

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C07K 7/00 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580007711.0

[43] 公开日 2007年4月18日

[11] 公开号 CN 1950394A

[22] 申请日 2005.3.10

[21] 申请号 200580007711.0

[30] 优先权

[32] 2004.3.10 [33] US [31] 60/551,817

[86] 国际申请 PCT/US2005/008131 2005.3.10

[87] 国际公布 WO2005/086947 英 2005.9.22

[85] 进入国家阶段日期 2006.9.11

[71] 申请人 三一治疗公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 N·M·博迪 E·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
代理人 王旭

权利要求书5页 说明书49页 附图14页

[54] 发明名称

在受试者中抑制免疫复合物形成的方法

[57] 摘要

描述了能够特异性结合于免疫球蛋白分子 C_H2 - C_H3 裂口的多肽和其它化合物, 以及应用这样的多肽和化合物抑制 Fc - 介导的免疫复合物形成的方法。

1. 一种用于抑制受试者中免疫复合物形成的方法，所述方法包括给所述受试者施用一种包含纯化的多肽的组合物，所述多肽包括氨基酸序列 Cys-Ala-Xaa-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr (SEQ ID NO:8)，其中 Xaa 为 Arg、Trp、Tyr 或 Phe。
2. 权利要求 1 的方法，其中所述免疫复合物形成与类风湿性关节炎相关。
3. 权利要求 2 的方法，其还包括对于类风湿性关节炎的临床或分子特征对所述受试者进行监测的步骤。
4. 权利要求 1 的方法，其中所述多肽还包括末端稳定基团。
5. 权利要求 4 的方法，其中所述末端稳定基团位于所述多肽的氨基端，并且是具有氨基酸序列 Xaa-Pro-Pro 的三肽，其中 Xaa 为任何氨基酸。
6. 权利要求 5 的方法，其中所述 Xaa 是 Ala。
7. 权利要求 4 的方法，其中所述末端稳定基团位于所述多肽的羧基端，并且是具有氨基酸序列 Pro-Pro-Xaa 的三肽，其中 Xaa 为任何氨基酸。
8. 权利要求 7 的方法，其中所述 Xaa 是 Ala。
9. 权利要求 4 的方法，其中所述末端稳定基团是小的稳定蛋白。
10. 权利要求 9 的方法，其中所述小的稳定蛋白包括 4 螺旋束拓扑结构。
11. 权利要求 9 的方法，其中所述小的稳定蛋白是 Rop。
12. 权利要求 1 的方法，其中所述多肽还包括在所述氨基酸序列的氨基端的添加的氨基酸。

- 13.权利要求 12 的方法,其中所述添加的氨基酸是除 Cys 外的任何氨基酸。
- 14.权利要求 12 的方法,其中所述添加的氨基酸是 Asp。
- 15.权利要求 1 的方法,其中所述多肽具有约 10-约 50 个氨基酸的长度。
- 16.权利要求 1 的方法,其中所述多肽包括氨基酸序列 Asp-Cys-Ala-Trp-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr (SEQ ID NO:2)。
- 17.权利要求 1 的方法,其中所述多肽包括氨基酸序列 Trp-Glu-Ala-Asp-Cys-Ala-Xaa-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr-Lys-Val-Glu-Glu (SEQ ID NO:32)。
- 18.一种用于治疗类风湿性关节炎的方法,其中所述方法包括鉴别患有类风湿性关节炎或处在形成类风湿性关节炎的危险中的个体,以及给所述个体施用包含纯化的多肽的组合物,所述多肽包括氨基酸序列 Cys-Ala-Xaa-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr (SEQ ID NO:8),其中 Xaa 为 Arg、Trp、Tyr 或 Phe。
- 19.权利要求 18 的方法,其还包括对于类风湿性关节炎的临床或分子特征对所述受试者进行监测的步骤。
- 20.权利要求 18 的方法,其中所述多肽还在所述氨基酸序列的氨基端包括 Asp。
- 21.权利要求 18 的方法,其中所述多肽还包括末端稳定基团。
- 22.权利要求 21 的方法,其中所述末端稳定基团位于所述多肽的氨基端,并且是具有氨基酸序列 Xaa-Pro-Pro 的三肽,其中 Xaa 为任何氨基酸。
- 23.权利要求 22 的方法,其中所述 Xaa 是 Ala。
- 24.权利要求 21 的方法,其中所述末端稳定基团位于所述多肽的羧基端,

并且是具有氨基酸序列 Pro-Pro-Xaa 的三肽，其中 Xaa 为任何氨基酸。

- 25.权利要求 24 的方法，其中所述 Xaa 是 Ala。
- 26.权利要求 21 的方法，其中所述末端稳定基团是小的稳定蛋白。
- 27.权利要求 26 的方法，其中所述小的稳定蛋白包括 4 螺旋束拓扑结构。
- 28.权利要求 26 的方法，其中所述小的稳定蛋白是 Rop。
- 29.权利要求 18 的方法，其中所述多肽具有约 10-约 50 个氨基酸的长度。
- 30.权利要求 18 的方法，其中所述多肽包括氨基酸序列 Asp-Cys-Ala-Trp-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr (SEQ ID NO:2)。
- 31.权利要求 18 的方法，其中所述多肽包括氨基酸序列 Trp-Glu-Ala-Asp-Cys-Ala-Xaa-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr-Lys-Val-Glu-Glu (SEQ ID NO:32)。
- 32.一种纯化的多肽，其包含氨基酸序列 Xaa₁-Pro-Pro-Cys-Ala-Xaa₂-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr (SEQ ID NO:12)，其中 Xaa₁ 为任何氨基酸和 Xaa₂ 为 Arg、Trp、Tyr 或 Phe。
- 33.权利要求 32 的纯化的多肽，其中 Xaa₁ 为 Ala。
- 34.一种组合物，其包含权利要求 32 的多肽。
- 35.一种纯化的多肽，其包含氨基酸序列 Cys-Ala-Phe-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr (SEQ ID NO:9)。
- 36.权利要求 35 的纯化的多肽，其中所述多肽包括不多于约 20 个氨基酸。
- 37.权利要求 35 的纯化的多肽，其中所述多肽包括末端稳定基团。
- 38.权利要求 37 的纯化的多肽，其中所述末端稳定基团位于所述多肽的氨基端，并且是具有氨基酸序列 Xaa-Pro-Pro 的三肽，其中 Xaa 为任何氨

基酸。

39.权利要求 38 的纯化的多肽，其中所述 Xaa 是 Ala。

40.权利要求 37 的纯化的多肽，其中所述末端稳定基团位于所述多肽的羧基端，并且是具有氨基酸序列 Pro-Pro-Xaa 的三肽，其中 Xaa 为任何氨基酸。

41.权利要求 40 的纯化的多肽，其中所述 Xaa 是 Ala。

42.权利要求 37 的纯化的多肽，其中所述末端稳定基团是小的稳定蛋白。

43.权利要求 42 的纯化的多肽，其中所述小的稳定蛋白包括 4 螺旋束拓扑结构。

44.权利要求 42 的纯化的多肽，其中所述小的稳定蛋白是 Rop。

45.权利要求 35 的纯化的多肽，其还在所述氨基酸序列的氨基端包括 Asp。

46.一种组合物，其包含权利要求 35 的多肽。

47.一种纯化的多肽，其氨基酸序列由下列序列组成：

$(Xaa_1)_n$ -Xaa₂-Cys-Ala-Xaa₃-His-Xaa₄-Xaa₅-Xaa₆-Leu-Val-Trp-Cys- $(Xaa_7)_n$
(SEQ ID NO:1)，其中 Xaa₁ 不存在或为任何氨基酸，Xaa₂ 为 Phe 或 Arg，Xaa₃ 为任何氨基酸，Xaa₄ 为 Gly 或 Ala，Xaa₅ 为 Glu 或 Ala，以及 Xaa₆ 为任何非芳族氨基酸。

48.一种纯化的多肽，其氨基酸序列由下列序列组成：

$(Xaa_1)_n$ -Cys-Ala-Xaa₂-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr- $(Xaa_3)_n$
(SEQ ID NO:35)，其中 Xaa₁ 为任何氨基酸，Xaa₂ 为 Arg、Trp、Tyr 或 Phe，Xaa₃ 为任何氨基酸，以及 n 为 0、1、2、3、4 或 5。

49.一种纯化的多肽，其氨基酸序列由下列序列组成：
(Xaa₁)_n-Cys-Ala-Xaa₂-His-Xaa₃-Xaa₄-Xaa₅-Leu-Val-Trp-Cys-Xaa₆-(Xaa₇)_n
(SEQ ID NO:34)，其中 Xaa₁ 为任何氨基酸，Xaa₂ 为 Phe 或 Arg，Xaa₃
为任何氨基酸，Xaa₄ 为 Gly 或 Ala，Xaa₅ 为 Glu 或 Ala，Xaa₆ 为任何非
芳族氨基酸，Xaa₇ 为任何氨基酸，以及 n 为 0、1、2、3、4 或 5。

在受试者中抑制免疫复合物形成的方法

技术领域

本发明涉及对免疫复合物形成的抑制，更具体地，涉及通过多肽和其它小分子抑制免疫复合物形成。

背景

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物质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。这一过程的实例包括类风湿性关节炎(RA)中关节的毁坏以及在狼疮性肾炎中肾脏的毁坏。更大的免疫复合物比小的、更加可溶的免疫复合物更有致病性。由于抗体分子与抗原的相互作用和抗体分子之间的相互作用引起大的、相对不溶的免疫复合物的形成。这样的免疫复合物还可以由于在没有抗原存在时抗体之间的相互作用形成。

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，可以预防免疫复合物的组织损害作用。

概述

本发明基于这样的发现：具有基于在 SEQ ID NO:1 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

CH₂-CH₃ 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类风湿性关节炎的自体免疫疾病的方法。

一方面，本发明着重描述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 Cys-Ala-Xaa-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr (SEQ ID NO:8)，并且其中 Xaa 为精氨酸 (Arg)、色氨酸 (Trp)、酪氨酸 (Tyr) 或苯丙氨酸 (Phe)。免疫复合物形成可以与类风湿性关节炎相关。所述方法还包括对于类风湿性关节炎的临床或分子特征对受试者进行监测的步骤。

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多肽的氨基端 (N 端) 或羧基端 (C 端)，或者两端，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，丙氨酸 (Ala))。末端稳定基团可以是小的稳定蛋白 (例如，4 螺旋束蛋白，诸如 Rop)。所述多肽还可以包括在氨基酸序列的 N 端添加的氨基酸。所添加的氨基酸可以是任何除了 Cys 的氨基酸 (例如，N 端氨基酸可以是 Asp)。

所述多肽可以具有约 10-约 50 个氨基酸的长度。多肽可以包括氨基酸序列 Asp-Cys-Ala-Trp-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr (SEQ ID NO:2)。多肽可以包括氨基酸序列 Trp-Glu-Ala-Asp-Cys-Ala-Xaa-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr-Lys-Val-Glu-Glu (SEQ ID NO:32)。

本发明还着重描述用于治疗类风湿性关节炎的方法。所述方法可以包括识别患有类风湿性关节炎或处于形成类风湿性关节炎的危险的个体，并且给这样的个体施用含有纯化的多肽的组合物，所述多肽含有氨基酸序列 Cys-Ala-Xaa-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr (SEQ ID NO:8)，其中 Xaa 为精氨酸 (Arg)、色氨酸 (Trp)、酪氨酸 (Tyr) 或苯丙氨酸 (Phe)。所述方法还包括对于类风湿性关节炎的临床或分子特征对受试者进行监测的步骤。

所述多肽还可以在氨基酸序列的 N 端包括天冬氨酸 (Asp)。多肽还

可以包括末端稳定基团。所述末端稳定基团可以是在多肽的 N 端或 C 端，或者两端，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，丙氨酸（Ala））。末端稳定基团可以是小的稳定蛋白（例如，4 螺旋束蛋白，诸如 Rop）。

所述多肽可以具有约 10-约 50 个氨基酸的长度。多肽可以包括氨基酸序列 Asp-Cys-Ala-Trp-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr (SEQ ID NO:2)。多肽可以包括氨基酸序列 Trp-Glu-Ala-Asp-Cys-Ala-Xaa-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr-Lys-Val-Glu-Glu (SEQ ID NO:32)。

在另一方面，本发明着重描述含有氨基酸序列 Xaa₁-Pro-Pro-Cys-Ala-Xaa₂-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr (SEQ ID NO:12) 的纯化的多肽，其中 Xaa₁ 为任何氨基酸（例如，丙氨酸（Ala）），和 Xaa₂ 为精氨酸（Arg）、色氨酸（Trp）、酪氨酸（Tyr）或苯丙氨酸（Phe）。本发明还着重描述含有所述多肽的组合物。

另一方面，本发明着重描述含有氨基酸序列 Cys-Ala-Phe-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr (SEQ ID NO:9) 的纯化的多肽。所述纯化的多肽可以具有不多于约 20 个氨基酸的长度。纯化的多肽还可以包括末端稳定基团。所述末端稳定基团可以是在多肽的 N 端或 C 端，或者两端，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，丙氨酸（Ala））。末端稳定基团可以是小的稳定蛋白（例如，4 螺旋束蛋白，诸如 Rop）。所述纯化的多肽还可以在氨基酸序列的 N 端包括天冬氨酸（Asp）。本发明还着重描述含有所述纯化的多肽的组合物。

在另一方面，本发明着重描述纯化的多肽，其氨基酸序列由下列序列组成：

(Xaa₁)_n-Xaa₂-Cys-Ala-Xaa₃-His-Xaa₄-Xaa₅-Xaa₆-Leu-Val-Trp-Cys-(Xaa₇)_n
(SEQ ID NO:1)，其中 Xaa₁ 可以不存在或为任何氨基酸，Xaa₂ 为苯丙氨酸（Phe）或精氨酸（Arg），Xaa₃ 为任何氨基酸，Xaa₄ 为甘氨酸（Gly）或丙氨酸（Ala），Xaa₅ 为谷氨酸（Glu）或丙氨酸（Ala），以及 Xaa₆ 为任何非芳族氨基酸。

在另一方面，本发明着重描述纯化的多肽，其氨基酸序列由下列序列组成： $(Xaa_1)_n$ -Cys-Ala- Xaa_2 -His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr- $(Xaa_3)_n$ (SEQ ID NO:35)，其中 Xaa_1 为任何氨基酸， Xaa_2 为精氨酸 (Arg)、色氨酸 (Trp)、酪氨酸 (Tyr) 或苯丙氨酸 (Phe)， Xaa_3 为任何氨基酸，以及 n 为 0、1、2、3、4 或 5。

在另一方面，本发明着重描述纯化的多肽，其氨基酸序列由下列序列组成： $(Xaa_1)_n$ -Cys-Ala- Xaa_2 -His- Xaa_3 - Xaa_4 - Xaa_5 -Leu-Val-Trp-Cys- Xaa_6 - $(Xaa_7)_n$ (SEQ ID NO:34)，其中 Xaa_1 为任何氨基酸， Xaa_2 为苯丙氨酸 (Phe) 或精氨酸 (Arg)， Xaa_3 为任何氨基酸， Xaa_4 为甘氨酸 (Gly) 或丙氨酸 (Ala)， Xaa_5 为谷氨酸 (Glu) 或丙氨酸 (Ala)， Xaa_6 为任何非芳族氨基酸， Xaa_7 为任何氨基酸，以及 n 为 0、1、2、3、4 或 5。

除非另外定义，本文所用的全部技术和科学术语具有与本发明所属于的领域中的一名普通技术人员常规理解的相同的意思。尽管与本文所描述的那些相似或等同的方法和材料可以用于实施本发明，下文还是描述适当的方法和材料。本文所提及的所有公布、专利申请、专利和其它参考文献通过参考加入本文。出现矛盾时，本详述，包括定义，将会控制。另外，所述材料、方法以及实例只是举例说明，并不意欲成为限制。

本发明的 1 个或多个实施方案的详情在下文的附图和描述中阐述。本发明的其它特征、目的和优点将通过描述和附图、以及通过权利要求而明显起来。

附图描述

图 1A 和 1B 是计算机产生的 IgG 分子的 C_H2 - C_H3 裂口 (cleft) 的三维结构模型，其显示当 IgG 处于 Fc-介导的免疫复合物中或为非免疫复合的时，所述裂口的构象，如图所显示的那样。

图 2A 是对于通过 C_H2 - C_H3 裂口结合于肽配体的 IgG 分子的原子坐标列表。图 2B 对于通过 C_H2 - C_H3 裂口结合于类风湿因子的 IgG 分子的原子坐标列表。

图3是计算机产生的结合于多肽的IgG Fc C_H2-C_H3裂口的三维结构模型，其中所述多肽具有在SEQ ID NO:5中提出的氨基酸序列。

图4A-4C是显示小鼠关节炎指数（arthritic indices）的线图，所述小鼠如图所示那样患有或没患有胶原诱导的关节炎和治疗或未治疗。图4A显示用指示量的ID 14多肽（SEQ ID NO:14）治疗的小鼠的结果。图4B显示用指示量的ID 2多肽（SEQ ID NO:2）治疗的小鼠的结果。图4C显示用指示量的泼尼松龙或REMICADE[®]治疗的小鼠的结果。

详述

本发明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，以致阻滞免疫球蛋白与其它分子的相互作用（例如，效应器或其它免疫球蛋白）。还提供用于识别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产品。另外，本发明提供关于应用所述多肽和化合物抑制免疫复合物形成和治疗诸如，例如类风湿性关节炎的疾病的方法。这些在下述部分描述。

免疫球蛋白

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结合于其它分子（例如，抗原和其它细胞表面受体）。基于其结构和生物活性，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；这一分子呈现扭曲的“Y”型构型。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.* 33:893-906）。

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.* 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：N

端可变结构域(V_H), 接着是 3 个恒定结构域 (C_{H1} , C_{H2} , 和 C 端 C_{H3})。铰链区对应应在 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。

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.* 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.* 164:5313-5318)。

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, 编号方式涉及完整的 IgG 分子, 如在 Kabat 等中那样 (Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版, Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services, Bethesda, MA)。本领域的那些普通技术人员可以容易地确定其它免疫球蛋白种类中对应的氨基酸。

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结合的重要驱动力。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, 在研究中发现在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.* 11:87-96)。因此, 抗原结合对于确定免疫球蛋白是否通过铰链区或 Fc C_{H2} - C_{H3} 裂口区结合于其它分子可以是重要的。

