

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02808712.7

[51] Int. Cl.

*C07K 14/00 (2006.01)*

*C07K 16/46 (2006.01)*

*A61K 38/16 (2006.01)*

*A61K 38/04 (2006.01)*

*A61K 39/395 (2006.01)*

*G01N 33/53 (2006.01)*

[45] 授权公告日 2007 年 4 月 11 日

[11] 授权公告号 CN 1309733C

[51] Int. Cl. (续)

*A61P 37/02 (2006.01)*

[22] 申请日 2002.2.26 [21] 申请号 02808712.7

[30] 优先权

[32] 2001. 2. 26 [33] IL [31] 141647

[86] 国际申请 PCT/IL2002/000148 2002. 2. 26

[87] 国际公布 WO2002/067848 英 2002. 9. 6

[85] 进入国家阶段日期 2003. 10. 23

[73] 专利权人 耶达研究及发展有限公司

地址 以色列雷霍沃特信箱 95 号

[72] 发明人 E·莫泽斯

[56] 参考文献

WO9630057A1 1996. 10. 3

审查员 周霞

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司  
代理人 徐雁漪

权利要求书 3 页 说明书 76 页 附图 26 页

[54] 发明名称

用于治疗系统性红斑狼疮的 16/6Id 抗体肽

[57] 摘要

至少 12 个氨基酸残基、至多 30 个氨基酸残基的合成肽，所述合成肽包含由人抗 DNA 16/6Id 单克隆抗体重链或轻链互补决定区 (CDR) 组成的序列或在所述互补决定区内发现的序列，或者所述合成肽包含通过在所述序列取代和/或缺失和/或添加一个或多个氨基酸残基而获得的序列，所述肽的盐、化学衍生物和聚合物可用于免疫调节系统性红斑狼疮相关反应。

1. 一种合成肽，其选自以下：
  - (a) 一种肽或其酰胺，所述肽的序列选自 SEQ ID NO: 6、12-18、7 和 20-27；
  - (b) 一种双合成肽，所述双合成肽包括相互之间直接共价连接或通过一个短连接链共价连接的两种不同的(a)所述肽；
  - (c) 一种肽聚合物，所述肽聚合物包括多个(a)所述肽的序列；以及
  - (d) 连接到大分子载体的(a)所述肽或(c)所述肽聚合物。
2. 权利要求 1 的合成肽，所述合成肽选自以下：
  - (a) 由选自 SEQ ID NO:6 和 12-18 的序列组成的肽；
  - (b) 一种双合成肽，所述双合成肽包括相互之间直接共价连接或通过一个短连接链共价连接的两种不同的(a)所述肽；
  - (c) 一种肽聚合物，所述肽聚合物包括多个(a)所述肽的序列；以及
  - (d) 连接到大分子载体的(a)所述肽或(c)所述肽聚合物。
3. 权利要求 2 的合成肽，所述合成肽由序列选自 SEQ ID NO:6 和 12-18 的肽组成。
4. 一种合成肽，所述肽由 SEQ ID NO:6 序列组成。
5. 权利要求 4 的合成肽，其于 C 末端酰胺化。
6. 权利要求 1 的合成肽，所述合成肽选自以下：
  - (a) 由选自 SEQ ID NO:7 和 20-27 的序列组成的肽；
  - (b) 一种双合成肽，所述双合成肽包括相互之间直接共价连接或通过一个短连接链共价连接的两种不同的(a)所述肽；
  - (c) 一种肽聚合物，所述肽聚合物包括多个(a)所述肽的序列；以及
  - (d) 连接到大分子载体的(a)所述肽或(c)所述肽聚合物。

7. 权利要求 6 的合成肽, 所述合成肽由序列选自 SEQ ID NO:7 和 20-27 的肽组成。

8. 一种合成肽, 所述肽由 SEQ ID NO:7 序列组成。

9. 权利要求 8 的合成肽, 其于 C 末端酰胺化。

10. 权利要求 1 的合成肽, 它是双合成肽, 其中由选自 SEQ ID NO:6 和 12-18 的序列组成的肽直接共价连接或通过一个短连接链共价连接由选自 SEQ ID NO:7 和 20-27 的序列组成的肽。

11. 一种双合成肽, 其中 SEQ ID NO:6 的肽共价连接 SEQ ID NO:7 的肽。

12. 权利要求 1 的合成肽, 它是肽聚合物, 所述肽聚合物包含多个由 SEQ ID NO:6 或 7 组成的相同序列。

13. 一种药用组合物, 所述药用组合物包含至少一种权利要求 1 到 12 中任一项的合成肽或肽聚合物以及药学上可接受的载体。

14. 一种药用组合物, 所述药用组合物包含序列为 SEQ ID NO:6 的肽以及药学上可接受的载体。

15. 一种药用组合物, 所述药用组合物包含序列为 SEQ ID NO:6、于 C 末端酰胺化的肽以及药学上可接受的载体。

16. 一种药用组合物, 所述药用组合物包含序列为 SEQ ID NO:7 的肽以及药学上可接受的载体。

17. 一种药用组合物, 所述药用组合物包含序列为 SEQ ID NO:7、于 C 末端酰胺化的肽以及药学上可接受的载体。

18. 权利要求 1 到 12 中任一项的肽或肽聚合物在制备用于治疗系统性红斑狼疮的药用组合物中的用途。

19. 权利要求 18 的用途, 其中所述肽为 SEQ ID NO:6 的肽, 所述肽任选于 C 末端酰胺化。

20. 权利要求 18 的用途, 其中所述肽为 SEQ ID NO:7 的肽, 所述肽任选于 C 末端酰胺化。

21. 权利要求 1 到 12 中任一项的肽或肽聚合物在制备用于通过

---

免疫调节 SLE 患者的 SLE 相关反应而治疗系统性红斑狼疮(SLE)的药用组合物中的用途。

22. 权利要求 21 的用途，其中所述肽是 SEQ ID NO:6 的肽。

23. 权利要求 21 的用途，其中所述肽是 SEQ ID NO:7 的肽。

## 用于治疗系统性红斑狼疮的 16/6Id 抗体肽

### 发明领域

本发明涉及合成肽，更具体地说，本发明涉及基于人单克隆抗 DNA 抗体互补决定区(CDR)的合成肽、包含所述合成肽的药用组合物以及它们在免疫调节系统性红斑狼疮(SLE)相关反应中的应用。

**缩写:** 16/6Id: 人 16/6 Id mAb; CDR: 互补决定区; CFA: 完全弗氏佐剂; hCDR 肽: 基于人 16/6Id mAb CDR 区的肽; hCDR1: SEQ ID NO:6 人类肽; hCDR3: SEQ ID NO:7 的人类肽; 人 16/6Id mAb: 携带 16/6Id 的人致病性抗 DNA mAb; ICD: 免疫复合物沉积; Id: 独特型; LNC: 淋巴结细胞; mAb: 单克隆抗体; MMP: 基质金属蛋白酶; mCDR1: SEQ ID NO:1 小鼠肽; mCDR3: SEQ ID NO:3 小鼠肽; PBL: 外周血淋巴细胞; PBS: 磷酸盐缓冲盐溶液; rev: 反向肽; SLE: 系统性红斑狼疮; SLEDAI: SLE 疾病活动指数; TGF- $\beta$ : 转化生长因子 $\beta$ ; UT: 未处理。

### 发明背景

系统性红斑狼疮(SLE)是一种自身免疫病，其特征在于出现一系列自身抗体，包括抗 DNA 抗体、抗核心抗原抗体和抗核糖核蛋白抗体。该疾病进行性发展伴有各种临床表现和免疫复合物沉积引起的组织和器官损害。与其它自身免疫病理状况相似，SLE 病因学是遗传、环境、激素和免疫学多因素的。目前没有目的在于预防或治疗 SLE 的特效治疗。

名为 16/6 Id 的人单克隆抗 DNA 抗体携带共有的独特型(Shoenfeld 等, 1983)。已经发现该独特型与 SLE 患者临床相关。因此，在 54%患有活动性疾病的 SLE 患者体内(Isenberg 等, 1984)，以及在

SLE 患者的感染器官中(Isenberg 和 Collins, 1985), 已经发现 16/6 Id 在抗 DNA 抗体上表达。用所述人抗 DNA 16/6 Id mAb 免疫未发展任何自发性自身免疫病的近交株小鼠, 所述小鼠发展出 SLE 在人体内以及在该疾病自发性鼠模型中的主要特点(Mendlovic 等, 1988)。因此, 免疫后, 所述小鼠产生特异性针对 16/6 Id 的抗体、携带 16/6 Id 的抗体以及靶向不同核心抗原(dsDNA、ssDNA、Sm、核糖核蛋白、Ro、La 及其它)的抗体。所述血清学发现与白细胞减少、红细胞沉积率、蛋白尿、肾内免疫复合物增加以及肾小球硬化有关(Mendlovic 等, 1988), 这些表现是 SLE 的典型表现。

从实验性 SLE 小鼠获得的鼠抗 16/6 Id mAb (Ab2)也能够小鼠中引起实验性疾病(Mendlovic 等, 1989), 其引起的实验性疾病与 16/6Id (Ab1)所引起的实验性疾病类似。此外, 从实验性 SLE 小鼠制备得到表达 16/6 Id 的鼠抗 DNA mAb。名为 5G12 的抗体 Ab3 与特异性针对 16/6Id 的抗体反应。用后一种抗体免疫引起实验性 SLE, 其表现与用人 16/6Id (Ab1)和用鼠抗 16/6Id (Ab2) mAb 免疫后观察到的表现类似(Waisman 等, 1993)。这些结果显示 16/6Id 网络在小鼠体内对于 SLE 的诱导以及进行的重要性。

为了解与 SLE 有关的自身抗体出现的机制, 本发明的发明人已经用实验性 SLE 的 C3H.SW 小鼠制备出多种单克隆抗体。通常能够引发携带 16/6 Id 或与之反应的抗体的单克隆自身抗体有致病性, 并因此能够在小鼠中引起实验性 SLE(Fricke 等, 1990; Sthoeger 等, 1993)。

然后测序从实验性 SLE 的 C3H.SW 小鼠分离的结合 DNA 或 HeLa 核提取物(NE)的九种自身抗体的可变(V)区(Waisman 和 Mozes, 1993)。分析具有不同特异性的单克隆抗体, 试图确定所述不同自身抗体之间的联系。三种 mAb 结合 DNA, 并且表现致病性抗 DNA 抗体的序列特征。这些 mAb 中名为 2C4C2 的一种 mAb 所使用的重(H)链 V 区基因( $V_H$ )与从其它易患狼疮的小鼠(即(NZB x NZW) $F_1$ )分离的

抗 DNA mAb 的  $V_H$  相同。MAb 2C4C2 的轻(L)链 V 区基因( $V_L$ )与从 (NZB x NZW) $F_1$  小鼠分离的另一种抗 DNA mAb 的  $V_L$  有 98% 同源性。名为 5G12-4 和 5G12-6 另外两种抗 DNA mAb 的  $V_H$  序列与 mAb 2C4C2 的  $V_H$  序列有 93% 同源性。根据对这些 mAb 的分析, 看起来在实验性 SLE 小鼠体内发现的自身抗体所使用的遗传元件与从自发发展出狼疮的小鼠株分离的 mAb 所使用的遗传元件相似。

T 细胞在实验性 SLE 的诱导和发展中起重要作用。因此, 特异性针对 16/6 Id 的 T 细胞系和克隆在同系接受者体内引起实验性 SLE, 其行为与 16/6 Id 抗体类似。因此, 当用所述细胞系的活化细胞接种小鼠后, 所述小鼠出现 SLE 典型的血清学和肾损害(Fricke 等, 1991)。

如上文所述, 从实验性 SLE 小鼠分离的能够结合 DNA 并且携带 16/6 Id 的 mAb 5G12 能够在小鼠中引起实验性 SLE(Waisman 等, 1993)。mAb 特异性反应增殖的 T 细胞可能与携带来自它们互补决定区(CDR)序列的肽反应。很有可能所述 T 细胞识别上述抗体的 V 区, 因为它们不与携带同样恒定区但有不同特异性的其它抗体反应。在所述可变区内, 最有可能被识别的区是 CDR, 因为它们是在不同抗体间差别最大的区。上文提到的在小鼠中引起 SLE 的九种致病性鼠 mAb 的  $V_H$  序列 CDR 区在 Waizman 和 Mozes, 1993 的图 1 中加框显示, 其中显示所述九种 mAb 的可变重链(VH)完整核苷酸序列和推导的氨基酸序列。

本发明的申请人的国际 PCT 专利公开第 WO 96/30057 号描述基于从实验性 SLE 小鼠分离的致病性 mAb CDR 区的肽, 尤其是分别基于鼠 mAb 5G12  $V_H$  链 CDR1、CDR2 和 CDR3 区的肽 Ia 到 IIIa, 以及分别基于鼠 mAb 2C4C2  $V_H$  链 CDR1 和 CDR3 区的肽 IVa 到 Va。这些肽具有实质上如下面 SEQ ID NO:1 到 SEQ ID NO:5 所指出的序列:

T G Y Y M Q W V K Q S P E K S L E W I G (Ia) [SEQ ID NO:1]  
 E I N P S T G G T T Y N Q K F K A K A T (IIa) [SEQ ID NO:2]  
 Y Y C A R F L W E P Y A M D Y W G Q G S (IIIa) [SEQ ID NO:3]

GYNMNWKQSHGKSLEWIG (IVa) [SEQ ID NO:4]

YYCARSGRYGNWYGQTL (Va) [SEQ ID NO:5]

本发明的发明人已经证明：当通过 PBS 给予这些肽，尤其是本文中分别名为 mCDR1 [SEQ ID NO:1]和 mCDR3 [SEQ ID NO:3]的肽 Ia 和 IIIa 时，这些肽能够抑制 T 细胞受到合适 mCDR 肽或鼠来源或人类来源的全抗 DNA 16/6Id mAb 的激发(Waisman 等, 1997)。本发明的发明人进一步证明：肽 mCDR1 和 mCDR3 治疗或预防由人抗 DNA 16/6Id mAb 引起的 SLE 或者在易患 SLE 的小鼠(NZB x NZW) F1 或 MRL/lpr/lpr 中自发发展出的已经建立的 SLE (established SLE)(Eilat 等, 2000 和 2001)。

### 发明简述

现在根据本发明，已经发现基于人单克隆抗 DNA 16/6Id 抗体 CDR 的肽能够免疫调节 SLE 相关反应。因此，测试基于人 16/6Id CDR1 和 CDR3 的肽，显示所述肽抑制用鼠肽 mCDR1 (SEQ ID NO:1)和 mCDR3 (SEQ ID NO:3)或用全人抗 DNA 16/6Id mAb 免疫的小鼠体内的淋巴结细胞增殖，抑制 SLE 患者外周血淋巴细胞(PBL)对人抗 DNA 16/6Id mAb 的增殖性反应，并缓解患有自发性或实验性 SLE 的小鼠的疾病表现。

这些发现完全出乎意料，因为不是所有致病性自身抗体的 CDR 都同样被患者的 T 细胞识别。如以前在本发明人的实验室内证明的(Dayan 等, 2000), SLE 患者 T 细胞对抗 DNA 自身抗体 2C4C2 的 CDR 的识别比对基于抗 DNA 抗体 5G12 的 CDR 的识别要差。此外，已经证明基于上文提到的 WO 96/30057 中鼠自身抗体 CDR 的肽的许多类似物在抑制效应上并不有效，因此无法预测或提示在基于本发明人单克隆抗 DNA 抗体 CDR 的肽序列上的修饰是有效的。此外，对于人类应用，应当认为应用基于人类抗体的肽优于应用基于非人类抗体的肽。

因此，本发明在一方面涉及选自以下的合成肽：

(a)一种至少 12 个氨基酸残基、至多 30 个氨基酸残基的肽或者所述肽的盐或化学衍生物，所述肽包含人单克隆抗 DNA 16/6Id 抗体重链或轻链的互补决定区(CDR)的序列或所述互补决定区内存在的序列(下文称为“hCDR 序列”)，或者包含如下获得的序列：(i)用不同氨基酸残基取代所述 hCDR 序列的一个或多个氨基酸残基；(ii)所述 hCDR 序列缺失一个或多个氨基酸残基；和/或(iii)在所述 hCDR 序列添加一个或多个氨基酸残基；

(b)双合成肽，所述双合成肽包含两种不同的所述(a)肽，这两种肽相互之间直接共价连接或通过短连接链共价连接；

(c)包含多个所述(a)肽序列的肽聚合物；和

(d)附着到大分子载体上的(a)肽或(c)肽聚合物。

人单克隆抗 DNA 16/6Id 抗体在本文称为“人 16/6Id mAb”，是能够在小鼠中引起 SLE 样疾病的致病性人单克隆抗 DNA 抗体。

根据本发明包含上文所定义的 hCDR 序列的肽在本文中称为“hCDR 肽”。

在一个优选实施方案中，所述 hCDR 肽包括人 16/6Id mAb 重链的 CDR 序列，更优选是 CDR1 或 CDR3，例如，包括但不限于本文称为 hCDR1 和 hCDR3 的肽，所述两种肽分别基本如 SEQ ID NO:6 和 SEQ ID NO:7 陈述的序列，如下所示：

G Y Y W S W I R Q P P G K G E E W I G [SEQ ID NO:6]  
Y Y C A R G L L R G G W N D V D Y Y G M D V [SEQ ID  
NO:7]

另一方面，本发明提供药用组合物，所述药用组合物包含至少一种本发明的合成肽或肽聚合物以及药学上可接受的载体。所述药用组合物尤其通过调节 SLE 患者体内 SLE 相关反应，即负调节 MMP-3 和/或 MMP-9 的水平和/或 IL-2 和/或 IFN- $\gamma$  活性，或正调节 TGF- $\beta$  活性水平，从而尤其用于治疗 SLE 和缓解其疾病临床表现。

又一方面，本发明涉及用于治疗 SLE 的方法，所述方法包括给予 SLE 患者有效量本发明的肽或肽聚合物。本发明还涉及免疫调节

SLE 患者体内的 SLE 相关反应的方法，例如负调节 SLE 患者体内 MMP-3 和/或 MMP-9 的水平 and/或 IL-2 和/或 IFN- $\gamma$  活性，或正调节 TGF- $\beta$  活性水平，所述方法包括给予 SLE 患者有效量本发明的肽或肽聚合物。

再一方面，本发明涉及评价药物在治疗 SLE 患者中的有效性的方法，所述方法包括在不同时间间隔测量从用所述药物治疗的所述患者获取的血液样品中的 MMP-3 和/或 MMP-9 水平，由此把 MMP-3 和/或 MMP-9 水平降低与药物疗效联系起来。

本发明又一方面涉及评价药物疗效的方法，该方法包括在不同时间间隔从用所述药物治疗的患者获取的血液样品中的 IL-2 和/或 IFN- $\gamma$  水平，由此把 IL-2 和/或 IFN- $\gamma$  水平降低与药物有效性联系起来。

另一方面，本发明涉及评价药物在治疗 SLE 患者中的有效性的方法，所述方法包括在不同时间间隔测量从用所述药物治疗的所述患者获取的血液样品中的 TGF- $\beta$  水平，由此把 TGF- $\beta$  水平升高与药物有效性联系起来。

可以根据上面任何一种方法评价有效性的药物可以是，例如但不限于，根据本发明的肽或上文提到的 WO 96/30057 中所述的鼠肽。

#### 附图简述

图 1 显示 300  $\mu$ g hCDR1 处理抑制用人 16/6Id mAb 免疫的小鼠的淋巴结细胞对不同浓度 16/6Id mAb (0.1-10  $\mu$ g/孔)的增殖反应。

图 2 显示 50  $\mu$ g hCDR1 处理抑制用人 16/6Id mAb 免疫的小鼠的淋巴结细胞对不同浓度 16/6Id mAb (0.1-10  $\mu$ g/孔)的增殖反应。

图 3A-C 显示用人 16/6Id mAb 免疫并用 hCDR1 或不相关肽 p259-271 处理的 BALB/c 小鼠中的细胞因子模式。图 3A - IFN- $\gamma$  模式；图 3B - TGF- $\beta$  模式；图 3C - IL-10 模式。

图 4 显示最佳化刺激 SLE 患者和健康对照的 PBL 所需的人抗 DNA16/6 Id mAb 浓度。用不同浓度 16/6 Id mAb 刺激 PBL。产生最

高刺激指标的浓度定义为最适于触发增殖反应。

图 5 显示在缺乏或存在 hCDR1 或 hCDR3 的情况下, 来自一名用促分裂原植物凝集素(PHA)刺激的 SLE 患者的 PBL 增殖。

图 6 显示在缺乏或存在人肽 hCDR1 或 hCDR3、或鼠肽 mCDR3 的情况下, 来自一名用人 16/6Id mAb 刺激的 SLE 患者的 PBL 增殖。

图 7 显示在缺乏或存在 hCDR1 或 hCDR3 或鼠反向肽 revmCDR1 和 revmCDR3 的情况下, 来自一名用人 16/6Id mAb 刺激的 SLE 患者的 PBL 增殖。

图 8 显示在缺乏或存在 hCDR1 或 hCDR3 的情况下, 抑制用人 16/6Id mAb 触发的 SLE 患者的 PBL 的 IL-2 分泌。

图 9 显示在缺乏或存在 hCDR1 或 hCDR3 的情况下, 正调节一名代表性的用人 16/6Id mAb 刺激的 SLE 患者的 PBL 的 TGF- $\beta$ 分泌。

图 10 显示在未处理或用 300  $\mu$ g hCDR1 处理或用反向肽 revhCDR1 (用作对照)处理的(NZB x NZW)F1 小鼠中的抗 DNA 自身抗体水平。

图 11A-11D 是照片, 显示来自易患 SLE 的(NZB x NZW)F1 小鼠的有代表性的肾切片, 所述小鼠从 5 个半月龄开始接受 PBS (11A, 11B) 或用 100  $\mu$ g hCDR1 (11C, 11D)处理。所述切片是在 9 月龄处死的小鼠的切片。为检测 Ig 沉积, 用缀合 FITC 的山羊抗鼠 IgG ( $\gamma$ 链特异性)温育所述切片(11A、11C x 100; 11B、11D x 400)。

图 12A-12F 是照片, 显示来自易患 SLE 的(NZB x NZW)F1 小鼠的有代表性的肾切片, 所述小鼠用 PBS (12A, 12B)或用 300  $\mu$ g hCDR1 (12C, 12D)处理, 或者用反向肽 revhCDR1 (12E, 12F)处理。所述切片是在 9 月龄处死的小鼠的切片。为检测免疫复合物 Ig 沉积, 用缀合 FITC 的山羊抗鼠 IgG ( $\gamma$ 链特异性)温育所述切片(12A、12C、12E x 100; 12B、12D、12F x 400)。

图 13A-13C 显示用 ELISA 测量得到的在易患 SLE 的(NZB x NZW)F1 小鼠脾细胞的 Con A 刺激培养物上清中的细胞因子模式,

所述小鼠未处理或用 hCDR1 处理或用反向肽 revhCDR1 处理。图 13A - IFN- $\gamma$ 模式；图 13B - IL-10 模式；图 13C - TGF- $\beta$ 模式。

图 14A-14F 是照片,显示患有 16/6Id 诱导的实验性 SLE 的 BALB/c 小鼠有代表性的肾切片,所述小鼠用 PBS (14A, 14B)处理或用 200  $\mu$ g hCDR1 (14C, 14D)处理,或者用反向肽 revhCDR1 (14E, 14F)处理。所述切片是在 9 月龄处死的小鼠的切片。为检测免疫复合物 Ig 沉积,用缀合 FITC 的山羊抗鼠 IgG ( $\gamma$ 链特异性)温育所述切片(14A、14C、14E x 100; 14B、14D、14F x 400)。

图 15A-15E 显示用 ELISA 测量得到的在 16/6Id 诱导的实验性 SLE 的 BALB/c 小鼠的 16/6Id 刺激的淋巴结培养物的上清中的细胞因子模式,所述小鼠未处理或用 hCDR1 处理(200 或 300  $\mu$ g)或用反向肽 revhCDR1 处理。在 16/6Id 触发的脾细胞的上清中测得:图 15A - IFN- $\gamma$ 模式;图 15B - TNF- $\alpha$ 模式;图 15C - IL-10 模式;图 15D - TGF- $\beta$ 模式;图 15E - TGF- $\beta$ 模式。

图 16A-16F 是照片,显示易患 SLE 的(NZB x NZW) F1 小鼠有代表性的肾切片,所述小鼠未处理(16A, 16B)或者接受来自用 300  $\mu$ g hCDR1 (16C, 16D)或反向肽 revhCDR1 (16E, 16F)处理的小鼠的脾细胞。为检测免疫复合物 Ig 沉积,用缀合 FITC 的山羊抗鼠 IgG ( $\gamma$ 链特异性)温育所述切片(16A、16C、16E x 400; 16B、16D、16F x 100)。

图 17A-17B 描述 MMP-3、MMP-2 和 MMP-9 在(NZB x NZW) F1 小鼠血清内出现的动力学。在指定时间点从(NZB x NZW) F1 小鼠(10 只小鼠/组)采血。使用蛋白质印迹,测试从每组小鼠汇集的血清(4  $\mu$ l)中的 MMP-3 表达水平(图 17A),使用凝胶酶谱法测试 MMP-9 和 MMP-2 活性(图 17B)。结果代表 4 个相似的实验。

图 18A-18B 描述 MMP-3、MMP-2 和 MMP-9 在 BALB/c 小鼠的血清内出现的动力学。在指定时间点从未免疫的 BALB/c 小鼠(10 只小鼠/组)或者用 PBS/CFA (10 只小鼠/组)或 16/6Id (在 CFA 中; 10 只小鼠/组)免疫的小鼠采血。使用蛋白质印迹,测试从每组小鼠汇集的

血清(4  $\mu$ l)中的 MMP-3 表达水平(图 18A), 使用凝胶酶谱法测试 MMP-9 和 MMP-2 活性(图 18B)。结果代表 3 个相似的实验。

图 19A-19C 描述免疫后 BALB/c 小鼠的肾切片针对 MMP-3 和 MMP-9 进行的免疫染色。未免疫的 BALB/c 小鼠或用 PBS/CFA 或 16/6Id (在 CFA 中)免疫的小鼠(3 只小鼠/组)在接受 16/6Id 的加强后, 于 5.5 个月处死。取出肾, 将它们的 5 $\mu$ m 恒冷箱切片针对 MMP-3 (19A) 和 MMP-9 (19B) 进行免疫染色。进行对照染色以确认阻断的效率 (19C)。(x200)。结果代表 3 个类似的实验。

图 20A-20B 描述在用 mCDR1 处理的(NZB x NZW) F1 小鼠的血清中 MMP-3 和 MMP-9 的水平。在预防实验中, 从小鼠 2 月龄开始, 在 10 周内为小鼠(10/组)每周皮下注射给予 mCDR1。结果代表处理结束后 4 个月所采的血清。在治疗实验中, 从 5 月龄开始为小鼠(10/组)皮下注射 PBS 或 250  $\mu$ g/小鼠 mCDR1。结果代表处理结束后 3 周所采的血清。使用蛋白质印迹分析(20A)测试每个实验组汇集血清中的 MMP-3 水平, 使用凝胶酶谱法(20B)测试 MMP-9 活性。UT - 未处理。结果代表 2 个相似的实验。

图 21A-21B 描述用 mCDR1 处理的 16/6Id 免疫 BALB/c 小鼠中 MMP-3 和 MMP-9 的水平。在预防实验中, 用 mCDR1 (100  $\mu$ g/小鼠) 静脉内处理小鼠(8/组)。所显示的结果是使用处理结束后 4.5 个月所采血清获得的结果。在治疗实验中, 用 100  $\mu$ g/小鼠 mCDR1 皮下处理小鼠(8/组)。结果是使用处理结束时所采血清获得的结果。通过蛋白质印迹分析(21A)测试从每个实验组汇集的血清中的 MMP-3, 通过凝胶酶谱法测试 MMP-9 活性(21B)。UT - 未处理。结果代表 2 个相似的实验。

图 22A-22B 描述 16/6Id 免疫的 BALB/c 小鼠的肾切片针对 MMP-3 和 MMP-9 进行的免疫染色, 所述小鼠接受 mCDR1 以预防(22A)或治疗(22B)实验性 SLE。引发疾病 8 个月后处死小鼠, 取出它们的肾。制备恒冷箱切片(5  $\mu$ m), 针对 MMP-3、MMP-9 以及免疫复合物沉积

的存在进行免疫染色(x 200)。(W/O) - 控制染色达到阻断的效率, 不使用第一抗体。结果代表 2 个相似的实验。

**图 23A-23B** 描述在用 hCDR1 处理的(NZB x NZW)F1 小鼠血清中的 MMP-3 和 MMP-9 水平。在治疗实验中, 从小鼠 7 月龄开始的十周内, 每周一次用 PBS 或 100  $\mu\text{g}$  或 30  $\mu\text{g}$ /小鼠 hCDR1 皮下注射处理小鼠(10/组)。结果代表使用治疗中期采集血清获得的结果。通过蛋白质印迹分析(23A)测试从每个实验组汇集的血清中的 MMP-3 水平, 通过凝胶酶谱法测试 MMP-9 活性(23B)。UT - 未处理。结果代表 2 个相似的实验。

**图 24** 描述一块有代表性的凝胶, 该凝胶显示在 SLE 患者和健康对照的血清中 MMP-2 和 MMP-9 活性。通过凝胶酶谱法分析 40 个 SLE 患者以及 25 个健康对照的血清(5  $\mu\text{l}$ )中的 MMP-2 或 MMP-9 活性。本图显示用这两个组的血清样品获得的代表性结果。

**图 25** 描述一张图, 该图显示对 SLE 患者(黑柱)和健康对照(白柱)的血清中 MMP-2 和 MMP-9 活性的定量分析。使用比活测定试剂盒测定三十六份 SLE 患者血清样品以及 15 份健康对照血清样品的 MMP-2 或 MMP-9 活性。结果表示为平均值 $\pm$ s.e.m.。\* $P = 0.0302$ 。

