

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4347808号
(P4347808)

(45) 発行日 平成21年10月21日(2009.10.21)

(24) 登録日 平成21年7月24日(2009.7.24)

(51) Int.Cl.

F 1

GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53	Z N A D
GO 1 N 33/543	(2006.01)	GO 1 N 33/543	5 1 5 D
C O 7 K 5/078	(2006.01)	C O 7 K 5/078	
C O 7 K 7/06	(2006.01)	C O 7 K 7/06	
C O 7 K 7/08	(2006.01)	C O 7 K 7/08	

請求項の数 24 (全 24 頁)

(21) 出願番号	特願2004-524435 (P2004-524435)	(73) 特許権者	507057686
(86) (22) 出願日	平成15年7月11日(2003.7.11)		ユーロ ダイアグノスティカ アクティエ
(65) 公表番号	特表2006-518834 (P2006-518834A)		ボラーグ
(43) 公表日	平成18年8月17日(2006.8.17)		スウェーデン国, 205 12 マルメ,
(86) 国際出願番号	PCT/SE2003/001211		イデオン
(87) 国際公開番号	W02004/011674	(74) 代理人	100099759
(87) 国際公開日	平成16年2月5日(2004.2.5)		弁理士 青木 篤
審査請求日	平成18年7月11日(2006.7.11)	(74) 代理人	100077517
(31) 優先権主張番号	0202325-7		弁理士 石田 敬
(32) 優先日	平成14年7月26日(2002.7.26)	(74) 代理人	100087871
(33) 優先権主張国	スウェーデン(SE)		弁理士 福本 積
(31) 優先権主張番号	0202880-1	(74) 代理人	100087413
(32) 優先日	平成14年9月30日(2002.9.30)		弁理士 古賀 哲次
(33) 優先権主張国	スウェーデン(SE)	(74) 代理人	100134360
			弁理士 岡村 亜矢子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 レクチン経路欠損検定

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

哺乳動物の血液、血清、血漿、又は哺乳動物から得られたその他の体液のサンプルを用いて、補体系のレクチン経路中の欠損を生理学的条件下で機能的に測定するための *in vitro* の方法であって、以下のステップ

(a) C 1 q、C 1 r 若しくは C 1 s に対する免疫グロブリン、タンパク質、及びペプチドから成る群から選定された C 1 複合体阻害剤を付加し；

(b) 副経路の活性化を阻害するために当該サンプルを希釈し；

(c) 当該サンプル中におけるレクチン経路を活性化させる M B L、又はフィコリン結合糖質を付加し；

(d) 自系の C 5 b - 9 複合体に対する第一の抗体を付加し；そして

(e) 当該自系の C 5 b - 9 複合体を測定することによる当該生理学的条件下でのレクチン経路の活性化を測定する、

を含んで成る方法。

【請求項2】

前記ステップ (a) における阻害剤が、C 1 阻害剤、C R T、C 1 Q r、大腸菌 C 1 q 結合タンパク質、g C 1 q R、g h B 3、デコリン、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン、界面活性剤プロテイン A、及び H N P - 1 から成る群から選定された請求項 1 に記載の方法。

【請求項3】

前記ステップ (a) における阻害剤が、TDGDKAFVDFLSDEIKEE, KDIRCKDD, AEAKAKA, VQVHN AKTKPR, WY, CEGPFGPRHDLTFCW, 及びLEQGENVFLQATLLから成る群から選定された請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記ステップ (a) における阻害剤が、ポリクローナル及びモノクローナル抗体から成る群から選定された請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記ステップ (c) における糖質が、マンノース、フコース、マンナン、合成糖質、並びに微生物多糖類から成る群から選定される、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 6】

前記ステップ (d) における第一の抗体が、ポリクローナル又はモノクローナル抗体である、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

前記ステップ (d) が、前記第一の抗体に対する第二の抗体を付加することを含んで成り、ここで当該第二抗体が標識された抗体である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記第一の抗体が標識された抗体である請求項 6に記載の方法。

【請求項 9】

補体系のレクチン経路における欠損を、哺乳動物からの体液中で機能的に測定するためのキットであって、以下を

20

(a) 不活性担体及びMBL又はフィコリン結合糖質、

(b) C 1 q、C 1 r、若しくはC 1 sに対する免疫グロブリン、タンパク質、ペプチド及びプロテアーゼから成る群から選定されたC 1 複合体阻害剤を含んで成る希釈剤、及び

(c) 自系のC 5 b - 9 複合体に対する第一の抗体、
を含んで成るキット。

【請求項 10】

前記 (a) における糖質が、マンノース、フコース、マンナン、合成糖質、並びに微生物多糖類から成る群から選定された請求項 9 に記載のキット。

【請求項 11】

30

前記 (b) における阻害剤が、C 1 阻害剤、CRT、C 1 Q r、大腸菌C 1 q 結合タンパク質、g C 1 q R、g h B 3、デコリン、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン、界面活性剤プロテインA、及びHN P - 1 から成る群から選定された請求項 9 ~ 10 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 12】

前記 (b) における阻害剤が、ペプチド、TDGDKAFVDFLSDEIKEE, KDIRCKDD, AEAKAKA, VQVHN AKTKPR, WY, CEGPFGPRHDLTFCW, 及びLEQGENVFLQATLLから成る群から選定された請求項 9 ~ 11 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 13】

前記 (b) における阻害剤が、ポリクローナル及びモノクローナル抗体から成る群から選定された請求項 9 ~ 12 に記載のキット。

40

【請求項 14】

前記 (c) における第一の抗体が、ポリクローナル又はモノクローナル抗体である請求項 9 ~ 13 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 15】

前記 (a) における糖質で不活性担体を覆った請求項 9 ~ 14 のいずれかに 1 項に記載のキット。

【請求項 16】

前記 (c) における第一の抗体が、標識化された抗体である請求項 9 ~ 15 のいずれか 1 項に記載のキット。

50

【請求項 17】

前記キットが、前記(c)における第一の抗体に対する標識化された第二の抗体(d)を更に含んで成る請求項9～15のいずれか1項に記載のキット。

【請求項 18】

前記標識が、蛍光又は酵素標識である請求項17に記載のキット。

【請求項 19】

前記キットが、酵素基質(e)を更に含んで成る請求項9～18のいずれか1項に記載のキット。

【請求項 20】

前記キットが、洗浄液(f)を更に含んで成る請求項9～19のいずれか1項に記載のキット。

10

【請求項 21】

前記キットが、哺乳動物からの正常の体液(g)を更に含んで成る請求項9～20のいずれか1項に記載のキット。

【請求項 22】

前記正常の体液(g)が、ヒト血清である請求項21に記載のキット。

【請求項 23】

前記キットが、不活性化された哺乳動物からの正常の体液(h)を更に含んで成る請求項10～22のいずれか1項に記載のキット。

【請求項 24】

前記不活性化された正常の体液(h)が、加熱不活性化されたヒト血清である請求項23に記載のキット。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、補体系検定について言及する。より明確には、本発明は生理学上の条件での補体系のレクチン経路欠損を機能的に測定するための方法及びキットについて言及する。

【背景技術】

【0002】

補体系とは、相互作用する多くの血漿中タンパク質及び膜貫通タンパク質を含む先天性免疫系の複雑な部分である。先天性免疫という用語は、適応性免疫という用語と免疫のタイプを区別するため用いられるものである。しかしながら補体は適応性免疫でも役割を果たすが、ここでの関連では十分に理解されていない。

30

【0003】

血清中に存在する一連の可溶性タンパク質は、活性化された時、微生物及び他の抗原を組織及び血液から排泄するのを助ける。これは補体成分単独、又は免疫応答の他の武器の誘因となる補体受容体を発現する細胞とのそれらのその後の相互作用のいずれかにより達成される。

【0004】

損傷を受けることから宿主組織を予防するために、補体系は厳格に統制されていなければならない。血漿中又は細胞表面のいずれかに存在する多くの数のタンパク質は、宿主細胞の保護、抗原による活性化の間の補体制御、及び一度抗原が排泄された補体の脱活性化における補体の統制分子として必要とされる。

40

【0005】

有機体の病原性に対する宿主防御の主な構成要素として、補体系の活性化は、病原体の侵入に対する先天性の防御のための重要な鍵となる。より高等な有機体である動物は、有機体の侵入により提示される抗原性攻撃に対し、特異的な免疫応答を発達させることにより応答する。抗体が形成され、特異的な外来抗原を認識する能力を持つ細胞が産出される。このようにして、補体は補体成分により直接的に微生物の表面を認識することによって、及び間接的に抗体又は急性段階タンパク質のようなアダプター分子と結合することによ

50

って標的を同定する。補体系の次に起こる活性化は、一般に体液及び細胞機構経由での活性化剤の排泄という結果となる。補体系のこれらの防御機能は、最適の宿主免疫のために必要とされる。

【0006】

例えば、マンナン結合レクチン(MBL)は、臨床的に重要である多くの微生物の表面上に頻りに発現する多糖類と結合することができる。このMBLの直接的な結合は、免疫系による病原体の排泄に關与する。病原体の侵入に対する先天性耐性におけるMBLの重要性は、MBL遺伝子中に遺伝子の突然変異を有するヒトにより明確に説明される。これらの突然変異はMBL分子の構造異常を引き起こし、感染への感受性の増強に關連するレクチン経路による補体活性化が減弱する結果となる。

10

【0007】

補体系の活性化は宿主防御の重要な構成要素である。感染後、補体構成要素の微生物表面への直接的な結合による補体活性化カスケードの誘発は、体液及び細胞機構経由でのオプソニン作用並びに病原体の排泄を誘導するであろう。更に、補体活性化が誘発され、後天免疫系を増幅するであろう。

【0008】

更に感染に対する宿主防御で重要な役割を果たす補体系は、免疫複合体疾患の病因及び予防の両方の媒体である。補体活性化により炎症が促進され、同時に適切に制御されていない時には細胞損傷という結果になり得るので、補体系が適切な病原体に対し適度に機能する場合には保護的效果を有する。

20

【0009】

補体活性化カスケード反応は、少なくとも3つの公知の活性経路、即ち古典経路(CP)、副経路(AP)、及びレクチン経路(LP)経路により誘発され得る。これらの3つの経路は、構成要素C3で合流する。末端の補体経路は、C3以後活性化される全てのタンパク質から成り、そして膜攻撃複合体(MAC)へのタンパク質C5-9群の集合に歸着する。MACは、細胞膜に穴をあけることによって強力な殺傷活性を働かせる。

【0010】

補体系の欠陥は、補体活性化カスケードの一部又は完全な封鎖を導くことができる。欠陥のレベル次第で補体活性化の誘導段階、エフェクター段階のいずれかが阻止され、そして当該欠陥は1以上の経路に影響を及ぼし得る。補体系機能の減弱は、遺伝子欠陥のため、又は補体構成要素の後天的な欠損により起こり得る。補体構成要素の後天的な欠損とは、補体構成要素に対する自己抗体の形成、又は過度の補体消費により起こり得る。遺伝子の補体欠損は、当該系の全てのレベルで説明された。

