



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101277714 B

(45) 授权公告日 2013. 01. 30

(21) 申请号 200680036622. 3

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2006. 09. 06

A61K 38/00 (2006. 01)

(30) 优先权数据

(56) 对比文件

60/714, 180 2005. 09. 06 US

60/775, 184 2006. 02. 22 US

60/779, 853 2006. 03. 08 US

Warren L. DeLano, Mark H. Ultsch, Abraham M. de Vos, James A. Wells. Convergent Solutions to Binding at a Protein-Protein Interface. 《Science》. 2000, 第 287 卷全文.

(85) PCT申请进入国家阶段日

审查员 李康琦

2008. 04. 01

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2006/034603 2006. 09. 06

(87) PCT申请的公布数据

W02007/030475 EN 2007. 03. 15

(73) 专利权人 三一治疗公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 尼尔·M·博迪 勒妮·博迪

埃利奥特·奥尔特曼

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任

公司 11021

代理人 王旭

权利要求书 1 页 说明书 23 页

序列表 11 页

(54) 发明名称

治疗免疫介导的神经疾病的方法

(57) 摘要

本发明提供可以特异性与免疫球蛋白分子的 C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3 裂口结合的多肽和其它化合物, 和使用所述多肽和化合物抑制 Fc $\gamma$  介导的免疫复合物形成、免疫复合的 IgG 与 IgG F $\gamma$ R 结合、和免疫复合的 IgG mC1q(膜 C1q) 或可溶的 C1q 结合的方法。所述化合物可以在治疗肌萎缩性脊髓侧索硬化 (ALS)、帕金森病 (PD) 和阿尔茨海默病 (AD) 中具有治疗应用。

1. 由氨基酸序列 Xaa<sub>1</sub>-Pro-Pro-Asp-Cys-Ala-Trp-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr (SEQ ID NO :43) 组成的多肽在制备用于抑制与肌萎缩性脊髓侧索硬化 (ALS), 帕金森病 (PD) 或阿尔茨海默病 (AD) 相关的免疫复合物形成的药物中的应用, 其中 Xaa<sub>1</sub> 为任何氨基酸。

2. 权利要求 1 的应用, 其中所述免疫复合物形成与 ALS 相关。

3. 权利要求 2 的应用, 其中所述多肽抑制 ALS IgG Fc 与 Fc γ I, Fc γ IIa, Fc γ IIb, Fc γ IIIa, Fc γ IIIb, FcRn, mClq, 或 sClq 的结合。

4. 权利要求 2 的应用, 其中所述多肽抑制 ALS IgG Fc 与野生型 SOD1 或突变型 SOD1 的结合。

5. 权利要求 1 的应用, 其中 Xaa<sub>1</sub> 是 Ala。

6. 权利要求 1 的应用, 其中所述免疫复合物形成与 PD 相关。

7. 权利要求 6 的应用, 其中所述多肽抑制 PD IgG Fc 与 Fc γ I, Fc γ IIa, Fc γ IIb, Fc γ IIIa, Fc γ IIIb, FcRn, mClq, sClq, α - 突触核蛋白, 或 α - 突触核蛋白与微管的聚集物的结合。

8. 权利要求 1 的应用, 其中所述免疫复合物形成与 AD 相关。

9. 权利要求 8 的应用, 其中所述多肽抑制 AD IgG Fc 与 Fc γ I, Fc γ IIa, Fc γ IIb, Fc γ IIIa, Fc γ IIIb, FcRn, mClq, 或 sClq 的结合。

10. 权利要求 8 的应用, 其中所述多肽抑制 AD IgG Fc 与 tau 蛋白, β - 淀粉样肽、微管或 tau 蛋白与微管的聚集物的结合。

11. 权利要求 1 的应用, 其中所述多肽由氨基酸序列 Ala-Pro-Pro-Asp-Cys-Ala-Trp-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr (SEQ ID NO :16) 组成。

12. 多肽在制备治疗 ALS 的药物中的应用, 其中所述多肽由氨基酸序列 Ala-Pro-Pro-Asp-Cys-Ala-Trp-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr (SEQ ID NO :16) 组成。

13. 多肽在制备治疗 PD 的药物中的应用, 其中所述多肽由氨基酸序列 Ala-Pro-Pro-Asp-Cys-Ala-Trp-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr (SEQ ID NO :16) 组成。

14. 多肽在制备治疗 AD 的药物中的应用, 其中所述多肽由氨基酸序列 Ala-Pro-Pro-Asp-Cys-Ala-Trp-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr (SEQ ID NO :16) 组成。

## 治疗免疫介导的神经疾病的方法

[0001] 对相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求于 2005 年 9 月 6 日递交的美国临时申请序列号 60/714, 180, 于 2006 年 2 月 22 日递交的美国临时申请序列号 60/775, 184, 和于 2006 年 3 月 8 日递交的美国临时申请序列号 60/779, 853 的优先权。

### 技术领域

[0003] 本申请涉及免疫复合物形成的抑制, 并且更具体地涉及通过多肽和其它小分子对免疫复合物形成的抑制。

[0004] 背景

[0005] 当抗原特异性结合于抗体时, 促发体液免疫应答。抗体分子与抗原的结合形成小的、相对可溶的免疫复合物。抗原可以是外来物质, 诸如病毒或细菌多肽, 或者可以是“自身抗原”, 诸如通常在人体中发现的多肽。免疫系统通常将外来抗原与自身抗原区别开来。然而, 当这一系统破坏时, 以致免疫系统攻击机体并且破坏组织或器官系统, 好像它们是外来物质一样, 可以发生“自体免疫”疾病。更大的免疫复合物比小的、更可溶的免疫复合物更有致病性。大的、相对不溶的免疫复合物的形成可以由抗体分子与抗原的相互作用和抗体分子彼此之间的相互作用而导致。这样的免疫复合物还可以由在不存在抗原时抗体分子之间的相互作用而导致。

[0006] 抗体可以通过包被病毒或细菌来预防感染, 但是它们本身是相对无害的。相反, 当抗体与抗原结合并且由此导致的免疫复合物结合于机体中某些效应器分子时, 可以发生器官特异性组织损害。效应器分子被如此命名是由于它们实现免疫复合物的致病作用。通过抑制大的、不可溶的免疫复合物的形成, 或者通过抑制免疫复合物与效应器分子的结合, 可以防止免疫复合物的组织损害作用。

[0007] 概述

[0008] 本发明基于这样的发现: 具有诸如在 SEQ ID NOS: 2 和 16 中提出的氨基酸序列的多肽可以特异性并且高亲和力地结合于免疫球蛋白分子的 C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3 结构域, 因此抑制含有抗体和抗原的不溶性免疫复合物的形成, 并且防止所述复合物与效应器分子的结合。本发明提供这样的多肽, 以及应用所述多肽和化合物抑制免疫复合物的形成和治疗诸如肌萎缩性脊髓侧索硬化 (ALS)、帕金森病 (PD) 或阿尔茨海默病 (AD) 的自体免疫综合疾病的方法。

[0009] 一方面, 本发明的特征在于用于抑制受试者中免疫复合物形成的方法。所述方法可以包括给受试者施用含有纯化的多肽的组合物, 其中所述多肽包括氨基酸序列 (Xaa<sub>1</sub>)<sub>n</sub>-Cys-Ala-Xaa<sub>2</sub>-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr-(Xaa<sub>3</sub>)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 35), 其中 Xaa<sub>1</sub> 为任意氨基酸, Xaa<sub>2</sub> 为 Arg, Trp, 5-HTP, Tyr, 或 Phe, Xaa<sub>3</sub> 为任意氨基酸, 和 n 为 0, 1, 2, 3, 4, 或 5。免疫复合物形成可以与肌萎缩性脊髓侧索硬化 (ALS) 相关。所述多肽可以抑制 ALS IgG Fc 与 Fc  $\gamma$  I, Fc  $\gamma$  IIa, Fc  $\gamma$  IIb, Fc  $\gamma$  IIIa, Fc  $\gamma$  IIIb, FcRn, mC1q, sC1q, 野生型 SOD1, 或突变型 SOD1 结合。所述方法还可以包括对于 ALS 的临床或分子特征对所述受试者进行监测的步骤。监测可以包括肌电图或测量 CNS MCP-1 水平, 运动神经元免疫球蛋白介导的钙

增加,神经递质释放,或神经元细胞损伤或细胞死亡。免疫复合物形成可以与帕金森病(PD)相关。所述多肽可以抑制PD IgG Fc与Fc $\gamma$  I, Fc $\gamma$  IIa, Fc $\gamma$  IIb, Fc $\gamma$  IIIa, Fc $\gamma$  IIIb, FcRn, mC1q, sC1q,  $\alpha$ -突触核蛋白,或 $\alpha$ -突触核蛋白与微管聚集体的结合。所述方法还可以包括对于PD的临床或分子特征对受试者进行监测的步骤。PD的临床或分子特征可以是黑质区域中MCP-1的减少或黑质中TH<sup>+</sup>细胞的增加的存活。免疫复合物形成可以与阿尔茨海默病(AD)相关。所述多肽可以抑制AD IgG Fc与Fc $\gamma$  I, Fc $\gamma$  IIa, Fc $\gamma$  IIb, Fc $\gamma$  IIIa, Fc $\gamma$  IIIb, FcRn, mC1q, sC1q,  $\beta$ -淀粉样肽, tau蛋白,微管,或tau蛋白与微管的聚集体的结合。所述方法还可以包括对于AD的临床或分子特征对所述受试者进行监测的步骤。

[0010] 所述多肽还可以含有末端稳定基团。末端稳定基团可以是在所述多肽的氨基端,并且可以是具有氨基酸序列Xaa-Pro-Pro的三肽,其中Xaa是任何氨基酸(例如,Ala)。末端稳定基团可以是在所述多肽的羧基端,并且可以具有氨基酸序列Pro-Pro-Xaa的三肽,其中Xaa是任何氨基酸(例如,Ala)。所述多肽还可以包括在所述氨基酸序列氨基端的Asp。

[0011] 所述多肽可以具有约10-约50个氨基酸的长度。多肽可以具有氨基酸序列Asp-Cys-Ala-Trp-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr(SEQ ID NO:2),或氨基酸序列Ala-Pro-Pro-Asp-Cys-Ala-Trp-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr(SEQ ID NO:16)。

[0012] 在另一个方面,本发明着重描述纯化的多肽,其氨基酸序列由(Xaa<sub>1</sub>)<sub>n</sub>-Cys-Ala-Xaa<sub>2</sub>-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr-(Xaa<sub>3</sub>)<sub>n</sub>(SEQ ID NO:35)组成,其中Xaa<sub>1</sub>为任何氨基酸,Xaa<sub>2</sub>为Arg、Trp、5-HTP、Tyr或Phe,Xaa<sub>3</sub>为任意氨基酸,和n为0,1,2,3,4,或5。

[0013] 本发明还着重描述设计对具有结合的抗原的免疫球蛋白分子的C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3裂口具有特异的结合亲和力的配体的方法。所述方法可以包括:a)为计算机提供数据,所述数据包括在C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3裂口内的位置252,253,435和436的氨基酸残基的原子坐标,并且计算机具有能够从原子坐标数据生成分子的原子模的计算程序;b)使用计算机生成C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3裂口的原子模型;c)给计算机提供包括候选化合物的原子坐标的数据;d)使用计算机生成最佳地位于C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3裂口内的候选化合物的原子模型;e)确定最佳地定位的候选化合物是否与在C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3裂口内氨基酸残基相互作用;和f)如果所述候选化合物与所述氨基酸残基相互作用,鉴定所述候选化合物作为具有针对C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3裂口的特异性结合亲和力的配体。所述配体可以具有针对CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>裂口的至少1 $\mu$ M(例如,至少100nM或至少10nM)的结合亲和力。所述配体可以能够抑制Fc-介导的免疫复合物形成。所述配体可以能够抑制FcR与CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>裂口的结合。所述配体可以能够抑制C1q与所述CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>裂口的结合。所述配体可以能够治疗ALS、PD、或AD。

[0014] 在另一个方面中,本发明着重描述多肽在制备用于治疗ALS、PD、或AD的药物中的应用,其中所述多肽包括氨基酸序列(Xaa<sub>1</sub>)<sub>n</sub>-Cys-Ala-Xaa<sub>2</sub>-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr-(Xaa<sub>3</sub>)<sub>n</sub>(SEQ ID NO:35),其中Xaa<sub>1</sub>为任意氨基酸,Xaa<sub>2</sub>为Arg, Trp, 5-HTP, Tyr,或Phe,Xaa<sub>3</sub>为任意氨基酸,和n为0,1,2,3,4,或5。

[0015] 在另一个方面中,本发明着重描述包含纯化的多肽的组合物,所述多肽包括氨基酸序列(Xaa<sub>1</sub>)<sub>n</sub>-Cys-Ala-Xaa<sub>2</sub>-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr-(Xaa<sub>3</sub>)<sub>n</sub>(SEQ ID NO:35),其中Xaa<sub>1</sub>为任意氨基酸,Xaa<sub>2</sub>为Arg, Trp, 5-HTP, Tyr,或Phe,Xaa<sub>3</sub>为任意氨基酸,

和  $n$  为 0, 1, 2, 3, 4, 或 5。

[0016] 除非另外定义, 本文所用的所有技术和科学术语具有本发明所属的技术领域的普通技术人员通常所理解的相同的意思。尽管与本文所述的方法和材料相似或等价的方法和材料可以用来实施本发明, 但是下文描述适当的方法和材料。本文提及的所有公布、专利申请、专利和其它参考文献都通过引用完全结合于此。在冲突的情形中, 本说明书, 包括定义, 将控制。另外, 材料、方法和实例只是举例说明, 并不意欲限制。

[0017] 本发明的一个或多个实施方案的详情在附图和下文描述中阐述。通过所述描述和通过权利要求, 本发明的其它特征、目的和优点将更加清楚。

[0018] 详述

[0019] 本申请提供能够与免疫球蛋白分子的  $C_H2-C_H3$  裂口相互作用的多肽和其它化合物, 以致免疫球蛋白与其它分子 (例如, 效应器或其它免疫球蛋白) 的相互作用得到阻滞。还提供用于鉴定这样的多肽和其它化合物的方法, 以及含有所述多肽和化合物的组合物和制品。另外, 本发明提供应用所述多肽和化合物抑制免疫复合物形成和治疗其中 IgG 免疫复合物与效应器分子结合的疾病的方法, 所述效应器分子诸如膜结合的  $C1q(mC1q)$ , 可溶的  $C1q(sC1q)$ , SOD1, tau 蛋白,  $\alpha$ -突触核蛋白和  $Fc\gamma Rs$  (包括, 但不限于  $Fc\gamma RI$ ,  $Fc\gamma RIIa$ ,  $Fc\gamma RIIb$ ,  $Fc\gamma RIIIa$ ,  $Fc\gamma RIIIb$ ,  $FcRn$  和  $Fc\gamma Rs$  的同种型), 其已经表现出是 ALS、PD 和 AD 的主要调控子。

