



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101848926 B

(45) 授权公告日 2014. 04. 30

(21) 申请号 200880112469. 7

C12N 1/21 (2006. 01)

(22) 申请日 2008. 08. 20

C12N 5/10 (2006. 01)

(30) 优先权数据

C12N 15/09 (2006. 01)

2007-214961 2007. 08. 21 JP

C12P 21/02 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

G01N 33/566 (2006. 01)

2010. 04. 14

(56) 对比文件

(86) PCT国际申请的申请数据

WO 2003022992 A2, 2003. 03. 20, 全文.

PCT/JP2008/064837 2008. 08. 20

Grant C.Sellar et al.Characterization

(87) PCT国际申请的公布数据

and organization of the genes encoding the A-, B- and C-chain of human complement subcomponent C1q. 《Biochem. J. 》.1991, 第 274 卷图 3 和 4, 摘要.

W02009/025300 JA 2009. 02. 26

(73) 专利权人 越智隆弘

Christine Gaboriaud et al.The crystal structure of the blobular head of complement protein C1q provides a basis for its cersatile recognition properties. 《The journal of biological chemistry》.2003, 第 278 卷 (第 47 期), 全文.

地址 日本兵库县

专利权人 露珍细胞再生株式会社

株式会社 MMT

(72) 发明人 越智隆弘 柴肇一 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 梁谋 郭文洁

(51) Int. Cl.

C07K 7/06 (2006. 01)

A61K 38/00 (2006. 01)

A61P 19/02 (2006. 01)

A61P 29/00 (2006. 01)

A61P 37/02 (2006. 01)

A61P 43/00 (2006. 01)

C07K 14/47 (2006. 01)

C07K 19/00 (2006. 01)

C12N 1/15 (2006. 01)

C12N 1/19 (2006. 01)

Jason H.Slingsby et al.Homozygous hereditary C1q deficiency and systemic lupus erythematosus. 《Arthritis & rheumatism》.1996, 第 39 卷 (第 4 期), 全文.

Takahiro ochi et al.Natural course of joint destruction and fluctuation of serum C1q levels in patients with rheumatoid arthritis. 《Arthritis and rheumatism》.1988, 第 31 卷 (第 1 期), 全文.

审查员 黎舒婷

权利要求书2页 说明书16页

序列表9页 附图5页

(54) 发明名称

能够结合免疫球蛋白的肽

药物组合物,其包含能够结合免疫球蛋白的肽或该肽的融合蛋白;及其他。

(57) 摘要

本发明公开了:能够结合免疫球蛋白的肽;该肽的融合蛋白;分别编码该肽和该融合蛋白的核酸;分别产生该肽和该融合蛋白的方法;用于结合免疫球蛋白的组合物和用具;用于治疗或预防由 C1q 和免疫球蛋白之间的结合引起的疾病的

1. 一种能够结合免疫球蛋白的肽,所述肽选自以下:
 - (a) 由 SEQ ID NO:1-7 氨基酸序列中任何一个序列组成的肽;和
 - (b) 由 SEQ ID NO:23-27 氨基酸序列中任何一个序列组成的肽。
2. 权利要求 1 的肽,其由 SEQ ID NO:1-7 氨基酸序列中任何一个序列组成。
3. 权利要求 1 或 2 的肽,其由 SEQ ID NO:1 氨基酸序列组成。
4. 一种编码能够结合免疫球蛋白的肽的核酸,所述核酸选自以下:
 - (a) 编码根据权利要求 1 的肽的核酸;和
 - (b) 由 SEQ ID NO:8-16 核苷酸序列中任何一个序列组成的核酸。
5. 根据权利要求 4 的核酸,其由 SEQ ID NO:8-16 核苷酸序列中任何一个序列组成。
6. 根据权利要求 4 或 5 的核酸,其由 SEQ ID NO:8 或 9 核苷酸序列组成。
7. 一种包含根据权利要求 4-6 中任一项的核酸的载体。
8. 一种融合蛋白,其中根据权利要求 1-3 中任一项的肽附加到靶蛋白的 N 末端和 / 或 C 末端。
9. 一种编码根据权利要求 8 的融合蛋白的核酸。
10. 一种包含根据权利要求 9 的核酸的载体。
11. 一种包含根据权利要求 4-6 或 9 中任一项的核酸或者根据权利要求 7 或 10 的载体的细胞。
12. 一种产生能够结合免疫球蛋白的肽的方法,所述方法包括以下步骤:
 - (a) 用根据权利要求 7 的载体转化细胞;和
 - (b) 培养所述细胞以产生所述肽。
13. 一种能够结合免疫球蛋白的肽,其可通过根据权利要求 12 的方法获得。
14. 一种产生其中能够结合免疫球蛋白的肽附加到靶蛋白的 N 末端和 / 或 C 末端的融合蛋白的方法,所述方法包括以下步骤:
 - (a) 用根据权利要求 10 的载体转化细胞;和
 - (b) 培养所述细胞以产生所述融合蛋白。
15. 根据权利要求 14 的方法,所述方法还包括从融合蛋白获得靶蛋白的步骤。
16. 一种融合蛋白,其可通过根据权利要求 14 或 15 的方法获得。
17. 一种用于结合免疫球蛋白的组合物,所述组合物包含根据权利要求 1-3 中任一项的肽或者根据权利要求 8 的融合蛋白。
18. 根据权利要求 17 的组合物,其用于测定免疫球蛋白的存在或数量,或者用于分离免疫球蛋白。
19. 一种用于结合免疫球蛋白的用具,所述用具上固定化了根据权利要求 1-3 中任一项的肽或者根据权利要求 8 的融合蛋白。
20. 根据权利要求 19 的用具,其用于测定免疫球蛋白的存在或数量,或者用于分离免疫球蛋白。
21. 一种用于结合免疫球蛋白的方法,所述方法包括:
 - (a) 向样品加入根据权利要求 1-3 中任一项的肽或者根据权利要求 8 的融合蛋白;和
 - (b) 检查所述肽或融合蛋白与免疫球蛋白的复合物,其中所述样品不是人或动物本身。

22. 一种供用于根据权利要求 21 的方法的试剂盒,所述试剂盒包含权利要求 1-3 中任一项的肽或者含有该肽的融合蛋白。

23. 一种用于治疗或预防由 C1q 和免疫球蛋白之间的结合引起的疾病的药物组合物,所述药物组合物包含根据权利要求 1-3 中任一项的肽或者根据权利要求 8 的融合蛋白。

24. 根据权利要求 23 的药物组合物,其中所述疾病是类风湿性关节炎。

25. 根据权利要求 23 的药物组合物,其中所述疾病是免疫复合物疾病。

26. 根据权利要求 25 的药物组合物,其中所述疾病是系统性红斑狼疮 (SLE)、血管球性肾炎、血管炎或关节炎。

27. 根据权利要求 1-3 中任一项的肽或者根据权利要求 8 的融合蛋白,其是经标记的。

28. 一种用于检测样品中的抗体的方法,所述方法包括使根据权利要求 27 的经标记的肽或融合蛋白与样品中的抗体反应,然后检测结合于抗体的所述肽或所述融合蛋白,其中所述样品不是人或动物本身。

能够结合免疫球蛋白的肽

技术领域

[0001] 本发明涉及能够结合免疫球蛋白的肽、该肽的融合蛋白、编码该肽和该融合蛋白的核酸、该肽和该融合蛋白的产生方法、用于结合免疫球蛋白的组合物和用具。本发明还涉及包含能够结合该免疫球蛋白的肽或该肽的融合蛋白的,用于治疗或预防由 C1q 和免疫球蛋白之间的结合引起的疾病的药物组合物,以及其他方面。

背景技术

[0002] C1q 是一种补体蛋白,已知能在补体激活途径中起作用。例如,已知该经典途径的激活是由 C1q 结合免疫球蛋白分子的 Fc 片断引发的。

[0003] 已报道,血液中 C1q 浓度很高的类风湿性关节炎 (RA) 患者将来会遭受关节破坏 (非专利文献 1)。由于据信涉及以上所述的 C1q 激活,因此需要开发针对 C1q 和免疫球蛋白分子之间的结合的抑制剂。

[0004] 已报道,C1q B 亚单位 (B 链) 上的精氨酸残基可能参与 C1q 和免疫球蛋白分子之间的结合 (非专利文献 2)。但是,由于这个报道是基于通过计算机模拟得出的预测结果,实际的免疫球蛋白结合位点并不清楚。另外,没有关于结合位点的氨基酸序列的详情。

[0005] 能特异性结合免疫球蛋白的蛋白质如 A 蛋白或 G 蛋白被用于免疫球蛋白的纯化。但是,由于这些蛋白质强烈结合免疫球蛋白,它们一旦被结合,需要苛刻的条件才能分离,例如使用强酸性缓冲剂来分离。由于这个原因,免疫球蛋白的构象容易发生解折叠,不能纯化出高亲和力抗体。

[0006] 非专利文献 1:Ochi T 等人, Arthritis Rheum. 1988 年 1 月 ;31(1) :37-73

[0007] 非专利文献 2:Gaboriaud C 等人, J Biol Chem. 2003 年 11 月 21 日 ;278(47) :46974-82。Epub 2003 年 9 月 5 日

[0008] 发明公开内容

[0009] 本发明所要解决的问题

[0010] 本发明的一个目标是提供能够结合免疫球蛋白的肽、该肽的融合蛋白、编码该肽和该融合蛋白的核酸、包含所述核酸的载体,以及其他方面。另外,本发明的另一个目标是提供一种新型抗体纯化方法,所述方法能让对抗原具有高亲和力的抗体得到纯化而不使该抗体的构象发生解折叠,以及用于该方法的组合物和用具。

[0011] 解决问题的手段

[0012] 鉴于上述情况,本发明人进行了认真的研究,结果成功鉴定出参与 C1q 和免疫球蛋白之间的结合的氨基酸序列,从而完成本发明。另外,该氨基酸序列出人意料地不含有据报道参与该结合的精氨酸残基。另外,由于包含这个氨基酸序列的肽能比 A 蛋白和 G 蛋白更弱地结合免疫球蛋白,它解决了常规的抗体纯化所造成的问题,如抗体的构象的解折叠,以及对于靶向用于纯化的抗体的限制 (如不能够纯化对抗原具有高亲和力的抗体),并且使得能够在温和条件下进行抗体纯化。

[0013] 也就是说,本发明涉及

- [0014] (1) 选自以下的能够结合免疫球蛋白的肽：
- [0015] (a) 具有 SEQ ID NO :1-7 氨基酸序列中任何一个序列的肽；
- [0016] (b) 具有由 SEQ ID NO :1-7 氨基酸序列中任何一个序列缺失、置换或添加一个或几个氨基酸得到的氨基酸序列的肽；和
- [0017] (c) 具有与 SEQ ID NO :1-7 氨基酸序列中任何一个序列有 66.7% 或更高同源性的氨基酸序列的肽，
- [0018] (2) 根据 (1) 的肽，其具有 SEQ ID NO :1-7 氨基酸序列中任何一个序列，
- [0019] (3) 根据 (1) 或 (2) 的肽，其具有 SEQ ID NO :1 氨基酸序列，
- [0020] (4) 选自以下的编码能够结合免疫球蛋白的肽的核酸：
- [0021] (a) 编码根据 (1) 的肽的核酸；
- [0022] (b) 具有 SEQ ID NO :8-16 核苷酸序列中任何一个序列的核酸；
- [0023] (c) 具有由 SEQ ID NO :8-16 核苷酸序列中任何一个序列缺失、置换或添加一个或几个核苷酸得到的核苷酸序列的核酸；
- [0024] (d) 可在严格条件下与 (b) 或 (c) 的核酸或者它们的互补链杂交的核酸；和
- [0025] (e) 具有与 SEQ ID NO :8-16 核苷酸序列中任何一个序列有 50% 或更高同源性的核苷酸序列的核酸，
- [0026] (5) 根据 (4) 的核酸，其具有 SEQ ID NO :8-16 核苷酸序列中任何一个序列，
- [0027] (6) 根据 (4) 或 (5) 的核酸，其具有 SEQ ID NO :8 或 9 核苷酸序列，
- [0028] (7) 一种包含根据 (4)-(6) 中任一项的核酸的载体，
- [0029] (8) 一种融合蛋白，其中根据 (1)-(3) 中任一项的肽附加到靶蛋白的 N 末端和 / 或 C 末端，
- [0030] (9) 一种编码根据 (8) 的融合蛋白的核酸，
- [0031] (10) 一种包含根据 (9) 的核酸的载体，
- [0032] (11) 一种包含根据 (4)-(6) 或 (9) 中任一项的核酸或者根据 (7) 或 (10) 的载体的细胞，
- [0033] (12) 一种产生能够结合免疫球蛋白的肽的方法，所述方法包括以下步骤：
- [0034] (a) 用根据 (7) 的载体转化细胞；和
- [0035] (b) 培养所述细胞以产生所述肽，
- [0036] (13) 一种能够结合免疫球蛋白的肽，其可通过根据 (12) 的方法获得，
- [0037] (14) 一种产生其中能够结合免疫球蛋白的肽附加到靶蛋白的 N 末端和 / 或 C 末端的融合蛋白的方法，所述方法包括以下步骤：
- [0038] (a) 用根据 (10) 的载体转化细胞；和
- [0039] (b) 培养所述细胞以产生所述融合蛋白，
- [0040] (15) 根据 (14) 的方法，所述方法还包括从融合蛋白获得靶蛋白的步骤，
- [0041] (16) 一种融合蛋白，其可通过根据 (14) 或 (15) 的方法获得，
- [0042] (17) 一种用于结合免疫球蛋白的组合物，所述组合物包含根据 (1)-(3) 中任一项的肽或者根据 (8) 的融合蛋白，
- [0043] (18) 根据 (17) 的组合物，其用于测定免疫球蛋白的存在或数量，或者用于分离免疫球蛋白，