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：

(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.* 157:3317-3322; Gheti 和 Ward (2000) *Ann. Rev. Immunol.* 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.* 186:777-783)。结合免疫复合物或与致病性自体抗体的 FcRn 的抑制剂将有效用于治疗包括致病性自体抗体和/或免疫复合物的疾病。

(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.* 164:6113-6119; Coxon 等, (2001) *Immunity* 14:693-704; Fossati 等, (2001) *Eur. J. Clin. Invest.* 31:821-831)。Fc...受体对 IgG 分子特异，并且包括 Fc...RI、Fc...RIIa、Fc...RIIb 和 Fc...RIII。这些同种型 (isotypes) 以不同的亲和力与单体的和免疫复合的 IgG 结合。

(3) **RF** – 类风湿因子是与其它免疫复合的免疫球蛋白分子结合的免疫球蛋白，并且其可以加剧类风湿性关节炎的动物模型中的关节炎 (参见，例如，Ezaki 等, (1996) *Clin. Exp. Immunol.* 104:474-482)。

(4) **组蛋白** – 组蛋白是非常碱性的、正电荷的蛋白，其在肾脏中结合于 DNA 和负电荷的基膜。在狼疮性肾炎中，组蛋白首先结合于肾脏，然后免疫复合物与这些肾-结合组蛋白结合 (Gussin 等, (2000) *Clin. Immunol.* 96:150-161)。

(5) **MBP** – 髓鞘碱性蛋白是多发性硬化病中的初级自体免疫靶点 (MS; Sindic 等, (1980) *Clin. Exp. Immunol.* 41:1-7; Poston (1984) *Lancet* 1:1268-1271)。

(6) **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。

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(the 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亲和力比对于单体抗体的更高。可以由于Fc-介导的免疫复合物形成引起的大的、通常不溶的复合物典型地参与疾病的病理学过程,诸如,例如RA和狼疮性肾炎。

纯化的多肽

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)。本发明的多肽典型地为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个氨基酸的本发明的多肽(例如,长度为10,11,12,13,14,15,16,17,18,19或20个氨基酸)是特别有效的。

本文所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Xaa₁-Cys-Ala-Xaa₂-His-Xaa₃-Xaa₄-Xaa₅-Leu-Val-Trp-Cys-Xaa₆(SEQ ID NO:1),其中由Xaa_n表示的残基可以表现出可变性。例如,Xaa₁可以不存在或为任何氨基酸(例如,精氨酸(Arg)或天冬氨酸(Asp))。Xaa₂可以为苯丙氨酸(Phe)、酪氨酸(Tyr)、色氨酸(Trp)或精氨酸(Arg)。Xaa₃可以为任何氨基酸。Xaa₄可以为甘氨酸(Gly)或丙氨酸(Ala),而Xaa₅可以为谷氨酸(Glu)或丙氨酸(Ala)。与Xaa₁相同,Xaa₆也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

另一实施方案中，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)。

另一实施方案中，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 可以为苯丙氨酸 (Phe)、酪氨酸 (Tyr)、色氨酸 (Trp) 或精氨酸 (Arg)。例如，本发明提供包含下述氨基酸序列的多肽：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)。

为了体内应用，可以通过在 N-端或 C-端、或两端添加稳定试剂，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。这样的稳定基团（本文也称为封闭试剂）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 N-端或 C-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 N-端和/或 C-端残基，或者 N 端氨基或 C 端的羧基可以用不同的部分 (moiety) 替代。

在另一实施方案中，本文提供的多肽可以被修饰，以致一种稳定的蛋白被安置在 N 端、在 C 端、或者两端。尽管没有指定关于蛋白锚定的特定大小限制，这样的稳定基团（还叫作“蛋白锚定 (protein anchor)”）典型地为小的稳定的蛋白，诸如，但不限于，硫氧还蛋白、谷胱甘肽磺基转移酶、麦芽糖结合蛋白、谷胱甘肽还原酶或诸如 Rop 蛋白的 4 螺旋束蛋白。

适合用作稳定基团的蛋白可以是天然存在的或非天然存在的。这样的稳定基团可以从内源来源分离，化学或酶促合成，或者应用重组 DNA 技术生产。特别适合用作稳定基团的蛋白是那些长度相对短并且在溶液中形

成非常稳定的结构的蛋白。具有小于约 70 kD 的分子量的蛋白（例如，小于约 65、60、50、40、25 或 12 kD）用作稳定基团可以特别有效。例如，人血清白蛋白具有约 64 kD 的分子量；大肠杆菌（*E. coli*）硫氧还蛋白具有约 11.7 kD 的分子量；大肠杆菌谷胱甘肽磺基转移酶具有约 22.9 kD 的分子量；ColE1 复制子的 Rop 具有约 7.2 kD 的分子量；以及麦芽糖结合蛋白（不带其信号序列）具有约 40.7 kD 的分子量。由于小的 Rop 蛋白比更大的蛋白更不可能干扰所结合的肽的可及性，因此保留其生物活性，所以小的 Rop 蛋白使其特别适合用作稳定基团。Rop 的高度规则的反向平行 4 螺旋束拓扑结构（二聚化作用后）、缓慢的解折叠动力学（unfolding kinetics；参见，例如，Betz 等. (1997) *Biochem.* 36:2450-2458）、以及二硫键的缺乏也有助于其用作按照本发明的蛋白锚定。具有相似的折叠动力学和/或热力学稳定性的其它蛋白（例如，Rop 具有约 71°C 的变性中点温度；Steif 等. (1993) *Biochem.* 32:3867-3876）也可用作稳定基团。具有高度稳定的三级模体（tertiary motifs），诸如 4 螺旋束拓扑结构的肽或蛋白特别有用。

在另一实施方案中，诸如脯氨酸、Pro-Pro 序列或 Xaa-Pro-Pro 序列（例如，Ala-Pro-Pro）的稳定基团可以位于多肽的 N 端（参见，例如，WO 00/22112）。例如，多肽可以包含氨基酸序列 Xaa₁-Pro-Pro-Cys-Ala-Xaa₂-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr (SEQ ID NO:12)，其中 Xaa₁ 为任何氨基酸（例如，丙氨酸（Ala）），和 Xaa₂ 为色氨酸（Trp）、酪氨酸（Tyr）、苯丙氨酸（Phe）或精氨酸（Arg），例如，多肽可以包含氨基酸序列 Xaa₁-Pro-Pro-Cys-Ala-Trp-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr (SEQ ID NO:13)，Xaa₁-Pro-Pro-Cys-Ala-Arg-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr (SEQ ID NO:14)，或 Xaa₁-Pro-Pro-Cys-Ala-Phe-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr (SEQ ID NO: 15)。备选地，多肽可以包含氨基酸序列 Xaa₁-Pro-Pro-Asp-Cys-Ala-Trp-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr (SEQ ID NO:16)，Xaa₁-Pro-Pro-Asp-Cys-Ala-Arg-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr (SEQ

ID NO:17) ,
 Xaa₁-Pro-Pro-Asp-Cys-Ala-Phe-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr (SEQ
 ID NO:18) ,
 Xaa₁-Pro-Pro-Arg-Cys-Ala-Trp-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr (SEQ
 ID NO:19) ,
 Xaa₁-Pro-Pro-Arg-Cys-Ala-Arg-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr (SEQ
 ID NO:20) 或
 Xaa₁-Pro-Pro-Arg-Cys-Ala-Phe-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr (SEQ
 ID NO: 21)。

备选地，本文提供的多肽可以具有位于其 C 端的脯氨酸、Pro-Pro 序列或 Pro-Pro-Xaa 序列（例如，Pro-Pro-Ala）。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 可以为任何氨基酸。在一个实施方案中，多肽可以同时具有在其 N 端的 Xaa-Pro-Pro（例如 Ala-Pro-Pro）序列和在其 C 端的 Pro-Pro-Xaa（例如，Pro-Pro-Ala）序列。

本文提供的多肽还可以包含添加的氨基酸序列，其在 SEQ ID NO:1 提出的序列的 N 端、SEQ ID NO:1 提出的序列的 C 端，或两端。例如，多肽可以包含氨基酸序列 Trp-Glu-Ala-Xaa₁-Cys-Ala-Xaa₂-His-Xaa₃-Xaa₄-Xaa₅-Leu-Val-Trp-Cys-Xaa₆-Lys-Val-Glu-Glu (SEQ ID NO:31)，其中 Xaa_n 所示的残基可以表现出可变性。对于 SEQ ID NO:1 提出的氨基酸序列，Xaa₁ 可以不存在或为任何氨基酸（例如，精氨酸 (Arg) 或天冬氨酸 (Asp)）；Xaa₂ 可以为苯丙氨酸 (Phe)、酪氨酸 (Tyr)、色氨酸 (Trp) 或精氨酸 (Arg)；Xaa₃ 可以为任何氨基酸；Xaa₄ 可以为甘氨酸 (Gly) 或丙氨酸 (Ala)；Xaa₅ 可以为谷氨酸 (Glu) 或丙氨酸 (Ala)；和 Xaa₆ 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 为精氨酸 (Arg)、色氨酸 (Trp)、酪氨酸 (Tyr) 或苯丙氨酸 (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)。

在另一实施方案中，多肽可以由氨基酸序列 (Xaa₁)_n-Xaa₂-Cys-Ala-Xaa₃-His-Xaa₄-Xaa₅-Xaa₆-Leu-Val-Trp-Cys-(Xaa₇)_n (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 0-10 的整数（例如，0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 或 10）。例如，Xaa₁ 可以为任何氨基酸；Xaa₂ 可以不存在或为任何氨基酸（例如，精氨酸 (Arg) 或天冬氨酸 (Asp)）；Xaa₃ 可以为苯丙氨酸 (Phe)、酪氨酸 (Tyr)、色氨酸 (Trp) 或精氨酸 (Arg)；Xaa₄ 可以为任何氨基酸；Xaa₅ 可以为甘氨酸 (Gly) 或丙氨酸 (Ala)；Xaa₆ 可以为谷氨酸 (Glu) 或丙氨酸 (Ala)；Xaa₇ 可以为任何氨基酸；以及 n 可以从 0-5（例如，0, 1, 2, 3, 4 或 5）。备选地，多肽可以由氨基酸序列 (Xaa₁)_n-Cys-Ala-Xaa₂-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr-(Xaa₃)_n (SEQ ID NO:35) 组成，其中 Xaa₁ 为任何氨基酸，Xaa₂ 为苯丙氨酸 (Phe) 或精氨酸 (Arg)，Xaa₃ 为任何氨基酸，以及 n 是从 0-5 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-Pro-Pro-Leu-Asp-Cys-Ala-Arg-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Ala-Leu-Pro-Pro-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-Pro-Pro-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。

在 SEQ ID NOs:1-38 中提出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典型地环化。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其它天然或非天然的氨基酸残基取代, 所述氨基酸可以形成内酰胺键而不是二硫键。例如, 一个半胱氨酸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。通过变化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。

本文提供的多肽可以包含氨基酸标记。“标记 (tag)” 一般为短的氨基酸序列, 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[®] 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; Qiagen, Valencia, CA) 在蛋白质印迹上检测。尽管在 N-或 C-端插入是特别有效的, 但是标记可以插入在多肽序列的任何位置。

术语“氨基酸”指天然氨基酸、非天然氨基酸和氨基酸类似物、其全部的 D 和 L 立体异构体, 如果其结构允许这样的话。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、2-氨基己二酸、3-氨基己二酸、 β -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2-哌啶酸。

“类似物 (analog)” 是一种化合物, 其彼此结构上相似, 但在组成上稍微不同 (如在使用不同元素的原子替代 1 个原子上或者在特定官能团存在上)。因此, “氨基酸类物” 与在天然多肽中典型发现的天然存在的氨基酸结构相似, 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其它官能团。氨基酸类似物包括天然或非天然氨基酸, 其在其 N 端氨基或其侧链基团进行可逆或不可逆地化学保护、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天冬氨酸-(β -甲酯), 天冬氨酸的类似物; N-乙基甘氨酸, 甘氨酸的类似物; 以及丙氨酰胺, 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, Academic Press, Inc., New York (1983) 中列出。

根据多肽骨架附近的侧链氨基酸残基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 α -碳原子而定义。另外, 多肽骨架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由 L-氨基酸组成。

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, 但是具有氨基酸残基按天然

肽序列的反方向组装的氨基酸序列。

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 \cap -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。

部分反-反转多肽类似物是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 N 和 C 端, 侧生在反向-反转部分的氨基酸残基可以分别用 \cap -取代的侧链类似物双-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。

本发明还提供基于多肽的氨基酸序列设计的拟肽 (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。本发明的拟肽化合物可以设计成模拟本发明的任何多肽。

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, 诸如增加细胞渗透性和延长生物半衰期。这样的化合物典型地具有部分或完全是非肽的骨架, 但是具有与在拟肽化合物依据的肽中发生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, 酯基、硫酸基、硫酸基、逆胺基、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键。

本发明的多肽和免疫分子之间的相互作用典型地通过免疫球蛋白的 C_{H2} - C_{H3} 裂口发生。通过物理接近发生这样的相互作用, 并且例如, 通过疏水相互作用介导。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离解常数 (K_d), 其以 $K_d = k_{off}/k_{on}$ 进行计算, 此处 k_{off} = 反应的动力学离解常数, 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 100 nM) 表示高亲和力。可以与免疫球蛋白分子相互作用的本发明的多肽

典型地具有对于免疫球蛋白的 C_{H2}-C_{H3} 裂口至少 1 μM 的亲和力（例如，至少 500 nM，至少 100 nM，至少 50 nM 或至少 10 nM）。

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，本发明的多肽可以具有比对于单体免疫球蛋白更高的亲和力（例如，至少 10 倍，至少 100 倍，或至少 1000 倍更高的亲和力）。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 NC6.8 Fab（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.* 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* 36:1581-1597; Sapphire 等. (2001) *Science* 293:1155-1159）。

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（参见图 1A 和 1B）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.* 310:25-31; Jefferies 等. (1984) *Immunol. Lett.* 7:191-194; 和 West 等. (2000) *Biochemistry* 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，对于免疫复合的 IgG 的 RF 的结合亲和力比对于单体 IgG 的 RF 的结合亲和力更大（Corper 等. (1997) *Nat. Struct. Biol.* 4:374; Sohi 等. (1996) *Immunol.* 88:636）。典型地，相同的结果对于本发明的多肽也正确。

由于本发明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、RF、组蛋白、MBP 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”意指在本发明的多肽的存在下，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。

本发明的多肽典型地以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，通过在本发明的多肽存在或不存在时，将 IgG 分子与标记的免疫球蛋白分子（例如，荧光标记的 RF 分子）一起培养，并且测量组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。

多肽的制备和纯化

本发明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，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 肽合成器合成；Applied Biosystems, Foster City, CA）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.* 24:553-556; 和 Verdini 和 Viscomi (1985) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 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）。

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，有义和反义单链）。如此处所用涉及到核酸的术语“分离的 (isolated)”是指天然存在的核酸，其不会立即毗连这样的 2 个序列：在其衍生的生物体的天然存在的基因组中，其立即与所述序列毗连（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立即毗连的序列，所以如此处所用涉及到核酸的术语“分离的”还包括任何非天然存在的核酸序列。

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与 DNA 分子立即毗连的 1 条核酸序列被移除或不存在。因此，分离的核酸可以包括，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的基因组 DNA 中的 DNA。另外，分离的核酸可以包括工程核酸，诸如重组 DNA 分子，其为杂合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 限制性内切消化液的凝胶切片内的数百一数百万其它核酸中的核酸不被认为是分离的核酸。

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，其中可以插入其它 DNA 片段，以使所插入的片段得以复制。本发明的载体优选表达载体，其中核苷编码带有起始密码子甲硫氨酸的本发明的多肽，其有效地连接于表达控制序列。如此处所用，“有效连接（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（expression control sequence）”为控制和调节其它 DNA 序列的转录和翻译的 DNA 序列，以及“表达载体（expression vector）”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“有效连接”并且受到细胞中转录和翻译控制序列的“控制”。

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 (第二版), Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989); 和 Ausubel 等., Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, New York (1989)。如本文所述，本发明的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、逆转录病毒、痘苗病毒、腺病毒以及腺伴随病毒的病毒载体。可以商购获得广泛种类的适宜的表达载体，包括 pET 系列的细菌表达载体 (Novagen, Madison, WI)、腺-X 表达系统 (Clontech)、Baculogold 杆状病毒表达系统 (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA) 和 pCMV-Tag 载体 (Stratagene, La Jolla, CA)。

编码本发明的多肽的表达载体可以用于生产多肽。可以用于本发明的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*)，其转化了含有本发明的核酸分子的重组噬菌体 DNA、质粒 DNA、或黏端质粒 DNA；酵母菌（例如，酿酒酵母菌 (*S. cerevisiae*)），其转化了含有本发明的核酸分子的重组酵母菌表达载体；昆虫细胞系统，其感染了含有本发明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，其感染了含有本发明的核酸分子的重组病毒表达载体（例如，烟草花叶病毒）或转化了重组质粒表达载体（例如，Ti 质粒）；或哺乳动物细胞系统（例如，初级细胞或无限增殖化细胞，诸如 COS 细胞、CHO 细胞、HeLa 细胞、HEK 293 细胞和 3T3 L1 细胞），其带有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），以及本发明的核酸分子。

如此处所用，术语“纯化的多肽 (purified polypeptide)”是指这样的多肽：其没有天然存在的副本（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分离或纯化出来的（例如，其它细胞蛋白、多聚核苷酸或细胞成分）。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，本发明的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%的本发明的多肽。用于纯化本发明的多肽的适合的方法包括，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、聚丙烯酰胺凝胶或高效液相色谱。

模拟、设计和鉴别化合物的方法

本发明提供用于设计、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_H2-C_H3 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 (ligands)”。通过本发明的方法设计、模拟或鉴别的化合物典型地可以通过 C_H2-C_H3 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_H2-C_H3 裂口具有至少 1 μ M 的结合亲和力（例如，至少 500 nM，至少 100 nM，至少 50 nM，或至少 10 nM）。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）。

本发明的化合物典型地以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）。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）。本发明的化合物和 C_H2-C_H3 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，RF、组蛋白、C1q、MBP 和银屑病相关抗原 pso p27）与 C_H2-C_H3 裂口的结合而抑制 Fc 介导的免疫复合物的形成。

