



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103497254 B

(45)授权公告日 2016. 12. 28

(21)申请号 201310054803.0

(22)申请日 2008.08.04

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 103497254 A

(43)申请公布日 2014.01.08

(30)优先权数据  
60/955162 2007.08.10 US

(62)分案原申请数据  
200880102840.1 2008.08.04

(73)专利权人 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 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)

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

A61P 43/00(2006.01)

审查员 赵天

权利要求书2页 说明书20页

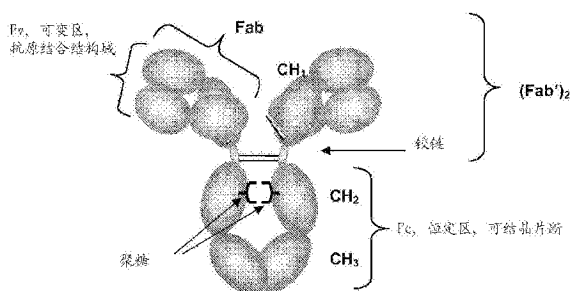
序列表4页 附图8页

(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CH<sub>2</sub>的片段,以及c)其中,所述抗体不与完整IgG反应并且所述抗体可通过用多肽来免疫动物或筛选抗体文库而获得,

所述多肽包括通过如下步骤制备的裂解产物肽:

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,

其中所述抗体特异性结合这样的多肽,所述多肽由SEQ ID NO:1的人IgG铰链区序列的至少5个连续的氨基酸组成,所述序列位于蛋白酶裂解位点的氨基末端一侧的上游,并且

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-,即SEQ ID NO:1的残基7-11。

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、人嗜中性粒细胞弹性蛋白酶、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,其中所述肽是人IgG1下游铰链和邻接的CH<sub>2</sub>结构域的12-mer肽,其由序列TCPPCPAPELLG即SEQ ID NO:1的残基7-18组成。

7. 根据权利要求1所述的抗体组合物,其特异性结合氨基酸序列为SEQ ID NO:10的裂解产物肽。

8. 根据权利要求1所述的抗体组合物,其特异性结合选自如下的多肽:(a) TCPPCPAP所示的多肽;(b) TCPPCPAPE所示的多肽;或(c) TCPPCPAPELLG所示的多肽。

9. 一种人IgG蛋白酶裂解位点肽,其由SEQ ID NO:10的氨基酸序列组成。

10. 根据权利要求9所述的肽,其通过N末端与匙孔血蓝蛋白共价连接。

11. 一种动物细胞,其中所述动物用根据权利要求9所述的肽免疫并且所述动物是家兔。

12. 权利要求1-9中任一项的抗体组合物在制备试剂盒中的用途,所述试剂盒用于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,其中所述蛋白水解裂解的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35 kDa的片段。

13. 根据权利要求12所述的用途,其中所述疾病是类风湿性关节炎。

14. 根据权利要求12所述的用途,其中所述疾病是类风湿性关节炎,和所述样品是滑液。

15. 根据权利要求12所述的用途,其中所述样品是血液或其分级制品。

16. 根据权利要求12所述的用途,其中所述检测离体进行。

17. 根据权利要求12所述的用途,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。

18. 根据权利要求12所述的用途,其中所述检测是对除血液分级制品以外的组织样品进行。

19. 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) 其中所述抗体不与完整IgG反应,

其中所述抗体特异性结合这样的多肽,所述多肽由SEQ ID NO:1的人IgG铰链区序列的至少5个连续的氨基酸组成,所述序列位于蛋白酶裂解位点的氨基末端一侧的上游,并且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-,即SEQ ID NO: 1的残基7-11。

## 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,1995J ImunoI.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')<sub>2</sub>片段,对于作为F(ab')<sub>2</sub>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;GoIdberg和Whitehouse.1970;WaIIer,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. BioI. 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另一方面,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')<sub>2</sub>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IgG1κ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')<sub>2</sub>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;TCPPCAPE,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TCPPCAPELLG,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 $\kappa$ 的F(ab')<sub>2</sub>片段的ELISA反应性。F(ab')<sub>2</sub>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')<sub>2</sub>片段几乎等同的反应性。条形对应于三个重复孔的均值±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')<sub>2</sub>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')<sub>2</sub>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')<sub>2</sub>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')<sub>2</sub>(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CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>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CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>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CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>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过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 $\gamma$ -免疫球蛋白(IgG),这些结构域集成成片段,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连接而构成。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')<sub>2</sub>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( $\gamma$ 受体)、IgE( $\eta$ 受体)、IgA( $\alpha$ 受体)以及IgM( $\mu$ 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 $\gamma$ 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')<sub>2</sub>的蛋白酶解中间物而存在(Gearing AJH等人,ImmunoI.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')<sub>2</sub>)(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')<sub>2</sub>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')<sub>2</sub>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(TCPPCPPELLG,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,CoId Spring Harbor, NY(1989);Harlow和Lane,antibodies,a Laboratory Manual,CoId Spring Harbor, NY(1989);CoIIigan等人编辑,Current Protocols in Immunology,John Wiley&Sons,Inc., NY(1994-2001);CoIIigan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SCDKTHTCPP 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TCNVDPKPSN TKVDRVESKYGPPCPSCPA 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TCPPCPPELLG(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. CoIi)、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性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. Nature 420(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')<sub>2</sub>、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 $\kappa$ 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 $\kappa$ 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 $\mu$ 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')<sub>2</sub>(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')<sub>2</sub>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')<sub>2</sub>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')<sub>2</sub>(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')<sub>2</sub>。

