

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4705694号
(P4705694)

(45) 発行日 平成23年6月22日(2011.6.22)

(24) 登録日 平成23年3月18日(2011.3.18)

(51) Int.Cl.		F I	
C07K 7/06	(2006.01)	C O 7 K	7/06 Z N A
C07K 14/47	(2006.01)	C O 7 K	14/47
C07K 19/00	(2006.01)	C O 7 K	19/00
G01N 33/53	(2006.01)	G O 1 N	33/53 N
A61K 38/00	(2006.01)	A 6 1 K	37/02

請求項の数 13 (全 32 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2010-520369 (P2010-520369)	(73) 特許権者	500097119 株式会社エム・エム・ティー 大阪府大阪市中央区大手前2丁目1番2号
(86) (22) 出願日	平成22年1月19日(2010.1.19)	(74) 代理人	100081422 弁理士 田中 光雄
(86) 国際出願番号	PCT/JP2010/050539	(74) 代理人	100084146 弁理士 山崎 宏
(87) 国際公開番号	W02010/084851	(74) 代理人	100122301 弁理士 富田 憲史
(87) 国際公開日	平成22年7月29日(2010.7.29)	(72) 発明者	真崎 修 大阪府大阪市中央区大手前2丁目1番2号 株式会社エム・エム・ティー内
審査請求日	平成22年5月25日(2010.5.25)	審査官	高堀 栄二
(31) 優先権主張番号	特願2009-12972 (P2009-12972)		
(32) 優先日	平成21年1月23日(2009.1.23)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		
早期審査対象出願			
前置審査			

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 イミュノグロブリン結合能を有するペプチド

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

イミュノグロブリン結合能を有するペプチドであって、d P r o G l y d L e u d T y r d T y r d P h eで表されるアミノ酸配列からなるペプチド。

【請求項2】

請求項1記載のペプチドが目的のタンパク質のN末端および/またはC末端に付加されている融合タンパク質。

【請求項3】

請求項1記載のペプチド、または請求項2記載の融合タンパク質を含む、イミュノグロブリンを結合させるための組成物。

【請求項4】

イミュノグロブリンの存在若しくは量を決定するため、またはイミュノグロブリンを単離するためのものである、請求項3記載の組成物。

【請求項5】

請求項1記載のペプチド、または請求項2記載の融合タンパク質を固定化した、イミュノグロブリンを結合させるための手段。

【請求項6】

イミュノグロブリンの存在若しくは量を決定するためであるか、またはイミュノグロブリンを単離するためのものである、請求項5記載の手段。

【請求項7】

イミュノグロブリンを結合させる方法であって、
(a) 請求項 1 記載のペプチド、または請求項 2 記載の融合タンパク質を試料に添加し、
(b) ペプチドまたは融合タンパク質とイミュノグロブリンとの結合体を調べる、
を含む、方法。

【請求項 8】

請求項 7 記載の方法に用いるための、請求項 1 記載のペプチドまたは請求項 2 記載の融合タンパク質を含むキット。

【請求項 9】

請求項 1 記載のペプチド、または請求項 2 記載の融合タンパク質を含む、C 1 q とイミュノグロブリンとの結合により引き起こされる疾患の治療または予防用医薬組成物。

10

【請求項 10】

疾患が関節リウマチである、請求項 9 記載の医薬組成物。

【請求項 11】

疾患が全身性エリテマトーデス (S L E)、糸球体腎炎、血管炎、関節炎などの免疫複合体病である、請求項 9 記載の医薬組成物。

【請求項 12】

標識されている請求項 1 記載のペプチド、または請求項 2 記載の融合タンパク質。

【請求項 13】

請求項 1 2 記載の標識されているペプチドまたは融合タンパク質を試料中の抗体と反応させ、次いで抗体と結合した該ペプチドまたは融合タンパク質を検出することを特徴とする、試料中の抗体の検出方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、イミュノグロブリン結合能を有するペプチドおよびかかるペプチドとの融合タンパク質、それらをコードする核酸、製造方法、イミュノグロブリンを結合させるための組成物および手段に関するものである。本発明はまた、イミュノグロブリン結合能を有するペプチドまたはかかるペプチドとの融合タンパク質を含む、C 1 q とイミュノグロブリンとの結合により引き起こされる疾患の治療または予防用医薬組成物などに関するものである。

30

【背景技術】

【0002】

C 1 q は補体タンパク質の 1 つであり、補体活性化経路において作用することが知られている。例えば、古典経路の活性化は、C 1 q がイミュノグロブリン分子の F c 部分に結合することにより引き起こされるとされている。

【0003】

C 1 q が血中に多く存在する関節リウマチ (R A) 患者は、将来関節破壊に陥ることが報告されている (非特許文献 1) 。上述の C 1 q による活性化が関与していると考えられており、C 1 q とイミュノグロブリン分子との結合の阻害剤の開発が望まれている。

【0004】

40

C 1 q とイミュノグロブリン分子との結合に、C 1 q B サブユニット (B 鎖) のアルギニン残基が関与する可能性があることが報告されている (非特許文献 2) 。しかしながら、この報告は、コンピューターによるシミュレーションにより予測されたものであり、実際のイミュノグロブリン結合部位は明確にされていなかった。また、かかる結合部位の詳細なアミノ酸配列も分かっていなかった。

【0005】

イミュノグロブリンの精製において、Protein A または Protein G のようなイミュノグロブリンに特異的に結合するタンパク質が用いられている。しかしながら、これらのタンパク質は、イミュノグロブリンとの結合力が強いため、一旦結合させた後、分離させるのに、強い酸性バッファを用いるなどの厳しい条件を必要とする。そのため、イミュノグロ

50

ブリンの立体構造が崩れやすく、親和性の高い抗体を精製することができなかった。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Ochi T et al., Arthritis Rheum. 1988 Jan; 31(1): 37-43

【非特許文献2】Gaboriaud C et al., J Biol Chem. 2003 Nov 21; 278(47): 46974-82. Epub 2003 Sep 5

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明の解決課題は、イミュノグロブリン結合能を有するペプチドおよびかかるペプチドとの融合タンパク質、それらをコードする核酸、かかる核酸を含むベクターなどを提供することである。また、抗体の立体構造を破壊せず、抗原との親和性の高い抗体も精製することができる、新規抗体精製方法、およびそのための組成物および手段を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは、上記事情に鑑み鋭意研究を重ねた結果、C1qとイミュノグロブリンとの結合に關与するアミノ酸配列の同定に成功し、本発明を完成するに至った。また、驚くべきことに、かかるアミノ酸配列は、結合に關与すると報告されているアルギニン残基を含まないものであった。さらに、このアミノ酸配列を含むペプチドは、Protein AやProtein Gより弱くイミュノグロブリンと結合するので、抗体の立体構造の破壊や精製の対象となる抗体の制限（抗原との親和性が高い抗体を精製することができないなど）などの従来の抗体精製の際の問題を解消し、マイルドな条件下での抗体精製を可能にした。

【0009】

すなわち、本発明は、

(1) イミュノグロブリン結合能を有するペプチドであって、
 (a) 配列番号1～7のいずれかのアミノ酸配列を有するペプチド、
 (b) 配列番号1～7のいずれかのアミノ酸配列において、1または数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有するペプチド、および
 (c) 配列番号1～7のいずれかのアミノ酸配列と66.7%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有するペプチド、
 からなる群より選択され、ここで、ペプチド中のシステインは異なる種類のアミノ酸で置換されてもよい、ペプチド；

(2) ペプチド中のシステインがセリンで置換されている、(1)記載のペプチド；
 (3) 配列番号28～32のいずれかのアミノ酸配列を有するものである、(2)記載のペプチド；

(4) イミュノグロブリン結合能を有するペプチドであって、
 (a) 配列番号1～7のいずれかのアミノ酸配列を有するペプチド、
 (b) 配列番号1～7のいずれかのアミノ酸配列において、1または数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有するペプチド、および
 (c) 配列番号1～7のいずれかのアミノ酸配列と66.7%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有するペプチド、
 からなる群より選択され、ここで、ペプチド中のアミノ酸は対応するD-アミノ酸で置換されてもよい、ペプチド；

(5) 全てのアミノ酸が対応するD-アミノ酸で置換されている、(4)記載のペプチド；

(6) dPro Gly dLeu dTyr dTyr dPheで表されるアミノ酸配列を有するものである、(5)記載のペプチド；

(7) イミュノグロブリン結合能を有するペプチドであって、

10

20

30

40

50

- (a) 配列番号 1 ~ 7 のいずれかのアミノ酸配列を有するペプチド、
 (b) 配列番号 1 ~ 7 のいずれかのアミノ酸配列において、1 または数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有するペプチド、および
 (c) 配列番号 1 ~ 7 のいずれかのアミノ酸配列と 66.7 % 以上の相同性を有するアミノ酸配列を有するペプチド、
 からなる群より選択され、ここで、ペプチド中のシステインは異なる種類のアミノ酸で置換されてもよく、かつペプチド中のアミノ酸は対応する D - アミノ酸で置換されてもよい、ペプチド；
 (8) ペプチド中のシステインが異なる種類のアミノ酸で置換され、かつ全てのアミノ酸が対応する D - アミノ酸で置換されている、(7) 記載のペプチド； 10
 (9) イミュノグロブリン結合能を有するペプチドをコードする核酸であって、
 (a) (1) 記載のペプチドをコードする核酸、
 (b) 配列番号 33 ~ 37 のいずれかのヌクレオチド配列を有する核酸、
 (c) 配列番号 33 ~ 37 のいずれかのヌクレオチド配列において、1 または数個のヌクレオチドが欠失、置換若しくは付加されたヌクレオチド配列を有する核酸、
 (d) 前記 (b) または (c) の核酸またはその相補鎖とストリンジェントな条件下でハイブリッド形成し得る核酸、
 (e) 配列番号 33 ~ 37 のいずれかのヌクレオチド配列と 50 % 以上の相同性を有するヌクレオチド配列を有する核酸、
 からなる群より選択される、核酸； 20
 (10) 配列番号 33 ~ 37 のいずれかのヌクレオチド配列を有するものである、(9) 記載の核酸；
 (11) (9) または (10) 記載の核酸を含むベクター；
 (12) (1) ~ (3) のいずれか記載のペプチドが目的のタンパク質の N 末端および / または C 末端に付加されている融合タンパク質；
 (13) (4) ~ (8) のいずれか記載のペプチドが目的のタンパク質の N 末端および / または C 末端に付加されている融合タンパク質；
 (14) (12) 記載の融合タンパク質をコードする核酸；
 (15) (14) 記載の核酸を含むベクター；
 (16) (9) 若しくは (10) 記載の核酸または (14) 記載の核酸、あるいは (11) 30
) または (15) 記載のベクターを含む、細胞；
 (17) イミュノグロブリン結合能を有するペプチドの製造方法であって、
 (a) (11) 記載のベクターを用いて細胞を形質転換し、
 (b) 該細胞を培養して、ペプチドを産生させる、
 工程を含む、方法；
 (18) (17) 記載の方法により得ることのできる、イミュノグロブリン結合能を有するペプチド；
 (19) イミュノグロブリン結合能を有するペプチドが目的のタンパク質の N 末端および / または C 末端に付加した融合タンパク質の製造方法であって、
 (a) (15) 記載のベクターを用いて細胞を形質転換し、 40
 (b) 該細胞を培養して、融合タンパク質を産生させる、
 を含む、方法；
 (20) 融合タンパク質から目的タンパク質を取り出す工程をさらに含む、(19) 記載の方法；
 (21) (19) または (20) 記載の方法により得ることのできる、融合タンパク質；
 (22) (1) ~ (8) のいずれか記載のペプチド、または (12) 若しくは (13) 記載の融合タンパク質を含む、イミュノグロブリンを結合させるための組成物；
 (23) イミュノグロブリンの存在若しくは量を決定するため、またはイミュノグロブリンを単離するためのものである、(22) 記載の組成物；
 (24) (1) ~ (8) のいずれか記載のペプチド、または (12) 若しくは (13) 記 50

載の融合タンパク質を固定化した、イミュノグロブリンを結合させるための手段；

(25) イミュノグロブリンの存在若しくは量を決定するためであるか、またはイミュノグロブリンを単離するためのものである、(24)記載の手段；

(26) イミュノグロブリンを結合させる方法であって、

(a) (1) ~ (8) のいずれか記載のペプチド、または(12)若しくは(13)記載の融合タンパク質を試料に添加し、

(b) ペプチドまたは融合タンパク質とイミュノグロブリンとの結合体を調べる、を含む、方法；

(27) (26)記載の方法に用いるための、イミュノグロブリン結合能を有するペプチドまたはかかるペプチドを含む融合タンパク質を含むキット；

10

(28) (1) ~ (8) のいずれか記載のペプチド、または(12)若しくは(13)記載の融合タンパク質を含む、C1qとイミュノグロブリンとの結合により引き起こされる疾患の治療または予防用医薬組成物；

(29) 疾患が関節リウマチである、(28)記載の医薬組成物；

(30) 疾患が全身性エリテマトーデス(SLE)、糸球体腎炎、血管炎、関節炎などの免疫複合体病である、(28)記載の医薬組成物；

(31) 標識されている(1) ~ (8) のいずれか記載のペプチド、または(12)若しくは(13)記載の融合タンパク質；

(32) (31)記載の標識されているペプチドまたは融合タンパク質を試料中の抗体と反応させ、次いで抗体と結合した該ペプチドまたは融合タンパク質を検出することを特徴とする、試料中の抗体の検出方法

