



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102361979 A

(43) 申请公布日 2012. 02. 22

(21) 申请号 201080014036. 5	<i>A61P 19/02</i> (2006. 01)
(22) 申请日 2010. 01. 19	<i>A61P 29/00</i> (2006. 01)
(30) 优先权数据	<i>A61P 37/02</i> (2006. 01)
2009-012972 2009. 01. 23 JP	<i>C07K 7/08</i> (2006. 01)
(85) PCT申请进入国家阶段日	<i>C07K 19/00</i> (2006. 01)
2011. 09. 23	<i>C12N 1/15</i> (2006. 01)
(86) PCT申请的申请数据	<i>C12N 1/19</i> (2006. 01)
PCT/JP2010/050539 2010. 01. 19	<i>C12N 1/21</i> (2006. 01)
(87) PCT申请的公布数据	<i>C12N 5/10</i> (2006. 01)
W02010/084851 JA 2010. 07. 29	<i>C12P 21/02</i> (2006. 01)
(71) 申请人 株式会社 MMT	<i>G01N 33/53</i> (2006. 01)
地址 日本大阪府	
(72) 发明人 真崎修	
(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司	
72001	
代理人 吴娟 郭文洁	
(51) Int. Cl.	
<i>C12N 15/09</i> (2006. 01)	
<i>A61K 38/00</i> (2006. 01)	
<i>A61P 9/00</i> (2006. 01)	
<i>A61P 13/12</i> (2006. 01)	

权利要求书 3 页 说明书 24 页
序列表 15 页 附图 12 页

(54) 发明名称

具有免疫球蛋白结合能力的肽

(57) 摘要

本发明提供具有免疫球蛋白结合能力的肽、以及与所述肽的融合蛋白、编码它们的核酸、制备方法、用于与免疫球蛋白结合的组合物以及手段、以及由于 C1q 与免疫球蛋白的结合而引起的疾病的治疗或预防用药物组合物等, 该药物组合物包含具有免疫球蛋白结合能力的肽或与所述肽的融合蛋白。

CN 102361979 A

1. 肽,该肽是具有免疫球蛋白结合能力的肽,选自
 - (a) 具有 SEQ ID NO :1 ~ 7 的任意的氨基酸序列的肽 ;
 - (b) 具有下述氨基酸序列的肽,其是在 SEQ ID NO :1 ~ 7 的任意的氨基酸序列中,缺失、置换或附加 1 个或多个氨基酸得到的氨基酸序列 ;以及
 - (c) 具有下述氨基酸序列的肽,其是与 SEQ ID NO :1 ~ 7 的任意的氨基酸序列具有 66.7% 以上同源性的氨基酸序列,其中,肽中的半胱氨酸可被不同种类的氨基酸置换。
2. 权利要求 1 所述的肽,其中,肽中的半胱氨酸被丝氨酸置换。
3. 权利要求 2 所述的肽,该肽具有 SEQ ID NO :28 ~ 32 的任意的氨基酸序列。
4. 肽,该肽是具有免疫球蛋白结合能力的肽,选自
 - (a) 具有 SEQ ID NO :1 ~ 7 的任意的氨基酸序列的肽 ;
 - (b) 具有下述氨基酸序列的肽,其是在 SEQ ID NO :1 ~ 7 的任意的氨基酸序列中,缺失、置换或附加 1 个或多个氨基酸得到的氨基酸序列 ;以及
 - (c) 具有下述氨基酸序列的肽,其是与 SEQ ID NO :1 ~ 7 的任意的氨基酸序列具有 66.7% 以上同源性的氨基酸序列,其中,肽中的氨基酸可被对应的 D- 氨基酸置换。
5. 权利要求 4 所述的肽,其中,所有的氨基酸均可被对应的 D- 氨基酸置换。
6. 权利要求 5 所述的肽,该肽具有 dPro Gly dLeu dTyr dTyr dPhe 所示的氨基酸序列。
7. 肽,该肽是具有免疫球蛋白结合能力的肽,选自
 - (a) 具有 SEQ ID NO :1 ~ 7 的任意的氨基酸序列的肽 ;
 - (b) 具有下述氨基酸序列的肽,其是在 SEQ ID NO :1 ~ 7 的任意的氨基酸序列中,缺失、置换或附加 1 个或多个氨基酸得到的氨基酸序列 ;以及
 - (c) 具有下述氨基酸序列的肽,其是与 SEQ ID NO :1 ~ 7 的任意的氨基酸序列具有 66.7% 以上同源性的氨基酸序列,其中,肽中的半胱氨酸可被不同种类的氨基酸置换,且肽中的氨基酸可被对应的 D- 氨基酸置换。
8. 权利要求 7 所述的肽,其中,肽中的半胱氨酸可被不同种类的氨基酸置换,且所有的氨基酸均可被对应的 D- 氨基酸置换。
9. 核酸,该核酸是编码具有免疫球蛋白结合能力的肽的核酸,选自
 - (a) 编码权利要求 1 所述的肽的核酸 ;
 - (b) 具有 SEQ ID NO :33 ~ 37 的任意的核苷酸序列的核酸 ;
 - (c) 具有下述核苷酸序列的核酸,其是在 SEQ ID NO :33 ~ 37 的任意的核苷酸序列中,缺失、置换或附加 1 个或多个核苷酸得到的核苷酸序列 ;
 - (d) 可与上述 (b) 或 (c) 的核酸或其互补链在严谨的条件下杂交形成的核酸 ;
 - (e) 具有下述核苷酸序列的核酸,其是与 SEQ ID NO :33 ~ 37 的任意的核苷酸序列具有 50% 以上同源性的核苷酸序列。
10. 权利要求 9 所述的核酸,该核酸具有 SEQ ID NO :33 ~ 37 的任意的核苷酸序列。
11. 载体,该载体含有权利要求 9 或 10 所述的核酸。

12. 融合蛋白,其是权利要求 1~3 中任一项所述的肽附加于目标蛋白质的 N 末端和 / 或 C 末端得到的融合蛋白。

13. 融合蛋白,其是权利要求 4~8 中任一项所述的肽附加于目标蛋白质的 N 末端和 / 或 C 末端得到的融合蛋白。

14. 核酸,该核酸编码权利要求 12 所述的融合蛋白。

15. 载体,该载体含有权利要求 14 所述的核酸。

16. 细胞,该细胞含有权利要求 9 或 10 所述的核酸或权利要求 14 所述的核酸、或者权利要求 11 或 15 所述的载体。

17. 具有免疫球蛋白结合能力的肽的制备方法,该方法包含以下步骤:

(a) 使用权利要求 11 所述的载体来转化细胞;

(b) 培养该细胞以生产肽。

18. 具有免疫球蛋白结合能力的肽,该肽可通过权利要求 17 所述的方法得到。

19. 融合蛋白的制备方法,该融合蛋白是具有免疫球蛋白结合能力的肽附加于目标蛋白质的 N 末端和 / 或 C 末端得到的,所述方法包含:

(a) 使用权利要求 15 所述的载体来转化细胞;

(b) 培养该细胞以生产融合蛋白。

20. 权利要求 19 所述的方法,该方法进一步包含由融合蛋白获取目标蛋白质的步骤。

21. 融合蛋白,该融合蛋白可通过权利要求 19 或 20 所述的方法得到。

22. 用于使免疫球蛋白结合的组合物,该组合物包含权利要求 1~8 中任一项所述的肽、或者权利要求 12 或 13 所述的融合蛋白。

23. 权利要求 22 所述的组合物,该组合物用于确定免疫球蛋白的存在或量、或者用于分离免疫球蛋白。

24. 用于使免疫球蛋白结合的手段,该手段是将权利要求 1~8 中任一项所述的肽、或者权利要求 12 或 13 所述的融合蛋白固定。

25. 权利要求 24 所述的手段,该手段用于确定免疫球蛋白的存在或量、或者用于分离免疫球蛋白。

26. 使免疫球蛋白结合的方法,该方法包含:

(a) 将权利要求 1~8 中任一项所述的肽、或者权利要求 12 或 13 所述的融合蛋白添加到试样中;

(b) 检测肽或融合蛋白与免疫球蛋白的结合体。

27. 试剂盒,该试剂盒用于在权利要求 26 所述的方法中使用,包含具有免疫球蛋白结合能力的肽或含所述肽的融合蛋白。

28. 由 C1q 与免疫球蛋白的结合而引起的疾病的治疗或预防用药物组合物,该药物组合物包含权利要求 1~8 中任一项所述的肽、或者权利要求 12 或 13 所述的融合蛋白。

29. 权利要求 28 所述的药物组合物,其中,疾病是类风湿性关节炎。

30. 权利要求 28 所述的药物组合物,其中,疾病是系统性红斑狼疮简写成 SLE、肾小球肾炎、血管炎、关节炎等的免疫复合物病。

31. 标记的权利要求 1~8 中任一项所述的肽、或者权利要求 12 或 13 所述的融合蛋白。

32. 试样中抗体的检测方法,其特征在于:使权利要求 31 所述的标记肽或融合蛋白与试样中的抗体反应,接着检测与抗体结合的该肽或融合蛋白。

具有免疫球蛋白结合能力的肽

技术领域

[0001] 本发明涉及具有免疫球蛋白结合能力的肽、以及与所述肽的融合蛋白、编码它们的核酸、制备方法、用于与免疫球蛋白结合的组合物以及手段。本发明还涉及由于 C1q 与免疫球蛋白的结合而引起的疾病的治疗或预防用药物组合物等,该药物组合物包含具有免疫球蛋白结合能力的肽或与所述肽的融合蛋白。

背景技术

[0002] 已知 C1q 是补体蛋白的一种,在补体活化途径中发挥作用。例如,经典途径的活化是通过 C1q 与免疫球蛋白分子的 Fc 部分结合而引起的。

[0003] 有报道称,C1q 在血液中较多存在的类风湿性关节炎 (RA) 患者将来会出现关节破坏 (非专利文献 1)。可以认为这与上述的 C1q 的活化有关,人们希望开发 C1q 与免疫球蛋白分子结合的抑制剂。

[0004] 有报道称,C1q 与免疫球蛋白分子的结合中,C1qB 亚基 (B 链) 的精氨酸残基可能参与 (非专利文献 2)。但是,该报告是通过计算机模拟来预测的,实际的免疫球蛋白结合部位尚未明确。所述结合部位的详细的氨基酸序列也并未了解。

[0005] 免疫球蛋白的纯化中使用 Protein A 或 Protein G 等的与免疫球蛋白特异性结合的蛋白质。但是,这些蛋白质与免疫球蛋白的结合力强,因此,一旦结合后若要分离,则必须使用强酸性缓冲液等的严苛条件。因此,免疫球蛋白的立体结构容易破坏,无法纯化亲和性高的抗体。

[0006] 现有技术文献

[0007] 非专利文献

[0008] 非专利文献 1 :Ochi T 等人., Arthritis Rheum. 1988Jan ;31(1) :37 ~ 43

[0009] 非专利文献 2 :Gaboriaud C 等人., J Biol Chem. 2003Nov 21 ;278(47) :46974 ~ 82. Epub 2003Sep 5

发明内容

[0010] 发明所要解决的课题

[0011] 本发明的解决课题在于提供 :具有免疫球蛋白结合能力的肽以及与所述肽的融合蛋白、编码它们的核酸、含有所述核酸的载体等。还在于提供 :不破坏抗体的立体结构、与抗原的亲和性高的抗体也可纯化的新型抗体纯化方法、以及为此的组合物和手段。

[0012] 解决课题的手段

[0013] 本发明人等针对上述情况进行了深入的研究,结果,成功地鉴定了参与 C1q 与免疫球蛋白结合的氨基酸序列,完成了本发明。还令人惊讶地发现,所述氨基酸序列并不含有被报道参与了结合的精氨酸残基。并且,含有该氨基酸序列的肽比 Protein A 或 Protein G 弱地与免疫球蛋白结合,因此消除了抗体立体结构的破坏或对纯化对象抗体的限制 (无法纯化与抗原的亲和性高的抗体等) 等的以往的抗体纯化时的问题,可以在温和的条件下进

行抗体纯化。

[0014] 即,本发明涉及以下内容:

[0015] (1) 肽,该肽是具有免疫球蛋白结合能力的肽,选自

[0016] (a) 具有 SEQ ID NO:1 ~ 7 的任意的氨基酸序列的肽;

[0017] (b) 具有下述氨基酸序列的肽,其是在 SEQ ID NO:1 ~ 7 的任意的氨基酸序列中,缺失、置换或附加 1 个或多个氨基酸得到的氨基酸序列;以及

[0018] (c) 具有下述氨基酸序列的肽,其是与 SEQ ID NO:1 ~ 7 的任意的氨基酸序列具有 66.7% 以上同源性的氨基酸序列,

[0019] 其中,肽中的半胱氨酸可被不同种类的氨基酸置换。

[0020] (2) (1) 所述的肽,其中,肽中的半胱氨酸被丝氨酸置换。

[0021] (3) (2) 所述的肽,该肽具有 SEQ ID NO:28 ~ 32 的任意的氨基酸序列。

[0022] (4) 肽,该肽是具有免疫球蛋白结合能力的肽,选自

[0023] (a) 具有 SEQ ID NO:1 ~ 7 的任意的氨基酸序列的肽;

[0024] (b) 具有下述氨基酸序列的肽,其是在 SEQ ID NO:1 ~ 7 的任意的氨基酸序列中,缺失、置换或附加 1 个或多个氨基酸得到的氨基酸序列;以及

[0025] (c) 具有下述氨基酸序列的肽,其是与 SEQ ID NO:1 ~ 7 的任意的氨基酸序列具有 66.7% 以上同源性的氨基酸序列,

[0026] 其中,肽中的氨基酸可被对应的 D-氨基酸置换。

[0027] (5) (4) 所述的肽,其中,所有的氨基酸均可被对应的 D-氨基酸置换。

[0028] (6) (5) 所述的肽,该肽具有 dPro Gly dLeu dTyr dTyr dPhe 所示的氨基酸序列。

[0029] (7) 肽,该肽是具有免疫球蛋白结合能力的肽,选自

[0030] (a) 具有 SEQ ID NO:1 ~ 7 的任意的氨基酸序列的肽;

[0031] (b) 具有下述氨基酸序列的肽,其是在 SEQ ID NO:1 ~ 7 的任意的氨基酸序列中,缺失、置换或附加 1 个或多个氨基酸得到的氨基酸序列;以及

[0032] (c) 具有下述氨基酸序列的肽,其是与 SEQ ID NO:1 ~ 7 的任意的氨基酸序列具有 66.7% 以上同源性的氨基酸序列,

[0033] 其中,肽中的半胱氨酸可被不同种类的氨基酸置换,且肽中的氨基酸可被对应的 D-氨基酸置换。

[0034] (8) (7) 所述的肽,其中,肽中的半胱氨酸可被不同种类的氨基酸置换,且所有的氨基酸可被对应的 D-氨基酸置换。

[0035] (9) 核酸,该核酸是编码具有免疫球蛋白结合能力的肽的核酸,选自

[0036] (a) 编码 (1) 所述的肽的核酸;

[0037] (b) 具有 SEQ ID NO:33 ~ 37 的任意的核苷酸序列的核酸;

[0038] (c) 具有下述核苷酸序列的核酸,其是在 SEQ ID NO:33 ~ 37 的任意的核苷酸序列中,缺失、置换或附加 1 个或多个核苷酸得到的核苷酸序列;

[0039] (d) 可与上述 (b) 或 (c) 的核酸或其互补链在严谨的条件下杂交形成的核酸;

[0040] (e) 具有下述核苷酸序列的核酸,其是与 SEQ ID NO:33 ~ 37 的任意的核苷酸序列具有 50% 以上同源性的核苷酸序列。

[0041] (10) (9) 所述的核酸,该核酸具有 SEQ ID NO:33 ~ 37 的任意的核苷酸序列。

- [0042] (11) 载体,该载体含有 (9) 或 (10) 所述的核酸。
- [0043] (12) 融合蛋白,其是 (1) ~ (3) 中任一项所述的肽附加于目标蛋白质的 N 末端和 / 或 C 末端得到的融合蛋白。
- [0044] (13) 融合蛋白,其是 (4) ~ (8) 中任一项所述的肽附加于目标蛋白质的 N 末端和 / 或 C 末端得到的融合蛋白。
- [0045] (14) 核酸,该核酸编码 (12) 所述的融合蛋白。
- [0046] (15) 载体,该载体含有 (14) 所述的核酸。
- [0047] (16) 细胞,该细胞含有 (9) 或 (10) 所述的核酸或 (14) 所述的核酸、或者 (11) 或 (15) 所述的载体。
- [0048] (17) 具有免疫球蛋白结合能力的肽的制备方法,该方法包含以下步骤:
- [0049] (a) 使用 (11) 所述的载体来转化细胞;
- [0050] (b) 培养该细胞以生产肽。
- [0051] (18) 具有免疫球蛋白结合能力的肽,该肽可通过 (17) 所述的方法得到。
- [0052] (19) 融合蛋白的制备方法,该融合蛋白是具有免疫球蛋白结合能力的肽附加于目标蛋白质的 N 末端和 / 或 C 末端得到的,所述方法包含:
- [0053] (a) 使用 (15) 所述的载体来转化细胞;
- [0054] (b) 培养该细胞以生产融合蛋白。
- [0055] (20) (19) 所述的方法,该方法进一步包含由融合蛋白获取目标蛋白质的步骤。
- [0056] (21) 融合蛋白,该融合蛋白可通过 (19) 或 (20) 所述的方法得到。
- [0057] (22) 用于使免疫球蛋白结合的组合物,该组合物包含 (1) ~ (8) 中任一项所述的肽、或者 (12) 或 (13) 所述的融合蛋白。
- [0058] (23) (22) 所述的组合物,该组合物用于确定免疫球蛋白的存在或量、或者用于分离免疫球蛋白。
- [0059] (24) 用于使免疫球蛋白结合的手段,该手段是将 (1) ~ (8) 中任一项所述的肽、或者 (12) 或 (13) 所述的融合蛋白固定。
- [0060] (25) (24) 所述的手段,该手段用于确定免疫球蛋白的存在或量、或者用于分离免疫球蛋白。
- [0061] (26) 使免疫球蛋白结合的方法,该方法包含:
- [0062] (a) 将 (1) ~ (8) 中任一项所述的肽、或者 (12) 或 (13) 所述的融合蛋白添加到试样中,
- [0063] (b) 检测肽或融合蛋白与免疫球蛋白的结合体。
- [0064] (27) 试剂盒,该试剂盒用于在 (26) 所述的方法中使用,包含具有免疫球蛋白结合能力的肽或含有所述肽的融合蛋白。
- [0065] (28) 由 C1q 与免疫球蛋白的结合而引起的疾病的治疗或预防用药物组合物,该药物组合物包含 (1) ~ (8) 中任一项所述的肽、或者 (12) 或 (13) 所述的融合蛋白。
- [0066] (29) (28) 所述的药物组合物,其中,疾病是类风湿性关节炎。
- [0067] (30) (28) 所述的药物组合物,其中,疾病是系统性红斑狼疮简称为 SLE、肾小球肾炎、血管炎、关节炎等的免疫复合物病。
- [0068] (31) 标记的 (1) ~ (8) 中任一项所述的肽、或者 (12) 或 (13) 所述的融合蛋白。