[0079] 分别基于对F(ab')<sub>2</sub>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;DiemeI等人,2005;Gearing等人,2002;Vincentis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')<sub>2</sub>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Ser<sup>219</sup>至Phe<sup>243</sup>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')<sub>2</sub>片段(跨越Ala<sup>231</sup>至Gly<sup>237</sup>)。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)(DoHery等人,2003;Kilian等人,1996;Roosjakkars等人,2005;Shonbeck等人,1999;Shapiro,1999;Sukhova等人,1998;van Kempen等人,2006;Vincentis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')<sub>2</sub>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')<sub>2</sub>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(Vencentis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')<sub>2</sub>的较缓慢的第二裂解相对要快。这里报道的研究集中于IgG1,这是因为它在人血液循环中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 <sup>233</sup> - leu <sup>234</sup>	F(ab') <sub>2</sub> + 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 <sup>223</sup> - his <sup>224</sup>	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 <sup>233</sup> - thr <sup>234</sup>	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 <sup>233</sup> - leu <sup>234</sup>	F(ab') <sub>2</sub> + 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 <sup>233</sup> - leu <sup>234</sup>	F(ab') <sub>2</sub> + Fc
基质裂解蛋白 (MMP-7)	" 腺上皮细胞	"	侵入性肿瘤 (1, 4)	Leu <sup>234</sup> - leu <sup>235</sup>	F(ab') <sub>2</sub> + 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)	Lcu <sup>234</sup> - leu <sup>235</sup>	F(ab') <sub>2</sub> + Fc

[0087]

巨噬细胞金属弹性蛋白酶 (MMP-12)	"	"	炎症、过表达时组织破坏、动脉瘤、动脉粥样硬化斑块 (1)	Pro <sup>232</sup> -glu <sup>233</sup>	F(ab') <sub>2</sub> + 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 <sup>233</sup> -leu <sup>234</sup>	F(ab') <sub>2</sub> + 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 <sup>236</sup> -gly <sup>237</sup>	F(ab') <sub>2</sub> + 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,JC.“Proteolytic Enzymes and Disease Treatment”1982.In: Feeney and Whitaker(编辑).Modification of Proteins:Food,Nutritional,and Pharmacological Aspects.Advances in Chemistry Series198.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)Vincent 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.Biochemistry43,15540-15549.

[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℃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%封闭级乳(“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')<sub>2</sub>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1deS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')<sub>2</sub>具有高特异性。该抗体制品显示对使用V8蛋白酶或1deS产生的scIgG和F(ab')<sub>2</sub>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1deS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')<sub>2</sub>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')<sub>2</sub>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')<sub>2</sub>(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')<sub>2</sub>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Bioreclamation。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')<sub>2</sub>、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')<sub>2</sub>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IgG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片段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sclgG和F(ab')<sub>2</sub>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℃通过将酶添加至于含有10mM CaCl<sub>2</sub>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,sclgG、F(ab)<sub>2</sub>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sclgG和F(ab)F(ab)<sub>2</sub>。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)<sub>2</sub>片段,不含有可检测到的完整的IgG或sclgG。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sclgG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sclgG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sclgG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sclgG和F(ab)<sub>2</sub>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sclgG和F(ab')<sub>2</sub>。

[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 sclgG1注射,两组使用MMP-3产生的Mab2 F(ab')<sub>2</sub>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℃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')<sub>2</sub>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sclgG1MMP-3或鼠/人F(ab')<sub>2</sub>MMP-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50ul/孔O-苯二胺底物大约10分钟,使用50ul/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')<sub>2</sub>没有。小鼠中F(ab')<sub>2</sub>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(100mL/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(USBiologicals, 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200μL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(100μL/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(100μL/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)(100μL/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75μL的1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>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sclgG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1GG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sclgG。

[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sclgG浓度 $>60\mu\text{g/mL}$ 。在健康对照组中,sclgG的浓度范围是从 $<8.2\mu\text{g/mL}$ 至 $52.7\mu\text{g/mL}$ 。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sclgG。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sclgG浓度。

#### [0136] 实例10:抗较链1GG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1gG而不结合完整的1gG,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1gG1下游较链及邻接CH2结构域的12-mer肽类似物是免疫原:TCPPCPAPPELLG (SEQ ID NO:1的残基7-18)。天然存在的半胱氨酸被丙氨酸替代,得到变异体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个阳性克隆。进一步的筛选涉及到与完整1gG1和1gG1的各种酶解产生的F(ab')<sub>2</sub>片断的结合。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')<sub>2</sub>片段以及对于完整1gG1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1gG。在标准ELISA方案中,检测纯化的家兔1gG结合人1gG1较链以及完整的1gG和纯化的1gG F

