



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101855236 B

(45) 授权公告日 2015.03.04

(21) 申请号 200880110871.1
 (22) 申请日 2008.08.15
 (66) 本国优先权数据
 PCT/CN2007/002467 2007.08.15 CN
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2010.04.09
 (86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/CN2008/072005 2008.08.15
 (87) PCT国际申请的公布数据
 WO2009/024070 EN 2009.02.26
 (83) 生物保藏信息
 CGMCC2114 2007.07.20
 CGMCC2115 2007.07.20
 CGMCC2116 2007.07.20
 CGMCC2247 2007.11.06
 CGMCC2248 2007.11.06
 (73) 专利权人 北京同为时代生物技术有限公司
 地址 100176 北京经济技术开发区西环南路
 26号院15号楼第一、三层
 (72) 发明人 沈恩允 余征 周敏 郭菲
 (74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
 11105
 代理人 岑晓东

(51) Int. Cl.
 C07K 7/00(2006.01)
 A61K 38/00(2006.01)
 A61K 39/00(2006.01)
 (56) 对比文件
 Ulrike FOCK et al. Topological assignment of the N-terminal extension of plasma gelsolin to the gelsolin surface. 《Biochem. J.》. 2005, 第 385 卷 659 - 665.
 Jose F. Cabello-Agueros et al. The Role of F-Actin Cytoskeleton- Associated Gelsolin in the Guinea Pig Capacitation and Acrosome Reaction. 《Cell Motility and the Cytoskeleton》. 2003, 第 56 卷 94-108.
 Shuying Hwo and Joseph Bryan. Immuno-identification of Ca²⁺-induced Conformational Changes in Human Gelsolin and Brevin. 《The Journal of Cell Biology》. 1986, 第 102 卷 227-236.
 审查员 陈中伟

权利要求书2页 说明书49页
序列表9页 附图4页

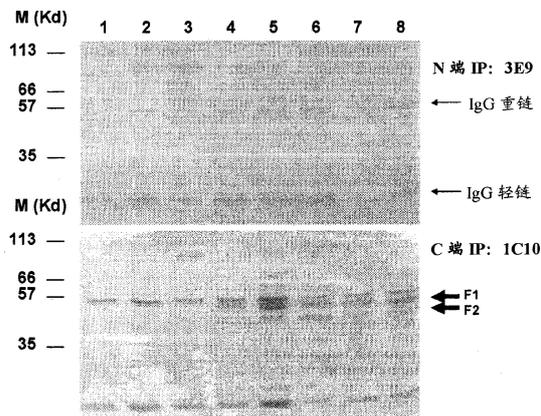
(54) 发明名称

尿凝溶胶蛋白的检测和定量

(57) 摘要

一般而言, 本发明涉及能结合凝溶胶蛋白多肽的凝溶胶蛋白结合剂(例如抗体)。本发明的凝溶胶蛋白结合剂可单独或组合用于检测测试样品中的凝溶胶蛋白多肽。具体地, 所述凝溶胶蛋白结合剂在尿样品的测定法中可用于诊断凝溶胶蛋白相关医学状况。本公开内容还提供了用于检测生物学样品中的凝溶胶蛋白的试剂盒。

CN 101855236 B



1. 由 (1)CGMCC 编号 2247 或 (2)CGMCC 编号 2247 和 2116 的保藏细胞系所生成的抗体或其抗体片段在制备用于测定哺乳动物受试者中与凝溶胶蛋白水平改变有关的疾病或状况的存在的试剂或试剂盒中的用途,其中所述抗体片段为 Fab、Fab' 或 F(ab')₂,所述测定包括下列步骤:

(a) 使来自所述哺乳动物受试者的尿样品在免疫学反应性条件下与所述抗体或抗体片段接触;并

(b) 检测所述抗体或抗体片段与所述凝溶胶蛋白样多肽的结合以测定所述样品中的凝溶胶蛋白样多肽水平,其中所述样品中的凝溶胶蛋白样多肽水平与参照水平之间的差异指明所述哺乳动物受试者中与凝溶胶蛋白水平改变有关的疾病或状况的存在。

2. 权利要求 1 的用途,其中所述测定以 ELISA 的形式实施。

3. 权利要求 2 的用途,其中第一抗体包被至 ELISA 板,且第二抗体与可检测标记物偶联,其中所述第一抗体和第二抗体是由选自下组的保藏细胞系生成的抗体:CGMCC 编号 2247 和 2116。

4. 权利要求 3 的用途,其中所述第一抗体由杂交瘤细胞系 CGMCC 编号 2247 所生成,而所述第二抗体由杂交瘤细胞系 CGMCC 编号 2116 所生成。

5. 权利要求 1 的用途,其中所述与凝溶胶蛋白水平改变有关的疾病或状况选自下组:肾衰竭、感染性休克、多器官功能障碍综合征、类风湿性关节炎、中风、心肌梗死、癌症、系统性自身免疫性疾病、慢性肝炎、化学疗法的副作用、和放射疗法的副作用。

6. 权利要求 1 的用途,其中所述凝溶胶蛋白样多肽是凝溶胶蛋白的 C 端片段。

7. 权利要求 1 的用途,其中与所述参照水平相比所述样品中的凝溶胶蛋白样多肽水平升高指明哺乳动物受试者中与凝溶胶蛋白水平改变有关的疾病或状况的存在。

8. 权利要求 1 的用途,其中所述参照水平是未患有与凝溶胶蛋白水平改变有关的疾病或状况的对照受试者群体中的凝溶胶蛋白样多肽量。

9. 权利要求 1 的用途,其中所述参照水平是未患有与凝溶胶蛋白水平改变有关的疾病或状况的受试者中的凝溶胶蛋白样多肽量。

10. 权利要求 1 的用途,其中所述参照水平是较早时间时所述受试者中的凝溶胶蛋白样多肽量。

11. 权利要求 1 的用途,其中所述测定进一步包括量化来自所述受试者的样品中的凝溶胶蛋白样多肽量。

12. 由 (1)CGMCC 编号 2247 或 (2)CGMCC 编号 2247 和 2116 的保藏细胞系所生成的抗体或其抗体片段在制备用于监测哺乳动物受试者中的肾衰竭的试剂或试剂盒中的用途,其中所述抗体片段为 Fab、Fab' 或 F(ab')₂,所述监测包括下列步骤:

(a) 使来自所述哺乳动物受试者的尿样品在免疫学反应性条件下与所述抗体或抗体片段接触;

(b) 检测所述抗体或抗体片段与所述凝溶胶蛋白样多肽的结合以测定所述样品中的凝溶胶蛋白样多肽水平;并

(c) 比较所述哺乳动物受试者中的凝溶胶蛋白样多肽水平与参照水平,其中所述参照水平是未患有肾衰竭的对照受试者的尿样品中的凝溶胶蛋白样多肽水平,且其中与所述参照水平相比所述受试者中的凝溶胶蛋白样多肽水平升高指明所述哺乳动物受试者患有肾

衰竭。

13. 一种抗体或其抗体片段,所述抗体由 CGMCC 编号为 2247 的保藏细胞系所生成,所述抗体片段为 Fab、Fab' 或 F(ab')₂。

14. 一种连续细胞系,其 CGMCC 编号为 2247。

15. 一种试剂盒,其包含

(a) 经第一抗体包被的 ELISA 板 ;和

(b) 容器中的第二抗体,其中第二抗体与第一抗体不同,且第二抗体与可检测标记物偶联 ;其中所述第一抗体和第二抗体是由选自下组的保藏细胞系生成的抗体 :CGMCC 编号 2247 和 2116。

尿凝溶胶蛋白的检测和定量

[0001] 对相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2007 年 8 月 15 日提交的 PCT 申请号 PCT/CN2007/002467 的优先权，本文完整收录其内容。

发明领域

[0003] 一般而言，本发明涉及检测尿凝溶胶蛋白的方法。具体地，本发明涉及使用特异性结合剂来检测尿凝溶胶蛋白样多肽。

[0004] 发明背景

[0005] 提供以下描述来帮助读者理解。所提供的信息或所引用的参考文献均不被承认是本发明的现有技术。

[0006] 肌动蛋白是动物细胞中最丰富的蛋白质，并且构成许多有核细胞蛋白质的 10-20% 和肌肉细胞蛋白质的 30%。肌动蛋白分子每个结合一个 ATP 分子，并自身装配成长丝，这期间 ATP 被水解成 ADP。

[0007] 损伤动物组织导致肌动蛋白释放入细胞外间隙（包括血流）中。虽然约一半的非肌肉细胞肌动蛋白是 F-肌动蛋白（自 G-肌动蛋白单体装配的双螺旋的、杆状的、细丝形式的肌动蛋白），但是细胞外液的离子条件有利于肌动蛋白聚合，因此预期实际上所有从濒死细胞释放入血液中的肌动蛋白会聚合成细丝（Lind, S. E. 等, *Am. Rev. Respir. Dis.* 138 : 429-434 (1988)）。在纯化的溶液中，在没有细丝缩短蛋白的情况下，肌动蛋白丝能容易地达到数微米的长度。然而，假如自受伤细胞释放的肌动蛋白的一些部分被不可逆变性，要不然被结合至下文所讨论的胞内肌动蛋白结合蛋白之一，那么此肌动蛋白会保持单体。

[0008] 有许多与肌动蛋白天然结合的蛋白质（关于肌动蛋白结合蛋白的综述，参见 Stossel 等, *Ann. Rev. Cell Biol.* 1 :353-402 (1985) ;Pollard 等, *Ann. Rev. Biochem.* 55 : 987-1035 (1986)）。然而，认为两种蛋白质，即凝溶胶蛋白和 DBP（维生素 D 结合蛋白）主要负责结合胞外肌动蛋白（Janmey 等, *Blood* 70 :529-530 (1987)）。凝溶胶蛋白是一种肌动蛋白结合蛋白，其是肌动蛋白丝装配和解装配的关键调节物。凝溶胶蛋白是具有 6 个同源亚域（称为 S1-S6）的 82-kDa 蛋白质。每个亚域包含一个五链 β 片层，侧翼有两个 α -螺旋，一个相对于这些链垂直定位，而另一个平行定位。N 端（S1-S3）形成延伸的 β 片层，C 端（S4-S6）亦然（Kisellar 等, *PNAS* 100 :3942-3947 (2003)）。该蛋白质在物种间高度保守且高度同源。凝溶胶蛋白位于细胞内（在胞质溶胶和线粒体中）和细胞外（在血浆中）（Koya 等, *J Biol Chem* 275 (20) :15343-15349 (2000)）。

[0009] 凝溶胶蛋白在调节肌动蛋白聚合方面具有数项功能。首先，凝溶胶蛋白牵涉单体肌动蛋白结合。在存在 Ca^{2+} 的情况下，凝溶胶蛋白结合两个肌动蛋白单体。凝溶胶蛋白还能通过另一个肌动蛋白结合位点结合肌动蛋白丝。其次，凝溶胶蛋白结合两个肌动蛋白单体以为肌动蛋白聚合形成核，并为肌动蛋白丝带刺的（barbed）末端加帽。如此，凝溶胶蛋白能够充当肌动蛋白聚合的核并为初生微丝的末端加帽。最后，凝溶胶蛋白具有肌动蛋白切断活性。

[0010] 由于细胞中的大量肌动蛋白,从濒死细胞释放肌动蛋白提供足够肌动蛋白而对微环境具有显著影响,其通过提高血浆的细胞外液粘度和 / 或通过俘获细胞或通过其它至今尚未鉴定的毒性效应来实现。细胞外游离的肌动蛋白的输注对动物组织,尤其是对肾和心肺系统是有毒的 (Harper 等, Clin. Res. 36 :625A(1988) ;Haddad 等, PNAS 87 :1381-1385(1990))。急性肾衰竭是肌肉损伤的并发症,并且大鼠中的肌动蛋白输注引起血液尿素氮 (BUN) 和肌酸酐水平的瞬时升高,这与肾衰竭一致。血浆中的游离肌动蛋白可以形成细丝,其可以导致多器官功能障碍综合征 (Dahl 等, Shock 12(2) :102-4(1999))。此外,因为细丝中的每个胞外肌动蛋白分子具有与其结合的 ADP 分子,所以血液中胞外肌动蛋白的存在可趋向于以对宿主可能没有益处的方式诱导或提升血小板聚集 (Lind 等, Am. Rev. Respir. Dis. 138 :429-434(1988) ;Scarborough 等, Biochem. Biophys. Res. Commun. 100 :1314-1319(1981))。因此,血浆凝溶胶蛋白具有清除自死亡和濒死细胞释放的肌动蛋白的生死攸关的功能,而且血浆凝溶胶蛋白水平表现为经历外伤的患者中的早期预后标志物 (Mounzer 等, Am. J. Respir. Crit. Care Med. 160 :1673-81(1999))。

[0011] 发明概述

[0012] 一般而言,本发明涉及凝溶胶蛋白结合剂的制备及其用途。具体地,本发明涉及一种用于测定哺乳动物受试者中与凝溶胶蛋白水平改变有关的疾病或状况的存在或素因的方法,该方法包括下列步骤:(a) 使来自所述哺乳动物受试者的尿样品在免疫学反应性条件下与一种或多种如下的抗体或抗体相关多肽接触,所述抗体或抗体相关多肽与由选自下组的保藏细胞系所生成的抗体具有相同的抗原结合特异性:CGMCC 编号 2114、2116、2247 和 2248;并 (b) 检测所述一种或多种抗体或抗体相关多肽与所述凝溶胶蛋白样多肽的结合以测定所述样品中的凝溶胶蛋白样多肽水平,其中所述样品中的凝溶胶蛋白样多肽水平与参照水平之间的差异指明所述哺乳动物受试者中与凝溶胶蛋白水平改变有关的疾病或状况的存在或素因。

[0013] 在一个实施方案中,在 ELISA 中使所述样品与所述抗体或抗体相关多肽接触。所述接触步骤可包括将第一抗体结合至基片和接触所述样品,并将第二抗体结合至所述基片,其中所述第二抗体包含可检测标记物。在一个实施方案中,所述第一抗体与由杂交瘤细胞系 CGMCC 编号 2247 所生成的抗体结合相同的抗原决定簇,而所述第二抗体与由选自下组的杂交瘤细胞系所生成的抗体结合相同的抗原决定簇:CGMCC 编号 2116。

[0014] 本方法可以用于诊断与凝溶胶蛋白水平改变有关的疾病或状况。所述与凝溶胶蛋白水平改变有关的疾病或状况可以选自下组:肾衰竭 (kidney failure)、感染性休克 (septic shock)、多器官功能障碍综合征 (multiple organ dysfunction syndrome)、类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis)、中风 (stroke)、心肌梗死 (heart infarction)、癌症 (cancer)、系统性自身免疫性疾病 (systemic autoimmune disease)、慢性肝炎 (chronic hepatitis)、化学疗法的副作用 (side-effects of chemotherapy)、和放射疗法的副作用 (side-effects of radiation therapy)。

[0015] 在一些实施方案中,尿凝溶胶蛋白中所检测的凝溶胶蛋白样多肽是凝溶胶蛋白的 C 端片段。例如,与所述参照水平相比所述样品中的凝溶胶蛋白样多肽水平升高指明哺乳动物受试者中与凝溶胶蛋白水平改变有关的疾病或状况的存在或素因。

[0016] 在一个实施方案中,所述参照水平是未患有与凝溶胶蛋白水平改变有关的疾病或

状况的对照受试者群体中的凝溶胶蛋白样多肽量。在另一个实施方案中,所述参照水平是未患有与凝溶胶蛋白水平改变有关的疾病或状况的受试者中的凝溶胶蛋白样多肽量。在又一个实施方案中,所述参照水平是较早时间时所述受试者中的凝溶胶蛋白样多肽量。

[0017] 在一个实施方案中,所述方法进一步包括量化来自所述受试者的样品中的凝溶胶蛋白样多肽量。在一个实施方案中,所述方法进一步包括使来自所述哺乳动物受试者的样品中的凝溶胶蛋白样多肽量与所述受试者的存活可能性相关联。

[0018] 另一方面,本发明提供了一种用于监测哺乳动物受试者中的肾衰竭的方法,该方法包括下列步骤:(a) 测定哺乳动物受试者的尿中的凝溶胶蛋白样多肽水平;(b) 比较所述哺乳动物受试者中的凝溶胶蛋白样多肽水平与参照水平,其中所述参照水平包括未患有肾衰竭的对照受试者,且其中与所述参照水平相比所述受试者中的凝溶胶蛋白样多肽水平升高指明所述哺乳动物受试者患有肾衰竭。

[0019] 另一方面,本发明提供了一种用于为哺乳动物受试者选择预防性或治疗性处理的方法,包括下列步骤:(a) 测定所述哺乳动物受试者中的凝溶胶蛋白样多肽水平;(b) 基于所述受试者的凝溶胶蛋白多肽水平将所述受试者归入受试者类;并(c) 基于所述受试者类选择预防性或治疗性处理。

[0020] 另一方面,本发明提供了一种为用于测定化合物预防或治疗哺乳动物受试者中与凝溶胶蛋白水平改变有关的医学状况的功的临床试验选择所包括的哺乳动物受试者的方法,包括下列步骤:(a) 测量来自所述哺乳动物受试者的样品中的凝溶胶蛋白样多肽水平;(b) 比较所述受试者中的凝溶胶蛋白水平与参照水平,其中所述参照水平包含未患有与凝溶胶蛋白水平改变有关的疾病或状况的对照群体;并(c) 选择在临床试验中的所包括的哺乳动物受试者,其中来自所述哺乳动物受试者的样品中的凝溶胶蛋白样多肽水平与所述参照标准中的水平相似 (wherein a similarity in the level of the gelsolin-like polypeptide in the same from the mammalian subject is similar to the level in thereference standard)。

[0021] 另一方面,本发明提供了一种抗体或其抗原结合片段,其与由选自下组的保藏细胞系所生成的抗体具有相同的抗原结合特异性:CGMCC 编号 2247 和 2248。在一个实施方案中,本发明提供了一种编码所述抗体或其抗原结合片段的分离的核酸。在一个实施方案中,编码所述抗体或其抗原结合片段的分离的核酸包含在载体中。该载体还可以包含与所述核酸分子可操作连接的启动子以指导载体中含有的编码所述抗体或其抗原结合片段的核酸的表达。一方面,本发明提供了包含编码所述抗体或其抗原结合片段的载体的宿主细胞。

[0022] 一方面,本发明提供了一种连续细胞系,其生成单克隆抗体,其中所述单克隆抗体与由选自下组的杂交瘤细胞系所生成的抗体结合相同的抗原决定簇:CGMCC 编号 2247 和 2248,其中所述细胞系是通过融合如下的淋巴细胞与小鼠骨髓瘤细胞的方法生成的,所述淋巴细胞是自用癌细胞或其免疫原性决定簇免疫的小鼠衍生的。

[0023] 附图简述

[0024] 图 1 是对用抗凝溶胶蛋白抗体免疫沉淀的人尿凝溶胶蛋白的 SDS-PAGE 分析。每道中的样品如下:第 1 道-第 3 道:健康对照患者;第 4 道-第 8 道:严重中风 (ICU) 患者。顶部小图描绘了用 N 端特异性抗凝溶胶蛋白抗体 GN3E9 免疫沉淀的样品。底部小图描绘了用 C 端特异性抗凝溶胶蛋白抗体 GC1C10 免疫沉淀的样品。

[0025] 图 2 是健康对照受试者（第 1 道 - 第 3 道）或 ICU 患者（第 4 道 - 第 8 道）中经免疫沉淀的尿蛋白质的 SDS-PAGE 的 Western 印迹。图 2A 描绘了用 N 端特异性抗凝溶胶蛋白抗体 GN3E9 免疫沉淀并使用 N 端特异性抗体 GN3E9 检测的样品。图 2B 描绘了用 C 端特异性抗凝溶胶蛋白抗体 GC1C10 免疫沉淀并使用 C 端特异性抗体 GC1C10 检测的样品。

[0026] 图 3 是健康对照受试者（第 1 道 - 第 3 道）或 ICU 患者（第 4 道 - 第 8 道）中经免疫沉淀的尿蛋白质的 SDS-PAGE 的 Western 印迹。样品用抗凝溶胶蛋白抗体 GC5D1 免疫沉淀，并使用 C 端特异性抗体 GF2D6 检测。

[0027] 图 4 是光密度对凝溶胶蛋白片段浓度的曲线图，其显示了全长 (FL)、N 端特异性 (NT)、或 C 端 (CT) 凝溶胶蛋白片段的定量测定，其通过使用作为捕捉抗体的 GC5D1 和作为检测抗体的 C 端特异性抗体 GF2D6 进行的 ELISA 测定法来实现。

[0028] 图 5A 和图 5B 是对照受试者和患有各种形式的外伤的患者中使用本发明的凝溶胶蛋白 ELISA 测定法所测量的尿凝溶胶蛋白浓度的图形。C 端特异性抗体 GC5D1 是捕捉抗体，而 C 端特异性抗体 GF2D6 是检测抗体。

[0029] 图 6 的图形显示了患者匹配样品中使用本发明的凝溶胶蛋白 ELISA 测定法测量的血清凝溶胶蛋白水平与尿凝溶胶蛋白样多肽之间的关联。

[0030] 发明详述

[0031] 总论。应当领会的是，下文以多种水平详细描述了本发明的某些方面、模式、实施方案、变化形式和特征，以便提供对本发明的实质理解。

[0032] 一般而言，本发明提供了能结合凝溶胶蛋白多肽的凝溶胶蛋白结合剂（例如抗体）。本发明的凝溶胶蛋白结合剂对于检测测试样品中的凝溶胶蛋白多肽（也称为靶多肽）以及在用于自生物学样品纯化凝溶胶蛋白蛋白质的方法中是有用的（单独地或组合地）。凝溶胶蛋白结合剂可用于诊断有所需要的受试者中的凝溶胶蛋白相关医学状况。表 1 中显示了人凝溶胶蛋白多肽的氨基酸序列 (SEQ ID NO. :1)。

[0033]

表 1 :人凝溶胶蛋白多肽序列

```

MAPHRPAPALLCALSLALCALSLPVRAATASRGASQAGAPQGRVPEARPNMVEHPEFLKAGKEPGLQI
WRVEKFDLVPVPTNLVYDFFTGDAYVILKTVQLRNGNLQYDLHYWLGNECSQDESGAAAIFTVQLDDYLN
GRAVQHREVVQGFESATFLGYFKSGLKYKGGVAVSGFKHVVPNEVVVQRLFQVKGRRVVRATEVPSWESF
NNGDCFILDLGNNIHQWCGSNSNRYERLKATQVSKGIRDNERSGRARVHVSEEGTEPEAMLQVLGPKPAL
PAGTEDTAKEDAANRKLAKLYKVSNGAGTMSVSLVADENPFAQGALKSEDCFILDHGKDGKIFVWKGKQA
NTEERKAALKTASDFITKMDYPKQTQVSVLPEGGETPLFKQFFKNWRDPDQTDGLGLSYLSSHIANVERV
PFDAATLHTSTAMAAQHGMDDGTGQKIWRIEGSNKVPVDPATYQQFYGGDSYIILYNYRHGGRQQQII
YNWQGAQSTQDEVAASAILTAQLDEELGGTPVQSRVVQKPEAHLMSLFGGKPMIYKGGTSREGGQTAP
ASTRLFQVRANSAGATRAVEVLKAGALNSNDAFVLKTPSAAYLVWGTGASEAEKTGAQELLRVLRAQPV
QVAEGSEPDGFWEALGGKAAAYRTSPRLKDKMDAHPRLFACSNKIGRFVIEEVPGELMQEDLATDDVML
LDTWDQVFVWVGKDSQEEKTEALTSAKRYIETDPANRDRRTPITVVKQGFEPSPFVWFLGWDDDYWSV
DPLDRAMAELAA (SEQ ID NO. :1)

```

[0034] 在一些实施方案中，本发明的凝溶胶蛋白结合剂（例如抗凝溶胶蛋白或抗凝溶胶蛋白样抗体）检测有活性的、或未结合的形式凝溶胶蛋白。虽然不希望限于理论，游离的

和复合的（与肌动蛋白）凝溶胶蛋白分子在其功能特性上有所不同。虽然游离的凝溶胶蛋白能切断肌动蛋白丝，但是复合物中的肌动蛋白-凝溶胶蛋白不能。凝溶胶蛋白的切断活性受到微摩尔 Ca^{2+} 活化，而且已经显示了受到磷脂酰肌醇二磷酸（ PIP_2 ）和磷脂酰肌醇一磷酸（PIP）抑制。因为胞外的 Ca^{2+} 浓度处于毫摩尔水平，而细胞外液正常情况下不含处于抑制凝溶胶蛋白的形式的 PIP 或 PIP_2 ，所以血浆凝溶胶蛋白在细胞外液中是组成性有活性的。

[0035] 本发明的多个方面进一步涉及如下诊断方法和试剂盒，它们使用本发明的凝溶胶蛋白结合剂来鉴定有医学状况素因的个体或关于药物响应性、副作用、或最佳药物剂量来对个体分类。在其它方面，本发明提供了用于从生物学样品纯化凝溶胶蛋白或凝溶胶蛋白样多肽（包括例如自血浆纯化天然人凝溶胶蛋白）的方法。因而，随后为例示这些方面的多个具体的实施方案。

[0036] 在实施本发明中，使用分子生物学、蛋白质生化、细胞生物学、免疫学、微生物学和重组 DNA 中的许多常规技术。这些技术是公知的，而且记载于例如 Current Protocols in Molecular Biology, 卷 I-III, Ausubel 编 (1997); Sambrook 等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第二版 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989)); DNA Cloning: A Practical Approach, 卷 I 和卷 II, Glover 编 (1985); Oligonucleotide Synthesis, Gait 编 (1984); Nucleic Acid Hybridization, Hames 和 Higgins 编 (1985); Transcription and Translation, Hames 和 Higgins 编 (1984); Animal Cell Culture, Freshney 编 (1986); Immobilized Cells and Enzymes (IRL Press, 1986); Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning; 丛书 Meth. Enzymol., (Academic Press, Inc., 1984); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells, Miller 和 Calos 编 (Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1987)); 及 Meth. Enzymol., 第 154 卷和第 155 卷, 分别由 Wu 和 Grossman, 及 Wu 编。用于检测和测量多肽基因表达产物的水平（即基因翻译水平）的方法是本领域中公知的，并且包括使用多肽检测方法诸如抗体检测和量化技术。还可参见 Strachan 和 Read, Human Molecular Genetics, 第二版 (John Wiley and Sons, Inc., New York (1999))。

[0037] 除非另有定义，本文中所使用的所有技术和科学术语一般与本发明所属领域普通技术人员通常的理解具有相同的含义。如本说明书和所附的权利要求书中所使用的，单数形式“一个”、“一种”和“所述”包括复数所指物，除非内容另有明确指明。例如，提及“一个/种细胞”包括两个/种或更多个/种细胞的组合等。一般而言，本文中所使用的术语和下文所描述的细胞培养、分子遗传学、有机化学、分析化学和核酸化学和杂交的实验室规程是那些本领域中公知且通常采用的。本文通过提及而完整且出于所有目的收录本文中所引用的所有参考文献，其程度就像出于所有目的明确且单独通过提及而完整收录每篇单独的出版物、专利、或专利申请一样。

[0038] 定义。下文提供了如本说明书中所使用的某些术语的定义。其它术语的定义可见于 Illustrated Dictionary of Immunology, 第 2 版 (Cruse, J. M. 和 Lewis, R. E. 编, Boca Raton, FL: CRC Press, 1995)。除非另有指明，术语“凝溶胶蛋白”在本文中使用时指人蛋白质和基因。

[0039] 如本文中所使用的，向受试者“施用”药剂或药物包括向受试者导入或投递化合物以执行其预期功能的任何路径。施用可以通过任何合适的路径来实施，包括口服、鼻内、胃

肠外（静脉内、肌肉内、腹膜内、或皮下）、直肠、或表面。施用包括自我施用和由他人施用。还应当领会的是，如所描述的医学状况的治疗或预防的各种模式意图意味着“基本上的/实质性的”（substantial），其包括总体的，但还包括小于总体的治疗或预防，及其中实现一些生物学或医学有关结果的。

[0040] 如本文中所使用的，术语“氨基酸”包括天然存在的氨基酸和合成的氨基酸，以及氨基酸类似物和以类似于天然存在的氨基酸的方式发挥功能的氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸是那些由遗传密码编码的氨基酸，以及那些随后进行修饰的氨基酸，例如羟脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸、和 O-磷酸丝氨酸。氨基酸类似物指具有与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构（即与氢、羧基基团、氨基基团、和 R 基团结合的 α -碳）的化合物，例如高丝氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸亚砷、甲硫氨酸甲基硫。此类类似物具有经过修饰的 R 基团（例如正亮氨酸）或经过修饰的肽主链，但是保留与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构。氨基酸模拟物指具有不同于氨基酸一般化学结构的结构但以类似于天然存在的氨基酸的方式发挥功能的化学化合物。氨基酸在本文中可以通过它们通常所知道的三字母符号或通过由 IUPAC-IUB 生化命名委员会推荐的单字母符号来提及。

[0041] 如本文中所使用的，术语“抗体”指特异性结合和识别抗原（例如凝溶胶蛋白多肽）的包含来自免疫球蛋白基因的框架区的多肽或其片段。术语抗体的使用意图包括完整抗体（包括单链完整抗体）及其抗原结合片段。术语“抗体”包括双特异性抗体和多特异性抗体，只要它们展现出想要的生物学活性或功能。

[0042] 如本文中所使用的，术语“抗体相关多肽”指可以包含单独的或与全部或部分下列多肽元件组合的可变区的抗原结合抗体片段（包括单链抗体）：抗体分子的铰链区、CH₁、CH₂、和 CH₃ 域。本发明中还包括的是可变区与铰链区、CH₁、CH₂、和 CH₃ 域的任意组合。作为本发明的结合剂有用的抗体相关分子包括例如但不限于 Fab、Fab' 和 F(ab')₂、Fd、单链 Fv(scFv)、单链抗体、二硫化物连接的 Fv(sdFv) 和包含 V_L 域或 V_H 域的片段。例子包括：(i) Fab 片段，即一种由 V_L 域、V_H 域、C_L 域和 CH₁ 域组成的单价片段；(ii) F(ab')₂ 片段，即一种包含通过铰链区处的二硫桥连接的两个 Fab 片段的二价片段；(iii) Fd 片段，其由 V_H 域和 CH₁ 域组成；(iv) Fv 片段，其由抗体单臂的 V_L 域和 V_H 域组成，(v) dAb 片段 (Ward 等, Nature 341 :544-546, (1989)), 其由 V_H 域组成；和 (vi) 分离的互补决定区 (CDR)。因此，“抗体片段”可以包含全长抗体的一部分，一般是其抗原结合区或可变区。抗体片段的例子包括 Fab、Fab'、F(ab')₂、和 Fv 片段；双抗体；线性抗体；单链抗体分子；和自抗体片段形成的多特异性抗体。单链抗体分子可以包含具有许多个体分子的聚合物，例如二聚物、三聚物或其它聚合物。

[0043] 如本文中所使用的，术语“CDR 嫁接抗体”指如下的抗体，其中“受体”抗体的至少一个 CDR 用来自拥有想要的抗原特异性的“供体”抗体的 CDR “嫁接物”替换。

[0044] 如本文中所使用的，术语“嵌合抗体”指如下的抗体，其中来自一个物种的单克隆抗体的 Fc 恒定区（例如小鼠 Fc 恒定区）使用重组 DNA 技术用来自另一个物种的抗体的 Fc 恒定区（例如人 Fc 恒定区）替换。一般而言，参见 Robinson 等, PCT/US86/02269；Akira 等, 欧洲专利申请 184, 187；Taniguchi, 欧洲专利申请 171, 496；Morrison 等, 欧洲专利申请 173, 494；Neuberger 等, W086/01533；Cabilly 等, 美国专利号 4, 816, 567；Cabilly 等, 欧洲专利申请 125, 023；Better 等, Science 240 :1041-1043(1988)；Liu 等, Proc.