[0069] (32) 试样中抗体的检测方法,其特征在于:使(31)所述的标记肽或融合蛋白与试样中的抗体反应,接着检测与抗体结合的该肽或融合蛋白。

[0070] 发明效果

[0071] 本发明提供:具有免疫球蛋白结合能力的肽以及与所述肽的融合蛋白、编码它们的核酸、制备方法、用于使免疫球蛋白结合的组合物和手段、以及由于 C1q 与免疫球蛋白的结合而引起的疾病的治疗或预防用药物组合物等,该药物组合物包含具有免疫球蛋白结合能力的肽或与所述肽的融合蛋白。

附图说明

[0072] 图 1 表示具有 6 个氨基酸的肽 R1、具有 9 个氨基酸的肽 R2、具有 15 个氨基酸的肽 R3 ~ R6 抑制 C1q 与免疫球蛋白的结合。图中、NC 是将不含有肽的 DMSO 添加到不含有碱性磷酸酶 (ALP) 标记的人免疫球蛋白 (IgG) 的反应液所得的样品的结果,PC 是将不含有肽的 DMSO 添加到含有碱性磷酸酶 (ALP) 标记的人免疫球蛋白 (IgG) 的反应液所得的样品的结果。

[0073] 图 2 表示具有 6 个氨基酸的变异肽 R7 ~ R9、具有 9 个氨基酸的变异肽 10、具有 15 个氨基酸的变异肽 R11 抑制 C1q 与免疫球蛋白的结合。图中,NC 是将不含有肽的 DMSO 添加到不含有碱性磷酸酶 (ALP) 标记的人免疫球蛋白 (IgG) 的反应液所得的样品的结果,PC 是将不含有肽的 DMSO 添加到含有碱性磷酸酶 (ALP) 标记的人免疫球蛋白 (IgG) 的反应液所得的样品的结果。

[0074] 图 3 表示变异肽 R12 ~ 18 抑制 C1q 与免疫球蛋白的结合。图中,NC 是将不含有肽的 DMSO 添加到不含有碱性磷酸酶 (ALP) 标记的人免疫球蛋白 (IgG) 的反应液所得的样品的结果,PC 是将不含有肽 DMSO 添加到含有碱性磷酸酶 (ALP) 标记的人免疫球蛋白 (IgG) 的反应液所得的样品的结果。

[0075] 图 4 表示变异肽 R19 ~ 22 抑制 C1q 与免疫球蛋白的结合。图中,NC 是将不含有肽的 DMSO 添加到不含有碱性磷酸酶 (ALP) 标记的人免疫球蛋白 (IgG) 的反应液所得的样品的结果,PC 是将不含有肽的 DMSO 添加到含有碱性磷酸酶 (ALP) 标记的人免疫球蛋白 (IgG) 的反应液所得的样品的结果。

[0076] 图 5 表示通过腹腔内给予 10mg/kg 的肽 R5(1 次 /1 天给予或 2 次 /1 天给予),在诱发关节炎的小鼠中,关节炎得到抑制。作为对照,给出 1 次 /1 天给予不含有肽的 0.5% 甲基纤维素溶液的小鼠的结果、以及 1 次 /1 天给予 0.1mg/kg 甲氨蝶呤溶液的小鼠的结果。

[0077] 图 6 表示通过腹腔内给予 10mg/kg 的肽 R1,在诱发关节炎的小鼠中,关节炎得到抑制。作为对照,给出同样地给予不含有肽的 0.5% 甲基纤维素溶液的小鼠的结果。

[0078] 图 7 表示通过腹腔内给予 10mg/kg 的肽 R2,在诱发关节炎的小鼠中,关节炎得到抑制。作为对照,给出同样地给予不含有肽的 0.5% 甲基纤维素溶液的小鼠的结果。

[0079] 图 8 表示通过腹腔内给予 10mg/kg 的肽 R5,在诱发关节炎的小鼠,关节炎得到抑制。作为对照,给出同样地给予不含有肽的 0.5% 甲基纤维素溶液的小鼠的结果。

[0080] 图 9 表示腹腔内给予 10mg/kg 的肽 R2 或 R13、或者静脉内给予 1mg/kg 的 R1 或 10mg/kg 的 R17 的、诱发关节炎的小鼠中临床评分的变化。作为对照,给出同样地给予不含有肽的生理盐水的小鼠的结果。

[0081] 图 10 表示腹腔内给予 10mg/kg 的肽 R2 或 R13、或者静脉内给予 1mg/kg 的 R1 或 10mg/kg 的 R17 的、诱发关节炎的小鼠中后肢容积的变化。作为对照,给出腹腔内给予不含有肽的生理盐水或 0.1mg/kg 甲氨蝶呤的小鼠的结果。

[0082] 图 11 表示腹腔内给予 10mg/kg 或 100mg/kg 的肽 R13 的、诱发关节炎的小鼠中临床评分变化。作为对照,给出腹腔内给予不含有肽的生理盐水或 0.1mg/kg 甲氨蝶呤的小鼠的结果。

[0083] 图 12 表示腹腔内给予 10mg/kg 或 100mg/kg 的肽 R19 的、诱发关节炎的小鼠中临床评分的变化。作为对照,给出腹腔内给予不含有肽的生理盐水或 0.1mg/kg 甲氨蝶呤的小鼠的结果。

[0084] 图 13 表示腹腔内给予 10mg/kg 或 100mg/kg 的肽 R21 的、诱发关节炎的小鼠中临床评分的变化。作为对照,给出腹腔内给予不含有肽的生理盐水或 0.1mg/kg 甲氨蝶呤的小鼠的结果。

[0085] 图 14 表示通过腹腔内给予 10mg/kg 或 100mg/kg 的肽 R1、R2 或 R5,诱发 III 型变态(阿图斯)反应的大鼠中,SLE、肾小球肾炎、血管炎、关节炎等的免疫复合物病得到抑制。作为对照,给出同样地给予不含有肽的生理盐水的大鼠的结果。

[0086] 图 15 表示通过尾静脉内给予 10mg/kg 的肽 R1 或 R2,在诱发 III 型变态(阿图斯)反应的大鼠中,SLE、肾小球肾炎、血管炎、关节炎等的免疫复合物病得到抑制。作为对照,给出同样地给予不含有肽的生理盐水的大鼠的结果。

[0087] 图 16 表示通过腹腔内给予 10mg/kg 或 100mg/kg 的肽 R13 或 R19,在诱发 III 型变态(阿图斯)反应的大鼠中,SLE、肾小球肾炎、血管炎、关节炎等的免疫复合物病得到抑制。作为阴性对照,给出同样地给予不含有肽的生理盐水的大鼠的结果,以及作为阳性对照,给出同样地给予 50mg/kg 氢化可的松的大鼠的结果。

[0088] 图 17 表示通过尾静脉内给予 10mg/kg 的肽 R13 或 R19,在诱发 III 型变态(阿图斯)反应的大鼠中,SLE、肾小球肾炎、血管炎、关节炎等的免疫复合物病得到抑制。作为阴性对照,给出同样地给予不含有肽的生理盐水的大鼠的结果。

[0089] 图 18 表示通过以 100mg/kg 或 10mg/kg 给予 R13 肽,可见关节炎抑制效果。作为阴性对照,给出同样地给予生理盐水或错义肽(scramble peptide)的组(图表中,以 CIA 或错义表示)的结果,作为阳性对照,给出同样地给予甲氨蝶呤的组(图表中,以 MTX(0.15mg/kg)表示)的结果。

[0090] 图 19 是表示通过本发明的肽来检测抗体的图。各泳道中使用的 BSA 的量如下所示:泳道 1BSA 0.1 μ g,泳道 2BSA 0.5 μ g,泳道 3BSA1.0 μ g,泳道 4BSA 2.0 μ g

[0091] 图 20 是表示通过使用本发明的肽的亲亲和纯化用柱来纯化兔抗体的图。作为对照,给出使用 Protein A 进行纯化的结果。值表示各组分中所含的 IgG 蛋白质量(mg/ml)。图中,PT 表示未吸附组分,W1~5 表示洗涤组分、E1~5 表示洗脱组分。

[0092] 图 21 是表示通过使用本发明的肽的亲亲和纯化用柱来纯化人抗体的图。值表示各组分中所含的 IgG 蛋白质量(mg/ml)。图中,PT 表示未吸附组分,W1~5 表示洗涤组分、E1~5 表示洗脱组分。

具体实施方式

[0093] 在一个方案 1 中,本发明涉及一种肽,该肽是具有免疫球蛋白结合能力的肽,选自

[0094] (a) 具有 SEQ ID NO :1 ~ 7 的任意的氨基酸序列的肽 ;

[0095] (b) 具有下述氨基酸序列的肽,其是在 SEQ ID NO :1 ~ 7 的任意的氨基酸序列中,缺失、置换或附加 1 个或多个氨基酸得到的氨基酸序列 ;以及

[0096] (c) 具有下述氨基酸序列的肽,其是与 SEQ ID NO :1 ~ 7 的任意的氨基酸序列具有 66.7% 以上同源性的氨基酸序列,

[0097] 其中,肽中的半胱氨酸可被不同种类的氨基酸置换,且 / 或肽中的氨基酸可被对应的 D- 氨基酸置换。本发明的肽与 Protein A 和 Protein G 比较,与免疫球蛋白的结合能力弱,因此,例如,可以温和的条件下将与本发明的肽结合的免疫球蛋白解离等。另外,与本发明的肽结合的免疫球蛋白自身的变性也降低。结合能力可通过该技术领域中已知的方法检测。例如,可以在免疫球蛋白存在下将肽进行培育,直接检测有否结合。

[0098] 本发明的肽中,肽中的半胱氨酸可被不同种类的氨基酸置换。上述不同种类的氨基酸除了甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、丝氨酸、苏氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、赖氨酸、精氨酸、半胱氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸、组氨酸和脯氨酸等的氨基酸的 L 构型和 D 构型之外,还可举出 : β - 丙氨酸、 γ - 氨基丁酸 (GABA)、5- 氨基乙酰丙酸、5- 氨基戊酸、高半胱氨酸、鸟氨酸、5- 羟基色氨酸、3,4- 二羟基苯丙氨酸 (多巴)、三碘甲腺原氨酸、甲状腺素、高赖氨酸 (homolysine)、正亮氨酸、肌酸、锁链赖氨酸、正缬氨酸和碘酪氨酸等的非天然氨基酸的 L 构型和 D 构型。优选本申请发明的肽中,肽中的半胱氨酸被置换为丝氨酸。本发明的肽中,肽中的氨基酸可被对应的 D- 氨基酸置换。具体来说,在 SEQ ID NO :1 ~ 7 的任意的氨基酸序列中,可将 1 个以上、优选 1 个或多个、例如 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 个或 15 个氨基酸用对应的 D- 氨基酸置换。对应的 D- 氨基酸除了丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、丝氨酸、苏氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、赖氨酸、精氨酸、半胱氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸、组氨酸和脯氨酸等氨基酸的 D 构型之外,也可以是上述非天然氨基酸的 D 构型。优选本申请发明的肽中,所有的氨基酸被对应的 D- 氨基酸置换。或者,本申请发明的肽中,肽中的半胱氨酸可被上述不同种类的氨基酸置换,且肽中的氨基酸被上述的对应的 D- 氨基酸置换。优选本申请发明的肽中,肽中的半胱氨酸被置换为丝氨酸,且所有的氨基酸被对应的 D- 氨基酸置换。即使是具有任意一种氨基酸序列的情形,本发明的肽也都是具有免疫球蛋白结合能力的肽。并且,本发明的肽是将来自天然蛋白质的氨基酸序列进行修饰,因此难以进行蛋白质分解,在所给予的对象体内具有高稳定性和长的半衰期。

[0099] 本发明的肽是具有免疫球蛋白结合能力的肽。所述肽可以是具有 SEQ ID NO : 28 ~ 32 的任意的氨基酸序列或 dPro Gly dLeu dTyr dTyrdPhe 所示的氨基酸序列的肽 ;还可以是具有下述氨基酸序列的肽 (变异肽) :其是在上述氨基酸序列的内部、N 末端和 / 或 C 末端,缺失、置换或附加 1 个以上、优选 1 个或多个、例如 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13 或 14 个氨基酸得到的氨基酸序列 ;以及具有下述氨基酸序列的肽 :其是与上述氨基酸序列具有例如 26.6% 以上或 44.4% 以上、优选至少为 50% 以上、更优选例如 60、66.7、70、75、80、83.3、85、90、93% 以上同源性的氨基酸序列。在本说明书中,“dL (dLeu)”、“dP (dPro)”、“dA (dAla)”、“dY (dTyr)” 和 “dF (dPhe)”、“dS (dSer)”、“dK (dLys)”、“dV (dVal)”、“dT (dThr)”、“dH (dHis)” 分别表示亮氨酸、脯氨酸、丙氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、丝氨酸、赖

氨酸、缬氨酸、苏氨酸、组氨酸的 D 构型。并且,关于氨基酸序列的同源性,为短链肽时,可以单纯地对序列进行比较来计算。或者,可使用 FASTA、BLAST、DNASIS(Hitachi Software Engineering(株)制造)、GENETYX((株)Genetyx 制造)进行测定。并且,这些氨基酸的任意一种均可以进行适当修饰。即使是具有任意一种氨基酸序列的情形,本发明的肽也都是具有免疫球蛋白结合能力的肽。

[0100] 本发明的肽只要具有上述氨基酸序列即可,可以是任意的肽。例如,本发明的肽可以由 SEQ ID NO:28~32 的任意的氨基酸序列或 dPro Gly dLeu dTyr dTyr dPhe 所示的氨基酸序列组成的肽本身。或者,还可以是含有上述氨基酸序列或其同源序列作为核心序列,且在所述氨基酸序列的 N 末端和 / 或 C 末端结合有肽或氨基酸、它们的类似物、聚乙二醇、糖、多糖、核苷酸等各种物质的肽。还可以在 N/C 末端经由氨基酸或肽、或者使用可利用的官能基团在氨基酸序列的内部结合荧光标记、生物素、链霉抗生物素蛋白、地高辛 (DIG)、磁珠、胶乳珠、胶体金等的物质。例如,肽结合时,所述肽可以是由 1 个~50 个、例如 1~20 个、1~15 个、1~9 个氨基酸组成的肽。所述肽可以是发挥组氨酸标记物、GST 标记物、S 标记物、Myc 标记物、HA 标记物、或 E 标记物功能等的、具有功能的肽。

[0101] 本发明的肽可通过本领域技术人员已知的各种方法制备和取得。例如,可根据编码本发明的肽的核苷酸序列通过基因工程来制备,或者可根据肽固相合成法等进行化学合成,或者还可以将它们组合来制备和取得。如上所述,本发明的肽具有免疫球蛋白结合能力,因此,使用所述肽,使其与免疫球蛋白结合,可以确定免疫球蛋白的存在或量,可以分离免疫球蛋白等。

[0102] 在另一个方案中,本发明涉及一种核酸,该核酸是编码具有免疫球蛋白结合能力的肽的核酸,选自

[0103] (a) 编码具有 SEQ ID NO:28~32 的任意的氨基酸序列或其同源序列的肽的核酸;

[0104] (b) 具有 SEQ ID NO:33~37 的任意的核苷酸序列的核酸;

[0105] (c) 具有下述核苷酸序列的核酸,其是在 SEQ ID NO:33~37 的任意的核苷酸序列中,缺失、置换或附加 1 个或多个核苷酸得到的核苷酸序列;

[0106] (d) 可在严谨的条件下与上述 (b) 或 (c) 的核酸或其互补链杂交形成的核酸;

[0107] (e) 具有下述核苷酸序列的核酸,其是与 SEQ ID NO:33~37 的任意的核苷酸序列具有 50% 以上同源性的核苷酸序列。

[0108] 在本说明书中,核酸是指单链或双链的 DNA 或 RNA。本发明的核酸可通过本领域技术人员已知的各种方法来制备和取得。本发明中,SEQ ID NO:33~37 的核苷酸序列分别编码 SEQ ID NO:28~32 的氨基酸序列。

[0109] 具体来说,本发明的核酸为以下 (1)~(7) 所述的核酸等:(1) 编码具有 SEQ ID NO:28~32 的任意的氨基酸序列的肽的核酸;(2) 编码具有下述氨基酸序列的肽的核酸,其是在 SEQ ID NO:28~32 的任意的氨基酸序列中,缺失、置换或附加 1 个以上、优选 1 个或多个、例如 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13 或 14 个左右的氨基酸得到的氨基酸序列;(3) 编码具有下述氨基酸序列的肽的核酸,其是与 SEQ ID NO:28~32 的任意的氨基酸序列具有例如 26.6% 以上或 44.4% 以上、优选至少 50% 以上、更优选例如 60、66.7、70、75、80、83.3、85、90 或 93% 以上同源性的氨基酸序列;(4) 具有 SEQ ID NO:33~37 的任意的核苷

酸序列的核酸；(5) 具有下述核苷酸序列的核酸，其是在 SEQ ID NO :33 ~ 37 的任意的核苷酸序列中，缺失、置换或附加 1 个以上、优选 1 个或多个、例如 2、3、4、5、6、7、8 或 9 个左右的核苷酸得到的核苷酸序列；(6) 可在严谨的条件下与上述 (3) 或 (4) 的任意的核酸或其互补链杂交形成的核酸；以及 (7) 具有下述核苷酸序列的核酸，其是与 SEQ ID NO :33 ~ 37 的任意的核苷酸序列至少具有 50% 以上、优选例如 60、70、75、80、90、93、95、或 97% 以上同源性的核苷酸序列。并且，这些核苷酸的任意一种均可以进行适当修饰。即使是具有任意一种氨基酸序列的情形，本发明的核酸也都是编码具有免疫球蛋白结合能力的肽的核酸。

[0110] 作为上述严谨的条件，例如可举出：J. Sambrook 等人.，“Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition”，1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press 中记载的条件。例如在含有 6×SSC、5×Denhardt's 溶液、0.5% SDS、100 μg/ml 变性鲑鱼精子 DNA 的溶液中，在 68℃ 下与探针杂交形成后，洗涤条件有下述条件等：自 2×SSC、0.1% SDS 中、室温下变化为在 0.1×SSC、0.5% SDS 中、68℃ 的条件；在 65℃ 下、在含有 2×SSPE (Frederick M. Ausubel 等人.，“Current Protocols in Molecular Biology”，1987, John Wiley & Sons, Hoboken NJ. 中记载) 和 0.1% SDS 的溶液中洗涤 15 分钟、2 次，在含有 0.5×SSPE 和 0.1% SDS 的溶液中进一步洗涤 15 分钟、2 次，接着在含有 0.1×SSPE 和 0.1% SDS 的溶液中洗涤 15 分钟、2 次的条件；或者在 65℃ 下、在含有 2×SSPE、0.1% SDS 和甲酰胺 (5 ~ 50%) 的溶液中洗涤 15 分钟、2 次，在含有 0.5×SSPE、0.1% SDS 和甲酰胺 (5 ~ 50%) 的溶液中进一步洗涤 15 分钟、2 次，接着在含有 0.1×SSPE、0.1% SDS 和甲酰胺 (5 ~ 50%) 的溶液中洗涤 15 分钟、2 次的条件。

[0111] 上述核苷酸序列的同源性例如可使用 FASTA、BLAST、DNASIS (Hitachi Software Engineering (株) 制造)、GENETYX ((株) Genetyx 制造) 来测定。