30

【0011】

大多数の補体欠陥は、感染に対する感受性の相対的な微増から重篤な全身性自己免疫性症候群の発症までの範囲にある疾患に關連する。更に補体機能の減弱は、全身性エリテマトーデス(SLE)患者の発赤の発生に關連する。従って、ヒト血漿中の補体活性を測定する機能性検定は、診断上の、及び予後の明確な価値を有する。

【0012】

しかしながら、類似の機構を経由する補体構成要素は、損傷した自己組織に対しその効果を標的にするおそれがあることが、この数年徐々に明確にされ始めた。それによれば自己免疫性疾患、免疫複合体疾患、アルツハイマー病、並びに例えば、心筋梗塞、脳卒中、及び主な外科的処置で発生する虚血性/再灌流(reperfusion)損傷といった症状下において補体は、組織損傷及び炎症の増幅に寄与する。例えば近年の研究ではMBLによるレクチン経路の活性化は、補体活性化及び虚血性/再灌流損傷、並びに心筋梗塞に關連する炎症の原因となり得るとの証明も提供した。更に補体活性は、同種移植及び異種移植の拒絶の原因に寄与する。このように所望されない補体活性が、多くの病的な状況下における炎症及び關連する組織損傷に含まれる。

40

【0013】

補体系の欠損を指摘すること及び機能的に測定することは困難である。欠陥は欠陥時点

50

での補体カスケードの遮断を誘導するであろう。一般に古典経路に欠陥のある患者は、欠陥時点までで当該経路を進めることを止め、カスケード中の後のタンパク質は補充されない。一方、副経路に異常を持つ固体は、古典経路に異常を持つ固体よりも普通少ないが、ある症例では異常を持つ数人の個体が発表された。

【0014】

レクチン経路の機能欠損は、普通はMBL遺伝子における遺伝子の多型性のためである。ヒトで説明された補体欠損の中で、MBLの欠損は最も頻度が高い。これらの欠損は、感染への感受性を増加させること、及び慢性疾患の進行を増強させることの両方の明確な臨床的意義を持つ。

【0015】

補体カスケード中の欠損は、不可抗力の感染及び敗血症へと導かれ得る。補体中の欠損は、2つの機構、即ち効果のないオプソニン化及び溶解活性の欠陥(MACの欠陥)によって主に患者を感染させやすくする。

【0016】

一つの例は不十分なオプソニン化となる欠陥の存在である。オプソニン化は病原性の有機体を覆う過程であり、そのためマクロファージ系により容易に食される。当該構成要素であるタンパク質C3bは、その分裂生成物であるC3biとともに補体カスケードにおけるオプソニン化の効力を有する物質である。C3bの生成の減少を引き起こすいかなる欠陥も不十分なオプソニン化能に帰着する。そのようなオプソニン化欠陥は古典経路、副経路、もしくはMBL経路の構成要素の欠損により引き起こされ、又は欠陥はC3構成要素自身の欠損により引き起こされるであろう。

【0017】

構成要素機能はほとんどの場合、古典補体経路及び副補体経路のそれぞれの機能的評価を可能とする溶血性検定を用いることによって測定される。これらの溶血性検定は、補体経路機能が、活性化に基づきC5b-9複合体を生成するためのその能力として現される。そのような検定は現在のところ補体のレクチン経路のために利用することはできない。ヒト個体群におけるMBL欠損の頻度の高さ考慮すると、レクチン経路機能を測定するための信頼できる検定は高く評価される。

【0018】

普通は、補体の検出又は血中での補体欠損の検出ための方法は、冗長な溶血性、又は抗原性の方法によって行われる。補体経路の異なる構成要素のレベルの増加又は減少が検定される。そのような試験では特異的な補体タンパク質を認識するであろう標的抗体が必要とされる。一般に血清又は血漿中の補体タンパク質の抗原性検定は、特にC3に最も容易に利用し得る試験である。後者の検定ではC3の血清レベルが提供されるが、機能的な活性化については殆ど何も、又は全く何も示さない。低機能性変異体の存在は発表されているが、非機能性C3変異体については発表されていない。

【0019】

機能的な補体を研究する場合、抗体及び補体によって容易に溶解するという理由から羊赤血球が用いられた。機能的な補体の活性化のために最も一般的に行われる試験は、抗体で覆われた羊赤血球を溶解させるための患者の血清の希釈能の尺度であるCH₅₀である。例えば古典経路のタンパク質の一つが欠落している場合、CH₅₀検定での溶解は遮断され、欠損タンパク質の機能的力価がゼロに近づき、及び得られるCH₅₀はゼロとなる。副経路溶解試験が存在し、AP₅₀と称される。この試験はCH₅₀試験よりも感度が低く、スクリーニング試験に用いられる。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0020】

レクチン経路の機能欠損を検出するために、例えば古典経路の抗体媒介活性化が偽陽性結果を導くように検出を干渉することがないよう機能的検定をデザインすることが重要である。これは、レクチン経路の活性化剤として用いられるMBLリガンドに対する抗糖質

10

20

30

40

50

抗体がヒト個体群において共通であるから、及びこれらの抗体はMBLが欠損した血清中の古典経路により補体を活性化する結果とすることができるから重要である。従って、信頼できる機能的レクチン経路検定では、古典補体経路の活性化を妨げるべきである。

【0021】

レクチン経路欠損の測定のため今まで利用可能であった検定は重大な制限があり、全体の活性化カスケードの機能的な活性を測定することができない。それらは生理学的補体活性化を大きく阻害する人工条件下における検定を用いることにより、外因性の補体（及びMBL-MASP複合体の活性のみを測定）又は内因性のC4（後の活性化ステップではなく）のいずれかを使用する。

【0022】

Zimmermann-Nielsen等の論文（Scand. J. Immunol. 55:105-110, 2002）では、MBLで誘導されたヒト血漿中補体系の活性化の定量的な検定を開示する。本検定では、補体活性化は自系でのC4活性化として測定された。副経路の開始は、血清培養緩衝剤としてイオン強度が高い希釈緩衝剤（1MのNaCl）を用いることにより遮断された。

【0023】

しかしながら、1MのNaClの存在は、古典経路及びレクチン経路の両方のC4活性化を強力に阻止する。従って、本検定はこれら2つの経路を真に区別せず、両方を高度に失効させる。更にこれは本検定において極端に高い血清濃度（1/5）を用いることの必要性を導き、なぜならこのような最適に満たない条件は検出限界に近い強く阻害された補体活性をもたらすからである。

【0024】

このようにこのZimmermann-Nielsen検定での補体活性化は、生理学的な条件下において測定されず、提供された人工的条件は、異なる起源、及び/又は異なるMBL遺伝子型由来の血清に対し異なる効果を有するであろう。更にC4より後の段階で補体活性化を評価することは、C4b2aの形成がイオン強度に強く依存していることから（Laich及びSim, BBA 1544:96-112, 2001）、及び高い血清濃度であってもC3活性化が1MのNaCl中で完全に検出されないことから、この検定において可能でない。

【0025】

このように、生理学的条件下でのヒトを含む哺乳動物の補体系のレクチン経路欠損の機能的な確認方法が必要とされる。そのような方法はC5b-9の形成までの補体活性の完全なレクチン経路の特異的な検定を可能にするだろう。

【0026】

本発明の目的は、in vitroでの補体系中の欠損を機能的に測定する方法を確立することであり、それによって上記問題が解決する。

【課題を解決するための手段】

【0027】

この目的を達成するため、補体系のレクチン経路中の欠損を生理学的条件下で機能的に測定するin vitroでの方法を提供する。当該方法は、以下のステップ

- (a) 哺乳動物の血液、血清、血漿、又はその他の体液のサンプルを提供し；
 - (b) 補体系のC1複合体分子の阻害剤と当該サンプルを接触させることにより、サンプル中での古典経路の活性化を妨げ；
 - (c) サンプル中での副経路の活性化を妨げ；
 - (d) サンプル中でレクチン経路を活性化し；及び
 - (e) 自系のC5b-9複合体の任意の活性化をサンプル中で測定する、
- を含んで成る。

【0028】

本発明の目的は、体液由来のサンプル中における補体系のレクチン経路の欠損を機能的に測定するためのキットを製造することでもある。

【0029】

当該目的は、以下の個別の品目

10

20

30

40

50

(a) 不活性担体及びレクチン経路を活性化する物質 ;
(b) C 1 複合体の分子の阻害剤を含む希釈剤 ; 及び
(c) 自系の C 5 b - 9 複合体に対する抗体、
を含んで成るキットによって達成される。

【 0 0 3 0 】

本発明によれば、自系補体による補体系レクチン経路 (L P) での欠損を生理学的条件下において機能的に測定する *in vitro* での方法を提供する。本発明の方法における哺乳動物の血液、血清、血漿、又はその他の体液のサンプルは、最初に当業界において周知の方法によって提供される。2つの検定されない経路の活性化、すなわち古典経路 (C P) 及び副経路 (A P) の活性化はその後サンプル中で妨げられ、そしてレクチン経路が活性化される。最終的に、補体系の任意の活性化が C 5 b - 9 複合体のレベルで測定される。

10

【 発明を実施するための最良の形態 】

【 0 0 3 1 】

本発明の手順は、多数の事実及び問題点を考慮に入れる必要がある。例えば補体系の巨大な多量体タンパク質複合体 C 1 は、C 1 q、C 1 r 及び C 1 s のサブユニットから構成される。古典経路の活性化は免疫複合体を形成するための特異的抗体 (例えば I g M) による外来抗原との結合により開始される。いずれの免疫グロブリン F c 領域も一つの C 1 q 結合サイトを有し、いずれの C 1 q も活性化されるためには2つの重鎖と結合していなければならない (即ち、架橋する2つの I g G、又は1の I g M となる) 。

【 0 0 3 2 】

20

古典補体経路における C 1 q 認識ユニットは、N末端での膠原性配列、及びC末端でのCタイプレクチンドメインから成る3量体の複雑な構造を構成するコレクシオンとして公知のタンパク質ファミリーと強く関連する。C 1 q はレクチンドメインを持たず、多くの構造的及び機能的特徴を当該コレクシオンと共有する。血漿中 C 1 q 濃度がおよそ 1 0 0 μ g / mL に達し、そして *in vitro* 実験は、ほんのわずかな C 1 q のみが完全な補体活性化に十分であることを示す。

【 0 0 3 3 】

本発明の方法において、有効及び特異的な補体阻害剤は、それぞれの補体経路の所望されない活性化を妨ぐために用いられる。少なくとも C 1 q 阻害剤の2つの異なるタイプは古典経路の活性化を妨げるために用いることができ、それらは球状頭部と結合し及びリガンド認識を干渉するもの、並びに膠原性尾部と結合し及び補体活性酵素、及び / 又は C 1 q 受容体との相互作用を減弱させるものである。リガンド結合を干渉するそれらの阻害剤は、明らかに古典経路活性化のより早期のステップを阻害する。一方、C 1 q の球状頭部に結合する分子は、特にこれらの C 1 q 結合分子が多量体である場合に、流動相中で C 1 活性化を誘発することができる。

30

【 0 0 3 4 】

好適には、C 1 q に対するモノクローナル抗体が、C 1 q 仲介リガンドとの結合及び補体活性化を効果的に阻害するために用いられる。

【 0 0 3 5 】

C 1 q の機能的活性を調節できるいくつかの確認された分子の数を、表 1 に示した。

40

【 0 0 3 6 】

【表1】

表1.