通过本发明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 C_H2-C_H3 裂口的任何适宜类型的分子。诸如栎精、乳香酸和抑制素的化合物是特别有效的。

“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目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。

设计与已经结合抗原的免疫球蛋白 C_H2-C_H3 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_H2-C_H3 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_{H2}-C_{H3} 裂口的三维模型和/或确定参与配体结合的结构。诸如 INSIGHT (Accelrys, Burlington, MA), GRASP (Anthony Nicholls, Columbia University), Dock (Molecular Design Institute, 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。

本发明的方法可以包括, 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_{H2}-C_{H3} 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(例如, 图 2A 和 2B 中所示的坐标), 使用计算机来产生 C_{H2}-C_{H3} 裂口的原子模型, 进一步提供候选化合物的原子结构坐标, 并且产生最优化位于 C_{H2}-C_{H3} 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, 鉴定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_{H2}-C_{H3} 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。

备选地, 用于设计具有对于免疫球蛋白分子 C_{H2}-C_{H3} 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, 并且可以产生最优化安置的候选化合物的原子模型。如本文所描述, 如果, 例如, 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, 可以鉴定候选化合物为具有对于免疫球蛋白分子 C_{H2}-C_{H3} 裂口的特异结合亲和力的配体。

还可以应用其它基于结构的设计/模拟技术, 从本文所述的化合物的结构信息交互式地设计本发明的化合物(参见, 例如, Jackson (1997) *Seminars in Oncology* 24:L164-172; 和 Jones 等. (1996) *J. Med. Chem.* 39:904-917)。

本发明的化合物和多肽还可以通过, 例如, 通过计算机模拟鉴定候选化合物进行鉴定, 其立体地并优选地适配(即, 具有高亲和力)到免疫球蛋白分子的 C_{H2}-C_{H3} 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。对于所述体外和体内筛选适用的方法

包括本文所描述的那些。

组合物和制品

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 介导的免疫复合物超量生产）引起的疾病的方法。通过这些方法，将按照本发明的多肽和化合物施用给受试者（例如，人或其它哺乳动物），其患有可以通过调节 Fc 介导的免疫复合物形成而减轻的疾病或紊乱（例如，类风湿性关节炎）。典型地，可以给怀疑患有与免疫复合物形成相关的疾病或病况的受试者施用 1 种或多种多肽或者化合物。

本文提供的多肽和化合物可以用于生产用于治疗由异常 Fc 介导的免疫复合物形成引起的疾病的药剂（即，组合物）。本发明的组合物典型地含有本文所述的 1 种或多种多肽和化合物。C_H2-C_H3 结合多肽，例如，可以在药用载体或稀释剂中，并且可以按量和周期施用，所述的量和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，所述多肽以抑制量施用（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）。本发明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风险受试者（例如，移植受体）中的免疫反应性减小到最低。

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，可以通过安乐处死后的免疫染色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，可以从类风湿性关节炎患者中减少的疼痛推断减少的免疫复合物形成。动物模型还可以用来研究诸如类风湿性关节炎的疾病的发展和减轻。

用于配制和后续施用的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，或者直到实现治愈或获得疾病状态的减轻。本领域

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 EC50 进行估算。典型地, 剂量为 0.01 μg -100 g 每 kg 体重, 并且可以给药每天 1 次或多次、每二周 1 次、每周 1 次、每月 1 次或甚至更不经常。成功治疗后, 可以让患者经受维持治疗, 以防止所述疾病状态的复发。

本发明提供包含本发明的多肽和/或化合物的药用组合物和制剂。因此, 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、受体靶点分子、或者口服、直肠、局部或其它制剂, 进行混合、胶囊化、缀合或缔合, 用于辅助摄入、分布和/或吸收。

“药用载体”(本文也叫作“赋形剂”)是用于运送 1 种或多种治疗化合物(例如, $\text{C}_{\text{H}2}$ - $\text{C}_{\text{H}3}$ 结合多肽)到受试者的药用溶剂、混悬剂或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 1 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进行选择, 以便提供需要的大小、密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; 结合试剂(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, 白明胶, 或硫酸钙); 滑润剂(例如, 淀粉, 聚乙二醇或乙酸钠); 崩解剂(例如, 淀粉或淀粉甘醇酯钠); 以及加湿剂(例如, 硫酸月桂酯钠)。

本发明的药用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(经皮的 (transdermal)、舌下的、眼的、或鼻内的); 肺部的(例如, 通过粉剂或气溶胶剂的吸入或吹入); 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, 通过缓慢灌输或施用缓慢释放制剂)。对于治疗中枢神经系统内的组织, 可以通过注射或灌输将 $\text{C}_{\text{H}2}$ - $\text{C}_{\text{H}3}$ 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的渗透性的药剂一起施用。

用于 $\text{C}_{\text{H}2}$ - $\text{C}_{\text{H}3}$ 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（oil bases）中的溶液。这样的溶液还可以含有缓冲液、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、液体和粉剂。鼻部喷雾剂特别有效，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效的。常规药用载体、水、粉剂或油基、增稠剂等可以是必要的或是需要的。

用于口服的组合物和制剂包括，例如，粉剂或粒剂、混悬液或者在水或非水性介质中的溶液、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。

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性溶液，其还可以含有缓冲液、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）。

本发明的药用组合物包括，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2个不相溶的液相：一般地，乳状液是水-在-油（water-in-oil, w/o）或油-在-水（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运送的治疗。

脂质体是具有由亲脂性材料和可以包含要运送的组合物水性内核组成的膜的赋形剂。由于其从药物运送的观点上提供的特异性和作用的持续性，脂质体可以特别有效。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，包括 LIPOFECTIN[®] (Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, CA) 和 EFFECTENE[™] (Qiagen, Valencia, CA)。

本发明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、

原药物 (prodrug) 以及所述原药物的药用盐、和其它生物等价物。术语“原药物 (prodrug)”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制剂和/或条件在机体或其细胞内转化成活性形式 (例如, 药物)。术语“药用盐 (pharmaceutically acceptable salts)”是指本发明的多肽在生理学上和制药学上可用的盐 (即, 保留母多肽 (parent polypeptide) 的需要的生物活性而没有给予不必要的毒性作用的盐)。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。

含有本发明的多肽的药用组合物还可以结合促进多肽向动物皮肤的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。渗透增强剂可以分类为属于 5 大类的 1 种, 即, 表面活性剂 (例如, 硫酸月桂酯钠、聚氧化乙烯基-9-十二烷基醚和聚氧乙烯基-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); 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。

本发明的某些实施方案提供药用组合物, 其包含(a) 1 种或多种多肽, 和(b) 1 种或多种通过不同机制作用的其它试剂。例如, 本发明的组合物可以包括消炎药物, 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、阿糖腺苷、阿昔洛韦和更昔洛韦。其它非多肽试剂 (例如, 化学治疗试剂) 也在本发明的范围内。所述组合的化合物可以一同或先后使用。

本发明的组合物又可以包含常规在药用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、或者用于在身体上配制本发明的多肽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、加湿剂、乳化剂、用于影响渗透压的盐、缓冲液、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的组合物内的多肽成分的生物活性。如要需要，可以将制剂灭菌。

可以按照制药工业中公知的常规技术制备本发明的药用制剂，其可以便利地以单位剂量形式存在。所述技术包括使活性组分（例如，本发明的 $C_{H2}-C_{H3}$ 结合多肽）与需要的药用载体或赋形剂缔合的步骤。典型地，可以通过这样的方式制备所述制剂：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。

本发明的组合物可以配制成许多可能的剂量形式的任何一种，诸如，但不限于，片剂、胶囊、液态糖浆、软凝胶、栓剂和灌肠剂。本发明的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。

本发明的 $C_{H2}-C_{H3}$ 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。用于生产产品的成分和方法是公知的。产品可以与前述部分提出的1种或多种多肽和化合物组合。另外，产品还可以包括，例如，缓冲液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。

应用 $C_{H2}-C_{H3}$ 结合多肽来抑制Fc-介导的免疫复合物形成的方法

$C_{H2}-C_{H3}$ 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 $C_{H2}-C_{H3}$ 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，RF, FcR, FcRn, 组蛋白, MBP 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，聚丙烯酰胺凝胶电泳和考马斯兰或银染，或者通过共免疫沉

淀进行评估。所述方法为本领域的普通技术人员所知。

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。这样的方法可包含,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-Arg-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr (SEQ ID NO:14)。

此处提供的方法可用于治疗患有,例如,类风湿性关节炎(RA),全身性狼疮性红斑症(systemic lupus erythematosus (SLE)),狼疮性肾炎,自体免疫肾小球肾炎,动脉粥样硬化,多发性硬化病(MS),帕金森症,局限性回肠炎,银屑病,关节强硬性脊椎炎(AS),或癌症的患者,或者用于移植受体。下述部分描述这些 Fc-介导的免疫复合物形成的疾病和参与。本发明的方法还可包括用于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的减少的步骤。

类风湿性关节炎 - RA 的特征在于慢性关节炎,其最终导致不可逆的软骨毁坏。在 RA 中,异常 IgG 抗体由滑膜中的淋巴细胞产生。然后,这些异常 IgG 抗体作用为抗原。称为类风湿因子(Rheumatoid Factors, RF)的其它 IgG 和 IgM 抗体存在于血清和滑膜中,并且接着与这些异常的 IgG 抗体/抗原反应,以产生免疫复合物。在患有 RA 的患者的滑膜组织中富含包含 RF 的免疫复合物。RF 被导向 IgG 的 Fc 区,并且与 C_H2-C_H3 裂口反应 (Zack 等. (1995) *J. Immunol.* 155:5057-5063)。尽管 RF 在 RA 中的准确作用还有待于充分地阐明,但是 RF 的存在与全身性症状、关节侵蚀和预后差相关。

胶原 II (CII)诱导的关节炎, RA 的鼠模型,特征在于多发性关节炎、滑膜增生、单核细胞渗透、关节翳形成以及软骨和骨骼的破坏。缺乏 FcγRI 和 FcγRIII 的小鼠免受 CII 诱导的关节炎,这表明 FcγRs 的封闭对于治疗

RA 是有效的(Kleinau 等. (2000) *J. Exp. Med.* 191:1611-1616)。尽管没有充分理解 RA 的病因学,但是遗传上倾向于发生所述疾病的个体产生了高水平的抗 CII 抗体。用含有 CII 的免疫复合物免疫产生抗-个体遗传型的 (anti-idiotypic) 抗-CII 抗体,其已表明实际上为 RF(Holmdahl 等. (1986) *Scand. J. Immunol.* 24:197-203)。结合于 IgG C_H2-C_H3 裂口的抑制剂将阻滞这种抗 CII 和 RF 抗-个体遗传型的抗体的循环生产。

在 RA 中由免疫复合物引起的炎症和后续的软骨损害可以与 Fc...Rs 在巨噬细胞上的发生相关(Blom 等. (2000) *Arthritis Res.* 2:489-503)。敲除小鼠中,在诱导免疫复合物-介导的关节炎后,功能型 Fc...RI 和 Fc...RIII 的缺失防止了炎症和软骨毁坏,然而,在同样处理的易得自体免疫性关节炎的小鼠的定居关节 (resident joint) 巨噬细胞上 Fc...Rs 的高基底表达与显著更多的滑膜炎症和软骨毁坏相关。在最近的研究中,在炎症和组织损伤中的这些受体的重要性已经在各种炎症疾病中得以阐明,其中炎症疾病包括自体免疫溶血性贫血和血小板减少症、自体免疫性肾小球肾炎、以及诱导的肾小球肾炎。由于大多数的人 RF 结合于 IgG C_H2-C_H3 裂口(Sasso 等. (1988) *J. Immunol.* 140:3098-3107; Corper 等.如前所述;和 Sohi 等. 如前所述),结合于 C_H2-C_H3 裂口的多肽将直接抑制 RF 与免疫复合的 IgG Fc 的结合,并且因此将改善 RF 对 RA 病理学的贡献作用。

全身性狼疮性红斑和狼疮性肾炎 - SLE 是一种具有许多表现的慢性自体免疫疾病。自体抗体的产生导致免疫复合物形成,并且随后沉积在许多组织中 (例如,肾小球、皮肤、肺、滑膜和间皮),导致疾病的表现。由于免疫复合物常常沉积在肾小球中,肾病通常具有 SLE。尽管治疗,慢性肾衰竭的进展是常见的。

狼疮性肾炎是一种肾脏的炎症,其由 SLE-相关的免疫复合物和 Fc...R 的肾小球沉积引起 (参见,例如, Clynes 等. (1998) *Science* 279:1052-1054)。在 SLE 的小鼠模型中,还观察到显著的蛋白尿症,其伴随着对于 DNA 和组蛋白,以及 IgG1、IgG2a 和 IgG2b 亚纲的免疫复合物的抗体的血清学呈现。平均存活为 6 个月,并且肾衰竭导致死亡。认为 B 细胞和自体抗体在疾病发展中起主要作用,并且已经表明妨碍自体抗体产生的药剂能减轻疾病。

缺失这一路径的成分的确定的鼠科品系的可用性促进了关于 Fc...Rs 的作用的研究。小鼠品系...⁴，其缺失 FcR...链，不表达活化受体 Fc...RI 和 Fc...RIII，但是还带有抑制性受体 Fc...RIIB。缺乏 Fc...RI 和 Fc...RIII 的小鼠免于发展狼疮性肾炎。通过 Fc...R/免疫复合物相互作用的遗传中断，Clynes 等(如前所述)表明免疫复合物和细胞 Fc 受体的相互作用对于狼疮性肾炎的发展是重要的。然而，缺乏 FcR 的小鼠还证明了显著的肾免疫复合物沉积。

已经表明组蛋白 H1 结合于免疫复合物(Gussin 等. (2000) *Ann. Rheum. Dis.* 59:351-358; 和 Costa 等. (1984) *J. Immunol. Methods* 74:283-291)。Costa 等还表明类风湿因子竞争性地抑制组蛋白 H1 与免疫复合物的结合，这表明组蛋白 H1 与免疫复合物的结合包括 IgG Fc C_H2-C_H3 裂口。其它研究表明用组蛋白、DNA 和抗-DNA 抗体灌注大鼠肾脏导致了 DNA/抗-DNA 免疫复合物在肾小球基膜(GBM)的沉积，这表明结合于 GBM 的免疫复合物直接由组蛋白与 GBM 的结合所调控(Termaat 等. (1992) *Kidney Int.* 42:1363-1371; 和 Gussin 等. 如前所述)。结合于 C_H2-C_H3 裂口的多肽的应用将抑制组蛋白与免疫复合的 IgG Fc 的结合，并且因此将改善这些 Fc-介导的免疫复合物对 SLE 和狼疮性肾炎的病理学的贡献作用。

在应用 IgG Fc 片段的竞争性抑制研究中，沉积的 IgG 免疫复合物和注射的 Fc 片段在共定位于 (colocalized) Fc-治疗的肾炎动物的血管系膜中，这表明 FcR 的封闭可能是 Fc 片段的有益作用的基本机制 (Gómez-Guerrero 等. (2000) *J. Immunol.* 164:2092-2101)。这一研究还证明了免疫复合物对于在调节狼疮性肾炎中的 FcR 相互作用的重要性。另外，多种炎性细胞因子的减少证明通过抑制 1 种或多种炎性分子预防炎性级联而不是试图妨碍所述级联的重要性。因此，结合于 C_H2-C_H3 裂口的多肽还将抑制 FcR 与免疫复合的 IgG Fc 的结合，并且将减少 FcR 对 SLE 和狼疮性肾炎的病理学的贡献作用。

Gómez-Guerrero 等还证明在未治疗的肾炎小鼠中观察到的上升的胆固醇(227 ± 27 mg/dl)在用 Fc 片段治疗的肾炎小鼠中减少多于一半(103 ± 16 mg/dl)。在 35-44 岁之间患有全身性狼疮性红斑的妇女与没有免疫复合物疾病的相似年龄的妇女相比，具有 50 倍更高的几率形成高级动脉粥样

硬化/心肌梗死(Manzi 等. (2000) *Ann. Rheum. Dis.* 59:321-325)。尽管没那么明显，但是这种相同的关系对于患有类风湿性关节炎的患者也是事实。。动脉粥样硬化和心肌梗死的上升几率可以归因于慢性免疫复合物的形成引起的慢性炎症状态。可以通过结合于 IgG Fc C_H2-C_H3 裂口的抑制性多肽防止这些免疫复合物的形成。

自体免疫肾小球肾炎 – 自体免疫肾小球肾炎，一种与狼疮性肾炎相关的疾病，是由于 T 细胞依赖型多克隆 B 细胞活化，其负责产生抗自身成分（例如，GBM，免疫球蛋白，DNA，髓过氧化物酶）和非自身成分（例如，绵羊红血细胞和三硝基苯酚）的抗体。增加的血清 IgE 浓度是这种疾病的特点。

动脉粥样硬化 – 动脉粥样硬化损害主要被认为是炎性性质。最近的研究已经聚焦在动脉粥样硬化的炎性成分上，其试图突出稳定和不稳定冠状斑（coronary plaques）之间的差异。增加的证据支持动脉粥样硬化与其它炎性/自体免疫疾病共有许多相似性的假说。实际上，在动脉粥样硬化、不稳定的绞痛、和自体免疫疾病的典型类风湿性关节炎中观察到的炎性/免疫应答中存在令人惊讶的相似性(Pasceri 和 Yeh (1999) *Circulation* 100(21):2124-2126)。

充满胆固醇酯的活化的巨噬细胞和巨噬细胞衍生的泡沫细胞是动脉粥样硬化的主要要素，并且可以通过一些潜在的机制影响损伤形成。一种这样的机制是 Fc...R 活化和/或 Fc...R-介导的诸如脂蛋白免疫复合物的含有胆固醇的免疫复合物的清除。最近的研究表明；高度细胞的前动脉粥样硬化损伤(preatheromatous lesions)在表达每种 Fc...R(Fc...RIA, Fc...RIIA, 和 Fc...RIIIA; (Ratcliffe 等. (2001) *Immunol. Lett.* 77:169-174)) 的增殖区包含许多巨噬细胞。这些数据为 Fc...R-介导的免疫复合物的清除可以在动脉粥样硬化形成过程中发生在动脉损伤中的观点提供进一步的支持。高亲和力(Fc...RIA)和更低亲和力(Fc...RIIA/Fc...RIIIA)受体的表达表明单价和多价包含 IgG 的免疫复合物可能结合 Fc...R，并且通过由受体活化诱发的一些不同的炎性机制影响损伤形成。

