



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101095053 B

(45) 授权公告日 2013.01.16

(21) 申请号 200580045294.9

(22) 申请日 2005.11.29

(30) 优先权数据

10/998,927 2004.11.29 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2007.06.28

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2005/042962 2005.11.29

(87) PCT申请的公布数据

W02006/058300 EN 2006.06.01

(73) 专利权人 理查德·J·扎赫拉德尼克

地址 美国加利福尼亚

专利权人 杰弗里·R·拉维涅

(72) 发明人 理查德·J·扎赫拉德尼克

杰弗里·R·拉维涅

(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 李瑛

(51) Int. Cl.

G01N 33/533(2006.01)

C07K 16/26(2006.01)

G01N 33/537(2006.01)

(56) 对比文件

US 2003/0175802 A1, 2003.09.18,

审查员 孙永福

权利要求书 2 页 说明书 7 页

序列表 4 页 附图 4 页

(54) 发明名称

抗体和用于产生对生物活性完整甲状旁腺激素(PTH) 1-84 具有选择性结合特异性的抗体的肽抗原

(57) 摘要

对应于甲状旁腺激素(PTH) 的氨基酸残基 2-12、1-12、2-15 和 1-15 的肽抗原,对该肽抗原具有亲和性的抗体及其制备方法。将根据本发明这样的抗原、抗体及其制备方法可用于检测血清、血浆和/或细胞培养基中的生物活性完整 PTH 水平。这样的抗体进一步具有高度的物种交叉反应性,但是基本上减轻的与非-完整 PTH 肽片段的交叉反应性以及几乎不能识别 PTH 的头一个氨基酸残基。

1. 制备抗体的方法,该抗体与被称为 (1-84)PTH 的生物活性甲状旁腺激素在 (1-84)PTH 的 N- 末端部分免疫特异性地结合,其中所述 N- 末端部分由 (i) (1-84)PTH 的三个 N- 末端氨基酸残基,或 (ii) (1-84)PTH 的四个 N- 末端氨基酸残基组成,该方法包括下列步骤:

a) 将第一种肽抗原给予宿主动物来在所述宿主动物中诱导针对所述第一种肽抗原的抗体产生,所述第一种肽抗原选自 SEQ ID NO. 3、SEQID NO. 4、SEQ ID NO. 5、SEQ ID NO. 6、(1-34)PTH 和 (1-84)PTH;

b) 监控将所述第一种抗原给予所述宿主动物所产生的抗体滴度;

c) 提取通过所述给予所述第一种肽抗原在所述宿主动物中产生的抗血清;

d) 使用选自 SEQ ID NO. 3、SEQ ID NO. 4、SEQ ID NO. 5 和 SEQ ID NO. 6 的第二种肽抗原通过亲和色谱法从步骤 c) 中提取的所述抗血清中分离和选择至少一种抗体;

e) 分别使用选自 (4-34)PTH、(5-34)PTH、(4-84)PTH 和 (5-84)PTH 的第三种肽抗原通过亲和色谱法除去步骤 d) 中分离的所述至少一种抗体中对选自 (4-34)PTH、(5-34)PTH、(4-84)PTH 和 (5-84)PTH 的肽抗原具有特异性的抗体;和

f) 通过收集从步骤 e) 产生的洗出液分离对 PTH 的 N- 末端部分的至多头三个或四个氨基酸残基具有结合亲和力的抗体并且其中分离的抗体对 PTH 的 N- 末端的第五个氨基酸残基上或其后的任何氨基酸残基不具有结合亲和力。

2. 权利要求 1 的方法,其中步骤 a) 中,所述宿主动物选自小鼠和兔。

3. 权利要求 1 的方法,其中步骤 a) 中,所述宿主动物包括至少一种山羊。

4. 权利要求 1 的方法,其中步骤 a) 中,所述 (1-34)PTH 来自选自人、大鼠、小鼠、牛、狗、猪、猫和猴的物种。

5. 权利要求 1 的方法,其中步骤 a) 中,所述第一种肽抗原具有与其结合的载体蛋白。

6. 权利要求 1 的方法,其中步骤 a) 中,所述 (1-84)PTH 来自选自人、大鼠、小鼠、牛、狗、猪、猫和猴的物种。

7. 与称为 (1-84)PTH 的生物活性甲状旁腺激素在 (1-84)PTH 的 N- 末端部分免疫特异性地结合的抗体,其中所述 N- 末端部分由 (i) (1-84)PTH 的三个 N- 末端氨基酸残基,或 (ii) (1-84)PTH 的四个 N- 末端氨基酸残基组成,所述抗体通过下列步骤制备:

a) 将第一种肽抗原给予宿主动物来在所述宿主动物中诱导针对所述第一种肽抗原的抗体产生,所述第一种肽抗原选自 SEQ ID NO. 3、SEQID NO. 4、SEQ ID NO. 5、SEQ ID NO. 6、(1-34)PTH 和 (1-84)PTH;

b) 监控将所述第一种抗原给予所述宿主动物所产生的抗体滴度;

c) 提取通过所述给予所述第一种肽抗原在所述宿主动物中产生的抗血清;

d) 使用选自 SEQ ID NO. 3、SEQ ID NO. 4、SEQ ID NO. 5 和 SEQ IDNO. 6 的第二种肽抗原通过亲和色谱法从步骤 c) 中提取的所述抗血清中分离和选择至少一种抗体;

e) 分别使用选自 (4-34)PTH、(5-34)PTH、(4-84)PTH 和 (5-84)PTH 的第三种肽抗原通过亲和色谱法除去步骤 d) 中分离的所述至少一种抗体中对选自 (4-34)PTH、(5-34)PTH、(4-84)PTH 和 (5-84)PTH 的肽抗原具有特异性的抗体;和

f) 通过收集从步骤 e) 产生的洗出液分离对 PTH 的 N- 末端部分的至多头三个或四个氨基酸残基具有结合亲和力的抗体并且其中分离的抗体对 PTH 的 N- 末端的第五个氨基酸残基上或其后的任何氨基酸残基不具有结合亲和力。

