克隆抗体或单克隆抗体,另外也可为将其用放射性物质、发光物质标记后的标记物、无标记物。反应形式不限于夹心法,也可为竞争法等。作为反应板的替代,可使用玻璃,磁性物质,乳胶,也可没有载体不使用固相法。

[0090] 在反应板上包被多肽时,包被物质可通过亲和素、生物素、或其组合成分进行包被。包被反应板的多肽可将多种进行混合,也可将后面选出的混合多肽样品按结构多肽区分来选择。多肽不仅可为合成的,在其他领域中使用的任意方法本领域技术人员均可使用。此外,第二抗体不限于抗样品 IgG 抗体,也可为抗样品 IgM 抗体、抗样品 IgA 抗体、抗样品免疫球蛋白抗体,但优选抗样品 IgG 抗体。

[0091] 4. 以免疫反应性多肽为引发原的肾炎模型的制作

[0092] 选出的多肽可单独及 / 或用多种一起作为肾炎的引发原。多肽示意了 yp08、yp12,动物示意了兔与豚鼠,但多肽、动物及给药方法都不限于此。

[0093] 对于兔(雌),将 0.3mg/mL(仅初次时为 0.15mg)多肽与等量的 FCA 一同,每 2 周 1 次共 4 次皮内给药。yp08 的尿蛋白(#2 ;+2)与 yp12 的尿蛋白(#1 ;+2)都显示阳性。

[0094] 另外,使用微量反应板被多肽 yp12(10ug/mL)包被的 ELISA 法,在初次给药的 7 周后,血清的抗体水平在稀释 32000 倍条件下达到吸光度计的测定上限附近的 3.00。

[0095] ELISA 抗体滴度 ;

[0096] yp08(#2 \times 8000 ;A450nm/3.00)

[0097] yp12(#1 \times 32000 ;A450nm/3.00)

[0098] 对于豚鼠(雌),将 0.1mg/mL 多肽与等量的 FCA 一同,每 2 周 1 次共 4 次皮内给药。yp12 的尿蛋白(#1 ;+1、#2 ; \pm , #3 ; \pm)任一都显示弱阳性。由于人的肾炎缓慢发展,因此该结果表明其为合适的模型。

[0099] 另外,使用微量反应板被多肽 yp12(10ug/mL)包被的 ELISA 法,在初次给予的 7 周

后,豚鼠血清的抗体水平在稀释 8000 倍条件下达到吸光度计的测定上限附近的 3.00。此外,这些抗免疫反应性多肽抗体(抗血清)给予到大鼠与小鼠的腹腔内,与以往的抗 NC1 抗体(抗血清)的给药差异小,可成为与人相似的慢性的肾炎模型。

[0100] 5. 利用免疫反应性多肽抑制肾炎

[0101] 在 2 只豚鼠购入后 1 周的驯化期间内,给予总量 5 ~ 10mg 的溶解于水中的 yP12。其后如上所述进行肾炎的引发。未见尿蛋白, (#1 :-, #2 :-), 不呈现肾炎尿。

[0102] 免疫反应性多肽的口服给药显示了肾炎的疫苗及治疗药。免疫反应性多肽及其抗体可在口服给药剂及脱敏疗法中使用,也可在注射剂中使用。类似的先例在日本特开 2000-214163 号公报中可见,但本发明多肽更加特异,效果也更好。

[0103] 6. 使用抗免疫反应性多肽的抗体的 ELISA 试剂盒

[0104] ELISA 法为检测抗原或抗体的通常方法,因测定步骤上无太大差异,在此示意先前的抗体的组合例。

[0105] 夹心 ELISA 法的“抗原 NC1”的测定中,作为“抗 NC1 单克隆抗体与抗 NC1 抗体(豚鼠)”的替代,使用上述示意的“抗 yP12 抗体(兔)与抗 yP12 抗体(豚鼠)”及“抗 NC1 单克隆抗体与抗 yp12 抗体或抗 yp08 抗体”的组合,任意一种都可进行 NC1 的测定,可以尿为样品在肾炎早期的检测中使用。测定范围例如用“抗 NC1 单克隆抗体(PCT/JP2005/002669)与抗 NC1 抗体(豚鼠)”,微量反应板被抗 NC1 单克隆抗体(2ug/mL) 包被,抗 NC1 抗体(豚鼠)(IgG AP- 生物素 0.95mg/mL) 运用 AB 法(亲和素-HRP×4000) 时,可能对 NC1 进行从 50ng/mL 至 1ng/mL 的微量测定,作为其用途,在肾炎尤其是糖尿病性肾炎的早期可通过尿检测。发展后的尿中抗原无法检测,因此其为疾病的早期诊断试剂。该情况下,将肾炎来源的试样作为样品,通过 yp08 或 yp12 的抗原固定化反应板检测对应的抗体(也包括抗 NC1 抗体)。另外,“抗 yp12 抗体(兔)与抗 yp12 抗体(豚鼠)”及“抗 NC1 单克隆抗体与抗 yp12 抗体或抗 yp08 抗体”的组合因可进行 yp12 或 yp08 的测定,可作为研究试剂使用。

