



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105874332 B

(45)授权公告日 2019.11.12

(21)申请号 201480069823.8

(22)申请日 2014.10.17

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105874332 A

(43)申请公布日 2016.08.17

(30)优先权数据

61/893,542 2013.10.21 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.06.20

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/061242 2014.10.17

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/061182 EN 2015.04.30

(73)专利权人 戴埃克斯有限公司

地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 D·J·塞克斯顿 B·阿德尔曼

A·尼克森

(74)专利代理机构 北京市铸成律师事务所

11313

代理人 郝文博 王建秀

(51)Int.Cl.

G01N 33/00(2006.01)

A61K 39/00(2006.01)

(56)对比文件

US 2011212104 A1,2011.09.01,说明书第

4,21,25,40,132,189-190段。

US 2013156753 A1,2013.06.20,全文。

CN 102762203 A,2012.10.31,全文。

Schousboe I. et al..High molecular weight kininogen binds to laminin--characterization and kinetic analysis.《Febs Journal》.2009,第276卷(第18期),

Irma Isordia-Salas et al..he mutation Ser511Asn leads to N-glycosylation and increases the cleavage of high molecular weight kininogen in rats genetically susceptible to inflammation.《Blood》.2003,第102卷(第8期),

Isordia-Salas et al..The Role of Plasma High Molecular Weight Kininogen in Experimental Intestinal and Systemic Inflammation.《Archives of Medical Research》.2005,第36卷

Cugno M.et al..Activation of the contact system and fibrinolysis in autoimmune acquired angioedema: a rationale for prophylactic use of tranexamic acid.《Journal of Allergy & Clinical Immunology》.1994,第93卷(第5期),

审查员 李重阳

权利要求书2页 说明书42页

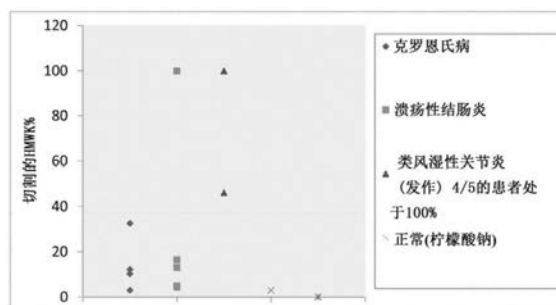
序列表16页 附图1页

(54)发明名称

自身免疫性疾病的诊断和治疗

(57)摘要

用于诊断和治疗自身免疫疾病,比如类风湿关节炎、克罗恩氏病和溃疡性结肠炎的方法、试剂盒和组合物。



1. 用于测量切割的高分子量激肽原 (HMWK) 的结合剂在制备用于在人受试者中诊断自身免疫性疾病的诊断剂中的用途, 其中所述诊断包括:

提供怀疑患有自身免疫性疾病的人受试者的生物样品;

使用结合切割的HMWK的结合剂测量所述生物样品中切割的高分子量激肽原 (HMWK) 的水平; 和

如果所述生物样品中所述切割的HMWK的水平与对照样品相比升高, 则鉴定所述人受试者患有自身免疫性疾病或处在自身免疫性疾病的风险中。

2. 权利要求1所述的用途, 其中所述自身免疫性疾病是类风湿性关节炎、克罗恩氏病或溃疡性结肠炎。

3. 权利要求1或权利要求2所述的用途, 其中所述生物样品是血清样品或血浆样品。

4. 权利要求1或权利要求2所述的用途, 其中所述生物样品包括一种或多种蛋白酶抑制剂, 所述蛋白酶抑制剂在收集所述生物样品之后添加至所述生物样品。

5. 权利要求1或权利要求2所述的用途, 其中所述切割的HMWK的水平通过涉及对切割的HMWK特异性的结合剂的试验测量。

6. 权利要求5所述的用途, 其中所述结合剂是结合切割的HMWK的抗体。

7. 权利要求5所述的用途, 其中所述试验是酶联免疫吸附试验 (ELISA) 或免疫印迹试验。

8. 权利要求5所述的用途, 其中所述试验是涉及LiCor检测的蛋白质印记试验。

9. 权利要求1或权利要求2所述的用途, 其中所述人受试者进行所述自身免疫性疾病的治疗。

10. 权利要求9所述的用途, 其中所述人受试者被施用以有效量的血浆激肽释放酶 (pKa1) 抑制剂。

11. 用于测量切割的高分子量激肽原 (HMWK) 的结合剂在制备用于监测人受试者中自身免疫性疾病的发展的诊断剂中的用途, 其中所述监测包括:

在第一时间点提供怀疑患有自身免疫性疾病的人受试者的第一生物样品;

使用结合切割的HMWK的结合剂测量所述第一生物样品中切割的高分子量激肽原 (HMWK) 的第一水平;

在所述第一时间点随后的第二时间点提供所述人受试者的第二生物样品;

使用所述结合剂测量所述第二生物样品中切割的HMWK的第二水平; 和

基于所述第一生物样品和所述第二生物样品中切割的HMWK的水平的变化, 评估所述人受试者中自身免疫性疾病的发展,

其中切割的HMWK的所述第二水平高于切割的HMWK的所述第一水平指示所述人受试者中自身免疫性疾病进展或所述人受试者已经发展了所述自身免疫性疾病或处在发展所述自身免疫性疾病的风险中。

12. 权利要求11所述的用途, 其中所述自身免疫性疾病是类风湿性关节炎、克罗恩氏病或溃疡性结肠炎。

13. 权利要求11或权利要求12所述的用途, 其中所述第一生物样品和第二生物样品是血清样品或血浆样品。

14. 权利要求11或权利要求12所述的用途, 其中所述第一生物样品、所述第二生物样品

或二者包括一种或多种蛋白酶抑制剂,所述蛋白酶抑制剂在所述生物样品收集之后,添加至所述生物样品。

15. 权利要求11或权利要求12所述的用途,其中切割的HMWK的所述第一水平或切割的HMWK的所述第二水平通过涉及对切割的HMWK特异性的结合剂的试验测量。

16. 权利要求15所述的用途,其中所述结合剂是结合切割的HMWK的抗体。

17. 权利要求15所述的用途,其中所述试验是酶联免疫吸附试验(ELISA)或免疫印迹试验。

18. 权利要求15所述的用途,其中所述试验是涉及LiCor检测的蛋白质印记试验。

19. 权利要求11或权利要求12所述的用途,其中所述人受试者进行自身免疫性疾病的治疗。

20. 权利要求19所述的用途,其中所述人受试者被施用以有效量的血浆激肽释放酶(pKa1)抑制剂。

21. 用于测量切割的高分子量激肽原(HMWK)的结合剂在制备用于评估治疗人患者中自身免疫性疾病的效力的诊断剂中的用途,其中所述评估包括:

在治疗过程期间提供进行自身免疫性疾病治疗的人患者的多种生物样品;

使用结合切割的HMWK的结合剂测量所述多种生物样品中高分子量激肽原(HMWK)的水平;和

基于治疗过程期间切割的HMWK的水平变化评估在人患者中的治疗效力,

其中如果在治疗过程期间,切割的HMWK的水平下降,则指示所述治疗在所述人患者中是有效的。

22. 权利要求21所述的用途,其中所述自身免疫性疾病是类风湿性关节炎、克罗恩氏病或溃疡性结肠炎。

23. 权利要求21或权利要求22所述的用途,其中所述治疗涉及至少一种血浆激肽释放酶抑制剂。

24. 权利要求21或权利要求22所述的用途,其中所述多种生物样品中的至少一种是血清样品或血浆样品。

25. 权利要求21或权利要求22所述的用途,其中所述多种生物样品中的至少一种包括一种或多种蛋白酶抑制剂,所述蛋白酶抑制剂在所述样品收集之后,添加至所述样品。

26. 权利要求21或权利要求22所述的用途,其中通过涉及对切割的HMWK特异性的结合剂的试验测量所述多种生物样品中的所述切割的HMWK的水平。

27. 权利要求26所述的用途,其中所述结合剂是结合切割的HMWK的抗体。

28. 权利要求26所述的用途,其中所述试验是酶联免疫吸附试验(ELISA)或免疫印迹试验。

29. 权利要求26所述的用途,其中所述试验是涉及LiCor检测的蛋白质印记试验。

自身免疫性疾病的诊断和治疗

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2013年10月21日提交的美国临时申请号61/893,542申请日的益处,其全部内容通过参考并入本文。

[0003] 背景

[0004] 血浆激肽释放酶(pKa1)是循环中主要的产生缓激肽的酶和血浆激肽释放酶-激肽系统(KKS)的组分。Colmanm,R.W.和Schmaier,A.H. (1997) Blood 90,3819-3843。经已经表明是与遗传性血管性水肿(HAE)相关的疾病病理学原因的接触系统,发生pKa1的激活。Zuraw,B.L.和Christiansen,S.C. (2008) Expert Opin Investig Drugs 17,697-706。缓激肽是疼痛、炎症、水肿和血管生成的关键介体(mediator)。Maurer,M.等(2011) Allergy 66,1397-1406;Colman,R.W. (2006) Curr Pharm Des 12,2599-2607。

发明内容

[0005] 本公开是基于这样的观察:切割的高分子量激肽原(HMWK)的水平在患有自身免疫性疾病,比如类风湿性关节炎(RA)、克罗恩氏病(CD)和溃疡性结肠炎(UC)的患者中升高。因此,本文公开了基于切割的HMWK的水平诊断自身免疫性疾病,比如RA、CD或UC,检测自身免疫性疾病的进展,或评估治疗自身免疫性疾病的效力的方法。

[0006] 在一个方面中,本公开提供了诊断受试者中自身免疫性疾病(例如,RA、CD或UC)的方法,该方法包括:(i)提供怀疑患有自身免疫性疾病的受试者的生物样品(例如,血清样品或血浆样品);(ii)测量生物样品中切割的高分子量激肽原(HMWK)的水平;和(iii)如果生物样品中切割的HMWK的水平与对照样品相比升高,则鉴定受试者患有自身免疫性疾病或处在自身免疫性疾病的风险中。

[0007] 在一些实施方式中,通过涉及对切割的HMWK特异性的结合剂(例如,抗体)的试验测量切割的HMWK的水平。试验可以是酶联免疫吸附试验(ELISA)或免疫印迹试验,例如,涉及LiCor检测的蛋白质印记试验。

[0008] 方法可进一步包括使受试者进行自身免疫性疾病的治疗。在一些实施方式中,受试者被施用有效量的血浆激肽释放酶(pKa1)抑制剂,例如,本文所述的那些。

[0009] 在另一方面中,本公开提供了监测受试者中自身免疫性疾病(例如,RA、CD或UC)的发展的方法,该方法包括:(i)在第一时间点提供怀疑患有自身免疫性疾病的受试者的第一生物样品;(ii)测量第一生物样品中的高分子量激肽原(HMWK)的第一水平;(iii)在第一时间点随后的第二时间点提供受试者的第二生物样品;(iv)测量第二生物样品中切割的HMWK的第二水平;和(v)基于第一生物样品和第二生物样品中切割的HMWK的水平的变化,评估受试者中自身免疫性疾病的发展。如果切割的HMWK的第二水平高于切割的HMWK的第一水平,指示受试者中自身免疫性疾病进展或受试者已经发展了自身免疫性疾病或处在发展自身免疫性疾病的风险中。

[0010] 在一些实施方式中,第一生物样品、第二生物样品,或二者是血清样品或血浆样品。在其他实施方式中,切割的HMWK的第一水平或第二水平通过涉及对切割的HMWK特异性

的结合剂(例如,抗体)的试验来测量。在一些实施例中,试验是酶联免疫吸附试验(ELISA)或免疫印迹试验,例如,涉及LiCor检测的蛋白质印记试验。

[0011] 方法可进一步包括使受试者进行自身免疫性疾病的治疗。在一些实施方式中,受试者被施用有效量的血浆激肽释放酶(pKal)抑制剂,比如本文所述的那些。

[0012] 此外,本公开提供了评估患者中自身免疫性疾病(例如,RA、CD或UC)的治疗效力的方法,该方法包括:(i)在治疗过程期间,提供进行自身免疫性疾病治疗的患者的多个生物样品(例如,血清样品或血浆样品);(ii)测量多个生物样品中高分子量激肽原(HMWK)的水平;和(iii)基于治疗过程期间切割的HMWK的水平的变化评估患者中治疗的效力。如果在治疗过程期间,切割的HMWK的水平下降,指示治疗在患者中是有效的。

[0013] 在一些实施方式中,治疗涉及至少一种血浆激肽释放酶抑制剂,例如,本文所述的那些。在其他实施方式中,通过涉及对切割的HMWK特异性的结合剂(例如,抗体)的试验,测量多个生物样品中的切割的HMWK的水平。在一些实施例中,试验是酶联免疫吸附试验(ELISA)或免疫印迹试验,例如,涉及LiCor检测的蛋白质印记试验。在本文所述的任何方法中,本文使用的生物样品可包括蛋白酶抑制剂或蛋白酶抑制剂混合物,其在收集生物样品之后添加至生物样品。

[0014] 用于该方法的激肽释放酶抑制剂可以是,例如,血浆激肽释放酶(pKal)抑制剂。在一些实施方式中,抑制剂是血浆激肽释放酶抑制剂。

[0015] 用于该方法的激肽释放酶抑制剂可以是本领域已知的或本文所述的任何Kunitz结构域多肽、包括任何这样的Kunitz结构域的较大的多肽(条件是激肽释放酶抑制剂多肽如在标准试验中测定地结合和抑制激肽释放酶)、激肽释放酶结合蛋白(例如,抗体,例如,抗血浆激肽释放酶抗体)或本文所述的其他激肽释放酶抑制剂。

[0016] 能够抑制pKal活性的示例性Kunitz结构域肽包括:Glu Ala Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp(SEQ ID NO:2; DX-88),或其片段,比如SEQ ID NO:2的氨基酸3-60。

[0017] 在一些实施方式中,激肽释放酶抑制剂包括kunitz结构域的框架区和DX-88多肽的第一和第二结合环区域或由其组成。

[0018] 在一些实施方式中,激肽释放酶抑制剂包括SEQ ID NO:2的氨基酸3-60的约58个氨基酸序列或具有SEQ ID NO:2的60个氨基酸序列的DX-88多肽或由其组成。

[0019] 在一些实施方式中,激肽释放酶抑制剂包括血浆激肽释放酶结合蛋白(例如,抗体,例如,本文所述的抗血浆激肽释放酶抗体)。

[0020] 在一些实施方式中,结合蛋白(例如,抗体,例如,人抗体)与本文所述的蛋白质结合相同的表位或与本文所述的蛋白质竞争结合。

[0021] 在一些实施方式中,本文所述的蛋白质选自M162-A04、M160-G12、M142-H08、X63-G06、X101-A01(本文也称为DX-2922)、X81-B01、X67-D03、X67-G04、X81-B01、X67-D03、X67-G04、X115-B07、X115-D05、X115-E09、X115-H06、X115-A03、X115-D01、X115-F02、X124-G01(本文也称为DX-2930)、X115-G04、M29-D09、M145-D11、M06-D09和M35-G04。这样的结合蛋白描述在例如PCT公开W02012/094587和美国专利申请公开US 20100183625中,这两篇通过引

用以它们的整体并入本文。

[0022] 在一些实施方式中,血浆激肽释放酶结合蛋白与X81-B01、X67-D03、X101-A01、M162-A04、X115-F02、X124-G01或X63-G06竞争或与X81-B01、X67-D03、X101-A01、M162-A04、X115-F02、X124-G01或X63-G06结合相同的表位。

[0023] 在一些实施方式中,血浆激肽释放酶结合蛋白不结合前激肽释放酶(例如,人前激肽释放酶),但是结合活性形式的血浆激肽释放酶(例如,人血浆激肽释放酶)。

[0024] 在某些实施方式中,蛋白质在血浆激肽释放酶或其片段的催化结构域的活性位点或其附近结合,或结合与血浆激肽释放酶的活性位点重叠的表位。

[0025] 在一些实施方式中,蛋白质结合形成血浆激肽释放酶的催化三联体的一个或多个氨基酸:His434、Asp483和/或Ser578(基于人序列编号)。在其他实施方式中,蛋白质结合Ser479、Tyr563和/或Asp585中的一个或多个氨基酸(基于人序列编号)。在仍其他实施方式中,血浆激肽释放酶结合蛋白结合Arg 551、Gln 553、Tyr 555和/或Arg 560中的一个或多个氨基酸(氨基酸位置编号基于人激肽释放酶序列)。在仍其他实施方式中,血浆激肽释放酶结合蛋白结合Ser 478、Asn 481、Ser 525和/或Lys 526中的一个或多个氨基酸(氨基酸位置编号基于人激肽释放酶序列)。