[0020] 1. 免疫球蛋白

[0021] 免疫球蛋白组成在血浆和其它体液中发现的一类蛋白, 其表现出抗体活性并且以高度的特异性与其它分子 (例如, 抗原和某些细胞表面受体) 结合。基于它们的结构和生物活性, 免疫球蛋白可以分成 5 类: IgM, IgG, IgA, IgD, 和 IgE。IgG 是机体中最丰富的抗体种类。除了 IgMs 之外, 免疫球蛋白主要由 4 条肽链组成, 所述肽链通过一些链内和链间二硫键连接。例如, IgGs 由 2 条多肽重链 (H 链) 和 2 条多肽轻链 (L 链) 组成, 其通过二硫键和非共价键偶联形成具有扭曲的“Y”型构型和大约 160,000 道尔顿的分子量的蛋白分子。一般 IgG 分子含有大约 4.5 个链间二硫键和大约 12 个链内二硫键 (Frangione 和 Milstein (1968) J. Mol. Biol. (分子生物学杂志) 33:893-906)。

[0022] 免疫球蛋白分子的轻链和重链由恒定区和可变区组成 (参见, 例如, Padlan (1994) Mol. Immunol. (分子免疫学) 31:169-217)。例如, IgG1 分子的每一条轻链含有可变结构域 ( $V_L$ ) 和恒定结构域 ( $C_L$ )。每一条重链具有 4 个结构域: 氨基端可变结构域 ( $V_H$ ), 接着是 3 个恒定结构域 ( $C_H1$ ,  $C_H2$ , 和羧基端  $C_H3$ )。铰链区对应于  $C_H1$  和  $C_H2$  结构域之间的柔性结合。用木瓜蛋白酶消化完整的 IgG 分子导致在铰链区的蛋白水解断裂, 并且产生含有  $C_H2$  和  $C_H3$  结构域的 Fc 片段, 和 2 条相同的 Fab 片段, 其中每一条 Fab 片段含有  $C_H1$ 、 $C_L$ 、 $V_H$  和  $V_L$  结构域。Fc 片段具有补体-和组织-结合活性, 而 Fab 片段具有抗原-结合活性。

[0023] 免疫球蛋白分子可以通过可变区与其它多肽相互作用。大多数的抗原结合, 例如, 通过 Fab 片段的  $V_L/V_H$  区发生。由于免疫学教义阐述用于 Fc 受体 ( $FcR$ ) 的结合位点发现于 IgG 分子的铰链区 (参见, 例如, Raghavan 和 Bjorkman (1996) Annu. Rev. Dev. Biol. (发育生物学综述年刊) 12:181-200), 所以还认为铰链区是重要的。然而, 更近的证据表明当免疫球蛋白是单体 (即, 非免疫复合的) 时,  $FcR$  主要与铰链区相互作用。这样的相互作用典型地包括 Ig 分子的位置 234-237 的氨基酸 (Wiens 等. (2000) J. Immunol. (免疫学杂志) 164:

5313-5318)。

[0024] 免疫球蛋白分子还可以通过  $C_{H2}$ - $C_{H3}$  结构域内的裂口与其它多肽相互作用。“ $C_{H2}$ - $C_{H3}$  裂口”典型地包括  $C_{H2}$  结构域内位置 251-255 的氨基酸和  $C_{H3}$  结构域内位置 424-436 的氨基酸。如此处所用,编号方式关于完整的 IgG 分子,如在 Kabat 等中那样 (Sequences of Proteins of Immunological Interest (免疫目的蛋白质的序列),第 5 版,Public Health Service (公共卫生服务),U. S. Department of Health and Human Services (美国健康与人类服务部),贝塞斯达,马萨诸塞)。本领域的那些普通技术人员可以容易地确定在其它免疫球蛋白种类中相对应的氨基酸。

[0025]  $C_{H2}$ - $C_{H3}$  裂口是不寻常的,原因在于其特征在于高度的溶剂可及性和突出的疏水特征,这表明暴露的疏水表面的包埋是在这一位点的结合之后的重要驱动力。一旦抗原结合,在 IgG  $C_{H2}$ - $C_{H3}$  裂口发生三维变化,这允许某些残基 (例如,位置 435 的组氨酸) 变成暴露的并且可用于结合。使用对人 IgG 的 Fc 区的构象变化敏感的单克隆抗体,在研究中发现抗原结合时发生的三维结构变化的直接证据。5 个 IgG 表位通过抗原结合而改变:2 个在铰链区之内和 3 个在  $C_{H2}$ - $C_{H3}$  裂口内 (Girkontraite 等. (1996) Cancer Biother. Radiopharm. (癌症生物治疗和放射治疗) 11:87-96)。因此,抗原结合对于确定免疫球蛋白是通过铰链区还是 Fc  $C_{H2}$ - $C_{H3}$  区结合于其它分子可以是重要的。

[0026] Fc 区可以结合于许多的效应器分子和其它蛋白,其包括下列各项:

[0027] (1)FcRn- 新生的 Fc 受体决定抗体分子在基本循环中的半衰期 (Leach 等, (1996) J. Immunol. (免疫学杂志) 157:3317-3322;Gheti 和 Ward (2000) Ann. Rev. Immunol. (免疫学综述年刊) 18:739-766)。由于自体抗体的缩短的半衰期,遗传上缺少 FcRn 的小鼠免于受到致病性自体抗体的有害作用 (Liu 等. (1997) J. Exp. Med. (实验医学杂志) 186:777-783)。FcRn 与 IgG Fc 的唯一结合位点是 IgG Fc  $C_{H2}$ - $C_{H3}$  裂口,并且已经通过 3D 结构和丙氨酸扫描表明 HIS 435 对于 FcRn 与 IgG Fc 结合是重要的 (Shields 等. (2001) JBC (生物化学杂志) 276:6591-6604 和 Martin 等, (2001), MolCell (分子细胞学), 7:867-877)。由于本文提供的肽以高亲和力与  $C_{H2}$ - $C_{H3}$  裂口和 HIS 435 结合,所以所述肽是 (免疫复合的) IgG Fc 与 FcRn 结合的直接抑制剂。结合免疫复合物或结合致病性自体抗体的 FcRn 的抑制剂将用于治疗涉及致病性自体抗体和 / 或免疫复合物的疾病。

[0028] (2)FcR- 细胞 Fc 受体提供在体液免疫应答和细胞介导的效应器系统之间的联系 (Hamano 等. (2000) J. Immunol. (免疫学杂志) 164:6113-6119;Coxon 等. (2001) Immunity (免疫性) 14:693-704;Fossati 等. (2001) Eur. J. Clin. Invest. (欧洲临床研究杂志) 31:821-831)。Fc  $\gamma$  受体对 IgG 分子特异, 并且包括 Fc  $\gamma$  RI、Fc  $\gamma$  RIIa、Fc  $\gamma$  RIIb 和 Fc  $\gamma$  RIII。这些同种型以不同的亲和力与单体的和免疫复合的 IgG 结合。

[0029] (3)C1q- 经典补体路径的第一个成分是 C1,其作为 3 个蛋白,C1q、C1r 和 C1s 的复合体存在于血清中。当 C1q 结合于抗原结合的 IgG 或 IgM 的 Fc 区时,激活经典补体路径。尽管 C1q 与单个 Fc 区的结合是微弱的,C1q 仍可以形成与 Fc 区的簇的牢固键合。在这一点上 C1 变得具有蛋白水解活性。

[0030] 通过免疫球蛋白 Fc 区与其它抗体或其它因子 (例如,上文所描述的那些) 之间的相互作用的免疫复合物的形成在本文称为“Fc-介导的免疫复合物形成 (Fc-mediated immune complex formation)”或者“免疫复合物的 Fc-介导的形成 (Fc-mediated

formation of an immune complex)”。含有这样的相互作用的免疫复合物被称为“Fc-介导的免疫复合物”。Fc-介导的免疫复合物可以包括带有或不带有结合的抗原的免疫球蛋白分子,和典型地包括  $C_H2-C_H3$  裂口-特异性配体,其具有的对于免疫复合的抗体的结合亲和力比对于单体抗体的更高。

## [0031] 2. 纯化的多肽

[0032] 如此处所用,“多肽”是氨基酸残基的任何链,不管翻译后修饰(例如,磷酸化或糖基化)。本文提供的多肽典型地为 10-50 个氨基酸的长度(例如,长度为 10,11,12,13,14,15,20,25,30,35,40,45 或 50 个氨基酸)。长度为 10-20 个氨基酸的多肽(例如,长度为 10,11,12,13,14,15,16,17,18,19 或 20 个氨基酸)可以是特别有用的。

[0033] 术语“氨基酸”指天然氨基酸、非天然氨基酸和氨基酸类似物,全都以它们的 D 和 L 立体异构体形式存在,只要它们的结构允许。天然氨基酸包括丙氨酸(Ala),精氨酸(Arg),天冬酰胺(Asn),天冬氨酸(Asp),半胱氨酸(Cys),谷氨酰胺(Gln),谷氨酸(Glu),甘氨酸(Gly),组氨酸(His),异亮氨酸(Ile),亮氨酸(Leu),赖氨酸(Lys),甲硫氨酸(Met),苯丙氨酸(Phe),脯氨酸(Pro),丝氨酸(Ser),苏氨酸(Thr),色氨酸(Trp),酪氨酸(Tyr),和缬氨酸(Val)。非天然氨基酸包括,但不限于,铃兰氨酸(azetidinecarboxylic acid)、2-氨基己二酸、3-氨基己二酸、 $\beta$ -丙氨酸、氨基丙酸、2-氨基丁酸、4-氨基丁酸、6-氨基己酸、2-氨基庚酸、2-氨基异丁酸、3-氨基异丁酸、2-氨基庚二酸、2,4-二氨基异丁酸、锁链赖氨酸、2,2'-二氨基庚二酸、2,3-二氨基丙酸、N-乙基甘氨酸、N-乙基天冬酰胺、羟基赖氨酸、别-羟基赖氨酸、3-羟基脯氨酸、4-羟基脯氨酸、异锁链赖氨酸、别-异亮氨酸、N-甲基甘氨酸、N-甲基异亮氨酸、N-甲基缬氨酸、正缬氨酸、正亮氨酸、鸟氨酸和六氢吡啶羧酸。

[0034] “类似物”是一种化学化合物,其彼此结构上相似,但在组成上稍微不同(如在用不同元素的原子替代一个原子上或者在特定官能团的存在上)。因此,“氨基酸类似物”与在天然多肽中典型发现的天然存在的氨基酸分子结构相似,但是在组成上不同,以致 C 端羧基、N 端氨基、或侧链官能团已经被化学修饰成另一种官能团。氨基酸类似物包括天然和非天然氨基酸,其在它们的 N 端氨基或它们的侧链基团进行可逆或不可逆地化学封闭、或修饰,并且包括,例如,甲硫氨酸亚砷、甲硫氨酸砷、S-(羧甲基)-半胱氨酸、S-(羧甲基)-半胱氨酸亚砷和 S-(羧甲基)-半胱氨酸砷。氨基酸类似物可以是天然存在的,或可以是合成制备的。氨基酸类似物非限制性的实例包括 5-羟色氨酸(5-HTP),天冬氨酸-( $\beta$ -甲酯),天冬氨酸的类似物;N-乙基甘氨酸,甘氨酸的类似物;以及丙氨酸羧酰胺(carboxamide),丙氨酸的类似物。氨基酸和氨基酸类似物的其它实例在 Gross 和 Meienhofer, The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology(肽:分析,合成,生物学), Academic Press, Inc.(学院出版公司), 纽约(1983)中列出。

[0035] 根据多肽主链附近的氨基酸残基侧链的拓扑化学排列可以描述多肽的立体化学,其通过氨基酸残基之间的肽键和键合的残基的  $\alpha$ -碳原子而定义。另外,多肽主链具有不同的末端和这样的方向。大多数天然存在的氨基酸为 L-氨基酸。天然存在的多肽主要包括 L-氨基酸。

[0036] D-氨基酸是 L-氨基酸的对映异构体,并且可以形成本文称为“反转(inverso)”多肽的肽(即,对应天然肽但由 D-氨基酸而非 L-氨基酸组成的肽)。“反(retro)”多肽由 L-氨基酸组成,但是具有其中氨基酸残基按天然肽序列的反方向组装的氨基酸序列。

[0037] 天然存在的多肽的“反-反转 (retro-inverso)”修饰包括将具有与对应的 L-氨基酸相反的  $\alpha$ -碳立体化学的氨基酸 (即, D- 或 D- 别-氨基酸) 按照与天然多肽序列相反的顺序合成组装。因此, 反-反转类似物具有反转的末端和反转的肽键方向, 然而其近似地保留了如在天然肽序列中的侧链的拓扑结构。术语“天然 (native)”是指对于制备部分或完全的反、反转或反-反转类似物用作起始序列的 L-氨基酸的任何序列。

[0038] 部分反-反转多肽类似物是其中只有部分序列反转并且用对映异构氨基酸残基替代的多肽。由于这样的类似物的反向反转部分具有反转的氨基和羧基末端, 侧连在反向-反转部分的氨基酸残基可以分别用侧链类似的  $\alpha$ -取代的双-二氨基甲烷和丙二酸替代。备选地, 多肽可以为完全的反-反转类似物, 其中全部序列反转并且用 D-氨基酸替代。

[0039] 本文提供的多肽的氨基酸序列是稍微限定的, 但是可以有一些变化。例如, 本文所提供的多肽典型地包括氨基酸序列 Xaa<sub>1</sub>-Cys-Ala-Xaa<sub>2</sub>-His-Xaa<sub>3</sub>-Xaa<sub>4</sub>-Xaa<sub>5</sub>-Leu-Val-Trp-Cys-Xaa<sub>6</sub> (SEQ ID NO :1), 其中由 Xaa<sub>n</sub> 表示的残基可以表现出可变性。例如, Xaa<sub>1</sub> 可以不存在或可以为任何氨基酸 (例如, Arg 或 Asp)。Xaa<sub>2</sub> 可以为任何氨基酸, 诸如 Phe、Tyr、Trp、Arg、5-羟色氨酸 (5-HTP) 或任何其它的氨基酸衍生物。Xaa<sub>3</sub> 可以为任何氨基酸。Xaa<sub>4</sub> 可以为 Gly 或 Ala, 而 Xaa<sub>5</sub> 可以为 Glu 或 Ala。与 Xaa<sub>1</sub> 相同, Xaa<sub>6</sub> 也可以不存在或可以为任何氨基酸。

