

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102869990 A

(43) 申请公布日 2013. 01. 09

(21) 申请号 201080052758. X

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公
司 31100

(22) 申请日 2010. 11. 17

代理人 余颖

(30) 优先权数据

61/281, 470 2009. 11. 17 US

61/386, 909 2010. 09. 27 US

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006. 01)

C07K 4/00(2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 05. 16

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2010/057106 2010. 11. 17

(87) PCT申请的公布数据

W02011/063043 EN 2011. 05. 26

(71) 申请人 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

权利要求书 7 页 说明书 25 页

序列表 3 页 附图 18 页

(54) 发明名称

通过对定向序列聚合物的组合物进行基于血清蛋白的检测,改进含定向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,检测定向序列聚合物(DSP)有效血浆浓度的方法是复杂的,因为与具有明确氨基酸序列的各别肽相反,DSP是肽的复杂混合物。本申请提供检测和评估DSP组合物的改进方法,检测和定量测定DSP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DSP组合物中肽亚组的方法,和对需要的对象给予DSP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 DSP 组合物的方法,包括以下步骤:
 - a. 提供一种或多种捕获多肽的基本纯制剂;
 - b. 使一种或多种捕获多肽附着于定量检测 DSP 组合物的工具;和
 - c. 测定 DSP 组合物与一种或多种所述捕获多肽的结合。
2. 一种改进 DSP 组合物设计的方法,包括以下步骤:
 - a. 提供一种或多种捕获多肽的基本纯制剂;
 - b. 使一种或多种捕获多肽附着于定量检测 DSP 组合物的工具;
 - c. 测定 DSP 组合物与一种或多种所述捕获多肽的结合;
 - d. 调整所述 DSP 组合物的设计以增加或减少其与一种或多种捕获多肽的结合;
 - e. 重复步骤 (c);
 - f. 任选地重复步骤 (c-e),

其中调整所述 DSP 组合物的设计导致提高其生物利用度、减小毒性和提高效能中的一种或多种。

3. 一种检测 DSP 组合物中肽种类的方法,包括以下步骤:
 - a. 提供一种或多种捕获多肽的基本纯制剂;
 - b. 使一种或多种捕获多肽附着于固体支持物上;
 - c. 使所述固体支持物与 DSP 组合物接触;和
 - d. 测定所述 DSP 组合物中单个肽种类与固体支持物的结合。
4. 一种改进 DSP 组合物中肽种类设计的方法,包括以下步骤:
 - a. 提供一种或多种捕获多肽的基本纯制剂;
 - b. 使一种或多种捕获多肽附着于固体支持物上;
 - c. 使所述固体支持物与 DSP 组合物接触;
 - d. 测定所述 DSP 组合物中单个肽种类与固体支持物的结合;
 - e. 调整所述 DSP 组合物的设计以增加或减少所述 DSP 组合物与一种或多种捕获多肽的结合;
 - f. 重复步骤 (d);
 - g. 任选地重复步骤 (d-f),

其中调整所述 DSP 组合物的设计导致提高生物利用度、减小毒性和提高效能中的一种或多种。

5. 如权利要求 1-4 之一所述的方法,其中 (a) 所述一种或多种捕获多肽通过以下步骤进行鉴定:

- i. 使 DSP 组合物附着于固体支持物上;
 - ii. 使 (i) 中所述固体支持物与含蛋白质生物液体接触;
 - iii. 鉴定特异性结合于 (i) 所述固体支持物的 (ii) 中所述的蛋白质;
- 其中, (ii) 中所述的蛋白质是一种捕获多肽。

6. 如权利要求 1-5 之一所述的方法,其中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 (载脂蛋白 D), 补体组分 C4A, 胰蛋白酶抑制剂, 间- α -胰蛋白酶抑制剂家族重链相关蛋白 (IHRP)、 α -1-B-糖蛋白, α -1-抗胰蛋白酶, 载脂蛋白 A-IV, 血浆铜蓝蛋白, 未命名的蛋白产物 (NCBI 基因座/登录号 No. CAA34971), 载脂

蛋白 E, 补体因子 B, 前白蛋白, 载脂蛋白 C-III, α 2-HS 糖蛋白, 载脂蛋白 J 前体, C 链, IgM, 免疫球蛋白 λ 轻链, 凝血因子 II (凝血酶), IgK 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, α -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。

7. 一种测定 DSP 组合物存在的方法, 包括以下步骤:

a. 使一种或多种蛋白质附着于定量检测样品中所述 DSP 组合物的工具, 所述一种或多种蛋白质选自以下物质: 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 - α - 胰蛋白酶抑制剂家族重链相关蛋白 (IHRP)、 α -1-B- 糖蛋白, α -1- 抗胰蛋白酶, 载脂蛋白 A-IV, 血浆铜蓝蛋白, 未命名的蛋白产物 (NCBI 基因座 / 登录号 No. CAA34971), 载脂蛋白 E, 补体因子 B, 前白蛋白, 载脂蛋白 C-III, α 2-HS 糖蛋白, 载脂蛋白 J 前体, C 链, IgM, 免疫球蛋白 λ 轻链, 凝血因子 II (凝血酶), IgK 链 V-III (KAU 冷凝集素), 载脂蛋白 J 前体, IgAI Bur, 富含组氨酸的糖蛋白前体, α -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; 和

b. 测定所述样品中所述 DSP 组合物的水平。

8. 如权利要求 1-4 之一所述的方法, 其中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 (载脂蛋白 D), 补体组分 C4A, 胰蛋白酶抑制剂, 间 - α - 胰蛋白酶抑制剂家族重链相关蛋白 (IHRP)、 α -1-B- 糖蛋白, α -1- 抗胰蛋白酶, 载脂蛋白 A-IV, 血浆铜蓝蛋白, 未命名的蛋白产物 (NCBI 基因座 / 登录号 No. CAA34971), 载脂蛋白 E, 补体因子 B, 前白蛋白, 载脂蛋白 C-III, α 2-HS 糖蛋白, 载脂蛋白 J 前体, C 链, IgM, 免疫球蛋白 λ 轻链, 凝血因子 II (凝血酶), IgK 链 V-III (KAU 冷凝集素), 载脂蛋白 J 前体, IgAI Bur, 富含组氨酸的糖蛋白前体, α -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。

9. 一种检测生物样品中 DSP 组合物存在的方法, 包括以下步骤:

a. 使生物样品与正常人血清、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、正常母牛血清中所含的至少一种捕获多肽接触; 和

b. 检测捕获多肽与 DSP 组合物的结合存在与否,

其中, 存在这种结合表明生物样品中 DSP 组合物的存在。

10. 如权利要求 9 所述的方法, 其中所述捕获多肽选自包括 HDL 蛋白质组、LDL 蛋白质组的至少一种组分或至少一种血清蛋白的多肽。

11. 一种检测生物样品中包含 YFAK 或 YEAK 肽的 DSP 组合物存在的方法, 包括以下步骤:

(a) 使生物样品与至少一种捕获多肽接触, 所述捕获多肽包括选自以下组的肽: 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 (载脂蛋白 D), 补体组分 C4A, 胰蛋白酶抑制剂, 间 - α - 胰蛋白酶抑制剂家族重链相关蛋白 (IHRP)、 α -1-B- 糖蛋白, α -1- 抗胰蛋白酶, 载脂蛋白 A-IV, 血浆铜蓝蛋白, 未命名的蛋白产物 (NCBI 基因座 / 登录号 No. CAA34971), 载脂蛋白 E, 补体因子 B, 前白蛋白, 载脂蛋白 C-III, α 2-HS 糖蛋白, 载脂蛋白 J 前体, C 链, IgM, 免疫球蛋白 λ 轻链, 凝血因子 II (凝血酶), IgK 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, α -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 ; 和

(b) 检测捕获多肽与 DSP 组合物的结合存在与否,

其中, 存在这种结合表明生物样品中 YEAK 或 YFAK 肽的存在。

12. 一种检测生物样品中包含 YFAK 肽或 YEAK 肽的 DSP 组合物含量的方法, 包括以下步骤:

a. 使生物样品与至少一种捕获多肽接触, 所述捕获多肽包含选自以下组的肽: 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 (载脂蛋白 D), 补体组分 C4A, 胰蛋白酶抑制剂, 间- α -胰蛋白酶抑制剂家族重链相关蛋白 (IHRP)、 α -1-B-糖蛋白, α -1-抗胰蛋白酶, 载脂蛋白 A-IV, 血浆铜蓝蛋白, 未命名的蛋白产物 (NCBI 基因座 / 登记号 No. CAA34971), 载脂蛋白 E, 补体因子 B, 前白蛋白, 载脂蛋白 C-III, α 2-HS 糖蛋白, 载脂蛋白 J 前体, C 链, IgM, 免疫球蛋白 λ 轻链, 凝血因子 II (凝血酶), IgK 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, α -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 ; 和

b. 定量测定捕获多肽与 DSP 组合物的结合水平,

其中, 结合水平表示生物样品中 DSP 组合物的含量。

13. 一种测定 DSP 组合物在哺乳动物体内生物利用度的方法, 包括以下步骤:

a. 给予哺乳动物一个剂量的含 DSP 组合物的组合物;

b. 从受试对象取生物样品;

c. 使该生物样品与至少一种捕获多肽接触, 所述捕获多肽包含选自以下组的肽: 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 (载脂蛋白 D), 补体组分 C4A, 胰蛋白酶抑制剂, 间- α -胰蛋白酶抑制剂家族重链相关蛋白 (IHRP)、 α -1-B-糖蛋白, α -1-抗胰蛋白酶, 载脂蛋白 A-IV, 血浆铜蓝蛋白, 未命名的蛋白产物 (NCBI 基因座 / 登记号 No. CAA34971), 载脂蛋白 E, 补体因子 B, 前白蛋白, 载脂蛋白 C-III, α 2-HS 糖蛋白, 载脂蛋白 J 前体, C 链, IgM, 免疫球蛋白 λ 轻链, 凝血因子 II (凝血酶), IgK 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, α -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 ;

从而确定生物样品中 DSP 组合物的生物利用度。

14. 一种确定对有需要的对象给予 DSP 组合物的合适剂量的方法, 包括以下步骤:

a. 给予受试对象一个剂量 DSP 组合物;

b. 从受试对象取生物样品;

c. 使生物样品与至少一种捕获多肽接触, 所述捕获多肽包含选自以下组的肽: 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 (载脂蛋白 D), 补体组分 C4A, 胰蛋白酶抑制剂, 间- α -胰蛋白酶抑制剂家族重链相关蛋白 (IHRP)、 α -1-B-糖蛋白, α -1-抗胰蛋白酶, 载脂蛋白 A-IV, 血浆铜蓝蛋白, 未命名的蛋白产物 (NCBI 基因座 / 登记号 No. CAA34971), 载脂蛋白 E, 补体因子 B, 前白蛋白, 载脂蛋白 C-III, α 2-HS 糖蛋白, 载脂

蛋白 J 前体, C 链, IgM, 免疫球蛋白 λ 轻链, 凝血因子 II (凝血酶), IgK 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, α -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;

- d. 检测该生物样品中捕获多肽的水平;
- e. 任选地用不同剂量重复步骤 (a) 至 (d); 和
- f. 将生物样品中测得的这些水平与 DSP 组合物预定的合适水平比较;

其中合适剂量是导致生物样品中 DSP 组合物达到预定合适水平的剂量。

15. 一种治疗或预防受试对象不希望有的免疫应答反应的方法, 包括以下步骤:

- a. 给予受试对象合适剂量的 DSP 组合物, 其中所述合适剂量由如下步骤确定:

- (i) 给予受试对象一个剂量的 DSP 组合物;

- (ii) 从受试对象取生物样品;

- (iii) 使生物样品与至少一种捕获多肽接触, 所述捕获多肽包括选自以下组的肽: 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 (载脂蛋白 D), 补体组分 C4A, 胰蛋白酶抑制剂, 间- α -胰蛋白酶抑制剂家族重链相关蛋白 (IHRP)、 α -1-B-糖蛋白, α -1-抗胰蛋白酶, 载脂蛋白 A-IV, 血浆铜蓝蛋白, 未命名的蛋白产物 (NCBI 基因座 / 登录号 No. CAA34971), 载脂蛋白 E, 补体因子 B, 前白蛋白, 载脂蛋白 C-III, α 2-HS 糖蛋白, 载脂蛋白 J 前体, C 链, IgM, 免疫球蛋白 λ 轻链, 凝血因子 II (凝血酶), IgK 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, α -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;

- (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); 和

- (vi) 将生物样品中测得的水平与预定的 DSP 组合物合适水平作比较;

其中合适剂量是导致生物样品中 DSP 组合物达到预定合适水平的剂量。

16. 如权利要求 11-15 之一所述的方法, 其中所述捕获多肽是被标记的多肽。

17. 如权利要求 11-15 之一所述的方法, 其中所述捕获多肽附着于固体支持物上。

18. 如权利要求 11-15 之一所述的方法, 还包括分离含结合于 DSP 组合物的捕获多肽的复合物。

19. 如权利要求 11-15 之一所述的方法, 还包括用抗捕获多肽的抗体检测捕获多肽与 DSP 组合物的结合。

20. 如权利要求 11-15 之一所述的方法, 其中所述组合物是皮下注射给予的。

21. 一种用于检测生物样品中 DSP 组合物的组合物, 其包含至少一种捕获多肽, 所述捕获多肽包括选自以下组的肽: 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 (载脂蛋白 D), 补体组分 C4A, 胰蛋白酶抑制剂, 间- α -胰蛋白酶抑制剂家族重链相关蛋白 (IHRP)、 α -1-B-糖蛋白, α -1-抗胰蛋白酶, 载脂蛋白 A-IV, 血浆铜蓝蛋白, 未命名的蛋白产物 (NCBI 基因座 / 登录号 No. CAA34971), 载脂蛋白 E, 补体因子 B, 前白蛋白, 载脂蛋白 C-III, α 2-HS 糖蛋白, 载脂蛋白 J 前体, C 链, IgM, 免疫球蛋白 λ 轻链, 凝血因子 II (凝血酶), IgK 链 V-III (KAU 冷凝集素), 载脂蛋白 J 前体, IgAI Bur, 富含组氨酸的糖蛋白前

体, α -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。

22. 一种分离含 DSP 组合物样品中的肽的方法, 包括以下步骤:

a. 使样品与至少一种捕获多肽接触, 所述捕获多肽包括选自以下组的肽: 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 (载脂蛋白 D), 补体组分 C4A, 胰蛋白酶抑制剂, 间- α -胰蛋白酶抑制剂家族重链相关蛋白 (IHRP)、 α -1-B-糖蛋白, α -1-抗胰蛋白酶, 载脂蛋白 A-IV, 血浆铜蓝蛋白, 未命名的蛋白产物 (NCBI 基因座 / 登记号 No. CAA34971), 载脂蛋白 E, 补体因子 B, 前白蛋白, 载脂蛋白 C-III, α 2-HS 糖蛋白, 载脂蛋白 J 前体, C 链, IgM, 免疫球蛋白 λ 轻链, 凝血因子 II (凝血酶), IgK 链 V-III (KAU 冷凝集素), 载脂蛋白 J 前体, IgA1 Bur, 富含组氨酸的糖蛋白前体, α -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; 和

b. 从混合物中分离结合于捕获多肽的肽。

23. 如权利要求 22 所述的方法, 其中所述捕获多肽固定于固体支持物上。

24. 如权利要求 23 所述的方法, 其中所述捕获多肽是表位标记的多肽。

25. 如权利要求 22 所述的方法, 还包括从捕获多肽分离结合的肽。

26. 如权利要求 22 所述的方法, 还包括测定所分离的肽的特性。

27. 如权利要求 26 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。

28. 一种在受试对象上鉴定 DSP 组合物中生物可利用肽的方法, 包括以下步骤:

a. 在第一时间给予受试对象 DSP 组合物;

b. 在给药后的第二时间从受试对象取组织样品; 和

c. 鉴定样品中结合于至少一种捕获多肽的肽, 所述捕获多肽包括选自以下组的肽: 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 (载脂蛋白 D), 补体组分 C4A, 胰蛋白酶抑制剂, 间- α -胰蛋白酶抑制剂家族重链相关蛋白 (IHRP)、 α -1-B-糖蛋白, α -1-抗胰蛋白酶, 载脂蛋白 A-IV, 血浆铜蓝蛋白, 未命名的蛋白产物 (NCBI 基因座 / 登记号 No. CAA34971), 载脂蛋白 E, 补体因子 B, 前白蛋白, 载脂蛋白 C-III, α 2-HS 糖蛋白, 载脂蛋白 J 前体, C 链, IgM, 免疫球蛋白 λ 轻链, 凝血因子 II (凝血酶), IgK 链 V-III (KAU 冷凝集素), 载脂蛋白 J 前体, IgA1 Bur, 富含组氨酸的糖蛋白前体, α -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。

