



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102869989 B

(45) 授权公告日 2015. 04. 29

(21) 申请号 201080052757. 5

(22) 申请日 2010. 11. 17

(30) 优先权数据

61/281, 470 2009. 11. 17 US

61/386, 909 2010. 09. 27 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012. 05. 16

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2010/057108 2010. 11. 17

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/063045 EN 2011. 05. 26

(73) 专利权人 阿雷斯贸易股份有限公司

地址 瑞士欧博讷

(72) 发明人 E·扎内利 J·克里格 J·康诺利

K·H·柯林斯

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 余颖

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006. 01)

C07K 4/00(2006. 01)

(56) 对比文件

US 2009/0275496 A1, 2009. 11. 05,

WO 02/076503 A1, 2002. 10. 03,

CN 1618018 A, 2005. 05. 18,

CN 101052409 A, 2007. 10. 10,

CN 101044188 A, 2007. 09. 26,

CN 101511862 A, 2009. 08. 19,

CN 101243113 A, 2008. 08. 13,

审查员 段晓露

权利要求书3页 说明书25页

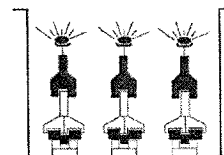
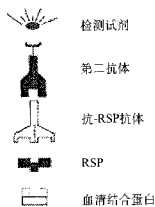
序列表9页 附图18页

(54) 发明名称

通过对随机序列聚合物的组合物基于血清蛋白的检测,改进含随机序列聚合物的组合物的设计、生物利用度和效能的方法

(57) 摘要

本领域已有检测简单肽的方法。然而,由于受检肽的异质性,检测一组肽混合物而非具有明确氨基酸序列的各别肽的有效血浆浓度的方法很复杂。本申请提供检测和评估随机序列聚合物(RSP)组合物的改进方法,检测和定量测定RSP组合物的方法,根据肽亚组与某些捕获多肽的相互作用确定和富集RSP组合物中肽亚组的方法,和对需要的对象给予RSP组合物的方法,其中,剂量方案和用量可根据上述检测和定量方法加以确定和评估。



1. 一种检测由 YFAK 肽组成的 RSP 组合物的方法,所述方法包括用一种或多种预定捕获多肽结合 YFAK 肽,所述捕获多肽是存在于正常人血清中的血清蛋白,所述捕获多肽选自补体组分 C3,载脂蛋白 A-I 前原蛋白,载脂蛋白 A-II 前原蛋白,补体组分 C4A,胰蛋白酶抑制剂,间- $\alpha$ -胰蛋白酶抑制剂家族重链相关蛋白(IHRP)、 $\alpha$ -1-B-糖蛋白, $\alpha$ -1-抗胰蛋白酶,载脂蛋白 A-IV,血浆铜蓝蛋白,载脂蛋白 E,补体因子 B,前白蛋白,载脂蛋白 C-III,凝血因子 II,载脂蛋白 J 前体,富含组氨酸的糖蛋白前体, $\alpha$ -2-HS 糖蛋白,凝溶胶蛋白同工型 a 前体和抑制剂 Kunitz 型蛋白酶,然后用免疫检测方法检测包含所述捕获多肽和 YFAK 肽的复合物。

2. 如权利要求 1 所述的方法,其中,用 YFAK 肽的相对抗体和第二抗体检测所述复合物或用对所述复合体具有特异性而不对捕获多肽或 RSP 组合物的肽组分具有特异性的抗体和第二抗体检测所述复合物。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的方法,所述捕获多肽选自  $\alpha$ -1-抗胰蛋白酶,载脂蛋白 A-I 前原蛋白, $\alpha$ -1-B-糖蛋白,载脂蛋白 A-IV 和前白蛋白。

4. 如权利要求 1 所述的方法,包括一种或多种捕获多肽的基本纯制剂,所述捕获多肽附着于定量检测 RSP 组合物的工具,所述方法包括检测 RSP 组合物与所述捕获多肽的结合。

5. 如权利要求 1 所述的方法,所述捕获多肽附着于固体支持物上。

6. 一种检测生物样品中由 YFAK 肽组成的 RSP 组合物的方法,所述方法包括以下步骤:

a. 将生物样品与至少一种预定捕获多肽接触,所述捕获多肽是存在于正常人血清中的血清蛋白,所述捕获多肽选自补体组分 C3,载脂蛋白 A-I 前原蛋白,载脂蛋白 A-II 前原蛋白,补体组分 C4A,胰蛋白酶抑制剂,间- $\alpha$ -胰蛋白酶抑制剂家族重链相关蛋白(IHRP)、 $\alpha$ -1-B-糖蛋白, $\alpha$ -1-抗胰蛋白酶,载脂蛋白 A-IV,血浆铜蓝蛋白,载脂蛋白 E,补体因子 B,前白蛋白,载脂蛋白 C-III,凝血因子 II,载脂蛋白 J 前体,富含组氨酸的糖蛋白前体, $\alpha$ -2-HS 糖蛋白,凝溶胶蛋白同工型 a 前体和抑制剂 Kunitz 型蛋白酶;和

b. 用免疫检测方法检测捕获多肽是否与 RSP 组合物结合,其中,存在这种结合表明生物样品中 RSP 组合物的存在。

7. 一种在生物样品中测定由 YFAK 肽组成的 RSP 组合物生物利用度的方法,所述生物样品采自被给予了 RSP 组合物的个体,所述方法包括以下步骤:

a. 在定量检测 RSP 组合物的免疫试验中将该生物样品与至少一种预定捕获多肽接触,所述捕获多肽是存在于正常人血清中的血清蛋白,所述捕获多肽选自:补体组分 C3,载脂蛋白 A-I 前原蛋白,载脂蛋白 A-II 前原蛋白,补体组分 C4A,胰蛋白酶抑制剂,间- $\alpha$ -胰蛋白酶抑制剂家族重链相关蛋白(IHRP)、 $\alpha$ -1-B-糖蛋白, $\alpha$ -1-抗胰蛋白酶,载脂蛋白 A-IV,血浆铜蓝蛋白,载脂蛋白 E,补体因子 B,前白蛋白,载脂蛋白 C-III,凝血因子 II,载脂蛋白 J 前体,富含组氨酸的糖蛋白前体, $\alpha$ -2-HS 糖蛋白,凝溶胶蛋白同工型 a 前体和抑制剂 Kunitz 型蛋白酶;

从而确定生物样品中 RSP 组合物的生物利用度;

其中,生物样品中 RSP 组合物的水平反映 RSP 组合物的生物利用度。

8. 捕获多肽用于制造治疗或预防不希望有的免疫应答反应的药物的用途,所述不希望有的免疫应答反应为自身免疫病,所述自身免疫疾病选自多发性硬皮症、和类风湿性关节炎,其中,检测采自个体的生物样品中捕获多肽的水平,所述个体是被给予了一定剂量 YFAK

肽组成的 RSP 组合物的个体,所述方法包括以下步骤:

a. 使生物样品与至少一种预定捕获多肽接触,所述捕获多肽是存在于正常人血清中的血清蛋白,所述捕获多肽选自:补体组分 C3,载脂蛋白 A-I 前原蛋白,载脂蛋白 A-II 前原蛋白,补体组分 C4A,胰蛋白酶抑制剂,间- $\alpha$ -胰蛋白酶抑制剂家族重链相关蛋白(IHRP)、 $\alpha$ -1-B-糖蛋白, $\alpha$ -1-抗胰蛋白酶,载脂蛋白 A-IV,血浆铜蓝蛋白,载脂蛋白 E,补体因子 B,前白蛋白,载脂蛋白 C-III,凝血因子 II,载脂蛋白 J 前体,富含组氨酸的糖蛋白前体, $\alpha$ -2-HS 糖蛋白,凝溶胶蛋白同工型 a 前体和抑制剂 Kunitz 型蛋白酶,并用免疫检测方法检测包含所述捕获多肽和 YFAK 肽的复合物;和

b. 将生物样品中测得的水平与预定的 RSP 组合物合适水平作比较;其中合适剂量是导致生物样品中 RSP 组合物达到预定合适水平的剂量,所述合适水平是能获得免疫应答反应增强或隐退的功能读出的水平,其中, TNFa、IL-6、CXCL1、CXCL2 和 IL-12p70 的升高或检出表明存在不希望有的免疫刺激, IL-1ra、CXCL13 和 CCL22 的升高或检出表明存在希望有的免疫刺激。

9. 如权利要求 7 所述的方法或如权利要求 8 所述的用途,其中所述捕获多肽是被标记的多肽。

10. 如权利要求 7 所述的方法或如权利要求 8 所述的用途,其中所述捕获多肽附着于固体支持物上。

11. 如权利要求 7 所述的方法或如权利要求 8 所述的用途,还包括分离含结合于 RSP 组合物的捕获多肽的复合物。

12. 如权利要求 7 所述的方法或如权利要求 8 所述的用途,还包括用抗捕获多肽的抗体检测捕获多肽与 RSP 组合物的结合。

13. 一种分离由 YFAK 肽组成的 RSP 组合物样品中的肽的方法,所述方法包括用一种或多种预定捕获多肽结合 YFAK 肽,所述捕获多肽是存在于正常人血清中的血清蛋白,所述捕获多肽选自补体组分 C3,载脂蛋白 A-I 前原蛋白,载脂蛋白 A-II 前原蛋白,补体组分 C4A,胰蛋白酶抑制剂,间- $\alpha$ -胰蛋白酶抑制剂家族重链相关蛋白(IHRP)、 $\alpha$ -1-B-糖蛋白, $\alpha$ -1-抗胰蛋白酶,载脂蛋白 A-IV,血浆铜蓝蛋白,载脂蛋白 E,补体因子 B,前白蛋白,载脂蛋白 C-III,凝血因子 II,载脂蛋白 J 前体,富含组氨酸的糖蛋白前体, $\alpha$ -2-HS 糖蛋白,凝溶胶蛋白同工型 a 前体和抑制剂 Kunitz 型蛋白酶,然后

从混合物中分离结合于捕获多肽的肽。

14. 如权利要求 13 所述的方法,其中所述捕获多肽固定于固体支持物上。

15. 如权利要求 14 所述的方法,其中所述捕获多肽是表位标记的多肽。

16. 如权利要求 13 所述的方法,还包括将结合的肽与捕获多肽分离。

17. 如权利要求 14 所述的方法,还包括测定所分离的肽的特性。

18. 如权利要求 17 所述的方法,其中所述测定所述特性包括:测定结合肽的氨基酸序列或测定结合肽中氨基酸的相对比例。

19. 一种制备毒性减弱的 YFAK 肽组成的 RSP 组合物的方法,所述方法包括以下步骤:

a. 将 RSP 组合物与至少一种预定捕获多肽接触,所述捕获多肽是存在于正常人血清中的血清蛋白,所述捕获多肽选自以下物质的肽:补体组分 C3,载脂蛋白 A-I 前原蛋白,载脂蛋白 A-II 前原蛋白,补体组分 C4A,胰蛋白酶抑制剂,间- $\alpha$ -胰蛋白酶抑制剂家族重链相

关蛋白 (IHRP)、 $\alpha$ -1-B-糖蛋白,  $\alpha$ -1-抗胰蛋白酶, 载脂蛋白 A-IV, 血浆铜蓝蛋白, 载脂蛋白 E, 补体因子 B, 前白蛋白, 载脂蛋白 C-III, 凝血因子 II, 载脂蛋白 J 前体, 富含组氨酸的糖蛋白前体,  $\alpha$ -2-HS 糖蛋白, 凝溶胶蛋白同工型 a 前体和抑制剂 Kunitz 型蛋白酶;

- b. 将结合于捕获多肽的肽与混合物分离;
- c. 测定所分离肽的特性;和
- d. 制备具有所分离肽的特性的一系列肽。

20. 一种制备效应增强的 YFAK 肽组成的 RSP 组合物的方法, 所述方法包括以下步骤:

a. 将 RSP 组合物与至少一种预定捕获多肽接触, 所述捕获多肽是存在于正常人血清中的血清蛋白, 所述捕获多肽选自: 补体组分 C3, 载脂蛋白 A-I 前原蛋白, 载脂蛋白 A-II 前原蛋白, 补体组分 C4A, 胰蛋白酶抑制剂, 间- $\alpha$ -胰蛋白酶抑制剂家族重链相关蛋白 (IHRP)、 $\alpha$ -1-B-糖蛋白,  $\alpha$ -1-抗胰蛋白酶, 载脂蛋白 A-IV, 血浆铜蓝蛋白, 载脂蛋白 E, 补体因子 B, 前白蛋白, 载脂蛋白 C-III, 凝血因子 II, 载脂蛋白 J 前体, 富含组氨酸的糖蛋白前体,  $\alpha$ -2-HS 糖蛋白, 凝溶胶蛋白同工型 a 前体和抑制剂 Kunitz 型蛋白酶;

- b. 将结合于捕获多肽的肽与混合物分离;
- c. 测定所分离肽的特性;和
- d. 制备具有所分离肽的特性的一系列肽。

## 通过对随机序列聚合物的组合物基于血清蛋白的检测,改进含随机序列聚合物的组合物的设计、生物利用度和效能的方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求 2009 年 11 月 17 日递交的美国临时申请 No. 61/281,470 和 2010 年 9 月 27 日递交的美国临时申请 No. 61/386,909 的优先权益。

### 背景技术

[0003] 现有技术中已有检测简单多肽的方法。然而,由于受检多肽的异质性,检测一组多肽混合物而非具有明确氨基酸序列的一种多肽的有效血浆浓度方法很复杂。例如,含随机序列聚合物(RSP)的组合物包括随机掺入多肽链的氨基酸的复杂混合物。RSP 组合物由氨基酸的特性和比例而不是特定序列决定。鉴于多肽的多样性,需要对多种制造方法制备的这些 RSP 组合物的均一性和组成进行评估的改进方法。确定 RSP 组合物在体内的状态具有重要的免疫学意义,因为取决于给药途径和/或给药频率及血清蛋白与 RSP 组合物的结合,这种肽混合物可能激发初级炎症反应(TH1 型)或初级调控反应(TH2 型),导致其在受试对象中的药代动力学和药效学改变。更加严谨的设计和坚持给予 RSP 组合物可能提高治疗效果或者减少潜在的不良反应。

[0004] 因此,为了治疗目的,需要定量分析 RSP 组合物的方法,例如有助于评估这种肽混合物在体内的状况和确定合适的剂量及给药方式。

[0005] 发明概述

[0006] 本申请提供检测和评价 RSP 组合物的改进的方法。本发明提供检测和定量分析 RSP 组合物的方法。本发明提供基于肽亚组与特定捕获多肽相互作用的测定,和富集 RSP 组合物中多肽亚组的方法。本发明进一步提供对需要接受治疗的患者给予 RSP 组合物的方法,其中可根据上述检测和定量方法来确定或评估给药方案和剂量。

[0007] 本申请还提供检测 RSP 组合物的方法,包括以下步骤:(a) 将所述 RSP 组合物附着于固相支持物上;(b) 使(a)所述固相支持物与含蛋白质生物液体接触;(c) 鉴定特异性结合于(a)所述固相支持物的(b)所述的蛋白质;(d) 获得基本纯的(c)所述结合蛋白产物;(e) 将(c)所述蛋白质附着于定量检测所述 RSP 组合物用的工具上;和(f) 测定所述 RSP 组合物与(e)所述蛋白每一种的结合。

[0008] 本说明书也提供一种改进 RSP 组合物设计的方法,包括以下步骤:(a) 将所述 RSP 组合物附着于固相支持物上;(b) 使(a)所述固相支持物与含蛋白的生物液体接触;(c) 鉴定特异性结合于(a)所述固相支持物的(b)所述的蛋白质;(d) 获得基本纯的(c)所述的结合蛋白产物;(e) 使(c)所述蛋白质附着于定量检测 RSP 组合物用的工具上;(f) 测定所述 RSP 组合物与(e)所述蛋白质结合的每一种肽;(g) 调整所述 RSP 组合物的设计以增加或减少与(e)所述一种或多种蛋白质的结合;(h) 重复步骤(f);(i) 任选地重复步骤(f-h),其中调整所述 RSP 组合物的设计可导致一种或多种效果:提高生物利用度、减少毒性和提高效能。

[0009] 此外,本申请提供一种检测 RSP 组合中肽种类的方法,包括以下步骤:(a) 将所述 RSP 组合附着于固相支持物上;(b) 使 (a) 所述固相支持物与含蛋白的生物液体接触;(c) 鉴定特异性结合于 (a) 所述固相支持物的 (b) 所述的蛋白质;(d) 获得基本纯的 (c) 所述结合蛋白制品;(e) 使 (c) 所述蛋白质附着于固相支持物上;(f) 使 (e) 所述固相支持物与所述 RSP 组合接触;(g) 测定所述 RSP 组合中每种肽与 (f) 所述固相支持物的结合。

[0010] 另外,本申请提供一种改进 RSP 组合中肽种类设计的方法,包括以下步骤:(a) 使所述 RSP 组合附着于固相支持物上;(b) 使 (a) 所述固相支持物与含蛋白的生物液体接触;(c) 鉴定特异性结合于 (a) 所述固相支持物的 (b) 所述蛋白质;(d) 获得基本纯的 (c) 所述结合蛋白制品;(e) 使 (c) 所述蛋白质附着于固相支持物上;(f) 使 (e) 所述固相支持物与所述 RSP 组合接触;(g) 测定所述 RSP 组合中与 (f) 所述固相支持物结合的每一种肽;(h) 调整所述 RSP 组合的设计以增加或减少与 (f) 所述一种或多种蛋白质的结合;(i) 重复步骤 (g);(j) 任选地重复步骤 (g-j),其中调整所述 RSP 组合肽种类的设计可导致一种或多种效果:提高生物利用度、减少毒性,和提高效能。

[0011] 通过应用本申请所述方法,研究者不仅可以更可靠地检测 RSP 组合中的低含量组分,而且可以特异性地检测 RSP 组合中与生物活性如毒性或效力有关或对其有贡献的肽种类。

[0012] 本发明的基础是,发现 RSP 组合中的一种肽或多种肽可与某些具有蛋白质性质的物质特异性结合。相反,一旦鉴定到本说明书称为“捕获多肽”的蛋白质,即可利用一种或多种这类捕获多肽定量分析 RSP 组合中所含的肽,并分离 RSP 组合中功能更优良的肽亚组,或者根据结合特异性给 RSP 组合中的各组分分类。为了实施本发明,鉴定到能与 (RSP 组合所含) 肽结合的捕获多肽后,即可将其制备成可用于实施本发明的形式,即对其进行分离和纯化,纯度达到足以结合 (RSP 组合所含) 肽而不受到存在的其他组分干扰。

[0013] 本发明的一个方面提供了一种评价或测定 RSP 组合不同制造的制剂、用不同方法制造的、或不同的制造后加工的产品的差异的方法。本发明的具体方法是,比较不同的 RSP 组合制品与捕获多肽的结合来确定各制品之间的相似性和 / 或差异。

[0014] 本发明的另一方面提供一种定量分析 RSP 组合或含 RSP 组合的样品中所含肽的方法。本发明的一些实施方式是检测给予 RSP 组合后其在体内的生物可利用含量或浓度 (如血浆浓度) 的方法。

[0015] 本发明的方法是检测受试对象组织中存在的 RSP 组合,所述受试对象先前曾接触过 RSP 组合或用其治疗过,在这种接触后立即、或在接触后至少大约 10、20、30、或 45 分钟,或者 1、2、4、6、12、24、36 或 48 小时,或 3、4、5、6、7 或 10 天,或 2、3、4、6、8 或 12 周进行一次或多次所述方法的检测。本发明的一种具体方法是检测哺乳动物血清或血浆中存在的 RSP 组合的各组分,所述哺乳动物在进行所述方法前曾在上述期间内用所述 DSP 组合治疗过。在某些具体实施方案中,所述哺乳动物是人。

[0016] 在某些实施方案中,本发明方法包括通过使 RSP 与一种或多种预先确定的捕获多肽结合然后用例如免疫检测方法检测 RSP 组合的存在,和任选地检测其含量。因此。本发明的一个方面包括选择或鉴定能与 RSP 组合优先结合的血清蛋白。在某些实施方案中,鉴定一种或多种血清蛋白的方法包括:使 RSP 组合与包括血清的生物样品接触;如果

样品中存在 RSP 组合物中的肽,则检测其与血清中一种或多种组分的结合;分离得到结合组分,鉴定一种或多种结合组分。在一些实施方式中,分离这种结合组分的方法是,使样品接触设计的能与 RSP 组合物所含肽结合的亲和柱、随后洗脱结合组分,然后鉴定结合组分。

[0017] 任何能与 RSP 组合物所含肽结合的血清结合蛋白可用于上述方法。合适的检测方法包括直接竞争酶联免疫吸附试验 (ELISA)、Western 印迹法、免疫流式细胞检测法、放射免疫检测法 (RIA),或者任何其他能定量检测特异性抗原的免疫学检测方法。

