



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101819201 A

(43) 申请公布日 2010.09.01

(21) 申请号 200910047942.4

(22) 申请日 2009.03.20

(71) 申请人 上海荣盛生物药业有限公司
地址 201108 上海市闵行区向阳路 888 号

(72) 发明人 朱绍荣

(74) 专利代理机构 上海开祺知识产权代理有限公司 31114
代理人 包文超 费开逵

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

C07K 7/08 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 18 页

(54) 发明名称

用于类风湿关节炎免疫抗体体外检测的多肽组合物

(57) 摘要

一种用于类风湿关节炎自身免疫抗体体外检测的多肽组合物,各种多肽序列中至少有一精氨酸侧链被修饰为电中性或电负性氨基酸。通过序列上两个不相邻的半胱氨酸侧链巯基形成二硫键的方式,产生环状的多肽。这类多肽不仅能与类风湿关节炎自身免疫抗体相结合,同时还能对 HLA-DR 具有高亲和力。经过实验验证,该类多肽组合物与类风湿关节炎自身免疫抗体相结合的专一性大于 90%,对类风湿关节炎自身免疫抗体的检测灵敏度大于 75%。与市场上销售的同类产品相比,其灵敏度得到显著提高,更有利于类风湿关节炎自身免疫抗体的体外检测。

1. 一种用于类风湿关节炎自身免疫抗体体外检测的多肽组合物,由三种多肽组成,
多肽 I, His-Gln-Cys-Xaa1-Xaa2-Phe-Xaa3-Xaa4-Xaa5-His-Xaa6-Xaa7-Xaa8-Xaa9-Xaa10-Cys-Gly,

其中,Xaa1 为 His 或 Ala ;Xaa2 为 Gln 或 Arg ;Xaa3 为 Arg 或 Gln ;Xaa4 为 Phe 或 Met ;
Xaa5 为 Arg ;Xaa6 为修饰的 Arg ;Xaa7 为 Ser 或 Arg ;Xaa8 为 Arg 或 Leu ;Xaa9 为 Ala 或
Ile ;Xaa10 为 Ala 或 Arg ;

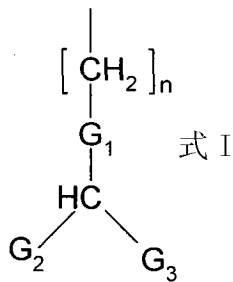
多肽 II, His-Gln-Cys-Xaa1-Xaa2-Phe-Xaa3-Xaa4-Xaa5-His-Xaa6-Xaa7-Xaa8-Xaa9-Xaa10-Cys-Gly,

其中,Xaa1 为 His 或 Ala ;Xaa2 为 Gln 或 Arg ;Xaa3 为 Arg 或 Gln ;Xaa4 为 Phe 或 Met ;
Xaa5 为修饰的 Arg ;Xaa6 为修饰的 Arg ;Xaa7 为 Ser 或 Arg ;Xaa8 为 Arg 或 Leu ;Xaa9 为 Ala
或 Ile ;Xaa10 为 Ala 或 Arg ;

多肽 III, His-Gln-Cys-Xaa1-Xaa2-Phe-Xaa3-Xaa4-Xaa5-Gly-Xaa6-Xaa7-Xaa8-Xaa9-Xaa10-Cys-Gly,

其中,Xaa1 为 His 或 Ala ;Xaa2 为 Gln 或 Arg ;Xaa3 为 Arg 或 Gln ;Xaa4 为 Phe 或 Met ;
Xaa5 为修饰的 Arg ;Xaa6 为修饰的 Arg ;Xaa7 为 Ser 或 Arg ;Xaa8 为 Arg 或 Leu ;Xaa9 为 Ala
或 Ile ;Xaa10 为 Ala 或 Arg ;

所述修饰的 Arg 为侧链修饰的 Arg,其侧链具有通式 I 所示的结构:



其中 G1 为 O、NH 或 CH₂;G2 为 NH₂、CH₃、NHCH₃ 或 N(CH₃)₂;G3 为 O、NH、NHCH₃、NHCH₃;n 为
2、3 或 4;

其中当 G1 为 NH,G2 为 NH₂ 时,G3 不为 NH。

2. 根据权利要求 1 所述的用于类风湿关节炎自身免疫抗体体外检测的多肽组合物,其
特征在于所述多肽组合物为,肽组合物,其特征在于所述多肽组合物为,

多肽 I, His-Gln-Cys-Ala-Xaa1-Phe-Gln-Met-Arg-His-Cit-Arg-Leu-Ile-Arg-Cys-Gly,其中,Xaa1 为 Arg 或 Gln ;

多肽 II, His-Gln-Cys-Ala-Arg-Phe-Xaa1-Met-Cit-His-Cit-Ser-Leu-Ile-Arg-Cys-Gly,其中,Xaa1 为 Arg 或 Gln ;

多肽 III, His-Gln-Cys-His-Gln-Phe-Arg-Phe-Cit-Gly-Cit-Ser-Arg-Ala-Ala-Cys-Gly。

3. 根据权利要求 1 所述的用于类风湿关节炎自身免疫抗体体外检测的多肽组合物,组
成所述多肽组合物各种多肽的摩尔比为 0.1-1 : 0.1-1 : 0.1-1。

4. 根据权利要求 1 所述的用于类风湿关节炎自身免疫抗体体外检测的多肽组合物,组
成所述多肽组合物各种多肽的摩尔比为 1 : 1 : 1。

5. 根据权利要求 1 所述的用于类风湿关节炎自身免疫抗体体外检测的多肽组合物,其

特征在于所述的多肽 I、II 和 III 结合有生物素标记。

6. 根据权利要求 5 所述的用于类风湿关节炎自身免疫抗体体外检测的多肽组合物,其特征在于所述的多肽 I、II 和 III 的 N 末端结合有生物素标记。

7. 根据权利要求 5 所述的用于类风湿关节炎自身免疫抗体体外检测的多肽组合物,其特征在于所述的标记有生物素的多肽与亲和素或链霉亲和素非共价结合。

8. 根据权利要求 1-7 之一所述的用于类风湿关节炎自身免疫抗体体外检测的多肽组合物,其特征在于所述多肽 I、II 和 III 与 HLA-DR 相结合形成 HLA-DR- 多肽复合物。

9. 根据权利要求 1-7 之一所述的用于类风湿关节炎自身免疫抗体体外检测的多肽组合物,其特征在于所述多肽 I、II 和 III 在第三位 Cys 与第十六位 Cys 之间形成二硫键。

10. 根据权利要求 9 所述的用于类风湿关节炎自身免疫抗体体外检测的多肽组合物,在类风湿关节炎自身免疫抗体体外 ELISA 检测中的应用。

用于类风湿关节炎免疫抗体体外检测的多肽组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及一种与免疫抗体相结合的多肽组合物,尤其涉及与类风湿关节炎免疫抗体相结合的多肽组合物,更具体的是涉及一种至少有一个精氨酸被修饰的,用于类风湿关节炎自身免疫抗体体外检测的多肽组合物。

背景技术

[0002] 临床上自身免疫疾病主要有系统性红斑狼疮、类风湿关节炎、干燥综合征、皮炎、多发性肌炎、系统(多发)性硬化症、硬皮病等,这些疾病曾被命名为“结缔组织病”,后来国外和国内均将它们归为风湿性疾病。

[0003] 类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种较常见的以慢性多关节炎症为主要表现的系统性自身免疫疾病,其病程长,多反复,且会造成组织不可逆的损伤,而给患者造成很大痛苦。该病的发病率在世界范围内为0.5-1%,中国的发病率约为0.36%。患者发病年龄多在20~50岁,女性多于男性,男女之比为1:3。最近流行病学统计,类风湿关节炎有逐年增加的趋势,其突出的早期临床表现为对称性关节红肿热痛、常见四肢小关节、指间近端关节肿胀、掌指、腕、肘和踝等关节肿痛及活动困难、晨间关节僵硬、午后逐渐减轻、关节外症状约有20%患者可出现皮下结节;长久不愈的晚期症状则有不同程度的关节畸形和强直,以及关节功能丧失等现象,还会损伤脏器和多组织器官,造成骨头缺血性坏死,对人体消耗大,致残率高。

[0004] 类风湿关节炎的病因至今尚不十分清楚,且早期临床表现也不典型。在国内外临床实践中,该疾病的常用诊断工具是美国风湿学学会(American College of Rheumatology, ACR)在1987年制定的类风湿分类标准(Arthritis Rheum 1988,31,315-24),该标准更依赖于类风湿关节炎所表现出的临床病症。但是,在该疾病早期,这些临床指标通常是不易操作的。因此,目前普遍认为这一标准不能较好适应于早期类风湿关节炎的诊断(Arthritis Rheum 2001,44,2485-91;Neth J Med 2002,60,383-8)。而目前使用的治疗类风湿关节炎的方法主要是采用消炎方法,这种方法虽能使得关节肿胀(swelling)和侵蚀(erosive)的程度得以减慢,却无法使疾病得到治愈。当前人们共同的观点认为,在该疾病早期采用多种方法治疗能得到最佳的治疗效果(Autoimmunity Reviews 2006,6,37-41)。由此,具有高专一性(Specificity)和高灵敏度(Sensitivity)的血清学检测标记对于类风湿关节炎在骨关节遭受损伤之前的早期诊断就显得尤为必要(Clin Applied Immunol Rev 2004,4,239-62)。

