



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 101952313 B

(45)授权公告日 2017.12.15

(21)申请号 200880125676.6

C07K 16/00(2006.01)

(22)申请日 2008.11.26

G01N 33/543(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 101952313 A

(56)对比文件

US 2004/0152630 A1,2004.08.05,全文.
US 5948765 A,1999.09.07,全文.

(43)申请公布日 2011.01.19

Satoh J.等.The 14-3-3 protein ϵ isoform expressed in reactive astrocytes in demyelinating lesions of multiple sclerosis binds to vimentin and glial fibrillary acidic protein in cultured human astrocytes.《American Journal of Pathology》.2004,第165卷(第2期),577-592.

(30)优先权数据

60/990,520 2007.11.27 US

61/077,123 2008.06.30 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2010.07.27

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/CA2008/002094 2008.11.26

(87)PCT国际申请的公布数据
W02009/067811 EN 2009.06.04

(73)专利权人 不列颠哥伦比亚大学
地址 加拿大不列颠哥伦比亚省

Umahara T.等.Intranuclear localization and isoform-dependent translocation of 14-3-3 proteins in human brain with infarction.《Journal of the Neurological Sciences》.2007,第260卷(第1-2期),159-166.

(72)发明人 安东尼·马罗塔

Kilani R. T.等.Detection of high levels of 2 specific isoforms of 14-3-3 proteins in synovial fluid from patients with joint inflammation.《The Journal of Rheumatology》.2007,第34卷(第8期),1650-1657.

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 顾晋伟 田旻

审查员 刘树柏

(51)Int.Cl.

C07K 16/18(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

A61P 19/02(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

权利要求书1页 说明书33页
序列表18页 附图5页

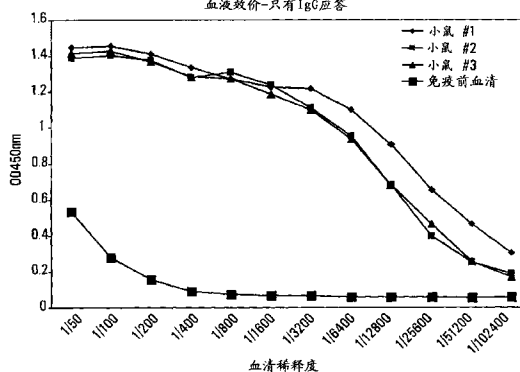
(54)发明名称

14-3-3 η 抗体及其用于诊断和治疗关节炎的用途

(57)摘要

本发明提供了抗14-3-3 η 抗体,其特异性结合天然构型的人14-3-3 η 蛋白同工型,同时表现出相对于人14-3-3 α 、 β 、 δ 、 ϵ 、 γ 、 τ 和 ξ 蛋白同工型的选择性.还提供了包含所述特异性抗14-3-3 η 抗体的方法、试剂盒和药物组合物,用于诊断和治疗关节炎.

ELISA: 测试小鼠抗14-3-3 ETA免疫血清(第2次加强后)对14-3-3 ETA抗原的血液效价-只有1gG应答



CN 101952313 B

1. 抗14-3-3 η 抗体,其中所述抗体能够特异性结合天然构型的人14-3-3 η 蛋白,其中所述抗体特异性结合氨基酸序列KKNSVVEASEAAYKEAF (SEQ ID NO:24),而不与位于所述人14-3-3 η 蛋白N端的表位结合,并且其中所述抗体表现出相对于其他人14-3-3蛋白同工型来说对所述人14-3-3 η 蛋白的选择性,并且其中所述N端是SEQ ID NO:33。

2. 根据权利要求1的抗14-3-3 η 抗体,其中所述抗体能够结合KNSVVEASEAAYKEA (SEQ ID NO:32)的氨基酸序列。

3. 根据权利要求1的抗14-3-3 η 抗体,其中所述抗体表现出相对于人14-3-3 α 、 β 、 δ 、 ϵ 、 γ 、 τ 、 ξ 和 σ 蛋白同工型来说对所述人14-3-3 η 蛋白的选择性。

4. 根据权利要求1的抗14-3-3 η 抗体,其中所述抗体能够从包含所述14-3-3 η 蛋白之生物溶液中免疫沉淀所述14-3-3 η 蛋白。

5. 根据权利要求1的抗14-3-3 η 抗体,其中所述抗体当用于ELISA中时,能够在对包含所述人14-3-3 η 蛋白的生物溶液进行所述ELISA时特异性结合所述生物溶液中的所述人14-3-3 η 蛋白。

6. 根据权利要求4或5的抗14-3-3 η 抗体,其中所述生物溶液包含来自关节炎患者之滑膜液、血浆或血清的样品。

7. 根据权利要求1的抗14-3-3 η 抗体,其中所述抗体能够抑制14-3-3 η 对MMP的诱导,其中所述MMP选自MMP-1、3、8、9、10、11和13。

8. 根据权利要求1的抗14-3-3 η 抗体,其中所述抗体是单克隆抗体。

9. 根据权利要求1的抗14-3-3 η 抗体,其中所述抗体是非人单克隆抗体。

10. 根据权利要求9的抗14-3-3 η 抗体,其中所述非人抗体是鼠抗体。

11. 根据权利要求9的抗14-3-3 η 抗体,其中所述非人抗体是人源化抗体。

12. 根据权利要求1的抗14-3-3 η 抗体,其中所述抗体由杂交瘤产生。

13. 肽在制备抗14-3-3 η 抗体中的用途,其中所述肽具有KKNSVVEASEAAYKEAF (SEQ ID NO:24)的氨基酸序列,其配制成用于免疫哺乳动物,并且所述抗体是权利要求1的抗体。

14. 权利要求1的抗14-3-3 η 抗体用于制备诊断关节炎之试剂盒的用途。

15. 权利要求1-12中任一项的抗14-3-3 η 抗体用于制备诊断关节炎之试剂盒的用途。

16. 用于诊断关节炎的试剂盒,其包含权利要求1的抗14-3-3 η 抗体和实施权利要求14之用途的说明。

17. 权利要求1-12中任一项的抗14-3-3 η 抗体用于制备治疗患者中关节炎之药物的用途。

18. 药物组合物,其包含权利要求1-12中任一项的抗14-3-3 η 抗体。

14-3-3 η 抗体及其用于诊断和治疗关节炎的用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2008年11月27日提交的美国临时专利申请序列号No.60/990,520和2008年6月30日提交的美国临时专利申请序列号No.61/077,123的权益,其均通过引用以整体并入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及特异性结合14-3-3蛋白之 η 同工型(isoform)并能够区分 η 同工型与其它14-3-3蛋白同工型的抗体。

[0004] 发明背景

[0005] 14-3-3蛋白是在真核生物中普遍表达的保守的细胞内调节分子家族。14-3-3蛋白能够结合多种功能各异的信号传导蛋白质,包括激酶、磷酸酶和跨膜受体。事实上,已报道超过100种信号传导蛋白质为14-3-3之配体。14-3-3蛋白可以被认为是34肽重复超家族(Tetratricopeptide Repeats superfamily)的演化成员。它们一般具有9或10个 α 螺旋,并通常沿其氨基端螺旋形成同二聚体和/或异二聚体相互作用。这些蛋白质含有多个已知结构域,包括二价阳离子相互作用区域、磷酸化和乙酰化区域以及蛋白质水解切割区域等。14-3-3蛋白有七种不同基因编码的已知在哺乳动物中表达的同工型,其中每种同工型包含242~255个氨基酸。所述七种14-3-3蛋白同工型分别称为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)。

[0006] 14-3-3蛋白具有高度的序列相似性。因此,抗14-3-3抗体通常识别多于一种14-3-3蛋白同工型。已经表征的几种抗14-3-3抗体制备物可商购获得。例如,识别14-3-3蛋白的兔多克隆抗体可从Biomol, Santa Cruz Biotechnology, Upstate Biotechnology, and Assay Designs获得。这些多克隆抗体制备物识别某种形式的14-3-3 η ;但是,它们并非相对于其它14-3-3蛋白同工型来说选择性针对 η 同工型。也参见Martin, H.等人(1993) Antibodies against the major brain isoforms of 14-3-3 protein. FEBS 331:296-303。还参见2007年5月9日提交的W0 2007/128132。除了缺少同工型选择性之外,几乎没有14-3-3抗体显示识别天然构型的14-3-3蛋白。

[0007] 已提示14-3-3蛋白参与多种疾病。然而,14-3-3蛋白的普遍存在和功能多样性极大地妨碍了与多种14-3-3蛋白同工型(“泛14-3-3抗体”)结合和/或不能识别天然构型14-3-3蛋白之抗体的治疗性应用。此外,已提示特定的14-3-3同工型参与特定的疾病,泛14-3-3抗体不能在诊断测定中进行确定无疑地检测,并且这些泛14-3-3抗体不能以靶向方式进行治疗。例如,已提示14-3-3 η 和14-3-3 γ 参与关节炎。参见2007年5月9日提交的W02007/128132。还参见Kilani等人(2007, J. Rheum. 34:1650-1657; W02007/128132),其报道14-3-3蛋白质家族的两个成员(具体为14-3-3 η 和14-3-3 γ)存在于关节炎患者的滑膜液和血清中,并且这些同工型与滑膜液和血清中的MMP-1和MMP-3水平直接相关。

发明内容

[0008] 本发明部分地来自于出人意料的发现:尽管14-3-3同工型之间具有高度的序列同一性,仍可使用选定的14-3-3 η 表位来制备针对天然构型14-3-3蛋白 η 同工型具有选择性的抗体。特别地,本发明提供了具有如下性质的抗14-3-3蛋白抗体:(i)通过例如免疫沉淀所证明地,特异性结合天然构型的14-3-3 η 蛋白;以及(ii)相对于其它14-3-3蛋白同工型来说,选择性地结合14-3-3 η 蛋白。该性质组合使得本发明的抗体区别于现有技术,并提供了选择性抗14-3-3 η 抗体在针对14-3-3 η 所参与之疾病的诊断和治疗方法中的用途。

[0009] 因此,在一个方面中,本发明提供了抗14-3-3 η 抗体。本发明的抗14-3-3抗体能够(i)通过例如天然14-3-3 η 的免疫沉淀所证明地,特异性结合天然构型的人14-3-3 η 蛋白;以及(ii)相对于其它的人14-3-3蛋白同工型来说,选择性地结合人14-3-3 η 蛋白。

[0010] 在一个优选实施方案中,本发明的抗14-3-3 η 抗体能够结合在关节炎中异常定位于细胞外滑膜腔(synovial space)的14-3-3 η 蛋白。

[0011] 在一个优选实施方案中,本发明的抗14-3-3 η 抗体不与位于人14-3-3 η 蛋白N端的表位结合。

[0012] 在一个优选实施方案中,本发明的抗14-3-3 η 抗体能够结合包含选自以下之肽的表位:14-3-3 η 环肽、14-3-3 η 螺旋肽和14-3-3 η 非螺旋肽,其中 η 环肽是尤其优选的。

[0013] 在一个优选实施方案中,所述14-3-3 η 环肽包含选自SEQ ID NO:11-16的氨基酸序列。在另一实施方案中,抗14-3-3 η 抗体结合与对应于选自SEQ ID NO:11-16之序列的氨基酸序列重叠的14-3-3 η 区域。

[0014] 在一个优选实施方案中,所述14-3-3 η 螺旋肽包含选自SEQ ID NO:1-10的氨基酸序列。在另一实施方案中,抗14-3-3 η 抗体结合与对应于选自SEQ ID NO:1-10之序列的氨基酸序列重叠的14-3-3 η 区域。

[0015] 在一个优选实施方案中,所述14-3-3 η 非螺旋肽包含选自SEQ ID NO:17-32的氨基酸序列。在另一实施方案中,抗14-3-3 η 抗体结合与对应于选自SEQ ID NO:17-32之序列的氨基酸序列重叠的14-3-3 η 区域。

[0016] 在一个特别优选的实施方案中,本发明的抗14-3-3 η 抗体结合选自LDKFLIKNSNDF (SEQ ID NO:30)、KKLEKVKAYR (SEQ ID NO:31)和KNSVVEASEAAYKEA (SEQ ID NO:32)的氨基酸序列。

[0017] 示例性14-3-3 η 环、螺旋和非螺旋肽公开于本文表1中。要注意的是,SEQ ID NO:30与对应的14-3-3 η 序列的不同在于:14-3-3 η 序列中的半胱氨酸被丝氨酸所替换以避免形成二硫键。在一个实施方案中,本发明提供了这样的抗体,其还结合包含半胱氨酸的与SEQ ID NO:30相关的天然14-3-3序列。在一个实施方案中,本发明提供了能够结合如下肽序列的抗体,所述肽序列与表1所列肽序列的不同在于用丝氨酸替换半胱氨酸。

[0018] 示例性14-3-3 η 环、螺旋和非螺旋肽公开于本文表1中。要注意的是,SEQ ID NO:30与对应的14-3-3 η 序列的不同在于:14-3-3 η 序列中的半胱氨酸被丝氨酸所替换以避免形成二硫键。在一个实施方案中,本发明提供了这样的抗体,其还结合包含半胱氨酸的与SEQ ID NO:30相关的天然14-3-3序列。在一个实施方案中,本发明提供了能够结合如下肽序列的抗体,所述肽序列与表1所列肽序列的不同在于用丝氨酸替换半胱氨酸。

[0019] 在一个实施方案中,抗14-3-3 η 抗体能够抑制14-3-3 η 对MMP的诱导。优选地,所述MMP选自MMP-1、3、8、9、10、11和13,尤其优选MMP-1和MMP-3。

[0020] 在一个方面中,本发明提供了诊断涉及14-3-3 η 之疾病和病症的方法。所述方法包括使用本发明的抗14-3-3 η 抗体来检测14-3-3 η 蛋白的变化,例如表达、定位、功能等的变化。在一个实施方案中,检测包括使用本发明的抗14-3-3 η 抗体进行免疫沉淀。在一个实施方案中,检测包括使用本发明的抗14-3-3 η 抗体进行ELISA。在一个实施方案中,检测包括使用本发明的抗14-3-3 η 抗体进行Western印迹。在一个实施方案中,检测包括将本发明的抗14-3-3 η 抗体用于免疫组织化学中。在一个实施方案中,检测包括将本发明的抗14-3-3 η 抗体用于免疫荧光中。在一个实施方案中,检测包括将本发明的抗14-3-3 η 抗体用于FACS分析中。在一个实施方案中,检测包括将本发明的抗14-3-3 η 抗体用于放射性免疫测定中。在一个实施方案中,检测包括将本发明的抗14-3-3 η 抗体用于试条测试(strip test)中。在一个实施方案中,检测包括将本发明的抗14-3-3 η 抗体用于床边检验(point of care test)中。在一个实施方案中,将检测14-3-3 η 与检测另一种疾病标志物(例如针对关节炎的MMP)联用。

[0021] 在一个实施方案中,本发明提供了用于诊断炎性病症的方法。在一个优选实施方案中,提供了用于诊断关节炎的方法。包括用于诊断选自以下之疾病的方法:强直性脊柱炎、白塞病(**Behçet's Disease**)、弥漫性特发性骨肥厚症(diffuse idiopathic skeletal hyperostosis, DISH)、埃-当综合征(Ehlers-Danlos Syndrome, EDS)、费尔蒂综合征(Felty's Syndrome)、纤维肌痛、痛风、感染性关节炎、幼年性关节炎、狼疮、混合性结缔组织病(mixed connective tissue disease, MCTD)、骨关节炎、佩吉特病(Paget's Disease)、风湿性多肌痛、多肌炎和皮炎、假性痛风、银屑病关节炎、雷诺现象(Raynaud's Phenomenon)、反应性关节炎、类风湿性关节炎、硬皮病、舍格伦综合征(**Sjögren's Syndrome**)、斯蒂尔病(Still's Disease)和韦格纳肉芽肿病(Wegener's granulomatosis)。

[0022] 在一个实施方案中,所述方法包括检测患者的滑膜液、血浆或血清中的14-3-3 η 蛋白。在一个实施方案中,通过使用本发明的抗14-3-3 η 抗体对来自滑膜液、血浆或血清的14-3-3 η 蛋白进行免疫沉淀来进行检测。在一个实施方案中,检测包括使用本发明的抗14-3-3 η 抗体进行ELISA。在一个实施方案中,检测包括使用本发明的抗14-3-3 η 抗体对包括来自患者的滑膜液、血浆或血清的样品进行Western印迹。在一个实施方案中,检测包括使用放射性免疫测定。在一个实施方案中,检测包括使用试条测试。在一个实施方案中,检测包括使用床边检验。在一个实施方案中,将检测14-3-3 η 与检测另一种关节炎标志物(例如,MMP、抗CCP抗体、抗RF抗体和/或CRP)联用。

[0023] 在一个实施方案中,本发明提供了用于诊断神经性病症的方法。在一个优选实施方案中,提供了用于诊断选自细菌性脑膜炎和克-雅病(Creutzfeldt Jakob disease)之疾病的方法。

[0024] 在一个方面中,本发明提供了用于治疗涉及14-3-3 η 之疾病的方法。所述方法包括向患者施用治疗有效量的本发明抗14-3-3 η 抗体。在一些实施方案中,所述方法包括联合治疗。

[0025] 在一个实施方案中,本发明提供了治疗炎性病症的方法。在一个优选实施方案中,

提供了用于治疗关节炎的方法。包括治疗选自以下疾病的方法：强直性脊柱炎、白塞病、弥漫性特发性骨肥厚症 (DISH)、埃-当综合征 (EDS)、费尔蒂综合征、纤维肌痛、痛风、感染性关节炎、幼年性关节炎、狼疮、混合性结缔组织病 (MCTD)、骨关节炎、佩吉特病、风湿性多肌痛、多肌炎和皮肌炎、假性痛风、银屑病关节炎、雷诺现象、反应性关节炎、类风湿性关节炎、硬皮病、舍格伦综合征、斯蒂尔病和韦格纳肉芽肿病。

[0026] 在一个实施方案中，所述方法包括联合治疗，其中除了施用一种或多种本发明抗 14-3-3 η 抗体之外还施用至少一种另外的治疗剂。在一个优选实施方案中，所述治疗剂选自：改变病因的抗风湿药物 (disease-modifying antirheumatic drug, DMARD)、改变病因的骨关节炎药物 (disease-modifying osteoarthritis drug, DMOAD；例如参见 Loeser, *Reumatologia*, 21:104-106, 2005)、抗 TNF α 抗体、抗 IL-1 抗体、抗 CD4 抗体、抗 CTLA4 抗体、抗 CD20 抗体、抗 IL-6 抗体、来氟米特、柳氮磺吡啶和甲氨蝶呤。

[0027] 在一个方面中，本发明提供了用于预防涉及 14-3-3 η 之病症发生的预防性方法。

[0028] 在一个实施方案中，本发明提供了用于在具有发生炎症性疾病风险的对象中预防炎症疾病发生的预防性方法。在一个优选实施方案中，提供了在具有发生关节炎风险的对象中预防关节炎的预防性方法。包括预防选自以下疾病的预防性方法：强直性脊柱炎、白塞病、弥漫性特发性骨肥厚症 (DISH)、埃-当综合征 (EDS)、费尔蒂综合征、纤维肌痛、痛风、感染性关节炎、幼年性关节炎、狼疮、混合性结缔组织病 (MCTD)、骨关节炎、佩吉特病、风湿性多肌痛、多肌炎和皮肌炎、假性痛风、银屑病关节炎、雷诺现象、反应性关节炎、类风湿性关节炎、硬皮病、舍格伦综合征、斯蒂尔病和韦格纳肉芽肿病。所述方法包括向对象施用本发明的抗 14-3-3 η 抗体。在一个实施方案中，所述抗 14-3-3 η 抗体作为本文所述联合疗法的组分进行施用。

[0029] 在一个方面中，本发明提供了监测涉及 14-3-3 η 之疾病的治疗的方法。所述方法包括使用本发明的抗 14-3-3 η 抗体测定患者样品中 14-3-3 η 的水平，以及监测进行治疗的患者中 14-3-3 η 的水平。

[0030] 在一个实施方案中，本发明提供了用于监测炎症病症之治疗的方法。在一个优选实施方案中，提供了用于监测关节炎治疗的方法。包括用于监测选自以下之疾病的治疗的方法：强直性脊柱炎、白塞病、弥漫性特发性骨肥厚症 (DISH)、埃-当综合征 (EDS)、费尔蒂综合征、纤维肌痛、痛风、感染性关节炎、幼年性关节炎、狼疮、混合性结缔组织病 (MCTD)、骨关节炎、佩吉特病、风湿性多肌痛、多肌炎和皮肌炎、假性痛风、银屑病关节炎、雷诺现象、反应性关节炎、类风湿性关节炎、硬皮病、舍格伦综合征、斯蒂尔病和韦格纳肉芽肿病。

[0031] 在一个方面中，本发明提供了用于确定患者对涉及 14-3-3 η 之疾病的治疗的响应潜力的方法。在一个实施方案中，所述方法包括使用本发明的抗 14-3-3 η 抗体测定患者样品中的 14-3-3 η 水平。在一个优选实施方案中，将患者样品中的 14-3-3 η 水平与来自已知能够响应于治疗之对象的样品中的 14-3-3 η 水平进行比较。