[0044] (19) 一种用于结合免疫球蛋白的用具,所述用具上固定化了根据(1)-(3)中任一项的肽或者根据(8)的融合蛋白,

[0045] (20) 根据(19)的用具,其用于测定免疫球蛋白的存在或数量,或者用于分离免疫球蛋白,

[0046] (21) 一种用于结合免疫球蛋白的方法,所述方法包括:

[0047] (a) 向样品加入根据(1)-(3)中任一项的肽或者根据(8)的融合蛋白;和

[0048] (b) 检查所述肽或融合蛋白与免疫球蛋白的复合物,

[0049] (22) 一种供用于根据(21)的方法的试剂盒,所述试剂盒包含能够结合免疫球蛋白的肽或者含有该肽的融合蛋白,

[0050] (23) 一种用于治疗或预防由C1q和免疫球蛋白之间的结合引起的疾病的药物组合物,所述药物组合物包含根据(1)-(3)中任一项的肽或者根据(8)的融合蛋白,

[0051] (24) 根据(23)的药物组合物,其中所述疾病是类风湿性关节炎,

[0052] (25) 根据(23)的药物组合物,其中所述疾病是免疫复合物疾病,如系统性红斑狼疮(SLE)、血管球性肾炎、血管炎或关节炎,

[0053] (26) 根据(1)-(3)中任一项的肽或者根据(8)的融合蛋白,其是经标记的,和

[0054] (27) 一种用于检测样品中的抗体的方法,所述方法包括使根据(26)的经标记的肽或融合蛋白与样品中的抗体反应,然后检测与抗体结合的所述肽或所述融合蛋白。

[0055] 发明的效果

[0056] 根据本发明,提供了以下方面:能够结合免疫球蛋白的肽,该肽的融合蛋白,编码该肽和该融合蛋白的核酸,该肽和该融合蛋白的产生方法,用于结合免疫球蛋白的组合物和用具,和用于治疗或预防由C1q和免疫球蛋白之间的结合引起的疾病的药物组合物,该药物组合物包含该能够结合免疫球蛋白的肽或该肽的融合蛋白,以及其他方面。

[0057] 附图简述

[0058] 图1显示具有6个氨基酸的肽R1、具有9个氨基酸的肽R2和具有15个氨基酸的肽R3-R6能抑制C1q和免疫球蛋白之间的结合。在这个图中,NC是其中无肽的DMSO加到不含碱性磷酸酶(ALP)标记人免疫球蛋白(IgG)的反应溶液所得的样品的结果,PC是其中无肽的DMSO加到不含碱性磷酸酶(ALP)标记人免疫球蛋白(IgG)的反应溶液所得的样品的结果。

[0059] 图2显示具有6个氨基酸的突变肽R7-R9、具有9个氨基酸的突变肽10和具有15个氨基酸的突变肽R11能抑制C1q和免疫球蛋白之间的结合。在这个图中,NC是其中无肽的DMSO加到不含碱性磷酸酶(ALP)标记人免疫球蛋白(IgG)的反应溶液所得的样品的结果,PC是其中无肽的DMSO加到不含碱性磷酸酶(ALP)标记人免疫球蛋白(IgG)的反应溶液所得的样品的结果。

[0060] 图3显示在关节炎诱发的小鼠中通过腹膜内给予(每天一次给予或者每天分两次给予)10mg/kg的肽R5,关节炎得到了抑制。作为对照,显示了每天给予一次无肽的0.5%甲基纤维素溶液的小鼠的结果和每天给予一次0.1mg/kg甲氨喋呤溶液的小鼠的结果。

[0061] 图4显示在关节炎诱发的小鼠中通过腹膜内给予10mg/kg的肽R1,关节炎得到了抑制。作为对照,显示了类似地给予无肽的0.5%甲基纤维素溶液的小鼠的结果。

[0062] 图5显示在关节炎诱发的小鼠中通过腹膜内给予10mg/kg的肽R2,关节炎得到了

抑制。作为对照,显示了类似地给予无肽的 0.5% 甲基纤维素溶液的小鼠的结果。

[0063] 图 6 显示在关节炎诱发的小鼠中通过腹膜内给予 10mg/kg 的肽 R5,关节炎得到了抑制。作为对照,显示了类似地给予无肽的 0.5% 甲基纤维素溶液的小鼠的结果。

[0064] 图 7 显示了在 III 型过敏性 (Arthus) 反应诱发的大鼠中通过腹膜内给予 10mg/kg 或 100mg/kg 的肽 R1、R2 或 R5,免疫复合物疾病如 SLE、血管球性肾炎、血管炎或关节炎得到了抑制。作为对照,显示了类似地给予无肽的生理盐水的大鼠的结果。

[0065] 图 8 显示了在 III 型过敏性 (Arthus) 反应诱发的大鼠中通过在尾静脉给予 10mg/kg 的肽 R1 或 R2,免疫复合物疾病如 SLE、血管球性肾炎、血管炎或关节炎得到了抑制。作为对照,显示了类似地给予无肽的生理盐水的大鼠的结果。

[0066] 图 9 显示用本发明的肽检测到抗体。对于每个条带,使用了以下数量的 BSA:条带 1,0.1 μ g BSA;条带 2,0.5 μ g BSA;条带 3,1.0 μ g BSA;条带 4,2.0 μ g BSA。

[0067] 图 10 显示通过使用本发明肽的亲纯化柱纯化到了兔抗体。作为对照,显示了使用 A 蛋白进行纯化的结果。各数值表示每个流份中 IgG 蛋白的数量 (mg/ml)。在图中,PT 代表流通流份,W1-5 代表洗涤流份,E1-5 代表洗脱流份。

[0068] 图 11 显示通过使用本发明肽的亲纯化柱纯化到了人抗体。各数值表示每个流份中 IgG 蛋白的数量 (mg/ml)。在图中,PT 代表流通流份,W1-5 代表洗涤流份,E1-5 代表洗脱流份。

[0069] 实施本发明的最佳方式

[0070] 在一个方面,本发明涉及选自以下的能够结合免疫球蛋白的肽:

[0071] (a) 具有 SEQ ID NO:1-7 氨基酸序列中任何一个序列的肽;

[0072] (b) 具有由 SEQ ID NO:1-7 氨基酸序列中任何一个序列缺失、置换或添加一个或几个氨基酸得到的氨基酸序列的肽;和

[0073] (c) 具有与 SEQ ID NO:1-7 氨基酸序列中任何一个序列有 66.7% 或更高同源性的氨基酸序列的肽。本发明的肽与 A 蛋白和 G 蛋白相比对免疫球蛋白具有低亲和力,因此比如说,与本发明的肽结合的免疫球蛋白可以在温和条件下解离,等等。另外,结合本发明肽的免疫球蛋白本身的变性也降低。亲和力可通过相关技术领域的已知方法来评估。例如,可将肽在免疫球蛋白的存在下进行温育以直接检查是否有结合。

[0074] 本发明的肽能够结合免疫球蛋白。上述的肽是具有 SEQ ID NO:1-7 氨基酸序列中任何一个序列的肽,具有由 SEQ ID NO:1-7 氨基酸序列中任何一个序列缺失、置换或添加一个或多个、优选一个或几个、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的肽(突变肽),和具有与 SEQ ID NO:1-7 氨基酸序列中任何一个序列有例如 26.6% 或更高或者 44.4% 或更高、优选至少 50% 或更高、更优选例如 60、66.7、70、75、80、83.3、85、90、93% 或更高同源性的氨基酸序列的肽。氨基酸序列同源性可用例如 FASTA、BLAST、DNASIS(Hitachi Software Engineering Co., Ltd 出品)或 GENETYX(Genetyx Corporation 出品)来计算。或者,在短肽的情况下,还可通过将序列简单地进行比较来计算。另外,任何这些氨基酸可进行适当修饰。不管肽具有哪个氨基酸序列,本发明的肽都能够结合免疫球蛋白。

[0075] 本发明的肽可以是任何一个肽,只要它是具有上述的氨基酸序列的肽。例如,它可以是由 SEQ ID NO:1-7 本身任何一个序列所示的氨基酸序列组成的肽本身,或者它可包含

上述的氨基酸序列或其同源序列作为核心序列,且具有多种附加到该氨基酸序列的 N 末端和 / 或 C 末端的物质,如肽或氨基酸及它们的类似物、聚乙二醇、糖类、多糖或核苷酸。诸如荧光标记、生物素、链霉亲和素、地高辛 (DIG)、磁珠、胶乳珠或金胶体的物质可经由氨基酸或肽附加到所述 N/C 末端。例如,当结合上肽时,这种肽可以是包含 1-50 个、例如 1-20、1-15 或 1-9 个氨基酸的肽。另外,这种肽可以是具有诸如充当组氨酸标签、GST 标签、S 标签、Myc 标签、HA 标签或 E 标签的功能的肽。

[0076] 本发明的肽可通过本领域技术人员知道的多种方法产生和获得。例如,它可基于编码本发明的肽的核苷酸序列通过遗传工程方式产生。由于如上所述本发明的肽能够结合免疫球蛋白,通过使用这种肽来结合免疫球蛋白,可以测定免疫球蛋白的存在或数量,分离免疫球蛋白,等等。

[0077] 在另一个方面,本发明涉及编码能够结合免疫球蛋白的肽的核酸,所述核酸选自以下:

[0078] (a) 编码上述的肽的核酸;

[0079] (b) 具有 SEQ ID NO :8-16 核苷酸序列中任何一个序列的核酸;

[0080] (c) 具有由 SEQ ID NO :8-16 核苷酸序列中任何一个序列缺失、置换或添加一个或几个核苷酸得到的核苷酸序列的核酸;

[0081] (d) 可在严格条件下与 (b) 或 (c) 的核酸或者它们的互补链杂交的核酸;和

[0082] (e) 具有与 SEQ ID NO :8-16 核苷酸序列中任何一个序列有 50% 或更高同源性的核苷酸序列的核酸。在本文中,核酸指单链或双链 DNA 或 RNA。本发明的核酸可通过本领域技术人员知道的多种方法产生和获得。在本发明中,SEQ ID NO :8、10、12 和 13 核苷酸序列源自 C1q B 亚单位,分别编码 SEQ ID NO :1、2、3 和 4 氨基酸序列。类似地,SEQ ID NO :9、11 和 14-16 核苷酸序列源自 C1q C 亚单位,分别编码 SEQ ID NO :1、2、5 和 6 氨基酸序列。