[0018] 本发明的一个方面是一种检测生物样品中 RSP 组合物存在与否的方法,包括:使生物样品与至少一种捕获多肽接触;检测捕获多肽与 RSP 组合物有无结合,其中存在这种结合表明在生物样品中存在 RSP 组合物中的肽组分。可进一步延伸用这种方法检测样品中 RSP 组合物的含量或浓度。

[0019] 本发明的另一个方面是测量 RSP 组合物在哺乳动物中的生物利用度方法,包括:给予哺乳动物一定剂量的 RSP 组合物;取得对象的生物样品;使该生物样品与至少一种捕获多肽接触;进而检测该生物样品中 RSP 组合物的生物利用度或者生物可利用的程度。

[0020] 本发明的另一个方面是提供给予哺乳动物对象 RSP 组合物的方法,给药量取决于用上述检测方法或者本说明书描述的其他方法检测的该剂量的生物可利用部分。在某些实施方式中,本发明方法还包括对样品,和进行药效学试验,通过比较样品与对照两者的检测结果,测定生理标志(例如激素、酶、血清蛋白、细胞因子、免疫调节剂,或者这些功能蛋白的效应物或调节剂)的变化,并确定能引起所需药效学参数变化的有效剂量。在某些实施方案中,观察对象报告的行为改变、自觉症状改变,例如疼痛或疾病症状的减轻或其他间接效应。在一些具体实施例中,所述哺乳动物是小鼠或大鼠等啮齿动物,其他的实施例中,所述对象是人。

[0021] 本发明这个方面的某些实施方案,提供确定给予需要的受试对象 RSP 组合物合适剂量的方法包括:(a) 给予受试对象一个剂量 RSP 组合物;(b) 取得受试对象的生物样品;(c) 使此生物样品与至少一种捕获多肽接触;(d) 检测该生物样品中 RSP 组合物各组分的水平;(e) 任选地用不同剂量重复步骤(a)至(d);(g) 将所测得的水平与预先确定的生物样品中的 RSP 组合物合适水平作比较;其中所述合适剂量是导致生物样品中 RSP 组合物达到预定合适水平的剂量。

[0022] 本发明的某些实施方案提供预测 RSP 组合物所含的有生物利用价值组分的方法。这种方法包括:使含 RSP 组合物的样品与 RSP 组合物给予和递送后预期可到达部位原位的预定捕获多肽接触,测定 RSP 组合物与该捕获多肽的结合。被大量 RSP 组合物结合,可表明较大比例的肽是与治疗和/或生理相关的肽,结合较紧密(对每种肽测定其解离常数)可能表示延长那些肽体内半衰期的保护作用。

[0023] 本发明的又一个方面提供根据从实验对象获得的数据预测拟给予治疗对象(如人)的 RSP 组合物的治疗有效量的方法。在某些实施方案中,该方法包括:给予非人哺乳动物实验对象 RSP 组合物,测定该剂量的生物可利用部分(例如用本说明书所述的定量测定方法),测定功能读出,根据从哺乳动物实验对象获得的数据和治疗对象与实验对象之间的相关比率,预测拟给予治疗对象的 RSP 组合物的治疗有效量。为了本发明的目的,“功能读出”可以是受试对象的表型或功能、受试对象细胞的表型或功能、或受试对象产生的一种或几种液体的组成。功能读出还可包括或者包括测量一种或几种生物合成或代谢产生的组

分,如激素、酶、血清蛋白、细胞因子、趋化因子、生长因子、免疫调节剂,或所述功能读出的效应器或调节剂。在某些实施方式中,检测步骤可以各种有规律或无规律的时间间隔后重复进行,来测定给予 RSP 组合物后其生物利用度、代谢和 / 或清除的时间进程。在某些实施方案中,可用此方法测定一组 RSP 组合物的血浆半衰期。在又一个实施方案中,可用此方法测定 RSP 组合物中一种肽类的半衰期。在具体实施方案中,实验对象是啮齿动物,例如小鼠或大鼠。

[0024] 本发明另一个方面提供通过给予 RSP 组合物治疗患者的有效方法,包括:通过合成肽(例如简单地接着合并每轮延伸产生的多个肽,或同时利用合并的氨基酸单体)制备 RSP 组合物,制备所述 RSP 组合物的药学上可接受的制剂,给予治疗对象所述 RSP 组合物,取得治疗对象的组织样品,测定所述组织样品中 RSP 组合物的含量和 / 或浓度,测定功能读出,将 RSP 组合物含量与功能读出相关联,及调整给予治疗对象的 RSP 组合物剂量以改善功能读出。

[0025] 本发明的另一个方面是治疗或预防治疗对象产生不希望有的免疫应答反应的方法,包括给予治疗对象合适剂量的 RSP 组合物,确定合适剂量可通过:(i) 给予治疗对象一个剂量的 RSP 组合物;(ii) 取得治疗对象的生物样品;(iii) 使该生物样品与至少一种捕获多肽接触;(iv) 检测生物样品中该捕获多肽的水平;(v) 任选地用不同剂量重复步骤(i)至(iv);(vi) 将测得的水平与预定的生物样品中 RSP 组合物的合适水平作比较;其中合适剂量是导致生物样品中 RSP 组合物达到预定合适水平的剂量。

[0026] 在前述某些方面和实施方案中,捕获多肽是标记的多肽。在某些实施方案中,捕获多肽附着于固相支持物。在某些实施方案中,检测和 / 或分离包含捕获多肽的复合体和 RSP 组合物的一个或多个肽组分。在具体实施方案中,用对所述复合体而不是对捕获多肽或 RSP 组合物的肽组分具有特异性的抗体来检测和 / 或分离这种复合体。

[0027] 本发明另一个方面提供一种分离所选择的组成 RSP 组合物的肽亚组的方法。在特别的例子中,该亚组由氨基酸序列不同的一种或多种肽组成。在其他例子中,可根据结合特异性利用捕获多肽对 RSP 组合物所含组分分类。

[0028] 在某些实施方案中,分离含 RSP 组合物样品中肽的方法包括:(a) 使该样品与至少一种捕获多肽接触;(b) 分离混合物中结合于捕获多肽的肽。在这样的实施方案中,捕获多肽附着于固相支持物上。在一些实施方式中,捕获多肽是表位示踪或标记的多肽。在一些实施方式中,该方法还包括分离与捕获多肽结合的肽,以分离得到这些肽。在具体实施方式中,该方法还包括测定该分离肽的特性,例如合并的分离肽中的氨基酸组成和 / 或分离肽的氨基酸序列。

[0029] 在某些实施方案中,鉴定在受试对象中 RSP 组合物的生物可利用肽的方法包括:(a) 给予受试对象 RSP 组合物;(b) 在执行步骤(a)后取得受试对象的生物样品;(c) 鉴定该样品中结合于至少一种捕获多肽的肽。

[0030] 在某些实施方案中,鉴定能结合捕获多肽的肽亚组的方法包括:按拟定方案制备 RSP 组合物,使所述 RSP 组合物与预先确定的捕获多肽(如适合作为体内靶标或运载体的多肽)接触,测定 RSP 组合物中的结合肽,鉴定能区别结合肽和未结合肽的特征,制备能反映一种或多种差别特征的改进的 RSP 组合物。

[0031] 本发明的另一个方面是改进含 RSP 组分的组合物制备工艺的方法。在某些实施方

案中,根据鉴定结合捕获多肽的肽亚组的上述方法设计 RSP 组合物。在某些实施方案中,设计的 RSP 组合物其氨基酸组成和 / 或氨基酸序列接近于结合捕获多肽的肽亚组的氨基酸组成和 / 或氨基酸序列。在某些实施方案中,RSP 组合物与参比 RSP 组合物相比效力增强,其中参比 RSP 组合物与接触捕获多肽的最初 RSP 组合物的效力相同或基本相同。在其他实施方式中,RSP 组合物的毒性比参比 RSP 组合物低。

[0032] 在可替代的实施方案中,一种方法包括按拟定方案制备 RSP 组合物,配制含 RSP 的组合物,通过检测功能读出的水平或程度确定所述组合物中生物可利用的 RSP 组分的含量,将功能读出与标准值作比较,和调整拟定方案或组合物的配方以获得满意的生物利用度。

[0033] 本发明还有一个方面是通过将 RSP 组合物(例如参比 RSP 组合物或用本说明书所述方法产生的改进的 RSP 组合物)或 RSP 组合物中的一个组分与受关注的治疗剂缔合而使该药物靶向特定组织,其中所述 RSP 组合物或其组分与具有组织特异性靶向性能的捕获多肽结合,可将这种缔合药剂给予患者使所述药物靶向能与相应捕获多肽结合的组织。

[0034] 本发明这一方面的一些实施方式提供了将治疗剂转运到治疗对象特定组织的方法,该方法包括:(a)使 RSP 组合物与组织特异性肽接触并分离混合物中结合于该组织特异性肽的肽,得到标记肽;(b)将标记肽与治疗剂偶联,(c)给予治疗对象该偶联物。本发明的其它实施方式包括通过上述方法的步骤(a)和(b)制备这种靶向治疗剂的方法,及用此方法制备的靶向治疗剂。

[0035] 本发明的又一个方面是上述方法之一中有用的组合物。本发明这一方面的一个实施方式是一种组合物,可用其检测生物样品中包含 YEAK 或 YEAK 肽的 RSP 组合物,这种组合物包含至少一种捕获多肽。在一些实施方式中,所述捕获多肽选自:正常人血清、正常非人灵长类动物血清、正常家兔血清、正常小鼠血清、正常大鼠血清、正常雪貂血清、正常猪血清、正常狗血清、正常马血清、正常绵羊血清、正常母牛血清中的一种组分,哺乳动物 HDL 蛋白质组的一种组分,哺乳动物 LDL 蛋白质组的一种组分,补体组分 C3,载脂蛋白 A-I 前原蛋白,载脂蛋白 A-II 前原蛋白(载脂蛋白 D),补体组分 C4A,胰蛋白酶抑制剂,间- $\alpha$ -胰蛋白酶抑制剂家族重链相关蛋白(IHRP)、 $\alpha$ -1-B-糖蛋白, $\alpha$ -1-抗胰蛋白酶酶,载脂蛋白 A-IV,血浆铜蓝蛋白,未命名的蛋白产物(BLAST 检索表明它是 IgM 重链),载脂蛋白 E,补体因子 B,前白蛋白,载脂蛋白 C-III, $\alpha$  2-HS 糖蛋白,载脂蛋白 J 前体,IgM 的 C 链,免疫球蛋白  $\lambda$  轻链,凝血因子 II(凝血酶),Ig  $\kappa$  轻链 V-III(KAU 冷凝集素),载脂蛋白 J 前体,Ig AI Bur,富含组氨酸的糖蛋白前体, $\alpha$ -2-HS 糖蛋白,凝溶胶蛋白同工型 a 前体,抑制剂 Kunitz 型蛋白酶,未命名的蛋白产物(NCBI 基因座 / 登记号 No. CAA28659),及 IgJ-链。

[0036] 在上述任何一个实施方式和任何一个方面中,所述 RSP 组合物包括 YEAK 肽或 YFAK 肽。YEAK 肽或 YFAK 肽是本领域已知的,下面对其进行描述,它们是 RSP 组合物所包含的肽,可称为 YFAK RSP 组合物或 YEAK RSP 组合物。另外,不依赖于选择 YFAK 或选择 YEAK 肽,在具体实施方式中,捕获多肽可以是血清结合蛋白。在更具体的实施方式中,捕获多肽选自: $\alpha$ -1-抗胰蛋白酶,载脂蛋白 A-I、 $\alpha$ -1-B-糖蛋白、载脂蛋白 A-IV、载脂蛋白 D 和前白蛋白,或选自本段落前一段所枚举的捕获多肽,或选自本说明书公开的血清多肽。

[0037] 在上述任何一个实施方式中,RSP 组合物所含肽可在生理上相关的其它组分存在下与捕获多肽(例如血清蛋白)进行结合。在具体实施方式中,其它组分是脂质,如胆固醇

或甘油三酯。在具体实施方式中,其它组分是除捕获多肽外基本上没有蛋白成分的 HDL 或 LDL 复合物。

[0038] 附图的简单描述

[0039] 图 1 是测定 RSP 组合物与血清结合蛋白(已结合于支持物上)结合所用的试验的示意图。在血清蛋白被鉴定后,将其结合于固相支持物。将 RSP 组合物(单独或包含于血清中)加到支持物上。加入抗 RSP 组合物(或抗 RSP 组合物与血清蛋白的偶联物)的第一抗体,再用第二抗体和检测试剂检测第一抗体与其靶标的结合。

[0040] 图 2 显示当抗体结合于它们的靶标后,结合了抗 YFAK 和抗 YEAK 抗体的 HRP 组合物的 A450 比色吸光度。靶标包括含有与正常人血清中所含(或所加)血清蛋白结合的 YFAK 和 YEAK 肽的 RSP 组合物。在 RSP 组合物浓度较高时,用抗 YFAK 和抗 YEAK 抗体检测的偶合物高于较低浓度 RSP 组合物。在病人中,12.5ng/mL 对应于大约 2mg 剂量。

[0041] 图 3 显示能结合 PI-2301 或考帕松(Copaxone)的血清蛋白列表。血清蛋白的来源是正常小鼠血清或正常人血清(已标明)。PI-2301 可以是乙酰化或非乙酰化的。用抗 YFAK 和抗 YEAK 抗体识别 PI-2301 或考帕松的结合复合体,并用第二抗体和检测试剂加以检测。洗脱该复合体中的血清蛋白并鉴定。根据检测试剂的 A450 吸光度给蛋白评分。与背景吸光度相比,70 分对应的 p 值 < 0.001,认为具有统计学显著意义。

[0042] 图 4 显示小鼠静脉内给予 4mg/kg 或皮下给予 21mg/kg 剂量的 YEAK 后血清中的 YEAK,用比色法和偶联有 HRP 的抗-YEAK 抗体检测 YEAK 与其结合于正常人血清所含血清蛋白的靶标 YEAK 肽结合后的 A450 吸光度。该图显示,给予 GA(乙酸格拉默)片段后约 15 分钟,GA 达到了血清最高浓度 1800ng/mL。皮下给予 Copaxone®的估计生物利用度为静脉给予 Copaxone®的 12%。给药后 2 小时仍可测到 GA 组分。

[0043] 图 5 显示给予小鼠 YEAK 后血清或血浆中对 YEAK 应答产生的可溶性因子紧急释放的示范例,此例中为 CCL22,也称为 MDC。如该图所示,皮下给予小鼠的 YEAK 剂量与观察到的最大 CCL22 血浆浓度之间存在线性相关。

[0044] 图 6 显示用 LC-MS 观察从固定于 CNBr-Seph 柱的 YEAK 片段洗脱所得血清蛋白的肽图像。用 Mascot 搜索引擎鉴定肽序列。简言之,将胰蛋白酶消化产生的 YEAK 片段偶联于溴化氰 Sepharose(CNBr-Seph)4b,与人或小鼠血清一起室温培育 2 小时。用 0.1M 甘氨酸-盐酸, pH 2.8 液洗脱结合于 YEAK 片段的血清蛋白,在 50%甲醇/50mM 碳酸氢铵中用胰蛋白酶消化,干燥后用液相色谱法(LC)分离,除去溶剂,电离后喷雾到质谱仪(MS)中,直视观察并用 Mascot 搜索引擎鉴定。

[0045] 图 7 显示用图 1 所示的本发明方法进行 ELISA 试验,其中,将 YEAK 加入到男性和女性正常人血清后合并男性和女性正常人血清。该试验显示检测血清 YEAK 浓度的线性范围在 1-100ng/ml 之间。用小鼠血清或用无关对照,如抗匙孔咸血兰蛋白(anti-Keyole Limpet Hemocyanin, KLH)多克隆血清,不能重复该试验。

[0046] 图 8 显示第 P53218 和 119142 批次 Copaxone®(YEAK)分子量的 SE-HPLC 图形,二批的图形相似。

[0047] 图 9 显示用图 1 所示本发明方法检测图 8 中两批 Copaxone®的结果。

[0048] 图 10 显示,对图 8 和图 9 所用的两批 Copaxone®作的生物试验,其中单核细胞系 RAW264.7 细胞接触 YEAK 后以浓度依赖方式释放 CCL22。

[0049] 图 11 显示,用 MALDI-TOF 检测,长度明确不同的 YEAK 共聚体的实际平均分子量与理论平均分子量之间有严格的线性关系。将计算的理论值乘以共聚体的氨基酸长度,即 20、40、60 和 80 乘以一个氨基酸加一个水分子的理论平均分子量。用 Y、E、A 和 K 各自的质量减去在氨基酸偶联过程中丢失的一个水分子的质量,计算出一个氨基酸的理论质量,这 4 个氨基酸的比例为 1.0 : 1.5 : 4.5 : 3.6。

[0050] 图 12 显示固相合成制备的长度不同 YEAK 共聚体的氨基酸分析,按 100 个氨基酸标准化后的输出比例,以及对图 8、9 和 10 所示的两批 Copaxone® 进行的相同分析。

[0051] 用含 20、40、60 和 80 个氨基酸的 YEAK 共聚体产生标准曲线。为了比较,也用 Copaxone 产生标准曲线。图 12 显示 YEAK 共聚体的大小与基于竞争性 ELISA 的 PK 试验检测结果之间的关系。20-聚 YEAK 共聚体的抑制作用很小,但用 80-聚 YEAK 共聚体产生的标准曲线与用 Copaxone 获得的曲线重叠。

[0052] 图 13 显示 ELISA 试验结果,其中家兔多克隆血清的 Ig 组分与 Copaxone® 相互作用强烈,表明随着固相合成的 YEAK 共聚体长度增加,其识别能力也提高。

[0053] 图 14 显示用先前 PCT 公开文本 W02009/075854(其内容纳入本说明书作参考的)所描述的 PK 方法与固相合成的 YEAK 共聚体所作的 ELISA 试验结果,证明 YEAK 共聚体的大小与用上述试验方法测得的结果之间相关。

[0054] 图 15 显示,单核细胞系 RAW264.7 细胞与图 12、13 和 14 所示固相合成的大小不同的共聚体一起培育后,随着共聚体长度的增加,CCL22 的产量也增加。

[0055] 图 16 显示,图 8、9、10 和 12 所用的两批 Copaxone® 与图 12、13、14 和 15 所用的固相合成的长度不同的 YEAK 共聚体,能在体内诱导用 2.5mg/kg Copaxone® 每周一次 ×3 周免疫的小鼠的脾细胞增殖。最后一次皮下给予后,收集脾脏,制备细胞悬液,将脾细胞与不同浓度的不同共聚体一起培养 4 天。用本领域熟知的方法通过测定氘化胸腺嘧啶的掺入检测脾细胞增殖。

[0056] 发明详述

[0057] 含随机序列聚合物的组合物

[0058] 为描述本发明目的的含随机序列聚合物(RSP)的组合物,可以是一种以不同比例包含两个或多个随机顺序氨基酸残基的氨基酸聚合物(典型地为通过肽键相连)的任意混合物,当给予哺乳动物时可用于激发或减弱某些免疫反应或其他反应。因为序列混和的随机多样性,该混合物中存在大量肽序列。肽序列的这种多样性可赋予比多样性差的组合物更高的效能。

[0059] RSP 组合物的定义包括一组聚合物的氨基酸序列和这些氨基酸的摩尔比。例如,以 YFAK 命名的 RSP 组合物含有酪氨酸(Y)、苯丙氨酸(F)、丙氨酸(A)和赖氨酸(K),但不表示该聚合物的氨基酸顺序就是 Y-F-A-K,这些氨基酸残基是随机掺入序列中的,因此,该 RSP 组合物包含具有各种顺序 Y、F、A、K 的肽,并且没有或基本上没有其它氨基酸。相对摩尔比的表示有两种方式:输入摩尔比和输出摩尔比。“输入摩尔比”指合成 RSP 所用氨基酸的摩尔比。例如,如果所述 RSP 的 Y : F : A : K 输入摩尔比为 1 : 1 : 10 : 6,那么用固体相合成法合成时,对于每轮循环延伸,将受保护的 Y、F、A 和 K 氨基酸以摩尔比 1 : 1 : 10 : 6 混和的混合物通过反应延伸肽链。另一方面,“输出摩尔比”指产物 RSP 肽中所见氨基酸的摩尔比。通过分析 RSP 组合物的氨基酸含量测定输出摩尔比。输入与输出摩尔比不同是由