**图 26A-26B** 是显示 SLE 患者体内 MMP-9 活性水平和疾病活动指数(SLEDAI)的图。使用比活测定试剂盒测定来自 8 名男性(图 26A)和 27 名女性(图 26B)SLE 患者总共三十五份 SLE 患者血清样品的 MMP-9 活性。给出根据患者 SLEDAI 的 MMP-9 活性分布。虚线表示健康对照体内的 MMP-9 活性。

**图 27A-27B** 是图, 显示从两个 SLE 患者在 4-6 年病程中所采血清中 MMP-2 (白环)和 MMP-9 (黑环)活性的模式。使用比活测定试剂盒测定血清的 MMP-2 或 MMP-9 活性。所述测定一式两份进行。

## 发明详述

在一方面, 本发明涉及合成肽, 所述合成肽包含在致病性人单

克隆抗 DNA 16/6Id 抗体(本文中称为“人抗 DNA 16/6Id mAb”或“人 16/6Id mAb”)重链或轻链的 CDR 序列, 或包含在所述 CDR 序列中存在的序列, 其中所述抗体在小鼠中引起 SLE 样疾病。

本发明中源于人 16/6Id mAb CDR 的合成肽在本文中称为 hCDR 肽, 所述肽最好基于在人 16/6Id mAb 重链 CDR。

人 16/6Id mAb 的  $V_H$  序列的 CDR 区在 Waisman 等, 1995 的图 4A 中加框显示。所述人 16/6Id mAb 的重链的 CDR 区具有实质上由 SEQ ID NO:8 到 SEQ ID NO:10 所描述的序列, 如下所示:

CDR1:	FSGYYWS	[SEQ ID NO: 8]
CDR2:	EINHSGSTNYKTSLS	[SEQ ID NO: 9]
CDR3:	GLLRGGWNDVDY YYGMDV	[SEQ ID NO: 10]

本发明的 hCDR 肽包含至少 12 个氨基酸残基、至多 30 个氨基酸残基, 并且优选包含与选自 SEQ ID NO:8、9 和 10 之一的序列相同的序列, 或更优选在所述 SEQ ID NO:8、9 或 10 中存在的序列, 或包含如下获得的序列: (i)用不同氨基酸残基取代 SEQ ID NO:8、9 和 10 序列中的一个或多个残基; (ii)SEQ ID NO:8、9 和 10 序列缺失一个或多个氨基酸残基; 或(iii)在 SEQ ID NO:8、9 和 10 序列中添加一个或多个氨基酸残基。

本发明的 hCDR 肽除所述 hCDR 序列外, 还包含其它氨基酸残基, 最好是在所述 hCDR 序列侧翼的人 16/6Id mAb 序列的氨基酸残基, 或者如下获得的序列的氨基酸残基: 用不同氨基酸残基取代所述 hCDR 侧翼序列的一个或多个氨基酸残基、缺失所述 hCDR 侧翼序列的一个或多个氨基酸残基或在所述 hCDR 侧翼序列中添加一个或多个氨基酸残基。

因此, 在一个实施方案中, 本发明提供合成肽, 所述合成肽基于人 16/6Id mAb 重链的 CDR1, 所述 CDR1 区是实质上如 SEQ ID NO:8 所描述的序列, 所述肽选自以下:

(a)一种肽或该肽的盐或化学衍生物, 所述肽包含 SEQ ID NO:8

的序列或包含 SEQ ID NO:8 中存在的序列，或者所述肽包含如下获得的序列：(i)用不同氨基酸残基取代所述 SEQ ID NO:8 的一个或多个氨基酸残基；(ii)从所述 SEQ ID NO:8 缺失一个或多个氨基酸残基；和/或(iii)在所述 SEQ ID NO:8 中添加一个或多个氨基酸残基。

(b)双合成肽，所述双合成肽包含两种不同的所述(a)肽，这两种肽相互之间直接共价连接或通过短连接链共价连接；

(c)包含多个所述(a)肽序列的肽聚合物；和

(d)附着到大分子载体上的(a)肽或(c)肽聚合物。

在本发明的一个优选实施方案中，基于人 16/6Id mAb 的重链的 CDR1 的肽是具有实质上如 SEQ ID NO:11 所描述的序列的肽：

$X_1 Y Y W S W I X_2 Q X_3 P X_4 X_5 G X_6 E W I G$  [SEQ ID NO:11]

其中  $X_1$  是 G 或 TG； $X_2$  是 R 或 K； $X_3$  是 P 或 S； $X_4$  是 G 或 E； $X_5$  是 K 或 D； $X_6$  是 E、L 或 S。

在更优选的实施方案中，SEQ ID NO:11 的肽是具有实质上如 SEQ ID NO:6 所述的序列的在本文中名为“hCDR1 肽”或简称为“hCDR1”的 19 体肽，SEQ ID NO:6 如下所述：

$G Y Y W S W I R Q P P G K G E E W I G$  [SEQ ID NO:6]

在 hCDR1 中，在 SEQ ID NO:8 内的序列 GYYWS 之后是人 16/6Id mAb 重链的 CDR1 天然序列，只是在所述肽 hCDR1 位置 15 上谷氨酸残基(E)(粗体)取代 mAb 的天然亮氨酸(L)残基。

在另一实施方案中，SEQ ID NO:11 的肽是通过在 hCDR1 肽序列中取代和/或添加氨基酸残基而获得的 hCDR1 肽的类似物，其例子是具有实质上如 SEQ ID NO:12 到 SEQ ID NO:18 序列的肽(其中取代或添加的氨基酸用粗体表示)：

GYYWSWIRQPPGKGLEWIG [SEQ ID NO:12]  
 GYYWSWIRQPPGKGSEWIG [SEQ ID NO:13]  
 GYYWSWIRQPPGDGEEWIG [SEQ ID NO:14]  
 GYYWSWIKQPPGKGEEWIG [SEQ ID NO:15]  
 GYYWSWIRQSPGKGEEWIG [SEQ ID NO:16]  
 GYYWSWIRQPPEKGEWIG [SEQ ID NO:17]  
 TGYYSWIRQPPGKGEEWIG [SEQ ID NO:18]

在又一实施方案中,本发明提供合成肽,所述合成肽基于人 16/6Id mAb 重链的 CDR3, 所述 CDR3 区是实质上如 SEQ ID NO:10 所描述的序列, 所述肽选自以下:

(a)一种肽或该肽的盐或化学衍生物, 所述肽包含 SEQ ID NO:10 的序列或包含 SEQ ID NO:10 中存在的序列, 或者所述肽包含如下获得的序列: (i)用不同氨基酸残基取代所述 SEQ ID NO:10 的一个或多个氨基酸残基; (ii)从所述 SEQ ID NO:10 缺失一个或多个氨基酸残基; 和/或(iii)在所述 SEQ ID NO:10 中添加一个或多个氨基酸残基;

(b)双合成肽, 所述双合成肽包含两种不同的所述(a)肽, 这两种肽相互之间直接或通过短连接链共价连接;

(c)包含多个所述(a)肽序列的肽聚合物; 和

(d)附着到大分子载体上的(a)肽或(c)肽聚合物。

在本发明的一个优选实施方案中, 基于人 16/6Id mAb 重链 CDR3 的肽是具有实质上如 SEQ ID NO:19 所描述的序列的肽:

YYCARX<sub>1</sub>LLX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>DVDYX<sub>7</sub>GX<sub>8</sub>DV [SEQ ID NO:19]

其中 X<sub>1</sub>是 G 或 F; X<sub>2</sub>是 R 或 A; X<sub>3</sub>是 G 或 A; X<sub>4</sub>是 G 或 A; X<sub>5</sub>是 W 或 A; X<sub>6</sub>是 N 或 A; X<sub>7</sub>是 Y 或 W; X<sub>8</sub>是 M 或 Q。

在更优选的实施方案中, SEQ ID NO:19 的肽是 SEQ ID NO:7 的在本文中名为“hCDR3 肽”或简称为“hCDR3”的肽, SEQ ID NO:7 如下所述:

YYCARGLLRGGWNDVDYYGMDV [SEQ ID NO:7]

在 hCDR3 中，人 16/6Id mAb 重链 CDR3 区的序列 GLLRGGWNDVDY~~YY~~GMDV [SEQ ID NO:10]的改变是缺失其中一个酪氨酸(Y)残基，在该序列之前是所述 mAb 的天然序列。

在另一实施方案中，SEQ ID NO:19 的肽是通过在 hCDR3 肽序列中取代和/或添加氨基酸残基而获得的 hCDR3 肽的类似物，其例子是具有 SEQ ID NO:20 到 SEQ ID NO:27 序列的肽(其中取代或添加的氨基酸用粗体表示):

**YYCARGLLRGGWADVDY~~YY~~GMDV** [SEQ ID NO:20]

**YYCARGLLRGGANDVDY~~YY~~GMDV** [SEQ ID NO:21]

**YYCARGLLRGAWNDVDY~~YY~~GMDV** [SEQ ID NO:22]

**YYCARGLLRAGWNDVDY~~YY~~GMDV** [SEQ ID NO:23]

**YYCARGLLAGGWNDVDY~~YY~~GMDV** [SEQ ID NO:24]

**YYCARFLLRGGWNDVDY~~YY~~GMDV** [SEQ ID NO:25]

**YYCARGLLRGGWNDVDY~~YY~~GQDV** [SEQ ID NO:26]

**YYCARGLLRGGWNDVDYWGMDV** [SEQ ID NO:27]

在再一实施方案中，本发明提供合成肽，所述合成肽基于人 16/6Id mAb 重链的 CDR2，所述 CDR2 区是实质上如 SEQ ID NO:9 所描述的序列，所述肽选自以下:

(a)一种肽或该肽的盐或化学衍生物，所述肽包含 SEQ ID NO:9 的序列或包含 SEQ ID NO:9 中存在的序列，或者所述肽包含如下获得的序列: (i)用不同氨基酸残基取代所述 SEQ ID NO:9 的一个或多个氨基酸残基; (ii)从所述 SEQ ID NO:9 缺失一个或多个氨基酸残基; 和/或(iii)在所述 SEQ ID NO:9 中添加一个或多个氨基酸残基;

(b)双合成肽，所述双合成肽包含两种不同的所述(a)肽，这两种肽相互之间直接或通过短连接链共价连接;

(c)包含多个所述(a)肽序列的肽聚合物; 和

(d)附着到大分子载体上的(a)肽或(c)肽聚合物。

本发明的合成肽具有 12-30 个氨基酸残基、优选 17-23 个氨基酸

残基、最优选 19-22 个氨基酸残基，可以通过化学合成或通过重组技术用本领域内众所周知的方法生产。

当制备通过取代氨基酸残基而获得的如上所述类似物时，重要的是所述取代不明显累积性改变未取代母肽的体积、疏水-亲水模式和对应部分的电荷。因此，可以用亲水性残基取代疏水性残基，或者相反，只要总效应不在实质上改变对应未取代母肽的体积、疏水-亲水模式和电荷。

本发明还包括本发明肽的化学衍生物。所述“化学衍生物”包含并不通常是所述肽的一部分的其它化学部分，只要所述衍生物保留所述肽的至少部分功能以允许它可用于预防或抑制 T 细胞增殖性反应和自身免疫病，所述衍生物包括在本发明范围内。例如，化学衍生物可能源于能够与所述肽的选定侧链或末端残基反应的有机衍生剂的反应，并最好保留所述肽的至少部分功能，以特异性抑制对 SLE 引起的自身抗体有高反应性的小鼠 T 淋巴细胞的增殖反应和细胞因子分泌。在这些化学衍生物中，酰胺尤其受到关注，包括在 C 末端羧基的酰胺和在天冬氨酸残基或谷氨酸残基的游离羧基基团的酰胺。许多这样的化学衍生物和制造它们的方法是本领域内众所周知的。

本发明的范围内还包括本发明所述肽的盐和类似物。本文所用术语“盐”指羧基基团的盐以及所述肽分子的氨基基团的酸加成盐。羧基基团的盐可以通过本领域内已知的方法形成，包括无机酸盐和有机碱盐，无机酸盐例如钠盐、钙盐、铵盐、铁盐或锌盐等等，有机碱盐例如与胺形成的盐，所述胺例如三乙醇胺、精氨酸或赖氨酸、吡啶、普鲁卡因等等。酸加成盐包括，例如，与无机酸如盐酸或硫酸形成的盐，以及与有机酸如乙酸或草酸形成的盐。所述化学衍生物和盐最好用于修饰所述肽的药学特性，包括稳定性、溶解度等等。

可以如下选择依照本发明的 hCDR 肽：使用对诱导 SLE 的自身抗体有高反应性的小鼠，测试所述 hCDR 肽抑制所述小鼠 T 淋巴细

胞增殖反应的潜力。一旦产生依照本发明的肽，本领域内一般技术人员不必进行过度实验而使用如本文所述那些测试就可以容易地确定所述肽抑制小鼠(所述小鼠对诱导 SLE 的自身抗体有高反应性)T 淋巴细胞增殖反应的能力。一个可以容易进行的测试是用于测试所述肽抑制某些特异性针对诱导 SLE 的自身抗体的 T 细胞系和集落体外增殖反应的能力。所述 T 细胞系和集落可以是，例如，采用以前描述的方法(Axelrod, O.和 Mozes, E. *Immunobiology*, 172, 99 (1986))从小鼠免疫淋巴结细胞建立的特异性针对 16/6Id mAb 的 T 细胞系和克隆(Fricke 等, 1991)。细胞每两周就暴露于在富集培养基中辐射过的同系脾细胞上呈递的刺激抗体。通过标准限制稀释技术克隆所述 T 细胞。使用例如在 WO 96/30057 中材料与方法部分(g)描述的方法测试这些 T 细胞系和集落的增殖反应。

为选择具有所需活性的类似物而可以进行的另一种测试是：测试所述合成肽在母肽存在下抑制所述 T 细胞系和克隆帮助肽特异性 B 细胞的能力。也可以测试所述合成肽在生物素化后直接结合相关株抗原呈递细胞上 II 类 MHC 产物的能力。为此目的，在水溶液中过量生物素-N-羧基琥珀酰亚胺存在下，0℃下 N 末端生物素化所述相关肽(Mozes 等, 1989)。小鼠脾粘附细胞或 PBL-粘附细胞( $1 \times 10^6$ /样品)在含 0.1%牛血清白蛋白的 PBS 中(PBS/BSA)37℃下与生物素化肽温育 20 小时，然后与藻红蛋白-链霉抗生物素在 4℃下温育 30 分钟。每次温育后，细胞都用上述溶液洗涤两次。此后，使用 FACScan 通过流式细胞术分析细胞。在每次分析中，最少检查 5000 个细胞(关于上述方法参见例如 Mozes 等, 1989)。

可以进行的另一个测试是测试所述肽抑制细胞因子分泌的能力，所述细胞因子分泌是指来自对诱导 SLE 的自身抗体有高反应性的小鼠的 T 细胞系或 T 淋巴细胞或淋巴结细胞的细胞因子分泌。如下检测细胞因子：通过 ELISA 评价 IL-1 活性，所述 ELISA 使用一对捕获和检测抗体(如下文针对 IL-4、IL-6、IL-10 所述)。使用依赖于 IL-2

的 CTLL 直接检测 IL-2，或通过 ELISA 检测 IL-2。通过 ELISA 测定上清液中 IL-4、IL-6、IL-10、IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  水平，所述 ELISA 根据厂家指导使用针对各种细胞因子的抗体(Pharmingen, San Diego, Ca., USA)。此外，可以通过如本文在下面实施例所述的 ELISA 评价所述肽提高免疫抑制性细胞因子 TGF- $\beta$  分泌水平的能力。

在这些体外测试的一种或多种中显示阳性的肽预期将有体内活性。然而，不需要过度实验，也可以进行体内测试。因此，例如，可以在第-3 天或第 0 天为成年小鼠注射候选肽。然后用引起疾病的自身抗体或所述肽免疫小鼠。十天以后，测试所述小鼠淋巴结细胞应答所述免疫原而增殖的能力，以发现所述候选肽的抑制能力。

另一个这样的体内动物试验包括直接测量针对小鼠模型体内上文所述 SLE 产生的治疗作用。可以注射所述肽入小鼠体内，其中通过不同途径、以不同剂量并采用不同时间表，诱导实验性 SLE。此外，可以定期测试接受处理的小鼠，以测定所述肽对于所述小鼠体内由诱导 SLE 的自身抗体引发的自身抗体反应和疾病表现的效应。

另一种体内方法包括评价候选肽治疗自发产生 SLE 的小鼠(如 (NZB x NZW)F1 小鼠)的能力，如本文实施例所述。

因此，可以看到，除已经在本文实施例中证明可操作的优选实施方案外，本领域内的一般技术人员将能够根据本文陈述的方针确定也可操作的其它类似物，而不需要进行过度实验。

在另一优选实施方案中，本发明提供多表位单肽，如二肽。在一个实施方案中，所述二肽包括基于同一 CDR 的两种不同的肽，例如包括人 16/6Id mAb 重链 CDR1 序列(SEQ ID NO:8)或 CDR3 序列(SEQ ID NO:10)的两种不同的肽。

在又一更优选的实施方案中，所述二肽包括两种基于不同 CDR 的不同的肽，例如一种肽包括人 16/6Id mAb 重链 CDR1 的序列(SEQ ID NO:8)，另一种肽包括人 16/6Id mAb 重链 CDR3 的序列(SEQ ID NO:10)。

依照本发明的二肽最好包括两种不同的肽,一种是 SEQ ID NO:11 的肽,另一种是 SEQ ID NO:19 的肽,更优选一种肽选自 SEQ ID NO:6 和 SEQ ID NO:12-18,另一种肽选自 SEQ ID NO:7 和 NO:20-27,最优选一种肽是 SEQ ID NO:6 的肽,另一种是 SEQ ID NO:7 的肽,所述两种不同的肽相互之间或者直接共价连接,或者通过短连接链如一段丙氨酸共价连接,或通过推定的组织蛋白酶蛋白水解位点连接。关于这种位点,见例如美国专利 5,126,249 和欧洲专利 495049。

在再一优选实施方案中,本发明提供多表位单肽,所述多表位单肽以肽聚合物的形式包括本发明的多个同种或不同的肽,通过用合适的聚合剂如 0.1% 戊二醛使所述肽聚合,得到所述肽聚合物 (Audibert 等, 1981, Nature 289: 593)。所述聚合物最好包含 5 到 20 个肽残基,优选包含 SEQ ID NO:6、7 和 11-27 的肽。也可以通过使所述肽交联或将多个肽附着到大分子载体上,形成所述肽聚合物。合适的大分子载体是,例如,蛋白质如破伤风类毒素,以及氨基酸的线性或分支共聚物,例如 L-丙氨酸、L-谷氨酸和 L-赖氨酸的线性共聚物和 L-酪氨酸、L-谷氨酸、L-丙氨酸和 L-赖氨酸(T,G)-A-L 的分支共聚物或者多链聚-DL-丙氨酸(M. Sela 等, 1955, J. Am. Chem. Soc. 77: 6175)。如下获得所述缀合物:例如,首先将所述肽与水溶性碳二亚胺(如 1-乙基-3-(3'-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐)偶联,然后与所述大分子载体偶联,如 Muller, G.M. 等(1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 569 所述。进行氨基酸分析,与单独所述载体的组成相比较,确定每种缀合物内偶联的肽的含量。

根据本发明的又一实施方案,可以将一种或多种活性肽附着到合适的大分子载体上,或者在戊二醛存在下聚合。

将所述肽、它们的聚合物或它们与合适大分子载体的缀合物以保证它们的生物利用率、使它们适用于治疗的形式给予患者。假如发现本发明一种以上的肽有显著的抑制活性,就将这些肽以包含它们的混合物的制剂给予患者。

因此，本发明还涉及药用组合物，所述药用组合物包括至少一种依照本发明的合成肽或肽聚合物，可选还有药学上可接受的载体。

在一个优选实施方案中，所述药用组合物包括至少一种本发明的合成肽，更优选是选自以下的肽：肽 hCDR1 [SEQ ID NO:6]和 hCDR3 [SEQ ID NO:7]以及通过在 hCDR1 和 hCDR3 序列中取代和/或添加氨基酸残基而获得的肽，尤其是选自以下的肽：SEQ ID NO:12 到 SEQ ID NO:18 以及 SEQ ID NO:20 到 SEQ ID NO:27 的肽。

本发明包括任何合适的给药途径，包括口服途径、静脉内途径、皮下途径、关节内途径、肌内途径、吸入途径、鼻内途径、鞘内途径、腹膜内途径、皮内途径、经皮途径或其它已知途径，包括肠途径。在优选实施方案中，通过口服途径、鼻内途径或皮下途径给予本发明的肽。

本发明组合物的给药剂量范围应当足以产生所需效应，例如，根据体外 T 细胞增殖测量，在实质上预防或抑制针对诱导 SLE 的自身抗体的免疫反应，并进而显著治疗所述疾病。所述剂量应当不足以引起副作用，例如不希望有的交叉反应、全身化免疫抑制、过敏反应等等。

本发明的肽用于治疗 SLE 的有效剂量在约 1  $\mu$ g 到 1 mg 并高达 100 mg/kg 体重的范围内。

本发明的合成人类肽目标在于抑制或阻抑 SLE 患者的特异性抗原反应，而不影响所有其它免疫反应。该方法非常重要，因为大多数确诊患者是年轻妇女，需要治疗许多年，而目前接受的 SLE 治疗涉及给予免疫抑制剂，如皮质甾类和/或细胞毒性药物，而这些免疫抑制剂缺乏特异性，并且有多种副作用。

本发明还涉及治疗系统性红斑狼疮(SLE)的方法，包括给予 SLE 患者有效量本发明的肽或肽聚合物。在一个优选实施方案中，所述方法包括给予 SEQ ID NO:6 的肽。在另一个优选实施方案中，所述方法包括给予 SEQ ID NO:7 的肽。

本发明还涉及免疫调节 SLE 患者体内 SLE 相关反应的方法，所述方法包括给予所述 SLE 患者有效量本发明的肽或肽聚合物。在一个实施方案中，所述方法包括负调节 SLE 患者体内基质金属蛋白酶 (MMP)-3 和/或 MMP-9 活性的水平。在另一实施方案中，所述方法包括免疫调节 SLE 患者体内细胞因子活性的水平，尤其是负调节 SLE 患者体内 IL-2 和/或 IFN- $\gamma$ 活性的水平和/或正调节 TGF- $\beta$ 活性的水平。在一个优选实施方案中，所述方法包括给予 SEQ ID NO:6 的肽。在另一个优选实施方案中，所述方法包括给予 SEQ ID NO:7 的肽。

本发明还提供评价药物对于治疗 SLE 患者的有效性的方法，所述方法包括在不同时间间隔测量从用所述药物治疗的所述患者获得的血液样品中 MMP-3、MMP-9、IL-2、IFN- $\gamma$ 和/或 TGF- $\beta$ 的水平，因为 MMP-3、MMP-9、IL-2 和/或 IFN- $\gamma$ 的水平降低或 TGF- $\beta$ 的水平升高与所述药物的有效性相关。

本发明还涉及应用本发明的肽或肽聚合物制备药用组合物，尤其用于治疗 SLE，更具体地说用于免疫调节 SLE 患者体内的 SLE 相关反应，例如负调节 SLE 患者体内的 MMP-3 和/或 MMP-9 和/或 IL-2 和/或 IFN- $\gamma$ 水平，或正调节 TGF- $\beta$ 的水平。

本发明将在下面非限制性的实施例和附图中更详细地说明。

## 实施例

### 材料和方法

**小鼠。**雌性(NZB x NZW)F1 小鼠得自 Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME)。6-8 周龄 BALB/c 纯系雌性小鼠得自 Experimental Animal Unit, The Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel。

**抗 DNA 单克隆抗体。**以前已经特征鉴定携带 16/6Id (IgG1/k)的人抗 DNA mAb (Shoenfeld 等, 1982; Waisman 等, 1995)。所述 mAb 由在培养物中培养的杂交瘤细胞分泌，并使用蛋白 G-Sepharose 柱 (Pharmacia, Fine Chemicals, Uppsala, Sweden)纯化。

**合成肽。**如以前所述(WO 96/30057), 或使用自动化合成仪 (Applied Biosystems 430A 型, Germany) 采取该公司用于 t-butylloxycarbonyl (t-Boc) 技术的方法, 制备合成鼠肽 mCDR1 (SEQ ID NO:1) 和 mCDR3 (SEQ ID NO:3) 以及按 mCDR1 和 mCDR3 的反向顺序以及按人类肽 hCDR1 的反向顺序合成的反向肽, 所述反向肽在本文中分别定义为 revmCDR1 [SEQ ID NO:28]、revmCDR3 [SEQ ID NO:29] 和 revhCDR1 [SEQ ID NO:30], 用作对照。

所述反向肽具有如下序列:

GIWELSKEPSQK V W Q M Y Y G T	revmCDR1 [SEQ ID NO: 28]
S G Q G W Y D M A Y P E W L F R A C Y Y	revmCDR3 [SEQ ID NO: 29]
GIWEEGK G P P Q R I W S W Y Y G	revhCDR1 [SEQ ID NO:30]

**诱导和治疗实验性 SLE。**为诱导实验性 SLE, 用 1-2  $\mu$ g 人 mAb 16/6Id 免疫 BALB/c 小鼠, 并在 3 周后加强。为预防实验性 SLE, 在免疫的同时静脉内(i.v.)或皮下给予小鼠 hCDR1 或 hCDR3 (mCDR1 或 revmCDR1 在实施例 12 中用作对照), 此后 5 周每周对所述小鼠进行注射。在用 16/6Id 引起疾病三个半月后已经观察到临床表现时, 开始对已经建立的疾病进行治疗。在实施例 12 中, 每周以 100  $\mu$ g/小鼠的剂量注射小鼠(静脉内或皮下)共 10 周。

**用 hCDR1 或 mCDR1 肽预防和/或治疗(NZB x NZW)F1 小鼠体内的 SLE 样疾病。**为预防 SLE, 在观察到 2 月龄的小鼠出现疾病表现之前, 每周为小鼠皮下注射 hCDR1 (或实施例 12 中的 mCDR1, 250  $\mu$ g/小鼠)共 10 周。为治疗已经建立的疾病, 每周为 5-7 月龄的小鼠注射 hCDR1 (在实施例 12 中, 皮下注射 mCDR1, 250  $\mu$ g/小鼠)共 10 周。

**增殖性反应。**通过 Ficoll-Hypaque (Pharmacia) 密度梯度离心从肝素化的静脉血分离 PBL。所有测定都在平底微量滴定板(Falcon, Becton Dickinson, Oxmard, CA, USA)上一式三份进行, 其中如所述(Dayan 等, 2000)在富集的 RPMI-1640 中培养  $2 \times 10^5$  PBL。使所述 PBL 暴露于不同浓度(0.1-40  $\mu$ g/孔)的人抗 DNA 16/6 Id mAb, 同时添加或不添加

浓度至少超过 16/6Id 浓度十倍的各种基于 CDR 的肽。在每个实验中使用植物凝集素(PHA; 2  $\mu\text{g}/\text{孔}$ )作为培养条件的对照。所述培养物在 37°C 下 7.5%  $\text{CO}_2$  中温育 6 天。在收获细胞十八小时前, 在所有培养物中加入 [ $^3\text{H}$ ]-胸苷(5 Ci/mmol 的 0.5  $\mu\text{Ci}$ )(Nuclear Research Center, Negev, Israel)。结果表示为三份平行培养物平均胸苷掺入的每分钟计数(CPM) $\pm$ SD, 或表示为刺激指数(S.I.; 人 16/6Id 最佳浓度下的平均 CPM 与仅存在培养基时平均 CPM 的比值)。S.I. $\geq$ 2 被认为是阳性反应(Dayan 等, 2000)。高于 50%的抑制(存在 16/6Id 和各种基于 CDR 的肽的情况下平均 CPM 与存在 16/6Id 而不存在基于 CDR 的肽的情况下的平均 CPM 的比值)被认为是阳性。

**诱导细胞因子生产。**小鼠用人 16/6Id mAb 免疫, 并用或不用基于 CDR 的肽处理, 在用所述肽处理的不同时期或处理后处死小鼠。收获脾细胞和淋巴结细胞(LNC), 在 16/6Id 存在下温育( $5 \times 10^6/\text{ml}$ )。在 48 小时和 72 小时后收集上清液。

**评价上清液中的细胞因子。**开始培养后 48 小时, 收集上清液, 保存于-70°C。通过 ELISA 测量 IL-2、IL-10、IFN- $\gamma$ 和 TNF- $\alpha$ , 所述 ELISA 根据厂家指导使用相关标准以及捕获和检测 Ab (Pharmingen)。通过 ELISA 测定 TGF- $\beta$ 。简要地说, 用重组人 TGF- $\beta$ 1 sRII/Fc 嵌合物(R & D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA)包被板, 使用的第二 Ab 是生物素化抗人 TGF- $\beta$ 1 抗体(R & D Systems Inc.)。所使用的底物溶液是 TMB 颜色试剂(Helix Diagnostics, West Sacramento, CA), 使用 570-nm 和 630-nm 滤片评价酶活性。

**检测 SLE 相关的临床和病理学表现。**使用 Combistix 试剂盒(Ames Division, Bayer Diagnostics, Newbury, U.K.)半定量测量蛋白尿。在含 1%乙酸(体积比)的蒸馏水中 10 倍稀释肝素化血液, 然后计数白细胞(WBC, 就白细胞减少而言)。为进行免疫组织学分析, 固定冰冻的肾切片(6  $\mu\text{m}$ ), 用 FITC 缀合的山羊抗鼠 IgG 抗体( $\gamma$ -链特异性; Sigma)。

**ELISA。**为测量抗 DNA 抗体, 用甲基化 BSA 或聚 L-赖氨酸(Sigma)

包被 96 孔 Maxisorb 微量滴定板(Nunc)。洗板, 然后用 10  $\mu\text{g/ml}$  变性的小牛胸腺 DNA (Sigma)或 $\lambda$ -噬菌体双链 DNA (Boehringer Mannheim, 5  $\mu\text{g/ml}$ )包被板。在用不同稀释度的血清温育后, 在板内加入缀合辣根过氧化物酶(Jackson ImmunoResearch)的山羊抗小鼠 IgG ( $\gamma$ 链特异性), 然后加入底物 2,2'-连氮基-双(3-乙基苯基噻唑啉-6-磺酸)(Sigma)。使用 ELISA 读板仪读取结果。