[0026] 在一些实施方式中,与标准,例如,在相同条件下但是在没有蛋白质的情况下因子XIIa和/或缓激肽产生比较,血浆激肽释放酶结合蛋白减少因子XIIa和/或缓激肽产生大于约5%、约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%或约95%。

[0027] 在一些实施方式中,血浆激肽释放酶结合蛋白的表观抑制常数(apparent inhibition constant) ($K_{i,app}$) 小于1000、500、100或10nM。

[0028] 在一个实施方式中,HC和LC可变结构域序列是相同多肽链的组分。

[0029] 在另一实施方式中,HC和LC可变结构域序列是不同多肽链的组分。例如,血浆激肽释放酶结合蛋白是IgG., 例如,IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。血浆激肽释放酶结合蛋白可以是可溶性Fab(sFab)。

[0030] 在其他实施方式中,血浆激肽释放酶结合蛋白包括Fab2'、scFv、微抗体(minibody)、scFv::Fc融合体、Fab::HSA融合体、HSA::Fab融合体、Fab::HSA::Fab融合体,或包括本文结合蛋白之一的抗原结合位点的其他分子。这些Fab的VH和VL区可作为IgG、Fab、Fab2、Fab2'、scFv、聚乙二醇化的Fab、聚乙二醇化的scFv、聚乙二醇化的Fab2、VH::CH1::HSA+LC、HSA::VH::CH1+LC、LC::HSA+VH::CH1、HSA::LC+VH::CH1,或其他适当的构建体提供。

[0031] 在一个实施方式中,血浆激肽释放酶结合蛋白是人抗体或人源化的抗体或在人中是非免疫原性的。例如,蛋白质包括一个或多个抗体框架区,例如,所有的人框架区。

[0032] 在一个实施方式中,血浆激肽释放酶结合蛋白包括人Fc结构域,或与人Fc结构域至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的Fc结构域。

[0033] 在一个实施方式中,血浆激肽释放酶结合蛋白是灵长类抗体或灵长类化(primatized)抗体或在人中是非免疫原性的。例如,蛋白质包括一个或多个灵长类抗体框架区,例如,所有的灵长类框架区。

[0034] 在一个实施方式中,血浆激肽释放酶结合蛋白包括灵长类Fc结构域,或与灵长类

Fc结构域至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的Fc结构域。“灵长类”包括人(智人(*Homo sapiens*))、黑猩猩(黑猩猩(*Pan troglodytes*)和倭黑猩猩(*Pan paniscus*)(倭黑猩猩))、大猩猩(*Gorilla gorilla*)、长臂猿(*gibbon*)、猴子、狐猴、狐猿(指猴(*Daubentonia madagascariensis*))和眼镜猴。

[0035] 在一个实施方式中,血浆激肽释放酶结合蛋白包括人框架区,或与人框架区至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的框架区。

[0036] 在某些实施方式中,血浆激肽释放酶结合蛋白不包括来自小鼠或兔子的序列(例如,不是鼠抗体或兔抗体)。

[0037] 在一些实施方式中,结合蛋白(例如,抗体比如人抗体)包括重链免疫球蛋白可变结构域序列和轻链免疫球蛋白可变结构域序列,其中:重链免疫球蛋白可变结构域序列包括一个、两个或三个(例如,三个)来自本文所述的蛋白质的重链可变结构域的CDR区域,和/或轻链免疫球蛋白可变结构域序列包括一个、两个或三个(例如,三个)来自本文所述的蛋白质的轻链可变结构域的CDR区域,其中蛋白质结合(例如,和抑制)血浆激肽释放酶。

[0038] 在一些实施方式中,分别地,重链免疫球蛋白可变结构域序列包括一个、两个或三个(例如,三个)来自下述重链可变结构域的CDR区域:M162-A04、M160-G12、M142-H08、X63-G06、X101-A01(本文也称为DX-2922)、X81-B01、X67-D03、X67-G04、X81-B01、X67-D03、X67-G04、X115-B07、X115-D05、X115-E09、X115-H06、X115-A03、X115-D01、X115-F02、X124-G01(本文也称为DX-2930)、X115-G04、M29-D09、M145-D11、M06-D09和M35-G04,和/或轻链免疫球蛋白可变结构域序列包括一个、两个或三个(例如,三个)来自下述轻链可变结构域的CDR区域:M162-A04、M160-G12、M142-H08、X63-G06、X101-A01(本文也称为DX-2922)、X81-B01、X67-D03、X67-G04、X81-B01、X67-D03、X67-G04、X115-B07、X115-D05、X115-E09、X115-H06、X115-A03、X115-D01、X115-F02、X124-G01(本文也称为DX-2930)、X115-G04、M29-D09、M145-D11、M06-D09和M35-G04。

[0039] 在一些实施方式中,来自重链可变结构域的一个、两个或三个(例如,三个)CDR区域来自X81-B01和/或来自轻链可变结构域的一个、两个或三个(例如,三个)CDR区域来自X81-B01或来自X67-D03。

[0040] 在一些实施方式中,重链免疫球蛋白可变结构域序列包括本文所述的蛋白质的重链可变结构域,和/或轻链免疫球蛋白可变结构域序列包括本文所述的蛋白质的轻链可变结构域。

[0041] 在一些实施方式中,分别地,重链免疫球蛋白可变结构域序列包括下述重链可变结构域:M162-A04、M160-G12、M142-H08、X63-G06、X101-A01(本文也称为DX-2922)、X81-B01、X67-D03、X67-G04、X81-B01、X67-D03、X67-G04、X115-B07、X115-D05、X115-E09、X115-H06、X115-A03、X115-D01、X115-F02、X124-G01(本文也称为DX-2930)、X115-G04、M29-D09、M145-D11、M06-D09和M35-G04,和/或轻链免疫球蛋白可变结构域序列包括下述轻链可变结构域:M162-A04、M160-G12、M142-H08、X63-G06、X101-A01(本文也称为DX-2922)、X81-B01、X67-D03、X67-G04、X81-B01、X67-D03、X67-G04、X115-B07、X115-D05、X115-E09、X115-H06、X115-A03、X115-D01、X115-F02、X124-G01(本文也称为DX-2930)、X115-G04、M29-D09、M145-D11、M06-D09和M35-G04。

[0042] 在一些实施方式中,重链免疫球蛋白可变结构域序列包括X81-B01的重链可变结

构域,和/或轻链免疫球蛋白可变结构域序列包括X81-B01的轻链可变结构域。

[0043] 在一些实施方式中,分别地,重链免疫球蛋白可变结构域序列包括下述的重链可变结构域:X67-D03、X101-A01、M162-A04、X115-F02、X124-G01或X63-G06和/或轻链免疫球蛋白可变结构域序列包括下述的轻链可变结构域:X67-D03、X101-A01、M162-A04、X115-F02、X124-G01或X63-G06。

[0044] 在一些实施方式中,蛋白质包括本文所述的蛋白质的重链,和/或本文所述的蛋白质的轻链。

[0045] 在一些实施方式中,分别地,蛋白质包括下述的重链:M162-A04、M160-G12、M142-H08、X63-G06、X101-A01(本文也称为DX-2922)、X81-B01、X67-D03、X67-G04、X81-B01、X67-D03、X67-G04、X115-B07、X115-D05、X115-E09、X115-H06、X115-A03、X115-D01、X115-F02、X124-G01(本文也称为DX-2930)、X115-G04、M29-D09、M145-D11、M06-D09和M35-G04。

[0046] 在一些实施方式中,蛋白质包括X81-B01的重链,和/或X81-B01的轻链。

[0047] 在一些实施方式中,分别地,蛋白质包括下述的重链:X67-D03、X101-A01、M162-A04、X115-F02、X124-G01或X63-G06和/或下述的轻链:X67-D03、X101-A01、M162-A04、X115-F02、X124-G01或X63-G06。

[0048] 在一些实施方式中,蛋白质包括一个或多个下述特征:(a)人CDR或人框架区;(b)HC免疫球蛋白可变结构域序列包括与本文所述的HC可变结构域的CDR至少85、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%同一性的一个或多个(例如,1、2或3个)CDR;(c)LC免疫球蛋白可变结构域序列包括与本文所述的LC可变结构域的CDR至少85、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%同一性的一个或多个(例如,1、2或3个)CDR;(d)LC免疫球蛋白可变结构域序列与本文所述的LC可变结构域的同源性是至少85、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%(例如,总体上或在框架区或CDR中);(e)HC免疫球蛋白可变结构域序列与本文所述的HC可变结构域的同源性是至少85、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%(例如,总体上或在框架区或CDR中);(f)蛋白质结合被本文所述的蛋白质结合的表位,或与本文所述的蛋白质竞争结合;(g)灵长类CDR或灵长类框架区域;(h)HC免疫球蛋白可变结构域序列包括的CDR1与本文所述的HC可变结构域的CDR1的差别是至少一个氨基酸但是不大于2或3个氨基酸;(i)HC免疫球蛋白可变结构域序列包括的CDR2与本文所述的HC可变结构域的CDR2差别是至少一个氨基酸但是不大于2、3、4、5、6、7、或8个氨基酸;(j)HC免疫球蛋白可变结构域序列包括的CDR3与本文所述的HC可变结构域的CDR3的差别是至少一个氨基酸但是不大于2、3、4、5或6个氨基酸;(k)LC免疫球蛋白可变结构域序列包括的CDR1与本文所述的LC可变结构域的CDR1的差别是至少一个氨基酸但是不大于2、3、4、或5个氨基酸;(l)LC免疫球蛋白可变结构域序列包括的CDR2与本文所述的LC可变结构域CDR2的差别是至少一个氨基酸但是不大于2、3或4个氨基酸;(m)LC免疫球蛋白可变结构域序列包括的CDR3与本文所述的LC可变结构域CDR3的差别是至少一个氨基酸但是不大于2、3、4、或5个氨基酸;(n)LC免疫球蛋白可变结构域序列与本文所述的LC可变结构域的同源性是至少一个氨基酸但是不大于2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸(例如,总体上或在框架区或CDR中);和(o)HC免疫球蛋白可变结构域序列与本文所述的HC可变结构域的同源性是至少一个氨基酸但是不大于2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸(例如,总体上或在框架区或CDR中)。

[0049] 在一些实施方式中,蛋白质的表观抑制常数($K_{i,app}$)小于1000、500、100或10nM。

[0050] 在优选的实施方式中,蛋白质是具有选自下述抗体的轻链和重链的抗体(例如,人抗体):M162-A04、M160-G12、M142-H08、X63-G06、X101-A01(本文也称为DX-2922)、X81-B01、X67-D03、X67-G04、X81-B01、X67-D03、X67-G04、X115-B07、X115-D05、X115-E09、X115-H06、X115-A03、X115-D01、X115-F02、X124-G01(本文也称为DX-2930)、X115-G04、M29-D09、M145-D11、M06-D09和M35-G04。

[0051] 在优选的实施方式中,蛋白质是具有选自下述抗体重链的抗体(例如,人抗体):M162-A04、M160-G12、M142-H08、X63-G06、X101-A01(本文也称为DX-2922)、X81-B01、X67-D03、X67-G04、X81-B01、X67-D03、X67-G04、X115-B07、X115-D05、X115-E09、X115-H06、X115-A03、X115-D01、X115-F02、X124-G01(本文也称为DX-2930)、X115-G04、M29-D09、M145-D11、M06-D09和M35-G04。

[0052] 在优选的实施方式中,蛋白质是具有选自下述抗体的轻链的抗体(例如,人抗体):M162-A04、M160-G12、M142-H08、X63-G06、X101-A01(本文也称为DX-2922)、X81-B01、X67-D03、X67-G04、X81-B01、X67-D03、X67-G04、X115-B07、X115-D05、X115-E09、X115-H06、X115-A03、X115-D01、X115-F02、X124-G01(本文也称为DX-2930)、X115-G04、M29-D09、M145-D11、M06-D09和M35-G04。

[0053] 在优选的实施方式中,蛋白质是具有选自下述抗体的轻链和/或重链抗体可变结构域的抗体(例如,人抗体):M162-A04、M160-G12、M142-H08、X63-G06、X101-A01(本文也称为DX-2922)、X81-B01、X67-D03、X67-G04、X81-B01、X67-D03、X67-G04、X115-B07、X115-D05、X115-E09、X115-H06、X115-A03、X115-D01、X115-F02、X124-G01(本文也称为DX-2930)、X115-G04、M29-D09、M145-D11、M06-D09和M35-G04。

[0054] 在一些实施方式中,血浆激肽释放酶结合蛋白不结合前激肽释放酶(例如,人前激肽释放酶),但是结合活性形式的血浆激肽释放酶(例如,人血浆激肽释放酶)。

[0055] 在一些实施方式中,与标准,例如,在相同条件下但是在没有蛋白质的情况下因子XIIa和/或缓激肽产生比较,血浆激肽释放酶结合蛋白减少因子XIIa和/或缓激肽产生大于约5%、约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%或约95%。

[0056] 在一些实施方式中,血浆激肽释放酶结合蛋白的表观抑制常数($K_{i,app}$)小于1000、500、100或10nM。

[0057] 在一个实施方式中,HC和LC可变结构域序列是相同多肽链的组分。

[0058] 在下述附图和说明中阐释了本公开的一个或多个实施方式的细节。通过说明书和附图以及权利要求,本公开的其他特征、目的和优势是显而易见的。

[0059] 遍及该申请引用的所有参考文献、待决专利申请和公开的专利的内容通过引用明确并入本文。

附图说明

[0060] 图1是显示切割的HMWK与类风湿性关节炎、克罗恩氏病和溃疡性结肠炎关系的图表。

[0061] 发明详述

[0062] 本公开是基于这样的出人意料的发现:在患RA、CD或UC的患者中观察到切割的

HMWK的升高水平。尤其地,在RA患者中观察到大量水平的切割的HMWK,和在CD和UC患者中都观察到中等水平的切割的HMWK。因此,本文提供了新的诊断和预后方法,用于鉴定患有自身免疫疾病比如RA、UC或CD或处在发展自身免疫疾病比如RA、UC或CD风险的受试者,监测自身免疫性疾病的进展,和基于受试者的生物样品中切割的HMWK的水平评估受试者中自身免疫疾病的治疗功效。而且,本文描述了使用pKa1抑制剂,比如本文所述的那些,治疗这样的自身免疫性疾病以及与血浆激肽释放酶(pKa1)系统相关的其他疾病的方法。

[0063] 定义

[0064] 为了方便,在进一步描述本公开之前,在此定义在说明书、实施例和所附权利要求中采用的某些术语。

[0065] 单数形式“一个(a)”、“一个(an)”和“所述(the)”包括复数指代,除非上下文另外明确指出。

[0066] 术语“抗体”指包括至少一个免疫球蛋白可变结构域或免疫球蛋白可变结构域序列的蛋白质。例如,抗体可包括重(H)链可变区(本文简称为VH),和轻(L)链可变区(本文简称为VL)。在另一实施例中,抗体包括两个重(H)链可变区和两个轻(L)链可变区。术语“抗体”包括抗体的抗原结合片段(例如,单链抗体、Fab和sFab片段、F(ab')₂、Fd片段、Fv片段、scFv和结构域抗体(dAb)片段(de Wildt等,Eur J Immunol.1996;26(3):629-39。))以及完整的抗体。抗体可具有IgA、IgG、IgE、IgD、IgM(以及其亚型)的结构特征。抗体可来自任何来源,但是灵长类(人和非人灵长类)和灵长类化的是优选的。