20

に関するものである。

【発明の効果】

【0010】

本発明により、イミュノグロブリン結合能を有するペプチドおよびかかるペプチドとの融合タンパク質、それらをコードする核酸、製造方法、イミュノグロブリンを結合させるための組成物および手段、およびイミュノグロブリン結合能を有するペプチドまたはかかるペプチドとの融合タンパク質を含む、C1qとイミュノグロブリンとの結合により引き起こされる疾患の治療または予防用医薬組成物などが提供される。

【図面の簡単な説明】

30

【0011】

【図1】図1は、6アミノ酸を有するペプチドR1、9アミノ酸を有するペプチドR2、15アミノ酸を有するペプチドR3~R6がC1qとイミュノグロブリンの結合を阻害することを示す。図中、NCはペプチドを含まないDMSOを、アルカリホスファターゼ(ALP)標識ヒトイミュノグロブリン(IgG)を含まない反応液に添加したサンプルの結果であって、PCはペプチドを含まないDMSOを、アルカリホスファターゼ(ALP)標識ヒトイミュノグロブリン(IgG)を含む反応液に添加したサンプルの結果である。

【図2】図2は、6アミノ酸を有する変異ペプチドR7~R9、9アミノ酸を有する変異ペプチド10、15アミノ酸を有する変異ペプチドR11がC1qとイミュノグロブリンの結合を阻害することを示す。図中、NCはペプチドを含まないDMSOを、アルカリホスファターゼ(ALP)標識ヒトイミュノグロブリン(IgG)を含まない反応液に添加したサンプルの結果であって、PCはペプチドを含まないDMSOを、アルカリホスファターゼ(ALP)標識ヒトイミュノグロブリン(IgG)を含む反応液に添加したサンプルの結果である。

40

【図3】図3は、変異ペプチドR12~18がC1qとイミュノグロブリンの結合を阻害することを示す。図中、NCはペプチドを含まないDMSOを、アルカリホスファターゼ(ALP)標識ヒトイミュノグロブリン(IgG)を含まない反応液に添加したサンプルの結果であって、PCはペプチドを含まないDMSOを、アルカリホスファターゼ(ALP)標識ヒトイミュノグロブリン(IgG)を含む反応液に添加したサンプルの結果であ

50

る。

【図4】図4は、変異ペプチドR19～22がC1qと免疫グロブリンの結合を阻害することを示す。図中、NCはペプチドを含まないDMSOを、アルカリホスファターゼ（ALP）標識ヒト免疫グロブリン（IgG）を含まない反応液に添加したサンプルの結果であって、PCはペプチドを含まないDMSOを、アルカリホスファターゼ（ALP）標識ヒト免疫グロブリン（IgG）を含む反応液に添加したサンプルの結果である。

【図5】図5は、10mg/kgのペプチドR5の腹腔内投与（1回/1日投与または2回/1日投与）により、関節炎誘発マウスにおいて関節炎が抑制されたことを示す。対照として、ペプチドを含まない0.5%メチルセルロース溶液を1回/1日投与したマウスの結果、および0.1mg/kgのメトトレキサート溶液を1回/1日投与したマウスの結果を示す。

10

【図6】図6は、10mg/kgのペプチドR1の腹腔内投与により、関節炎誘発マウスにおいて関節炎が抑制されたことを示す。対照として、ペプチドを含まない0.5%メチルセルロース溶液を同様に投与したマウスの結果を示す。

【図7】図7は、10mg/kgのペプチドR2の腹腔内投与により、関節炎誘発マウスにおいて関節炎が抑制されたことを示す。対照として、ペプチドを含まない0.5%メチルセルロース溶液を同様に投与したマウスの結果を示す。

【図8】図8は、10mg/kgのペプチドR5の腹腔内投与により、関節炎誘発マウスにおいて関節炎が抑制されたことを示す。対照として、ペプチドを含まない0.5%メチルセルロース溶液を同様に投与したマウスの結果を示す。

20

【図9】図9は、10mg/kgのペプチドR2若しくはR13を腹腔内投与したか、または1mg/kgのR1若しくは10mg/kgのR17を静脈内投与した関節炎誘発マウスにおける臨床スコアの変化を示す。対照として、ペプチドを含まない生理食塩水を同様に投与したマウスの結果を示す。

【図10】図10は、10mg/kgのペプチドR2若しくはR13を腹腔内投与したか、または1mg/kgのR1若しくは10mg/kgのR17を静脈内投与した関節炎誘発マウスにおける後肢容積の変化を示す。対照として、ペプチドを含まない生理食塩水または0.1mg/kgのメトトレキサートを腹腔内投与したマウスの結果を示す。

【図11】図11は、10mg/kgまたは100mg/kgのペプチドR13を腹腔内投与した関節炎誘発マウスにおける臨床スコアの変化を示す。対照として、ペプチドを含まない生理食塩水または0.1mg/kgのメトトレキサートを腹腔内投与したマウスの結果を示す。

30

【図12】図12は、10mg/kgまたは100mg/kgのペプチドR19を腹腔内投与した関節炎誘発マウスにおける臨床スコアの変化を示す。対照として、ペプチドを含まない生理食塩水または0.1mg/kgのメトトレキサートを腹腔内投与したマウスの結果を示す。

【図13】図13は、10mg/kgまたは100mg/kgのペプチドR21を腹腔内投与した関節炎誘発マウスにおける臨床スコアの変化を示す。対照として、ペプチドを含まない生理食塩水または0.1mg/kgのメトトレキサートを腹腔内投与したマウスの結果を示す。

40

【図14】図14は、10mg/kgまたは100mg/kgのペプチドR1、R2またはR5の腹腔内投与により、III型アレルギー（アルサス）反応誘発ラットにおいてSLE、糸球体腎炎、血管炎、関節炎などの免疫複合体病が抑制されたことを示す。対照として、ペプチドを含まない生理食塩水を同様に投与したラットの結果を示す。

【図15】図15は、10mg/kgのペプチドR1またはR2の尾静脈内投与により、III型アレルギー（アルサス）反応誘発ラットにおいてSLE、糸球体腎炎、血管炎、関節炎などの免疫複合体病が抑制されたことを示す。対照として、ペプチドを含まない生理食塩水を同様に投与したラットの結果を示す。

【図16】図16は、10mg/kgまたは100mg/kgのペプチドR13またはR

50

19の腹腔内投与により、III型アレルギー（アルサス）反応誘発ラットにおいてSLE、糸球体腎炎、血管炎、関節炎などの免疫複合体病が抑制されたことを示す。陰性対照としてペプチドを含まない生理食塩水、および陽性対照としてヒドロコルチゾン50mg/kgを同様に投与したラットの結果を示す。

【図17】図17は、10mg/kgでのペプチドR13またはR19の尾静脈内投与により、III型アレルギー（アルサス）反応誘発ラットにおいてSLE、糸球体腎炎、血管炎、関節炎などの免疫複合体病が抑制されたことを示す。陰性対照としてペプチドを含まない生理食塩水を同様に投与したラットの結果を示す。

【図18】図18は、R13ペプチドを100mg/kgまたは10mg/kgで投与することにより、関節炎抑制効果が確認されたことを示す。陰性対照として、生理食塩水またはスクランブルペプチドを同様に投与した群（グラフ中、CIAまたはスクランブルとして示す）、陽性対照として、メトトレキサートを同様に投与した群（グラフ中、MTX（0.15mg/kg）として示す）の結果を示す。

【図19】図19は、本発明のペプチドにより、抗体が検出できたことを示す図である。各レーンに用いたBSAの量を以下に示す：レーン1 BSA 0.1μg、レーン2 BSA 0.5μg、レーン3 BSA 1.0μg、レーン4 BSA 2.0μg

【図20】図20は、本発明のペプチドを用いたアフィニティー精製用カラムによってウサギ抗体が精製できたことを示す図である。対照として、Protein Aを用いて精製した結果を示す。値は、それぞれのフラクションに含まれるIgGタンパク質量（mg/ml）を示す。図中、PTは未吸着フラクション、W1～5は洗浄フラクション、E1～5は溶出フラクションを示す。

【図21】図21は、本発明のペプチドを用いたアフィニティー精製用カラムによってヒト抗体が精製できたことを示す図である。値は、それぞれのフラクションに含まれるIgGタンパク質量（mg/ml）を示す。図中、PTは未吸着フラクション、W1～5は洗浄フラクション、E1～5は溶出フラクションを示す。

【発明を実施するための形態】

【0012】

本発明は、1の態様において、イミュノグロブリン結合能を有するペプチドであって、
 (a) 配列番号1～7のいずれかのアミノ酸配列を有するペプチド、
 (b) 配列番号1～7のいずれかのアミノ酸配列において、1または数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有するペプチド、および
 (c) 配列番号1～7のいずれかのアミノ酸配列と66.7%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有するペプチド、

からなる群より選択され、ここで、ペプチド中のシステインは異なる種類のアミノ酸で置換されてもよく、かつ/またはペプチド中のアミノ酸は対応するD-アミノ酸で置換されてもよい、ペプチドに関するものである。本発明のペプチドは、Protein AおよびProtein Gと比較して、イミュノグロブリンとの結合能が弱く、そのため、例えば、本発明のペプチドと結合したイミュノグロブリンをマイルドな条件下で解離することなどが可能となる。また、本発明のペプチドと結合したイミュノグロブリン自体の変性も低減される。結合能は、当該技術分野において既知の方法により調べることができる。例えば、ペプチドをイミュノグロブリン存在下でインキュベートし、結合するかどうかを直接調べてもよい。

【0013】

本発明のペプチドは、ペプチド中のシステインが異なる種類のアミノ酸で置換されていてもよい。上記異なる種類のアミノ酸としては、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、トレオニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミン、リシン、アルギニン、システイン、メチオニン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、ヒスチジンおよびプロリンなどのアミノ酸のL体およびD体に加えて、D-アラニン、D-アミノ酪酸（GABA）、5-アミノレブリン酸、5-アミノ吉草酸、ホモシステイン、オルニチン、5-ヒドロキシトリプトファン、3,4-ジヒドロキシフェニルアラニン（ドーパ）、トリヨードチロニン、チロキシン、ホモリジン、ノル

10

20

30

40

50

ロイシン、クレアチン、デスモシン、ノルバリンおよびヨードチロシンなどの非天然アミノ酸のL体およびD体が挙げられる。好ましくは、本願発明のペプチドは、ペプチド中のシステインがセリンに置換されているものである。また、本発明のペプチドは、ペプチド中のアミノ酸が対応するD-アミノ酸で置換されてもよい。詳細には、配列番号1~7のいずれかのアミノ酸配列において、1個以上、好ましくは、1または数個、例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14個または15個のアミノ酸を対応するD-アミノ酸で置換してもよい。対応するD-アミノ酸としては、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、トレオニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミン、リシン、アルギニン、システイン、メチオニン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、ヒスチジンおよびプロリンなどのアミノ酸のD体に加えて、上記非天然アミノ酸のD体であってもよい。好ましくは、本願発明のペプチドは、全てのアミノ酸が対応するD-アミノ酸で置換されているものである。あるいは、本願発明のペプチドは、ペプチド中のシステインが上記の異なる種類のアミノ酸で置換され、かつペプチド中のアミノ酸が上記の対応するD-アミノ酸で置換されていてもよい。好ましくは、本願発明のペプチドは、ペプチド中のシステインがセリンに置換され、かつ全てのアミノ酸が対応するD-アミノ酸で置換されているものである。いずれのアミノ酸配列を有する場合であっても、本発明のペプチドは免疫グロブリン結合能を有するものである。さらに、本発明のペプチドは、天然のタンパク質由来のアミノ酸配列を改変することによってタンパク質分解を受けにくく、投与した対象の体内において高い安定性および長い半減期を有する。

【0014】

本発明のペプチドは、免疫グロブリン結合能を有するものである。かかるペプチドは、配列番号28~32のいずれかのアミノ酸配列またはdProGlydLeudTyr dTyr dPheで表されるアミノ酸配列を有するペプチドであってもよく、上記アミノ酸配列の内部、N末端および/またはC末端において、1個以上、好ましくは、1または数個、例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、または14個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有するペプチド(変異ペプチド)、および上記アミノ酸配列と例えば、26.6%以上または44.4%以上、好ましくは、少なくとも50%以上、より好ましくは、例えば、60、66.7、70、75、80、83.3、85、90、93%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有するペプチドであってもよい。なお、本明細書において、「dL(dLeu)」、「dP(dPro)」、「dA(dAla)」、「dY(dTyr)」および「dF(dPhe)」、「dS(dSer)」、「dK(dLys)」、「dV(dVal)」、「dT(dThr)」、「dH(dHis)」は、それぞれロイシン、プロリン、アラニン、チロシン、フェニルアラニン、セリン、リシン、バリン、トレオニン、ヒスチジンのD体を表す。さらに、アミノ酸配列の相同性は、短鎖ペプチドの場合、単純に配列を比較し計算することもできる。あるいは、FASTA、BLAST、DNASIS(日立ソフトウェアエンジニアリング(株)製)、GENETYX((株)ジェネティクス製)を用いて測定することができる。さらに、これらのアミノ酸のいずれかが適宜修飾されたものであってもよい。いずれのアミノ酸配列を有する場合であっても、本発明のペプチドは免疫グロブリン結合能を有するものである。

【0015】

本発明のペプチドは、上記アミノ酸配列を有するものであればいずれのものであってもよい。例えば、本発明のペプチドは、配列番号28~32のいずれかのアミノ酸配列またはdProGlydLeudTyr dTyr dPheで表されるアミノ酸配列からなるペプチドそのものであってもよい。あるいは、上記アミノ酸配列またはその相同配列をコア配列として含み、かつかかるアミノ酸配列のN末端および/またはC末端に、ペプチドまたはアミノ酸、それらのアナログ、ポリエチレングリコール、糖、多糖、ヌクレオチドなどの種々の物質の結合したものであってもよい。N/C末端にアミノ酸またはペプチドを介して、あるいは利用可能な官能基を用いてアミノ酸配列の内部に、蛍光標識、ピ