在慢性肺炎衣原体 (*Chlamydia pneumoniae*) 感染和动脉粥样硬化之间还存在建立的联系(Glader 等. (2000) *Eur. Heart J.* 21(8):639-646)。通过

形成含有肺炎衣原体-特异性 IgG 抗体的循环免疫复合物可以提高和/或部分调节肺炎衣原体 (*C. pneumoniae*) 脂蛋白的促动脉硬化形成 (proatherogenic) 的作用。在慢性肺炎衣原体感染和动脉粥样硬化之间的联系至少部分可以由通过形成循环的免疫复合物与肺炎衣原体的相互作用而解释。因此, 本发明的 C_{H2}-C_{H3} 结合多肽还可以有效用于治疗上升的胆固醇水平和动脉粥样硬化/心肌梗死。

多发性硬化病 - MS 是一种攻击包围神经元的隔离的髓鞘的自体免疫性疾病。这损害机体和大脑之间的神经信号传导。症状可以是轻微的或严重的, 持续时间可短可长, 并且可以包含视力模糊、失明、头晕、麻木、肌肉虚弱、缺乏协调和平衡、言语障碍、疲劳、颤动、性功能障碍、以及肠和膀胱问题。尽管许多人具有部分或完全的减缓, 但是对于一些进展更加严重的症状很少或没有减缓。

研究表明患有 MS 的患者具有正在进行的全身性病毒产生, 其导致免疫复合物形成。另外, MS 患者常常具有含有大脑-反应成分的血清复合物 (Coyle 和 Procyk-Dougherty (1984) *Ann. Neurol.* 16:660-667)。MS 的病因学可能是多因子的, 并且包括异常免疫应答, 其可能由遗传上易感染的个体在儿童时期获得的感染剂促发。所述免疫应答包括髓鞘碱性蛋白 (myelin basic protein) 浓度、CSF 中抗髓鞘抗体和免疫复合物活性、和血液淋巴细胞的体外刺激、抑制和迁移抑制的改变。这些应答似乎与 MS 的阶段和 CNS 损伤的严重性相关 (Iivanainen (1981) *J. Neuroimmunol.* 1:141-172)。并且, 在患有渐进的和活性复发-间歇的 MS 的患者血清中, 发现循环免疫复合物的水平显著地增加 (Procaccia 等. (1988) *Acta Neurol. Scand.* 77:373-381)。在处于复发-间歇的 MS 患者的脑脊髓液中, 也发现免疫复合物水平增加。

髓鞘碱性蛋白 (myelin basic protein, MBP) 在 MS 的免疫发病机制中是重要的。已表明 MBP 结合于免疫复合物和免疫复合的 IgG Fc (Sindic 等. 如前所述)。表明这些免疫复合物结合位点在 MBP 上是多化合价的, 并且组蛋白通过 MBP 完全抑制免疫复合的 IgG Fc 乳胶-包被珠粒 (IgG Fc latex-coated beads) 的凝集。另外, 某些 FcR 等位基因与 MS 的疾病过程相关 (Vedeler 等. (2001) *J. Neuroimmunol.* 118:187-193)。通过表明 FcR...^{+/+}

小鼠免受实验性自体免疫脑脊髓炎的研究,其为由髓鞘少突胶质糖蛋白诱导的 MS 模型,进一步表明 FcRs 参与 MS (Abdul-Majid 等. (2002) *Scand. J. Immunol.* 55:70-81)。使用结合于 C_H2-C_H3 裂口的多肽治疗 MS 患者将抑制 MBP 与免疫复合的 IgG Fc 的结合,并且将干扰免疫复合物结合于 FcRs, 因此,改善 MS 的病理。

帕金森症 – 帕金森症(PD)的临床症状由在已知为黑质(substantia nigra, SN)的大脑切片中的多巴胺能神经元的死亡引起。应答过度的免疫系统可能通过在应答初始损伤中产生细胞因子而在延长 PD 中起作用,其可能进一步损害大脑中的细胞。并且,已经表明来自 PD 个体的免疫球蛋白对 SN 细胞的发病机理起贡献作用(Chen 等. (1998) *Arch. Neurol.* 55:1075-1080)。

酪氨酸氢化酶(TH)是儿茶酚胺神经递质生物合成中的限速酶,并且只在那些通常合成并释放所述神经递质的神经元(例如, SN 的神经元)中表达。TH 的结构分析表明,免疫复合物可以结合于所述酶,并且对 PD 病理起贡献作用。因此, C_H2-C_H3 裂口-结合多肽可以通过抑制 Fc-介导的免疫复合物与 TH 的结合而有效用于治疗 PD。

局限性回肠炎 – 局限性回肠炎导致胃肠道,通常是小肠的慢性炎症。它在美国影响大约 500,000 人,大部分常常不到 30 岁,其引起轻微到严重的腹痛、腹泻、发烧和体重减轻。尽管所述疾病的起因未知,但是普遍的理论是,在局限性回肠炎患者中,肠免疫系统与病毒的或细菌的试剂过量反应,并且引发正在进行的、不可控制的肠炎。已经表明 IgG 种类的免疫复合物可能在局限性回肠炎中激活炎性嗜中性粒细胞(Nielsen 等. (1986) *Clin. Exp. Immunol.* 65:465-471)。

已在局限性回肠炎患者的血清中检测到 RF 和循环的免疫复合物(Procaccia 等. (1990) *Boll Ist Sieroter Milan* 69:413-421; 和 Elmgreen 等. (1985) *Acta Med. Scand.* 218:73-78)。在这些患者中含有 IgG 的免疫复合物的普遍存在和增加的 IgG RF 水平表明抑制 Fc-介导的免疫复合物形成将有效用于治疗局限性回肠炎。

银屑病 – 认为诸如白介素-2 的细胞因子的释放参与银屑病。在这种疾病中,细胞因子发出信号使得皮肤细胞以加快的速率再生和成熟,其引

发其它反应，诸如激活多余的 T 细胞并将 T 细胞“恢复”到皮肤中。T 细胞的起始活化引发一个循环，其最终导致在皮肤表明形成银屑病损伤。

银屑病相关的抗原，pso p27，是银屑病免疫反应中的主要抗原。这种特殊的抗原的合成随着银屑病皮肤损伤中的炎症的减轻而减少。参见 Dalaker 等. (1999) *Acta Derm. Venereol.* 79:281-284。来自银屑病鳞屑的抗 pso p27 的兔抗血清与人 IgG 的 Fc 区反应。另外，商业的抗人 IgG 抗血清识别用作用于免疫兔的抗原来源的含有 pso p27 的溶液中的一种成分 (Asbakk 等. (1991) *APMIS* 99:551-556)。因此，在银屑病患者中，pso p27 抗原可以引起具有类风湿因子活性的抗体的产生。

应用叫作“类风湿性”玫瑰花结测试 (“rheumatoid” rosette test) 证明了在银屑病患者中细胞水平的抗 IgG 活性。纯化的细胞群体的应用表明参与类风湿性玫瑰花结形成现象的淋巴细胞缺少常规的 T 和 B 细胞膜标记。携带 FcR 的这样的单核细胞能够作为对于 IgG 包被的靶细胞的杀伤细胞。这种细胞毒性可能对银屑病中的损伤的病因论起贡献作用 (Clot 等. (1978) *Brit. J. Derm.* 99:25-30)。因此，抑制所述淋巴细胞与具有 C_H2-C_H3 结合多肽的 IgG 分子的结合将有效用于治疗银屑病。

关节强硬性脊椎炎 – 对于与兔 IgG 的 Fc 区交叉反应的抗体的存在，分析来自患有关节强硬性脊椎炎患者和来自健康献血者的血清和滑液，这显示出显著数量的游离 RF，然而，IgG RF 在碱性解离的循环免疫复合物 (CIC) 中被观察到。在来自 AS 患者的碱性解离的 CIC 中还检测到与 pso p27 反应的大量的 IgG 和中量的 IgM (Rodahl 等. (1988) *Ann. Rheum. Dis.* 47:628-633)。因此，与 pso p27 相关的抗原似乎参与 AS 中的 CIC 形成，并且可能负责患有 AS 的患者中 RF 的激发。

癌症 – 科学证据表明能够结合免疫球蛋白的因子可以抑制癌症转移 (参见，例如，Mathiot 等. (1992) *Immunol. Res.* 11:296-304; and Hoover et al. (1990) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 166:77-85)。本发明提供的多肽和其它化合物可以抑制转移过程的一些关键元件。癌细胞上的 Fc 受体与癌症转移有关 (参见，例如，Gergely 等. (1994) *Adv. Cancer Res.* 64:211; Wallace 等. (1994) *J. Leuk. Biol.* 55:816-823; 和 Witz 和 Ran. (1992) *Immunol. Res.* 11:283-295)。

FcR 阳性肿瘤细胞可以结合于肿瘤-特异性抗体的 Fc 区。因此, FcRs 可以保护细胞, 其通过抵消抗体依赖型效应器的作用, 诸如补体-介导的溶解或抗体依赖型细胞-介导的细胞毒性 (Gergely 等, 如前所述)。在这种方式下, FcR 表达赋予肿瘤细胞逃脱免疫机制的能力。FcRs 在肿瘤细胞上的表达还可以促进细胞生长。另外, 肿瘤细胞可以使用 FcRs 以结合于黏着分子, 并且引起导致血管发生的局部的炎性应答。使用 FcγR 体外转染的肿瘤细胞与不表达所述受体的细胞相比, 表现出更高的体内转移和肿瘤发生率(Witz 和 Ran, 如前所述)。使用 C_{H2}-C_{H3} 结合多肽来阻滞免疫球蛋白分子与癌细胞上的 FcRs 之间的相互作用将有效用于预防或减少癌症转移。

移植后的移植排斥 – 本发明的 C_{H2}-C_{H3} 结合多肽还有效用于预防组织或器官移植后的移植排斥。移植排斥典型地由移植组织上的细胞-介导的和体液免疫攻击引起。固体器官(组织)移植包括, 例如, 肾脏、心脏、肺、肝脏、胰腺、皮肤和骨骼转移。骨髓移植用在下述疾病的治疗中: 诸如, 免疫缺陷疾病、再生障碍性贫血、白血病、淋巴瘤和造血作用的遗传疾病。最近的研究表明 FcR 非结合抗-CD3 单克隆抗体通过运送不完整的信号到活化的 T 细胞而深入地影响 T 细胞功能。这些不完整的信号可以导致调控移植排斥的炎性 Th1 T 细胞亚型的功能性灭活。本发明的 C_{H2}-C_{H3} 结合多肽还可以有效用于阻止到活化的 T 细胞的信号, 因此抑制移植排斥。

本发明将在下述实例中进一步描述, 所述实例不会限制权利要求中描述的本发明的范围。

实施例

实施例 1 – 模拟对结合测试多肽重要的 C_{H2}-C_{H3} 裂口内的氨基酸残基

基于结构的分子药物设计的第一步是确定目标受体的三维结构。展示测试配体的三维结构的计算机程序(例如, RasMol 2.6, Protein Explorer, 或 Chime, 分别获得于 University of Massachusetts Molecular Visualization 在互联网上的网址), 以及展示目标受体的准确的三维结构的程序(例如,

Auto-dock 或 Dock), 可以用来预测将与目标受体结合的配体的结构。可以通过给包含适当软件的计算机提供由所述目标受体和测试配体的原子坐标组成的数据产生三维结构。图 1A 和 1B 显示 IgG 分子的 Fc C_H2-C_H3 裂口在非复合的和抗原结合的状态下计算机产生的、三维结构, 这揭示本文所述的开放和封闭的构象。与肽配体和类风湿因子复合的 IgG 分子的 C_H2-C_H3 裂口的原子坐标分别在图 2A 和 2B 中显示。

对 IgG Fc C_H2-C_H3 裂口和具有氨基酸序列 Asp-Cys-Ala-Ala-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr (SEQ ID NO:39) 的多肽之间的相互作用的计算机模拟的检验, 表明多肽的色氨酸 (Trp) 残基可能在 C_H2 区的 Ile253 和 C_H3 区的 His435 之间形成对于裂口的氢键(图 3)。在 C_H2-C_H3 裂口内对于结合于所述多肽关键的氨基酸为 Leu251, Met252, Ile253, Ser254, His433, Asn434, His435 和 Tyr436。

实施例 2 – 实施例 1 中的多肽的氨基酸取代

对具有氨基酸序列 Arg-Cys-Ala-Trp-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr (SEQ ID NO:6) 的多肽的检验, 表明在第一位置用精氨酸 (Arg) 取代天冬氨酸 (Asp) 没有影响对 IgG Fc 区的结合。在第四位置用精氨酸 (Arg) 替代色氨酸 (Trp) 也不期望对免疫球蛋白结合有重要影响。将这些残基的 1 个或 2 个取代为精氨酸 (Arg) (例如, 如在 SEQ ID NO:5 中提出的) 不期望使得所述多肽更加水溶, 因此增加其生物利用度。这种结合于 Fc C_H2-C_H3 区的修饰肽的三维结构在图 3 中显示。

实施例 3 – 用于测定结合于 CH2-CH3 裂口的配体的体外测定法

应用包括酶联免疫吸附测定(ELISA)和双向免疫扩散技术的体外测定法来证明本发明的多肽和化合物对结合于诸如 FcR, RF, FcRn, C1q, 组蛋白, CII, 和 MBP 的因子的免疫复合的 IgG Fc 的竞争性抑制。标准的试剂和 ELISA 试剂盒有效地减少成本并且增加实验的重复性。

在标准的 ELISA 中, 将抗原免疫吸附到塑料微孔上。适当封闭和洗

涤后, 将具有定向于抗原的特异性的初级抗体添加到微孔中。再洗涤一次后, 将定向于初级抗体并且与诸如辣根过氧化物酶(HRP)的酶标记缀合的二级抗体添加到微孔中。随着另一洗涤循环后, 添加适当的酶底物。如果形成抗原与初级抗体与二级抗体/HRP 缀合物, 缀合的酶催化与底物的比色化学反应, 其用微量培养板读数仪 (microplate reader) 或分光光度计读取。通过标准化抗原和二级抗体/HRP 缀合物的水平, 建立初级抗体(可变的)的效价 (titer)。在标准的 ELISA 系统中, 初级抗体通过其位于 Fab 臂的互补决定区(CDR)与抗原结合。由于 HRP 缀合到二级抗体的 Fc 区, 直接的 Fc 结合非常有限或者被消除了。

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。在方式 ELISA 中, 所述酶 (例如, 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 (或鼠) 抗-过氧化物酶 IgG (“PAP”复合物) 的免疫复合物。在这种方法中, HRP 作为酶标记, 但是不封闭 Fc 区。在反式 ELISA 系统中, Fc C_{H2}-C_{H3} 裂口结合配体 (例如, 纯化的人 C1q) 结合于微孔平板上。在不存在竞争者时, PAP 复合物结合于固定的配体, 并且在 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本发明的多肽和化合物减少这种信号。

C1q 结合的抑制: 将 20 μl 过氧化物酶(P) (Sigma)在 2 ml 样品稀释剂(Quidel Corp, San Diego, CA)中稀释。将 20 μl 抗-过氧化物酶(AP) (Sigma)在 2 ml 样品稀释剂中稀释, 并将 20 μl 稀释的 AP 添加到稀释的 P 中(1:100 抗原:抗体比例), 以形成过氧化物酶-抗-过氧化物酶(PAP)复合物。极度的抗原过剩保证任何单个抗体将与 2 个过氧化物酶分子结合, 并且不会形成更大的免疫复合物, 因此防止更大的免疫复合物与多聚体 C1q (六聚体)的桥接。将 100μl 肽或 C1q 与新鲜制备的 PAP 预先温育 30 分钟, 添加到 C1q 包被的培养板 (Quidel Corp.), 并且温育 1 小时。洗涤后, 将 ABTS 底物(Quidel Corp.)添加到所述培养板中, 温育 30 分钟, 并且在 405 nm 处对培养板进行读数。所有的肽都通过在 2 个半胱氨酸残基之间形成二硫键而环化。结果在表 1 中显示。

可溶的 C1q 导致更低的 OD 405 值, 并且因此提供固相结合 C1q

对免疫复合物最大的竞争性抑制。大多数其它的肽防止免疫复合物与固相 C1q 的结合，其中 APPCARHLGELVWCT (SEQ ID NO:14)给出另一个最低 OD 值。丙氨酸取代的肽(DCAAHLGELAACT; SEQ ID NO:40)，其关键的结合残基取代成丙氨酸，导致与阳性对照没有显著差别的 OD 读数。

表 1

肽	SEQ ID NO:	OD 405 nm
(+) 对照 (PAP, 没有肽)	-	0.467
DCAAHLGELAACT	40	0.458
DCAWHLGELVWCT	2	0.208
APPCARHLGELVWCT	14	0.163
PCARHLGELVWCT	41	0.205
RCARHLGELVWCT	5	0.247
DCARHLGELVWCT	4	0.193
C1q (对照抑制剂)	-	0.149

FcR 结合的抑制: 一旦应用 C1q 测定法建立起反式 ELISA 方法，应用 FcγIIa, FcγIIb 和 FcγIII 代替 C1q 重新设计测定法。将高度纯化的 FcγIIa, FcγIIb 和 FcγIII 免疫吸附到塑料微孔上。在将 FcγR 反式 ELISA 系统最优化之后，应用本发明的多肽进行简单的竞争性抑制实验，以研究其对于免疫复合物与纯化的 FcγR 结合的抑制能力。

将 Falcon 微量滴定板用高度纯化的 FcγIIa, FcγIIb 和 FcγIII 的 1:10 稀释液包被，并且温育 24 小时。洗涤柱子，然后用 5X BSA 封闭溶液 (Alpha Diagnostic International, San Antonio, Texas) 封闭 24 小时。将等量(50μl)的肽和 1:10 PAP 免疫复合物预先温育 1 小时，然后在 FcR 包被的培养板上温育 1 小时。洗涤后，将培养板与 TMB 底物 (Alpha Diagnostic International) 温育 30 分钟。加入终止溶液 (10μl) 并且在 450 nm 对培养板进行读数。结果在表 2 中显示。