于氨基酸掺入效率的差异所致。

[0060] 合适的 RSP 包括在 PCT 国际公开出版物 WO 00/05250、W000/0524、WO 02/59143、WO 0027417、WO 96/32119, 美国专利申请 US2008/0021192、2004/003888、2002/005546、2003/0004099、2003/0064915 和 2002/0037848, 美国专利 6,514,938、5,800,808 和 5,858,964 中描述的和 PCT 申请 PCT/US05/06822 中描述的那些。这些文献描述了合成 RSP 的方法, 含 RSP 的组合物, RSP 的治疗制剂, 给予受试对象 RSP 组合物的方法, 可用 RSP 治疗的疾病, 及可与 RSP 同时给予受试对象的治疗有效药物。本发明所用的另外的 RSP 和合成它们的方法可参见文献, 如 Shukaliak Quandt, J. 等. (2004) Mol. Immunol. 40(14-15) : 1075-87 ;Montaudo, MS(2004) J. Am. Soc. Mass Spectrom. 15(3) :374-84 ;Takeda, N. 等. (2004) J. Control Release 95(2) :343-55 ;Pollino, JM 等. (2004) J. Am. Chem. Soc. 126(2) :563-7 ;Fridkis-Hareli, M 等. (2002) J. Clin Invest. 109(12) :1635-43 ;Williams, DM 等. (2000) J. Biol. Chem. 275(49) :38127-30 ;Tselios, T. 等. (2000) Bioorg. Med. Chem. 8(8) :1903-9 和 Cady, CT 等. (2000) J. Immunol. 165(4) :1790-8。所有这些专利、专利申请和出版物的完整内容均纳入本说明书作为参考, 特别是其中所描述的 RSP 的结构、制备和功能。

[0061] 某些 RSP 可包含适量带正电的氨基酸如赖氨酸或精氨酸, 和带负电的氨基酸(含量宜较少) 如谷氨酸或天冬氨酸, 任选地与电中性的氨基酸如丙氨酸或甘氨酸(起填充作用) 联合, 任选地还可进一步包含适合赋予共聚体免疫原性的氨基酸, 例如芳族氨基酸如酪氨酸或色氨酸。这类组合物可包含 WO 00/005250 中所述的任何一种氨基酸, 其全部内容纳入本说明书作为参考, 特别关注所披露的讨论 RSP 结构、制备和功能的那些部分。在本发明的某些实施方式中, RSP 组合物是一种聚合物的混合物, 这些聚合物包含随机或部分随机组成的氨基酸序列和含有以下四组氨基酸:(a) 带正电氨基酸, 即赖氨酸和精氨酸;(b) 带负电氨基酸, 即谷氨酸和天冬氨酸;(c) 小的中性氨基酸, 即丙氨酸、苏氨酸、丝氨酸和甘氨酸;(d) 大的氨基酸, 即亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸和色氨酸。这类 RSP 的具体实施方式有: YEAK(包括下文描述的 Cop-1)、VEAK 和 FEAk。在其它实施方式中, RSP 是由三个氨基酸组成的三聚体, 选自上述四组中三组的各个氨基酸。具体的实施方式有: YAK, YEK, KEA 和 YEA, 下文中有进一步描述。

[0062] 在本发明的其它实施方式中, RSP 组合物是由随机或部分随机氨基酸序列组成的聚合物的混和物, 含有 (a) 谷氨酸, (b) 天冬氨酸和选自以下各组的氨基酸:(c) 小中性氨基酸, 即丙氨酸、苏氨酸、丝氨酸和甘氨酸;和 (d) 疏水性氨基酸, 即缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸。这类 RSP 的具体实施方式为 DALE、DAIE、DAVE、DGLE、DGIE 和 DGVE。本发明有用的 RSP 的其它实施方式是不含疏水性氨基酸的 RSP。具体实施方式是 DASE、DATE、DGSE 和 DGTE。

[0063] 其他合适的 RSP 是具有随机或部分随机的氨基酸序列并含有选自以下四组之一氨基酸的聚合物的混和物:(a) 带负电氨基酸, 即天冬氨酸和谷氨酸;(b) 小脂族氨基酸, 即丙氨酸和甘氨酸;(c) 疏水性氨基酸, 即亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸;和 (d) 含小疏水侧链的氨基酸(如丝氨酸、半胱氨酸、苏氨酸), 此外, 所述共聚体可包含脯氨酸残基。在一种实施方式中, 所述共聚体由氨基酸谷氨酰胺 (E) 和 / 或天冬氨酸 (D)、亮氨酸 (L)、丝氨酸 (S) 和丙氨酸 (A) 产生, 本说明书称之为 "ELSA" 共聚体。

[0064] 在某些其他实施方式中, RSP 是随机或部分随机氨基酸序列的混和物, 含有以下四

组的氨基酸:(a)带负电氨基酸(如天冬氨酸和谷氨酸);(b)疏水性脂族氨基酸,即亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸;大疏水性氨基酸,即酪氨酸、苯丙氨酸;和(d)有小中性侧链的氨基酸,即丝氨酸、苏氨酸、丙氨酸、甘氨酸;此外,所述共聚体可含脯氨酸残基。一种示例性共聚体由氨基酸残基谷氨酰胺(E)和/或天冬氨酸(D)、亮氨酸(L)、酪氨酸(Y)和缬氨酸(V)形成,本说明书称之为“DLYV”共聚体。

[0065] RSP的其他具体实施方式是VYAK、VWAK和YFAK,下文有进一步描述。在还有的其他实施方式中,适合用于本发明的RSP包含氨基酸残基K、E、A、S、V和任选的P。更优选,K:E:A:S:V的比例是0.3:0.7:9:0.5:0.5:0.3。RSP优选长约10-100个氨基酸残基,更优选长约20-80个氨基酸残基,甚至更优选长约40-60个氨基酸残基,最优选长约50个氨基酸残基。典型的RSP制备物是各种长度肽的混合物,主要是所需长度的肽,但可含有某些较短或较长的肽。

[0066] 一种适合于本说明书描述的组合物和方法的特异性RSP是YEA K,它包含L-丙氨酸(A)、L-谷氨酸(E)、L-赖氨酸(K)和L-酪氨酸(Y)的组合,带净正电荷。一具体实施方式是共聚体1(Cop-1),也称为glatiramer acetate。几个国家已批准用Cop-1来治疗多发性硬化症(MS),其商品名为COPAXON<sup>TM</sup>(Teva 药物有限公司的商标, Petah Tikva, 以色列)。由于Cop-1是随机多肽的混合物,可能它包含的肽的所有亚组或只有一个亚组是“活性肽”。受关注的Cop-1RSP分子量约2,000-13,000道尔顿(Da)。Cop-1的平均分子量约4,700-13,000Da,但也可包含较小和较大的肽。最受关注的Cop-1的平均分子量约5,000-9,000Da。因此,Cop-1RSP可以是由长约15-100个氨基酸残基(优选长约40-80个氨基酸残基)组成的肽。在一种具体实施方式中,Cop-1RSP的长度在35-75个氨基酸残基之间。更优选的Cop-1RSP长度在35-65个氨基酸残基之间。在一种具体实施方式中,Cop-1长约50个氨基酸。在另一种具体实施方式中,Cop-1长约52个氨基酸。在某些实施方式中,用本领域熟知的液相或固相化学合成的Cop-1的平均输出摩尔比Y:E:A:K分别约为1.0:2.0:6.0:5.0。与传统的肽合成相反,但与其他RSP的制备相似,进行Cop-1的合成是通过加入明确比例的受适当保护的Y、E、A和K的混合物,而不是每轮只加入一种氨基酸。输出比例的差异范围在不同氨基酸之间约为10%。优选形式Cop-1的分子量范围和制备方法可参见美国专利No. 5,800,808,其全部内容纳入本说明书,特别是其中描述的RSP的结构、制备和功能。

[0067] 在含约52个氨基酸残基的Cop-1RSP的某些实施方式中,31-52位氨基酸中丙氨酸组分的比例高于11-30位氨基酸中的比例,和11-30位氨基酸中丙氨酸组分的比例高于1-10位氨基酸中的比例。在一种具体实施方式中,Cop-1RSP序列中的1-10位残基中的输出摩尔比为约1.0:2.0:5.5:5.0,而11-30位残基的输出摩尔比约为1.0:2.0:6.0:5.0;31-52位残基的输出摩尔比约为1.0:2.0:6.5:5.0,以上标示的所有比例是按Y、E、A、K顺序的摩尔比。

[0068] 就本发明的目的而言,短语“Cop-1或Cop-1-相关肽或多肽”意味着包括与髓磷脂碱性蛋白(MBP)有功能交叉反应、在抗原提呈中能与MBP竞争MHC II类分子的任何肽或多肽。对于本说明书所述的用途,预期如果只进行以下一个或几个氨基酸的替换,即天冬氨酸(D)替换谷氨酸(E),甘氨酸(G)替换丙氨酸(A),精氨酸(R)替换赖氨酸(K),色氨酸(W)替换酪氨酸(Y),可保留Cop-1的活性。

[0069] 在其他实施方式中, RSP 组合物包含以下组别的三种不同氨基酸: (a) 带负电氨基酸 (如天冬氨酸和谷氨酸); (b) 疏水性脂族氨基酸, 即亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸; (c) 大疏水性氨基酸, 即酪氨酸、苯丙氨酸; 和 (d) 小中性侧链氨基酸, 即丝氨酸、苏氨酸、丙氨酸、甘氨酸; 此外, 所述共聚体可包含脯氨酸残基。这些共聚体在本说明书中指“三聚体”。平均分子量在约 2,000-40,000Da 之间, 优选在约 3,000--35,000Da 之间。在一种更具体实施方式中, 平均分子量约 5,000--25,000Da。以下表格中显示了示例的三聚体。这些三元共聚体的氨基酸平均摩尔分数可以不同, 显示为一般范围。

[0070] 表 A 适合于本发明使用的三元共聚体

[0071]

氨基酸组成	摩尔分数范围 (输出)	具体实施方式 的比例	参考文献和 注意事项
酪氨酸、丙氨酸 和 赖 氨 酸 ("YAK")	Y:约 0.0005-0.250 A:约 0.3-0.6 K: :约 0.1-0.5	Y:约 0.10 A:约 0.54 K:约 0.35	Fridkis-Hareli.M., Hum Immunol. 2000;61(7):640-50
酪氨酸、谷氨酸 和 赖 氨 酸 ("YEK")	Y:约 0.0005-0.250 E:约 0.005-0.300 K: 约 0.3-0.7	Y:约 0.26 E:约 0.16 K: :约 0.58	变异: Y->W E->D 和/或 K->R
赖氨酸、酪氨酸 和 丙 氨 酸 和 ("KEA")	K:约 0.2-0.7 E:约 0.005-0.300 A:约 0.005-0.600	K:约 0.36 E:约 0.15 A: :约 0.48	
酪氨酸、谷氨酸 和 丙 氨 酸 ("YEA")	Y:约 0.005-0.250 E:约 0.005-0.300 A: :约 0.005-0.800	Y:约 0.21 E:约 0.14 A :约 0.65	变异: Y->W E->D 和/或 A->G
作为参比: 酪氨 酸、谷氨酸、丙 氨酸、赖氨酸 ("YEAK:Cop-1")		Y:约 0.10 E:约 0.14 A :约 0.43 K:约 0.43	

[0072] 在具体实施方式中, 该三元共聚体的氨基酸摩尔比与优选的 Cop-1 相似, 如谷氨酸约 0.14, 丙氨酸约 0.43, 酪氨酸约 0.10 和赖氨酸约 0.34。

[0073] 其他合适的 RSP 包含 L- 丙氨酸 (A)、L- 苯丙氨酸 (F)、L- 赖氨酸 (K) 和 L- 酪氨酸 (Y), 本说明书称为 YFAK。任何这类 RSP 的长度在约 25-300 个氨基酸残基之间。优选用于治疗组合物的 YFAK RSP 含 35-75 个氨基酸残基。更优选的 RSP 长度在 35-65 个氨基酸残基之间。一种优选的 RSP 长度约 50 个或 52 个氨基酸。

[0074] 一种特别的 YFAK 组合物 (L- 酪氨酸、L- 苯丙氨酸、L- 丙氨酸和 L- 赖氨酸) 其输出摩尔比分别约为 1.0 : 1.2 : XA : 6.0, 其中 XA 大于 11.0 小于 30.0, 更具体大于 20.0

小于 30.0 ;输出比的这种差异在不同氨基酸之间包括约为 10% 的范围。优选用于治疗的 YFAK 随机共聚体的输出摩尔比见下面的表 B。

[0075] 表 B :YFAK RSP 的组成氨基酸组成比例

[0076]

Y	F	A	K
1.0:	1.2:	11.0 - 30.0:	6.0
1.0:	1.2:	18.0:	4.0
1.0:	1.2:	18.0:	5.0
1.0:	1.2:	18.0:	6.0
1.0:	1.2:	18.0:	7.0
1.0:	1.2:	18.0:	8.0
1.0:	1.2:	20.0:	4.0
1.0:	1.2:	20.0:	5.0
1.0:	1.2:	20.0:	6.0
1.0:	1.2:	20.0:	7.0
1.0:	1.2:	20.0:	8.0
1.0:	1.2:	20.0<30.0:	6.0
1.0:	1.2:	22.0:	6.0
1.0:	1.2:	24.0:	6.0
1.0:	1.2:	26.0:	6.0

[0077]

1.0:	1.2:	28.0:	6.0
1.0:	1.2:	30.0:	6.0
(Y+F=2.2):		18.0:	6.0
1.0:	1.3:	24.0:	6.0
0.66:	1.54:	18.0:	6.0
0.88:	1.32:	18.0:	6.0

[0078] 一种特定的 YFAK 组合物的具体平均输出摩尔比 Y, F, A, K 分别约为 1.0 : 1.3 : 24.0 : 6.0, 可用本领域已知的固体相合成法制备。

[0079] 另一种优选用于治疗的 YFAK 组合物的平均输出摩尔比 YFAK 约为 1.0 : 1.2 : XA : 6.0, 其中 XA 大于 20.0, 丙氨酸的比例随共聚体的长度而增加。在一个具体的组合物中, 该 RSP 的长度约 52 个氨基酸残基, 在 31-52 位氨基酸中丙氨酸的比例大于在 11-30 位氨基酸中的比例 ; 在 11-30 位氨基酸中丙氨酸的比例大于在 1-10 位氨基酸中的比例。

[0080] RSP 可按照其优先结合靶蛋白的能力及生理功能进行分类,从其氨基酸组成和比例直接推导。可采用现有的任何方法来确定 RSP 组合物能否结合候选或已知的靶蛋白。例如,将报告分子(如放射性核素或生物素)标记的多肽与粗制或纯化的靶蛋白混和,去除未结合的多肽后如果该报告分子附着于靶蛋白,则检测其结合。

[0081] RSP 可包含任何比例的氨基酸残基,可具有各种不同的生理作用,但某些 RSP 有被认可的免疫学活性。设计某些 RSP,它们能优先与特异性 T 细胞表位相互作用,其中的一些与病理性紊乱直接相关。本发明采用的一类 RSP 对分泌可溶性介质如细胞因子的 T 细胞具有特异性。优选的这类 RSP 是含有 2-8 种氨基酸的肽,能优先与特异性 T 细胞表位相互作用,其中的一些被认为与病理性紊乱直接相关,这些病理性紊乱被可溶性介质如细胞因子的异常产生所加重。

[0082] 另一类 RSP 的潜在功能,是能与通过 MHC 分子(优选通过 MHC II 类分子)提呈的数千种、优选数十万种、更优选数百万种 T 细胞表位相互作用。人的 MHC II 类等位基因包括 HLA-DR、HLA-DQ 或 HLA-DP 分子。有许多编码这些 HLA 分子每种类型的等位基因。MHC II 分子主要表达在 B 淋巴细胞和抗原提呈细胞如巨噬细胞的表面。MHC II 类蛋白由大小几乎相等的  $\alpha$  和  $\beta$  亚基组成,二者均为跨膜蛋白。 $\alpha$  和  $\beta$  亚基的氨基末端部分形成肽结合槽。这种肽结合槽是向 T 细胞提呈抗原的位点。MHC II 类蛋白的某些等位基因变体与自身免疫疾病和其他免疫功能紊乱疾病相关。

[0083] 一种具体的这类疾病是多发性硬化症(MS)。MS-相关的 HLA-DR2(DRB1\*1501)分子以高亲和力结合于髓磷脂碱性蛋白(MBP),引起 T 细胞攻击髓磷脂鞘膜。上述 Cop-1 能以高亲和力和肽-特异性方式结合于纯化的 HLA-DR2(DRB1\*1501),HLA-DR1(DRB1\*0101)和 HLA-DR4(DRB 1\*0401)。其他 RSP(如 YFAK)对 MHC II 类蛋白的抗原结合沟槽也有与 Cop-1 相似或更高的亲和力。因此,这些 RSP 能抑制或取代髓磷脂自身抗原与 MHC II 类蛋白的结合。

[0084] 类似地,本说明书所述方法采用的 RSP 组合物可用于治疗关节疾病,如类风湿性关节炎(RA)或骨关节炎(OA)。能结合 Cop-1 的 HLA-DR1(DRB1\*0101)或 HLA-DR4(DRB1\*0401)与类风湿性关节炎(RA)相关。Cop-1、YFAK 和本发明所用的其他 RSP 对这类 HLA 的抗原结合沟槽亲和力比类风湿性关节炎的病理靶蛋白--II 型胶原蛋白 261-273 肽更高。因此,这些 RSP 能抑制或取代 II 型胶原蛋白 261-273 肽与 MHC II 类蛋白抗原结合沟槽的结合。

[0085] 在本发明方法的某些实施方式中采用的其他 RSP,是能结合 HLA-DQA 1 分子,甚至更优选能结合等位基因 DQA 1\*0501-DQB 1\*0201, DQA1\*0301, DQB 1\*0401 和 DQA1\*03-DQB1\*0302 所编码的一种或多种 HLA 分子的 RSP。

[0086] 在具体实施方式中,RSP 结合某种 HLA-DQ 分子(携带这种分子的人易感自身免疫相关疾病,如 I 型糖尿病和乳糜腹泻病)的解离常数(3/4)比结合 HLA-DR 分子和/或其他 DQ 同工型分子至少低 10 倍。这类 HLA-DQ 分子是称作 DQB 1\*0201、DQB 1\*0302、DQB 1\*0304、DQB 1\*0401、DQB1\*0501、DQB1\*0502 及 DQA1\*0301、DQA1\*0302、DQA1\*0303 和 DQA1\*0501 的特异性 HLA-DQB1 和 DQA1 等位基因分子的联合蛋白质产物。这些等位基因(“顺式”等位基因)编码相同的单倍型,如 DQB 1\*0201-DQA1\*0501-DRB1\*0301 和 DQB1\*0302-DQA1\*0301-DRB1\*0401。所产生的包含“顺式”等位基因多肽产物的 HLA 分子,称为“顺式二聚体”。或者,这些等位基因可在不同的单倍型(“反式”等位基因)上编码。

含有“反式”等位基因多肽产物的 HLA 分子称为“反式二聚体”。“反式”等位基因的一个例子是 DQB 1\*0201-DQA1\*0501-DRB1\*0301 上的 DQB 1\*0201 与 DQB 1\*0301-DQA1\*0301-DRB1\*0404 上的 DQA1\*0301 的联合（蛋白）。

[0087] 在具体实施方式中,本发明所用的 RSP 组合物能结合一种或多种 DQ 同工型分子,其平均  $K_d$  为  $1 \mu\text{M}$  或更低,更优选平均  $K_d$  低于  $100\text{nM}$ ,  $10\text{nM}$  或甚至低于  $1\text{nM}$ 。另一种鉴定优选共聚体的方法基于竞争结合试验（如 Sidney 等,2002, J. Immunol. 169 :5098 描述的试验）中一种共聚体取代另一种共聚体的测定,用  $\text{IC}_{50}$  值表示。本发明的优选 RSP 的  $\text{IC}_{50}$  值低于  $1 \mu\text{M}$ ,更优选低于  $500\text{nM}$ ,甚至低于  $100\text{nM}$ 。对 HLA-DQ 具有特异性的某些 RSP 是 ELSA 和 VLYV。

[0088] 在某些其他具体实施方式中,本发明的方法涉及的 RSP 具有基于疾病相关表位 APL 的某些特性。

[0089] 在某些实施方式中,将本发明有用的 RSP 配制用作药物,其分散度低于 25,000,更优选低于 10000、5000、1000、500、100、50 或甚至低于 10。

#### [0090] 药代动力学方法

[0091] 在某些实施方式中,可测定 RSP 组合物的吸收和分布。也可测定 RSP 组合物发生变化的速率和这种变化的持续时间,以及 RSP 组合物组成的化学变化。

[0092] 某些 RSP 组合物在血清和其他生物液体中的持续时间比其他混合物长得多。例如,发现一种 YFAK 制品 PI-2301 的血清浓度高 10 倍于最初以相同的“体重 - 体积”浓度给药的 Cop-1 (US App. Pub. 2009-0275496)。在某些情况下,给予的多肽在体内被隔离或结合于原位的某些体内成分,其结果在体内环境中半衰期延长,伴随或不伴随生物利用度提高。在某些实施方式中,所述环境是血浆或淋巴液。在另一种实施方式中,所述环境是脊髓或脑液。在其他实施方式中,所述环境是 RSP 组合物递送肽所在部位的任何组织或器官。