[0032] 在一个实施方案中，本发明提供了用于确定患者对炎症疾病之治疗的响应潜力的方法。在一个优选实施方案中，提供了用于确定患者对关节炎治疗的响应潜力的方法。包括用于确定对选自以下疾病之治疗的响应潜力的方法：强直性脊柱炎、白塞病、弥漫性特发性骨肥厚症 (DISH)、埃-当综合征 (EDS)、费尔蒂综合征、纤维肌痛、痛风、感染性关节炎、幼年性关节炎、狼疮、混合性结缔组织病 (MCTD)、骨关节炎、佩吉特病、风湿性多肌痛、多肌炎和

皮炎、假性痛风、银屑病关节炎、雷诺现象、反应性关节炎、类风湿性关节炎、硬皮病、舍格伦综合征、斯蒂尔病和韦格纳肉芽肿病。

[0033] 在一个方面中,本发明提供了用于区分涉及14-3-3 η 之疾病亚型的方法。

[0034] 在一个实施方案中,提供了用于区分炎性疾病亚型的方法。在一个优选实施方案中,提供了用于区分关节炎亚型的方法。包括用于区分选自以下之疾病的方法:强直性脊柱炎、白塞病、弥漫性特发性骨肥厚症(DISH)、埃-当综合征(EDS)、费尔蒂综合征、纤维肌痛、痛风、感染性关节炎、幼年性关节炎、狼疮、混合性结缔组织病(MCTD)、骨关节炎、佩吉特病、风湿性多肌痛、多肌炎和皮炎、假性痛风、银屑病关节炎、雷诺现象、反应性关节炎、类风湿性关节炎、硬皮病、舍格伦综合征、斯蒂尔病和韦格纳肉芽肿病。在一个实施方案中,所述方法包括使用本发明的抗14-3-3 η 抗体测定患者样品中的14-3-3 η 水平。在一个优选实施方案中,将患者样品中的14-3-3 η 水平与来自炎性疾病或预后亚型已知的对象之样品中的14-3-3 η 水平进行比较。

[0035] 在一个方面中,本发明提供了用于减少由外伤引起的关节损伤的方法。所述方法包括向具有外伤受损关节的对象施用本发明的抗14-3-3 η 抗体。在一个实施方案中,所述抗14-3-3 η 抗体作为本文所述联合治疗的组分来施用。

[0036] 在一个方面中,本发明提供了降低MMP表达的方法。在一个实施方案中,待降低的MMP表达是在滑膜中。所述方法包括向存在产生MMP之细胞的组织或区室递送本发明的抗14-3-3 η 抗体,其中产生MMP的细胞响应于14-3-3 η 蛋白。可以直接或间接地递送至受影响组织或区室。在一个优选实施方案中,所述响应细胞是成纤维细胞或FLS细胞。

[0037] 在一个优选实施方案中,待降低的MMP表达是与关节炎相关的MMP表达。

[0038] 在一个优选实施方案中,待降低的MMP表达是选自以下MMP的表达:MMP-1、3、8、9、10、11和13。在一个特别优选的实施方案中,待降低的MMP表达是MMP-1或MMP-3的表达。

[0039] 在一个方面中,本发明提供了抑制14-3-3 η 蛋白对MMP之诱导的方法。抑制可以是部分的或完全的。所述方法包括向存在产生MMP之细胞的组织或区室递送本发明的抗14-3-3 η 抗体,其中所述产生MMP的细胞响应于14-3-3 η 蛋白。可以直接或间接递送至受影响组织或区室。在一个优选实施方案中,将所述抗14-3-3 η 抗体施用到滑膜。在一个优选实施方案中,所述响应细胞是成纤维细胞或FLS细胞。

[0040] 在一个优选实施方案中,待抑制的MMP诱导是对在关节炎中上调之MMP的诱导。

[0041] 在一个优选实施方案中,待抑制的MMP诱导是对选自以下MMP的诱导:MMP-1、3、8、9、10、11和13。在一个特别优选的实施方案中,待抑制的MMP诱导是MMP-1或MMP-3的诱导。

[0042] 在一个方面中,本发明提供了降低对象中关节肿胀的方法。所述方法包括向受影响对象施用本发明的抗14-3-3 η 抗体。

[0043] 在一个方面中,本发明提供了降低对象中软骨降解的方法。所述方法包括向受影响对象施用本发明的抗14-3-3 η 抗体。

[0044] 在一个方面中,本发明提供了降低对象中骨降解的方法。所述方法包括向受影响对象施用本发明的抗14-3-3 η 抗体。

[0045] 在一个方面中,本发明提供了降低滑膜液中促炎细胞因子积累的方法。所述方法包括向受影响对象施用本发明的抗14-3-3 η 抗体。

[0046] 对于涉及向受影响对象施用抗14-3-3 η 抗体的方法,在一个优选实施方案中,使用

囊内递送。在另一实施方案中,使用系统性递送。配制治疗性组合物,并施用以使得这样递送的抗14-3-3 η 抗体可结合位于细胞外的14-3-3 η 蛋白。

[0047] 在一个方面中,本发明提供了可用于诊断涉及14-3-3 η 的疾病或者确定受涉及14-3-3 η 之疾病影响的患者之预后的试剂盒。

[0048] 在一个方面中,本发明提供了可用于治疗涉及14-3-3 η 之疾病的药物组合物。所述药物组合物包含本发明的抗14-3-3 η 抗体。在一个优选实施方案中,提供了可用于治疗关节炎的药物组合物。

[0049] 在一个方面中,本发明提供了制备可用于治疗涉及14-3-3 η 之疾病的药物的方法。

附图说明

[0050] 图1.ELISA:小鼠抗AUG1-CLDK免疫血清(第二次加强后)针对AUG1-CLDK-BSA抗原的测试血液效价(仅IgG应答)。

[0051] 图2.ELISA:小鼠抗AUG2-KKLE免疫血清(第二次加强后)针对AUG2-KKLE-BSA抗原的测试血液效价(仅IgG应答)。

[0052] 图3.ELISA:小鼠抗AUG3-CKNS免疫血清(第二次加强后)针对AUG3-CKNS-BSA抗原的测试血液效价(仅IgG应答)。

[0053] 图4.多种14-3-3蛋白同工型的序列比对。

[0054] 图5.Western印迹,显示市售14-3-3 η 多克隆抗体与7种14-3-3蛋白同工型的交叉反应性。

[0055] 图6.Western印迹,显示由针对人全长重组14-3-3 η 产生之单克隆抗体免疫沉淀的来自细胞裂解物之14-3-3 η 蛋白和人重组14-3-3 η 。

[0056] 图7.Western印迹,显示由针对来自所述蛋白质非螺旋区的人14-3-3 η 肽片段142-158SEQ ID NO:24产生之单克隆抗体免疫沉淀的来自细胞裂解物之14-3-3 η 蛋白和人重组14-3-3 η 。

[0057] 图8.ELISA:小鼠抗14-3-3 η 免疫血清(第二次加强后)针对14-3-3 η 抗原的测试血液效价(仅IgG应答)。

[0058] 发明详述

[0059] 如果抗体或其抗原结合片段以可检出水平(例如在ELISA测定中)与配体反应,并且在相似条件下不与无关配体可检出地反应,则称抗体或其抗原结合片段与配体“特异性结合”、“免疫结合”和/或“免疫反应”。

[0060] 本文所用的免疫结合一般是指发生在免疫球蛋白分子与该免疫球蛋白特异性的抗原之间的非共价相互作用类型。免疫结合相互作用的强度或亲和力可用相互作用的解离常数(K_d)来表示,其中较小的 K_d 表示较大的亲和力。可使用本领域公知的方法对免疫结合特性进行定量。例如,参见Davies等人(1990) Annual Rev. Biochem. 59:439-473。

[0061] “抗体”是指包含特异性结合相应抗原之蛋白质的组合物,并且其具有免疫球蛋白的一般共同结构。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)以及抗体片段,只要它们表现出期望的生物活性即可。抗体可以是鼠源的、人源的、人源化的、嵌合的或者源自其它物种。通常,抗体会包含由二硫键相互连接的至少两个重链和两个轻链,当它们组合时形成与抗原相互作用的结合结构域。每个

重链包含重链可变区 (VH) 和重链恒定区 (CH)。重链恒定区包括三个结构域——CH1、CH2和CH3,并且可以为 μ 、 δ 、 γ 、 α 和 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构成——CL,其可以为 κ 或 λ 同种型。VH和VL区域还可进一步细分成高变区(称为互补决定区(CDR)),其被称为框架区(FR)的较保守区域间隔开。每个VH和VL包含3个CDR和4个FR,从氨基端至羧基端以下列顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的可变区包含与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子(包括免疫系统的多种细胞(例如,效应细胞)和经典补体系统的第一组分(C1q))的结合。重链恒定区介导免疫球蛋白与宿主组织或宿主因子的结合,特别是通过细胞受体(例如Fc受体(例如,Fc γ RI、Fc γ RII、Fc γ RIII等))的结合。如本文所用,抗体还包括免疫球蛋白中保留了结合抗原之能力的抗原结合部分。这些包括例如F(ab)——VL CL和VH CH抗体结构域的单价片段;和F(ab')₂片段——包含由铰链区二硫键相连的两个Fab片段的二价片段。术语“抗体”还指重组的单链Fv片段(scFv)和双特异性分子,例如双抗体、三抗体和四抗体(参见例如美国专利No.5,844,094)。

[0062] 抗体可以多种形式制备和使用,包括抗体复合物。本文使用的术语“抗体复合物”是指一种或多种抗体与另一抗体或者与抗体片段的复合物,或者是两种或更多种抗体片段的复合物。抗体复合物包括多聚形式的抗14-3-3抗体,例如如本发明所述的同缀合物和异缀合物以及其它交联抗体。

[0063] “抗原”作广义理解,其是指可特异性结合抗体的任何分子、组合物或颗粒。抗原具有一个或多个与抗体相互作用的表位,尽管其不一定诱导该种抗体的产生。

[0064] 术语“交联”及其语法上的等同形式是指两个或更多个抗体结合形成抗体复合物,也可称为多聚化。交联或多聚化包括两个或更多个同样抗体的结合(例如,同二聚化),以及两个或更多个不同抗体的结合(例如,异二聚化)。本领域技术人员还会了解,交联或多聚化也称为形成抗体同缀合物和抗体异缀合物。这样的缀合物可包括同一克隆来源的两个或更多个单克隆抗体的结合(同缀合物)或者两个或更多个不同克隆来源的抗体的结合(也称为异缀合物或双特异性)。抗体可通过非共价或共价结合进行交联。本领域技术人员会了解适于交联的多种技术。可通过使用特异性针对第一抗体种类的第二抗体来实现非共价结合。例如,可使用山羊抗小鼠(goat anti-mouse,GAM)第二抗体来交联小鼠单克隆抗体。可通过使用化学交联物来实现共价结合。

[0065] “表位”是指能够特异性结合抗体的决定簇。表位是通常存在于分子表面上并且有机会与抗体相互作用的化学特征。典型的化学特征是具有三维结构特征以及包括电荷、亲水性和亲脂性等化学性质的氨基酸和糖部分。构象表位与非构象表位的不同在于:其在分子的空间要素变化而没有任何内在化学结构的变化时丧失与抗体的反应性。

[0066] “人源化抗体”是指尽可能少地含有源自非人免疫球蛋白之序列的免疫球蛋白分子。人源化抗体包括这样的人免疫球蛋白(受者抗体),其中来自受者互补决定区(CDR)的残基被具有所需特异性、亲和力和容量的来自非人物种例如小鼠、大鼠或兔的CDR(供者抗体)的残基替换。在一些情形中,人免疫球蛋白的Fv框架残基被相应的非人残基所替换。人源化抗体还可包含在受者抗体或者所引入的CDR或框架序列中均不存在的残基。一般地,人源化抗体会包含至少一个以及通常两个可变结构域的基本全部,其中全部或基本上全部的CDR区域对应于非人免疫球蛋白中的那些,全部或基本上全部的框架(FR)区是人免疫球蛋白共

有序列中的那些。人源化抗体还涵盖包含免疫球蛋白恒定区 (Fc) 之至少一部分 (其一般是人免疫球蛋白的) 的免疫球蛋白 (Jones等人, Nature 321:522-525 (1986); Reichmann等人, Nature 332:323-329 (1988))。

[0067] “免疫原”是指刺激产生免疫应答的物质、化合物或组合物。

[0068] 术语“免疫球蛋白基因座”是指这样的遗传元件或者一组连锁的遗传元件,其包含B细胞或B细胞前体可利用来表达免疫球蛋白多肽的信息。该多肽可以是重链多肽、轻链多肽或者重链和轻链多肽的融合物。在未经重排基因座的情形中,B细胞前体对遗传元件进行组装以形成编码免疫球蛋白多肽的基因。在经重排基因座的情形中,基因座内包含编码免疫球蛋白多肽的基因。

[0069] “同种型 (isotype)”是指由重链恒定区定义的抗体类别。重链一般分为 γ 、 μ 、 α 、 δ 、 ϵ , 并命名为IgG、IgM、IgA、IgD和IgE。每个同种型内的差异又将其分为多种亚型,例如IgG的亚型分为IgG1、IgG2、IgG3和IgG4,而IgA分为IgA1和IgA2。IgY同种型是鸟类特有的。

[0070] “单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”是指单一分子组成的抗体分子制备物。单克隆抗体组合物显示出对特定表位的单一结合特异性和亲和力。

[0071] 术语“人单克隆抗体”包括具有来源于人免疫球蛋白序列的可变区和/或恒定区 (如果存在的话) 的显示单一结合特异性的抗体。在一个实施方案中,人单克隆抗体由这样的杂交瘤产生,所述杂交瘤包含与永生化细胞融合的、具有包含人重链转基因和轻链转基因之基因组的、从转基因非人动物 (例如转基因小鼠) 获得的B细胞。

[0072] “单链Fv”或“scFv”是指包含抗体VH和VL区域的抗体,其中这些结构域存在于单个多肽链中。通常,scFv还包含VH和VL结构域之间的多肽接头,其使得scFv形成抗原结合的所需结构。

[0073] “对象”和“患者”可互换使用,其是指哺乳动物例如人和非人灵长类以及兔、大鼠、小鼠、山羊、猪以及其它哺乳动物物种,另有指明除外。

[0074] “重组抗体”是指所有通过重组技术产生的抗体。这些包括从免疫球蛋白基因座为转基因的动物获得的抗体、从重组表达载体表达的抗体以及通过将任意免疫球蛋白基因序列剪接成任何其它核酸序列而产生、制备和表达的抗体。

[0075] 抗14-3-3抗体

[0076] 在一个方面中,本发明提供了抗14-3-3 η 抗体。本发明的抗14-3-3 η 抗体能够 (i) 通过例如免疫沉淀所证明地,特异性结合天然构型的人14-3-3 η 蛋白,以及 (ii) 相对于其它的人14-3-3蛋白同工型来说,选择性结合人14-3-3 η 蛋白。

[0077] 特异性结合“天然构型”的人14-3-3 η 蛋白意指有如是在体内接触时结合14-3-3蛋白的能力。这可例如通过抗体对来自生物样品的14-3-3 η 蛋白进行免疫沉淀的能力来证明。

[0078] “相对于其它的人14-3-3蛋白同工型来说,针对所述人14-3-3 η 蛋白的选择性”意指:在同样的条件下,与其它的人14-3-3蛋白同工型相比,特异性结合人14-3-3 η 蛋白并优先结合14-3-3 η 的能力。可例如使用ELISA测定来证明选择性,该测定可使用例如杂交瘤克隆的上清液来进行。优选使用对照 (例如免疫前血清)。“选择性”抗体能够识别14-3-3 η ,并且与其它的人14-3-3同工型相比产生更高的针对14-3-3 η 的信号,优选相比于其它同工型高出至少1.5倍的信号,更优选高出至少2倍的信号。在一个优选实施方案中,相比于其它14-3-3同工型,选择性抗体能够选择性免疫沉淀14-3-3 η 。

[0079] 在一个优选实施方案中,所述抗14-3-3 η 抗体显示出相比于人14-3-3 α 、 β 、 δ 、 ϵ 、 γ 、 τ 和 ξ 蛋白来说针对所述人14-3-3 η 蛋白的选择性。这可例如通过ELISA来证明。

[0080] 在一个优选实施方案中,本发明的抗14-3-3 η 抗体能够结合在关节炎中异常定位于细胞外滑膜腔中的14-3-3 η 蛋白。这可通过例如对存在于关节炎患者之滑膜液样品中的14-3-3 η 蛋白进行免疫沉淀来证明。

[0081] 在一个优选实施方案中,抗14-3-3 η 抗体能够抑制14-3-3 η 对MMP的诱导。优选地,所述MMP选自MMP-1、3、8、9、10、11和13,特别优选MMP-1和MMP-3。该能力可通过体外测定或体内测定来确定。如本领域技术人员所了解地,设计该测定使得在不存在抗14-3-3 η 抗体时,14-3-3 η 的存在会导致MMP诱导。降低14-3-3 η 对MMP之诱导的能力可证明抗14-3-3 η 抗体的该功能抑制能力。

[0082] 14-3-3 η 表位

[0083] 在一个优选实施方案中,本发明的抗14-3-3 η 抗体不结合14-3-3 η N端的表位。14-3-3 η 的“N端”是指1-12位氨基酸(即,DREQLLQRARLA (SEQ ID NO:33))。

[0084] 在一个优选实施方案中,本发明的抗14-3-3 η 抗体能够结合包含选自以下肽的表位:14-3-3 η 环肽、14-3-3 η 螺旋肽和14-3-3 η 非螺旋肽,其中 η 环肽是特别优选的。参见本文表1。示例性的14-3-3 η 环、螺旋和非螺旋肽公开于本文表1中。要注意的是,SEQ ID NO:30与对应的14-3-3 η 序列的不同在于:14-3-3 η 序列中存在的半胱氨酸被丝氨酸所替换,以避免形成二硫键。在一个实施方案中,本发明提供了这样的抗体,其还结合与SEQ ID NO:30相关的包含半胱氨酸的天然14-3-3 η 序列。在一个实施方案中,本发明提供了能够结合如下肽序列的抗体,所述肽序列与表1所列肽序列的不同在于用丝氨酸替换半胱氨酸。

[0085] (i) 环肽

[0086] 在一个优选实施方案中,所述14-3-3 η 环肽包含选自SEQ ID NO:11-16的氨基酸序列。在另一实施方案中,抗14-3-3 η 抗体结合与对应于选自SEQ ID NO:11-16之序列的氨基酸序列重叠的14-3-3 η 区域。

[0087] 在一个特别优选的实施方案中,本发明的抗14-3-3 η 抗体结合选自以下的氨基酸序列:LDKFLIKNSNDF (SEQ ID NO:30)、KKLEKVKAYR (SEQ ID NO:31) 和KNSVVEASEAAYKEA (SEQ ID NO:32)。

[0088] (ii) 螺旋肽

[0089] 在一个优选实施方案中,所述14-3-3 η 螺旋肽包含选自SEQ ID NO:1-10的氨基酸序列。在另一实施方案中,抗14-3-3 η 抗体结合与对应于选自SEQ ID NO:1-10之序列的氨基酸序列重叠的14-3-3 η 区域。

[0090] (iii) 非螺旋肽

[0091] 在一个优选实施方案中,所述14-3-3 η 非螺旋肽包含选自SEQ ID NO:17-32的氨基酸序列。在另一实施方案中,抗14-3-3 η 抗体结合与对应于选自SEQ ID NO:17-32之序列的氨基酸序列重叠的14-3-3 η 区域。

[0092] 单克隆抗体、杂交瘤及其制备方法

[0093] 在一个实施方案中,本发明提供了抗14-3-3 η 抗体,其为抗14-3-3 η 单克隆抗体。还提供了能够产生此类抗体的杂交瘤细胞系。还提供了用于产生此类杂交瘤的方法以及产生此类抗体的方法。

[0094] 所提供的抗14-3-3 η 单克隆抗体包括与本文所述14-3-3 η 环、螺旋和非螺旋肽结合的抗体。

[0095] 在一个方面中,本发明提供了通过融合来源于小鼠的脾细胞而产生的杂交瘤,其中所述小鼠用包含14-3-3 η 环、螺旋或非螺旋肽的免疫原进行免疫。还提供了此类杂交瘤产生的单克隆抗体。

[0096] 本发明还提供了产生这些单克隆抗体或其衍生物的方法,包括在合适条件下培养本发明的杂交瘤,由此产生单克隆抗体,并从细胞和/或细胞培养基获得抗体和/或其衍生物。

[0097] 本领域技术人员可容易地制备抗体。由杂交瘤制备单克隆抗体的一般性方法已是本领域公知的。参见例如M.Schreier等人,Hybridoma Techniques (Cold Spring Harbor Laboratory) 1980;Hammerling等人,Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas (Elsevier Biomedical Press) 1981。

[0098] 在一些实施方案中,这些方法包括在合适条件下培养产生所述抗体的杂交瘤细胞,以及从所述细胞和/或细胞培养基获得抗体和/或其衍生物。

[0099] 本发明还考虑到使用噬菌体文库来筛选能够结合本文所述之目的14-3-3肽的抗体。例如参见Konthur等人,Targets, 1:30-36, 2002。

