



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103497254 A

(43) 申请公布日 2014. 01. 08

(21) 申请号 201310054803. 0

G01N 33/569 (2006. 01)

(22) 申请日 2008. 08. 04

G01N 33/53 (2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 39/395 (2006. 01)

60/955, 162 2007. 08. 10 US

A61P 43/00 (2006. 01)

(62) 分案原申请数据

200880102840. 1 2008. 08. 04

(71) 申请人 詹森生物科技公司

地址 美国宾夕法尼亚州

(72) 发明人 R. 乔丹 D. D. 佩特罗恩 M. 瑞安

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

司 72001

代理人 林毅斌 权陆军

(51) Int. Cl.

C07K 16/42 (2006. 01)

C07K 16/06 (2006. 01)

C07K 16/00 (2006. 01)

C07K 1/22 (2006. 01)

A01K 67/02 (2006. 01)

G01N 33/574 (2006. 01)

权利要求书2页 说明书20页

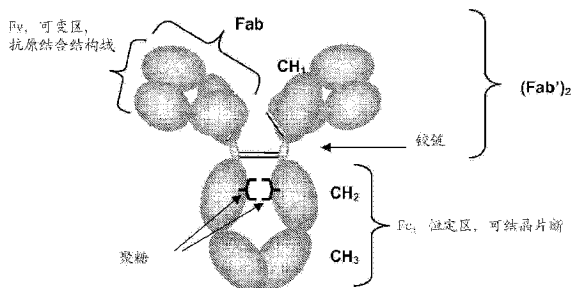
序列表4页 附图10页

(54) 发明名称

作为疾病指标的免疫球蛋白裂解片段与用于检测和结合所述片段的组合物

(57) 摘要

本发明涉及抗体组合物和所述组合物用于检测与蛋白酶活动相关的疾病过程的用途。所述试剂用于评价这种蛋白水解裂解所产生的 IgG 裂解产物。本发明还涉及对保留抗原结合功能但已丧失效应子功能的 IgG 裂解产物有免疫特异性的治疗剂。



1. 一种抗体组合物,其包含至少一种特异性结合 IgG 蛋白酶裂解产物的抗体,所述裂解产物的特征在于:a) 在非变性条件下具有与完整哺乳动物 IgG 相当的分子量,和 b) 在变性但非还原条件下可分离成两个片段,包括 135 kDa 的抗原结合片段和含有 CH2 的片段,以及 c) 其中,所述试剂不与完整 IgG 反应。

2. 根据权利要求 1 所述的抗体组合物,其包含多克隆抗血清。

3. 根据权利要求 1 所述的抗体组合物,其包含至少一种单克隆抗体。

4. 根据权利要求 1 所述的抗体组合物,其特异性结合人 IgG1 中由选自以下的蛋白酶产生的蛋白酶特异性裂解位点:MMP-3、MMP-7、MMP-12、HNE、纤溶酶、组织蛋白酶 G、胃蛋白酶、IdeS 或来自金黄色葡萄球菌的谷氨酰基内肽酶 I。

5. 根据权利要求 1 所述的抗体组合物,其包含通过用多肽来免疫动物或筛选抗体文库而产生的抗体,所述多肽包括通过如下步骤制备的裂解产物类似物肽:

a) 鉴定抗体重链的被蛋白酶所裂解的一对残基的 N 末端残基;

b) 鉴定包含至少 5 个位于蛋白酶裂解位点上游的连续氨基酸残基的肽序列,其中所述蛋白酶裂解位点的 N 末端残基将变成所确定的序列的 C 末端;以及

c) 制备用于所述免疫或筛选的足够量的肽溶液。

6. 根据权利要求 1 所述的抗体组合物,其含有至少一种特异性结合这样的多肽的抗体,所述多肽包含选自 SEQ ID NO:1、2、3 或 4 的人 IgG 铰链区序列的至少 5 个连续的氨基酸,所述序列位于蛋白酶裂解位点的氨基末端一侧的上游。

7. 根据权利要求 6 所述的抗体组合物,其中所述多肽包含至少 IgG1 的铰链核心,所述铰链核心被定义为残基 -T-C-P-P-C- (SEQ ID NO: 1 的残基 7-11)。

8. 根据权利要求 6 所述的抗体组合物,其中所述肽是人 IgG1 下游铰链和邻接的 CH2 结构域的 12-mer 肽类似物,其具有序列 TCPPCAPPELLG (SEQ ID NO:1 的残基 7-18)。

9. 根据权利要求 1 所述的抗体组合物,其特异性结合裂解产物肽类似物,所述类似物包括具有选自 SEQ ID NO:8-11 的氨基酸序列的肽及其 N 末端截短形式,包括至少 5 个氨基酸和含有位于 IgG 蛋白酶裂解位点的 N 末端一侧的上游的氨基酸序列。

10. 根据权利要求 1 所述的抗体组合物,其特异性结合具有选自 SEQ ID NO:8-11 的氨基酸序列的多肽。

11. 根据权利要求 1 所述的抗体组合物,其特异性结合具有选自如下的氨基酸序列的多肽:(a) 包含位于 IgG1 MMP-3 裂解位点的氨基末端一侧氨基酸序列的肽 (TCPPCAP, SEQ ID NO:1 的残基 7-14);(b) 或包含谷氨酰基内肽酶 IgG1 裂解位点的肽 (TCPPCAPE, SEQ ID NO:1 的残基 7-15);或 (c) 包含 IdeS IgG1 裂解位点的肽 (TCPPCAPPELLG, SEQ ID NO:1 的残基 7-18)。

12. 一种人 IgG 蛋白酶裂解位点肽类似物,其由选自 SEQ ID NO:8-11 的氨基酸序列组成。

13. 根据权利要求 12 所述的肽,其通过 N 末端与匙孔血蓝蛋白 (KLH) 共价连接。

14. 一种用根据权利要求 12 所述的肽类似物免疫的动物。

15. 根据权利要求 14 所述的动物,其中所述动物是家兔。

16. 一种使用根据权利要求 15 所述的被免疫动物制备根据权利要求 1 所述的抗体组

合物的方法,其中,通过在人 IgG 亲和基质上预吸附而从所述动物血清纯化所述试剂。

17. 一种通过分析受试者的组织样品来检测所述受试者的疾病过程的方法,其中所述方法包括检测蛋白水解裂解的 IgG,所述裂解的 IgG 的特征在于,a) 在生理条件下具有与完整哺乳动物 IgG 相当的分子量,和 b) 在变性但非还原条件下可分离成两个片段,包括 135 kDa 的抗原结合片段和 25 kDa 的片段。

18. 根据权利要求 17 所述的方法,其中所述疾病选自关节炎疾病、恶性病、感染性疾病和血管疾病。

19. 根据权利要求 18 所述的方法,其中所述疾病是类风湿性关节炎。

20. 根据权利要求 19 所述的方法,其中所述疾病是类风湿性关节炎,所述样品是滑液。

21. 根据权利要求 17 所述的方法,其中所述样品是血液或其分级制品。

22. 根据权利要求 17 所述的方法,其中所述检测离体进行。

23. 根据权利要求 17 所述的方法,其中所述检测程序选自 ELISA、免疫组织化学染色以及蛋白质印迹。

24. 根据权利要求 17 所述的方法,其中所述检测是对除血液分级制品以外的组织样品进行。

25. 一种试剂盒,其包含用于检测受试者的组织中的疾病标记的试剂,所述试剂包含至少一种特异性结合裂解的 IgG 的抗体,所述抗体能够检测有如下特征的 IgG 裂解产物:a) 在非变性条件下具有与完整哺乳动物 IgG 相当的分子量,和 b) 在变性但非还原条件下可分离成两个片段,包括 135 kDa 的抗原结合片段和含有 CH2 的片段,以及 c) 其中所述试剂与完整 IgG 不反应。

26. 一种使用根据权利要求 1 所述的抗体组合物治疗具有病理状态的受试者的方法,所述病理状态的特征是释放能够产生 IgG 裂解产物的蛋白酶。

27. 根据权利要求 26 所述的方法,其中所述抗体识别人 IgG1 中由选自以下的蛋白酶产生的蛋白酶特异性裂解位点:MMP-3、MMP-7、MMP-12、HNE、纤溶酶、组织蛋白酶 G、胃蛋白酶、IdeS 或来自金黄色葡萄球菌的谷氨酰基内肽酶 I。

28. 根据权利要求 1 所述的抗体组合物用于恢复用以治疗病理状况的抗体的效应子功能的用途,其中所述用以治疗病理状态的抗体经受一种或多种蛋白酶的裂解。

作为疾病指标的免疫球蛋白裂解片段与用于检测和结合所述片段的组合物

[0001] 本申请是申请日为2008年8月4日,申请号为200880102840.1(PCT/US2008/072083),发明名称为“作为疾病指标的免疫球蛋白裂解片段与用于检测和结合所述片段的组合物”的发明专利申请的分案申请。

背景技术

技术领域

[0002] 本发明涉及诊断和预后指标以及用于检测它们的方法和试剂。本发明还涉及监测患者疾病自然史的方法。

[0003] 相关领域描述

[0004] 在医学上,生物标记是可用于检测疾病进展或治疗效果的生物化学物质,也就是,诊断或预后指标。一种有效反映疾病自然史和疾病控制的生物标记是用于反映糖尿病患者的血糖控制的血红蛋白A1c。由于血红蛋白A1c(HbA1c)在血清中的半衰期长,它用作血糖自理想水平偏移和这种偏移的持续时间的最近记录。当前使用的全身炎症性病症的生物标记是C反应性蛋白(CRP)(Pepys MB等人, J. Clin. Invest. 111;1805-1812, 2003)。CRP是一种响应许多种急性炎症性病症而产生的急性期反应物。CRP响应细胞因子信号而在肝脏中合成,所述信号包括TNF和IL-6,它们自身从远方的炎症部位迁移而来。血清中CRP增加发生于感染、中风、血管疾病、心肌梗塞以及几种其他急性炎症性疾患。

[0005] 循环免疫球蛋白,特别是IgG类的那些抗体,是主要的血清蛋白。公知的是,人蛋白酶与炎症性疾病、增殖性疾病、转移性疾病以及感染性疾病有关。如细菌蛋白酶如谷氨酰基内肽酶(金黄色葡萄球菌(*Staph. aureus*)或链球菌(化脓性链球菌(*Strep. pyogenes*))的免疫球蛋白降解酶那样,人蛋白酶诸如基质金属蛋白酶(MMP)和嗜中性粒细胞弹性蛋白酶在各蛋白酶特有的残基处裂解gG重链多肽。重链的裂解位点聚集在被称为铰链结构域的区域周围,两条重链链间二硫键出现在该区域中。铰链以下的区域构成Fc区,包含负责IgG的效应子功能的结合位点。在微生物的情况中,蛋白酶表达是潜在的附属致病途径,允许生物体避免调理作用(Rooijackers等人, *Microbes and Infection* 7:476-484, 2005),以致铰链下游由裂解导致的Fc结构域的蛋白酶解释放有效地中和会否则导致病理细胞的靶向和杀伤的功能。因此,特异性蛋白酶的活动可以代表无数疾病状态,包括癌症、炎症性疾病以及感染性疾病。

[0006] 在体内病理环境中,IgG裂解增强,这通过结合裂解的铰链结构域的天然IgG自身抗体的存在得以证明(Knight等人,1995; Nasu等人,1980; Persselin和Stevens,1985, Terness等人,1995 *J Immunol.* 154:6446-6452)。这些自身抗体还结合由几种蛋白酶(包括木瓜蛋白酶和胃蛋白酶)产生的Fab和F(ab')₂片段,对于作为F(ab')₂分子的C末端残基剩余的下铰链结构域具有特别强的反应性(Terness等人,1995)。已有报道检测到实际裂解产物(Fick等人,1985; Goldberg和Whitehouse. 1970; Waller,1974),但尚未开发出

能使这些片段作为生物标记的强力测定方法,这可能是由于各片段被快速清除导致血清中浓度低,或由于在血液和组织中的大量完整免疫球蛋白当中检测所述片段的技术问题。过去制备了特异性抗体 (Eckle 等人,1988. Adv. Exp. Med. Biol. 240 :531-534),用于检测人嗜中性粒细胞弹性蛋白水解裂解的 Fc 结构域,在类风湿性关节炎患者的滑液中直接检测到 0.62ug/ml 的中位浓度的 Fc,但在患有其他类型的关节疾病的患者的滑液中没有检测到。

[0007] 因此,若能够评估受试者的体液或血液中的 IgG 裂解产物的类型和数量,这可用作特定疾病活动的生物标记。用于这些测定的特定试剂和方法将可提供用于诊断性和预后性医学测定的有用工具。

发明内容

[0008] 本发明涉及用于检测与蛋白酶活动有关的疾病过程的试剂以及所述试剂的该用途,所述蛋白酶是疾病病理的表现,并且是限制宿主免疫防御的因子。在本发明的一方面,涉及所述试剂和所述试剂在检测抗疾病抗体的测定方法中的用途,所述抗体对于与疾病病理相关的靶标具有特异性。所述试剂用于评价所述蛋白水解裂解导致的 IgG 分解产物。

[0009] 在本发明的另一个实施例中,本发明的方法用于检测 IgG 裂解产物,所述裂解产物的特征在于:1) 在生理条件下具有可与完整哺乳动物 IgG 相比的分子量;2) 在变性但非还原条件下可分离成两个片段,包括抗原结合片段和 32kDa 片段;3) 在体外测定中不显示 ADCC 活性。在本发明的检测 IgG 裂解产物的方法的一方面,提供了能够检测所述裂解产物的特异性试剂,所述试剂为至少一种能够结合所述裂解产物的抗体。

[0010] 在本发明的另一个实施例中,提供了用于产生可用于检测 IgG 裂解产物的试剂的序列,所述序列可用于本发明的抗 IgG 裂解产物试剂的免疫、淘洗以及选择。一方面,所述序列选自至少 5 个连续的氨基酸组成的组,所述氨基酸选自人 IgG 铰链区序列 SEQ ID NO: 1、2、3 或 4,位于蛋白水解裂解位点的氨基末端一侧。在一个实施例中,所述序列选自 SEQ IDNO:5-11 及其 N 末端截短形式。另一方面,提供了一种基于人 IgG 分子的蛋白酶水解裂解位点来设计肽免疫原的方法。

[0011] 在本发明的另一个实施例中,提供了制备本发明抗 IgG 裂解产物抗体的方法,包括用于重组产生抗 IgG 裂解产物抗体的核酸序列、载体以及宿主细胞。在制备抗 IgG 裂解产物抗体的方法的一方面,提供了免疫宿主动物,所述动物的血清是本发明抗体的来源,从中通过所述方法或本领域已知的方法制备所述试剂。