**测量 MMP-2 和 MMP-9 的活性。**通过凝胶酶谱法测试 MMP 活性。通过 1 mg/ml 明胶聚合的 8% SDS-PAGE 分离从不同实验组个体小鼠汇集的血清。电泳后, 凝胶在 2.5% Triton X-100 中洗涤 30 分钟一次, 除去 SDS, 然后在含 50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 10 mM  $\text{CaCl}_2$  和 0.02% (重量/体积)Brij 35 的反应缓冲液(pH 7.5)中洗涤 30 分钟一次。更换新鲜的反应缓冲液, 将所述凝胶在 37 $^\circ\text{C}$ 温育 24 小时。通过用 0.5%考马斯亮蓝染色凝胶, 显示明胶水解活性。

**血清中 MMP-3 的蛋白质印迹。**在 12% SDS/PAGE 上加载 5  $\mu\text{l}$  每种血清的样品, 在还原条件下分离, 然后转移到硝酸纤维素上。用抗 MMP-3 抗体(Oncogene Research Products, MA, USA)探测印迹(0.5  $\mu\text{g/ml}$ , 1 小时, 室温), 并使用化学发光显影。

**针对 MMP-3 或 MMP-9 进行肾切片免疫染色。**为针对 MMP-3 或 MMP-9 进行免疫染色, 用冷丙酮固定(室温下 5 分钟)肾切片(5  $\mu\text{m}$ ), 在 PBS 中洗涤两次, 在 0.05% Triton X-100 (在 PBS 中稀释)中渗透(室温下 1 分钟), 然后在 PBS 中洗涤两次。为获得 FITC 标记的山羊抗小鼠的特异性抗 MMP 染色和避免对免疫复合物沉积的染色, 用未标记的山羊抗小鼠 IgG+IgM (在 1% BSA/PBS 中以 1:1 稀释; (Jackson ImmunoResearch Laboratories))封闭(室温下 1 小时), 然后用含 0.05% Tween 的 PBS 洗涤 3 次。加入用 1% BSA/PBS 稀释的单克隆抗 MMP-9 抗体 (1:100; Chemicon International, Inc.)或抗 MMP-3 抗体(1:50; Oncogene Research Products), 在室温下温育 30 分钟。对于所有的免疫染色程序, 都使用在 1% BSA/PBS 中稀释的 FITC 标记的

山羊抗小鼠 IgG+IgM (Jackson ImmunoResearch Laboratories)(室温下 30 分钟)。

**统计分析。**结果表示为平均值±SD。使用卡方检验、Wilcoxon 检验、Mann-Whitney 检验和 *t*-检验进行统计分析。 $P \leq 0.05$  被认为具有显著性。

## **实施例 1**

### **合成人肽 hCDR1 和 hCDR3**

如所述，使用本领域内众所周知的方法制备人 hCDR1 (SEQ ID NO:6)和 hCDR3 (SEQ ID NO:7)肽，例如使用自动化合成仪应用化学固相合成或液相合成，采用厂家用于叔丁氧基羰基(t-Boc)、芴甲氧羰基(Fmoc)或其它  $\alpha$ -氨基保护基团程序的方法(见，例如，Peptides: Synthesis, Structure and Applications, B. Gutte 编辑, Academic Press, 1995; Peptide Synthesis Protocols, M. Pennington 和 B. Dunn 编辑, Humana Press, 1994; Schnolzer M.等, Boc-化学固相肽合成中的原位中和, 困难序列的快速、高产量组装. Int. J. Pept. Protein Res. 40: 180-193, 1992)。

## **实施例 2**

### **用 mCDR1 和 mCDR3 免疫并用 hCDR1 和 hCDR3 处理的小鼠体内淋巴结细胞(LNC)增殖的抑制**

为确定人类肽 hCDR1 和 hCDR3 的抑制效应，我们首先测试它们在体内抑制用鼠肽 mCDR1 和 mCDR3 引发小鼠的能力。

为此，分别用 mCDR1 和 mCDR3 免疫 BALB/c 小鼠和 SJL 小鼠。将溶于 CFA 的免疫用鼠肽注射(10  $\mu$ g/小鼠)入 hind footpad 的真皮内。在免疫的同时，为 BALB/c 小鼠的组皮下(s.c.)注射溶于 PBS 中的 200  $\mu$ g hCDR1，相似地为 SJL 小鼠的组注射 hCDR3。免疫后十天，处死小鼠，收获淋巴结，测试所述细胞在用免疫肽触发后增殖的能力。

简要地说，在含有不同浓度(1-20  $\mu\text{g}/\text{孔}$ )鼠免疫肽并补充 1%正常小鼠血清的富集 RPMI-1640 培养基中培养免疫后小鼠的 LNC ( $0.5 \times 10^6/\text{孔}$ ，一式三份)。温育四天后，添加  $^3\text{H}$ -胸苷，继续培养 16 小时。然后收获细胞，用 $\beta$ -计数器计数放射性。

表 1A 和 1B 中的结果表示分别用 mCDR1 和 mCDR3 免疫并用 hCDR1 和 hCDR3 处理的小鼠的 LNC 增殖的最大抑制%。所述抑制根据未用抑制肽 hCDR1 和 hCDR3 处理的小鼠 LNC 的增殖进行计算。可以看到 hCDR1 和 hCDR3 能够抑制对免疫用小鼠 CDR 肽的增殖反应。

表 1A

hCDR1 抑制从 BALB/c 获得的 LNC 应答 mCDR1 的增殖

抑制剂	抑制%
hCDR1	55%

表 1B

hCDR3 抑制从 SJL 获得的 LNC 应答 mCDR3 的增殖

抑制剂	抑制%
hCDR3	55%

### 实施例 3

#### 用人抗 DNA 16/6Id mAb 免疫并用 hCDR1 和 hCDR3 处理的小鼠体内 LNC 增殖的抑制

因为我们的目标是测试基于人 16/6Id 自身抗体的 CDR 的肽的抑制能力，所以重要的是了解肽 hCDR1 和 hCDR3 是否能够抑制人 16/6Id mAb 完整分子的引发作用。为此，用溶于 CFA 的人 16/6Id mAb ( $2 \mu\text{g}/\text{小鼠}$ ) 在 hind footpad 真皮下引发 BALB/c 和 SJL 小鼠。在引发的同时，为 BALB/c 小鼠的组皮下给予溶于 PBS 中的  $200 \mu\text{g}/\text{小鼠}$  hCDR1，为

SJL 小鼠皮下给予溶于 PBS 中的 200  $\mu\text{g}$ /小鼠 hCDR3。免疫后十天，处死小鼠，体外测试它们的 LNC 应答不同浓度(0.1-10  $\mu\text{g}$ /孔)人抗 DNA 16/6Id mAb 而增殖的能力。

这些实验有代表性的结果显示于表 2A 和表 2B。结果表示为：与用 16/6Id mAb 免疫但未用肽 hCDR1 和 hCDR3 处理的小鼠相比，来自用所述肽免疫和处理的小鼠的淋巴结细胞应答免疫用人 16/6Id mAb 而增殖的最大抑制%。如结果所示，肽 hCDR1 和 hCDR3 都能够有效抑制应答人 16/6Id mAb 的引发。

**表 2A**

**hCDR1 抑制来自 BALB/c 的 LNC 应答人 16/6Id mAb 的增殖**

抑制剂	抑制%
hCDR1	88%

**表 2B**

**hCDR3 抑制来自 SJL 的 LNC 应答人 16/6Id mAb 的增殖**

抑制剂	抑制%
hCDR3	68%

进一步的实验证明：在用人 16/6Id mAb 免疫的同时，经鼻给予低至 10 甚至 2  $\mu\text{g}$ /小鼠肽 hCDR1 或 hCDR3 抑制淋巴结细胞应答所述免疫用抗体的增殖反应达到 100%。

在另一个实验中，用溶于 CFA 的 1  $\mu\text{g}$  人 16/6Id 在 hind footpad 真皮下免疫 BALB/c 小鼠，然后或者皮下注射溶于 PBS 中的 300  $\mu\text{g}$ /小鼠 hCDR1，或者不进行进一步的处理。十天后，处死小鼠，测试它们的 LNC 在体外应答人 16/6Id 而增殖的能力。因此，在不同浓度(0.1-10  $\mu\text{g}$ /孔)人抗 DNA 16/6Id mAb 存在下温育 LNC ( $0.5 \times 10^6$ )。在 4 天温育期的结尾，在所述培养物中加入  $^3\text{H}$ -胸苷，培养最后 18

小时。收获细胞，计数放射性。

图 1 显示所述实验的结果，证明 hCDR1 有效抑制受到处理的小鼠的淋巴结细胞的增殖反应。在不同浓度 16/6Id mAb 下增殖抑制%如下：0.1  $\mu\text{g}/\text{孔}$  - 47%；1  $\mu\text{g}/\text{孔}$  - 66%；5  $\mu\text{g}/\text{孔}$  - 76%；和 10  $\mu\text{g}/\text{孔}$  - 62%。

用溶于 PBS 中的 50  $\mu\text{g}$  hCDR1/小鼠重复上面的同样实验。图 2 显示：hCDR1 非常有效地抑制用完整抗 DNA 16/6Id 大分子在小鼠体内进行的引发，甚至皮下注射少至 50  $\mu\text{g}$  的 hCDR1 也显著抑制淋巴结细胞应答 16/6Id 自身抗体而增殖的能力。在不同 16/6Id mAb 浓度下增殖的抑制%如下：0.1  $\mu\text{g}/\text{孔}$  - 98%；1  $\mu\text{g}/\text{孔}$  - 76%；5  $\mu\text{g}/\text{孔}$  - 73%；和 10  $\mu\text{g}/\text{孔}$  - 64%。

#### 实施例 4

##### 肽 hCDR1 免疫调节细胞因子产生

用人 16/6Id mAb 刺激来自用 50  $\mu\text{g}$  实施例 3 的 hCDR1 处理的 BALB/C 小鼠的淋巴结细胞，以产生细胞因子，并通过 ELISA 测试细胞因子(IFN- $\gamma$ 、TGF- $\beta$ 和 IL-10)的分泌。

图 3 显示有代表性的实验的结果。可以看到：hCDR1 负调节 INF- $\gamma$  的生产(图 3A)，正调节 TGF- $\beta$  (图 3B)和 IL-10 (图 3C)的分泌。应当注意到：用作对照的肽(p259-271，一种致肌无力的肽)并不显著影响 INF- $\gamma$ 和 IL-10 的生产，并且对于正调节 TGF- $\beta$ 并不那么有效。

#### 实施例 5

##### 肽 hCDR1 和 hCDR3 抑制 SLE 患者的 PBL 应答人 16/6Id mAb 的增殖反应

六十二名 SLE 患者参加我们的研究，包括 9 名男性(14.5%)和 53 名女性(85.5%)。诊断时的平均年龄是  $32.95 \pm 12.92$  岁(范围 12-61 岁)，平均随访期是  $10.98 \pm 10.76$  年(范围 1-32 年)。所有患者满足至少四

项美国风湿病学学院(American College of Rheumatology, ACR)修订的 SLE 诊断标准(Tan 等, 1982)。从三个以色列医疗中心(Kaplan, Rehovot; Ichilov, Tel Aviv; Asaf-Harofeh, Rishon Lezion)招募患者。根据 SLEDAI 狼疮活动性指数(Bombardier 等, 1992)确定疾病活动性。在研究 SLE 患者的同时, 研究由 36 名性别和年龄相似的健康对照志愿者组成的对照组。该研究得到医疗中心伦理委员会的批准。

我们感兴趣的是研究基于人 16/6Id mAb CDR1 和 CDR3 的肽 hCDR1 和 hCDR3 是否能够抑制 SLE 患者 PBL 针对人 16/6Id mAb 的特异性增殖反应。为此, 我们首先必须鉴定其体内 PBL 能够受到人 16/6Id mAb 的刺激而增殖的患者(应答者)。

因此, 在人 16/6 Id 存在下, 顺序培养 62 名 SLE 患者的 PBL, 并确定它们的增殖反应以及分泌 IL-2 的能力。在总共 62 名接受测试的 SLE 患者中, 有 24 名患者(39%)的 PBL 有增殖应答( $SI \geq 2$ , 范围 2-5.6), 在总共 55 名接受测试的 SLE 患者中, 有 23 名患者(42%)的 PBL 有 IL-2 分泌应答( $SI \geq 2$ , 范围 2-60)。在 SLE 患者组中应答者的频率低于在作为对照测试的健康供体组中观察到的频率。因此, 在总共 36 名健康供体中, 有 21 名健康供体(58%)的 PBL 对 16/6 Id 有增殖应答。应答 16/6 Id 的 SLE 患者以及健康对照的增殖程度(SI 水平)是相似的。然而, 如图 4 所示, 与 SLE 患者相比, 在更高的浓度才观察到对照供体的 PBL 对 16/6 Id 的增加应答。

在应答 16/6 Id 的 SLE 患者和患者无应答者组之间, 没有出现性别和年龄的差异。然而, 其 PBL 应答 16/6 Id 而增殖的患者患病时间较短(应答者的平均患病时间是  $9.78 \pm 8.36$  年, 而无应答者的平均患病时间是  $11.73 \pm 12.06$  年;  $P \leq 0.036$ )。表 3 综述 SLE 患者中 16/6 Id 应答者组以及无应答者组的临床特征。如我们可以从该表中看到的, 两组在大多数 SLE 相关临床表现上是相似的。两组间 SLE 疾病活动性分数(SLEDAI)以及 SLE 诊断标准的数目也是相似的。尽管如此, 与无应答者组相比, 在患者的应答者组中观察到更高频率的神经受累(癫

痛发作以及精神病)和血液学受累以及更低比率的肾损害。然而,可能由于相关亚组中的患者数目少,上述差异没有达到统计学显著性。此外,在研究时在那些用类固醇或细胞毒性剂治疗的患者之间,检测到相对更少的应答者患者。值得注意的是:与无应答者组相比,显著更多的从未接受类固醇的患者对 16/6 Id 有应答(应答者组是 54%,而无应答者组是 21%; P=0.023)。

值得注意的是:基于 CDR 的肽抑制健康供体 PBL 对 16/6 Id 的增殖应答的功效远远低于其对 SLE 患者 PBL 的功效(未显示)。

表 3. SLE 患者的临床和实验室标准。

A: 诊断标准\*

	所有患者	应答者	无应答者
患者数目(%)	62 (100)	24 (39)	38 (61)
颧部疹	19/62 (30.1)	8/24 (33.3)	11/38 (29)
盘状疹	9/62 (15)	3/24 (12.5)	6/38 (16)
光敏感性	21/62 (34)	9/24 (37.5)	12/38 (32)
粘膜溃疡	17/62 (27.4)	8/24 (33.3)	9/38 (23.7)
关节炎	46/62 (74.2)	19/24 (79.2)	27/38 (71)
浆膜炎	14/62 (22.6)	5/24 (20.8)	9/38 (23.7)
神经异常 <sup>++</sup>	5/62 (8.1)	4/24 (16.7)	1/38 (2.7)
肾异常 <sup>++</sup>	24/62 (38.8)	7/24 (29.2)	17/38 (44.8)
血液异常 <sup>++</sup>	44/62 (71)	19/24 (79.2)	25/38 (65.8)
ANA	61/62 (98.4)	24/24 (100)	37/38 (92.1)
α-dsDNA	54/62 (87.1)	19/24 (79.2)	35/38 (92.1)
APLA	35/62 (56.5)	12/24 (50.0)	23/38 (60.53)

**B: 疾病活动性**

SLEDAI 分数	6.65±5.12	7.29±1.06	6.24±0.84
ACR 诊断标准的数目	5.44±1.39	5.54±0.33	5.34±0.2

**C: 当前治疗<sup>+</sup>**

NSAIDS	17/62 (27.4)	6/24 (25)	11/38 (29)
抗疟药物	37/62 (59.7)	15/24 (62.5)	22/38 (57.9)
类固醇 <sup>**</sup>	33/62 (53.2)	11/24 (45.8)	22/38 (57.9)
细胞毒性 <sup>**</sup>	10/62 (16.1)	2/24 (8.3)	8/38 (21)

\*根据 ACR 修订的标准定义临床损害程度。分别根据 Hep2 细胞以及 *Crithidia luciliae* 测定抗核抗体(ANA)以及抗 dsDNA 抗体。根据下面测试中一个或多个的反应性定义抗磷脂抗体(APLA): VDRL 假阳性、狼疮抗凝血剂(LAC)或针对抗心磷脂抗体的 ELISA。

+ 以 200-400 mg/天的剂量应用抗疟剂羟氯喹; 类固醇治疗定义为以日剂量 $\geq 5$ mg 使用泼尼松; 使用的细胞毒性剂是环磷酰胺(0.75-1.0 g/m<sup>2</sup>; 每月)或硫唑嘌呤(100-150 mg/天)。

\*\*在应答组和无应答组 SLE 患者之间观察到差异趋势的参数。

为测试肽 hCDR1 和 hCDR3 抑制 SLE 患者 PBL 对人 16/6Id mAb 的应答的能力, 用不同浓度(0.1-20  $\mu$ g/孔)人 16/6Id mAb, 在或不在肽 hCDR1 和 hCDR3 存在下(50 或 100  $\mu$ g/孔), 体外刺激 SLE 患者的 PBL ( $2 \times 10^5$ /孔), 一式三份。温育 6 天后, 在每孔中加入 <sup>3</sup>H-胸苷(0.5  $\mu$ Ci 在 5 Ci/mmol), 继续温育 18 小时。然后收获细胞, 用  $\beta$ -计数器测量放射性。结果表示为三份平行培养物的平均每分钟计数(cpm)。然后计算刺激指数(最佳浓度 16/6Id 下 cpm 与不存在 16/6Id 时平均 cpm 的比值)。刺激指数(SI)  $\geq 2$  被认为是阳性。

在总共 62 名患者中, 发现 24 名患者(39%)的 PBL 应答 16/6Id mAb

而增殖。对 19 名应答者 SLE 患者的 PBL 测试肽 hCDR1 和 hCDR3 抑制针对 16/6Id 自身抗体全分子的增殖反应的能力。

表 4 显示这些实验的结果。抑制超过 50%的增殖能力被认为是阳性。该表显示每种肽最高的阳性抑制能力。可以看到，在测试的 19 名应答者中，人 hCDR1 和 hCDR3 分别抑制 16/19 (84.2%)以及 15/19 (78.9%)的 PBL 增殖。两种肽一起抑制 19 名受测试的应答者中 18 名患者(95%)的 PBL 增殖。还可以从表中看到，两种肽抑制的程度相似。因此，可以得出结论：基于人 16/6Id mAb CDR1 和 CDR3 的肽是 SLE 患者的 PBL 应答人 16/6Id mAb 的增殖的有效抑制剂。

**表 4**  
**肽 hCDR1 和 hCDR3 抑制 SLE 患者的 PBL 增殖。**

编号	姓名的首字母	抑制百分率	
		hCDR1	hCDR3
1.	B.L.	62	<50
2.	M.D.	70	75
3.	T.L.	69	<50
4.	Z.D.	<50	<50
5.	N.N.	88.5	87.5
6.	S.S.	80	80
7.	S.H.	76	70.4
8.	S.D.	58	56
9.	A.N.	69.5	65
10.	I.J.	68.2	71.8
11.	L.J.	<50	72
12.	V.L.	82	86
13.	M.S.	63	64
14.	D.S.	56	74
15.	Z.A.	63	69
16.	B.M.	<50	68

17.	S.N.	70.5	77.8
18.	G.M.	51.5	<50
19.	N.J.	63	60.8
平均值±SD		68.12±9.57	71.82±8.44

### 实施例 6.

#### **hCDR1 和 hCDR3 抑制能力的特异性**

重要的是证明基于 hCDR 的肽的抑制效应特异性针对 SLE 相关反应。为此，在用促细胞分裂原植物凝集素(PHA, 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )刺激过的 SLE 患者 PBL 培养物中加入肽 hCDR1 或 hCDR3。图 5 显示用一名 SLE 患者的 PBL 进行的所述实验的结果。肽 hCDR1 和 hCDR3 不能抑制 PBL 针对促细胞分裂原 PHA 的增殖反应(以 cpm 表示)，并且在存在或不存在(黑色柱)hCDR1 或 hCDR3 的情况下，所述增殖反应相似地高。

在另一实验中，用人 16/6Id mAb 刺激 SLE 患者的 PBL 培养物，然后所述培养物与人类肽 hCDR1 或 hCDR3 温育，使用鼠肽 mCDR3 作为对照。图 6 显示用一名 SLE 患者 PBL 进行的所述实验的结果。如图 6 所示，虽然基于人自身抗体的肽 hCDR1 和 hCDR3 都有效抑制 PBL 针对人 16/6Id mAb 的增殖反应，但基于鼠抗体 CDR3 的肽 mCDR3 不抑制所述增殖。

在这些实验中使用另外对照肽，即按鼠 mCDR1 和 mCDR3 肽的反向顺序合成的肽(revmCDR1 和 revmCDR3)，结果显示于图 7。可以看到，这两种反向肽不能显著抑制 SLE 患者 PBL 针对人 16/6Id mAb 的增殖反应，而肽 hCDR1 和 hCDR3 确实有效抑制所述增殖，这证明基于人 hCDR 的肽对增殖的抑制对于所述肽是特异性的，并且特异性针对 SLE 相关的 T 细胞反应。

**实施例 7.****在肽 hCDR1 和 hCDR3 存在下, SLE 患者 PBL 的 IL-2 分泌受到负调节**

我们想知道 hCDR 肽是否能够抑制在用人 16/6Id mAb 刺激后 SLE 患者 PBL 的 IL-2 分泌。所述抑制也提示: 所述基于人 CDR 的肽至少部分通过负调节 IL-2 分泌而抑制针对 16/6Id mAb 的增殖反应。为此, 在存在或不存在肽 hCDR1 或 hCDR3 的情况下, 将 SLE 患者的 PBL 与人 16/6Id mAb 一起温育。温育 48 小时后, 收集所述培养物的上清。使用 IL-2 依赖性 CTLL 细胞系进行测定, 确定所述上清中的 IL-2 水平。简要的说, CTLL 系的细胞( $2 \times 10^4$ /孔)在不同上清存在下温育 24 小时, 然后加入  $^3\text{H}$ -胸苷, 继续温育 18 小时。然后收获细胞, 用  $\beta$  计数器测量放射性。使用重组人 IL-2 作为标准, 据此计算结果。测试所述肽抑制 23 名应答者 PBL 受到人 16/6Id mAb 刺激后的 IL-2 分泌的能力。结果综述于表 5, 显示 hCDR1 和 hCDR3 分别抑制 21/23 以及 19/23 名患者 PBL 的 IL-2 分泌。PBL 增殖反应的抑制直接与所述基于 CDR 的肽的 IL-2 抑制相关。因此, 在确定有抑制增殖的所有病例中, 都观察到 IL-2 分泌的抑制。

图 8 显示用一名 SLE 患者的 PBL 获得的结果(IL-2 的分泌以 pg/ml 表示), 结果显示 hCDR1 和 hCDR3 一起抑制 100% 由人 16/6Id mAb 触发的 SLE 患者 PBL 的 IL-2 分泌。

**表 5.hCDR1 和 hCDR3 抑制 IL-2 分泌**

肽	抑制活性*%	最大抑制%
hCDR1	91 (21/23)	84±31
hCDR3	83 (19/23)	78±34

\*认为仅存在 16/6 Id 的情况下 IL-2 分泌是 100%。认为 50% 或以上的抑制具有显著性。

**实施例 8.****基于 CDR 的肽正调节免疫抑制性细胞因子 TGF- $\beta$  的分泌**

为阐明所述基于人 CDR 的肽抑制针对人单克隆抗 DNA 16/6Id 抗体的增殖反应的机制，测定细胞培养物上清中免疫抑制性细胞因子 TGF- $\beta$  的水平。这些实验的基本原理基于我们以前的发现，即患 SLE 的小鼠的脾细胞培养物在用人抗 DNA 16/6Id mAb 诱导后 TGF- $\beta$  水平提高，或者在用基于鼠 CDR 的肽治疗后自发出现{(NZB x NZW) F1 小鼠} TGF- $\beta$  水平提高(Eilat 等, 2001)。TGF- $\beta$  水平提高与受治疗小鼠的疾病表现缓解相关。

为此目的，各种 SLE 患者的 PBL 培养物与人 16/6Id mAb 在存在或不存在肽 hCDR1 或 hCDR3 的情况下温育 48 小时后，从培养物中取出上清。通过 ELISA，根据厂商指导测定 TGF- $\beta$ 。简要地说，用 PBS 稀释的重组人 TGF $\beta$ sRII/Fc 嵌合物(R&D Systems)(100 ng/ml) 包被 Maxisorb 板(Nunc)。封闭后，加入细胞上清。温育 18 小时后，加入检测用生物素化的抗人 TGF- $\beta$  抗体(R&D Systems)。所使用的底物溶液是 TMB 染色试剂(Helix Diagnostics)，使用 MRX ELISA 读板仪，用 570 nm 和 630 nm 滤片评估酶活。结果综述于表 6。

图 9 中的结果证明：用致病性人 16/6Id mAb 刺激一名有代表性的 SLE 患者的 PBL 后，肽 hCDR1 和 hCDR3 触发所述 PBL 的 TGF- $\beta$  分泌(以 pg/ml 表示)显著正调节。

表 6

**hCDR1 和 hCDR3 肽正调节 SLE 患者 PBL 的 16/6 Id 诱导刺激的 TGF- $\beta$  分泌。**

肽	TGF- $\beta$ 的正调节%	最大正调节%
hCDR1	100 (19/19)	305 $\pm$ 221
hCDR3	100 (19/19)	338 $\pm$ 242

认为在 16/6 Id 单独存在下 TGF- $\beta$  的分泌(平均值 636 $\pm$ 25 pg/ml)

是 100%。结果表示为在单独存在 16/6Id 的情况以上的分泌百分率。

### 实施例 9.

#### hCDR1 免疫调节小鼠的 SLE 表现: 用 hCDR1 治疗(NZB x NZW)F1 小鼠后疾病表现的缓解。

如上文所示, 基于人抗 DNA 16/6Id mAb CDR 的肽能够以相似的效率抑制 16/6Id mAb 引发淋巴结细胞以及 SLE 患者 PBL 应答 16/6Id mAb 的增殖反应。因此, 我们想查明这些肽是否能在动物模型中免疫调节 SLE 样疾病。

所述实验的目标在于查明所述人类肽治疗已经建立的 SLE 疾病的能力, 首先用 hCDR1 肽进行所述实验。为此, 设计一些实验, 其中用 hCDR1 肽在易患 SLE 的(NZB NZW)F1 小鼠 5 个半月龄、已经观察到 SLE 样疾病的表现(抗 dsDNA、蛋白尿等)时进行治疗。每周皮下给予 PBS 中的 hCDR1 肽, 共 10 周。测试不同剂量(50、100 和 200  $\mu\text{g}$ /小鼠) hCDR1 肽的功效。对照组注射媒介物 PBS。该治疗导致抗 dsDNA 自身抗体滴度中度降低。因此, 在 1:1250 血清稀释度, 治疗结束时分别对 PBS 处理的小鼠、50  $\mu\text{g}$ /小鼠、100  $\mu\text{g}$ /小鼠和 200  $\mu\text{g}$ /小鼠 hCDR1 治疗的小鼠的血清测得  $0.586\pm 0.1$ 、 $0.27\pm 0.1$ 、 $0.37\pm 0.1$  和  $0.29\pm 0.1$  的 O.D.值。

我们进行另一个实验, 其中每周为 7 月龄(NZB x NZW)F1 小鼠皮下注射 PBS 中的 300  $\mu\text{g}$  hCDR1, 共 10 周。在用 hCDR1 治疗的小鼠的血清中能够观察到抗 DNA 抗体滴度轻度降低。然而, 表 7 显示: 用 hCDR1 治疗导致蛋白尿降低以及受治疗小鼠肾内的免疫复合物沉积(ICD)显著减少。该表中的结果表示 ICD 的强度, 其中 0=没有 ICD; 1=中度 ICD; 2=严重 ICD 而 3=严重并且极强烈的 ICD。

表 7

用 hCDR1 在 7 月龄治疗的(NZB x NZW)F1 小鼠的临床表现

治疗	蛋白尿 g/L±SEM	免疫复合物沉积 ±SEM
未治疗	4.80 ± 2.56	2.57 ± 0.29
hCDR1 300 µg/小鼠	1.08 ± 0.38	1.44 ± 0.41 p=0.035

p 相对于未处理组小鼠计算。

然后我们进行另一个实验，该实验使用 400 µg/小鼠的 hCDR1，查明是否能够通过增加所述肽的剂量获得更多的有益效果。用 400 µg/小鼠的 hCDR1 治疗对于抗 DNA 抗体滴度没有更多的效果，并且如表 8 所示，其对肾病的效果与用 300 µg 剂量治疗后观察到的效果相似。

表 8

用 hCDR1 在 7 月龄治疗的(NZB x NZW)F1 小鼠的临床表现

治疗	蛋白尿 g/L±SEM	免疫复合物沉积 ±SEM
未治疗	4.99 ± 2.53	2 ± 0.29
hCDR1 400 µg/小鼠	0.77 ± 0.32	1.42 ± 0.19 p=0.05

p 相对于未处理组小鼠计算。

因此，我们进行另一个实验，其中用 300 µg hCDR1 在 7 月龄治疗小鼠，并且使用对照肽，所述对照肽即反向 hCDR1。该实验的目的是查明用 hCDR1 治疗除缓解临床表现外，是否免疫调节细胞因子产生。图 10 证明抗 DNA 自身抗体水平轻度降低。表 9 显示在不同时间点测量的蛋白尿。