Natl. Acad. Sci. USA 84 :3439-3443(1987) ;Liu 等, J. Immunol 139 :3521-3526(1987) ; Sun 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 :214-218(1987) ;Nishimura 等, Cancer Res 47 :999-1005(1987) ;Wood 等, Nature 314 :446-449(1985) ; 及 Shaw 等, J. Natl. Cancer Inst. 80 :1553-1559(1988)。

[0045] 如本文中所使用的,术语“临床响应”指任何或所有以下各项:不利的响应(即副作用)、无响应、和响应的定量测量。

[0046] 如本文中所使用的,术语“临床试验”指设计用于收集关于对特定处理的响应的临床数据的任何调查研究,并且包括但不限于 I 期、II 期、和 III 期临床试验。使用标准方法来限定患者群体和登记受试者。

[0047] 如本文中所使用的,术语“共有 FR”指共有免疫球蛋白序列中的框架 (FR) 抗体区。抗体的 FR 区不接触抗原。

[0048] 如本文中所使用的,术语“双抗体”指具有两个抗原结合位点的小抗体片段,该片段包含同一多肽链中相连接的重链可变域 (V_H) 与轻链可变域 (V_L) ($V_H V_L$)。通过使用短得不能容许同一条链上的两个域之间配对的接头,迫使这些域与另一条链的互补域配对,并创建两个抗原结合位点。双抗体更全面地记载于例如 EP 404,097 ;WO 93/11161 ;及 Hollinger 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90 :6444-6448(1993)。

[0049] 如本文中所使用的,术语“效应细胞”指牵涉免疫应答的效应器阶段(与免疫应答的认知和活化阶段形成对比)的免疫细胞。例示性的免疫细胞包括骨髓或淋巴起源的细胞,例如淋巴细胞(例如 B 细胞和 T 细胞,包括溶细胞性 T 细胞 (CTL))、杀伤细胞、天然杀伤细胞、巨噬细胞、单核细胞、嗜曙红细胞、嗜中性粒细胞、多形核细胞、粒细胞、肥大细胞、和嗜碱细胞。效应细胞表达特定的 Fc 受体,并实施特定的免疫功能。效应细胞能诱导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC),例如能够诱导 ADCC 的嗜中性粒细胞。例如,表达 $Fc\alpha R$ 的单核细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、嗜曙红细胞、和淋巴细胞牵涉特异性杀伤靶细胞,并将抗原呈递至免疫系统的其它成分,或结合呈递抗原的细胞。效应细胞还能吞噬靶抗原、靶细胞、转移癌细胞、或微生物。

[0050] 如本文中所使用的,术语“表位”指能够特异性结合抗体的蛋白质决定簇。表位通常由有化学活性的表面分子诸如氨基酸或糖侧链组成,而且通常具有特定的三维结构特征,以及特定的电荷特征。构象性和非构象性表位的区别在于在存在变性溶剂的情况下丧失对前一种而非后一种的结合。在一个实施方案中,凝溶胶蛋白的“表位”是凝溶胶蛋白蛋白质中与本发明的凝溶胶蛋白结合剂结合的区域。在本发明的挑选的实施方案中,此表位在跨越 SEQ ID NO. :1 中自约 321 至约 330、自约 636 至约 645、或自约 661 至 670 氨基酸残基的域中。

[0051] 为了筛选结合表位的凝溶胶蛋白结合剂,可以实施常规的交叉阻断测定法,诸如记载于 Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow 和 David Lane(1988) 的。可以使用此测定法来测定凝溶胶蛋白结合剂是否与本发明的凝溶胶蛋白抗体结合相同位点或表位。或者/另外,可以通过本领域中已知的方法来实施表位作图。例如,可以通过诸如丙氨酸扫描来诱变抗体序列以鉴定接触残基。在一种不同的方法中,可以在用多种测试抗体或用一种测试抗体和一种具有已表征或已知表位的抗体进行的竞争测定法中使用与凝溶胶蛋白的不同区域对应的肽。

[0052] 如本文中所使用的,组合物的术语“有效量”或“药学有效量”或“治疗有效量”指足以实现想要的治疗和/或预防效果的数量,例如,导致所治疗的疾病(例如与靶多肽(例如凝溶胶蛋白或凝溶胶蛋白样多肽)有关的疾病或医学状况)有关的症状的预防或减少/减轻的量。向受试者施用的本发明组合物的量会取决于疾病的类型和严重性,并取决于个体的特征,诸如一般健康、年龄、性别、体重和对药物的耐受。它还会取决于疾病的程度、严重性和类型。熟练技术人员会能够根据这些和其它因素来确定合适的剂量。还可以与一种或多种别的治疗化合物组合施用本发明的组合物。在本发明的方法中,可以向具有由疾病或外伤状况引起的凝溶胶蛋白水平降低的受试者施用凝溶胶蛋白,由此提高受试者中血浆凝溶胶蛋白的水平。例如,凝溶胶蛋白的“治疗有效量”指最少游离的胞外肌动蛋白的毒性效应得到改善的水平。

[0053] 如本文中所使用的,“表达”包括但不限于以下一项或多项:基因转录成前体 mRNA;对前体 mRNA 的剪接和其它加工以生成成熟 mRNA;mRNA 稳定性;成熟 mRNA 翻译成蛋白质(包括密码子选择和 tRNA 可用性);和对翻译产物的糖基化和/或其它修饰,若正确的表达和功能需要的话。

[0054] 如本文中所使用的,术语“凝溶胶蛋白”指一种多功能性肌动蛋白结合蛋白。在哺乳动物中,凝溶胶蛋白包含两种同等型:胞质变体和胞外变体。人血浆凝溶胶蛋白与细胞凝溶胶蛋白的不同之处仅在于向该分子的 N 端添加约 25 个氨基酸,并且两种凝溶胶蛋白都是单基因的产物。血浆凝溶胶蛋白具有三个肌动蛋白结合位点,而且以高亲和力结合 G-肌动蛋白或 F-肌动蛋白。“凝溶胶蛋白”还指重组形式的哺乳动物多肽。

[0055] 如本文中所使用的,“凝溶胶蛋白样多肽”指不同于凝溶胶蛋白多肽但与本发明的凝溶胶蛋白结合剂有免疫学反应性的多肽。凝溶胶蛋白样多肽可以衍生自与凝溶胶蛋白多肽相同的生物体或不同的生物体。凝溶胶蛋白样多肽可以由与凝溶胶蛋白多肽相同的基因或不同的基因编码。凝溶胶蛋白样多肽可以是凝溶胶蛋白多肽的免疫反应性片段(例如 C 端片段)。

[0056] 如本文中所使用的,术语“基因”指中含有关于 RNA 产物受调节的生物合成的所有信息的 DNA 区段,包括启动子、外显子、内含子、及其它控制表达的非翻译区。

[0057] 如本文中所使用的,术语“人序列抗体”包括具有自人种系免疫球蛋白序列衍生的可变区和恒定区(若存在的话)的抗体。本发明的人序列抗体可以包括不由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如通过体外随机或定点诱变或通过体内体细胞突变引入的突变)。可以在非人转基因动物中生成此类抗体,例如如记载于 PCT 公开文本号 WO 01/14424 和 WO 00/37504 的。然而,如本文中所使用的,术语“人序列抗体”并不意图包括如下抗体,其中已经将自另一种哺乳动物物种(诸如小鼠)的种系衍生的 CDR 序列嫁接至人框架序列上(例如人源化抗体)。

[0058] 如本文中所使用的,非人(例如鼠)抗体的术语“人源化”形式指最低限度含有衍生自非人免疫球蛋白的序列的嵌合抗体。在极大程度上,人源化抗体指如下的人免疫球蛋白,即受体的高变区残基用具有期望特异性、亲和力、和能力的非人物种(供体抗体)诸如小鼠、大鼠、家兔或非人灵长类动物的高变区残基替换。在有些情况中,将人免疫球蛋白的 Fv 框架区(FR)残基用相应的非人残基替换。此外,人源化抗体可以包含在受体抗体中或在供体抗体中没有找到的残基。进行这些修饰以进一步改进抗体的性能诸如结合亲和力。一

一般而言,人源化抗体会包含至少一个,通常两个基本上如下的整个可变域,其中所有或基本上所有高变环对应于非人免疫球蛋白的那些,且所有或基本上所有FR区是人免疫球蛋白序列的那些,尽管FR区可以包含一处或多处改善结合亲和力的氨基酸替代。FR中这些氨基酸替代的数目通常在H链中不超过6处,而在L链中不超过3处。人源化抗体任选还会包含免疫球蛋白恒定区(Fc)(通常是人免疫球蛋白的)的至少一部分。更多细节参见Jones等, *Nature* 321:522-525(1986); Reichmann等, *Nature* 332:323-329(1988); 和 Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596(1992)。

[0059] 涵盖对本文中所述的凝溶胶蛋白抗体的“氨基酸序列修饰”。例如,可能想要改善抗体的结合亲和力和/或其它生物学特性。通过将合适的核苷酸变化引入抗体核酸中,或者通过肽合成来制备凝溶胶蛋白抗体的氨基酸序列变体。此类修饰包括例如凝溶胶蛋白抗体氨基酸序列内的残基的删除、和/或插入和/或替代。进行删除、插入、和替代的任意组合以获得感兴趣的抗体,只要所获得的抗体拥有想要的特性。修饰还包括蛋白质糖基化样式的改变。一种对鉴定优选的诱变位置有用的方法称作“丙氨酸扫描诱变”,如记载于Cunningham和Wells,于 *Science*, 244:1081-1085(1989)的。然后对突变抗体筛选想要的活性。本发明包括具有由杂交瘤GC1C10、CN3E9、GF2D6、GC5D1、GC4A10所限定的氨基酸序列的一处或多处氨基酸添加、删除和/或替代的抗体变体,倘若所述抗体变体拥有想要的特性,所述杂交瘤分别具有CGMCC编号2114、2115、2116、2247和2248。

[0060] 如本文中所使用的,术语“高变区”指抗体中负责抗原结合的氨基酸残基。一般而言,高变区包含来自“互补决定区”或“CDR”的氨基酸残基(例如, V_L 中大约残基24-34(L1)、50-56(L2)和89-97(L3)附近及 V_H 中大约残基31-35B(H1)、50-65(H2)和95-102(H3)附近(Kabat等, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))和/或那些来自“高变环”的残基(例如 V_L 中的残基26-32(L1)、50-52(L2)和91-96(L3)及 V_H 中的残基26-32(H1)、52A-55(H2)和96-101(H3)(Chothia和Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917(1987))。

[0061] 如本文中所使用的,术语“相同的”或百分比“同一性”在两种或更多种核酸或多肽序列的语境中使用指根据用下文所描述的缺省参数使用的BLAST或BLAST 2.0序列比较算法,或者通过手动比对和目视检查(参见例如NCBI网站)的测量,两种或更多种序列或亚序列相同或具有规定百分比的相同氨基酸残基或核苷酸(即,在为实现最大对应而在比较窗或指定区域里比较和比对时,在规定区域(例如,编码本文中所描述的抗体的核苷酸序列或本文中所描述的抗体的氨基酸序列)里约60%同一性,优选65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或更高的同一性)。然后此类序列被说成是“基本上相同的”。此术语还指,或者可以应用于测试序列的互补物。该术语还包括具有删除和/或添加的序列,以及那些具有替代的序列。该算法可以考虑缺口等。典型地,在长至少约25个氨基酸或核苷酸的区域里,或者在长至少约50-100个氨基酸或核苷酸的区域里存在同一性。

[0062] “分离的”或“纯化的”多肽或其生物学活性部分是基本上没有细胞物质或来自衍生凝溶胶蛋白结合剂的细胞或组织来源的其它污染性多肽,或者在化学合成时基本上没有化学前体或其它化学品。例如,分离的凝溶胶蛋白结合剂(其是抗凝溶胶蛋白或抗凝溶胶

蛋白样抗体)会没有会干扰该药剂的诊断或治疗用途的物质。此类干扰性物质可以包括酶、激素和其它蛋白质性质的和非蛋白质性质的溶质。或者,分离的凝溶胶蛋白或凝溶胶蛋白样多肽(其与本发明的凝溶胶蛋白结合剂有免疫反应性)会基本上没有会干扰该多肽的诊断或治疗用途的物质。

[0063] 如本文中所使用的,术语“完整抗体”指具有通过二硫键相互联结的至少两条重(H)链多肽和两条轻(L)链多肽的抗体。每条重链由重链可变区(在本文中缩写为HCVR或 V_H)和重链恒定区构成。重链恒定区由三个域,即 CH_1 、 CH_2 和 CH_3 构成。每条轻链由轻链可变区(在本文中缩写为LCVR或 V_L)和轻链恒定区构成。轻链恒定区由一个域,即 C_L 构成。可以将 V_H 区和 V_L 区进一步细分成高变性区域(称作互补决定区(CDR)),其散布有更保守的区域(称作框架区(FR))。每个 V_H 和 V_L 由三个CDR和四个FR构成,从氨基端至羧基端以如下次序排列:FR₁、CDR₁、FR₂、CDR₂、FR₃、CDR₃、FR₄。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合域。抗体的恒定区能介导免疫球蛋白对宿主组织或因子的结合,包括免疫系统的多种细胞(例如效应细胞)和经典补体系统的第一成分(C1q)。

[0064] 如本文中所使用的,术语“免疫学交叉反应性”和“免疫学反应性”可互换使用,指抗原与使用相同(“免疫学反应性”)或不同(“免疫学交叉反应性”)抗原生成的抗体有特异性反应性。一般而言,抗原是凝溶胶蛋白或凝溶胶蛋白样多肽,其变体或亚序列。

[0065] 如本文中所使用的,术语“免疫学反应性条件”指容许针对抗原的特定表位生成的抗体以可检测出的如下程度结合该表位的条件,所述程度大于该抗体结合基本上所有其它表位,一般至少超出背景结合两倍,优选至少超出背景五倍。免疫学反应性条件依赖于抗体结合反应的形式,并且通常是那些在免疫测定方案中利用的。关于免疫测定法形式和条件的描述参见Harlow和Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Publications, New York (1988))。

[0066] 如本文中所使用的,术语“医学状况”包括但不限于如想要治疗和/或预防的一种或多种身体和/或心理症状所表现的任何状况或疾病,并且包括先前和新近鉴定的疾病和其它病症。例如,医学状况可以是肝炎、SLE、癌症、肾衰竭、感染性休克、中风、癌症、心肌梗死、及化学疗法和放射疗法的副作用。

[0067] 如本文中所使用的,术语“单克隆抗体”指从一群基本上同质的抗体获得的抗体,即构成群体的各个抗体是相同的,除了可以以极少量存在的可能的天然存在突变外。例如,单克隆抗体可以是自单一克隆(包括任何真核、原核、或噬菌体克隆)衍生的抗体,而非生成其的方法。单克隆抗体组合物展示针对特定表位的单一结合特异性和亲和力。单克隆抗体是高度特异性的,针对单一抗原性位点。此外,与通常包含针对不同决定簇(表位)的不同抗体的常规(多克隆)抗体制备物不同,每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。修饰语“单克隆”指明如自一群基本上同质的抗体获得的抗体的特征,而不应解释为要求通过任何特定方法来生成抗体。可以使用本领域中已知的极其多种技术来制备单克隆抗体,包括例如但不限于杂交瘤、重组、和噬菌体展示技术。例如,要依照本发明使用的单克隆抗体可以通过最初由Kohler等, *Nature* 256:495 (1975) 描述的杂交瘤方法来制备,或者可以通过重组DNA方法来制备(参见例如美国专利No. 4,816,567)。“单克隆抗体”还可以使用例如Clackson等, *Nature* 352:624-628 (1991) 及Marks等, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991) 中记载的技术从噬菌体抗体库分离。

[0068] 如本文中所使用的,术语“药学可接受载体”意图包括与药学施用相容的任何和所有溶剂、分散介质、涂层、抗细菌和抗真菌化合物、等张和吸收延迟化合物等。

[0069] 如本文中所使用的,术语“多克隆抗体”指自至少两种 (2) 不同抗体生成细胞系衍生的抗体的制备物。此术语的使用包括至少两种 (2) 抗体的制备物,其含有特异性结合抗原的不同表位或区域的抗体。

[0070] 如本文中所使用的,术语“多核苷酸”或“核酸”指任何 RNA 或 DNA,其可以是未修饰的或经修饰的 RNA 或 DNA。多核苷酸包括但不限于单链和双链 DNA,单链和双链区混合物的 DNA、单链和双链 RNA、单链和双链区混合物的 RNA、和包含 DNA 和 RNA 的杂合分子,其中所述 DNA 和 RNA 可以是单链或者 (更典型地) 双链或单链和双链区的混合物。另外,多核苷酸指包含 RNA 或 DNA 或 RNA 和 DNA 两者的三链区。术语多核苷酸还包括含有一个或多个经修饰的碱基的 DNA 或 RNA 和具有经修饰的主链的 DNA 或 RNA,所述修饰是出于稳定性或出于其它原因。在一个具体的实施方案中,多核苷酸含有来自凝溶胶蛋白基因的多核苷酸序列。

[0071] 如本文中所使用的,术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用,指包含两个或更多个彼此由肽键或修饰的肽键 (即肽等排体) 相连接的氨基酸的聚合物。多肽指短链 (通常称为肽、糖肽或寡聚物) 和较长的链 (通常称为蛋白质) 两者。多肽可以含有 20 种由基因编码的氨基酸以外的氨基酸。多肽包括通过天然过程 (诸如翻译后加工) 或通过本领域中公知的化学修饰技术修饰的氨基酸序列。此类修饰详细记载于基础教科书和更详细的专著,以及多卷的研究文献中。在一个具体的实施方案中,多肽含有来自凝溶胶蛋白蛋白质的多肽序列。

[0072] 如本文中所使用的,术语“群体”可以是至少两个个体的任何组。群体可以包括例如但不限于参照群体、群体组、家族群体、临床群体、和相同性别的群体。

[0073] 如本文中所使用的,术语“重组”在提及例如细胞、或核酸、蛋白质、或载体使用时指明已经通过引入异源核酸或蛋白质或对天然核酸或蛋白质的改变而修饰的细胞、核酸、蛋白质或载体,或者该物质衍生自如此修饰的细胞。如此,例如重组细胞表达在天然 (非重组) 形式的细胞内没找到的基因或者表达在其它情况中异常表达、表达不足或根本不表达的天然基因。

[0074] 如本文中所使用的,术语“参照水平”指可出于比较目的而感兴趣的生物标志的量或浓度 (例如凝溶胶蛋白或凝溶胶蛋白样多肽的水平)。在一个实施方案中,参照水平可以是以自健康受试者的对照群体采集的至少一种生物标志的水平的平均值表示的至少一种生物标志的水平。在另一个实施方案中,参照水平可以是较早时间时 (即本测定法前) 同一受试者中的至少一种生物标志的水平。在又一个实施方案中,参照水平可以是接受治疗方案前受试者中的至少一种生物标志的水平。

[0075] 如本文中所使用的,术语“参照标准”指施用化合物前在参照标准群体或单一受试者中观察到的一种或多种基因或蛋白质的表达样式。“参照标准群体”指以一项或多项生物学特征 (例如药物响应性、基因型、单元型、表型等) 表征的群体。

[0076] 如本文中所使用的,短语“补救受体结合表位”指 IgG 分子 (例如 IgG₁、IgG₂、IgG₃、或 IgG₄) Fc 区中负责延长 IgG 分子的体内血清半衰期的表位。为了延长抗体的血清半衰期,可以将补救受体结合表位引入抗体 (特别是抗体片段) 中,如记载于例如美国专利 5,739,277 的。

[0077] 如本文中所使用的,术语“样品”指自活细胞衍生的或由活细胞接触的样品材料。术语“样品”意图包括自受试者分离的组织、细胞和生物学液体,以及存在于受试者内的组织、细胞和液体。本发明的生物学样品包括例如但不限于全血、血浆、精液、唾液、泪液、尿液、粪便材料、汗液、口腔、皮肤、脑脊髓液、和毛发。生物学样品还可以获自内脏活组织检查或者获自癌症。生物学样品可以获自受试者(用于诊断或研究),或者可以获自未患病个体(作为对照或用于基础研究)。

[0078] 如本文中所使用的,术语“单链抗体”或“单链 Fv(scFv)”指 Fv 片段的两个域(即 V_L 和 V_H) 的抗体融合分子。虽然 Fv 片段的两个域(即 V_L 和 V_H) 由分开的基因编码,但是它们可以使用重组方法通过使它们能够以单一蛋白质链制备的合成接头连接,在所述单一蛋白质链中 V_L 和 V_H 区配对以形成单价分子(称为单链 Fv(scFv))。参见例如 Bird 等, Science 242 :423-426(1988); 及 Huston 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 :5879-5883(1988)。此类单链抗体被包括在提及术语“抗体”片段时,并且可以通过重组技术或对完整抗体的酶促或化学切割来制备。

[0079] 如本文中所使用的,术语“特异性结合”指凝溶胶蛋白结合剂和抗原之间以至少 $10^{-6}M$ 的结合亲和力接触。优选的结合剂以至少约 $10^{-7}M$, 且优选 $10^{-8}M$ 至 $10^{-9}M$ 、 $10^{-10}M$ 、 $10^{-11}M$ 、或 $10^{-12}M$ 的亲和力结合。

[0080] 如本文中所使用的,术语“受试者”指受试者是哺乳动物,诸如人,但也可以是动物,例如家畜动物(例如犬、猫等)、牲畜动物(例如牛、绵羊、猪、马等)和实验室动物(例如猴、大鼠、小鼠、家兔、豚鼠等)。

[0081] 如本文中所使用的,术语“替代”是本领域中通常使用的突变之一。那些替代变体使凝溶胶蛋白结合剂中有至少一个氨基酸残基被不同残基替换。最有趣进行替代诱变的位点包括高变区,但是也涵盖 FR 改变。下表中“优选替代”的标题下显示了“保守替代”。如果此类替代导致生物学活性变化,那么可导入表 2 中称为“例示替代”的更实质变化,或如下文参照氨基酸分类进一步所述,并筛选产物。

[0082]

原始残基	例示替代	优选替代
Ala (A)	val; leu; ile	Val
Arg (R)	lys; gln; asn	Lys
Asn (N)	gln; his; asp, lys; arg	Gln
Asp (D)	glu; asn	Glu
Cys (C)	ser; ala	Ser
Gln (Q)	asn; glu	Asn
Glu (E)	asp; gln	Asp
Gly (G)	ala	Ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	Arg

表2: 氨基酸替代

原始残基	例示替代	优选替代
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; 正亮氨酸	Leu
Leu (L)	正亮氨酸; ile; val; met; ala; phe	Ile
Lys (K)	arg; gln; asn	Arg
Met (M)	leu; phe; ile	Leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	tyr; phe	Tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	Phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; 正亮氨酸	Leu

[0083]

[0084] 特别优选的替代变体类型牵涉替代亲本抗体的一个或多个高变区残基。用于生成此类替代变体的一种便利方式牵涉使用噬菌体展示进行的亲和力成熟。具体地,突变数个高变区位点(例如6-7个位点)以在每个位点产生所有可能的氨基酸替代。如此产生的抗体变体以单价形式展示在丝状噬菌体颗粒上,作为与每个颗粒内包装的M13基因III产物的融合物。然后如本文所公开的对噬菌体展示的变体筛选其生物学活性(例如结合亲和力)。为了鉴定用于修饰的候选高变区位点,可以实施丙氨酸扫描诱变以鉴定对抗原结合凝溶胶蛋白具有重要贡献的高变区残基。或者/另外,分析抗原-抗体复合物的晶体结构,以鉴定抗体与凝溶胶蛋白之间的接触点可能是有益的。此类接触残基及邻近残基是依照本文详述的技术进行替代的候选物。一旦产生此类变体,就如本文所述对该组变体进行筛选,并可以选择在一种或多种相关测定法中具有类似或优良特性的抗体用于进一步的开发。本发明包括对由杂交瘤GC1C10、GN3E9、GF2D6、GC5D1、和GC4A10所限定的免疫球蛋白重链或轻链的高变域具有一处或多处氨基酸替代(尤其是保守替代)的抗体变体,倘若所述抗体变体拥有想要的特性,所述杂交瘤分别具有CGMCC编号2114、2115、2116、2247和2248。

[0085] 如本文中所使用的,“测试样品”指自感兴趣的受试者获得的生物样品。例如,测试样品可以是生物学液体(例如血清或尿液)、细胞或组织样品、来自培养物或生长培养液的样品、或自此衍生的分离的核酸或多肽。

[0086] 如本文中所使用的,术语“治疗剂”意图指在以有效量存在时对有所需要的受试者产生想要的治疗效果的化合物。

[0087] 如本文中所使用的,术语“治疗”或“处理”或“缓和”指治疗性处理及预防性或防范性措施二者,其中目标是预防或减缓(减轻)所针对的病理状况或病症。如果依照本发明的方法接受治疗量的天然或重组凝溶胶蛋白后,受试者显示与血清凝溶胶蛋白水平改变

有关的特定疾病或状况的一种或多种体征和症状的可观察到的和 / 或可测量到的减轻和 / 或缺失,那么该受试者成功“治疗”了以凝溶胶蛋白水平降低为特征的病症。

[0088] 如本文中所使用的,术语“可变的”指可变域中的某些区段在抗体序列间差异广泛的实情。V 域介导抗原结合,并限定特定抗体对其特定抗原的特异性。然而,变异性并非在可变域的整个氨基酸跨度间均匀分布。相反,V 区由 15-30 个氨基酸的、称作框架区 (FR) 的相对不变的区段及将框架区分开的每个长 9-12 个氨基酸、称作“高变区”的极度变异的较短区域组成。天然重链和轻链的可变域各自包含四个 FR,它们大多采取 β -折叠片构象,通过形成环状连接且在有些情况中形成 β -折叠片结构一部分的三个高变区连接。每条链中的高变区通过 FR 非常接近的保持在一起,并与另一条链的高变区一起促成抗体的抗原结合位点的形成。(参见 Kabat 等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第 5 版 Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD. (1991))。恒定域不直接参与抗体与抗原的结合,但展现出多种效应器功能,诸如抗体依赖性细胞的细胞毒性 (ADCC) 中抗体的参与。