阻害剤	説明／解説	C1阻害の機構
C1阻害剤	血漿セリンプロテアーゼ阻害剤	C1r及びC1s活性の阻害
IVIg	広域の活性を有す	C1qリガンド結合の遮断
CRT	いくつかの活性ドメインを含む	C1q頭部及びC1q尾部の両方を阻害できる
C1Qr	先天性C1g受容体	C1q尾部と結合し、C1形成を阻害
大腸菌C1q結合タンパク質		C1q尾部と結合し、C1形成を阻害
gC1qR	先天性C1q受容体	C1q頭部と結合
デコリン	マトリックスタンパク質	C1q頭部及び尾部と結合調整
コンドロイチン硫酸プロテオグリカン	血漿プロテオグリカン／B細胞分泌	C1形成の阻害
プロテインA界面活性剤	肺中に存在するコレクチン	C1qリガンド結合及びC1形成の阻害
HNP-1	好中球から産生される細胞毒性ペプチド	C1q尾部と結合し、C1形成を阻害
ペプチド gC1q-R ₁₈ (TDGDKAFVDFLSDEIKKE)	gC1qR由来	明確にされていない
ペプチド KDIRCKDD	CRT由来	C1qリガンド結合の阻害
ペプチド AEAKAKA	ヒトIgG由来	C1qリガンド結合の阻害
ペプチド VQVHNAKTKPR	ヒトIgG1由来	明確にされていない
ペプチド WY	ヒトIgG由来	C1qリガンド結合の阻害
ペプチド 2J (CEGPFGRHDLTFCW)	合成ペプチド	C1q頭部と結合し、リガンド結合を阻害
ghB3	3量体 C1q B鎖	C1q結合のための競合剤として作用
ペプチド CBP2 LEQGENVFLQATLL	C1q B鎖由来	C1q結合のための競合剤として作用

【0037】

表1では、天然のC1q結合分子、C1q結合ペプチドのいくつかの系列、及びC1q配列由来の競合的阻害剤を示し、古典経路の活性化を妨げる時、補体系のC1q阻害のため、又は阻害性のC1q結合タンパク質として、それらを本発明による方法において用いることができる。

【0038】

古典経路のC1q結合タンパク質は免疫グロブリンであり、C1qの球状頭部ドメインは、抗原との結合により、或いは凝集又は固定化されて、IgG及びIgMの両方と相互作用する。静注で用いるためのヒト免疫グロブリン(IVIg)は、補体活性化を阻害することができ、当該主作用機構は、C1q並びに可溶性免疫グロブリンにより活性化されたC4及びC3を除去すると思われる。

【0039】

免疫グロブリンの他に、多くの他のタンパク質が、C1qに結合できることが確認された。それらの中には、カルレチキュリン(CRT)、内皮C1q受容体、及び球状C1q

10

20

30

40

50

受容体 (g C 1 q - R) といった細胞膜上に存在する (一定の条件及び一定の細胞のタイプにおいて) C 1 q 結合タンパク質がある。これらの C 1 q 結合タンパク質の膜発現フォームは C 1 q 仲介細胞活性化に關与し、一方でこれらの分子の可溶性フォームは C 1 q 機能を阻害することができる。

【 0 0 4 0 】

カルレチキュリン (C R T) は、カルシウム結合タンパク質であり、主に小胞体のルーメン中に存在している。タンパク質配列データは、C R T が様々なタイプの細胞表面上に存在する C 1 q 受容体とおそらく同一であることを示す。C R T は細胞表面上で 2 巨大グロブリン受容体 (C D 9 1) と結合でき、C 1 q に結合する C R T の種々のドメイン、即ち、C ドメインではなく、隣接する N ドメイン及び P ドメインは区別できる。更に、N 及び P ドメインと一部分が重複する S ドメインは、明白な C 1 q 結合も見せる。C R T の S ドメインは C 1 r 及び C 1 s に存在する C U B ドメインと明らかに類似し、当該ドメインは C 1 q の膠原性部分とおそらく相互作用することが示唆される。

10

【 0 0 4 1 】

従って、C 1 q 上の異なるサイトが C R T の異なるドメインと相互作用する。天然及び組換え C R T、並びに N ドメイン、P ドメイン、及び S ドメインは、全て C 1 q 依存的溶血、並びに C 1 形成を阻害する。C 1 q 結合ペプチドの多くは C 1 q 機能を阻害することができることも確認され、当該ペプチドは、本発明の方法に有用である。それらは、ヒト好中球ペプチド 1、天然 C 1 q 結合タンパク質由来ペプチド、及びペプチドライブラリーから選定した合成ペプチドの中にある。

20

【 0 0 4 2 】

C 1 q 結合タンパク質 (g C 1 q R)、特に C 1 q の球状頭部と結合する C 1 q 結合タンパク質も用いることができる。ヒト内皮細胞膜、又は多形核白血球膜から単離された天然 C 1 q 受容体 (C 1 q R) は、活性 C 1 の形成を機能的に阻害する。この阻害活性は、C 1 q 膠原性尾部により取り消されるが、球状頭部によっては取り消されない。類似方法では、大腸菌から単離された C 1 q と結合する可溶性タンパク質は、C 1 形成を阻害することができる。

【 0 0 4 3 】

更に、古典経路の活性化は C 1 r 又は C 1 s に対する抗体により検定中でサンプルと接触させることによって妨げることができる。これに関連して C 1 q 機能を調節することができるいくつかの他の C 1 q 結合分子を用いることができる。C 1 q に関連したヒト B 細胞から産生される血漿プロテオグリカン、及びコンドロイチン硫酸プロテオグリカンがそれらの例であり、C 1 q と結合することができ、及び C 1 形成を阻害することができる。デルマタン硫酸プロテオグリカンデコリン、細胞外マトリックスの組成物、及び関連したプロテオグリカン 2 糖類は、適した阻害剤でもある。

30

【 0 0 4 4 】

同様に、古典経路の活性化は、C 1 r 又は C 1 s のペプチド阻害剤を提供することによって妨げることができる。ペントラキシン (pentraxin) ファミリーのいくつかのメンバー、即ち、C 反応性タンパク質、血清アミロイド P 化合物、及びペントラキシン 3、が C 1 q と結合すると記載されている。ペントラキシン 3 は一定の条件下で C 1 q 活性を阻害することができ、コレクシオンファミリーのメンバーである界面活性剤プロテイン A は、C 1 q と結合すること、及びその活性を阻害することができる。これは C 1 r 及び C 1 s の結合、並びに免疫複体の結合の両方を妨げることによって達成される。

40

【 0 0 4 5 】

C 1 q 由来分子による C 1 q の競合的阻害は、古典補体経路阻害のための代替アプローチである。ここでは C 1 q 分子の機能的に不活性な部分が用いられ、C 1 q リガンド結合のための競合的阻害剤としてそれぞれが働く。C 1 q A (g h A) の球状頭部ドメイン及び B 鎖 (g h B) の組換え体が作製され、当該組換え体のそれぞれのドメインは、共に I g G と結合することができるが、B ドメインは A ドメインよりもより効力がある。C 1 q 組換え体の B 鎖が界面活性剤プロテイン D の頸部領域を用いることにより 3 量体化された

50

時、よりよい活性が得られる。

【0046】

ヒト好中球ペプチド1 (HN P - 1) といった阻害性C1q結合低分子も用いることができ、それはC1qと結合、及び古典補体経路を阻害することができる。当該ペプチドは、低分子陽イオンペプチドのデフェンシン (defensin) ファミリーに属し、アズール好中球顆粒中 (azurophilic neutrophil granules) に存在している。そのようなC1r又はC1sの阻害ペプチドは、低コストで十分量を得られるため化学合成的に製造されることが好ましい。

【0047】

いくつかのC1q結合ペプチドは、C1q結合タンパク質のアミノ酸配列の基礎を確認した。92の一部分が重複するペプチドを使用することによって、CRTのN及びP領域中のいくつかのC1q結合サイトが確認された。これらのペプチドの多くはヒト血清中の古典経路活性化、及びC1qのIgGへの結合を阻害することができる。これらのペプチドはIgGドメイン中のCH2にあるC1qのための結合サイトと似ているモチーフ (ExKxKx) によって特徴づけられる。

10

【0048】

これに関連して、IgGから直接的に由来するペプチド (ExKxKxモチーフを含む7量体ペプチド (即ち、AEAKAKA)、同じモチーフに関係したIgG1から由来する11量体ペプチド (VQVHNAKTKPR)、及び2量体ペプチド (WY, 表1参照) といった) はC1qを阻害することが記載されている。これらのペプチドは、いくつかのin vitro検定で古典補体経路の活性化を阻害することができた。しかしながら、WYペプチドは副補体経路をも阻害する。

20

【0049】

ヒトC1qと結合するファージを基礎とするファージディスプレイペプチドライブラリーから選定した42ペプチド中の20ペプチドが、ヒト血清中での古典補体経路を阻害することが確認された。これらの20ペプチドの中での13は、溶血性検定において著しく古典経路及び副経路を阻害することができたのに反し、7ペプチドは特異的に古典経路を阻害した。これらのペプチドの中からペプチド2J (CEGPFGRHDLTFCW) が選定された。ペプチド2JはC1q溶血機能の強力な阻害剤である。IgGモチーフと類似したペプチドであるペプチド2Jは、C1qの球状頭部と結合し、C1qのIgGへの結合を阻害する。更にペプチド2Jはヒト、霊長類及びげっ歯動物由来のC1qを阻害する。

30

【0050】

他の選定された古典経路を阻害するための有用なペプチドは、CEGPFGRHDLTFCW, CRWDG SWGEVRC, CMWVRMWGDVNC, CFWAGKFGLGTC, CKDRVVVEERCC, 及びCWNRFKMDRCである。C1q結合のための競合剤として働き、そしてC1qB鎖から由来するいくつかのその他のペプチド (例えばペプチドCBP2 (LEQGENVFLQATLL)) も使用することができる。