8. 包含权利要求 7 的抗体的测试试剂盒,用于检测生物活性 (1-84)PTH。
9. 权利要求 7 的抗体,其中所述抗体进一步具有可检测的部分。

抗体和用于产生对生物活性完整甲状旁腺激素 (PTH) 1-84 具有选择性结合特异性的抗体的肽抗原

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请是 2000 年 12 月 5 日提交的美国专利申请顺序号 09/730, 174 的部分继续申请, 该申请的发明名称为抗体和用于产生对生物活性完整甲状旁腺激素 (PTH) 1-84 具有选择性结合特异性的抗体的肽抗原, 且现在处于颁布过程中, 在此将其教导专门引入作为参考。

[0003] 声明: 联邦政府资助的研究 / 开发

[0004] 不适用

[0005] 发明背景

[0006] 甲状旁腺激素 (PTH) 及其在调节血液中钙离子浓度中的重要性是公知的。在这点上, 通过甲状旁腺产生该激素, 并与其他因子联合起作用来调节血钙离子水平, 使得将细胞和周围液体中的血钙离子水平维持在稳定的浓度。实质上, 当血清钙水平降低时, PTH 起作用来释放体内贮存的钙。另一方面, 可将这样的分泌抑制到血清钙浓度增加的程度。

[0007] 在其完整形式中, PTH 包括由 84 个氨基酸构成的单一肽。PTH 的特定序列, 如多个物种即, 人、大鼠、小鼠、牛、狗、猪、猫和猴所具有的, 描绘于图 1 中, 图 2 中描绘了其变化形式, 这说明了在这些鉴定的物种之间该激素保持着相对一致的结构。

[0008] 已知其在钙代谢中的重要性不仅是对于人而且对于多种物种, 因此精确测量 PTH 具有并持续具有实质性的临床重要性。如许多文献所证明的, 血清 PTH 水平作为患病患者的重要参数, 特别是如血钙过多、原发性甲状旁腺功能亢进症和骨质疏松症患者。PTH 同样在遭受慢性肾衰竭的患者中具有实质性的临床重要性, 由于 PTH 异常, 该慢性肾衰竭患者可以发展成肾性骨营养不良。

[0009] 尽管它在代谢中的重要作用和临床重要性, 但对于测定循环生物活性 PTH 水平具有并持续存在着实质性的困难。首先, 公知的是通常 PTH 以非常低的水平存在, 通常为 10pg/ml 至 65pg/ml。此外, 已知 PTH 肽可以以多种循环 PTH 片段存在, 特别是大的非-(1-84) 循环 PTH 片段中, 该片段似乎与 (7-84) PTH 分子在色谱上共同迁移并已知显著干扰常规的 PTH 测定测量值。实际上, 大的非-(1-84) PTH 片段可以代表约一半 (1/2) 通过大部分当前的测定法测量的 PTH。公开的专利合作条约国际申请 PCT/US00/00855, 国际公开号为 WO/00/42437, 发明名称为辨别和监控甲状旁腺和骨状态相关疾病的方法, 和 Lepage, Raymond 等, 非-(1-84) 循环甲状旁腺激素 (PTH) 片段干扰尿毒症样品中完整 PTH 商业测定法测量, *Clinical Chemistry* 44:4, 1998, p805-809 中给出了 PTH 精确测量的公认缺陷的实例, 在此将其教导专门引入作为参考。

[0010] 在克服该缺陷的尝试中, Scantibodies 实验室, Santee, California, 介绍了检测 PTH 水平的新测定法, 其引入了对人 PTH 最末端 N-末端部分具有结合特异性的示踪抗体, 更具体地是其头六个氨基酸残基。按照目前所理解的, 这样的测定法似乎使与大的非-(1-84) PTH 片段的交叉反应性减到最小。然而, 为了得到这样的抗体需要在其纯化中付出大量的努力和费用。此外, 这样的示踪抗体只对 PTH 的头一个氨基酸残基具有最大识别,

基本上降低了对任何随后残基的特异性,因此不能将其用于其中头一个氨基酸不同的一些其他物种。这样的缺陷描述于 M. R. 等的论文中,题目为新的免疫放射性测定法检测全长人 PTH,而不是氨基末端截断的片段:肾衰竭中 PTH 测量的推断,The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, Vol. 84, No. 11, 1999, p. 4287-4290,在此将其教导专门引入作为参考。

[0011] 因此,本领域中已经并持续长期迫切需要对生物活性完整 PTH 具有特异性的测定结合配偶体及其制备方法,该测定结合配偶体可以确定具有与 PTH 肽片段降低的交叉反应性的 PTH 水平。本领域中同样需要改良的 PTH 结合配偶体,该配偶体可以有更高的成本效益的方式测量 PTH 水平并对 PTH 具有更大的亲和性,可以将其容易地掺入免疫测定试剂盒等中。再进一步,本领域中存在对结合配偶体的需要,即,具有对 PTH 特异的结合识别并可以用来检测多种物种中 PTH 水平的抗体。最后,本领域中存在对改良的结合配偶体的需要,该配偶体对 PTH 具有高的结合亲和性,并可以应用常规机理容易地得到,需要最小限度的纯化,导致对完整的 PTH 更大的结合识别,与大的非-(1-84)PTH 片段具有最小限度的交叉反应性,并可以利用产生比现有技术结合配偶体更高抗体产量的方法得到。