[0100] 可通过本领域技术人员已知的方法来纯化通过任意方法制备的抗体。纯化方法包括选择性沉淀、液相色谱、HPLC、电泳、色谱聚焦和多种亲和技术等。选择性沉淀可使用硫酸铵、乙醇(Cohn沉淀)、聚乙二醇或其它本领域可用的试剂。液相色谱介质包括离子交换介质DEAE、聚天冬氨酸、羟磷灰石、尺寸排阻(例如,基于交联琼脂糖、丙烯酰胺、葡聚糖等的尺寸排阻)、疏水性基质(例如Blue Sepharose)。亲和技术通常依赖于与免疫球蛋白Fc结构域相互作用的蛋白质。来自金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的蛋白A可用于纯化基于人 γ 1、 γ 2或 γ 4重链的抗体(Lindmark等人,J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983))。来自C群和G群链球菌的蛋白G可用于所有小鼠同种型和人 γ 3(Guss等人,EMBO J. 5:1567-1575 (1986))。蛋白L(一种大消化链球菌(*Peptostreptococcus magnus*)细胞壁蛋白质,其通过 κ 轻链相互作用与免疫球蛋白(Ig)结合(BD Bioscience/ClonTech, Palo Alto, CA)可用于Ig亚类IgM、IgA、IgD、IgG、IgE和IgY的亲纯化。这些蛋白质的重组形式也有市售。如果所述抗体含有金属结合残基(例如构建成含有组氨酸标签的噬菌体展示抗体),可使用金属亲和色谱法。当有足够量的特异性细胞群可用时,可用细胞制备抗原亲和基质以提供纯化所述抗体的亲和方法。

[0101] 在一个优选实施方案中,分离包括使用14-3-3 η 或其片段的亲和色谱法。

[0102] 本发明提供了本文所述的抗体,以及相应的抗体片段和抗原结合部分。所有这些都涵盖在术语“抗14-3-3 η 抗体”中。本文所用的本发明术语“抗体片段”或抗体的“抗原结合部分”(或简称“抗体部分”)是指保留了特异性结合抗原能力的一个或多个抗体片段。已显示,抗体的抗原结合功能可由全长抗体的片段来实现。术语“抗体片段”或抗体的“抗原结合部分”所涵盖的结合片段实例包括:(i) Fab片段——由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段;(ii) F(ab')₂片段——包含由铰链区二硫键连接的两个Fab片段的二价片段;(iii) 由VH和CH1结构域组成的Fd片段;(iv) 由抗体单个臂上的VL和VH结构域组成的Fv片段,(v) dAb片段(例如,Ward等人,(1989) Nature 341:544-546),其由VH结构域组成;(vi) 分离的互补决

定区(CDR),和(vii)双特异性单链Fv二聚体(例如PCT/US92/09965)。此外,尽管Fv片段的两个结构域(VL和VH)由单独的基因编码,但可以通过合成的接头使用重组方法将它们连接,所述接头使得它们能够制备成单个蛋白质链,其中VL和VH区域对形成单价分子(称为“单链Fv(scFv)”);参见例如Bird等人(1988)Science 242:423-426;以及Huston等人(1988)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883)。这样的单链抗体也旨在涵盖在术语抗体的“抗原结合部分”中。使用本领域技术人员已知的常规技术获得这些抗体片段,使用与完整抗体同样的方式筛选片段。可对所述抗体片段进行修饰。例如,可通过整合入连接VH和VL结构域的二硫桥来稳定所述分子(Reiter等人,1996,Nature Biotech.14:1239-1245)。

[0103] 可将免疫球蛋白分子切割成片段。所述分子的抗原结合区域可分为F(ab')₂或Fab片段。F(ab')₂片段是二价的,可用于Fc区域是不期望的或不需要的特征时。Fab片段是单价的,可用于抗体对其抗原具有非常高的亲和力时。从抗体中去除Fc区域降低了Fc区域与具有Fc受体之细胞之间的非特异性结合。为了得到Fab或F(ab')₂片段,用酶消化抗体。在免疫球蛋白分子的铰链区进行切割的蛋白酶保留了连接Fab结构域的二硫键,使它们在切割后仍连在一起。适于此目的的蛋白酶是胃蛋白酶。为产生Fab片段,选择蛋白酶以使得切割发生在含有连接重链之二硫键的铰链区以上,但其仍保留了连接重链和轻链的完整二硫键。适于制备Fab片段的蛋白酶是木瓜蛋白酶。通过上述方法纯化所述片段,需要完整Fc区域的亲和方法除外(例如蛋白A亲和色谱法)。

[0104] 可通过抗体的有限蛋白水解产生抗体片段,其称为蛋白水解抗体片段。这些包括但不限于:F(ab')₂片段、Fab'片段、Fab'-SH片段和Fab片段。通过将抗体有限暴露于蛋白水解酶(例如胃蛋白酶或无花果蛋白酶)而从抗体释放“F(ab')₂片段”。F(ab')₂片段包含两个“臂”,其中每个臂均包含针对共同抗原并与其特异性结合的可变区。两个Fab'分子通过重链铰链区中的链间二硫键连接;所述Fab'分子可以针对相同(二价)或不同(双特异性)的表位。“Fab'片段”含有单个抗原结合结构域,其包含Fab以及穿过铰链区的额外重链部分。“Fab'-SH片段”通常由F(ab')₂片段制备,其在F(ab')₂片段中由H链之间的二硫键连接在一起。用弱还原剂(例如但不限于,β-巯基乙胺)处理,断裂二硫键,继而从F(ab')₂片段释放两个Fab'片段。Fab'-SH片段是单价且单特异性的。“Fab片段”(即含有抗原结合结构域并包含轻链和由二硫键桥连之部分重链的抗体片段)可通过木瓜蛋白酶消化完整抗体来产生。简便的方法是使用固定于树脂上的木瓜蛋白酶,从而可容易地除去所述酶并终止消化。Fab片段不具有F(ab')₂片段中存在的H链之间的二硫键。

[0105] “单链抗体”是一类抗体片段。术语“单链抗体”常缩写为“scFv”或“sFv”。这些抗体片段使用DNA重组技术制备。单链抗体由多肽链组成,所述多肽链包含V_H和V_L结构域,其相互作用以形成抗原结合位点。所述V_H和V_L结构域通常由10~25个氨基酸残基的肽连接。

[0106] 术语“单链抗体”还包括但不限于:二硫键连接的Fv(dsFv),其中两个单链抗体(每个可针对不同的表位)通过二硫键连接在一起;双特异性sFv,其中具有不同特异性的两个独立的scFv通过肽接头相连;双抗体(当第一sFv的V_H结构域与第二sFv的V_L结构域组装以及所述第一sFv的V_L结构域与第二sFv的V_H结构域组装时形成的二聚化sFv;双抗体的两个抗原结合区域可针对相同或不同的表位);以及三抗体(三聚化sFv,以类似于双抗体的方式形成,只是其中在单个复合物中形成三个抗原结合结构域;所述三个抗原结合结构域可针对相同或不同的表位)。

[0107] “互补决定区肽”或“CDR肽”是另一种抗体片段形式。在一个实施方案中,本发明提供了这样的CDR肽。在一个优选实施方案中,此类CDR肽用作14-3-3拮抗剂。CDR肽(也称为“最小识别单位”)是对应于单个互补决定区(CDR)的肽,并且可通过构建编码目的抗体之CDR的基因来制备。例如通过使用聚合酶链式反应从产生抗体之细胞的RNA合成可变区来制备这些基因。参见,例如Larrick等人,Methods:A Companion to Methods in Enzymology 2:106,1991。

[0108] 在“经半胱氨酸修饰的抗体”中,通过基因操作将半胱氨酸插入或替换于抗体表面上,用于将所述抗体与另一分子通过例如二硫桥进行缀合。抗体的半胱氨酸替换或插入已有描述(参见美国专利No.5,219,996)。将Cys残基引入IgG抗体恒定区中用于抗体之位点特异性缀合的方法描述于Stimmel等人(J.Biol.Chem 275:330445-30450,2000)。

[0109] 本公开内容还提供了人源化和非人源化的抗体。人源化形式的非人(例如小鼠)抗体是尽可能少地含有来源于非人免疫球蛋白之序列的嵌合抗体。通常,人源化抗体是非人抗体,其可变结构域框架区替换为人抗体中存在的序列。人源化抗体可以是这样的人免疫球蛋白(受者抗体),其中来自受者高变区的残基被来自非人物种(例如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类)的具有期望特异性、亲和力和容量的高变区(供者抗体)的残基所替换。在一些情形中,人免疫球蛋白的框架区(FR)残基被相应的非人残基所替换。此外,人源化抗体可包含在受者抗体或供者抗体中均不存在的残基。进行这些修饰以进一步优化抗体的性能。一般地,人源化抗体会包含至少一个以及通常两个可变结构域的基本上全部,其中全部或基本上全部的高变环对应于非人免疫球蛋白中的高变环,并且全部或基本上全部的FR是人免疫球蛋白序列中的FR。任选地,人源化抗体还会包含至少部分的免疫球蛋白恒定区(Fc)(通常是人免疫球蛋白的Fc)。

[0110] 一般地,在人源化抗体中,除CDR以外的整个抗体均由人源的多核苷酸编码,或者除了CDR以外均与此抗体一致。将CDR(其中一些或全部由非人生物来源之核酸编码)“嫁接”于人抗体可变区的 β -片层框架,产生特异性由所“嫁接”CDR决定的抗体。这些抗体的产生描述于例如W092/11018, Jones, 1986, Nature 321:522-525, Verhoeyen等人, 1988, Science 239:1534-1536中。人源化抗体还可使用具有遗传改造之免疫系统的小鼠来得到,例如Roque等人, 2004, Biotechnol. Prog. 20:639-654。

[0111] 在效应物功能方面对本发明抗体进行修饰可以是理想的。例如,可将半胱氨酸残基引入Fc区域,从而允许在该区域中形成链间二硫键。还可使用异双功能交联剂来制备同二聚化抗体,例如Wolff等人Cancer Research, 53:2560-2565(1993)。或者,可改造抗体使其具有两个Fc区域。参见例如,Stevenson等人, Anti-Cancer Drug Design, 3:219-230(1989)。

[0112] 经修饰抗体

[0113] 在一个实施方案中,本发明提供了抗14-3-3 η 抗体,其为经修饰的抗体。经修饰抗体包括如本文所述的重组抗体。

[0114] 本领域技术人员会了解多种类型的经修饰抗体或重组抗体。合适类型的经修饰或重组抗体包括但不限于:经改造单克隆抗体(例如嵌合单克隆抗体、人源化单克隆抗体)、结构域抗体(例如Fab、Fv、VH、scFv和dsFv片段)、多价或多特异性抗体(例如双抗体、微抗体(minibody)、微抗体(miniantibody)、(scFv)₂、三抗体和四抗体)以及如本文所述的抗体缀

合物。

[0115] 在一方面中,本发明提供了作为结构域抗体的抗14-3-3 η 抗体。“结构域抗体”是抗体的功能性结合结构域,其对应于人抗体的重链(VH)或轻链(VL)的可变区。结构域抗体可具有约13kDa的分子量或者小于完整抗体大小的十分之一。它们在多种宿主中很好地表达,包括细菌、酵母和哺乳动物细胞系统。另外,结构域抗体高度稳定,并且甚至在经历严苛条件(例如冷冻干燥或热变性)之后仍保持活性。参见例如,美国专利6,291,158;6,582,915;6,593,081;6,172,197;美国序列号No.2004/0110941;欧洲专利0368684;美国专利6,696,245、W004/058821、W004/003019和W003/002609。在一个实施方案中,本发明的结构域抗体是单结构域。单结构域抗体可如例如美国专利No.6,248,516中所述来制备。

[0116] 在另一方面中,本发明包括多特异性抗体。多特异性抗体包括双特异性、三特异性抗体等。双特异性抗体可通过重组手段制备,例如通过使用亮氨酸拉链部分(即,来自Fos和Jun蛋白,其优先形成异二聚体;例如Kostelny等人,1992,J.Immunol.148:1547)或者其它锁钥相互作用结构域结构来实现,例如美国专利No.5,582,996中所述。其它可用的技术包括美国专利No.5,959,083和美国专利No.5,807,706中所述的技术。

[0117] 双特异性抗体有时也称为“双抗体”。它们是与两种(或更多种)不同抗原结合的抗体。本领域中还已知三抗体(三聚化sFv,以类似于双抗体的形式形成,只是其中在单个复合物中形成三个抗原结合结构域;所述三个抗原结合结构域可针对相同或不同表位)或四抗体(在单个复合物中形成四个抗原结合结构域,其中所述四个抗原结合结构域可针对相同或不同表位)。双抗体、三抗体或四抗体可采用本领域中已知的各种方法来制备(例如Holliger和Winter,1993,Current Opinion Biotechnol.4:446-449),例如化学方法制备或者从杂交瘤制备。另外,这些抗体及其片段可通过基因融合来构建(例如,Tomlinson等人,2000,Methods Enzymol.326:461-479;W094/13804;Holliger等人,1993,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.90:6444-6448)。

[0118] 在另一实施方案中,本发明提供了微抗体,其是最小化的抗体样蛋白质,包含与CH3结构域连接的scFv(其来源于抗14-3-3 η 抗体)。微抗体可如本领域中所述来制备(例如,Hu等人,1996,Cancer Res.56:3055-3061)。

[0119] 在另一实施方案中,本发明提供了14-3-3 η 结合结构域-免疫球蛋白融合蛋白。在一个实施方案中,所述融合蛋白可包含与免疫球蛋白铰链区多肽融合的14-3-3 η 结合结构域多肽,所述铰链区多肽与融合了免疫球蛋白重链CH3恒定区多肽的免疫球蛋白重链CH2恒定区多肽融合。在本发明中,14-3-3抗体融合蛋白可通过本领域技术人员所了解的方法来制备(参见例如,公开的美国专利申请No.20050238646、20050202534、20050202028、2005020023、2005020212、200501866216、20050180970和20050175614)。

[0120] 在另一实施方案中,本发明提供了来源于抗14-3-3 η 抗体的重链蛋白。已利用天然重链抗体(例如不具有轻链的骆驼抗体)开发抗体衍生的治疗性蛋白质,其通常保留了天然重链抗体的结构和功能性质。它们在本领域中称作“纳米抗体(nanobody)”。可通过本领域技术人员了解的方法来制备来源于抗14-3-3 η 重链抗体的重链蛋白(参见例如,公开的美国专利申请No.20060246477、20060211088、20060149041、20060115470和20050214857)。此外,有关在轻链缺陷型小鼠中生产仅含重链的抗体,参见例如Zou等人,JEM,204:3271-3283,2007。

[0121] 在一个实施方案中,本发明提供了作为人抗体的经修饰抗14-3-3 η 抗体。在一个实施方案中,提供了全人14-3-3抗体。“全人抗体”是指仅具有来源于人染色体之抗体基因序列的人抗体。所述抗14-3-3全人抗体可通过使用产生人抗体的小鼠的方法获得,所述小鼠具有含人抗体重链和轻链基因的人染色体片段[参见例如, Tomizuka, K. 等人, *Nature Genetics*, 16, 133-143页, 1997; Kuroiwa, Y. 等人, *Nuc. Acids Res.*, 26, 3447-3448页, 1998; Yoshida, H. 等人, *Animal Cell Technology: Basic and Applied Aspects* 卷10, 69-73页 (Kitagawa, Y., Matuda, T. 和 Iijima, S. 编), Kluwer Academic Publishers, 1999; Tomizuka, K. 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 722-727, 2000]; 或者通过用选择人抗体文库的噬菌体展示获得人抗体的方法获得(参见例如, Wormstone, I. M. 等人, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 43 (7), 2301-8页, 2002; Carmen, S. 等人, *Briefings in Functional Genomics and Proteomics*, 1 (2), 189-203页, 2002; Siriwardena, D. 等人, *Ophthalmology*, 109 (3), 427-431页, 2002)。

[0122] 在一个方面中,本发明提供了作为抗体类似物的14-3-3抗体,其有时称作“合成抗体”。例如,可使用“嫁接”了CDR的替代性蛋白质骨架或人工骨架。这些骨架包括但不限于例如由生物相容性聚合物组成的合成骨架。参见例如, Korndorfer 等人, 2003, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 卷53, Issue 1: 121-129; Roque 等人, 2004, *Biotechnol. Prog.* 20: 639-654。此外,可使用肽抗体模拟物 (peptide antibody mimetics, “PAM”) 以及利用纤连蛋白组分作为支骨架的抗体模拟物。

[0123] 在一个实施方案中,本发明提供了交联抗体,其包含彼此结合形成抗体复合物的本文所述两个或更多个抗体。交联抗体也称为抗体多聚体、同缀合物和异缀合物。

[0124] 在一些实施方案中,本文提供的抗体复合物包括多聚体形式的抗14-3-3抗体。例如,本发明的抗体复合物可采用单体免疫球蛋白分子的抗体二聚体、三聚体或更高级多聚体的形式。可通过本领域已知的多种方法进行抗体的交联。例如,抗体交联可通过抗体的天然聚集、通过化学或重组连接技术或本领域已知的其它方法来实现。例如,经纯化的抗体制备物可自发地形成含有抗体同二聚体以及其它更高级抗体多聚体的蛋白质聚集体。

[0125] 在一个实施方案中,本发明提供了特异性结合14-3-3 η 的同二聚化抗体。

[0126] 可通过本领域已知的连接技术对抗体进行交联或二聚化。可利用非共价连接方法。在一个具体实施方案中,可通过使用第二交联剂抗体来实现抗体的交联。所述交联剂抗体可来源于不同于目的抗体的动物。例如,可将山羊抗小鼠抗体 (Fab特异性) 添加到小鼠单克隆抗体中以形成异二聚体。该二价交联剂抗体识别两个目的抗体的Fab或Fc区域,从而形成同二聚体。

[0127] 在本发明的一个实施方案中,使用山羊抗小鼠抗体 (GAM) 交联特异性结合14-3-3抗原的抗体。在另一实施方案中,GAM交联剂识别两种抗体的Fab或Fc区域,其中每种抗体均特异性结合14-3-3 η 。

[0128] 还可使用共价或化学连接抗体的方法。化学交联剂可以是同双功能的或异双功能的,并且会共价结合两个抗体,形成同二聚体。交联剂是本领域中公知的;例如,公知同双功能接头或异双功能接头(参见, 2006 Pierce Chemical Company Crosslinking Reagents Technical Handbook; Hermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego, CA (1996); Aslam M. 和 Dent A. H., *Bioconjugation: protein coupling techniques*

for the biomedical sciences, Houndsmills, England: Macmillan Publishers (1999); Pierce: Applications Handbook & Catalog, PerbioScience, Ermodegem, Belgium (2003-2004); Haughland, R.P., Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals Eugene, 第9版, Molecular Probes, OR (2003) 以及美国专利 No. 5,747,641)。本领域技术人员会了解多种官能团对修饰抗体氨基酸(包括交联)的适合性。用于抗体交联的合适化学交联剂实例包括但不限于: SMCC[4-(马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯]、SATA[S-硫代乙酰基-乙酸N-琥珀酰亚胺酯]、N-羟基琥珀酰亚胺的半琥珀酸酯; N-羟基硫代琥珀酰亚胺; 羟基苯并三唑和对硝基酚; 二环己基碳二亚胺(DCC)、1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(ECD)和1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺甲碘化物(EDCI)(参见例如, 美国专利 No. 4,526,714, 其公开内容通过引用整体并入本文)。其它连接试剂包括谷胱甘肽、3-(二乙氧基磷酰氧基)-1,2,3-苯并三嗪-4(3H)-酮(3-(diethoxyphosphoryloxy)-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-one, DEPBT)、基于镉盐的偶联剂、基于聚环氧乙烷的异双功能交联试剂等(Haitao等人, *Organ Lett* 1:91-94(1999); Albericio等人, *J Organic Chemistry* 63:9678-9683(1998); Arpicco等人, *Bioconjugate Chem.* 8:327-337(1997); Frisch等人, *Bioconjugate Chem.* 7:180-186(1996); Deguchi等人, *Bioconjugate Chem.* 10:32-37(1998); Beyer等人, *J. Med. Chem.* 41:2701-2708(1998); Drouillat等人, *J. Pharm. Sci.* 87:25-30(1998); Trimble等人, *Bioconjugate Chem.* 8:416-423(1997))。用于形成抗体同二聚体的示例性方案在美国专利公开20060062786中给出。将治疗性化合物与抗体缀合的方法也描述于 Arnon 等人, "Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancers Therapy," *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Reisfeld 等人编, 243-256页, Alan R. Liss, Inc. (1985); Thorpe 等人 "The Preparation and Cytotoxic Properties of Antibody Toxin Conjugates," *Immunol. Rev.* 62:119-58(1982) 以及 Pietersz, G.A., "The linkage of cytotoxic drugs to monoclonal antibodies for the treatment of cancer," *Bioconjugate Chemistry* 1(2):89-95(1990) 中, 所有参考文献均通过引用并入本文。

