



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102112876 A

(43) 申请公布日 2011.06.29

(21) 申请号 200980129119.6

(22) 申请日 2009.05.28

(30) 优先权数据

61/130,269 2008.05.28 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011.01.26

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2009/003291 2009.05.28

(87) PCT申请的公布数据

W02009/154695 EN 2009.12.23

(71) 申请人 普罗瑟拉生物制剂有限责任公司

地址 美国罗德岛州

(72) 发明人 Y-P. 林 E. S. 西尔亚 P. 布尔内

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

司 72001

代理人 权陆军 郭文洁

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

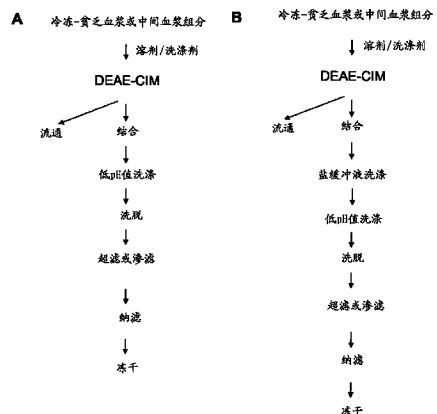
权利要求书 3 页 说明书 25 页 附图 12 页

(54) 发明名称

来自血液的间- $\alpha$  抑制物蛋白的制备和组合物

(57) 摘要

本发明一般地提供了从血液纯化间- $\alpha$  抑制物蛋白(I $\alpha$  Ip) 和其组合物的方法。



1. 一种纯化间- $\alpha$  抑制物蛋白(I $\alpha$  Ip 蛋白)的方法,所述方法包括其中所述 I $\alpha$  Ip 蛋白暴露于约 4.0 或更低的 pH 值的条件的步骤。
2. 权利要求 1 的方法,包括其中 I $\alpha$  Ip 蛋白暴露于约 3.6 或更低的 pH 值的条件的步骤。
3. 权利要求 2 的方法,包括其中 I $\alpha$  Ip 蛋白暴露于约 3.3 或更低的 pH 值的条件的步骤。
4. 权利要求 3 的方法,包括其中 I $\alpha$  Ip 蛋白暴露于约 3.3 到约 2.9 之间的 pH 值的条件的步骤。
5. 权利要求 1-4 的任一项的方法,包括层析步骤或固相提取步骤。
6. 权利要求 1-5 的任一项的方法,其中所述层析步骤包括液相层析、柱层析、阴离子交换层析或其组合。
7. 权利要求 1-6 的任一项的方法,其中所述层析包括单片支持物或基于颗粒的支持物的使用。
8. 权利要求 1-7 的任一项的方法,其中所述单片支持物或颗粒支持物包括固定的阴离子交换配体。
9. 权利要求 1-8 的任一项的方法,其中所述固定的阴离子交换配体是二乙基氨基乙烷(DEAE)或季胺(Q)。
10. 权利要求 1-9 的任一项的方法,包括至少一个缓冲液洗涤步骤,其中所述至少一个缓冲液洗涤步骤的洗涤缓冲液具有约 4.0 或更低的 pH 值。
11. 权利要求 1-10 的任一项的方法,包括至少一个缓冲液洗涤步骤,其中所述至少一个缓冲液洗涤步骤的洗涤缓冲液具有约 3.6 或更低的 pH 值。
12. 权利要求 1-11 的任一项的方法,包括至少一个缓冲液洗涤步骤,其中所述至少一个缓冲液洗涤步骤的洗涤缓冲液具有约 3.3 或更低的 pH 值。
13. 权利要求 1-12 的任一项的方法,包括至少一个缓冲液洗涤步骤,其中所述至少一个缓冲液洗涤步骤的洗涤缓冲液具有约 3.3 到约 2.9 之间的 pH 值。
14. 权利要求 1-13 的任一项的方法,包括缓冲液洗涤步骤,其中所述至少一个缓冲液洗涤步骤的洗涤缓冲液具有约 250 mM NaCl 或更高的盐浓度。
15. 权利要求 1-14 的任一项的方法,其中所述 I $\alpha$  Ip 蛋白是从血液纯化的。
16. 权利要求 1-15 的任一项的方法,其中所述 I $\alpha$  Ip 蛋白是从血浆或血浆组分纯化的。
17. 权利要求 1-16 的任一项的方法,其中所述血浆是冷冻贫乏的血浆,或所述血浆组分是中间血浆组分。
18. 权利要求 1-17 的任一项的方法,其中所述中间血浆组分是含有 I $\alpha$  Ip 的组分。
19. 权利要求 1-18 的任一项的方法,其中所述血液、血浆组分或中间血浆组分是人类、灵长类、牛、马、猪、羊、猫、犬或其组合的。
20. 权利要求 1-19 的任一项的方法,其中所述 I $\alpha$  Ip 蛋白具有约 60 到约 280 kDa 之间的表观分子量。
21. 权利要求 1-20 的任一项的方法,其中所述 I $\alpha$  Ip 蛋白具有生物学活性。
22. 权利要求 1-21 的任一项的方法,其中所述生物学活性是细胞因子抑制物活性、趋化因子抑制物活性或丝氨酸蛋白酶抑制物活性。

23. 权利要求 1-22 的任一项的方法,其中所述方法具有约 85% 到约 100% I  $\alpha$  Ip 蛋白的产率。
24. 权利要求 1-23 的任一项的方法,进一步包括病毒灭活步骤或纳滤步骤。
25. 权利要求 1-24 的任一项的方法,其中所述病毒灭活步骤或纳滤步骤在层析步骤之前发生。
26. 权利要求 1-25 的任一项的方法,其中所述病毒灭活步骤或纳滤步骤在层析步骤之后发生。
27. 一种包含根据权利要求 1-26 的方法纯化的 I  $\alpha$  Ip 蛋白的组合物。
28. 一种药物组合物,包含有效剂量的根据权利要求 1-26 的任一项的方法纯化的 I  $\alpha$  Ip 蛋白和药学上可接受的赋形剂。
29. 权利要求 28 的药物组合物,用于在有需要的受试者中的治疗。
30. 权利要求 29 的药物组合物,其中所述有需要的受试者是人类、灵长类、牛、马、猪、羊、猫或犬。
31. 权利要求 30 的药物组合物,其中有需要的受试者是被鉴定为需要急性炎性疾病、脓毒症、严重休克、脓毒性休克、类风湿性关节炎、癌症、癌症转移、外伤 / 损伤、传染性疾病或早产的治疗的人类。
32. 一种治疗或预防受试者中的疾病或疾病症状的方法,包括向所述受试者施用权利要求 28 的组合物。
33. 权利要求 32 的方法,其中所述受试者被鉴定为需要用权利要求 27 的组合物治疗。
34. 权利要求 33 的方法,其中所述受试者被鉴定为需要急性炎性疾病、脓毒症、严重休克、脓毒性休克、类风湿性关节炎、癌症、癌症转移、外伤 / 损伤、传染性疾病或早产的治疗。
35. 一种用于纯化 I  $\alpha$  Ip 蛋白的试剂盒,其包含 pH 值约 4.0 或更低的至少一种缓冲溶液和使用所述试剂盒的说明。
36. 权利要求 35 的试剂盒,其中至少一种缓冲溶液是具有约 4.0 或更低的 pH 值的洗涤缓冲液。
37. 权利要求 35 的试剂盒,其中至少两种缓冲溶液是具有约 4.0 或更低的 pH 值的洗涤缓冲液。
38. 权利要求 37 的试剂盒,其中第一洗涤缓冲液具有约 4.0 的 pH 值,第二洗涤缓冲液具有约 2.9 的 pH 值。
39. 权利要求 35 的试剂盒,进一步包括具有 250 mM NaCl 或更高的盐浓度的至少一种缓冲溶液。
40. 一种试剂盒,其包含权利要求 26 的组合物和治疗使用的说明。
41. 一种试剂盒,其包含权利要求 26 的组合物和分析使用的说明。
42. 一种纯化间 -  $\alpha$  抑制物蛋白(I  $\alpha$  Ip 蛋白)的方法,所述方法包括:  
将血液、血浆组分或中间血浆组分置于层析柱上,  
使所述柱经历约 4.0 或更低的 pH 值的洗涤缓冲液。
43. 权利要求 42 的方法,其中所述间 -  $\alpha$  抑制物蛋白(I  $\alpha$  Ip 蛋白)结合所述柱。
44. 权利要求 42-43 的任一项的方法,其中所述间 -  $\alpha$  抑制物蛋白(I  $\alpha$  Ip 蛋白)是分离的。

45. 通过权利要求 1-26 的任一项的方法制得的纯化的间- $\alpha$  抑制物蛋白(I $\alpha$  Ip 蛋白)。

46. 权利要求 44 的 I $\alpha$  Ip 蛋白,其中所述 I $\alpha$  Ip 蛋白在竞争性酶联免疫吸附测定(ELISA)中测得具有相比参考物提高的结合。

47. 权利要求 46 的 I $\alpha$  Ip 蛋白,相比所述参考物,其中所述结合提高至大于 1、1.5、2、3、4、5 或 10 倍。

48. 权利要求 45 的 I $\alpha$  Ip 蛋白,其中所述 I $\alpha$  Ip 蛋白具有约 85% 到约 100% 纯的纯度。

49. 一种试剂盒,包含权利要求 45-48 的任一项的 I $\alpha$  Ip 蛋白和分析使用的说明。

## 来自血液的间- $\alpha$ 抑制物蛋白的制备和组合物

### [0001] 相关申请的交叉引用

本申请要求 2008 年 5 月 28 日提交的美国临时申请 NO. 61/130,269 的权益,通过引用将其全部内容合并在本文中。

### [0002] 关于在联邦政府赞助的研究之下完成的发明的权利的声明

这些工作由国家卫生研究所/国家普通医学科学研究所拨款、拨款 NO. 2R44GM65667-02 和 1R43GM079071-01A1 支持。政府在本发明中拥有一定权益。

### [0003] 发明背景

脓毒症和全身性炎症反应综合征(Systemic Inflammatory Response Syndrome, SIRS)都涉及在暴露于传染原(例如,细菌毒素,如炭疽)之后,或来自损伤或外伤的严重的生化反应。全身性应答可能导致脓毒性休克,其特征在于血压的急剧降低、心血管虚脱和/或多器官衰竭。尽管在超过五十年前引入了抗生素,在被诊断患有脓毒性休克的受试者中死亡率是 30-50%,高于乳腺癌、结肠癌或前列腺癌的死亡率。在美国每年有大约 800,000 例脓毒症病例,代价为 170 亿美元,与世界上其他地区数量相等。由于抗生素抗性和提高的生物学威胁,脓毒症和 SIRS 在全世界快速地增多。当人们考虑潜在的关联的世界大流行(例如,禽流感)或生物恐怖主义时,“风险”群体是实质上更大的。在生物恐怖主义或战场暴露中,死亡率预计更高得多。使用常规的药物快速和可靠地治疗脓毒症、SIRS 和脓毒性休克是困难的。

[0004] 间- $\alpha$  抑制物蛋白(inter-alpha inhibitor protein) ( $I\alpha Ip$ ) 家族是一组血浆相关的丝氨酸蛋白酶抑制物,其调节身体对伴随脓毒症、感染、外伤和损伤的严重全身性炎症的应答。间- $\alpha$  抑制物蛋白( $I\alpha Ip$ ) 已经显示了改善患有脓毒症;感染炭疽、Ebola 或登革热病毒;或由于对有毒化学品或电离辐射的暴露遭受肺部损伤的测试动物的存活和状况。 $I\alpha Ip$  是分离自血液的大的蛋白质。由于间- $\alpha$  抑制物蛋白在治疗脓毒症和 SIRS 中的治疗用途,纯化或制备  $I\alpha Ip$  的方法是迫切需要的。

### [0005] 发明概述

如下所述,本发明涉及纯化间- $\alpha$  抑制物蛋白( $I\alpha Ip$ )的方法,以及它们用于治疗疾病或其症状的用途,包括疾病例如脓毒症、急性炎症性疾病、严重休克、脓毒性休克、类风湿性关节炎、癌症、癌症转移、传染性疾病和早产;或降低与脓毒症、急性炎症性疾病、严重休克、脓毒性休克、类风湿性关节炎、癌症、癌症转移、传染性疾病和早产相关的死亡的风险。

[0006] 在一个方面,本发明提供了纯化间- $\alpha$  抑制物蛋白( $I\alpha Ip$  蛋白)的方法,所述方法涉及其中  $I\alpha Ip$  蛋白暴露于约 4.0 或更低(例如,3.7、3.5、3.4、3.3、3.1、3.0、2.9、2.0)的 pH 值的条件下的步骤。

[0007] 在一个方面,本发明提供了含有根据一方法纯化的  $I\alpha Ip$  蛋白的组合物,所述方法涉及其中  $I\alpha Ip$  蛋白暴露于约 4.0 或更低的 pH 值的条件的步骤。

[0008] 在另一个方面,本发明提供了含有有效剂量的根据一方法纯化的  $I\alpha Ip$  蛋白和药学上可接受的赋形剂的药物组合物,所述方法涉及其中  $I\alpha Ip$  蛋白暴露于约 4.0 或更低的 pH 值的条件的步骤。

[0009] 在又一个方面,本发明提供了治疗或预防受试者中疾病或疾病症状的方法,包括向所述受试者施用含有根据涉及其中 I $\alpha$  Ip 蛋白暴露于约 4.0 或更低的 pH 值的条件的步骤的方法纯化的 I $\alpha$  Ip 蛋白的组合物。

[0010] 在再另一个方面,本发明提供了用于纯化 I $\alpha$  Ip 蛋白的试剂盒,其具有 pH 值约 4.0 或更低的至少一种缓冲溶液和使用所述试剂盒的说明。在一个实施方式中,所述试剂盒具有至少一种缓冲溶液,其是具有约 4.0 或更低的 pH 值的洗涤缓冲液。在另一个实施方式中,所述试剂盒具有至少两种缓冲溶液,它们是具有约 4.0 或更低的 pH 值的洗涤缓冲液。在具体的实施方式中,第一洗涤缓冲液具有约 4.0 的 pH 值,第二洗涤缓冲液具有约 3.3 的 pH 值。在另一个具体的实施方式中,第一洗涤缓冲液具有约 4.0 的 pH 值,第二洗涤缓冲液具有约 2.9 的 pH 值。

[0011] 在另外的方面,本发明提供了用于治疗用途的具有组合物的试剂盒,所述组合物含有根据一方法纯化的 I $\alpha$  Ip 蛋白,所述方法涉及其中 I $\alpha$  Ip 蛋白暴露于约 4.0 或更低的 pH 值的条件的步骤。

[0012] 在另外的方面,本发明提供了用于分析用途的具有组合物的试剂盒,所述组合物含有根据一方法纯化的 I $\alpha$  Ip 蛋白,所述方法涉及其中 I $\alpha$  Ip 蛋白暴露于约 4.0 或更低的 pH 值的条件的步骤。

[0013] 在相关的方面,本发明提供了用于纯化间- $\alpha$  抑制物蛋白(I $\alpha$  Ip 蛋白)的方法,所述方法涉及:将血液、血浆组分、或中间血浆组分放置在层析柱上,使所述柱经受具有约 4.0 或更低 pH 值的洗涤缓冲液。

[0014] 在又一个相关的方面,本发明提供了通过一方法制造的纯化的间- $\alpha$  抑制物蛋白(I $\alpha$  Ip 蛋白),所述方法涉及其中 I $\alpha$  Ip 蛋白暴露于约 4.0 或更低的 pH 值的条件,和其中所述 I $\alpha$  Ip 蛋白在竞争性酶联免疫吸附测定(ELISA)中与参考物相比实现提高的结合的步骤。在一个实施方式中,与参考物(例如,未用低 pH 值处理的 I $\alpha$  Ip 蛋白)相比,I $\alpha$  Ip 蛋白的结合提高至大于 1、1.5、2、3、4、5 或 10 倍。

[0015] 在任何上述方面或在此描述的任何其他发明的各种实施方式中,所述方法涉及其中 I $\alpha$  Ip 蛋白暴露于约 3.6 或更低的 pH 值的条件的步骤。在各种实施方式中,所述方法涉及其中 I $\alpha$  Ip 蛋白暴露于约 3.3 或更低的 pH 值的条件的步骤。在各种实施方式中,所述方法涉及其中 I $\alpha$  Ip 蛋白暴露于约 3.3 到约 3.1 之间的 pH 值的条件的步骤。在各种实施方式中,所述方法涉及其中 I $\alpha$  Ip 蛋白暴露于约 3.1 到约 2.9 之间的 pH 值的条件的步骤。

[0016] 在任何上述方面或在此描述的任何其他发明的各种实施方式中,所述方法涉及层析步骤或固相提取步骤。在各种实施方式中,所述层析步骤包含液相层析、柱层析、阴离子交换层析或其组合。在各种实施方式中,所述层析涉及单片支持物或基于颗粒的支持物的使用。在各种实施方式中,所述单片支持物或颗粒支持物涉及固定的阴离子交换配体。在各种实施方式中,所述固定的阴离子交换配体是二乙基氨基乙烷(DEAE)或季胺(Q)。

[0017] 在任何上述方面或在此描述的任何其他发明的各种实施方式中,所述方法涉及至少一个缓冲液洗涤步骤,其中所述至少一个缓冲液洗涤步骤的洗涤缓冲液具有约 4.0 或更低的 pH 值。在各种实施方式中,所述方法涉及至少一个缓冲液洗涤步骤,其中所述至少一个缓冲液洗涤步骤的洗涤缓冲液具有约 3.6 或更低的 pH 值。在各种实施方式中,所述方法涉及至少一个缓冲液洗涤步骤,其中所述至少一个缓冲液洗涤步骤的洗涤缓冲液具有约

3.3 或更低的 pH 值。在各种实施方式中,所述方法涉及至少一个缓冲液洗涤步骤,其中所述至少一个缓冲液洗涤步骤的洗涤缓冲液具有约 3.1 或更低的 pH 值。在各种实施方式中,所述方法涉及至少一个缓冲液洗涤步骤,其中所述至少一个缓冲液洗涤步骤的洗涤缓冲液具有约 3.1 到约 2.9 之间的 pH 值。在各种实施方式中,所述间- $\alpha$  抑制物蛋白(I $\alpha$  Ip 蛋白)结合所述柱。在各种实施方式中,所述间- $\alpha$  抑制物蛋白(I $\alpha$  Ip 蛋白)是分离的。

[0018] 在任何上述方面或在此描述的任何其他发明的各种实施方式中,所述方法涉及其中所述 I $\alpha$  Ip 蛋白暴露于约 250 mM NaCl 或更高的盐的浓度(例如,260、270、280、290 mM NaCl)的步骤。在此处描述的任何上述方面的各种实施方式中,所述方法涉及至少一个缓冲液洗涤步骤,其中所述洗涤缓冲液具有约 250 mM NaCl 或更高的盐的浓度(例如,260、270、280、290 mM NaCl)。

[0019] 在任何上述方面或在此描述的任何其他发明的各种实施方式中,所述 I $\alpha$  Ip 蛋白是从血液纯化的。在各种实施方式中,所述 I $\alpha$  Ip 蛋白是从血浆或血浆组分纯化的。在各种实施方式中,所述血浆是冷冻贫乏的(cryo-poor)血浆,或所述血浆组分是中间血浆组分。在各种实施方式中,所述中间血浆组分是含有 I $\alpha$  Ip 的组分。在各种实施方式中,所述血液、血浆组分或中间血浆组分是人类、灵长类、牛、马、猪、羊、猫、犬或其组合的。