[0012] 发明简述

[0013] 本发明具体地克服和减轻了本领域中的上述缺陷。在这点上,本发明涉及某些抗原、抗体和制备用于确定样品流体如血清、血浆或细胞培养基中生物活性完整 PTH 水平的抗体的方法。本发明的抗体和方法具有特殊的优势,即,对 PTH 具有更大的亲和性,特别是,被设计成对从第一个 N-末端 PTH 残基延伸出来,但优选不超过 PTH 的第四个氨基酸残基的头几个氨基酸残基具有新的识别。在极其优选的实施方案中,抗体具有对 N-末端 PTH 的头三个氨基酸残基的特异性。抗体进一步不具有与 PTH 的大的非-(1-84)分子形式的交叉反应性。此外,根据本发明的抗原、抗体及其制备方法与多种物种具有实质性的交叉反应性,并且不仅可以用于检测人中的 PTH 水平,而且可以检测大鼠、小鼠、牛、狗、猪、猫和猴中的 PTH 水平。

[0014] 根据优选的实施方案,抗原包括下式:

[0015] VAL-SER-GLU-ILE-GLN-X-MET-HIS-ASN-LEU-GLY

[0016] 其中 X 选自 LEU[SEQ ID NO. 1] 和 PHE[SEQ ID NO. 2]。关于该实施方案,这样的抗原性肽代表 PTH 的氨基酸残基 2-12,其第六个氨基酸残基在 LEU 和 PHE 之间是选择性的,一方面,前者出现在人、大鼠、小鼠和猪的 PTH 中,另一方面,后者在牛和狗的 PTH 中是固有的。在更非常优选的实施方案中,抗原包括具有下式的肽:

[0017] Y-VAL-SER-GLU-ILE-GLN-X-MET-HIS-ASN-LEU-GLY

[0018] 其中如上所述, X 是选自 LEU 和 PHE 的氨基酸残基,且 Y 是由 SER 或 ALA[分别为 SEQ ID NO. 3、SEQ ID NO. 4、SEQ ID NO. 5 和 SEQ ID NO. 6] 组成的氨基酸残基,前者反应了人、狗和猪中存在的氨基酸,而后者在大鼠、小鼠和牛的 PTH 中是固有的。

[0019] 在进一步优选的实施方案中,抗原包括下式:

[0020] VAL-SER-GLU-ILE-GLN-X-MET-HIS-ASN-LEU-GLY-LYS-HIS-LEU

[0021] 其中 X 选自 LEU[SEQ ID NO. 7] 或 PHE[SEQ ID NO. 8]。这样的抗原性肽代表 PTH 的氨基酸残基 2-15,其中第六个氨基酸残基包括 LEU 或 PHE,因此反应了出现在以上指明的合适物种中的相应氨基酸残基。在另一实施方案中,抗原性肽代表 PTH 的氨基酸残基 1-15

并包括下式：

[0022] Y-VAL-SER-GLU-ILE-GLN-X-MET-HIS-ASN-LEU-GLY-LYS-HIS-LEU

[0023] 其中 X 包括氨基酸残基 LEU 或 PHE, 且 Y 是由 SER 或 ALA [分别为 SEQ ID NO. 9、SEQ ID NO. 10、SEQ ID NO. 11 和 SEQ ID NO. 12] 组成的氨基酸残基, 后者是选择性的以对应以上指明的特定物种。

[0024] 关于根据本发明的抗体及其制备方法, 涉及对上述抗原具有亲和性和特异性的抗体。优选, 抗体分别对 PTH 的氨基酸残基 2-12、1-12、2-15 和 1-15 是特异性的。在极其优选的实施方案中, 抗体只对 PTH 的头三个氨基酸残基是特异性的。优选通过以下步骤来制备这样的抗体, 将上述种类的肽抗原单独或结合载体蛋白给予优选包括山羊的宿主动物, 来引起针对肽抗原的抗体产生。在可替换的、优选的实施方案中, 通过给予较大的 PTH 肽片段来诱导抗体产生。优选, 这样的 PTH 片段可以包括 (1-34)PTH, 其可以进一步任选地包括与其共价结合或融合的载体蛋白来提高抗原性, 或完整 (1-84)PTH。在设法得到用于检测人 PTH 的抗体方面来说, 完整 (1-84)PTH 分子优选包括完整大鼠 PTH, 或较低程度上, 包括人 PTH。然后监控通过将抗原给予宿主动物产生的抗体滴度。此后, 分离宿主动物中产生的抗血清并通过亲和色谱法来选择其对所需 PTH 的抗原性区域 (即, 分别为 PTH 的氨基酸残基 2-12、1-12、2-15 和 1-15) 具有特异性的抗体。在附加的步骤中, 进一步纯化分离的抗体以除去那些对延伸超出第四或第五个 N- 末端 PTH 氨基酸残基的氨基酸残基具有亲和性的抗体, 使用对应于 (4-34)PTH 和 / 或 (4-84)PTH 或 (5-34)PTH 和 / 或 (5-84)PTH 的结合的抗原, 其保留不需要的抗体但允许那些只对 (1-3) 或 (1-4)PTH 具有特异性的抗体通过。然后可以将抗体标记或将抗体引入多种用于检测 PTH 的常规测定法的任何一种中, 不管是用于人还是用于多种物种中的任何一种。

