[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C12N 9/64 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)

[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680007279.X

[43] 公开日 2008 年 5 月 14 日

[11] 公开号 CN 101180391A

[22] 申请日 2006.1.10
[21] 申请号 200680007279.X
[30] 优先权
[32] 2005.1.11 [33] GB [31] 0500487.4
[86] 国际申请 PCT/GB2006/000072 2006.1.10
[87] 国际公布 WO2006/075142 英 2006.7.20
[85] 进入国家阶段日期 2007.9.6
[71] 申请人 埃克西斯 - 希尔德诊断有限公司
地址 英国敦提
[72] 发明人 戴维·约翰·普里查德
[74] 专利代理机构 上海市华诚律师事务所
代理人 傅强国 涂 勇
权利要求书 9 页 说明书 37 页 序列表 4 页
附图 13 页

[54] 发明名称

因子 XIIa 形式

[57] 摘要

一种 53Kd 的新形式的因子 XIIa 及相关产物，其包括核酸分子、单克隆和多克隆抗体、以及杂交瘤细胞株。 本发明还包括 53Kd 形式的因子 XIIa 的测试方法，以及所述测试方法在诊断方法和预后性方法中的应用，例如用于心肌梗死主体存活率的预测。

1. 一种 53Kd 形式的因子 XIIa。

2. 如权利要求 1 所述的 53Kd 形式的因子 XIIa ，其特征在于，其为 53Kd 形式的人类因子 XIIa。

3. 如权利要求 2 所述的 53Kd 形式的因子 XIIa，其特征在于，具有基本上为分别如图 1 和图 2 所示氨基酸序列的肽。

4. 一种分离的核酸分子，其编码如权利要求 1~3 中任一项所述的 53Kd 形式的因子 XIIa 的一条或两条肽链。

5. 如权利要求 4 所述的分离的核酸分子，其特征在于，其为分离的 DNA 分子。

6. 一种单克隆或多克隆抗体，其结合于如权利要求 1~3 中任一项所述的 53Kd 形式的因子 XIIa 的一个或多个表位，或者结合于所述抗体的与表位结合的片段或衍生物，其特征在于，所述抗体与因子 αXIIa 和因子 βXIIa 之一或两者的校正交叉反应性为 10%以下。

7. 一种如权利要求 6 所述的抗体、片段或衍生物，其特征在于，它们固定在固体载体上

8. 一种如权利要求 6 所述的抗体、片段或衍生物，其特征在于，它们具有可检测标记。

9. 一种杂交瘤细胞株，其生产如权利要求 6 所述单克隆抗体。

10. 一种生产如权利要求 6 所述单克隆抗体的方法，其特征在于，它包括：在生长培养基中培养能生产所述抗体的杂交瘤细胞株，并且从生长培养基中获得抗体。

11. 一种生产如权利要求 6 所述多克隆抗体的方法，其特征在于，它包括用 53Kd 形式的因子 XIIa 抗原给哺乳动物接种疫苗，并且从所述哺乳动物血清中纯化抗体。

12. 一种生产如权利要求 9 所述的杂交瘤细胞株的方法，其特征在于，它包括：将抗原给药于哺乳动物，从所述哺乳动物获得产抗体细胞，使得到的产抗体细胞与骨髓瘤融合或者以别的方式使细胞无限增殖化，并且筛选得到的杂交瘤以用于单克隆抗体的生产。

13. 一种在液体样品中进行抗原免疫测试的方法，该测试包括：抗原和与其结合的抗体之间相互作用，以及对照使用预定量抗原所获得的结果来测定存在于样品中的抗原含量，其特征在于，所述抗体是如权利要求 6~8 中任一项所述的抗体，而所述抗原是 53Kd 形式的因子 XIIa。

14. 一种在样品中检测和/或测定 53Kd 形式的因子 XIIa 的方法，其包括对样品进行定性或定量免疫测定，该测定包括抗原和抗体相互作用、以及检测和/或测定任何得到的抗体-抗原复合物，其特征在于，所述抗体是如权利要求 6~8 中任一项所述的抗体。

15. 一种用于检测或测定样品中 53Kd 形式的因子 XIIa 的方法，其特征在于，它包括进

行一个程序，所述程序是能优先于其它形式的因子 XIIa 来检测或测定所选择的 53Kd 形式的因子 XIIa。

16. 如权利要求 15 所述的方法，其特征在于，其包括使用一种能够以优先于其它形式的因子 XIIa 测定所述 53Kd 因子 XIIa 的测试方法，来检测或测定所述 53Kd 形式的因子 XIIa。

17. 如权利要求 15 或 16 所述的方法，其特征在于，其包括将所述 53Kd 形式的因子 XIIa 从因子 XIIa 中分离出来并检测或测定所述 53Kd 形式的因子 XIIa。

18. 如权利要求 16 或 17 所述的方法，其特征在于，所述检测或测定分离的 53Kd 形式的因子 XIIa 是使用如权利要求 16 所述的测试方法。

19. 如权利要求 17 所述的方法，其特征在于，它包括：使样品与经标记的抗体接触，该抗体能结合于所述 53Kd 形式的因子 XIIa 并且也能任意地结合于其它分子量形式的因子 XIIa；使所研究的 53Kd 形式的因子 XIIa 与其它形式的因子 XIIa 相分离；以及检测或测定所述 53Kd 形式的因子 XIIa。

20. 如权利要求 17~19 中任一项所述的方法，其特征在于，基于物理、化学或免疫学的特性，将一种或多种所研究的因子 XIIa 形式与其它形式的因子 XIIa 分离。

21. 如权利要求 20 所述的方法，其特征在于，使用色谱法、流式细胞技术或超速离心工艺，并且可选地进行酶活性测试或分离物质的免疫学特性测试，从而将所述 53Kd 形式的因子 XIIa 与其它形式的因子 XIIa 分离。

22. 如权利要求 20 所述的方法，其特征在于，使用能结合于所述 53Kd 形式的因子 XIIa 的抗体，通过免疫亲和层析，并且可选地进行酶活性测试或分离物质的免疫学特性测试，从而将所述 53Kd 形式的因子 XIIa 与其它形式的因子 XIIa 分离。

23. 如权利要求 21 或 22 所述的方法，其特征在于，在使所述 53Kd 形式的因子 XIIa 不解离的条件下进行分离步骤。

24. 如权利要求 15~23 中任一项所述的方法，其特征在于，所述其它形式的因子 XIIa 是非 53Kd 形式的因子 XIIa。

25. 如权利要求 13~24 中任一项所述的方法，其特征在于，所述样品是体液样品或身体组织。

26. 如权利要求 25 所述的方法，其特征在于，所述体液是血液、血浆或血清。

27. 如权利要求 25 所述的方法，其特征在于，所述体液是尿液、脑脊液、唾液或眼泪。

28. 如权利要求 13~27 中任一项所述的方法，其特征在于，所研究的 53Kd 形式的因子 XIIa 是细胞性 53Kd 因子 XIIa。

29. 如权利要求 17~27 中任一项所述的方法，其特征在于，所述 53Kd 形式的因子 XIIa 是细胞性 53Kd 因子 XIIa，其中通过从体液或组织液中分离出细胞、细胞残留物和/或细胞物质，而将所述细胞性 53Kd 因子 XIIa 与其它结合形式的因子 XIIa 分离。

30. 如权利要求 29 所述的方法，其特征在于，通过离心分离所述细胞、细胞残留物和/或细胞物质。

31. 如权利要求 28~30 中任一项所述的方法，其特征在于，在检测或测定所述 53Kd 因子 XIIa 之前，将所述细胞性 53Kd 因子 XIIa 与其它形式的 53Kd 因子 XIIa 分离。

32. 如权利要求 15~27 中任一项所述的方法，其特征在于，所研究的 53Kd 形式的因子 XIIa 是脂结合性 53Kd 因子 XIIa。

33. 如权利要求 32 所述的方法，其特征在于，所述 53Kd 形式的因子 XIIa 是脂结合性 53Kd 因子 XIIa，其中通过从体液或组织中分离脂质组分，而将脂结合性 53Kd 因子 XIIa 与非脂结合性因子 XIIa 分离。

34. 如权利要求 33 所述的方法，其特征在于，脂质组分包括脂蛋白和/或其残留物。

35. 如权利要求 34 所述的方法，其特征在于，使用脂蛋白沉淀剂沉淀出所述脂质组分。

36. 如权利要求 32~35 中任一项所述的方法，其特征在于，在所述脂结合性 53Kd 因子 XIIa 与其它形式的因子 XIIa 分离之前，使所述脂结合性 53Kd 因子 XIIa 与经标记的抗体相接触。

37. 如权利要求 36 所述的方法，其特征在于，所述其它形式的因子 XIIa 是非 53Kd 形式的因子 XII。

38. 如权利要求 15~27 中任一项所述的方法，其特征在于，所述 53Kd 形式的因子 XIIa 是任何一种或多种包含两种以上 53Kd 因子 XIIa 分子的复合体、53Kd 因子 XIIa 与低亲和性结合伴侣相结合的复合体、以及 53Kd 因子 XIIa 与高亲和性结合伴侣相结合的复合体。

39. 如权利要求 15~38 中任一项所述的方法，其特征在于，在使所述 53Kd 形式的因子 XIIa 不解离的条件下进行所述检测或测定。

40. 如权利要求 15~39 中任一项所述的方法，其特征在于，在使所述 53Kd 形式的因子 XIIa 不解离的条件下进行分离步骤。

41. 如权利要求 15~40 中任一项所述的方法，其特征在于，使用免疫测试来检测或测定所述 53Kd 形式的因子 XIIa。

42. 如权利要求 41 所述的方法，其特征在于，所述免疫测试是一种能相对于其它形式的因子 XIIa 优先检测或测定 53Kd 形式的因子 XIIa 的免疫测试。

43. 如权利要求 42 所述的方法，其特征在于，所述免疫测试包括使用能结合于所述 53Kd 形式的因子 XIIa 的抗体。

44. 如权利要求 43 所述的方法，其特征在于，所述抗体用可被直接或间接地检出的标签所标记。

45. 如权利要求 44 所述的方法，其特征在于，所述抗体进行放射性标记。

46. 如权利要求 41~45 中任一项所述的方法，其特征在于，直接检测或测定得到的抗原-抗体复合物。

47. 如权利要求 41~45 中任一项所述的方法，其特征在于，间接地检测或测定得到的抗原-抗体复合物。

48. 如权利要求 41~45 中任一项所述的方法，其特征在于，通过流式细胞技术、表面胞质基因共振技术、表面声波方法或者石英晶体微量天平方法来检测得到的抗体-抗原复合物。

49. 如权利要求 41~48 中任一项所述的方法，其特征在于，所述样品是组织样品，并且通过免疫组织学检测或测定所述 53Kd 形式的因子 XIIa。

50. 如权利要求 40~49 中任一项所述的方法，其特征在于，所述其它形式的因子 XIIa 是非 53Kd 形式的因子 XIIa。

51. 如权利要求 40~49 中任一项所述的方法，其特征在于，所述抗体是 mAb 2/215 或其类似物、mAb 201/9 或其类似物。

52. 如权利要求 40~50 中任一项所述的方法，其特征在于，所述抗体是如权利要求 6 所述的抗体。

53. 如权利要求 15~52 中任一项所述的方法，其特征在于，所述检测或测定程序是在无洗涤剂的情况下进行的。

54. 如权利要求 15~52 中任一项所述的方法，其特征在于，所述检测或测定程序是在有洗涤剂的情况下进行的。

55. 如权利要求 15~54 中任一项所述的方法，其特征在于，所述程序能够优先检测或测定结合于低亲和性结合伴侣的 53Kd 因子 XIIa。

56. 如权利要求 15~54 中任一项所述的方法，其特征在于，所述程序能够优先检测或测定结合于高亲和性结合伴侣的 53Kd 因子 XIIa。

57. 如权利要求 15~54 中任一项所述的方法，其特征在于，所述程序能够优先检测或测定与两种以上因子 XIIa 分子相结合的分子复合体，其中至少一种因子 XIIa 分子是 53Kd 形式。

58. 如权利要求 15~54 中任一项所述的方法，其特征在于，所述程序能够优先检测或测

定结合于细胞或者细胞衍生物的 53Kd 因子 XIIa。

59. 如权利要求 15~54 中任一项所述的方法，其特征在于，所述程序能够优先检测或测定结合于脂质、脂蛋白或其残留物的 53Kd 因子 XIIa。

60. 如权利要求 15~41 中任一项所述的方法，其特征在于，使用显色分析来检测或测定所述 53Kd 形式的因子 XIIa。

61. 如权利要求 15~60 中任一项所述的方法，其特征在于，从患有疾病或紊乱、接受疾病或紊乱、或已患上疾病或紊乱后、或者进行疾病或紊乱治疗后的主体上得到所述样品。

62. 如权利要求 61 所述的方法，其特征在于，所述疾病或紊乱涉及凝血系统。

63. 如权利要求 61 所述的方法，其特征在于，所述疾病或紊乱涉及血凝、纤维蛋白溶解、激肽原生成、补体激活或者血管生成、维持血管完整性和维持血压、维持血管内组成性抗凝因子特性、或者组织防御和修复。

64. 如权利要求 61 所述的方法，其特征在于，所述疾病或紊乱是或者涉及急性或慢性炎症、任何病原性休克包括脓毒性休克、糖尿病、变态反应、凝血-出血紊乱、脓毒病、自发性流产、或者癌症。

65. 如权利要求 61 所述的方法，其特征在于，所述疾病或紊乱是或者涉及血管内凝血或者血栓栓塞、心肌梗死、急性冠状动脉综合症、或咽峡炎。

66. 如权利要求 61 所述的方法，其特征在于，所述疾病或紊乱是或者涉及血栓形成或血管狭窄。

67. 如权利要求 61 所述的方法，其特征在于，所述疾病或紊乱是或者涉及疑似心肌梗死或急性冠状动脉综合症。

68. 如权利要求 61 所述的方法，其特征在于，所述疾病或紊乱是或者涉及脓毒病。

69. 如权利要求 61 所述的方法，其特征在于，治疗包括治疗剂给药，和/或包括外科手术步骤。

70. 如权利要求 69 所述的方法，其特征在于，治疗是冠状动脉血管成形术或血栓溶解。

71. 如权利要求 15~70 中任一项所述的方法，其特征在于，测试一系列从主体取得的样品。

72. 如权利要求 71 所述的方法，其特征在于，在所述疾病或紊乱期间得到样品。

73. 如权利要求 71 或 72 所述的方法，其特征在于，在疾病或紊乱的治疗期间、在治疗开始之前和/或治疗完成后得到样品。

74. 一种方法，用于对疾病或紊乱的感病性、进展或结果进行诊断、监控或预测，或者

对患有或怀疑患有疾病或紊乱的主体的治疗进行诊断、监控或预测，其包括：以优先于其它因子 XIIa 形式的方式来检测或测定主体样品中 53Kd 形式的因子 XIIa；以及将从该主体获得的测试结果与使用相同方法从如下至少一种或多种主体样本所得的测试结果进行比较：

(i) 患有疾病或紊乱的主体；

(ii) 患有疾病或紊乱的主体，对其疾病或紊乱的进展和/或结果进行了监测；

(iii) 患有疾病或紊乱并接受治疗的主体；

(iv) 患有疾病或紊乱并接受治疗的主体，针对该疾病或紊乱的进展和/或结果对该主体的治疗进行监测；

(v) 未患疾病或紊乱的主体；

(vi) 在疾病或紊乱发作前或者在疾病或紊乱的治疗开始前的同一主体；以及

(vii) 疾病或紊乱的早期或晚期、或者疾病或紊乱的治疗早期或晚期、或者在疾病或紊乱发作前的同一主体。

75. 如权利要求 74 所述的方法，其特征在于，使用如权利要求 15~60 中任一项所述的方法来检测或测定所述 53Kd 形式的因子 XIIa。

76. 如权利要求 74 或 75 所述的方法，其特征在于，所述疾病或紊乱是如权利要求 62~68 中任一项所述的疾病或紊乱。

77. 如权利要求 66 或 67 所述的方法，其特征在于，所述治疗是如权利要求 69 或 70 所述的治疗。

78. 如权利要求 74~77 中任一项所述的方法，其特征在于，所述样品是如权利要求 71~73 中任一项所述的样品。

79. 如权利要求 75 或 76 所述的方法，其特征在于，在疑似心肌梗死的主体入院时或入院后得到样品，并且其中低水平的特定形式的 53Kd 因子 XIIa 与二级肌钙蛋白阳性发生风险的升高有关。

80. 如权利要求 75 或 76 所述的方法，其特征在于，在疑似心肌梗死的主体入院时或入院后得到样品，并且其中高水平的特定形式的 53Kd 因子 XIIa 与二级肌钙蛋白阳性发生风险的升高有关。

81. 如权利要求 75 或 76 所述的方法，其特征在于，在疑似心肌梗死的主体入院时或入院后得到样品，并且其中低水平的特定形式的 53Kd 因子 XIIa 与死亡风险的升高有关。

82. 如权利要求 75 或 76 所述的方法，其特征在于，在疑似心肌梗死的主体入院时或入院后得到样品，并且其中高水平的特定形式的 53Kd 因子 XIIa 与死亡风险的升高有关。

83. 如权利要求 75 或 76 所述的方法，其特征在于，在急性冠状动脉综合症主体入院时或入院后得到样品，并且其中高水平的特定形式的 53Kd 因子 XIIa 与死亡风险的升高有关。

84. 如权利要求 75 或 76 所述的方法，其特征在于，在肌钙蛋白 T（TnT）水平大于 0.05 ng/ml 的主体入院时或入院后得到样品，并且其中高水平的特定形式的 53Kd 因子 XIIa 与死亡风险的升高有关。

85. 如权利要求 75 或 76 所述的方法，其特征在于，在疑似心肌梗死的主体入院时或入院后得到样品，并且其中高水平的特定形式的 53Kd 因子 XIIa 与二级心肌梗死风险的升高有关。

86. 如权利要求 75 或 76 所述的方法，其特征在于，高水平的特定形式的 53Kd 因子 XIIa 与脓毒病有关。

87. 一种方法，包括：对于患有疾病或紊乱、或者疾病或紊乱治疗中的主体的样品进行一系列 53Kd 因子 XIIa 的测试；以及选出一种能够提供与疾病或紊乱或其治疗有关的 53Kd 因子 XIIa 水平的信息的测试。

88. 一种方法，用于提供一种测试 53Kd 因子 XIIa 的方法，该测试方法适合于提供与诊断、监控或预测疾病或紊乱的感病性、进展或结果有关的信息，或者与诊断、监控或预测患有或怀疑患有疾病或紊乱的主体的治疗有关的信息，包括：对于从患有疾病或紊乱或者治疗中的主体所取得的样品进行一系列 53Kd 因子 XIIa 的测试；以及确定哪种测试可以提供与诊断、监测或预测疾病或紊乱的感病性、进展或结果有关的 53Kd 因子 XIIa 水平的信息，或者与诊断、监测或预测疾病或紊乱的治疗有关的 53Kd 因子 XIIa 水平的信息。

89. 如权利要求 88 所述的方法，其特征在于，包括，将从患有疾病或紊乱的或者治疗中的主体取得的样本中 53Kd 因子 XIIa 测试结果与使用相同方法测试如下至少一种或多种主体样本所得的结果进行比较：

(i) 患有疾病或紊乱的主体；

(ii) 患有疾病或紊乱的主体，对其疾病或紊乱的进展和/或结果进行了监测；

(iii) 患有疾病或紊乱并在治疗中的主体；

(iv) 患有疾病或紊乱并在治疗中的主体，针对该疾病或紊乱的进展和/或结果对该主体的治疗进行监测；

(v) 未患疾病或紊乱的主体；

(vi) 在疾病或紊乱发作前或者在疾病或紊乱的治疗开始前的同一主体；以及

(vii) 疾病或紊乱的早期或晚期、或者疾病或紊乱的治疗早期或晚期、或者在疾病或紊乱

发作前的同一主体。

90. 如权利要求 87~89 中任一项所述的方法，其特征在于，所述测试方法是如权利要求 15~67 中任一项所述的方法。

91. 如权利要求 87~90 中任一项所述的方法，其特征在于，所述疾病或紊乱是如权利要求 62~68 中任一项所述的疾病或紊乱。

92. 如权利要求 87~91 中任一项所述的方法，其特征在于，所述治疗是如权利要求 69 或 70 所述的治疗。

93. 如权利要求 87~92 中任一项所述的方法，其特征在于，所述样品是如权利要求 71~73 中任一项所述的样品。

94. 如权利要求 87~93 中任一项所述的方法，其特征在于，将得到的结果汇集在数据库中。

95. 一种数据库，其包括根据权利要求 87~94 中任一项所述的方法所得到的结果。

96. 一种方法，该方法包括以优先于其它分子量形式的因子 XIIa 的方式来检测或测定主体样品中 53Kd 因子 XIIa，其特征在于，所述样品是尿液样品。

97. 一种方法，该方法用于诊断或监测疾病或紊乱、或者监测疾病或紊乱的治疗，其包括：以优先于其它分子量形式的因子 XIIa 的方式，来检测或测定患有或怀疑患有疾病或紊乱的主体尿液中的 53Kd 因子 XIIa。

98. 如权利要求 97 所述的方法，其特征在于，所述疾病是或者涉及肾功能、肾病或肾损伤，或其治疗。

99. 如权利要求 96~98 中任一项所述的方法，其特征在于，将主体样本的测试结果与使用相同方法测试如下至少一种或多种主体样本所得结果进行比较：

(i) 患有疾病或紊乱的主体，例如，患有肾功能降低、肾病或肾损伤；

(ii) 患有疾病或紊乱的主体，例如患有肾功能降低、肾病或肾损伤，监测该主体的疾病或紊乱例如肾功能降低、肾病或肾损伤的进展和/或结果；

(iii) 患有疾病或紊乱例如肾功能降低、肾病或肾损伤的主体，并且在对其进行治疗；

(iv) 患有疾病或紊乱例如肾功能降低、肾病或肾损伤的主体，并且在进行治疗，针对该疾病或紊乱例如肾功能降低、肾病或肾损伤的进展和/或结果，对该主体的治疗进行监测；