10

20

30

40

50

オチン、ストレプトアビジン、ジコキシゲニン(DIG)、磁気ビーズ、ラテックスビーズ、金コロイドなどの物質が結合していてもよい。例えば、ペプチドが結合する場合、かかるペプチドは、1個~50個、例えば、1~20個、1~15個、1~9個のアミノ酸からなるものであってもよい。また、かかるペプチドが、ヒスチジンタグ、GSTタグ、Sタグ、Mycタグ、HAタグ、またはEタグとしての機能などの機能を有するものであってもよい。

【0016】

本発明のペプチドは、当業者に既知の種々の方法により製造および取得することができる。例えば、本発明のペプチドをコードするヌクレオチド配列に基づき遺伝子工学的に製造するか、またはペプチド固相合成法などに従って化学的に合成してもよく、あるいはそれらを組み合わせて製造および取得してもよい。本発明のペプチドは、上述の通り免疫グロブリン結合能を有するので、かかるペプチドを用いて免疫グロブリンを結合させ、免疫グロブリンの存在または量を決定すること、免疫グロブリンを単離することなどが可能である。

【0017】

本発明は、もう1つの態様において、免疫グロブリン結合能を有するペプチドをコードする核酸であって、

(a) 配列番号28~32のいずれかのアミノ酸配列またはその相同配列を有するペプチドをコードする核酸、

(b) 配列番号33~37のいずれかのヌクレオチド配列を有する核酸、

(c) 配列番号33~37のいずれかのヌクレオチド配列において、1または数個のヌクレオチドが欠失、置換若しくは付加されたヌクレオチド配列を有する核酸、

(d) 前記(b)または(c)の核酸またはその相補鎖とストリンジェントな条件下でハイブリッド形成し得る核酸、

(e) 配列番号33~37のいずれかのヌクレオチド配列と50%以上の相同性を有するヌクレオチド配列を有する核酸、

からなる群より選択される、核酸に関するものである。本明細書において核酸とは、1本鎖または2本鎖のDNAまたはRNAを意味する。本発明の核酸は、当業者に既知の種々の方法により製造および取得され得る。本発明において、配列番号33~37のヌクレオチド配列は、配列番号28~32のアミノ酸配列をそれぞれコードするものである。

【0018】

本発明の核酸は、具体的には、(1)配列番号28~32のいずれかのアミノ酸配列を有するペプチドをコードする核酸、(2)配列番号28~32のいずれかのアミノ酸配列において、1個以上、好ましくは、1または数個、例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、または14個程度のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有するペプチドをコードする核酸、(3)配列番号28~32のいずれかのアミノ酸配列と例えば、26.6%以上または44.4%以上、好ましくは、少なくとも50%以上、より好ましくは、例えば、60、66.7、70、75、80、83.3、85、90、または93%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有するペプチドをコードする核酸、(4)配列番号33~37のいずれかのヌクレオチド配列を有する核酸、(5)配列番号33~37のいずれかのヌクレオチド配列において、1個以上、好ましくは、1または数個、例えば、2、3、4、5、6、7、8、または9個程度のヌクレオチドが欠失、置換若しくは付加されたヌクレオチド配列を有する核酸、(6)前記(3)または(4)のいずれかの核酸またはその相補鎖とストリンジェントな条件下でハイブリッド形成し得る核酸、および(7)配列番号33~37のいずれかのヌクレオチド配列と少なくとも50%以上、好ましくは、例えば、60、70、75、80、90、93、95、または97%以上の相同性を有するヌクレオチド配列を有する核酸などである。さらに、これらのヌクレオチドのいずれかが適宜修飾されたものであってもよい。いずれのヌクレオチド配列を有する場合であっても、本発明の核酸は、免疫グロブリン結合能を有するペプチドをコードし得るものである。

【0019】

上記ストリンジェントな条件としては、例えば、J. Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition", 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Pressに記載されるような条件が挙げられる。例えば、 $6 \times \text{SSC}$ 、 $5 \times$ デンハルト溶液 (Denhardt's solution)、 $0.5\% \text{SDS}$ 、 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 変性サケ精子DNAを含む溶液中 68°C でプローブとハイブリッド形成させた後、洗浄条件を $2 \times \text{SSC}$ 、 $0.1\% \text{SDS}$ 中室温から $0.1 \times \text{SSC}$ 、 $0.5\% \text{SDS}$ 中 68°C まで変化させる条件、 65°C で、 $2 \times \text{SSPE}$ (Frederick M. Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", 1987, John Wiley & Sons, Hoboken NJ.に記載) および $0.1\% \text{SDS}$ を含む溶液中で15分を2回、 $0.5 \times \text{SSPE}$ および $0.1\% \text{SDS}$ を含む溶液中でさらに15分を2回、次に、 $0.1 \times \text{SSPE}$ および $0.1\% \text{SDS}$ を含む溶液中で15分を2回の条件、または 65°C で、 $2 \times \text{SSPE}$ 、 $0.1\% \text{SDS}$ およびホルムアミド ($5 \sim 50\%$) を含む溶液中で15分を2回、 $0.5 \times \text{SSPE}$ 、 $0.1\% \text{SDS}$ およびホルムアミド ($5 \sim 50\%$) を含む溶液中でさらに15分を2回、次に、 $0.1 \times \text{SSPE}$ 、 $0.1\% \text{SDS}$ およびホルムアミド ($5 \sim 50\%$) を含む溶液中で15分を2回の条件などである。

10

【0020】

上記ヌクレオチド配列の相同性は、例えば、FASTA、BLAST、DNASIS (日立ソフトウェアエンジニアリング(株)製)、GENETYX ((株)ジェネティクス製)を用いて測定することができる。

20

【0021】

本発明の核酸は、上記ヌクレオチド配列を有するものであればいずれのものであってもよい。例えば、配列番号33~37のいずれかのヌクレオチド配列からなる核酸そのものであってもよく、上記ヌクレオチド配列をコア配列として含み、かつかかる配列の5'末端および/または3'末端に、ヌクレオチド、ポリヌクレオチド、またはそれらのアナログなどの種々の物質が結合したものであってもよい。例えば、ポリヌクレオチドが結合する場合、かかるポリヌクレオチドは、1~150個、例えば、1~60個、1~45個、1~18個のヌクレオチドからなるものであってもよい。

【0022】

本発明は、さらなる態様において、上記核酸を含むベクターに関するものである。本発明のベクターは、上記核酸を含んでいれればいずれのものであってもよい。ベクターの種類、上記核酸のヌクレオチド配列以外の配列などは、ベクターを導入する宿主の種類、目的などの種々の条件に応じて適宜選択され得る。本発明のベクターは、例えば、配列番号33~37のいずれかで示すヌクレオチド配列の5'末端または3'末端にインフレームで目的のタンパク質をコードするヌクレオチド配列を挿入することにより、イミュノグロブリン結合能を有するペプチドが目的のタンパク質のN末端またはC末端に付加した融合タンパク質の発現用ベクターとして用いることもできる。融合タンパク質からの目的のタンパク質の単離を容易にするために、本発明のベクターは、上記ヌクレオチド配列と目的のタンパク質のヌクレオチド配列挿入部の間に例えば、HRV 3C、トロンピン、Factor Xa、エンテロキナーゼなどのプロテアーゼにより認識される配列を含んでいてもよい。本発明のベクターを細胞に導入し、タンパク質を産生させることにより、上記本発明のイミュノグロブリン結合能を有するペプチドを得てもよい。

30

40

【0023】

本発明は、別の態様において、本発明のイミュノグロブリン結合能を有するペプチドが目的のタンパク質のN末端および/またはC末端に付加した融合タンパク質に関するものである。本発明の融合タンパク質は、当業者に既知の種々の方法により製造および取得することができる。本発明の融合タンパク質はイミュノグロブリン結合能を有するペプチドを含むものであるため、かかるペプチドをタグ配列として用い、目的のタンパク質を単離および/または精製することなどが可能になる。また、上述の通り、本発明のペプチドはイミュノグロブリンとの結合能が低いので、本発明の融合タンパク質は、例えば、精製用

50

カラムに固定された場合、Protein AまたはProtein Gと比較して、マイルドな条件下でのイミュノグロブリンの精製およびかかるカラムの繰り返し使用（劣化が抑えられる）を可能にし、例えば、イミュノグロブリンの検出用プローブとして用いた場合、リプローブが容易であるなどの利点を有する。

【0024】

本発明の融合タンパク質に含まれる目的のタンパク質は、いずれのタンパク質であってもよい。本発明の融合タンパク質が、例えば、アルカリホスファターゼ（ALP）、パーオキシダーゼ（HRP）、ルシフェラーゼおよびグリーンフルオロレッセンスプロテイン（GFP）などの蛍光タンパク質、 α -ガラクトシダーゼ、グルタチオンSトランスフェラーゼ、マルトース結合タンパク質などの酵素を目的のタンパク質として含む場合、本発明の融合タンパク質に含まれるイミュノグロブリン結合能を有するペプチドとイミュノグロブリンとの結合を検出することなどが容易になる。本発明の融合タンパク質はまた、例えば、ヒスチジンタグ、GSTタグ、Sタグ、Mycタグ、HAタグ、またはEタグなどのタグ配列、核移行シグナル、シリカ結合タンパク質、またはProtein Aなどを含んでいてもよい。

10

【0025】

本発明の融合タンパク質は、本発明のペプチドと目的のタンパク質との間にプロテアーゼにより認識されるペプチドを含んでいてもよい。かかるペプチドを含むことにより、融合タンパク質から目的のタンパク質を容易に単離することができる。

【0026】

従って、本発明は、さらなる態様において、上記融合タンパク質をコードする核酸に関するものである。

20

【0027】

さらに、本発明は、上記融合タンパク質をコードする核酸を含むベクターに関するものである。かかるベクターを細胞に導入し、タンパク質を産生させることにより、本発明の融合タンパク質を得てもよい。

【0028】

本発明は、1つの態様において、上記イミュノグロブリン結合能を有するペプチドをコードする核酸、上記融合タンパク質をコードする核酸、またはそれらの核酸を含むベクターを含む細胞に関するものである。本発明の細胞は、例えば、大腸菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などの宿主細胞を上記核酸またはベクターを用いて形質転換することにより製造することができる。本発明の細胞を培養し、産生されたイミュノグロブリン結合能を有するペプチド、またはイミュノグロブリン結合能を有するペプチドを含む融合タンパク質を回収することにより、本発明のペプチドまたは融合タンパク質を製造することもできる。

30

【0029】

本発明は、さらなる態様において、イミュノグロブリン結合能を有するペプチドの製造方法であって、

(a) イミュノグロブリン結合能を有するペプチドをコードする核酸を含むベクターを用いて細胞を形質転換し、

(b) 該細胞を培養して、ペプチドを産生させる、
工程を含む方法に関するものである。細胞の形質転換は、当業者に既知の手段および/または方法により行われ得る。

40

【0030】

従って、本発明は、上記ペプチドの製造方法により得ることのできる、イミュノグロブリン結合能を有するペプチドに関するものである。

【0031】

本発明は、別の態様において、イミュノグロブリン結合能を有するペプチドが目的のタンパク質のN末端および/またはC末端に付加した融合タンパク質の製造方法であって、(a) イミュノグロブリン結合能を有するペプチドが目的のタンパク質のN末端またはC末端に付加した融合タンパク質をコードする核酸を含むベクターを用いて細胞を形質転換

50

し、

(b) 該細胞を培養して、融合タンパク質を産生させる、
工程を含む方法に関するものである。本発明の融合タンパク質の製造方法は、融合タンパク質から目的タンパク質を取り出す工程をさらに含んでいてもよい。

【0032】

従って、本発明は、上記融合タンパク質の製造方法により得ることのできる、イミュノグロブリン結合能を有するペプチドが目的のタンパク質のN末端および/またはC末端に付加した融合タンパク質に関するものである。

【0033】

本発明は、1つの態様において、イミュノグロブリン結合能を有するペプチド、またはかかるペプチドを含む融合タンパク質を含む、イミュノグロブリンを結合させるための組成物に関するものである。上記ペプチドまたは融合タンパク質以外の成分は、本発明の組成物が用いられる目的など種々の条件に応じて適宜選択され得る。上述の通り、本発明の組成物はイミュノグロブリン結合能を有するペプチドを含むものである。本発明の組成物は、例えば、イミュノグロブリンの存在または量を決定するための組成物であってもよく、イミュノグロブリンを単離するための組成物であってもよい。本発明の組成物により、試料中のイミュノグロブリンの量を決定すること、試料からイミュノグロブリンを単離することなどが可能になる。

10

【0034】

本発明は、もう1つの態様において、イミュノグロブリン結合能を有するペプチド、またはかかるペプチドを含む融合タンパク質を固定化した、イミュノグロブリンを結合させるための手段に関するものである。本発明の手段は、例えば、プレート、樹脂、カラム、ビーズ、アガロースまたはセファロースなどの糖を含むレジン、シリカ基板、ガラス（スライドガラスなど）、金属（金など）、アパタイトなどの担体に上記ペプチドまたは融合タンパク質が固定されたものである。固定化は、ペプチド、またはタンパク質のアミノ基若しくはカルボキシル基を介した方法、アミノ酸側鎖のSH基を介した方法、イオニック結合による方法、疎水的な結合による方法などの当業者に既知の手段・方法により行われ得る。