[0025] 如本领域技术人员所知, 本发明的抗原、抗体和方法, 通过分别集中于 PTH 的氨基酸残基 2-12、1-12、2-15 和 1-15, 集中于 PTH 分子的具有 N- 末端生物活性的一部分, 因此最大化了其检测。此外, 关于更非常优选的实施方案, 通过提供抗原、抗体及其制备方法, 其包括延伸超出 N- 末端生物活性位点的其他氨基酸残基 (即, 多达并包括 PTH 的第十二个和第十五氨基酸残基), 因此该抗体的特异性和亲和性得到更高度的改善并使其能够以比现有技术受体更高的特异性和亲和性检测 PTH 水平, 如引入测定法中等。在极其优选的实施方案中, 抗体具有对不多于 PTH 头三个氨基酸残基的特异性, 如所讨论的, 其通过除去或“擦洗”步骤来实现, 借此可以选择性地除去使用本发明的抗原所产生的抗体至任何这样的抗体都具有对 (4-34)PTH 或 (4-84)PTH 的亲和性的程度。因此, 根据本发明产生的抗体 (以及在此公开的为实现该方法的目标的方法和肽抗原) 基本上消除了与大的非 (1-84)PTH 肽片段的交叉反应性, 不是只对 PTH 的第一个氨基酸残基具有最大的识别, 且更进一步, 可以容易地以有成本效益的方式得到, 但是由本发明的方法产生的抗体产量应当高于现有技术的方法。

[0026] 另外, 这样的除去或“擦洗”步骤将被用于选择性地除去具有对 (5-34)PTH 或 (5-84)PTH 的亲和性的抗体。通过这样做, 最终分离的抗体对 N- 末端 PTH 的不多于头四个氨基酸残基具有亲和性。因此本发明的目的是提供 : 1) 选择用于产生和分离抗体的抗原 ; 2) 抗体 ; 和 3) 制备抗体的方法, 该抗体对 PTH 具有结合亲和性和特异性并具有减小的与大的非 (1-84)PTH 肽片段的交叉反应性。

[0027] 本发明的另一个目的是提供：1) 选择用于产生抗体的抗原；2) 抗体；和 3) 制备抗体的方法，该抗体对 PTH 具有比现有技术结合配偶体更大的亲和性和特异性，且进一步在种间 PTH 之间具有更高层次的交叉反应性，使得根据本发明的抗原、抗体及其制备方法可以容易地用于检测多种物种中的 PTH。

[0028] 本发明的另一个目的是提供：1) 选择用于产生和分离抗体的抗原；2) 抗体；和 3) 制备抗体的方法，该抗体对更多的 PTH 的生物活性 N- 末端部分具有结合亲和性和特异性，因此，在确定生物活性完整 PTH 水平中比其针对的现有技术中的结合配偶体更有效和更精确。

[0029] 本发明的另一个目的是提供：1) 选择用于产生和分离抗体的抗原；2) 抗体；和 3) 制备抗体的方法，该抗体不是只对 PTH 的第一个 N- 末端氨基酸残基具有最大的结合亲和性。

[0030] 本发明的另一个目的是提供：1) 选择用于产生和分离抗体的抗原；2) 抗体；和 3) 制备抗体的方法，该方法比制备对 PTH 的 N- 末端具有结合亲和性和特异性的抗体的现有技术方法费用更低并且产生更高的抗体产量。

[0031] 本发明的更进一步的目的是提供：1) 选择用于产生和分离抗体的抗原；2) 抗体；和 3) 制备抗体的方法，该方法易于产生可以容易引入多种可商购的测定法的任何一种中的抗体，此外，该抗体可以根据多种免疫测定应用中任一种的需要来进行修饰（例如，使之包括标记等）。

[0032] 附图简述

[0033] 本发明的这些以及其他特征参照附图时将变得更加显而易见，其中：

[0034] 图 1 描绘了多种物种，即人、大鼠、小鼠、牛、狗、猪、猫和猴中 PTH 的氨基酸序列，并进一步描绘了在此标识为 SEQ ID NO. 1、SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 3、SEQ ID NO. 4、SEQ ID NO. 5、SEQ ID NO. 6、SEQ ID NO. 7、SEQ ID NO. 8、SEQ ID NO. 9、SEQ ID NO. 10、SEQ ID NO. 11 和 SEQ ID NO. 12 的氨基酸序列。

[0035] 图 2 是图 1 的交替性说明，描绘了上述物种中 PTH 的 1-84 氨基酸序列的变化形式，还描绘了 PTH 的保守的 N- 末端，其中 SEQ ID NO. 1-12 的氨基酸序列保持相对恒定。

[0036] 图 3 是人 PTH 的 N- 末端部分的简图。

[0037] 图 4 是流程图，描绘了根据本发明的优选实施方案制备抗体的步骤。

[0038] 发明详述

[0039] 以下给出的详述是为了描述本发明的优选实施方案，而不是要代表可以构成或使用本发明的唯一形式。该描述阐明了构成和实施本发明的步骤的功能和次序。然而，能够理解可以通过不同的实施方案来实现相同或等价的功能和次序并且它们也包括在本发明的范围内。

[0040] 本发明包括抗原、抗体和制备抗体的方法，该抗体针对 PTH 的位于其 N- 末端区域中的抗原性区域，更确切地说，从 N- 末端延伸的头十五 (15) 个氨基酸残基，图 1-3 中描绘为 10。在极其优选的实施方案中，该抗体只对 PTH 的头三 (3) 个氨基酸是特异性的。众所周知，认为 PTH 的 N- 末端区域对 PTH/PTHrp 受体结合是必需的，并进一步认为是最理想的用于测量生物活性完整 PTH 水平的抗原决定部位，在生物流体样品如血清、血浆或细胞培养基中可以发现这一点。表明与 PTH 及其测定方法相关的现有技术状态详细地描述于公开