[0067] VH和VL区域可进一步分成高变区域,称为“互补决定区”(“CDR”),其中散布更保守的称为“框架区”(“FR”)的区域。已经精确界定了框架区和CDR的范围(见,Kabat,E.A.,等(1991)Sequence of Proteins of Immunological Interest,第五版,U.S.Department of Health and Human Services,NIH Publication No.91-3242,和Chothia,C.等(1987)J.Mol.Biol.196:901-917,也见www.hgmp.mrc.ac.uk)。本文使用Kabat定义。每个VH和VL通常由三个CDR和四个FR组成,其从氨基端至羧基端以下述顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。

[0068] 抗体的VH或VL链可进一步包括所有的或一部分重链或轻链恒定区,从而分别形成重或轻免疫球蛋白链。在一个实施方式中,抗体是两条重免疫球蛋白链和两条轻免疫球蛋白链的四聚物,其中重和轻免疫球蛋白链通过例如二硫键相互连接。在IgG中,重链恒定区包括三个免疫球蛋白结构域,CH1、CH2和CH3。轻链恒定区包括CL结构域。重链和轻链的可变区包含与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区通常介导抗体与宿主组织或因子,包括免疫系统的各种细胞(例如,效应细胞)和典型补体系统的第一组分(C1q)的结合。免疫球蛋白的轻链可以是κ或λ型。在一个实施方式中,抗体被糖基化。对于抗体依赖性细胞毒性和/或补体介导的细胞毒性,抗体可以是有功能的。

[0069] 抗体的一个或多个区域可以是人的或实际上是人的。例如,一个或多个可变区可以是人的或实际上是人的。例如,一个或多个CDR可以是人的,例如,HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2和LC CDR3。每个轻链CDR均可以是人的。HC CDR3可以是人的。一个或多个框架区可以是人的,例如,HC或LC的FR1、FR2、FR3和FR4。例如,Fc区域可以是人的。在一个实施方式中,所有的框架区都是人的,例如,具有由人体细胞产生的抗体的框架的序列,所述人体细胞例如产生免疫球蛋白的造血细胞或非造血细胞。在一个实施方式中,人序

列是生殖系序列,例如,由生殖系核酸编码。在一个实施方式中,选择的Fab的框架(FR)残基可转化成最类似灵长类生殖系基因,尤其是人生殖系基因中相应残基的氨基酸类型。一个或多个恒定区可以是人的或实际上是人的。例如,至少70,75,80,85,90,92,95,98,或100%的免疫球蛋白可变结构域、恒定区、恒定结构域(CH1、CH2、CH3、CL1),或整个抗体可以是人的或实际上是人的。

[0070] 所有的或部分抗体可由免疫球蛋白基因或其区段编码。示例性人免疫球蛋白基因包括 κ 、 λ 、 α (IgA1和IgA2)、 γ (IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)、 δ 、 ϵ 和 μ 恒定区基因,以及许多免疫球蛋白可变区基因。全长免疫球蛋白“轻链”(约25KDa或约214个氨基酸)由在NH2端的可变区基因(约110氨基酸)和在C00H-端的 κ 或 λ 恒定区基因编码。全长免疫球蛋白“重链”(约50KDa或约446个氨基酸)类似地由可变区基因(约116个氨基酸)其他上述的恒定区基因之一,例如, γ (编码约330个氨基酸)编码。人HC的长度不同,主要因为HC CDR3从约3个氨基酸残基到超过35个氨基酸残基不等。

[0071] 术语全长抗体的“抗原结合片段”指保持特异性结合感兴趣的靶标能力的全长抗体的一个或多个片段。术语全长抗体的“抗原结合片段”中包括的结合片段的例子包括(i) Fab片段,其是由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段;(ii) F(ab')₂片段,其是包括通过在铰链区的二硫桥连接的两个Fab片段的二价片段;(iii) 由VH和CH1结构域组成的Fd片段;(iv) 由抗体单臂的VL和VH结构域组成的Fv片段,(v) dAb片段(Ward等,(1989) Nature 341: 544-546),其由VH结构域组成;和(vi) 保持功能的分离的互补决定区(CDR)。此外,尽管Fv片段的两个结构域,VL和VH,由各自基因编码,但是它们可使用重组方法通过使得它们能够作为单蛋白质链被制备的合成接头被接合,在所述单蛋白质链中,VL和VH区配对形成称为单链Fv(scFv)的单价分子。见例如,美国专利5,260,203、4,946,778和4,881,175;Bird等(1988) Science 242:423-426;和Huston等(1988) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883。

[0072] 可使用任何适当的技术,包括本领域技术人员已知的常规的技术,获得抗体片段。术语“单特异性抗体”指对特定的靶标,例如表位,显示单一结合特异性和亲和性的抗体。该术语包括“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”,如本文所使用的,其指具有单分子组分的抗体或其片段的制备物,无论抗体是如何产生的。

[0073] 抑制常数(K_i)提供了对抑制剂效力的测量;其是使酶活性降低一半所需要的抑制剂的浓度,并且不依赖于酶或底物浓度。通过测量不同浓度的抑制剂(例如,抑制性结合蛋白)对反应程度的抑制作用(例如,酶活性)获得在不同底物浓度的表观K_i(K_{i,app});将作为抑制剂浓度函数的准一级速率常数的变化拟合至莫里森(Morrison)方程(方程1),产生对表观K_i值的评估。K_i获得自从K_{i,app}与底物浓度的图的线性回归分析推出的y-截距。

$$[0074] \quad v = v_o - v_o \left(\frac{(K_{i,app} + I + E) - \sqrt{(K_{i,app} + I + E)^2 - 4 \cdot I \cdot E}}{2 \cdot E} \right)$$

[0075] 方程1

[0076] 其中v=测量速率;v₀=在没有抑制剂的情况下的速率;K_{i,app}=表观抑制常数;I=总抑制剂浓度;和E=总酶浓度。

[0077] 如本文所使用,“结合亲和力”指表观缔合常数或K_a。K_a是解离常数(K_d)的倒数。对

于具体的靶分子,结合蛋白的结合亲和力可以是,例如至少 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 和 10^{11}M^{-1} 。相对于第二靶标,结合蛋白对第一靶标的较高的亲和性结合可由比结合第二靶标的 K_a (或数值 K_d)较高的结合第一靶标的 K_a (或较小数值 K_d)指示。在这样的情况下,相对于第二靶标(例如,处于第二构象的相同蛋白质或其模拟物;或第二蛋白质),结合蛋白对于第一靶标(例如,处于第一构象的蛋白质或其模拟物)具有特异性。结合亲和力(例如,对于特异性或其他比较)的差异可以是至少1.5、2、3、4、5、10、15、20、37.5、50、70、80、91、100、500、1000或 10^5 倍。

[0078] 结合亲和力可通过各种方法测定,包括平衡透析、平衡结合、凝胶过滤、ELISA、表面等离子共振或光谱学(例如,使用荧光试验)。用于评估结合亲和力的示例性条件是在TRIS-缓冲液(50mM TRIS,150mM NaCl,5mM CaCl_2 ,pH7.5)中。这些技术可用于测量作为结合蛋白(或靶标)浓度的函数的结合的和游离的结合蛋白的浓度。结合的结合蛋白的浓度([结合的])与游离的结合蛋白的浓度([游离的])和靶标上的结合蛋白的结合位点的浓度相关,其中,根据下述方程,(N)是每个靶标分子的结合位点的数量:

[0079] $[\text{结合的}] = N \cdot [\text{游离的}] / ((1/K_a) + [\text{游离的}])$ 。

[0080] 但是,不必总是精确测量 K_a ,因为有时足以获得对亲和力的定量测量,例如使用比如ELISA或FACS分析测定的,其与 K_a 成比例,因此可用于比较,比如确定较高的亲和力是否是例如2倍高,以获得亲和力的定性测量,或获得对亲和力的推导,例如通过功能试验例如体外或体内试验中的活性。

[0081] 术语“结合蛋白”指可与靶标分子相互作用的蛋白质。该术语与“配体”可互换使用。“血浆激肽释放酶结合蛋白”指可与血浆激肽释放酶相互作用(例如,结合)的蛋白质,其尤其包括优选或特异性与血浆激肽释放酶相互作用和/或抑制血浆激肽释放酶的蛋白质。相比在相同条件且没有蛋白质的情况下血浆激肽释放酶的活性,如果蛋白质导致血浆激肽释放酶的活性降低,则蛋白质抑制血浆激肽释放酶。在一些实施方式中,血浆激肽释放酶结合蛋白是抗体。

[0082] 术语“激肽释放酶抑制剂”指抑制激肽释放酶的任何剂或分子。

[0083] 术语“联合(combination)”指使用两种或更多种剂或疗法治疗相同的患者,其中剂或疗法的使用或作用在时间上重叠。剂或疗法可同时施用(例如,作为施用至患者的单制剂或作为同时施用的两个分开的制剂)或以任何顺序相继施用。

[0084] “保守氨基酸取代”是其中氨基酸残基被具有类似侧链的氨基酸残基取代的氨基酸取代。本领域已经定义了具有类似侧链的氨基酸残基的家族。这些家族包括具有下述的氨基酸:碱性侧链(例如,赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如,天冬氨酸、谷氨酸)、不带电的极性侧链(例如,甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、非极性侧链(例如,丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、 β -支链侧链(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳族侧链(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。

[0085] 相对于本文所述的结合蛋白,结合蛋白的一个或多个框架和/或CDR氨基酸残基(或结合环氨基酸残基)可能包括一个或多个突变(例如,取代(例如,保守取代或非必需氨基酸的取代)、插入或缺失)。相对于本文所述的结合蛋白,血浆激肽释放酶结合蛋白可具有突变(例如,取代(例如,保守取代或非必需氨基酸的取代)、插入或缺失)(例如,至少一个、

两个、三个或四个,和/或小于15、12、10、9、8、7、6、5、4、3或2个突变),例如,对蛋白质功能没有实质影响的突变。突变可存在于框架区、CDR(或结合环)和/或恒定区中。在一些实施方式中,突变存在于框架区中。在一些实施方式中,突变存在于CDR中。在一些实施方式中,突变存在于恒定区中。具体的取代是否是耐受的,即,不利地影响生物学性能比如结合活性,可通过例如评估突变是否是保守的或通过Bowie,等(1990) Science 247:1306-1310的方法预测。

[0086] “实际上人的(effectively human)”免疫球蛋白可变区是包括足够数量的人框架氨基酸位置以便免疫球蛋白可变区不在正常人中引起免疫原性反应的免疫球蛋白可变区。“实际上人的”抗体是包括足够数量的人氨基酸位置以便抗体不在正常人中引起免疫原性反应的抗体。

[0087] “表位(epitope)”指被结合蛋白(例如,抗体,比如Fab或全长抗体)结合的靶标化合物上的位点。在靶标化合物是蛋白质的情况下,位点可全部由氨基酸组分组成、全部由蛋白质的氨基酸的化学修饰(例如,糖基部分)组成、或由其组合组成。重叠表位包括至少一个共同的氨基酸残基、糖基基团、磷酸基团、硫酸基团或其他分子特征。

[0088] 如果第一结合蛋白结合第二结合蛋白结合的靶标化合物上的相同位点,或结合与第二结合蛋白结合的位点重叠(例如,50%、60%、70%、80%、90%,或100%重叠,例如,就氨基酸序列或其他分子特征(例如,糖基基团、磷酸基团或硫酸基团)而言)的位点,则第一结合蛋白(例如,抗体)与第二结合蛋白(例如,抗体)“结合相同的表位”。

[0089] 如果第一结合蛋白与其表位的结合减少(例如,减少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%或更多)结合其表位的第二结合蛋白的量,则第一结合蛋白(例如,抗体)与第二结合蛋白(例如,抗体)“竞争结合”。竞争可以是直接的(例如,第一结合蛋白结合与第二结合蛋白结合的表位相同或重叠的表位),或是间接的(例如,第一结合蛋白与其表位的结合造成靶标化合物的空间改变,其降低了第二结合蛋白结合其表位的能力)。

[0090] 如下进行两个序列之间“同源性(homology)”或“序列同一性(sequence identity)”(术语在本文中可互换使用)的计算。为了最佳比较目的,比对序列(例如,缺口可引入第一和第二氨基酸或核酸序列之一或二者中,以进行最佳比对,并且为了比较目的可忽略非同源的序列)。使用具有Blossum 62评分矩阵的GCG软件包中的GAP程序确定最佳比对为最佳分数,缺口罚分为12、缺口延伸罚分为4,和移码缺口罚分为5。然后,比较在相应氨基酸位置或核苷酸位置处的氨基酸残基或核苷酸。当第一序列中的位置被与第二序列中相应位置的氨基酸残基或核苷酸相同氨基酸残基或核苷酸占据时,则分子在该位置是相同的(如本文使用的氨基酸或核酸“同一性”相当于氨基酸或核酸“同源性”)。两条序列之间的同一性百分数是序列共有的相同位置的数量的函数。

[0091] 在优选的实施方式中,用于比较目的被比对的参考序列的长度是参考序列长度的至少30%,优选地至少40%,更优选地至少50%,甚至更优选地至少60%,和甚至更优选地至少70%、80%、90%、92%、95%、97%、98%或100%。例如,参考序列可以是免疫球蛋白可变结构域序列的长度。

[0092] “人源化的(humanized)”免疫球蛋白可变区是被修饰以包括足够数量的人框架氨基酸位置以便免疫球蛋白可变区不在正常人中引起免疫原性反应的免疫球蛋白可变区。对

于“人源化的”免疫球蛋白的描述包括,例如,U.S.6,407,213和U.S.5,693,762。

[0093] 如本文所使用,术语“在低严格、中等严格、高度严格或非常高的严格条件下杂交”描述杂交和洗涤的条件。进行杂交反应的指南可见于Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley&Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6。水性和非水性方法描述在该参考文献中,并且都可被使用。本文提及的具体杂交条件如下:(1) 低严格杂交条件,在6X氯化钠/柠檬酸钠(SSC)中,在约45℃,随后在0.2X SSC,0.1%SDS中,至少50℃,两次洗涤(对于低严格条件,洗涤的温度可提高至55℃);(2) 中等严格杂交条件,在6X SSC中,在约45℃,随后在0.2X SSC,0.1%SDS中,在60℃,一次或多次洗涤;(3) 高度严格杂交条件,在6X SSC中,在约45℃,随后在0.2X SSC,0.1%SDS中,在65℃,一次或多次洗涤;和(4) 非常高的严格杂交条件是0.5M磷酸钠,7%SDS,在65℃,随后在0.2X SSC,1%SDS中,在65℃,一次或多次洗涤。非常高的严格条件(4)是优选的条件并且是应当使用的条件,除非另外指出。本公开包括以低、中、高或非常高的严格性与本文所述的核酸或其补体,例如,编码本文所述的结合蛋白的核酸,杂交的核酸。核酸可与参考核酸的长度相同或在参考核酸长度的30%、20%或10%内。核酸可对应编码本文所述的免疫球蛋白可变结构域序列的区域。

[0094] “分离的组合物”指从可获得分离的组合物天然样品的至少一种组分的至少90%去除的组合物。如果感兴趣的种类或种类的群体按重量-重量计,是至少5%、10%、25%、50%、75%、80%、90%、92%、95%、98%或99%纯的,则人工或天然产生的组合物可以是“具有至少一定程度的纯度的组合物”。

[0095] “分离的”蛋白质指从可获得分离的蛋白质的天然样品的至少一种组分的至少90%的去掉的蛋白质。如果感兴趣的种类或种类的群体按重量-重量计,是至少5%、10%、25%、50%、75%、80%、90%、92%、95%、98%或99%纯的,则蛋白质可以是“具有至少”一定程度的纯度。

[0096] “非必需”氨基酸残基是可与结合剂,例如,抗体的野生型序列不同而不消除或更优选地基本上不改变生物学活性的残基,而改变“必需”氨基酸残基导致活性的大量丢失。

[0097] 通过方法治疗的“患者”、“受试者”或“宿主”(这些术语可交换使用)可意为人或非人动物。

[0098] “需要其的受试者”包括,例如,患本文所述的疾病或病症的受试者或处在发展本文所述的疾病或病症的受试者。

[0099] 术语“激肽释放酶”(例如,血浆激肽释放酶)指肽酶(切割蛋白质中肽键的酶),丝氨酸蛋白酶家族的亚组。血浆激肽释放酶切割激肽原产生激肽,其是一种有效的促炎肽。DX-88(本文也称为“PEP-1”)是血浆激肽释放酶的有效($K_i < 1\text{nM}$)且特异性的抑制剂(NP_000883)。(也见例如,WO 95/21601或WO 2003/103475)。