#### [0093] 对与 RSP 组合物中的氨基酸共聚体结合的生理多肽和蛋白质的鉴定

[0094] 本发明的一个方面是鉴定能结合 RSP 组合物的捕获多肽。术语“捕获多肽”在本说明书中用来表示见于正常组织和器官的任何多肽、蛋白质、蛋白片段、脂蛋白或具有蛋白质性质的其他分子。它可以是单一的多肽或含多条多肽和 / 或亚基的蛋白,或含与其他材料如脂质结合（共价或非共价结合）的蛋白质,该捕获多肽还可具有结合 RSP 组合物所需或所必需的明确结构。捕获多肽常常不是短暂存在的,即无论何时都可发现其以基础且稳定的量存在,不论是否有被诱导而短暂提高的量。捕获多肽优选蛋白质,更优选地,捕获多肽是生物液体中的蛋白质,如血清蛋白质。

[0095] 本发明此方面的某些实施方式是鉴定能与 RSP 组合物中所含肽结合的捕获多肽的方法。该方法包括:使含一定量 RSP 组合物的样品接触正常组织样品;和检测 RSP 组合物的肽与正常组织样品中任何组分的结合。在某些实施方式中,将 RSP 组合物包含的肽固定在树脂（通过该肽与活化树脂的反应而共价结合）或固体材料如聚苯乙烯上。例如,使组织样品与固定的肽接触并进行培养,洗涤除去非特异结合,鉴定组织样品中与该肽结合的物质。可用任何合适的方法鉴定结合的物质,例如将该物质施加于特异性抗体平板上;如果疑为多肽或核苷酸则对其进行微测序;如果疑为多糖,则用胰蛋白酶消化后用液相色谱法结合串联质谱 (LC-MS/MS),用特异性染料染色;或采用灵敏度足够高的任何分析方法。

[0096] 作为以上所述鉴定的一个非限制性例子,PI-2301 或 Cop-1 可用于直接 ELISA 试

验（见材料和方法）以鉴定能结合含 YFAK 或 YEAK 肽的 RSP 组合物的血清蛋白。下面的表 C 列出了实验显示正常人血清中能结合 YEAK 和 / 或 YFAK 肽的血清蛋白质。观察到 YEAK 和 YFAK 肽具有不同的结合特异性；相反，可以说是血清蛋白以不同的结合特异性与 YEAK 和 YFAK 肽结合。表 D 和 E 分别列出了与 HDL 和 LDL 结合的血清蛋白。任何血清蛋白可以不同的亲和力和选择性与本说明书所述的 RSP 组合物结合。

[0097] 一旦鉴定到能与 RSP 组合物包含的肽结合的捕获多肽，可测定其结合类似肽或完全随机组成的肽的特异性。捕获多肽经鉴定和特性分析后（或是实际上鉴定过的相同分子，或是不同来源获得的同样分子）进而可用于定量分析与之结合的 RSP 组合物。

#### [0098] 血清蛋白质

[0099] 在某些实施方式中，RSP 组合物与血清蛋白质的结合构成了它们生物学活性的重要方面。RSP 组合物与血清蛋白质的结合有利于其组织分布和被抗原提呈细胞（如单核细胞和巨噬细胞）捕获。如上所述，肽与血清蛋白结合可保护它们避免被降解和 / 或转化。例如，皮下给予 PI-2301 (plovamer, 一种 YFAK RSP) 和 Cop-1 (乙酸格拉默 (glatiramer), 一种 YEAKRSP) 后几小时可在不同动物（包括人）的血清中检测到，而对照 RSP 短时间后就从血清中消失 [US App. Pub. 2009-027496]。

[0100] 因此，可利用血清蛋白来捕获和 / 或鉴定 RSP 中的一种或多种肽。虽然 RSP 组合物总体上含有许多不同的肽，但其中只有一种或多种组分与血清蛋白结合性能相关，而其他组分则并非如此。特别是用液相肽合成法制备的混合肽的确如此，不同批次的 RSP 组合物含有的能结合血清蛋白的肽的百分比可有变化。例如，重要的是监测血清中的乙酸格拉默 (glatiramer) 变体，以揭示不同批次 RSP 组合物中各变体的生物等效性，及揭示血清蛋白结合组分在数量与质量上的等效性。

[0101] 可利用血清蛋白来体外选择和 / 或特征鉴定 RSP 结合物中的结合伴侣。也可利用血清蛋白在体内选择、检测和 / 或特征鉴定结合血清蛋白的肽，根据其与血清蛋白的结合和 / 或在体内的持久性而提供区别特异性肽或肽亚组的方法。结合血清蛋白的肽的具体特性可包括：氨基酸的具体序列、混合物中各氨基酸的比例、结构、独特基序、带电残基的结构。例如，PI-2301 与 HDL 或 LDL 复合体中的脂蛋白结合，可能是因为其带正电的赖氨酸与脂蛋白外部带负电的残基相互作用，及其丙氨酸与脂蛋白疏水部分的苯丙氨酸相互作用所致。

[0102] 表 C：实验显示人血清中能与 YEAK 和 YFAK 肽结合的血清蛋白示例：

蛋白质	NCBI 基因座/登录号
$\alpha$ -1-抗胰蛋白酶(SEQ ID NO:1)	AAA51546(CAJ15161)
$\alpha$ -1-B-糖蛋白(SEQ ID NO:3)	OMHU1B
$\alpha$ -2-HS 糖蛋白	BAA22651

[0104]

α-2-HS 糖蛋白	P02765
载脂蛋白 A-1 的前原蛋白(SEQ ID NO:4)	AAA51747
载脂蛋白 A-1 (SEQ ID NO:2)	Q9Z2L4(AAS68227)
载脂蛋白 A-II 前原蛋白 (载脂蛋白 D)	NP_001634(AAB32200)
载脂蛋白 A-IV	AAA51744
载脂蛋白 C-III	AAB59372
载脂蛋白 D (SEQ ID NO:5)	AAB35919
载脂蛋白 E	AAB59518
载脂蛋白 J 前体蛋白	AAA51765
血浆铜兰蛋白	AAA51975
免疫球蛋白 M 的 C 链	2RCJ_C
凝血因子 II(凝血酶)	3F68_H
补体组分 3	NP_058690
补体组分 C3	AAA85332
补体组分 C4A	AAA51855
补体因子 B	AAA16820
凝溶胶蛋白同工型 a 前体蛋白	NP_000168
富含组氨酸的糖蛋白前体蛋白	NP_000403
IgA1 Bur	763134A
Ig J 链	AAA58902
Ig κ 轻链 V-III(KAU 冷凝集素)	A23746
免疫球蛋白 λ 轻链	CAA40939
抑制剂, Kunitz 型蛋白酶	0511271A
间-α-胰蛋白酶抑制剂家族重链相关蛋白 (IHRP)	BAA07602
间-α-胰蛋白酶抑制剂重链 H1	Q61702
间-α-胰蛋白酶抑制剂重链 H2	Q61703
基膜聚糖	AAB35361
前白蛋白(SEQ ID NO:6)	BAA0059

[0105]	胰蛋白酶抑制剂	CAA30160
	未命名的蛋白产物（推测是 IgM 重链）	CAA34971
	未命名的蛋白产物（推测是玻璃状粘蛋白）	CAA28659
	玻璃状粘蛋白	AAA40588

[0106] 表 D :结合 HDL 的血清蛋白

[0107]

蛋白质	登录号
ApoA-I	P02647
ApoA-II	P02652
ApoA-IV	P06727
ApoC-II	P02655
ApoC-III	P02656
ApoD	P05090
ApoE	P02649
ApoJ	P10909
ApoL1	014791
ApoM	gi 13645390
LPL	gi 3293305
CETP	P11597
C-RP	P02741
大马鲛纤溶酶 (Ceroplasmin)	gi 13645230
补体组分 3	gi 13649325
触珠蛋白	gi 1212947, P00738
SAA	P35542
SAP	P02743

运甲状腺素蛋白	P02766
运铁蛋白	gi 4557871, P02787
PON	P27169
补体组分 1 抑制剂	P05155
巨噬细胞刺激因子	gi 10337615
淋巴细胞抗原	gi 553540
脑脊膜瘤表达的抗原 5	gi 11024698
HLA-A 蛋白	gi 13620230
NOTCH1	gi 11275980
唾液酸结合 Ig 样凝集素 5	gi 13633818
C- 型凝集素超家族成员 1	gi 5031637
H 因子 1( 补体 )	gi 4504375
补体组分 3	gi 13649325
胰岛素瘤 - 相关蛋白 IA-6	gi 14211925
潜在的转化生长因子 $\beta$	gi 3327808
LTBP-2	gi 1272664
生长停止 - 特异性基因 -6	gi 4557617
受体利阿诺定受体 -2	gi 13638463
POU5 结构域蛋白	gi 12382246
血浆激肽释放酶 B1	gi 11436257
TFP1	P10646/P48307
未取名蛋白产物	gi 10435007
未知蛋白	gi 12653035
未知蛋白	gi 12802992

KIAA1095	gi 5689527
KIAA1730 蛋白	gi 12698005
KIAA0675 基因产物	gi 13643803
CIP- 相互作用锌指蛋白	gi 12643326
dj675G8. 1( 新颖锌指蛋白 )	gi 11137825
dj733D15. 1	gi 3702137
TAT- 相互作用蛋白, 72kDa	gi 1427566
dj758N20. 1( 蛋白激酶 )	gi 11493357
蛋白酪氨酸磷酸化酶	gi 13645209
推测的蛋白质 dj1057B20. 2	gi 11034845
桥粒胶蛋白	gi 13435361
凝血因子 VIII- 相关蛋白	gi 13652210
IgG	gi 10334541, P99007
HSA	gi 178345, P02728
$\alpha$ -1 $\beta$ - 糖蛋白	P04217

[0108] 表 E :与 LDL 结合的血清蛋白

[0109]

蛋白质	
ApoE(5 种同工型)	
ApoL-I(7 种同工型)	
ApoC-IV(3 种同工型)	
ApoA-IV	
ApoA-I	
ApoM	

ApoC-III	
$\beta$ -肌动蛋白	
纤维蛋白素原-g(两种同工型)	
白蛋白(3种同工型)	
异戊二烯基半胱氨酸裂解酶(两种同工型)	

[0110] 血清蛋白与 RSP 组合物之间的结合

[0111] 不希望受理论的束缚,在机制上 RSP 组合物(如 PI-2301 和 Cop-1)中的肽与血清蛋白如载脂蛋白(被发现与 HDL 和 LDL 相关联)结合可有利于它们被单核细胞捕获(通过受体,如 SR-BI 或 ABCA1 受体)。这种结合可诱导单核细胞活化和分化成为抗炎细胞。PI-2301 与 Cop-1 结合的血清蛋白有所不同(见图 3)。这种不同的一个原因是,溶液相肽合成产生 Cop-1 和乙酸格拉默(glatiramer)基因变体,因此可观察到各批次组合物之间有显著差异。相反,PI-2301 系用固体相合成法制备,如用 SEC-HPLC 和 MALDI-TOF 两种方法检测所显示,PI-2301 的分子量分布范围非常狭窄,高斯正态分布紧凑。因此,混合物中绝大多数 PI-2301 52-聚肽可能是有功能的肽。Cop-1 的分子量分布则范围宽得多,使混合物中一些种类的肽(如小肽)可能是无效的。与上述相一致,在多发性硬化症和克罗恩病的临床前模型上的效能测试中 PI-2301 的效能比 Cop-1 高,达到了更高的血清接触。

[0112] 在检测与 PI-2301 或 Cop-1 结合的血清蛋白时,发现与 YFAK 和 YEAK 肽结合的血清蛋白亚组有所不同(见图 3)。

[0113] 能结合 RSP 组合物的血清蛋白是含胆固醇的复合体(如 HDL 或 LDL 复合体)的一部分,和/或与其他蛋白和多肽(可作为有功能的捕获多肽)结合,这些蛋白和多肽在生理条件下可见与血清蛋白结合。因此,本发明的方法注重 RSP 组合物与血清蛋白结合时血清中有其他组分。

[0114] 检测生物样品中的 RSP 组合物;生物利用度的测定

[0115] 本发明一方面内容是检测生物样品中 RSP 组合物存在的方法,包括使生物样品与至少一种捕获多肽接触;和检测该捕获多肽是否与 RSP 组合物结合,存在这种结合表明生物样品中存在 RSP 组合物中的肽组分。还可扩展此种方法来检测样品中 RSP 组合物的含量或浓度。

[0116] 在某些实施方式中,检测生物样品中存在的 RSP 组合物(如包含 YFAK 或 YEAK 肽)的方法是,使生物样品与至少一种捕获多肽(例如包括选自  $\alpha$ -1-抗胰蛋白酶、载脂蛋白 A-I、 $\alpha$ -1-B-糖蛋白、载脂蛋白 A-IV、载脂蛋白 D 和前白蛋白的肽)接触;和检测是否存在捕获多肽与 RSP 组合物的结合。在此试验中存在这种结合表明生物样品中存在 YFAK 或 YEAK 肽。本发明也提供方法,通过使生物样品与至少一种捕获多肽(例如包括选自  $\alpha$ -1-抗胰蛋白酶、载脂蛋白 A-I、 $\alpha$ -1-B-糖蛋白、载脂蛋白 A-IV、载脂蛋白 D 和前白蛋白的肽)接触,和定量测定该捕获多肽与 RSP 组合物结合的水平,来检测生物样品中包含 YFAK 或 YEAK 肽的 RSP 组合物的含量。

[0117] 本发明的其他实施方式提供检测对象中 RSP 组合物(如包含 YFAK 或 YEAK 肽)生

物利用度的方法,包括给予受试对象一个剂量含 RSP 组合物的组合物;取得受试对象的生物样品,使该生物样品与至少一种捕获多肽(例如包括选自  $\alpha$ -1-抗胰蛋白酶、载脂蛋白 A-I、 $\alpha$ -1-B-糖蛋白、载脂蛋白 A-IV、载脂蛋白 D 和前白蛋白的肽)接触。可以预期,RSP 组合物中的肽在体内可与捕获多肽广泛结合。虽然如此,对于进一步的特性鉴定,可利用针对含有 RSP 组分肽和捕获多肽的复合体的特异性抗体(而不是针对其中各组分的单一抗体)来检测 RSP 组合物的生物利用度。

#### [0118] 给药剂量和方法的改进

[0119] 本发明另一方面的内容是提供给予哺乳动物受试者 RSP 组合物的方法,所用量根据用上述方法或本说明书描述的其他方法测定所给剂量的生物可利用部分而加以确定。在某些实施方式中,该方法还包括:对照样品;进行药效试验以检测生理标志(如激素、酶、血清蛋白、细胞因子、免疫调节剂或这些功能蛋白之一的效应物或调节物),比较对照样品与测试样品之间的两种结果,确定导致药效参数所需改变的有效剂量。在某些实施方式中,观察受试者所报告的行为变化,自觉症状改变,例如疼痛或疾病症状的减轻,或其他间接效应的证据。在某些实施方式中,所述哺乳动物受试者是啮齿动物,如小鼠或大鼠。在其他实施方式中,所述受试者是人。

[0120] 更通俗地说,治疗或预防治疗对象不希望有的免疫应答反应的方法可包括提供 RSP 组合物(如包含 YFAK 或 YEAK 肽);给予受试对象该 RSP 组合物;取得受试对象的生物样品;使该生物样品与至少一种捕获多肽(例如选自  $\alpha$ -1-抗胰蛋白酶、载脂蛋白 A-I、 $\alpha$ -1-B-糖蛋白、载脂蛋白 A-IV、载脂蛋白 D 和前白蛋白的肽序列)接触;分离混合物中结合捕获多肽的肽;测定分离肽的特性;制备具有分离肽特性的一组肽,并将制备的该组肽给予治疗对象。

[0121] 在这些方法中,可给予受试对象一次以上的 RSP 组合物。例如,可间隔 1、2、3、4、6、12、18、24、36、48 或 72 小时给予受试对象 RSP 组合物。

[0122] 因此,本发明的一些实施方式是给予有需要的对象合适剂量的 RSP 组合物(如包含 YFAK 或 YEAK 肽),合适剂量的确定是通过给予治疗对象第一剂 RSP 组合物;取得治疗对象的生物样品;使该生物样品与至少一种捕获多肽(例如包括选自  $\alpha$ -1-抗胰蛋白酶、载脂蛋白 A-I、 $\alpha$ -1-B-糖蛋白、载脂蛋白 A-IV、载脂蛋白 D 和前白蛋白的肽)接触;检测生物样品中捕获多肽的水平;任选地用第二种不同剂量重复上述步骤;将测得的水平与预先确定的生物样品中 RSP 组合物的合适水平进行比较。在这些情况下,合适的剂量是可导致生物样品中 RSP 组合物达到预先确定的合适水平的剂量。生物样品中 RSP 组合物的合适水平是能获得所需功能的读出或替代标志改变的水平。功能读出可以是受试对象的表型或功能,受试对象细胞的表型或功能,或受试对象产生的液体的组分。在一种具体的实施方式中,在确定的时间间隔后重复该检测步骤,以确定给药后生物利用度的时间进程。在某些实施方式中,从该时间进程确定 RSP 组合物(作为一个组)的半衰期。就 YFAK 或 YEAK 而言,免疫应答反应增强或隐退的功能读出的例子是:作为不希望有的免疫刺激作用指标的 TNF $\alpha$ 、IL-6、CXCL1、CXCL2 和 IL-12p70 水平的提高或可测到,作为需要的正向变化指标的 II-Ira、CXCL13 和 CCL22 水平的提高或可测到。采用本领域已知的和易得的技术和材料,不难测定这些标志的变化。

[0123] 本发明的某些实施方式促进了各种类生物之间有效剂量的比较。进行人与实验动

物（如小鼠或大鼠）有效剂量的比较，困难不仅在于身体大小的差异和总体代谢的差异，而且在于已观察到的动物种类之间药物生物利用度的差异。本发明的一个方面是，RSP 组合物的生物利用度与组分肽和血清蛋白的结合部分相关，这可使半衰期延长和促进某些组织中的分布。因此，本发明的一些实施方式是测定 RSP 组合物在受试对象中的合适剂量的方法，这些方法包括在实验动物模型上测定 RSP 组合物的第一种合适剂量，这第一种合适剂量是能给出良好的读出并与 RSP 组合物在体内与血清蛋白结合水平相对应的剂量，通过给予受试对象使其体内与血清蛋白结合的 RSP 组合物水平与给予实验动物第一种合适剂量所达到的水平相似或相同的剂量，从而确定 RSP 组合物的第二种合适剂量。

[0124] 在具体实施方式中，采用本发明的方法可提高给予 RSP 组合物（例如用于治疗或预防治疗对象不希望有的免疫应答反应而采用的 YEAK 或 YFAK RSP）的效果。一种方法包括给予治疗对象合适剂量的 RSP 组合物（如包括 YEAK 或 YFAK RSP 组合物），可如下确定这种合适剂量：给予一种剂量的 RSP 组合物；取得受试对象的生物样品；使该生物样品与至少一种捕获多肽（例如选自  $\alpha$ -1-抗胰蛋白酶、载脂蛋白 A-I、 $\alpha$ -1-B-糖蛋白、载脂蛋白 A-IV、载脂蛋白 D 和前白蛋白）接触；检测生物样品中捕获多肽的水平；任选地重复上述所有步骤；及比较测得的水平与预先确定的生物样品中 RSP 组合物的合适水平。如上所述根据优良的读出确定合适的剂量。

[0125] 可采用任何合适的标记物来标记肽，如采用附着的荧光分子、放射性标记、形成化学偶联物、生物素化、附加表位标签，或任何有利于检测的分子。上述作为多肽检测剂的血清蛋白可固定在固相支持物上。当血清蛋白结合于 RSP 组合物中的一种或多种肽后，可分离得到含有结合于 RSP 组合物的捕获多肽的结合复合体。

[0126] 分离该结合复合体的方法可包括：免疫沉淀、ELISA、免疫检测或标记捕获多肽的检测。用针对捕获多肽的抗体、针对 RSP 组合物的抗体（如抗-YFAK 或抗-YEAK 多克隆抗体），或用已制备的能识别该结合复合体的抗体，来进行捕获多肽与 RSP 结合的检测。

[0127] 可经皮下、肌肉内、静脉内、鼻内，或通过喷管或粘膜给予 RSP 组合物。

[0128] 在某些实施方式中，用于检测生物样品中含 YEAK 或 YFAK 肽的 RSP 组合物的组合物，可包含至少一种捕获多肽，该捕获多肽含有选自  $\alpha$ -1-抗胰蛋白酶、载脂蛋白 A-I、 $\alpha$ -1-B-糖蛋白、载脂蛋白 A-IV、载脂蛋白 D 和前白蛋白的肽。

[0129] RSP 组合物中特异性肽的选择

[0130] 本发明的一个方面是在鉴定和 / 或分离 RSP 组合物中的肽或肽亚组的用途。虽然 RSP 组合物与单种或寡聚特异性肽样品相比的一个优点是它的异质性，但可以想象组成混合物的肽亚组比其它肽亚组或实际上不需要的亚组更有效。因此，本发明提供根据肽对某些捕获多肽的亲合力来鉴定和 / 或分离含 RSP 组合物样品中肽的方法，在特别的情况下，所述肽亚组可包含含有一种或多种不同氨基酸序列的肽。在其他情况下，可利用捕获多肽根据其结合特异性给 RSP 组合物中的组分分类。

