



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104011068 A

(43) 申请公布日 2014. 08. 27

(21) 申请号 201280058618. 2

G01N 33/53 (2006. 01)

(22) 申请日 2012. 10. 19

G01N 33/564 (2006. 01)

(30) 优先权数据

C40B 40/10 (2006. 01)

61/550, 046 2011. 10. 21 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 05. 29

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/CA2012/050748 2012. 10. 19

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/056377 EN 2013. 04. 25

(71) 申请人 奥古雷克斯生命科学公司

地址 加拿大不列颠哥伦比亚省

(72) 发明人 A·马洛塔

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 殷骏

(51) Int. Cl.

C07K 14/47 (2006. 01)

C07K 16/18 (2006. 01)

C07K 17/00 (2006. 01)

C07K 7/08 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书24页

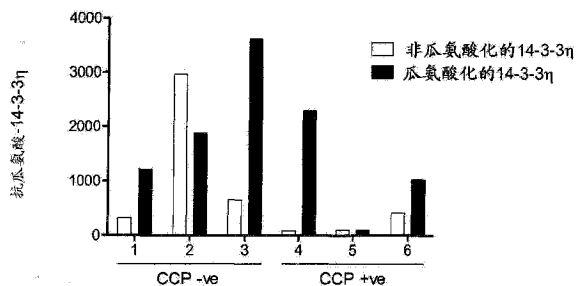
序列表10页 附图1页

(54) 发明名称

衍生自瓜氨酸化的 14-3-3 的抗原及其在风湿性关节炎诊断中的用途

(57) 摘要

本发明提供瓜氨酸化的 14-3-3 肽和针对其的抗体以及瓜氨酸化的 14-3-3 肽评价关节炎病症如风湿性关节炎的方法。



1. 一种分离的瓜氨酸化的 14-3-3 η 蛋白或其片段,其被存在于患关节炎病症患者的血清中的抗 14-3-3 η 自身抗体特异性识别。

2. 权利要求 1 的蛋白,包含在选自 SEQ ID NO:5 的 4 位、12 位、19 位、42 位、61 位、86 位和 227 位的位置上的瓜氨酸残基。

3. 权利要求 1 的蛋白,包含选自 SEQ ID NO:16-22 的氨基酸序列。

4. 根据权利要求 1 的蛋白,其中所述关节炎病症为风湿性关节炎。

5. 组合物,包含至少一种与固体支持物结合的根据权利要求 1-4 任一项的瓜氨酸化的 14-3-3 η 蛋白。

6. 试剂盒,包含至少一种根据权利要求 1 的瓜氨酸化的 14-3-3 η 蛋白。

7. 一种诊断受试者关节炎病症的方法,包括

使得自受试者的生物样品与至少一种瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白或其片段在适合于瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白或其片段与可能存在于生物样品中的抗瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白或其片段的自身抗体之间形成至少一种免疫复合物的条件下接触 ;和

检测瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白或其片段与抗瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白或其片段的自身抗体之间的免疫复合物的存在,

其中所述的所述免疫复合物的存在指示在所述受试者中有关节炎病症。

8. 权利要求 7 的方法,其中所述检测步骤还包括测定抗瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白或其片段的自身抗体的量。

9. 权利要求 7 的方法,其中瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白为瓜氨酸化的 14-3-3 η 。

10. 权利要求 7 的方法,其中瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白为瓜氨酸化的 14-3-3 η 的片段。

11. 根据权利要求 7 的方法,其中瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白或其片段用选自放射性标记、发光标记、和荧光标记的标记和酶进行可检测地标记。

12. 根据权利要求 7 的方法,其中瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白或其片段与固体支持物结合。

13. 根据权利要求 7 的方法,其中自身抗体通过 ELISA 测定进行检测。

14. 根据权利要求 7 的方法,其中所述检测通过化学发光进行。

15. 根据权利要求 7 的方法,其中所述关节炎病症为风湿性关节炎。

16. 针对根据权利要求 1 的瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白的抗体。

17. 根据权利要求 16 的抗体,其中所述抗体选择性结合瓜氨酸化的形式。

18. 一种产生权利要求 16 的抗体的非人宿主。

19. 权利要求 19 的宿主,其中宿主为杂交瘤细胞系。

20. 一种诊断和 / 或预测受试者关节炎病症的方法,包括

使来自受试者的生物样品与至少一种能选择性结合瓜氨酸化的人 14-3-3 蛋白或其片段的抗体在适合于抗体与可能存在于生物样品中的瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白之间形成至少一种免疫复合物的条件下接触 ;和

检测在所述瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白内的至少一种瓜氨酸残基的存在、程度和 / 或位置,

其中所述至少一种瓜氨酸残基的所述存在、程度和 / 或位置指示所述受试者的关节炎病症或提供所述受试者预后的信息。

衍生自瓜氨酸化的 14-3-3 的抗原及其在风湿性关节炎诊断中的用途

发明领域

[0001] 本发明概括而言涉及被存在于患关节炎病症患者的血清中的血清自身抗体、特别是抗 14-3-3 自身抗体特异性结合的瓜氨酸化的肽。此种肽包含瓜氨酸化的 14-3-3 η 序列、或其一部分,其中在天然序列中的精氨酸已经脱亚氨化成瓜氨酸。本发明还涉及这类肽评价关节炎病症包括风湿性关节炎的用途和涉及这类瓜氨酸化的肽的抗体。

[0002] 发明背景

[0003] 关节炎、或关节痛,一般指身体关节的炎症,且通常伴有疼痛、肿胀和僵硬。关节炎可由包括感染、创伤、退行性疾病、代谢失调或障碍或其它未知的致病源的若干原因中的任何原因引起。

[0004] 风湿性关节炎 (RA),例如,是滑膜的慢性炎症,并且是最常见的全身性自身免疫性疾病之一。RA 的诊断主要依赖于临床表现,但实验室结果在鉴别诊断和疾病管理方面有帮助。RA 的早期诊断在疾病的治疗和管理方面都很重要。Kim 和 Weisman(2000) *Arthritis Rheum.* 43:473-84。

[0005] 受影响的患者的血清含有可以是该疾病标志物的因子,允许早期诊断。历史上,类风湿因子 (RF) 是 RA 的初级血清学指标之一很久了。另外,抗角蛋白自身抗体 (AKA),亦称抗核周自身抗体,在 40-55% 的 RA 患者中和在 40-50% 的 RF 阴性的临床确诊的 RA 患者中检测到。Vincent 等 (1989) *Ann. Rheum. Dis.* 48:712-22 ;Corconnier 等 (1996) *Br. J. Rheumatol.* 35:620-4 ;Gabay 等 (1993) *Ann. Rheum. Dis.* 52:785-9。AKA 通常被认为比 RF 显著地更具有特异性。另外,AKA 可能在 RA 临床显现之前数月或数年显现。发明名称为“表征关节炎病症的组合物和方法 (Compositions and Methods for Characterizing Arthritic Conditions)”的 PCT 公开号 2010102412 也描述了针对 14-3-3 蛋白的自身抗体和采用它们评价关节炎病症如 RA 的方法。例如,14-3-3 η 一般为细胞内蛋白且只有在疾病状态它释放到细胞外间隙中。因而,血清 14-3-3 η 和 / 或针对它的自身抗体具有作为标志物的诊断应用价值,它补充了早期的和确定的 RA 的其它血清学指标且与 RA 和 PsA 中的关节损害有关。

[0006] 最近发现 AKA 识别含有瓜氨酸的表位。von Venrooj(2000) *Arthritis Res.* 52:785-9。瓜氨酸化为一种翻译后修饰 (PTM) 的形式,藉此肽基精氨酸脱亚胺酶 (PAD) 催化氨基酸精氨酸 (R) 脱亚胺基成瓜氨酸 (C) 导致释放氨基部分的化学变化。失调的瓜氨酸化似乎是炎性病症如 RA 中的激活过程,藉此“伤害”导致 1) PAD 的活化 ;2) PAD 酶类释放到滑膜间隙中 ;3) 细胞外蛋白质如波形蛋白和角质纤维聚集蛋白的瓜氨酸化 ;4) 抗瓜氨酸化抗原的体液免疫应答和 5) 疾病的永久化 (perpetuation)。检测这些抗瓜氨酸化抗体还可用于 RA 的早期诊断。

[0007] 已经证明抗含有瓜氨酸的合成肽 (被称为 CCP (环状瓜氨酸化肽)) 的 IgG 抗体在将 RA 区分于其它自身免疫性疾病中优于 AKA 或 RF 试验,抗 CCP 抗体的存在与 RA 患者中提高的 RF 水平无关。然而,很大百分比的患者对抗 CCP 是血清反应阴性的或保持血清反应阴

性。因此,在技术上仍然非常需要该疾病的更好和更特异性的诊断信号。

[0008] 发明概述

[0009] 如本文中公开的,经由电脑模拟、在体外和使用临床样品鉴定人 14-3-3 η 的瓜氨酸化位点。将 14-3-3 η 的瓜氨酸化形式和 / 或对这些翻译后修饰特异性的抗 14-3-3 自身抗体与天然的或非瓜氨酸化的 14-3-3 η 形式比较,可用来风湿性关节炎的诊断和预测,包括在抗 CCP 阴性患者中。尤其,且如本申请中首次公开的,14-3-3 η 代表一种新的瓜氨酸化靶标,其在抗 CCP 阴性的 RA 患者中与健康对照中有差别地表达,表明检测该瓜氨酸化的蛋白、和 / 或对瓜氨酸化的 -14-3-3 η 特异性的自身抗体可显著地改进 RA 诊断。

[0010] 因此,本发明提供包含瓜氨酸化的 14-3-3 η 蛋白或其瓜氨酸化的片段的组合物和用它们例如诊断和预测风湿性关节炎的方法。本申请中还提供包含选择性与瓜氨酸化的 14-3-3 η 蛋白结合和 / 或与所述蛋白内特定的瓜氨酸化位点结合的单克隆抗体的组合物、和使用该单克隆抗体的方法,其中瓜氨酸化的 14-3-3 η 蛋白与天然的或非瓜氨酸化的形式相反。

[0011] 在一方面,本发明涉及以下发现:在生物样品中针对瓜氨酸化形式的 14-3-3 η 的自身抗体的存在 / 量指示受试者关节炎病症的存在和 / 或状态。本申请中还提供评价和 / 或表征哺乳动物受试者的关节炎病症的方法,包括检测来自受试者的生物样品中的含至少一种瓜氨酸化的 14-3-3 η 蛋白或其片段的循环免疫复合物。

[0012] 在优选的实施方案中,瓜氨酸化的 14-3-3 η 蛋白或其片段在至少一个瓜氨酸化位点上包含至少一个瓜氨酸残基,瓜氨酸化位点优选地选自天然的 14-3-3 η 序列的 4 位、12 位、19 位、42 位、61 位、86 位或 227 位、或其组合。该瓜氨酸化的 14-3-3 η 蛋白或其片段可以是分离的或,更优选,与本文中更详细描述固体支持物结合。

[0013] 因此,本申请中描述了评价和 / 或表征哺乳动物受试者的关节炎病症的方法,包括使来自受试者的生物样品与至少一种瓜氨酸化的 14-3-3 η 蛋白或其片段接触和检测抗瓜氨酸化的 14-3-3 η 蛋白或其片段的自身抗体,其中抗所述的至少一种瓜氨酸化的 14-3-3 η 蛋白或其片段的自身抗体的存在 / 量指示受试者的关节炎病症的存在和 / 或状态。本申请中还提供评价和 / 或表征哺乳动物受试者的关节炎病症的方法,包括检测来自受试者生物样品中的自身抗体和至少一种瓜氨酸化的 14-3-3 η 蛋白之间的循环免疫复合物,其中样品中存在的免疫复合物的存在 / 量指示受试者的关节炎病症的存在和 / 或状态。

[0014] 在一实施方案中,检测步骤包括定量 / 测定生物样品中抗瓜氨酸化的 14-3-3 η 蛋白或其片段的自身抗体、或含瓜氨酸化的 14-3-3 η 蛋白或其片段的免疫复合物的水平用于与对照样品比较。因此,本申请要求保护的评价受试者关节炎病症的方法可提供预测以及诊断性测定。

[0015] 在一方面,对照样品为正常的对照,且该比较指示关节炎诊断。在一实施方案中,与正常的对照样品(例如,来自另一个没有关节炎病症的受试者)比较,在所述生物样品中抗瓜氨酸化的 14-3-3 η 蛋白或其片段的自身抗体、含瓜氨酸化的 14-3-3 η 蛋白或其片段的免疫复合物的升高的水平为所述受试者关节炎病症的诊断指标。

[0016] 因此,在一些实施方案中,来自受试者生物样品中抗瓜氨酸化的 14-3-3 η 蛋白的自身抗体或其免疫复合物的存在和 / 或来自受试者生物样品中的此种自身抗体或免疫复合物的水平相对于正常的(即非关节炎)对照样品中的此种自身抗体或免疫复合物的水平

升高提供诊断；该受试者有关节炎病症。

[0017] 在一方面，对照样品为来自哺乳动物受试者先前的生物样品，比较指示疾病恶化和 / 或治疗方案的效力。在一实施方案中，与先前的样品（例如，来自所述受试者的基线生物样品）比较，所述样品中抗瓜氨酸化的 14-3-3 η 的自身抗体或瓜氨酸化的 14-3-3 η 的循环免疫复合物的水平降低指示正在进行的治疗方案的效力。在另一实施方案中，与先前的样品比较，所述样品中抗瓜氨酸化的 14-3-3 η 的自身抗体或瓜氨酸化的 14-3-3 η 的循环免疫复合物的水平升高指示对治疗方案没有反应。

[0018] 因此，在一些实施方案中，在来自受试者生物样品中所检测到的抗瓜氨酸化的 14-3-3 η 或其片段的自身抗体与来自相同受试者的基线生物样品中存在的此种自身抗体或复合物的水平比较的相对水平提供关节炎病症的预测性指标、和 / 或所建议的治疗方案的潜在效力的治疗诊断学指标。