[0112] 本发明的核酸只要是具有上述核苷酸序列的核酸即可，可以是任意的核酸。例如，可以由 SEQ ID NO :33 ~ 37 的任意的核苷酸序列组成的核酸本身，还可以是含有上述核苷酸序列作为核心序列，且所述序列的 5' 末端和 / 或 3' 末端结合有核苷酸、多核苷酸、或它们的类似物等各种物质的核酸。例如多核苷酸结合时，所述多核苷酸可以由 1 ~ 150 个、例如 1 ~ 60 个、1 ~ 45 个、1 ~ 18 个核苷酸组成的多核苷酸。

[0113] 在又一方案中，本发明涉及含有上述核酸的载体。本发明的载体只要含有上述核酸即可，可以使任意的载体。载体的种类、上述核酸的核苷酸序列以外的序列等可根据导入载体的宿主的种类、目的等各种条件适当选择。本发明的载体例如可通过在 SEQ ID NO :33 ~ 37 的任一个所示的核苷酸序列的 5' 末端或 3' 末端读框内插入编码目标蛋白质的核苷酸序列，可作为具有免疫球蛋白结合能力的肽附加在目标蛋白质的 N 末端或 C 末端得到的融合蛋白的表达用载体使用。为了容易地从融合蛋白上分离目标蛋白质，本发明的载体可以在上述核苷酸序列和目标蛋白质的核苷酸序列插入部之间含有例如通过 HRV 3C、凝血酶、因子 Xa、胰激酶等的蛋白酶识别的序列。也可以将本发明的载体导入细胞，以生产蛋白质，由此得到上述本发明的具有免疫球蛋白结合能力的肽。

[0114] 在另一方案中，本发明涉及本发明的具有免疫球蛋白结合能力的肽附加在目标蛋白质的 N 末端和 / 或 C 末端得到的融合蛋白。本发明的融合蛋白可通过本领域技术人员已知的各种方法来制备和取得。本发明的融合蛋白含有具有免疫球蛋白结合能力的肽，因此，可以使用所述肽作为标记物序列，进行目标蛋白质的分离和 / 或纯化等。另外，如上所述，

本发明的肽与免疫球蛋白的结合能力低,因此,本发明的融合蛋白例如固定于纯化用柱中时,与Protein A或Protein G比较,可在温和的条件下进行免疫球蛋白的纯化以及将所述柱反复使用(可抑制劣化),例如,作为免疫球蛋白的检测用探针时,具有再探测容易等的优点。

[0115] 本发明的融合蛋白中所含的目标蛋白质可以使任意的蛋白质。本发明的融合蛋白含有例如碱性磷酸酶(ALP)、过氧化物酶(HRP)、萤光素酶和绿色荧光蛋白(GFP)等的荧光蛋白质、 β -半乳糖苷酶、谷胱甘肽S转移酶、麦芽糖结合蛋白质等的酶作为目标蛋白质时,可以容易地检测本发明的融合蛋白中所含的具有免疫球蛋白结合能力的肽与免疫球蛋白的结合等。本发明的融合蛋白还可以含有例如组氨酸标记物、GST标记物、S标记物、Myc标记物、HA标记物或E标记物等的标记物序列,核定位信号、硅结合蛋白质或Protein A等。

[0116] 本发明的融合蛋白可以在本发明的肽与目标蛋白质之间含有蛋白酶识别肽。通过含有所述肽,可以容易地从融合蛋白中分离目标蛋白质。

[0117] 因此,在又一方案中,本发明涉及编码上述融合蛋白的核酸。

[0118] 本发明进一步涉及含有编码上述融合蛋白的核酸的载体。可通过将所述载体导入细胞,生产蛋白质,来得到本发明的融合蛋白。

[0119] 在一个方案中,本发明涉及编码上述具有免疫球蛋白结合能力的肽的核酸、编码上述融合蛋白的核酸、或含有载体的细胞,该载体含有上述这些核酸。本发明的细胞例如可通过使用上述核酸或载体来转化大肠杆菌、酵母、昆虫细胞、动物细胞等宿主细胞来制备。培养本发明的细胞,回收所生产的具有免疫球蛋白结合能力的肽、或含有具有免疫球蛋白结合能力的肽的融合蛋白,由此可以制备本发明的肽或融合蛋白。

[0120] 在又一方案中,本发明涉及具有免疫球蛋白结合能力的肽的制备方法,该方法包含以下步骤:

[0121] (a) 使用含有核酸的载体来转化细胞,其中,该核酸编码具有免疫球蛋白结合能力的肽;

[0122] (b) 培养该细胞以生产肽。

[0123] 细胞的转化可通过本领域技术人员已知的手段和/或方法进行。

[0124] 因此,本发明涉及可通过上述肽的制备方法得到的、具有免疫球蛋白结合能力的肽。

[0125] 在另一方案中,本发明涉及具有免疫球蛋白结合能力的肽附加于目标蛋白质的N末端和/或C末端得到的融合蛋白的制备方法,该方法包含以下步骤:

[0126] (a) 使用含有核酸的载体来转化细胞,其中,所述核酸编码具有免疫球蛋白结合能力的肽附加于目标蛋白质的N末端或C末端得到的融合蛋白;

[0127] (b) 培养该细胞以生产融合蛋白。

[0128] 本发明的融合蛋白的制备方法可以进一步包含从融合蛋白中获取目的蛋白质的步骤。

[0129] 因此,本发明涉及可通过上述融合蛋白的制备方法得到的、具有免疫球蛋白结合能力的肽附加于目标蛋白质的N末端和/或C末端得到的融合蛋白。

[0130] 在一个方案中,本发明涉及用于使免疫球蛋白结合的组合物,该组合物包含具有免疫球蛋白结合能力的肽或含所述肽的融合蛋白。上述肽或融合蛋白以外的成分可根据使

用本发明的组合物的目的等各种条件适当选择。如上所述,本发明的组合物含有具有免疫球蛋白结合能力的肽,因此,本发明的组合物例如可以是用于确定免疫球蛋白的存在或量的组合物,也可以是用于分离免疫球蛋白的组合物。通过本发明的组合物,可以确定试样中免疫球蛋白的量,也可以从试样中分离免疫球蛋白。

[0131] 在又一方案中,本发明涉及用于使免疫球蛋白结合的手段,该手段是将具有免疫球蛋白结合能力的肽、或含有所述肽的融合蛋白固定。本发明的手段例如是在板、树脂、柱、珠、琼脂糖或 Sepharose 等的含有糖的树脂、硅基板、玻璃(玻片等)、金属(金等)、磷灰石等的担体上固定上述肽或融合蛋白。固定可通过以下方法进行:经由肽、或蛋白质的氨基或羧基的方法,经由氨基酸支链的 SH 基的方法,通过离子性结合的方法,通过疏水性结合的方法等本领域技术人员已知的手段、方法。

[0132] 如上所述,本发明的手段是将具有免疫球蛋白结合能力的肽固定,因此,本发明的手段包含用于确定免疫球蛋白的存在或量的手段、以及用于分离免疫球蛋白的手段。例如也可以以 ELISA 用板、免疫球蛋白纯化用柱、检测用玻璃阵列(glass array)、微流体系统、SPR 用传感芯片、检测用硅基板、抗体药物纯化系统等的使用本发明的手段。

[0133] 在又一方案中,本发明涉及使免疫球蛋白结合的方法,该方法包含:

[0134] (a) 将具有免疫球蛋白结合能力的肽、或含有所述肽的融合蛋白添加到试样中;

[0135] (b) 检测肽或融合蛋白与免疫球蛋白的结合体。

[0136] 试样只要具有含免疫球蛋白的可能性即可,可以是任意的试样。通过检测与免疫球蛋白的结合体的存在和/或量,可以确定试样中是否存在免疫球蛋白,并可进一步确定存在于试样中的免疫球蛋白的量等。本发明的方法中使用的肽或融合蛋白可以进行标记。标记可举出:生物素化、荧光标记、RI 标记、酶标等本领域技术人员已知的各种标记。通过附加所述标记,使得对与肽或融合蛋白的结合体的检测变得容易。本发明的方法可进一步包含从结合体上分离免疫球蛋白的步骤。

[0137] 因此,本发明涉及试剂盒,该试剂盒是用于在使免疫球蛋白结合的方法中使用,包含具有免疫球蛋白结合能力的肽或含所述肽的融合蛋白。本发明的试剂盒中,除了上述肽或融合蛋白之外,例如还可含有标记、检测结合体的手段等。

[0138] 在另一方案中,本发明涉及由 C1q 与免疫球蛋白的结合而引起的疾病的治疗或预防用药物组合物,该药物组合物含有具有免疫球蛋白结合能力的肽、或含所述肽的融合蛋白。由 C1q 与免疫球蛋白的结合而引起的疾病是指由于所述结合而直接或间接地发生的疾病,例如可举出:类风湿性关节炎、关节炎、系统性红斑狼疮(SLE)、血管炎综合征、肾炎等的免疫复合物病,其它的炎症性疾病、感染症、和恶性肿瘤等。本发明的药物组合物是通过所含的具有免疫球蛋白结合能力的肽抑制 C1q 与免疫球蛋白的结合,可以治疗和预防上述疾病。本发明的肽来自原本存在于人体内的 C1q,且为 6~15 个残基,较短,因此,将本发明的肽给予人时发生的副作用少。并且,本发明的肽是将来自天然蛋白质的氨基酸序列进行修饰,因此难以进行蛋白质分解,在所给予的对象体内具有高稳定性和长的半衰期。

[0139] 本发明的药物组合物的给予方法可根据疾病的种类、对象的状态、和/或靶部位等的条件适当选择。该方法可举出:皮内给予、皮下给予、肌肉内给予、静脉内给予、透鼻给予、口服给予等,但并不限于此。本发明的药物组合物中所含的肽的量、药物组合物的剂型、给予频率等可根据疾病的种类、对象的状态、靶部位等的条件适当选择,例如 1 次的肽给予

量可以是 0.01 ~ 100mg/kg、优选 0.1 ~ 10mg/kg,但本发明的肽的给予量并不限于这些。

[0140] 在又一方案中,本发明涉及由 C1q 与免疫球蛋白的结合而引起的疾病的治疗或预防方法,该方法包含将有效量的具有免疫球蛋白结合能力的肽或含所述肽的融合蛋白给予对象。

[0141] 以下给出实施例,具体且详细地说明本发明,但不能理解为实施例限定本发明。

[0142] 实施例 1

[0143] 免疫球蛋白所识别的 C1q 中的氨基酸序列的鉴定

[0144] 材料和方法

[0145] 人 C1q 的亚基 A 链、B 链、C 链的氨基酸序列如 SEQ ID NO :17 ~ 19 所示,核苷酸序列如 SEQ ID NO :20 ~ 22 所示。以各氨基酸序列为基础,以 3 个氨基酸的间隔推移每 15 个氨基酸(残基),以此序列作为合成肽(肽编号依次为 1 ~ 78、97 ~ 117、193 ~ 270 号),在玻璃阵列上合成各亚基的氨基酸序列。各肽的合成在阵列上特定的位置进行,制作肽阵列,该肽阵列含有包罗了 C1q 亚基的全部氨基酸序列的合成肽。阵列的制作委托 JPT 公司进行。

[0146] 将 330 μ l 用 PBS(10mM 磷酸缓冲液,pH7.0,0.1M NaCl) 稀释 1,000 倍的 Cy3 标记山羊抗小鼠免疫球蛋白(IgG)(1mg/ml;Zymed Laboratories 公司制造)涂布在肽阵列上,密封,然后在 4°C 培育 12 小时。然后用甲醇洗涤 1 次,用 Milli-Q 水以 5 分钟 \times 5 次洗涤。离心,将阵列玻片干燥,用荧光扫描仪(Agilent DNA 微阵列扫描仪;Agilent 公司制造)扫描,使用软件(Feature Extraction 软件;Agilent 公司制造),将阵列上各肽样点的荧光强度数值化。检测显示强荧光强度的几个样点。其中,显示比背景水平高的、60,000 以上高的荧光强度的肽样点的氨基酸序列(SEQ ID NO :3 ~ 7)如表 1 所示。在本说明书中,氨基酸由本领域已知的单字母标记记载。

[0147] [表 1]

[0148]

肽编号	氨基酸序列	SEQ ID NO	荧光强度*
149 号	SGKFTCKVPGLYYFT	3	65,300
150 号	FTCKVPGLYYFTYHA	4	65,311
244 号	STGKFTCKVPGLYYF	5	65,311
245 号	KFTCKVPGLYYFVYH	6	65,311
246 号	CKVPGLYYFVYHASH	7	65,313

[0149] *背景的荧光强度为 2.6

[0150] 结果

[0151] 149 号和 150 号的肽是来自 C1qB 亚基(B 链)的序列,244 ~ 246 号的肽是来自 C1qC 亚基(C 链)的序列。由这些序列预测,C1q 与免疫球蛋白结合所必须的序列是以 CKVPGLYYF(SEQ ID NO :2) 的 9 个残基为核心的序列。还确认,如果是含有该核心序列的序

列,即使是数个残基的氨基酸与该 N 末端或 C 末端一侧结合,也不妨碍与免疫球蛋白的结合。149 号和 150 号、244 ~ 246 号的肽的核苷酸序列如 SEQ ID NO :12 ~ 16 所示。

[0152] 实施例 2

[0153] 具有免疫球蛋白结合能力的肽对免疫球蛋白与 C1q 结合的抑制抑制活性的研究 (1)

[0154] 材料和方法

[0155] 以下研究 C1q 与免疫球蛋白 (IgG) 的结合所必须考虑的 CKVPGLYYF (SEQ ID NO : 2) 的 9 个残基的肽是否抑制 C1q 与免疫球蛋白的结合。委托 GL Biochem (Shanghai) 公司制作具有 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列的肽 (R2)、具有比所述肽短的氨基酸序列 PGLYYF (SEQ ID NO :1) 的肽 (R1)、以及具有含 SEQ ID NO :2 所示的氨基酸序列的氨基酸序列 SGKFTCKVPGLYYFT (SEQ ID NO :3) 的肽 (R3)、具有氨基酸序列 FTCKVPGLYYFTYHA (SEQ ID NO :4) 的肽 (R4)、具有氨基酸序列 STGKFTCKVPGLYYF (SEQ ID NO :5) 的肽 (R5)、以及具有氨基酸序列 CKVPGLYYFVYHASH (SEQ ID NO :7) 的肽 (R6)。这些肽如表 2 所示。将各肽溶解于 DMSO,使浓度为 10mg/ml,保存。

[0156] [表 2]

[0157]

合成肽	氨基酸序列	SEQ ID NO
R1	PGLYYF	1
R2	CKVPGLYYF	2
R3	SGKFTCKVPGLYYFT	3
R4	FTCKVPGLYYFTYHA	4
R5	STGKFTCKVPGLYYF	5
R6	CKVPGLYYFVYHASH	7

[0158] 将人 C1q 蛋白 (Carbiochem 公司制造) 溶解于 10mM HEPES、300mM NaCl、40% 甘油 (pH7.2), 制备 200 μ g/ml 人 C1q 蛋白质溶液。以各 2 μ l (400ng) 将人 C1q 蛋白质溶液在 5mm \times 15mm 大小的硝基纤维素膜 (Hybond C, Amersham 公司制造) 上点样, 在室温下风干约 1 小时。将硝基纤维素膜浸渍在 TBS 中, 培育 5 分钟, 使用含有 5% 封闭剂 (Amersham ECL blocking reagent, GE Healthcare 公司制造) 的 TBS (20mM Tris-HCl pH7.5, 150mM NaCl), 在室温下封闭 1 小时。用 TBS 轻轻洗涤, 然后将碱性磷酸酶 (ALP) 标记的人免疫球蛋白 (IgG) (BECKMAN COULTER 公司制造) 用 TBS 稀释 1000 倍, 浸渍在 20 μ l 以各肽的浓度为 500 μ g/ml 混合的溶液中, 在室温下反应 1 小时。用 TTBS 溶液 (TBS 中加入吐温 20, 终浓度为 0.05%) 轻轻洗涤, 然后用同溶液振荡 10 分钟、3 次, 进行洗涤。

[0159] 使用 ALP 标记免疫球蛋白 (IgG) 的检测方法

[0160] 将硝基纤维素膜用 ALP 显色缓冲液 (含 100mM NaCl, 5mM MgCl₂ 的 Tris-HCl, pH9.5) 轻轻洗涤, 然后浸渍在 30 μ l 含有 BCIP/NBT 溶液 (Promega 公司制造) 的 ALP 显色

缓冲液中,在室温下显色 10 分钟。在得到染色图像时,将硝基纤维素膜浸渍在足够量的蒸馏水中,冲洗显色缓冲液。洗涤后,将硝基纤维素膜风干,使用 Multi Gauge (FUJIFILM) 获取染色图像。

[0161] 结果

[0162] 结果如图 1 所示。具有 C1q 与免疫球蛋白 (IgG) 的结合所必须的 9 个氨基酸的肽 R2 以及具有所述肽作为核心序列的肽 (肽 R3 ~ 6) 可抑制结合,不仅如此,具有更短的氨基酸序列的肽 (肽 R1) 也抑制结合,因此可知,免疫球蛋白与 C1q 的结合中,以 PGLYYF (SEQ ID NO :1) 的 6 个残基的氨基酸作为核心的序列是很重要的。还可知,这些肽通过抑制 C1q 与免疫球蛋白的结合,具有治疗或预防由该结合而引起的疾病的可能性。

[0163] 抑制活性的研究 (2)

[0164] 材料和方法

[0165] 除了实施例 2 的抑制活性的研究 (1) 中给出的肽以外,对于其变异肽是否抑制 C1q 与免疫球蛋白的结合进行了检测。委托 GL Biochem (Shanghai) 公司制作表 3 所示的肽。将各肽溶解于 DMSO,使浓度为 10mg/ml,保存。实验按照与实施例 2 的抑制活性的研究 (1) 同样的方法进行,对照也是对肽 R1、R2 和 R5 进行试验。

[0166] [表 3]

[0167]

合成肽	氨基酸序列	SEQ ID NO
R7	PGAYYF	23
R8	PGLAYF	24
R9	PGLYAF	25
R10	CKAPGLYYF	26
R11	STAKFTCKVPGLYYF	27

[0168] 结果

[0169] 结果如图 2 所示。将特定的氨基酸置换为丙氨酸所得的肽充分抑制了 C1q 与免疫球蛋白的结合。因此可知,对于这些变异肽或者含有它们作为核心的肽,通过抑制 C1q 与免疫球蛋白的结合,也具有治疗或预防由该结合而引起的疾病的可能性。

[0170] 抑制活性的研究 (3)

[0171] 材料和方法

[0172] 接续实施例 1 (2),对于又一种变异肽检测是否抑制 C1q 与免疫球蛋白的结合。将表 4 所示的肽委托 GL Biochem (Shanghai) 公司制作。这些肽通过将特定的氨基酸残基置换为对应的 D-氨基酸,或者将氨基酸序列中的半胱氨酸残基置换为丝氨酸残基,可使肽稳定性提高。即,这些肽设计为具有更长的半衰期,在对象体内的治疗或预防效果可长期持续。将各肽溶解于 DMSO,使浓度为 10mg/ml,保存。实验按照与实施例 2 的抑制活性的研究 (1) 同样的方法进行,对照使用了肽 R1、R2 和 R5。

[0173] [表 4]

[0174]