[0020] 在任何上述方面或在此描述的任何其他发明的各种实施方式中,所述 I $\alpha$  Ip 蛋白具有约 60 到约 280 kDa 之间的表观分子量。在任何上述方面或在此描述的任何其他发明的各种实施方式中,所述 I $\alpha$  Ip 蛋白或组合物具有约 85% 到约 100% 纯的纯度。在任何上述方面或在此描述的任何其他发明的各种实施方式中,所述 I $\alpha$  Ip 蛋白或组合物具有约 85% 到约 100% 的产率。在某些实施方式中,所述 I $\alpha$  Ip 蛋白或组合物可以用于分析用途(例如,来测定未知 I $\alpha$  Ip 浓度的样品中 I $\alpha$  Ip 的数量)。在某些实施方式中,所述 I $\alpha$  Ip 蛋白或组合物具有生物学活性。在各种实施方式中,所述生物学活性是细胞因子抑制物活性、趋化因子抑制物活性或丝氨酸蛋白酶抑制物活性。在各种实施方式中,所述方法涉及处在层析步骤之前或之后的病毒灭活步骤或纳滤步骤。

[0021] 在任何上述方面或在此描述的任何其他发明的各种实施方式中,所述组合物或药物组合物用于有需要的受试者中的治疗。在各种实施方式中,所述受试者被鉴定为需要用所述组合物治疗。在各种实施方式中,所述受试者被鉴定为需要急性炎症性疾病、脓毒症、严重休克、脓毒性休克、类风湿性关节炎、癌症、癌症转移、外伤 / 损伤、传染性疾病或早产的治疗。在任何上述方面的各种实施方式中,有需要的受试者是人类、灵长类、牛、马、猪、羊、猫或犬。

[0022] 本发明提供了从血浆制备或纯化间- $\alpha$  抑制物蛋白(I $\alpha$  Ip)的方法。根据详细说明和根据权利要求,本发明的其他特征和优点将是明显的。

[0023] 定义

如在此使用的,“改变”是指由本领域已知的标准方法、如此处描述的那些来检测的, I $\alpha$  Ip 蛋白的产率、数量、浓度、活性、纯度或水平的变化(提高或降低)。如在此使用的,改变包括在产率、纯度或活性方面 10% 的改变,优选的在表达水平方面 25% 的改变、更优选的 40% 的改变以及最优选的 50% 或更高的改变。

[0024] “类似物”是指具有参考多肽或核酸分子的功能的、结构上相关的多肽或核酸分子。

[0025] “化合物”是指任何小分子化合物、抗体、核酸分子或多肽、或其片段。

[0026] “降低”或“提高”分别是指至少 10%、25%、50%、75% 或 100% 的负的或正的改变。

[0027] “受试者”是指哺乳动物,包括但不限于,人类或非人类哺乳动物,例如,灵长类、牛、马、猪、羊、猫或犬。

[0028] 如在此使用的,术语“治疗”等等是指降低或改善病症和 / 或与之相关的症状。要理解的是,虽然没有排除,治疗病症或状况不需要所述病症、状况或与之相关的症状被完全消除。

[0029] 如在此使用的,术语“预防”或“预防性治疗”等等,是指降低受试者中发生病症或状况的概率,所述受试者不患有、但是处在发生病症或状况的风险中或对发生病症或状况是敏感的。

[0030] “参考”是指标准或对照的条件。

[0031] 在本公开中,“包含”、“含有”和“具有”等等可以具有在美国专利法中归于它们的含义,可以指“包括”等等;“基本上由……组成”或“基本上组成”同样具有在美国专利法中归于它们的含义,该术语是开放式的,容许叙述内容之外的内容的存在,只要所叙述内容的基础的或新的特征不由叙述内容之外的内容的存在而改变,但是排除现有技术实施方式。

[0032] 附图的简要说明

附图 1A-1B 描述了利用单个层析步骤从人血浆中纯化 I $\alpha$  Ip 的方案。附图 1A 描述了利用低 pH 值洗涤步骤从人血浆中纯化 I $\alpha$  Ip 的方案。附图 1B 描述了利用盐缓冲液洗涤步骤和低 pH 值洗涤步骤从人血浆中纯化 I $\alpha$  Ip 的方案。

[0033] 附图 2A-2C 显示了利用低 pH 值洗涤步骤(pH 4.0 或 pH 3.3)通过 DEAE 层析从血浆(组分 D 和组分 C)纯化 I $\alpha$  Ip 蛋白。附图 2A 显示了利用用洗涤缓冲液(25 mM Tris, 200 mM NaCl, pH 7.8)的一个洗涤步骤通过 DEAE 层析(单片支持物;流动速度:5 mL/分钟)分离的、用洗脱缓冲液(100 mM Tris, 1000 mM NaCl, pH 7.6)洗脱的血浆(在 25 mM Tris, 200 mM NaCl, pH 7.8 中 1:100 稀释物 1 mL)的 UV 曲线。附图 2B 显示了利用使用低 pH 值洗涤缓冲液(150 mM 乙酸, pH 4.0)的一个洗涤步骤通过 DEAE 层析(单片支持物;流动速度:5 mL/分钟)分离的、使用洗脱缓冲液(100 mM Tris, 1000 mM NaCl, pH 7.6)洗脱的血浆(在 25 mM Tris、200 mM NaCl、pH 7.8 中 1:100 稀释物 1 mL)的 UV 曲线。附图 2C 显示了利用使用低 pH 值洗涤缓冲液(150 mM 乙酸, pH 3.3)的一个洗涤步骤通过 DEAE 层析(单片支持物;流动速度:5 mL/分钟)分离的、使用洗脱缓冲液(100 mM Tris, 1000 mM NaCl, pH 7.6)洗脱的血浆(在 25 mM Tris, 200 mM NaCl, pH 7.8 中 1:100 稀释物 1 mL)的 UV 曲线。

[0034] 附图 3 显示了利用使用两种低 pH 值洗涤缓冲液(洗涤缓冲液 #1:150 mM 乙酸, pH 4.0;洗涤缓冲液 #2:200 mM 乙酸, pH 3.3)的两个洗涤步骤通过 DEAE 层析(单片支持物)分离的、用 100 mM Tris+1000 mM NaCl, pH 7.6 洗脱的冷冻贫乏的血浆(在 25 mM Tris, 200 mM NaCl, pH 7.8 中 1:100 稀释物 1 mL)的 UV 曲线。

[0035] 附图 4A-4D 显示了利用单个低 pH 值洗涤步骤(pH 3.3)或两个低 pH 值洗涤步骤(pH 4.0 和 pH 3.3)通过 DEAE 层析的中间血浆的分级(组分 D 和组分 C)。附图 4A 显示了利用使用低 pH 值洗涤缓冲液(洗涤缓冲液 #1:150 mM 乙酸, pH 4.0)的一个洗涤步骤通过 DEAE 层析(单片支持物;流动速度:5 mL/分钟)分离的、使用洗脱缓冲液(100 mM Tris, 1000 mM NaCl, pH 7.6)洗脱的中间血浆(在 25 mM Tris, 200 mM NaCl, pH 7.8 中组分 D 的 1:200

稀释物 1 mL)的 UV 曲线。附图 4B 显示了利用使用低 pH 值洗涤缓冲液(洗涤缓冲液 #1 :150 mM 乙酸,pH 4.0)的一个洗涤步骤通过 DEAE 层析(1 mL 单片支持物;流动速度:5 mL/分钟)分离的、使用洗脱缓冲液(100 mM Tris,1000 mM NaCl,pH 7.6)洗脱的中间血浆组分(在 25 mM Tris,200 mM NaCl,pH 7.8 中组分 C 的 1:200 稀释物 1 mL)的 UV 曲线。附图 4C 显示了利用使用两种低 pH 值洗涤缓冲液(洗涤缓冲液 #1 :150 mM 乙酸,pH 4.0;洗涤缓冲液 #2 :200 mM 乙酸,pH 3.3)的两个洗涤步骤通过 DEAE 层析(1 mL 单片支持物;流动速度:5 mL/分钟)分离的、使用洗脱缓冲液(100 mM Tris,1000 mM NaCl,pH 7.6)洗脱的中间血浆(在 25 mM Tris、200 mM NaCl、pH 7.8 中组分 D 的 1:200 稀释物 1 mL)的 UV 曲线。附图 4D 显示了利用使用两种低 pH 值洗涤缓冲液(洗涤缓冲液 #1 :150 mM 乙酸,pH 4.0;洗涤缓冲液 #2 :200 mM 乙酸,pH 3.3)的两个洗涤步骤通过 DEAE 层析(1 mL 单片支持物;流动速度:5 mL/分钟)分离的、使用洗脱缓冲液(100 mM Tris,1000 mM NaCl,pH 7.6)洗脱的中间血浆组分(在 25 mM Tris、200 mM NaCl、pH 7.8 中组分 C 的 1:200 稀释物 1 mL)的 UV 曲线。

[0036] 附图 5 显示了由 Western 印迹分析的通过 DEAE 单片柱层析的 I $\alpha$  Ip 蛋白的纯化。显示了来自中间血浆组分(组分 D 和组分 C)的两种层析分离的分析。对于每种层析分离,起始材料(SM)每个泳道加载相等的数量,洗涤 #1 组分(W#1)、洗涤 #2 组分(W#2)和洗脱物(E)通过 SDS-PAGE (6%;非变性的)分离。显示了来自冷冻贫乏血浆的层析分离的洗脱物(E)用于比较。SDS-PAGE 分离的蛋白质转移到硝化纤维素膜上,其用抗人类 I $\alpha$  Ip (MAb 69.26)作为初级抗体来探测。

[0037] 附图 6A-6F 显示了利用两个低 pH 值洗涤步骤(pH 4.0 和 pH 3.3)通过 DEAE 层析从冷冻贫乏血浆或中间血浆(组分 D 和组分 C)纯化 I $\alpha$  Ip 蛋白是规模可变的。附图 6A 显示了利用使用两种低 pH 值洗涤缓冲液(洗涤缓冲液 #1 :150 mM 乙酸,pH 4.0;洗涤缓冲液 #2 :200 mM 乙酸,pH 3.3)的两个洗涤步骤通过 DEAE 层析(8 mL 单片支持物;流动速度:40 mL/分钟)分离的、使用洗脱缓冲液(100 mM Tris,1000 mM NaCl,pH 7.6)洗脱的冷冻贫乏血浆(起始材料:在 25 mM Tris,200 mM NaCl,pH 7.8 中组分 C 的 1:10 稀释物 25 mL)的 UV 曲线。附图 6B 显示了通过 SDS-PAGE (4-20% 梯度)分析的,通过 DEAE 单片层析(起始材料(SM),洗涤 #1 (W#1)、洗涤 #2 (W#2)和洗脱物(EL))来自冷冻贫乏血浆的分离的组分。附图 6C 显示了利用使用两种低 pH 值洗涤缓冲液(洗涤缓冲液 #1 :150 mM 乙酸,pH 4.0;洗涤缓冲液 #2 :200 mM 乙酸,pH 3.3)的两个洗涤步骤通过 DEAE 层析(8 mL 单片支持物;流动速度:40 mL/分钟)分离的、使用洗脱缓冲液(100 mM Tris,1000 mM NaCl、pH 7.6)洗脱的中间血浆(起始材料:在 25 mM Tris,200 mM NaCl,pH 7.8 中组分 D 的 1:125 稀释物 2 mL)的 UV 曲线。附图 6D 显示了通过 SDS-PAGE (4-20% 梯度)分析的,通过 DEAE 单片层析(起始材料(SM),洗涤 #1 (W#1)、洗涤 #2 (W#2)和洗脱物(EL))来自中间血浆(组分 D)的分离的组分。附图 6E 显示了利用使用两种低 pH 值洗涤缓冲液(洗涤缓冲液 #1 :150 mM 乙酸,pH 4.0;洗涤缓冲液 #2 :200 mM 乙酸,pH 3.3)的两个洗涤步骤通过 DEAE 层析(8 mL 单片支持物;流动速度:40 mL/分钟)分离的、使用洗脱缓冲液(100 mM Tris,1000 mM NaCl,pH 7.6)洗脱的中间血浆组分(起始材料:在 25 mM Tris,200 mM NaCl,pH 7.8 中组分 C 的 1:125 稀释物 2 mL)的 UV 曲线。附图 6F 显示了通过 SDS-PAGE (4-20% 梯度)分析的,通过 DEAE 单片层析(起始材料(SM),洗涤 #1 (W#1)、洗涤 #2 (W#2)和洗脱物(EL))来自中间血浆(组分 C)的分离的组分。

[0038] 附图 7A 和 7B 显示了使用利用盐缓冲液(大于 250mM NaCl)的洗涤步骤和低 pH 值洗涤步骤(pH 2.95)通过 DEAE 层析从冷冻贫乏的血浆或中间血浆组分纯化 I $\alpha$  Ip 蛋白。附图 7A 显示了利用使用盐洗涤缓冲液(10 倍柱体积的 40 mM Tris-HCl、290mM NaCl pH 7.6)和低 pH 值洗涤缓冲液(10 倍柱体积的 200mM 乙酸钠 pH 2.95)的两个洗涤步骤通过 DEAE 层析(单片支持物)分离的、用高盐洗脱缓冲液(5 倍柱体积的 40 mM 柠檬酸钠 pH 6.50, 1000 mM NaCl)洗脱的冷冻贫乏的血浆(在 40 mM Tris, 200 mM NaCl, pH 7.6 中 1:10 稀释物的 12.5 倍柱体积; 0.2  $\mu$ M 过滤的)的 UV 曲线。附图 7B 显示了利用使用盐洗涤缓冲液(10 倍柱体积的 40 mM Tris-HCl、290mM NaCl pH 7.6)和低 pH 值洗涤缓冲液(10 倍柱体积的 200mM 乙酸钠 pH 2.95)的两个洗涤步骤通过 DEAE 层析(单片支持物)分离的、用高盐洗脱缓冲液(5 倍柱体积的 40 mM 柠檬酸钠 pH 6.50, 1000 mM NaCl)洗脱的中间血浆组分(组分 D)(在 40 mM Tris, 200 mM NaCl, pH 7.6 中 1:10 稀释物的 2.5 倍柱体积; 0.2  $\mu$ M 过滤的)的 UV 曲线。在 2.5 倍柱体积(cv)每分钟的流动速度下,商业上可获得的 8 mL DEAE 单片柱(DEAE-CIM; BIA Separations)用于进行层析。采集流通物。其他的加载缓冲液施加到柱上直到流通峰回到基线(例如,在附图 7A 中,7 倍柱体积 25 mM Tris、200 mM NaCl、pH 7.6)。采集通过洗涤洗脱的所有的峰。采集通过高盐洗脱缓冲液洗脱的峰,这个级分含有高纯度的 I $\alpha$  Ip。

[0039] 附图 8 显示了与来自使用低 pH 值洗涤步骤(pH 2.95)的 I $\alpha$  Ip 蛋白纯化的级分相比较的,来自包括盐洗涤步骤(290mM NaCl)和低 pH 值洗涤步骤(pH 2.95)的 I $\alpha$  Ip 蛋白纯化的级分的 SDS-PAGE 分析。级分通过洗涤缓冲液 pH 2.95 (pH 洗涤)、含有 290 mM NaCl 的洗涤缓冲液(盐洗涤)和含有 1000 mM NaCl 的洗脱缓冲液(洗脱)来洗脱,通过 SDS-PAGE (4-12% 梯度;非变性的)来分离。在两种层析过程中, I $\alpha$  Ip 蛋白从中间血浆组分(组分 D)中纯化。跑动标准分子量蛋白质(Std MW)用于比较。箭头——250 kDa 间- $\alpha$  抑制物和 125 kDa 前- $\alpha$  抑制物。

[0040] 发明的详细说明

本发明一般地提供了从血浆纯化 I $\alpha$  Ip 的方法和用于治疗疾病、病症或损伤的治疗组合物,所述疾病、病症或损伤的特征在于急性炎性疾病、脓毒症、严重休克、脓毒性休克、类风湿性关节炎、癌症、癌症转移、传染性疾病和早产。所述方法涉及在 I $\alpha$  Ip 的纯化期间使 I $\alpha$  Ip 暴露于低 pH 值缓冲液。

[0041] 间- $\alpha$  抑制物蛋白(I $\alpha$  Ip)

如在此使用的,“间- $\alpha$  抑制物蛋白(I $\alpha$  Ip)”是指在结构上相关的丝氨酸蛋白酶抑制物的家族中大的、多组分的多肽。“多肽”是指氨基酸的任何的链,不考虑长度或翻译后修饰。所述复合物已经显示了在一系列蛋白酶的抑制作用中是重要的,所述蛋白酶包括嗜中性细胞弹性蛋白酶、纤溶酶、胰蛋白酶、糜蛋白酶、组织蛋白酶 G 和顶体蛋白,包括胰蛋白酶型蛋白酶抑制物。在人血浆中, I $\alpha$  Ip 蛋白以相对高的浓度存在(400-800 mg/L)。不同于其他的抑制物分子,这个抑制物家族由通过硫酸软骨素链独特地共价连接的多肽链(轻链和重链)的组合组成。

[0042] 间- $\alpha$  蛋白质的重链(H1、H2 和 H3)也称为透明质酸(HA)结合蛋白。在人血浆中发现的主要形式是由两个重链(H1&H2)和单个轻链(L)组成的间- $\alpha$ -抑制物(IaI),以及由一个重链(H3)和一个轻链(L)组成的前- $\alpha$ -抑制物(PaI)。轻链(也称为 bikunin

(双-kunitz 抑制物),具有两个 Kunitz 结构域)已知广泛地抑制血浆丝氨酸蛋白酶。在血浆组分中存在的 I $\alpha$ I 和 P $\alpha$ I 具有约 60 kDa 到约 280 kDa 之间的表观分子量。分子量可以通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)来测定。I $\alpha$ I 和 P $\alpha$ I 也被发现与 H4 复合,H4 是 I $\alpha$ I $\rho$  蛋白另一种重链。不希望受到任何特定的科学理论的限制,相信的是,I $\alpha$ I $\rho$  的重链,在从复合物释放之后,结合(透明质酸)HA,防止 HA 与它的受体 CD44 结合。在缺乏 I $\alpha$ I $\rho$  的重链时,HA 将结合 CD44 并触发促炎症因子,例如 TNF- $\alpha$  的分泌,导致炎症。同时,I $\alpha$ I $\rho$  的轻链,一旦从复合物上释放,展现抗蛋白酶活性。

#### [0043] 脓毒症和全身性炎症反应综合征(SIRS)

脓毒症和全身性炎症反应综合征(SIRS)都是指在暴露于传染原(例如,细菌毒素,例如炭疽)或外伤/损伤之后的严重的物理化学反应。脓毒症是个体对具有潜在的危急生命结果的病原体的过度反应,一般不直接从致病病原体发生。如果不治疗,脓毒症可能导致对生命组织的严重损伤,这将患者置于发生多器官功能障碍、休克和最终死亡的风险中。

[0044] 脓毒症、SIRS 和脓毒性休克与先天免疫和凝结系统的活化相关。脓毒症和脓毒性休克的临床特征在于全身性炎症、凝血病、低血压和多器官功能障碍(J. -L. Vincent et al., *Annals of Medicine* 34 (2002) 606-613)。在严重的脓毒症期间,特异性蛋白酶的网络激活凝血、血纤蛋白溶解和补体因子。这些蛋白酶也可能触发组织和器官损伤,并增强血浆中凝结和补体因子的非特异性蛋白水解作用(J. Wite et al., *Intensive Care Medicine* 8(1982)215-222 ;S. J. Weiss, *New England Journal of Medicine* 320(1989) 365-376)。在主要由于身体的压倒性全身炎症反应的暴露的个体中观察到“脓毒症样”症状。过度反应一般包括细胞因子的过度产生(“细胞因子风暴”)和破坏性蛋白酶的过度产生,以及代谢、氧化、凝血和血管功能的紊乱,导致多器官功能障碍。