[0012] 在本发明的另一个实施例中,提供了一种用于检测抗 IgG 裂解产物的试剂盒,其包含本发明的抗 IgG 裂解产物抗体。

[0013] 本发明的又一个实施例是一种进行抗 IgG 裂解特异性抗体给药来治疗患者以恢复对于 IgG 裂解产物的效应子功能的方法。

附图说明

[0014] 图 1 描绘了典型的哺乳动物 IgG 类抗体的多种结构域,显示了它们与铰链和被确定为 Fab、F(ab')₂ 以及 Fc 的的胃蛋白酶和木瓜蛋白水解裂解产物的关系。

[0015] 图 2 显示了四种单独的 Agilent Biosizing 微毛细管电泳分析,为在人 IgG1 κ 抗体 Mab1 在 37°C 下被 1% w/w 的人 MMP-3(A)、链球菌 IdeS(B)、葡萄球菌谷氨酰基内肽酶 I(C)

以及人嗜中性粒细胞弹性蛋白酶 (D) 各蛋白酶消化过程中各时间的凝胶图像。各凝胶上的标准品 (泳道 1) 对应于完整的人 / 鼠嵌合 IgG1 和已知的裂解片段。

[0016] 图 3 显示了铰链区周围的人 IgG1 重链的序列, 主要的蛋白水解裂解的位置由箭头表示。

[0017] 图 4 是蛋白质印迹 (Western Blot), 显示了生物素化的鼠 / 人 IgG 被创伤渗出物降解的时程。

[0018] 图 5 的柱状图显示了用缀合的 $F(ab')_2$ 降解产物免疫的家兔中产生的抗血清的相对特异性, 所述裂解产物由三种不同的蛋白酶 MMP-3、V8 以及 IdeS 产生: TCPPCPAP, 其为对应于 MMP-3 裂解位点的 SEQ ID NO: 1 的残基 7-14; TCPPCPAPE, 其为对应于谷氨酰基内肽酶位点的 SEQ ID NO: 1 的残基 7-15; 以及 TCPPCPPELLG, 其为对应于 IdeS 位点的 SEQ ID NO: 1 的残基 7-18。显示了三种家兔多克隆抗铰链肽抗体制品各自与 Mab3 IgG1 κ 的 $F(ab')_2$ 片段的 ELISA 反应性。 $F(ab')_2$ 片段是用人重组 MMP-3、葡萄球菌谷氨酰基内肽酶 I 以及来自化脓性链球菌的重组 IdeS 来产生。家兔抗体制品的混合汇集物表现了与各 Mab3 $F(ab')_2$ 片段几乎等同的反应性。条形对应于三个重复孔的均值 \pm 标准差。

[0019] 图 6 是家兔多克隆抗体制品与抗体消化物的蛋白质印迹反应性。通过 SDS-PAGE 分离完整的 Mab3 人 IgG1 或已经使用 MMP-3、谷氨酰基内肽酶 (V8) 或 IdeS 部分消化的 Mab3 人 IgG1, 然后进行免疫印迹分析。(A): 使用抗人 IgG (H+L) 抗体 [泳道 1-4] 或抗... LLG 家兔多克隆抗体 [泳道 6-10] 进行印迹。(B): 使用抗... PAP 抗体 [泳道 2-5] 或抗... APE 抗体 [泳道 7-10] 进行印迹。切下印迹, 然后与通过小图 A 泳道 5 和小图 B 泳道 6 的抗体一起温育, 以使得可用单独的抗血清进行检测。

[0020] 图 7 是使用 RAH-1 试剂对来自 5 名类风湿性关节炎的滑液中 IgG 降解的分析样品进行显影的蛋白质印迹, 并与来自使用 MMP-3、谷氨酰基内肽酶 (V8) 以及 IdeS 进行的单克隆 IgG1 的体外蛋白水解消化物的样品进行比较。

[0021] 图 8 显示了不同蛋白水解裂解片段完整 IgG、scIgG 以及 $F(ab')_2$ 随时间推移的血清浓度; 这是在指定的纯化片段注射至小鼠之后使用山羊抗人 IgG (H+L) 检测的。

[0022] 图 9 是在来自经诊断患有图中所示疾病的患者的人血清样品中通过试剂 RAH-1 检测到的 scIgG 各数值的点图, 与正常人血清样品组中相比较, 其中线条表示各组的均值。

[0023] 图 10 显示了使用改进形式的 ELISA 用试剂 RAH-1 检测到的 10 个类风湿性关节炎 (RA) 个体和同样数量的健康正常对照的稀释血清中 scIgG 的浓度; RA 组中的“(2)”表示在两个分开的个体中获得的相同数值。

[0024] 图 11 显示了靶向作为肽类似物的人 IgG1 铰链的裂解片段和在指定残基处终止的抗体片段 (见图 3) 的家兔单克隆抗体的相对反应性。

[0025] 图 12 显示了三种不同的靶向人 IgG1 铰链裂解片段的家兔单克隆抗体在对用 IdeS 消化 IgG1 而产生的 $F(ab')_2$ 恢复补体依赖性细胞裂解 (CDC) 时的浓度依赖性, 与所制备的抗裂解肽类似物的家兔多克隆抗体 (rb poly) 相比较。

[0026] 序列表简述

[0027]

SEQ ID NO:	描述

1	人 IgG1 铰链区
2	人 IgG4 铰链区
3	人 IgG2 铰链区
4	人 IgG3 铰链区
5	MMP-3 和 MMP12 裂解肽
6	谷氨酰基内肽酶 1 和组织蛋白酶 G 裂解肽
7	IdeS 裂解肽
8	纤溶酶裂解肽
9	HNE 裂解肽
10	胃蛋白酶和 MMP-7 裂解肽
11	木瓜蛋白水解裂解肽

具体实施方式

[0028] 缩写

[0029] Abs = 抗体 ;ADCC = 抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用 ;CDC = 补体介导的细胞毒作用 ;HNE = 人嗜中性粒细胞弹性蛋白酶 ;IdeS = 化脓性链球菌的免疫球蛋白降解酶 ;Ig = 免疫球蛋白 ;Mab = 单克隆抗体 ;MMP = 基质金属蛋白酶 ;scIgG = 单链裂解的 IgG ;SA = 链霉亲和素 ;V8 = 来自金黄色葡萄球菌的谷氨酰基内肽酶 I。

[0030] 定义

[0031] 抗体片段 :Fab、F(ab')₂ 以及 Fc 是描述 IgG 抗体的蛋白水解裂解产物的术语,所述产物可进一步通过重链之间的二硫键(核心铰链区)的还原而离解。典型的蛋白水解产生的抗体片段包括 :Fab(例如,通过木瓜蛋白酶消化),Fab'(例如,通过胃蛋白酶消化和部分还原)以及 F(ab')₂(例如,通过胃蛋白酶消化),facb(例如,通过纤溶酶消化),pFc'(例如,通过胃蛋白酶或纤溶酶消化),Fd(例如,通过胃蛋白酶消化,部分还原以及重聚合),其中还原去除半胱氨酸残基之间形成链间键的二硫键(参见图 1)。由于 Fc 片段被描述为木瓜蛋白裂解片段,所述木瓜蛋白酶在相对于铰链处在 N 末端的残基 224(EU 编号)处解离人 IgG1,所以认为 Fc 片断保留铰链以及重链间二硫键,然而,由于抗体中重链 CH2-CH3 二聚体之间高度缔合,甚至在不存在二硫键(铰链)的情况下二聚体结构也得以保留。因此,如本文所使用,“Fc”是指由重链 CH2-CH3 区段缔合(不管是共价结合还是非共价结合)而形成的二聚体结构。应理解,由于非共价结合的 Fc 具有在变性剂如去污剂的存在下离解成 CH2-CH3 单体的能力,它可与二硫键连接的 Fc 相区别。

[0032] 术语“蛋白水解的”、“蛋白水解裂解”,“蛋白酶”和“蛋白水解酶”可替换使用,意

指能够裂解多肽链产生两个或多个片段的物质,例如酶,其中所述酶在正常温度下和在生理条件下或生理相容性条件下起作用。生理条件包括自然存在于健康或有疾病的活哺乳动物体内的任何温度、缓冲剂、阳离子、阴离子、底物、催化剂、pH、辅因子等。然而,蛋白酶可衍生自非哺乳动物来源,诸如来自可为任何类型的生命形式的病原体。

[0033] “scIgG”或“单链裂解的 IgG”是指具有包含两个重链和两个轻链的异二聚体结构的任何免疫球蛋白 G 类分子,其中一个重链已经经受在单条重链上的蛋白水解裂解,而另一个重链保持完整。

[0034] 与从 N 末端到 C 末端残基书写的氨基酸序列有关的“上游”是指该序列中自给定的残基起至 N 末端的残基。相反地,与氨基酸序列相关的“下游”是指该序列中自给定的残基起至 C 末端的残基。

[0035] 亚结构的抗体功能

[0036] 通常,免疫球蛋白、抗体由包含约 100 个氨基酸的连续多肽链区域组成,所述区域显示特征性折叠的球形结构域并代表结构的不同元件。每 100 个氨基酸区域代表约 10-11kDa 的球形结构域。对于 γ -免疫球蛋白 (IgG),这些结构域集成片段,Fab 片段由轻链可变区与轻链恒定区连接成单链而构成,该单链通过二硫键与重链第一恒定区 (CH1) 连接,重链第一恒定区邻近重链可变区。Fc 由两个邻近的重链恒定区 (CH2 和 CH3) 通过铰链区中的两个或三个二硫键链接而构成。研究表明,蛋白酶,诸如木瓜蛋白酶和胃蛋白酶,优先地在片段之间的位点裂解抗体。两个完全相同的 Fab 片段通过铰链区与一个 Fc 片段连接,由此形成 Y 形构象的 150kDa 结构 (见图 1)。使用木瓜蛋白酶产生的 Fab 片段通常具有 46kDa 的分子量,非还原的 $F(ab')_2$ 通常具有 90-100kDa 的分子量,非糖基化非还原 Fc 具有约 50-60kDa 的表观分子量。然而,由于各抗体种类和某种类中各亚类抗体稍有不同,确切的裂解性质和位置以及和裂解产物也不同。

[0037] 抗原通过每对轻重链的可变结构域中的抗原结合位点来结合抗体 (图 1)。被称为效应分子的其他分子或细胞结合分子其余部分中的其他位点,即抗原结合位点以外的位点,抗体的这个部分包括变异性较弱的免疫球蛋白序列抗体的“恒定部分”,这些位点尤其位于由重链的延伸超过轻链末端的部分构成的 Fc 区。

[0038] 抗体具有通过效应分子的结合而介导的几种效应子功能。例如,补体的 C1 组分结合抗体会激活补体系统。补体的激活在调理作用和细胞病原体的裂解 (被称为补体介导的细胞毒作用或 CDC 的过程) 中重要。补体的激活会刺激炎症反应,且还可涉及自身免疫性超敏反应。另外,抗体通过 Fc 区结合细胞,即抗体 Fc 区上的 Fc 受体位点结合细胞上的 FC 受体 (FcR)。有许多种对不同类别的抗体有特异性的 Fc 受体,所述抗体包括 IgG (γ 受体)、IgE (η 受体)、IgA (α 受体) 以及 IgM (μ 受体)。抗体结合细胞表面的 Fc 受体会引发许多重要的和各式各样的生物反应,包括吞噬和破坏抗体包裹颗粒,清除免疫复合物,杀伤细胞裂解抗体包裹的靶细胞 (被称为抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用,或 ADCC),释放炎症介质,胎盘转移和调节免疫球蛋白产生。

[0039] 通常,在 IgG 同种型 (SEQ ID NO :1-4) 和哺乳动物物种中,铰链结构域周围的序列是保守的。IgG1 (SEQ ID NO :1) 和 IgG3 (SEQ ID NO :1) 同种型包含 Leu-Leu 对,它是用于结合 Fc γ 受体和用于 Fc 效应子功能的结构基序。“铰链核心”下游的其他残基也是保守的,所述铰链核心通常包括至少由两个非半胱氨酸残基分开的半胱氨酸。

[0040] 申请人已经发现,当构成 IgG 的两条重链多肽之一发生蛋白酶解时,通过人和细菌蛋白酶形成人 IgG1 的裂解产物 scIgG,而同时不破坏异二聚体分子的总体组成。其次,申请人已经通过对含有人重链恒定区的 IgG 分子进行蛋白酶解攻击的动力学分析而确定,scIgG 可能是体内蛋白酶解的较丰富的产物。对于 MMP-3 酶,先前注意到 scIgG 作为 IgG 蛋白酶解过程中产生 F(ab')₂ 的蛋白酶解中间物而存在 (Gearing AJH 等人, Immunol. Lett. 81 :41-48,2002)。先前也注意到链球菌蛋白酶 IdeS 裂解 IgG 而产生通过尺寸排阻层析鉴定的类似完整 IgG 的产物 (Vincentis B 等人, Biochemistry 43 :15540-15549,2004)。然而,未有报道该中间物的功能表征,也没有提供用于检测生物样品中的 scIgG 的方法。

[0041] 申请人还已经证实了,在体内,scIgG 显示出与疾病活动评价一致的几天至几个月的血清半衰期,由此使得能够使用 scIgG 作为潜在的或受抑制的疾病过程的标记,或者可用于理解疾病的最近自然史和反应或恢复。

[0042] 简而言之,申请人已经发现,在生理条件下蛋白水解裂解的动力学导致蛋白水解裂解的 IgG 处于 scIgG 构象的比例大于作为多个裂解事件的产物的物质 (例如 F(ab')₂) (参见图 1)) 的比例。在检测大量蛋白酶的过程中确定到,完整 IgG 中的重链恒定区的第一裂解进行得比第二裂解要快,这样的顺序导致单链裂解的物质暂时聚集这种单链裂解形式的 IgG 分子与其完整母体在许多方面 (例如,分子大小、抗原结合、被蛋白 A/G 识别的能力) 不能区分。

[0043] 根据本发明,申请人已经产生了适合检测蛋白水解裂解产物 (包括 F(ab')₂ 和 scIgG) 的试剂。使用本发明的裂解位点类似物肽产生的本发明的试剂能识别人 IgG1 裂解产物,但不识别完整 IgG。