[0089] I. 本发明的组合物

[0090] A. 凝溶胶蛋白结合剂

[0091] 一方面,本发明提供了凝溶胶蛋白结合剂组合物,也称为结合剂。在一个实施方案中,本发明的结合剂是针对凝溶胶蛋白、凝溶胶蛋白样多肽、其同系物、片段、或衍生物的完整抗体。感兴趣的结合剂可以是特异性结合游离的、全长的、有活性的凝溶胶蛋白,但“实质上”(或“基本上”)不结合与肌动蛋白结合的凝溶胶蛋白的结合剂。在此类实施方案中,本发明的结合剂对这些蛋白质的结合程度会小于约 10%,优选地,或小于约 5%,或小于约 1%,如通过荧光激活细胞分选 (FACS) 分析、ELISA、Western 印迹、或放射性免疫测定法测定的。或者,结合剂(或其组合)可以结合凝溶胶蛋白的片段(例如 C 端片段),但基本上不结合全长凝溶胶蛋白。

[0092] 先前生成具有限定表位(具体地,与功能性凝溶胶蛋白有关的表位)的单克隆抗体的努力大部分未获成功。凝溶胶蛋白是高度保守的蛋白质,而且在物种间是高度同源的。凝溶胶蛋白在血浆中也是丰富的,这就要求其是免疫系统耐受良好的。此外,由于凝溶胶蛋白是主要肌动蛋白结合蛋白的实情,所暴露的表位受到凝溶胶蛋白与肌动蛋白和其它血浆蛋白质复合的限制。虽然已经生成了针对凝溶胶蛋白的一些单克隆抗体(参见 Hiyoshi 等,BiochemMol Biol Int. 32 :755-62(1994)),但是没有用于定量测量血浆凝溶胶蛋白的免疫测定法。

[0093] 本发明人已经发现了使用供免疫接种和筛选两者用的各种形式的人凝溶胶蛋白蛋白质(包括天然凝溶胶蛋白、重组全长凝溶胶蛋白、及 N 端和 C 端凝溶胶蛋白片段)来设计凝溶胶蛋白结合剂的策略。此外,发明人的策略设计成使用免疫应答调控物来破坏对人凝溶胶蛋白常规表位的免疫耐受。此策略的结果是具有限定表位的凝溶胶蛋白结合剂,其容许针对血浆凝溶胶蛋白和 / 或尿凝溶胶蛋白样多肽(即,凝溶胶蛋白片段)的快速的、精确的、和定量的测定法,该测定法可以在临床背景中使用。

[0094] 本发明的结合剂可以关于本发明的多肽中被该结合剂识别或特异性结合的表位或部分(例如凝溶胶蛋白多肽中位于多肽表面上的区域,例如亲水性区域)来描述或规定。在一个实施方案中,本发明提供了针对包含一种或多种选自下组的氨基酸序列的

凝溶胶蛋白多肽（也称为靶多肽）的凝溶胶蛋白结合剂（例如抗体或抗体相关多肽）：FAQGALKSED (SEQ ID NO. :2)、SEPDGFWEAL (SEQ ID NO. :3)、和 ACSNKIGRFV (SEQ ID NO. :4)。

[0095] 在挑选的实施方案中，本发明提供了表 3 中汇总的凝溶胶蛋白结合剂。

[0096]

结合剂	类型	描述
GN3E9	鼠单克隆抗体	针对包含多肽序列FAQGALKSED (SEQ ID NO.:2)的表位的鼠单克隆抗体
GC1C10	鼠单克隆抗体	针对包含多肽序列SEPDGFWEAL (SEQ ID NO.:3)的表位的鼠单克隆抗体

[0097]

结合剂	类型	描述
GF2D6	鼠单克隆抗体	针对具有多肽序列ACSNKIGRFV (SEQ ID NO.:4)的表位的鼠单克隆抗体
GC5D1	鼠单克隆抗体	针对具有多肽序列GASEAEKTGA (SEQ ID NO.:5)的表位的鼠单克隆抗体
GC4A10	鼠单克隆抗体	针对具有多肽序列GASEAEKTGA (SEQ ID NO.:5)的表位的鼠单克隆抗体

[0098] 与表 3 (上文) 中汇总的凝溶胶蛋白结合剂有关的生物学材料的保藏是在中国普通微生物菌种保藏管理中心 (China General Microbiological Culture Collection Center, CGMCC), 中国微生物菌种保藏管理委员会 (China Committee for Culture Collection of Microorganisms), 邮政信箱 2714, 北京 100080, 中华人民共和国进行的, 如下文表 4 中详述的。

[0099]

保藏物名称	材料	日期	编号
GN3E9	小鼠-小鼠杂交瘤	2007年7月20日	2115
GC1C10	小鼠-小鼠杂交瘤	2007年7月20日	2114
GF2D6	小鼠-小鼠杂交瘤	2007年7月20日	2116
GC5D1	小鼠-小鼠杂交瘤	2007年11月6日	2247
GC4A10	小鼠-小鼠杂交瘤	2007年11月6日	2248

[0100] 在另一个实施方案中,本发明提供了一种阐明凝溶胶蛋白的其它表位的方法,其可以用于生成具有结合活性凝溶胶蛋白,而非与肌动蛋白结合的凝溶胶蛋白的想要的特征的抗体。针对所述表位的结合剂可以具有不同的可变区或 CDR 区,但是应当具有本发明抗体的结合和功能特征。作为一种用于靶向抗体生成的手段,可以通过本领域中公知的任何方法来产生显示亲水性和疏水性区域的亲水性图,包括例如 Kyte Doolittle 或 Hopp Woods 方法,进行或不进行傅里叶变换(参见例如 Hopp 和 Woods, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 78 : 3824-3828 (1981) ;Kyte 和 Doolittle, J. Mol. Biol. 157 :105-142 (1982))。可以如本文中所述的那样规定表位或多肽部分,例如按照 N 端和 C 端位置,按照连续氨基酸残基的大小。本发明包括特异性结合本发明多肽的结合剂,而且容许将其排除。本发明包括特异性结合如下表位的结合剂,所述表位是构象性表位或非构象性表位。如上文所记录的,构象性表位或非构象性表位的区别之处在于在存在变性溶剂的情况中丧失对前一种而非后一种的结合。

[0101] 本发明的结合剂还可以关于其交叉反应性来描述或规定。包括不结合本发明靶多肽的任何其它类似物、直向同系物、或同系物的结合剂。本发明中还包括不结合与本发明的多肽具有小于 95%、小于 90%、小于 85%、小于 80%、小于 75%、小于 70%、小于 65%、小于 60%、小于 55%、和小于 50% 同一性(如使用本领域中已知的和本文中所描述的方法计算的)的多肽的结合剂。本发明中进一步包括的是如下结合剂,其仅结合由在严格杂交条件(如本文中所述的)下与本发明的多核苷酸杂交的多核苷酸编码的多肽。

[0102] 本发明的结合剂还可以关于其结合亲和力来描述或规定。优选的结合亲和力包括那些具有小于 $5 \times 10^{-6} \text{M}$ 、 10^{-6}M 、 $5 \times 10^{-7} \text{M}$ 、 10^{-7}M 、 $5 \times 10^{-8} \text{M}$ 、 10^{-8}M 、 $5 \times 10^{-9} \text{M}$ 、 10^{-9}M 、 $5 \times 10^{-10} \text{M}$ 、 10^{-10}M 、 $5 \times 10^{-11} \text{M}$ 、 10^{-11}M 、 $5 \times 10^{-12} \text{M}$ 、 10^{-12}M 、 $5 \times 10^{-13} \text{M}$ 、 10^{-13}M 、 $5 \times 10^{-14} \text{M}$ 、 10^{-14}M 、 $5 \times 10^{-15} \text{M}$ 、和 10^{-15}M 的解离常数或 K_d 的。在一个实施方案中,本发明提供了至少以不高于 1×10^{-8} 的 K_d 值、优选不高于约 1×10^{-9} 的 K_d 值结合人凝溶胶蛋白的凝溶胶蛋白结合剂。

[0103] 本发明范围内的凝溶胶蛋白结合剂包括例如但不限于特异性结合靶多肽、其同系物、衍生物或片段的单克隆、多克隆、嵌合、人源化、双抗体、和人单克隆和人多克隆抗体。作为本发明的结合剂有用的抗体包括例如但不限于 IgG(包括 IgG₁、IgG₂、IgG₃、和 IgG₄)、IgA(包括 IgA₁ 和 IgA₂)、IgD、IgE、或 IgM、和 IgY。

[0104] 在另一个实施方案中,本发明的结合剂是针对凝溶胶蛋白多肽、其同系物或衍生物的抗体相关多肽。典型地,结合剂的抗原结合区(例如抗凝溶胶蛋白结合区)在本发明结合剂的结合特异性和亲和力方面会是最重要的。在一些实施方案中,凝溶胶蛋白结合剂是抗凝溶胶蛋白多肽抗体,诸如抗凝溶胶蛋白多肽单克隆抗体、抗凝溶胶蛋白多肽嵌合抗体、和抗凝溶胶蛋白多肽人源化抗体,其已经通过例如删除、添加、或替代抗体的一部分而得到修饰。

[0105] 在一个实施方案中,对凝溶胶蛋白多肽的特定域特异性的抗体的选择通过生成结合拥有此类域的凝溶胶蛋白多肽片段的杂交瘤来推动。如此,本文中还提供了如下的凝溶胶蛋白结合剂,其是对凝溶胶蛋白多肽内想要的域、或其衍生物、片段、类似物或同系物特异性的抗体。

[0106] 本发明进一步包括本发明结合剂的抗独特型抗体。本发明的结合剂可以是单特异性的、双特异性的、三特异性的或更大多特异性的。多特异性结合剂可以是对本发明凝

溶胶蛋白多肽的不同表位特异性的,或者可以是对本发明的凝溶胶蛋白多肽以及对异源组分诸如异源多肽或固体支持物质两者特异性的。参见例如 WO 93/17715 ;WO 92/08802 ;WO 91/00360 ;WO 92/05793 ;Tutt 等, J. Immunol. 147 :60-69(1991) ;美国专利号 5, 573, 920, 4, 474, 893, 5, 601, 819, 4, 714, 681, 4, 925, 648 ;6, 106, 835 ;Kostelny 等, J. Immunol. 148 :1547-1553(1992)。本发明的结合剂可以来自任何动物来源,包括鸟类和哺乳类。例如,结合剂可以来自人、海洋动物 (marine)、家兔、山羊、豚鼠、骆驼、马、或鸡。

[0107] 可以单独地或与其它组分组合地使用本发明的结合剂。例如,可以与一种或多种本领域中已知的抗凝溶胶蛋白抗体 (例如但不限于抗体 GS-2C4) (Sigma-Aldrich, 产品目录编号 G4896 ;Afify and Werness. Appl. Immunohistochem. 6 :30(1998)) 组合使用本发明的凝溶胶蛋白结合剂。

[0108] 可以将本发明的凝溶胶蛋白结合剂进一步以重组方式在 N 端或 C 端融合至异源多肽,或者化学偶联 (包括共价和非共价偶联) 至多肽或其它组分。例如,可以将本发明的凝溶胶蛋白结合剂以重组方式融合或偶联至作为检测测定法中的标记物和效应分子有用的分子诸如异源多肽、药物、或毒素。参见例如 WO 92/08495 ;WO 91/14438 ;WO 89/12624 ;美国专利号 5, 314, 995 ;及 EP 0 396 387。

[0109] B. 制备本发明的凝溶胶蛋白结合剂的方法

[0110] 总论。用于生成针对靶多肽的结合剂的技术是本领域技术人员公知的。此类技术的例子包括但不限于例如那些牵涉展示文库、异种或人抗体小鼠 (xeno or humab mouse)、杂交瘤等的。本发明范围内的靶多肽包括能够展现出抗原性的任何多肽或多肽衍生物。例子包括但不限于凝溶胶蛋白及其片段。

[0111] 应当理解的是,不仅天然存在的抗体适合作为依照本公开内容使用的结合剂,而且针对凝溶胶蛋白多肽及其片段的重组工程抗体和抗体片段 (例如抗体相关多肽) 也是适合的。

[0112] 能进行本文中所提出的技术的结合剂 (例如抗凝溶胶蛋白抗体) 包括单克隆和多克隆抗体、和抗体片段诸如 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、scFv、双抗体、抗体轻链、抗体重链和/或抗体片段。对抗体含 Fv 多肽 (例如 Fab' 和 F(ab')₂ 抗体片段) 的高产量生成有用的方法已经有记载。参见美国专利号 5, 648, 237。

[0113] 一般而言,结合剂获自起源的物种。更具体地,获得具有对靶多肽抗原特异性的起源物种抗体的轻链、重链或两者的可变部分的核酸或氨基酸序列。起源物种是对生成本发明的结合剂或结合剂库有用的任何物种,例如大鼠、小鼠、家兔、鸡、猴、人等。

[0114] 在一些实施方案中,凝溶胶蛋白结合剂是抗凝溶胶蛋白抗体。噬菌体或噬菌粒展示技术是对衍生本发明的结合剂有用的技术。在本发明中有用的抗凝溶胶蛋白抗体是“人抗体”(例如自人分离的抗体)或“人序列抗体”。可以通过本领域中已知的多种方法 (包括噬菌体展示方法) 来制备人抗体。还可参见美国专利号 4, 444, 887, 4, 716, 111, 5, 545, 806, 和 5, 814, 318 ;及 W098/46645, W0 98/50433, W0 98/24893, W0 98/16654, W0 96/34096, W096/33735, 和 W0 91/10741。对于通过筛选聚合噬菌体颗粒来鉴定编码多聚体多肽复合物的成员的核酸序列有用的方法已经有记载。Rudert 等,美国专利号 6, 667, 150。还有,可以生成重组免疫球蛋白。Cabilly,美国专利号 4, 816, 567 ;Cabilly 等, U. S. 6, 331, 415 和 Queen 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA86 :10029-10033(1989)。用于生成和克隆单克隆抗体

的技术是本领域技术人员公知的。合适地,本发明的凝溶胶蛋白结合剂具有高的免疫反应性,即进行正确折叠以使得抗体分子能特异性结合其靶抗原的抗体分子的百分比。可以在大肠杆菌中实施编码结合剂(例如本发明的抗体)的序列的表达,如下文所描述的。此类表达通常导致至少 80%、90%、95%或 99%的免疫反应性。

[0115] 这些蛋白质或基因的某些截短发挥全序列蛋白质或基因的调节或酶功能。例如,可以通过替代、添加、删除或多聚体表达来改变编码其的核酸序列,从而提供在功能上等等的蛋白质或基因。由于核酸编码序列的简并性,可以在本发明的实践中使用编码与天然存在蛋白质的氨基酸序列基本上相同的氨基酸序列的其它序列。这些包括但不限于如下的核酸序列,其包括整个或部分编码上述多肽的核酸序列,其通过用编码该序列内的功能等同性氨基酸残基的不同密码子进行的替代来进行改变,如此产生沉默变化。领会的是,依照本发明的免疫球蛋白的核苷酸序列容忍多至 25%的序列同源性变异,如通过标准方法计算的(“Current Methods in Sequence Comparison and Analysis,”Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications, Alan R. Liss, Inc., 127-149, 1998),只要此类变体形成识别凝溶胶蛋白或凝溶胶蛋白样多肽的有效抗体。例如,多肽序列内的一个或多个氨基酸残基可以用起功能性等同物作用的类似极性的另一种氨基酸替代,导致沉默改变。对序列内的氨基酸的替代可以选自该氨基酸所属种类的其它成员。例如,非极性(疏水性)氨基酸包括丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和甲硫氨酸。极性中性氨基酸包括甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、天冬酰胺、和谷氨酰胺。带正电荷的(碱性)氨基酸包括精氨酸、赖氨酸和组氨酸。带负电荷的(酸性)氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸。本发明范围内还包括的是翻译期间或之后通过例如糖基化、蛋白水解切割、与抗体分子或其它细胞配体的连接等而差别修饰的蛋白质或其片段或衍生物。另外,可以在体外或在体内突变抑制剂编码核酸序列以创建和/或破坏翻译、起始、和/或终止序列或者产生编码区中的变异和/或形成新的限制性内切核酸酶位点或破坏先前存在的,以便于进一步的体外修饰。可以使用本领域中已知的任何诱变技术,包括但不限于体外定点诱变, J. Biol. Chem. 253 :6551 (1978), 使用 Tab 接头 (Pharmacia) 等。

[0116] 多克隆抗血清和免疫原的制备。生成本发明的抗体或抗体片段的方法通常包括用纯化的凝溶胶蛋白或凝溶胶蛋白样多肽或其同系物或片段或用表达凝溶胶蛋白或凝溶胶蛋白样多肽或其同系物或片段的细胞免疫接种受试者(一般是非人受试者诸如小鼠或家兔)。可以采用凝溶胶蛋白多肽的任何免疫原性部分作为免疫原。合适的免疫原性制备物可以含有例如重组表达的凝溶胶蛋白多肽或化学合成的凝溶胶蛋白多肽。可以使用分离的凝溶胶蛋白多肽或其部分或片段作为免疫原来生成结合凝溶胶蛋白多肽或部分或片段的凝溶胶蛋白结合剂,其使用用于多克隆和单克隆抗体制备的标准技术来实现。可以使用全长凝溶胶蛋白多肽,或者,本发明提供了凝溶胶蛋白多肽片段作为免疫原的使用。凝溶胶蛋白多肽包含 SEQ ID NO. :1 中所显示的氨基酸序列的至少 4 个氨基酸残基,而且涵盖凝溶胶蛋白多肽的表位以使得针对该肽产生的抗体与凝溶胶蛋白多肽形成特异性免疫复合物。抗原性肽可以包含至少 5 个、8 个、10 个、15 个、20 个、或 30 个氨基酸残基。有时,较长的抗原性肽比较短的抗原性肽是优选的,这取决于用途并依照本领域技术人员公知的方法。典型地,免疫原会长至少约 8 个氨酰基残基,或长至少约 10 个酰基残基。给定表位的多聚物有时比单体更有效。

[0117] 若需要的话,可以通过与半抗原诸如匙孔螯血蓝蛋白 (KLH) 或卵清蛋白 (OVA) 融合或偶联来提高凝溶胶蛋白多肽 (或其片段) 的免疫原性。许多此类半抗原是本领域中已知的。还可以组合凝溶胶蛋白多肽与常规的佐剂诸如弗氏完全或不完全佐剂以提高受试者对该多肽的免疫反应。用于提高免疫学应答的各种佐剂包括但不限于弗氏 (完全的和不完全的)、矿物凝胶 (例如氢氧化铝)、表面活性物质 (例如溶血卵磷脂、Pluronic 多元醇、聚阴离子、肽、油乳剂、二硝基酚等)、人佐剂诸如卡介苗和小棒杆菌 (*Corynebacterium parvum*)、或类似的免疫刺激性化合物。这些技术是本领域中标准的。

[0118] 为方便起见,免疫应答在本发明中通常被描述为“初次”或“再次”免疫应答。初次免疫应答 (其也被描述为“保护性”免疫应答) 指由于对特定抗原 (例如凝溶胶蛋白多肽) 的一些初始暴露 (例如初始“免疫接种”) 而在个体中产生的免疫应答。此类免疫接种可以例如由于对抗原 (例如来自通过展现或呈递抗原的一些病原体的初始感染) 或来自个体中的一些肿瘤 (例如恶性黑素瘤) 的癌细胞呈递的抗原的一些天然暴露而发生。或者,免疫接种可以由于用含有抗原的疫苗给个体疫苗接种而发生。例如,疫苗可以是包含来自凝溶胶蛋白多肽或凝溶胶蛋白样多肽的一种或多种抗原的凝溶胶蛋白疫苗。

[0119] 初次免疫应答可以随时间而变弱或减弱,而且可以甚至消失或至少变得如此减弱以致于其不能被检出。因而,本发明还涉及“再次”免疫应答,其在本文也被描述为“记忆免疫应答”。术语再次免疫应答指已经产生初次免疫应答后在个体中引发的免疫应答。

[0120] 如此,可以引发再次或 (记忆) 免疫应答,例如以增强已经变弱或减弱的现有免疫应答,或者再次产生已经消失或不再能被检出的先前免疫应答。再次或记忆免疫应答可以是体液 (抗体) 应答或细胞应答。再次或记忆体液应答可以在对第一次抗原呈递时产生的记忆 B 细胞的刺激后发生。迟发型超敏感性 (DTH) 反应是一类由 CD4⁺ 细胞介导的细胞再次或记忆免疫应答。对抗原的初次暴露启动免疫系统,而再次暴露导致 DTH。

[0121] 合适的免疫接种后,可以自受试者的血清制备凝溶胶蛋白结合剂 (例如抗凝溶胶蛋白多克隆抗体)。若想要的话,可以自哺乳动物 (例如自血液) 分离针对凝溶胶蛋白多肽的抗体分子,并通过公知的技术诸如蛋白 A 层析来进一步纯化以获得 IgG 级分。

[0122] 单克隆抗体。在一个实施方案中,所述结合剂是抗凝溶胶蛋白单克隆抗体。例如,在一些实施方案中,抗凝溶胶蛋白单克隆抗体可以是人或小鼠抗凝溶胶蛋白单克隆抗体。为了制备针对特定凝溶胶蛋白多肽、或其衍生物、片段、类似物或同系物的单克隆抗体,可以利用提供通过连续细胞系培养生成抗体分子的任何技术。此类技术包括但不限于杂交瘤技术 (参见例如 Kohler 和 Milstein, *Nature* 256 :495-497 (1975)); 三源杂交瘤 (trioma) 技术; 人 B 细胞杂交瘤技术 (参见例如 Kozbor 等, *Immunol. Today* 4 :72 (1983)) 和 EBV 杂交瘤技术。(参见例如 Cole 等,于 :*Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., 77-96 (1985)), 其用于生成人单克隆抗体。可以在本发明的实践中利用人单克隆抗体,并且可以通过使用人杂交瘤 (参见例如 Cote 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 :2026-2030 (1983)) 或通过体外用埃巴病毒转化人 B 细胞 (参见例如 Cole 等,于 :*MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY*, Alan R. Liss, Inc., 77-96 (1985)) 来生成。例如,可以分离编码抗体各区的核酸的群体。使用利用自编码抗体保守区的序列衍生的引物的 PCR 来从该群体扩增编码抗体各部分的序列,然后自所扩增的序列重建编码抗体或其片段诸如可变域的 DNA。还可以将此类扩增序列融合至编码其它蛋白质 (例如噬菌体

外壳,或细菌细胞表面蛋白)的 DNA 以在噬菌体或细菌上表达和展示融合多肽。然后可以表达所扩增的序列,并基于例如所表达抗体或其片段对凝溶胶蛋白多肽上存在的抗原或表位的亲和力来进一步选择或分离。或者,可以通过免疫受试者来制备表达抗凝溶胶蛋白单克隆抗体的杂交瘤,然后使用常规方法自受试者的脾分离杂交瘤。参见例如 Milstein 等, Galfre 和 Milstein, *Methods Enzymol* 73 :3-46(1981)。使用标准方法筛选杂交瘤会生成具有不同特异性(即,针对不同表位)和亲和力的单克隆抗体。可以使用具有想要的特性(例如凝溶胶蛋白结合)的选定的单克隆抗体,如由杂交瘤所表达的,其可以被结合至诸如聚乙二醇(PEG)等分子以改变其特性,或者可以分离编码它的 cDNA,测序,并以各种方式进行操作。可以对合成的树状体(dendromeric)树添加反应性氨基酸侧链(例如赖氨酸)以增强凝溶胶蛋白多肽的免疫原性特性。还有,可以使用 CPG-二核苷酸技术来增强凝溶胶蛋白多肽的免疫原性特性。其它操作包括替代或删除促成贮存期间或向受试者施用后的抗体不稳定性的特定氨酰基残基,和用于改善凝溶胶蛋白多肽抗体的亲和力的亲和力成熟技术。

[0123] 杂交瘤技术。在一个实施方案中,本发明的结合剂是由杂交瘤生成的抗凝溶胶蛋白单克隆抗体,所述杂交瘤包括与永生化细胞融合的自转基因非人动物例如转基因小鼠(其具有包含人重链转基因和轻链转基因的基因组)获得的 B 细胞。杂交瘤技术包括那些在本领域中已知的和记载于 Harlow 等, *Antibodies :A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York 349(1988); Hammerling 等, *Monoclonal Antibodies And T-Cell Hybridomas*, 563-681(1981) 的。用于生成杂交瘤和单克隆抗体的其它方法是本领域技术人员公知的。

[0124] 噬菌体展示技术。如上文所记录的,可以经由应用重组 DNA 和噬菌体展示技术来生成本发明的结合剂。例如,可以使用本领域中已知的多种噬菌体展示方法来制备本发明的结合剂(例如抗凝溶胶蛋白抗体)。在噬菌体展示方法中,功能性抗体域展示在携带编码它们的多核苷酸序列的噬菌体颗粒的表面上。通过用抗原(通常是被结合或捕获至固体表面或珠子的抗原)直接进行选择来从全集或组合抗体文库(例如人或鼠的)选择具有想要的结合特性的噬菌体。这些方法中所使用的噬菌体通常是丝状噬菌体,包括 fd 和 M13,其中将 Fab、Fv 或二硫化物稳定化的 Fv 抗体域以重组方式融合至噬菌体基因 III 或基因 VIII 蛋白。另外,方法可以在改编后用于构建 Fab 表达文库(参见例如 Huse 等, *Science* 246 :1275-1281, (1989)),以容许快速且有效鉴定具有对凝溶胶蛋白多肽(例如一种多肽或其衍生物、片段、类似物或同系物)的想要的特异性的单克隆 Fab 片段。可以用于制备本发明的结合剂的噬菌体展示方法的其它例子包括那些披露于 Huston 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85 :5879-5883(1988); Chaudhary 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87 :1066-1070(1990); Brinkman 等, *J. Immunol. Methods* 182 :41-50(1995); Ames 等, *J. Immunol. Methods* 184 :177-186(1995); Kettleborough 等, *Eur. J. Immunol.* 24 :952-958(1994); Persic 等, *Gene* 187 :9-18(1997); Burton 等, *Advances in Immunology* 57 :191-280(1994); PCT/GB91/01134; WO 90/02809; WO91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO95/20401; WO 96/06213; WO 92/01047(Medical Research Council 等); WO97/08320(Morphosys); WO 92/01047(CAT/MRC); WO 91/17271(Affymax); 及美国专利号 5,698,426,5,223,409,5,403,484,

5, 580, 717, 5, 427, 908, 5, 750, 753, 5, 821, 047, 5, 571, 698, 5, 427, 908, 5, 516, 637, 5, 780, 225, 5, 658, 727 和 5, 733, 743 的。对于通过经由二硫键附着多肽来在噬菌体颗粒表面上展示多肽有用的方法已经记载于 Lohning, 美国专利号 6, 753, 136。如上文的参考文献中所描述的, 噬菌体选择后, 可以分离来自噬菌体的抗体编码区, 并用于生成完整抗体 (包括人抗体), 或任何其它想要的抗原结合片段, 并在任何想要的宿主 (包括哺乳动物细胞、昆虫细胞、植物细胞、酵母、和细菌) 中表达。例如, 还可以采用用于重组生成 Fab、Fab' 和 F(ab')₂ 片段的技术, 其使用本领域中已知的方法诸如那些披露于 WO 92/22324; Mullinax 等, BioTechniques 12 :864-869 (1992); 和 Sawai 等, AJRI 34 :26-34 (1995); 及 Better 等, Science 240 :1041-1043 (1988) 的方法来进行。

[0125] 一般而言, 可以针对合适的抗原选择克隆入展示载体中的杂合抗体或杂合抗体片段以便鉴定维持良好结合活性的变体, 因为该抗体或抗体片段会存在于噬菌体或噬菌体颗粒的表面上。参见例如 Barbas III 等, Phage Display, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 2001)。然而, 可以使用其它载体形式来进行此方法, 诸如将抗体片段文库克隆入裂解性噬菌体载体 (经修饰的 T7 或 λ Zap 系统) 中以进行选择 and / 或筛选。

[0126] 重组凝溶胶蛋白结合剂的表达。如上文所记录的, 可以经由应用重组 DNA 技术来生成本发明的结合剂。编码本发明的凝溶胶蛋白结合剂的重组多核苷酸构建体通常包括与抗凝溶胶蛋白抗体链的编码序列可操作连接的表达控制序列, 包括天然相关的或异源的启动子区。因此, 本发明的另一方面包括含有编码本发明的凝溶胶蛋白结合剂的一种或多种核酸序列的载体。对于一种或多种本发明的多肽的重组表达, 通过本领域中公知的和如下文所详述的重组 DNA 技术来将含有整个或部分编码凝溶胶蛋白结合剂的核苷酸序列的核酸插入合适的克隆载体或表达载体 (即, 含有对转录和翻译所插入的多肽编码序列必需的元件的载体) 中。用于生成各式各样载体群体的方法已经记载于 Lerner 等, 美国专利号 6, 291, 160 ; 6, 680, 192。