[0005] 研究发现一些自身免疫抗体虽然与类风湿关节炎疾病相联系,如:抗calpastatin抗体(Proc Natl Acad Sci USA 1995,92,7267-71)、抗中性粒细胞胞质抗体(anti-neutrophil cytoplasmic antibodies, ANCA)(Int Arch Allergy Immunol 1996,109,201-6)、核抗原抗体(anti-nuclear antigens, ANA)(Scand J Rheumatol 1986,15,185-92)、抗II型胶原抗体(anti-collagen type II)(J Immunol Methods 2001,247,191-203)和抗葡萄糖6磷酸异构酶(anti-glucose-6-phosphate isomerase, anti-GPI)

(Nat Immunol 2001,2,746-53) 等也都能在患有其它自身免疫疾病的病人中,甚至于在健康个体中检测出来 (Clin Applied Immunol Rev 2004,4,239-62)。其中的某些抗体虽然能应用于风湿性疾病的识别,而且筛选这些抗体也有助于疾病监测和预测,但由于其对类风湿关节炎缺乏专一性,这些抗体中的绝大多数都很少应用于类风湿关节炎早期诊断 (Clinica Chimica Acta 2004,350,17-34)。

[0006] 对于类风湿关节炎早期诊断的理想标记 (Marker) 应当至少满足 4 个标准:(1) 高灵敏度,能检测的病人达到高百分比;(2) 高专一性,尽可能地限制错误阳性结果的发生;(3) 能适用于早期诊断;(4) 能预见到某些病人会发展成侵蚀性疾病 (erosive disease) (Autoimmunity Reviews2006,6,37-41;MEDICINE 2006,34,441-4)。

[0007] 类风湿因子 (rheumatoid factor, RF) 抗体作为血清学检测方法应用于 ACR 标准中,被公认为是 IgG 分子上 Fc 结构域的直接抗体。虽然其检测灵敏度范围可以达到 60-80%,但其对于类风湿关节炎的专一性也比较一般,为 60%。此外,RF 同样可以在其它患有自身免疫疾病的病人中、患有感染性疾病的病人中以及 3-5% 健康人群中(其中 10-30% 的老年人)检测到 (Ann Rheum Dis 2003,62,261-3)。

[0008] 抗 BiP (p68) 抗体,抗 Sa 抗体和抗环状胍氨酸化蛋白抗体 (APF、AKA、抗 filaggrin 和抗 CCP) 则对类风湿关节炎有更高的专一性。64% 的类风湿关节炎病人能产生直接针对 BiP 的抗体,还有报道称其对该疾病具有高度的专一性,但目前没有数据支持 BiP 在预测类风湿关节炎方面具有作用,而且这些报道的 BiP 抗体还需要等待进一步通过独立的临床研究加以确认 (Clinica Chimica Acta 2004,350,17-34)。抗 Sa 抗体是源自于人脾脏和胎盘的提取物当中,分子量为 50kDa 的蛋白 (Internal Medicine 2005,44,1122-6)。另有研究揭示 Sa 抗原对于类风湿关节炎的专一性可以高达 92-99%,但其灵敏度则显得一般,仅为 30-40% (J Rheumatol 1994,21,1027-33;J Rheumatol 1999,26,7-13)。

[0009] 抗核周因子 (antiperinuclear factor, APF) 首次披露于 1964 年。经研究这些自身免疫抗体对类风湿关节炎具有专一性,并能通过以人颊粘膜细胞为抗原底物的免疫荧光法间接测得 (Ann Rheum Dis 1964,23,302-5)。

[0010] 1979 年研究者描述了一种类风湿关节炎专一性角质蛋白抗体,它能直接抑制角质层上皮细胞角质化,并将这类抗体的名称暂定为抗角质蛋白抗体 (anti-keratin antibody, AKA) (BMJ 1979,2,97-9)。之后的研究证实,虽然 AKA 和 APF 的发现是互相独立的,但是两者所直接对应的抗原是一致的 (J. Clin. Invest 1995,95,2672-9)。许多研究进一步表明 AKA 和 APF 具有许多共同的特性,它们均对于 RA 患者表现出高度的专一性 (Internal Medicine 2005,44,1122-6)。Filaggrin (filament aggregating protein) 是一种互相交联的角蛋白丝状体,作用是形成非常坚固的细胞骨架结构,其也是 AKA 和 APF 的常见抗原 (Clin Applied Immunol Rev 2004,4,239-62)。其中,APF 的目标抗原为 profilaggrin,而 AKA 的抗原为 filaggrin (J Clin Invest 1995,95,2672-9)。

[0011] 虽然 AKA 和 APF 对于类风湿关节炎具有专一性,但其缺陷也很突出。这两种抗体的检测灵敏度严重依赖于 filaggrin 的纯化方法。实践中,由于难以分离得到纯的且胍基含量具有可重复性的抗原,再加上其检测手段不简便,以及荧光免疫检测过程需要耗费较大的工作量,从而使得实验室间难以形成标准化,导致 AKA 和 APF 没有成为类风湿关节炎检测的主流方法 (Clin Applied Immunol Rev 2004,4,239-62)。

[0012] 基于 filaggrin 和 profilaggrin 是 AKA 和 APF 抗体靶点的知识,人们合成了含有瓜氨酸的多肽以检测类风湿关节炎血清中 AKA 和 APF 抗体的活性。由于瓜氨酸不是基本氨基酸而无法在蛋白质翻译中加入,因此通常的方法是通过肽精氨酸脱亚胺酶(peptidylarginine deiminase, PAD, EC3.5.3.15)催化精氨酸残基脱氨基得到。根据这些事实,一些从 filaggrin 序列中衍生出来的精氨酸侧链经修饰的,尤其是含有瓜氨酸的多肽被合成出来,并用于类风湿关节炎抗体的体外检测(US6,858,438)。在用酶联免疫吸附(Enzyme-Linked immunosorbent Assay, ELISA)方法检测实验中,这一方法合成的含有瓜氨酸直线性多肽能从类风湿关节炎患者血清中检测出抗瓜氨酸肽抗体,在保持高专一性(大于90%)的情况下,还大大提高了检测的灵敏度(达到63%)。实验还证明,只有含瓜氨酸的多肽才能实现该反应,若将多肽中的瓜氨酸用其它氨基酸代替则完全没有反应发生。这些结果表明,瓜氨酸部分是决定能被 AKA 和 APF 抗体识别的抗原决定因子(J Clin Invest 1998,101,273-81)。

[0013] 其它研究者发现将含有瓜氨酸的直线性多肽通过二硫键(S-S键)形成环形结构的方式能模拟类似 β -转角结构,从而模仿最初抗原决定簇的 β -转角结构,并可增加多肽-抗体的亲和力(FASEB J 1995,9,37-42;Mol Immunol 1985,22,1255-64)。由此,一种环状肽被人工合成出来,其将 filaggrin 主要表位上的两个丝氨酸换成半胱氨酸后,再由二硫键环化形成,即第一代环瓜氨酸肽(the first generation cyclic citrullinated peptide, CCP1)(Internal Medicine 2005,44,1122-6)。研究者将一条由19个氨基酸残基组成的瓜氨酸肽中两个丝氨酸替换为半胱氨酸形成与 β -转角具有相似结构的二硫键,得到人工合成 CCP,并将 CCP1 与直线性肽的检测结果作了比较。结果显示,采用 CCP1 为抗原的多肽用 ELISA 法检测 RA 患者的抗 CCP 抗体,灵敏度较用直线性瓜氨酸肽为抗原有显著提高,分别为68%和49%,二者专一性相似(Arthritis Rheum 2000,43,155-63)。穆荣等人在266例 RA 患者和186例对照者血清中检测 RF 和 AKA 抗体、APF 和抗 CCP 抗体的方式,评估了抗聚丝蛋白抗体群(anti-filaggrinantibodies, AFAs)与 RF 联合检测的意义。由于 AKA 和 APF 的敏感性太低,临床上以 RF 和抗 CCP 抗体的联合测定更为实用(北京大学学报(医学版)2005,37,894)。研究还发现,通过检测抗 CCP 抗体还能作为类风湿关节炎早期病人一项重要指标,为这类人群的早期防治提供参考(JIndia Rheumatol Assoc 2004,12,143-6),其还能预测侵蚀性疾病(ClinApplied Immunol Rev 2004,4,239-62)。

[0014] 在含有不同瓜氨酸多肽的反应模式中,类风湿关节炎血清检测表现出巨大的可变性。类风湿关节炎患者的血清/血浆中除了 filaggrin 精氨酸残基被瓜氨酸化外,Sa 抗原、胶原蛋白(I和II型)、组蛋白、髓磷脂碱蛋白、纤维连接蛋白等也出现瓜氨酸化,并产生抗 CCP 抗体。深入研究表明,瓜氨酸化的自身抗原中并非所有精氨酸脱氨基转化为瓜氨酸;已瓜氨酸化的瓜氨酸也不完全参与形成抗原表位,即产生抗 CCP 抗体。综上,抗瓜氨酸抗体的产生与瓜氨酸密切相关,并且瓜氨酸的侧翼序列对抗瓜氨酸抗体的产生起重要作用,这一事实暗示着瓜氨酸残基的周边氨基酸对于抗原表位(antigen epitope)具有重要作用,以及抗瓜氨酸化蛋白(如:AKA 和 APF 抗体)活性是多克隆反应(J Clin Invest 1998,101,273-81)。基于 filaggrin 的属性,它被认为是模拟瓜氨酸抗原表位的天然库藏(Clin Applied Immunol Rev 2004,4,239-62)。