[0044] 申请人还已经证实,能识别保留抗原结合特异性的 IgG 裂解产物的抗体能够恢复裂解的 IgG 的效应子功能,诸如 CDC 和 ADCC。

[0045] 蛋白水解酶和疾病的相关性

[0046] 申请人证实,在患有类风湿性关节炎的患者的炎性渗出物如滑液中,可检测到其大小与体外酶组 (enzyme panel) 所产生的那些产物相似的抗体裂解产物,包括 scIgG 在内。另外,在多种疾病的患者的血清中可检测到 scIgG,在所述疾病中,局部的蛋白酶解活性是已知的病理特征。这些疾病状态中的 scIgG 的浓度比健康正常志愿者高,且比患有较不严重的炎性疾病的患者的血清高。

[0047] 通过产生亲和纯化的多克隆抗体 (家兔) 使得能够检测到 scIgG,所述抗体特异性结合裂解的重链的铰链二硫键处或周围的新暴露表位,但与完整的非裂解的 IgG 分子不起反应。能在血清中检测 scIgG 的确证理由是它具有与完整 IgG 相似的长期循环寿命。能够检测患病个体的体液或血液中的 scIgG,这是一种潜在新型的生物标记策略。应理解,除了家兔以外的其他物种 (诸如小鼠、大鼠和骆驼) 的抗体也可使用,例如通过克隆编码特定抗体结合区域序列的抗体基因而产生的单克隆抗体被包括作为本发明的试剂,所述多克隆或单克隆抗体保留结合人 IgG1 裂解产物的能力但不识别完整的 IgG。其他产生抗体的方法,例如,通过筛选抗体结构域文库来产生,对于本领域技术人员来说是已知的,可用作本发明抗体的来源。

[0048] 抗体试剂

[0049] 可使用标准品和本申请人设计的用来引生或选择可用于本发明的实施的抗体的

免疫原,以本领域公知的几种方式来制备本发明的抗体。

[0050] 一方面,从杂交瘤方便地获得抗体,所述杂交瘤通过使用观察到的裂解片段或由此衍生的裂解位点类似物肽来免疫动物而制备。因此,可通过使用抗体裂解片段(包括 $F(ab')_2$ 和 scIgG 或其 N 末端截短形式或结构类似物)免疫动物或筛选抗体文库来获得抗体。在一个实施例中,用于产生抗体的肽选自示于 SEQ ID NO:5-11 的 IgG1 的 14-mer 肽片段,其中,多肽或肽的 C 末端残基代表残基裂解对的裂解位点(如表 1 所示)上游(N 末端侧)的残基。包含铰链基序(例如 IgG1 的 -T-C-P-P-C-(SEQ IDNO:1 的残基 7-11))的片段由于二硫键的形成而为多聚体,除非半胱氨酸残基(C)被例如丙氨酸(A)残基取代。

[0051] 在一个具体的实施例中,使用对应于 MMP-3 裂解位点氨基末端一侧的氨基酸序列(TCPPCPAP, SEQ ID NO:1 的残基 7-14)的 8-mer 肽、或对应于谷氨酰基内肽酶位点(TCPPCPAPE, SEQ ID NO:1 的残基 7-15)或 IdeS 位点(TCPPCAPELLG, SEQ ID NO:1 的残基 7-18)的延长的肽,来产生抗体。当肽用作免疫原时,其可通过 N 末端或通过添加的接头残基或接头肽而与匙孔血蓝蛋白(KLH)连接。

[0052] 因此,可使用本领域公知的任何杂交瘤技术获得抗体,见例如 Ausubel, 等人编辑, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley&Sons, Inc., NY, NY(1987-2001); Sambrook 等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第 2 版, Cold Spring Harbor, NY(1989); Harlow 和 Lane, *antibodies, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY(1989); Colligan 等人编辑, *Current Protocols in Immunology*, John Wiley&Sons, Inc., NY(1994-2001); Colligan 等人, *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley&Sons, NY, NY, (1997-2001), 上述文献各自以引用方式并入本文中。本发明的抗体可包括或衍生自任何哺乳动物,例如但不限于人、小鼠、家兔、大鼠、啮齿动物、灵长类动物或它们的任何组合,且包括分离的人的、灵长类动物的、啮齿动物的、哺乳动物的、嵌合的、人源化的和/或 CDR 移植的抗整联蛋白抗体、免疫球蛋白、裂解产物和其他特定部分及其变异体。

[0053] 也可用噬菌体展示抗体文库来鉴定对 scIgG 和其他抗体片断有期望的特异性的新型结合结构域。

[0054] 在引生或选择可用于本发明的抗体或其他结合物时,用于这个目的的特异性试剂是本发明的又一方面。所开发的用于这个目的的特异性免疫原或检测试剂的特征在于包含 IgG1 的铰链核心周围的残基,包括但不限于图 3 所示的残基 SCDKHTCPP CPAPELLGGP SVFLFP(SEQ ID NO:1)。其他的当与蛋白水解酶接触时产生抗体片段的人同种型抗体的铰链区,也可充当用于产生、选择或检测抗体或其他与酶裂解产物结合的分子的目的的类似物的来源。人 IgG4 重链的类似物区域包括残基 TCNVDHKPSN TKVDKRVESKYGPPCSCPA PEFLGGPSVF LF(SEQ ID NO:2),对于 IgG2 和 IgG3,分别如 SEQ ID NO:3 和 4 中所示。在各种情况中,肽都由至少 5 个连续的氨基酸组成,所述氨基酸选自 SEQ ID NO:1、2、3 或 4 的在蛋白酶裂解位点的氨基末端一侧的人 IgG 铰链区序列。一方面,用于产生抗体的特异性免疫原或肽包含至少 IgG1 的铰链核心,其被定义为残基 -T-C-P-P-C-。在一个具体实施例中,所述肽为人 IgG1 下游铰链和邻接的 CH2 结构域的 12-mer 肽类似物,其具有序列 TCPPCAPELLG(SEQ ID NO:1 的残基 7-18)。用于产生可用于产生、选择或检测抗体或其他与酶裂解产物结合的分子的肽片段的一般方法是:a) 鉴定抗体重链的被蛋白酶所裂解的

一对残基的 N 末端残基,所述蛋白酶如实例 1 中通过具体蛋白酶举例说明的和表 1 中所示的 ;b) 确定自该裂解位点起的 5-14 个或更多个上游残基,其中该 N 末端残基将变成所确定的序列的 C 末端 ;以及 c) 产生足量的用于所需目的的肽。诸如所述的那些的肽为选自 SEQ ID NO :5-11 或其 N 末端截短形式的那些。所述肽可进行标记、缀合或交联或者互相混合混合或与佐剂混合使用,目的是检测结合,或者作为免疫原或者用于例如从噬菌体展示文库选择结合物 (binder) 的淘选靶标。

[0055] 一方面,本发明还提供了这样的分离核酸,其包含与编码前述特异性肽或其抗体的多核苷酸、与该多核苷酸互补、或与该多核苷酸杂交,包括至少一种指定序列、结构域、其部分或变异体。本发明包括编码至少一种如本文所述对 scIgG 具有特异性的分离单克隆抗体的分离核酸,和包含所述分离核酸的核酸载体,和 / 或包含所述分离核酸的原核或真核宿主细胞。所述宿主细胞可任选为选自以下的至少一种 :大肠杆菌 (E. Coli)、COS-1、COS-7、HEK293、BHK21、CHO、BSC-1、Hep G2,653、SP2/0,293、HeLa、骨髓瘤、淋巴瘤、酵母、昆虫或植物细胞,或它们的任何衍生细胞、永生细胞或转化细胞。还提供了一种用于产生至少一种本发明的抗体的方法,其包括在体外、体内或原位条件下翻译编码抗体的核酸,使得所述肽或抗体以可检测或可回收的量表达。

[0056] 使用方法

[0057] 当疾病过程引发、造成蛋白水解活性和蛋白水解酶、蛋白酶,或者由蛋白水解活性和蛋白水解酶、蛋白酶所致,或者另外与蛋白水解活性和蛋白水解酶、蛋白酶有关联时,本发明的试剂可用于检测疾病病理。所述疾病和过程包括促成、加剧、产生于或起因于感染、中风、血管疾病、心肌梗塞和几种其他急性和慢性炎症病症的那些疾病和过程。申请人已经证实,蛋白酶解活性的一种特别有用的生物标记是 scIgG,其在某些前述病症中以增加的水平检测到。由于 scIgG 在病理或病理过程或感染的部位局部产生,所以 scIgG 提供了这些过程的独特和特异性标记,作为特定组织或细胞类型在疾病部位的参与情况的度量。

[0058] 在本发明的方法的一个实施例中,从怀疑正患有、已经患有具有蛋白酶水平升高特征的疾病或因患有该疾病而进行了治疗的受试者获取样品。使样品与对 IgG 裂解片段具有特异性的结合剂 (诸如抗体制品) 接触,已知所述 IgG 裂解片段因疾病刺激的蛋白酶和血清 IgG 群体之间的接触而产生。

[0059] 本发明的方法可用于评价先前诊断患有疾病或病症的患者是否处于重病的危险 (例如,癌症转移、迅速蔓延的肿瘤生长、持续感染等) 之中。

[0060] 在某些情况中,例如在癌症患者中,scIgG 的检测可用于指示涉及转移扩散的重病进展,已知转移扩散涉及蛋白酶的活动 (elaboration),尤其是 MMP。在某些方面,肿瘤性疾病通常和炎症过程、组织修复以及痊愈共有这些机制 (Coussens, L. M. 和 Werb, Z. 2002. Nature420(19) :860-867)。其他研究已经显示,例如脂质降低与心脏和血管事件 (例如,血栓形成) 的危险降低有关,也与 MMP (例如, MMP-2 和 MMP-9) 的降低有关,这些酶是由动脉粥样硬化斑块产生 (Deguchi, J, Maanori, A., Ching-Hsuan, T. 等人,2006 Circulation 114 :555-62)。因此,本发明的方法特别可适用于但不限于患有严重关节炎综合征 (RA, 强直性脊柱炎)、某些癌症 (尤其是炎性乳腺癌)、重症冠状动脉疾病 (心肌梗塞和充血性心力衰竭) 以及其他疾病例如哮喘的患者。本发明的方法可用于将其中病理生理涉及或诱导能够作用于 IgG 的蛋白酶的那些疾病和病症与不具有水平增高的分泌性蛋白酶或其中蛋

白酶不裂解 IgG 的疾病区分开来。

[0061] 因此,尽管使用本发明描述的试剂的方法对于检测裂解的片段具有特异性,但对于裂解片段的更具有特异性的分析包括对于裂解的抗体的可变区的结合特异性的分析。例如,将抗原结合选择性与片段化抗体检测相结合的固相测定可用于确定某些抗原和蛋白酶是否在受试者中共定位,由此提供关于蛋白水解活性部位的组织、疾病或病理的性质的信息。

[0062] 抽取血液是最常实践的从健康或患病的人或动物受试者进行组织取样的形式。在此程度上,由于 scIgG 可见于全身,并不限于形成部位,即蛋白酶活性的部位,它是可能局限于特定隔室的疾病活动的报告标记。一种这样的隔室是滑液。因此,血液或血清采集提供了用于使用本发明提供的试剂和方法检测早期疾病的方便和可行的来源。可选地,局部环境如 RA 滑液、肺渗出物、活组织检查等的取样也可在任何阶段(包括诊断)应用于患者或应用于重症疾病的患者。裂解的抗体片段可在所述组织样品中通过直接染色(免疫组织化学法)检测到或在衍生自所述样品的切片样品中检测到。

[0063] 组织样品包括血液应该进行处理,以抑制任何残留的活性蛋白酶。金属的螯合作用(例如,)可有效抑制 MMP。碘乙酰胺可阻断半胱氨酸蛋白酶(例如, IdeS),使用 DFP 和相似的化合物可阻断丝氨酸蛋白酶。活性蛋白酶存在于滑液中,因此应进行处理。样品还应冷冻维持直到测定时为止。一旦已经合适地处理样品,可将本发明的 scIgG 特异性试剂用于本领域已知或还待于开发的基于任何抗体的技术,例如 ELISA、基于微珠的形式(bead-based format)、RIA。

[0064] 本发明的抗 IgG 蛋白水解裂解片段试剂可包装于试剂盒中用于研究或诊断用途,和用于和其他试剂连同用于检测的说明书一起商业销售,所述其他试剂例如缓冲液和标准物例如完整的人 IgG 和已知量的裂解的 IgG,所述说明书指导如何测量和如果需要的话定量来自受试者的组织样品收获物中的 IgG 蛋白水解裂解片段。

[0065] 对铰链肽裂解片段具有免疫特异性的本发明抗体能够结合保留抗原结合结构域例如 Fab、F(ab')₂、scIgG 的酶裂解的 IgG 的残留物,并由此通过提供完整 Fc 区而恢复 Fc 相关的结合特性和伴随的效应子功能。因此,通过本文教导的方法产生的抗体或具有体内结合酶解产生的抗体片段的特性的抗体可用作治疗分子。本发明的抗 IgG 裂解片段抗体可用于治疗患有具有疾病诱导的 IgG 蛋白水解裂解的特征的疾病的患者。一方面,抗 IgG 裂解片段抗体可用于恢复保留靶标特异性结合能力的抗体片段的效应子功能。

[0066] 已对本发明进行了一般性的描述,以下实例将进一步公开本发明的实施例。

[0067] 实例 1:人 IGG 重链的裂解分析

[0068] 研究了基质金属蛋白酶、组织蛋白酶、人嗜中性粒细胞弹性蛋白酶(HNE)和选择的病原体酶例如葡萄球菌谷氨酰基内肽酶(V8 蛋白酶)以及链球菌免疫球蛋白降解酶(IdeS)对人 IgG 重链的蛋白酶解。

[0069] 使包含人 IgG 重链的纯化的单克隆抗体与所述的蛋白酶接触,在接触的各时间段进行取样。使用用于体外生物分级(biosizing)的 Agilent 微流控“芯片实验室”技术评价样品中的片段形成(Goetz H 等人, Biochemical and Biophysical Methods 60 ;281-293, 2004)。

[0070] 抗体底物. 单克隆抗体是完全的人抗体、重组的人源化鼠抗体或具有人恒定结构

域和 IgG1 κ 类 / 亚类和种类的铰链区的人 / 鼠嵌合抗体 ;Mab1 是结合病原体的人 IgG1, Mab2(抗细胞因子) 是具有人恒定区和铰链结构域的人 / 鼠嵌合 IgG1 抗体, Mab3 是 CDR 移植人源化 IgG1。所有所述抗体均含有 κ 轻链。