20

【0035】

上述の通り、本発明の手段はイミュノグロブリン結合能を有するペプチドが固定化されたものである。本発明の手段は、イミュノグロブリンの存在若しくは量を決定するための手段、およびイミュノグロブリンを単離するための手段を含むものである。本発明の手段を、例えば、ELISA用プレート、イミュノグロブリン精製用カラム、検出用ガラスアレイ、マイクロ流路系、SPR用センサーチップ、検出用シリカ基板、抗体医薬品精製システムなどとして用いることもできる。

30

【0036】

本発明は、さらなる態様において、イミュノグロブリンを結合させる方法であって、
(a) イミュノグロブリン結合能を有するペプチド、またはかかるペプチドを含む融合タンパク質を試料に添加し、

(b) ペプチドまたは融合タンパク質とイミュノグロブリンとの結合体を調べる、
を含む方法に関するものである。試料は、イミュノグロブリンが含まれている可能性があればいずれのものであってもよい。イミュノグロブリンとの結合体の存在および/または量を調べることにより、試料中にイミュノグロブリンが存在するかどうか、さらには、試料中に存在するイミュノグロブリンの量を決定することなどが可能になる。本発明の方法に用いるペプチドまたは融合タンパク質は標識されたものであってもよい。標識としては、ビオチン化、蛍光標識、RI標識、酵素標識など当業者に既知の種々のものが挙げられる。かかる標識を付すことにより、ペプチドまたは融合タンパク質との結合体を調べるのが容易になる。さらに、本発明の方法は、結合体からイミュノグロブリンを単離する工程を含んでいてもよい。

40

【0037】

50

従って、本発明は、イミュノグロブリンを結合させる方法に用いるための、イミュノグロブリン結合能を有するペプチドまたはかかるペプチドを含む融合タンパク質を含むキットに関するものである。本発明のキットには、上記ペプチドまたは融合タンパク質の他、例えば、標識、結合体を調べる手段などが含まれ得る。

【0038】

本発明は、別の態様において、イミュノグロブリン結合能を有するペプチドまたはかかるペプチドを含む融合タンパク質を含む、C1qとイミュノグロブリンとの結合により引き起こされる疾患の治療または予防用医薬組成物に関するものである。C1qとイミュノグロブリンとの結合により引き起こされる疾患とは、かかる結合により直接的または間接的に生じる疾患をいい、例えば、関節リウマチ、関節炎、全身性エリテマトーデス(SLE)、血管炎症群、腎炎などの免疫複合体病、その他の炎症性疾患、感染症、および悪性腫瘍などが挙げられる。本発明の医薬組成物は、含まれるイミュノグロブリン結合能を有するペプチドがC1qとイミュノグロブリンとの結合を阻害することにより、上記疾患を治療および予防することができる。なお、本発明のペプチドは、元々ヒトの体内に存在するC1qに由来するものであって、かつ6~15残基と短いので、本発明のペプチドをヒトに投与することで生じる副作用は少ない。さらに、本発明のペプチドは、天然のタンパク質由来のアミノ酸配列を改変することによってタンパク質分解を受けにくく、投与した対象の体内において高い安定性および長い半減期を有する。

10

【0039】

本発明の医薬組成物の投与方法は、疾患の種類、対象の状態、および/または標的部位などの条件に応じて適宜選択することができる。当該方法としては、皮内投与、皮下投与、筋肉内投与、静脈内投与、経鼻投与、経口投与などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。本発明の医薬組成物に含まれるペプチドの量、医薬組成物の剤形、投与頻度などは、疾患の種類、対象の状態、標的部位などの条件に応じて適宜選択でき、例えば、1回あたりのペプチド投与量を0.01~100mg/kg、好ましくは0.1~10mg/kgとしてもよいが、本発明のペプチドの投与量はこれらに限定されるものではない。

20

【0040】

本発明は、さらなる態様において、有効量のイミュノグロブリン結合能を有するペプチドまたはかかるペプチドを含む融合タンパク質を対象に投与することを含む、C1qとイミュノグロブリンとの結合により引き起こされる疾患の治療または予防方法に関するものである。

30

【0041】

以下に実施例を示して本発明を具体的かつ詳細に説明するが、実施例は本発明を限定するものと解してはならない。

【実施例1】

【0042】

イミュノグロブリンが認識するC1q中のアミノ酸配列の同定材料および方法

ヒトC1qのサブユニットA鎖、B鎖、C鎖のアミノ酸配列を配列番号17~19に、ヌクレオチド配列を配列番号20~22に示す。それぞれのアミノ酸配列をもとにして、各サブユニットのアミノ酸配列を15アミノ酸(残基)ずつ3アミノ酸の間隔ですらした配列を合成ペプチド(順に、ペプチド番号1~78、97~117、193~270番)としてガラスアレイ上に合成した。それぞれのペプチドの合成はアレイ上の特定の位置で行い、C1qのサブユニットの全アミノ酸配列を網羅する合成ペプチドを含むペプチドアレイを作製した。尚、アレイの作製はJPT社に委託して行った。

40

【0043】

PBS(10mMリン酸緩衝液 pH7.0, 0.1M NaCl)にて1,000倍希釈したCy3標識ヤギ抗マウスイミュノグロブリン(IgG)(1mg/ml; Zymed Laboratories社製)330μlをペプチドアレイ上に塗布し、シー

50

ルをした後、4 で12時間インキュベートした。その後メタノール1回、Milli-Q水で5分間×5回洗浄した。遠心してアレイスライドを乾燥させ、蛍光スキャナー(Agilent DNAマイクロアレイスキャナ; アジレント社製)で、スキャンし、ソフトウェア(Feature Extractionソフトウェア; アジレント社製)を用いてアレイ上のそれぞれのペプチドスポットの蛍光強度を数値化した。強い蛍光強度を示すいくつかのスポットを検出した。このうち、バックグラウンドレベルより60,000以上高い蛍光強度を示すペプチドスポットのアミノ酸配列(配列番号3~7)を表1に示す。なお、本明細書において、アミノ酸は当該分野において知られた1文字表記により記載している。

【0044】

【表1】

ペプチド番号	アミノ酸配列	配列番号	蛍光強度*
149番	SGKFTCKVPGLYYFT	3	65,300
150番	FTCKVPGLYYFTYHA	4	65,311
244番	STGKFTCKVPGLYYF	5	65,311
245番	KFTCKVPGLYYFVYH	6	65,311
246番	CKVPGLYYFVYHASH	7	65,313

*バックグラウンドの蛍光強度は2.6

【0045】

結果

149番および150番のペプチドはC1qBサブユニット(B鎖)由来の配列であり、244~246番のペプチドはC1qCサブユニット(C鎖)由来の配列である。これらの配列から、C1qとイミュノグロブリンの結合に必要な配列はCKVPGLYYF(配列番号2)の9残基をコアにした配列であると予測した。またこのコア配列を含む配列であればそのN末端若しくはC末端側に数残基のアミノ酸が結合していてもイミュノグロブリンとの結合が妨げられないことも確認した。149番および150番、244~246番のペプチドのヌクレオチド配列を配列番号12~16に示す。

【実施例2】

【0046】

イミュノグロブリン結合能を有するペプチドによるイミュノグロブリンとC1qの結合の阻害

阻害活性の検討(1)

材料および方法

C1qとイミュノグロブリン(IgG)の結合に必須と考えられるCKVPGLYYF(配列番号2)の9残基のペプチドが、C1qとイミュノグロブリンとの結合を阻害するかどうかを調べた。配列番号2のアミノ酸配列を有するペプチド(R2)、かかるペプチドより短いアミノ酸配列PGLYYF(配列番号1)を有するペプチド(R1)、ならびに配列番号2で示されるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列SGKFTCKVPGLYYFT(配列番号3)を有するペプチド(R3)、アミノ酸配列FTCKVPGLYYFTYHA(配列番号4)を有するペプチド(R4)、アミノ酸配列STGKFTCKVPGLYYF(配列番号5)を有するペプチド(R5)、およびアミノ酸配列CKVPGLYYFVYHASH(配列番号7)を有するペプチド(R6)をGL Biochem(Shanghai)社に委託して作製した。これらのペプチドを表2に示す。それぞれのペプチドを10mg/mlとなるようDMSOに溶解し、保存した。

【0047】

10

20

30

40

【表 2】

合成ペプチド	アミノ酸配列	配列番号
R 1	P G L Y Y F	1
R 2	C K V P G L Y Y F	2
R 3	S G K F T C K V P G L Y Y F T	3
R 4	F T C K V P G L Y Y F T Y H A	4
R 5	S T G K F T C K V P G L Y Y F	5
R 6	C K V P G L Y Y F V Y H A S H	7

10

【0048】

ヒトC1qタンパク質(Carbiochem社製)を10mM HEPES、300mM NaCl、40%グリセロール(pH7.2)に溶解し、200µg/mlヒトC1qタンパク質溶液を調製した。ヒトC1qタンパク質溶液を5mm×15mmの大きさのニトロセルロース膜(Hybond C;アマシャム社製)に2µl(400ng)ずつスポットし、室温にて約1時間風乾した。ニトロセルロース膜をTBSに浸し、5分間インキュベートし、5%ブロッキング剤(Amersham ECL blocking reagent; GE Healthcare社製)を含むTBS(20mM Tris-HCl pH7.5, 150mM NaCl)を用いて室温にて1時間ブロッキングを行った。TBSにて軽く洗浄した後、アルカリホスファターゼ(ALP)標識ヒトイミュノグロブリン(IgG)(BECKMAN COULTER社製)をTBSにて1000倍希釈し、各ペプチドの濃度が500µg/mlとなるように混合した溶液20µlに浸し、室温で1時間反応させた。TBS溶液(TBSに最終濃度0.05%でTween 20を加えたもの)にて軽く洗浄した後、同液にて10分間、3回振盪しながら洗浄した。

20

【0049】

ALP標識イミュノグロブリン(IgG)を用いた検出方法

ニトロセルロース膜をALP発色バッファー(100mM NaCl, 5mM MgCl₂入りTris-HCl pH9.5)で軽く洗浄後、BCIP/NBT溶液(プロメガ社製)を含むALP発色バッファー30µlに浸し、室温で10分間発色させた。染色像が得られたところでニトロセルロース膜を十分量の蒸留水に浸し、発色バッファーを洗い流した。洗浄後、ニトロセルロース膜を風乾してMulti Gauge(FUJIFILM)を用いて染色像の取り込みを行った。

30

【0050】

結果

結果を図1に示す。C1qとイミュノグロブリン(IgG)との結合に必須と思われる9アミノ酸を有するペプチドR2およびかかるペプチドをコア配列として有するペプチド(ペプチドR3~6)によって結合が阻害されているだけでなく、より短いアミノ酸配列を有するペプチド(ペプチドR1)によっても結合が阻害されたことから、イミュノグロブリンとC1qの結合にはPGLYYF(配列番号1)の6残基のアミノ酸をコアとする配列が重要であることがわかった。また、これらのペプチドは、C1qとイミュノグロブリンとの結合を阻害することにより、この結合により引き起こされる疾患を治療または予防できる可能性があることが分かった。

40

【0051】

阻害活性の検討(2)

材料および方法

実施例2の阻害活性の検討(1)にて示すペプチド以外にも、その変異ペプチドについて、C1qとイミュノグロブリンとの結合を阻害するかどうかを調べた。表3に示すペプチドをGL Biochem(Shanghai)社に委託して作製した。それぞれのペプチドを10mg/mlとなるようDMSOに溶解し、保存した。なお、実験は実施例2の阻害活性の検討(1)と同様の方法で行い、対照としてペプチドR1、R2およびR5

50

についても試験を行った。

【0052】

【表3】

合成ペプチド	アミノ酸配列	配列番号
R 7	P G A Y Y F	2 3
R 8	P G L A Y F	2 4
R 9	P G L Y A F	2 5
R 1 0	C K A P G L Y Y F	2 6
R 1 1	S T A K F T C K V P G L Y Y F	2 7

10

【0053】

結果

結果を図2に示す。特定のアミノ酸をアラニンに置換したペプチドは、C1qとイミュノグロブリンとの結合を十分に阻害した。従って、これらの変異ペプチドあるいはそれらをコアとして含むペプチドも、C1qとイミュノグロブリンとの結合を阻害することにより、この結合により引き起こされる疾患を治療または予防できる可能性があることが分かった。

【0054】

阻害活性の検討(3)

20

材料および方法

実施例1(2)に続き、さらなる変異ペプチドについて、C1qとイミュノグロブリンとの結合を阻害するかどうかを調べた。表4に示すペプチドをGL Biochem (Shanghai)社に委託して作製した。これらのペプチドは、特定のアミノ酸残基を対応するD-アミノ酸に置換するか、またはアミノ酸配列中のシステイン残基をセリン残基に置換することによってペプチド安定性を向上させている。すなわち、これらのペプチドはより長い半減期を有しており、対象体内での治療または予防効果が長期にわたって持続するように設計されている。各ペプチドを10mg/mlとなるようDMSOに溶解し、保存した。なお、実験は実施例2の阻害活性の検討(1)と同様の方法で行い、対照としてペプチドR1、R2およびR5を用いた。

30

【0055】

【表4】

合成ペプチド	アミノ酸配列	配列番号
R 1 2	P G d L Y Y F	1 に対応する
R 1 3	d P G d L d Y d Y d F	1 に対応する
R 1 4	S G K F T S K V P G L Y Y F T	2 8
R 1 5	S T G K F T S K V P G L Y Y F	2 9
R 1 6	S K V P G L Y Y F V Y H A S H	3 0
R 1 7	K F T S K V P G L Y Y F V Y H	3 1
R 1 8	F T S K V P G L Y Y F T Y H A	3 2