[0015] 第二代 CCP(CCP2)检测方法产生于2002年,通过将含有瓜氨酸的多肽库与类风

湿关节炎血清筛选得到与 filaggrin 无关的第二代 CCP, 其具有更有利于抗体检测的表位 (Report on the 5th Dresden symposium on autoantibodies. Lengerich, Germany :Pabst Science Publishers ;2000. p. 140-5)。将 CCP1 和 CCP2 经同一组病人测试后表明, CCP2 不仅保持了较高专一性 (96%), 而且其分析灵敏度也有显著的提高 (Ann. Rheum. Dis. 2005, 64, 1510-2)。许多研究者在最近 5 年的研究证明, 抗含瓜氨酸多肽的测试的灵敏度具有较高的可变性, 范围在 40% -94% (Clin. Exp Rheumatol. 2005, 23(Suppl39), 569-76 ;Ann. Rheum. Dis. 2006, 65, 845-51)。CCP2 在类风湿关节炎自身免疫抗体体外检测中得到应用说明了在该领域的检测抗原的筛选并不需要仅仅依赖 filaggrin, 也说明与 filaggrin 不同的结合表位能更有利于体外检测。

[0016] Bizzaro N 等人 (Clin Chem 2007, 53, 1527-33) 和 Lutteri L 等人 (Clinica Chimica Acta 2007, 386, 76-81) 分别针对现在市场上使用的第二代和第三代 CCP 试剂盒 (Kit) 进行了比较, 结果发现, 伊诺瓦诊断 (Inova Diagnostics) 公司开发的三种检测方法中, 其 CCP3 试剂盒与使用 CCP2 为抗原的方法相比仅仅略有改善, 各自的灵敏度分别为 67% 和 64%。相反地, 用于抗 IgG 的 CCP3.0 与即能检测 IgG 又能检测 IgA 的 CCP3.1 的检测方法相比后发现, 两者竟然没有丝毫差别。可见, 同时检测 IgG 和 IgA 抗体的方法并没有象看上去那样有显著改进。他们的结论是由于测试的诊断试剂盒灵敏度可能与胍基化精氨酸残基的位置和数量有关, 而专一性则可能受到蛋白质或杂多肽序列的影响, 因此, 对此二者而言, 抗原的种类显得更为重要。两者综合考虑, 实验数据表明抗原的制备是决定测定方法优劣的最重要的可变因素。

[0017] Lutteri L 等人 (Clinica Chimica Acta 2007, 386, 76-81) 的研究还发现了抗 CCP 的另一个价值, 他们指出, IgM-RF 是最灵敏的标记, 能在 77.9% 的类风湿关节炎患者中发现。必须注意的是, 作为 ACR 标准中的 RF, 其类风湿关节炎诊断中灵敏度不能直接与那些没有包括在诊断标准中的其它方法相比较。IgM-RF 被认为在疾病专一性方面略有欠缺。使用 IgM-RF 检测类风湿关节炎患者, 其中有 13-19% 的人为 RF 阴性, 与之相比, 当这些患者使用抗 CCP 方法检测时均为阳性。

[0018] 类风湿关节炎的遗传因素会影响瓜氨酸化蛋白的出现和产生, 也会影响针对这些修饰蛋白的抗体产物 (Clinica Chimica Acta 2004, 350, 17-34)。一系列相关研究表明, 类风湿关节炎与某些 HLA-DR 等位基因有密切联系, 尤其是 HLA-DRB 1*0401 和 HLA-DRB 1*0404 (Cell 1996, 85, 307-10)。与相应的含有精氨酸的多肽相比, 将多肽瓜氨酸化就能与 HLA-DRB1*0401 和 HLA-DRB1*0404 两种“袋形”抗原更好地结合 (J India Rheumatol Assoc 2004, 12, 143-6)。在不同地区的人群中, 这些等位基因也略有不同。DRB 1*0401 主要出现在北欧和北美地区的人群中, 有证据表明该基因与类风湿关节炎所导致的“特大关节”表征 (extraarticular manifestations) 有联系, 在 DRB 1*0401/DRB1*0404 杂合基因型中尤为突出。DRB1*0403、DRB1*0406 和 DRB1*0407 与 DRB1*0401、*0404 或 *0101 基因组合后会增加类风湿关节炎病情的发展可能。DRB1*0404 与 DRB1*0408 只要存在于白色人种中。DRB1*0405 很少在北欧人群中, 但在亚洲和环地中海沿岸国家的人群中极其普遍。DRB1*0101 主要存在于北欧和北美人群中。美洲印第安人群中则为 DRB1*1402 和 *1406 (Hum Immuno 2000, 61, 1254-1261)。虽然这些与类风湿关节炎相关的基因在各地区人群中各有不同, 但研究发现在 DRB1 的第三高度可变区 (HV3) 具有共享表位 (shared epitope, SE),

在 70-74 位氨基酸残基都为 QKRAA、QRRAA 或 RRRAA (Clinica Chimica Acta 2004, 350, 17-34)。

[0019] 将一群有几个共享表位基因型的类风湿关节炎患者与具有抗 CCP2 抗体的患者比较研究表明,一种共享表位等位基因与抗 CCP2 抗体的产生具有密切的内在联系 (Arthritis Rheum 2000, 50, 2113-21; Arthritis Res Ther 2004, 6, R303-8)。经证实,这一关联是由于 MHC 分子共享表位 β 链的 70-74 位氨基酸残基 (Q/R, K/R, R, A, A) 形成第 4 个锚定袋 (P4), 其与电中性或负电荷氨基酸具有高度亲和性 (J Immuno 2003, 171, 538-541)。当带正电荷精氨酸在 PAD 酶作用下转换成电中性的瓜氨酸后, 得到的翻译后修饰蛋白 / 多肽亲和力远远大于精氨酸与 P4 的亲和力, 并能够激活 CD4⁺T 细胞, 这些“瓜氨酸特异 T 细胞”可有助于抗瓜氨酸蛋白 (多肽) 抗体的产生 (J Immuno 2003, 171, 538-541; Arthritis Rheum 1987, 30, 1205-13; Rheum Dis Clin North Am 1992, 18, 741-59; Arthritis Rheum 2005, 52, 1063-68)。这些结果表明具有共享表位的 DBR1 等位基因能激活类风湿关节炎患者自身免疫反应。

[0020] 综合目前的研究结果, 抗 CCP 抗体对 RA 具有较高的专一性, 能将 RA 与其它与 RA 相似的疾病相区分, 这类抗体存在于绝大多数的病人体内, 在疾病的早期就能检测到, 有助于对疾病的预测, 能通过简单的方式加以检测 (J India Rheumatol Assoc 2004, 12, 143-6)。

[0021] 目前类风湿关节炎检测方法通常使用单一的多肽抗原。虽然这些从 filaggrin 衍生出的或人工设计的环形或直线型多肽在类风湿关节炎抗体检测中都表现出较高的专一性 (> 90%), 但是由于类风湿关节炎患者存在众多的 HLA-DR 等位基因, 由此产生的抗体也相应地有所差异, 这使得检测灵敏度则始终得不到明显提高 (< 70%)。

发明内容

[0022] 本发明的一个目的在于提供一种与类风湿关节炎免疫抗体相结合的多肽。

[0023] 本发明的另一个目的在于提供一种用于类风湿关节炎自身免疫抗体体外检测的多肽组合物。

[0024] 一种与类风湿关节炎免疫抗体相结合的多肽, 包含有如下氨基酸序列:

[0025] His-Gln-Cys-Xaa1-Xaa2-Phe-Xaa3-Xaa4-Xaa5-Xaa6-Xaa7-Xaa8-Xaa9-Xaa10-Xaa11-Cys-Gly,

[0026] 其中, Xaa1 为 His 或 Ala; Xaa2 为 Gln 或 Arg; Xaa3 为 Arg 或 Gln; Xaa4 为 Phe 或 Met; Xaa5 为 Arg; Xaa6 为 Gly 或 His; Xaa7 为 Arg; Xaa8 为 Ser 或 Arg; Xaa9 为 Arg 或 Leu; Xaa10 为 Ala 或 Ile; Xaa11 为 Ala 或 Arg, 其中至少有一个精氨酸被修饰。

[0027] 另一种与类风湿关节炎免疫抗体相结合的多肽, 其包含有如下氨基酸序列:

[0028] His-Gln-Cys-Xaa1-Xaa2-Phe-Xaa3-Xaa4-Xaa5-Xaa6-Xaa7-Xaa8-Xaa9-Xaa10-Xaa11-Cys-Gly,

[0029] 其中, Xaa1 为 His 或 Ala; Xaa2 为 Gln 或 Arg; Xaa3 为 Arg 或 Gln; Xaa4 为 Phe 或 Met; Xaa5 为 Arg; Xaa6 为 Gly 或 His; Xaa7 为修饰的 Arg; Xaa8 为 Ser 或 Arg; Xaa9 为 Arg 或 Leu; Xaa10 为 Ala 或 Ile; Xaa11 为 Ala 或 Arg。