29. 一种制备含毒性减弱的 DSP 组合物的方法, 包括以下步骤:

a. 使 DSP 组合物与至少一种捕获多肽接触, 所述捕获多肽包括选自以下组的肽: 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 (载脂蛋白 D), 补体组分 C4A, 胰蛋白酶抑制剂, 间- α -胰蛋白酶抑制剂家族重链相关蛋白 (IHRP)、 α -1-B-糖蛋白, α -1-抗胰蛋白酶, 载脂蛋白 A-IV, 血浆铜蓝蛋白, 未命名的蛋白产物 (NCBI 基因座 / 登记号 No. CAA34971), 载脂蛋白 E, 补体因子 B, 前白蛋白, 载脂蛋白 C-III, α 2-HS 糖蛋白, 载脂蛋白 J 前体, C 链, IgM, 免疫球蛋白 λ 轻链, 凝血因子 II (凝血酶), IgK 链 V-III (KAU 冷凝集素), 载脂蛋白 J 前体, IgA1 Bur, 富含组氨酸的糖蛋白前体, α -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 ;

- 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。

30. 一种制备效应增强的 DSP 组合物的方法, 包括以下步骤 :

a. 使 DSP 组合物与至少一种捕获多肽接触, 所述捕获多肽包括选自以下组的肽 : 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 (载脂蛋白 D), 补体组分 C4A, 胰蛋白酶抑制剂, 间 - α - 胰蛋白酶抑制剂家族重链相关蛋白 (IHRP)、 α -1-B- 糖蛋白, α -1- 抗胰蛋白酶, 载脂蛋白 A-IV, 血浆铜蓝蛋白, 未命名的蛋白产物 (NCBI 基因座 / 登录号 No. CAA34971), 载脂蛋白 E, 补体因子 B, 前白蛋白, 载脂蛋白 C-III, α 2-HS 糖蛋白, 载脂蛋白 J 前体, C 链, IgM, 免疫球蛋白 λ 轻链, 凝血因子 II (凝血酶), IgK 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, α -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 ;

- 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。

31. 一种治疗或预防受试对象不希望有的免疫应答反应的方法, 包括

- a. 提供一种 DSP 组合物 ;
- b. 给予受试对象该 DSP 组合物 ;
- c. 从受试对象取生物样品 ;

d. 使此生物样品与至少一种捕获多肽接触, 所述捕获多肽包括选自以下组的肽序列 : 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 - α - 胰蛋白酶抑制剂家族重链相关蛋白 (IHRP)、 α -1-B- 糖蛋白, α -1- 抗胰蛋白酶, 载脂蛋白 A-IV, 血浆铜蓝蛋白, 未命名的蛋白产物 (NCBI 基因座 / 登录号 No. CAA34971), 载脂蛋白 E, 补体因子 B, 前白蛋白, 载脂蛋白 C-III, α 2-HS 糖蛋白, 载脂蛋白 J 前体, C 链, IgM, 免疫球蛋白 λ 轻链, 凝血因子 II (凝血酶), IgK 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, α -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 ;

- e. 将结合于捕获多肽的肽与混合物分离 ;
- f. 测定所分离肽的特性 ;
- g. 制备具有所分离肽的特性的一组肽 ; 和
- h. 将这组新的肽给予受试对象。

32. 如权利要求 28 或 31 所述的方法, 其中所述肽给予受试对象一次以上。

33. 如权利要求 32 所述的方法, 其中所述肽以 1, 2, 3, 4, 6, 12, 18, 24, 36, 48 或 72 小时的间隔给予受试对象。

34. 一种比较 DSP 组合物不同制剂的方法, 包括以下步骤 :

a. 使第一种 DSP 组合物与正常人血清、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、正常母牛血清中所含的至少一种捕获多肽接触；

b. 使第二种 DSP 组合物与正常人血清、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、正常母牛血清中所含的至少一种捕获多肽接触；

c. 必要时重复步骤 (b)；

d. 从步骤 (a-c) 的混合物中分离结合于捕获多肽的肽；

e. 测定步骤 (d) 分离的肽的特性；和

f. 比较具有步骤 (d) 分离的肽的特性的所述一组分离肽。

35. 一种制备靶向受试对象组织的治疗剂的方法，包括以下步骤：

a. 提供 DSP 组合物；和

b. 将治疗剂与 DSP 组合物偶联以形成偶联物。

36. 一种向受试对象特定组织递送治疗剂的方法，包括以下步骤：

a. 通过以下步骤分离标记肽：

(i) 使 DSP 组合物与组织特异性肽接触，所述组织特异性肽包括选自以下组的肽：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（载脂蛋白 D），补体组分 C4A，胰蛋白酶抑制剂，间- α -胰蛋白酶抑制剂家族重链相关蛋白（IHRP）、 α -1-B-糖蛋白， α -1-抗胰蛋白酶，载脂蛋白 A-IV，血浆铜蓝蛋白，未命名的蛋白产物（NCBI 基因座 / 登录号 No. CAA34971），载脂蛋白 E，补体因子 B，前白蛋白，载脂蛋白 C-III， α 2-HS 糖蛋白，载脂蛋白 J 前体，C 链，IgM，免疫球蛋白 λ 轻链，凝血因子 II（凝血酶），IgK 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， α -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；

(ii) 从混合物中分离结合于组织特异性肽的肽；

b. 将标记肽与治疗剂偶联；和

c. 将偶联物给予受试对象。

37. 如权利要求 35 或 36 所述的方法，其中所述治疗剂是有机小分子或生物大分子。

38. 如权利要求 35 或 36 所述的方法，其中所述组织是脑、肺或肝组织。

39. 如权利要求 35 或 36 所述的方法，其中所述标记肽通过共价键、包络物、离子键或氢键偶联于治疗剂。

通过对定向序列聚合物的组合物进行基于血清蛋白的检测,改进含定向序列聚合物的组合物的设计、生物利用度和效能的方法

相关申请

[0001] 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

[0002] 复杂的肽混合物是肽治疗剂的一个新兴的类型,其中考帕松(醋酸格拉默)是一个领先的例子。复杂的肽混合物包括有一个或几个共享特征(如氨基酸组成和/或序列相似)的多样性肽,并包括改变了的肽配体(APL)、肽库、肽文库、含随机序列聚合物(RSP)的组合物(如醋酸格拉默,及 W003/029276、W0 05/112972 和 W0 05/085323 中公开的组合物)及含定向序列多肽(DSP)的组合物(见例如 W0 2007/120834、W0 2009/051797 和 W0 2009/128948)。DSP 和 RSP 组合物在如下方面是相似的:二者都包含大量不同的肽,它们的序列在某些确定的公共参数上是随机变化的。在 RSP 组合物中,序列的相似性起源于肽的氨基酸含量有限,因为所有肽由相同的为数不多的氨基酸以随机顺序排列而组成。在 DSP 组合物中,序列的相似性则起源于共享的基础肽序列,其中某些氨基酸位置被有限的氨基酸标记以有限的频率随机地取代。

[0003] 现有技术中已有检测简单多肽的方法,但是只有较少方法适合于检测和测定复杂的肽混合物。检测定向序列聚合物(DSP)有效血浆浓度的方法是复杂的,因为与具有明确氨基酸序列的各别肽相比,DSP 是肽的复杂混合物。需要对多种制造方法制备的 DSP 组合物的均一性和组成进行评估的改进方法。确定 DSP 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 DSP 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 DSP 组合物可能提高治疗效果或者减少潜在的不良炎症应答反应。

[0004] 因此,为了治疗目的,需要定量分析 DSP 组合物的方法,例如促进这种肽混合物在体内状况的评估和确定合适的剂量及给药方式。

发明概述

[0005] 本申请提供检测和评价 DSP 组合物的改进的方法。本发明提供检测和定量分析 DSP 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 DSP 组合物中多肽亚组亚组的方法。本发明进一步提供对需要接受治疗的患者给予 DSP 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。

[0006] 本申请还提供检测 DSP 组合物的方法,包括以下步骤:(a) 将所述 DSP 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 DSP 组合物用的工具上;和(f) 测定所述 DSP 组

合物与 (e) 所述蛋白每一种的结合。

[0007] 本说明书也提供一种改进 DSP 组合物设计的方法,包括以下步骤:(a) 将所述 DSP 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 DSP 组合物用的工具上;(f) 测定所述 DSP 组合物与 (e) 所述蛋白质结合的每一种肽;(g) 调整所述 DSP 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 DSP 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。

[0008] 此外,本申请提供一种检测 DSP 组合物中肽种类的方法,包括以下步骤:(a) 将所述 DSP 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 DSP 组合物接触;(g) 测定所述 DSP 组合物中每种肽与 (f) 所述固相支持物的结合。

[0009] 另外,本申请提供一种改进 DSP 组合物中肽种类设计的方法,包括以下步骤:(a) 使所述 DSP 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 DSP 组合物接触;(g) 测定所述 DSP 组合物中与 (f) 所述固相支持物结合的每一种肽;(h) 调整所述 DSP 组合物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 DSP 组合物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。

[0010] 通过应用本申请所述方法,研究者不仅可以更可靠地检测 DSP 组合物中的低含量组分,而且可以特异性地检测 DSP 组合物中与生物活性如毒性或效力有关或对其有贡献的肽种类。

[0011] 本发明的基础是,发现 YEAK 或 YFAK 组合物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,具有蛋白质性质的物质在本说明书称为“捕获多肽”,这种物质较佳地也结合 DSP 组合物。相反,一旦“捕获多肽”被鉴定,便可利用一种或多种这类捕获多肽定量分析 DSP 组合物中所含的肽,并分离 DSP 组合物中功能更优良的肽亚组,或者根据结合特异性给 DSP 组合物中的各组分分类。为了实施本发明,鉴定到能与 (DSP 组合物所含) 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 (DSP 组合物所含) 肽而不受到存在的其他组分干扰。

[0012] 本发明的一个方面提供了一种评价或测定 DSP 组合物不同制造的制剂、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 DSP 组合物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。

[0013] 本发明的另一方面提供一种定量分析 DSP 组合物或含 DSP 组合物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 DSP 组合物后其在体内的生物可利用含量或浓度 (如血浆浓度) 的方法。

[0014] 本发明的方法是检测受试对象组织中存在的 DSP 组合物,所述受试对象先前曾接

触过 DSP 组合物或用其治疗过,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 DSP 组合物的各组分,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 组合物治疗过。在某些具体实施方案中,所述哺乳动物是人。

[0015] 在某些实施方案中,本发明方法包括通过使 DSP 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 DSP 组合物的存在,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 DSP 组合物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 DSP 组合物与包括血清的生物样品接触;如果样品中存在 DSP 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 DSP 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。

[0016] 任何能与 DSP 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。

[0017] 本发明的一个方面是一种检测生物样品中 DSP 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 DSP 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 DSP 组合物中的肽组分。可进一步延伸用这种方法检测样品中 DSP 组合物的含量或浓度。

[0018] 本发明的另一个方面是测量 DSP 组合物在哺乳动物中的生物利用度的方法,包括:给予哺乳动物一定剂量的 DSP 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 DSP 组合物的生物利用度或者生物可利用的程度。

[0019] 本发明的另一个方面是提供给予哺乳动物对象 DSP 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照样品,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。

[0020] 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 DSP 组合物合适剂量的方法包括:(a) 给予受试对象一个剂量 DSP 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 DSP 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 DSP 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 DSP 组合物达到预定合适水平的剂量。

[0021] 本发明的某些实施方案提供预测 DSP 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 DSP 组合物的样品与 DSP 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 DSP 组合物与该捕获多肽的结合。被大量 DSP 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。

[0022] 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 DSP 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 DSP 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 DSP 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物或调节剂。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 DSP 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 DSP 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 DSP 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。

[0023] 本发明另一个方面提供通过给予 DSP 组合物治疗患者的有效方法, 包括: 通过合成肽 (例如同时利用每轮延伸合并的氨基酸单体) 制备 DSP 组合物, 制备所述 DSP 组合物的药学上可接受的制剂, 给予治疗对象所述 DSP 组合物, 取得治疗对象的组织样品, 测定所述组织样品中 DSP 组合物的含量和 / 或浓度, 测定功能读出, 将 DSP 组合物含量与功能读出相关联, 及调整给予治疗对象的 DSP 组合物剂量以改善功能读出。

[0024] 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 DSP 组合物, 确定合适剂量可通过: (i) 给予治疗对象一个剂量的 DSP 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 DSP 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 DSP 组合物达到预定合适水平的剂量。

[0025] 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 DSP 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 DSP 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。

[0026] 本发明另一个方面提供一种分离所选择的组成 DSP 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 DSP 组合物所含组分分类。

[0027] 在某些实施方案中, 分离含 DSP 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。

[0028] 在某些实施方案中, 鉴定在受试对象中 DSP 组合物的生物可利用肽的方法包括: (a) 给予受试对象 DSP 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。

[0029] 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 DSP 组合物, 使所述 DSP 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 DSP 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 DSP 组合物。

[0030] 本发明的另一个方面是改进含 DSP 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 DSP 组合物。在某些实施方案中, 设计的 DSP 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, DSP 组合物与参比 DSP 组合物相比效力增强, 其中参比 DSP 组合物与接触捕获多肽的最初 DSP 组合物的效力相同或基本相同。在其他实施方式中, DSP 组合物的毒性比参比 DSP 组合物低。

[0031] 在可替代的实施方案中, 一种方法包括按拟定方案制备 DSP 组合物, 配制含 DSP 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 DSP 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。

[0032] 本发明还有一个方面是通过将 DSP 组合物 (例如参比 DSP 组合物或用本说明书所述方法产生的改进的 DSP 组合物) 或 DSP 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 DSP 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。

[0033] 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 DSP 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。

[0034] 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用于检测生物样品中 DSP 组合物的组合物, 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- α -胰蛋白酶抑制剂家族重链相关蛋白 (IHRP)、 α -1-B-糖蛋白, α -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, α 2-HS 糖蛋白, 载脂蛋白 J 前体, IgM 的 C 链, 免疫球蛋白 λ 轻链, 凝血因子 II (凝血酶), Ig κ 轻链 V-III (KAU 冷凝集素), 载脂蛋白 J 前体, IgAI Bur, 富含组氨酸的糖蛋白前体, α -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。

[0035] 在一些具体的实施方式中,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: α -1-抗胰蛋白酶,载脂蛋白 A-I、 α -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。

[0036] 在上述任何一个实施方式中,DSP 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。

附图的简单描述

[0037] 图 1 是测定 DSP 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 DSP 组合物(单独或包含于血清中)加到支持物上。加入抗 DSP 组合物(或抗 DSP 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。

[0038] 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 YEAK 或 YFAK 肽的复杂肽混合物。在复杂肽混合物浓度较高时,用抗 YEAK 或 YFAK 抗体检测的偶合物高于较低浓度复杂肽混合物。在病人中,12.5ng/mL 对应于大约 2mg 剂量。

[0039] 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。

[0040] 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。

[0041] 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。

[0042] 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。

[0043] 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,如抗匙孔戚血兰蛋白(KLH)多克隆血清,

不能重复该试验。

[0044] 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。

[0045] 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。

[0046] 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。

[0047] 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。

[0048] 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。

[0049] 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。

[0050] 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。

[0051] 图 14 显示用先前 PCT 公开文本 W02009/075854 (其内容整体纳入本说明书作为参考) 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。

[0052] 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。

[0053] 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。

发明详述

定向序列聚合物 (DSP) 的组合物

[0054] DSP 是一种所含序列衍生于已知基础肽序列的肽, 可以是但不限于与免疫应答反应相关的天然表位, 如起始位点。可按确定的规则进行置换, 使 DSP 具有一个或多个与所述基础肽的序列不同的氨基酸残基。由于 DSP 组合物序列的半随机多样性, 该组合物中存在大量的肽序列。多样性的肽序列可赋予比多样性少的组合物更高的效力, 特别是当发生表位漂移和扩散时。在一些实施方式中, 利用包含多种 DSP 的 DSP 组合物来调控不希望有的免疫应答反应, 或在所述基础肽免疫原性微弱或不能测到时用其来诱导免疫应答反应。

[0055] 对 DSP 进行设计以包含在基础肽序列的任何给定位置引入明确比例的明确的氨基酸残基变异。不像产生的肽 RSP 如 Cop-1 那样, 虽然它们可在不同程度上被置换, 但其特

定长度的明确预定肽序列仍能维持它们与天然序列的氨基酸残基相似性。每个氨基酸位置的改变,应根据一组明确的规则,这样的取代氨基酸选自基础肽异基因同工蛋白质中所见的化学性质相关的氨基酸,空间结构相似的氨基酸,种系发育改变的氨基酸,不会导致基础肽功能障碍的已知等位基因变异,或导入后不会破坏肽的二极结构的小氨基酸残基。在某些实施方式中,按照 Kosiol 等, *J. Theoretical Biol*, 2004, 228 :97-106 所述方法置换氨基酸。或者,可按照 PCT/US2004/032598 第 10-11 页所述的示例性置换方法改变氨基酸。