[0127] 一般而言, 重组 DNA 技术中有用的表达载体通常处于质粒形式。在本说明书中, “质粒” 和 “载体” 可以互换使用, 因为质粒是最常用的载体形式。然而, 本发明意图包括在技术上不是质粒的发挥等同功能的此类其它形式的表达载体, 诸如病毒载体 (例如复制缺陷型逆转录病毒、腺病毒和腺伴随病毒)。此类病毒载体容许感染受试者和在该受试者中表达化合物。表达控制序列通常是能够转化或转染真核宿主细胞的载体中的真核启动子系统。一旦已经将载体掺入合适的宿主中, 便在如下条件下维持宿主, 所述条件适合于高水平表达编码凝溶胶蛋白结合剂的核苷酸序列, 和收集及纯化凝溶胶蛋白结合剂, 例如交叉反应性抗凝溶胶蛋白抗体。一般参见美国申请号 20020199213。这些表达载体在宿主生物体中通常作为附加体或作为宿主染色体 DNA 的整合部分可复制。通常, 表达载体含有选择标志 (例如氨苄青霉素抗性 or 潮霉素抗性), 以便容许检测那些用想要的 DNA 序列转化的细胞。载体还可以编码对于指导胞外抗体片段分泌有用的信号肽 (例如果胶裂合酶)。参见美国专利号 5, 576, 195。

[0128] 重组表达载体包含处于如下形式的编码具有凝溶胶蛋白结合特性的化合物的核酸, 所述形式适合于在宿主细胞中表达该核酸, 这意味着所述重组表达载体包含与要表达的核酸序列可操作连接的一种或多种调节序列, 所述调节序列基于要用于表达的宿主细胞

进行选择。在重组表达载体内，“可操作连接的”意图指感兴趣的核苷酸序列以如下方式与调节序列连接，所述方式容许表达该核苷酸序列（例如在体外转录 / 翻译系统中，或在宿主细胞中，此时载体被导入宿主细胞中）。术语“调节序列”意图包括启动子、增强子和其它表达控制元件（例如多腺苷酸化信号）。此类调节序列记载于例如 Goeddel, *Gene Expression Technology :Methods In Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990)。调节序列包括那些在许多类型的宿主细胞中指导核苷酸序列组成性表达的调节序列和那些仅在某些宿主细胞中指导核苷酸序列表达的调节序列（例如组织特异性调节序列）。本领域技术人员会领会的是，表达载体的设计会取决于诸如要转化的宿主细胞的选择、想要的多肽表达水平等因素。作为重组多肽表达（例如凝溶胶蛋白结合剂）的启动子有用的典型调节序列包括例如但不限于 3- 磷酸甘油酸激酶和其它糖酵解酶。诱导型酵母启动子包括来自醇脱氢酶、异细胞色素 C (isocytochrome C)、和负责麦芽糖和半乳糖利用的酶的启动子等。在一个实施方案中，编码本发明的凝溶胶蛋白结合剂的多核苷酸与 ara B 启动子可操作连接，并在宿主细胞中可表达。参见美国专利 5, 028, 530。可以将本发明的表达载体导入宿主细胞中，以由此生成由如本文中所描述的核酸编码的多肽或肽（包括融合多肽）（例如凝溶胶蛋白结合剂等）。

[0129] 本发明的另一方面属于凝溶胶蛋白结合剂表达宿主细胞，其含有编码一种或多种凝溶胶蛋白结合剂的核酸。可以设计本发明的重组表达载体来在原核或真核细胞中表达凝溶胶蛋白结合剂。例如，可以在细菌细胞诸如大肠杆菌、昆虫细胞（使用杆状病毒表达载体）、真菌细胞例如酵母、酵母细胞或哺乳动物细胞中表达凝溶胶蛋白结合剂。合适的宿主细胞进一步记载于 Goeddel, *Gene Expression Technology :Methods In Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990)。或者，可以在体外转录和翻译重组表达载体，例如使用 T7 启动子调节序列和 T7 聚合酶来实现。对于经由表达随机生成的多核苷酸序列来制备和筛选具有预先确定的特性的多肽（例如凝溶胶蛋白结合剂）有用的方法已经有记载。参见美国专利号 5, 763, 192 ; 5, 723, 323 ; 5, 814, 476 ; 5, 817, 483 ; 5, 824, 514 ; 5, 976, 862 ; 6, 492, 107 ; 6, 569, 641。

[0130] 原核生物中的多肽表达最通常在具有如下载体的大肠杆菌中实施，所述载体含有指导融合或非融合多肽表达的组成型或诱导型启动子。融合载体将许多氨基酸添加至其中编码的多肽，通常向重组多肽的氨基端。此类融合载体通常用于三种目的：(i) 提高重组多肽的表达；(ii) 提高重组多肽的溶解度；和 (iii) 在亲和纯化中通过起配体的作用来帮助纯化重组多肽。通常，在融合表达载体中，在融合模块与重组多肽的接合处引入蛋白水解切割位点以在纯化融合多肽后能够实现重组多肽与融合模块的分开。此类酶及其关联识别序列包括因子 Xa、凝血酶和肠激酶。典型的融合表达载体包括 pGEX (Pharmacia Biotech Inc ; Smith and Johnson, *Gene* 67 :31-40 (1988))、pMAL (New England Biolabs, Beverly, Mass.) 和 pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, N. J.)，它们分别将谷胱甘肽 S- 转移酶 (GST)、麦芽糖 E 结合多肽、或多肽 A 融合至靶重组多肽。

[0131] 合适的诱导型非融合大肠杆菌表达载体的例子包括 pTrc (Amrann 等, *Gene* 69 : 301-315 (1988)) 和 pET 11d (Studier 等, *Gene Expression Technology :Methods In Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, Calif. 60-89 (1990))。用于经由多肽融合来靶向装配独特的活性肽或蛋白质域以产生多功能性多肽的方法已经记载于 Pack 等, 美

国专利号 6, 294, 353 ;6, 692, 935。一种用于使大肠杆菌中的重组多肽（例如凝溶胶蛋白结合剂）表达最大化的策略是在蛋白水解切割重组多肽的能力得到削弱的宿主细菌中表达多肽。参见例如 Gottesman, Gene Expression Technology :Methods In Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. 119-128(1990)。另一种策略是改变要插入表达载体中的核酸的核酸序列以使得每个氨基酸的各密码子是那些在表达宿主（例如大肠杆菌）中偏爱利用的（参见例如 Wada 等, Nucl. Acids Res. 20 :2111-2118(1992)）。可以通过标准的 DNA 合成技术来实施对本发明的核酸序列的此改变。

[0132] 在另一个实施方案中,凝溶胶蛋白结合剂表达载体是酵母表达载体。供酵母酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中表达用的载体的例子包括 pYepSec1(Baldari 等, EMBO J. 6 :229-234(1987))、pMFa(Kurjan 和 Herskowitz, Cell 30 :933-943(1982))、pJRY88(Schultz 等, Gene 54 :113-123(1987))、pYES2(Invitrogen Corporation, San Diego, Calif.)、和 picZ(In Vitrogen Corp, San Diego, Calif.)。或者,可以使用杆状病毒表达载体在昆虫细胞中表达凝溶胶蛋白结合剂。可用于在培养的昆虫细胞（例如 SF9 细胞）中表达多肽（例如凝溶胶蛋白结合剂）的杆状病毒载体包括 pAc 系列 (Smith 等, Mol. Cell. Biol. 3 :2156-2165(1983)) 和 pVL 系列 (Lucklow 和 Summers, Virology 170 :31-39(1989))。

[0133] 在又一个实施方案中,使用哺乳动物表达载体在哺乳动物细胞中表达编码本发明的凝溶胶蛋白结合剂的核酸。哺乳动物表达载体的例子包括例如但不限于 pCDM8(Seed, Nature 329 :840(1987)), 和 pMT2PC(Kaufman 等, EMBO J. 6 :187-195(1987))。在哺乳动物细胞中使用时,表达载体的控制功能通常由病毒调节元件提供。例如,常用的启动子衍生自多瘤、腺病毒 2、巨细胞病毒、和猿病毒 40。关于对于表达本发明的凝溶胶蛋白结合剂有用的适合于原核和真核细胞两者的其它表达系统,参见例如 Sambrook 等, Molecular Cloning : A Laboratory Manual. 第 2 版, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., (1989) 的第 16 章和第 17 章。

[0134] 在另一个实施方案中,重组哺乳动物表达载体能够优先在特定的细胞类型中指导表达核酸（例如使用组织特异性调节元件来表达核酸）。组织特异性调节元件是本领域中已知的。合适的组织特异性启动子的非限制性例子包括清蛋白启动子（肝特异性的；Pinkert 等, Genes Dev. 1 :268-277(1987))、淋巴样特异性启动子 (Calame 和 Eaton, Adv. Immunol. 43 :235-275(1988)) 特别是 T 细胞受体启动子 (Winoto 和 Baltimore, EMBO J. 8 :729-733(1989))、和免疫球蛋白启动子 (Banerji 等, Cell 33 :729-740(1993) ;Queen 和 Baltimore, Cell 33 :741-748(1983))、神经元特异性启动子（例如神经丝启动子 ;Byrne 和 Ruddle, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 :5473-5477(1989))、胰特异性启动子 (Edlund 等, Science 230 :912-916(1985))、和乳腺特异性启动子（例如乳的乳清启动子 ;美国专利号 4, 873, 316 和欧洲申请公开文本号 264, 166)。还涵盖由发育调节的启动子,例如鼠 *hox* 启动子 (Kessel 和 Gruss, Science 249 :374-379(1990)), 和甲胎蛋白启动子 (Campes 和 Tilghman, Genes Dev. 3 :537-546(1989))。

[0135] 本发明的另一方面属于其中已经导入有本发明的重组表达载体的宿主细胞。术语“宿主细胞”和“重组宿主细胞”在本文中可互换使用。理解的是,此类术语不仅指具体的受试细胞,而且还指此细胞的后代或潜在后代。因为随后世代中可能由于突变或环境影响而

发生某些修饰,所以实际上此后代可能与亲本细胞不相同,但是仍然包括在如本文中所使用的术语的范围内。

[0136] 宿主细胞可以是任何原核或真核细胞。例如,可以在细菌细胞诸如大肠杆菌、昆虫细胞、酵母或哺乳动物细胞中表达凝溶胶蛋白结合剂。哺乳动物细胞是用于表达编码免疫球蛋白或其片段的核苷酸区段的一种宿主。参见 Winnacker, *From Genes To Clones*, (VCH Publishers, New York (1987))。本领域中已经开发了能够分泌完整异源蛋白质的许多合适的宿主细胞系,并且包括中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞系、多种 COS 细胞系、HeLa 细胞、L 细胞和骨髓瘤细胞系。优选地,细胞是非人的。供这些细胞用的表达载体可以包括表达控制序列,诸如复制起点、启动子、增强子、和必需的加工信息位点,诸如核糖体结合位点、RNA 剪接位点、多腺苷酸化位点、和转录终止子序列。Queen 等, *Immunol. Rev.* 89 :49 (1986)。优选的表达控制序列是自内源基因、巨细胞病毒、SV40、腺病毒、牛乳头瘤病毒等衍生的启动子。Co 等, *J Immunol.* 148 :1149 (1992)。其它合适的宿主细胞是本领域技术人员已知的。

[0137] 可以经由常规的转化或转染技术来将载体 DNA 导入原核或真核细胞中。如本文中所使用的,术语“转化”和“转染”意图指多种本领域公认的用于将外来核酸(例如 DNA)导入宿主细胞中的技术,包括磷酸钙或氯化钙共沉淀、DEAE-右旋糖苷介导的转染、脂转染、或电穿孔,可以对其它细胞宿主使用生物射弹或基于病毒的转染。用于转化哺乳动物细胞的其它方法包括使用 Polybrene、原生质体融合、脂质体、电穿孔、和显微注射(一般参见, Sambrook 等, *Molecular Cloning :A Laboratory Manual*)。适合于转化或转染宿主细胞的方法可见于 Sambrook 等 (*Molecular Cloning :A Laboratory Manual*. 第 2 版, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989)), 及其它实验室手册。可以通过公知的方法来将含有感兴趣的 DNA 区段的载体转移入宿主细胞中,这取决于细胞宿主的类型。

[0138] 对于哺乳动物细胞的稳定转染,知晓的是,根据所使用的表达载体和转染技术,仅小部分的细胞可以将外来 DNA 整合入其基因组中。为了鉴定和选择这些整合体,一般连同感兴趣的基因将编码选择标志(例如对抗生素的抗性)的基因导入宿主细胞中。多种选择标志包括那些赋予对药物诸如 G418、潮霉素和甲氨蝶呤的抗性的。可以将编码选择标志的核酸在与编码凝溶胶蛋白结合剂的核酸相同的载体上导入宿主细胞中或者可以在分开的载体上导入。可以通过药物选择来鉴定用所导入的核酸稳定转染的细胞(例如已经掺入有选择标志基因的细胞会存活,而其它细胞死亡)。

[0139] 可以使用包含本发明凝溶胶蛋白结合剂的宿主细胞(诸如培养中的原核或真核宿主细胞)来生成(即,表达)重组凝溶胶蛋白结合剂。在一个实施方案中,所述方法包括在合适的培养基中培养本发明的宿主细胞(已经向其中导入编码凝溶胶蛋白结合剂的重组表达载体),使得凝溶胶蛋白结合剂生成。在另一个实施方案中,所述方法进一步包括自培养液或宿主细胞分离凝溶胶蛋白结合剂的步骤。一旦表达,便自培养液和宿主细胞纯化凝溶胶蛋白结合剂(例如抗凝溶胶蛋白抗体或抗凝溶胶蛋白抗体相关多肽)的集合。可以依照本领域的标准规程来纯化凝溶胶蛋白结合剂,包括 HPLC 纯化、柱层析、凝胶电泳等。在一个实施方案中,通过 Boss 等,美国专利号 4,816,397 的方法在宿主生物体中生成凝溶胶蛋白结合剂。通常,与信号序列一起表达抗凝溶胶蛋白抗体链,并且如此被释放至培养液。然而,若抗凝溶胶蛋白抗体链不是宿主细胞天然分泌的,则可以通过用温和的去污剂

进行的处理来释放抗凝溶胶蛋白抗体链。重组多肽的纯化是本领域中公知的,并且包括硫酸铵沉淀、亲和层析纯化技术、柱层析、离子交换纯化技术、凝胶电泳等(一般参见 Scopes, Protein Purification(Springer-Verlag, N. Y. (1982))。

[0140] 可以在转基因中掺入编码凝溶胶蛋白结合剂的多核苷酸(例如抗凝溶胶蛋白抗体编码序列)以导入转基因动物的基因组中,并且随后在转基因动物的乳中表达。参见例如,美国专利号 5,741,957,5,304,489,和 5,849,992。合适的转基因包括与来自乳腺特异性基因诸如酪蛋白或 β -乳球蛋白的启动子和增强子可操作连接的轻链和/或重链编码序列。为了产生转基因动物,可以将转基因显微注射入受精卵母细胞中,或者可以掺入胚胎干细胞的基因组中,并将此类细胞的细胞核转移入去核卵母细胞中。

[0141] 单链抗体。在一个实施方案中,本发明的结合剂是单链抗凝溶胶蛋白抗体。依照本发明,技术可以在改编后用于生成对凝溶胶蛋白多肽特异性的单链抗体(参见例如,美国专利号 4,946,778)。可以用于生成本发明的单链 Fv 和抗体的技术的例子包括那些记载于美国专利号 4,946,778 和 5,258,498;Huston 等, Methods in Enzymology, 203:46-88(1991);Shu, L. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:7995-7999(1993);及 Skerra 等, Science 240:1038-1040(1988) 的。

[0142] 嵌合和人源化抗体。在一个实施方案中,本发明的结合剂是嵌合抗凝溶胶蛋白抗体。在一个实施方案中,本发明的结合剂是人源化抗凝溶胶蛋白抗体。在本发明的一个实施方案中,供体和受体抗体是来自不同物种的单克隆抗体。例如,受体抗体是人抗体(以使其在人的抗原性最小化),在该情况中,所得的 CDR 嫁接抗体称为“人源化”抗体。

[0143] 可以使用标准的重组 DNA 技术来制备包含人和非人部分两者的重组抗凝溶胶蛋白抗体(诸如嵌合和人源化单克隆抗体),并且在本发明的范围内。对于一些使用(包括本发明的结合剂在人的体内使用以及这些药剂在体外检测测定法中的使用),优选使用嵌合的、人源化的、或人的抗凝溶胶蛋白抗体。可以通过本领域中已知的重组 DNA 技术来生成此类嵌合和人源化单克隆抗体。此类有用的方法包括例如但不限于如下方法,其记载于国际申请号 PCT/US86/02269;美国专利号 5,225,539;欧洲专利号 184187;欧洲专利号 171496;欧洲专利号 173494;PCT 国际公开文本号 WO 86/01533;美国专利号 4,816,567;5,225,539;欧洲专利号 125023;Better 等, Science 240:1041-1043(1988);Liu 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443(1987);Liu 等, J. Immunol. 139:3521-3526(1987);Sun 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218(1987);Nishimura 等, Cancer Res. 47:999-1005(1987);Wood 等, Nature 314:446-449(1985);Shaw 等, J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-1559(1988);Morrison, Science 229:1202-1207(1985);Oi 等, BioTechniques 4:214(1986);Jones 等, Nature 321:552-525(1986);Verhoeyan 等, Science 239:1534(1988);Morrison, Science 229:1202(1985);Oi 等, BioTechniques 4:214(1986);Gillies 等, J. Immunol. Methods, 125:191-202(1989);美国专利号 5,807,715;及 Beidler 等, J. Immunol. 141:4053-4060(1988)。例如,可以使用多种技术来使抗体人源化,包括 CDR 嫁接(EP 0 239 400;WO 91/09967;美国专利号 5,530,101;5,585,089;5,859,205;6,248,516;EP460167)、镶饰(veneering)或重修表面(resurfacing)(EP 0 592 106;EP 0 519 596;Padlan E. A., Molecular Immunology, 28:489-498(1991);Studnicka 等, Protein Engineering 7:805-814(1994);Roguska 等, PNAS 91:969-973(1994))、和链改

组（美国专利号 5, 565, 332）。在一个实施方案中，用明确选定的限制酶消化编码鼠抗凝溶胶蛋白单克隆抗体的 cDNA 以除去编码 Fc 恒定区的序列，并且替换编码人 Fc 恒定区的 cDNA 的等同部分（参见 Robinson 等，PCT/US86/02269；Akira 等，欧洲专利申请 184, 187；Taniguchi，欧洲专利申请 171, 496；Morrison 等，欧洲专利申请 173, 494；Neuberger 等，WO 86/01533；Cabilly 等，美国专利号 4, 816, 567；Cabilly 等，欧洲专利申请 125, 023；Better 等，Science 240:1041-1043(1988)；Liu 等，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443(1987)；Liu 等，J Immunol 139:3521-3526(1987)；Sun 等，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218(1987)；Nishimura 等，Cancer Res 47:999-1005(1987)；Wood 等，Nature 314:446-449(1985)；及 Shaw 等，J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-1559(1988)；美国专利号 6, 180, 370；美国专利号 6, 300, 064；6, 696, 248；6, 706, 484；6, 828, 422。

[0144] 在一个实施方案中，本发明容许不太可能诱导人抗小鼠抗体（下文称为“HAMA”）应答，而仍具有有效抗体效应器功能的人源化抗凝溶胶蛋白抗体的构建。如本文中所使用的，关于抗体的术语“人的”和“人源化的”涉及预期在人受试者中引发治疗可耐受的弱免疫原性应答的任何抗体。在一个实施方案中，本发明提供了人源化的凝溶胶蛋白抗体，重链和轻链免疫球蛋白。

[0145] CDR 抗体。在一个实施方案中，本发明的结合剂是抗凝溶胶蛋白 CDR 抗体。一般而言，用于生成抗凝溶胶蛋白 CDR 抗体的供体和受体抗体是来自不同物种的单克隆抗体；通常受体抗体是人抗体（以使其在人的抗原性最小化），在该情况中，所得的 CDR 嫁接抗体称为“人源化”抗体。嫁接物可以是受体抗体的单一 V_H 或 V_L 内的单一 CDR（或者甚至单一 CDR 的部分）的，或者可以是 V_H 和 V_L 之一或两者内的多个 CDR（或其部分）的。通常，受体抗体的所有可变域中的所有三个 CDR 会用相应的供体 CDR 替换，尽管仅需要替换多得必需容许所得的 CDR 嫁接抗体足够结合 MetAp3。Queen 等美国专利号 5, 585, 089，美国专利号 5, 693, 761；美国专利号 5, 693, 762；和 Winter U. S. 5, 225, 539；及 EP 0682040 教导了用于生成 CDR 嫁接和人源化抗体的方法。Winter 等，美国专利号 4, 816, 397；6, 291, 158；6, 291, 159；6, 291, 161；6, 545, 142；EP 0368684；EP0451216；EP0120694 教导了可用于制备 V_H 和 V_L 多肽的方法。

[0146] 从相同家族和 / 或相同家族成员选择合适的框架区候选物后，通过将来自起源物种的 CDR 嫁接入杂合框架区中来生成重链和轻链可变区之任一者或两者。可以使用本领域技术人员已知的常规方法来实现关于上文方面之任一的具有杂合可变链区的杂合抗体或杂合抗体片段的装配。例如，可以通过寡核苷酸合成和 / 或 PCR 来生成编码本文中所描述的杂合可变域（即，基于靶物种的框架和来自起源物种的 CDR）的 DNA 序列。还可以使用合适的限制酶从起源物种抗体分离编码 CDR 区的核酸，并通过用合适的连接酶进行连接来接入靶物种框架中。或者，可以通过定点诱变来改变起源物种抗体的可变链的框架区。

[0147] 因为杂合物是自与每个框架区对应的多种候选物中的选择构建的，所以存在适合依照本文中所描述的原则进行构建的许多序列组合。因而，可以装配杂合物文库，其具有具有各框架区的不同组合的成员。此类文库可以是序列的电子数据库集合或杂合物的实物集合。

[0148] 此方法通常不改变嫁接 CDR 侧翼的受体抗体 FR。然而，本领域技术人员有时可以如下改善所得的抗凝溶胶蛋白 CDR 嫁接抗体的抗原结合亲和力，即替换给定 FR 的某些残基

来使该 FR 更类似于供体抗体的相应 FR。优选的替代位置包括与 CDR 接近或能够与 CDR 相互作用的氨基酸残基。(参见例如 US5, 585, 089, 特别是第 12 栏 - 第 16 栏)。或者, 本领域技术人员可以以供体 FR 开始, 并将其修饰成更类似于受体 FR 或人共有 FR。用于进行这些修饰的技术是本领域中已知的。具体地, 若所得的 FR 在该位置符合人共有 FR, 或者与此共有 FR 是至少 90% 或更多相同的, 则与具有完全人 FR 的相同抗体相比, 这样做可能不会显著提高所得的经过修饰的抗凝溶胶蛋白 CDR 抗体的抗原性。

[0149] 融合蛋白。在一个实施方案中, 本发明的结合剂是融合蛋白。本发明的凝溶胶蛋白结合剂在与第二种蛋白质融合时可以作为抗原性标签使用。可以与多肽融合的域的例子不仅包括异源信号序列, 而且还包括其它异源功能区。融合不必需要是直接的, 而且可以经由接头序列发生。此外, 还可以工程化改造本发明的融合蛋白以改善凝溶胶蛋白结合剂的特征。例如, 可以向凝溶胶蛋白结合剂的 N 端添加额外氨基酸 (特别是带电荷的氨基酸) 的区域以改善自宿主细胞纯化或随后的操作和贮存过程中的稳定性和持久性。还有, 可以将肽模块添加至凝溶胶蛋白结合剂以便于纯化。可以在凝溶胶蛋白结合剂的最终制备前除去此类区域。添加肽模块以便于多肽操作是本领域中熟悉且常规的技术。可以将本发明的凝溶胶蛋白结合剂与标志物序列诸如便于融合多肽纯化的肽融合。在优选的实施方案中, 标志物氨基酸序列是六组氨酸肽, 诸如 pQE 载体 (QIAGEN, Inc., Chatsworth, CA) 中提供的标签等, 其中许多是商品化的。如记载于 Gentz 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 : 821-824 (1989) 的, 例如, 六组氨酸提供融合蛋白的方便纯化。另一种对于纯化有用的肽标签, 即“HA”标签对应于自流感血凝素蛋白衍生的表位。Wilson 等, Cell 37 : 767 (1984)。

[0150] 如此, 可以使用本发明的多核苷酸或多肽来工程化改造这些上文的融合物之任一种。还有, 融合蛋白可以显示延长的体内半衰期。

[0151] 具有二硫化物连接的二聚体结构 (由于 IgG) 的融合蛋白可以比单独的单体分泌蛋白或蛋白质片段更有效地结合和中和其它分子。Fountoulakis 等, J. Biochem. 270 : 3958-3964 (1995)。

[0152] 类似地, EP-A-0 464 533 披露了如下的融合蛋白, 其包含免疫球蛋白分子的恒定区的各部分以及另一种人蛋白质或其部分。在许多情况中, 融合蛋白中的 Fc 部分在治疗和诊断中是有益的, 并且如此可以导致例如药动学特性的改善。参见 EP-A 0232 262。或者, 会想要的是, 在已经表达、检测、并纯化融合蛋白后删除 Fc 部分。例如, 若融合蛋白作为供免疫接种用的抗原使用, 则 Fc 部分会阻碍治疗和诊断。在药物发现中, 例如出于高通量筛选测定法的目的已经将人蛋白质诸如 hIL-5 与 Fc 部分融合以鉴定 hIL-5 的拮抗剂。Bennett 等, J. Molecular Recognition 8 : 52-58 (1995) ; Johanson 等, J. Biol. Chem. , 270 : 9459-9471 (1995)。

[0153] 经标记的凝溶胶蛋白结合剂。在一个实施方案中, 本发明的凝溶胶蛋白结合剂与标记物模块 (即可检测基团) 偶联。与本发明的凝溶胶蛋白结合剂偶联的具体标记物或可检测基团不是本发明的重要方面, 只要它没有显著干扰本发明的凝溶胶蛋白结合剂对凝溶胶蛋白多肽或凝溶胶蛋白样多肽的特异性结合。可检测基团可以是具有可检测的物理或化学特性的任何材料。已经在免疫测定法和成像领域中完善开发了此类可检测标记物, 一般而言, 此类方法中有用的几乎任何标记物可以适用于本发明。如此, 标记物是通过光谱学、光化学、生物化学、免疫化学、电学、光学或化学手段可检测的任何成分。本发明中

有用的标记物包括磁珠（例如 Dynabeads™）、荧光染料（例如异硫氰酸荧光素、德克萨斯红 (Texas red)、罗丹明 (rhodamine) 等）、放射性标记物（例如 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{125}I 、 ^{121}I 、 ^{131}I 、 ^{112}In 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ）、其它成像剂诸如微泡（用于超声成像）、 ^{18}F 、 ^{11}C 、 ^{15}O （用于正电子发射断层摄影术 (Positron emission tomography)）、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{111}In （用于单光子发射断层摄影术）、酶（例如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶及其它在 ELISA 中通常使用的）、和量热标记物诸如胶体金或有色玻璃或塑料（例如聚苯乙烯、聚丙烯、胶乳等）珠。描述此类标记物的用途的专利包括美国专利号 3,817,837 ;3,850,752 ;3,939,350 ;3,996,345 ;4,277,437 ;4,275,149 ;及 4,366,241, 本文通过提及而完整且出于所有目的收录每篇。还可参见 Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (第 6 版, Molecular Probes, Inc., Eugene OR. (1996))。

[0154] 可以依照本领域中公知的方法将标记物与测定法的想要成分直接或间接偶联。如上文所指明的, 可以使用极其多种标记物, 其中标记物的选择取决于所要求的灵敏度、容易与化合物偶联、稳定性要求、可用的仪表装置、和处理规定 (disposal provision)。

[0155] 通常通过间接手段来附着非放射性标记物。一般而言, 将配体分子（例如生物素）共价结合至所述分子。然后配体结合抗配体（例如链霉亲和素）分子, 其是固有可检测的或者被共价结合至信号系统诸如可检测酶、荧光化合物、或化学发光化合物。可以使用许多配体和抗配体。若配体具有天然抗配体, 例如生物素、甲状腺素、和皮质醇, 则其可以与标记的、天然存在的抗配体联合使用。或者, 可以与抗体（例如抗凝溶胶蛋白抗体）组合使用任何半抗原性或抗原性化合物。

[0156] 还可以通过例如与酶或荧光团偶联来将所述分子直接偶联至信号产生化合物。作为标记物的感兴趣酶会主要是水解酶, 特别是磷酸酶、酯酶和糖苷酶, 或氧化还原酶, 特别是过氧化物酶。作为标记模块有用的荧光化合物包括但不限于例如荧光素及其衍生物、罗丹明及其衍生物、丹酰、伞形酮等。作为标记模块有用的化学发光化合物包括但不限于例如萤光素、和 2,3-二氢酞嗪二酮, 例如鲁米诺。关于可以使用的多种标记或信号产生系统的综述, 参见美国专利号 4,391,904。

[0157] 检测标记物的手段是本领域技术人员公知的。如此, 例如, 若标记物是放射性标记物, 则检测手段包括闪烁计数器或如放射自显影术中的感光胶片。若标记物是荧光标记物, 则其可以如下检测, 即用合适波长的光激发荧光染料, 并检测所得的荧光。可以借助于感光胶片, 通过使用电子检测器诸如电荷耦合装置 (CCD) 或光电倍增管等在视觉上检测荧光。类似地, 可以如下检测酶标记物, 即为该酶提供合适的底物, 并检测所得的反应产物。最后, 可以仅通过观察与标记物有关的颜色来检测简单的比色标记物。如此, 在多种量杆测定法中, 偶联金通常表现出粉红色, 而多种偶联珠表现出珠子的颜色。