[0100] KLKb1(血浆激肽释放酶)的氨基酸序列是:

[0101] KLKb1

[0102] >gi|78191798|ref|NP_000883.2|血浆激肽释放酶B1前体[智人]

[0103] MILFKQATYFISLFATVSCGCLTQLYENAFFRGGDVASMYTPNAQYCQMRCTFHPRCLLFSFLPASSI
NDMEKRFGCFLKDSVTGTLPKVHRTGAVSGHSLKQCGHQISACHRDYKGVDMRGVNFNVSKVSSVEECQKRCTSN
IRCQFFSYATQTFHKA EYRNNCLLKYSPPGPTAIKVL SNVESGFS LKPCALSEIGCHMNIFQHLAFSDVDVARVL
TPDAFVCRTICTYHPNCLFFTFYTNVWKIESQRNVCLLKTSESGTPSSSTPQENTISGYSLLTCKRTLPEPCHSKI

YPGVDFGGEELNVTfVKGvNVCQETCTKMIRCQFFTYSLLPEDCKEEKCKCFLRLSMDGSPTRIAyGTQGSSGYSL
RLCNTGDNSVCTTKTSTRIVGGTNSSWGEWPWQVSLQVKLTAQRHLCGGSLIGHQWVLTAAHCFDGLPLQDVWRIY
SGILNLSDITKDTPFSQIKEIIHQNyKVSEGNHDIALIKLQAPLNYTEFQKPICLPSKGDSTSTIYTNCWVTGWGF
SKEKGEIQNILQKVNIPLVTNEECQKRYQDYKITQRMVCAGYKEGGKDACKGDSGGPLVCKHNGMWRLVGITSWGE
GCARREQPGVYTKVAEYMDWILEKTQSSDGKAQMSPA (SEQ ID NO:3)。

[0104] 如本文使用的术语“DX-2922”与术语“X101-A01”可交替使用。下面描述了该抗体的其他变体。

[0105]

抗体身份	描述
X63-G06	使用 ROLIC 发现的非生殖系化的 Fab, 与 M160-G12 相同的 HC 但是不同的 LC
X81-B01	在 HEK 293T 细胞中产生的生殖系化的 IgG
X101-A01	在 CHO 细胞中产生的生殖系化的 IgG, 与 X81-B01 相同的 HC 和 LC 序列
DX-2922	X101-A01 的可选命名

[0106] 如本文使用的术语“DX-2930”与术语“X124-G01”可互换使用。下面描述了该抗体的其他变体。

[0107]

抗体身份	描述
M162-A04	使用噬菌体展示发现的非生殖系化的 Fab
M199-A08	通过 M162-A04 的亲和力成熟衍生的重链 CDR3 变化的 Fab
X115-F02	在 293T 细胞中产生的生殖系化的 Fab, 与 X124-G01 相同的可变重链
X124-G01 或 DX-2930	在 CHO 细胞中产生的生殖系化的 IgG, 其 LC 和 HC 序列与 X115-F02 相同, 除了在 X124-G01 (也称为 DX-2930)中去除了 HC 的 C 端 Lys.

[0108] KLK1

[0109] >gi|13529059|gb|AAH05313.1|激肽释放酶1[智人]

[0110] MWFLVLCLALSLGGTGAAPPIQSRIVGGWECEQHSQPWQAALYHFSTFQCGGILVHRQWVLTAHCIS
DNYQLWLGRHNLFDDENTAQFVHVSESFPHPGFNMSLLENHTRQADEDYSHDLMLLRLTEPADTITDAVKVVELPT
QEPEVGSTCLASGWGSIENPNSFPDDLQCVDLKILPNDECKKVHVQKVTDfMLCVGHLEGGKDTcVGDSGGPLMC
DGVLQGVTswgyVPCGTPNKPSVAVRVLSYVKWIEDTIAENS (SEQ ID NO:4)

[0111] 本文使用的短语“肠胃外施用 (parenteral administration)”和“经肠胃外施用 (administered parenterally)”意思是除了肠和局部施用的施用模式,通常通过注射,包括但不限于静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、被膜下、蛛网膜下、脊柱内、硬膜外和胸骨内注射和输注。

[0112] 术语“预防 (preventing)”受试者中的疾病指使受试者进行药物治疗,例如,施用药物,以便预防疾病的至少一种症状,即,在有害病况 (例如,宿主动物的疾病或其他有害状况) 的临床表现之前施用,从而预防宿主发展有害的病况。“预防”疾病也可称为“预防 (prophylaxis)”或“预防性治疗”。

[0113] “预防有效量”指在剂量上和时间周期内必要的有效量,以实现期望的预防性结果。通常,由于在疾病之前或在疾病早期阶段在受试者中使用预防性剂量,所以预防性有效量可能小于但是不一定小于治疗有效量。

[0114] 如本文所使用,术语“基本上同一的(substantially identical)”(或“基本上同源的(substantially homologous)”)在本文用于指第一氨基酸或核酸序列包含足够数量的、与第二氨基酸或核酸序列相同或等同的(例如,具有类似的侧链,例如,保守的氨基酸取代)氨基酸残基或核苷酸,以便第一和第二氨基酸或核酸序列具有(或编码的蛋白具有)类似的活性,例如,结合活性,结合偏好或生物学活性。在抗体的情况下,第二抗体具有相同的特异性,并且相对于相同的抗原具有至少50%,至少25%,或至少10%的亲和力。

[0115] 与本文公开的序列类似或同源的(例如,至少约85%序列同一性)的序列也是本申请的一部分。在一些实施方式中,序列同一性可以是约85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高。在一些实施方式中,血浆激肽释放酶结合蛋白可与本文所述的结合蛋白具有约85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的序列同一性。在一些实施方式中,血浆激肽释放酶结合蛋白与本文所述的结合蛋白在HC和/或LC框架区(例如,HC和/或LC FR 1、2、3和/或4)可具有约85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的序列同一性。在一些实施方式中,血浆激肽释放酶结合蛋白与本文所述的结合蛋白在HC和/或LC CDRs(例如,HC和/或LC CDR1、2和/或3)可具有约85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的序列同一性。在一些实施方式中,血浆激肽释放酶结合蛋白与本文所述的结合蛋白在恒定区(例如,CH1、CH2、CH3和/或CL1)可具有约85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的序列同一性。

[0116] 另外,当核酸区段在选择性杂交条件(例如,高度严格杂交条件)下与链的补体杂交时,存在实质上的同一性。核酸可存在于全细胞中、细胞裂解物中或以部分纯化或基本上纯的形式。

[0117] 用于生物聚合物的基序序列可包括可以是不同氨基酸的位置。例如,符号“X”在这样的上下文中一般指任何氨基酸(例如,二十种天然氨基酸的任何一种),除非另外指出,例如,指任何非半胱氨酸氨基酸。其他允许的氨基酸可也例如,使用括号和斜线指示。例如,“(A/W/F/N/Q)”意思是允许丙氨酸、色氨酸、苯丙氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺在该特定位置。

[0118] 统计学显著性可通过任何现有技术已知的方法确定。示例性统计学检验包括:学生T检验、Mann Whitney U非参数检验,和Wilcoxon非参数统计学检验。一些统计学上显著的关系的P值小于0.05或0.02。具体的结合蛋白,例如在特异性或结合方面,可显示统计学上显著的(例如,P值<0.05或0.02)的差异。指示两种状态之间可区分的定性或定量的差异的术语,例如“诱导”、“抑制”、“促进”、“升高”、“增加”、“减少”等,可指两种状态之间的差异例如,统计学上显著的差异。

[0119] “治疗有效量”指在剂量上和时间周期内必要的有效的量,以实现期望的治疗性结果。组合物的治疗有效量可根据下述因素而改变:比如个体的疾病状态、年龄、性别和体重,以及蛋白质在个体中引起期望的应答的能力。治疗有效量也是其中组合物的任何有毒或有害作用被治疗有益作用超过的量。

[0120] “治疗有效的剂量”优选地调节疾病或病症的可测量参数。例如,与治疗之前的症

状相比,治疗有效的剂量可减少疾病或病症的症状程度至少约20%,更优选地至少约40%,甚至更优选地至少约60%,和仍更优选地至少约80%。化合物调节可测量的参数,例如疾病相关的参数,的能力可在预测在人病症或病况中的效力的动物模型系统中被评估。可选地,组合物的该性质可通过检查化合物在体外调节参数的能力被评估。

[0121] 在受试者中“治疗”疾病或病症(包括,例如,“治疗”患疾病或病症的受试者或处在发展疾病或病症的风险中的受试者)指使受试者进行药物治疗,例如,施用药物,以便疾病的至少一种症状被预防、治愈、缓解、减轻等。

[0122] “与蛋白质错折叠或聚集相关的疾病(disease associated with protein misfolding or aggregation)”是至少部分由于蛋白质的折叠过程或折叠结构的稳定性的改变(例如,障碍)而出现的疾病。折叠过程的障碍、聚集的增加和天然蛋白质结构的去稳定化可导致功能丧失或功能获得病理学。与蛋白质错折叠或聚集相关的疾病包括但不限于:全身性淀粉样变性病、冷球蛋白血症和镰刀细胞疾病。与蛋白质错折叠或聚集相关的神经疾病包括Jacob-Kreutzfeld疾病(与朊病毒蛋白相关)、阿尔茨海默氏疾病、其他淀粉样蛋白疾病比如家族性淀粉样多神经病(Familial amyloidotic polyneuropathy) (FAP)。

[0123] I. 切割的高分子量激肽原(HMWK)作为生物标记物在自身免疫性疾病的诊断和预后试验中的用途

[0124] 出人意料地,在自身免疫性疾病,比如类风湿性关节炎(RA)、克罗恩氏病(CD)和溃疡性结肠炎(UC)中发现了升高水平的切割的HMWK。下面实施例1。因此,切割的HMWK可用作可靠的生物标记物,用于诊断自身免疫性疾病(例如,RA、UC和CD)、监测这样的自身免疫性疾病的进展和评估疾病的治疗功效。

[0125] 因此,本文描述了基于获得自候选患者的生物样品(例如,血浆样品)中切割的HMWK的水平,针对自身免疫性疾病(例如,RA、UC和CD)的诊断和预后方法。

[0126] 高分子量激肽原(HMWK),也称为Williams-Fitzgerald-Flaujeac因子或Fitzgerald因子或HMWK-激肽释放酶因子,是来自血凝系统以及激肽-激肽释放酶系统的蛋白质。其是吸附至在体内接触血液的生物材料表面的蛋白质。高分子量激肽原(HMWK)作为分子量是约110kDa的单多肽(1-链)多结构域(结构域1-6)蛋白质存在于血浆中。通过结构域4中的pKa1切割HMWK,以释放9个氨基酸,促炎肽缓激肽和2-链形式的HMWK(切割的激肽原)。HMWK的2条链是包含HMWK的结构域1-3的重链,和包含HMWK的结构域5和6的轻链。重链和轻链的分子量分别是约56和46千道尔顿。

[0127] 编码HMWK的人基因是激肽原1(KNG1)。KNG1被转录并且被可选地剪接形成编码HMWK或低分子量激肽原(LMWK)的mRNA。下面提供了HMWK的示例性蛋白质序列:

[0128] >gi|156231037|ref|NP_001095886.1|激肽原-1同种型1前体[智人]

[0129] MKLITILFLCSRLLLSLTQESQSEIDCNDKDLFKAVIDAALKKYNSQNSQNNQFVLYRITEATKTVGSDTFYSFKYEIKEGDCPVQSGKTWQDCEYKDAKAATGECTATVGKRSSTKFSVATQTCQITPAEGPVVTAQYDCLGCVHPISTQSPDLEPILRHGIQYFNNNTQHSSLFMLNEVKRAQRQVAGLNFRITYSIVQTNCSKENFLFLTPDCKSLWNGDTGECTDNAYIDIQLRIASFQNCDIYPGKDFVQPPTKICVGCPRDIPTNSPELEETLHTITKLNAENNATFYFKIDNVKKARVQVVAGKKYFIDFVARETTCSKESNEELTESCETKKLGQSLDCNAEVVVPWEKKIYPTVNCQPLGMISLMKRPPGFSFPRSSRIGEIKEETTVSPHTSMAPAQDEERDSGKEQGHTRRHDWGHEKQRKHNHGHGKHGERDQGHGHRGHLGHGHEQQHGLGHGKFKLDDLEHQGGHVLDHGKHKHGHGKHGKHKNKGKNGKHNGWKTEHL

ASSSEDSTTPSAQTQEKTEGPTPIPSLAKPGVTVTFSDFQSDSLIATMMPPISPAPIQSDDDWIPDIQIDPNGLSFNPISDFPDTTSPKCPGRPWKSVEINPTTQMKESEYFDLTDGLS (SEQ ID NO:5)

[0130] 完整的高分子量激肽原 (HMWK) 可使用例如凝血剂或免疫学方法,例如,放射免疫分析测定(见,例如,Kerbiriou-Nabias,D.M.,Br J Haematol,1984,56 (2):2734-86)。针对人HMWK轻链的单克隆抗体是已知的。见,例如,Reddigari,S.R.&Kaplan,A.P.,Blood,1999,74:695-702。也可使用依赖于显色底物的HMWK的试验。见,例如,Scott,C.F.等Thromb Res,1987,48 (6):685-700;Gallimore,M.J.等Thromb Res,2004,114 (2):91-96。

[0131] 切割的高分子量激肽原 (HMWK),本文也称为“切割的激肽原”可使用例如实施例1中描述的方法,例如蛋白质印迹,来评估。可使用特异性结合切割的HMWK的抗体,比如,例如,小鼠mAb克隆11H05。另外,可使用质谱评估切割的HMWK。用于评估切割的HMWK水平的免疫印迹技术是本领域已知的。见,例如,Buhler R.等Blood Coagul Fibrinolysis,1995,6 (3):223-232。

[0132] 下面提供了切割的激肽原的重链和轻链的示例性序列。

[0133] >切割的激肽原-1重链

[0134] QESQSEEIDCNDKDLFKAVDAALKKYNSQNSQNNQFVLYRITEATKTVGSDTFYSFKYEIKEGDCPVQSGKTWQDCEYKDAKAATGECTATVGKRSSTKFSVATQTCQITPAEGPVVTAQYDCLGCVHPISTQSPDLEPILRHGIQYFNNNTQHSSLFMLNEVKRAQRQVAVGLNFRITYSIVQTNSKENFLFLTPDCKSLWNGDTGECTDNAYIDIQLRIASFQNCDIYPGKDFVQPPTKICVGCPRDIPTNSPELEETLTHTITKLNAENNATFYFKIDNVKKARVQVVAGKKYFIDFVARETTCSKESNEELTESCETKKLGQSLDCNAEYVVPWEKKIYPTVNCQPLGMISLMK (SEQ ID NO:6)

[0135] >切割的激肽原-1轻链

[0136] SSRIGEIKEETTVSPHTSMAPAQDEERDSGKEQGHTRRHDWGHEKQRKHNLGHGKHHERDQGHGHRGHGLGHGHEQQHGLGHGKFKLDDDLHGGHVLDHGKHKHKHGHGKHKNKGKNGKHNGWKTEHLASSEDSTTPSAQTQEKTEGPTPIPSLAKPGVTVTFSDFQSDSLIATMMPPISPAPIQSDDDWIPDIQIDPNGLSFNPISDFPDTTSPKCPGRPWKSVEINPTTQMKESEYFDLTDGLS (SEQ ID NO:7)

[0137] 在一些实施例中,通过蛋白质印迹分析,例如Simple Western™ProteinSimple®蛋白质印迹分析,测量完整的HMWK和切割的HMWK的水平。Simple Western™试验是本领域已知的(见,例如,Rustandi等Qualitative and quantitative evaluation of Simon™,a new CE-based automated Western blot system as applied to vaccine development.Electrophoresis.2012Sep;33 (17):2790-7)。Simple Western™产品也是商业上可获得的(见,例如,ProteinSimple®,Santa Clara,CA)。