[0056] 可用固相肽合成法制备 DSP, 每轮合成时, 用按上述理由选定的明确比例混和的受适当保护的氨基酸混合物, 而不是单个的氨基酸掺入合成的多肽中。根据该混和比例, 所选氨基酸的引入(肽链)有所不同。因此, 与 RSP 组合物相同, DSP 组合物不是以单一的肽合成的, 而总是以共同的模板序列为基础合成含多种相关 DSP 肽组成的组合物, 可重复产生整个混和物, 这与所采用的合成规则相一致。产生的是有用的理论上相关蛋白质的混合物, 本说明书将其称为包含“定向序列聚合物”或“DSP”的组合物。对于固相合成法, 肽中给定位置氨基酸的混合物是按比例一一限定的。开始合成前, 对肽的每个决定要改变的位置确定氨基酸的混和比例。得到的定向顺序肽混和物包含多种相关的肽序列。可用于本发明的一些 DSP 包括国际专利申请 WO 2007/120834、WO 2009/051797、WO 2009/128948 和美国申请公布公报 US 2009/0036653 中所描述的那些 DSP。这些参考文献描述了合成 DSP 的方法、包含 DSP 的组合物、DSP 的治疗制剂, 给予治疗对象 DSP 组合物的方法、可用 DSP 治疗的疾病和可以与 DSP 共同给予治疗对象的其他治疗有效制剂。所有这些专利、专利申请和出版物均以整体内容纳入本说明书作为参考, 特别注意讨论 DSP 结构、制备和功能的部分。

[0057] 通过选择没有已知功能、具有已知或预期的研究价值、具有已知或预期的诊断价值、或具有已知或预期的与疾病相关性的蛋白质, 及选择蛋白中的一个部分, 该部分可以是如下免疫原性范围内的表位(从没有已知的免疫原性到弱免疫原性到强免疫原性, 或已知其与疾病病理相关), 来设计和制备 DSP。对于制备 DSP 组合物, 可从不同来源选择基础肽序列。在某些情况下, 可通过相关表位的实验研究来鉴定对疾病状态或不良反应有某些意义的肽序列。这些序列可包括已证明对治疗疾病或病况有用的天然存在的肽序列, 一个例子可参见国际专利申请 WO 2006/031727, 美国专利 No. 6, 930, 168 和相关的科学出版物 Stern 等, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 2005, 102 :1620-25。

[0058] 另外, 凭经验确定可能作为表位的基础肽序列, 方法可以是通过通过对合成的组合肽文库进行位置扫描鉴定候选序列(例如, 参见 D. Wilson 等, 同上; R. Houghten 等, 同上; Hernandez 等, *Eur. J. Immunol*, 2004, 34 :2331-41), 或标出受关注的整个蛋白的重叠肽序列, 和测试肽的免疫反应活性, 所用的方法有例如适合于寻找疾病和物种有关表位的体外或体内试验系统中对此类目的有用的任何读出试验, 如 HI 试验, 病毒攻击模型, 或 NIH, John Wiley 父子公司出版的由 John E Coligan, Ada M Kruisbeek, David H Margulies, Ethan M Shevach, Warren Strober 编著的“免疫学当代方案 (Current Protocols in Immunology)”中描述的方法。候选分子可包括合成期间或合成后修饰的肽, 例如加入糖基或修饰的糖基, 如糖基化和糖原化(可以是 N-连接或 S-连接), 脂肪酸修饰, 如十四烷酰化, 或产生二硫键。

[0059] 鉴定到候选表位后, 可利用病原的次代品系变异、簇群变异、漂移变异、替换变异, 通过目前易于得到的参考文献(如 WO 2000/042559)中所述的模拟算法和预测算法, 如对

突变、可能的抗体接触表位进行对比和分析,或利用 2005/103679、WO 2002/073193 和 WO 99/45954 中描述的预测方法来预测这些可能表位的结合,从而制备可能的一组额外相关的表位。

[0060] 在一些实施方式中,设计 DSP 用的基础肽序列是与选自多发性硬皮病、全身性红斑狼疮、I 型糖尿病、重症肌无力、类风湿关节炎和寻常型天疱疹等自身免疫疾病相关的表位。

[0061] 在其他实施方式中,基础肽序列是与选自:白血病、乳腺癌、皮肤癌、骨癌、前列腺癌、肝癌、肺癌、脑癌、喉癌、胆囊癌、胰腺癌、直肠癌、甲状旁腺癌、甲状腺癌、肾上腺癌、神经癌、头颈癌、结肠癌、胃癌、支气管癌、肾癌、基底细胞癌、鳞状细胞癌、黑色素瘤、转移性皮肤癌、骨肉瘤、尤因氏肉瘤、veticulum 细胞瘤、骨髓瘤、骨巨细胞瘤、小细胞肺癌、胰岛细胞瘤、淋巴细胞、粒细胞、毛细血管瘤、腺瘤、增生、髓样瘤、嗜铬细胞瘤、卵巢肿瘤、宫颈非典型增生、原位癌、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤、软组织肉瘤、卡波西肉瘤和骨肉瘤的癌症病理学相关表位。

[0062] 在其他实施方式中,基础肽序列是与病毒感染疾病病理上相关的表位,这些疾病选自:AIDS、AIDS 相关综合征、水痘、感冒、巨细胞病毒感染、科罗拉多蜱传热、登革热、埃博拉出血热、头足口病、肝炎、单纯性疱疹、带状疱疹、HPV、流感(Flu)、拉沙热、麻疹、马尔堡出血热、传染性单核细胞增多症、流行性腮腺炎、脊髓灰质炎、进行性多病灶白细胞脑病、狂犬病、风疹、SARS、天花、病毒性脑炎、病毒性胃肠炎、病毒性脑膜炎、病毒性肺炎、西尼洛河病和黄热病。

[0063] 在其他实施方式中,基础肽序列是与细菌染疾病病理上相关的表位,这些疾病选自:炭疽、细菌性脑膜炎、肉毒中毒、布鲁氏杆菌病、弯曲菌病、猫抓病、霍乱、白喉、淋病、脓疱病、军团菌病、麻风病、钩端螺旋体病、李斯特杆菌病、莱姆病、类鼻疽、MRSA 感染、诺卡氏菌病、百日咳、鼠疫、肺炎球菌性肺炎、鹦鹉热、Q 热病、落矶山斑疹热(RMSF)、沙门氏菌病、猩红热、志贺氏菌病、梅毒、破伤风、沙眼、结核病、土拉菌病、伤寒热、斑疹伤寒(包流行性斑疹伤寒)和尿道感染。

[0064] 在其他实施方式中,所述基础肽序列是寄生虫传染疾病病理上相关的表位,这些疾病选自:阿米巴病、蛔虫病、巴贝西虫病、南美洲锥虫病、支睾吸虫病、隐孢子虫病、囊虫病、裂头绦虫病、麦地那龙线虫病、包虫病、蛲虫病、片吸虫病、姜片虫病、丝虫病、自由活动的阿米巴感染、贾第虫病、腭口线虫病、膜壳绦虫病、等孢球虫病、黑热病、利什曼病、疟疾、后殖吸虫病、蝇蛆病、盘尾丝虫病、虱病、蛲虫感染、疟原虫感染、疥疮、血吸虫病、绦虫病、弓蛔虫病、弓浆虫病、旋毛虫病、鞭虫病、滴虫病和锥虫病(包括非洲锥虫病)。

[0065] 在一些实施方式中,基础肽序列是与影响中枢和/或外周神经系统的蛋白质构象无序病理上相关的表位,这些疾病选自:阿尔茨海默病(AD)、荷兰遗传性脑出血伴淀粉样变(又名脑血管淀粉样变)、congophilic 血管病;皮克病、进行性核上麻痹症、家族性英国痴呆、帕金森氏病(PD)、Lewy 体相关病、多系统萎缩症、哈施二氏病、肌萎缩性脊髓侧索硬化症(ALS)、亨廷顿氏病(HD)、脊髓小脑共济失调症、神经元核内包涵体病、遗传性齿状核红核苍白球丘脑下部核萎缩病、朊蛋白相关疾病如羊瘙痒症、牛海绵状脑病、变体型克雅二氏症、Gerstmann-Straussler-Scheinker 综合征、库鲁症、致命性家族性失眠症;及随着疾病发展以脑萎缩和检测到细胞内和/或细胞外纤维凝聚为特征的其他疾病。

[0066] 在一具体实施方式中,所述蛋白构象无序疾病是帕金森氏病。在另一具体实施方式中,所述蛋白构象无序疾病是阿尔茨海默病。在一具体实施方式中,所述构象无序疾病是肌蛋白相关疾病。在一具体实施方式中,所述构象无序疾病是肌萎缩性脊髓侧索硬化症。在一具体实施方式中,所述构象无序疾病是亨廷顿氏病。

[0067] 在其他实施方式中,用于加工制备 DSP 组合物的基础肽序列是与影响中枢神经系统外的多个器官的蛋白构象无序病理上相关的表位,这些疾病选自:脊髓和延髓性肌萎缩、遗传性全身和脑淀粉样变性、芬兰型家族淀粉样变性、老年性全身淀粉样变性(又名老年性心脏淀粉样变)、家族性淀粉样多神经病、II 型糖尿病特别是胰岛淀粉样变性、透折相关性淀粉样变性(DRA)、炎症相关性反应性全身淀粉样变(又名 AA 淀粉样变)、主动脉中层淀粉样变性、甲状腺髓质癌、遗传性肾淀粉样变性、轻链相关性淀粉样变性、轻链沉积病、轻链管型肾病、轻链心肌病、心房淀粉样变性、注射局部淀粉样变性、囊性纤维化病(CF)、镰状细胞贫血症,以及在受累器官或组织中观察到有原纤维形成的其他疾病。

[0068] 天然未折叠的蛋白质和肽,那些怀疑经历原纤维形成的天然展开因而与蛋白构象无序相关、可用作制备 DSP 组合物的基础肽来源序列的蛋白质和肽,例子包括:肌蛋白及其片段,淀粉样 β 蛋白及其片段,abri 蛋白、微管相关蛋白、 α 突触核蛋白及其中心片段、胰岛淀粉样多肽(也称为糊精)、亨廷顿病外显子 I、前胸腺素 α 、雄激素受体蛋白氨基末端结构域、虾红素-1(ataxin-1)、DRPLA 蛋白(也称为萎缩素-1)和降钙素。

[0069] 经历原纤维形成因而与蛋白构象无序相关、可用作 DSP 组合物基础肽来源序列的球蛋白的例子包括:半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C、运甲状腺素蛋白、 β -2 微球蛋白、血清淀粉样蛋白 A 及其片段、亨廷顿蛋白、免疫球蛋白轻链可变区、胰岛素、溶菌酶(特别是人溶菌酶)、 α 乳清蛋白和莫尼糖蛋白、雄激素受体蛋白的配体和 DNA-结合结构域、lactadherein 及其特异性片段(如残基 245-294 片段,也称为 medin)、凝溶胶蛋白、载脂蛋白 AI、纤维蛋白素原及其片段,和心房利钠因子。

[0070] 作为一个具体例子,在病理学上,阿尔茨海默病与存在 4kDa 淀粉样 β ($A\beta$) 肽强烈相关,这种肽系早老素 1(PS1) 酶切割 $A\beta$ 肽的前体(APP) 而产生。大多数 $A\beta$ 长 40 个氨基酸,称为 $A\beta$ 40、 $A\beta$ 1-40,或氨基末端含变异的 $A\beta$ X-40。此外,研究表明微纤维形式的 $A\beta$ 1-40 能激活通常认为在阿尔茨海默病病理发生中具有重要作用的小胶质细胞(Jekabsone, A 等, J. Neuroinflammation 3:24(2006))。 $A\beta$ 1-40 的肽序列见表 1 中的 SEQ ID NO:7。另一方面, $A\beta$ 1-42 是空斑形成 $A\beta$ 的微小组分,认为其帮助启动了纤维状 $A\beta$ 的生成。该肽“全长形式”见表 1 的 SEQ ID NO:8。因此,所述基础肽序列可以是 SEQ ID NO:8 所示的 $A\beta$ 肽。该基础肽序列也可以是较短的肽,即 $A\beta$ X-40、 $A\beta$ 1-11,在一些报导中具有临床意义的有 $A\beta$ 14-23 或 $A\beta$ 16-20。Tjernberg, L. O. 等, Biochem. J. 366:343-351(2002)。

表 I:表位的示例

相关疾病	肽序列	来源/起源蛋白质	残基数	参考文献	SEQ ID NO:
神经退变性疾病	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFA EDVGSNKGAIIGLMVGGVV	β 淀粉样蛋白	1-40	54	7
	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFA EDVGSNKGAIIGLMVGGVIA	β 淀粉样蛋白	1-42	55	8
	MGKGEEGYPQEGILEDMPVDP GSEAYEMPSEEGYQDYEEA	小鼠 α -突触核蛋白	100-140	56	9
	DNEAYEMPSEEGYQDYE	人 α -突触核蛋白	121-137	57	10
	MATLEKLMKAFESLKSF	亨廷顿肽	1-17	58	11
	透析相关的淀粉样变	IQPTPKIQVYSRHPAENGKS	β -2 微球蛋白	21-40	59

参考文献

- [0071] Naslund, J. 等, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 91 :8378-8382 (1994) 54
- [0072] Gandy, S., J. Clin. Invest. 115(5) :1121-1129 (2005) 55
- [0073] Benner, E. J. 等, PLoS ONE 3(1) :e1376 (2008) 56
- [0074] Campion, D. 等“NACP/ 突触核蛋白基因 :阿尔茨海默病中发生改变的染色体定位和筛选”, Genomics 26(2), 254-257 (1995) 57
- [0075] Lecerf, J.-M. 等, Proc Natl Acad Sci USA. 98(8) :4764-4769 (2001) 58
- [0076] Kozhukh, GV 等, JBC, Vol. 277, No. 2, Issue of January 11, pp. 1310-1315, 2002.
- [0077] 也可用 DSP 治疗帕金森病 (PD)。PD 是一种影响到 1-2% 50 岁以上个体的目前未能治愈的神经退变性疾病。其神经病理的特征标志是在黑质致密部分 (SNpc) 含多巴胺能神经元的神经黑素进行性丧失, 并且存在嗜酸性胞质内蛋白包涵体 (称为路易氏小体 (LB))。 α -突触核蛋白是路易氏小体中最丰富的蛋白, 似乎是最重要的介质, 也许甚至是 PD 毒性的致病因素。因此, 减少毒性 α -突触核蛋白被认为对 PD 病人有益。一种小鼠 α -突触核蛋白的序列衍生自表 1 的 SEQ ID NO :9 所示全长蛋白的 C-末端区域 (Benner, E. J. 等, PLoS ONE 3(1) :e1376 (2008))。此外, 消除或结合硝化的 α -突触核蛋白及其片段看来对 PD 患者有益。据说有治疗效果的抗体是针对硝化的 α -突触核蛋白而不是针对天然 α -突触核蛋白。因此, 所述基础肽序列可以是例如 SEQ ID NO :9。在其他实施方式中, 所述基础肽序列可以是含人 α -突触核蛋白 121-137 氨基酸的片段 (DNEAYEMPSEEGYQDYE) (SEQ ID NO :10)。在还有的其他实施方式中, α -突触核蛋白片段 (121-137) 序列的 121 和 122 位氨基酸用不同种类的氨基酸取代, 在每个 Y (酪氨酸) 位置各自被三硝基化和 / 或 S115 位被磷酸化。
- [0078] DSP 也可衍生自朊蛋白 - 相关疾病的基础肽序列。SEQ ID NO :13(AAH22532) 是人朊蛋白序列。一个相关肽选自 SEQ ID NO :13 的部分序列。Harmeyer, S. 等, J Gen

Virology 79(Pt 4) :937-45(1998) 公开了各物种的朊蛋白序列,其整体内容纳入本说明书作为参考。各物种之间的氨基酸变异可被用来设计要取代的氨基酸。

[0079] 基础肽序列也可衍生自超氧化物歧化酶 I(SOD1)。已知 SOD1 突变与某些类型的家族性 ALS 的病理存在因果关系。有报告说,抗 SOD1 突变型人 G93A SOD1 重组蛋白的抗血清对携带 G37R 突变的 SOD1(品系 29)的 ALS 模型小鼠有保护作用,它过量表达人 SOD1 蛋白,高于小鼠内源 SOD1 表达约 4 倍(Urushitani, M. 等., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 104(7) : 2495-2500(2007))。SOD1 蛋白序列的一个例子是 SEQ ID NO :14(CAG46542)。因此,基础肽序列可以是 SEQ ID NO :14 的部分序列。