【0051】

C1阻害タンパク質は、認識段階での補体統制に関する重要な分子であり、活性化されたC1複合体のセリンプロテアーゼを阻害する。このように、C1阻害の効能を有すものはいずれも古典経路の活性化を妨げるために用いることができる。

40

【0052】

更に、C1r又はC1sのプロテアーゼ阻害剤、例えばセリンプロテアーゼの公知阻害剤を用いることができる。これらの阻害剤はレクチン経路の活性化が妨げられた時に使用することもできる。

【0053】

マンナン結合レクチン (MBL) は、C1との類似点を見せる大きなプロ酵素複合体に属する血清中のCタイプレクチンである。C1qと同様、MBLは、3量体サブユニットの多量体分子である。MBLの3量体は、膠原性尾部領域及び糖質認識ドメインを持つ3つの同一の鎖から成る。血清中では、MBLはMBL結合セリンプロテアーゼ、MASP-1、MASP-2、及びMASP-3と結合する。活性化MASP-2はC4及びC2

50

を活性化することができることが説明され、それはC3コンバーターゼC4b2aの形成、及びその後のC3活性化に帰着する。MASP酵素はC1r及びC1sと相同である。

【0054】

副経路の活性化を妨げるための簡単で効果的な方法はサンプルを希釈することである。1MのNaClを血清希釈緩衝剤へ付加することによりC1q結合及びCP活性化を完全に妨げることができるのに反し、MBLの結合を進行させることができる。しかしながら高いイオン強度の阻害効果を考慮に入れるべきである。

【0055】

副経路において、セリンプロテアーゼ因子DはC3コンバーターゼを産生し、(仮に不活性化されていない場合)C3化合物への作用が続き、その全体的な枯渇を引き起こすであろう。このようにして副経路の活性化は、検定において補体系の因子Dのプロテアーゼ阻害剤、又はそれに対する抗体とサンプルを接触させることにより妨げることができる。

10

【0056】

レクチン経路は、侵入する病原体上の糖質の成分に特異的であるタンパク質のコレクチンファミリーメンバーとの結合により活性化されることが知られている。これらはその後、直接的に古典経路の化合物を活性化し、特異的な抗体の必要性が回避される。コレクチンファミリーのメンバーの一つはマンナンに結合したレクチン(MBL)であり、血清中で見出され、バクテリアの末端マンノース基へ結合する。

【0057】

従って、レクチン経路は、MBLが結合した高分子量又は低分子量の糖質とサンプルを接触させることにより活性化され得る。高分子量マンナンの例は、グルコマンナン及びガラクトマンナンである。低分子量のMBLが結合した糖質は、好適にはマンノース又はフコースである。レクチン経路は共役糖質合成物質又は微生物多糖類との結合によっても誘発され得る。

20

【0058】

血清中のN-アセチルグルコサミンレクチンであるフィコリンは、レクチン経路を活性化する能力を有すレクチンであると考えられているため、当該レクチン経路は検定においてフィコリン結合糖質を供給することによっても活性化され得る。

【0059】

しかしながら一定の病原体は、特異的な抗体と相互作用する必要がなくても古典経路を直接的に活性化する能力を有している。活性化分子には、酵母の細胞壁、バクテリアのリポ多糖類(LPS)、及びいくつかのウィルスのキャプシドが含まれる。同様に免疫グロブリンの集合体、例えばIgA又はIgEは、副補体経路を活性化することが知られている。このように一の経路の活性化を妨げる場合、その経路自体を活性化するような活性化剤は本発明の方法に用いるべきでない。

30

【0060】

サンプル中の補体経路の任意の活性化はそのC4からC9の補体タンパク質の活性化を確立することにより後に測定することができる。好適には、末端補体複合体SC5b-9は、いずれかの経路によって補体活性化が発生した時に形成される膜攻撃複合体(MAC, C5b-9)であるため測定される。当該測定は、自系で形成されたC5b-9複合体に対する抗体を検定に提供することによって達成され得る。

40

【0061】

本発明の方法において、C5b-9複合体に対する抗体は複合体全体を認識し、それらの個々の部分については認識しないことに注意すべきである。

【0062】

補体機能検定では、活性化物質のある一定の密度が必要とされる。例として抗体は、補体の活性化のために、例えば、抗原、又はプラスチック材料に固定されていなければならない。同様に補体の任意の活性化がC4からC9の任意の補体タンパク質；又は形成された任意のC5b-9複合体と、活性化面との結合を測定することにより行われるべきであ

50

る。

【 0 0 6 3 】

従って、不活性担体上を活性化物質で覆った（固定した）本発明によるキットは好ましい。担体の表面上の覆いは慣例技術を用いることによって達成され得る。例えば活性化物質は、ビーズ又はマトリックス/ゲルとしての担体に共有結合性カップリングにより固定され得る。

【 0 0 6 4 】

レクチン経路を活性化する物質を付着させるために適した担体は、ポリプロピレン、ポリスチレン、置換されたポリスチレン（例えばアミノ化又はカルボキシル化）、ポリアクリルアミド、ポリアミド、ポリビニルクロライド等といった合成ポリマー担体、ガラス、アガロース、ニトロセルロース等である。担体はビーズ、ストリップ、又はマイクロタイターウェルのフォームでよい。好適には、E L I S A プレートを用いる。しかしながら、他の担体も使用できる。

10

【 0 0 6 5 】

発明の方法を実施するためのキットには、以下の別個のアイテム、
 (a) 不活性担体及びレクチン経路を活性化する物質；
 (b) C 1 複合体の分子の阻害剤を含んで成る希釈剤；
 (d) C 5 b - 9 複合体に対する抗体；
 (e) C 5 b - 9 複合体に対する抗体に対してラベル化された抗 - 抗体；
 (f) 酵素基質；
 (g) 洗浄液；
 (h) 正常の体液；及び
 (i) 不活性化された正常の体液、
 を含む。

20

【 0 0 6 6 】

好適には、発明の方法を実施する際、当該キットはE L I S A 分析において用いられる。そのようなキットは、マニュアルで、又はロボットの中で用いられ得る。フレキシブルに自動化されたマルチウェルプレート (multi-well plates) 分析のためのソフトウェアシステムも利用され得る。

【 0 0 6 7 】

補体系のレクチン経路の欠損が疑われる場合、患者から得られた体液、普通血清は、本発明の方法によって分析され得る。血清、ネガティブ及びポジティブコントロールは、希釈剤によって同一の方法で全て希釈される。

30

【 0 0 6 8 】

希釈剤は、古典経路を阻害するためにC 1 複合体の分子の阻害剤を含み、好適にはC 1 q 阻害剤を含む。上記に述べた他の阻害剤も用いることができる。

【 0 0 6 9 】

希釈剤は、様々な塩類及び緩衝剤を含む緩衝水性媒体で形成され得る。好適には、塩類はハロゲン化されたアルカリ及びアルカリ土類、例えば塩化ナトリウム、塩化カリウム、又は硫酸ナトリウムである。種々のそのような緩衝剤（その目的のために生理学的に許容される緩衝剤である限り、クエン酸塩、リン酸塩、ヘペス、トリス等）が用いられてよい。当該希釈剤は、生理学的なp H及び生理学的なイオン強度を有すべきである。好適にはリン酸緩衝生理食塩水 (P B S) が用いられる。当該希釈剤は、カルシウム及びマグネシウムイオンを含有すべきである。

40

【 0 0 7 0 】

ネガティブコントロールとは、不活性化された正常の体液である。この場合、不活性化された正常の体液とは、加熱不活性化されたヒト血清である。当該ネガティブコントロールは、レクチン経路だけではなく、全補体系が完全に消失する本発明の方法で得ることができる最小限の可能なシグナルを規定する。

【 0 0 7 1 】

50

ポジティブコントロールとは、補体が正常レベルにあるヒトからの血清サンプルである。そのようなコントロールは、C5b-9複合体の活性化をサンプル中において測定する時、シグナルが妥当であるか否かを評価するためのキット中に含まれる。

【0072】

ポジティブコントロールは、本法の定量的測定のために用いられる検量曲線のための正常の血清の一連の希釈物（検定物質）でもよい。そのような検定物質は標準数値を選定するために用いることができ、それを介して異なる患者との比較、又は患者の治療の追試が可能となる。

【0073】

試験すべき血清、並びにポジティブ及びネガティブコントロールの希釈の後、これらの液体は、不活性担体及びレクチン経路を活性化する物質と接触させる。

10

【0074】

本発明の限定でない実施例の態様において、担体はマンナンで覆われたストリップの形状にある。希釈された血清、ネガティブ及びポジティブコントロールを有するそれぞれのストリップは37で30分培養され、それによって補体を活性化し、及び末端複合体が形成される。

【0075】

ストリップは、その後洗浄液で洗浄し、本態様においては洗浄液は希釈剤の緩衝成分とすべきである。

【0076】

C5b-9複合体に対する抗体に対するラベルされたマウスの抗-抗体の希釈緩衝溶液は、その後当該ストリップに付加され、更に30分間培養される。当該抗-抗体は酵素ラベル、又はいくつかの他の方法（例えば蛍光ラベルといった）でラベルされ得る。好適なラベルは酵素である。モノクローナル抗体も好適な抗体であり、モノクローナル抗-マウス抗体が最適である。

20

【0077】

C5b-9複合体に対する抗体は、蛍光又は酵素ラベルのように（好適には酵素によるラベル）シグナルを発生するために直接的にラベルすることもでき、抗-抗体のステップは省略する。

【0078】

ストリップは、再び洗浄され、適した反応緩衝剤中の酵素基質がその後付加される。酵素ラベルされた抗-マウス抗体、及び酵素基質との反応は、30分間進行することができ、そして反応生成物の色が分光光度計で測定され、試験血清中でポジティブコントロール血清を参照し、低い吸収と一致すれば欠損が測定される。

30

実施例

【0079】

本発明の方法をここに更に説明するが、以下の実施例に制限されない。

【0080】

原料及び方法

ヒト原料。

ヒト血清は70人の健常成人ボランティアから採取し、少量ずつ速やかに-80で凍結した。オランダの血液バンクLeiden-Haaglanden, Leidenから以前の健常人ドナーからの血漿を得た。IgMタイプのKahler's病患者からの血漿は、血漿瀉血治療後に利用できる状態になるものが得られた。

40

【0081】

抗-C1q及び抗-MBL抗体。

C1qに対するモノクローナル抗体は、以前に説明されている通りマウスで製造した（Hoekzema R., 等.Mol. Immunol.25,485-494,1988）。抗-C1q mAb 2204(IgG1)はC1qの球状頭部ドメインに対するものであり、並びにIgGへのC1qの結合を阻害すること及びC1q依存性溶血を阻害することができる（Roos A., 等., J. Immunol. 167,7052-7059,20