[0040] 在一些实施方案中, 多肽可以包含氨基酸序列 Asp-Cys-Ala-Trp-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr (SEQ ID NO :2)。备选地, 多肽可以包含氨基酸序列 Asp-Cys-Ala-Phe-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr (SEQ ID NO :3) 或 Asp-Cys-Ala-Arg-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr (SEQ ID NO :4)。在一些实施方案中, 多肽可以包含氨基酸序列 Arg-Cys-Ala-Arg-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr (SEQ ID NO :5), Arg-Cys-Ala-Trp-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr (SEQ ID NO :6), 或 Arg-Cys-Ala-Phe-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr (SEQ ID NO :7)。

[0041] 在一些实施方案中, 多肽可以包含氨基酸序列 Cys-Ala-Xaa-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys (SEQ ID NO :8), 其中 Xaa 可以是 Phe, Tyr, Trp, Arg, 或 5-HTP。例如, 多肽可以包含下述氨基酸序列: Cys-Ala-Phe-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr (SEQ ID NO :9), Cys-Ala-Trp-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr (SEQ ID NO :10), 和 Cys-Ala-Arg-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr (SEQ ID NO :11)。

[0042] 为了体内应用, 可以通过在氨基端或羧基端添加稳定剂, 对本文提供的多肽进行修饰, 以促进多肽在体内的存活。这可以用于这样的情形: 在细胞吸收前, 肽末端趋向于被蛋白酶降解。这样的封闭试剂可以包括, 但不限于, 添加的相关的或不相关的肽序列, 其可以附着于多肽的氨基端和 / 或羧基端残基上 (例如, 附着于 N-端氨基酸的乙酰基或者附着于 C-端氨基酸的酰胺基)。应用本领域的普通技术人员熟悉的方法, 可以在多肽合成过程中通过化学方法或者通过重组 DNA 技术获得这样的附着。备选地, 封闭试剂, 诸如焦谷氨酸或其它本领域已知的分子, 可以附着于氨基端和 / 或羧基端残基, 或者氨基端的氨基或羧基端的羧基可以用不同的部分替代。

[0043] 在氨基端的脯氨酸或 Xaa-Pro-Pro (例如, Ala-Pro-Pro) 序列可以是特别有用的 (参见, 例如, WO 00/22112)。例如, 多肽可以包含氨基酸序列 Xaa<sub>1</sub>-Pro-Pro-Cys-Ala-Xaa<sub>2</sub>-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr (SEQ ID NO :12), 其中 Xaa<sub>1</sub> 为任何氨基酸 (例如,

Ala), 和 Xaa<sub>2</sub> 是 Trp, Tyr, Phe, Arg, 或 5-HTP。因此, 例如, 多肽可以包含氨基酸序列 Xaa<sub>1</sub>-Pro-Pro-Cys-Ala-Trp-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr (SEQ ID NO:40), Xaa<sub>1</sub>-Pro-Pro-Cys-Ala-Arg-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr (SEQ ID NO:41), 或 Xaa<sub>1</sub>-Pro-Pro-Cys-Ala-Phe-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr (SEQ ID NO:42)。备选地, 多肽可以包含氨基酸序列 Xaa<sub>1</sub>-Pro-Pro-Asp-Cys-Ala-Trp-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr (SEQ ID NO:43), Xaa<sub>1</sub>-Pro-Pro-Asp-Cys-Ala-Arg-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr (SEQ ID NO:17), Xaa<sub>1</sub>-Pro-Pro-Asp-Cys-Ala-Phe-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr (SEQ ID NO:18), Xaa<sub>1</sub>-Pro-Pro-Arg-Cys-Ala-Trp-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr (SEQ ID NO:19), Xaa<sub>1</sub>-Pro-Pro-Arg-Cys-Ala-Arg-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr (SEQ ID NO:20), 或 Xaa<sub>1</sub>-Pro-Pro-Arg-Cys-Ala-Phe-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr (SEQ ID NO:21)。

[0044] 本文提供的多肽可以在它们的羧基端具有 Pro-Pro-Xaa (例如, Pro-Pro-Ala) 序列。例如, 多肽可以包含氨基酸序列 Cys-Ala-Trp-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr-Pro-Pro-Xaa (SEQ ID NO:22), Cys-Ala-Arg-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr-Pro-Pro-Xaa (SEQ ID NO:23), Cys-Ala-Phe-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr-Pro-Pro-Xaa (SEQ ID NO:24), Asp-Cys-Ala-Trp-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr-Pro-Pro-Xaa (SEQ ID NO:25), Asp-Cys-Ala-Arg-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr-Pro-Pro-Xaa (SEQ ID NO:26), Asp-Cys-Ala-Phe-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr-Pro-Pro-Xaa (SEQ ID NO:27), Arg-Cys-Ala-Trp-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr-Pro-Pro-Xaa (SEQ ID NO:28), Arg-Cys-Ala-Arg-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr-Pro-Pro-Xaa (SEQ ID NO:29), 或 Arg-Cys-Ala-Phe-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr-Pro-Pro-Xaa (SEQ ID NO:30), 其中 Xaa 可以是任何氨基酸。

[0045] 在一些实施方案中, 本文提供的多肽可以包含添加的氨基酸序列, 其在 SEQ ID NO:1 描述的序列的氨基端、SEQ ID NO:1 描述的序列的羧基端, 或两端。例如, 多肽可以包含氨基酸序列 Trp-Glu-Ala-Xaa<sub>1</sub>-Cys-Ala-Xaa<sub>2</sub>-His-Xaa<sub>3</sub>-Xaa<sub>4</sub>-Xaa<sub>5</sub>-Leu-Val-Trp-Cys-Xaa<sub>6</sub>-Lys-Val-Glu-Glu (SEQ ID NO:31), 其中 Xaa<sub>n</sub> 所示的残基可以表现出可变性。对于 SEQ ID NO:1 描述的氨基酸序列, Xaa<sub>1</sub> 可以不存在或可以为任何氨基酸 (例如, Arg 或 Asp); Xaa<sub>2</sub> 可以为 Phe, Tyr, 5-HTP, Trp, 或 Arg; Xaa<sub>3</sub> 可以为任何氨基酸; Xaa<sub>4</sub> 可以为 Gly 或 Ala; Xaa<sub>5</sub> 可以为 Glu 或 Ala; 和 Xaa<sub>6</sub> 可以不存在或为任何氨基酸。在一个实施方案中, 多肽可以包含氨基酸序列 Trp-Glu-Ala-Asp-Cys-Ala-Xaa-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr-Lys-Val-Glu-Glu (SEQ ID NO:32), 其中 Xaa 为 Arg, Trp, 5-HTP, Tyr, 或 Phe。例如, 多肽可以包含氨基酸序列 Trp-Glu-Ala-Asp-Cys-Ala-Trp-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr-Lys-Val-Glu-Glu (SEQ ID NO:33)。

[0046] 在一些实施方案中, 多肽可以由氨基酸序列 (Xaa<sub>1</sub>)<sub>n</sub>-Xaa<sub>2</sub>-Cys-Ala-Xaa<sub>3</sub>-His-Xaa<sub>4</sub>-Xaa<sub>5</sub>-Xaa<sub>6</sub>-Leu-Val-Trp-Cys-(Xaa<sub>7</sub>)<sub>n</sub> (SEQ ID NO:34) 组成, 其中 Xaa 所示的残基可以表现出可变性, 以及 n 可以是从 0 到 10 的整数 (例如, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 或 10)。例如, Xaa<sub>1</sub> 可以为任何氨基酸; Xaa<sub>2</sub> 可以不存在或为任何氨基酸 (例如, Arg 或 Asp); Xaa<sub>3</sub> 可以为 Phe, Tyr, Trp, Arg, 或 5-HTP; Xaa<sub>4</sub> 可以为任何氨基酸; Xaa<sub>5</sub> 可以为 Gly 或 Ala; Xaa<sub>6</sub> 可以为 Glu 或 Ala; Xaa<sub>7</sub> 可以为任何氨基酸; 以及 n 可以从 0 到 5 (例如, 0, 1, 2, 3, 4 或 5)。备选地,

多肽可以由氨基酸序列  $(Xaa_1)_n$ -Cys-Ala-Xaa<sub>2</sub>-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr- $(Xaa_3)_n$  (SEQ ID NO :35) 组成, 其中 Xaa<sub>1</sub> 为任何氨基酸, Xaa<sub>2</sub> 为 Phe, Trp, Tyr, Arg, 或 5-HTP, Xaa<sub>3</sub> 为任何氨基酸, 以及 n 是从 0 到 5 的整数 (例如, 0, 1, 2, 3, 4 或 5)。在这些实施方案内的多肽的实例包括, 但不限于, 由氨基酸序列 Ala-Ala-Ala-Ala-Ala-Asp-Cys-Ala-Arg-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Ala-Ala-Ala-Ala (SEQ ID NO :36), Ala-Ala-Arg-Cys-Ala-Arg-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr-Ala-Ala (SEQ ID NO :37), 或 Ala-Ala-Ala-Asp-Cys-Ala-Phe-Trp-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr-Ala-Ala (SEQ ID NO :38) 组成的多肽。

[0047] 在 SEQ ID NOs :1-38 中描述的氨基酸序列典型地包含 2 个半胱氨酸残基。由于这 2 个半胱氨酸残基之间的二硫键的形成, 含有这些氨基酸序列的多肽可以环化。例如, 本领域的普通技术人员可以应用 Ellman's 试剂 (Ellman's Reagent) 来确定含有多个半胱氨酸残基的肽是否环化。在一些实施方案中, 这些半胱氨酸残基可以用可以形成内酰胺键而不是二硫键的其它天然或非天然的氨基酸残基取代。例如, 一个半胱氨酸残基可以用天冬氨酸或谷氨酸取代, 而另外一个可以用鸟氨酸或赖氨酸取代。这些组合的任一种都可以产生内酰胺键。通过改变形成内酰胺键的氨基酸, 可以生成本文提供的多肽, 其包含与二硫键长度近似相等的键, 如果多肽中存在 2 个半胱氨酸残基就可能形成所述二硫键。

[0048] 本文提供的多肽可以包含氨基酸标记。“标记 (tag)”通常为短的氨基酸序列, 其通过与抗所述标记的抗体的相互作用或者通过识别所述标记的其它化合物或分子而提供检测或纯化的便捷方法。例如, 可以应用诸如 c-myc、血凝素、多组氨酸或 FLAG<sup>®</sup> 的标记来辅助多肽的纯化和检测。例如, 基于组氨酸残基对镍离子的亲和力 (例如, 在 Ni-NTA 柱上), 可以纯化带有多组氨酸标记的多肽, 并且可以通过抗多组氨酸的抗体 (例如, 5- 组氨酸抗体; 快而精公司 (Qiagen), Valencia, CA) 在蛋白质印迹上检测。尽管在氨基端或羧基端插入是特别有用的, 但是标记可以插入在多肽序列内的任何位置。

[0049] 本发明还提供基于多肽的氨基酸序列基础设计的拟肽 (peptidomimetic) 化合物。拟肽化合物是合成的、非肽化合物, 其具有基本上与选择的肽的三维构象相同的三维构象 (即“肽模体,”), 并且因此可以赋予与选择的肽相同或相似的功能。本文提供的拟肽化合物可以设计成模拟本文所述的任何多肽。

[0050] 蛋白酶抗性的拟肽化合物特别有用。并且, 拟肽化合物可以具有增加治疗效用的附加特征, 诸如增加的细胞渗透性和延长的生物半衰期。这样的化合物典型地具有部分或完全是非肽的主链, 但是具有与在拟肽化合物依据的肽中存在的氨基酸残基的侧链基团相同或相似的侧链基团。一些类型的化学键 (例如, 酯、硫代酸酯、硫代酰胺、逆酰胺、还原羰基、二亚甲基和酮亚甲基) 是本领域已知的在拟肽化合物构建中用于肽键的有效取代。

[0051] 本文所述的多肽和免疫球蛋白分子之间的相互作用典型地通过免疫球蛋白的 C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3 裂口发生。这样的相互作用通过物理接近发生, 并且例如, 通过疏水相互作用调控。多肽对于免疫球蛋白分子的“结合亲和力”是指多肽和免疫球蛋白之间相互作用的强度。结合亲和力典型地表示为平衡解离常数 ( $K_d$ ), 其以  $K_d = k_{off}/k_{on}$  进行计算, 此处  $k_{off}$  = 反应的动力学解离常数, 和  $k_{on}$  = 反应的动力学缔合常数。  $K_d$  表示为浓度, 其低  $K_d$  值 (例如, 低于 100nM) 表示高亲和力。可以与免疫球蛋白分子相互作用的多肽典型地具有对于免疫球蛋白的 C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3 裂口至少 1  $\mu$ M 的结合亲和力 (例如, 至少 500nM, 至少 100nM, 至少 50nM 或至少

10nM)。

[0052] 本文提供的多肽可以以基本相等的亲和力结合于和抗原结合的免疫球蛋白分子,以及结合于单体免疫球蛋白。备选地,对于与抗原结合的免疫球蛋白分子,多肽可以具有比对于单体免疫球蛋白更高的结合亲和力(例如,至少10倍,至少100倍,或至少1000倍更高的结合亲和力)。当抗原结合于Fab区时在免疫球蛋白分子的Fc区内发生的构象变化可能参与亲和力的差异。结合和非结合的NC6.8Fab(来自鼠单克隆抗体)的晶体结构表明,与其在非结合的Fab中的位置相比,Fab重链尾在抗原/抗体复合物的晶体中移动了19埃(Guddat等.(1994)J. Mol. Biol. (分子生物学杂志)236-247-274)。由于在完整的抗体中Fab区的C端尾与Fc区连接,这一移动(shift)预计将影响 $C_H2-C_H3$ 裂口的构象。并且,完整免疫球蛋白的一些三维结构检验揭示Fab重链和Fc $C_H2-C_H3$ 裂口之间的直接的物理联系(Harris等.(1997)Biochemistry(生物化学)36:1581-1597;Saphire等.(2001)Science(科学)293:1155-1159)。