[0080] 在由亨廷顿(htt)蛋白(SEQ ID NO :15,人亨廷顿肽)聚谷氨酰胺(polyQ)神经束病理性扩展所致的遗传疾病(亨廷顿病)中,错误折叠的蛋白可能起着作用,导致受累个体的神经退变和过早死亡。能结合 htt 的 N-末端 17 个氨基酸所形成的表位的单链抗体(Lecerf, J.-M. 等, Proc Natl Acad Sci USA. 98(8) :4764-4769(2001)SEQ ID NO : 11)被证明能减轻亨廷顿病果蝇模型的症状(Wolfgang, W. J. 等., Proc Natl Acad Sci USA. 102(32) :11563-11568(2005))。因此,基础肽的序列可以是 SEQ ID NO :11。

[0081] DSP 组合物也可用于治疗透析相关性淀粉样变(DRA)疾病。DRA 可由不同形式的血液过滤,如血液透析、血液过滤或连续流动式腹膜透析(CAPD)所引起。透析 15 年以上的病人超过 95%发生 DRA, β -2 微球蛋白(B2M, SEQ ID NO :13)淀粉样变性最为普遍,预计会随时间推移而增加。临床上已观察到 B2M 的构象异构体(Uji 等, Nephron Clin Pract 2009 ;111 :c173-c181)。B2M 是 I 类人白细胞抗原(HLA)分子的一部分,具有显著的淀粉样原纤维 β -褶皱型结构特征。已知 B2M 经血循环作为不结合的单体分布在细胞外间隙中。在各种组织中, B2M 经历原纤维形成而形成淀粉样沉积。这种沉积可导致肾衰竭,导致 B2M 合成和释放增加,从而加重病情。本发明的一个实施方式中,一种其基础序列用于制备 DSP 组合物的蛋白是 β -2 微球蛋白(SEQ ID NO :16)及其片段。一种示例性的 B2M 片段是表 1 中 SEQ ID NO :12 所示的氨基酸残基 21-40,可用作 DRA 的基础肽序列。

[0082] 在其他实施方式中,所述基础肽序列是选自以下蛋白的部分序列:骨桥蛋白、HLA 蛋白、髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白、髓磷脂碱性蛋白(MBP)、蛋白脂质蛋白和髓磷脂相关糖蛋白 SI00 β 、热激蛋白 α 、 β -晶状体蛋白、髓磷脂相关少突胶质细胞碱性蛋白(MOBP)、2', 3' 环核苷酸 3' - 磷酸二酯酶、hsp60、hsp70、Ro60、La, SmD 和 70-kDa U1RNP、谷氨酸脱羧酶(GAD65)、胰岛素-抗原 2(IA-2)、胰岛素、乙酰胆碱受体(AChR) α -亚基和肌肉特异性受体酪氨酸激酶(MuSK)、II 型胶原蛋白、桥粒核心糖蛋白 1(Dsg1)、桥粒核心糖蛋白 3(Dsg3)、G-蛋白偶联受体(GPCR)、炎症相关蛋白、变态反应相关蛋白、白介素及其受体、趋化因子及其受体、蛋白伴侣及其受体。在其他实施方式中,所述基础肽序列衍生自:CD20、血管内皮生长因子(VEGF)、CD52、表皮生长因子受体(EGFR+)、CD33、HER2;非致癌相关蛋白,如 TNF- α 、CD25 或免疫球蛋白 E;对于免疫抑制,有 CD11a、 α 4- β 整联蛋白;与传染病相关的 β 趋化因子受体 CCR5、RSVgpP。

[0083] 或者,可从不连续的表位产生基础肽序列,即选择组成表位的氨基酸,将这些氨基酸连接成线性肽以进行定向排列产生 DSP 组合物。

[0084] 本发明的其他实施方式包括选择两种或多种受关注的蛋白,从中选择两个或多个表位,从每个受关注的蛋白得到至少一个表位,将这些表位连接形成线性序列以进行定向

排列产生 DSP 组合物。

[0085] 在还有其他实施方式中,制备 DSP 组合物的基础序列取自以下蛋白质,包括已知仅为含一级、二级、三级或四级结构域如 β 折叠片层或 α 螺旋的蛋白质,已知仅为含具有某些活性(如血清素结合)结构域的蛋白质,已知仅为含已知来源的蛋白质,已知仅为属于特定细胞区室如细胞核或胞浆的蛋白质,已知仅为具有细胞功能(如细胞加工产生特异性关注蛋白)的蛋白质,已知仅为具有抗氧化活性或代谢活性或生物合成活性、或分解代谢活性、或激酶活性、或转移酶活性、或裂解酶活性、或连接酶活性、或信号转导活性、或结合活性、或运动活性、或膜融合活性、或细胞沟通活性、或生物学过程调节活性、对刺激的反应活性,细胞死亡相关活性、T 细胞激活相关活性、B 细胞激活相关活性、APC 激活相关活性、炎症性免疫应答相关活性、变态反应相关活性、传染病应答相关活性、转运活性、通道活性、分泌活性、致病活性和细胞骨架组织活性的蛋白质。

[0086] 根据从 DSP 的氨基酸组成和它们的比例直接得出的优先结合靶标和它们的生理功能,可将 DSP 组合物分类。任何现有的方法可用于查明 DSP 组合物是否结合候选或已知的靶蛋白。例如,用报告分子(如放射性核素或生物素)标记多肽后,与粗制或纯化的靶蛋白制品混和,除去未结合的多肽后,如果报告分子粘附于其靶蛋白则检测其结合。

[0087] 在具体实施方式中,本发明所用的 DSP 组合物结合一种或多种 DQ 同工型,其平均 K_a 值为 $1 \mu M$ 或更低,更优选平均 K_j 低于 $100nM$,低于 $10nM$ 或甚至低于 $1nM$ 。另一种鉴定优选的 DSP 的方法是采用近似 Sidney et al, 2002, J. Immunol. 169 :5098 所述的试验,基于在竞争结合试验中测试 DSP 组合物替代另一种组合物,以 IC_{50} 值表示。在某些实施方式中,本发明 DSP 的 IC_{50} 低于 $1 \mu M$,更优选低于 $500nM$,甚至还要优选低于 $100nM$ 。

[0088] 在本说明书所述方法中,可用肽池、肽文库或改变的肽配体库 (APL) 取代 DSP。像 DSP 组合物一样, APL 组合物包含相关多肽的混合物。 APL 的定义为一系列肽,其中每个肽具有从受关注的起始序列(如天然免疫原性肽配体的起始起始序列)发生的少量氨基酸改变。将含有氨基酸序列改变的变体肽合并以制备具有异质性肽混和物优点的组合物 (Fairchild 等, Curr. Topics Peptide & Protein Res. 2004, 6 :237-44)。每种 APL 都有明确的序列,但是组合物可以是具有一种以上序列 APL 的混和物。在一些实施方式中,本发明可采用的肽池或 APL 或肽文库包括美国 No. 7, 118, 874 中所描述的那些。

药代动力学方法

[0089] 在某些实施方式中,可测定 DSP 组合物的吸收和分布。也可测定 DSP 组合物发生变化的速率和这种变化的持续时间,以及 DSP 组合物组成的化学变化。

[0090] 某些 DSP 组合物在血清和其他生物液体中持续不同的时间长度,比其他混合物长得多。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 DSP 组合物递送肽所在部位的任何组织或器官。

对与 DSP 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

[0091] 本发明的一个方面是鉴定能结合 DSP 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 DSP 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。

[0092] 本发明此方面的某些实施方式是鉴定能与 DSP 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 DSP 组合物的样品接触正常组织样品；和检测 DSP 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 DSP 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。

[0093] 作为以上所述鉴定的一个非限制性例子，DSP 组合物可用于直接 ELISA 试验以使用类似实施例 1 中拟定的草案鉴定能结合 DSP 组合物的血清蛋白。下面的表 II 列出了实验显示正常人血清中能结合 DSP、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 III 和 IV 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 DSP 结合。

[0094] 一旦鉴定到能与 DSP 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 DSP 组合物。

血清蛋白质

[0095] 在某些实施方式中，DSP 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。DSP 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。在涉及 RSP 的一个类似实施例中例如，皮下给予 PI-2301 (plovamer, 一种 YFAk 随机序列聚合物) 和 Cop-1 (乙酸格拉默 (glatiramer), 一种 YEAk RSP) 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)。共聚物 1 (Cop-1) 也称作乙酸格拉默。Cop-1 以商品名 COPAXONE™ (Teva Pharmaceuticals Ltd. 商标, Petah Tikva, Israel) 在几个国家被批准用于治疗多发性硬化症 (MS)。Cop-1 的分子量范围和制备优选剂型的方法在美国专利 No. 5, 800, 808 中有描述。

[0096] 因此，可利用血清蛋白来捕获和 / 或鉴定 DSP 中的一种或多种肽。虽然 DSP 组合物总体上含有大量、甚至数十亿不同的肽，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 DSP 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 DSP 组合物，以揭示不同批次 DSP 组合物之间的生物等效性，及揭示不同批次 DSP 组合物之间血清蛋白结合组分在数量与质量上的等效性。

[0097] 可利用血清蛋白来体外选择和 / 或特征鉴定 DSP 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、带电残基的构型。

表 II：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
α -1-抗胰蛋白酶(SEQ ID NO:1)	AAA51546(CAJ15161)
α -1-B-糖蛋白(SEQ ID NO:3)	OMHU1B
α -2-HS 糖蛋白	BAA22651
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
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

表 III :结合 HDL 的血清蛋白

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	gi13645390
LPL	gi3293305
CETP	P11597
C-RP	P02741
大马鲛纤溶酶 (Ceroplasmin)	gi13645230
补体组分 3	gi13649325
触珠蛋白	gi1212947, P00738
SAA	P35542
SAP	P02743
运甲状腺素蛋白	P02766
运铁蛋白	gi4557871, P02787
PON	P27169
补体组分 1 抑制剂	P05155
巨噬细胞刺激因子	gi10337615

淋巴细胞抗原	gi553540
脑脊膜瘤表达的抗原 5	gi11024698
HLA-A 蛋白	gi13620230
NOTCH1	gi11275980
唾液酸结合 Ig 样凝集素 5	gi13633818
C- 型凝集素超家族成员 1	gi5031637
H 因子 1(补体)	gi4504375
补体组分 3	gi13649325
胰岛素瘤 - 相关蛋白 IA-6	gi14211925
潜在的转化生长因子 β	gi3327808
LTBP-2	gi1272664
生长停止 - 特异性基因 -6	gi4557617
受体利阿诺定受体 -2	gi13638463
POU5 结构域蛋白	gi12382246
血浆激肽释放酶 B1	gi11436257
TFP1	P10646/P48307
未取名蛋白产物	gi10435007
未知蛋白	gi12653035
未知蛋白	gi12802992
KIAA1095	gi5689527
KIAA1730 蛋白	gi12698005
KIAA0675 基因产物	gi13643803
CIP- 相互作用锌指蛋白	gi12643326
dj675G8.1(新颖锌指蛋白)	gi11137825

dj733D15.1	gi3702137
TAT- 相互作用蛋白,72kDa	gi1427566
dj758N20.1(蛋白激酶)	gi11493357
蛋白酪氨酸磷酸化酶	gi13645209
推测的蛋白质 dj1057B20.2	gi11034845
桥粒胶蛋白	gi13435361
凝血因子 VIII- 相关蛋白	gi13652210
IgG	gi10334541, P99007
HSA	gi178345, P02728
α -1 β -糖蛋白	P04217

表 IV :与 LDL 结合的血清蛋白

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	
β -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)	

血清蛋白与 DSP 组合物之间的结合

[0098] 不希望受理论的束缚,在机制上 DSP 组合物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。

[0099] 能结合 DSP 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 DSP 组合物与血清蛋白结合时血清中有其他组分。

检测生物样品中的 DSP 组合物:生物利用度的测定

[0100] 本发明一方面内容是检测生物样品中 DSP 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 DSP 组合物结合,存在这种结合表明生物样品中存在 DSP 组合物中的肽组分。还可扩展此种方法来检测样品中 DSP 组合物的含量或浓度。

[0101] 在某些实施方式中,检测生物样品中 DSP 组合物存在的方法是,使生物样品与至少一种捕获多肽(例如包括选自 α -1-抗胰蛋白酶、载脂蛋白 A-I、 α -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 DSP 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 DSP 组合物。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 α -1-抗胰蛋白酶、载脂蛋白 A-I、 α -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 DSP 组合物结合的水平,来检测生物样品中 DSP 组合物的含量。

[0102] 本发明的其他实施方式提供检测对象中 DSP 组合物生物利用度的方法,包括给予受试对象一个剂量含 DSP 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 α -1-抗胰蛋白酶、载脂蛋白 A-I、 α -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,DSP 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 DSP 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 DSP 组合物的生物利用度。

给药剂量和方法的改进

[0103] 本发明另一方面的内容是提供给予哺乳动物受试者 DSP 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。

[0104] 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 DSP 组合物;给予受试对象该 DSP 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 α -1-抗胰蛋白酶、载脂蛋白 A-I、 α -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 DSP;测定分

离的 DSP 的特性 ; 制备具有分离的 DSP 特性的一组 DSP, 和将制备的该组 DSP 给予治疗对象。

[0105] 在这些方法中, 可给予受试对象一次以上的 DSP 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 DSP 组合物。

[0106] 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 DSP 组合物, 合适剂量的确定是通过给予治疗对象第一剂 DSP 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 α -1- 抗胰蛋白酶、载脂蛋白 A-I、 α -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 DSP 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 DSP 组合物达到预先确定的合适水平的剂量。生物样品中 DSP 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成。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 DSP 组合物 (作为一个组) 的半衰期。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 α 、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。

[0107] 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, DSP 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 DSP 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 DSP 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 DSP 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 DSP 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 DSP 组合物的第二种合适剂量。

[0108] 在具体实施方式中, 采用本发明的方法可提高给予 DSP 组合物的效果。一种方法包括给予受试对象合适剂量的 DSP 组合物, 可按如下步骤确定这种合适剂量 : 给予受试对象一种剂量的 DSP 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 α -1- 抗胰蛋白酶、载脂蛋白 A-I、 α -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 DSP 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。

[0109] 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 DSP 组合物中的一种或多种肽后, 可分离得到含有结合于 DSP 组合物的捕获多肽的结合复合体。

[0110] 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 DSP 组合物的抗体, 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 DSP 结合的检测。

[0111] 可经皮下、肌肉内、静脉内、鼻内,或通过喷管或粘膜给予 DSP 组合物。

[0112] 在某些实施方式中,用于检测生物样品中 DSP 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 α -1-抗胰蛋白酶、载脂蛋白 A-I、 α -1-B-糖蛋白、载脂蛋白 A-IV、载脂蛋白 D 和前白蛋白的肽。

DSP 组合物中特异性肽的选择

[0113] 本发明的一个方面是在鉴定和 / 或分离 DSP 组合物中的肽或肽亚组上的用途。虽然 DSP 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 DSP 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 DSP 组合物中的组分分类。

[0114] 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 DSP 组合物,使所述 DSP 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 DSP 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 DSP 组合物。

[0115] 在某些实施方式中,使含 DSP 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 DSP 组合物所含的肽。在某些实施方式中,使 DSP 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 α -1-抗胰蛋白酶、载脂蛋白 A-I、 α -1-B-糖蛋白、载脂蛋白 A-IV、载脂蛋白 D 和前白蛋白。

[0116] 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。

[0117] 也可利用 DSP 组合物与血清蛋白的结合来鉴定 DSP 组合物(例如,从受试对象收集的生物样品)中的生物可利用肽。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 α -1-抗胰蛋白酶、载脂蛋白 A-I、 α -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。

改进的 DSP 组合物制备

[0118] 本发明的另一方面是改进含 DSP 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 DSP 组合物设计。在一些实施方式中,将 DSP 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。

[0119] 在某些实施方式中,制备毒性减弱的 DSP 组合物的方法包括:使该 DSP 组合物与至少一种捕获多肽(例如包括选自 α -1-抗胰蛋白酶、载脂蛋白 A-I、 α -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。

[0120] 类似地,制备疗效提高的 DSP 组合物的方法可包括:使 DSP 组合物与至少一种捕获多肽(包含选自 α -1-抗胰蛋白酶、载脂蛋白 A-I、 α -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。

[0121] 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 DSP 组合物亚组。可按前面的预期和描述, 制备 DSP 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 DSP 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 DSP 组合物可用作治疗剂。

[0122] 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 DSP 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 DSP 组合物 ; 配制包含 DSP 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 DSP 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。

治疗剂的组织特异性靶向

[0123] DSP 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 DSP 组合物 ; 和将治疗剂与 DSP 组合物偶联, 形成偶联药物。

[0124] 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 DSP 组合物与组织特异性肽 (例如包括选自 α -1- 抗胰蛋白酶、载脂蛋白 A-I、 α -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。