[0083] 具体地讲,本发明的核酸是:(1) 编码具有 SEQ ID NO :1-7 氨基酸序列中任何一个序列的肽的核酸,(2) 编码具有由 SEQ ID NO :1-7 氨基酸序列中任何一个序列缺失、置换或添加一个或多个、优选一个或几个、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的肽的核酸,(3) 编码具有与 SEQ ID NO :1-7 氨基酸序列中任何一个序列有例如 26.6% 或更高或者 44.4% 或更高、优选至少 50% 或更高、更优选例如 60、66.7、70、75、80、83.3、85、90、93% 或更高同源性的氨基酸序列的肽的核酸,(4) 具有 SEQ ID NO :8-16 核苷酸序列中任何一个序列的核酸,(5) 具有由 SEQ ID NO :8-16 核苷酸序列中任何一个序列缺失、置换或添加一个或多个、优选一个或几个、例如 2、3、4、5、6、7、8 或 9 个核苷酸得到的核苷酸序列的核酸,(6) 可在严格条件下与 (3) 或 (4) 的核酸或者它们的互补链杂交的核酸,和 (7) 具有与 SEQ ID NO :8-16 核苷酸序列中任何一个序列有至少 50% 或更高、优选例如 60、70、75、80、90、93、95 或 97% 或更高同源性的核苷酸序列的核酸,等等。另外,任何这些核苷酸可进行适当修饰。不管核酸具有哪个核苷酸序列,本发明的核酸都可编码能够结合免疫球蛋白的肽。

[0084] 作为以上提到的严格条件,例如可举出诸如 J. Sambrook 等人, "Molecular Cloning :A Laboratory Manual, Second Edition", 1989, ColdSpring Harbor Laboratory Press 中描述的条件。例如,在含有 6×SSC、5×Denhardt 溶液、0.5% SDS 和 100 μg/ml 变性鲑精 DNA 的溶液在 68°C 下与探针杂交之后,将洗涤条件从 2×SSC、0.1% SDS 中室温变

成在 $0.1 \times \text{SSC}$, 0.5% SDS 中 68°C 的条件;在 65°C 下、在含有 $2 \times \text{SSPE}$ (描述于 Frederick M. Ausubel 等人, "Current Protocols in Molecular Biology", 1987, John Wiley & Sons, Hoboken NJ.) 和 0.1% SDS 的溶液中 15 分钟两次、再在含有 $0.5 \times \text{SSPE}$ 和 0.1% SDS 的溶液中 15 分钟两次、然后在含有 $0.1 \times \text{SSPE}$ 和 0.1% SDS 的溶液中 15 分钟两次的这么一种条件;或者在 65°C 下、在含有 $2 \times \text{SSPE}$, 0.1% SDS 和甲酰胺 (5-50%) 的溶液中 15 分钟两次、再在含有 $0.5 \times \text{SSPE}$, 0.1% SDS 和甲酰胺 (5-50%) 的溶液中 15 分钟两次、然后在含有 $0.1 \times \text{SSPE}$, 0.1% SDS 和甲酰胺 (5-50%) 的溶液中 15 分钟两次的这么一种条件,等等。

[0085] 上述的核苷酸序列同源性可用例如 FASTA、BLAST、DNASIS (Hitachi Software Engineering Co., Ltd 出品) 或 GENETYX (Genetyx Corporation 出品) 来计算。

[0086] 本发明的核酸可以是任何核酸,只要它具有上述的核苷酸序列。例如,它可以是由 SEQ ID NO:8-16 核苷酸序列本身任何一个序列组成的核酸,或者它可包含上述的核苷酸序列作为核心序列,且具有多种结合到该序列的 $5'$ 末端和 / 或 $3'$ 末端的物质,如核苷酸、多核苷酸或它们的类似物。例如,当结合上多核苷酸时,所述多核苷酸可以是包含 1-150 个、例如 1-60、1-45 或 1-18 个核苷酸的多核苷酸。

[0087] 在另一方面,本发明涉及包含上述核酸的载体。本发明的载体可以是任何载体,只要它包含上述核酸。载体的类型、上述核酸的核苷酸序列以外的序列等,可根据诸如导入该载体的宿主的类型以及目的等各种条件进行选择。例如,本发明的载体也可用作其中能够结合免疫球蛋白的肽附加到靶蛋白的 N 末端或 C 末端的融合蛋白的表达载体,所述附加是通过将编码靶蛋白的核苷酸序列同框插入在 SEQ IDNO:8 或 9 核苷酸序列的 $5'$ 末端 $3'$ 或末端进行。为了容易从融合蛋白分离靶蛋白,本发明的载体可含有在上述核苷酸序列和靶蛋白核苷酸序列插入位点之间的,能被诸如 HRV 3C、凝血酶、Xa 因子或肠激酶的蛋白酶识别的序列。可通过将本发明的载体导入细胞中以产生蛋白质,来获得上述本发明的能够结合免疫球蛋白的肽。

[0088] 在另一个方面,本发明涉及其中能够结合免疫球蛋白的本发明肽附加到靶蛋白的 N 末端和 / 或 C 末端的融合蛋白。本发明的融合蛋白可通过本领域技术人员知道的多种方法产生和获得。由于本发明的融合蛋白是包含能够结合免疫球蛋白的肽的融合蛋白,可将这种肽用作标签序列以分离和 / 或纯化靶蛋白,等等。另外,由于如上所述,本发明的肽对免疫球蛋白的亲和力低,本发明的融合蛋白具有诸如以下的优点:比如当在纯化柱上固定化时,可以在比 A 蛋白或 G 蛋白温和的条件下纯化免疫球蛋白并反复使用该柱(柱的劣化得到抑制),又比如当用作探针以检测免疫球蛋白时,可容易进行再探测。

[0089] 本发明融合蛋白中所含的靶蛋白可以是任何蛋白质。当本发明的融合蛋白含有诸如碱性磷酸酶 (ALP)、过氧化物酶 (HRP)、荧光蛋白如萤光素酶或绿色荧光蛋白 (GFP)、 β -半乳糖苷酶、谷胱甘肽 S-转移酶或麦芽糖结合蛋白的酶作为靶蛋白时,可容易检测本发明融合蛋白中所含的能够结合免疫球蛋白的肽与免疫球蛋白之间的结合,等等。另外,本发明的融合蛋白可含有例如诸如以下的标签序列:组氨酸标签、GST 标签、S 标签、Myc 标签、HA 标签或 E 标签、核定位信号、二氧化硅结合蛋白或者 A 蛋白,以及其他标签序列。

[0090] 本发明的融合蛋白可含有在本发明肽和靶蛋白之间的能被蛋白酶识别的肽。含有这种肽可使得靶蛋白容易从融合蛋白分离。

[0091] 因此,在另一个方面,本发明涉及编码上述融合蛋白的核酸。

[0092] 另外,本发明涉及包含编码上述融合蛋白的核酸的载体。可通过将这种载体导入细胞中产生蛋白质,来获得本发明的融合蛋白。

[0093] 在一个方面,本发明涉及包含有编码上述能够结合免疫球蛋白的肽的核酸、编码上述融合蛋白的核酸或者包含这些核酸的载体的细胞。可通过用上述的核酸或载体转化宿主细胞如大肠杆菌、酵母、昆虫细胞或动物细胞,来产生本发明的细胞。还可通过培养本发明的细胞,并收集所产生的能够结合免疫球蛋白的肽或者含有能够结合免疫球蛋白的肽的融合蛋白,来产生本发明的肽或者融合蛋白。

[0094] 在另一方面,本发明涉及产生能够结合免疫球蛋白的肽的方法,所述方法包括以下步骤:

[0095] (a) 用包含编码能够结合免疫球蛋白的肽的核酸的载体转化细胞;和

[0096] (b) 培养所述细胞以产生所述肽。

[0097] 细胞的转化可通过本领域技术人员知道的手段和/或方法来进行。

[0098] 因此,本发明涉及可通过上述肽产生方法获得的,能够结合免疫球蛋白的肽。

[0099] 在另一个方面,本发明涉及产生其中能够结合免疫球蛋白的肽附加到靶蛋白的N末端和/或C末端的融合蛋白的方法,所述方法包括以下步骤:

[0100] (a) 用包含编码其中能够结合免疫球蛋白的肽附加到靶蛋白的N末端和/或C末端的融合蛋白的核酸的载体转化细胞;和

[0101] (b) 培养所述细胞以产生所述融合蛋白。

[0102] 本发明融合蛋白的产生方法还可包括从融合蛋白获得靶蛋白的步骤。

[0103] 因此,本发明涉及可通过上述的融合蛋白产生方法获得的,其中能够结合免疫球蛋白的肽附加到靶蛋白的N末端和/或C末端的融合蛋白。

[0104] 在一个方面,本发明涉及用于结合免疫球蛋白的组合物,所述组合物包含能够结合免疫球蛋白的肽或者含有这种肽的融合蛋白。可根据各种条件,例如本发明组合物的使用目的,适当选择上述肽或融合蛋白质之外的成分。如上所述,由于本发明的组合物含有能够结合免疫球蛋白的肽,本发明的组合物可以是例如用于检测免疫球蛋白的存在或数量的组合物,或者用于分离免疫球蛋白的组合物。借助本发明的组合物,可以测定样品中的免疫球蛋白的数量,从样品分离免疫球蛋白,等等。

[0105] 在另一个方面,本发明涉及用于结合免疫球蛋白的用具,所述用具上固定化有能够结合免疫球蛋白的肽或者含有这种肽的融合蛋白。本发明的用具是这样的用具,其中上述的肽或融合蛋白固定化在诸如板、树脂、柱、珠粒、含有糖如琼脂糖或琼脂糖凝胶的树脂、硅石底物、玻璃(载玻璃及其他玻璃)、金属(金及其他金属)或者磷灰石的载体上。固定化可通过本领域技术人员知道的手段/方法进行,例如经由肽或蛋白质的氨基或羧基进行的方法、经由氨基酸侧链的SH基团进行的方法、通过离子相互作用进行的方法和通过疏水相互作用进行的方法。

[0106] 由于如上所述,本发明的用具是其上固定化有能够结合免疫球蛋白的肽的用具,本发明的用具包括用于测定免疫球蛋白的存在或数量的用具和用于分离免疫球蛋白的用具。本发明的用具还可用作例如ELISA板、免疫球蛋白纯化柱、检测用玻璃阵列、微流体系统、SPR传感器芯片、检测用硅石底物、药物抗体纯化系统,等等。

[0107] 在另一方面,本发明涉及结合免疫球蛋白的方法,所述方法包括以下步骤:

[0108] (a) 向样品加入能够结合免疫球蛋白的肽或者含有这种肽的融合蛋白 ;和

[0109] (b) 检查所述肽或融合蛋白与免疫球蛋白的复合物。

[0110] 样品可以是任何样品,只要该样品可含有免疫球蛋白。通过检查与免疫球蛋白所成的复合物的存在和 / 或数量,可以确定样品中是否存在免疫球蛋白,并且确定样品中存在的免疫球蛋白的数量,等等。本发明方法中所用的肽或融合蛋白可以是经过标记的。标记可包括本领域技术人员知道的各种标记,如生物素酰化标记、荧光标记、RI 标记或酶标记。加入这样的标记有助于检查与肽或融合蛋白所成的复合物。另外,本发明的方法可包括从复合物分离免疫球蛋白的步骤。

[0111] 因此,本发明涉及供在用于结合免疫球蛋白的方法中使用的试剂盒,所述试剂盒装有能够结合免疫球蛋白的肽或包含这种肽的融合蛋白。除了上述的肽或融合蛋白之外,本发明的试剂盒还装有例如标记、检查复合物的用具,等等。

[0112] 在其他方面,本发明涉及用于治疗或预防由 C1q 和免疫球蛋白之间的结合引起的疾病的药物组合物,所述药物组合物包含有能够结合免疫球蛋白的肽或包含这种肽的融合蛋白。由 C1q 和免疫球蛋白之间的结合引起的疾病指直接或间接由这种结合引起的疾病,例如可包括免疫复合物疾病如类风湿性关节炎、关节炎、系统性红斑狼疮 (SLE)、血管炎症群或肾炎、其他炎性疾病、传染病或者恶性肿瘤,等等。本发明的药物组合物可通过用所含的能够结合免疫球蛋白的肽抑制 C1q 和免疫球蛋白之间的结合,来治疗和预防上述疾病。要指出的是,将本发明的肽给予人,所产生的副作用极少,因为本发明的肽是源自天然存在于人体内的 C1q,且只有短短 6-15 个残基。