[0158] 一些测定法形式不需要使用标记的成分。例如, 可以使用凝集测定法来检测靶抗体（例如抗凝溶胶蛋白抗体）的存在。在此情况中, 经抗原包被的颗粒被包含靶抗体的样品凝集。在此形式中, 成分均不需要是标记的, 并且通过简单的目视检查来检测靶抗体的存在。

[0159] C. 鉴定和表征本发明的凝溶胶蛋白结合剂

[0160] 用于鉴定和 / 或筛选本发明的结合剂的方法。可用于鉴定和筛选拥有对凝溶胶蛋白多肽的期望的特异性的结合剂（例如抗凝溶胶蛋白抗体和抗凝溶胶蛋白抗体相关多肽）

的方法包括本领域内已知的任何免疫学介导的技术。可以通过本领域普通技术人员公知的多种方法来在体外检测免疫应答的成分。例如, (1) 可以将细胞毒性 T 淋巴细胞与经放射性标记的靶细胞一起温育, 并通过放射性的释放来检测这些靶细胞的溶胞; (2) 可以将辅助 T 淋巴细胞与抗原和抗原呈递细胞一起温育, 并通过标准的方法来测量细胞因子的合成和分泌 (Windhagen A 等, *Immunity*, 2 :373-80(1995)); (3) 可以将抗原呈递细胞与全蛋白抗原一起温育, 并通过 T 淋巴细胞活化测定法或生物物理方法来检测该抗原在 MHC 上的呈递 (Harding 等, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 86 :4230-4(1989)); (4) 可以将肥大细胞与交联其 Fc- ϵ 受体的试剂一起温育, 并通过酶免疫测定法来测量组胺释放 (Siraganian 等, *TIPS*, 4 :432-437(1983)); 及 (5) 酶联免疫吸附测定法 (ELISA)。

[0161] 类似地, 还可以通过本领域普通技术人员公知的多种方法来检测模式生物体 (例如小鼠) 或人受试者中的免疫应答产物。例如, (1) 可以容易地通过临床实验室中当前使用的标准方法 (例如 ELISA) 来检测响应疫苗接种而发生的抗体生成; (2) 可以如下检测免疫细胞向炎症位置的迁移, 即抓破皮肤表面, 并在抓破位置上放置无菌容器来捕捉迁移细胞 (Peters 等, *Blood*, 72 :1310-5(1988)); (3) 可以使用 ^3H - 胸苷来测量响应促细胞分裂原而发生的外周血单个核细胞增殖或混合的淋巴细胞反应; (4) 可以通过在孔中放置 PMBC 以及经标记的颗粒来测量 PMBC 中的粒细胞、巨噬细胞、和其它吞噬细胞的噬菌细胞能力 (Peters 等, *Blood*, 72 :1310-5(1988)); 及 (5) 可以如下测量免疫系统细胞的分化, 即用针对 CD 分子诸如 CD4 和 CD8 的抗体标记 PMBC, 并测量表达这些标志物的 PMBC 的分数。

[0162] 在一个实施方案中, 使用可复制遗传包装表面上的候选结合剂展示来选择本发明的凝溶胶蛋白结合剂。参见例如美国专利号 5, 514, 548 ; 5, 837, 500 ; 5, 871, 907 ; 5, 885, 793 ; 5, 969, 108 ; 6, 225, 447 ; 6, 291, 650 ; 6, 492, 160 ; EP 585287 ; EP 605522 ; EP 616640 ; EP 1024191 ; EP 589877 ; EP 774 511 ; EP 844 306。对于生成 / 选择含有如下噬菌粒基因组的丝状噬菌体颗粒有用的方法已经有记载, 所述噬菌粒基因组编码具有想要的特异性的结合分子。参见例如 EP 774 511 ; US 5871907 ; US 5969108 ; US 6225447 ; US 6291650 ; US 6492160。

[0163] 在一个实施方案中, 使用酵母宿主细胞表面上的候选结合剂展示来选择本发明的凝溶胶蛋白结合剂。对于通过酵母表面展示来分离 scFv 多肽有用的方法已经记载于 Kieke 等, *Protein Eng.*, 10(11) :1303-10(1997)。

[0164] 在一个实施方案中, 使用核糖体展示来选择本发明的凝溶胶蛋白结合剂。对于使用核糖体展示来鉴定肽文库中的配体有用的方法已经记载于 Mattheakis 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 :9022-26(1994); 及 Hanes 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 :4937-42(1997)。

[0165] 在一个实施方案中, 使用候选结合剂的 tRNA 展示来选择本发明的凝溶胶蛋白结合剂。对于使用 tRNA 展示来进行配体体外选择有用的方法已经记载于 Merryman 等, *Chem. Biol.* 9 :741-46(2002)。

[0166] 在一个实施方案中, 使用 RNA 展示来选择本发明的凝溶胶蛋白结合剂。对于使用 RNA 展示文库来选择肽和蛋白质有用的方法已经记载于 Roberrs 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94 :12297-302(1997); 及 Nemoto 等, *FEBS Lett.*, 414 :405-8(1997)。对于使用非天然 RNA 展示文库来选择肽和蛋白质有用的方法已经记载于 Frankel 等, *Curr. Opin. Struct.*

Biol., 13 :506-12 (2003)。

[0167] 在一个实施方案中,在革兰氏阴性细菌的周质中表达本发明的凝溶胶蛋白结合剂,并与经标记的凝溶胶蛋白多肽混合。参见 WO 02/34886。在表达具有对凝溶胶蛋白多肽的亲力的重组多肽的克隆中,与结合剂结合的经标记的凝溶胶蛋白多肽的浓度升高,并容许细胞从文库的剩余部分分离,如记载于 Harvey 等, Proc. Natl. Acad. Sci. 22 : 9193-98 (2004) 和美国专利公开文本号 2004/0058403 的。

[0168] 选择想要的凝溶胶蛋白结合剂后,涵盖的是,其可以通过本领域技术人员已知的任何技术(例如原核或真核细胞表达等)以大体积生产。可以如下生成凝溶胶蛋白结合剂(其是例如但不限于抗凝溶胶蛋白杂合抗体或片段),即使用常规技术来构建编码如下抗体重链的表达载体,其中保留初始物种抗体结合特异性所要求的 CDR 和(如必要的话)可变区框架中最少部分(如依照本文中所述的技术进行工程化改造的)衍生自起源物种抗体,而抗体的剩余部分衍生自可以如本文中所描述的那样操作的靶物种免疫球蛋白,由此生成供表达杂合抗体重链用的载体。

[0169] 凝溶胶蛋白结合的测量。在一个实施方案中,凝溶胶蛋白结合测定法指如下的测定法形式,其中在如下条件下混合凝溶胶蛋白多肽与凝溶胶蛋白结合剂,所述条件适合于凝溶胶蛋白或凝溶胶蛋白样多肽与凝溶胶蛋白结合剂之间的结合和评估凝溶胶蛋白或凝溶胶蛋白样多肽与凝溶胶蛋白结合剂之间的结合量。比较结合量与合适的对照,其可以是没有凝溶胶蛋白多肽的情况中的结合量、存在非特异性免疫球蛋白组分的情况中的结合量、或两者。可以通过任何合适的方法来评估结合量。结合测定法方法包括例如 ELISA、放射性免疫测定法、闪烁逼近测定法、荧光能量转移测定法、液体层析、膜过滤测定法等。用于直接测量凝溶胶蛋白多肽与凝溶胶蛋白结合剂结合的生物物理测定法是例如核磁共振、荧光、荧光偏振、表面等离子共振(BIACOR 芯片)等。通过本领域中已知的标准测定法来测定特异性结合,例如放射性配体结合测定法、ELISA、FRET、免疫沉淀、SPR、NMR(2D-NMR)、质谱术等。若候选凝溶胶蛋白结合剂的特异性结合比在没有候选凝溶胶蛋白结合剂的情况中观察到的结合大至少 1%,则候选凝溶胶蛋白结合剂作为本发明的凝溶胶蛋白结合剂是有用的。

[0170] 本发明还提供了凝溶胶蛋白多肽与凝溶胶蛋白结合剂的共晶体,作为一种测定分子相互作用的方法。适合于凝溶胶蛋白结合剂与凝溶胶蛋白多肽之间的结合的条件会取决于化合物及其配体,并且本领域普通技术人员能容易地确定。

[0171] II. 本发明的凝溶胶蛋白结合剂的用途

[0172] 总论。本发明的结合剂在涉及凝溶胶蛋白或凝溶胶蛋白样多肽的定位和/或定量的本领域已知方法中是有用的(例如对于在测量合适的生理学样品内的凝溶胶蛋白或凝溶胶蛋白样多肽水平中的使用、对于在诊断方法中的使用、对于在使多肽成像中的使用等)。本发明的结合剂可用于通过标准的技术诸如亲和层析或免疫沉淀来分离凝溶胶蛋白多肽。本发明的凝溶胶蛋白结合剂可以便于纯化来自生物学样品(例如哺乳动物血清、尿、或细胞)的天然免疫反应性凝溶胶蛋白多肽或凝溶胶蛋白样多肽以及宿主系统中表达的重组合成的免疫反应性凝溶胶蛋白多肽或凝溶胶蛋白样多肽。此外,可以使用凝溶胶蛋白结合剂来检测免疫反应性凝溶胶蛋白多肽或凝溶胶蛋白样多肽(例如在血浆、尿、细胞溶胞物或细胞上清液中)以便评估免疫反应性多肽的丰度和表达样式。可以在诊断上使用本

发明的凝溶胶蛋白结合剂来监测组织中的免疫反应性凝溶胶蛋白和 / 或凝溶胶蛋白样多肽水平, 作为临床测试规程的一部分, 例如用以测定给定治疗方案的功效。如上文所记录的, 可以通过偶联 (即, 物理连接) 本发明的凝溶胶蛋白结合剂与可检测物质来便于检测。

[0173] 凝溶胶蛋白多肽的检测。用于检测生物样品中是否存在凝溶胶蛋白多肽或凝溶胶蛋白样多肽的一种例示性方法牵涉自测试受试者获得生物样品, 并使所述生物样品与能够检测凝溶胶蛋白多肽或凝溶胶蛋白样多肽的本发明凝溶胶蛋白结合剂接触, 使得在所述生物样品中检测凝溶胶蛋白多肽或凝溶胶蛋白样多肽的存在。凝溶胶蛋白结合剂的一个例子是针对 SEQ IDNO. :1 或其同系物或片段生成的抗体, 其能够结合凝溶胶蛋白多肽 (凝溶胶蛋白多肽片段) 或凝溶胶蛋白样多肽。凝溶胶蛋白结合剂可以是标记的。关于结合剂的术语“标记的”意图涵盖通过偶联 (即, 物理连接) 可检测物质与结合剂来直接标记结合剂, 以及通过与被直接标记的另一化合物的反应性来间接标记结合剂。间接标记的例子包括使用荧光标记的二抗来检测一抗和用生物素对 DNA 探针进行末端标记以使得其能用荧光标记的链霉亲和素检测。

[0174] 在合适的实施方案中, 对尿样品测定凝溶胶蛋白多肽或凝溶胶蛋白样多肽。虽然不希望限于理论, 尿凝溶胶蛋白或凝溶胶蛋白样多肽可以是利用血浆凝溶胶蛋白的产物。血浆凝溶胶蛋白是 90kDa 的多肽, 而且在结合和清除自受伤细胞释放的肌动蛋白和其它毒性物质方面具有至关重要的生物学功能。较低的血浆凝溶胶蛋白水平与许多疾病有关, 这提示血浆凝溶胶蛋白的消减在疾病过程期间发生。结合肌动蛋白后, 全长凝溶胶蛋白可以由肾清除。如此, 尿凝溶胶蛋白片段代表体内利用血浆凝溶胶蛋白的生物标志。

[0175] 可以使用本发明的检测方法检测体内以及体外生物样品中的凝溶胶蛋白多肽或凝溶胶蛋白样多肽。用于检测凝溶胶蛋白多肽或凝溶胶蛋白样多肽的体外技术包括酶联免疫吸附测定法 (ELISA)、Western 印迹、免疫沉淀、放射性免疫测定法、和免疫荧光。此外, 用于检测凝溶胶蛋白多肽或凝溶胶蛋白样多肽的体内技术包括向受试者中导入标记的凝溶胶蛋白结合剂, 例如抗凝溶胶蛋白抗体。例如, 可以用放射性标记物标记抗体, 所述放射性标记物在受试者中的存在和位置能通过标准的成像技术来检测。在一个实施方案中, 所述生物样品包含来自测试受试者的多肽分子。

[0176] 免疫测定法和成像。使用基于抗体的技术, 可以使用本发明的凝溶胶蛋白结合剂来测定生物样品 (例如人血浆) 中的凝溶胶蛋白多肽水平或凝溶胶蛋白样多肽水平。例如, 可以用经典的免疫组织学方法来研究组织中的蛋白质表达 (Jalkanen, M. 等, *J. Cell. Biol.* 101 :976-985(1985) ;Jalkanen, M. 等, *J. Cell. Biol.* 105 :3087-3096(1987))。对于检测蛋白质基因表达有用的其它基于抗体的方法包括免疫测定法, 诸如酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 和放射性免疫测定法 (RIA)。合适的抗体测定标记物是本领域中已知的, 并且包括酶标记物 (诸如葡萄糖氧化酶)、和放射性同位素或其它放射性试剂 (诸如碘 (^{125}I 、 ^{121}I 、 ^{131}I)、碳 (^{14}C)、硫 (^{35}S)、氘 (^3H)、铟 (^{112}In)、和锝 ($^{99\text{m}}\text{Tc}$)、和荧光标记物 (诸如荧光素和罗丹明)、和生物素。

[0177] 在测定生物样品中的凝溶胶蛋白多肽水平或凝溶胶蛋白样多肽水平外, 还可以通过成像来体内检测凝溶胶蛋白多肽水平或凝溶胶蛋白样多肽水平。供体内成像凝溶胶蛋白多肽水平或凝溶胶蛋白样多肽用的凝溶胶蛋白结合剂 (例如抗凝溶胶蛋白抗体) 标记物或标志物包括那些通过 X- 射线照相术、NMR 或 ESR 可检测的。对于 X- 射线照相术, 合适的

标记物包括放射性同位素诸如钷或铯,其放射可检测的辐射,但对受试者不是明显有害的。适合于NMR和ESR的标志物包括那些具有可检测的特征性自旋的,诸如氘,其可以通过为相关 scFv 克隆标记营养物来掺入凝溶胶蛋白结合剂中。

[0178] 将已经用合适的可检测成像模块诸如放射性同位素(例如¹³¹I、¹¹²In、^{99m}Tc)、射线不透性物质、或通过核磁共振可检测的材料标记的凝溶胶蛋白结合剂导入(例如胃肠外、皮下、或腹膜内)受试者中。本领域中应当理解的是,受试者的体型和所使用的成像系统会决定产生诊断图像所需要的成像模块数量。在放射性同位素模块的情况下,对于人受试者,所注射的放射性的数量通常会在约5至20毫居里^{99m}Tc的范围内。然后经标记的凝溶胶蛋白结合剂会优先在含有特定靶多肽的细胞的位置处积累。例如,体内肿瘤成像记载于S. W. Burchiel等, *Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer* 13(1982)。

[0179] 如此,本发明提供了一种医学状况的诊断方法,其牵涉:(a) 通过在个体的细胞或体液中测量本发明的凝溶胶蛋白结合剂的结合来测定多肽的表达;(b) 比较蛋白质量与标准,由此与标准水平相比所测定多肽的升高或降低指明医学状况。

[0180] 亲和纯化。可以使用本发明的凝溶胶蛋白结合剂来从样品纯化免疫反应性凝溶胶蛋白(例如天然的血浆凝溶胶蛋白)。在一些实施方案中,可以将抗体(例如GN3E9、GC1C10、GC5D1、GC4A10、和/或GF2D6)固定化在固体支持物上。此类固体支持物的例子包括塑胶诸如聚碳酸酯、复合碳水化合物诸如琼脂糖和 Sepharose、丙烯酸类树脂和诸如聚丙烯酰胺和胶乳珠。用于偶联抗体与此类固体支持物的技术是本领域中公知的(Weir等,“*Handbook of Experimental Immunology*”第4版,Blackwell Scientific Publications, Oxford, England, 第10章(1986);Jacoby等, *Meth. Enzym.* 34 Academic Press, N. Y. (1974))。

[0181] 用于向抗体-支持基质结合抗原的最简单方法是在柱中收集珠子,并使抗原溶液往下流过该柱。此方法的效率取决于固定化抗体与抗原之间的接触时间,其可以通过使用低流速来延长。固定化抗体随抗原流过而捕获它。或者,可以如下使抗原与抗体-支持基质接触,即混合抗原溶液与支持物(例如珠子),并旋转或摇动浆体,容许抗原与固定化抗体之间的最大限度接触。已经完成结合反应后,使浆体流入柱中以收集珠子。使用合适的清洗缓冲液来清洗珠子,然后洗脱纯的或基本上纯的抗原。

[0182] 可以将感兴趣的抗体或多肽与固体支持物诸如珠子偶联。另外,若想要的话,还可以将第一固体支持物诸如珠子与第二固体支持物(其可以是第二珠子或其它支持物)偶联,其通过任何合适的手段来实现,包括那些在本文中公开的用于偶联多肽与支持物的。因而,还可以应用本文中公开的关于多肽与固体支持物偶联的任何偶联方法和手段以偶联第一支持物与第二支持物,其中所述第一和第二固体支持物可以是相同的或不同的。

[0183] 供偶联多肽与固体支持物使用的合适接头(其可以是交联剂)包括能与支持物表面上存在的官能团,或与多肽,或与两者起反应的多种试剂。作为交联剂有用的试剂包括同双功能和特别是异双功能试剂。有用的双功能交联剂包括但不限于N-SIAB、二马来酰亚胺、DTNB、N-SATA、N-SPDP、SMCC和6-HYNIC。可以选择交联剂来提供多肽与固体支持物之间的选择性可切割键。例如,可以采用光不稳定性交联剂诸如3-氨基-(2-硝基苯基)丙酸作为用于自固体支持物切割多肽的手段(Brown等, *Mol. Divers* 4-12(1995);Rothschild等, *Nucl. Acids Res.* 24:351-66(1996);及美国专利号5,643,722)。其它交联剂是本领域中公

知的（参见例如 Wong(1991), 见上文；及 Hermanson(1996), 见上文）。

[0184] 可以将抗体或多肽固定化在固体支持物诸如珠子上, 其经由羧基官能化的珠子与多肽氨基末端之间形成的共价酰胺键或者, 相反地, 经由氨基官能化的珠子与多肽羧基末端之间形成的共价酰胺键来实现。另外, 可以将双功能三苯甲基接头附着至支持物, 例如树脂（诸如王树脂）上的 4-硝基苯基活性酯, 其经由氨基树脂经树脂上的氨基或羧基来实现。使用双功能三苯甲基办法, 固体支持物能要求用挥发性酸诸如甲酸或三氟乙酸进行的处理以确保切割多肽, 并能除去。在此情况中, 多肽能在固体支持物的孔底部或固体支持物的平坦表面上以无珠斑块沉积。添加基质溶液后, 可以将多肽解吸入 MS 中。

[0185] 还可以如下利用疏水性三苯甲基接头作为酸不稳定性接头, 即使用挥发性酸或合适的基质溶液（例如含有 3-HPA 的基质溶液）来从多肽切割氨基连接的三苯甲基基团。还可以改变酸不稳定性。例如可以将三苯甲基、单甲氧基三苯甲基、二甲氧基三苯甲基或三甲氧基三苯甲基改变成多肽的合适对位取代的、或更加酸不稳定的三苯甲胺衍生物, 即, 可以对多肽产生三苯甲基醚和三苯甲胺键。因而, 可以如下从疏水性接头除去多肽, 例如破坏疏水性吸引或者在酸性条件下, 包括（若想要的话）在典型的 MS 条件下（其中基质诸如 3-HPA 充当酸）切割三苯甲基醚和三苯甲胺键。

[0186] 可垂直切割的接头对于将第一固体支持物（例如珠子）结合至第二固体支持物, 或者对于将感兴趣的多肽结合至固体支持物也是有用的。使用此类接头, 可以从第二固体支持物选择性切割第一固体支持物（例如珠子）, 而不从支持物切割多肽；然后可以在较晚的时间时从珠子切割出多肽。例如, 可以采用二硫化物接头（其可以使用还原剂诸如 DDT 来切割）来将珠子结合至第二固体支持物, 并且可以使用酸可切割的双功能三苯甲基基团来将多肽固定化至支持物。根据需要, 可以首先切割多肽与固体支持物的连接, 例如保持完整的第一与第二支持物之间的连接完整。三苯甲基接头能提供共价的或疏水性的偶联, 而且不管偶联的性质, 在酸性条件下容易切割三苯甲基基团。

[0187] 例如, 可以经由连接基团来将珠子结合至第二支持物, 所述连接基团可以进行选择以具有如下的长度和化学性质, 使得珠子与固体支持物的高密度结合, 或多肽与珠子的高密度结合得到促进。此连接基团可以具有例如“树样”结构, 由此在固体支持物上的每个附着位点提供大量官能团。此连接基团的例子包括聚赖氨酸、聚谷氨酸、五赤藓糖醇 (penta-erythrole, penta-erythrol) 和三羟基氨基甲烷。

[0188] 非共价结合结合。可以将抗体或多肽与固体支持物偶联, 或者还可以将第一固体支持物与第二固体支持物偶联, 其经由非共价相互作用来实现。例如, 由铁磁性材料（其能够被磁化）制成的磁珠能被吸引至磁性固体支持物, 并且能通过除去磁场来从支持物释放。或者, 可以给固体支持物提供离子或疏水性模块, 这能容许离子或疏水性模块分别与多肽（例如含有附着的三苯甲基基团的多肽）或与具有疏水性特征的第二固体支持物的相互作用。

[0189] 还可以给固体支持物提供特异性结合对的成员, 因此能与含有互补结合模块的多肽或第二固体支持物偶联。例如, 用亲合素或用链霉亲合素包被的珠子能与具有掺入其中的生物素模块的多肽, 或者与用生物素或生物素的衍生物诸如亚氨基生物素包被的第二固体支持物结合。

[0190] 应当认可的是, 本文中所公开的或者其它地方本领域已知的任何结合成员可以是

颠倒的。如此,例如可以将生物素掺入多肽或固体支持物中,并且相反地,分别会将亲合素或其它生物素结合模块掺入支持物或多肽中。在本文中使用的所涵盖的其它特异性结合对包括但不限于激素及其受体、酶及其底物、核苷酸序列及其互补序列、抗体及与其特异性相互作用的抗原、和本领域技术人员已知的其它此类对。

[0191] A. 凝溶胶蛋白结合剂的诊断用途

[0192] 总论。本发明的凝溶胶蛋白结合组合在诊断方法中是有用的。因此,本发明提供了在诊断受试者中凝溶胶蛋白相关医学状况中使用本发明的结合剂的方法。可以选择本发明的结合剂,使得它们具有针对凝溶胶蛋白多肽的任何水平的表位结合特异性和很高的结合亲和力。一般而言,结合剂的结合亲和力越高,在免疫测定法中为了在不除去靶多肽的情况中除去非特异性结合的材料而实施的清洗条件能越严格。因而,本发明的凝溶胶蛋白结合剂在诊断测定法中通常具有至少 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 或 $10^{12}M^{-1}$ 的结合亲和力。此外,想要的是,作为诊断试剂使用的凝溶胶蛋白结合剂具有足以在标准条件下在至少 12h,优选至少五 (5)h,且更优选至少一 (1) 小时里达到平衡的动力学结合速率 (on-rate)。

[0193] 虽然凝溶胶蛋白结合剂可以作为任何种类的样品的诊断试剂使用,但是它们作为人生物学样品的诊断试剂是最有用的。可以使用凝溶胶蛋白结合剂来以多种标准测定法形式检测给定的凝溶胶蛋白或凝溶胶蛋白样多肽。此类形式包括免疫沉淀、Western 印迹、ELISA、放射性免疫测定法、和免疫计量测定法。参见 Harlow 和 Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Publications, New York (1988)); 美国专利号 3,791,932 ;3,839,153 ;3,850,752 ;3,879,262 ;4,034,074,3,791,932 ;3,817,837 ;3,839,153 ;3,850,752 ;3,850,578 ;3,853,987 ;3,867,517 ;3,879,262 ;3,901,654 ;3,935,074 ;3,984,533 ;3,996,345 ;4,034,074 ;及 4,098,876。可以自受试者的任何组织或体液获得生物学样品。

[0194] 免疫计量或三明治式 / 夹心测定法是本发明诊断方法的优选形式。参见美国专利号 4,376,110,4,486,530,5,914,241,和 5,965,375。此类测定法使用固定化至固相的一种凝溶胶蛋白结合剂 (例如抗凝溶胶蛋白抗体) 或一群抗凝溶胶蛋白抗体和溶液中的另一种抗凝溶胶蛋白抗体或一群抗凝溶胶蛋白抗体。典型地,所述一种溶液抗凝溶胶蛋白抗体或一群抗凝溶胶蛋白抗体是标记的。若使用抗体群体,则该群体可以含有结合靶多肽内的不同表位特异性的抗体。因而,可以对固相和溶液抗体两者均使用相同群体。若使用抗凝溶胶蛋白单克隆抗体,则对固相和溶液相使用具有不同结合特异性的第一和第二凝溶胶蛋白单克隆抗体。可以以任一次序或同时使固相 (也称为“捕获”) 和溶液 (也称为“检测”) 抗体与靶抗原接触。若首先接触固相抗体,则该测定法被称为是正向测定法。相反地,若首先接触溶液抗体,则该测定法被称为是反向测定法。若使靶物同时与两种抗体接触,则该测定法被称为同时测定法。使凝溶胶蛋白多肽与抗凝溶胶蛋白抗体接触后,温育样品达一段时间,其通常从约 10 分钟变化至约 24 小时,而且通常约 1 小时。然后实施清洗步骤以除去与作为诊断试剂使用的抗凝溶胶蛋白抗体没有特异性结合的产品成分。在分开的步骤中结合固相和溶液抗体时,可以在任一或两个结合步骤后实施清洗。清洗后,量化结合,其通常通过经由经标记的溶液抗体的结合来检测与固相连接的标记物来实现。通常对于给定的抗体群体或抗体对和给定的反应条件,从含有浓度已知的靶抗原的样品绘制校准曲线。然后通过从校准曲线得到的插值读取凝溶胶蛋白多肽在所测试样品中的浓度。可以自平衡时结

合的经标记溶液抗体量或者通过达到平衡前一系列时间点时结合的经标记溶液抗体的动力学测量来测量分析物。此曲线的斜率是样品中凝溶胶蛋白多肽浓度的度量。

[0195] 适合于在上文的方法中使用的支持物包括例如硝酸纤维素膜、尼龙膜、和衍生化的尼龙膜，并且还有颗粒诸如琼脂糖、基于右旋糖苷的凝胶、浸渍条、微粒、微球、磁性颗粒、试管、微量滴定孔、SEPHADEX™ (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway N. J.) 等。固定化可以通过吸附或通过共价附着。任选地，可以将抗凝溶胶蛋白抗体与接头分子诸如生物素连接以附着至表面结合的接头诸如亲合素。

[0196] 本发明还提供了用于确定个体是否有风险形成与凝溶胶蛋白多肽表达或活性有关的病症的预后（或预测）测定法。可以出于预后或预测目的而使用此类测定法，由此在以凝溶胶蛋白多肽为特征的或与凝溶胶蛋白多肽有关的病症发作前预防性处理个体。此外，还可以使用本发明的方法来在如下情况中评估个体是否表达凝溶胶蛋白多肽或凝溶胶蛋白多肽的多态形式，在所述情况中本发明的凝溶胶蛋白结合剂对于凝溶胶蛋白多肽对其多态形式具有较大的亲和力（或者反之亦然）。

[0197] 例如，可以利用本发明的凝溶胶蛋白结合剂对凝溶胶蛋白多肽或凝溶胶蛋白样多肽的结合来鉴定患有或有风险形成与凝溶胶蛋白多肽或凝溶胶蛋白样多肽水平改变有关的病症的受试者。或者，可以利用预后测定法来鉴定患有或有风险形成疾病或病症的受试者。如此，本发明提供了一种用于鉴定与异常凝溶胶蛋白多肽或凝溶胶蛋白样多肽表达或活性有关的疾病或状况的方法，其中自受试者获得测试样品，并检测凝溶胶蛋白或凝溶胶蛋白样多肽，其中存在凝溶胶蛋白或凝溶胶蛋白样多肽的改变诊断出受试者患有或有风险形成与异常凝溶胶蛋白多肽或凝溶胶蛋白样多肽表达或活性有关的疾病或状况。