(ab')<sub>2</sub>片段的肽类似物的特异性,所述IgG F(ab')<sub>2</sub>片段使用1deS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亲和素包被的孔上。以10μg/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')<sub>2</sub>片段和scIgG片段具有可忽略的结合(这与在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1des产生的F(ab')<sub>2</sub>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W1L2-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50μl细胞添加至96孔培养板的各孔,最终浓度为每孔 $8 \times 10^4$ 个细胞。将另外50μl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50μl 10%家兔补体(Invitrogen)添加至各孔,在37℃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50μl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')<sub>2</sub>片段的存在下滴定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')<sub>2</sub>片段和scIgG形式无活性。在无结合细胞的情况下,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。

## 序列表

<110> Centocor, Inc.  
 <120> 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  
 <130> CEN5192PCT  
 <140> TO BE ASSIGNED  
 <141> 2008-08-04  
 <150> 60/955162  
 <151> 2007-08-10  
 <160> 11  
 <170> PatentIn version 3.5  
 <210> 1  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 [0001]  
 <400> 1  
 Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu  
 1 5 10 15  
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe  
 20 25  
 <210> 2  
 <211> 41  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <400> 2  
 Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg  
 1 5 10 15  
 Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu  
 20 25 30  
 Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu  
 35 40

<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

[0002]