[0045] I $\alpha$ I $\rho$  是天然的血液蛋白质,是身体的先天免疫系统的一部分。I $\alpha$ I $\rho$  调节身体对伴随脓毒症、感染、外伤和损伤的严重全身性炎症的应答。I $\alpha$ I $\rho$  是针对脓毒症和 SIRS 的重要的天然防御,因而,它们调节身体的防御,对抗对全身性炎症效应的“过度反应”。I $\alpha$ I $\rho$  是丝氨酸蛋白酶的抑制物,丝氨酸蛋白酶是涉及各种各样的生理学过程,包括凝血、炎症和免疫反应的蛋白质消化酶。I $\alpha$ I $\rho$  充当了广谱的生物响应修饰物,来调节分泌的炎性物质的循环水平,所述分泌的炎性物质例如免疫反应调节物(细胞因子)、吸引白细胞到损伤或炎症的位点的蛋白质(趋化因子)以及在受影响患者中引起严重的发病和过高死亡率的破坏性蛋白酶。I $\alpha$ I $\rho$  蛋白结合引起和维持脓毒状态的循环的细胞因子、趋化因子和蛋白酶。在严重的炎症过程期间,I $\alpha$ I $\rho$  的身体水平快速的耗尽,引起不受控制的疾病过程。在脓毒症患者中血浆 I $\alpha$ I $\rho$  水平和疾病的严重度与死亡率之间存在高度显著的反比关系(Lim et al., *J Infect Dis* 2003, 188 : 919-926)。

[0046] I $\alpha$ I $\rho$  已经显示了显著地改善患有脓毒症的实验动物、感染炭疽的实验动物以及在暴露于有毒化学品或电离辐射之后遭受急性肺损伤的动物的存活率(Yang et al., *Crit Care Med* 2002, 30 (3):617-622 ;Lim et al., *J Infect Dis* 2003, 188 : 919-926 ;Wu et al., *Crit Care Med* 2004, 32(8):1747-1752 ;and Opal et al., *Infect and Immun* 2005, 73 (8) :5101-5105)。对凝血、新陈代谢、肝脏损伤、炎性细胞因子和氧化功能的治疗效果与刺激或致病病原体无关。在 I $\alpha$ I $\rho$  水平被严重地耗尽的急性炎症的严重病例中,展现的是,不受控制的疾病过程的发展可以通过 I $\alpha$ I $\rho$  的外源施用来部分地或完全地阻止

(Yang et al., Crit Care Med 2002, 30(3):617-622; Wu et al., Crit Care Med 2004, 32(8):1747-1752)。循环的细胞因子、趋化因子和蛋白酶可以通过施用 I $\alpha$  Ip 来除去或灭活,这种除去或灭活产生改善的存活率、降低的发病,以及处理任何基础的疾病状况或感染的增多的时间。从尿液分离的 I $\alpha$  Ip 的蛋白酶片段展现了在降低脓毒症患者的死亡率方面显著的效力(Lin HY. Zhonghua Yi Xue Za Zhi. 2007 Feb 13;87(7):451-7)。通过恢复控制,使用 I $\alpha$  Ip 替代治疗具有潜力来改善存活率、降低发病和提供治疗基础疾病状况或感染的时间。替代治疗具有高度的安全界限,因为 I $\alpha$  Ip 通常在血液中以相对高的水平存在。I $\alpha$  Ip 是用于在脓症患者和暴露于“细胞因子风暴”的患者中维持血液动力学稳定性、防止器官损伤、改善存活率的有用的、安全的试剂。

#### [0047] 治疗方法

在此公开的是向受试者施用纯化的 I $\alpha$  Ip 来治疗急性炎症性疾病、脓毒症、严重休克、脓毒性休克、类风湿性关节炎、癌症、癌症转移、传染性疾病和早产的治疗方法。本发明可以用于治疗与受试者中间- $\alpha$  抑制物蛋白(I $\alpha$  Ip)水平的降低相关的几乎任何的疾病。间- $\alpha$  抑制物蛋白(I $\alpha$  Ip)水平的降低可能与趋化因子、细胞因子或蛋白酶的不希望的提高相关。例如,哺乳动物可能患有引起趋化因子、细胞因子或蛋白酶的不希望的提高的疾病、病症或状况。示范性的治疗的状况包括急性炎症性疾病、脓毒症、严重休克、脓毒性休克、类风湿性关节炎、癌症、癌症转移、外伤/损伤、传染性疾病或早产。在其他实施方式中,所述哺乳动物具有发生通过所述方法延迟或防止的疾病、病症或状况的提高了的风险。

[0048] 本发明的方法涉及以治疗有效剂量施用 I $\alpha$  Ip。在各种实施方式中,与参考物相比,所述方法提高受试者中 I $\alpha$  Ip 的水平达至少 5%、10%、25%、50%、75%、100%、200%,或甚至高达 300%、400% 或 500%。在其他实施方式中,与参考物相比,所述方法降低细胞因子、趋化因子或蛋白酶水平达至少 5%、10%、20%,更理想地达至少 25%、30%、35%、40%、50%、60%,或甚至高达 70%、80%、90 或 100%。分析生物学化合物的水平的方法是常规的,是熟练的技术人员已知的(例如,Guyton et al., Textbook of Medical Physiology, Tenth edition, W.B. Saunders Co., 2000)。

[0049] 虽然不限于特定的理论,在此提及的病理中细胞因子、趋化因子和蛋白酶的提高了的水平的效应,引起随后导致组织损伤的局部和全身性反应。组织损伤可能导致器官衰竭。在优选的实施方式中,与相应的天然发生的组织或器官相比,所述方法提高组织或器官的生物学活性达至少 5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%,或甚至高达 200%、300%、400% 或 500%。可进行组织的生物学功能包括消化、废物的排出、分泌、电活性、肌肉活性、激素生产或其他代谢活性。分析组织和器官的生物学活性的方法是常规,是熟练的技术人员已知的(例如,Guyton et al., Textbook of Medical Physiology, Tenth edition, W.B. Saunders Co., 2000)。

[0050] 本发明的方法对于在患者(例如,人类或哺乳动物)中治疗或稳定影响组织或器官的状况、疾病或病症是有用的。治疗效力任选地通过测量,例如,治疗的组织或器官(例如,膀胱、骨骼、脑、乳腺、软骨、食道、输卵管、心脏、胰腺、肠、胆囊、肾脏、肝脏、肺、神经组织、卵巢、前列腺、骨骼肌、皮肤、脊髓、脾脏、胃、睾丸、胸腺、甲状腺、气管、输尿管、尿道、泌尿生殖道和子宫)的生物学功能来分析。这样的方法是本领域中标准的。例如,膀胱功能通过测量尿液滞留和排出来分析。脑、脊髓或神经组织功能通过测量神经活性(例如,电活性)来

分析。食道功能通过测量食道向胃传送食物的能力来分析。心脏功能通过心电图来分析。胰功能通过测量胰岛素生产来分析。肠功能通过测量肠内容物穿过肠部的能力来分析,可以使用钡剂灌肠和胃肠造影来评估。胆囊功能使用胆囊放射性核素扫描来分析。肾脏功能通过测量肌酐水平、尿肌酐水平,或通过肌酐廓清率或血尿素氮的临床测试来分析。肝功能使用肝功能测试,或测量肝脏酶水平、胆红素水平和白蛋白水平的肝功能检查(liver panel)来分析。肺功能使用肺活量测定法、肺容量和扩散能力测试来分析。卵巢功能通过测量卵巢激素(例如,促滤泡激素)的水平来分析。前列腺异常通过测量前列腺特异性抗原来分析。脾脏功能通过使用肝脏-脾脏扫描来分析。胃功能利用胃酸测试或通过分析胃排空来分析。睾丸功能通过测量睾丸激素(例如,睾酮)的水平来分析。分析器官功能的其他方法是熟练的技术人员已知的,例如,在教科书医学生理学,第十版(Guyton et al., W.B. Saunders Co., 2000)中描述了。

#### [0051] I $\alpha$ I $\rho$ 组合物

如在此使用的,“I $\alpha$ I $\rho$  组合物”是指 I $\alpha$ I $\rho$  蛋白的制品,包括处于生理学比例的 I $\alpha$ I 和 P $\alpha$ I。如在此使用的,生理学的比例意图包括在不患有感染或状况的人或动物中存在的比例,和 / 或在人血浆中天然出现的 I $\alpha$ I 与 P $\alpha$ I 的比例。生理学的比例通常是约 60% 到约 80% 之间的 I $\alpha$ I,和约 40% 到约 20% 之间的 P $\alpha$ I。由于受试者的遗传组成方面的正常变异,生理学的比例可能在这些范围内变动。

[0052] 如在此使用的,“I $\alpha$ I $\rho$  复合物”意图包括 I $\alpha$ I $\rho$  蛋白的所有天然发生的生物学活性变体,包括含有删除、插入、添加和取代的蛋白质。I $\alpha$ I $\rho$  蛋白的“天然变体”被定义为从血浆获得的、具有改变了一个或多个氨基酸的序列的肽。变体可以具有“保守的”改变,其中取代的氨基酸具有相似的结构或化学性质,例如,亮氨酸用异亮氨酸取代。在其他实施方式中,变体可能具有“非保守的”改变,例如,甘氨酸用色氨酸取代。相似的变体还可以包括氨基酸删除或插入,或两者。确定哪些和多少氨基酸残基可以被取代、插入或删除而不消除生物学或免疫学活性方面的指导可以利用本领域公知的计算机程序来找到,例如,DNASTAR 软件。如在此使用的“功能等效的”是指任何蛋白质,其能够展现与在此描述的 I $\alpha$ I $\rho$  蛋白基本上相似的体内或体外活性,例如,引起脓毒症的降低。

[0053] 如在此使用的,“间- $\alpha$  抑制物蛋白(I $\alpha$ I)和前- $\alpha$  蛋白(P $\alpha$ I)的混合物”是指含有 I $\alpha$ I 和 P $\alpha$ I 复合物的组合物。混合物还可以含有用于分离 I $\alpha$ I $\rho$  复合物的缓冲液、盐或其他成分。在某些方面,所述 I $\alpha$ I 和 P $\alpha$ I 以生理学比例在所述混合物中存在。

[0054] 在血浆组分中存在的 I $\alpha$ I 和 P $\alpha$ I 具有约 60 到约 280 kDa 之间的表观分子量。分子量可以通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳来测定。

[0055] 本发明的 I $\alpha$ I $\rho$  组合物可以具有高的胰蛋白酶抑制比活性。根据本发明的 I $\alpha$ I $\rho$  组合物的胰蛋白酶抑制比活性可以从约 100 到约 200 IU/mg。优选的,所述胰蛋白酶抑制比活性是高于 120 IU/mg,再更优选的高于 150 IU/mg。例如,胰蛋白酶抑制比活性可以通过利用 L-BAPA 作为底物通过胰蛋白酶抑制分析来测量。参见,H U Bergmeyer, ed: vol 5, 3rd ed. 119(1984)Verlag Chemie, Weinheim: Chromogenic substrate for the assay of trypsin: R. Geiger, H. Fritz, Methods of Enzymatic Analysis.

[0056] I $\alpha$ I $\rho$  的组合物可以是间- $\alpha$  抑制物蛋白(I $\alpha$ I)和前- $\alpha$  蛋白(P $\alpha$ I)的混合物,其中所述 I $\alpha$ I 和 P $\alpha$ I 在所述混合物中以生理学比例存在,包括与三个重链 H1、H2 和 H3

的至少一个缔合的间- $\alpha$  抑制物蛋白的轻链。根据本发明的组合物还可以具有与四个重链 H1、H2、H3 和 H4 的至少一个缔合的间- $\alpha$  抑制物蛋白的轻链。I $\alpha$  Ip 复合物中每种蛋白质的实例如下: Bikunin GenBank 登记号码: AAB84031, P02760; H1 GenBank 登记号码: P19827, NP--002206; H2 GenBank 登记号码: NP--002207, P19823; H3 GenBank 登记号码: NP--002208; H4 GenBank 登记号码: Q14624, NP--002209, 通过完全引用将它们每一个合并在本文中。

#### [0057] 间- $\alpha$ 抑制物蛋白(I $\alpha$ Ip)的纯化

I $\alpha$  Ip 可以通过层析来纯化。如在此使用的,“纯化”是指从 I $\alpha$  Ip 中除去不需要的或污染的蛋白质或成分来产生纯化的 I $\alpha$  Ip 的步骤或过程。例如,含有生理学比例的 I $\alpha$  I 和 P $\alpha$  I 的血浆组分可以通过至少一个层析步骤来纯化所述 I $\alpha$  Ip。如在此使用的,“层析”可以包括液体层析或柱层析。本领域已知的是,层析具有不相互排斥的许多种描述和/或分类。例如,液相层析可以在柱上进行。柱层析可以包括阴离子交换层析。

[0058] 一般地, I $\alpha$  Ip 的制备涉及样品的分离和被测定含有目标蛋白质的级分的采集。分离的方法包括,例如,固相提取、层析,例如,阴离子交换层析、大小排阻层析、离子交换层析、肝素层析、亲和层析、连续提取、凝胶电泳和液相层析。制备还可以包括纯化,其可以包括层析的步骤,例如,离子交换层析、肝素层析、亲和层析、连续提取、凝胶电泳和液相层析。

[0059] “固相支持物”是指固体材料,其可以用捕获试剂衍生化,或以另外方式附着于捕获试剂。示范性的固相支持物包括单片支持物、基于颗粒的支持物、探针和微量滴定板。如在此使用的,“单片支持物”是指单块的多孔固相支持物。如在此使用的,“基于颗粒的支持物”是指用于填充层析柱的匀质的颗粒,包括层析树脂。

[0060] “被分析物”是指期望被检测的样品的任何成分。该术语还可以指样品中的单个成分或多个成分。

[0061] “吸附”是指被分析物与吸附剂或捕获试剂的可检测的非共价结合。吸附剂表面是指吸附剂(也称为“捕获试剂”或“亲和试剂”)结合的表面。吸附剂是能够结合被分析物(例如,目标多肽或核酸)的任何材料。

[0062] 层析吸附剂是指一般用于层析中的材料。层析吸附剂包括,例如,离子交换材料、金属螯合剂(例如,氮川乙酸或亚氨基二乙酸)、固定的金属螯合物、疏水性相互作用吸附剂、亲水性相互作用吸附剂、染料、简单的生物分子(例如,核苷酸、氨基酸、单糖和脂肪酸)以及混合式吸附剂(例如,疏水性吸移/静电排斥吸附剂)。

[0063] 生物特异性吸附剂是指包含生物分子的吸附剂,所述生物分子例如核酸分子(例如,适体)、多肽、多糖、脂质、类固醇或这些的共轭物(例如,糖蛋白、脂蛋白、糖脂、核酸(例如, DNA)-蛋白质共轭物)。在某些情况中,生物特异性吸附剂可以是高分子结构,例如,多蛋白复合物、生物膜或病毒。生物特异性吸附剂的实例有抗体、受体蛋白和核酸。与层析吸附剂相比,生物特异性吸附剂一般具有对目标被分析物更高的特异性。

[0064] “洗脱液”或“洗涤缓冲液”是指试剂,一般是溶液,其被用于影响或修饰被分析物与吸附剂表面的吸附和/或从所述表面除去未结合的材料。洗涤缓冲液或洗脱液的洗脱特征可以取决于,例如, pH 值、离子强度、疏水性、chaotropism 的程度、洗涤剂强度和温度。在本发明的某些实施方式中,所述纯化方法涉及至少一个缓冲液洗涤步骤。在本发明的方法中,缓冲液洗涤步骤涉及向柱施加具有低 pH 值的洗涤缓冲液(例如, 4.0、3.7、3.5、3.4、

3.3、3.1、2.9、2.0)。在一个实施方式中,所述低 pH 值洗涤缓冲液具有小于约 4.0 的 pH 值。在优选的实施方式中,所述洗涤溶液具有小于约 3.6 的 pH 值。在再更优选的实施方式中,所述洗涤溶液具有小于约 3.3 的 pH 值。最优的,所述洗涤溶液具有小于约 3.3 到约 2.9 的 pH 值。在其他实施方式中,所述纯化方法涉及超过一个缓冲液洗涤步骤。优选的是,随后的缓冲液洗涤步骤具有比之前的缓冲液洗涤步骤更低的 pH 值。在一个实施方式中,第一洗涤缓冲液具有约 4.0 的 pH 值,第二洗涤缓冲液具有约 3.6 的 pH 值。在另一个实施方式中,第一洗涤缓冲液具有约 4.0 的 pH 值,第二洗涤缓冲液具有约 3.1 的 pH 值。在另一个实施方式中,第一洗涤缓冲液具有约 4.0 的 pH 值,第二洗涤缓冲液具有约 2.9 的 pH 值。在本发明的实施方式中,所述洗涤缓冲液是乙酸或乙酸钠。适用于本发明的其他洗涤缓冲液包括柠檬酸、甘氨酸或磷酸盐缓冲液。在再其他的实施方式中,所述纯化方法涉及使用含盐的缓冲液的洗涤步骤。优选的是,在含盐的缓冲液中的盐浓度是高于 250 mM NaCl (例如,260、270、280、290 mM NaCl)。在一个实施方式中,第一洗涤缓冲液具有 290 mM NaCl 的盐浓度,第二洗涤缓冲液具有约 2.9 的 pH 值。发现的是,与没有盐洗涤步骤时相比,向涉及低 pH 值步骤的纯化方案中添加盐洗涤步骤提高了 I $\alpha$  Ip 的产率和纯度。在本发明的实施方式中,含盐洗涤缓冲液中的盐是氯化钠(NaCl)。适用于本发明的其他盐包括氯化钾(KCl)。

[0065] 阴离子交换层析可以通过单片支持物,例如,具有固定的阴离子交换配体的 CIM,例如 DEAE-CIM 或 Q-CIM(BIA Separations)。阴离子交换层析还可以是基于颗粒的,例如,DEAE Sepharose、DEAE Sephadex A50、Toyopearl DEAE、TMAE Fractogel、DEAE Fractogel 或 Q-Sepharose。SEPHAROSE 是新泽西州 Pharmacia 公司用于高分子量物质的商品名,所述高分子量物质用于通过大分子凝胶过滤的分离。阴离子交换柱具有两种成分,基质和配体。基质可以是,例如,纤维素、葡聚糖、琼脂糖或聚苯乙烯。固定的阴离子交换配体可以是二乙基氨基乙烷(DEAE)、聚乙烯亚胺(PEI)或季胺官能团(Q)。阴离子交换柱的强度是指配体的电离状态。强阴离子交换柱,例如,具有季铵配体的那些,在宽阔的 pH 范围上带有永久的正电荷。在弱阴离子交换柱例如 DEAE 和 PEI 中,正电荷的存在取决于柱的 pH 值。强阴离子交换柱,例如 Q Sepharose FF 或金属螯合 Sepharose(例如,Cu<sup>2+</sup>-螯合 Sepharose)是优选的。阴离子交换柱一般加载处在高于要纯化的蛋白质的 pI 的 pH 值下的低盐缓冲液。缓冲液、缓冲液浓度、盐浓度和洗脱液的选择是本领域技术人员已知的(参见,例如 Scopes “Protein Purification: Principles and Practice” Springer ;3rd ed. edition (November 19, 1993))。