合成肽	氨基酸序列	SEQ ID NO
R12	PGdLYYF	与 1 对应
R13	dPGdLdYdYdF	与 1 对应
R14	SGKFTSKVPGLYYFT	28
R15	STGKFTSKVPGLYYF	29
R16	SKVPGLYYFVYHASH	30
R17	KFTSKVPGLYYFVYH	31
R18	FTSKVPGLYYFTYHA	32

[0175] 结果

[0176] 结果如图 3 所示。表中,NC 是将不含有肽的 DMSO 添加到不含有碱性磷酸酶 (ALP) 标记的人免疫球蛋白 (IgG) 的反应液中所得的样品的结果,PC 是将不含有肽的 DMSO 添加到含有碱性磷酸酶 (ALP) 标记的人免疫球蛋白 (IgG) 的反应液中所得的样品的结果。将特定的氨基酸置换为对应的 D-氨基酸 (R12 和 R13)、以及将丝氨酸残基置换为半胱氨酸残基的肽 (R14 ~ 18) 分别抑制 C1q 与免疫球蛋白的结合。

[0177] 抑制活性的研究 (4)

[0178] 材料和方法

[0179] 对又一种变异肽是否抑制 C1q 与免疫球蛋白的结合进行了检测。将表 5 所示的肽委托 GL Biochem(Shanghai) 公司制作。这些肽通过将氨基酸残基置换为对应的 D-氨基酸,且将氨基酸序列中的半胱氨酸残基置换为丝氨酸残基,可以使肽稳定性提高。即,这些肽设计为具有更长的半衰期,在对象体内的治疗或预防效果可长期持续。将各肽溶解于 DMSO,使浓度为 10mg/ml,保存。实验按照与实施例 2 的抑制活性的研究 (1) 同样的方法进行,对照使用了肽 R1、R5 和 R13。

[0180] [表 5]

[0181]

合成肽	氨基酸序列	SEQ ID NO
R19	dSdKdVdPGdLdYdYdF	与 2 对应
R20	dSGdKdFdTdSdKdVdPGdLdYdYdFdT	与 3 对应
R21	dSdTgdkdFdTdSdKdVdPGdLdYdYdF	与 5 对应
R22	dFdTdSdKdVdPGdLdYdYdFdTdYdHdA	与 4 对应

[0182] 结果

[0183] 结果如图 4 所示。表中,NC 是将不含有肽的 DMSO 添加到不含有碱性磷酸酶 (ALP) 标记的人免疫球蛋白 (IgG) 的反应液中所得的样品的结果,PC 是将不含有肽的 DMSO 添加到含有碱性磷酸酶 (ALP) 标记的人免疫球蛋白 (IgG) 的反应液中所得的样品的结果。将氨基酸残基置换为对应的 D-氨基酸、且将氨基酸序列中的半胱氨酸残基置换为丝氨酸残基的肽 (R19 ~ 22) 分别抑制 C1q 与免疫球蛋白的结合。

[0184] 实施例 3

[0185] 具有免疫球蛋白结合能力的肽的关节炎抑制作用的验证

[0186] (1) 具有免疫球蛋白结合能力的肽对诱发关节炎的小鼠的关节炎抑制作用 -1

[0187] 材料和方法

[0188] 使用单克隆抗体鸡尾酒诱发的关节炎小鼠 (BALB/c Cr Slc (SPF)), 研究实施例 2 中的以 R5 表示的肽的关节炎抑制作用。以 2mg/ 个体静脉内给予诱发关节炎用的单克隆抗体鸡尾酒, 3 天后, 以 50 μ g/ 个体腹腔内给予脂多糖 (LPS), 诱发关节炎。自 LPS 给予翌日 (第 4 天) 至第 14 天, 以 1 天 1 次或 1 天 2 次、10mg/kg 腹腔内给予肽 R5。自第 4 天起, 以 1 天 1 次、0.1mg/kg 口服给予阳性对照试剂甲氨蝶呤。自第 0 天至第 14 天的偶数日, 测定四肢的临床评分。麻醉下, 用含有肝素的生理盐水进行放血, 持续注入冰冷却 4% 仲甲醛液, 进行全身灌流固定。灌流固定后, 摘取两后肢的膝关节 (将大腿骨中心部和胫骨中心部切断, 除去皮肤和肌肉) 以及踝关节 (由胫骨中心部至趾尖), 进一步用 4% 仲甲醛液浸泡过夜, 固定 (4 $^{\circ}$ C)。然后, 将两膝和两踝关节移入 50mM PBS (4 $^{\circ}$ C), 然后由两个方向 (内侧面方向和上面方向) 进行踝关节的软 X 射线照片拍摄。

[0189] 肽溶液的制备

[0190] 关于肽, 根据动物的体重计算必需量。将肽用 0.5% 甲基纤维素溶液制备成 1mg/ml, 将制备的肽溶液冷藏保存。

[0191] 甲氨蝶呤溶液的制备

[0192] 称量 1mg 甲氨蝶呤, 加入到玛瑙乳钵中, 用研磨棒粉碎, 然后缓慢加入 0.5% 甲基纤维素溶液, 使其悬浮, 制备成 0.01mg/ml。然后将制备物冷藏保存。

[0193] 体重测定、一般症状观察和分组

[0194] 动物的体重测定是在试验期间中, 以诱发关节炎用的单克隆抗体鸡尾酒给予日为第 0 天, 在第 0、3、6、9、12 和 14 天测定。每天实施一般状态观察。

[0195] 关节炎模型的制作

[0196] 第 0 天, 以 2mg/ 个体对 20 只 7 周龄的小鼠静脉内给予诱发关节炎用的单克隆抗体鸡尾酒, 第 3 天, 以 50 μ g/ 个体腹腔内给予 LPS。

[0197] 肽溶液的给予

[0198] 肽溶液是自第 4 天起, 1 天 1 次 (上午) 或 1 天 2 次 (上午和下午) 腹腔内给予 10mg/kg。作为对照, 自第 4 天起, 1 天 1 次 (上午) 腹腔内给予 0.5% 甲基纤维素溶液。给予时使用注射针 (26G, Terumo) 和注射器 (1.0ml 容量, Terumo)。给予量是 10ml/kg。甲氨蝶呤是自第 4 天起, 1 天 1 次 (上午) 口服给予 0.1mg/kg。给予时使用经口探棒 (peroral probe) (小鼠用 peroral probe, Fuchigami 器械店) 和注射器 (1.0ml 容量, Terumo)。给予量为 10ml/kg。

[0199] 临床评分观察

[0200] 临床评分的观察是在自第 0 天至第 14 天的偶数日,按照以下标准进行观察。四肢的合计最高为 12 分。

[0201] < 临床评分 >

[0202] 0 :正常的关节

[0203] 1 :稍有炎症和红肿

[0204] 2 :前后足全体形成妨碍了前后足使用的严重的红斑和肿胀

[0205] 3 :伴随强直、关节僵硬、功能丧失的前后足或关节的变形统计学的分析处理方法

[0206] 试验成绩以平均值 \pm 标准误差表示,使用 EXSAS (Version 7.1.6, 株式会社 Arm Systex) 进行分析。临床评分是进行 Wilcoxon 检验。用肉眼观察足的肿胀。

[0207] 结果

[0208] 结果如图 5 所示。未观察到 1 天 1 次给予和 1 天 2 次给予之间肽 R5 的有效性存在显著差异,可见对关节炎抑制的效果。关节炎抑制的强度比甲氨蝶呤强。由该结果可已明确,本发明的肽在临床中,具有比现已使用的药物优异的关节炎抑制作用,对于关节炎和相关疾病的处置和预防有用。

[0209] 已知甲氨蝶呤即使微量使用也会带来严重的副作用。而本发明的肽来自天然,未见任何副作用。因此,本发明的使用比以往使用的药物有利。

[0210] (2) 具有免疫球蛋白结合能力的肽对于诱发关节炎的小鼠的关节炎抑制作用 -2

[0211] 材料和方法

[0212] 使用单克隆抗体鸡尾酒诱发的关节炎小鼠,研究实施例 2 中以 R1、R2 和 R5 给出的肽的关节炎抑制作用。以 2mg/ 个体静脉内给予诱发关节炎用的单克隆抗体鸡尾酒,3 天后,以 50 μ g/ 个体腹腔内给予 LPS,诱发关节炎。各肽是自诱发关节炎用的单克隆抗体鸡尾酒给予日(第 0 天)起,分别以 10mg/kg 按照 1 天 2 次、连续给予 14 天,通过临床评分来研究关节炎抑制作用。实验按照与实施例 3(1) 同样的方法进行。

[0213] 肽溶液的制备

[0214] 各肽是根据动物的体重计算必需量。用 0.5% 甲基纤维素溶液制备成 1mg/ml,冷藏保存。

[0215] 体重测定和一般状态观察

[0216] 动物的体重测定是在试验期间,以诱发关节炎用的单克隆抗体鸡尾酒给予日为第 0 天,在第 0、3、6、9、12 和 14 天测定。每天实施一般状态观察。

[0217] 关节炎模型的制作和分组

[0218] 给予开始前一天测定体重,通过分组软件随机分组,使各组的平均体重值大致相等。第 0 天,以 2mg/ 个体对 20 只 7 周龄的小鼠静脉内给予诱发关节炎用的单克隆抗体鸡尾酒,第 3 天,以 50 μ g/ 个体腹腔内给予 LPS。

[0219] 肽溶液的给予

[0220] 自第 0 天起,于上午和下午 1 天 2 次腹腔内给予各肽溶液。作为对照,自第 0 天起,1 天 2 次、腹腔内给予 0.5% 甲基纤维素溶液。给予时使用注射针 (26G, Terumo) 和注射器 (1.0ml 容量, Terumo)。给予量为 10ml/kg。

[0221] 临床评分观察

[0222] 以诱发关节炎用的单克隆抗体鸡尾酒给予日作为第 0 天,在至第 14 天的偶数日,按照如下标准观察全部实验例的四肢的临床评分。四肢的合计最高为 12 分。

[0223] < 临床评分 >

[0224] 0 :正常的关节

[0225] 1 :稍有炎症和红肿

[0226] 2 :前后足全体形成妨碍了前后足使用的严重的红斑和肿胀

[0227] 3 :伴随强直、关节僵硬、功能丧失的前后足或关节的变形统计学的分析处理方法

[0228] 试验成绩以平均值 \pm 标准误差表示,使用 EXSAS (Version 7.1.6, 株式会社 Arm Systex) 进行分析。临床评分是进行 Wilcoxon 检验。肉眼观察足的肿胀。

[0229] 结果

[0230] 结果如图 6、图 7 和图 8 所示。以 10mg/kg 1 天 2 次给予 R1、R2 或 R5 的所有组中,均可见关节炎抑制作用。由此可以明确,本发明的肽具有关节炎抑制作用,对关节炎和相关疾病的处置和预防有用。另外,在所使用的肽中均未见一般症状的异常和对体重的作用。

[0231] 在使用小鼠的试验中,本发明的肽未显示毒性影响。并且,本发明的肽来自于原本存在于人体内的 C1q,且为 6 ~ 15 个残基,较短,因此,通过使用本发明的肽,有望降低治疗或预防所伴随的副作用。(3) 具有免疫球蛋白结合能力的肽对于诱发关节炎的小鼠的关节炎抑制作用 -3

[0232] 材料和方法

[0233] 使用单克隆抗体鸡尾酒诱发的关节炎小鼠,研究实施例 2(3) 中以 R13 和 R17 给出的肽的关节炎抑制作用。以 2mg/ 个体静脉内给予诱发关节炎用的单克隆抗体鸡尾酒,3 天后,以 50 μ g/ 个体腹腔内给予 LPS,诱发关节炎。各肽是自诱发关节炎用的单克隆抗体鸡尾酒给予 4 天后,分别以 1 天 1 次连续 10 天进行腹腔内或静脉内给予,通过临床评分和后肢容积测定来研究关节炎抑制作用。

[0234] 肽溶液的制备

[0235] 各肽是根据动物的体重来计算必需量。使用生理盐水进行制备 (R1 为 0.1mg/ml、R2 为 1mg/ml、以及 R13 和 R17 为 1mg/ml 或 10mg/ml),冷藏保存。

[0236] 体重测定和一般状态观察

[0237] 动物的体重测定是在试验期间,以诱发关节炎用的单克隆抗体鸡尾酒给予日作为第 0 天,在第 0、3、6、9、12 和 14 天测定。每日实施一般状态观察。

[0238] 关节炎模型的制作和分组

[0239] 给予开始的前一天测定体重,通过分组软件随机分组,使各组的平均体重值大致相等。第 0 天,以 2mg/ 个体对 55 只 7 周龄的小鼠静脉内给予诱发关节炎用的单克隆抗体鸡尾酒,第 3 天后,以 50 μ g/ 个体腹腔内给予 LPS。

[0240] 肽溶液的给予

[0241] 自第 4 天起,1 天 1 次腹腔内或静脉内给予各肽溶液。同样地,自第 4 天起,1 天 1 次腹腔内给予生理盐水作为阴性对照、以及给予甲氨蝶呤 (0.01mg/ml) 作为阳性对照。给予时使用注射针 (26G, Terumo) 和注射器 (1.0ml 容量, Terumo)。给予量为 10ml/kg。

[0242] 临床评分观察

[0243] 以诱发关节炎用的单克隆抗体鸡尾酒给予日作为第 0 天,至第 14 天的偶数日,按

照如下标准观察全部实验例的四肢的临床评分。四肢的合计最高为 12 分。

[0244] < 临床评分 >

[0245] 0 : 正常的关节

[0246] 1 : 稍有炎症和红肿

[0247] 2 : 前后足全体形成妨碍了前后足使用的严重的红斑和肿胀

[0248] 3 : 伴随强直、关节僵硬、功能丧失的前后足或关节的变形

[0249] 统计学的分析处理方法

[0250] 试验成绩以平均值 ± 标准误差表示, 使用 EXSAS (Version 7.1.6, 株式会社 Arm Systex) 进行分析。临床评分是进行 Wilcoxon 检验。肉眼观察足的肿胀。体重和足容积等的定量性数据进行 Bartlett 检验, 如果方差齐同 (分散が均一), 则进行 Dunnett 的多重比较检验, 如果方差不齐同 (分散が不均一), 则进行 Steel 的多重比较检验。

[0251] 结果

[0252] 结果如图 9 和图 10 所示。图 9 的临床评分中, 在 1 天 1 次给予 (R13 为腹腔内, R17 为静脉内) R13 或 R17 的所有的组中, 显示了与给予 R1 和 R2 时 (R1 为静脉内, R2 为腹腔内) 同程度的关节炎抑制作用, 与给予甲氨蝶呤时比较, 也为同程度或更大的作用。由图 10 的后肢容积测定的结果可以了解, 本发明的肽以与 R1 和 R2、进一步与甲氨蝶呤同程度或更大地抑制关节炎导致的患部的肿胀。由此可知, 本发明的肽具有关节炎抑制作用, 对于关节炎以及相关疾病的处置和预防有用。

[0253] 已知甲氨蝶呤即使微量使用也会带来严重的副作用。而本发明的肽来自天然, 未见任何副作用。因此, 本发明的应用比以往使用的药物有利。

[0254] (4) 具有免疫球蛋白结合能力的肽对于诱发关节炎的小鼠的关节炎抑制作用 -4

[0255] 材料和方法

[0256] 使用单克隆抗体鸡尾酒诱发的关节炎小鼠, 研究实施例 2(3) 中作为 R13、实施例 2(4) 中作为 R19 和 R21 分别给出的肽的关节炎抑制作用。以 2mg/ 个体静脉内给予诱发关节炎用的单克隆抗体鸡尾酒, 3 天后以 50 μg/ 个体腹腔内给予 LPS, 诱发关节炎。各肽是自诱发关节炎用的单克隆抗体鸡尾酒给予 4 天后, 分别以 1 天 1 次连续 10 天进行腹腔内给予, 通过临床评分和后肢容积测定来研究关节炎抑制作用。

[0257] 肽溶液的制备

[0258] 各肽是根据动物的体重来计算必需量。使用生理盐水进行制备 (10mg/ml 和 1mg/ml), 冷藏保存。

[0259] 体重测定和一般状态观察

[0260] 动物的体重测定是在试验期间, 以诱发关节炎用的单克隆抗体鸡尾酒给予日作为第 0 天, 在第 0、3、6、9、12 和 14 天测定。每日实施一般状态观察。

[0261] 关节炎模型的制作和分组

[0262] 给予开始前一天测定体重, 通过分组软件随机分组, 使各组的平均体重值大致相等。第 0 天, 以 2mg/ 个体对 40 只 7 周龄的小鼠静脉内给予诱发关节炎用的单克隆抗体鸡尾酒, 第 3 天后, 以 50 μg/ 个体腹腔内给予 LPS。

[0263] 肽溶液的给予

[0264] 自第 4 天起, 1 天 1 次腹腔内给予各肽溶液。同样, 自第 4 天起, 1 天 1 次腹腔内给

予生理盐水作为阴性对照、以及给予甲氨蝶呤 (0.1mg/ml) 作为阳性对照。给予时使用注射针 (26G, Terumo) 和注射器 (1.0ml 容量, Terumo)。给予量是 10ml/kg 或 100mg/kg。

[0265] 临床评分观察

[0266] 以诱发关节炎用的单克隆抗体鸡尾酒给予日作为第 0 天,至第 14 天的偶数日,按照如下标准观察全部实验例的四肢的临床评分。四肢的合计最高为 12 分。

[0267] < 临床评分 >

[0268] 0 : 正常的关节

[0269] 1 : 稍有炎症和红肿

[0270] 2 : 前后足全体形成妨碍了前后足使用的严重的红斑和肿胀

[0271] 3 : 伴随强直、关节僵硬、功能丧失的前后足或关节的变形

[0272] 试验成绩以平均值 ± 标准误差表示,使用 EXSAS (Version 7.1.6, 株式会社 Arm Systex) 进行分析。临床评分是进行 Wilcoxon 检验。肉眼观察足的肿胀。体重和足容积等的定量性数据是进行 Bartlett 检验,如果方差齐同,则进行 Dunnett 的多重比较检验,如果方差不齐同,则进行 Steel 的多重比较检验。

[0273] 结果

[0274] 结果如图 11、12 和 13 所示。以 10mg/kg 或 100mg/kg 的用量腹腔内给予肽 R13 时,可见与甲氨蝶呤同程度或更大的关节炎抑制作用。以 100mg/kg 的用量腹腔内给予肽 R19 和 21 时,可见与甲氨蝶呤同程度或更大的关节炎抑制作用。由此可以明确,本发明的肽具有关节炎抑制作用,对于关节炎和相关疾病的处置和预防有用。

[0275] 已知甲氨蝶呤即使微量使用也会带来严重的副作用。而本发明的肽来自天然,未见任何副作用。因此,本发明的应用比以往使用的药物有利。

[0276] 实施例 4

[0277] 具有免疫球蛋白结合能力的肽的免疫复合物病抑制作用的验证 (1) 在诱发 III 型变态 (阿图斯) 反应的大鼠中具有免疫球蛋白结合能力的肽对免疫复合物病抑制作用 -1