[0019] 另一方面，对照样品为来自哺乳动物受试者的相同生物样品，且是与涉及天然的或非瓜氨酸化的 14-3-3 η 的自身抗体的相对水平或量比较，其也可指示疾病恶化和 / 或本文中描述的潜在治疗方案的效力。在一实施方案中，与相同的样品中抗天然的或非瓜氨酸化的 14-3-3 η 的自身抗体或其循环免疫复合物的水平比较，所述样品中抗瓜氨酸化的 14-3-3 η 的自身抗体或瓜氨酸化的 14-3-3 η 的循环免疫复合物的水平升高指示疾病的阶段进展 (staging) 和 / 或预后，或暗示潜在的治疗干预（例如直接以肽基精氨酸及类似物为靶标的抑制剂）。

[0020] 因此，在一些实施方案中，在来自受试者生物样品中所检测到的抗瓜氨酸化的 14-3-3 η 或其片段的自身抗体、含瓜氨酸化的 14-3-3 η 蛋白或其片段的免疫复合物与来自此受试者的相同或后续的 (sequential) 生物样品中抗天然的或非瓜氨酸化形式的自身抗体或复合物的水平比较的相对水平提供关节炎病症的预测性指标、和 / 或所建议的治疗方案的潜在效力的治疗诊断学指标。

[0021] 另一方面，对照样品为关节炎对照，且比较指示疾病的预后。在一实施方案中，与关节炎对照样品（例如，来自另一个有定义明确的关节炎病症的受试者）比较，抗瓜氨酸化的 14-3-3 η 的自身抗体或其免疫复合物的相对水平为关节炎的预后指标。

[0022] 因此，在一些实施方案中，不同关节炎状态的受试者在抗至少一种瓜氨酸化的 14-3-3 η 蛋白或其片段的自身抗体、和 / 或其循环免疫复合物的水平上具有可检测的差异，且这些差异具有预后关联性。在一个实施例，本申请中公开了可用于确定关节炎病症的特定疾病阶段或组织病理学表型的方法，该方法基于在受试者中检测到的自身抗体与先前在另一个患者中测定的存在于整个关节炎病症过程中，例如，在治疗之前、在治疗期间、在治疗之后等的水平比较的相对水平。在另一个实例中，本申请公开的方法可用于对来自于处于关节炎病症表现的高危的受试者的生物样品进行分类，该方法基于在生物样品中检测到的自身抗体与对照样品比较的相对水平，其中对照样品可以是，例如，数据库中存储的。

[0023] 另一方面，本申请公开的方法可用于治疗诊断学目的，例如，预测受试者对所建议的治疗方案的响应的方法，该方法基于在来自受试者生物样品中检测到的自身抗体与对照样品（例如，来自用所建议的治疗方案成功治疗的另一受试者的另一生物样品）比较的相对水平。

[0024] 因此, 在一些实施方案中, 将来自第一受试者的生物样品中的抗至少一种瓜氨酸化的 14-3-3 η 蛋白或其片段的自身抗体、或含至少一种瓜氨酸化的 14-3-3 η 蛋白或其片段的免疫复合物的相对水平, 与来自已知能对治疗作出反应的受试者的抗瓜氨酸化的 14-3-3 η 的自身抗体、或含瓜氨酸化的 14-3-3 η 的免疫复合物的水平比较, 其中这种比较能测定第一受试者对治疗的反应潜能。然后受试者对治疗方案的敏感性的测定可用于获悉治疗有关节炎病症的受试者的方法。例如, 本申请中描述了治疗有关节炎病症的受试者的方法, 包括测量来自受试者生物样品中抗瓜氨酸化的 14-3-3 η 的自身抗体的水平 (例如, 通过测量自身抗体 / 瓜氨酸化的 14-3-3 η 免疫复合物形成的水平), 将抗瓜氨酸化的 14-3-3 η 的自身抗体或含瓜氨酸化的 14-3-3 η 或免疫复合物与受试者对治疗方案的敏感性关联, 和提供针对受试者的治疗方案。另一方面, 本发明提供监测关节炎病症的治疗的方法, 包括测定患者样品中抗至少一种瓜氨酸化的 14-3-3 η 蛋白或其片段的自身抗体、或含至少一种瓜氨酸化的 14-3-3 η 蛋白或其片段的免疫复合物的水平和监测接受治疗的患者中有关瓜氨酸化的 14-3-3 η 的自身抗体 / 免疫复合物的水平。

[0025] 另一方面, 本申请中提供确定和 / 或区分患者的关节炎的亚型的方法。在这方面, 将来自第一受试者的生物样品中的抗至少一种瓜氨酸化的 14-3-3 η 蛋白或其片段的自身抗体、或含至少一种瓜氨酸化的 14-3-3 η 蛋白或其片段的免疫复合物的相对水平, 与来自其关节炎的亚型是已知的和 / 或先前已确定的一个或多个受试者的抗瓜氨酸化的 14-3-3 η 的自身抗体、或含瓜氨酸化的 14-3-3 η 的免疫复合物的水平比较, 其中这种比较能确定第一受试者的关节炎的亚型。

[0026] 测得来自第一受试者的生物样品中的抗至少一种瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白或其片段的自身抗体、或含至少一种瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白或其片段的免疫复合物的水平, 与来自其关节炎的亚型是已知的和 / 或先前已确定的另一个受试者的生物样品中的抗至少一种瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白或其片段的自身抗体、或含至少一种瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白或其片段的免疫复合物的水平相似, 可表明第一受试者具有与另一个受试者相同的关节炎亚型。例如, 来自第一受试者的生物样品中和另一个已知有炎性关节炎, 例如, 风湿性关节炎的受试者的生物样品中抗瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白或其片段的自身抗体、或含至少一种瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白或其片段的免疫复合物的水平相似, 可确定第一受试者也有炎性关节炎, 例如, 风湿性关节炎。

[0027] 另外, 来自第一受试者的生物样品中的抗至少一种瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白或其片段的自身抗体、或含至少一种瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白或其片段的免疫复合物的水平, 与来自其关节炎的亚型是已知的和 / 或先前已确定的另一个受试者的生物样品中的抗至少一种瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白或其片段的自身抗体、或含至少一种瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白或其片段的免疫复合物的水平不相似, 可表明第一受试者具有与另一个受试者不同的关节炎亚型。例如, 来自第一受试者的生物样品中和另一个已知有非炎性关节炎, 例如, 骨关节炎的受试者的生物样品中抗瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白或其片段的自身抗体、或含至少一种瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白或其片段的免疫复合物的水平不相似, 可确定第一受试者有炎性关节炎, 例如, 风湿性关节炎。

[0028] 在一实施方案中, 检测步骤包括以免疫学为基础的技术, 例如, 免疫沉淀法, ELISA, 蛋白印迹分析, 免疫组织化学, 免疫荧光, “三明治”免疫测定, 免疫放射测定法, 凝

胶扩散沉淀反应,免疫扩散试验,原位免疫测定,沉淀反应,凝集试验,补体结合试验,蛋白 A 检测,免疫电泳分析,荧光激活细胞分选 (FACS) 分析,放射免疫测定等。

[0029] 因此根据本文中描述的方法检测和 / 或测量抗瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白或其片段的自身抗体可通过观察样品中自身抗体和瓜氨酸化的 14-3-3 或其片段之间免疫复合物的形成、或通过测定样品中现存自身抗体 / 瓜氨酸化的 14-3-3 复合物的存在来进行。在一实施方案中,该形成可通过可检测标记的瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白或其片段进行检测。在另一实施方案中,该复合物可通过形成自身抗体 / 瓜氨酸化的 14-3-3 复合物和可检测标记的结合免疫球蛋白 (例如,自身抗体的免疫球蛋白主链) 的第二抗体之间的另一免疫复合物进行检测。

[0030] 在一实施方案中,该方法涉及检测患者的血液、滑膜液、血浆、血清、或组织 (例如滑膜关节、受伤的关节组织等) 中抗瓜氨酸化的 14-3-3 的自身抗体或瓜氨酸化的 14-3-3 的循环免疫复合物。在一实施方案中,检测通过采用瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白或其片段将来自血液、滑膜液、血浆、血清或组织的抗瓜氨酸化的 14-3-3 的自身抗体进行免疫沉淀。在一实施方案中,检测包括使用 ELISA。在一实施方案中,检测包括包含来自患者的滑膜液、血浆、或血清的样品的蛋白印迹分析。在一实施方案中,检测包括使用放射免疫测定法。在一实施方案中,检测包括使用试纸检验。在一实施方案中,检测包括使用床旁即时检测 (point of care test)。在一实施方案中,抗瓜氨酸化的 14-3-3 的自身抗体或瓜氨酸化的 14-3-3 的循环复合物的检测与另一种关节炎标识物 (例如,MMP,抗 CCP,抗 RF 和 / 或 CRP) 的检测结合。

[0031] 本申请中还描述了包含评价受试者关节炎病症的试剂的试剂盒,其中试剂特异性识别瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白或其片段的自身抗体。在一实施方案中,试剂可包括可检测标记的瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白或其片段,其也可在固体支持物上固定化。瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白或其片段可包含多种 14-3-3 蛋白同工型之间共享的表位,或可包含一种瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白同工型或一个亚组的瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白独有的表位。在优选的实施方案中,瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白或其片段包含瓜氨酸化的 14-3-3 η 和 / 或 γ 表位。在一实施方案中,瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白或其片段包含至少一种其它瓜氨酸化的 14-3-3 同工型,例如 14-3-3 γ 共享的瓜氨酸化的 14-3-3 η 表位。在另一实施方案中,瓜氨酸化的 14-3-3 η 表位是 14-3-3 η 独有的。

[0032] 另一方面,本申请中提供能相对于天然的人 14-3-3 η 蛋白或其天然的人 14-3-3 η 片段分别选择性结合瓜氨酸化的人 14-3-3 蛋白或其瓜氨酸化的片段的抗体。在优选的实施方案中,该分离的抗体与特异性针对瓜氨酸化的 14-3-3 η 蛋白的抗 14-3-3 η 自身抗体竞争结合瓜氨酸化的 14-3-3 η 蛋白,但不与特异性针对天然的或非瓜氨酸化形式的 14-3-3 η 蛋白的抗 14-3-3 η 自身抗体竞争。

[0033] 在一实施方案中,抗体能相对于天然的 14-3-3 η 蛋白或其天然的 14-3-3 η 片段分别选择性结合瓜氨酸化的 14-3-3 η 蛋白或其瓜氨酸化的片段。在优选的实施方案中,抗体能相对于包含选自 SEQ ID NO:9-15 的天然 14-3-3 η 蛋白分别选择性结合包含选自 SEQ ID NO:16-22 的氨基酸序列的瓜氨酸化的 14-3-3 η 蛋白。在一实施方案中,本申请中提供的抗体能选择性结合包含 SEQ ID NO:16 的氨基酸序列的蛋白,但不结合包含 SEQ ID NO:9 的氨基酸序列的蛋白。在一实施方案中,本申请中提供的抗体能选择性结合包含 SEQ ID NO:17

的氨基酸序列的蛋白,但不结合包含 SEQ ID NO:10 的氨基酸序列的蛋白。在一实施方案中,本申请中提供的抗体能选择性结合包含 SEQ ID NO:18 的氨基酸序列的蛋白,但不结合包含 SEQ ID NO:11 的氨基酸序列的蛋白。在一实施方案中,本申请中提供的抗体能选择性结合包含 SEQ ID NO:19 的氨基酸序列的蛋白,但不结合包含 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列的蛋白。在一实施方案中,本申请中提供的抗体能选择性结合包含 SEQ ID NO:20 的氨基酸序列的蛋白,但不结合包含 SEQ ID NO:13 的氨基酸序列的蛋白。在一实施方案中,本申请中提供的抗体能选择性结合包含 SEQ ID NO:21 的氨基酸序列的蛋白,但不结合包含 SEQ ID NO:14 的氨基酸序列的蛋白。在一实施方案中,本申请中提供的抗体能选择性结合包含 SEQ ID NO:22 的氨基酸序列的蛋白,但不结合包含 SEQ ID NO:15 的氨基酸序列的蛋白。在另一实施方案中,抗体能相对于天然的 14-3-3 γ 蛋白选择性结合瓜氨酸化的 14-3-3 γ 蛋白。

[0034] 另一方面,本发明涉及以下的发现:瓜氨酸化的个体 14-3-3 η 蛋白的程度、和/或在蛋白内特定的位点上(例如在 SEQ ID NO:5 的 4 位、12 位、19 位、42 位、61 位、86 位和 227 位中任何一个或多个位点上)的瓜氨酸驻留的鉴定,也指示受试者关节炎病症的存在和/或状态。本申请中还提供评价和/或表征哺乳动物受试者的关节炎病症的方法,包括用前述的选择性抗体检测来自受试者生物样品中至少一种瓜氨酸化的 14-3-3 η 蛋白或其片段的程度和/或特异性瓜氨酸化位置。

[0035] 因此,本申请中描述了评价和/或表征哺乳动物受试者的关节炎病症的方法,包括使来自受试者的生物样品与能选择性结合瓜氨酸化的人 14-3-3 η 蛋白或其瓜氨酸化的片段的一种或多种抗体接触和检测瓜氨酸化的 14-3-3 η 蛋白或其片段,其中所述的 14-3-3 η 蛋白或其片段内瓜氨酸化的程度和/或位置,与定义的临床试验结果标准比较,指示受试者关节炎病症的存在和/或状态。

[0036] 附图简述

[0037] 附图 1 显示代表抗 CCP 阴性的和抗 CCP 阳性的风湿性关节炎 (RA) 患者中 14-3-3 η 瓜氨酸化特异性自身抗体反应的柱形图,其中所述反应通过针对重组的非瓜氨酸化或瓜氨酸化形式的 14-3-3 η 抗原的自身抗体反应性测量。14-3-3 η 自身抗体优选地既与抗 CCP 阴性的患者又与抗 CCP 阳性的患者中瓜氨酸化形式的 14-3-3 η 抗原结合。

[0038] 附图 2 为代表与三十个抗 CCP 阴性风湿性关节炎 (RA) 患者 (▲) 比较在三十个抗 CCP 阴性的健康对照 (●) 中 14-3-3 η 瓜氨酸化特异性自身抗体反应的点图。纵坐标轴 (抗 cit-14-3-3 η) 代表每个个体受试者针对瓜氨酸化形式的 14-3-3 η 抗原的自身抗体反应。

