

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 96196006. X

[51] Int. Cl.

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 38/04 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 7 月 18 日

[11] 授权公告号 CN 1326557C

[22] 申请日 1996.6.6 [21] 申请号 96196006. X

[30] 优先权

[32] 1995. 6. 7 [33] US [31] 08/482,651

[86] 国际申请 PCT/US1996/009976 1996. 6. 6

[87] 国际公布 WO1996/040197 英 1996. 12. 19

[85] 进入国家阶段日期 1998. 1. 27

[73] 专利权人 拉卓拉药物公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 E·J·维克多利亞

D·M·玛奎司 D·S·琼斯

L·于

[56] 参考文献

US5344758A 1994. 9. 6

EP0498658A2 1992. 8. 12

CN1225015A 1999. 8. 4

EP0642798A2 1995. 3. 15

:" ACTIVITY, DISULPHIDE MAPPING AND
STRUCTURAL MODELLING OF THE FIFTH DO-
MAIN OF HUMA STEINKASSERER ET AL,
FEBS LETT, VOL. 313, NO. 2 1992

:" AMINO ACIDSEQUENCE OF THE RE-
GION BETA2 - GLYCOPROTEIN 1 (GP1)
WHICH MEDIATES BINDING O S. A. LAUER
ET AL, IMMUNOLOGY, VOL. 80. NO. 1 1993

审查员 丁 海

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 李 瑛

权利要求书 2 页 说明书 61 页 附图 20 页

[54] 发明名称

aPL 免疫反应性肽和其缀合物以及治疗 aPL 抗
体 - 介导的疾病的方法

[57] 摘要

本文公开了特异性结合 B 细胞 (aPL 表位与其结
合) 的 aPL 类似物。 无 T 细胞表位的优化类似物作
为治疗 aPL 抗体 - 介导的疾病的缀合物是有用的。
另外, 本文也公开了制备和鉴别所说的类似物的方
法、利用所说的类似物进行治疗的方法、制备所说
的类似物的缀合物的方法和组合物以及 aPL 抗体的
诊断免疫测定法。

1. 一种诱导对 aPL 免疫原的特异性 B 细胞耐受的组合物，该组合物包含非免疫原性效价平台分子与该免疫原的 aPL 抗体-结合类似物的缀合物，所说的抗体-结合类似物 (a) 特异性结合 aPL 免疫原结合的 B 细胞，(b) 缺乏该免疫原的 T 细胞表位和 (c) 是肽。

2. 权利要求 1 的组合物，其中所说的非免疫原性效价平台分子包括三甘醇。

3. 权利要求 2 的组合物，其中所说的效价平台分子包括 AHAB-三甘醇。

4. 权利要求 2 的组合物，其中所说的效价平台分子包括 DABA-TEG。

5. 权利要求 1 的组合物，其中所说的非免疫原性效价平台分子包括聚乙二醇。

6. 权利要求 1 的组合物，其中所说的效价平台分子包括 DABA-聚乙二醇。

7. 权利要求 1 的组合物，其中所说的非免疫原性效价平台分子包括四氨基苯。

8. 权利要求 1 的组合物，其中所说的非免疫原性效价平台分子包括七氨基β环糊精。

9. 权利要求 1 的组合物，其中所说的非免疫原性效价平台分子包括四氨基季戊四醇。

10. 权利要求 1 的组合物，其中所说的非免疫原性效价平台分子包括 1, 4, 8, 11-四氮杂环十四烷。

11. 权利要求 1 的组合物，其中所说的非免疫原性效价平台分子包括 1, 4, 7, 10-四氮杂环十二烷。

12. 前述权利要求任一项的组合物，其中所说的肽包括序列 CLILAPDRC、CLILTPDRC、CLLLAPDRC、CTILTLDRC、CLVLALDRC、CTILTPDRC、CILLAHDRC、CGNAADARC、CTNWADPRC、CGNIADPRC、CTNLTD SRC、CGNPTDVRC、GILLNEFA、GILTIDNL、GILALDYV、LSDPGYVRNIFH 或 LTDPRYTRDISNFTD。

13. 权利要求 1-11 任一项的组合物, 其中所说的肽包括序列 AGPCLGVLGKLC PG、GPCLGVLGKLC PG、PCLGVLGKLC PG、CLGVLGKLC PG、AGPCLGVLGKL CG 或 CLGVLGKLC。

14. 权利要求 1-11 任一项的组合物, 其中所说的肽含有至少一个脯氨酸, 并且其中 α -甲基脯氨酸取代了至少一个所说的脯氨酸。

15. 权利要求 1-11 任一项的组合物, 其中 D-氨基酸取代了至少一个 L-氨基酸。

16. 权利要求 1-11 任一项的组合物, 其中所说的肽是被二硫键环化的。

17. 权利要求 16 的组合物, 其中硫醚键取代了二硫键。

18. 权利要求 1-11 任一项的组合物, 其中所说的肽包含至少一个亮氨酸, 并且其中异亮氨酸取代了至少一个所说的亮氨酸。

19. 如权利要求 1-18 任一项所定义的组合物在制造用于治疗 aPL 抗体-介导的疾病的药物中的应用。

20. 一种适合于注射给药的制剂, 包括如权利要求 1-18 任一项所定义的缀合物和药物上可接受的载体。

21. 一种制备如权利要求 1 所定义的缀合物的方法, 该方法包括将所述类似物与非免疫原性效价平台分子缀合。

22. 根据权利要求 1-11 任一项的组合物, 其中用具有下式的亲水接头将所述 aPL 抗体-结合类似物与所述效价平台分子缀合:



其中 $n=0-200$; $m=1$ 或 2 ; R^1 =保护基; R^2 =芳基。

23. 权利要求 22 的组合物, 其中所述亲水接头结构式中的 R^1 是三苯甲基。

24. 权利要求 22 或 23 的组合物, 其中所述亲水接头结构式中的 R^2 是 4-硝基苯基。

aPL 免疫反应性肽和其缀合物以及 治疗 aPL 抗体-介导的疾病的方法

发明所属技术领域

本发明属于免疫学领域，同时涉及用于治疗 and 诊断抗磷脂(aPL)抗体-介导的疾病的组合物与方法。具体地说，本发明涉及化学限定的非免疫原性平台分子和 aPL 结合表位的特异性免疫类似物的缀合物以及用以产生这些缀合物的方法和组合物。优化的类似物缺乏 T 细胞表位。此外，本发明涉及用于检测生物样品中抗磷脂抗体的存在和测定其总量的诊断测定方法。本发明也涉及用随机肽文库鉴别 aPL 结合表位的特异性免疫类似物表位的方法。

发明背景

抗磷脂抗体发生在自身免疫疾病(如全身红斑狼疮症(SLE)和抗磷脂抗体综合症(APS)以及与感染和药物疗法联系的病症)中。APS 的特性为具有一个或更多临床特征(如动脉或静脉血栓，血小板减少和胎丧失)。APS 是基本的，或者它可能与其它病症相联系(主要是 SLE)。(《磷脂结合抗体》(Harris 等，eds., CRC 出版社，Boca Raton, FL, 1991); McNeil 等，免疫学进展杂志，49 卷，193-281 页(Austen 等，eds., 学院出版社，圣地亚哥，CA, 1991))。近 30-40%的 SLE 患者有 aPL，而 50%的带 aPL 抗体的病人却缺乏 SLE。这 50%的病人可能患有其它的自身免疫风湿疾病，或各种各样的病症，或者它们可能已经接受了药物(特别是氯丙嗪)治疗。在对 70 位(26 位男性和 44 位女性)原发性 APS(PAPS)(但无证据表明有 SLE)的患者的一项研究中，观察到下列特征：患深静脉血栓症(DVT)的有 31 位；得动脉闭塞(特别是中风或者是瞬时局部缺血)有 31 位；患心肌梗塞的 15 位；患习惯性流产 (fetal loss) 的 24 位；患血小板减少症(TCP)的 32 位；10 位的 Coomb 氏测验呈阳性；患 Evans 氏综合症的有 7 位；

32 位有抗核抗体(ANA), 但其中 29 位不到 1:160; 大约 24 位有抗线粒体抗体(AMA)(McNeil 等, 同上)。只是在所有中风患者大约 5%中估测有变化, aPL 抗体被认为是一个重要的起作用的因子。

短暂存在的 aPL 抗体, 如那些在 VDRL 试验中检测到的, 发生在许多感染期间。大约 30%的有永久 aPL 抗体的病人曾得过血栓病。aPL 抗体的存在可在 SLE 患者群内定义一组病人, 他们表现出包括一个或更多个血栓症、TCP 和流产等临床特征的综合症。在 SLE 中得这种综合症的危险总体来说大约是 25%; 在 aPL 抗体存在时危险性增加到 40%, 而在它们不存在时危险性减少至 15%。因为 aPL 抗体被认为是针对原生质膜中的磷脂的, 人们假设它可能通过干扰在细胞(如血小板或者是内皮细胞)的磷脂膜上发生的止血过程在活体中产生直接致病效果。在 PAPS 患者中, aPL 抗体看来是存在的唯一危险因子这一事实进一步证明了这些抗体有直接致病作用(Bakimer 等, 1992, J. Clin. Invest. 89: 1558-1563; Blank 等, 1991, 美国科学院学报, 88:3069-3073)。

在临床环境中的 aPL 抗体测量仍然不完善。一套可供使用的商业标准抗血清(APL 诊断公司, Louisville, KY)可产生标准曲线以用于比较在各种实验室进行测定。然而, 关于确切的 GPL 和 MPL, IgG 和 IgM 抗磷脂抗体的测量单位, 对所给血清的等级分类和分为高、中、低滴定率的 GPL 和 MPL 的级别, 在这些实验室各自获得的结果间有很多的不一致性。可供使用的商业试剂盒在商业可供使用的标准分配的值上变化很大(Reber 等(1995), 血栓形成和止血剂 73: 444-452)。尽管有这些局限性, 一般认为, 受在 APS, PAPS 和其它 aPL 抗体-介导的疾病(包括周期性中风和周期性流产)中抗体识别的表位位于 β_2 -GPI 的第 5 域中, 并且在 β_2 -GPI 与心磷脂结合后暴露给抗体。

现在人们一般地接受是 aPL 抗体识别由 β_2 -糖蛋白(β_2 -GPI)和带负电磷脂(例如心磷脂)构成的抗抗原复合体(McNeil 等(1990) 美国科学院学报, 87: 4120-4124; Galli(1990) Lancet I: 1544-1547)(在下文为“aPL 免疫原”)。 β_2 -GPI 是所发现的游离的较小血浆糖蛋白与脂蛋白脂类相联系, 它也叫作载脂蛋白 H(ape H)。它由被称作 Sushi 的 5 个独立折叠域或者是与其它蛋白质中类似域相似的短的共有重复域构成。已有报道 β_2 -GPI 在结

合磷脂上经历了抗抗原的和构造上的变化(Wagenknecht 等(1993)血栓形成和止血剂 69: 361-365; Jones 等(1992)第5届抗磷脂抗体国际会议议程(摘要5)).第5个域包含脂类结合和aPL抗体结合的假定位点(Hunt J. 和 S. Krilis(1994)免疫学杂志 152: 653-659; Lauer 等(1993)免疫学 80: 22-28)。关于aPL的病理机制是未知的(McNeil 等, 同上)。大多数解释援引内皮细胞功能或者是血小板介入(Haselaar 等(1990)血栓形成和止血剂 63: 169-173)。这些解释提出在血管内皮细胞伤害或者是血小板激活后, 向原生质暴露表面的阴离子磷脂的暴露或转双面迁移可能会导致 β_2 -GPI结合和引发aPL抗体形成。

aPL 抗体可能通过减少前列环素形成而直接起原血栓形成作用的(Vermeylen, J. 和 J. Arnout(1992)临床实验室医学杂志 120: 10-12); 通过直接干扰凝结蛋白质的作用; 或者是通过封阻 β_2 -GPI 的能力来抑制内在的血液凝固途径, 血小板凝血原酶活性, 和腺苷二磷酸(ADP)调解的血小板聚合(Arvieux 等(1993)血栓形成和止血剂 60: 336-341)。

提供巨大的分子多样性的组合文库已经是在搜索铅化化合物的药物化学中的一种主要的新工具。分子多样性可以从化学合成或生物系统中产生(Scott, J.K.[合理的药物设计](CRC 出版社, Weiner, D. B. 和 W.V. Williams, eds., Boca, Raton, FL., 1994); Moos 等(1993)药物化学年报 28: 315-324)。通过在丝状噬菌体的表面显示随机肽, 人们已经创造了包含用临床的显著抗体来进行检测的数以亿计的克隆的表位文库(Scott, J.K. 和 G.P. Smith(1990)科学 249: 286-390; Cesareni, G.(1992)FEBS Lett. 307: 66-70)。通过把随机化的寡核苷酸序列(通常是pIII 基因, 该基因编码每个噬菌体表面上的单一肽序列)结合到噬菌体基因组中来制备这样的噬菌体文库。在亲和纯化和扩增的顺序循环之后, 结合抗体的那些噬菌体在大肠杆菌和通过测序病毒脱氧核糖核酸(DNA)的相应编码区鉴别的结合肽中得到增殖。在大多数情况下, 随后的研究将涉及相应的合成肽(在建立它们结合抗体的能力之后)。基于噬菌体的文库已用来模仿不连续的表位(Luzzago 等(1993)基因杂志 128: 51-57; BaLass 等(1993)美国科学院学报, 90: 10638-10642)。基于肽-的药物的潜在的血浆不稳定性已经成功地通过 N-末端封阻或者是正确的使用氨基酸类似物得到

克服(Powell, M.F.(1993)药物化学年报 28: 285-293)。

现在缺乏对显示 aPL 抗体高效价的患者的特异性免疫疗法。已经证明在许多用药(如阿斯匹林, 甾类化合物, 和华法令)的情况很大程度上不充分([磷脂-结合抗体](Harris 等, eds., CRC 出版社, Boca Raton, FL, 1991); McNeil 等, 同上)。合成的模拟肽, 其特征是(i)不能激活 T 细胞, 但(ii)保持结合免疫 B 细胞的能力, 用于以抗原-特定的方式耐受 B 细胞。这项技术公开在共有的共同未决美国专利申请 08/118,055(申请于 1993 年 9 月 8 日)和美国专利 5,268,454 中, 在本文中一并参考。如以上所引用的申请与专利中公开的, 如在以上应用和专利中公开的 B 细胞耐受力限制了缀合到多价的, 稳定的, 非免疫原性平台的肽的施用, 通过 B 细胞无变应性或交叉连接免疫球蛋白后的克隆缺失废除抗体的产生。

虽然 aPL 抗体识别的靶表位的确切的分子性质是未知的, 利用从表位文库所衍生的肽将允许成功的构建耐受原。用于与人类全身红斑狼疮有关的肾炎的治疗的 B 细胞耐受原也曾是在共有的美国专利 5,276,013 和 5,162,515 中公开, 它们的全部在本文一并参考。

发明描述

本发明在于发现了一种利用随机肽噬菌体文库, 用于鉴别在患者(患有 PAPS、APS 和其它 aPL 抗体-介导的疾病, 如周期性中风和习惯性流产)中 aPL 抗体识别的关键表位的类似物的方法。

因此, 本发明的一个方面是用于筛选随机肽噬菌体文库以鉴别充分模拟由 aPL 抗体识别的表位肽序列的一种改进的方法。该方法包括的步骤如下: (a)用在本领域中那些已知的修改的方法生物淘选 (biopanning) 所说的文库; (b)通过微淘选筛选 (micropanning) 自步骤(a)的噬菌体除去结合很弱的噬菌体: 通过(i)在涂布有结合到蛋白质 G 的 aPL 抗体微型板孔中培养噬菌体, (ii)洗涤微型板孔移去未结合的噬菌体, (iii)洗脱结合的噬菌体, 并且(iv)用所洗脱的噬菌体感染微生物如大肠杆菌, 通过涂布在琼脂上以计算被感染过的微生物的数量; (c)通过噬菌体俘获 ELISA 的评价确定在 (b)中回收的最强结合克隆: 通过(i)把微型板面的孔涂布上一层 aPL 抗体, (ii)在所涂布的孔中温育通过在 (b)中微淘选鉴别的最强结合克隆, 并且洗掉

未结合噬菌体, (iii)在比色 ELISA 测定中利用酶-缀合山羊-抗噬菌体抗体定量结合至抗体上的噬菌体, 如果鉴别到若干相同强结合的克隆, 则附加一次(d)在最强结合噬菌体-俘获-ELISA 克隆上进行噬菌体-ELISA。

在这一点上, 本发明包括用于鉴别特异性结合分离自患有 aPL 抗体-介导的疾病的人类 aPL 抗体之表位类似物的方法, 该方法包括: (a)制备噬菌体随机肽文库; (b)筛选所说的具有 aPL 抗体的文库, 以鉴别 aPL 模拟肽, 其中所说的筛选包括: (i)通过生物淘选筛选所说的文库; (ii)通过微淘选筛选经(i)中的生物淘选分离的噬菌体; 并且(iii)通过免疫测定鉴别在(ii)中回收的包含 aPL 抗体高亲和性结合肽的噬菌体。

本发明也包括一种生物淘选噬菌体随机肽文库以鉴别和分离结合到 aPL 抗体上的肽的方法, 该方法包括: (a)使亲和纯化的 aPL 抗体与携带随机肽插入物的噬菌体反应; (b)回收携带有结合到 aPL 抗体上的随机肽插入物的噬菌体; (c)用在(b)中回收的噬菌体感染微生物; 和(d)在包含抗生素的培养基中培养感染过的微生物以分离噬菌体。

本发明还包括一种微淘选噬菌体随机肽文库以鉴别和分离具有对 aPL 抗体的高结合亲和性的肽的方法, 该方法包括: (a)通过生物淘选分离携带随机肽插入物的噬菌体; (b)在涂布有结合到蛋白质 G 上的 aPL 抗体的微型板孔中培养步骤(a)中回收的噬菌体; (c)洗涤微型板孔, 除去未结合的噬菌体; (d)洗脱结合的噬菌体; (e)用在(d)中回收的噬菌体感染微生物; 和(f)在包含抗生素的培养基中培养感染过的微生物以分离噬菌体。

本发明也包括上述所描述的方法, 其中免疫测定是噬菌体-俘获 ELISA, 该方法包括: (a)在涂布有 aPL 抗体的微型板孔中, 培养通过微淘选分离的携带随机肽插入物的噬菌体; (b)洗掉未结合噬菌体; (c)在孔中温育酶-标记的抗噬菌体抗体; (d)洗掉未结合的酶-标记的抗噬菌体抗体; (e)添加比色 (colorimetric) 底物; 和(f)测量底物的吸收率, 以鉴别高亲和性-结合噬菌体。

也包括在本发明中的是以上所述的方法, 并且还包括进行附加的高亲和性结合噬菌体的噬菌体-俘获 ELISA 测定, 该方法包括: (a)在微型板孔上涂布上相同数量的噬菌体; (b)在孔中温育 aPL 抗体; (c)洗掉未结合抗体; (e)用结合的 aPL 抗体与酶-标记的-抗-aPL 抗体一起温育; (f)洗掉未结

合的酶-标记的抗-aPL 抗体；(g)将比色底物添加至孔中；(h)测量底物的吸收率，以测量噬菌体的相关的结合亲和性。

本发明也包括以上所述的方法，其中所说的免疫测定是一种菌落-印迹免疫测定，该方法包括：(a)在包含琼脂的培养基顶上的硝酸纤维素膜上培养受到携带随机肽插入物的噬菌体感染的微生物；(b)通过在包含琼脂的培养基顶上的第二个硝酸纤维素膜上印迹微生物来复制转移(a)中培养的微生物；(c)培养转移的微生物；(d)裂解所说的微生物；(e)以溶菌酶消化微生物；(f)以明胶溶液封阻膜；(g)将 aPL 抗体与膜一起温育；(h)洗掉未结合的 aPL 抗体；(i)将硝酸纤维素膜与酶-标记的抗-aPL 抗体一起温育；(j)洗掉未结合的酶-标记的抗-aPL 抗体；(k)添加比色底物；和(l)测量底物的吸收率以鉴别高亲和性结合的噬菌体。

本发明也包括一种用于测定和分级亲和-结合特征表位的方法，所说的表位特异性结合分离自患有 aPL 抗体-介导的疾病的患者的 aPL 抗体，该方法包括：(a)用心磷脂涂布微滴板的孔；(b)添加成年牛或人类血清，其作为结合到心磷脂上的 β 2-GPI 源，并阻止非特异性结合到平板的孔上；(c)温育单节类似物溶液和高-效价 aPL 抗体一段预定的时间；(d)向微滴板孔中添加 aPL 抗体/类似物混合物并温育一段预定的时间；(e)洗涤孔以洗掉未结合 aPL 抗体；(f)将与标记缀合的抗-人类 IgG 添加到平板孔中，培养一段预定的时间；(g)洗涤孔以洗掉未结合的抗-人类 IgG 缀合物；(h)添加标记的缀合物的底物，进行底物/标记反应一段预定的时间；(i)测量底物/标记反应的最终-产物，并以数量表示结合至孔上的 aPL 抗体的量；(j)计算 aPL 抗体结合的抑制(如果有的话)百分比，以确定类似物对 aPL 抗体的亲和性。

本发明也包括一种用于确定从怀疑患有 aPL 抗体-介导的疾病的患者取得的体液中 aPL 抗体存在的诊断免疫测定法，该测定法包括将特异性结合 aPL 抗体的表位类似物与体液样品接触，并通过本领域所熟知的方法来确定 aPL 抗体是否在体液中存在，如果存在，用数量表示在液体中存在的 aPL 抗体的量。一个这样的免疫测定法包括：(a)用特异性结合 aPL 抗体的表位的类似物涂布在微滴板的孔上；(b)洗涤孔以洗掉未结合类似物；(c)将体液试验样品添加至孔中，并温育一段预定的时间；(d)洗涤孔以除去未结合的试验样品；(e)将与标记缀合的抗-人类 IgG 添加到平板孔中，温育一

段预定的时间；(f)洗涤孔以洗掉未结合的抗-人类 IgG 缀合物；(g)添加标记的缀合物的底物，并进行底物/标记反应一段预定的时间；(h)测量底物/标记反应的最终-产物，以确定抗-aPL 抗体在试验样品中的存在。本发明也包括一种如上所述的其中的免疫测定是定量的诊断免疫测定法。

噬菌体-ELISA 测定包括：(i)在微滴板的孔上涂布上相同量的不同的克隆，随后(ii)通过在孔中添加抗体以鉴别孔最强地结合 aPL 抗体的肽插入物，并且用酶-标记抗-人类 IgG 缀合物进行该反应。如噬菌体-ELISA，菌落印迹或者是噬菌体-俘获-ELISA 测量的，对 aPL 抗体具有高亲和性的噬菌体所显示的随机肽，代表着 aPL-特定的表位类似物。然后合成这些肽并用竞争测定法按结合强度分成等级。

本发明的另一个方面是特异性结合到由 aPL 表位结合的 B 细胞的 aPL 抗体结合类似物。优化的类似物缺乏 T 细胞表位。

本发明的另一个方面是引发特定的对 aPL 免疫原的 B 细胞耐性的组合物，该组合物包含非免疫原性平台（platform）分子和 aPL 抗体结合类似物的缀合物，所说的抗体-结合类似物(a)特异性结合 aPL 免疫原结合于其上的 B 细胞和(b)缺乏 T 细胞表位。

附图简要说明

图 1 显示了一个市售的 aPL 抗体标准的 ELISA 测定中鱼明胶取代成年牛血清废除了所有抗心磷脂(ACA)活性。这项结果支持了 McNeil 等，同上，和 Galli 等，同上的研究结果，注意到在定义 ACA 的靶表位中 β_2 -糖蛋白 I 的(β_2 -GPI)重要性。

图 2 显示了免疫特异性结合到亲和-纯化的 IgG 上的命名为 ACA-6501 的树脂-结合类似物 5A12。

图 3 说明了来源于用结合 aPL 抗血清但是不结合正常的血清的 ACA-6626 筛选的 aPL 抗体-结合类似物。

图 4 也说明了免疫特异性结合 ACA-6501 抗血清，并且与 ACA-6626 有交叉反应的 ACA6501/5A12 类似物。

图 4 和 5，说明当 ACA6501/5A12 和 ACA6626/4D3 aPL 抗体结合类似物来源于用在本发明之内的方法(优选地结合筛选抗体)筛选时，检测到明

显程度的交叉反应。

图 6 说明用于计算 ACA-6501aPL 抗体的 GPL 得分的方法。

图 7 显示与 GPL 标准的血清相比的亲水性-分离的 ACA-6501 活性。

图 8 说明通过第四轮生物淘选在分离的序列多样性的明显下降。

图 9 说明三个克隆(3A12、3B3 和 3A5)在用 ACA-6635 的噬菌体-俘获 ELISA 中显示出很强的特异性免疫信号,而所有所试验的克隆与正常的 IgG 缺乏反应。

图 10 显示了在用 ACA-6501 的噬菌体-ELISA 中七个克隆显示的强的信号。

图 11 显示了用 ACA-6501 的从肽 5A12、CB2 和 3B10 得到的竞争-结合 ELISA 的结果。0.16 μg 的肽 5A12 产生对 ACA6501aPL 抗体结合到结合至聚苯乙烯微型板孔的四价肽 ACA6501/3B10 的 50%的抑制,其中需要 0.08 μg CB2 和 0.5 μg 3B10 来产生 50%抑制。

图 12 说明修饰的 ACA6641/3G3 类似物的竞争活性。

图 13 说明在用 ACA-6501 抗体的竞争性-结合 ELISA 中肽 139、142 和 143 的 50%抑制值分别是 6.9、0.7 和 0.9 μg 。

图 14 说明在肽 3B10 中在 3、9 位和 3 与 9 两个位上取代 α -Me-脯氨酸的影响。与“天然”肽比在 9 位 α -Me-脯氨酸的取代增加了四-折叠肽的活性。

图 15 显示了肽 6641/3G3(LJP 688)与九种亲和-纯化的 ACA 抗体高度的交叉反应。

图 16 和 17 显示了在脾细胞分别在 100、20 和 4 μM 的 LJP 685-MTU-DABA-PEG 的缀合物(化合物 36)和 LJP 685-ATU-MTU-AHAB-TEG 缀合物(化合物 35)中培养 2 小时后,用经 LJP 685-KLH 免疫的小鼠脾细胞,在 10^8M 时抗-685 抗体 ABC 剂量-依赖性减弱。

图 18 显示了最靠近所阐明肽 925 的九种结构的质心核磁共振结构,是肽 925 分子形状的合理的代表。

图 19 把肽 925(在图的底部标记,如 3G3)的结构与肽 5A12 的结构相比较。两种肽在肽序列中大约相同的位置都有转折。

图 20A 和 B 说明了 aPL 类似物的药效基因被暂时鉴别为小疏水基团

和带正电的基团。如图 20A 所示肽 925 的 gem-二甲基和氨基基团被暂时鉴别为这个肽的药效基因。在图 20A 中限定了药效基因限制到一些支架上的碳氢化合物接头的长度以及分开这些接头连到支架上的位点的距离。

实施发明的方式

A. 定义

本文中所用的术语“aPL 抗体”指任何可以特异性地结合介导疾病的 β 2-GPI 的抗体。

如本文中所用的术语“B 细胞无反应性”指需要 T 细胞辅助来产生和分泌抗体的那些 B 细胞的不反应性,包括(没有限制)未成熟和(或)成熟 B 细胞的无性系缺失和(或)B 细胞无能力产生抗体。

“不反应性”指对免疫原的体液反应上的一种治疗上有效的降低。数量上的减弱(如在抗体产生上减弱所测量的)至少是 50 %,优选地至少是 75 %,最好为 100 %。

“抗体”指的是 T 细胞依赖性的那些抗体。

如本文中所用的术语“免疫原”是指能引起包含 aPL 抗体的体液免疫反应的实体。免疫原有 B 细胞表位和 T 细胞表位。在 aPL 抗体-介导的病理学中涉及的 aPL 免疫原可能是外部的(对个体是外源的)免疫原如药物,包括对个体是外源的天然生物物质如治疗蛋白质、肽和抗体等或者是自身免疫原(自动免疫原),如与抗体-介导的超凝固性(中风)有关的那些。

术语免疫原的“类似物”指一种分子,该分子(a)特异性地结合到与免疫原特异性地结合的抗体,(b)缺乏 T 细胞表位。尽管类似物通常将是免疫原的片段或者衍生物,由此与免疫原具有相同的化学类别(例如,免疫原是多肽而类似物也是多肽),但化学相似不是必要的。因此,类似物可以是与免疫原相比有不不同的化学类别(如免疫原是碳水化合物而类似物是多肽)而同时它具有以上(a)和(b)的功能特征。类似物可能是肽、碳水化合物、脂类、脂多糖、核酸或其他生化体。另外,为本发明的目的免疫原和类似物的化学结构都不需限定。