表 9

用 hCDR1 在 7 月龄治疗的(NZB x NZW)F1 小鼠的临床表现

治疗	蛋白尿 g/L $\pm$ SEM		
	下面为治疗编号:		
	5	7	9
未治疗	2.65 $\pm$ 1.76	3.89 $\pm$ 2.73	7.55 $\pm$ 3.95
hCDR1 300 $\mu$ g/小鼠	0.61 $\pm$ 0.23	0.65 $\pm$ 0.32	1.02 $\pm$ 0.39 p = 0.05
revhCDR1 300 $\mu$ g/小鼠	6.94 $\pm$ 2.53	6.76 $\pm$ 2.91	5.99 $\pm$ 3.08

在所有测量中可以看到用 hCDR1 治疗的效果。肾损害是(NZB x NZW)F1 小鼠中 SLE 样疾病的主要表现之一。用 hCDR1 肽治疗十周显著减少肾损害。在治疗肾损害这一方面, 50  $\mu$ g 剂量不如 100 和 200  $\mu$ g 剂量有效。后两种剂量的有效性相似。

图 11A-11D 是图, 显示用 100  $\mu$ g 剂量 hCDR1 治疗的小鼠有代表性的肾切片。因此, 处死 9 月龄的小鼠, 取出肾, 立即在液氮中冰冻。5  $\mu$ m 的冰冻恒冷箱切片风干, 在丙酮中固定。为检测 Ig 沉积, 用 FITC 缀合山羊抗小鼠 IgG ( $\gamma$ 链特异性)温育切片。图 11A 和 11B 显示 PBS 处理组小鼠(对照)的肾切片, 而图 11C 和 11D 显示用 100  $\mu$ g hCDR1 治疗的小鼠的肾切片。可以在图中看到, 所述治疗减少免疫复合物的数目以及强度(11A、11C x 100; 11B、11D x 400)。

各组(NZB x NZW)F1 在 7 月龄、已经观察到充分发展的疾病时接受 hCDR1 治疗, 获得相似结果。用 100  $\mu$ g/小鼠或 300  $\mu$ g/小鼠治疗小鼠 10 周。两种剂量的治疗都导致抗 DNA 自身抗体滴度中度降低, 这与上述结果相似。还测量到蛋白尿相对于 PBS 处理组降低。用两种剂量治疗后肾病都得到缓解; 然而, 在用 300  $\mu$ g 剂量治疗的小鼠的组内测得更显著的效应。图 12A-12F 是每组有代表性的

小鼠肾切片，其中 A、B 代表未治疗的小鼠；C、D 代表用 hCDR1 治疗的小鼠的肾，而 E、F 代表用反向 hCDR1 治疗的小鼠的肾切片。A、C、E x 100 而 B、D x 400。

图 13A-13C 显示通过 ELISA 测得的治疗(每周皮下注射，共 10 周)结束时 3 组小鼠用 Con A 刺激的脾细胞培养物的上清内细胞因子 (INF- $\gamma$ 、IL-10 和 TGF- $\beta$ ) 模式。可以看到，INF- $\gamma$  (图 13A) 和 IL-10 (图 13B，程度更低) 在接受治疗的小鼠体内受到负调节。在未刺激的细胞的上清中可以看到 TGF- $\beta$  分泌增加(图 13C，左)。Con A 并不触发所述细胞分泌更多的 TGF- $\beta$  (图 13C，右)。

上面综述的结果指出：用 hCDR1 长期治疗缓解疾病表现并且免疫调节细胞因子分泌。

### 实施例 10.

#### 在诱导实验性 SLE 后，用人 hCDR1 肽治疗 BALB/c 小鼠

我们想查明 hCDR1 肽是否能够治疗小鼠体内用人抗 DNA 16/6Id mAb 诱导的实验性 SLE。因此，用 16/6Id 致病性自身抗体免疫并加强 BALB/c 小鼠。加强注射三个半月后，当所述小鼠已经发展出疾病表现时，将它们分成三组。一组不接受治疗，第二组用 100  $\mu$ g/小鼠 hCDR1 治疗，第三组用 300  $\mu$ g/小鼠 hCDR1 肽治疗 10 周。跟踪小鼠的临床表现。

表 10 展示治疗结束时在接受测试的个体小鼠观察到的结果。对于治疗所用的两种剂量，都观察到所有测量的临床表现得到缓解[抗 dsDNA 自身抗体、白细胞计数(WBC)和尿蛋白]。实验结束时(加强注射后 7 个月)分析处死的小鼠的肾，显示在用 16/6Id mAb 免疫和未治疗的 10 只小鼠中有 9 只出现免疫复合物沉积。与此不同，在用 16/6Id mAb 免疫并分别用 100  $\mu$ g/小鼠和 300  $\mu$ g/小鼠 hCDR1 治疗的小鼠中，分别仅在 3/10 和 2/9 小鼠的肾中观察到免疫复合物沉积。因此，结果显示人类肽 hCDR1 能够治疗已经建立的实验性 SLE。

**表 10**  
**用 100 $\mu$ g 或 300 $\mu$ g hCDR1 肽治疗患有实验性 SLE 的 BALB/c**  
**小鼠的效果。**

	对照, 健康 小鼠 平均值 $\pm$ SD	注射 16/6Id 平均值 $\pm$ SD	注射 16/6Id + hCDR1 100 $\mu$ g 平均值 $\pm$ SD	注射 16/6Id + hCDR1 300 $\mu$ g 平均值 $\pm$ SD
蛋白尿 g/l	0.12 $\pm$ 0.16	0.65 $\pm$ 0.36	0.3 $\pm$ 0.02	0.34 $\pm$ 0.25
WBC/mm <sup>3</sup>	7440 $\pm$ 960	3260 $\pm$ 920	6090 $\pm$ 2160*	5890 $\pm$ 2660*
抗 dsDNA O.D.(1:50)	0.1 $\pm$ 0.05	1.1 $\pm$ 0.6	0.3 $\pm$ 0.2*	0.55 $\pm$ 0.3*

\*=与注射 16/6Id 组有显著差异(P<0.05)。

在另一个实验中, 用人 16/6Id 免疫和加强 BALB/c 小鼠, 诱导实验性 SLE。加强两个月后, 将小鼠分组(每组 8 只小鼠)。用 200、300 或 400  $\mu$ g/小鼠治疗所述小鼠 10 周。跟踪观察小鼠的抗体产生、白细胞减少、蛋白尿, 并在治疗结束两个月后处死小鼠, 分析它们肾内的免疫复合物沉积。结果综述于表 11, 显示治疗对于 16/6Id 特异性抗体反应没有效应。

**表 11**  
**用 200 $\mu$ g、300 $\mu$ g 或 400 $\mu$ g hCDR1 肽治疗患有实验性 SLE 的**  
**BALB/c 小鼠的效应。**

	16/6Id 平均值 $\pm$ SD	16/6Id + hCDR1 200 $\mu$ g/小鼠 平均值 $\pm$ SD	16/6Id + hCDR1 300 $\mu$ g/小鼠 平均值 $\pm$ SD	16/6Id + hCDR1 400 $\mu$ g/小鼠 平均值 $\pm$ SD	对照 平均值 $\pm$ SD
蛋白尿 g/l	0.5 $\pm$ 0.34	0.13 $\pm$ 0.16 p=0.0131	0.16 $\pm$ 0.16 p=0.0209	0.11 $\pm$ 0.15 p=0.0070	0.03 $\pm$ 0.09 p=0.0002
WBC/mm <sup>3</sup>	2871 $\pm$ 1205	5625 $\pm$ 1659 p=0.0047	4677 $\pm$ 1508 p=0.0209	4012 $\pm$ 1421 p=0.0760	7280 $\pm$ 352 p=0.0001
肾内 ICD 程度	1.86 $\pm$ 0.38	0.57 $\pm$ 0.97 p=0.0189	0.75 $\pm$ 0.71 p=0.0047	0.71 $\pm$ 0.76 p=0.0055	0
在 1:1250 稀释度的抗 dsDNA 抗 体	1.16 $\pm$ 0.37	0.69 $\pm$ 0.39 p=0.0189	0.45 $\pm$ 0.24 p=0.0003	0.8 $\pm$ 0.39 p=0.0603	0.029 $\pm$ 0.025 p=0.0001
在 1:1000 稀释度的抗 16/6Id 抗体	2.55 $\pm$ 0.09	2.7 $\pm$ 0.12	2.8 $\pm$ 0.11	2.75 $\pm$ 0.1	0

然而，治疗影响抗 DNA 抗体滴度、白细胞减少、蛋白尿水平，更重要的是，影响肾内的免疫复合物沉积。实验的对照组是同样年龄的完全未接受免疫或治疗的 BALB/c 小鼠。该实验提示：hCDR1 有效治疗实验性 SLE，但没有观察到 400  $\mu$ g 剂量的好处。

因此，进行另外一个实验，其中用 200 和 300  $\mu$ g/小鼠治疗小鼠。在该实验中使用对照肽反向 hCDR1。该实验的目的除比较 200 和 300  $\mu$ g 治疗剂量外，是研究治疗对于接受治疗的小鼠体内细胞因子产生的影响。用 16/6Id 免疫和加强六十只 BALB/c 小鼠。加强三个月后，将小鼠分组(每组 15 只小鼠)，每组或者不进行进一步的治疗，或者每周接受 200 或 300  $\mu$ g hCDR1 的治疗。另一组接受 300  $\mu$ g 反向 hCDR1

治疗。第五组(对照)不接受免疫并且不接受进一步治疗。跟踪观察小鼠的抗体产生和疾病表现。如表 12 所示, 各组间小鼠血清内的抗 16/6Id 抗体水平(稀释度 1:10000)并没有差别。如该表所示, 用 200 和 300  $\mu\text{g}$  治疗降低抗 DNA 抗体水平(血清稀释度 1:1250)。表 12 也综述不同组小鼠间的临床表现。可以看到, 虽然两种剂量都有效降低白细胞减少和蛋白尿, 但在该实验中 200  $\mu\text{g}$  剂量的效应没有达到显著性(实验结束一个月后处死小鼠)。

表 12

用 200 $\mu\text{g}$  或 300 $\mu\text{g}$  hCDR1 或 300 $\mu\text{g}$  revhCDR1 治疗患有实验性 SLE 的 BALB/c 小鼠的效应

	16/6Id 平均值 $\pm$ SD	16/6Id + hCDR1 200 $\mu\text{g}$ /小鼠 平均值 $\pm$ SD	16/6Id + hCDR1 300 $\mu\text{g}$ /小鼠 平均值 $\pm$ SD	16/6Id + rev-hCDR1 300 $\mu\text{g}$ /小 鼠 平均值 $\pm$ SD	对照 平均值 $\pm$ SD
蛋白尿 g/l	0.58 $\pm$ 0.34	0.17 $\pm$ 0.15 p=0.0366	0.085 $\pm$ 0.01 p=0.0088	0.8 $\pm$ 0.3 p>0.5	0.031 $\pm$ 0.09
WBC/mm <sup>3</sup>	2800 $\pm$ 300	4900 $\pm$ 800 p=0.004	5800 $\pm$ 300 p=0.004	4180 $\pm$ 831 p=0.0079	7900 $\pm$ 400
肾内 ICD 程度	1.6 $\pm$ 0.55	1 $\pm$ 0.63 p=0.0887	0.5 $\pm$ 0.5 p=0.0152	0.85 $\pm$ 0.75 p=0.0628	0
抗 dsDNA 抗体 1:1250	0.47 $\pm$ 0.3	0.23 $\pm$ 0.1 p=0.0234	0.2 $\pm$ 0.1 p=0.0145	0.35 $\pm$ 0.3 p=0.343	0.002 $\pm$ 0.002
抗 16/6Id 抗体 1:10000	0.89 $\pm$ 0.1	0.96 $\pm$ 0.2	0.93 $\pm$ 0.1	0.95 $\pm$ 0.13	0.03 $\pm$ 0.1

图 14A-F 显示每组的一个肾, 其中 A、B 代表未治疗的小鼠; C、D 代表用 hCDR1 治疗的小鼠, E、F 代表用反向 hCDR1 治疗的小鼠

的肾切片。图 A、C、E x 100 而 B、D、F x 400。

图 15A-E 显示接受治疗的小鼠的脾细胞用 16/6Id 刺激的淋巴结培养物上清内不同细胞因子的水平。后面的实验在治疗结束时进行(10 次治疗注射后)。可以看到，用 hCDR1 治疗(两种剂量)负调节 INF- $\gamma$  (图 15A)、IL-10 (图 15C)和 TNF- $\alpha$  (图 15B)。另一方面，hCDR1 正调节 TGF- $\beta$  的水平。因为脾细胞通常比淋巴结细胞分泌更多的 TGF- $\beta$  (图 15D)，所以也测量在用 16/6Id 触发的各组小鼠脾细胞上清内的 TGF- $\beta$  (图 15E)。

因此，在患有诱导型实验性 SLE 的小鼠体内，hCDR1 缓解疾病表现并免疫调节细胞因子分泌。

### 实施例 11.

#### 通过接受 hCDR1 治疗的小鼠的脾细胞转移对狼疮表现的有益效应

重要的是研究受治疗小鼠的脾细胞是否能够传递 hCDR1 治疗的有益效应，即负调节疾病表现的效应。为此，我们进行一个实验，其中将 8 月龄大的已经患有完全发展的狼疮样疾病的(NZB x NZW)F1 小鼠分为 2 个组。组 1 不接受治疗，向组 2 的小鼠转移  $20 \times 10^6$  个 3 月龄(NZB x NZW)F1 小鼠的脾细胞，所述(NZB x NZW)F1 小鼠已经接受 300  $\mu\text{g}$ /小鼠 hCDR1 注射 3 次(皮下，每隔两天)。所有脾细胞都经腹腔注射。测试小鼠的抗 dsDNA 自身抗体产生、疾病表现，并在转移细胞 4 周后处死小鼠。转移 hCDR1 治疗小鼠的细胞导致抗 DNA 抗体的水平轻度降低。

表 13 证明：转移 hCDR1 治疗小鼠的脾细胞导致显著更低的蛋白尿，并且肾内的免疫复合物减少。

表 13

## hCDR1 治疗小鼠脾细胞的小鼠接受者中的临床狼疮表现

组编号	治疗	蛋白尿 g/L ± SEM	I.C.D. ± SEM
1	未治疗	15.07 ± 4.92	2.25 ± 0.47
2	来自 hCDR1 治疗小鼠的 20x10 <sup>6</sup> 个脾细胞	0.97 ± 0.67 p=0.05	0.75 ± 0.47 p=0.05

p 值相对于未治疗小鼠的 gr1 计算

重复所述实验几次，使用 revhCDR1 作为对照。结果类似于第一个实验的结果，即转移受治疗小鼠的细胞轻微影响抗 DNA 滴度，显著影响蛋白尿和肾损害。表 14 显示一个有代表性的实验的临床表现。

表 14

## hCDR1 治疗小鼠脾细胞的小鼠接受者中的临床狼疮表现

组编号	治疗	蛋白尿 g/L ± SEM	I.C.D. ± SEM
1	未治疗	10.9 ± 3.05	2.3 ± 0.26
2	来自 hCDR1 治疗小鼠的 20x10 <sup>6</sup> 个脾细胞	2.91 ± 1.6 p=0.0402	1.33 ± 0.35 p=0.034
3	来自 revhCDR1 治疗小鼠的 20x10 <sup>6</sup> 个脾细胞	5.38 ± 2.34 p=0.0931	1.7 ± 0.23 p=0.065

p 值相对于未治疗小鼠的 gr1 计算

可以看到：受治疗小鼠的脾细胞能够传递用 hCDR1 治疗的负调节效应。

图 16A-F 显示组 1 (A、B-未治疗小鼠)、组 2 (用 hCDR1 治疗的

2月龄小鼠的脾细胞的接受者)和组3(用 revhCDR1 治疗的2月龄小鼠的脾细胞的接受者)的小鼠的肾切片。A、C、E x 400; B、D、F x 100。

上面实验的结果指出:以前用 hCDR1 治疗的健康小鼠的免疫细胞可以传递 hCDR1 对疾病表现的缓解效应。

## 实施例 12.

### 鼠 mCDR 肽负调节 MMP-3 和 MMP-9

基质金属蛋白酶(MMP)(Shingleton 等, 1996; Goetzi 等, 1996; Massova 等, 1998)构成包含锌的内切蛋白酶的一个家族, 该家族在正常组织中细胞外基质的重建中起重要作用, 并且促进病理学进行。它们具有共同的结构域, 但在底物特异性、细胞来源以及诱导性上不同。

MMP 作为酶原样潜在前体合成, 随后转化为活性形式。MMP-2 和 MMP-9 都是明胶酶, 能够降解 IV 型胶原蛋白、变性的胶原蛋白、V 型、VII 型、X 型和 XII 型胶原蛋白、玻连蛋白、聚集蛋白聚糖、galectin-3 以及弹性蛋白。MMP-2 是最广泛表达的 MMP。它由多种细胞产生, 常常在恶性肿瘤转移时水平升高。

在蛋白质和域结构方面, MMP-9 是目前鉴定的最大和最复杂的成员。MMP-9 表达的特征在于: 在基因转录以及蛋白分泌(例如细胞因子、趋化因子、类二十烷酸)炎症介质水平受到严格控制的复杂调节, 并且受到金属蛋白酶的抑制因子(TIMPs)作用的调节。此外, MMP-9 活性受到 pro-MMP-9 的激活、血纤维蛋白溶酶原激活系统的成份或其它 MMP 的调节(Guedez 等, 1996)。

已经在各种自身免疫病如多发性硬化(Ozenci 等, 1999)及其动物模型实验性自身免疫脑脊髓炎(EAE)(Gijbels 等, 1994)、类风湿性关节炎(Keyszer 等, 1999)、急性热病性多神经炎(Creange 等, 1999)、实验性大疱性类天疱疮(Liu 等, 1998)和实验性自身免疫神经炎(Hughes 等, 1998)中, 证明 MMP 涉及自身免疫病。据报道, 狼疮神经炎患者体

内 MMP-3 和 TIMP-2 的血清水平显著高于健康对照的血清水平, 但没有注意到与疾病活动性的相关性(Zucker, 1999; Keyszer 等, 1999)。

MMP 抑制剂在几个自身免疫病动物模型中的抑制效应已经提示 MMP 的许多活性在炎症反应中的潜在重要性。在几种炎症和自身免疫病中, 在体内对 MMP 的特异性抑制会抑制水肿、病理性组织增殖以及对专化组织结构的损伤(Gijbels 等, 1994; Wallace 等, 1999; Conway 等, 1995)。

根据本发明, 我们显示 MMP-3 和 MMP-9 的水平在患有自发性 SLE 或诱导性实验性 SLE 的小鼠的血清和肾内提高。我们已经证明: 基于 CDR 的鼠肽缓解小鼠中的狼疮表现, 用所述肽治疗患有 SLE 的小鼠降低 MMP-3 和 MMP-9 在受治疗小鼠的血清和肾内的水平, 并且导致疾病表现缓解。预期本发明的人 hCDR 肽表现同样效应。

### 实施例 12(i)

#### MMP-3、MMP-2 和 MMP-9 在(NZBxNZW)F1 小鼠血清内出现的动力学。

我们首先调查(NZB x NZW)F1 小鼠内自发性 SLE 的发展是否与 MMP-3、MMP-2 和 MMP-9 在它们血清中水平的改变有关。因此, 我们从 2 月龄观察到疾病表现前开始, 跟踪调查它们的水平, 直到 8 月龄所述小鼠患有充分发展的疾病以后。结果显示于图 17。如图 17A 所示, 根据蛋白质印迹分析检测, MMP-3 的 34 kd 和 40 kd 形式在 2 月龄小鼠血清中都非常低。所有形式的水平朝着 8 月龄(最后一个测试时间点)的方向逐渐提高。相似地, 图 17B 显示: 根据凝胶酶谱法, MMP-9 在小鼠血清中的活性在 2 月龄低, 然后随着疾病进行逐渐提高直到 8 月龄。在图 17B 中也可以看到: MMP-2 的水平并不随着疾病进行显著改变。

### **实施例 12(ii)**

#### **MMP-3、MMP-2 和 MMP-9 在用 16/6Id 免疫的 BALB/c 小鼠血清内出现的动力学**

以前我们实验室的结果已经显示：用 16/6Id 免疫后可以在 BALB/c 小鼠中诱导 SLE (Mendlovic 等, 1988; Waisman 等, 1993)。因此，我们想测试 SLE 的诱导模型在 MMP-3 和 MMP-9 变化方面是否类似于(NZB x NZW)F1 模型。由此，我们观察该 SLE 实验模型中的 MMP-3 和 MMP-9 水平。图 18 显示的结果指出：MMP-3 的水平(所有同种型)在加强 10 天后(免疫后 4.5 周)升高，并且比同等年龄的对照未免疫或 CFA 免疫 BALB/c 小鼠体内的水平更高(图 18A)。MMP-3 的水平随着年龄的增长在所有组中提高，然而，其水平在 16/6Id 免疫小鼠中总是高于对照组。与此不同，在加强后 2 个月之前，都没有检查到 MMP-9 活性的诱导型变化(图 18B)。在加强后约 4 个月可以观察到 MMP-9 在 16/6Id 免疫小鼠体内的活性比在未免疫小鼠体内的活性更高。

### **实施例 12(iii)**

#### **在用 16/6Id 免疫的 BALB/c 小鼠的肾切片中，MMP-3 和 MMP-9 的特异性正调节。**

由于用 16/6Id 免疫 BALB/c 小鼠导致 SLE 特征性的临床表现，其中包括肾损害(Mendlovic 等, 1988; Waisman 等, 1993)，并且因为(NZB x NZW)F1 小鼠体内的肾损害据报道与 MMP-3 和 MMP-9 水平的提高相关(Nakamura 等, 1993)，所以我们观察这些酶在用 16/6Id 免疫的 BALB/c 小鼠肾内的表达。作为对照，我们使用 CFA 免疫的小鼠以及年龄匹配的未免疫小鼠。在加强时间点为这两个对照组注射 PBS。用 16/6Id 加强后两个月和 5 个月，针对 MMP-3 或 MMP-9 免疫染色小鼠肾切片。图 19 显示加强后 5 个月取得的肾的免疫组织学。如在图中可以看到的，用 CFA 免疫小鼠正调节 MMP-3 (19A)、MMP-9

(19B)在肾、肾小球和周围组织中的表达。然而,用在 CFA 中的 16/6Id 免疫进一步显著提高这两种 MMP 的表达水平。在用 16/6Id 加强后两个月已经观察到这种升高(数据未显示)。还显示所述染色的非特异性背景水平(19C)。

### **实施例 12(iv)**

#### **鼠肽 mCDR1 肽负调节(NZB x NZW)F1 小鼠血清中 MMP-3 的水平 和 MMP-9 的活性。**

由于我们发现 MMP-3 和 MMP-9 的水平在 SLE 的两个实验模型中都升高,因此我们想检查在用 mCDR1 肽治疗后观察到的 SLE 临床症状缓解(Eilat 等, 2000; Eilat 等, 2001)是否伴随 MMP-3 和 MMP-9 水平的降低。因此,我们在小鼠 2 月龄(在观察到临床表现之前)处理自发发展出 SLE 样疾病的(NZB x NZW)F1 小鼠:每周为它们皮下注射 PBS 中的 mCDR1 (250  $\mu$ g/小鼠)共 10 周。该实验方案导致所有临床症状的缓解(Eilat 等, 2000)。如在图 20 中可以看到,血清内 MMP-3 两条在下面的带减少(20A), MMP-9 活性降低(20B)。所述减少和降低与临床表现的减少相关(Eilat 等, 2000)。如在图 20A 中所看到的, MMP-3 的 45 kd 形式不受影响。

我们还想查明 mCDR1 肽是否能够负调节 MMP-3 已经升高的水平以及 MMP-9 的活性。因此,我们观察(NZB x NZW)F1 小鼠血清中 MMP-3 的水平 and MMP-9 的活性,所述小鼠在已经观察到疾病表现时接受 mCDR1 治疗。我们使用反向 mCDR1 作为对照肽。如图所示(图 20, 右边),用 mCDR1 治疗病鼠特异性负调节血清中的 MMP-3 水平(20A)和 MMP-9 活性(20B),而用 revmCDR 治疗则没有观察到这种效果。

### **实施例 12(v)**

#### **mCDR1 肽负调节 16/6Id 免疫小鼠血清内的 MMP-3 水平和 MMP-9 活性。**

如我们已经证明的, MMP-9 活性在两个 SLE 实验模型[(NZB x NZW)F1 和 16/6Id 诱导型]中升高。因为 mCDR1 肽在两个模型中都缓解疾病, 并且负调节受治疗(NZB x NZW)F1 小鼠血清内的 MMP-3 水平和 MMP-9 活性, 我们进一步寻找治疗对 16/6Id 免疫 BALB/c 小鼠血清内这些酶的效应。图 21 显示一个预防实验和一个治疗实验的结果。该图显示: mCDR1 也能调节该实验模型中的 MMP-3 和 MMP-9。在所述预防实验方案和所述治疗实验方案中都观察到 MMP-3 水平和 MMP-9 活性的负调节。因此, 在诱导疾病阶段或在完全发展的疾病阶段, 体内给予 mCDR1 能够降低 MMP-3 (21A)和 MMP-9 (21B)的水平。这种降低是特异性的, 因为用反向 mCDR1 治疗并不影响 MMP-3 或 MMP-9 活性(未显示)。使用 MMP-9 活性测定系统(得自 Amersham-Pharmacia Biotech UK Limited, England)得到的初步结果显示: 未免疫 BALB/c 小鼠的血清活性相当于 7 ng/ml 纯的活性 MMP-9。用 16/6Id 免疫提高所述活性到 16 ng/ml, 而用 mCDR1 肽治疗负调节所述活性到几乎正常的水平(8.5 ng/ml)。

### **实施例 12(vi)**

#### **mCDR1 肽治疗对 16/6Id 免疫 BALB/c 小鼠肾切片中 MMP-3 和 MMP-9 水平的效应。**

因为 MMP-3 和 MMP-9 在患有诱导型实验性 SLE 的小鼠的肾中提高, 所有我们想观察 mCDR1 肽治疗对受治疗小鼠肾内后面 MMP 表达的效应。图 22 证明: 在预防实验(图 22A)和治疗实验(图 22B)中, mCDR1 负调节受治疗小鼠肾内 MMP-3 和 MMP-9 的表达水平。在肾小球和间质都观察到 MMP 水平的降低。所观察到的 MMP 表达减少与使用抗 Ig 针对免疫复合物沉积的染色减少相关(图 22B)。

因为 MMP-3 和 MMP-9 明显参与 SLE 的发病机理，所以我们测试人 hCDR1 肽是否能够在缓解疾病表现的同时，相关地负调节后者的水平。为此，每周一次皮下注射 100  $\mu\text{g}$  或 300 $\mu\text{g}$ /小鼠 hCDR1，共 10 周，治疗各组(NZB x NZW)F1 小鼠，然后在治疗期间的不同时期测试各组汇集的血清内的 MMP 水平。图 23 显示一个实验的结果，其中在小鼠 7 月龄观察到所有临床表现后开始对小鼠进行治疗。结果是在治疗中间、5 次注射 hCDR1 后收集的血清的结果。图 23 的结果指出：用 300  $\mu\text{g}$  hCDR1 治疗小鼠负调节 MMP-3 水平和 MMP-9 活性。这些结果与用 hCDR1 治疗后疾病表现的显著缓解一致。

## 讨论

上面的结果显示：MMP-3 和 MMP-9 在 SLE 鼠模型的血清中和肾内都升高。鼠 mCDR1 肽能够负调节患有 SLE 的小鼠血清中和肾内的 MMP-9 和 MMP-3 水平。证明在 SLE 的自发模型中，血清中 MMP-9 和 MMP-3 的正调节都出现在头 3.5 个月内。在诱导模型中，血清中 MMP-3 水平提高出现非常早(用 16/6Id 加强后 10 天)，而 MMP-9 活性的升高在约 3-4 个月之后出现。16/6Id 诱导模型允许我们跟踪疾病最早几个阶段的过程，根据该模型的结果，看起来 MMP-3 涉及诱导疾病，而 MMP-9 涉及疾病发展。

我们的结果显示在 SLE 的小鼠模型中 MMP-3 升高，该结果与下面的结果一致：MMP-3 在 SLE 患者血清中显著增加(Kotajima 等, 1998)，以及(NZB x NZW)F1 小鼠体内 MMP-3 转录物随神经炎的进行显著增加(Nakamura 等, 1993)。总而言之，这些结果提示：MMP-3 可能促进狼疮神经炎中肾小球损伤的发展。

我们的结果显示：在 SLE 的诱导模型和自发模型中，血清中的 MMP-2 活性水平并不随着疾病进行而显著升高。这些结果与以前报道的结果(Zucker, 1999)相符，即 MMP-2 水平在 SLE 中不提高。因此，用基于 CDR1 的肽治疗并不调节该酶(数据未显示)。MMP-2 的水平

组成型分泌，在其它病理条件下(例如视神经炎和多发性硬化)也不改变，而 MMP-9 的水平相对于健康对照升高(Gijbels 等, 1992; Paemen 等, 1994)。

有趣的是，mCDR1 肽特异性并直接影响 SLE 相关的 T 细胞反应，它可以负调节已经正调节(治疗方案)的 MMP-3 和 MMP-9 水平，以及防止它们升高(预防方案)。

还未报道过 SLE 患者体内或 SLE 动物模型中血清内的 MMP-9 活性。这是首次显示 SLE 和 MMP-9 之间的相关关系，并且首次证明 MMP-9 在患有 SLE 的小鼠的血清和肾中升高。虽然 MMP-9 在血清中的升高相对较晚(约加强后 4 个月)，但诱导疾病后在早期阶段(2 个月)就观察到肾内 MMP-9 的升高(数据未显示)。本文还首次显示：缓解小鼠 SLE 表现的肽(如上文所示的 mCDR1 和 hCDR1)也负调节血清中和肾内的 MMP-9。后面的数据还得到初步结果的支持，所述初步结果使用 MMP-9 活性测定系统，显示用 16/6Id 免疫升高 MMP-9 活性，而用基于 CDR1 的肽治疗负调节该活性到未免疫小鼠的活性水平。