[0138] 为了实施本文所述的任何诊断和/或预后方法,生物样品(例如,生物流体样品,比如血浆样品或血清样品)可获得自候选受试者(例如,候选人患者),用于测量切割的HMWK的水平。受试者可以是哺乳动物,更优选地是人。非人哺乳动物包括但不限于农场动物、体育动物、宠物、灵长类、马、狗、猫、小鼠和大鼠。人受试者可以是怀疑患有自身免疫性疾病,比如本文所述的那些,例如,RA、CD或UC的人患者。

[0139] 获得自受试者的生物样品可以是组织或流体样品。流体样品的例子包括但不限于唾液、血液、血浆、血清和尿。在一些实施方式中,来自受试者的生物样品包括白细胞,例如,血液样品。可使用本领域已知的任何方法从自患者获得生物样品,例如,静脉穿刺、活检或

擦拭。分析之前,可将蛋白酶抑制剂或蛋白酶抑制剂混合物添加至生物样品,以抑制HMWK的体外切割。本领域已知的任何蛋白酶抑制剂均可用于本文所述的方法。

[0140] 可通过本领域已知的任何适当的试验测量切割的HMWK的水平(见,例如, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, J. Sambrook, 等, eds., Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001; *Current Protocols in Molecular Biology*, F. M. Ausubel, 等, eds., John Wiley & Sons, Inc., New York. 微阵列技术描述在 *Microarray Methods and Protocols*, R. Matson, CRC Press, 2009 或 *Current Protocols in Molecular Biology*, F. M. Ausubel, 等, eds., John Wiley & Sons, Inc., New York) 中。

[0141] 在一些实施方式中,测量样品中切割的HMWK蛋白质的水平。用于检测切割的HMWK蛋白质水平的试验包括但不限于免疫试验(本文也称为基于免疫的 (immune-based or immuno-based) 试验,例如,蛋白质印迹、免疫组织化学和ELISA试验)、质谱和基于多重珠的试验。用于蛋白质水平检测的这样的试验是本领域已知的。

[0142] 在一些实施例中,通过蛋白质印迹试验测量切割的HMWK的水平,其可涉及如本文所描述的LiCor检测。在其他实施例中,通过免疫组织化学试验测量切割的HMWK蛋白质的水平,其可涉及特异性结合切割的HMWK或特异性结合切割的和未切割的HMWK的结合伴侣,比如抗体。

[0143] 可使用本领域已知的和如本文所描述的方法设计用于蛋白质检测的结合伴侣。在一些实施方式中,切割的HMWK蛋白质结合伴侣,例如,抗切割的HMWK抗体,结合HMWK蛋白质的部分或全部氨基酸序列。蛋白质检测和定量方法的其他例子包括多重免疫试验(如在例如美国专利号6,939,720和8,148,171中描述,和美国专利申请号2008/0255766中公开)和例如在公开的美国专利专利申请号2009/0088329中描述的蛋白质微阵列。考虑将用于切割的HMWK的任何适当的结合伴侣用于检测切割的HMWK水平。在一些实施方式中,结合伴侣是特异性结合HMWK蛋白质或切割的HMWK蛋白质的任何分子。相比其与未切割的HMWK的结合,这样的结合伴侣可以以高得多的亲和力结合切割形式的HMWK(例如,切割的HMWK)。在一些情况下,结合伴侣比如抗体可仅仅结合切割形式的HMWK。

[0144] 用于本文所述方法的抗体可为任何形式,包括但不限于,全长抗体或其抗原结合片段,比如Fab、F(ab)2、Fv、单链抗体、Fab和sFab片段、F(ab')2、Fd片段、scFv或dAb片段。用于产生抗体的方法是本领域熟知的(见,例如, Sambrook等, “*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*” (2nd Ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Lewin, “*Genes IV*”, Oxford University Press, New York, (1990); 和 Roitt等., “*Immunology*” (2nd Ed.), Gower Medical Publishing, London, New York (1989)、W02006/040153、W02006/122786和W02003/002609)。也见本文的描述。

[0145] 在其他实施方式中,用于测量切割的HMWK水平的结合伴侣可以是特异性结合切割的HMWK的非抗体肽分子或适体。用于产生肽分子和适体的方法也是本领域已知的(见,例如,公开的美国专利申请号2009/0075834、美国专利号7435542、7807351和7239742)。

[0146] 当测定了获得自候选受试者的生物样品中切割的HMWK水平时,可与将其与对照水平进行比较,以确定受试者是否患自身免疫性疾病、处在自身免疫性疾病的风险中或怀疑患自身免疫性疾病,所述自身免疫性疾病比如RA、CD或UC。

[0147] 在一些实施方式中,对照水平是对照样品中切割的HMWK水平,所述对照样品比如获得自健康的受试者或健康的受试者群体,优选地是与候选受试者属于相同的物种,的细胞、组织或流体。如本文所使用,健康的受试者是在测量HMWK水平时明显没有目标疾病(例如,RA、CD或UC)或没有疾病历史的受试者。

[0148] 在一些实施方式中,对照水平是使用标准检测方法(例如,蛋白质印迹或免疫组织化学)获得的检测不到的或低于背景/噪音水平的切割的HMWK的水平。优选地,标准检测方法是用于测量候选受试者的样品中切割的HMWK的水平的相同方法。

[0149] 对照水平可也是预定的水平。这样的预定的水平可代表没有如本文所描述的自身免疫性疾病或不处在如本文所描述的自身免疫性疾病的风险中的受试者群体中切割的HMWK的水平。预定的水平可采用各种形式。例如,其可以是单个截止值,比如中位数或平均值。在一些实施方式中,可基于比较组,比如其中一个限定的组已知患有目标自身免疫性疾病(例如,RA、UC或CD)而另一限定的组已知没有目标自身免疫性疾病,来确定这样的预定水平。可选地,预定的水平的范围可以是,例如,代表预定的百分位数内的对照群体中切割的HMWK水平的范围。

[0150] 预定的水平可取决于选择的具体群体。例如,相比成员患有可处于缓解中的目标自身免疫性疾病或处在目标自身免疫性疾病风险中的群体将具有的切割的HMWK范围,明显健康的(没有可检测的疾病或目标自身免疫性疾病,比如RA、CD或UC的病史)将具有不同的‘正常’范围的切割的HMWK。因此,选择的预定水平可考虑受试者所属的类别。本领域技术人员可仅仅通过常规实验选择适当的范围和类别。

[0151] 如本文所描述的对照水平可通过常规技术确定。在一些实施例中,可通过对如本文所述的对照样品进行常规方法(例如,用于在如本文所描述的测试样品中获得切割的HMWK的水平的相同的试验)获得对照水平。在其他实施例中,切割的HMWK的水平可获得自对照群体的成员,并且结果可通过,例如计算程序,进行分析,以获得表示对照群体中切割的HMWK水平的对照水平(预定的水平)。

[0152] 通过比较获得自候选受试者的样品的切割的HMWK的水平与本文所描述的对照水平,可确定候选受试者是否患有目标自身免疫性疾病或处在目标自身免疫性疾病的风险中。例如,如果候选受试者的切割的HMWK水平偏离对照水平(例如,与对照水平相比升高或降低),则候选受试者可能被鉴定为患有目标自身免疫性疾病或处在目标自身免疫性疾病的风险中。

[0153] 如本文所使用“升高的水平或高于对照的水平”意思是切割的HMWK的水平高于对照水平,比如预定的阈值或对照样品中切割的HMWK的水平。本文详细描述了对照水平。切割的HMWK的升高的水平包括,例如比对照水平高1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、300%、400%、500%或更多的切割的HMWK水平。切割的HMWK的升高的水平也包括增加从零态(例如,对照中没有或不可检测的切割的HMWK)至非零态(例如,样品中一些切割的HMWK或可检测的切割的HMWK)的现象。

[0154] 如本文所使用,“降低的水平或低于对照的水平”意思是切割的HMWK的水平小于对照水平,比如预定的阈值或对照样品中切割的HMWK的水平。本文详细描述了对照水平。切割的HMWK的降低的水平包括,例如比对照水平低1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、300%、400%、500%或更多的切割的HMWK水平。切割

的HMWK的降低的水平也包括降低从非零态(例如,样品中一些切割的HMWK或可检测的切割的HMWK)至零态(例如,对照中没有或不可检测的切割的HMWK)的现象。

[0155] 在一些实施方式中,如果在获得自RA候选患者的生物样品中观察到大量水平(例如,至少40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%)的切割的HMWK,则该候选人被诊断为患RA发作(flare)或处在RA发作的风险中。如果在获得自UC或CD候选患者的生物样品中观察到中等水平(例如,约10-30%)的切割的HMWK,则该候选人被诊断为患UC或CD或处在UC或CD的风险中。

[0156] 此外,切割的HMWK的水平可用作用于监测自身免疫性疾病比如RA、UC和CD的发展的生物标记。例如,至少两个生物样品(例如,血清样品或血浆样品)可在不同的时间点获得自患有目标自身免疫性疾病比如RA、UC或CD或处在发展目标自身免疫性疾病比如RA、UC或CD的人受试者。在一些实施例中,可在在获得第一生物样品之后至少1个月(例如,3个月、6个月、9个月或12个月)获得第二生物样品。可测量至少两个生物样品中的切割的HMWK的水平。如果切割的HMWK的水平随着时间的推移升高(例如,后面获得的生物样品中的切割的HMWK的水平高于之前获得的生物样品中的切割的HMWK的水平,例如,至少20%、50%、70%、90%、1倍、5倍、10倍、20倍、50倍或100倍),则指示受试者中疾病的进展(例如,受试者具有发展自身免疫性疾病的高风险或自身免疫性疾病加剧)。

[0157] 而且,切割的HMWK的水平可也用作评估受试者对抗自身免疫治疗,例如,本文所述的那些的反应的生物标记。例如,在治疗过程期间多个生物样品可获得自进行治疗的人患者并且可根据常规技术,比如本文所述的那些测量切割的HMWK的水平。如果进行治疗的人患者中切割的HMWK的水平在治疗期间保持降低(例如,后来获得的生物样品中切割的HMWK的水平小于较早获得的生物样品中的切割的HMWK的水平,例如,至少20%、50%、70%、80%、90%、100%、2倍、5倍、10倍、50倍或100倍),则指示人患者对治疗有应答。另一方面,如果切割的HMWK的水平在治疗期间保持基本上相同(例如,后来获得的生物样品中的切割的HMWK的水平相对于较早获得的生物样品中的切割的HMWK的水平基本上相同或降低小于20%,例如,15%、10%或5%),则指示人患者对治疗无应答。

[0158] 在通过本文所述的任何方法鉴定受试者为患自身免疫性疾病(例如,RA、UC或CD)或处在自身免疫性疾病(例如,RA、UC或CD)的风险中时,可进行适当的治疗,以治疗疾病。在一些实施例中,受试者可通过如本文所描述的一种或多种pKa1抑制剂治疗。在受试者被确定为对通过本文所述的任何方法的治疗没有应答时,可将更高剂量和/或剂量频率的治疗剂(例如,pKa1抑制剂)施用至受试者。可选地,受试者可转换不同的治疗。另一方面,在鉴定为对治疗有反应或不需要进一步治疗的受试者中,保持、降低或停止治疗剂的剂量或剂量频率。

[0159] II. 自身免疫性疾病的治疗

[0160] 本文也描述了用于治疗与血浆激肽释放酶(pKa1)系统有关的疾病的方法,所述疾病包括但不限于糖尿病性黄斑性水肿、视网膜增生、脑外伤、急性脊髓损伤、局部淀粉样变性病、自身免疫性疾病比如牛皮癣、多发性硬化、炎症肠疾病、类风湿性关节炎、血管炎、系统性红斑狼疮肾炎、系统性肥大细胞增生症、严重烧伤和神经病性疼痛(糖尿病和带状疱疹后神经痛)。这样的方法包括向需要治疗的受试者(例如,患有疾病或处在疾病风险中的人患者)经适当的途径施用有效量的一种或多种激肽释放酶抑制剂。

[0161] (A) 血浆激肽释放酶

[0162] 针对其可开发血浆激肽释放酶结合蛋白的示例性血浆激肽释放酶序列可包括人、小鼠或大鼠血浆激肽释放酶氨基酸序列,与这些序列之一或其片段具有80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%,或99%同一性的序列,例如,下面提供的序列。

[0163] 下面显示了用于选择和随后筛选结合蛋白的人血浆激肽释放酶的序列(登录号NP_000883.2)。使用的人血浆激肽释放酶(86kDa)是从人血浆纯化并且通过商业供应商由因子XIIa激活。因子XIIa通过在单个位点(Arg371-Ile372之间,下述序列中切割位点由“/”标记)切割多肽序列而激活前激肽释放酶,以产生活性血浆激肽释放酶,其然后由两条二硫键连接的多肽、约52kDa的重链和约34kDa的催化结构域组成[Colman and Schmaier, (1997) “Contact System: A Vascular Biology Modulator With Anticoagulant, Profibrinolytic, Antiadhesive, and Proinflammatory Attributes” Blood, 90, 3819-3843]

[0164] 下面阐释人、小鼠和大鼠前激肽释放酶氨基酸序列和编码其的mRNA序列。除了活性血浆激肽释放酶(pkal)在单个位置(由“/”表示)切割单多肽链以产生两条链之外,前激肽释放酶的序列与血浆激肽释放酶相同。下面提供的序列是包括信号序列的完整序列。当从表达细胞分泌时,预期信号序列被去除。

[0165] 来自各个物种的示例性血浆激肽释放酶蛋白质可见于GeneBank登录号NP_000883.2(人pKal蛋白质)、NM_000892(人pKal mRNA)、NP_032481.1(小鼠pKal蛋白质)、NM_008455.2(小鼠pKal mRNA)、NP_036857.2(大鼠pKal蛋白质)、和NM_012725(大鼠pKal mRNA)。

[0166] (B) 激肽释放酶抑制剂

[0167] Kunitz结构域抑制剂。激肽释放酶(组织激肽释放酶和/或血浆激肽释放酶)的许多有用的抑制剂包括Kunitz结构域。示例性Kunitz结构域抑制剂描述在美国专利申请公开US20100183625中,其通过引用并入本文。

[0168] 如本文所使用,“Kunitz结构域”是具有至少51个氨基酸和包含至少两个,优选地三个,二硫键的多肽结构域。折叠结构域使得第一和第六半胱氨酸,第二和第四,以及第三和第五半胱氨酸形成二硫键(例如,在具有58个氨基酸的Kunitz结构域中,半胱氨酸可存在于对应于氨基酸5、14、30、38、51和55的位置(根据下面提供的BPTI同源序列的编号)处,并且二硫键可在5和55、14和38以及30和51位之间形成),或者,如果存在两个二硫键,则它们可在其相应半胱氨酸的亚组之间形成。根据下面提供的BPTI序列的编号,各个半胱氨酸之间的间隔可在对应于5至55、14至38和30至51位置之间的下述间隔的7、5、4、3、2、1或0个氨基酸内。BPTI序列可用作指示任何一般Kunitz结构域中特定位置的参考。感兴趣的Kunitz结构域与BPTI的比较可通过鉴定其中比对的半胱氨酸数目最大化的最佳拟合比对进行。

[0169] BPTI的Kunitz结构域的3D结构(以高分辨率)是已知的。一种X射线结构以“6PTI”保藏在Brookhaven Protein Data Bank(Brookhaven蛋白质数据)中。一些BPTI同系物的3D结构(Eigenbrot等, (1990) Protein Engineering, 3 (7): 591-598; Hynes等, (1990) Biochemistry, 29: 10018-10022)是已知的。至少81个Kunitz结构域序列是已知的。已知的人同系物包括也称为组织因子通路抑制剂(TFPI)的LACI的三个Kunitz结构域(Wun等, (1988) J. Biol. Chem. 263 (13): 6001-6004; Girard等, (1989) Nature, 338: 518-20; Novotny