[0071] 蛋白水解酶和检测方法。人 MMP-2、MMP-7 酶原以及 MMP-9 酶原获得自 Chemicon International(Temecula, CA), 并在使用前通过使用 1mM 醋酸氨基苯汞 (p-aminophenylmercuric acetate, APMA ;CalBiochem, San Diego, CA) 在 37 °C 温育 16 小时而激活 (March 等人, 1991)。重组的人活性 MMP-12 获得自 R&D Systems。重组的 MMP-1 是 Hideaki Nagase 博士的慷慨馈赠品。人 MMP-3 酶原在 HEK 细胞中瞬时表达, 其中使用组氨酸标签代替铰链和血红素结合蛋白结构域。如先前所述 (Koklitis 等人, 1991) 通过在 55 °C 温育 25 分钟激活 MMP-3 酶原变异体。组织蛋白酶 B、D、G、S 以及蛋白酶 3 获自 Athens Research&Technology(Athens, GA)。凝固酶凝血酶 F. Xa、F. IXa、F. XIIa 和血管舒缓素 (kallikrein) 以及纤溶酶和纤溶酶原购自 Enzyme Research Laboratories(South Bend, IN)。组织纤溶酶原激活剂 (Activase) 是 Genentech(South San Francisco, CA) 的产品。链激酶和激活的蛋白 C 获自 Sigma(St. Louis, MO)。葡激酶获自 Affinity BioReagents(Golden, CO)。金黄色葡萄球菌 V8 谷氨酰基内肽酶 I 获自 Pierce Biotechnology(Rockville, IL)。化脓性链球菌的重组免疫球蛋白降解酶 (IdeS) 由隆德大学 (瑞典 Lund) 的 Lars Bjorck 博士提供。

[0072] 在磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中于 pH7.5 下对于纯化的 IgG 进行蛋白酶消化, 或对于金属蛋白酶, 在 Tris 缓冲盐水缓冲液中于 37 °C 对于纯化的 IgG 进行蛋白酶消化。在金属蛋白酶反应中, 对于 MMP-12 包括 1mM 氯化钙, 对于 MMP-3 包括 10mM 氯化钙, 除此之外不使用添加剂。抗体浓度通常为 1 或 2mg/mL, 通过添加酶至与 IgG 的比例为 1% (w/w) 来起始反应。在指定时间移除等份 (10-20 μ L), 并通过调整到 20mM EDTA (金属蛋白酶) 或 1mM 碘乙酰胺 (半胱氨酸蛋白酶) 或通过快速冷冻终止反应。

[0073] 通过对纯化的 Fc 片段 (MMP-3 和 MMP-12) 进行 N 末端测序, 和 / 或通过对纯化的 Fab (嗜中性粒细胞弹性蛋白酶, 纤溶酶) 和 F(ab')₂ (组织蛋白酶 G, 谷氨酰基内肽酶和 IdeS) 片段进行高分辨率质谱分析, 来对 IgG1 铰链中的主要蛋白水解裂解位置鉴定酶产生的片断。使用 Agilent 微流控“芯片实验室”技术来评价片段形成情况。

[0074] 结果 检测了一系列蛋白酶, 表 1 中显示了人 IgG1 的蛋白水解裂解主要产物的分析结果。在所使用的条件下, 有几种酶不使 IgG1 形成片段。在活性蛋白酶中, 在所述的条件下的相对特异性活性为 :IdeS > MMP-12 > MMP-3, 谷氨酰基内肽酶 > 嗜中性粒细胞弹性蛋白酶 > 组织蛋白酶 G, 纤溶酶 > MMP-2, MMP-9 > MMP-7。

[0075] 图 2 描绘了在蛋白酶处理之前和处理过程中对 IgG 的生物分级 (biosizing) 分析。观察到 MMP-3、谷氨酰基内肽酶 I 以及 IdeS 各自以分步方式裂解 IgG1 (分别见图 2A、2B 以及 2C)。在每种情况下, 产生约 135,000Da 的早期中间物, 其随后被转化为约 100,000Da 的片段。在这些反应过程中, 还形成约 35kDa 的片段, 推定是 Fc 单体。通过凝胶迁移测量的分子量 (35kDa) 比通过重链片段氨基酸序列预测的要大, 为 211 至 215 个残基 (在重链 C 末端处的残基 232 和 237 至第 447 个残基之间), 但与在 CH2 结构域中含有糖基化位点的片段一致。在这些条件下, 使用 MMP-3 和谷氨酰基内肽酶 I, 完整的 IgG (160,000Da) 经几小时的时间段消失, 使用 IdeS 则在一分钟或更少时间之内消失。所有消化是在所述的可比较

的条件下进行。

[0076] 发现 135kDa 中间体是由一条重链中下游铰链结构域中的单一蛋白水解裂解所产生。在非变性条件下,该中间物与完整的 IgG 在某些物理特性上不可区分,例如在尺寸排阻层析中的迁移(数据未显示)。然而,在 SDS 凝胶和目前的微毛细管电泳系统中,Fc 区(重链的 CH2-CH3 结构域)的裂解片段与结构的其余部分分离,从而显示出分子大小减小的中间物(135kDa)。该片段的大小与 Gearing 报道的单一裂解的 IgG 一致[2002(同上文)]。使用所述三种酶对 IgG1 进行长时间温育导致 scIgG 中间物转变成 F(ab')₂ 片段和 Fc。

[0077] 在显示出具有裂解所检测的基于不同单克隆 IgG1 的底物的 IgG1 能力的酶中,有下述一致的发现:初始裂解成单链裂解的中间体相对较快,而二次裂解成 F(ab')₂ 则需要较长时间。图 2D 中还显示了使用人嗜中性粒细胞弹性蛋白酶(HNE)对 Mab1 消化得到的消化物。HNE 不同于所述三种酶在于它在上游铰链将 IgG 裂解而产生 Fab 片段和相应的二硫键连接的 Fc 二聚体。

[0078] 通过对纯化的 Fc 片段(MMP-3 和 MMP-12)进行 N 末端测序,和/或通过对纯化的 Fab(嗜中性粒细胞弹性蛋白酶,纤溶酶)和 F(ab')₂(组织蛋白酶 G,谷氨酰基内肽酶和 IdeS)片段进行高分辨率质谱分析,来对 IgG1 铰链中主要蛋白水解裂解位置鉴定酶产生的片段。图 3 中显示了人 IgG1 铰链区的氨基酸序列,指示了鉴定的酶裂解位置。使用在上游铰链中裂解的蛋白酶长时间消化产生两个 Fab 片段,裂解下游铰链(在核心铰链二硫键之下)的酶则产生 F(ab')₂。

[0079] 分别基于对 F(ab')₂ 或 Fc 片段中的羧基和氨基末端残基的分析,鉴定或证实各种酶的酶裂解主要位点,所述酶包括人 MMP-3 和 MMP-12、人组织蛋白酶 G、人 HNE、葡萄球菌谷氨酰基内肽酶 I 和链球菌 IdeS(表 1)。在长时间的温育过程中,在某些情况下观察到次级裂解位点(例如,组织蛋白酶 G 和 HNE),不清楚这些是指定的蛋白酶的另选裂解位点,还是由这些酶制品中轻微的蛋白酶污染物导致。先前未有报道 IgG 中的 MMP-12 和 HNE 裂解位点。对于其他蛋白酶,所鉴定的 IgG 的主要裂解位置与先前报道的结果一致(Chuba, 1994; Diemel 等人, 2005; Gearing 等人, 2002; Vincents 等人, 2004; Yamaguchi 等人, 1995)。

[0080] 酶的裂解位置稍有不同,对于 MMP-3、V8 和 IdeS 分别在脯氨酸-245、谷氨酸-246 以及甘氨酸-249 之后进行蛋白酶解。这些裂解位置的不同不影响分子量,如使用微毛细管电泳生物分级系统(Agilent Technologies)检测的分子量。与 MMP-3、V8 以及 IdeS 一起温育更长时间可以完全转变成 F(ab')₂ 片段。HNE 对 IgG1 的消化不同于其他蛋白酶,这是因为它在核心铰链二硫键(半胱氨酸 238 和 241)之前组氨酸 236 处裂解而产生 Fab 产物和二硫键连接的 Fc(见图 2D)。

[0081] 裂解位点是基于 EU 编号,并与图 3 和 SEQ ID NO:1 中显示的残基有关,包括人 IgG1 类抗体的 Ser²¹⁹ 至 Phe²⁴³ 几种蛋白酶在铰链结构域以下裂解 IgG1,产生长度稍有不同的 F(ab')₂ 片段(跨越 Ala²³¹ 至 Gly²³⁷)。这个研究所表征的 IgG 降解蛋白酶中有许多据报道表达于或富含于炎症部位(HNE、组织蛋白酶 G、MMP-12)、在肿瘤或创伤愈合环境中(MMP-2、MMP-3、MMP-7、MMP-9、纤溶酶)以及在感染部位(谷氨酰基内肽酶、IdeS)(Dollery 等人, 2003; Kilian 等人, 1996; Rooijackers 等人, 2005; Shonbeck 等人, 1999; Shapiro, 1999; Sukhova 等人, 1998; van Kempen 等人, 2006; Vincents 等人, 2004)。对于许多情况,特异性蛋白酶的细胞外表达主要针对宿主 IgG 是不可能的,相反,它们的活动与疾病生理学有关

(例如,肿瘤环境中的基质金属蛋白酶)。尽管如此,这些体外的纯化酶 / 单克隆抗体降解研究表明人 IgG 对于许多与人疾病有潜在关联性的蛋白酶没有抵抗力。

[0082] 对于将 IgG1 转化为 F(ab')₂ 的酶 (大多数),裂解具有高度特异性和自限性 (与将 Fc 变为小肽的胃蛋白酶消化不同)。除了 IdeS 之外,使用大部分这些细胞外蛋白水解裂解 IgG1 的速率通常比使用胃蛋白酶在其优先条件 (例如, pH4.0) 下裂解 IgG1 的速率要低。蛋白酶解形成 F(ab')₂ 片段是以两步骤过程经过单链裂解的中间体而进行。先前认为 IgG1 的单一裂解中间体是使用 MMP-3 (Gearing 等人, 2002) 和使用 IdeS (Vencents 等人, 2004) 进行的消化过程中的可能中间体。在目前的研究中,一致地观察到首次裂解成单链裂解中间体进行得比产生 F(ab')₂ 的较缓慢的第二裂解相对要快。这里报道的研究集中于 IgG1, 这是因为它是人血液循环中 IgG 的主要同种型。进行了有限数量的其他人同种型实验,以测定对 MMP-3 和 IdeS 的相对敏感性。在这些实验中,观察到 IgG4 在敏感性上与 IgG1 相当,而 IgG2 和 IgG3 在这些条件下更具有抵抗力 (数据未显示)。没有对于 IgA、IgM、IgE、IgD 降解进行比较性研究。

[0083] 所有信息总结于表 1,其中,“血凝蛋白酶”包括 F. XIIa、FIXa、F. Xa、凝血酶以及激活的蛋白 C;纤溶酶是与纤溶酶原激活物共温育的纤溶酶原;tPA,链激酶和葡激酶;“单独纤溶酶原激活物”是没有纤溶酶原;MMP 是作为活性形式或酶原获得的重组蛋白酶,如在“材料”中所详细描述;以及,“无”是指在 24 小时内无可检测到的裂解。除非指明,否则所有的酶均为人类酶。残基名称用于 EU 编号系统用于 IgG1 抗体重链,其中,SEQ ID NO:1 的 25 个残基对应于完整天然重链的残基 219 至 243。

[0084] 表 1.

[0085]

酶	来源	蛋白酶类型	疾病相关性 (Ref)	裂解位点	主要产物
组织蛋白酶 G	人嗜中性粒细胞	丝氨酸内肽酶	肺气肿、IPF、RA (2, 3)	Glu ²³³ - leu ²³⁴	F(ab') ₂ + Fc
组织蛋白酶 B	"	"			无
组织蛋白酶 D	"	"			无
嗜中性粒细胞弹性蛋白酶 (HNE、白细胞弹性蛋白酶、PMN 弹性蛋白酶)	嗜中性粒细胞	"	淀粉样变性病、肺气肿、囊性纤维化病、ARDS、RA、肿瘤侵入 (2, 3)	Thr ²²³ - his ²²⁴	Fab + Fc

[0086]

胰弹性蛋白酶			胰腺炎 (3)		
蛋白酶 3 (成髓细胞蛋白酶)	"	"			无
类胰蛋白酶	" 肥大细胞	"	过敏反应、纤维化 (2)		无
糜蛋白酶	" 肥大细胞	"	炎症、心血管疾病 (2, 3)		无
血管舒缓素	"	"			无
血凝蛋白酶	"	"			无
纤溶酶 (纤维蛋白溶酶)	"	"	细胞迁移 (例如, 肿瘤) (2) 链球菌感染 (6)	Lys ²³³ - thr ²³⁴	Fab + Fc
单独纤溶酶原激活物	"	"			无
间质胶原酶 (MMP-1)	人 (成纤维细胞、软骨细胞)	金属内肽酶	RA、OA、IBD、IPF、动脉瘤 (1)		无
明胶酶 A (MMP-2)	" 肿瘤细胞、成纤维细胞	"	侵入性肿瘤 (1)	Glu ²³³ - leu ²³⁴	F(ab') ₂ + Fc
溶基质蛋白酶 (MMP-3)	" 成纤维细胞、软骨细胞、破骨细胞、巨噬细胞	"	RA、OA、动脉粥样硬化斑块、克罗恩病、结肠炎、某些肿瘤 (1, 4)	Glu ²³³ - leu ²³⁴	F(ab') ₂ + Fc
基质裂解蛋白 (MMP-7)	" 腺上皮细胞	"	侵入性肿瘤 (1, 4)	Leu ²³⁴ - leu ²³⁵	F(ab') ₂ + Fc
胶原酶 2 (MMP-8)	" 嗜中性粒细胞	"	炎症、RA、OA (1, 4)		无
明胶酶 B (MMP-9)	" 正常和肿瘤细胞、激活的单核细胞、嗜中性粒细胞、T 细胞	"	炎症、动脉瘤、ARDS、烧伤 RA > OA、炎症细胞肿瘤浸润 (1, 4)	Leu ²³⁴ - leu ²³⁵	F(ab') ₂ + Fc

[0087]

巨噬细胞金属弹性蛋白酶 (MMP-12)	" 巨噬细胞	"	炎症、过表达时组织破坏、动脉瘤、动脉粥样硬化斑块 (1)	Pro ²³² - glu ²³³	F(ab') ₂ + Fc
组织蛋白酶 S	"	半胱氨酸内肽酶			无
谷氨酰基内肽酶 I (Glu V8 蛋白酶)	金黄色葡萄球菌	丝氨酸内肽酶	金黄色葡萄球菌感染 (2)	Glu ²³³ - leu ²³⁴	F(ab') ₂ + Fc
链球菌免疫球蛋白降解酶 (IdeS)	化脓性链球菌	丝氨酸内肽酶	化脓性链球菌感染 (5)	Gly ²³⁶ - gly ²³⁷	F(ab') ₂ + Fc

[0088] (1)Barrett A. J., Rawlings N. D. 以及 Woessner J. F. (编辑), Handbook of Proteolytic Enzymes Vol. 1, Elsevier, Amsterdam, 2004.