本文还首次证明：在自身免疫病的实验模型中，MMP-3 和 MMP-9 的诱导动力学不同，所述实验模型如本文专门针对 SLE 所示。这可能指出上述 MMP 在所述疾病的发病机理中的不同作用。我们的结果证明：免疫调节 SLE 相关 T 细胞反应并负调节疾病表现的肽能够控制那些 MMP 在血清和肾中的分泌(虽然不一定是由 T 细胞本身分泌)。这些结果指出：MMP-3 和 MMP-9 在 SLE 的发病机理中起作用，并且可能一方面作为疾病进行的替代标记，另一方面作为给定治疗缓解疾病的替代标记。

### 实施例 13.

#### MMP-9 活性(而不是 MMP-2 活性)在 SLE 患者的血清中升高

在本实施例中，我们测定 40 名 SLE 患者血清中的 MMP-9 和

MMP-2 水平, 我们证明: SLE 患者血清中 MMP-9 活性而不是 MMP-2 活性相对于健康对照显著上升。高 MMP-9 活性与盘形疹、雷诺现象、肺炎、粘膜溃疡以及抗磷脂抗体(APLA)的存在相关。此外, MMP-9 升高的水平与男性患者组内的 SLE 活动性相关。

## 材料和方法

**患者。**四十名患者参加本研究, 包括 32 名女性和 8 名男性。所有患者表现至少四项美国风湿病学学院(American College of Rheumatology, ACR)针对诊断 SLE 建立的修订诊断标准(Winchester, 1996)。本研究中二十五名性别和年龄相匹配的健康志愿者作为对照组。患者在诊断时的平均年龄是  $29 \pm 9.7$  岁(范围从 15-48 岁), 平均随访期是  $11 \pm 10$  年(范围 1-32 年)。根据 SLEDAI 狼疮活动性指数(Bombardier 等, 1992)确定疾病活动性。该研究得到以色列 Rehovot 的 Kaplan 医疗中心伦理委员会的批准。

**通过活性测定试剂盒测量 MMP-2 和 MMP-9。**通过特异性 Biotrak MMP-2 或 MMP-9 活性测定试剂盒(Amersham Pharmacia Biotech UK Limited, UK), 根据厂家的操作指南测量 MMP-2 和 MMP-9 的活性。血清分别稀释 1:100 倍和 1:32 倍, 以测定 MMP-2 和 MMP-9 活性。在每个测定中加入合适的标准。为测量 MMP 总含量, 使用对氨基苯乙酸汞(APMA)激活 MMP 的原形式。

**通过凝胶酶谱法测量 MMP-2 和 MMP-9 活性。**通过明胶酶谱法测定 MMP-2 和 MMP-9 活性。通过 1 mg/ml 明胶聚合的 8% SDS-PAGE 分离 5  $\mu$ l 血清样品。凝胶在 2.5% Triton X-100 中洗涤 30 分钟一次, 除去 SDS, 然后在含 50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 10 mM  $\text{CaCl}_2$  和 0.02% (重量/体积) Brij 35 的反应缓冲液(pH 7.5)中洗涤 30 分钟一次。更换新鲜的反应缓冲液, 将所述凝胶在 37 $^{\circ}$ C 温育 24 小时。通过用 0.5% 考马斯亮蓝染色凝胶, 显示明胶水解活性, 然后通过光密度测定法进行定量。

**统计分析。**使用卡方检验或 Fisher 精确检验(Fisher exact test)、非配对 *t*-检验和两尾 *P* 值评估数据。也使用 Superman 分析和多变量分析。

### **实施例 13(i)**

#### **MMP-9 活性而不是 MMP-2 活性在 SLE 中升高**

如上文所述, MMP-9 涉及几种自身免疫病以及 SLE 的动物模型。因此, 我们感兴趣的是研究 MMP-9 是否也在 SLE 患者的血清中升高。为此目的, 我们通过凝胶酶谱法检查 40 名 SLE 患者和 25 名健康对照的血清, 其中可以看到 MMP-9 和 MMP-2 的活性。图 24 显示一块有代表性的凝胶。如在该图中可以看到的, MMP-9 在 SLE 患者血清中的水平相对于健康对照提高。对 40 名 SLE 患者和 25 名健康对照的血清酶谱法的光密度测定法分析指出: SLE 患者的平均 MMP-9 活性是  $109 \pm 5.6$  光密度单位, 健康对照的平均 MMP-9 活性是  $76.5 \pm 4.2$  光密度单位( $p=0.0001$ )。高于 85 光密度单位的活性值(健康对照平均值 + 2 s.e.)被认为是高的。结果证明: 在 68% 的 SLE 患者体内出现高活性水平 MMP-9。仅 3% 健康对照表现高 MMP-9 活性( $p=0.001$ )。对同样血清样品中 MMP-2 水平的光密度测定法分析揭示: SLE 患者和健康对照血清间 MMP-2 活性的差异不显著。因此, 针对健康对照和 SLE 患者分别测得  $109 \pm 7$  和  $123 \pm 5$  (平均活性光密度单位  $\pm$  标准差)的值( $p=0.0531$ )。为进一步定量血清中的 MMP-9 和 MMP-2 活性水平, 我们使用活性测定试剂盒。

图 25 显示: MMP-9 活性在 SLE 患者血清中相对于在健康对照血清中的水平提高到三倍, 并且这种提高在统计学上显著( $P=0.0302$ )。与此不同, 两组间 MMP-2 水平的差异不显著( $P=0.1254$ )。

由于我们以及其他人(Ebihara 等, 1998 和 1999)在患有非 SLE 慢性肾衰竭(如糖尿病、高血压)的患者血清中检测到可能由于 MMP-9 的保留而产生的高 MMP-9 水平, 因此我们分析在所测试的 SLE 患者

组内 MMP-9 水平与肾功能之间的相关性。在肌酸酐水平和 MMP-9 水平间没有观察到相关性( $r^2=0.01$ ), 这指出: SLE 患者体内 MMP-9 水平升高不是该酶由于肾损害而保留的结果。

### 实施例 13(ii)

#### MMP-9 活性与临床和实验室参数之间的相关性

SLE 患者血清中 MMP-9 活性水平的升高促使我们寻找临床和实验室参数与血清 MMP-9 水平之间的可能相关性。进行统计学分析(卡方分析或 Fisher 精确检验), 研究每种临床表现具有高的和正常的 MMP-9 水平的患者数目(表 15), 并且考虑具有或不具有某种临床症状的患者的实际平均 MMP-9 活性水平。两个分析的结果是相似的。值得注意的是, 对于所有的临床症状, MMP-9 水平升高的患者百分率远远高于健康对照组内的百分率。MMP-9 水平与性别、患病时间或发病年龄不相关(Person, Spearman)。

图 15 显示根据患者 MMP-9 活性水平(低于或等于健康对照=正常)排列的 SLE 患者的临床和实验室特征。高水平 MMP-9 与雷诺现象的存在显著相关( $P=0.0138$ ), 并且与 APLA 显著相关( $P=0.041$ )。对于肺炎、盘状疹、神经学疾病和粘膜溃疡观察到强相关关系。然而, 具有后面表现的患者数目太少, 无法进行统计分析。多变量分析揭示: 雷诺现象和低补体(C3、C4)水平与高 MMP-9 水平呈正相关( $P=0.0001$  和  $0.0137$ )。与此不同, 光敏感性、关节炎和血液学疾病与 MMP-9 活性水平呈负相关( $P=0.0381$ 、 $0.0014$  和  $0.0065$ )。

表 15

根据患者 MMP-9 水平具有高的和正常的 MMP-9 活性的患者的  
临床特征。

		MMP-9 水平	
		(%)	
		高	正常
患者数目(%)	40 (100)	27 (68)	13 (32)
光敏感性	13	8 (62)	5 (38)
粘膜溃疡	9	8 (89)	1 (11)
颧部疹	9	7 (78)	2 (22)
盘状疹	5	5 (100)	0 (0)
雷诺现象	8	8 (100)	0 (0)
脉管炎	18	14 (78)	4 (22)
关节炎	31	21 (68)	10 (32)
浆膜炎	9	7 (78)	2 (22)
肺炎	4	4 (100)	0 (0)
神经异常	4	4 (100)	0 (0)
肾损害	16	11 (69)	5 (31)
血液学异常	29	18 (62)	11 (38)
ANA	40	27 (68)	13 (32)
$\alpha$ -dsDNA	36	24 (67)	12 (33)
APLA	25	20 (80)	5 (20)
低补体(C3、C4)	30	21 (70)	9 (30)

根据 ACR 修订的标准(Winchester, 1996)定义临床损害程度。分别使用 Hep2 细胞和 *Crithidia luciliae* 测定抗核抗体(ANA)和抗 ds DNA 抗体。根据下面测试中一个或多个的反应性定义抗磷脂抗体(APLA): 假阳性 VDR、狼疮抗凝血剂(LAC)或针对抗心磷脂抗体的 ELISA。

我们还查找男性患者(图 26A)和女性患者(图 26B)在 SLEDAI 和 MMP-9 活性之间的可能相关性。有趣的是, 相关系数在男性中显著并且是肯定的( $r^2=0.6333$ ), 但对于女性不显著并且是否定的( $r^2=0.0571$ )。使用 BILAG 评分系统得到相似的结果。因此, 男性的 MMP-9 活性和 BILAG 分数之间观察到肯定的相关系数( $r^2=0.6442$ ), 而女性的该相关系数不显著。

我们还想确定患者应用的各种治疗形式与 MMP-9 活性之间是否存在相关性。如在表 16(A)中看到的, 在患者的当前治疗与 MMP-9 活性之间没有显著的相关性。然而, 当我们在他们病程内的任何时间观察患者时(表 16(B)), 高 MMP-9 水平与细胞毒性剂的应用相关(82%)。

表 16

根据患者 MMP-9 水平分类的 SLE 患者的治疗形式

	患者总数目	MMP-9 水平 (%)	
		高	正常
<b>A. 当前治疗</b>			
细胞毒性剂	8	6 (75)	2 (25)
类固醇	23	17 (74)	6 (26)
抗疟剂	21	14 (67)	7 (33)
NSAID	7	5 (71)	2 (29)
<b>B. 随访期间的治疗</b>			
细胞毒性剂	17	14 (82)	3 (18)
类固醇	29	19 (66)	10 (34)
抗疟剂	26	16 (62)	10 (38)
NSAID	18	12 (67)	6 (33)

以 200-400 mg/天的剂量应用抗疟剂羟氯喹。类固醇治疗定义为

以日剂量 $\geq 5\text{mg}$  使用泼尼松；使用的细胞毒性剂是环磷酰胺( $0.5\text{-}1\text{g}/\text{m}^2$ , 每月)或硫唑嘌呤( $100\text{-}150\text{ mg}/\text{天}$ )。

### **实施例 13(iii)**

#### **在不同时间点从各个 SLE 患者取得的血清样品中 MMP-9 活性的变化**

由于疾病活动性随时间变化，因此我们测量在 4-6 年随访期内取得的各个患者血清样品内 MMP-9 和 MMP-2 的活性水平。分析在不同时间点取得的九名患者的血清。MMP-2 的水平在患者和健康对照间没有显著变化。在测试的 9 名患者中，对 5 名患者可以观察到各个患者血清样品中 MMP-9 活性随时间的变化。图 27 显示 2 名有代表性的 SLE 患者的结果。如可以看到的，MMP-9 活性，而不是 MMP-2 活性，在同一患者体内随时间而变化。这些变化与根据 SLEDAI 或 BILAG 系统测定的疾病活动性指数不相关。在不同时间点从 5 名健康对照取样，在他们的血清中没有检测到 MMP-9 活性的变化(数据未显示)。在 4 名其他 SLE 患者中，没有观察到 MMP-9 或 MMP-2 活性随时间有实质性的变化，并且各个患者情况各不相同，MMP-9 活性水平保持高或低的水平。

### **讨论**

本研究首次显示 MMP-9 涉及人 SLE。我们显示：MMP-9 而不是 MMP-2 的活性在 68% SLE 患者血清中相对与健康对照显著升高。高 MMP-9 水平与雷诺现象、肺炎、神经性异常、盘状疹和 APLA 的存在相关。在同一患者疾病不同时期的血清中观察到 MMP-9 活性的变化。女性患者中 MMP-9 活性水平并不与疾病活动性指数(SLEDAI、BILAG)相关，但男性患者中 MMP-9 活性水平与 SLE 活动性相关。

本研究显示：MMP-2 活性水平在 SLE 患者血清中并未显著升高。

这些结果与以前的报道(Zucker, 1999)一致, 即 MMP-2 水平在 SLE 中不提高。在 MMP-9 水平相对于健康对照提高的其它病理状况中(例如视神经炎和多发性硬化), MMP-2 水平也是组成型并且未改变(Gijbels 等, 1992; Paemen 等, 1994)。

SLE 的发病机理中可能涉及另一种 MMP, 即 MMP-3, 因为 MMP-3 在 SLE 患者血清中显著升高(Kotajima 等, 1998)。本实施例中显示的具有升高的 MMP-9 活性的 SLE 患者的频率(68%)类似于 SLE 患者(76%)和 RA 患者(82%)中报道的高 MMP-3 水平的频率。此外, 随着肾炎在(NZB x NZW)F1 小鼠体内的进行, MMP-3 转录物显著增加(Nakamura 等, 1993)。

SLE 患者血清中增加的 MMP 的来源仍然未知。已经显示 MMP-9 由外周血细胞如 T 细胞、中性白细胞和巨噬细胞分泌(综述见 Goetzl 等, 1996)。在 MMP-9 活性水平和患者体内外周血细胞数目之间没有相关性, 这个事实提示: MMP-9 不是由外周血免疫细胞分泌, 而是由 SLE 影响的器官如肾或肺/胸膜分泌。所有患肺炎的 SLE 患者都表现高 MMP-9 活性水平, 这个观察提示病肺是高 MMP-9 水平的一种来源。此外, 细胞毒性治疗(体现 SLE 相关器官损伤的严重性)与血清中高 MMP-9 水平之间的联系也支持这种意见, 即患病器官是 SLE 患者体内 MMP-9 活性的来源。然而, 仍然存在少数外周血淋巴细胞分泌更高 MMP-9 活性水平的可能性。

TNF- $\alpha$ 和 IL-1 在人类疾病(Dean 等, 2000)和鼠模型(Segal 等, 1997; Theofilopoulos 等, 1999; Eilat 等, 2001)的 SLE 发病机理中都起重要作用。已经在几个系统中显示这些细胞因子诱导 MMP-9 产生(Guedez 等, 1996), 因此, 有可能诱导 MMP-9 是这些细胞因子在 SLE 中的部分致病效应。已经报道由健康个体的外周血单核细胞自发分泌的 MMP-9 水平在暴露于 TNF- $\alpha$ 和 IL-1 $\beta$ 时受到正调节(Saren 等, 1996)。此外, T 细胞和巨噬细胞的 MMP 通过切割膜结合形式而有利于 TNF- $\alpha$  的分泌(Gearing 等, 1994)。因此, 这些例子证明 MMP 对促炎细胞因

子的相互调节效应，反之亦然。然而，在一些患者的血清中 MMP-9 活性水平在随访期内保持在正常范围内，而在大多数患者的血清中测量到高 MMP-9 活性水平，这个事实提示遗传因素参与 MMP-9 的调节。

本文的结果指出：MMP-9 可能在 SLE 的发病机理中起作用，并且在监测用干预 MMP-9 活性的药物治疗的患者时，测量这种金属蛋白酶的血浆/血清活性水平可能提供重要的信息。

## 参考文献

Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB 等. SLEDAI 的推导. 狼疮患者的疾病活动性指数. *Arthritis Rheum* 35: 630-40 (1992).

Conway, J. G., J. A. Wakefield, R. H. Brown, B. E. Marron, L. Sekut, R. L. Clark, G. McGeechan 和 K. M. Connolly. 通过基质技术蛋白酶抑制剂抑制辅助关节炎中的软骨和骨破坏. *J. Exp. Med.* 182,449 (1995).

Creange, A., Sharshar, T., Planchenault, T., Christov, C., Poron, F., Raphael, J-C.和 Gherardi, R. K., 基质金属蛋白酶-9 在急性热病性多神经炎中增加并切与疾病严重性相关. *Neurology* 53 : 1683-1691 (1999).

Dayan, M., Segal, R., Sthoeger, Z., Waisman, A., Brosh, N., Elkayam, O., Eilat, E., Fridkin, M.和 Mozes, E. SLE 患者对基于致病性抗 DNA 单克隆抗体互补决定区的肽的免疫反应. *J. Clin. Immunol.* 20,187 (2000).

Dean GS, Tyrrell-Price J, Crawley E 等. 细胞因子和系统性红斑狼疮. *Ann Rheum Dis* 59: 243-51 (2000).

Ebihara I, Nakamura T, Shimada N 等. 非胰岛素依赖性糖尿病 mellitus 中金属蛋白酶-9 血浆浓度增加在微白蛋白尿发展之前. *Am J Kidney Dis* 32: 544-50 (1998).

Ebihara I, Nakamura T, Ushiyama C 等. 在慢性肾衰竭中口服吸附剂 AST-120 对金属蛋白酶-9 血浆浓度以及金属蛋白酶-1 血清组织抑制剂浓度的效应. *Nephron* 83: 169 (1999).

Eilat, E., Zinger, H., Nyska, A.和 Mozes, E. 通过用基于致病性自身抗体 CDR1 和 CDR3 的肽处理预防(NZB x NZW)F1 小鼠体内的系统性

红斑狼疮样疾病. *J. Clin. Immunol.* 20,268 (2000).

Eilat, E., Dayan, M., Zinger, H.和 Mozes, E. 基于致病性抗 DNA 自身抗体互补决定区 1 的肽缓解实验性 SLE 的机制. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 98,1148 (2001).

Fricke, H., Offen, D., Mendlovic, S., Shoenfeld, Y., Bekimer, R., Sperling, J.和 Mozes, E. 用单克隆抗 La 自身抗体免疫, 在小鼠中诱导实验性系统性红斑狼疮. *Int. Immunol.* 2,225 (1990).

Fricke, H., Mendlovic, S., Blank, M., Shoenfeld, Y., Ben-Bassat, M.和 Mozes, E. 个体基因型特异性 T 细胞系在 小鼠中诱导实验性系统性红斑狼疮. *Immunology.* 73,421 (1991).

Gearing AJH, Beckett P, Christodoulou M 等. 用金属蛋白酶处理肿瘤坏死因子 $\alpha$ 前体. *Nature* 370: 555-7 (1994).

Gijbels K, Masure S, Carton H 等. 多发性硬化患者和其它炎症神经学疾病患者脑脊髓液中的明胶酶. *J Neuroimmunol* 41: 29-34 (1992).

Gijbels, K., R. E. Galardy 和 L. Steinman. 用金属蛋白酶氧肟盐抑制剂逆转实验性自身免疫脑脊髓炎. *J. Clin. Invest.* 94: 2177-82 (1994).

Goetzl, E. J., Banda, M. J.和 Leppert, D., 免疫中的基质金属蛋白酶. *J. Immunol.* 156: 1-4 (1996).

Guedez, L., Lim, M. S.和 Stetler-Stevenson, W. G., 金属蛋白酶和它们的抑制剂在血液学疾病中的作用. *Crit. Rev. Oncogenesis* 7: 205-225 (1996).

Hay EM, Bacon PA, Gordon C 等. BILAG 指数: 测量系统性红斑狼疮临床疾病活动性的可靠和有效手段. *Q J Med* 86: 447-58 (1993).

Hughes, P. M., G. M. A. Wells, J. M. Clements, A. J. Gearing, E. J. Redford, M. Davies, K. J. Smith, R. A. Hughes, M. C. Brown 和 K. M. Miller. 实验性神经炎期间基质金属蛋白酶的表达. *Brain*. 121,481 (1998).

Isenberg, D. A., Shoenfeld, Y., Madaio, M. P., Rauch, J., Reichlin, M., Stollar, B. D.和 Schwartz, R. S. 系统性红斑狼疮中的抗 DNA 抗体个体基因型. *Lancet*. 2,417 (1984).

Isenberg, D. A.和 Collins, C. 检测来自狼疮患者的肾组织结合免疫球蛋白的交叉反应性抗 DNA 抗体个体基因型. *J. Clin. Invest.* 76,287 (1985).

Keyszer, G., I. Lambiri, R. Nagel, C. Keysser, M. Keysser, E. Gromnica-hle, J. Franz, G. R. Burmester 和 K. Jung. 风湿性疾病中基质金属蛋白酶 MMP-3 和 MMP-1、金属蛋白酶 1 的组织抑制剂(TIMP-1)以及 MMP-1/TIMP-1 复合物的循环水平。与其它替代标记相比与类风湿性关节炎临床活动性的相关性. *J Rheumatol*. 26,251 (1999).

Kotajima, L., Aotsuka, S., Fujimani, M., Okawa-Takatsuji, M., Kinoshita, M., Sumiya, M.和 Obata, K., 在患有活动的狼疮神经炎的患者血清中基质金属蛋白酶水平提高. *Clin. Exp. Rheum.* 16: 409-415 (1998).

Liu, Z., Shipley, J. M., Vu, T. H., Zhou, X., Diaz, L. A., Werb, Z.和 Senior, R. M., 明胶酶 B 缺陷型小鼠抵抗实验性大疱性类天疱疮. *J. Exp. Med.* 188 : 475-482 (1998).

Massova, I., Kotra, L. P., Fridman, R.和 Mobashery, S., 基质金属蛋白酶: 结构、进化和多样化. *Faseb. J.* 12: 1075-1095 (1998).

Mendlovic, S., Brocke, S., Shoenfeld, Y., Ben-Bassat, M., Meshorer, A., Bakimer, R.和 Mozes, E. 用通用抗 DNA 个体基因型在小鼠中诱导系统性红斑狼疮样疾病. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. SA.* 85,2260 (1988).

Mendlovic, S., Fricke, H., Shoenfeld, Y.,和 Mozes, E. 抗个体基因型抗体对于在小鼠中诱导实验性系统性红斑狼疮的作用. *Eur. J Immunol.* 19,729 (1989).

Mozes, E., Dayan, M., Zisman, E., Brocke, S., Licht, A.和 Pecht, I. 重症肌无力相关表位与生活的鼠抗原呈递细胞表面 II 类 MHC 分子的直接结合. *EMBO J.* 8,4049 (1989)

Nakamura, T., I. Ebihara, S. Osada, T. Takahashi, M. Yamamoto, Y. Tomino 和 H. Koide. 金属蛋白酶和它们的抑制剂在 New Zealand Black/White F1 小鼠肾组织中的基因表达. *Clin. Sci.* 85: 295-301 (1993).

Ozenci, V., L. Rinaldi, N. Teleshova, D. Matusevicius, p. Kivisak, M. Kouwenhoven 和 H. Link. 多发性硬化中金属蛋白酶和它们的组织抑制剂. *J. Autoimmun.* 12,297 (1999).

Paemen, L., Olsson, T., Soderstrom, M., Van Damme, J.和 Opdenakker, G., 评价视神经炎、多发性硬化和其它炎症神经学疾病患者的脑脊液中的明胶酶和 IL-6. *Eur. J. Neurol.* 1: 55-63 (1994).

Saren P, Welgus HG, Kovanen PT. TNF- $\alpha$ 和 IL-1 $\beta$ 选择性诱导人巨噬细胞表达 92-kDa 明胶酶. *J Immunol* 157: 4159-65 (1996).

Segal R, Bermas BL, Dayan M 等. 实验性系统性红斑狼疮中细胞因子产生的动力学: T 辅助细胞 1/T 辅助细胞 2 型细胞因子涉及疾病. *J Immunol* 158: 3009-16 (1997).

Shingleton, W. D. Hodges, D. J., Brick, P.和 Cawston, T. E., 胶原酶: 胶原蛋白周转中的关键酶. *Biochem. Cell. Biol.* 74: 759-775 (1996).

Shoenfeld, Y., Isenberg, D. A., Rauch, J., Madaio, M. P., Stollar, B. D.和 Schwartz, R. S. 单克隆人狼疮抗体的个体基因型交叉反应. *J. Exp. Med.* 158, 718 (1983).

Shoenfeld, Y., Hsu-Lin, S. C., Gabriels, J. E., Silberstein, L. E., Furie, B. C., Furie, B., Stollar, B. D.和 Schwartz, R. S., 人-人杂交瘤的自身抗体产生. *J. Clin. Invest.* 70: 205-208 (1982).

Sthoeger, Z. M., Tartakovsky, B., Bentwitch, Z.和 Mozes, E. 来自患有实验性系统性红斑狼疮的小鼠的单克隆抗心磷脂抗体: 表征和诱导继发性抗心磷脂综合征. *J. Clin. Immunol.* 13,127 (1993).

Tan EM, Cohen AS, F. FJ, Talal N, Winchester RJ. 用于分类系统性红斑狼疮的 1982 年修订标准. *Arthritis Rheum* 25: 1271-77 (1982)

Theofilopoulos AN, Lawson BR. 鼠狼疮中的肿瘤坏死因子和其它细胞因子. *Ann Rheum Dis* 58 增刊: 149-55 (1999).

Waisman, A.和 Mozes, E. 患有实验性系统性红斑狼疮的小鼠的自身抗体的可变区序列. *Eur. J. Immunol.* 23,1566 (1993).

Waisman, A., Mendlovic, S., Ruiz, P. J., Zinger, H., Meshorer, A.和

Mozes, E. 16/6Id 个体基因型网络在诱导和表现系统性红斑狼疮中的作用. *Int. Immunol.* 5,1293 (1993).

Waisman, A., Shoenfeld, Y., Blank, M., Ruiz, P. J.和 Mozes, E. 在小鼠中诱导实验性系统性红斑狼疮的致病性人单克隆抗 DNA 由 VH4 基因区段编码. *Int. Immunol.* 7,689 (1995).

Waisman, A., Ruiz, P. J., Israeli, E., Eilat, E. Konin-Waisman, S., Zinger, H., Dayan, M.和 Mozes, E. 用基于致病性抗 DNA 单克隆抗体互补决定区的肽调节鼠系统性红斑狼疮. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94,4620 (1997).

Wallace, G. R., R. A. Whiston, M. R. Stanford, G. M. A. Wells, A. J. H. Gearing 和 J. M. Clements. 基质金属蛋白酶抑制剂 BB-1101 预防实验性自身免疫 uveoretinitis (EAU). *Clin. Exp. Immunol.* 118,364 1999).

Winchester RJ. 系统性红斑狼疮发病机理. Koopman WJ 编辑 Birmingham. Alabama: William 和 Wilkins, 第 1361-91 页(1996).

Zucker, S. 溶基质素血清水平在系统性红斑狼疮中增加: 缺乏与疾病活动性的相关性. *J. Rheumatol.* 26,78 (1999).



