

(19) 国家知识产权局



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110709103 B

(45) 授权公告日 2024.02.02

(21) 申请号 201880034638.3

(22) 申请日 2018.04.04

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 110709103 A

(43) 申请公布日 2020.01.17

(30) 优先权数据

62/482,089 2017.04.05 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2019.11.26

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/026058 2018.04.04

(87) PCT国际申请的公布数据

W02018/187453 EN 2018.10.11

(73) 专利权人 机敏医药股份有限公司

地址 美国加利福尼亚

(72) 发明人 R·A·维杰耶德兰

S·文卡巴苏巴拉

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所

有限公司 11038

专利代理人 李程达

(51) Int.CI.

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/40 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

C12N 9/64 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

(56) 对比文件

US 2016297893 A1, 2016.10.13

CN 102781471 A, 2012.11.14

CN 105026429 A, 2015.11.04

聂青和等.“单克隆抗体双抗体夹心 ELISA 快速检测肝炎患者血清中 TIMP-2”.《胃肠病学和肝病学杂志》.2005, 第第14卷卷(第第14卷期), 第577-580页.

审查员 陈咪咪

权利要求书4页 说明书38页

(54) 发明名称

用于生物学样品中具有改善的性能的TIMP2
的测定法

(57) 摘要

本发明涉及结合人“TIMP2”的抗体或其抗原结合片段。还提供了用于治疗包括人类受试者的受试者的方法，所述受试者需要用本文所公开的分离的TIMP2抗体或其抗原结合片段的治疗。还提供了本发明的抗TIMP2抗体和抗原结合片段的药物或无菌组合物，抗体或其抗原结合片段与药学上可接受的载体或赋形剂混合。还提供了包括一种或多种包含本发明的抗TIMP2抗体或其抗原结合片段或者其药物组合物的组分的试剂盒。

1. 结合TIMP2的单克隆抗体,其中

(i) 所述抗体包含:由SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列组成的轻链可变区的三个互补决定区(CDR)和由SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列组成的重链可变区的三个CDR;或

(ii) 所述抗体包含:由SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列组成的轻链可变区的三个CDR和由SEQ ID NO:31所示的氨基酸序列组成的重链可变区的三个CDR。

2. 根据权利要求1的单克隆抗体,其中

(i) 所述抗体包含:

由SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列组成的轻链可变区CDR1;

由SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列组成的轻链可变区CDR2;

由SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列组成的轻链可变区CDR3;

由SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列组成的重链可变区CDR1;

由SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列组成的重链可变区CDR2;和

由SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列组成的重链可变区CDR3;或

(ii) 所述抗体包含:

由SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列组成的轻链可变区CDR1;

由SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列组成的轻链可变区CDR2;

由SEQ ID NO:26所示的氨基酸序列组成的轻链可变区CDR3;

由SEQ ID NO:27所示的氨基酸序列组成的重链可变区CDR1;

由SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列组成的重链可变区CDR2;和

由SEQ ID NO:29所示的氨基酸序列组成的重链可变区CDR3。

3. 根据权利要求2的单克隆抗体,其中所述抗体包含:

i) 由SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列组成的轻链可变区序列和由SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列组成的重链可变区序列;或

ii) 由SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列组成的轻链可变区序列和由SEQ ID NO:31所示的氨基酸序列组成的重链可变区序列。

4. 根据权利要求3的单克隆抗体,其中所述抗体包含:

i) 由SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列组成的轻链和由SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列组成的重链;或

ii) 由SEQ ID NO:39所示的氨基酸序列组成的轻链和由SEQ ID NO:33所示的氨基酸序列组成的重链。

5. 根据权利要求1-4任一项的单克隆抗体,其中所述抗体是兔抗体。

6. 根据权利要求1-4任一项的单克隆抗体,其中抗体缀合至信号产生元件。

7. 根据权利要求1-4任一项的单克隆抗体,其中抗体被固定化在固体支持物上。

8. 根据权利要求1-4任一项的单克隆抗体,其中所述抗体缀合至信号产生元件或被固定化在固体支持物上,并且其中所述抗体是兔抗体。

9. 试剂盒,其包括根据权利要求1-5任一项的第一单克隆抗体,其中试剂盒还包括特异性结合人TIMP-2的第二单克隆抗体,其中第一抗体和第二抗体与人TIMP-2形成三明治复合物。

10. 根据权利要求9的试剂盒,还包括一次性测试装置,其配置为生成与生物学样品中

人TIMP-2的存在或量相关的可检测信号,其中第一抗体或者第二抗体被固定化在所述一次性测试装置内的表面上。

11.根据权利要求10的试剂盒,其中第一抗体和第二抗体中的一个被固定化在所述一次性测试装置内的表面上,并且第一抗体和第二抗体中的另一个被可检测地标记。

12.根据权利要求11的试剂盒,其中所述一次性测试装置是侧流测试装置。

13.根据权利要求11的试剂盒,其中将被可检测地标记的抗体提供在与所述一次性测试装置分开的容器中。

14.根据权利要求10的试剂盒,其中试剂盒还包括校准以将可检测信号与TIMP-2的浓度相关联。

15.根据权利要求14的试剂盒,其中校准是在电子存储装置上提供的校准曲线。

16.根据权利要求9的试剂盒,其中试剂盒被配置为执行测定方法,所述测定方法提供与生物学样品中人TIMP-2的存在或量相关的信号,并且其中测定方法中的TIMP-2最小可检测浓度为10ng/mL或更低。

17.根据权利要求9的试剂盒,其中第一单克隆抗体是兔抗体。

18.试剂盒,其包含与人TIMP-2形成三明治复合物的第一单克隆抗体和第二单克隆抗体,其中第一单克隆抗体和第二单克隆抗体各自是根据权利要求1-5之一的单克隆抗体。

19.根据权利要求18的试剂盒,还包括一次性测试装置,其配置为生成与生物学样品中人TIMP-2的存在或量相关的可检测信号,其中第一抗体或者第二抗体被固定化在所述一次性测试装置内的表面上。

20.根据权利要求19的试剂盒,其中第一抗体和第二抗体中的一个被固定化在所述一次性测试装置内的表面上,并且第一抗体和第二抗体中的另一个被可检测地标记。

21.根据权利要求20的试剂盒,其中所述一次性测试装置是侧流测试装置。

22.根据权利要求20的试剂盒,其中将被可检测地标记的抗体提供在与所述一次性测试装置分开的容器中。

23.根据权利要求19的试剂盒,其中试剂盒还包括校准以将可检测信号与TIMP-2的浓度相关联。

24.根据权利要求23的试剂盒,其中校准是在电子存储装置上提供的校准曲线。

25.根据权利要求18的试剂盒,其中试剂盒被配置为执行测定方法,所述测定方法提供与生物学样品中人TIMP-2的存在或量相关的信号,并且其中测定方法中的TIMP-2最小可检测浓度为10ng/mL或更低。

26.根据权利要求18的试剂盒,其中第一单克隆抗体是兔抗体。

27.根据权利要求18的试剂盒,其中第一抗体包含:由SEQ ID NO:8的氨基酸序列组成的重链可变区序列和由SEQ ID NO:7的氨基酸序列组成的轻链可变区序列;并且第二抗体包含:由SEQ ID NO:31的氨基酸序列组成的重链可变区序列和由SEQ ID NO:30的氨基酸序列组成的轻链可变区序列。

28.根据权利要求27的试剂盒,还包括一次性测试装置,其配置为生成与生物学样品中人TIMP-2的存在或量相关的可检测信号,其中第一抗体或者第二抗体被固定化在所述一次性测试装置内的表面上。

29.根据权利要求28的试剂盒,其中第一抗体和第二抗体中的一个被固定化在所述一

次性测试装置内的表面上，并且第一抗体和第二抗体中的另一个被可检测地标记。

30. 根据权利要求29的试剂盒，其中所述一次性测试装置是侧流测试装置。

31. 根据权利要求29的试剂盒，其中将被可检测地标记的抗体提供在与所述一次性测试装置分开的容器中。

32. 根据权利要求28的试剂盒，其中试剂盒还包括校准以将可检测信号与TIMP-2的浓度相关联。

33. 根据权利要求32的试剂盒，其中校准是在电子存储装置上提供的校准曲线。

34. 根据权利要求27的试剂盒，其中试剂盒被配置为执行测定方法，所述测定方法提供与生物学样品中人TIMP-2的存在或量相关的信号，并且其中测定方法中的TIMP-2最小可检测浓度为10ng/mL或更低。

35. 根据权利要求27的试剂盒，其中第一单克隆抗体是兔抗体。

36. 根据权利要求1-5之一的抗体在制备用于确定生物学样品中人TIMP2的存在或量的方法中的诊断剂中的用途，所述方法包括：

用一起与人TIMP2形成三明治复合物的第一单克隆抗体和第二单克隆抗体对生物学样品执行免疫测定法，其中免疫测定法提供与在三明治复合物中结合的生物学样品中人TIMP2的存在或量相关的可检测信号；和

将可检测信号与生物学样品中人TIMP2的存在或量相关联，

其中第一单克隆抗体是根据权利要求1-5之一的抗体。

37. 根据权利要求36的用途，其中在免疫测定法中TIMP-2的最小可检测浓度是10ng/mL或更低。

38. 根据权利要求36的用途，其中免疫测定法以侧流形式执行。

39. 根据权利要求36的用途，其中免疫测定法是体外诊断。

40. 根据权利要求36的用途，其中通过将生物学样品应用到一次性测试装置上来执行免疫测定法，并且通过将一次性测试装置插入到分析仪器中来获得可检测信号，其中将包含第一抗体和第二抗体的三明治复合物固定化在一次性测试装置的预定区域中用于检测，并且其中分析仪器检测固定化的三明治复合物以提供可检测的信号。

41. 根据权利要求40的用途，其中第一抗体缀合至信号产生元件。

42. 根据权利要求41的用途，其中第二抗体被固定化在固体支持物的预定区域。

43. 根据权利要求42的用途，其中第一抗体与生物学样品形成反应混合物，并且通过将反应混合物应用至一次性测试装置而将生物学样品应用至一次性测试装置。

44. 根据权利要求36的用途，其中第一和第二抗体中的至少一个是兔抗体。

45. 第一单克隆抗体和第二单克隆抗体在制备用于确定生物学样品中人TIMP-2的存在或量的方法中的诊断剂中的用途，所述方法包括：

用一起与人TIMP2形成三明治复合物的第一单克隆抗体和第二单克隆抗体对生物学样品执行免疫测定法，其中免疫测定法提供与在三明治复合物中结合的生物学样品中人TIMP2的存在或量相关的可检测信号；和

将可检测信号与生物学样品中人TIMP2的存在或量相关联，并且

其中第一单克隆抗体和第二单克隆抗体各自是根据权利要求1-5之一的抗体。

46. 根据权利要求45的用途，其中在免疫测定法中TIMP-2的最小可检测浓度是10ng/mL

或更低。

47. 根据权利要求45的用途,其中免疫测定法以侧流形式执行。
48. 根据权利要求45的用途,其中免疫测定法是体外诊断。
49. 根据权利要求45的用途,其中通过将生物学样品应用到一次性测试装置上来执行免疫测定法,并且通过将一次性测试装置插入到分析仪器中来获得可检测信号,其中将包含第一抗体和第二抗体的三明治复合物固定化在一次性测试装置的预定区域中用于检测,并且其中分析仪器检测固定化的三明治复合物以提供可检测的信号。
50. 根据权利要求49的用途,其中第一抗体缀合至信号产生元件。
51. 根据权利要求50的用途,其中第二抗体被固定化在固体支持物的预定区域。
52. 根据权利要求51的用途,其中第一抗体与生物学样品形成反应混合物,并且通过将反应混合物应用至一次性测试装置而将生物学样品应用至一次性测试装置。
53. 根据权利要求45的用途,其中第一和第二抗体中的至少一个是兔抗体。
54. 根据权利要求45的用途,其中第一抗体包含:由SEQ ID NO:8的氨基酸序列组成的重链可变区序列和由SEQ ID NO:7的氨基酸序列组成的轻链可变区序列;并且第二抗体包含:由SEQ ID NO:31的氨基酸序列组成的重链可变区序列和由SEQ ID NO:30的氨基酸序列组成的轻链可变区序列。
55. 根据权利要求54的用途,其中在免疫测定法中TIMP-2的最小可检测浓度是10ng/mL或更低。
56. 根据权利要求54的用途,其中免疫测定法以侧流形式执行。
57. 根据权利要求54的用途,其中免疫测定法是体外诊断。
58. 根据权利要求54的用途,其中通过将生物学样品应用到一次性测试装置上来执行免疫测定法,并且通过将一次性测试装置插入到分析仪器中来获得可检测信号,其中将包含第一抗体和第二抗体的三明治复合物固定化在一次性测试装置的预定区域中用于检测,并且其中分析仪器检测固定化的三明治复合物以提供可检测的信号。
59. 根据权利要求58的用途,其中第一抗体缀合至信号产生元件。
60. 根据权利要求59的用途,其中第二抗体被固定化在固体支持物的预定区域。
61. 根据权利要求60的用途,其中第一抗体与生物学样品形成反应混合物,并且通过将反应混合物应用至一次性测试装置而将生物学样品应用至一次性测试装置。
62. 根据权利要求54的用途,其中第一和第二抗体中的至少一个是兔抗体。

用于生物学样品中具有改善的性能的TIMP2的测定法

[0001] 本申请要求2017年4月5日提交的美国临时专利申请62/482,089的权益,其通过引用整体并入本文,包括所有表格、附图和权利要求。

技术背景

[0002] 本发明的背景技术的以下讨论仅用于帮助读者理解本发明,并且不被旨在描述或构成本发明的现有技术。

[0003] 金属蛋白酶抑制剂2(Swiss-Prot P16035,也称为“金属蛋白酶2的组织抑制剂”和“TIMP2”)是一种分泌的蛋白质,其与金属蛋白酶复合并通过与它们的催化锌辅因子结合而不可逆地失活金属蛋白酶。已知TIMP2作用于MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-7、MMP-8、MMP-9、MMP-10、MMP-13、MMP-14、MMP-15、MMP-16和MMP-19。据报道TIMP2抑制内皮细胞的增殖。结果是,已经提出了编码的蛋白通过抑制响应血管生成因子的静止组织的增殖,以及通过抑制正在重塑的组织中的蛋白酶活性,而在维持组织稳态中起作用。

[0004] 另外,W02010/048346和W02011/075744(其各自通过引用整体并入本文,包括所有表格、附图和权利要求书)描述了TIMP2在评估受试者的肾脏状况中的用途,无论是单独使用和在多标志物组中。特别地,显示通过免疫测定法测量的TIMP2水平与肾状态的危险分层、诊断、分期、预后、分类和监测相关。PCT/US2014/050195公开了用于此类测定法的某些抗体。

[0005] 从特异性结合测定法例如免疫测定法获得的信号是在一种或多种结合物质(例如抗体)与包含抗体结合的必需表位的靶生物分子(即分析物)和多肽之间形成的复合物的直接结果。免疫测定法通常能够“检测”分析物;但是由于抗体表位在于8个氨基酸的次序,因此配置为检测目的标志物的免疫测定法还可以检测与标志物序列相关的多肽,只要这些多肽含有结合测定法中所使用的一种或多种抗体所必需的表位。尽管此类测定法可以检测全长生物标志物并且测定法结果以目的生物标志物的浓度表示,但来自测定法的信号实际上是样品中存在的所有这种“免疫反应性”多肽的结果。这种结合测定法还可以检测与其他物质,例如结合蛋白、受体、肝素、脂质、糖等复合的生物学样品中存在的免疫反应性多肽,只要那些附加的物质不会干扰结合物质与靶生物分子之间的结合。但是通常情况下,使用纯化的分析物配置特定结合测定法,不考虑复杂的形成和断裂模式。当此类其他结合物质的身份未知时,尤其如此。

[0006] 发明概述

[0007] 本发明的一个目的是提供结合TIMP2的新表位的抗体。这样的抗体可用于具有改善的临床性能的免疫测定法中,尤其是当用于评估肾损伤时,以及在需要TIMP2结合的治疗方法中。

[0008] 在第一方面,本发明涉及结合人TIMP2的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或抗原结合片段包含以下的一个或多个和任选地每个:

[0009] 轻链可变区CDR1,其包含氨基酸序列ESISGW (SEQ ID NO:1) 或与其至少90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列,

- [0010] 轻链可变区CDR2,其包含氨基酸序列RAS (SEQ ID NO:2) 或与其至少90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列,
- [0011] 轻链可变区CDR3,其包含氨基酸序列QCSYGINGNSEHGNP (SEQ ID NO:3) 或与其至少90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列,
- [0012] 重链可变区CDR1,其包含氨基酸序列GFTISSNYY (SEQ ID NO:4) 或与其至少90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列,
- [0013] 重链可变区CDR2,其包含氨基酸序列ILGGSGTYT (SEQ ID NO:5) 或与其至少90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列,和
- [0014] 重链可变区CDR3,其包含氨基酸序列ARQAPADTYLYGGYGPFL (SEQ ID NO:6) 或与其至少90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。
- [0015] 在某些实施方案中,此类抗体或抗原结合片段包含
- [0016] 轻链序列,其包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列或与其至少90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;SEQ ID NO:2的氨基酸序列或与其至少90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;和/或SEQ ID NO:3的氨基酸序列或与其至少90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;和/或
- [0017] 重链序列,其包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列或与其至少90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;SEQ ID NO:5的氨基酸序列或与其至少90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;和/或SEQ ID NO:6的氨基酸序列或与其至少90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。
- [0018] 在某些优选的实施方案中,此类抗体或抗原结合片段包含
- [0019] 轻链可变区序列,其包含氨基酸序列DIVMTQTPSSVEAAVGGTVTIKCQASESISGWLAWYQ QKPGQPPKLLIYRASTLESGVPSRFKGSGSGTEFTLTISDLECADAATYYCQCSYGINGNSEHGNPFGGGTEVVVK (SEQ ID NO:7) 或与其至少90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;和/或
- [0020] 重链可变区序列,其包含氨基酸序列QSLEESGGDLVKPEGSLTLCTASGFTISSNYYMCWV RQAPGKGLEWWVACILGGSGTYYYATWAKGRFTISKTSSTTVTLQMPSLTAADTATYFCARQAPADTYLYGGYGPFL NLWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO:8) 或其至少90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。
- [0021] 在某些最优选的实施方案中,此类抗体或抗原结合片段包含具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的重链可变区序列和具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的轻链可变区序列。
- [0022] 在某些最优选的实施方案中,此类抗体或抗原结合片段包含具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的重链序列和具有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的轻链序列。此类抗体在本文中称为抗体“40H2-40K3”。
- [0023] 在另一个相关方面,上述抗体或抗原结合片段是一对抗体的成员,其与也结合TIMP2的第二抗体或抗原结合片段形成三明治复合物。仅作为示例,第二抗体可以是以下描述为6E2.1的抗体或其抗原结合片段。
- [0024] 在相关方面,本发明涉及结合TIMP2的抗体或结合片段,例如抗体40H2-40K3,其中抗体结合序列NHRYQMGCECKI (SEQ ID NO:21)。结合该序列的优选抗体是上述抗体,并且最优选地,此类抗体或抗原结合片段包含具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列或与其至少90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的重链可变区序列和具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列或与其至少90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的轻链可变区序列。在某