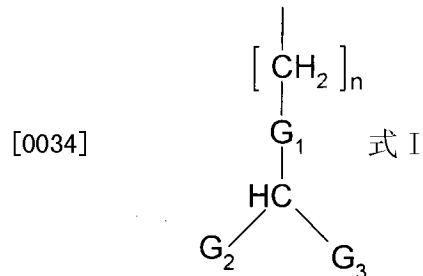
[0030] 另一种与类风湿关节炎免疫抗体相结合的多肽, 其包含有如下氨基酸序列:

[0031] His-Gln-Cys-Xaa1-Xaa2-Phe-Xaa3-Xaa4-Xaa5-Xaa6-Xaa7-Xaa8-Xaa9-Xaa10-Xaa

a11-Cys-Gly,

[0032] 其中, Xaa1 为 His 或 Ala ;Xaa2 为 Gln 或 Arg ;Xaa3 为 Arg 或 Gln ;Xaa4 为 Phe 或 Met ;Xaa5 为修饰的 Arg ;Xaa6 为 Gly 或 His ;Xaa7 为修饰的 Arg ;Xaa8 为 Ser 或 Arg ;Xaa9 为 Arg 或 Leu ;Xaa10 为 Ala 或 Ile ;Xaa11 为 Ala 或 Arg。

[0033] 上述与类风湿关节炎免疫抗体相结合的多肽,所述修饰的 Arg 为侧链修饰的 Arg,其侧链具有通式 (I) 所示的结构:



[0035] 其中 G1 为 O、NH 或 CH₂;G2 为 NH₂、CH₃、NHCH₃ 或 N(CH₃)₂;G3 为 O、NH、NHCH₃、NHCH₃;n 为 2、3 或 4;

[0036] 其中当 G1 为 NH, G2 为 NH₂ 时, G3 不为 NH。

[0037] 另一种与类风湿关节炎免疫抗体相结合的多肽,其包含有如下氨基酸序列:

[0038] His-Gln-Cys-Xaa1-Xaa2-Phe-Xaa3-Xaa4-Xaa5-His-Xaa6-Xaa7-Xaa8-Xaa9-Xaa10-Cys-Gly,

[0039] 其中, Xaa1 为 His 或 Ala ;Xaa2 为 Gln 或 Arg ;Xaa3 为 Arg 或 Gln ;Xaa4 为 Phe 或 Met ;Xaa5 为 Arg ;Xaa6 为修饰的 Arg ;Xaa7 为 Ser 或 Arg ;Xaa8 为 Arg 或 Leu ;Xaa9 为 Ala 或 Ile ;Xaa10 为 Ala 或 Arg。

[0040] 所述修饰的 Arg 为瓜氨酸 (Cit),即当 G1 为 NH, G2 为 NH₂, G3 为 O, 及 n 为 3。

[0041] 另一种与类风湿关节炎免疫抗体相结合的多肽,其包含有如下氨基酸序列:

[0042] His-Gln-Cys-Xaa1-Xaa2-Phe-Xaa3-Xaa4-Xaa5-His-Xaa6-Xaa7-Xaa8-Xaa9-Xaa10-Cys-Gly,

[0043] 其中, Xaa1 为 His 或 Ala ;Xaa2 为 Gln 或 Arg ;Xaa3 为 Arg 或 Gln ;Xaa4 为 Phe 或 Met ;Xaa5 为修饰的 Arg ;Xaa6 为修饰的 Arg ;Xaa7 为 Ser 或 Arg ;Xaa8 为 Arg 或 Leu ;Xaa9 为 Ala 或 Ile ;Xaa10 为 Ala 或 Arg。

[0044] 所述修饰的 Arg 为瓜氨酸 (Cit),即当 G1 为 NH, G2 为 NH₂, G3 为 O, 及 n 为 3。

[0045] 另一种与类风湿关节炎免疫抗体相结合的多肽,其包含有如下氨基酸序列:

[0046] His-Gln-Cys-Xaa1-Xaa2-Phe-Xaa3-Xaa4-Xaa5-Gly-Xaa6-Xaa7-Xaa8-Xaa9-Xaa10-Cys-Gly,

[0047] 其中, Xaa1 为 His 或 Ala ;Xaa2 为 Gln 或 Arg ;Xaa3 为 Arg 或 Gln ;Xaa4 为 Phe 或 Met ;Xaa5 为修饰的 Arg ;Xaa6 为修饰的 Arg ;Xaa7 为 Ser 或 Arg ;Xaa8 为 Arg 或 Leu ;Xaa9 为 Ala 或 Ile ;Xaa10 为 Ala 或 Arg。

[0048] 所述修饰的 Arg 为瓜氨酸 (Cit),即当 G1 为 NH, G2 为 NH₂, G3 为 O, 及 n 为 3。

[0049] 上述多肽能与类风湿自身免疫抗体相结合,形成抗原-抗体复合物 (Complex)。

[0050] 上述多肽能与 HLA-DR 分子具有高亲和力,与 HLA-DR 相结合形成 HLA-DR-多肽复合物。

[0051] 一种用于类风湿关节炎自身免疫抗体体外检测的多肽组合物,由三种多肽组成,

[0052] 多肽 I, His-Gln-Cys-Xaa1-Xaa2-Phe-Xaa3-Xaa4-Xaa5-His-Xaa6-Xaa7-Xaa8-Xaa9-Xaa10-Cys-Gly,

[0053] 其中, Xaa1 为 His 或 Ala; Xaa2 为 Gln 或 Arg; Xaa3 为 Arg 或 Gln; Xaa4 为 Phe 或 Met; Xaa5 为 Arg; Xaa6 为修饰的 Arg; Xaa7 为 Ser 或 Arg; Xaa8 为 Arg 或 Leu; Xaa9 为 Ala 或 Ile; Xaa10 为 Ala 或 Arg;

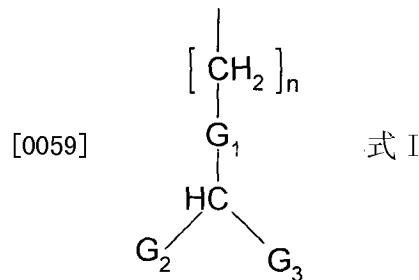
[0054] 多肽 II, His-Gln-Cys-Xaa1-Xaa2-Phe-Xaa3-Xaa4-Xaa5-His-Xaa6-Xaa7-Xaa8-Xaa9-Xaa10-Cys-Gly,

[0055] 其中, Xaa1 为 His 或 Ala; Xaa2 为 Gln 或 Arg; Xaa3 为 Arg 或 Gln; Xaa4 为 Phe 或 Met; Xaa5 为修饰的 Arg; Xaa6 为修饰的 Arg; Xaa7 为 Ser 或 Arg; Xaa8 为 Arg 或 Leu; Xaa9 为 Ala 或 Ile; Xaa10 为 Ala 或 Arg;

[0056] 多肽 III, His-Gln-Cys-Xaa1-Xaa2-Phe-Xaa3-Xaa4-Xaa5-Gly-Xaa6-Xaa7-Xaa8-Xaa9-Xaa10-Cys-Gly,

[0057] 其中, Xaa1 为 His 或 Ala; Xaa2 为 Gln 或 Arg; Xaa3 为 Arg 或 Gln; Xaa4 为 Phe 或 Met; Xaa5 为修饰的 Arg; Xaa6 为修饰的 Arg; Xaa7 为 Ser 或 Arg; Xaa8 为 Arg 或 Leu; Xaa9 为 Ala 或 Ile; Xaa10 为 Ala 或 Arg;

[0058] 所述修饰的 Arg 为侧链修饰的 Arg, 其侧链具有通式 (I) 所示的结构:



[0060] 其中 G1 为 O、NH 或 CH₂; G2 为 NH₂、CH₃、NHCH₃ 或 N(CH₃)₂; G3 为 O、NH、NHCH₃、NHCH₃; n 为 2、3 或 4;

[0061] 其中当 G1 为 NH, G2 为 NH₂ 时, G3 不为 NH。

[0062] 另一种用于类风湿关节炎自身免疫抗体体外检测的多肽组合物,由三种多肽组成,

[0063] 多肽 I, His-Gln-Cys-Xaa1-Xaa2-Phe-Xaa3-Xaa4-Xaa5-His-Xaa6-Xaa7-Xaa8-Xaa9-Xaa10-Cys-Gly,

[0064] 其中, Xaa1 为 His 或 Ala; Xaa2 为 Gln 或 Arg; Xaa3 为 Arg 或 Gln; Xaa4 为 Phe 或 Met; Xaa5 为 Arg; Xaa6 为修饰的 Arg; Xaa7 为 Ser 或 Arg; Xaa8 为 Arg 或 Leu; Xaa9 为 Ala 或 Ile; Xaa10 为 Ala 或 Arg;

[0065] 多肽 II, His-Gln-Cys-Xaa1-Xaa2-Phe-Xaa3-Xaa4-Xaa5-His-Xaa6-Xaa7-Xaa8-Xaa9-Xaa10-Cys-Gly,

[0066] 其中, Xaa1 为 His 或 Ala; Xaa2 为 Gln 或 Arg; Xaa3 为 Arg 或 Gln; Xaa4 为 Phe 或 Met; Xaa5 为修饰的 Arg; Xaa6 为修饰的 Arg; Xaa7 为 Ser 或 Arg; Xaa8 为 Arg 或 Leu; Xaa9 为 Ala 或 Ile; Xaa10 为 Ala 或 Arg;