[0066] 在本发明的一个实施方式中,样品可以通过阴离子交换层析纯化。阴离子交换层析容许大略地根据样品中的蛋白质的电荷特征纯化样品中的蛋白质。例如,可以使用 Q 阴离子交换树脂(例如, Q HyperD F, Biosepra),样品可以使用具有不同的 pH 值的洗脱液连续地洗脱。阴离子交换层析容许样品中带有比其他类型生物分子更多负电荷的生物分子的分离。用具有高 pH 值的洗脱液洗脱的蛋白质可能是微弱地带负电的,用具有低 pH 值的洗脱液洗脱的级分可能是强烈地带负电的。因而,除了降低样品的复杂性之外,阴离子交换层析根据蛋白质的结合特征分离蛋白质。

[0067] 在又一个实施方式中,样品可以通过肝素层析进一步纯化。肝素层析容许还在与肝素的亲和相互作用以及电荷特征的基础上进一步纯化样品中的 I $\alpha$  Ip 复合物。肝素,一种硫酸化的粘多糖,将结合具有带正电荷部分的 I $\alpha$  Ip 复合物,样品可以用具有不同 pH 值

或盐浓度的洗脱液连续地洗脱。用具有低 pH 值的洗脱液洗脱的 I $\alpha$  Ip 复合物更可能是微弱地带正电的。用具有高 pH 值的洗脱液洗脱的 I $\alpha$  Ip 复合物更可能是强烈地带正电的。因而,肝素层析也降低样品的复杂性,并根据 I $\alpha$  Ip 复合物的结合特征分离 I $\alpha$  Ip 复合物。在另一个实施方式中,样品可以通过羟磷灰石层析进一步纯化。在又一个实施方式中,样品可以通过疏水性相互作用层析进一步纯化。

[0068] I $\alpha$  Ip 复合物可以用固定在支持物上的捕获试剂来捕获,支持物例如任何生物芯片、多孔微量滴定板、树脂或硝化纤维素膜,其随后被探测蛋白质的存在。特别地,本发明的 I $\alpha$  Ip 复合物可以捕获在表面增强的激光脱附 / 电离 (SELDI) 蛋白质生物芯片上。捕获可以在层析表面或生物特异性表面上。包含反应表面的任何 SELDI 蛋白质生物芯片可以用于捕获和检测本发明的 I $\alpha$  Ip 复合物。这些生物芯片可以用特异性捕获 I $\alpha$  Ip 复合物的抗体来衍生化,或它们可以用捕获试剂,例如结合免疫球蛋白的蛋白 A 或蛋白 G 来衍生化。然后 I $\alpha$  Ip 复合物可以利用特异性抗体在溶液中捕获,捕获的 I $\alpha$  Ip 复合物在芯片上通过捕获试剂分离。

[0069] I $\alpha$  Ip 的纯化可以根据体积和数量来调整规模。在某些实施方式中,1 mL 或 8 mL 柱被用于纯化 I $\alpha$  Ip。在其他实施方式中,80 mL、800 mL 柱或 8 L 柱被用于纯化 I $\alpha$  Ip。

[0070] 一般地,在从柱上洗脱之后,纯化的 I $\alpha$  Ip 被交换到缓冲液中来维持稳定性或活性。纯化的 I $\alpha$  Ip 还可以通过超滤或渗滤处理来除去低分子量蛋白质污染物。在某些实施方式中,病毒灭活步骤被整合到纯化中。在层析分离之前,血浆的溶剂和洗涤剂处理可以用于灭活病毒颗粒。在超滤或渗滤之后,纯化的 I $\alpha$  Ip 可以通过纳滤来进一步处理(例如,来灭活病毒)。纯化的 I $\alpha$  Ip 还可以被冻干和包装用于长期保存(库存)。

[0071] 本发明的 I $\alpha$  Ip 组合物优选地是约 85% 到约 100% 纯的。如在此使用的,术语“纯”是指 I $\alpha$  Ip 组合物,其是从其天然环境移除的、分离的或分隔的,以及没有至少约 85% 到约 100% 之间、优选 90%、以及更优选的 95% 与之天然相关的其他成分。在优选的实施方式中,基本上纯化的蛋白质将构成组合物中蛋白质的超过 85%、87.5%、90%、92.5%、95%、99% 或甚至更多。

[0072] 用于本发明时,“纯化到匀质”的肽、多肽或蛋白质意思是,肽、多肽或蛋白质具有一定水平的纯度,其中所述肽、多肽或蛋白质基本上没有其他蛋白质和生物学成分。任何适合的材料和方法可以用于进行单个或多个血浆的分离步骤来获得纯化的 I $\alpha$  Ip。

[0073] 根据当前的公开内容,用于定量蛋白质、多肽或肽的纯化的程度的各种方法对本领域技术人员将是已知的。这些包括,例如,测定级分的蛋白质比活性,或通过凝胶电泳评估级分内多肽的数量。术语“生物学活性”是指具有天然发生的 I $\alpha$  Ip 复合物的结构、调节或生物化学功能。同样地,“免疫学活性”定义了天然的、重组的或合成的 I $\alpha$  Ip 复合物或其任何寡肽在适合的动物或细胞中诱导特异性免疫反应、以及与特定抗体结合的能力。I $\alpha$  Ip 浓度可以利用如 Lim et al, (J. of Infectious Diseases, 2003) 中描述的 Mab 69.31 通过竞争性酶联免疫吸附测定 (ELISA) 来测量。在竞争性 ELISA 中,结合 I $\alpha$  Ip 的轻链的抗体,例如 MAb 69.26 和 MAb 69.31 (Lim et al, J. of Infectious Diseases, 2003) 可以用于检测 I $\alpha$  Ip 的活性位点是否被暴露。当在竞争性 ELISA 中利用结合 I $\alpha$  Ip 的轻链的抗体时,与根据蛋白质浓度预测的相比、获得的更高的测量值可能表明 I $\alpha$  Ip 的活性位点被暴露。如通过竞争性 ELISA 测定的,抗 I $\alpha$  Ip 抗体与纯化的 I $\alpha$  Ip 的结合提高至大于 1、

1.5、2、3、4、5 或 10 倍。测量蛋白质浓度的方法是本领域已知的,也可以通过商业上可获得的蛋白质分析(二喹啉甲酸(BCA)蛋白质分析;BioRad 蛋白质分析)来测量。I $\alpha$  Ip 产物结构和纯度可以通过,例如,HPLC 或本领域技术人员已知的其他层析方法来确认。纯化的 I $\alpha$  Ip 的比抑制活性可以利用发色底物 L-BAPA (N( $\alpha$ )-苯甲酰基-L-精氨酸-4-硝基苯胺盐酸盐(Fluka Chemicals)在胰蛋白酶抑制分析中测量。这种分析是基于 I $\alpha$  Ip 抑制 L-BAPA 的水解的能力。抑制作用可以通过在 410 nm 处  $\Delta$  吸光度/分钟的比例的降低来监视。

[0074] 纯化的 I $\alpha$  Ip 具有约 60 到约 280 kDa 之间的表观分子量。分子量可以通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳来测定。纯化的 I $\alpha$  Ip 也具有生物学活性(例如,细胞因子抑制物活性、趋化因子抑制物活性或丝氨酸蛋白酶抑制物活性),其可以通过在此描述的或本领域已知的方法来测定。纯化的 I $\alpha$  Ip 具有与未用低 pH 值处理的 I $\alpha$  Ip 的相比至少一样高的生物学活性,所述未用低 pH 值处理的 I $\alpha$  Ip 包括,血液、血浆或血浆组分中存在的 I $\alpha$  Ip,或通过其他手段纯化的 I $\alpha$  Ip。

[0075] 所述方法还有助于定量未知 I $\alpha$  Ip 浓度的样品中间- $\alpha$  抑制物蛋白(I $\alpha$  Ip)。未知 I $\alpha$  Ip 浓度的样品被施加于层析柱。在某些实施方式中,层析柱的体积小于 1 mL。施加样品的柱用低 pH 值缓冲液(例如, pH 值小于 4.0)洗涤。柱随后用高盐缓冲液(例如, >500 mM)洗脱。基本上由 I $\alpha$  Ip 组成的(例如,纯度 >90%)洗脱的蛋白质通过本领域已知的用于测定蛋白质浓度的方法来测量。这样的方法可以包括 UV 吸光度、蛋白质分析、或用于测定 I $\alpha$  Ip 浓度的竞争性 ELISA,如在此描述的。样品中存在的 I $\alpha$  Ip 的数量可以通过与一个或更多个参考物比较蛋白质的数量来获得。这样的参考物包括含有已知数量的 I $\alpha$  Ip、通过用于加工未知 I $\alpha$  Ip 浓度的样品的方法处理的样品。

#### [0076] 血液、血浆和血浆组分

由于 I $\alpha$  Ip 在血液中是丰富的, I $\alpha$  Ip 一般从血液、血浆或分离自血浆的血浆组分来纯化。如在此使用的“分离”是指从血浆产生血浆组分,其含有生理学比例的 I $\alpha$  I 和 P $\alpha$  I。例如,分离血浆组分可以通过使血浆层析根据本发明来实现。分离的是指从其原始环境(例如,如果它是天然存在的,指自然环境)移出的材料,因而是从其自然状态“经人手”改变的。例如,分离的多肽或蛋白质可以是血浆的成分,或可以被包含在细胞内并被认为是“分离的”,因为血浆或特定的细胞可能不是所述多肽的原始环境。

[0077] 如在此使用的,“血浆-衍生的”是指原始地分离自或纯化自血浆。也就是说,组合物的自然环境是血浆。

[0078] 如在此使用的,“血浆组分”是来自分离或纯化步骤的组分,例如,层析,其原始地来自血浆。根据本发明的血浆组分可以是,例如,获自凝血因子 IX 的纯化的副组分、来自凝血酶原复合物浓缩物的纯化的副组分、产自血浆的冷冻沉淀的冷冻上清液(在 Hoffer et al., Journal of Chromatography B 669 (1995) 187-196 中描述的)或冷冻贫乏的血浆。如在此使用的,“冷冻贫乏的血浆”或“冷冻上清液”是获自血浆的冷冻沉淀的上清液。冷冻贫乏的血浆可以通过解冻新鲜的冷冻血浆制备(例如,在 4 摄氏度和在 10k rpm 离心 30 分钟)。

[0079] 除了血浆之外,这种纯化方案也可以对含有 I $\alpha$  Ip 的任何血浆组分使用。含有 I $\alpha$  Ip 的血浆组分包括在凝血因子和其他血浆衍生物的工业加工期间、或在其他治疗蛋白质如凝血因子的纯化过程期间的副组分或血浆中间物。根据本发明的副组分的实例是获自

凝血因子 IX 的纯化的副组分。I $\alpha$ I/P $\alpha$ I 的混合物已经显示了在因子 IX (FIX) 的纯化期间产生的副组分中存在。获得获自凝血因子 IX 的纯化的副组分的方法在 Hoffer et al., Journal of Chromatography B 669 (1995) 187-196 中描述了,通过完全引用将其合并在本文中。副组分的其他实例包括来自 FIX 纯化的副组分、或来自凝血酶原复合物浓缩物的纯化的副组分,如在 D. Josic et al., Thrombosis Research 100 (2000)433-441 中描述的,通过完全引用将其合并在本文中。副组分的其他实例包括来自 FIX 纯化的副组分,在此称为组分 D 和组分 C。组分 D 和组分 C 是指在 FIX 和其他凝血因子等等通过阴离子交换层析的纯化期间获得的含有 I $\alpha$ I<sub>p</sub> 的组分。组分 D 是在高盐条件(例如, >500mM NaCl)下从阴离子交换柱洗脱的含有 I $\alpha$ I<sub>p</sub> 的组分。组分 C 是含有 I $\alpha$ I<sub>p</sub> 的组分,其来自从阴离子交换柱纯化、用 25 mM 柠檬酸盐, pH 6.0, 0.5 M NaCl 洗脱的血浆组分。组分 C 是来自抗因子 IX 亲和纯化步骤的未结合的组分,即,流通物,在所述步骤中来自阴离子交换柱的洗脱液(在 25 mM 柠檬酸盐、pH 6.0 0.5 M NaCl 中)施加到抗-因子 IX 亲和柱上。

[0080] 副组分的实例作为产自血浆的冷冻沉淀的冷冻上清液分离。例如,Hoffer et al., Journal of Chromatography B 669 (1995) 187-196 中描述了适合的冷冻沉淀方法。

[0081] 血液和血浆可以获自人类、灵长类、牛、马、猪、羊、猫或犬来源。血液可以获自或购自,例如,血库、医院、收容所、私营公司、研究基金会或任何其他血液来源。血浆可以获自或购自,例如,血库、医院、收容所、私营公司、研究基金会或任何其他血液来源。作为选择,血浆也可以在获得血液时从血液分离。分离血浆的适合的方法包括重力和离心。根据本发明的血浆组分可以获自人类、灵长类、牛、马、猪、羊、猫或犬来源。

[0082] 来自副组分的某些早先的 I $\alpha$ I<sub>p</sub> 纯化物含有因子 X (FX) 的污染,其通过 Western 印迹分析作为 80 kDa 条带和在凝血分析中被检测出。FX 的去除是重要的,因为 FX 是凝血酶原性的,如果施用给人类可能是有害的。在此描述的 I $\alpha$ I<sub>p</sub> 纯化的方法除去 FX 污染物。另外,在层析分离之前可以进行血浆的溶剂和洗涤剂处理,来灭活在血浆或血浆组分中存在的任何病毒。

#### [0083] 治疗方法

本发明提供了与 I $\alpha$ I<sub>p</sub> 水平的降低或趋化因子、细胞因子或蛋白酶的水平提高相关的疾病和病症的治疗。与细胞数量的缺陷相关的许多疾病或状况特征在于趋化因子、细胞因子或蛋白酶的水平提高。这样的疾病或病理学状况包括但不限于炎症、外伤/损伤、肿瘤侵入、肿瘤转移、脓毒症、脓毒性休克或传染性疾病。本发明的方法通过降低趋化因子、细胞因子或蛋白酶的水平或活性改善这样的疾病、病症或损伤。

[0084] 本发明提供了治疗疾病和/或病症或其症状的方法,其包括向受试者(例如,哺乳动物,例如人类)施用治疗有效量的包含此处的纯化的 I $\alpha$ I<sub>p</sub> 蛋白的药物组合物。因而,一个实施方式是治疗受试者的方法,所述受试者患有或易感于以 I $\alpha$ I<sub>p</sub> 的缺陷为特征的疾病或病症或其症状。所述方法包括在一定条件下向所述哺乳动物施用足以治疗所述疾病或病症或其症状的、治疗数量的本发明的组合物的步骤,所述条件使得所述疾病或病症被治疗。

[0085] 在各种实施方式中,本发明的试剂通过向疾病或损伤的位点局部注射、通过持续输注、或通过在外科条件下的微量注射(Wolff et al., Science 247:1465, 1990)来施用。在其他实施方式中,所述试剂向具有 I $\alpha$ I<sub>p</sub> 方面缺陷的患者的组织或器官全身地施用。

[0086] 此处的方法包括向所述受试者(包括被鉴定为需要这样的治疗的受试者)施用有

效量的在此描述的纯化的 I $\alpha$  Ip 蛋白、或在此描述的组合物来产生这样的效果。鉴定需要这样的治疗的受试者可以是受试者或护理专业人员的判断,可以主观的(例如,观点)或客观的(例如,通过测试或诊断方法可测量的)。

[0087] 本发明的治疗方法(其包括预防性治疗)一般包括向有需要的受试者(例如,动物,人类),包括哺乳动物,特别是人类施用治疗有效量的此处的化合物,例如,此处的化学式的化合物。所述受试者还可以是灵长类、牛、马、猪、羊、猫或犬。适合于用 I $\alpha$  Ip 治疗的受试者可以被鉴定为患有炎症、外伤 / 损伤、肿瘤侵入、肿瘤转移、脓毒症、脓毒性休克或传染性疾病。这样的治疗将适合地施用给受试者,特别是人类,其患有、具有或易感于、或有疾病、病症或其症状的风险。“有风险”的那些受试者的鉴定可以通过诊断测试或受试者或护理提供者的意见(例如,遗传学测试、酶或蛋白质标志物、标志物(在此定义的)、家族史,等等)通过任何客观或主观的鉴定来进行。受试者可以自我鉴定或由执业医师诊断为患有炎症、肿瘤侵入、肿瘤转移、脓毒症、脓毒性休克或传染性疾病。所述受试者可以是灵长类、人类或其他动物。此处的组合物也可以用于治疗任何其他病症,在所述病症中可能存在细胞数量的缺陷。

[0088] 在一个实施方式中,本发明提供了监视治疗进展的方法。所述方法包括测定受试者中诊断标志物(标志物)(例如,通过此处的化合物、蛋白质或其指示物等等调节的、在此描述的任何靶点)或诊断测量(例如,筛选,分析)的水平步骤,所述受试者患有或易感于与 I $\alpha$  Ip 水平的缺陷或趋化因子、细胞因子或蛋白酶水平的提高相关的病症或其症状。所述受试者可以被施用足以治疗所述疾病或其症状的、治疗数量的此处的化合物。在所述方法中测定的标志物的水平可以与健康的正常对照中或其他患病患者中的标志物的已知水平比较,来建立受试者的疾病状态。在优选的实施方式中,所述受试者中标志物的第二水平在比所述第一水平的测定更晚的时点测量,比较两种水平来监视疾病的进程或治疗的效力。在某些优选的实施方式中,所述受试者中治疗前的标志物水平在开始根据本发明的治疗之前测定;这种标志物的治疗前的水平然后可以与治疗开始后受试者中的标志物的水平比较,来确定治疗的效力。

#### [0089] 药物组合物

本发明的特征在于药物制品,其包含能够降低细胞因子、趋化因子和蛋白酶的水平或抑制细胞因子、趋化因子和蛋白酶的活性的试剂。这样的制品兼具治疗和预防应用。在此处描述的方法中有用的试剂包括降低细胞因子、趋化因子或蛋白质的水平的那些。如果希望,本发明的组合物与降低受试者的循环中存在的细胞因子、趋化因子和蛋白酶的水平的那些试剂一起配制。降低细胞因子或趋化因子应答的试剂包括但不限于抗 -TNF- $\alpha$  抗体或 TNF 抑制物。

[0090] 本发明的化合物可以作为药物组合物的部分来施用。组合物应当被消毒,并在适合于向受试者施用的重量或体积单位中含有治疗有效量的本发明的试剂。本发明的组合物和组合可以是药物包装的部分,其中每一种化合物以独立的剂量数量存在。

[0091] 用于预防性的或治疗性施用的本发明的药物组合物应当被消毒。消毒可以通过无菌过滤膜(例如,0.2  $\mu$ m 膜)过滤、通过  $\gamma$  辐射、或本领域技术人员已知的任何其他适合的手段来容易地实现。治疗多肽组合物一般置于具有消毒的进入口的容器中,例如,具有可被皮下注射针头刺入的塞子的静脉内溶液袋或小瓶。这些组合物通常将保存在单位剂量或多