[0106] 通过与 α 5 链 NC1 使用的方法相同的手法,选出三链(7S 及 / 或主三螺旋区)来源的免疫反应性多肽,使用抗选出的免疫反应性多肽的抗体,也可进行三链(7S 及或主三螺旋区)及 / 或其免疫反应性多肽的测定。

[0107] 通过使用分离出的肾炎来源的生物试样,可选出 IV 型胶原样免疫反应性多肽。另外,选出的 IV 型胶原样免疫反应性多肽可作为 IV 型胶原的替代,在肾炎的诊断试剂、肾炎治疗药、肾炎治疗用具、从生物试样中去除抗体及抗体采集中发挥作用,另外,抗 IV 型胶原样免疫反应性多肽抗体在肾炎的诊断试剂、治疗药、肾炎治疗用具、从生物试样中去除抗原及抗原采集中发挥作用。

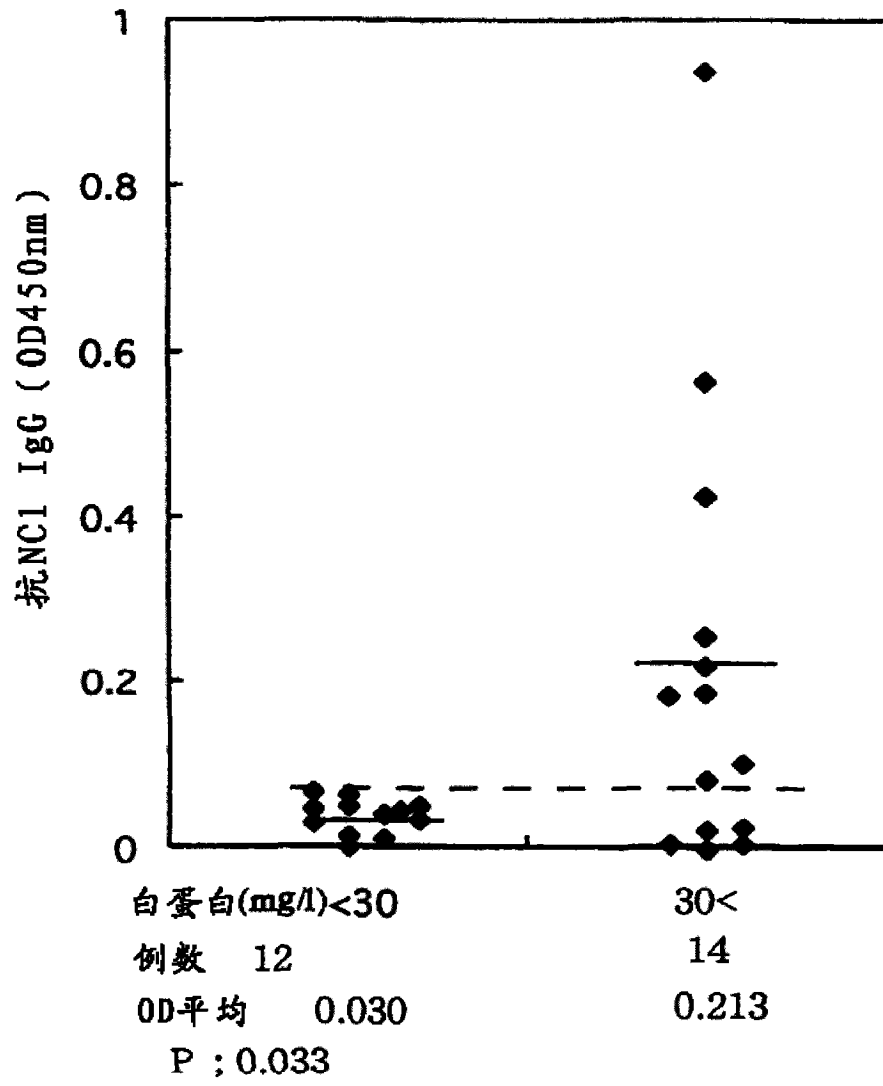


图 1

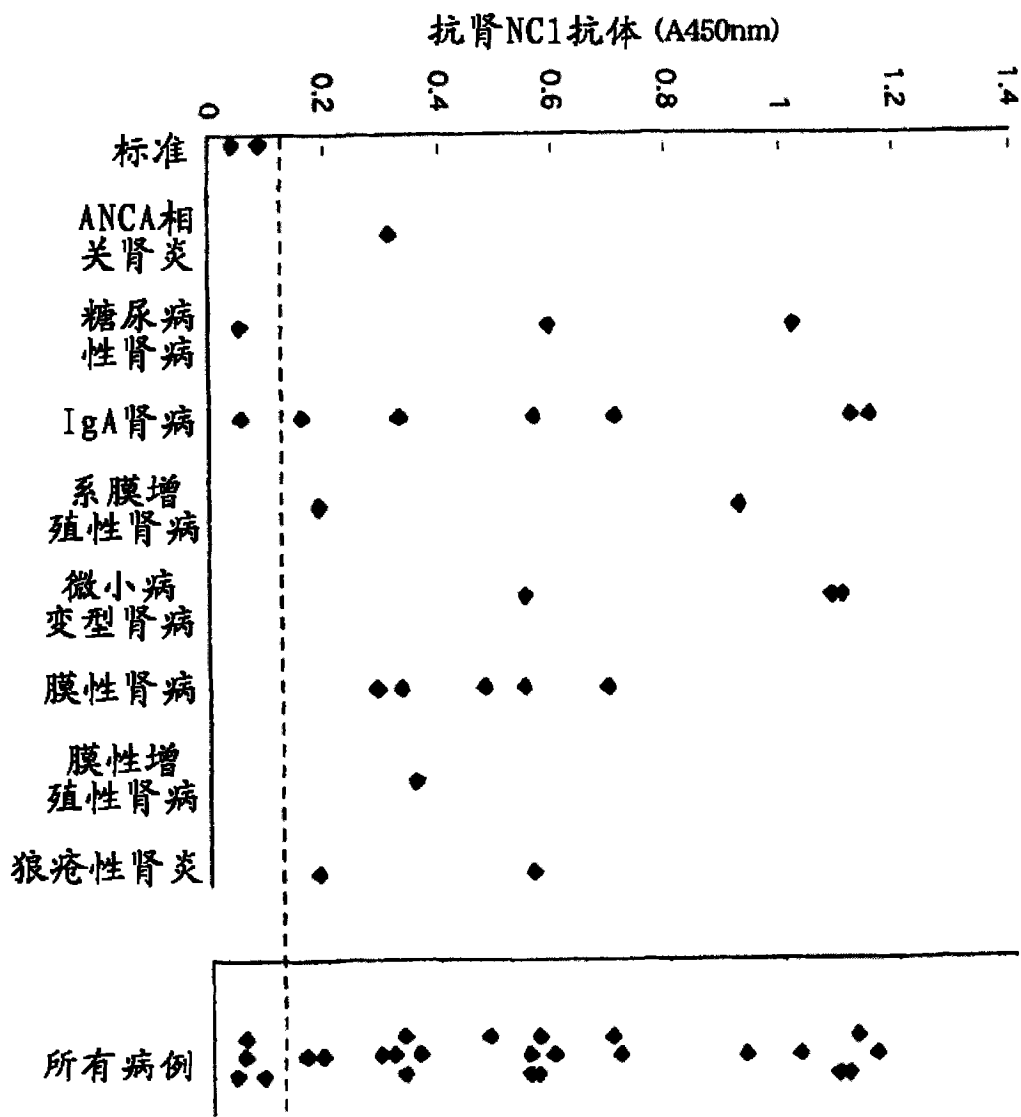


图 2

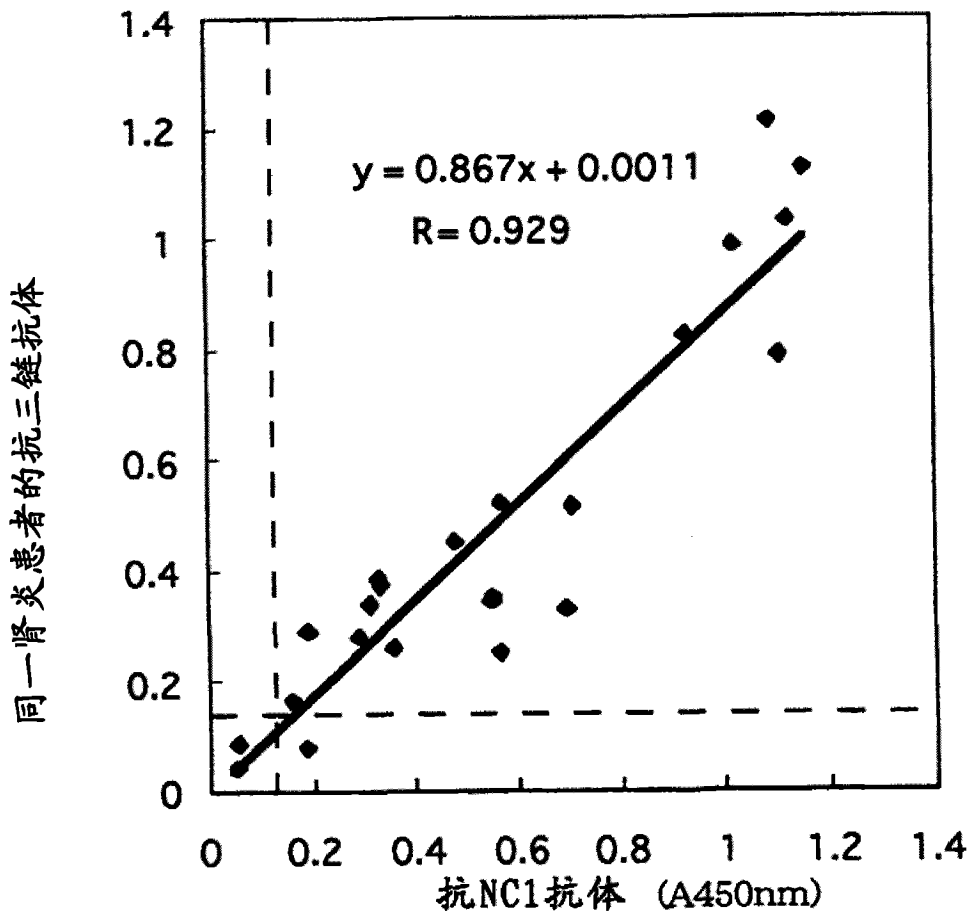


图 3

	实际 数值	实际 数值	横向 平均值	标准 偏差	CV
标准					
S0	0.078	0.072	0.075	0.004	5.657