Ala Lys Ala Thr  
20

<210> 3  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> 小鼠

<400> 3

Tyr Tyr Cys Ala Arg Phe Leu Trp Glu Pro Tyr Ala Met Asp Tyr Trp  
1 5 10 15

Gly Gln Gly Ser  
20

<210> 4  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> 小鼠

<400> 4

Gly Tyr Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu  
1 5 10 15

Trp Ile Gly

<210> 5  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> 小鼠

<400> 5

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Arg Tyr Gly Asn Tyr Trp Gly Gln Thr  
1 5 10 15

Leu

<210> 6  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> 人

<400> 6

Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Glu Glu  
 1                   5                   10                   15

Trp Ile Gly

<210> 7  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> 人

<400> 7

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Leu Arg Gly Gly Trp Asn Asp Val Asp  
 1                   5                   10                   15

Tyr Tyr Gly Met Asp Val  
 20

<210> 8  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 人

<400> 8

Phe Ser Gly Tyr Tyr Trp Ser  
 1                   5

<210> 9  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> 人

<400> 9

Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Lys Thr Ser Leu Lys Ser  
 1                   5                   10                   15

<210> 10  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> 人  
 <400> 10

Gly Leu Leu Arg Gly Gly Trp Asn Asp Val Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met  
 1                   5                   10                   15

Asp Val

<210> 11  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 基于人 16/6id mAb 重链 CDR1 的合成肽。注意:Thr(位置 1)可能缺失。

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(20)  
 <223> 位置 9 的 Xaa 为 Arg 或 Lys; 位置 11 的 Xaa 为 Pro 或 Ser; 位置 13 的 Xaa 为 Gly 或 Glu; 位置 1 的 Xaa4 为 Lys 或 Asp; 位置 16 的 Xaa 为 Glu, Leu 或 Ser。

<400> 11

Thr Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Xaa Gln Xaa Pro Xaa Xaa Gly Xaa  
 1                   5                   10                   15

Glu Trp Ile Gly  
 20

<210> 12  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列



Trp Ile Gly

<210> 15  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>

<223> 合成。注意：SEQ ID NO: 11的肽，其中 Thr(位置 1)缺失，Xaa(9)为 Lys, Xaa(11)为 Pro, Xaa(13)为 Gly, Xaa(14)为 Lys, Xaa(16)为 Glu。

<400> 15

Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Lys Gln Pro Pro Gly Lys Gly Glu Glu  
 1                    5                    10                    15

Trp Ile Gly

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

<220>

<223> 合成。注意：SEQ ID NO: 11的肽，其中 Thr(位置 1)缺失，Xaa(9)为 Arg, Xaa(11)为 Ser, Xaa(13)为 Gly, Xaa(14)为 Lys, Xaa(16)为 Glu。

<400> 16

Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Glu Glu  
 1                    5                    10                    15

Trp Ile Gly

<210> 17  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>

<223> 合成。注意：SEQ ID NO:11的肽，其中 Thr(位置 1)缺失，Xaa(9)为 Arg, Xaa(11)





<213> 人工序列

<220>

<223> 合成。注意：SEQ IDNO:19 的肽，其中 Xaa(6)为 Gly, Xaa(9)为 Arg, Xaa(10)为 Gly, Xaa(11)为 Ala, Xaa(12)为 Trp, Xaa(13)为 Asn, Xaa(18)为 Tyr, Xaa(20)为 Met。

<400> 22

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Leu Arg Gly Ala Trp Asn Asp Val Asp  
1                   5                   10                   15

Tyr Tyr Gly Met Asp Val  
                  20

<210> 23

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成。注意：SEQ IDNO:19 的肽，其中 Xaa(6)为 Gly, Xaa(9)为 Arg, Xaa(10)为 Ala, Xaa(11)为 Gly, Xaa(12)为 Trp, Xaa(13)为 Asn, Xaa(18)为 Tyr, Xaa(20)为 Met。

<400> 23

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Leu Arg Ala Gly Trp Asn Asp Val Asp  
1                   5                   10                   15

Tyr Tyr Gly Met Asp Val  
                  20

<210> 24

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成。注意：SEQ IDNO:19 的肽，其中 Xaa(6)为 Gly, Xaa(9)为 Ala, Xaa(10)为 Gly, Xaa(11)为 Gly, Xaa(12)为 Trp, Xaa(13)为 Asn, Xaa(18)为 Tyr, Xaa(20)为 Met。

<400> 24

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Leu Ala Gly Gly Trp Asn Asp Val Asp  
1                   5                   10                   15

Tyr Tyr Gly Met Asp Val  
20

<210> 25  
<211> 22  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成。注意: SEQ ID NO:19 的肽, 其中 Xaa(6)为 Phe, Xaa(9)为 Arg, Xaa(10)为 Gly, Xaa(11)为 Gly, Xaa(12)为 Trp, Xaa(13)为 Asn, Xaa(18)为 Tyr, Xaa(20)为 Met。

<400> 25

Tyr Tyr Cys Ala Arg Phe Leu Leu Arg Gly Gly Trp Asn Asp Val Asp  
1 5 10 15

Tyr Tyr Gly Met Asp Val  
20

<210> 26  
<211> 22  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成。注意: SEQ ID NO:19 的肽, 其中 Xaa(6)为 Gly, Xaa(9)为 Arg, Xaa(10)为 Gly, Xaa(11)为 Gly, Xaa(12)为 Trp, Xaa(13)为 Asn, Xaa(18)为 Tyr, Xaa(20)为 Gln。

<400> 26

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Leu Arg Gly Gly Trp Asn Asp Val Asp  
1 5 10 15

Tyr Tyr Gly Gln Asp Val  
20

<210> 27  
<211> 22  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成。注意：SEQ ID NO:19 的肽，其中 Xaa(6)为 Gly, Xaa(9)为 Arg, Xaa(10)为 Gly, Xaa(11)为 Gly, Xaa(12)为 Trp, Xaa(13)为 Asn, Xaa(18)为 Trp, Xaa(20)为 Met。

<400> 27

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Leu Arg Gly Gly Trp Asn Asp Val Asp  
1                   5                   10                   15

Tyr Trp Gly Met Asp Val  
                  20

<210> 28

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 以 SEQ ID NO: 1 反向顺序制备的合成肽。

<400> 28

Gly Ile Trp Glu Leu Ser Lys Glu Pro Ser Gln Lys Val Trp Gln Met  
1                   5                   10                   15

Tyr Tyr Gly Thr  
                  20

<210> 29

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 以 SEQ ID NO: 3 反向顺序制备的合成。

<400> 29

Ser Gly Gln Gly Trp Tyr Asp Met Ala Tyr Pro Glu Trp Leu Phe Arg  
1                   5                   10                   15

Ala Cys Tyr Tyr  
                  20

<210> 30

<211> 19  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 以 SEQ ID NO: 6 反向顺序制备的合成肽。

<400> 30

Gly Ile Trp Glu Glu Gly Lys Gly Pro Pro Gln Arg Ile Trp Ser Trp  
1                   5                   10                   15

Tyr Tyr Gly

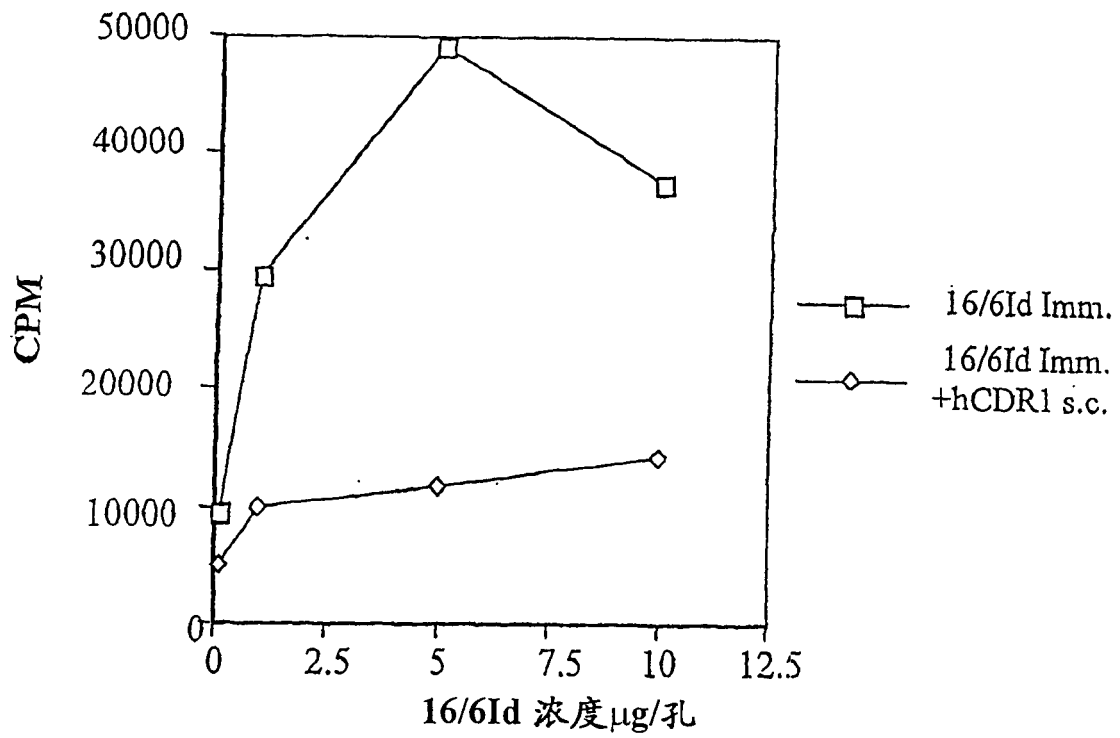


图 1

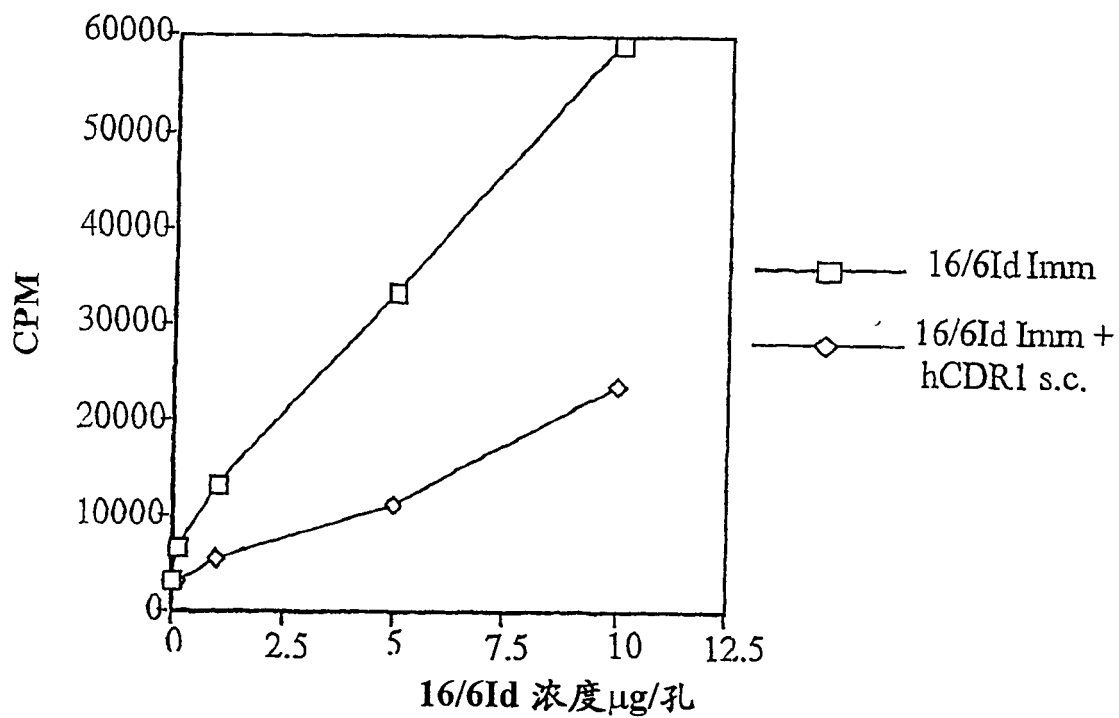


图 2

图 3A

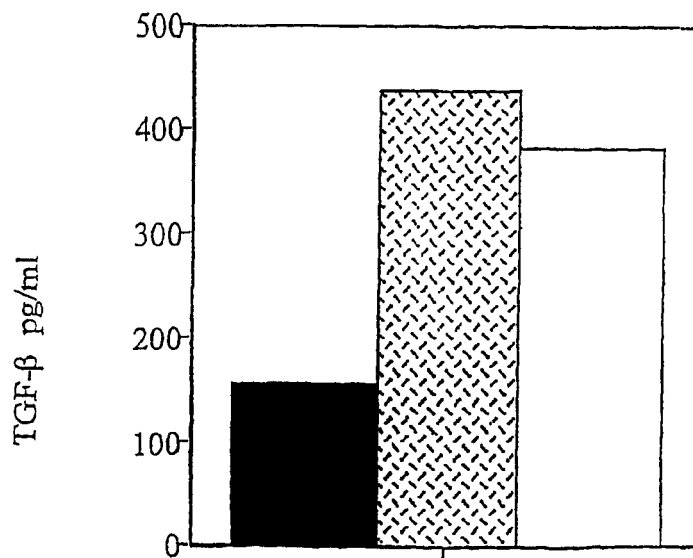
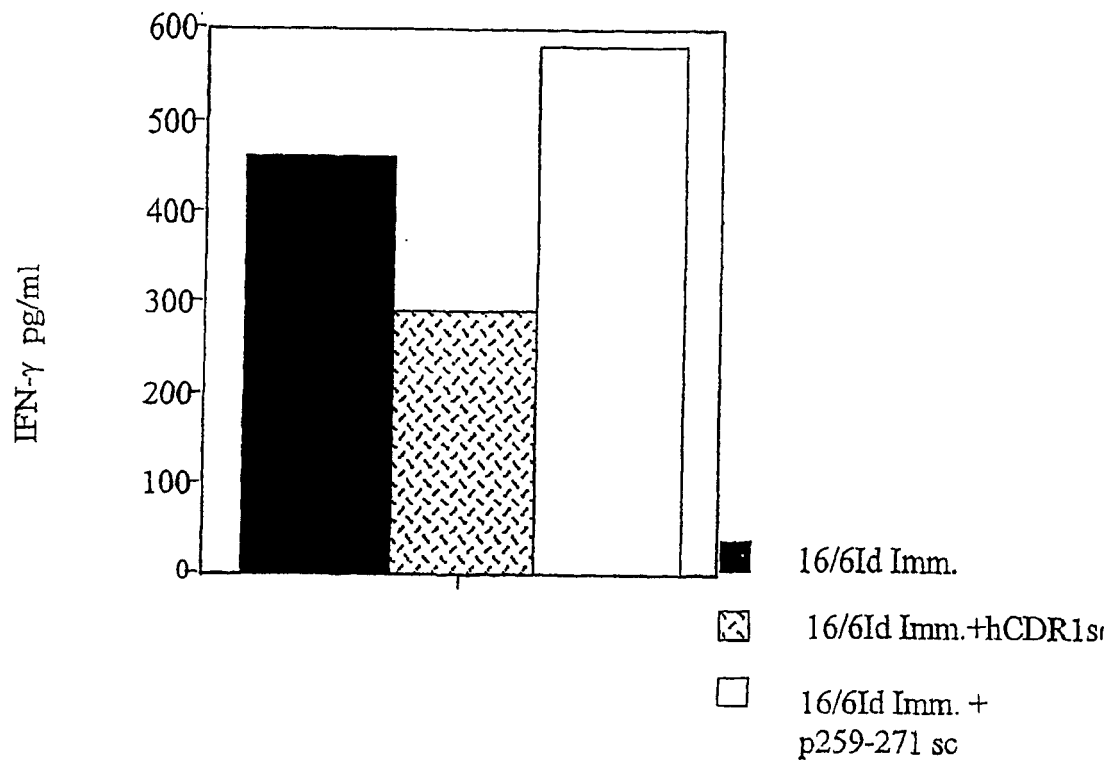


图 3B

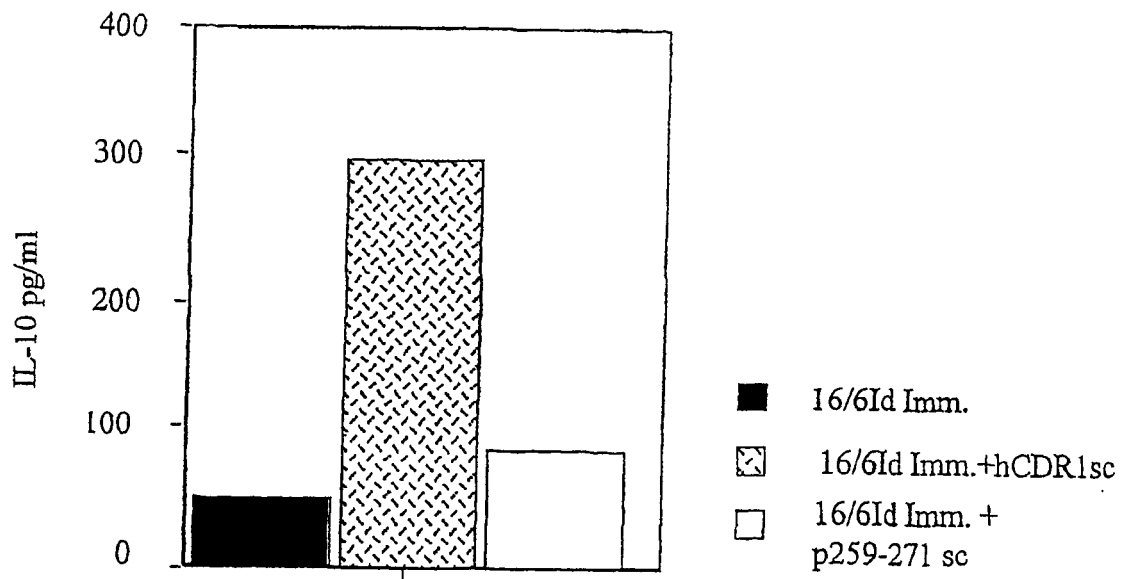


图 3C

图 4

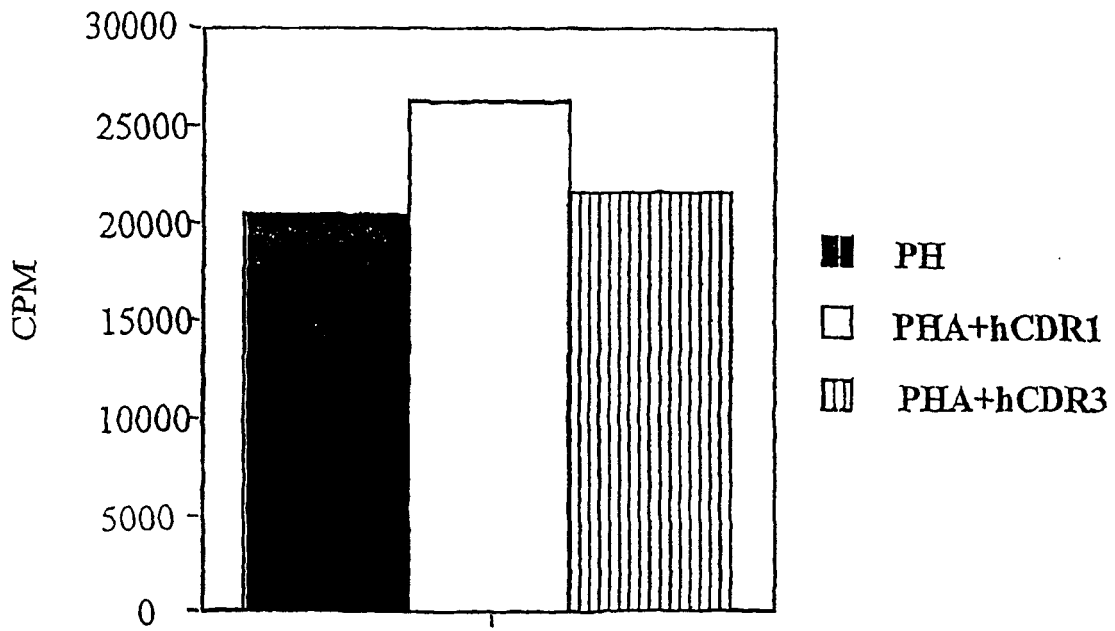
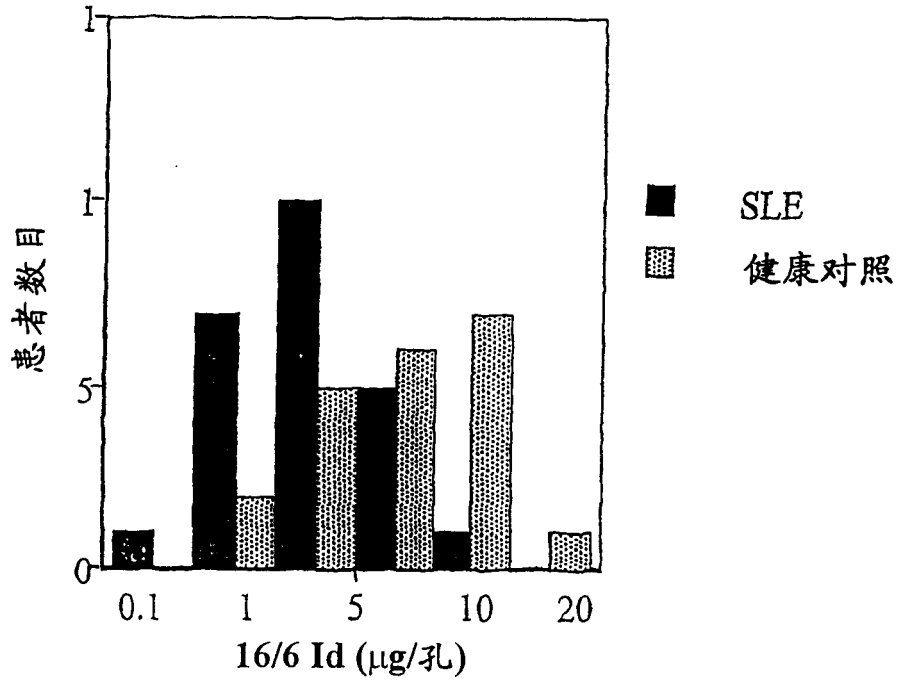


图 5

图 6

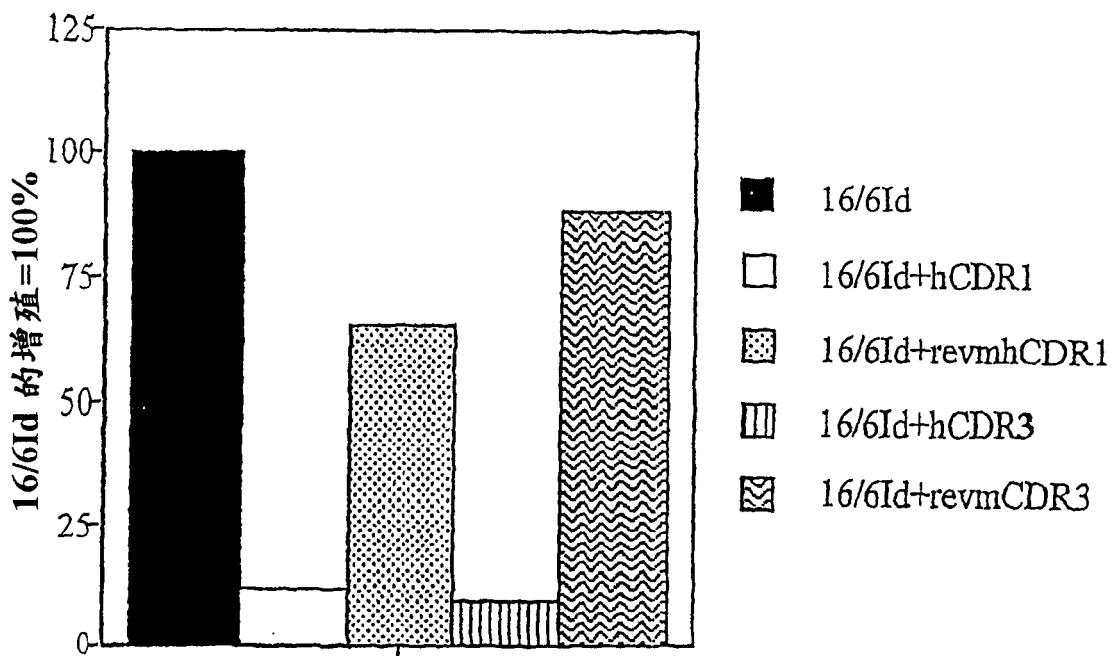
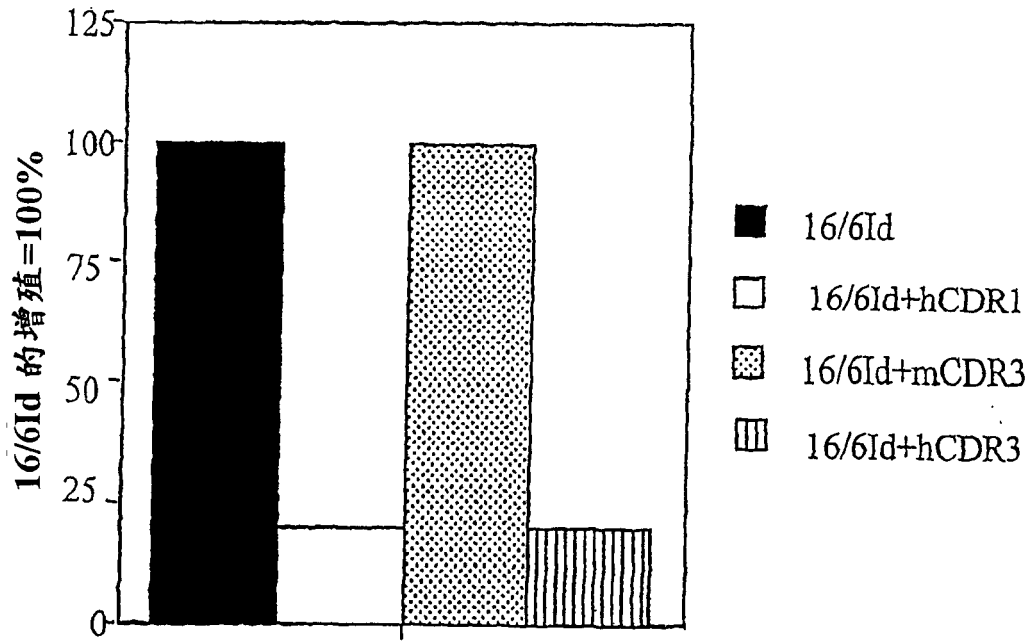


图 7

图 8

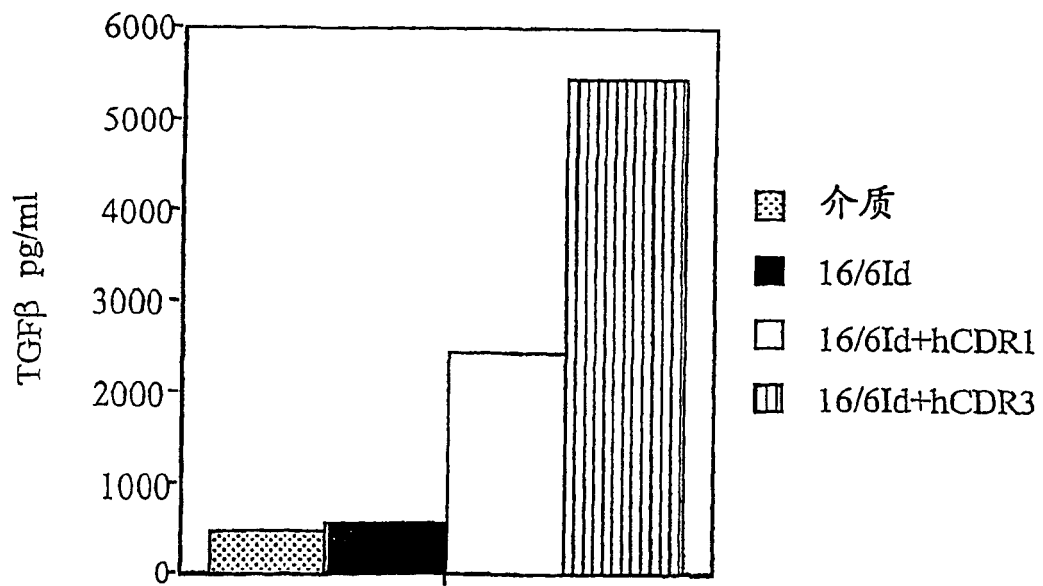
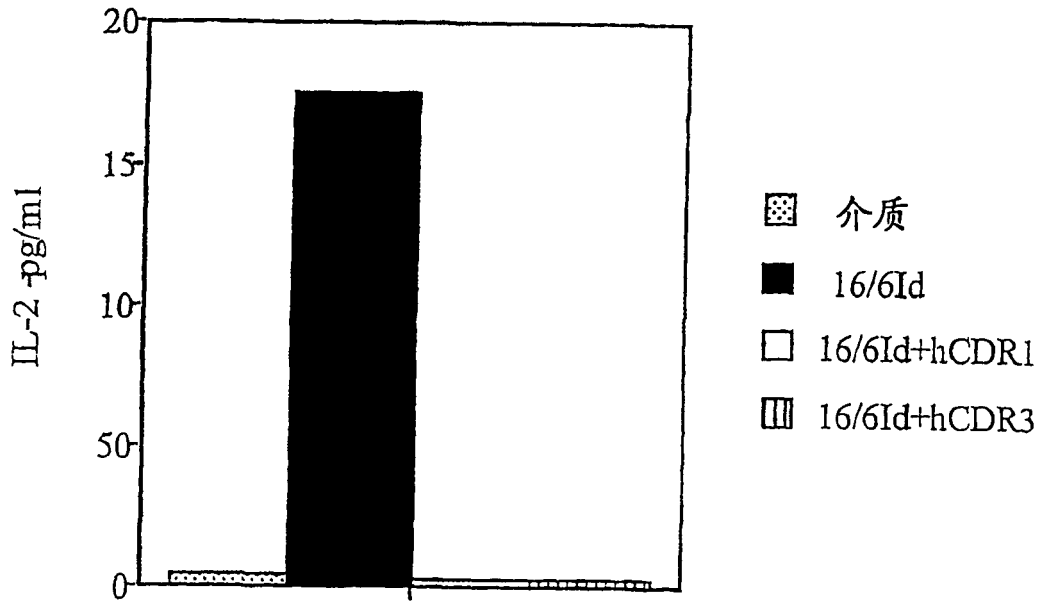