[0089] (2)Barrett A. J., Rawlings N. D. 以及 Woessner J. F. (编辑), Handbook of Proteolytic Enzymes Vol. 2, Elsevier, Amsterdam, 2004.

[0090] (3)Powers, J.C. "Proteolytic Enzymes and Disease Treatment" 1982. In: Feeney and Whitaker (编辑). Modification of Proteins: Food, Nutritional, and Pharmacological Aspects. Advances in Chemistry Series 198. ACS, Washington, D. C. 1982 pp 347-367.

[0091] (4)Tchetverikov I., Ronday H. K., van El B., Kiers G. H., Verzijl N., TeKoppele J. M., Huizinga T. W. J., DeGroot J. 以及 Hannemaaijer R., 2004. MMP Profile in paired serum and synovial fluid samples of patients with rheumatoid arthritis. Ann. Rheum. Dis. 63, 881-883.

[0092] (5)Vincents B., von Pawel-Rammingen U., Björck L. 以及 Abrahamson M., 2004. Enzymatic characterization of the streptococcal endopeptidase, IdeS, reveals that it is a cysteine protease with strict specificity for IgG cleavage due to exosite binding. Biochemistry 43, 15540-15549.

[0093] (6)Sun H., Ringdahl U., Homeister J. W., Fay W. P., Engleberg N. C., Yang A. Y., Rozek L. S., Wang X., Sjobring U., Ginsburg D., 2004. Plasminogen is a critical host pathogenicity factor for group A streptococcal infection. Science. 305, 1283-1286.

[0094] 实例 2: 炎性渗出物中 IGG 的裂解

[0095] 预期炎性渗出物和其他这类液体具有与炎症和创伤愈合相关的蛋白水解酶。出于该目的, 从 Ethicon Inc. 获得创伤液体的样品。

[0096] 首先, 对包含人重链恒定区的抗体底物进行随机生物素化。将 10 微升生物素化的抗体底物添加至 190 微升的创伤液体中, 在 37°C 温育 8-24 小时。在特定时间, 移取样品。在分开的孔中将来自各时间的起始 IgG 和样品施加到 4-12% Bis-Tris 凝胶, 进行 SDS PAGE。将分离的条带转移至硝酸纤维素膜, 使用含有 0.1% Tween20 和 10% 封闭剂乳 ("Blotto") 的 0.1M Tris 缓冲盐水封闭, 使用 AVIDIN-D 辣根过氧化物酶试剂然后是

TMB(膜)底物对斑点进行显影。

[0097] 如图 4 中的凝胶图像所显现的,8 小时完整的 IgG 丧失,出现大小与 F(ab')₂ 和 Fab 标准品相似的条带。该实验的结果表明,经几小时的时间段 IgG 被炎性液体中的酶酶解,并产生与体外使用纯化的酶酶解而产生的片段一致的片段。

[0098] 实例 3:试剂的制备

[0099] 测定由内源性蛋白酶产生的宿主(患者)抗体片段的的存在,需要能选择性结合裂解的 IgG 但不结合完整的 IgG 的试剂。裂解的组分的鉴定和来自患病的患者的样品的片段含量与正常群体相比的定量差异应该能够使用该试剂来进行评价。

[0100] 检测含有较高浓度的完整 IgG 的溶液中未知的但可能小量的 IgG 片段是困难的。尽管已经认为 scIgG 是可能的 IgG 裂解片段(Gearing 2002,同上文),但先前未进行在人样品中的定量。出于该目的,在家兔中产生具有必需的特异性的试剂,其对裂解的 IgG 但非完整的 IgG 具有高度特异性。

[0101] 将人 IgG1 铰链的三种缀合的和渐进地更长的单链肽类似物用于免疫(Invitrogen Corporation)。使与 MMP-3 裂解位点的氨基末端一侧氨基酸序列对应的 8-mer 肽通过 N 末端(TCPPCPAP, SEQ ID NO:1 的残基 7-14)与匙孔血蓝蛋白(KLH)连接。将对应于谷氨酰基内肽酶位点(TCPPCAPE, SEQ ID NO:1 的残基 7-15)和 IdeS 位点(TCPPCAPELLG, SEQ ID NO:1 的残基 7-18)的延伸的肽分别制备成免疫原。通过皮下注射 0.2mg 于完全福氏佐剂中的缀合肽免疫新西兰家兔(每种免疫原两只),并于第 14、42 以及 56 天使用 0.1mg 于不完全福氏佐剂中的抗原再加强免疫三次。在 4、8 以及 10 周时收集血清,将每种免疫原汇集用于抗体纯化。通过基于固相抗原肽的 ELISA 监测免疫滴度。

[0102] 抗体的亲和纯化应用固定于激活的载体上的各肽抗原。汇集使用相同抗原免疫的两只家兔的抗血清,并使其穿过抗原柱,之后充分洗涤柱子。分别使用 3M KSCN 和 0.1M 甘氨酸(pH2.5)将特异性抗体洗脱为低亲和力和高亲和力汇集物。两份汇集物产生不可区分的结合特征,因此可互换使用和/或汇集。使三份分别洗脱的结合抗体汇集物接着进行第二个亲和吸附步骤,这次是在含有包含人 IgG1 重链恒定区的完整抗体(Mab3)的柱子上进行。第二个亲和层析步骤的意图是去除不想要的可识别完整 IgG 的抗体。然而,很少家兔抗体或无家兔抗体吸附至 IgG 柱,表明抗体群体仅以其暴露的羧基末端与“裂解的”序列具有反应性。

[0103] 通过 ELISA 检测各亲和纯化的家兔抗肽抗体与酶解产生的人 IgG 的片段和完整的 IgG 结合的能力(图 5)。来自使用与 SEQ ID NO:1 的残基 7-14 缀合的 KLH(MMP-3 位点类似物)免疫的家兔的纯化抗体并不结合完整的 IgG,而对使用 MMP-3 消化 IgG 而产生的 scIgG 和 F(ab')₂ 具有高特异性。该抗体制品显示对使用 V8 蛋白酶或 IdeS 产生的 scIgG 和 F(ab')₂ 具有最小的反应性。相比之下,从使用 V8 裂解位点铰链肽类似物(SEQ ID NO:1 的残基 7-15)和 IdeS 裂解位点铰链肽类似物(SEQ ID NO:1 的残基 7-18)免疫的家兔获得的抗体显示对由这两种酶的任一者产生的 scIgG 和 F(ab')₂ 具有交叉反应性结合情况。然而,这些制品对 MMP-3 消化的产物显示最小的反应性。所述抗体制品中无一结合完整的 IgG,且所述抗体制品中无一与由三种不同的酶产生的片段(包括 F(ab')₂ 和 scIgG)具有同等反应性,如图 6 中所示。

[0104] 抗铰链试剂的预期用途是检测 scIgG 和 F(ab')₂(以及其他潜在的片段),它们在

体内复杂环境中由存在于疾病特异性组织中的酶产生,或由疾病特异性细胞类型或细胞群体(例如浸润的巨噬细胞或嗜中性粒细胞)产生。对于潜在的 IgG 片段的最佳涵盖范围,认为优选的是具有尽可能广泛的裂解位点识别谱。出于这个原因,将三种家兔抗体汇集物各自以 0.33mg/mL 各组分(总计 = 1mg/mL)制备混合物,用于后续的蛋白印迹和基于血清的 ELISA 检测。这个汇集的试剂被称为 RAH-1。

[0105] 实例 4:单链裂解的免疫球蛋白测定

[0106] 下文详细描述了用于检测血清中 scIgG 的新型测定方法,其使用能够结合裂解的人 IgG 而非完整的人 IgG 的 RAH-1 作为捕获试剂。

[0107] 使用化学发光 ELISA,用 10mg/ml(于 PBS 中)RAH-1 包被 Nunc Chemiluminescence 96 孔培养板的一些区域。培养板其余部分保持不包被(仅 1×PBS)。在 4°C 下过夜温育培养板。洗涤培养板,将 200ml/孔的 Chemicon International 的 ChemiBLOCKER(C#2160)添加至培养板,在 37°C 温育 30 分钟从孔吸去封闭缓冲液,并将标准品和样品添加至培养板。以双份添加标准品 Mab3、使用 V8 消化的 scIgG,以于含有 1%酪蛋白和 3% BSA 的 PBS 中 50mg/ml 开始,使用系列四倍稀释。以于相同缓冲液中 1 : 50 稀释度添加疾病血清样品。洗涤培养板,将 1 : 6000 稀释度的 Jackson Immuno Research 的 HRP 缀合的 AffiniPure F(ab')₂ 片段驴抗人 IgG(H+L)(对包括家兔在内的各种动物具有最低交叉反应性)添加至所有孔中。将其于含有 1%酪蛋白和 3% BSA 的 PBS 稀释液中添加,在 37°C 温育 1 小时。彻底洗涤培养板,添加 100ml/孔的 HRP 底物(Roche 的 BMChemiluminescence POD,582 950),并在几秒钟之后于发光读板机上读取培养板。

[0108] 从暴露于 RAH-1 包被层的所有孔扣除标准曲线上 0ng/ml scIgG 孔的平均发光。该扣除控制了使用 RAH-1 的次级反应的任何非特异性反应。然后,从 RAH 包被的孔的先前调节的数值扣除非 RAH 包被的孔上各供体的数值。这解决了血清中对于培养板的任何非特异性反应。

[0109] 实例 5:试剂检测与疾病相关的蛋白酶解活性的用途

[0110] 检测 RAH-1 试剂在另一种炎性液体患有类风湿性关节炎(RA)的患者的滑液中检测 IgG 片段的能力。

[0111] RA 患者的滑液采集样品商购自 Bioreclamat ion。样品于 LDS 样品缓冲液中稀释 1 : 5,将 10 微升各样品上样于 4-12% Bis-Tris 凝胶。作为 RAH-1 反应性的对照,将完整 IgG(Mab3)或蛋白酶消化的 IgG(使用 MMP-3、谷氨酰基内肽酶以及 IdeS 对 Mab3 进行部分消化)也上样于凝胶。在 SDS PAGE 之后,将凝胶转移至硝酸纤维素膜,并使用 Blotto 封闭。然后使用于 Blotto 中的 RAH-1 的 1 : 2,500 稀释液温育该膜,使用 pH7.5 含有 0.1% Tween20 的 0.1M tris 缓冲盐水洗涤,并与山羊抗家兔 IgG(H&L)辣根过氧化物酶缀合物的 1 : 5,000 稀释液温育。然后使用 TMB 膜对斑点进行显影。如图 7 中所示,RAH-1 制品与完整的 IgG 不反应,但自所有三种蛋白酶消化物检测到 scIgG、F(ab')₂、可能还有 Fab'。对于来自 RA 患者的所有五个滑液样品,在 scIgG、F(ab')₂ 以及 Fab' 的大约大小下检测到条带,表明这些蛋白酶解片段存在于患有 RA 的个体的滑液中。

[0112] 实例 6:使用试剂监测疾病

[0113] 对于生物标记检测,血浆或血清比生物液体或组织提取物例如滑液更方便。然而,滑液的优点是,它是自含的局部环境,在其中,蛋白酶具有活性,且预期 IgG 片段可积累,如

实例 2 中所描述。尽管如此,血清用于检测的方便和普及使得它更有可能作为生物标记的样品组织,包括 IgG 裂解产物在内。

[0114] 在开始检测不同类型和来源的血清中的 I gG 片段之前,理想的是确定哪些(如果有的话)蛋白水解产生的 IgG 片断会循环足够的时间以使其能聚集和定量。为了回答该问题,设计了比较性药代动力学研究。以下在小鼠中进行的药代动力学实验是模拟几个相似的之前报道的研究,所述研究中 IgG 通常显示 10-20 天的终末半衰期。

[0115] 用 MMP-3 产生的分级的蛋白酶解产物 Mab2 IgG1 和 scIgG 和 F(ab')₂ 如下制备。如实例 1 中所述使用热激活的 MMP-3 消化 20 毫克量的 Mab2IgG。在 37°C 通过将酶添加至于含有 10mM CaCl₂ 的 tris 缓冲盐水中的 4mg/mL Mab2 溶液 (pH7.5) 来启动消化。在 48 小时时,通过将 EDTA 添加至 20mM 终浓度来终止反应。基于 Agilent 生物分级 (bio-sizing) 分析 (8862-67),没有残余的完整 IgG, scIgG、F(ab)₂ 以及 Fc 的百分数分别是 24%、41% 以及 36%。使终止反应的消化物经受两步骤纯化,以去除 Fc 片段,并分离纯化的 scIgG 和 F(ab)F(ab)₂。在第一个步骤中,使用蛋白 A-Sepharose 使消化物经受层析。从柱子出来的未被结合的物质含有 F(ab)₂ 片段,不含有可检测到的完整的 IgG 或 scIgG。使用 pH3.5 的 0.1M 柠檬酸钠处理柱子,导致含有 Fc 的组分即 Fc 片段和 scIgG 的混合物洗脱。通过添加 pH7.0 的 1/10 体积的 2M Tris 将所得级分立即中和至 pH7。将中和的物质浓缩至约 1mL,并透析至 pH7.5 的磷酸盐缓冲盐水中。于 Superdex200 (柱体积 = 100mL) 上通过尺寸排阻层析将 Fc 片段与 scIgG 分离。自柱子洗脱两个峰,所述峰被接着使用先前描述的 Agilent 生物分级技术鉴定为与 scIgG 的凝胶带位置一致的 135kDa,和鉴定为约 35kDa 的 Fc 单体片段的较低分子量峰。使纯化的 scIgG 和 F(ab)₂ 组分与 ActicleanEtox 接触 (每 5mL 各蛋白溶液 0.5mL 凝胶),以将内毒素减少到可允许在小鼠中静脉注射的 AALAC 规范 (< 40EU/kg)。

[0116] 对于这个研究,如下文所述检测同等毫克量 (1.9mg/kg) 的完整小鼠-人嵌合单克隆抗体 Mab2 IgG1 以及 MMP-3 产生的 scIgG 和 F(ab')₂。