些最优先的实施方案中,此类抗体或抗原结合片段包含具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的重链可变区序列和具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的轻链可变区序列。优先地通过使用线性15聚体肽的嵌套组内的非突变(肽组1)和双丙氨酸突变(肽组2)的丙氨酸扫描,以源自TIMP-2序列(SEQ ID NO:45)的一个氨基酸残基为步进来确定表位结合。参见,例如,McBride et al.,Methods Mol.Biol.1352:67-83,2016;Kong et al.,J.Virol.86:12115-28,2012。

[0025] 在某些实施方案中,结合序列NHRYQMGCECKI (SEQ ID NO:21) 的抗体结合不连续的表位。在这些实施方案中,结合TIMP2的抗体或结合片段还结合序列HPQQAFCNA (SEQ ID NO:22) 和序列RSDGSCAWYR (SEQ ID NO:23)。

[0026] 在相关方面,本发明涉及编码结合人TIMP2的此类抗体或其抗原结合片段的核酸。

[0027] 在另一方面,本发明涉及结合人TIMP2的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段包含以下的一个或多个和任选地每个:

[0028] 轻链可变区CDR1,其包含氨基酸序列DHINNW (SEQ ID NO:24) 或与其至少90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列,

[0029] 轻链可变区CDR2,其包含氨基酸序列SGA (SEQ ID NO:25) 或与其至少90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列,

[0030] 轻链可变区CDR3,其包含氨基酸序列QQYWSTPFT (SEQ ID NO:26) 或与其至少90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列,

[0031] 重链可变区CDR1,其包含氨基酸序列GYSFTSYW (SEQ ID NO:27) 或与其至少90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列,

[0032] 重链可变区CDR2,其包含氨基酸序列IDPSDSET (SEQ ID NO:28) 或与其至少90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列,和

[0033] 重链可变区CDR3,其包含氨基酸序列ARRDYGSRYDAMDY (SEQ ID NO:29) 或与其至少90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。

[0034] 在某些实施方案中,此类抗体或抗原结合片段包含

[0035] 轻链序列,其包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列或与其至少90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;SEQ ID NO:25的氨基酸序列或与其至少90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;和/或SEQ ID NO:26的氨基酸序列或与其至少90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;和/或

[0036] 重链序列,其包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列或与其至少90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;SEQ ID NO:28的氨基酸序列或与其至少90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;和/或SEQ ID NO:29的氨基酸序列或与其至少90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。

[0037] 在某些优先的实施方案中,此类抗体或抗原结合片段包含

[0038] 轻链可变区序列,其包含氨基酸序列DIQMTQSSSYLSVSLGGRVTITCKASDHINNLAWYQ QKPGNAPRLLISGATSLETGVPSRFSGSGSGKDYTLSITSLQTEDVATYYCQQYWSTPFTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO:30) 或与其至少90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列;和/或

[0039] 重链可变区序列,其包含氨基酸序列QVQLQQSGPQLVRPGASVKISCKASGYSFTSYWMHWV KQRPGQGLEWIGVIDPSDSETRLNQKFKDATALTVDKSSSTAYMQLNSPTSEDSAVYYCARRDY

GSRYDAMDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO:31) 或与其至少90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。

[0040] 在某些最优选的实施方案中,此类抗体或抗原结合片段包含具有SEQ ID NO:31的氨基酸序列的重链可变区序列和具有SEQ ID NO:30的氨基酸序列的轻链可变区序列。

[0041] 在某些最优选的实施方案中,此类抗体或抗原结合片段包含具有SEQ ID NO:33的氨基酸序列的重链序列和具有SEQ ID NO:39的氨基酸序列的轻链序列。此类抗体在本文中称为抗体“6E2.1”。

[0042] 在另一个相关方面,上述抗体或抗原结合片段是一对抗体的成员,其与也结合TIMP2的第二抗体或抗原结合片段形成三明治复合物。仅作为示例,第二抗体可以是以上描述为40H2-40K3的抗体或其抗原结合片段。

[0043] 在相关方面,本发明涉及结合TIMP2的抗体或结合片段,例如抗体6E2.1,其中抗体结合序列PWDTLSTTQKK (SEQ ID NO:44)。结合该序列的优选抗体是上述抗体,并且最优先地,此类抗体或抗原结合片段包含具有SEQ ID NO:31的氨基酸序列或与其至少90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的重链可变区序列和具有SEQ ID NO:30的氨基酸序列或与其至少90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的轻链可变区序列。在某些最优先的实施方案中,此类抗体或抗原结合片段包含具有SEQ ID NO:31的氨基酸序列的重链可变区序列和具有SEQ ID NO:30的氨基酸序列的轻链可变区序列。优选地通过使用线性15聚体肽的嵌套组内的单和双丙氨酸突变的丙氨酸扫描,以源自TIMP-2序列 (SEQ ID NO:45) 的一个氨基酸残基为步进来确定表位结合。参见,例如,McBride et al., Methods Mol.Biol.1352:67-83,2016; Kong et al., J.Virol.86:12115-28,2012。

[0044] 在相关方面,本发明涉及编码结合人TIMP2的此类抗体或其抗原结合片段的核酸。

[0045] 用于所要求保护的方法的抗体或抗原结合片段可获自多种物种。例如,本发明的抗体或抗原结合片段可以包含免疫球蛋白序列,其是兔、小鼠、大鼠、豚鼠、鸡、山羊、绵羊、驴、人、美洲鸵或骆驼科动物的免疫球蛋白序列,或这些序列的组合(所谓的嵌合抗体)。此类抗体或抗原结合片段也可以是单克隆或多克隆的。可以通过它们在免疫测定法中的性能来鉴定用于本发明的抗体,然后进一步通过表位作图来表征,以了解与该性能相关的表位。优选的是兔抗体或衍生自兔抗体的人源化形式。

[0046] 此类抗体或抗原结合片段可以与信号产生元件缀合或固定化在固体支持物上。另外,此类抗体或抗原结合片段可以以多种竞争性和三明治测定法形式使用。在三明治测定法的一个例子中,第一抗体或抗原结合片段(可检测地标记的)和第二抗体或抗原结合片段(固定化在测试装置的预定区域)与样品中的TIMP2在测试设备的预定区域形成三明治复合物。在三明治测定法中,第一和第二抗体或抗原结合片段可以相同(特别是在使用多克隆抗体时)或不同。因此,本发明的抗体或抗原结合片段可以以三明治对使用,或者可以与不是单克隆抗体的另一结合实体例如多克隆抗体或适体单独地使用。

[0047] 本发明的抗体或抗原结合片段可以在用于检测生物学样品中的TIMP-2的测试试剂盒中用作反应剂。这样的测试试剂盒可以例如包括一次性测试装置,其配置为生成与生物学样品中人TIMP-2的存在或量相关的可检测信号。备选地,可以将这样的测试试剂盒配制成为在不使用一次性测试装置的临床分析仪中执行测定法。优选地,测试试剂盒是体外诊断。如本文所用,术语“体外诊断”是指医疗装置,其是反应剂、反应剂产品、校准品、对

照材料、试剂盒、仪器、器械、设备或系统，无论是单独使用还是组合使用，均由制造商旨在体外用于样本包括源自人体的血液和组织供体的检查，仅用于或主要用于提供关于生理或病理状态或者关于先天性异常的信息，或者以确定潜在接受者的安全性和相容性，或者以监测治疗措施。

[0048] 在某些实施方案中，以侧流形式执行免疫测定法。侧流测试是免疫测定法的一种形式，其中测试样品以色谱方式沿吸水或非吸水的多孔固体基底流动。侧流测试可以作为竞争性或三明治形式的测定法进行操作。优选的侧流装置是一次性的一次使用的测试装置。将样品应用到测试装置在应用区域并穿过基底，在该处遇到已经用抗体或抗原进行预处理的线条或区域。如本文所用，术语“测试区”是指在侧流测试条上的离散位置，其被查询以便生成与目的分析物的存在或量相关的信号。可检测信号可以目视读取或通过将一次性测试装置插入分析仪器（例如反射仪、荧光计或透射光度计）中获得。该列表并非限制性的。样品可以不经预处理而应用到应用区域，或者可以在应用之前与一种或多种测定法反应剂预混合。在后一种情况下，可以将抗体提供在与一次性测试装置分开的容器中。

[0049] 本发明的抗体或抗原结合片段可以扩散地固定化在一次性测试装置内的表面上，使得当样品接触表面时，抗体或抗原结合片段溶解到样品中。在三明治测定法形式中，该扩散地结合的抗体可以与样品中的其同源抗原结合，然后当抗原被在检测区域非扩散地结合的第二抗体或抗原结合片段结合时，固定化在检测区域。以竞争形式，在样品中的其同源抗原可以与作为测定法反应剂提供的标记的抗原竞争结合扩散地结合的抗体。

[0050] 本发明的试剂盒还可以包括将可检测信号与TIMP-2浓度相关联的校准。举例来说，可以在电子存储设备上提供校准曲线，该电子存储设备由接收一次性测试装置的分析仪器读取，例如ROM芯片、闪存驱动器、RFID标签等。备选地，可以在诸如二维条形码之类的光学读取的编码标签上提供校准曲线，或者通过网络连接传输校准曲线。然后，分析仪器可以使用该校准曲线将来自测定法的可检测信号与TIMP-2浓度相关联。

[0051] 在某些实施方案中，使用本发明的一种或多种抗体执行的测定方法提供了与生物学样品中人TIMP-2的存在或量相关的信号，其中测定法中TIMP-2的最小可检测浓度为10ng/mL或更低，更优选地为1ng/mL或更低，并且最优选地为0.1ng/mL或更低。

[0052] 在相关方面，本发明提供了用于确定生物学样品中人TIMP2的存在或量的方法，包括：

[0053] 用一起与人TIMP2形成三明治复合物的第一单克隆抗体或抗原结合片段和第二单克隆抗体或抗原结合片段对生物学样品执行免疫测定法，其中免疫测定法提供与在三明治复合物中结合的生物学样品中的人TIMP2的存在或量相关的可检测信号；和

[0054] 将可检测信号与生物学样品中人TIMP2的存在或量相关联。优选地，免疫测定法中TIMP-2的最小可检测浓度为10ng/mL或更低，更优选地为1ng/mL或更低，并且最优选地为0.1ng/mL或更低。

[0055] 在特别优选的实施方案中，第一单克隆抗体或抗原结合片段和第二单克隆抗体或抗原结合片段中的一个或两个是如本文所述的本发明的抗体。在某些实施方案中，

[0056] 第一单克隆抗体或抗原结合片段包含具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列或与其至少90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的重链可变区序列和具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列或与其至少90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的轻链可变区序

列,和

[0057] 第二单克隆抗体或抗原结合片段包含具有SEQ ID NO:31的氨基酸序列或与其至少90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的重链可变区序列和具有SEQ ID NO:30的氨基酸序列或与其至少90%、95%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的轻链可变区序列。

[0058] 在特别优选的实施方案中,第一单克隆抗体或抗原结合片段是40H2-40K3或其抗原结合片段,并且第二单克隆抗体或抗原结合片段是6E2.1或其抗原结合片段。

[0059] 优选的测定方法包括执行检测人TIMP-2的免疫测定法。此类免疫测定法可包括使所述体液样品与检测标志物的抗体或抗原结合片段接触并检测与该抗体的结合。尽管一般就免疫测定法描述了本发明,但是在这种方法中,可以使用不基于免疫球蛋白支架的其他结合实体(例如适体)代替抗体。优选地,体液样品选自尿、唾液、血液、血清和血浆,并且最优先地为尿。

[0060] 在以下附图和描述中阐述了本公开的一个或多个实施方案的细节。根据说明书和附图以及根据权利要求书,本公开的其他特征、目的和优点将是显而易见的。

[0061] 详细说明

[0062] 定义

[0063] 如本文所用,术语“金属蛋白酶抑制剂2”和“TIMP-2”是指存在于生物学样品中的一种或多种多肽,其衍生自金属蛋白酶抑制剂2前体(人前体:Swiss-Prot P16035(SEQ ID NO:45))。

10	20	30	40	50	60
MGAAARTLRL	ALGLLLLATL	LRPADACSCS	PVHPQQAFNC	ADVIRAKAV	SEKEVDMSGND
70	80	90	100	110	120
IYGNPIKRIQ	YEIKQIKMFK	GPEKDIEFIY	TAPSSAVCGV	SLDVGGKKEY	LIAGKAEGDG
130	140	150	160	170	180
KMHITLCDI	VPWDTLSTTQ	KKSLNHRYQM	GCECKITRCP	MIPCYISSPD	ECLWMDWVTE
190	200	210	220		
KNINGHQAKF	FACIKRSDGS	CAWYRGAAPP	KQEFLDIEDP		

[0064]

[0065] 在金属蛋白酶抑制剂2中已鉴定出以下结构域:

残基	长度	结构域 ID
----	----	--------

[0066] 1-26 26 信号肽

27-220 194 金属蛋白酶抑制剂 2

[0067] 除非本文另外特别指出,否则所用术语的定义是药物科学领域中使用的标准定义。如说明书和所附权利要求书中所使用的,单数形式“一”、“一个”和“该”包括复数对象,除非上下文另外明确指出。因此,例如,提及“药物载体”包括两种或更多种这样的载体的混合物,等等。

[0068] 如本文所用,术语“受试者”是指人类或非人类生物。因此,本文所述的方法和组合物适用于人类和兽医疾病。此外,尽管受试者优选地是活生物体,但是本文所述的发明也可

以用于验尸分析中。优选的受试者是人类，并且最优先地是“患者”，如本文所用，其是指正在接受针对疾病或病况的医疗护理的活着的人类。这包括没有明确疾病并正在接受病理学征兆检查的人。

[0069] 优选地，测量样品中的分析物。这样的样品可以从受试者获得，或者可以从旨在提供给受试者的生物材料获得。例如，可以从正在评估是否可能移植到受试者体内的肾脏中获取样品，并使用分析物测量来针对预先存在的损伤评估肾脏。优选的样品是体液样品。

[0070] 如本文所用，术语“体液样品”是指出于诊断、预后、分类或评估目的受试者例如患者或移植供体的目的而获得的体液样品。在某些实施方案中，可以出于确定进行中病况的结果或治疗方案对病况的影响的目的而获得这种样品。优选的体液样品包括血液、血清、血浆、脑脊液、尿、唾液、痰和胸腔积液。另外，本领域的技术人员将认识到，在分级分离或纯化程序之后，例如将全血分离成血清或血浆成分，某些体液样品将更容易分析。

[0071] 如本文所用，术语“诊断”是指技术人员可以通过其估计和/或确定患者是否患有给定疾病或病况的可能性（“似然性”）的方法。在本发明的情况下，“诊断”包括使用对于本发明的肾损伤标志物的测定法，最优先地免疫测定法的结果，任选地连同其他临床特征，来实现对从中获得并测定样品的受试者的急性肾损伤或ARF的诊断（即，发生或不发生）。“确定”这样的诊断并不意味着暗示诊断是100%准确的。许多生物标志物指示多种病况。熟练的临床医生不会在信息真空中使用生物标记结果，而是将测试结果与其他临床指示一起使用以实现诊断。因此，相对于预定诊断阈值的另一侧上的测量水平，在预定诊断阈值的一侧上的测量的生物标志物水平指示受试者中疾病发生的可能性更大。

[0072] 类似地，预后风险表示将发生给定的过程或结果的可能性（“似然性”）。预后指标的水平或水平的改变，继而与发病的可能性增加（例如，肾功能恶化，未来的ARF或死亡）相关，被称为患者的不良后果的“似然性增加的指示”。

[0073] 如本文所用，术语“侧流”是指反应剂在纵向方向上通过基本平坦的多孔材料的流动。如果材料的厚度不超过长度和宽度尺寸的10%，则这种多孔材料是“基本上平坦的”。

[0074] 如本文使用的相对于装置的第一区域的术语“下游区域”是指在流体已经到达第一区域之后接收流体流的区域。

[0075] 如本文所用，术语“样品应用区域”是指测定装置的一部分，为了确定其组分的目的，将目的流体样品引入其中。

[0076] 标志物测定法

[0077] 通常，免疫测定法包括使含有或怀疑含有目的生物标志物的样品与至少一种特异性结合生物标志物的抗体接触。然后生成信号，指示通过样品中的多肽与抗体的结合形成的复合物的存在或量。信号然后与样品中生物标志物的存在或量相关联。用于检测和分析生物标志物的许多方法和装置是技术人员众所周知的。参见，例如，美国专利6,143,576; 6,113,855; 6,019,944; 5,985,579; 5,947,124; 5,939,272; 5,922,615; 5,885,527; 5,851,776; 5,824,799; 5,679,526; 5,525,524; 和5,480,792，以及The Immunoassay Handbook, David Wild, ed. Stockton Press, New York, 1994, 其通过引用整体并入本文，包括所有表格、附图和权利要求。

[0078] 本领域已知的测定装置和方法可以利用各种三明治、竞争或非竞争测定法形式的标记的分子，以生成与目的生物标志物的存在或量相关的信号。合适的测定法形式还包括

色谱法、质谱法和蛋白质“印迹”法。另外，某些方法和装置，例如生物传感器和光学免疫测定法，可以用于确定分析物的存在或量，而无需标记的分子。参见，例如，美国专利5,631,171和5,955,377，其每一个均通过引用整体并入本文，包括所有表格、附图和权利要求。本领域技术人员还认识到，包括但不限于Beckman ACCESS®、Abbott AXSYM®、Roche ELECSYS®、Dade Behring STRATUS®系统的机器人仪器是能够执行免疫测定法的免疫测定分析仪。但是可以使用任何合适的免疫测定法，例如酶联免疫测定法(ELISA)、放射免疫测定法(RIA)、竞争性结合测定法等。

[0079] 抗体或其他多肽可以固定化在多种固体支持物上用于测定法。可以用于固定化特异性结合成员的固相包括在固相结合测定法中开发和/或用作固相的那些。合适固相的例子包括膜过滤器、纤维素纸、珠(包括聚合物、乳胶和顺磁性颗粒)、玻璃、硅片、微粒、纳米颗粒、TentaGels、AgroGels、PEGA凝胶、SPOCC凝胶和多孔板。可以通过将抗体或大量抗体以阵列形式包被在固体支持物上来制备测定法条带。然后可以将该条带浸入测试样品中，然后通过洗涤和检测步骤快速处理以生成可测量的信号，例如色斑。抗体或其他多肽可通过直接缀合至测定装置表面或通过间接结合而结合至测定装置的特定区域。在后一种情况的例子中，可以将抗体或其他多肽固定化在颗粒或其他固体支持物上，并且将该固体支持物固定化至装置表面。

[0080] 生物学测定法需要用于检测的方法，并且最常见的定量结果的方法之一是将可检测的标签缀合至对所研究的生物学系统中的一种组分具有亲和力的蛋白质或核酸。可检测的标签可以包括本身可检测的分子(例如，荧光部分、电化学标签、金属螯合物等)以及可以通过产生可检测的反应产物间接检测的分子(例如酶，诸如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶等)或通过本身可检测的特异性结合分子(例如生物素、洋地黄毒昔、麦芽糖、低聚组氨酸、2,4-二硝基苯、苯砷酸根、ssDNA、dsDNA等)。