[0198] 此外，可以使用本文中所描述的预后测定法来确定是否可以向受试者施用化合物（例如激动剂、拮抗剂、肽模拟物、多肽、肽、核酸、小分子、或其它药物候选物）以治疗与异常凝溶胶蛋白多肽或凝溶胶蛋白样多肽表达或活性有关的疾病或病症。例如，可以使用此类方法来确定受试者是否可以用影响凝溶胶蛋白多肽水平的化合物（例如化疗剂）有效治疗。如此，本发明提供了用于确定受试者是否可以用化合物有效治疗与异常凝溶胶蛋白多肽或凝溶胶蛋白样多肽表达或活性有关的病症或状况的方法，其中获得测试样品，并使用凝溶胶蛋白结合剂来检测凝溶胶蛋白多肽或凝溶胶蛋白样多肽（例如其中凝溶胶蛋白多肽或凝溶胶蛋白样多肽的存在与否诊断出受试者可以施用该化合物来治疗与异常凝溶胶蛋白多肽或凝溶胶蛋白样多肽表达或活性有关的病症）。

[0199] 测定凝溶胶蛋白多肽或凝溶胶蛋白样多肽在自受试者获得的尿样品中的水平，并与自未患该疾病或状况的个体获得的尿样品中找到的水平进行比较。与自健康受试者获得的样品相比自怀疑患有影响凝溶胶蛋白水平的疾病或状况的受试者获得的样品中的凝溶胶蛋白多肽或凝溶胶蛋白样多肽不够丰富（或过于丰富）指明所测试的受试者中有凝溶胶蛋白多肽或凝溶胶蛋白样多肽相关的疾病或状况。可能需要进一步的测试来做出阳性诊断。例如，与健康对照相比受试者尿中的凝溶胶蛋白或凝溶胶蛋白样多肽量增加可以指明受试者患有引起血浆凝溶胶蛋白利用升高的疾病或状况。

[0200] 有许多如下疾病，其中已知某些凝溶胶蛋白多肽或凝溶胶蛋白样多肽分子不够丰富（或过于丰富）的程度指明患有该疾病的受试者是否有可能响应特定类型的疗法或治疗。如此，检测样品中的凝溶胶蛋白多肽或凝溶胶蛋白样多肽的方法可以作为预后方法使

用,例如用以评估该受试者会响应疗法或治疗的可能性。与对照受试者相比血浆凝溶胶蛋白水平降低的状况的例子包括但不限于感染性休克、多器官功能障碍综合征、类风湿性关节炎、外伤、中风、心肌梗死、癌症、化学疗法和放射疗法、系统性自身免疫性疾病、和慢性肝炎。因而,与健康对照受试者相比,尿凝溶胶蛋白样多肽水平在患有这些状况的受试者中会升高。

[0201] 可以通过例如利用包含至少一种探针试剂(例如本文中所述的凝溶胶蛋白结合剂)的预先包装的诊断试剂盒(其可以在例如临床背景中方便地使用以诊断展现出牵涉凝溶胶蛋白多肽或凝溶胶蛋白样多肽的疾病或病的症状的受试者)来实施本文中所述的方法。此外,可以在本文中所述的预后测定法中利用表达凝溶胶蛋白多肽或凝溶胶蛋白样多肽的任何细胞类型或组织。

[0202] 使受试者与标准参照群体相关联。为了推导出对治疗的临床响应与特定的血浆凝溶胶蛋白水平之间的相关性,有必要获得关于由接受该治疗的个体群体,即临床群体展现出的临床响应的数据。可以通过对临床试验结果的回顾分析来获得此临床数据。或者,可以通过设计和实施一项或多项新的临床试验来获得临床数据。对临床群体数据的分析可用于定义标准参照群体,继而,其可用于为临床试验登记或为治疗性处理的选择而将受试者分类。在一个优选的实施方案中,已经在感兴趣的医学状况的存在方面对临床群体中包括的受试者分级。潜在受试者的分级可以包括例如标准体格检查或一项或多项实验室测试。或者,受试者分级可以包括基因表达样式的使用。例如,血浆或尿凝溶胶蛋白水平作为分级标准是有用的,其中表达样式与对疾病或状况的易感性或严重性之间有强烈的相关性。在一个实施方案中,将受试者分类或归入特定的组或类,这基于受试者中的一种或多种生物标志的测量水平与标准参照群体中观察到的一种或多种生物标志的水平的相似性。

[0203] 在本发明的一个实施方案中,向试验群体中的每名受试者施用感兴趣的治疗性处理,并使用一项或多项预先确定的标准来测量每名受试者对该处理的响应。涵盖的是,在许多情况中,试验群体会展现出一系列响应,而且调查人员会选择由各种响应构成的响应者组(例如低的、中等的、高的)的数目。另外,量化生物标志(例如尿凝溶胶蛋白)的表达水平,这可以在施用治疗前和/或后进行。然后分析这些结果以确定各组之间任何观察到的临床响应变异是否是统计学显著的。可以使用的统计学分析方法记载于L. D. Fisher 和 G. vanBelle, *Biostatistics :A Methodology for the Health Sciences*(Wiley-Interscience, New York(1993))。

[0204] 熟练技术人员能构建预测临床响应的数学模型,其作为来自上文所述分析的表达水平的函数。鉴定临床响应与生物标志表达水平之间的关联可以是用于设计如下诊断方法的基础,所述诊断方法用于确定会或者不会响应所述治疗的那些个体,或者会以较低水平响应,如此可能需要更多治疗,即更大剂量的药物的那些个体。诊断方法可以采取数种形式之一:例如,ELISA 或基于抗体的测试、血清学测试、或体格检查测量。唯一的要求是诊断测试结果与潜在状况之间有良好的关联。在一个实施方案中,此诊断方法使用针对血清或尿凝溶胶蛋白的抗体测定法,如上文所描述的。

[0205] 在一个实施方案中,测定自第一受试者获得的血液或组织样品中的生物标志分子的水平,并与来自自未患生物标志相关疾病的第二受试者获得的血液样品或相同组织类型的样品中找到的水平比较。与自健康(第二)受试者获得的样品比较自怀疑患有生物标志

相关疾病的第一受试者获得的样品中的生物标志分子过于丰富（或不够丰富）指明所测试的受试者中的生物标志相关疾病。可能需要进一步的测试来做出阳性诊断。

[0206] 在一个实施方案中，测定第一时间点时自受试者获得的血液、尿、或组织样品中的生物标志分子（例如凝溶胶蛋白）水平，并与较晚的时间点时自该受试者获得的尿样品中找到的水平比较。可以与在第二时间点时自受试者获得的样品比较在第一时间点时自受试者获得的样品中的生物标志分子的过于丰富（或不够丰富），其中与第二时间点时的生物标志水平相比第一时间点之间的生物标志水平升高指明受试者需要凝溶胶蛋白代替疗法。可能需要进一步的测试来做出阳性诊断。

[0207] 有许多如下疾病，其中已知某些生物标志分子的过表达（或表达不足）的程度指明患有该疾病的受试者是否有可能响应特定类型的疗法或治疗。如此，检测样品中的生物标志分子的方法可以作为预后方法使用，例如以便评估该受试者会响应疗法或治疗的可能性。因而，在另一个实施方案中，测定自第一受试者获得的血液或尿样品中的至少一种生物标志分子的水平，并与自对化合物（例如感兴趣的治疗性化合物）有响应的第二受试者，或标准参照群体获得的血液或尿样品中找到的至少一种生物标志分子的水平比较。与自第二受试者，或标准参照群体获得的血液或尿样品中找到的至少一种生物标志分子的水平相比自第一受试者获得的血液或尿样品中的至少一种生物标志分子的表达水平或样式的相似性指明该第一受试者会响应所述化合物，例如感兴趣的治疗性化合物。即，测定来自受试者的合适组织或生物学样品中的相关生物标志的水平，并与合适的对照例如患有相同疾病但已经对治疗有利响应的受试者中的水平比较。与对照相比样品中生物标志过表达（或表达不足）的程度可以预测受试者不会有利响应治疗或疗法（例如耐受化学疗法）的可能性。相对于对照的过表达（或表达不足）越大，受试者会响应治疗的可能性越小。

[0208] 有许多如下疾病，其中已知某些生物标志分子的过表达（或表达不足）的程度指明受试者是否会形成疾病（即生物标志相关疾病或医学状况）。如此，检测样品中的生物标志的方法可以作为预测受试者是否会形成疾病的方法使用。测定来自有风险形成疾病或状况的受试者的合适的尿或血液样品中的一种或多种生物标志的水平，并与合适的对照，例如没有风险形成该疾病的受试者中的水平比较。与对照相比样品中一种或多种生物标志过表达（或表达不足）的程度可以预测受试者会形成所述疾病的可能性。相对于对照的过表达（或表达不足）越大，受试者会形成疾病的可能性越大。

[0209] 可以通过例如利用包含至少一种探针试剂（例如本文中所描述的抗凝溶胶蛋白多肽抗体）的预先包装的诊断试剂盒（其可以在例如临床背景中方便地使用以诊断展现出牵涉本发明生物标志的疾病或病的症状或家族史的患者）来实施本文中所描述的方法。此外，可以在本文中所描述的预后测定法中利用表达本发明生物标志的任何细胞类型或组织。

[0210] 监测临床功效。在一个实施方案中，本发明提供了监测药剂（例如药物、化合物、或小分子）对凝溶胶蛋白或凝溶胶蛋白样多肽的表达或利用的影响。可以在基础药物筛选中和在临床试验中应用此类测定法。例如，可以在展现出凝溶胶蛋白表达下降的受试者的临床试验中监测药剂提高（或降低）凝溶胶蛋白或凝溶胶蛋白样多肽水平的效力。可以通过施用药剂并观察响应来鉴定影响凝溶胶蛋白或凝溶胶蛋白样多肽表达的药剂。因此，凝溶胶蛋白或凝溶胶蛋白样多肽的表达样式可以充当标志物，其指明受试者对药剂的生理学

响应。因而,在用药剂治疗个体前和期间的多个点时测定此响应状态。

[0211] 受试者分类。通过测量不同对照组的水平来测定凝溶胶蛋白或凝溶胶蛋白样多肽的标准对照水平。然后比较对照水平(参照水平)与给定受试者中凝溶胶蛋白或凝溶胶蛋白样多肽的测量水平。基于所测量水平与给定组的参照水平相比有多么相似,可以将受试者分类或归入特定组。

[0212] 如本领域技术人员会理解的,做出此确定会牵涉某种程度的不确定性。因此,可以使用对照组水平的标准偏差来做出概率确定,并且本发明的方法对广泛的基于概率的基因型组确定是可应用的。如此,例如而非为了限制,在一个实施方案中,若凝溶胶蛋白多肽的测量水平落入任何对照组的均值的 2.5 个标准偏差内,则可以将该个体归入该组。在另一个实施方案中,若凝溶胶蛋白多肽的测量水平落入任何对照组的均值的 2.0 个标准偏差内,则可以将该个体归入该组。在又一个实施方案中,若凝溶胶蛋白多肽的测量水平落入任何对照组的均值的 1.5 个标准偏差内,则可以将该个体归入该组。在又一个实施方案中,若凝溶胶蛋白多肽的测量水平是任何对照组水平的均值的 1.0 个或更小的标准偏差,则可以将该个体归入该组。

[0213] 如此,此方法容许以各种程度的概率确定特定受试者应当被放置在哪组中,然后此分配会确定个体应当被放入的风险种类。

[0214] B. 试剂盒

[0215] 本发明范围内还有包含本发明的凝溶胶蛋白结合剂组合物(例如单克隆抗体)和使用说明书的试剂盒。所述试剂盒对于检测生物学样品(例如任何体液,包括但不限于例如血清、血浆、淋巴、囊液(cystic fluid)、尿液、粪便、脑脊液、腹水或血液,而且包括身体组织的活检样品)中的凝溶胶蛋白多肽或凝溶胶蛋白样多肽的存在是有用的。例如,试剂盒可以包含:能够结合生物学样品中的凝溶胶蛋白多肽或凝溶胶蛋白样多肽的一种或多种凝溶胶蛋白结合剂(例如抗体或其抗原结合片段,其具有与由选自下组的保藏细胞系生成的抗体相同的抗原结合特异性:CGMCC 编号 2114、2115、和 2116);用于测定样品中的凝溶胶蛋白多肽或凝溶胶蛋白样多肽量的手段;和用于比较样品中的凝溶胶蛋白多肽或凝溶胶蛋白样多肽量与标准的手段。一种或多种凝溶胶蛋白结合剂可以是标记的。可以在合适的容器中包装试剂盒各成分(例如试剂)。试剂盒可以进一步包含关于使用该试剂盒来检测凝溶胶蛋白多肽或凝溶胶蛋白样多肽的说明书。

[0216] 对于基于抗体的试剂盒,试剂盒可以包含例如 1) 第一抗体(例如附着至固体支持物的),其结合与本发明的标志物对应的多肽;和任选地,2) 不同的第二抗体,其结合多肽或第一抗体,并与可检测标记物偶联。

[0217] 试剂盒还可以包含例如缓冲剂、防腐剂或蛋白质稳定剂。试剂盒可以进一步包含检测可检测的标记物所必需的成分,例如酶或底物。试剂盒还可以含有对照样品或一系列对照样品,其可以进行测定,并与测试样品比较。可以将试剂盒的每种成分装入单独的容器内,并且所有各容器以及解读使用该试剂盒实施的测定法的结果的说明书可以在单个包装内。本发明的试剂盒可以含有在试剂盒容器上或在试剂盒容器中的书面产品。书面产品描述如何使用试剂盒中装有的试剂,例如在确定用于预防或治疗受试者中的医学状况的策略中使用本发明的生物标志。在数个实施方案中,试剂的使用可以依照本发明的方法。

[0218] C. 凝溶胶蛋白代替疗法的预防性和治疗性用途

[0219] 总论。可以与凝溶胶蛋白代替疗法联合使用本发明的凝溶胶蛋白结合剂和方法。具体地,本发明提供了处理有与异常凝溶胶蛋白表达或活性有关的病症的风险(或对该病症易感)或患有与异常凝溶胶蛋白表达或活性有关的病症的受试者的预防性和治疗性方法两者。使用凝溶胶蛋白结合剂和方法来例如,确定凝溶胶蛋白代替疗法对受试者的适合性或者监测凝溶胶蛋白代替疗法在接受此疗法的受试者中的功效。在一个实施方案中,施用治疗有效量的重组的或纯化的、天然的凝溶胶蛋白化合物,从而提供针对过多胞外肌动蛋白的继发毒性效应的治疗益处。“过多的”胞外肌动蛋白指超出在没有继发组织损伤或毒性效应的前提下血浆蛋白结合并从细胞外液清除肌动蛋白的能力的胞外肌动蛋白量。“继发”组织损伤或毒性效应指由于血浆中存在过多的胞外肌动蛋白(通常由于身体别处的“原发”组织损伤)而对其它方面的健康组织、器官、和其中的细胞发生的组织损伤或毒性效应。虽然不希望限于理论,凝溶胶蛋白的输注导致 a) 结合肌动蛋白单体,从而阻止其缩合成肌动蛋白丝,和 / 或 b) 将肌动蛋白丝切割成单体状态,和 / 或 c) 与肌动蛋白结合蛋白或其片段复合的此肌动蛋白自循环或胞外组织环境的清除增强。

[0220] 任选地,在辅助疗法诸如放射、化疗处理、或施用其它细胞保护剂或免疫调节剂的组合循环的过程期间进行施用。因此,辅助疗法中有用的化合物和本发明的结合剂可以向需要其施用的受试者同时和序贯施用。

[0221] 一方面,本发明提供了一种用于在受试者中预防与异常凝溶胶蛋白表达或活性有关的疾病或状况的方法,其通过向受试者施用凝溶胶蛋白来进行。预防性凝溶胶蛋白结合剂的施用可以在表现出异常的特征性症状前发生,使得疾病或病症在其行进中得到预防或者延迟。在治疗性应用中,向怀疑或者已经患有血清凝溶胶蛋白水平下降的受试者施用凝溶胶蛋白。足以实现治疗性或预防性处理的量定义为治疗或预防有效剂量。

[0222] 基于凝溶胶蛋白结合剂的治疗剂的生物学效果的测定。在本发明的多个实施方案中,实施合适的体外或体内测定法来测定凝溶胶蛋白代替疗法的效果,及确定是否指明施用它于治疗受试者中的受累组织。

[0223] 典型地,凝溶胶蛋白足以实现治疗性或预防性效果的有效量在每天每千克体重约 0.00001mg 至每天每千克体重约 10,000mg 的范围。优选地,剂量范围为每天每千克体重约 0.0001mg 至每天每千克体重约 100mg。对于施用凝溶胶蛋白,剂量在每周、每两周或每三周约 0.0001 至 100mg/kg、且更通常是 0.01 至 5mg/kg 宿主体重的范围。例如,剂量可以是每周、每两周或每三周 1mg/kg 体重或 10mg/kg 体重,或者在每周、每两周或每三周 1-10mg/kg 的范围内。例示性的治疗方案需要每两天一次或每周一次或每月一次进行的施用。通常在多个时机施用凝溶胶蛋白。各单个剂量之间的时间间隔可以是每天、每周、每周或每年。时间间隔还可以是不规则的,如通过测量受试者中的抗体血液水平所指明的。在一些方法中,调节剂量以实现受试者中约 75 μ g/mL 至约 125 μ g/mL、100 μ g/mL 至约 150 μ g/mL、约 125 μ g/mL 至约 175 μ g/mL、或约 150 μ g/mL 至约 200 μ g/mL 的血清凝溶胶蛋白浓度。或者,可以以持续释放的配制剂施用凝溶胶蛋白,在该情况中需要较小频率的施用。剂量和频率随凝溶胶蛋白结合剂在受试者中的半衰期而变化。施用的剂量和频率可以根据处理是预防性的还是治疗性的而变化。在预防性应用中,在较长的一段时间里以相对稀少的时间间隔施用相对较低的剂量。一些受试者余生继续接受治疗。在治疗性应用中,有时需要相对较短时间间隔的相对较高剂量,直至降低或终止疾病行进,且优选地,直至受试者显示疾病症

状的部分或完全改善。此后,可以向患者施用预防性方案。

[0224] 毒性。优选地,有效量(例如剂量)的本文中所描述的凝溶胶蛋白会在不对受试者引起实质毒性的情况中提供治疗益处。可以测定本文中所描述的凝溶胶蛋白的毒性,其通过细胞培养物或实验动物中的标准药理学规程,例如通过测定LD₅₀(群体50%致死的剂量)或LD₁₀₀(群体100%致死的剂量)来实现。毒性和治疗效果之间的剂量比率是治疗指数。可以在配制对人中使用没有毒性的剂量范围中使用自这些细胞培养测定法和动物研究获得的数据。优选地,本文中所描述的凝溶胶蛋白的剂量位于循环浓度范围内,其包括具有少许毒性或没有毒性的有效剂量。剂量可以在此范围内变化,这取决于所采用的剂量形式和所利用的施用路径。考虑到受试者的状况,各医生可以选择准确的配方、施用路径和剂量。参见例如Fingl等,于:The Pharmacological Basis of Therapeutics 第1章(1975)。

[0225] 药物组合物的配方。依照本发明方法,可以将凝溶胶蛋白掺入适合于施用的药物组合物中。一般而言,药物组合物包含重组的或基本上纯化的天然凝溶胶蛋白和药学可接受载体,其形式适合于向受试者施用。药学可接受载体部分地由所施用的特定组合物,以及由施用该组合物所使用的特定方法来确定。因而,有极其多种适合于施用蛋白质组合物的药物组合物的配制剂(参见例如Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA 第18版(1990))。药物组合物一般配制为无菌的、基本上等张的,而且完全遵照美国食品药品监督管理局的所有优质生产规范(Good Manufacturing Practice, GMP) 条例。

[0226] 术语“药学可接受的”、“生理学可耐受的”及其语法变化形式在它们提及组合物、载体、稀释剂和试剂时可互换使用,表示该物质能够向受试者或者对受试者施用,而不以会禁止该组合物施用的程度产生不想要的生理学效果。例如,“药学可接受的赋形剂”指在制备药学组合物中有用的赋形剂,其一般是安全的、无毒的、和想要的,而且包括对于兽医使用以及对于人药学使用可接受的赋形剂。此类赋形剂可以是固体的、液体的、半固体的,或者,在气雾剂组合物的情况中,可以是气体的。“药学可接受的盐和酯”指药学可接受的且具有想要的药理学特性的盐和酯。此类盐包括能在如下情况中形成的盐,其中凝溶胶蛋白中存在的酸性质子能够与无机碱或有机碱起反应。合适的无机盐包括那些与碱金属(例如钠和钾)、镁、钙、和铝形成的。合适的有机盐包括那些与有机碱诸如胺碱(例如乙醇胺、二乙醇胺、三乙醇胺、缓血酸胺(tromethamine)、N-甲基葡糖胺等)形成的。此类盐还包括与无机酸(例如氢氯酸和氢溴酸)和有机酸(例如乙酸、柠檬酸、马来酸、及烷烃和芳烃磺酸诸如甲磺酸和苯磺酸)形成的酸加成盐。药学可接受的酯包括自凝溶胶蛋白中存在的羧基、磺酰氧、和磷酰氧(phosphonoxy)基团形成的酯,例如C₁₋₆烷基酯。在有两个酸性基团存在时,药学可接受的盐或酯可以是单酸单盐或酯或者二盐或酯;且类似地,若有超过两个酸性基团存在,则一些或所有此类基团可以成盐或成酯。凝溶胶蛋白多肽可以以未成盐或未成酯形式,或者以成盐和/或成酯形式存在,并且此凝溶胶蛋白多肽的命名意图包括初始(未成盐的和未成酯的)化合物及其药学可接受的盐和酯两者。还有,某些凝溶胶蛋白多肽可以以超过一种立体异构体形式存在,并且此凝溶胶蛋白多肽的命名意图包括所有单一立体异构体和此类立体异构体的所有混合物(无论外消旋或其它情况)。本领域普通技术人员确定施用本发明的特定药物和组合物的合适时机、次序和剂量不会有困难。

[0227] 此类载体或稀释剂的例子包括但不限于水、盐水、Ringer氏溶液、右旋糖溶液、和

5%人血清清蛋白。还可以使用脂质体和非水性媒介诸如不挥发性油。对药学活性物质使用此类介质和化合物是本领域中公知的。除非任何常规的介质或化合物与凝溶胶蛋白结合剂不相容,涵盖其在组合物中的应用。还可以将补充性的活性化合物掺入组合物中。

[0228] 将本发明的药物组合物配制成与其预想的施用路径相容。可以通过胃肠外、表面、静脉内、口服、皮下、动脉内、真皮内、经皮、直肠、颅内、腹膜内、鼻内、肌肉内路径或者以吸入剂施用凝溶胶蛋白组合物。任选地,可以与至少部分有效治疗各种疾病(包括各种肌动蛋白或微丝相关疾病)的其它药剂组合施用凝溶胶蛋白。

[0229] 用于胃肠外、真皮内、或皮下应用的溶液或悬浮液可以包括下列成分:无菌稀释剂诸如注射用水、盐水溶液、不挥发性油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其它合成溶剂;抗菌化合物诸如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂诸如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合化合物诸如乙二胺四乙酸(EDTA);缓冲剂诸如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐,及供调节张力用的化合物诸如氯化钠或右旋糖。pH可以用酸或碱来调节,诸如盐酸或氢氧化钠。胃肠外制剂可以装在由玻璃或塑料制成的安瓿、一次性注射器或多剂量管形瓶中。

[0230] 适合用于可注射使用的药物组合物包括无菌水溶液(在水溶性的情况中)或分散体和供即时制备无菌可注射溶液或分散体用的无菌粉剂。对于静脉内施用,合适的载体包括生理盐水、抑菌水、Cremophor EL(BASF, Parsippany, N. J.)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)。在所有情况中,组合物必须是无菌的,而且应当是流体的,其程度使得存在容易的可注射性。它在制造和贮存条件下必须是稳定的,而且必须针对微生物诸如细菌和真菌的污染作用提供防护。载体可以是溶剂或分散介质,其包含例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇、及液态聚乙二醇等)、及其合适的混合物。可以例如通过使用涂层诸如卵磷脂、在分散体的情况中通过维持所要求的粒度、及通过使用表面活性剂来维持适当的流动性。各种抗菌化合物和抗真菌化合物(例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、酚、抗坏血酸、硫柳汞等)可以实现阻止微生物的作用。在许多情况中,组合物中包含等张化合物(例如糖类,多元醇诸如甘露醇、山梨醇、氯化钠)会是优选的。可以通过在组合物中包含延迟吸收的化合物(例如单硬脂酸铝和明胶)来引起可注射组合物的吸收延长。

[0231] 可以如下制备无菌可注射溶液,即根据需要在具有上文所列举的一种成分或成分组合的合适溶剂中掺入需要量的凝溶胶蛋白,接着过滤灭菌。一般而言,通过将药剂掺入无菌媒介中来制备分散体,所述无菌媒介含有基础分散介质及来自那些上文所列举的成分的其它所需成分。在供制备无菌可注射溶液用的无菌粉剂的情况中,制备方法是自其先前无菌过滤的溶液产生活性成分和任何其它想要成分的粉末的真空干燥和冷冻干燥。可以以积存注射(depot injection)或植入制剂形式施用药剂,所述积存注射或植入制剂可以以使得容许持续或脉冲释放活性成分的方式配制。

[0232] 一般而言,口服组合物包含惰性稀释剂或可食用载体。可以将它们装入明胶胶囊中或者压缩成片剂。出于口服治疗施用的目的,可以与赋形剂一起掺入多肽,并以片剂、锭剂、或胶囊形式使用。还可以使用流体载体来制备口服组合物而作为漱口液使用,其中口服应用流体载体中的化合物,嗖嗖漱口,并吐出或吞下。可以包含药学相容的结合化合物和/或佐剂物质作为组合物的一部分。片剂、丸剂、胶囊、锭剂等可以含有任何下列成分或具有相似性质的化合物:粘合剂诸如微晶纤维素、黄耆胶或明胶;赋形剂诸如淀粉或乳糖,崩解化合物诸如褐藻酸、Primogel、或玉米淀粉;滑润剂诸如硬脂酸镁或 Sterotes;助流剂诸如

胶体二氧化硅；甜味化合物诸如蔗糖或糖精；或调味化合物诸如薄荷、水杨酸甲酯、或桔味剂。

[0233] 对于通过吸入进行的施用，从含有合适推进剂（例如气体诸如二氧化碳）的加压容器或分配器，或喷雾器以气溶胶喷射形式投递凝溶胶蛋白。

[0234] 系统施用也可以是通过经粘膜或经皮手段。对于经粘膜或经皮施用，在配制剂中使用适合于要渗透的屏障的渗透剂。一般而言，此类渗透剂是本领域中已知的，并且包括例如对于经粘膜施用，去污剂、胆汁盐、和梭链孢酸衍生物。可以经由使用鼻喷雾或栓剂来实现经粘膜施用。对于经皮施用，将凝溶胶蛋白配制成软膏剂、油膏剂、凝胶剂、或乳膏，如本领域中普遍知道的。

[0235] 凝溶胶蛋白还可以以用于直肠投递的栓剂（例如用常规栓剂基质，诸如可可脂及其它甘油酯等）或保留灌肠剂形式制备成药学组合物。

[0236] 在一个实施方案中，凝溶胶蛋白与会保护凝溶胶蛋白免于从身体内快速消除的载体一起制备，诸如受控释放配制剂，包括植入物和微囊化投递系统。可以使用生物可降解的、生物相容的聚合物，诸如乙烯-乙酸乙烯、聚（酸）酐、聚乙醇酸、胶原、多正酯（polyorthoester）、和聚乳酸。用于制备此类配制剂的方法对于本领域技术人员会是显而易见的。此类材料也可以购自 Alza Corporation 和 Nova Pharmaceuticals, Inc. 脂质体悬浮液（包括用针对病毒抗原的单克隆抗体靶向受感染细胞的脂质体）也可以用作药学可接受载体。这些可以依照本领域技术人员已知的方法来制备，例如如记载于美国专利号 4,522,811 的。

[0237] 重组凝溶胶蛋白的制备。下文大部分的讨论属于如下进行的凝溶胶蛋白生成，即培养用含有编码凝溶胶蛋白的核酸的载体转化的细胞，并从细胞培养物回收多肽。进一步涵盖，可以通过使用亲和纯化（上文所描述的）从血浆纯化天然凝溶胶蛋白来生成凝溶胶蛋白。可以使用标准方法来生成蛋白质和编码蛋白质的 DNA 序列。还可以使用标准规程来实现纯化，诸如使用层析、使用针对多肽的抗体，或通过生成如下形式的多肽来分离蛋白质，在所述形式中所述多肽与有助于纯化，然后可被切割的模块（或标签）融合。

[0238] 可以使用本领域中公知的试剂和技术来将编码凝溶胶蛋白或凝溶胶蛋白样多肽（例如，多肽 SEQ ID NO. :1）的多核苷酸插入许多商品化的表达载体之任一种中。在制备重组表达构建体中，可以将本发明的各种多核苷酸插入或替代入细菌质粒载体中。可以采用任何方便的质粒，其会以具有细菌复制系统、容许在细菌中选择的标志物和一般是一个或多个独特的、方便定位的克隆位点为特征。许多质粒（也称为载体）可用于转化。合适的载体包括但不限于下列各项：病毒载体诸如 λ 载体系统 gt11，卡隆 4，和质粒载体诸如 pBR322、pBR325、pACYC177、pACYC1084、pUC8、pUC9、pUC18、pUC19、pLG339、pR290、pKC37、pKC101、SV 40、pBluescript II SK/- 或 KS+/- (Stratagene, La Jolla, CA)，及其任何衍生物。也合适的是酵母表达载体，其对于克隆和表达可能是高度有用的。例示性的酵母质粒包括但不限于 pPICZ 和 pFLD (Invitrogen, Carlsbad, CA)。载体的选择会取决于优选的转化技术和靶宿主细胞。