[0053] 单体(即,不结合的)和免疫复合的IgG的 $C_H2-C_H3$ 裂口的分子模型揭示单体的Fc $C_H2-C_H3$ 裂口具有封闭的构型(closed configuration),其可以防止与关键(critical)氨基酸残基结合(例如,His435;参见,例如,O'Brien等.(1994)Arch. Biochem. Biophys. (生物化学和生物物理学档案)310:25-31;Jefferies等.(1984)Immunol. Lett. (免疫学通讯)7:191-194;和West等.(2000)Biochemistry(生物化学)39:9698-9708)。然而,免疫复合的(抗原结合的)IgG具有更加开放的构型,并且因此更加利于配体结合。例如,RF对于免疫复合的IgG的结合亲和力比RF对于单体IgG的结合亲和力大得多(Corper等.(1997)Nat. Struct. Biol. (自然结构生物学)4:374;Sohi等.(1996)Immunol. (免疫学)88:636)。典型地,相同的结果对于本文提供的多肽也是正确的。

[0054] 由于本文提供的多肽可以结合于免疫球蛋白分子的 $C_H2-C_H3$ 裂口,它们可有效用于阻滞其它因子(例如,FcRn、FcR、C1q、组蛋白、MBP、SOD1和其它免疫球蛋白)与免疫球蛋白的Fc区的相互作用,并且因此可以抑制Fc-介导的免疫复合物形成。“抑制”意指当与不存在多肽时免疫复合物形成的水平相比较时,在多肽的存在下,Fc介导的免疫复合物形成减少。这样的抑制可以在体外(例如,在测试试管中)或在体内(例如,在个体中)发生。可以应用任何适当的方法评估免疫复合物形成的水平。在本领域内已知许多这样的方法,并且本文描述了这些方法中的一些。

[0055] 本文提供的多肽典型地以具有1:2的IgG Fc与肽的化学计量的单体方式与免疫球蛋白分子的 $C_H2-C_H3$ 裂口相互作用(即,只与一个免疫球蛋白分子相互作用,并且因此不会将2个或更多的免疫球蛋白分子结合在一起)。因此,多肽的存在排除了通过Fc区与其它免疫球蛋白分子的相互作用。可以在体外评估Fc-介导的免疫复合物形成的抑制,例如,通过在本文所述的多肽存在和不存在时,将IgG分子与标记的免疫球蛋白分子(例如,荧光或酶(ELISA)标记的Fc受体或C1q)一起温育,并且测量接合到免疫复合物中的标记的免疫球蛋白的量进行评估。如下文所讨论,还可以应用适于检测免疫复合物形成的其它方法。

[0056] 3. 多肽的制备和纯化

[0057] 本文提供的多肽可以通过许多方法生产,其中的许多方法为本领域所公知。通过实例的方式,但不限于此,多肽可以通过从天然来源中(例如,从分离的细胞、组织或体

液中)提取,通过编码所述多肽的重组核酸的表达(例如,下文所描述的),或通过化学合成(例如,通过固相合成或本领域公知的其它方法,包括用ABI肽合成器(应用生物系统(Applied Biosystems), Foster City, CA))合成而获得。还描述了用于合成反-反转多肽类似物的方法(Bonelli等.(1984)Int. J. Peptide Protein Res. (肽蛋白质研究国际杂志)24:553-556;和Verdini和Viscomi(1985)J. Chem. Soc. Perkin Trans. (化学学会-Perkin学报杂志)I:697-701),以及用于部分反-反转肽类似物的固相合成的一些方法(参见,例如,欧洲专利号EP0097994)。

[0058] 本发明提供此处所描述的编码多肽的分离的核酸分子。如此处所用,“核酸”是指RNA和DNA,包括cDNA、基因组DNA和合成的(例如,化学合成的)DNA。核酸可以是双链的或单链的(即,有义或反义单链)。

[0059] 如此处所用涉及核酸的术语“分离的(isolated)”是指天然存在的核酸,其不会直接毗连这样的2个序列:在其衍生的生物体的天然存在的基因组中,其直接与所述序列毗连(1个在5'端和1个在3'端)。由于所述非天然存在的序列没有在自然中发现,并且在天然存在的基因组中没有直接毗连的序列,所以如此处所用涉及核酸的术语“分离的”还包括任何非天然存在的核酸序列。

[0060] 分离的核酸可以是,例如,DNA分子,条件是在天然存在的基因组中通常与DNA分子直接毗连的一条核酸序列被移除或不存在。因此,分离的核酸包括,但不限于,不依赖其它序列作为独立的分子存在的DNA分子(例如,化学合成的核酸、或通过PCR或限制性核酸内切酶处理产生的cDNA或基因组DNA片段),以及整合到载体、自主复制的质粒、病毒(例如,逆转录病毒、慢病毒、腺病毒或疱疹病毒)、或整合到原核或真核生物的基因组DNA中的DNA。另外,分离的核酸可以包括工程化核酸,诸如重组DNA分子,其为杂化物或融合核酸的一部分。例如,存在于在cDNA文库或基因组文库、或含有基因组DNA限制性消化物的凝胶切片内的数百到数百万其它核酸中的核酸不被认为是分离的核酸。

[0061] 本发明还提供含有本文所描述的核酸的载体。如此处所用,“载体(vector)”是一种复制子,诸如质粒、噬菌体、或黏端质粒,其中可以插入另一种DNA片段,以使所插入的片段得以复制。本文提供的载体优选为表达载体,其中核苷酸编码带有起始密码子甲硫氨酸的多肽,其可操作地连接于表达控制序列。如此处所用,“可操作地连接(operably linked)”意指组合到遗传构建体中以便表达控制序列有效地控制目的编码序列的表达。“表达控制序列”为控制和调节另一种DNA序列的转录和翻译的DNA序列,以及“表达载体”是包括表达控制序列的载体,以便转录和翻译整合到载体中的相关的DNA片段。当RNA聚合酶将所述编码序列转录成mRNA时,该mRNA然后翻译成由所述编码序列编码的蛋白,所述编码序列“可操作地连接”并且受到细胞中转录和翻译控制序列的“控制”。

[0062] 可以应用本领域的技术人员公知的方法将分离的编码目的多肽的核酸分子亚克隆到表达载体中,所述表达载体包含相关编码序列和适当的转录/翻译控制信号。参见,例如,Sambrook等.,Molecular Cloning: A Laboratory Manual(分子克隆:实验室手册)(第二版),冷泉港实验室(ColdSpring Harbor Laboratory),纽约(1989);和Ausubel等.,Current Protocols in Molecular Biology(分子生物学现代方法),格林出版协会和Wiley相互科学(Green Publishing Associates and Wiley Interscience),纽约(1989)。如本文所述,表达载体可以用于各种系统(例如,细菌、酵母菌、昆虫细胞和哺乳动物细胞)。

适宜的表达载体的实例包括,但不限于,质粒和衍生于,例如,疱疹病毒、反转录病毒、痘苗病毒、腺病毒以及腺伴随病毒的病毒载体。广泛种类的适宜的表达载体和系统可以商购获得,包括 pET 系列的细菌表达载体 (Novagen, Madison, WI)、腺-X 表达系统 (克隆技术 (Clontech))、Baculogold 杆状病毒表达系统 (BD 生物科学 Pharmingen, 圣地亚哥 (San Diego), CA) 和 pCMV-Tag 载体 (Stratagene, 拉霍亚 (LaJolla), CA)。

[0063] 编码本文所述的多肽的表达载体可以用于生产多肽。可以用于多肽的小量或大量生产的表达系统包括,但不限于,微生物,诸如细菌 (例如,大肠杆菌 (*E. coli*) 和枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*)),其转化了含有本文所述的核酸分子的重组噬菌体 DNA、质粒 DNA、或黏端质粒 DNA 表达载体;酵母 (例如,酿酒酵母 (*S. cerevisiae*)),其转化了含有本文所述的核酸分子的重组酵母表达载体;昆虫细胞系统,其感染了含有本文所述的核酸分子的重组病毒表达载体 (例如,杆状病毒);植物细胞系统,其感染了含有本文所述的核酸分子的重组病毒表达载体 (例如,烟草花叶病毒) 或转化了含有本文所述的核酸分子的重组质粒表达载体 (例如, Ti 质粒);或哺乳动物细胞系统 (例如,原代细胞或无限增殖的细胞系,诸如 COS 细胞、CHO 细胞、HeLa 细胞、HEK 293 细胞和 3T3L1 细胞),其携带含有衍生于哺乳动物细胞基因组的启动子 (例如,金属硫蛋白启动子) 或衍生于哺乳动物病毒的启动子 (例如,腺病毒后期启动子和巨细胞启动子),以及本文所述的核酸的重组表达构建体。

[0064] 如此处所用,术语“纯化的多肽”是指这样的多肽:其没有天然存在的负体 (例如,拟肽),或是化学合成的并且因此不被其它多肽污染,或者是从其天然伴随的其它细胞成分中 (例如,其它细胞蛋白、多聚核苷酸或细胞成分) 分离或纯化出来的。典型地,当其为至少 70 干重%,没有与其天然缔合的蛋白和天然存在的有机分子时,认为所述多肽是“纯化的”。因此,纯化的多肽的制剂可以是,例如,至少 80 干重%、至少 90 干重%或至少 99 干重%的所述多肽。用于纯化本文提供的多肽的适合的方法可以包括,例如,亲和层析、免疫沉淀法、大小排阻层析以及离子交换层析。可以通过任何适当的方法测量纯化的程度,这些方法包括,但不限于:柱层析、聚丙烯酰胺凝胶电泳或高效液相色谱。

#### [0065] 4. 模拟、设计和鉴别化合物的方法

[0066] 本发明还提供用于设计、模拟和鉴别化合物的方法,其中所述化合物可以结合于免疫球蛋白分子的 C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3 裂口,并且因此作用为 Fc- 介导的免疫复合物形成的抑制剂。此处,这样的化合物还叫作“配体”。通过本发明提供的方法设计、模拟和鉴别的化合物典型地可以通过 C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3 裂口与免疫球蛋白分子相互作用,并且典型地对于免疫球蛋白的 C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3 裂口具有至少 1  $\mu$  M 的结合亲和力 (例如,至少 500nM, 至少 100nM, 至少 50nM, 或至少 10nM)。对于免疫复合的免疫球蛋白分子,所述化合物通常具有比对于单体免疫球蛋白分子更高的结合亲和力 (例如,至少 10 倍,至少 100 倍,或至少 1000 倍更高的结合亲和力)。

[0067] 本发明提供的化合物典型地以单体方式与免疫球蛋白分子的 C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3 裂口相互作用 (即,只与一个免疫球蛋白分子相互作用,并且因此不会将两个或更多的免疫球蛋白分子结合在一起)。化合物分子和免疫球蛋白分子之间的相互作用典型地包括免疫球蛋白的位置 252、253、435 和 436 的氨基酸残基 (按照 Kabat 编号,如前所述)。本发明所述的化合物和 C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3 裂口之间的相互作用使得所述化合物能够通过阻滞其它因子 (例如, FcRs、FcRn、组蛋白、MBP、RF、tau 蛋白、 $\alpha$ -突触核蛋白、SOD1 和 C1q) 与 C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3 裂口的结合而抑制 Fc- 介导的免疫复合物的形成。

[0068] 通过本发明提供的方法鉴别的化合物可以是多肽,诸如,例如,本文所描述的那些。备选地,化合物可以是能够特异性结合于免疫球蛋白分子 C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3 裂口的任何适宜类型的分子。

[0069] “模拟 (modeling)”意指基于三维结构信息和受体-配体相互作用模型对受体-配体结构/功能进行的定量和/或定性的分析。这包括常规的基于数字的分子动力学和能量最小化模型、交互式计算机立体图、修饰的分子力学模型、距离几何学和其它基于结构的限制模型。模拟典型地使用计算机进行,并且可以使用已知方法进一步最优化。

[0070] 设计与已经结合抗原的免疫球蛋白分子的 C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3 裂口特异性结合(即,以高亲和力)的配体的方法典型地是基于计算机的,并且包括使用具有能够产生原子模型的程序的计算机。对于设计可以与 Fc C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3 裂口相互作用的配体,应用 X-射线结晶学数据的计算机程序是特别有用的。例如,诸如 RasMol 的程序可以用于产生 C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3 裂口的三维模型和/或确定参与配体结合的结构。诸如 INSIGHT(Accelrys,伯灵顿(Burlington),马萨诸塞),GRASP(Anthony Nicholls,哥伦比亚大学),Dock(分子设计研究所(Molecular Design Institute),加利福尼亚旧金山大学(University of California at San Francisco)),和 Auto-Dock(Accelrys)的计算机程序允许进一步的处理和引入新结构的能力。

[0071] 方法可以包括,例如,给计算机提供位于 Fc-介导的免疫复合物中免疫球蛋白分子 C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3 裂口内的氨基酸残基(例如,在裂口的位置 252, 253, 435 和 436 的氨基酸残基)的原子结构坐标,使用计算机来产生 C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3 裂口的原子模型,进一步提供候选化合物的原子结构坐标,并且生成最优化位于 C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3 裂口内的化合物的原子模型,并且,如果所述化合物与裂口位置 252, 253, 435 和 436 的氨基酸残基相互作用,那么鉴定所述候选化合物为目的配体。提供给计算机的数据还可以包括除了在位置 252, 253, 435 和 436 之外的位置的氨基酸残基的原子坐标。“最优化位于 (optimally positioned)”意指进行放置以最优化候选化合物和 C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3 裂口的位置 252, 253, 435 和 436 的氨基酸残基之间的疏水性相互作用。

[0072] 备选地,用于设计具有对于免疫球蛋白分子 C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3 裂口的特异结合亲和力的配体的方法可以利用在其内存中存储裂口的原子模型的计算机。然后,可以将候选化合物的原子坐标提供给计算机,并且可以生成最优化放置的候选化合物的原子模型。如本文所描述,例如,如果所述化合物与裂口位置 252, 253, 435 和 436 的氨基酸残基相互作用,那么可以鉴定所述候选化合物为具有对于免疫球蛋白分子 C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3 裂口的特异结合亲和力的配体。单体(非抗原结合的)IgG Fc 在不同于 IgG Fc C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3 裂口的位点结合,诸如在更低的铰链区结合(Wines 等, 2000, 164 :5313-5318),而免疫复合的(抗原结合的)IgG Fc 与 Fc  $\gamma$  IIa 的结合被 IgM 类风湿因子(RF-AN)抑制,3D 结构已经表明其只与 IgG Fc C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3 界面裂口结合(Sohi 等, (1996), Immunology(免疫学), 88 :636-641 和 Corper 等, (1997), Nature Structural Biology(自然结构生物学), 4(5) :374-381)。可溶的 Fc  $\gamma$  IIa 抑制免疫复合的(而不是单体的、非免疫复合的)IgG Fc 与 RF-AN 的结合(Wines 等, (2003), Immunology(免疫学), 109 :246-254),然后结合 IgG Fc C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3 裂口的抑制剂,诸如本文所述的肽,抑制免疫复合的(抗原结合的)IgG Fc 与 Fc  $\gamma$  Rs 的结合。