剂量容器中,例如,密封的安瓿瓶或小瓶,作为水溶液或作为用于重构的冻干的制剂。

[0092] 任选地,化合物可以与药学上可接受的赋形剂组合。在此使用的术语“药学上可接受的赋形剂”是指适合于向人类施用的一种或更多种相容的固体或液体填充物、稀释剂或包封物质。赋形剂优选地含有微小数量的添加剂,例如,增强等渗性和化学稳定性的物质。这样的材料在所采用的剂量和浓度下对接受者是无毒的,包括缓冲剂,例如,磷酸盐、柠檬酸盐、琥珀酸盐、乙酸盐、乳酸盐、酒石酸盐和其他有机酸或它们的盐;三-羟基甲基氨基甲烷(TRIS)、重碳酸盐、碳酸盐和其他有机碱和它们的盐;抗氧化剂,例如,抗坏血酸;低分子量(例如,小于约十个残基)多肽,例如,聚精氨酸、聚赖氨酸、聚谷氨酸和聚天冬氨酸;蛋白质,例如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,例如,聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、聚丙二醇(PPG)和聚乙二醇(PEG);氨基酸,例如,甘氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、组氨酸、赖氨酸或精氨酸;单糖、二糖和其他碳水化合物,包括纤维素或它的衍生物、葡萄糖、甘露糖、蔗糖、糊精或硫酸化的碳水化合物衍生物,例如,肝素、硫酸软骨素或硫酸葡聚糖;多价金属离子,例如,二价金属离子,包括,钙离子、镁离子和锰离子;螯合剂,例如,乙二胺四乙酸(EDTA);糖醇,例如,甘露醇或山梨醇;平衡离子,例如,钠或铵;和/或非离子型表面活性剂,例如,聚山梨酸酯或泊洛沙姆。也可以包括其他添加剂,例如,稳定剂、抗微生物剂、惰性气体、液体和营养补充物(即,Ringer's 葡萄糖)、电解质补充物,等等,其可以以常规数量存在。

[0093] 如上所述,所述组合物可以以有效量施用。有效量将取决于施用的方式、要治疗的特定状况和期望的结果。它还取决于状况的阶段、所述受试者的年龄和物理条件、当前的治疗的性质,如果有的话,以及执业医师公知的类似因素。对于治疗应用,数量足以实现医学上期望的结果。

[0094] 对于患有以 I $\alpha$  Ip 的降低为特征的疾病或病症的受试者,有效量是足以降低趋化因子、细胞因子或蛋白酶的水平或活性的;或足以稳定、减慢或降低与病理相关的症状。本发明的组合物可以用来治疗急性的炎性疾病、脓毒症、严重休克、脓毒性休克、类风湿性关节炎、癌症、癌症转移、传染性疾病或早产,可以直接地确定。一般地,本发明的化合物的剂量将是约 0.01 mg/kg 每天到约 1000 mg/kg 每天。预计的是,从约 50 到约 2000 mg/kg 的剂量将是适合的。更低的剂量将来自某些施用形式,例如,静脉内施用。在受试者中的应答在施加的初始剂量下不充分的情况下,可以采用更高的剂量(或通过不同的、更为局部化的递送途径的有效地更高的剂量)达到患者耐受性允许的程度。实现本发明的组合物的合适的全身性水平的每天的多剂量是期待的。

[0095] 多种给药途径是可获得的。一般而言,本发明的方法可以利用医学上可接受的任何施用方式实践,是指产生有效水平的活性化合物而不引起临床上不可接受的副作用的任何方式。施用的其他方式包括口服、直肠、局部、眼内、口腔、阴道内、脑池内、脑室内、气管内、鼻、经皮、植入物之内或之上、或胃肠外的途径。术语“胃肠外的”包括皮下的、鞘内的、静脉内的、肌肉内的、腹膜内的或输注。由于对患者以及给药日程是方便的,口服施用对于预防性治疗是优选的。

[0096] 本发明的药物组合物任选地可以进一步含有所希望的一种或更多种另外的蛋白质。适合的蛋白质或生物材料可以通过本领域技术人员已知的和可获得的任何纯化方法从人类或哺乳动物血浆获得;从含有根据标准的重组 DNA 技术导入的、表达人类或哺乳动物蛋白质的基因的重组组织培养物、病毒、酵母、细菌等等的上清液、提取物或溶胞产物获得;

或从人类生物液体(例如,血液、奶、淋巴、尿液,等等)或从含有根据标准的转基因技术导入的、表达人类蛋白质的基因的转基因动物获得。

[0097] 本发明的药物组合物可以包含一种或更多种 pH 值缓冲化合物来将制剂的 pH 值维持在预定水平,所述水平反映生理学的 pH 值,例如,在约 5.0 到 8.0 的范围之内。在水性液体制剂中使用的 pH 值缓冲化合物可以是氨基酸或氨基酸的混合物,例如组氨酸,或氨基酸如组氨酸和甘氨酸的混合物。做为选择, pH 值缓冲化合物优选地是将制剂的 pH 值维持在预定水平的试剂,例如,在约 5.0 到约 8.0 的范围内,并且其不螯合钙离子。这样的 pH 值缓冲化合物的说明性实例包括但不限于,咪唑和乙酸盐离子。pH 缓冲化合物可以以适合于将制剂的 pH 值维持在预定水平的任何数量存在。

[0098] 本发明的药物组合物还可以含有一种或更多种渗透调节试剂,即,将制剂的渗透性质(例如,渗透度、重量克分子渗透压浓度和 / 或渗透压)调节到接受个体的血流和血细胞可接受的水平的化合物。渗透调节试剂可以是不螯合钙离子的试剂。渗透调节试剂可以是调节制剂的渗透性质的、本领域技术人员已知的或可获得的任何化合物。本领域技术人员可以经验性地确定本发明的制剂中使用的给定渗透调节试剂的适用性。渗透调节试剂的适合的类型的说明性实例包括但不限于:盐,例如,氯化钠和乙酸钠;糖类,例如,蔗糖、葡萄糖和甘露醇;氨基酸,例如,甘氨酸;以及这些试剂和 / 或试剂类型的一种或更多种的混合物。渗透调节试剂可以以足够调节制剂的渗透性质的任何浓度存在。

[0099] 包含本发明的化合物的组合物可以含有多价的金属离子,例如,钙离子、镁离子和 / 或锰离子。可以使用帮助稳定组合物并且将不会不利地影响接受个体的任何多价的金属离子。根据这两个指标,熟练的技术人员将可以经验性地确定适合的金属离子,这样的金属离子的适合的来源是已知的,包括无机盐和有机盐。

[0100] 本发明的药物组合物也可以是非水性液体制剂。可以采用任何适合的非水性液体,只要它为其中含有的活性试剂提供了稳定性。优选的,所述非水性液体是亲水性液体。适合的非水性液体的说明的例子包括:甘油;二甲亚砜(DMSO);聚二甲硅氧烷(PMS);乙二醇,例如,乙二醇、二乙二醇、三乙二醇、聚乙二醇(“PEG”) 200、PEG 300 和 PEG 400;以及丙二醇,例如,二丙二醇、三丙二醇、聚丙二醇(“PPG”) 425、PPG 725、PPG100、PPG2000、PPG 3000 和 PPG 4000。

[0101] 本发明的药物组合物也可以是混合的水性 / 非水性液体制剂。任何适合的非水性液体制剂,例如上文描述的那些,可以与任何水性液体制剂,例如上文描述的那些一起采用,条件是所述混合的水性 / 非水性液体制剂为其中含有的化合物提供了稳定性。优选的,这样的制剂中的非水性液体是亲水性液体。适合的非水性液体的说明性的实例包括:甘油;DMSO;PMS;乙二醇,例如,PEG 200、PEG 300 和 PEG 400;以及丙二醇,例如,PPG 425、PPG725、PPG 1000、PPG 2000、PPG 3000 和 PPG 4000。

[0102] 适合的稳定制剂可以允许活性试剂在冷冻或非冷冻液体状态中保存。稳定的液体制剂可以在至少 -70°C 的温度下保存,但也可以在至少 0°C、或约 0.1°C 和约 42°C 之间的更高的温度下保存,取决于组合物的性质。熟练的技术人员一般已知的是,蛋白质和多肽对于 pH 值、温度以及可能影响治疗效力的许多其他因素的改变是敏感的。

[0103] 其他递送系统可以包括时间 - 释放、延迟释放或持续释放递送系统。这样的系统可以避免本发明的组合物的重复施用,提高对受试者和医师的方便性。许多类型的释

放递送系统是本领域普通技术人员可获得的和已知的。它们包括基于聚合物的系统,例如聚交酯(美国专利 NO. 3,773,919;欧洲专利 NO. 58,481)、聚(丙交酯-乙交酯)、共聚草酸酯、聚己酸内酯、聚酰胺酯、聚正酯、聚羟基丁酸,例如,聚-D-(-)-3-羟基丁酸(欧洲专利 NO. 133,988)、L-谷氨酸和  $\gamma$ -乙基-L-谷氨酸的共聚物(Sidman, K.R. et al., *Biopolymers* 22:547-556)、聚(2-羟乙基甲基丙烯酸酯)或乙烯-乙酸乙烯酯(Langer, R. et al., *J. Biomed. Mater. Res.* 15:267-277;Langer, R. *Chem. Tech.* 12:98-105)和聚酞。

[0104] 持续释放组合物的其他实例包括处于有形的物体,例如薄膜或微囊的形式的半渗透性的聚合物基质。递送系统还包括非聚合物系统,它们是:脂质,包括固醇例如胆固醇、胆固醇酯和脂肪酸或中性脂肪,例如单-、二-和三-甘油酯;水凝胶释放系统,例如生物学衍生的生物可吸收的水凝胶(即,几丁质水凝胶或壳聚糖水凝胶);sylastic 系统;基于肽的系统;蜡包衣;利用常规粘合剂和赋形剂的压制的片剂;部分融合的植入物;等等。具体的实例包括但不限于:(a) 浸蚀性系统,其中试剂以处在基质内部的形式含有,例如在美国专利 NO. 4,452,775、4,667,014、4,748,034 和 5,239,660 中描述那些,和(b) 扩散系统,其中活性成分以受控的速率从聚合物中渗透,例如在美国专利 NO. 3,832,253 和 3,854,480 中描述的那些。

[0105] 可以用于本发明的方法和组合物的另一种类型的递送系统是胶态分散系统。胶态分散系统包括基于脂质的系统,包括水包油乳剂、胶粒团、混合的胶粒团和脂质体。脂质体是人工的膜容器,其作为体内或体外的递送载体是有用的。大小范围从 0.2-4.0  $\mu\text{m}$  的大单层容器(LUV),可以在水性内部之内封装大的大分子,并以生物学活性形式递送到细胞(Fraley, R., and Papahadjopoulos, D., *Trends Biochem. Sci.* 6:77-80)。

[0106] 通过将脂质体偶联到特异性配体,例如,单克隆抗体、糖类、糖脂或蛋白质,脂质体可以靶向特定的组织。脂质体是从 Gibco BRL 商业上可获得的,例如,LIPOFECTIN™ 和 LIPOFECTACE™,它们由阳离子脂质形成,例如 N-[1-(2,3-二油氧基)-丙基]-N,N,N-三甲基铵氯化物(DOTMA)和二甲基双十八烷基铵溴化物(DDAB)。制造脂质体的方法是本领域公知的,以及在许多公开物中描述,例如,DE 3,218,121;Epstein et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*82:3688-3692 (1985);Hwang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 77:4030-4034 (1980);EP 52,322;EP 36,676;EP 88,046;EP 143,949;EP 142,641;日本专利申请 83-118008;美国专利 Nos. 4,485,045 和 4,544,545;和 EP 102,324。脂质体还由 Gregoriadis, G., *Trends Biotechnol.*, 3:235-241 综述。

[0107] 另一种类型的运载体是适合于植入到哺乳动物接受者中的生物相容的微粒或植入物。根据这种方法有用的示范性的生物可侵蚀的植入物在 PCT 国际申请 NO. PCT/US/03307 (公开 NO. WO 95/24929、标题“聚合的基因递送系统”)中描述。PCT/US/0307 描述了生物相容的、优选地生物可降解的聚合物基质,用于含有处在合适的启动子控制下的外源基因。聚合物基质可以用于实现外源基因或基因产物在受试者中的持续释放。

[0108] 聚合物基质优选地处于微粒的形式,例如微球体(其中试剂分散在整个固体聚合物基质中)或微囊(其中试剂保存在聚合物壳的核心中)。上述含有药物的聚合物的微囊在例如美国专利 5,075,109 中描述了。含有试剂的其他形式的聚合物基质包括薄膜、包衣、凝胶、植入物和 stents。选择聚合物基质设备的大小和组成来产生在导入基质的组织中有利

的释放动力学。根据要使用的递送方法进一步选择聚合物基质的大小。优选的,当使用气雾剂途径时,聚合物基质和组合物被包围在表面活性剂运载体中。可以选择聚合物基质组成以兼具有利的降解速率,以及由生物粘附性的材料形成,以进一步提高转移的有效性。还可以选择基质组成不被降解,而是在延长的时间期中通过扩散释放。递送系统还可以是生物相容的微球体,其适合于局部的、位点特异性的递送。这样的微球体在 Chickering, D. E., et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 52: 96-101; Mathiowitz, E., et al., *Nature* 386: 410-414 中公开了。

[0109] 生物不可降解的和生物可降解的聚合物基质都可以用于向受试者递送本发明的组合物。这样的聚合物可以是天然的或合成的聚合物。根据期望的释放的时间期,一般在数小时到一年或更久的数量级,来选择聚合物。一般地,在几个小时和三到十二个月之间的时间上的释放是最期望的。聚合物任选地是水凝胶的形式,其可以在水中吸收其重量的最高达约 90%,以及进一步的,任性地是与多价离子或其他聚合物交联的。

[0110] 可以用于形成生物可降解的递送系统的示范性的合成聚合物包括:聚酰胺、聚碳酸酯、聚烯、聚亚烷基二醇、聚亚烷基氧化物、聚对苯二甲酸亚烷酯、聚乙烯醇、聚乙烯醚、聚乙烯酯、聚卤乙烯、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙交酯、聚硅氧烷、聚氨基甲酸酯和其共聚物、烷基纤维素、羟基烷基纤维素、纤维素醚、纤维素酯、硝基纤维素、丙烯酸和异丁烯酸酯的聚合物、甲基纤维素、乙基纤维素、羟丙基纤维素、羟基-丙基甲基纤维素、羟基丁基甲基纤维素、醋酸纤维素、丙酸纤维素、醋酸丁酸纤维素、苯二甲酸醋酸纤维素、羧基乙基纤维素、三醋酸纤维素、纤维素硫酸钠盐、聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚(甲基丙烯酸乙酯)、聚(甲基丙烯酸丁酯)、聚(甲基丙烯酸异丁酯)、聚(甲基丙烯酸己酯)、聚(甲基丙烯酸异癸基酯)、聚(甲基丙烯酸月桂酯)、聚(甲基丙烯酸苯酯)、聚(丙烯酸甲酯)、聚(丙烯酸异丙酯)、聚(丙烯酸酸异丁酯)、聚(丙烯酸十八烷酯)、聚乙烯、聚丙烯、聚(乙二醇)、聚(氧乙烯)、聚(对苯二甲酸亚乙酯)、聚(乙醇醇)、聚醋酸乙烯酯、聚氯乙烯、聚苯乙烯、聚乙烯吡咯烷酮以及乳酸和乙醇酸的聚合物、聚酐、聚(原)酯、聚(丁酸)、聚(戊酸)和聚(丙交酯-共己内酯)和天然聚合物,例如,藻酸盐和其他多糖,包括葡聚糖和纤维素、胶原蛋白、其化学衍生物(化学基团的取代、添加,例如,烷基、亚烷基、羟基化、氧化和本领域技术人员进行的其他常规修饰)、白蛋白和其他亲水性蛋白质、玉米蛋白和其他醇溶谷蛋白和疏水性蛋白质、共聚物和其混合物。一般地,这些材料通过在体内酶水解或暴露于水、通过表面或骨架侵蚀(bulk erosion)来降解。

[0111] 技术人员将认识到,使用本发明的化合物来治疗急性炎症性疾病、脓毒症、严重休克、脓毒性休克、类风湿性关节炎、癌症、癌症转移、传染性疾病或早产的最佳处置方案可以直接的确定。这不是实验的问题,而是优化的问题,这是医学领域中常规地进行的。裸鼠中的体内研究常常提供了出发点,从该出发点开始优化剂量和递送方案。注射的频率开始将是每周一次,如在某些小鼠研究中进行的一样。然而,取决于从初始的临床试验获得的结果和特定患者的需求,这个频率可以从一天到每两周到每月来最佳地调整。

[0112] 人类剂量数量可以通过从小鼠中使用的化合物的数量推断来初步确定,熟练的技术人员知道,与动物模型相比修改人类的剂量是本领域常规的。在某些实施方式中,设想的是剂量可以在约 1 mg 化合物/kg 体重到约 5000 mg 化合物/kg 体重之间变化;或从约 5 mg/kg 体重到约 4000 mg/kg 体重或从约 10 mg/kg 体重到约 3000 mg/kg 体重;或从约 50 mg/kg 体重到约 2000 mg/kg 体重;或从约 100 mg/kg 体重到约 1000 mg/kg 体重;或从约 150

mg/kg 体重到约 500 mg/kg 体重。在其他实施方式中,这个剂量可以是约 1、5、10、25、50、75、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1050、1100、1150、1200、1250、1300、1350、1400、1450、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000 mg/kg 体重。在其他实施方式中,设想的是可以使用更高的剂量,这样的剂量可以在约 5 mg 化合物 /kg 体重到约 20 mg 化合物 /kg 体重的范围内。在其他实施方式中,剂量可以是约 8、10、12、14、16 或 18 mg/kg 体重。当然,这个剂量数量可以向上或向下调整,如在这样的治疗方案中常规地进行的,取决于初步临床试验的结果和特定患者的需要。

#### [0113] 组合治疗

本发明的组合物和方法可以与本领域已知的任何标准疗法组合地施用。例如,其他治疗试剂可以是抗癌试剂、抗炎症试剂、抗凝剂或免疫调节物。例如,双脱氧核苷,例如齐多夫定(AZT)、2',3'-双脱氧肌苷(ddI)和2',3'-双脱氧胞嘧啶(ddC)、拉米夫定(3TC)、司他夫定(d4T)和 TRIZIVIR (abacavir+zidovudine+ 拉米夫定)、非核苷类,例如,依法韦仑(DMP-266, DuPont Pharmaceuticals/Bristol Myers Squibb)、奈韦拉平(Boehringer Ingleheim) 和 delaviridine (Pharmacia-Upjohn)、TAT 拮抗剂例如 Ro 3-3335 和 Ro 24-7429、蛋白酶抑制物,例如,茚地那韦(Merck)、利托那韦(阿博特)、沙奎那韦(Hoffmann LaRoche)、奈非那韦(Agouron Pharmaceuticals)、141 W94(Glaxo-Wellcome)、阿扎那韦(Bristol Myers Squibb)、安普那韦(GlaxoSmithKline)、fosamprenavir (GlaxoSmithKline)、替拉那韦(Boehringer Ingleheim)、KALETRA (洛匹那韦 + 利托那韦, Abbott)和其他试剂例如 9-(2-羟基乙氧基甲基)鸟嘌呤(无环鸟苷)、干扰素,例如,  $\alpha$ -干扰素、白细胞介素 II 和膦甲酸(Foscarnet)、或进入抑制物,例如,T20(enfuvirtide, Roche/Trimeris) 或 UK-427,857 (Pfizer)、左旋咪唑或胸腺素、顺铂、卡铂、多西他赛、紫杉醇、氟尿嘧啶、卡培他滨、吉西他滨、伊立替康、托泊替康、依托泊苷、丝裂霉素、吉非替尼、长春新碱、长春碱、多柔比星、环磷酰胺、塞来考昔、罗非考昔、伐地考昔、布洛芬、萘普生、酮洛芬、地塞米松、泼尼松、泼尼松龙、氢化可的松、退热净、米索硝唑、氨磷汀、坦洛新、非那吡啶、昂丹司琼、格拉司琼、阿洛司琼、帕洛诺司琼、异丙嗪、丙氯拉嗪、曲美苄胺、阿瑞吡坦、地芬诺酯与阿托品和 / 或洛哌丁胺。抗凝剂例如抗凝血酶 III、活化蛋白 C 和蛋白酶抑制物,例如, furin 抑制物。