[0081] 固相和可检测的标签缀合物的制备通常包括使用化学交联剂。交联反应剂包含至少两个反应性基团，并且通常分为同功能性交联剂(包含相同的反应性基团)和杂功能性交联剂(包含不同的反应性基团)。通过胺、巯氨基或非特异性反应的同双功能交联剂可从许多商业来源获得。马来酰亚胺、烷基和芳基卤化物、 α -卤代酰基和吡啶基二硫化物是巯醇反应性基团。马来酰亚胺、烷基和芳基卤化物、 α -卤代酰基与巯氨基反应而形成巯醇醚键，而吡啶基二硫化物与巯氨基反应而产生混合的二硫化物。吡啶基二硫化物产物是可裂解的。亚氨基酯对于蛋白质-蛋白质交联也是非常有用的。商业上可获得各种异双功能交联剂，每一种结合不同的特征以成功地缀合。

[0082] 在某些方面，本发明提供了用于分析所述标志物的试剂盒。试剂盒包括用于分析至少一种测试样品的反应剂，所述反应剂包含至少一种特异性结合标志物的抗体。试剂盒还可以包括用于执行本文所述的诊断和/或预后关联中的一个或多个的装置和说明书。优选的试剂盒将包括用于对分析物执行三明治测定法的抗体对或用于执行竞争性测定法的标记的物质。优选地，抗体对包含缀合至固相的第一抗体和缀合至可检测标签的第二抗体，其中第一抗体和第二抗体各自结合肾损伤标志物。最优选地，每种抗体是单克隆抗体。使用试剂盒和执行校准的说明书可以是标签形式，指的是在试剂盒的制造、运输、销售或使用过程中，随时地附着或附带的任何书面或记录材料。例如，术语标签包括广告传单和小册子、包装材料、说明书、录音带或录像带、计算机光盘以及直接印在试剂盒上的文字。

[0083] 在某些实施方案中,使用一次使用的一次性测试装置进行标志物测定法。这样的测试装置通常采用侧流装置的形式,现在通过非处方妊娠测试的普遍使用已经很熟悉这种形式。通常,这些测定装置具有延伸的基础层,可以在其上进行样品添加区域和评估区域之间的区分。在典型的使用中,将样品应用到样品添加区域,沿着平行于基础层的液体传输路径流动,然后流入评估区域。捕获反应剂存在于评估区域中,并且可以通过多种方案检测捕获的分析物以检测与捕获的分析物相关的可见部分。例如,当指示生物学样品中分析物的存在或不存在时,测定法可以产生视觉信号,例如颜色变化、荧光、发光等。

[0084] 样品添加区域可以例如以壳体中的开放室的形式;以吸收垫的形式等提供。样品添加区域可以是多种构造的端口,即,圆形、长方形、正方形等,或者区域可以是装置中的槽。

[0085] 过滤器元件可以被放置在样品添加区域中、上方或附近,从而从样品中过滤颗粒,从而从血液中去除或保留血细胞,使得血浆可以进一步行进通过装置。滤液然后可以移动到与过滤器流体连接的多孔膜中。用于去除或保留血液中存在的细胞物质的合适的过滤器是本领域众所周知的。参见,例如,美国专利4,477,575;5,166,051;6,391,265;和7,125,493,其每一个通过引用整体并入本文。许多合适的材料是技术人员已知的,并且可以包括玻璃纤维、合成树脂纤维、各种类型的膜,包括孔径在约65至约15 μm 之间变化的不对称膜过滤器,以及这些材料的组合。另外,过滤器元件可包含一种或多种化学物质以促进红细胞与血浆的分离。这种化学物质的实例是凝血酶、凝集素、阳离子聚合物、针对一种或多种红细胞表面抗原的抗体等。可以通过共价手段、非特异性吸收等在过滤器元件中提供促进红细胞与血浆分离的这类化学物质。

[0086] 在某些实施方案中,标签区位于样品接收区的下游,并且包含扩散定位的标记的反应剂,所述反应剂结合目的分析物或与目的分析物竞争结合结合物质。备选地,如果在将标记的反应剂应用到样品接收区之前将标记的反应剂与样品预混合,则可以去除标签区。检测区位于标签区的下游,并包含与目的分析物结合的固定化的捕获反应剂。

[0087] 用于本发明的膜的最佳孔径为约10至约50 μm 。膜的厚度通常为约1密耳至约15密耳,通常在5或10密耳的范围内,但可以高达200密耳或更厚。膜可以被通常不透水的层,例如Mylar®聚酯膜(DuPont Teijin Films)背衬。当使用时,通常通过诸如3M 444双面胶带的粘合剂将背衬固定至膜。通常,不透水的背衬用于低厚度的膜。可以使用多种聚合物,只要它们不非特异性地结合测定成分并且不干扰样品流动即可。示例性的聚合物包括聚乙烯、聚丙烯、聚苯乙烯等。备选地,膜可以是自支持的。也可以使用其他非吸水膜,例如聚氯乙烯、聚乙酸乙烯酯、乙酸乙烯酯和氯乙烯的共聚物、聚酰胺、聚碳酸酯、聚苯乙烯等。在多种实施方案中,可以用包含封闭剂和稳定剂的溶液预处理标签区材料。封闭剂包括牛血清白蛋白(BSA)、甲基化的BSA、酪蛋白、脱脂奶粉。该装置还可以包括其他成分,包括例如缓冲剂、HAMA抑制剂、去污剂、盐(例如钙、镁、钾等的氯酸盐和/或硫酸盐)和蛋白质成分(例如血清白蛋白、明胶、牛奶蛋白等)。该列表并非限制性的。

[0088] 设备可以进一步包括各种对照位置,其被读取以确定测试设备已经被正确地运行。举例来说,可以与测定检测区分开提供程序对照区,以验证样品流是否如预期的那样。对照区优选地是在空间上不同的区域,在该区域可以生成指示反应剂正确流动的信号。程序对照区可以包含目的分析物或其片段,分析物测定法中使用的过量的标记的抗体可以与

所述目的分析物或其片段结合。在操作中,即使当测试样品中不存在目的分析物时,标记的反应剂也结合对照区。使用对照线会有所帮助,因为对照线中的信号出现指示可以读取测试结果的时间,即使是阴性结果也是如此。因此,当期望信号出现在对照线中时,可以注意到捕获区域中信号的存在或不存在。装置可以进一步包括负对照区。该对照区的目的是警告用户测试装置无法正常工作。正常工作时,在阴性对照区域中应该看不到任何信号或标志物。

[0089] 这种测定装置的外壳或壳体可以采用多种形式。通常,它将包括细长的外壳,并且可以具有多个相互配合的部分。在特别优选的实施例中,壳体包括顶盖和底部支撑件。顶盖包含应用孔和观察口。在优选的实施方式中,壳体由不透湿的固体材料例如塑料材料制成。可以想到,可以使用多种可商购的塑料,包括但不限于乙烯基、尼龙、聚氯乙烯、聚丙烯、聚苯乙烯、聚乙烯、聚碳酸酯、聚硫烷、聚酯、氨基甲酸乙酯和环氧树脂,来构成壳体。壳体可以通过常规方法来制备,例如本领域中众所周知并使用的标准模制技术。可以通过模制技术来制造壳体,所述模制技术包括但不限于注射模制、压缩模制、转移模制、吹塑、挤出模制、泡沫模制和热成型模制。前述模制技术在本领域中是众所周知的并因此在此不详细讨论。参见,例如,Processes And Materials Of Manufacture, Third Edition, R.A.Lindsberg (1983) Allyn and Baron pp.393-431。

[0090] 如果有必要,然后可以使用适合于标签的仪器评估所采用的可检测标签的比色、发光或荧光强度。举例来说,荧光计可以用来检测荧光标签;反射计可以用来检测吸收光的标签,等等。可以通过将测量的响应与样品流体中分析物的量相关联来确定样品中目的分析物的浓度。

[0091] 测定法相关性

[0092] 如本文所用,术语“相关的”和“有关的”是指测定法中生物标志物的测量,是指基于从测定法获得的信号确定样品中生物标志物的存在,或更优选的是其量。通常,这采取比较从参与测定法的一种物质上的可检测标签生成的信号与预定标准曲线的形式,该预定标准曲线可用于将信号转换为生物标志物的浓度或阈值量。

[0093] 如本文中所使用的术语“相关”和“有关”涉及生物标志物用于诊断或预后的用途,是指将患者中生物标志物的存在或量与其在已知患有或已知处于给定病况的风险人中;或在已知无给定病况的人中的存在或量进行比较。通常,这采取将以生物标志物浓度形式的测定结果与预定阈值进行比较,该预定阈值选择为指示疾病的发生或未发生或者某些未来结果的可能性。

[0094] 选择诊断阈值尤其涉及对疾病的可能性,在不同的测试阈值处的正确和错误诊断的分布以及基于诊断的治疗后果(或治疗失败)的估计。例如,当考虑施用高效且风险低的特定疗法时,几乎不需要测试,因为临床医生可以接受实质性的诊断不确定性。另一方面,在治疗选项更无效和风险更高的情况下,临床医生通常需要更高的诊断确定性。因此,成本/效益分析涉及选择诊断阈值。

[0095] 可以以多种方式确定合适的阈值。例如,使用心肌肌钙蛋白诊断急性心肌梗塞的推荐诊断阈值是正常人群中浓度的97.5%。另一种方法可以是查看来自同一患者的连续样品,其中先前的“基线”结果用于监视生物标志物水平的时间变化。

[0096] 人口研究也可以用于选择决策阈值。受试者工作特性(“ROC”)源自二战期间开发

的用于雷达图像分析的信号检测理论领域，并且ROC分析通常用于选择能够最佳地区分“患病”亚群体和“非患病”亚群体的阈值。在这种情况下，当人测试呈阳性但实际上没有患病时，就会出现假阳性。另一方面，当患者实际未患病而被测试阴性（表明他们是健康的）时，就会出现假阴性。为了绘制ROC曲线，当判定阈值连续变化时，确定真阳性率（TPR）和假阳性率（FPR）。由于TPR等价于灵敏度，而FPR等于 $1 - 特异性$ ，因此ROC图有时称为灵敏度vs $(1 - 特异性)$ 图。完美测试的ROC曲线下的面积应为1.0；随机测试的面积为0.5。选择阈值以提供可接受水平的特异性和灵敏度。

[0097] 在本文中，“患病”是指具有一种特征（疾病或病况的存在或者某些结果的发生）的群体，而“未患病”是指缺乏该特征的群体。尽管单个决策阈值是这种方法的最简单应用，但是可以使用多重决策阈值。例如，在第一阈值以下，疾病的不存在可以分配以相对高的置信度，而在第二阈值以上，疾病的存也可以分配以相对高的置信度。在两个阈值之间可以认为是不确定的。这实际上仅是示例性的。

[0098] 除了阈值比较之外，用于将测定结果与患者分类（疾病的发生或不发生，结局的可能性等）相关的其他方法包括决策树、规则集、贝叶斯方法和神经网络方法。这些方法可以产生表示受试者属于多个分类中的一个分类的程度的概率值。

[0099] 可以如Fischer et al., Intensive Care Med. 29:1043-51, 2003中所述获得测试准确性的量度，并用于确定给定生物标志物的有效性。这些措施包括灵敏度和特异性、预测值、似然比、诊断比值比和ROC曲线面积。ROC图的曲线下面积（“AUC”）等于分类器将随机选择的正实例的排名高于随机选择的负实例的概率。可以认为ROC曲线下的面积等价于Mann-Whitney U测试，该测试用于在所考虑的两组均具有连续数据的情况下在两组中获得的得分之间的中位数差异，或等价于Wilcoxon等级测试。

[0100] 如上所述，合适的测试可以在这些各种量度上显示以下结果中的一个或多个：特异性大于0.5，优选地至少0.6，更优选地至少0.7，再更优选地至少0.8，甚至更优选地至少0.9，和最优选地至少0.95，相应的灵敏度大于0.2，优选地大于0.3，更优选地大于0.4，还更优选地至少0.5，甚至更优选地0.6，再更优选地大于0.7，还更优选地大于0.8，慎重更优选地大于0.9，和最优选地大于0.95；灵敏度大于0.5，优选地至少0.6，更优选地至少0.7，再更优选地至少0.8，甚至更优选地至少0.9和最优选地至少0.95，相应的特异性大于0.2，优选地大于0.3；更优选地大于0.4，还更优选地至少0.5，甚至更优选地0.6，再更优选地大于0.7，还更优选地大于0.8，更优选地大于0.9，和最优选地大于0.95；至少75%的灵敏度，以及至少75%的特异性；ROC曲线面积大于0.5，优选地至少0.6，更优选地0.7，再更优选地至少0.8，甚至更优选地至少0.9，和最优选地至少0.95；比值比不等于1，优选地至少约2或更大或者约0.5或更小，更优选地至少约3或更大或者约0.33或更小，甚至更优选地至少约4或更大或者约0.25或更小，甚至更优选地至少约5或更大或者约0.2或更小，最优选地至少约10或更大或者约0.1或更小；正似然比（以灵敏度 $/ (1 - 特异性)$ 计算）大于1，至少2，更优选地至少3，还更优选地至少5，和最优选地至少10；和或负似然比（按 $(1 - 灵敏度) / 特异性$ 计算）小于1，小于或等于0.5，更优选地小于或等于0.3，和最优选地小于或等于0.1。

[0101] 抗体

[0102] 如本文所用，术语“抗体”是指能够特异性结合抗原或表位的，由一个或多个免疫球蛋白基因衍生、建模或基本上由其编码的肽或多肽，或其片段。参见例如Fundamental

Immunology, 3rd Edition, W.E.Paul, ed., Raven Press, N.Y. (1993); Wilson (1994; J. Immunol. Methods 175:267-273; Yarmush (1992) J. Biochem. Biophys. Methods 25:85-97。术语抗体包括抗原结合部分,即保留结合抗原的能力的“抗原结合位点”,(例如,片段、子序列、互补决定区(CDR)),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,是一个二价片段,包含在铰链区通过二硫键连接的两个Fab片段;(iii)由VH和CH1结构域组成的Fd片段;(iv)由抗体的单臂的VL和VH结构域组成的Fv片段,(v)dAb片段(Ward et al., (1989) Nature 341:544-546),其由VH结构域组成;和(vi)分离的互补决定区(CDR)。单链抗体也通过引用包括在术语“抗体”中。

[0103] 优选的治疗性抗体是IgG抗体。如本文所用,术语“IgG”是指属于基本上由公认的免疫球蛋白 γ 基因编码的一类抗体的多肽。在人类中,该类别包括IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。在小鼠中,此类包括IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3。IgG类抗体中已知的Ig结构域是VH、C γ 1、C γ 2、C γ 3、VL和CL。出于几种实际原因,IgG是治疗性抗体的优选类别。IgG抗体稳定,易于纯化,并能够在药物供应链适用的条件下储存。在体内,它们具有长的生物学半衰期,这不仅是其大小的函数,而且是它们与所谓的Fc受体(或FcRn)相互作用的结果。该受体似乎可以保护IgG免受细胞内的分解代谢,并将其再循环回血浆。

[0104] 抗体是结合特异性抗原的免疫蛋白。在包括人和小鼠在内的大多数哺乳动物中,抗体都是由成对的重和轻多肽链组成。轻链和重链可变区在抗体之间显示出显著的序列多样性,并负责结合靶抗原。每条链由分别的免疫球蛋白(Ig)结构域组成,并因此通用术语免疫球蛋白用于此类蛋白质。

[0105] 术语“特异性结合”并不旨在表示抗体仅与其预期靶标结合,因为如上所述,抗体结合展示该抗体结合的表位的任何多肽。相反,如果与其对不显示适当表位的非靶标分子的亲和力相比,抗体与其预期靶标的亲和力约高5倍,则该抗体“特异性结合”。优选地,抗体对靶分子的亲和力比抗体对非靶分子的亲和力高至少约5倍,优选地为10倍,更优选地为25倍,甚至更优选地为50倍,并且最优选地为100倍或更多。在优选的实施方案中,优选的抗体以至少约 $10^7 M^{-1}$,并且优选地约 $10^8 M^{-1}$ 至约 $10^9 M^{-1}$,约 $10^9 M^{-1}$ 至约 $10^{10} M^{-1}$ 或约 $10^{10} M^{-1}$ 至约 $10^{12} M^{-1}$ 的亲和力结合。

[0106] 将亲和力计算为 $K_d = k_{off}/k_{on}$ (k_{off} 是解离速率常数, k_{on} 是结合速率常数,而 K_d 是平衡常数)。可以通过在平衡时测量各种浓度(c)下标记的配体的结合分数(r)来确定亲和力。数据使用斯卡查德方程式绘制: $r/c = K(n-r)$:其中, r =平衡时结合的配体的摩尔数/受体的摩尔数; c =平衡时游离配体的浓度; K =平衡结合常数;和 n =每个受体分子的配体结合位点数。通过图形分析, r/c 绘制在Y轴上,而 r 绘制在X轴上,从而产生斯卡查德图。通过斯卡查德分析的抗体亲和力测量是本领域众所周知的。参见,例如,van Erp et al., J. Immunoassay 12:425-43,1991; Nelson and Griswold, Comput. Methods Programs Biomed. 27:65-8,1988。

[0107] 本发明的抗体可以通过表位作图来进一步表征,从而可以选择在本文所述的免疫测定法中具有最大临床效用的抗体和表位。术语“表位”是指能够与抗体特异性结合的抗原决定簇。表位通常由分子的化学活性表面基团组成,例如氨基酸或糖侧链,并且通常具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。构象性和非构象性表位的区别在于,在存在变性溶剂的情况下,丧失与前者的结合而不是后者的结合。优选地,靶向存在于靶分子上但部分