[0129] 另外, 本发明的抗体-抗体缀合物可通过本领域已知的技术彼此共价结合, 例如使用异双功能交联试剂——GMBS (maleimidobutryloxysuccinimide, 马来酰亚胺丁氧基琥珀酰亚胺) 和 SPDP (3-(2-吡啶二硫基)丙酸N-琥珀酰亚胺酯) [参见例如, Hardy, "Purification And Coupling Of Fluorescent Proteins For Use In Flow Cytometry", *Handbook Of Experimental Immunology*, 卷1, Immunochimistry, Weir 等人(编), 31.4-31.12页, 第4版, (1986) 以及 Ledbetter 等人, 美国专利 No. 6,010,902]。

[0130] 另外, 抗体可通过硫醚交联进行连接, 如美国专利公开20060216284、美国专利 No. 6,368,596 中所述。如本领域技术人员所了解地, 抗体可以在 Fab 区域交联。在一些实施方案中, 理想的是, 化学交联剂不与抗体的抗原结合区域相互作用, 因为这可能影响抗体功能。

[0131] 缀合抗体

[0132] 本文公开的抗 14-3-3 η 抗体包括与无机或有机化合物缀合的抗体, 包括例如但不限于: 其它蛋白质、核酸、碳水化合物、类固醇和脂质(参见例如, Green 等人, *Cancer Treatment Reviews*, 26:269-286(2000))。所述化合物可以具有生物活性。“生物活性”是指:

与未暴露于化合物的细胞相比,所述化合物对细胞具有生理作用。生理作用是生物过程中的变化,包括例如但不限于:DNA复制和修复、重组、转录、翻译、分泌、膜周转、细胞粘附、信号转导、细胞死亡等。生物活性化合物包括药物化合物。在一个实施方案中,将抗14-3-3 η 抗体与14-3-3拮抗剂肽(优选R-18)缀合,优选通过接头进行缀合。有关R18,参见例如Wang等人1999-参考文献35。

[0133] 药物组合物、施用和剂量

[0134] 可将本发明的抗14-3-3 η 抗体掺入适于向对象施用的药物组合物中。通常,所述药物组合物包含本发明的抗14-3-3 η 抗体以及可药用载体。本文使用的“可药用载体”包括任意及全部的生理相容性溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。可药用载体的实例包括水、盐水、磷酸盐缓冲液、右旋糖、甘油、乙醇等及其组合中的一种或多种。在许多情形中,优选在所述组合物中包含等渗剂,例如糖、多元醇(如甘露醇、山梨醇)或氯化钠。可药用物质例如润湿物质或少量辅助物质(如润湿剂或乳化剂、防腐剂或缓冲剂)提高了抗14-3-3 η 抗体的保存期或有效性。

[0135] 在一个优选实施方案中,抗14-3-3 η 抗体靶向位于细胞外的14-3-3 η 蛋白。因此,配制治疗性组合物并施用,以使得这样递送的抗14-3-3 η 抗体可供与细胞外的14-3-3 η 蛋白结合之用。

[0136] 本发明的组合物可采用多种形式。这些包括例如液体、半固体和固体剂型,例如液体溶液(例如注射液和输注液)、分散系或混悬液、片剂、丸剂、粉末剂、脂质体和栓剂。优选形式取决于预定的施用模式和治疗性应用。典型的优选组合物采用注射液或输注液的形式,例如与用其它抗体对人进行被动免疫时使用的组合物类似的组合物。优选的施用模式是肠胃外(例如静脉内、皮下、腹膜内、肌内,其中尤其优选囊内)施用。在一个实施方案中,所述抗14-3-3 η 抗体通过静脉内输注或注射施用。在另一优选实施方案中,所述抗14-3-3 η 抗体通过肌内或皮下注射施用。在一个优选实施方案中,直接注射进滑膜内。

[0137] 治疗性组合物通常必须是无菌的并且在制备和储存条件下是稳定的。所述组合物可以配制成溶液、微乳剂、分散系、脂质体或适于高药物浓度的其它有序结构。可如下制备无菌注射液:将所需量的活性化合物掺入根据需要含有一种上文所列成分或成分组合的合适溶剂中,随后过滤除菌。一般地,如下制备分散系:将所述活性化合物掺入含有基础分散介质和所需的其它上文所列成分的无菌载体中。对于用来制备无菌注射液的无菌粉末来说,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥,其得到来自先前经过滤灭菌之溶液的活性成分和任意额外所需成分的粉末。可例如通过使用包衣(例如卵磷脂)、在分散系的情形中通过维持所需粒径以及通过使用表面活性剂来维持溶液的适当流动性。注射用组合物的延长吸收可通过在组合物中包含延迟吸收的药剂(例如单硬脂酸盐和明胶)来实现。

[0138] 本发明的抗14-3-3 η 抗体可通过本领域已知的多种方法来施用,包括静脉内注射或输注。直接施用至滑膜是一种优选的施用途径。如本领域技术人员所了解地,施用途径和/或模式将根据期望结果而有所不同。在某些实施方案中,所述活性化合物可与保护该化合物免于快速释放的载体一起制备,例如受控释放制剂,包括植入物、透皮贴剂和微胶囊递送系统。可使用可生物降解的生物相容性聚合物,例如乙烯-醋酸乙烯、聚酞、聚乙醇酸、胶原蛋白、聚正酯和聚乳酸。制备这些制剂的许多方法都是专利方法或者是本领域技术人员一般所知的。参见例如,Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems,

J.R.Robinson编,Marcel Dekker,Inc.,New York,1978。代表性的制备技术在Remington: The Science and Practice of Pharmacy,第19版,Mack Publishing Co.,Easton,PA (1995)和Handbook of Pharmaceutical Excipients,第3版,Kibbe,A.H.编, Washington DC,American Pharmaceutical Association(2000)等中有教导。

[0139] 在某些实施方案中,本发明的抗14-3-3 η 抗体可经口施用,例如,与惰性稀释剂或可吸收食用载体一起施用。所述化合物(及其它成分,如果需要的话)还可封装在硬壳或软壳明胶胶囊中,压制成片剂或者直接掺入对象的饮食中。为了经口治疗性施用,所述活性化合物中可掺入赋形剂并采用可摄入片剂、口含片剂、锭剂、胶囊剂、酏剂、混悬液、糖浆、薄片等形式。为了通过肠胃外施用之外的方式施用本发明化合物,可能有必要使用防止其失活的材料对所述化合物进行包衣或者与所述化合物共施用。

[0140] 还可将补充性活性化合物掺入所述组合物中。在某些实施方案中,本发明的抗14-3-3 η 抗体与一种或多种另外的治疗剂共配制和/或共施用。例如,DMARD或DMOAD或另一种抗体。这样的联合治疗可有利地利用较低剂量的所施用治疗剂,从而避免了与各种单一治疗相关的可能毒性或并发症。

[0141] 本发明的药物组合物可包含“治疗有效量”或“预防有效量”的本发明抗体。“治疗有效量”是指在必要的剂量和时间下有效实现期望治疗结果的量。所述抗14-3-3 η 抗体的治疗有效量可根据例如个体的疾病状况、年龄、性别和体重以及所述抗14-3-3 η 抗体在该个体中引发期望应答的能力等因素而有所不同。治疗有效量也是治疗有益作用胜过抗体任何毒性或有害作用的量。“预防有效量”是指在必要的剂量和时间下有效实现期望预防结果的量。通常,由于预防性剂量在疾病之前或早期阶段用于对象,因此预防有效量会少于治疗有效量。

[0142] 可以调整给药方案以提供最佳的期望应答(例如治疗性或预防性应答)。例如,可施用单次剂量,可随时间施用若干分开的剂量,或者可根据治疗情况的迫切性来按比例减少或增加剂量。配制成剂量单位形式的胃肠外组合物是尤其有利的,因为这便于施用且剂量均一。本文使用的“剂量单位形式”是指适合作为待治疗哺乳动物对象之单次剂量的物理上离散的单位;每单位含有经计算产生期望治疗效果的预定量的活性化合物以及所需的药物载体。本发明剂量单位形式的规格由(a)所述活性化合物的独特特性和待实现之特定治疗或预防效果,以及(b)在制备这样的活性化合物以用于个体敏感治疗的领域中固有的限制所决定并直接取决于它们。

[0143] 本发明抗体的治疗或预防有效量的示例性非限制性范围是0.1~20mg/kg,更优选1~10mg/kg。应当注意,剂量值可随着待缓解病症的类型和严重程度而变化。还应理解,对于任何特定对象来说,具体给药方案应根据个体需要以及施加或指导施用所述组合物的人的专业判断随时间进行调整,本文所设定的剂量范围仅为示例性的且不意在限制所要求保护之组合物的范围或实施。

[0144] 本文所述的药物组合物可置于单位剂量或多剂量容器(例如密封安瓿或小瓶/管)中。此类容器通常以保持所述制剂的无菌和稳定性直至使用的方式进行密封。一般地,制剂可作为油或水性介质中的混悬液、溶液或乳剂来保存,如上文所示。或者,药物组合物可以冻干状态保存,其仅需要在临使用前加入无菌液体载体即可。

[0145] 抗14-3-3 η 抗体的治疗性用途

[0146] 本文中“治疗”意指针对疾病、病症或不希望的情况的治疗性或预防性治疗或者抑制性手段。“治疗”涵盖在疾病症状出现之前和/或疾病的临床表现或其它表现之后向对象施加适当形式的抗14-3-3 η 抗体,从而降低疾病的严重程度、停止疾病发展或消除疾病。疾病的预防包括拖延或延迟疾病或病症之症状的出现,优选在疾病易感性提高的对象中。

[0147] 在一个方面中,本发明提供了治疗涉及14-3-3 η 之疾病的方法。所述方法包括向患者施用治疗有效量的本发明抗14-3-3 η 抗体。在一些实施方案中,所述方法包括联合治疗。

[0148] 在一个实施方案中,本发明提供了治疗关节炎的方法,包括治疗下列疾病的方法:强直性脊柱炎、白塞病、弥漫性特发性骨肥厚症(DISH)、埃-当综合征(EDS)、费尔蒂综合征、纤维肌痛、痛风、感染性关节炎、幼年性关节炎、狼疮、混合性结缔组织病(MCTD)、骨关节炎、佩吉特病、风湿性多肌痛、多肌炎和皮肌炎、假性痛风、银屑病关节炎、雷诺现象、反应性关节炎、类风湿性关节炎、硬皮病、舍格伦综合征、斯蒂尔病和韦格纳肉芽肿病。

[0149] 在一个实施方案中,所述方法涉及联合治疗,其中除了施用一种或多种本发明的抗14-3-3 η 抗体之外还施用至少一种另外的治疗剂。在一个优选实施方案中,所述治疗剂选自:改变病因的抗风湿药物(DMARD)、改变病因的骨关节炎药物(DMOAD;例如参见Loeser, *Reumatologia*, 21:104-106, 2005)、抗TNF α 抗体、抗IL-1抗体、抗CD4抗体、抗CTLA4抗体、抗CD20抗体、抗IL-6抗体、来氟米特、柳氮磺吡啶和甲氨蝶呤。

[0150] 诊断、预后和治疗性诊断(theragnostic)方法以及治疗监测

[0151] 在一个方面中,本发明提供了用于诊断涉及14-3-3 η 之疾病和病症的方法。所述方法包括使用本发明的抗14-3-3 η 抗体来检测14-3-3 η 蛋白的变化,例如表达、定位、功能等的变化。在一个实施方案中,检测包括使用本发明的抗14-3-3 η 抗体进行免疫沉淀。在一个实施方案中,检测包括使用本发明的抗14-3-3 η 抗体进行ELISA。在一个实施方案中,检测包括使用本发明的抗14-3-3 η 抗体进行Western印迹。在一个实施方案中,检测包括将本发明的抗14-3-3 η 抗体用于免疫组织化学中。在一个实施方案中,检测包括将本发明的抗14-3-3 η 抗体用于免疫荧光中。在一个实施方案中,检测包括将本发明的抗14-3-3 η 抗体用于FACS分析中。在一个实施方案中,检测包括将本发明的抗14-3-3 η 抗体用于放射性免疫测定中。在一个实施方案中,检测包括将本发明的抗14-3-3 η 抗体用于试条测试中。在一个实施方案中,检测包括将本发明的抗14-3-3 η 抗体用于床边检验中。在一个实施方案中,将检测14-3-3 η 与检测另一种疾病标志物(例如,针对关节炎的MMP、抗CCP抗体、抗RF抗体和/或CRP)联用。

[0152] 在一个实施方案中,本发明提供了用于诊断炎性病症的方法。在一个优选实施方案中,提供了诊断关节炎的方法。包括诊断选自以下之疾病的方法:强直性脊柱炎、白塞病、弥漫性特发性骨肥厚症(DISH)、埃-当综合征(EDS)、费尔蒂综合征、纤维肌痛、痛风、感染性关节炎、幼年性关节炎、狼疮、混合性结缔组织病(MCTD)、骨关节炎、佩吉特病、风湿性多肌痛、多肌炎和皮肌炎、假性痛风、银屑病关节炎、雷诺现象、反应性关节炎、类风湿性关节炎、硬皮病、舍格伦综合征、斯蒂尔病和韦格纳肉芽肿病。

[0153] 一般地,可基于患者的滑膜液、血浆或血清中14-3-3 η 的存在来检测患者的关节炎。换句话说,细胞外的14-3-3 η 蛋白可用作指示关节炎的标志物。

[0154] 此外,14-3-3 η 的存在或者包括14-3-3 η 在内的14-3-3蛋白同工型的相对水平(如通过使用本发明的抗14-3-3 η 抗体以及其它抗14-3-3抗体所测定地)可作为早期关节炎在

发展成衰弱形式之前的预后指示物。早期预后或诊断的优点是较早实施治疗方案。

[0155] 14-3-3 η 的存在或相对水平可与患者样品中另一些蛋白质(例如基质金属蛋白酶(MMP),如MMP-1或MMP-3)的存在或相对水平相关联。已鉴定出至少25种不同的MMP。检测患者样品中的14-3-3 η 以及至少一种MMP可用于诊断关节炎。另外,患者样品中的14-3-3 η 以及至少一种MMP的存在或相对水平可用作早期关节炎在发展成衰弱形式之前的预后指示物。

[0156] 在一个实施方案中,所述方法包括检测患者的滑膜液、血浆或血清中的14-3-3 η 蛋白。在一个实施方案中,通过使用本发明的抗14-3-3 η 抗体对来自滑膜液、血浆或血清的14-3-3 η 蛋白进行免疫沉淀来进行检测。在一个实施方案中,检测包括使用本发明的抗14-3-3 η 抗体进行ELISA。在一个实施方案中,检测包括使用本发明的抗14-3-3 η 抗体对包含患者的滑膜液、血浆或血清的样品进行Western印迹。在一个实施方案中,检测包括使用放射性免疫测定。在一个实施方案中,检测包括使用试条测试。在一个实施方案中,检测包括使用床边检验。在一个实施方案中,将检测14-3-3 η 与检测另一种关节炎标志物(例如,MMP、抗CCP抗体、抗RF抗体和/或CRP)联用。

[0157] 在一个实施方案中,本发明提供了用于诊断神经性病症的方法。在一个优选实施方案中,提供了用于诊断选自细菌性脑膜炎和克-雅病之疾病的方法。在一个实施方案中,检测脑脊液中14-3-3 η 的存在。

[0158] 在一个方面中,本发明提供了用于确定患者对炎性疾病之治疗的响应潜力的方法。在一个优选实施方案中,提供了确定患者对关节炎治疗之响应潜力的方法。包括确定针对选自以下疾病之治疗的响应潜力的方法:强直性脊柱炎、白塞病、弥漫性特发性骨肥厚症(DISH)、埃-当综合征(EDS)、费尔蒂综合征、纤维肌痛、痛风、感染性关节炎、幼年性关节炎、狼疮、混合性结缔组织病(MCTD)、骨关节炎、佩吉特病、风湿性多肌痛、多肌炎和皮肌炎、假性痛风、银屑病关节炎、雷诺现象、反应性关节炎、类风湿性关节炎、硬皮病、舍格伦综合征、斯蒂尔病和韦格纳肉芽肿病。

[0159] 在一个实施方案中,所述方法包括使用本发明的抗14-3-3 η 抗体确定患者样品中的14-3-3 η 水平。在一个优选实施方案中,将患者样品中的14-3-3 η 水平与来自治疗响应能力已知的对象中的样品进行比较。与来自非炎症对象的样品和/或来自另一炎症患者的样品相比,第一患者样品中相对较高的14-3-3 η 水平可指示该第一患者是用抗14-3-3 η 抗体或替代性的DMARD疗法(例如抗TNF抗体)进行治疗的优选候选者。相反,与来自另一炎症患者的样品相比,第一患者样品中相对较低的14-3-3 η 水平可指示该第一患者不是用抗14-3-3 η 抗体或替代性的DMARD疗法(例如抗TNF抗体)进行治疗的优选候选者,尤其是当所述水平接近于非炎症对象中样品的水平时。

[0160] 在一个方面中,本发明提供了用于区分炎性疾病亚型的方法。在一个优选实施方案中,提供了区分关节炎亚型的方法。在一个实施方案中,所述方法包括使用本发明的抗14-3-3 η 抗体确定患者样品中的14-3-3 η 水平。在一个优选实施方案中,将患者中的14-3-3 η 水平与炎性疾病亚型或预后已知的对象之样品中的14-3-3 η 水平进行比较。

[0161] 在一个方面中,本发明提供了用于预防涉及14-3-3 η 之疾病发生的预防性方法。

[0162] 在一个实施方案中,本发明提供了用于在具有发生炎性疾病之风险的对象中预防炎性疾病发生的预防性方法。在一个优选实施方案中,提供了用于在具有发生关节炎之风险的对象中预防关节炎的预防性方法。包括用于预防选自以下疾病的预防性方法:强直性

脊柱炎、白塞病、弥漫性特发性骨肥厚症 (DISH)、埃-当综合征 (EDS)、费尔蒂综合征、纤维肌痛、痛风、感染性关节炎、幼年性关节炎、狼疮、混合性结缔组织病 (MCTD)、骨关节炎、佩吉特病、风湿性多肌痛、多肌炎和皮肌炎、假性痛风、银屑病关节炎、雷诺现象、反应性关节炎、类风湿性关节炎、硬皮病、舍格伦综合征、斯蒂尔病和韦格纳肉芽肿病。所述方法包括向对象施用本发明的抗14-3-3 η 抗体。在一个实施方案中,将所述抗14-3-3 η 抗体作为本文所述联合治疗的组分来施用。

[0163] 在一个方面中,本发明提供了用于监测炎症病症之治疗的方法。在一个优选实施方案中,提供了用于监测关节炎治疗的方法。包括用于监测选自以下疾病之治疗的方法:强直性脊柱炎、白塞病、弥漫性特发性骨肥厚症 (DISH)、埃-当综合征 (EDS)、费尔蒂综合征、纤维肌痛、痛风、感染性关节炎、幼年性关节炎、狼疮、混合性结缔组织病 (MCTD)、骨关节炎、佩吉特病、风湿性多肌痛、多肌炎和皮肌炎、假性痛风、银屑病关节炎、雷诺现象、反应性关节炎、类风湿性关节炎、硬皮病、舍格伦综合征、斯蒂尔病和韦格纳肉芽肿病。

[0164] 在一个实施方案中,所述方法包括使用本发明的抗14-3-3 η 抗体测定患者样品中的14-3-3 η 水平,以及监测进行治疗的患者中14-3-3 η 的水平。

[0165] 在一个方面中,本发明提供了用于检测患者样品中14-3-3 η 以及任选地其它标志物(例如MMP)之存在的试剂盒,所述试剂盒可用于提供适于诊断或区分多种涉及14-3-3 η 之疾病类型的诊断或预后结果。试剂盒包含本发明的抗14-3-3 η 抗体。此试剂盒还可包含特异性针对特定MMP(其为关节炎标志物)的检测试剂。所述试剂盒还可包含免疫检测14-3-3 η 所需的其它试剂,例如带标记的第二抗体、生色或发荧光的试剂、聚合剂和/或出于诊断或预后目的使用所述试剂盒的说明。

[0166] 有关诊断方法,还参见2007年5月9日提交的WO 2007/128132。

[0167] 对于使用抗体来检测样品中的蛋白质标志物来说,存在多种本领域技术人员已知的测定形式。参见例如,Harlow和Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988。一般地,关节炎或其它涉及14-3-3 η 之病症的存在与否或者患者预后可如下确定:(a) 将从患者获得的生物样品与本发明的抗14-3-3 η 抗体接触;(b) 检测样品中与所述抗体结合的14-3-3 η 水平;以及(c) 将多肽水平与预定截断值(即对照)进行比较。

[0168] 在一个优选实施方案中,所述测定包括使用固定于固体支持物上的本发明抗14-3-3 η 抗体来结合14-3-3 η 蛋白并将其从样品剩余物中除去。然后,可使用含有报告基团并且特异性结合抗体/蛋白质复合物的检测试剂来检测所结合的14-3-3 η 蛋白。这样的检测试剂可包含例如特异性结合14-3-3 η 蛋白的结合剂。或者,可利用竞争性测定,其中用报告基团标记14-3-3 η 蛋白,并在将所述抗体与所述样品孵育后使之结合经固定的抗体。样品中的组分抑制经标记14-3-3 η 蛋白与抗体结合的程度指示样品与经固定抗体的反应性。在这些测定中使用的合适蛋白质包括全长14-3-3 η 蛋白以及与抗体结合的其多肽部分。