[0073] 还可以应用其它基于结构的设计/模拟技术(参见,例如, Jackson(1997) Seminars in Oncology(肿瘤学研讨会) 24 :L164-172;和 Jones 等. (1996) J. Med. Chem. (医学生物化学杂志) 39 :904-917),从本文所述的化合物的结构信息交互式地设计本发明

提供的化合物。

[0074] 化合物和多肽还可以通过,例如,通过计算机模拟将候选化合物特征性描述为在空间上并优选地适配(即,具有高亲和力)免疫球蛋白分子的 C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3 裂口,然后在体外或体内筛选那些具有抑制 Fc-介导的免疫复合物形成的能力的化合物而进行鉴定。用于所述体外和体内筛选的适用的方法包括本文所描述的那些。

#### [0075] 5. 组合物和制品

[0076] 本发明提供用于治疗由异常 Fc-介导的免疫复合物形成(例如, Fc-介导的免疫复合物过量生产)引起的疾病的方法。在这些方法中,将本发明所述的多肽和化合物施用于受试者(例如,人或其它哺乳动物),所述受试者患有可以通过调节 Fc-介导的免疫复合物形成而减轻的疾病或病症(例如, ALS, PD, 或 AD),并且本发明所述的多肽和化合物可以抑制免疫复合物的 IgG Fc 与,例如, mC1q, sC1q, Fc  $\gamma$  Rs, 组蛋白, MBP, tau 蛋白,  $\alpha$ -突触核蛋白, SOD1 和 FcRn 的结合。典型地,可以给怀疑患有、诊断患有或有危险患有与免疫复合物形成相关的疾病或病况的受试者施用一种或多种多肽或者化合物。组合物可以包含一种或多种本文所述的多肽和化合物。例如, C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3 结合多肽可以组合药用载体或稀释剂,并且可以按量和时间周期施用,所述的量和时间周期将取决于具体疾病的性质、其严重度和受试者的总体情况而变化。典型地,所述多肽以抑制量(即,以有效抑制多肽接触的细胞或组织中免疫复合物的产生的量)施用。本发明所述的多肽和方法还可以预防性地应用,例如,将处于免疫复合物异常或超量生产的危险中的受试者(例如,移植物受者)中的免疫反应性减小到最低。

[0077] 多肽抑制 Fc-介导的免疫复合物形成的能力可以通过,例如,在治疗之前和之后测量受试者中免疫复合物的水平进行评估。许多方法可以用于测量组织或生物样品中免疫复合物水平,其包括本领域公知的那些方法。例如,如果受试者是研究动物,那么可以通过在安乐处死后免疫染色而评估关节处的免疫复合物水平。还可以通过直接方法,诸如测量血清样品中的循环免疫复合物的水平,来评估抑制性多肽的效用。备选地,可以应用间接方法来评估多肽在活的受试者中的效用。例如,可以从免疫介导的神经变性疾病或者 ALS、PD 或 AD 的体外或体内模型的临床改善而推断减少的免疫复合物形成。

[0078] 用于配制和后续施用治疗组合物的方法是为本领域的技术人员公知的。剂量定量通常取决于要治疗的疾病状态的严重度和反应性,治疗的疗程持续几天到几个月,或者持续到实现治愈或获得疾病状态的减轻。本领域的普通技术人员常规确定最适剂量、定量方法和重复率。最适剂量可以取决于个体多肽的相对强度(potency)而变化,并且通常可以基于在体外和体内动物模型中发现有效的 EC<sub>50</sub> 进行估算。典型地,剂量为每 kg 体重 0.01  $\mu$ g-100g,并且可以给药每天 1 次或多次、每两周 1 次、每周 1 次、每月 1 次或甚至更不经常给药。成功治疗后,可以理想地让患者经受维持治疗,以防止所述疾病状态的复发。

[0079] 本发明提供包含本发明所述的多肽和/或化合物的药用组合物和制剂。本发明还提供将本发明所述的多肽用于制备减少免疫复合物形成(例如,与 ALS、PD 或 AD 相关的免疫复合物形成)的药物的方法。本发明提供的多肽可以与其它分子,分子结构,或化合物的混合物,诸如,例如,脂质体、聚乙二醇、受体靶向的分子、或者口服、直肠、局部或其它制剂,进行混合、包封、缀合或另外缔合,用于辅助摄入、分布和/或吸收。

[0080] “药用载体”(本文也叫作“赋形剂”)是用于运送一种或多种治疗化合物(例如,

C<sub>12</sub>-C<sub>13</sub> 结合多肽) 到受试者的药用溶剂、混悬剂或任何其它药用惰性赋形剂。药用载体可以是液体或固体, 并且, 当其与一种或多种治疗化合物和给出的药用组合物的任何其它成分组合时, 可以考虑计划的施用方式而进行选择, 以便提供需要的大小、稠度和其它相关的转运和化学特性。不与氨基酸有有害反应的典型的药用载体包括, 通过实例方式, 但不限于: 水; 盐溶液; 粘合剂 (例如, 聚乙烯吡咯烷酮或羟丙基甲基纤维素); 填料 (例如, 乳糖和其它糖, 明胶, 或硫酸钙); 滑润剂 (例如, 淀粉, 聚乙二醇或乙酸钠); 崩解剂 (例如, 淀粉或淀粉羟乙酸钠); 以及湿润剂 (例如, 月桂硫酸钠)。

[0081] 本发明提供的药物组合物可以通过许多方法施用, 其取决于需要的是局部还是全身性的治疗, 以及要治疗的面积。例如, 施用可以是局部的 (例如, 透皮的、舌下的、眼的、或鼻内的); 肺部的 (例如, 通过散剂或气雾剂的吸入或吹入); 口服的; 或肠胃外的 (例如, 通过皮下、鞘内、心室内、肌内、或腹膜内注射, 或者通过静脉内点滴)。施用可以是快速的 (例如, 通过注射) 或者可以在一段时间内发生 (例如, 通过缓慢输注或施用缓释制剂)。对于治疗中枢神经系统内的组织, 可以通过注射或输注将 C<sub>12</sub>-C<sub>13</sub> 结合多肽施用到脑脊髓液中, 优选地和一种或多种能够促进所述多肽穿过血脑屏障渗透的药剂一起施用。

[0082] 用于 C<sub>12</sub>-C<sub>13</sub> 结合多肽局部施用的制剂包括, 例如, 无菌的和未灭菌的水性溶液, 在诸如醇类的常规溶剂中的非水性溶液, 或者在液态或固态油基质 (oil bases) 中的溶液。这样的溶液还可以含有缓冲剂、稀释剂以及其它适宜的添加剂。用于局部施用的药用组合物和制剂可以包括透皮贴片 (transdermal patches)、油膏、洗液、膏剂、凝胶、滴剂、栓剂、喷雾剂、液体和散剂。鼻部喷雾剂特别有用, 并且可以通过, 例如, 喷雾器或其它鼻部喷雾装置进行施用。通过吸入器的施用也是特别有用的。常规药用载体、水、散剂或油基质、增稠剂等可以是必需的或是需要的。

[0083] 用于口服施用的组合物和制剂包括, 例如, 散剂或颗粒剂、或者在水或非水性介质中的混悬液或溶液、胶囊、香囊或片剂。这样的组合物还可以结合增稠剂、调味剂、稀释剂、乳化剂、分散辅剂或结合剂。

[0084] 用于肠胃外、鞘内或心室内施用的组合物和制剂可以包括无菌的水溶液, 其还可以含有缓冲剂、稀释剂和其它适当的添加剂 (例如, 渗透增强剂、载体化合物和其它药用载体)。

[0085] 药物组合物可以包括, 但不限于, 溶液、乳状液、水性混悬液和含脂质体制剂。这些组合物可以从各种成分产生, 其中所述成分包括, 例如, 预制的液体、自身乳化固体和自身乳化半固体。乳状液通常为两相系统, 其包括密切混合并且分散在彼此之中的两个不相溶的液相; 通常, 乳状液是油包水 (water-in-oil, (w/o)) 或水包油 (oil-in-water, (o/w)) 种类。由于其配制的容易度和溶解、吸收以及生物利用度的功效, 乳状液制剂已经广泛地用于口服递送治疗剂。

[0086] 脂质体是具有由亲脂性材料形成的膜的和可以包含要递送的组合物的水性内核的囊泡。由于其从药物递送的观点上提供的特异性和作用的持续性, 脂质体可以是特别有用的。脂质体组合物可以由, 例如, 磷脂酰胆碱, 二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱, 二棕榈酰磷脂酰胆碱, 二肉豆蔻酰磷脂酰甘油, 或二油酰基磷脂酰乙酰胺形成。许多亲脂性试剂可以商购获得, 包括 LIPOFECTIN<sup>®</sup> (体外基因 (Invitrogen)/ 生命技术, Carlsbad, CA) 和 EFFECTENE<sup>™</sup> (快而精公司 (Qiagen), Valencia, CA)。

[0087] 本发明提供的多肽还包含任何药用盐、酯或者所述酯的盐、或任何其它化合物，所述化合物在施用给包括人在内的动物时，能够提供（直接地或间接地）生物活性代谢物或其残基。因此，例如，本发明提供多肽的药用盐、药物前体（prodrug）以及所述药物前体的药用盐、和其它生物等价物。术语“药物前体”是指一种治疗药剂，其以无活性形式制备，并且通过内生酶或其它化学剂和 / 或条件的作用在机体或其细胞内转化成活性形式（即，药物）。术语“药用盐”是指本发明所述的多肽在生理学上和制药学上可用的盐（即，保留母体多肽（parent polypeptide）的需要的生物活性而没有给予不理想的毒性作用的盐）。药用盐的实例包括，但不限于，与阳离子（例如，钠、钾、钙或多胺，诸如精胺）形成的盐；与无机酸（例如，盐酸、氢溴酸、硫酸、磷酸或硝酸）形成的酸式加成盐；以及与有机酸（例如，乙酸、柠檬酸、草酸、棕榈酸或延胡索酸）形成的盐。

[0088] 含有本发明所述的多肽的药用组合物还可以结合促进多肽向动物皮肤有效运送的渗透增强剂。渗透增强剂可以增强亲脂性和非亲脂性药物穿过细胞膜的扩散。渗透增强剂可以分为属于五大类中的一种，即，表面活性剂（例如，月桂硫酸钠、聚氧乙烯-9-十二烷基醚和聚氧乙烯-20-十六烷基醚）；脂肪酸（例如，油酸、月桂酸、肉豆蔻酸、棕榈酸和硬脂酸）；胆酸盐（例如，胆酸、脱氢胆酸和脱氧胆酸）；螯合剂（例如，乙二胺四乙酸二钠、柠檬酸和水杨酸盐）；以及非螯合非表面活性剂（例如，不饱和环状脲）。备选地，抑制性多肽可以通过离子电渗疗法运送，其包括带有电荷的透皮贴片以“驱动”多肽通过真皮。

[0089] 在一些实施方案中，药物组合物可以包含（a）一种或多种多肽，和（b）一种或多种通过不同机制作用的其它试剂。例如，在本发明提供的组合物中可以包含消炎药物，其包括但不限于非类固醇消炎药物和皮质甾类，以及抗病毒药物，其包括但不限于利巴韦林（ribavirin）、阿糖腺苷、阿昔洛韦和更昔洛韦。其它非多肽试剂（例如，化学治疗药剂）也在本发明提供的组合物的范围内。所述组合的化合物可以一同或先后使用。

[0090] 组合物另外可以包含常规在药物组合物中发现的其它辅助成分。因此，所述组合物还可以包括相容的、药用活性材料，诸如例如，止痒剂、收敛剂、局部麻醉剂或消炎药物、或者用于在物理配制本发明提供的组合物的不同剂量形式的添加材料，诸如染料、调味剂、防腐剂、抗氧化剂、遮光剂、增稠剂和稳定剂。并且，所述组合物可以与辅剂混合，例如，滑润剂、防腐剂、稳定剂、湿润剂、乳化剂、用于影响渗透压的盐、缓冲剂、染料、调味剂以及芳香物质。然而，当添加时，这样的材料不应该不适当地妨碍本发明提供的组合物内的多肽成分的生物活性。如果需要，可以将所述制剂灭菌。

[0091] 可以按照制药工业中公知的常规技术制备药用制剂，其可以便利地以单位剂型存在。所述技术可以包括使活性组分（例如，本发明提供的  $C_{12}$ - $C_{18}$  结合多肽）与需要的药用载体或赋形剂缔合的步骤。典型地，所述制剂可以通过这样的方式制备：均一地并且使活性组分与液态载体或细碎的固体载体或者两者紧密缔合，然后，如果必要，将产品定型。如果需要，可以将制剂灭菌，条件是灭菌方法不妨碍制剂中包含的多肽的效力。

[0092] 本发明提供的组合物可以配制成许多可能的剂型中的任何一种，诸如，但不限于，片剂、胶囊、液态糖浆、软凝胶、栓剂和灌肠剂。所述组合物还可以配制成在水性、非水性或混合介质中的混悬液。水性混悬液还可以包含增加所述混悬液黏度的物质，其包括，例如，羧甲基纤维素钠、山梨醇和 / 或葡聚糖。混悬液还可以包含稳定剂。

[0093] 本发明提供的 C<sub>α</sub>2-C<sub>α</sub>3 结合多肽可以与包装材料组合,并且作为用于减少 Fc- 介导的免疫复合物形成的试剂盒出售。用于生产制品的成分和方法是公知的。制品可以与前述部分描述的一种或多种多肽和化合物组合。另外,制品还可以包括,例如,缓冲剂或其它用于减少或监测减少的免疫复合物形成的控制试剂。描述所述多肽怎样有效用于减少 Fc- 介导的免疫复合物形成的用法说明可以包含在这样的试剂盒中。