[0113] 在另一方面,本发明涉及治疗或预防由 C1q 和免疫球蛋白之间的结合引起的疾病,所述方法包括将有效量的能够结合免疫球蛋白的肽或者包含这种肽的融合蛋白给予受试者。

[0114] 下文给出实施例,对本发明作具体且详细的描述,但是不应将这些实施例理解为限制本发明。

[0115] 实施例 1

[0116] C1q 中的为免疫球蛋白所识别的氨基酸序列的鉴定

[0117] 材料和方法

[0118] 人 C1q 的亚单位 A 链、B 链和 C 链的氨基酸序列在 SEQ ID NO :17-19 中显示,核苷酸序列在 SEQ ID NO :20-22 中显示。基于各个氨基酸序列,在玻璃阵列上合成出这样的具有氨基酸序列的序列作为合成肽:它们从每个具 15 个氨基酸(残基)的亚单位的氨基酸序列,每次以三个氨基酸的间隔移位(依次为肽编号 1-78、97-117 和 193-270)。每个肽的合成是在阵列上的特定位置进行,以制备出包含着涵括 C1q 亚单位的全体氨基酸序列的合成肽的肽阵列。说明:阵列的制作外包给 JPT 进行。

[0119] 用在 PBS(10mM 磷酸盐缓冲溶液, pH 7.0, 0.1M NaCl) 中稀释 1000 倍的 Cy3 标记山羊抗小鼠免疫球蛋白(IgG)(1mg/ml ;ZymedLaboratories 制造)330 μ l 包被肽阵列,密封后在 4°C 下温育 12 小时。然后用甲醇洗涤阵列一次,用 Milli-Q 水洗涤 5 分钟 \times 5 次。将阵列载片离心干燥,用荧光扫描仪(Agilent DNA 微阵列扫描仪 ;Agilent 制造)进行扫描,用软件(Feature Extraction 软件 ;Agilent 制造)定量阵列上的每个肽斑点的荧光强度。检测到几个显示强烈荧光强度的斑点。其中,显示荧光强度比背景水平高 60,000 倍或更高

的肽斑点的氨基酸序列 (SEQ ID NO :3-7) 在表 1 中示出。说明 :在本文中氨基酸是用相关领域公知的单字母符号来表示。

[0120] [表 1]

[0121]

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

[0122] *背景荧光强度为 2.6

[0123] 结果

[0124] 肽 No. 149 和 No. 150 具有源自 C1q B 亚单位 (B 链) 的序列, 肽 No. 244-No. 246 具有源自 C1q C 亚单位 (C 链) 的序列。从这些序列预测到, C1q 和免疫球蛋白之间的结合所需的序列是具有 CKVPGLYYF (SEQ ID NO :2) 这 9 个残基作为核心的序列。另外观察到, 若该序列含有这个核心序列, 其 N 末端或 C 末端一侧附加上氨基酸残基并不妨碍其与免疫球蛋白的结合。肽 No. 149、150 和 244-246 的核苷酸序列在 SEQ ID NO :12-16 中显示。

[0125] 实施例 2

[0126] 能够结合免疫球蛋白的肽对免疫球蛋白和 C1q 之间的结合的抑制抑制活性的检查 (1)

[0127] 材料和方法

[0128] 研究了据认为是 C1q 和免疫球蛋白 (IgG) 之间的结合所必需的 9 残基肽 CKVPGLYYF (SEQ ID NO :2) 是否能抑制 C1q 和免疫球蛋白之间的结合。具有 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列的肽 (R2)、具有比这个肽短的氨基酸序列 PGLYYF (SEQ ID NO :1) 的肽 (R1)、以及含有 SEQ ID NO :2 所示的氨基酸序列的以下肽 :具有氨基酸序列 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) 和具有氨基酸序列 CKVPGLYYFVYHASH (SEQ ID NO :7) 的肽 (R6), 外包给 GL Biochem (上海) 制备。这些肽在表 2 中示出。将每个肽溶于二甲亚砜中至 10mg/ml 的浓度并保存。

[0129] [表 2]

[0130]

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

[0131] 将人 C1q 蛋白 (Carbiochem 制造) 溶于 10mM HEPES, 300mM NaCl 和 40% 甘油 (pH 7.2) 中, 制备 200 μ g/ml 人 C1q 蛋白溶液。将人 C1q 蛋白溶液每次 2 μ l (400ng) 点滴到 5mm \times 15mm 大小的硝酸纤维膜 (Hybond C; Amersham 制造) 上, 在室温下风干大约 1 小时。将硝酸纤维膜浸入 TBS 中, 温育 5 分钟, 然后用含有 5% 封闭剂 (Amersham ECL 封闭剂; GE Healthcare 制造) 的 TBS (20mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl) 在室温下封闭 1 小时。该膜在 TBS 中稍微洗涤后, 浸入碱性磷酸酶 (ALP) 标记人免疫球蛋白 (IgG) (BECKMAN COULTER 制造) 1000 倍稀释于 TBS 中且使各肽浓度达到 500 μ g/ml 所得的混合溶液 20 μ l 中, 让其在室温下反应 1 小时。在 TTBS 溶液 (其中加入 Tween 20 至 0.05% 的最终浓度的 TBS) 中稍微洗涤后, 将膜在相同溶液中洗涤 10 分钟, 期间振荡三次。

[0132] 使用 ALP 标记免疫球蛋白 (IgG) 的检测方法

[0133] 硝酸纤维膜在 ALP 着色缓冲液 (含有 100mM NaCl, 5mM MgCl₂, pH 9.5 的 Tris-HCl) 中稍微洗涤后, 将其浸入含有 BCIP/NBT 溶液 (Promega 制造) 的 30 μ l ALP 着色缓冲液中, 在室温下着色 10 分钟。一旦获得染色像, 将硝酸纤维膜浸入足量的蒸馏水中洗去着色缓冲液。洗涤后, 将硝酸纤维膜风干, 用 Multi Gauge (FUJIFILM) 采集染色像。

[0134] 结果

[0135] 结果在图 1 中显示。不仅具有据认为是 C1q 和免疫球蛋白 (IgG) 之间的结合所必需的 9 个氨基酸的肽 R2 以及具有这个肽作为核心序列的肽 (肽 R3-6) 抑制了该结合, 而且具有更短的氨基酸序列的肽 (肽 R1) 也抑制了该结合, 由这个事实可知具有 6 氨基酸残基 PGLYYF (SEQ ID NO:1) 作为核心的序列对于免疫球蛋白和 C1q 之间的结合是重要的。另外还发现这些肽通过抑制 C1q 和免疫球蛋白之间的结合, 有可能治疗或预防由这个结合引起的疾病。

[0136] 抑制活性的检查 (2)

[0137] 材料和方法

[0138] 除了实施例 2 的抑制活性的检查 (1) 中所示的肽之外, 还研究了它们的突变肽是否能抑制 C1q 和免疫球蛋白之间的结合。表 3 中示出的肽是外包给 GL Biochem (上海) 制备。将每个肽溶于二甲亚砜中至 10mg/ml 的浓度并保存。说明: 实验是用与实施例 2 的抑制活性的检查 (1) 同样的方法进行, 且还对作为对照的肽 R1、R2 和 R5 进行了试验。

[0139] [表 3]

[0140]

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

[0141] 结果

[0142] 结果在图 2 中显示。其中特定的氨基酸被丙氨酸置换的肽充分抑制了 C1q 和免疫球蛋白之间的结合。因此,由于这些突变肽或者含有这些突变肽作为核心的肽也能抑制 C1q 和免疫球蛋白之间的结合,可知有可能治疗或预防由这个结合引起的疾病。

[0143] 实施例 3

[0144] 能够结合免疫球蛋白的肽的关节炎抑制作用的研究

[0145] (1) 能够结合免疫球蛋白的肽的对关节炎诱发小鼠的关节炎抑制作用 -1

[0146] 材料和方法

[0147] 使用混合单克隆抗体 (monoclonal antibody cocktail) 诱发的关节炎小鼠 (BALB/c Cr Slc(SPF)), 研究了实施例 2 标示为 R5 的肽的关节炎抑制作用。静脉内给予 2mg/ 个体的关节炎诱发用混合单克隆抗体, 三天后腹膜内给予 50 μ g/ 个体的脂多糖 (LPS), 诱发关节炎。自 LPS 给予后次日 (第 4 天) 起直到第 14 天, 每天一次或每天分两次腹膜内给予 10mg/kg 的肽 R5。从第 4 天起每天一次口服给予 0.1mg/kg 的阳性对照药甲氨喋呤。从第 0 天至第 14 天双日测量四肢的临床分数。在麻醉下, 用含有肝素的生理盐水进行脱血, 连续注入冰冷的 4% 多聚甲醛溶液以灌注固定全身。灌注固定后, 切取两后肢膝关节 (切断大腿骨中部和胫骨中部; 除去皮肤和肌肉) 和踵关节 (从胫骨中部到趾头), 再用 4% 多聚甲醛溶液过夜 (4 $^{\circ}$ C) 浸渍固定。之后, 将两膝关节和两踵关节转移到 50mM PBS (4 $^{\circ}$ C), 然后从两个方向 (内侧面方向和上面方向) 进行踵关节的软 X 射线照相。

[0148] 肽溶液的制备

[0149] 基于动物的体重计算肽的必要量。用 0.5% 甲基纤维素溶液制备肽溶液, 达到 1mg/ml 的浓度, 并将制备得到的肽溶液冷藏保存。

[0150] 甲氨喋呤溶液的制备

[0151] 如下制备甲氨喋呤: 称取 1mg, 放入玛瑙研钵中, 用研棒粉碎, 徐徐加入 0.5% 甲基纤维素溶液进行悬浮, 达到 0.01mg/ml 的浓度。然后将制备物冷藏保存。

[0152] 体重测量、一般状态观察和分组

[0153] 在试验期间, 以给予关节炎诱发用混合单克隆抗体的日期为第 0 天, 在第 0、3、6、9、12 和 14 天测量动物的体重。一般状态观察则是每天进行。

[0154] 关节炎模型的制作

[0155] 在第 0 天给 20 只 7 周龄小鼠静脉内给予 2mg/ 个体的关节炎诱发用混合单克隆抗体, 在第 3 天腹膜内给予 LPS 50 μ g/ 个体。

[0156] 肽溶液的给予

[0157] 从第 4 天起, 每天一次 (早上) 或者每天分两次 (早上和下午) 腹膜内给予肽溶液 10mg/kg。作为对照, 从第 4 天起, 每天一次 (早上) 腹膜内给予 0.5% 甲基纤维素溶液。使用注射针 (26G, Terumo) 和注射筒 (1.0ml 容量, Terumo) 进行给予。用量为 10ml/kg。从第 4 天起, 每天一次 (早上) 口服给予甲氨喋呤 0.1mg/kg。使用经口探头 (小鼠用经口探头, Fuchigami 器械店) 和注射筒 (1.0ml 容量, Terumo) 进行给予。用量为 10ml/kg。

[0158] 临床分数观察

[0159] 按以下方案从第 0 天到第 14 天双日观察临床分数。四肢合计最大 12 分。

[0160] < 临床分数 >

[0161] 0 : 正常关节

[0162] 1 : 轻度炎症和发红

[0163] 2 : 手足全体严重红斑和肿胀, 妨碍手足的使用

[0164] 3 : 手足或关节变性伴强直、关节硬直、机能丧失

[0165] 统计分析处理方法

[0166] 试验结果以平均值 \pm 标准偏差表示, 用 EXSAS (Version 7.1.6, ArmSystem Co., Ltd.) 进行分析。对临床分数进行 Wilcoxon 检验。足部的肿胀情况直接用肉眼观察。

[0167] 结果

[0168] 结果在图 3 中显示。在每天一次给予和每天分两次给予之间, 没有观察到肽 R5 的有效性的显著差异, 但观察到对关节炎抑制的效果。另外, 关节炎抑制水平比甲氨喋呤高。从这个结果可知, 本发明的肽比已经临床使用的药物具有更好的关节炎抑制作用, 可用于治疗和预防关节炎及相关疾病。