由于不能获得大量的可溶 FcR；对于这些实验没有包括炎性对照抑制剂。在所测试的肽中，DCAWHLGELVWCT (SEQ ID NO:2)引起最大的结

合抑制, 而 APPCARHLGELVWCT (SEQ ID NO:14)导致第二个最低的 OD 读数。

表 2

肽	SEQ ID NO:	Fc...IIa	FC...IIb	Fc...III
(+)对照 (PAP, 没有肽)	-	3.600	3.600	3.600
DCAAHLGELAACT	40	2.434	2.263	2.413
DCAWHLGELAACT	42	1.484	1.067	1.345
DCAWHLGELVWCT	2	0.499	0.494	0.477
APPCARHLGELVWCT	14	0.682	0.554	0.542
PCARHLGELVWCT	41	1.149	1.211	1.602
RCARHLGELVWCT	5	3.398	3.284	3.502
DCARHLGELVWCT	4	2.539	1.952	2.529

RF 结合的抑制: 除了多克隆 IgM RF 代替 C1q 包被在微孔上以外, 测试对 RF 与 IgG Fc C_{H2}-C_{H3} 裂口结合的能力的测定法与上文所描述的 C1q-CIC EIA 测定法非常相似。最优化后, 应用如对于 C1q-CIC EIA 所描述的相同的竞争性抑制技术来证明多克隆 RF 对免疫复合结合的抑制。高效价、RF 阳性的血清购自 Research Diagnostics (Flanders, NJ)。

将 200 μl 的 200 I.U.类风湿因子(RF) (+)对照的 1:10 稀释液 (由 Research Diagnostics 提供阳性标准)包被在 Falcon 微量滴定板上并且温育 24 小时。将培养板用 1:5 BSA 封闭缓冲液 (Alpha Diagnostic International) 封闭 1 小时。将新鲜配制的 1:10 PAP (抗原:抗体)免疫复合物与肽或 RF (只含有缓冲液的阳性对照)预先温育 30 分钟。洗涤后, 将培养板与 ABTS 底物(Research Diagnostics)温育 30 分钟, 然后在 405 nm 读数。结果在表 3 中显示。

表 3

肽	SEQ ID NO:	OD 405 nm
(+) 对照 (PAP, 没有肽)	-	0.753

DCAWHLGELAACT	42	0.622
DCAWHLGELVWCT	2	0.163
APPCARHLGELVWCT	14	0.103
PCARHLGELVWCT	41	0.106
RCARHLGELVWCT	5	0.152
DCARHLGELVWCT	4	0.109
RF (对照抑制剂)	-	0.108

可溶的类风湿因子(RF) 提供对于固相 RF 结合于免疫复合物的抑制。肽 APPCARHLGELVWCT (SEQ ID NO:14), PCARHLGELVWCT (SEQ ID NO:41), 和 DCARHLGELVWCT (SEQ ID NO:4)具有与可溶的 RF 的读数基本上相同的 OD 读数, 并且因此提供对于 RF 结合于免疫复合物的非常有效的抑制。

组蛋白结合的抑制: 在狼疮性肾炎中免疫复合物与肾脏的结合似乎包括(a) 组蛋白与 GBM 的结合, 然后(b) 免疫复合物(通过 IgG Fc C_H2-C_H3 裂口) 与结合的组蛋白的结合。应用与上文描述的那些相似的实验来抑制纯化的组蛋白与 IgG Fc 结合区的结合。将组蛋白(Sigma)在包被缓冲液 (Alpha Diagnostic International)中稀释 1:10, 并在 Falcon 微量滴定板上温育 24 小时。将培养板用 5X BSA 封闭溶液 (Alpha Diagnostic International) 封闭 24 小时。将新鲜制备的 1:10 兔 PAP (Sigma)与任何一种肽或组蛋白预先温育 1 小时, 然后将 100 μ l 混合物添加到组蛋白包被的培养板上放置 1 小时。洗涤后, 将培养板与 ABTS 底物 (Quidel Corp.)温育 45 分钟, 并且读取 OD 450。结果在表 4 中显示。

DCAWHLGELVWCT 肽 (SEQ ID NO:2)是最好的肽抑制剂, 其具有第二最低的 OD 值。

表 4

肽	SEQ ID NO:	OD 405 nm
(+) 对照 (PAP, 没有肽)	-	1.268
DCAWHLGELAACT	42	0.729

DCAWHLGELVWCT	2	0.212
APPCARHLGELVWCT	14	0.368
PCARHLGELVWCT	41	0.444
RCARHLGELVWCT	5	0.359
DCARHLGELVWCT	4	0.363
组蛋白	-	0.057

MBP 结合的抑制: 将 MBP (Sigma)用包被缓冲液(Alpha Diagnostic International) 1:10 稀释, 并在 Falcon 微量滴定板上温育 24 小时。洗涤培养板, 然后用 5X BSA 封闭缓冲液 (Alpha Diagnostic International)封闭 24 小时。将兔 1:10 PAP 免疫复合物与等量的肽或 MBP 预先温育 30 分钟。然后将 100 μ l PAP 免疫复合物/肽或 PAP/MBP 添加到 MBP 包被的培养板上并温育 1 小时。洗涤培养板并与 TMB 底物 (Alpha Diagnostic International)温育 30 分钟。加入终止溶液 (Alpha Diagnostic International)后, 将培养板在 450 nm 读数。结果在表 5 中显示。

除了在位置 10 和 11 用丙氨酸取代的肽 (SEQ ID NO:42)之外, 所测试的肽表现出对于固相 MBP 结合于免疫复合物的不同量的抑制。

表 5

肽	SEQ ID NO:	OD 405 nm
MBP	-	0.139
DCAWHLGELAACT	42	0.706
DCAWHLGELVWCT	2	0.588
APPCARHLGELVWCT	14	0.466
PCARHLGELVWCT	41	0.489
RCARHLGELVWCT	5	0.569
DCARHLGELVWCT	4	0.473
(+) 对照 (只有缓冲液)	-	1.033

Fc:Fc 相互作用的抑制: IgG4 的 Fc 区以 Fc 对 Fc 的方式与免疫复合

的 IgG 相互作用。应用纯化的 IgG4 与本发明的多肽一起来检验对免疫复合物形成和 Fc:Fc 相互作用的抑制。已知本发明的多肽结合的关键 IgG Fc 氨基酸，His435 的化学修饰，可以抑制 Fc:Fc 相互作用。

除了完整的 IgG4 代替 C1q 包被在微孔上以外，测试本发明的多肽妨碍 Fc:Fc 结合的能力的测定法与上文描述的 C1q-CIC EIA 测定法非常相似。最优化这种 CIC 测定法后，应用与对于 C1q-CIC EIA 描述相同的竞争性抑制技术来证明 gG4 Fc:Fc 免疫复合物结合的抑制。结果在表 6 中显示。

在所测试的肽中，DCARHLGELVWCT (SEQ ID NO:4), DCAWHLGELVWCT (SEQ ID NO:2), 和 APPDCARHLGELVWCT (SEQ ID NO:14)提供最强的 Fc:Fc 结合的抑制。

表 6

肽	SEQ ID NO:	OD 405 nm
IgG4	-	0.108
DCAWHLGELAACT	42	0.557
DCAWHLGELVWCT	2	0.107
APPDCARHLGELVWCT	14	0.107
PCARHLGELVWCT	41	0.129
RCARHLGELVWCT	5	0.191
DCARHLGELVWCT	4	0.096
阳性对照 (缓冲液)	-	0.716

胶原 II 和 FcRn 结合的抑制: 还测试本发明的多肽对于其抑制 CII 与抗-CII 抗体的结合以及 FcRn 与免疫复合物的结合的能力。除了用 CII 或 FcRn 代替 C1q 包被微孔之外，测试本发明的多肽干扰所述结合的能力的测定法与上文描述的 C1q-CIC EIA 测定法非常相似。CII 肽的免疫结构域是一段小的线性肽，并且易于合成，纯化的 CII 提取物还可以商购。最优化后，应用对于 C1q-CIC EIA 所描述的相同的竞争性抑制技术来证明结合的抑制。

实施例 4 – 类风湿因子与单体 IgG 结合的抑制

测试多肽抑制类风湿因子与单体 IgG 的结合的能力。由于其可以增加特别的肽的半衰期并且允许它们更加有生物活性，与单体 IgG 的结合可能是重要的。

应用标准的类风湿因子商业测试 (Research Diagnostics)，其具有下述修改：将 100 μ l 测试肽与人单体 IgG (Research Diagnostics) 预先温育 30 分钟。洗涤培养板，并且与测试试剂盒提供的 200 I.U. 类风湿因子阳性对照物一起温育。按照制造者的用法说明进行余下的测试。结果在表 7 中显示。

对于这一实验没有应用 RF 对照。在所测试的肽中，DCAWHLGELVWCT (SEQ ID NO:2) 明显地超出其它的肽，得到了最低的 OD 读数。

表 7

肽	SEQ ID NO:	OD 405 nm
(+) 对照 (只有缓冲液)	-	1.376
DCAAHLGELAACT	40	1.421
DCAWHLGELAACT	42	1.397
DCAWHLGELVWCT	2	0.464
APPCARHLGELVWCT	14	1.393
PCARHLGELVWCT	41	1.323
RCARHLGELVWCT	5	1.314
DCARHLGELVWCT	4	1.231

实施例 5 – 应用添加的肽抑制 RF 与免疫复合物的结合

测试添加的肽抑制 RF 与免疫复合物结合的能力。通过在 1 ml 蒸馏水中将 2 μ l 兔抗-过氧化物酶与 50 μ l 过氧化物酶混合形成免疫复合物 (PAP)。将 PAP (100 μ l) 与 100 μ l 肽预先温育 1 小时。将用 RF 包被的培养板用 5X BSA 封闭 24 小时。将 PAP/肽混合物 (100 μ l) 与 RF 包被的培养

板一起温育 30 分钟。应用 RF (100 μ l 的 200 I.U. 标准, 由 Research Diagnostics 提供)作为阴性对照。洗涤并与 ABTS 底物 (Quidel Corp., San Diego, CA)温育 15 分钟后, 培养板在 405 nm 处读数。结果在表 8 中显示。

表 8

肽	SEQ ID NO:	OD 405 nm
DCAWHLGELVWCT	2	1.421
APPCARHLGELVWCT	14	1.397
DCAFHLGELVWCT	3	0.464
APPDCAWHLGELVWCT	16	1.393
APPCAFHLGELVWCT	15	1.323
APPCAWHLGELVWCT	13	1.314
RF (阴性对照)	-	1.231
阳性对照	-	1.176

所测试的所有的肽导致相似的抑制率, 其中 APPDCAWHLGELVWCT (SEQ ID NO:16)提供最好的抑制。

实施例 6 – 应用添加的肽抑制 C1q 与免疫复合物的结合。

PAP 复合物如在实施例 5 中所描述的那样制成, 并取 100 μ l 与 100 μ l 的肽或人 C1q (Quidel Corp.)预先温育 1 小时。将 C1q/PAP 和肽/PAP 混合物 (100 μ l)与 C1q 包被的培养板一起温育 30 分钟。洗涤后, 将培养板与 ATBS (Quidel Corp.)温育 15 分钟, 并在 405 nm 读数。结果在表 9 中显示。

如在实施例 5 中一样, APPDCAWHLGELVWCT (SEQ ID NO:16)导致对 C1q 结合的最大抑制, 几乎相当于 C1q 自身。肽 APPCARHLGELVWCT (SEQ ID NO:14)给出次最好的结果。

表 9

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
APPCAWHLGELVWCT	13	1.148
C1q (阴性对照)	-	0.337
阳性对照	-	2.355

实施例7 - 通过添加的肽抑制 RF 与单体 IgG 的结合.

测试添加的肽抑制 RF 与单体 IgG 结合的能力。应用标准的类风湿因子商业测试(Research Diagnostics, New Jersey), 其具有下述修改: 将 100 μ l 测试肽与人单体 IgG (Research Diagnostics, New Jersey) 预先温育 1 小时。然后洗涤培养板, 并且与测试试剂盒提供的 200 I.U. 类风湿因子阳性对照物一起温育。按照制造者的用法说明进行余下的测试。结果在表 10 中显示。

肽 DCAWHLGELVWCT (SEQ ID NO:2) 导致对 RF 与单体 IgG 结合的最大抑制, 其次是肽 DCAFHLGELVWCT (SEQ ID NO:3)。

表 10

肽	SEQ ID NO:	OD 405 nm
DCAWHLGELVWCT	2	0.539
APPCARHLGELVWCT	14	1.095
DCAFHLGELVWCT	3	0.962
APPDCAWHLGELVWCT	16	1.065
APPCAFHLGELVWCT	15	1.159
APPCAWHLGELVWCT	13	1.166
阳性对照	-	1.312

实施例8 – 通过添加的肽抑制 FcR 与 PAP 的结合。

将 Falcon 微量滴定板用高度纯化的 FcγIIa, FcγIIb 和 FcγIII 的 1:10 稀释液包被, 密封, 并在 4°C 温育 1 年。洗涤培养板, 然后用 5X BSA 封闭溶液 (Alpha Diagnostic International, San Antonio, Texas) 封闭 24 小时。按在实施例 5 中描述的那样形成 PAP 免疫复合物。将 PAP (100 μl) 与 100 μl 肽预先温育 1 小时。将 PAP/肽混合物添加到 FcR 包被的培养板中, 并温育 1 小时。洗涤后, 将培养板与 ABTS 底物温育 15 分钟, 并在 405 nm 处读数。结果在表 11 中显示。

肽 APPDCAWHLGELVWCT (SEQ ID NO:16) 似乎导致对 FcR 与 PAP 结合的最大抑制, 其次是肽 DCAWHLGELVWCT (SEQ ID NO:2)。

表 11

肽	SEQ ID NO:	Fc...IIa	FcγIIb	FcγIII
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
APPCAWHLGELVWCT	13	0.658	0.562	0.530
阳性对照	-	1.599	1.394	1.588

实施例9 – 在胶原诱导的关节炎鼠科模型中体内测定 FD5 的治疗功效。

DBA/1J 小鼠获得于 Jackson 实验室 (Bar Harbor, ME), 并且保持检疫隔离 4 天, 每天检查。一旦确定动物是明显的健康良好的, 就将它们从检疫隔离中释放出来进行常规培养。

在第-2 天, 将 10 mg 胶原 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) 溶解在 5 ml 0.01 M 醋酸中, 并且在 4-8°C 搅拌过夜。在第-1 天, 通过将 10.6 mg 结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, Difco) 悬浮在 5.3 ml 角鲨烯中

制备佐剂。将混悬液匀浆一整天。

在第 0 天, 将 3.7 ml 的佐剂混悬液用 3.7 ml 的胶原溶液乳化。将小鼠耳朵标记以用于识别的目的, 称重, 并用异氟醚 (isoflurane) 麻醉。将 90 只“患病”鼠真皮下注射 0.05 ml 的佐剂/胶原乳剂。10 只对照小鼠 (“无病”) 获得 0.01 M 醋酸/角鲨烯的真皮下注射。没有观察到关于注射的不利反应, 并且将所述动物放回常规培养。

在第 6 和 13 天制备胶原和佐剂的新鲜制剂。在第 7 和 14 天, 将小鼠麻醉, 并且按照第 0 天它们被注射那样进行注射。同样, 在每次注射后没有记录到对注射方法不利的反应。

从第 15 天开始每天检验小鼠的关节炎症状。在第 21 天, 在 3 只小鼠身上观察到第一次症状 (一个肿胀的脚趾)。到第 31 天, 50% 的患病小鼠有症状, 而无病小鼠没有一只有症状。按下述对每一只个体小鼠记分关节炎症状的程度: 0, 正常; 2.5, 轻微的病灶性慢性侵蚀性的骨性关节炎; 5, 中度的病灶性化脓性侵蚀性的骨性关节炎; 10, 中度的多病灶性慢性侵蚀性的骨性关节炎。在第 32 天, 将患病小鼠称重, 对关节炎症状进行记分, 并分成 9 个治疗组, 每组 10 只小鼠。每组具有相似的平均关节炎指数。从每只小鼠身上采集血液用于标准化学/CBC 分析。

具有在 SEQ ID NOS:14 和 2 中提出的氨基酸序列的多肽 “ID 14” 和 “ID 2”, 分别获得于 Sigma Genosys (The Woodlands, TX)。在第 32 天, 将 305.2 mg ID 14 溶解于 91.7 ml pH 7.4 的磷酸缓冲盐溶液(PBS)中, 产生 3.33 mg/ml 的溶液。将 248.7 mg ID 2 溶解于 74.7 ml PBS 中, 以产生 3.33 mg/ml 的溶液。将这些溶液等分并在 -20°C 冻存备用。

REMICADE[®]获得于 Centocor (Malvern, PA)。通过在 30.03 ml PBS 中溶解 100 mg REMICADE[®]制备 3.33 mg/ml 的溶液。将这种溶液的等分试样保存 -20°C。通过在 15 ml PBS 中溶解 14.1 mg 制备 21-半琥珀酸脱氢皮质甾醇酯的溶液。在环境温度下保存等分试样。

采血后, 将 90 只患病小鼠分成 9 组, 每组 10 只小鼠。将这些组每组分别以 30 ml/kg 的体积量皮下注射赋形剂, 1 mg/kg ID 14, 10 mg/kg ID 14, 100 mg/kg ID 14, 1 mg/kg ID 2, 10 mg/kg ID 2, 100 mg/kg ID 2, 3 mg/kg 泼尼松龙, 或 10 mg/kg REMICADE[®]。从第 33 天到第 47 天每天称重小鼠并

对关节炎症状记分。另外，如在第 32 天那样，小鼠获得赋形剂, ID 14, ID 2, 泼尼松龙, 或 REMICADE®的每日注射。每天检验注射位点, 并没有观察到不利反应。

在第 48 天, 将小鼠称重, 并对关节炎症状记分。将所有的动物麻醉并放血, 用于标准化学/CBC 分析。将后肢移除并置于 10%缓冲的福尔马林中用于组织学分析, 以检验包括滑膜、关节软骨、关节周组织和骨骼的炎性损伤的程度。应用下述数值对每个后肢的分析进行等级评分: 0, 正常; 2.5, 轻微的病灶性慢性侵蚀性骨性关节炎; 5, 中度的病灶性化脓性侵蚀性骨性关节炎; 10, 中度的多病灶性慢性侵蚀性骨性关节炎。