[0131] 在某些实施方式中，鉴定结合捕获多肽的肽亚组的方法包括：按照拟定方案制备 RSP 组合物，使所述 RSP 组合物与预先确定的捕获多肽（如适合作为体内靶标或运载体的多肽）接触，测定 RSP 组合物中肽的结合，鉴定能区分结合肽与未结合肽的特征；制备能反映一种或多种特性差异的改进的 RSP 组合物。

[0132] 在某些实施方式中，使含 RSP 组合物的样品与捕获多肽接触，分离并鉴定与捕获

多肽结合的 RSP 组合物所含的肽。在某些实施方式中,所述 RSP 组合物是 YFAK RSP 组合物,在一具体实施方式中,所述混合物是 PI-2301。在其他实施方式中,所述 RSP 组合物是 YEAK RSP 组合物,在一具体实施方式中,所述混合物是 Cop1。在某些实施方式中,使 RSP 组合物与至少一种作为捕获多肽的血清蛋白接触。在更具体的实施方式,所述血清蛋白选自捕获多肽  $\alpha$ -1-抗胰蛋白酶、载脂蛋白 A-I、 $\alpha$ -1-B-糖蛋白、载脂蛋白 A-IV、载脂蛋白 D 和前白蛋白。

[0133] 可将捕获多肽固定在固相支持物上,和 / 或可用本领域已知的方法进行标记。固定和标记可用于进一步的分离捕获多肽结合的肽,和 / 或测定所分离肽的特性。这些特性可包括结合肽的氨基酸序列、结合肽中各氨基酸的相对比例、氨基酸序列中带电残基的构象和布局、肽的结构、电荷或任何其他合适的特性。

[0134] 也可利用 RSP 组合物与血清蛋白的结合来鉴定 RSP 组合物中的生物可利用肽,例如,在受试对象中包括 YFAK 或 YEAK 肽的生物可利用肽。可将该 DSP 组合物在第一时间给予受试对象,然后在给予后的第二时间取得患者的组织样品,鉴定组织样品中与至少一种捕获多肽(例如包括选自  $\alpha$ -1-抗胰蛋白酶、载脂蛋白 A-I、 $\alpha$ -1-B-糖蛋白、载脂蛋白 A-IV、载脂蛋白 D 和前白蛋白的肽)结合的肽。

#### [0135] 改进的 RSP 组合物制备

[0136] 本发明的另一方面是改进含 RSP 组合物的组合物制备工艺的方法。在某些实施方式中,根据鉴定结合捕获多肽的肽亚组的上述方法进行 RSP 组合物设计。在一些实施方式中,将 RSP 组合物设计成其氨基酸组成和 / 或氨基酸序列接近结合捕获多肽的肽亚组。

[0137] 在某些实施方式中,制备毒性减弱的 RSP 组合物(例如包含 YEAK 或 YFAK 肽)的方法包括:使该 RSP 组合物与至少一种捕获多肽(例如包含选自  $\alpha$ -1-抗胰蛋白酶、载脂蛋白 A-I、 $\alpha$ -1-B-糖蛋白、载脂蛋白 A-IV、载脂蛋白 D 和前白蛋白的肽)接触;分离混合物中与捕获多肽结合的肽;检测分离的肽的特性;和制备具有分离肽特性的一组肽。

[0138] 类似地,制备疗效提高的 RSP 组合物(例如包含 YEAK 或 YFAK 肽)的方法可包括:使 RSP 组合物与至少一种捕获多肽(包含选自  $\alpha$ -1-抗胰蛋白酶、载脂蛋白 A-I、 $\alpha$ -1-B-糖蛋白、载脂蛋白 A-IV、载脂蛋白 D 和前白蛋白的肽)接触;分离混合物中与捕获多肽结合的肽;检测分离的肽的特性;和制备具有分离肽特性的一组肽。

[0139] 在一些实施方式中,利用预定规模的固定的捕获多肽,获得所需的 RSP 组合物亚组。可按前面的预期和描述,制备 RSP 组合物,使其接触与所需改进有关的固定的捕获多肽。洗涤样品去除未结合的肽,利用适当的解离条件,如改变 pH、盐浓度或加入有机溶剂,洗脱 RSP 组合物中的结合肽部分。适当处理合并的结合肽部分,例如通过蒸发或通过合适的层析或结晶或其他纯化方法进一步纯化,浓缩和去除治疗上不需要的组分。如此制备的 RSP 组合物可用作治疗剂。

[0140] 另外,本发明的这一方面可与上述剂量和给药的改进方法联用。当制备更好的定制 RSP 组合物时,预计可相应地调整剂量和给药方式。因此,在另一可替代的实施方式中,所述方法包括:按照拟定方案制备 RSP 组合物;配制包含 RSP 组合物的组合物;通过检测功能性读出的水平或程度确定所述组合物中 RSP 组合物的生物可利用量;对这种读出与标准读出进行比较;及调整所述拟定方案或组合物配方,以获得所需生物利用度。

#### [0141] 治疗剂的组织特异性靶向

[0142] RSP 组合物与血清蛋白之间的关系的一种潜在用途是治疗剂的组织特异性靶向。在一种实施方式中,靶向治疗对象靶组织的治疗剂的制备方法可包括:提供 RSP 组合物(例如包含 YEAK 或 YFAK 肽);和将治疗剂与 RSP 组合物偶联,形成偶联药物。

[0143] 因此,本发明一些实施方式是通过分离标记肽将治疗剂递送到治疗对象特定组织的方法,该方法包括:使 RSP 组合物(例如包含 YEAK 或 YFAK 肽)与组织特异性肽(例如包括选自  $\alpha$ -1-抗胰蛋白酶、载脂蛋白 A-I、 $\alpha$ -1-B-糖蛋白、载脂蛋白 A-IV、载脂蛋白 D 和前白蛋白的肽)接触;分离混合物中与该组织特异性肽结合的肽;将该标记肽与治疗剂偶联;和将该偶联药物给予治疗对象。

[0144] 本发明的其他实施方式,包括含有偶联于标记肽的治疗剂的偶联物的制备方法,及所得的偶联物本身。本说明书预期的这种标记肽可以是例如 YEAK 或 YFAK 肽。根据对  $\alpha$ -1-抗胰蛋白酶、载脂蛋白 A-I、 $\alpha$ -1-B-糖蛋白、载脂蛋白 A-IV、载脂蛋白 D 和前白蛋白的结合亲和力,从 RSP 组合物中可分离得到这样的肽。

[0145] 治疗剂可以是有机小分子或生物大分子,特定组织可以是脑、肺或肝组织。此种标记肽可包括 YEAK 或 YFAK 肽。标记肽与治疗剂的偶联可通过共价键、包络物、离子键或氢键。可用于实施本发明的治疗剂的例子是抗肿瘤药物(包括抗代谢物)、细胞因子和生长因子抑制剂、激酶抑制剂、血管生成抑制剂、消炎剂、疾病特异性抗体、疫苗和抗生素。

[0146] 本说明书采用的标准免疫学、生物化学和分子生物学方法是本领域已知的。例如,标准方法的示范例子可见于 John Wiley 和 Sons 出版的“当代方案”系列丛书及迄今的所有更新版,此丛书包括分子生物学、免疫学、细胞生物学、蛋白质化学、药理学和其他科学的当代方案。本说明书引用的所有参考文献、专利和专利申请全部纳入本说明书作为参考。

## 实施例

[0147] 实施例 1. 检测正常人血清中的 PI-2301 和 Cop-1

[0148] 制备浓度 500ng/mL 的 RSP 组合物 PI-2301(YFAK) 或 Cop-1(YEAK),用含 5% 正常人血清的 PBS 稀释为 100ng/mL、50ng/mL、25ng/mL 或 12.5ng/mL,加入正常人血清中。通过加入兔抗-YFAK 或兔抗-YEAK 抗体,检测正常人血清中所含有的 RSP 组合物与血清蛋白的结合。

[0149] 于室温下,用 PBS/0.1%吐温封闭未包被的 ELISA 平板 2 小时。用含 5% 正常人血清的 PBS 作 PI-2301 或 Cop-1 样品的系列稀释,加入已封闭和洗涤的 ELISA 平板孔中。使正常人血清中的 PI-2301 或 Cop-1 与平板结合,用 PBS/0.05%吐温 20 洗涤除去未结合的 PI-2301 或 Cop-1。根据滴定度将用 A 蛋白纯化的兔抗-YFAK 或兔抗-YEAK 抗体稀释到合适的浓度,加入平板室温反应 1 小时。经另一洗涤步骤除去未结合的兔抗 PI-2301 或兔抗-Cop-1 抗体后,在孔中加入第二抗体:山羊抗兔 IgG-HRP(辣根过氧化物酶偶联的抗兔 IgG 抗体)。洗涤除去任何未结合的第二抗体后,在孔中加入 HRP 的底物液,培育 15 分钟,加入终止液时产生兰色进而变成黄色时,显色的强度与孔中 PI-2301 或 Cop-1 的含量相关。用 ELISA 平板读数仪检测 450nm 光密度,分别产生加入标准 PI-2301 或 Cop-1 的每组血清样品的滴定曲线。血清 PI-2301 或血清 Cop-1 浓度检测的极限定义为导致 A450nm 吸光度高于背景三倍时的浓度。将用于检测背景的 ELISA 平板孔按如上所述进行处理,除了省略 RSP 组合物中的肽外。

[0150] 将结果绘成图 2。X-轴为 RSP 组合物的浓度。Y 轴显示 HRP 偶联第二抗体的 A450 比色吸光度。在 RSP 组合物浓度较高时,用抗 PI-2301 或抗 Cop-1 抗体测得偶联物(浓度)高于较低浓度的 RSP 组合物。在病人中 12.5ng/mL 浓度对应于大约 2mg 剂量。

#### [0151] 实施例 2. 在柱上捕获复合体

[0152] 制备固定的 RSP 组合物的方法是,用溴化氰法使 RSP 组合物中的肽与溴化氰活化的琼脂糖珠 Sepharose® (用于固定含伯胺配体(蛋白质、肽、核酸)的预先活化的大孔层析介质)进行反应。简言之,称取所需量的冻干 CNBr-Sepharose® 凝胶珠,用冷的 1M HCl (每 g 冻干 Sepharose 珠用大约 200mL 1M HCl) 洗涤 15 分钟 10 次,然后用偶联缓冲液洗 2 次。将配体溶于偶联缓冲液中至所需浓度,以 1 : 2 比例与 CNBr-Sepharose® 凝胶珠混和(1 体积配体与 2 体积洗过的 CNBr-Sepharose® 凝胶珠),然后在摇动平台上 4°C 培育过夜。封闭凝胶上的残留活性位点,洗涤除去过量的配体。为纯化配体特异性蛋白,用磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤偶联的凝胶后,以 1 : 2 比例(1 体积试剂与 2 体积洗过的 CNBr-Sepharose® 凝胶珠)加入所需的试剂(血清、细胞上清液),在摇动平台上 4°C 培育过夜。将凝胶/试剂浆液填充入一次性使用的柱子中,洗涤除去未结合配体,然后用低 pH 缓冲液洗脱得到配体特异性蛋白质。将 pH 调到中性后,读取洗脱流份的 280nm 吸光度以鉴定含配体的流份。洗涤该柱子后 4°C 贮藏供重复使用。

#### [0153] 实施例 3. 结合于 PI-2301 或 Cop-1 的蛋白质的鉴定

[0154] 用实施例 1 或实施例 2 的方法获得含 PI-2301 结合蛋白或 Cop-1 结合蛋白的样品。用酶消化这些样品后作液相色谱串联质谱(LC-MS/MS)分析,目的是鉴定结合 PI-2301 或 Cop-1 的蛋白质。简言之,用序列特异性蛋白酶胰蛋白酶消化一等份的各样品。消化后用 LC-MS/MS 分析蛋白肽混合物。根据分析柱中相对于释放相的滞留然后在质谱仪中雾化,分离这些肽。雾化过程中,肽获得 +2 或 +3 电荷,质谱仪监测质量充电比率。如果某肽有显著的质量充电比率,然后使之与气体碰撞而分裂成片段并记录该片的模式。可将这些片段模式与所有已知蛋白的理论片段模式作比较。此实验片段模式与理论片段模式的比较导致从 HDL 和 LDL 复合体中鉴定到几种脂蛋白。在 PI-2301 样品和 Cop-1 样品中均发现有这些脂蛋白。Cop-1 样品中还有一些独特的蛋白,包括补体蛋白如 C3 和 C4A。

[0155] 图 3 概括了用对 PI-2301 或 Cop-1 的结合鉴定的正常小鼠血清或正常人血清中的血清蛋白。PI-2301 可以是乙酰化或非乙酰化蛋白质。获得样品蛋白质的方法与实施例 1 相似,其中将 RSP 组合物的肽混合,使之结合血清中的组分。用抗 -YFAK 或抗 -YEAKE 抗体识别 PI-2301 或 Cop-1 的结合复合体,并用第二抗体和检测试剂进行检测。将血清蛋白质从复合体上洗脱并加以鉴定。根据检测试剂的 A450nm 吸光度对蛋白质进行评分。与背景吸光度相比,70 分对应的 p 值 < 0.001,被认为具有统计学显著意义。

#### [0156] 实施例 4. 比较不同长度和不同批次 RSP 组合物的肽组成

[0157] 合成不同的 DSP 组合物(例如用固相合成或液相合成法)后,可检测用相同制备方法制得的各批次和用不同方法制得的各批次,并用生物测定法比较它们的变化,如用单核细胞系 RAW264.7 释放 CCL22 试验、活体外细胞增殖试验、检测血清蛋白与 RSP 组合物所含肽的结合,可以确定在任何特定处理或批次中存在的肽亚组或甚至各别的肽。比较 RSP 组合物的制备方法和批次,以确定不同方法和批次之间同一肽亚组和/或肽的类型是否相一致。

[0158] 通过将所选的纯化血清蛋白固定在固体支持物上,制备几种鉴定用树脂。对于分析 Cop-1 或 PI-2301,所用的血清蛋白可以是实施例 1 中所鉴定的那些分别结合 Cop-1 或 PI-2301 的蛋白中的一种或几种(见图 3)。经鉴定能结合 Cop-1 或 PI-2301 的其他合适蛋白质也可使用。每种固相支持物含至少一种血清蛋白。如果有一种以上的血清蛋白结合于固相支持物,则各鉴定树脂之间结合于给定固相支持物的各血清蛋白的比率将是一致的。在允许 Cop-1 或 PI-2301 肽的一个亚组结合于血清蛋白的条件下,取各批 Cop-1 或 PI-2301 一等份加入其各自固相支持物中。洗涤除去未结合肽后,洗脱得到结合的肽。对这样分离得到的 Cop-1 肽进一步作特性分析:(1) 是否存在独特的 Cop-1 肽,(2) 各肽之间的相互比例,(3) 能结合血清结合蛋白的肽占整个 RSP 组合物的比例,(4) 是否存在结合基序和结合肽序列,(5) 氨基酸组成和各氨基酸的比例,和 / 或其他肽的特性。互相比对每批分离得到的 Cop-1 肽的特性。

[0001]

## 序列表

&lt;110&gt; 阿雷斯贸易股份有限公司 (Ares Trading S.A.)

&lt;120&gt; 通过对随机序列聚合物的组合物基于血清蛋白的检测, 改进含随机序列聚合物的组合物的设计、生物利用度和效能的方法

&lt;130&gt; 122386 1PWCN

&lt;140&gt; 201080052757.5

&lt;141&gt; 2010-11-17

&lt;150&gt; US 61/281,470

&lt;151&gt; 2009-11-17

&lt;150&gt; US 61/386,909

&lt;151&gt; 2010-09-27

&lt;160&gt; 6

&lt;170&gt; PatentIn version 3.5

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 418

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人(Homo sapiens)

&lt;400&gt; 1

Met Pro Ser Ser Val Ser Trp Gly Ile Leu Leu Leu Ala Gly Leu Cys  
1 5 10 15Cys Leu Val Pro Val Ser Leu Ala Glu Asp Pro Gln Gly Asp Ala Ala  
20 25 30Gln Lys Thr Asp Thr Ser His His Asp Gln Asp His Pro Thr Phe Asn  
35 40 45Lys Ile Thr Pro Asn Leu Ala Glu Phe Ala Phe Ser Leu Tyr Arg Gln  
50 55 60Leu Ala His Gln Ser Asn Ser Thr Asn Ile Phe Phe Ser Pro Val Ser  
65 70 75 80Ile Ala Thr Ala Phe Ala Met Leu Ser Leu Gly Thr Lys Ala Asp Thr  
85 90 95His Asp Glu Ile Leu Glu Gly Leu Asn Phe Asn Leu Thr Glu Ile Pro  
100 105 110Glu Ala Gln Ile His Glu Gly Phe Gln Glu Leu Leu Arg Thr Leu Asn  
115 120 125

Gln Pro Asp Ser Gln Leu Gln Leu Thr Thr Gly Asn Gly Leu Phe Leu



Pro Pro Glu Val Lys Phe Asn Lys Pro Phe Val Phe Leu Met Ile Glu  
385 390 395 400

Gln Asn Thr Lys Ser Pro Leu Phe Met Gly Lys Val Val Asn Pro Thr  
405 410 415

Gln Lys

<210> 2

<211> 267

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 2

Met Lys Ala Ala Val Leu Thr Leu Ala Val Leu Phe Leu Thr Gly Ser  
1 5 10 15

Gln Ala Arg His Phe Trp Gln Gln Asp Glu Pro Pro Gln Ser Pro Trp  
20 25 30

Asp Arg Val Lys Asp Leu Ala Thr Val Tyr Val Asp Val Leu Lys Asp  
35 40 45

Ser Gly Arg Asp Tyr Val Ser Gln Phe Glu Gly Ser Ala Leu Gly Lys  
50 55 60

Gln Leu Asn Leu Lys Leu Leu Asp Asn Trp Asp Ser Val Thr Ser Thr  
65 70 75 80

Phe Ser Lys Leu Arg Glu Gln Leu Gly Pro Val Thr Gln Glu Phe Trp  
85 90 95

Asp Asn Leu Glu Lys Glu Thr Glu Gly Leu Arg Gln Glu Met Ser Lys  
100 105 110

Asp Leu Glu Glu Val Lys Ala Lys Val Gln Pro Tyr Leu Asp Asp Phe  
115 120 125

Gln Lys Lys Trp Gln Glu Glu Met Glu Leu Tyr Arg Gln Lys Val Glu  
130 135 140

Pro Leu Arg Ala Glu Leu Gln Glu Gly Ala Arg Gln Lys Leu His Glu  
145 150 155 160

Leu Gln Glu Lys Leu Ser Pro Leu Gly Glu Glu Met Arg Asp Arg Ala  
165 170 175

[0004]

Arg Ala His Val Asp Ala Leu Arg Thr His Leu Ala Pro Tyr Ser Asp  
180 185 190

Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala Ala Arg Leu Glu Ala Leu Lys Glu Asn  
195 200 205

Gly Gly Ala Arg Leu Ala Glu Tyr His Ala Lys Ala Thr Glu His Leu  
210 215 220

Ser Thr Leu Ser Glu Lys Ala Lys Pro Ala Leu Glu Asp Leu Arg Gln  
225 230 235 240

Gly Leu Leu Pro Val Leu Glu Ser Phe Lys Val Ser Phe Leu Ser Ala  
245 250 255

Leu Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Leu Asn Thr Gln  
260 265

<210> 3  
<211> 474  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 3

Ala Ile Phe Tyr Glu Thr Gln Pro Ser Leu Trp Ala Glu Ser Glu Ser  
1 5 10 15

Leu Leu Lys Pro Leu Ala Asn Val Thr Leu Thr Cys Gln Ala Arg Leu  
20 25 30

Glu Thr Pro Asp Phe Gln Leu Phe Lys Asn Gly Val Ala Gln Glu Pro  
35 40 45

Val His Leu Asp Ser Pro Ala Ile Lys His Gln Phe Leu Leu Thr Gly  
50 55 60

Asp Thr Gln Gly Arg Tyr Arg Cys Arg Ser Gly Leu Ser Thr Gly Trp  
65 70 75 80

Thr Gln Leu Ser Lys Leu Leu Glu Leu Thr Gly Pro Lys Ser Leu Pro  
85 90 95

Ala Pro Trp Leu Ser Met Ala Pro Val Ser Trp Ile Thr Pro Gly Leu  
100 105 110

Lys Thr Thr Ala Val Cys Arg Gly Val Leu Arg Gly Val Thr Phe Leu

[0005]