50

01)。mAb 2204の精製のため、グロブリンを50% (NH₄)₂SO₄を用いることによって腹水から沈殿させた。当該沈殿は2 mMのEDTAを含む10 mMのトリス (pH 7.8) で分離し、そしてDEAE-Sephacel (pharmacia, Uppsala, スウェーデン) を用いて陰イオン交換クロマトグラフィーにかけた。タンパク質は塩濃度勾配を用いて溶出し、そしてマウスIgGを1 MのNaClの存在下においてC1qで覆ったELISAプレートへ結合させて提示されたフラクションを貯蔵し、濃縮し、PBSで分離し、及び-80 で保存した。

【0082】

ポリクローナル抗-C1q抗体はウサギで作製した。ニュージーランド白ウサギは、完全なFreundsアジュバントに溶解した180 μgのC1qにより免疫化され (週1回、4週間)、1/25,000を超えるC1qで覆ったELISAプレート上で陽性力価を有する抗血清をもたらした。IgGは、40% (NH₄)₂SO₄を用いることによってウサギ血清から沈殿させ、上記の通りDEAE-Sephacelを用いることによって精製した。

10

【0083】

ウサギIgG抗-C1qの精製を根幹として、パピンをを用いることによりFabフラグメントを作製した。それゆえにIgGは10 mMのLシステイン及び2 mMのEDTA (pH 7.0) を含む10 mMのリン酸緩衝剤で分離した。続けてマーキュリパピン (シグマ製) を付加し (1重量%のタンパク質含有量)、引き続き37 で16時間培養した。PBSに対する透析後、サンプルをセファロース結合化プロテインG (ファルマシア、Uppsala、スウェーデン製) に加え、そしてFabフラグメントを含む分画にかけたフラクションを貯蔵し、濃縮し、及び実験のために用いた。非還元 SDS-PAGEによる分析では、およそ45 KDでの顕著なバンドが見られた。

20

【0084】

ヒトMBLのレクチンドメインに対するマウスmAb (mAb 3F8) は、Dr.G.L.Stahl (Harvard Medical School, ボストン、マサチューセッツ、米) の好意により提供された (Collard C.C., 等., Am.J.Pathol. 156, 1549-1556, 2000)。

【0085】

ヒトC1q及びC1qを枯渇させた血清の調整。

ヒトC1qを、全く以前に説明された通りにヒトドナーの血漿から単離し、-80 で保存した (Roos A., 等., J. Immunol. 167, 7052-7059, 2001)。単離されたC1qは、C1qが枯渇したヒト血清により、誘導された抗体で覆われた赤血球の溶解を完全に回復させることができた。

30

【0086】

C1qが枯渇した血清の調整のため、希釈されていない正常のヒトEDTA血漿 (MBL/A A遺伝子型のドナーから得られた) を、ウサギIgG抗-ヒトC1qを結合させたバイオゲルA5 (Biorad製) から成るカラムにかけた。当該カラムは、10 mMのEDTAを含むペロナルで緩衝された食塩水 (VBS; 1.8 mMのNa⁺、5,5-ジエチルバルビタール、0.2 mMの5,5-ジエチルバルピツル酸、145 mM NaCl) を用いて洗浄した。精製したC1qの存在下又は不存在下におけるC1q依存性溶血性検定においてフラクションを試験した。C1qの存在下において完全な赤血球溶解を見せるが、C1q不存在下において見せないフラクションを蓄え、及び元の容量になるまで濃縮した。カルシウム再添加の後、C1qが枯渇した血清を-80 で貯蔵した。

40

【0087】

ヒトIgMの単離。

IgMパラプロテインを含む血漿は、2 mMのEDTAを含む10 mM酢酸ナトリウム (pH 5.0) に対し透析した。沈殿したタンパク質は遠心分離により回収し、PBS中に溶解し、トリス/EDTA緩衝剤に対し透析し (10 mMトリス、2 mMのEDTA、pH 7.8及び5.0 mS伝導性)、そしてDEAE Sephacelを用いて陰イオン交換クロマトグラフィーにかけた。塩濃度勾配によって溶出したIgMは、貯蔵され、10 mM

50

酢酸ナトリウム (6.0 mM, pH 7.0) に対し透析し、CM-C-50 Sephadex陰イオン交換カラム (ファルマシア製) にかけた。塩濃度勾配による溶出に引き続き、IgGを含むフラクションを、貯蔵し、濃縮し、及びSuperdex 300ゲルろ過カラムへかけた。IgMを含むピークフラクション及び遊離IgGを貯蔵し、濃縮し、そして-80で保存した。

【0088】

比較例

【0089】

高い塩濃度は、補体システムに負に影響し、いくつかの反応は減弱した。

【0090】

血清は、図1に示した濃度でカルシウム、マグネシウム、及びNaClを含む緩衝剤においてマンナンで覆われたマイクロタイタープレートのウェル中で培養し、そして活性化されたC4 (A) 及びC3 (B) をELISA法により検定した。

【0091】

C4 (A) 活性化の完全な阻害、及びC3 (B) 活性化の完全な阻害は、高い塩濃度によって得られた。従って、高いイオン強度はおそらく変性によってC3を阻害し、それによってC4後の活性化のいかなる測定も妨げる。

【実施例1】

【0092】

ELISAによる機能的なレクチン経路活性検定

レクチン経路の機能的活性を、リガンドとして固定化マンナンを用いるELISAにより検定した。マンナン (シグマ製、サッカロミセス属・セレンビシエ (cerevisiae); M7504) を得て、PBS (10mg/mL) 中に溶解し、-20で貯蔵した。コーティング緩衝剤 (100 mM, Na₂CO₃ / NaHCO₃, pH 9.6) 中で16時間室温、又は2時間37で、Nunc Maxisorb plates (Nunc, Roskilde, デンマーク) にマンナン (100 µg/mL) を覆った。それぞれのステップが終了後、0.05% Tween 20を含むPBSでプレートを3回洗浄した。残留物が結合したサイトは、1% BSAを含むPBSと共に1時間37で培養することにより遮断した。血清サンプルは、別のやり方が示されていない限り、C1q阻害剤としてmAb 2204 (20 µg/mL) の存在下において、GVB++ (0.5 mMのMgCl₂を含むVBS、2 mMのCaCl₂、0.05% Tween 20、及び0.1%ゼラチン; pH 7.5) 中で希釈した。この混合物は、プレートへ付加する前に氷上で15分間プレインキュベートした。当該プレートは、その後連続的に1時間4及び1時間37で培養し、引き続き洗浄した。補体結合は、マウスmAbを用いて検出した。製造業者によって提供された指示書に従い、ジゴキシゲニン-3-O-メチルカルボニル- -アミノカプリン酸 N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (ベーリンガーマンハイム製、マンハイム、独) を使用し、マウスmAbが結合したジゴキシゲニン (dig) を用いることにより補体結合を検出した。C1q、C4、C3及びC5b-9の検出は、それぞれDr. T. E. Molines (オスロ、ノルウェー) の好意によって提供されたmAb 2214 (抗-ヒトC1q)、mAb C4-4a (抗-ヒトC4d)、RFK 22 (抗ヒトC3)、及びAE 11 (抗-C5b-9) を用いて実施した。Digを結合させた羊抗-マウス抗体 (Fabフラグメント) を用いて、引き続きHRPを結合させた羊抗-dig抗体を用いてmAbの結合を検出した (Fabフラグメント、共にベーリンガーマンハイム製)。全ての検出抗体は、1% BSA及び0.05% Tween20を含むPBS中で希釈した。HRPの酵素活性は、2,2'-アジノ-ビス (3-エチルベンズチアゾリン-6-スルホン酸) (シグマ製; 0.1Mクエン酸塩 / Na₂HPO₄ 緩衝剤、pH 4.2において2.5mg/mL) で、0.01% H₂O₂ の存在下において室温で30から60分培養した後に検出した。415 nmでのODは、マイクロプレートバイオキネティックスリーダー (EL312e、Biotek Instruments製、Winooski, Vermont, 米) を用いることにより測定した。

【0093】

ヒト血清における抗マンナン抗体の定量的測定。

10

20

30

40

50

ヒト血清における抗マンナン抗体の定量的測定のために、E L I S A プレートにマンナンで覆い、そしてP B S中の1% B S Aにより遮断した。血清サンプルはI g G抗 - マンナンA bの検出のために1 / 1 0 0、I g A抗 - マンナンA bの検出のために1 / 1 0、及びI g M抗 - マンナンA bの検出のために1 / 4 0に、別の方法が示されていない限り、それぞれ希釈した。定量的測定のため、貯蔵されたヒトI g G (48mg/mL IgG)、貯蔵されたヒトI g A (41mg/mL IgA)、貯蔵されたヒトI g M (35mg/mL IgM) (Biotest Pharma GmbH, Dreieich, 独の好意によって提供された)が、I g G、I g A、及びI g M抗 - マンナン抗体の検出のため、それぞれ標準品として用いられた。これらの調整における抗 - マンナン抗体の濃縮は、1 0 0 0 U / m Lに任意に設定した。全てのサンプルは0 . 0 5 % Tween20及び1 % B S Aを含むP B S中で希釈した。抗体結合は、ビオチン化されたH B 4 3 (マウスm A b抗 - ヒトI g G)、ビオチン化されたH B 5 7 (マウスm A b抗 - ヒトI g M)、及びd i gを結合させた4 E 8 (マウスm A b抗 - ヒトI g A)を用いることにより検出され、それぞれに引き続きH R Pを結合させたストレプトアビジン、又はH R Pを結合させた羊抗 - dig抗体 (共にペーリンガー製)のいずれかを用いることによって検出された。

【0094】

マンナンは、M B Lの主要なリガンドであり、補体のL Pを効果的に活性化することができる。しかしながらヒト血清は、おそらく以前の微生物との接触での結果物である抗 - 糖質抗体を含む。そのような抗 - 糖質抗体はマンナンと結合するかもしれない、及び結果物である免疫複合体は古典補体経路活性化経路でマンナンによる補体活性化に寄与するかもしれない (Petersen S.V., 等., J. Immunol. Methods 257, 107-116, 2001)。マンナン結合抗体は、E L I S Aによる検定でヒト血清中において明確に検出できる (図2)。固定化されたマンナン上での貯蔵されたヒトI g G (図2 A)、I g A (図2 B)、及びI g M (図2 C)の培養は、それぞれ、アイソタイプに特異的なm A bにより検出されたような、I g G、I g A、及びI g Mの用量依存的結合という結果となる。コントロールとして、固定化されたB S A上で並行培養を実施し、貯蔵されたI gの低い結合、又は検出されない目立たない結合という結果を得た。マンナンで覆われたプレート上での健常人ドナーからの3つの血清培養は、3つ全ての血清に強い用量依存的I g G結合という結果を得た。ドナー1のI g A及びI g M抗マンナンA bは検出できず、ドナー2からの血清は、I g G、I g A及びI g M抗 - マンナン抗体を含んだが、一方ドナー3では、多少のI g M結合が観察されたが、I g A結合はなかった (図2 A - C)。70人の健常人ドナーからの血清中の抗 - マンナン抗体の定量は図2 Dにある。I g G及びI g M抗 - マンナンA bは、個体間で大きな変動あり、ほぼ全てのドナーに存在したが、一方I g A抗 - マンナンA bは、ドナーの63%で検出された。抗マンナン抗体の3つの主要なアイソタイプ間、又は抗 - マンナン抗体及びM B L濃度間に重大な関連性は観察されなかった (示されなかった)。