[0169] (2) 能够结合免疫球蛋白的肽的对关节炎诱发小鼠的关节炎抑制作用 -2

[0170] 材料和方法

[0171] 使用混合单克隆抗体诱发的关节炎小鼠, 研究了实施例 2 标示为 R1、R2 和 R5 的肽的关节炎抑制作用。对小鼠静脉内给予 2mg/ 个体的关节炎诱发用混合单克隆抗体, 三天后腹膜内给予 50 μ g/ 个体的 LPS, 诱发关节炎。对于每种肽, 从给予关节炎诱发用混合单克隆抗体的当天 (第 0 天) 起, 分别每天分两次给予 10mg/kg, 持续 14 天, 通过临床分数研究关节炎抑制作用。说明: 实验是用与实施例 3(1) 同样的方法进行。

[0172] 肽溶液的制备

[0173] 基于动物的体重计算每种肽的必要量。用 0.5% 甲基纤维素溶液制备肽溶液, 达到 1mg/ml 的浓度, 并冷藏保存。

[0174] 体重测量和一般状态观察

[0175] 在试验期间, 以给予关节炎诱发用混合单克隆抗体的日期为第 0 天, 在第 0、3、6、9、12 和 14 天测量动物的体重。一般状态观察则是每天进行。

[0176] 关节炎模型制作和分组

[0177] 在开始给予前一天测量体重, 用分组软件随机分配, 使得每组的平均体重值大约相等。在第 0 天给 20 只 7 周龄小鼠静脉内给予 2mg/ 个体的关节炎诱发用混合单克隆抗体,

在第 3 天腹膜内给予 LPS 50 μ g/ 个体。

[0178] 肽溶液的给予

[0179] 从第 0 天起,每天分两次即早上和下午腹膜内给予每种肽溶液。作为对照,从第 0 天起,每天分两次腹膜内给予 0.5% 甲基纤维素溶液。使用了注射针 (26G, Terumo) 和注射筒 (1.0ml 容量, Terumo) 进行给予。用量为 10ml/kg。

[0180] 临床评分观察

[0181] 以给予关节炎诱发用混合单克隆抗体的当天为第 0 天,按照以下方案在双日观察所有病例的四肢临床分数,直到第 14 天为止。四肢合计最大 12 分。

[0182] < 临床分数 >

[0183] 0 : 正常关节

[0184] 1 : 轻度炎症和发红

[0185] 2 : 手足全体严重红斑和肿胀,妨碍手足的使用

[0186] 3 : 手足或关节变性伴强直、关节硬直、机能丧失

[0187] 统计分析处理方法

[0188] 试验结果以平均值 (标准偏差表示,用 EXSAS \pm Version 7.1.6, ArmSystemex Co., Ltd.) 进行分析。对临床分数进行 Wilcoxon 检验。足部的肿胀情况直接用肉眼观察。

[0189] 结果

[0190] 结果在图 4、图 5 和图 6 中显示。在所有的每天分两次给予了 10mg/kg 的 R1、R2 或 R5 的组中都观察到关节炎抑制作用。因此证明本发明的肽具有关节炎抑制作用,可用于治疗和预防关节炎及相关疾病。另外,在任何使用的肽中都没有观察到一般状态的异常或者对体重的作用。

[0191] 此外,在使用小鼠的试验中,本发明的肽没有显示毒性作用。另外,由于本发明的肽是源自天然存在于人体内的 C1q,且只有短短 6-15 个残基,预期使用本发明的肽的话,治疗或预防所伴随产生的副作用会减低。

[0192] 实施例 4

[0193] 能够结合免疫球蛋白的肽的免疫复合物疾病抑制作用的研究

[0194] 材料和方法

[0195] 用 64 只 7 周龄的 Slc :Wistar 品系雄性大鼠,分两次即对每一种给予方法 (腹膜内给予和尾静脉内给予) 进行肽 R1、R2 和 R5 的试验。连续 9 天或更长时间给予正常固体饲料 CRF-1 进行驯化。在给予前一天,刮掉动物的背毛,在给予当天,将 OVA+Evans 蓝色染料混合溶液给予尾静脉。若是腹膜内给予的话在给予 OVA+Evans 蓝色染料混合溶液 30 分钟后,若是尾静脉内给予的话在 50 分钟后,分别给予每种肽溶液。对于抗 OVA 溶液的皮内给予,若是腹膜内给予的话在给予试验物质后 30 分钟,若是静脉内给予的话在 10 分钟后,将溶液以 0.1ml/ 部位的用量给予动物的背部,以局部诱发 Arthus 反应。诱发后 4 小时,将动物安乐死,完全放血后剥离背部皮肤。将剥离的皮肤上的 Arthus 反应部位冲取下来,从这块皮肤过夜提取 Evans 蓝色染料。通过用分光光度计测量 Evans 蓝色染料的吸光度和使用标准曲线,对漏出的染料量进行定量 (说明 :关于实施例 4 中所用的实验方法,应参考 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))

[0196] 以下示出本实验中所用的每种肽溶液：

[0197] < 阴性对照物质 >

[0198] 生理盐水

[0199] < 肽溶液 >

[0200] 将所定量称量的每种肽（肽 R1、R2 和 R5）分别溶于生理盐水中，得到 20mg/ml 溶液。用生理盐水将 20mg/mL 溶液进行 10 倍稀释，制备 2mg/ml 溶液。5mg/ml 溶液是通过将所定量称量的每种肽溶于生理盐水中获得制备溶液来制备。

[0201] Arthus 反应

[0202] 将 OVA+Evans 蓝色染料混合溶液以 2ml/kg 给予尾静脉内。若是腹膜内给予的话在给予 OVA+Evans 蓝色染料混合溶液 30 分钟后，若是尾静脉内给予的话在 50 分钟后，分别给予每种肽溶液。对于抗 OVA 溶液的皮内给予，若是腹膜内腹给予的话在给予试验物质后 30 分钟，若是静脉内给予的话在 10 分钟后，将溶液以 0.1ml/ 部位的用量给予动物的背部，以局部诱发 Arthus 反应。皮内给予是，对于每个动物，PBS 部位有两个，抗 OVA 溶液部分有两个。诱发后 4 小时，通过在乙醚麻醉下使动物断头将其安乐死，完全放血后剥离背部皮肤。用冲压机将剥离的皮肤上的 Arthus 反应部位冲取下来，用于进行染料提取。

[0203] 染料提取和测量

[0204] 在用冲压机冲取的皮肤条带上几个位置处切出切口，浸入 2ml 的染料提取溶液中，振荡搅拌 10 分钟。之后在室温下静置过夜。静置过夜后，将溶液再振荡 10 分钟，离心（1500rpm, 15 分钟），取其上清液用作染料测量样品。用 UV-1600（株式会社岛津制作所）在 OD 620nm 波长下进行测量。从染料量标准曲线算出漏出染料量。

[0205] 数据处理和统计学处理

[0206] 对体重测量值和漏出染料量算出组平均值（mean）± 标准偏差（SD）。对于漏出染料量，每只动物的值是将两个抗 OVA 溶液给予部位的平均值减去两个 PBS 给予部位的平均值所得的值。对漏出染料量进行了以下统计学分析：在第一个试验中（腹膜内给予每种肽溶液），分别进行第一组对第二和第三组、第一组对第四和第五组以及第一组对第六和第七组的 Bartlett 方差齐性检验，如果方差不存在差异的话通过 Dunnett 多重比较检验，或者如果方差存在差异的话通过 Steel 多重比较检验，对第一组和其他各组之间的平均值的差异进行检验；在第二个试验中（尾静脉内给予每种肽溶液），进行第九组对第十组、第十一组和第十二组的 Bartlett 方差齐性检验，如果方差不存在差异的话通过 Dunnett 多重比较检验，或者如果方差存在差异的话通过 Steel 多重比较检验，对第九组和其他各组之间的平均值的差异进行检验。显著水平对于 Bartlett 方差齐性检验为 5%，对于其他检验为两侧 5%。

[0207] 结果

[0208] 对于每种肽溶液，分别在图 7 中示出腹膜内给予的结果，在图 8 中示出尾静脉内给予的结果。在本实施例所用的 III 型过敏（Arthus）反应模型系统中，观察到与对照相比 Evans 蓝色漏出量减少大约 30%，这被认为对于抑制诸如 SLE、血管球性肾炎、关节炎或血管炎等的免疫复合物疾病是有效的。在肽溶液的腹膜内给予中，在肽 R1、R2 和 R5 都观察到明确且充分的对免疫复合物疾病的抑制作用。另外，在尾静脉给予中，在肽 R1 和 R2 观察到

明确且充分的对免疫复合物疾病的抑制作用。因此证明本发明的肽具有明确且充分的对免疫复合物疾病的抑制作用,可用于治疗和预防诸如 SLE、血管球性肾炎、关节炎或血管炎等的免疫复合物疾病。

[0209] 实施例 5

[0210] 使用能够结合免疫球蛋白的肽的抗体检测剂的研究

[0211] 材料和方法

[0212] 研究了在蛋白质印迹法中,是否可用生物素酰化的肽取代第二抗体来检测第一抗体。生物素酰化的肽 R5 是外包给 GL Biochem(上海)制备的。

[0213] 将 BSA 在 12% SDS-PAGE 中电泳,然后转移到 PVDF 膜上。转移后,将 PVDF 膜在 5% 脱脂乳中进行封闭。将 PVDF 膜浸入抗 BSA IgG(兔)的 2000 倍稀释溶液中,在室温下反应 1 小时。在 TBST 中洗涤三次。将生物素酰化肽 R5 溶于 DMSO 中达 10mg/ml 的浓度,将 10ul 的此溶液加到 10ml 的 TBST(1000 倍稀释)中,在室温下反应 1 小时。在 TBST 中洗涤三次。用 VECTOR laboratories 公司制造的 ABC kit 进行着色。着色溶液中使用了硫酸镍和二氨基联苯胺,底物中使用了过氧化氢溶液。

[0214] 结果

[0215] 结果在图 9 中显示。可以用生物素酰化的本发明肽取代第二抗体检出 PVDF 膜上的抗体。因此证明本发明的肽经生物素酰化可用于抗体的检测。

[0216] [实施例 6]

[0217] 使用能够结合免疫球蛋白的肽的抗体纯化柱的研究

[0218] 材料和方法

[0219] 对使用能够结合免疫球蛋白的肽的抗体纯化柱进行了研究。说明:A 蛋白用作对照。

[0220] 肽柱的制备

[0221] 给 PD-10 空柱填充 1ml 的 NHS 活化 Sepharose 4B Fast Flow,用 10ml 的 1mM HCl 洗涤,并用 10ml 的 PBS 平衡。将 5mg 的肽 R4 溶于 1ml 的 PBS 后加到柱子,将柱子在室温下旋转 4 小时。用 5ml 的 PBS 洗涤柱子,然后加入 1ml 的 1M 甘氨酸,在室温下将柱子旋转 2 小时,以封闭未反应的 NHS。除去 1M 甘氨酸,用 10ml 的 PBS 洗涤柱子进行平衡。

[0222] 抗体的纯化

[0223] 向亲和纯化柱加入 1mg 的抗 BSA IgG(兔)(抗牛血清白蛋白 IgG(兔)),在室温下旋转柱子 2 小时。用 15ml 的 PBS 进行洗涤。加入 5ml 的 0.1M 甘氨酸-HCl(pH 3.2) 将抗 BSA IgG 洗脱,收集在 5 个含有 100ul 的 1M Tris 的微管中各 1ml。用 DC 蛋白分析试剂盒 (Protein AssayKit) (Bio-Rad) 定量洗脱流份中的蛋白质的量。另外,对人 IgG 进行同样的吸附-洗脱试验。

[0224] 结果

[0225] 结果在图 10 中显示。在使用本发明肽的柱子中,纯化用的兔抗体 70-80% 得到回收。这个回收率优于对照 A 蛋白。另外证实使用本发明肽的亲和纯化柱也适用于纯化人 IgG(图 11)。因此证实其中固定化有本发明肽的用具在抗体纯化中极为有用。

[0226] 工业实用性

[0227] 根据本发明,获得了能够结合免疫球蛋白的肽和该肽的融合蛋白、编码该肽和该

融合蛋白的核酸等,因此,本发明可用于免疫球蛋白的检测、分离和纯化领域,和治疗或预防由 C1q 和免疫球蛋白之间的结合引起的疾病用的药物组合物领域,所述疾病例如类风湿性关节炎或者免疫复合物疾病如 SLE、血管球性肾炎、血管炎或关节炎。

[0228] 序列表自由文本

[0229] SEQ ID NO :1 :免疫球蛋白结合肽

[0230] SEQ ID NO :2 :免疫球蛋白结合肽

[0231] SEQ ID NO :3 :免疫球蛋白结合肽

[0232] SEQ ID NO :4 :免疫球蛋白结合肽

[0233] SEQ ID NO :5 :免疫球蛋白结合肽

[0234] SEQ ID NO :6 :免疫球蛋白结合肽

[0235] SEQ ID NO :7 :免疫球蛋白结合肽

[0236] SEQ ID NO :23 :免疫球蛋白结合肽

[0237] SEQ ID NO :24 :免疫球蛋白结合肽

[0238] SEQ ID NO :25 :免疫球蛋白结合肽

[0240] SEQ ID NO :26 :免疫球蛋白结合肽

[0241] SEQ ID NO :27 :免疫球蛋白结合肽。

序列表

<110>OCHI, Takahiro

RegeneTiss Inc.