[0278] 材料和方法

[0279] 使用 64 只雄性 7 周龄的 Slc :WiStar 系大鼠,对于肽 R1、R2 和 R5,每种给予方法 (腹腔内给予和尾静脉内给予) 分 2 次进行试验。驯化是供给固型常规饲料 CRF-1, 喂饲 9 天以上。给予前一天,剃去动物背部的毛,给予当天,尾静脉内给予 OVA+ 伊文思蓝 (Evans blue) 染料混合溶液。腹腔内给予时在 OVA+ 伊文思蓝染料混合溶液给予 30 分钟后、尾静脉内给予时在 50 分钟后分别给予各肽溶液。关于抗 OVA 溶液的皮内给予,腹腔内给予时是在受验物质给予 30 分钟后、静脉内给予时是在 10 分钟后,以 0.1mL/ 部位的用量对动物的背部皮内给予各肽溶液,局部诱发阿图斯反应。诱发 4 小时后,使动物安乐死,充分放血后剥离背部皮肤。冲切剥离的皮肤的阿图斯反应部位,由该皮肤过夜提取伊文思蓝染料。对于渗出的染料量,用分光光度计测定伊文思蓝染料的吸光度,使用校正曲线进行定量 (关于实施例 4 中采用的实验方法,参照 H. Okamoto, Y. Iwahisa 和 M. Terasawa : Suppression of the Arthus reaction by Y-24180, a potent and specific antagonist of platelet-activating factor. Agents Actions, 35 : 149 ~ 158 (1992))。

[0280] 该实验中使用的各肽溶液如下所示 :

[0281] < 阴性对照物质 >

[0282] 生理盐水

[0283] < 肽溶液 >

[0284] 将按规定量称量的各肽（肽 R1、R2 和 R5）溶解于生理盐水，制成 20mg/ml 溶液。2mg/ml 溶液的制备是将 20mg/mL 溶液用生理盐水稀释 10 倍来制备。5mg/ml 溶液的制备是将按规定量称量的各肽溶解于生理盐水，制成制备液。

[0285] 阿图斯反应

[0286] 以 2ml/kg 尾静脉内给予 OVA+ 伊文思蓝染料混合溶液。腹腔内给予时是在 OVA+ 伊文思蓝染料混合溶液的给予 30 分钟后、尾静脉内给予时是在 50 分钟后，分别给予各肽溶液。关于抗 OVA 溶液的皮内给予，腹腔内给予时是在受验物质给予 30 分钟后、静脉内给予时是在 10 分钟后，以 0.1mL/ 部位的用量对动物的背部皮内给予各肽溶液，诱发局部阿图斯反应。皮内给予是对 1 只动物，PBS 给予 2 处、抗 OVA 溶液给予 2 处。诱发 4 小时后，将动物在乙醚麻醉下断颈安乐死，充分放血后剥离背部皮肤。用打孔机冲切剥离的皮肤的阿图斯反应部位，用于染料提取。

[0287] 染料提取和测定

[0288] 在用打孔机冲切的皮肤片短条上切数个切口，在 2ml 染料提取液中浸泡，振荡搅拌 10 分钟。然后在室温静置过夜。静置过夜后，再次振荡搅拌 10 分钟，进行离心（1500rpm，15 分钟），将其上清作为染料测定用试样。测定使用 UV-1600（株式会社岛津制作所），以 OD620nm 的波长进行测定。渗出染料量根据染料量标准曲线进行计算。

[0289] 数据的处理和统计处理

[0290] 关于体重测定值和渗出染料量，是计算组平均值（mean）± 标准偏差（SD）。渗出染料量是从 2 处抗 OVA 溶液给予处的平均值中减去 2 处 PBS 给予处的平均值，将所得作为各动物的值。对渗出染料量进行以下的统计分析。第 1 次的试验（各肽溶液的腹腔内给予）中，第 1 组对第 2、3 组、第 1 组对第 4、5 组、第 1 组对第 6、7 组分别进行 Bartlett 的齐性检验，如果方差没有不齐同则通过 Dunnett 的多重比较检验、如果方差不齐同则通过 Steel 的多重比较检验，来检验第 1 组与其它各组之间的平均值的差。第 2 次的试验（各肽溶液的尾静脉内给予）中，第 9 组对第 10、11、12 组之间进行 Bartlett 的齐性检验，如果方差没有不齐同则通过 Dunnett 的多重比较检验、如果方差不齐同则通过 Steel 的多重比较检验，检验第 9 组与其它各组之间的平均值的差。关于显著水平，Bartlett 的齐性检验为 5%，其它的检验是双侧 5%。

[0291] 结果

[0292] 各肽溶液的腹腔内给予的结果如图 14 所示、尾静脉内给予的结果如图 15 所示。该实施例中所使用的 III 型变态（阿图斯）反应模型体系中，与对照比较，可见 30% 左右的伊文思蓝渗出量的减少，可认为对于 SLE、肾小球肾炎、关节炎、血管炎等免疫复合物病的抑制有效。肽溶液的腹腔内给予中，在肽 R1、R2、R5 的全部中均可见明确且充分的免疫复合物病抑制作用。尾静脉给予中，在肽 R1、R2 中可见明确且充分的免疫复合物病抑制作用。由此可以明确，本发明的肽具有明确且充分的免疫复合物病抑制作用，对于 SLE、肾小球肾炎、关节炎、血管炎等的免疫复合物病的处置和预防有用。

[0293] (2) 在诱发 III 型变态（阿图斯）反应的大鼠中具有免疫球蛋白结合能力的肽对于免疫复合物病抑制作用 -2

[0294] 材料和方法

[0295] 使用 45 只雄性 7 周龄的 Slc :WiStar 系大鼠,对于肽 R13 和 R19,每种给予方法(腹腔内给予和尾静脉内给予)分 2 次进行试验。驯化是供给固型常规饲料 CRF-1,喂饲 6 天或 8 天。给予前一天,剃去动物背部的毛,给予当天,尾静脉内给予 OVA+ 伊文思蓝染料混合溶液。腹腔内给予时是在 OVA+ 伊文思蓝染料混合溶液的给予 30 分钟后、尾静脉内给予时是在 50 分钟后,分别给予各肽溶液。关于抗 OVA 溶液的皮内给予,腹腔内给予时是在受验物质给予 30 分钟后、静脉内给予时是在 10 分钟后,以 0.1ml/ 部位的用量对动物的背部皮内给予各肽溶液,诱发局部的阿图斯反应。诱发 4 小时后,将动物安乐死,充分放血后剥离背部皮肤。冲切剥离的皮肤的阿图斯反应部位,由该皮肤过夜提取伊文思蓝染料。对于渗出的染料量,用分光光度计测定伊文思蓝染料的吸光度,使用校正曲线进行定量。

[0296] 该实验中使用的各肽溶液如下所示:

[0297] < 阴性对照物质 >

[0298] 生理盐水

[0299] < 阳性对照物质给予液 >

[0300] 将按规定量称量的氢化可的松加入到乳钵中,用研磨棒破碎,然后加入生理盐水,使终浓度为 10mg/ml,制备悬浮液。

[0301] < 肽溶液 >

[0302] 将按规定量称量的各肽(肽 R13 和 R19)溶解于生理盐水,制成 20mg/ml 溶液。2mg/ml 溶液的制备时将 20mg/mL 溶液用生理盐水稀释 10 倍来制备。5mg/ml 溶液的制备是将按规定量称量的各肽溶解于生理盐水,制成制备液。

[0303] 阿图斯反应

[0304] 以 2ml/kg 尾静脉内给予 OVA+ 伊文思蓝染料混合溶液。腹腔内给予时是在 OVA+ 伊文思蓝染料混合溶液的给予 30 分钟后、尾静脉内给予时是在 50 分钟后,给予各肽溶液。关于抗 OVA 溶液的皮内给予,腹腔内给予时是在受验物质给予 30 分钟后、静脉内给予时是在 10 分钟后,以 0.1mL/ 部位的用量对动物的背部皮内给予各肽溶液,诱发局部的阿图斯反应。皮内给予是对 1 只动物,PBS 给予 2 处、抗 OVA 溶液给予 2 处。诱发 4 小时后,将动物在乙醚麻醉下断颈安乐死,充分放血后剥离背部皮肤。用打孔机冲切剥离的皮肤的阿图斯反应部位,用于染料提取。

[0305] 染料提取和测定

[0306] 在用打孔机冲切的皮肤片短条上切数个切口,在 2ml 染料提取液中浸泡,振荡搅拌 10 分钟。然后在室温静置过夜。静置过夜后,再次振荡搅拌 10 分钟,进行离心(1500rpm, 15 分钟),将其上清作为染料测定用试样。测定使用 UV-1600(株式会社岛津制作所),以 OD620nm 的波长进行测定。渗出染料量根据染料量标准曲线来计算。

[0307] 数据的处理和统计处理

[0308] 关于体重测定值和渗出染料量,是计算组平均值(mean)± 标准偏差(SD)。渗出染料量是从 2 处抗 OVA 溶液给予处的平均值中减去 2 处 PBS 给予处的平均值,将所得作为各动物的值。对渗出染料量进行以下的统计分析。第 1 次(受验物质的腹腔内给予)试验中,对第 1、2、3 组、第 1、4、5 组分别进行 Bartlett 的齐性检验,如果方差没有不齐同则通过 Dunnett 的多重比较检验、如果方差不齐同则通过 Steel 的多重比较检验,来检验第 1 组

与其它各组之间的平均值的差。第 1 组与第 6 组之间进行 F 检验, 方差没有不斉同则通过 Student 的 t 检验、方差不齐同则通过 Aspin-Welch 的 t 检验, 来检验 2 组间的平均值的差。第 2 次 (受验物质的尾静脉内给予) 试验中, 在第 7、8、9 组之间进行 Bartlett 的斉性检验, 如果没有方差不齐同, 则通过 Dunnett 的多重比较检验、如果方差斉同则通过 Steel 的多重比较检验, 来检验第 7 组与其它各组之间的平均值的差。显著水平在 Bartlett 的斉性检验中为 5%, 在其它的检验中为双侧 5%。

[0309] 结果

[0310] 各肽溶液的腹腔内给予的结果如图 16、尾静脉内给予的结果如图 17 所示。腹腔内给予试验中, 在 10mg/kg 和 100mg/kg 给予肽 R13 两组中, 与阴性对照物质给予组比较, 可见显著的抑制效果。特别是在 100mg/kg 给予组中, 可见非常显著的抑制效果 (抑制约 60%), 这是比给予 50mg/kg 阳性对象物质氢化可的松时更强的抑制效果。关于肽 R19 给予组, 在 10mg/kg 给予组中, 与阴性对照物质给予组比较, 显示 25 ~ 30% 的低值, 可见抑制效果。另外, 在 100mg/kg 给予组中, 可见约 50% 的抑制效果, 可见与阳性对照物质同样的抑制效果。第 2 次的尾静脉给予试验中, 在肽 R13 给予组可见约 70% 的抑制效果, 与阴性对照物质给予组比较, 是非常显著的抑制效果。另外, 肽 R19 给予组与阴性对照物质给予组比较, 也可见约 50% 的抑制效果。该结果与同序列、L 构型合成的肽比较, 是非常显著的抑制效果。可证实, 通过制成 D 构型肽, 可以以更强的效果显示明确且充分的 III 型变态 (阿图斯) 反应的抑制效果, 还由该结果表明, 本肽对于肾小球肾炎、SLE、关节炎、血管炎等免疫复合物病的处置和预防有用。已知氢化可的松被分类为类固醇药物, 即使微量使用也会带来严重的副作用。而本发明的肽来自天然, 未见任何副作用。因此, 与以往使用的药物相比, 本发明的使用是非常有利的。

[0311] 实施例 5

[0312] 具有免疫球蛋白结合能力的肽对大鼠胶原关节炎模型的关节炎抑制作用

[0313] 使用大鼠胶原关节炎模型, 研究以肽 R13 给出的肽的关节炎抑制效果。

[0314] 将 500 μ g 来自牛的 II 型胶原对 Lewis 系雌性大鼠免疫, 初次免疫后第 7 天和第 14 天, 追加免疫 100 μ g 同胶原, 诱发胶原关节炎。自关节炎完全发病 12 天后, 连续 25 天、1 天 1 次给予 R13 肽、错义肽 (dYdPdYGdFdL) 或甲氨蝶呤, 通过临床评分研究关节炎的抑制效果。

[0315] 对照药物是给予 0.15mg/kg 甲氨蝶呤。

[0316] 肽溶液的制备方法

[0317] 各肽是根据动物的体重计算必需量。缓慢加入生理盐水, 使其悬浮, 制备 100mg/ml 和 10mg/ml。

[0318] 临床评分观察

[0319] 以用来自牛的 II 型胶原进行初次免疫当天作为第 0 天, 自关节炎发病的第 12 天至第 36 天, 在 3 的倍数日, 按照如下标准观察全部实验例的四肢的临床评分。四肢的合计最高为 16 分。

[0320] < 临床评分 >

[0321] 0: 无变化

[0322] 1: 足根关节部或足背足底有轻度红斑和肿胀或者最多 2 根足趾有红斑和肿胀

[0323] 2:足根关节部或足背足底有红斑和肿胀或者 3 根以上足趾有红斑和肿胀

[0324] 3:足全体肿胀和红斑

[0325] 4:最大强度的足全体肿胀和红斑

[0326] 结果

[0327] 如图 18 所示,以 100mg/kg、10mg/kg 1 天 1 次给予 R13 肽的组中可见关节炎抑制效果。特别是在以 100mg/kg 给予 R13 肽的组中,可见比给予甲氨蝶呤时更大的抑制效果。而错义肽中未见抑制效果。由此可以明确,本发明的肽具有关节炎抑制效果,对于关节炎和相关的疾病的处置和预防有用。另外,在任何所使用的肽中均未见一般症状的异常和对体重的作用。组织学观察也表明,由于给予肽,可见破坏关节部位的 TNF 表达显著降低,也可抑制破骨细胞的诱导。已知甲氨蝶呤即使微量使用也会带来严重的副作用。而本发明的肽来自天然,未见任何副作用。因此,与以往使用的药物相比,本发明的使用是有利的。

[0328] 实施例 6

[0329] 使用具有免疫球蛋白结合能力的肽研究抗体检测试剂

[0330] 材料和方法

[0331] 蛋白质印迹法中,研究使用生物素化肽代替 2 次抗体,是否可以检测 1 次抗体。将肽 R5 进行生物素化,将该步骤委托 GL Biochem(Shanghai) 公司制作。

[0332] 将 BSA 用 12% SDS-PAGE 电泳,并转印至 PVDF 膜上。将转印的 PVDF 膜用 5% 脱脂乳封闭。将 PVDF 膜浸渍在将抗 BSA IgG(兔)稀释 2000 倍所得的溶液中,在室温下反应 1 小时。用 TBST 洗涤 3 次。将生物素化肽 R5 溶解于 DMSO,使浓度为 10mg/ml,将 10 μ l 该溶液加入到 10ml 的 TBST 中(稀释 1000 倍),在室温下反应 1 小时。用 TBST 洗涤 3 次。使用 VECTOR laboratories 公司制造的 ABC 试剂盒进行显色。显色液使用硫酸镍和二氨基联苯,底物使用过氧化氢水。

[0333] 结果

[0334] 结果如图 19 所示。通过使用生物素化的本发明的肽代替 2 次抗体,可检测 PVDF 膜上的抗体。由此可知,将本发明的肽生物素化,在抗体的检测中是有用的。

[0335] 实施例 7

[0336] 使用具有免疫球蛋白结合能力的肽研究抗体纯化柱

[0337] 材料和方法

[0338] 对于使用具有免疫球蛋白结合能力的肽的抗体纯化柱进行研究。对照是使用 Protein A。

[0339] 肽柱的制作

[0340] 将 1ml NHS-activated Sepharose 4B Fast Flow 填充于 PD-10 空白柱,用 10ml 1mM HCl 洗涤,用 10ml PBS 平衡。将 5mg 肽 R4 溶解于 1ml PBS,添加到柱中,在室温下旋转 4 小时。将柱用 5ml PBS 洗涤,然后添加 1ml 的 1M 甘氨酸,在室温下旋转 2 小时,由此封闭未反应的 NHS。除去 1M 甘氨酸,用 10ml PBS 洗涤,平衡。

[0341] 抗体的纯化

[0342] 亲和纯化用柱中加入 1mg 抗 BSA IgG(兔)(抗牛血清白蛋白 IgG(兔)),在室温下旋转 2 小时。用 15ml PBS 洗涤。加入 5ml 的 0.1M 甘氨酸-HCl(pH3.2),洗脱,在加入了 100 μ l 的 1M Tris 的微量管中,每 1ml 洗脱 5 次。用 DC Protein Assay Kit(DC 蛋白质

测定试剂盒) (Bio-Rad) 对洗脱组分中的蛋白质量进行定量。对于人 IgG 也进行同样的吸附 - 洗脱试验。

[0343] 结果

[0344] 结果如图 20 所示。在使用了本发明的肽的柱中, 用于纯化的兔抗体中, 可回收 70 ~ 80%。该回收率比对照的 Protein A 优异。可知使用本发明的肽的亲纯化用柱也适用于人 IgG 的纯化 (图 21)。由此可知, 将本发明的肽固定的手段在抗体纯化中是极为有用的。

[0345] 产业实用性

[0346] 根据本发明, 可得到具有免疫球蛋白结合能力的肽和与所述肽的融合蛋白、编码它们的核酸等, 因此可在免疫球蛋白的检测、分离、纯化、类风湿性关节炎、以及 SLE、肾小球肾炎、血管炎、关节炎等免疫复合物病等的、由 C1q 与免疫球蛋白的结合而引起的疾病的治疗或预防用药物组合物领域中利用。

[0347] 序列表自由文本

- [0348] SEQ ID NO :1 :免疫球蛋白结合肽
- [0349] SEQ ID NO :2 :免疫球蛋白结合肽
- [0350] SEQ ID NO :3 :免疫球蛋白结合肽
- [0351] SEQ ID NO :4 :免疫球蛋白结合肽
- [0352] SEQ ID NO :5 :免疫球蛋白结合肽
- [0353] SEQ ID NO :6 :免疫球蛋白结合肽
- [0354] SEQ ID NO :7 :免疫球蛋白结合肽
- [0355] SEQ ID NO :23 :免疫球蛋白结合肽
- [0356] SEQ ID NO :24 :免疫球蛋白结合肽
- [0357] SEQ ID NO :25 :免疫球蛋白结合肽
- [0358] SEQ ID NO :26 :免疫球蛋白结合肽
- [0359] SEQ ID NO :27 :免疫球蛋白结合肽
- [0360] SEQ ID NO :28 :免疫球蛋白结合肽
- [0361] SEQ ID NO :29 :免疫球蛋白结合肽
- [0362] SEQ ID NO :30 :免疫球蛋白结合肽
- [0363] SEQ ID NO :31 :免疫球蛋白结合肽
- [0364] SEQ ID NO :32 :免疫球蛋白结合肽

<210> 12
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 12
 agtggcaagt tcacctgcaa ggtgcccggt ctctactact tcacc 45

<210> 13
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 13
 ttcacctgca aggtgcccggt tctctactac ttcacctacc acgcc 45

<210> 14
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 14
 agcactggca agttcacctg caaagtcgcc ggccctctact acttt 45

<210> 15
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 15
 aagttcacct gcaaagtccc cggcctctac tactttgtct accac 45

<210> 16
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 16
 tgcaaagtcc cggcctctata ctactttgtc taccacgcgt cgcac 45

<210> 17
 <211> 245

[0005]