【実施例2】

【0095】

C 1 q - 阻害性A bの存在下におけるレクチン経路の機能評価

L P及びC Pは共にカルシウム依存性であり、C 4の活性化を誘導する。両方の経路の識別は、L P又はC Pのいずれかの特異的な活性化を引き起こす特異的なリガンドの選定によりなし得る。ヒト血清中の抗 - マンナンA bの存在を考慮すると、マンナンはM B L経路のL P、及び抗 - マンナンA b経路のC Pの両方を活性化するようだ。従って、固定化マンナンによるL Pの活性化だけを才能とするために、阻害的抗 - C 1 q抗体を用いることによりC Pの活性化を阻害する戦略を開発した。

【0096】

抗 - C 1 q抗体は、C Pの特異的な活性化剤として固定化I g Mを用いて、それらの補体C P阻害能について試験された。固定化I g M上での1%標準ヒト血清 (N H S)の培養は、C 4の堆積を引き起こし、ウサギ抗 - C 1 q抗体調整から調整された抗C 1 q m A b 2 2 0 4、ウサギI g G抗 - C 1 q抗体、及びF a bフラグメントによって、用量

依存的に阻害することができた。5 μ g/mLの抗体が適用された時、完全な阻害に達した。それに比べて、免疫化されていないウサギから調整されたウサギIgGは、CP経路でのC4活性化への効力を有さなかった。これらの抗体は、固定化マンナンにより誘導された補体活性化へのそれらの影響について試験された。マンナン上のNH₂Sの培養は、1%の血清濃度での最大限の活性化とともに用量依存的なC4の堆積を引き起こす。mAb 2204、Fab抗-C1qフラグメント、又はコントロールとして標準のウサギIgGのある一定の定められた濃度での付加は、C4活性化に軽微な阻害的効果を有した。それに比べて、ウサギIgG抗-C1qAbは、マンナンによるC4活性化の完全な阻害を引き起こし、それはおそらくC1q-抗-C1q複合体による補体消費が原因する。これらのデータは、C1q-阻害的抗体がCP活性化を完全に遮断することができる一方、マンナンで誘導されるLP活性化は、C1qに依存しない方法で進行できることを示す。

10

【0097】

マンナン及びIgMによる補体活性化におけるC1qの役割を更に調べるため、NH₂S中のC1qを枯渇させた。以前に説明されたように(Petersen S.V.,等J.Immunol .Methods257,107-116,2001)NH₂SからのC1qの枯渇は、固定化IgM(図3A)によるC4活性化の完全な阻害となる一方、固定化マンナンによるC4活性化はC1qの枯渇により軽微に阻害された(図3B)。精製されたC1qによるC1qが枯渇した血清の再構成は、IgMによるC4活性化の完全な回復という結果となった(図3C)。それに比べてマンナンによるC4活性化は、C1qが枯渇した血清への精製C1qの付加により、おそらくC1qと共に単離させる阻害的タンパク質の存在のために、軽微に阻害された。IgM及びマンナンによるC4活性化へのC1q及びMBLの寄与は、更にC1q及びMBLに対するmAb遮断を用いることによりそれぞれ研究された(図3D)。IgMで覆われたプレート上でのC4活性化は、mAb抗-C1qによって完全に阻害され、抗-MBL mAbを遮断することによる阻害は発生しなかった。それに比べて、マンナンにより誘導されるC4活性化は、mAb抗-C1qにより部分的に阻害され、mAb抗-MBLにより強力に阻害された。マンナンで誘導されたC4活性化の完全な阻害は、mAb抗-C1q及びmAb抗-MBLの組み合わせを用いた場合に達成された。これらのデータを総合すると、IgMで仲介されたC4活性化は、完全にC1qに依存し、MBLは携わらないことを示す。それに比べて、マンナンで誘導されるC4活性化は、主にLPにより仲介されるが、CPの比較的重要でない寄与も含む。後者のCPの寄与は、C1qを遮断するAbによって阻害することができ、このようにしてLPのみの活性化に至る。

20

30

【実施例3】

【0098】

マンナンによる補体活性化における古典経路及びレクチン経路間の協力の証明

抗-マンナン抗体の補体活性能は、正常のヒト血漿由来の精製IgG及びIgMを用いて機能的な実験において更に検定された。抗体は、希釈緩衝剤として1%BSA、0.05%Tween20、及び10mMのEDTAを含むPBSを用いてマンナンで覆ったプレート上で培養した。洗浄後、MBLが欠損した血清(mAb 2204の存在下、又は不存在下において、1/100に希釈)と共にプレートを培養し、及びC4の活性化を上記の通り検定した。ELISAにおけるOD₄₁₅による測定として、mAb 2204抗-C1qの不存在下、又は存在下でのC4枯渇が図4に示された。精製されたIgG又はIgMとマンナンで覆われたプレートの前培養は、MBLが欠損した血清(BB遺伝子型)の付加でマンナン上のC4の用量依存的な堆積を誘導し、一方、補体活性化は当該血清のみでは検出できなかった。抗-マンナンAbにより引き起こさせるC4活性化は、MBLが欠損した血清中におけるC1q-阻害性Abの付加により完全に阻害され、マンナン結合性IgG及びIgMは、機能的MBLが存在しない中で、補体の古典経路の活性化によるMBLが欠損した血清中におけるマンナンによって補体活性化を回復させ得ることを明確に示している。

40

【実施例4】

【0099】

50

E L I S Aによる機能的古典経路活性の検定

古典経路の機能的な活性のためのプロトコールは、実施例1のLP検定のためのプロトコールと類似するが、重要な改変を伴う。CP活性化のためのリガンドとして、ヒトIgMを、 $2\mu\text{g}/\text{mL}$ で覆った。過剰の結合サイトを遮断した後、GV B++中で希釈した血清サンプルをプレートへ付加し、1時間37で培養した。補体結合は、C1q、C4、C3、及びC5b-9に対するdigが結合したmAbを用いて検定し、HRPが結合した羊抗dig抗体を用いてのmAb結合の検出を続けた。

【実施例5】

【0100】

CP及びLP経路の補体活性化及びC5b-9形成

CP及びLP経路で活性化された特異的な補体構成要素の結合を検出するため、mAbを用いることにより、補体活性化カスケードはそれぞれについて更に研究された。固定化IgMでのNHSの培養は、プレートに対してC1q、C4、C3、及びC5b-9の用量依存的堆積という結果となった(図5A)。C1q結合、及びIgMによって引き起こされる後の補体活性化は、mAb2204によって完全に阻害することができた。固定化マンナン上でのNHSの培養は、C4、C3、及びC5b-9の用量依存的結合という結果となったが、一方C1qの結合は殆ど検出することができなかった(図5B)。マンナンによる補体活性化は、mAb2204の付加によって軽微に阻害されるだけであった。従って、mAb2204の血清への付加は、CPのいかなる干渉もなく、リガンドとしてマンナンを用いることによるLP活性化の特異的な検出をもたらす。

【実施例6】

【0101】

E L I S Aによる機能的副経路活性の検定

副経路の機能的活性のためのプロトコールは、実施例5のLP検定のためのプロトコールと類似するが、重要な改変を伴う。AP活性化のためのリガンドとして、LPSが $10\mu\text{g}/\text{mL}$ で覆われた。サルモネラチフス菌由来のLPSは、シグマから入手し(L-6386)、PBS中で $1.6\text{mg}/\text{mL}$ になるように溶解し、 -20 で貯蔵した。プレートはPBS中の1%BSAを用いることによって遮断した。血清サンプルはGV B/MgEGTA(10mM のEGTAを含むVBS、 5mM の MgCl_2 、 0.05% Tween20、及び 0.1% ゼラチン; $\text{pH}7.5$)及びプレート中で1時間37で培養した。補体はC4及びC3に対するdigが結合したmAbを用いることにより検定し、引き続きHRPが結合した羊抗-dig抗体を用いることにより、mAb結合を検出した。

【0102】

副経路の活性化

1の検定システムにおいて全ての補体活性化経路の検出が可能であるため、ELISAシステムにおける副経路の活性化についても研究された。LP及びCPに比べて、APの活性化はカルシウムに依存的でない。従って、カルシウムが存在しない緩衝剤が用いられ、このようにして、CP及びLPのかかわりが排除された。以前に説明された通り(Fredrikson G.N., 等., J. Immunol. Methods 166, 263-270, 1993)、LPSで覆われたプレート上のEGTA及びMgイオンを含む緩衝剤中でのNHSの培養は、用量依存的なC3の堆積という結果となった(図6)。C3のいくつかの活性化は、APの自然に起こる活性化のために最適であるBSAのみにより覆われたプレート上でも観察された。同一の条件を使用することによって、NHSがマンナンで覆われたプレート上で培養された時、驚くことに、C3の強力な活性化も観察され、マンナンはAPの活性化も支持するかもしれないことが示唆された。C3の検出は、補体の出所の中でEDTAが存在した時、表面に出ないレベルまで減少した(示されなかった)。AP依存性機構から期待されるのは、カルシウムが存在しない緩衝剤においてC3活性化はLP経路によるカルシウム含有緩衝剤中のマンナンによるC3活性化のために必要とされる約10倍高い血清濃度が必要とされた(図6と図5bとの比較)。C3活性化はカルシウムが存在しない緩衝剤中で明確に検出されないにもかかわらず、C4の活性化は確立されず(図6)、これらの条件下におけるC3

10

20

30

40

50

の活性化は、M B L の結合及び C 4 活性化に依存しない。

【図面の簡単な説明】

【 0 1 0 3 】

【図 1】カルシウム、マグネシウム、及び N a C l を含む緩衝剤中において、マンナンで覆ったプレート上で培養したヒト血清の E L I S A による検定として C 4 (A) 及び C 3 (B) の活性化を示す。