[0067] 多肽 III, His-Gln-Cys-Xaa1-Xaa2-Phe-Xaa3-Xaa4-Xaa5-Gly-Xaa6-Xaa7-Xaa8-Xaa9-Xaa10-Cys-Gly,

a9-Xaa10-Cys-Gly,

[0068] 其中, Xaa1 为 His 或 Ala ;Xaa2 为 Gln 或 Arg ;Xaa3 为 Arg 或 Gln ;Xaa4 为 Phe 或 Met ;Xaa5 为修饰的 Arg ;Xaa6 为修饰的 Arg ;Xaa7 为 Ser 或 Arg ;Xaa8 为 Arg 或 Leu ;Xaa9 为 Ala 或 Ile ;Xaa10 为 Ala 或 Arg ;

[0069] 所述修饰的 Arg 为瓜氨酸 (Cit), 即当 G1 为 NH, G2 为 NH₂, G3 为 O, 及 n 为 3。

[0070] 另一种用于类风湿关节炎自身免疫抗体体外检测的多肽组合物, 由三种多肽组成,

[0071] 多肽 I, His-Gln-Cys-Ala-Xaa1-Phe-Xaa2-Xaa3-Arg-His-Cit-Xaa4-Xaa5-Xaa6-Xaa7-Cys-Gly,

[0072] 其中, Xaa1 为 Gln 或 Arg ;Xaa2 为 Arg 或 Gln ;Xaa3 为 Phe 或 Met ;Xaa4 为 Ser 或 Arg ;Xaa5 为 Arg 或 Leu ;Xaa6 为 Ala 或 Ile ;Xaa7 为 Ala 或 Arg ;

[0073] 多肽 II, His-Gln-Cys-Ala-Xaa1-Phe-Xaa2-Xaa3-Cit-His-Cit-Xaa4-Xaa5-Xaa6-Xaa7-Cys-Gly,

[0074] 其中, Xaa1 为 Gln 或 Arg ;Xaa2 为 Arg 或 Gln ;Xaa3 为 Phe 或 Met ;Xaa4 为 Ser 或 Arg ;Xaa5 为 Arg 或 Leu ;Xaa6 为 Ala 或 Ile ;Xaa7 为 Ala 或 Arg ;

[0075] 多肽 III, His-Gln-Cys-His-Xaa1-Phe-Xaa2-Xaa3-Cit-Gly-Cit-Xaa4-Xaa5-Xaa6-Xaa7-Cys-Gly,

[0076] 其中, Xaa1 为 Gln 或 Arg ;Xaa2 为 Arg 或 Gln ;Xaa3 为 Phe 或 Met ;Xaa4 为 Ser 或 Arg ;Xaa5 为 Arg 或 Leu ;Xaa6 为 Ala 或 Ile ;Xaa7 为 Ala 或 Arg。

[0077] 另一种用于类风湿关节炎自身免疫抗体体外检测的多肽组合物, 由三种多肽组成,

[0078] 多肽 I, His-Gln-Cys-Ala-Xaa1-Phe-Xaa2-Xaa3-Arg-His-Cit-Xaa4-Leu-Ile-Arg-Cys-Gly,

[0079] 其中, Xaa1 为 Arg 或 Gln ;Xaa2 为 Arg 或 Gln ;Xaa3 为 Phe 或 Met ;Xaa4 为 Ser 或 Arg ;

[0080] 多肽 II, His-Gln-Cys-Ala-Arg-Phe-Gln-Xaa1-Cit-His-Cit-Xaa2-Xaa3-Xaa4-Arg-Cys-Gly,

[0081] 其中, Xaa1 为 Phe 或 Met ;Xaa2 为 Ser 或 Arg ;Xaa3 为 Arg 或 Leu ;Xaa4 为 Ala 或 Ile ;

[0082] 多肽 III, His-Gln-Cys-His-Gln-Phe-Xaa1-Xaa2-Cit-Gly-Cit-Xaa3-Xaa4-Ala-Ala-Cys-Gly,

[0083] 其中, Xaa1 为 Arg 或 Gln ;Xaa2 为 Phe 或 Met ;Xaa3 为 Ser 或 Arg ;Xaa4 为 Arg 或 Leu。

[0084] 另一种用于类风湿关节炎自身免疫抗体体外检测的多肽组合物, 由三种多肽组成,

[0085] 多肽 I, His-Gln-Cys-Ala-Xaa1-Phe-Gln-Xaa2-Arg-His-Cit-Xaa3-Leu-Ile-Arg-Cys-Gly,

[0086] 其中, Xaa1 为 Arg 或 Gln ;Xaa2 为 Phe 或 Met ;Xaa3 为 Ser 或 Arg ;

[0087] 多肽 II, His-Gln-Cys-Ala-Arg-Phe-Xaa1-Met-Cit-His-Cit-Xaa2-Xaa3-Ile-Arg

-Cys-Gly,

[0088] 其中, Xaa1 为 Arg 或 Gln ;Xaa2 为 Ser 或 Arg ;Xaa3 为 Arg 或 Leu ;

[0089] 多肽III, His-Gln-Cys-His-Gln-Phe-Xaa1-Phe-Cit-Gly-Cit-Xaa2-Xaa3-Ala-Ala-Cys-Gly,

[0090] 其中, Xaa1 为 Arg 或 Gln ;Xaa2 为 Ser 或 Arg ;Xaa3 为 Arg 或 Leu。

[0091] 上述组成多肽组合物的各种多肽是通过各自序列中的不相邻的两个 Cys 之间形成二硫键。所形成的二硫键能使该多肽具有环状结构并能模拟 β -转角结构,使得该多肽不仅具有与 HLA-DR 分子具有高亲和力,与 HLA-DR 相结合形成 HLA-DR-多肽复合物;还能与抗 CCP 抗体高效结合,形成抗原-抗体复合物。

[0092] 另一种用于类风湿关节炎自身免疫抗体体外检测的多肽组合物,由三种多肽组成,

[0093] 多肽 I, His-Gln-Cys-Ala-Xaa1-Phe-Gln-Xaa2-Arg-His-Cit-Arg-Leu-Ile-Arg-Cys-Gly,

[0094] 其中, Xaa1 为 Arg 或 Gln ;Xaa2 为 Phe 或 Met ;

[0095] 多肽 II, His-Gln-Cys-Ala-Arg-Phe-Xaa1-Met-Cit-His-Cit-Xaa2-Leu-Ile-Arg-Cys-Gly,

[0096] 其中, Xaa1 为 Arg 或 Gln ;Xaa2 为 Ser 或 Arg ;

[0097] 多肽III, His-Gln-Cys-His-Gln-Phe-Xaa1-Phe-Cit-Gly-Cit-Ser-Xaa3-Ala-Ala-Cys-Gly,

[0098] 其中, Xaa1 为 Arg 或 Gln ;Xaa2 为 Arg 或 Leu ;

[0099] 所述多肽 I、II 和III第三位 Cys 与第十六位 Cys 之间形成二硫键。

[0100] 另一种用于类风湿关节炎自身免疫抗体体外检测的多肽组合物,由三种多肽组成,

[0101] 多肽 I, His-Gln-Cys-Ala-Xaa1-Phe-Gln-Met-Arg-His-Cit-Arg-Leu-Ile-Arg-Cys-Gly,

[0102] 其中, Xaa1 为 Arg 或 Gln ;

[0103] 多肽 II, His-Gln-Cys-Ala-Arg-Phe-Xaa1-Met-Cit-His-Cit-Ser-Leu-Ile-Arg-Cys-Gly,

[0104] 其中, Xaa1 为 Arg 或 Gln ;

[0105] 多肽III, His-Gln-Cys-His-Gln-Phe-Arg-Phe-Cit-Gly-Cit-Ser-Arg-Ala-Ala-Cys-Gly,

[0106] 所述多肽 I、II 和III第三位 Cys 与第十六位 Cys 之间形成二硫键。

[0107] 上述组成多肽组合物的各种多肽的摩尔比为 0.1-1 : 0.1-1 : 0.1-1。

[0108] 另一种用于类风湿关节炎自身免疫抗体体外检测的多肽组合物,由三种多肽组成,

[0109] 多肽 I, His-Gln-Cys-Ala-Arg-Phe-Gln-Met-Arg-His-Cit-Arg-Leu-Ile-Arg-Cys-Gly ;

[0110] 多肽 II, His-Gln-Cys-Ala-Arg-Phe-Gln-Met-Cit-His-Cit-Arg-Leu-Ile-Arg-Cys-Gly ;

[0111] 多肽III, His-Gln-Cys-His-Gln-Phe-Arg-Phe-Cit-Gly-Cit-Ser-Arg-Ala-Ala-Cys-Gly,