(v) 未患有疾病或紊乱例如肾功能降低、肾病或肾损伤的主体；

(vi) 在疾病或紊乱例如肾功能降低、肾病或肾损伤发作前，或者在疾病或紊乱例如肾功能降低、肾病或肾损伤的治疗开始前的同一主体；和

(vii) 在疾病或紊乱例如肾功能降低、肾病或肾损伤的早期或晚期，或者在疾病或紊乱例如肾功能降低、肾病或肾损伤的治疗早期或晚期，或者在疾病或紊乱例如肾功能降低、肾病或肾损伤发作前的同一主体。

100. 如权利要求 97~99 中任一项所述的方法，其特征在于，所述测试方法是如权利要求 15~67 中任一项所述的方法，所述样品是尿液。

因子 XIIa 形式

技术领域

本发明涉及因子 XIIa，所述因子 XIIa 是“接触激活系统”的一个组分，并且涉及一种新分子量形式的因子 XIIa。

背景技术

因子 XIIa 是存在于正常血液中的一种无活性的酶原。在体外，当存在激肽释放酶、高分子量激肽原和负电性表面时，它可以很容易地转化成具有酶活性的形式，因子 XIIa。以前报道了两种形式的体外活性因子 XIIa。其中，丝氨酸蛋白酶的 80Kd 形式，通常称为因子 αXIIa，它具有经二硫键与 28Kd 轻链连接的 52Kd 重链。该因子经蛋白酶解从重链释放出一个肽，得到产物，即因子 βXIIa，其保留了丝氨酸蛋白酶活性，其中，因子 αXIIa 的 28Kd 链和源于其 52Kd 重链的一个小肽片段经二硫键相连接。在许多情况下，该小肽片段的分子量大约为 1000d，但体外也观察到其不同大小的片段。

专利 WO90/08835 公开了一种因子 XIIa 的免疫测试方法，还公开了与所有已知分子量的因子 XIIa 结合的单克隆抗体 2/215 和 201/9 及其生产方法。产生单克隆抗体（mAb）2/215 的杂交瘤 2/215 于 1990 年 1 月 16 日以保藏编号 90011606 保藏于欧洲动物细胞培养物保藏中心（简称为 ECACC）（欧洲动物细胞培养物保藏中心，生物制品部，PHLS Centre for Applied Microbiology and Research, Porton Down, Salisbury SP4 0JG, England），并且于 2004 年 6 月 14 日以保藏编号 04061403 重新保藏于 ECACC。产生单克隆抗体 201/9 的杂交瘤 201/9 于 1990 年 1 月 18 日以保藏编号 90011893 保藏于 ECACC，并且于 2004 年 6 月 14 日以保藏编号 04061402 重新保藏于 ECACC。

很早就知道因子 XIIa 参与了体内血液凝结的接触系统。近期更多的工作表明因子 XIIa 也参与了其它的系统，包括纤维蛋白溶解作用、激肽原生成、补体激活和血管发生。许多临床和实验数据表明接触系统的作用已超越了血液凝结，它在维持血管完整和血压上有作用，对内皮细胞的多种功能有影响，参与了纤维蛋白溶解的控制和血管内组成性抗凝因子特性的维持。进一步的临床和实验研究表明接触系统参与了急性和慢性炎症、各种病原性休克、糖尿病、变态反应、包括弥漫性血管内凝血在内的凝血-出血紊乱和癌症疾病。还有脓毒病、自发性流产和血栓栓塞。另外，因子 XIIa 也可能参与了组织保护和修复。Yarovaya 等最近的文章（Yarovaya，G.A.，Blokhina，T.B.& Neshkova，E.A.Contact system ，New concepts on activation

mechanisms and bioregulatory functions. Biochemistry (Mosc). 2002 Jan; 67 (l) : 13-24）综述了接触系统和有关激活机制及生物调控功能的新概念。

WO 04/057343 揭示了因子 XIIa 以多种形式存在于体内，并且不同形式因子水平的测量可以提供与多种临床状况有关的有价值的信息。

发明内容

本发明提供了一种新形式的因子 XIIa，通过高效液相色谱和质谱测量，其分子量为 53Kd。

优选该新形式的因子 XIIa 是人类的因子 XIIa，并且具有基本上如图 1 和 2 所示的氨基酸序列。该 53Kd 形式的因子 XIIa 具有两条肽链，通过二硫桥结合在一起。图 1 显示了第一条肽链的氨基酸序列，术语称作“重链”。图 1 显示了第二条肽链的氨基酸序列，术语称作“轻链”。优选至少一种、更优选两种序列与图 1 和图 2 所示序列相差 10%以下，更优选 8%以下，更优选 6%以下，更优选 4%以下，更优选 2%以下。优选重链和轻链与如图 1 和图 2 所示的长度基本相同。本发明还提供了分离的的核酸分子，该核酸分子编码 53Kd 形式的因子 XIIa 的两条肽之一或二者。本发明提供了一种结合于 53Kd 形式的因子 XIIa 的一个或多个表位的抗体，并且本发明还提供了与表位结合的片段或所述抗体的衍生物，例如 Fab 片段、$F(ab')_2$ 片段、由 Fab 表达文库产生的片段、或者抗独特型（抗 Id）抗体，其与一种或多种因子 αXIIa 和因子 βXIIa 的校正的交叉反应性为 10%或以下，更优选 5%或以下，更优选 2%或以下，更优选 1%或以下，更优选 0.5%或以下，更优选 0.1%或以下。本发明的抗体可以固定在载体上或者打上可检测标记。本发明的抗体可以是单克隆抗体或多克隆抗体。

本发明还提供了一种生产本发明的单克隆抗体的杂交瘤细胞株，以及一种通过在生长培养基中培养本发明的杂交瘤细胞株来生产这种单克隆抗体并且从生长培养基中获得抗体的方法。

本发明还提供了一种生产多克隆抗体血清的方法，其包括用存在于 53Kd 形式的因子 XIIa 中的抗原或其抗原片段给哺乳动物接种疫苗，以及从所述哺乳动物血浆提纯抗体血清。

本发明还提供了一种生产本发明的杂交瘤细胞株的方法，其包括：将存在于 53Kd 形式的因子 XIIa 中的抗原给药于哺乳动物，从所述哺乳动物获得产抗体细胞，使得到的产抗体细胞与骨髓瘤融合或者以别的方式使细胞无限增殖化，并且筛选得到的杂交瘤以用于单克隆抗体的生产。

本发明还提供了一种在液体样品中进行抗原免疫测试的方法，该测试包括：抗原和与其结合的抗体相互作用，以及对照使用预定抗原含量获得的结果而测定存在于样品中的抗原含量，其特征在于，所述抗体是根据本发明的抗体，而所述抗原是 53Kd 形式的因子 XIIa。

本发明还提供了一种检测并/或测定样品中 53Kd 形式的因子 XIIa 的方法，其包括对样品进行定性或定量免疫测试，该测定包括抗原和抗体相互作用和检测并/或测定任何得到的抗原抗体复合物，其特征在于，所述抗体是根据本发明的抗体，而所述抗原是 53Kd 形式的因子 XIIa。

本发明提供一种用于检测或测定样品中 53Kd 形式的因子 XIIa 的方法，其包括进行一个能优先于其它形式的因子 XIIa 来检测或测定 53Kd 形式的因子 XIIa 的步骤，所述其它形式的因子 XIIa 优选非 53Kd 形式的因子 XIIa。

在一种实施方式中，本发明的方法包括使用一种能够优先于其它形式的因子 XIIa 测定出所研究的 53Kd 形式的因子 XIIa 的测试方法，来检测或测定所研究的 53Kd 形式的因子 XIIa，所述其它形式的因子 XIIa 优选非 53Kd 形式的因子 XIIa。

在另一个实施方式中，本发明的方法包括：将所研究的 53Kd 形式的因子 XIIa 与其它形式的因子 XIIa 相分离，以及检测或测定分离的 53Kd 形式的因子 XIIa，所述其它形式的因子 XIIa 优选非 53Kd 形式的因子 XIIa。

分离的 53Kd 形式的因子 XIIa 的检测或测定可以使用一种能够优先于其它形式的因子 XIIa 测定出所研究的 53Kd 形式的因子 XIIa 的测试方法，所述其它形式的因子 XIIa 优选非 53Kd 形式的因子 XIIa。

在另一种实施方式中，本发明的方法包括：使样品与标记的抗体接触，该抗体能结合于所研究的 53Kd 形式的因子 XIIa 并且也能任意地结合于其它形式的因子 XIIa；使所研究的 53Kd 形式的因子 XIIa 与其它的形式分离；以及检测或测定 53Kd 形式的因子 XIIa，所述其它形式的因子 XIIa 优选非 53Kd 形式的因子 XIIa。

本发明还提供了一种方法，用于对疾病或紊乱的感病性、进展或结果进行诊断、监测或预测，或者对患有或者怀疑患有疾病或紊乱的主体的治疗进行诊断、监测或预测，该方法包括：以优先于其它形式的因子 XIIa 的方式检测或测定主体试样中 53Kd 形式的因子 XIIa，其中其它形式的因子 XIIa 优选非 53Kd 形式的因子 XIIa；以及将该主体试样的测试结果与使用相同方法测试如下至少一种或多种主体试样所得结果进行比较：

(i) 患有疾病或紊乱的主体；

(ii) 患有疾病或紊乱的主体，对其疾病或紊乱的进展和/或结果进行了监测；

(iii) 患有疾病或紊乱并在治疗中的主体；

(iv) 患有疾病或紊乱并在治疗中的主体，针对该疾病或紊乱的进展和/或结果，对该主体的治疗进行监测；

(v) 未患疾病或紊乱的主体；

(vi) 在疾病或紊乱发作前或者在疾病或紊乱的治疗开始前的同一主体；以及

(vii) 疾病或紊乱早期或晚期、或者疾病或紊乱的治疗早期或晚期、或者在疾病或紊乱发作前的同一主体。

本发明进一步提供一种方法，其包括：对于从患有疾病或紊乱的主体、或者从对疾病或紊乱在治疗中的主体所取得试样进行一系列 53Kd 形式的因子 XIIa 的测试；以及选择一种测试方法，以提供与疾病或紊乱或其治疗有关的 53Kd 形式的因子 XIIa 水平的信息。

本发明还提供了一种方法，用于提供一种测试 53Kd 形式的因子 XIIa 的方法，该测试适合于提供与诊断、监控或预测对疾病或紊乱的感病性、进展或结果有关的信息，或者提供与诊断、监控或预测对患有或者怀疑患有疾病或紊乱的主体的治疗有关的信息，其包括：对从患有疾病或紊乱的主体或者从治疗中的主体所取得的试样进行一系列 53Kd 形式的因子 XIIa 的测试；以及确定哪种测试可以提供与诊断、监测或预测疾病或紊乱的感病性、进展或结果有关的 53Kd 形式的因子 XIIa 水平的信息，或者提供与诊断、监测或预测疾病或紊乱的治疗有关的 53Kd 形式的因子 XIIa 水平的信息。

该方法优选包括，将从患有疾病或紊乱的主体或者治疗中的主体的试样中取得的 53Kd 形式的因子 XIIa 的结果与使用相同方法测试从如下至少一种或多种主体的试样中所得结果进行比较：

(i) 患有疾病或紊乱的主体；

(ii) 患有疾病或紊乱的主体，对其疾病或紊乱的进展和/或结果进行了监测；

(iii) 患有疾病或紊乱并在治疗中的主体；

(iv) 患有疾病或紊乱并在治疗中的主体，针对该疾病或紊乱的进展和/或结果，对该主体的治疗进行监测；

(v) 未患疾病或紊乱的主体；

(vi) 在疾病或紊乱发作前或者在疾病或紊乱的治疗开始前的同一主体；以及

(vii) 疾病或紊乱早期或晚期、或者疾病或紊乱的治疗早期或晚期、或者在疾病或紊乱发作前的同一主体。

附图说明

图 1 和图 2 显示了组成 53Kd 因子 XIIa 的两条肽链的氨基酸序列。图 1 显示的是“重链”序列，而图 2 显示的是“轻链”序列。

图 3 以图解方式显示了因子 XII 酶原。粗黑线条代表肽链，二硫桥由细短线表示。氨基

末端标记为“N”而羧基末端标记为“C”。

图 4 以图解方式显示了因子 αXIIa，图示方法与图 3 相同。可以看出，相比因子 XII，缺少了一个较短区域的肽链。缺失的区域将剩余的肽切成两条链，仍然通过二硫桥结合在一起。

图 5 以图解方式显示了因子 βXIIa，使用的图解方法与图 3 和图 4 相同。能够看出，相比因子 XII，因子 βXIIa 中也缺少了因子 αXIIa 中缺失的较短区域肽链。另外，缺失了因子 αXIIa 重链的大部分氨基末端。

图 6 以图解方式显示了 53Kd 因子 XIIa，使用的图解方法与图 3 至图 5 相同。可以看出，其与因子 βXIIa 相比，保留了因子 αXIIa 的更多重链，但仍然缺少了因子 αXIIa 重链的氨基末端的较短部分。

图 7 显示了由高压液相色谱(HPLC)分离结合于放射性标记的单克隆抗体 2/215 Fab 的不同形式因子 XIIa 的示踪结果。图 7a 显示了分子量标准样（670、158、44、17、1.35kD）的示踪。图 7b 显示了放射性标记的单克隆抗体 2/215 Fab 的示踪。图 7c 显示了 βXIIa+放射性标记的单克隆抗体 2/215 Fab 的示踪。图 7d 显示了 αXIIa+放射性标记的单克隆抗体 2/215 Fab 的示踪。图 7e 显示了典型血浆+放射性标记的单克隆抗体 2/215 Fab 的示踪。

图 8 显示了实施例 2 中描述的质谱实验结果。较低分子量处显著的峰值（在 201/9 区域星号标示）是主要为 53Kd 峰值的多个离子化种类。

图 9 显示了实施例 3 中描述的 53Kd 用胰蛋白酶消化后 MALDI-TOF 分析的结果。图中峰值代表得到的肽序列的分子量。

图 10 到图 12 显示了实施例 4 中描述的实验的实验数据。

图 10 显示了患有胸痛的病人的 Kaplan Meier 生存曲线。根据 53kD XIIa 浓度，将病人四等分。

图 11 显示了患有胸痛并且肌钙蛋白 T（TnT）高于 0.05 ng/ml 的病人的 Kaplan Meier 生存曲线。根据 53kD XIIa 浓度，将病人四等分。

图 12 显示了患有胸痛并且肌钙蛋白 T(TnT)低于或等于 0.05 ng/ml 的病人的 Kaplan Meier 生存曲线。根据 53kD XIIa 浓度，将病人四等分。

图 13 和 14 显示了实施例 5 中描述的实验的实验数据。

图 13 显示了病人因心肌梗死住院后 4 天内 53kD 形式的 XIIa 的浓度变化（表示为 pM）。

图 14 显示了病人因心肌梗死住院后 4 天内 53kD 形式的 XIIa 的浓度变化（表示为相对于住院时数值的百分比变化）。

具体实施方式

术语解释

抗体，包括任何能够结合抗原的抗体片段，例如 Fab 和 $F(ab')_2$ 片段，并且也包括重组体、嵌合抗体和人源化抗体。

抗体偶联物，也称检测抗体，指用可直接或间接测试的标签标记的抗体。

捕获抗体，指固定在固相上用于免疫测试的抗体。

捕获测试，指一种将固定在固相上的捕获抗体与样品相接触的免疫测试方法。如果样品包括能结合于固定化抗体的抗原并且反应条件合适，抗原将与固定化抗体形成抗原抗体复合物，从而被“捕获”于固相上，并且随后可以进行检测或测定。

细胞，若非特别指示，否则代表完整细胞、细胞残留物和细胞物质。

细胞因子 XIIa 和细胞因子 XII，分别指因子 XIIa 和因子 XII，其存在于细胞表面，或者结合于细胞、细胞残留物或细胞物质。

检测，指定性分析。

检测和/或测定，指定量或半定量分析。

因子 XIIa，也称为活化的因子 XII，指任何有酶活性的酶原因子 XII 的形式或片段。

高亲和性结合伴侣，指一种可与因子 XIIa 形成复合物的分子，该复合物不能通过例如添加洗涤剂或者与另一种分子竞争等简单方法而解离。

脂结合因子 XIIa，指与脂类物质连接的因子 XIIa，例如与脂质尤其是脂蛋白及其残留物结合的因子 XIIa。

低亲和性结合伴侣，指一种可与因子 XIIa 形成复合物的分子，该复合物可以很容易地通过例如添加洗涤剂或者与另一种分子竞争等简单方法而解离。

单克隆抗体（mAb）2/215，也称为抗体 2/215，是由杂交瘤 2/215 产生的抗体，该杂交瘤于 1990 年 1 月 16 日以保藏编号 90011606 保藏于欧洲动物细胞培养物保藏中心，生物制品部，PHLS Centre for Applied Microbiology and Research, Porton Down, Salisbury SP4 0JG, England，并且于 2004 年 6 月 14 日以保藏编号 04061403 重新保藏于 ECACC。

单克隆抗体（mAb）2/215 类似物，指具有因子 XIIa 结合特性的抗体，其特性基本上与 mAb 2/215 的特性相同。

单克隆抗体（mAb）201/9，也称为抗体 201/9，是由杂交瘤 201/9 产生的抗体，该杂交瘤于 1990 年 1 月 18 日以保藏编号 90012512 保藏于 ECACC，并且于 2004 年 6 月 14 日以保藏编号 04031402 重新保藏于 ECACC。

单克隆抗体（mAb）201/9 类似物，指具有因子 XIIa 结合特性的抗体，其特性基本上与

mAb 201/9 的特性相同。

含细胞样品，指包含细胞的体液样品和包含分离的细胞的样品。

种类和形式，在指因子 XIIa 的相关种类和形式时可以互换。它们用于区分肽链长度不同的因子 XIIa 形式，这种使用方式是指“分子量变体”或“分子量形式”，并且也用于区分结合形式不同的因子 XIIa 形式。已知分子量形式的因子 XIIa 是因子 αXIIa、因子 βXIIa、因子 γXIIa 和 53Kd 因子 XIIa。在这种应用中，53kd 因子 XIIa 是首次公开。结合性因子 XIIa 形式的例子包括细胞性因子 XIIa、脂结合因子 XIIa 和尿液因子 XIIa。“因子 XIIa 形式”的例子，在不进一步限定时，其表述方式包括下述具体形式：细胞性因子 αXIIa 和尿液 53Kd 因子 XIIa。已知的分子量不是 53Kd 的因子 XIIa 形式是因子 αXIIa、因子 βXIIa 和因子 γXIIa。

ug 和 ul，分别指微克和微升。

尿液因子 XIIa，指尿液中的因子 XIIa。

因子 XIIa 分子量变体

本发明基于我们的一个意想不到的发现，体内因子 XIIa（活化的因子 XII）主要作为分子量大约为 53Kd 的种类存在，并且对该 53Kd 种类的测量可能会为多种临床条件提供有关信息。这种信息将比从测量因子 XIIa 的方法得到的信息更精确，因为该方法不能将 53Kd 形式的因子 XIIa 与其它分子量形式的因子 XIIa 区别开来。尽管本发明是基于该新颖的 53Kd 形式的因子 XIIa，为方便起见，将其称为“53Kd 因子 XIIa”，或者简称“53Kd XIIa”。该术语的范围包括因子 XIIa 的变体，所述变体具有与 53Kd XIIa 长度基本相同的肽链，但由于任选的磷酸化、糖基化或其它衍生物化而具有不同于 53Kd 的分子量。该术语还包括当测量时分子量不为 53Kd 的 53Kd XIIa 形式，因为此时它们与其它化合物进行了复合或结合。因此，“53Kd 形式的因子 XIIa”的表述方式是用以表示含有因子 XIIa 肽链的因子 XIIa 形式，所述肽链长度类似于原始型 53Kd 形式的因子，而并不考虑下述事实：这种因子 XIIa 形式指的是包括例如细胞性 53Kd XIIa 等在内的因子 XIIa，当在其处于仍与细胞组分复合状态下进行测量时，它们的分子量可以大大超过 53Kd。“53Kd 形式的因子 XIIa”或者“53Kd XIIa”指的是任何形式含有分子量 53Kd 的因子 XIIa 新变体的因子 XIIa，例如尿液 53Kd XIIa 和细胞性 53Kd XIIa。优选 53Kd XIIa 的氨基酸序列类似于图 1 和图 2 公开的氨基酸序列。然而，这类情况包括存在于健康人群个体的变体，但因为天然产生的等位多态性以及因通过进行氨基酸替换尤其是保守性氨基酸替换而产生的人工合成序列变体，使得 53Kd XIIa 变体的具体序列方面有所不同，其不会对酶活性或者肽的抗原性产生实质上的影响。

因子 XIIa 形式

图 3 至图 6 图示了因子 XIIa 肽链的不同分子量变体。因子 XIIa 的形式变化反映出图 3 所示无活性酶原因子 XII 逐步裂解产生的因子 XIIa 的分子量和肽链序列。因子 XII 进行裂解产生了 80Kd 的活性丝氨酸蛋白酶，称为因子 αXIIa 并且在图 4 中称作“alpha XIIa”，其含有一条 52Kd 的重链，通过二硫键与一条 28Kd 的轻链相连接。该因子经蛋白酶解从重链释放一段肽链，并且得到称为因子 βXIIa 的产物，该产物在图 5 中称作“beta XIIa”，其保留了丝氨酸蛋白酶活性，但其中 αXIIa 的 28Kd 肽链通过二硫键连接于由前述 52Kd 重链衍生的一小段肽链。因子 βXIIa 可以进一步进行蛋白水解，该裂解产生了分子量约为 15Kd 的片段，也将其称为因子 γXIIa，未在图 3 至图 6 中显示。图 6 显示了 53Kd 形式的因子 XIIa，标记为“53Kd XIIa”。由图示可见，53Kd XIIa 具有因子 αXIIa 的轻链。该肽链偶联于一条第二肽链，该第二肽链长度比因子 αXIIa 的第二肽链短，但比因子 βXIIa 的第二肽链长。