[0039] 发明详述

[0040] “14-3-3”和“14-3-3 蛋白”可互换使用并指 14-3-3 族的至少一个成员。14-3-3 蛋白为保守的细胞内调节分子族的成员,其在真核生物中无所不在地表达。14-3-3 蛋白能够结合许多功能不同的信号蛋白,包括激酶、磷酸酶、和跨膜受体。实际上,已经报道 100 种以上的信号蛋白作为 14-3-3 配体。可认为 14-3-3 蛋白是 Tetratricco 肽重复超家族的进化成员。它们通常具有 9 或 10 个 α -螺旋,且通常沿着它们的氨基-末端螺旋线形成均-和/或杂-二聚体相互作用。这些蛋白含有许多已知的结构域,包括二阶阳离子相互作用、磷酸化和乙酰化、和蛋白水解裂解等的区域。

[0041] 有七个不同基因编码的 14-3-3 蛋白同工型,已知它们在哺乳动物中表达,各个同

工型包含 242-255 个氨基酸。这七个 14-3-3 蛋白同工型称为 14-3-3 α/β (alpha/beta), 14-3-3 δ/ξ (delta/zeta), 14-3-3 ϵ (epsilon), 14-3-3 γ (gamma), 14-3-3 η (eta), 14-3-3 τ/θ (tau/theta), 和 14-3-3 σ (sigma/stratifin)。14-3-3 蛋白具有高度的序列相似性, 且已知经历了翻译后的处理, 例如, 磷酸化, 瓜氨酸化等。参见, 例如, Megidish 等 (1998) *J. Biol. Chem.* 273:21834-45。因此, 抗 14-3-3 自身抗体可特异性结合和 / 或识别一种以上的 14-3-3 蛋白同工型, 或可特异性结合和 / 或识别仅一种同工型 (例如, 14-3-3 η)。

[0042] 瓜氨酸化为一种翻译后修饰 (PTM) 的形式, 藉此肽基精氨酸脱亚胺酶 (PAD) 催化氨基酸精氨酸 (R) 脱亚胺基成瓜氨酸 (C) 导致释放氨基部分的化学变化。因此, 术语“瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白”和“瓜氨酸化的 14-3-3 肽”可互换, 且指具有与天然的 14-3-3 蛋白相同的氨基酸序列的蛋白 (例如, 翻译后未修饰的 14-3-3 蛋白), 但在瓜氨酸化的序列中天然序列中的至少一个精氨酸残基以瓜氨酸残基置换。

[0043] “被取代”或“被置换”包括修饰进入, 例如, 被瓜氨酸残基取代或置换的精氨酸残基, 也可指精氨酸残基被修饰成瓜氨酸残基, 例如通过用 PAD 温育。通过 PAD 进行瓜氨酸化大部分在蛋白的 NH_2 - 末端开始, 但在例外的情况下它从蛋白的 COOH 末端开始。在若干精氨酸残基被瓜氨酸残基置换的情况下, 这意味着对于所述的若干精氨酸残基的每一单个的精氨酸残基被一个单个的瓜氨酸残基置换。

[0044] 肽基精氨酸脱亚胺酶 (PADs), 亦称蛋白 - 精氨酸脱亚胺酶, 是一族在钙离子的存在下将肽内的精氨酸残基转变为瓜氨酸残基的翻译后修饰酶。

[0045] “瓜氨酸”和“Cit”指 2- 氨基 -5-(氨甲酰基氨基) 戊酸, 是具有下式的 α - 氨基酸: $\text{H}_2\text{NC}(\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$ 。

[0046] 术语“肽”和“蛋白”如本文中所示可互换, 指包含 2 至 200 个通过肽键连接的氨基酸的氨基酸序列的分子。肽可含有任何传统的 20 个氨基酸或其经修饰的形式和任何通过化学肽合成或通过化学或酶修饰引入的非天然存在的氨基酸。肽可用作抗原和可包含一个或多个表位。

[0047] 提及蛋白时如本文中所使用的术语“衍生物”“变体”和“片段”指包含至少所述蛋白活性部分的分子, 例如, 包含至少所述蛋白的表位和 / 或瓜氨酸残基, 二者之一或两者都被抗 14-3-3 自身抗体特异性结合。

[0048] 术语“表位”指被抗体或其一部分 (Fab', Fab2', 等)、或存在于 B 细胞或 T 细胞淋巴细胞的细胞表面的受体特异性识别和结合的抗原蛋白的一部分或若干部分 (其可定义构象表位), 且其能通过所述结合诱导免疫应答。表位为通常存在于分子表面上的化学特征且易于接近与抗体相互作用。典型的化学特征为氨基酸和糖部分, 具有三维的结构特征以及化学性质包括电荷、亲水性、和亲油性。构象表位与非构象表位的区别在于抗体在分子的空间要素发生变化而基础化学结构没有任何变化之后丧失了反应性。

[0049] 普通技术人员将认识到自身抗体识别抗原的片段。因此, 如本文中所使用的, “其片段”和“表位”可互换使用且通常指能结合抗体, 例如自身抗体, 的 14-3-3 的决定簇。因此, 术语“表位”当在提到 14-3-3 蛋白或特定的同工型使用时通常指能结合抗体 (例如自身抗体) 的蛋白 (包括瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白) 的片段。

[0050] 本申请中描述了包含至少一个瓜氨酸残基且被诊断为关节炎, 特别是风湿性关节

炎患者的自身抗体识别的瓜氨酸化的 14-3-3 表位、用这种表位评价和 / 或表征受试者的关节炎病症的方法、和包含这种表位的试剂盒。在表位独有的空间构型中,表位可包含少至 3 个氨基酸。通常表位由至少 6 个这种氨基酸构成,且更通常由至少 8-10 个这种氨基酸构成。测定构成表位的氨基酸的方法包括 x 射线晶体学、二维核磁共振、和表位作图。

[0051] “抗体”指包含特异性结合相应抗原并具有免疫球蛋白的共同、一般结构的蛋白的组合物。术语抗体特别地包括多克隆抗体、单克隆抗体、二聚体、多聚体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)、和抗体片段,只要它们表现出期望的生物学活性。抗体可以是鼠的、人的、人化的、嵌合的、或来源于其它物种。典型地,抗体将包含通过二硫键互相连接的至少两个重链和两个轻链,当结合时形成与抗原相互作用的结合域。每个重链包含重链可变区(VH)和重链恒定区(CH)。重链恒定区包含三个结构域 CH1、CH2 和 CH3,且可以是 μ 、 δ 、 γ 、 α 或 ϵ 同种型。类似地,轻链包含轻链可变区(VL)和轻链恒定区(CL)。轻链恒定区包含一个结构域 CL,其可以是 κ 或 λ 同种型。VH 和 VL 区可进一步细分成超变的区域,被称为互补决定区(CDR),穿插更保守的区域,被称为框架区(FR)。每个 VH 和 VL 包含三个 CDRs 和四个 FRs,自氨基-末端至羧基-末端按以下顺序排列:FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合域。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白去结合宿主组织或因子,包括免疫系统的各种细胞(例如,效应细胞)和典型的补体系统的第一组分(C1q)。重链恒定区介导免疫球蛋白去结合宿主组织或宿主因子,特别是通过细胞的受体如 Fc 受体(例如, Fc γ RI、Fc γ RII、Fc γ RIII 等)。如本文中所述的,抗体还包括保持结合抗原能力的免疫球蛋白的结合抗原的部分。这些包括,作为实例, F(ab), 一种 VL CL 和 VH CH 抗体结构域的单价片段;和 F(ab')₂ 片段,一种包含通过铰链区上的二硫键连接的两个 Fab 片段的二价片段。术语抗体还指重组单链 Fv 片段(scFv)和双特异性分子如,例如,双体,三体,和四体(参见,例如,美国专利号 5,844,094)。

[0052] “抗原”要广义地解释并指特异性结合抗体的任何分子、组合物、或颗粒。抗原可具有一个或多个与抗体相互作用的表位,尽管它未必诱导抗体的产生。

[0053] “自身抗体”为特异性结合自身抗原(即,正常组织组分)的内源性抗体。自身抗体响应于产生该自身抗体的同一身体的天然存在的抗原而产生。因此,术语“抗 14-3-3 的自身抗体”和“针对 14-3-3 的自身抗体”可互换使用且指哺乳动物受试者产生的内源性抗体,其特异性结合来自所述宿主的可瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白、或其片段。

[0054] “免疫结合”和“形成免疫复合物”可互换使用,且在本文上下文中使用时,通常指发生在抗体(例如,自身抗体)与该抗体对其有特异性的抗原之间的类型的非共价相互作用。免疫结合相互作用的强度、或亲和性可根据该相互作用的解离常数(K_d)来表示,其中较小的 K_d 代表较大的亲和性。免疫结合性质可采用本领域公知的方法进行定量。例如,参见 Davies 等,(1990) Annual Rev. Biochem. 59:439-473。抗体、或其抗原结合片段,如果它在可检测的水平下(例如,在 ELISA 检测范围内)与配体反应,且在相似条件下与无关的配体没有可检测地反应,则被说成是“特异性结合”、“免疫结合”、和 / 或“免疫反应的”。

[0055] 当指蛋白或肽时,短语“特异性(或选择性)结合”抗体(当指蛋白或肽时),指在蛋白的异源群体和及其它生物制品中确定该蛋白存在的结合反应。当指抗体时,术语“针对”蛋白或肽,指通过该抗体在蛋白的异源群体和及其它生物制品中确定所述蛋白存在的特异性结合反应。因此,在指定的免疫测定条件下,特异的抗体至少两倍于背景地结合特定

蛋白而不以显著量实质性结合存在于样品中的其它蛋白。在这种条件下针对抗体的特异性结合可能需要就其针对特定蛋白的特异性选择抗体。例如,可选择从特定物种如大鼠、小鼠、或人针对标志物“X”获得的多克隆抗体以获得仅仅那些与标志物“X”有特异性免疫反应而不与其它蛋白反应的多克隆抗体,除标志物“X”的多态变体和等位基因以外。这种选择可通过减去与来自其它物种的标志物“X”分子起交叉反应的抗体实现。多种免疫测定形式可用于选择对特定蛋白有特异性免疫活性的抗体。例如,固相 ELISA 免疫测定通常用于选择对蛋白有特异性免疫活性的抗体(参见,例如, Harlow&Lane, Antibodies, A Laboratory Manual (1988), for a description of immunoassay formats and conditions that can be used to determine specific immunoreactivity(关于可用于测定特异免疫反应性的免疫测定形式和条件的说明))。典型地特异性或选择性反应将至少是两倍于背景信号或噪声,更典型地是超过 10 至 100 倍背景信号。

[0056] “诊断”指基于对本文中公开的瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白的一种或多种自身抗体的存在或不存在来鉴定受试者病理情况的存在或性质。诊断方法在针对瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白的自身抗体的存在与特定疾病(例如,风湿性关节炎)、或一类疾病(例如关节炎病症)的发生之间建立关联。

[0057] “预后的”指在治疗或者没有治疗的情况下,基于对本文中公开的瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白的一种或多种自身抗体的存在/不存在和/或量,确定受试者病理情况和/或疾病过程的潜在进展或结果。预后的方法在针对瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白的自身抗体的存在和/或量与关节炎病症的进展和/或可能的结果之间建立关联。

[0058] “治疗诊断学”指基于对本文中公开的瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白的一种或多种自身抗体的存在/不存在和/或量,确定对关于受试者的病理情况和/或疾病过程所建议的治疗方案的潜在和/或可能的反应,并基于该结果设计对受试者适宜的治疗。治疗诊断学方法在针对瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白的自身抗体的存在和/或量与关于受试者关节炎病症不同的治疗选择的可能的效力之间建立关联。

[0059] “受试者”和“患者”可互换使用,除了在注明的情况下之外,指哺乳动物如人和非人灵长类、以及兔、大鼠、小鼠、山羊、猪、及其它哺乳动物种类。

[0060] “关节炎病症”、“关节炎”、和“关节痛”可互换使用,除了在注明的情况下之外,通常指身体关节的炎症。疼痛、肿胀、僵硬、和运动困难通常与关节炎病症相关。关节炎由 100 种以上不同的病症组成。这些病症可以从相对轻的形式到断裂的系统形式中任何形式,参见,例如,www.arthritis.ca/types%20of%20arthritis/default.asp?s=1。关节炎病症可由包括感染、创伤、退行性疾病、代谢失调或障碍、或其它未知的致病源的若干原因中的任何原因引起。

[0061] 关节炎病症可根据其亚型更具体地描述,例如,风湿性关节炎,混合型结缔组织病(MCTD),晶体性关节炎,反应性关节炎,脊柱关节病,骨关节炎,结节病,复发性风湿病,创伤后关节炎,恶性肿瘤相关性关节炎,脓毒性关节炎,莱姆关节炎(lyme arthritis),骨关节炎,细菌、感染性关节炎等。关节炎还可伴随其它已鉴定的机能障碍,包括痛风、强直性脊柱炎、系统性红斑狼疮、炎症性肠病、银屑病等。定义明确的关节炎病症指有关关节炎的类型及其阶段(例如,发作、缓解、复发等)的知识。

[0062] 瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白

[0063] 天然的 14-3-3 蛋白的氨基酸序列列于表 1 中。在一些实施方案中,14-3-3 蛋白与表 1 中提供的天然的 14-3-3 蛋白序列相同。14-3-3 蛋白也可和表 1 中提供的天然的 14-3-3 蛋白序列基本上同源和保持 14-3-3 蛋白的功能活性,例如,特异性结合抗 14-3-3 自身抗体,还由于天然的等位变异或突变而在氨基酸序列上不同。

[0064] 表 1:14-3-3 蛋白

[0065]

14-3-3 蛋白	NCBI 保藏号	序列号:
14-3-3 α / β	NP_003395.1	1
14-3-3 δ / ξ	NP_001129171.1	2
14-3-3 ϵ	NP_006752.1	3
14-3-3 γ	NP_036611.2	4
14-3-3 η	NP_003396.1	5
14-3-3 τ / θ	NP_006817.1	6
14-3-3 σ	NP_006133.1	7