[0117] 一组 21 只雌性 Balb/c 小鼠 (Ace Animals) 用于药代动力学研究。在实验之前,通过心脏穿刺从 3 只随机选择的小鼠取终末血,作为基线对照。对剩下的 18 只雌性 Balb/c 小鼠进行称重,并将它们分成六个相等的组。两组使用完整 Mab2 IgG1 注射,两组使用 MMP-3 产生的 Mab2 scIgG1 注射,两组使用 MMP-3 产生的 Mab2 F(ab')₂ 注射。所有注射均为以 0.19mg/ml 基于个体动物重量 10ml/kg 的恒定剂量体积进行腹膜内注射。因此,每只动物在 0 天接受 1.9mg/kg 剂量。在 1h、24h、7d、21d、35d 从两组中的第一组采集约 80ul 血液,并在 5h、48h、14d 以及 28d 从第二组采集约 80ul 血液。将血清样品储存于 20°C 直至检测。

[0118] 所采集的血清的 IgG 和 IgG 片段浓度通过酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 进行定量。将 Jackson Immuno research 的 F(ab')₂ 片段特异性的山羊抗人 IgG 于 PBS 中的 0.5ug/ml 稀释液 (与牛、马以及小鼠血清蛋白具有最小的交叉反应性) 用于包被 Costar 3369 培养板。使用 PBS/ 酪蛋白 /BSA 封闭培养板。在封闭之后,将标准品和样品添加在 PBS/1% 酪蛋白 /3% BSA 中。标准品包括以下系列稀释液:以 1000ng/ml 开始的鼠 / 人 IgG1、鼠 / 人 scIgG1MMP-3 或鼠 / 人 F(ab')₂MMP-3。在 PBS/1% 酪蛋白 /3% BSA 中从 1 : 10 至 1 : 163,840 系列稀释各时间点样品。使用 50ul/ 孔 Jackson Immuno-research 的山羊抗人 IgG (H+L) (与牛、马以及小鼠血清蛋白具有最小交叉反应性,109-035-083) 并在室温下

温育 1 小时检测到与包被抗人捕获抗体的培养板结合的人 IgG。彻底洗涤培养板,并将其暴露于 50 μ l/孔 O-苯二胺底物大约 10 分钟,使用 50 μ l/孔 3M HCL 终止,在 490-650nm 读取数值。结果在图 8 显示。

[0119] 小鼠药代动力学实验结果表明,scIgG 具有延长的循环寿命,而 F(ab')₂ 没有。小鼠中 F(ab')₂ 非常快速清除与该片段在人体中快速消失相一致 (Roskos LK 等人, Drug Dev. Res. 61 :108-120, 2004)。这些结果表明 scIgG 是用于生物标记目的的最丰富、寿命最长以及最有用的 IgG 组分。

[0120] 实例 7 :疾病中的蛋白水解酶

[0121] 为了使 scIgG 成为有用的疾病生物标记,它必须在从所确定的疾病范畴的患者获得的样品中表现出与健康人相比有差异的数量。

[0122] 患病个体血清的商业来源是 Genomics Collaborative (现在的 SeraCare Life Sciences Inc.)。购买了来自 8 种疾病的每一种的 10 个不同个体的小量血清 (300 微升)。所述疾病范畴为类风湿性关节炎、骨关节炎、哮喘、1 型糖尿病、乳腺癌、肺癌、心肌梗塞、以及充血性心力衰竭。另外,从该商业来源获得来自 28 名年龄和性别相匹配的正常健康志愿者的血清作为对照。

[0123] 使用如实例 4 中所描述的测定方法,分析样品,结果示于图 9 中。基于 RAH-1 试剂的选择性的测定证明,与由已知的特异性蛋白酶产生的那些 IgG 裂解产物相当的 IgG 裂解产物是明显可检测的,并且对于炎性自身免疫性疾病类风湿性关节炎来说大于在健康或正常供体中维持的水平。相比之下,骨关节炎患者显示了与正常个体样品相似和在其范围内的水平。

[0124] 实例 8 :修饰的单链裂解的 IGG 测定方法

[0125] 使用 RAH-1 试剂的固相测定方法 ELISA 用于检测血清中的 scIgG 在实施例 4 中进行了描述。为了优化 scIgG 浓度的检测范围,对血清样品进行了特定改变。

[0126] 所使用的培养板是 Immulon 4 HBX 培养板 (VWR),所述培养板是通过使用于 pH7.2PBS 中 5mg/mL 浓度的家兔多克隆抗体 (RAH-1) 在室温下封闭和温育 1 小时进行包被的 (100 μ l/孔)。之后,于自动洗板机上使用 PBS,0.05% Tween (Sigma) 洗涤培养板三次。所有样品和标准品使用含有 1% BSA、0.05% Tween 的 PBS 稀释。抗 IgG Fc 生物素 (US Biologicals, Swampscott, MA) 是检测 scIgG 标准品或血清稀释液中 scIgG 未知物的工具。

[0127] 使用 200 μ L 的 SuperBlock (Pierce) 在室温 (RT) 下摇动 15 分钟封闭培养板,然后于自动洗板机上使用 PBS,0.05% Tween 洗涤培养板三次。

[0128] 将标准材料 Mab1 蛋白酶消化产物以 600ng/mL (100 μ L/孔, 3 倍稀释度) 开始添加至双份孔。将血清样品适当地稀释成 1 : 100、1 : 200、1 : 400 等。以双份同时添加样品,并于振荡器上在室温下温育 1 小时,之后于自动洗板机上使用 PBS,0.05% Tween 洗涤三次。

[0129] 将 1 : 20,000 的 IgG Fc 生物素稀释液 (于测定缓冲液中适当地稀释) 添加至所有孔 (100 μ L/孔),并于振荡器上在室温下温育 1 小时,之后于自动洗板机上使用 PBS,0.05% Tween 洗涤三次。

[0130] 将 SA-HRP (与辣根过氧化物酶缀合的链霉亲和素, Sigma, 以于 PBS (0.05% Tween,

1% BSA) 中 1 : 30,000 的稀释度使用)(100 μ L/孔),并于振荡器上在室温下温育 1 小时,之后于自动洗板机上使用 PBS,0.05% Tween 洗涤三次。

[0131] 最后,将 100mL 的由生产商 (Sigma) 提供的 TMB(3,3',5,5' - 四甲基联苯胺,一种过氧化物酶底物)添加至各孔,并让其温育约 10 分钟,用于显色。使用 75 μ L 的 1N H₂SO₄ 终止反应,并在 450nm 下对培养板进行读数。

[0132] 使用上述 ELISA 型式 (format) 测定表明 scIgG 在正常健康血清中具有很大改善的线性和加料回收率 (spike recovery)。在两个血清汇集物中测定出该测定法的稀释线性,所述汇集物稀释 1 : 100,然后使用 Mab1 以 150ng/mL 和 300ng/mL 的浓度加料 (spike),再进一步稀释成 0%、25%、75% 以及 100% 的血清浓度。以一式三份测定各样品稀释液,并计算平均的分析物回收率。通过从各样品汇集物的所观察的 (y 轴) 和预期的 (x 轴) 分析物回收率结果的曲线图计算 R2 相关系数来评价线性。R2 值为:样品 1 低 0.9983 ;样品 1 高 0.9913 ;样品 2 低 0.9852 ;样品 2 高 0.973 ;所有稀释液的稀释线性都是 100%。

[0133] 实例 9 :血清中单链裂解 IGG 的检测

[0134] 专门使用类风湿性关节炎患者的血清,以进一步研究实例 4 中的结果,其中来自该组患者的某些血清样品与对照相比具有显著较高的 scIgG。

[0135] 从 Genomics Collaborative 获得来自 10 个患有类风湿性关节炎 (RA) 的受试者和 10 个年龄和性别匹配的健康个体的血清样品。使用实例 8 中所述的修改的测定法,分析样品,结果示于图 10。结果表明,10 个患有类风湿性关节炎的受试者中有 4 个显示出血清 scIgG 浓度 > 60 μ g/mL。在健康对照组中,scIgG 的浓度范围是从 < 8.2 μ g/mL 至 52.7 μ g/mL。用于这个比较的样品没有对于病期、治疗方案等进行严格选择。因此,预期在对来自良好控制和前瞻性设计的临床试验的患者的纵向分析中可进一步区分健康的和疾病相关的血清 scIgG。然而,目前对这些商业样品的测定提示在患有疾病的患者中可检测到升高的 scIgG 浓度。

[0136] 实例 10 :抗铰链 IGG 单克隆抗体的制备

[0137] 产生出用于生产和潜在用于人类患者的确定的 (defined) 分子将是合乎需要的,所述分子结合裂解的 IgG 而不结合完整的 IgG,诸如单克隆抗体。下列程序代表着用于产生这样的分子的方法。

[0138] 人 IgG1 下游铰链及邻接 CH₂ 结构域的 12-mer 肽类似物是免疫原: TCPPCAPPELLG (SEQ ID NO :1 的残基 7-18)。天然存在的半胱氨酸被丙氨酸替代,得到变体 TAPPAPPELLG。添加 N 末端半胱氨酸,以使得可以通过用于进行与游离巯基的反应的标准化学方法来与匙孔血蓝蛋白 (KLH) 缀合。最终免疫原是 KLH-CTAPPAPPELLG。

[0139] 使用多个皮下部位 (5 个),用在完全福氏佐剂中的 0.5mg KLH 肽来免疫新西兰白色家兔 (3 只)。以 3 周间隔使用在不完全福氏佐剂中的 0.25mg 免疫原对动物加强免疫,共进行 4 次附加免疫。

[0140] 在免疫过程中通过标准 ELISA 方法监测 BSA 缀合形式的相同肽的血清抗体滴度。基于滴度数据选择动物 (2 只) 用于脾切除术。从与家兔融合伴侣细胞融合的脾衍生淋巴细胞生成家兔杂交瘤 (Spieker-Polet,1995PNAS USA92 :9348-9352)。在多个培养板中融合之后 2-3 周检查细胞生长情况。

[0141] 在包被有 BSA 免疫原肽缀合物的培养板上通过 ELISA 筛选阳性杂交瘤。鉴定来

自各融合的多重阳性克隆。进一步的筛选涉及到与完整 IgG1 和 IgG1 的各种酶解产生的 F(ab')₂ 片段的结合。从这些筛选和反筛选策略,选择了 3 个克隆,该选择基于结合免疫原肽和结合末端位于或接近免疫原肽末端的 F(ab')₂ 片段以及对于完整 IgG1 具有最小结合的强选择性。对阳性杂交瘤进行亚克隆和扩增。

[0142] 通过标准的方法(包括在固定化蛋白 A 上的层析)从各细胞上清液纯化家兔 IgG。在标准 ELISA 方案中,检测纯化的家兔 IgG 结合人 IgG1 铰链以及完整的 IgG 和纯化的 IgG F(ab')₂ 片段的肽类似物的特异性,所述 IgG F(ab')₂ 片段使用 IdeS 和 MMP-3 酶使用单链或双链裂解的 Mab 产生。简而言之,将通过标准肽化学合成和进行了 N 末端生物素酰化的肽捕获在链霉素亲和素包被的孔上。以 10 μg/mL 直接包被 IgG 和片段。通过得到很好表征的山羊抗家兔 IgG Fc 辣根过氧化物酶和 OPD 底物系统检测家兔 mAb 的结合。

[0143] 家兔 mAb91-2 的 ELISA 结果示于图 11。对在 SEQ ID NO:1 的残基 16-22(L-L-G-G-P-S-V-F) 终止的下游铰链肽具有明显的结合选择性。对与上游铰链、核心铰链或早期下游铰链的被 SEQ ID NO:1 的 3-16(D-K-T-H-T-C-P-P-C-P-A-P-E-L-) 所涵盖的那些区段对应的上游残基很少结合或不结合。对 MMP-3 产生的 F(ab')₂ 片段和 scIgG 片段具有可忽略的结合(这和在 SEQ ID NO:1 的残基 14 和 15 之间的 MMP-3 裂解位点(P-A-P*E-L-L) 的肽类似物无结合相一致)。相比之下,与 Ides 产生的 F(ab')₂ 片段和 scIgG 具有显著结合。因此,家兔 mAb 的结合特异性与引生它的免疫原非常一致。直接包被的 rb(家兔)IgG 是阳性对照。

[0144] 补体测定.

[0145] 将表达 CD20(ATCC) 的类淋巴母细胞 B 细胞系 WIL2-S 细胞用作 CDC 测定的靶细胞。将于 RPMI [5% 热灭活的 FBS, 0.1mM 非必需氨基酸, 1mM 丙酮酸钠, 青霉素 (500U/ml), 链霉素 (500U/ml), 2mM L-谷氨酰胺] 中的 50 μl 细胞添加至 96 孔培养板的各孔,最终浓度为每孔 8×10^4 个细胞。将另外 50 μl 与或不与多个浓度的抗体一起添加至各孔,在室温下温育培养板 2 小时。将 50 μl 10% 家兔补体 (Invitrogen) 添加至各孔,在 37°C 下温育培养板 20 分钟。所有样品以一式三份操作。在 200g 下对培养板离心 3 分钟,将 50 μl 上清液移取到分开的培养板,使用 LDH 细胞毒性检测试剂盒 (Roche) 检测 CDC。使用 Spectra max Plus 384 (PerkinElmer) 检测吸光度。将数据归一化到使用 Triton X-100 (Sigma Aldrich) 的最大细胞毒性和仅含细胞和单独补体的最小对照。

[0146] 图 12 显示了,当在固定浓度的结合 CD20 的抗体的 F(ab')₂ 片段的的存在下滴定 3 个家兔抗铰链 mAb 时,其能够恢复对靶细胞的补体依赖性细胞裂解。家兔 mAb 比多克隆抗铰链 mAb 制品(用于先前描述的血清 scIgG 的相同检测系统的组分)更有效且浓度较低。如所预期的,CD20 的完整抗体具有活性,但单独其 F(ab')₂ 片段和 scIgG 形式无活性。在无结合细胞的 F(ab')₂ 片段的情况下,家兔抗铰链 mAb 不能够指导细胞裂解。这些结果确立的是,单克隆抗铰链抗体能够重建 IgG1 的无活性的蛋白酶解产物的补体介导效应子功能。

<210> 3
 <211> 41
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 3

Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr
 1 5 10 15

Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro
 20 25 30

Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 35 40

<210> 4
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 4

Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser
 1 5 10 15

Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 20 25 30

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 35 40

<210> 5
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 5

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 1 5 10

[0003]