<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





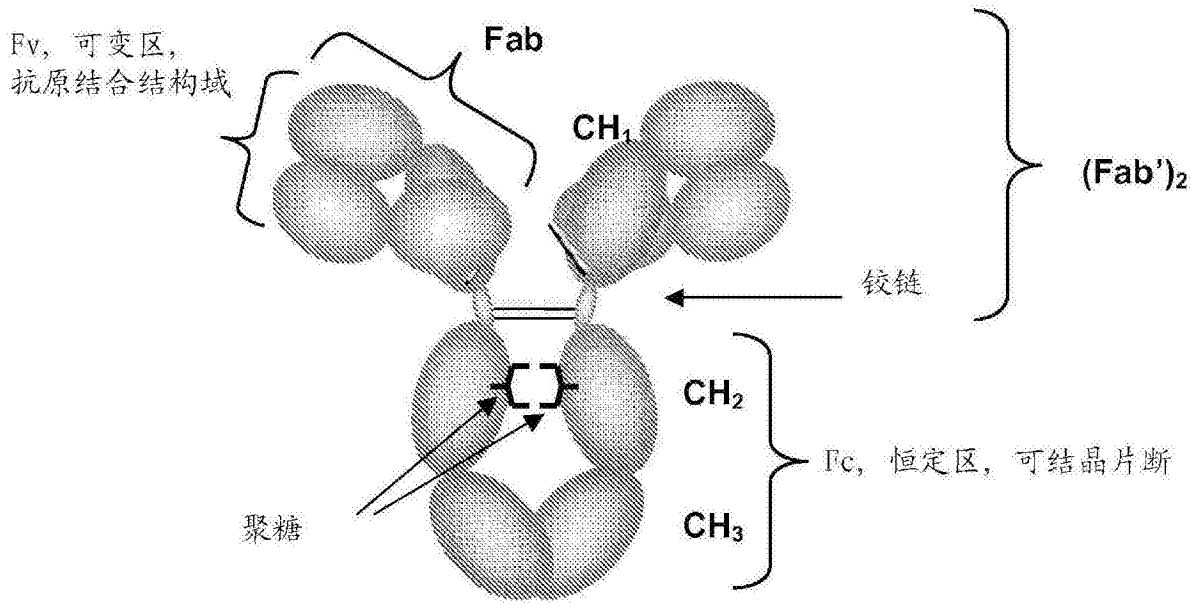


图1

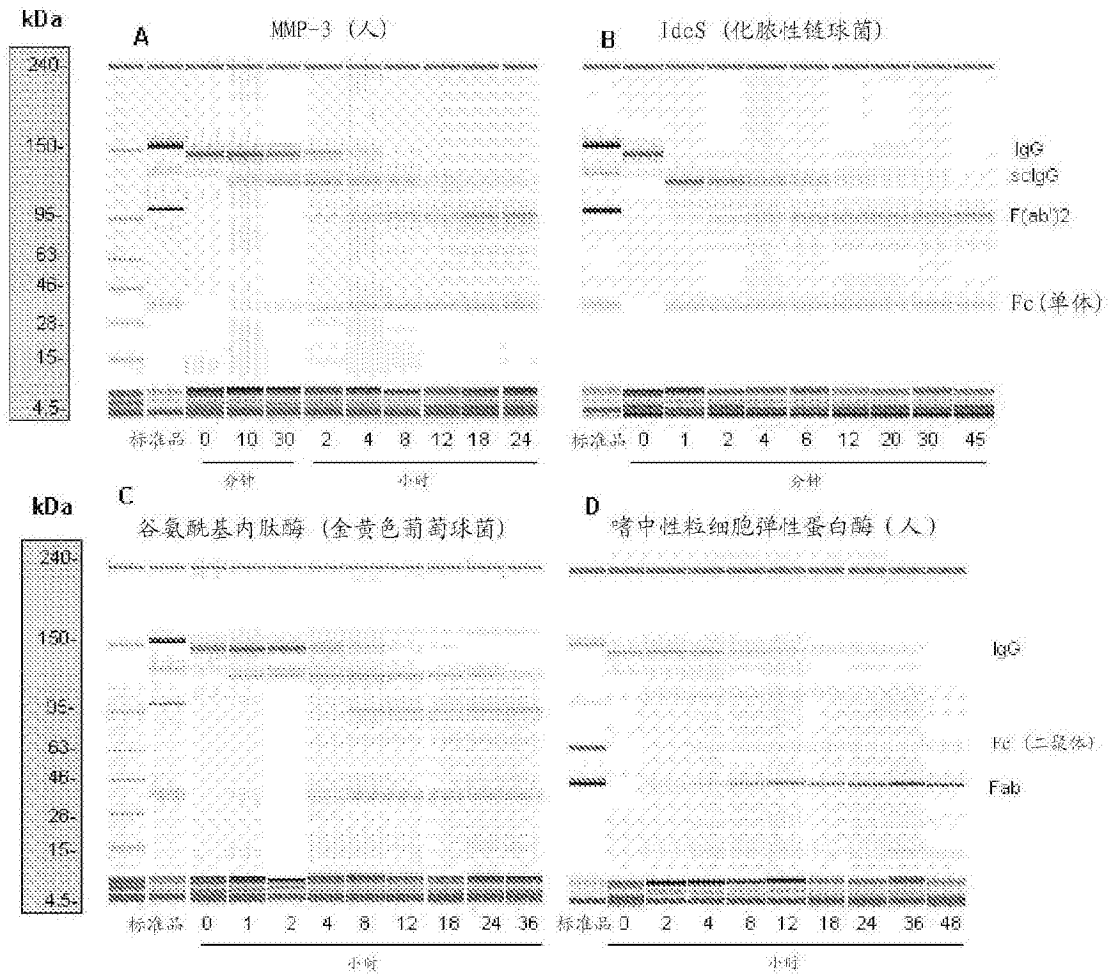


图2

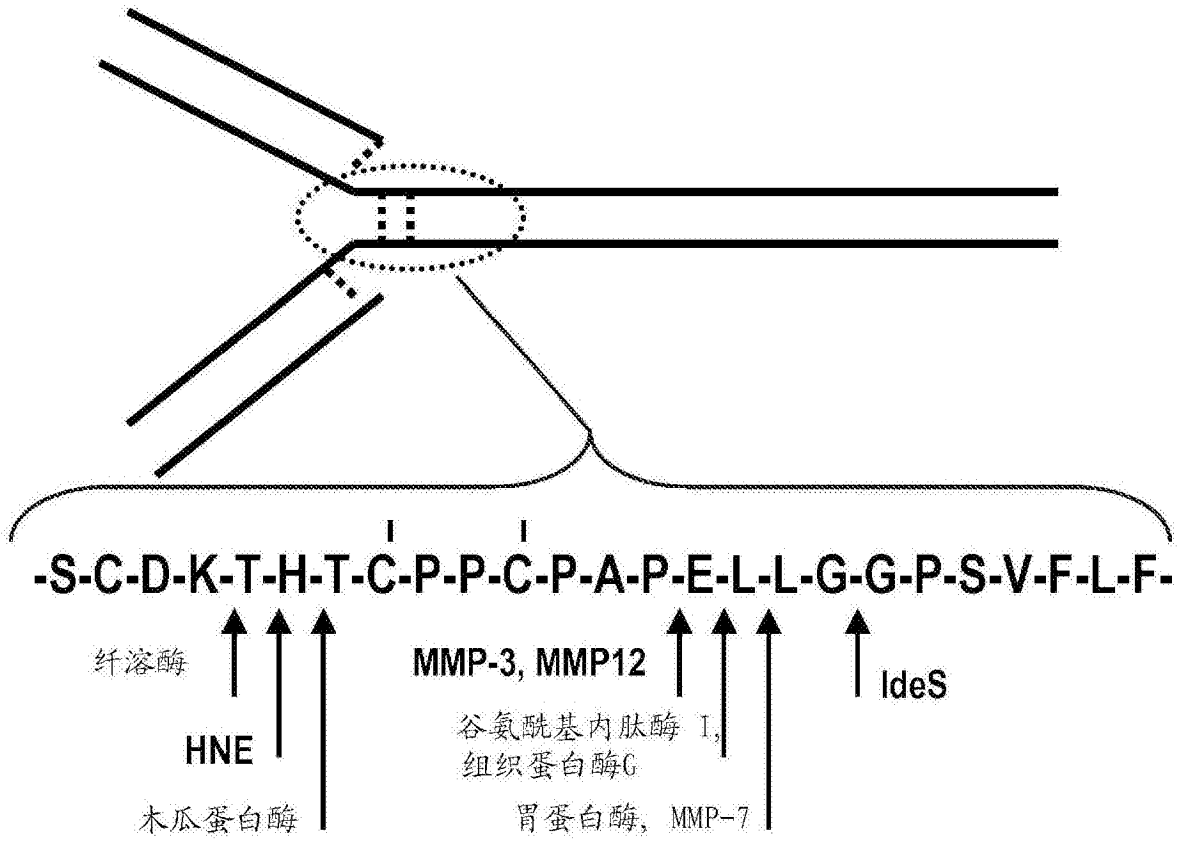


图3