的专利合作条约国际申请 PCT/US00/00855, 国际公开号为 WO/00/42437, 发明名称为辨别和监控甲状旁腺和骨状态相关疾病的方法, 和 Lepage, Raymond 等, 非-(1-84) 循环甲状旁腺激素 (PTH) 片段干扰尿毒症样品中完整 PTH 商业测定法测量, *Clinical Chemistry* 44 :4, 1998, p805-809, 在此将其教导专门引入作为参考。

[0041] 根据优选的实施方案, 本发明的抗原性肽包括对应于 PTH 的氨基酸残基 2-12 的那些氨基酸残基, 图 1-3 中总地以 12 来表示。具体地说, 这样的抗原性肽将具有下式:

[0042] VAL-SER-GLU-ILE-GLN-X-MET-HIS-ASN-LEU-GLY

[0043] 其中 X 是选自 LEU[SEQ ID NO. 1] 或 PHE[SEQ ID NO. 2] 的氨基酸残基。如本领域技术人员所知的, 这种 PTH 肽片段的第六个氨基酸残基在所提及的物种之间确实是不同的, 借此, 一方面, 这样的残基包括人、大鼠、小鼠和猪中的 LEU, 而另一方面, 对于牛和狗为 PHE。如本领域技术人员所知的, 尽管只是单个氨基酸不同, 但是这样的抗原性肽在所提及的物种之间保持着其他方面的一致性, 这在以下将更充分地讨论, 使得能够制得并最终使用具有交叉反应性的抗体, 因此, 在检测多种这样的物种的 PTH 水平中是有效的。

[0044] 在更非常优选的实施方案中, 肽抗原反映出 PTH 的头十二 (12) 个氨基酸残基, 以 14 来表示, 并包括下式:

[0045] Y-VAL-SER-GLU-ILE-GLN-X-MET-HIS-ASN-LEU-GLY

[0046] 其中 X 是选自 LEU 或 PHE 的氨基酸残基, 且 Y 是选自 SER 或 ALA[分别为 SEQ ID NO. 3、SEQ ID NO. 4、SEQ ID NO. 5 和 SEQ ID NO. 6] 的氨基酸残基。关于在第一个氨基酸残基上的改变, 将容易理解可以形成这样的抗原性肽使得该氨基酸包括 SER, 如在人、狗和猪中发现的, 或 ALA, 如在大鼠、小鼠和牛中发现的。在这点上, 在本发明中, 特别是在其更非常优选的实施方案中, 在抗原性肽中所规定的改变提供了可允许的误差使得可以形成最终源自这样的抗原性肽的抗体, 该抗体具有更高的结合亲和性, 可以期望用于检测给定物种中的 PTH。

[0047] 在本发明更高度改进的实施方案中, 抗原性肽包括分别对应于 PTH 的氨基酸残基 2-15 和 1-15 的序列。关于前者, 在图 1-3 中以 16 来表示, 这样的抗原性肽将具有下式:

[0048] VAL-SER-GLU-ILE-GLN-X-MET-HIS-ASN-LEU-GLY-LYS-HIS-LEU

[0049] 其中 X 是选自 LEU[SEQ ID NO. 7] 或 PHE[SEQ ID NO. 8] 的氨基酸残基。关于后一对应于 PTH 的氨基酸残基 1-15 的实施方案, 以 10 来表示这样的抗原性肽将具有下式:

[0050] Y-VAL-SER-GLU-ILE-GLN-X-MET-HIS-ASN-LEU-GLY-LYS-HIS-LEU

[0051] 其中 X 是选自 LEU 或 PHE 的氨基酸残基, 且 Y 是选自 SER 或 ALA[分别为 SEQ ID NO. 9、SEQ ID NO. 10、SEQ ID NO. 11 和 SEQ ID NO. 12] 的氨基酸残基。按照 37CFR1. 821-1. 825 的要求提供计算机可读形式的 SEQ ID NO. 1-12 的光盘, 与在此提供的书面序列表是相同的, 已经提交以符合这样的法定要求。尽管之前描述了上述肽的结构式, 但是应该认识到其可以延伸至所有的功能衍生物, 这意味着包括源自 PTH 相同区域的功能上相当的肽, 如图 1-3 的序列中所反映的, 并具有相似的诱导特异性抗 PTH 抗体, 更具体地, 诱导对 PTH 的 N-末端氨基酸残基具有特异性的抗体的能力。在这点上, 这样的功能衍生物可以是具有氨基酸置换、添加或删除的位于相似位置的肽或源自上述序列并反映在图 1-3 中的肽, 只要该衍生没有改变肽抗原诱导对 PTH 具有反应性的抗体的能力。

[0052] 应当进一步认识到本发明的肽抗原包括其氨基酸序列在图 1-3 中上面讨论的肽

上游或下游的几个氨基酸内可以替换的那些肽,以及具有保守氨基酸改变使得氨基酸的置换、添加或缺失或改变没有显著影响肽抗原诱导对 PTH 的头十二个氨基酸残基具有高度亲和性和特异性的抗体的能力的那些肽,或其任何亚成分。