Ser Ser Ser Arg Gly Gln Val Arg Arg Ser Leu Gly Phe Cys Asp Thr
 180 185 190

Thr Asn Lys Gly Leu Phe Gln Val Val Ser Gly Gly Met Val Leu Gln
 195 200 205

Leu Gln Gln Gly Asp Gln Val Trp Val Glu Lys Asp Pro Lys Lys Gly
 210 215 220

His Ile Tyr Gln Gly Ser Glu Ala Asp Ser Val Phe Ser Gly Phe Leu
 225 230 235 240

Ile Phe Pro Ser Ala
 245

<210> 18

<211> 253

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Met Met Met Lys Ile Pro Trp Gly Ser Ile Pro Val Leu Met Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Gly Leu Ile Asp Ile Ser Gln Ala Gln Leu Ser Cys Thr
 20 25 30

Gly Pro Pro Ala Ile Pro Gly Ile Pro Gly Ile Pro Gly Thr Pro Gly
 35 40 45

Pro Asp Gly Gln Pro Gly Thr Pro Gly Ile Lys Gly Glu Lys Gly Leu
 50 55 60

Pro Gly Leu Ala Gly Asp His Gly Glu Phe Gly Glu Lys Gly Asp Pro
 65 70 75 80

[0007]

Gly Ile Pro Gly Asn Pro Gly Lys Val Gly Pro Lys Gly Pro Met Gly
85 90 95

Pro Lys Gly Gly Pro Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Pro Lys Gly Glu
100 105 110

Ser Gly Asp Tyr Lys Ala Thr Gln Lys Ile Ala Phe Ser Ala Thr Arg
115 120 125

Thr Ile Asn Val Pro Leu Arg Arg Asp Gln Thr Ile Arg Phe Asp His
130 135 140

Val Ile Thr Asn Met Asn Asn Asn Tyr Glu Pro Arg Ser Gly Lys Phe
145 150 155 160

Thr Cys Lys Val Pro Gly Leu Tyr Tyr Phe Thr Tyr His Ala Ser Ser
165 170 175

Arg Gly Asn Leu Cys Val Asn Leu Met Arg Gly Arg Glu Arg Ala Gln
180 185 190

Lys Val Val Thr Phe Cys Asp Tyr Ala Tyr Asn Thr Phe Gln Val Thr
195 200 205

Thr Gly Gly Met Val Leu Lys Leu Glu Gln Gly Glu Asn Val Phe Leu
210 215 220

Gln Ala Thr Asp Lys Asn Ser Leu Leu Gly Met Glu Gly Ala Asn Ser
225 230 235 240

Ile Phe Ser Gly Phe Leu Leu Phe Pro Asp Met Glu Ala
245 250

<210> 19
<211> 245
<212> PRT
<213> Homo sapiens

[0008]

<400> 19

Met Asp Val Gly Pro Ser Ser Leu Pro His Leu Gly Leu Lys Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Arg Gly Gln Ala Asn Thr Gly Cys
 20 25 30

Tyr Gly Ile Pro Gly Met Pro Gly Leu Pro Gly Ala Pro Gly Lys Asp
 35 40 45

Gly Tyr Asp Gly Leu Pro Gly Pro Lys Gly Glu Pro Gly Ile Pro Ala
 50 55 60

Ile Pro Gly Ile Arg Gly Pro Lys Gly Gln Lys Gly Glu Pro Gly Leu
 65 70 75 80

Pro Gly His Pro Gly Lys Asn Gly Pro Met Gly Pro Pro Gly Met Pro
 85 90 95

Gly Val Pro Gly Pro Met Gly Ile Pro Gly Glu Pro Gly Glu Glu Gly
 100 105 110

Arg Tyr Lys Gln Lys Phe Gln Ser Val Phe Thr Val Thr Arg Gln Thr
 115 120 125

His Gln Pro Pro Ala Pro Asn Ser Leu Ile Arg Phe Asn Ala Val Leu
 130 135 140

Thr Asn Pro Gln Gly Asp Tyr Asp Thr Ser Thr Gly Lys Phe Thr Cys
 145 150 155 160

Lys Val Pro Gly Leu Tyr Tyr Phe Val Tyr His Ala Ser His Thr Ala
 165 170 175

Asn Leu Cys Val Leu Leu Tyr Arg Ser Gly Val Lys Val Val Thr Phe

[0009]

	180		185		190	
Cys Gly His Thr Ser Lys Thr Asn Gln Val Asn Ser Gly Gly Val Leu						
	195		200		205	
Leu Arg Leu Gln Val Gly Glu Glu Val Trp Leu Ala Val Asn Asp Tyr						
	210		215		220	
Tyr Asp Met Val Gly Ile Gln Gly Ser Asp Ser Val Phe Ser Gly Phe						
	225		230		235	240
Leu Leu Phe Pro Asp						
	245					

<210> 20
 <211> 738
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 20
 atggagggtc cccgggatg gctggtgctc tgtgtgctgg ccatatcgct ggcctctatg 60
 gtgaccgagg acttgtgccg agcaccagac gggaagaaag gggaggcagg aagacctggc 120
 agacgggggc ggccaggcct caagggggag caaggggagc cgggggcccc tggcatccgg 180
 acaggeatcc aaggccttaa aggagaccag gggaacctg ggcctcttgg aaaccccggc 240
 aaggtgggct acccagggcc cagcggcccc ctcggagccc gtggcatccc gggaattaaa 300
 ggcaccaagg gcagcccagg aaacatcaag gaccagccga ggccagcctt ctccgccatt 360
 cggcggaaacc cccaatggg gggcaactg gtcattctcg acacggcat caccaaccag 420
 gaagaaccgt accagaacca ctccggccga ttcgtctgca ctgtaccgg ctactactac 480
 ttcacctcc aggtgctgtc ccagtgggaa atctgcctgt ccatcgtctc ctctcaagg 540
 ggccaggtec gacgetcctt gggcttctgt gacaccacca acaaggggct cttccagggt 600
 gtgtcagggg gcatggtgct tcagctgcag cagggtgacc aggtctgggt tgaaaaagac 660
 cccaaaaagg gtcacattta ccagggtctt gaggccgaca gcgtcttcag cggttctctc 720

[0010]

atcttccat ctgcctga 738

<210> 21

<211> 762

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 21

atgatgatga agatcccatg gggcagcacc ccagtactga tgttgctcct gctcctgggc 60

ctaatcgata tctcccaggc ccagctcagc tgcaccgggc ccccagccat ccttggcacc 120

ccgggtatcc ctgggacacc tggccccgat ggccaacctg ggaccccagg gataaaagga 180

gagaaagggc ttccagggtt ggctggagac catggtgagt tcggagagaa gggagaccca 240

gggattcctg ggaatccagg aaaagtccgc cccaagggcc ccatgggccc taaaggtggc 300

ccagggggccc ctggagcccc agggccccaaa ggtgaatcgg gagactacaa ggccaccag 360

aaaatgcctt tctctgccac aagaaccatc aacgtcccc tgcgccggga ccagaccatc 420

cgcttcgacc acgtgateac caacatgaac aacaattatg agccccgag tggcaagttc 480

acctgcaagg tgcccgtctt ctactacttc acctaccagc ccagctctcg agggaacctg 540

tgcgtgaacc tcatgcgtgg ccgggagcgt gcacagaagg tggtcacctt ctgtgactat 600

gcctacaaca cttccaggt caccaccggt ggcatggtcc tcaagctgga gcagggggag 660

aacgtcttcc tgcaggccac cgacaagaac tcaactactg gcattggagg tgccaacagc 720

atcttttccg ggttctgct ctttccagat atggaggcct ga 762

<210> 22

<211> 738

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 22

atggacgtgg ggcccagctc cctgccccac cttgggctga agctgctgct gctcctgctg 60

ctgctgcccc tcaggggcca agccaacaca ggctgctacg ggatcccagg gatgcccggc 120

ctgcctgggg caccagggaa ggatgggtac gacggactgc cggggcccaa gggggagcca 180

[0011]

ggaatcccag ccattcccgg gatccgagga cccaaagggc agaagggaga acccggctta 240
 cccggccatc ctgggaaaaa tggcccatg ggaccccctg ggatgccagg ggtgcccggc 300
 cccatgggca tccctggaga gccaggtag gagggcagat acaagcagaa attccagtca 360
 gtgttcacgg tcaactggca gaccaccag cccctgcac ccaacagcct gatcagattc 420
 aacgcggtec tcaccaaccc gcaggagat tatgacacga gcaactggcaa gttcacctgc 480
 aaagtccccg gccttacta ctttgtctac cacgcctgc atacagcaa cctgtgcgtg 540
 ctgctgtacc gcagcggcgt caaagtggc accttctgt gccacacgtc caaaaccaat 600
 caggtaact cggcgggtg gctgctgagg ttgcaggtg gcgaggaggt gtggctggct 660
 gtcaatgact actacgacat ggtggcatc cagggtctg acagcgtctt ctccggcttc 720
 ctgctcttcc ccgactag 738

<210> 23

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 免疫球蛋白结合肽

<400> 23

Pro Gly Ala Tyr Tyr Phe

1

5

<210> 24

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 免疫球蛋白结合肽

<400> 24

Pro Gly Leu Ala Tyr Phe

1

5

[0012]

<210> 25
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 免疫球蛋白结合肽

<400> 25

Pro Gly Leu Tyr Ala Phe
 1 5

<210> 26
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 免疫球蛋白结合肽

<400> 26

Cys Lys Ala Pro Gly Leu Tyr Tyr Phe
 1 5

<210> 27
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 免疫球蛋白结合肽

<400> 27

Ser Thr Ala Lys Phe Thr Cys Lys Val Pro Gly Leu Tyr Tyr Phe
 1 5 10 15

<210> 28
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0013]

Lys Phe Thr Ser Lys Val Pro Gly Leu Tyr Tyr Phe Val Tyr His
 1 5 10 15

<210> 32
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 免疫球蛋白结合肽

<400> 32

Phe Thr Ser Lys Val Pro Gly Leu Tyr Tyr Phe Thr Tyr His Ala
 1 5 10 15

<210> 33
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<400> 33
 agtggcaagt tcacctctaa ggtgcccggg ctctactact tcacc 45

<210> 34
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<400> 34
 agcactggca agttcacctc taaagtcccc ggctctact acttt 45

<210> 35
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<400> 35
 tctaaagtcc cggcctcta ctactttgtc taccacggt cgcatt 45

<210> 36
 <211> 45
 <212> DNA

[0015]