S2	0.250	0.232	0.241	0.013	5.281
S3	0.381	0.383	0.382	0.001	0.370
S4	0.689	0.632	0.661	0.040	6.102
S5	1.142	1.093	1.118	0.035	3.101
S6	2.012	2.067	2.040	0.039	1.907
< 对照 >					
D2	0.539	0.561	0.550	0.016	2.828
Y	0.546	0.520	0.533	0.018	3.449
<GBM 标准 >					
C(*2)	2.745	2.656	2.701	0.063	2.330
D(*2)	0.853	0.785	0.819	0.048	5.871
E(-)(*2)	0.206	0.199	0.203	0.005	2.444
TD31	0.216	0.167	0.192	0.035	18.093
TD32	0.219	0.220	0.220	0.001	0.322
TD33	0.198	0.198	0.198	0.000	0.000
TD34	0.255	0.248	0.252	0.005	1.968
TD35	0.314	0.324	0.319	0.007	2.217
TD36	0.319	0.276	0.298	0.030	10.220
TD37	0.401	0.380	0.391	0.015	3.803
TD38	1.059	0.957	1.008	0.072	7.155
TD39	0.139	0.139	0.139	0.000	0.000
TD40	0.149	0.137	0.143	0.008	5.934
TD41	0.408	0.393	0.401	0.011	2.648
TD42	2.728	2.664	2.696	0.045	1.679

图 4

人 IV α 3 NC1

PATWTTTRGFVTRHSQTTAIPSCPEGTVPLYSGFSFLFVQGNQRAHGQDLGTLGS
CLQRFTTMPFLFCNVNDVCNFASRNDYSYWLSTPALMPMNMAPITGRALEPYISR
CTVCEGPAIAIAVHSQTTDIPPCPHGWISLWKGFSFIMFTSAGSEGTGQALASPGS
CLEEFRASPFLECHGRGTCNYYSNSYSFWLASLNPERMFRKPIPSTVKAGELEKIIS
RCQVCMKKRH