40

【0056】

結果

結果を図3に示す。表中、NCはペプチドを含まないDMSOを、アルカリホスファターゼ(ALP)標識ヒトイミュノグロブリン(IgG)を含まない反応液に添加したサンプルの結果であって、PCはペプチドを含まないDMSOを、アルカリホスファターゼ(ALP)標識ヒトイミュノグロブリン(IgG)を含む反応液に添加したサンプルの結果である。特定のアミノ酸を対応するD-アミノ酸(R12およびR13)、およびセリン残基をシステイン残基に置換したペプチド(R14~18)はそれぞれ、C1qとイミュ

50

ノグロブリンとの結合を阻害した。

【0057】

阻害活性の検討(4)

材料および方法

さらなる変異ペプチドについて、C1qとイミュノグロブリンとの結合を阻害するかどうかを調べた。表5に示すペプチドをGL Biochem(Shanghai)社に委託して作製した。これらのペプチドは、アミノ酸残基を対応するD-アミノ酸に置換し、かつアミノ酸配列中のシステイン残基をセリン残基に置換することによってペプチド安定性を向上させている。すなわち、これらのペプチドはより長い半減期を有しており、対象体内での治療または予防効果が長期にわたって持続するように設計されている。各ペプチドを10mg/mlとなるようDMSOに溶解し、保存した。なお、実験は実施例2の阻害活性の検討(1)と同様の方法で行い、対照としてペプチドR1、R5およびR13を用いた。

10

【0058】

【表5】

合成ペプチド	アミノ酸配列	配列番号
R19	d S d K d V d P G d L d Y d Y d F	2に対応する
R20	d S G d K d F d T d S d K d V d P G d L d Y d Y d F d T	3に対応する
R21	d S d T G d K d F d T d S d K d V d P G d L d Y d Y d F	5に対応する
R22	d F d T d S d K d V d P G d L d Y d Y d F d T d Y d H d A	4に対応する

20

【0059】

結果

結果を図4に示す。表中、NCはペプチドを含まないDMSOを、アルカリホスファターゼ(ALP)標識ヒトイミュノグロブリン(IgG)を含まない反応液に添加したサンプルの結果であって、PCはペプチドを含まないDMSOを、アルカリホスファターゼ(ALP)標識ヒトイミュノグロブリン(IgG)を含む反応液に添加したサンプルの結果である。アミノ酸残基を対応するD-アミノ酸に置換し、かつアミノ酸配列中のシステイン残基をセリン残基に置換したペプチド(R19~22)は、それぞれC1qとイミュノグロブリンとの結合を阻害した。

30

【実施例3】

【0060】

イミュノグロブリン結合能を有するペプチドの関節炎抑制作用の検証

(1) 関節炎誘発マウスに対するイミュノグロブリン結合能を有するペプチドの関節炎抑制作用 - 1

材料および方法

40

モノクローナル抗体カクテル誘発関節炎マウス(BALB/c Cr Slc (SPF))を用い、実施例2にてR5として示すペプチドの関節炎抑制作用を検討した。関節炎惹起用モノクローナル抗体カクテル2mg/個体を静脈内投与し、その3日後にLipopolysaccharide(LPS)を50µg/個体で腹腔内投与し、関節炎を惹起した。ペプチドR5を、LPS投与翌日(4日目)より14日目まで、1日1回あるいは1日2回、10mg/kgで腹腔内投与した。陽性対照薬のメトトレキサートを、4日目より1日1回、0.1mg/kgで経口投与した。0日目より14日目までの偶数日に四肢の臨床スコアを測定した。麻酔下にてヘパリン含有生理食塩液で脱血を行い、氷冷4%パラホルムアルデヒド液を持続注入して全身灌流固定した。灌流固定後、両後肢の膝関節(大腿骨中心部および脛骨中心部を切断し、皮膚および筋肉を除去)および踵関節(

50

脛骨中心部から指先まで)を摘出し、さらに4%パラホルムアルデヒド液で一晩浸漬固定(4)した。その後、両膝および両踵関節を50mM PBS(4)に移した後、踵関節の軟X線写真撮影を2方向(内側面方向および上面方向)から行った。

【0061】

ペプチド溶液の調製

ペプチドについて、動物の体重を基に必要量を算出した。ペプチドを0.5%メチルセルロース溶液で1mg/mlとなるように調製し、調製したペプチド溶液を冷蔵保存した。

【0062】

メトトレキサート溶液の調製

メトトレキサートを、1mg秤量してメノウ乳鉢に入れ、乳棒で粉碎した後に0.5%メチルセルロース溶液を徐々に加えて懸濁し、0.01mg/mlとなるように調製した。その後、調製物を冷蔵保存した。

【0063】

体重測定、一般症状観察および群分け

動物の体重測定は、試験期間中、関節炎惹起用モノクローナル抗体カクテル投与日を0日目とし、0、3、6、9、12および14日目に測定した。一般状態観察は、毎日実施した。

【0064】

関節炎モデルの作製

0日目に7週齢のマウス20匹に関節炎惹起用モノクローナル抗体カクテル2mg/個体を静脈内投与し、3日目にLPSを50μg/個体で腹腔内投与した。

【0065】

ペプチド溶液の投与

ペプチド溶液は、4日目より1日1回(午前)あるいは1日2回(午前および午後)10mg/kg腹腔内投与した。対照として、4日目より0.5%メチルセルロース溶液を1日1回(午前)腹腔内投与した。投与には注射針(26G;テルモ)および注射筒(1.0ml容量;テルモ)を用いた。投与量は、10ml/kgとした。メトトレキサートは、4日目より1日1回(午前)0.1mg/kg経口投与した。投与には経口ゾンデ(マウス用経口ゾンデ;フチガミ器械店)および注射筒(1.0ml容量;テルモ)を用いた。投与量は、10ml/kgとした。

【0066】

臨床スコア観察

臨床スコアの観察は、0日目より14日目までの偶数日に以下に従って観察した。四肢の合計で最大12スコアとした。

<臨床スコア>

- 0: 正常な関節
- 1: わずかな炎症および赤み
- 2: 手足全体に及び、手足の使用を妨げる重篤な紅斑および腫れ
- 3: 強直、関節硬直、機能喪失を伴う、手足または関節の変形

【0067】

統計学的解析処理方法

試験成績は平均値±標準誤差で表示し、EXSAS(Version7.1.6;株式会社アームシステックス)を用いて解析を行った。臨床スコアはWilcoxon検定を行った。足の腫れを肉眼で観察した。

【0068】

結果

結果を図5に示す。1日1回投与と1日2回投与の間でペプチドR5の有効性に有意な差異は観察されなかったが、関節炎抑制に対する効果は認められた。また、関節炎抑制の強度は、メトトレキサートよりも強いものであった。この結果から、本発明のペプチドは

10

20

30

40

50

、臨床において既に用いられている医薬品より優れた関節炎抑制作用を有しており、関節炎および関連する疾患の処置および予防に有用であることが明らかになった。

なお、メトトレキサートは微量の使用であっても重大な副作用をもたらすことが知られている。一方で、本発明のペプチドは天然由来のものであり、副作用は一切認められなかった。従って、本発明の使用は、従来用いられている医薬品と比べて有利である。

【0069】

(2) 関節炎誘発マウスに対するイミュングロブリン結合能を有するペプチドの関節炎抑制作用 - 2

材料および方法

モノクローナル抗体カクテル誘発関節炎マウスを用い、実施例2にてR1、R2およびR5として示すペプチドの関節炎抑制作用を検討した。関節炎惹起用モノクローナル抗体カクテルを2mg/個体で静脈内投与し、その3日後にLPSを50μg/個体で腹腔内投与し、関節炎を惹起した。各ペプチドは、関節炎惹起用モノクローナル抗体カクテル投与日(0日目)より、それぞれ10mg/kgを1日2回、14日間連続投与を行い、関節炎抑制作用を臨床スコアにより検討した。なお、実験は、実施例3(1)と同様の方法で行った。

10

【0070】

ペプチド溶液の調製

各ペプチドは、動物の体重を基に必要量を算出した。0.5%メチルセルロース溶液で1mg/mlとなるように調製し、冷蔵保存した。

20

【0071】

体重測定および一般状態観察

動物の体重測定は、試験期間中、関節炎惹起用モノクローナル抗体カクテル投与日を0日目とし、0、3、6、9、12および14日目に測定した。一般状態観察は毎日実施した。

【0072】

関節炎モデルの作製および群分け

投与開始前日に体重を測定し、群分けソフトにより各群の平均体重値がほぼ等しくなるように無作為に割り付けた。0日目に、7週齢のマウス20匹に関節炎惹起用モノクローナル抗体カクテルを2mg/個体で静脈内投与し、3日目にLPSを50μg/個体で腹腔内投与した。

30

【0073】

ペプチド溶液の投与

各ペプチド溶液を、0日目より、午前および午後の1日2回、腹腔内投与した。対照として、0日目より、0.5%メチルセルロース溶液を1日2回、腹腔内投与した。投与には注射針(26G;テルモ)および注射筒(1.0ml容量;テルモ)を用いた。投与量は、10ml/kgとした。

【0074】

臨床スコア観察

関節炎惹起用モノクローナル抗体カクテル投与日を0日目とし、14日目までの偶数日に、全例の四肢の臨床スコアを以下に従い観察した。四肢の合計で最大12スコアとした。

40

<臨床スコア>

- 0: 正常な関節
- 1: わずかな炎症および赤み
- 2: 手足全体に及び、手足の使用を妨げる重篤な紅斑および腫れ
- 3: 強直、関節硬直、機能喪失を伴う、手足または関節の変形

【0075】

統計学的解析処理方法

試験成績は平均値±標準誤差で表示し、EXSAS(Version7.1.6;株式

50

会社アームシステックス)を用いて解析を行った。臨床スコアはWilcoxon検定を行った。足の腫れを肉眼で観察した。

【0076】

結果

結果を図6、図7および図8に示す。R1、R2またはR5を10mg/kgで1日2回投与した全ての群において関節炎抑制作用が認められた。従って、本発明のペプチドは、関節炎抑制作用を有しており、関節炎および関連する疾患の処置および予防に有用であることが明らかになった。また、一般症状の異常および体重に対する作用は、用いたペプチドのいずれにおいても認められなかった。

また、マウスを用いた試験において、本発明のペプチドは毒性影響を示さなかった。さらに、本発明のペプチドは、元々ヒトの体内に存在するC1qに由来するものであって、かつ6~15残基と短いので、本発明のペプチドを用いることで治療または予防に伴う副作用を低減させることが期待できる。

【0077】

(3) 関節炎誘発マウスに対するイミュノグロブリン結合能を有するペプチドの関節炎抑制作用 - 3

材料および方法

モノクローナル抗体カクテル誘発関節炎マウスを用い、実施例2(3)にてR13およびR17として示すペプチドの関節炎抑制作用を検討した。関節炎惹起用モノクローナル抗体カクテルを2mg/個体で静脈内投与し、その3日後にLPSを50μg/個体で腹腔内投与し、関節炎を惹起した。各ペプチドは、関節炎惹起用モノクローナル抗体カクテル投与から4日後より、それぞれを1日1回、10日間連続で腹腔内または静脈内投与を行い、関節炎抑制作用を臨床スコアおよび後肢容積測定により検討した。

【0078】

ペプチド溶液の調製

各ペプチドは、動物の体重を基に必要量を算出した。生理食塩水を用いて調製し(R10 1mg/ml、R2 1mg/ml、ならびにR13およびR17 1mg/mlまたは10mg/ml)、冷蔵保存した。

【0079】

体重測定および一般状態観察

動物の体重測定は、試験期間中、関節炎惹起用モノクローナル抗体カクテル投与日を0日目とし、0、3、6、9、12および14日目に測定した。一般状態観察は毎日実施した。

【0080】

関節炎モデルの作製および群分け

投与開始前日に体重を測定し、群分けソフトにより各群の平均体重値がほぼ等しくなるように無作為に割り付けた。0日目に、7週齢のマウス55匹に関節炎惹起用モノクローナル抗体カクテルを2mg/個体で静脈内投与し、3日後にLPSを50μg/個体で腹腔内投与した。

【0081】

ペプチド溶液の投与

各ペプチド溶液を、4日目より、1日1回腹腔内または静脈内投与した。同様に、陰性対照として生理食塩水、および陽性対照としてメトトレキサート(0.01mg/ml)を、4日目より、1日1回腹腔内投与した。投与には注射針(26G;テルモ)および注射筒(1.0ml容量;テルモ)を用いた。投与量は、10ml/kgとした。

【0082】

臨床スコア観察

関節炎惹起用モノクローナル抗体カクテル投与日を0日目とし、14日目までの偶数日に、全例の四肢の臨床スコアを以下に従い観察した。四肢の合計で最大12スコアとした。

。

10

20

30

40

50

< 臨床スコア >

- 0 : 正常な関節
- 1 : わずかな炎症および赤み
- 2 : 手足全体に及び、手足の使用を妨げる重篤な紅斑および腫れ
- 3 : 強直、関節硬直、機能喪失を伴う、手足または関節の変形

【0083】

統計学的解析処理方法

試験成績は平均値 ± 標準誤差で表示し、EXSAS (Version 7.1.6; 株式会社アームシステックス) を用いて解析を行った。臨床スコアはWilcoxon検定を行った。足の腫れを肉眼で観察した。体重および足容積などの定量的データは、Bartlett検定を行い、分散が均一であればDunnettの多重比較検定を行い、分散が不均一であればSteelの多重比較検定を行った。