[0066] 如本文中所用的,短语“14-3-3 η 蛋白”指包含 SEQ ID NO:5 的蛋白以及与其基本上同源的蛋白,例如,具有与 SEQ ID NO:5 至少 75%、还更优选 80%至 90%、还更优选 90%–95%、再更优选 95%、和最优选至少 98%氨基酸序列的同一性的蛋白。SEQ ID NO:5 的氨基酸序列提供如下。

[0067]

**MGDREQLLQR ARLAEQAERY DDMASAMKAV TELNEPLSNE DRNLLSVAYK
 NVVGARRSSW RVISSIEQKT MADGNEKKLE KVKAYREKIE KELETVCNDV
 LSLLDKFLIK NCNDFQYESK VFYLMKMGDY YRYLAEVASG EKKNVVEAS
 EAAYKEAFEI SKEQMOPHP IRLGLALNFS VFYYEIQNAP EQACLLAKQA
 FDDAIAELDT LNEDSYKDST LIMQLLRDNL TLWTSDQQDE EAGEGN**

[0068] 为了确定两个氨基酸序列或两个多核苷酸序列的同一性百分比,将序列对齐(aligned)用于最佳的比较目的(例如,缺口可引入第一和第二氨基酸或多核苷酸序列之一或两者用于最佳的对齐且为了比较的目的非同源序列可被忽视)。在优选的实施方案中,为了比较的目的对齐的参比序列的长度为至少 30%、优选至少 40%、更优选至少 50%、甚至更优选至少 60%、甚至更优选至少 70%、80%、或 90%参比序列的长度。然后比较在相应的氨基酸位置或核苷酸位置的氨基酸残基或核苷酸。当第一序列中的位置被与第二序列中相应位置相同的氨基酸残基或核苷酸占据时,那么分子在那个位置相同(如本文中所用的氨基酸或多核苷酸“同一性”等同于氨基酸或多核苷酸“同源性”)。两个序列之间的同一

性百分比为序列共享的相同位置的数目的函数,同时考虑缺口的数目、和每个缺口的长度,为了两个序列的最佳对齐需要引入缺口。

[0069] 两个序列之间的序列的比较和同一性百分比的测定可采用数学算法完成。在优选的实施方案中,两个氨基酸序列之间的同一性百分采用 Needleman 和 Wunsch 算法测定 (J. Mol. Biol. (48):444-453(1970)),在 GCG 软件包中已经将其引入 GAP 程序中(可在 <http://www.gcg.com> 获得),采用 Blossom62 矩阵或 PAM250 矩阵二者之一、和 16、14、12、10、8、6、或 4 的缺口权重和 1、2、3、4、5、或 6 的长度权重。在另一优选的实施方案中,两个核苷酸序列之间的同一性百分比采用 GCG 软件包中的 GAP 程序测定(可在 <http://www.gcg.com> 获得),采用 NWSgapdna. CMP 矩阵和 40、50、60、70、或 80 的缺口权重和 1、2、3、4、5、或 6 的长度权重。在另一实施方案中,两个氨基酸或核苷酸序列之间的同一性百分比采用 E. Meyers 和 W. Miller 的算法测定 (CABIOS, 4:11-17(1989)),其已经引入 ALIGN 程序(第 2.0 版)中,采用 PAM120 权重残基表,缺口长度损失 (gap length penalty) 为 12 和缺口损失 (gap penalty) 为 4。

[0070] 本发明的蛋白质序列还可作为“查询序列”用以针对公众数据库进行检索,例如,鉴定其它族成员或相关性序列。这种检索可采用 Altschul 等 (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10 的 NBLAST 和 XBLAST 程序(第 2.0 版)进行。BLAST 核苷酸检索可用 NBLAST 程序、得分 = 100、字长 = 12 进行以获得和本发明的多核苷酸分子同源的核苷酸序列。BLAST 蛋白质检索可用 XBLAST 程序、得分 = 50、字长 = 3 进行以获得和本发明的 14-3-3 蛋白分子同源的氨基酸序列。为了获得用于比较的目的的有缺口的对齐,可使用描述于 Altschul 等, (1997) Polynucleotides Res. 25(17):3389-3402 中的 Gapped BLAST。当使用 BLAST 和 Gapped BLAST 程序时,可以使用各个程序(例如, XBLAST 和 NBLAST) 的默认参数,例如在 www.ncbi.nlm.nih.gov。

[0071] 将 14-3-3 蛋白、其片段、或融合与肽基精氨酸脱亚胺酶一起按照公知的方法温育产生瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白、其片段或融合。这种瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白、其片段或融合可作为免疫原使用以生产抗 14-3-3 抗体、纯化抗 14-3-3 抗体,和用于本文中描述的诊断性、预测性和治疗诊断学检测。

[0072] 根据本发明,经由电脑模拟、体外和采用临床样品鉴定的人 14-3-3 η 瓜氨酸化位点提供于表 2 中。

[0073] 表 2

[0074]

AA 位置	AA 序列	精氨酸化的肽	瓜氨酸化的肽
4	1 - 12	MGD [R] EQLLQRAR (SEQ ID NO: 9)	MGD [Cit] EQLLQRAR (SEQ ID NO: 16)
12	4 - 18	REQLLQRA [R] LAEQAE (SEQ ID NO: 10)	REQLLQRA [Cit] LAEQAE (SEQ ID NO: 17)
19	12 - 26	RLAEQAE [R] YDDMASA (SEQ ID NO: 11)	RLAEQAE [Cit] YDDMASA (SEQ ID NO: 18)
42	29 - 45	KAVTELNEPLSNED [R] NLL (SEQ ID NO: 12)	KAVTELNEPLSNED [Cit] NLL (SEQ ID NO: 19)
61	50 - 69	KNVVGARRSSW [R] VISSIEQK (SEQ ID NO: 13)	KNVVGARRSSW [Cit] VISSIEQK (SEQ ID NO: 20)
86	77 - 89	KKLEKVKAY [R] BKI (SEQ ID NO: 14)	KKLEKVKAY [Cit] BKI (SEQ ID NO: 21)
227	217 - 235	KDSTLIMQLL [R] DNLTWTS (SEQ ID NO: 15)	KDSTLIMQLL [Cit] DNLTWTS (SEQ ID NO: 22)

[0075] 本发明的瓜氨酸化的蛋白质在列于表 2 中的氨基酸位置之一上至少包含瓜氨酸残基。在一实施方案中,根据本发明的瓜氨酸化的 14-3-3 η 片段包含选自 SEQ ID NO:16-22 的氨基酸序列。

[0076] 如表 3 中所示,列于表 2 中的七个瓜氨酸化位点中的几个(如果不是全部)在其它 14-3-3 同工型中也是保守的。因此,在某种程度上在其它 14-3-3 同工型中这些瓜氨酸化位点是保守的,这些位点也可用于采用本文中公开的方法和材料确定这些其它 14-3-3 同工型的瓜氨酸化状态。

[0077] 表 3

[0078]

η 内的氨基 酸位点	η	γ	α / β	ϵ	σ	θ	ξ
4	存在	存在	无	存在	存在	无	无
12	存在	存在	无	无	无	无	无
19	存在	存在	存在	存在	存在	存在	存在
42	存在	存在	存在	存在	存在	存在	存在
61	存在	存在	存在	存在	存在	存在	存在
86	存在	存在	存在	存在	存在	存在	存在
227	存在	存在	存在	存在	存在	存在	存在

[0079] 本发明的若干方面涉及分离的瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白、及其生物活性部分,例如,适于用作抗瓜氨酸化的 14-3-3 自身抗体的抗原的片段。瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白,包括其片段,通过肽基精氨酸脱亚胺酶的作用,例如,通过按照公知的方法分别将天然的 14-3-3 蛋白或其片段与肽基精氨酸脱亚胺酶一起温育,可从天然、重组或合成的 14-3-3 蛋白(分别包括其片段)中分离出来。备选地,瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白可按照公知的方法,通过肽

合成进行分离,例如,通过将瓜氨酸残基直接掺入合成的肽中。

[0080] 在一实施方案中,14-3-3 蛋白可采用标准的蛋白质纯化技术通过适宜的纯化流程从细胞或组织源中分离出来。在另一实施方案中,14-3-3 蛋白通过重组 DNA 技术制备。

[0081] 优选地,本发明的 14-3-3 蛋白或其片段通过标准的重组 DNA 技术制备。例如,按照常规的技术将编码 14-3-3 蛋白或其片段的 DNA 片段在框内 (in-frame) 表达载体中连接,例如通过采用连接反应 (ligation) 的盲端 (blunt-ended) 或交错端 (stagger-ended) 末端、保证适宜的末端的限制性内切酶消化、适用时粘性末端的补平 (filling-in)、避免不期望的连接的碱性磷酸酶处理、和酶促连接 (enzymatic ligation)。备选地,基因片段的 PCR 扩增可采用锚定引物进行,其导致在两个连续的基因片段之间的补充外伸 (complementary overhangs),可随后将其退火和再扩增产生 a c 基因序列 (参见,例如, Current Protocols In Molecular Biology, eds. Ausubel 等, John Wiley&Sons:1992)。而且,许多已经编码一部分 (例如,可检测的一部分) 的表达载体可商购获得。编码 14-3-3 蛋白或其片段的多核苷酸可克隆进入此种表达载体中使得一部分 (例如,可检测的一部分) 与 14-3-3 蛋白或片段框内 (in-frame) 连接。

[0082] 信号序列可用于促进分泌性蛋白或其它目的蛋白的分泌和分离。信号序列典型地以疏水氨基酸的核心为特征,其通常在一个或多个裂解事件的分泌过程中由成熟蛋白裂解。这种信号肽含有加工位点,其中加工位点当它们通过分泌途径时允许自成熟蛋白的信号序列的裂解。因此,本发明涉及所描述的含信号序列的多肽,以及涉及多肽,其中信号序列由多肽通过蛋白水解裂解 (即,裂解产物)。在一实施方案中,编码信号序列的多核苷酸序列可在表达载体中可操作地与目的蛋白 (如通常不被分泌或否则难以分离的蛋白) 可操作地连接。该信号序列指引蛋白的分泌,如从真核生物的宿主进入表达载体中,其中表达载体被转化,信号序列随后或一并裂解。然后可通过本领域公认的方法将蛋白从细胞外介质中轻易地纯化。

[0083] 备选地,信号序列可利用促进纯化的序列,如含 GST 结构域的序列,与天然的或瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白、其片段、其融合连接。

[0084] 瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白及其片段的抗体

[0085] 在其它实施方案中,本发明提供特异性结合瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白或其片段、优选哺乳动物 (例如,人) 14-3-3 蛋白的抗体,即,完整的抗体及其抗原结合片段,其可用于诊断、预测、监测和 / 或治疗 RA。

[0086] 本发明的多肽 (例如,瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白或其瓜氨酸化的片段) 的抗体分子,可通过本领域的技术人员熟知的方法制备。例如,单克隆抗体可按照已知的方法产生杂交瘤来制备。然后采用标准方法,如酶联免疫吸附测定 (ELISA),筛选用这种方式所形成的杂交瘤,以鉴定一种或多种生产特异性结合本发明多肽的抗体的杂交瘤。例如,本发明的瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白或其瓜氨酸化的片段也可用于免疫非人宿主,例如,驴、山羊、绵羊、豚鼠、仓鼠、兔、大鼠和小鼠,以获得与瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白或其瓜氨酸化的片段起反应但不与天然的 14-3-3 蛋白或其天然的片段起反应的多克隆和单克隆抗体。该肽免疫原还可在羧基末端含有半胱氨酸残基,且可与半抗原如钥孔戚血蓝素 (KLH) 缀合的半抗原。其它的肽免疫原可通过用硫酸化酪氨酸残基置换酪氨酸残基而产生。合成这种肽的方法为本领域公知。本发明的全长多肽可用作免疫原,或者该多肽的抗原性肽片段可用作免疫原。本

发明的多肽的抗原性肽包含至少 7 个连续的氨基酸残基且包括表位使得所产生的抗肽的抗体与多肽形成特异性免疫复合物。优选地,抗原性肽包含至少 10 个氨基酸残基,更优选至少 15 个氨基酸残基,甚至更优选至少 20 个氨基酸残基,最优选至少 30 个氨基酸残基。

[0087] 单克隆抗体可通过重组 DNA 技术中本领域技术人员已知的其它方法产生。作为制备分泌单克隆抗体的杂交瘤的替代方法,可通过如下的方法鉴定和分离抗本发明多肽的单克隆抗体:用与本发明相关的多肽(例如,瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白或其瓜氨酸化的片段)筛选重组的组合免疫球蛋白库(例如,抗体噬菌体展示库)从而分离结合与本发明相关的多肽(例如,瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白或其瓜氨酸化的片段)的免疫球蛋白库成员。产生和筛选噬菌体展示库的技术和可商购获得的试剂盒是本领域的技术人员熟知的。另外,特别适合用于产生和筛选抗体展示库的方法和试剂的实例可见于文献。例如,“组合抗体展示”方法是公知的和被开发以鉴定和分离具有特定的抗原特异性的抗体片段,且可用于生产单克隆抗体。在用如上所述的免疫原免疫动物之后,克隆所得 B 细胞池的抗体谱。采用低聚物引物的混合物和 PCR 获得不同种群免疫球蛋白分子的可变区的 DNA 序列是公知的。例如,对应于 5' 前导(信号肽)序列和 / 或框架 1 (FR1) 序列的混合寡核苷酸引物、以及对应于保守的 3' 恒定区的引物,可用于由许多鼠抗体进行重链和轻链可变区的 PCR 扩增;类似的策略也已用于由人抗体扩增人重链和轻链可变区。

[0088] 多克隆的血清和抗体可通过用本发明的多肽免疫合适的受试者来制备。所免疫的受试者中的抗体滴度可通过标准的技术,如采用固定化蛋白质用 ELISA,进行随时间变化的监视。如有需要,针对本发明多肽的抗体分子可从受试者或培养基中分离出来和通过公知的技术,如蛋白 A 色谱,进一步纯化,以获得 IgG 级分。

[0089] 抗本发明多肽的抗体的片段可按照本领域公知的方法通过裂解抗体来制备。例如,免疫活性的 Fab 和 F(ab')₂ 片段可通过用酶如胃蛋白酶处理抗体而产生。