53Kd XIIa 肽链的氨基酸序列显示于图 1 和图 2。为避免混乱，应当注意，当用于描述其它分子量形式的因子 XIIa 的肽链时，将因子 αXIIa（图 4）中相对大小的肽链衍生的术语“重链”和“轻链”保留在本申请通篇文件中。因此，当相应于因子 αXIIa 轻链的肽链存在于因子 βXIIa 和 53Kd 因子 XIIa 中时，继续称之为“轻链”，尽管事实上称为“重链”的其它肽链实际上在一些蛋白质中是较短的肽链。

53Kd 因子 XIIa 蛋白质

将 53Kd 因子 XIIa 蛋白质及其组分肽链归入本发明的保护范围。可以制备出这样的蛋白质和肽链用于多种用途。这些用途包括但不限于：产生抗体；用作诊断测试试剂；以及用作筛选化合物中的分析试剂，所述化合物可用作治疗药物障碍和疾病的药物试剂。本发明的 53Kd 因子蛋白质序列包括图 1 和图 2 所示序列及其类似物和衍生物。本发明进一步包括不同于其它种类的相应同源物。本发明还包括功能等同于 53Kd 因子 XIIa 的蛋白质，这类蛋白质包括但不限于，一条或两条肽链的氨基酸序列内含有取代氨基酸残基的蛋白质。可以根据所含氨基酸残基的极性、电荷、溶解性、疏水性、亲水性、和/或两亲性（亲水和亲油）的相似性，进行氨基酸的取代。例如，非极性的（疏水性的）氨基酸包括丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和甲硫氨酸；极性中性氨基酸包括甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、天门冬酰胺和谷氨酰胺；带正电的（碱性）氨基酸包括精氨酸、赖氨酸和组氨酸；而带负电的（酸性）氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸。

多种宿主表达载体系统可用于表达本发明的蛋白质和多肽。合适的表达系统以及从表达系统纯化或富集蛋白质和多肽的方法的详细情况例如可以参见 WO 02/00720，将其引入本文作为参考。

编码 53Kd XIIa 的核酸

本发明包括任何能编码本发明的蛋白质或肽的核酸。这些氨基酸的补码也包括在本发明的保护范围内。可以从合适的核酸文库中分离本发明的核酸，可以使用合适的设计引物并利用基因文库登录号 NP_000496 所公开的因子 XIIa 序列的辅助、通过 PCR 分离出来，或者通过本技术领域已知的标准方法(例如在 WO 02/00720 中和包含其内的参考文献所描述的方法)合成出来。优选本发明的核酸单独编码 53Kd 因子 XIIa 肽链。优选本发明的核酸不包含编码 53Kd 因子 XIIa 肽链所缺少的氨基酸序列的核酸序列。优选本发明的核酸不包含 53Kd 因子 XIIa 肽链所缺少、但存在于肽或多肽中一条、多条或所有非 53Kd 形式因子 XIIa 肽链中的序列。

含有本发明的核酸的产物

本发明还包括：DNA 载体，尤其是含有一种或多种本发明的核酸的 DNA 表达载体；含有一种或多种本发明的核酸或 DNA 载体的基因工程寄主细胞；以及非人类的转基因动物，例如转基因表达本发明的蛋白质或肽的小鼠、大鼠、猪、山羊、奶牛或者小鸡。

可选择的因子 XIIa 的结合形式

不同分子量形式的因子 XIIa 变体中的任何一个，例如因子 αXIIa、βXIIa、γXIIa 或 53Kd XIIa，可以与其它分子种类相结合，所述分子种类包括高亲和性结合伴侣例如抑制剂、C1 酯酶抑制剂，以及其它结合蛋白例如低亲和性结合伴侣。假定因子 XIIa 与这类其它结合蛋白例如低亲和性结合伴侣相结合，这种结合可以是可逆的，与抑制蛋白的结合是可以阻止的，从而可以减少或防止对因子 XIIa 活性的抑制。

不同分子量形式的因子 XIIa 变体中的任何一个，例如因子 αXIIa、βXIIa、γXIIa 或 53Kd XIIa 可以与脂质例如脂蛋白相结合并与其解离，该脂蛋白可以呈颗粒形式和/或颗粒残留物形式。不同分子量形式的因子 XIIa 变体中的任何一个例如因子 αXIIa、βXIIa、γXIIa 或 53Kd XIIa 可以与任何细胞和细胞碎片相结合并与其解离。特别是在因子 XIIa 与细胞、细胞碎片、脂蛋白和脂蛋白残留物相结合时，单个颗粒上可以结合几个分子量不同的因子 XIIa 分子。另外，几个分子量相同或者不同的因子 XIIa 分子，可以以因子 XIIa 分子复合体形式存在。

如同 WO 04/057343 和其图 1 所示的假定，人们认为存在多种结合性因子 XIIa 之间互变的体内动态系统。人们还假定不同的结合性因子 XIIa 形式和不同分子量形式的因子 XIIa 在生理学和病理学方面起不同的作用，并且假定与测定未限定的因子 XIIa 形式相比，优先测定特定形式的因子 XIIa 将会改善其在疾病和紊乱的诊断、预测和监测以及治疗方面的临床应用。

细胞性因子 XIIa

许多作者认为因子 XII 活化为因子 XIIa 可以发生在细胞表面并且提供有数据来支持该假设。尤其是一些作者认为，因子 XII 活化发生在细胞特别是内皮细胞上，可以通过构建还含有高分子量激肽原、激肽释放酶前体和因子 XI 的多分子聚集体而实现。这些模型表明，在因子 XII 活化后，因子 XIIa 从聚集体上解离并且不会长期保留在细胞表面上。例如参见文献：Yarovaya 等（同上）。

WO 04/057343 公开了因子 XIIa 以多种结合形式存在的现象，其中一种形式是因子 XIIa 存在于在血液里循环的细胞表面并且存在于这些细胞残留物上，以及存在于源于细胞的细胞物质上。这类形式的因子 XIIa 被称作“细胞性因子 XIIa”。

另一个发现是，当因子 XIIa 是细胞性因子 XIIa 时，并非所有的因子 XIIa 表位都可以用，这与非细胞性因子不同。例如，单克隆抗体 2/215 能够有效地结合于细胞性因子 XIIa 和非细胞性因子 XIIa。然而，单克隆抗体 201/9 和绵羊产生的抗因子 βXIIa 的多克隆抗体似乎并不能像结合非细胞性因子 XIIa 那样有效地结合细胞性因子 XIIa。

在血液中，因子 XIIa 似乎可以专门存在于粒细胞上，尤其是存在于一类在流式细胞仪测试中显示出比其它粒细胞有稍高分散性的粒细胞亚群落上，这表明该亚群落与其它粒细胞有不同的形态。这些发现具有临床参考意义。

脂结合因子 XIIa

由 WO 04/057343 还可知，一些因子 XIIa 与血液中脂质例如脂蛋白及其残留物相结合，并且测定该脂结合因子 XIIa 可以提供与多种临床情况有关的信息。

尿液因子 XIIa

WO 04/057343 还揭示，因子 XIIa 存在于尿液，并且测定尿液因子 XIIa 可以提供与多种临床情况有关的信息。

分子复合体及因子 XIIa 与其它分子种类的结合

两种以上因子 XIIa 分子可以彼此相结合而呈复合体形式，同时因子 XIIa 还可以与一种或多种其它分子种类如高亲和性结合蛋白（例如抑制剂分子）、或低亲和性结合蛋白相结合。当存在以及缺少洗涤剂情况下进行免疫测试时，获得的结果也显示了分子复合体的存在以及分子复合体与结合伴侣的结合。其中在进行免疫测试时，洗涤剂预期会使因子 XIIa 分子复合体解离并且会打断因子 XIIa 与低亲和性结合伴侣的结合，但不会破坏因子 XIIa 与高亲和性结合伴侣的结合。

不同形式因子 XIIa 的抗体

现有技术的抗体例如 mAb 2/215 和 mAb 201/9 不结合因子 XII，但结合所有已知形式的

因子 XIIa，包括本发明的 53Kd 的新形式。因此它们不能用于区别不同分子量形式的因子 XIIa，除非它们在结合抗体之前或之后与能够分离不同分子量形式的因子 XIIa 的技术协同使用。分离不同分子量形式的因子 XIIa 的合适方法包括色谱技术，例如凝胶电泳法。一个可以使用现有技术抗体的用于 53Kd XIIa 特定分析的实施例是这样一种测试方法：将现有技术抗体通常用于从样品中免疫沉淀因子 XIIa，然后将得到的因子 XIIa 跑胶（run on a gel）以分离不同分子量形式的因子 XIIa。然后通过用普通的蛋白质染料或一种现有技术抗体染色，可以使蛋白质显色于凝胶上，通过观察凝胶上 53Kd 条带染色强度，可确定 53Kd 因子 XIIa 水平。

虽然如上所述测试方法较容易进行，人们还是希望通过免除对分子量分离的需要，来更进一步简化该测试方法。这样一种改进带来了一种单步测试，因此是有利的。根据本发明的抗体能区分 53Kd 因子 XIIa 和一种或多种非 53Kd 形式因子 XIIa，该抗体的生产方法描述如下。

53Kd 因子 XIIa 专一性抗体的生产

对于生产抗体，可以通过注射合适的抗原对多种宿主动物进行免疫（见下文抗原选择的详细描述）。这样的宿主动物可以包括但不限于猪、兔、小鼠、山羊、马和大鼠。根据宿主种类，可以使用多种佐剂以提高免疫应答，该佐剂包括但不限于：弗氏佐剂（完全型和不完全型），金属盐比如氢氧化铝或者磷酸铝，表面活性物质比如溶血卵磷脂、复合多元醇、聚阴离子，多肽，油乳化液，以及可能有用的人用佐剂比如 BCG（卡介苗）和小棒状杆菌（Corynebacterium parvum）。

作为另一种选择，免疫应答可以通过与应答增强剂分子的组合和/或偶合而得到增强，所述应答增强剂分子例如是钥孔蛾血蓝蛋白（keyhole limpet haemocyanin，KLH）、破伤风毒素、白喉类毒素、卵清蛋白、霍乱毒素、或它们的片段。

多克隆的抗体是免疫动物血清衍生的抗体分子异型群。

通过用于在培养物中由传代细胞系生产抗体分子的任何技术，可以得到作为特定抗原的抗体同型群的单克隆抗体。

这些技术包括但不限于：Kohler 和 Milstein 的杂交瘤技术（Nature. 1975，256：495-497；以及美国专利 No. 4,376,110），人类 B 细胞杂交瘤技术（Kosbor 等，Immunology Today. 1983，4：72；Cole 等，Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1983，80：2026-2030），以及 EBV 杂交瘤技术（Cole 等，Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy. Alan R. Liss, Inc.，1985，pp. 7796）。

生产根据本发明的 mAb 的杂交瘤可以进行体外或体内培养，并且通过传统方法纯化得到的 mAb。在体内产生高滴度的 mAbs，可以使其成为一种优选的生产方法。然而，可以优选

体外生产 mAbs，这是合法的、可商业化的或符合伦理的方法，而使用动物进行体内生产抗体是不合需要的。

另外，可以使用用于生产“嵌合型抗体”所开发的技术（Morrison 等，Proc. Natl. Acad. Sci.，1984，81：6851-6855；Neuberger 等，Nature. 1984，312：604-608；Takeda 等，Nature. 1985，314：452-454），该技术将具有适当抗原专一性的小鼠抗体分子基因与具有适当生物活性的人类抗体分子基因拼接一起。嵌合抗体是一种分子，其中不同部分来源于不同的动物种类，比如具有源于鼠科 mAb 的可变区和人免疫球蛋白恒定区。这样的技术在美国专利 Nos. 6,075,181 和 5,877,397 各自公开的内容中有描述，并在此将其全部内容引入本文以供参考。本发明还包括如在美国专利 No. 6,150,584 中描述的全人源化单克隆抗体的应用，在此将其全部内容引入本文以供参考。人类或人源化动物 mAbs 可以优选用于人类的治疗用途。

作为另一种选择，可以采用所述用于生产单链抗体的技术（美国专利 US 4,946,778；Bird，Science. 1988，242：423-426；Huston 等，Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1988，85：5879-5883；以及 Ward 等，Nature. 1989，341：544-546）来生产单链抗体。单链抗体通过 Fv 区域的重链和轻链片段经由氨基酸桥连接而形成，从而产生单链多肽。

可以通过已知的技术产生识别专一性表位的抗体片段。例如，这种片段包括但不限于：可以通过胃蛋白酶消化抗体分子而产生的 $F(ab')_2$ 片段，和可以通过还原 $F(ab')_2$ 片段的二硫键而产生的 Fab 片段。作为选择之一，可以构建 Fab 表达文库（Huse 等，Science. 1989，246：1275-1281），使得以预期的专一性快速容易地识别单克隆 Fab 片段。

可以使用本发明的 53Kd 因子 XIIa 的抗体，通过使用为本领域技术人员所熟知的技术，来生产“模拟”53Kd 因子 XIIa 的抗独特型抗体。(参见，例如，Greenspan & Bona，FASEB J. 1993，7（5）：437-444；以及 Nissinoff，J. Immunol. 1991，147（8）：2429-2438）。

本发明的抗体可以是任何免疫球蛋白类型，包括 IgG、IgM、IgE、IgA、IgD、及其任何亚类型。

选择并制备合适的抗原用于抗体的生产

抗原选择

要求根据本发明的抗体以优先于因子 αXIIa 和因子 βXIIa 中的至少一种而结合于 53Kd 因子 XIIa。因此它们将识别 53Kd XIIa 上存在并可进入的、但在因子 αXIIa 和因子 βXIIa 中的至少一种上缺少或难以进入的一个或多个表位。因此一种选择抗原的方法是选择具有存在于 53Kd 因子 XIIa 上但因子 βXIIa 上缺少的氨基酸序列的肽抗原。这样的序列可以在 53Kd 因子 XIIa 重链部分找到，而因子 βXIIa 上缺少该重链部分。另一种可供选择的选择抗原的方法是

使用基本上完整的 53Kd 因子 XIIa 或其肽链或它们的片段，以便提高对表位的抗体响应，该表位包括了 53Kd 因子 XIIa 重链 N-末端，该末端唯一作用在 53Kd 因子上的。另一种可选择的选择抗原的方法是选择一种肽作为抗原，该肽的序列存在于因子 αXIIa 和/或因子 βXIIa 上、但其仅作用在 53Kd 因子 XIIa 上。

抗原制备

蛋白质抗原的大小、聚集程度、和相对天然性即相对不足或变性，都可以显著地影响产生的抗体数量和质量。小多肽（<10Kda）和非蛋白质抗原通常需要偶联或者交联于较大的、免疫原的载体蛋白，以增加免疫原性并提供 T 细胞表位。注射可溶的非聚集性蛋白质，可以诱导耐药性，而不是良好的抗体响应。因此可以预期将抗原偶联于较大的蛋白质比如钥孔蛾血蓝蛋白（KLH）或者牛血清蛋白质（BSA）。也有人成功地将聚 L-赖氨酸用作小抗原肽的骨架。

也需要考虑抗原的天然性程度。天然蛋白质诱导的抗体最好与天然蛋白质起反应，并且变性蛋白诱导的抗体最好与变性蛋白起反应。如果想使用抗体来检测变性蛋白，那么优选诱导抗体抗变性抗原。另一方面，如果使用抗体检测天然蛋白质，如同通常的诊断应用情况，优选诱导抗体抗天然的或基本上为天然的抗原。选择合适的佐剂可以用于改变抗原的天然性。通常情况下，在预先形成的水包油乳剂型佐剂中被吸收的蛋白质抗原，相比在油包水乳剂型佐剂中的情形，保留了更多的天然蛋白质结构。

通过使用一些技术手段，制备抗原时始终保证抗原不受微生物污染。抗原制备可以通过流经 0.22 um 过滤器进行灭菌。

多克隆抗体的纯化

可以使用已知的技术纯化多克隆和单克隆抗体以去除非免疫球蛋白杂质，例如使用蛋白质 A 或者蛋白质 G 亲和色谱柱。可以要求对根据本发明的多克隆抗体进一步纯化，以消除或减少交叉反应性。为了除去对非 53Kd 形式的因子 XIIa 的交叉反应性，有必要通过亲和性纯化工艺从多克隆血清除去这些种类的抗体。Fisher 等在文献 Cell. 1988，54：813-822 中给出了一种用于多克隆抗体亲和性纯化的合适方案的详细资料，现将其公开的内容引入本发明作为参考。概括来讲，这些纯化方法包括：将引起交叉反应性问题的抗原或抗原固定于固体基材上，该基材例如是实验室用塑料器具物品的器壁，或者是填装于色谱柱内部的固体珠料；以及使多克隆血清流经或通过该固体基材，这样使得显示出交叉反应性的抗体种类保留下来，而使得不显示交叉反应性的抗体种类维持在液相中。作为亲和性纯化方法用于生产本发明的多克隆抗体的应用实施例，通过用 53Kd 因子 XIIa 给动物接种疫苗，可以在动物体内唤起多

克隆抗体响应；然后可以使得到的多克隆血清进行亲和性纯化，该纯化是使多克隆血清流经含有固定化因子 αXIIa 的色谱柱。显示出与因子 αXIIa 的交叉反应性的抗体种类将保留于柱中，而能结合 53Kd 因子 XIIa 但不结合因子 αXIIa 的抗体种类将维持在液相中，并且包含于柱的洗脱液中。

不同形式因子 XIIa 的检测和/或测定

本发明提供一种用于检测或测定样品中 53Kd 形式的因子 XIIa 的方法，53Kd 形式的因子 XIIa 例如是细胞性 53Kd XIIa、循环系统中 53Kd XIIa 或尿液 53Kd XIIa，该方法包括进行一程序，所述程序能以优先于其它分子量形式的因子 XIIa 而检测或测定所研究的 53Kd 形式的因子 XIIa。

在一种实施方式中，本发明的方法包括利用一种能够优先于其它形式的因子 XIIa 测定出所研究的 53Kd 的因子 XIIa 的测试方法，来检测或测定所研究的 53Kd 形式的因子 XIIa，所述其它形式的因子 XIIa 优选是非 53Kd 形式的因子 XIIa。

在另一种实施方式中，本发明的方法包括：将 53Kd 形式的因子 XIIa 与其它形式的因子 XIIa 分离，以及检测或测定分离的 53Kd 形式的因子 XIIa，所述其它形式的因子 XIIa 优选是非 53Kd 形式的因子 XIIa。

可以通过使用一种能够以优先于其它形式的因子 XIIa 而测定出 53Kd 形式的因子 XIIa 的测试方法，来检测或测定分离的 53Kd 形式的因子 XIIa，所述其它形式的因子 XIIa 优选是非 53Kd 形式的因子 XIIa。

在另一种实施方式，本发明的方法包括：使样品与标记的抗体接触，该抗体能结合 53Kd 形式的因子 XIIa 并且也能任意地结合于其它形式的因子 XIIa；使 53Kd 形式的因子 XIIa 与其它形式的因子 XIIa 分离，所述其它形式的因子优选是非 53Kd 形式的因子 XIIa；以及检测或测定 53Kd 形式的因子 XIIa。

因此，根据本发明，首先将 53Kd 形式的因子 XIIa 与其它形式的因子 XIIa、优选其它分子量形式的因子 XIIa 分离，然后可以测定 53Kd 形式的因子 XIIa。可以使用用于因子 XIIa 测试的普通方法，该测试对任何特定形式的因子 XIIa 都不是专一性的，但使用能够以优先于其它形式的因子 XIIa 来测定 53Kd 因子 XIIa 的测试方法可能是有利的，所述其它形式的因子 XIIa 优选是非 53Kd 形式的因子 XIIa。下面将会给出这种测试方法的实施例。可以使用这种程序来检测或测定例如细胞性 53Kd XIIa、分子复合体、以及 53Kd XIIa 与其它分子种类的结合体。

作为另一种选择，可以直接地对样品进行能够优先于其它形式的因子 XIIa（优选其它非

53Kd 形式的因子 XIIa）来测定所研究的 53Kd 形式的因子 XIIa 的测试，而不用预先分离不同形式因子 XIIa。下面将会给出这种测试方法的实施例。可以直接地对样品进行这样的测试。可以使用这种程序来检测或测定例如分子复合体、以及因子 XIIa 与其它分子种类的结合体。

作为另一种的选择，可以将包含 53Kd 形式的因子 XIIa 的样品与标记的抗体接触，然后可以进行所研究的不同分子量形式的因子 XIIa 的分离，同时检测或测定分离的因子 XIIa 形式。可以使用这种程序来检测或测定例如脂结合性 53Kd 因子 XIIa。

因子 XIIa 形式的分离

各种形式的因子 XIIa 可以根据其物理、化学或免疫学性质而被分离。一般来说，进行任何这样的分离的条件应当是使所研究的因子 XIIa 形式维持不变，例如该条件通常应是任何复合体或分子结合体不解离，并且任何结合于另一种材料比如细胞体或脂质物的因子 XIIa 形式不会从该材料上分离出来。然而，在某些情况下，可能希望能将因子 XIIa 从结合体上或从其结合的材料上分离出来。

基于物理性质的分离

不同分子量形式的因子 XIIa 可以基于分子量的不同而进行分离，例如，使用色谱方法比如高压液相色谱法（HPLC）、流式细胞技术或超速离心法技术，接着测试经分离的物质。

测试可以通过几种方法进行，比如对分离的因子 XIIa 形式进行免疫测试，或者进行酶测试，比如使用生色物质如 S2302（Kabi Diagnostics，Uxbridge，England）。抗因子 XIIa 的抗体可以与 HPLC 联合使用。例如，标记的抗体可以与样品反应，而得到的混合物可以通过 HPLC 进行分离。然后可以使用针对标记抗体用材料的合适的检测系统，来测定抗体与特定分子量形式的因子 XIIa 的复合物。

基于物理性质分离分子复合体和因子 XIIa 与结合伴侣的结合体

这样一种方法可能是有用的，尤其用于将包含两种以上因子 XIIa 分子的分子复合体与其它形式的因子 XIIa 分离开来，以及用于分离与高亲和性或者低亲和性结合伴侣结合的因子 XIIa 形式。