表 12

体内关节炎研究

	关节炎 指数	变化 百分数	组织学 评估	变化 百分数
患病的(对照)	3.8	---	45	---
ID 14 (1 mg/kg)	2.8	-26%	55	+22%
ID 14 (10 mg/kg)	2.7	-29%	40	-11%
ID 14 (100 mg/kg)	3.6	-5%	45	0%
ID 2 (1 mg/kg)	2.8	-26%	25	-44%
ID 2 (10 mg/kg)	2.4	-37%	25	-44%
ID 2 (100 mg/kg)	2.5	-34%	10	-78%
REMICADE® (10 mg/kg)	3.8	0%	45	0%
泼尼松龙 (3 mg/kg)	1.4	-63%	25	-44%

对于在治疗的最後 3 天的各组的平均关节炎指数的计算揭示出, 施用 1 mg/kg 和 10 mg/kg ID 14 导致 26-29% 的关节炎症状逆转(图 4A 和表 12)。100 mg/kg 剂量的 ID 14 对所述疾病没有显著的作用。1, 10, 或 100 mg/kg ID 2 的每日注射导致关节炎症状的剂量-依赖型逆转(图 4B 和表 12)。使用 10 mg/kg 剂量观察到 37% 的最大抑制。通过比较, 相对于赋形剂-治疗的患病大鼠, 使用泼尼松龙的治疗防止关节炎症状的进一步发展(图 4C

和表 12)。在使用泼尼松龙治疗 8 天后,观察到 63%的关节炎症状的最大逆转。相反,使用 REMICADE®治疗对于关节炎症状没有作用(图 4C)。因此,多肽 ID 2 和 ID 14 能够逆转这些动物中的关节炎症状。

小鼠后肢的组织学检验揭示出,以 1 mg/kg, 10 mg/kg 和 100 mg/kg 施用 ID 2 导致 44-78%的关节炎症状逆转(表 12)。每日注射 1 mg/kg, 10 mg/kg,和 100 mg/kg 的 ID 14 没有显著作用。使用泼尼松龙的治疗导致 44%的关节炎症状逆转。相反地,使用 REMICADE®治疗对于关节炎的组织学症状没有作用。因此,多肽 ID 2 能够逆转这些动物中的关节炎症状。

实施例 10 - 在小鼠 RA 模型中评估 Fc-介导的免疫复合物形成的抑制的体内测定法

还在 CII-诱导的关节炎动物模型中测试本发明多肽的抑制作用。将易得关节炎的 DBA/1 小鼠真皮内注射 100 µg 在完全弗氏佐剂中乳化的牛 CII。60 天后,这些小鼠典型地发展 RA-类似的疾病。将小鼠分成 3 组:(1) 对照组,其期望发展关节炎;(2) 治疗组,其在 CII 免疫时用本发明的多肽或化合物治疗;和(3) 治疗组,其在 CII 免疫后 45-60 天,在已经开始表现出关节炎迹象的小鼠中开始用本发明的多肽或化合物治疗。监测治疗之前和之后的关节炎症状,以确定本发明的多肽和化合物的体内功效。

实施例 11 - 在小鼠 SLE 模型中评估 Fc-介导的免疫复合物形成的抑制的体内测定法

MRL/MpJ-Fas (MRL/lpr)小鼠发展一种在血清学上和病理学上与人 SLE 相似的综合征。这些小鼠具有高水平的对诸如单链和双链 DNA 的核抗原的 IgG 自体抗体,并且,由于体内免疫复合物形成以及在肾脏的肾小球中的沉积,还表现出渐进的肾小球肾炎。在第 7 周龄,将 MRL/lpr 小鼠每两周注射一次本文所描述的多肽进行治疗。每周测量一次蛋白尿水平,持续 40 周,以确定使用所述多肽治疗的动物是否具有更低的蛋白尿水平。40 周后,进行肾脏活体解剖来确定治疗的动物是否具有更少的肾小球肾

炎和/活 IgG 免疫复合物沉积。另外，计算平均存活率，以确定所述治疗的动物的平均存活率是否增加了。应用另外一种 SLE 鼠科模型，(NZB x NZW)F1 小鼠，实行相似的研究。

其它实施方案

应该理解尽管已经结合其详细描述对本发明进行了描述，前述描述意欲举例说明并不缩小本发明的范围，其由附加的权利要求的范围定义。其它方面、优点和修改在下述权利要求的范围内。

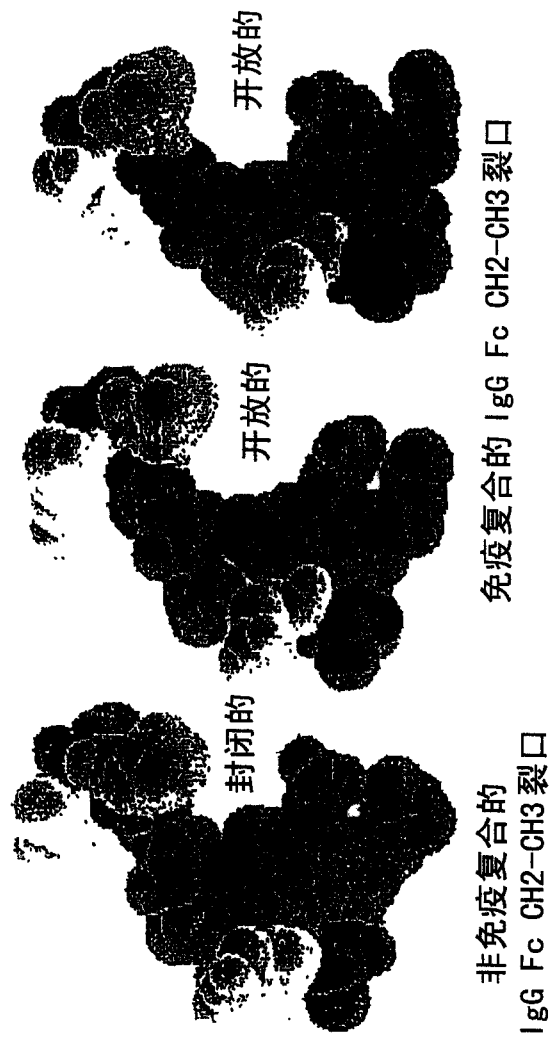


图 1A

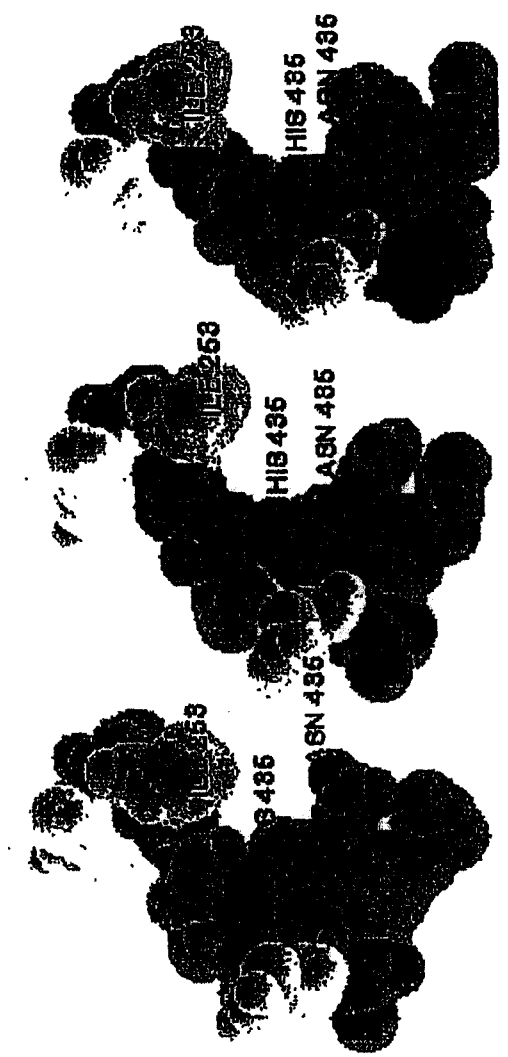


图 1B

ATOM	1865	N	LEU	A 251	27.507	31.617	11.391	1.00	19.12	N
ATOM	1866	CA	LEU	A 251	27.327	31.886	12.816	1.00	18.21	C
ATOM	1867	C	LEU	A 251	28.563	32.344	13.599	1.00	19.13	C
ATOM	1868	O	LEU	A 251	28.433	32.877	14.706	1.00	18.20	O
ATOM	1869	CB	LEU	A 251	26.730	30.649	13.489	1.00	18.15	C
ATOM	1870	CG	LEU	A 251	25.417	30.137	12.891	1.00	15.85	C
ATOM	1871	CD1	LEU	A 251	25.009	28.822	13.509	1.00	12.87	C
ATOM	1872	CD2	LEU	A 251	24.350	31.174	13.098	1.00	14.96	C
ATOM	1873	N	MET	A 252	29.754	32.076	13.067	1.00	19.47	N
ATOM	1874	CA	MET	A 252	30.998	32.483	13.718	1.00	17.57	C
ATOM	1875	C	MET	A 252	31.631	33.635	12.942	1.00	19.19	C
ATOM	1876	O	MET	A 252	31.917	33.509	11.751	1.00	19.47	O
ATOM	1877	CB	MET	A 252	31.986	31.324	13.778	1.00	17.49	C
ATOM	1878	CG	MET	A 252	31.569	30.181	14.680	1.00	20.45	C
ATOM	1879	SD	MET	A 252	32.867	28.921	14.831	1.00	22.74	S
ATOM	1880	CE	MET	A 252	33.894	29.668	16.021	1.00	17.91	C
ATOM	1881	N	ILE	A 253	31.863	34.751	13.628	1.00	20.54	N
ATOM	1882	CA	ILE	A 253	32.458	35.946	13.026	1.00	18.92	C
ATOM	1883	C	ILE	A 253	33.930	35.709	12.677	1.00	20.20	C
ATOM	1884	O	ILE	A 253	34.529	36.465	11.901	1.00	20.88	O
ATOM	1885	CB	ILE	A 253	32.320	37.157	13.973	1.00	15.28	C
ATOM	1886	CG1	ILE	A 253	32.613	38.463	13.235	1.00	17.06	C
ATOM	1887	CG2	ILE	A 253	33.246	36.996	15.160	1.00	16.38	C
ATOM	1888	CD1	ILE	A 253	31.683	38.772	12.079	1.00	11.72	C
ATOM	1889	N	SER	A 254	34.506	34.648	13.232	1.00	19.05	N
ATOM	1890	CA	SER	A 254	35.891	34.327	12.945	1.00	21.13	C
ATOM	1891	C	SER	A 254	36.056	33.485	11.673	1.00	22.40	C
ATOM	1892	O	SER	A 254	37.172	33.069	11.354	1.00	22.89	O
ATOM	1893	CB	SER	A 254	36.538	33.628	14.143	1.00	19.91	C
ATOM	1894	OG	SER	A 254	35.833	32.459	14.508	1.00	19.27	O
ATOM	1895	N	ARG	A 255	34.954	33.225	10.961	1.00	23.38	N
ATOM	1896	CA	ARG	A 255	34.993	32.434	9.726	1.00	23.13	C
ATOM	1897	C	ARG	A 255	34.419	33.198	8.553	1.00	24.34	C
ATOM	1898	O	ARG	A 255	33.769	34.220	8.740	1.00	24.57	O
ATOM	1899	CB	ARG	A 255	34.269	31.100	9.883	1.00	21.88	C
ATOM	1900	CG	ARG	A 255	34.885	30.244	10.941	1.00	23.18	C
ATOM	1901	CD	ARG	A 255	34.572	28.781	10.796	1.00	25.79	C
ATOM	1902	NE	ARG	A 255	35.225	28.072	11.892	1.00	35.87	N
ATOM	1903	CZ	ARG	A 255	35.179	26.760	12.098	1.00	37.69	C
ATOM	1904	NH1	ARG	A 255	34.501	25.970	11.273	1.00	39.85	N
ATOM	1905	NH2	ARG	A 255	35.811	26.243	13.147	1.00	35.85	N
ATOM	3301	N	GLU	X 430	21.640	30.893	14.939	1.00	15.96	N
ATOM	3302	CA	GLU	X 430	21.482	32.343	14.837	1.00	16.83	C
ATOM	3303	C	GLU	X 430	20.580	33.002	15.882	1.00	17.49	C
ATOM	3304	O	GLU	X 430	20.808	34.155	16.254	1.00	16.39	O
ATOM	3305	CB	GLU	X 430	21.001	32.737	13.435	1.00	18.58	C
ATOM	3306	CG	GLU	X 430	19.587	32.290	13.103	1.00	24.20	C
ATOM	3307	CD	GLU	X 430	19.055	32.908	11.825	1.00	26.67	C
ATOM	3308	OE1	GLU	X 430	18.935	32.176	10.812	1.00	29.85	O
ATOM	3309	OE2	GLU	X 430	18.760	34.124	11.834	1.00	26.94	O
ATOM	3310	N	ALA	X 431	19.564	32.273	16.343	1.00	16.87	N
ATOM	3311	CA	ALA	X 431	18.598	32.793	17.306	1.00	17.47	C
ATOM	3312	C	ALA	X 431	19.015	32.786	18.770	1.00	18.82	C

图 2A-页 1

ATOM	3313	O	ALA	X 431	18.273	33.282	19.631	1.00	19.27	O
ATOM	3314	CB	ALA	X 431	17.288	32.077	17.149	1.00	18.26	C
ATOM	3315	N	LEU	X 432	20.158	32.165	19.054	1.00	19.02	N
ATOM	3316	CA	LEU	X 432	20.696	32.092	20.412	1.00	17.81	C
ATOM	3317	C	LEU	X 432	21.410	33.407	20.693	1.00	20.18	C
ATOM	3318	O	LEU	X 432	21.801	34.118	19.754	1.00	21.08	O
ATOM	3319	CB	LEU	X 432	21.702	30.938	20.524	1.00	13.24	C
ATOM	3320	CG	LEU	X 432	21.173	29.498	20.601	1.00	11.17	C
ATOM	3321	CD1	LEU	X 432	22.246	28.492	20.229	1.00	5.93	C
ATOM	3322	CD2	LEU	X 432	20.665	29.229	21.999	1.00	8.08	C
ATOM	3323	N	HIS	X 433	21.559	33.764	21.968	1.00	19.77	N
ATOM	3324	CA	HIS	X 433	22.280	34.996	22.278	1.00	18.30	C
ATOM	3325	C	HIS	X 433	23.717	34.699	21.888	1.00	17.74	C
ATOM	3326	O	HIS	X 433	24.301	33.731	22.381	1.00	17.19	O
ATOM	3327	CB	HIS	X 433	22.221	35.329	23.763	1.00	19.01	C
ATOM	3328	CG	HIS	X 433	23.120	36.462	24.161	1.00	15.62	C
ATOM	3329	ND1	HIS	X 433	22.844	37.778	23.855	1.00	16.17	N
ATOM	3330	CD2	HIS	X 433	24.283	36.474	24.856	1.00	13.22	C
ATOM	3331	CE1	HIS	X 433	23.797	38.551	24.346	1.00	14.33	C
ATOM	3332	NE2	HIS	X 433	24.682	37.785	24.956	1.00	12.05	N
ATOM	3333	N	ASN	X 434	24.255	35.489	20.967	1.00	16.58	N
ATOM	3334	CA	ASN	X 434	25.621	35.300	20.489	1.00	16.67	C
ATOM	3335	C	ASN	X 434	25.765	34.004	19.682	1.00	15.91	C
ATOM	3336	O	ASN	X 434	26.881	33.500	19.487	1.00	12.49	O
ATOM	3337	CB	ASN	X 434	26.623	35.307	21.649	1.00	15.89	C
ATOM	3338	CG	ASN	X 434	26.930	36.702	22.150	1.00	20.56	C
ATOM	3339	OD1	ASN	X 434	26.848	37.685	21.401	1.00	19.24	O
ATOM	3340	ND2	ASN	X 434	27.301	36.802	23.430	1.00	22.26	N
ATOM	3341	N	HIS	X 435	24.637	33.489	19.192	1.00	14.58	N
ATOM	3342	CA	HIS	X 435	24.630	32.263	18.401	1.00	15.75	C
ATOM	3343	C	HIS	X 435	25.235	31.111	19.194	1.00	16.92	C
ATOM	3344	O	HIS	X 435	25.654	30.115	18.604	1.00	18.53	O
ATOM	3345	CB	HIS	X 435	25.467	32.424	17.115	1.00	15.28	C
ATOM	3346	CG	HIS	X 435	25.045	33.565	16.230	1.00	14.75	C
ATOM	3347	ND1	HIS	X 435	25.857	34.056	15.226	1.00	12.80	N
ATOM	3348	CD2	HIS	X 435	23.909	34.293	16.185	1.00	12.14	C
ATOM	3349	CE1	HIS	X 435	25.233	35.037	14.601	1.00	11.07	C
ATOM	3350	NE2	HIS	X 435	24.051	35.204	15.159	1.00	12.23	N
ATOM	3351	N	TYR	X 436	25.249	31.210	20.520	1.00	17.92	N
ATOM	3352	CA	TYR	X 436	25.863	30.161	21.331	1.00	19.32	C
ATOM	3353	C	TYR	X 436	25.198	29.910	22.694	1.00	21.37	C
ATOM	3354	O	TYR	X 436	24.517	30.772	23.263	1.00	24.74	O
ATOM	3355	CB	TYR	X 436	27.354	30.493	21.528	1.00	15.83	C
ATOM	3356	CG	TYR	X 436	28.235	29.346	21.976	1.00	13.27	C
ATOM	3357	CD1	TYR	X 436	28.732	29.283	23.281	1.00	15.99	C
ATOM	3358	CD2	TYR	X 436	28.618	28.352	21.082	1.00	14.84	C
ATOM	3359	CE1	TYR	X 436	29.600	28.258	23.681	1.00	15.45	C
ATOM	3360	CE2	TYR	X 436	29.480	27.319	21.464	1.00	15.42	C
ATOM	3361	CZ	TYR	X 436	29.968	27.279	22.763	1.00	18.79	C
ATOM	3362	OH	TYR	X 436	30.827	26.263	23.132	1.00	21.48	O
ATOM	3621	N	ASP	F 1	28.847	41.426	24.951	1.00	34.85	N
ATOM	3622	CA	ASP	F 1	29.773	40.372	25.482	1.00	34.05	C
ATOM	3623	C	ASP	F 1	30.000	39.378	24.352	1.00	33.05	C