术语免疫原的“类似物”也包括术语“模拟表位”。术语“模拟表位”指一种通过竞争阻止抗体结合免疫原的分子。因为它特异性结合所说的抗

体，人们认为模拟表位是模仿了免疫原的抗原决定簇。

本文中用的“效价平台分子”意义为具有有利于一系列免疫原接触的位点的非免疫原性分子。

“非免疫原性”用来描述效价平台分子，同时意指当对个体施用其自身时，效价平台分子表示出缺乏免疫反应。

本文中用“个体”指哺乳动物种类中的一员并且包括人类、类人猿、大鼠和家畜(如牛和羊)、运动动物(如马)和宠物(如狗和猫)。

本文中用的“药效基因”指在 aPL 类似物与抗体靶结合中涉及到的主要的基团的三维方向和化学性质。

B. aPL 抗体结合类似物的鉴别

aPL 抗体结合类似物可以通过筛选候选分子确定他们是否(a)特异性结合到 aPL 抗体上，同时(b)缺乏 T 细胞表位来鉴别。特异性结合 aPL 抗体可以用常规的免疫测定法如下例提到的 ELISA 法，同时 T 细胞表位的存在与否也可由实施例中描述的常规 T 细胞活性测定法确定。在这一点上，“特异性地结合”到免疫原的血清抗体上的类似物显示了其合理的亲和性，例如， 10^7M^{-1} 。T 细胞表位的存在与否也可由在 08 118,055 号中所公开的氘化胸苷结合测定法测定。T 细胞表位的存在也能通过本领域已知的方法测量 T 细胞-来源的淋巴激活素的分泌得到测定。在以上背景下不能引起胸苷的统计学上明显的结合的类似物被认为是缺乏 T 细胞表位的。胸苷结合的量随着免疫原变化将是人们所喜欢的。典型的刺激指数低于 2-3，更常见的是大约 1-2，表明缺乏 T 细胞表位。

C. 缀合物的制备

将 aPL 抗体-结合类似物连接到非免疫原性平台分子上以制备本发明的缀合物。优选的效价平台分子是生物上稳定的，即，它们表现一种从几小时到几天到几个月的活体排泄半寿期以赋予治疗功效，优选的包括限定的组合物的一条合成的单链。它们通常具有的分子量在 200 到 200,000 的范围内，通常大约 200 到 20,000。在本发明中的效价平台分子的例子是聚合物如聚乙烯乙二醇(PEG)，聚-D-赖氨酸，聚乙烯醇和聚乙烯吡咯烷酮。优选的聚合物基于聚乙烯乙二醇(PEGs)，具有大约 200 到大约 8,000 的分子量。

其它适合于在本发明中的使用的效价平台分子是化学限定的，非多聚效价平台分子，这在共有共同未决的美国专利申请 08/152,506(申请于 1993 年 11 月 15 日)中公开；在本文中一并参考。特别优选的同类的化学限定的适合于在本发明之内使用的效价平台分子是衍生的 2,2'-乙烯二氧乙二脂胺(EDDA)和三乙基乙二醇(TEG)。

附加的适合的效价平台分子包括四氨基苯，七氨基 β 环化糊精，t 四氨基季戊四醇，1,4,8,11-四氮杂环十四烷(Cyclam)和 1,4,7,10-四氮杂环十二烷(Cyclen)。

aPL 抗体结合类似物与效价平台分子的缀合可以以任何数量方式起作用，典型地包括一种或更多交叉连接剂以及在类似物和效价平台分子上的功能基团。

多肽类似物包含含有功能基团（如氨基，羧基，或者是巯基基团(作为连接类似物到载体的位点)）的氨基酸的侧链部分。如果类似物还没有这些基团，可以将有这样的功能基团的残基添加到类似物上。这些残基可以通过固相合成技术或者是重组体技术整合，两种技术在肽合成领域中都是已知的。在碳水化合物或者是脂类类似物的情况下，功能性氨基和巯基基团可用常规化学结合整合到其中。例如，主要的氨基基团可通过在可以在氰基硼氢化钠存在下与乙烯二胺反应得到整合而巯基基团则通过半胱胺赖氨酸二盐酸盐的反应与随后的一种标准的二硫化物还原剂的还原引入其中。如果不具有适合的功能基团，按一种类似的方式，效价平台分子也可以衍生出包含功能基团来。

可变长度的亲水接头对把肽或者其它生物活性分子与效价平台分子相连接来说是有用的。适合的接头包括乙二醇的线性低聚物或者是聚合物。这样的接头包括具有式 $R^1S(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2O(CH_2)_mCO^2R^2$ 的接头，其中 $n=0-200$ ， $m=1$ 或 2 ， $R^1=H$ 或一种保护基团如三苯甲基， $R^2=H$ 或烷基或芳基，例如，4-硝基苯基酯。这些接头对于通过硫醚，将包含硫醇反应基团（如卤乙酰、马来酰亚胺等）的分子连接到含有经酰胺键的氨基的第二分子上是有用的。这些接头在连接顺序上是灵活的，即，硫醚可以首先或者是最后形成。

通常配制缀合物供注射施用(例如，腹膜内注射，静脉注射，皮下注射，

肌肉注射, 等)。因此, 典型地是将它们与药学上可接受的载体(如盐水、林格氏溶液、右旋糖溶液等)组合。缀合物通常占制剂重量的大约 0.01% 至 10%。对个体施用的缀合物以“治疗有效的量”, 即, 施用量足以使 B 细胞对所涉及的免疫原无反应性, 并影响所说的抗体-介导的病证的预防、改善或消除。特定的剂量方案(即, 剂量、时间和重复)取决于特殊的个体以及该个体的病史。通常, 对大约 $1\mu\text{g}$ 到 100mg 缀合物/kg 体重的剂量, 优选地, 大约 $100\mu\text{g}$ 到 10mg/kg 体重, 每周给一次。其他合适的用药方案的频度例如每日一次或者是每周 3 个剂量, 或者是每周 1 个剂量, 或者是第 2 周到 4 周 1 个剂量, 或者按月 1 个剂量, 或者根据个体或者是疾病状态采用频度较低的方案。可能需要重复施用(通常根据 B 细胞转换率计时)以完成和/或者是保持体液无反应性状态。如果检测到抗体效价上的增加, 这样的典型地重复施用包括每 30 至 60 天大约 $1\mu\text{g}$ 到 10mg/kg 体重或者更高剂量。另外, 缀合物的持续不断的释放配方可用于一些病态。用于完成持续释放的各种配方和仪器在本领域中也被人们所了解。

抗-辅助 T 细胞治疗可与缀合物一道施用。这样的治疗通常使用抑制 T 细胞的药剂, 如甾类化合物或者是环孢菌素。

D. aPL 抗体的抗原的特性

本发明者在 aPL 抗体上的初始研究与对这些抗体识别的抗抗原位点的特性提出问题的出版物相吻合。最初人们认为这些抗体很象那些在 VDRL 试验中检测到的抗体识别心磷脂分子。如图 1 所示, 在抗心磷脂抗体(ACA)固相 ELISA 中, 以鱼明胶取代成年牛血清从根本上废除了所有作为 ACA 标准的购得的抗体制剂的 ACA 活性。这一发现表明 ACA 抗体识别在血清蛋白质上的决定簇, 如由 McNeil 等, 同上和 Galli 等, 同上所提出的, 而非心磷脂本身。这些作者显示的这个蛋白质是 $\beta 2\text{-GPI}$, 这样, 术语“ACA”或者是“抗心磷脂抗体”实际是用词不当, 但是今天仍然用来指这些抗体。

自身免疫的大多数, IgG aPL 抗体识别在 $\beta 2\text{-GPI}$ 分子上的决定簇。这些表位仅仅在它与心磷脂结合时才形成或者是暴露在 $\beta 2\text{-GPI}$ 上(neo 表位)。另外, 在 $\beta 2\text{-GPI}$ 上的表位存在于每一个 $\beta 2\text{-GPI}$ 分子的单个拷贝之中, 并且可以对 aPL 抗体有较低的亲和性。保持抗体-抗原相互作用的足够亲合力只有通过由它们结合到心磷脂上排列在邻近 $\beta 2\text{-GPI}$ 上这两个位点

达到。

在本发明(模拟天然 B2-GPI 的表位)之内通过对 aPL 类似物的核磁共振分析得到了 β 2-GPI 表位结构的更深入的了解。例如,通过对与 aPL 抗体的高度交叉反应的两种肽 aPL 类似物的核磁共振溶液结构的比较显示,在肽序列中,两种肽都在大约相同的位置具有转折(turn)(参见图 18 和 19)。

E. ACA ELISA

与临床样品的 GPL 得分关连的大规模检验和研究抗体与 β 2-GPI 的层析纯化的必要性导致开发了一种功能上与一套市售的试剂盒近一致并且与发现具有最佳可再现性(Reber 等, 同上)的设计相似的用于 aPL 抗体的 ELISA 测定法。

F. aPL 抗体的免疫亲和纯化

为了分离 aPL 抗体,将多层状、包含心磷脂的弥散体(脂质体;也包含胆甾醇和三十二烷基磷酸盐)与 aPL 血浆(或者是血清)一起温育。这些脂质体是通过离心从血清中沉淀得到的。在洗涤后,脂质体混合物由 2% 辛基葡萄糖苷去垢剂破坏,并且用于蛋白质 A-琼脂糖柱。接着充分洗涤首先除去脂类,然后除去非 IgG 组分,用温和的酸把 IgG aPL 抗体从蛋白质 A 中洗脱,中和,进行缓冲液交换,并在 ACA ELISA 中测验。如以兔 IgG - 抗人类 β 2-GPI 抗血清进行的 Western 印迹法所示,这一方法产生的 aPL 抗体达 10,000-倍,对 β 2-GPI 没有任何污染。

G. 丝状噬菌体随机肽文库的构建

在 p-III 蛋白质上构建十一个不同的 flJSE 5 丝状噬菌体随机肽文库得到构建(每噬菌体 5 个具有肽的 p-III 拷贝)。这些文库为拟表位的发现提供了一个巨大形状和结构组。4 个文库,指定为“x”文库,具有肽插入物(长度分别是 8、10、12 和 15 个残基),并且在氨基和羧基末端侧面上有脯氨酸残基。这些脯氨酸残基的作用在于破坏任何对二级结构的贡献(可能从天然 P-III 蛋白质产生并使插入物进入溶剂)。“y'”文库包含 6、7、8、9、11 和 13 个氨基酸长的半胱氨酸-结合插入物。除了缺乏 6 和 8 个氨基酸的插入物外,“y”文库与“y'”文库相同。这些为“y”和“y'”文库的肽插入物在氨基和羧基末端由半胱氨酸残基侧翼,形成环状更坚固

的结构。由于类似于以上的那些“x”文库的理由，脯氨酸残基结合到这些半胱氨酸残基外部。“x”、“y¹”和“y”文库定位在天然的 p-III 蛋白质的氨基末端的 5 个残基。“z”文库包括定位于 P-III 蛋白质的氨基末端的随机的 8 个插入物，并且不包含任何侧翼脯氨酸或者是半胱氨酸残基。“x”、“y¹”和“z”文库的组合代表了十一个不同的文库，其中每个有大约一百万个不同的肽插入物。

通过利用标准的分子生物学技术将合适长度的随机寡核苷酸序列渗入，以给出插入进 fUSE 的 P-III 基因的所需长度来构建这些文库。在 fUSE 5DNA 的限制性核酸内切酶消化之后，加入超量的作为缺口双链体的激酶寡核苷酸并连接。将 DNA 电穿孔进大肠杆菌并通过在四环素培养基中培养选择插入物。从上清液分离这种培养物的噬菌体(包含肽插入物)，并在缓冲液中洗涤和再悬浮。典型地文库显示在每 mL 8×10^{12} 转导单位下具有 7×10^{12} 个独立克隆。

H. 噬菌体-筛选方法

筛选噬菌体的本质显示肽文库具有将几十亿潜在的候选噬菌体减少到相对极少的具有显著的性质能力。原来的筛选方案(由 Scott, J. K. 和 G. P. Smith 推荐, (1990)科学杂志 249: 315-324)经过大的修改有利选择各种 aPL 抗体的最好的表位。设计这些程序使选择更加严格，当筛选进行直到达到某一点时，其中代表最好的序列的一定数量的有用的克隆可以得到全面的研究。对一些抗体，文库看来似乎没有可以结合很紧的序列，如果用高度严格的方法筛选，则不存在特异性的克隆。在另一方面，所说的文库经常产生许多代表所说抗原的好类似物的克隆，同时有必要使用高度严格的方法来鉴别最好的表位。由于这一原因，开发了不同严格程度的测定法，以从表位文库筛选中鉴别最好的表位。测定按增加的严格程度在这里列出：生物淘选 < 微淘选 < 噬菌体-俘获 ELISA < 噬菌体 ELISA = 菌落印迹 = 肽 ELISA。

(i) 生物淘选

“生物淘选”描述了这样的技术，其中，使亲和-纯化的 aPL 抗体和携带随机肽插入物的噬菌体混合，接着，抗体-特异性回收俘获结合的噬菌体。噬菌体赋予在四环素培养基中培养然后分离的大肠杆菌的四环素抗性，然

后分离。多轮生物淘选增加了样品中特异性免疫噬菌体的数量。噬菌体总是在 3 至 5 轮选择后得到回收，但是可以仅代表对选择的抗体以低亲和性非特异性结合的序列。用于进一步评价这些噬菌体(微淘选)的方法是需要

(ii)微淘选

噬菌体结合 aPL 抗体的相对强度的估计可以通过“微淘选”来进行。微淘选是 3 轮或是更多轮生物淘选后进行的并且与生物淘选方法使用相同的抗体。该方法包括稀释来自生物淘选的最后轮的噬菌体，通过微淘选对 50 或更多个这样的克隆进行分析。通过使每个克隆增长到相似的密度，并且在预先涂布有常量抗体的微量滴定孔中培养以理想的单一浓度下稀释的噬菌体来完成微淘选。噬菌体的最理想的单一浓度是最有可能揭示微淘选得分的最宽的范围(从 0 到 4+)的那一浓度，这样使得在测验的克隆中间有最大的差别。它是基于所选择的 6 个随机选择的克隆的微淘选行为，其中的得分是由系列稀释获得的每噬菌体浓度确定的。在与抗体一起培养之后，未结合的噬菌体被洗掉，同时结合噬菌体的量用作为抗体的噬菌体插入物的亲和性的指示。结合噬菌体的量是由温和的酸洗脱随后中和并以大肠杆菌感染确定的。通过将该微生物涂布在含四环素的琼脂平板上，然后确定每克隆达到的菌落密度，对感染的大肠杆菌的数量进行定量。

(iii)噬菌体-俘获 ELISA

进行噬菌体-俘获 ELISA 试验是为了提供一种中间的水平测定来为比较低的严格微淘选测定和高的严格噬菌体-或者是肽-ELISA 测定之间的间隙搭桥。初步的研究显示通过微淘选(但是没有通过噬菌体-ELISA 或者是肽-ELISA)一些抗体制剂给出太多阳性克隆。以下所描述的噬菌体-ELISA 的限制是只有 P-III 的五个拷贝位于每个噬菌体中，并且即使是以大量噬菌体涂布在孔上，插入物的极少拷贝被代表，并且检测需要抗体有对插入物十分高的亲和性。通过噬菌体-俘获 ELISA，信号扩增许多倍从而有利于低亲和性的检测以及所说抗体与插入物之间的稳定的相互作用。

噬菌体-俘获 ELISA 包括下列步骤。将微量滴定孔涂布上 aPL 抗体和如在微淘选测定添加噬菌体克隆。未结合噬菌体被洗掉，利用结合噬菌体的大多数外壳蛋白的酶-缀合山羊抗血清来量化结合噬菌体的量。用噬菌

体-俘获 ELISA 筛选的噬菌体与许多 aPL 抗体反应，在随后进行的 ELISA 测定中提供强的信号。这一敏感的中间水平使得肽合成更为有效率，因为极少微淘选-阳性噬菌体是噬菌体-俘获 ELISA 阳性的。结果是，从阳性的噬菌体-俘获 ELISA 噬菌体合成的肽一般是免疫反应性的。

(iv)噬菌体-ELISA

这种选择噬菌体的方法要求插入物十分紧地结合筛选的抗体。将噬菌体直接涂布在筛选在微滴板的孔上，与筛选的抗体一起培养。随后洗掉未结合的抗体，添加抗-人类 IgG 碱性磷酸酶缀合物以结合任何结合到噬菌体上的 aPL 抗体。按照本领域已知的方法通过在孔中加入比色底物使其与碱性磷酸酶反应来检测 APL 抗体。

(v)菌落印迹

该测定方法使得可以大规模地菌落筛选由生物淘选噬菌体感染的大肠杆菌。这一方法可替代噬菌体-ELISA 来鉴别免疫反应的克隆，并且显示出敏感性上可比较的水平，而不需要在试验前单独的噬菌体克隆的培养。在这种测定中，将受到来源于一轮生物淘选的噬菌体感染的大肠杆菌扩散在一个大直径的硝酸纤维素(NC)膜上并且在含四环素的琼脂平面的表面上隔夜培养(Barbs 等(1991)美国科学院学报 USA 88: 7978-7982)。每个菌落从经含有同一的序列的噬菌体感染产生。用这种 NC “master” 在 NC 上制出若干复制转移印迹并允许在琼脂平面的表面上生长。在菌落印迹上的噬菌体感染的菌落的化学和酶促破坏后，可以用一般用于 Western 印迹法的技术检测噬菌体，即，用染色或者是免疫印迹。被封阻的印迹可与筛选 aPL 抗体一起培养。在洗掉未结合的抗体后，添加抗-人类 IgG 辣根过氧化物酶缀合物以结合结合到噬菌体上的任何 aPL 抗体。添加比色底物使得人们可以定位在主平板中的离散的菌落，该菌落代表可被克隆来供进一步研究的特异性免疫噬菌体。

(vi)肽-ELISA

随后的 DNA 测序用来确定以上描述的测定方法中最佳-反应的噬菌体的肽插入物序列，用本领域已知的标准的 Fmoc 肽化学制造相应的肽。对于肽-ELISA 测定，肽可以制造出来，例如，如出现分支四价分子，即，每个分子有插入物的四个拷贝。这样一种分子能涂布在微滴板的孔上，并

且仍然使表位向溶液暴露允许由抗体结合。通过渗入赖氨酸作为头两个连接的支点合成四价肽，此类似于用于多抗原肽类(MAPS)的方法(Posnett 等(1988)生物化学杂志 263 : 1719-1725)。将由甘氨酸-丝氨酸-甘氨酸-丝氨酸组成的间隔添加在赖氨酸之后的每个臂上，然后添加插入物(包括在噬菌体中所发现的框架氨基酸，在羧基末端的脯氨酸-甘氨酸，和在氨基末端的丙氨酸-甘氨酸-脯氨酸)。利用标准的 Fmoc 方法将所有在这种合成中的氨基酸一次加入一个。

这些肽由 ELISA 测定，即通过把这些肽涂布在微量滴定的孔上，然后以一种标准的 ELISA 方式用 aPL 抗体测定它们的反应。实际上，肽通常很强地结合在原来的筛选抗体上，同时显示与其它 aPL 抗体的一些交叉反应。包括非 aPL 抗体的对照以除去非特异性结合肽类。

(vii)竞争性结合肽-ELISA

一旦 ELISA-阳性肽类得到鉴别，就有必要量化它们相应的对 aPL 抗体的结合亲和性，同时通过肽-竞争 ELISA 测定确定是否两肽结合给定的病人血清中抗体的相同的群。在这种测定中，各种单节肽与涂布上在微滴板上的四价肽竞争。为完成测定，利用标准的 Fmoc 化学将要评价的肽作为单体合成，即，在四价肽的合成中没有用赖氨酸分支。然后将单节肽纯化，并且在已知浓度中溶解。在微滴板的孔中涂布上已知结合到 aPL 抗体的四价肽。系列稀释的单节肽与恒定量稀释的 aPL 抗体一起温育。aPL 抗体的稀释度预先经滴定四价肽并且在滴定率曲线的下斜部分上选择稀释度来确定。在温育抗体和单节肽一小时后，将抗体/肽溶液添加到微量滴定孔并进行标准的比色 ELISA。减少 aPL 与四价肽结合的每个单节肽的浓度通过画每个孔的比色读数的散点图来测定。50 %的抑制点用作为测量对单节肽的结合的相对强度。

这一测定方法的一个变化是利用涂布上人类 β 2-糖蛋白 I/心磷脂(β 2-GPI/CL)(而不是四价肽)的微滴板，并检验单节肽封阻 aPL 抗体结合到在 β 2-GPI CL 上的表位上的能力。在这种测定中，在优化浓度中耗尽 IgG 的人类血清用作 β 2-GPI 的来源。用类似于用四价肽作为平板底物的测定的方式将单节肽在若干浓度下与优化浓度的 aPL 一起温育。在 aPL/肽(β 2-GPI/CL)上温育后，抗体结合和 50 %抑制所需的肽浓度以如在四价测定中

的半最大吸收率确定。

(viii)以取代和缺失合成评价氨基酸对结合的贡献

耐受诱导所需表位应该尽可能与许多 aPL 抗体有强的相互作用并且不包含任何不必要的残基。为了推导一个表位的最小构造, 制造了每肽的类似物: (i)缺乏所给定的残基的, 例如, 除去在羧基和/或氨基末端的框架残基, 或者(ii)其中的氨基酸的取代已进行的而又不同于在表位文库筛中发现的序列。这些氨基酸取代物也可以天然的, 例如, 亮氨酸的异亮氨酸, 或者是非自然的, 例如, 脯氨酸的 α -甲基脯氨酸。这些缺失和/或者是取代的效果然后由肽-竞争 ELISA 测定。

(ix)通过 β 2-GPI 第 5 域的诱变分组 aPL 血清特性

作为一般有效的耐受原, 它必须结合在大多数患者中的 aPL 抗体的主要部分。确定来自不同的患者的几个抗体是否结合(如其他人提出含有靶表位的) β 2-GPI 的 84 个氨基酸第 5 域的相同残基是重要的。如果几个抗体结合相同残基, 则可以构建来源于肽结构数据中衍生的模拟表位, 它将与所有抗体进行反应。在另一方面, 如果抗体结合不同的残基, 则每个抗体需要单一耐受原。进行定点诱变来鉴别涉及 aPL 抗体结合的关键残基是否存在于 β 2-GPI 的第 5 域中。试验形成的突变 β 2-GPI 与几个 aPL 抗体的反应性。结果是不确定的。包含 β 2-GPI 的第 5 域的融合蛋白质和 glutathione S 转移酶从 A. Steinkasserer 中获得并在大肠杆菌中表达(Steinkasserer 等 (1992)FEBS Lett. 313: 193-197)。在 ACA ELISA 中天然的 β 2-GPI 成功地被这一融合蛋白替代。用标准的定点诱变来进行氨基酸的取代。

I. 合成的 aPL 表位的分离

来自具有 151 GPL 得分(高滴度)并有周期性中风史、流产、狼疮、和三大血管瓣替代的患者的抗体 ACA-6501 在心磷脂脂质体上进行免疫亲和纯化。该抗体用于四个分开的噬菌体文库筛选, 利用 xy、xyz、xy'z 和特殊的 pro/cys-结合的 7-mer 文库, 在以前筛选的基础上, 将精氨酸在第七个位置固定。如表 1 所示, 在微淘选的噬菌体中(从试验的 140 个中)得到了 36 种序列。这些显得十分同源, 同时在位置 6 和 7 的保守 DR 残基非常明显。共有的序列是 CLLAPDRC。尽管有这样的同源性, 但只有 7 个噬菌体(见表 2)在噬菌体-ELISA 比色检验之后为阳性。用亲和纯化的 ACA-

6626(来自有高滴度, 但是比 ACA-6501 的低的病人)筛选 xy`z 噬菌体产生出五种经噬菌体-ELISA 测验的单一序列。没有一种是颜色阳性的, 但是当用化学发光底物进行 ELISA 免疫缀合时, 两个是阳性。与 ACA-6626 联系的序列基序显出相联系但是不同于用 ACA-6501 看到的(见表 3)。两个抗体优选在开放的前结合序列上的 Cys-结合(可能是环化的和受约束的)表位。

表 1

ACA-6501 噬菌体文库序列

克隆	序列	克隆	序列
xy 文库			
2101	CNILVLDRC		
xyz 文库			
5A12	CLILAPDRC	3C10	CILLAKNRC
2D7	CLLLAPDRC	3C5	CIVLVPDRC
3B6	CLVLALDRC	2F4	CLVIALDRC
3E4	CLFVALDRC	5B1	CWFRSQSSC
3E7	CILLAHDRC	3E11	CSPILRGNC
2H1	CHILAPGRC	3E8	CHKFFWLTC
xy`z 文库			
2A10	CTILAPDRC	2D12	CLVLAADRC
2G12	CLLITPDRC	3B10	CLLLAPDRC
2G11	CLLITHDRC	3F2	CFFHFDHSC
2F10	ChTILVLDRC	2D3	CPLHTHTC
2E3	CPLITHDRC		
常规(X) ₆ R 文库			
G11	CTILTTPDRC	1A4	CNLLALDRC
2H5	CTILTTPDRC	2H6	ChTLLAIDRC
2H2	CTILTLDRC	1C3	CLLLAIDRC
2H10	CTLLTPDRC	1D10	CTIITQDRC
2E10	CIQLTPDRC	2H4	CNIITRDRC
1B7	CHLLTPDRC	2G12	CILHAAHRC
2H1	CLILTTPDRC	1A9	CSSKSYWRC
2H12	CSILAPDRC		

表 2

ACA-6501 比色 ELISA-阳性噬菌体

克隆	序列	克隆	序列
5A12	CLILAPDRC	3B6	CLVLALDRC
2H1	CLILTPDRC	2G11	CTILTPDRC
3B10	CLLLAPDRC*	3E7	CILLAHDRC
2H2	CTILTLDRC		

* 对应于共有或平均序列

表 3

ACA-6626 xy`z 噬菌体文库序列

克隆	序列	克隆	序列
4B11	CGNAADARC	4G7	CTNLTD SRC
4D3	CTNWADPRC	4A2	CGNPTDVRC
4C7	CGNIADPRC		

根据本文描述的方法 ACA-6644 是另一个用于筛选混合的 p-III 噬菌体文库的高-滴定 aPL 抗体。发现了以下序列:

ACA 6644/CBc GILLNEFA

ACA 6644/CBd GILTIDNL

ACA 6644/CBf GILALDYV

这些序列都来自组分“z”表位文库, 其在 N-末端缺乏噬菌体框架残基。当作为肽合成时, 这些序列与几种 ACA 血清(包括 ACA-6644 和 ACA-6501)发生免疫反应。分析揭示了与以前用 ACA-6501 获得的序列的出乎意料的同源性, 如表 4 所示。

表 4

ACA-6644/CBd	GILTIDNL
ACA6501/2H2	CTILTLDRC
ACA-6644/CBf	GILALDYV

ACA-6501/2F10	CNILVLDRC
ACA-6644/CBc	GILLNEFA
ACA-6501/1D10	CTIITODRC

来源于由这两种 aPL 抗体筛选的两个十分不同的源文库的趋同序列的同源性表明这些序列可以模仿天然靶抗原中的主要的(可能是免疫决定簇)区域。

用 ACA-6701 对 P-III 文库的筛选产生出有高度的内部同源性的两种单一序列,但是不同于以前以其它 aPL 抗体获得的其它序列。序列如下所示:

ACA-6701/3B1 LSDPGYVRN/FH

ACA-6701/3E1 LTDPRYTRD/ISNFTD

作为树脂-结合肽类,该序列是与亲本血清(ACA-6701)强免疫反应性的,但是与其它 aPL 抗体有最小的交叉-反应。

用亲和纯化的 ACA 抗体对随机的 pIII 噬菌体文库继续的筛选发现了一种肽,针对该肽最初的试验,其对所有九种亲和纯化的 ACA 抗体显示出明显交叉反应。尔后的检验测定了这种肽,具有 AGP-CLGVLGKLC-PG(LJP 688)的 ACA-6641/3G3 是以前发现发现的任何肽中的交叉-反应最高的。当针对 65 种高滴度 ACA 抗血清的进行试验时, 6641/3G3(LJP 688)或者是其截短的形式与这些血清的 93.8%高交叉-反应, 3.1%中度交叉-反应,无交叉反应占 3.1%。对这肽进行化学优化是截短,系统的氨基酸取代,和非二硫化物环化研究所追求的。

从随机噬菌体文库筛选中选择的几个肽的基序如下:

ACA 抗体	噬菌体插入物序列
6501	CLLLAPDRC (3B10)
6626	CTNWADPRC
6641	CLGVLGKLC (3G3)
6644	GILALDYV
6701	LTDPRYTRDISNFTD
6707	CAHPDWDRRC