人 IV α 4 NC1

GPGYLGFFLLVLHSQTDQEPTCPLGMPRLWTGYSLLYLEGQEKAHNQLGLAGS
CLPVFSTLPFAYCNIHQVCHYAQRNDRSYWLASAAPLPMMPLSEEAIRPYVSRCA
VCEAPAQAVAVHSQDQSIPPCPQWTWRSLWIGYSFLMHTGAGDQGGGQALMSPG
SCLEDFRAAPFLECQGRQGTCHFFANKYSFWLTTVKADLQFSSAPAPDTLKESQ
AQRQKISRCQVCVKYS

人 IV α 5 NC1

GTSSVAHGFLITRHSQTTDAPQCPQGTQVYEGFSLLYVQGNKRAHGQDLGTAG
SCLRRFSTMPFMFCNINNVCFASRNDYSYWLSTPEPMPMSMQPLKQSIQPFISR
CAVCEAPAVVIAVHSQTIQIPHCPQGWDSLWIGYSFMMHTSAGAEGSGQALASP
GSCLEEFRSAPFIECHGRGTCNYYANSYSFWLATVDVSDMFSKPQSETLKAGDLR
TRISRCQVCMKRT

人 IV α 6 NC1

GQSMRVGYTLVKHSQSEQVPPCPIGMSQLWVGYSLLFVEGQEKAHNQLGFAGS
CLPRFSTMPFIYCNINEVCHYARRNDKSYWLSTTAPIPMPVVSQTQIPQYISRC SVC
EAPSQAI VHSQDITIPQCPLGWRSLWIGYSFLMHTAAGAEGGGQSLVSPGSCLE
DFRATPFIECSGARGTCHYFANKYSFWLTTVEERQQFGELPVSETLKAGQLHTRV
SRCQVCMKSL

图 5

TD31 31				TD32 32			
吸光度		平均值		吸光度		平均值	
H4NA5-1	0.080	0.061	0.068	H4NA5-1	0.082	0.079	0.081
H4NA5-2	0.083	0.061	0.067	H4NA5-2	0.086	0.068	0.082
H4NA5-3	0.053	0.098	0.076	H4NA5-3	0.076	0.071	0.074
H4NA5-4	0.096	0.080	0.094	H4NA5-4	0.074	0.097	0.081
H4NA5-5	0.112	0.080	0.101	H4NA5-5	0.142	0.130	0.136
H4NA5-6	0.065	0.100	0.083	H4NA5-6	0.082	0.122	0.102
H4NA5-7	0.141	0.077	0.108	H4NA5-7	0.114	0.086	0.090
H4NA5-8	0.164	0.117	0.141	H4NA5-8	0.140	0.154	0.147
H4NA5-9	0.216	0.083	0.148	H4NA5-9	0.073	0.085	0.078
H4NA5-10	0.059	0.488	0.274	H4NA5-10	0.171	0.086	0.089
H4NA5-11	0.328	0.078	0.204	H4NA5-11	0.123	0.081	0.102
H4NA5-12	0.287	0.053	0.170	H4NA5-12	0.078	0.100	0.089
H4NA5-13	0.077	0.064	0.071	H4NA5-13	0.123	0.092	0.106
H4NA5-14	0.150	0.087	0.109	H4NA5-14	0.100	0.072	0.086
H4NA5-15	0.080	0.054	0.057	H4NA5-15	0.085	0.103	0.089
H4NA3-1	0.141	0.063	0.102	H4NA3-1	0.181	0.157	0.174

TD34 38				TD42 42			
吸光度		平均值		吸光度		平均值	
H4NA5-1	0.347	0.178	0.263	H4NA5-1	0.498	0.275	0.386
H4NA5-2	0.257	0.251	0.254	H4NA5-2	0.267	0.251	0.254
H4NA5-3	0.284	0.388	0.336	H4NA5-3	0.284	0.388	0.336
H4NA5-4	0.255	0.217	0.236	H4NA5-4	0.465	0.638	0.552
H4NA5-5	0.642	0.635	0.639	H4NA5-5	1.703	1.829	1.766
H4NA5-6	0.255	0.180	0.223	H4NA5-6	0.253	0.280	0.267
H4NA5-7	0.256	0.193	0.225	H4NA5-7	0.356	0.410	0.383
H4NA5-8	0.511	0.519	0.565	H4NA5-8	2.076	2.093	2.080
H4NA5-9	0.188	0.232	0.200	H4NA5-9	0.195	0.281	0.238
H4NA5-10	0.437	0.402	0.420	H4NA5-10	2.028	2.157	2.092
H4NA5-11	0.176	0.185	0.188	H4NA5-11	0.272	0.298	0.284
H4NA5-12	0.355	0.370	0.363	H4NA5-12	0.946	1.011	0.979
H4NA5-13	0.457	0.384	0.421	H4NA5-13	2.423	1.753	2.088
H4NA5-14	0.200	0.142	0.171	H4NA5-14	0.232	0.226	0.229
H4NA5-15	0.305	0.369	0.337	H4NA5-15	0.441	0.484	0.463
H4NA3-1	0.280	0.313	0.302	H4NA3-1	0.433	0.354	0.394