[0169] 所述固体支持物可以是本领域技术人员已知的任何材料。例如,所述固体支持物可以是微量滴定板中的测试孔或者硝酸纤维素膜或其它合适的膜。或者,所述支持物可以是珠或盘,例如玻璃、玻璃纤维、乳胶或塑料材料例如聚苯乙烯或聚氯乙烯。所述支持物还可以是磁性颗粒或光纤传感器,例如美国专利No. 5,359,681中公开的那些。所述抗体可以使用本领域技术人员所知的多种方法固定在固体支持物上,其充分地描述于专利和科学文

献中。在本发明中,术语“固定”是指非共价结合(例如吸附)和共价连接(可以是抗体与支持物上官能团的直接连接,或者可以是通过交联剂的连接)。优选通过吸附固定于微量滴定板的孔中或膜上。在此情形中,可以通过在合适缓冲液中将抗体与固体支持物接触一段合适的时间来实现吸附。接触时间随温度而变化,但通常为约1小时至约1天。在一个实施方案中,使用经链霉亲和素包被的微量滴定板与生物素化抗体相组合。

[0170] 抗体与固体支持物的共价连接一般可通过下述方式实现:首先将支持物与双功能试剂反应,所述双功能试剂与支持物和抗体均能发生反应。

[0171] 在某些实施方案中,所述测定是双抗体夹心测定。该测定可通过下述方式进行:首先将已固定于固体支持物(通常为微量滴定板的孔)的抗体与样品接触,从而使样品中的14-3-3 η 蛋白与经固定的抗体结合。然后,从经固定的蛋白质-抗体复合物中除去未结合之样品,加入含有报告基团的检测试剂(优选能够结合所述多肽上不同位点的第二抗体)。然后,使用适合于特定报告基团的方法测定仍与固体支持物结合的检测试剂的量。

[0172] 经固定的抗体和检测抗体优选是不同的。在一个优选实施方案中,经固定抗体是本发明的抗14-3-3 η 抗体,而检测抗体是本发明的另一种抗14-3-3 η 抗体或者能够结合14-3-3 η 的另一种抗14-3-3抗体。在一个实施方案中,所述检测抗体是泛14-3-3抗体。

[0173] 在另一实施方案中,所述检测抗体是本发明的抗14-3-3 η 抗体,而经固定抗体是本发明的另一种抗14-3-3 η 抗体或者能够结合14-3-3 η 的另一种抗14-3-3抗体。在一个实施方案中,所述经固定抗体是泛14-3-3抗体。

[0174] 所述方法包括使用本发明的抗14-3-3 η 抗体。作为所述第二抗体的替代方案,可使用与14-3-3 η 结合的另一种配体来与本发明的抗14-3-3 η 抗体相组合。这种配体的实例有R18(Wang等人1999-参考文献35)。

[0175] 抗体一经如上所述固定于支持物上,通常就将支持物上剩余的蛋白质结合位点封闭。本领域技术人员已知的任何合适封闭剂,例如牛血清白蛋白或脱脂奶粉。然后,将经固定抗体与样品一起孵育,使14-3-3 η 蛋白与抗体结合。可在孵育前用合适的稀释剂(例如磷酸盐缓冲液(PBS))稀释样品。一般地,合适的接触时间(即孵育时间)是足以检测获得自患关节炎或其它涉及14-3-3 η 之病症的个体样品中14-3-3 η 蛋白存在的时间。优选地,接触时间足以实现这样的结合水平,即在结合和未结合之14-3-3 η 蛋白平衡状态下所实现水平的至少约95%。本领域技术人员会了解,可通过测定在一段时间内发生结合的水平来容易地确定实现平衡所需的时间。在室温下,约30分钟的孵育时间通常是足够的。

[0176] 然后,可通过用合适的缓冲液(例如含有0.1%吐温20™的PBS)清洗固体支持物以除去未结合的样品。然后,可将含有报告基团的第二抗体加至固体支持物。适于本发明方法的报告基团是本领域公知的。

[0177] 然后,将检测试剂与经固定的抗体-蛋白质复合物一起孵育足以检测所结合14-3-3 η 蛋白的时间。合适的时间一般可通过测定一段时间内发生的结合水平来测定。然后除去未结合的检测试剂,使用报告基团检测结合的检测试剂。用于检测报告基团的方法取决于报告基团的性质。对于放射性基团来说,闪烁计数或放射自显影方法一般是合适的。光谱分析法可用于检测染料、发光基团和荧光基团。可使用与不同的报告基团(通常为放射性或荧光基团或酶)偶联的亲合素来检测生物素。酶报告基团一般可通过加入底物(一般保持特定的时间段)然后对反应产物进行光谱分析或其它分析来检测。

[0178] 为了确定是否存在关节炎或其它涉及14-3-3 η 病症,一般将仍结合于固体支持物之报告基团检测到的信号与对应于预定截断值(对照)的信号进行比较。在一个优选实施方案中,所述截断值是当经固定抗体与来自未患关节炎或其它涉及14-3-3 η 之病症的患者样品一起孵育时获得的信号的平均值。一般地,认为产生高于预定截断值三倍标准差之信号的样品是关节炎或其它涉及14-3-3 η 之病症阳性的。在一个替代性优选实施方案中,可使用接收者操作特征曲线(Receiver Operator Curve)来确定截断值,例如参见Sackett等人, *Clinical Epidemiology: A Basic Science for Clinical Medicine*, Little Brown and Co., 1985, 106-7页的方法。简言之,在该实施方案中,截断值可根据对应于诊断测试结果之每个可能截断值的真阳性率(即灵敏度)和假阳性率(100%-特异性)的配对曲线来确定。曲线上最接近于左上角的截断值(即囊括了最大面积的值)是最精确的截断值,产生高于根据该方法确定之截断值的信号的样品可认为是阳性的。或者,所述截断值可以沿曲线向左移,从而使假阳性率最小,或者向右移,从而使假阴性率最小。一般地,产生高于该方法确定之截断值的信号的样品被认为是关节炎或其它涉及14-3-3 η 之病症阳性的。

[0179] 在一个实施方案中,所述测定作为床边检验来提供。例如,在一个相关实施方案中,所述测定采用流通(flow-through)形式或试条测试形式进行,其中所述抗体固定于膜(例如硝酸纤维素膜)上。在流通测试中,随着样品与膜接触,样品中的14-3-3蛋白结合至经固定的抗体。然后,随着含有第二结合剂的溶液接触所述膜,第二经标记结合剂结合至结合剂-多肽复合物。然后,可如上所述对所结合的第二结合剂进行检测。在试条测试形式中,将结合有抗体之膜的一端浸于含有样品的溶液中。样品沿膜迁移,通过含有第二14-3-3 η 结合剂的区域,到达经固定抗体的区域。在经固定抗体区域处的第二结合剂的浓度指示关节炎或其它涉及14-3-3 η 之病症或者患者预后等的存在情况。通常,该位点处第二结合剂的浓度产生可目测的图案,例如线。没有该图案指示阴性结果。一般地,选择固定于所述膜上的结合剂的量以使得当生物样品含有足以在双抗体夹心测定中产生阳性信号的多肽水平时产生肉眼可辨别的图案(以上述形式)。用于这些测定的优选结合剂是抗体及其抗原结合片段。这些测试通常可使用很少量的生物样品并且可随时进行。

[0180] 在一个优选实施方案中,所述经固定抗体是本发明的抗14-3-3 η 抗体。所述第二结合剂是另一种14-3-3 η 配体,其是否选择性地结合14-3-3 η 蛋白均可。

[0181] 在另一实施方案中,所述第二结合剂是本发明的抗14-3-3 η 抗体,最优选其抗原结合片段,所述经固定抗体是能够结合14-3-3 η 蛋白的抗14-3-3 η 抗体。所述抗体是否选择性地结合14-3-3 η 蛋白均可。

[0182] 当然,还存在许多其它适用于本发明抗14-3-3 η 抗体的测定方案。以上描述仅旨在举例。

[0183] 为了改善灵敏度,可在给定样品中测定多种标志物。特别地,可与14-3-3蛋白相结合地测定关节炎或其它涉及14-3-3 η 之病症的一种或多种其它标志物或者预后指示物等。这些另外的标志物可以是蛋白质或核酸。在一个优选实施方案中,其中所述疾病是关节炎,一种或多种其它标志物是MMP蛋白或核酸或者其它常用作关节炎指示物的因子,例如抗CCP抗体、抗RF抗体、CRP等。基于参考序列分离和测定核酸的方法是本领域中公知的。

[0184] 可同时或依次进行组合测定。可基于常规实验选择标志物,以确定得到最佳灵敏度的组合。

[0185] 本发明还提供了用于上述任何诊断方法中的试剂盒。这些试剂盒通常包含进行诊断测定所需的两种或更多种组分。组分可以是化合物、试剂、容器和/或设备。例如，试剂盒中的一个容器可含有本发明的抗14-3-3 η 单克隆抗体。如上所述，可提供连接至支持物材料的这些抗体。一个或多个另外的容器可容纳测定中所用的要件，例如试剂或缓冲液。这样的试剂盒还可包含如上所述的检测试剂，其含有适于直接或间接检测抗体结合的报告基团。

[0186] 试剂盒还可包含检测其它关节炎标志物的试剂，包括编码特定MMP的特定mRNA。

[0187] 实验

[0188] 表1:14-3-3 η 表位

[0189]

SEQ ID NO:1	93-107	螺旋	LETVCNDVLSLLDKF
SEQ ID NO:2	191-199	螺旋	EQACLLAKQ
SEQ ID NO:3	144-155	螺旋	NSVVEASEAAYK
SEQ ID NO:4	144-152	螺旋	NSVVEASEA
SEQ ID NO:5	147-155	螺旋	VEASEAAYK
SEQ ID NO:6	163-170	螺旋	EQMQPTHP
SEQ ID NO:7	168-177	螺旋	THPIRLGLAL
SEQ ID NO:8	82-92	螺旋	VKAYTEKIEKE
SEQ ID NO:9	68-79	螺旋	QKTMADGNEKKL
SEQ ID NO:10	138-146	螺旋	ASGEKKNSV

[0190]

SEQ ID NO:11	69-77	环	KTMADGNEK
SEQ ID NO:12	32-40	环	ELNEPLSNE
SEQ ID NO:13	103-117	环	LLDKFLIKNCNDFQY
SEQ ID NO:14	130-143	环	YYRYLAEVASGEKK
SEQ ID NO:15	184-194	环	YEIQNAPEQAC
SEQ ID NO:16	206-218	环	AELDTLNEDSYKD
SEQ ID NO:17	44-57	非螺旋	LLSVAYKNVVGARR
SEQ ID NO:18	15-23	非螺旋	EQAERYDDM
SEQ ID NO:19	130-138	非螺旋	YYRYLAEVA
SEQ ID NO:20	118-125	非螺旋	ESKVFYLK
SEQ ID NO:21	210-218	非螺旋	TLNEDSYKD
SEQ ID NO:22	77-84	非螺旋	KKLEKVKA
SEQ ID NO:23	76-86	非螺旋	EKKLRKVKAYR
SEQ ID NO:24	142-158	非螺旋	KKNSVVEASEAAYKEAF
SEQ ID NO:25	105-120	非螺旋	DKFLIKNCNDFQYESK
SEQ ID NO:26	237-246	非螺旋	QQDEEAGEGN
SEQ ID NO:27	75-82	非螺旋	NEKKLEKVK
SEQ ID NO:28	104-116	非螺旋	LDKFLIKNCNDFQ
SEQ ID NO:29	141-146	非螺旋	EKKNSV

SEQ ID NO:30	104-115	非螺旋	LDKFLIKNS*NDF
SEQ ID NO:31	77-86	非螺旋	KKLEKVKAYR
SEQ ID NO:32	143-157	非螺旋	KNSVVEASEAAYKEA
SEQ ID NO:33	1-12	非螺旋	DREQLLQRARLA

[0191] *内部半胱氨酸氨基酸被丝氨酸氨基酸所替换,以防止形成二硫键。

[0192] 表2.人重组14-3-3 η 的蛋白质序列(SEQ ID NO:35)

[0193]

SEQ ID NO:35	MGDREQLLQR	ARLAEQAERY	DDMASAMKAV	TELNEPLSNE	40
	DRNLLSVAYK	NVVGARRSSW	RVISSIEQKT	MADGNEKKLE	80
	KVKAYREKIE	KELETVCNDV	LSLLDKFLIK	NCNDFQYESK	120
	VFYLLKMGDY	YRYLAEVASG	EKKNSVVEAS	EAAAYKEAFEI	160
	SKEQMOPHP	IRLGLALNFS	VFYYEIQNAP	EQACLLAKQA	200
	FDDAIAELDT	LNEDSYKDST	LIMQLLRDNL	TLWTSDDQDE	240
	EAGEGN				

[0194] 在一个实施方案中,在包含半胱氨酸残基的序列中,半胱氨酸残基被丝氨酸残基替换,以避免形成二硫键。所述半胱氨酸可以是内部半胱氨酸残基或末端半胱氨酸残基。

[0195] 可出于多种目的修饰肽表位,包括与另一部分缀合,例如与产生免疫原(包含表位)的部分缀合。如所了解地,可适当地放置半胱氨酸用于连接载体并暴露希望暴露以产生抗体的区域。在KKLE的情形中,将半胱氨酸加至C末端,从而暴露另一侧。所用的载体可以是相当大的,并且可遮盖最初几个氨基酸。

[0196] 实施例1:14-3-3 η 免疫原序列和抗14-3-3 η 抗体

[0197] 为了制备单特异性抗14-3-3 η 抗体,基于我们自己的标准选择长度为8~15个氨基酸的多种肽。将这些肽以及全长重组天然(无标签)14-3-3 η 用作产生单克隆抗体的免疫原。7种14-3-3同工型的蛋白质序列比对示于图4中。

[0198] 免疫原#1:C-LDKFLIKNSNDF(104-115位氨基酸序列;“AUG1-CLDK”),通过加入用于连接载体的N端半胱氨酸部分以及替换内部112位半胱氨酸部分以避免形成内部二硫键来修饰对应于人14-3-3 η 104-115位残基区段的肽。

[0199] 免疫原#2:KKLEKVKAYR-C(77-86位氨基酸序列;“AUG2-KKLE”),通过加入用于连接载体的C端半胱氨酸部分来修饰对应于人14-3-3 η 77-86位残基区段的肽。

[0200] 免疫原#3:C-KNSVVEASEAAYKEA(143-157位氨基酸序列;“AUG3-CKNS”)。通过加入用于连接载体的N端半胱氨酸部分来修饰对应于人14-3-3 η 143-157位残基区段的肽。

[0201] 免疫原#4:人全长重组14-3-3 η (SEQ ID NO:35),蛋白质登记号:NP_003396。

[0202] 免疫

[0203] 每只小鼠使用完全弗氏佐剂中的50 μ g抗原(免疫原#1、#2、#3或#4),经腹膜内注射对多组由4只雌性BALB/c小鼠组成的组进行初始免疫。使用不完全弗氏佐剂中的抗原如上所述进行四次后续加强免疫,以3周为间隔。当通过ELISA所测的血清效价与免疫前血清样品相比上升10以上倍时,用100 μ l无菌PBS(pH 7.4)中的10 μ g抗原经静脉内对每组中2只最高应答者逐一进行加强免疫。从第二次加强免疫后的经免疫小鼠中取出的血清样品之效价示于图1(免疫原#1;CLDK)、图2(免疫原#2;KKLE)、图3(免疫原#3;CKNS)和图8(免疫原#4)

中。

[0204] 融合方法

[0205] 最后一次加强免疫后三天,处死供体小鼠,收获脾细胞并合并。如前所述(Kohler等人,如下)进行脾细胞与SP2/0BALB/c亲代骨髓瘤细胞的融合,唯一不同的是进行杂交瘤的一步式选择和克隆。融合后11天挑取克隆,重悬于96孔组织培养板的孔中含1%次黄嘌呤/胸腺嘧啶、20%胎牛血清、2mM GlutaMax I、1mM丙酮酸钠、50 μ g/ml庆大霉素、1%OPI和0.6ng/ml IL-6的200 μ l D-MEM培养基中。4天后,利用包被有1 μ g/孔的经纯化抗原的板通过ELISA筛选上清液中的抗体活性。

[0206] 生长缓慢的杂交瘤克隆的复苏方法

[0207] 生长缓慢或看起来不健康的杂交瘤细胞系通常可通过添加富营养生长培养基来挽救,所述培养基中含有:含1%次黄嘌呤/胸腺嘧啶、20%胎牛血清、2mM GlutaMax I、1mM丙酮酸钠、50 μ g/ml庆大霉素、1%OPI、20%条件化EL-4组织培养物上清液和0.6ng/ml IL-6的D-MEM培养基。EL-4是鼠胸腺瘤细胞系,当用12-肉豆蔻酰-12-佛波醇乙酯(PMA,来自Sigma货号P-8139)刺激时导致所述细胞分泌白介素2(IL-2)、B细胞分化因子(EL-BCDF-nak)和两种B细胞生长因子(BSF-p1和 EL-BCGF-swa)以及其它另外的淋巴因子,这些大大地提高淋巴细胞的生长和分化。参见G.Kohler和C.Milstein,Preparation of monoclonal antibodies, Nature 25 (1975) 256-259; Ma, M., S. Wu, M. Howard和 A. Borkovec. 1984. Enhanced production of mouse hybridomas to picomoles of antigen using EL-4 conditioned media with an in vitro immunization protocol. In Vitro 20:739。

[0208] 30天的稳定性测试之后,获得总共100个分泌能够识别重组14-3-3 η 之IgG的存活克隆。出于鉴定随后使用之克隆(lead clone to pursue)的目的,使用一系列方法对所述100个存活克隆进行筛选,所述方法包括:免疫印迹(点印迹)、诱捕测定和自定的捕获(夹心法)ELISA。还使用自定的捕获(夹心法)ELISA测试全部100个克隆对另外六种14-3-3同工型的交叉反应性。

[0209] 实施例2:在捕获ELISA中使用生物素化14-3-3同工型测试来自杂交瘤克隆的组织培养物(TC)上清液的交叉反应性

[0210] 我们利用自定的捕获ELISA,使用7种14-3-3同工型作为“钓饵”,来确定我们已得到的任一杂交瘤克隆是否识别除14-3-3 η 以外的六种同工型之任意种或与其发生交叉反应。如表4中示出的代表性数据所表明地,所选的杂交瘤克隆中的4种(AUG3-CKNS-2D5、AUG3-CKNS-7F8、AUG3-CKNS-7H8、AUG4-ETA-8F10)结合并识别两个连续稀释度的14-3-3 η ,但是不结合任何其它14-3-3同工型或与其发生交叉反应(即使在所测试的较低稀释度下)。该数据清楚地表明,这些克隆对14-3-3 η 具有高度特异性。相反,一个克隆——AUG3-CKNS-4F10——与另外三种14-3-3同工型(分别主要是14-3-3 γ 、 β 和 ξ)结合或发生交叉反应。综上,这些数据显示我们的捕获ELISA代表了用于鉴定针对14-3-3 η 同工型具有高度特异性之杂交瘤克隆的有效方法。

[0211] 如下进行表4中的自定的捕获ELISA实验。用纯的过度生长TC上清液以100 μ l/孔包被ELISA板,并在4 $^{\circ}$ C孵育过夜。以1/500至超过1/16000滴定经生物素标记的14-3-3(对应于所有7种同工型),并在室温下孵育1小时。然后,用PBS(pH 7.4)中3%脱脂奶粉以100 μ l/孔

封闭板,并在室温下孵育1小时。用PBS-吐温稀释成1/8000链霉亲和素-HRP0,以100μL/孔添加并于37°C振摇孵育1小时。以50μL/孔添加TMB缓冲液,并在室温下避光孵育。10分钟后用每孔50μL 1M HCl终止反应,并于OD450nm处读数。

[0212] 表4a:通过ELISA测试交叉反应性

[0213]

在捕获ELISA中使用生物素化的14-3-3同工型作为钓饵测试来自杂交瘤克隆之组织培养物(TC)上清液的交叉反应性(在OD ₄₅₀ nm处测量)														
14-3-3 同工型:	Gamma (γ)		Beta (β)		Sigma (σ)		Theta/Tau (θ)		Zeta (ζ)		Epsilon (ε)		Eta (η)	
稀释度:	1:15 00	1:30 00	1:15 00	1:30 00	1:15 00	1:30 00	1:15 00	1:30 00	1:15 00	1:30 00	1:15 00	1:30 00	1:15 00	1:30 00
TC 上清液:														
AUG3- CKNS-2D5	0.076	0.073	0.085	0.075	0.084	0.076	0.101	0.082	0.097	0.076	0.074	0.064	0.351	0.263
*AUG3- CKNS- 4F10	0.084	0.076	0.096	0.085	0.125	0.102	0.185	0.153	0.167	0.122	0.139	0.101	0.114	0.09
AUG3- CKNS-7F8	0.072	0.067	0.078	0.076	0.083	0.076	0.116	0.104	0.093	0.084	0.089	0.076	0.946	0.741
AUG3- CKNS-7H8	0.07	0.066	0.072	0.063	0.087	0.078	0.098	0.083	0.089	0.08	0.074	0.064	0.774	0.608
AUG4- ETA-8F10	0.072	0.069	0.073	0.069	0.092	0.084	0.109	0.097	0.099	0.082	0.099	0.09	0.169	0.131
免疫前 血清 (1:250)	0.097	0.074	0.093	0.081	0.136	0.113	0.193	0.158	0.152	0.119	0.144	0.115	0.152	0.11