通常在优先使因子 XIIa 复合体不解离以及因子 XIIa 不与结合伴侣解离的条件下进行这种分离。例如，通常优先避免使用洗涤剂，因为其容易使复合体和一些分子结合体解离。然而，在某些情况下可能希望发生解离。例如，如果希望因子 XIIa 从低亲和性结合伴侣上分离，或者将和低亲和性结合伴侣相连接的因子 XIIa 与和高亲和性结合伴侣相连接的因子 XIIa 分离，可以使用合适的条件比如使用洗涤剂，这将导致因子 XIIa 从低亲和性结合伴侣上解离，但不会从高亲和性结合伴侣上解离。

基于物理或者化学性质分离细胞性因子 XIIa 和脂结合因子 XIIa

通过物理或化学方法或者通过其组合，可以将细胞性因子 XIIa 和脂结合因子 XIIa 与其它形式的因子 XIIa 分离。例如，通过离心或者流式细胞技术可以分离细胞性因子 XIIa。例如，通常通过脂蛋白沉淀剂和离心法，或者通过密度跃变层（density layer）超速离心法，可以分离脂结合因子 XIIa。

通常优先在使因子 XIIa 不与细胞体或脂质物解离的条件下进行分离。例如，通常优先避免使用洗涤剂。然而，在某些情况下可能希望发生解离。如果希望因子 XIIa 从其结合的材料上分离，可以使用合适的条件。

免疫法分离

使用免疫法可以将一种或多种所研究的因子 XIIa 形式与其它因子 XIIa 形式分离，该方法使用了显示出对于一种或多种所研究的因子 XIIa 形式的优先结合性的抗体。例如，可以进行免疫亲和层析，其中抗体固定于合适的固体状载体上。在层析后可以检测结合或未结合的组分的酶活力。优选的抗体能够识别 53Kd 因子 XIIa 形式的一个或多个表位，并且该抗体与因子 αXIIa 和因子 βXIIa 之一或两者的校正交叉反应性是 0.1%以下。这些抗体的生产在该说明书的其它部分有描述。

如上所述，相对于基于物理或化学性质的分离，免疫亲和层析分离通常在使一种或多种因子 XIIa 形式维持不变的条件下进行，例如，复合体和结合体不发生解离，并且结合的因子分子不释放。然而，可能有时希望发生解离。如果这样，可以使用合适的条件。优选使用抗体进行免疫亲和层析，该抗体可以识别 53Kd 因子 XIIa 形式的一个或多个表位，但其与因子 αXIIa 和因子 βXIIa 之一或两者的校正交叉反应性是 10%以下，更优选 5%以下，更优选 2%以下，更优选 1%以下，更优选 0.5%以下，更优选 0.1%以下。这些抗体的生产在本说明书的其它部分有描述。

测试方法适用性的判定

在不区分不同分子量形式的因子 XIIa 的情况下，已知用于检测或测定因子 XIIa 的方法包括：显色法，例如酰胺分解测试，以及各种型式的免疫测试，例如使用现有技术抗体的免疫测试。

如果在进行测试前，53Kd 的一种或多种所研究的因子 XIIa 形式已与其它分子量形式的因子 XIIa 分离，可以使用一种不区分不同分子量形式的因子 XIIa 的测试方法，即“普通的”因子 XIIa 测试方法。然而即便是在分离步骤之后，使用能够相对于其它分子量形式的因子 XIIa 优先检测或测定 53Kd 的一种或多种所研究的因子 XIIa 形式的测试方法也是有利的。

如果未进行分离步骤，所用的测试方法必须能够从其它非 53Kd 形式的因子 XIIa 中检测或测定出 53Kd 的一种或多种所研究的因子 XIIa 形式。可以试验一下一种已知的适合于检测或测定因子 XIIa 的测试方法，用于判断其检测或测定样品中预期的一种或多种形式的 53Kd 因子 XIIa 的能力。

例如，使用一种已知包含细胞性 53Kd 因子 XIIa 的样品，将所研究的测试方法得到的结果与使用已知适合于检测细胞性 53Kd 因子 XIIa 的测试方法所得到的结果相比较。单克隆抗体 2/215 能够有效地结合细胞性 53Kd 因子 XIIa。可以使用包括 mAb 2/215 或其类似物的免疫测试作为对比测试方法。对于其它形式的 53Kd 因子 XIIa，也进行相同的考虑。

一种可供选择的办法是，将所研究的测试方法应用于已知包含预期形式的 53Kd 因子 XIIa（比如细胞性 53Kd 因子 XIIa）的样品的一部分。这种情况下，样品将不包含非细胞性 53Kd 因子 XIIa。对样品的另一部分进行处理，以便从细胞上释放 53Kd 因子 XIIa，经处理后的细胞被分离出来，重复上述测试方法，并且比较两种测试方法的结果。如果测试含有细胞性 53Kd 因子 XIIa 的样品所得的结果高于从处理后除去细胞性 53Kd 因子 XIIa 的样品所得结果，表明该测试方法适合于检测或测定细胞性 53Kd 因子 XIIa。对于其它形式的 53Kd 因子 XIIa，也进行相同的考虑。

用于一种或多种形式因子 XIIa 的测试方法的专一性

通过设计测试方法，可以实现或提高用于一种或多种因子 XIIa 形式测试方法相对于其它因子形式测试方法的专一性。可以调节测试参数，使得一种或多种所研究的因子 XIIa 形式相对于其它因子 XIIa 形式的优先得到检测或测定。

这种测试方法的优化是本技术领域的常规作法，并且适用的技术已为大家所熟知，参见实施例、Principles and Practice of Immunoassays, Eds. Price. CP & Newman DJ，Stockton Press，1991。

就免疫测试而言，可以调节至取得预期专一性的参数可以包括对所用抗体或抗体组合的任何一种或多种选择；对使用、不使用洗涤剂和其品种的选择；以及在包含有涂覆于固相上抗体的抗原捕获测试情况下涂覆板的条件的选择。

例如，就微量滴定板免疫测试而言，有许多参数可以进行改变，以便相对于其它因子形式优先测定出某种形式的因子 XIIa。

用捕获抗体涂覆固相用的溶液配方还影响到不同形式因子 XIIa 的优先测定，例如，包含于配方的抗体浓度和 pH 以及缓冲液组分都是很重要的。

影响到优先测定哪种因子形式的其它参数是，在用抗体孵育期间样品中是否含有洗涤剂，

例如三硝基甲苯。此时推定洗涤剂的存在可以解离复合体，例如因子 XIIa 分子复合体，和/或洗涤剂可以释放已与细胞和/或脂质结合的因子 XIIa。洗涤剂性质和/或含量也可以影响测试。

可以进行改变以影响优先测定特定形式因子 XIIa 的附加参数实施例是，进行标记以形成用于检测抗原抗体复合物的偶联物的抗体的选择。

应当注意，在测试参数之间有复杂的相互作用，例如，测试中混入洗涤剂的效果取决于捕获抗体的组合、涂覆抗体浓度、涂覆缓冲液、以及使用的抗体偶联物。根据本技术领域的普通实践，通过适当控制多种参数，可以确定用于检测或测定预期形式因子 XIIa 的最佳条件。

如果测试是想通过使用能识别仅存在于 53Kd 因子 XIIa 上的表位的抗体，从而区分 53Kd 因子 XIIa 和非 53Kd 形式的因子 XIIa，设计测试条件必须小心进行，以确保用来结合抗体的目标表位的完整性。如果 53Kd 因子 XIIa 是不变性的，则仅有特定表位可供利用。其它表位可能要求一种或多种形式的因子 XIIa 进行变性以便显露出来。测试条件的选择将影响蛋白变性的延伸。例如，使用洗涤剂或高离子浓度通常会导致提高变性水平。在还原条件下（例如存在还原剂比如巯基乙醇时）进行测试和/或样品制备阶段将可能导致因子 XIIa 重链和轻链的分离。取决于测试中使用的表位，这可能会导致表位的破坏，或者会导致隐藏表位的显露。

样品和样品制备

样品

可以在一种体液样品中测定不同形式的 53Kd 因子 XIIa，该体液样品是：例如，全血、血浆、血清、尿液、脑脊液、唾液或眼泪；或者是从体液分离的包含细胞的样品，即，细胞基本上游离于其在体内时存在于其中的液相之外；或者包含有组织或从组织样品得到的细胞的样品。

样品制备

根据普通方法可以得到并制备出样品，例如，参见如下文献：Young, D. S. & Bermes, E. W. "Specimen collection and processing" in Tietz Textbook of Clinical Chemistry 2nd Edition" Eds. Burtis, C. A. & Ashwood, E. R., Saunders (1994)；Methods in Enzymology, H. Van Vunakis and J. J. Langone (Eds), 1981, 72(B); Practice and Theory of Enzyme Immunoassays, P Tijssen, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, R. J. Burden and P. H. Van Knippenberg (Eds), Elsevier, 1985; Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques, T. Chard, ibid, 3rd Edition, 1987; Methods in Enzymology, H. Van Vunakis and J. J. Langone (Eds) 1981, 74(C)。

体液

根据本发明，可以在体液样品中检测或测定一种或多种 53Kd 形式的因子 XIIa。体液的例子有全血、血浆、血清、尿液、脑脊液、唾液和眼泪。可以用普通的方法例如在上述参考文献中描述的方法来获得并制备体液样品。

按如下所述测试方法部分，可以实现优先于其它因子形式来检测特定形式因子 XIIa 的选择性测定。

细胞性因子 XIIa

在一种实施方式中，本发明提供一种方法，其包括检测或测定样品中 53Kd 因子 XIIa，该样品含有哺乳动物主体、通常为人类的细胞，尤其含有在血液中或另一种体液中循环的细胞。

在进行分析以确定细胞性因子 XIIa 之前，可以对体液样品进行细胞性因子 XIIa 测定，或者可以从体液样品（例如全血或血浆）中分离细胞，即，使该细胞基本上游离于其在体内时存在于其中的液相之外。作为可供选择之一，可以从组织样品得到细胞。

如果使用的测试方法能同时检测或测定细胞性和非细胞性因子 XIIa，对包含细胞的样品进行这种测试就会检测或测定出细胞结合性因子 XIIa 和非细胞性因子 XIIa。然而，如果测试针对已分离细胞的样品进行，其结果将仅为细胞性因子 XIIa 的测试结果。术语“包含细胞的样品”此处既代表包含细胞的体液样品又表示已分离细胞的样品。

细胞（包括细胞残留物和细胞体）例如可以用如上所述“分离因子 XIIa 形式”的方法进行分离。例如，可以通过离心和洗涤分离细胞。优选将细胞离心并洗涤至少一次，优选两次或多次。通常在足够高的离心力下进行离心，该离心力使细胞形成离散的颗粒状物，从而可以与上清液分离。该颗粒状物可以在合适的介质中洗涤，该介质不会影响细胞性因子 XIIa，例如不会引起细胞性因子 XIIa 从细胞解离。例如，可以使用 pH7.4 的磷酸盐缓冲盐水来洗涤并悬浮细胞，用于检测或者检测和/或测定细胞性因子 XIIa。也可以使用流式细胞技术来分离细胞。

如果在进行测试前，细胞性因子 XIIa 已与其它结合性形式的因子 XIIa 分离，可以使用一种不区分细胞性因子 XIIa 和其它结合性形式的因子 XIIa 的测试方法，即“普通的”因子 XIIa 测试方法。然而，使用一种即使在预先的分离步骤之后也能相对于其它因子形式优先检测或测定细胞性因子 XIIa 的测试方法可能是有利的。

如果未进行分离步骤，所使用的测试方法应能检测或测定所研究的细胞性因子 XIIa。

可以使用免疫组织学技术来检测存在于组织样品中的细胞性因子 XIIa。例如，可以使用

如下所述的用适当的标签（如荧光性标签）标记的单克隆抗体。

脂结合因子 XIIa

在一种实施方式中，本发明提供一种方法，其包括检测或测定含有组织的样品中的脂结合性 53Kd 因子 XIIa，或者该样品特别是哺乳动物主体、通常为人类的体液。

可以对体液样品（例如全血或血浆）进行脂结合因子 XIIa 的测定。作为可供选择之一，可以从体液或者组织分离脂质部分，并且确定脂质部分的因子 XIIa 含量。可以按照如上所述“因子 XIIa 形式的分离”方法分离脂质组分。例如，通过沉淀方法，可以从组织或者体液（如血浆）中分离脂蛋白。已知用于沉淀脂蛋白的合适试剂包括，例如，包含氯化钠、氯化锰和肝素的试剂，以及磷钨酸盐试剂。多种试剂和方法描述于文献 Demacker, P.N.M et al. Clinical Chemistry Vol. 43, No. 4, 1997, p 663-668；Sharma, A. et al. Clinical Chemistry, Vol. 36, No. 3, 1990, p 529-532。

可以将样品（如血浆）在中速~高速（例如 12,000~16,000 g）下进行离心以除去细胞组分。可以使用已知的脂蛋白沉淀剂来沉淀脂蛋白，该脂蛋白沉淀剂例如是含有氯化钠、氯化锰和肝素的试剂，例如含有大约 500 mM 氯化钠、大约 215 mM 二氯化锰和大约 500 U/ml 肝素的试剂，或者该脂蛋白沉淀剂是磷钨酸盐沉淀剂，例如含有大约 50 mM 磷钨酸盐和常规量的氯化镁的磷钨酸盐沉淀剂。

可以例如通过离心分离所得沉淀物。如需要，可以将沉淀物再悬浮于沉淀剂中并且再次进行分离。该步骤可以重复进行，例如，如需要，可以重复两三次。可以在沉淀步骤之间进行洗涤。

如果在进行测试前，脂结合因子 XIIa 已与其它形式的因子 XIIa 分离，可以使用一种不区分不同形式因子 XIIa 的测试方法，即“普通的”因子 XIIa 测试方法。然而，使用一种即使在预先的分离步骤之后也能相对于其它因子形式优先检测或测定脂结合因子 XIIa 的测试方法可能是有利的。

如果未进行分离步骤，则所使用的测试方法必须能够检测或测定脂结合因子 XIIa。

在进行免疫测试情况下，可以在将样品和抗体接触之前或之后分离脂蛋白组分。优选在样品和抗体接触之后分离脂蛋白组分。

分子复合体和因子 XIIa 与其它分子种类的结合体

按照常规方法，制备出用于测试的含有分子复合体和因子 XIIa 与其它分子种类的结合体的样品（通常为体液样品，参见上文）。

如需要，在进行因子 XIIa 测试之前，可以按照如上所述“因子 XIIa 形式的分离”方法，

分离出包含两种以上因子 XIIa 分子的分子复合体、或者与低亲和性的或高亲和的性结合伴侣结合的因子 XIIa 形式。例如，可以分离出结合于低亲和性结合伴侣的因子 αXIIa、结合于低亲和性结合伴侣的因子 βXIIa、结合于低亲和性结合伴侣的 53Kd 因子 XIIa、结合于高亲和性结合伴侣的因子 αXIIa、结合于高亲和性结合伴侣的因子 βXIIa、以及结合于高亲和性结合伴侣的 53Kd 因子 XIIa。

如果在进行测试前，包含两种以上因子 XIIa 分子的分子复合体、或者与低亲和性的或高亲和性结合伴侣结合的因子 XIIa 形式已与其它形式的因子 XIIa 分离，可以使用一种不区分这类因子 XIIa 形式和其它形式的因子 XIIa 的测试方法，即“普通的”因子 XIIa 测试方法。然而，使用一种即使在预先的分离步骤之后也能相对于其它因子形式优先检测或测定这类因子 XIIa 形式的测试方法可能是有利的。

可以使用在不预先分离一种或多种所研究的因子 XIIa 形式的情况下，能够以优先于其它因子形式的方式来检测或测定一种或多种所研究的因子 XIIa 形式的测试方法。

合适的测试方法，特别是免疫测试，将描述如下。

免疫测试

根据本发明，可以使用一种免疫测试方法，以优先于其它因子形式的方式来检测或测定一种或多种形式的 53Kd 因子 XIIa，所述其它形式的因子 XIIa 优选是非 53Kd 形式的因子 XIIa。根据本发明，可以使用免疫测试方法来测试任何样品。

常用的免疫测试技术

进行免疫测试的方法已为大家所熟知，例如参见如下文献：Tietz Textbook of Clinical Chemistry 2nd Edition Eds. Burtis, C. A. & Ashwood, E. R., Saunders (1994); Methods in Enzymology, H. Van Vunakis and J. J. Langone (Eds), 1981, 72(B); Practice and Theory of Enzyme Immunoassays, P Tijssen, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, R. J. Burden and P. H. Van Knippenberg (Eds), Elsevier, 1985; Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques, T. Chard, ibid, 3rd Edition, 1987; Methods in Enzymology, H. Van Vunakis and J. J. Langone (Eds) 1981, 74(C)。

定性和定量的免疫测试技术包括 ELISA（酶联免疫吸附测试）、Western blotting（蛋白质印迹法）、液相沉淀测试、涂覆颗粒测试、竞争性测试、夹心法测试包括正向、反向和同时进行的夹心法测试，以及固相放射免疫测试（SPRIA）。

通过如下所述技术，或者利用标记的抗体，可以直接检测抗原抗体复合物。

双抗体夹心法测试

根据本发明，可以使用的ELISA形式例子是所谓的“双抗体夹心”测试方法，其中将抗体、特别是能够结合于一种或多种形式的53Kd因子XIIa的单克隆抗体固定在固相载体上，该载体例如是塑料或其它聚合物材料，比如是专有系统如美国伊利诺斯州 Abbott Laboratories，Abbott Park 的 IMx 系统所使用的塑料微量滴定板孔槽、珠子或颗粒。该抗体被称作“捕获抗体”。将样品与固定化捕获抗体接触进行孵育。能结合于固定化抗体的任何形式的53Kd因子XIIa将被固定化抗体“捕获”，由此其本身也被固定化于固相上。使用能够结合于一种或多种形式的53Kd因子XIIa的标记抗体，可以检测捕获于固相上的53kd因子XIIa。这种标记的抗体经常被称为抗体“偶联物”。通过小心选择抗体和/或其它测试条件，可以优化测试方法，使其相对于其它形式的因子XIIa，可以优先测试、检测并/或测定一种或多种特定形式的53Kd因子XIIa，所述其它形式的因子XIIa优选是非53Kd形式的因子XIIa。

标记抗体

用于检测或者检测并/或测定靶抗原的标记抗体可以是多克隆抗体或单克隆抗体。经常很便利地将抗人体抗体，例如抗人体多克隆抗体用作临床用标记抗体。作为选择之一，可以使用结合于所研究的因子XIIa形式的抗体。这类抗体例如可以结合于53Kd因子XIIa的重链。

可直接或间接地检测该标记。可以使用任何合适的放射性同位素作为可直接检测的标签，例如β辐射源或者γ辐射源，其例子有^{125}I、^{131}I、^{3}H和^{14}C。出于商业应用，通常优选非放射性标签是酶标签。可间接地检测酶标记。酶标签例如是碱性磷酸酶或过氧化物酶（例如辣根过氧化酶）。用于所选择酶的合适底物，例如，可以使用产生可检测的光变化或荧光变化的底物，比如酚酞一磷酸盐或荧光底物如4-甲基伞形酮酰磷酸酯。作为选择之一，也可以使用一种能用电化学方法发生的酶反应。

可以使用标记的抗体来检测ELISA中的抗原抗体复合物，或者可以与抗原形成复合物，然后可以检测该复合物。也可以使用流式细胞技术用于该检测。

竞争测试

可以在竞争测试中，使用一种或多种已被标记（例如放射性标记或酶标记）的53Kd形式的因子XIIa，用于测定一种或多种形式的53Kd因子XIIa。

其它免疫测试技术

其它用于检测或测定抗原的免疫测试方法用的是直接检测得到的抗体-抗原复合物。这类技术的例子有表面胞质基因共振技术（Surface Plasmon Resonance）、表面声波和石英晶体微量天平方法论（Suzuki M, Ozawa F, Sugimoto W, Aso S. Anal Bioanal Chem 372:301-4, 2002; Pearson JE, Kane JW, Petraki-Kallioti I, Gill A, Vadgama P. J Immunol Methods ;221:87-94, 1998;

Weisch W, Klein C, von Schickfus M, Hunklinger S. Anal Chem 1996 68:2000-4, 1996; Chou SF, Hsu WL, Hwang JM, Chen CY. Clin Chem 48:913-8, 2002）。

如果标记的抗体与抗原形成复合物，该复合物可以通过流式细胞技术得到检测或测定。

标准和对照

免疫测试通常使用“标准样”作参考点。

典型地，一种适合于检测或者检测和/或测定一种或多种形式的 53Kd 因子 XIIa 的测试方法所用标准样，可以包含含有已知含量的一种或多种适当形式的 53Kd 因子 XIIa 的溶液。作为选择之一，标准样可以包含结合于载体（比如固相）的一种或多种适当形式的 53Kd 因子 XIIa。作为选择之一，可以使用显示出与 53Kd 因子 XIIa 的交叉反应性的非 53Kd 形式的因子 XIIa 作为标准样。任何已知测试因子 αXIIa 的方法可以使用因子 βXIIa 作为标准样，因此由于熟悉使用因子 βXIIa 作为标准样，使得用因子 βXIIa 作为标准样用于 53Kd 因子 XIIa 测试的方法具有一定优势。

用作标准样和对照样的材料可以采用多种形式，这取决于使用的测试方法。对于一些测试方法，合适的材料可以是呈水溶液状态。

典型地，一种适合于检测或者检测和/或测定脂结合性 53Kd 因子 XIIa 的测试方法所用标准样，可以包括含有已知含量脂结合性 53Kd 因子 XIIa 的溶液。作为选择之一，标准样可以包含结合于非脂质载体（例如固相）的 53Kd 因子 XIIa，或者可以使用 53Kd 因子 XIIa 水溶液作为标准样。

典型地，一种适合于检测或者检测和/或测定尿液 53Kd 因子 XIIa 的测试方法所用标准样，可以由含有已知量 53Kd 因子 XIIa 的溶液组成。

免疫组织学

可以使用免疫组织技术来检测存在于组织样品中的一种或多种形式的 53Kd 因子 XIIa。例如，可以使用如上所述用适当的标签（如荧光性标签）标记的单克隆抗体。典型地，使标记的抗体与组织样品接触并进行孵育，接着在不解离任何已形成的抗体-抗原复合物条件下洗去试剂，并且对任何这类复合物进行检测。