[0112] 所述多肽 I、II 和 III 第三位 Cys 与第十六位 Cys 之间形成二硫键。

[0113] 上述组成多肽组合物的各种多肽的摩尔比为 1 : 1 : 1。

[0114] 本发明所述的多肽为通过化学方法直接合成或先通过化学合成或基因工程方法, 即将从表达载体中分离纯化得到的多肽再经过修饰精氨酸侧链的步骤得到。

[0115] 具体地说, 所述的多肽通过化学方法直接合成, 或先通过化学方法合成后, 再由 PAD 酶修饰精氨酸侧链得到。

[0116] 本发明所述的多肽能与类风湿关节炎自身免疫抗体相结合。

[0117] 进一步地说, 所述的多肽与类风湿关节炎自身免疫抗体相结合的专一性大于 90%。

[0118] 进一步地说, 所述的多肽对类风湿关节炎自身免疫抗体的灵敏度大于 70%。

[0119] 更进一步的, 所述的多肽对类风湿关节炎自身免疫抗体的灵敏度大于 75%。

[0120] 本发明所述的多肽对 HLA-DR 具有高亲和力, 与 HLA-DR 相结合形成 HLA-DR- 多肽复合物。

[0121] 本发明所述的多肽及其组合物能应用于类风湿关节炎疾病自身免疫抗体的体外检测。

[0122] 本发明所述的类风湿关节炎疾病自身免疫抗体的体外检测的应用, 其一般方法为将待测血清 (serums) 与包含有上述的多肽 (即抗原) 试剂混合, 检测所述多肽与血清中抗体所形成的复合物。检测结果呈阳性表明, 该血清中具有类风湿关节炎疾病自身免疫抗体。

[0123] 检测介质选择固相或液相。固相介质选择塑料板、玻璃片或试纸条。

[0124] 塑料应当理解为全部或部分由碳与氧、氢、氮及其它有机及无机元素化合而成, 在制造的最后阶段成为固体, 在制造中某些阶段是液体 (塑料材料在成为最终产品以前, 在某些阶段必需要能够流动), 因而可以加热或加压力, 或二者并用的方式, 使其形成各种形状, 此庞大而变化多端材料族类中的任何一种, 如树脂、热固性树脂、纤维素衍生物等, 在一条长链的分子结构中存在众多的重复原子或分子。塑料包括人工合成或自然界有机材料。

[0125] 玻璃应当被理解为易碎的非晶体物质, 这些物质可以是透明的也可以是半透明的, 通常由熔融硅和硅酸盐融合组成。玻璃还可以认为是一类不具有结晶过程, 而是由熔化状态固化而来的材料, 大体上由 Na_2O 、 CaO 和 6SiO_2 化学氧化物组成, 具有光学属性和各种机械属性。

[0126] 具体的, 塑料板是由聚苯乙烯、聚乙烯、聚氯乙烯或聚碳酸酯等制成的直板或具有多孔构造的酶标板; 试纸条是由聚苯乙烯、聚乙烯、聚氯乙烯或聚酯等制成的膜。在所述塑料板或试纸条上结合有检测所需的上述多肽或多肽组合物。

[0127] 检测方法可以有多种, 例如间接酶联免疫测定技术、双抗原夹心酶免疫测定技术、金标快速检测技术、免疫渗滤检测技术和蛋白芯片检测技术等。一般选择间接酶联免疫测定, 即间接 ELISA 方法。

[0128] 所述的 ELISA 检测方法具体的实验步骤可以参见 US6, 858, 438 中关于 ELISA 检测的相应部分。

[0129] 其基本原理是：多肽（抗原）包被在酶标板表面，将稀释后的待检血清 / 血浆和对照物加入反应板孔中，如果被检血清 / 血浆中存在抗 CCP 抗体，经温育后，则血清 / 血浆中特异性抗体与反应板孔中的 CCP 抗原多肽结合，形成固相抗原 - 抗体复合物，洗去未结合的血清 / 血浆中其它成分，加入酶标记的抗人 IgG 抗体，温育，固相 CCP 抗原（多肽）结合的抗 CCP 抗体再与酶标记的抗人 IgG 抗体结合，洗去未结合的酶标记抗体成分，加入酶底物，并被催化成为有色产物，最后加入终止液终止反应。根据试剂盒内的对照物，可对抗 CCP 抗体进行定量或定性测定。

[0130] 应用于 ELISA 检测方法中的上述多肽及其组合物，还可以为经生物素标记的多肽及其组合物，其能与亲和素或链霉亲和素非共价结合。所述的亲和素 (Avidin) 是一种相对分子质量为 68,000Da, pI 为 10.5 的一种碱性糖蛋白，又称卵白素，在鸡蛋清中含量比较丰富，一般从蛋白清中提取。所述的链霉亲和素 (Streptavidin) 是一种从链霉菌 (*Streptomyces avidinii*) 培养物中提取的蛋白质，相对分子质量 60,000Da, 不具有糖链。其特性与亲和素一样，也具有 4 个生物素结合位点，与生物素具有高亲和力。

[0131] 所述的多肽与生物素标记相结合的方法可以通过先由固相合成或基因工程表达并纯化，所得多肽再与生物素连接并纯化（如申请号为 200310108264.0 中国发明专利所公开的技术方案）。

[0132] 所述的多肽与生物素标记相结合的方法还可以在多肽的固相合成过程中先与生物素连接再纯化的方式 (Pept. Res. 1989, 2, 189-194)。

[0133] 具体的，所述的结合有生物素的多肽，其上生物素与多肽的 N 末端相结合。

[0134] 在 ELISA 检测方法中，所述的抗人 IgG 抗体为辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的抗人 IgG 抗体其具体配制方式为，取 20 μ L 储存液，加 800ml 抗体稀释液作 1 : 40000 稀释，混匀，分装标准小瓶，每瓶 15ml, 2 ~ 8 $^{\circ}$ C 下保存。

[0135] 其中 HRP 标记的抗人 IgG 抗体底物 A 配制方式为：称取柠檬酸 17.9g 和 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 4.67g 溶解于 400ml 去离子水中，然后缓慢加入 30% H_2O_2 330 μ L, 搅拌均匀后，加水至 500ml, 2 ~ 8 $^{\circ}$ C 下保存。

[0136] 其中 HRP 标记的抗人 IgG 抗体底物 B 配制方式为：称取四甲基联苯氨 (tetramethyl benzidine, TMB) 0.1g 于 100ml 去离子水中，加入二甲基亚砷 (DMSO) 2.5ml, 在搅拌的同时，缓慢加入 0.5ml 6M HCL, 直至完全溶解，最后加水至 500ml, 2 ~ 8 $^{\circ}$ C 下保存。

[0137] 其中 HRP 标记的抗人 IgG 抗体底物反应终止液的配制方式：分别量取 55ml 98% H_2SO_4 和去离子水 445ml, 然后将浓硫酸缓慢加入到去离子水中，混匀，2 ~ 8 $^{\circ}$ C 下保存。

[0138] 酶标仪测定波长设定在 450nm, 30 分钟内测定各孔 OD_{450} 值。

[0139] 本发明技术方案实现的有益效果：

[0140] 本发明所述的多肽组合物，其各自序列上至少有一精氨酸侧链经修饰后呈现电中性或电负性，并优先选择瓜氨酸。通过各自序列上两个不相邻的半胱氨酸侧链巯基形成二硫键的方式，产生环状的多肽。这类多肽不仅能与类风湿关节炎自身免疫抗体相结合，同时还能对 HLA-DR 具有高亲和力。经过实验验证，该类多肽与类风湿关节炎自身免疫抗体相结合的专一性大于 90%，对类风湿关节炎自身免疫抗体的检测灵敏度大于 75%。与市场销售的同类产品相比，其灵敏度得到显著提高，更有利于类风湿关节炎自身免疫抗体的体外检测。

具体实施方式

[0141] 以下详细描述本发明的技术方案。本发明实施例仅用以说明本发明的技术方案而非限制,尽管参照较佳实施例对本发明进行了详细说明,本领域的普通技术人员应当理解,可以对发明的技术方案进行修改或者等同替换,而不脱离本发明技术方案的精神和范围,其均应涵盖在本发明的权利要求范围内。

[0142] 本发明所用的试剂若未明确指明,则均购自西格玛-奥德里奇(Sigma-Aldrich)。

[0143] 实施例 1 多肽 I 的合成

[0144] 多肽采用 Fmoc 化学方法,通过固相合成技术合成。该方法的具体步骤参见 Eur. J. Immunol. 1994, 24, 3188-3193 ;J. Org. Chem. 1972, 37, 3404-3409 ;黄惟德,陈常庆多肽合成,北京:科学出版社,1985。

[0145] 二硫键的形成方法及其步骤可以参见文献:黄惟德,陈常庆多肽合成,北京:科学出版社,1985, p85 ;Michael W. Pennington Peptide Synthesis Protocols (Methods in Molecular Biology), Humana Press, 1994, p91-169。

[0146] 通过上述步骤,合成多肽的具体序列为:

[0147] 多肽 I :His-Gln-Cys-Ala-Arg-Phe-Gln-Met-Arg-His-Cit-Arg-Leu-Ile-Arg-Cys-Gly,其上第三位和第十六位 Cys 通过巯基形成二硫键,并使多肽形成环状结构,并能模拟 β -转角结构。

[0148] 实施例 2 多肽 II 的合成

[0149] 根据实施例 1 所公开的方法合成多肽 II :His-Gln-Cys-Ala-Arg-Phe-Gln-Met-Cit-His-Cit-Arg-Leu-Ile-Arg-Cys-Gly,其上第三位和第十六位 Cys 通过巯基形成二硫键,并使多肽形成环状结构,并能模拟 β -转角结构。