[0114] 如果希望,诱导组织修复或再生、或防止细胞死亡的试剂与 I  $\alpha$  Ip 蛋白一起施用。这样的试剂包括干细胞、胶原蛋白、纤连蛋白、层粘连蛋白、整联蛋白、血管生成因子、抗炎因子、糖胺聚糖、vitrogen、抗体和其片段、这些试剂的功能等效物和其组合。本发明的组合物可以同时地、或在相互间几个小时、几天或几周内施用。在一种方法中,诱导组织修复或再生或防止细胞死亡的试剂在此处描述的常规治疗剂之前、同时或之后施用。

#### [0115] 试剂盒

本发明提供了用于 I  $\alpha$  Ip 蛋白的纯化的试剂盒。在一个实施方式中,所述试剂盒包括用于 I  $\alpha$  Ip 蛋白的层析纯化的试剂。在某些实施方式中,所述试剂盒包含无菌容器,其含有低 pH 值洗涤缓冲液(例如, pH 3.1-4.0);这样的容器可以是安瓿剂、瓶子、小瓶、试管、袋子、小袋、泡罩包装或本领域已知的其他适合的容器形式。这样的容器可以由塑料、玻璃或适合于保持试剂的其他材料制成。

[0116] 如果希望,本发明的试剂盒提供了用于 I $\alpha$  Ip 蛋白的纯化的试剂以及纯化方案的说明。所述说明一般将包括关于纯化方案中使用的缓冲条件和体积的信息。在其他实施方式中,所述说明包括至少一种以下的:试剂或试剂的组的描述;预防措施;警告;科学研究;和/或参考文献。所述说明可以直接印刷为独立的页、小册子、卡片或折页,或在容器上(当有容器时),或贴在试剂盒内或与试剂盒一起提供的容器上的标签。

[0117] 本发明提供了用于提高受试者中间- $\alpha$  抑制物蛋白(I $\alpha$  Ip)水平或降低受试者中细胞因子趋化因子或蛋白酶水平的试剂盒。本发明还提供了用于与受试者中 I $\alpha$  Ip 水平的降低或受试者中细胞因子、趋化因子或蛋白酶水平的提高相关的疾病、病症或其症状的治疗或预防的试剂盒。疾病、病症或其症状可以包括急性炎性疾病、脓毒症、严重休克、脓毒性休克、类风湿性关节炎、癌症、癌症转移、外伤/损伤、传染性疾病或早产。在一个实施方式中,所述试剂盒包括包含有效量的纯化的 I $\alpha$  Ip 的药物包装。优选的,所述组合物以单位剂量形式存在。在某些实施方式中,所述试剂盒包含无菌容器,其含有治疗或预防组合物;这样的容器可以是盒子、安瓿瓶、瓶子、小瓶、试管、袋子、小袋、泡罩包装或本领域已知的其他适合的容器形式。这样的容器可以由塑料、玻璃、层压纸、金属箔或适合于保持药物的其他材料制成。

[0118] 如果希望,本发明的组合物或其组合与向需要的受试者施用它们的说明一起提供。说明一般将包括关于化合物用于治疗或预防可用 I $\alpha$  Ip 治疗的疾病或病症(例如,急性的炎性疾病、脓毒症、严重休克、脓毒性休克、类风湿性关节炎、癌症、癌症转移、外伤/损伤、传染性疾病或早产)的使用的信息。在其他实施方式中,说明包括至少一种以下的:化合物或化合物的组的描述;对于提高受试者中的 I $\alpha$  Ip 水平和/或降低受试者中的细胞因子、趋化因子或蛋白酶水平的给药日程和施用;对于治疗急性炎性疾病、脓毒症、严重休克、脓毒性休克、类风湿性关节炎、癌症、癌症转移、外伤/损伤、传染性疾病或早产或其症状的给药日程和施用;预防措施;警告;适应症;反向指示(counter indication);过量信息;有害反应;动物药理学;临床研究;和/或参考文献。所述说明可以直接印刷在容器(当有容器时)上,或作为贴在容器上的标签,或作为容器中提供的或与容器一起提供的独立的页、小册子、卡片或折页。

[0119] 本发明还提供了用于分析样品中的间- $\alpha$  抑制物蛋白(I $\alpha$  Ip)的试剂盒。在一个实施方式中,所述试剂盒包括已知数量的纯化的 I $\alpha$  Ip。所述已知数量的纯化的 I $\alpha$  Ip 可以用作分析参考物用于未知 I $\alpha$  Ip 浓度的样品中 I $\alpha$  Ip 的测量。优选的,所述组合物以等分量存在。在某些实施方式中,所述试剂盒包含无菌容器,其含有纯化的 I $\alpha$  Ip 的等分量;这样的容器可以是盒子、安瓿瓶、瓶子、小瓶、试管、袋子、小袋、泡罩包装或本领域已知的其他适合的容器形式。这样的容器可以由塑料、玻璃、层压纸、金属箔或适合于保持化合物或溶液的其他材料制成。在其他实施方式中,所述说明包括至少一种以下的:化合物或化合物的组的描述。所述说明可以直接印刷在容器(当有容器时)上,或作为贴在容器上的标签,或作为容器中提供的或与容器一起提供的独立的页、小册子、卡片或折页。

## 实施例

[0120] 实施例 1. I $\alpha$  Ip 在涉及用低 pH 值缓冲液洗涤的单个层析步骤中纯化。

[0121] 利用单个层析步骤从人血浆纯化 I $\alpha$  Ip 的方案涉及低 pH 值洗涤(附图 1A)。使用

低 pH 值洗涤步骤的 I $\alpha$  Ip 纯化方案被用于从冷冻贫乏的血浆中纯化 I $\alpha$  Ip。冷冻贫乏的血浆(在 25 mM Tris +200 mM NaCl, pH 7.6 的 1:10 稀释物;0.2  $\mu$ m 过滤的)。稀释的血浆(五十(50)倍柱体积)以 5 倍柱体积(cv)每分钟的流速施加到商业上可获得的 1 mL DEAE 单片柱(DEAE-CIM ;BIA Separations)上。柱的结合能力被预测为每 1 mL 柱体积约 50 mL 稀释的血浆。采集流通物。其他血浆稀释缓冲液(20 倍柱体积 25 mM Tris, 20 mM NaCl, pH 7.6)施加到柱上以容许起始材料完全地穿过柱。当流通峰返回基线时,柱用洗涤缓冲液(5 倍柱体积的 150 mM 乙酸, pH 4.0, 或 200 mM 乙酸, pH 3.3)洗涤,采集峰。在低 pH 值洗涤之后,柱进一步用缓冲液洗涤以将 pH 值提高到低 pH 值洗涤之前的(15 倍柱体积的 100 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 7.6)以准备洗脱。结合的蛋白质用高盐洗脱缓冲液(15 倍柱体的 25 mM Tris, 1000 mM NaCl, pH 7.6)洗脱。采集峰,这个级分含有高纯度的 I $\alpha$  Ip。为了交换缓冲液和除去低分子量溶质和盐,利用 30 kDa 的膜截断进行超滤或渗滤。纯化的 I $\alpha$  Ip 也可以冻干。

[0122] 在三次独立的分离中利用三种不同的洗涤缓冲液通过 DEAE 单片层析的相同数量血浆的分级,被用于确定在洗涤步骤期间降低 pH 值对 I $\alpha$  Ip 蛋白的纯化的作用。不使用低 pH 值洗涤(pH 7.6)通过 DEAE 单片层析的血浆的分级当用 1000 mM NaCl (pH 7.6)洗脱时产生了相对大的峰的洗脱(附图 2A)。纯化的 I $\alpha$  Ip 具有大于 95% I $\alpha$  Ip 的产率,纯度约 10-15% 之间。应用低 pH 值洗涤(pH 4.0)产生了大的峰,代表了在用 1000 mM NaCl (pH 7.6)洗脱之前通过低 pH 值洗涤的进一步污染物的分离。在洗脱的级分中,约 95% 的 I $\alpha$  Ip 被回收,40-50% 纯度(附图 2B)。与 pH 4.0 相比,降低洗涤步骤的 pH 值到 pH 3.3 引起了洗脱峰大小的减少(附图 2C)。洗脱的产率是约 90% I $\alpha$  Ip, 纯度 80-90% (附图 2C)。这些研究显示了在洗涤步骤期间降低 pH 值产生了更高纯度的 I $\alpha$  Ip, 伴有产率的微小降低。

[0123] 冷冻贫乏的血浆通过 DEAE 单片层析利用两种低 pH 值洗涤缓冲液(150 mM 乙酸、pH 4.0, 和 200 mM 乙酸、pH 3.3)分离,用于检查对蛋白质的分级的作用(附图 3)。每个低 pH 值洗涤引起一定量蛋白质从柱上去除。由于相应于两种低 pH 值洗涤缓冲液的应用观察到两个峰,这种结果表明在 pH 3.3 的第二次低 pH 值洗涤可以进一步除去 pH 4.0 的第一次低 pH 值洗涤没有除去的污染物。当组分 D 和组分 C 用作起始材料时(附图 4A-4D),观察到显示了第二次低 pH 值洗涤步骤的进一步蛋白质去除的类似结果。

[0124] 还通过 Western 印迹分析了通过 DEAE 单片柱层析来自组分 D 起始材料的 I $\alpha$  Ip 蛋白纯化的级分(附图 5)。在第一次低 pH 值洗涤时(150 mM 乙酸, pH 4.0),可以检测到 I $\alpha$  Ip (250 kDa)。在第二次低 pH 值洗涤(200 mM 乙酸、pH 3.3)时,某些 I $\alpha$  Ip (250 kDa 和 125 kDa)也变得与柱不结合,被洗脱在不结合的物质中。然而,在洗脱物中检测到主要数量的纯化的 I $\alpha$  Ip 蛋白。对于利用两次低 pH 值洗涤通过 DEAE 单片柱层析、从组分 C 起始材料的 I $\alpha$  Ip 蛋白的纯化,观察到类似的结果。

[0125] 对于利用两个低 pH 值洗涤步骤(pH 4.0 和 pH 3.3)通过 DEAE 单片柱层析(DEAE-CIM ;BIA Separations)来自组分 D 起始材料的分离的级分,也测定了产率和纯度的量(表 1)。

[0126] 表 1

	总蛋白 (mg)	总 I $\alpha$ Ip (mg)	I $\alpha$ Ip 的% (纯度)	总 I $\alpha$ Ip 的% (产率)
起始材料	48.0	13.6	26%	-
流通物	3.1	0.1	0.05%	0.007%
洗涤#1 (pH 4.0)	24.1	0.6	0.07%	4.4%
洗涤#2 (pH 3.3)	9.1	2.1	25%	15%
洗脱	11.5	10.4	90%	76%

级分的分析表明,在 25mM Tris,200mM NaCl,pH 7.6 下,起始材料中高于 99% 的 I $\alpha$  Ip 与柱结合,在流通物中检测到总 I $\alpha$  Ip 的约 0.007%。向柱应用第一洗涤步骤(150 mM 乙酸、pH 4.0)引起了大量污染物的消除(~50% 的总蛋白),伴有 I $\alpha$  Ip 的一些损失(4.4% 总 I $\alpha$  Ip)。向柱应用第二洗涤步骤(200 mM 乙酸、pH 3.3)引起了大量污染物的进一步消除(~19% 的总蛋白),伴有 I $\alpha$  Ip 的可接受的损失(15% 总 I $\alpha$  Ip)。使用高盐(25 mM Tris + 1000 mM NaCl, pH 7.6)洗脱剩余的结合的蛋白质,产生了 90% 纯度的 76% 的总 I $\alpha$  Ip。级分的分析与类似级分的 Western 印迹分析相关(附图 5)。这种分析显示了通过用低 pH 值缓冲液洗涤,在单个层析步骤中基本上纯化了 I $\alpha$  Ip。

[0127] 实施例 2. 利用低 pH 值洗涤步骤的 I $\alpha$  Ip 蛋白的层析纯化可以扩大。

[0128] 为了确定使用低 pH 值洗涤步骤的 I $\alpha$  Ip 纯化方案是否可以扩大到更大的柱体积,在 8 ml DEAE 单片柱上进行冷冻贫乏的血浆和中间血浆组分(组分 D 和组分 C)的层析。UV 类似于在 1 ml DEAE 单片柱上分离的冷冻贫乏的血浆和中间血浆组分(附图 6A、6C 和 6E)。来自每个层析分离的级分也通过非变性 SDS-PAGE (附图 6B、6D 和 6F)来分析。各种起始材料的纯化的洗脱的级分显示了 250 kDa 和 125 kDa 条带的存在,其相应于 I $\alpha$  Ip 蛋白的分子量。因而 I $\alpha$  Ip 纯化可以扩大至 8 倍到更大的柱体积。结果表明 I $\alpha$  Ip 蛋白可以在更大的规模上(例如,800 mL 柱和 8 L 柱)用低 pH 值洗涤方法纯化。

[0129] 实施例 3. 用低 pH 值洗涤步骤纯化的 I $\alpha$  Ip 蛋白在竞争性 ELISA 分析中显示了与人类 I $\alpha$  Ip 的抗体的提高的结合。

[0130] 为了测定与没有低 pH 值洗涤相比,使用低 pH 值洗涤的 DEAE 单片柱层析上纯化的 I $\alpha$  Ip 的数量和质量,利用 Lim et al. (J. of Infectious Diseases, 2003) 描述的 MAb 69.31 通过竞争性酶联免疫吸附测定(ELISA)分析了两种条件下纯化的 I $\alpha$  Ip 浓度。纯化的级分也通过商业上可获得的二喹啉甲酸(BCA)蛋白分析来定量测量以测定总蛋白浓度。令人惊讶地,对利用 pH 3.3 的洗涤条件纯化的 I $\alpha$  Ip,通过竞争性 ELISA 测量的 I $\alpha$  Ip 浓度甚至高于 BCA 蛋白分析所测量的总蛋白浓度。当与柱上加载的起始材料的相等数量或不使用低 pH 值洗涤条件纯化的 I $\alpha$  Ip 的相等数量相比较时,利用低 pH 值洗涤纯化的 I $\alpha$  Ip 在竞争性 ELISA 中观察到具有为预测浓度 300% 的浓度。对利用 pH 3.6 和 3.3 的低 pH 值洗涤条件纯化的 I $\alpha$  Ip 也在竞争性 ELISA 中观察到提高的表观 I $\alpha$  Ip 浓度,但是利用 pH 4.0 的洗涤条件纯化的 I $\alpha$  Ip 没有观察到。

[0131] 因为在竞争性 ELISA 中分析的样品中总蛋白保持恒定,这个结果表明某些改变、

或甚至是活化,可能在纯化期间被触发。不限于任何特定的理论,相信的是,通过低 pH 值的条件, I  $\alpha$  Ip 的活性位点被暴露。在竞争性 ELISA 中使用的 MAb 69.31 抗体识别位于分子的活性位点中的表位。如果活性位点被暴露,当控制被测定的蛋白质的数量时,对于在低 pH 值条件下纯化的 I  $\alpha$  Ip,来自竞争性 ELISA 的浓度将明显提高。因而低 pH 值条件可能阻断 I  $\alpha$  Ip 的抑制性活性,从而提高活性。

[0132] 为了确定 I  $\alpha$  Ip 的抑制性活性是否通过低 pH 值条件改变,利用发色底物 L-BAPA (N ( $\alpha$ )- 苯甲酰基 -L- 精氨酸 -4- 硝基苯胺盐酸盐,Fluka Chemicals)在胰蛋白酶抑制分析中测量 I  $\alpha$  Ip 的生物学活性。这项分析根据 I  $\alpha$  Ip 抑制 L-BAPA 的水解的能力测量比抑制活性。抑制作用可以通过在 410 nm 处  $\Delta$  吸光度 / 分钟的比值的降低来监视。计算用低 pH 值洗涤纯化的 I  $\alpha$  Ip 的比抑制活性,与没有低 pH 值洗涤来纯化的 I  $\alpha$  Ip 的比较。与不使用低 pH 值纯化的 I  $\alpha$  Ip 相比,在层析期间的低 pH 值条件(即,高于约 3.3 的 pH 值)不灭活或降低纯化的 I  $\alpha$  Ip 的生物学活性。这些结果显示了,用低 pH 值洗涤步骤纯化的 I  $\alpha$  Ip 与不使用低 pH 值条件纯化的 I  $\alpha$  Ip 相比是至少有一样的生物学活性的。

[0133] 实施例 4. 在涉及用含盐缓冲液和用低 pH 值缓冲液洗涤的单个层析步骤中纯化 I  $\alpha$  Ip。

[0134] 利用单个层析步骤从人血浆纯化 I  $\alpha$  Ip 的方案涉及盐缓冲液洗涤步骤和低 pH 值洗涤步骤的(附图 1B)。使用盐缓冲液洗涤步骤和低 pH 值洗涤步骤的 I  $\alpha$  Ip 纯化方案被用于从冷冻贫乏的血浆纯化 I  $\alpha$  Ip (附图 7A)。冷冻贫乏的血浆(12.5 倍柱体积的 40 mM Tris + 200 mM NaCl, pH 7.6 中的 1:10 稀释物;0.2  $\mu$ m 过滤的)。稀释的血浆在 2.5 倍柱体积(cv) 每分钟的流动速度下,施加到商业上可获得的 8 mL DEAE 单片柱(DEAE-CIM ;BIA Separations)上。采集流通物。其他加载缓冲液(7 倍柱体积的 25 mM Tris, 200 mM NaCl, pH 7.6)施加到柱上以容许起始材料完全地穿过柱。当流通峰返回基线时,柱用含盐洗涤缓冲液(10 倍柱体积的 40mM Tris-HCl, 290mM NaCl, pH 7.6)洗涤,采集峰。在盐洗涤之后,柱用低 pH 值缓冲液(10 倍柱体积的 200 mM 乙酸钠, pH 2.95)另外洗涤,采集峰。在第二次洗涤之后,用高盐洗脱缓冲液(5 倍柱体积的 40 mM 柠檬酸钠, pH 6.50, 1000 mM NaCl)洗脱结合的蛋白质。采集峰,这个级分含有高纯度的 I  $\alpha$  Ip。

[0135] 使用盐缓冲液洗涤步骤和低 pH 值洗涤步骤的 I  $\alpha$  Ip 纯化方案被用于从中间血浆组分(组分 D)纯化 I  $\alpha$  Ip (附图 7B)。中间血浆组分(2.5 倍柱体积,在 40 mM Tris + 200 mM NaCl, pH 7.6 中的 1:10 稀释物;0.2  $\mu$ m 过滤的)以每分钟 2.5 倍柱体积(cv) 的流动速率施加到商业上可获得的 8 mL DEAE 单片柱上(DEAE-CIM ;BIA Separations)。采集流通物。加载缓冲液施加到柱上以容许起始材料完全地穿过柱。当流通峰返回基线时,柱用含盐洗涤缓冲液(10 倍柱体积的 40mM Tris-HCl, 290mM NaCl, pH 7.6)洗涤,采集峰。在盐洗涤之后,柱用低 pH 值缓冲液(10 倍柱体积的 200 mM 乙酸钠, pH 2.95)另外洗涤,采集峰。在第二次洗涤之后,用高盐洗脱缓冲液(5 倍柱体积的 40 mM 柠檬酸钠, pH 6.50, 1000 mM NaCl)洗脱结合的蛋白质。采集峰,这个级分含有高纯度的 I  $\alpha$  Ip。