J. aPL-有关的肽与亲和纯化的 IgG aPL 抗体的免疫反应

在最近开发的用于组合合成肽文库的固相支持物上合成从亲和纯化的 ACA-6501 获得的并发现是呈噬菌体-ELISA 阳性的噬菌体序列。这种支持物是一种 Rapp 树脂, 有高的肽密度并在第一个氨基酸偶联前用亲水聚乙二醇隔离。该合成产生树脂-结合的肽, 该肽用于抗体结合研究十分合适。如图 2 所示, 肽 5A12(序列 CLILAPDRC)明显地优于一种无关的对照肽, 但不显著地结合正常的 IgG。测验其它的噬菌体-ELISA-阳性肽类获得了类似结果。在实验中显示, 通过免疫结合显色反应检测到树脂-结合亲和纯化的 aPL 抗体。

K. aPL 血清抗体与合成的肽的反应性

利用血清树脂-结合肽类能免疫特异性地结合 aPL 的发现显著提高了测验 aPL 抗体的能力。如图 3 所显示的, 来自 ACA-6626 筛选的肽结合 aPL 抗血清但是没有显示正常血清显著的结合。图 3 也说明了 ACA6501-5A12 肽对 aPL 血清的特异性免疫-结合行为。数据中正常血清的结合肽 5A12 是零而没有显示。

L. 合成肽对不是文库筛选抗体来源的 aPL 抗血清的交叉反应

选择两个肽用于 aPL 血清测定, 一个(5A12)代表 ACA-6501 筛选而另一个(4D3)代表 ACA-6626 筛选。如图 4 和 5 中所示, 其中的每个肽都对筛选抗体的亲本血清优先作出反应。然而明显程度的交叉反应特别是在 ACA-6501 和 ACA-6626 之间是可检测的。以 5A12 树脂-结合肽对 19 个患者血清(低或没有 GPL 得分)和 13 个病理血清(GPL 得分从低到高)的研究表明 13 个病理样品中的 8 个有可检测的肽结合而 19 个对照样品显出低的肽结合。这些结合证明合成的肽在中风病人护理中对诊断或者是预诊的测定来说是有用的。

如在上述第一部分指明的, 对一个合成肽, 6641/3G3 针对几个高滴度的 ACA 抗血清进行测定。发现这种肽与测验的大多数 ACA 抗血清有交叉反应(如图 14 中所说明的)。在 1.8mg/mL 完全抑制(>80%)下 6641/3G3 显示出与 10 种 ACA 抗体中的 10 个的剂量-依赖性交叉-反应, 并如下表 5 所示对 ACA 抗体有特异性。

表 5

对 AGP-CLGVLGKLC-PG(LJP 688)的交叉反应数据

带有心磷脂的 ACA 血清/ β 2-GPI-涂布的平板

ACA 血清 Nr	IC50, mg/ml, 对肽 LJP688
[1] 6501RS RFL	10.89, 1.1
[2] 6626 RS	1.09
[3] 6635 RS	1
[4] 6638 RS	0.81
[5] 6641 RS	0.89, 0.51
[6] 6644 RS	0.76
[7] 6701 RS	1.07
[8] 6903 RS	0.8
[9] 7004 RFL	0.67
[10] 7005 RFL	0.75
平均数 $\pm$ 标准差	0.86 $\pm$ 0.16

RS=周期性中风

RFL=习惯性流产

M. 新的合成肽方法

经 aPL 文库筛选的新的候选序列的鉴别需要试验新合成的肽对抗体的结合。用已知的肽取代的 Rapp 树脂，用放射性标记的 aPLIgG 可以实行定量的结合研究（如饱和结合分析和平均测量）。

肽合成使得可以通过选择性合成对模拟表位进行分子详细分析。这包括以增强抗体结合为目标修饰沿链的每个氨基酸。选择性合成揭示在序列中每个氨基酸的相对重要性。如果必要，可以设计在特殊残基位置的选择性的取代以便保持 B 细胞反应而废除在 T 细胞测验中发现的任何 T 细胞增殖反应。

对肽 6641/3G3(LJP)进行一些分析。分析包括在 N-末端和 C-末端切短，二硫化物取代，对在位置 2 到 8 的氨基酸丙氨酸和甘氨酸的取代，在 2、

4、5和8位置上的分支脂族氨基酸的取代,影响肽的构造的氨基酸的取代(包括 α -甲基氨基酸的取代),位置7上碱性氨基酸的取代,位置2-9上D-氨基酸的取代,以及在1到9位置上N- α -甲基氨基酸的取代。这些结果如表8所示。这些取代与切断的结构/活性的关系如表6所示。

表 6

肽 3G3 的优化		总肽														144	
328.96	位置编号	-2	-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	A	B	用 ACA 6301	
截短分析																160.ug/mL	std
	1	A	G	P	C	L	G	V	L	G	K	L	C	P	G	850	
	2		G	P	C	L	G	V	L	G	K	L	C	P	G	180	
	3			P	C	L	G	V	L	G	K	L	C	P	G	420	
	4				C	L	G	V	L	G	K	L	C	P	G	460	
	5	A	G	P	C	L	G	V	L	G	K	L	C	G		450	
	6				C	L	G	V	L	G	K	L	C			10	#908 (LJP 690)
二硫化物取代																	
	1				C	L	G	V	L	G	K	L	C			110	#952 = 100
	2				Hc	L	G	V	L	G	K	L	C			46	
	3				C	L	G	V	L	G	K	L	Hc			92	
	4				Hc	L	G	V	L	G	K	L	Hc			80	
Ala 扫描																	
	1				C	A	G	V	L	G	K	L	C			200	#952 = 80
	2				C	L	A	V	L	G	K	L	C			170	
	3				C	L	G	A	L	G	K	L	C			260	
	4				C	L	G	V	A	G	K	L	C			Inf.	
	5				C	L	G	V	L	A	K	L	C			40	
	6				C	L	G	V	L	G	A	L	C			Inf.	
	7				C	L	G	V	L	G	K	A	C			360	
Gly 扫描																	
	1				C	G	G	V	L	G	K	L	C			310	#952 = 120
	2				C	L	G	G	L	G	K	L	C			Inf.	
	3				C	L	G	V	G	G	K	L	C			Inf.	
	4				C	L	G	V	L	G	G	L	C			Inf.	
	5				C	L	G	V	L	G	K	G	C			500	

序列优化

分支脂族氨基酸

1	C	I	G	V	L	G	K	L	C	60	#910 = 40
2	C	V	G	V	L	G	K	L	C	130	
3	C	M	G	V	L	G	K	L	C		
4	C	Cy	G	V	L	G	K	L	C		
5	C	tL	G	V	L	G	K	L	C		
6	C	mL	G	V	L	G	K	L	C		
7	C	lv	G	V	L	G	K	L	C		
8	C	L	G	L	L	G	K	L	C		
9	C	L	G	I	L	G	K	L	C		
10	C	L	G	M	L	G	K	L	C		
11	C	L	G	Cy	L	G	K	L	C		
12	C	L	G	tL	L	G	K	L	C		
13	C	L	G	mL	L	G	K	L	C		
14	C	L	G	lv	L	G	K	L	C		
15	C	L	G	V	I	G	K	L	C		
16	C	L	G	V	V	G	K	L	C		
17	C	L	G	V	M	G	K	L	C		
18	C	L	G	V	Cy	G	K	L	C		
19	C	L	G	V	Lt	G	K	L	C		
20	C	L	G	V	mL	G	K	L	C		
21	C	L	G	V	lv	G	K	L	C		
22	C	L	G	V	L	G	K	I	C		
23	C	L	G	V	L	G	K	V	C		
24	C	L	G	V	L	G	K	M	C		
25	C	L	G	V	L	G	K	Cy	C		
26	C	L	G	V	L	G	K	tL	C		
27	C	L	G	V	L	G	K	mL	C		
28	C	L	G	V	L	G	K	lv	C		

构象扫描氨基酸

1	C	L	P	V	L	G	K	L	C		
2	C	L	mP	V	L	G	K	L	C		
3	C	L	mA	V	L	G	K	L	C		
4	C	L	cG	V	L	G	K	L	C		
5	C	L	G	V	L	P	K	L	C		
6	C	L	G	V	L	mP	K	L	C		
7	C	L	G	V	L	mA	K	L	C		
8	C	L	G	V	L	cG	K	L	C		
9	C	L	dA	V	L	G	K	L	C		
10	C	L	G	V	L	dA	K	L	C		
11	C	P	G	V	L	G	K	L	C	160	#952 = 100
12	C	L	P	V	L	G	K	L	C	340	(Pro scan)
13	C	L	G	P	L	G	K	L	C	180	
14	C	L	G	V	P	G	K	L	C	Inf.	
15	C	L	G	V	L	P	K	L	C	350	
16	C	L	G	V	L	G	P	L	C	160	
17	C	L	G	V	L	G	K	L	C	650	
18	C	pG	G	V	L	G	K	L	C	130	#910 = 40
19	C	L	pG	V	L	G	K	L	C	70	
20	C	L	G	pG	L	G	K	L	C	70	
21	C	L	G	V	pG	G	K	L	C	35	
22	C	L	G	V	L	pG	K	L	C	30	#910 = 5
23	C	L	G	V	L	G	pG	L	C	230	
24	C	L	G	V	L	G	K	pG	C	80	
α Me AA 25	C	alB	G	V	L	G	K	L	C	370	910 = 40
26	C	L	alB	V	L	G	K	L	C	80	
27	C	L	G	alB	L	G	K	L	C	110	
28	C	L	G	V	alB	G	K	L	C	Inf.	
29	C	L	G	V	L	alB	K	L	C	110	
30	C	L	G	V	L	G	alB	L	C	460	
31	C	L	G	V	L	G	K	alB	C	>470	

碱性氨基酸

1	C	L	G	V	L	G	R	L	C	160	#952 = 120
2	C	L	G	V	L	G	Or	L	C	40	910 = 50
3	C	L	G	V	L	G	mK	L	C		

D 氨基酸 (小写字母 d)

1	dP	C	L	G	V	L	G	K	L	C	120	#952 = 100
2		C	dL	G	V	L	G	K	L	C	180	#952 = 30
3		C	L	G	dV	L	G	K	L	C	260	#952 = 30
4		C	L	G	V	dL	G	K	L	C	230	#952 = 30
5		C	L	G	V	L	G	dK	L	C	170	#952 = 60
6		C	L	G	V	L	G	K	dL	C	140	#952 = 30
7		C	dL	G	dV	L	G	K	L	C		
8		C	dV	G	dV	L	G	K	L	C		
9		C	dL	G	dL	L	G	K	L	C		
10		C	L	G	dV	dL	G	K	L	C	50	#952 = 30
11		C	L	G	dL	dV	G	K	L	C		
12		C	L	G	dV	dV	G	K	L	C		
13		C	L	G	dL	dL	G	K	L	C		
14		C	L	G	V	dL	G	dK	L	C		
15		C	L	G	V	dK	G	dL	L	C		
16		C	L	G	V	dL	G	dL	L	C		
17		C	L	G	V	dK	G	dK	L	C		
18		C	L	G	V	L	G	dK	dL	C	150	#952 = 60
19		C	L	G	V	L	G	dL	dK	C		
20		C	L	G	V	L	G	dK	dK	C		
21		C	L	G	V	L	G	dL	dL	C		
22		C	L	G	V	L	dA	K	L	C	140	#952 = 30
		C	L	G	V	L	G	K	L	dC	140	#952 = 60

氨基酸 (nAA)

1	nC	L	G	V	L	G	K	L	C		
2	C L G V L G K L C										
3	C	L	nG	V	L	G	K	L	C	70	#952 = 60
4	C	L	G	nV	L	G	K	L	C	220	
5	C	L	G	V	nL	G	K	L	C	180	
6	C	L	G	V	L	nG	K	L	C	550	
7	C	L	G	V	L	G	nK	L	C		
8	C	L	G	V	L	G	K	nL	C	240	#952 = 60
9	C	L	G	V	L	G	K	L	nC		

其它

1		C	L	G	V	L	G	K	L	C	ATU-Y	300	#952 = 60
2	Y ATU	C	L	G	V	L	G	K	L	C		170	
3		C	L	G	V	L	G	K	L	C	TGR re	500	
4		C	L	G	V	L	G	K	L	dC	TGR re	620	
5		dC	L	G	V	L	G	K	L	C			
6		dC	L	G	V	L	G	K	L	dC	TGR 树脂		

硫醚:

单一缺失

1	Hc	L	G	V	L	A	K	L	C		
2	Hc		G	V	L	A	K	L	C		
3	Hc	L		V	L	A	K	L	C		
4	Hc	L	G		L	A	K	L	C		
5	Hc	L	G	V		A	K	L	C		
6	Hc	L	G	V	L		K	L	C		
7	Hc	L	G	V	L	A		L	C		
8	Hc	L	G	V	L	A	K		C		

缩小化

1	Hc			V	L	A	K	L	C		
2	Hc				L	A	K	L	C		
3	Hc				L	A	K		C		

分支的

1	Hc	L	G	V	L	G	K	L	Pe		
2	Hc	L	G	V	L	G	K	L	dPe		
3	Pe	L	G	V	L	G	K	L	Hc		
4	dPe	L	G	V	L	G	K	L	Hc		
5	dPe	L	G	V	L	G	K	L	dPe		

D 氨基酸

1	dHc	L	G	V	L	G	K	L	C		
2	dHc	L	G	V	L	G	K	L	dC		
3	Hc	L	G	V	L	G	K	L	dC		

去氨基

1	By	L	G	V	L	G	K	L	Hc
2	By	L	G	V	L	G	K	L	C
3	Pp	L	G	V	L	G	K	L	Hc
4	Pp	L	G	V	L	G	K	L	C

去氨基 HHTe
 去氨基 HCTe
 去氨基 CHTe
 去氨基 CCTe

缩写

Hc 高半胱氨酸
 Cy 环己基丙氨酸
 tL 三级亮氨酸
 mL α -甲基亮氨酸?
 tv α 甲基, α 氨基丁酸?
 mP α -甲基脯氨酸
 mA α -甲基丙氨酸
 aB 氨基异丁酸
 pG 苯基甘氨酸
 cG 环丙基甘氨酸
 dA D丙氨酸
 dP D脯氨酸
 dL D亮氨酸
 dV D缬氨酸
 dK D赖氨酸
 nC N- α -甲基半胱氨酸
 nL N- α -甲基亮氨酸
 nG N-甲基甘氨酸
 IV N- α -甲基缬氨酸
 lK N- α -甲基赖氨酸
 mK N- ϵ -甲基赖氨酸
 Pe 青霉胺
 By 丁酰基
 Pp 丙酰基
 Or 鸟氨酸

表 7
交叉反应的 ACA 表位的结构活性关系

结构	相对活性
AGPCLGVLGKLC _{PG} (3G3)(LJP 688)	100
CLGVLGKLC(LJP 690)	3.5
CLGVLA _K LC	1.8
CLGVLP _G KLC	1.4
CLG _d V _d LGKLC	5.9
HcLGVLGKLC(硫醚)	1.6
SLGVLGKLS	∞
CLGVAGKLC	∞
CLGVLGALC	∞

N.用 α -甲基氨基酸取代提高肽的免疫活性并赋予其对蛋白酶攻击的抗性

脯氨酸残基有一种特殊的重要性，这是因为它们对多肽的链构造的影响。它们经常出现在球状蛋白的表面上的转折处。在本发明的噬菌体表位文库中，所有随机肽插入物侧翼于边界脯氨酸。此外，所发现的具有 ACA-6501 的大多数模拟表位有第三个脯氨酸，这是基于计算机的预测，很有可能作为 β -转折的部分存在。 β -转折模拟物能用来提高在小肽中转折构象的稳定性。这样的模拟物是(S)- α -甲基脯氨酸(α -MePro)，脯氨酸类似物，除此之外能稳定转折构象，赋予其对蛋白酶降解的抗性。蛋白酶抗性对于所设计的在血浆中作用的潜在的药物是一种理想的性质。肽 ACA-6501/3B10 AGPCLLLAPDRCPG(粗体部分为插入物)是一种共有肽。基于与其他 35 个同源序列的比较，它具有的序列特性是在每个位置有最有优势的残基。由于其代表性特征，对其序列进行一些系统的修饰和缺失，因此它的活性通过 aPL 抗体结合来评价。在最重要的发现中脯氨酸在 3 和 9 位置这一发现对活性来说是重要的。脯氨酸来自噬菌体框架而不是随机插入物的一部分。最明显的影响是通过由 MePro 在 9 位置取代脯氨酸获得的。这个取代导致在免疫活性上 6 倍的提高。

在肽 6641/3G3 上进行的 α -甲基和 N- α -甲基氨基酸的取代研究的结果

如上表 6 中所示。

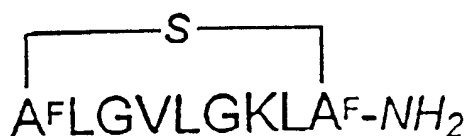
M. 环硫醚类似物的制备

用本发明的方法所鉴别的拟环硫醚能进一步修饰使其含有硫醚取代物。环二硫化物类似物和环硫醚类似物的修饰将延长类似物缀合物的半寿期，因此，需要一个更低的剂量。环硫醚类似物也消除了二硫键交换问题，这种交换经常随环二硫化物多肽发生。此外，环硫醚类似物也可以参与对 T 细胞进行的 MHC II 类呈递，这样，有利于无反应性的诱导。最后，环硫醚类似物在用于效价平台分子缀合物的产生的硫依赖性结合反应中 useful。

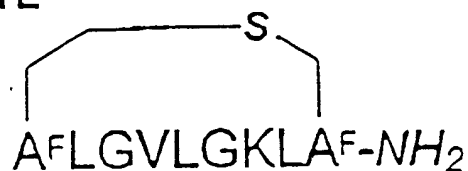
根据在共有共同未决的专利申请（代理人摘要号 252312006600）中描述的方法，其制备了四种环硫醚类似物，在本文中全部一并参考。利用 RinkTM 酰胺 4-甲基苯氢氨基树脂或者是 MBHA 树脂制备 6641/3G3 的全长度肽类似物，并将其转化成氯-肽，从固相载体中切除，然后环化该类似物。详见以下硫醚反应方案。

适合的环硫醚类似物包括以下显示的类似物。

CCTE



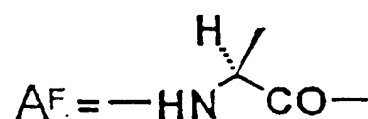
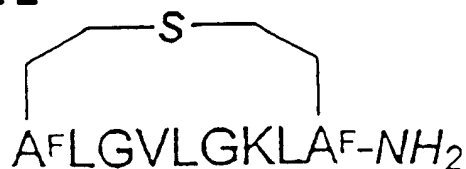
HCTE



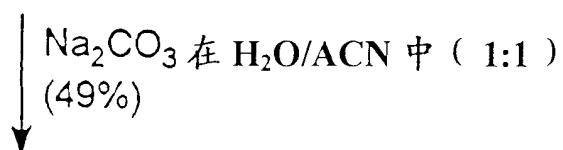
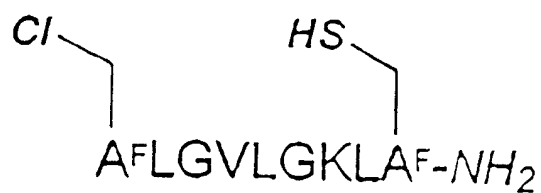
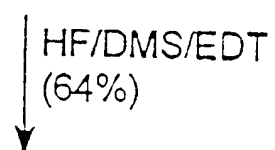
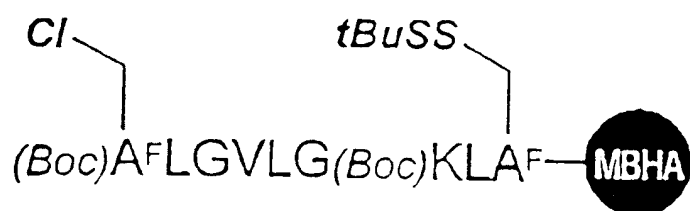
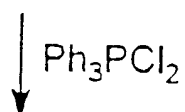
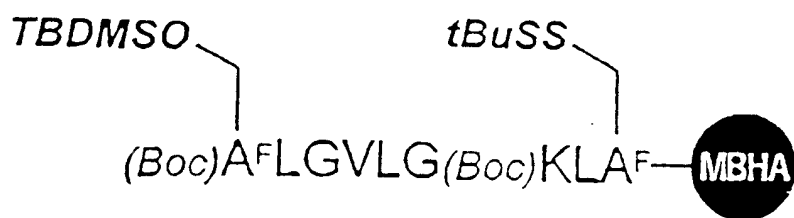
CHTE



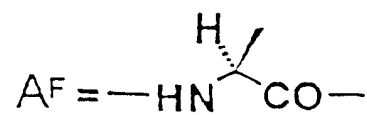
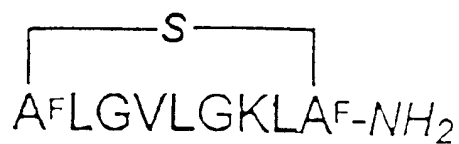
HHTE



环硫醚反应方案 1

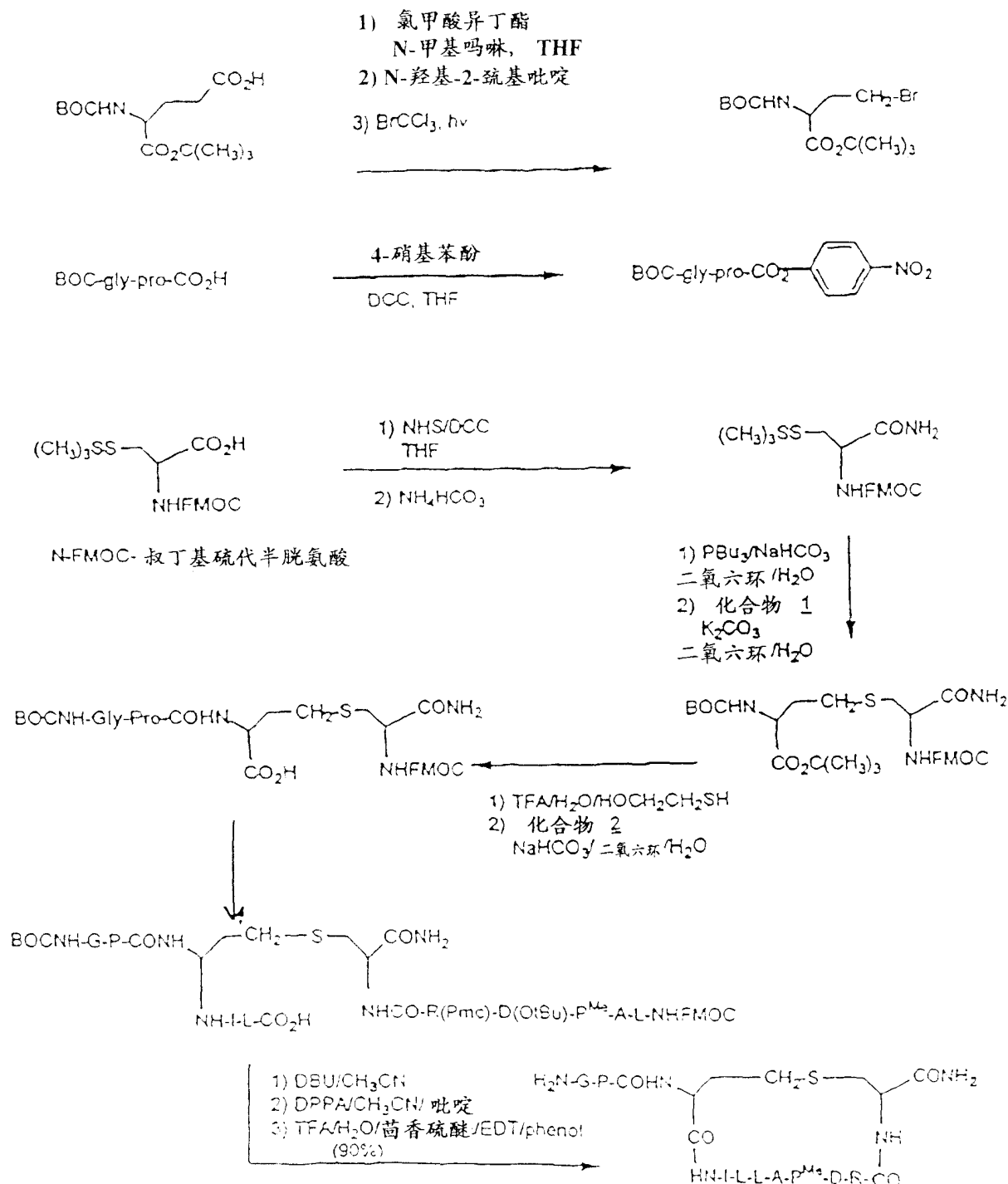


CCTE

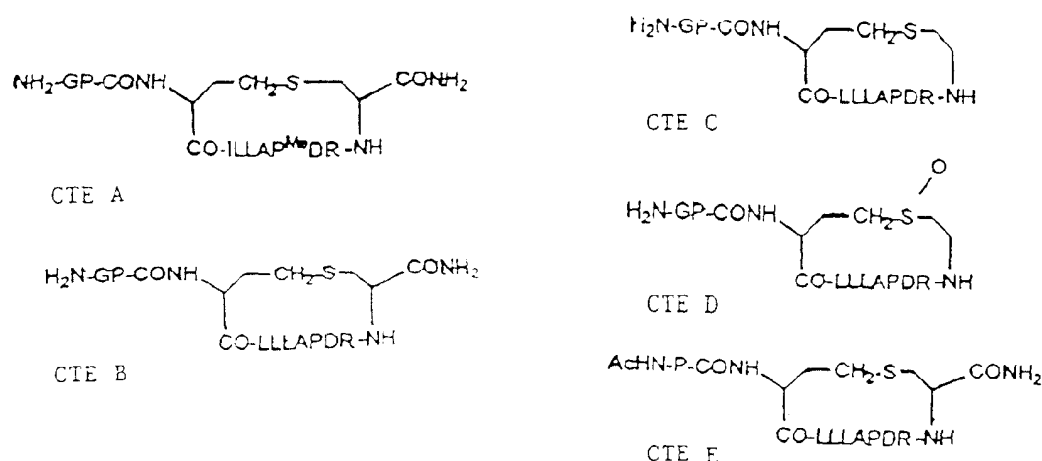


另外，硫醚类似物也可根据以下反应方案制备。

环硫醚反应方案 2



下列类似物代表环硫醚反应方案 2 所制造的类似物。



例证性的环硫醚类似物就针对 ACA 的抗体 ACA 6501 和 ACA 6701 测定其活性。结果如下表 7 所示。

表 7
IC₅₀ 值(μg/0.1mL)

硫醚	ACA6501	ACA6701
CCTE, LJP 698	11.0	5.0
HCTE, LJP 699	4.6	3.0
CHTE, LJP 702	9.2	3.2
HHTE, LJP 703	8.0	3.6
LJP 690	10.0	4.0
CTE A	0.08	
CTE B	0.5	
CTE C	0.9	
CTE D	3.2	
CTE E	6.3	

HCTE 类似物 LJP 699, 优于参考肽 LJP 690, 其是 LJP688 的截短的形式 CLGVLGKLC, LJP 688 的, AGPCLGVLGKLCPG。

本文引用的所有文章、专利和专利申请全部一并参考。下列实施例进一步说明本发明和它的独特性。这些实施例无意以任何方式限制本发明的范围。

实施例

实施例 1：血清 6501 中抗心磷脂抗体(ACA)的测定

以每孔 30 μ L 乙醇中的 50 μ g 心磷脂(西格马化学公司, 圣路易斯, MO)涂布在 Immulon I 微滴板(Dynatech 实验室, Inc., Chantilly, VA)的偶数孔中。将平板在 4 $^{\circ}$ C 下干燥一夜, 并在室温(RT)下在磷酸盐-缓冲盐水(ABS/PBS)中以 200 μ L 10%的成年牛血清(Irvine 科学公司, Santa Ana, CA)封阻 2 小时。在加入 10 μ L aPL 标准和试验血清 ACA-6501 之前, 将平板以 Tris-缓冲盐水(TBS)洗涤 5 次。根据制造厂商的说明重建该 aPL 标准(APL 诊断公司, Louisville, KY), 并用 10% ABS-PBS 将其稀释至 1:50。将试验血清 ACA-6501 用 10%的 ABS-PBS 连续稀释(从 1:50 到 1:2,000), 将其加到选择的重复的孔中并在室温下温育 2 小时。将平板用 TBS 和 100 μ L 的 1:1,000 的山羊-抗人类-IgG/碱性磷酸酶缀合物(Zymed, 南旧金山, CA, Cat. 62,8422 号)洗涤 5 次, 加入 10% ABS-PBS 并在室温下温育 1 小时。将平板用 TBS 再洗涤 5 次并通过添加 100 μ L 酚酞脱氧次黄苷酸(PPMP)底物溶液(西格马, Cat. P-5758 号)进行测定, 该溶液是从 0.13M PPMP 和 7.8M 2-氨基-2-甲基-1-丙醇的储备溶液制备的(在用去离子水稀释到 1:26 之后, 用 HCl 将其 pH 值调到 10.15)。在大约 30 分钟之后, 在每孔中加入 50 μ L 的 0.2 M 双碱价磷酸钠(Mallinckrodt, 分析试剂)来终止反应。在微型板自读仪(Bio-Tek 仪器, Winooski, VT, EL311 型)中在 550 nm 处读其光密度。从偶数孔的光密度中减去奇数对照孔(空白, 没有心磷脂(CL))的光密度。用 Graph Pad Prism 软件, Graph Pad 软件公司, 圣地亚哥, CA)将 aPL 标准的吸收率读数制成散点图以形成 GPL(IgG 磷脂)标准曲线。依据 GPL 标准曲线用稀释的 6501 试验血清吸收率读数来计算 GPL 得分。