图 2A-页 2

ATOM	3624	O	ASP	F	1	29.348	39.478	23.319	1.00	35.27	O
ATOM	3625	CB	ASP	F	1	29.171	39.674	26.712	1.00	34.66	C
ATOM	3626	CG	ASP	F	1	27.813	39.049	26.435	1.00	36.33	C
ATOM	3627	OD1	ASP	F	1	27.520	37.973	27.003	1.00	37.16	O
ATOM	3628	OD2	ASP	F	1	27.022	39.637	25.670	1.00	39.41	O
ATOM	3629	N	CYS	F	2	30.891	38.414	24.550	1.00	31.11	N
ATOM	3630	CA	CYS	F	2	31.197	37.448	23.503	1.00	28.39	C
ATOM	3631	C	CYS	F	2	31.028	36.004	23.926	1.00	28.75	C
ATOM	3632	O	CYS	F	2	30.893	35.707	25.115	1.00	30.10	O
ATOM	3633	CB	CYS	F	2	32.630	37.646	23.006	1.00	27.54	C
ATOM	3634	SG	CYS	F	2	33.023	39.335	22.461	1.00	21.72	S
ATOM	3635	N	ALA	F	3	31.058	35.113	22.935	1.00	29.17	N
ATOM	3636	CA	ALA	F	3	30.931	33.670	23.139	1.00	30.01	C
ATOM	3637	C	ALA	F	3	32.111	33.026	22.437	1.00	30.25	C
ATOM	3638	O	ALA	F	3	32.504	33.462	21.354	1.00	30.98	O
ATOM	3639	CB	ALA	F	3	29.615	33.151	22.547	1.00	29.87	C
ATOM	3640	N	ALA	F	4	32.678	31.996	23.048	1.00	31.67	N
ATOM	3641	CA	ALA	F	4	33.834	31.325	22.474	1.00	32.06	C
ATOM	3642	C	ALA	F	4	33.608	29.818	22.440	1.00	32.05	C
ATOM	3643	O	ALA	F	4	33.087	29.237	23.390	1.00	32.14	O
ATOM	3644	CB	ALA	F	4	35.090	31.640	23.301	1.00	34.09	C
ATOM	3654	N	HIS	F	5	33.979	29.200	21.325	1.00	32.99	N
ATOM	3655	CA	HIS	F	5	33.846	27.763	21.136	1.00	32.73	C
ATOM	3656	C	HIS	F	5	35.259	27.206	21.000	1.00	34.20	C
ATOM	3657	O	HIS	F	5	35.922	27.419	19.978	1.00	34.53	O
ATOM	3658	CB	HIS	F	5	33.029	27.464	19.863	1.00	33.09	C
ATOM	3659	CG	HIS	F	5	32.839	26.000	19.580	1.00	32.96	C
ATOM	3660	ND1	HIS	F	5	32.280	25.128	20.492	1.00	31.19	N
ATOM	3661	CD2	HIS	F	5	33.144	25.255	18.489	1.00	31.40	C
ATOM	3662	CE1	HIS	F	5	32.253	23.911	19.978	1.00	30.26	C
ATOM	3663	NE2	HIS	F	5	32.772	23.962	18.764	1.00	30.80	N
ATOM	3664	N	LEU	F	6	35.731	26.537	22.050	1.00	34.57	N
ATOM	3665	CA	LEU	F	6	37.067	25.944	22.052	1.00	35.43	C
ATOM	3666	C	LEU	F	6	38.148	26.986	21.761	1.00	36.60	C
ATOM	3667	O	LEU	F	6	39.099	26.723	21.015	1.00	35.70	O
ATOM	3668	CB	LEU	F	6	37.155	24.821	21.008	1.00	35.00	C
ATOM	3669	CG	LEU	F	6	36.178	23.651	21.094	1.00	34.12	C
ATOM	3670	CD1	LEU	F	6	36.327	22.767	19.848	1.00	34.64	C
ATOM	3671	CD2	LEU	F	6	36.428	22.872	22.372	1.00	33.53	C
ATOM	3672	N	GLY	F	7	37.991	28.175	22.334	1.00	37.43	N
ATOM	3673	CA	GLY	F	7	38.969	29.223	22.114	1.00	38.95	C
ATOM	3674	C	GLY	F	7	38.664	30.140	20.942	1.00	39.28	C
ATOM	3675	O	GLY	F	7	39.090	31.292	20.945	1.00	42.00	O
ATOM	3676	N	GLU	F	8	37.936	29.648	19.943	1.00	38.59	N
ATOM	3677	CA	GLU	F	8	37.590	30.458	18.773	1.00	37.57	C
ATOM	3678	C	GLU	F	8	36.463	31.440	19.058	1.00	34.89	C
ATOM	3679	O	GLU	F	8	35.497	31.099	19.742	1.00	34.71	O
ATOM	3680	CB	GLU	F	8	37.165	29.568	17.615	1.00	41.42	C
ATOM	3681	CG	GLU	F	8	38.262	29.147	16.676	1.00	45.84	C
ATOM	3682	CD	GLU	F	8	37.713	28.301	15.550	1.00	50.27	C
ATOM	3683	OE1	GLU	F	8	37.431	28.858	14.459	1.00	50.07	O
ATOM	3684	OE2	GLU	F	8	37.531	27.084	15.780	1.00	52.26	O

图 2A-页 3

ATOM	3685	N	LEU	F 9	36.569	32.648	18.511	1.00	32.00	N
ATOM	3686	CA	LEU	F 9	35.535	33.658	18.721	1.00	27.85	C
ATOM	3687	C	LEU	F 9	34.328	33.315	17.880	1.00	25.43	C
ATOM	3688	O	LEU	F 9	34.435	33.119	16.671	1.00	26.38	O
ATOM	3689	CB	LEU	F 9	36.023	35.065	18.351	1.00	28.29	C
ATOM	3690	CG	LEU	F 9	34.985	36.179	18.579	1.00	27.64	C
ATOM	3691	CD1	LEU	F 9	34.647	36.290	20.072	1.00	26.13	C
ATOM	3692	CD2	LEU	F 9	35.479	37.503	18.045	1.00	25.10	C
ATOM	3693	N	VAL	F 10	33.179	33.227	18.532	1.00	22.45	N
ATOM	3694	CA	VAL	F 10	31.948	32.911	17.844	1.00	18.45	C
ATOM	3695	C	VAL	F 10	31.253	34.185	17.426	1.00	18.93	C
ATOM	3696	O	VAL	F 10	31.153	34.473	16.238	1.00	19.89	O
ATOM	3697	CB	VAL	F 10	30.992	32.076	18.726	1.00	16.56	C
ATOM	3698	CG1	VAL	F 10	29.665	31.886	18.029	1.00	16.45	C
ATOM	3699	CG2	VAL	F 10	31.592	30.723	19.004	1.00	16.04	C
ATOM	3700	N	TRP	F 11	30.844	34.989	18.399	1.00	18.72	N
ATOM	3701	CA	TRP	F 11	30.109	36.207	18.093	1.00	19.89	C
ATOM	3702	C	TRP	F 11	30.086	37.109	19.310	1.00	22.86	C
ATOM	3703	O	TRP	F 11	30.247	36.626	20.437	1.00	23.85	O
ATOM	3704	CB	TRP	F 11	28.667	35.819	17.763	1.00	16.70	C
ATOM	3705	CG	TRP	F 11	27.886	36.841	17.024	1.00	15.87	C
ATOM	3706	CD1	TRP	F 11	27.014	37.759	17.553	1.00	16.27	C
ATOM	3707	CD2	TRP	F 11	27.862	37.034	15.608	1.00	16.46	C
ATOM	3708	NE1	TRP	F 11	26.449	38.510	16.547	1.00	15.16	N
ATOM	3709	CE2	TRP	F 11	26.954	38.088	15.343	1.00	17.92	C
ATOM	3710	CE3	TRP	F 11	28.517	36.415	14.533	1.00	17.45	C
ATOM	3711	CZ2	TRP	F 11	26.688	38.538	14.041	1.00	15.75	C
ATOM	3712	CZ3	TRP	F 11	28.249	36.861	13.240	1.00	13.24	C
ATOM	3713	CH2	TRP	F 11	27.343	37.912	13.008	1.00	14.35	C
ATOM	3714	N	CYS	F 12	29.859	38.403	19.088	1.00	24.42	N
ATOM	3715	CA	CYS	F 12	29.775	39.365	20.181	1.00	26.86	C
ATOM	3716	C	CYS	F 12	28.615	40.322	19.943	1.00	29.15	C
ATOM	3717	O	CYS	F 12	28.449	40.828	18.830	1.00	27.79	O
ATOM	3718	CB	CYS	F 12	31.055	40.198	20.294	1.00	25.49	C
ATOM	3719	SG	CYS	F 12	32.631	39.306	20.465	1.00	27.47	S
ATOM	3720	N	THR	F 13	27.789	40.533	20.963	1.00	32.63	N
ATOM	3721	CA	THR	F 13	26.689	41.481	20.838	1.00	38.91	C
ATOM	3722	C	THR	F 13	27.201	42.868	21.245	1.00	41.56	C
ATOM	3723	O	THR	F 13	27.732	43.056	22.363	1.00	42.26	O
ATOM	3724	CB	THR	F 13	25.443	41.110	21.712	1.00	40.71	C
ATOM	3725	OG1	THR	F 13	25.805	41.012	23.101	1.00	39.07	O
ATOM	3726	CG2	THR	F 13	24.800	39.810	21.202	1.00	39.18	C
HETATM	3727	N	NH2	F 14	27.091	43.827	20.331	1.00	40.27	N
TER	3728		NH2	F 14						

图 2A-页 4

ATOM	1495	N	SER	D 424	1.722	20.062	14.486	1.00	23.86	N
ATOM	1496	CA	SER	D 424	3.071	19.631	14.159	1.00	23.86	C
ATOM	1497	C	SER	D 424	3.136	18.213	13.611	1.00	23.86	C
ATOM	1498	O	SER	D 424	2.443	17.317	14.104	1.00	23.86	O
ATOM	1499	CB	SER	D 424	3.965	19.744	15.398	1.00	23.86	C
ATOM	1500	OG	SER	D 424	3.863	21.025	15.993	1.00	23.86	O
ATOM	1501	N	CYS	D 425	3.963	18.023	12.585	1.00	4.89	N
ATOM	1502	CA	CYS	D 425	4.157	16.723	11.963	1.00	4.89	C
ATOM	1503	C	CYS	D 425	5.447	16.167	12.533	1.00	4.89	C
ATOM	1504	O	CYS	D 425	6.526	16.663	12.223	1.00	4.89	O
ATOM	1505	CB	CYS	D 425	4.290	16.865	10.449	1.00	4.89	C
ATOM	1506	SG	CYS	D 425	4.514	15.266	9.604	1.00	4.89	S
ATOM	1507	N	SER	D 426	5.331	15.171	13.400	1.00	12.94	N
ATOM	1508	CA	SER	D 426	6.490	14.570	14.037	1.00	12.94	C
ATOM	1509	C	SER	D 426	6.887	13.296	13.321	1.00	12.94	C
ATOM	1510	O	SER	D 426	6.078	12.379	13.184	1.00	12.94	O
ATOM	1511	CB	SER	D 426	6.178	14.253	15.502	1.00	12.94	C
ATOM	1512	OG	SER	D 426	5.520	15.341	16.138	1.00	12.94	O
ATOM	1513	N	VAL	D 427	8.126	13.236	12.859	1.00	2.00	N
ATOM	1514	CA	VAL	D 427	8.611	12.054	12.170	1.00	2.00	C
ATOM	1515	C	VAL	D 427	9.854	11.464	12.837	1.00	2.00	C
ATOM	1516	O	VAL	D 427	10.759	12.186	13.267	1.00	2.00	O
ATOM	1517	CB	VAL	D 427	8.861	12.336	10.672	1.00	2.00	C
ATOM	1518	CG1	VAL	D 427	9.709	13.553	10.507	1.00	2.00	C
ATOM	1519	CG2	VAL	D 427	9.511	11.150	10.005	1.00	2.00	C
ATOM	1520	N	MET	D 428	9.841	10.146	12.984	1.00	12.84	N
ATOM	1521	CA	MET	D 428	10.936	9.405	13.583	1.00	12.84	C
ATOM	1522	C	MET	D 428	11.537	8.509	12.508	1.00	12.84	C
ATOM	1523	O	MET	D 428	10.813	7.798	11.809	1.00	12.84	O
ATOM	1524	CB	MET	D 428	10.424	8.538	14.739	1.00	12.84	C
ATOM	1525	CG	MET	D 428	9.852	9.319	15.916	1.00	12.84	C
ATOM	1526	SD	MET	D 428	9.537	8.258	17.346	1.00	12.84	S
ATOM	1527	CE	MET	D 428	11.158	8.180	18.065	1.00	12.84	C
ATOM	1528	N	HIS	D 429	12.853	8.572	12.349	1.00	17.82	N
ATOM	1529	CA	HIS	D 429	13.535	7.751	11.361	1.00	17.82	C
ATOM	1530	C	HIS	D 429	15.007	7.575	11.698	1.00	17.82	C
ATOM	1531	O	HIS	D 429	15.679	8.509	12.140	1.00	17.82	O
ATOM	1532	CB	HIS	D 429	13.379	8.335	9.947	1.00	17.82	C
ATOM	1533	CG	HIS	D 429	13.993	7.489	8.873	1.00	17.82	C
ATOM	1534	ND1	HIS	D 429	13.480	6.264	8.501	1.00	17.82	N
ATOM	1535	CD2	HIS	D 429	15.093	7.682	8.107	1.00	17.82	C
ATOM	1536	CE1	HIS	D 429	14.236	5.739	7.555	1.00	17.82	C
ATOM	1537	NE2	HIS	D 429	15.223	6.580	7.297	1.00	17.82	N
ATOM	1538	N	GLU	D 430	15.496	6.367	11.453	1.00	35.29	N
ATOM	1539	CA	GLU	D 430	16.880	5.991	11.706	1.00	35.29	C
ATOM	1540	C	GLU	D 430	17.935	7.050	11.385	1.00	35.29	C
ATOM	1541	O	GLU	D 430	18.730	7.408	12.249	1.00	35.29	O
ATOM	1542	CB	GLU	D 430	17.198	4.702	10.947	1.00	35.29	C
ATOM	1543	CG	GLU	D 430	18.621	4.218	11.111	1.00	35.29	C
ATOM	1544	CD	GLU	D 430	18.942	3.056	10.202	1.00	35.29	C
ATOM	1545	OE1	GLU	D 430	18.085	2.153	10.064	1.00	35.29	O
ATOM	1546	OE2	GLU	D 430	20.057	3.049	9.630	1.00	35.29	O
ATOM	1547	N	ALA	D 431	17.925	7.563	10.158	1.00	2.00	N

图 2B- 页 1

ATOM 1548	CA	ALA	D 431	18.909	8.551	9.726	1.00	2.00	C
ATOM 1549	C	ALA	D 431	18.696	9.997	10.161	1.00	2.00	C
ATOM 1550	O	ALA	D 431	19.312	10.902	9.611	1.00	2.00	O
ATOM 1551	CB	ALA	D 431	19.082	8.488	8.229	1.00	2.00	C
ATOM 1552	N	LEU	D 432	17.819	10.229	11.126	1.00	2.68	N
ATOM 1553	CA	LEU	D 432	17.584	11.589	11.598	1.00	2.68	C
ATOM 1554	C	LEU	D 432	18.462	11.869	12.827	1.00	2.68	C
ATOM 1555	O	LEU	D 432	18.668	10.989	13.667	1.00	2.68	O
ATOM 1556	CB	LEU	D 432	16.104	11.785	11.941	1.00	2.68	C
ATOM 1557	CG	LEU	D 432	15.121	11.843	10.777	1.00	2.68	C
ATOM 1558	CD1	LEU	D 432	13.718	11.633	11.275	1.00	2.68	C
ATOM 1559	CD2	LEU	D 432	15.245	13.173	10.068	1.00	2.68	C
ATOM 1560	N	HIS	D 433	18.897	13.117	12.968	1.00	49.93	N
ATOM 1561	CA	HIS	D 433	19.757	13.533	14.076	1.00	49.93	C
ATOM 1562	C	HIS	D 433	19.526	12.874	15.436	1.00	49.93	C
ATOM 1563	O	HIS	D 433	20.476	12.454	16.086	1.00	49.93	O
ATOM 1564	CB	HIS	D 433	19.721	15.051	14.247	1.00	49.93	C
ATOM 1565	CG	HIS	D 433	20.489	15.539	15.439	1.00	49.93	C
ATOM 1566	ND1	HIS	D 433	21.793	15.167	15.689	1.00	49.93	N
ATOM 1567	CD2	HIS	D 433	20.130	16.354	16.459	1.00	49.93	C
ATOM 1568	CE1	HIS	D 433	22.201	15.726	16.810	1.00	49.93	C
ATOM 1569	NE2	HIS	D 433	21.213	16.452	17.299	1.00	49.93	N
ATOM 1570	N	ASN	D 434	18.284	12.852	15.896	1.00	2.00	N
ATOM 1571	CA	ASN	D 434	17.960	12.257	17.192	1.00	2.00	C
ATOM 1572	C	ASN	D 434	16.830	11.265	16.963	1.00	2.00	C
ATOM 1573	O	ASN	D 434	16.036	10.987	17.862	1.00	2.00	O
ATOM 1574	CB	ASN	D 434	17.541	13.371	18.175	1.00	2.00	C
ATOM 1575	CG	ASN	D 434	16.960	12.841	19.487	1.00	2.00	C
ATOM 1576	OD1	ASN	D 434	17.381	11.808	20.005	1.00	2.00	O
ATOM 1577	ND2	ASN	D 434	15.978	13.558	20.026	1.00	2.00	N
ATOM 1578	N	HIS	D 435	16.773	10.706	15.755	1.00	22.31	N
ATOM 1579	CA	HIS	D 435	15.713	9.768	15.393	1.00	22.31	C
ATOM 1580	C	HIS	D 435	14.368	10.477	15.540	1.00	22.31	C
ATOM 1581	O	HIS	D 435	13.333	9.827	15.668	1.00	22.31	O
ATOM 1582	CB	HIS	D 435	15.729	8.540	16.318	1.00	22.31	C
ATOM 1583	CG	HIS	D 435	16.910	7.645	16.123	1.00	22.31	C
ATOM 1584	ND1	HIS	D 435	16.920	6.330	16.534	1.00	22.31	N
ATOM 1585	CD2	HIS	D 435	18.104	7.863	15.529	1.00	22.31	C
ATOM 1586	CE1	HIS	D 435	18.070	5.773	16.198	1.00	22.31	C
ATOM 1587	NE2	HIS	D 435	18.806	6.683	15.587	1.00	22.31	N
ATOM 1588	N	TYR	D 436	14.389	11.806	15.471	1.00	2.00	N
ATOM 1589	CA	TYR	D 436	13.188	12.612	15.645	1.00	2.00	C
ATOM 1590	C	TYR	D 436	13.309	13.959	14.936	1.00	2.00	C
ATOM 1591	O	TYR	D 436	14.415	14.477	14.765	1.00	2.00	O
ATOM 1592	CB	TYR	D 436	12.963	12.869	17.149	1.00	2.00	C
ATOM 1593	CG	TYR	D 436	11.673	13.599	17.481	1.00	2.00	C
ATOM 1594	CD1	TYR	D 436	10.483	12.895	17.659	1.00	2.00	C
ATOM 1595	CD2	TYR	D 436	11.626	14.991	17.546	1.00	2.00	C
ATOM 1596	CE1	TYR	D 436	9.275	13.556	17.881	1.00	2.00	C
ATOM 1597	CE2	TYR	D 436	10.421	15.661	17.767	1.00	2.00	C
ATOM 1598	CZ	TYR	D 436	9.250	14.932	17.930	1.00	2.00	C
ATOM 1599	OH	TYR	D 436	8.048	15.578	18.105	1.00	2.00	O
ATOM 105	N	LEU	B 251	13.677	2.651	16.873	1.00	22.41	N