[0136] 对于利用含盐缓冲液洗涤步骤(290mM NaCl)和低 pH 值洗涤步骤(pH 2.95)通过 DEAE 单片柱层析(DEAE-CIM ;BIA Separations)来自组分 D 起始材料的分离的级分,也测定了产率和纯度的量(表 2)。

[0137] 表 2

	总蛋白 (mg)	总 I $\alpha$ Ip (mg)	I $\alpha$ Ip 的% (纯度)	总 I $\alpha$ Ip 的% (产率)
起始材料	28.7	5.6	19.5%	-
流通物	0.2	n.d.	n.d.	-
盐缓冲液洗涤	9.0	0.38	4.2%	6.8%
低 pH 值洗涤 (pH 2.95)	14.1	0.28	2.0%	5.0%
洗脱	5.4	5.0	91.8%	88.2%

(n.d = 未检出)

这项分析显示了,向涉及低 pH 值缓冲液洗涤步骤的纯化方案添加盐缓冲液洗涤步骤产生了从血浆组分纯化的 88.2% 的 I $\alpha$  Ip。与表 1 的结果相比,向涉及低 pH 值缓冲液洗涤步骤的纯化方案添加盐缓冲液洗涤步骤提高了从血浆或血浆组分纯化的 I $\alpha$  Ip 的产率。

[0138] 另外,当进行低 pH 值洗涤步骤(pH 2.95)时,而不是在进行盐洗涤步骤(290 mM NaCl)和低 pH 值步骤(pH 2.95)两者时,两种方法的级分的 SDS-PAGE 分析显示了在洗脱的级分中 ~75-80 kDa 条带存在(附图 8)。使用盐洗涤步骤和低 pH 值步骤的 I $\alpha$  Ip 纯化方案的洗脱的级分基本上由相应于间- $\alpha$ -抑制物(250 kDa)和前- $\alpha$ 抑制物(125 kDa)的两种蛋白质组成。因而,当纯化方案涉及盐洗涤步骤和低 pH 值步骤时,洗脱的级分含有高纯度的 I $\alpha$  Ip。

[0139] 其他实施方式

根据上文的描述,明显的是可以对在此描述本发明进行变化和修改来使它适应各种运用和条件。这样的实施方式也处在以下的权利要求的范围内。

[0140] 此处可变量的任何定义中一列元素的描述,包括了作为列出的元素的任何单个元素或组合(或子组合)的该可变量的定义。此处的实施方式的描述包括了作为任何单独的实施方式、或与任何其他实施方式或其部分组合的实施方式。

[0141] 在本说明书中提及的所有的专利和公开物通过引用合并在此,达到如同每个独立的专利和公开物被特别地和单独地指明通过引用来合并的同样程度。

**A**

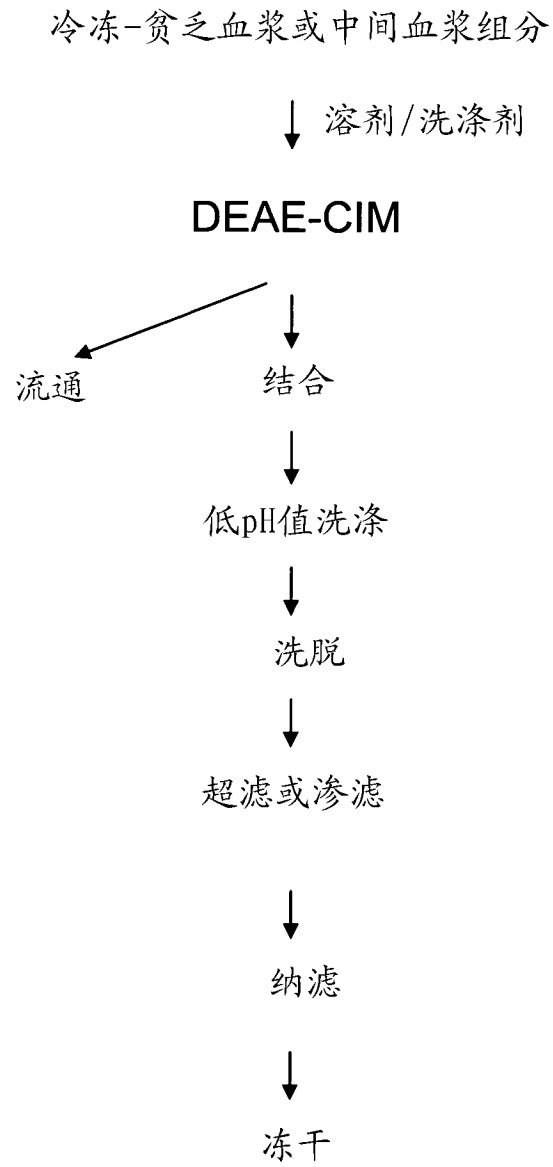


图 1

**B**

冷冻-贫乏血浆或中间血浆组分

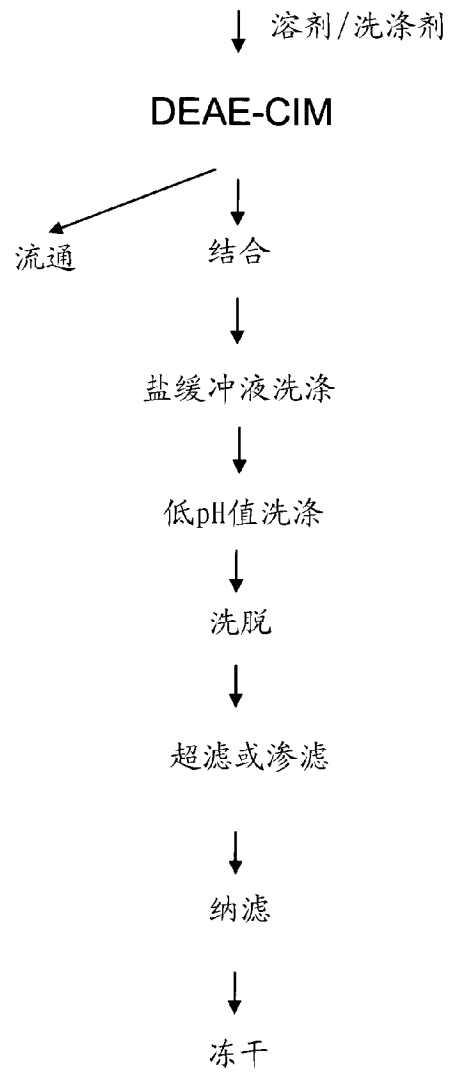


图 1 续

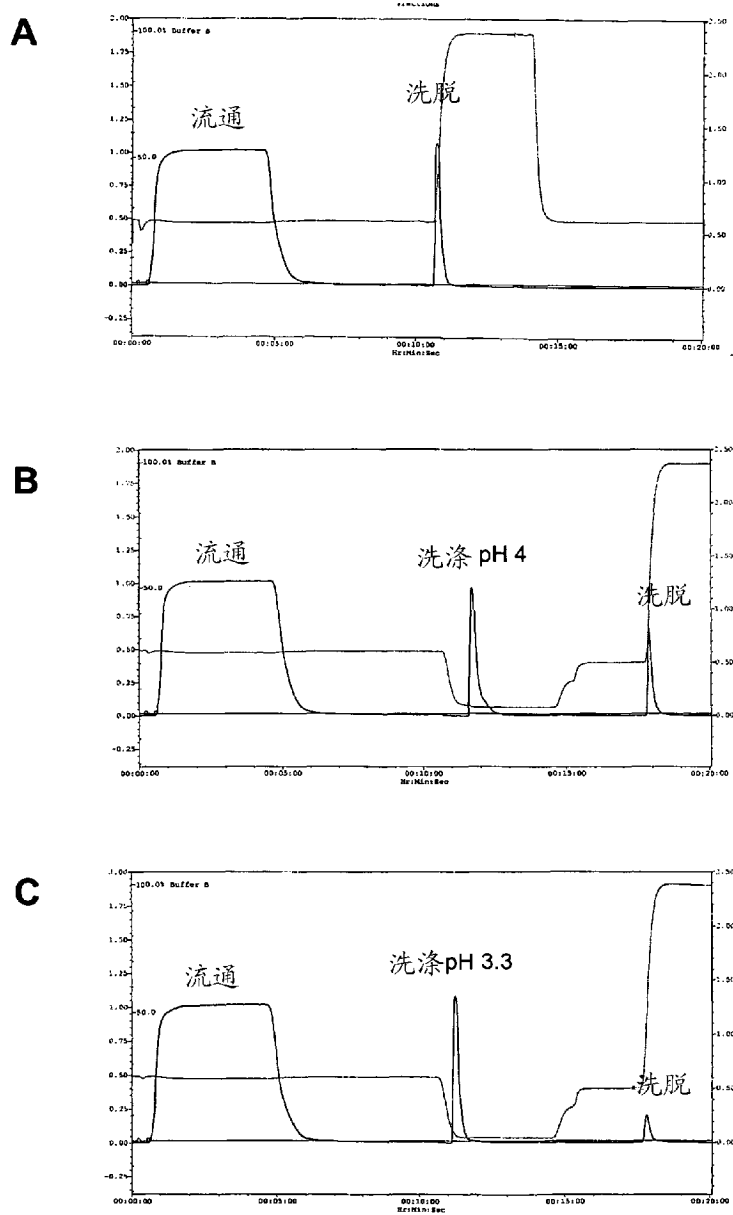


图 2

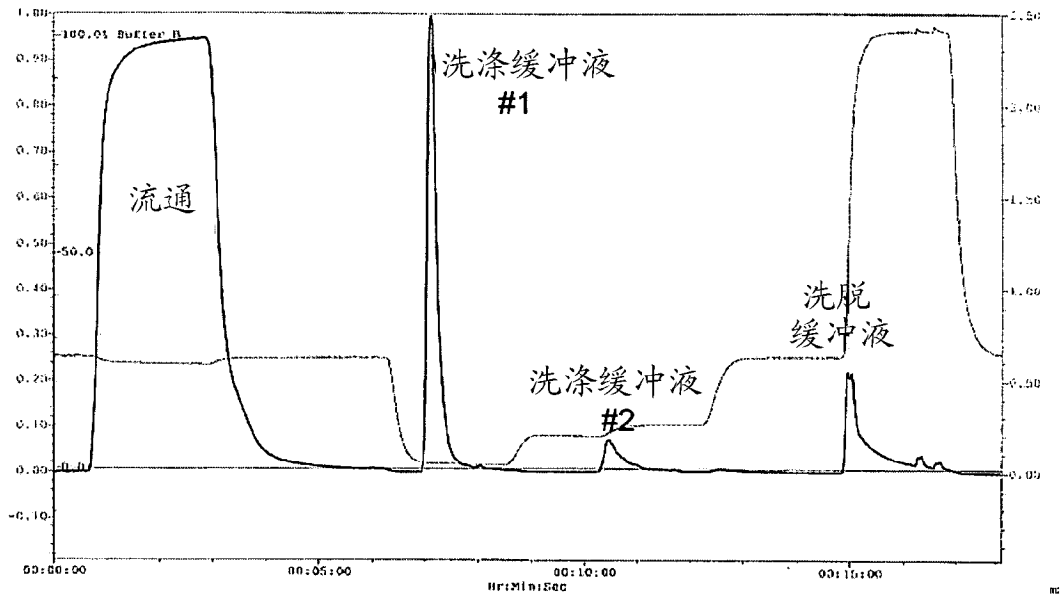


图 3

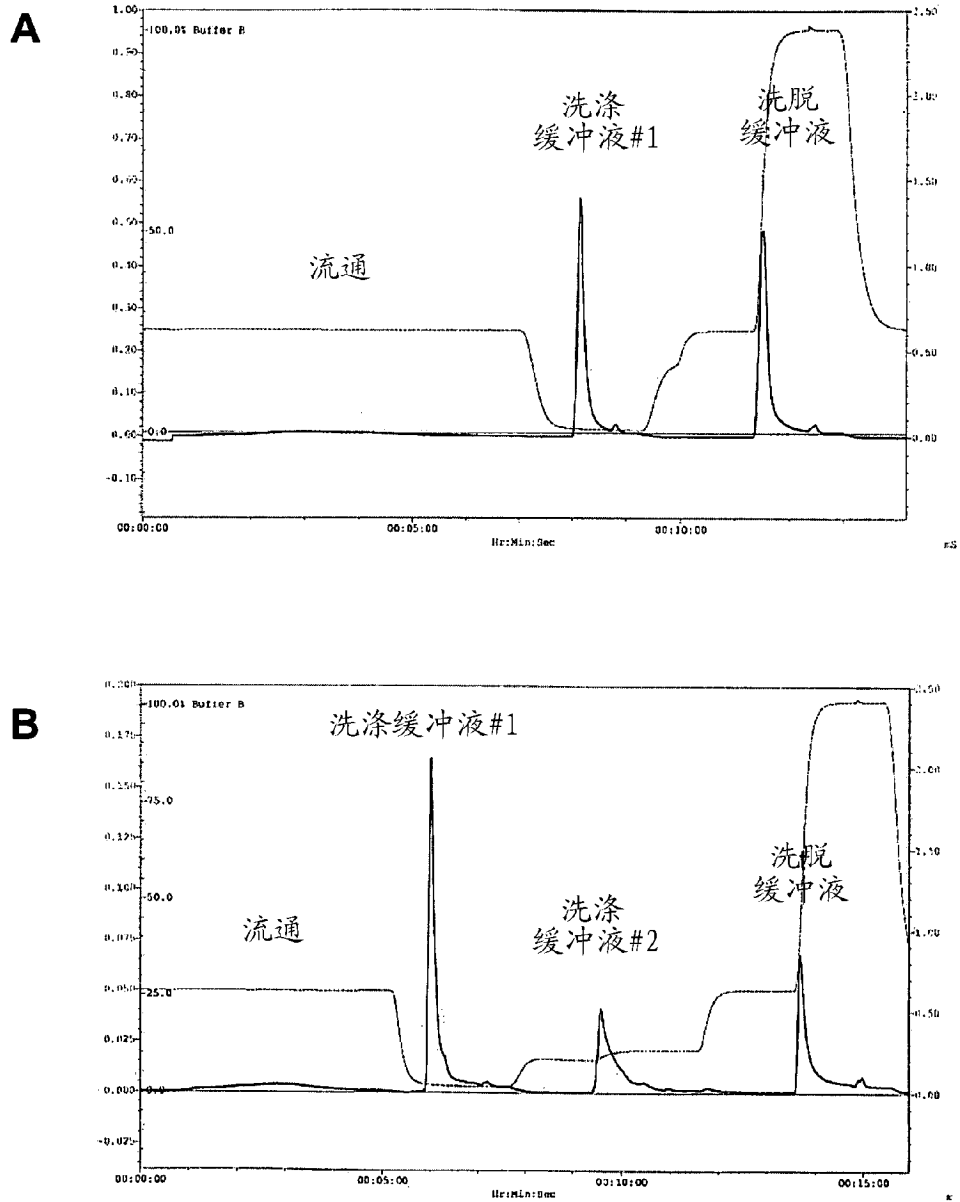


图 4

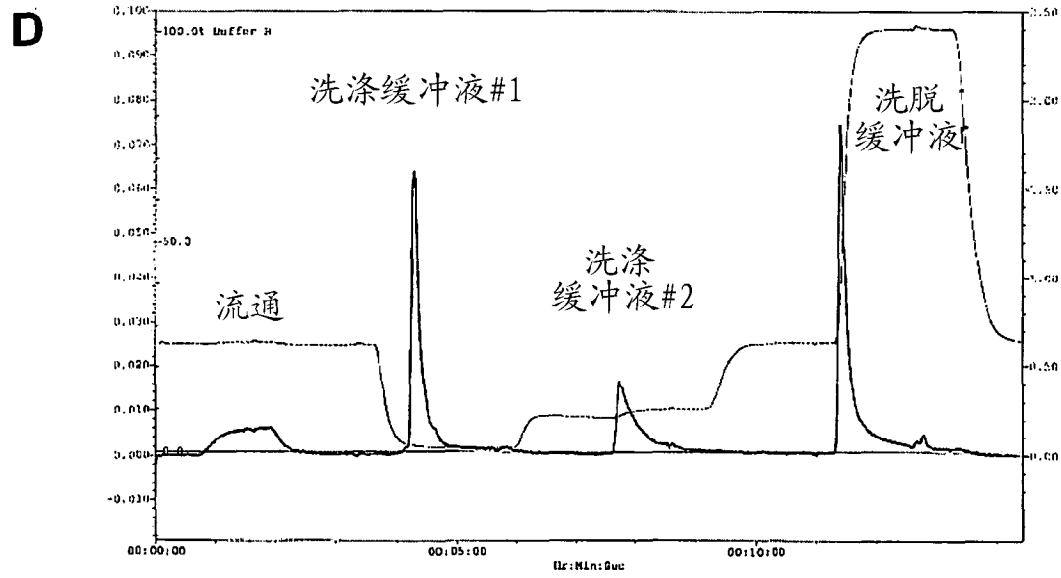
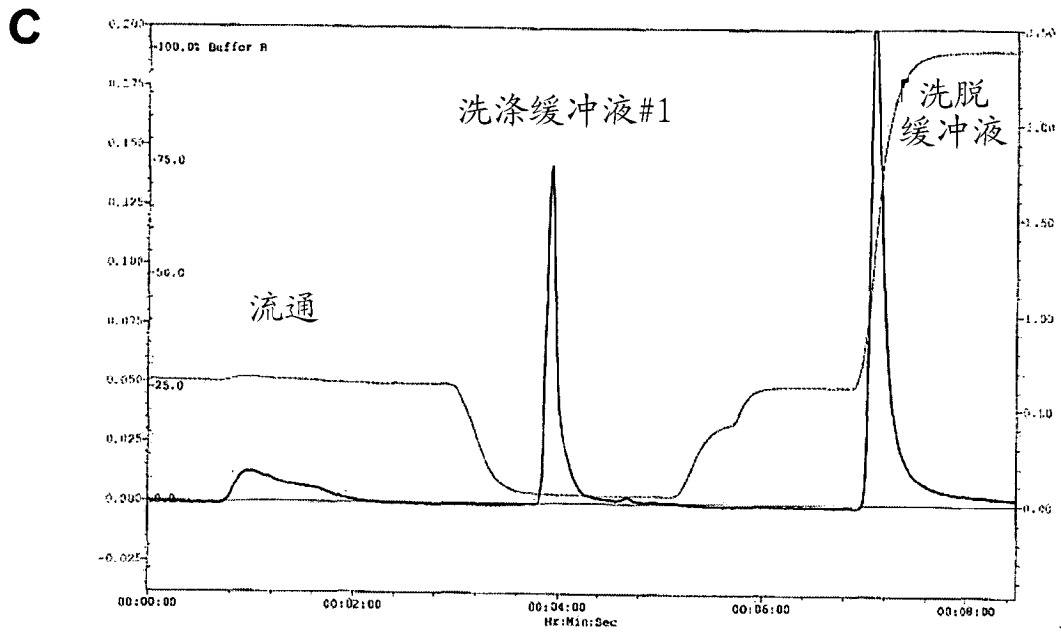