[0239] 可以沿 5' 向 3' 方向将编码凝溶胶蛋白的核酸分子插入载体中，使得可读框正确取向以在选定启动子的控制下表达所编码的蛋白质。如此，凝溶胶蛋白结构基因被说成是与启动子“可操作连接的”。可以以此方式将单个或多个核酸插入合适的载体中（每个在合

适的启动子的控制下)以制备本发明的核酸构建体。

[0240] 还可以将某些调节序列掺入本发明的表达构建体中。这些包括载体的非转录区,其与宿主细胞蛋白质相互作用以实施转录和翻译。此类元件在其强度和特异性方面可以有所变化。根据所利用的载体系统和宿主,可以使用任何数目的合适转录和/或翻译元件,包括组成型、诱导型、和阻抑型启动子,以及最低限度的5'启动子元件。

[0241] 组成型启动子是指导基因在细胞中恒定表达的启动子。广泛用于诱导异源多核苷酸表达的一些组成型启动子的例子包括供酵母中表达用的ADH1启动子、那些自数种肌动蛋白基因(已知它们在大多数真核细胞类型中表达)之任一种衍生的、和泛素启动子(其是已知在许多细胞类型中积累的基因产物的启动子)。在哺乳动物细胞中使用的组成型启动子的例子包括自劳氏肉瘤病毒衍生的RSV启动子、自巨细胞病毒衍生的CMV启动子、 β -肌动蛋白和其它肌动蛋白启动子、和EF1 α 启动子。

[0242] 也适合作为本发明质粒中的启动子的是容许对基因表达调节进行外部控制的启动子。一种调节基因表达的量 and 时机的方式是使用诱导型启动子。与组成型启动子不同,诱导型启动子不总是最佳活性的。诱导型启动子能够响应诱导剂(或诱导物)而直接或间接激活一种或多种DNA序列或基因的转录。一些诱导型启动子由物理手段激活,诸如热休克启动子(HSP),其在某些温度被激活。其它启动子由化学手段(例如IPTG)激活。诱导型启动子的其它例子包括金属硫蛋白启动子(其由重金属离子激活)和激素响应性启动子(其通过某些激素的处理来激活)。在没有诱导物的情况中,诱导型启动子控制下的核酸序列或基因不会被转录或者仅会被最少限度地转录。本发明的核酸构建体的启动子可以是同源的(自与宿主细胞相同的物种衍生的)或异源的(自与宿主细胞不同的物种衍生的)。

[0243] 一旦已经制备好本发明的核酸构建体,便可以将其掺入宿主细胞中。这是通过用本发明的质粒构建体转化或转染宿主或细胞来实施的,其使用本领域中已知的标准规程来进行,诸如记载于Sambrook等, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第三版, Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (2001) 的。适合于本发明的宿主和细胞包括但不限于细菌细胞、病毒、酵母细胞、昆虫细胞、植物细胞、和哺乳动物细胞,包括人细胞,以及任何其它适合于生成重组蛋白的细胞系统。例示性的细菌细胞包括但不限于大肠杆菌(*E. coli*)和分支杆菌(*Mycobacterium sp.*)。例示性的酵母宿主包括但不限于巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)、酿酒酵母或啤酒糖酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、和粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)。转化或转染的方法可以导致质粒中含有的感兴趣基因的瞬时或稳定表达。转化后,可以选择经过转化的宿主细胞,并在合适的培养中扩大。首先使用与本发明的核酸构建体一起被同时导入宿主细胞中的选择标志来鉴定经过转化的细胞。合适的标志物包括编码抗生素抗性的标志物,诸如对卡那霉素、庆大霉素、氨苄青霉素、潮霉素、链霉素、大观霉素、四环素、氯霉素等的抗性。依照本发明,可以使用任何已知的抗生素抗性标志物来转化和选择经过转化的宿主细胞。将细胞或组织培养于含有抗生素的选择培养基上,由此一般仅仅那些表达抗生素抗性标志物的转化体继续生长。另外/或者,可以使用报告基因(包括但不限于 β -半乳糖苷酶、 β -葡糖醛酸糖苷酶、萤光素酶、绿色荧光蛋白(GFP)或增强型绿色荧光蛋白(EGFP))来选择经过转化的细胞。所采用的选择标志会取决于靶物种。

[0244] 为了获得凝溶胶蛋白蛋白质,若编码序列在诱导型启动子的控制下,则表达被诱

导。为了分离蛋白质,增殖携带表达载体的宿主细胞,均浆,并离心均浆物以除去细胞碎片。然后将上清液进行连续硫酸铵沉淀。将含有本发明的蛋白质的级分在合适大小的右旋糖苷或聚丙烯酰胺柱中进行凝胶过滤以分开蛋白质。若必要的话,可以通过 HPLC 进一步纯化蛋白质级分。备选的蛋白质纯化方法可以在合适时使用。参见 J. E. Coligan 等编, *Current Protocols in Protein Science* (John Wiley & Sons (2003))。获得基本上纯化的重组蛋白后,可以向受试者施用蛋白质,如本文中所述的。[或者,可以使用标准的阴离子交换层析来纯化重组凝溶胶蛋白。Oberley, R. E. 等, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287 :L296-306 (2004)]。

[0245] 呈现以下实施例,以便更充分地例示本发明的一些实施方案。这些实施例决不应解释为限制本发明的范围,本发明的范围由所附权利要求书来限定。

实施例

[0246] 本发明由以下实施例进一步例示,所述实施例不应以任何方式解释为限制性的。

[0247] 实施例 1-GN3E9、GC1C10、和 GF2D6 单克隆抗体的纯化

[0248] 如 PCT 申请号 PCT/CN2007/002467 中所描述的那样制备单克隆抗凝溶胶蛋白抗体 GN3E9、GC1C10、和 GF2D6。通过山羊抗鼠同种型特异性抗体 (Southern Biotech, Birmingham, AL) 来测定选定的抗凝溶胶蛋白抗体的同种型。GN3E9 的同种型测定为鼠 IgG2b κ , 而 GC1C10 和 GF2D6 的同种型测定为鼠 IgG1 κ 。

[0249] 通过使用 Sepharose GL-4B 亲和纯化介质 (Pharmacia, Uppsala, Sweden) 进行的亲和层析来纯化 GN3E9。通过使用蛋白 G-Sepharose CL-4B 亲和纯化介质 (Pharmacia, Uppsala, Sweden) 进行的亲和层析来纯化 GC1C10 和 GF2D6 抗体。以每分钟 2ml 的流速将培养物上清液应用至柱。在将培养物上清液流过该柱后,用 50ml PBS 清洗它。用洗脱缓冲液 (0.1M 甘氨酸 (pH 2.4), 0.15M NaCl) 洗脱蛋白质。在 OD280nm 测量每份洗脱级分 (1ml) 的光密度。收集 OD280 大于 0.1 个单位的级分。将 100 μ l 中和缓冲液 (1M Tris-HCl pH 8.5) 添加至级分后,将洗脱液在透析管中分开放置,并于 4°C 将洗脱液针对 1L PBS (pH 7.5) 透析。更换透析缓冲液两次。将每种亲和纯化的抗体浓缩至 1mg/ml, 灭菌, 并于 4°C 贮存, 直至使用。

[0250] 实施例 2- 用本发明的凝溶胶蛋白结合剂免疫沉淀人尿凝溶胶蛋白

[0251] 尿凝溶胶蛋白多肽的免疫沉淀。为了测定本发明的凝溶胶蛋白结合剂免疫沉淀尿形式的凝溶胶蛋白的能力,以 2mg/ml 珠子的浓度将 GN3E9 和 GC1C10 抗体与 CNBr 活化的 Sepharose 4B (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) 偶联。依照制造商的说明书来实施偶联规程。简言之,将预先活化的珠子 (660mg; 等于约 2mL 最终的珠体积) 在 15 个体积的 1mM HCl 中悬浮,并容许膨胀 30 分钟。然后用 15 个凝胶体积的冷的 (4°C) 1mM HCl 清洗珠子,接着用 15 个体积的偶联缓冲液 (含有 0.5M NaCl 的 0.1M NaHCO₃ pH 8.3) 清洗以产生称为“清洗过的凝胶”的珠子。将每种抗凝溶胶蛋白抗体 (GN3E9、GC1C10、和 GF2D6) 在偶联缓冲液中稀释至 0.5 至 1.0mg/ml, 并将 pH 调节至 pH 8.3。将清洗过的凝胶添加至每种抗凝溶胶蛋白抗体溶液,并于 4°C 温育混合物过夜以产生“偶联凝胶”。将偶联凝胶在 15 个体积的 1M 乙醇胺中于室温重悬 2-4 小时以封闭活化珠上未使用的活化的化学偶联位点。然后将经封闭的凝胶在 15 个体积中清洗 8 次,其中交替 50mM Tris, 1M NaCl pH 8.0 和 50mM

甘氨酸, 1M NaCl pH 3.5 缓冲液, 接着用 10 个凝胶体积的 PBS 进行最终的清洗以除去任何未结合的材料。

[0252] 接着, 将一毫升 (1mL) 人尿样品 (其已经被短暂离心以除去沉淀物) 与 $10 \mu\text{l}$ 经抗凝溶胶蛋白抗体偶联的珠子 (即经 GN3E9 或 GC1C10 偶联的珠子) 一起于室温温育 2 小时。如下自经抗凝溶胶蛋白抗体偶联的珠子或空白珠子漂洗未结合的材料, 即通过离心 (14,000rpm, 3 分钟) 使珠子沉淀, 除去上清液, 然后通过 PBS 中重悬来清洗沉淀的珠子。五 (5) 轮清洗循环后, 如下在变性条件下除去结合至经抗凝溶胶蛋白抗体偶联的珠子的材料, 即将 $40 \mu\text{l}$ SDS-PAGE 加样缓冲液 (通过混合 3X 储液: 1M Tris-Cl pH 6.8, 2.4ml; 20% SDS 3ml; 甘油 (100%) 3ml; β -巯基乙醇 1.6ml; 溴酚蓝 0.006g, 10ml 制备的 SDS-PAGE 加样缓冲液) 添加至沉淀的珠子, 并将样品煮沸 5 分钟。将免疫沉淀的蛋白质在 10% SDS-PAGE 上分级, 并使用标准技术用考马斯蓝染料染色来显现。脱色后, 使用 HP 照相扫描仪来扫描凝胶。图 1 中显示了结果。顶部小图显示了 N 端特异性抗凝溶胶蛋白抗体 GN3E9 进行的免疫沉淀的结果。底部小图显示了 C 端特异性抗凝溶胶蛋白抗体 GC1C10 进行的免疫沉淀的结果。图 1 中所显示的 SDS-PAGE 的泳道如下: 第 1 道 - 第 3 道: 健康对照患者; 第 4 道 - 第 8 道: 来自 ICU 的严重中风患者。

[0253] 本发明的 C 端特异性抗凝溶胶蛋白抗体 (GC1C10 和 GF2D6) 能够免疫沉淀来自 ICU 患者, 而非来自健康对照患者的两种约 50kDa 的多肽。N 端特异性抗凝溶胶蛋白抗体 GN3E9 不能免疫沉淀来自对照或 ICU 患者的这些片段。因此, 本研究中所测试的本发明的凝溶胶蛋白结合剂能够鉴定来自人尿样品的约 50kDa 免疫反应性多肽。通过质谱术分析证实这些约 50kDa 的多肽的身份是 C 端凝溶胶蛋白片段 (参见实施例 2)。

[0254] 所测试的本发明挑选的凝溶胶蛋白结合剂免疫沉淀凝溶胶蛋白样多肽的能力对于这些结合剂在本发明方法中的使用是有利的。具体地, 可以采用能沉淀免疫反应性凝溶胶蛋白多肽的本发明凝溶胶蛋白结合剂来检测尿样品中的凝溶胶蛋白样片段。

[0255] Western 印迹分析。使用 Western 印迹分析技术来评估来自生物样品的尿凝溶胶蛋白片段的免疫沉淀。即, 为了进一步测定尿凝溶胶蛋白片段的身份, 用抗凝溶胶蛋白抗体实施对免疫沉淀的人尿蛋白质的 Western 印迹分析。用 C 端特异性抗凝溶胶蛋白抗体 GN3E9 或 GC1C10 免疫沉淀 3 名正常人受试者和 3 名严重中风 (ICU) 受试者的尿样品, 如上文所描述的。通过 10% SDS-PAGE 使免疫沉淀的蛋白质分级, 并使用标准技术向硝酸纤维素膜上进行 Western 印迹。于室温使用 5% (w/v) 脱脂奶封闭经电印迹的硝酸纤维素膜 (印迹) 1 小时后, 于室温用纯化的偶联有 HRP 的抗凝溶胶蛋白抗体 GN3E9 或 GC1C10 ($1 \mu\text{g/ml}$) 探查印迹达 2 小时。通过在摇动的情况中于室温用含有 0.02% Tween20 的 PBS 清洗 10 分钟来从印迹漂洗未结合的抗凝溶胶蛋白抗体。使用 HRP 介导的化学发光来显现复合物。具体地, 将印迹与 LumiGLO® 过氧化物酶化学发光底物 (KPL, Gaithersburg, MD) 一起温育 3 分钟, 并暴露于 X-射线胶片。图 2 中显示了结果。除第 6 道中的样品外, N 端特异性抗体 GN3E9 在尿样品中没有检测出全长凝溶胶蛋白以外的任何片段。如图 2B 中所显示的, 在自 ICU 受试者 (第 4 道 - 第 8 道), 而非对照受试者 (第 1 道 - 第 3 道) 获得的样品中鉴定出显著量的与人凝溶胶蛋白片段对应的免疫反应性肽。如此, 本发明的凝溶胶蛋白结合剂能在 Western 印迹测定法中检测尿样品中的免疫反应性凝溶胶蛋白样多肽。

[0256] 实施例 3- 对凝溶胶蛋白结合剂结合的免疫反应性多肽的表征

[0257] 为了证实由抗凝溶胶蛋白抗体免疫沉淀的蛋白质是人凝溶胶蛋白的片段,自 SDS-PAGE 切割出蛋白质条带,并将内含物在国家生物医学分析中心 (National Center of Biomedical Analysis, Beijing, China) 通过使用标准技术进行的质谱术进行分析 (参见 Lewis 等, Identification of Viral Mutants by Mass Spectrometry, Proc Nat Acad Sci USA 95 :8596-8601 (1998))。使用 C 端特异性抗凝溶胶蛋白抗体 GF2D6 来免疫沉淀尿蛋白质,如实施例 1 中所描述的。图 1 中显示了所分析的各条蛋白质条带。自凝胶切割出片段 F1 和 F2,并通过质谱术进行分析。分别通过表 5 和表 6 中标有下划线的区域来标示来自片段 F1 和 F2 的通过质谱术鉴定的肽。

[0258]

表 5 :片段 F1 的肽指纹

401	QTDGLGLSYL	SSHIANVERV	PFDAATLHTS	TAMAAQHGM	DDGTGQKQIW
451	<u>RIEGSNKVPV</u>	<u>DPATYGQFYG</u>	<u>GDSYIILYNY</u>	<u>RHGGRQGQII</u>	<u>YNWQGAQSTQ</u>
501	<u>DEVAASAILT</u>	<u>AQLDEELGGT</u>	<u>PVQSRVVQVK</u>	<u>EPAHLSLFG</u>	<u>GKPMIYKGG</u>
551	TSREGGQTAP	ASTRLFQVRA	NSAGATRAVE	VLPKAGALNS	NDAFVLKTPS
601	<u>AAYLWVGTGA</u>	<u>SEAEKTGAQE</u>	<u>LLRVLRAQPV</u>	<u>QVAEGSEPDG</u>	<u>FWEALGGKAA</u>
651	YRTSPRLKDK	<u>KMDAHPPLRF</u>	ACSNKIGRFV	IEEVPGELMQ	EDLATDDVML
701	LDTWDQVFW	VGKDSQEEK	<u>TEALSAKRY</u>	<u>IETDPANRDR</u>	<u>RTPITVVKQG</u>
751	FEPPSFVGF	LGWDDYWSV	DPLDRAMAEL	AA	(SEQ ID NO. :6)

[0259]

表 6 :片段 F2 的肽指纹

401	QTDGLGLSYL	SSHIANVERV	PFDAATLHTS	TAMAAQHGM	DDGTGQKQIW
451	<u>RIEGSNKVPV</u>	<u>DPATYGQFYG</u>	<u>GDSYIILYNY</u>	<u>RHGGRQGQII</u>	<u>YNWQGAQSTQ</u>
501	<u>DEVAASAILT</u>	<u>AQLDEELGGT</u>	<u>PVQSRVVQVK</u>	<u>EPAHLSLFG</u>	<u>GKPMIYKGG</u>
551	TSREGGQTAP	ASTRLFQVRA	NSAGATRAVE	VLPKAGALNS	NDAFVLKTPS
601	<u>AAYLWVGTGA</u>	<u>SEAEKTGAQE</u>	<u>LLRVLRAQPV</u>	<u>QVAEGSEPDG</u>	<u>FWEALGGKAA</u>
651	YRTSPRLKDK	<u>KMDAHPPLRF</u>	ACSNKIGRFV	IEEVPGELMQ	EDLATDDVML
701	LDTWDQVFW	VGKDSQEEK	<u>TEALSAKRY</u>	<u>IETDPANRDR</u>	<u>RTPITVVKQG</u>
751	FEPPSFVGF	LGWDDYWSV	DPLDRAMAEL	AA	(SEQ ID NO. :7)

[0260] 蛋白质组学数据库 (Swiss-Prot/TrEMBL) 搜索指明,所述多肽是人凝溶胶蛋白的 C 端片段。获得 F1 片段的 N 端序列,并显示 F1 片段对应于 SEQ ID NO :1 的氨基酸 410-782。因而,证实由本发明的抗凝溶胶蛋白抗体免疫沉淀的约 50kDa 多肽为人凝溶胶蛋白的 C 端片段。

[0261] 实施例 4- 对人尿凝溶胶蛋白 C 端片段特异性的抗体对

[0262] 尿凝溶胶蛋白 C 端片段的免疫沉淀。为了测定本发明的凝溶胶蛋白结合剂免疫沉淀尿凝溶胶蛋白片段的能力,以 2mg/ml 珠子的浓度将 GC5D1 抗体与 CNBr 活化的 Sepharose 4B (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) 偶联。依照制造商的说明书来实施偶联规程。简言之,将预先活化的珠子 (660mg ;等于约 2mL 最终的珠体积) 在 15 个体积的 1mM HCl 中悬浮,并容许膨胀 30 分钟。然后用 15 个凝胶体积的冷的 (4°C) 1mM HCl 清洗珠子,

接着用 15 个体积的偶联缓冲液（含有 0.5M NaCl 的 0.1M NaHCO₃ pH 8.3）清洗以产生称为“清洗过的凝胶”的珠子。将 GC5D1 抗体在偶联缓冲液中稀释至 0.5 至 1.0mg/ml，并将 pH 调节至 pH 8.3。将清洗过的凝胶添加至每种抗凝溶胶蛋白抗体溶液，并于 4℃ 温育混合物过夜以产生“偶联凝胶”。将偶联凝胶在 15 个体积的 1M 乙醇胺中于室温重悬 2-4 小时以封闭活化珠上未使用的活化的化学偶联位点。然后将经封闭的凝胶在 15 个体积中清洗 8 次，其中交替 50mM Tris, 1M NaCl pH 8.0 和 50mM 甘氨酸, 1M NaCl pH 3.5 缓冲液，接着用 10 个凝胶体积的 PBS 进行最终的清洗以除去任何未结合的材料。

[0263] 接着，将来自对照和严重中风患者的一毫升 (1mL) 人尿样品（其已经被短暂离心以除去沉淀物）与 10 μl 经 GC5D1 抗体偶联的珠子一起于室温温育 2 小时。如下自经抗凝溶胶蛋白抗体偶联的珠子漂洗未结合的材料，即通过离心 (14,000rpm, 3 分钟) 使珠子沉淀，除去上清液，然后通过 PBS 中重悬来清洗沉淀的珠子。五 (5) 轮清洗循环后，如下在变性条件下除去结合至经 GC5D1 抗体偶联的珠子的材料，即将 40 μl SDS-PAGE 加样缓冲液（通过混合 3X 储液：1M Tris-Cl pH 6.8, 2.4ml；20% SDS 3ml；甘油 (100%) 3ml；B-巯基乙醇 1.6ml；溴酚蓝 0.006g, 10ml 制备的 SDS-PAGE 加样缓冲液）添加至沉淀的珠子，并将样品煮沸 5 分钟。将免疫沉淀的蛋白质在 10% SDS-PAGE 上分级，并使用标准技术向硝酸纤维素膜上进行 Western 印迹。于室温使用 5% (w/v) 脱脂奶封闭经电印迹的硝酸纤维素膜（印迹）1 小时后，于室温用偶联有 HRP 的 GF2D6 (1 μg/ml) 探查印迹达 2 小时。通过在摇动的情况中于室温用含有 0.02% Tween 20 的 PBS 清洗 10 分钟来从印迹漂洗未结合的抗凝溶胶蛋白抗体。使用 HRP 介导的化学发光来显现复合物。具体地，将印迹与 LumiGLO® 过氧化物酶化学发光底物 (KPL, Gaithersburg, MD) 一起温育 3 分钟，并暴露于 X-射线胶片。图 3 中显示了结果。

[0264] 本发明的 C 端特异性抗凝溶胶蛋白抗体 (GC5D1, GF2D6) 能够免疫沉淀和检测来自 ICU 患者，而非来自健康对照患者的两种约 50kDa 的多肽。使用这两种抗体的组合没有检测出全长凝溶胶蛋白多肽。因此，本研究中所测试的本发明的凝溶胶蛋白结合剂能够鉴定来自人尿样品的约 50kDa 免疫反应性多肽。

[0265] 所测试的本发明挑选的凝溶胶蛋白结合剂免疫沉淀的能力对于这些结合剂在本发明方法中的使用是有利的。具体地，可以采用能沉淀免疫反应性凝溶胶蛋白多肽的本发明凝溶胶蛋白结合剂来检测尿样品中的凝溶胶蛋白多肽。

[0266] 实施例 5- 使用本发明的凝溶胶蛋白结合剂来定量测量尿凝溶胶蛋白片段

[0267] 测试抗凝溶胶蛋白抗体以测定它们充当用于检测尿凝溶胶蛋白片段的捕捉或检测抗体的能力。如下实施凝溶胶蛋白 ELISA。于 4℃ 用 10 μg/ml 捕捉抗体 (GC5D1) 包被 ELISA 平板 (96 孔；BD biosciences CA) 过夜。通过用 PBS 清洗平板 3 次来从各孔漂洗未结合的捕捉抗体。然后通过将各孔与 PBS 中的 3% (w/v) BSA 一起温育 (1 小时，室温) 来封闭非特异性结合位点。自各孔除去封闭溶液，并将平板风干，之后真空密封，并在使用前于 4℃ 贮存。

[0268] 将不同浓度 (0.01 至 1,000ng/mL) 的重组凝溶胶蛋白免疫原添加至 ELISA 平板。免疫原是全长凝溶胶蛋白 (FL)、包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸 13 至 440 的 N 端 (NT) 片段、或包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸 440 至 782 的 C 端 (CT) 片段。通过用 PBS 清洗 3 次来从各孔漂洗未结合的凝溶胶蛋白免疫原。

[0269] 通过将各孔与经 HRP 偶联的 2D6 抗体 (1 : 10,000) 一起温育 (30 分钟 ;37°C) 来检测结合的凝溶胶蛋白免疫原。通过用 PBS 漂洗各孔 3 次 (每次 5 分钟) 来除去未结合的经 HRP 偶联的 2D6 抗体。使用 SureBlue TMB 1- 成分微孔过氧化物酶底物 (KPL, Gaithersburg, MD) 来测量抗体复合物。具体地, 将 SureBlue TMB 1- 成分微孔过氧化物酶底物 (KPL, Gaithersburg, MD) 添加至各孔, 并将平板温育 10 分钟以容许对底物进行 HRP 介导的转化。通过添加 100 μ l 2NH₂SO₄ 来停止酶促反应。然后使用 ELISA 读板仪在 450nm/650nm 测量样品孔的光密度。

[0270] 图 4 中显示了如下文所详述的那样实施的用于测定挑选的凝溶胶蛋白结合剂的结合特征的研究的结果汇总。C 端抗体对显示对 C 端凝溶胶蛋白免疫原的剂量依赖性响应, 但是在所测试的浓度范围里没有显著检测出 N 端或全长免疫原。因此, 挑选的凝溶胶蛋白结合剂具有以定量方式特异性检测尿凝溶胶蛋白片段的能力。因此, 可以在 ELISA 形式中采用这些凝溶胶蛋白结合剂来检测尿样品中的凝溶胶蛋白样多肽。

[0271] 实施例 6- 临床样品中的尿凝溶胶蛋白片段的检测

[0272] 为了测试凝溶胶蛋白 ELISA 测定法定量临床背景中的尿凝溶胶蛋白片段的能力, 获得来自正常患者和外伤患者的样品, 并使用 ELISA 测定法来分析, 如实施例 5 中所描述的。从患有各种种类的外伤或医学状况的受试者获得样品。这些包括病危护理 (ICU) 患者和癌症患者 (即任何主要治疗诸如外科手术、化学疗法、或放射疗法前的患有新近诊断的癌症的患者)。从具有重大外科手术的患者获得别的样品, 其中重大外科手术定义为牵涉麻醉或呼吸辅助的任何外科手术规程。先前描述了用于募集患者的标准 (参见 Wang 等, Eur J Clin Pharmacol 62 :927-31 (2006))。败血症患者包括那些患有与新器官功能障碍、低血压、或灌注不足有关的败血症的患者。先前描述了用于募集患者的标准 (参见 Chen 等, Genes Immun 8 :439-43 (2007))。最后, 从患有肾炎的患者获得样品, 所述肾炎是肾的炎症。

[0273] 图 5 中显示了结果。正常患者具有很低水平的尿凝溶胶蛋白片段, 而肾衰竭、病危护理、癌症、外科手术、败血症、和肾炎患者展现出水平升高的尿凝溶胶蛋白, 如通过测定法所测量的 (图 5A 和图 5B)。这些结果表明本发明的凝溶胶蛋白结合剂量化临床背景中的尿凝溶胶蛋白片段的能力。此外, 研究表明凝溶胶蛋白样多肽是人肾衰竭、中风、败血症、癌症、外伤、和肾炎的生物标志。此外, 可以使用本发明的凝溶胶蛋白结合剂来测量患者对凝溶胶蛋白代替疗法的随后响应, 其通过在治疗患者后测量血清凝溶胶蛋白水平来实现。

[0274] 实施例 7- 全长血浆凝溶胶蛋白与尿凝溶胶蛋白片段之间的反相关

[0275] 在此实施例中, 使用来自正常个体或病危护理患者的患者匹配样品调查全长血浆凝溶胶蛋白水平与尿凝溶胶蛋白片段之间的关系。测量尿凝溶胶蛋白片段的水平, 如图 5 中所描绘的。

[0276] 如下实施血浆样品的凝溶胶蛋白 ELISA。于 4°C 用 10 μ g/ml 捕捉抗体 GN3E9 包被 ELISA 平板 (96 孔 ;BD biosciences CA) 过夜。通过用 PBS 清洗平板 3 次来从各孔漂洗未结合的捕捉抗体。然后通过将各孔与 PBS 中的 3% (w/v) BSA 一起温育 (1 小时, 室温) 来封闭非特异性结合位点。自各孔除去封闭溶液, 并将平板风干, 之后真空密封, 并在使用前于 4°C 贮存。首先将五十 (50) μ l 已经平衡至室温的人血浆添加至用捕捉抗体处理的凝溶胶蛋白 ELISA 平板的合适孔。将样品添加至平板后, 立即将 50 μ l 经 HRP 偶联的检测抗体 GC1C10 (封闭缓冲液中的约 0.1 μ g/ml) 添加至合适的孔, 并于 37°C 温育平板达 20 分钟。

通过用 PBS 清洗平板 3 次来从各孔漂洗未结合的材料。通过添加 100 μ l ECL 底物缓冲液 (KPL, Inc., Gaithersburg, Maryland) 来测量捕获的血浆凝溶胶蛋白:经 HRP 偶联的抗体复合物。于 37°C 温育 3 分钟后,在 ELISA 读板仪中在 450nm/650nm 测量每孔的光密度。

[0277] 图 6 中显示了结果,并且指明具有水平升高的尿凝溶胶蛋白片段的病危护理患者还具有水平消减的血浆凝溶胶蛋白。同样地,具有低水平尿凝溶胶蛋白片段的健康患者具有较高水平的血浆凝溶胶蛋白。因此,血浆凝溶胶蛋白水平与尿凝溶胶蛋白片段水平之间有反相关。