地或完全不存在于非靶分子上的表位。

[0108] 在一些实施方案中,抗体支架可以是来自不同物种的序列的混合物。这样,如果抗体是一个抗体,则该抗体可以是嵌合抗体和/或人源化抗体。通常,“嵌合抗体”和“人源化抗体”均指组合来自一个以上物种的区域的抗体。例如,“嵌合抗体”传统上包含来自小鼠(或在某些情况下为大鼠)的可变区和来自人的恒定区。“人源化抗体”通常是指已将可变域框架区交换为在人抗体中发现的序列的非人抗体。通常,在人源化抗体中,除CDR外的整个抗体由人源的多核苷酸编码或与此类抗体相同,但在其CDR内除外。将一部分或全部由起源于非人类有机体的核酸编码的CDR移植到人类抗体可变区的 β -片层框架中以产生抗体,该抗体的特异性由移植的CDR决定。此类抗体的产生描述于例如WO 92/11018, Jones, 1986, Nature 321:522-525, Verhoeyen et al., 1988, Science 239:1534-1536。通常需要所选择的接受体框架残基“回复突变”为相应的供体残基以恢复在初始移植的构建体中丧失的亲和力(美国专利号5,530,101;美国专利号5,585,089;美国专利号5,693,761;美国专利号5,693,762;美国专利号6,180,370;美国专利号5,859,205;美国专利号5,821,337;美国专利号6,054,297;美国专利号6,407,213)。人源化抗体最佳地还将包含免疫球蛋白恒定区的至少一部分,通常是人免疫球蛋白的恒定区的至少一部分,并因此通常将包含人Fc区。人源化抗体也可以使用具有基因工程改造的免疫系统的小鼠来生成。Roque et al., 2004, Biotechnol. Prog. 20:639-654。用于人源化和重塑非人抗体的多种技术和方法是本领域众所周知的(参见Tsurushita&Vasquez, 2004, Humanization of Monoclonal Antibodies, Molecular Biology of B Cells, 533-545, Elsevier Science (USA), 和其中引用的参考文献)。人源化方法包括但不限于在Jones et al., 1986, Nature 321:522-525; Riechmann et al., 1988; Nature 332:323-329; Verhoeyen et al., 1988, Science, 239:1534-1536; Queen et al., 1989, Proc Natl Acad Sci USA 86:10029-33; He et al., 1998, J. Immunol. 160: 1029-1035; Carter et al., 1992, Proc Natl Acad Sci USA 89:4285-9, Presta et al., 1997, Cancer Res. 57 (20) :4593-9; Gorman et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 4181-4185; O'Connor et al., 1998, Protein Eng 11:321-8中描述的方法。降低非人抗体可变区的免疫原性的人源化或其他方法可包括表面重铺方法,例如在Roguska et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:969-973中所述。在一个实施方案中,如本领域已知,亲本抗体已经亲和力成熟。可以采用基于结构的方法进行人源化和亲和力成熟,例如美国专利号11/004,590中所述。可以采用基于选择的方法来人源化和/或亲和力成熟抗体可变区,包括但不限于Wu et al., 1999, J. Mol. Biol. 294:151-162; Baca et al., 1997, J. Biol. Chem. 272 (16) :10678-10684; Rosok et al., 1996, J. Biol. Chem. 271 (37) :22611-22618; Rader et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:8910-8915; Krauss et al., 2003, Protein Engineering 16 (10) :753-759中描述的方法。其他人源化方法可能涉及嫁接CDR的仅部分,包括但不限于美国专利号09/810,502; Tan et al., 2002, J. Immunol. 169: 1119-1125; De Pascalis et al., 2002, J. Immunol. 169:3076-3084中描述的方法。

[0109] 在一个实施方案中,抗体是完全人抗体。“完全人抗体”或“完全的人抗体”是指具有源自人染色体的抗体的基因序列的人抗体。可以例如使用转基因小鼠(Bruggemann et al., 1997, Curr Opin Biotechnol 8:455-458)或结合选择方法的人类抗体文库(Griffiths et al., 1998, Curr Opin Biotechnol 9:102-108)获得完全人抗体。

[0110] 抗体的产生

[0111] 可以使用本领域中已知的多种技术来生产单克隆抗体制备物，包括使用杂交瘤、重组和噬菌体展示技术或其组合。例如，可以使用杂交瘤技术产生单克隆抗体，所述杂交瘤技术包括本领域已知的技术，例如在Harlow et al., ANTIBODIES:A LABORATORY MANUAL, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling, et al., in: MONOCLONAL ANTIBODIES AND T-CELL HYBRIDOMAS, pp. 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981) 中教导的技术(两者均通过引用整体并入本文)。如本文所用，术语“单克隆抗体”不限于通过杂交瘤技术产生的抗体。术语“单克隆抗体”是指衍生自单个克隆的抗体，包括任何真核、原核或噬菌体克隆，而不是其产生方法。

[0112] 衍生自除大鼠和小鼠以外的动物的单克隆抗体具有独特的优势。与信号转导和疾病相关的许多蛋白质靶标在小鼠、大鼠和人类之间高度保守，并因此可以被小鼠或大鼠宿主识别为自身抗原，从而使其免疫原性降低。当使用兔子作为宿主动物时，可以避免这个问题。参见，例如，Rossi et al., Am.J.Clin.Pathol., 124, 295-302, 2005。

[0113] 使用杂交瘤技术产生和筛选特异性抗体的方法是常规的并且是本领域众所周知的。在非限制性实例中，可用目的抗原或表达该抗原的细胞免疫小鼠。一旦检测到免疫应答，例如在小鼠血清中检测到对抗原特异的抗体，就收获小鼠脾脏并分离脾细胞。然后通过众所周知的技术将脾细胞与任何合适的骨髓瘤细胞融合。选择杂交瘤并通过有限稀释克隆。然后通过本领域已知的方法针对分泌能够结合抗原的抗体的细胞对杂交瘤克隆进行测定。通过用阳性杂交瘤克隆腹膜内接种小鼠可生成通常含有高水平抗体的腹水。

[0114] 可用于抗体生成的方法的佐剂包括但不限于蛋白质佐剂；细菌佐剂，例如完整细菌(BCG, 短小棒状杆菌(Corynebacterium parvum), 明尼苏达沙门氏菌(Salmonella minnesota))和细菌组分，包括细胞壁骨架，海藻糖二甲酸酯，单磷酰脂质A，结核杆菌的甲醇可提取残留物(MER)，完全或不完全的弗氏佐剂；病毒佐剂；化学佐剂，例如氢氧化铝、碘乙酸盐和胆固醇基半琥珀酸酯；裸DNA佐剂。可以在本发明的方法中使用的其他佐剂包括霍乱毒素、paropox蛋白、MF-59(Chiron Corporation; 也参见Bieg et al. (1999) "GAD65 And Insulin B Chain Peptide (9-23) Are Not Primary Autoantigens In The Type 1 Diabetes Syndrome Of The BB Rat," Autoimmunity, 31(1):15-24, 通过引用并入本文)，MPL®(Corixa Corporation; 也参见Lodmell et al. (2000) "DNA Vaccination Of Mice Against Rabies Virus:Effects Of The Route Of Vaccination And The Adjuvant Monophosphoryl Lipid A(MPL)," Vaccine, 18:1059-1066; Johnson et al. (1999) "3-O-Desacyl Monophosphoryl Lipid A Derivatives:Synthesis And Immunostimulant Activities," Journal of Medicinal Chemistry, 42:4640-4649; Baldridge et al. (1999) "Monophosphoryl Lipid A(MPL) Formulations For The Next Generation Of Vaccines," Methods, 19:103-107, 其全部通过引用整体并入本文), RC-529佐剂(Corixa Corporation; 来自Corixa氨基烷基葡萄糖苷4-磷酸氨基(AGP)化学文库的先导化合物，也参见www.corixa.com)和DETOX™佐剂(Corixa Corporation; DETOX™佐剂包括MPL®佐剂(单磷酰脂质A)和分枝杆菌细胞壁骨架；也参见Eton et al. (1998) "Active Immunotherapy With Ultraviolet B-Irradiated Autologous Whole Melanoma Cells Plus DETOX In Patients With Metastatic Melanoma," Clin.Cancer Res. 4(3):619-

627; 和 Gupta et al. (1995) "Adjuvants For Human Vaccines-Current Status, Problems And Future Prospects," Vaccine, 13(14):1263-1276, 两者均通过引用并入本文)。

[0115] 许多出版物讨论了使用噬菌体展示技术来产生和筛选用于与选定分析物结合的多肽文库。参见,例如,Cwirla et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87, 6378-82, 1990; Devlin et al., Science 249, 404-6, 1990, Scott and Smith, Science 249, 386-88, 1990; 和Ladner等人的美国专利号5,571,698。噬菌体展示方法的基本概念是在编码待筛选的多肽的DNA与多肽之间建立物理联系。这种物理联系是由噬菌体颗粒提供的,该噬菌体颗粒将多肽展示为包裹编码该多肽的噬菌体基因组的衣壳的一部分。在多肽及其遗传物质之间建立物理联系,可以同时大规模筛选大量带有不同多肽的噬菌体。展示对靶标具有亲和力的多肽的噬菌体结合靶标,并且通过对靶标的亲和力筛选而富集这些噬菌体。从这些噬菌体展示的多肽的身份可以从它们各自的基因组中确定。使用这些方法,然后可以通过常规方法大量合成被鉴定为对所需靶标具有结合亲和力的多肽。参见,例如,美国专利号6,057,098,其通过引用整体并入本文,包括所有表格、附图和权利要求。

[0116] 然后可以通过首先针对与目的纯化的多肽的亲和力和特异性进行筛选,并且如果需要,将结果与具有需要从结合中排除的多肽的抗体的亲和力和特异性进行比较,来选择通过这些方法产生的抗体。筛选过程可涉及将纯化的多肽固定化在微量滴定板的单独孔中。然后将含有潜在抗体或抗体组的溶液放入各自的微量滴定孔中,并孵育约30分钟至2小时。然后洗涤微量滴定孔,并将标记的第二抗体(例如,如果产生的抗体是小鼠抗体,则与碱性磷酸酶缀合的抗小鼠抗体)添加到孔中,并孵育约30分钟,然后洗涤。将底物添加到孔中并且在存在针对固定化的多肽的抗体的地方将发生显色反应。

[0117] 这样鉴定的抗体然后可以在选择的测定法设计中进一步分析亲和力和特异性。在针对靶标蛋白的免疫测定法的开发中,纯化的靶标蛋白充当标准,使用该标准来判断使用所选抗体的免疫测定法的灵敏度和特异性。因为各种抗体的结合亲和力可能不同;某些抗体对(例如,在三明治测定法中)可能在空间上相互干扰,等等,抗体的测定法性能可能比抗体的绝对亲和力和特异性更为重要。

[0118] 抗体也可以使用不能表达功能性内源性免疫球蛋白但可以表达人免疫球蛋白基因的转基因小鼠产生。例如,可以将人重链和轻链免疫球蛋白基因复合物随机引入或通过同源重组引入小鼠胚胎干细胞中。备选地,除人重链和轻链基因外,还可将人可变区、恒定区和多样性区引入小鼠胚胎干细胞中。可通过同源重组引入人免疫球蛋白基因座分别地或同时使小鼠重链和轻链免疫球蛋白基因失去功能。特别地,JH区的纯合缺失阻止了内源性抗体产生。将修饰的胚胎干细胞扩增并显微注射到胚泡中以产生嵌合小鼠。然后繁殖嵌合小鼠以产生表达人抗体的纯合后代。使用常规方法用选定的抗原,例如本发明的全部或部分多肽,免疫转基因小鼠。可以使用常规杂交瘤技术从免疫的转基因小鼠中获得针对抗原的单克隆抗体。转基因小鼠携带的人免疫球蛋白转基因在B细胞分化过程中重排,然后进行类别转换和体细胞突变。因此,使用这种技术,可以产生治疗上有用的IgG、IgA、IgM和IgE抗体。用于产生人抗体的这项技术的概述,请参见Lonberg et al. (1995) "Human Antibodies From Transgenic Mice," Int.Rev.Immunol. 13:65-93, 其通过引用整体并入本文。对于产生人抗体和人单克隆抗体的这种技术以及产生这种抗体的方案的详细讨论,参见,例如,国际公开号WO 98/24893、WO 96/34096和WO 96/33735; 和美国专利号5,413,923、5,625,126、

5,633,425、5,569,825、5,661,016、5,545,806、5,814,318和5,939,598,其通过引用整体并入本文。另外,可以安排诸如Abgenix, Inc. (Freemont, Calif.) 和Medarex (Princeton, N.J.) 的公司使用类似于上述技术来提供针对所选抗原的人抗体。

[0119] 抗体的重组表达

[0120] 一旦获得了编码本发明抗体的核酸序列,就可以使用本领域众所周知的技术通过重组DNA技术来产生用于产生抗体的载体。可以使用本领域技术人员众所周知的方法来构建包含抗体编码序列以及合适的转录和翻译控制信号的表达载体。这些方法包括,例如,体外重组DNA技术、合成技术和体内遗传重组。(参见,例如在Sambrook et al, 1990, MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. 和Ausubel et al. eds., 1998, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley&Sons, NY中描述的技术)。

[0121] 可以通过常规技术(例如,电穿孔、脂质体转染和磷酸钙沉淀)将包含抗体的核苷酸序列的表达载体转移至宿主细胞,并然后通过常规技术培养转染的细胞以产生本发明的抗体。在特定的实施方案中,抗体的表达由组成型、诱导型或组织的特异性启动子调节。

[0122] 本文公开的抗TIMP2抗体也可以重组产生(例如,在大肠杆菌/T7表达系统、哺乳动物细胞表达系统或低等真核表达系统中)。在该实施方案中,可以将编码本发明的抗体免疫球蛋白分子(例如,V_H或V_L)的核酸插入基于PET的质粒中,并在大肠杆菌/T7系统中表达。例如,本发明包括在宿主细胞(例如,细菌宿主细胞,例如大肠杆菌,诸如BL21或BL21DE3)中表达抗体或其抗原结合片段或其免疫球蛋白链的方法,包括在还包含编码与T7启动子可操作连接的免疫球蛋白链的多核苷酸的细胞中表达T7 RNA聚合酶。例如,在本发明的一个实施方案中,细菌宿主细胞,例如大肠杆菌,包括编码可操作地连接至lac启动子的T7 RNA聚合酶基因的多核苷酸,并且聚合酶和链的表达是通过用IPTG(异丙基-β-D-硫代半乳糖吡喃糖苷)孵育宿主细胞来诱导的。

[0123] 因此,本发明包括用于制备本发明的抗TIMP2抗体或其抗原结合片段或其免疫球蛋白链的重组方法,其包括引入编码该抗体或片段的一个或多个免疫球蛋白链(例如,重和/或轻的免疫球蛋白链)的多核苷酸;在有利于这种表达的条件下培养宿主细胞(例如CHO或毕赤酵母(Pichia)或巴斯德毕赤酵母(Pichia pastoris)),并任选地从宿主细胞和/或生长宿主细胞的培养基中分离抗体或片段或链。

[0124] 抗TIMP2抗体也可以通过美国专利号6,331,415中阐述的任何方法来合成。

[0125] 真核和原核宿主细胞包括哺乳动物细胞作为表达本文公开的抗体或片段或免疫球蛋白链的宿主是本领域众所周知的,并且包括许多可从美国典型培养物保藏中心(ATCC)获得的永生化细胞系。这些尤其包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、NS0、SP2细胞、HeLa细胞、幼仓鼠肾(BHK)细胞、猴肾细胞(COS)、人肝细胞癌细胞(例如Hep G2)、A549细胞、3T3细胞、HEK-293细胞和许多其他细胞系。哺乳动物宿主细胞包括人、小鼠、大鼠、狗、猴、猪、山羊、牛、马和仓鼠细胞。通过确定哪些细胞系具有高表达水平来选择特别优选的细胞系。可以使用的其他细胞系是昆虫细胞系例如Sf9细胞、两栖细胞、细菌细胞、植物细胞和真菌细胞。真菌细胞包括酵母和丝状真菌细胞,包括例如巴斯德毕赤氏酵母(Pichia pastoris)、芬兰毕赤酵母(Pichia finlandica)、喜海藻糖毕赤酵母(Pichia trehalophila)、小克氏酵母(Pichia koclamae)、膜状毕赤酵母(Pichia membranaefaciens)、小毕赤酵母(Pichia

minuta) (*Ogataea minuta*、*Pichia lindneri*)、仙人掌毕赤酵母 (*Pichia opuntiae*)、耐热毕赤酵母 (*Pichia thermotolerans*)、柳毕赤酵母 (*Pichia salictaria*)、*Pichia guercuum*、皮杰普毕赤酵母 (*Pichia pijperi*)、树干毕赤酵母 (*Pichia stiptis*)、甲醇毕赤酵母 (*Pichia methanolica*)、毕赤酵母属物种 (*Pichia* sp.)、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、酿酒酵母属物种 (*Saccharomyces* sp.)、多形汉逊酵母 (*Hansenula polymorpha*)、克鲁维酵母属物种 (*Kluyveromyces* sp.)、乳酸克鲁维酵母 (*Kluyveromyces lactis*)、白色念珠菌 (*Candida albicans*)、构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans*)、黑曲霉 (*Aspergillus niger*)、米曲霉 (*Aspergillus oryzae*)、里氏木霉 (*Trichoderma reesei*)、勒克瑙金孢霉菌 (*Chrysosporium lucknowense*)、镰刀霉属物种 (*Fusarium* sp.)、禾谷镰刀菌 (*Fusarium gramineum*)、镰刀镰刀菌 (*Fusarium venenatum*)、小立碗藓 (*Physcomitrella patens*) 和粗糙脉孢霉 (*Neurospora crassa*)，毕赤酵母属物种、任何酿酒酵母属物种、多形汉逊酵母、任何克鲁维酵母属物种、白色念珠菌、任何曲霉属物种、里氏木霉、勒克瑙金孢霉菌、任何镰刀霉属物种、解脂耶氏酵母 (*Yarrowia lipolytica*) 和粗糙脉孢霉 (*Neurospora crassa*)。当将编码重链或其抗原结合部分或其片段，轻链和/或其抗原结合片段的重组表达载体引入哺乳动物宿主细胞时，通过将宿主细胞培养足够的时间，以允许抗体或片段或链在宿主细胞中表达或分泌到宿主细胞在其中生长的培养基中来产生抗体。

[0126] 多种宿主表达载体系统可用于表达本发明的抗体。这样的宿主表达系统代表可以通过其产生并随后纯化抗体的编码序列的媒介物，还代表了当用合适的核苷酸编码序列转化或转染时可以原位表达本发明抗体的细胞。这些包括但不限于微生物，例如用含有免疫球蛋白编码序列的重组噬菌体DNA、质粒DNA或粘粒DNA表达载体转化的细菌(例如，大肠杆菌和枯草芽孢杆菌)；用含有免疫球蛋白编码序列的重组酵母表达载体转化的酵母(例如毕赤酵母)；用含有免疫球蛋白编码序列的重组病毒表达载体(例如杆状病毒)感染的昆虫细胞系统；用重组病毒表达载体(例如花椰菜花叶病毒(CaMV)和烟草花叶病毒(TMV))感染的或用含有免疫球蛋白编码序列的重组质粒表达载体(例如Ti质粒)转化的植物细胞系统；或携带重组表达构建体的哺乳动物细胞系统(例如COS、CHO、BHK、293、293T、3T3细胞，淋巴细胞(参见美国专利号5,807,715)，Per C.6细胞(由Crucell开发的大鼠视网膜细胞))，所述重组表达构建体含有源自哺乳动物细胞基因组的启动子(例如金属硫蛋白启动子)或源自哺乳动物病毒的启动子(例如腺病毒的晚期启动子；牛痘病毒7.5K启动子)。

[0127] 在细菌系统中，取决于对于在表达的抗体的预期用途，可以有利地选择许多表达载体。例如，当要生产大量这样的蛋白质时，为了生成抗体的药物组合物，可能需要指导表达易于纯化的高水平融合蛋白产物表达的载体。这样的载体包括但不限于大肠杆菌表达载体pUR278 (Ruther et al. (1983) "Easy Identification Of cDNA Clones," EMBO J. 2: 1791-1794)，其中抗体编码序列可以是与lac Z编码区同框单独地连接到载体中，从而产生融合蛋白；pIN载体 (Inouye et al. (1985) "Up-Promoter Mutations In The Lpp Gene Of *Escherichia coli*," Nucleic Acids Res. 13: 3101-3110; Van Heeke et al. (1989) "Expression Of Human Asparagine Synthetase In *Escherichia coli*," J. Biol. Chem. 24: 5503-5509)；等等。pGEX载体也可用于表达外源多肽为与谷胱甘肽S-转移酶(GST)的融合蛋白。通常，这样的融合蛋白是可溶的并且可以通过吸附并结合到基质谷胱甘肽-琼脂糖珠上，然后在游离谷胱甘肽的存在下洗脱而容易地从裂解的细胞中纯化。pGEX