显色分析

按照 Vinazzer H.在 Thromb Res.，14，155-66，1979 描述的方法，可以通过使用显色底物测量酶活性来检测或测定一种或多种 53Kd 形式的因子 XIIa。

这种测试方法可以包括将一种或多种形式的 53Kd 因子 XIIa 与其它因子形式分离的步骤，参见上文。

对细胞性 53Kd 因子 XIIa 的免疫测试

在不影响细胞性 53Kd 因子 XIIa（例如不会引起细胞性 53Kd 因子 XIIa 从细胞解离）的合适介质中，通过离心和洗涤（优选至少一次并且尤其优选两次或多次），可以将细胞从体液（如血液或血浆）中分离。合适的液体通常是缓冲液，例如 pH 7.4 的磷酸盐缓冲盐水（PBS）。

对含有细胞的体液样品可以洗涤，高速离心，然后悬浮在合适的液体中得到“洗涤过的细胞”。高速离心可以在 16,000 g 下进行 10 分钟。合适的洗涤和悬浮液的例子是 PBS （pH 7.4）。离心操作可以进行一轮或多轮（例如两三轮或更多轮）。

通过对血液低速离心，例如在 1000g 下离心柠檬酸盐血 10 分钟，可以得到富含细胞的血浆。进一步进行离心，例如，将富含细胞的血浆在 16,000g 下高速离心 10 分钟，得到上清液，称为缺乏细胞的血浆。

对脂结合 53Kd 因子 XIIa 的免疫测试

可以使用 mAb 2/215 或其类似物或其片段（例如 Fab 片段）来进行免疫测试。就捕获测试而言，优选使用 mAb 2/215 或其类似物作为捕获抗体。作为选择之一，根据本发明可以使用 53Kd 因子 Xlla 专一性抗体。可以使用不同的抗体，例如不同的多克隆抗体或不同的单克隆抗体或相同的抗体用于检测。

可以使用直接的免疫测试，例如放射免疫测试。在这种情况下优选使用本发明的单克隆抗体或其类似物或其片段（例如 Fab 片段）。上文已给出了合适标签的例子。

可以在将样品与抗体接触之前或之后分离脂蛋白组分。优选在样品和抗体接触之后分离脂蛋白组分。可以按如上所述“样品制备”部分分离脂蛋白组分。

作为免疫测试的另一种选择，可以通过使用显色底物测量酶活性进行脂结合性 53Kd 因子 XIIa 的检测和/或测定，例如按照 Vinazzer H.在 Thromb Res, 14,155-66,1979 中描述的方法进行。这可以包括一个将一个或多个种类与其它种类分离的阶段（如上文所述）。

对分子复合体和 53Kd 因子 XIIa 与其它分子种类的结合体的免疫测试

在将分子复合体和 53Kd 因子 XIIa 与其它分子种类的结合体免疫测试从其它形式的因子 XIIa 中分离后，可以进行免疫测试，或者在不进行这种分离情况下对样品进行免疫测试。例如，如需要，在进行 53Kd 因子 XIIa 测试之前，可以按照如上所述“53Kd 形式的因子 XIIa 的分离”方法，分离出包含两种以上 53Kd 因子 XIIa 分子的分子复合体、或者与低亲和性的或高亲和性的结合伴侣结合的 53Kd 形式的因子 XIIa。例如，可以分离出结合于低亲和性结合伴侣的因子 αXIIa、结合于低亲和性结合伴侣的因子 βXIIa、结合于低亲和性结合伴侣的 53Kd 因子 XIIa、结合于高亲和性结合伴侣的因子 αXIIa、结合于高亲和性结合伴侣的因子

βXIIa、以及结合于高亲和性结合伴侣的 53Kd 因子 XIIa。

可以使用任何如上所述的免疫测试方法来确定分子复合体和因子 XIIa 与其它分子种类的结合体。如上所述，根据本发明，可优先使用 mAb 2/215 或其类似物作为抗体或者 53Kd 因子 XIIa 特异性抗体，特别是在捕获免疫测试中作为捕获抗体。用于检测的标记抗体应能够结合于被捕获的因子 XIIa 形式。例如，标记抗体可以结合于因子 αXIIa 的重链，结合于因子 βXIIa，或者结合于 53Kd 因子 XIIa。

对尿液 53Kd 因子 XIIa 的免疫测试和其它测试

可以使用任何如上所述免疫测试方法，以相对于其它分子量形式的因子优先确定尿液中一种或多种形式的 53Kd 因子 XIIa。如上所述，根据本发明，可优先使用 mAb 2/215 或其类似物作为抗体或者 53Kd 因子 XIIa 特异性抗体，特别是在捕获免疫测试中作为捕获抗体。

试剂盒

本发明进一步提供一种试剂盒，用于进行本发明的免疫测试，该试剂盒（每一个置于单独的容器中或被间隔化）包含：

(i) 能够结合于一种或多种形式的 53Kd 因子 XIIa 的单克隆抗体，以及

(ii) 能够结合于一种或多种形式的 53Kd 因子 XIIa 的标记抗体，此时一种或多种形式的 53Kd 因子 XIIa 结合于(i)中限定的单克隆抗体，这两种抗体具有如下特征：它们与因子 αXIIa 和因子 βXIIa 之一或两者的校正交叉反应性为 10%以下，更优选 5%以下，更优选 2%以下，更优选 1%以下，更优选 0.5%以下，更优选 0.1%以下。

该试剂盒可以进一步包含用于进行免疫测试的上文所述组分。单克隆抗体可以固定于固体状载体上。

根据本发明的试剂盒可以包含，例如，

(a) 能够结合于一种或多种形式的 53Kd 因子 XIIa 的单克隆抗体，

(b) 典型地由含有已知量一种或多种形式的因子 XIIa 的溶液组成的的标准样，

(c) 当一种或多种形式的 53Kd 因子 XIIa 结合于(i)中限定的单克隆抗体时，能够与一种或多种形式的 53Kd 因子 XIIa 发生反应的标记抗体。

用作标准样和对照样的材料可以采用多种形式，这取决于使用的测试方法。对于一些测试方法，合适的材料可以是呈水溶液状态。在其它的测试方法中，例如该测试方法是将相同的抗体用作 ELISA 中的捕获抗体及检测（偶联物）抗体，所希望的是通过将 53Kd 因子 XIIa 结合于珠子（例如直径 3 μm 的聚碳酸酯珠子）的表面，来制作含有多个因子 XII 分子或其片段、包括多种因子 XIIa 形式的构建体。

上文已给出另一些标准样的例子。

作为另一种选择，试剂盒可以包含标记的因子 XIIa 形式，特别是标记的 53Kd 因子 XIIa 形式，以用于竞争**测试**。

试剂盒（每一个置于单独的容器中）也可以包含其它的组分，例如稀释剂、洗涤试剂溶液和底物溶液。

测试装置

本发明还提供一种测试装置，其适合进行本发明的测试。在此使用的术语“测试装置”是表示一种用于进行免疫测试的设备，包括一种通常为薄片状的固相物，例如膜、片材、条带、涂层、薄膜或其它薄片状物，其上固定有适当的捕获抗体。该固定化抗体优选存在于限定区域，在此称为“抗原捕获区”。

测试装置可以将固相整合于一刚性载体或容器之内，其也可以包含一些或所有进行测试所需要的试剂。通常将样品施加于测试装置的预定的样品涂敷区，例如将样品倾注于或滴于该区域，或者把装置有关部分浸入样品中。样品涂敷区与抗体捕获区处于不同的位置，装置的配置通常使得样品中抗原可以迁移到抗体捕获区。然后以适当的顺序将需要的试剂施加于指定涂敷区，该区域可以与样品涂敷区相同也可以不同。同样，如果所述的或者任何的试剂涂敷区与抗体捕获区处于不同位置，装置的配置通常是使得试剂迁移到抗体捕获区，在此处检测任何形成的抗原抗体复合物。可以将所有或一些免疫测试所需要的试剂以液体或干燥形式整合在装置之内。如果这样，通常将装置配置得使装置的不同部分之间产相互作用，该相互作用可以在装置的操作期间自动发生；也可以由装置的用户按正确的免疫测试顺序使多种试剂彼此接触，进行相互作用。

在免疫测试文献中已描述了多种测试装置。美国专利 Nos. 4,623,461 和 4,693,984 描述了膜装置的例子。取决于它们的设计和它们的作用速率，一些测试装置被称作“测试杆” 装置，而另一些测试装置被称作“快速测试”装置。“快速测试”装置通常在样品涂敷后十分钟内给出结果。（一个典型的微量滴定板或珠子测试要求有孵育步骤，并且通常至少要花 1 小时方能给出结果。）因此，虽然测试装置通常比微量滴定法或珠子形式的测试方法更昂贵，但例如当要求迅速出结果（例如在急诊情况）时，它们在临床试验中具有特殊的用途。

测试装置具有特别的优点，即，它们可以无需复杂的实验室设备就可进行，甚至不需要任何实验室设备。因此它们可以用于“及时照顾”试验，例如在急救室、手术中、配药时，或者在某些情况下用于家庭检测。它们在缺少实验室设备的边远地区尤其有用。

抗体交叉反应性

本发明的抗体与因子 αXIIa 和因子 βXIIa 之一或两者的校正交叉反应性为 10%以下，更优选 5%以下，更优选 2%以下，更优选 1%以下，更优选 0.5%以下，更优选 0.1%以下。优选抗体与因子 XII 具有低的交叉反应性，例如为 0.5%以下，更优选 0.1%以下。在评价本发明的抗体与因子 αXIIa、因子 βXIIa 和因子 XII 的交叉反应性时，要考虑的因素是，即使“纯的”这类蛋白质制品几乎都不可避免被少量的 53Kd 因子 XIIa 污染。同样，如 Silverberg 和 Kaplan 在文献 Blood. 60，1982，64-70 中所述，因子 XII 制品不可避免地被因子 XIIa 污染。WO 90/08835 给出了评价与因子 XII 校正交叉反应性的方法详述，这类方法适用于评价与因子 αXIIa 和因子 βXIIa 的校正交叉反应性。如非另有说明，在此使用的术语“交叉反应性”的含义是指校正的交叉反应性。

用于生产单克隆抗体的方法已为大家所熟知，参见文献 Methods in Enzymology, H. Van Vunakis and J. J. Longone (Eds) 1981, 72(B) and ibid, 1983 92(E)。例如可以用 Kohler 和 Milstein 方法的改进法（G. Kohler and C. Milstein, Nature, 1975, 256, 495）生产单克隆抗体。

WO 90/08835（被引入本文作为参考）其大体描述了如何生产结合于因子 αXIIa 和因子 βXIIa 的抗体的方法，该抗体显示出与因子 XII 的校正交叉反应性为 0.1%以下，该专利还给出了 mAb 2/215 和 mAb 201/9 的生产细节。其中描述的可以用于生产单克隆抗体的一般方法和特别方法，可适用于根据本发明生产单克隆抗体，例如结合于 53Kd 因子 XIIa 但不结合一种或多种非 53Kd 形式因子 XIIa 的单克隆抗体。

基于 WO 90/08835 公开的内容，WO 04/057343 的实施例 22 给出了适用于根据本发明生产单克隆抗体的总方案，将其引入本文作为参考。

用于生产单克隆抗体的方法已为大家所熟知，参见文献 Methods in Enzymology, H. Van Vunakis and J. J. Longone (Eds) 1981, 72(B) and ibid, 1983 92(E)。例如可以用 Kohler 和 Milstein 方法的改进法（G. Kohler and C. Milstein, Nature, 1975, 256, 495）生产单克隆抗体。生产单克隆抗体中使用的抗原可以是因子 αXIIa 或 53Kd 因子 XIIa。可以从得到的单克隆抗体中筛选出那些显示出不显著结合于一种或多种非 53Kd 形式因子 XIIa 的单克隆抗体，例如其与因子 αXII 或 βXII 的校正交叉反应性为 0.1%以下。

可以从得到的单克隆抗体中筛选出那些按预期结合于 53Kd 因子 XIIa 形式的单克隆抗体，例如结合于细胞性 53Kd 因子 XIIa、脂结合性 53Kd 因子 XIIa、53Kd 因子 XIIa 与其它因子 XIIa 分子的复合体或结合体、或者 53Kd 因子 XIIa 与高亲和性的或低亲和性的结合伴侣的复合体或结合体的单克隆抗体。

在筛选结合于特定的结合性 53Kd 因子 XIIa 形式的抗体中，优选分别使用单克隆抗体

2/215 或者 201/9 作为参照抗体。与所选择的抗体与所选择的 53Kd 因子 XIIa 形式的结合特性，可以分别与 mAb 2/215 或 201/9 的结合特性相同、相类似或者不同。

本发明不限于鼠源或半鼠源的杂交瘤。可以从任何合适的动物得到两种融合伴侣（脾细胞和骨髓瘤）。

可以生产出重组体抗体。如需要，抗体可以采用嵌合形式或人源化形式。优选杂交瘤进行体外培养。

多克隆抗体

本发明还提供了能选择性地与一种或多种形式的 53Kd 因子 XIIa 发生反应的多克隆抗体，也称为多克隆抗血清。这类抗体在 ELISA 中可以进行标记并且用于检测一种或多种捕获形式的 53Kd 因子 XIIa。

本发明还提供了一种用于生产这种多克隆抗血清的方法，其包括：将存在于 53Kd 形式的因子 XIIa 中的抗原给药于动物，从动物身上得到血清，筛选用于结合一种或多种形式的 53Kd 因子 XIIa 的血清。某些情况下，因子 XII 或非 53Kd 形式的因子 XIIa 可以用作抗原。

尿液测试

本发明还包括一种方法，其包括检测或测定包含主体尿液的样品中的 53Kd 因子 XIIa。在本发明的实施方式中，可能没必要相对于其它结合形式的因子 XIIa 优先检测或测定任何一种或多种结合形式的 53Kd 因子 XIIa。可以使用一种不区分结合形式因子的测试方法。这样一种测试方法例如可以是显色分析或免疫测试。

使用一种可以区分不同分子量形式的因子 XIIa 的测试方法来测试尿液中 53Kd 因子 XIIa，可以提供与肾功能、肾病和肾损伤有关的有用信息，因为尿液中因子 XIIa 浓度是肾功能、肾病和肾损伤的灵敏标志，特别在没有大量蛋白尿的情况下。相对于健康主体，主体尿液中因子 XIIa 浓度的升高意味着肾功能降低、肾病和肾损伤中的任何一种。尿中因子 XIIa 浓度的变化可能预示着临床方面的变化，例如治疗条件恶化或改善。

临床和其它用途

本发明，特别是如上所述免疫测试，提供了一种可以容易地在大规模使用的自动化设备上使用的、检测和/或测定不同 53Kd 因子 XIIa 形式的方法。

因子 XII 和其主要的活化形式，53Kd 因子 XIIa，被认为参与了凝血及其它接触系统，亦称接触相系统，例如纤维蛋白溶解、补体级联系统、炎症和血管扩张等，参见文献：Jacobsen S. and Kriz M., Br J Pharmacol., 29, 25-36, 1967; Kurachi K et al, Biochemistry, 19, 1330-8 1980; Radcliffe R et al, Blood, 50, 611-7, 1977; Ghebrehiwet B et al, J Clin Invest,71, 1450-6, 1983; Z

Toossi et al, Proc Natl Acad Sci U.S.A, 89, 11969-72, 1992; Wachtfogel YT et al, Blood 67, 1731-7, 1986; Wachtfogel YT et al, Thromb Haemost, 80, 686-91, 1998; and Schreiber et al AD, J Clin Invest, 52, 1402-9, 1973。

作为因子 XII 及其主要的活化形式的 53Kd 因子 XIIa，参与了凝血，并且在维持血管完整性和血压、影响内皮细胞多种功能、控制纤维蛋白溶解和维持血管内组成性抗凝因子特性方面具有作用，特定形式的 53Kd 因子 XIIa 的测定在一些系统例如包括血纤蛋白溶解、补体级联系统和血管舒张的研究中很有用，还对与血栓形成和血管狭窄有关的研究有用。

临床和实验研究表明，包括 53Kd 因子 XIIa 的接触系统参与了急性和慢性炎症，包括脓毒性休克在内的不同病原性休克，糖尿病，变态反应，包括弥漫性血管内凝血在内的凝血-出血紊乱，癌症，心血管疾病例如心肌梗死、咽峡炎和急性冠状动脉综合症，血管生成，脓毒病，自发性流产，以及血栓栓塞。

53Kd 因子 XIIa 参与凝血、维持血管完整性和血压、控制血纤蛋白溶解、和维持血管内组成性抗凝因子特性，支持了临床和实验观察的 53Kd 因子 XIIa 参与下述的观点：包括弥漫性血管内凝血在内凝血-出血紊乱，癌症，心血管疾病例如心肌梗死、咽峡炎和急性冠状动脉综合症，血管生成，以及血栓栓塞。

因子 XIIa，包括其主要的 53Kd 形式在内，存在于被激活/参与炎性过程的粒细胞上。进一步的观察支持了临床和实验研究的下述现象：因子 XIIa 在多种情况下参与了炎症例如急性和慢性炎症、包括脓毒性休克在内的不同病原性休克、变态反应、癌症和脓毒病。

因此，特定形式的 53Kd 因子 XIIa 的检测和/或测定可能对有接触系统参与的疾病和紊乱的临床及科学研究有用，包括用于对这种疾病或紊乱的感病性、进展或结果进行诊断、监测或预测，或者对患有或怀疑患有疾病或紊乱的主体的治疗进行诊断、监测或预测。这类疾病和紊乱包括：急性和慢性炎症，不同病原性休克，糖尿病，变态反应，包括弥漫性血管内凝血和血栓栓塞在内的凝血-出血紊乱，血栓形成和血管狭窄，癌症，心血管疾病例如心肌梗死，咽峡炎和急性冠状动脉综合症，血管生成，脓毒病，以及自发性流产。

因此，检测或测定一种或多种形式的 53Kd 因子 XIIa，有助于对疾病或紊乱的感病性、过程或结果进行诊断、监测或预测，或者对患有或怀疑患有疾病或紊乱的主体的治疗进行诊断、监测或预测，其中该疾病或紊乱主体的一种或多种 53Kd 形式的因子 XIIa 含量与健康主体不同。一种或多种 53Kd 形式的因子 XIIa 浓度的改变可能预示着如上所述的任何疾病和紊乱。主体体内在所述浓度随时间进行的这种变化可能预示着状况变化，例如治疗条件恶化或改善。这类对疾病或紊乱的感病性、过程或结果，或者对疾病或紊乱的治疗进行诊断、监测、

预测的方法，称为“诊断、预测和监测”，属于本发明的内容。

另外，已知尿液中因子 XIIa 是肾功能、肾病和肾损伤的灵敏标志，并且因此对尿液中 53Kd 因子 XIIa 的检测或测定可能会提供出有关肾功能、肾病和肾损伤的有用信息。

诊断、预测和监测

本发明提供了一种方法，用于对疾病或紊乱的感病性、过程或结果进行诊断、监控或预测，或者对患有或怀疑患有疾病或紊乱的主体的治疗进行诊断、监控或预测，该方法包括：以优先于其它因子 XIIa 形式的方式来检测或测定主体样品中一种或多种形式的 53Kd 因子 XIIa，所述其它形式的因子 XIIa 优选是非 53Kd 形式的因子 XIIa；以及将该主体试样的测试结果与使用相同方法测试如下至少一种或多种主体试样所得结果进行比较：

(i)患有疾病或紊乱的主体；

(ii) 患有疾病或紊乱的主体，对其疾病或紊乱的进展和/或结果进行了监测；

(iii) 患有疾病或紊乱并在治疗中的主体；

(iv) 患有疾病或紊乱并在治疗中的主体，针对该疾病或紊乱的进展和/或结果，对该主体的治疗进行监测；

(v) 未患疾病或紊乱的主体；

(vi) 在疾病或紊乱发作前或者在疾病或紊乱的治疗开始前的同一主体；以及

(vii) 疾病或紊乱早期或晚期、或者疾病或紊乱的治疗早期或晚期、或者在疾病或紊乱发作前的同一主体。

样品可以是如上所述任何样品。例如，样品可以是体液样品，例如血液、血浆、血清、尿液、脑脊液、唾液、或眼泪。

该测试方法可以用于检测和/或检测和/或测定一种或多种 53Kd 形式的因子 XIIa，例如任何一种或多种选择的因子形式，例如任何一种或多种细胞性 53Kd 因子 XIIa、脂结合性 53Kd 因子 XIIa 和尿液因子 53Kd XIIa。

如上所述，通过设计测试方法，可以实现或提高用于一种或多种形式因子 XIIa 的测试方法相对于其它因子形式优选非 53Kd 形式因子 XIIa 测试方法的专一性。就免疫测试而言，这种设计可以包括：对所用抗体或抗体组合的任何一种或多种选择；对使用、不使用洗涤剂和其品种的选择；以及在包含有涂覆于固相上抗体的抗原捕获测试情况下涂覆板的条件的选择，参见上文。

53Kd 因子 XIIa 测试方法可以是免疫测试，其包括使用能结合于所研究的一种或多种形式 53Kd 因子 XIIa 的抗体。该测试方法中，将能结合于所研究的一种或多种形式 53Kd 因子

XIIa 的抗体固定在固相上作为捕获抗体。

作为另一种选择或者另外还有的，用标签标记能结合于所研究的一种或多种形式 53Kd 因子 XIIa 的抗体，该标签可直接或间接地检测。

在免疫测试中，能结合于所研究的一种或多种形式 53Kd 因子 XIIa 的抗体可以是 mAb 2/215 或其类似物、mAb 201/9 或其类似物、或者能结合于 53Kd 因子 XIIa 的多克隆抗体。然而，如果使用不能区分 53Kd 因子 XIIa 和非 53Kd 形式因子 XIIa 的抗体比如 mAb 2/215，有必要使用将将分离或分辨不同分子量形式的因子 XIIa 的方法联合使用的测试方法。

在一种免疫测试中，其中使用了 mAb 2/215 或其类似物、mAb 201/9 或其类似物、或者能结合于 53Kd 因子 XIIa 的多克隆抗体，则可以用可直接或间接地检测的标签来标记抗体，和/或可将抗体固定在固相上作为捕获抗体。