115	120	125
Leu Arg Arg Glu Gly Asp His Glu Phe Leu Glu Val Pro Glu Ala Gln 130	135	140
Glu Asp Val Glu Ala Thr Phe Pro Val His Gln Pro Gly Asn Tyr Ser 145	150	155
Cys Ser Tyr Arg Thr Asp Gly Glu Gly Ala Leu Ser Glu Pro Ser Ala 165	170	175
Thr Val Thr Ile Glu Glu Leu Ala Ala Pro Pro Pro Pro Val Leu Met 180	185	190
His His Gly Glu Ser Ser Gln Val Leu His Pro Gly Asn Lys Val Thr 195	200	205
Leu Thr Cys Val Ala Pro Leu Ser Gly Val Asp Phe Gln Leu Arg Arg 210	215	220
Gly Glu Lys Glu Leu Leu Val Pro Arg Ser Ser Thr Ser Pro Asp Arg 225	230	235
Ile Phe Phe His Leu Asn Ala Val Ala Leu Gly Asp Gly Gly His Tyr 245	250	255
Thr Cys Arg Tyr Arg Leu His Asp Asn Gln Asn Gly Trp Ser Gly Asp 260	265	270
Ser Ala Pro Val Glu Leu Ile Leu Ser Asp Glu Thr Leu Pro Ala Pro 275	280	285
Glu Phe Ser Pro Glu Pro Glu Ser Gly Arg Ala Leu Arg Leu Arg Cys 290	295	300
Leu Ala Pro Leu Glu Gly Ala Arg Phe Ala Leu Val Arg Glu Asp Arg 305	310	315
Gly Gly Arg Arg Val His Arg Phe Gln Ser Pro Ala Gly Thr Glu Ala 325	330	335
Leu Phe Glu Leu His Asn Ile Ser Val Ala Asp Ser Ala Asn Tyr Ser 340	345	350
Cys Val Tyr Val Asp Leu Lys Pro Pro Phe Gly Gly Ser Ala Pro Ser 355	360	365

[0006]

Glu Arg Leu Glu Leu His Val Asp Gly Pro Pro Pro Arg Pro Gln Leu  
370 375 380

Arg Ala Thr Trp Ser Gly Ala Val Leu Ala Gly Arg Asp Ala Val Leu  
385 390 395 400

Arg Cys Glu Gly Pro Ile Pro Asp Val Thr Phe Glu Leu Leu Arg Glu  
405 410 415

Gly Glu Thr Lys Ala Val Lys Thr Val Arg Thr Pro Gly Ala Ala Ala  
420 425 430

Asn Leu Glu Leu Ile Phe Val Gly Pro Gln His Ala Gly Asn Tyr Arg  
435 440 445

Cys Arg Tyr Arg Ser Trp Val Pro His Thr Phe Glu Ser Glu Leu Ser  
450 455 460

Asp Pro Val Glu Leu Leu Val Ala Glu Ser  
465 470

<210> 4  
<211> 396  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 4

Met Phe Leu Lys Ala Val Val Leu Thr Leu Ala Leu Val Ala Val Ala  
1 5 10 15

Gly Ala Arg Ala Glu Val Ser Ala Asp Gln Val Ala Thr Val Met Trp  
20 25 30

Asp Tyr Phe Ser Gln Leu Ser Asn Asn Ala Lys Glu Ala Val Glu His  
35 40 45

Leu Gln Lys Ser Glu Leu Thr Gln Gln Leu Asn Ala Leu Phe Gln Asp  
50 55 60

Lys Leu Gly Glu Val Asn Thr Tyr Ala Gly Asp Leu Gln Lys Lys Leu  
65 70 75 80

Val Pro Phe Ala Thr Glu Leu His Glu Arg Leu Ala Lys Asp Ser Glu  
85 90 95

Lys Leu Lys Glu Glu Ile Gly Lys Glu Leu Glu Glu Leu Arg Ala Arg  
100 105 110

[0007]

Leu Leu Pro His Ala Asn Glu Val Ser Gln Lys Ile Gly Asp Asn Leu  
 115 120 125

Arg Glu Leu Gln Gln Arg Leu Glu Pro Tyr Ala Asp Gln Leu Arg Thr  
 130 135 140

Gln Val Asn Thr Gln Ala Glu Gln Leu Arg Arg Gln Leu Asp Pro Leu  
 145 150 155 160

Ala Gln Arg Met Glu Arg Val Leu Arg Glu Asn Ala Asp Ser Leu Gln  
 165 170 175

Ala Ser Leu Arg Pro His Ala Asp Glu Leu Lys Ala Lys Ile Asp Gln  
 180 185 190

Asn Val Glu Glu Leu Lys Gly Arg Leu Thr Pro Tyr Ala Asp Glu Phe  
 195 200 205

Lys Val Lys Ile Asp Gln Thr Val Glu Glu Leu Arg Arg Ser Leu Ala  
 210 215 220

Pro Tyr Ala Gln Asp Thr Gln Glu Lys Leu Asn His Gln Leu Glu Gly  
 225 230 235 240

Leu Thr Phe Gln Met Lys Lys Asn Ala Glu Glu Leu Lys Ala Arg Ile  
 245 250 255

Ser Ala Ser Ala Glu Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala Pro Leu Ala Glu  
 260 265 270

Asp Val Arg Gly Asn Leu Lys Gly Asn Thr Glu Gly Leu Gln Lys Ser  
 275 280 285

Leu Ala Glu Leu Gly Gly His Leu Asp Gln Gln Val Glu Glu Phe Arg  
 290 295 300

Arg Arg Val Glu Pro Tyr Gly Glu Asn Phe Asn Lys Ala Leu Val Gln  
 305 310 315 320

Gln Met Glu Gln Leu Arg Gln Lys Leu Gly Pro His Ala Gly Asp Val  
 325 330 335

Glu Gly His Leu Ser Phe Leu Glu Lys Asp Leu Arg Asp Lys Val Asn  
 340 345 350

[0008]

Ser Phe Phe Ser Thr Phe Lys Glu Lys Glu Ser Gln Asp Lys Thr Leu  
 355 360 365

Ser Leu Pro Glu Leu Glu Gln Gln Gln Glu Gln Gln Gln Glu Gln Gln  
 370 375 380

Gln Glu Gln Val Gln Met Leu Ala Pro Leu Glu Ser  
 385 390 395

<210> 5  
 <211> 98  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 5

Gly Glu Ala Thr Pro Val Asn Leu Thr Glu Pro Ala Lys Leu Glu Val  
 1 5 10 15

Lys Phe Ser Trp Phe Met Pro Ser Ala Pro Tyr Trp Ile Leu Ala Thr  
 20 25 30

Asp Tyr Glu Asn Tyr Ala Leu Val Tyr Ser Cys Thr Cys Ile Ile Gln  
 35 40 45

Leu Phe His Val Asp Phe Ala Trp Ile Leu Ala Arg Asn Pro Asn Leu  
 50 55 60

Pro Pro Glu Thr Val Asp Ser Leu Lys Asn Ile Leu Thr Ser Asn Asn  
 65 70 75 80

Ile Asp Val Lys Lys Met Thr Val Thr Asp Gln Val Asn Cys Pro Lys  
 85 90 95

Leu Ser

<210> 6  
 <211> 147  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 6

Met Ala Ser His Arg Leu Leu Leu Leu Cys Leu Ala Gly Leu Val Phe  
 1 5 10 15

Val Ser Glu Ala Gly Pro Thr Gly Thr Gly Glu Ser Lys Cys Pro Leu  
 20 25 30

[0009]

Met Val Lys Val Leu Asp Ala Val Arg Gly Ser Pro Ala Ile Asn Val  
 35 40 45

Ala Met His Val Phe Arg Lys Ala Ala Asp Asp Thr Trp Glu Pro Phe  
 50 55 60

Ala Ser Gly Lys Thr Ser Glu Ser Gly Glu Leu His Gly Leu Thr Thr  
 65 70 75 80

Glu Glu Glu Phe Val Glu Gly Ile Tyr Lys Val Glu Ile Asp Thr Lys  
 85 90 95

Ser Tyr Trp Lys Ala Leu Gly Ile Ser Pro Phe His Glu His Ala Glu  
 100 105 110

Val Val Phe Thr Ala Asn Asp Ser Gly Pro Arg Arg Tyr Thr Ile Ala  
 115 120 125

Ala Leu Leu Ser Pro Tyr Ser Tyr Ser Thr Thr Ala Val Val Thr Asn  
 130 135 140

Pro Lys Glu  
 145

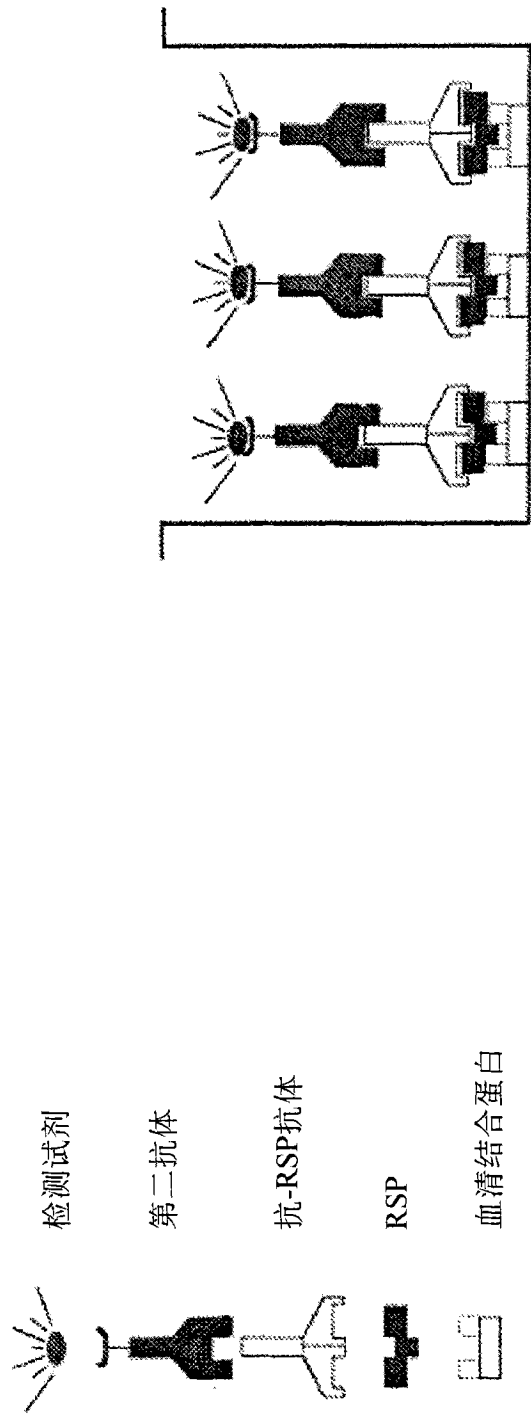


图 1

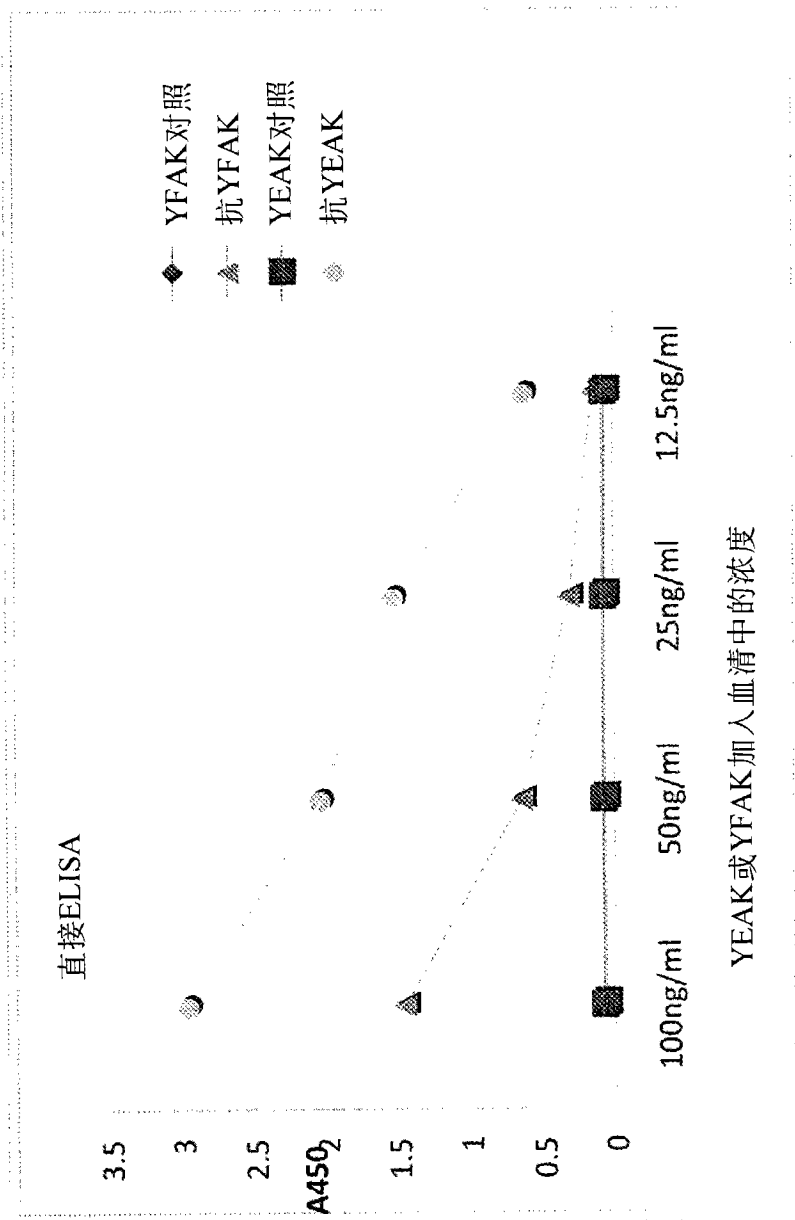


图 2

P1-2301 的U0517批次与正常小鼠血清		
蛋白质身份	NCBI基因座/登录号	蛋白评分 (三个显著性ID的平均值)
载脂蛋白A-1	Q9Z2L4	118
玻璃粘状蛋白	AAA40558	101
基膜聚糖	AAB35361	75

考帕松与正常小鼠血清		
蛋白质身份	NCBI基因座/登录号	蛋白评分 (三个显著性ID的平均值)
载脂蛋白A-1	Q9Z2L4	125
间- $\alpha$ -胰蛋白酶抑制剂重链H1	Q61702	109
补体组分3	NP_058690	97
间- $\alpha$ -胰蛋白酶抑制剂重链H2	Q61703	89
玻璃粘状蛋白	AAA40558	87

考帕松与正常人血清		
蛋白质身份	NCBI基因座/登录号	蛋白评分 (三个显著性ID的平均值)
补体组分C3	AAA85332	397
载脂蛋白A-1前原蛋白	AAA51747	279
载脂蛋白A-II前原蛋白 (载脂蛋白D)	NP_001634 (AAB32200)	208
补体组分C4A	AAA51855	193
胰蛋白酶抑制剂	CAA30160	183
间- $\alpha$ -胰蛋白酶抑制剂家族重链-相关蛋白 (IHRP)	BAA07602	175
$\alpha$ -1-B糖蛋白	OMHU1B	160
$\alpha$ -1-抗胰蛋白酶	AAA51546	156
载脂蛋白A-IV	AAA51744	147

图 3

考陶松与正常人血清		
血浆铜兰蛋白	AAA51975	142
未命名的蛋白产物 (BLAST检索其身份可能是IgM的重链)	CAA34971	134
载脂蛋白E	AAB59518	129
补体因子B	AAA16820	127
前白蛋白	BAA00059	120
IgM的C链	2RCJ C	105
免疫球蛋白λ轻链	CAA40939	104
凝血因子II (凝血酶)	3F68_H	103
Igκ轻链V-III (KAU冷凝集素)	A23746	97
载脂蛋白J前体	AAA51765	97
IgA1Bur	763134A	92
富含组氨酸的糖蛋白前体	NP_000403	91
α-2-HS糖蛋白	P02765	82
凝溶胶蛋白同工型前体	NP_000168	78
抑制剂Kunitz型蛋白酶	0511271A	74
未命名的蛋白产物 (BLAST检索身份是玻璃状粘蛋白)	CAA28659	72
IgJ-链	AAA58902	67

PI-2301的U0517批次与正常人血清		
蛋白质身份	NCBI基因座/登录号	蛋白评分 (三个显著性ID的平均值)
载脂蛋白A-I前原蛋白	AAA51747	495
前白蛋白	BAA00059	179
载脂蛋白A-IV	AAA51744	103
α-1-抗胰蛋白酶	AAA51546	102
载脂蛋白A-II前原蛋白 (载脂蛋白D)	NP_001634 (AAB32200)	84
载脂蛋白C-III	AAB59372	86
α-1-B-糖蛋白	OMHU1B	85

图3(续)

在马来乙酰化的P1-2301与正常人血清		
蛋白质身份	NCBI基因座/登录号	蛋白评分 (三个显著性ID的平均值)
载脂蛋白A-I前原蛋白	AAA51747	515
前白蛋白	BAA00059	170
载脂蛋白A-II前原蛋白(载脂蛋白D)	NP_001634 (AAB32200)	123
$\alpha$ -1-抗胰蛋白酶	AAA51546	128
载脂蛋白A-IV	AAA51744	143
载脂蛋白C-III	AAB59372	100
$\alpha$ 2-HS糖蛋白	BAA22651	88
$\alpha$ -1-B-糖蛋白	OMHU1B	79
载脂蛋白J前体	AAA51765	72

在马来未乙酰化的P1-2301与正常人血清		
蛋白质身份	NCBI基因座/登录号	蛋白评分 (三个显著性ID的平均值)
载脂蛋白A-I前原蛋白	AAA51747	471
$\alpha$ -1-抗胰蛋白酶	AAA51546	209
载脂蛋白A-IV	AAA51744	150
前白蛋白	BAA00059	177
载脂蛋白C-III	AAB59372	116
载脂蛋白A-II前原蛋白(载脂蛋白D)	NP_001634 (AAB32200)	122
$\alpha$ -1-B-糖蛋白	OMHU1B	84
$\alpha$ 2-HS糖蛋白	BAA22651	86

图 3(续)