载体设计为包括凝血酶或因子Xa蛋白酶切割位点,因此可以从GST部分释放克隆的靶基因产物。

[0128] 在昆虫系统中,将苜蓿银纹夜蛾(*Autographa californica*)核多角体病毒(AcNPV)用作表达外源基因的载体。该病毒在草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)细胞中生长。可以将抗体编码序列单独地克隆到病毒的非必需区域(例如多面体基因)中并置于AcNPV启动子(例如多面体启动子)的控制下。

[0129] 在哺乳动物宿主细胞中,可以利用许多基于病毒的表达系统。在将腺病毒用作表达载体的情况下,可以将目的抗体编码序列连接至腺病毒转录/翻译控制复合体,例如晚期启动子和三方前导序列。然后可以通过体外或体内重组将该嵌合基因插入腺病毒基因组。插入病毒基因组的非必需区域(例如,区域E1或E3)将产生有活力的并且能够在感染的宿主中表达免疫球蛋白分子的重组病毒。(参见,例如,Logan et al. (1984) "Adenovirus Tripartite Leader Sequence Enhances Translation Of mRNAs Late After Infection," Proc.Natl.Acad.Sci. (U.S.A.) 81:3655-3659)。为了有效翻译插入的抗体编码序列,可能还需要特定的起始信号。这些信号包括ATG起始密码子和相邻序列。此外,起始密码子必须与所需编码序列的阅读框同相,以确保整个插入片段的翻译。这些外源翻译控制信号和起始密码子可以是天然和合成的多种来源。可以通过包含适当的转录增强子元件、转录终止子等来增强表达的效率(参见Bitter et al. (1987) "Expression And Secretion Vectors For Yeast," Methods in Enzymol.153:516-544)。

[0130] 此外,可以选择宿主细胞株,其调控插入序列的表达,或以所需的方式修饰和加工基因产物。蛋白质产物的此类修饰(例如,糖基化)和加工(例如,切割)对于蛋白质的功能可能是重要的。不同的宿主细胞具有蛋白质和基因产物的翻译后加工和修饰的特征性的和特定的机制。可以选择适当的细胞系或宿主系统以确保表达的外源蛋白质的正确修饰和加工。为此,可以使用具有用于基因产物的初级转录物的适当加工、糖基化和磷酸化的细胞机制的真核宿主细胞。这样的哺乳动物宿主细胞包括但不限于CHO、VERY、BHK、HeLa、COS、MDCK、293、293T、3T3、WI38、BT483、Hs578T、HTB2、BT20和T47D、CRL7030和Hs578Bst。

[0131] 为了长期、高产量地生产重组蛋白,优选稳定表达。例如,可以工程化改造稳定地表达本发明抗体的细胞系。可以使用由适当的表达控制元件(例如,启动子、增强子、序列、转录终止子、聚腺苷酸化位点等)和选择标志物控制的DNA转化宿主细胞,而不是使用包含病毒复制起点的表达载体。引入外源DNA后,可使工程化改造的细胞在富集培养基中生长1-2天,并然后切换至选择性培养基。重组质粒中的可选择标志物赋予对选择的抗性,并使细胞将质粒稳定整合到其染色体中并生长以形成灶,然后可以将其克隆并扩增成细胞系。该方法可有利地用于工程化改造表达本发明抗体的细胞系。这样的工程化改造的细胞系在筛选和评估与本发明的抗体直接或间接相互作用的化合物时可能特别有用。

[0132] 可以使用许多选择系统,包括但不限于单纯疱疹病毒胸苷激酶(Wigler et al. (1977) "Transfer Of Purified Herpes Virus Thymidine Kinase Gene To Cultured Mouse Cells," Cell 11:223-232),次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶(Szybalska et al. (1962) "Genetics Of Human Cess Line.IV.DNA-Mediated Heritable Transformation Of A Biochemical Trait," Proc.Natl.Acad.Sci. (U.S.A.) 48:2026-2034),和腺嘌呤磷酸核糖基转移酶(Lowy et al. (1980) "Isolation Of Transforming

DNA:Cloning The Hamster Aprt Gene,"Cell 22:817-823)基因可分别用于tk-、hgprt-或aprt-细胞。同样,抗代谢物抗性可以用作选择以下基因的基础:dhfr,其赋予对甲氨蝶呤的抗性(Wigler et al. (1980) "Transformation Of Mammalian Cells With An Amplifiable Dominant-Acting Gene," Proc.Natl.Acad.Sci.(U.S.A.)77:3567-3570;O'Hare et al. (1981) "Transformation Of Mouse Fibroblasts To Methotrexate Resistance By A Recombinant Plasmid Expressing A Prokaryotic Dihydrofolate Reductase," Proc.Natl.Acad.Sci.(U.S.A.)78:1527-1531);gpt,其赋予对麦考酚酸的抗性(Mulligan et al. (1981) "Selection For Animal Cells That Express The Escherichia coli Gene Coding For Xanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase," Proc.Natl.Acad.Sci.(U.S.A.)78:2072-2076);neo,其赋予对氨基糖苷G-418的抗性(Tachibana et al. (1991) "Altered Reactivity Of Immunoglobulin Produced By Human-Human Hybridoma Cells Transfected By pSV2-Neo Gene," Cytotechnology 6 (3):219-226;Tolstoshev(1993) "Gene Therapy, Concepts, Current Trials And Future Directions," Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol.32:573-596;Mulligan(1993) "The Basic Science Of Gene Therapy," Science 260:926-932;和Morgan et al. (1993) "Human gene therapy," Ann.Rev.Biochem.62:191-217)。可以使用的重组DNA技术领域中通常已知的方法描述于Ausubel et al. (eds.), 1993, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley&Sons, NY; Kriegler, 1990, GENE TRANSFER AND EXPRESSION, A LABORATORY MANUAL, Stockton Press, NY; 和第12和13章, Dracopoli et al. (eds.), 1994, CURRENT PROTOCOLS IN HUMAN GENETICS, John Wiley&Sons, NY.; Colbere-Garapin et al. (1981) "A New Dominant Hybrid Selective Marker For Higher Eukaryotic Cells," J.Mol.Biol.150: 1-14; 和hygro,其赋予对潮霉素的抗性(Santerre et al. (1984) "Expression Of Prokaryotic Genes For Hygromycin B And G418 Resistance As Dominant-Selection Markers In Mouse L Cells," Gene 30:147-156)。

[0133] 本发明的抗体的表达水平可以通过载体扩增来提高(综述,参见Bebbington and Hentschel, "The Use Of Vectors Based On Gene Amplification For The Expression Of Cloned Genes In Mammalian Cells,"于DNA CLONING, Vol.3. (Academic Press, New York, 1987))。当表达抗体的载体系统中的标志物是可扩增的时,宿主细胞培养物中存在的抑制剂水平的增加将增加标志物基因的拷贝数。由于扩增的区域与抗体的核苷酸序列相关,因此抗体的产生也将增加(Crouse et al. (1983) "Expression And Amplification Of Engineered Mouse Dihydrofolate Reductase Minigenes," Mol.Cell.Biol.3:257-266)。

[0134] 宿主细胞可以用本发明的两种表达载体共转染,第一载体编码重链衍生的多肽并且第二载体编码轻链衍生的多肽。两种载体可以包含相同的可选择标志物,其使得重链和轻链多肽能够相等表达。备选地,可以使用编码重链和轻链多肽两者的单个载体。在这种情况下,应将轻链放在重链之前,以避免过量的无毒重链(Proudfoot (1986) "Expression And Amplification Of Engineered Mouse Dihydrofolate Reductase Minigenes," Nature 322:562-565; Kohler (1980) "Immunoglobulin Chain Loss In Hybridoma Lines," Proc.Natl.Acad.Sci.(U.S.A.)77:2197-2199)。重链和轻链的编码序列可以包含cDNA或基因组DNA。

[0135] 通常，在特定细胞系或转基因动物中产生的糖蛋白将具有糖基化模式，其对于细胞系或转基因动物中产生的糖蛋白是特征性的。因此，抗体的特定糖基化模式将取决于用于产生抗体的特定细胞系或转基因动物。然而，由本文提供的核酸分子编码或包含本文提供的氨基酸序列的所有抗体均独立于抗体可能具有的糖基化模式而构成本发明。类似地，在特定的实施方案中，具有仅包含非岩藻糖基化的N-聚糖的糖基化模式的抗体可能是有利的，因为已经显示这些抗体在体外和体内通常比其岩藻糖基化的对等物更有效的功效(参见例如Shinkawa et al., J.Biol.Chem. 278: 3466-3473 (2003); 美国专利号6,946,292和7,214,775)。这些具有非岩藻糖基化N-聚糖的抗体不太可能具有免疫原性，因为它们的碳水化合物结构是人类血清IgG中存在的群体的正常组分。

[0136] 一旦本发明的抗体已经重组表达，就可以通过本领域已知的用于纯化抗体的任何方法进行纯化，例如，通过色谱法(例如，离子交换、亲和力、特别是蛋白质A后通过对特定抗原的亲和力，和尺寸柱色谱)、离心、差异溶解度或通过用于纯化蛋白质的任何其他标准技术。

[0137] 抗体缀合物

[0138] 本文公开的抗TIMP2抗体及其抗原结合片段也可以缀合至化学部分。化学部分尤其可以是聚合物、放射性核素或细胞毒性因子。在特定的实施方案中，化学部分是增加抗体或片段在受试者体内的半衰期的聚合物。合适的聚合物包括但不限于亲水聚合物，其包括但不限于聚乙二醇(PEG)(例如，分子量为2kDa、5kDa、10kDa、12kDa、20kDa、30kDa或40kDa的PEG)、右旋糖酐和单甲氧基聚乙二醇(mPEG)。Lee, et al., (1999) (Bioconj.Chem. 10: 973-981)公开了PEG缀合的单链抗体。Wen, et al., (2001) (Bioconj.Chem. 12: 545-553)公开了用与放射性金属螯合剂(二亚乙基三氨基五乙酸(DTPA))连接的PEG缀合抗体。

[0139] 本文公开的抗体及其抗原结合片段也可以与诸如⁹⁹Tc、⁹⁰Y、¹¹¹In、³²P、¹⁴C、¹²⁵I、³H、¹³¹I、¹¹C、¹⁵O、¹³N、¹⁸F、³⁵S、⁵¹Cr、⁵⁷To、²²⁶Ra、⁶⁰Co、⁵⁹Fe、⁵⁷Se、¹⁵²Eu、⁶⁷Cu、²¹⁷Ci、²¹¹At、²¹²Pb、⁴⁷Sc、¹⁰⁹Pd、²³⁴Th、和⁴⁰K、¹⁵⁷Gd、⁵⁵Mn、⁵²Tr和⁵⁶Fe的标签缀合。

[0140] 本文公开的抗体和抗原结合片段也可以被PEG化，例如以增加其生物学(例如血清)半衰期。为使抗体或片段PEG化，通常在一个或多个PEG基团连接到抗体或抗体片段的条件下，使抗体或片段与聚乙二醇(PEG)的反应性形式(例如PEG的反应性酯或醛衍生物)反应。在特定的实施方案中，通过与反应性PEG分子(或类似的反应性水溶性聚合物)的酰基化反应或烷基化反应而进行PEG化。如本文所用，术语“聚乙二醇”旨在涵盖已用于衍生化其他蛋白质的任何形式的PEG，例如单(C1-C10)烷氧基-或芳氧基-聚乙二醇或聚乙二醇-马来酰亚胺。在某些实施方案中，待PEG化的抗体或片段是无糖基化的抗体或片段。PEG化蛋白质的方法是本领域已知的，并且可以应用于本发明的抗体。参见，例如，EP 0 154 316和EP 0 401 384。

[0141] 本文公开的抗体和抗原结合片段也可以与荧光或化学发光标签缀合，包括荧光团，例如稀土螯合物、荧光素及其衍生物、若丹明及其衍生物、异硫氰酸酯、藻红蛋白、藻蓝蛋白、别藻蓝蛋白、o-邻苯二甲醛、荧光胺、¹⁵²Eu、丹磺酰基、伞形酮、萤光素、鲁米那标签(luminal label)、异鲁米那标签、芳族吖啶酯标签、咪唑标签、吖啶盐标签、草酸酯标签、水母发光蛋白标签、2,3-二氢邻苯二嗪二酮、生物素/抗生物素蛋白、自旋标签和稳定的自由基。

[0142] 本发明的抗体及其抗原结合片段也可以缀合至细胞毒性因子例如白喉毒素、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)外毒素A链、蓖麻毒素A链、相思豆毒素A链、modeccin A链、 α -sarcin、油桐(*Aleurites fordii*)蛋白和化合物(例如,脂肪酸)、石竹素(dianthin)蛋白、美洲商陆(*Phytolacca americana*)蛋白PAPI、PAPII和PAP-S、苦瓜(*momordica charantia*)抑制剂、麻疯树毒蛋白(curcin)、巴豆毒蛋白(croton),肥皂草(*saponaria officinalis*)抑制剂、丝林霉素(mitogellin)、局限曲菌素(restrictocin)、酚霉素(phennomycin)和依诺霉素(enomycin)。

[0143] 可以采用本领域已知的将本发明的抗体及其抗原结合片段缀合至各种部分的任何方法,包括由Hunter, et al., (1962) *Nature* 144:945; David, et al., (1974) *Biochemistry* 13:1014; Pain, et al., (1981) *J. Immunol. Meth.* 40:219; 和Nygren, J., (1982) *Histochem. and Cytochem.* 30:407描述的方法。缀合抗体和片段的方法是常规的并且在本领域中是众所周知的。

[0144] 抗TIMP2抗体的治疗用途

[0145] 进一步提供了用于治疗需要用本文公开的分离的抗体或其抗原结合片段治疗的受试者,包括人类受试者的方法。

[0146] 为了制备本发明的抗TIMP2抗体和抗原结合片段(例如,抗体6E2.1或40H2-40K3及其人源化形式)的药物或无菌组合物,将抗体或其抗原结合片段与药学上可接受的载体或赋形剂混合。参见,例如,Remington's *Pharmaceutical Sciences* and U.S. *Pharmacopeia*:National Formulary, Mack Publishing Company, Easton, PA (1984)。

[0147] 治疗剂和诊断剂的制剂可以通过与可接受的载体、赋形剂或稳定剂混合以例如冻干粉剂、浆剂、水溶液或悬浮液的形式来制备(参见,例如,Hardman, et al. (2001) *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, McGraw-Hill, New York, NY; Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, Lippincott, Williams, and Wilkins, New York, NY; Avis, et al. (eds.) (1993) *Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications*, Marcel Dekker, NY; Lieberman, et al. (eds.) (1990) *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets*, Marcel Dekker, NY; Lieberman, et al. (eds.) (1990) *Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems*, Marcel Dekker, NY; Weiner and Kotkoskie (2000) *Excipient Toxicity and Safety*, Marcel Dekker, Inc., New York, NY)。

[0148] 单独或与另一种治疗剂组合施用的本发明的抗体的毒性和治疗功效可以通过在细胞培养物或实验动物中的标准药学规程来确定,例如,用于确定LD₅₀(对50%的群体致死的剂量)和ED₅₀(在群体的50%中具有治疗效果的剂量)。毒性和治疗效果之间的剂量比是治疗指数(LD₅₀/ED₅₀)。从这些细胞培养测定法和动物研究中获得的数据可用于制定用于人的剂量范围。这类化合物的剂量优选地在循环浓度的范围内,该循环浓度包括几乎没有或没有毒性的ED₅₀。剂量可以根据所采用的剂型和施用途径在该范围内变化。

[0149] 在另一个实施方案中,根据Physicians' Desk Reference 2003 (Thomson Healthcare; 57th edition (2002年11月1日)),与本发明的抗TIMP2抗体或其抗原结合片段(例如,抗体131A或其人源化形式)联合对受试者施用其他治疗剂。

[0150] 施用模式可以变化。施用途径包括口服、直肠、透粘膜、肠道、肠胃外;肌内、皮下、

真皮内、髓内、鞘内、直接心室内、静脉内、腹膜内、鼻内、眼内、吸入、吹入、局部、皮肤、透皮或动脉内。

[0151] 在特定的实施方案中,本发明的抗TIMP2抗体或其抗原结合片段(例如,抗体131A及其人源化形式)可以通过侵入性途径例如通过注射进行施用。在本发明的其他实施方案中,抗TIMP2抗体或其抗原结合片段或其药物组合物通过静脉内、皮下、肌肉内、动脉内、肿瘤内或通过吸入、气雾剂递送进行施用。通过非侵入性途径(例如口服;例如,以丸剂、胶囊或片剂的形式)的施用也在本发明的范围内。

[0152] 本发明提供了包含本发明的任何抗体或抗原结合片段(例如,抗体131A及其人源化形式)或其药物组合物的容器(例如,塑料瓶或玻璃瓶,例如具有盖或色谱柱、空心针或注射器筒)。本发明还提供了注射装置,其包含本发明的任何抗体或抗原结合片段(例如,抗体131A及其人源化形式)或其药物组合物。注射装置是通过肠胃外途径例如肌肉内、皮下或静脉内将物质引入患者体内的装置。例如,注射装置可以是注射器(例如,预先填充有药物组合物,例如自动注射器),该注射器例如包括用于容纳待注射流体(例如抗体或片段或其药物组合物)的圆筒或针筒,用于将皮肤和/或血管穿刺以注射流体的针;和用于将流体推出圆筒并通过针孔的柱塞。在本发明的一个实施方案中,包含本发明的抗体或其抗原结合片段或其药物组合物的注射装置是静脉内(IV)注射装置。这样的装置在插管或套管针/针中包括抗体或片段或其药物组合物,该插管或套管针/针(cannula or trocar/needle)可以附接到管,该管可以附接到用于容纳流体(例如盐水;或包含NaCl、乳酸钠、KC1、CaCl₂和可选地包括葡萄糖的乳酸林格液)的包或储库,所述流体通过套管或套管针/针头引入患者体内。在本发明的一个实施方案中,一旦将套管针和套管插入受试者的静脉中并且从所插入的套管中取出套管针,就可以将抗体或片段或其药物组合物引入装置中。IV装置可以例如被插入到外周静脉中(例如,在手或手臂中);上腔静脉或下腔静脉,或心脏右心房内(例如中枢IV);或者进入锁骨下静脉、颈内静脉或股静脉,例如,向心脏前进直至到达上腔静脉或右心房(例如,中央静脉线)。在本发明的一个实施方案中,注射装置是自动注射器;射流注射器或外部输注泵。射流注射器使用液体的高压窄射流穿透表皮,以将抗体或片段或其药物组合物引入患者体内。外部输注泵是将抗体或片段或者其药物组合物以受控量递送到患者体内的医疗装置。外部输注泵可以电动或机械方式供能。不同的泵以不同的方式运行,例如,注射泵将流体保持在注射器的储库中,并且可移动的活塞控制流体递送,弹性泵将流体保持在可拉伸的球囊储库中,并且来自球囊弹性壁的压力驱动流体递送。在蠕动泵中,一组滚子在一段柔性管上向下挤压,将流体向前推动。在多通道泵中,流体可以以多种速率从多个储库中递送出来。