[0090] 另外,抗本发明多肽的嵌合的、人源化的、和单链抗体,既包含人又包含非人部分,可采用标准的重组 DNA 技术和 / 或重组的组合免疫球蛋白库制备。人源化抗体也可用不能表达内源性免疫球蛋白重链和轻链基因、但能表达人重链和轻链基因的转基因小鼠制备。例如,针对,例如,瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白或其片段的人单克隆抗体 (mAbs),可用载有人免疫球蛋白基因而不是鼠免疫球蛋白基因的转基因小鼠产生。然后可使用以目的抗原免疫的这些转基因小鼠的脾细胞生产对人蛋白的表位具有特定亲和性的分泌人 mAbs 的杂交瘤。

[0091] 嵌合抗体,包括嵌合的免疫球蛋白链,可通过本领域已知的重组 DNA 技术制备。例如,编码鼠(或其它种类)单克隆抗体分子的 Fc 恒定区的基因用限制性内切酶消化以除去编码鼠 Fc 的区域,编码人 Fc 恒定区的基因的等效部分被取代。

[0092] 抗体或免疫球蛋白链可通过本领域已知的方法进行人源化。人源化抗体,包括人源化的免疫球蛋白链,可通过用人 Fv 可变区的等效序列置换不直接涉及抗原结合的 Fv 可变区的序列而产生。产生人源化抗体的一般方法通过 Morrison (1985) Science 229:1202-07 ; Oi 等, (1986) BioTechniques 4:214 ; Queen 等, 美国专利号 5,585,089 ; 5,693,761 ; 5,693,762 提供,其中所有的内容在此引入作为参考。那些方法包括分离、操作、和表达编码重链或轻链中至少之一的全部或部分免疫球蛋白 Fv 可变区的核酸序列。这种核酸序列的来源是本领域的技术人员熟知的,例如,可由产生抗预定靶标的抗体的杂交瘤来获得。然后将编码人源化抗体、或其片段的重组 DNA 克隆进入适宜的表达

载体中。

[0093] 人源化的或 CDR- 嫁接的抗体分子或免疫球蛋白可通过 CDR 嫁接或 CDR 取代来制备,其中免疫球蛋白链中的一个、两个、或所有 CDRs 可被置换。参见,例如,美国专利号 U. S. Pat. No. 5, 225, 539 ;Jones 等 (1986)Nature321:552-25 ;Verhoeyan 等 (1988)Science239:1534 ;Beidler 等 (1988)J. Immunol. 141:4053-60 ;Winter, 美国专利号 5, 225, 539, 所有的内容在此引入作为参考。Winter 描述了可用于制备本发明的人源化抗体的 (英国专利申请 GB2188638A ;Winter, 美国专利号 5, 225, 539)CDR- 嫁接方法,其中内容在此引入作为参考。特定的人抗体的所有 CDRs 可用至少非人 CDR 的至少一部分置换,或该 CDRs 中只有一些可用非人 CDRs 置换。仅仅置换对人源化抗体结合预定的抗原所需要的 CDRs 的数目是必需的。

[0094] 人抗体还可采用转基因的非人类动物来制备,其中非人类动物被修饰以响应抗原的激发生产完全人抗体而不是动物的内源性抗体。参见,例如,PCT 公开 W094/02602。非人宿主中的编码免疫球蛋白重链和轻链的内源基因已经丧失能力,而编码人重链和轻链免疫球蛋白的活跃的基因位点 (active loci) 被插入宿主的基因组中。例如,采用含有必要的人 DNA 段引入人类基因酵母人工染色体。然后通过使含有比完整补充的改变少的中间转基因动物杂交获得作为后代的提供所有期望的修饰的动物。这种非人类动物的优选实施方案为小鼠,且被称为 PCT 公开 W096/33735 和 W096/34096 中公开的 XENOMOUSE™。该动物生产分泌完全人免疫球蛋白的 B 细胞。该抗体可如,例如,制备多克隆抗体,在用目的免疫原免疫之后由动物直接获得,或由来源于该动物的永生 B 细胞,如产生单克隆抗体的杂交瘤获得。另外,编码含人可变区的免疫球蛋白的基因可被回收和被表达以直接获得抗体,或者可被进一步修饰以获得抗体的类似物如,例如,单链 Fv 分子。

[0095] 已经通过,例如,删除、添加、或取代抗体的其它部分,例如,恒定区,而修饰的单克隆、嵌合和人源化抗体也在本发明的范围内。作为非限制性的实例,抗体可通过删除恒定区,通过用另一恒定区 (例如,意欲增加半衰期、抗体的稳定性、或亲和性的恒定区、或来自另一种类或抗体类别的恒定区) 置换恒定区、和通过修饰一个或多个恒定区中的氨基酸以改变,例如,糖基化位点的数目、效应细胞功能、Fc 受体 (FcR) 结合、补体结合等,进行修饰。

[0096] 改变抗体恒定区的方法是本领域已知的。改变了功能 (例如,改变了效应子配体的亲和性,如细胞上的 FcR、或补体的 C1 组分) 的抗体,可通过用不同的残基置换抗体恒定部分中的至少一个氨基酸残基来制备 (参见,例如,EP388, 151A1, 美国专利号 5, 624, 821 和美国专利号 5, 648, 260, 所有的内容在此引入作为参考)。对鼠 (或其它种类) 免疫球蛋白进行相似类型的改变可用于降低或消除这些功能,且是本领域已知的。

[0097] 例如,通过用在其侧链上具有适宜官能团的残基置换特定残基,或通过引入带电荷的官能团,如谷氨酸盐或天冬氨酸盐,或芳香非极性残基如苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸或丙氨酸,来改变抗体 (例如, IgG, 如人 IgG) 的 Fc 区对 FcR (例如, Fc γ R1) 的亲和性、或补体 C1q 的结合,是可能的 (参见,例如,美国专利号 5, 624, 821)。

[0098] 诊断、预测和治疗方法、和治疗监测

[0099] 另一方面,本发明提供诊断疾病和病症的方法,其涉及抗瓜氨酸化的 14-3-3 的自身抗体。通常,可通过如下的方法确定风湿性关节炎的存在或不存在、或患者的预后:(a) 使由哺乳动物受试者获得的生物样品与至少一种瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白或其片段接触;

(b) 在样品中检测到特异性结合瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白或其片段的自身抗体的水平；和
(c) 将这种抗体的水平与适宜的对照，例如，天然的或非瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白的水平比较。

[0100] 该方法包括采用至少一种瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白或其片段检测抗蛋白的自身抗体。有本领域普通技术人员已知的使用蛋白检测样品中抗体的各种检测形式。参见，例如，Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988。作为非限制性实例，可采用公知的方法或试验进行抗瓜氨酸化的 14-3-3 的自身抗体的检测，例如，免疫沉淀法，ELISA，蛋白印迹分析，免疫组织化学，免疫荧光，“三明治”免疫测定，免疫放射测定法，凝胶扩散沉淀反应，免疫扩散试验，原位免疫测定，沉淀反应，凝集试验，补体结合试验，蛋白 A 检测，免疫电泳分析，荧光激活细胞分选 (FACS) 分析，放射免疫测定，试纸检验，床旁即时检测 (point of care test) 等。普通技术人员将认识到这些方法也可用于测量生物样品中抗瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白的自身抗体、或含瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白的免疫复合物的水平。

[0101] 在一些实施方案中，使用自动化的检测试验。自动化免疫测定的方法包括描述于美国专利号 5, 885, 530、4, 981, 785、6, 159, 750、和 5, 358, 691 中的那些，各自在本文中引入作为参考。在一些实施方案中，结果的分析 and 说明也自动化。例如，在一些实施方案中，使用了基于一系列对应于关节炎病症的蛋白质（包括瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白）的存在或不存在产生预后的软件。

[0102] 在一实施方案中，该试验涉及在固体支持物上固定化的至少一种瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白或其片段结合和捕获特异性结合来自样品剩余物的瓜氨酸化 14-3-3 蛋白的自身抗体的用途。然后可采用含有报道基和特异性结合抗体 / 蛋白质络合物的检测试剂检测结合的自身抗体。这种检测试剂可包括，例如，特异性结合自身抗体如抗人抗体的结合剂。

[0103] 固体支持物可以是本领域普通技术人员已知的任何材料。例如，固体支持物微量滴定板内的试孔或硝化纤维或其它适宜的膜。备选地，支持物可以是珠粒或盘，如玻璃、纤维玻璃、胶乳或塑性材料如聚苯乙烯或聚氯乙烯。支持物也可以是磁性颗粒或光纤传感器，如，例如，美国专利号 5, 359, 681 中所公开的那些。瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白或其片段可采用本领域技术人员已知的各种技术在固体支持物上固定化，其在专利和科学文献中有详细的描述。在本发明的上下文中，术语“固定化”指非共价缔合（如吸附）、和共价连接（其可以是在抗体和支持物上的官能团之间的直接键或可以通过交联剂的方式的键）。优选通过吸附于微量滴定板内的孔或吸附于膜进行固定化。在这种情况下，吸附可通过使抗体在适宜的缓冲液中与固体支持物接触适当的时间来实现。接触时间随温度而变化，但典型地在约 1 小时至约 1 天之间。在一实施方案中，用抗生蛋白链菌素包覆的微量滴定板用于连接生物素化的瓜氨酸化 14-3-3 蛋白或其片段。

[0104] 瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白或其片段与固体支持物的共价连接通常可通过将支持物与双功能试剂进行第一反应来实现，其中双功能试剂将既与支持物起反应又与瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白或其片段起反应。然后可采用非竞争性“三明治”技术检测所俘获的自身抗体，其中标记的自身抗体的配体暴露于洗过的固相。备选地，竞争的形式依赖于先前标记的抗体引入样品使得标记的和未标记的形式竞争结合固相。这种试验技术是公知的且在专利和科学文献中均有充分描述。参见，例如，美国专利号 3, 791, 932 ; 3, 817, 837 ; 3, 839, 153 ;

3, 850, 752 ;3, 850, 578 ;3, 853, 987 ;3, 867, 517 ;3, 879, 262 ;3, 901, 654 ;3, 935, 074 ;3, 984, 533 ;3, 996, 345 ;4, 034, 074 ;和 4, 098, 876。酶联免疫吸附测定 (ELISA) 方法详细描述于美国专利号 3, 791, 932 ;3, 839, 153 ;3, 850, 752 ;3, 879, 262 ;和 4, 034, 074。ELISA 试验能检测极低滴度的自身抗体。

[0105] 自身抗体也可通过固相放射免疫测定法 (RIA) 检测。在竞争结合固定化配体的放射性标记的抗体的存在下将固相暴露于血清样品。在该试验中, 与固相结合放射性标记的量与最初存在于血清样品之中的自身抗体的量逆相关。在分离固相后, 通过洗涤除去非特异性地结合的放射性标记, 并测定与固相结合的放射性标记的量。所结合的放射性标记的量, 转而, 与最初存在于样品中的自身抗体的量相关。

[0106] 在一实施方案中, 试验以溢流法 (flow-through) 或试纸检验形式进行, 其中瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白或其片段在膜, 如硝化纤维, 上固定化。在溢流 (flow-through) 试验中, 当样品接触膜时样品内的抗瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白的自身抗体与固定化的瓜氨酸化 14-3-3 蛋白或其片段结合。然后当含有第二结合剂的溶液接触膜时另一标记的结合剂与免疫复合物结合。然后所结合的第二结合剂的检测可按照上面的描述进行。在试纸检验形式中, 瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白或其片段结合的膜的一端浸于含有样品的溶液中。样品沿着膜通过含有第二结合剂的区域迁移, 例如, 至自身抗体, 和迁移至固定化的瓜氨酸化 14-3-3 蛋白或其片段的区域。在固定化的瓜氨酸化 14-3-3 蛋白或其片段的区域上的第二结合剂的浓度指示关节炎病症的存在、患者的预后。典型地, 在那个位点上的第二结合剂的浓度产生可用视觉读出的图案, 如线。这种图案不存在表明阴性结果。通常, 在上述形式中, 当生物样品含有足以在该试验中产生阳性信号的自身抗体水平时, 对在膜上固定化的粘剂进行选择以产生视觉上可辨别的图案。优选的用于这种试验的结合剂为瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白及其片段。这种试验可典型地用极少量的生物样品和在医疗点 (at the point of care) 进行, 其也可定量。

[0107] 除检测样品中自身抗体的存在之外, 许多方法都可用于定量测量自身抗体的水平。在一些方法中, 抗原与自身抗体在液相中起反应, 且自身抗体通过免疫沉淀技术定量测量。例如, 瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白或其片段 (即, 全长异构体或抗原性的片段) 可进行可检测标记 (例如, 用同位素或酶)。多肽可在合成 (例如, 通过将 35S- 蛋氨酸添加至体外翻译系统或细胞的表达系统中) 过程中或在合成之后标记。可检测的抗原直接加入到液体生物样品 (例如, 血清) 中形成免疫复合物。免疫复合物可用聚乙二醇沉淀。免疫复合物也可用第二抗体 (例如, 山羊抗人免疫球蛋白) 或与固体支持物 (例如, 琼脂或琼脂糖珠) 结合的其他种类的结合分子 (例如, A 蛋白或 G 蛋白) 进行分离。在与液体样品分开并检验可检测标记 (例如, 放射性) 之后将免疫沉淀物洗涤几次。因此任何存在于样品之中的自身抗体都可进行检测和定量。任选地, 也可添加未标记的多肽与标记的多肽竞争与自身抗体结合。

[0108] 本发明的诊断方法还涉及在受试者中检测瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白和自身抗体之间形成的循环免疫复合物。上述方法能容易改良以检测这种免疫复合物。例如, 可将固定化的结合分子 (例如, 与珠粒结合的 A 蛋白或 G 蛋白) 加入到液体生物样品中。在从液相中分离之后, 可用 SDS-PAGE 对结合分子俘获的免疫复合物进行分析和用各种抗瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白的抗体探测。还可对俘获的抗原进行直接的氨基酸序列分析。因