[0053] 关于抗体产生,图 4 中说明了产生抗体的方法 20。最初,提供上述种类的肽 22,其对应于给定物种的 PTH 的头十二 (12) 个至十五 (15) 个氨基酸的全部或一部分。然而,根据更非常优选的实施方案,用于使抗体产生的抗原性肽将包括较大的 PTH 片段,包括但不限于,(1-34)PTH 和完整的 (1-84)PTH 肽。按照如此方法,尽管本发明的方法内最终产生的抗体将具有对对应于上述抗原性肽(即,PTH 的氨基酸序列 2-12、1-12、2-15 和 / 或 1-15)的那些氨基酸残基的特异性,至少对于提供抗原 22 的最初步骤和随后通过以下讨论的步骤 24 给予抗原,将认识到完整 PTH 肽及其任何的 N-末端片段都可以优选作为合适的抗原性肽来诱导抗体的产生,该抗体最终将具有对 PTH 的 N-末端生物活性部分理想的结合亲和性和特异性。在极其优选的实施方案中,提供和给予的抗原性肽将包括对应于 PTH 的氨基酸残基 1-34 的 PTH 片段,其可以任选地与载体蛋白偶联。或者,可以优选将这样的肽片段作为全长 (1-84)PTH 来给予,其可以采取图 1 和 2 中标识的任何一种物种的形式。优选,在产生人 PTH 特异性抗体的情况中,优选使用 (1-34)大鼠 PTH 或全长 (1-84)大鼠 PTH。

[0054] 可以通过本领域公知的多种方法中的任何一种来制备这样的抗原性肽,包括通过常规方法如固相化学合成法的合成,或通过重组技术制备。如将进一步认识到的,合成肽可以任选地以化学方式与载体蛋白偶联,或者,可以作为融合蛋白来产生重组肽以提高抗原性。如本领域技术人员将进一步认识到的,可以基于它们诱导抗 PTH 抗体的能力来筛选这样的抗原性肽。在这点上,这样的筛选技术可以包括,但不限于,免疫沉淀或免疫测定。

[0055] 一旦产生了抗原,就可以使用常规技术将这样的肽抗原用于产生本发明的抗体。在这点上,将肽抗原,优选与佐剂结合,给予宿主动物 24,其优选包括山羊。然而,应当认识到,此外还可以将其他物种,如兔、小鼠、绵羊、鸡等用作宿主动物。在这点上,可以通过多种方法中的任何一种来完成这样的抗原的给予,包括但不限于皮下或肌肉注射。如将认识到的,给予的肽抗原的剂量将随着所用的具体肽以及动物宿主而相应地改变。然而,如另外将认识到的,为了获得对给定物种具有可能的最高亲和性和特异性的抗体,应当产生针对来自每个物种的合适的相应肽的个别的抗体。

[0056] 一旦给予了抗原,就可以监控宿主动物中产生的抗体滴度的结果 26,这可以通过本领域多种公知技术中的任何一种,使用常规放血等来进行,其中在步骤 28 中,分离抗血清(例如,通过离心),此后根据对肽抗原具有结合亲和性的抗肽抗体的存在进行筛选。将进一步认识到已知用于产生本发明抗体的前述常规免疫学方法,这样的抗体本质上是单克隆或多克隆的。与常规实践相一致,优选抗血清源自多种宿主动物。

[0057] 所得到的源自宿主动物的抗血清可以被亲和性纯化以得到用于本发明的抗体。如本领域公知的,可以通过常规技术来纯化抗血清,如引入分离柱,其中上述的对应于 PTH 的氨基酸残基序列 2-12、1-12、2-15 和 / 或 1-15 的抗原性肽结合于固相(例如,珠子等)上。然后可以洗涤抗血清以除去对抗原性肽不具有特异性的抗体,最终从其中洗脱出剩余的结合抗体,其对抗原性肽具有特异性。然后可以按照本领域技术人员公知的常规实践来贮存该抗体。

[0058] 在附加的步骤 29 中,通过这样的分离和纯化过程得到的抗体将经历进一步的纯

化过程,借此选择性地除去或“擦洗”抗血清中存在的任何对(4-34)或(5-34)PTH和/或(4-84)或(5-84)PTH具有亲和性的抗体。为此,设想一旦在步骤28中分离了抗血清,就可以通过使用分离柱或其他已知的常规技术将其纯化以除去对任何在此指明的物种的(4-34)或(5-34)PTH和/或(4-84)或(5-84)PTH具有特异性的任何抗体,借此将对应于氨基酸序列(4-34)或(5-34)PTH或(4-84)或(5-84)PTH的抗原性肽结合于固相上,其中寻求纯化的抗血清经历纯化过程。任何对特定的(4-34)或(5-34)PTH或(4-84)或(5-84)PTH肽具有特异性的抗体将保持结合状态而对(4-34)或(5-34)PTH或(4-84)或(5-84)PTH肽不具有特异性的剩余的抗体将被从中分离出来。有利地,这样的过程将因此只分离那些对PTH的至多头三(3)个或四(4)个氨基酸残基具有亲和性的抗体,并因此对位于或超出PTH N-末端的第五个氨基酸残基的任何氨基酸残基将完全不具有结合亲和性。这样的过程因此确保了最终分离的任何抗体实际上将是对(1-84)PTH的N-最末端具有特异性的,并因此不另外结合任何类型的不包括PTH的至少头三个或四个N-末端氨基酸残基的PTH片段。

[0059] 同样地,使用分别对应于PTH的氨基酸残基序列2-12和2-15的那些抗原性肽分离抗体,因此将使对于PTH的第一个氨基酸残基未必获得了结合亲和性,更不用说最大结合亲和性的抗体得到分离,已知这对于通过现有技术方法产生的抗体是成问题的。按照如此方法,通过使用分别对应于PTH的1-12和1-15的肽序列将同样获得对PTH的第一个氨基酸残基具有亲和性的抗体的消除或基本上抑制,只要这样的序列选自具有不同的第一个氨基酸残基的那些物种,所述物种的第一个氨基酸残基不同于最终得到的抗体将被利用的物种。例如,为了得到适于检测人体中的PTH水平缺乏对人PTH的第一个氨基酸残基的特异性的抗体,将认识到可以针对对应于人PTH的氨基酸残基序列1-12和1-15的肽来纯化源自该宿主动物的抗大鼠PTH血清。应该理解,因为大鼠PTH的第一个N-末端氨基酸残基包括ALA,和人类中发现的SER相对,所以任何最终分离的抗体都将必定对延伸超出这样的第一个氨基酸残基序列的氨基酸残基具有结合亲和性。