10

【0084】

結果

結果を図9および図10に示す。図9の臨床スコアでは、R13またはR17を1日1回投与 (R13について腹腔内、R17について静脈内) した全ての群において、R1およびR2を投与した場合 (R1について静脈内、R2について腹腔内) と同程度の関節炎抑制作用が示されており、メトトレキサートを投与した場合と比較しても、同程度またはそれ以上の作用であった。また、図10の後肢容積測定の結果から、本願発明のペプチドは、R1およびR2、さらにメトトレキサートと同程度またはそれ以上に関節炎による患部の腫れを抑制していることが理解される。従って、本発明のペプチドは、関節炎抑制作用を有しており、関節炎および関連する疾患の処置および予防に有用であることが明らかになった。

20

なお、メトトレキサートは微量の使用であっても重大な副作用をもたらすことが知られている。一方で、本発明のペプチドは天然由来のものであり、副作用は一切認められなかった。従って、本発明の使用は、従来用いられている医薬品と比べて有利である。

【0085】

(4) 関節炎誘発マウスに対するイミュノグロブリン結合能を有するペプチドの関節炎抑制作用 - 4

材料および方法

30

モノクローナル抗体カクテル誘発関節炎マウスを用い、実施例2(3)にてR13として、実施例2(4)にてR19およびR21としてそれぞれ示すペプチドの関節炎抑制作用を検討した。関節炎惹起用モノクローナル抗体カクテルを2mg/個体で静脈内投与し、その3日後にLPSを50μg/個体で腹腔内投与し、関節炎を惹起した。各ペプチドは、関節炎惹起用モノクローナル抗体カクテル投与から4日後より、それぞれを1日1回、10日間連続で腹腔内投与を行い、関節炎抑制作用を臨床スコアおよび後肢容積測定により検討した。

【0086】

ペプチド溶液の調製

各ペプチドは、動物の体重を基に必要量を算出した。生理食塩水を用いて調製し (10mg/mlおよび1mg/ml)、冷蔵保存した。

40

【0087】

体重測定および一般状態観察

動物の体重測定は、試験期間中、関節炎惹起用モノクローナル抗体カクテル投与日を0日目とし、0、3、6、9、12および14日目に測定した。一般状態観察は毎日実施した。

【0088】

関節炎モデルの作製および群分け

投与開始前日に体重を測定し、群分けソフトにより各群の平均体重値がほぼ等しくなるように無作為に割り付けた。0日目に、7週齢のマウス40匹に関節炎惹起用モノクロー

50

ナル抗体カクテルを2 mg / 個体で静脈内投与し、3日目後にL P Sを50 μg / 個体で腹腔内投与した。

【0089】

ペプチド溶液の投与

各ペプチド溶液を、4日目より、1日1回腹腔内投与した。同様に、陰性対照として生理食塩水、および陽性対照としてメトトレキサート(0.1 mg / ml)を、4日目より、1日1回腹腔内投与した。投与には注射針(26 G ; テルモ)および注射筒(1.0 ml 容量 ; テルモ)を用いた。投与量は、10 ml / kg または100 mg / kg とした。

【0090】

臨床スコア観察

関節炎惹起用モノクローナル抗体カクテル投与日を0日目とし、14日目までの偶数日に、全例の四肢の臨床スコアを以下に従い観察した。四肢の合計で最大12スコアとした。

< 臨床スコア >

- 0 : 正常な関節
- 1 : わずかな炎症および赤み
- 2 : 手足全体に及び、手足の使用を妨げる重篤な紅斑および腫れ
- 3 : 強直、関節硬直、機能喪失を伴う、手足または関節の変形

【0091】

統計学的解析処理方法

試験成績は平均値 ± 標準誤差で表示し、EXSAS (Version 7.1.6 ; 株式会社アームシステックス) を用いて解析を行った。臨床スコアはWilcoxon検定を行った。足の腫れを肉眼で観察した。体重および足容積などの定量的データは、Bartlett検定を行い、分散が均一であればDunnettの多重比較検定を行い、分散が不均一であればSteelの多重比較検定を行った。

【0092】

結果

結果を図11、12および13に示す。ペプチドR13を10 mg / kg または100 mg / kg の用量で腹腔内投与した場合、メトトレキサートと同程度のまたはそれ以上の関節炎抑制作用が確認された。また、ペプチドR19および21を100 mg / kg の用量で腹腔内投与した場合についても、メトトレキサートと同程度のまたはそれ以上の関節炎抑制作用が確認された。従って、本発明のペプチドは、関節炎抑制作用を有しており、関節炎および関連する疾患の処置および予防に有用であることが明らかになった。

なお、メトトレキサートは微量の使用であっても重大な副作用をもたらすことが知られている。一方で、本発明のペプチドは天然由来のものであり、副作用は一切認められなかった。従って、本発明の使用は、従来用いられている医薬品と比べて有利である。

【実施例4】

【0093】

イミュノグロブリン結合能を有するペプチドの免疫複合体病抑制作用の検証

(1) III型アレルギー(アルサス)反応誘発ラットにおけるイミュノグロブリン結合能を有するペプチドの免疫複合体病抑制作用 - 1

材料および方法

7週齢のSlc : Wistar系ラットの雄64匹を用いて、ペプチドR1、R2およびR5について、投与方法(腹腔内投与と尾静脈内投与)ごとに2回に分けて試験を行った。馴化は、固形通常飼料CRF-1を与えて9日以上行った。投与前日に動物の背部を剪毛し、投与当日、OVA + エバンスブルー色素混合溶液を尾静脈内投与した。腹腔内投与する際はOVA + エバンスブルー色素混合溶液の投与30分後に、尾静脈内投与する際は50分後に、各ペプチド溶液をそれぞれ投与した。抗OVA溶液の皮内投与については、腹腔内投与する際は被験物質投与30分後に、静脈内投与する際は10分後に、動物の背部に0.1 ml / 部位の用量で各ペプチド溶液を皮内投与し、局所的にアルサス反応を

10

20

30

40

50

惹起させた。惹起4時間後、動物を安楽死させ十分に脱血した後に、背部皮膚を剥離した。剥離した皮膚のアルサス反応部位を打ち抜き、その皮膚よりエバンスブルー色素を一晩かけて抽出した。漏出色素量は、分光光度計でエバンスブルー色素に関する吸光度を測定し、検量線を用いて定量化した（なお、実施例4にて用いた実験方法については、H. Okamoto, Y. Iwahisa and 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)を参照のこと）。

【0094】

この実験において用いた各ペプチド溶液を以下に示す：

<陰性対照物質>

生理食塩液

<ペプチド溶液>

所定量秤量した各ペプチド（ペプチドR1、R2およびR5）を生理食塩液にて溶解し、20mg/ml溶液とした。2mg/ml溶液の調製は、20mg/ml溶液を生理食塩液で10倍希釈して調製した。5mg/ml溶液の調製は、所定量秤量した各ペプチドを生理食塩液に溶解して調製液とした。

【0095】

アルサス反応

OVA+エバンスブルー色素混合溶液を2ml/kg尾静脈内投与した。腹腔内投与する場合はOVA+エバンスブルー色素混合溶液の投与30分後に、尾静脈内投与する場合は50分後に、各ペプチド溶液をそれぞれ投与した。抗OVA溶液の皮内投与については、腹腔内投与の場合は被験物質投与30分後に、静脈内投与の場合は10分後に、動物の背部に0.1ml/部位の用量で各ペプチド溶液を皮内投与し、局所的にアルサス反応を惹起させた。皮内投与は動物1匹に対して、PBS2カ所、抗OVA溶液2カ所とした。惹起4時間後に、動物をエーテル麻酔下の断頭により安楽死させ、十分に脱血させた後に背部皮膚を剥離した。剥離した皮膚のアルサス反応部位をポンチで打ち抜き、色素抽出に使用した。

【0096】

色素抽出および測定

ポンチで打ち抜いた皮膚片短冊上に数ヶ所の切れ込みをいれ、2mlの色素抽出液中に浸漬して10分間振とう攪拌した。その後、室温で一晩静置した。一晩静置した後、再度10分間振とう攪拌し、遠心分離（1500rpm, 15分）を行い、その上清を色素測定用試料とした。測定にはUV-1600（株式会社島津製作所）を使用し、OD620nmの波長で測定した。漏出色素量は、色素量標準曲線から算出した。

【0097】

データの処理および統計処理

体重測定値および漏出色素量について、群平均値（mean）±標準偏差（SD）を算出した。漏出色素量については、抗OVA溶液投与2カ所の平均値からPBS投与2カ所の平均値を差し引いたものを各動物の値とした。漏出色素量について以下の統計解析を行った。1回目の試験（各ペプチド溶液の腹腔内投与）では、第1群対第2、3群、第1群対第4、5群、第1群対第6、7群のそれぞれについてBartlettの等分散検定を行い、分散に違いがなければDunnnettの多重比較検定で、分散に違いがあればSteelの多重比較検定で第1群とその他の各群の間の平均値の差を検定した。2回目の試験（各ペプチド溶液の尾静脈内投与）では、第9群対第10、11、12群の間でBartlettの等分散検定を行い、分散に違いがなければDunnnettの多重比較検定で、分散に違いがあればSteelの多重比較検定で第9群とその他の各群の間の平均値の差を検定した。有意水準はBartlettの等分散検定では5%、その他の検定では両側5%とした。

【0098】

結果

各ペプチド溶液の腹腔内投与の結果を図14、尾静脈内投与の結果を図15にてそれぞれ示す。この実施例において用いたIII型アレルギー（アルサス）反応モデル系において、対照と比較して30%程度のエバンスブルー漏出量の減少が認められており、SLE、糸球体腎炎、関節炎、血管炎などの免疫複合体病の抑制に有効であると考えられる。ペプチド溶液の腹腔内投与において、ペプチドR1、R2、R5の全てにおいて明確かつ十分な免疫複合体病抑制作用が認められた。また、尾静脈投与において、ペプチドR1、R2で明確かつ十分な免疫複合体病抑制作用が認められた。従って、本発明のペプチドは、明確かつ十分な免疫複合体病抑制作用を有しており、SLE、糸球体腎炎、関節炎、血管炎などの免疫複合体病の処置および予防に有用であることが明らかになった。

【0099】

(2) III型アレルギー（アルサス）反応誘発ラットにおける免疫グロブリン結合能を有するペプチドの免疫複合体病抑制作用 - 2

材料および方法

7週齢のSlc:Wistar系ラットの雄45匹を用いて、ペプチドR13およびR19について、投与方法（腹腔内投与と尾静脈内投与）ごとに2回に分けて試験を行った。馴化は、固形通常飼料CRF-1を与えて6日または8日行った。投与前日に動物の背部を剪毛し、投与当日、OVA+エバンスブルー色素混合溶液を尾静脈内投与した。腹腔内投与する際はOVA+エバンスブルー色素混合溶液の投与30分後に、尾静脈内投与する際は50分後に、各ペプチド溶液をそれぞれ投与した。抗OVA溶液の皮内投与については、腹腔内投与する際は被験物質投与30分後に、静脈内投与する際は10分後に、動物の背部に0.1ml/部位の用量で各ペプチド溶液を皮内投与し、局所的にアルサス反応を惹起させた。惹起4時間後、動物を安楽死させ十分に脱血した後に、背部皮膚を剥離した。剥離した皮膚のアルサス反応部位を打ち抜き、その皮膚よりエバンスブルー色素を一晩かけて抽出した。漏出色素量は、分光光度計でエバンスブルー色素に関する吸光度を測定し、検量線を用いて定量化した。

【0100】

この実験において用いた各ペプチド溶液を以下に示す：

<陰性対照物質>

生理食塩液

<陽性対照物質投与液>

所定量秤量したヒドロコルチゾン乳鉢に入れて乳棒で破砕した後、最終濃度が10mg/mlとなるように生理食塩液を加えて懸濁液を調製する。

<ペプチド溶液>

所定量秤量した各ペプチド（ペプチドR13およびR19）を生理食塩液にて溶解し、20mg/ml溶液とした。2mg/ml溶液の調製は、20mg/ml溶液を生理食塩液で10倍希釈して調製した。5mg/ml溶液の調製は、所定量秤量した各ペプチドを生理食塩液に溶解して調製液とした。

【0101】

アルサス反応

OVA+エバンスブルー色素混合溶液を2ml/kg尾静脈内投与した。腹腔内投与する場合はOVA+エバンスブルー色素混合溶液の投与30分後に、尾静脈内投与する場合は50分後に、各ペプチド溶液を投与した。抗OVA溶液の皮内投与については、腹腔内投与の場合は被験物質投与30分後に、静脈内投与の場合は10分後に、動物の背部に0.1ml/部位の用量で各ペプチド溶液を皮内投与し、局所的にアルサス反応を惹起させた。皮内投与は動物1匹に対して、PBS2カ所、抗OVA溶液2カ所とした。惹起4時間後に、動物をエーテル麻酔下の断頭により安楽死させ、十分に脱血させた後に背部皮膚を剥離した。剥離した皮膚のアルサス反応部位をポンチで打ち抜き、色素抽出に使用した。

【0102】

色素抽出および測定

ポンチで打ち抜いた皮膚片短冊上に数ヶ所の切れ込みをいれ、2 ml の色素抽出液中に浸漬して10分間振とう攪拌した。その後、室温で一晩静置した。一晩静置した後、再度10分間振とう攪拌し、遠心分離(1500 rpm、15分)を行い、その上清を色素測定用試料とした。測定にはUV-1600(株式会社島津製作所)を使用し、OD620 nmの波長で測定した。漏出色素量は、色素量標準曲線から算出した。