YEAK在小鼠中的生物利用度

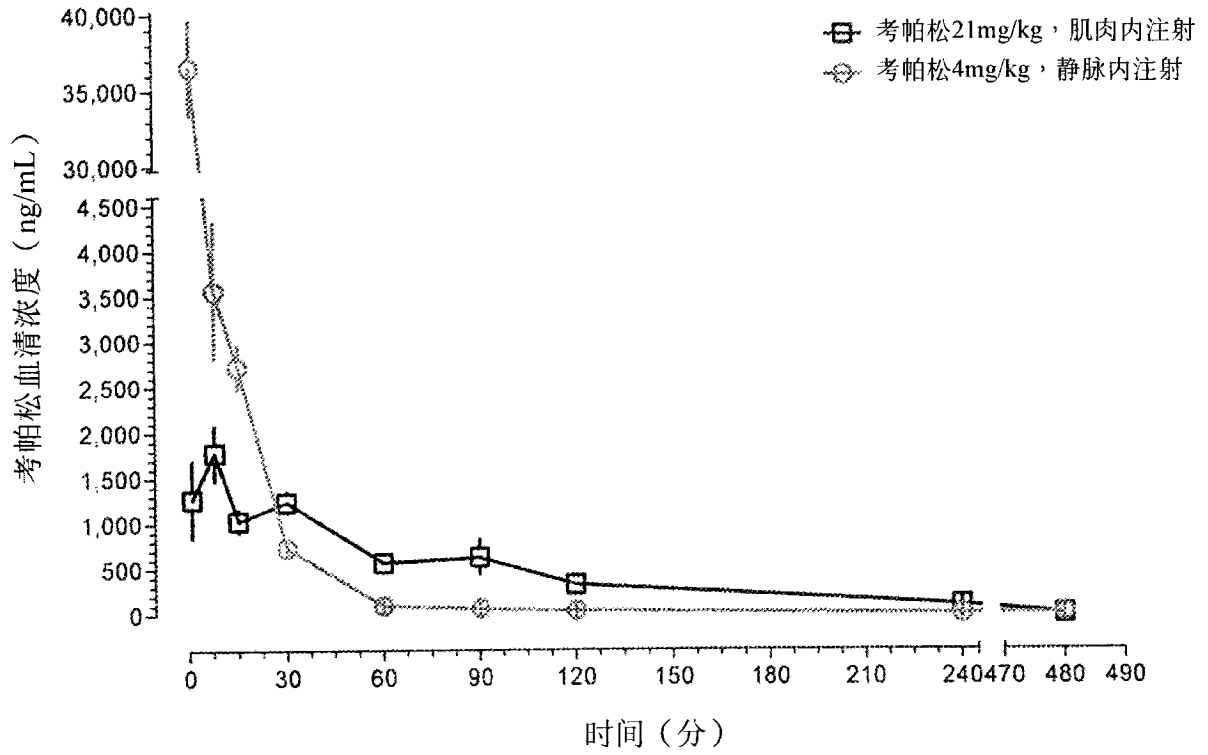


图 4

CCL22最高血浆浓度与小鼠皮下给予考帕松剂量之间的线性相关性

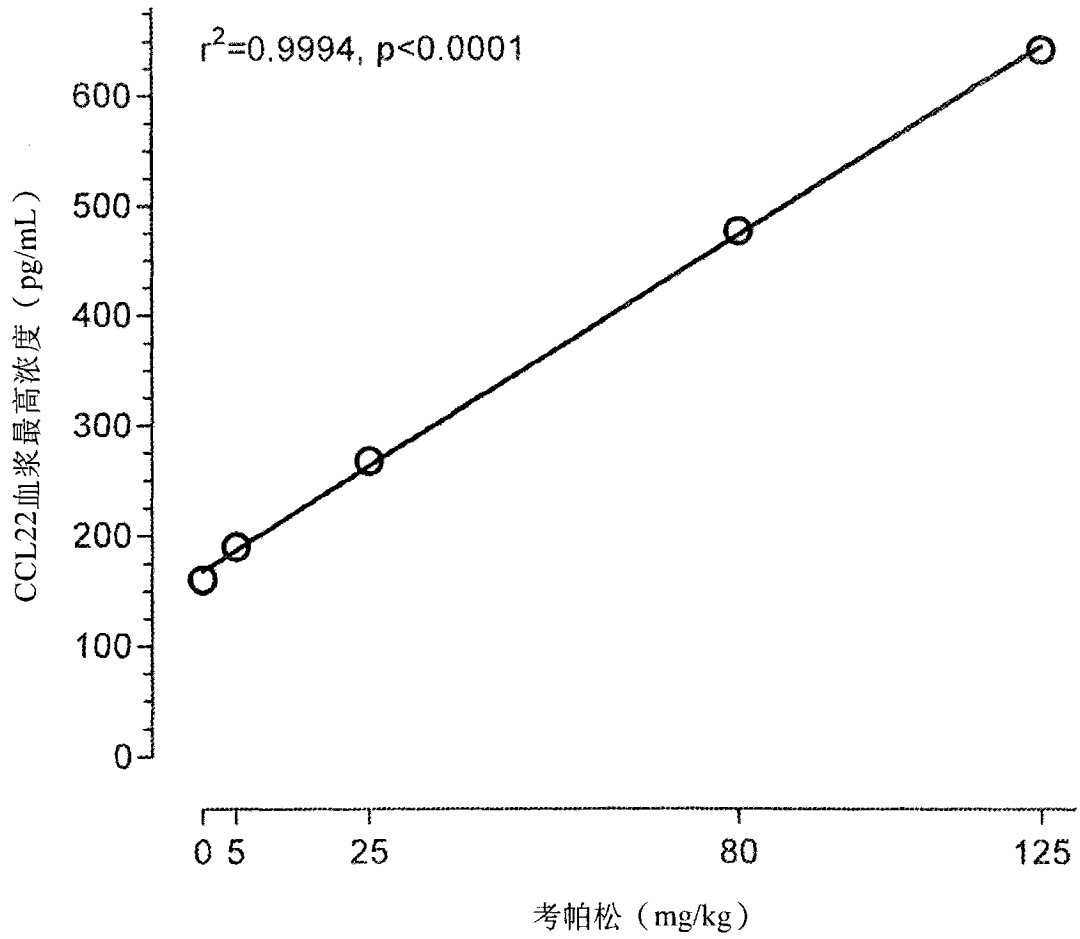


图 5

从固定在CNBr凝胶柱上YEAH片段洗脱得到的血清蛋白用LC-MS观察的肽图像

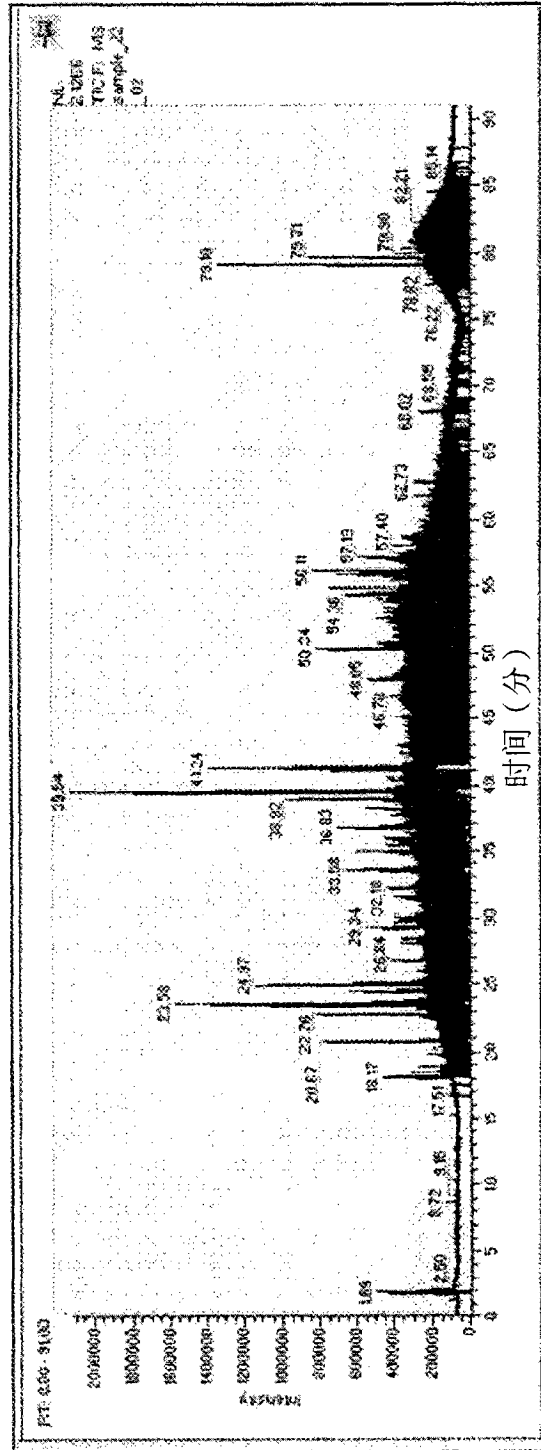


图 6

用新型ELISA和将乙酸格拉默加入男性血清、女性血清或男女混和血清中作出的标准曲线

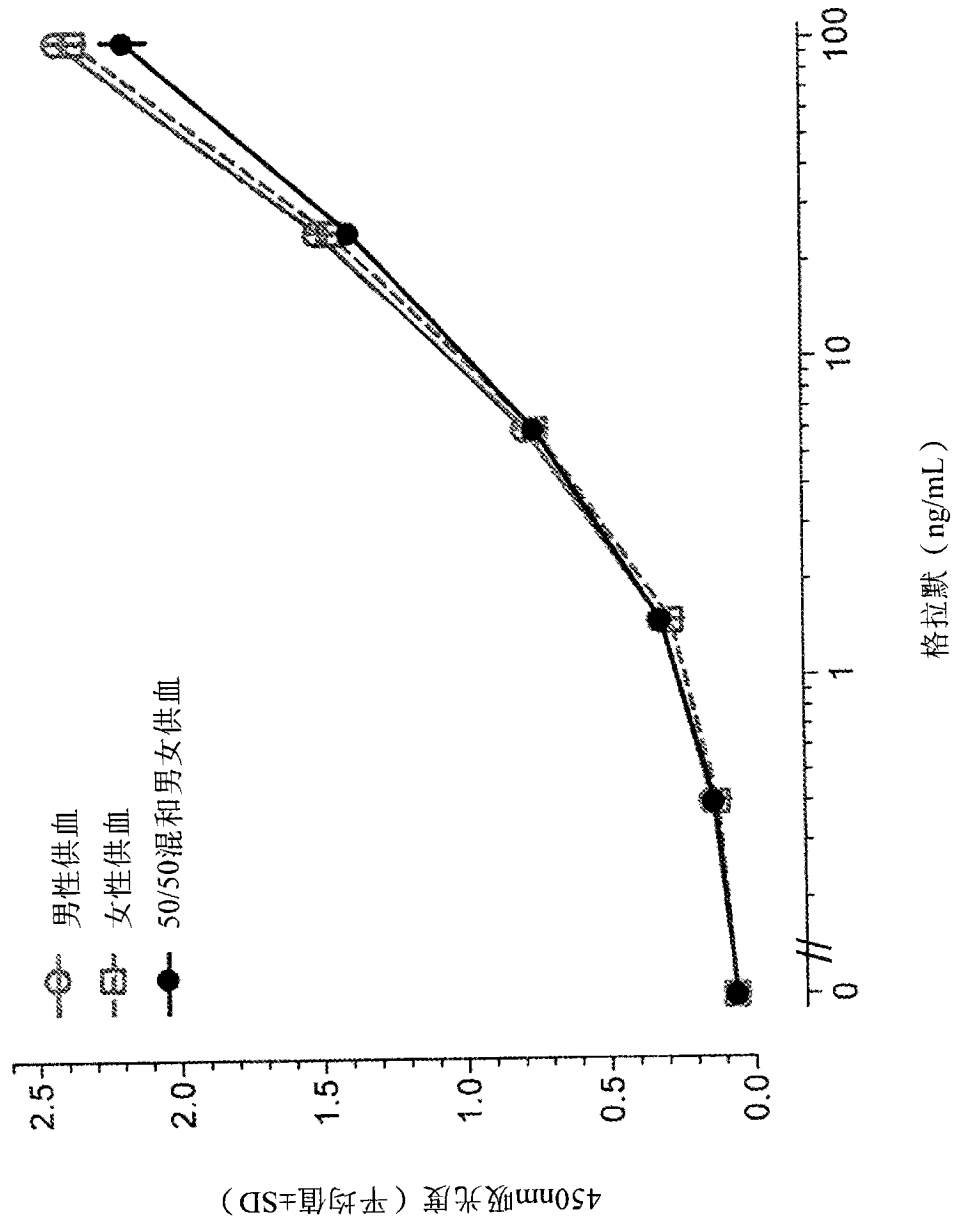


图 7

用SE-PHLC检测#P53218批次和#119142批次Copaxone®的情况

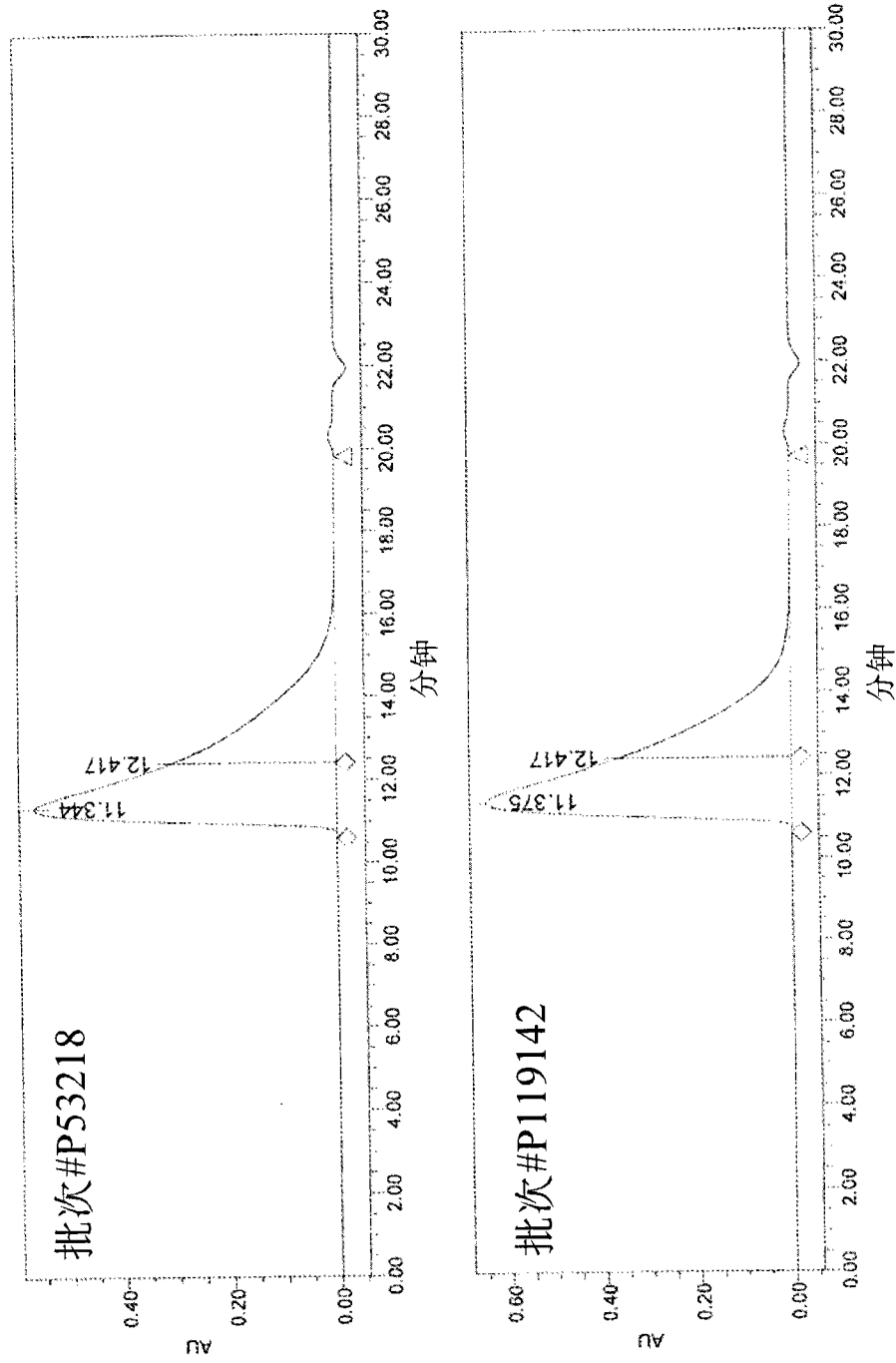


图 8

采用新型ELISA作出的标准曲线和#P53218批次与#119142批次Copaxone®的比较

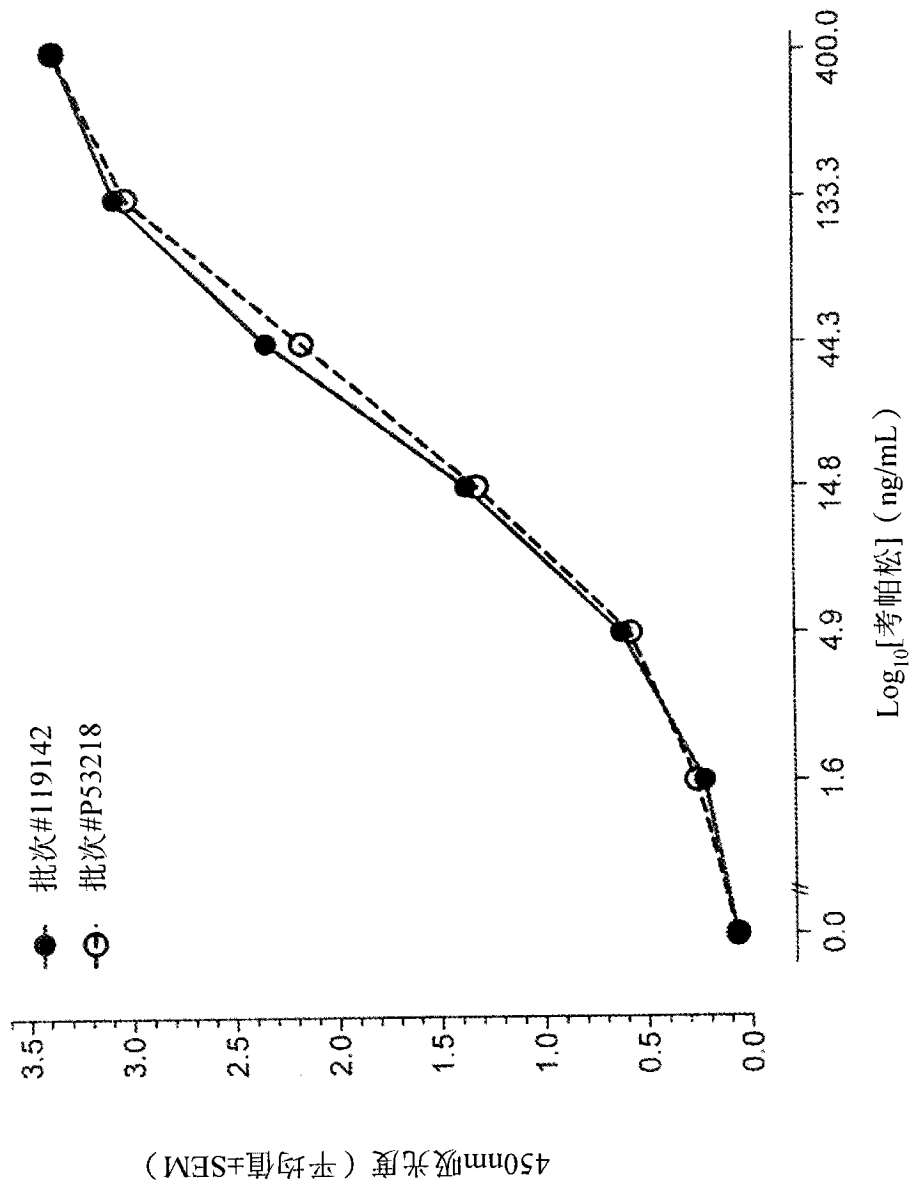


图 9

用批次#P53218和批次#119142 Copaxone®培养的单核细胞释放放入培养液中的CCL22

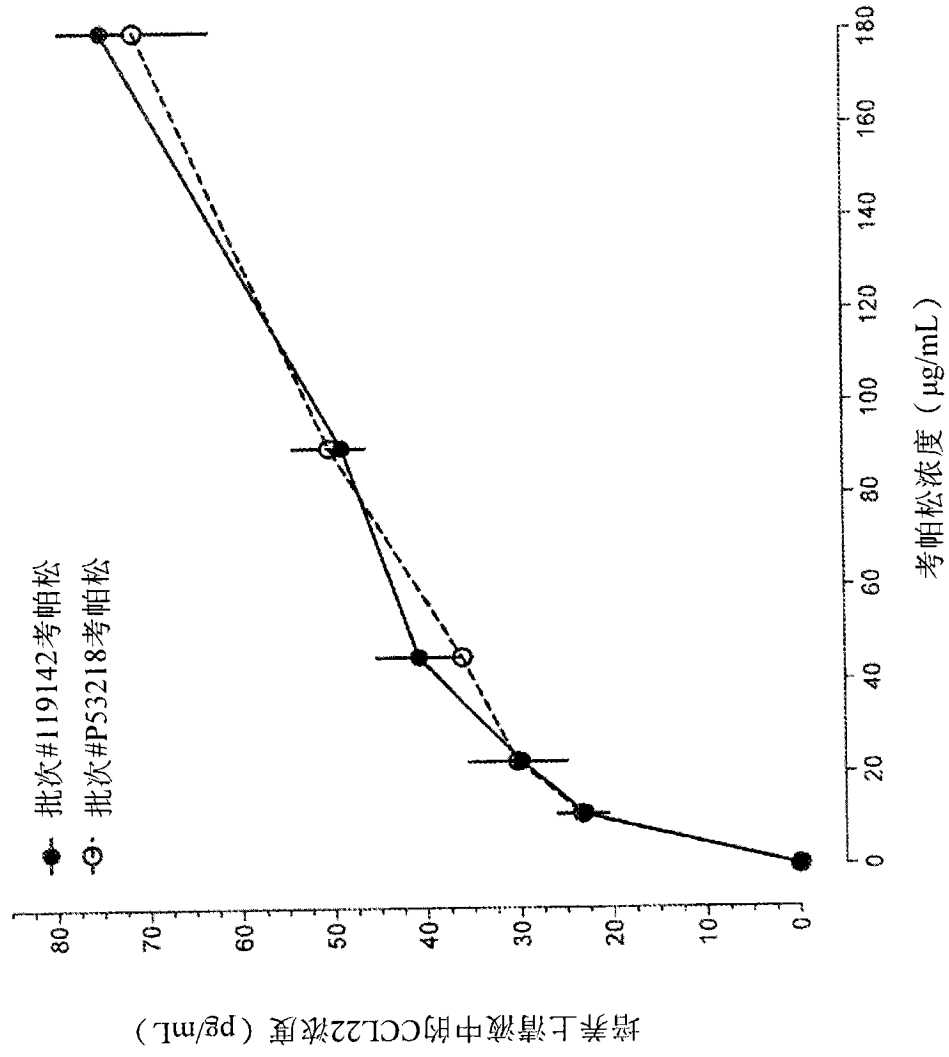


图 10

用固相肽合成法制备的YEAK共聚体的氨基酸长度与平均分子量之间的线性关系

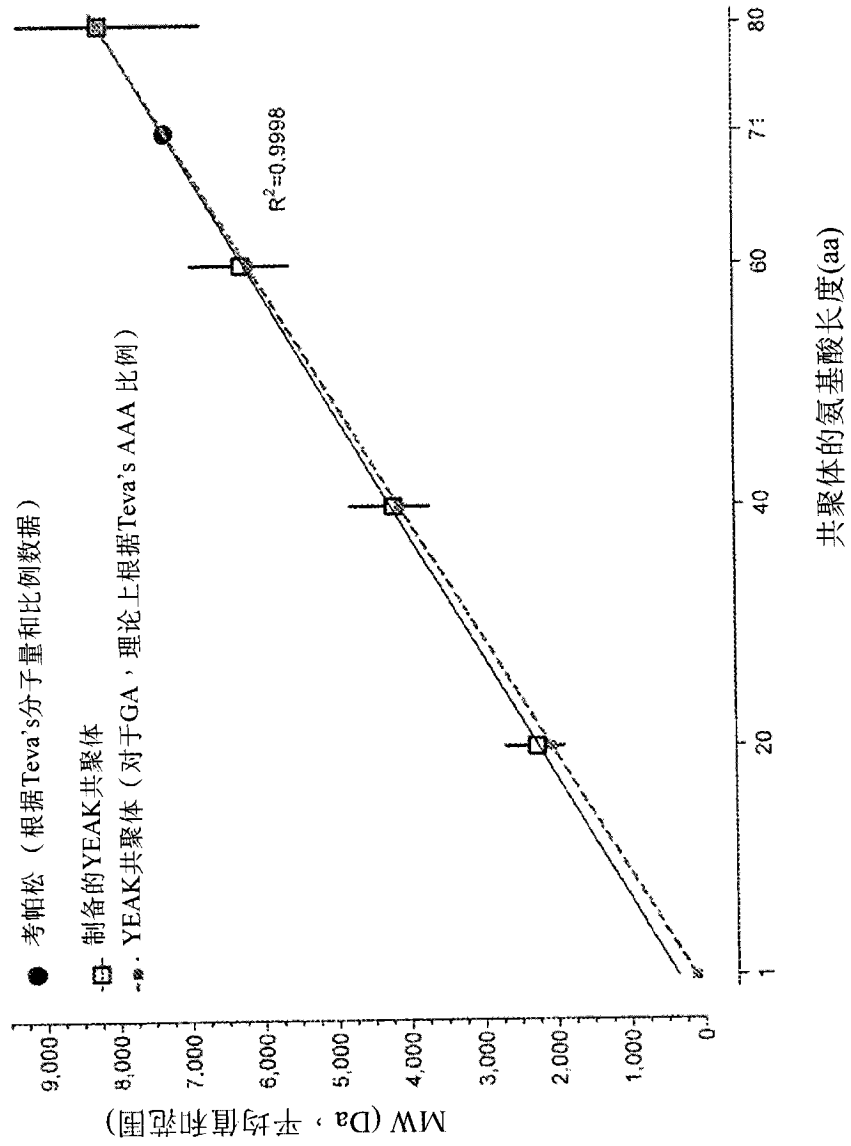
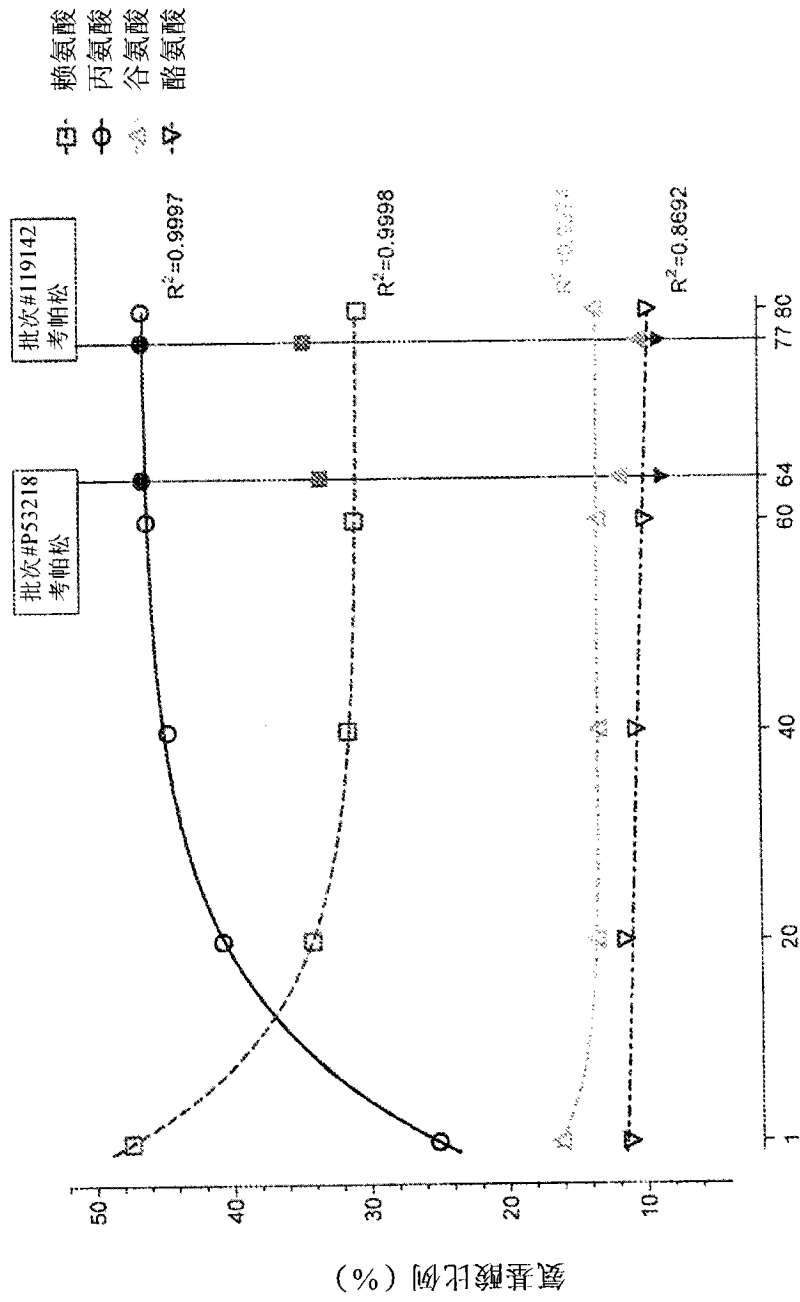


图 11

用固相肽合成法制备的YEAK共聚体的Y、E、A和K氨基酸的比例（按100个氨基酸标准化后）



根据氨基酸MALDI-TOF分析的共聚体氨基酸长度 (aa)

图 12

针对用固相肽合成法制备的YEAK氨基酸共聚体的兔抗GA  
多克隆抗血清免疫球蛋白片段的反应活性

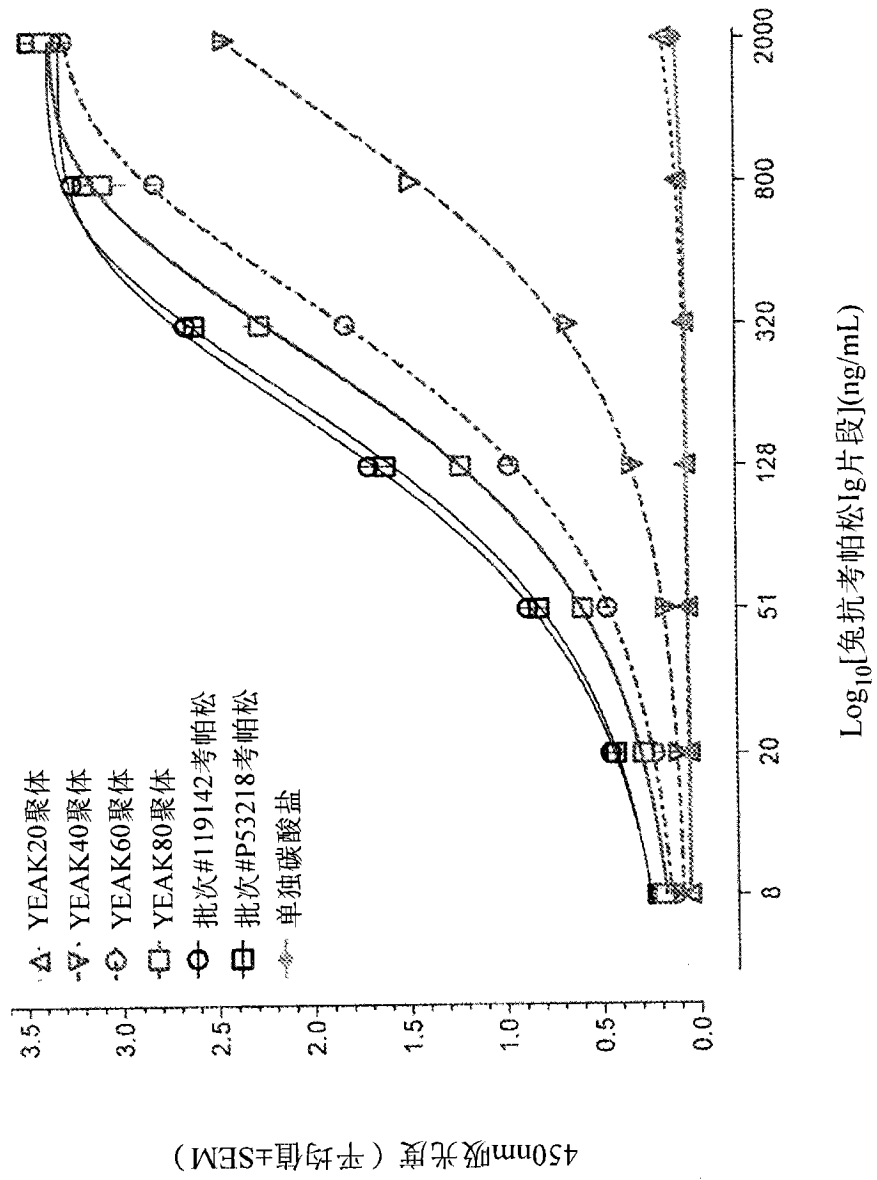
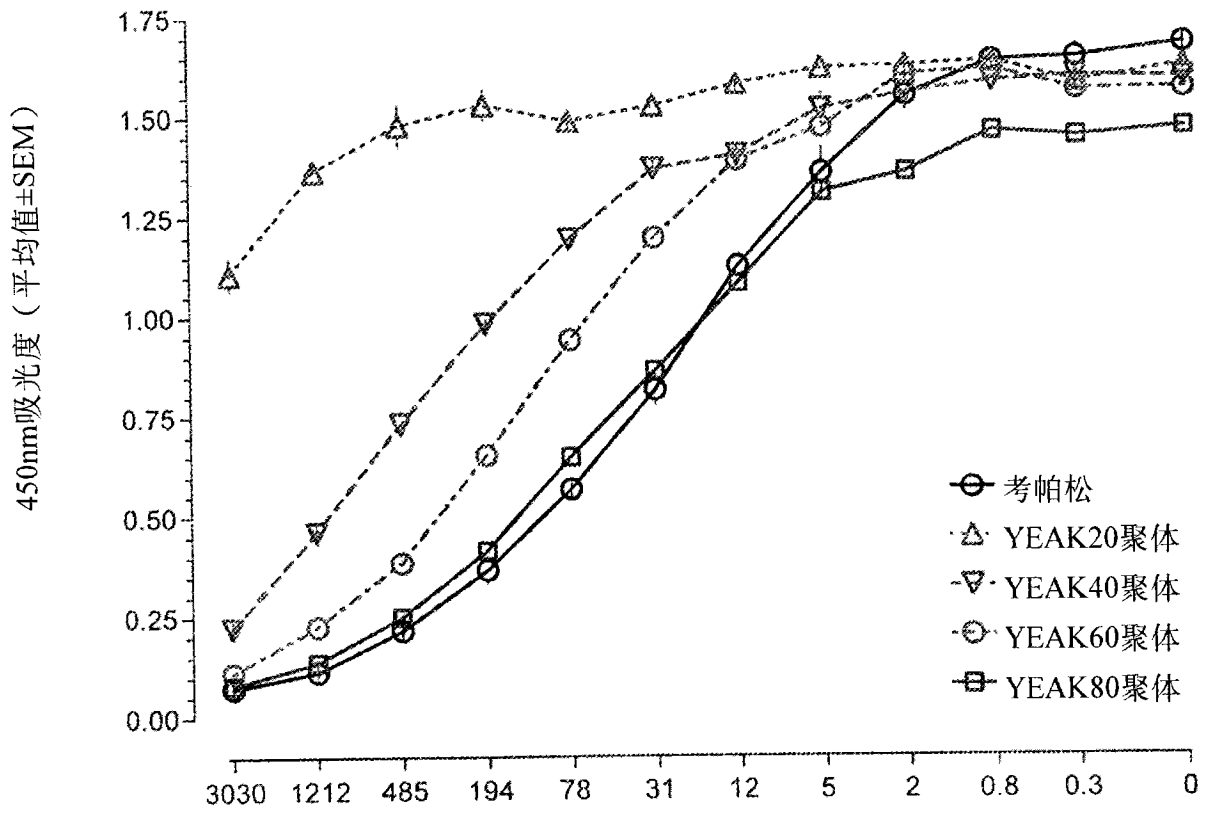


图 13

采用上述PK方法和YEAKE共聚体的标准曲线与考帕松比较



Log<sub>10</sub>[受试共聚体] (nM) 线与考帕松比较