实施例 2：从血清 6501 纯化抗心磷脂抗体(ACA)

在 25ml 园底烧瓶(Kontes Scientific Co., Vineland, N.J.)中, 用 Rotavap(Buchi, Switzerland)将 1.2 ml 抗心磷脂(西格马化学公司, 圣路易斯, MO, #C-1649), 0.464 ml 胆固醇(西格马 Diag., 圣路易斯, MO., #965-25), 0.088 ml 5 mg 三十二烷磷酸盐(西格马化学公司, 圣路易斯, MO, D-2631/ml 氯仿的混合物干燥约 5 分钟。在除去溶剂后, 添加 2 ml

0.96%(wt./vol.)的 NaCl(J.T. Baker, Inc., Phillipsburg, NJ)Baker 分析试剂), 并在 Vortex Genie Mixer(科学工业, 公司, Bohemia, NY)中混合 1 分钟。于 37 °C 将脂质体悬液温育 1 小时。同时, 于 8 °C 下在 Sorvall RT 6000 离心机(杜邦公司, Wilmington, DE)中在 600 X g 下离心血清 6501 10 分钟。将 4 ml 上清液置于具有 1 ml 制备的脂质体悬液的 25 ml 园底烧瓶中, 于 4 °C 在搅拌下以中等速度在有轨摇床 Tektator V(Scientific Products, McGraw Park, IL)上温育混合物 48 小时, 在 37 °C 温育另外的 2 小时。加入 20 ml 冷的 TBS, 将混合物转移到 50 ml 聚碳酸酯离心管(Nalge Co., Rochester, NY)中, 于 4 °C 在 27,000 X g 下离心 15 分钟(在 SS-34 回转装置中的 RC3 离心机(Sorvall-Dupont, Wilmington, DE)中)。用 RC3 离心机以 25 ml 冷的 0.96% NaCl 洗涤沉淀 3 次。将沉淀溶解在 1 ml 2%(wt/vol)在 TBS 中的 n-辛基- β -D-葡萄糖吡喃糖苷(Calbiochem, Ljolla, CA)的溶液中, 用于 0.6 ml 蛋白质 A/交联琼脂糖(Repligen 公司, Cambridge, MA)柱, 该柱已以 15 倍柱床体积的 1 M 乙酸预洗涤过, 并用 15 倍柱床体积 TBS 平衡过。用 40 倍柱床体积的 2% 辛基葡萄糖吡喃糖苷洗涤抗体-蛋白质 A/琼脂糖柱, 以除去脂质, 接着用 TBS 充分洗涤, 直到洗脱物在 280 nm 的光密度达到基线。结合的抗体用 1 M 乙酸洗脱。收集 1 ml 组分, 每一组分立即用 0.34 ml 3 M Tris(Bio-Rad, 电泳级试剂)中和, 并保持的冰浴上。在分光光度计(Hewlett-Packard, 8452A Diode Array 分光光度计, Pale Alto, CA)中在 280 nm 测定各组分的吸光度。合并含有抗体的组分, 按制造者的方案在 Centricon-30 浓缩器(Amicon Division, W.R. Grace & Co., Beverly, MA)中浓缩和用 TBS 洗涤 4 次。

通过读取浓缩试样在 280 nm 的吸光度确定从 4 ml 血清 6501 产生纯化的抗体的最终产率, 其中 1 mg=1.34 OD₂₈₀。所获得的平均产率是从 4 ml 血清 6501 得到 750 μ g 抗体。用纯化的抗体试验 ACA 活性, 并由 Laemmli SDS-PAGE 检查纯度。

实施例 3: 构建 D-IIT 文库载体制剂

fUSE 5(Scott, J.K.和 G. Smith, 同上)用作构建 p-III 文库的载体, 将 Holmes, D.S.和 M. Quigley(1981), Ana/. Biocheml. 144:193 的修改的方法用

于产生双链重复形式(RF)。简言之,在剧烈振荡下,于37℃在含有20毫克/ml四环素的2YT培养基(Difco Labs, Am Arbor, MI)中培养大肠杆菌K802(具有fUSE 5)的800 ml培养物18小时。通过离心收集细胞,并重悬于75 ml STET中。STET由在50 mM Tris/HCl pH 8.0中的8%蔗糖,50 mM EDTA组成,并含有0.5% Triton X-100。将在STET中的10 mg/mL溶菌酶添加到最终浓度或1 mg/mL。在RT下1分钟后,将三个等分样置于沸水浴(偶尔振荡)中3.5分钟。在18000 X g下离心粘性浆状物30分钟,将等体积的异丙醇添加到上清液中。将溶液冷却至-20℃,通过离心收集核酸。通过 Sambrook 等,分子克隆:实验室手册(冷泉港实验室出版社,冷泉港,NY,第二版,1989)的描述从CsCl梯度分离RF。

制备随机插入物随机插入物

通过 Cwirl 等 1990, 美国科学院学报, 87:6378-6382 描述的"缺口双螺旋"法产生用于插入的 DNA。在这一方法中,中间含有简并区的寡核苷酸被寡核苷酸各端的短的恒定区包围。使两个较短的互补的寡核苷酸退火以形成"缺口双螺旋",其具有互补于由用于消化载体的限制性内切核酸酶产生的粘性末端的突出端。在这种情况下,较长的简并寡核苷酸具有序列: 5' GGGCTGGACCC(NNK)_xCCGGGGGCTGCTG 3', 其中 N=A 或 C 或 G 或 T, K = G 或 T, x 是在随机区中密码子的数量。EpiGS2 被设计成简并寡核苷酸的 5'末端的碱基对,具有序列 5' GGGTCCAGCCCCCGT 3'。类似地 EpiGS3 被设计成退火到简并寡核苷酸的 3'末端,具有序列 5' CAGCCCCCGG 3'。当正确退火时,三种寡核苷酸形成"缺口双螺旋",其在插入到用 SfiI 消化的 fUSE 5 中时,恢复具有接近 5'末端的随机插入物的 p-III 读框。

以上所描述的寡核苷酸是从聚丙烯酰胺凝胶切下制备的。1 nanomole 的 EpiGS2、EpiGS3 和 50 picomole 的简并寡核苷酸分别在 66 微升体积中用激酶处理。然后合并三种寡核苷酸添加 50 mM NaCl。将混合物加热至 65℃ 5 分钟,其后缓慢冷却至 RT。将退火的寡核苷酸在冰上冷却,直接用于与 5fUSE 的连接反应。连接反应物由 10 毫克 fUSE 5 DNA(用 SfiI 消化完全)、30μL "缺口双螺旋"溶液和 1000U T4 连接酶组成(在 450 微升总体积中)。于 16℃ 温育连接物 18 小时。然后用苯酚-三氯甲烷提取混合物,

用乙醇沉淀，将沉淀溶解在 20 μ L 水中。

产生和扩增文库

经电穿孔(Dower 等,(1988)核酸的研究, 16:6127-6145)将连接 DNA 引入大肠杆菌中。将冷冻的电组分(electrocompetent)MC1061 细胞(0.1 ml)在冷的 2mM 透明小容器中与连接的 DNA 混合，用 BTX 电穿孔装置(BTX 公司, San Diego, CA)施加 2.5 kV 5.2 mS 脉冲。紧接着脉冲之后，加入 1mL SO(一种细胞生长培养基(参见 Dower 等, 同上)。进行 5 种不同的电穿孔，收集并在 37 °C 培养 1 小时。此时，移走样品并稀释，以测定产生的克隆的总数量。用含有 20 毫克/毫升四环素的 1 升 2YT(1.6 % 蛋白胨, 140, 1% 22 酵母膏, 和 0.5 % NaCl, Difco, Ann Arbor, MI)稀释剩下的混合物，并于 37 °C 在 275rpm 振荡下培养 18 小时。经 2 次 PEG/NaCl 沉淀纯化噬菌体，并悬浮在包含 0.02 % 叠氮化钠的 1.2 ml TBS 中。将在 269 nm 的吸收率估计颗粒数量。通过将稀释的噬菌体与 10 微升饥饿的大肠杆菌混合测定噬菌体的滴度。

实施例 4： 筛选具有 aPL 抗体的 p-III 文库

于 RT 下在硅氧烷化的 1.4 ml 离心聚丙烯管中，将亲和-纯化的 ACA-6501(affACA-6501, 10 μ g; 7 μ L 11.44 mg/mL 贮存溶液)温育 2 小时，所述离心聚丙烯管含有合并的来源于 x, y 和 z 文库(epi^{XYZ})[分别 11 μ L + 8.5 μ L + 2 μ L; 总体积= 21.5 μ L, $\sim 10^{10}$ 个克隆]的噬菌体，具有 0.5% 牛血清白蛋白(BSA)的最终体积为 100 μ L 的 TBS(pH 7.4F)。在这一温育期间，进行制备新鲜的饥饿大肠杆菌菌株 K-91 的最后步骤。将于 37 °C 在 250 rpm 振荡下在 2YT 培养基中新鲜生长约 5 小时的大肠杆菌悬液于 RT 用 50 ml 聚丙烯管在 1000 X g 下离心 10 分钟。将 20 ml 80 mM NaCl 添加到紧密的大肠杆菌沉淀上，并在 100 rpm 下于 37 °C 温育 45 分钟。在以上离心后，将饥饿的大肠杆菌沉淀悬浮在 1 ml 50 mM 磷酸铵/80 mM NaCl 中，以后用于噬菌体扩增。将蛋白质 G-琼脂糖珠用 TBSIBS 洗涤 2 次，用 TBS/0.5% Tween-20 洗涤 2 次，以在 TBS/Tween 中的 50% 悬液贮存于 4 °C。

然后将 200 μ L 蛋白质 G-琼脂糖珠悬液添加到 ACA-6501/噬菌体混合物中，在 RT 下继续温育 1 小时。此时，急冷混合物，用冷的 TBS/Tween 洗

涤 3 次, 经在冷的房间离心收集沉淀。将洗涤过的珠转移到新的用 TBS/BSA 和 TBS/Tween 预洗涤的离心管中, 以阻止非特异性粘附。在用 TBS/Tween 额外洗涤 3 小时后, 通过在 RT 下搅动 10 分钟用 300 μ L 0.2 N HCl/甘氨酸, pH 2.1 洗脱具有结合的 ACA-6501-产生噬菌体的珠。在 16,000 X g 离心后, 收集酸性洗脱物上清液, 将另外的 100 μ L 洗脱液液添加到珠沉淀上, 重复这一操作。10 分钟后, 收集($\sim$ 400 μ L)后洗脱物的噬菌体(代表未扩增的第一轮噬菌体), 置于无菌的 17 x 100 mm 聚丙烯细胞培养管中, 向该管中添加 50 μ L 0.5 M NaCl, 接着用 2.5 M Tris 碱(通常 $\sim$ 25-35 μ L) 进行 pH 中和。立即加入等体积的饥饿的大肠杆菌悬液, 然后在 37 $^{\circ}$ C 在 100 rpm 下培养 10 分钟。接着将混合物转移至 250 ml 无菌培养瓶(含有具有 20 μ g/mL 四环素(Tet)的 25 ml 2YT)中, 在 37 $^{\circ}$ C 在 250 rpm 下培养一夜。

为了分离从过夜培养物扩增的噬菌体, 用聚碳酸酯试管在 12,000 $\times$ g 下离心 10 分钟。弃去沉淀。在 70 $^{\circ}$ C 加热在聚丙烯管中的上清液 30 分钟后, 再次用聚碳酸酯管离心, 保存上清液。向上清液中加入 1/4 体积的 20%(w/v)聚乙二醇, 分子量 8000(PEG 8000), 以沉淀噬菌体。通过倒转 100 次混合溶液, 然后在 4 $^{\circ}$ C 下温育 2 小时。于 4 $^{\circ}$ C 在 35,000 X g 下离心 30 分钟后, 将含有噬菌体的沉淀重悬于 $\sim$ 0.5 ml TBS/BS 中, 并转移至 1.4 ml 离心管中。在 16,000 x g 下在微量离心机中离心 1 分钟后, 将上清液转移至清洁的试管中, 标记第一轮扩增的噬菌体。

在第二、三和四轮生物淘选期间, 在 100 微升终体积中将三轮的 75 μ L 扩增的噬菌体与 7 μ L affACA-6501 一起温育。对第五轮噬菌体, 首先以 1:1000 稀释 affACA-6501, 然后如其它轮所述处理。如第一轮所述进行所有其它的后续步骤。将生物淘选第五轮的噬菌体点滴(spot-titered)在 2YT/Tet 平板上, 以测定噬菌体浓度。点滴扩增的噬菌体需要采用 TBS/BSA 或 2YT 培养基的 1×10^6 稀释度。对每一轮, 在 37 $^{\circ}$ C 下将 1010 μ L 稀释的噬菌 40 μ L 饥饿的大肠杆菌一起无振荡培养 10 分钟。在加入 950 μ L 2YT/稀释的 Tet(0.2 μ g/mL)后, 将混合物于 37 $^{\circ}$ C 在 250 rpm 振荡下培养 30-45 分钟, 将 10 μ L 纯粹的和稀释(1:10, 1:100 和 1:1000)的噬菌体溶液试样点滴在 2YT/dilute Tet 上(采用含有 20 μ g/mL Tet 的琼脂板)。

微淘选

用蛋白质 G 涂布 Immulon 2 型平板。用 0.1 M NaHCO_3 以 $10\mu\text{g/mL}$ 制备蛋白质 G，以每孔 $100\mu\text{L}$ 添加到微滴板的孔中，于 4°C 温育一夜。在从平板弃去过量的蛋白质 G 溶液后，于 RT 在搅拌下在振动平台上用 $250\text{--}300\mu\text{L}$ 2YT 封阻 1 小时。将 Tris-缓冲的盐水(pH 7.4/0.5% Tween 20(TBS/Tween))与自动平板洗涤仪一起使用，以便用 $200\mu\text{L}$ 洗涤每孔 4 次。 $100\mu\text{L}$ affACA-6501(或对照正常 IgG)用 2YT 稀释成 $2.5\mu\text{g/mL}$ ，将其添加到洗涤的孔中。在旋转平台上于室温温育接近 1 小时时，把平板转移至冷室回转装置(rotator)中。

待经微淘选试验的噬菌体经生物淘选从琼脂板产生。用无菌牙签将待试克隆转移至园底 96 孔微滴板(Corning, Corning, NY)的孔的不同的孔(含有 $250\mu\text{L}$ 2YT/Tet/孔)中，并在 37°C 培养一夜。克隆的命名基于筛选的抗体，来源的生物淘选轮次和克隆在过夜培养板上的位置，例如 ACA-6501/3B10 指这样一种克隆，其是通过 ACA-6501，在第三轮中，从位于微滴板的命名为 B10 的孔分离的。在过夜培养后，采用微滴板夹持装置于 RT 在 $1300 \times g$ 下离心噬菌体培养物 10 分钟。上清液构成“纯粹的”噬菌体的来源。

起始微淘选限制在 6 个克隆，这些克隆用以 1:10 到 1:106 的系数扩展的稀释度试验。从这些试点克隆产生的结果用于说明合适的单一稀释度(对各轮的源平板中的克隆其产生可分级的结果)。将代表培养的从生物淘选的第三、第四和第五轮随机选择的克隆的平板用 2YT 在微滴板中以每孔 $250\mu\text{L}$ 的终体积从“纯粹的”溶液稀释成 1:100,000。将代表所需稀度的最后平板的 $100\mu\text{L}$ 添加到含有蛋白质 G-结合的 ACA- 6501 和如上所述制备的正常 IgG 的平板上。在水平的回转装置上于 4°C 进行稀释噬菌体与 aPL 抗体或对照 IgG 的温育。在自动平板洗涤仪中用 TBS/Tween 洗涤 9 次后，用 $20\mu\text{L}$ 0.2 N HCl-甘氨酸/0.1% BSA, pH 2.2 洗脱 IgG-结合的噬菌体。在 RT 下继续温育洗脱物 10 分钟，在此期间，制备每孔含有 $20\mu\text{L}$ 新鲜饥饿大肠杆菌的新的 Corning 微滴板，并冷却。将 $140\mu\text{L}$ 29 mM Tris 添加到含有噬菌体洗脱物的平板上，以中和 pH，接着从各孔将 $20\mu\text{L}$ 噬菌体悬液转移到含有饥饿的大肠杆菌的平板的相应的孔中。在 37°C 培养 10 分钟后，加入 $200\mu\text{L}$ 2YT/dil Tet，在 37°C 进行另外的 30 分钟培养。用多段式吸移管将

各孔的 10 μ L 点滴在大的 2YT/Tet 琼脂板, 而保留原来的 8 x 12 孔格式和最后微滴板的方向。在使斑点干燥 30 分钟后, 将平板在 37 °C 温育。下一天, 用从 0 到 4+ 半定量计分菌落, 0 表示 <10 个菌落 s; +/-, 10-20 个; 1+, 20-50 个; 2+, 50-70% 汇合; 3+, 70-90% 汇合; 4+ 代表 >90% 汇合的菌落。94 个在 1:10⁵ 稀释度[代表 81 个第三轮、6 个第四轮、7 个第五轮克隆|测定的克隆中, 6 个克隆具有 0 的微淘选得分, 3 个得分为 1+, 14 个得分为 2+, 62 个得分为 3+, 9 个得分为 4+。通过如以下所描述的 G-跟踪 DNA 测序进行来源于代表生物淘选的第二到第五轮的平板的随机克隆的测定。结果显示第四轮生物淘选的序列差异戏剧性地下降(参见图 8), 因此, 第二平板用噬菌体在 3 X 10⁵ 稀释度微淘选, 此时变化较早(第二)轮的克隆。试验总共 94 个克隆, 包括在 1 X 10⁵ 稀释度具有高分的 29 个克隆[26 个来源于第三轮, 1 个来源于第四轮, 2 个来源于第五轮]和以前已试验的第二轮的 65 个克隆。在 1:3 X 10⁵ 稀释度试验的 94 个克隆中, 26 个得分为 0, 11 个得分为 +/-, 10 个得分为 1+, 13 个得分为 2+, 34 个得分为 3+, 0 个得分为 4+。

G-跟踪 DNA 测序

从在 37 °C 过夜培养的培养物中分离单链病毒 DNA。为了制备培养物, 用来源于以前生长的微滴板培养物的扩散平板的单个噬菌体接种 2YT/Tet(以在试管中的 2 ml 或者在微滴板园底孔中的 250 μ L)。如 Smith, G.P. 和 J.K. Scott, "丝状真菌上显示的肽和蛋白质文库"(1993), 酶学方法, 217:228-257(有关试管中的培养物)中的描述以及 Haas, S.J. 和 G.P. Smith G.P., "从丝状真菌噬菌体快速测序 DNA"(1993)生物技术, 15:422-431(有关微滴板中的噬菌体)的描述, 经 20% PEG/2.5 M NaCl 沉淀培养物上清液和经苯酚-氯仿抽提或经碱性变性分离或释放病毒粒子 DNA。如 Smith 和 Scottt 同上(有关试管培养物噬菌体 DNA)的描述以及 Haas 和 Smith, 同上(有关微滴板上噬菌体 DNA)的描述, 用市售的测序试剂盒(U.S. Biochemical/Amersham, Arlington Heights, IL)实施 Sanger 等(Sanger 等, "用链终止抑制剂的 DNA 测序"(1970)美国科学院学报, 74:5463-5467)的双脱氧核苷酸链终止 DNA 测序技术。通过仅采用 ddCTP 终止混合物, 7% 聚丙烯酰胺/脲测序凝胶上电泳和将放射自显影显示后获得 G 跟踪或由单碱基 μ g)给出的序列格式。按照标准的凝胶电泳和放射自显影方法(Sambrook

等, 同上)进行。

G-跟踪的 76 个克隆(来源于 ACA-6501 文库筛选的在噬菌体稀释度 $1:1 \times 10^5$ 试验的微筛选平板的)揭示出 11 个独特的序列, 而在噬菌体稀释度 $1:3 \times 10^5$ 试验的第二微筛选平板的 64 个克隆显示出 30 个独特的序列。将采用所有 4 个双脱氧核苷酸三磷酸的常规 DNA 测序用于具有最高微淘选得分和独特的序列的噬菌体克隆, 导致出现表 1 所示的 xyz 文库的 12 个序列。

噬菌体俘获 ELISA

将克隆 ACA-6635/3A12、3B3、3C8、3A5、3C9 和 3B7 以 3ml 培养物培养。将亲和纯化的 ACA-6635 在磷酸缓冲盐水(pH 7.2)中稀释到 $2.5 \mu\text{g/ml}$, 向 Immulon-2 微量滴定板的孔中加入 $100 \mu\text{l}$ 。然后在每孔中用溶解在 PBS 中的 $150 \mu\text{l}$ 0.1%BSA(游离球蛋白)封阻此平板。在 4°C 下放置 1 小时后, 将此平板如上所述洗涤 3 次。以 $17,000 \times g$ 将每一种噬菌体培养物离心 3 分钟后, 在 0.1%BSA/PBS 中以 1:10 稀释每一种上清液, 并向每一个涂上一层亲和纯化的 ACA-6635 的孔中加入 $100 \mu\text{l}$, 4°C 下温育 2 小时。然后如上所述用 TBS/Tween 洗涤平板。在 0.1%BSA/PBS 中以 1:5,000 稀释辣根过氧化物酶-缀合的羊 IgG 抗-M13 噬菌体抗体 (Pharmacia 公司, Piscataway, NJ), 并向每个孔中加入 $100 \mu\text{l}$ 。 4°C 下温育 1 小时后, 如上所述将此平板洗涤 4 次。将按照缀合厂商的指导制备的 $100 \mu\text{l}$ 底物加入到每个孔中。19 分钟后, 在自动微量平板吸收率测定仪(Biotek, Winooski, VT)上测定每孔在 405 nm 的吸收率。选择了测验的由 ACA-6635 噬菌体文库筛选的 7 个克隆, 这是因为它们高的微淘选得分和阴性噬菌体 ELISA 得分(参见下文)。如图 9 所示, 所实验的 7 个克隆中有 3 个(3A12、3B3 和 3A5)在噬菌体俘获 ELISA 中显示出很强的免疫特异信号。

噬菌体-ELISA

由上述以亲和纯化的 ACA-6501 在几个噬菌体文库筛选物中分离的 35 个克隆制备 3ml 培养物, 并以一个缺乏肽插入物的 FUSE 2 噬菌体克隆作为对照。在以 $17,000 \times g$ 离心 3 分钟后, 将 $100 \mu\text{l}$ 的各种噬菌体上清液(以吸收率为基础调至 2×10^{11} 粒子/毫升)加入到微量滴定板的孔(Falcon, Becton-Dickinson Labware, Lincoln Park, NY)中, 并在 4°C 下过夜温育。用 TBS 7.4 洗涤 4 次后, 在室温下用 $125 \mu\text{l}$ 的 0.5%BSA/TBS 将此平板封

阻 1 小时。经 TBS 再洗涤 4 次后, 将 100 μ l 原来在 TBS/BSA 中稀释到 2.5 μ g/ml 的 affACA-6501 加入到每个孔中, 在 37 $^{\circ}$ C 下温育 1 小时。再洗涤 4 次后, 将在 TBS/0.5%Tween 中以 1: 1000 稀释的 100 μ l 抗人类 IgG 加入到每个孔中。室温下放置 1 小时后, 加入酶底物, 并温育 2 小时。然后加入 50 μ l 0.2M Na₂HPO₄ 终止反应, 在自动平板吸收率测定仪上以 550nm 测量吸收率。如图 10 所示, 7 个克隆在带有 ACA - 6501 的噬菌体-ELISA 中具有明显的信号: 5A12、3B6、3E7、3B10(和 2D7 具有相同的序列)、2G11、2H1 和 2H2。中心克隆的序列如表 2 所示。

肽-ELISA

在标准方案中, 将溶解在二甲基甲酰胺中的四肽肽贮存溶液在 pH 9.5 的碳酸盐缓冲液中稀释 1000 倍, 即 10 μ g/ml。用 100 μ l 稀释的肽在每一个微量滴定板的孔上涂上一层, 然后用缓冲白蛋白封阻, 4 $^{\circ}$ C 下过夜。在室温下将每一个涂上一层肽的微量滴定板孔与不同稀释浓度(以 1: 50 开始)的 aPL 血清一起温育 1 - 2 小时。洗涤后, 按照标准的 ELISA 方法使用酶-缀合的抗人类 IgG 确定结合肽的人类 IgG 的存在。

竞争性结合肽-ELISA

在每一个 Immulon II 平板(Dynatech 实验室公司, Chantilly VA)的孔中涂上一层含有溶解在 50 mM 碳酸钠(pH 9.5, 含有 35 mM 重碳酸钠)(Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, 试剂等级)中的 10 μ g 四价肽 ACA 6501/3B10, 室温下放置至少 1 小时(除了用作空白对照的 3 个孔外)。然后, 将此液体从孔中除去, 向每个孔(包括空白孔)中加入用于封阻的 200 μ l 溶解在 TBS 中的 0.5%(wt/vol)BAS(Sigma 化学药品, St. Louis, MO, #A7638), 将其在室温下温育至少 1 小时。将 4 个 1.5 毫升的离心管标记为 1 - 4。在第一个离心管(Brinkman Instruments, Westbury, NY)中混合下列试剂: 30 μ l 的 5% BSA; 284 μ l TBS; 8 μ l 大约 400-500 μ g/ml 的单体肽(ACA-5A12 或-CB2 或-3B10 或混杂的-3B10 作为阴性对照)TBS 溶液的贮存溶液; 8.2 μ l 1:10 稀释的血清 6501 的 0.5% BSA-TBS 溶液。在第二个离心管中混合下列试剂: 30 μ l 的 5% BSA; 290 μ l TBS; 2 μ l 大约 400-500 μ g/ml 的单体肽(ACA-5A12 或-CB2 或-3B10 或混杂的-3B10 作为阴性对照)TBS 溶液的贮存溶液; 8.2 μ l 1:10 稀释的血清 6501 的 0.5% BSA-

TBS 溶液。在第三个离心管中混合下列试剂：30 μ l 的 5% BSA；287 μ l 大约 400-500 μ g/ml 的单体肽(5A12 或-CB2 或-3B10 或混杂的-3B10 作为对照)的 1:10 稀释液；8.2 μ l 原来以 1:10 稀释的 ACA - 6501 血清的 0.5% BSA-TBS 溶液。在第四个 Eppendorf 离心管中混合下列试剂：60 μ l 5% BSA；584 μ l TBS 和 16.5 μ l 的 1:10 稀释的血清 6501 的 0.5% BSA-TBS 溶液。用 TBS 将封阻的平板洗涤 5 次。将第一个离心管的溶液加入到 3 个孔中，每孔 100 μ l。将相同数量的第二、第三和第四离心管的溶液也加入到三个孔中。将第四个离心管中的 100 μ l 溶液加入到微量滴定板的三个封阻的空白孔的每一个中。室温下将此平板在 40 rpm 的有轨振荡器(American Dade, Miami, FL, Rotator V)中温育 1 小时，然后用 TBS 洗涤 5 次。加入溶解在 0.5% BSA-TBS 中的 100 μ l 1: 1000 稀释的山羊 - 抗人类 - IgG/碱性磷酸酯酶缀合物(Zymed, 南旧金山, CA, 产品号 62-8422)溶液, 室温下温育 1 小时。然后用 TBS 洗涤此平板 5 次，如实施例 1 所述通过加入 100 μ l PPMP 稀释的底物溶液进行测定。20 分钟后，通过向每孔中加入 50 μ l 的 0.2 M Na₂HPO₄(Mallinckrodt, St. Louis, MO., 试剂等级)终止反应。在微量平板测定仪(Bio-Tek 仪器, Winooski, VT, Model EL 311)上以 550 nm 测定光密度。将 550 nm 下的光密度对每孔中的肽量在 Graph Pad Priun(Graph Pad 软件公司, San Diego, CA)上作图。从此图计算血清 6501 与四价 3B10 结合的 50 % 抑制作用所需要的肽量。