此可显示免疫复合物的同一性 (Identity)。许多试验以常规方式实施以检测受试者中的循环免疫复合物,例如,按照 Tomimori-Yamashita 等, *Lepr Rev*, 70(3):261-71, 1999(antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay); Krapf 等, *J Clin Lab Immunol*, 21(4):183-7, 1986(fluorescence linked immunosorbent assay); Kazeem 等, *East Afr Med J*, 67(6):396-403, 1990(laser immunonephelometry); 和 Rodrick 等, *J Clin Lab Immunol*, 7(3):193-8, 1982(Protein A-glass fiber filter assay, PA-GFF, and polyethylene glycol solubilization assay) 中的描述。

[0109] 为了改善临床敏感性,可将多种标志物在给定的样品中试验。尤其,可将一种或多种关节炎、或预后指标等的其它标志物与抗瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白的自身抗体组合进行试验。这些其它标志物可以是蛋白质或核酸。在优选的实施方案中,一项或多项其它标志物为 MMP 蛋白质或核酸或其它因子,它们通常用作关节炎的指标,例如,抗 CCP, 抗 RF, CRP, SAA, IL-6, SI00, 骨桥蛋白, RF, MMP-1, MMP-3, 透明质酸, sCD14, 血管生成标志物和骨制品, 软骨或滑膜代谢(例如, CTX-I 和 CTX-II) 等。基于参比序列分离和试验核酸的方法是本领域公知的,它们是在患者样品中检测目的蛋白的方法。

[0110] 普通技术人员将认识到可采用这些公知的试验中每种试验检测生物样品中的循环免疫复合物用于本发明的方法中。类似地,可用在本发明中公开的抗瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白(及其片段)的抗体进行这些公知的试验中的每种试验以监测生物样品中 14-3-3 蛋白的瓜氨酸化状态,例如,在本文中描述的诊断、预测和治疗诊断学中,作为临床检验过程的一部分,例如,测定 14-3-3 蛋白中有多少被瓜氨酸化和/或哪些 14-3-3 蛋白和 14-3-3 蛋白中多少位点被瓜氨酸化。普通技术人员将容易认识到如何使各种试验形式、诊断、预测和治疗诊断学试验、和试剂盒适合用本文中描述的抗瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白的抗体测定生物样品中 14-3-3 蛋白的瓜氨酸化状态。

[0111] 组合试验可同时或依次进行。标志物的选择可基于常规的试验以确定产生最佳灵敏度的组合。

[0112] 在一实施方案中,本发明提供诊断关节炎病症的方法。通常可基于患者的滑膜液、滑膜关节、血液、血浆、或血清中抗瓜氨酸化的 14-3-3 的自身抗体的存在在患者中检测关节炎病症。换言之,抗瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白的自身抗体可用作指示关节炎病症的标志物。

[0113] 在优选的实施方案中,本发明提供诊断风湿性关节炎的方法。通常可基于患者的滑膜液、滑膜关节、血液、血浆、或血清中抗瓜氨酸化的 14-3-3 的自身抗体的存在,在患者中检测风湿性关节炎。换言之,抗瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白的自身抗体可用作指示风湿性关节炎的标志物。在特别优选的实施方案中,瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白为 14-3-3 η 。

[0114] 此外,抗瓜氨酸化的 14-3-3 的自身抗体的存在、或抗瓜氨酸化的 14-3-3 的自身抗体的相对水平,通过使用瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白或其片段测定,可以是在它发展成衰老的形式之前早期阶段的风湿性关节炎的预后指标。早期的预后或诊断的优点是较早地实施治疗方案。

[0115] 为了确定受试者中的风湿性关节炎存在或不存在,通常可将来自受试者生物样品中的抗瓜氨酸化 14-3-3 的自身抗体、或含瓜氨酸化 14-3-3 的免疫复合物的水平与正常对照相应的自身抗体/免疫复合物的水平比较。在一优选的实施方案中,正常的对照

是根据来自未患风湿性关节炎的患者样品中抗瓜氨酸化 14-3-3 的自身抗体、或含瓜氨酸化 14-3-3 的免疫复合物的平均水平建立的。在另一实施方案中,正常的对照值可采用 Receiver Operator Curve 确定,例如参见 Sackett 等, *Clinical Epidemiology: A Basic Science for Clinical Medicine*, Little Brown and Co., 1985, 第 106-7 页的方法。简而言之,在该实施方案中,对照值可根据真阳性率(即,敏感性)和假阳性率(100% - 特异性)的成对图来确定,其中真阳性率和假阳性率与用于诊断试验结果的各个可能的截止值相对应。与左上角最近的图上的对照值(即,围最大面积的值)提供最准确的值,且产生高于通过此方法确定的值的信号的样品可被认为是阳性。备选地,对照值可沿着图左移,以将假阳性率减至最小,或右移,以将假阴性率减至最小。通常,产生高于通过此方法确定的对照值的信号的样品被认为是对关节炎是阳性。

[0116] 另一方面,本发明提供区分关节炎亚型的方法。在一实施方案中,该方法涉及测定抗至少一种瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白或其片段的自身抗体、或含至少一种瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白或其片段的免疫复合物的水平。在优选的实施方案中,将患者中抗瓜氨酸化的 14-3-3 的自身抗体 / 免疫复合物的水平与来自受试者的样品比较,其中受试者的关节炎亚型是已知的和 / 或先前已确定。

[0117] 另一方面,本发明提供测定患者对针对风湿性关节炎的治疗的反应潜能的方法。在一实施方案中,该方法包括测定患者样品中抗至少一种瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白或其片段的自身抗体、或含至少一种瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白或其片段的免疫复合物的水平。在优选的实施方案中,将患者样品中抗瓜氨酸化的 14-3-3 的自身抗体 / 含瓜氨酸化的 14-3-3 的免疫复合物的水平与来自受试者的样品比较,其中受试者对治疗的反应能力是已知的。将第一患者样品中抗瓜氨酸化的 14-3-3 的自身抗体 / 含瓜氨酸化的 14-3-3 的免疫复合物与来自非炎症受试者的样品和 / 或来自另一炎症患者的样品相比的相对高水平可表明第一患者是对公知的治疗(例如,改善疾病的抗风湿性药 (DMARD) 治疗如抗 TNF、甲氨蝶呤、米诺环素、羟氯喹、柳氮磺胺吡啶、硫唑嘌呤 (azathioprine)、抗 IL-1、抗 IL-6r 等) 优选的候选人。反之,第一患者样品中抗瓜氨酸化的 14-3-3 的自身抗体 / 免疫复合物与来自另一炎症患者的样品相比较的相对低水平可表明第一患者不是对公知的治疗优选的候选人,尤其是如果该水平更接近非炎症受试者样品的水平。

[0118] 各种类型的关节炎的治疗方案是本领域已知的。例如,诊断患风湿性关节炎的患者可在最初开以非甾体抗炎药 (NSAIDs) 处方,以减轻不适和减少炎症。其它治疗方案可包括,例如,甾体抗炎药 (SAIDs 例如皮质醇、强的松)、环加氧酶 2 特异性抑制剂 (CSIs)、糖皮质激素、和 / 或标准的改善疾病的抗风湿药 (DMARDs) 如,例如,抗 TNF- α 中和剂、免疫抑制药(例如,环孢素、硫唑嘌呤、环磷酰胺)、抗生素、抗疟药和细胞毒类药(例如,甲氨蝶呤、柳氮磺吡啶、来氟米特)。治疗方案也可有利地包括直接靶向瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白的那些,参见,例如, PCT/CA2008/002154。关于特定药物的剂量或实例的详情将是本领域技术人员已知的,可见于,例如 Harrison's Principles of Internal Medicine 第 15 版, BRAUNWALD 等编者 McGraw-Hill or "The Pharmacological basis of therapeutics", 第 10 版, 5HARDMAN HG., LIMBIRD LE. 编者 McGraw-Hill, New York, 和见于 "Clinical Oncology", 第 3 版, Churchill Livingstone/Elsevier Press, 2004. ABELOFF, MD. 编者。

[0119] 一方面,本发明提供监测风湿性关节炎治疗的方法。在一实施方案中,该方法包括

测定患者样品中抗至少一种瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白或其片段的自身抗体、或含至少一种瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白或其片段的免疫复合物的水平和监测接受治疗的患者中抗瓜氨酸化 14-3-3 的自身抗体 / 含瓜氨酸化 14-3-3 的免疫复合物的水平。

[0120] 抗瓜氨酸化的 14-3-3 的自身抗体 / 含瓜氨酸化的 14-3-3 的免疫复合物的存在或相对水平可能与其它蛋白的存在或相对水平相关,其中所述的其它蛋白与患者的关节炎病症有关。公知的与关节炎病症有关的蛋白非限制性实例包括炎性细胞因子,如肿瘤坏死因子,和基质金属蛋白酶 (MMPs),如 MMP-1 或 MMP-3 等。至少 25 不同的 MMPs 已经被鉴定。患者样品中抗瓜氨酸化的 14-3-3 的自身抗体的检测与至少一种炎性细胞因子和 / 或 MMP 的检测结合可用于诊断关节炎。另外,患者样品中抗瓜氨酸化的 14-3-3 的自身抗体 / 免疫复合物的存在或相对水平与至少一种 MMP 和 / 或至少一种炎性细胞因子结合可用作在关节炎发展成衰老形式之前早期阶段关节炎的预后指标。

[0121] 本申请中还描述了评价关节炎病症、尤其是风湿性关节炎的试剂盒。此类试剂盒典型地包含对进行诊断、预测和 / 或治疗诊断学试验是必要的两种或两种以上的组分。组分可以是化合物、试剂、容器、说明书和 / 或装置。例如,试剂盒内的容器可含有一种或多种瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白或其片段。此类试剂盒也可含有如上所述的检测试剂,其含有适合于直接或间接检测结合的抗体的报道基。

[0122] 因此,本申请中描述了检测患者样品中抗瓜氨酸化的 14-3-3 的自身抗体 / 含瓜氨酸化的 14-3-3 的免疫复合物和任选的其它标志物 (例如, MMPs) 的存在的试剂盒,该试剂盒对得到适于诊断或区分各种关节炎病症、更优选风湿性关节炎的诊断或预测结果是有用的。其中瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白和 / 或自身抗体的存在可能是暗示的其它适应症还包括,例如,心血管和 / 或神经变性功能障碍。试剂盒可包含至少一种瓜氨酸化的 14-3-3 蛋白或其片段,其可任选地例如用放射性标记、发光标记、荧光标记、酶等进行可检测标记。可检测标记蛋白质的方法是本领域公知的。这种试剂盒可进一步包含对其它关节炎的标志物特异性的检测试剂,例如,抗 CCP,抗 RF,CRP,SAA,IL-6,S100,骨桥蛋白,RF,MMP-I,MMP-3,透明质酸,sCD14,血管生成标志物和骨制品,软骨或滑膜代谢 (例如,CTX-I 和 CTX-II) 等。试剂盒可进一步包含对检测免疫抗瓜氨酸化的 14-3-3 的自身抗体是必要的第二试剂,如标记的第二抗体 (例如抗人抗体)、生色或荧光试剂、聚合剂等。使用诊断或预测目的的试剂盒,包括用于定量和 / 或评价在特定疾病状态的范围内此种自身抗体的水平的适宜参比标准,还可以印刷的形式有利地提供和 / 或记录在适宜的介质上。

实施例

[0123] 当 14-3-3 η 释放到其中存在 PAD 酶的 RA 的滑膜间隙中时,我们研究是否 14-3-3 η 为可用于诊断 RA 的瓜氨酸化靶标,如果得以肯定,是否瓜氨酸化的 14-3-3 η 或片段能用于鉴定抗 CCP 阴性的 RA 患者。14-3-3 η 上瓜氨酸化位点的鉴定包含三个 (3) 阶段过程 1) 由电脑模拟预测,2) 体外测定和 3) 用临床样本验证或鉴定。

[0124] 实施例 1:瓜氨酸化位点的电脑模拟鉴定

[0125] 基于以下几点鉴定代表推定的瓜氨酸化位点的精氨酸 (R) 部分:1) 与天然的 3D 蛋白质构型有关的“R”的位置;2) “R”对 PAD 酶的易接近性和 3) 位于“R”侧面的序列。鉴定了对应于“R”的五个 (5) 推定的瓜氨酸化位点:4,12,19,61 和 227。

[0126] 实施例 2 :瓜氨酸化位点的体外测定

[0127] 进行体外瓜氨酸化,藉此将重组人 14-3-3 η 与重组人 PAD2 或 PAD4 二者之一共温育,因为已有报道这两种同工型是两种在 RA 中最相关的。

[0128] 简而言之, PAD2(MQ16. 201) 和 PAD4(MQ16. 203) 得自 ModiQuest Research。将酶在 100 μ l 的 PAD 缓冲液 (0. 1M Tris HCl, pH7. 4, 含 5mM DTT 的 10mM CaCl₂, 1mM PMSF, 10 μ g/ml 抑酶肽, 10 μ g/ml 亮肽素和 10 μ g/ml 胃酶抑素) 中进一步稀释, 使 PAD2 的原液浓度为 80mU/ μ l 和 PAD4 的原液浓度为 82. 5mU/ μ l。

[0129] 将十个 (10) μ g 的全长重组 14-3-3 η 与 PAD2(8mU) 或 PAD4(8. 2mU) 二者之一温育。将反应混合物用 PAD 缓冲液调至 100 μ l 并于 37°C 温育 2h。温育之后, 通过加入 25 μ l 的 4X Lammelli 缓冲液终止反应。蛋白质通过 SDS-PAGE 拆分 (resolved) 切除对应于 14-3-3 η 的带。将切除的带自凝胶洗脱, 经胰蛋白酶处理, 然后按照他人描述的方法采用傅里叶变换质谱进行分析以鉴定脱亚氨酸位点。结果得到 PAD2 有 4 个推定的瓜氨酸化位点和 PAD4 有 3 个推定的瓜氨酸化位点, 结果描述于表 4 中。

[0130] 表 4 :体外测定的 14-3-3 η 的瓜氨酸化位点

	位点	序列	无 PAD	PAD2	PAD4
	4 位	mgdReql1q	非	是	是
[0131]	19 位	qaeRyddma	非	是	是
	42 位	dRnllsvayk	非	是	是
	61 位	sswRvissie	非	是	非