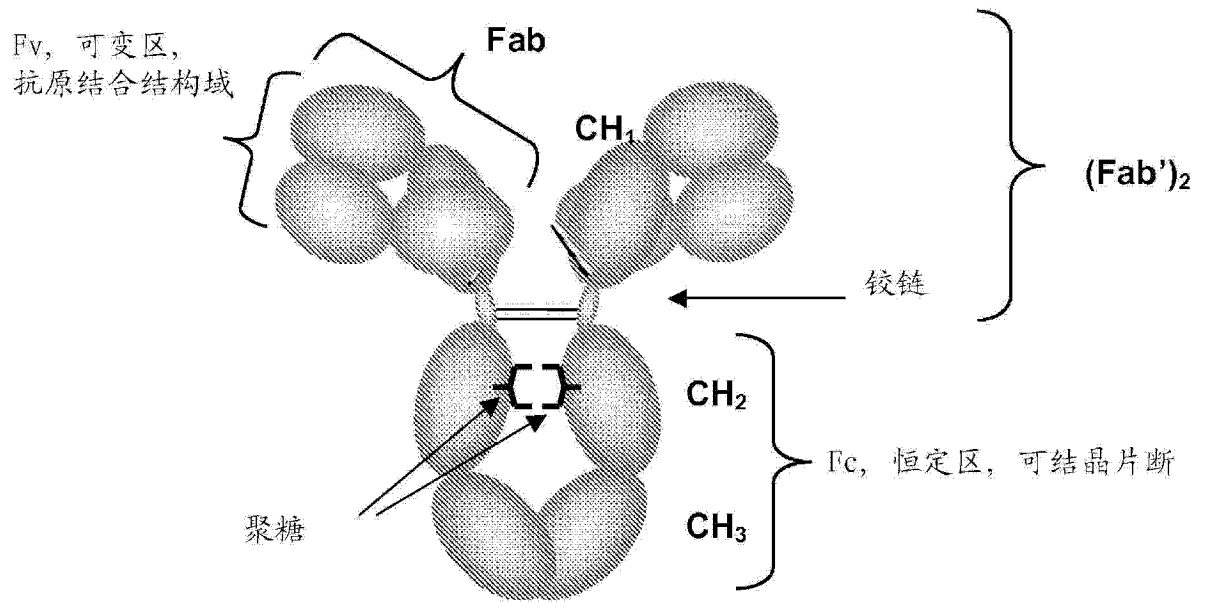


图 1

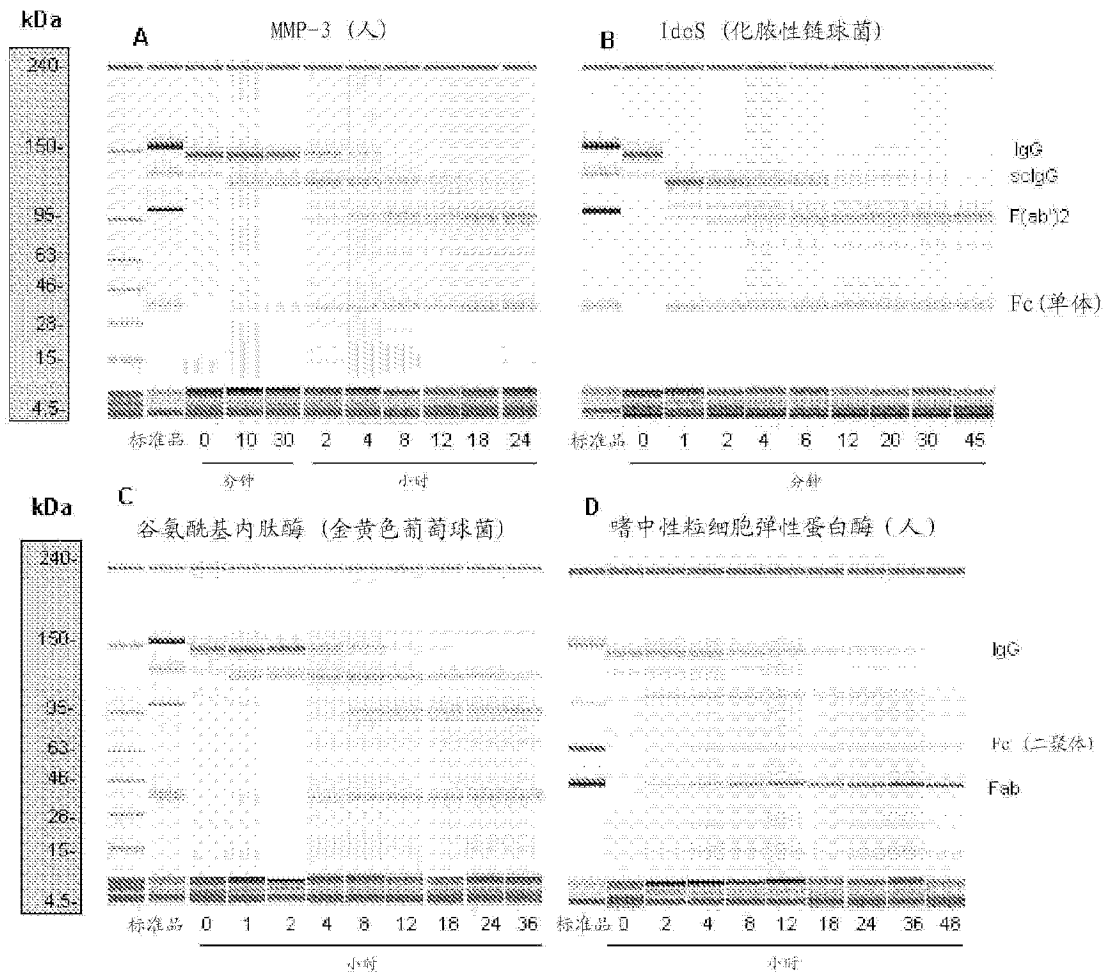


图 2

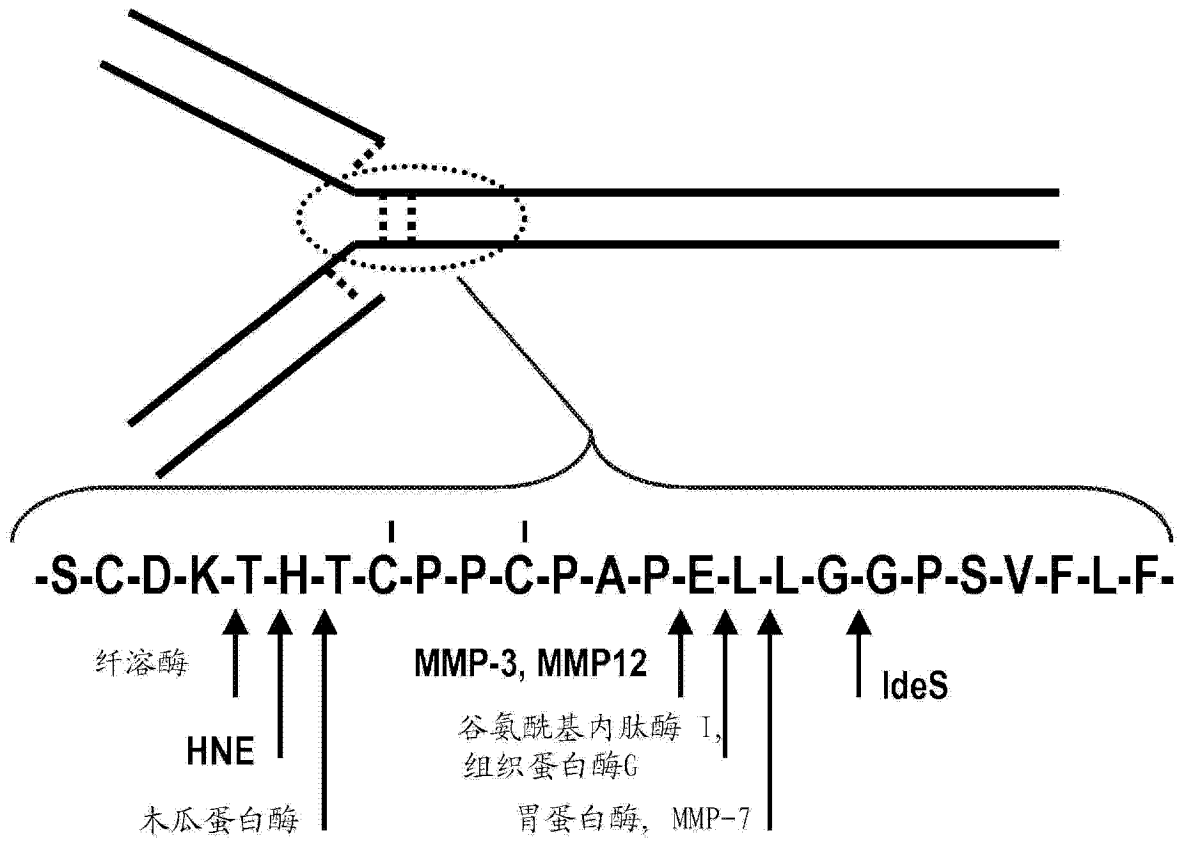


图 3



图 4

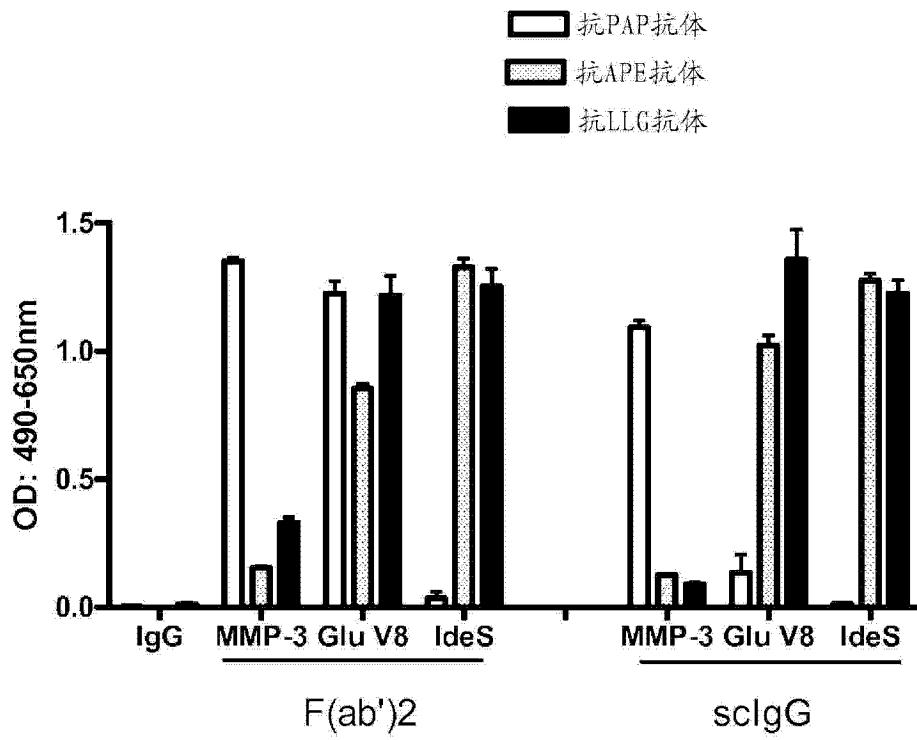


图 5

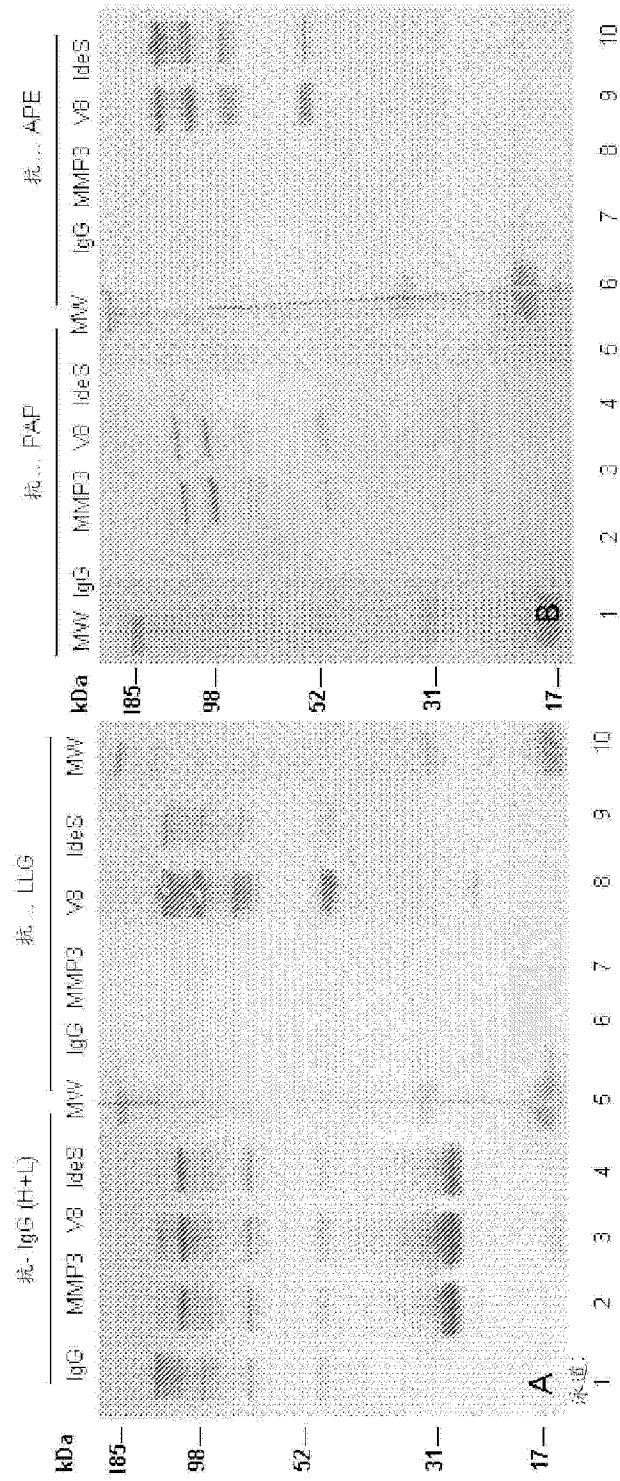


图 6

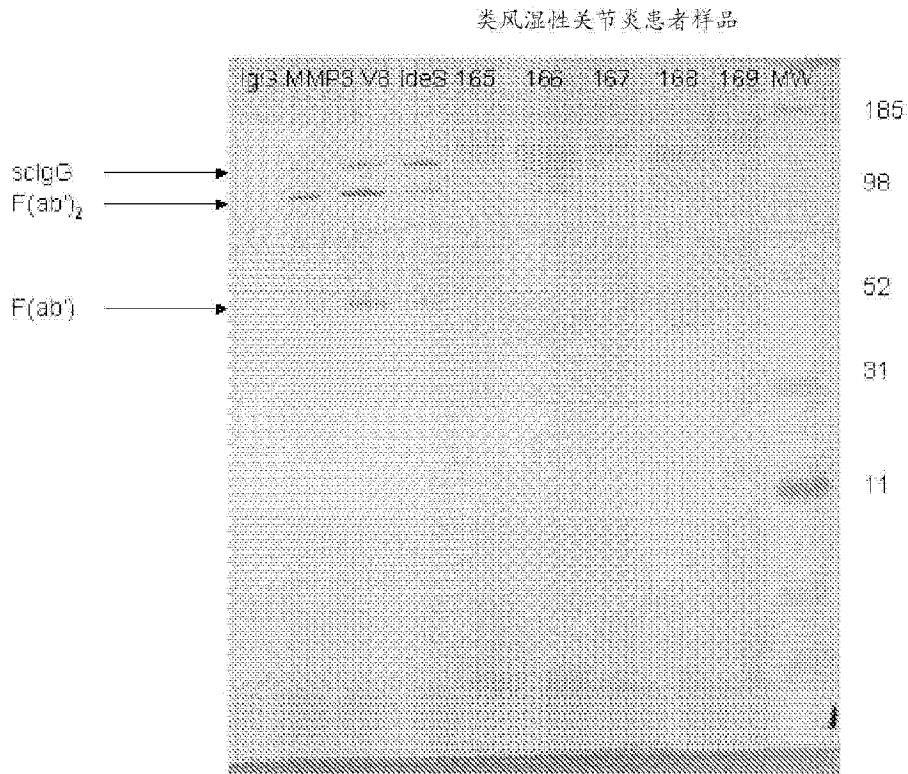


图 7

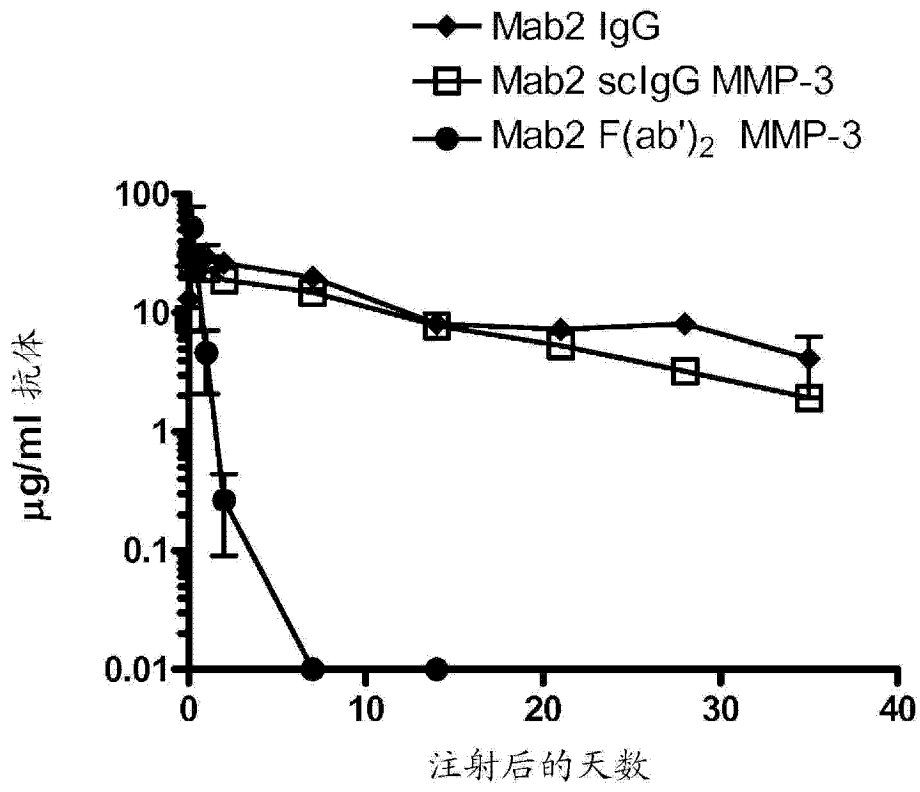


图 8

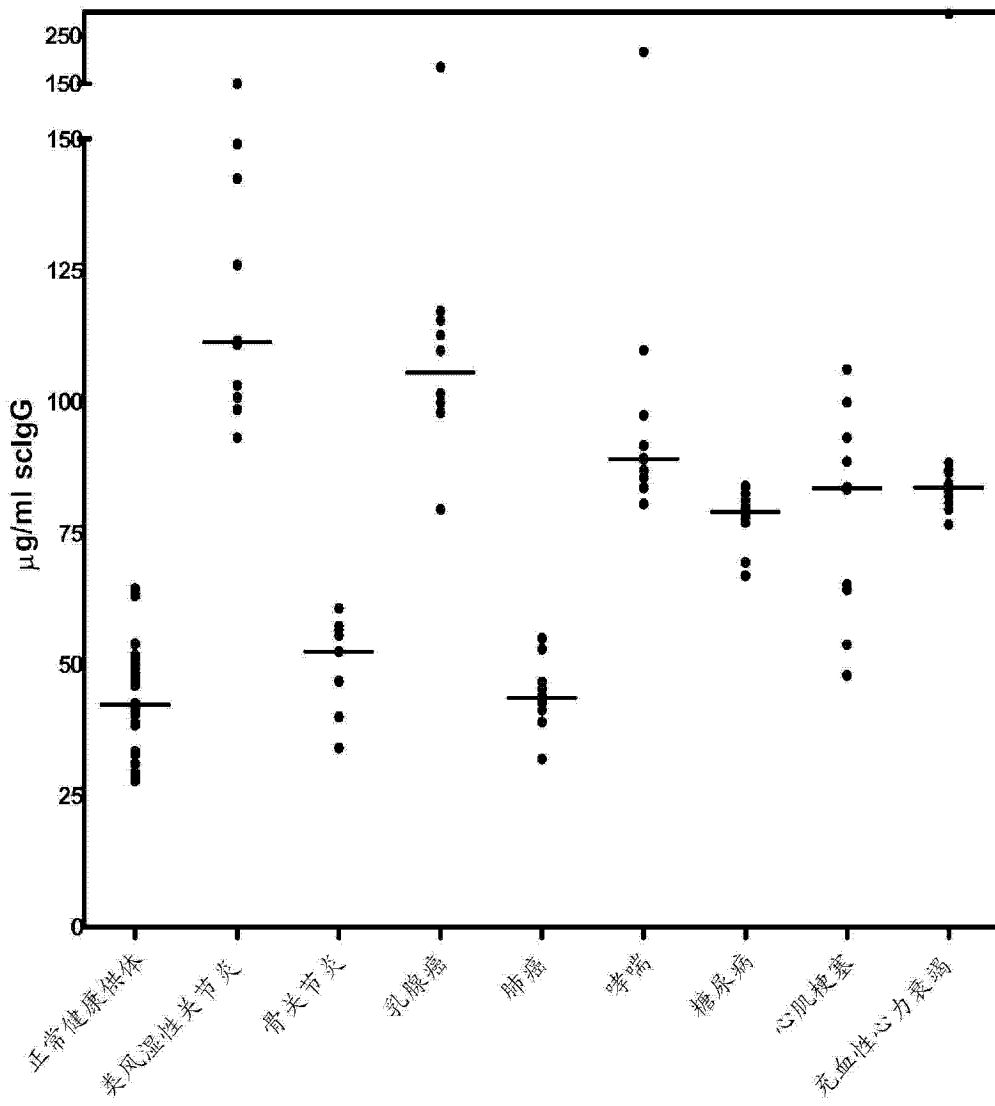


图 9

血清sclgG的ELISA测定

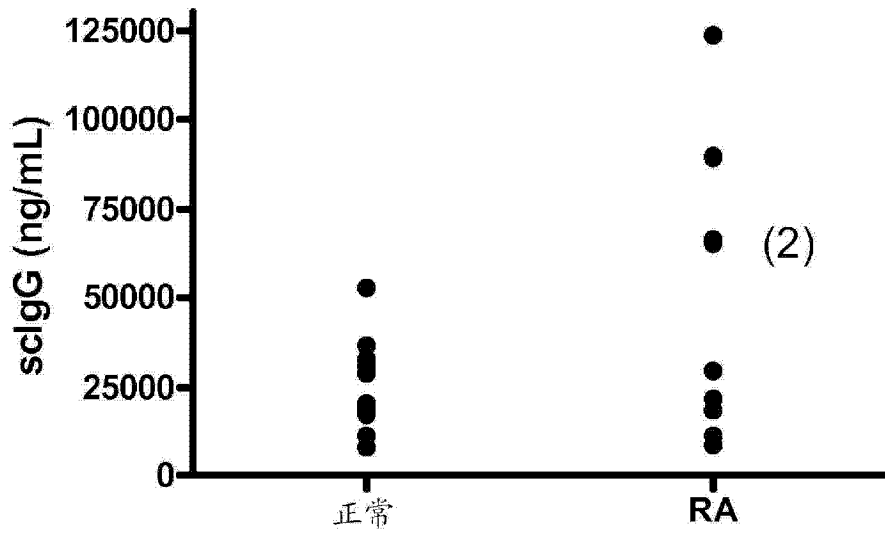


图 10

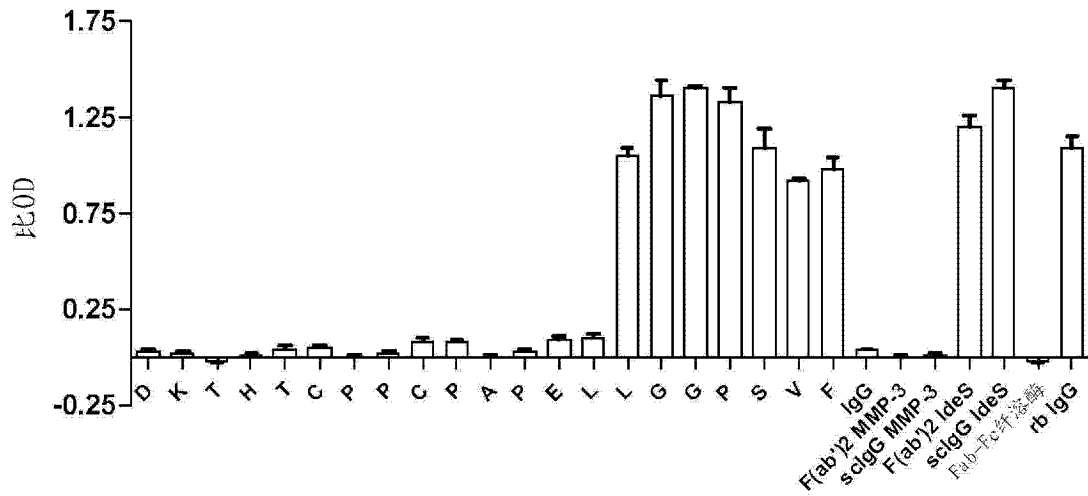


图 11

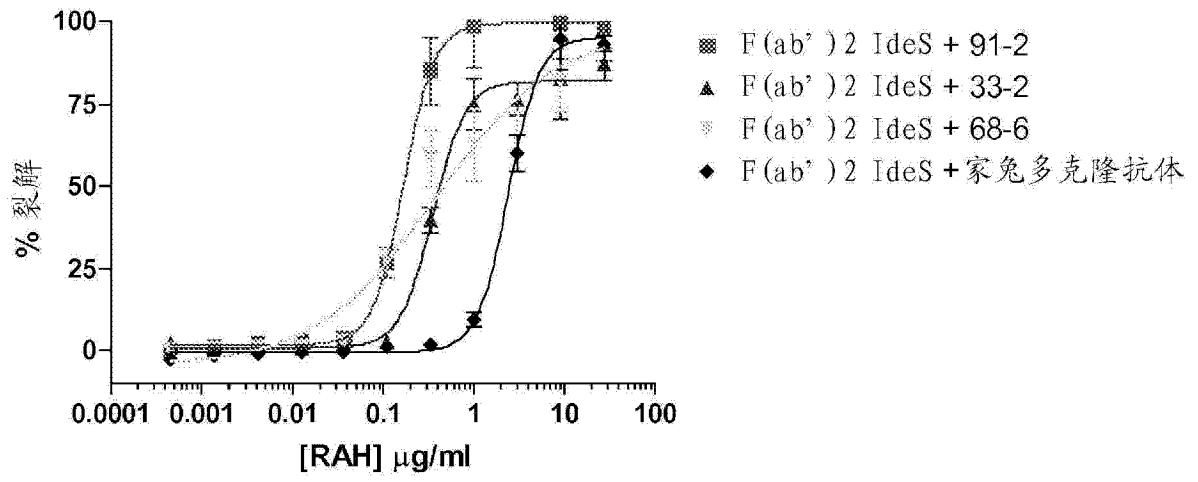


图 12

专利名称(译)	作为疾病指标的免疫球蛋白裂解片段与用于检测和结合所述片段的组合物		
公开(公告)号	CN103497254A	公开(公告)日	2014-01-08
申请号	CN201310054803.0	申请日	2008-08-04
[标]申请(专利权)人(译)	詹森生物科技公司		
申请(专利权)人(译)	詹森生物科技公司		
当前申请(专利权)人(译)	詹森生物科技公司		
[标]发明人	R 乔丹 D D 佩特罗恩 M 瑞安		
发明人	R.乔丹 D.D.佩特罗恩 M.瑞安		
IPC分类号	C07K16/42 C07K16/06 C07K16/00 C07K1/22 A01K67/02 G01N33/574 G01N33/569 G01N33/53 A61K39/395 A61P43/00		
CPC分类号	G01N33/6854 C07K2317/734 C07K16/065 C07K2317/50 C07K16/42 A61P9/00 A61P19/02 A61P31/00 A61P35/00 A61P43/00		
代理人(译)	林毅斌		
优先权	60/955162 2007-08-10 US		
其他公开文献	CN103497254B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及抗体组合物和所述组合物用于检测与蛋白酶活动相关的疾病过程的用途。所述试剂用于评价这种蛋白水解裂解所产生的IgG裂解产物。本发明还涉及对保留抗原结合功能但已丧失效应子功能的IgG裂解产物有免疫特异性的治疗剂。