TD33 33				IgA			
吸光度		平均值		吸光度		平均值	
H4NA5-1	0.073	0.068	0.070	H4NA5-1	0.467	0.342	0.405
H4NA5-2	0.063	0.059	0.061	H4NA5-2	0.350	0.387	0.368
H4NA5-3	0.062	0.074	0.068	H4NA5-3	0.393	0.400	0.397
H4NA5-4	0.078	0.069	0.074	H4NA5-4	0.619	0.608	0.613
H4NA5-5	0.126	0.079	0.103	H4NA5-5	2.347	2.384	2.356
H4NA5-6	0.102	0.166	0.134	H4NA5-6	0.308	0.244	0.276
H4NA5-7	0.340	0.186	0.263	H4NA5-7	0.670	0.503	0.587
H4NA5-8	0.108	0.102	0.105	H4NA5-8	2.794	2.738	2.765
H4NA5-9	0.084	0.189	0.122	H4NA5-9	0.363	0.475	0.419
H4NA5-10	0.121	0.113	0.117	H4NA5-10	2.250	2.272	2.261
H4NA5-11	0.084	0.062	0.063	H4NA5-11	0.451	0.388	0.420
H4NA5-12	0.074	0.071	0.073	H4NA5-12	1.828	1.887	1.858
H4NA5-13	0.081	0.074	0.078	H4NA5-13	2.105	2.114	2.110
H4NA5-14	0.092	0.088	0.080	H4NA5-14	0.278	0.228	0.254
H4NA5-15	0.468	0.494	0.481	H4NA5-15	0.468	0.494	0.481
H4NA3-1	0.192	0.157	0.180	H4NA3-1	0.734	0.600	0.667

图 6

专利名称(译)	IV型胶原样免疫反应性多肽		
公开(公告)号	CN101466732B	公开(公告)日	2013-04-17
申请号	CN200780022028.3	申请日	2007-06-12
[标]申请(专利权)人(译)	横山 司甫		
申请(专利权)人(译)	横山司甫		
当前申请(专利权)人(译)	横山司甫		
[标]发明人	横山司甫		
发明人	横山司甫		
IPC分类号	C07K14/78 A61K39/00 A61K39/395 A61P13/12 A61P37/02 C07K16/18 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53		
CPC分类号	A61K39/0008 G01N33/6854 G01N33/6893 G01N2500/00 C07K16/18 G01N33/6887 G01N2800/347 G01N2333/78 A61P13/12		
代理人(译)	刘新宇		
审查员(译)	徐荣		
优先权	2006187186 2006-06-12 JP 2007137856 2007-05-24 JP		
其他公开文献	CN101466732A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种对肾炎的检测有用的IV型胶原样免疫反应性多肽及其抗体、IV型胶原样免疫反应性多肽选出方法、免疫反应性抗体与免疫反应性多肽的筛选方法、肾炎模型、慢性肾炎的检测方法、以及疫苗与肾炎治疗药。一种IV型胶原样免疫反应性多肽，其与分离出的慢性肾炎来源的生物试样发生免疫反应。所述IV型胶原样免疫反应性多肽优选具有选自下组中的至少一个以上：作为结构 α 链的1链~6链中的任意1条链以上、作为结构区域的选自7S、主三螺旋区及NC1中的任意一种以上、以及作为结构多肽的氨基酸数为3个以上、35个以下。

ical Inilestigation》.1992, 第22卷(第),
常立峻等. ELISA 定量检测IV型胶原方
建立. 《Labeled Immunoassays & Clin
.2003, 第10卷(第1期),

审查员 徐荣

权利要求书 1 页 说明书 10 页 附图 6 页

3 个以上、35 个以下。