[0132] 实施例 3 :采用临床样品检测针对瓜氨酸化的 14-3-3 η 的抗体

[0133] 按照实施例 2 中的描述进行体外瓜氨酸化, 并将 96 孔板涂覆瓜氨酸化形式或非瓜氨酸化形式的重组 14-3-3 η 中的任何一种。采用抗人抗体对抗 CCP 阳性和阴性患者中的针对天然的或瓜氨酸化形式的 14-3-3 η 中任何一种的人自身抗体反应进行定量。

[0134] 为了评价是否这些新自身抗体在抗 CCP 阴性的 RA 患者中可检测出和与健康的对照比较有差别地表达, 在 30 个抗 CCP 阴性的 RA 患者和 30 个已证实的抗 CCP 阴性的健康对照中测量对非瓜氨酸化的和瓜氨酸化的 14-3-3 η 两者的反应性。评价用单位 (U) 表示的平均和中值自身抗体水平并采用相应的 t 检验和 Mann-Whitney U- 检验测定组内和组间差别。生成 ROC 曲线下面积 (AUC) 用于诊断应用估算和测定各种抗瓜氨酸化的 14-3-3 η 切分点 (cut-offs) 的似然比 (LR)。

[0135] 附图 1 显示, 与非瓜氨酸化的 14-3-3 η 比较, 在 3 个抗 CCP 阳性 RA 患者中 2 个患者观察到高达 25X 高的对瓜氨酸化 14-3-3 η 的反应性, 首次揭示了针对 RA 中瓜氨酸化形式的 14-3-3 η 的自身抗体的表达。在抗 CCP 阴性的 RA 组内, 与天然的 14-3-3 η 比较观察到显著地更高的针对瓜氨酸化的 14-3-3 η 的反应性 (1943U 对 395U, $p = 0. 01$)。在健康组内发现反应性没有显著性差异。图 2 显示与健康对照的 155U(122U) 和 100U(45-564U) 比较抗 CCP 阴性的 RA 患者中抗瓜氨酸化的 -14-3-3 η 抗体表达 (平均值 (SD) 和中值 (最小值 - 最大值) 为 1943U(3045U) 和 306U(68-8982U)) 显著更高, $p < 0. 002$ 。与健康对照比较抗 CCP 阴性 RA 患者中抗瓜氨酸化的 14-3-3 η 抗体微分表达式的相应的 ROC AUC 为 0. 79(95% CI 0. 68-0. 91 ; $p < 0. 0001$)。在 320U 的切分点上, 特异性和敏感性为 90% 和

50%，在 439U 上输送 LR 阳性 5 增加至 14，相应的特异性为 97%和敏感性为 47%。

[0136]

	健康 N=58	CCP-ve RA 患者 N=30
平均值 (SD)	155U (122U)	1943U (3045U)
中值 (最小值-最大值)	100U (45-564U)	306U (68-8982U)
AUC	0.79	
95% CI	0.68-0.91	

[0137]

P 值	<0.0001
切分点	439U
LR	14
特异性	97%
敏感性	47%

[0138] 实施例 4:采用临床样品鉴定瓜氨酸化位点

[0139] 将来自 14-3-3 η 蛋白阳性的临床样品的 14-3-3 η 进行免疫沉淀,将免疫沉淀的蛋白质通过 SDS-PAGE 拆分并切除对应于 14-3-3 η 的带。将切除的带自凝胶洗脱,胰蛋白酶处理,然后运用傅里叶变换质谱进行分析以鉴定蛋白质上的脱亚氨化位点。

[0140] 选出临床上相关的 14-3-3 η 瓜氨酸化位点

[0141] 为了鉴定最相关的 14-3-3 η 位点,使用具有精氨酸化 (arginylated) 或瓜氨酸化部分的肽筛选和选出 14-3-3 η 上最相关的瓜氨酸化位点,其既可用于区分两种非瓜氨酸化形式的蛋白质又可用于区分健康个体或感染关节炎性皮疹的那些个体。

[0142] 采用两种不同的方法,通过 MRM/LC-MS 和 ELISA 测量,比较临床样品中 14-3-3 η 的表达水平,显示表达上的差别可归因于瓜氨酸化,因为精氨酸脱亚胺基产生瓜氨酸导致错裂解 (mis-cleavage),这是由于当蛋白质瓜氨酸化时胰蛋白酶没有进行切割,参见表 5。特别地在样品 1-6 中高水平的 14-3-3 η 蛋白可通过 ELISA 检测,但与样品 7-12 相比较当通过质谱测量时似乎具有可忽略不计的水平。用质谱对样品进行胰蛋白酶处理并通过测量作为特定肽质量的结果的峰强度对 14-3-3 η 水平定量,其为“AV TELNEPLSNED”的肽,位于靠近本文中已经描述为瓜氨酸化位点的 Arg-42。将通过 ELISA 检验样品 1-12 中对 Arg-42 的瓜氨酸化特异性抗体以证实 Arg-42 为临床上相关的瓜氨酸化位点。

[0143] 表 5

Sample ID	Mass Spec	ELISA
1	0	297.8
2	0	23.85
3	0	33.11
4	139	1078.1
5	0	65.85
6	0	18.7
7	5679	64.47
8	1283	29.07
9	9791	7.9
10	14278	47.7
11	1602	3.2
12	2451	31.3

[0144]

[0145] 实施例 5 :诊断、预后、和 / 或治疗监测

[0146] 临床样品中抗瓜氨酸化的 14-3-3 η 蛋白的自身抗体的检测

[0147] 附图 1 中呈现的数据证明对瓜氨酸化形式的全长 14-3-3 η 的自身抗体的检测在鉴定抗 CCP 阴性的患者方面是有用的,因此补充了诊断血清反应阴性的 RA 患者中的抗 CCP 试验。附图 2 中呈现的 RA 对健康个体中的微分表达式证明在 RA 患者中抗瓜氨酸化的 14-3-3 η 自身抗体较高且很可能对 RA 是高特异性的。瓜氨酸化的 14-3-3 η 片段,各自隐藏不同的瓜氨酸化位点,也将用于检测对每个不同位点的自身抗体。这种对位点特异性自身抗体的检测很可能与全长的瓜氨酸化 14-3-3 η 蛋白对 RA 特异性一样或特异性更强。

[0148] 临床样品中 14-3-3 蛋白的瓜氨酸化状态的测定

[0149] 如果患者测量对抗瓜氨酸化的 14-3-3 η 蛋白的自身抗体呈阳性,那么采用抗全长的瓜氨酸化 14-3-3 η 蛋白或其瓜氨酸化的片段二者之一或两者升高的单克隆抗体评价蛋白的瓜氨酸化状态以评价两个参数:

[0150] 1) 多少蛋白被瓜氨酸化?

[0151] 2) 在蛋白上的什么位点被瓜氨酸化和 / 或多少位点被瓜氨酸化?

[0152] 独立地检验瓜氨酸化的 14-3-3 η 自身抗体的滴度和相对于 14-3-3 η 血清蛋白水平以及蛋白的瓜氨酸化状态进行检验。下面的表 5 定义可能的结果。

[0153] 表 5

[0154]

抗瓜氨酸化的 14-3-3 η 自身抗体水平	14-3-3 η 蛋白水平	预后
高	高	差
	低	良好
低	高	差
	低	良好或 14-3-3 η 对疾病过程不是主要的

[0155] 对于治疗反应和监测,高水平的抗瓜氨酸化的 14-3-3 η 自身抗体可能暗示应用

了超越其它治疗的某些治疗。另外,可以预见较高%的蛋白被瓜氨酸化与更显著的疾病负荷量有关。也可以预见不同的瓜氨酸化位点可赋予蛋白不同的生物学活性因此与不同的临床结果有联系。然后此信息可用于帮助确定对于特定的患者和对于监测治疗反应将是最好的治疗。

[0156] 例如,高滴度和 / 或高瓜氨酸化状态将对使用 B 细胞抑制剂的治疗如利妥昔单抗或直接靶向肽基精氨酸的抑制剂是有用的。通过测量前处理和后处理水平的监测结果也可能是有用的。例如如果水平降低,则可能是收到药物的益处即对治疗有反应,而如果水平保持不变或升高,则治疗剂量可能需要提高或治疗的类别可能需要转变。

[0157] 本申请中涉及的所有专利和专利公开在此引入作为参考。

[0158] 本领域的技术人员阅读以上说明时将意识到某些改变和改良。应当理解为了简明和易读,所有这种改变和改良在本文中被删除,但仍适宜于下列权利要求的范围内。

[0001]

序列表

<110> Augurex Life Sciences Corp.
 Marotta, Anthony
 <120> 衍生自瓜氨酸化的14-3-3的抗原及其在风湿性关节炎诊断中的用途
 <130> 177073/PCT
 <150> US61/550,046
 <151> 2011-11-10
 <160> 22
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 246
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 1
 Met Thr Met Asp Lys Ser Glu Leu Val Gln Lys Ala Lys Leu Ala Glu
 1 5 10 15
 Gln Ala Glu Arg Tyr Asp Asp Met Ala Ala Ala Met Lys Ala Val Thr
 20 25 30
 Glu Gln Gly His Glu Leu Ser Asn Glu Glu Arg Asn Leu Leu Ser Val
 35 40 45
 Ala Tyr Lys Asn Val Val Gly Ala Arg Arg Ser Ser Trp Arg Val Ile
 50 55 60
 Ser Ser Ile Glu Gln Lys Thr Glu Arg Asn Glu Lys Lys Gln Gln Met
 65 70 75 80
 Gly Lys Glu Tyr Arg Glu Lys Ile Glu Ala Glu Leu Gln Asp Ile Cys
 85 90 95
 Asn Asp Val Leu Glu Leu Leu Asp Lys Tyr Leu Ile Pro Asn Ala Thr
 100 105 110
 Gln Pro Glu Ser Lys Val Phe Tyr Leu Lys Met Lys Gly Asp Tyr Phe
 115 120 125
 Arg Tyr Leu Ser Glu Val Ala Ser Gly Asp Asn Lys Gln Thr Thr Val
 130 135 140
 Ser Asn Ser Gln Gln Ala Tyr Gln Glu Ala Phe Glu Ile Ser Lys Lys
 145 150 155 160
 Glu Met Gln Pro Thr His Pro Ile Arg Leu Gly Leu Ala Leu Asn Phe
 165 170 175
 Ser Val Phe Tyr Tyr Glu Ile Leu Asn Ser Pro Glu Lys Ala Cys Ser
 180 185 190
 Leu Ala Lys Thr Ala Phe Asp Glu Ala Ile Ala Glu Leu Asp Thr Leu
 195 200 205
 Asn Glu Glu Ser Tyr Lys Asp Ser Thr Leu Ile Met Gln Leu Leu Arg

[0002]

Glu Gly Gly Glu Asn
 245

<210> 3
 <211> 255
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 3

Met Asp Asp Arg Glu Asp Leu Val Tyr Gln Ala Lys Leu Ala Glu Gln
 1 5 10 15

Ala Glu Arg Tyr Asp Glu Met Val Glu Ser Met Lys Lys Val Ala Gly
 20 25 30

Met Asp Val Glu Leu Thr Val Glu Glu Arg Asn Leu Leu Ser Val Ala
 35 40 45

Tyr Lys Asn Val Ile Gly Ala Arg Arg Ala Ser Trp Arg Ile Ile Ser
 50 55 60

Ser Ile Glu Gln Lys Glu Glu Asn Lys Gly Gly Glu Asp Lys Leu Lys
 65 70 75 80

Met Ile Arg Glu Tyr Arg Gln Met Val Glu Thr Glu Leu Lys Leu Ile
 85 90 95

Cys Cys Asp Ile Leu Asp Val Leu Asp Lys His Leu Ile Pro Ala Ala
 100 105 110

Asn Thr Gly Glu Ser Lys Val Phe Tyr Tyr Lys Met Lys Gly Asp Tyr
 115 120 125

His Arg Tyr Leu Ala Glu Phe Ala Thr Gly Asn Asp Arg Lys Glu Ala
 130 135 140

Ala Glu Asn Ser Leu Val Ala Tyr Lys Ala Ala Ser Asp Ile Ala Met
 145 150 155 160

Thr Glu Leu Pro Pro Thr His Pro Ile Arg Leu Gly Leu Ala Leu Asn
 165 170 175

Phe Ser Val Phe Tyr Tyr Glu Ile Leu Asn Ser Pro Asp Arg Ala Cys
 180 185 190

Arg Leu Ala Lys Ala Ala Phe Asp Asp Ala Ile Ala Glu Leu Asp Thr
 195 200 205

Leu Ser Glu Glu Ser Tyr Lys Asp Ser Thr Leu Ile Met Gln Leu Leu
 210 215 220

Arg Asp Asn Leu Thr Leu Trp Thr Ser Asp Met Gln Gly Asp Gly Glu
 225 230 235 240

Glu Gln Asn Lys Glu Ala Leu Gln Asp Val Glu Asp Glu Asn Gln
 245 250 255

[0004]

<210> 4
 <211> 247
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 4
 Met Val Asp Arg Glu Gln Leu Val Gln Lys Ala Arg Leu Ala Glu Gln
 1 5 10 15
 Ala Glu Arg Tyr Asp Asp Met Ala Ala Ala Met Lys Asn Val Thr Glu
 20 25 30
 Leu Asn Glu Pro Leu Ser Asn Glu Glu Arg Asn Leu Leu Ser Val Ala
 35 40 45
 Tyr Lys Asn Val Val Gly Ala Arg Arg Ser Ser Trp Arg Val Ile Ser
 50 55 60
 Ser Ile Glu Gln Lys Thr Ser Ala Asp Gly Asn Glu Lys Lys Ile Glu
 65 70 75 80
 Met Val Arg Ala Tyr Arg Glu Lys Ile Glu Lys Glu Leu Glu Ala Val
 85 90 95
 Cys Gln Asp Val Leu Ser Leu Leu Asp Asn Tyr Leu Ile Lys Asn Cys
 100 105 110
 Ser Glu Thr Gln Tyr Glu Ser Lys Val Phe Tyr Leu Lys Met Lys Gly
 115 120 125
 Asp Tyr Tyr Arg Tyr Leu Ala Glu Val Ala Thr Gly Glu Lys Arg Ala
 130 135 140
 Thr Val Val Glu Ser Ser Glu Lys Ala Tyr Ser Glu Ala His Glu Ile
 145 150 155 160
 Ser Lys Glu His Met Gln Pro Thr His Pro Ile Arg Leu Gly Leu Ala
 165 170 175
 Leu Asn Tyr Ser Val Phe Tyr Tyr Glu Ile Gln Asn Ala Pro Glu Gln
 180 185 190
 Ala Cys His Leu Ala Lys Thr Ala Phe Asp Asp Ala Ile Ala Glu Leu
 195 200 205
 Asp Thr Leu Asn Glu Asp Ser Tyr Lys Asp Ser Thr Leu Ile Met Gln
 210 215 220
 Leu Leu Arg Asp Asn Leu Thr Leu Trp Thr Ser Asp Gln Gln Asp Asp
 225 230 235 240
 Asp Gly Gly Glu Gly Asn Asn
 245
 <210> 5
 <211> 246
 <212> PRT
 <213> 智人