<213> 人工序列

<400> 36

aagttcacct ctaaagtccc cggcctctac tactttgtct accac

45

<210> 37

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 37

ttcacctcta aggtgcccg tctctactac ttcacctacc acgcc

45

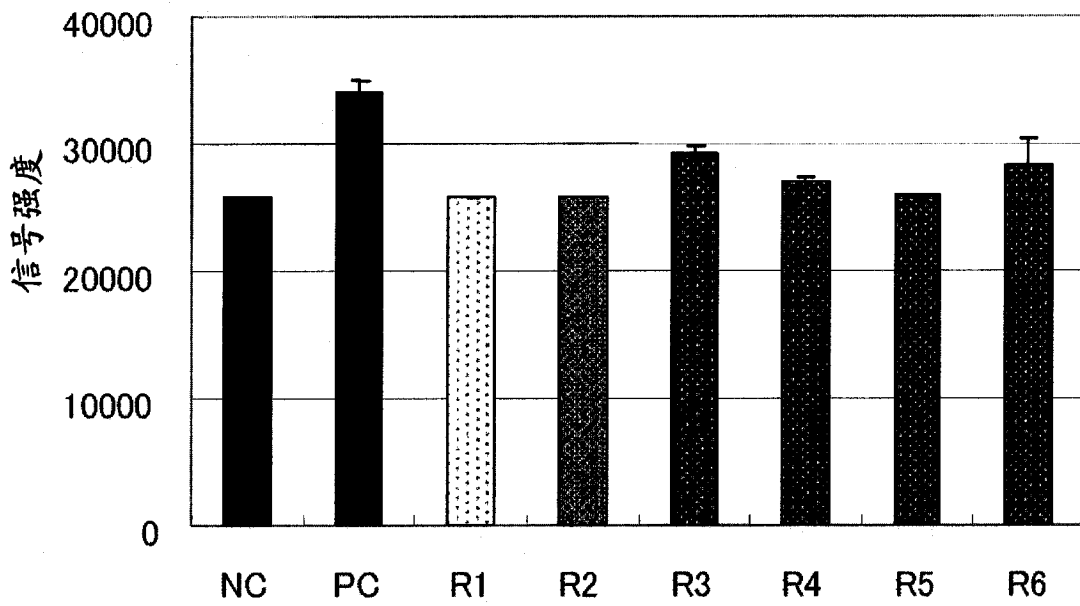


图 1

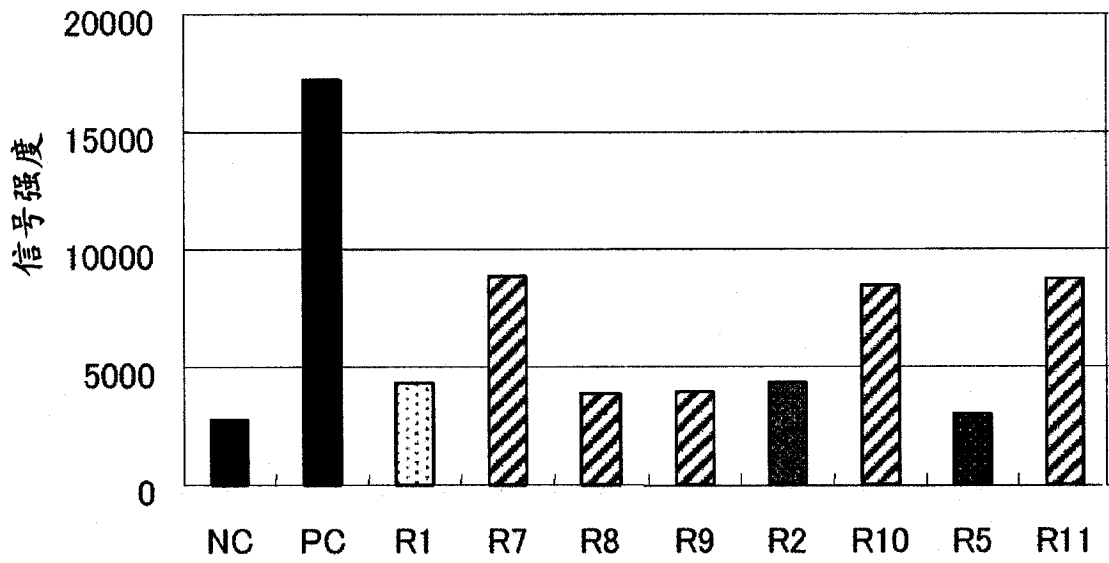


图 2

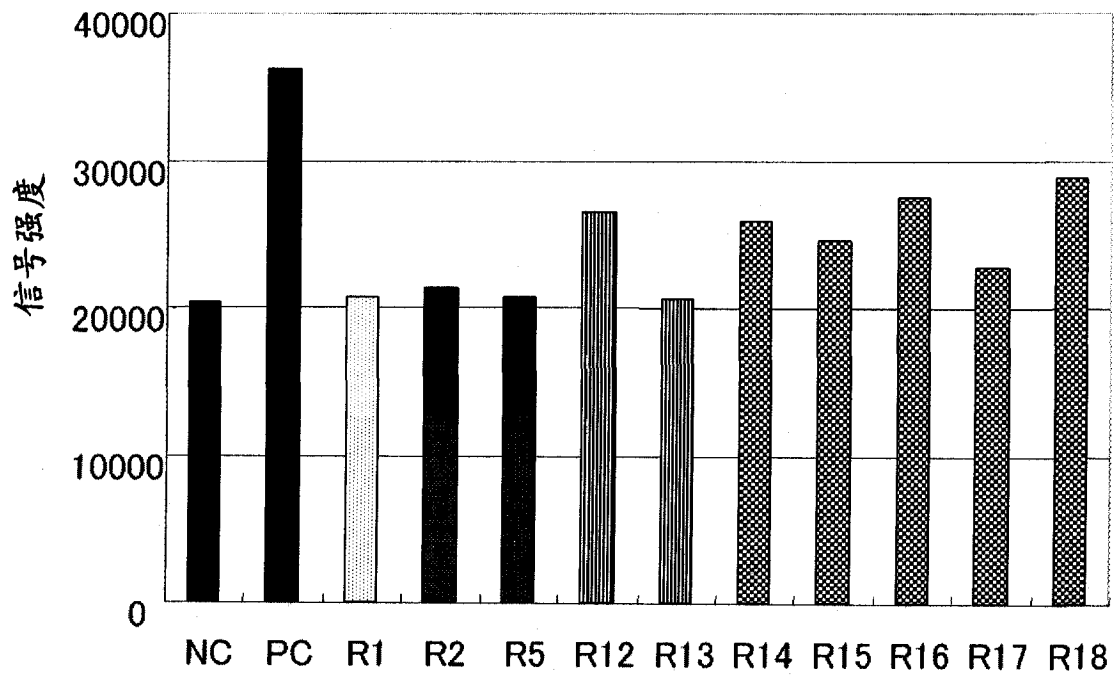


图 3

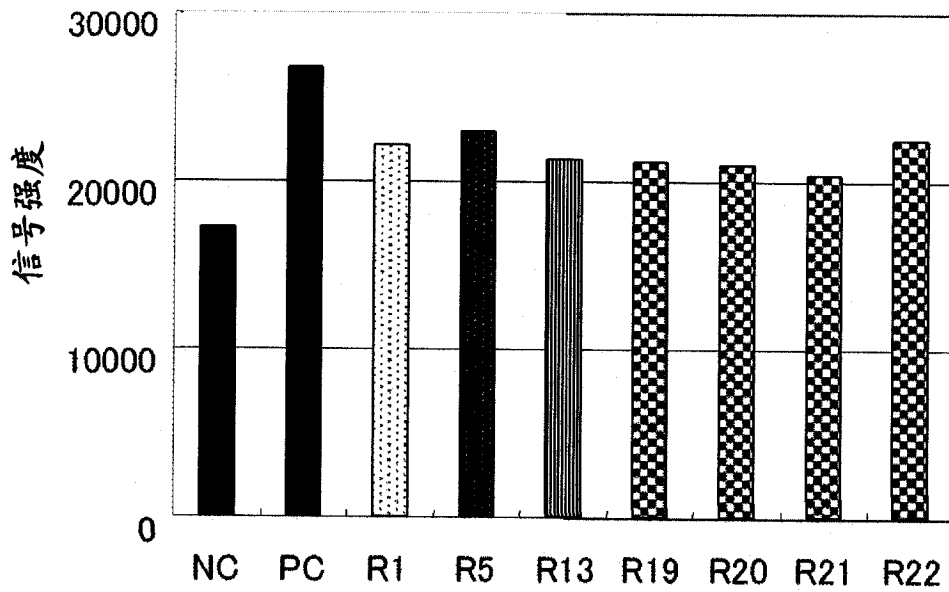


图 4

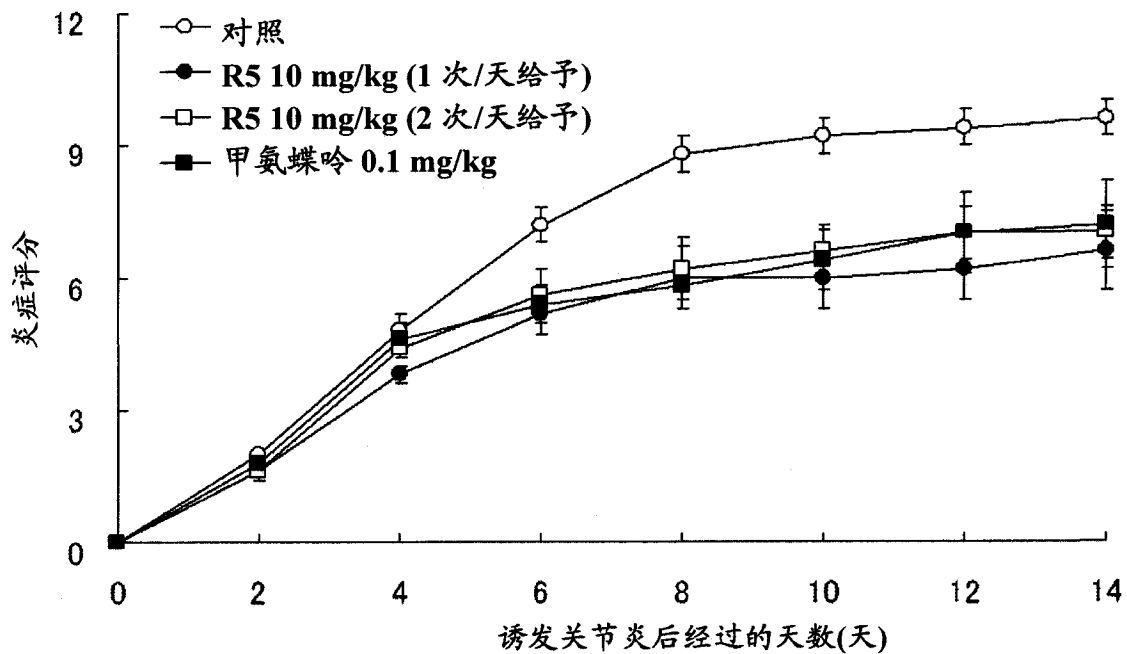


图 5

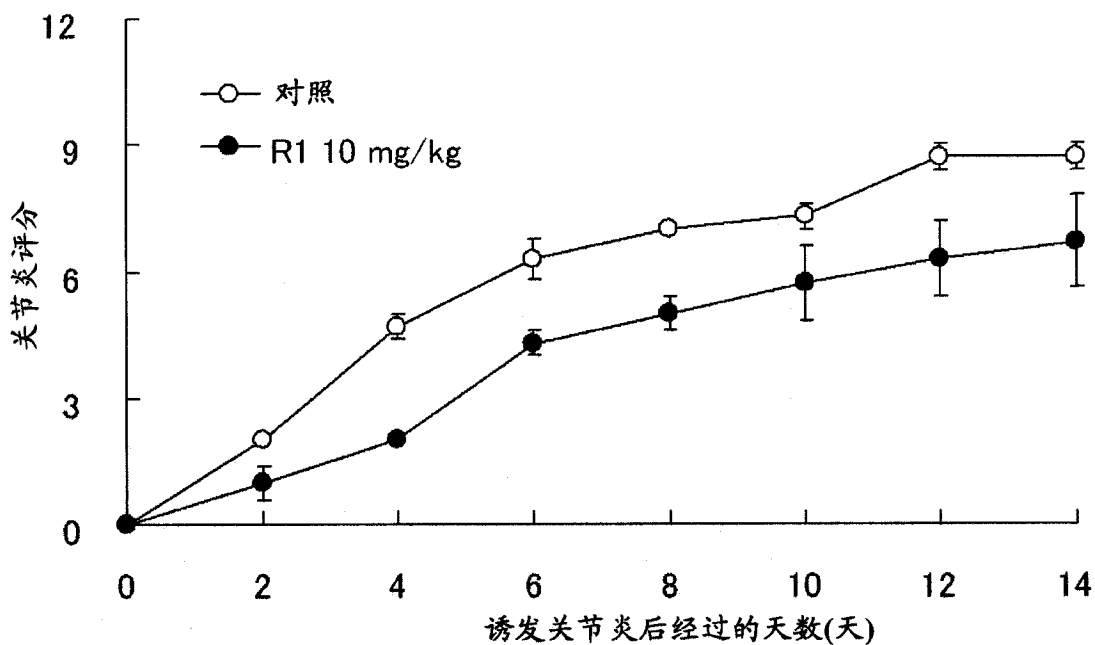


图 6

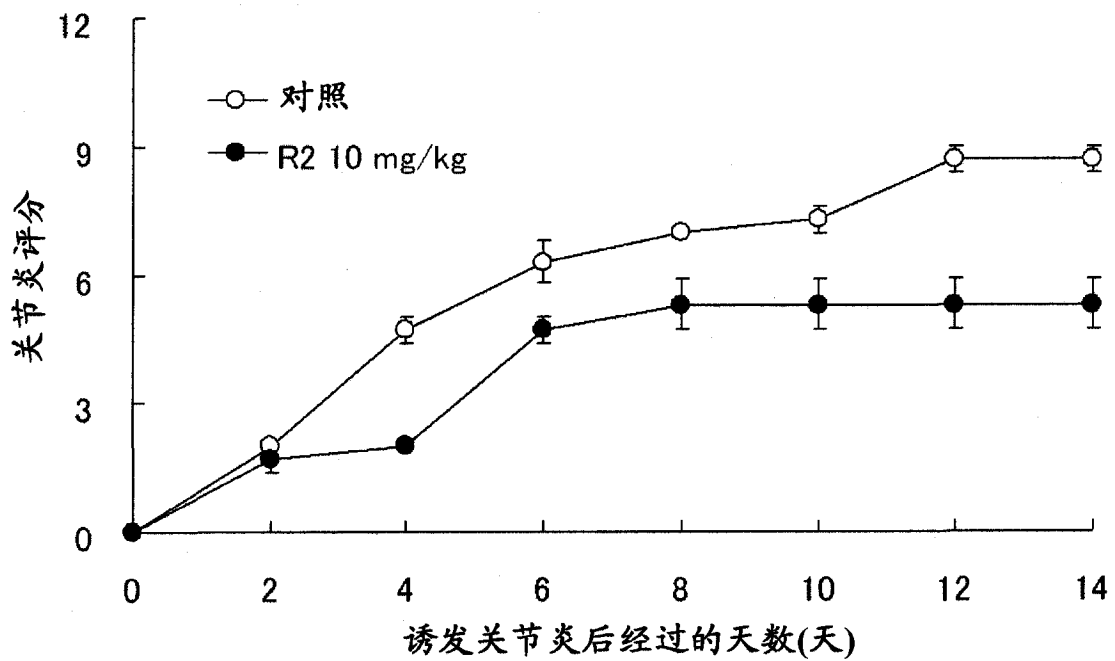


图 7

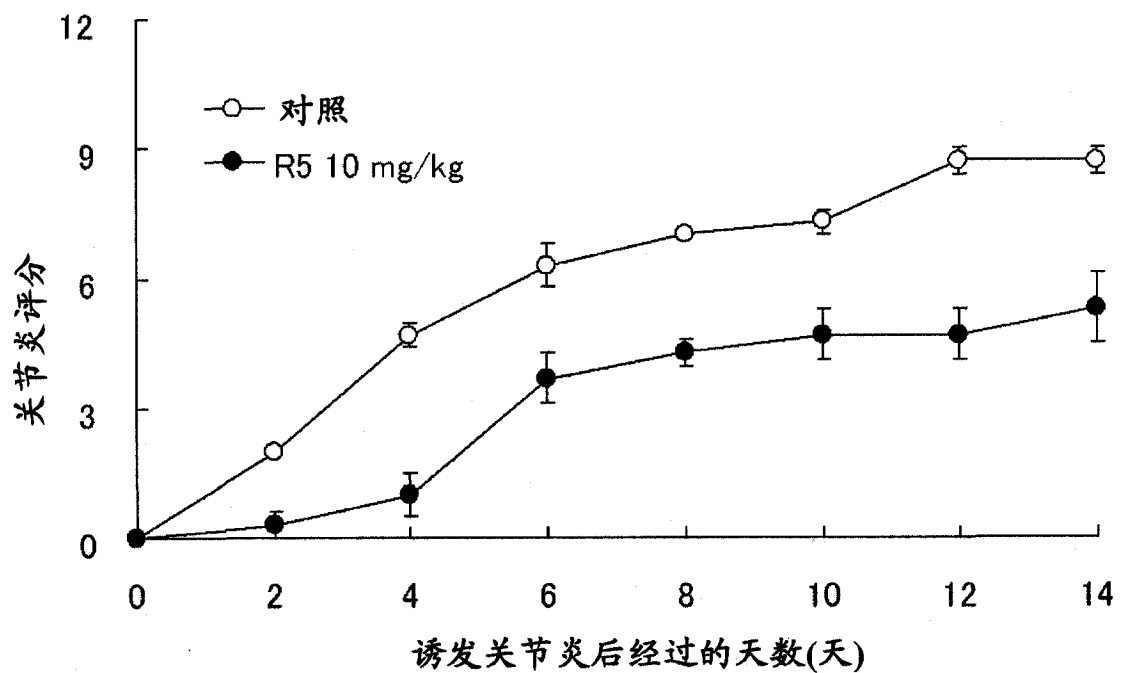


图 8

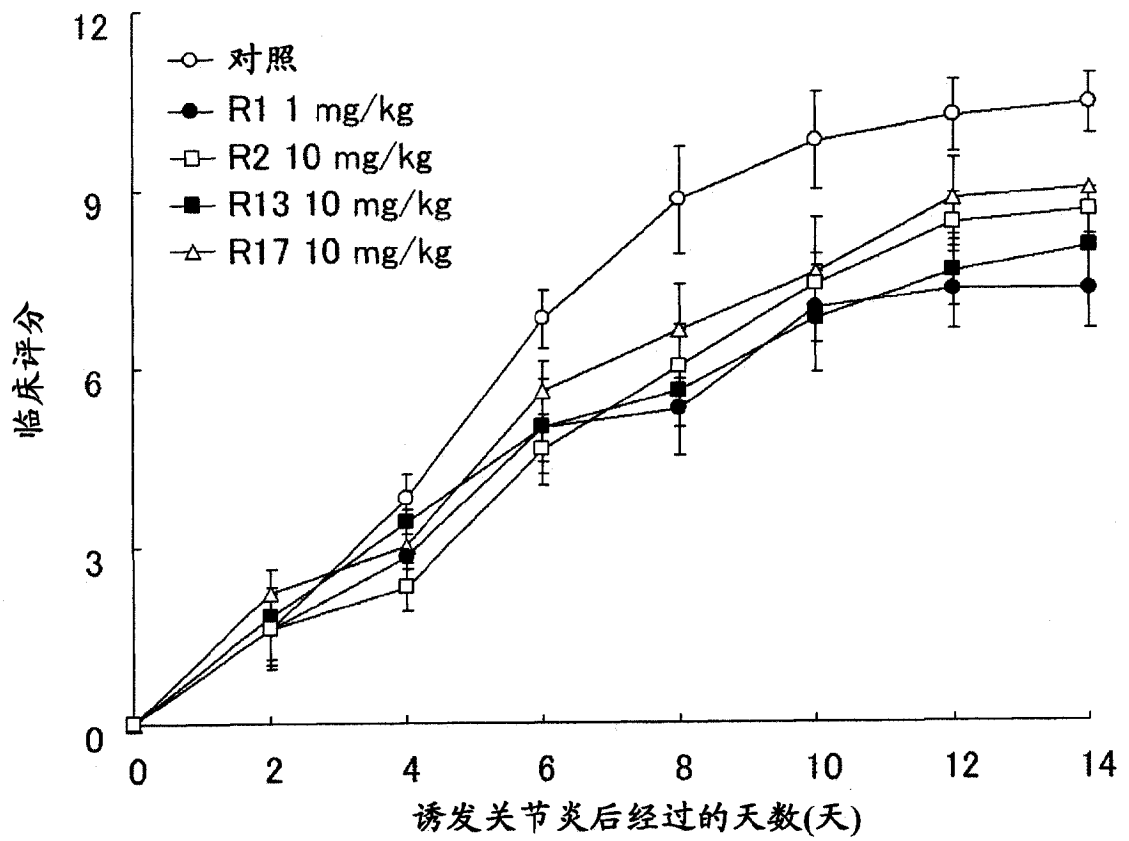


图 9

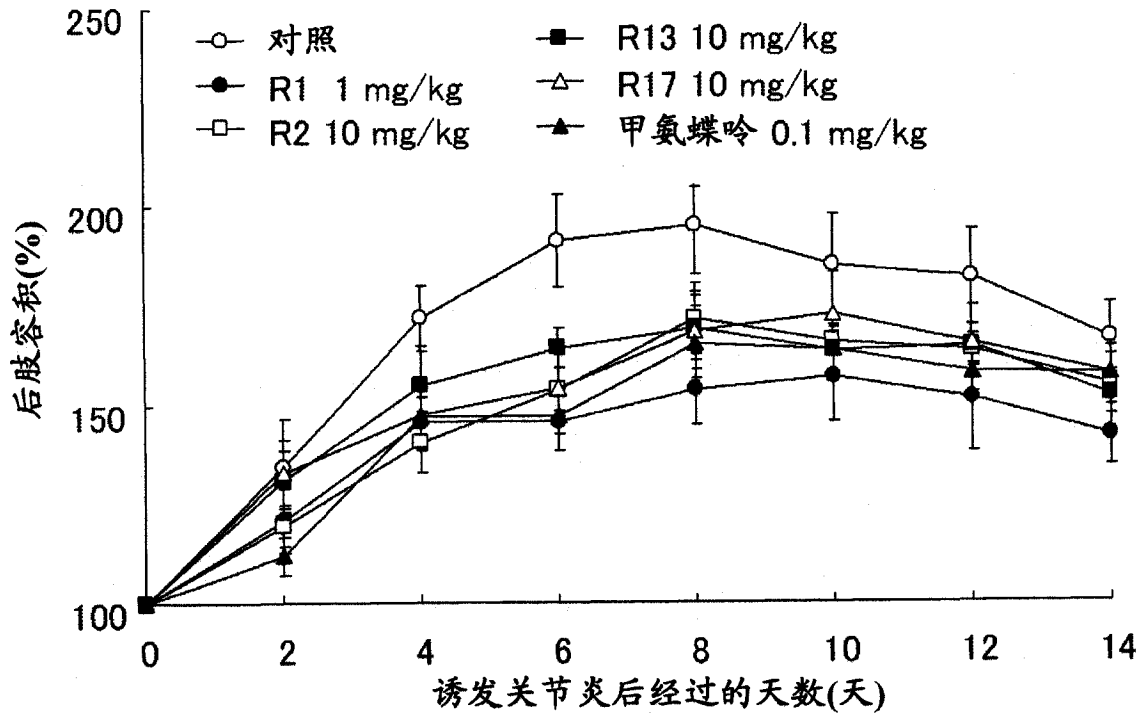


图 10

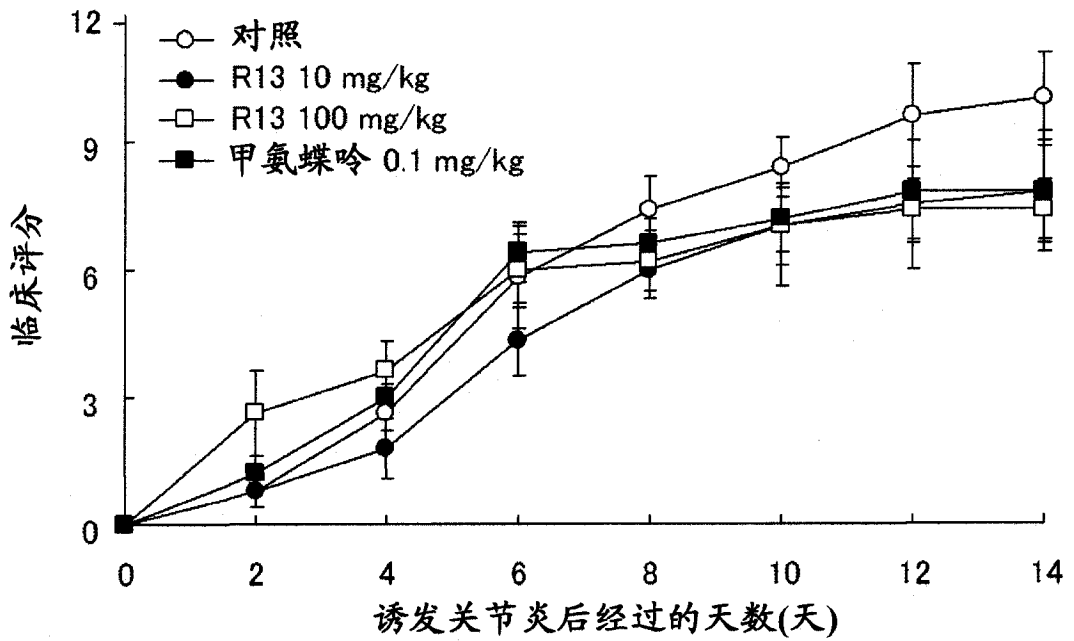


图 11

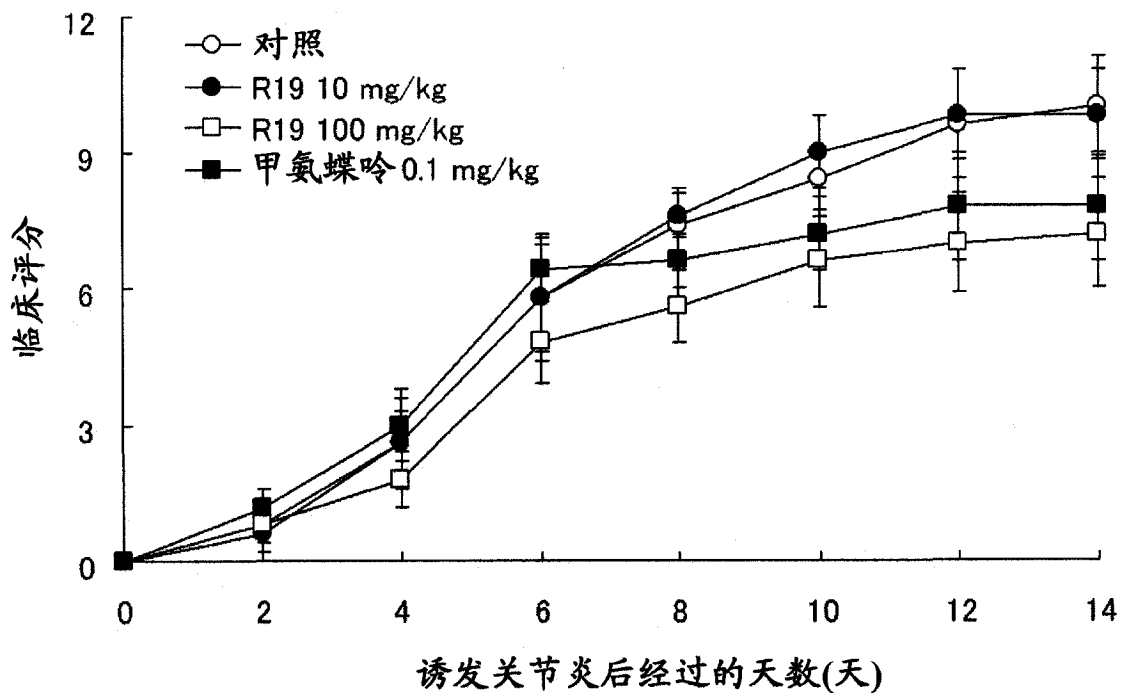


图 12

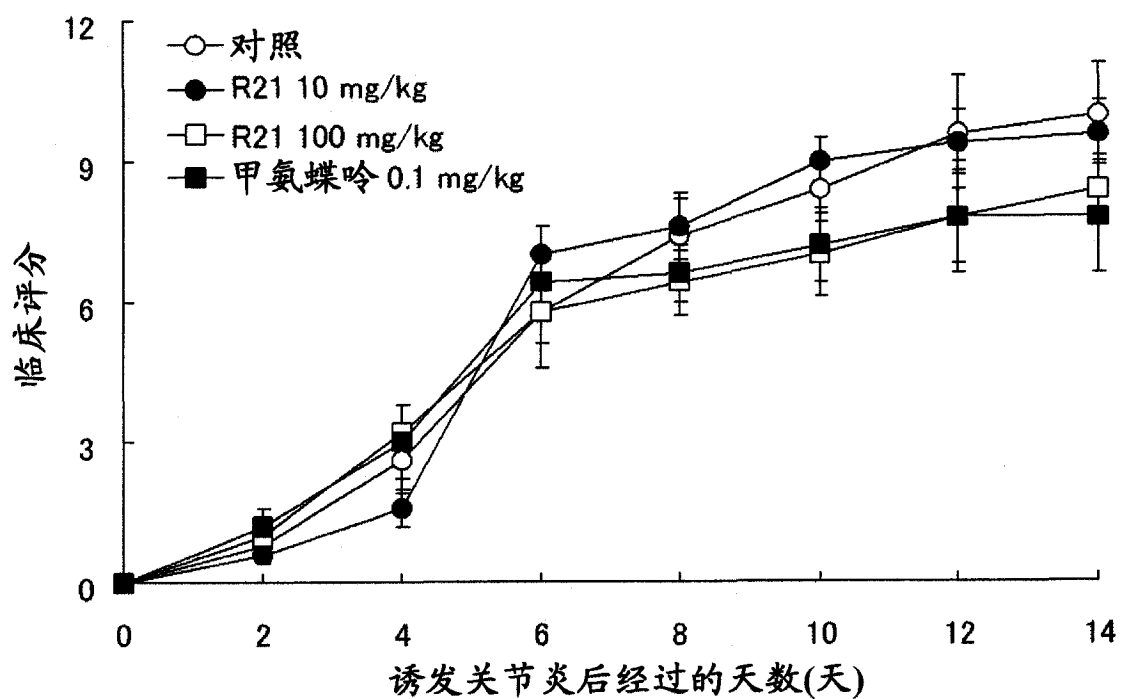


图 13

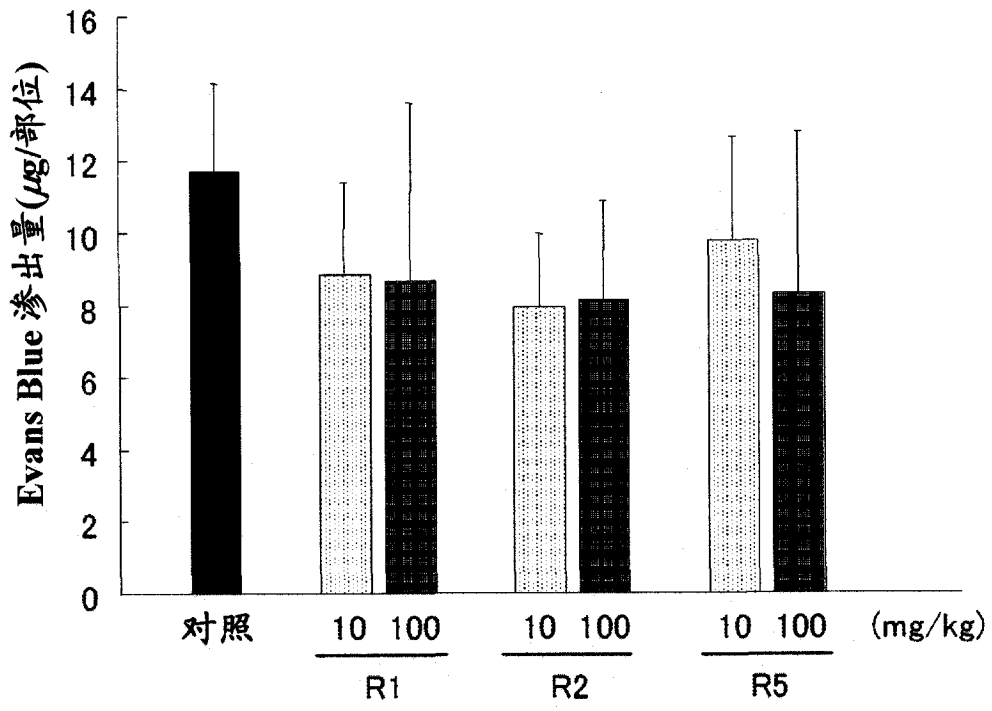


图 14

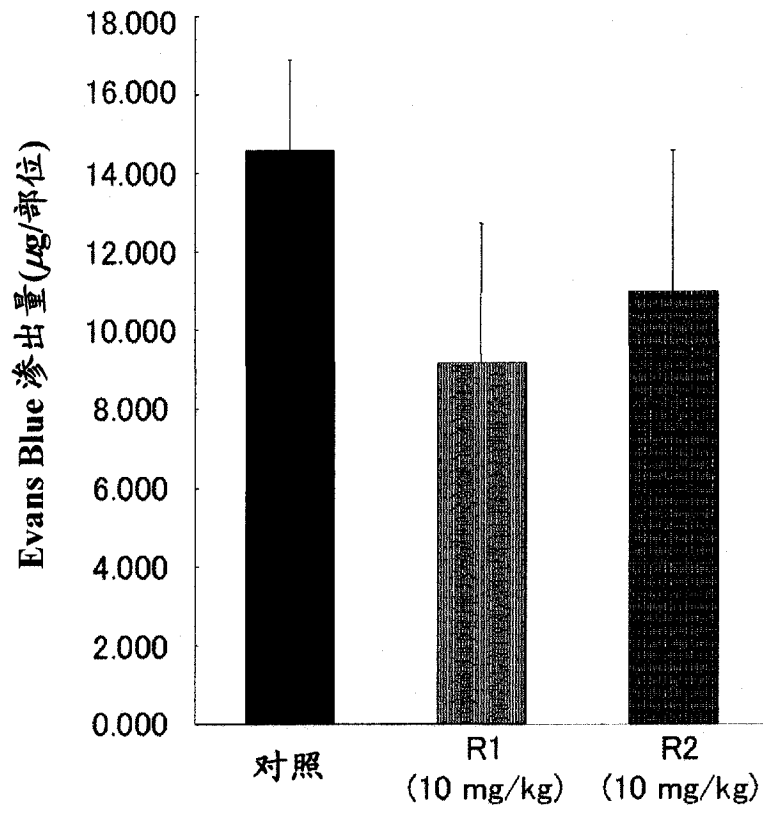


图 15

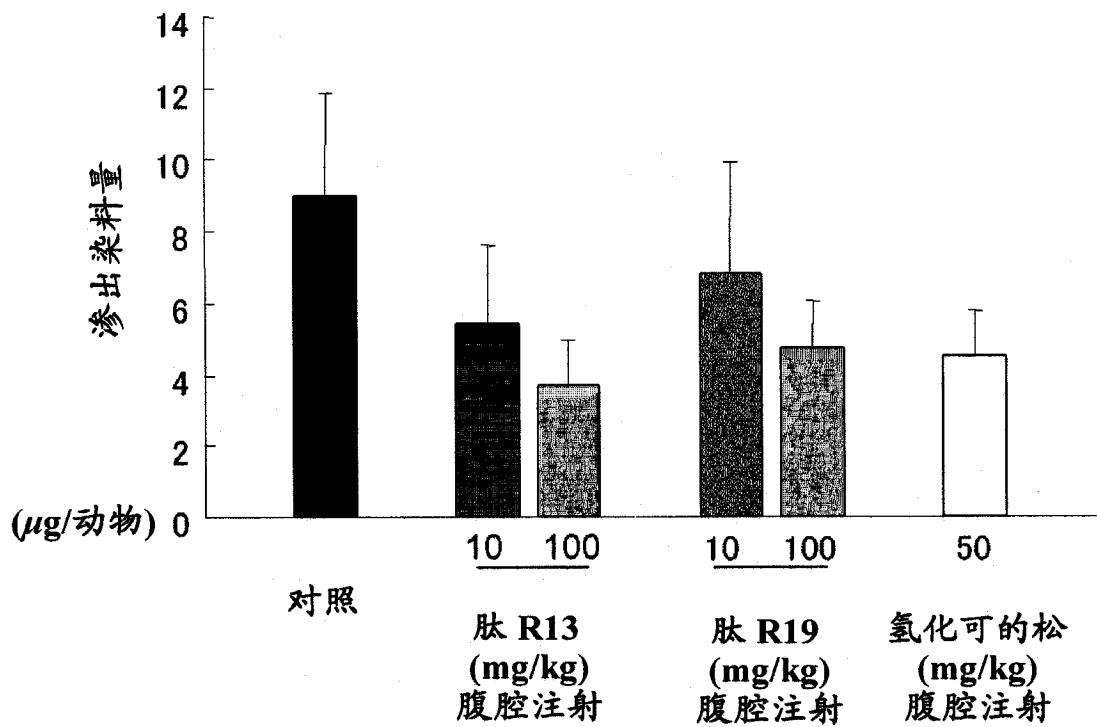