可以使用如上限定的标记抗体来检测或测定被限定抗体捕获的 53Kd 因子 XIIa。

所研究的疾病或紊乱可以是如上 在“临床应用”部分所述的任何一种，例如：凝血系统疾病和紊乱；包括血凝（hemaocoagulation）、纤维蛋白溶解、激肽原生成、补体激活或血管生成、维持血管完整性和维持血压，维持血管内组成性抗凝因子特性、或者组织防御和修复等在内的临床状况；包括急性或慢性炎症、任何病原性休克、糖尿病、变态反应、凝血-出血紊乱、脓毒病、自发性流产或癌症等在内的的临床状况；包括血管内凝血或血栓栓塞、血栓形成或血管狭窄、心肌梗死、急性冠状动脉综合症或咽峡炎等在内的临床状况。

临床或病理状况的治疗可以包括治疗剂给药，和/或可以包括外科手术步骤。例如，治疗血栓形成或血管狭窄可以包括冠状动脉血管成形术和/或溶栓。

测试一系列主体样品可能是有利的，所述样品例如，在疾病或紊乱过程期间得到的样品和/或在疾病或紊乱的治疗期间和/或在治疗开始之前得到的样品。

疾病或紊乱可以是或者包括血栓形成或血管狭窄，和/或治疗可以包括冠状动脉血管成形术或溶栓。

如上所述，尿液中因子 XIIa 是肾功能、肾病和肾损伤的灵敏标志。

本发明涉及一种诊断或监测疾病或紊乱的方法，其中 53Kd 因子 XIIa、特别是患有疾病或紊乱的主体尿液中的 53Kd 因子 XIIa 浓度不同于健康主体的 53Kd 因子 XIIa。

本发明提供一种诊断或监测疾病或紊乱、或者监测疾病或紊乱的治疗的方法，其包括检测或测定 53Kd 因子 XIIa、特别是患有或怀疑患有疾病或紊乱的主体尿液中的 53Kd 因子 XIIa 浓度。

例如，本发明提供一种方法，用于诊断或监测肾功能、肾病或肾损伤，或者用于监测患

有或怀疑患有肾功能降低、肾病或肾损伤的主体的肾功能降低、肾病或肾损伤的治疗，其包括检测或测定主体样品中 53Kd 因子 XIIa。

通常，将主体试样的测试结果与使用相同方法测试如下至少一种或多种主体试样所得结果进行比较：

(i) 患有疾病或紊乱的主体，例如，患有肾功能降低、肾病或肾损伤；

(ii) 患有疾病或紊乱的主体，例如患有肾功能降低、肾病或肾损伤，监测该主体的疾病或紊乱例如肾功能降低、肾病或肾损伤的过程和/或结果；

(iii) 患有疾病或紊乱例如肾功能降低、肾病或肾损伤的主体，并且在对其进行治疗；

(iv) 患有疾病或紊乱例如肾功能降低、肾病或肾损伤的主体，并且在进行治疗，针对该疾病或紊乱例如肾功能降低、肾病或肾损伤的进展和/或结果，对该主体的治疗进行监测；

(v) 未患有疾病或紊乱例如肾功能降低、肾病或肾损伤的主体；

(vi) 在疾病或紊乱例如肾功能降低、肾病或肾损伤发作前的，或者在疾病或紊乱例如肾功能降低、肾病或肾损伤的治疗开始前的同一主体；和

(vii) 在疾病或紊乱例如肾功能降低、肾病或肾损伤的早期或晚期，或者在疾病或紊乱例如肾功能降低、肾病或肾损伤进行治疗的早期或晚期，或者在疾病或紊乱例如肾功能降低、肾病或肾损伤发作前的同一主体。

通过一种能优先于其它形式的因子 XIIa 检测或测定一种或多种形式 53Kd 因子 XIIa 的测试方法，可以检测或测定 53Kd 因子 XIIa，所述其它形式的因子 XIIa 优选是非 53Kd 形式的因子 XIIa。

下述非限制性实施例用于阐明本发明。

实施例

实施例 1

在该实施例中，通过结合用放射性示踪剂（^{125}I）标记的抗体片段，并且基于分子量不同，使用高效液相色谱（HPLC）分离得到的复合体，从而显示出血浆中存在 53Kd 活化因子 XII。

根据厂商的指导，使用试剂盒“Immunopure Fab Preparation Kit”（Pierce，3747 N Meridian Road，PO Box 117，Rockford，IL 61105，美国）制备出抗体 2/215 的 Fab 抗体片段。然后将 Fab 片段交由 Amersham Pharmacia Biotech 公司（Pollards Wood, Nightingales Lane，Chalfont St Giles, HP8 4SP，英国）用 ^{125}I 进行放射性标记。

将 1 μlf 放射性标记的抗体加入到 1 ml 众多健康志愿者中每个人的血浆中。在孵育 4 小时后，通过高效液相色谱(HPLC)分离血浆组分。所使用的 HPLC 系统是 Agilent Technologies，

Santa Clara，CA，USA 公司的 Agilent 1100 系统。

用于 HPLC 的流动相是 0.1 M NaCl 0.05M Tris HCl、0.4%（w/v）柠檬酸三钠（pH 7.5）。固定相包含 2x30 cm BioSep-SEC- S 3000 串联柱（Phenomenex，Queens Avenue，Hurdsfield Industrial Estate，Macclesfield，Cheshire SKlO 2BN，英国）。流速是 0.7 ml min^{-1} 并且注射体积是 100 μl。

通过测量 280 nm 处吸光度，并且通过使用流量-计数放射色谱检测器（Flow-Count Radiochromatography detector，LabLogic，Sheffield，英国）监测放射性，来监测 HPLC 洗脱液。

放射性对时间的曲线的实施例如图 7 所示，从图中可以看出，由于抗体片段与血浆中种类的结合体的分子量为 83 Kd 左右，此处有一最大峰值，表明其为 30kd 放射性标记 Fab 与 53Kd 左右血浆种类的结合体。

实施例 2

使用 Ciphergen 表面增强激光解吸和电离-飞行时间（Ciphergen Surface Enhanced Laser Desorption and Ionisation - Time of Flight，SELDI-TOF）系统（Ciphergen Biosystems 公司，Fremont，Ca，美国），进行质谱分析。

通过每个阵列点中加入 2 μl 抗体溶液(0.2 mg/ml PBS)和 3 μl 的 50mM $NaHCO_3$(pH 8.2)，将抗活化因子 XII 的单克隆抗体 2/215 和 201/9 以及非专一性鼠源单克隆抗体作为对照样偶联于预先活化的 RS-100 SELDI- TOF 芯片（Ciphergen 公司），并且在湿容器内于室温下孵育 1 小时。孵育结束后，除去抗体溶液，并且每个阵点加入 4 μl 封闭溶液（2 mg/ml PBS 中的牛血清白蛋白），在湿容器内于室温下孵育 20 分钟。除去封闭溶液后，每个阵列在 15 ml PBS 中洗涤两次，每次 5 分钟。

将 100 μl 血浆和 200 μl PBS 施加于使用 96 孔生物处理器(Ciphergen)的 ProteinChip Array 的每个点上。然后在平板式振荡器上于室温下孵育样品 50 分钟。然后用含有 0.05 %三硝基甲苯 X-100 的 PBS 洗涤阵列（200 ul 每点）三次，每次 5 分钟。然后用每点 200μl 的 PBS 洗涤每个点两次以上，每次 5 分钟。然后用 15 ml 蒸馏水漂洗每个阵列 5 秒钟。在空气干燥后，将 0.5ml 在 500 ml/ L 乙腈、5 ml/L 三氟乙酸中饱和的 EAMl（Ciphergen 公司）施加于每个点两次。使用 ProteinChip 阅读机检测与固定在 RS1OO ProteinChip 阵列上的抗体结合的蛋白质。图 8 显示出抗活化因子 XII（2/215 和 201/9，分别标记为“Ab 215”和“Ab 2019”）的抗体与 53Kd 左右的血浆组分起反应，同时未观察到该物质与对照样抗体发生互相作用（图 8）。

实施例 3

用 500 μl 醋酸钠缓冲液（pH 5）洗涤 80 ul Interaction Discovery Beads（Ciphergen 公司）三次。然后将这些珠子均分于 4 个 Eppendorf 试管，并且将 40μg 在 1.5 ml 的 50 mM 醋酸钠缓冲液（pH 5.0）中的抗体加入每个试管，并且在振荡器上于 4 ℃ 下孵育过夜。除去上清液（抗体溶液）后，用 1000 μl 的 50 mM 醋酸钠缓冲液（pH 5.0）洗涤珠子一次。然后在涡动混合器上于室温下用 1000 μl 封闭溶液（2 mg/ml PBS 中的 BSA ）孵育珠子 20 分钟，并且用 1000μl PBS、0.02%三硝基甲苯 X-100 洗涤两次，并且用 500μl 1X PBS 洗涤一次。

将 300 μl 血浆+600μl PBS、0.02%三硝基甲苯 X-100 加入到珠子中，并且在涡动混合器上于室温下孵育 1 小时。然后用 1000μl PBS、0.02%三硝基甲苯 X-100 洗涤这些珠子两次，每次 15 分钟，并且用 1000 μl PBS 洗涤两次，每次 15 分钟，并且用 1000 μl 水洗涤一次，洗涤时间 15 秒。加入 40 μl 样品缓冲液以洗脱蛋白质。

将洗脱液进行凝胶电泳，并且切除跑胶带上 53Kd 左右的条带，进行胰蛋白酶消化。参见 Fenselau, C. 1997. MALDI-MS and strategies for protein analysis. Anal. Chem. 661A-665A. Jungblut, P. and Thiede., B. 1997. Protein identification from 2-DE gels by MALDI mass spectrometry. Mass Spectrom. Rev. 16:145- 162. Patterson, S.D. and Aebersold, R. 1995. Mass spectrometric approaches for the identification of gel-separated proteins. Electrophoresis 16:1791-1814。然后使用 Ciphergen ProteinChip Reader 阅读机，对消化液进行 MALDI-TOF（基体辅助激光解吸电离-飞行时间质谱分析法）分析。得到的一部分肽模式如图 9 所示。将得到的肽模式与数据库中的肽模式进行对比，结果表明 53Kd 蛋白质衍生于因子 XII，但缺失了大约 115 个氨基端残基。

实施例 4

该实施例显示，53Kd 形式因子 XIIa 的测定可以对怀疑患有心肌梗死和/或急性冠状动脉综合症的入院病人的全部病因引起的死亡率提供风险预测。

采集了 871 位住院病人的检测数据。使用优先测量 53Kd 形式因子 XIIa 的测试方法，对每个病人的因子 XIIa 进行测量。研究这些测试方法的数据，以确定其是否对所有病因的死亡率的初步临床终点提供预测。

通过将 53Kd 因子 XIIa 值分等级（从低到高），然后将个体总体分为四等分，即，具有最低的 53Kd 因子 XIIa 浓度的 25%对象分为第一个四分位，同时最高 53Kd 因子 XIIa 浓度的 25%个体处于第 4 个四分位，从而确定该测试方法对预后症状的应用。

在样品与 ^{125}I 标记的抗体反应后，使用高效液相色谱测量 53kD 形式的 XIIa。

根据厂商的指导，使用试剂盒“Immunopure Fab Preparation Kit”（Pierce，3747 N Meridian Road，PO Box 117，Rockford，IL 61105，美国）制备出抗体 2/215 的 Fab 抗体片段。然后将 Fab 片段交由 Amersham Pharmacia Biotech 公司（Pollards Wood, Nightingales Lane，Chalfont St Giles, HP8 4SP，英国）用 ^{125}I 进行放射性标记。

将 1 μl 放射性标记的抗体加入到 1 ml 众多健康志愿者中每位的血浆中。在孵育 4 小时后，通过高效液相色谱（HPLC）分离血浆组分。所用 HPLC 系统是 Agilent 1100 系统。

用于 HPLC 的流动相是 0.1 M NaCl 0.05M Tris HCl、0.1m.4%（w/v）柠檬酸三钠（pH 7.5）。固定相包含 2x30 cm BioSep-SEC- S 3000 串联柱（Phenomenex，Queens Avenue，Hurdsfield Industrial Estate，Macclesfield，Cheshire SKlO 2BN，英国）。流速是 0.7 ml min^{-1}，并且注射体积是 100 μl。

通过测量 280 nm 处吸光度，并且通过使用流量-计数放射色谱检测器（Flow-Count Radiochromatography detector，LabLogic，Sheffield，英国）监测放射性，来监测 HPLC 洗脱液。

将分子量标准样用于测量，并且通过对比，可以识别出 53Kd XIIa 峰值。在该峰下面的积分面积（放射性信号）提供了 53kD 形式的 XIIa 的定量测定。通过使用具有已知数量的 30Kd 形式 XIIa（βXIIa）标准样进行测试，得到了定量校正值。

表 1 显示了与不同跟踪时间点时 53kD 形式的 XIIa 浓度有关的所有病因的死亡率的相对风险。在所有情况下，那些具有最高的 53Kd XIIa 浓度的病人在统计上具有显著提高的死亡风险。这对所有病人都是符合的，这些病人患有心肌梗死（确定为可容许的肌钙蛋白 T（TnT）大于 0.05 mg/ml 的病人），但尤其指肌钙蛋白阴性的（TnT 小于或等于 0.05 ng/ml）患有胸痛的病人。图 10~12 显示了所有病人的 Kaplan Meier 存活曲线，这些病人分别指可容许的 TnT 大于 0.05 ng/ml 的病人，以及 TnT 小于或等于 0.05 ng/ml 的病人。

表 1 对应于 53Kd XIIa 浓度的所有病因死亡率的比值比

53Kd 因子 XIIa 四分位

53Kd 因子 XIIa 四分位（pM 范围）		Q1（<25.0）	Q2（25.0-35.0）	Q3（35.1-55.0）	Q4（>55.0）
30 天	所有病号	1.00	1.68	1.52	4.34**
	TnT≤0.05 ng/mL	1.00	1.00	3.12	16.1**
	TnT>0.05 ng/mL	1.00	1.33	0.88	2.45*
6 个月	所有病号	1.00	2.09	2.39*	5.38**
	TnT≤0.05 ng/mL	1.00	2.12	4.10	15.7**
	TnT>0.05 ng/mL	1.00	1.84	2.31	3.92**
12 个月	所有病号	1.00	1.64	1.82	3.93**
	TnT≤0.05 ng/mL	1.00	4.30	7.95*	24.98**
	TnT>0.05 ng/mL	1.00	1.62	1.64	2.10*

*p<0.05 **p<0.01

实施例 5

该实施例显示，测定 53Kd 形式的因子 XIIa 的浓度变化，可以对患有心肌梗死的入院病人提供二级心肌梗死的风险预测。

采集了 315 位住院病人的检测数据。得到了入院时和入院 4 天后的血液样品。使用优先测量 53Kd 因子 XIIa 的测试方法，对每个病人的因子 XIIa 进行测量。研究这些测试的数据，确定 53Kd 形式的因子 XIIa 的浓度是否变化以提供在入院 30 天内二级心肌梗死的初步临床终点的预测。在 30 天的跟踪中，24 病人患上了二级心肌梗死。

在样品与 ^{125}I 标记的抗体反应后，使用高效液相色谱测量 53kD 形式的 XIIa。

根据厂商的指导，使用试剂盒“Immunopure Fab Preparation Kit”（Pierce，3747 N Meridian Road，PO Box 117，Rockford，IL 61105，美国）制备出抗体 2/215 的 Fab 抗体片段。然后将这些Fab片段交由 Amersham Pharmacia Biotech 公司（Pollards Wood, Nightingales Lane，Chalfont St Giles, HP8 4SP，英国）用 ^{125}I 进行放射性标记。

将 1μl 放射性标记的抗体加入到 1 ml 众多健康志愿者中每位的血浆中。在孵育 4 小时后，通过高效液相色谱（HPLC）分离血浆组分。所用 HPLC 系统是 Agilent 1100 系统。

HPLC 的流动相是 0.1 M NaCl 0.05 M Tris HCl、0.4%（w/v）柠檬酸三钠（pH 7.5）。固定相包含 2x30 cm BioSep-SEC- S 3000 串联柱（Phenomenex，Queens Avenue，Hurdsfield Industrial Estate，Macclesfield，Cheshire SKlO 2BN，英国）。流速是 0.7 ml min^{-1}，并且注射体积是 100 μl。

通过测量 280 nm 处吸光度，并且通过使用流量-计数放射色谱检测器（Flow-Count Radiochromatography detector, LabLogic, Sheffield, 英国）监测放射性，来监测 HPLC 洗脱液。

将分子量标准样用于测量，并且通过对比，可以识别出 53Kd XIIa 峰值。在该峰下面的积分面积（放射性信号）提供了 53kD 形式的 XIIa 的定量测定。通过使用具有已知量的 30Kd 形式的 XIIa（βXIIa）标准样进行测量，得到了定量校正值。

通过将 53Kd 因子 XIIa 变化值分等级（从低到高），然后将个体总体分为四等分，即，在入院时和入院 4 天间 53Kd 因子 XIIa 浓度降低最大的 25%个体分为第一个四分位，同时 53Kd 因子 XIIa 浓度提高最大的 25%个体处于第 4 个四分位，从而确定该测试方法对预后性症状的应用。

53kD 形式的 XIIa 的浓度变化分布（表示为 pM）如图 13 所示，并且 53kD 形式的 XIIa 的浓度相对变化（表示为相对于入院值的百分比变化）如图 14 所示。

根据 53kD XIIa 浓度变化的事故发生率显示于表 2。53kD XIIa 浓度变化的绝对值和相对值（相对入院值的百分比变化）与风险值的相关性很强。对于 XIIaA 浓度绝对值变化，Q4 中复发性 TnT 阳性情况同 Q1 中情况相比的比值比是 15.36（p = 0.0046），并且相对于入院值的百分比变化是 13.97（p = 0.0062）。因此，可以得出如下结论：从因心肌梗死入院到 4 天后 53kD 形式的 XIIa 浓度变化，可以显著预测在 30 天跟踪期间的心肌梗死情况。

表 2 与在因心肌梗死入院时和入院 4 天后之间的 53kD XIIa 浓度变化相关的在住院后 30 天内 TnT 阳性心脏病发病情况

pM 变化	Q1	Q2	Q3	Q4
复发性 TnT+ 发生次数	1	4	6	13
比值比（p）	1.0	4.16（0.104）	6.41（0.044）	15.36（0.0046）
53kD XIIa 浓度变化（表示为入院值的百分比）	Q1	Q2	Q3	Q4
复发性 TnT+ 发生次数	1	4	7	12
比值比（p）	1.0	4.16（0.104）	7.58（0.030）	13.97（0.0062）

<110> 埃克西斯一希尔德诊断有限公司

<120> 因子 XIIa 形式

<130> 10708WO TJH

<150> GB 0500487.4

<151> 2005-01-11

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 226

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Lys Cys Phe Glu Pro Gln Leu Leu Arg Phe Phe His Lys Asn Glu Ile
1 5 10 15

Trp Tyr Arg Thr Glu Gln Ala Ala Val Ala Arg Cys Gln Cys Lys Gly
20 25 30

Pro Asp Ala His Cys Gln Arg Leu Ala Ser Gln Ala Asn Pro Cys Leu
35 40 45

His Gly Gly Arg Cys Leu Glu Val Glu Gly His Arg Leu Cys His Cys
50 55 60

Pro Val Gly Tyr Thr Gly Pro Phe Cys Asp Val Asp Thr Lys Ala Ser
65 70 75 80

Cys Tyr Asp Gly Arg Gly Leu Ser Tyr Arg Gly Leu Ala Arg Thr Thr
85 90 95

Leu Ser Gly Ala Pro Cys Gln Pro Trp Ala Ser Glu Ala Thr Tyr Arg
100 105 110

Asn Val Thr Ala Glu Gln Ala Arg Asn Trp Gly Leu Gly Gly His Ala
115 120 125

Phe Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Ile Arg Pro Trp Cys Phe Val Leu
130 135 140

Asn Arg Asp Arg Leu Ser Trp Glu Tyr Cys Asp Leu Ala Gln Cys Gln
145 150 155 160

Thr Pro Thr Gln Ala Ala Pro Pro Thr Pro Val Ser Pro Arg Leu His
165 170 175

Val Pro Leu Met Pro Ala Gln Pro Ala Pro Pro Lys Pro Gln Pro Thr
180 185 190

Thr Arg Thr Pro Pro Gln Ser Gln Thr Pro Gly Ala Leu Pro Ala Lys
195 200 205

Arg Glu Gln Pro Pro Ser Leu Thr Arg Asn Gly Pro Leu Ser Cys Gly
210 215 220

Gln Arg
225

<210> 2

<211> 243

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Val Val Gly Gly Leu Val Ala Leu Arg Gly Ala His Pro Tyr Ile Ala
1 5 10 15

Ala Leu Tyr Trp Gly His Ser Phe Cys Ala Gly Ser Leu Ile Ala Pro
20 25 30

Cys Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Gln Asp Arg Pro Ala Pro
35 40 45

Glu Asp Leu Thr Val Val Leu Gly Gln Glu Arg Arg Asn His Ser Cys
50 55 60

Glu Pro Cys Gln Thr Leu Ala Val Arg Ser Tyr Arg Leu His Glu Ala
65 70 75 80

Phe Ser Pro Val Ser Tyr Gln His Asp Leu Ala Leu Leu Arg Leu Gln
85 90 95

Glu Asp Ala Asp Gly Ser Cys Ala Leu Leu Ser Pro Tyr Val Gln Pro
100 105 110

Val Cys Leu Pro Ser Gly Ala Ala Arg Pro Ser Glu Thr Thr Leu Cys
115 120 125

Gln Val Ala Gly Trp Gly His Gln Phe Glu Gly Ala Glu Glu Tyr Ala
130 135 140

Ser Phe Leu Gln Glu Ala Gln Val Pro Phe Leu Ser Leu Glu Arg Cys
145 150 155 160

Ser Ala Pro Asp Val His Gly Ser Ser Ile Leu Pro Gly Met Leu Cys
165 170 175

Ala Gly Phe Leu Glu Gly Gly Thr Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly
180 185 190