【0103】

データの処理および統計処理

体重測定値および漏出色素量について、群平均値(mean) ± 標準偏差(SD)を算出した。漏出色素量については、抗OVA溶液投与2カ所の平均値からPBS投与2カ所の平均値を差し引いたものを各動物の値とした。漏出色素量について以下の統計解析を行った。1回目(被験物質の腹腔内投与)試験では、第1、2、3群、第1、4、5群のそれぞれについてBartlettの等分散検定を行い、分散に違いがなければDunnnettの多重比較検定で、分散に違いがあればSteelの多重比較検定で第1群とその他の各群の間の平均値の差を検定した。第1群と第6群の間ではF検定を行い、分散に違いがなければStudentのt検定で、分散に違いがあればAspin-Welchのt検定で2群間の平均値の差を検定した。2回目(被験物質の尾静脈内投与)試験では、第7、8、9群の間でBartlettの等分散検定を行い、分散に違いがなければDunnnettの多重比較検定で、分散に違いがあればSteelの多重比較検定で第7群とその他の各群の間の平均値の差を検定した。有意水準はBartlettの等分散検定では5%、その他の検定では両側5%とした。

【0104】

結果

各ペプチド溶液の腹腔内投与の結果を図16、尾静脈内投与の結果を図17にてそれぞれ示す。腹腔内投与試験ではペプチドR13、10 mg/kgおよび100 mg/kg投与両群において、陰性対照物質投与群と比較して有意な抑制効果が認められた。特に100 mg/kg投与群では、非常に有意な抑制効果(約60%の抑制)を認め、これは陽性対象物質ヒドロコルチゾン50 mg/kgを投与した場合よりも強い抑制効果であった。ペプチドR19投与群は、10 mg/kg投与群にて、陰性対照物質投与群と比較して25~30%の低値を示し、抑制効果を認めた。また、100 mg/kg投与群では約50%の抑制効果を認め、陽性対照物質と同様の抑制効果を認めた。2回目の尾静脈投与試験では、ペプチドR13投与群では、約70%の抑制効果を認め、陰性対照物質投与群と比較して非常に有意な抑制効果であった。またペプチドR19投与群でも、陰性対照物質投与群と比較して約50%の抑制効果を認めた。この結果は、同配列、L体で合成したペプチドと比較して、非常に有意な抑制効果であった。D体ペプチドにすることにより、より強い効果で、明確且つ十分なIII型アレルギー(アルサス)反応の抑制効果を示すことが実証され、またこの結果より本ペプチドは糸球体腎炎、SLE、関節炎、血管炎などの免疫複合体病の処置および予防に有用であることが明らかになった。なお、ヒドロコルチゾンはステロイド医薬に分類され、微量の微量の使用であっても重大な副作用をもたらすことが知られている。一方で、本発明のペプチドは天然由来のものであり、副作用は一切認められなかった。従って、本発明の使用は、従来用いられている医薬品と比べて非常に有利である。

【実施例5】

【0105】

ラットコラーゲン関節炎モデルに対する免疫グロブリン結合能を有するペプチドの関節炎抑制作用

ラットコラーゲン関節炎モデルを用い、ペプチドR13として示すペプチドの関節炎抑制効果を検討した。

ウシ由来タイプIIコラーゲン500 µgをルイス系雌性ラットに免疫し、初回免疫後7日目及び14日目に同コラーゲン100 µgを追加免疫することにより、コラーゲン関節炎を誘発した。R13ペプチド、スクランブルペプチド(dYdPdYgdfL)ま

たはメトトレキサートを、関節炎が完全に発症した12日後より、25日間1日1回、連続投与を行い、関節炎抑制効果を臨床スコアにより検討した。対照薬として、メトトレキサート、0.15mg/kgを投与した。

【0106】

ペプチド溶液の調製方法

各ペプチドは、動物の体重を基に必要量を算出した。生理食塩水を徐々に加えて懸濁し、100mg/mlおよび10mg/mlとなるように調製した。

臨床スコア観察

ウシ由来タイプIIコラーゲンを初回免疫した日を0日目とし、関節炎を発症させた12日目より、36日目までの3の倍数日に、全例の四肢の臨床スコアを以下に従い観察した。四肢の合計で最大16スコアとした。

<臨床スコア>

- 0： 変化なし
- 1： 足根関節部あるいは足背足裏の軽度な紅斑および腫脹あるいは2本までの指の紅斑および腫脹
- 2： 足根関節部あるいは足背足裏の紅斑および腫脹あるいは3本以上の指の紅斑および腫脹
- 3： 足全体の腫脹・紅斑
- 4： 最大強度の足全体の腫脹・紅斑

【0107】

結果

図18に示すように、R13ペプチドを100mg/kg、10mg/kgで1日1回投与した群は、関節炎抑制効果が見られた。特に、R13ペプチドを100mg/kg投与した群では、メトトレキサートを投与した場合以上の抑制効果が見られた。一方で、スクランブルペプチドでは抑制効果は見られなかった。したがって、本発明のペプチドは関節炎抑制効果を有しており、関節炎および関連する疾患の処置及び予防に有用であることが明らかになった。また、一般症状の異常および体重に対する作用は、用いたペプチドいずれにおいても認められなかった。組織学的所見においても、破壊関節部位でのペプチド投与によるTNFの発現の有意な低下も認め、破骨細胞誘導についても抑制していることが判明した。なお、メトトレキサートは微量の使用であっても重大な副作用をもたらすことが知られている。一方で、本発明のペプチドは天然由来のものであり、副作用は一切認められなかった。従って、本発明の使用は、従来用いられている医薬品と比べて有利である。

【実施例6】

【0108】

イミュノグロブリン結合能を有するペプチドを用いた抗体検出薬の検討

材料および方法

ウェスタンブロット法において、2次抗体の代わりにビオチン化ペプチドを用いて1次抗体を検出できるか検討した。ペプチドR5をビオチン化したものをGL Biochem (Shanghai)社に委託して作製した。

【0109】

BSAを12% SDS-PAGEにて泳動し、PVDF膜へ転写した。転写したPVDF膜を5% スキムミルクにてブロッキングした。Anti-BSA IgG (rabbit)を2000倍希釈した溶液にPVDF膜を浸し、室温で1時間反応させた。TBSTにて3回洗浄した。ビオチン化ペプチドR5をDMSOに10mg/mlとなるように溶解し、その溶液10ulを10mlのTBSTに加え(1000倍希釈)、室温で1時間反応させた。TBSTにて3回洗浄した。VECTOR Laboratories社製のABC kitを用いて、発色を行なった。発色液には硫酸ニッケルとジアミノベンジジンを、基質には過酸化水素水を用いた。

【0110】

結果

結果を図19に示す。2次抗体の代わりにビオチン化した本発明のペプチドを用いることで、PVD膜上の抗体が検出できた。従って、本発明のペプチドをビオチン化したものは、抗体の検出において有用であることが分かった。

【実施例7】

【0111】

イミュノグロブリン結合能を有するペプチドを用いた抗体精製カラムの検討

材料および方法

イミュノグロブリン結合能を有するペプチドを用いた抗体精製カラムについて検討を行った。なお、対照として、Protein Aを用いた。

10

【0112】

ペプチドカラムの作製

NHS-activated Sepharose 4B Fast Flow 1mlをPD-10 Empty columnに充填し、1mM HCl 10mlで洗浄し、PBS 10mlにて平衡化した。ペプチドR4 5mgをPBS 1mlに溶解し、カラムに添加し、室温にて4時間ローテートした。カラムをPBS 5mlにて洗浄した後、1M グリシン1mlを添加し、室温で2時間ローテートすることで未反応のNHSをブロッキングした。1M グリシンを除去し、PBS 10mlにて洗浄して、平衡化した。

【0113】

抗体の精製

アフィニティー精製用カラムに1mgのanti-BSA IgG (rabbit) (抗ウシ血清アルブミンIgG (ウサギ))を加え、室温で2時間ローテートした。PBS 15mlにて洗浄した。0.1M グリシン-HCl (pH 3.2) 5mlを加えて溶出し、100ulの1M Trisが入ったマイクロチューブに1mlずつ5回溶出した。溶出画分中のタンパク量をDC Protein Assay Kit (Bio-Rad)にて定量した。また、ヒトIgGについても同様の吸着-溶出試験を行った。

20

【0114】

結果

結果を図20に示す。本発明のペプチドを用いたカラムにおいて、精製に用いたウサギ抗体のうち70~80%を回収できた。この回収率は、対照のProtein Aよりも優れたものであった。また、本発明のペプチドを用いたアフィニティー精製用カラムは、ヒトIgGの精製にも適用できることが分かった(図21)。従って、本発明のペプチドを固定化した手段は、抗体精製において極めて有用であることが分かった。

30

【産業上の利用可能性】

【0115】

本発明により、イミュノグロブリン結合能を有するペプチドおよびかかるペプチドとの融合タンパク質、それらをコードする核酸などが得られるので、イミュノグロブリンの検出、単離、精製、関節リウマチ、およびSLE、糸球体腎炎、血管炎、関節炎などの免疫複合体病などのC1qとイミュノグロブリンとの結合により引き起こされる疾患の治療または予防用医薬組成物の分野において利用可能である。

40

【配列表フリーテキスト】

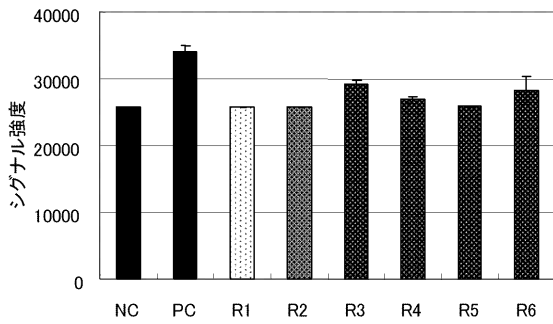
【0116】

SEQ ID NO:1:Immunoglobulin binding peptide
 SEQ ID NO:2:Immunoglobulin binding peptide
 SEQ ID NO:3:Immunoglobulin binding peptide
 SEQ ID NO:4:Immunoglobulin binding peptide
 SEQ ID NO:5:Immunoglobulin binding peptide
 SEQ ID NO:6:Immunoglobulin binding peptide
 SEQ ID NO:7:Immunoglobulin binding peptide

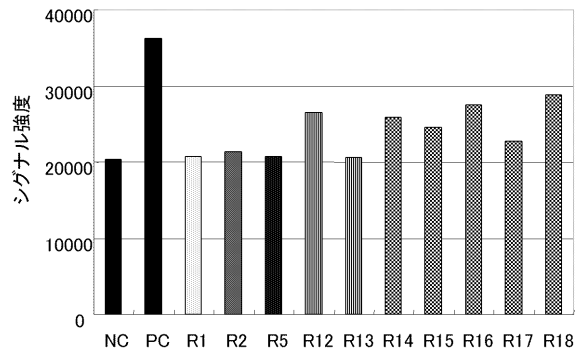
50

SEQ ID NO:23:Immunoglobulin binding peptide
SEQ ID NO:24:Immunoglobulin binding peptide
SEQ ID NO:25:Immunoglobulin binding peptide
SEQ ID NO:26:Immunoglobulin binding peptide
SEQ ID NO:27:Immunoglobulin binding peptide
SEQ ID NO:28:Immunoglobulin binding peptide
SEQ ID NO:29:Immunoglobulin binding peptide
SEQ ID NO:30:Immunoglobulin binding peptide
SEQ ID NO:31:Immunoglobulin binding peptide
SEQ ID NO:32:Immunoglobulin binding peptide