[0094] 6. 应用 C<sub>α</sub>2-C<sub>α</sub>3 结合多肽来抑制 Fc- 介导的免疫复合物形成的方法

[0095] C<sub>α</sub>2-C<sub>α</sub>3 结合多肽可以用于 Fc- 介导的免疫复合物形成的体外测定。例如,所述方法有效用于评估 C<sub>α</sub>2-C<sub>α</sub>3 裂口 - 结合多肽阻滞 Fc- 介导的免疫复合物形成的能力。体外方法可以包括,例如,在本发明提供的多肽存在和不存在的条件下,将免疫球蛋白分子(例如,抗原结合的免疫球蛋白分子)和效应器分子(例如, mC1q, sC1q, FcR, FcRn, 或其它抗体)接触,并且确定每种样品中免疫复合物形成的水平。免疫复合物形成的水平可以通过,例如,用考马斯亮蓝或银染的聚丙烯酰胺凝胶电泳,或者通过共免疫沉淀进行评估。这样的方法包括本领域的普通技术人员公知的那些。本文提供的方法还可用来抑制受试者中的免疫复合物形成,和通过抑制体内 Fc- 介导的免疫复合物形成来治疗受试者中的自体免疫疾病。这样的方法可包括,例如,给受试者施用任何本文提供的多肽,或含有任何本文提供的多肽的组合物。例如,一种方法可包括给个体施用含有包括氨基酸序列 Cys-Ala-Trp-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr (SEQ ID NO:10) 的多肽的组合物。备选地,一种方法可包括给受试者施用包含下列氨基酸序列的多肽: Asp-Cys-Ala-Trp-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr (SEQ ID NO:2), 或 Ala-Pro-Pro-Asp-Cys-Ala-Trp-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr (SEQ ID NO:16)。

[0096] 本发明提供的方法可用于治疗患有,例如,PD、ALS 或 AD 的受试者。此处描述这些病况和 Fc- 介导的免疫复合物形成的涉及。所有这些神经变性疾病特征在于,胞内蛋白质 / 包涵体的聚集,异常的微管和活化的小胶质细胞 (CNS 巨噬细胞),其通常在选择性神经元丢失发作和每种这些疾病临床症状的发作之前。ALS 特征在于,免疫复合的 IgG Fc 与叫作超氧化物歧化酶 -1 (SOD1) 的酶的结合,细胞蛋白质的聚集,异常的微管,小胶质细胞的活化,和最终运动神经元的死亡。PD 特征在于,免疫复合的 IgG Fc 与 α - 突触核蛋白的结合,细胞蛋白质的聚集,异常的微管,小胶质细胞的活化,和最终 SN TH+ 细胞的死亡。AD 特征在于,免疫复合的 IgG Fc 与 tau 蛋白 / 微管的结合,异常的微管形成 / 聚集,小胶质细胞的活化,和胆碱能皮质神经元的选择性死亡。参见,例如, Henkel 等 (2004) Ann. Neurol. (神经学年刊) 55:221-235; Morrison 等 (2000) Exp. Neurol. (实验神经学) 165:207-220; Orr 等 (2005) Brain (大脑) 128:2665-2674; 和 Bouras 等 (2005) Brain Res. Brain Res. Rev. (大脑研究和大脑研究综述) 48:477-487。这表明,尽管特异的神经元受到影响,并且不同的蛋白质参与这三种疾病,但是基本的神经免疫病理可能是相似的 (Couillard 等 (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA (美国国家科学院学报) 95:9626-9630; 和 Trojanowski 等 (1993) Brain Pathol. (大脑病理学) 3:45-54)。

[0097] 方法还可包括鉴定需要所述治疗的受试者和 / 或监测受治疗的个体在症状或免疫复合物形成水平中的减少的步骤。例如,ALS 可以通过测量 CNS 中的 MCP-1 水平,通过肌电图,或者通过用于测量诊断患有 ALS 的个体的进展或减少的任何其它的客观或主观检测(例如,通过神经学家或其他医生评估)而进行监测。

[0098] 帕金森病 -PD 的临床症状由在叫作黑质 (SN) 的大脑部分中的多巴胺能神经元的死亡引起。过度应答的免疫系统可能在延长 PD 存在中起作用,其通过生成细胞因子(例如,白介素-1 和肿瘤坏死因子) 应答初始损伤,其可以进一步损伤大脑中的细胞。已经表明来自 PD 个体的免疫球蛋白对 SN 细胞的发病机理有贡献 (Chen 等 (1998) Arch. Neurol. (神经学档案) 55 :1075-1080)。由于敲除 Fc  $\gamma$  Rs 可以防止小鼠小胶质细胞活化和多巴胺细胞死亡 (He 等 (2002) Exp. Neurol. (实验神经学) 176 :322-327 ;和 Le 等 (2001) J. Neurosci. (神经科学杂志) 21 :8447-8455),所以在由人 PD IgG 的被动转运诱导的 PD 小鼠模型中 Fc  $\gamma$  Rs 似乎是重要的。体液(抗体)介导的免疫性已经涉及 PD 的免疫发病机理。活化的小胶质细胞在遗传的和自发性(偶发性)PD 中都表达激活的 Fc  $\gamma$  R,与通过神经元 IgG、支配性 IgG1 激活小胶质细胞 Fc  $\gamma$  R 一致 (Orr 等,如前所述)。此外,由于  $\alpha$ -突触核蛋白聚集物的积聚,其引起微管病理学,在患有 PD 的受试者中 SN 细胞选择性地死亡。 $\alpha$ -突触核蛋白与 SN-特异的 IgG1 共局部化 (colocalize),这表明  $\alpha$ -突触核蛋白可以与免疫复合的 IgG 相互作用。

[0099] 肌萎缩性脊髓侧索硬化 -ALS 是具有上部和下部运动神经元 (MN) 变性的破坏性疾病,由于呼吸衰竭其最终在 1 到 5 年内导致死亡。来自 ALS 患者的 IgG 免疫复合物可以在小鼠中诱导 ALS 样的损伤。IgG Fc  $\gamma$  Rs 似乎在 ALS 的免疫发病机理中是重要的 (Mohamed 等 (2002) J. Neurosci. Res. (神经科学研究杂志) 69 :110-116 ;和 Engelhardt 等 (2005) Acta Neurol. Scand. 112 :126-133 ;和 Zhao 等 (2003) J. Neuropathol. Exp. Neurol. (神经病理学和实验神经学杂志) 63 :964-977)。不到 10% 的 ALS 病例具有家族性(遗传的)" fALS" 基础。大约 2% 的全部人类 ALS 病例是由于在编码 SOD1 的基因中的多于一百个的已知突变引起的 (Alexianu 等 (2001) Neurol. (神经学) 57 :1282-1289)。转基因人类 SOD1 突变诸如 SOD1 G93A 的小鼠,表现出与在同人 ALS 临床和组织病理发展一致的运动神经元 (MN) 丢失和临床迹象发作之前出现的增加的 IgG、Fc  $\gamma$  R 和活化的小胶质细胞的免疫反应性。超过 90% 的全部 ALS 病例具有偶发性" sALS" 基础,没有已知的遗传基础或任何关于 SOD1 或微管的已知的突变 (Valentine 等 (2005) Ann. Rev. Biochem. (生物化学综述年刊) 74 :563-593 ;和 Garcia 等 (2006) Neurobiol. Dis. (神经生物学发现) 21 :102-109)。

[0100] 已经在 fALS 和 sALS 的脊髓中发现树突细胞、单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1) 和活化的小胶质细胞/巨噬细胞 (Henkel 等,如前所述)。免疫复合的 IgG(而不是单体的、非免疫复合的 IgG,或 IgG 的 F(ab')<sub>2</sub> 片段)通过结合并且激活免疫复合的 IgG Fc  $\gamma$  R 而使 MCP-1mRNA 的表达增加 10 倍 (Hora 等 (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA (美国国家科学院学报) 89 :1745-1749),表明在 fALS 和 sALS 病例中,免疫复合的 IgG 通过 Fc  $\gamma$  R(最可能在周围的小胶质细胞上)而激活 MCP-1。

[0101] 阿尔茨海默病 -传统的科学观点认为,由于大脑通过血脑屏障 (BBB) 而排斥 IgG,所以免疫球蛋白,包括 IgG,不能到达大脑。然而,患有炎症神经疾病或作为正常大脑衰老的结果,IgG 可以穿过有功能障碍的 BBB 而进入大脑。IgG Fc 可以激活小胶质细胞,其已经通过细胞 Fc  $\gamma$  Rs(例如, Fc  $\gamma$  RI 和 Fc  $\gamma$  RIII) 参与 AD 的免疫发病机理。免疫细胞化学实验已经表明 Fc  $\gamma$  RI 存在于在衰老的大脑中是 IgG-免疫反应性的相同的锥形神经元中,表明这些受体在 IgG Fc 神经元内部渗透中的作用。已经表明神经元内部的 IgG Fc 结合 tau 蛋白。由于已经表明 tau 蛋白在微管的正确聚合中是重要的,所以 IgG Fc(而不是 IgG

Fab 片段)与 tau 蛋白和与微管本身的结合可以引起微管的异常聚合。因此, IgG Fc 神经元内部渗透可能参与皮层神经元的易受攻击的子集中的神经变性的早期阶段 (Reiderer 等 (2003) NeuroReport (神经学报告) 14 :117-121 ;Bouras 等, 如前所述 ;和 Engelhardt 等 (2000) Arch. Neurol. (神经学档案) 57 :681-686)。Fc  $\gamma$  R 在 AD 免疫病理学中的作用可以在 AD 老年斑中的 Fc  $\gamma$  R+ 小胶质细胞的活化中发现 (Peress 等 1993 J Neuroimmunol. (神经免疫学杂志) 48 :71-79)。

[0102] 将在下述实施例中进一步描述本发明, 所述实施例不限制在权利要求中描述的本发明的范围。

#### [0103] 实施例

[0104] 实施例 1- 用于测量结合于 C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3 裂口的配体的体外测定法

[0105] 包括酶联免疫吸附测定 (ELISA) 和双免疫扩散技术的体外测定用来证明本发明提供的多肽和化合物对免疫复合的 IgG Fc 与因子如 FcRs、FcRn、C1q、 $\alpha$ -突触核蛋白、SOD1、和 tau 蛋白的结合的竞争性抑制。

[0106] 在标准 ELISA 中, 抗原被免疫吸附到塑料微孔上。在封闭和洗涤后, 将具有针对所述抗原的特异性的一级抗体加入到微孔中。再一次洗涤阶段之后, 将针对所述一级抗体并且与酶标记诸如辣根过氧化物酶 (HRP) 缀合的二级抗体加入到所述微孔中。再一次洗涤循环之后, 加入适当的酶底物。如果形成抗原 / 一级抗体 / 二级抗体 / HRP 缀合物, 那么所缀合的酶催化与底物的比色化学反应, 其在微量板读数仪或分光光度计上读取。通过将抗原和二级抗体 / HRP 缀合物的水平标准化, 确定一级抗体的滴度 (变量)。在标准 ELISA 系统中, 一级抗体通过其位于 Fab 臂的互补决定区 (CDR) 与抗原结合。同样地, 二级抗体 / HRP 缀合物通过其 CDR Fab 区与一级抗体结合。由于 HRP 缀合到二级抗体的 Fc 区, 所以直接的 Fc 结合非常有限或者被消除了。

[0107] 由于这一原因, 应用“反式 ELISA”技术来评估 Fc 区与结合于免疫复合的 IgG Fc 的配体的结合。在这些测定中, 所述酶 (HRP) 没有共价缀合到二级抗体的 Fc 部分。相反地, 应用预制的过氧化物酶 - 兔 (或小鼠) 抗 - 过氧化物酶 IgG 的免疫复合物 (“PAP”复合物)。因此, HRP 作为抗原和酶标记, 但是不封闭 Fc 区。在反式 ELISA 系统中, Fc C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3 裂口结合配体 (例如, 纯化的人 C1q) 结合于微孔板上。在不存在竞争剂时, PAP 复合物与固定的配体结合, 并且 HRP 和其底物之间的反应产生信号。抑制 PAP 与固定的配体结合的多肽和化合物, 如本发明提供的那些, 减少这种信号。

#### [0108] 实施例 2-C1q 结合的抑制

[0109] 通过将 2  $\mu$  l 兔抗 - 过氧化物酶 (西格玛化学 (Sigma Chemicals), St. Louis, MO) 与 50  $\mu$  l 过氧化物酶 (西格玛 - 奥德里奇 (Sigma Aldrich), St. Louis, MO) 在 1ml 蒸馏水中混合而形成 PAP 复合物。将 PAP (100  $\mu$  l) 与 100  $\mu$  l 肽或人 C1q (快得标 (Quidel) 公司, San Diego, CA) 预温育 1 小时。然后将 C1q/PAP 和肽 / PAP 混合物 (100  $\mu$  l) 用 C1q 包被的板温育 30 分钟。在洗涤之后, 将板用 2-2' - 连氮双 -3- 乙基苯并噻唑啉 -6- 磺酸 (ATBS ; 快得标 (Quidel) 公司) 温育 15 分钟, 并且在 405nm 读数。结果在表 1 中显示。

#### [0110] 表 1

[0111]

| 肽                | SEQ ID NO: | OD 405 nm |
|------------------|------------|-----------|
| DCAWHLGELVWCT    | 2          | 1.100     |
| APPCARHLGELVWCT  | 14         | 0.567     |
| DCAFHLGELVWCT    | 3          | 0.859     |
| APPDCAWHLGELVWCT | 16         | 0.389     |
| APPCAFHLGELVWCT  | 15         | 0.983     |
| APPCAHLGELVWCT   | 13         | 1.148     |
| C1q (阴性对照)       | -          | 0.337     |
| 阳性对照             | -          | 2.355     |

[0112] APPDCAWHLGELVWCT (SEQ ID NO:16) 导致最大的 C1q 结合的抑制,几乎等于 C1q 自身。肽 APPCARHLGELVWCT (SEQ ID NO:14) 给出次好的结果。

[0113] 实施例 3-FcR 结合的抑制

[0114] 一旦应用 C1q 测定法建立起反式 ELISA 方法,就应用 Fc $\gamma$  IIa、Fc $\gamma$  IIb 和 Fc $\gamma$  III 替代 C1q 重新设计测定法。将高度纯化的 Fc $\gamma$  IIa、Fc $\gamma$  IIb 和 Fc $\gamma$  III 免疫吸附到塑料微孔上。在将 Fc $\gamma$  R 反式 ELISA 系统最优化之后,应用本发明所述的多肽进行竞争性抑制实验,以研究它们对于免疫复合物与纯化的 Fc $\gamma$  R 结合的抑制能力。