[0125] 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。根据对 α -1- 抗胰蛋白酶、载脂蛋白 A-I、 α -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 DSP 组合物中可分离得到这样的肽。

[0126] 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。

[0127] 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

实施例 1. 检测正常人血清中的 PI-2301 和 Cop-1

[0128] 制备浓度 500ng/mL 的 PI-2301 (YFAK 随机序列聚合物) 或 Cop-1 (YEAk 随机序列聚合物), 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

PI-2301 或 Cop-1 与血清蛋白的结合。

[0129] 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 蛋白纯化的抗兔抗 -PI-2301 或抗兔抗 -Cop-1 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 PI-2301 或 Cop-1 外。

[0130] 将结果绘成图 2。X-轴为复杂肽混合物的浓度。Y 轴显示 HRP 偶联第二抗体的 A450 比色吸光度。在复杂肽混合物浓度较高时,用抗 PI-2301 或抗 Cop-1 抗体测得偶联物(浓度)高于较低浓度的复杂肽混合物。在病人中 12.5ng/mL 浓度对应于大约 2mg 剂量。

实施例 2. 在柱上捕获复合体

[0131] 制备固定的 PI-2301 或 Cop-1 的方法是,用溴化氰法使这些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 1mM HCl(每 g 冻干 Sepharose 珠用大约 200mL 1mM 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。

实施例 3. 结合于 PI-2301 或 Cop-1 的蛋白质的鉴定

[0132] 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段模式。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。

[0133] 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 PI-2301 或 Cop-1 混合, 使之结合血清中的组分。用抗 -YFAK 或抗 -YEAk 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。

[0134] 当用上述方法鉴定的捕获多肽预期与 DSP 结合时, 也可用 DSP 进行上述测试以便凭经验对最强的结合 DSP 的血清蛋白进行鉴定。

实施例 4. 比较不同长度和不同批次 DSP 组合物的肽组成

[0135] 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。根据对 DSP 组合物的鉴定, 合适的生物测定法包括用单核细胞系 RAW264.7 释放 CCL22、活体外细胞增殖试验, 及检测血清蛋白与 DSP 组合物所含肽的结合。用这些生物测定法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 DSP 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。

[0136] 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。在某些实施方案中, 捕获多肽是图 3 所示蛋白质。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 DSP 的一个亚组结合于血清蛋白的条件下, 取各批 DSP 组合物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 DSP 肽进一步作特性分析: (1) 是否存在独特的 DSP 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 DSP 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。互相比较每批分离得到的 DSP 肽的特性。

[0001]

序列表

SEQ ID NO:1, 人 α -1-抗胰蛋白酶; 登录号: CAJ15161

MPSSVSWGILLLAGLCCLVPVSLAEDPQGDAAQKTDTSHHQDHPNFKITPNLAEFAFSL
YRQLAHQSNSTNIFFSPVSIATAFAMLSLGTKADTHDEILEGLNFNLTETIPEAQIHEGFQE
LLRTLNPDSQLQLTTGNGLFLSEGLKLVDFLEDVKKLYHSEAFVNFWDTEEAKKQIND
YVEKGTQGKIVDLVKELDRDTVFALVNYIFFKKGWERPFVVKDTEEDDFHVDQATTVKVP
MKRLGMFNIQHCKKLSWVLLMKYLGNATAIFFLPDEGKLOHLENELTHDIITKFLNEDR
RSASLHLPKLSITGTDLKSVLGLGITKVFNSGADLSGVTEEAPLKLKAVHKAVLTIDK
KGTEAAGAMFLEAIPMSIPPEVKFNKPFVFLMIEQNTKSPLFMGKVVNPTQK

SEQ ID NO:2, 人载脂蛋白A-1; 登录号: AAS68227

MKAAVLTAVLFLTGSQARHFVQDDEPPQSPWDRVKDLATVYVDVLKDSGRDYVSQFEGSA
LGKQLNLKLLDNWDSVTSTFSKLRQLGPVTQEFWDNLEKETEGLRQEMSKDLEEVKAKVQ
PYLDDFQKKWQEEEMELYRQKVEPLRAELQEGARQKLHELQEKLSPLGEEMRDRARAHVDAL
RTHLAPYSDELQRRLAARLEALKENGGARLAEYHAKATEHLSTLSEKAKPALEDLRQGLLP
VLESFKVSFLSALEEYTKKLNTQ

SEQ ID NO:3, 人 α -1-B-糖蛋白; 登录号: OMHU1B

AIFYETQPSLWAESESLKPLANVTLTQARLETPDFQLFKNGVAQEPVHLDSPAIKHQFL
LTGDTQGRYRCRSGLSTGWTQLSKLLELTGPKSLPAPWLSMAPVSWITPGLKTTAVCRGVL
RGVTFLLRREGDHEFLEVPEAQEDVEATFPVHQPGNYSCSYRTDGEALSEPSATVTIEEL
AAPPPVLMHHGESSQVLHPPGNKVTLTQVAPLSGVDFQLRRGEKELLVPRSSSTSPDRIFFH
LNAVALGDGGHYTCRYRLHDNQNWSGDSAPVELILSDETLPAPEFSPEPESGRALRLRCL
APLEGARFALVREDRGGRRVHRFQSPAGTEALFELHNI SVADSANYSCVYVDLKPFFGGSA
PSELELHVDGPPPRPQLRATWVGAVLAGRDAVLRCEGPIPDVTFELLREGETKAVKTVRT
PGAAANLELIFVGPQHAGNYRCRYRSWVPHTFESELSDPVELLVAES

SEQ ID NO:4, 人载脂蛋白A-1V; 登录号: AAA51744

MFLKAVVLTALVAVAGARAEVSADQVATVMWDYFSQLSNNAKEAVEHLQKSELTOQLNAL
FQDKLGEVNTYAGDLQKKLVPFATELHERLAKDSEKLKEEIGKELEELRARLLPHANEVSO
KIGDNLRELQQRLEPYADQLRTQVNTQAEQLRRQLDPLAQRMERVLRENADSLQASLRPHA
DELKAKIDQNVEELKGRLLTPYADEFKVKIDQTVVEELRRSLAPYAQDTQEKLNHQLEGLTFQ
MKNNAEELKARISASAEELRQLAPLAEDVRGNLKGNTGLQKSLAELGGHLDQQVEEFRR
RVEPYGENFNKALVQQMEQLRQKLGPHAGDVEGHLSFLEKDLRDKVNSFFSTFKEKESQDK
TSLPELEQQQEQQQEQQQEQVQMLAPLES

SEQ ID NO:5, 人载脂蛋白D; 登录号: AAB35919

GEATPVNLTEPAKLEVKFSWFMPSPAPYWILATDYENYALVYSCTCIIQLFHVDFAWILARN
PNLPPETVDSLKNILTSNNIDVKMKTVDQVNCPKLS

[0002]

SEQ ID NO:6, 人前白蛋白; 登录号: BAA00059

MASHRLLLLCLAGLVFVSEAGPTGTGESKCPMLVKVLDVAVRGS PA INVAMHVFRKAADDTW
EPFASGKTSESGELHGLTTEEEFVEGIYKVEIDTKSYWKALGISPFHEHAEVVFANDSGP
RRYTIAALLSPYSYSTTAVVTNPKE

SEQ ID NO:13, 人肌蛋白; (AAH22532)

MANLGCWMLVLFVATWSDLGLCKKRPKPGGWNTGGSRYPGQGS PGGNRYPPQGGGGWGQPH
GGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQGGGTHSQWNKPSKPKTNMKHMAGAAAAGAVV
GGLGGYVLGSAMSRPI IHFGSDYEDRYRENMHRYPNQVYYRPMDEYSNQNNFVHDCVNIT
IKQHTVTTTTKGENFTETDVKMMERVVEQMCITQYERESQAYYKRGSSMVLFSPPVILLI
SFLIFLIVG

SEQ ID NO:14, 人SOD1; (CAG46542)

MATKAVCVLKGDPVQGI INFEQKESNGPVKVGWS IKGLTEGLHGFHVHEFGDNTAGCTSA
GPHFNPLSRKHGGPKDEERHVGDLGNVTADKDGADVSIEDSVISLSGDHCI IGRTLNVHE
KADDLGKGGNEESTKTGNAGSRLACGVIGIAQ

SEQ ID NO:15, 人享廷顿肽

MATLEKLMKAFESLKS FQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQPPPPPPPPPPQLPQPPQQAQ
PLLQPQPPPPPPPPPPGPAVAEEPLHRPKKELSATKKDRVNHCLTICENIVAQS VRNSPE
FQKLLGIAMELFLLCSDDAESDVRMVADECLNKVIKALMDSNLPRLQLELYKEIKKNGAPR
SLRAALWRFaelahlvrpQKCRPYLVNLLPCLTRTSKRPEESVQETLAAAVPKIMASFGNF
ANDNEIKVLLKAFIANLKSSSPTIRRTAAGSAVSI CQHSRRTQYFYSWLLNVLLGLLVPVE
DEHSTLLILGVLLTLRYLVPLLQQQVKDTSLKGSFGVTRKEMEVS PSAEQLVQVYELTLHH
TQHQDHNVV TGALELLQQLFRTPPELLQTLTAVGGIGQLTAAKEESGGRSRSGSIVELIA
GGSSCS PVL SRKQKGVLLGEEEALEDDSESRS DVSSALTASVKDEISGELAASSGVST
PGSAGHDIITEQPRSQHTLQADSVDLASC DLTSSATDGDEEDILSHSSQVS AVPSDPAMD
LNDGTQASSPI SDSSQTTTEGPDSAVTPSDSSEIVLDGTDNQYLG LQIGQPQDEDEEATGI
LPDEASEAFRNS SMALQQAHL LKNMSHCRQPSDSSVDK FVLRDEATEPGDQENKPCRIGD
IGQSTDDDSAPLVHCVRLLSASFLLTGKKNVLPDRDVRVSVKALALSCVGA AVALHPESF
FSKLYKVP LDTTEY PEEQYVSDILNYIDHGDPQVRGATAILCGTLIC SILSRSRFHVGDWM
GTIRTLTGNTFSLADCI PLLRKT LKDESSVTCKLACTAVRNCVMSLCSSSYSELGLQLIID
VLT LRNSSYWLVRTELLET LAEIDFRLVS FLEAKAENLHRGAHHTG LLLKQERVLNNVVI
HLLGDEDPRVRHVAASLIRLVPKLFYKCDQGGADPVVAVARDQSSVYLKLLMHETQPPSH
FSVSTITRIYRGYNLLPSITDVTMENNLSRVIAAVSHELITSTTRALTFGCCEALCLLSTA
FPVCIWSLGWHCGV PPLSASDESRSCTVGMATMIL TLLSSAWFPLDLSAHQDALILAGNL
LAASAPKSLRSSWASEEEANPAATKQEEVWPALGDRALVPMVEQLF SHLLKVINICAHVLD
DVAPGPAIKAALPSLTNPPSLSPIRRKGKEKEPGEQASVPLSPKKGSEASAASRQSDTSGP
VTTSKSSSLGSFYHLPSY LKLHDVLKATHANYKVTLDLQNSTEKFGGFLRSALDVLSQILE
LATLQDIGKCV EeilgylkscfsRPEMMATVCVQQLLKT LFGTNLASQFDGLSSNPSKSQG
RAQRLGSSSVRGLYHYCFMAPYTHFTQALADASLRNMVQAEQENDTSGWFDVLQKVSTQL
KTNLTSVTKNRADKNAIHNHIRLFEPLVIKALKQYTTTTTCVQLQKQVLDLLAQLVQLRVNY
CLLDSDQVFIGFVLKQFEYIEVGQFRESEAIIPNIFFLVLLSYERYH SKQIIGIPKIIQL
CDGIMASGRKAVTHAIPALQPIVHDLFVLRGTNKADAGKELETQKEVVVSM LRLRIQYHQV
LEMFILVLQQCHKENEDKWKRLSRQIADIILPMLAKQQM HIDSHEALGVLNTLFEILAPSS
LRPVDMLLRSMFVTPNTMASVSTVQLWISGILAILRVLISQSTEDIVLSRIQELSFSPYLI

[0003]

SCTVINRLRDGDSTSTLEEHSEGKQIKNLPEETFSRFLLQLVGILLEDIVTKQLKVMSEQ
QHTFYCQELGTLMLCLIHIFKSGMFRITAAATRLFRSDGCGGSFYTLDSLNLRRSMITT
HPALVLLWCQILLLVNHTDYRWVAEVQQTPKRHLSSTKLLSPQMSGEEEDSDLAAKLGM
NREIVRRGALILFCDYVCQNLHDSEHLTWLIVNHIQDLISLSHEPPVQDFISAVHRNSAAS
GLFIQAIQSRNENLSTPTMLKKTLCLEGIHLSQSGAVLTLYVDRLLCTPFRVLARMVDIL
ACRRVEMLLAANLQSSMAQLPMEELNRIQEYLQSSGLAQRHQRLYSLLDRFRLSTMQDSLS
PSPVSSHPLDGDGHVSLETVSPDKDWYVHLVKSQCWTRSDSALLEGAELVNRI PAEDMNA
FMMNSEFNLSLLAPCLSLGMSEISGGQKSALFEAAREVTLARVSGTVQQLPAVHHVFQPEL
PAEPAAYWSKLNDFLFGDAALYQSLPTLARALAQYLVVVSKLPSHLHLPPEKEKDIVKVVVA
TLEALSWHLIHEQIPLSLDLQAGLDCCCLALQLPGLWSVVSSTEFVTHACSLIYCVHFIL
AVAVQPGEQLLSPERRTNTPKAISEEEEEVDPNTPKPKYITACEMVAEMVESLQSVLALG
HKRNSGVP AFLTPLLRIIISLARLPLVNSYTRVPLVWKLGWSPKPGGDFGTAFPEIPVE
FLQEKEVFKEFIYRINTLGTWTSRTQFEETWATLLGVLTQPLVMEQEEESPPEEDTERTQIN
VLAVQAITSVLVSAMTVPVAGNPAVSCLEQQPRNKPLKALDTRFGRKLSIIRGIVEQEIQA
MVKRENIATHHLYQAWDPVPSLSPATTGALISHEKLLLQINPERELGSMYSKLGQVSIHS
VWLGNSITPLREEEWDEEEEEADAPAPSSPPTSPVNSRKHRAAGVDIHSQFLLELYSRW
ILPSSSARRTPAILISEVVRSLLVSDLFTERNQFELMYVTLTELRRVHPSEDEILAQYLV
PATCKAAAVLGMKAVAEPVSRLLLESTLRSSHLP SRV GALHGVLYVLECDLDDTAKQLIP
VISDYLLSNLKGIAHCVNIHSQQHVLVMCATAFYLIENYPLDVGPEFSASIIQMCGVMMLSG
SEESTPSIIYHCALRGLERLLLSEQLSRLDAESLVKLSVDRVNVHSPHRAMAALGLMLTCM
YTGKEKVS PGR TSDPNPAAPDSESVIVAMERVS VLFDRIRKGFPC EARVVARILPQFLDDF
FPPQDIMNKVIGEFLSNQQPYQFMATVVYKVFQTLHSTGQSSMVRDWMLSLSNFTQRAP
VAMATWSLSCFFVSASTSPWVAAILPHVISRMGKLEQVDVNLFCLVATDFYRHQIEEELDR
RAFQSVLEVVAAPGSPYHRLTCLRNHVHKVTTC

SEQ ID NO:16, 人 β -2微球蛋白; 登录号: P61769-1

MSRSVALAVLALLSLSGLEAIQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLK
NGERIEKVEHSDLSFSKDW SFYLLLYTEFTPTTEKDEYACRVNHVTL SQPKIVKWDRDM