[0214] *对照抗体

[0215] 表4b:通过ELISA测试交叉反应性(背景(免疫前血清)值已减去)

[0216]

在捕获ELISA中使用生物素化的14-3-3同工型作为钓饵测试来自杂交瘤克隆之组织培养物 (TC) 上清液的交叉反应性 (在OD ₄₅₀ nm处测量)														
14-3-3 同工型:	Gamma (γ)		Beta (β)		Sigma (σ)		Theta/Tau (θ)		Zeta (ζ)		Epsilon (ε)		Eta (η)	
	1:15 00	1:30 00	1:15 00	1:30 00	1:15 00	1:30 00	1:15 00	1:30 00	1:15 00	1:30 00	1:15 00	1:30 00	1:15 00	1:30 00
TC 上清液:														
AUG3- CKNS-2D5	-0.021	-0.001	-0.008	-0.006	-0.052	-0.037	-0.092	-0.076	-0.055	-0.043	-0.070	-0.051	0.199	0.153
*AUG3- CKNS-4F10	-0.013	0.002	0.003	0.004	-0.011	-0.011	-0.008	-0.005	0.015	0.003	-0.005	-0.014	-0.038	-0.020
AUG3- CKNS-7F8	-0.025	-0.007	-0.015	-0.005	-0.053	-0.037	-0.077	-0.054	-0.059	-0.035	-0.055	-0.039	0.794	0.631
AUG3- CKNS-7H8	-0.027	-0.008	-0.021	-0.018	-0.049	-0.035	-0.095	-0.075	-0.063	-0.039	-0.070	-0.051	0.622	0.498
AUG4- ETA-8F10	-0.025	-0.005	-0.020	-0.012	-0.044	-0.029	-0.084	-0.061	-0.053	-0.037	-0.045	-0.025	0.017	0.021

[0217] *对照抗体

[0218] 实施例3:市售抗14-3-3η多克隆抗体的交叉反应性

[0219] 使用针对来自14-3-3ηN端的12个氨基酸肽 (Ac-DREQLLQRARLA-NH₂) 表位产生的市售抗14-3-3兔多克隆抗体 (Biomol International LP, 货号SA476-0100) 来评价抗体的特异性。简言之,通过SDS-PAGE来分离1μg人重组14-3-3η、γ、σ、α/β、ε、θ或ξ,并使用14-3-3η抗体进行检测。

[0220] 与本发明抗体得到的结果形成鲜明对比,图4中的结果显示该市售的14-3-3η抗体与另几种14-3-3同工型(主要是γ)发生交叉反应。泳道1:分子量标准品;泳道2:重组14-3-3η;泳道3:重组14-3-3γ;泳道4:重组14-3-3σ;泳道5:重组14-3-3α/β;泳道6:重组14-3-3ε;泳道7:重组14-3-3θ;泳道8:重组14-3-3ξ。

[0221] 实施例4:人重组14-3-3η与来自HeLa细胞的内源14-3-3η的免疫沉淀

[0222] 测定来自实施例1的抗14-3-3单克隆抗体免疫沉淀或“捕获”重组和 内源细胞14-3-3η的能力。对于本文所述的本发明治疗方法来说,优选使用能够免疫沉淀或识别天然三维构型14-3-3η的抗体。在4℃将来自抗14-3-3η杂交瘤克隆的培养物上清液与含有100ng人重组14-3-3η的缓冲液或者含有来自裂解HeLa细胞之上清液的缓冲液(200μg蛋白质)一起孵育2小时。使用标准方法利用蛋白A/G琼脂糖收集免疫沉淀。通过SDS-PAGE和Western印迹对免疫沉淀进行分析。图6显示使用杂交瘤克隆7B11获得的Western印迹,其使用免疫原#4(全长重组14-3-3η)制得。第1泳道:仅有蛋白A/G琼脂糖珠;第2泳道:蛋白A/G琼脂糖珠与细胞裂解物混合;第3泳道:蛋白A/G琼脂糖珠与人重组14-3-3η混合;第4泳道:蛋白A/G琼脂糖珠与杂交瘤上清液混合;第5泳道:蛋白A/G琼脂糖珠与杂交瘤上清液和细胞裂解物混合;第6泳道:蛋白A/G琼脂糖珠与杂交瘤上清液和重组14-3-3η混合。数据显示,克隆7B11与HeLa细胞来源的14-3-3η(第5泳道)和人重组14-3-3η(第6泳道)发生免疫沉淀。

[0223] 图7显示通过使用由免疫原#3(CKNS)制得的杂交瘤克隆2D5获得的Western印迹。

第1泳道:仅有蛋白A/G琼脂糖珠;第2泳道:蛋白A/G琼脂糖珠与细胞裂解物混合;第3泳道:蛋白A/G琼脂糖珠与人重组14-3-3 η 混合;第4泳道:蛋白A/G琼脂糖珠与杂交瘤上清液混合;第5泳道:蛋白A/G琼脂糖珠与杂交瘤上清液和细胞裂解物混合;第6泳道:蛋白A/G琼脂糖珠与杂交瘤上清液和重组14-3-3 η 混合。数据显示,克隆2D5与HeLa细胞裂解物来源的14-3-3 η (第5泳道)和人重组14-3-3 η (第6泳道)均发生免疫沉淀。

[0224] 对另外几种杂交瘤克隆进行类似的分析(数据未显示)。这些实验表明,实施例1中得到的单克隆抗体能够结合以及免疫沉淀或“捕获”天然构型的14-3-3 η ,如来自HeLa细胞裂解物之蛋白质的免疫沉淀所证明。

[0225] 实施例5:受RA影响之患者的滑膜液和血清中的14-3-3表达

[0226] 使用角质形成细胞裂解物(K)作为阳性对照,通过Western印迹来分析合并的患者滑膜液(SF)和血清(PS)样品中不同14-3-3蛋白质同工型(β 、 γ 、 ϵ 、 η 、 τ 、 σ 和 ζ)的水平。在SF样品中仅检出 η 和 γ 同工型,并且与PS相比染色更强。来自17位表现出活动性滑膜炎但尚未接受抗TNF抗体治疗的RA患者的关节滑膜液样品也显示出一致的14-3-3 η 同工型表达(数据未显示)。所有患者均具有大于6.0的疾病活动度评分(disease activity score, DAS)。

[0227] 实施例6:患者滑膜液血清中的MMP表达

[0228] 为了确定这些变化是否与同一滑膜液样品中的MMP-1和MMP-3之变化相关联,同时评价了总共12份RA滑膜液样品及其匹配的血清样品中的14-3-3 η 和 γ 以及MMP-1和MMP-3蛋白。在所有样品中均检测到14-3-3 η 。在SF和PS的所有样品中均检测到MMP-1,而MMP-3的检测水平则更多变。在患者滑膜液和血清样品中也检测到14-3-3 γ 同工型(数据未显示)。

[0229] MMP-1和MMP-3的表达表明了滑膜液和血清中与14-3-3 η 和 γ 同工型表达的显著相关性(表5)。

[0230] 表5:血清和滑膜液中MMP和14-3-3蛋白水平的相关性。

[0231]

	14-3-3 η 血清	14-3-3 η 滑膜	14-3-3 γ 血清	14-3-3 γ 滑膜
MMP-1	r=0.62; p=0.02	r=0.83; p=0.03	r=0.77; p=0.02	r=0.65; p=0.03
MMP-3	r=0.68; p=0.01	r=0.77; p=0.003	r=0.80; p=0.03	r=0.76; p=0.04

[0232] 实施例7:Western印迹检测患者血清和滑膜液样品中的14-3-3蛋白的灵敏度

[0233] 为了确定滑膜液和血清样品中14-3-3的检测水平,将来自12位受RA影响之患者或正常患者的样品合并,通过Western印迹分析经合并样品的有限稀释物。14-3-3 η 在低至0.1 μ l有效滑膜液体积和1.0 μ l有效血清体积的稀释度范围内均可检出(数据未显示)。

[0234] 将2 μ l经合并的正常血清(normal serum, NS)或患者血清(patient serum, PS)在0.05~2.0 μ g的已知浓度重组14-3-3 η 旁边跑胶。经估计,2 μ l体积的NS和PS样品分别具有约1~1.5和15~20 μ g的14-3-3 η (数据未显示)。这提示,与正常患者相比,14-3-3 η 的水平在受RA影响的患者血清中高出约10倍。

[0235] 更多细节和结果,参见Kilani等人, J. Rheumatology, 34:1650-1657, 2007。

[0236] 实施例8:抗14-3-3抗体降低小鼠RA模型中的MMP表达

[0237] 通过在尾基部注射100 μ g经弗氏完全佐剂乳化的纯化II型胶原蛋白在雄性DBA小

鼠中诱导胶原蛋白诱发的关节炎,如Williams等人,PNAS,89:9784-9788,1992中所述。之后每天检查小鼠,将一肢或多肢中表现出红斑和/或肿胀的小鼠随机分配以接受使用本文所述抗14-3-3 η 抗体的治疗方案或者安慰剂治疗。或者,在用II型胶原蛋白免疫之前一天开始进行治疗。使用10只小鼠的组来进行各治疗方案,如下所示:

[0238] 1) 将从实施例1中所述杂交瘤上清液获得并纯化的所选抗14-3-3 η 抗体以0.10~20mg/kg的不同剂量(a)经腹膜内施用或者(b)滑膜内施用,一周两次。

[0239] 2) 安慰剂治疗

[0240] 在20天的治疗期间监测关节炎,评价以下疾病指标。

[0241] 临床评分评估小鼠肢体的肿胀、红斑、关节僵硬和爪肿胀。与安慰剂对照相比,在治疗方案发生效用的动物中关节炎临床指标降低。

[0242] 滑膜中14-3-3 η 、MMP-1和/或MMP-3的表达在多个时间点取滑液样品,并测定14-3-3 η 、MMP-1和/或MMP-3水平。与安慰剂对照相比,在治疗方案发生效用的动物中MMP-1和MMP-3的水平降低。

[0243] 组织病理学评估固定患关节炎的爪,将其在石蜡中包埋,切片并用苏木精和伊红染色,以用于显微镜检评估。根据下列标准对每个关节中关节炎的严重程度进行分级:轻度=滑膜炎很少、软骨损失并且骨侵蚀限于离散的点;中度=滑膜炎并存在侵蚀但正常关节结构完整;重度=滑膜炎,大范围的侵蚀,以及关节结构破坏。与安慰剂对照相比,在治疗方案发生效用的动物中,通过组织病理学检测的关节炎严重程度降低。

[0244] 实施例9:抗14-4-3抗体降低了由植入分泌IL-1之细胞诱导的兔RA模型中的MMP表达

[0245] 在兔模型中评价本发明的14-3-3 η 抗体,所述兔模型中的关节炎通过将 5×10^5 个产生IL-1之细胞植入新西兰白兔膝关节来诱导,如Yao等人,Arthritis Research and Therapy 2006,8:R16中所述,其可在线获得<http://arthritis-research.com/content/8/1/R16>。基本上如实施例8所述进行测试与评价。

[0246] 实施例10:抗14-4-3抗体降低RA模型中的MMP表达

[0247] 通过将重组14-3-3 η 蛋白注射入腿关节滑膜中而在Brown Norway大鼠或新西兰白兔中诱导实验性关节炎。基本上如实施例8所述进行测试与评价。

[0248] 可用于本发明方法的其它类风湿性关节炎模型(胶原蛋白诱发的关节炎,“CIA”)和实验设计可在例如下列参考文献中找到:Williams,Methods Mol Med.2004;98:207-16.Collagen-induced arthritis as a model for rheumatoid arthritis;Brand,Com.Med.,55:114-122,2005;Vierboom等人,Drug Discovery Today,12:327-335,2007;Sakaguchi等人,Curr.Opin.Immunol.,17:589-594,2005。

[0249] 在特定动物模型中开始初始治疗方案之前,优选首先验证该模型是涉及14-3-3 η 的炎性疾病模型。优选地,确定14-3-3 η 和MMP(优选MMP-1和/或MMP-3)的水平以显示在该模型中诱导实验性关节炎之后所述水平升高。

[0250] 一般方法

[0251] Western印迹

[0252] 对样品(滑膜液或血清(各2 μ l)、人重组14-3-3 η 、细胞裂解物或细胞裂解物免疫沉淀物)进行SDS-PAGE分析(其使用12~15%(重量/体积)丙烯酰胺凝胶),并电转至PVDF膜

上。用PBS-0.1%吐温-20中5%脱脂奶粉过夜封闭膜上的非特异性蛋白质。使用2 μ g/ml的7种同工型特异性之兔抗人14-3-3多克隆抗体进行实施例3的免疫印迹(Martin H, Patel Y, Jones D, Howell S, Robinson K和Aitken A 1993. Antibodies against the major brain isoforms of 14-3-3 protein. An antibody specific for the N-acetylated amino-terminus of a protein. FEBS Letters. 331:296-303)。在一些实验中(主要是实施例7),将来自实施例1中杂交瘤克隆的抗体用于免疫沉淀或“捕获”实验。通过SDS-PAGE来分离免疫沉淀物,并用脱脂乳封闭膜,然后与14-3-3 η 第一抗体(1:1000, BioMol International SE-486)一起孵育,之后与合适的经辣根过氧化物酶缀合之抗兔IgG或抗小鼠IgG第二抗体(1:2500稀释)一起孵育。然后,使用ECL加Western印迹检测系统使免疫反应性蛋白质可见。角质形成细胞裂解物(K)、重组蛋白质和/或HeLa细胞裂解物用作阳性对照。SF:滑膜液;PS:患者血清。

[0253] 患者样品

[0254] 在进行抗TNF抗体治疗之前从患有活动性滑膜炎之患者的膝关节获得滑膜液。所有患者均具有>6.0的DAS评分。通过标准静脉穿刺方法获得相匹配的血液样品。通过离心除去凝块。

[0255] 重组14-3-3 η

[0256] 按照下述方法,从提取自人角质形成细胞的总RNA制备角质形成细胞来源之14-3-3 η 的cDNA,将其克隆并表达于大肠杆菌中,并进行亲和纯化:Ghahary等人2004 J Invest Dermatol 122:1188-1197(参考文献36,如下)。用于14-3-3 η cDNA PCR扩增的引物为:(GCGAATTCCTGCAGCGGGCGCGCTGGCCGA)和(GCTCGAGCCTGAAGGATCTTCAGTTGCCTTC)。

[0257] 无标签的重组14-3-3蛋白

[0258] 从人来源获得cDNA,将其克隆并表达于大肠杆菌中,并进行亲和纯化。用于14-3-3 η cDNA PCR扩增的引物为:

[0259] (agaattcagttgccttctcctgctt)和(acatatgggggaccgga);14-3-3 γ 为:

[0260] (agaattcttaattgttgcttcgccc)和(acatatggtggaccgagc);14-3-3 β 为:

[0261] (acatatgacaatggataaaagtgagctg)和(agaattcttagttctcctccccagc);14-3-3 ϵ 为:

[0262] (acatatggatgatcgagaggatctg)和(agaattctcactgattttcgtcttccac);14-3-3 θ 为:

[0263] (acatatggagagagccagtctgatcc)和(agaattcagctctggggctcctg);14-3-3 σ 为:

[0264] (acatatggagaagactgagctgatcc)和(agaattcttagttttcagccccttctgc);14-3-3 ξ 为:

[0265] (acatatggataaaaatgagctggttc)和(agaattcttaattttcccctccttctcct)。

[0266] ELISA测定条件

[0267] 针对筛选和测试:对于筛选和测试来说,将dH₂O(50 μ l/孔)中1.0 μ g/孔的抗AUG1-CLDK抗体、抗-AUG2-KKLE抗体、抗-AUG3-CKNS抗体或抗14-3-3 η 抗原抗体包被于ELISA板上,在37 $^{\circ}$ C干燥过夜。对14-3-3 η 抗原的测试,在碳酸酯包被缓冲液中包被0.25 μ g/孔,在4 $^{\circ}$ C孵育过夜。

[0268] 针对抗体诱捕测定的测试:将碳酸酯包被缓冲液(pH 9.6)(100 μ L/孔)中1/10000

山羊抗小鼠IgG/IgM诱捕抗体(Pierce,货号31182)包被于ELISA板上,在4℃过夜孵育。

[0269] 针对阴性对照抗原的测试:将dH₂O(50μL/孔)中0.5μg/孔HT(人转铁蛋白)抗原包被于ELISA板上,在37℃干燥过夜。

[0270] 针对捕获ELISA的测试:用纯的过度生长TC上清液以100μL/孔包被ELISA平板,在4℃孵育过夜。以1/500至超过1/16000滴定经生物素标记的14-3-3η(或者六种另外的14-3-3家族成员之一),在室温下孵育1小时。

[0271] 封闭:用PBS(pH 7.4)中3%脱脂奶粉以100μL/孔封闭板,在室温下孵育1小时。

[0272] 第一抗体:以100μL/孔加入小鼠抗AUG1-CLDK抗体、抗AUG2-KKLE抗体、抗AUG3-CKNS抗体或抗14-3-3η杂交瘤组织培养物上清液以及小鼠单克隆对照,用以筛选和测试。将小鼠抗AUG1-CLDK抗体、抗AUG2-KKLE抗体、抗AUG3-CKNS抗体或抗14-3-3η免疫血清以及小鼠免疫前血清用SP2/0组织培养物上清液以1/500稀释,并以100μL/孔加入,用以筛选和测试。在37℃摇动孵育1小时,用于筛选和测试。

[0273] 用于筛选和测试的第二抗体:使用1/25000经HRP缀合的山羊抗小鼠IgG Fc(Jackson,货号115-035-164)进行筛选和测试。用PBS-吐温稀释的第二抗体以100μL/孔添加,并在37℃振摇孵育1小时。

[0274] 用于捕获ELISA的链霉亲和素:添加100μL孔的链霉亲和素HRP0(1:8000, CedarLane,货号CLCSA1007),在室温下振摇孵育1小时。

[0275] 底物:以50μL/孔添加TMB缓冲液(BioFX,货号TMBW-1000-01),在室温下避光孵育。10分钟后用50μL/孔1M HCl终止筛选和测试的反应,在OD_{450nm}处读数。

[0276] 点印迹条件:

[0277] 针对筛选:使用Millipore, Immobilon转移膜(货号IPVH304F0)。将14-3-3η抗原在样品缓冲液中煮沸5分钟,使其冷却。使用移液器将抗原点样,总共6μg的点样量。在使抗原干燥15分钟后,用PBS-吐温(pH7.4)清洗印迹数遍。在整个筛选过程中,将印迹保持在分别的培养皿中。

[0278] 封闭:在室温下用PBS(pH7.4)中5%奶粉将PVDF膜封闭1小时。封闭15分钟后,用PBS-吐温(pH7.4)清洗印迹数遍。使印迹面朝上在纸巾上干燥10分钟,然后施加第一抗体。

[0279] 第一抗体:将小鼠AUG1-CLDK抗体、抗AUG2-KKLE抗体、抗AUG3-CKNS抗体或抗14-3-3η杂交瘤组织培养物上清液以及小鼠单克隆对照与各培养皿中的印迹一起孵育。将小鼠抗AUG1-CLDK抗体、抗AUG2-KKLE抗体、抗AUG3-CKNS抗体或抗14-3-3η免疫血清以及小鼠免疫前血清用SP2/0组织培养物上清液以1/500稀释,以用作对照。将印迹在室温下振动孵育1小时。在与第一抗体孵育30分钟后,用PBS-吐温(pH7.4)将印迹清洗5遍。

[0280] 第二抗体:将用PBS-吐温(pH7.4)以1/5000稀释的经碱性磷酸酶缀合之山羊抗小鼠IgG/IgM(H+L)(Rockland 610-4502)添加至印迹,并于室温下在培养皿中振摇孵育1小时。在第二抗体孵育30分钟后,用PBS-吐温(pH7.4)将印迹清洗5遍。在室温下用Tris 0.1M(pH 9)缓冲液使印迹平衡10分钟,然后在加入底物前下滴干燥。

[0281] 底物:在室温下将BCIP/NBT developer 1组分AP膜底物(BioFX,产品号BCID-1000-01)滴在印迹上。5分钟后,用冷自来水终止反应,肉眼定量测定结果并给出评分:强阳性+++ ,中等阳性++ ,弱阳性+ ,轻微阳性+/- ,阴性-。

[0282] 参考文献

- [0283] 1.Harris ED Jr.,History and Epidemiology of Rheumatoid Arthritis:How long has it affected us,and who is at risk?In:Rheumatoid Arthritis.Philadelphia:W.B.Saunders Company,1997:21-27.
- [0284] 2.Harris ED Jr.,Introduction.In:Rheumatoid Arthritis.Philadelphia:W.B.SaundersCompany,1997:xix-xxiii.
- [0285] 3.Harris ED Jr.,Rheumatoid Synovium:Complex,and More Than the Sum of its Parts.In:Rheumatoid Arthritis.Philadelphia:W.B.Saunders Company,1997:127-149.
- [0286] 5.Firestein GS.(1997).Rheumatoid synovitis and pannus.In:J.H.Klippel and P.A.Dieppe,Editors,Rheumatology,Mosby,London,pp.5/13.1-5/13.5,1997.
- [0287] 6.Pap T,Shigeyama Y,Kuchen S.(2000).Arthritis Rheum.43:1226-1232.
- [0288] 7.Tolboom TCA,Pieterman E,van der Laan WE.Ann.Rheum.Dis.61:975-980,2002.
- [0289] 8.Sorsa T,Konttinen YT,Lindy O.Arthritis Rheum.22:44-53,1992.
- [0290] 9.Lindy O,Konttinen YT,Sorsa T.Arthritis Rheum.40:1391-139g,1997.
- [0291] 10.Ahrens D,Koch AE,Pope RM.Arthritis Rheum.39:1576-1587,1996.
- [0292] 11.Smeets TJM,Dayer JM,Karan MC.Arthritis Rheum.43:270-274,2000.
- [0293] 12.Poole AR;Cartilage in health and disease.In:Koopman WJ.Ed.Arthritis and Allied conditions.A textbook of rheumatology.14th ed.Baltimore:Williams and Wilikins,2001:226-284.
- [0294] 13.Konttinen YT,Ceponis A,Takagi M,Ainola M,Sorsa T,Sutinen M,et al.Matrix Biol.17:585-601,1998.
- [0295] 14.Katib.A,McNeil HP,Youssef PP:Inflamm.Res.51:170-175,2002.
- [0296] 15.Harris ED Jr.,Cytokines,Lymphokines,Growth Factors,and Chemokines.In:Rheumatoid Arthritis.Philadelphia:W.B.Saunders Company,1997:105-125.
- [0297] 16.Jasser,M.Z.,Mitchell P.G.and Cheung,H.S.:induction of stomelysin-1 and collagenases synthesis in fibrochondrocytes by TNF-alpha.Matrix Biology 14:241,1994.
- [0298] 17.Burger D,Rezzonico R,Li JM,Modoux C,Pierce RA,Welgus HG,Dayer JM.ArthritisRheum.41(10):1748-59,1998
- [0299] 18.Y.Yamamura,R.Gupta,Y.Morit,X.He,R.Pai,J.Endres,A.Freiberg,K.Chung and D.A.Fox.J.Immunol.166(2001),pp.2270-2275
- [0300] 19.Miranda-Carus ME,Balsa A,Benito-Miguel M,Perez de Ayala C,Martin-Mola E.J.Immunol.173:1463-1476,2004
- [0301] 20.Cho ML,Yoon CH,Hwang CY.Arthritis Rheum.50:776-784,2004
- [0302] 21.Bombara MP,Webb DL,Conrad P.J.Leukocyte Biol.54:399-406,1993.
- [0303] 22.McInnes IB,Leung BP,Liew FY.Arthritis Res.2(5):374-8.34,2000.
- [0304] 23.FU H,Subramanian RR,Masters SC:Annu Rev Pharmacol Toxicol 40:617-

647,2000.