[0115] 将 Falcon 微量滴定板用高度纯化的 Fc $\gamma$  IIa、Fc $\gamma$  IIb 和 Fc $\gamma$  III 的 1 : 10 稀释液包被,并且温育 24 小时。洗涤板,然后用 5X BSA 封闭溶液 (阿尔法诊断国际公司 (Alpha Diagnostic International), San Antonio, 德克萨斯) 封闭 24 小时。PAP 免疫复合物按照实施例 2 所述形成。将 PAP (100  $\mu$  l) 与 100  $\mu$  l 的肽预先温育 1 小时。将 PAP/ 肽混合物加入到 Fc $\gamma$  R 包被的板中,并且温育 1 小时。洗涤后,将板与 ABTS 底物温育 15 分钟,并且在 405nm 读数。结果在表 2 中显示。

[0116] 表 2

[0117]

| 肽                | SEQ ID NO: | Fc $\gamma$ IIa | Fc $\gamma$ IIb | Fc $\gamma$ III |
|------------------|------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| DCAWHLGELVWCT    | 2          | 0.561           | 0.532           | 0.741           |
| APPCARHLGELVWCT  | 14         | 0.956           | 0.768           | 0.709           |
| DCAFHLGELVWCT    | 3          | 0.660           | 0.510           | 0.810           |
| APPDCAWHLGELVWCT | 16         | 0.509           | 0.496           | 0.670           |
| APPCAFHLGELVWCT  | 15         | 0.605           | 0.380           | 0.880           |
| APPCAHLGELVWCT   | 13         | 0.658           | 0.562           | 0.530           |
| 阳性对照             | -          | 1.599           | 1.394           | 1.588           |

[0118] 肽 APPDCAWHLGELVWCT (SEQ ID NO :16) 导致最大的 FcR 与 PAP 结合的抑制, 其次是肽 DCAWHLGELVWCT (SEQ ID NO :2)。

[0119] 实施例 4- 免疫复合的 IgG 与野生型 (wt) 和突变型 SOD1 的结合的抑制

[0120] PAP 复合物按照实施例 2 所述形成。将 PAP (100  $\mu$  l) 与 100  $\mu$  l 肽预温育 1 小时, 并且对照 (200  $\mu$  l PAP) 也温育 1 小时。将 100  $\mu$  l PAP 或 PAP/ 肽加入到 Falcon 微量滴定板上, 所述板已经用 0.8  $\mu$  g/ml 人 wtSOD1 (西格玛-奥德里奇 (Sigma-Aldrich)) 或 apo (不含 Cu、Zn) 单体突变型 SOD1 C57S (mSOD1C57S) 包被 24 小时。1 小时后将 PAP 或肽 /PAP 混合物 (100  $\mu$  l) 加入到 wt SOD1 或 mSOD1C57S 包被的板中 60 分钟。洗涤后, 将板用 ATBS 温育 15 分钟, 并且在 405nm 读数。结果显示在表 3 中。

[0121] 表 3

[0122]

| 肽                | SEQ ID NO: | wt SOD1 | mSOD1C57S |
|------------------|------------|---------|-----------|
| DCAWHLGELVWCT    | 2          | 0.292   | 0.592     |
| APPDCAWHLGELVWCT | 16         | 0.277   | 0.226     |
| 阳性对照             | -          | 2.900   | 2.924     |

[0123] 肽 APPDCAWHLGELVWCT (SEQ ID NO :16) 导致最大的 wt SOD1 或 mSOD1C57S 与 PAP 结合的抑制, 其次是肽 DCAWHLGELVWCT (SEQ ID NO :2)。

[0124] 由于 SOD1 在特定条件下可以利用过氧化氢和 ABTS 作为底物 (Elam 等 (2003) J. Biol. Chem. (生物的化学杂志) 278 :21032-21039 ; 和 Yim 等 (1993) J. Biol. Chem. (生物的化学杂志) 268 :4099-4105), 将 0.05mg/ml wtSOD1 或 0.050mg/ml 过氧化物酶 (西格玛-奥德里奇 (Sigma-Aldrich)) 加入到用于上述所述的 SOD 免疫复合物结合测定的 ABTS 底物中。在温育 5 分钟之后将板在 405nm 读数。结果在表 4 中显示。

[0125] 表 4

[0126]

| 酶            | 0.05mg/ml<br>wt SOD1 | 0.050mg/ml<br>过氧化物酶 | 单独的底物 |
|--------------|----------------------|---------------------|-------|
| 过氧化氢/ABTS 底物 | 0.063                | 3.432               | 0.061 |

[0127] 综合来看, 这些数据表明, 免疫复合的 IgFc 与 wtSOD1 和 mSOD1C57S 的结合受到肽 2 和 16 的抑制, 其中肽 16 给出最好的抑制。由于肽 2 和 16 只与 IgG Fc C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3 裂口结合, 所以它在免疫复合的 IgG Fc C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3 裂口与 wtSOD1 和 mSOD1C57S 结合之后。如在表 4 中所示, 100X 的 wtSOD 对在表 3 总结的实验中所用的 ABTS 底物的 OD 读数没有作用。

[0128] 实施例 5- 免疫复合的 IgG 与野生型  $\alpha$ -突触核蛋白的结合的抑制

[0129] 通过将 2  $\mu$  l 兔抗-过氧化物酶 (西格玛) 与 50  $\mu$  l 过氧化物酶 (西格玛) 在 1ml 蒸馏水中混合而形成 PAP 复合物。将 PAP (100  $\mu$  l) 与 100  $\mu$  l 肽预温育 1 小时。对照 PAP (200  $\mu$  l) 也温育 1 小时。将 100  $\mu$  l PAP 或 PAP/ 肽加入到 Falcon 微量滴定板中, 所述

板已经用 167  $\mu$ g/ml 的人 wt  $\alpha$ -突触核蛋白（西格玛-奥德里奇）包被 24 或 48 小时，并且将板温育 60 分钟。洗涤后，将板用 ATBS 温育 30 分钟，然后在 405nm 读数。结果显示在表 5 中。

[0130]

表 5

[0131]

| 肽                          | SEQ ID NO: | wt $\alpha$ -突触核蛋白 |
|----------------------------|------------|--------------------|
| DCAWHLGELVWCT (24 小时)      | 2          | 0.111              |
| APPDCAWHLGELVWCT (24 小时)   | 16         | 0.088              |
| 阳性对照                       | -          | 1.433              |
| 只有 ABTS 底物                 |            | 0.061              |
| DCAWHLGELVWCT (48 小时)      | 2          | 0.152              |
| APPDCAWHLGELVWCT (48 小时)   | 16         | 0.136              |
| $\alpha$ -突触核蛋白阳性对照(48 小时) | -          | 2.934              |

[0132] 肽 APPDCAWHLGELVWCT (SEQ ID NO :16) 导致最大的  $\alpha$ -突触核蛋白与 PAP 结合的抑制，其次是肽 DCAWHLGELVWCT (SEQ ID NO :2)。

[0133]

#### 实施例 6- 在体外系统中抑制 ALS 抗体

[0134] 为了确定用本发明所述的抑制剂阻滞 FcRs 和 C1q 是否可以减少与 ALS 相关的 MN 细胞损伤和 MN 细胞死亡，按照 Zhao 等 (J. Neuropath. Exp. Neurol. (神经病理学和实验神经学杂志) (2004) 63 :964-977) 所述制备含有小胶质细胞和运动神经元 (MN) 的细胞培养物。将 ALS IgG (1 或 2  $\mu$ g/ml) 加入到有或无本文所述的 FcR 和 C1q 结合抑制剂（例如，具有在 SEQ ID NOS :2 和 16 中描述的氨基酸序列的多肽）的小胶质细胞 /MN 细胞培养物中。通过测量促炎性细胞因子，TNF- $\alpha$  的量而进行小胶质细胞激活测定。使用抗 -p75 和 / 或抗 -CFAP 抗体进行免疫细胞化学 MN 染色，以确定有和 无免疫复合的 IgG 抑制剂时 MN 的存活。使用高效液相色谱测量谷氨酸，已知其对 MN 是细胞毒性的。

[0135]

#### 实施例 7- 在体内模型中抑制 ALS 免疫复合的 IgG Fc

[0136] 在有和无本发明所述的多肽抑制剂的 i. p. 注射时，将从 ALS 患者制备的 IgG (40mg) (Mohamed 等. (2002) J. Neurosci. Res. (神经科学研究杂志) 69 :110-116) 腹膜内 (i. p.) 注射到 13-17 周龄的 C57B1/6X 129SvEv 小鼠中。MN 中 ALS IgG 的超微结构检测，细胞内钙的释放，和在神经肌肉结合处的乙酰胆碱 (actylcholine) 释放用来监测在对照和治疗的小鼠中的 ALS- 样症状。备选地，使用 Fc  $\gamma$  RIIb 敲除小鼠。使用这些小鼠的实验已经表明，类风湿性关节炎 (RA) 或系统红斑狼疮 (SLE) 的临床迹象可以通过被动施用人 RA 或 SLE 血清而诱导 (Petkova 等. (2006) J. Exp. Med. (实验医学杂志) 203 (2) :275-280)。因此，在用和不用本发明所述的抑制剂时，给 Fc  $\gamma$  RIIbR 敲除小鼠施用 ALS 阳性血清用来被动诱导 ALS。

[0137]

#### 实施例 8- 在体外模型中抑制 PD 免疫复合的 IgG Fc

[0138] 进行实验以确定本发明所述的抑制剂是否可以防止与 PD 临床免疫病理相关的多

巴胺能细胞的细胞破坏。用纯化的小鼠小胶质细胞制备多巴胺能细胞系 MES 23.5 (Le 等 (2001) J. Neurosci. (神经科学杂志) 21 :8447-8455)。制备纯化的 PD 免疫复合的 IgG, 并且在用和不用本发明所述的 FcR 抑制剂时加入到所述细胞培养物中。按照实施例 5 中所述的方法还测量对  $\alpha$ -突触核蛋白与免疫复合的 IgG Fc 结合的抑制。

[0139] 实施例 9- 在体内模型中抑制 PD 免疫复合的 IgG Fc

[0140] 进行体内实验, 以确定本发明所述的抑制剂是否可以防止 PD IgG 与小胶质细胞 Fc  $\gamma$  R 的结合, 并且因此防止 SN 多巴胺能细胞的破坏, 其是与 PD 相关的主要病理性损害。PD IgG 如所述 (He 等, 如前所述) 纯化, 并且将 20  $\mu$  l 立体定位地 (stereotactically) 注射到小鼠 SN 中。在用和不用所述抑制剂时, Fc  $\gamma$  IIb 敲除的小鼠还用作被动转移 PD 的体内模型。

[0141] 实施例 10- 在体内模型中使用 Fc  $\gamma$  R 抑制剂抑制 AD IgG 介导的对胆

[0142] 碱能神经元的损伤

[0143] AD 是一种发展性神经变性疾病, 其特征在于在基底前脑中的胆碱能神经元 (CN) 的失去。将 AD IgG 立体定位注射到成年雌性 Sprague-Dawley 大鼠的基底前脑中导致 ChAT- 免疫染色的 CN 细胞的显著减少, 所述 ChAT- 免疫染色的 CN 细胞是在人 AD 患者中 CN 退化的特征 (Engelhardt 等 (2000) 如前所述)。因此, 进行体内实验以确定本发明所述的 Fc  $\gamma$  R 抑制剂是否可以防止 Fc  $\gamma$  R 小胶质细胞的激活和 IgG Fc 对 CN 细胞的内在化, 其导致在 AD 中观察到的退化性的免疫病理。在用和不用所述抑制剂时, Fc  $\gamma$  IIb 敲除小鼠还用作被动转移 AD 的体内模型。

[0144] 实施例 11- 免疫复合的 IgG 与野生型 tau 结合的抑制

[0145] 通过将 2  $\mu$  l 兔抗 - 过氧化物酶与 50  $\mu$  l 过氧化物酶在 1ml 蒸馏水中混合而形成 PAP 复合物。将 PAP (100  $\mu$  l) 与 100  $\mu$  l 肽预温育 1 小时。对照 PAP (200  $\mu$  l) 也温育 1 小时。将 100  $\mu$  l PAP 或 PAP/ 肽加入到 Falcon 微量滴定板中, 所述板已经用 16.7  $\mu$  g/ml 的人野生型 tau 蛋白 (441 个残基; 西格玛 - 奥德里奇) 包被 24 小时。1 小时后, 将 PAP 或肽 /PAP 混合物 (100  $\mu$  l) 加入到 tau 包被的板中, 并且温育 60 分钟。洗涤后, 将板用 ATBS 温育 15 分钟, 并且在 405nm 读数。结果显示在表 6 中。

[0146] 表 6

[0147]

| 肽                | SEQ ID NO: | 野生型 tau 蛋白 |
|------------------|------------|------------|
| DCAWHLGELVWCT    | 2          | 0.322      |
| APPDCAWHLGELVWCT | 16         | 0.059      |
| 阳性对照             | -          | 0.695      |
| 阴性对照 (只有底物)      | -          | 0.060      |

[0148] 肽 APPDCAWHLGELVWCT (SEQ ID NO: 16) 导致对人野生型 tau 蛋白与 PAP 结合的最大抑制, 其次是肽 DCAWHLGELVWCT (SEQ ID NO: 2)。

[0149] 实施例 12- 免疫复合的 IgG 与野生型  $\beta$ -淀粉样肽结合的抑制

[0150] A  $\beta$  肽的不同片段构成 AD 的淀粉状蛋白斑特殊病征, 并且这些 A  $\beta$  片段似乎刺激

小胶质细胞激活和随后的 AD 神经病理。因此,进行实验,以检测 Aβ 1-40 与免疫复合物的结合,并且确定本发明所述的抑制剂是否可以抑制 PAP 免疫复合物与 Aβ 肽的结合。PAP 复合物通过 2 μ l 兔抗 - 过氧化物酶与 50 μ l 过氧化物酶在 1ml 蒸馏水中混合而制备。将 PAP(100 μ l) 与 100 μ l 肽预温育 1 小时。对照 PAP(200 μ l) 也温育 1 小时,并将 100 μ l PAP 或 PAP/ 肽加入到 Falcon 微量滴定板中,所述板已经用 33 μ g/ml 的人野生型 β 淀粉样肽 1-40(淀粉状前体蛋白 (APP) 片段 1-40 ;西格玛 - 奥德里奇) 包被 24 小时,所述人野生型 β 淀粉样肽 1-40 具有序列 Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val (SEQ ID NO :39)。将 PAP 或肽 /PAP 混合物在 β - 淀粉样肽包被的板上温育 60 分钟。洗涤后,将板用 ATBS 温育 15 分钟,并且在 405nm 读数。结果显示在表 7 中。