图 9

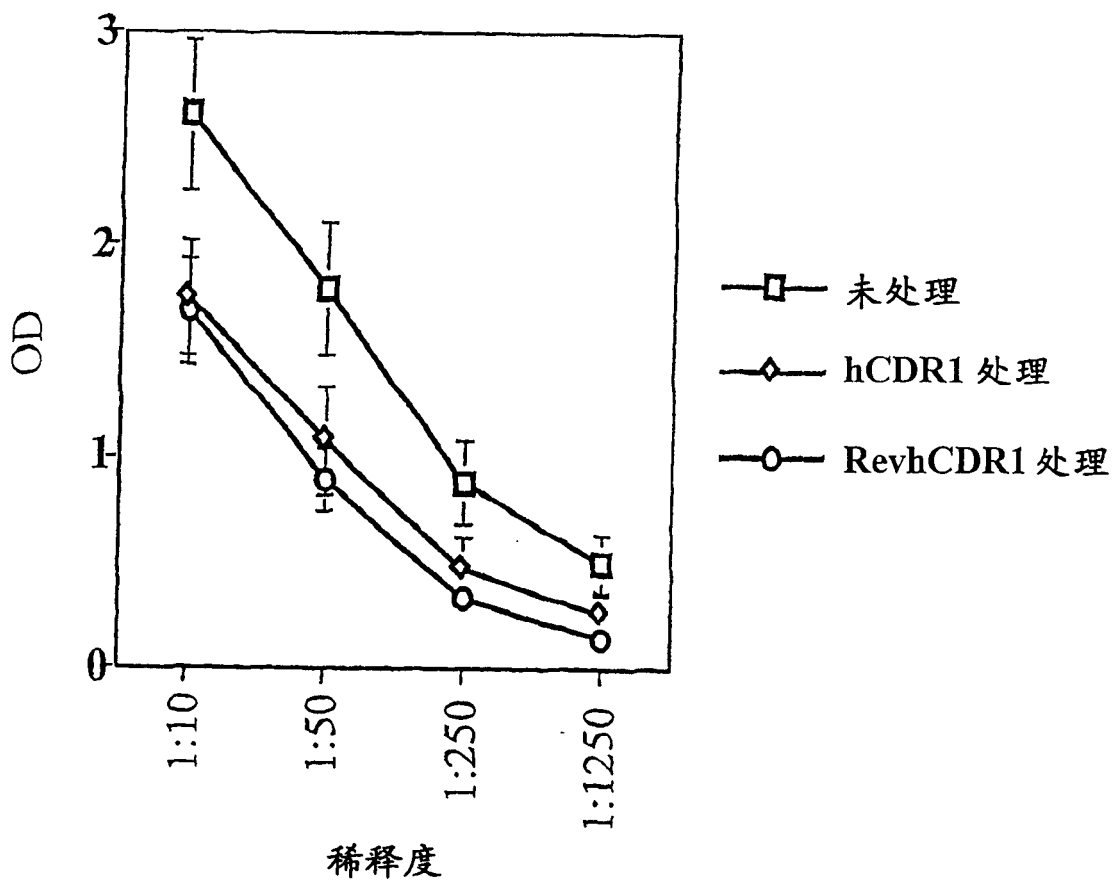


图 10

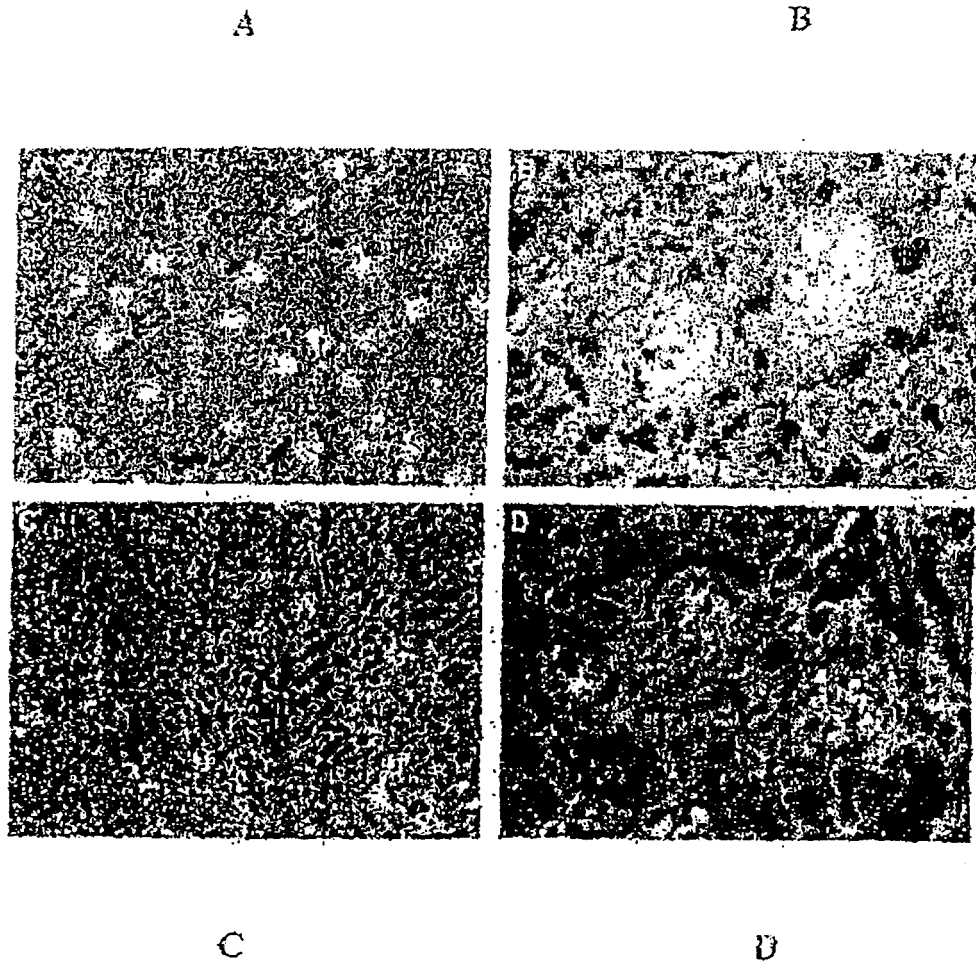


图 11

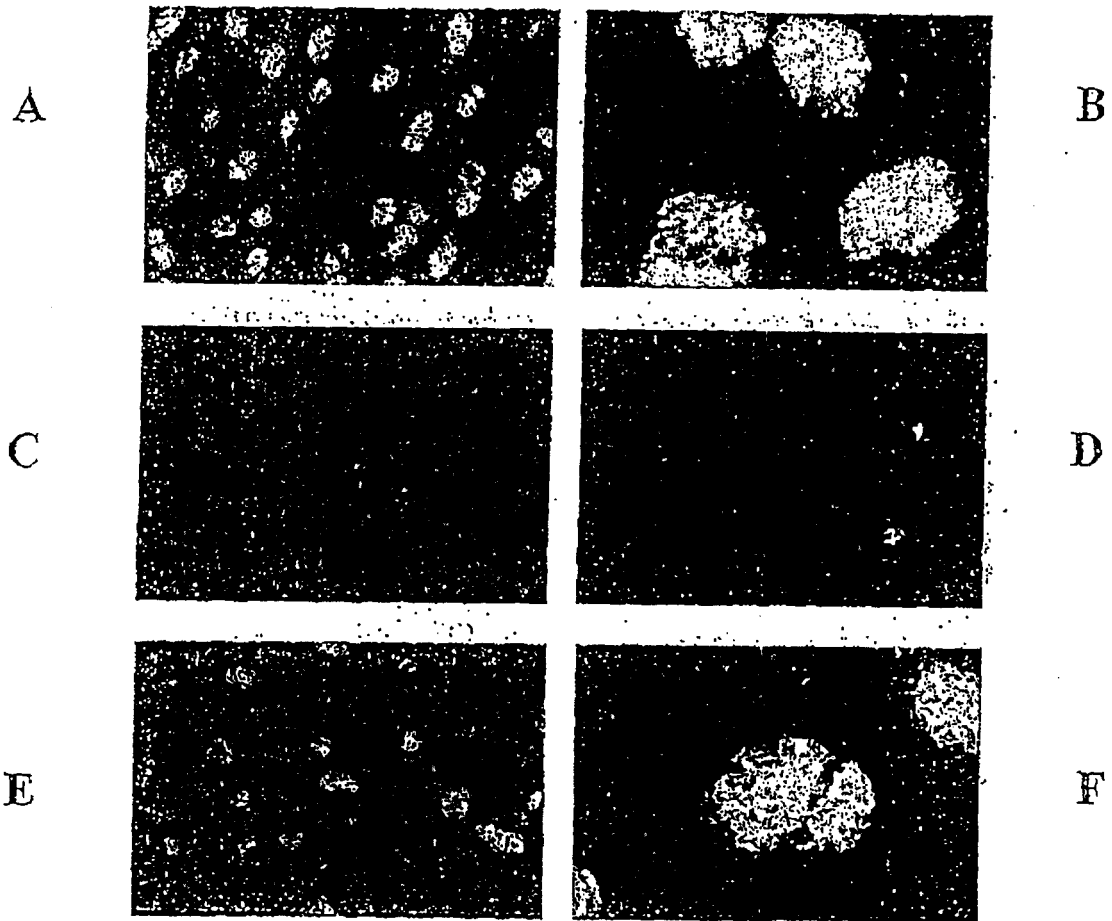
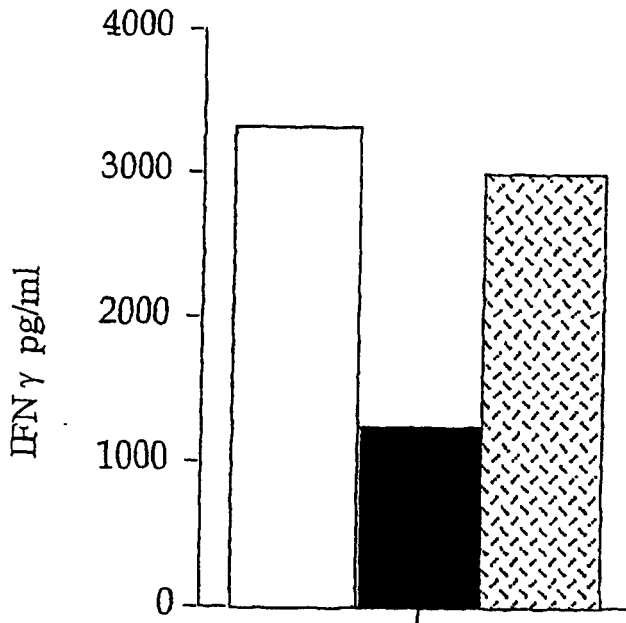


图 12

图 13A



- 未治疗
- hCDR1
- rev hCDR1

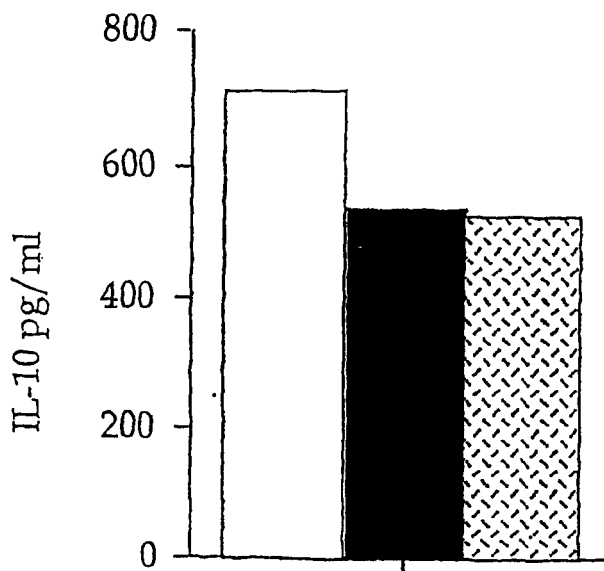


图 13B

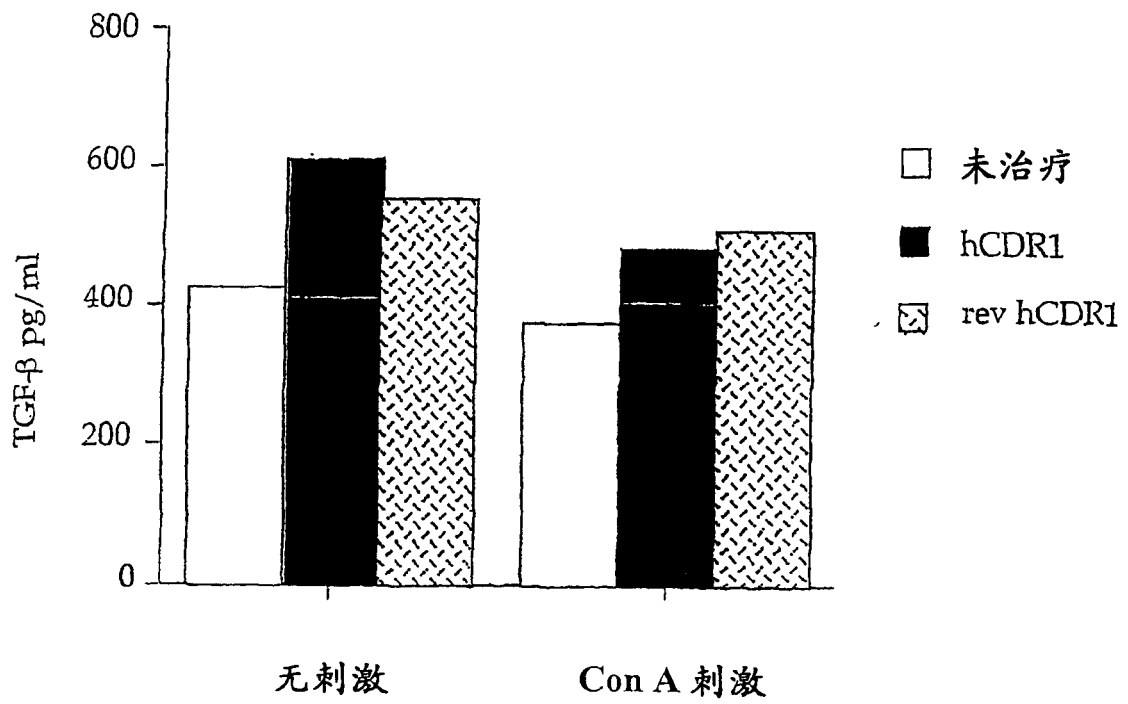


图 13C

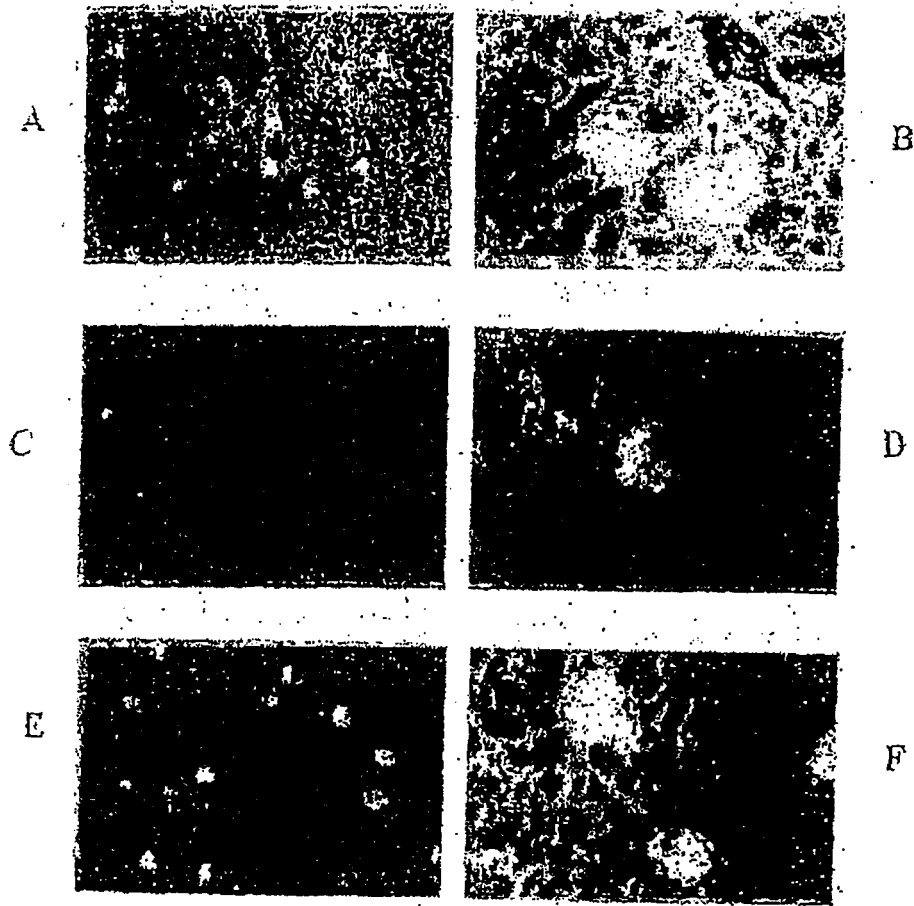


图 14

图 15A

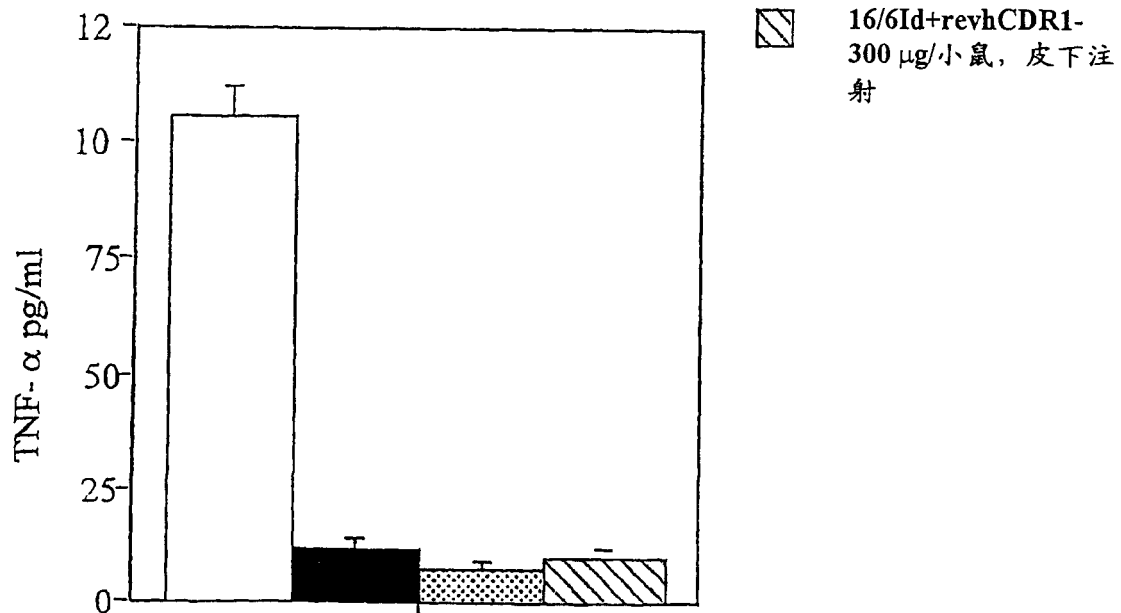
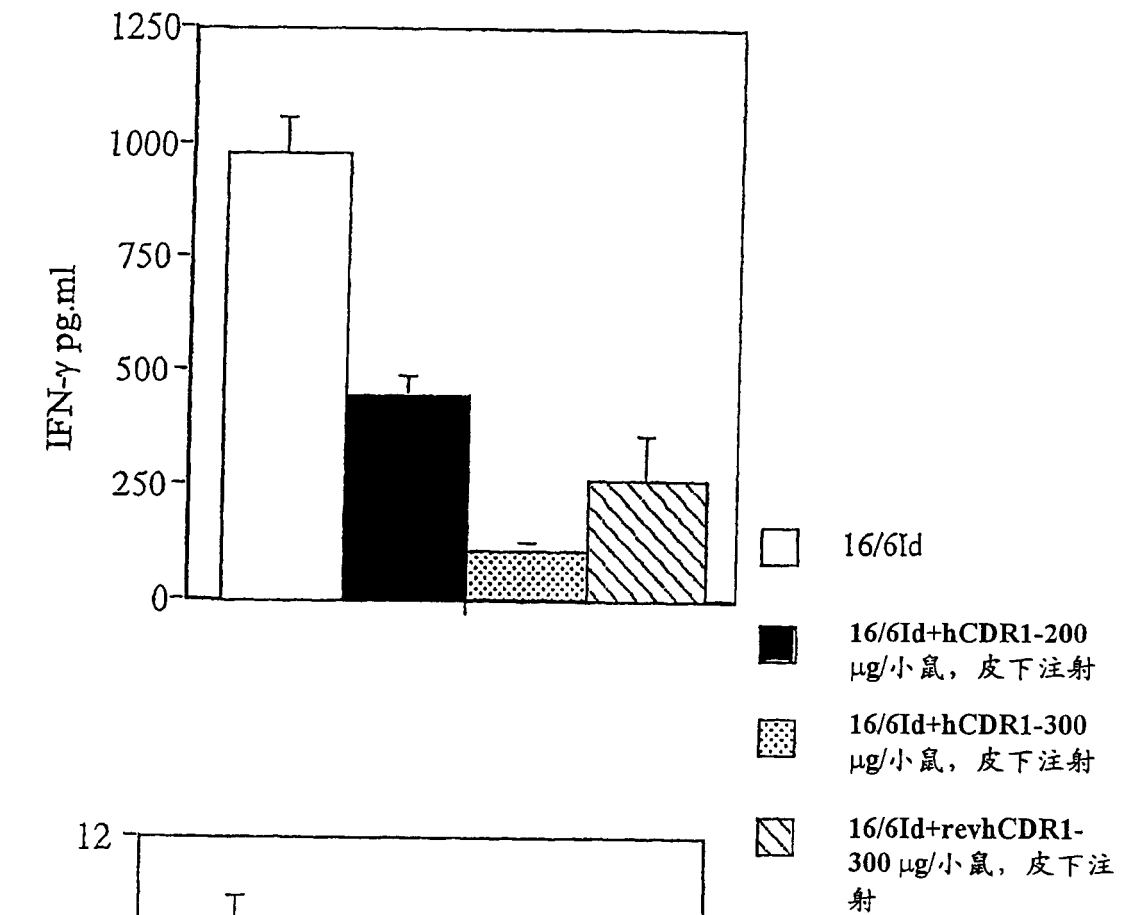


图 15B

图 15C

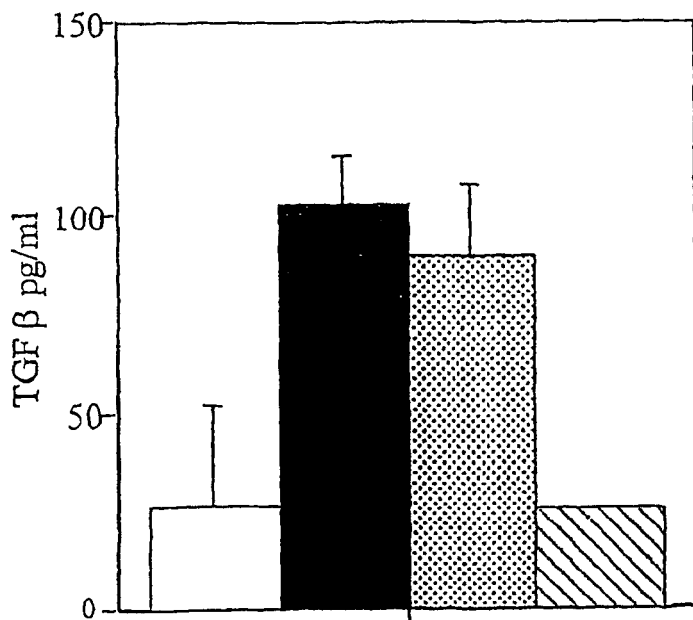
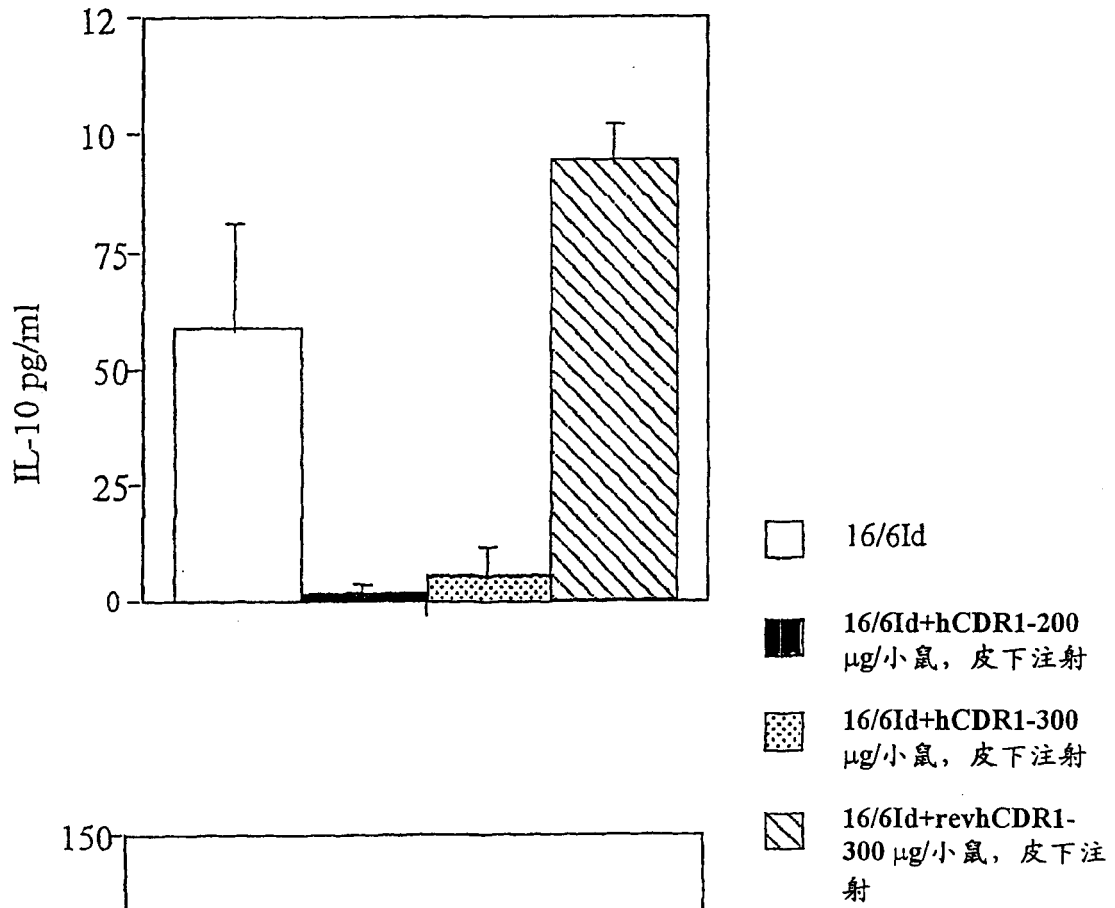


图 15D

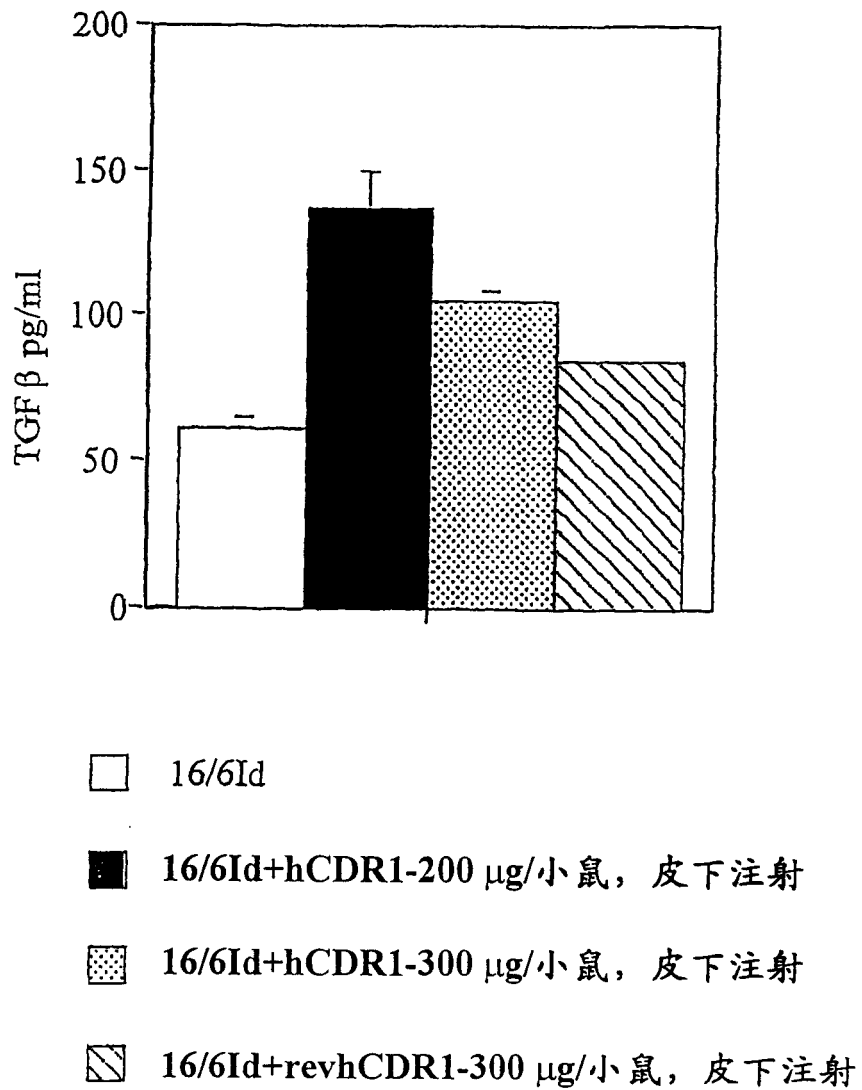


图 15E

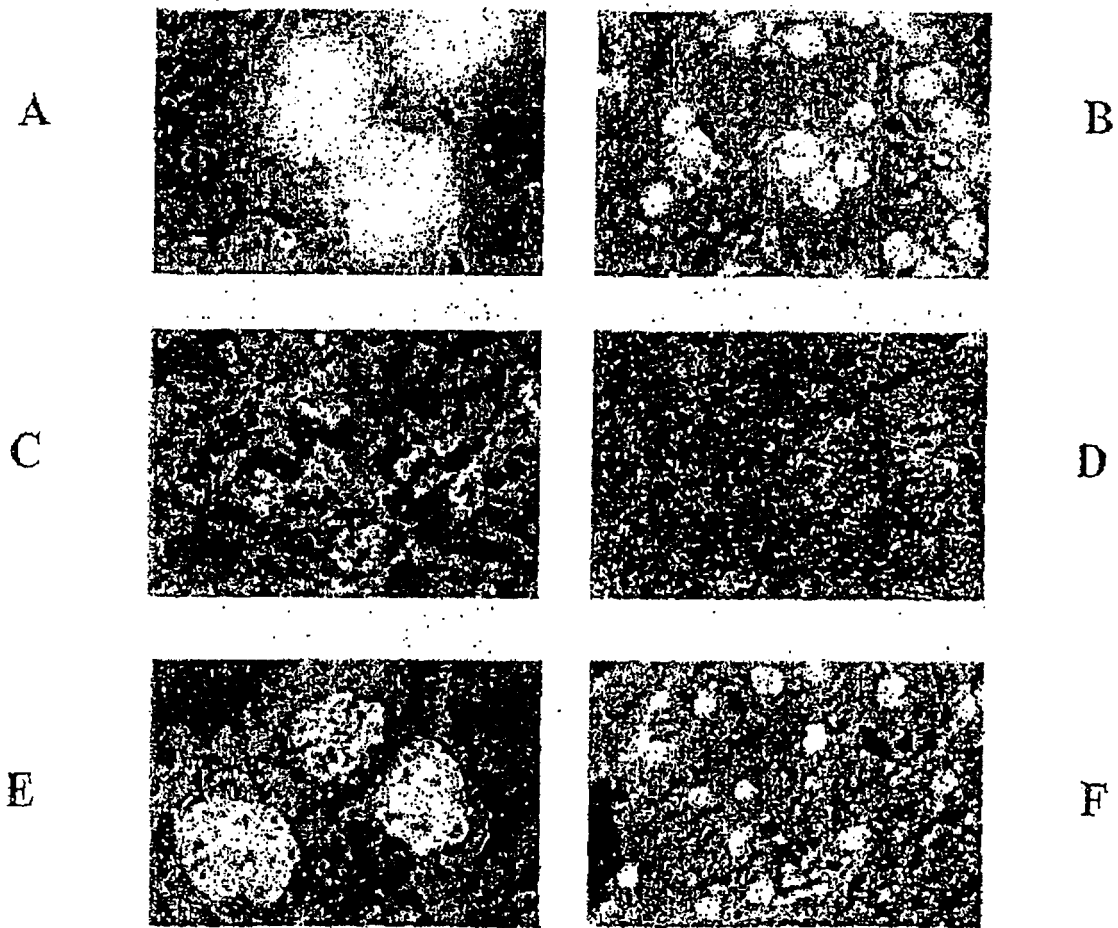


图 16

图 17A

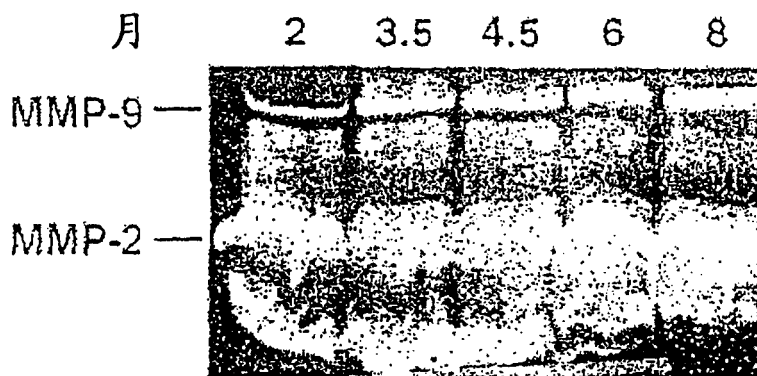
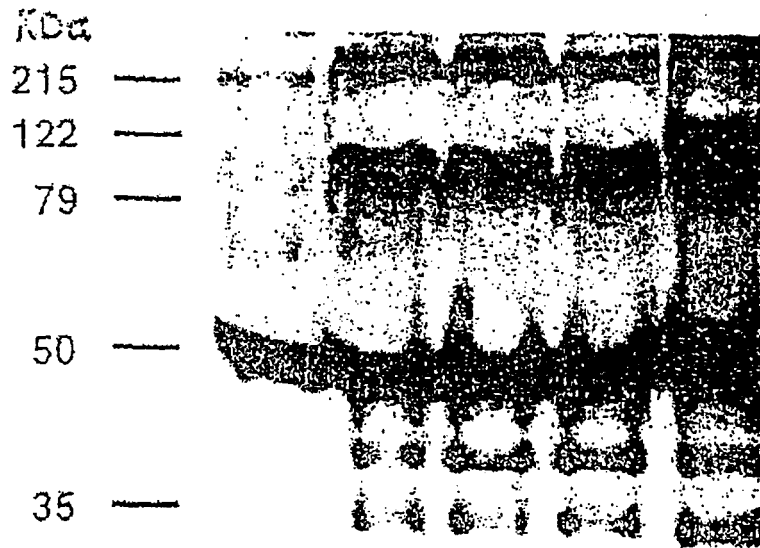