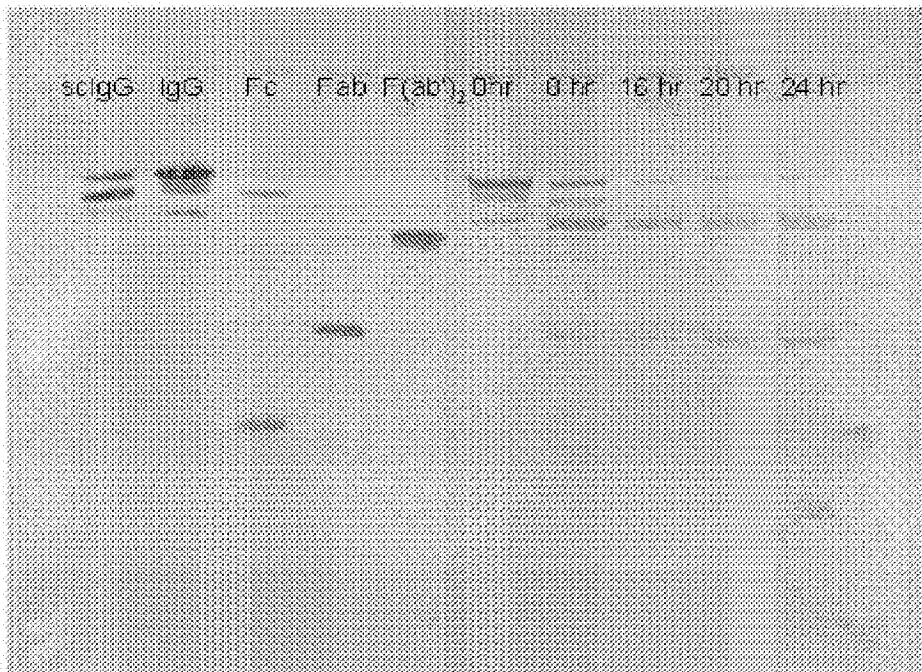


图4

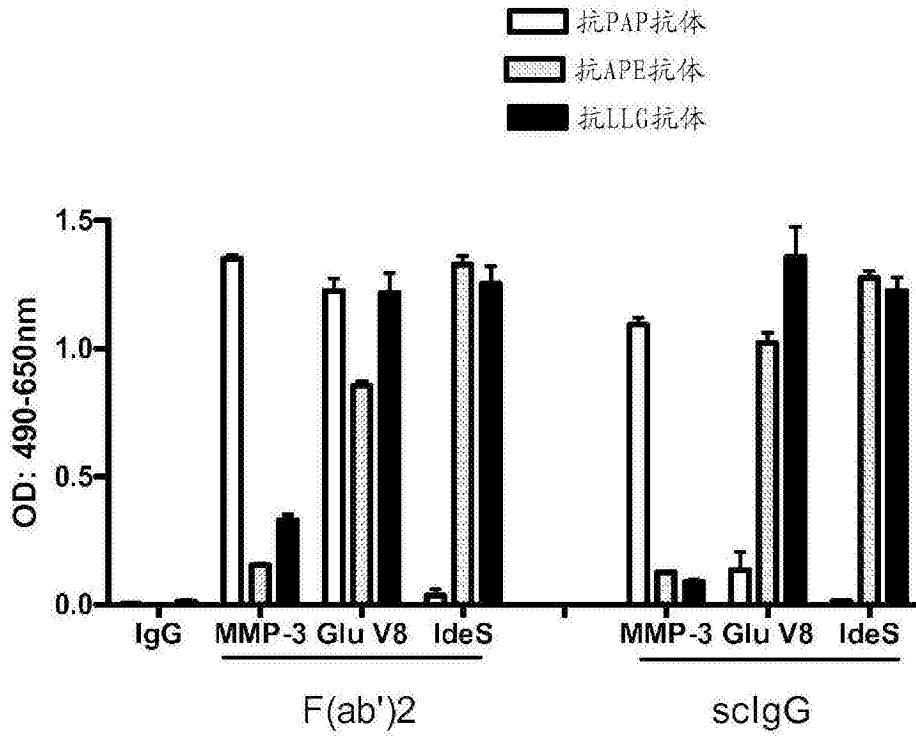


图5

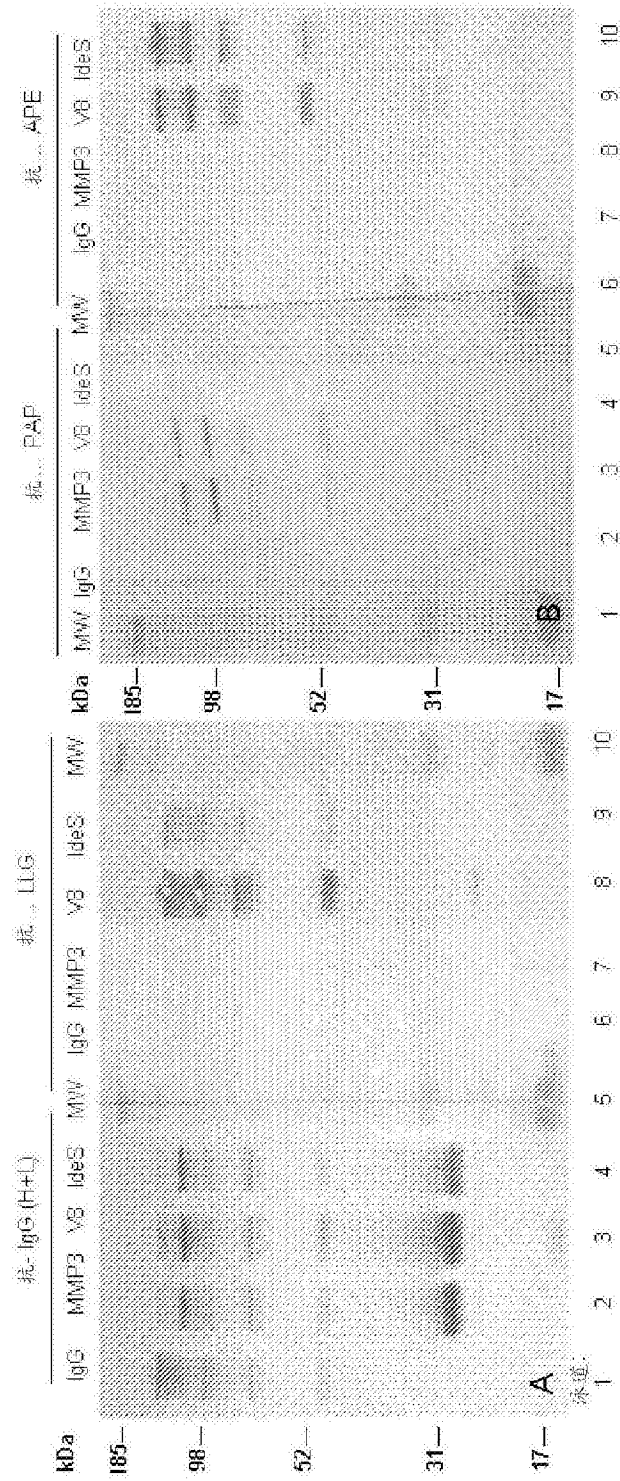


图6

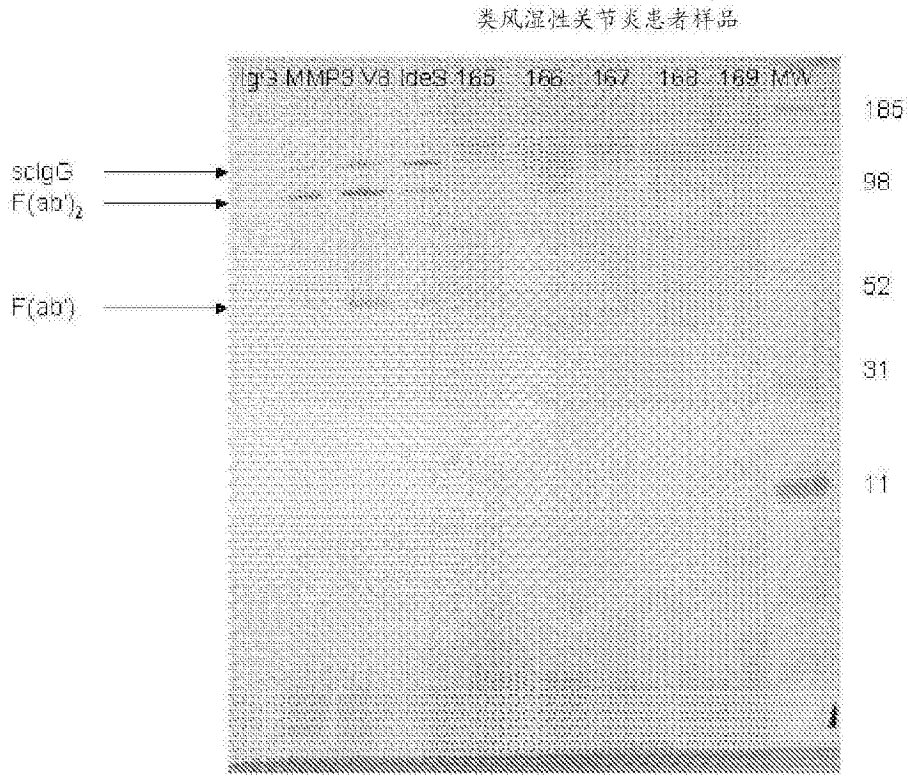


图7

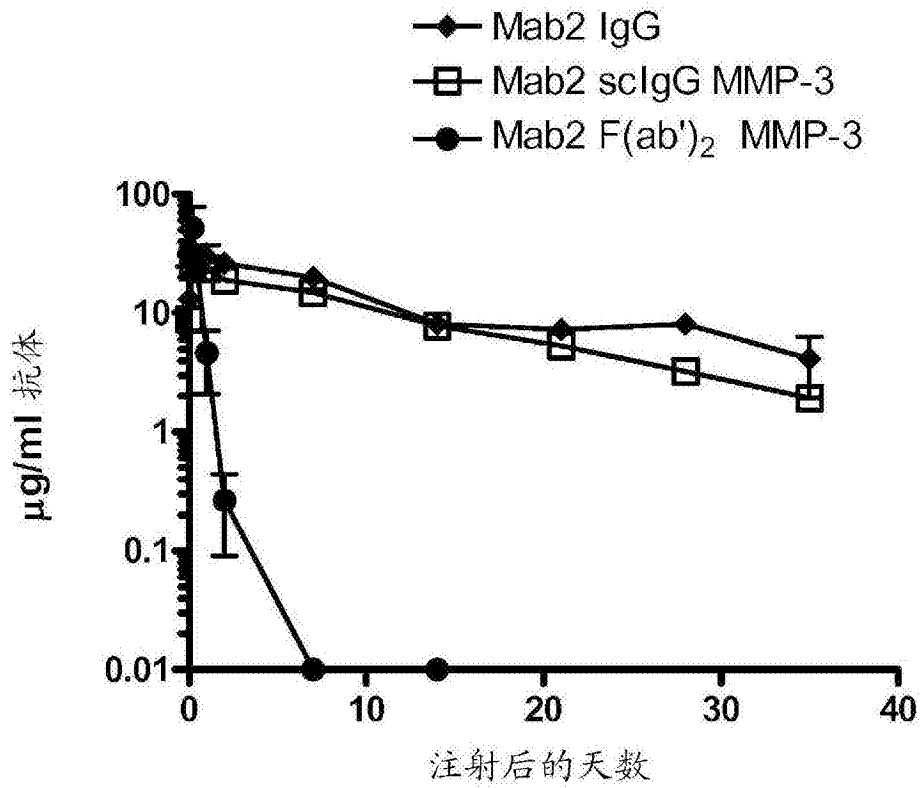