[0151]

表 7

[0152]

| 肽                | SEQ ID NO: | 野生型 1-40 β-淀粉样肽 |
|------------------|------------|-----------------|
| DCAWHLGELVWCT    | 2          | 0.151           |
| APPDCAWHLGELVWCT | 16         | 0.885           |
| 阳性对照             | -          | 3.278           |
| 阴性对照 (只有底物)      | -          | 0.061           |

[0153] 肽 DCAWHLGELVWCT (SEQ ID NO :2) 导致对人野生型 β 淀粉样肽与 PAP 结合的最大抑制,其次是肽 APPDCAWHLGELVWCT (SEQ ID NO :16)。

[0154] 其它实施方案

[0155] 应该理解,尽管本发明已经结合其详细内容进行了描述,但是前述内容只是举例说明,并不限制本发明的范围,本发明的范围通过后附的权利要求的范围而限定。其它方面、优点和改进在下述权利要求的范围内。

[0001]

## 序列表

<110> 三一治疗公司  
 <120> 治疗免疫介导的神经疾病的方法  
 <130> 20160/004W01  
 <140> PCT/US2006/034603  
 <141> 2006-09-06  
 <150> 60/779, 853  
 <151> 2006-03-08  
 <150> 60/775, 184  
 <151> 2006-02-22  
 <150> 60/714, 180  
 <151> 2005-09-06  
 <160> 41  
 <170> FastSEQ for Windows Version 4.0  
 <210> 1  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成肽  
 <220>  
 <221> 变体  
 <222> 1  
 <223> Xaa = 不存在或是任何氨基酸  
 <220>  
 <221> 变体  
 <222> 4  
 <223> Xaa = Phe, Tyr, Trp, Arg, 或5-羟色氨酸(5-HTP)  
 <220>  
 <221> 变体  
 <222> 6  
 <223> Xaa = 任何氨基酸  
 <220>  
 <221> 变体  
 <222> 7  
 <223> Xaa = Gly或Ala  
 <220>  
 <221> 变体  
 <222> 8  
 <223> Xaa = Glu或Ala  
 <220>  
 <221> 变体  
 <222> 13  
 <223> Xaa = 不存在或是任何氨基酸  
 <400> 1  
 Xaa Cys Ala Xaa His Xaa Xaa Xaa Leu Val Trp Cys Xaa  
 1 5 10  
 <210> 2  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成肽

[0002]

<400> 2  
Asp Cys Ala Trp His Leu Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr  
1 5 10

<210> 3  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<400> 3  
Asp Cys Ala Phe His Leu Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr  
1 5 10

<210> 4  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<400> 4  
Asp Cys Ala Arg His Leu Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr  
1 5 10

<210> 5  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<400> 5  
Arg Cys Ala Arg His Leu Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr  
1 5 10

<210> 6  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<400> 6  
Arg Cys Ala Trp His Leu Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr  
1 5 10

<210> 7  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<400> 7  
Arg Cys Ala Phe His Leu Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr  
1 5 10

<210> 8  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>

[0003]

<223> 合成肽

<220>

<221> 变体

<222> 3

<223> Xaa= Phe, Tyr, Trp, Arg, 或5-HTP

<400> 8

Cys Ala Xaa His Leu Gly Glu Leu Val Trp Cys  
1 5 10

<210> 9

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 9

Cys Ala Phe His Leu Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr  
1 5 10

<210> 10

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 10

Cys Ala Trp His Leu Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr  
1 5 10

<210> 11

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 11

Cys Ala Arg His Leu Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr  
1 5 10

<210> 12

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<220>

<221> 变体

<222> 1

<223> Xaa= 任何氨基酸

<220>

<221> 变体

<222> 6

<223> Xaa= Trp, Tyr, Phe, Arg, 或5-HTP

<400> 12

Xaa Pro Pro Cys Ala Xaa His Leu Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr  
1 5 10 15

<210> 13

<211> 15

<212> PRT

[0004]

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 13

Ala Pro Pro Cys Ala Trp His Leu Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr  
1 5 10 15

<210> 14

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 14

Ala Pro Pro Cys Ala Arg His Leu Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr  
1 5 10 15

<210> 15

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 15

Ala Pro Pro Cys Ala Phe His Leu Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr  
1 5 10 15

<210> 16

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 16

Ala Pro Pro Asp Cys Ala Trp His Leu Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr  
1 5 10 15

<210> 17

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<220>

<221> 变体

<222> 1

<223> Xaa= 任何氨基酸

<400> 17

Xaa Pro Pro Asp Cys Ala Arg His Leu Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr  
1 5 10 15

<210> 18

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<220>

<221> 变体

[0005]

<222> 1  
<223> Xaa= 任何氨基酸

<400> 18  
Xaa Pro Pro Asp Cys Ala Phe His Leu Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr  
1 5 10 15

<210> 19  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<220>  
<221> 变体  
<222> 1  
<223> Xaa= 任何氨基酸

<400> 19  
Xaa Pro Pro Arg Cys Ala Trp His Leu Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr  
1 5 10 15

<210> 20  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<220>  
<221> 变体  
<222> 1  
<223> Xaa= 任何氨基酸

<400> 20  
Xaa Pro Pro Arg Cys Ala Arg His Leu Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr  
1 5 10 15

<210> 21  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<220>  
<221> 变体  
<222> 1  
<223> Xaa= 任何氨基酸

<400> 21  
Xaa Pro Pro Arg Cys Ala Phe His Leu Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr  
1 5 10 15

<210> 22  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<220>  
<221> 变体  
<222> 15  
<223> Xaa= 任何氨基酸

<400> 22  
Cys Ala Trp His Leu Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr Pro Pro Xaa

[0006]

| 1                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 5 | 10 | 15 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|----|----|
| <div>&lt;210&gt; 23</div> <div>&lt;211&gt; 15</div> <div>&lt;212&gt; PRT</div> <div>&lt;213&gt; 人工序列</div> <div>&lt;220&gt;</div> <div>&lt;223&gt; 合成肽</div> <div>&lt;220&gt;</div> <div>&lt;221&gt; 变体</div> <div>&lt;222&gt; 15</div> <div>&lt;223&gt; Xaa= 任何氨基酸</div> <div>&lt;400&gt; 23</div> <div>Cys Ala Arg His Leu Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr Pro Pro Xaa</div> <div>1 5 10 15</div>     |   |    |    |
| <div>&lt;210&gt; 24</div> <div>&lt;211&gt; 15</div> <div>&lt;212&gt; PRT</div> <div>&lt;213&gt; 人工序列</div> <div>&lt;220&gt;</div> <div>&lt;223&gt; 合成肽</div> <div>&lt;220&gt;</div> <div>&lt;221&gt; 变体</div> <div>&lt;222&gt; 15</div> <div>&lt;223&gt; Xaa= 任何氨基酸</div> <div>&lt;400&gt; 24</div> <div>Cys Ala Phe His Leu Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr Pro Pro Xaa</div> <div>1 5 10 15</div>     |   |    |    |
| <div>&lt;210&gt; 25</div> <div>&lt;211&gt; 16</div> <div>&lt;212&gt; PRT</div> <div>&lt;213&gt; 人工序列</div> <div>&lt;220&gt;</div> <div>&lt;223&gt; 合成肽</div> <div>&lt;220&gt;</div> <div>&lt;221&gt; 变体</div> <div>&lt;222&gt; 16</div> <div>&lt;223&gt; Xaa= 任何氨基酸</div> <div>&lt;400&gt; 25</div> <div>Asp Cys Ala Trp His Leu Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr Pro Pro Xaa</div> <div>1 5 10 15</div> |   |    |    |
| <div>&lt;210&gt; 26</div> <div>&lt;211&gt; 16</div> <div>&lt;212&gt; PRT</div> <div>&lt;213&gt; 人工序列</div> <div>&lt;220&gt;</div> <div>&lt;223&gt; 合成肽</div> <div>&lt;220&gt;</div> <div>&lt;221&gt; 变体</div> <div>&lt;222&gt; 16</div> <div>&lt;223&gt; Xaa= 任何氨基酸</div> <div>&lt;400&gt; 26</div> <div>Asp Cys Ala Arg His Leu Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr Pro Pro Xaa</div> <div>1 5 10 15</div> |   |    |    |
| <div>&lt;210&gt; 27</div> <div>&lt;211&gt; 16</div>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |   |    |    |

[0007]

<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<220>  
<221> 变体  
<222> 16  
<223> Xaa= 任何氨基酸

<400> 27  
Asp Cys Ala Phe His Leu Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr Pro Pro Xaa  
1 5 10 15

<210> 28  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<220>  
<221> 变体  
<222> 16  
<223> Xaa= 任何氨基酸

<400> 28  
Arg Cys Ala Trp His Leu Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr Pro Pro Xaa  
1 5 10 15

<210> 29  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<220>  
<221> 变体  
<222> 16  
<223> Xaa= 任何氨基酸

<400> 29  
Arg Cys Ala Arg His Leu Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr Pro Pro Xaa  
1 5 10 15

<210> 30  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<220>  
<221> 变体  
<222> 16  
<223> Xaa= 任何氨基酸

<400> 30  
Arg Cys Ala Phe His Leu Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr Pro Pro Xaa  
1 5 10 15

<210> 31  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

[0008]

<220>  
 <221> 变体  
 <222> 4  
 <223> Xaa= 不存在或是任何氨基酸

<220>  
 <221> 变体  
 <222> 7  
 <223> Xaa= Phe, Tyr, 5-HTP, Trp, 或Arg

<220>  
 <221> 变体  
 <222> 9  
 <223> Xaa= 任何氨基酸

<220>  
 <221> 变体  
 <222> 10  
 <223> Xaa= Gly或Ala

<220>  
 <221> 变体  
 <222> 11  
 <223> Xaa = Glu或Ala

<220>  
 <221> 变体  
 <222> 16  
 <223> Xaa= 不存在或是任何氨基酸

<400> 31  
 Trp Glu Ala Xaa Cys Ala Xaa His Xaa Xaa Xaa Leu Val Trp Cys Xaa  
 1 5 10 15  
 Lys Val Glu Glu  
 20

<210> 32  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成肽

<220>  
 <221> 变体  
 <222> 7  
 <223> Xaa= Arg, Trp, 5-HTP, Tyr, 或Phe

<400> 32  
 Trp Glu Ala Asp Cys Ala Xaa His Leu Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr  
 1 5 10 15  
 Lys Val Glu Glu  
 20

<210> 33  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成肽

<400> 33  
 Trp Glu Ala Asp Cys Ala Trp His Leu Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr  
 1 5 10 15  
 Lys Val Glu Glu  
 20

<210> 34  
 <211> 32

[0009]

<212> PRT  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 合成肽  
  
 <220>  
 <221> 变体  
 <222> 1-11, 23-32  
 <223> Xaa= 不存在或是任何氨基酸  
  
 <220>  
 <221> 变体  
 <222> 14  
 <223> Xaa= Phe, Tyr, Trp, Arg, 或5-HTP  
  
 <220>  
 <221> 变体  
 <222> 16  
 <223> Xaa= 任何氨基酸  
  
 <220>  
 <221> 变体  
 <222> 17  
 <223> Xaa= Gly或Ala  
  
 <220>  
 <221> 变体  
 <222> 18  
 <223> Xaa= Glu或Ala  
  
 <400> 34  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Ala Xaa His Xaa  
 1 5 10 15  
 Xaa Xaa Leu Val Trp Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 20 25 30  
  
 <210> 35  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 合成肽  
  
 <220>  
 <221> 变体  
 <222> 1-5, 18-22  
 <223> Xaa = 不存在或是任何氨基酸  
  
 <221> 变体  
 <222> 8  
 <223> Xaa = Phe, Trp, Tyr, Arg, 或5-HTP  
  
 <400> 35  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Ala Xaa His Leu Gly Glu Leu Val Trp Cys  
 1 5 10 15  
 Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 20  
  
 <210> 36  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 合成肽  
  
 <400> 36  
 Ala Ala Ala Ala Asp Cys Ala Arg His Leu Gly Glu Leu Val Trp  
 1 5 10 15  
 Cys Ala Ala Ala Ala Ala  
 20  
  
 <210> 37

[0010]

<211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 合成肽  
  
 <400> 37  
 Ala Ala Arg Cys Ala Arg His Leu Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr Ala  
   1                  5                  10                  15  
 Ala  
  
  
 <210> 38  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 合成肽  
  
 <400> 38  
 Ala Ala Ala Asp Cys Ala Phe Trp His Leu Gly Glu Leu Val Trp Cys  
   1                  5                  10                  15  
 Thr Ala Ala  
  
  
 <210> 39  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 合成肽  
  
 <400> 39  
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Glu Lys  
   1                  5                  10                  15  
 Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Ala Lys Gly Ala Ile Ile  
                   20                  25                  30  
 Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val  
                   35                  40  
  
 <210> 40  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 合成肽  
  
 <220>  
 <221> 变体  
 <222> 1  
 <223> Xaa= 任何氨基酸  
  
 <400> 40  
 Xaa Pro Pro Cys Ala Trp His Leu Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr  
   1                  5                  10                  15  
  
 <210> 41  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 合成肽  
  
 <220>  
 <221> 变体  
 <222> 1  
 <223> Xaa= 任何氨基酸  
  
 <400> 41  
 Xaa Pro Pro Cys Ala Arg His Leu Gly Glu Leu Val Trp Cys Thr

[0011]

| 1                | 5   | 10  | 15  |
|------------------|-----|-----|-----|
| <210> 42         |     |     |     |
| <211> 15         |     |     |     |
| <212> PRT        |     |     |     |
| <213> 人工序列       |     |     |     |
| <220>            |     |     |     |
| <223> 合成肽        |     |     |     |
| <220>            |     |     |     |
| <221> 变体         |     |     |     |
| <222> 1          |     |     |     |
| <223> Xaa= 任何氨基酸 |     |     |     |
| <400> 42         |     |     |     |
| Xaa              | Pro | Pro | Cys |
| 1                | 5   | 10  | 15  |
| <210> 43         |     |     |     |
| <211> 16         |     |     |     |
| <212> PRT        |     |     |     |
| <213> 人工序列       |     |     |     |
| <220>            |     |     |     |
| <223> 合成肽        |     |     |     |
| <220>            |     |     |     |
| <221> 变体         |     |     |     |
| <222> 1          |     |     |     |
| <223> Xaa= 任何氨基酸 |     |     |     |
| <400> 43         |     |     |     |
| Xaa              | Pro | Pro | Asp |
| 1                | 5   | 10  | 15  |