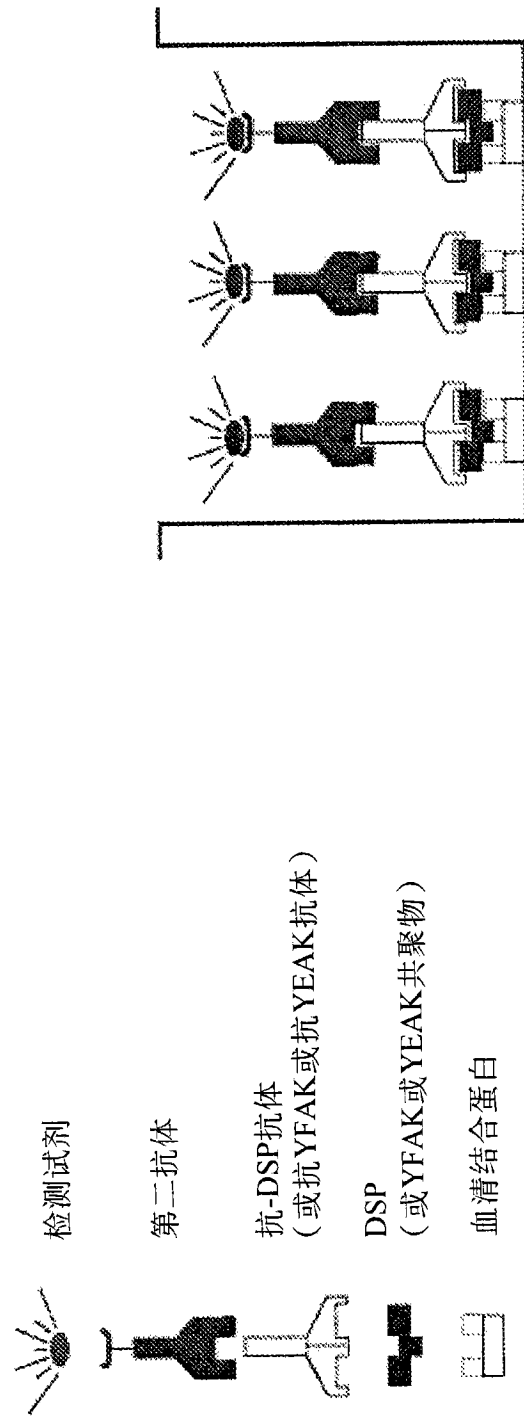


图 1

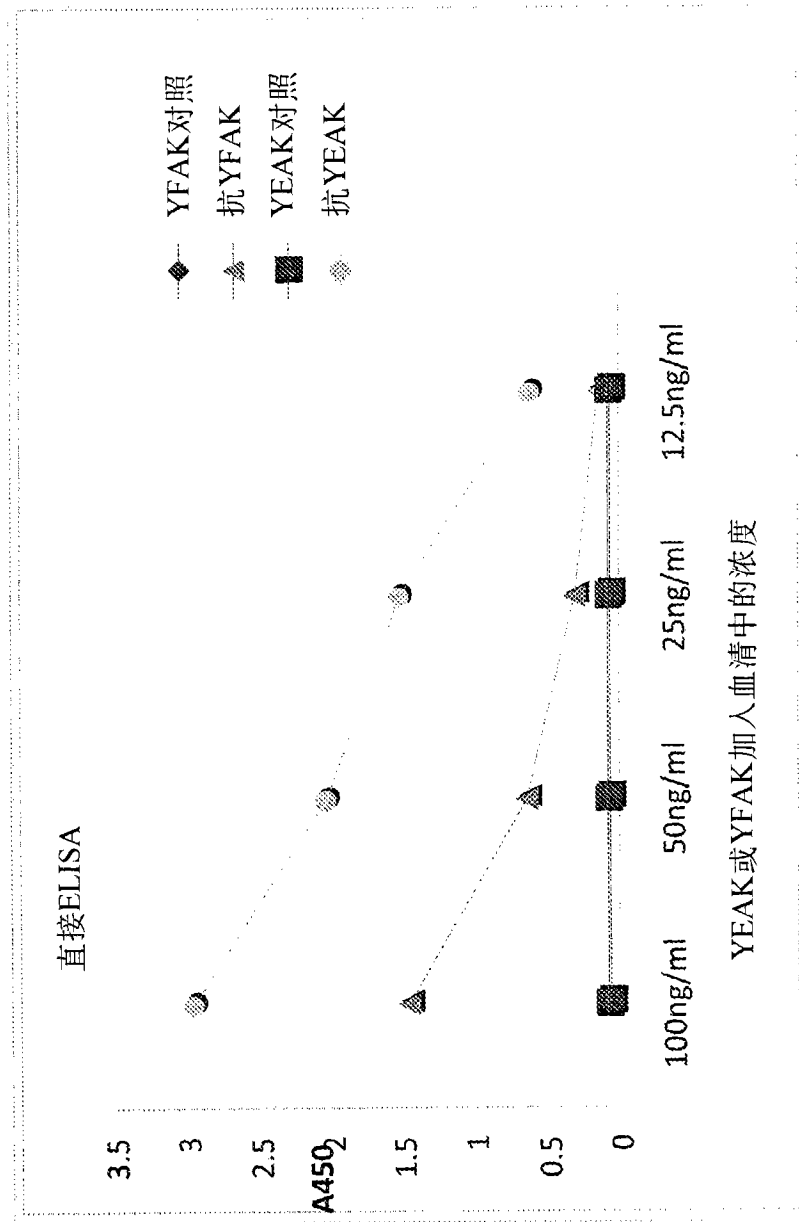


图 2

PI-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-I	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		
	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	Q9Z2L4	125
间- α -胰蛋白酶抑制剂重链H1	Q61702	109
补体组分3	NP_058690	97
间- α -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-I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- α -胰蛋白酶抑制剂家族重链-相关蛋白 (IHRP)	BAA07602	175
α -1-B糖蛋白	OMHU1B	160
α -1-抗胰蛋白酶	AAA51546	156
载脂蛋白A-IV	AAA51744	147

图 3

考帕松与正常人血清		
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
补体因数B	AAA16820	127
前白蛋白	EAA00059	120
IgM的C链	ZRCJ C	105
免疫球蛋白λ轻链	CAA40939	104
凝血因数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

P1-2301 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PI-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
α -1-抗胰蛋白酶	AAA51546	128
载脂蛋白A-IV	AAA51744	143
载脂蛋白C-III	AAB59372	100
α 2-HS糖蛋白	BAA22651	88
α -1-B-糖蛋白	OMHU1B	79
载脂蛋白J前体	AAA51765	72

在马来未乙酰化的PI-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
α -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
α -1-B-糖蛋白	OMHU1B	84
α 2-HS糖蛋白	BAA22651	86

图3(续)