[0278] 实施例 8- 尿凝溶胶蛋白片段水平与临床结果的关联

[0279] 为了测试凝溶胶蛋白 ELISA 测定法定量临床背景中的尿凝溶胶蛋白片段的能力,获得来自病危护理患者的样品,并分析,如上文所描述的。评估每名患者的临床结果或疾病阶段。构建预测临床响应或结果的数学模型,其作为尿凝溶胶蛋白片段水平的函数。鉴定临床响应与尿凝溶胶蛋白片段水平之间的关联是用于设计如下诊断方法的基础,所述诊断方法用于确定哪些个体会或者不会响应所述治疗,或者会以较低水平响应,如此需要更多治疗,即更大剂量的化合物、药物、或治疗。使用通过该数学模型测量出的关联,使用本发明的凝溶胶蛋白结合剂进行的凝溶胶蛋白 ELISA 可用于确定患者的临床结果。

[0280] 等同方案

[0281] 本发明并不是按照本申请中所描述的具体实施方案而限制的,所述具体实施方案意图作为本发明各方面的单一例示。可以在不背离本发明的精神和范围的前提下对其进行许多修饰和变化,如本领域技术人员会显而易见的。在那些本文中所列举的之外,从上述描述看,本发明范围内的功能等同方法和组合物对于本领域技术人员会是显而易见的。意图此类修饰和变化形式落入所附权利要求书的范围内。本发明应当仅受限于所附权利要求书的各条款,以及这些权利要求书的等同方案的全部范围。应当理解的是,本发明并不限于具体的方法、试剂、化合物组合物或生物学系统,它们当然可以有所变化。还应当理解的是,本文中所使用的术语仅出于描述具体的实施方案的目的,而并不意图是限制性的。

[0282] 所附权利要求书内提出了其它实施方案。

序列表

<110> 芒盖特集团有限公司 (MOUNTGATE GROUP LIMITED)

Shen, Enyun

Yu, Zheng

Zhou, Min

Guo, Fei

<120> 尿凝溶胶蛋白的检测和定量

<130>F07W0188

<140>PCT/CN2007/002467

<141>2007-08-15

<160>7

<170>PatentIn version 3.4

<210>1

<211>782

<212>PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400>1

```

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

```

Ile Leu Lys Thr Val Gln Leu Arg Asn Gly Asn Leu Gln Tyr Asp Leu
 100 105 110
 His Tyr Trp Leu Gly Asn Glu Cys Ser Gln Asp Glu Ser Gly Ala Ala
 115 120 125
 Ala Ile Phe Thr Val Gln Leu Asp Asp Tyr Leu Asn Gly Arg Ala Val
 130 135 140
 Gln His Arg Glu Val Gln Gly Phe Glu Ser Ala Thr Phe Leu Gly Tyr
 145 150 155 160
 Phe Lys Ser Gly Leu Lys Tyr Lys Lys Gly Gly Val Ala Ser Gly Phe
 165 170 175
 Lys His Val Val Pro Asn Glu Val Val Val Gln Arg Leu Phe Gln Val
 180 185 190
 Lys Gly Arg Arg Val Val Arg Ala Thr Glu Val Pro Val Ser Trp Glu
 195 200 205
 Ser Phe Asn Asn Gly Asp Cys Phe Ile Leu Asp Leu Gly Asn Asn Ile
 210 215 220
 His Gln Trp Cys Gly Ser Asn Ser Asn Arg Tyr Glu Arg Leu Lys Ala
 225 230 235 240
 Thr Gln Val Ser Lys Gly Ile Arg Asp Asn Glu Arg Ser Gly Arg Ala
 245 250 255
 Arg Val His Val Ser Glu Glu Gly Thr Glu Pro Glu Ala Met Leu Gln
 260 265 270
 Val Leu Gly Pro Lys Pro Ala Leu Pro Ala Gly Thr Glu Asp Thr Ala
 275 280 285
 Lys Glu Asp Ala Ala Asn Arg Lys Leu Ala Lys Leu Tyr Lys Val Ser
 290 295 300
 Asn Gly Ala Gly Thr Met Ser Val Ser Leu Val Ala Asp Glu Asn Pro
 305 310 315 320
 Phe Ala Gln Gly Ala Leu Lys Ser Glu Asp Cys Phe Ile Leu Asp His
 325 330 335
 Gly Lys Asp Gly Lys Ile Phe Val Trp Lys Gly Lys Gln Ala Asn Thr
 340 345 350
 Glu Glu Arg Lys Ala Ala Leu Lys Thr Ala Ser Asp Phe Ile Thr Lys
 355 360 365
 Met Asp Tyr Pro Lys Gln Thr Gln Val Ser Val Leu Pro Glu Gly Gly
 370 375 380
 Glu Thr Pro Leu Phe Lys Gln Phe Phe Lys Asn Trp Arg Asp Pro Asp
 385 390 395 400
 Gln Thr Asp Gly Leu Gly Leu Ser Tyr Leu Ser Ser His Ile Ala Asn

	405		410		415
Val	Glu Arg Val Pro Phe Asp Ala Ala Thr Leu His Thr Ser Thr Ala				
	420		425		430
Met	Ala Ala Gln His Gly Met Asp Asp Asp Gly Thr Gly Gln Lys Gln				
	435		440		445
Ile	Trp Arg Ile Glu Gly Ser Asn Lys Val Pro Val Asp Pro Ala Thr				
	450		455		460
Tyr	Gly Gln Phe Tyr Gly Gly Asp Ser Tyr Ile Ile Leu Tyr Asn Tyr				
465		470		475	480
Arg	His Gly Gly Arg Gln Gly Gln Ile Ile Tyr Asn Trp Gln Gly Ala				
	485		490		495
Gln	Ser Thr Gln Asp Glu Val Ala Ala Ser Ala Ile Leu Thr Ala Gln				
	500		505		510
Leu	Asp Glu Glu Leu Gly Gly Thr Pro Val Gln Ser Arg Val Val Gln				
	515		520		525
Gly	Lys Glu Pro Ala His Leu Met Ser Leu Phe Gly Gly Lys Pro Met				
	530		535		540
Ile	Ile Tyr Lys Gly Gly Thr Ser Arg Glu Gly Gly Gln Thr Ala Pro				
545		550		555	560
Ala	Ser Thr Arg Leu Phe Gln Val Arg Ala Asn Ser Ala Gly Ala Thr				
	565		570		575
Arg	Ala Val Glu Val Leu Pro Lys Ala Gly Ala Leu Asn Ser Asn Asp				
	580		585		590
Ala	Phe Val Leu Lys Thr Pro Ser Ala Ala Tyr Leu Trp Val Gly Thr				
	595		600		605
Gly	Ala Ser Glu Ala Glu Lys Thr Gly Ala Gln Glu Leu Leu Arg Val				
	610		615		620
Leu	Arg Ala Gln Pro Val Gln Val Ala Glu Gly Ser Glu Pro Asp Gly				
625		630		635	640
Phe	Trp Glu Ala Leu Gly Gly Lys Ala Ala Tyr Arg Thr Ser Pro Arg				
	645		650		655
Leu	Lys Asp Lys Lys Met Asp Ala His Pro Pro Arg Leu Phe Ala Cys				
	660		665		670
Ser	Asn Lys Ile Gly Arg Phe Val Ile Glu Glu Val Pro Gly Glu Leu				
	675		680		685
Met	Gln Glu Asp Leu Ala Thr Asp Asp Val Met Leu Leu Asp Thr Trp				
	690		695		700
Asp	Gln Val Phe Val Trp Val Gly Lys Asp Ser Gln Glu Glu Glu Lys				
705		710		715	720

<210>5

<211>10

<212>PRT

<213> 鼠

<400>5

Gly Ala Ser Glu Ala Glu Lys Thr Gly Ala

1

5

10

<210>6

<211>382

<212>PRT

<213> 与 SEQ ID NO. 1 的氨基酸 401-782 相对应的片段 F1 的肽指纹

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(20)..(81)

<223> 通过质谱法从片段 F1 中鉴别出的肽

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(86)..(125)

<223> 通过质谱法从片段 F1 中鉴别出的肽

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(154)..(169)

<223> 通过质谱法从片段 F1 中鉴别出的肽

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(185)..(223)

<223> 通过质谱法从片段 F1 中鉴别出的肽

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(227)..(248)

<223> 通过质谱法从片段 F1 中鉴别出的肽

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(261).. (268)

<223> 通过质谱法从片段 F1 中鉴别出的肽

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(329).. (340)

<223> 通过质谱法从片段 F1 中鉴别出的肽

<400>6

Gln	Thr	Asp	Gly	Leu	Gly	Leu	Ser	Tyr	Leu	Ser	Ser	His	Ile	Ala	Asn
1			5						10					15	
Val	Glu	Arg	Val	Pro	Phe	Asp	Ala	Ala	Thr	Leu	His	Thr	Ser	Thr	Ala
			20					25						30	
Met	Ala	Ala	Gln	His	Gly	Met	Asp	Asp	Asp	Gly	Thr	Gly	Gln	Lys	Gln
			35				40					45			
Ile	Trp	Arg	Ile	Glu	Gly	Ser	Asn	Lys	Val	Pro	Val	Asp	Pro	Ala	Thr
			50				55					60			
Tyr	Gly	Gln	Phe	Tyr	Gly	Gly	Asp	Ser	Tyr	Ile	Ile	Leu	Tyr	Asn	Tyr
65					70					75				80	
Arg	His	Gly	Gly	Arg	Gln	Gly	Gln	Ile	Ile	Tyr	Asn	Trp	Gln	Gly	Ala
					85					90				95	
Gln	Ser	Thr	Gln	Asp	Glu	Val	Ala	Ala	Ser	Ala	Ile	Leu	Thr	Ala	Gln
			100						105					110	
Leu	Asp	Glu	Glu	Leu	Gly	Gly	Thr	Pro	Val	Gln	Ser	Arg	Val	Val	Gln
			115					120					125		
Gly	Lys	Glu	Pro	Ala	His	Leu	Met	Ser	Leu	Phe	Gly	Gly	Lys	Pro	Met
			130				135					140			
Ile	Ile	Tyr	Lys	Gly	Gly	Thr	Ser	Arg	Glu	Gly	Gly	Gln	Thr	Ala	Pro
145					150						155				160
Ala	Ser	Thr	Arg	Leu	Phe	Gln	Val	Arg	Ala	Asn	Ser	Ala	Gly	Ala	Thr
					165					170				175	
Arg	Ala	Val	Glu	Val	Leu	Pro	Lys	Ala	Gly	Ala	Leu	Asn	Ser	Asn	Asp
					180					185				190	
Ala	Phe	Val	Leu	Lys	Thr	Pro	Ser	Ala	Ala	Tyr	Leu	Trp	Val	Gly	Thr
					195				200					205	

Gly Ala Ser Glu Ala Glu Lys Thr Gly Ala Gln Glu Leu Leu Arg Val
 210 215 220
 Leu Arg Ala Gln Pro Val Gln Val Ala Glu Gly Ser Glu Pro Asp Gly
 225 230 235 240
 Phe Trp Glu Ala Leu Gly Gly Lys Ala Ala Tyr Arg Thr Ser Pro Arg
 245 250 255
 Leu Lys Asp Lys Lys Met Asp Ala His Pro Pro Arg Leu Phe Ala Cys
 260 265 270
 Ser Asn Lys Ile Gly Arg Phe Val Ile Glu Glu Val Pro Gly Glu Leu
 275 280 285
 Met Gln Glu Asp Leu Ala Thr Asp Asp Val Met Leu Leu Asp Thr Trp
 290 295 300
 Asp Gln Val Phe Val Trp Val Gly Lys Asp Ser Gln Glu Glu Glu Lys
 305 310 315 320
 Thr Glu Ala Leu Thr Ser Ala Lys Arg Tyr Ile Glu Thr Asp Pro Ala
 325 330 335
 Asn Arg Asp Arg Arg Thr Pro Ile Thr Val Val Lys Gln Gly Phe Glu
 340 345 350
 Pro Pro Ser Phe Val Gly Trp Phe Leu Gly Trp Asp Asp Asp Tyr Trp
 355 360 365
 Ser Val Asp Pro Leu Asp Arg Ala Met Ala Glu Leu Ala Ala
 370 375 380

<210>7

<211>382

<212>PRT

<213> 与 SEQ ID NO. 1 的氨基酸 401-782 相对应的片段 F2 的肽指纹

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(48)..(81)

<223> 通过质谱法从片段 F2 中鉴别出的肽

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(86)..(125)

<223> 通过质谱法从片段 F2 中鉴别出的肽

<220>

<221>MISC_FEATURE
 <222>(154).. (169)
 <223> 通过质谱法从片段 F2 中鉴别出的肽

<220>
 <221>MISC_FEATURE
 <222>(185).. (223)
 <223> 通过质谱法从片段 F2 中鉴别出的肽

<220>
 <221>MISC_FEATURE
 <222>(227).. (248)
 <223> 通过质谱法从片段 F2 中鉴别出的肽

<220>
 <221>MISC_FEATURE
 <222>(261).. (268)
 <223> 通过质谱法从片段 F2 中鉴别出的肽

<220>
 <221>MISC_FEATURE
 <222>(329).. (340)
 <223> 通过质谱法从片段 F2 中鉴别出的肽

<400>7

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

	100		105		110
Leu Asp Glu	Glu Leu Gly Gly Thr Pro Val Gln Ser Arg Val Val Gln				
	115		120		125
Gly Lys Glu	Pro Ala His Leu Met Ser Leu Phe Gly Gly Lys Pro Met				
	130		135		140
Ile Ile Tyr	Lys Gly Gly Thr Ser Arg Glu Gly Gly Gln Thr Ala Pro				
145		150		155	160
Ala Ser Thr	Arg Leu Phe Gln Val Arg Ala Asn Ser Ala Gly Ala Thr				
	165		170		175
Arg Ala Val	Glu Val Leu Pro Lys Ala Gly Ala Leu Asn Ser Asn Asp				
	180		185		190
Ala Phe Val	Leu Lys Thr Pro Ser Ala Ala Tyr Leu Trp Val Gly Thr				
	195		200		205
Gly Ala Ser	Glu Ala Glu Lys Thr Gly Ala Gln Glu Leu Leu Arg Val				
	210		215		220
Leu Arg Ala	Gln Pro Val Gln Val Ala Glu Gly Ser Glu Pro Asp Gly				
225		230		235	240
Phe Trp Glu	Ala Leu Gly Gly Lys Ala Ala Tyr Arg Thr Ser Pro Arg				
	245		250		255
Leu Lys Asp	Lys Lys Met Asp Ala His Pro Pro Arg Leu Phe Ala Cys				
	260		265		270
Ser Asn Lys	Ile Gly Arg Phe Val Ile Glu Glu Val Pro Gly Glu Leu				
	275		280		285
Met Gln Glu	Asp Leu Ala Thr Asp Asp Val Met Leu Leu Asp Thr Trp				
	290		295		300
Asp Gln Val	Phe Val Trp Val Gly Lys Asp Ser Gln Glu Glu Glu Lys				
305		310		315	320
Thr Glu Ala	Leu Thr Ser Ala Lys Arg Tyr Ile Glu Thr Asp Pro Ala				
	325		330		335
Asn Arg Asp	Arg Arg Thr Pro Ile Thr Val Val Lys Gln Gly Phe Glu				
	340		345		350
Pro Pro Ser	Phe Val Gly Trp Phe Leu Gly Trp Asp Asp Asp Tyr Trp				
	355		360		365
Ser Val Asp	Pro Leu Asp Arg Ala Met Ala Glu Leu Ala Ala				
	370		375		380

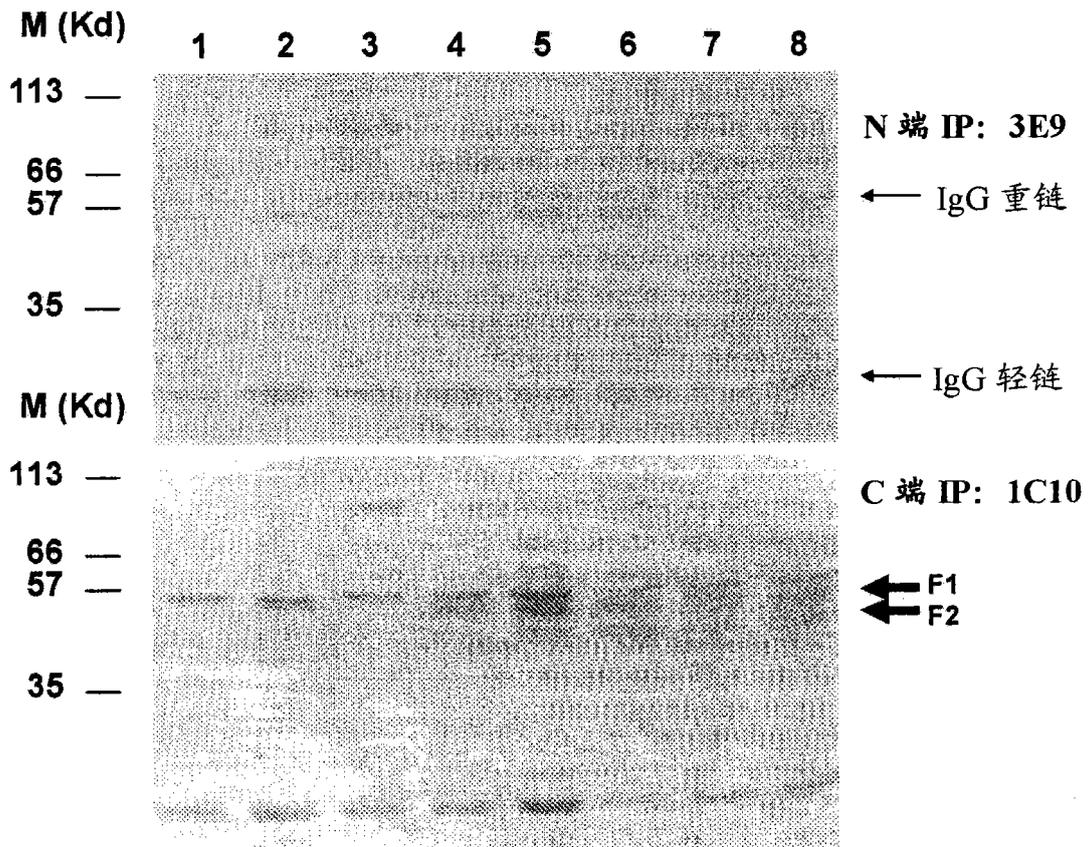


图 1

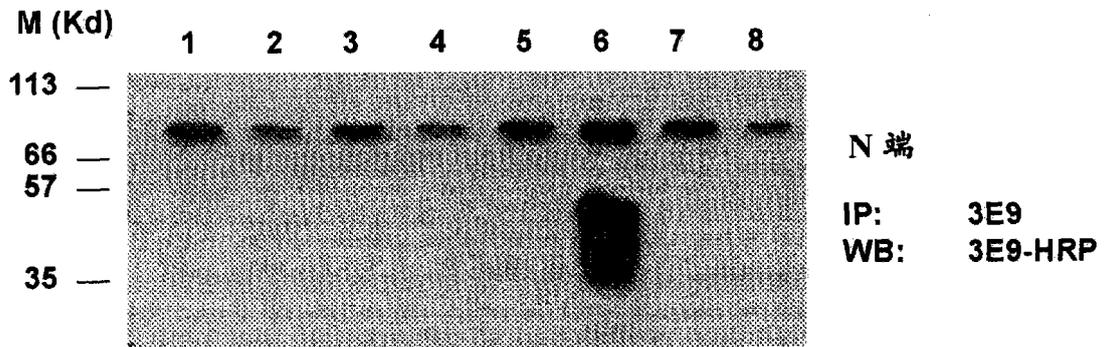


图 2A

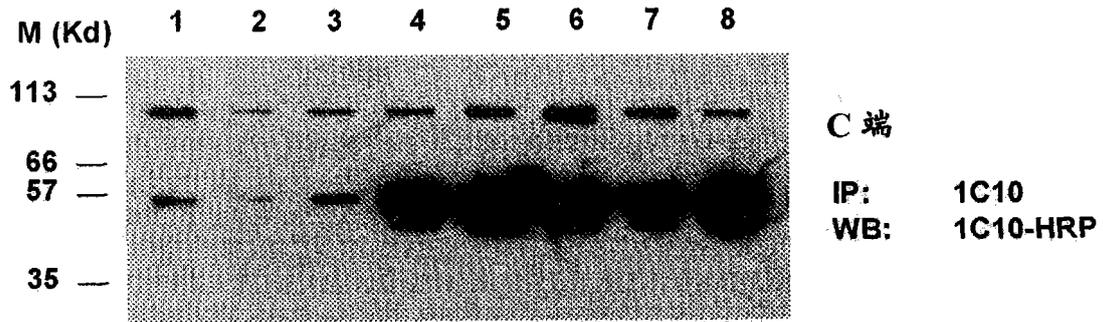


图 2B

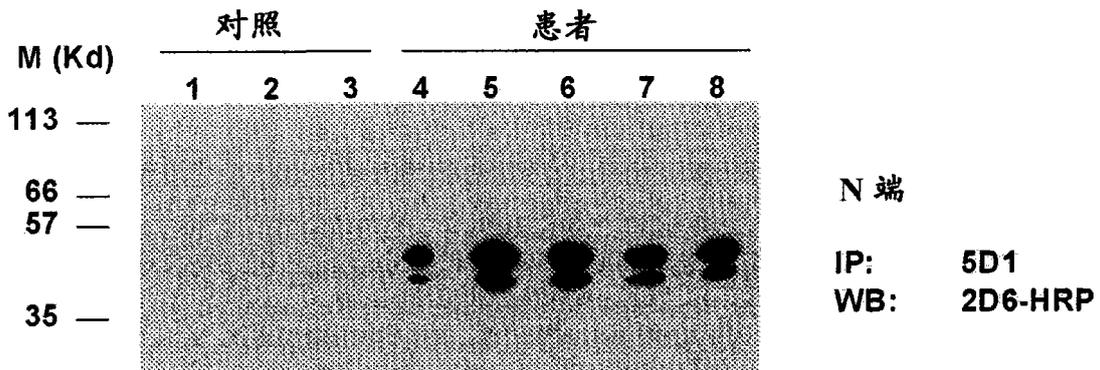


图 3

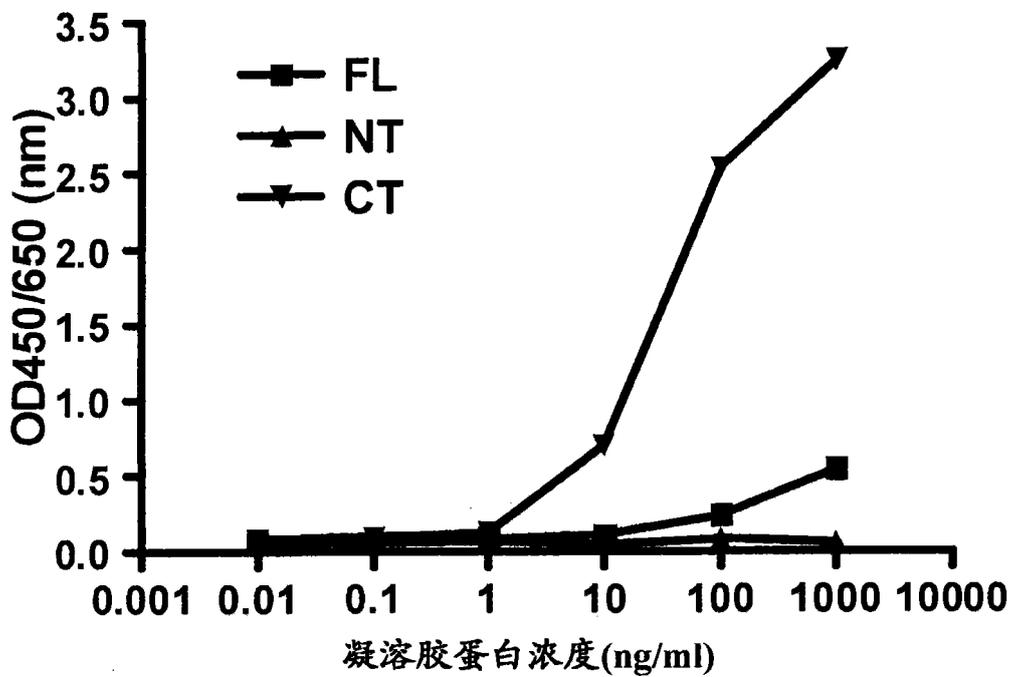


图 4

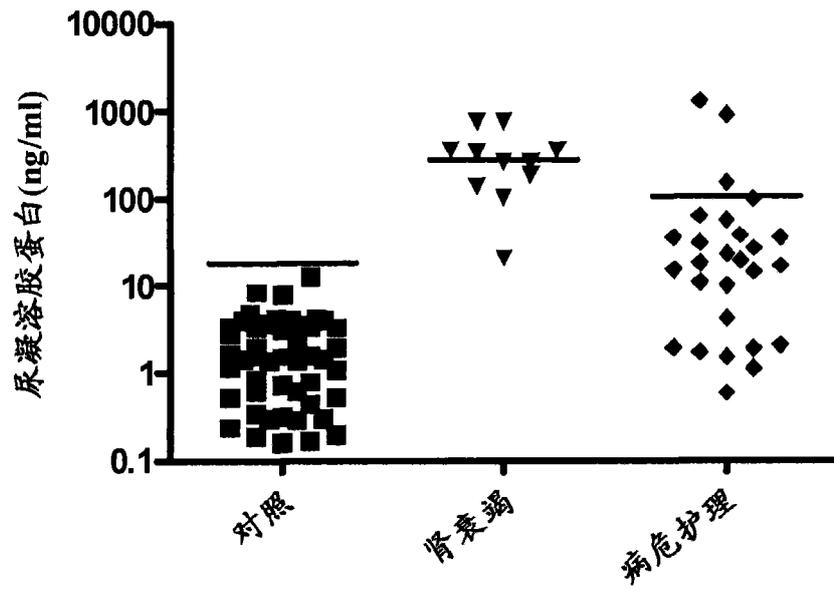


图 5A

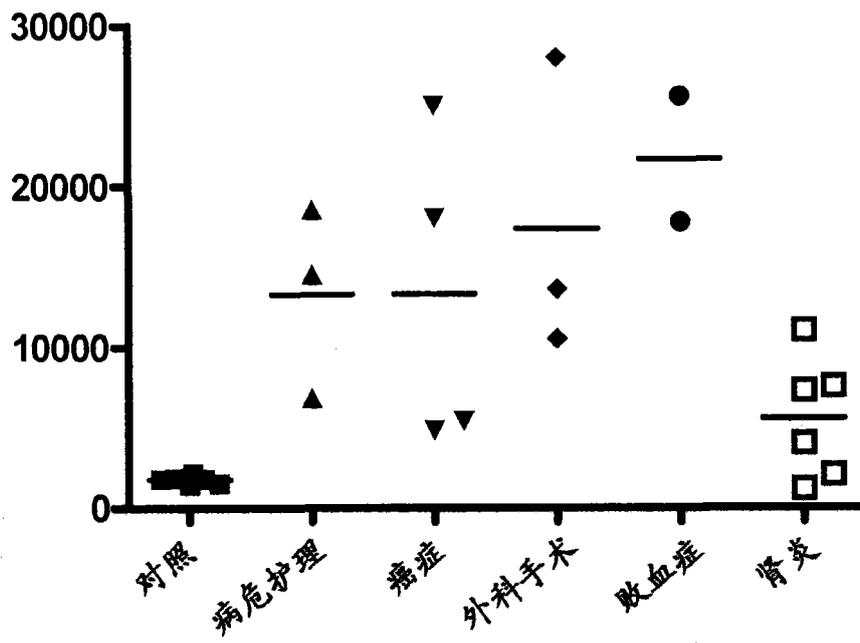


图 5B

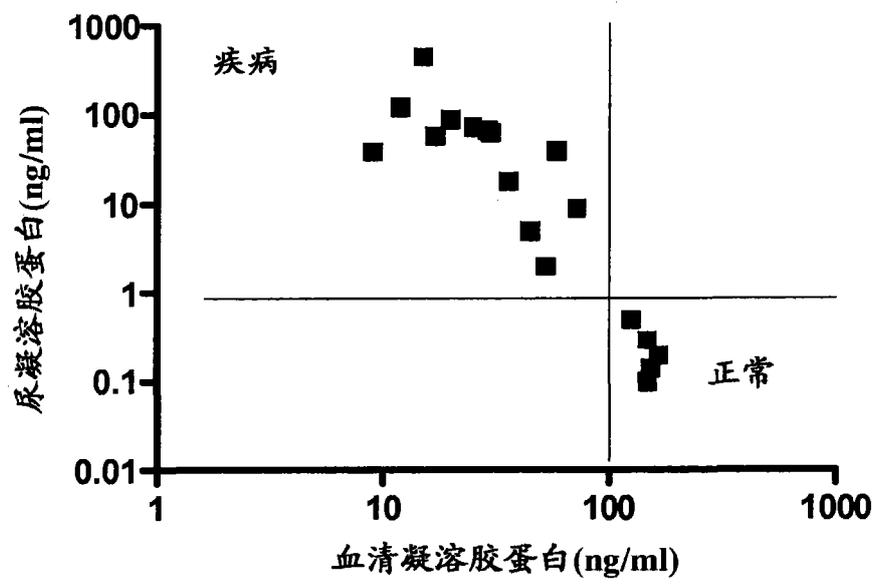


图 6