图 4 续

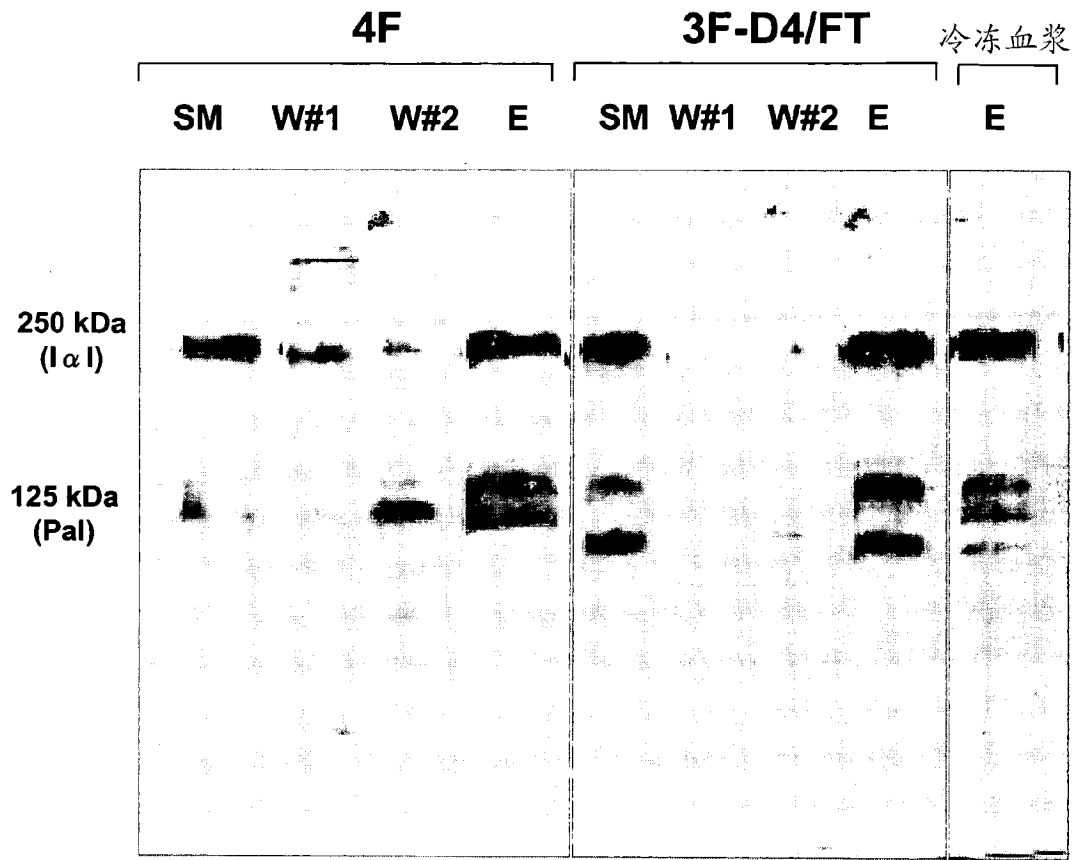


图 5

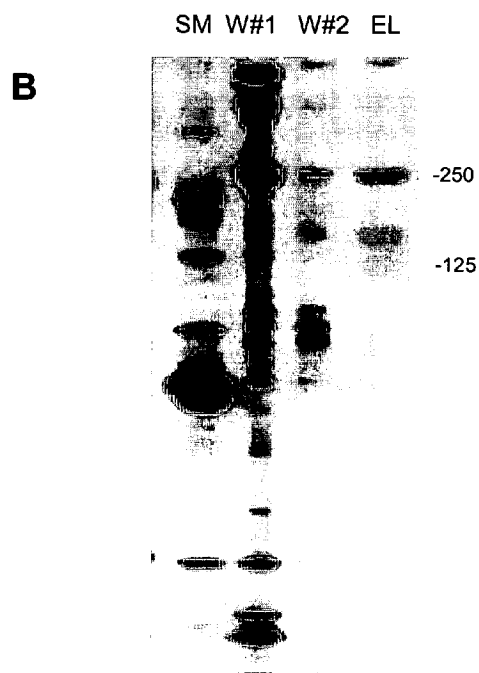
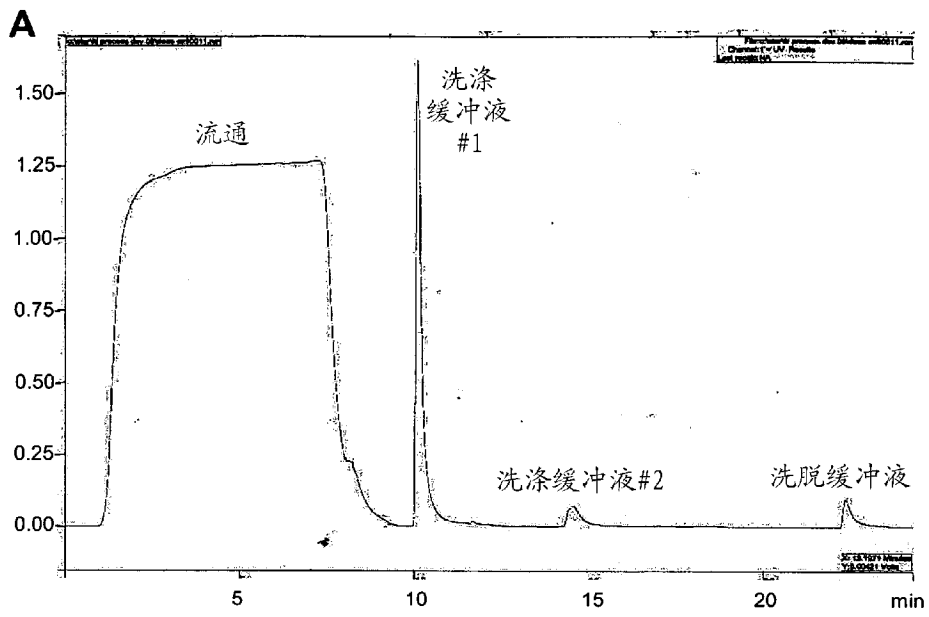


图 6

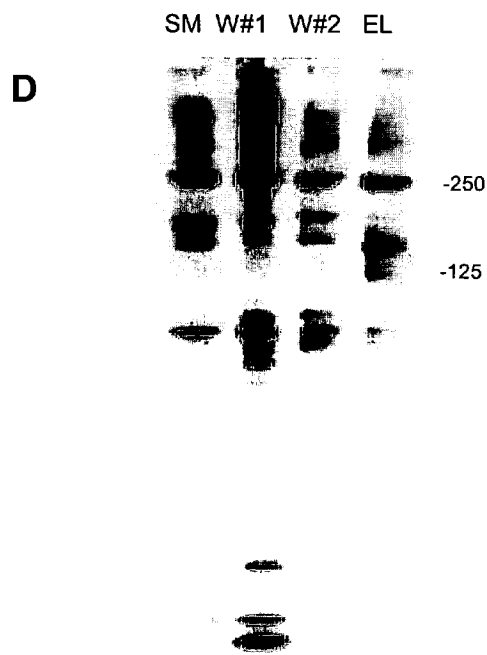
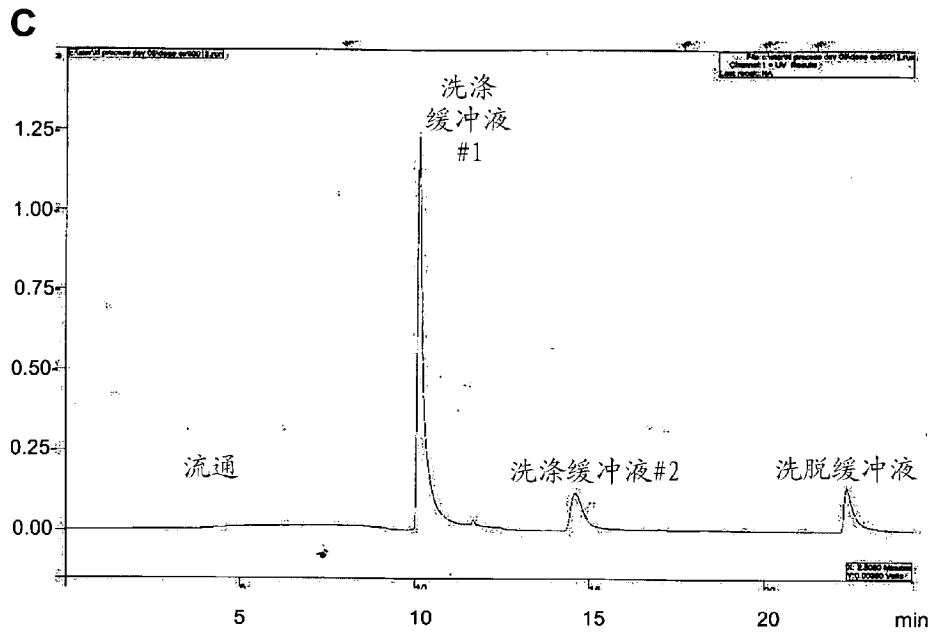
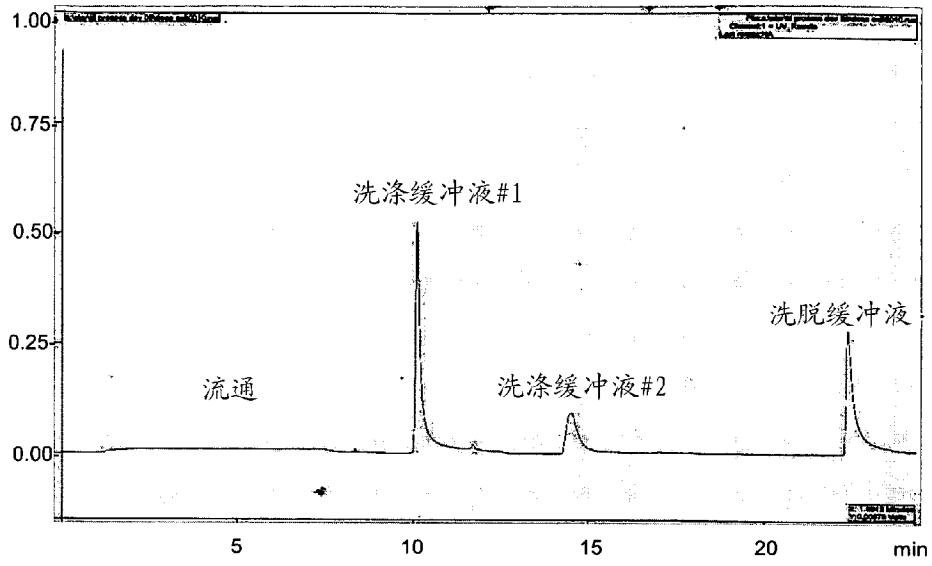


图6续

**E**



SM W#1 W#2 EL

**F**

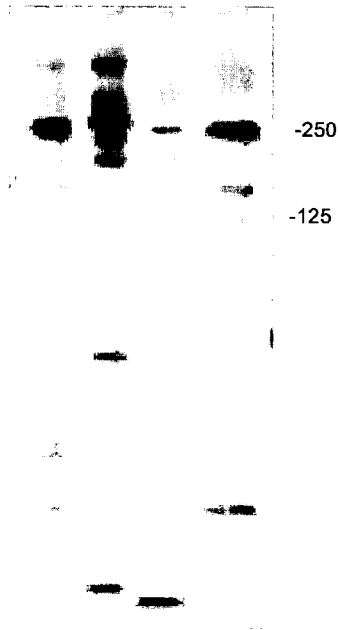


图6续

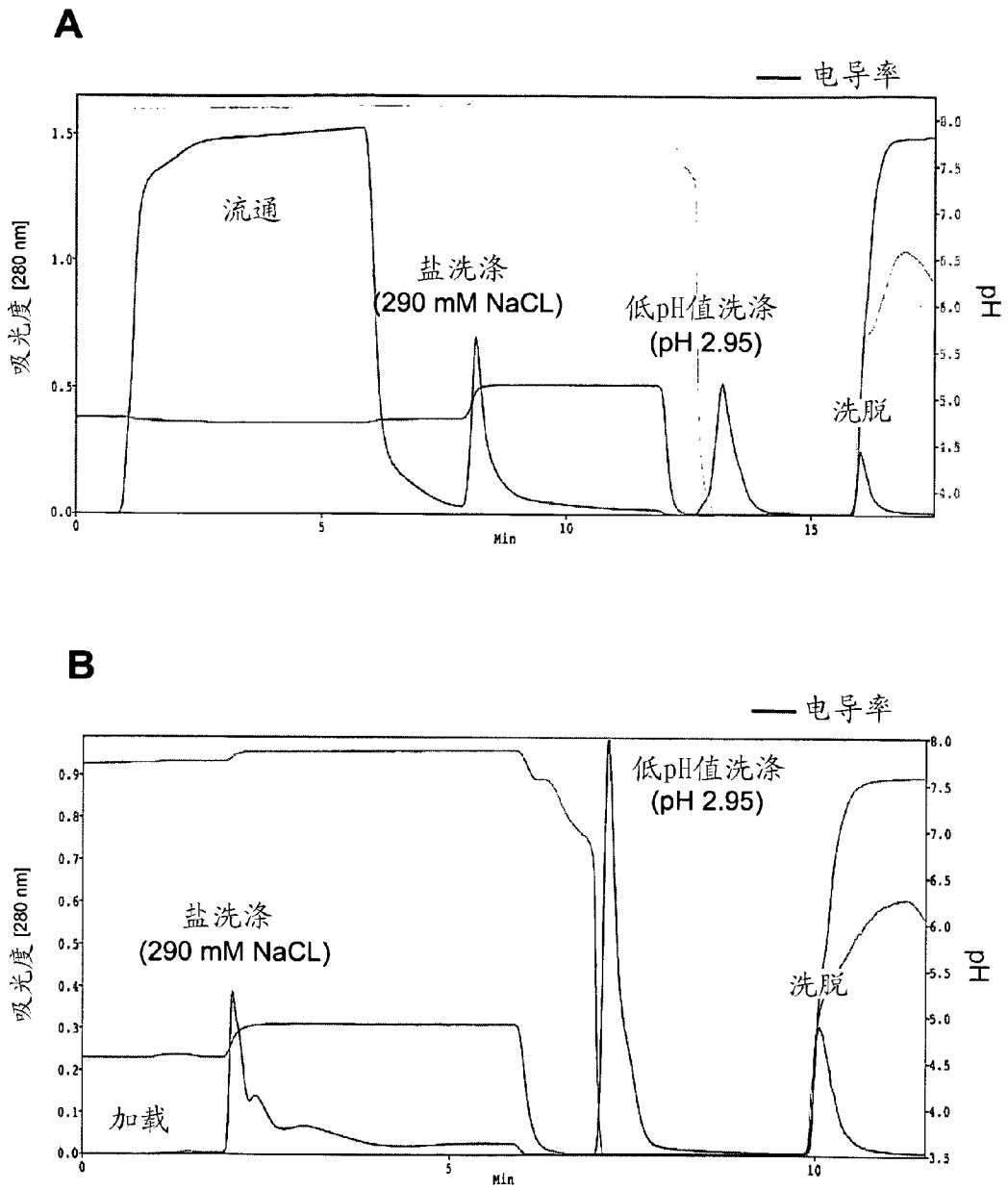
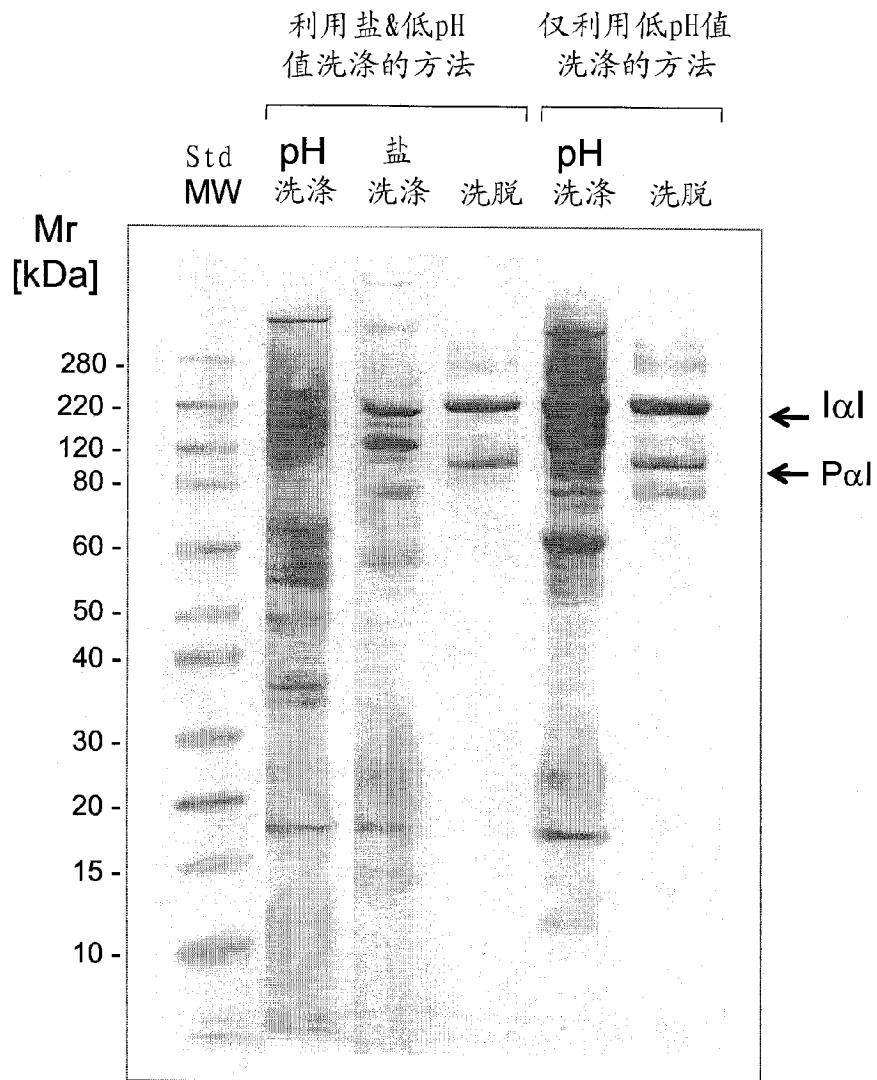


图 7



中间血浆组分D的纯化的SDS PAGE

Std MW=标准分子量蛋白

pH洗涤 = pH2.95的洗涤缓冲液

盐洗涤 = 含有290mM NaCl的洗涤缓冲液

洗脱 = 含有1000nM NaCl的洗脱缓冲液

箭头 - 250 kDa 间-α抑制物和125kDa前-α抑制物

图 8

专利名称(译)	来自血液的间- $\alpha$ 抑制物蛋白的制备和组合物		
公开(公告)号	<a href="#">CN102112876A</a>	公开(公告)日	2011-06-29
申请号	CN200980129119.6	申请日	2009-05-28
[标]申请(专利权)人(译)	普罗瑟拉生物制剂有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	普罗瑟拉生物制剂有限责任公司		
当前申请(专利权)人(译)	普罗瑟拉生物制剂有限责任公司		
[标]发明人	Y P 林 E S 西尔亚 P 布尔内		
发明人	Y-P.林 E.S.西尔亚 P.布尔内		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	A61K38/00 C07K14/811 A61K38/57 A61P15/00 A61P15/06 A61P17/02 A61P19/02 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P35/00 C07K1/16 C07K1/36 C07K14/81		
代理人(译)	郭文洁		
优先权	61/130269 2008-05-28 US		
其他公开文献	CN102112876B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明一般地提供了从血液纯化间- $\alpha$ 抑制物蛋白 (I $\alpha$ p) 和其组合物的方法。