图8

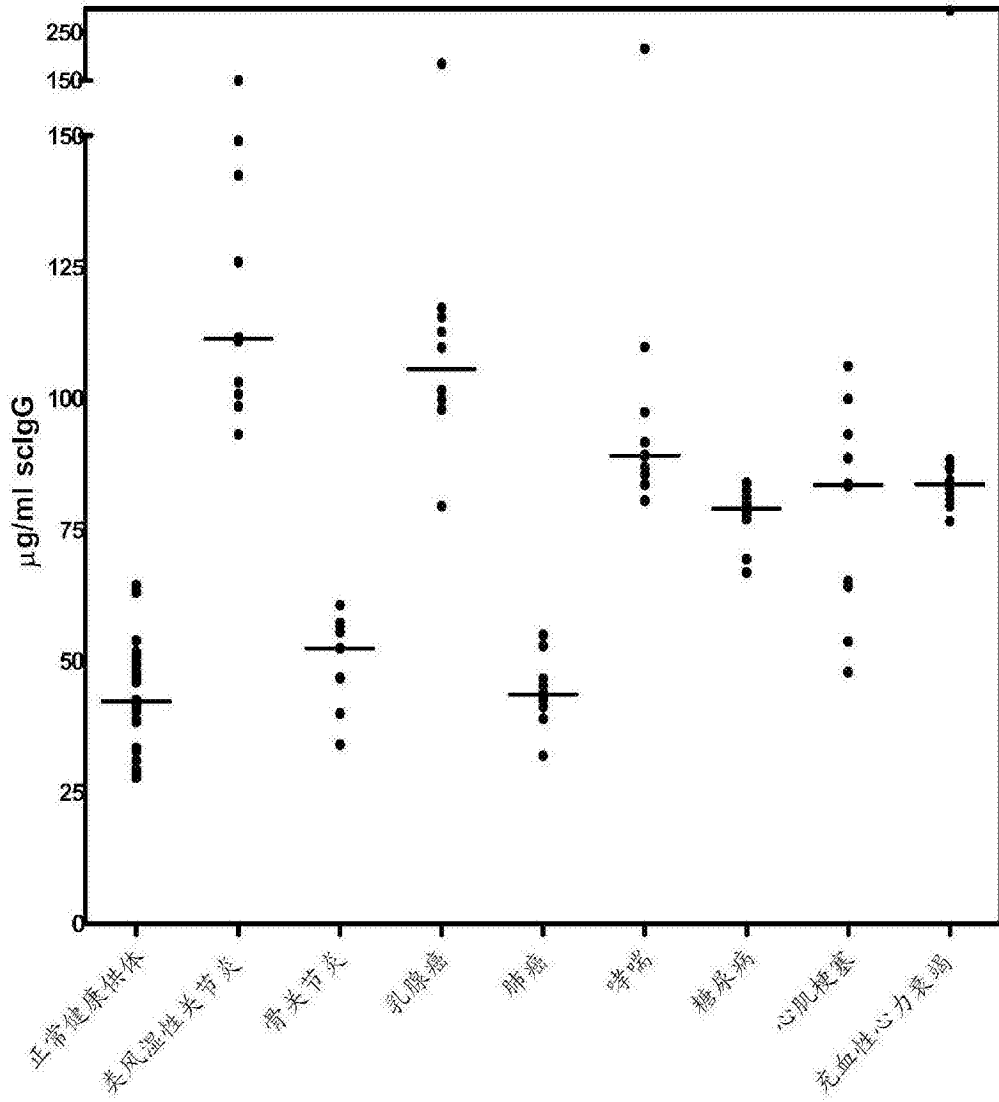


图9

血清sclgG的ELISA测定

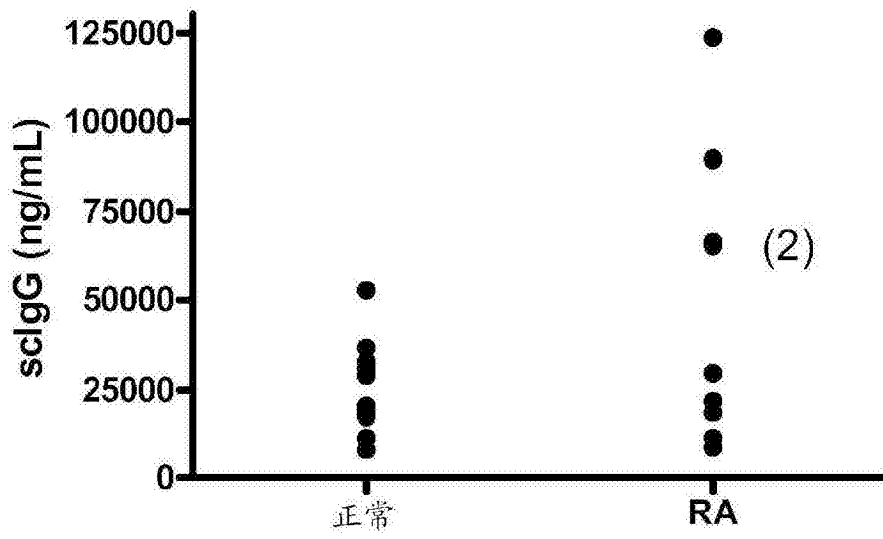


图10

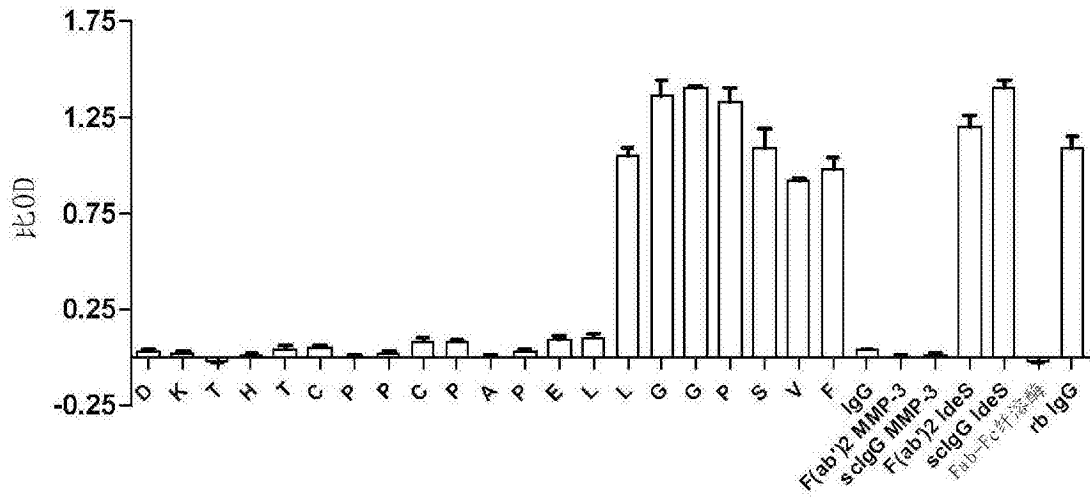


图11

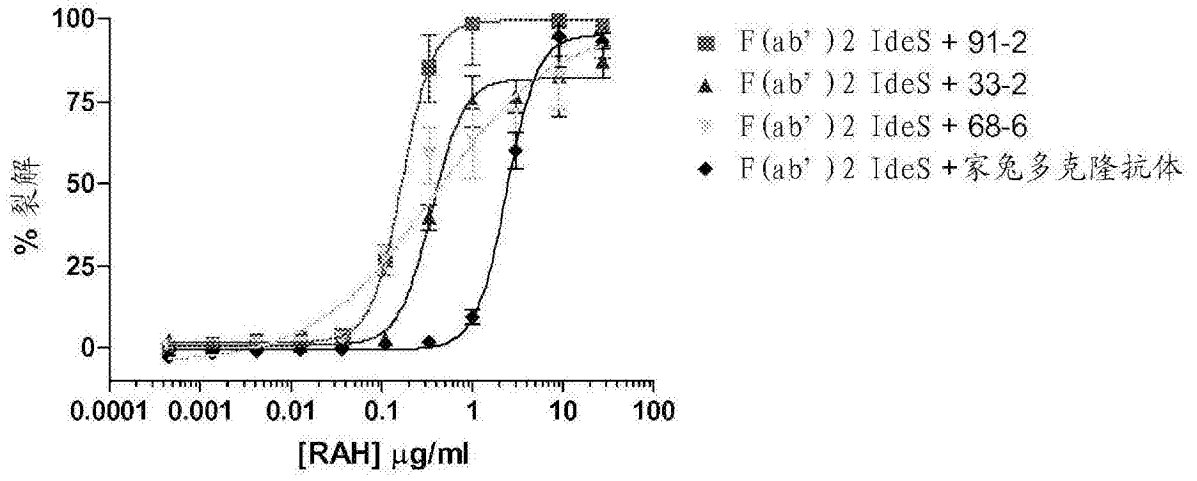


图12

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	<a href="#">CN103497254B</a>	公开(公告)日	2016-12-28
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	A61P19/02 C07K16/065 C07K16/42 C07K2317/50 C07K2317/734 G01N33/6854		
代理人(译)	林毅斌		
审查员(译)	赵天		
优先权	60/955162 2007-08-10 US		
其他公开文献	CN103497254A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

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。