[0060] 一旦在步骤30中得到抗体,就可以将这样的抗体用于免疫学技术中以便可以在给定样品(例如,血清或血浆)中发现的生物活性完整PTH的存在相互关联。在这点上,本发明的抗体可以单独或结合使用以筛选给定样品来测定生物活性完整PTH的存在,但仍然有利地避免了与大的非(1-84)PTH片段的交叉反应性。例如,可以将这样的抗体掺入免疫测定试剂盒中。这类应用的实例包括人生物反应性完整PTH和大鼠生物反应性完整PTH ELISA试剂盒,由Immutopics, Inc., San Clemente, California生产,其提供了酶联免疫吸附测定法(ELISA)用于血清、血浆或细胞培养基中生物活性完整PTH水平的定量测定。在这点上,已知前述产生对多种物种的PTH具有特异性的抗体的适用性,将认识到可以具体性地设计这样的免疫测定试剂盒,如Immutopics, Inc.提供的那些,使得这类抗体的亲和性和特异性适用于多种物种,或者,可以针对给定物种合适的相应肽来产生这样的免疫测定试剂盒,使得该试剂盒对于给定的物种是更精细地特制的。

[0061] 本发明其他的改变和改进也是本领域技术人员显而易见的。因此,在此描述和说明的部分的特定组合只用来表示本发明的某一实施方案,而不是用来作为对本发明的精神和范围内可替换策略的限制。