等, (1989) J. Biol. Chem., 264 (31) :18832-18837)、Inter- α -胰蛋白酶抑制剂APP-I的两个Kunitz结构域(Kido等, (1988) J. Biol. Chem., 263 (34) :18104-18107)、来自胶原蛋白的Kunitz结构域、TFPI-2的三个Kunitz结构域(Sprecher等, (1994) PNAS USA, 91:3353-3357)、1型肝细胞生长因子活性抑制剂的Kunitz结构域、2型肝细胞生长因子活性抑制剂的Kunitz结构域、美国专利公开号2004-0152633中描述的Kunitz结构域。LACI是人血清磷糖蛋白,分子量是39kDa,包含三个Kunitz结构域。

[0170] 上述Kunitz结构域称为LACI-K1(残基50至107)、LACI-K2(残基121至178)和LACI-K3(213至270)。LACI的cDNA序列报道在Wun等(J. Biol. Chem., 1988, 263 (13) :6001-6004)中。Girard等(Nature, 1989, 338:518-20)报道了突变研究,其中改变了三个Kunitz结构域中每一个的P1残基。当F.VIIa与组织因子复合时LACI-K1抑制因子VIIa(F.VIIa),并且LACI-K2抑制因子Xa。

[0171] 包含示例性Kunitz结构域的蛋白质包括下述,其中括弧中是SWISS-PROT登录号:

[0172] A4_HUMAN(P05067)、A4_MACFA(P53601)、A4_MACMU(P29216)、A4_MOUSE(P12023)、A4_RAT(P08592)、A4_SAISC(Q95241)、AMBP_PLEPL(P36992)、APP2_HUMAN(Q06481)、APP2_RAT(P15943)、AXP1_ANTAF(P81547)、AXP2_ANTAF(P81548)、BPT1_BOVIN(P00974)、BPT2_BOVIN(P04815)、CA17_HUMAN(Q02388)、CA36_CHICK(P15989)、CA36_HUMAN(P12111)、CRPT_BOOMI(P81162)、ELAC_MACEU(O62845)、ELAC_TRIVU(Q29143)、EPPI_HUMAN(O95925)、EPPI_MOUSE(Q9DA01)、HTIB_MANSE(P26227)、IBP_CARCR(P00993)、IBPC_BOVIN(P00976)、IBPI_TACTR(P16044)、IBPS_BOVIN(P00975)、ICS3_BOMMO(P07481)、IMAP_DROFU(P11424)、IP52_ANESU(P10280)、ISC1_BOMMO(P10831)、ISC2_BOMMO(P10832)、ISH1_STOHE(P31713)、ISH2_STOHE(P81129)、ISIK_HELPO(P00994)、ISP2_GALME(P81906)、IVB1_BUNFA(P25660)、IVB1_BUNMU(P00987)、IVB1_VIPAA(P00991)、IVB2_BUNMU(P00989)、IVB2_DABRU(P00990)、IVB2_HEMHA(P00985)、IVB2_NAJNI(P00986)、IVB3_VIPAA(P00992)、IVBB_DENPO(P00983)、IVBC_NAJNA(P19859)、IVBC_OPHHA(P82966)、IVBE_DENPO(P00984)、IVBI_DENAN(P00980)、IVBI_DENPO(P00979)、IVBK_DENAN(P00982)、IVBK_DENPO(P00981)、IVBT_ERIMA(P24541)、IVBT_NAJNA(P20229)、MCPI_MELCP(P82968)、SBPI_SARBU(P26228)、SPT3_HUMAN(P49223)、TKD1_BOVIN(Q28201)、TKD1_SHEEP(Q29428)、TXCA_DENAN(P81658)、UPTI_PIG(Q29100)、AMBP_BOVIN(P00978)、AMBP_HUMAN(P02760)、AMBP_MERUN(Q62577)、AMBP_MESAU(Q60559)、AMBP_MOUSE(Q07456)、AMBP_PIG(P04366)、AMBP_RAT(Q64240)、IATR_HORSE(P04365)、IATR_SHEEP(P13371)、SPT1_HUMAN(O43278)、SPT1_MOUSE(Q9R097)、SPT2_HUMAN(O43291)、SPT2_MOUSE(Q9WU03)、TFP2_HUMAN(P48307)、TFP2_MOUSE(O35536)、TFPI_HUMAN(P10646)、TFPI_MACMU(Q28864)、TFPI_MOUSE(O54819)、TFPI_RABIT(P19761)、TFPI_RAT(Q02445)、YN81_CAEEL(Q03610)

[0173] 各种方法可用于从序列数据库种鉴定Kunitz结构域。例如,Kunitz结构域的已知的氨基酸序列、共有序列或基序(例如,ProSite基序)可从GenBank序列数据库(National Center for Biotechnology Information, National Institutes of Health(国立卫生研究院国家生物技术信息中心), Bethesda MD), 例如使用BLAST搜索;从HMM的Pfam数据库(隐马尔可夫模型(Hidden Markov Models))(例如,使用Pfam搜索的默认参数)搜索;从SMART数据库搜索;或从ProDom数据库搜索。例如,Pfam版本9的Pfam登录号PF00014提供了许多

Kunitz结构域和用于鉴定Kunitz结构域的HMM。关于Pfam数据库的描述可见于Sonhammer等(1997) *Proteins* 28(3):405-420和关于HMM的详细描述可见于,例如Gribskov等(1990) *Meth.Enzymol.*183:146-159;Gribskov等(1987) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 84:4355-4358;Krogh等(1994) *J.Mol.Biol.*235:1501-1531;和Stultz等(1993) *Protein Sci*,2:305-314中。HMM的SMART数据库(Simple Modular Architecture Research Tool(简单的模块构造研究工具),EMBL,Heidelberg,DE)描述在Schultz等(1998), *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 95:5857和Schultz等(2000) *Nucl.Acids Res* 28:231中。SMART数据库包含通过用HMMer2搜索程序的隐马尔可夫模型分析(profiling)而鉴定的结构域(R.Durbin等(1998) *Biological sequence analysis:probabilistic models of proteins and nucleic acids*.Cambridge University Press)。数据库也被注释和监测。ProDom蛋白质结构域数据库由同源结构域的自动编译(automatic compilation)构成(Corpet等(1999), *Nucl.Acids Res.*27:263-267)。当前版本的ProDom使用SWISS-PROT 38和TREMBL蛋白质数据库的递归PSI-BLAST搜索(Altschul等(1997) *Nucl.Acids Res.*25:3389-3402;Gouzy等(1999) *Computers and Chemistry* 23:333-340。)构建。数据库自动产生每个结构域的共有序列。Prosite列举了作为基序的Kunitz结构域并且鉴定了包括Kunitz结构域的蛋白质。见,例如,Falquet等 *Nucl.Acids Res.*30:235-238(2002)。

[0174] Kunitz结构域主要使用两个环区域(“结合环”)中的氨基酸与靶蛋白酶相互作用。第一环区域在大约对应于BPTI的氨基酸13-20的残基之间。第二环区域在大约对应于BPTI的氨基酸31-39的残基之间。Kunitz结构域的示例性文库在第一和/或第二环区域的一个或多个氨基酸位置不同。当筛选与激肽释放酶相互作用的Kunitz结构域或当选择改善的亲性和变体时,尤其有用的待改变的位置包括:相对于BPTI序列的13、15、16、17、18、19、31、32、34和39位。预期至少这些位置中的一些紧密接触靶蛋白酶。改变其他位置也是有用的,所述位置例如在三维结构中邻近上述位置的位置。

[0175] Kunitz结构域的“框架区”定义为是Kunitz结构域的一部分,但是尤其排除第一和第二结合环区域中的残基的那些残基,即,大约对应于BPTI的氨基酸13-20和BPTI的氨基酸31-39的残基。相反地,不在结合环中的残基可耐受较宽范围的氨基酸取代(例如,保守和/或非保守取代)。

[0176] 在一个实施方式中,这些Kunitz结构域是具有成环结构的变体形式,包括缔合人脂蛋白的凝聚抑制剂(LACI)蛋白的Kunitz结构域1。LACI包含三个界定清楚的内部肽环结构,其是典型的Kunitz结构域(Girard,T.等,1989. *Nature*,338:518-520)。已经筛选、分离了本文所述的LACI的Kunitz结构域1的变体,其以增强的亲和性和特异性结合激肽释放酶(见,例如,美国专利号5,795,865和6,057,287)。这些方法可也用于其他Kunitz结构域框架,以获得与激肽释放酶,例如,血浆激肽释放酶相互作用的其他Kunitz结构域。激肽释放酶功能的有用调谐剂通常结合和/或抑制激肽释放酶,如使用激肽释放酶结合和抑制试验测定的。

[0177] 包括抑制血浆激肽释放酶的Kunitz结构域的示例性多肽具有或包括由SEQ ID NO:2的氨基酸3-60限定的氨基酸序列。另一包括抑制血浆激肽释放酶的Kunitz结构域的示例性多肽具有或包括SEQ ID NO:2的氨基酸序列。

[0178] 示例性多肽包括氨基酸序列:

[0179] Xaa1 Xaa2 Xaa3 Xaa4 Cys Xaa6 Xaa7 Xaa8 Xaa9 Xaa10 Xaa11 Gly Xaa13 Cys Xaa15 Xaa16 Xaa17 Xaa18 Xaa19 Xaa20 Xaa21 Xaa22 Xaa23 Xaa24 Xaa25 Xaa26 Xaa27 Xaa28 Xaa29 Cys Xaa31 Xaa32 Phe Xaa34 Xaa35 Gly Gly Cys Xaa39 Xaa40 Xaa41 Xaa42 Xaa43 Xaa44 Xaa45 Xaa46 Xaa47 Xaa48 Xaa49 Xaa50 Cys Xaa52 Xaa53 Xaa54 Cys Xaa56 Xaa57 Xaa58 (SEQ ID NO:1)。

[0180] “Xaa”指可以是肽链中许多不同氨基酸的任何一种的位置。在第一个例子中，Xaa可以是半胱氨酸之外的任何氨基酸。在另一例子中，采用下述的一种或多种：Xaa10可以是Asp或Glu；Xaa11可以是Asp、Gly、Ser、Val、Asn、Ile、Ala或Thr；Xaa13可以是Pro、Arg、His、Asn、Ser、Thr、Ala、Gly、Lys或Gln；Xaa15可以是Arg、Lys、Ala、Ser、Gly、Met、Asn或Gln；Xaa16可以是Ala、Gly、Ser、Asp或Asn；Xaa17可以是Ala、Asn、Ser、Ile、Gly、Val、Gln或Thr；Xaa18可以是His、Leu、Gln或Ala；Xaa19可以是Pro、Gln、Leu、Asn或Ile；Xaa21可以是Trp、Phe、Tyr、His或Ile；Xaa31可以是Glu、Asp、Gln、Asn、Ser、Ala、Val、Leu、Ile或Thr；Xaa32可以是Glu、Gln、Asp Asn、Pro、Thr、Leu、Ser、Ala、Gly或Val；Xaa34可以是Ile、Thr、Ser、Val、Ala、Asn、Gly或Leu；Xaa35可以是Tyr、Trp或Phe；Xaa39可以是Glu、Gly、Ala、Ser或Asp。氨基酸Xaa6、Xaa7、Xaa8、Xaa9、Xaa20、Xaa24、Xaa25、Xaa26、Xaa27、Xaa28、Xaa29、Xaa41、Xaa42、Xaa44、Xaa46、Xaa47、Xaa48、Xaa49、Xaa50、Xaa52、Xaa53和Xaa54可以是任何氨基酸。

[0181] 另外，SEQ ID NO:1的前四个 (Xaa1、Xaa2、Xaa3、Xaa4) 和最后三个 (Xaa56、Xaa57或Xaa58) 氨基酸中的每一个可任选地存在或不存在，并且如果存在，可以是任何氨基酸，例如任何非半胱氨酸氨基酸。

[0182] 在一个实施方式中，多肽具有含有下述一种或多种特性的序列：Xaa11可以是Asp、Gly、Ser或Val；Xaa13可以是Pro、Arg、His或Asn；Xaa15可以是Arg或Lys；Xaa16可以是Ala或Gly；Xaa17可以是Ala、Asn、Ser或Ile；Xaa18可以是His、Leu或Gln；Xaa19可以是Pro、Gln或Leu；Xaa21可以是Trp或Phe；Xaa31是Glu；Xaa32可以是Glu或Gln；Xaa34可以是Ile、Thr或Ser；Xaa35是Tyr；和Xaa39可以是Glu、Gly或Ala。

[0183] 示例性多肽可包括下述氨基酸：Xaa10是Asp；Xaa11是Asp；Xaa13可以是Pro或Arg；Xaa15是Arg；Xaa16可以是Ala或Gly；Xaa17是Ala；Xaa18是His；Xaa19是Pro；Xaa21是Trp；Xaa31是Glu；Xaa32是Glu；Xaa34可以是Ile或Ser；Xaa35是Tyr；和Xaa39是Gly。

[0184] 也可能使用本文所述的多肽的一部分。例如，多肽可包括针对特定激肽释放酶表位的结合结构域。例如，Kunitz结构域的结合环可被环化并且用于分离，或可接枝在另一结构域上，例如，另一Kunitz结构域的框架。也可能从本文所述的氨基酸序列的N端去除一个、两个、三个或四个氨基酸，和/或从本文所述的氨基酸序列的C端去除一个、两个、三个、四个或五个氨基酸。

[0185] 序列的另外例子包括相对于本文所述的氨基酸序列，例如，上面提供的氨基酸序列，区别是至少一个氨基酸但是小于七个、六个、五个、四个、三个或两个氨基酸差异的那些。在一个实施方式中，小于三个、两个或一个的差异在一个结合环中。例如，相对于本文所述的氨基酸序列，例如，上面提供的氨基酸序列，第一结合环可没有差异。在另一实施例中，第一和第二结合环与本文所述的氨基酸序列，例如，上面提供的氨基酸序列都没有不同。

[0186] 抑制血浆激肽释放酶的其他多肽包括SEQ ID NO:2的氨基酸3-60的约58个氨基酸序列或具有SEQ ID NO:2的60个氨基酸序列的PEP-1多肽。本文使用的术语“PEP-1”和“DX-

88”都指SEQ ID NO:2的60个氨基酸序列。在一个实施方式中,多肽与牛胰蛋白酶抑制剂不同,例如,与牛胰蛋白酶抑制剂的区别是至少一个、两个、三个、五个、十个或十五个氨基酸。

[0187] 本文所述的多肽可使用任何标准多肽合成方案和装置被合成制备。例如,多肽的逐步合成可通过如下程序进行:从初始(即,羧基末端)氨基酸去除氨基(N)端-保护基团并且使其连接多肽的序列中下一氨基酸的羧基端。也适当保护该氨基酸。通过形成活性基团比如形成碳二亚胺、对称的酸酐,或“活性酯”基团比如羟基苯并三唑或五氟苯基酯,进入的氨基酸的羧基可被激活,以与结合的氨基酸的N端反应。优选的固相肽合成方法包括BOC方法,其使用叔丁氧基羰基作为I-氨基保护基团,和FMOC方法,其使用9-芴基甲氧基羰基来保护氨基酸残基的 α -氨基。两种方法是本领域技术人员熟知的(Stewart, J. 和Young, J., *Solid-Phase Peptide Synthesis* (W.H. Freeman Co., San Francisco 1989); Merrifield, J., 1963. *Am. Chem. Soc.*, 85:2149-2154; Bodanszky, M. 和Bodanszky, A., *The Practice of Peptide Synthesis* (Springer-Verlag, New York 1984))。如果期望,另外的氨基和/或羧基末端氨基酸可被设计到氨基酸序列中并且在多肽合成期间被添加。

[0188] 可也使用重组技术产生多肽。重组方法可采用许多细胞和相应的表达载体中的任何一种,所述表达载体包括但不限于细菌表达载体、酵母表达载体、杆状病毒表达载体、哺乳病毒表达载体等。可通过转基因动物,例如,在转基因动物的乳腺中产生本文所述的多肽。在一些情况下,将抑制激肽释放酶的多肽(例如,包括Kunitz结构域的多肽)的编码序列融合至表达载体中的另一编码序列可能是必要或有利地,以形成容易在宿主细胞中表达的融合多肽。可通过例如蛋白酶消化去除部分或所有的另外序列。