图 17B

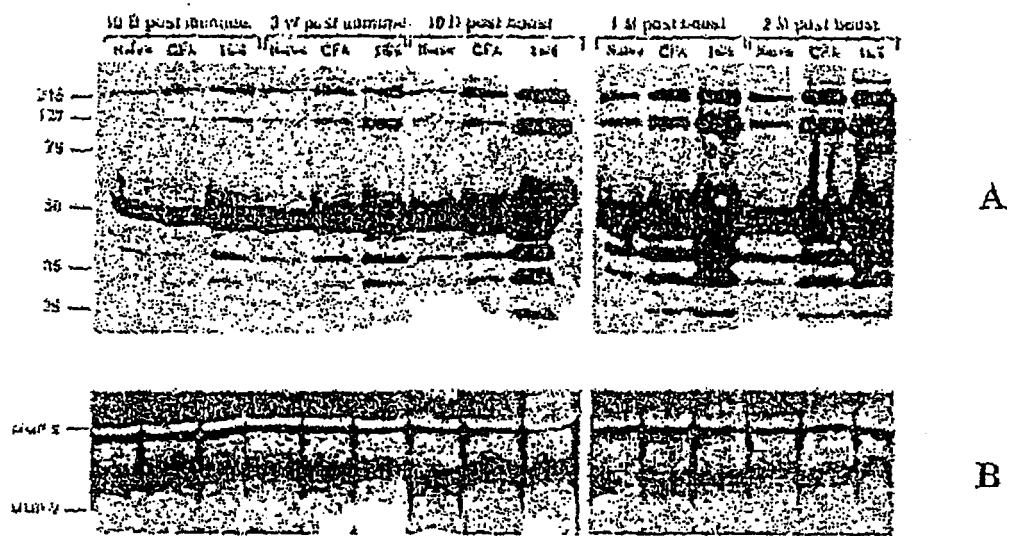


图 18

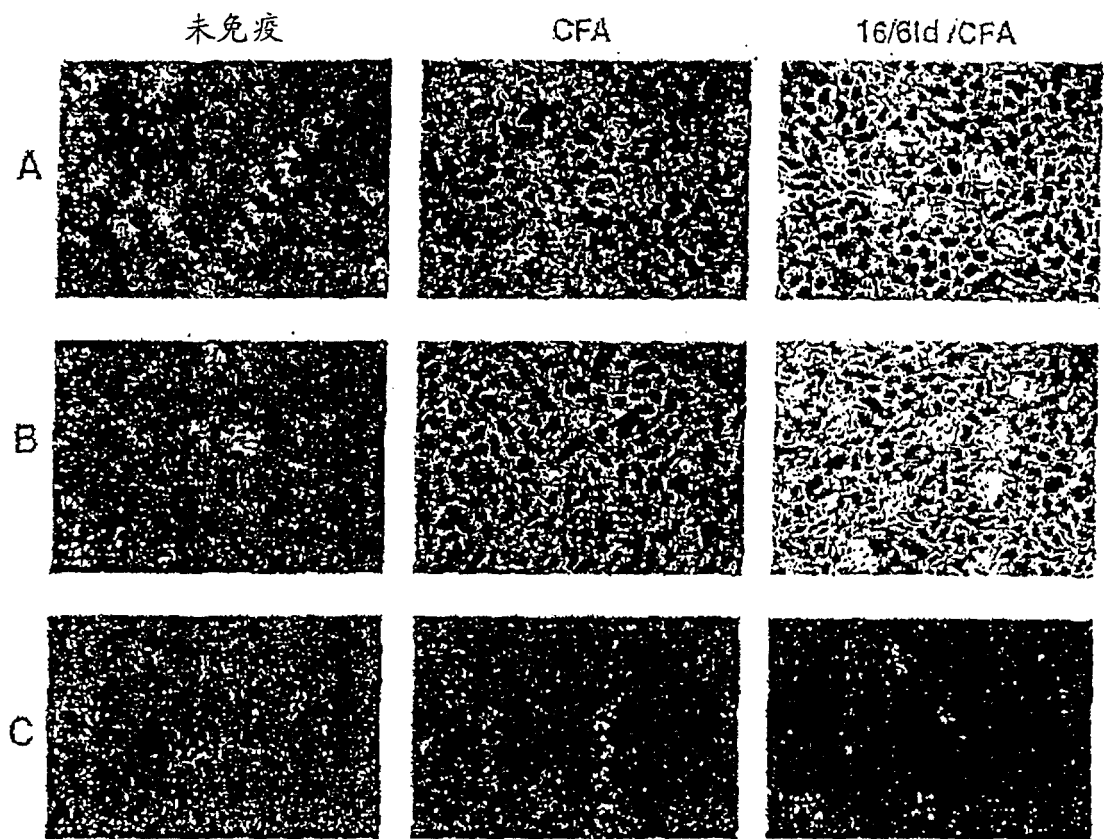


图 19

图 20

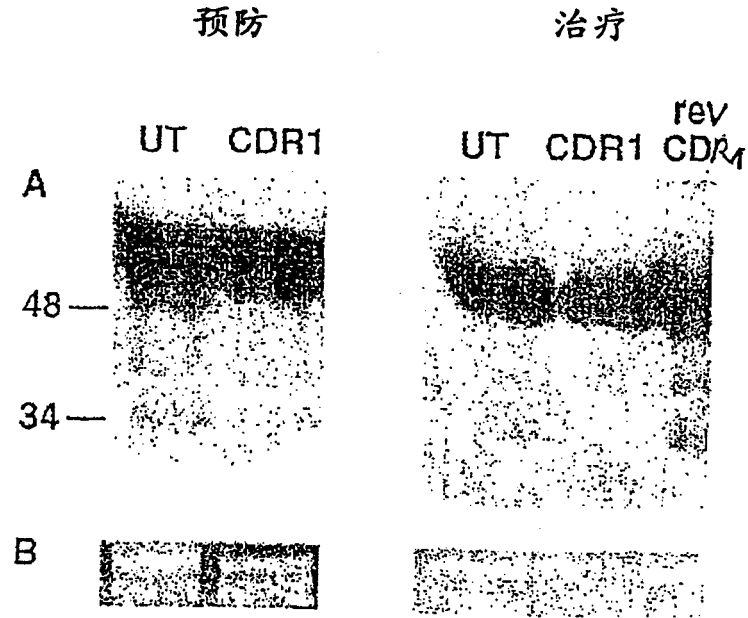
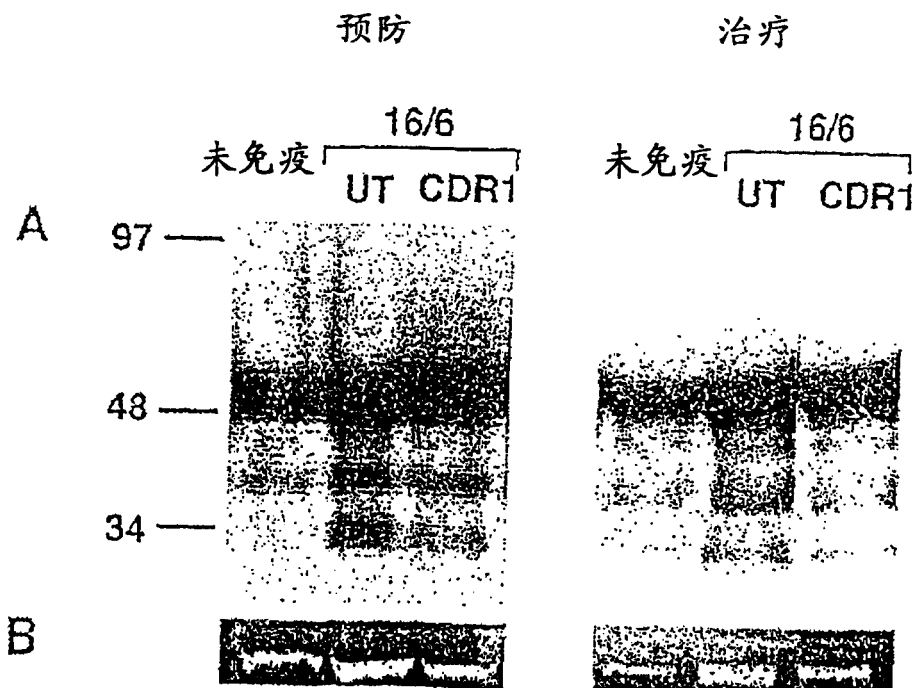


图 21



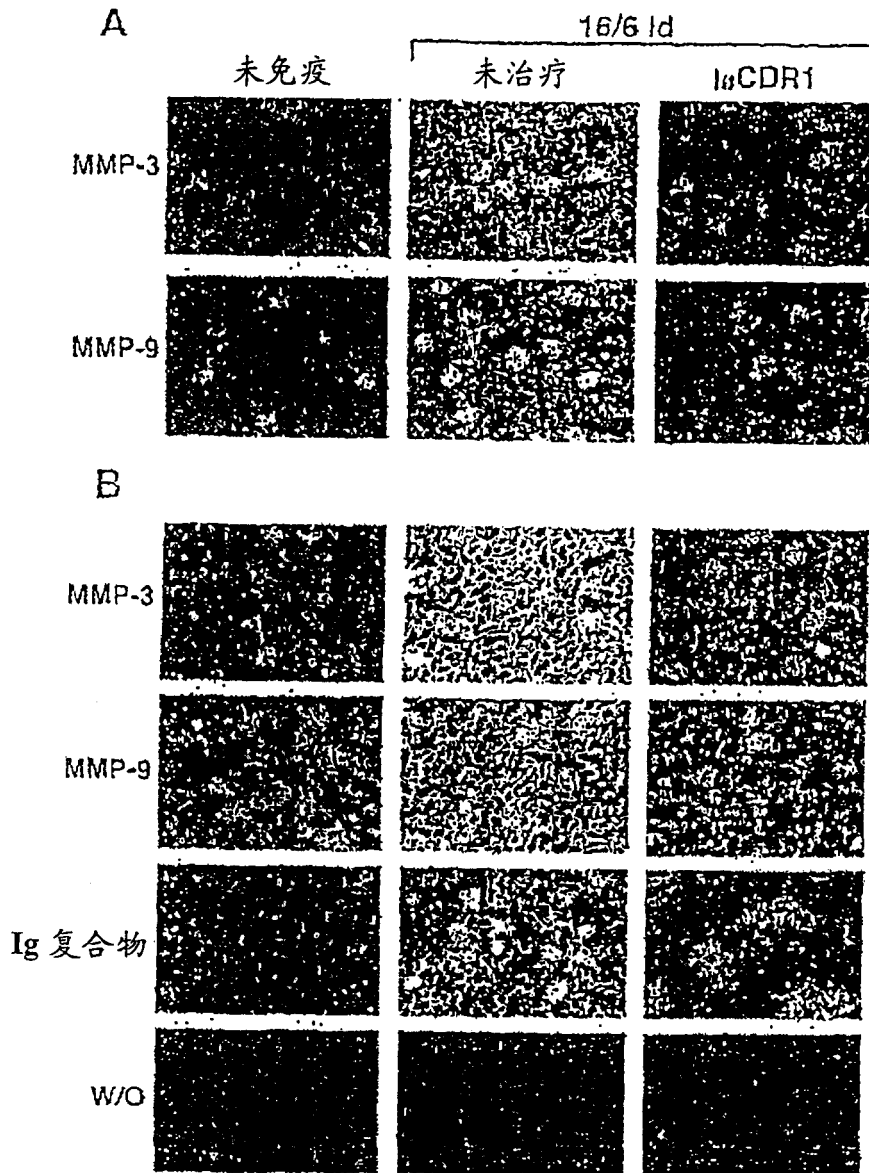


图 22

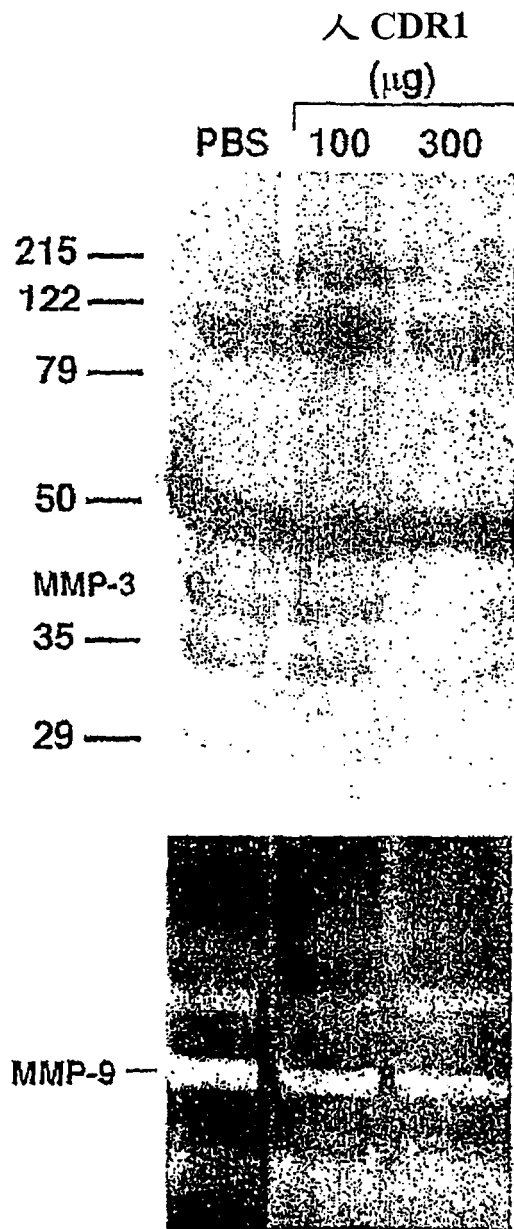


图 23

图 24

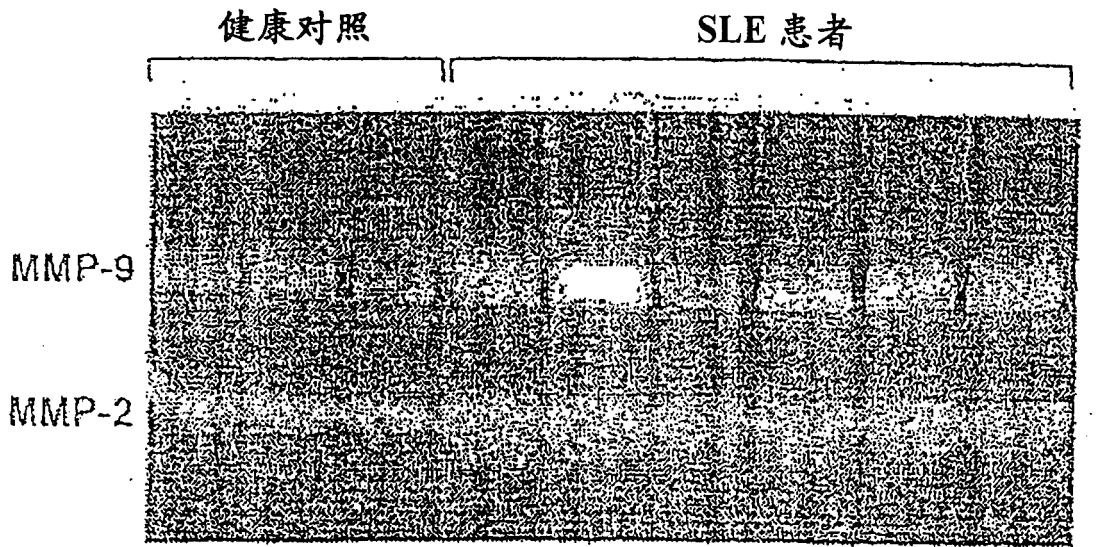


Fig. 24

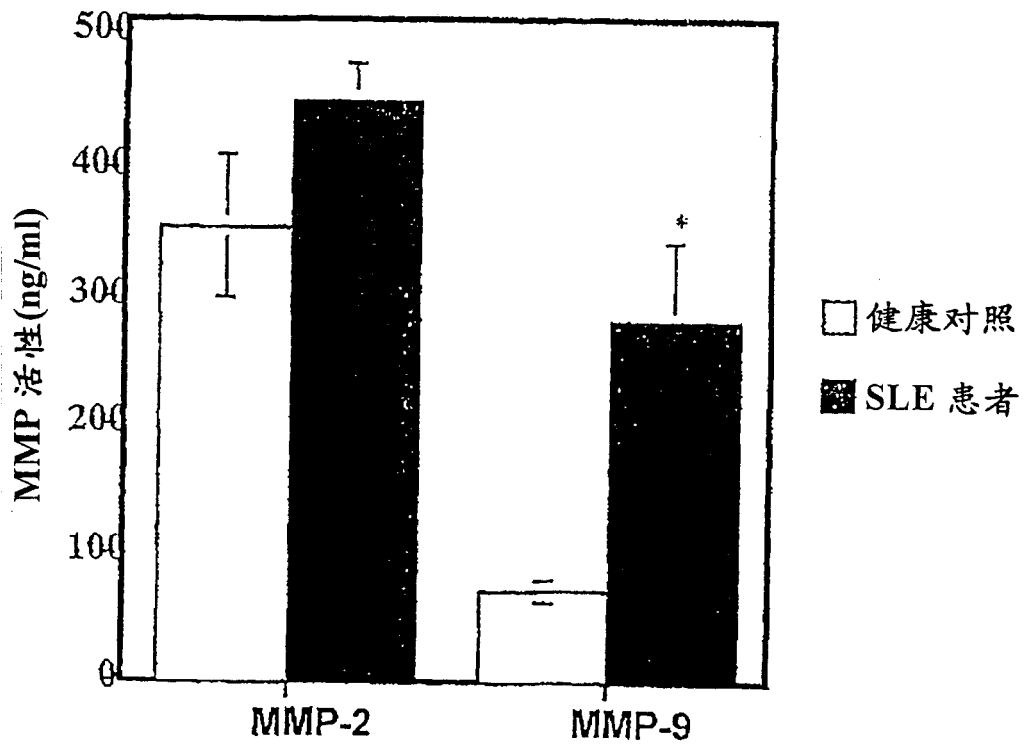


图 25

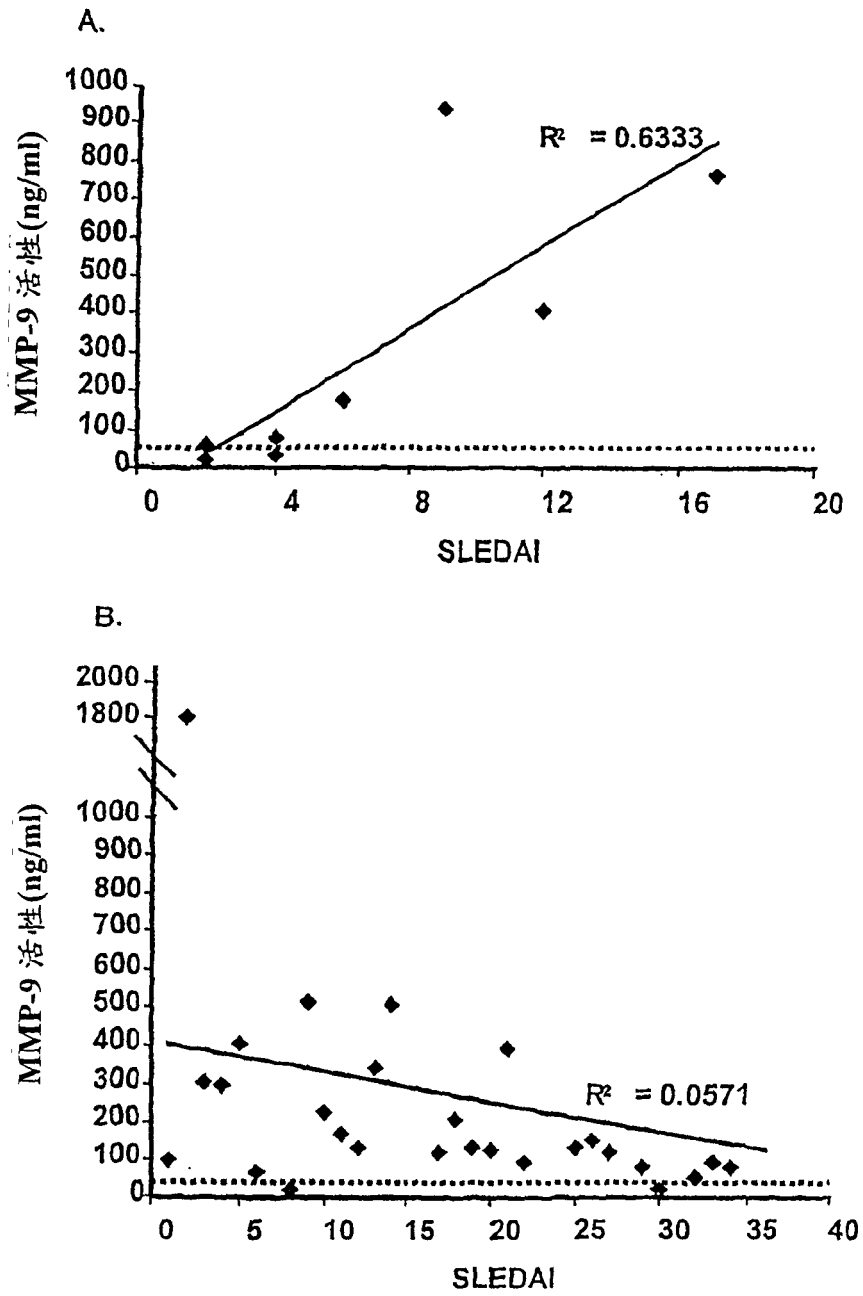


图 26

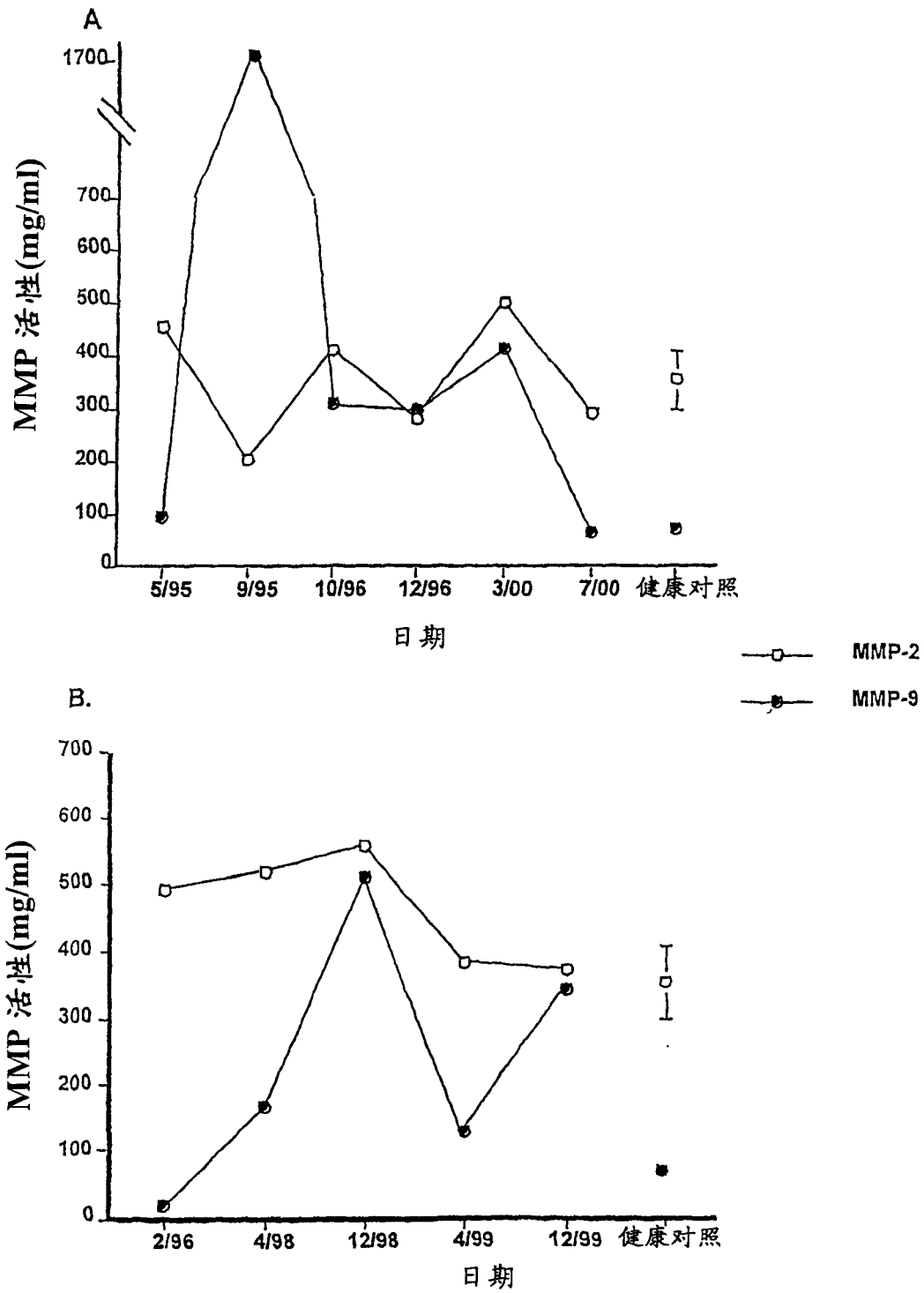


图 27

专利名称(译)	用于治疗系统性红斑狼疮的16/6Id抗体肽		
公开(公告)号	<a href="#">CN1309733C</a>	公开(公告)日	2007-04-11
申请号	CN02808712.7	申请日	2002-02-26
[标]申请(专利权)人(译)	耶达研究及发展有限公司		
申请(专利权)人(译)	耶达研究及发展有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	耶达研究及发展有限公司		
[标]发明人	E莫泽斯		
发明人	E·莫泽斯		
IPC分类号	C07K14/00 C07K16/46 A61K38/16 A61K38/04 A61K39/395 G01N33/53 A61P37/02 C12Q1/37 A61K38/00 A61K39/00 A61P17/00 A61P29/00 A61P37/06 A61P43/00 C07K C07K16/18 C12P21/08		
CPC分类号	C07K16/18 C07K2317/565 C07K2317/21 A61K2039/505 A61K39/00 C07K2317/73 A61P17/00 A61P29/00		
优先权	141647 2001-02-26 IL		
其他公开文献	CN1503806A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

至少12个氨基酸残基、至多30个氨基酸残基的合成肽，所述合成肽包含由人抗DNA 16/6Id单克隆抗体重链或轻链互补决定区(CDR)组成的序列或在所述互补决定区内发现的序列，或者所述合成肽包含通过在所述序列取代和/或缺失和/或添加一个或多个氨基酸残基而获得的序列，所述肽的盐、化学衍生物和聚合物可用于免疫调节系统性红斑狼疮相关反应。

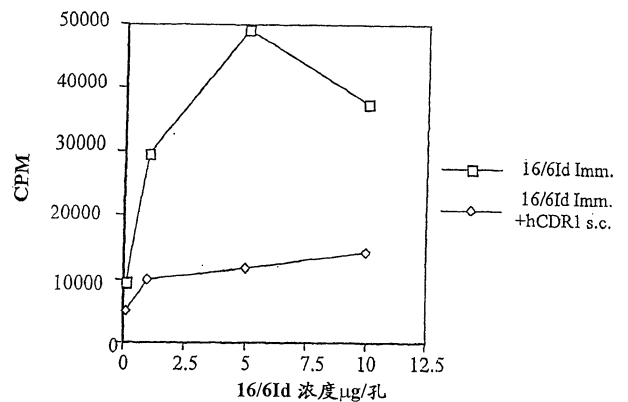


图 1