(B)用心磷脂(CL, 50 μ g; Sigma 化学药品公司, St. Louis, MO)的乙醇溶液以 30 μ l/孔的量将 Immulon I® 96 孔平底聚苯乙烯微量滴定板(Dynatech 实验室公司, Chantilly, VA)涂上一层。两个对照孔中只含有 30 μ l 的乙醇。4℃下，过夜蒸发后，室温下将每个孔用 200 μ l 5%(w/v)鱼明胶的 PBS 溶液封阻。然后用 TBS 洗涤 5 次涂上一层 CL 的封阻的平板，并向每个孔中加入 β 2 - GPI(作为 100 μ l 2.3 % (以 v/v 表示的 PBS 溶液) IgG 已耗尽的人类血清)(Sigma 化学药品公司, St. Louis, MO)，室温下温育 2 小时。

在温育过程中，使用 Eppendorf 离心管，将数量可变化的 6 种肽的每一种与 22 μ l ACA6501 血清混合(所说的血清是用溶解在 TBS/PBS(1:1)中的 3 % 鱼明胶稀释(最终为 1: 400 的稀释液)的)，最终体积为 220 μ l。特异地，

在管 1 中混合了 181.3 μl 的 3% 鱼明胶的 TBS-PBS 溶液, 16.7 μl 的肽贮存物溶液 + 22 μl 的 ACA 6501 血清(在 3% 鱼明胶的 TBS-PBS 溶液中稀释 40 倍)。对于肽 951(二丝氨酸非环化的阴性控制)、952 (大量的 LJP 690)和硫醚(CCTE-3G3、CHTE-3G3、HCTE-3G3 和 HHTE-3G3)贮存物溶液的浓度从 450 - 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 变化。在 2 号管中加入下列物质: 148 μl 的鱼明胶/TBS-PBS, 50 μl 的肽贮存物溶液 + 22 μl 40 倍稀释的 ACA6501 血清。3 号管含有 48 μl 的鱼明胶/TBS-PBS, 50 μl 的肽贮存物溶液 + 22 μl 40 倍稀释的 ACA6501 血清。4 号对照管中含有 396 μl 的鱼明胶/TBS-PBS 和 + 44 μl 40 倍稀释的 ACA6501 血清(不含肽)。室温下将每一个管温育大约 1 小时。

用 TBS 洗涤 CL/ β 2-GPI 微量滴定板 5 次, 将 100 μl Eppendorf 管 1、2、3、4 中的含有抗体肽(或者没有肽混合物)的溶液重复加入到这些孔中。将 100 μl 的管 4 的溶液重复加入到不含心磷脂的对照孔中。室温下将此平板在 40 rpm 的轨道振荡器(American Scientific, Rotator V)中温育 1 小时, 然后用 TBS 洗涤 5 次。加入溶解在 0.5% BSA-TBS 中的 100 μl 1: 1000 稀释的山羊 - 抗人类 - IgG/碱性磷酸酯酶缀合物(Zymed, 产品号 62-8422)溶液。室温下温育 1 小时后, 然后再用 TBS 洗涤此平板 5 次, 通过加入 100 μl PPMP 溶液(7.8 g 酚肽一磷酸盐 + 69.5 g 2-氨基-2-甲基-1-丙醇的 100ml 水贮存物溶液, 用水以 1: 26 稀释)进行酶比色测定。21 分钟后, 通过向每孔中加入 50 μl 的 0.2 M Na_2HPO_4 (Mallinckrodt)终止反应。在微量平板测定仪(Bio-Tek 仪器, Winooski, VT, Model EL 311)上以 550 nm 测定吸收率。将吸收率对加入的肽量在 Graph Pad Prism(Graph Pad 软件公司)上作图。从此图的增加的肽量与最大吸收率一半的交叉点计算 50 % 抑制 ACA6501 结合(IC_{50})的肽量。

实施例 5: 肽 3B10 的截短实验和所形成的肽竞争 ELISA 结果

室温下以每孔 100 μl 的四体 ACA - 6501/3B10 肽(为 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的碳酸盐缓冲液(pH 9.6, 15mM Na_2CO_3 /35 mM NaHCO_3))溶液)涂布微量滴定板(96 孔、平底的聚苯乙烯 Immulon - 2, Dynatech 实验室公司, Chantilly, VA)。从孔中除去液体后, 室温下用 200 μl 的 0.5 % (wt/vol) BSA(游离球蛋白, 产品号 A7638, Sigma 化学药品公司, St. Louis, MO)的 TBS 溶液封阻 1

小时。此平板左边的三个孔没有涂布四价的肽，目的是作为空白对照孔。

在封阻期间，每一种可溶的待测的单体肽排列在三个实验管(Eppendorf 小实验管，Brinkmann 仪器，Westbury, NY)中，每个管中含有 30 μl 5% BSA/TBS、8.2 μl ACA-6501 血清(用 0.5% BSA/TBS 以 1:10 稀释)+ 体积可变的肽/TBS 贮存物、必要量的 TBS，使最终体积为 330 μl 。330 μl 足以产生 3 个 100 μl 的每一种肽浓缩物的样品，这些样品用于检测其封阻 ACA - 6501 与四价肽涂布的平板的结合能力。对于肽 139(其氨基末端是截短的，并缺乏正常实验的框架 ala-gly)，此贮存物溶液的浓度为大约 340-400 $\mu\text{g/ml}$ TBS，除去 19 μl , 75 μl ，和 292 μl 的该溶液以便制备三种肽浓度的管。对于肽 142(只是没有 N - 末端 ala)和肽 143(没有截短)，贮存物溶液的浓度为大约 400-500 $\mu\text{g/ml}$ TBS。从每一种贮存物溶液中除去 1 μl , 4 μl ，和 16 μl 的等分溶液，用来制备每种肽的三种浓度的管。对于肽单体对照管(没有肽)，制备最终体积为 660 μl 的管，其包含 60 μl 5% BSA, 16.5 μl 1:10 的 ACA-6501 的稀释液和 583.5 μl 的 TBS(即与 330 μl 的管具有相同的最终浓度(0.5% BSA 和 1:400 的 ACA-6501 血清)，但是体积是它的两倍，不含肽)。

封阻温育后，将用四价肽涂布的平板用 TBS 洗涤 5 次。将每一个 330 μl 的以不同浓度含有肽 139、142 和 143 的管中的 100 μl 溶液加入到涂布的三重孔中。将不含肽的 660 μl 的对照管中的三份 100 μl 等分溶液分别加入到涂布的孔中，另外三份 100 μl 的等分溶液分别加入到未涂布的空白孔中。室温下将此平板在 40rev/分钟的旋转有轨振荡器(Rotator V, American Dade, Miami, FL)中温育 1 小时，然后用 TBS 洗涤 5 次。向微量滴定板中加入溶解在 BSA-TBS 中的 100 μl 1: 1000 稀释的山羊 - 抗人类 - IgG/碱性磷酸酯酶缀合物(产品号 62-8422, Zymed, South San Francisco, CA)溶液。室温下温育 1 小时后，然后再用 TBS 洗涤此平板 5 次。向每孔中加入 100 μl 新制备的稀释 PPMP 底物溶液后可产生颜色。PPMP 的稀释溶液(酚肽 - 磷酸盐，产品号 P-5758, Sigma 化学样品公司，St. Louis, MO)是通过以 1: 26 用水稀释 PPMP 贮存物溶液(0.13M PPMP、7.8 M 氨基-2-甲基-1-丙醇(用 HCl 将其 pH 调至 10.15))制备的。30 分钟后，通过向每孔中加入 50 μl 的 0.2 M Na_2HPO_4 (试剂级，Mallinckrodt, St. Louis, MO)终止反应。在微量

平板测定仪(Bio-Tek 仪器, Winooski, VT, Model EL 311)上以 550 nm 测定吸收率, 将吸收率对每孔加入的肽量在 Graph Pad Prism(Graph Pad 软件公司, San Diego, CA)上作图。如图 11 所示, 划出的基线相当于在没有单体肽竞争抑制作用时的结合反应最大值的一半。50 % 的抑制值如图 2 所示。所得的结果表明 N-末端 Ala 的缺失没有负作用, 而 Gly 的再缺失则增加了获得 50 % 抑制作用所必需的浓度大约 8 倍。

实施例 6: 取代 3B10 中的 α - 甲基及所得到的 ELISAs

使用实施例 5 描述的方法实验肽 ACA-6501/3B10 和其类似物(其中 3 和 9 位上的脯氨酸由 α - Me-Pro 代替)。使用四肽肽 3B10 涂布的微量滴定板和 ACA - 6501 血清在竞争结合 ELISA 中检验作为可溶单体肽的肽 3B10, 726 (在 3 位上 α Me-Pro 取代的), 727 (在 9 位上 α Me-Pro 取代的), 和 728 (在 3 和 9 位上 α Me-Pro 取代的)。

如实施例 5 所述将微量滴定板用四肽肽 3B10 涂上一层。对于所实验的 4 种肽的每一种, 在管中制备 3 种浓度的肽。这 12 个管的最终浓度为 0.5%BSA/TBS、以 1: 400 最终稀释的 ACA - 6501 血清, 总体积为 330 μ l。所有的肽贮存物溶液为 400-500 μ l/ml TBS。向含有 30 μ l 5% BSA/TBS 和 8.2 μ l ACA-6501 血清(用 0.5% BSA/TBS 以 1:10 稀释)的管中, 加入 4 种肽贮存物溶液的每一种: 1 μ l、4 μ l 和 16 μ l 的等分溶液, 另外加入合适体积的 TBS, 使最终体积为 330 μ l。如实施例 5 所述, 制备最终体积为 660 μ l 的不含竞争肽的对照管。

四肽肽涂布的平板的温育封阻后, 如实施例 5 的描述实验来源于四种肽的各种肽浓度管中的三份 100 μ l 等份样品、以及来源于不包含肽的对照管和空白对照中的等份样品。如实施例 5 的描述实施微量滴定板 ELISA 方法和进行数据处理。如图 13 所示, 肽 727(其中在 9 位置上的 α - Me-Pro 被取代)与未改变的肽 3B10 或带有改变的脯氨酸的类似物(肽 728)相比具有明显提高的活性。肽 726(其在 3 位发生取代)由于这种取代而失去了活性。

实施例 7: 使用 6626 抗体筛选的简要描述和相应的序列

通过亲和纯化从上述的 8ml ACA - 6626 血浆中分离亲和纯化的 ACA

- 6626(AffACA-6626)。将 AffACA-6626(10 μ g)与含有全部的 p-III 感受态的一组文库(最终体积为 100 μ l)(如上文用于 ACA - 6501 生物淘选的描述)的表位 xy'z 噬菌体文库一起温育。在三轮生物淘选之后,通过显微淘选检验从第二轮和第三轮中随机选择的噬菌体。只有几个克隆在 1: 1000 稀释浓度下具有微弱的免疫阳性。对另外的第四轮进行生物淘选。94 个第四轮克隆的显微淘选显示出 43 个免疫阳性,有些在高达 1: 100000 稀释度下表现出免疫阳性。如上文用于 ACA - 6501 的描述所进行的 43 个免疫阳性克隆的 G-示踪 DNA 测序表明 5 个单一序列。在常规的四碱基 DNA 测序后,获得了表 3 的翻译氨基酸序列。

实施例 8: 患者 6644 的特异性 ACA 序列的鉴定

使用与实施例 4 类似的方法通过患者 6644 的 ACA 亲和纯化的抗体筛选 epi^{xy'z}噬菌体显示文库。在肽合成前使用上述的菌落印迹分析作为最后的鉴定步骤。在原来硝酸纤维素膜上接种大约 150 个菌落,并对其进行分析。以 1 μ g/ml 的浓度使用患者 6644 的抗体。在此筛选中,在硝基纤维素膜上平板接种和分析的 150 个菌落中,只有四个具有较强的阳性,2 个表现出微弱的阳性。此筛选中选择出的 6 个阳性噬菌体的插入物的测序表明所有这些插入物都来自具有游离氨基末端(epi^{xy'})的八聚体文库。

Gly-Ile-Leu-Ala-Leu-Asp-Tyr-Val-Gly-Gly (3 个插入片段)

Gly-Ile Leu-Thr-Ile-Asp-Asn-Leu-Gly-Gly (1 个插入片段)

Gly-Ile-Leu-Leu-Asn-Glu-Phe-Ala-Gly-Gly (2 个插入片段)

实施例 9: 具有 ACA-6641 的噬菌体文库的筛选概述

从患者 6641 的 4ml 血浆中分离 AffACA-6641。如上所述将 AffACA-6641(10 μ g)与一组 p-III 噬菌体文库(最终体积为 100 μ l)一起温育。在四轮生物淘选之后,通过显微淘选检验从第三轮和第四轮中的 45 个克隆。在 45 个克隆中有 23 个是阴性的。第三轮噬菌体产生标记为 4+的两个克隆、标记为 3+的两个克隆、标记为 2+的两个克隆。在第四轮中一个克隆标记为 4+,一个克隆标记为 3+, 3 个克隆标记为 2+。G - 示踪的 DNA 测序显示出 6 个单一序列。只有一个克隆(3G3)在噬菌体俘获 ELISA 中显示出较强的阳

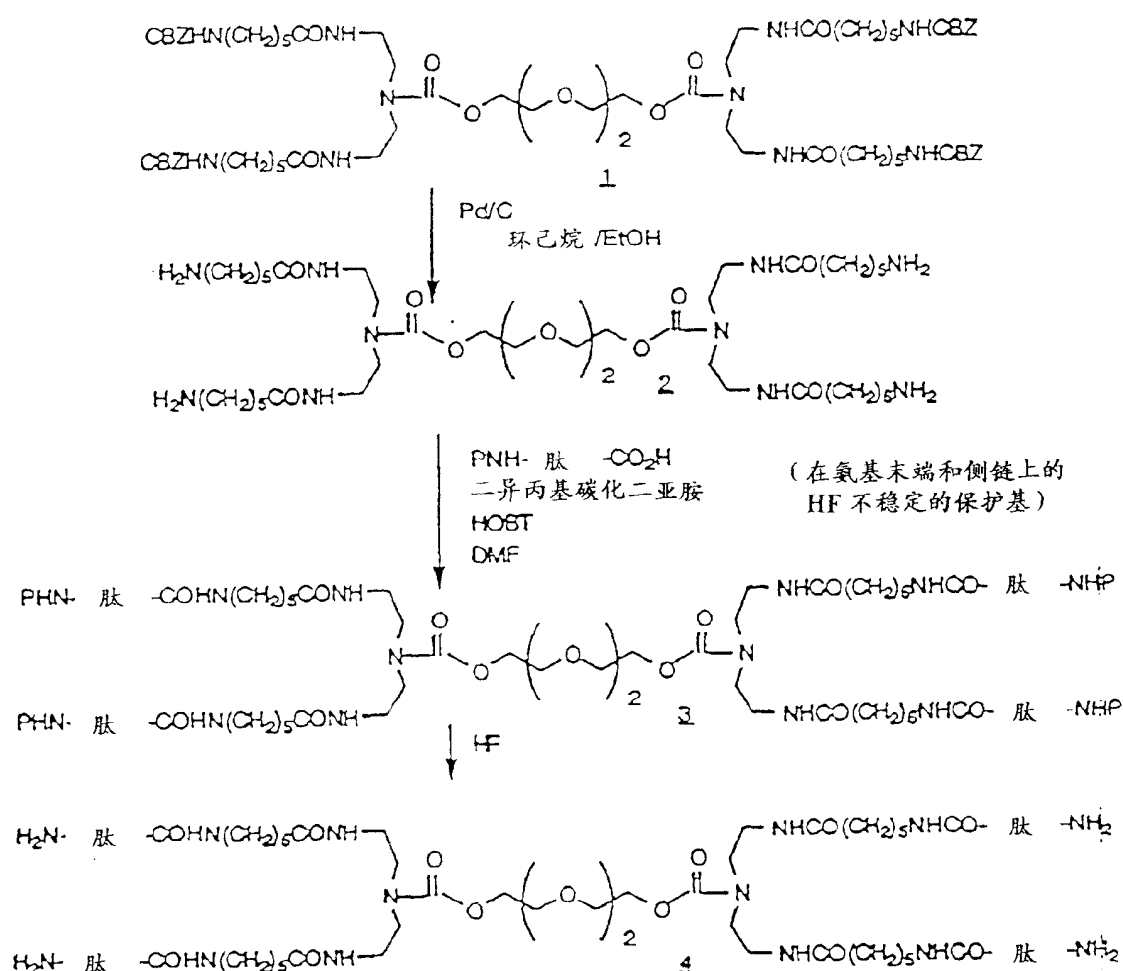
性。四个碱基的 DNA 测序得到下列翻译的肽序列：CLGVLGKLC。

实施例 10：肽与非免疫原性多价载体的缀合

如共有共同未决美国专利申请 08/118, 055(1993 年 9 月 8 日申请)、08/152,506(1993 年 11 月 15 号申请)和美国专利 5,268,454、5,276,013 和 5,162,515(其全部内容本文一并参考)中所述, 已经研究出用于产生 B 细胞耐受原的一些四价平台。结合通过表位文库的 aPL 抗体筛选选择的候选肽, 并检验它的免疫化学行为(如抗体结合)的改变。

按照下面的方案合成带有胺基团的非免疫原性多价平台。

平台上的胺 - 肽上的羧基



化合物 2

将溶解在 50ml 纯 EtOH 和 35ml 环己烯中的 8.0g(5.7 mmol)化合物 1 溶液放置在氮气中, 在碳上加入 500 mg 10%Pd。将混合物振荡回流 2 小

时。冷却后经 Celite 过滤, 浓缩得到油状的 5.0g 化合物 2。 $^1\text{H NMR}$ (50/50 $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) δ 1.21 (m, 8H), 1.49 (m, 8H), 1.62 (m, 8H), 2.19(t, $J = 7.4$ Hz, 8H), 2.67 (t, $J = 7.4$ Hz, 8H), 3.36 (bd s, 16H), 3.67 (s, 4H), 3.71 (m, 4H): 4.21(m,4H)。

带有游离羧基的保护肽(PHN-肽- CO_2H)

在 Wang(对烷氧基苯)树脂上利用 Fmoc 化学经标准固相方法合成肽, 其中使用三氟乙酸(TFA)稳定保护基团(在羧基的苯酯或环己烷酯和在氨基上的苄氧羰基(CBZ))。将氨基酸残基顺序地加入到氨基末端。利用 TFA 从树脂上取出肽, 以便提供在羧基末端具有一个游离羧基的肽, 所有其它的羧基和氨基都被封阻。通过反相 HPLC 纯化保护的肽。

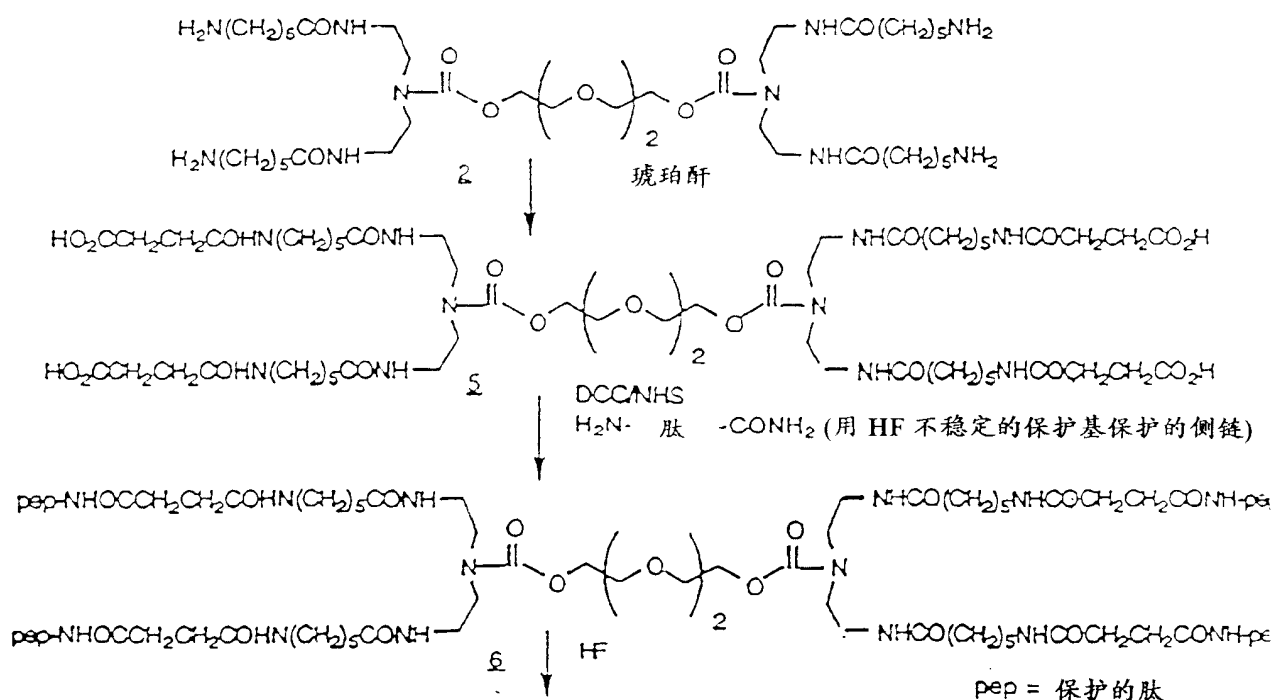
肽-平台缀合物 4

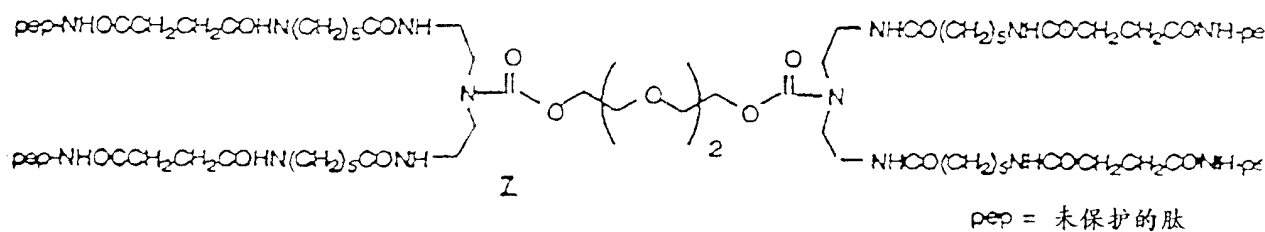
把保护的肽(0.3 mmol)溶解在 1ml 的二甲基甲酰胺(DMF), 向溶液中加入 0.3 mmol 二异丙基碳二亚胺、0.3 mmol 1-羟基苯并三唑氢氧化物(HOBT)。将此溶液加入到含有 0.025mmol 四氨基平台、化合物 2(1mlDMF 溶液)的溶液。加入后真空除去 DMF 以产生粗制的完全保护的缀合物 3。在 0°C 下用氢氟酸(HF)在茴香醚存在下处理缀合物 3 产生缀合物 4。

通过制备型反相 HPLC 进行纯化。

下列的方案显示出肽的氨基附着在平台的羧基上。

平台上的羧基-配体上的胺





化合物 5 - 带有 4 个羧酸基团的平台

将琥珀酐(1.0g, 10mmol)加入到溶解在 20ml 1/1 二氧六环/水中的 861mg(1.0 mmol)的化合物 2 和 252mg(3.0 mmol)的 NaHCO_3 溶液中, 将混合物在室温下搅拌 16 小时。用 1N HCl 将混合物酸化, 并将其浓缩。通过硅胶层析纯化此浓缩物, 产生化合物 5。

带有游离氨基的保护的肽(H_2N -肽 - CONH_2)

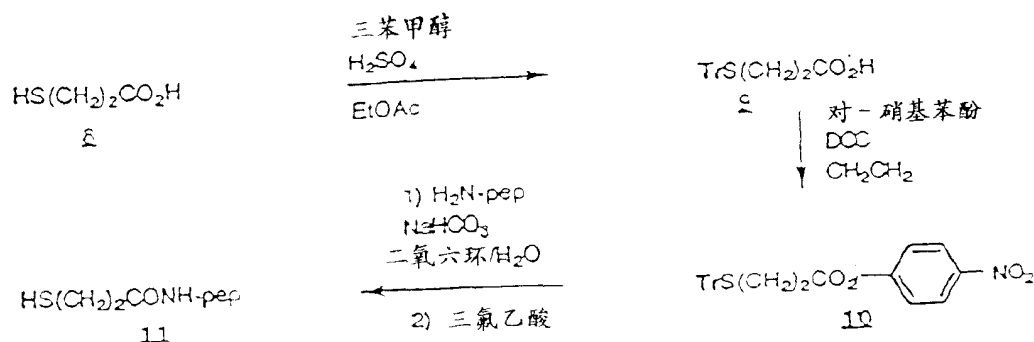
使用 TFA 稳定保护基团(在羧基的苯酯或环己烷酯和在氨基上的 CBZ)在酰胺树脂上经标准的固相方法合成肽, 这样, 从此树脂上切割后产生羧基末端的酰胺, 使用标准的 Fmoc 化学向氨基末端顺序加入氨基酸残基。使用三氟乙酸从树脂上除去此肽以产生带有游离氨基接头的保护的肽。经反相 HPLC 纯化此保护的肽。

肽 - 平台缀合物 7

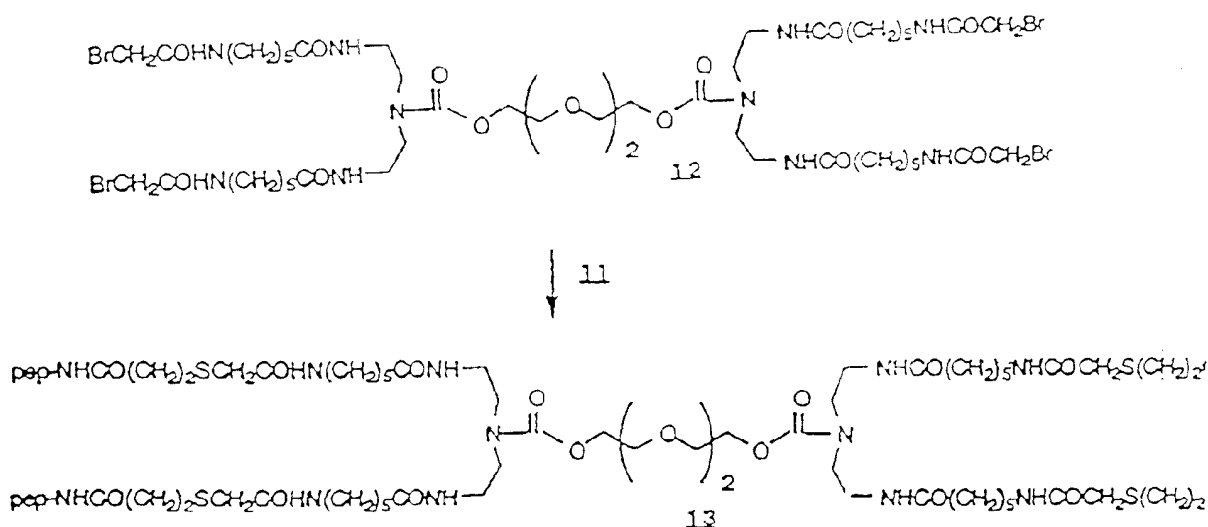
制备溶解在 1ml 的 DMF 中的 0.05 mmol 带有游离氨基的保护肽(H_2N -肽 - CONH_2)、0.1 mmol 二异丙乙基胺、0.01mmol 的化合物 5 溶液。加入 BOP 试剂(苯并三唑 - 1 - 基氧 - 三(二甲基氨)磷律六氟磷酸)(0.1 mmol), 搅拌混合物直到经分析型 HPLC 确定反应完全。0 °C 下在茴香醚存在时通过 HF 处理除去肽保护基团, 得到除去肽保护基因的缀合物 7。经制备型反相 HPLC 纯化化合物 7。

下列方案表明如何将巯基接头与肽的氨基末端结合, 接下来将肽/接头与四溴乙酰化的平台结合产生化合物 13。

平台上的卤乙酰和肽上的巯基



pep = 环状的非二硫化物肽



化合物 9

将浓硫酸(100 μL)添加到 4.48g 三苯甲醇(17.2 mmol) 和 1.62 g (15.3 mmol, 1.3 ml) 3-巯丙酸在 35 ml EtOAc 中的 60 $^\circ\text{C}$ 溶液中。在 60 $^\circ\text{C}$ 将混合物搅拌 10 分钟, 使其冷却至室温(RT), 置于冰上 1 小时。通过过滤收集所形成的白色固体, 给出 4.52 g (75%) 化合物 9。

化合物 10

将二环己基碳二亚胺(DCC) (2.41 g, 11.7 mmol) 添加到 2.72 g (7.8 mmol) 化合物 9 和 1.08 g (7.8 mmol) 对硝基苯酚在 41 ml CH_2Cl_2 中的 0 $^\circ\text{C}$ 溶液中。将混合物搅拌 16 小时, 使其到达 RT。过滤混合物以除去 N,N'-二环己基脲(DCU), 浓缩滤液。从己烷/二氯甲烷结晶残渣, 产生 3.17 g (86%) 淡黄色结晶状的化合物 10。