图 14

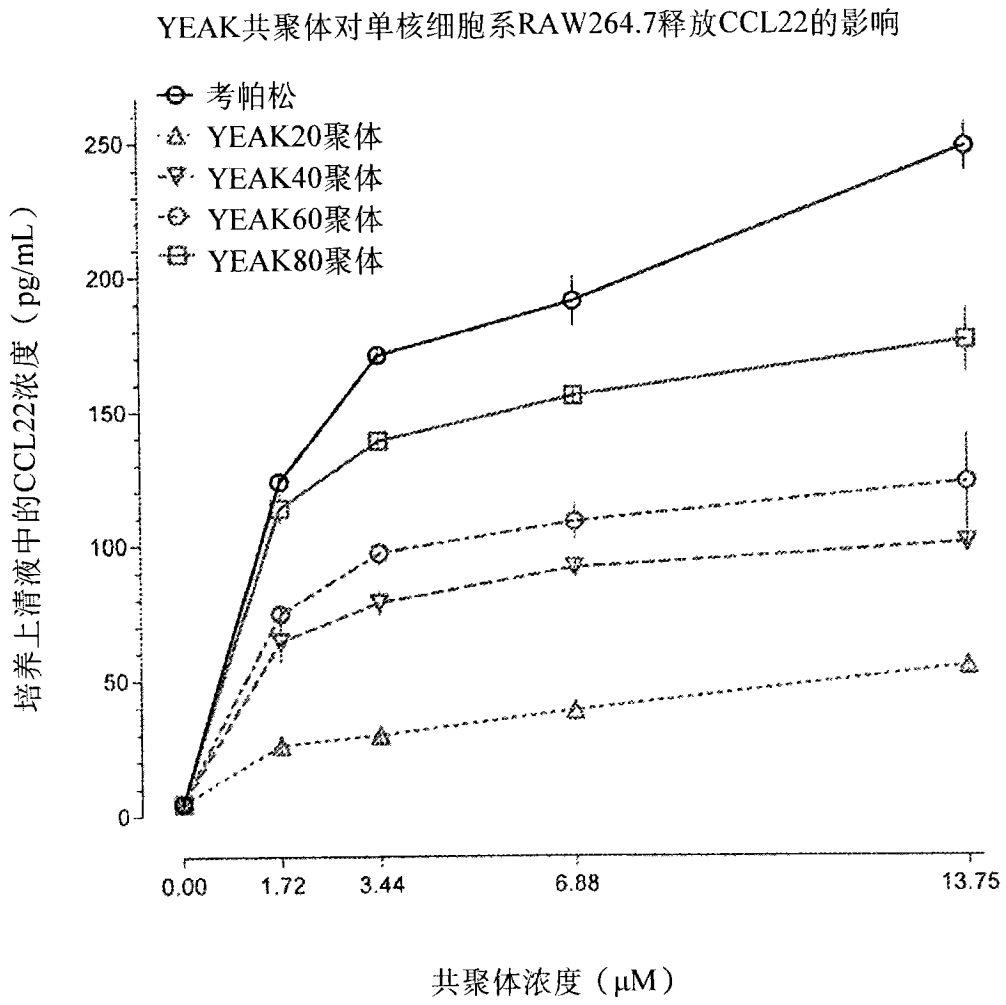


图 15

YEAK共聚体对小鼠脾细胞回忆应答的影响

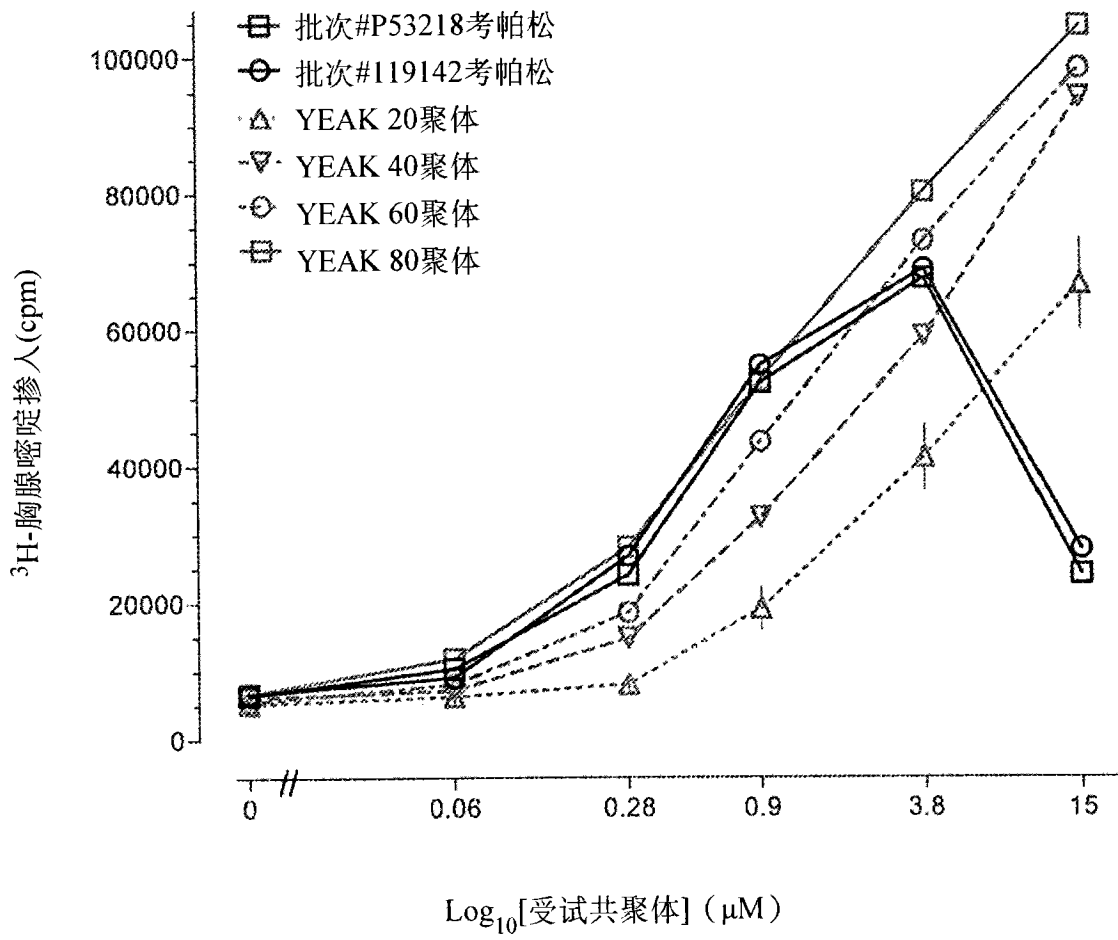


图 16

专利名称(译)	通过对随机序列聚合物的组合物基于血清蛋白的检测，改进含随机序列聚合物的组合物的设计、生物利用度和效能的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN102869989B</a>	公开(公告)日	2015-04-29
申请号	CN201080052757.5	申请日	2010-11-17
[标]申请(专利权)人(译)	阿雷斯贸易股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	阿雷斯贸易股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	阿雷斯贸易股份有限公司		
[标]发明人	E扎内利 J克里格 J康诺利 KH柯林斯		
发明人	E·扎内利 J·克里格 J·康诺利 K·H·柯林斯		
IPC分类号	G01N33/53 C07K4/00		
CPC分类号	A61P19/02 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/16 A61P25/28 A61P29/00 C07K1/00 C07K1/22 G01N33/68		
代理人(译)	余颖		
审查员(译)	段晓露		
优先权	61/281470 2009-11-17 US 61/386909 2010-09-27 US		
其他公开文献	CN102869989A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本领域已有检测简单肽的方法。然而，由于受检肽的异质性，检测一组肽混合物而非具有明确氨基酸序列的各别肽的有效血浆浓度的方法很复杂。本申请提供检测和评估随机序列聚合物(RSP)组合物的改进方法，检测和定量测定RSP组合物的方法，根据肽亚组与某些捕获多肽的相互作用确定和富集RSP组合中肽亚组的方法，和对需要的对象给予RSP组合物的方法，其中，剂量方案和用量可根据上述检测和定量方法加以确定和评估。