Gly Pro Leu Val Cys Glu Asp Gln Ala Ala Glu Arg Arg Leu Thr Leu
195 200 205

Gln Gly Ile Ile Ser Trp Gly Ser Gly Cys Gly Asp Arg Asn Lys Pro
210 215 220

Gly Val Tyr Thr Asp Val Ala Tyr Tyr Leu Ala Trp Ile Arg Glu His
225 230 235 240

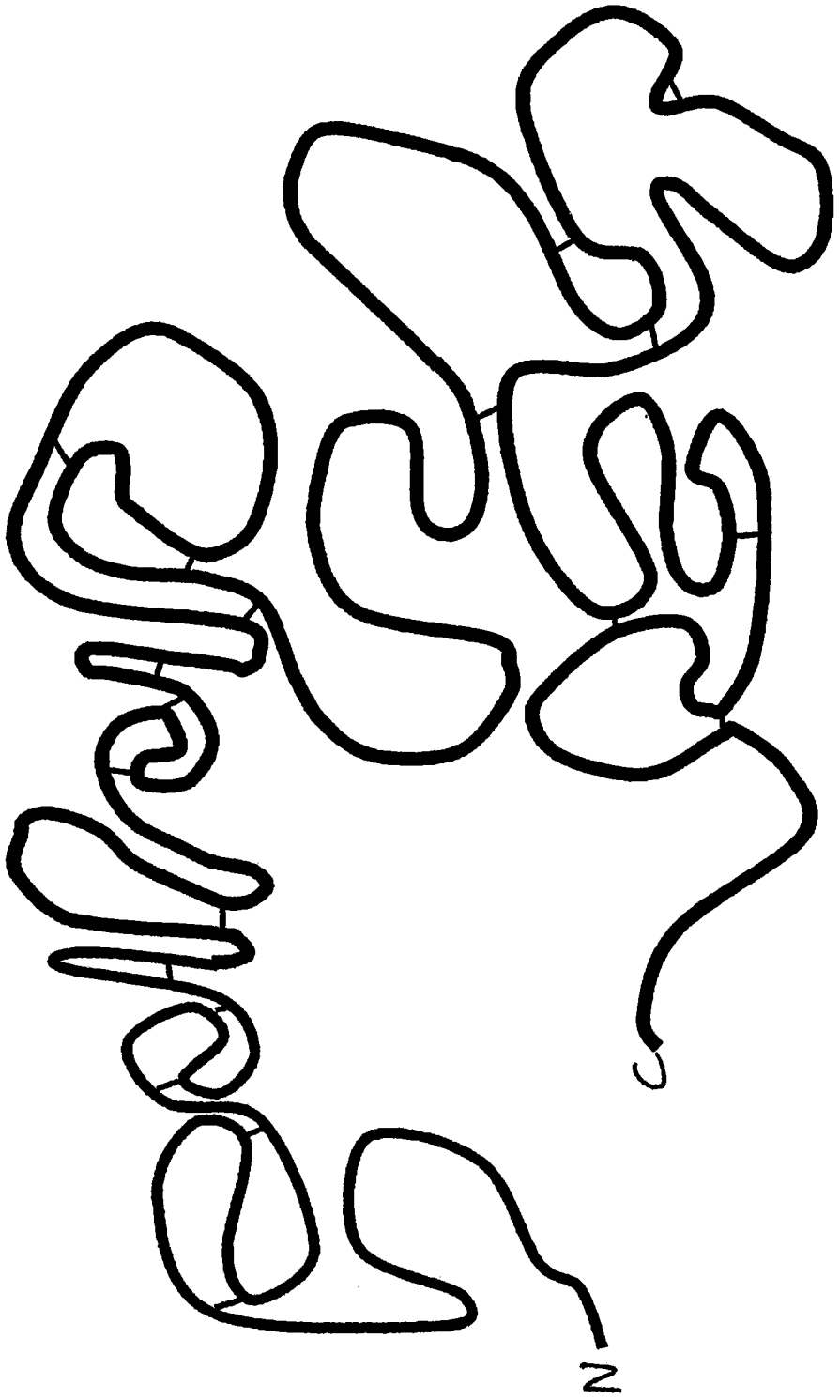
Thr Val Ser

KCFEPQLLRFFHKNEIWYRTEQAAVARCQCKGPDAHCQRLASQANPCLHGGRCLEVEGHR
LCHCPVGYTGPFCDVDTKASCYDGRGLSYRGLARTTLSGAPCQPWASEATYRNVTAEQAR
NWGLGGHAFCRNPDNDIRPWCFVLNRDRLSWEYCDLAQCQTPTQAAPPTPVSPRLHVPLM
PAQPAPPKPQPTTRTPPQSQTPGALPAKREQPPSLTRNGPLSCGQR
(SEQ ID NO.1)

图 1

VVGGLVALRGAHPYIAALYWGHSFCAGSLIAPCWVLTAAHCLQDRPAPEDLTVVLGQERR
NHSCEPCQTLAVRSYRLHEAFSPVSYQHDLALLRLQEDADGSCALLSPYVQPVCLPSGAA
RPSETTLCQVAGWGHQFEGAEEYASFLQEAQVPFLSLERCSAPDVHGSSILPGMLCAGFL
EGGTDACQGDSGGPLVCEDQAAERRLTLQGIISWGSGCGDRNKPGVYTDVAYYLAWIREH
TVS (SEQ ID NO.2)

图 2



因子 XII

图 3

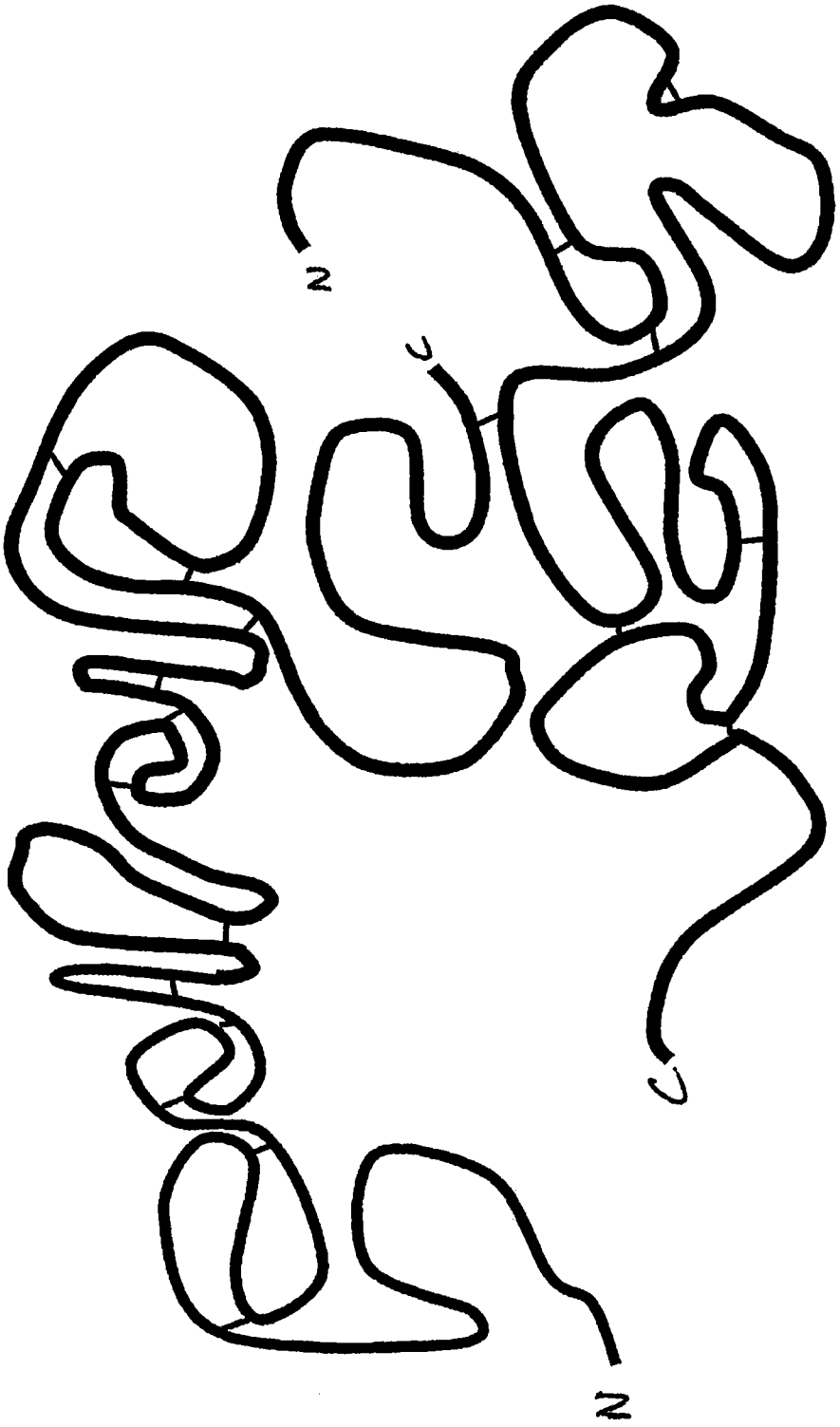


图 4

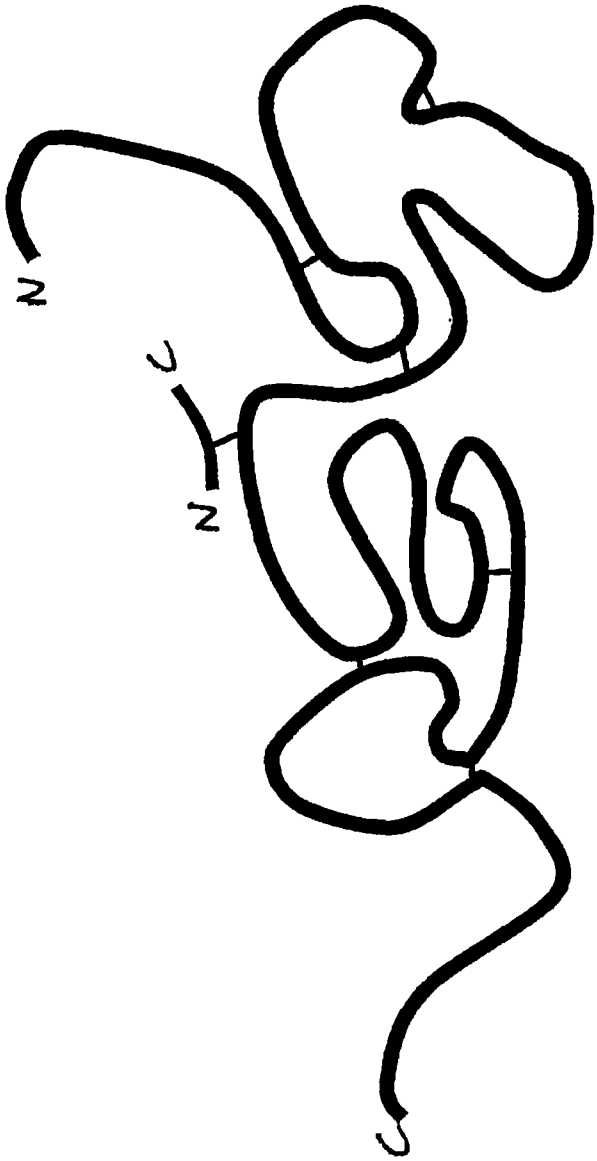


图 5

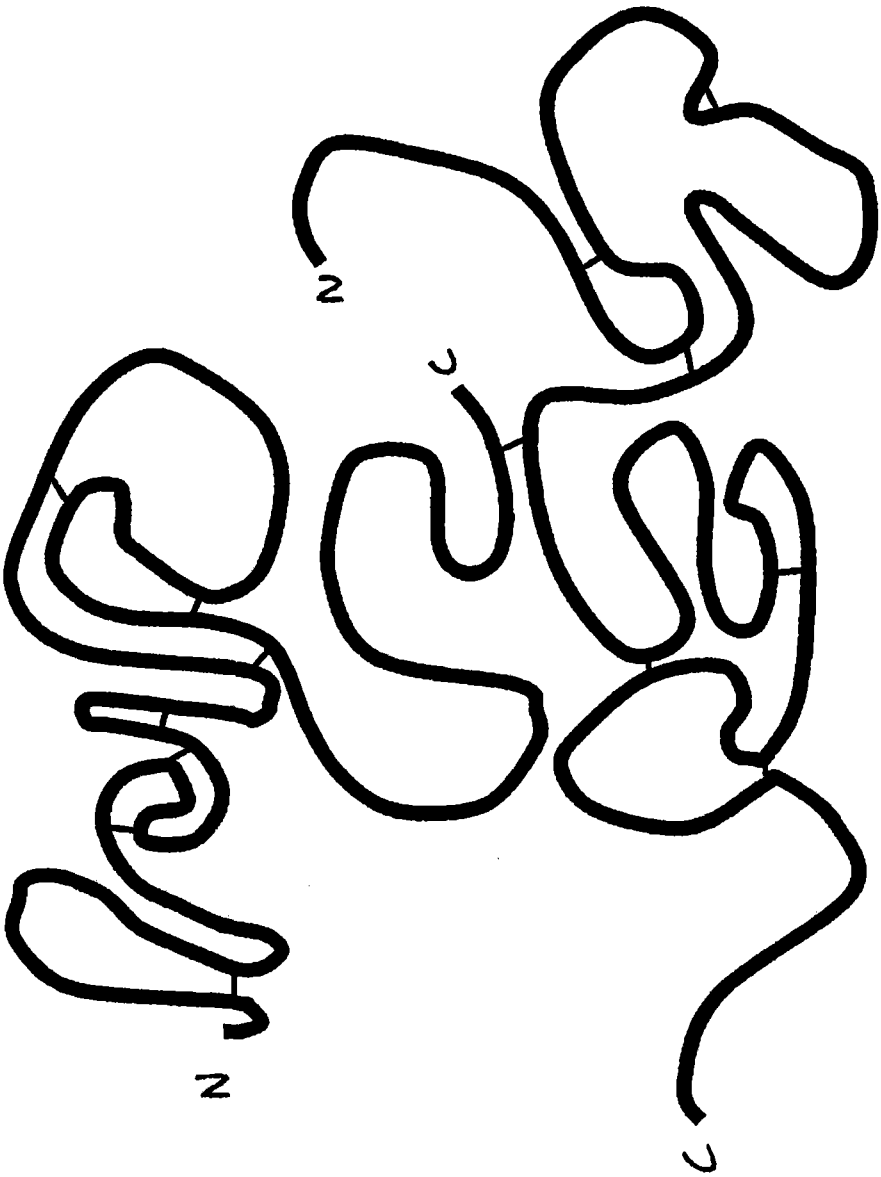


图 6

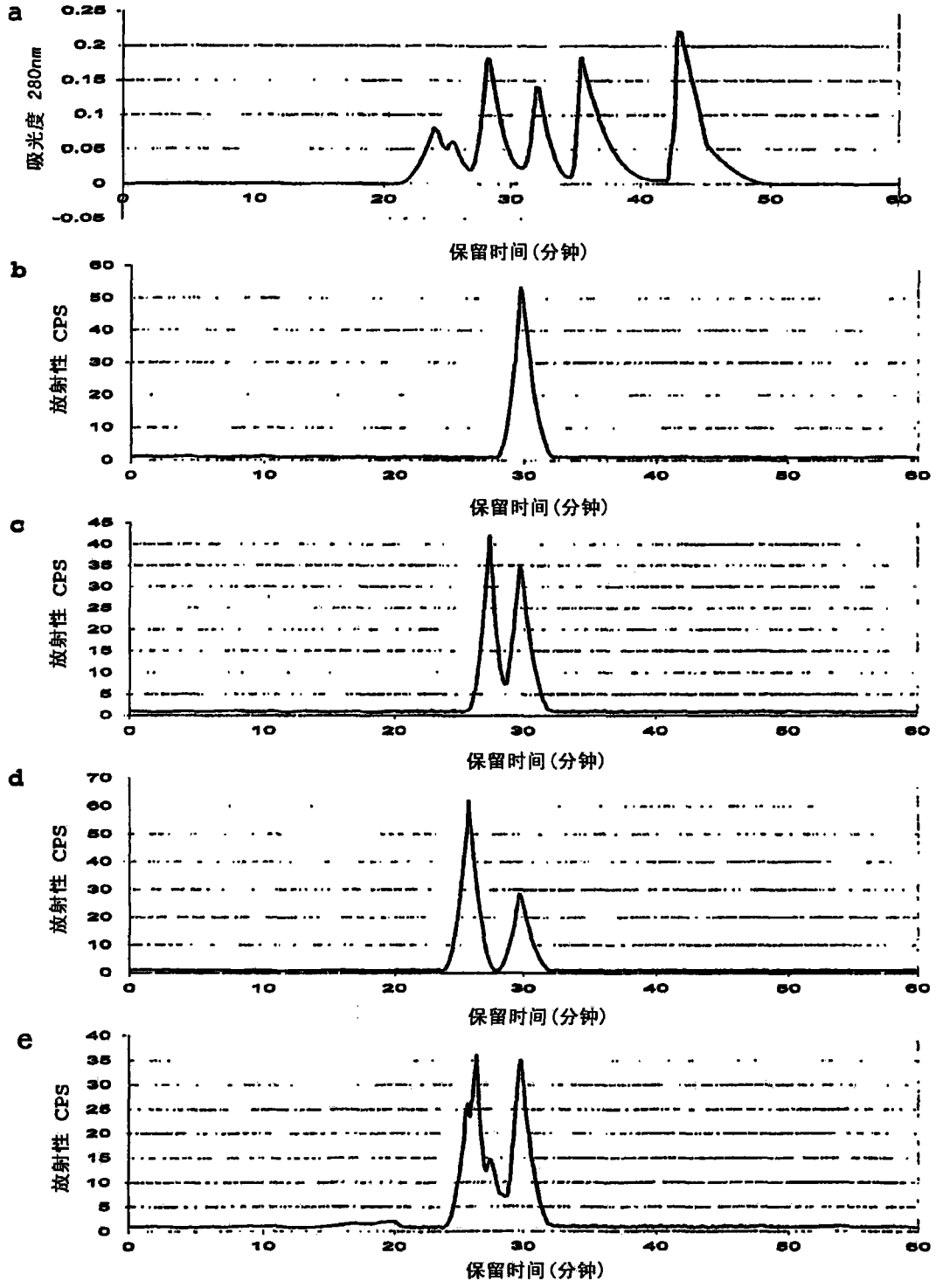

a
吸光度 280nm
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
-0.05
0 10 20 30 40 50 60
保留时间(分钟)
b
放射性 CPS
60 50 40 30 20 10 0
0 10 20 30 40 50 60
保留时间(分钟)
c
放射性 CPS
45 40 35 30 25 20 15 10 5 0
0 10 20 30 40 50 60
保留时间(分钟)
d
放射性 CPS
70 60 50 40 30 20 10 0
0 10 20 30 40 50 60
保留时间(分钟)
e
放射性 CPS
40 35 30 25 20 15 10 5 0
0 10 20 30 40 50 60
保留时间(分钟)