图 2B-页 2

ATOM 106	CA	LEU	B 251	14.234	3.995	16.926	1.00	22.41	C
ATOM 107	C	LEU	B 251	14.404	4.605	18.308	1.00	22.41	C
ATOM 108	O	LEU	B 251	15.305	5.415	18.503	1.00	22.41	O
ATOM 109	CB	LEU	B 251	13.434	4.929	16.027	1.00	22.41	C
ATOM 110	CG	LEU	B 251	13.277	4.382	14.609	1.00	22.41	C
ATOM 111	CD1	LEU	B 251	12.423	5.319	13.785	1.00	22.41	C
ATOM 112	CD2	LEU	B 251	14.633	4.163	13.965	1.00	22.41	C
ATOM 113	N	MET	B 252	13.522	4.276	19.248	1.00	25.23	N
ATOM 114	CA	MET	B 252	13.656	4.814	20.603	1.00	25.23	C
ATOM 115	C	MET	B 252	14.149	3.785	21.619	1.00	25.23	C
ATOM 116	O	MET	B 252	13.500	2.767	21.863	1.00	25.23	O
ATOM 117	CB	MET	B 252	12.379	5.523	21.072	1.00	25.23	C
ATOM 118	CG	MET	B 252	11.063	4.898	20.662	1.00	25.23	C
ATOM 119	SD	MET	B 252	9.777	6.180	20.565	1.00	25.23	S
ATOM 120	CE	MET	B 252	9.364	6.399	22.280	1.00	25.23	C
ATOM 121	N	ILE	B 253	15.313	4.074	22.197	1.00	23.63	N
ATOM 122	CA	ILE	B 253	15.983	3.210	23.170	1.00	23.63	C
ATOM 123	C	ILE	B 253	15.090	2.730	24.326	1.00	23.63	C
ATOM 124	O	ILE	B 253	15.333	1.674	24.911	1.00	23.63	O
ATOM 125	CB	ILE	B 253	17.258	3.917	23.732	1.00	23.63	C
ATOM 126	CG1	ILE	B 253	18.195	2.904	24.389	1.00	23.63	C
ATOM 127	CG2	ILE	B 253	16.886	5.019	24.710	1.00	23.63	C
ATOM 128	CD1	ILE	B 253	19.044	2.123	23.397	1.00	23.63	C
ATOM 129	N	SER	B 254	14.044	3.495	24.618	1.00	34.09	N
ATOM 130	CA	SER	B 254	13.118	3.174	25.697	1.00	34.09	C
ATOM 131	C	SER	B 254	12.168	2.006	25.423	1.00	34.09	C
ATOM 132	O	SER	B 254	11.650	1.390	26.356	1.00	34.09	O
ATOM 133	CB	SER	B 254	12.321	4.424	26.069	1.00	34.09	C
ATOM 134	OG	SER	B 254	11.935	5.147	24.909	1.00	34.09	O
ATOM 135	N	ARG	B 255	11.936	1.711	24.148	1.00	23.81	N
ATOM 136	CA	ARG	B 255	11.042	0.623	23.762	1.00	23.81	C
ATOM 137	C	ARG	B 255	11.824	-0.665	23.532	1.00	23.81	C
ATOM 138	O	ARG	B 255	13.049	-0.641	23.372	1.00	23.81	O
ATOM 139	CB	ARG	B 255	10.276	1.002	22.491	1.00	23.81	C
ATOM 140	CG	ARG	B 255	9.483	2.302	22.594	1.00	23.81	C
ATOM 141	CD	ARG	B 255	8.405	2.208	23.662	1.00	23.81	C
ATOM 142	NE	ARG	B 255	7.643	3.446	23.815	1.00	23.81	N
ATOM 143	CZ	ARG	B 255	6.796	3.918	22.907	1.00	23.81	C
ATOM 144	NH1	ARG	B 255	6.601	3.264	21.770	1.00	23.81	N
ATOM 145	NH2	ARG	B 255	6.106	5.023	23.156	1.00	23.81	N
ATOM 4018	N	ARG	E 96	14.003	15.127	25.869	1.00	16.08	N
ATOM 4019	CA	ARG	E 96	13.379	14.548	24.691	1.00	16.08	C
ATOM 4020	C	ARG	E 96	14.482	13.998	23.806	1.00	16.08	C
ATOM 4021	O	ARG	E 96	14.952	14.674	22.891	1.00	16.08	O
ATOM 4022	CB	ARG	E 96	12.566	15.607	23.939	1.00	16.08	C
ATOM 4023	CG	ARG	E 96	11.573	15.031	22.949	1.00	16.08	C
ATOM 4024	CD	ARG	E 96	11.919	15.433	21.540	1.00	16.08	C
ATOM 4025	NE	ARG	E 96	11.849	16.877	21.330	1.00	16.08	N
ATOM 4026	CZ	ARG	E 96	10.728	17.548	21.096	1.00	16.08	C
ATOM 4027	NH1	ARG	E 96	9.566	16.912	21.051	1.00	16.08	N
ATOM 4028	NH2	ARG	E 96	10.779	18.848	20.864	1.00	16.08	N
ATOM 4029	N	SER	E 97	14.906	12.776	24.103	1.00	24.55	N
ATOM 4030	CA	SER	E 97	15.968	12.120	23.352	1.00	24.55	C

图 2B-页 3

ATOM 4031	C	SER	E 97	15.717	10.621	23.256	1.00	24.55	C
ATOM 4032	O	SER	E 97	15.240	10.001	24.209	1.00	24.55	O
ATOM 4033	CB	SER	E 97	17.304	12.381	24.033	1.00	24.55	C
ATOM 4034	OG	SER	E 97	17.215	12.074	25.413	1.00	24.55	O
ATOM 4035	N	TYR	E 98	16.057	10.043	22.108	1.00	2.00	N
ATOM 4036	CA	TYR	E 98	15.856	8.615	21.863	1.00	2.00	C
ATOM 4037	C	TYR	E 98	17.175	7.887	21.594	1.00	2.00	C
ATOM 4038	O	TYR	E 98	17.313	6.695	21.883	1.00	2.00	O
ATOM 4039	CB	TYR	E 98	14.893	8.442	20.690	1.00	2.00	C
ATOM 4040	CG	TYR	E 98	13.685	9.344	20.810	1.00	2.00	C
ATOM 4041	CD1	TYR	E 98	12.555	8.939	21.523	1.00	2.00	C
ATOM 4042	CD2	TYR	E 98	13.687	10.622	20.247	1.00	2.00	C
ATOM 4043	CE1	TYR	E 98	11.461	9.783	21.676	1.00	2.00	C
ATOM 4044	CE2	TYR	E 98	12.596	11.474	20.395	1.00	2.00	C
ATOM 4045	CZ	TYR	E 98	11.489	11.047	21.111	1.00	2.00	C
ATOM 4046	OH	TYR	E 98	10.414	11.884	21.269	1.00	2.00	O
ATOM 4047	N	VAL	E 99	18.140	8.608	21.033	1.00	19.77	N
ATOM 4048	CA	VAL	E 99	19.444	8.033	20.743	1.00	19.77	C
ATOM 4049	C	VAL	E 99	20.170	7.703	22.043	1.00	19.77	C
ATOM 4050	O	VAL	E 99	20.021	8.405	23.045	1.00	19.77	O
ATOM 4051	CB	VAL	E 99	20.317	8.991	19.898	1.00	19.77	C
ATOM 4052	CG1	VAL	E 99	19.796	9.069	18.474	1.00	19.77	C
ATOM 4053	CG2	VAL	E 99	20.331	10.375	20.517	1.00	19.77	C

图 2B- 页 4

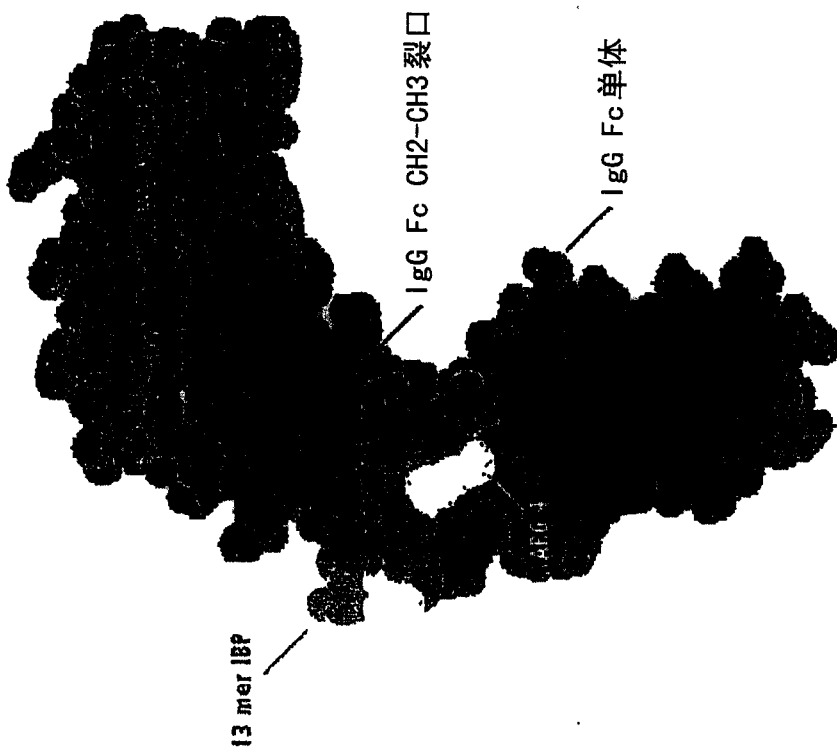


图 3

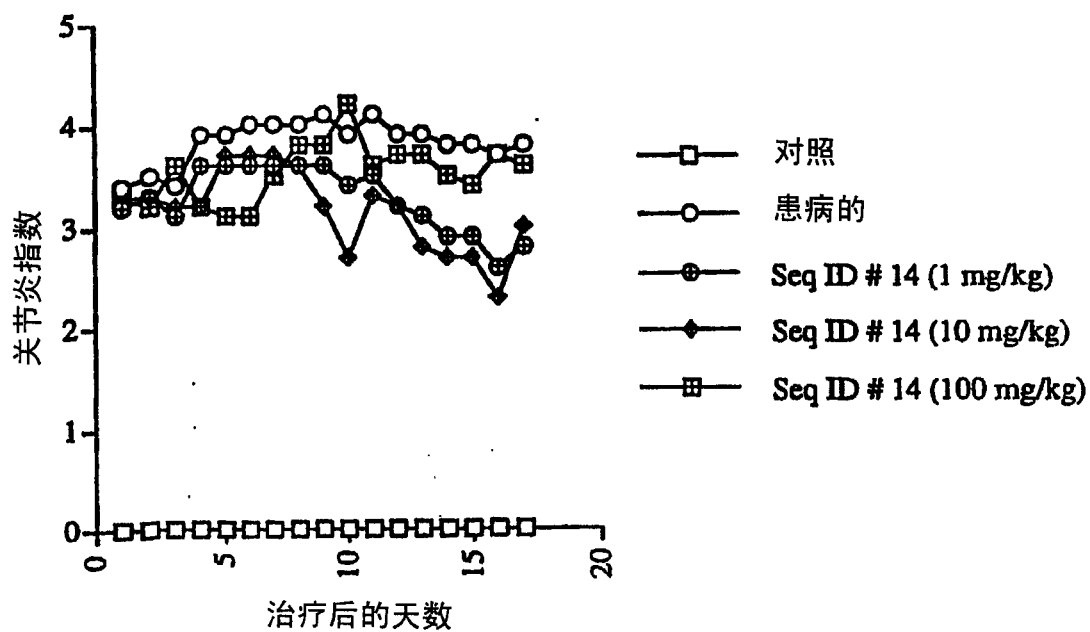


图 4A

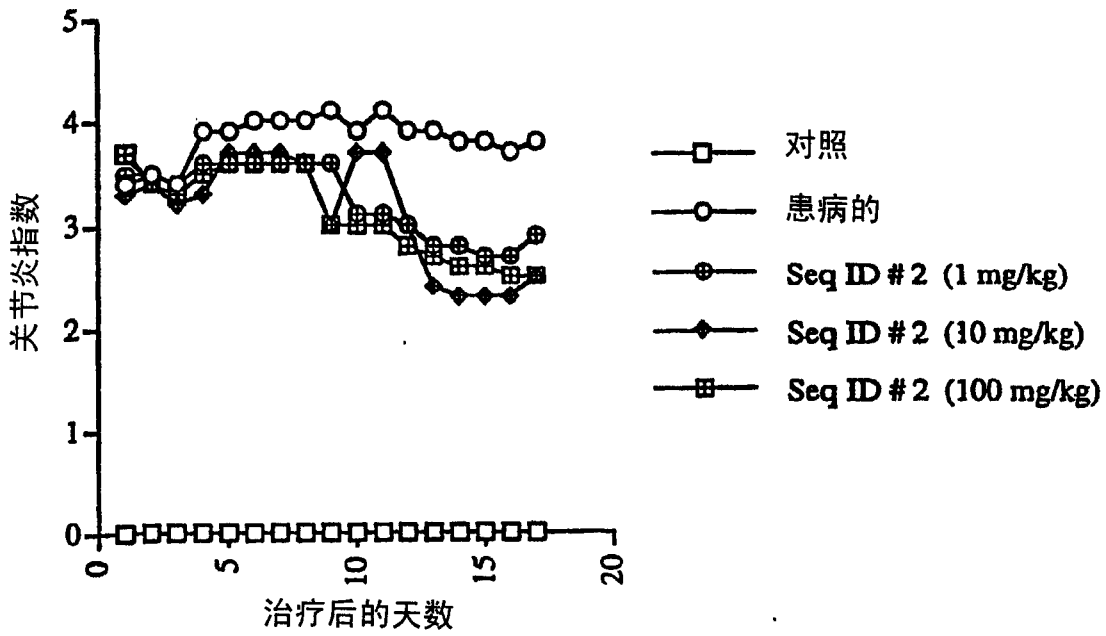


图 4B

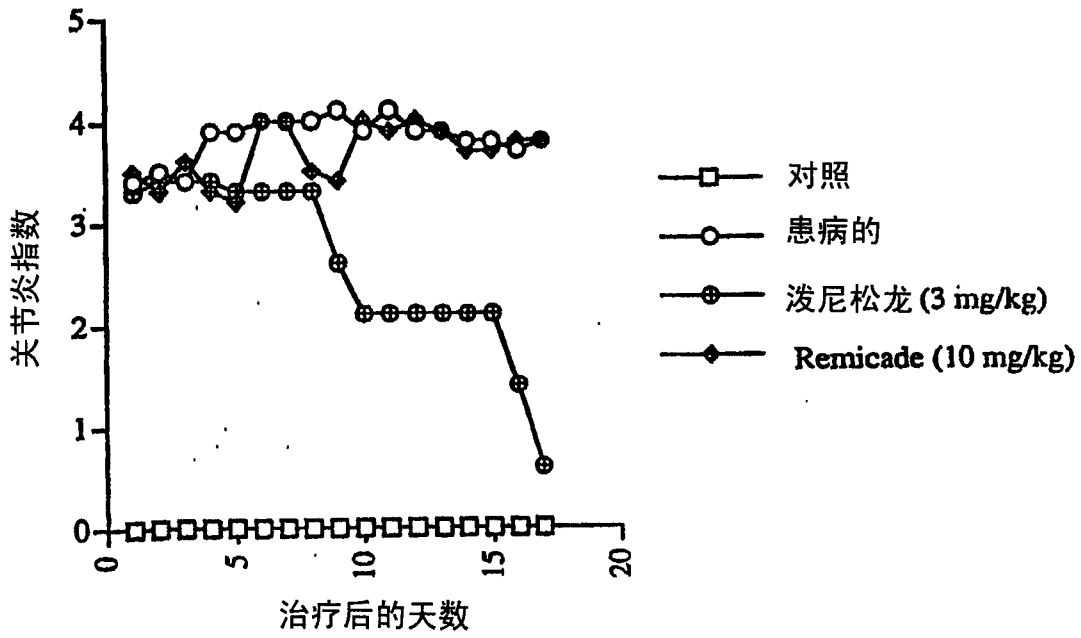


图 4C