[0305] 24.Hsich G,Kenney K,Gibbs CJ, Lee KH,Harrington MG:N Engl J Med 335: 924-30,1996

[0306] 25.Wilker E,Yaffe MB:J Mol Cell Cardiol 37:633-642,2004.

[0307] 26.Moore et al.1967.

[0308] 27.Ichimura T,Isobe T,Okuyama T,Yamauchi T,Fujisawa H(1987)FEBS Lett.219:79-82.

[0309] 28.Ichimura T,Isobe T,Okuyama T,Takahashi N,Araki K,Kuwano R,Akahashi Y(1988).Proc Natl Acad Sci USA,85:7084-8.

[0310] 29.Toker A,Ellis CA,Sellers LA,Atiken A 1990.Eur J Biochem 191:421-429.

[0311] 30.Craparo A,Freund R,Gustafson T(1997).J Biol Chem 272:11663-69.

[0312] 31.Yaffe MB(2002).FEBS Lett 513(1):53-57.

[0313] 32.Hermeking H,Lengauer C,Polyak K,He TC,Zhang L,Thiagalingam S, Kinzler KW,Volgelstein B.Mol Cell 1:3-11,1997.

[0314] 33.Chan TA,Hermeking H,Lengauer C,Kinzler KW,Volgelstein B.Nature 401:616-620,1999.

[0315] 34.Laronga C,Yang HY,Neal C, Lee MH(2000).J.Biol.Chem.275:23106-23112.

[0316] 35.Wang B,Yang H,Liu Y,Jelinek T,Zhang L,Ruoslahti E,Fu H(1999) Biochemistry 38:12499-12504.

[0317] 36.Ghahary A,Karimi-Busheri F,Marcoux Y,Li Y,Tredget EE,Kilani RT,Li L,Zheng J,Karami A,Keller B,Weinfeld M.J.Invest.Dermatol.122(5):1188-1197, 2004.

[0318] 所有引文均明确地通过引用全部并入本文中。

[0078]	<213>	人
[0079]	<400>	10
[0080]	Ala Ser Gly Glu Lys Lys Asn Ser Val	
[0081]	1	5
[0082]	<210>	11
[0083]	<211>	9
[0084]	<212>	PRT
[0085]	<213>	人
[0086]	<400>	11
[0087]	Lys Thr Met Ala Asp Gly Asn Glu Lys	
[0088]	1	5
[0089]	<210>	12
[0090]	<211>	9
[0091]	<212>	PRT
[0092]	<213>	人
[0093]	<400>	12
[0094]	Glu Leu Asn Glu Pro Leu Ser Asn Glu	
[0095]	1	5
[0096]	<210>	13
[0097]	<211>	15
[0098]	<212>	PRT
[0099]	<213>	人
[0100]	<400>	13
[0101]	Leu Leu Asp Lys Phe Leu Ile Lys Asn Cys Asn Asp Phe Gln Tyr	
[0102]	1	5 10 15
[0103]	<210>	14
[0104]	<211>	14
[0105]	<212>	PRT
[0106]	<213>	人
[0107]	<400>	14
[0108]	Tyr Tyr Arg Tyr Leu Ala Glu Val Ala Ser Gly Glu Lys Lys	
[0109]	1	5 10
[0110]	<210>	15
[0111]	<211>	11
[0112]	<212>	PRT
[0113]	<213>	人
[0114]	<400>	15
[0115]	Tyr Glu Ile Gln Asn Ala Pro Glu Gln Ala Cys	
[0116]	1	5 10

[0117]	<210>	16
[0118]	<211>	13
[0119]	<212>	PRT
[0120]	<213>	人
[0121]	<400>	16
[0122]	Ala Glu Leu Asp Thr Leu Asn Glu Asp Ser Tyr Lys Asp	
[0123]	1	5 10
[0124]	<210>	17
[0125]	<211>	14
[0126]	<212>	PRT
[0127]	<213>	人
[0128]	<400>	17
[0129]	Leu Leu Ser Val Ala Tyr Lys Asn Val Val Gly Ala Arg Arg	
[0130]	1	5 10
[0131]	<210>	18
[0132]	<211>	9
[0133]	<212>	PRT
[0134]	<213>	人
[0135]	<400>	18
[0136]	Glu Gln Ala Glu Arg Tyr Asp Asp Met	
[0137]	1	5
[0138]	<210>	19
[0139]	<211>	9
[0140]	<212>	PRT
[0141]	<213>	人
[0142]	<400>	19
[0143]	Tyr Tyr Arg Tyr Leu Ala Glu Val Ala	
[0144]	1	5
[0145]	<210>	20
[0146]	<211>	8
[0147]	<212>	PRT
[0148]	<213>	人
[0149]	<400>	20
[0150]	Glu Ser Lys Val Phe Tyr Leu Lys	
[0151]	1	5
[0152]	<210>	21
[0153]	<211>	9
[0154]	<212>	PRT
[0155]	<213>	人

[0195]	<210>	27
[0196]	<211>	9
[0197]	<212>	PRT
[0198]	<213>	人
[0199]	<400>	27
[0200]	Ash Glu Lys Lys Leu Glu Lys Val Lys	
[0201]	1	5
[0202]	<210>	28
[0203]	<211>	13
[0204]	<212>	PRT
[0205]	<213>	人
[0206]	<400>	28
[0207]	Leu Asp Lys Phe Leu Ile Lys Asn Cys Asn Asp Phe Gln	
[0208]	1	5 10
[0209]	<210>	29
[0210]	<211>	6
[0211]	<212>	PRT
[0212]	<213>	人
[0213]	<400>	29
[0214]	Glu Lys Lys Asn Ser Val	
[0215]	1	5
[0216]	<210>	30
[0217]	<211>	12
[0218]	<212>	PRT
[0219]	<213>	人工序列
[0220]	<220>	
[0221]	<223>	源自人14-3-3 η 104-115残基的肽
[0222]	<400>	30
[0223]	Leu Asp Lys Phe Leu Ile Lys Asn Ser Asn Asp Phe	
[0224]	1	5 10
[0225]	<210>	31
[0226]	<211>	10
[0227]	<212>	PRT
[0228]	<213>	人
[0229]	<400>	31
[0230]	Lys Lys Leu Glu Lys Val Lys Ala Tyr Arg	
[0231]	1	5 10
[0232]	<210>	32
[0233]	<211>	15

[0273]	Leu Asn Tyr Ser Val Phe Tyr Tyr Glu Ile Gln Asn Ala Pro Glu Gln
[0274]	180 185 190
[0275]	Ala Cys His Leu Ala Lys Thr Ala Phe Asp Asp Ala Ile Ala Glu Leu
[0276]	195 200 205
[0277]	Asp Thr Leu Asn Glu Asp Ser Tyr Lys Asp Ser Thr Leu Ile Met Gln
[0278]	210 215 220
[0279]	Leu Leu Arg Asp Asn Leu Thr Leu Trp Thr Ser Asp Gln Gln Asp Asp
[0280]	225 230 235 240
[0281]	Asp Gly Gly Glu Gly Asn Asn
[0282]	245
[0283]	<210> 35
[0284]	<211> 246
[0285]	<212> PRT
[0286]	<213> 人
[0287]	<400> 35
[0288]	Met Gly Asp Arg Glu Gln Leu Leu Gln Arg Ala Arg Leu Ala Glu Gln
[0289]	1 5 10 15
[0290]	Ala Glu Arg Tyr Asp Asp Met Ala Ser Ala Met Lys Ala Val Thr Glu
[0291]	20 25 30
[0292]	Leu Asn Glu Pro Leu Ser Asn Glu Asp Arg Asn Leu Leu Ser Val Ala
[0293]	35 40 45
[0294]	Tyr Lys Asn Val Val Gly Ala Arg Arg Ser Ser Trp Arg Val Ile Ser
[0295]	50 55 60
[0296]	Ser Ile Glu Gln Lys Thr Met Ala Asp Gly Asn Glu Lys Lys Leu Glu
[0297]	65 70 75 80
[0298]	Lys Val Lys Ala Tyr Arg Glu Lys Ile Glu Lys Glu Leu Glu Thr Val
[0299]	85 90 95
[0300]	Cys Asn Asp Val Leu Ser Leu Leu Asp Lys Phe Leu Ile Lys Asn Cys
[0301]	100 105 110
[0302]	Asn Asp Phe Gln Tyr Glu Ser Lys Val Phe Tyr Leu Lys Met Lys Gly
[0303]	115 120 125
[0304]	Asp Tyr Tyr Arg Tyr Leu Ala Glu Val Ala Ser Gly Glu Lys Lys Asn
[0305]	130 135 140
[0306]	Ser Val Val Glu Ala Ser Glu Ala Ala Tyr Lys Glu Ala Phe Glu Ile
[0307]	145 150 155 160
[0308]	Ser Lys Glu Gln Met Gln Pro Thr His Pro Ile Arg Leu Gly Leu Ala
[0309]	165 170 175
[0310]	Leu Asn Phe Ser Val Phe Tyr Tyr Glu Ile Gln Asn Ala Pro Glu Gln
[0311]	180 185 190

[0312]	Ala Cys Leu Leu Ala Lys Gln Ala Phe Asp Asp Ala Ile Ala Glu Leu
[0313]	195 200 205
[0314]	Asp Thr Leu Asn Glu Asp Ser Tyr Lys Asp Ser Thr Leu Ile Met Gln
[0315]	210 215 220
[0316]	Leu Leu Arg Asp Asn Leu Thr Leu Trp Thr Ser Asp Gln Gln Asp Glu
[0317]	225 230 235 240
[0318]	Glu Ala Gly Glu Gly Asn
[0319]	245
[0320]	<210> 36
[0321]	<211> 246
[0322]	<212> PRT
[0323]	<213> 人
[0324]	<400> 36
[0325]	Met Thr Met Asp Lys Ser Glu Leu Val Gln Lys Ala Lys Leu Ala Glu
[0326]	1 5 10 15
[0327]	Gln Ala Glu Arg Tyr Asp Asp Met Ala Ala Ala Met Lys Ala Val Thr
[0328]	20 25 30
[0329]	Glu Gln Gly His Glu Leu Ser Asn Glu Glu Arg Asn Leu Leu Ser Val
[0330]	35 40 45
[0331]	Ala Tyr Lys Asn Val Val Gly Ala Arg Arg Ser Ser Trp Arg Val Ile
[0332]	50 55 60
[0333]	Ser Ser Ile Glu Gln Lys Thr Glu Arg Asn Glu Lys Lys Gln Gln Met
[0334]	65 70 75 80
[0335]	Gly Lys Glu Tyr Arg Glu Lys Ile Glu Ala Glu Leu Gln Asp Ile Cys
[0336]	85 90 95
[0337]	Asn Asp Val Leu Glu Leu Leu Asp Lys Tyr Leu Ile Pro Asn Ala Thr
[0338]	100 105 110
[0339]	Gln Pro Glu Ser Lys Val Phe Tyr Leu Lys Met Lys Gly Asp Tyr Phe
[0340]	115 120 125
[0341]	Arg Tyr Leu Ser Glu Val Ala Ser Gly Asp Asn Lys Gln Thr Thr Val
[0342]	130 135 140
[0343]	Ser Asn Ser Gln Gln Ala Tyr Gln Glu Ala Phe Glu Ile Ser Lys Lys
[0344]	145 150 155 160
[0345]	Glu Met Gln Pro Thr His Pro Ile Arg Leu Gly Leu Ala Leu Asn Phe
[0346]	165 170 175
[0347]	Ser Val Phe Tyr Tyr Glu Ile Leu Asn Ser Pro Glu Lys Ala Cys Ser
[0348]	180 185 190
[0349]	Leu Ala Lys Thr Ala Phe Asp Glu Ala Ile Ala Glu Leu Asp Thr Leu
[0350]	195 200 205

[0351]	Asn Glu Glu Ser Tyr Lys Asp Ser Thr Leu Ile Met Gln Leu Leu Arg
[0352]	210 215 220
[0353]	Asp Asn Leu Thr Leu Trp Thr Ser Glu Asn Gln Gly Asp Glu Gly Asp
[0354]	225 230 235 240
[0355]	Ala Gly Glu Gly Glu Asn
[0356]	245
[0357]	<210> 37
[0358]	<211> 245
[0359]	<212> PRT
[0360]	<213> 人
[0361]	<400> 37
[0362]	Met Asp Lys Asn Glu Leu Val Gln Lys Ala Lys Leu Ala Glu Gln Ala
[0363]	1 5 10 15
[0364]	Glu Arg Tyr Asp Asp Met Ala Ala Cys Met Lys Ser Val Thr Glu Gln
[0365]	20 25 30
[0366]	Gly Ala Glu Leu Ser Asn Glu Glu Arg Asn Leu Leu Ser Val Ala Tyr
[0367]	35 40 45
[0368]	Lys Asn Val Val Gly Ala Arg Arg Ser Ser Trp Arg Val Val Ser Ser
[0369]	50 55 60
[0370]	Ile Glu Gln Lys Thr Glu Gly Ala Glu Lys Lys Gln Gln Met Ala Arg
[0371]	65 70 75 80
[0372]	Glu Tyr Arg Glu Lys Ile Glu Thr Glu Leu Arg Asp Ile Cys Asn Asp
[0373]	85 90 95
[0374]	Val Leu Ser Leu Leu Glu Lys Phe Leu Ile Pro Asn Ala Ser Gln Ala
[0375]	100 105 110
[0376]	Glu Ser Lys Val Phe Tyr Leu Lys Met Lys Gly Asp Tyr Tyr Arg Tyr
[0377]	115 120 125
[0378]	Leu Ala Glu Val Ala Ala Gly Asp Asp Lys Lys Gly Ile Val Asp Gln
[0379]	130 135 140
[0380]	Ser Gln Gln Ala Tyr Gln Glu Ala Phe Glu Ile Ser Lys Lys Glu Met
[0381]	145 150 155 160
[0382]	Gln Pro Thr His Pro Ile Arg Leu Gly Leu Ala Leu Asn Phe Ser Val
[0383]	165 170 175
[0384]	Phe Tyr Tyr Glu Ile Leu Asn Ser Pro Glu Lys Ala Cys Ser Leu Ala
[0385]	180 185 190
[0386]	Lys Thr Ala Phe Asp Glu Ala Ile Ala Glu Leu Asp Thr Leu Ser Glu
[0387]	195 200 205
[0388]	Glu Ser Tyr Lys Asp Ser Thr Leu Ile Met Gln Leu Leu Arg Asp Asn
[0389]	210 215 220

[0390]	Leu Thr Leu Trp Thr Ser Asp Thr Gln Gly Asp Glu Ala Glu Ala Gly
[0391]	225 230 235 240
[0392]	Glu Gly Gly Glu Asn
[0393]	245
[0394]	<210> 38
[0395]	<211> 245
[0396]	<212> PRT
[0397]	<213> 人
[0398]	<400> 38
[0399]	Met Glu Lys Thr Glu Leu Ile Gln Lys Ala Lys Leu Ala Glu Gln Ala
[0400]	1 5 10 15
[0401]	Glu Arg Tyr Asp Asp Met Ala Thr Cys Met Lys Ala Val Thr Glu Gln
[0402]	20 25 30
[0403]	Gly Ala Glu Leu Ser Asn Glu Glu Arg Asn Leu Leu Ser Val Ala Tyr
[0404]	35 40 45
[0405]	Lys Asn Val Val Gly Gly Arg Arg Ser Ala Trp Arg Val Ile Ser Ser
[0406]	50 55 60
[0407]	Ile Glu Gln Lys Thr Asp Thr Ser Asp Lys Lys Leu Gln Leu Ile Lys
[0408]	65 70 75 80
[0409]	Asp Tyr Arg Glu Lys Val Glu Ser Glu Leu Arg Ser Ile Cys Thr Thr
[0410]	85 90 95
[0411]	Val Leu Glu Leu Leu Asp Lys Tyr Leu Ile Ala Asn Ala Thr Asn Pro
[0412]	100 105 110
[0413]	Glu Ser Lys Val Phe Tyr Leu Lys Met Lys Gly Asp Tyr Phe Arg Tyr
[0414]	115 120 125
[0415]	Leu Ala Glu Val Ala Cys Gly Asp Asp Arg Lys Gln Thr Ile Asp Asn
[0416]	130 135 140
[0417]	Ser Gln Gly Ala Tyr Gln Glu Ala Phe Asp Ile Ser Lys Lys Glu Met
[0418]	145 150 155 160
[0419]	Gln Pro Thr His Pro Ile Arg Leu Gly Leu Ala Leu Asn Phe Ser Val
[0420]	165 170 175
[0421]	Phe Tyr Tyr Glu Ile Leu Asn Asn Pro Glu Leu Ala Cys Thr Leu Ala
[0422]	180 185 190
[0423]	Lys Thr Ala Phe Asp Glu Ala Ile Ala Glu Leu Asp Thr Leu Asn Glu
[0424]	195 200 205
[0425]	Asp Ser Tyr Lys Asp Ser Thr Leu Ile Met Gln Leu Leu Arg Asp Asn
[0426]	210 215 220
[0427]	Leu Thr Leu Trp Thr Ser Asp Ser Ala Gly Glu Glu Cys Asp Ala Ala
[0428]	225 230 235 240