化合物 11 - 具有连接的巯丙基的环状硫醚肽

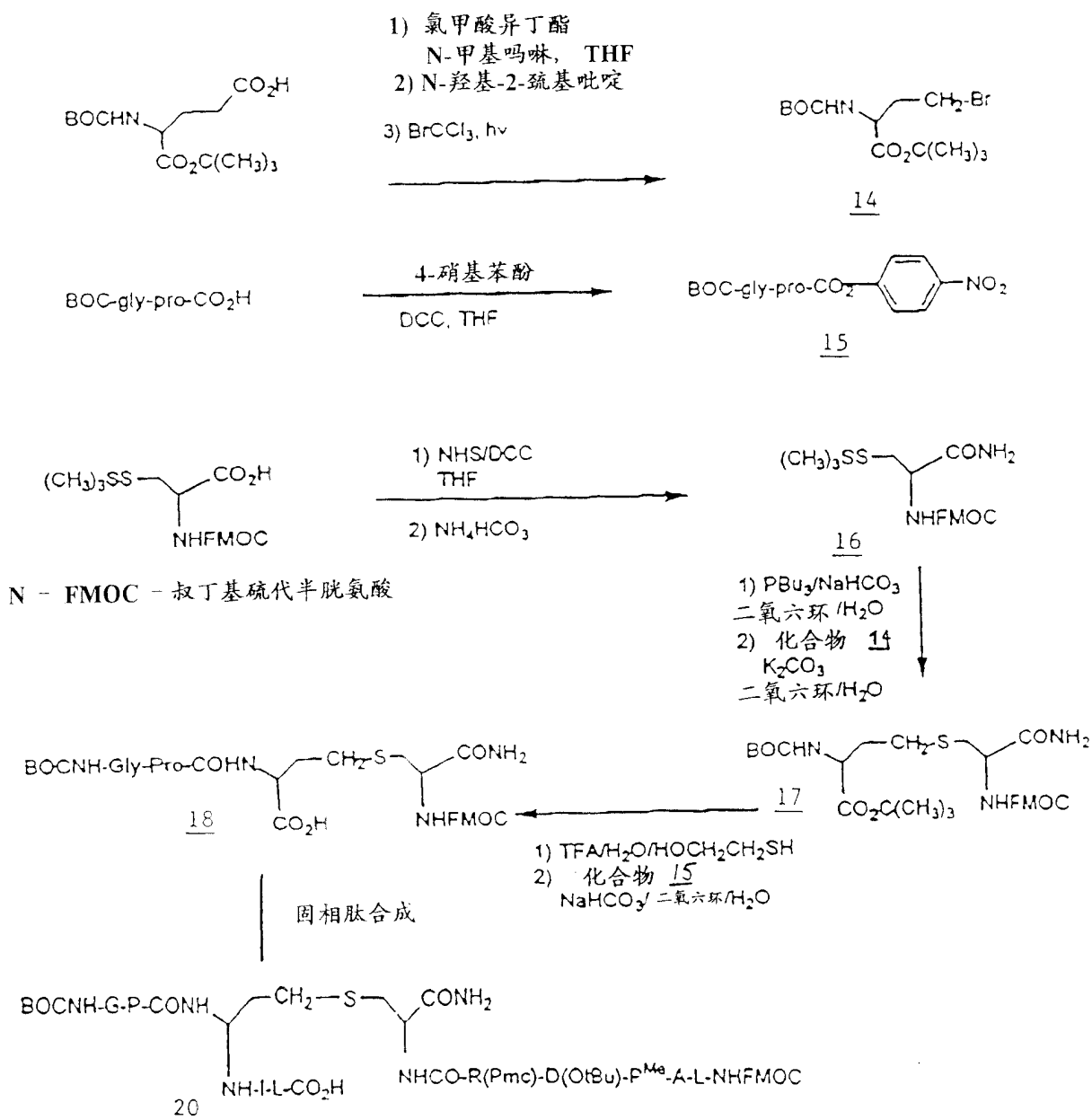
将环状硫醚肽(一种二硫化环状肽类似物, 其中一个硫原子被一个 CH_2

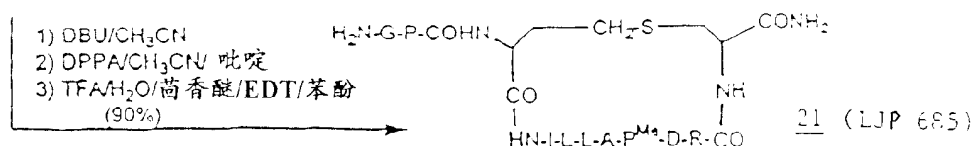
取代)和碳酸氢钠在水和二氧六环中的溶液用对硝基苯酯 **10** 处理。如果肽含有赖氨酸, 则其必须进行合适的封阻。将所形成的稀释肽用三氟醋酸处理, 产生硫醇接头肽 **11**。

化合物 **13** - 环状硫醚肽和溴乙酰化平台的缀合物

向 0.10 mmol 硫醇修饰肽 **11** 在 100 mM 硼酸钠中的 He 喷雾溶液(pH 9)加入 0.025 溴乙酰化平台 **12**(以在 9/1 MeOH/H₂O 中的 40 mg/mL 溶液)。在 N₂ 氛围下搅拌溶液, 直到由 HPLC 证实缀合完全。

实施例 12: 合成 LJP 685





γ-溴-N-BOC-α-氨基丁酸叔丁酯，化合物 14

在 40 ml 干 THF 中的 4.03 g (13.3 mmol) N-BOC-谷氨酸-α-叔丁酯和 1.61 ml (1.48 g, 14.6 mmol) N-甲基吗啉在 N₂ 氛围下冷却至 15 °C。将氯甲酸异丁酯 (1.73 ml, 1.82 g, 13.3 mmol) 逐滴加入到混合物中。将混合物搅拌 10 分钟，加入 2.03 g (16.0 mmol) N-羟基-2-巯基吡啶在 8 ml of THF 中的溶液，接着加入 2.23 ml (1.62 g, 16.0 mmol) Et₃N。将混合物用箔包裹以避免光，使其在室温下搅拌 1 小时。过滤混合物，在旋转蒸发器上浓缩滤液，小心尽量不暴露于光下。将浓缩物溶解在 20 ml BrCCl₃ 中，将溶液冷却至 -70 °C。将固体置于真空中，然后用 N₂ 清除，使其达到室温，置于 20 °C 的水浴中，在近距离内从上用 500W 太阳灯照射 5 分钟。在旋转蒸发器上浓缩混合物，将硅胶色谱纯化(40 mm X 150 mm, 甲苯用作洗脱液直到 UV 活性物完全洗脱，2% EtOAc/甲苯(500 ml), 5% EtOAc/甲苯(500 mL)。再纯化不纯的组分。合并 TLC (R_f 0.23, 5% EtOAc/甲苯)纯化的组分，浓缩，产生 3.23 g (72%)蜡状固体状化合物 14。

N-BOC-甘氨酸酰肼氨酸-4-硝基苯酯，化合物 15:

将 3.0 g (11.6 mmol) N-BOC-甘氨酸酰肼氨酸和 1.93 g (13.9 mmol) 4-硝基苯酚在 82 ml of 干 THF 中的溶液冷却至 0 °C，加入 3.34 g (16.2 mmol) DCC。将混合物在 0 °C 下搅拌 1 小时，移去冰浴。将混合物在室温下搅拌 16 小时。将 HOAc(579 CLL)加入到混合物中搅拌 30 分钟。将混合物保持在冰箱中 30 分钟，在真空下过滤。浓缩滤液，经硅胶色谱(18 X 150 mm 柱, 2.50% EtOAc/97.5% CH₂Cl₂/1%HOAc)纯化。通过在旋转蒸发器上从二氧六环浓缩几次除去微量的乙酸。用 3/1 己烷 Et₂O 研磨浓缩物，经过滤收集所形成的白色固体，产生 4.1 g (90%)白色固体状化合物 15。TLC R_f 0.09, 40/60/1 EtOAc/己烷/HOAc; ¹H NMR(CDCl₃) δ1.09-2.55 (m, 4H), 1.48 (s, 9H), 3.47-3.77 (m, 2H), 4.05 (m, 2H), 4.74 (m, 1H), 5.45 (bd s, 1H), 7.35 (d, 2H), 8.30 (d, 2H)。

N-FMOC-S-叔丁基硫代半胱氨酸酰胺(thiocysteineamide), 化合物 16:

将 5.0 g (11.6 mmol) Fmoc-S-叔丁基硫代半胱氨酸和 1.33 g (11.6 mmol) N-羟基琥珀酰亚胺在 115 ml THF 中的溶液冷却至 0 °C。向溶液中加入 3.58 g (17.37 mmol) DCC，在 0 °C 搅拌混合物 1 小时，加入 1.6 g (NH₄)HCO₃ 在 50 ml 水中的 42.9 ml 溶液。将混合物搅拌 4.5 小时，使冰浴逐渐温热至室温，在旋转蒸发器上浓缩，以除去 THF，产生具有白色固体的水相。将混合物与 200 ml CH₂Cl₂ 一起搅拌，直到大多数固体溶解，然后与 100 ml 1N HCl 一起振荡。用 100 ml 饱和 NaHCO₃ 溶液洗涤 CH₂Cl₂ 层。干燥(Na₂SO₄)并过滤。在热的平板上使滤液沸腾，从 300 ml CH₂Cl₂/己烷结晶，产生 4.36 g (87%) 白色固体状化合物 14：mp 127-129 °C；TLC Rf 0.29, 95/5/1 CH₂Cl₂/CH₃CN/MeOH, ¹H NMR (CDCl₃) δ 1.36 (s, 9H): 3.06-3.24 (m, 2H), 4.25 (t, 1H), 4.55 (m, 3H), 5.56 (bd s, 1H), 5.70 (bd s, 1H), 6.23 (bd s, 1H); ¹³C NMR (CDCl₃) 29.8, 41.9, 47.1, 48.5, 54.2, 67.2, 120.0, 125.0, 127.1, 127.8, 141.3, 143.6, 156.1, 172.2. 分析计算值: C, 61.4%; H, 6.1%; N, 6.5%. 实测值: C, 61.5%; H, 6.0%; N, 6.5%。

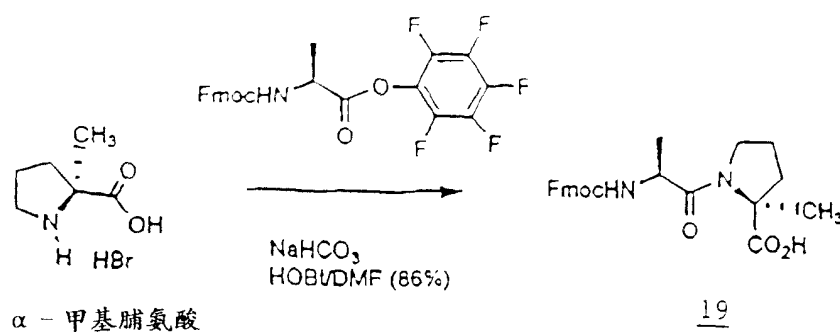
化合物 17:

将水(16.9 ml) 添加到在 33.8 ml 二氧六环中的 2.91 g (6.75 mmol) 化合物 16 中，用氮喷雾溶液 5-10 分钟。将混合物保持在氮氛围下，加入 1.13 g (13.5 mmol) NaHCO₃，接着加入 1.77 ml (1.44 g, 7.09 mmol) PBu₃。在室温下搅拌混合物 1 小时，在 1 X 100 ml 1N HCl 和 2 X 100 ml CH₂Cl₂ 之间分配。合并 CH₂Cl₂ 层，浓缩，将所形成的白色固体部分溶解在 33.8 ml 二氧六环中。加入水(9 ml)，用氮净化混合物 5-10 分钟。将混合物保持在氮氛围下，加入 2.17 g (16.9 mmol) K₂CO₃，接着加入 2.63 g (8.1 mmol) 化合物 14。将混合物搅拌 16 小时，在 1 X 100 ml 1N HCl 和 2 X 100 ml 10% MeOH/ CH₂Cl₂ 之间分配。合并 CH₂Cl₂ 层，用硫酸钠干燥，过滤并浓缩成半固体残渣。经硅胶色谱(1/3 CH₃CN/CH₂Cl₂)纯化，产生 3.2 g (80%) 化合物 17 白色固体；TLC Rf 0.27, 1/3 CH₃CN/CH₂Cl₂。通过从己烷/EtOAc 重结晶进行分析样品的进一步纯化；mp 104-106.5 °C；¹H NMR (CDCl₃) δ 1.47 (s, 9H), 1.49 (s, 9H), 1.96 (m, 1H), 2.11(m, 1H), 2.69 (m, 2H), 2.88 (m, 1H), 3.03 (m, 1H), 4.29 (t, 1H), 4.36 (m, 2H), 4.50 (m, 2H), 5.21(m, 1 H), 5.49 (m, 1H), 5.81(m, 1 H), 6.54 (m, 1H), 7.34 (t, 2H), 7.42 (t, 2H),

7.61 (d, 2H), 7.80 (d, 2H); ^{13}C NMR (MeOH) δ 26.1, 26.7, 28.2, 28.7, 34.8, 54.8, 55.7, 68.1, 80.5, 82.7, 120.9, 126.3, 128.2, 128.8, 142.6, 145.2, 160.0, 162.7, 173.4, 175.8。 $\text{C}_{31}\text{H}_{91}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}$ 分析计算值: C, 62.08; H, 6.89; N, 7.01; 实测值: C, 62.23; H, 7.12; N, 7.39。

化合物 18:

将 20/1/1 TFA/ H_2O /巯基乙醇(23.2 ml)溶液加入到 1.27 g (2.11 mmol) 化合物 17 中。在室温下搅拌混合物 1 小时, 浓缩至约 3 ml 体积。添加 50 ml 乙醚以沉淀产物。用两份多乙醚洗涤所形成的固体, 并在真空下干燥, 产生 812 mg 固体。将该固体悬浮在 10.6 ml 二氧六环和 10.6 ml H_2O 中。将 NaHCO_3 (355 mg, 4.22 mmol) 添加到混合物中, 接着添加 1.33 g (3.38 mmol) 化合物 15 在 10.5 ml 二氧六环的溶液中。在室温下搅拌混合物 20 小时, 在 100 ml 1N HCl 和 3 X 100 ml CH_2Cl_2 中分配。干燥合并的 CH_2Cl_2 层(Na_2SO_4), 过滤并浓缩。将硅胶色谱纯化(35 X 150 mm; 梯级梯度, 5/95/1 MeOH/ CH_2Cl_2 /HOAc (1L) 到 10/95/1)。浓缩纯的组分, 与乙醚一起研磨残渣, 产生 881 mg (60%) 化合物 18; TLC R_f 0.59, 10/90/1 MeOH/ CH_2Cl_2 /HOAc; mp 116-117.5 $^\circ\text{C}$; ^1H NMR(CDCl_3) δ 1.41(s, 9H), 2.00 (m, 2H), 2.18(m, 2H), 2.56 (m, 1H), 2.69 (m, 1H), 2.85 (m, 2H), 3.49 (m, 2H), 3.62 (m, 2H), 3.85 (m, 2H), 4.08 (m, 1H): 4.12 (m, 1H), 4.22 (t, 1H), 4.38 (m, 1H), 4.49 (m, 2H), 4.61 (m, 2H), 7.78 (d, bd s, 1H), 6.12 (bd s, 1H), 6.43 (bd s, 1H), 7.35 (d, 2H), 7.40 (d, 2H), 7.61 (d, 2H), 7.78 (d, 2H); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 25.3, 27.8, 28.6, 29.4, 32.6, 35.1, 44.1, 46.9, 47.3, 52.2, 53.9, 61.2, 67.8, 80.8, 120.8, 125.7, 128.2, 129.0, 142.0, 144.5, 157.6, 157.8, 170.6, 181.2, 182.9, 183.1。分析计算值 $\text{C}_{34}\text{H}_{43}\text{N}_5\text{O}_9\text{S}$: C, 58.52; H, 6.21; N, 10.03。实测值: C, 58.38, 11, 6.17; N, 10.20。



N-FMOC-L-丙氨酰-L-2-甲基脯氨酸, 化合物 19:

将 2- 甲基脯氨酸(Seebach 等(1983)美国化学会杂志, 105:5390-5398) (1.00 g: 4.76 mmol), 4.00 g (47.6 mmol) NaHCO₃ 和 31 mg (0.23 mmol) HOBT 在 6.9 ml DMF 中的溶液冷却至 0 °C, 加入 3.18 g (6.66 mmol) N-FMOC-L-丙氨酸。在 0 °C 搅拌反应物 1 小时, 然后在室温下搅拌 18 小时。将混合物在 50 ml EtOAc 和 3 X 50 ml 1N HCl 中分配, 干燥 EtOAc 层 (MgSO₄), 过滤并浓缩。经硅胶色谱(梯级梯度 45/55/1 EtOAc/己烷/HOAc 到 47/53/1 EtOAc/己烷/HOAc 到 50/50/1 EtOAc/己烷/HOAc)纯化, 产生 1.72 g (86%) 化合物 19 白色固体。将产物从二氧六环浓缩几次, 以除去微量的乙酸: mp 59-60 °C; ¹H NMR (CDCl₃) δ 1.39(d, 3H), 1.93 (m, 2H), 2.06 (m, 2H), 3.78 (m, 2H), 4.22 (m, 1H), 4.40 (d, 2H), 4.56 (m, 1H), 5.09 (t, 1H), 5.69 (d, 1H), 7.32 (t, 2H), 7.42 (t, 2H), 7.62 (d, 2H), 7.78 (d, 2H); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 17.8, 21.8, 23.8, 37.9, 47.1, 48.5, 65.9, 67.0, 120.0, 125.1, 127.1, 127.7, 141.3, 144.1, 155.6, 172.9, 175.1。

N-FMOC-L-亮氨酰-HMPB-MBHA 树脂:

制备 N-FMOC-L-亮氨酸在 22.5 ml CH₂Cl₂ 中的溶液和几滴 DMF, 冷却至 0 °C。向溶液中加入 1.71 ml (1.38 g, 10.9 mmol) 二异丙基碳化二亚胺 (DIC), 在 0 °C 下搅拌混合物 20 分钟。将混合物浓缩成油状, 同时, 将足够量的 DMF (约 3 ml) 加入到 2.5 g (0.87 mmol/g, 2.18 mmol) HMPB-MBHA 树脂(Nova Biochem)上, 以膨胀树脂。将浓缩的油状物溶解少量 DMF (约 1 ml) 中, 并添加到膨胀的树脂上, 接着加入溶解在约 1 ml DMF 中的 266 mg (2.18 mmol) DMAP 溶液。轻轻摇动混合物 1 小时, 洗涤(2 X DMF, 2 X MeOH, 2 X DMF, 2 X MeOH)。将树脂在真空下干燥, 产生 2.77 g (85%), 取代基由 Geisen 试验测得为 0.540 mmol/g。

具有在天冬氨酸上的丁酯和在精氨酸上的 Pmc 基以及具有硫醚插入物的 N-FMOC-线性肽, 化合物 20:

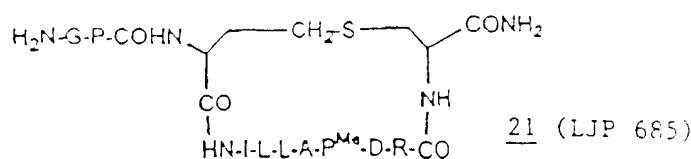
在 N-FMOC-L-亮氨酰-HMPB-MBHA 树脂上经标准 FMOC 合成法制备该肽。除了化合物 18 的偶联步骤外, 在各偶联步骤中使用三当量的氨基酸, HOBT 和(DIC)。两当量的化合物 18 与三当量的 HOBT 和二异丙基

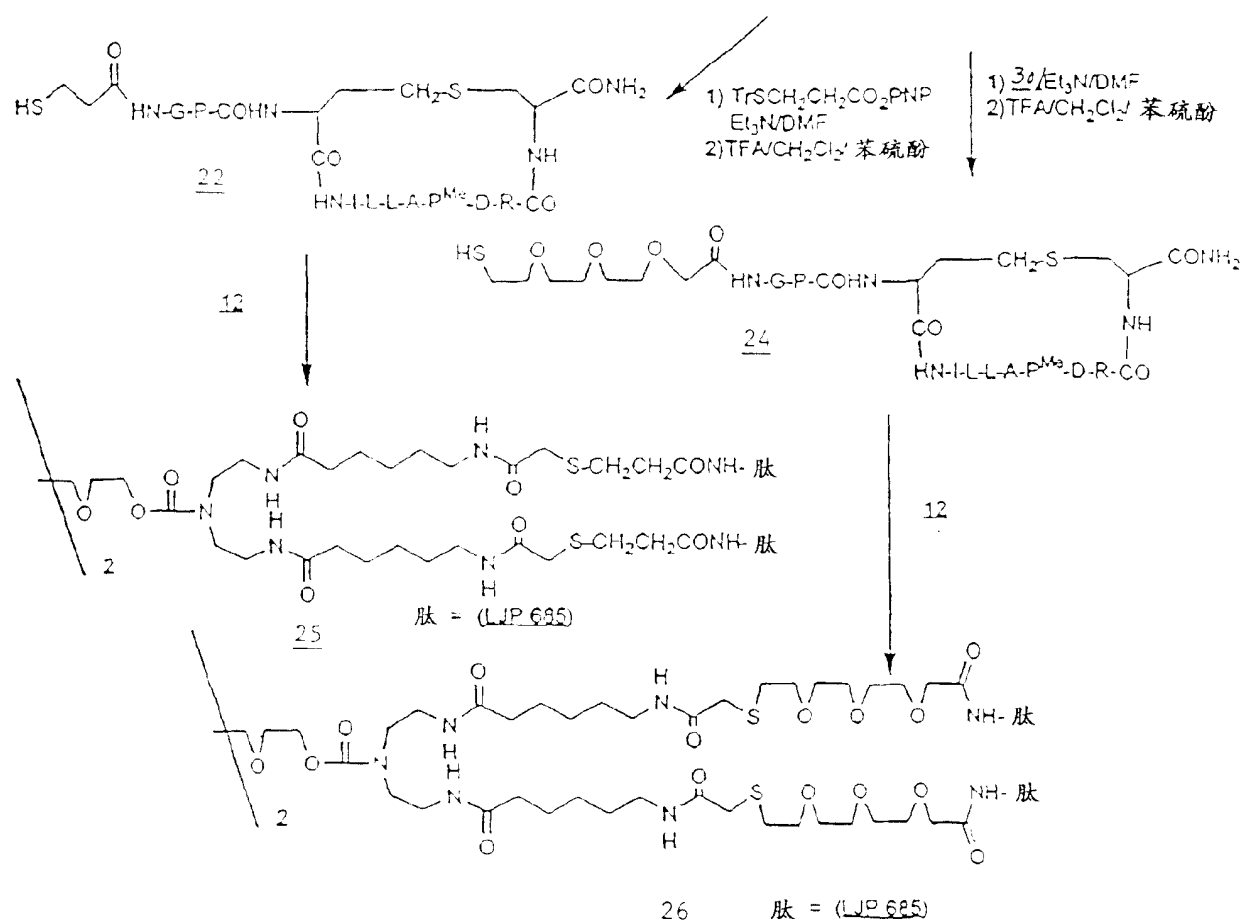
碳化二亚胺一起使用。采用 10 μ L 溴酚蓝指示剂监测各步反应。也用茚三酮试验(在 100 $^{\circ}$ C 加热 2 分钟, 用 1 滴吡啶和 1 滴在 EtOH 中的 5% 茚三酮和 1 滴在 EtOH 中的 80% 苯酚, 液滴变蓝)估计反应的完成情况。这样, 将 1.13 mg (0.613 mmol) 树脂 用于制备所说的肽。在最后的偶联步骤后, 通过用 1% 三氟乙酸在 CH_2Cl_2 中的溶液处理 2 分钟完成从树脂上裂解。2 分钟后, 减压过滤进 30 ml 10% 吡啶在 MeOH 中的溶液中。重复这一操作 10 次。合并经 HPLC (C18, 梯度, 60/40/0.1 $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}/\text{TFA}$ 到 90/10/0.1 $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}/\text{TFA}$, 210 nm, 1 ml/min, 4.6 mm X 250 mm 柱)证实含有肽的滤液并浓缩。将浓缩物溶解在 40 ml 10% HOAc 溶液中, 经 HPLC 纯化, 产生 0.528 g (49%) 肽 20。

将肽 20 转化成肽 21(除去 FMOC 基, 结晶和除去保护基):

将 99 μ L DBU 在 10 ml CH_3CN 中的溶液(5 ml)添加到 96 mg (0.052 mmol) 肽 20 中。搅拌溶液 1 小时, 浓缩成残渣。将该残渣与 2 X 10 ml Et_2O 一起研磨, 产生白色固体。将该固体溶解在 100 ml CH_3CN 和 312 μ L (0.312 mmol) 0.1 M 二苯基磷酰基叠氮化物(DPPA)在 CH_3CN 中的溶液中。将混合物搅拌 20 小时, 并在旋转蒸发器上浓缩。将该残渣与 2 X 50 ml Et_2O 一起研磨, 白色的不透明残渣用 5 ml 92/3/2/3 TFA/茴香醚/EDT/ Me_2S 处理 1 小时。通过将混合物加入到在 50 ml 聚丙烯离心管中的 40ml Et_2O 中沉淀产物。将沉淀冷却至 0 $^{\circ}$ C, 在 2000 rpm 下离心 5 分钟。倾析上清液, 用 Et_2O 洗涤沉淀并再离心。干燥沉淀并溶解在 4 ml 50/50 $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 中。用 36 ml $\text{H}_2\text{O}/0.1\%$ TFA 稀释混合物, 经 HPLC(1" C18 柱, 梯度, 10/90/0/1 $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}/\text{TFA}$ 到 35/65/0.1 $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}/\text{TFA}$, 230 nm)纯化。冷冻干燥经 HPLC 证实的纯化的组分, 产生 52 mg (90%) 化合物 21。

实施例 12: 合成 LJP 685 缀合物





用 3-三苯甲基巯基丙酸 PNP 酯处理 LJP 685(也称为化合物 21), 将产生的产物脱三苯甲基化, 产生化合物 22, 具有游离硫醇接头的肽。过量化合物 22 与效价平台分子 U 的反应产生四价的缀合物 25。用较长的接头, 化合物 15 (参见以下反应方案) 处理化合物 21, 接着脱三苯甲基产生化合物 24。化合物 24 与效价平台分子 12 反应产生四缀合物 26。通过 HPLC, 两种缀合反应显得非常清楚。

将 MTU 接头连接到 LJP 685 上, 合成化合物 24:

向 15 mg (0.013 mmol) 化合物 21 中加入 160 μL 29.5 mg 化合物 21 的溶液和 17.5 μL 在 0.5 ml DMF 中的二丙基乙胺的溶液。将混合物搅拌 2 小时, 并从 Et_2O 中沉淀。干燥沉淀并溶解在 650 μL 1/1/0.056/0.040 TFA/ CH_2Cl_2 /苯硫酚/ Me_2S 溶液中, 使溶液静置 1 小时。从 Et_2O 沉淀, 产生粗化合物 24, 经 HPLC (C18, 15-45% $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$, 0.1% TFA) 纯化。将含有纯化的产物的组分冷干, 产生 8.6 mg 化合物 24 白色固体。

LJP 685-MTU-AHAB-TEG, 化合物 26:

实施例 16 T 细胞活化测定

在 96 孔园底平板中监测肽-刺激 T 细胞产生的三苯甲基化胸腺嘧啶核甙摄取。将消耗淋巴结细胞(小鼠)或分离外围的血淋巴细胞(人)的单-细胞悬液 5×10^5 以每孔 150 μ l 终体积与 1 和 30 μ g 之间的肽混合, 在 5% 二氧化碳中于 37 $^{\circ}$ C 下培养 5 天。培养结束时加入 1 微居里标记的胸腺嘧啶核甙, 并培养另外的 15-24 小时。将收获的细胞收集在过滤器上, 由液态闪烁光谱测定法计数。

实施例 17 体外诱导的耐受性

8 组(每组包含 5 只 C57B1/6 小鼠)用 10 μ g/小鼠在明矾上的 LJP685-KLH 缀合物加作为佐剂的 *B. pertussis* 疫苗灌注。在 3 周之后, 收获脾并制备单细胞悬液, 用平衡盐溶液洗涤 3 次, 以等同于 1 个脾/1.5 ml 培养基的浓度重悬于完全 RPMI-1640 培养基中。将细胞悬液分成 2.5ml/培养皿的等分样, 在 37 $^{\circ}$ C 以 100 μ M、20 μ M 和 4 μ M 浓度与(LJP685)₄-DABA-PEG(化合物 36)和(LJP685)₄-TEG(化合物 35)一起培养 2 小时。一组细胞在没有耐受原存在下培养, 作为阳性对照。然后用大体积的平衡盐溶液洗涤细胞, 并重悬于 2.5ml 平衡盐溶液中。接着将细胞注射进 650R 放射同系 (syngeneic) 受体小鼠, 使得所有来源于给定处理组的细胞平等地分成 5 组受体。用 10 μ g 盐水中的 LJP 685-KLH 腹膜内强化免疫包括阳性对照在内的所有受体小鼠。在强化免疫后七天, 对小鼠放血, 其血清用于试验抗 LJP 685 抗体的存在。用两种缀合物处理产生如图 16 和图 17 所示的抗 LJP 685 抗体的明显剂量依赖性降低, 其是通过如 Iverson, G.M., 在试验免疫学手册, 第二卷, 细胞免疫学中的"体内过继免疫反应测定"(Weir, D.M., ed., Blackwell 科学出版社, Pale Alto, CA, 1986)中所描述的抗原结合能力(ABC)测定的。