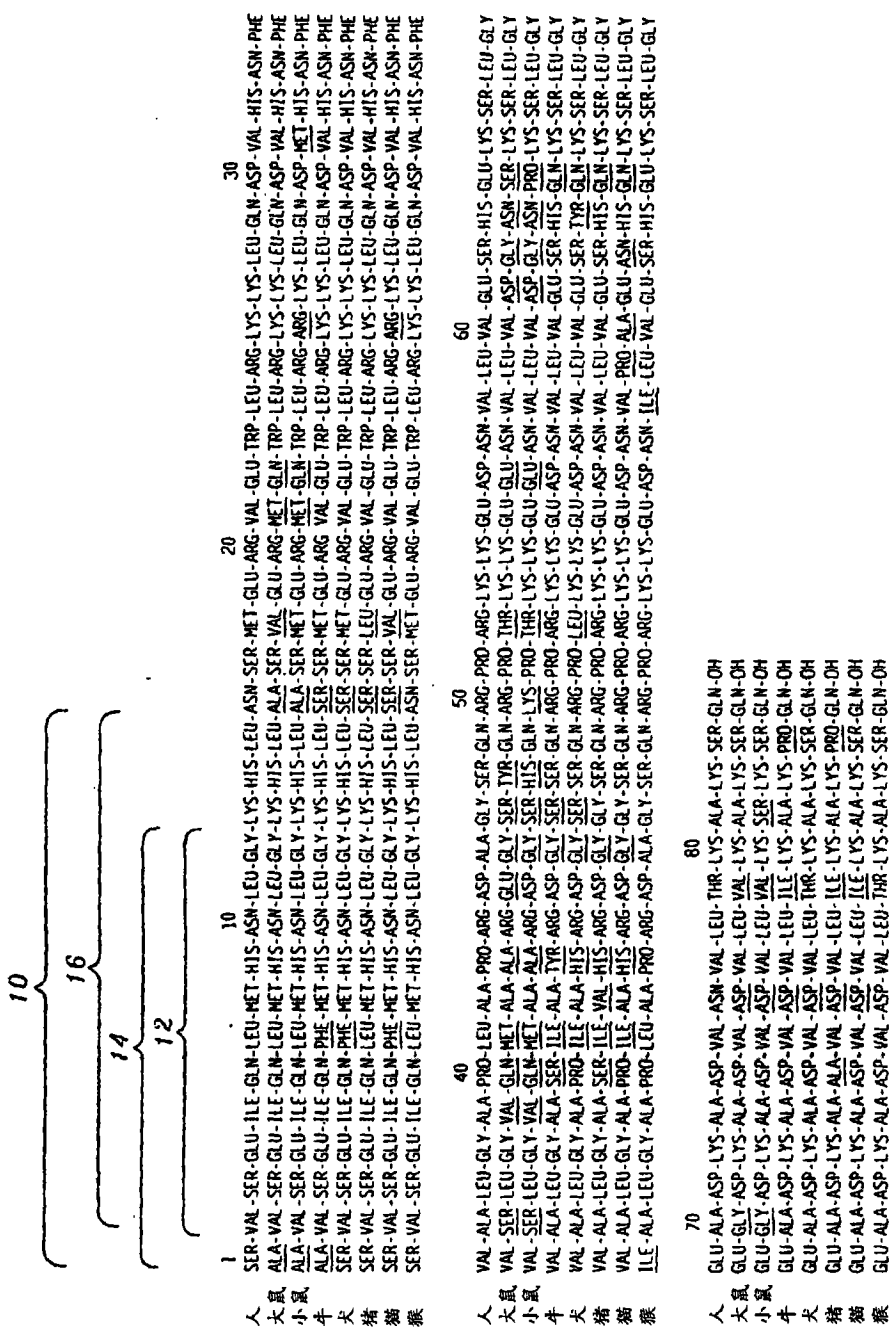


图1

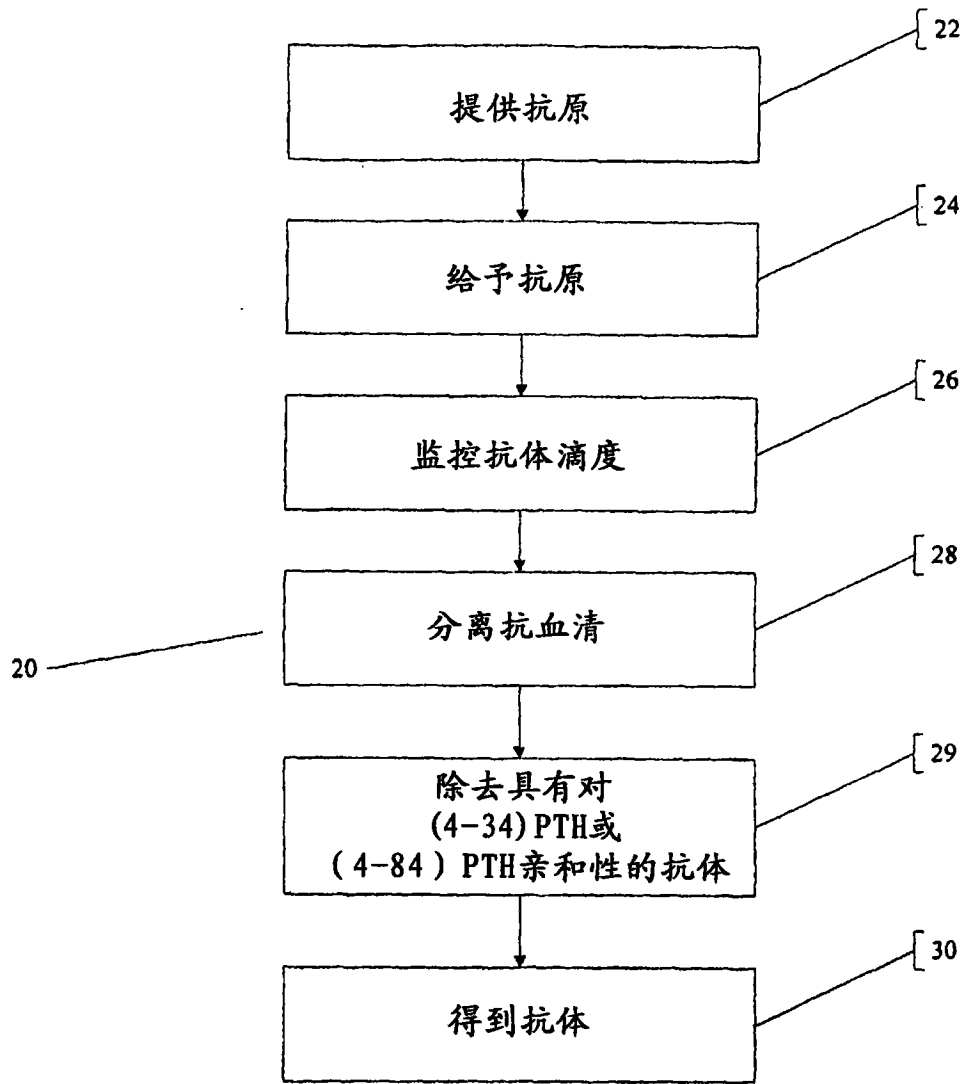


图 4

专利名称(译)	抗体和用于产生对生物活性完整甲状旁腺激素(PTH)1-84具有选择性结合特异性的抗体的肽抗原		
公开(公告)号	CN101095053B	公开(公告)日	2013-01-16
申请号	CN200580045294.9	申请日	2005-11-29
[标]发明人	理查德J扎赫拉德尼克 杰弗里R拉维涅		
发明人	理查德· J· 扎赫拉德尼克 杰弗里· R· 拉维涅		
IPC分类号	G01N33/533 C07K16/26 G01N33/537 A61K39/00 C07K14/635 C12P21/04		
CPC分类号	C07K2317/34 C07K16/26 C07K14/635 A61K39/00		
代理人(译)	李瑛		
审查员(译)	孙永福		
优先权	10/998927 2004-11-29 US		
其他公开文献	CN101095053A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

对应于甲状旁腺激素(PTH)的氨基酸残基2-12、1-12、2-15和1-15的肽抗原，对该肽抗原具有亲和性的抗体及其制备方法。将根据本发明这样的抗原、抗体及其制备方法可用于检测血清、血浆和/或细胞培养基中的生物活性完整PTH水平。这样的抗体进一步具有高度的物种交叉反应性，但是基本上减轻的与非-完整PTH肽片段的交叉反应性以及几乎不能识别PTH的头一个氨基酸残基。

	序列表
<110> Zahradnik, Richard J. Lavigne, Jeffrey R.	
<120> 抗体和用于产生对生物活性完整甲状旁腺激素 (PTH) 1-84 具有选择性结合特异性的抗体的肽抗原	
<130> IMUNE-001B	
<150> US 09/730,174	
<151> 2000-12-05	
<160> 12	
<170> PatentIn version 3.3	
<210> 1	
<211> 11	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220> 诱导抗体的形成并分离所述的抗体	
<223> 1	
<400> 1	
Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly	
1 5 10	
<210> 2	
<211> 11	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220> 诱导抗体的形成并分离所述的抗体	
<223> 2	
<400> 2	
Val Ser Glu Ile Gln Phe Met His Asn Leu Gly	
1 5 10	
<210> 3	
<211> 12	
<212> PRT	
<213> 人工序列	