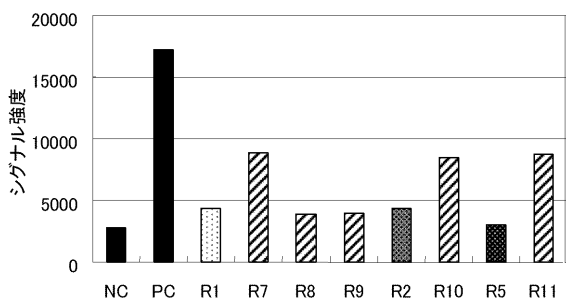
【 図 1 】



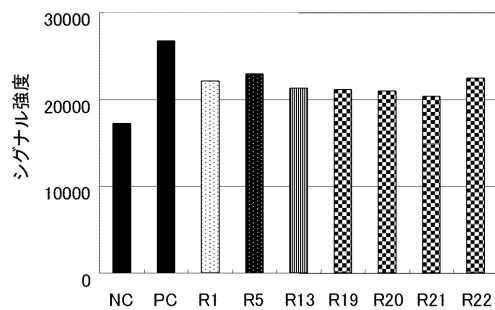
【 図 3 】



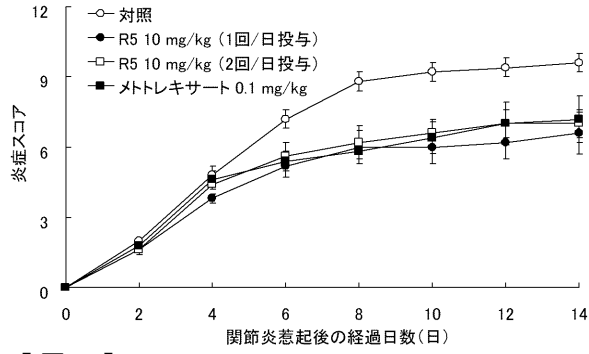
【 図 2 】



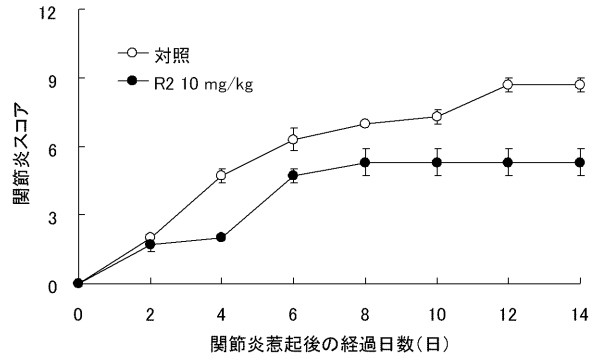
【 図 4 】



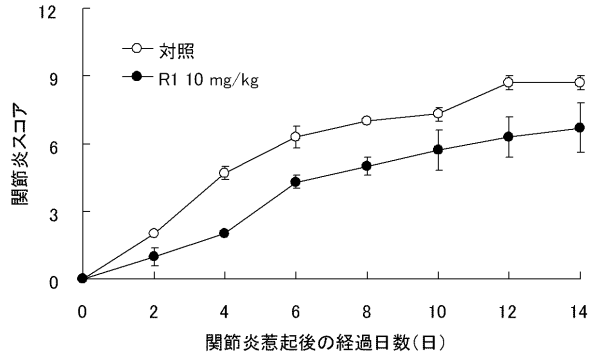
【図5】



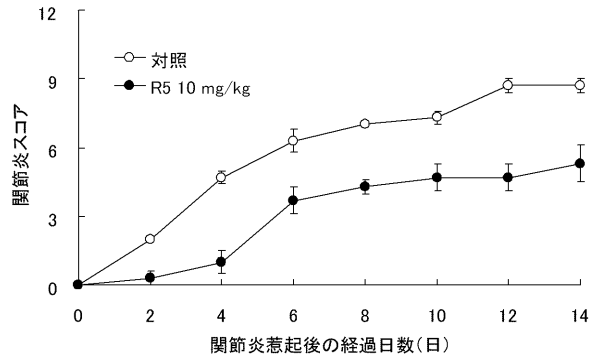
【図7】



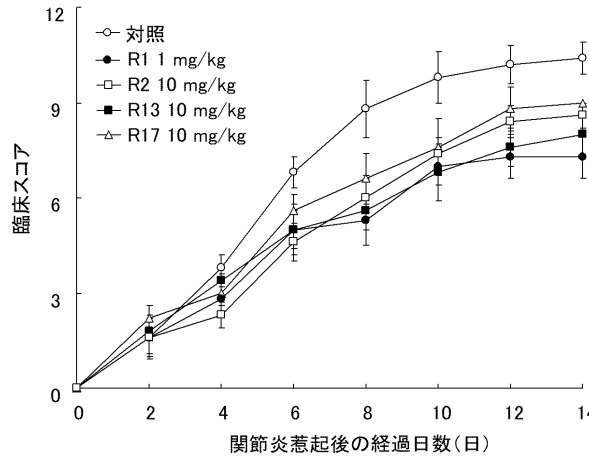
【図6】



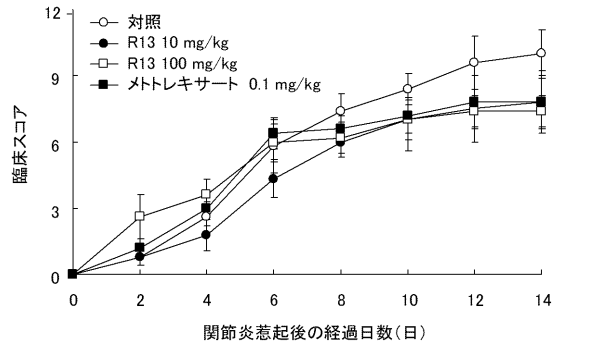
【図8】



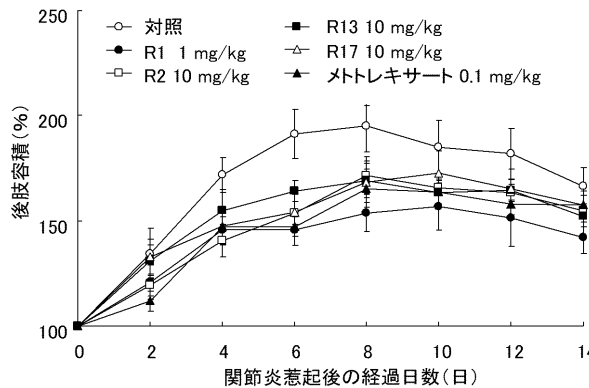
【図9】



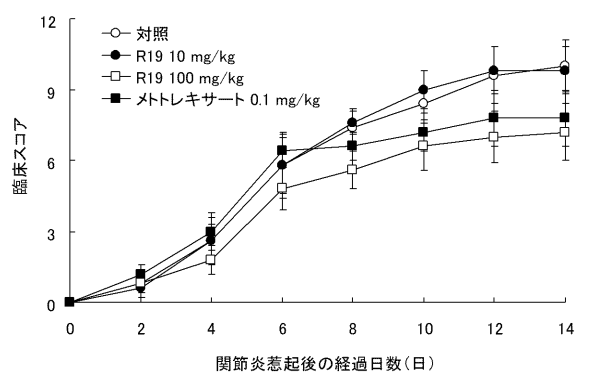
【図11】



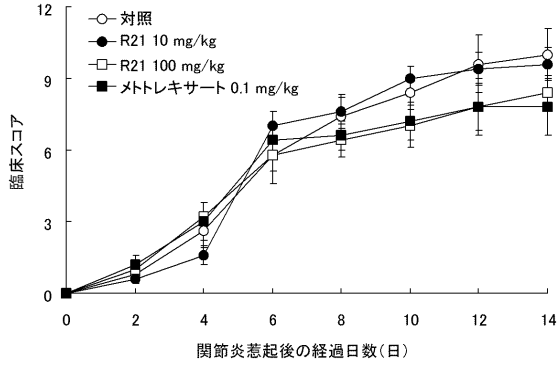
【図10】



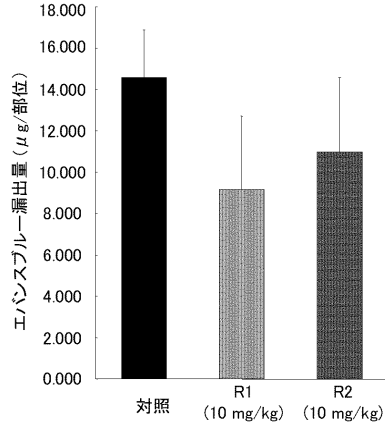
【図12】



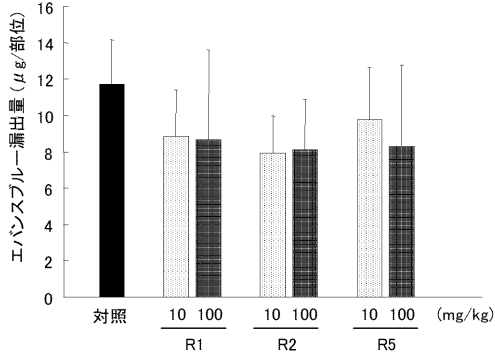
【図13】



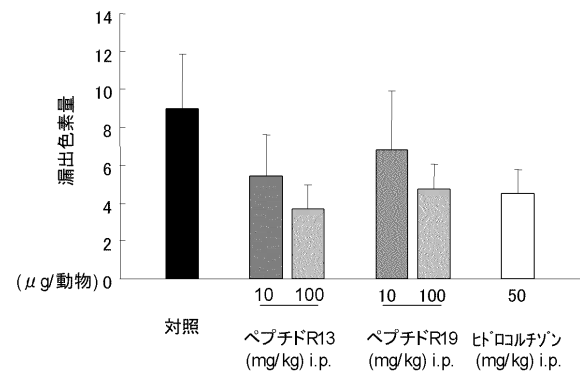
【図15】



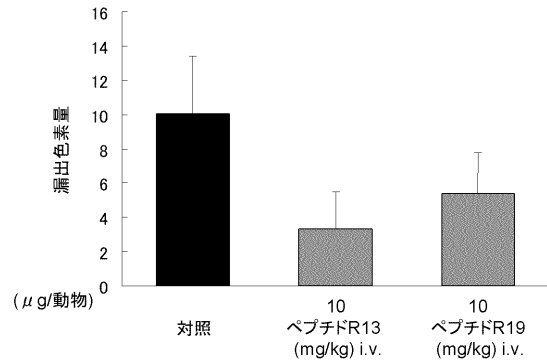
【図14】



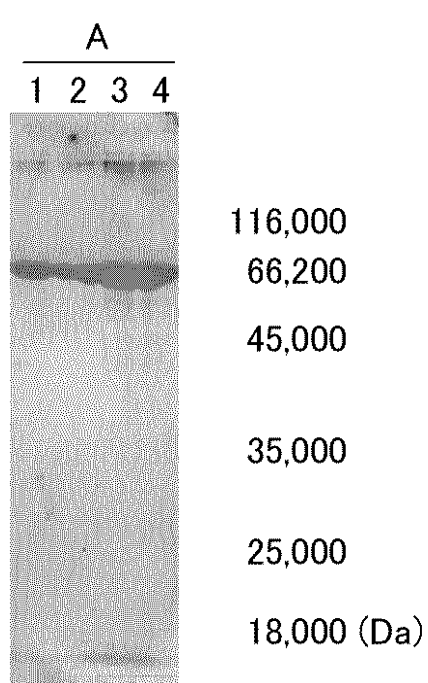
【図16】



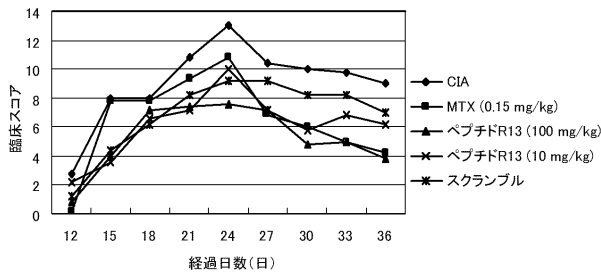
【図17】



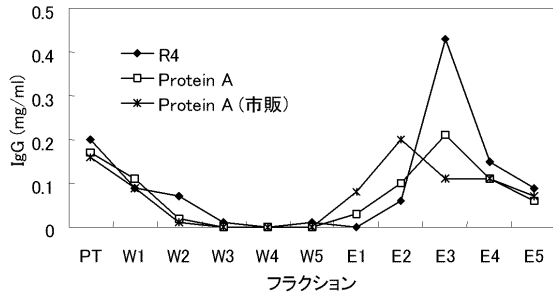
【図19】



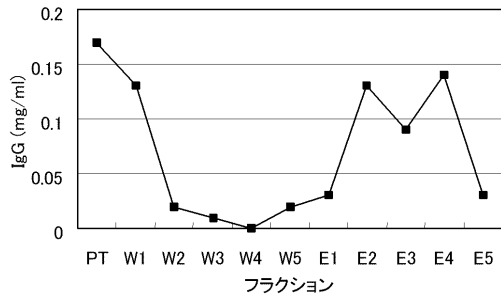
【図18】



【 図 2 0 】



【 図 2 1 】



【 配列表 】

0004705694000001.app

 フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I		
<i>A 6 1 P</i>	<i>19/02</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i>	<i>19/02</i>	
<i>A 6 1 P</i>	<i>29/00</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i>	<i>29/00</i>	<i>1 0 1</i>
<i>A 6 1 P</i>	<i>37/00</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i>	<i>37/00</i>	
<i>A 6 1 P</i>	<i>13/12</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i>	<i>13/12</i>	
<i>A 6 1 P</i>	<i>9/14</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i>	<i>9/14</i>	
<i>C 1 2 N</i>	<i>15/09</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 N</i>	<i>15/00</i>	<i>A</i>

- (56) 参考文献 国際公開第 2 0 0 8 / 0 3 5 5 2 7 (W O , A 1)
 国際公開第 2 0 0 9 / 0 2 5 3 0 0 (W O , A 1)

- (58) 調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)
 CA/REGISTRY (STN)
 JSTPlus (JDreamII)

专利名称(译)	具有免疫球蛋白结合能力的肽		
公开(公告)号	JP4705694B2	公开(公告)日	2011-06-22
申请号	JP2010520369	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)	M.有限公司茶M.		
当前申请(专利权)人(译)	M.有限公司茶M.		
[标]发明人	真崎修		
发明人	真崎 修		
IPC分类号	C07K7/06 C07K14/47 C07K19/00 G01N33/53 A61K38/00 A61P19/02 A61P29/00 A61P37/00 A61P13/12 A61P9/14 C12N15/09		
CPC分类号	A61K38/00 A61P9/00 A61P9/14 A61P13/12 A61P19/02 A61P29/00 A61P37/00 A61P37/02 C07K14/47 G01N33/564 G01N33/6854		
FI分类号	C07K7/06.ZNA C07K14/47 C07K19/00 G01N33/53.N A61K37/02 A61P19/02 A61P29/00.101 A61P37/00 A61P13/12 A61P9/14 C12N15/00.A		
代理人(译)	田中，三夫 山崎 宏 富田健二		
优先权	2009012972 2009-01-23 JP		
其他公开文献	JPWO2010084851A1		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

根据本发明，具有免疫球蛋白结合能力的肽和具有这种肽的融合蛋白，编码它们的核酸，制备方法，组合物和结合免疫球蛋白的方法，以及免疫球蛋白结合能力本发明提供用于治疗或预防由C1q与免疫球蛋白结合引起的疾病的药物组合物等，其包含肽或具有这种肽的融合蛋白。

【表1】

ペプチド番号	アミノ酸配列	配列番号	蛍光強度*
149番	SGKFTCKVPGLYYFT	3	65,300
150番	FTCKVPGLYYFTYHA	4	65,311
244番	STGKFTCKVPGLYYF	5	65,311
245番	KFTCKVPGLYYFVYH	6	65,311
246番	CKVPGLYYFVYHASH	7	65,313

*バックグラウンドの蛍光強度は2.6