[0153] 本文公开的药物组合物还可与无针皮下注射装置一起施用;例如美国专利号6,620,135;6,096,002;5,399,163;5,383,851;5,312,335;5,064,413;4,941,880;4,790,824或4,596,556中公开的装置。这种包含药物组合物的无针装置也是本发明的一部分。本文公开的药物组合物也可以通过输注进行施用。用于施用药物组合物的众所周知的植入物和模块的实例包括在如下中公开的那些:美国专利号4,487,603,其公开了用于以受控的速率分配药物的可植入的微输注泵;美国专利号4,447,233,其公开了用于以精确的输注速率递送药物的药物输注泵;美国专利号4,447,224,其公开了用于连续药物递送的可变流量可植入输注器械;美国专利号4,439,196,其公开了具有多腔室的渗透药物递送系统。许多其他此

类植入物、递送系统和模块是本领域技术人员众所周知的，并且包含本发明的药物组合物的那些植入物、递送系统和模块也在本发明的范围内。

[0154] 备选地，可以以局部而非全身的方式，例如通过将抗体或片段直接注射到肿瘤例如TIMP²⁺肿瘤中，来施用本发明的抗TIMP2抗体或抗原结合片段（例如，抗体131A及其人源化形式）。此外，可以在靶向药物递送系统中施用抗体或片段，例如在用靶向例如肿瘤（例如TIMP²⁺肿瘤，例如以免疫病理表征）的组织特异性抗体包被的脂质体中。脂质体将靶向患病组织并被患病组织选择性吸收。这样的方法和脂质体是本发明的一部分。

[0155] 施用方案取决于几个因素，包括治疗性抗体或抗原结合片段的血清或组织周转率、症状水平、治疗性抗体的免疫原性以及生物学基质中靶细胞的可及性。优选地，施用方案递送足够的治疗性抗体或片段以实现靶疾病状态的改善，同时最小化不希望的副作用。因此，所递送的生物制剂的量部分取决于特定的治疗性抗体和所治疗病症的严重性。可获得选择合适剂量的治疗性抗体或片段的指南（参见，例如，Wawrzynczak (1996) Antibody Therapy, Bios Scientific Pub.Ltd, Oxfordshire, UK; Kresina (ed.) (1991) Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis, Marcel Dekker, New York, NY; Bach (ed.) (1993) Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases, Marcel Dekker, New York, NY; Baert, et al. (2003) New Engl.J.Med. 348:601-608; Milgrom et al. (1999) New Engl.J.Med. 341:1966-1973; Slamon et al. (2001) New Engl.J.Med. 344: 783-792; Beniaminovitz et al. (2000) New Engl.J.Med. 342:613-619; Ghosh et al. (2003) New Engl.J.Med. 348:24-32; Lipsky et al. (2000) New Engl.J.Med. 343:1594-1602）。

[0156] 由临床医生例如使用本领域已知或怀疑影响治疗的参数或因素来确定合适的剂量。通常，剂量以比最佳剂量稍小的量开始，并且然后以小增量增加，直到相对于任何负面影响达到期望或最佳效果为止。重要的诊断量度包括那些症状，例如炎症或产生的炎性细胞因子的水平。通常，期望将要使用的生物制品衍生自与用于治疗的靶向动物来自相同的物种，从而使对反应剂的任何免疫应答减至最小。在人类受试者的情况下，例如，人源化和完全人类抗体可能是理想的。

[0157] 本文公开的抗体或其抗原结合片段（例如，抗体131A及其人源化形式）可以通过连续输注或通过例如每天、每周1-7次、每周、每两周、每月、每两月、每季度、每半年、每年等施用剂量来提供。剂量可以例如静脉内、皮下、局部、口服、经鼻、经直肠、肌内、脑内、脊髓内或通过吸入提供。每周总剂量通常为至少0.05μg/kg体重，更通常为至少0.2μg/kg、0.5μg/kg、1μg/kg、10μg/kg、100μg/kg、0.25mg/kg、1.0mg/kg、2.0mg/kg、5.0mg/kg、10mg/kg、25mg/kg、50mg/kg或更多（参见，例如Yang, et al. (2003) New Engl.J.Med. 349:427-434; Herold, et al. (2002) New Engl.J.Med. 346:1692-1698; Liu, et al. (1999) J.Neurol.Neurosurg.Psych. 67:451-456; Portielji, et al. (2003) Cancer Immunol.Immunother. 52:151-144）。还可以提供剂量以达到受试者血清中抗TIMP2抗体的预定靶浓度，例如0.1、0.3、1、3、10、30、100、300μg/ml或更高。在其他实施方案中，本发明的抗TIMP2抗体以例如皮下或静脉内，在每周、每两周、“每四周”、每月、每两月或每季度的基础上，以10、20、50、80、100、200、500、1000或2500mg/受试者进行施用。

[0158] 如本文所用，术语“有效量”是指当单独或与其他治疗剂组合施用给细胞、组织或

受试者时,有效引起疾病的一种或多种症状(例如癌症或癌症的进展)的可测量的改善的本发明的抗TIMP2或其抗原结合片段(例如抗体131A及其人源化形式)的量。有效剂量进一步指足以至少部分改善症状(例如,肿瘤缩小或消除、缺乏肿瘤生长、增加的生存时间)的抗体或片段的量。当应用于单独施用的单个活性成分时,有效剂量是指单独的该成分。当应用于组合时,有效剂量是指导致治疗效果的活性成分的组合量,无论是组合、连续或同时施用。有效量的治疗剂将导致诊断量度或参数改善至少10%;通常至少20%;优选地至少约30%;更优选地至少40%,和最优选地至少50%。在使用主观量度评估疾病严重程度的情况下,有效量还可以改善主观量度。

[0159] 实验和诊断用途

[0160] 本文公开的抗TIMP2抗体及其抗原结合片段可以用作亲和纯化剂。在该方法中,使用本领域公知的方法将抗TIMP2抗体及其抗原结合片段固定化在固相上,例如Sephadex、玻璃或琼脂糖树脂或滤纸。使固定化的抗体或片段与含有待纯化的TIMP2蛋白(或其片段)的样品接触,然后用合适的溶剂洗涤支持物,该溶剂将基本上除去样品中除与固定化的抗体或片段结合的TIMP2蛋白以外的所有材料。最后,用洗脱结合的TIMP2的溶剂(例如蛋白A)洗涤支持物。这种固定化的抗体和片段构成本发明的一部分。

[0161] 进一步提供了用于生成第二抗体的抗原,其例如用于执行Western印迹和本文讨论的其他免疫测定法。

[0162] 抗TIMP2抗体(例如,人源化抗体)及其抗原结合片段也可用于TIMP2蛋白的诊断测定法,例如,检测其在特定细胞、组织或血清例如肿瘤细胞如黑色素瘤细胞中的表达。这样的诊断方法在各种疾病诊断中可能是有用的。

[0163] 本发明包括ELISA测定法(酶联免疫吸附测定法),其涵盖了使用本文公开的抗TIMP2抗体或其抗原结合片段(例如抗体131A或其人源化形式)。

[0164] 例如,这种方法包括以下步骤:

[0165] (a) 用抗TIMP2抗体或其抗原结合片段包被基底(例如,微量滴定板孔的表面,例如塑料板);

[0166] (b) 将待测试TIMP2存在的样品应用到基底上;

[0167] (c) 清洗板,使得除去样品中未结合的材料;

[0168] (d) 应用对TIMP2抗原也具有特异性的可检测标记的抗体(例如酶联抗体);

[0169] (e) 洗涤基底,使得除去未结合的标记的抗体;

[0170] (f) 如果标记的抗体是酶连接的,则应用被酶转化为荧光信号的化学试剂;和

[0171] (g) 检测标记的抗体的存在。

[0172] 对与基底相连的标志物的检测表明TIMP2蛋白的存在。

[0173] 在另一个实施方案中,标记的抗体或其抗原结合片段用与ABTS(例如2,2'-叠氮基-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸))或3,3',5,5'-四甲基联苯胺反应的过氧化物酶进行标记,产生可检测的颜色变化。备选地,标记的抗体或片段用可检测的放射性同位素(例如³H)进行标记,该放射性同位素可以在闪烁剂存在下通过闪烁计数器所检测。

[0174] 本发明的抗TIMP2抗体或其抗原结合片段可以用于Western印迹法或免疫蛋白印迹法。这样的程序构成本发明的一部分并且包括例如可选地使用本领域已知的方法(例如,半干印迹或槽印迹),将蛋白质从待测试TIMP2存在的样品(例如,来自样品中蛋白质的PAGE

或SDS-PAGE电泳分离)中转移到膜或其他固体基底上;使待测试结合的TIMP2或其片段存在的膜或其他固体基底与本发明的抗TIMP2抗体或其抗原结合片段接触;清洗膜一次或多次以去除未结合的抗TIMP2抗体或片段以及其他未结合的物质;并检测结合的抗TIMP2抗体或片段。

[0175] 这样的膜可以采取硝酸纤维素膜或基于乙烯基的膜(例如,聚偏二氟乙烯(PVDF))的形式,待在非变性PAGE(聚丙烯酰胺凝胶电泳)凝胶或SDS-PAGE(十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳)凝胶测试TIMP2存在的蛋白质已转移至所述膜(例如,在凝胶中进行电泳分离后)。在使膜与抗TIMP2抗体或片段接触之前,任选地用例如脱脂奶粉等将膜封闭,以结合膜上的非特异性蛋白质结合位点。

[0176] 对结合的抗体或片段的检测表明TIMP2蛋白存在于膜或基底上以及样品中。对结合的抗体或片段的检测可以通过将抗体或片段与被可检测地标记的第二抗体(抗免疫球蛋白抗体)结合,然后检测第二抗体的存在来进行。

[0177] 本文公开的抗TIMP2抗体及其抗原结合片段也可以用于免疫组织化学。这样的方法构成本发明的一部分并且包括例如使待测试TIMP2蛋白存在的细胞(例如,肿瘤细胞,例如黑素瘤细胞)与本发明的抗TIMP2抗体或其抗原结合片段接触;并检测细胞上或细胞内的抗体或片段。

[0178] 如果抗体或片段本身被可检测地标记,则可以直接检测。备选地,抗体或片段可以与被检测到的可检测地标记的第二抗体结合。

[0179] 本文公开的某些抗TIMP2抗体及其抗原结合片段也可以用于体内肿瘤成像。这样的方法可以包括将放射性标记的抗TIMP2抗体或其抗原结合片段注射到待测试与TIMP2表达相关(例如表达TIMP2,例如在肿瘤细胞表面上)的肿瘤的存在的患者体内,然后对患者身体进行核成像,以检测标记的抗体或片段的存在,例如在包含高浓度结合至肿瘤的抗体或片段的灶处。对灶的检测表明TIMP²⁺肿瘤和肿瘤细胞的存在。

[0180] 成像技术包括SPECT成像(单光子发射计算机断层扫描)或PET成像(正电子发射断层扫描)。标签包括例如碘-123(¹²³I)和锝-99m(^{99m}Tc),例如结合SPECT成像或¹¹C、¹³N、¹⁵O或¹⁸F,例如结合PET成像或铟-111(参见,例如Gordon et al., (2005) International Rev.Neurobiol. 67:385-440)。

[0181] 药物组合物和施用

[0182] 为了制备本发明的抗TIMP2抗体和抗原结合片段的药物或无菌组合物,将抗体或其抗原结合片段与药学上可接受的载体或赋形剂混合。参见,例如Remington's Pharmaceutical Sciences and U.S.Pharmacopeia:National Formulary, Mack Publishing Company, Easton, PA(1984)。

[0183] 治疗剂和诊断剂的制剂可以通过与可接受的载体、赋形剂或稳定剂混合以例如冻干粉剂、浆剂、水溶液或悬浮液的形式来制备(参见,例如,Hardman, et al. (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, NY; Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams, and Wilkins, New York, NY; Avis, et al. (eds.) (1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY; Lieberman, et al. (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY; Lieberman, et al. (eds.)

(1990) Pharmaceutical Dosage Forms:Disperse Systems,Marcel Dekker, NY; Weiner and Kotkoskie (2000) Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., New York, NY)。

[0184] 单独或与另一种治疗剂组合施用的本发明抗体的毒性和治疗功效可以通过在细胞培养物或实验动物中的标准药学方法来确定,例如,用于确定LD₅₀ (对50%的群体致死的剂量) 和ED₅₀ (在群体的50% 中具有治疗效果的剂量)。毒性和治疗效果之间的剂量比是治疗指数 (LD₅₀/ED₅₀)。从这些细胞培养测定法和动物研究中获得的数据可用于制定用于人的剂量范围。这类化合物的剂量优选地在循环浓度的范围内,该循环浓度包括几乎没有或没有毒性的ED₅₀。剂量可以根据所采用的剂型和施用途径在该范围内变化。

[0185] 在另一个实施方案中,根据Physicians' Desk Reference 2003 (Thomson Healthcare; 57th edition (2002年11月1日)),与本发明的抗TIMP2抗体或其抗原结合片段联合施用给受试者的其他治疗剂。

[0186] 施用方式可以变化。施用途径包括口服、直肠、透粘膜、肠、肠胃外;肌内、皮下、真皮内、髓内、鞘内、直接心室内、静脉内、腹膜内、鼻内、眼内、吸入、吹入、局部、皮肤、透皮、瘤内或动脉内。

[0187] 在特定的实施方案中,本发明的抗TIMP2抗体或其抗原结合片段可以通过侵入性途径例如通过注射来施用。在本发明的其他实施方案中,抗TIMP2抗体或其抗原结合片段或其药物组合物通过静脉内、皮下、肌内、动脉内、肿瘤内或通过吸入、气雾剂递送进行施用。通过非侵入性途径(例如口服;例如,以丸剂、胶囊或片剂的形式)的施用也在本发明的范围内。

[0188] 本发明提供了包含本发明的任何抗体或抗原结合片段或者其药物组合物的容器(例如,塑料瓶或玻璃瓶,例如具有盖或色谱柱、空心针或注射器筒)。本发明还提供了注射装置,其包含本发明的任何抗体或抗原结合片段或者其药物组合物。注射装置是通过肠胃外途径例如肌肉内、皮下或静脉内将物质引入患者体内的装置。例如,注射装置可以是注射器(例如,预先填充有药物组合物,例如自动注射器),该注射器例如包括用于容纳待注射流体(例如抗体或片段或者其药物组合物)的圆筒或针筒,用于将皮肤和/或血管穿刺以注射流体的针;和用于将流体推出圆筒并通过针孔的柱塞。在本发明的一个实施方案中,包含本发明的抗体或其抗原结合片段或者其药物组合物的注射装置是静脉内(IV)注射装置。这样的装置在插管或套管针/针中包括抗体或片段或者其药物组合物,该插管或套管针/针可以附接到管,该管可以附接到用于容纳流体(例如盐水;或包含NaCl、乳酸钠、KC1、CaCl₂,可选地包括葡萄糖的乳酸林格液)的包或储库,所述流体通过套管或套管针/针头引入患者体内。在本发明的一个实施方案中,一旦将套管针和套管插入受试者的静脉中并且从所插入的套管中取出套管针,就可以将抗体或其片段或者其药物组合物引入装置中。IV装置可以例如被插入到外周静脉中(例如,在手或手臂中);上腔静脉或下腔静脉,或心脏右心房内(例如中枢IV);或者进入锁骨下静脉、颈内静脉或股静脉,并且例如,向心脏前进直至到达上腔静脉或右心房(例如,中央静脉线)。在本发明的一个实施方案中,注射装置是自动注射器;射流注射器或外部输注泵。射流注射器使用液体的高压窄射流穿透表皮,以将抗体或片段或者其药物组合物引入患者体内。外部输注泵是将抗体或片段或者其药物组合物以受控量递送到患者体内的医疗装备。外部输注泵可以电动或机械方式供能。不同的泵以不同的

方式运行,例如,注射泵将流体保持在注射器的储库中,并且可移动的活塞控制流体递送,弹性泵将流体保持在可拉伸的球囊储库中,并且来自球囊弹性壁的压力驱动流体递送。在蠕动泵中,一组滚子在一段柔性管上向下挤压,将流体向前推动。在多通道泵中,流体可以多种速率从多个储库中递送出来。

[0189] 本文公开的药物组合物还可与无针皮下注射装置一起施用;例如美国专利号6,620,135;6,096,002;5,399,163;5,383,851;5,312,335;5,064,413;4,941,880;4,790,824或4,596,556中公开的装置。这种包含药物组合物的无针装置也是本发明的一部分。本文公开的药物组合物也可以通过输注进行施用。用于施用药物组合物的众所周知的植入物和模块的实例包括在如下中公开的那些:美国专利号4,487,603,其公开了用于以受控的速率分配药物的可植入的微输注泵;美国专利号4,447,233,其公开了用于以精确的输注速率递送药物的药物输注泵;美国专利号4,447,224,其公开了用于连续药物递送的可变流量可植入输注器械;美国专利号4,439,196,其公开了具有多腔室的渗透药物递送系统。许多其他此类植入物、递送系统和模块是本领域技术人员众所周知的,并且包含本发明的药物组合物的那些植入物、递送系统和模块也在本发明的范围内。

[0190] 备选地,可以以局部而非全身的方式,例如通过将抗体或片段直接注射到肿瘤例如TIMP²⁺肿瘤中,来施用本发明的抗TIMP2抗体或抗原结合片段。此外,可以在靶向药物递送系统中施用抗体或片段,例如在用靶向例如肿瘤(例如TIMP²⁺肿瘤,例如以免疫病理表征)的组织特异性抗体包被的脂质体中。脂质体将靶向患病组织并被患病组织选择性吸收。这样的方法和脂质体是本发明的一部分。

[0191] 施用方案取决于几个因素,包括治疗性抗体或抗原结合片段的血清或组织周转率、症状水平、治疗性抗体的免疫原性以及生物学基质中靶细胞的可及性。优选地,施用方案递送足够的治疗性抗体或片段以实现靶疾病状态的改善,同时最小化不希望的副作用。因此,所递送的生物制剂的量部分取决于特定的治疗性抗体和所治疗病况的严重性。可获得选择合适剂量的治疗性抗体或片段的指南(参见,例如,Wawrzynaczak (1996) Antibody Therapy, Bios Scientific Pub.Ltd, Oxfordshire, UK; Kresina (ed.) (1991) Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis, Marcel Dekker, New York, NY; Bach (ed.) (1993) Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases, Marcel Dekker, New York, NY; Baert, et al. (2003) New Engl.J.Med. 348:601-608; Milgrom et al. (1999) New Engl.J.Med. 341:1966-1973; Slamon et al. (2001) New Engl.J.Med. 344: 783-792; Beniaminovitz et al. (2000) New Engl.J.Med. 342:613-619; Ghosh et al. (2003) New Engl.J.Med. 348:24-32; Lipsky et al. (2000) New Engl.J.Med. 343:1594-1602)。

[0192] 由临床医生例如使用本领域已知或怀疑影响治疗的参数或因素来确定合适的剂量。通常,剂量以比最佳剂量稍小的量开始,并且然后以小增量增加,直到相对于任何负面影响达到期望或最佳效果为止。重要的诊断量度包括那些症状,例如炎症或产生的炎性细胞因子的水平。通常,期望将要使用的生物制品衍生自用于治疗的靶向动物来自相同的物种,从而使对反应剂的任何免疫应答减至最小。在人类受试者的情况下,例如,人源化和完全人类抗体可能是理想的。