[0150] 实施例 3 多肽 III 的合成

[0151] 根据实施例 1 所公开的方法合成多肽 III :His-Gln-Cys-His-Gln-Phe-Arg-Phe-Cit-Gly-Cit-Ser-Arg-Ala-Ala-Cys-Gly,其上第三位和第十六位 Cys 通过巯基形成二硫键,并使多肽形成环状结构,并能模拟 β -转角结构。

[0152] 实施例 4 多肽的纯化

[0153] 先将蛋白质或多肽末端的保护基在二甲基酰胺(DMF)溶剂中脱保护,中和。再用氟化氢将多肽从合成树脂上切下,得到的粗产物经过反相色谱 C18 或 C8 柱(如:5 μ m, 250 \times 4.6mm),以流动相 A(0.1% (v/v) 三氟乙酸乙腈溶液)和流动相 B(0.1% (v/v) 三氟乙酸水溶液)为梯度洗脱溶剂。在 45 分钟内,流动相 A 占 A、B 两相总体积 0% (v/v) 变化到 100% (v/v) 收集得到目标多肽,通过脱盐色谱柱(GE Healthcare)或旋转蒸发去除有机溶剂,目标多肽可以通过 LC-MS 连用或将收集得到的多肽直接进样的方式通过 ESI 质谱得到的分子量来确定。(参见:中国分析化学 2002, 30, 1126-9)

[0154] 实施例 5 多肽 I 和多肽 II 的纯度与分子量检测

[0155] 上述合成出的多肽 I 和多肽 II 分别通过反相色谱(RP-HPLC)测定,其具体方法为:

[0156] 4.6 \times 250mm 5 μ m C18 分析柱(Kromasil);

[0157] 流动相 A 为三氟乙酸(trifluoroacetic, TFA) 加入 100%腈(acetonitrile, ACN)

中,使得 TFA 浓度为 0.1% (v/v) ;

[0158] 流动相 B 为 TFA 加入 100%水中,使得 TFA 浓度为 0.1% (v/v) ;

[0159] 流速为 1.0ml/min ;

[0160] 检测波长为 220nm ;

[0161] 洗脱梯度 :以流动相 A 占 A、B 两项总体积 15% (v/v) 的比例平衡,进样后,采用线性梯度洗脱 (Gradient Elution),在 25 分钟内流动相 A 占 A、B 两项总体积从 15% (v/v) 改变至 50% (v/v) 的比例,之后以 100% (v/v) 流动相 A 平衡 5 分钟。

[0162] 多肽 I 的保留时间 (Retention Time) 为 12.5,其纯度大于 95%。

[0163] 多肽 II 的保留时间为 13.2,其纯度大于 95%。

[0164] 通过 ESI 质谱分别测定多肽 I 和多肽 II 的分子量,其具体条件为 :

[0165] 质谱 (Probe) ESI

[0166] 质谱电压 (Probe bias) +4.5kv

[0167] 喷雾器流速 (Nebulizer Gas Flow) 1.5L/min

[0168] 检测器 (Detector) 1.5kv

[0169] 样品电离化装置 (CDL) -20.0v

[0170] 流动相流速 (T. Flow) 0.2ml/min

[0171] CDL 温度 (CDL Temp) 250℃

[0172] 缓冲液浓度 (B. conc) 50% H₂O, 50% ACN

[0173] 加热块温度 (Block Temp) 200℃

[0174] 多肽 I 分子量为 2167.59Da ;多肽 II 分子量为 2168.58Da。

[0175] 实施例 6 多肽 III 的纯度与分子量检测

[0176] 上述合成出的多肽 III 通过反相色谱 (RP-HPLC) 测定,其具体方法为 :

[0177] 4.6×250mm 5μm C18 分析柱 (Kromasil) ;

[0178] 流动相 A 为三氟乙酸 (trifluoroacetic, TFA) 加入 100%乙腈 (acetonitrile, ACN) 中,使得 TFA 浓度为 0.1% (v/v) ;

[0179] 流动相 B 为 TFA 加入 100%水中,使得 TFA 浓度为 0.1% (v/v) ;

[0180] 流速为 1.0ml/min ;

[0181] 检测波长为 220nm ;

[0182] 洗脱梯度 :以流动相 A 占 A、B 两相总体积 10% (v/v) 的比例平衡,进样后,采用线性梯度洗脱 (Gradient Elution),在 25 分钟内流动相 A 占 A、B 两相总体积从 10% (v/v) 改变至 35% (v/v) 的比例,之后以 100% (v/v) 流动相 A 平衡 5 分钟。

[0183] 多肽 III 的保留时间为 9.32,其纯度大于 95%。

[0184] 使用与实施例 5 相同的质谱条件,测定多肽 III 的分子量为 2017.26Da。

[0185] 实施例 7 多肽的生物素标记

[0186] 生物素 - 多肽 I、II 和 III 均采用在固相合成过程中先与生物素连接再纯化的方式分别进行,其具体方式参见 Deibel, M. R., Jr., Lobl, T. J. and Yem, A. W., A technique for rapid purification of low yield products :Biotinylation of chemically synthesized proteins on-resin. Pept. Res. 1989, 2, 189-194。

[0187] 当生物素通过缩合剂在多肽合成时直接缩合后,使用 Kaiser test 检测缩合

反应是否完全。该反应的详细说明请参见 Sigma-Aldrich 60017 产品说明 (60017Data Sheet), 该方法可不仅应用于定性 (Analytical Biochemistry 1970, 34, 595), 还能进行定量 (Analytical Biochemistry 1981, 117, 147) 检测。

[0188] 通过实施例 1 公开的二硫键形成方法, 在多肽第三位和第十六位 Cys 通过巯基形成二硫键, 并使多肽形成环状结构。

[0189] 实施例 8 多肽与生物素结合后的分离和纯化

[0190] 在树脂上进行生物素标记。首先, 蛋白质或多肽末端在二甲基酰胺 (DMF) 溶剂中脱保护, 中和; 然后与 N- 羟基琥珀酰亚胺生物素反应 (即生物素化), 反应条件为 45°C 24 小时; 再用氯化氢将标记有生物素的多肽切下, 得到的粗产物经过亲和素偶联琼脂的亲和层析柱 (GE Healthcare), 用磷酸盐缓冲液洗涤, 去除未结合的成分, 最后用 0.1M 的甘氨酸溶液 (pH2.0) 洗脱, 得到生物素化的蛋白质或多肽。

[0191] 实施例 9 生物素 - 多肽 I 和 II 的纯度与分子量检测

[0192] 上述合成出的环形生物素 - 多肽 I 和 II 分别通过反相色谱 (RP-HPLC) 测定, 其具体方法为:

[0193] 4.6×250mm 5 μm C18 分析柱 (Kromasil);

[0194] 流动相 A 为三氟乙酸 (trifluoroacetic, TFA) 加入 100% 乙腈 (acetonitrile, ACN) 中, 使得 TFA 浓度为 0.1% (v/v);

[0195] 流动相 B 为 TFA 加入 100% 水中, 使得 TFA 浓度为 0.1% (v/v);

[0196] 流速为 1.0ml/min;

[0197] 检测波长为 220nm;

[0198] 洗脱梯度: 以流动相 A 占 A、B 两项总体积 15% (v/v) 的比例平衡, 进样后, 采用线性梯度洗脱 (Gradient Elution), 在 25 分钟内流动相 A 占 A、B 两项总体积从 15% (v/v) 改变至 50% (v/v) 的比例, 之后以 100% (v/v) 流动相 A 平衡 5 分钟。

[0199] 环形生物素 - 多肽 1 的保留时间为 8.4, 其纯度大于 95%。

[0200] 环形生物素 - 多肽 2 的保留时间为 13.5, 其纯度大于 95%。

[0201] 通过 ESI 质谱分别测定多肽 I 和多肽 II 的分子量, 其具体条件为:

[0202] 质谱 (Probe) ESI

[0203] 质谱电压 (Probe bias) +4.5kv

[0204] 喷雾器流速 (Nebulizer Gas Flow) 1.5L/min

[0205] 检测器 (Detector) 1.5kv

[0206] 样品电离化装置 (CDL) -20.0v

[0207] 流动相流速 (T.Flow) 0.2ml/min

[0208] CDL 温度 (CDL Temp) 250°C

[0209] 缓冲液浓度 (B.conc) 50% H₂O, 50% ACN

[0210] 加热块温度 (Block Temp) 200°C

[0211] 根据峰值和其所带的电荷来计算, 生物素 - 多肽 I 分子量为 2393.9Da; 生物素 - 多肽 II 分子量 2394.89Da。

[0212] 实施例 10 生物素 - 多肽 III 的纯度与分子量检测

[0213] 上述合成出的环形生物素 - 多肽 III 通过反相色谱 (RP-HPLC) 测定, 其具体方法

为：

- [0214] 4.6×250mm 5 μ m C18 分析柱 (Kromasil)；
- [0215] 流动相 A 为三氟乙酸 (trifluoroacetic, TFA) 加入 100% 乙腈 (acetonitrile, ACN) 中, 使得 TFA 浓度为 0.1% (v/v)；
- [0216] 流动相 B 为 TFA 加入 100% 水中, 使得 TFA 浓度为 0.1% (v/v)；
- [0217] 流速为 1.0ml/min；
- [0218] 检测波长为 220nm；
- [0219] 洗脱梯度: 以流动相 A 占 A、B 两相总体积 15% (v/v) 的比例平衡, 进样后, 采用线性梯度洗脱 (Gradient Elution), 在 25 分钟内流动相 A 占 A、B 两相总体积从 15% (v/v) 改变至 40% (v/v) 的比例, 之后以 100% (v/v) 流动相 A 平衡 5 分钟。
- [0220] 生物素 - 环形多肽的保留时间为 17.76, 其纯度大于 95%。
- [0221] 通过 ESI 质谱分别测定多肽的分子量, 其具体条件为：
- [0222] 使用与实施例 9 相同的质谱条件, 测定生物素 - 环形多肽 III 分子量为 2243.57Da。
- [0223] 实施例 11 类风湿关节炎抗体的体外检测
- [0224] 使用 ELISA 方法检测类风湿关节炎患者的血清中自身免疫抗体, 具体的实验步骤可以参见 US6,858,438 中关于 ELISA 检测的相应部分。
- [0225] 其基本原理是: 多肽 (抗原) 包被在酶标板表面, 将稀释后的待检血清 / 血浆和对照物加入反应板孔中, 如果被检血清 / 血浆中存在抗 CCP 抗体, 经温育后, 则血清 / 血浆中特异性抗体与反应板孔中的 CCP 抗原多肽结合, 形成固相抗原 - 抗体复合物, 洗去未结合的血清 / 血浆中其它成分, 加入酶标记的抗人 IgG 抗体, 温育, 固相 CCP 抗原 (多肽) 结合的抗 CCP 抗体再与酶标记的抗人 IgG 抗体结合, 洗去未结合的酶标记抗体成分, 加入酶底物, 并被催化成为有色产物, 最后加入终止液终止反应。根据试剂盒内的对照物, 可对抗 CCP 抗体进行定量或定性测定。
- [0226] 本发明所述的抗人 IgG 抗体为 HRP 标记的兔抗人 IgG 抗体采购于武汉博士德生物工程有限公司 (货号: BA1070)。其具体配制方式为, 取 20 μ L 储存液, 加 800ml 抗体稀释液作 1 : 40000 稀释, 混匀, 分装标准小瓶, 每瓶 15ml, 2 ~ 8°C 下保存。抗体稀释液购自 Pierce 公司 (货号: 37552)。
- [0227] HRP 标记的抗人 IgG 抗体底物 A 配制: 称取柠檬酸 17.9g 和 Na₂HPO₄ · 12H₂O 4.67g 溶解于 400ml 去离子水中, 然后缓慢加入 30% H₂O₂ 330 μ L, 搅拌均匀后, 加水至 500ml, 2 ~ 8°C 下保存。
- [0228] HRP 标记的抗人 IgG 抗体底物 B 配制: 称取四甲基联苯氨 (tetramethyl benzidine, TMB) 0.1g 于 100ml 去离子水中, 加入二甲基亚砜 (DMSO) 2.5ml, 在搅拌的同时, 缓慢加入 0.5ml 6M HCl, 直至完全溶解, 最后加水至 500ml, 2 ~ 8°C 下保存。
- [0229] HRP 标记的抗人 IgG 抗体底物反应终止液的配制: 分别量取 55ml 98% H₂SO₄ 和去离子水 445ml, 然后将浓硫酸缓慢加入到去离子水中, 混匀, 2 ~ 8°C 下保存。
- [0230] 酶标仪测定波长设定在 450nm, 30 分钟内测定各孔 OD₄₅₀ 值。
- [0231] 将实施例 1-3 中合成的三种未经标记生物素的环形多肽以摩尔比为 1 : 1 : 1 与类风湿关节炎患者血清进行实验。

多肽 I、II 和 III，摩尔比为 1 : 1 : 1

[0232]	真阳性	109
	假阴性	35
	合计	390

[0233] 多肽组合物灵敏度 = 真阳性 / (真阳性 + 假阴性) = 109/144 = 75.7%

[0234] 将实施例 1-3 中合成的三种环形多肽以摩尔比为 1 : 1 : 1 与非类风湿关节炎患者血清进行实验。

多肽 I、II 和 III，摩尔比为 1 : 1 : 1

[0235]	假阳性	22
	真阴性	224
	合计	390

[0236] 多肽组合物专一性 = 真阴性 / (真阴性 + 假阳性) = 224/246 = 91.1%

[0237] 实施例 12 生物素标记多肽组合物用于类风湿关节炎抗体的体外检测

[0238] 加有 0.05% (v/v) Tween-20 的 pH7.4 磷酸缓冲盐溶液 (PBST) 稀释链霉亲和素, 使其浓度为 5 μg/ml。然后加入到酶标板各孔中, 4℃ 过夜, 取出酶标板, 去除包被液, 用 pH7.4 的 PBST 溶液洗 2 次, 然后加入 PBST 稀释的生物素标记的多肽, 室温孵育 1 小时 (在脱色摇床上混匀), 洗板, 备用。

[0239] 将稀释后的待检血清 / 血浆和对照物加入反应板孔中, 如果被检血清 / 血浆中存在抗 CCP 抗体, 经温育后, 则血清 / 血浆中特异性抗体与反应板孔中的 CCP 抗原多肽结合, 形成固相抗原 - 抗体复合物, 洗去未结合的血清 / 血浆中其它成分, 加入酶标记的抗人 IgG 抗体, 温育, 固相 CCP 抗原 (多肽) 结合的抗 CCP 抗体再与酶标记的抗人 IgG 抗体结合, 洗去未结合的酶标记抗体成分, 加入酶底物, 并被催化成为有色产物, 最后加入终止液终止反应。根据试剂盒内的对照物, 可对抗 CCP 抗体进行定量或定性测定。

[0240] 后续操作及所用试剂与实施例 11 记载相一致。

[0241] 将使用实施例 9 和 10 中公开的方法合成的三种环形生物素 - 多肽 I、II 和 III 以摩尔比为 1 : 1 : 1 与类风湿关节炎患者血清进行实验。

生物素 - 多肽组合物

[0242]	真阳性	105
	假阴性	24
	合计	390

[0243] 生物素多肽组合物灵敏度 = 真阳性 / (真阳性 + 假阴性) = 105/129 = 81.4%

[0244] 将使用实施例 9 和 10 中公开的方法合成的三种环形生物素 - 多肽 I、II 和 III 以摩

尔比为 1 : 1 : 1 与非类风湿关节炎患者血清进行实验。

生物素-多肽组合物

[0245]	真阴性	240
	假阳性	21
	合计	390

[0246] 生物素多肽组合物专一性 = 真阴性 / (真阴性 + 假阳性) = 240/261 = 92.0%

[0247] 序列表

[0248] <110> 上海荣盛生物药业有限公司

[0249] <120> 用于类风湿关节炎自身免疫抗体体外检测的多肽组合物

[0250] <130>09111143

[0251] <160>3

[0252] <170>PatentIn version 3.3

[0253]

[0254] <210>SEQ ID No 1

[0255] <211>17

[0256] <212>PRT

[0257] <213> 人工合成

[0258] <223>Xaa 为瓜氨酸

[0259] <400>1

[0260]

[0261] His Gln Cys Ala Arg Phe Gln Met Arg His Xaa Arg Leu Ile Arg Cys

[0262] 1 5 10 15

[0263] Gly

[0264]

[0265] <210>SEQ ID No 2

[0266] <211>17

[0267] <212>PRT

[0268] <213> 人工合成

[0269] <223>Xaa 为瓜氨酸

[0270] <400>2

[0271]

[0272] His Gln Cys Ala Arg Phe Gln Met Xaa His Xaa Arg Leu Ile Ala Cys

[0273] 1 5 10 15

[0274] Gly

[0275]

[0276] <210>SEQ ID No 3

- [0277] <211>17
[0278] <212>PRT
[0279] <213>人工合成
[0280] <223>Xaa 为瓜氨酸
[0281] <400>3
[0282]
[0283] His Gln Cys His Gln Phe Arg Phe Xaa Gly Xaa Ser Arg Ala Ala Cys
[0284] 1 5 10 15
[0285] Gly

专利名称(译)	用于类风湿关节炎免疫抗体体外检测的多肽组合物		
公开(公告)号	CN101819201A	公开(公告)日	2010-09-01
申请号	CN200910047942.4	申请日	2009-03-20
[标]申请(专利权)人(译)	上海荣盛生物药业有限公司		
申请(专利权)人(译)	上海荣盛生物药业有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	上海荣盛生物药业有限公司		
[标]发明人	朱绍荣		
发明人	朱绍荣		
IPC分类号	G01N33/53 C07K7/08 C07K19/00		
代理人(译)	包文超		
其他公开文献	CN101819201B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种用于类风湿关节炎自身免疫抗体体外检测的多肽组合物，各种多肽序列中至少有一精氨酸侧链被修饰为电中性或电负性氨基酸。通过序列上两个不相邻的半胱氨酸侧链巯基形成二硫键的方式，产生环状的多肽。这类多肽不仅能与类风湿关节炎自身免疫抗体相结合，同时还能对HLA-DR具有高亲和力。经过实验验证，该类多肽组合物与类风湿关节炎自身免疫抗体相结合的专一性大于90%，对类风湿关节炎自身免疫抗体的检测灵敏度大于75%。与市场上销售的同类产品相比，其灵敏度得到显著提高，更有利于类风湿关节炎自身免疫抗体的体外检测。

多肽 I、II 和 III，摩尔比为 1:1:1

真阳性	109
假阴性	35
合计	390