MMT CO., LTD.

<120>Peptide having ability of binding to immunoglobulin

<130>668338

<150>JP 2007-214961

<151>2007-08-21

<160>27

<170>PatentIn version 3.2

<210>1

<211>6

<212>PRT

<213>人工序列

<220>

<223>免疫结合肽

<400>1

Pro Gly Leu Tyr Tyr Phe

1 5

<210>2

<211>9

<212>PRT

<213>人工序列

<220>

<223>免疫结合肽

<400>2

Cys Lys Val Pro Gly Leu Tyr Tyr Phe

1 5

<210>3

<211>15

<212>PRT

<213>人工序列

<220>

<223>免疫结合肽

<400>3

Ser Gly Lys Phe Thr Cys Lys Val Pro Gly Leu Tyr Tyr Phe Thr

1 5 10 15

<210>4

<211>15

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 免疫结合肽

<400>4

Phe Thr Cys Lys Val Pro Gly Leu Tyr Tyr Phe Thr Tyr His Ala

1 5 10 15

<210>5

<211>15

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 免疫结合肽

<400>5

Ser Thr Gly Lys Phe Thr Cys Lys Val Pro Gly Leu Tyr Tyr Phe

1 5 10 15

<210>6

<211>15

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 免疫结合肽

<400>6

Lys Phe Thr Cys Lys Val Pro Gly Leu Tyr Tyr Phe Val Tyr His

1 5 10 15

<210>7

<211>15

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 免疫结合肽

<400>7

Cys Lys Val Pro Gly Leu Tyr Tyr Phe Val Tyr His Ala Ser His

1 5 10 15

<210>8

<211>18

<212>DNA

<213> 人 (Homo sapiens)

<400>8	
cccggctctct actacttc	18
<210>9	
<211>18	
<212>DNA	
<213> 人 (Homo sapiens)	
<400>9	
cccggcctct actacttt	18
<210>10	
<211>27	
<212>DNA	
<213> 人 (Homo sapiens)	
<400>10	
tgcaaggtgc ccggctcteta ctacttc	27
<210>11	
<211>27	
<212>DNA	
<213> 人 (Homo sapiens)	
<400>11	
tgcaaagtcc ccggccteta ctacttt	27
<210>12	
<211>45	
<212>DNA	
<213> 人 (Homo sapiens)	
<400>12	
agtggaagt tcacctgcaa ggtgcccggc ctctactact tcacc	45
<210>13	
<211>45	
<212>DNA	
<213> 人 (Homo sapiens)	
<400>13	
ttacctgca aggtgcccgg tctctactac ttacctacc acgcc	45
<210>14	
<211>45	
<212>DNA	
<213> 人 (Homo sapiens)	
<400>14	
agcactggca agttacctg caaagtcgcc ggcctctact acttt	45
<210>15	

<211>45
 <212>DNA
 <213> 人 (Homo sapiens)
 <400>15
 aagttcacct gcaaagtecc cggcctctac tactttgtct accac 45
 <210>16
 <211>45
 <212>DNA
 <213> 人 (Homo sapiens)
 <400>16
 tgcaaagtcc cggcctctata ctactttgtc taccacgct cgcat 45
 <210>17
 <211>245
 <212>PRT
 <213> 人 (Homo sapiens)
 <400>17
 Met Glu Gly Pro Arg Gly Trp Leu Val Leu Cys Val Leu Ala Ile Ser
 1 5 10 15
 Leu Ala Ser Met Val Thr Glu Asp Leu Cys Arg Ala Pro Asp Gly Lys
 20 25 30
 Lys Gly Glu Ala Gly Arg Pro Gly Arg Arg Gly Arg Pro Gly Leu Lys
 35 40 45
 Gly Glu Gln Gly Glu Pro Gly Ala Pro Gly Ile Arg Thr Gly Ile Gln
 50 55 60
 Gly Leu Lys Gly Asp Gln Gly Glu Pro Gly Pro Ser Gly Asn Pro Gly
 65 70 75 80
 Lys Val Gly Tyr Pro Gly Pro Ser Gly Pro Leu Gly Ala Arg Gly Ile
 85 90 95
 Pro Gly Ile Lys Gly Thr Lys Gly Ser Pro Gly Asn Ile Lys Asp Gln
 100 105 110
 Pro Arg Pro Ala Phe Ser Ala Ile Arg Arg Asn Pro Pro Met Gly Gly
 115 120 125
 Asn Val Val Ile Phe Asp Thr Val Ile Thr Asn Gln Glu Glu Pro Tyr
 130 135 140
 Gln Asn His Ser Gly Arg Phe Val Cys Thr Val Pro Gly Tyr Tyr Tyr
 145 150 155 160
 Phe Thr Phe Gln Val Leu Ser Gln Trp Glu Ile Cys Leu Ser Ile Val
 165 170 175
 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>	人 (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				
Gly	Ile	Pro	Gly	Asn	Pro	Gly	Lys	Val	Gly	Pro	Lys	Gly	Pro	Met	Gly				
						85									90				
Pro	Lys	Gly	Gly	Pro	Gly	Ala	Pro	Gly	Ala	Pro	Gly	Pro	Lys	Gly	Glu				
						100									105				
Ser	Gly	Asp	Tyr	Lys	Ala	Thr	Gln	Lys	Ile	Ala	Phe	Ser	Ala	Thr	Arg				
						115									120				
Thr	Ile	Asn	Val	Pro	Leu	Arg	Arg	Asp	Gln	Thr	Ile	Arg	Phe	Asp	His				
						130									135				
Val	Ile	Thr	Asn	Met	Asn	Asn	Asn	Tyr	Glu	Pro	Arg	Ser	Gly	Lys	Phe				
145															150				
Thr	Cys	Lys	Val	Pro	Gly	Leu	Tyr	Tyr	Phe	Thr	Tyr	His	Ala	Ser	Ser				
															165				
Arg	Gly	Asn	Leu	Cys	Val	Asn	Leu	Met	Arg	Gly	Arg	Glu	Arg	Ala	Gln				
															170				
Lys	Val	Val	Thr	Phe	Cys	Asp	Tyr	Ala	Tyr	Asn	Thr	Phe	Gln	Val	Thr				
															180				
															185				
															190				

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
Ile Phe Ser Gly Phe Leu Leu Phe Pro Asp Met Glu Ala		
245	250	
<210>19		
<211>245		
<212>PRT		
<213>人 (Homo sapiens)		
<400>19		
Met Asp Val Gly Pro Ser Ser Leu Pro His Leu Gly Leu Lys Leu Leu		
1	5	10
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
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
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		
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> 人 (Homo sapiens)			
<400>20			
atggagggtc cccggggatg gctggtgctc tgtgtgctgg ccatatcgct ggctctatg			60
gtgaccgagg acttgtgccg agcaccagac gggaaagaaag gggaggcagg aagacctggc			120
agacgggggc ggccaggcct caagggggag caaggggagc cgggggcccc tggcatccgg			180
acaggcatcc aaggccttaa aggagaccag ggggaacctg ggccctctgg aaaccccggc			240
aaggtgggct acccagggcc cagcggcccc ctccggagccc gtggcatccc ggaattaaa			300
ggcaccaagg gcagcccagg aaacatcaag gaccagccga ggccagcctt ctccgccatt			360
cggcggaaacc cccaatggg gggcaacgtg gtcattcttcg acacggtcac caccaaccag			420
gaagaaccgt accagaacca ctccggccga ttctgtctgca ctgtaccgag ctactactac			480
ttcaccttcc aggtgctgtc ccagtgggaa atctgcctgt ccatcgtctc ctctcaagg			540
ggccagggtc gacgctccct gggcttctgt gacaccacca acaaggggct ctccagggtg			600
gtgtcagggg gcatggtgct tcagctgcag cagggtgacc aggtctgggt tgaaaaagac			660
cccaaaaagg gtcacattta ccagggtctt gaggccgaca gcgtcttcag cggtctcctc			720
atcttcccat ctgcctga			738
<210>21			
<211>762			
<212>DNA			
<213> 人 (Homo sapiens)			
<400>21			
atgatgatga agatcccatg gggcagcacc ccagtactga tgttgctcct gctcctgggc			60
ctaategata tctcccaggc ccagctcagc tgcaccgggc ccccagccat ccctggcacc			120
ccgggtatcc ctgggacacc tggccccgat ggccaacctg ggaccccagg gataaaaagga			180
gagaaaagggc ttccagggtc ggctggagac catggtgagt tcggagagaa gggagacca			240
gggattcctg ggaatccagg aaaagtcggc cccaagggcc ccatgggccc taaaggtggc			300
ccaggggccc ctggagcccc aggccccaaa ggtgaatcgg gagactacaa ggccaccag			360
aaaategcct tctctgccac aagaaccatc aacgtccccc tgcgccggga ccagaccatc			420
cgcttcgacc acgtgatcac caacatgaac aacaattatg agccccgcag tggcaagttc			480
acctgcaagg tgeccggtct ctactacttc acctaccagc ccagctctcg agggaacctg			540
tgcgtgaacc tcatgctggt ccgggagcgt gcacagaagg tggtcacctt ctgtgactat			600
gcctacaaca cttccaggt caccaccggt ggcatggtcc tcaagctgga gcagggggag			660

aacgtcttcc tgcaggccac cgacaagaac tcontactgg gcatggaggg tgccaacagc	720
atcttttccg ggttctgct ctttccagat atggaggcct ga	762
<210>22	
<211>738	
<212>DNA	
<213> 人 (Homo sapiens)	
<400>22	
atggacgtgg ggcccagctc cctgccccac cttgggctga agctgctgct gtcctgctg	60
ctgctgcccc tcaggggcca agccaacaca ggctgctacg ggatcccagg gatgcccggc	120
ctgcctgggg caccagggaa ggatgggtac gacggactgc cggggcccaa gggggagcca	180
ggaatcccag ccattcccgg gatccgagga cccaaagggc agaagggaga acccggtta	240
cccggccatc ctgggaaaaa tggccccatg ggacccccctg ggatgccagg ggtgcccggc	300
cccatgggca tccctggaga gccaggtgag gagggcagat acaagcagaa attccagtca	360
gtgttcacgg tcontactgca gaccaccag cccccctgac ccaacagcct gatcagattc	420
aacgcggtcc tcaccaacce gcagggagat tatgacacga gactggcaa gttcacctgc	480
aaagtccccg gccttacta ctttgtctac cacgcgtcgc atacagccaa cctgtgctg	540
ctgctgtacc gcagcggcgt caaagtggtc accttctgtg gccacacgtc caaaaccaat	600
caggtcaact cgggcgggtgt gctgctgagg ttgcaggtgg gcgaggaggt gtggctggct	660
gtcaatgact actacgacat ggtgggcatc cagggtctctg acagcgtctt ctccggcttc	720
ctgcttccc cegactag	738
<210>23	
<211>6	
<212>PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 免疫结合肽	
<400>23	
Pro Gly Ala Tyr Tyr Phe	
1 5	
<210>24	
<211>6	
<212>PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 免疫结合肽	
<400>24	
Pro Gly Leu Ala Tyr Phe	
1 5	
<210>25	