[0005]

<400> 5
 Met Gly Asp Arg Glu Gln Leu Leu Gln Arg Ala Arg Leu Ala Glu Gln
 1 5 10 15
 Ala Glu Arg Tyr Asp Asp Met Ala Ser Ala Met Lys Ala Val Thr Glu
 20 25 30
 Leu Asn Glu Pro Leu Ser Asn Glu Asp Arg Asn Leu Leu Ser Val Ala
 35 40 45
 Tyr Lys Asn Val Val Gly Ala Arg Arg Ser Ser Trp Arg Val Ile Ser
 50 55 60
 Ser Ile Glu Gln Lys Thr Met Ala Asp Gly Asn Glu Lys Lys Leu Glu
 65 70 75 80
 Lys Val Lys Ala Tyr Arg Glu Lys Ile Glu Lys Glu Leu Glu Thr Val
 85 90 95
 Cys Asn Asp Val Leu Ser Leu Leu Asp Lys Phe Leu Ile Lys Asn Cys
 100 105 110
 Asn Asp Phe Gln Tyr Glu Ser Lys Val Phe Tyr Leu Lys Met Lys Gly
 115 120 125
 Asp Tyr Tyr Arg Tyr Leu Ala Glu Val Ala Ser Gly Glu Lys Lys Asn
 130 135 140
 Ser Val Val Glu Ala Ser Glu Ala Ala Tyr Lys Glu Ala Phe Glu Ile
 145 150 155 160
 Ser Lys Glu Gln Met Gln Pro Thr His Pro Ile Arg Leu Gly Leu Ala
 165 170 175
 Leu Asn Phe Ser Val Phe Tyr Tyr Glu Ile Gln Asn Ala Pro Glu Gln
 180 185 190
 Ala Cys Leu Leu Ala Lys Gln Ala Phe Asp Asp Ala Ile Ala Glu Leu
 195 200 205
 Asp Thr Leu Asn Glu Asp Ser Tyr Lys Asp Ser Thr Leu Ile Met Gln
 210 215 220
 Leu Leu Arg Asp Asn Leu Thr Leu Trp Thr Ser Asp Gln Gln Asp Glu
 225 230 235 240
 Glu Ala Gly Glu Gly Asn
 245
 <210> 6
 <211> 245
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 6
 Met Glu Lys Thr Glu Leu Ile Gln Lys Ala Lys Leu Ala Glu Gln Ala
 1 5 10 15

[0006]

Glu Arg Tyr Asp Asp Met Ala Thr Cys Met Lys Ala Val Thr Glu Gln
 20 25 30
 Gly Ala Glu Leu Ser Asn Glu Glu Arg Asn Leu Leu Ser Val Ala Tyr
 35 40 45
 Lys Asn Val Val Gly Gly Arg Arg Ser Ala Trp Arg Val Ile Ser Ser
 50 55 60
 Ile Glu Gln Lys Thr Asp Thr Ser Asp Lys Lys Leu Gln Leu Ile Lys
 65 70 75 80
 Asp Tyr Arg Glu Lys Val Glu Ser Glu Leu Arg Ser Ile Cys Thr Thr
 85 90 95
 Val Leu Glu Leu Leu Asp Lys Tyr Leu Ile Ala Asn Ala Thr Asn Pro
 100 105 110
 Glu Ser Lys Val Phe Tyr Leu Lys Met Lys Gly Asp Tyr Phe Arg Tyr
 115 120 125
 Leu Ala Glu Val Ala Cys Gly Asp Asp Arg Lys Gln Thr Ile Asp Asn
 130 135 140
 Ser Gln Gly Ala Tyr Gln Glu Ala Phe Asp Ile Ser Lys Lys Glu Met
 145 150 155 160
 Gln Pro Thr His Pro Ile Arg Leu Gly Leu Ala Leu Asn Phe Ser Val
 165 170 175
 Phe Tyr Tyr Glu Ile Leu Asn Asn Pro Glu Leu Ala Cys Thr Leu Ala
 180 185 190
 Lys Thr Ala Phe Asp Glu Ala Ile Ala Glu Leu Asp Thr Leu Asn Glu
 195 200 205
 Asp Ser Tyr Lys Asp Ser Thr Leu Ile Met Gln Leu Leu Arg Asp Asn
 210 215 220
 Leu Thr Leu Trp Thr Ser Asp Ser Ala Gly Glu Glu Cys Asp Ala Ala
 225 230 235 240
 Glu Gly Ala Glu Asn
 245
 <210> 7
 <211> 248
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 7
 Met Glu Arg Ala Ser Leu Ile Gln Lys Ala Lys Leu Ala Glu Gln Ala
 1 5 10 15
 Glu Arg Tyr Glu Asp Met Ala Ala Phe Met Lys Gly Ala Val Glu Lys
 20 25 30

[0007]

Gly Glu Glu Leu Ser Cys Glu Glu Arg Asn Leu Leu Ser Val Ala Tyr
 35 40 45

Lys Asn Val Val Gly Gly Gln Arg Ala Ala Trp Arg Val Leu Ser Ser
 50 55 60

Ile Glu Gln Lys Ser Asn Glu Glu Gly Ser Glu Glu Lys Gly Pro Glu
 65 70 75 80

Val Arg Glu Tyr Arg Glu Lys Val Glu Thr Glu Leu Gln Gly Val Cys
 85 90 95

Asp Thr Val Leu Gly Leu Leu Asp Ser His Leu Ile Lys Glu Ala Gly
 100 105 110

Asp Ala Glu Ser Arg Val Phe Tyr Leu Lys Met Lys Gly Asp Tyr Tyr
 115 120 125

Arg Tyr Leu Ala Glu Val Ala Thr Gly Asp Asp Lys Lys Arg Ile Ile
 130 135 140

Asp Ser Ala Arg Ser Ala Tyr Gln Glu Ala Met Asp Ile Ser Lys Lys
 145 150 155 160

Glu Met Pro Pro Thr Asn Pro Ile Arg Leu Gly Leu Ala Leu Asn Phe
 165 170 175

Ser Val Phe His Tyr Glu Ile Ala Asn Ser Pro Glu Glu Ala Ile Ser
 180 185 190

Leu Ala Lys Thr Thr Phe Asp Glu Ala Met Ala Asp Leu His Thr Leu
 195 200 205

Ser Glu Asp Ser Tyr Lys Asp Ser Thr Leu Ile Met Gln Leu Leu Arg
 210 215 220

Asp Asn Leu Thr Leu Trp Thr Ala Asp Asn Ala Gly Glu Glu Gly Gly
 225 230 235 240

Glu Ala Pro Gln Glu Pro Gln Ser
 245

<210> 8
 <211> I2
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 8:

Met Gly Asp Arg Glu Gln Leu Leu Gln Arg Ala Arg
 1 5 10

<210> 9
 <211> I2
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 9:

Met Gly Asp Arg Glu Gln Leu Leu Gln Arg Ala Arg

[0008]

Trp Thr Ser

<210> 16
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 智人

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> Citrulline

<400> 16

Met Gly Asp Cys Arg Glu Gln Leu Leu Gln Arg Ala Arg
 1 5 10

<210> 17
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (9)..(9)
 <223> Citrulline

<400> 17

Arg Glu Gln Leu Leu Gln Arg Ala Arg Leu Ala Glu Gln Ala Glu
 1 5 10 15

<210> 18
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> Citrulline

<400> 18

Arg Leu Ala Glu Gln Ala Glu Arg Tyr Asp Asp Met Ala Ser Ala
 1 5 10 15

<210> 19
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 智人

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (15)..(15)
 <223> Citrulline

<400> 19

Lys Ala Val Thr Glu Leu Asn Glu Pro Leu Ser Asn Glu Asp Arg Asn
 1 5 10 15

Leu Leu

[0010]

<210> 20
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 智人

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (12)..(12)
 <223> Citrulline

<400> 20

Lys Asn Val Val Gly Ala Arg Arg Ser Ser Trp Arg Val Ile Ser Ser
 1 5 10 15

Ile Glu Gln Lys
 20

<210> 21
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 智人

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10)..(10)
 <223> Citrulline

<400> 21

Lys Lys Leu Glu Lys Val Lys Ala Tyr Arg Glu Lys Ile
 1 5 10

<210> 22
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 智人

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (11)..(11)
 <223> Citrulline

<400> 22

Lys Asp Ser Thr Leu Ile Met Gln Leu Leu Arg Asp Asn Leu Thr Leu
 1 5 10 15

Trp Thr Ser

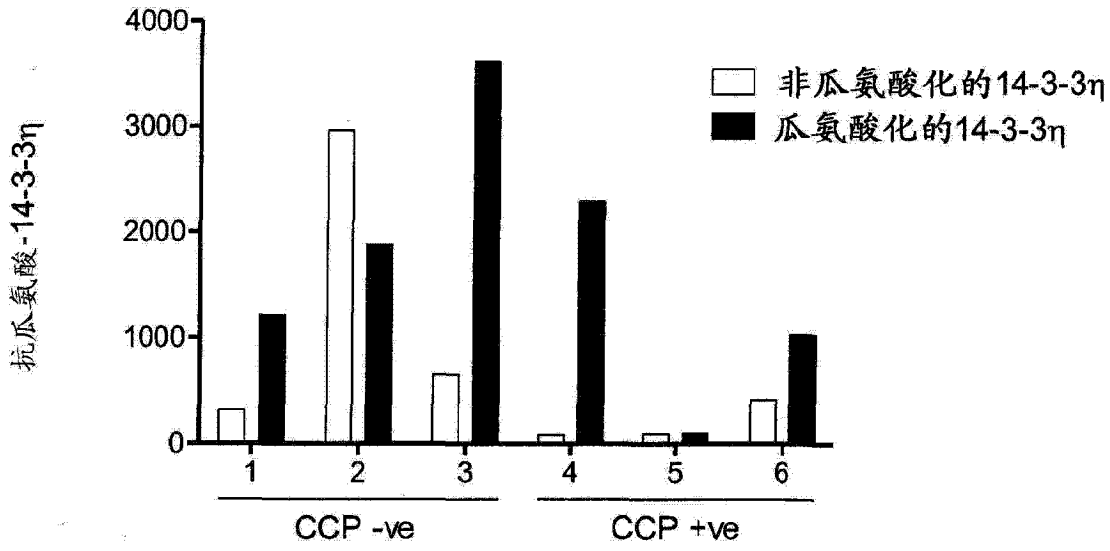


图 1

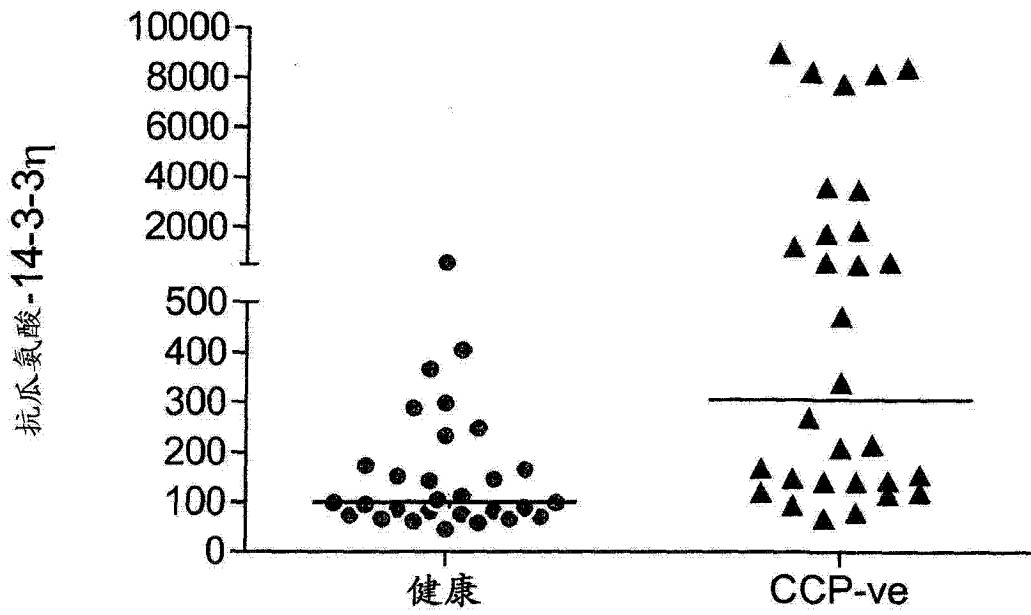


图 2

专利名称(译)	衍生自瓜氨酸化的14-3-3的抗原及其在风湿性关节炎诊断中的用途		
公开(公告)号	CN104011068A	公开(公告)日	2014-08-27
申请号	CN201280058618.2	申请日	2012-10-19
[标]申请(专利权)人(译)	奥古雷克斯生命科学公司		
申请(专利权)人(译)	奥古雷克斯生命科学公司		
当前申请(专利权)人(译)	奥古雷克斯生命科学公司		
[标]发明人	A马洛塔		
发明人	A·马洛塔		
IPC分类号	C07K14/47 C07K16/18 C07K17/00 C07K7/08 G01N33/53 G01N33/564 C40B40/10		
CPC分类号	C07K14/47 G01N33/6893 G01N33/564 C07K14/4713 G01N2800/105 G01N33/54306 G01N2440/18		
代理人(译)	殷骏		
优先权	61/550046 2011-10-21 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供瓜氨酸化的14-3-3肽和针对其的抗体以及瓜氨酸化的14-3-3肽评价关节炎病症如风湿性关节炎的方法。