【図 2 - 1】ヒト血清中における抗 - マンナン - 抗体 ; A - C : 3 人の異なる健常人ドナーからの異なる濃度でのヒト血清を、マンナン (べた塗り記号, 実線) 又は B S A (白抜き, 破線) のいずれかで覆われたプレート上で培養した。I g G (A)、I g A (B)、又は I g M (C) の結合体を検出した。ポジティブコントロールとして、プレートは指示された通り、貯蔵された免疫グロブリンにより培養した。 ; D : 3 つの主要な I g クラスの抗 - マンナン抗体を、健常人ドナー血清 (N = 7 0) 中で定量した。実線は中央値を示し、破線は検出限界を示す。

10

【図 2 - 2】ヒト血清中における抗 - マンナン - 抗体 ; A - C : 3 人の異なる健常人ドナーからの異なる濃度でのヒト血清を、マンナン (べた塗り記号, 実線) 又は B S A (白抜き, 破線) のいずれかで覆われたプレート上で培養した。I g G (A)、I g A (B)、又は I g M (C) の結合体を検出した。ポジティブコントロールとして、プレートは指示された通り、貯蔵された免疫グロブリンにより培養した。 ; D : 3 つの主要な I g クラスの抗 - マンナン抗体を、健常人ドナー血清 (N = 7 0) 中で定量した。実線は中央値を示し、破線は検出限界を示す。

20

【図 3 - 1】C P 及び L P の活性における C 1 q の役割を示す ; A , B : G V B + + 中で希釈された標準ヒト血清又は C 1 q が枯渇した血清 (C 1 q D - N H S) を、I g M (A) 及びマンナン (B) により覆われたプレート上で培養し、それぞれに C 4 結合の検出を行い ;

【図 3 - 2】C : N H S 及び C 1 q が枯渇した N H S (1 / 4 0 0 に希釈された) を、指示されたように精製した C 1 q (0 . 5 μ g / m L) の存在下、又は不存在下において、I g M、又はマンナンで覆われたプレート上で培養した。D : N H S を、M B L に対する m A b (m A b 3 F 8、1 0 μ g / m L) もしくは C 1 q (m A b 2 2 0 4、2 0 μ g / m L) の遮断、又は両方 (コンビネーション) の存在下、又は不存在下で I g M、又はマンナンで覆われたプレート上で培養した。

30

【図 4】m A b 2 2 0 4 抗 - C 1 q の不存在下、又は存在下において M B L が欠損した血清と共にマンナンで覆われたプレート上で培養されたそれぞれの濃度での、精製された I g G 及び I g M 抗体による C 4 活性化の検定を示す。

【図 5 - 1】L P 及び C P 経路での補体活性化を示し ; 補体活性化は、m A b 2 2 0 4 (2 0 μ g / m L) の存在下、又は不存在下において、C P 活性化 (A) のための I g M、又は L P 活性化 (B) のためのマンナンで覆われたプレート上の N H S の異なる濃度の培養により誘導した。補体の活性化及び結合は、特異的な m A b を用いた C 1 q、C 4、C 3、及び C 5 b - 9 の検出により説明した。

【図 5 - 2】L P 及び C P 経路での補体活性化を示し ; 補体活性化は、m A b 2 2 0 4 (2 0 μ g / m L) の存在下、又は不存在下において、C P 活性化 (A) のための I g M、又は L P 活性化 (B) のためのマンナンで覆われたプレート上の N H S の異なる濃度の培養により誘導した。補体の活性化及び結合は、特異的な m A b を用いた C 1 q、C 4、C 3、及び C 5 b - 9 の検出により説明した。

40

【図 5 - 3】L P 及び C P 経路での補体活性化を示し ; 補体活性化は、m A b 2 2 0 4 (2 0 μ g / m L) の存在下、又は不存在下において、C P 活性化 (A) のための I g M、又は L P 活性化 (B) のためのマンナンで覆われたプレート上の N H S の異なる濃度の培養により誘導した。補体の活性化及び結合は、特異的な m A b を用いた C 1 q、C 4、C 3、及び C 5 b - 9 の検出により説明した。

【図 5 - 4】L P 及び C P 経路での補体活性化を示し ; 補体活性化は、m A b 2 2 0 4 (2 0 μ g / m L) の存在下、又は不存在下において、C P 活性化 (A) のための I g M、

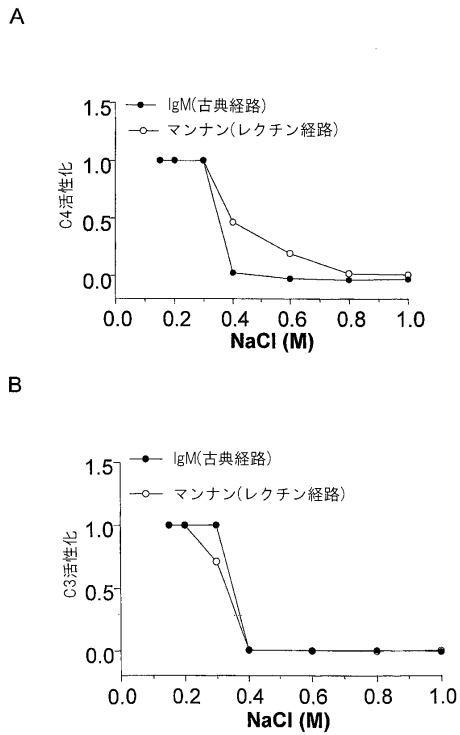
50

又はLP活性化(B)のためのマンナンで覆われたプレート上のNH₄Sの異なる濃度の培養により誘導した。補体の活性化及び結合は、特異的なmAbを用いたC1q、C4、C3、及びC5b-9の検出により説明した。

【図6】副経路の活性化を示し；NH₄Sは、CP及びLPの活性化を遮断するためにカルシウムが存在しない緩衝剤(GVB/MgEGTA)中で、マンナン、LPS、又はBSAで覆われたプレート上で培養した。C3及びC4の結合は、それぞれ後に検定した。

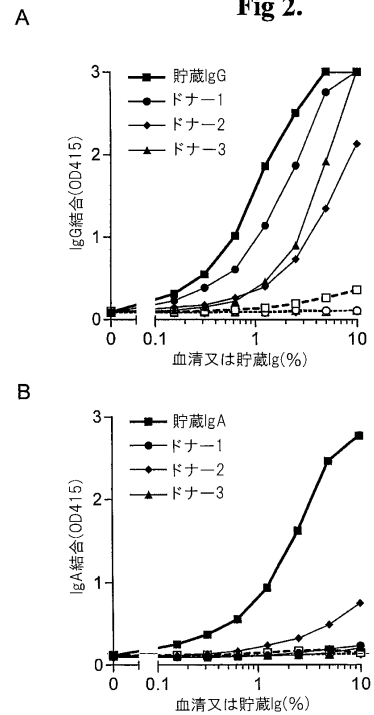
【図1】

Fig 1.

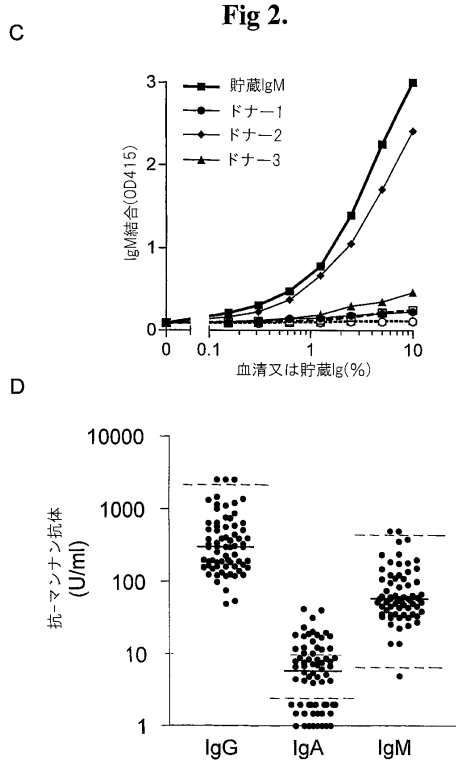


【図2 - 1】

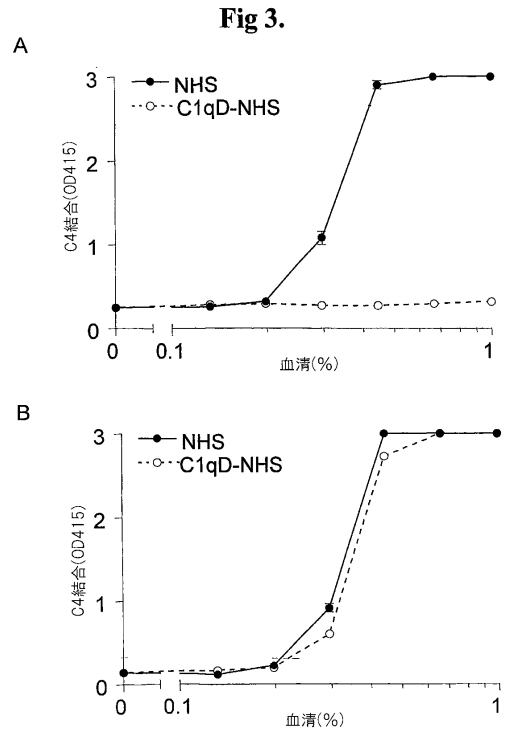
Fig 2.