图 7

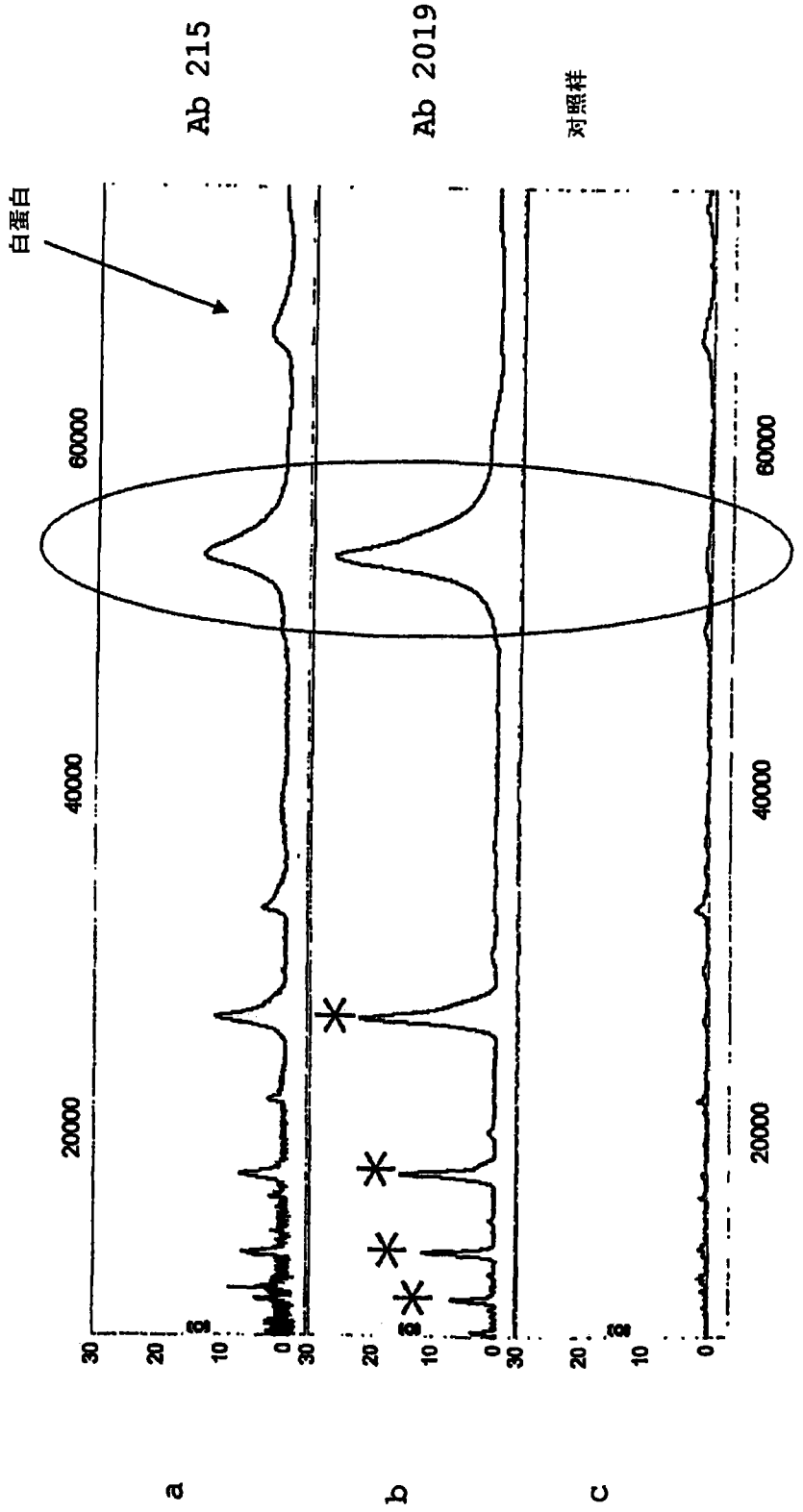


图 8

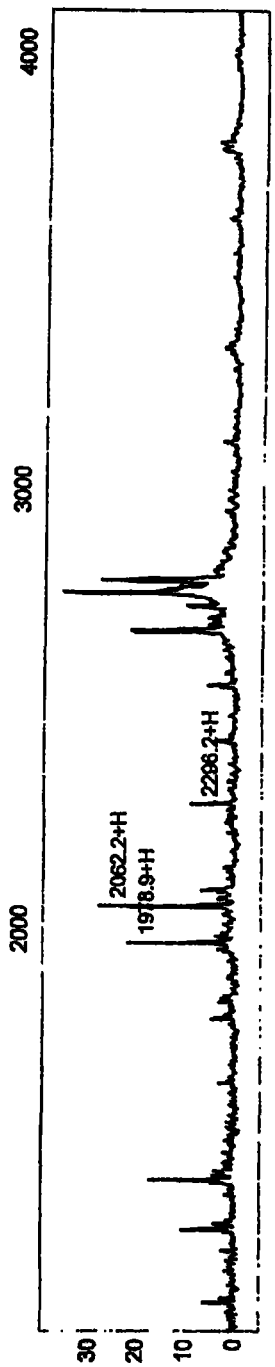


图 9

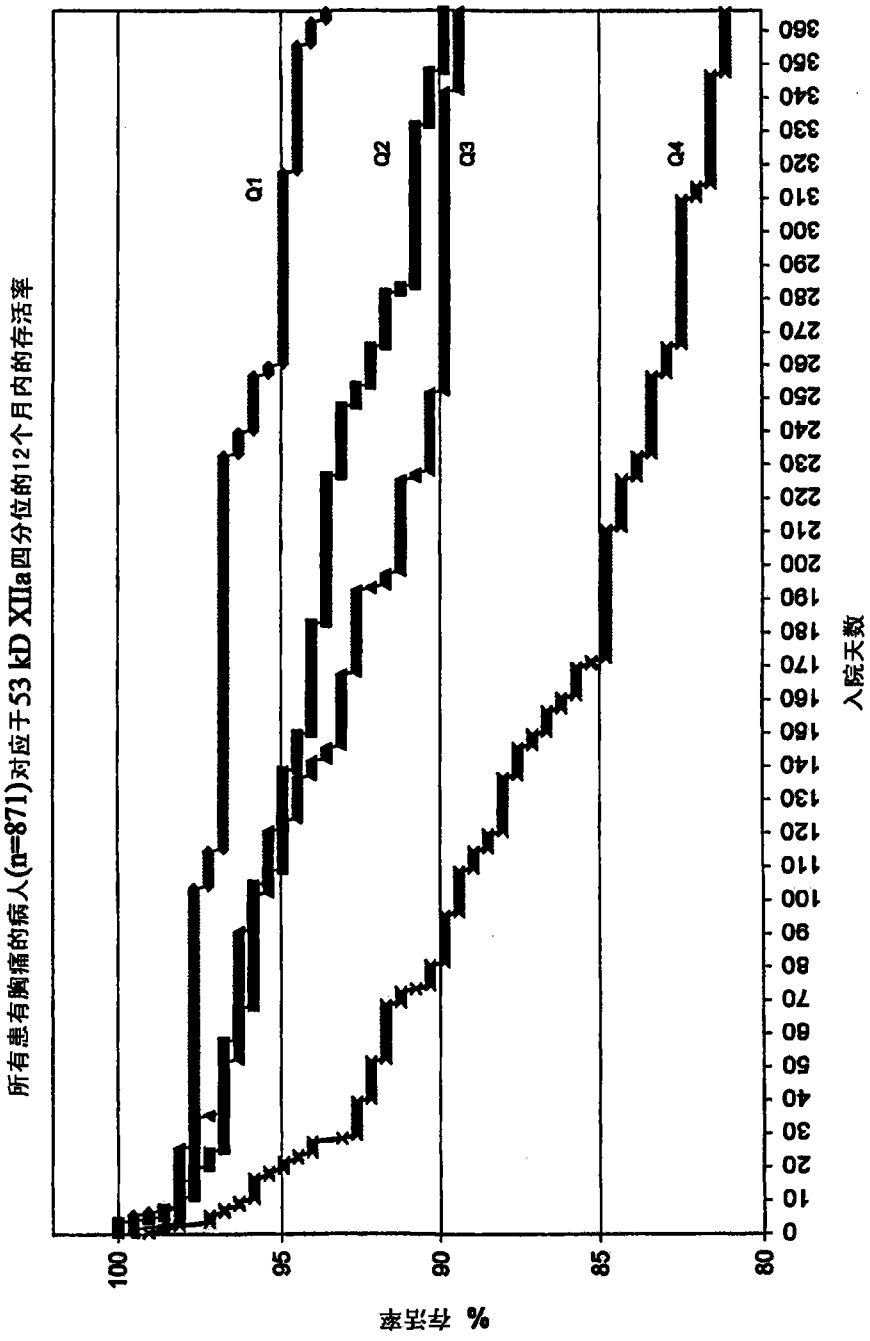

所有患有胸痛的病人(n=871)对应于53 kD XIIa四分位的12个月内的存活率
Q1
Q2
Q3
Q4
% 存活率
100
95
90
85
80
入院天数
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
130
140
150
160
170
180
190
200
210
220
230
240
250
260
270
280
290
300
310
320
330
340
350
360

图 10

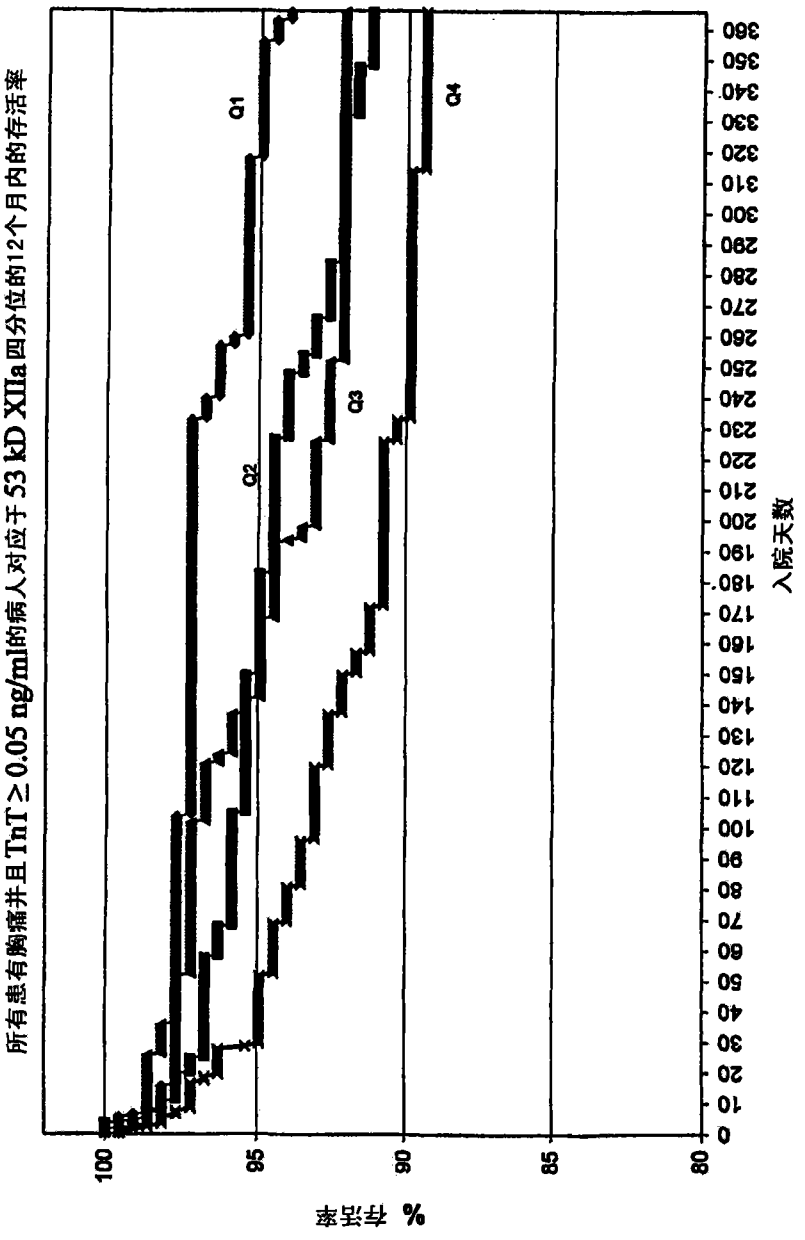

所有患有胸痛并且TnT≥0.05 ng/ml的病人对应于53 kD XIIa四分位的12个月内的存活率
Q1
Q2
Q3
Q4
% 存活率
100
95
90
85
80
入院天数
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
130
140
150
160
170
180
190
200
210
220
230
240
250
260
270
280
290
300
310
320
330
340
350
360

图 11

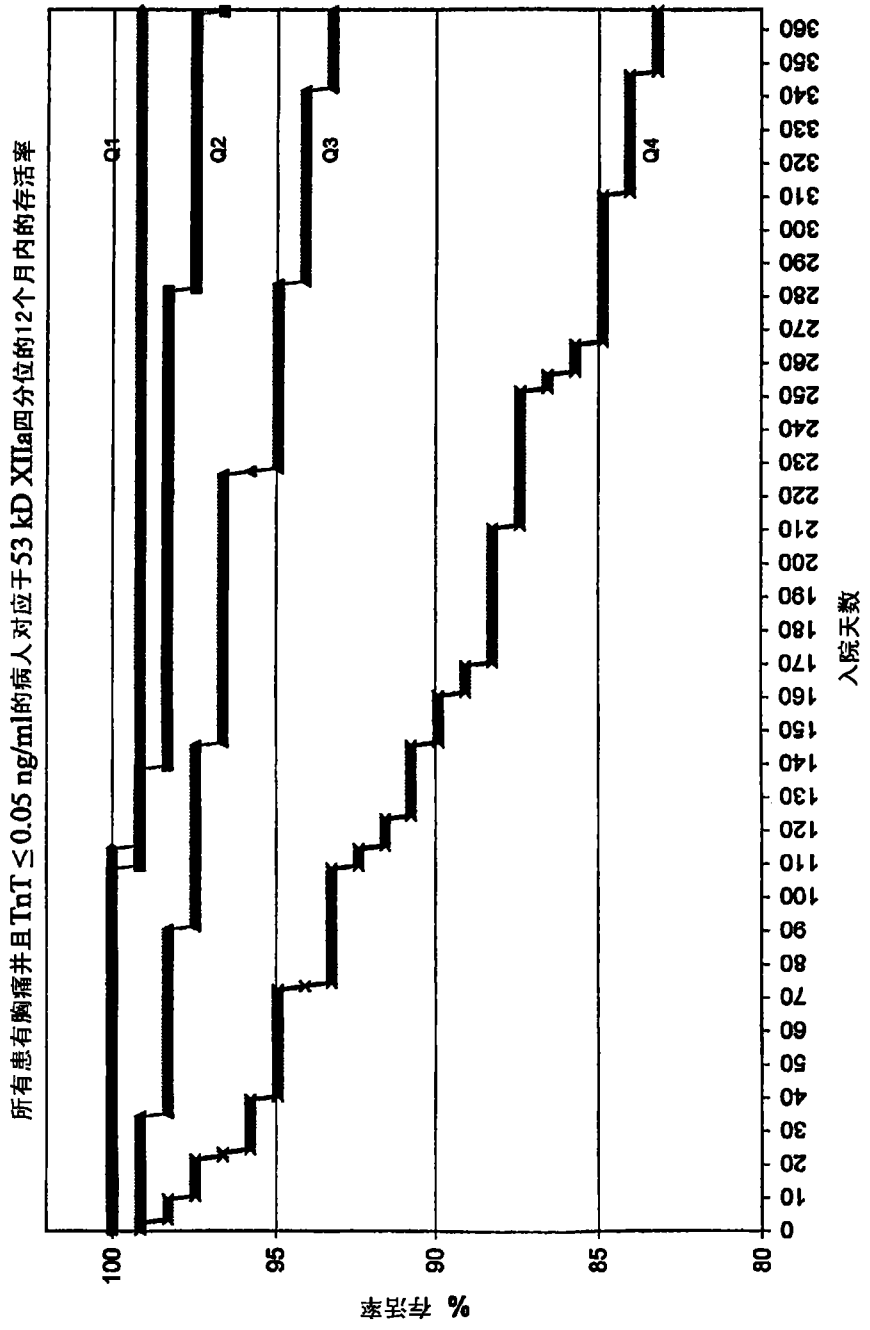

所有患有胸痛并且TnT ≤ 0.05 ng/ml的病人对应于53 kD XIIa四分位的12个月内的存活率
Q1
Q2
Q3
Q4
% 存活率
100
95
90
85
80
入院天数
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
130
140
150
160
170
180
190
200
210
220
230
240
250
260
270
280
290
300
310
320
330
340
350
360

图 12

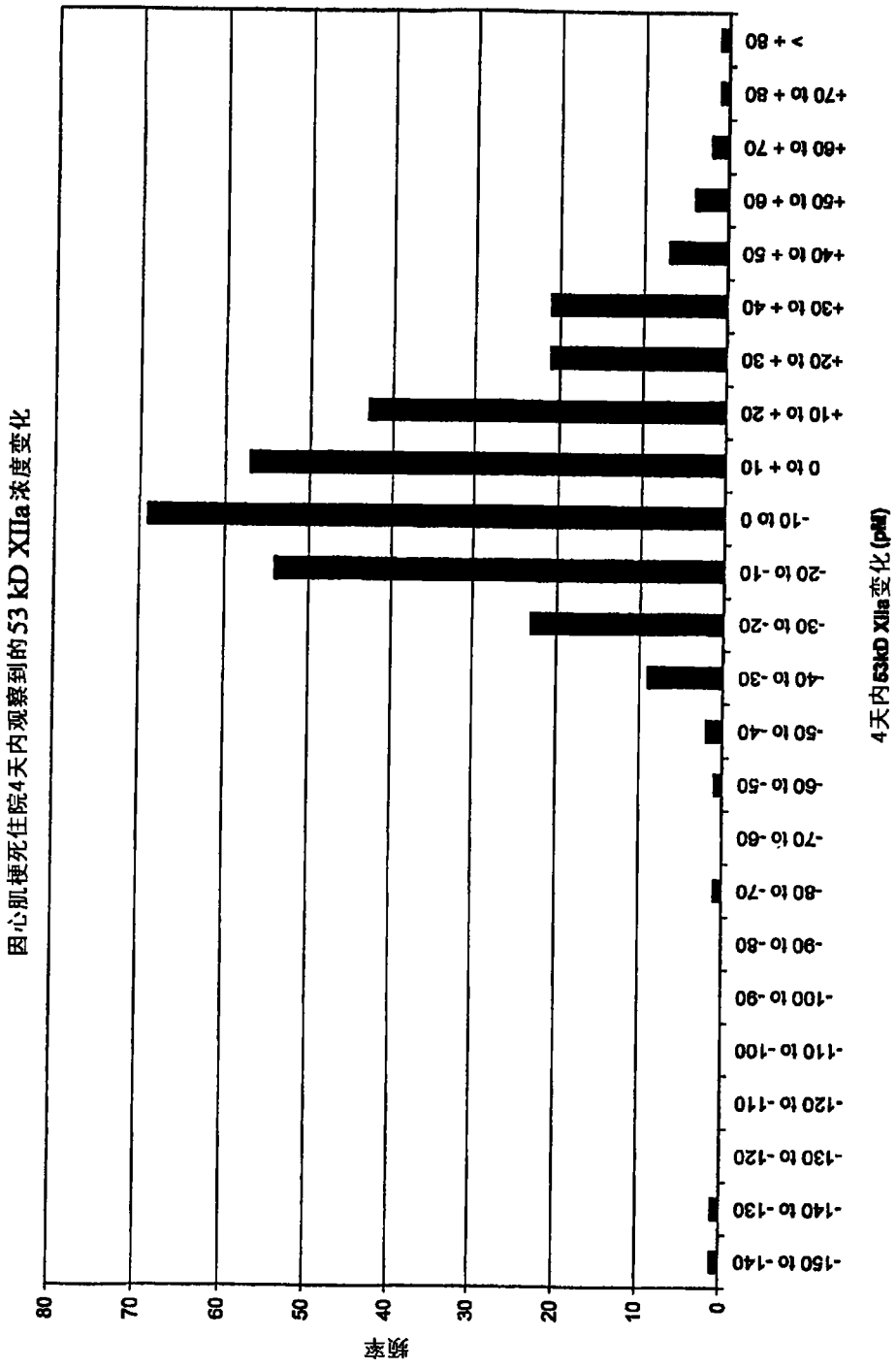

因心肌梗死住院4天内观察到的53 kD XIIa浓度变化
频率
4天内53kD XIIa变化 (pM)
80
70
60
50
40
30
20
10
0
-150 to -140
-140 to -130
-130 to -120
-120 to -110
-110 to -100
-100 to -90
-90 to -80
-80 to -70
-70 to -60
-60 to -50
-50 to -40
-40 to -30
-30 to -20
-20 to -10
-10 to 0
0 to + 10
+10 to + 20
+20 to + 30
+30 to + 40
+40 to + 50
+50 to + 60
+60 to + 70
+70 to + 80
> + 80

图 13

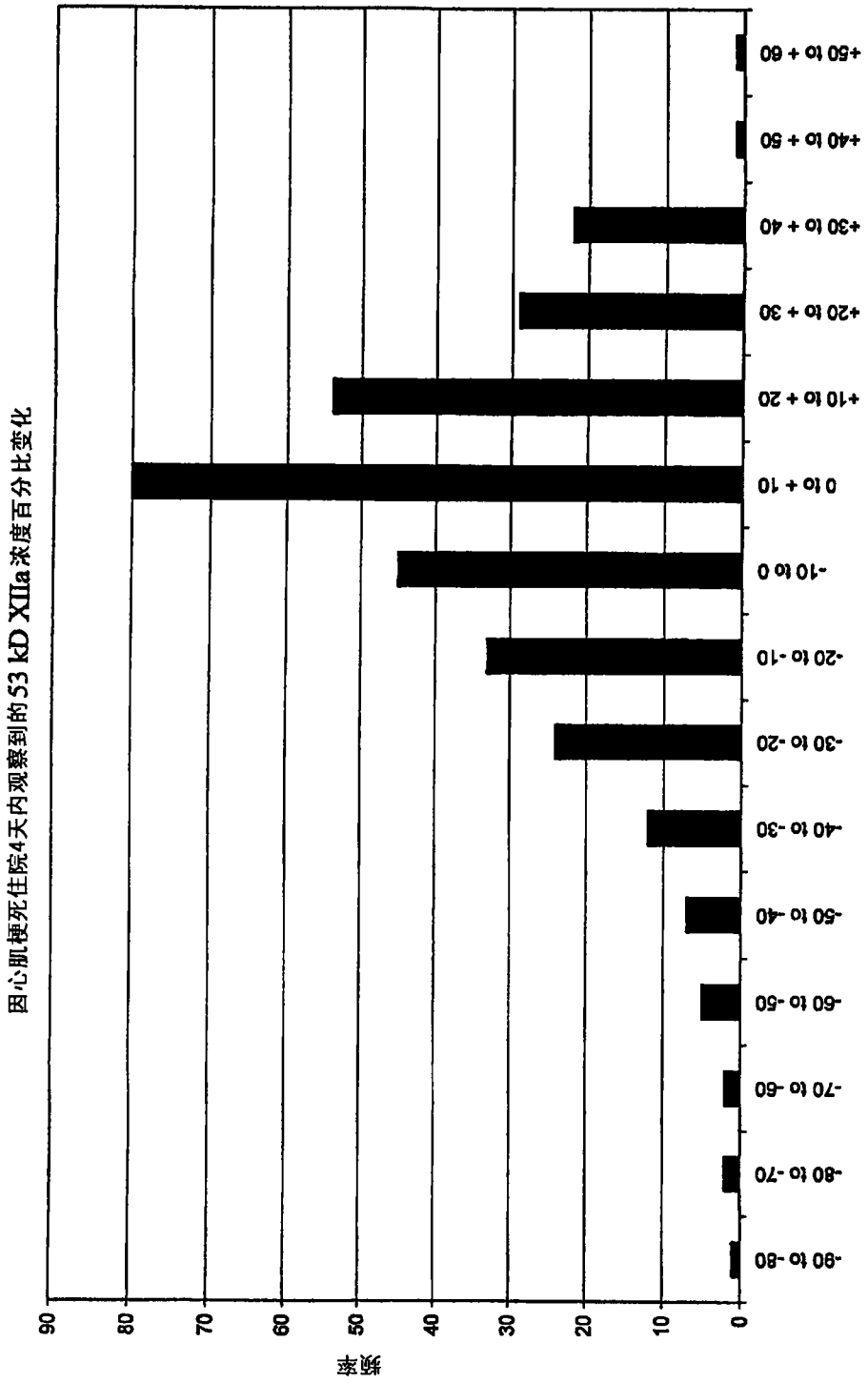

因心肌梗死住院4天内观察到的53 kD XIIa浓度百分比变化
频率
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
-90 to -80
-80 to -70
-70 to -60
-60 to -50
-50 to -40
-40 to -30
-30 to -20
-20 to -10
-10 to 0
0 to + 10
+10 to + 20
+20 to + 30
+30 to + 40
+40 to + 50
+50 to + 60
53 kD XIIa 百分比变化

图 14