[0189] 产生抑制激肽释放酶的多肽(例如,包括Kunitz结构域的多肽)的示例性重组表达系统是酵母表达载体,其允许编码抑制剂多肽的氨基酸序列的核酸序列与编码酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的MAT α 前先导肽(prepro leader peptide)序列的核苷酸序列在相同阅读框中连接,其进而在可操作酵母启动子的控制下。所得重组酵母表达质粒可通过标准方法转化至适当的相容酵母宿主的细胞中,该细胞能够从重组酵母表达载体表达重组蛋白质。优选地,用这样的重组表达载体转化的宿主酵母细胞也能够加工融合蛋白质,以提供活性抑制剂多肽。用于产生重组多肽的其他示例性酵母宿主是毕赤酵母(*Pichia pastoris*)。

[0190] 如上所述,抑制激肽释放酶的多肽可包括本文所述的Kunitz结构域多肽。一些多肽可包括在氨基和/或羧基端的另外的侧翼序列,优选地长度是一至六个氨基酸,条件是这样另外的氨基酸不明显消除激肽释放酶结合亲和力或激肽释放酶抑制活性,从而不能阻止在本文所述的方法和组合物中的用途。可以有意地添加这样的另外氨基酸,以在特定重组宿主细胞中表达多肽,或可添加这样的另外氨基酸,以提供另外的功能,例如,提供与另一分子的接头或提供促进多肽纯化的亲和性部分。优选地,另外的氨基酸(一种或多种)不包括半胱氨酸,其可干扰Kunitz结构域的二硫键。

[0191] 示例性Kunitz结构域多肽包括SEQ ID NO:2的残基3-60的氨基酸序列。当在酵母融合蛋白质表达系统中表达和加工时(例如,基于整合表达质粒pHIL-D2),这样的Kunitz结构域多肽保留来自与酿酒酵母的MAT α -前先导肽序列的融合物的另外的氨基端Glu-Ala二肽。当从酵母宿主细胞分泌时,大部分先导肽从融合蛋白被加工,产生具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的功能性多肽(本文称为“PEP-1”)。

[0192] 典型的Kunitz结构域,例如,包括SEQ ID NO:1的结构域,包含许多不变的位置,例如,在BPTI编号方案中对应于位置5、14、30、33、38、45、51和55的位置是半胱氨酸。这些位置之间的间隔可改变,其改变的程度是在Kunitz结构域折叠内允许的,例如,以便形成三个二硫键。其他位置比如,例如,6、7、8、9、20、24、25、26、27、28、29、41、42、44、46、47、48、49、50、52、53和54位,或对应于这些位置的位置,可以是任何氨基酸(包括非基因编码产生的氨基酸)。在尤其优选的实施方式中,一个或多个氨基酸对应天然序列的氨基酸。在另一实施方式中,至少一个可变位置不同于天然序列的位置。在仍另一优选的实施方式中,氨基酸可每个单独或共同通过保守或非保守氨基酸取代而被取代。

[0193] 保守氨基酸取代用具有类似化学性质的另一氨基酸替换氨基酸,并且对蛋白质功能可以没有影响。非保守氨基酸取代用具有不同化学结构的另一氨基酸替换氨基酸。保守的氨基酸取代的例子包括,例如,Asn→Gln、Arg→Lys和Ser→Thr。在优选的实施方式中,这些氨基酸中的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20和/或21个可独立地或以任何组合共同被选择,以对应于SEQ ID NO:2的相应位置。

[0194] 其他位置,例如,位置10、11、13、15、16、17、18、19、21、22、23、31、32、34、35、39、40、43和45,或对应于这些位置的位置可以是选择的氨基酸的组中的任何一个。例如,SEQ ID NO:1限定了可能的序列的组。该组的每个成员包含,例如,在5、14、30、51和55位的半胱氨酸,和在10、11、13、15、16、17、18、19、21、22、23、31、32、34、35、39、40、43和45位或对应于这些位置的位置的具体氨基酸的组中的任何一个。在优选的实施方式中,这些氨基酸中的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18和/或19个可被独立地或以任何组合共同被选择,以对应于SEQ ID NO:2的相应位置。多肽优选地与SEQ ID NO:2具有至少80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%同一性。

[0195] 两条序列之间序列的比较和同源性百分数的测定可使用数学算法完成。在优选的实施方式中,使用已经并入GCG软件包中的GAP程序中的算法,Needleman和Wunsch (1970), J.Mol.Biol.48:444-453,使用Blossum 62矩阵或PAM250矩阵,并且缺口权重为16、14、12、10、8、6或4和长度权重为1、2、3、4、5或6,测定两条氨基酸序列之间的同源性百分数。在仍另一优选的实施方式中,使用GCG软件包中的GAP程序测定两条核苷酸序列之间的同源性百分数,其使用NWSgapdna.CMP矩阵,并且缺口权重为40、50、60、70或80和长度权重为1、2、3、4、5或6。尤其优选的参数集(并且,在从业者不确定使用什么参数来确定分子是否在同源性范围内时而应该使用的参数集)是Blossum 62评分矩阵、其中缺口罚分为12、缺口延伸罚分为4,和移码缺口罚分为5。

[0196] 结合蛋白抑制剂。在其他实施方式中,激肽释放酶的抑制剂是结合蛋白,比如抗体。示例性结合蛋白比如抗体描述在例如PCT公开W02012/094587和美国专利申请公开US20100183625中,这两篇通过引用以它们整体并入本文。

[0197] 在一个方面中,本公开的特征在于结合血浆激肽释放酶(例如,人血浆激肽释放酶)的蛋白质(例如,分离的蛋白质),其包括至少一个免疫球蛋白可变区。例如,蛋白质包括重链(HC)免疫球蛋白可变结构域序列和/或轻链(LC)免疫球蛋白可变结构域序列。蛋白质可结合和抑制血浆激肽释放酶,例如,人血浆激肽释放酶。

[0198] 蛋白质可包括下述一种或多种特征:(a)人CDR或人框架区;(b)HC免疫球蛋白可变结构域序列包括与本文所述的HC可变结构域的CDR具有至少85、88、89、90、91、92、93、94、

95、96、97、98、99或100%同一性的一个或多个(例如,1、2或3)CDR;(c)LC免疫球蛋白可变结构域序列包括与本文所述的LC可变结构域的CDR具有至少85、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%同一性的一个或多个(例如,1、2或3)CDR;(d)LC免疫球蛋白可变结构域序列与本文所述的LC可变结构域具有至少85、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%同一性(例如,总体上或在框架区或CDR中);(e)HC免疫球蛋白可变结构域序列与本文所述的HC可变结构域具有至少85、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%同一性(例如,总体上或在框架区或CDR中);(f)蛋白质结合被本文所述的蛋白质结合的表位,或与本文所述的蛋白质竞争结合;(g)灵长类CDR或灵长类框架区域;(h)HC免疫球蛋白可变结构域序列包括的CDR1与本文所述的HC可变结构域的CDR1的差别是至少一个氨基酸但是不大于2或3个氨基酸;(i)HC免疫球蛋白可变结构域序列包括的CDR2与本文所述的HC可变结构域的CDR2的差别是至少一个氨基酸但是不大于2、3、4、5、6、7、或8个氨基酸;(j)HC免疫球蛋白可变结构域序列包括的CDR3与本文所述的HC可变结构域的CDR3的差别是至少一个氨基酸但是不大于2、3、4、5或6个氨基酸;(k)LC免疫球蛋白可变结构域序列包括的CDR1与本文所述的LC可变结构域的CDR1的差别是至少一个氨基酸但是不大于2、3、4、或5个氨基酸;(l)LC免疫球蛋白可变结构域序列包括的CDR2与本文所述的LC可变结构域CDR2的差别是至少一个氨基酸但是不大于2、3或4个氨基酸;(m)LC免疫球蛋白可变结构域序列包括的CDR3与本文所述的LC可变结构域CDR3的差别是至少一个氨基酸但是不大于2、3、4、或5个氨基酸;(n)LC免疫球蛋白可变结构域序列与本文所述的LC可变结构域的差别是至少一个氨基酸但是不大于2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸(例如,总体上或在框架区或CDR中);和(o)HC免疫球蛋白可变结构域序列与本文所述的HC可变结构域的差别是至少一个氨基酸但是不大于2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸(例如,总体上或在框架区或CDR中)。

[0199] 血浆激肽释放酶结合蛋白可以是分离的蛋白质(例如,至少70、80、90、95或99%不含其他蛋白质)。血浆激肽释放酶结合蛋白可抑制血浆激肽释放酶,例如,人血浆激肽释放酶。在一些实施方式中,血浆激肽释放酶结合蛋白不结合前激肽释放酶(例如,人前激肽释放酶),但是结合活性形式的血浆激肽释放酶(例如,人血浆激肽释放酶)。

[0200] 在某些实施方式中,蛋白质在血浆激肽释放酶催化结构域或其片段的活性位点或附近结合,或结合与血浆激肽释放酶的活性位点重叠的表位。在一些方面中,蛋白质与本文所述的蛋白质结合相同的表位或与本文所述的蛋白质竞争结合。

[0201] 在一些实施方式中,蛋白质与下述蛋白质竞争或结合与下述蛋白质结合相同的表位:M162-A04、M160-G12、M142-H08、X63-G06、X101-A01(本文也称为DX-2922)、X81-B01、X67-D03、X67-G04、X81-B01、X67-D03、X67-G04、X115-B07、X115-D05、X115-E09、X115-H06、X115-A03、X115-D01、X115-F02、X124-G01(本文也称为DX-2930)、X115-G04、M29-D09、M145-D11、M06-D09和M35-G04。见,例如,PCT公开W02012/094587和美国专利申请公开US 20100183625。

[0202] 在一些实施方式中,蛋白质结合形成血浆激肽释放酶的催化三联体的一个或多个氨基酸:His434、Asp483和/或Ser578(基于人序列编号)。

[0203] 在一些实施方式中,蛋白质结合Ser479、Tyr563和/或Asp585(基于人序列编号)中的一个或多个氨基酸。

[0204] 蛋白质可结合血浆激肽释放酶,例如,人血浆激肽释放酶,结合亲和力是至少 10^5 、

10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 和 10^{11}M^{-1} 。在一个实施方式中,蛋白质结合人血浆激肽释放酶, K_{off} 小于 1×10^{-3} 、 $5 \times 10^{-4}\text{s}^{-1}$ 或 $1 \times 10^{-4}\text{s}^{-1}$ 。在一个实施方式中,蛋白质结合人血浆激肽释放酶, K_{on} 比 1×10^2 、 1×10^3 或 $5 \times 10^3\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 快。在一个实施方式中,蛋白质结合血浆激肽释放酶,但是与其结合血浆激肽释放酶相比,不结合组织激肽释放酶和/或血浆前激肽释放酶(例如,蛋白质效率较低地结合组织激肽释放酶和/或血浆前激肽释放酶(例如,与阴性对照相比,少例如5-、10-、50-、100-或1000倍或根本不结合)。

[0205] 在一个实施方式中,蛋白质抑制人血浆激肽释放酶活性,例如, K_i 小于 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 和 10^{-10}M 。蛋白质的 IC_{50} 可例如小于100nM、10nM或1nM。例如,蛋白质可调节血浆激肽释放酶活性,以及因子XIIa(例如,从因子XII)和/或缓激肽(例如,从高分子量激肽原(HMWK))的产生。蛋白质可抑制血浆激肽释放酶活性,和/或因子XIIa(例如,从因子XII)的产生和/或缓激肽(例如,从高分子量激肽原(HMWK))的产生。蛋白质对人血浆激肽释放酶的亲和力可由 K_D 小于100nm、小于10nM或小于1nM来表征。在一个实施方式中,蛋白质抑制血浆激肽释放酶,但是与其抑制血浆激肽释放酶相比,其不抑制组织激肽释放酶(例如,蛋白质效率较低地抑制组织激肽释放酶(例如,与阴性对照相比,少例如5-、10-、50-、100-或1000倍或根本不抑制)。

[0206] 在一些实施方式中,蛋白质的表观抑制常数($K_{i,\text{app}}$)小于1000、500、100或10nM。

[0207] 血浆激肽释放酶结合蛋白可以是抗体。结合血浆激肽释放酶的抗体可使它们的HC和LC可变结构域序列包括在单条多肽(例如,scFv)中,或在不同的多肽(例如,IgG或Fab)上。

[0208] 在优选的实施方式中,蛋白质是具有选自下述的抗体的轻链和/或重链的抗体(例如,人抗体):M162-A04、M160-G12、M142-H08、X63-G06、X101-A01(本文也称为DX-2922)、X81-B01、X67-D03、X67-G04、X81-B01、X67-D03、X67-G04、X115-B07、X115-D05、X115-E09、X115-H06、X115-A03、X115-D01、X115-F02、X124-G01(本文也称为DX-2930)、X115-G04、M29-D09、M145-D11、M06-D09和M35-G04。

[0209] 在优选的实施方式中,蛋白质是具有一个或多个(例如,1、2或3个)重链CDR的抗体(例如,人抗体),所述重链CDR选自由下述的重链组成的组的相应的CDR:M162-A04、M160-G12、M142-H08、X63-G06、X101-A01(本文也称为DX-2922)、X81-B01、X67-D03、X67-G04、X81-B01、X67-D03、X67-G04、X115-B07、X115-D05、X115-E09、X115-H06、X115-A03、X115-D01、X115-F02、X124-G01(本文也称为DX-2930)、X115-G04、M29-D09、M145-D11、M06-D09和M35-G04。

[0210] 在优选的实施方式中,蛋白质是具有一个或多个(例如,1、2或3个)轻链CDR的抗体(例如,人抗体),所述轻链CDR选自由下述的轻链组成的组的相应的CDR:M162-A04、M160-G12、M142-H08、X63-G06、X101-A01(本文也称为DX-2922)、X81-B01、X67-D03、X67-G04、X81-B01、X67-D03、X67-G04、X115-B07、X115-D05、X115-E09、X115-H06、X115-A03、X115-D01、X115-F02、X124-G01(本文也称为DX-2930)、X115-G04、M29-D09、M145-D11、M06-D09和M35-G04。

[0211] 在优选的实施方式中,蛋白质是具有一个或多个(例如,1、2或3个)重链CDR和一个或多个(例如,1、2或3个)轻链CDR的抗体(例如,人抗体),所述轻链CDR选自由下述的轻链组成的组的相应的CDR:M162-A04、M160-G12、M142-H08、X63-G06、X101-A01(本文也称为DX-

2922)、X81-B01、X67-D03、X67-G04、X81-B01、X67-D03、X67-G04、X115-B07、X115-D05、X115-E09、X115-H06、X115-A03、X115-D01、X115-F02、X124-G01 (本文也称为DX-2930)、X115-G04、M29-D09、M145-D11、M06-D09和M35-G04。

[0212] 在一个实施方式中,HC和LC可变结构域序列是相同多肽链的组分。在另一实施方式中,HC和LC可变结构域序列是不同多肽链的组分。例如,蛋白质是IgG,例如,IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。蛋白质可以是可溶性的Fab。在其他实施中,蛋白质包括Fab2'、scFv、微抗体、scFv::Fc融合体、Fab::HSA融合体、HSA::Fab融合体、Fab::HSA::Fab融合体,或包括本文所述结合蛋白之一的抗原结合位点的其他分子。这些Fab的VH和VL区可作为IgG、Fab、Fab2、Fab2'、scFv、聚乙二醇化的Fab、聚乙二醇化的scFv、聚乙二醇化的Fab2、VH::CH1::HSA+LC、HSA::VH::CH1+LC、LC::HSA+VH::CH1、HSA::LC+VH::CH1或其他适当的构建体而提供。

[0213] 在一个实施方式中,蛋白质是人抗体或人源化的抗体或在人中是非免疫原性的。例如,蛋白质包括一个或多个个人抗体框架区,例如,所有的人框架区,或与人框架区具有至少85、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99%同一性的框架区。在一个实施方式中,蛋白质包括人Fc结构域,或与人Fc结构域具有至少95、96、97、98或99%同一性的Fc结构域。