图 16

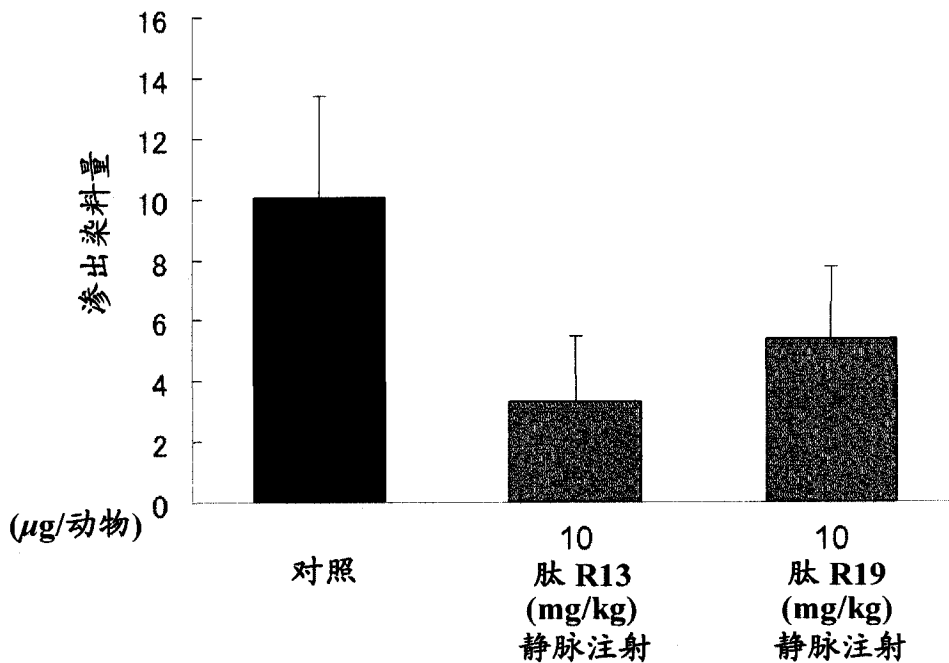


图 17

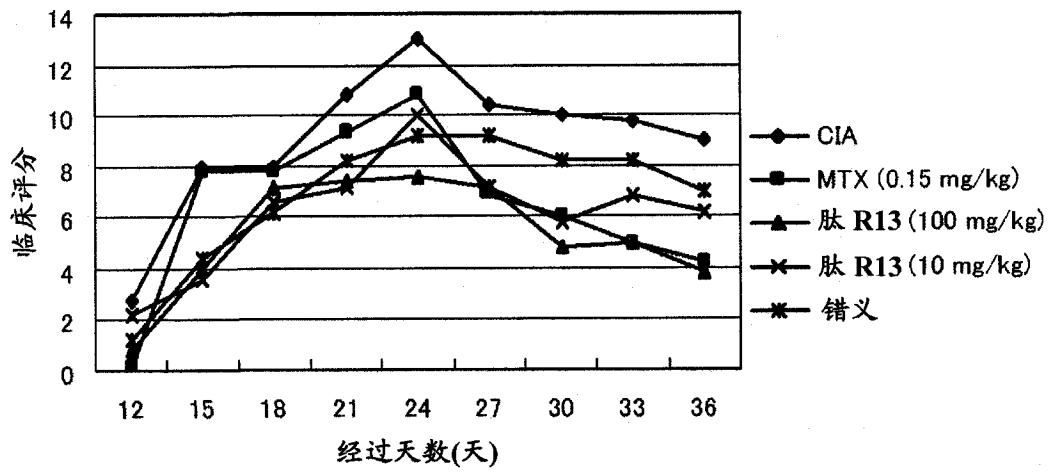


图 18

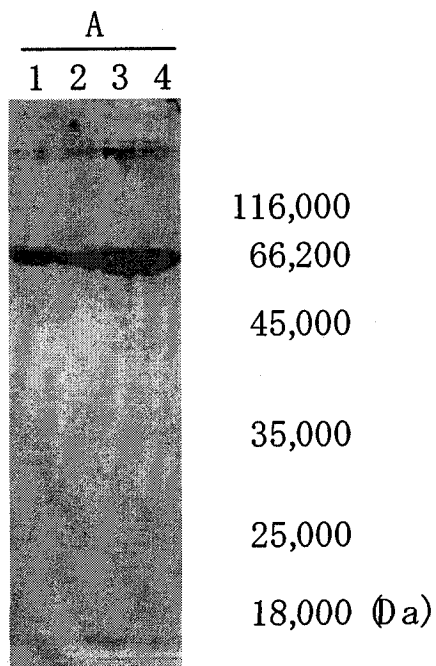


图 19

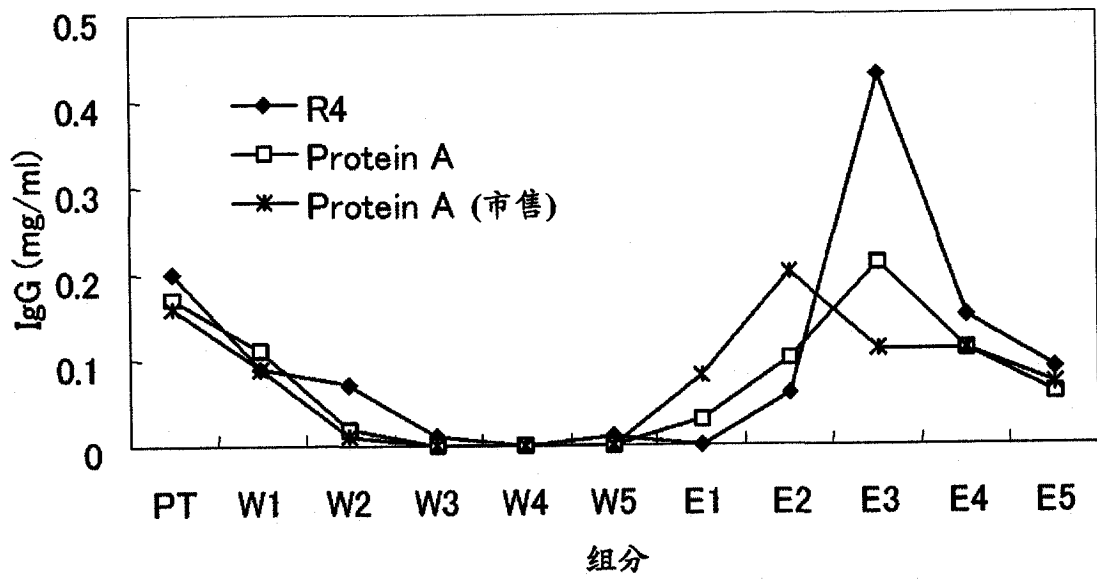


图 20

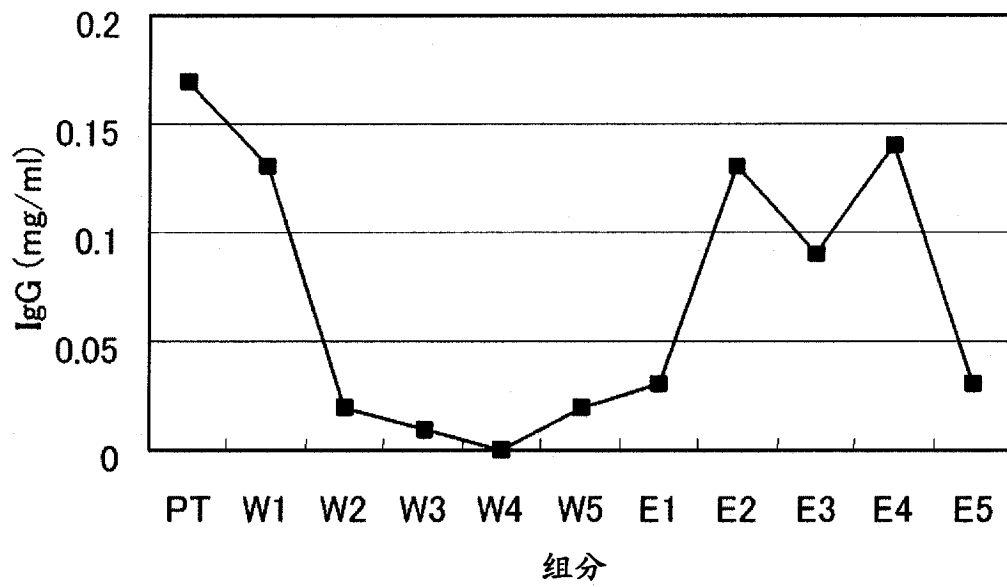


图 21

专利名称(译)	具有免疫球蛋白结合能力的肽		
公开(公告)号	CN102361979A	公开(公告)日	2012-02-22
申请号	CN201080014036.5	申请日	2010-01-19
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社MMT		
申请(专利权)人(译)	株式会社MMT		
当前申请(专利权)人(译)	株式会社MMT		
[标]发明人	真崎修		
发明人	真崎修		
IPC分类号	C12N15/09 A61K38/00 A61P9/00 A61P13/12 A61P19/02 A61P29/00 A61P37/02 C07K7/08 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/02 G01N33/53		
CPC分类号	A61K38/00 A61P13/12 A61P19/02 A61P29/00 C07K14/47 G01N33/564 G01N33/6854		
代理人(译)	吴娟 郭文洁		
优先权	2009012972 2009-01-23 JP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供具有免疫球蛋白结合能力的肽、以及与所述肽的融合蛋白、编码它们的核酸、制备方法、用于与免疫球蛋白结合的组合物以及手段、以及由于C1q与免疫球蛋白的结合而引起的疾病的治疗或预防用药物组合物等，该药物组合物包含具有免疫球蛋白结合能力的肽或与所述肽的融合蛋白。