YEAK在小鼠中的生物利用度

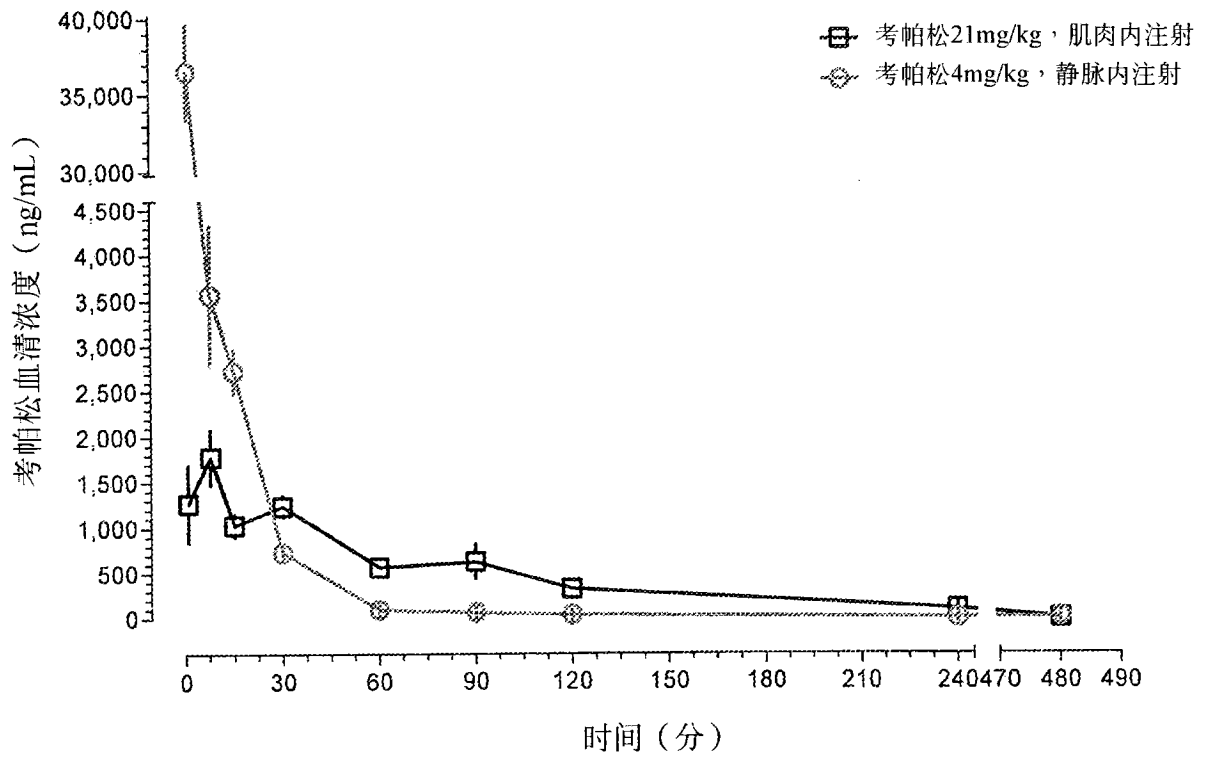


图 4

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

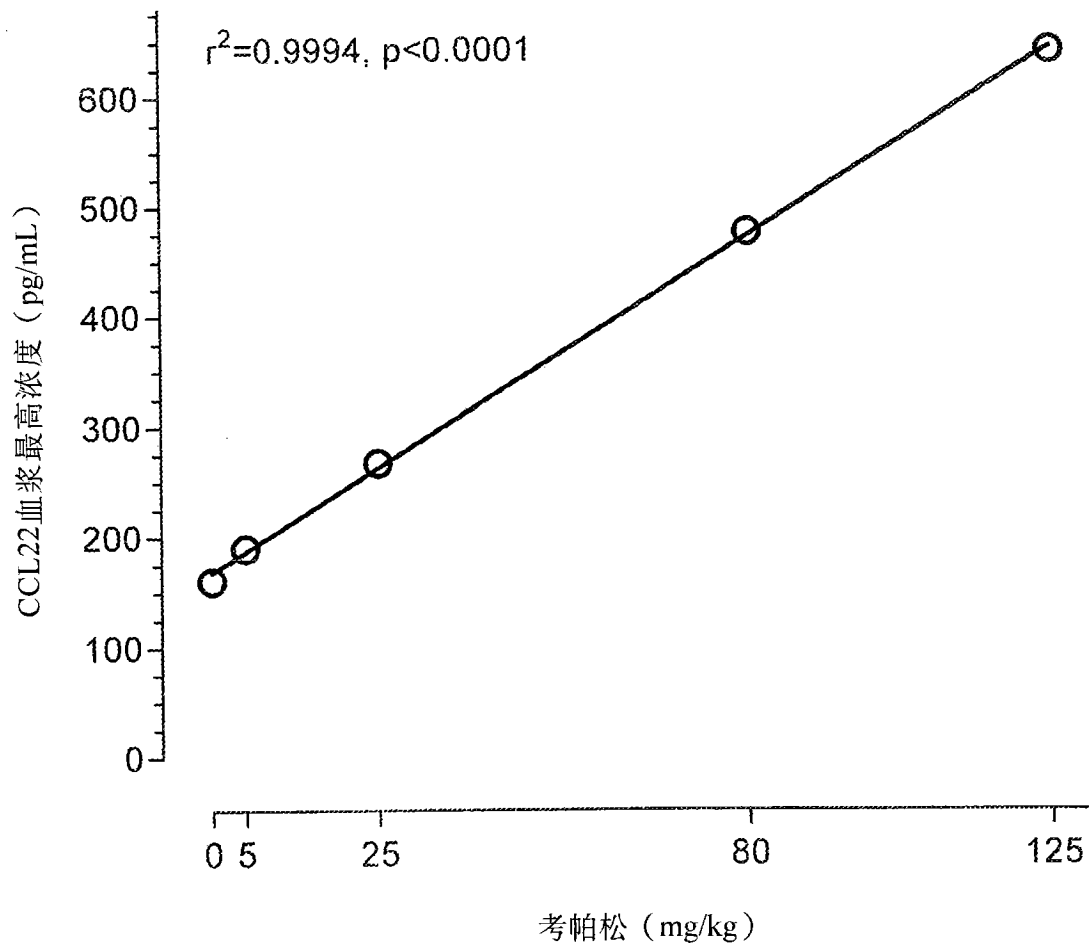


图 5

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

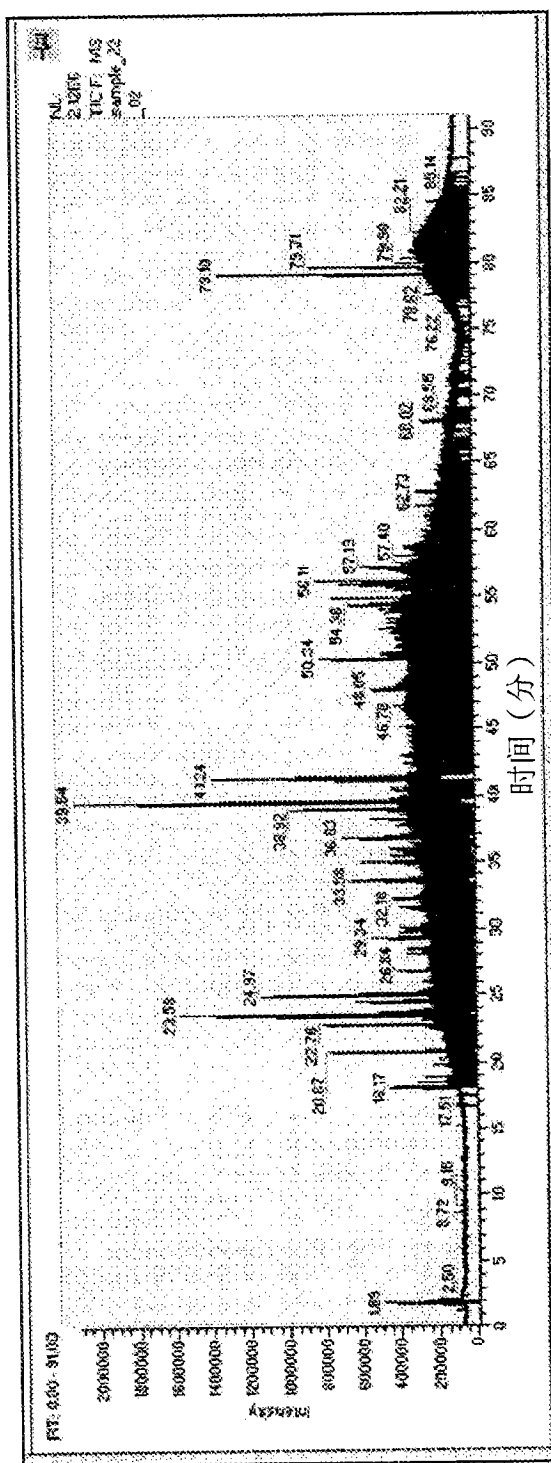


图 6

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

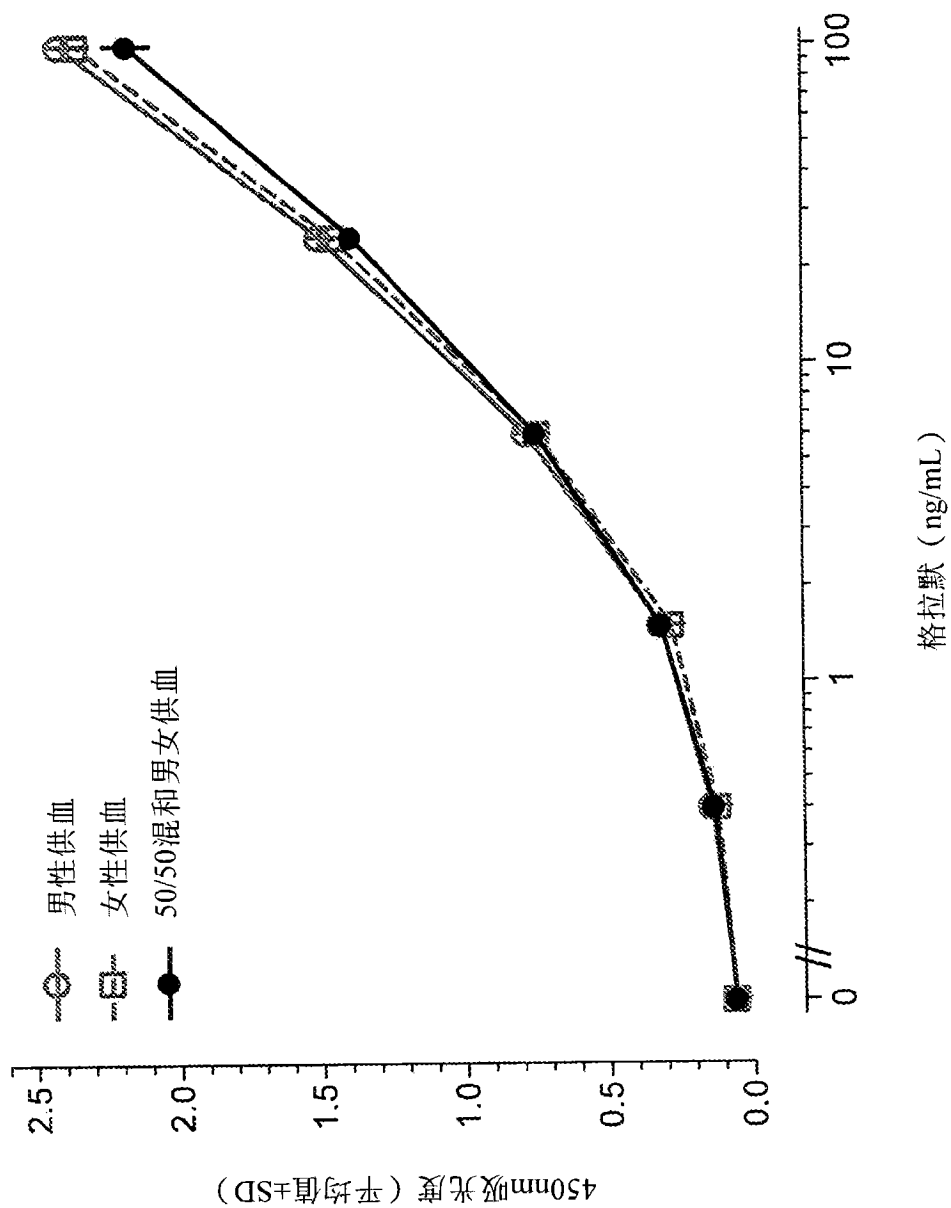


图 7

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

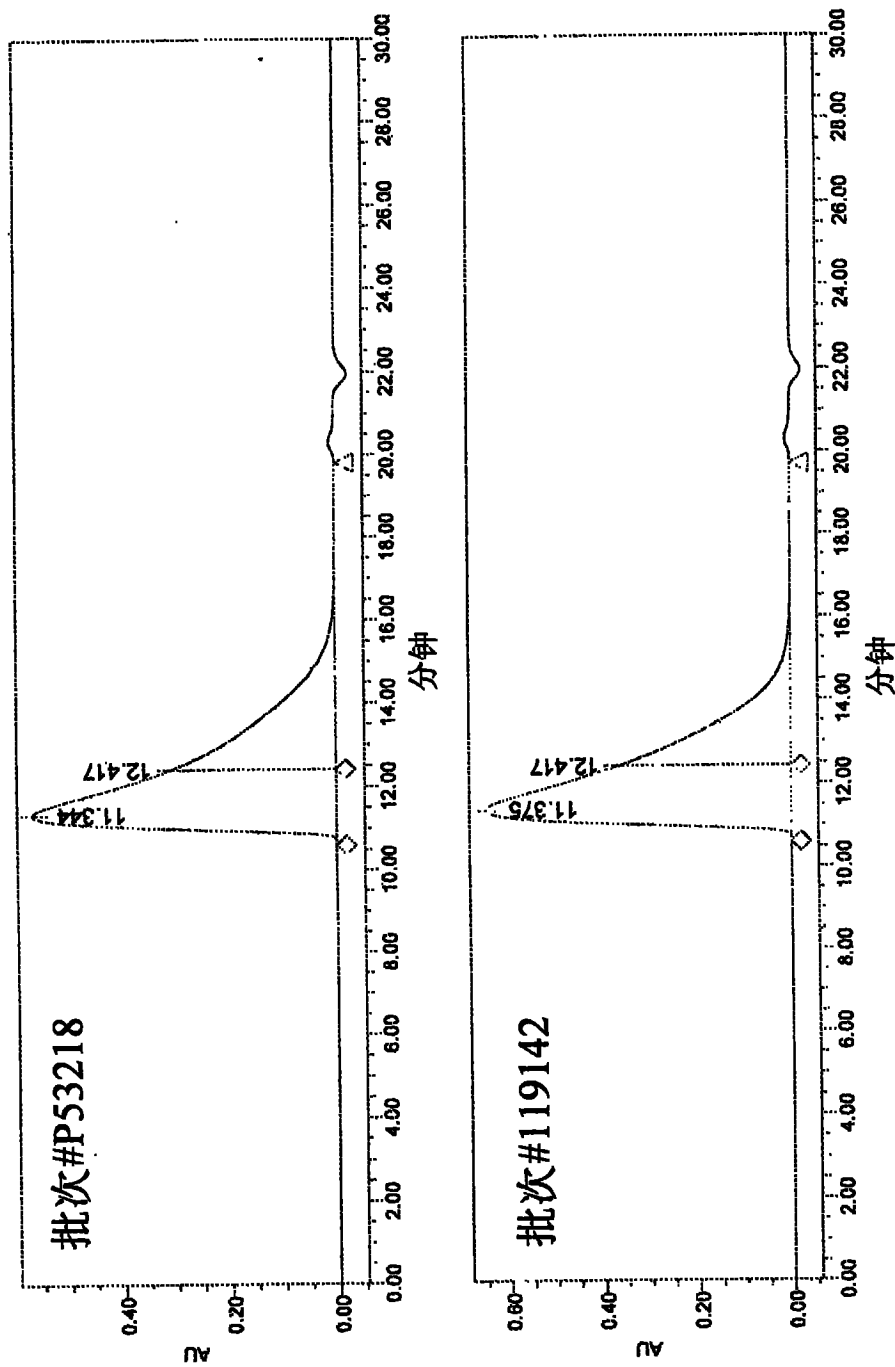
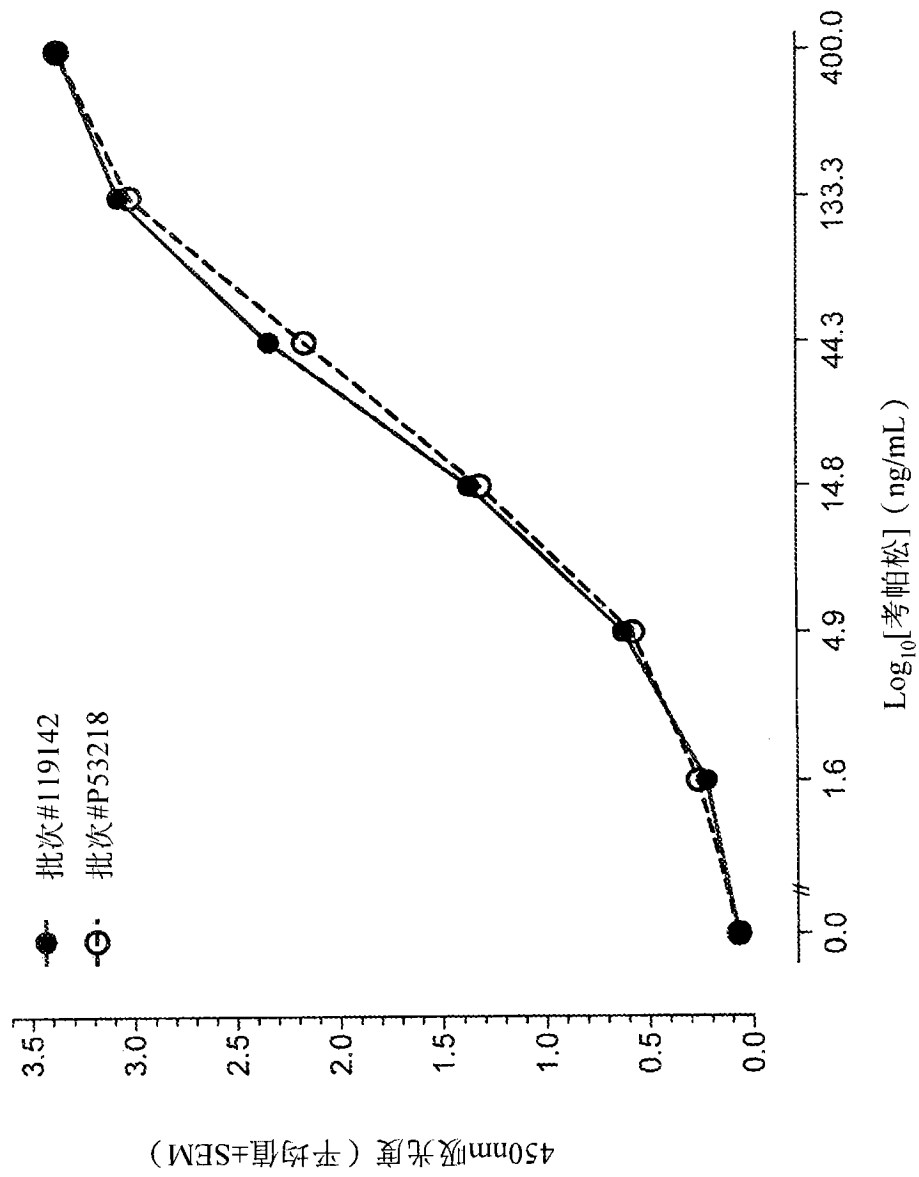