实施例 18 5A12, CB2 和 3G3 肽的 NMR 溶液结构分析

对采用以上实施例中所描述的方法从噬菌体文库筛选分离的两种肽进行 NMR 分析。原来的肽在倒数第二为有脯氨酸, 而这一氨基酸被除去,

因为二维 (2D)双量子滤过相关光谱学(DQF-COSY) NMR 数据表明两个在这一位置上的不同于顺式和方式异构体的结构。除去脯氨酸给出具有结合 ACA 抗体的在 50 - 100nM 范围内的 K_d 和在 DQF-COSY 谱指纹区中预定数目的峰的肽。所形成的环状肽是 5A12(GPCLILAPDRCG)和 CB2(GPCILLARDRCG)。所述肽之间的主要区别是 8 位上脯氨酸取代精氨酸, 其导致 CB2(与 5A12 是刚性肽是一致的)的 1D ^1H NMR 谱中少得多的弥散。精氨酸取代也产生 pK 值所反映的离子化天冬酰基羧基的 0.55 kcal/mol 稳定化。在更加规则的 5A12 肽上进行结构分析。尽管重氢交换和温度系数数据显示没有氢结合的证据, 但核 Overhauser 效应(NOE)、旋转 Overhauser 效应(ROE)和连接数据是与一个结构一致的。距离几何学计算给出 50 个结构的家族。15 个最好的具有 2.1 ± 0.2 埃的所有原子的平均根平均平方偏差(RMSD)。我们确定, 所说的肽具有椭圆形, 在分子相对的端、二硫化物和脯氨酸 8(其是顺式的)处有转折。在骨架 LIL 区中也有结。最后, 羧基末端甘氨酸是非常易变的, 因为其是具有阳性内残基 NOE 的仅有的残基。这代表有关肽(其模仿在 $\beta 2$ -GPI 上的 ACA 表位)的所确定的第一结构信息。

与距离几何学计算相联系的 NMR 数据用来确定肽 925(CLGVLAKLC)、具有在肽 925 的 6 位丙氨酸取代甘氨酸的截短的肽 3G3(AGPCLGVLGKLC PG)的三维结构。于 25 $^{\circ}\text{C}$ pH 3.8 下在水中测定肽 925 的结构。计算了全部 9 个结构, 所有的均与 NMR 数据一致。当每一结构与质心比较时, 所有非氢原子的 RMSD 是 2.45 ± 0.36 埃。图 18 显示了最接近质心的全部结构, 因此是肽 925 分子形状的合理的代表。图 19 将肽 925 的结构(如 3G3, 在图的底部标记)与肽 5A12 的结构进行了比较。在肽序列中两种肽大约在相同的位置具有转折。

肽的药效基因已被暂时鉴定为小的疏基团和带正电荷的基团。肽 925 的 gem-二甲基和氨基已被暂时鉴定为这一肽的药效基因, 如图 20 所示。限制药效基因在某些支架上的碳氢化合物具有图 20 限定的长度, 这些接头连接到脚手架上的位点由限定的距离分开。最后, 限定两种接头相对取向的两面角被确定为 22° 。