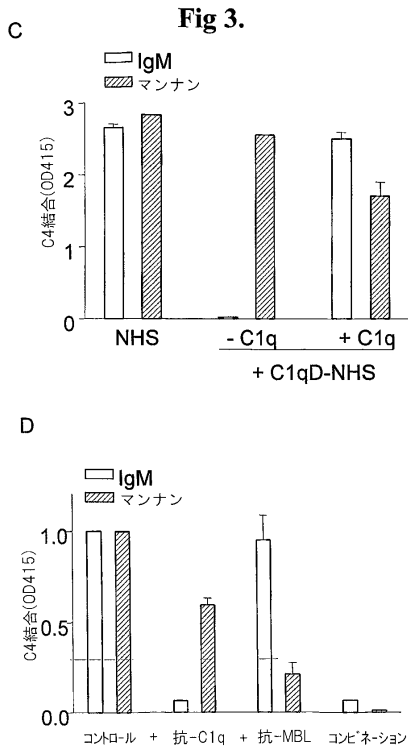
【 図 2 - 2 】



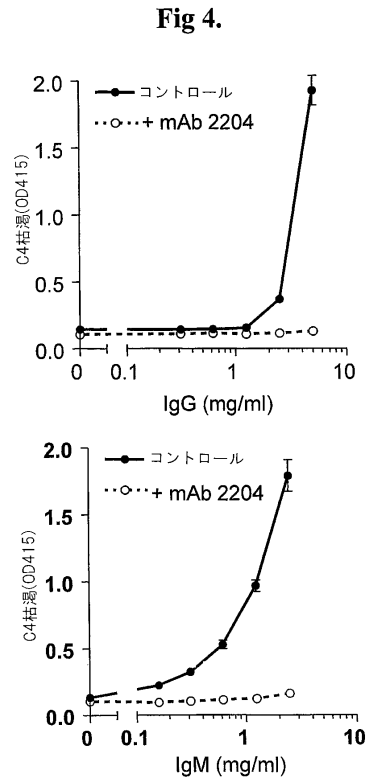
【 図 3 - 1 】



【 図 3 - 2 】

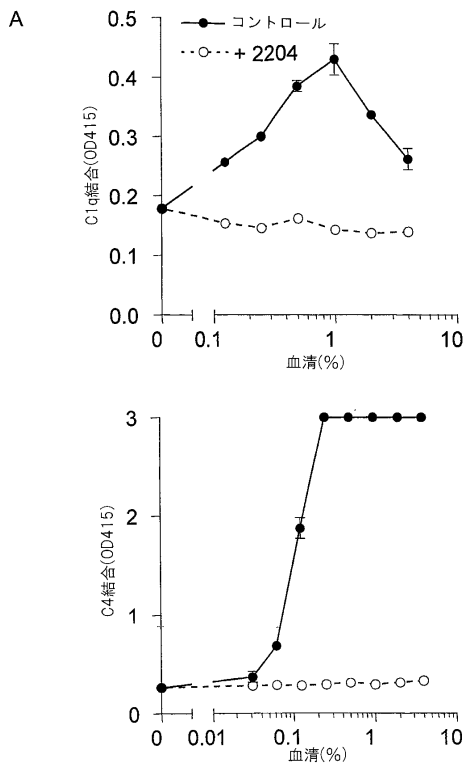


【 図 4 】



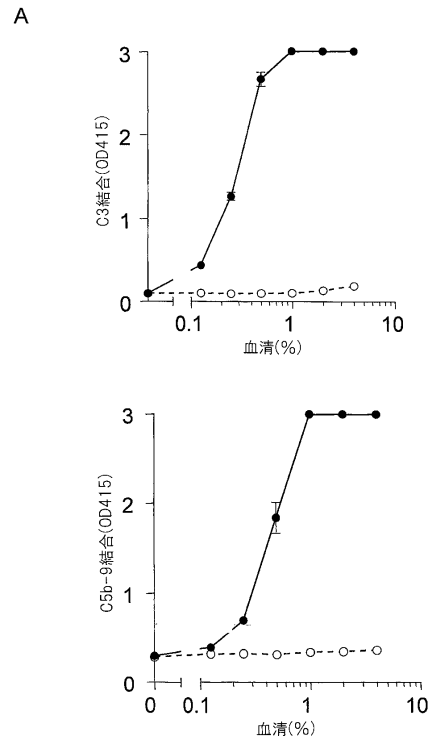
【 図 5 - 1 】

Fig 5.



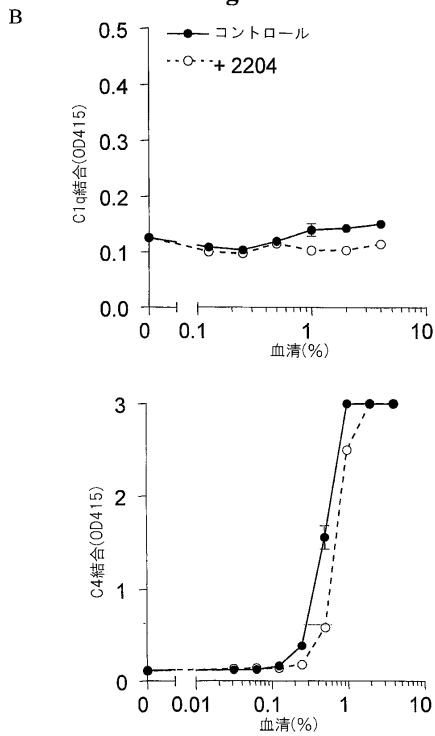
【 図 5 - 2 】

Fig 5.



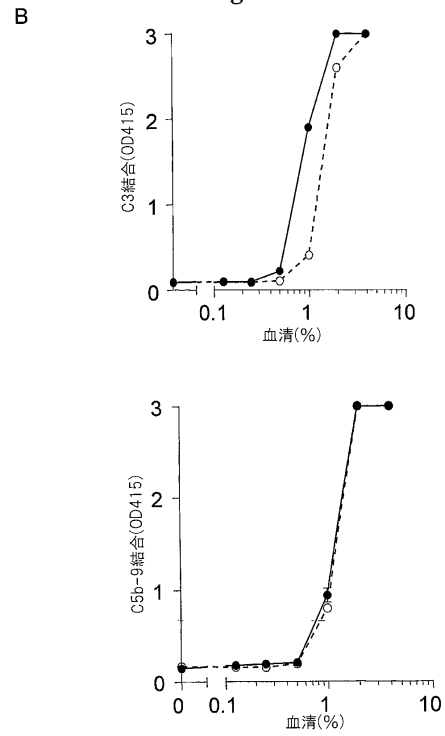
【 図 5 - 3 】

Fig 5.

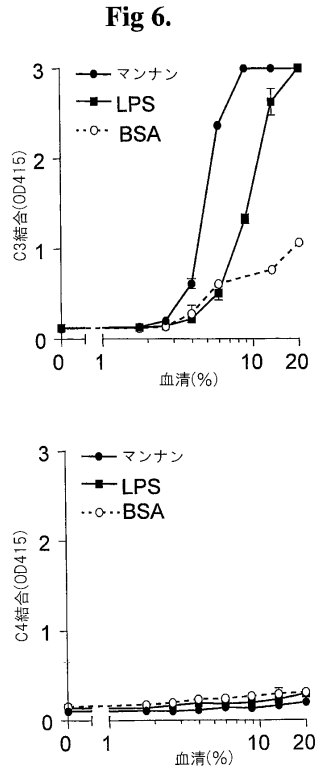


【 図 5 - 4 】

Fig 5.



【 図 6 】



フロントページの続き

- (72)発明者 ロース, ヨハンナ
オランダ国, エヌエル - 2 2 2 5 ベーバー カトウィーク ゼットハー, リーンモンド 3 6
- (72)発明者 ダハ, モハメド エル.
オランダ国, エヌエル - 2 2 5 3 セーハー ライダードープ, カンプファイセンドリーフ 9
- (72)発明者 ブーマン, リーハー.
オランダ国, エヌエル - 2 3 1 2 ペーゼット レイデン, ハウトマルクト 4 デー
- (72)発明者 ハック, コーネリス エリク
オランダ国, エヌエル - 1 1 1 1 エヌデー ディーメン, ファン ディークストラート 2 1

審査官 海野 佳子

- (56)参考文献 ZIMMERMANN-NIELSEN E. et al., "Complement activation mediated by mannan-binding lectin in plasma from healthy individuals and from patients with SLE, crohn's disease and colorectal cancer. Suppressed activation by SLE plasma.", Scand. J. Immunol., 2002年 1月, Vol.55, P.105-110
堀内孝彦、塚本浩, 「II. 膠原病検査の進歩と病態解明 7. 補体」, 日本内科学会雑誌, 1998年12月, Vol.87, No.12, P.2427-2433
藤田禎三、松下操, 「感染防御の分子機構に関する最近の進歩 感染防御における補体レクチン経路の役割」, 臨床免疫, 2001年, Vol.35, No.1, P.38-43

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

G01N 33/48-98

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

CAPlus(STN)

专利名称(译)	凝集素途径缺陷试验		
公开(公告)号	JP4347808B2	公开(公告)日	2009-10-21
申请号	JP2004524435	申请日	2003-07-11
[标]申请(专利权)人(译)	蜂板动埃沃LARG		
申请(专利权)人(译)	Bisurabu动埃沃LARG		
当前申请(专利权)人(译)	欧元Diagnostica公司Activision公司的Evo LARG		
[标]发明人	ロースヨハンナ ダハモハメドエル ブーマンリーハー ハックコーネリスエリク		
发明人	ロース,ヨハンナ ダハ,モハメド エル. ブーマン,リー ハー. ハック,コーネリス エリク		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 C07K5/078 C07K7/06 C07K7/08 G01N33/564 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/564 G01N33/68		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.D G01N33/543.515.D C07K5/078 C07K7/06 C07K7/08		
代理人(译)	青木 笃 石田 敬		
优先权	0202325 2002-07-26 SE 0202880 2002-09-30 SE		
其他公开文献	JP2006518834A JP2006518834A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及在生理条件下功能性测量补体系统的凝集素途径中的缺陷的体外方法,包括以下步骤:(a)接触哺乳动物血液,血清,血浆,(B)通过使样品与补体系统的C1复合物分子的抑制剂接触来防止样品中经典途径的活化;(c)(D)激活样品中的凝集素途径;和(e)测量样品中自体C5b-9复合物的任何活化。本发明还涉及用于功能性测量来自哺乳动物的体液中补体系统的凝集素途径缺陷的试剂盒,其包含以下各个项目:(a)惰性载体和凝集素途径待活化的物质;(b)包含C1络合物分子抑制剂的稀释剂;和(c)针对自体C5b-9复合物的抗体。

表 1.

阻害剤	説明/解説	C1阻害の機構
C1阻害剤	血漿セリンプロテアーゼ阻害剤	C1r及びC1s活性の阻害
IVIg	広域の活性を有す	C1qリガンド結合の遮断
GRT	いくつかの活性ドメインを含む	C1a頭部及びC1q尾部の両方を阻害できる
C1qr	先天性C1q受容体	C1q尾部と結合し、C1形成を阻害
大腸菌C1q結合タンパク質		C1q尾部と結合し、C1形成を阻害
gC1qr	先天性C1q受容体	C1a頭部と結合
テコリン	マトリックスタンパク質	C1q頭部及び尾部と結合調整
コンドロイチン硫酸 プロテオグリカン プロテインA	血漿プロテオグリカン/ 巨細胞分泌	C1形成の阻害
界面活性剤	肺中に存在するコレクテン	C1qリガンド結合及びC1形成の阻害
HNP-1	好中球から産生される 細胞毒性ペプチド	C1q尾部と結合し、C1形成を阻害
ペプチド gC1a-R1a (TDGDKAFVDFLSDEIKKE)	gC1aR由来	明確にされていない
ペプチド KDIRCKDD	GRT由来	C1qリガンド結合の阻害
ペプチド AEAKAKA	ヒトIgG由来	C1qリガンド結合の阻害
ペプチド VQVHNAKTKPR	ヒトIgG1由来	明確にされていない
ペプチド WY	ヒトIgG由来	C1qリガンド結合の阻害
ペプチド 2J (GEGPFGRMDLTFCW)	合成ペプチド	C1a頭部と結合し、リガンド結合を阻害
ghB3	3量体 C1q B鎖	C1a結合のための競合剤として作用
ペプチド CBP2 LEQGENVFLQATLL	C1q B鎖由来	C1q結合のための競合剤として作用