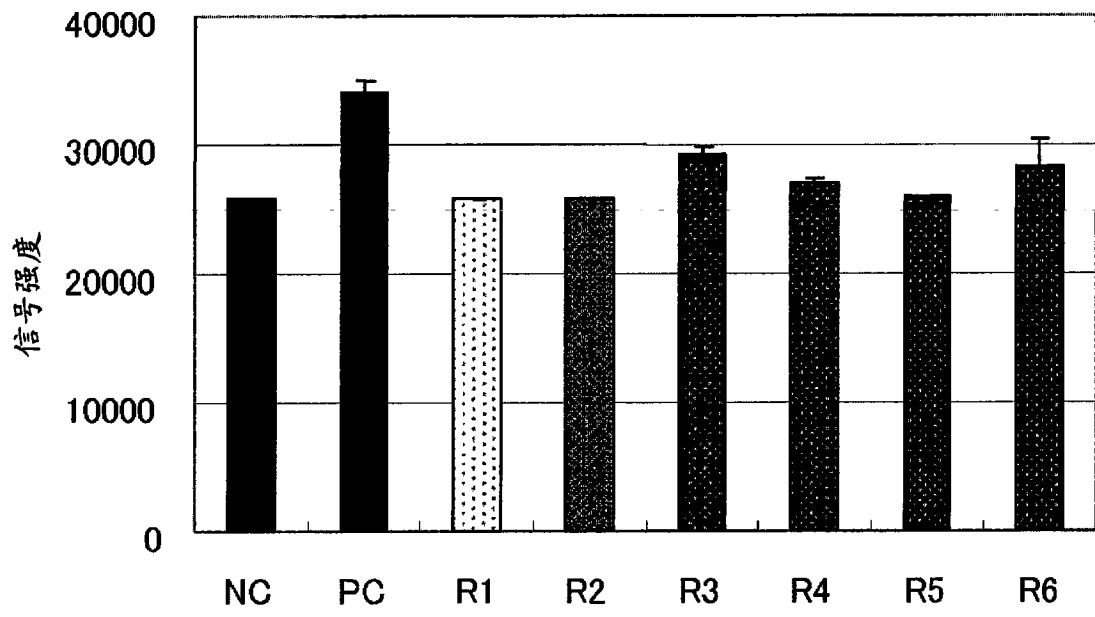


图 1

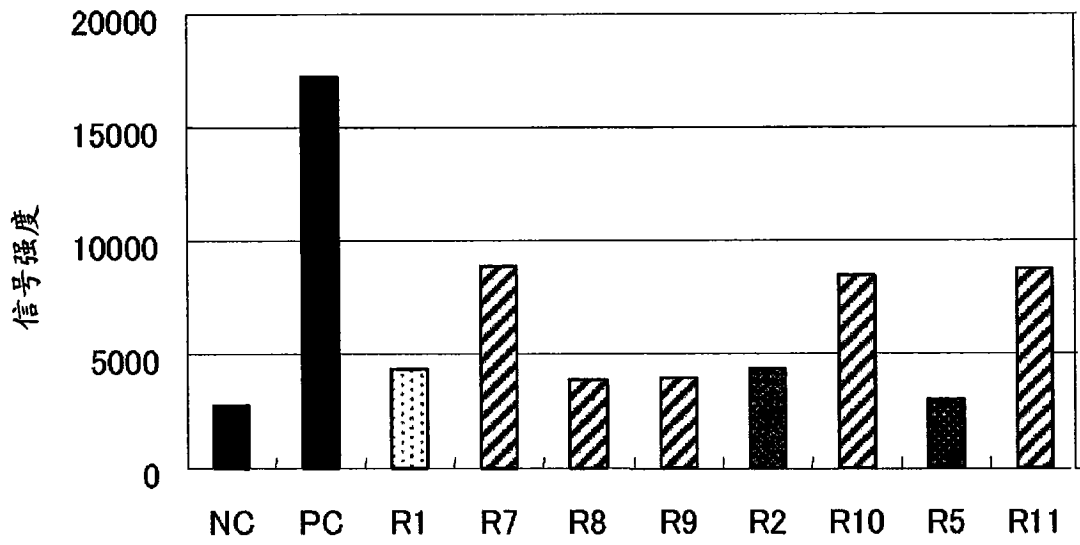


图 2

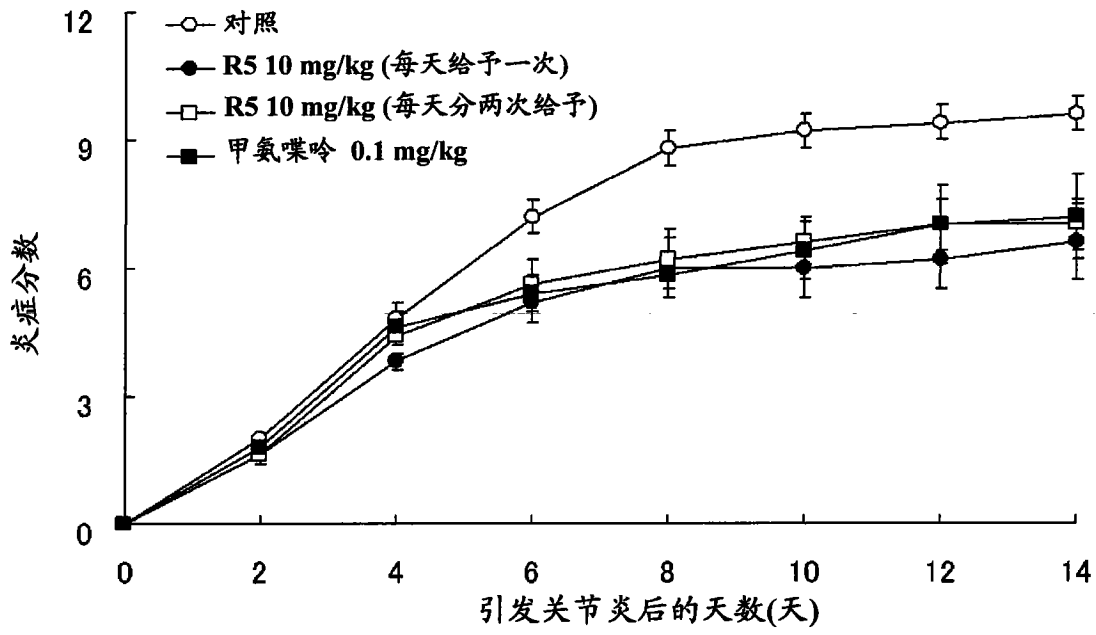


图 3

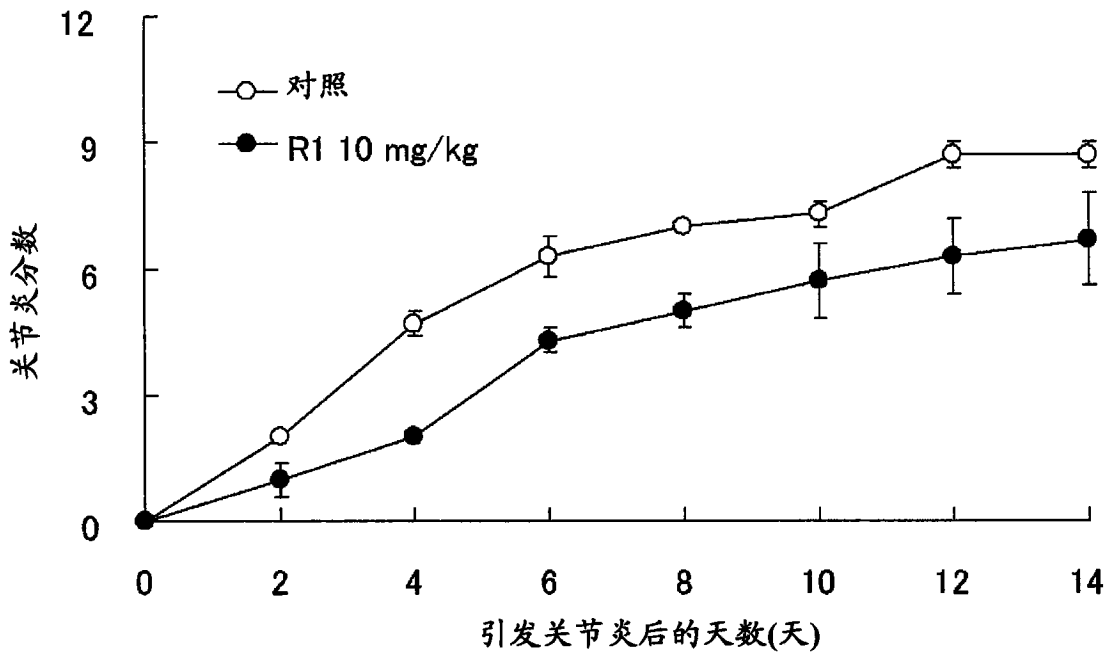


图 4

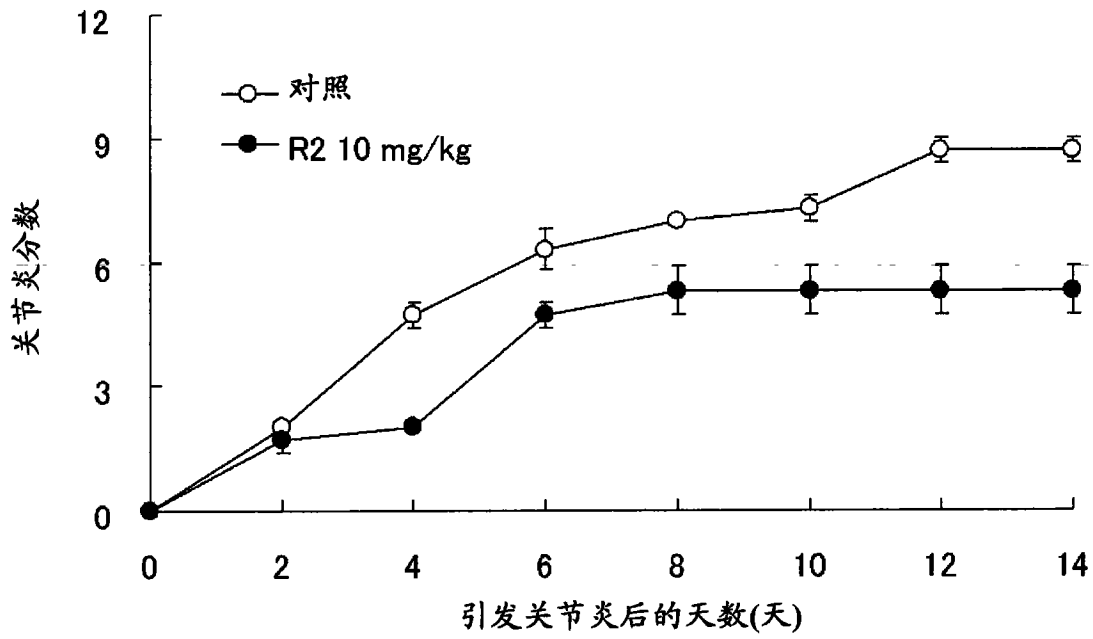


图 5

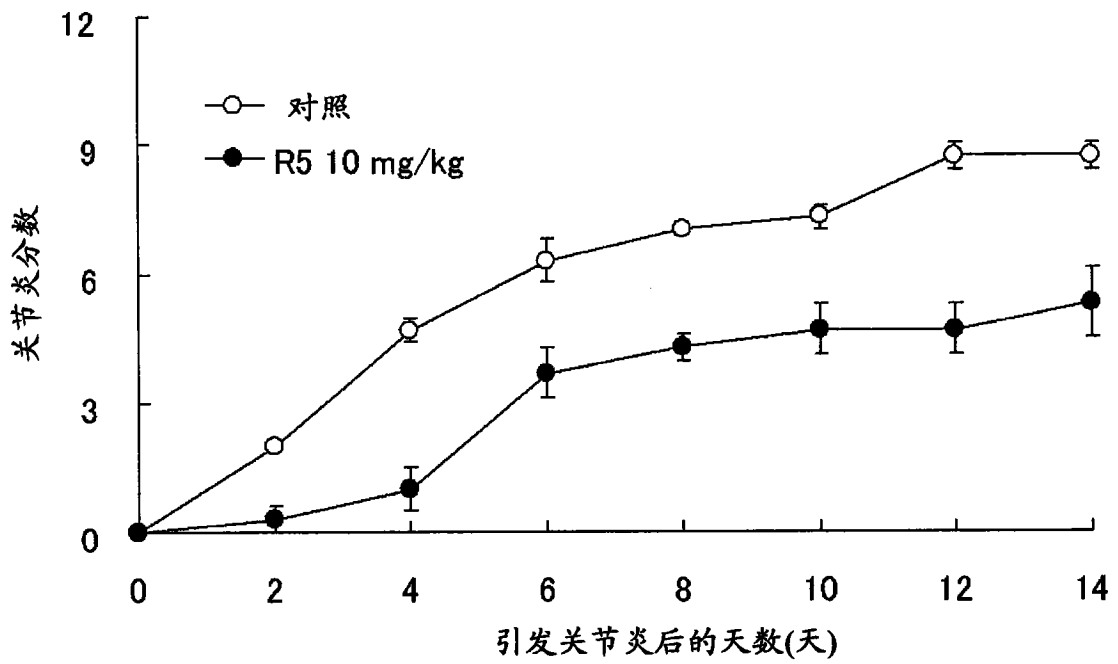


图 6

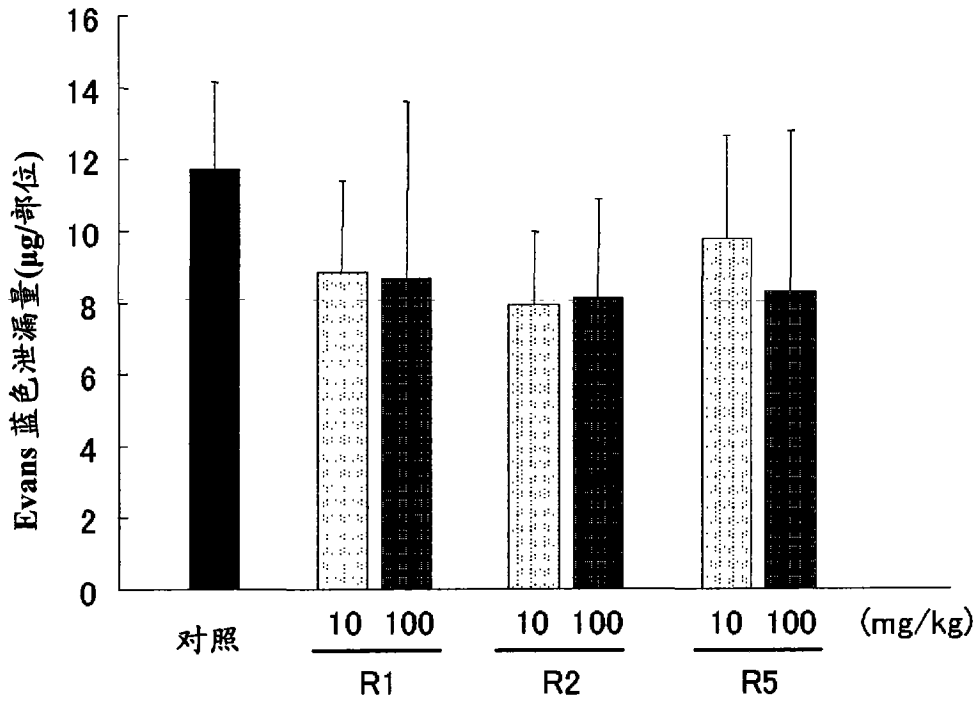


图 7

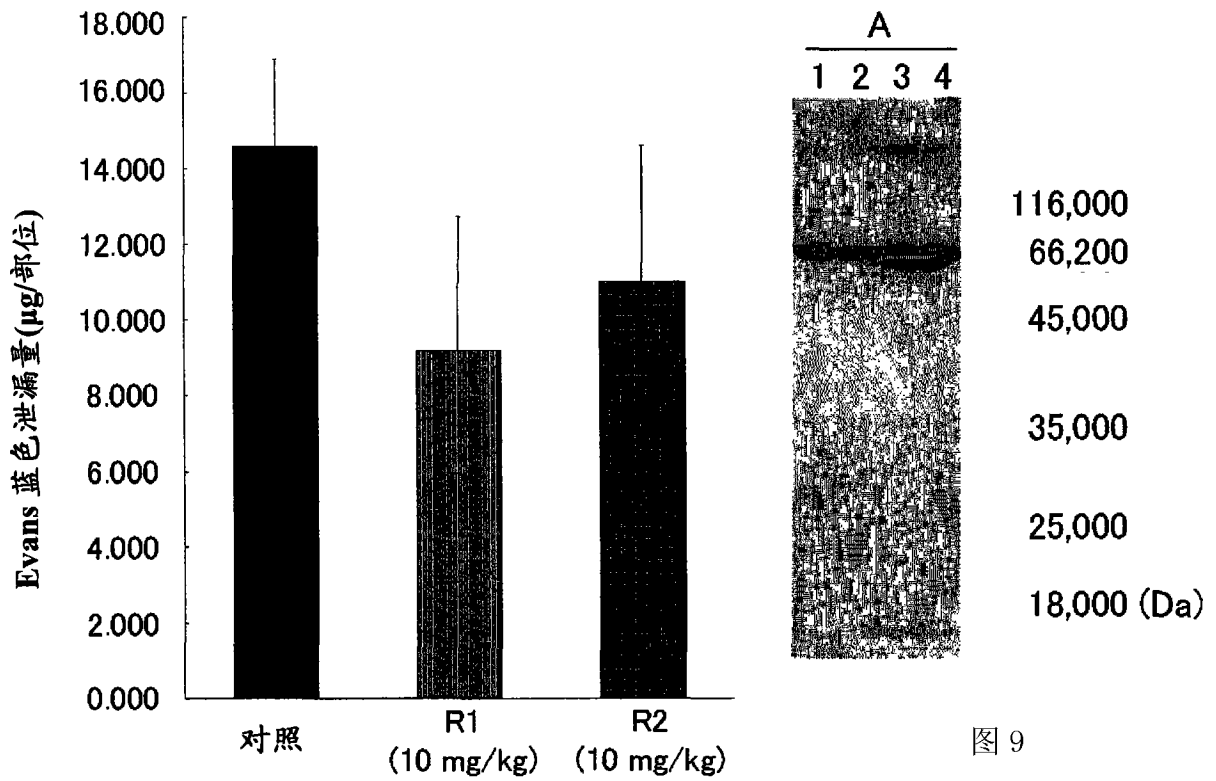


图 9

图 8

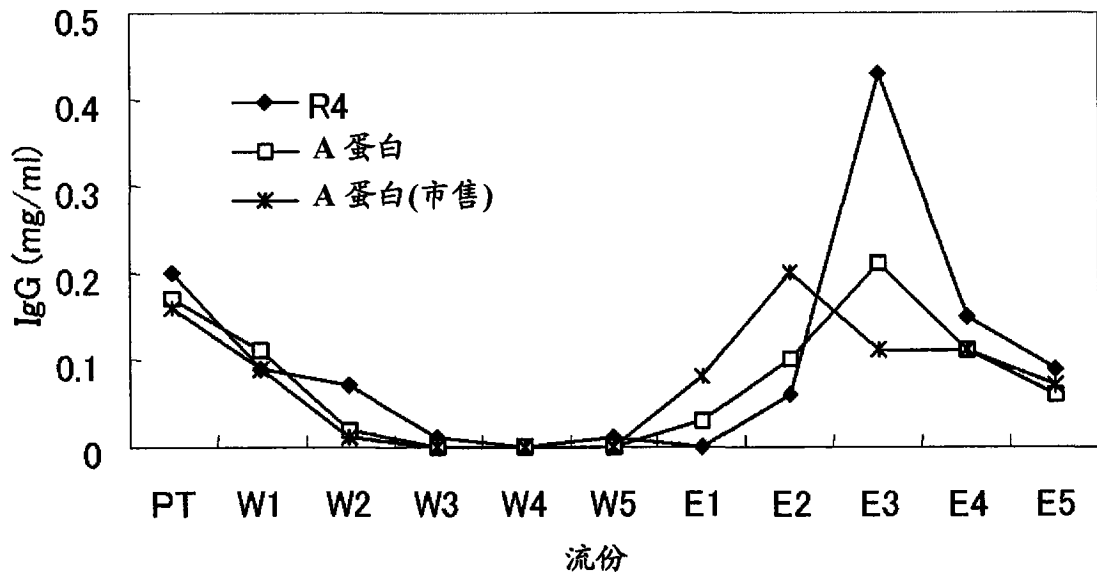


图 10

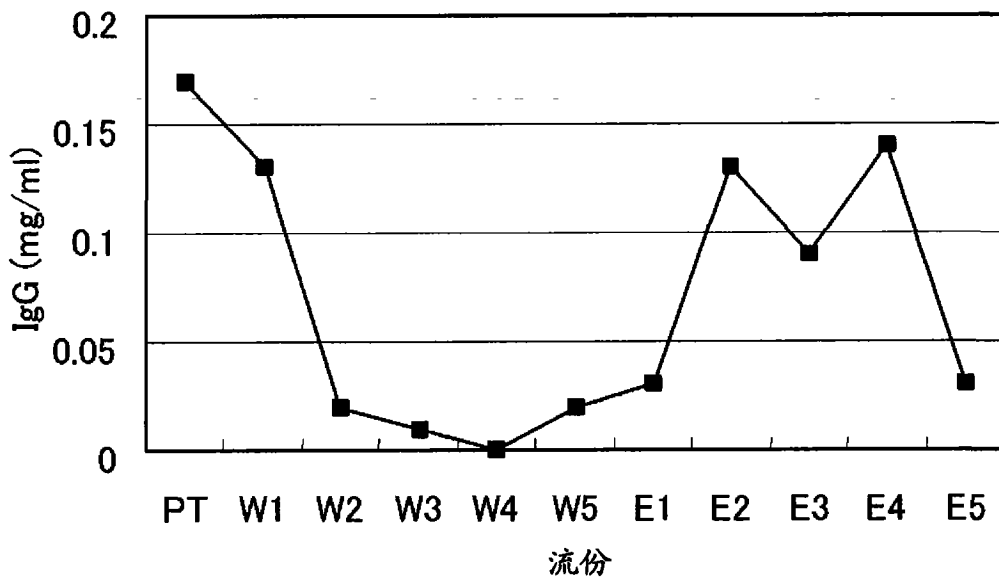


图 11

专利名称(译)	能够结合免疫球蛋白的肽		
公开(公告)号	CN101848926B	公开(公告)日	2014-04-30
申请号	CN200880112469.7	申请日	2008-08-20
[标]申请(专利权)人(译)	越智隆宏 株式会社MMT		
申请(专利权)人(译)	越智隆弘 株式会社MMT		
当前申请(专利权)人(译)	越智隆弘 株式会社MMT		
[标]发明人	越智隆弘 柴肇一 真崎修		
发明人	越智隆弘 柴肇一 真崎修		
IPC分类号	C07K7/06 A61K38/00 A61P19/02 A61P29/00 A61P37/02 A61P43/00 C07K14/47 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/02 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	C07K2319/00 C07K7/06 C07K7/08 G01N33/564 C07K14/472 A61K38/00 C07K14/47 A61P13/12 A61P19/02 A61P29/00 A61P37/02 A61P43/00		
代理人(译)	梁谋 郭文洁		
优先权	2007214961 2007-08-21 JP		
其他公开文献	CN101848926A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了：能够结合免疫球蛋白的肽；该肽的融合蛋白；分别编码该肽和该融合蛋白的核酸；分别产生该肽和该融合蛋白的方法；用于结合免疫球蛋白的组合物和用具；用于治疗或预防由C1q和免疫球蛋白之间的结合引起的疾病的药物组合物，其包含能够结合免疫球蛋白的肽或该肽的融合蛋白；及其他。