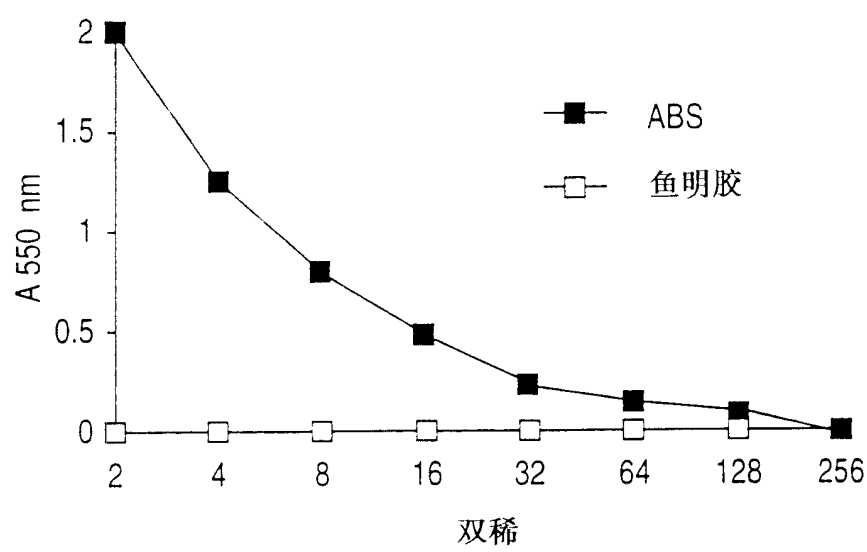


图1

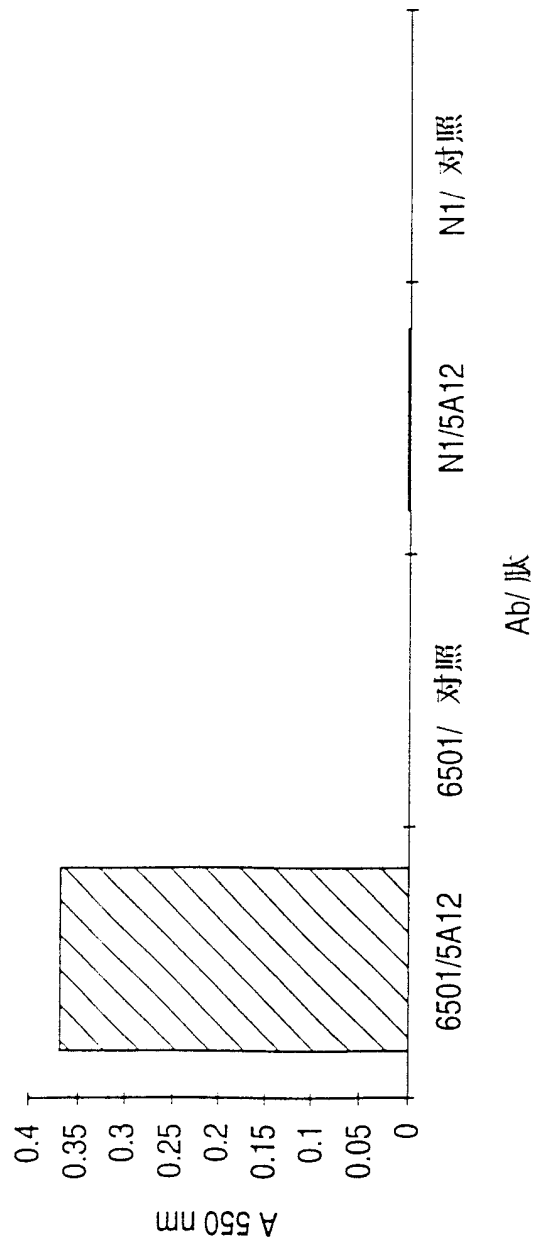


图 2

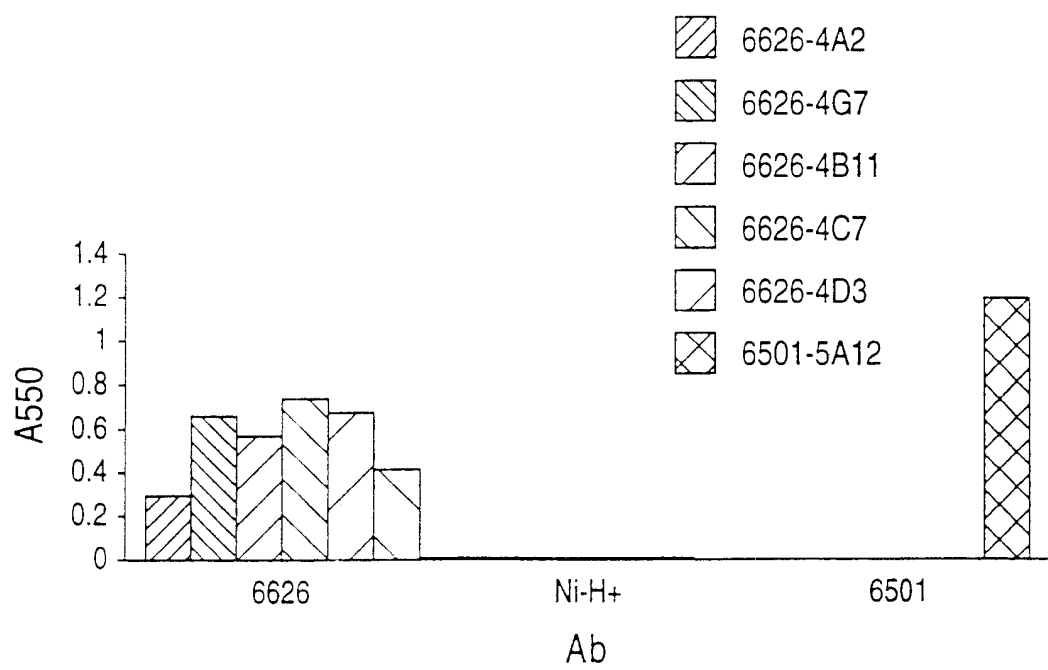


图 3

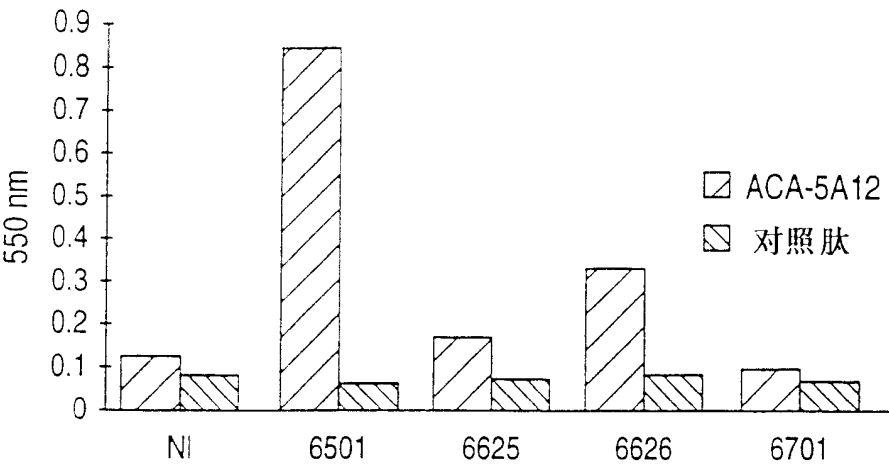


图 4

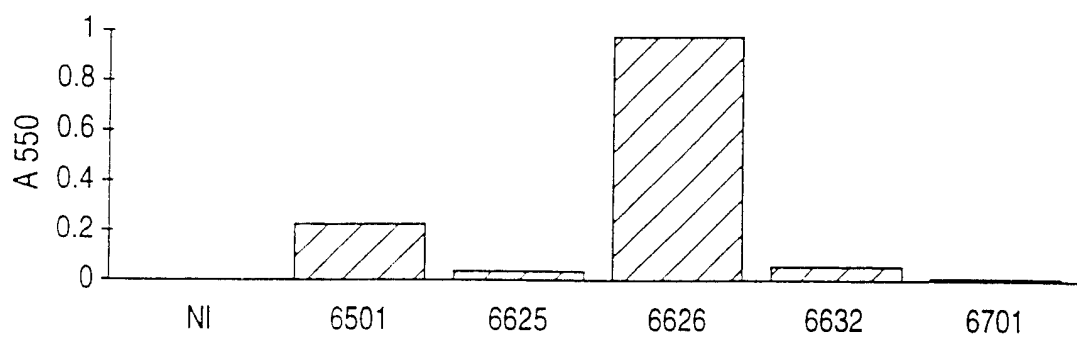


图 5

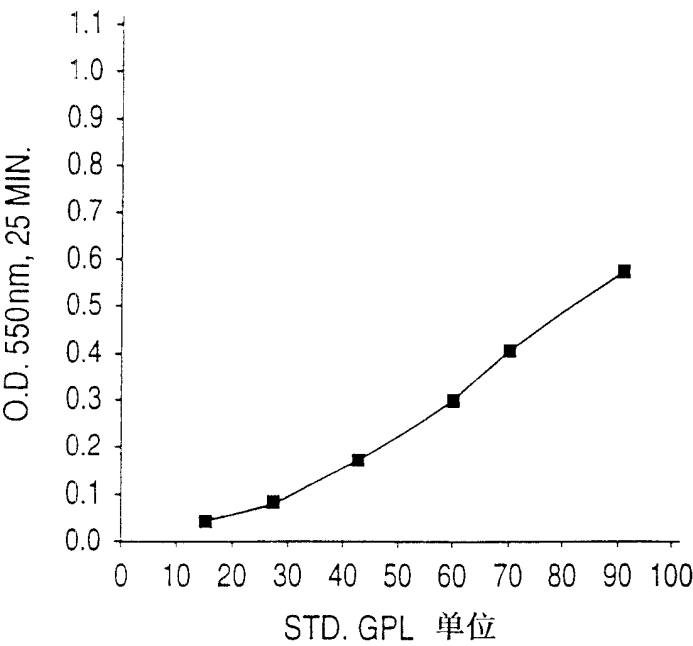


图 6A

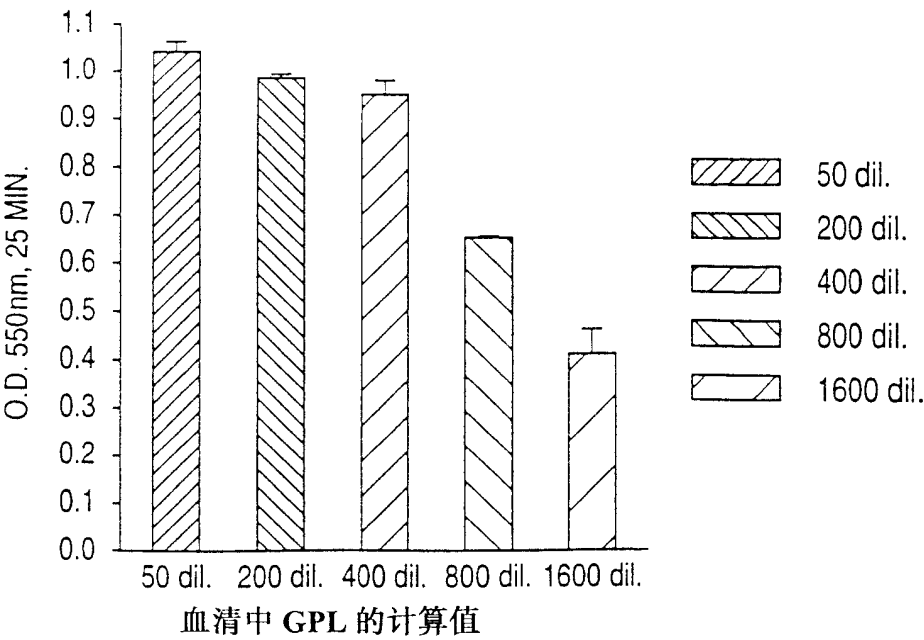


图 6B

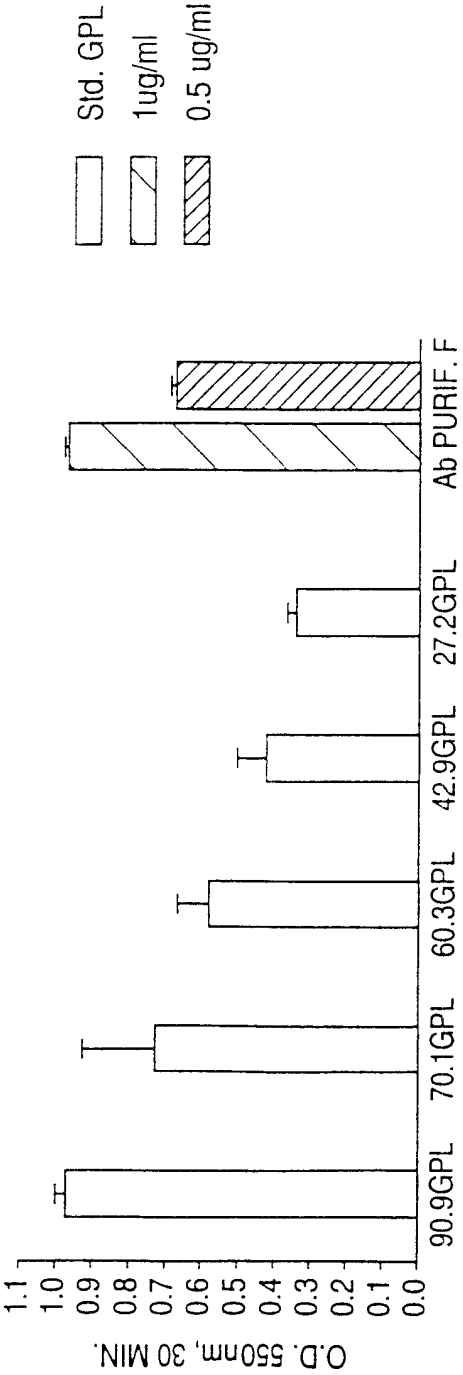


图7

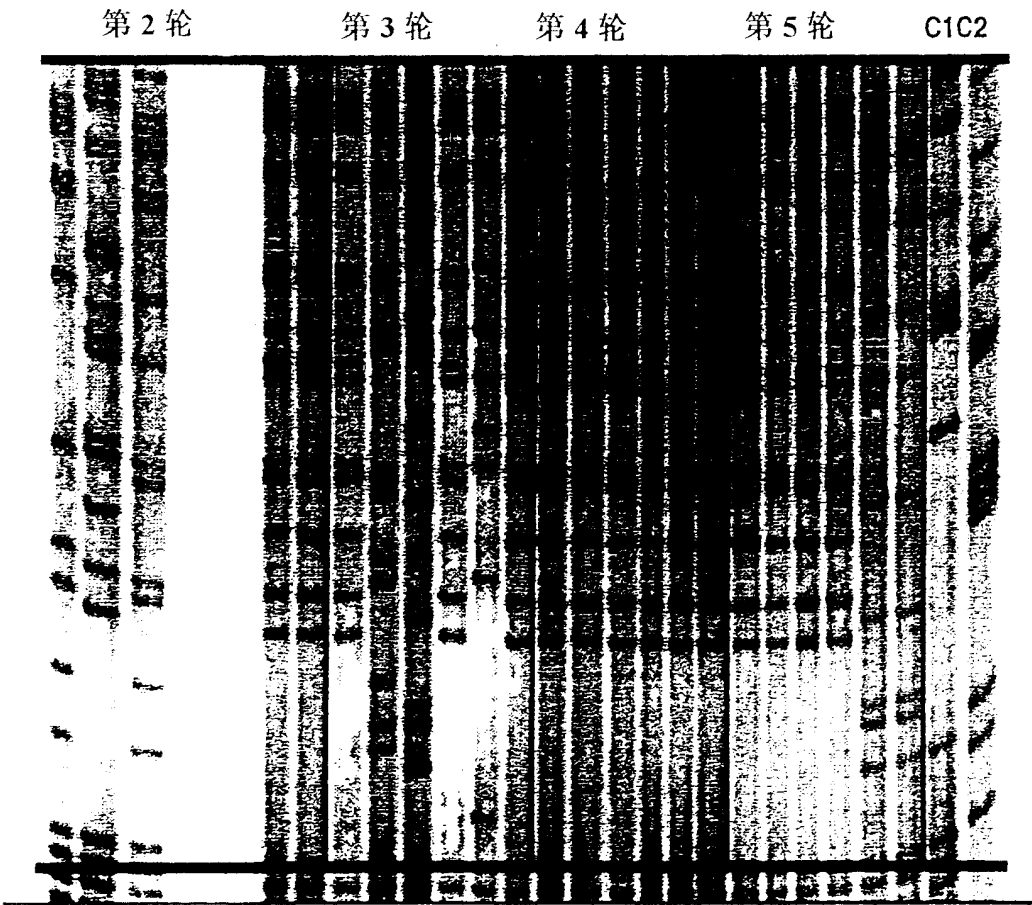


图 8

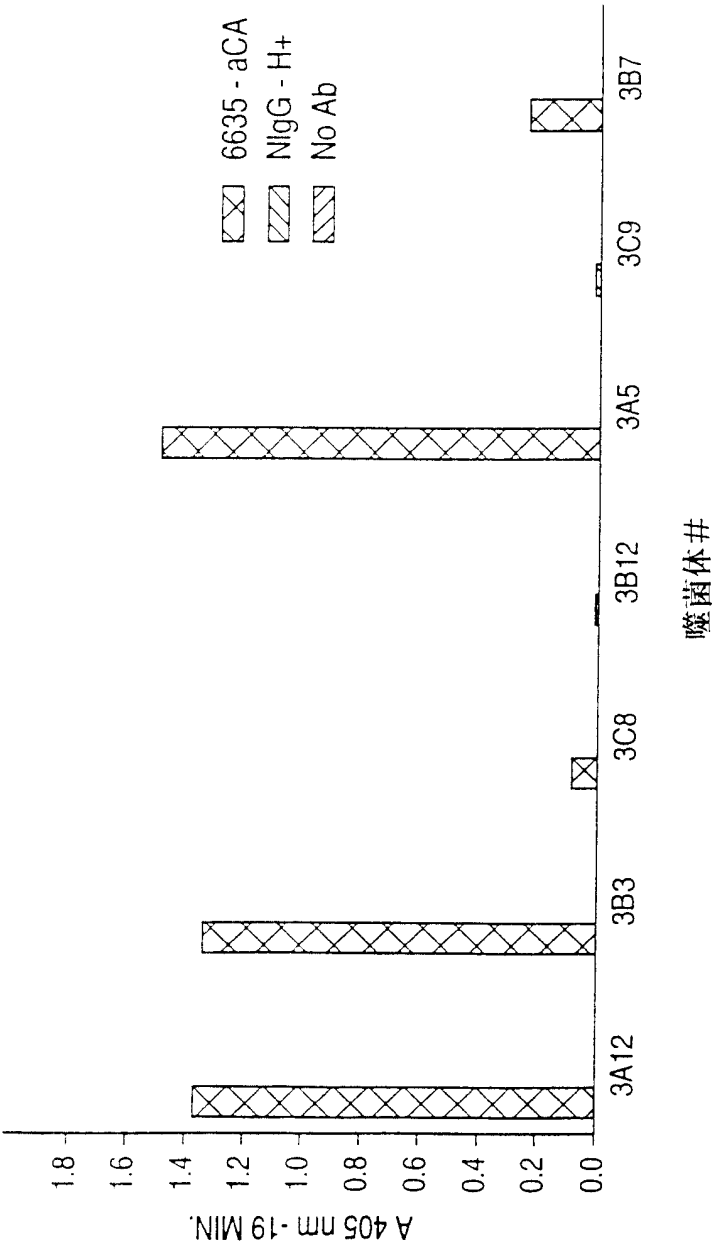


图 9

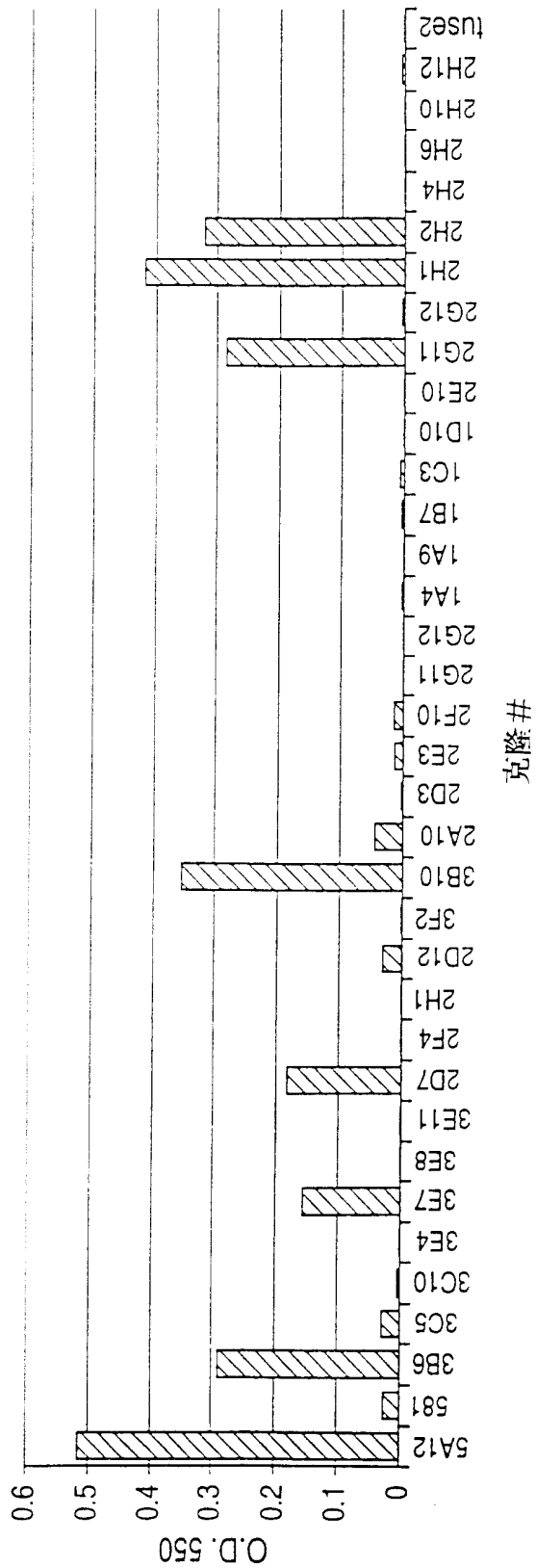


图10

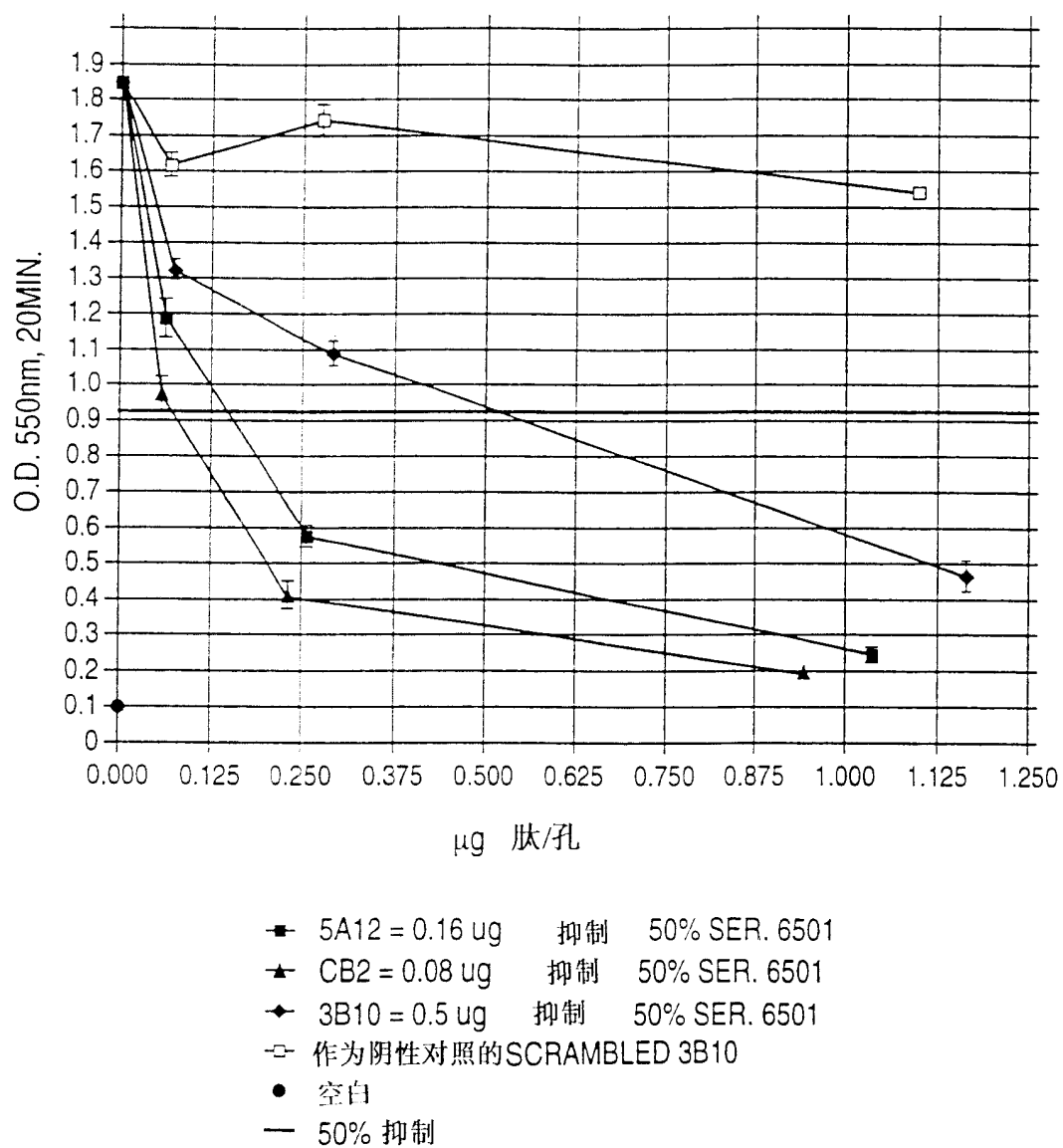


图 11

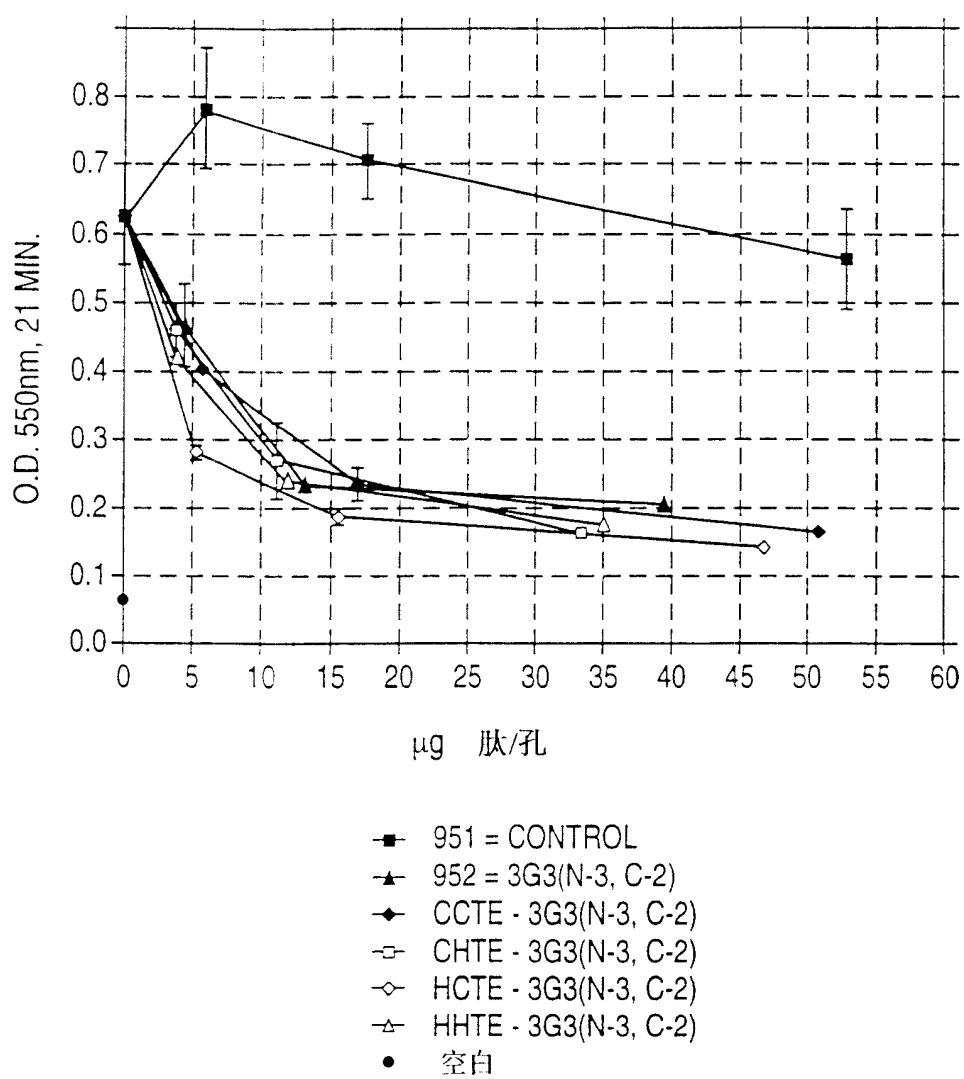


图 12

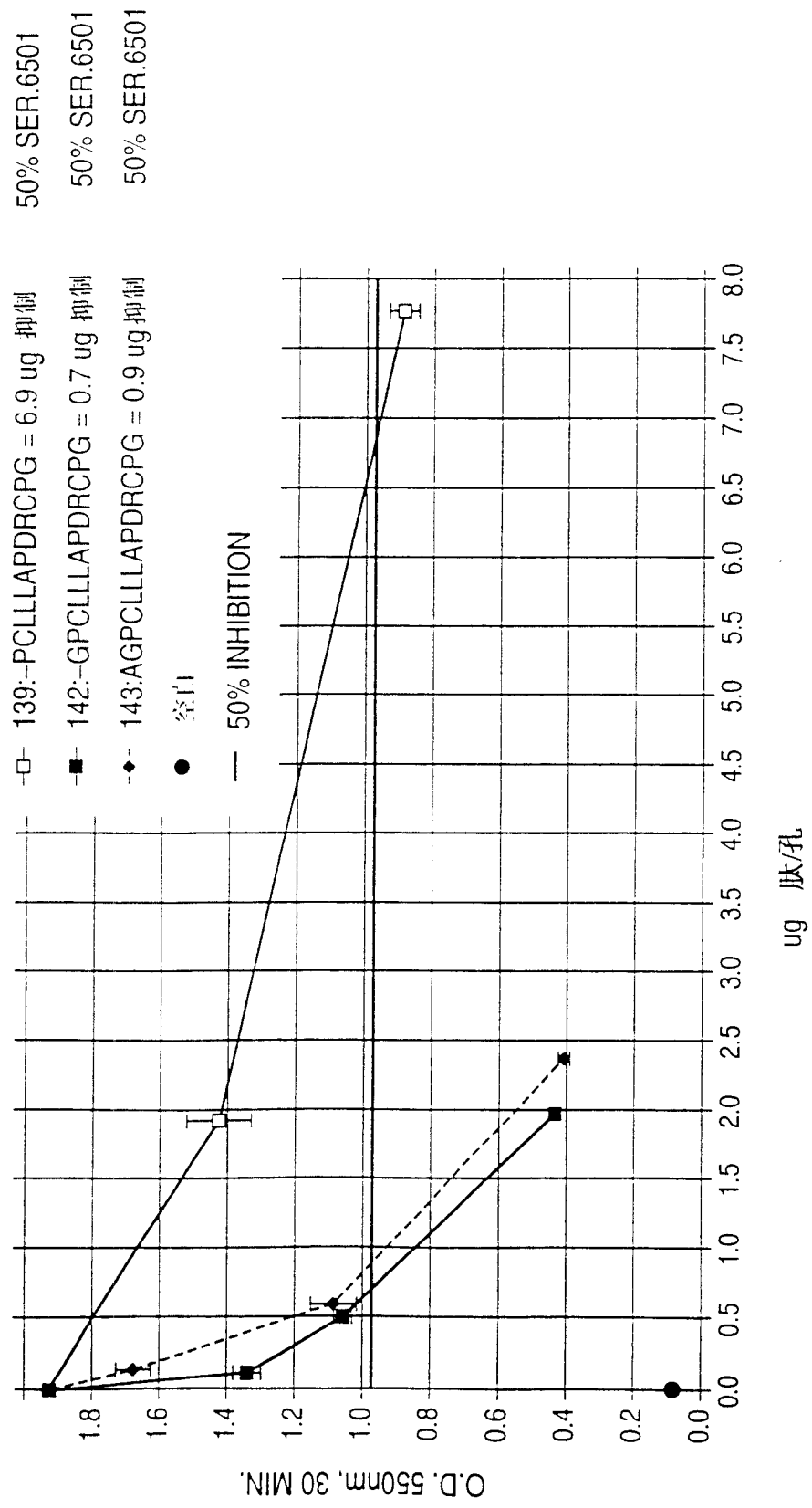


图 13

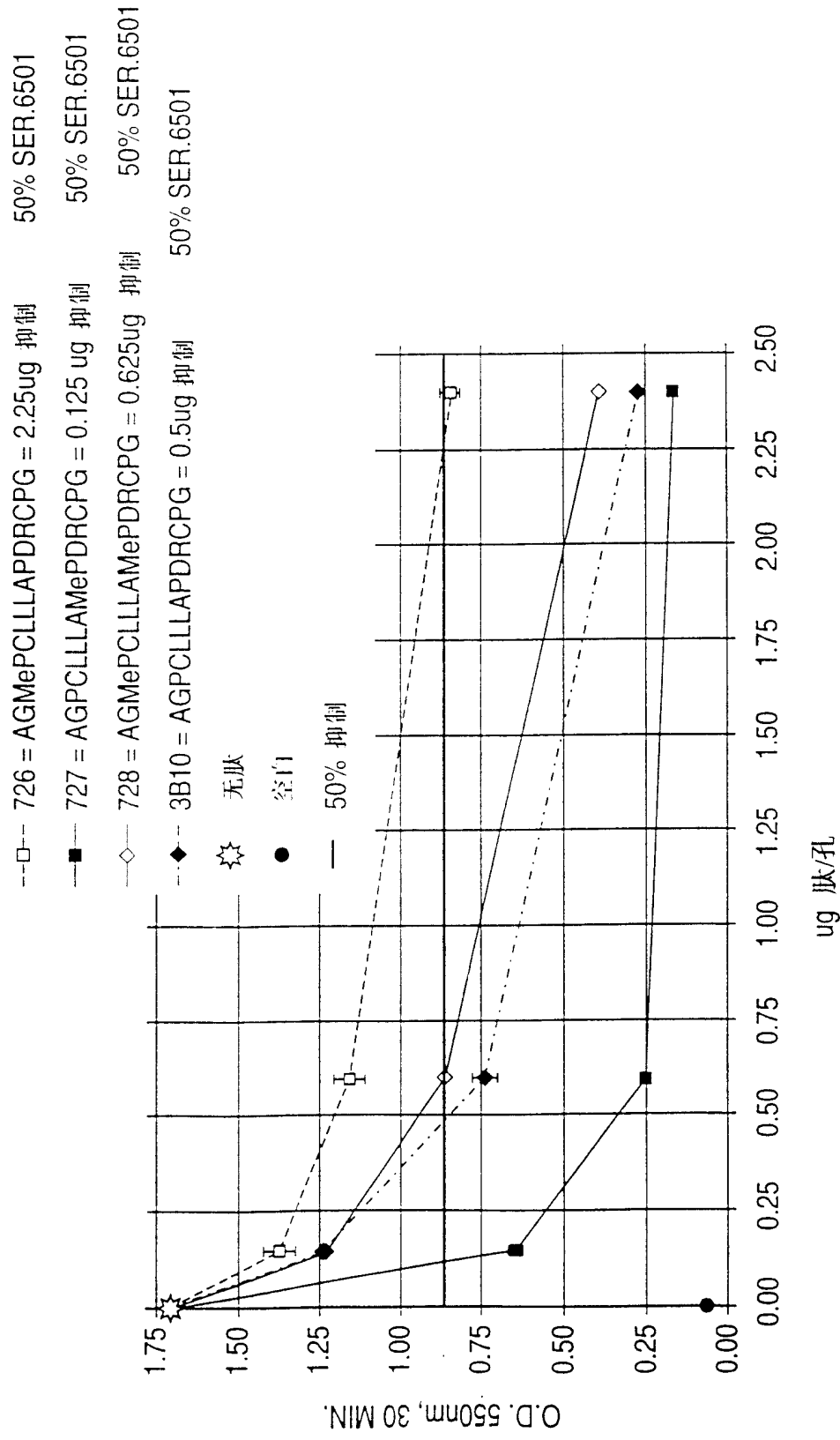


图 14

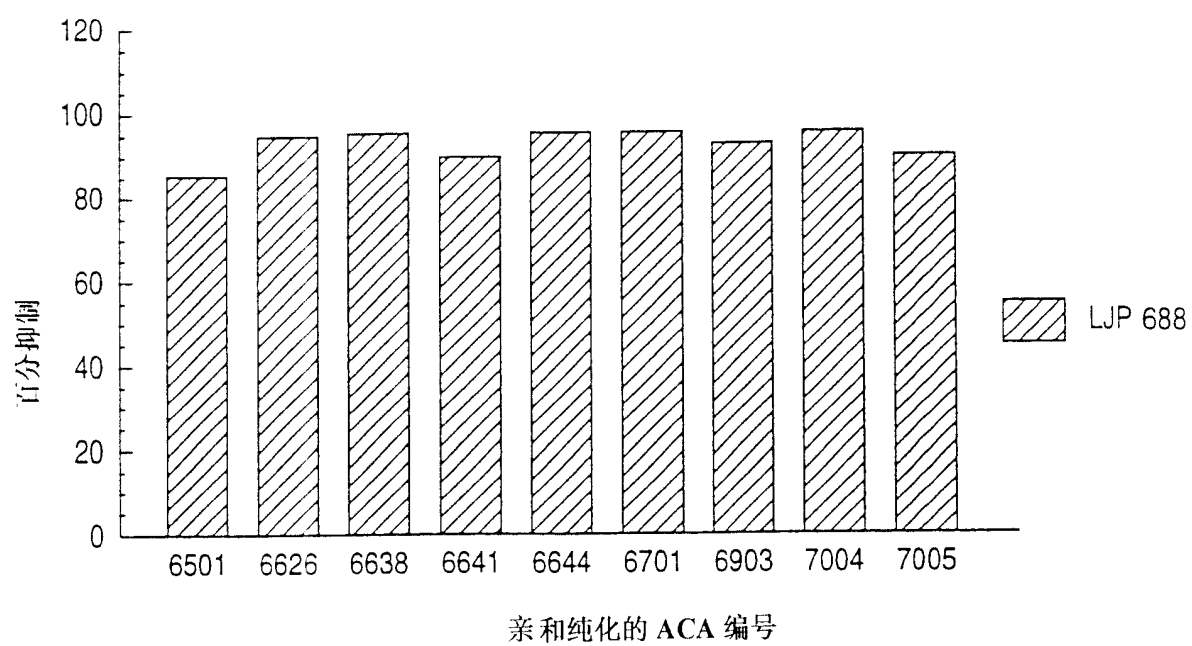


图15

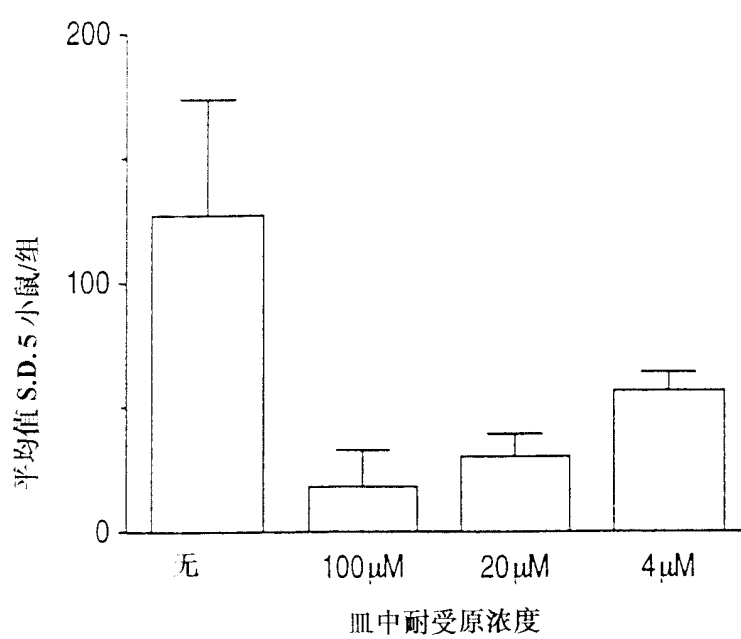


图 16

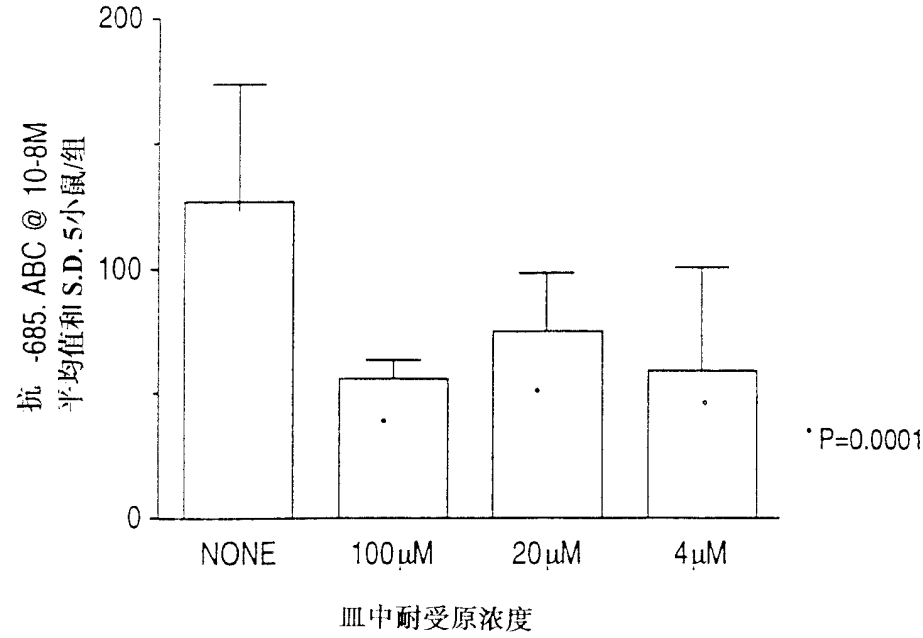


图17

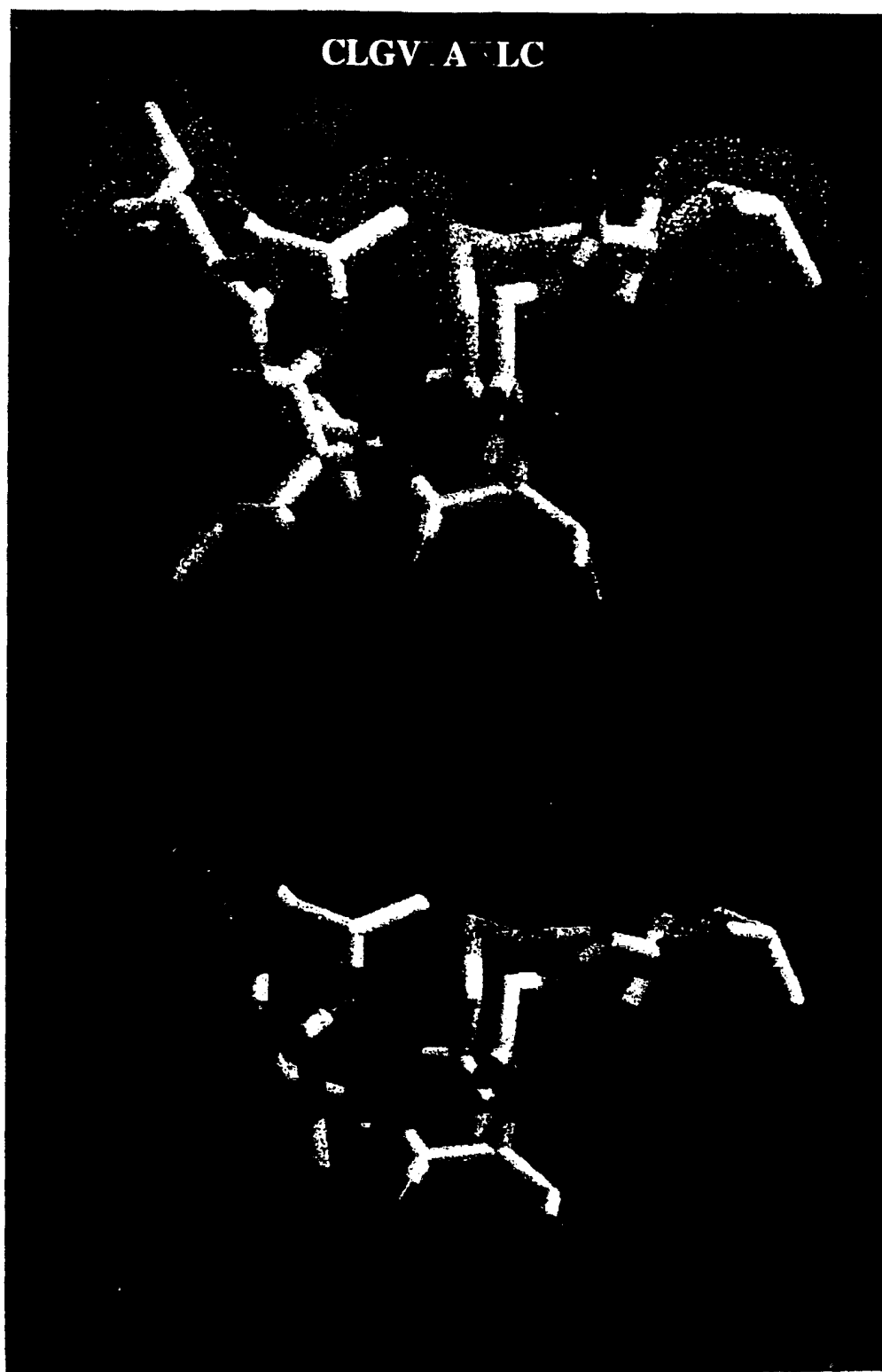


图 18

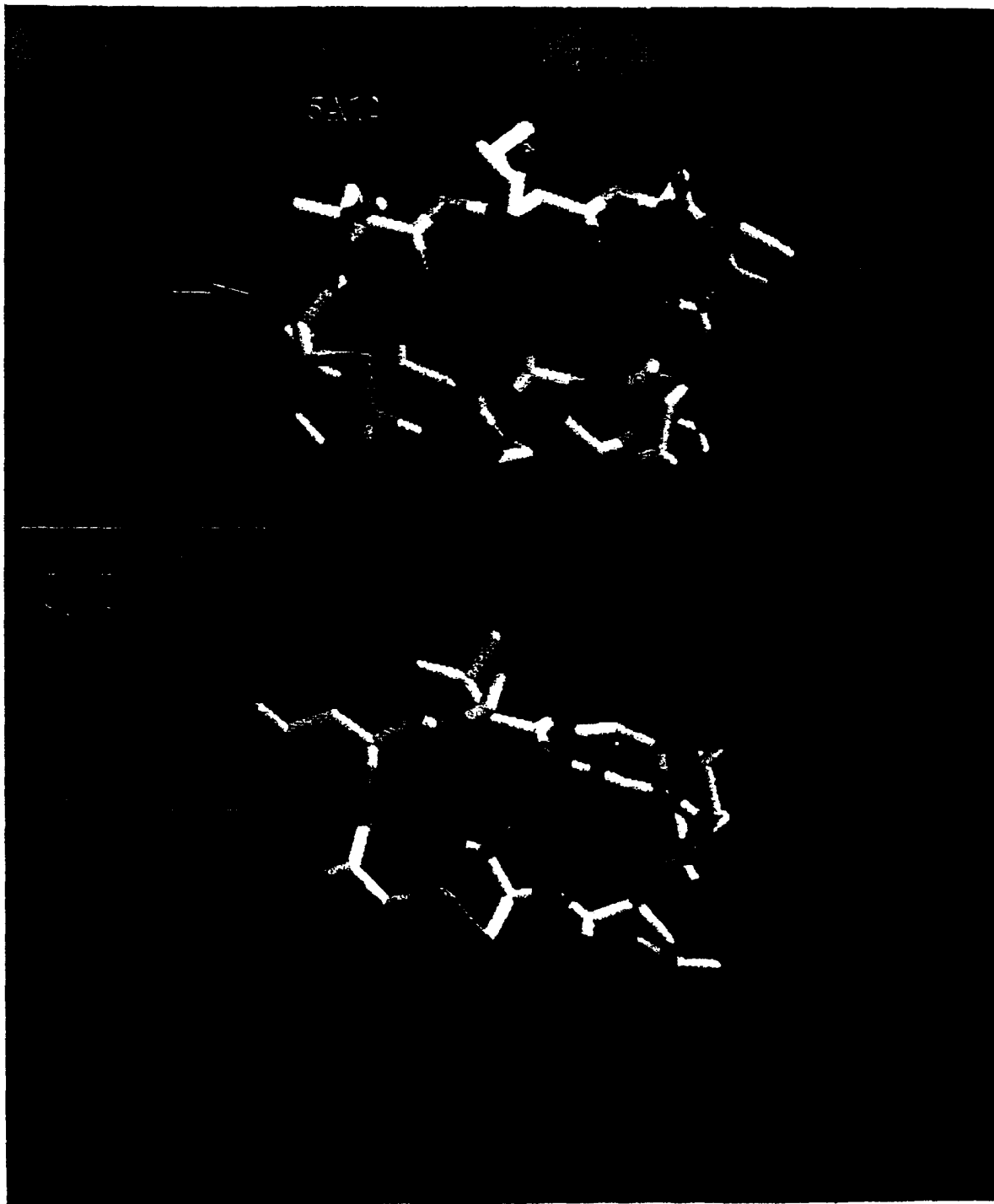


图 19

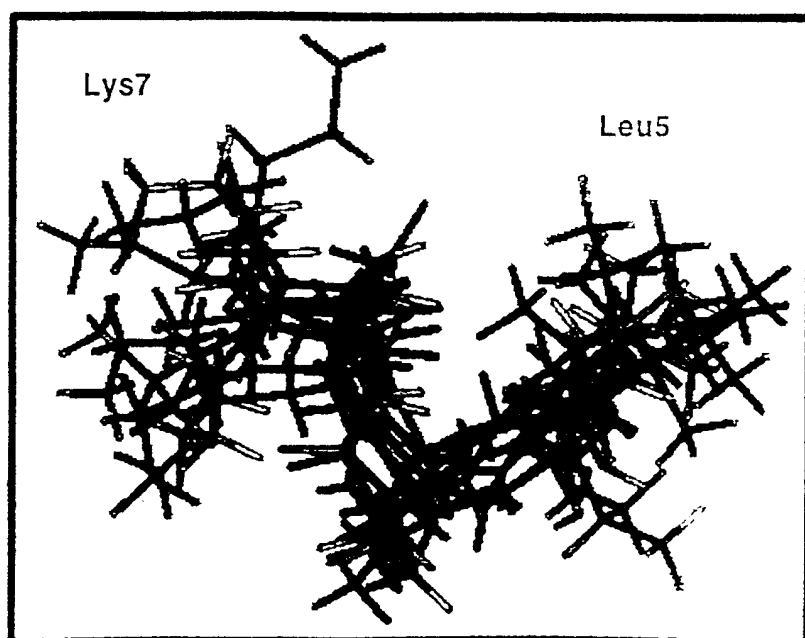
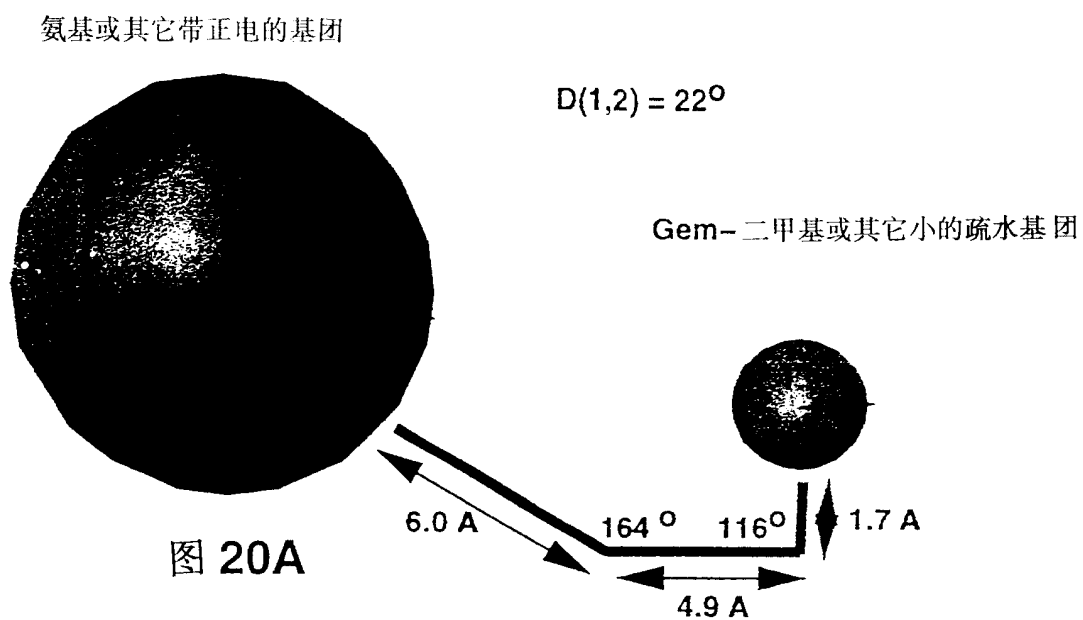


图 20B