[0429]	Glu Gly Ala Glu Asn
[0430]	245
[0431]	<210> 39
[0432]	<211> 248
[0433]	<212> PRT
[0434]	<213> 人
[0435]	<400> 39
[0436]	Met Glu Arg Ala Ser Leu Ile Gln Lys Ala Lys Leu Ala Glu Gln Ala
[0437]	1 5 10 15
[0438]	Glu Arg Tyr Glu Asp Met Ala Ala Phe Met Lys Gly Ala Val Glu Lys
[0439]	20 25 30
[0440]	Gly Glu Glu Leu Ser Cys Glu Glu Arg Asn Leu Leu Ser Val Ala Tyr
[0441]	35 40 45
[0442]	Lys Asn Val Val Gly Gly Gln Arg Ala Ala Trp Arg Val Leu Ser Ser
[0443]	50 55 60
[0444]	Ile Glu Gln Lys Ser Asn Glu Glu Gly Ser Glu Glu Lys Gly Pro Glu
[0445]	65 70 75 80
[0446]	Val Arg Glu Tyr Arg Glu Lys Val Glu Thr Glu Leu Gln Gly Val Cys
[0447]	85 90 95
[0448]	Asp Thr Val Leu Gly Leu Leu Asp Ser His Leu Ile Lys Glu Ala Gly
[0449]	100 105 110
[0450]	Asp Ala Glu Ser Arg Val Phe Tyr Leu Lys Met Lys Gly Asp Tyr Tyr
[0451]	115 120 125
[0452]	Arg Tyr Leu Ala Glu Val Ala Thr Gly Asp Asp Lys Lys Arg Ile Ile
[0453]	130 135 140
[0454]	Asp Ser Ala Arg Ser Ala Tyr Gln Glu Ala Met Asp Ile Ser Lys Lys
[0455]	145 150 155 160
[0456]	Glu Met Pro Pro Thr Asn Pro Ile Arg Leu Gly Leu Ala Leu Asn Phe
[0457]	165 170 175
[0458]	Ser Val Phe His Tyr Glu Ile Ala Asn Ser Pro Glu Glu Ala Ile Ser
[0459]	180 185 190
[0460]	Leu Ala Lys Thr Thr Phe Asp Glu Ala Met Ala Asp Leu His Thr Leu
[0461]	195 200 205
[0462]	Ser Glu Asp Ser Tyr Lys Asp Ser Thr Leu Ile Met Gln Leu Leu Arg
[0463]	210 215 220
[0464]	Asp Asn Leu Thr Leu Trp Thr Ala Asp Asn Ala Gly Glu Glu Gly Gly
[0465]	225 230 235 240
[0466]	Glu Ala Pro Gln Glu Pro Gln Ser
[0467]	245

[0468]	<210>	40
[0469]	<211>	255
[0470]	<212>	PRT
[0471]	<213>	人
[0472]	<400>	40
[0473]	Met Asp Asp Arg Glu Asp Leu Val Tyr Gln Ala Lys Leu Ala Glu Gln	
[0474]	1	5 10 15
[0475]	Ala Glu Arg Tyr Asp Glu Met Val Glu Ser Met Lys Lys Val Ala Gly	
[0476]		20 25 30
[0477]	Met Asp Val Glu Leu Thr Val Glu Glu Arg Asn Leu Leu Ser Val Ala	
[0478]		35 40 45
[0479]	Tyr Lys Asn Val Ile Gly Ala Arg Arg Ala Ser Trp Arg Ile Ile Ser	
[0480]		50 55 60
[0481]	Ser Ile Glu Gln Lys Glu Glu Asn Lys Gly Gly Glu Asp Lys Leu Lys	
[0482]		65 70 75 80
[0483]	Met Ile Arg Glu Tyr Arg Gln Met Val Glu Thr Glu Leu Lys Leu Ile	
[0484]		85 90 95
[0485]	Cys Cys Asp Ile Leu Asp Val Leu Asp Lys His Leu Ile Pro Ala Ala	
[0486]		100 105 110
[0487]	Asn Thr Gly Glu Ser Lys Val Phe Tyr Tyr Lys Met Lys Gly Asp Tyr	
[0488]		115 120 125
[0489]	His Arg Tyr Leu Ala Glu Phe Ala Thr Gly Asn Asp Arg Lys Glu Ala	
[0490]		130 135 140
[0491]	Ala Glu Asn Ser Leu Val Ala Tyr Lys Ala Ala Ser Asp Ile Ala Met	
[0492]		145 150 155 160
[0493]	Thr Glu Leu Pro Pro Thr His Pro Ile Arg Leu Gly Leu Ala Leu Asn	
[0494]		165 170 175
[0495]	Phe Ser Val Phe Tyr Tyr Glu Ile Leu Asn Ser Pro Asp Arg Ala Cys	
[0496]		180 185 190
[0497]	Arg Leu Ala Lys Ala Ala Phe Asp Asp Ala Ile Ala Glu Leu Asp Thr	
[0498]		195 200 205
[0499]	Leu Ser Glu Glu Ser Tyr Lys Asp Ser Thr Leu Ile Met Gln Leu Leu	
[0500]		210 215 220
[0501]	Arg Asp Asn Leu Thr Leu Trp Thr Ser Asp Met Gln Gly Asp Gly Glu	
[0502]		225 230 235 240
[0503]	Glu Gln Asn Lys Glu Ala Leu Gln Asp Val Glu Asp Glu Asn Gln	
[0504]		245 250 255
[0505]	<210>	41
[0506]	<211>	13

[0507]	<212>	PRT
[0508]	<213>	人工序列
[0509]	<220>	
[0510]	<223>	源自人14-3-3η104-115残基的肽
[0511]	<400>	41
[0512]		Cys Leu Asp Lys Phe Leu Ile Lys Asn Ser Asn Asp Phe
[0513]	1	5 10
[0514]	<210>	42
[0515]	<211>	11
[0516]	<212>	PRT
[0517]	<213>	人工序列
[0518]	<220>	
[0519]	<223>	源自人14-3-3 η 77-86残基的肽
[0520]	<400>	42
[0521]		Lys Lys Leu Glu Lys Val Lys Ala Tyr Arg Cys
[0522]	1	5 10
[0523]	<210>	43
[0524]	<211>	16
[0525]	<212>	PRT
[0526]	<213>	人工序列
[0527]	<220>	
[0528]	<223>	源自人14-3-3 η 143-157残基的肽
[0529]	<400>	43
[0530]		Cys Lys Asn Ser Val Val Glu Ala Ser Glu Ala Ala Tyr Lys Glu Ala
[0531]	1	5 10 15
[0532]	<210>	44
[0533]	<211>	4
[0534]	<212>	PRT
[0535]	<213>	人
[0536]	<400>	44
[0537]		Cys Leu Asp Lys
[0538]	1	
[0539]	<210>	45
[0540]	<211>	4
[0541]	<212>	PRT
[0542]	<213>	人
[0543]	<400>	45
[0544]		Lys Lys Leu Glu
[0545]	1	

[0585]	<213>	人	
[0586]	<400>	50	
[0587]	agaattcagt	tccttctcc	tgctt
			25
[0588]	<210>	51	
[0589]	<211>	18	
[0590]	<212>	DNA	
[0591]	<213>	人	
[0592]	<400>	51	
[0593]	acatatgggg	gaccggga	
			18
[0594]	<210>	52	
[0595]	<211>	26	
[0596]	<212>	DNA	
[0597]	<213>	人	
[0598]	<400>	52	
[0599]	agaattctta	attgttgctt	tcgccg
			26
[0600]	<210>	53	
[0601]	<211>	20	
[0602]	<212>	DNA	
[0603]	<213>	人	
[0604]	<400>	53	
[0605]	acatatggtg	gaccgcgagc	
			20
[0606]	<210>	54	
[0607]	<211>	28	
[0608]	<212>	DNA	
[0609]	<213>	人	
[0610]	<400>	54	
[0611]	acatatgaca	atggataaaa	gtgagctg
			28
[0612]	<210>	55	
[0613]	<211>	28	
[0614]	<212>	DNA	
[0615]	<213>	人	
[0616]	<400>	55	
[0617]	agaattctta	gttctctccc	tccccagc
			28
[0618]	<210>	56	
[0619]	<211>	25	
[0620]	<212>	DNA	
[0621]	<213>	人	
[0622]	<400>	56	
[0623]	acatatggat	gatcgagagg	atctg
			25

[0624]	<210>	57	
[0625]	<211>	28	
[0626]	<212>	DNA	
[0627]	<213>	人	
[0628]	<400>	57	
[0629]	agaattctca ctgattttcg tcttccac		28
[0630]	<210>	58	
[0631]	<211>	26	
[0632]	<212>	DNA	
[0633]	<213>	人	
[0634]	<400>	58	
[0635]	acatatggag agagccagtc tgatcc		26
[0636]	<210>	59	
[0637]	<211>	23	
[0638]	<212>	DNA	
[0639]	<213>	人	
[0640]	<400>	59	
[0641]	agaattcagc tctggggctc ctg		23
[0642]	<210>	60	
[0643]	<211>	26	
[0644]	<212>	DNA	
[0645]	<213>	人	
[0646]	<400>	60	
[0647]	acatatggag aagactgagc tgatcc		26
[0648]	<210>	61	
[0649]	<211>	28	
[0650]	<212>	DNA	
[0651]	<213>	人	
[0652]	<400>	61	
[0653]	agaattctta gttttcagcc ccttctgc		28
[0654]	<210>	62	
[0655]	<211>	26	
[0656]	<212>	DNA	
[0657]	<213>	人	
[0658]	<400>	62	
[0659]	acatatggat aaaaatgagc tggttc		26
[0660]	<210>	63	
[0661]	<211>	29	
[0662]	<212>	DNA	

- [0663] <213> 人
- [0664] <400> 63
- [0665] agaattctta attttcccct ccttctcct 29

ELISA: 测试小鼠抗AUG1-CLDK免疫血清(第2次加强后)对AUG1-CLDK-BSA抗原的
血液效价-只有IgG应答

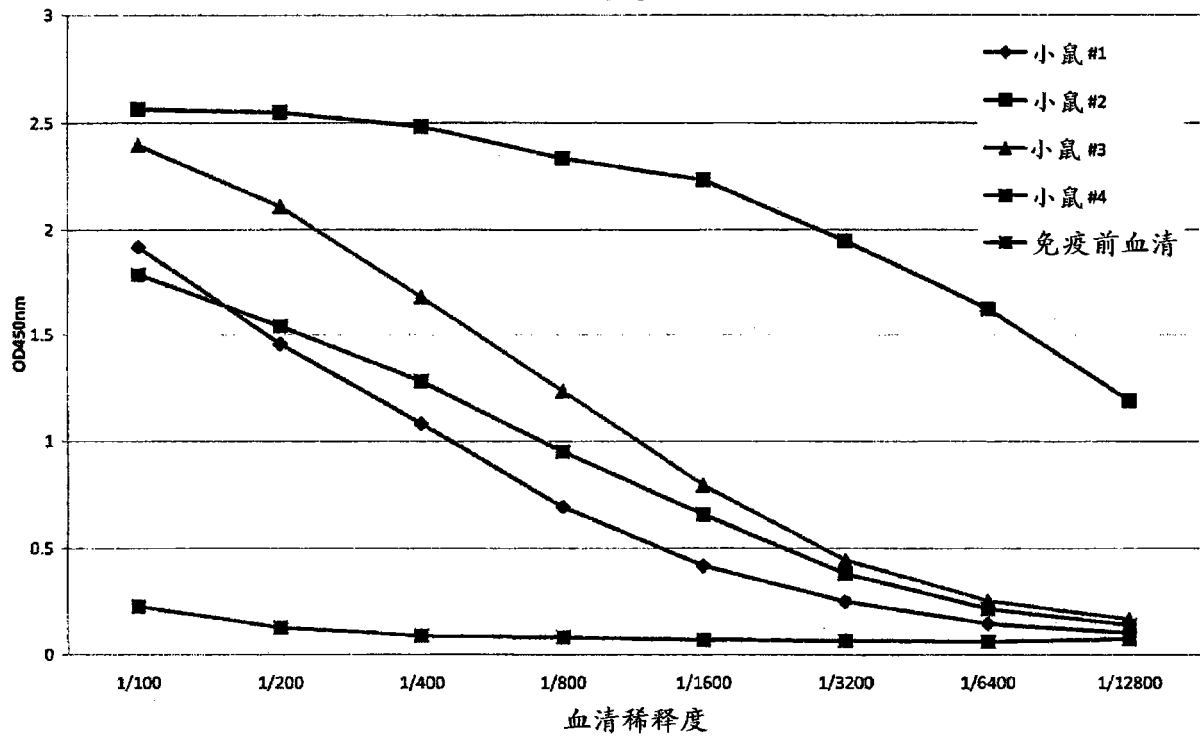


图1

ELISA: 测试小鼠抗AUG2-KKLE免疫血清(第2次加强后)对AUG2-KKLE-BSA抗原的血液效价-只有IgG应答

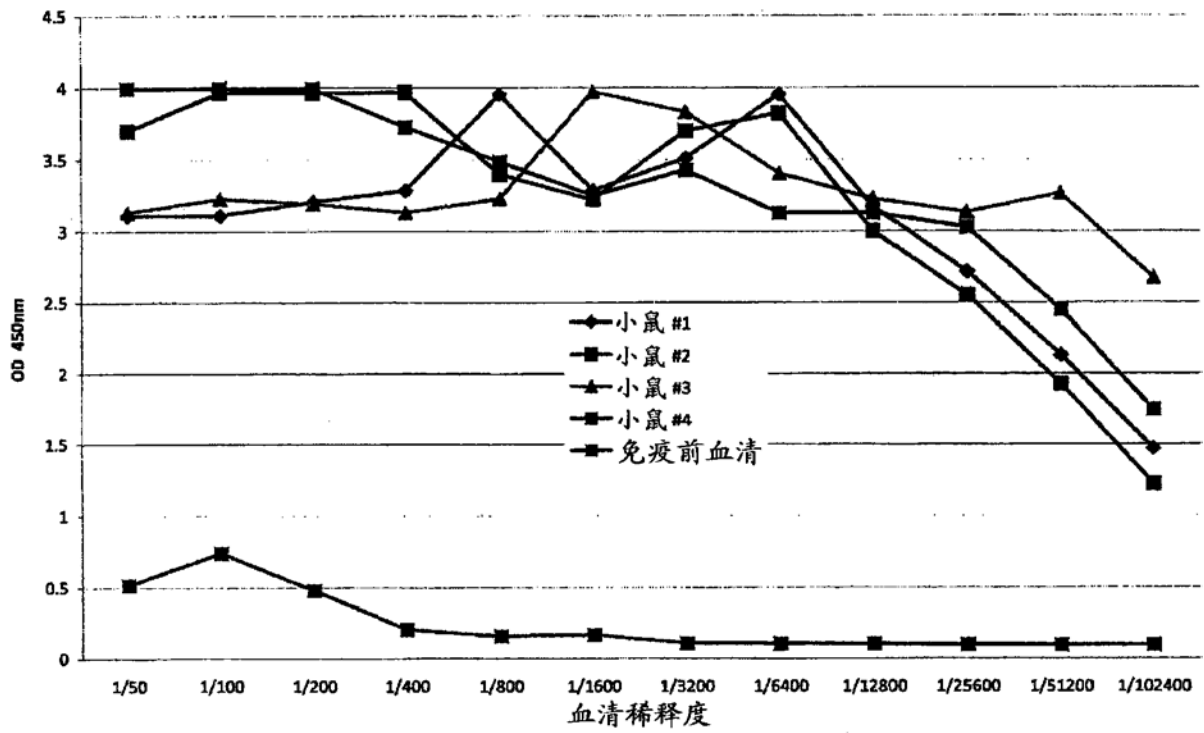
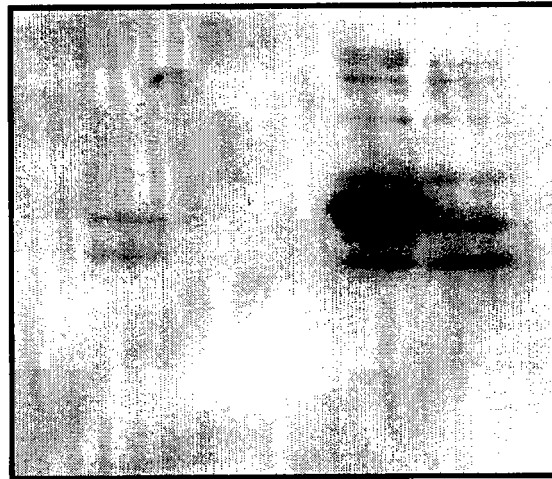


图2



泳道: 1 2 3 4 5 6 7 8

图5



泳道: 1 2 3 4 5 6

图6

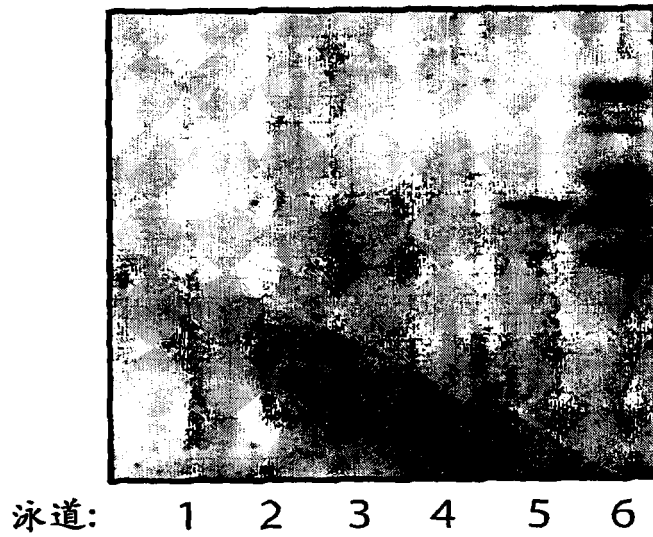


图7

ELISA: 测试小鼠抗14-3-3 ETA免疫血清(第2次加强后)对14-3-3 ETA抗原的血液效价-只有IgG应答

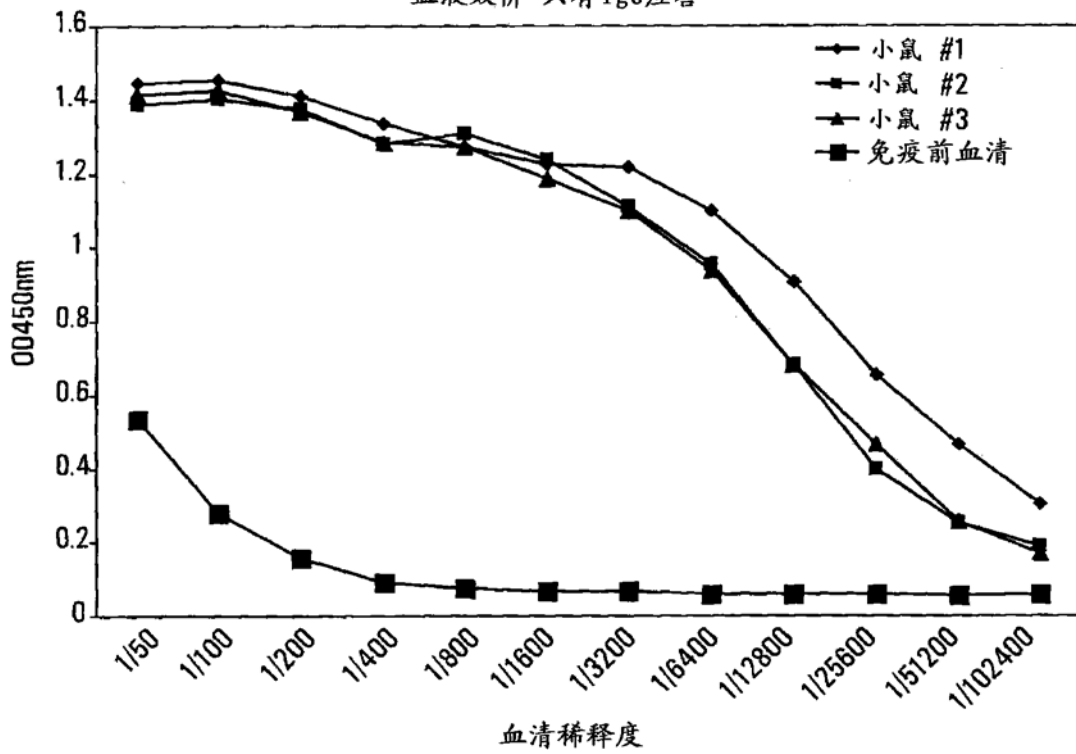


图8

专利名称(译)	14-3-3η抗体及其用于诊断和治疗关节炎的用途		
公开(公告)号	CN101952313B	公开(公告)日	2017-12-15
申请号	CN200880125676.6	申请日	2008-11-26
[标]申请(专利权)人(译)	英属哥伦比亚大学		
申请(专利权)人(译)	不列颠哥伦比亚大学		
当前申请(专利权)人(译)	不列颠哥伦比亚大学		
[标]发明人	安东尼·马罗塔		
发明人	安东尼·马罗塔		
IPC分类号	C07K16/18 A61K39/395 A61P19/02 G01N33/53 C07K16/00 G01N33/543		
CPC分类号	A61K2039/505 C07K16/18 C07K2317/24 C07K2317/33 C07K2317/34 C07K2317/76 G01N33/6893 G01N2333/47 G01N2800/102 A61P19/02 A61P29/00 A61P37/06 A61P43/00 A61K39/395 G01N33/53		
审查员(译)	刘树柏		
优先权	60/990520 2007-11-27 US 61/077123 2008-06-30 US		
其他公开文献	CN101952313A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了抗14-3-3η抗体，其特异性结合天然构型的人14-3-3η蛋白同工型，同时表现出相对于人14-3-3α、β、δ、ε、γ、τ和ξ蛋白同工型的选择性。还提供了包含所述特异性抗14-3-3η抗体的方法、试剂盒和药物组合物，用于诊断和治疗关节炎。

ELISA: 测试小鼠抗14-3-3 ETA免疫血清(第2次加强后)对14-3-3 ETA抗原的血液效价-只有IgG应答