[0193] 本文公开的抗体或其抗原结合片段可以通过连续输注或通过例如每天、每周1-7

次、每周、每两周、每月、每两月、每季度、每半年、每年等施用剂量来提供。剂量可以例如静脉内、皮下、局部、口服、经鼻、经直肠、肌内、脑内、脊髓内或通过吸入提供。每周总剂量通常为至少 $0.05\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重,更通常为至少 $0.2\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $0.5\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $10\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $100\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $0.25\text{mg}/\text{kg}$ 、 $1.0\text{mg}/\text{kg}$ 、 $2.0\text{mg}/\text{kg}$ 、 $5.0\text{mg}/\text{kg}$ 、 $10\text{mg}/\text{kg}$ 、 $25\text{mg}/\text{kg}$ 、 $50\text{mg}/\text{kg}$ 或更多(参见,例如Yang, et al. (2003) New Engl. J. Med. 349: 427-434; Herold, et al. (2002) New Engl. J. Med. 346: 1692-1698; Liu, et al. (1999) J. Neurol. Neurosurg. Psych. 67: 451-456; Portielji, et al. (2000) Cancer Immunol. Immunother. 52: 151-144)。还可以提供剂量以达到受试者血清中抗TIMP2抗体的预定靶浓度,例如 0.1 、 0.3 、 1 、 3 、 10 、 30 、 100 、 $300\mu\text{g}/\text{ml}$ 或更高。在其他实施方案中,本发明的抗TIMP2抗体以例如皮下或静脉内,在每周、每两周、“每四周”、每月、每两月或每季度的基础上,以 10 、 20 、 50 、 80 、 100 、 200 、 500 、 1000 或 $2500\text{mg}/\text{受试者}$ 进行施用。

[0194] 如本文所用,术语“有效量”是指当单独或与其他治疗剂组合施用给细胞、组织或受试者时,有效引起疾病的一种或多种症状(例如癌症或癌症的进展)的可测量的改善的本发明的抗TIMP2或其抗原结合片段的量。有效剂量进一步指足以至少部分改善症状(例如,肿瘤缩小或消除、缺乏肿瘤生长、增加的生存时间)的抗体或片段的量。当应用于单独施用的单个活性成分时,有效剂量是指单独的该成分。当应用于组合时,有效剂量是指导致治疗效果的活性成分的组合量,无论是组合、连续或同时施用。有效量的治疗剂将导致诊断量度或参数改善至少 10% ;通常至少 20% ;优选地至少约 30% ;更优选地至少 40% ,最优选地至少 50% 。在使用主观量度评估疾病严重程度的情况下,有效量还可以改善主观量度。

[0195] 试剂盒

[0196] 还提供了包括一种或多种组分的试剂盒,所述组分包括但不限于抗TIMP2抗体或抗原结合片段,如本文所讨论的,与一种或多种另外的组分联合,包括但不限于如本文所讨论的药学上可接受的载体和/或治疗剂。抗体或片段和/或治疗剂可以在药物组合物中配制为纯组合物或与药学上可接受的载体组合。

[0197] 在一个实施方案中,试剂盒包括在一个容器中(例如在无菌玻璃或塑料瓶中)的本发明的抗TIMP2抗体或其抗原结合片段或者其药物组合物和/或在另一个容器中(例如在无菌玻璃或塑料瓶中)的治疗剂。

[0198] 在另一个实施方案中,试剂盒包括本发明的组合,包括本发明的抗TIMP2抗体或其抗原结合片段以及药学上可接受的载体,任选地与配制在一起的一种或多种治疗剂组合,任选地,在药物组合物中,在单个普通容器中。

[0199] 如果试剂盒包括用于肠胃外施用给受试者的药物组合物,则试剂盒可包括用于执行这种施用的装置。例如,试剂盒可包括一个或多个皮下注射针头或如上所述的其他注射装置。

[0200] 试剂盒可以包括包装插页,该包装插页包括关于试剂盒中的药物组合物和剂型的信息。通常,这样的信息帮助患者和医生有效且安全地使用包括在内的药物组合物和剂型。例如,以下关于本发明组合的信息可以在插页中提供:药代动力学、药效学、临床研究、功效参数、适应症和用法、禁忌症、警告、注意事项、不良反应、过量、适当的剂量和施用、如何提供、适当存储条件、参考、制造商/分销商信息和专利信息。

[0201] 为方便起见,本发明的抗TIMP2抗体或其抗原结合片段可以在试剂盒中提供,即,

预定量的反应剂与执行诊断或检测测定法的说明书的包装组合。如果抗体或片段用酶进行标记，则试剂盒将包括酶所需的底物和辅因子（例如，提供可检测的发色团或荧光团的底物前体）。另外，可以包括其他添加剂，例如稳定剂、缓冲液（例如封闭缓冲液或裂解缓冲液）等。各种反应剂的相对量可以广泛地变化以提供反应剂溶液中的浓度，这实质上优化了测定法的灵敏度。特别地，反应剂可以以干燥粉末的形式提供，通常是冻干的，包括赋形剂，其在溶解时将提供具有适当浓度的反应剂溶液。

[0202] 还提供了诊断或检测反应剂和试剂盒，其包含一种或多种这样的反应剂，用于多种检测测定法，包括例如ELISA（三明治型或竞争性形式）的免疫测定法。试剂盒的组件可以预先附接到固体支持物上，或也可以在使用试剂盒时应用于固体支持物的表面。在本发明的一些实施方案中，使用之前，信号生成装置（means）可以与本发明的抗体或片段预先联合，或者可能需要与一种或多种组分例如缓冲液、抗体-酶-缀合物、酶底物等组合。试剂盒还可包括其他反应剂，例如用于减少与固相表面的非特异性结合的封闭反应剂、洗涤反应剂、酶底物等。固相表面可以是管、珠、微量滴定板、微球或适合于固定化蛋白质、肽或多肽的其他材料的形式。在特定方面，催化化学发光或生色产物的形成或者化学发光或生色底物的还原的酶是信号生成装置（means）的组分。这样的酶是本领域众所周知的。试剂盒可包含本文所述的任何捕获剂和检测反应剂。任选地，试剂盒还可包含用于实施本发明方法的说明书。

[0203] 还提供了试剂盒，其包括包装在诸如小瓶或瓶的容器中的抗TIMP2抗体（例如，人源化抗体）或其抗原结合片段，并且还包括附接于或包装于容器的标签，该标签描述了容器的内容物并提供了有关使用容器的内容物来治疗本文所述的一种或多种疾病状态的指示和/或说明。

[0204] 一方面，试剂盒用于治疗癌症并且包含抗TIMP2抗体（例如，人源化抗体）或其抗原结合片段以及另外的治疗剂或疫苗。试剂盒可以任选地进一步包括用于肠胃外例如静脉内施用的注射器。在另一方面，试剂盒包括抗TIMP2抗体（例如，人源化抗体）或其抗原结合片段以及附接到容器或包装于容器的标签，其描述抗体或片段与疫苗或其他治疗剂的用途。在另一方面，试剂盒包括疫苗或另外的治疗剂和附接到容器或包装在容器上的标签，其描述疫苗或另外的治疗剂与抗TIMP2抗体或片段的用途。在某些实施方案中，抗TIMP2抗体和疫苗或其他治疗剂在分别的小瓶中或在同一药物组合物中组合在一起。

[0205] 如上文在组合疗法部分中所讨论的，两种治疗剂的共同施用不需要在同一时间或通过相同途径施用试剂，只要在试剂发挥其治疗作用期间的时间段内存在重叠即可。涵盖同时或顺序施用，如在不同天或周进行施用。

[0206] 还可以制备本文公开的治疗和检测试剂盒，其包括本文公开的抗体、肽、抗原结合片段或多核苷酸中的至少一种，以及使用组合物作为检测反应剂或治疗剂的说明。用于这种试剂盒的容器通常可以包括至少一个小瓶、试管、烧瓶、瓶子、注射器或其他合适的容器，可以将一种或多种检测和/或治疗组合物放入其中，并且优选地适当地等分。在还提供第二种治疗剂的情况下，试剂盒还可包括第二种不同的容器，该第二种检测和/或治疗性组合物可放入其中。备选地，可以在单一药物组合物中制备多种化合物，并且可以将其包装在单个容器工具中，例如小瓶、烧瓶、注射器、瓶子或其他合适的单个容器中。本文所公开的试剂盒通常还将包括用于紧密封闭地容纳小瓶以进行商业销售的装置，例如将一个或多个所需小

瓶保留在其中的注射或吹塑塑料容器。如果试剂盒中包括放射性标签、生色、荧光或其他类型的可检测标签或检测装置，则可以将标记剂作为检测或治疗组合物本身放在同一容器中，或备选地放置在第二个单独的容器装置中，可以将第二种组合物放入其中并适当等分。备选地，检测反应剂和标签可以在单个容器装置中制备，并且在大多数情况下，试剂盒通常还将包括用于密闭容纳小瓶的装备，以用于商业销售和/或方便的包装和运输。

[0207] 还提供了用于实施本文描述的检测或监视方法的装置或器械。这种器械可包括可将样品输入其中的腔室或管，可选地包括阀或泵以引导样品流过装置的流体处理系统，可选地从血液中分离血浆或血清的过滤器，用于添加捕获剂或检测反应剂的混合腔室，以及可选地用于检测与捕获剂免疫复合物结合的可检测标签的量的检测装置。样品流可以是被动的（例如，通过毛细管力、流体静力或应用样品后无需进一步操作设备的其他力）或是主动的（例如，通过应用由机械泵、电渗泵、离心力或增加的气压产生的力），或通过主动力和被动力的组合。

[0208] 在进一步的实施方案中，还提供了处理器、计算机可读存储器以及存储在计算机可读存储器上并且适于在处理器上执行以进行本文描述的任何方法的例程。合适的计算系统、环境和/或配置的示例包括个人计算机、服务器计算机、手持式或膝上型计算机设备、多处理器系统、基于微处理器的系统、机顶盒、可编程消费电子产品、网络PC、小型计算机、大型计算机、分布式计算环境，包括以上任何系统或设备，或本领域已知的任何其他系统。

[0209] 一般方法

[0210] 分子生物学中的标准方法描述于Sambrook,Fritsch and Maniatis (1982&1989 2nd Edition,2001 3rd Edition)Molecular Cloning,A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NY;Sambrook and Russell (2001) Molecular Cloning,3rd ed.,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NY;Wu (1993) Recombinant DNA,Vol.217,Academic Press, San Diego,CA)。标准方法也出现在Ausbel,et al. (2001) Current Protocols in Molecular Biology,Vols.1-4, John Wiley and Sons, Inc. New York, NY中，描述了细菌细胞中的克隆和DNA诱变(Vol.1)，哺乳动物细胞和酵母中的克隆(Vol.2)，糖缀合物和蛋白质表达(Vol.3)和生物信息学(Vol.4)。

[0211] 描述了用于蛋白质纯化的方法，包括免疫沉淀、色谱、电泳、离心和结晶(Coligan, et al. (2000) Current Protocols in Protein Science, Vol.1, John Wiley and Sons, Inc., New York)。描述了化学分析、化学修饰、翻译后修饰、融合蛋白的产生、蛋白的糖基化(参见例如Coligan,et al. (2000) Current Protocols in Protein Science, Vol.2, John Wiley and Sons, Inc., New York; Ausubel,et al. (2001) Current Protocols in Molecular Biology, Vol.3, John Wiley and Sons, Inc., NY, NY, pp.16.0.5-16.22.17; Sigma-Aldrich,Co. (2001) Products for Life Science Research, St.Louis, MO; pp.45-89; Amersham Pharmacia Biotech(2001) BioDirectory, Piscataway, N.J., pp.384-391)。描述了多克隆和单克隆抗体的产生、纯化和片段化(Coligan,et al. (2001) Current Protocols in Immunology, Vol.1, John Wiley and Sons, Inc., New York; Harlow and Lane (1999) Using Antibodies, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Harlow and Lane, 同上)。表征配体/受体相互作用的标准技术是可用的(参见，

例如,Coligan,et al.(2001) Current Protocols in Immunology,Vol.4,John Wiley, Inc.,New York)。

[0212] 可以制备单克隆抗体、多克隆抗体和人源化抗体(参见,例如,Sheperd and Dean (eds.) (2000) Monoclonal Antibodies,Oxford Univ.Press,New York,NY;Kontermann and Dubel (eds.) (2001) Antibody Engineering,Springer-Verlag,New York;Harlow and Lane (1988) Antibodies A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor,NY,pp.139-243;Carpenter,et al.(2000) J.Immunol.165:6205;He, et al.(1998) J.Immunol.160:1029;Tang et al.(1999) J.Biol.Chem.274:27371-27378; Baca et al.(1997) J.Biol.Chem.272:10678-10684;Chothia et al.(1989) Nature 342: 877-883;Foote and Winter(1992) J.Mol.Biol.224:487-499;U.S.Pat.No.6,329,511)。

[0213] 人源化的替代方法是使用在噬菌体上展示的人抗体文库或转基因小鼠中的人抗体文库(Vaughan et al. (1996) Nature Biotechnol.14:309-314;Barbas (1995) Nature Medicine 1:837-839;Mendez et al. (1997) Nature Genetics 15:146-156;Hoogenboom and Chames (2000) Immunol.Today 21:371-377;Barbas et al. (2001) Phage Display:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,New York;Kay et al. (1996) Phage Display of Peptides and Proteins:A Laboratory Manual,Academic Press,San Diego,CA;de Bruin et al.(1999) Nature Biotechnol.17: 397-399)。

[0214] 描述了单链抗体和双抗体(参见,例如,Malecki et al.(2002) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 99:213-218;Conrath et al.(2001) J.Biol.Chem.276:7346-7350;Desmyter et al.(2001) J.Biol.Chem.276:26285-26290;Hudson and Kortt(1999) J.Immunol.Methods 231:177-189;和美国专利号4,946,778)。提供了双功能抗体(参见,例如,Mack,et al.(1995) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 92:7021-7025;Carter(2001) J.Immunol.Methods 248:7-15;Volkel,et al.(2001) Protein Engineering 14:815-823; Segal,et al.(2001) J.Immunol.Methods 248:1-6;Brennan,et al.(1985) Science 229: 81-83;Raso,et al.(1997) J.Biol.Chem.272:27623;Morrison(1985) Science 229:1202-1207;Traunecker,et al.(1991) EMBO J.10:3655-3659;和美国专利号5,932,448,5,532, 210,和6,129,914)。

[0215] 还提供了多特异性抗体(参见,例如,Azzoni et al.(1998) J.Immunol.161:3493; Kita et al.(1999) J.Immunol.162:6901;Merchant et al.(2000) J.Biol.Chem.74:9115; Pandey et al.(2000) J.Biol.Chem.275:38633;Zheng et al.(2001) J.Biol.Chem.276: 12999;Propst et al.(2000) J.Immunol.165:2214;Long(1999) Ann.Rev.Immunol.17: 875);Labrijin et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA110:5145-50,2013;de Jong et al., PLOS Biol 14(1):e1002344,2016(doi:10.1371/journal.pbio.1002344)。抗原的纯化对于抗体的生成不是必需的。可以用带有目的抗原的细胞免疫动物。然后可以从被免疫的动物分离脾细胞,并且可以将脾细胞与骨髓瘤细胞系融合以产生杂交瘤(参见,例如,Meyaard et al.(1997) Immunity 7:283-290;Wright et al.(2000) Immunity 13:233-242;Preston et al.,同上;Kaithamana et al.(1999) J.Immunol.163:5157-5164)。

[0216] 抗体可以缀合至例如小药物分子、酶、脂质体、聚乙二醇(PEG)。抗体可用于治疗、

诊断、试剂盒或其他目的，并且包括偶联至例如染料、放射性同位素、酶或金属(例如胶体金)的抗体(参见，例如Le Doussal et al. (1991) J. Immunol. 146:169-175; Gibellini et al. (1998) J. Immunol. 160:3891-3898; Hsing and Bishop (1999) J. Immunol. 162:2804-2811; Everts et al. (2002) J. Immunol. 168:883-889)。

[0217] 流式细胞术的方法包括荧光激活细胞分选(FACS)是可用的(参见，例如，Owens, et al. (1994) *Flow Cytometry Principles for Clinical Laboratory Practice*, John Wiley and Sons, Hoboken, NJ; Givan (2001) *Flow Cytometry*, 2nd ed.; Wiley-Liss, Hoboken, NJ; Shapiro (2003) *Practical Flow Cytometry*, John Wiley and Sons, Hoboken, NJ)。适用于修饰核酸的荧光反应剂，包括核酸引物和探针、多肽和抗体，例如用作诊断反应剂是可用的(Molecular Probes (2003) Catalogue, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR; Sigma-Aldrich (2003) Catalogue, St. Louis, MO)。

[0218] 描述了免疫系统的组织学的标准方法(参见，例如，Muller-Harmelink (ed.) (1986) *Human Thymus: Histopathology and Pathology*, Springer Verlag, New York, NY; Hiatt, et al. (2000) *Color Atlas of Histology*, Lippincott, Williams, and Wilkins, Phila, PA; Louis, et al. (2002) *Basic Histology: Text and Atlas*, McGraw-Hill, New York, NY)。

[0219] 用于确定例如抗原性片段、前导序列、蛋白质折叠、功能结构域、糖基化位点和序列比对的软件包和数据库是可用的(参见例如GenBank, Vector NTI® Suite (Informax, Inc, Bethesda, MD); GCG Wisconsin Package (Accelrys, Inc., San Diego, CA); De Cypher® (TimeLogic Corp., Crystal Bay, Nevada); Menne, et al. (2000) Bioinformatics 16:741-742; Menne, et al. (2000) Bioinformatics Applications Note 16:741-742; Wren, et al. (2002) Comput. Methods Programs Biomed. 68:177-181; von Heijne (1983) Eur. J. Biochem. 133:17-21; von Heijne (1986) Nucleic Acids Res. 14: 4683-4690)。

实施例

[0220] 实施例1:兔中单克隆抗体的形成

[0221] 通过皮下注射(SQ)用抗原/佐剂乳剂免疫雌性新西兰兔。使用完全弗氏佐剂进行初次免疫并使用不完全弗氏佐剂进行所有的后续加强。每三周给兔子SQ注射250μg TIMP2抗原/每只兔子(臀部和肩骨两个部位交替)。第二次加强免疫后7天，从耳缘静脉抽取了测试出血。通过间接ELISA测定法测试该测试出血(免疫血清)以确定兔子的免疫应答是否足以用于单克隆抗体的形成。对反应最好的兔子进行最后的SQ加强，四天后通过放血进行安乐死。通过心脏穿刺收集全血。通过对靶抗原的间接ELISA鉴定产生目的抗体的B细胞，并分离免疫球蛋白基因。将重链和轻链克隆到单独的哺乳动物表达载体中，转染到HEK细胞中(瞬时转染)，并收集含有兔单克隆抗体的组织培养上清液。