图 8

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



6 图

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

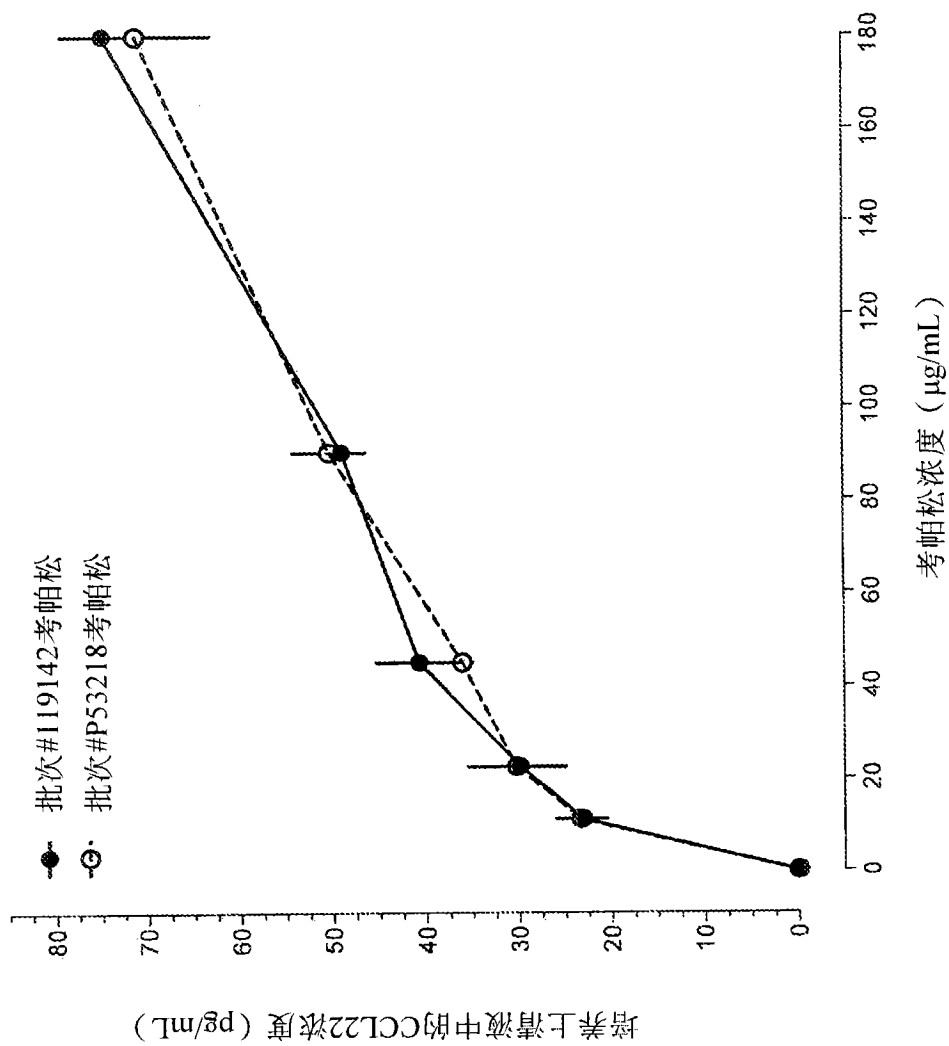


图 10

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

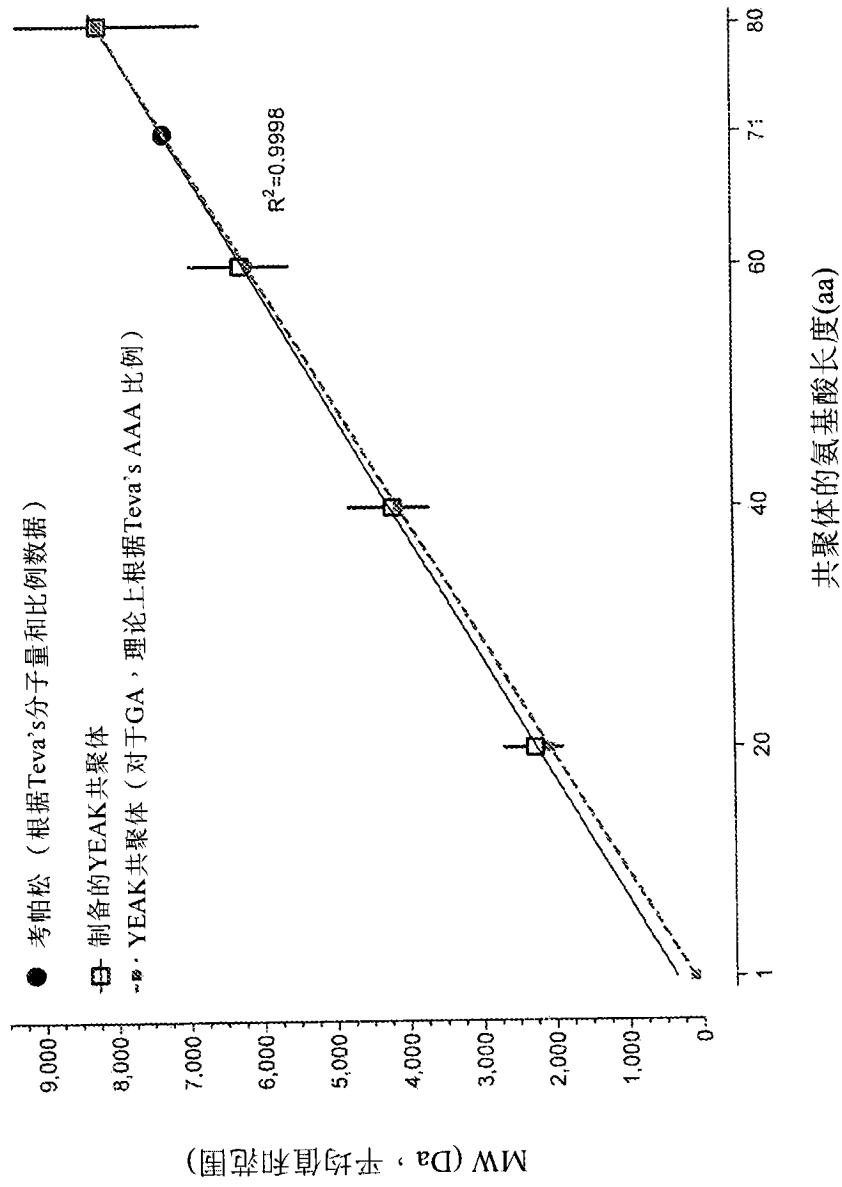


图 11

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）

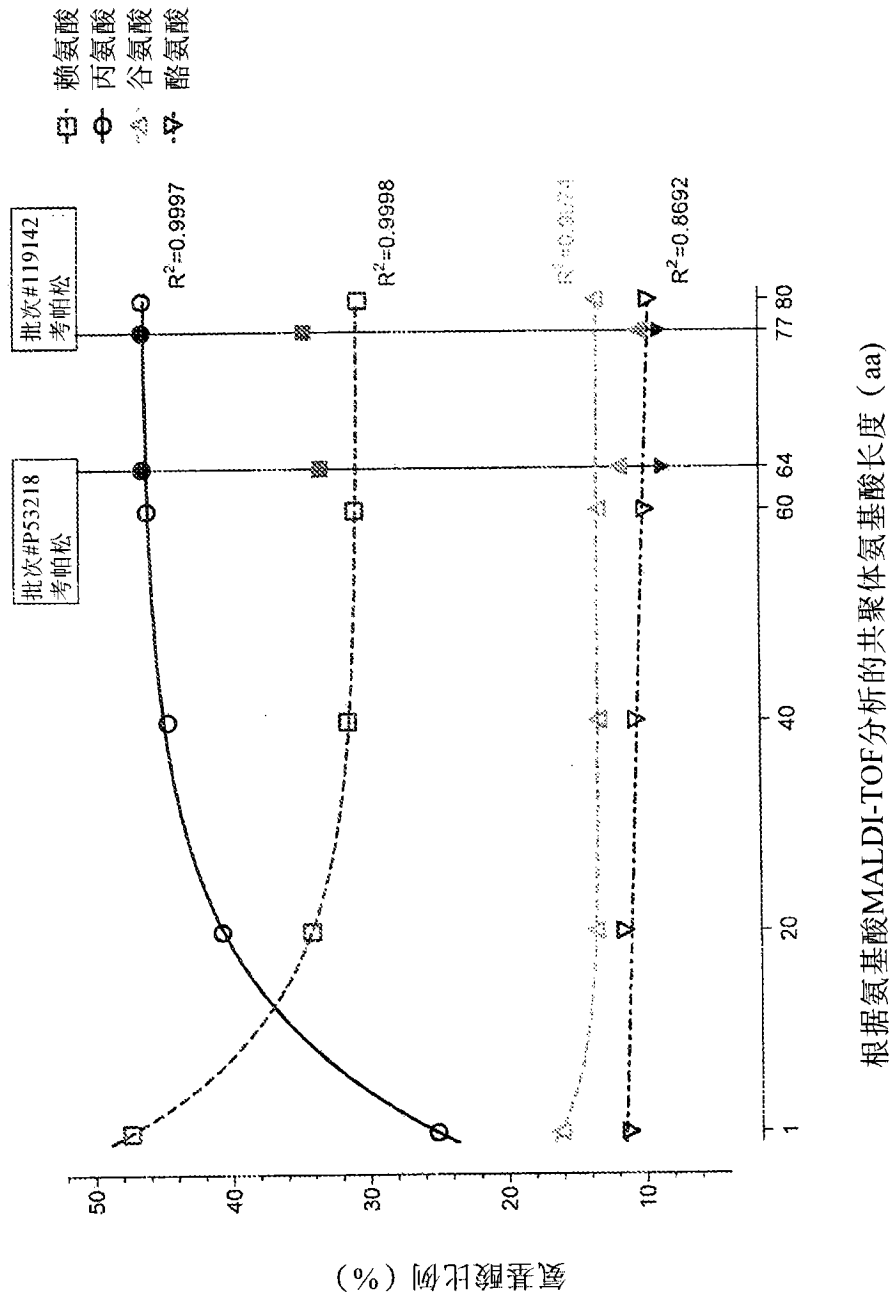


图 12

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

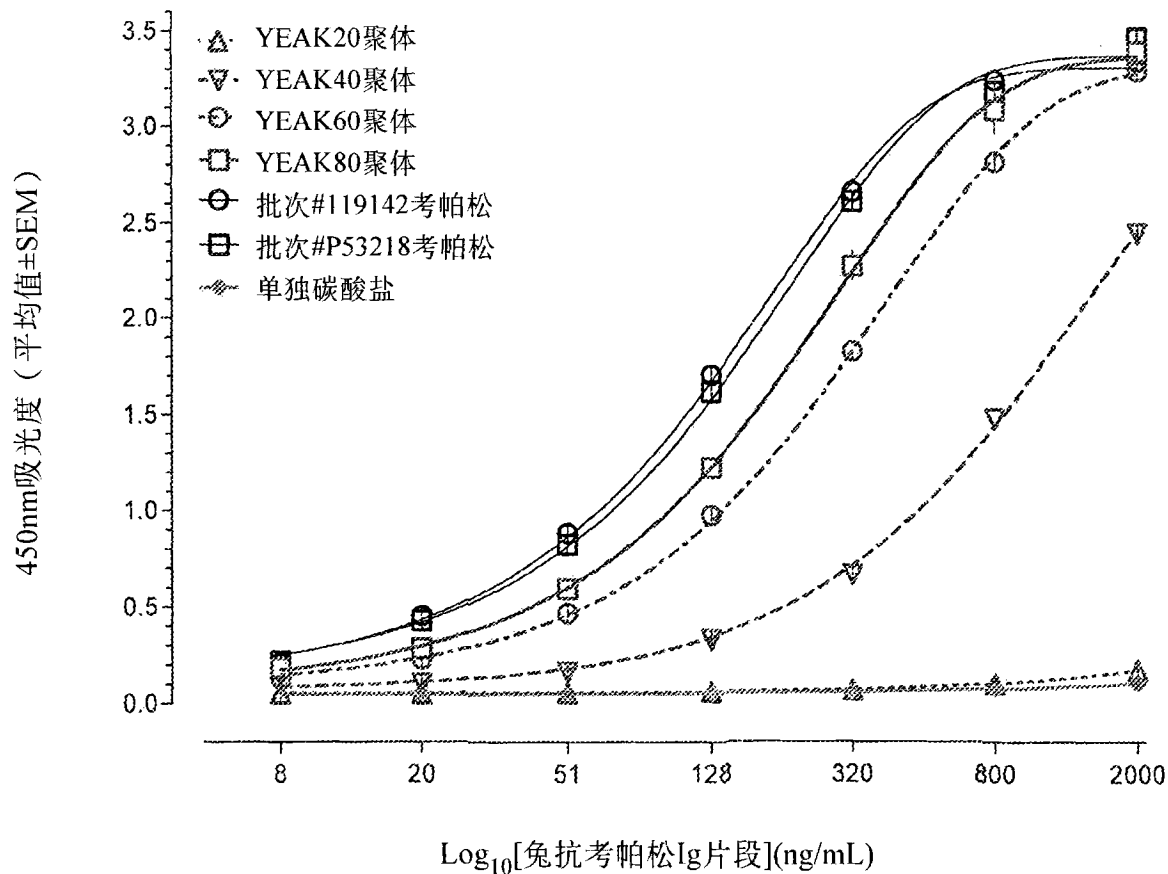
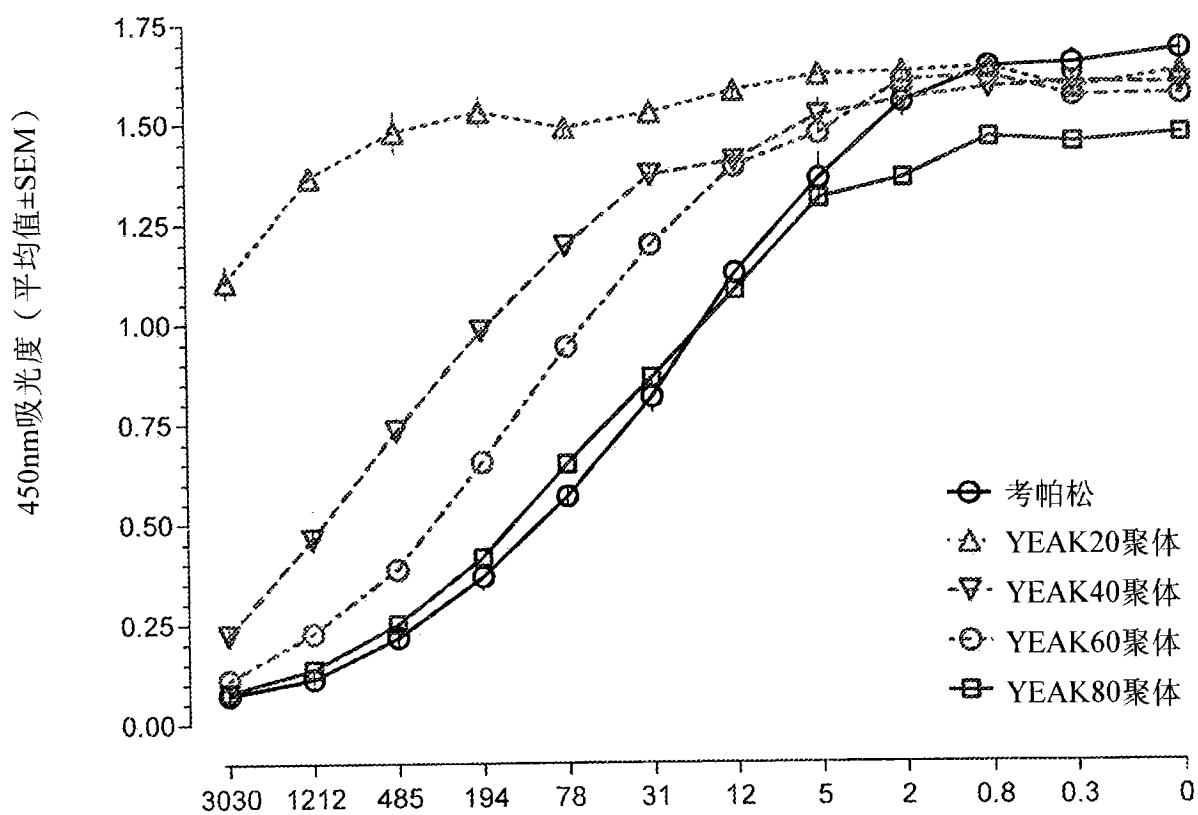


图 13

采用上述PK方法和YEAk共聚体的标准曲线与考帕松比较



Log₁₀[受试共聚体] (nM) 线与考帕松比较

图 14

YEAK共聚体对单核细胞系RAW264.7释放CCL22的影响

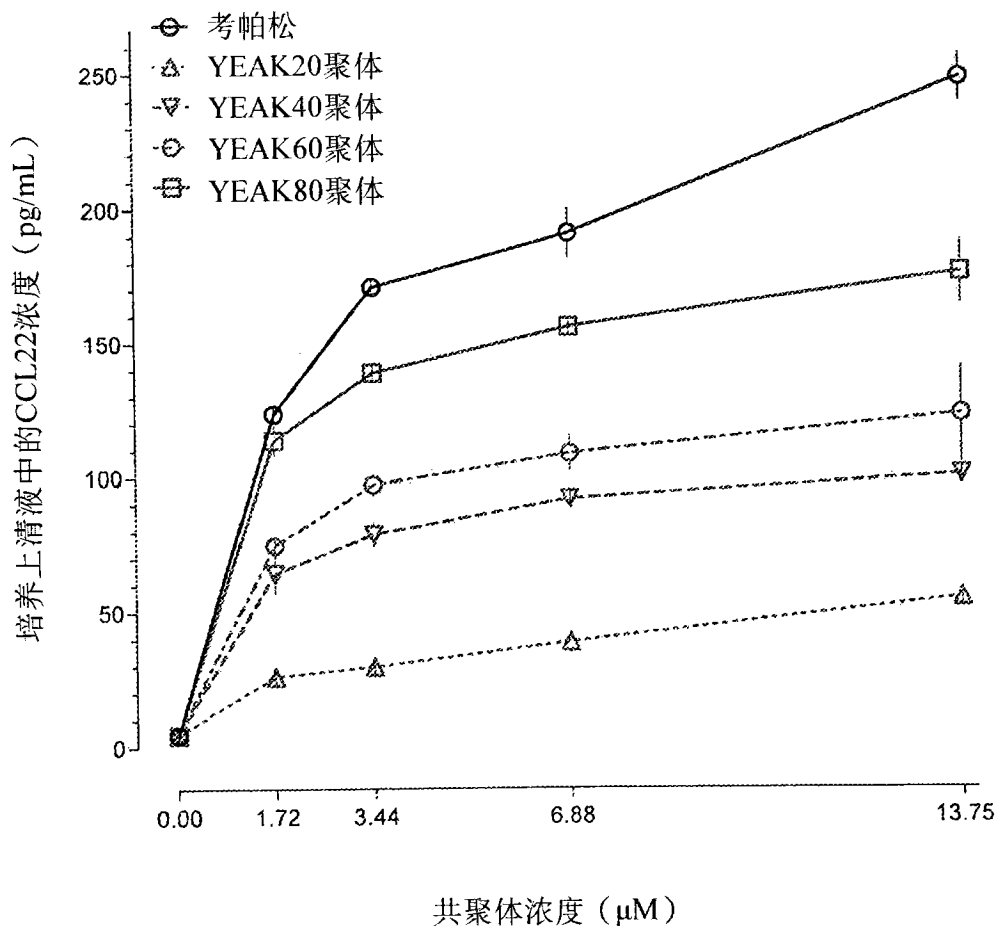


图 15

YEAKE共聚体对小鼠脾细胞回忆应答的影响

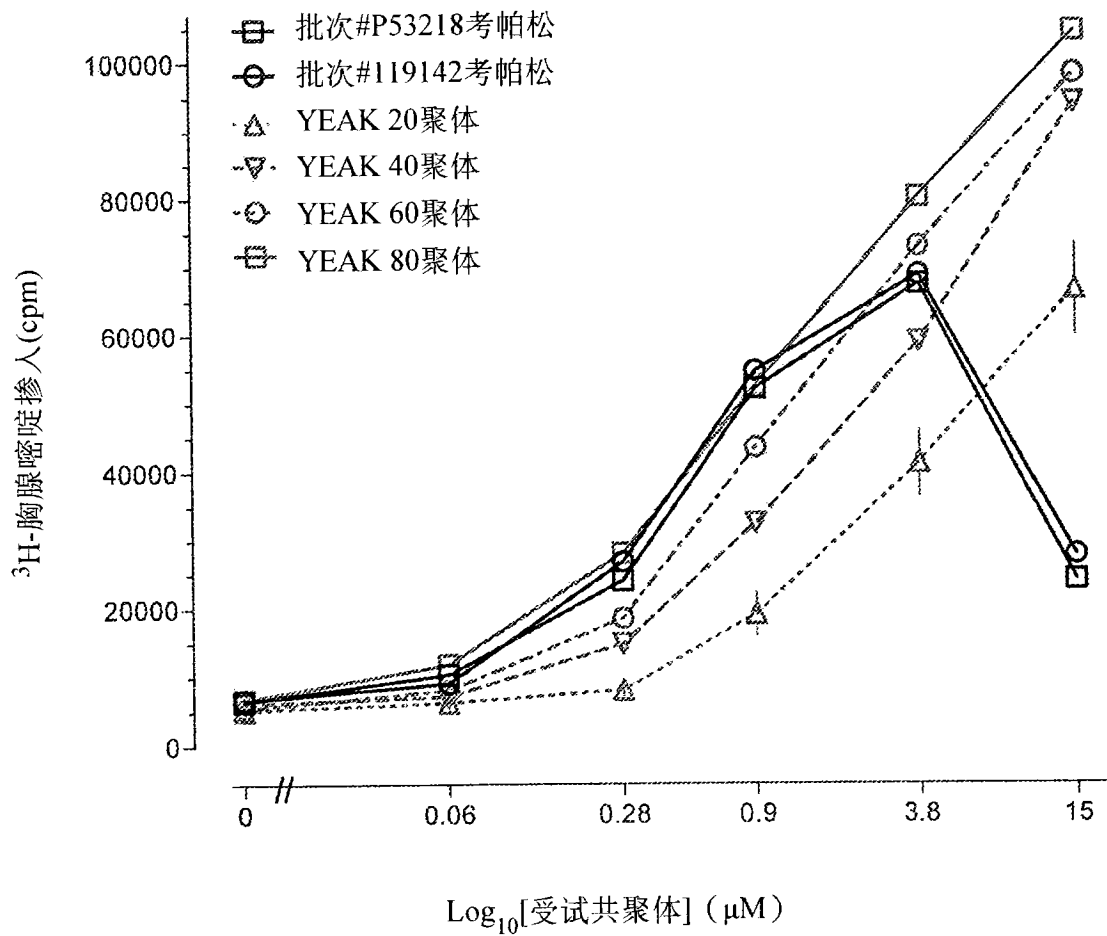


图 16

专利名称(译)	通过对定向序列聚合物的组合物进行基于血清蛋白的检测,改进含定向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	CN102869990A	公开(公告)日	2013-01-09
申请号	CN201080052758.X	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	C07K1/22 G01N33/68 C07K1/00 A61P3/10 A61P19/02 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/16 A61P25/28 A61P29/00 A61P31/04 A61P31/12 A61P31/16 A61P31/18 A61P33/00 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/00 A61P37/06		
代理人(译)	余颖		
优先权	61/281470 2009-11-17 US 61/386909 2010-09-27 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本领域已有检测简单肽的方法。然而,检测定向序列聚合物(DSP)有效血浆浓度的方法是复杂的,因为与具有明确氨基酸序列的各别肽相反,DSP是肽的复杂混合物。本申请提供检测和评估DSP组合物的改进方法,检测和定量测定DSP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DSP组合物中肽亚组的方法,和对需要的对象给予DSP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。

相关疾病	肽序列	来源/起源蛋白质	残基数	参考文献	SEQ ID NO.
神经退变性疾病	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFA	β 淀粉样蛋白	1-40	54	7
	EDVGSNKGAIIGLMVGGVV				
	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFA	β 淀粉样蛋白	1-42	55	8
	EDVGSNKGAIIGLMVGGVIA				
	MKGEEGYPQEGILEDMPVDP GSEAYEMPSEEGYQDYEEA	小鼠 α-突触核蛋白	100-140	56	9
	DNEAYEMPSEEGYQDYEEA	人 α-突触核蛋白	121-137	57	10
	MATLEKLMKAFESLKSF	亨廷顿肽	1-17	58	11
透析相关的淀粉样变	IQTPKIQVYSRHPAENGKS	β-2 微球蛋白	21-40	59	12