[0222] 分离了命名为40H2-40K3的抗体，并且如下确定了核酸和蛋白质序列:重链

[0223] SEQ ID NO:9

[0224] atggagactggctgcgtggcttcctggcgctgtgctaaagggtccagtgtcagtcgttggaggagtccggggagacctggtaagcctgagggatccctgacactcacctgcacagcctctggattcaccatcagt

tctaactactacatgtgctgggccaggctccagggactggagtggcgcatgcatttgggtggta
 gtggtaacttacacttactacgcgacacctggcgaaaggccattcaccatctccaaaacctcgaccacggtgac
 tctgcaaatgcccagtctgacagccgcccacacggccacctattctgtcgagacaggcccctgccgatacttat
 ctttatggtggttatggcccttaacttgtggccaaaggaccctgtcaccgtctcgagcggacagccgaaag
 ccccgccgtgttccactggccctgtgtggcgatcgcctcgtccaccgtgaccctggctgtctgtgaa
 gggtaacctcccgagccggtactgtaacatggaattcaggacactcacaacgggtcaggacttccatca
 gtcagacagtcatccggctgtattacttagctcgtagtgcgtacttcctccagccagccgtaacatgta
 acgtacgcacccccccaccaataccaggtaagaccgtggccatcgccctcaacatgctcgaaacctacgtgccc
 tccgcctgaacttctcggggtcccagcgtcttatctccctctaagccaaagatacgctgatgatctcgccg
 accccggagggtgacttgtgtcgatgtccaaagacgatcccgaagtacagttcacctggtacattaaca
 acgagcaagtccgaacggccaggccaccgtgcgcgagcagaattcaattcgacgatccgggtggtatcaacgtt
 gccgatcactcatcaggactggttgcAagggaaaggaattcaaatgcaaggccacaacaaggccctccggcacca
 atcgagaaaacgatcagcaaggcgaggggcagccctggaacccaaggctatacatgggaccaccaggaaag
 agtgtcatccggccgtatcgcttacatgcatgatgatcggttctatcctcagacattcagtagatgggaa
 gaagaatggaaaagccgaagataactacaaaacaaccccccgcagtacttgactccgacggatcgacttctgtac
 aacaagctctcggtgcccacgtcagaatggcaacgagggatgtttacatgctcggtatgcatgaggcactcc
 acaatcattacacgcagaaaagcatctccgctcgccggaaagtgatgat

[0225] SEQ ID NO:10:

[0226] metglrwlllvavlkvgvqcqslleesggdlvkpegslltctasgftissnyymcwvrqapgkglewva
 cilggsgtyyyawakgrftisktsstvtlqmps1taadtatyfcarqapadtylyggypfnlwqgqltv
 sgqpkapsvflapccgdpsstvtlgclvkgylpepvtnwsqtlngvrtfpsvrqssglylsrssvsvtss
 qpvtcnvahpatntkvdktvapstcskptcppellggpsvfifppkpkdtlmisrtpevtcvvdvsqddpevqf
 twyinneqvrarplreqqfnstirvstlpithqdwlQgkefkckvhnkalpapietiskargqplepkvym
 gppreelssrsvs1tcmingfypsdisvewekngkaednykttavldsdgsyflynlsvptsewqrgdvftcsv
 mhealhnhytqksisrspgk*

[0227] 标记为粗体和下划线的核苷酸和相应的恒定域氨基酸可以被替换,例如,G>A,导致氨基酸取代,例如,R>Q。在该位置的优选残基:R、Q、N。

FR1: QSLEESGGDLVKPEGSLTLTCTAS (SEQ ID NO: 11)

CDR1: GFTISSNYY (SEQ ID NO: 4)

FR2: MCWVRQAPGKGLEWVAC (SEQ ID NO: 12)

CDR2: ILGGSGTYT (SEQ ID NO: 5)

[0228] FR3: YYATWAKGRFTISKTSSTTVTLQMPSLTAADTATYFC
 (SEQ ID NO: 13)

CDR3: ARQAPADTYLYGGYGPFL (SEQ ID NO: 6)

FR4: WGQGTLTVSS (SEQ ID NO: 14)

[0229] 轻链

[0230] SEQ ID NO:15:

[0231] atggacacgaggccccactcagctgctgggctcgtgcctggctccaggtgccagatgtgc
cgacatcgatgaccagactccatcctccgtggaggcagctgtggaggcacagtaccatcaagtgccaggcc
agttagagcattagcggttggtggcctggatcagcagaaaccaggcagcctccaagctcctgatctacaggg
catccactctggaatctgggtcccattcggttcaaaggcagttggatctggacagagttcacttcaccatcag
cgacctggagtgtgccatgctgccacttattattgtcaatgcagttatggatataatggtaatagtgagcatggt
aatccttcggcggagggaccgagggtggtcaaacgtacgcccgtggcacccactgtactcctgttccgcctt
cctcgatgagggtggcagggcacgtcacaatcgctcgatggcagaataagtacttccggatgtcacagtgc
gtgggaggtggacgggacaacacagaccaggtattgaaaacagcaaaacaccgcagaattcggctgactgtacg
tataacttgcctccactttacgttacatcaacacagtacaattcgccacaaggagtatacgcaaggtAACCC
aggtacgacaagcgtagtccagtcctcagcaggaagaactgctgataa

[0232] SEQ ID NO:16

[0233] mdtraptql1gl1llwlgarcadivmtqtpssveavggvtikcqasesisgwlawyqqkpgqppk
11iyraastlesgvpsrfkgsgsgteftltisidleadaatyyycqcsygingnsehgnpfggtevvvkrtpvaptv
11fpssdevatgtvtivcvankypdvtvwevdgttqttgiensktpqnsadctynlsstltstqynshkey
tckvtqgtsvvqsfsrknc

FR1:	DIVMTQTPSSVEAAVGGVTIKCQAS	(SEQ ID NO: 17)
CDR1:	ESISGW	(SEQ ID NO: 1)
FR2:	LAWYQQKPGQPPKLLIY	(SEQ ID NO: 18)
[0234] CDR2:	RAS	(SEQ ID NO: 2)
FR3:	TLESGVPSRFKGSGSGTEFTLTISDLECADAATYYC	(SEQ ID NO: 19)
CDR3:	QCSYGINGNSEHGNP	(SEQ ID NO: 3)
FR4:	FGGGTEVVVK	(SEQ ID NO: 20)

[0235] 分离了命名为6E2.1的抗体,并且如下确定了核酸和蛋白质序列:

[0236] 重链

[0237] SEQ ID NO 32:

[0238] atggctggagctgcattattctgtttctggtgagcaccgcgaccggcgtcatagccaggtgcagct
gcagcagagcggcccgcagctggcgccccggcgcgacgcgtgaaaattagctgcaaagcgagcggctatagctt
accagctattggatgcattgggtgaaacagcgccccggccagggctggatggattggcgtattgcgcgcgcgattatggcagcgc
atagcgaaaccgcctgaaccagaaattaaagataaagcgaccctgaccgtggataaaagcagcagcaccgcgt
tatgcagctgaacagccccgaccagcgaagatagcgcgtgtattattgcgcgcgcgattatggcagccgtat
gatgcgtatggattattggggccagggcaccagcgtgaccgtgagcgcgaaaaccacccgcgagcgtgtatc
cgctggcgccggcagcgccgcgaccaacagcatggtgaccctggctggctggtaaaggctatttccgga
accgtgaccgtgaccctgaa

[0239] SEQ ID NO:33:

[0240] MGWSCIILFLVSTATGVHSQVQLQQSGPQLVRPGASVKISCKASGYSFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIG
VIDPSDSETRLNQFKDKATLTVDKSSSTAYMQLNSPTSEDSAVYYCARRDYGSRYDAMDYWGQGTSVTVSSAKTT
PPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWN*

- | | | | |
|--------|--|--|-----------------|
| [0241] | FR1: | QSGPQLVRPGASVKISCKAS | (SEQ ID NO: 34) |
| | CDR1: | GYSFTSYW | (SEQ ID NO: 27) |
| | FR2: | MHWVKQRPGQGLEWIGV | (SEQ ID NO: 35) |
| | CDR2: | IDPSDSET | (SEQ ID NO: 28) |
| [0242] | FR3: | RLNQKFKDKATLTVDKSSSTAYMQLNSPTSEDSAVYYC | |
| | | | (SEQ ID NO: 36) |
| | CDR3: | ARRDYGSRYDAMDY | (SEQ ID NO: 29) |
| | FR4: | WGQGTSVTVSS | (SEQ ID NO: 37) |
| [0243] | 轻链 | | |
| [0244] | SEQ ID NO: 38: | | |
| [0245] | atgaaattccgagccagctgctgtttctgtgttgcattaccggcattattgcgatattca
gatgaccaggcagcagctatctgagcgtgaggctggcgccgcgtgaccattacctgcaaagcgagcgatcat
attacaactggctggcgttgtatcagcagaaaccggcaacgcgcgcgcgcgtgatttagcggcgcgaccaggc
tggaaaccggcgtgccgagccgcttagcggcagcggcagcggcaaagattataccctgagcattaccagcctgca
gaccgaagatgtggcaccattattgccagcagtattggagcacccgttaccttggcagcggcaccaaactg
gaaattaaacgcggatgcggccgaccgtgagcatttccgcccagcagcgaacagctgagcaac | | |
| [0246] | SEQ ID NO: 39 | | |
| [0247] | MKFPSQLLFLFRITGIICDIQMTQSSSYLSVSLGGRVTITCKASDHINNWLAZYQQKPGNAPRLLI
GATSLETGVPSRFSGSGKDYTLSITSLQTEDVATYYCQQYWSTPFTFGSGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLN | | |
| | FR1: | DIQMTQSSSYLSVSLGGRVTITCKAS | |
| | | | (SEQ ID NO: 40) |
| | CDR1: | DHINNW | (SEQ ID NO: 24) |
| | FR2: | LAWYQQKPGNAPRLLI | (SEQ ID NO: 41) |
| [0248] | CDR2: | SGA | (SEQ ID NO: 25) |
| | FR3: | TSLETGVPSRFSGSGSGKDYTLSITSLQTEDVATYYC | |
| | | | (SEQ ID NO: 42) |
| | CDR3: | QQYWSTPFT | (SEQ ID NO: 26) |
| [0249] | FR4: | FGSGTKLEIK | (SEQ ID NO: 43) |
| [0250] | 实施例2:用患者样品筛选抗体(基于微量滴定的ELISA方法) | | |
| [0251] | 材料: | | |

- [0252] 96孔高结合ELISA平板-Costar 3590(Corning)
- [0253] ELISA包被缓冲液:PBS
- [0254] ELISA洗涤缓冲液:含0.02%Tween-20的PBS
- [0255] ELISA封闭缓冲液(Thermo Pierce,目录号N502)
- [0256] ELISA反应剂稀释液:200mM Tris,1%BSA(BioFx),0.05%Tween-20,pH 8.1
- [0257] 中性抗生物素蛋白(Neuroavidin)-HRP缀合物(Thermo Pierce,目录号31001)
- [0258] 1-Step Ultra TMB底物(R&D系统,目录号34028)
- [0259] 终止溶液:2N硫酸
- [0260] 捕获抗体(6E2.1)
- [0261] 生物素缀合的检测抗体(40H2-40K3)
- [0262] 重组人TIMP2(Peprotech,目录号410-02)
- [0263] EXLx405洗板机(Biotek)
- [0264] Multiskan FC读板器(Fisher Scientific)
- [0265] 测试程序
- [0266] 将纯化的重组TIMP2分析物掺入反应剂稀释剂中并连续稀释以生成一组涵盖一定浓度范围的标准样品。将患者样品的冷冻单次使用等分试样在室温水浴中解冻10分钟,并然后用反应剂稀释剂稀释至所需水平。
- [0267] 将在包被缓冲液中制备的100 μ L的5 μ g/mL捕获抗体溶液加入到96孔高结合ELISA板上的每个孔中,并在室温(22°C至25°C)孵育过夜。抽吸每个孔,并使用自动清洗机用300 μ L清洗缓冲液清洗3次。然后将250 μ L的ELISA封闭缓冲液添加到每个孔中。在室温孵育2小时后,重复上述抽吸/洗涤步骤。
- [0268] 将100 μ L标准样品或患者样品添加至制备的板的每个孔中,并在室温在水平轨道振荡器上孵育。孵育2小时后,如上所述洗涤板。然后,将在反应剂稀释液中制备的100 μ L的0.1 μ g/mL检测抗体溶液添加到每个孔中。在室温孵育1小时后,再次洗涤板。在反应剂稀释液中制备0.1 μ g/mL的中性抗生物素蛋白-HRP缀合物溶液,并将100 μ L的该溶液添加到每个孔中。将板在室温孵育1小时并洗涤。将100 μ L的1步超TMB底物添加到每个孔中,在避光条件下室温孵育10分钟,然后加入50 μ L终止溶液。用设置为450nm的波长的微板读板器测量每个孔中的光密度。
- [0269] 实施例3:用患者样品筛选抗体(侧流条带测试方法)
- [0270] 材料:
- [0271] 硝酸纤维素膜
- [0272] 衬板
- [0273] 样品垫
- [0274] 芯吸(wicking)垫
- [0275] 膜封闭缓冲液:10mM磷酸钠、0.1%蔗糖、0.1%BSA、0.2%PVP-40,pH 8.0样品垫封闭缓冲液:5mM硼酸盐,0.1%Tween-20、0.25%PVP-40、0.5%BSA,pH 8.5
- [0276] 运行缓冲液J:500mM Tris、0.2%10G、0.35%Tween-20、0.25%PVP-40,pH 8.5
- [0277] 荧光缀合的抗体(40H2-40K3)
- [0278] 测试线抗体(6E2.1)

[0279] 山羊抗小鼠阳性对照抗体

[0280] 重组人TIMP-2

[0281] 条带组件

[0282] 使用AD3050抽吸分配系统,用测试线抗体对硝酸纤维素膜进行条带化,用膜封闭缓冲液封闭,并在37℃干燥30分钟。在干燥器中固化过夜后,将条带化和封闭的硝化纤维素膜层压到带有芯吸垫和用样品垫封闭缓冲液预处理过的样品垫的衬板上。将卡片切成5毫米宽的测试条,然后将其放入药筒(cartridge)中。

[0283] 样品制备

[0284] 将纯化的重组TIMP-2分析物掺入运行缓冲液J中,并连续稀释以生成涵盖一定浓度范围的一组标准样品。将患者样品的冷冻单次使用等分试样在室温水浴中解冻10分钟,然后用运行缓冲液J稀释至所需水平。

[0285] 测试程序

[0286] 将PBS中的10μL荧光缀合的抗体(0.025μg/μL)添加至100μL样品中。然后将100μL的该溶液装入药筒的输入端口。使用荧光读取器和相关软件在t=20分钟时读取结果。

[0287] 实施例4:使用Pepscan方法的表位作图肽的合成和pepscan筛选

[0288] 如Slootstra等人(Slootstra et al., 1996, Mol. Diversity 1, 87-96)和Timmerman等人(Timmerman et al., 2007, J. Mol. Recognit 20, 283-299)所述合成和筛选合成的线性肽。在基于PEPSCAN的酶联免疫测定法(ELISA)中测试抗体与每种肽的结合。将共价连接的肽与样品(例如,在含有5%马血清(体积/体积)和4%卵清蛋白(重量/体积)的PBS溶液中稀释的1μg/mL抗体)和1%Tween 80在4℃孵育过夜。洗涤后,将肽与山羊抗兔HRP(Jackson Immunoresearch)在25℃孵育1小时,然后在洗涤过氧化物酶底物2,2'-叠氮基-二-3-乙基苯并噻唑啉磺酸盐(ABTS)之后加入2μg/mL的3%H₂O₂。1小时后,测量显色。

[0289] 肽组1由来自TIMP-2序列的嵌套线性15聚体肽组成,其具有1个氨基酸残基的步差,而肽组2由相同的肽组组成,所述肽组具有在肽的位置11和12处的双丙氨酸突变体。举例来说,从天然TIMP2(SEQ ID NO:45)的第一个残基开始的肽组1中的三个肽为:

[0290] MGAARTLRLALGLL (SEQ ID NO:46)

[0291] GAAARTLRLALGLLL (SEQ ID NO:47)

[0292] AAARTLRLALGLLLL (SEQ ID NO:48)

[0293] 相应的突变序列如下:

[0294] MGAAARTLRLGAGLL (SEQ ID NO:49)

[0295] GAAARTLRLAAALLL (SEQ ID NO:50)

[0296] AAARTLRLALAALLL (SEQ ID NO:51)

[0297] 注意,当天然序列中存在丙氨酸时,其在相应的突变序列中被甘氨酸替代。在组1上显示出高结合而在组2上不显示出高结合的肽鉴定了结合的关键残基。

[0298] 使用该方法,将抗体6E2.1的优势表位鉴定为₁₃₂PWDTLSTTQKK₁₄₂(SEQ ID NO:44),其中带下划线的残基是最关键的残基。

[0299] 抗体40H2-40K3表现出三个结合区₁₄₅NHRYQMGCECKI₁₅₆(SEQ ID NO:21),₃₃HPQQAFCNA₄₁(SEQ ID NO:22)和₁₉₆RSDGSCAWYR₂₀₅(SEQ ID NO:23),表明可能是不连续的表位。核心结合区被鉴定为₁₄₅NHRYQMGCECKI₁₅₆(SEQ ID NO:21)。

[0300] 尽管已经足够详细地描述和例示了本发明以使本领域技术人员能够制造和使用本发明,但是在不脱离本发明的精神和范围的情况下,各种替代、修改和改进应当是显而易见的。本文提供的实例代表优选实施方案,是示例性的,并不意在限制本发明的范围。本领域技术人员将想到其中的修改和其他用途。这些修改包含在本发明的精神内,并由权利要求的范围限定。

[0301] 除非另有说明,否则本文中“或”的使用是指“和/或”。类似地,“包括”、“包括有”、“包含”、“包含有”、“含有”和“含”是可互换的而不是限制性的。

[0302] 将进一步理解的是,在各个实施方案的描述使用术语“包括”的情况下,本领域技术人员将理解,在一些特定情况下,可以可替代地使用语言“基本上由……组成”或“由…组成”来描述实施方案。

[0303] 除非另有定义,否则本文中使用的所有技术和科学术语具有与本公开所属领域的普通技术人员通常理解的相同含义。尽管与本文描述的那些方法或反应剂相似或等同的任何方法和反应剂都可以用于所公开的方法和组合物的实践中,但是现在描述示例性的方法和材料。

[0304] 为了描述和公开在出版物中描述的方法,本文中提及的所有出版物均通过引用全文并入本文,所述方法可与本文的描述结合使用。说明书中提到的所有专利和出版物都指示了在公开日之前的本发明所属领域的普通技术人员的水平。本文中的任何内容均不应解释为承认发明人无权凭借在先公开而使这类公开日期提前。

[0305] 对本领域技术人员而言显而易见的是,在不脱离本发明的范围和精神的情况下,可以对本文公开的发明进行各种替换和修改。

[0306] 本文说明性地描述的发明可以在不存在本文未具体公开的任何一个或多个要素、一个或多个限制的情况下适当地实践。因此,例如,在本文的每种情况下,术语“包括”、“基本上由…组成”和“由…组成”中的任何一个都可以用其他两个术语中的任一个代替。已经采用的术语和表达用作描述性术语,而不是限制性的,并且不意图在使用这样的术语和表达时排除所示出和描述的特征或其部分的任何等同形式,应当认识到,在所要求保护的本发明的范围内可以进行各种修改。因此,应当理解,尽管已经通过优选实施方案和可选特征具体公开了本发明,但是本领域技术人员可以对本文公开的概念进行修改和变型,并且认为这样的修改和变型在由所附权利要求书限定的本发明的范围内。

[0307] 在所附权利要求书中阐述了其他实施方案。