[0214] 在一个实施方式中,蛋白质是灵长类抗体或灵长类化抗体或在人中是非免疫原性的。例如,蛋白质包括一个或多个灵长类抗体框架区,例如,所有的灵长类框架区,或与灵长类框架区具有至少85、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99%同一性的框架区。在一个实施方式中,蛋白质包括灵长类Fc结构域,或与灵长类Fc结构域具有至少95、96、97、98或99%同一性的Fc结构域。“灵长类”包括人(智人),黑猩猩(黑猩猩(*Pan troglodytes*)和倭黑猩猩(*Pan paniscus*)(倭黑猩猩)),大猩猩(*Gorilla gorilla*)、长臂猿、猴子、狐猴、狐猿(指猴(*Daubentonia madagascariensis*))和眼镜猴。

[0215] 在一些实施方式中,灵长类抗体对人血浆激肽释放酶的亲和力由 K_D 小于1000、500、100或10nM,例如,小于10nM或小于1nM来表征。

[0216] 在一个实施方式中,蛋白质包括人框架区,或与人框架区具有至少95、96、97、98或99%同一性的框架区。在某些实施方式中,蛋白质不包括来自小鼠或兔子的序列(例如,不是鼠抗体或兔抗体)。

[0217] 在一些方面中,本公开提供了结合血浆激肽释放酶(例如,人血浆激肽释放酶)并且包括至少一个免疫球蛋白可变区的蛋白质(例如,结合蛋白,例如,抗体)(例如,本文所述的蛋白质)在治疗本文所述的疾病或病症的方法中的用途。例如,血浆激肽释放酶结合蛋白包括重链(HC)免疫球蛋白可变结构域序列和轻链(LC)免疫球蛋白可变结构域序列。许多示例性血浆激肽释放酶结合蛋白在本文中被描述。

[0218] 可通过使用激肽释放酶靶标以及其他方法,筛选文库而发现抗体。例如,激肽释放酶蛋白质或其区域可在非人动物,例如,啮齿动物中用作抗原。可通过用来自人Fv可变区的等同序列替换不直接参与抗原结合的Fv可变区的序列而产生人源化的抗体。Morrison, S.L., 1985, *Science* 229:1202-1207; Oi等, 1986, *BioTechniques* 4:214; 和Queen等美国专利号5,585,089、US 5,693,761和US 5,693,762提供了产生人源化抗体的一般方法。那些方法包括分离、操作和表达编码来自重链或轻链的至少一条的所有或部分免疫球蛋白Fv可变区的核酸序列。这样的核酸的许多来源是可得。例如,核酸可获得自产生针对如上述预定靶标的抗体的杂交瘤。编码人源化的抗体或其片段的重组DNA可然后被克隆至适当的表

达载体中。

[0219] 免疫球蛋白激肽释放酶结合蛋白(例如,IgG或Fab激肽释放酶结合蛋白)可被修饰以降低免疫原性。在打算用作治疗剂的激肽释放酶结合蛋白中降低的免疫原性是期望的,因为其降低了受试者发展针对治疗性分子的免疫应答的几率。用于降低激肽释放酶结合蛋白的免疫原性的技术包括缺失/修饰潜在的人T细胞表位和‘生殖系化’CDR外部的序列(例如,框架和Fc)。

[0220] 可通过特定的人T细胞表位的缺失或通过WO 98/52976和WO 00/34317公开的方法“去免疫化”,而修饰激肽释放酶-结合抗体。简言之,针对结合II型MHC的肽分析抗体的重链和轻链可变区;这些肽代表潜在的T-细胞表位(如在WO 98/52976和WO00/34317中限定)。对于检测潜在的T-细胞表位,可采用称为“肽线程(peptide threading)”的计算机建模方法,另外,可搜索人II型MHC结合肽的数据库中VH和VL序列中出现的基序,如在WO 98/52976和WO 00/34317中描述。这些基序结合18种主要的II型MHC DR同种异型的任何一种,因此构成潜在的T细胞表位。可通过取代可变区中少数氨基酸残基,或优选地,通过单氨基酸取代,消除检测到的潜在T-细胞表位。进行尽可能保守的取代,通常但是不是排他性的,可使用在人生殖系抗体序列位置中常见的氨基酸。人生殖系序列公开在Tomlinson,I.A.等,1992,J.Mol.Biol.227:776-798;Cook,G.P.等,1995,Immunol.Today Vol.16(5):237-242;Chothia,D.等,1992,J.Mol.Bio.227:799-817中。V BASE目录提供了人免疫球蛋白可变区序列的广泛目录(由Tomlinson,I.A.等MRC Centre for Protein Engineering,Cambridge,UK编辑)。在去免疫化之后,鉴定了变化,可通过诱变或其他合成方法(例如,从头合成、盒取代等)构建编码V_H和V_L的核酸。诱变的可变序列可,任选地,与人恒定区,例如,人IgG1或κ恒定区融合。

[0221] 在一些情况下,潜在的T细胞表位包括已知或预期对于抗体功能重要的残基。例如,潜在的T细胞表位通常偏向CDR。另外,潜在的T细胞表位可出现在对于抗体结构和结合重要的框架残基中。消除这些潜在表位的变化在一些情况下需要更详细监视,例如,通过制备和测试在有和没有改变的链。在可能的情况下,通过CDR外部的取代消除与CDR重叠的潜在的T细胞表位。在一些情况下,CDR内的改变是唯一选择,因此应测试有和没有该取代的变体。在其他情况下,去除潜在的T细胞表位需要的取代处于对于抗体结合可能至关重要的框架内部的残基位置。在这些情况下,应测试有和没有这些取代的变体。因此,在一些情况下,设计若干变异的、去免疫化的重链和轻链可变区,并且测试各种重/轻链组合,以便鉴定最佳去免疫化的抗体。通过考虑不同变体的结合亲和力,结合去免疫化的程度,即,保留在可变区中的潜在的T细胞表位的数量,可然后作出最终去免疫化的抗体的选择。去免疫化可用于修饰任何抗体,例如,包括非人序列的抗体,例如,合成抗体、鼠抗体其他非人单克隆抗体、或分离自展示文库的抗体。

[0222] 通过将框架区中一个或多个非生殖系氨基酸复原成抗体相应的生殖系氨基酸,而“种系化”激肽释放酶结合抗体,只要基本上保持结合特性。类似的方法可也用于恒定区,例如,恒定免疫球蛋白结构域。

[0223] 结合激肽释放酶的抗体,例如本文所述的抗体,可被修饰,以便使得抗体的可变区与一个或多个生殖系序列更类似。例如,在框架、CDR或恒定区中,例如,抗体可包括一个、两个、三个或更多个氨基酸取代,,以使得与参考生殖系序列更类似。一种示例性生殖系化方

法可包括鉴定与分离的抗体的序列类似的一个或多个生殖系序列(例如,在具体数据库中最类似)。然后,递增地或结合其他突变,在分离的抗体中进行突变(在氨基酸水平上)。例如,制备包括编码一些或所有可能的生殖系突变的序列的核酸文库。然后评估突变的抗体,例如,以鉴定相对于分离的抗体具有一个或多个另外的生殖系残基并且仍有用(例如,具有功能活性)的抗体。在一个实施方式中,尽可能多的生殖系残基被引入分离的抗体中。

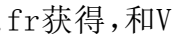

[0224] 在一个实施方式中,诱变用于取代或插入一个或多个生殖系残基到框架和/或恒定区中。例如,生殖系框架和/或恒定区残基可来自与被修饰的非可变区类似(例如,最类似)的生殖系序列。诱变之后,可评估抗体的活性(例如,结合或其他功能活性),以确定生殖系残基或残基是否是耐受的(即,不消除活性)。可在框架区中进行类似的诱变。

[0225] 可以以不同的方式进行选择生殖系序列。例如,在生殖系序列符合选择或相似性的预定标准,例如,至少一定百分数的同一性,例如,至少75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或99.5%同一性的情况下,可选择生殖系序列。可使用至少2、3、5或10条生殖系序列进行选择。在CDR1和CDR2的情况下,鉴定类似的生殖系序列可包括选择一条这样的序列。在CDR3的情况下,鉴定类似的生殖系序列可包括选择一条这样的序列,但是可包括使用分别有助于氨基末端部分和羧基末端部分的两条生殖系序列。在其他实施中,使用例如大于一条或两条生殖系序列,以形成共有序列。

[0226] 在一个实施方式中,就具体的参考可变结构域序列,例如,本文所述的序列而言,相关的可变结构域序列具有至少30、40、50、60、70、80、90、95或100%的CDR氨基酸位置,其与参考CDR序列中的残基不同,所述残基与在人生殖系序列(即,由人生殖系核酸编码的氨基酸序列)中相应位置的残基一致。

[0227] 在一个实施方式中,就具体的参考可变结构域序列,例如,本文所述的序列而言,相关的可变结构域序列具有至少30、50、60、70、80、90或100%的FR区域,其与来自人生殖系序列,例如,与参考可变结构域序列相关的生殖系序列的FR序列一致。

[0228] 因此,可能分离与给定的感兴趣的抗体具有类似活性的抗体,但是该抗体与一个或多个生殖系序列,尤其一个或多个人生殖系序列更类似。例如,抗体可以与CDR外部的区域(例如,框架区)中的生殖系序列具有至少90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或99.5%同一性。此外,抗体在CDR区域中可包括至少1、2、3、4或5个生殖系残基,生殖系残基来自与被修饰的可变区的类似的(例如,最类似的)生殖系序列。主要感兴趣的生殖系序列是人生殖系序列。抗体的活性(例如,通过 K_A 测量的结合活性)可以是初始抗体的100、10、5、2、0.5、0.1和0.001倍内。

[0229] 已经测定了人免疫球蛋白基因的生殖系序列,其可获得自许多来源,包括国际ImmunoGeneTics信息系统® (IMGT),经世界万维网在获得,和V BASE目录(由Tomlinson,I.A.等MRC Centre for Protein Engineering,Cambridge,UK编辑,经世界万维网在获得)。

[0230] V_k 的示例性生殖系参考序列包括:012/02、018/08、A20、A30、L14、L1、L15、L4/18a、L5/L19、L8、L23、L9、L24、L11、L12、011/01、A17、A1、A18、A2、A19/A3、A23、A27、A11、L2/L16、L6、L20、L25、B3、B2、A26/A10和A14。见,例如,Tomlinson等,1995,EMBO J.14(18):4628-3。

[0231] HC可变结构域的生殖系参考序列可基于具有特定标准结构,例如,H1和H2高变环中的1-3结构的序列。免疫球蛋白可变结构域的高变环的标准结构可从其序列推断,如在下

述文献中描述的:Chothia等,1992,J.Mol.Biol.227:799-817;Tomlinson等,1992,J.Mol.Biol.227:776-798);和Tomlinson等,1995,EMBO J.14(18):4628-38.1-3结构的示例性序列包括:DP-1、DP-8、DP-12、DP-2、DP-25、DP-15、DP-7、DP-4、DP-31、DP-32、DP-33、DP-35、DP-40、7-2、hv3005、hv3005f3、DP-46、DP-47、DP-58、DP-49、DP-50、DP-51、DP-53和DP-54。

[0232] 有用的多肽可也由与编码本文所述的多肽的核酸杂交的核酸编码。核酸可在中、高或非常高的严格条件下杂交。如本文所使用,术语“在低严格、中等严格、高度严格或非常高的严格条件下杂交”描述了杂交和洗涤的条件。进行杂交反应的指南可见于Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley&Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6, 其通过参考并入本文。水性和非水性方法描述在该参考文献中, 并且都可使用。本文提及的具体杂交条件如下: (1) 低严格杂交条件, 在6X氯化钠/柠檬酸钠(SSC)中, 约45℃, 随后在0.2X SSC, 0.1% SDS中, 至少50℃, 两次洗涤(对于低严格条件, 洗涤的温度可提高至55℃); (2) 中等严格杂交条件, 在6X SSC中, 约45℃, 随后在0.2X SSC, 0.1% SDS中, 60℃, 一次或多次洗涤; (3) 高度严格杂交条件, 在6X SSC中, 约45℃, 随后在0.2X SSC, 0.1% SDS中, 65℃, 一次或多次洗涤; 和(4) 非常高的严格杂交条件是0.5M磷酸钠, 7% SDS, 在65℃, 随后在0.2X SSC, 1% SDS中, 65℃, 一次或多次洗涤。

[0233] 蛋白质生产。标准重组核酸方法可用于表达结合血浆激肽释放酶的蛋白质。一般而言, 编码蛋白质的核酸序列被克隆至核酸表达载体中。当然, 如果蛋白质包括多条多肽链, 则每条链可被克隆至表达载体中, 例如, 在相同或不同细胞中表达的不同载体。

[0234] 抗体生产。可在细菌细胞, 例如, 大肠杆菌(E.coli)细胞中产生一些抗体, 例如, Fab。例如, 如果Fab被包括展示实体和噬菌体蛋白质(或其片段)之间的抑制性终止密码子的噬菌体展示载体中的序列编码, 那么可将载体核酸转移至不能抑制终止密码子的细菌细胞中。在该情况下, Fab不被融合至基因III蛋白质, 并且被分泌至周质和/或培养基中。

[0235] 抗体也可在真核细胞中产生。在一个实施方式中, 抗体(例如, scFv's)在酵母细胞比如毕赤酵母属(Pichia)(见, 例如, Powers等, 2001, J. Immunol. Methods. 251:123-35), 汉逊酵母属(Hansenula)或酵母属(Saccharomyces)中被表达。

[0236] 在一个优选的实施方式中, 抗体在哺乳动物细胞中产生。用于表达克隆抗体或其抗原结合片段的优选的哺乳动物宿主细胞包括中国仓鼠卵巢(CHO细胞)(包括dhfr-CHO细胞, 描述在Urlaub和Chasin, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220中, 与DHFR选择标记一起使用, 所述选择标记例如, 如在Kaufman和Sharp, 1982, Mol. Biol. 159:601621中描述的)、淋巴细胞细胞系, 例如, NS0骨髓瘤细胞和SP2细胞、COS细胞、HEK293T细胞(J. Immunol. Methods (2004) 289(1-2):65-80)、和来自转基因动物, 例如, 转基因哺乳动物的细胞。例如, 细胞是乳腺上皮细胞。

[0237] 除了编码多样化的免疫球蛋白结构域的核酸序列, 重组表达载体可携带另外的序列, 比如调节宿主细胞中载体复制的序列(例如, 复制起点)和选择标记基因。选择标记基因有助于其中已经引入载体的宿主细胞的选择(见例如, 美国专利号4,399,216、4,634,665和5,179,017)。例如, 通常选择标记基因赋予已经引入载体的宿主细胞对药物, 比如G418、潮霉素或氨甲喋呤的抗性。优选的选择标记基因包括二氢叶酸还原酶(DHFR)基因(用于通过

氨甲喋呤选择/扩增的dhfr⁻宿主细胞中)和neo基因(用于G418选择)。

[0238] 在用于抗体或其抗原结合部分的重组表达的示例性系统中,编码抗体重链和抗体轻链的重组表达载体通过磷酸钙介导的转染被引入dhfr⁻CHO细胞中。在重组表达载体内,抗体重链和轻链基因各自可操作地连接至增强子/启动子调节元件(例如,源自SV40、CMV、腺病毒等,比如CMV增强子/AdMLP启动子调节元件或SV40增强子/AdMLP启动子调节元件),以驱动基因的高水平的转录。重组表达载体也携带DHFR基因,其允许选择已经使用氨甲喋呤选择/扩增用载体转染的CHO细胞。培养选择的转化体宿主细胞,以允许抗体重链和轻链的表达并且从培养基回收完整的抗体。使用标准分子生物学技术制备重组表达载体、转染宿主细胞、选择转化子、培养宿主细胞和从培养基回收抗体。例如,可通过亲和层析用结合蛋白质A或蛋白质G的基质分离一些抗体。

[0239] 对于包括Fc结构域的抗体,抗体生产系统可产生其中Fc区域被糖基化的抗体。例如,IgG分子的Fc结构域在CH2结构域中的天冬酰胺297被糖基化。该天冬酰胺是用于经双触角型寡糖进行修饰的位点。已经表明该糖基化对于由Fcγ受体和补体C1q介导的效应子功能是必要的(Burton和Woof,1992,Adv.Immunol.51:1-84;Jefferis等,1998,Immunol.Rev.163:59-76)。在一个实施方式中,在适当使对应于天冬酰胺297的残基糖基化的哺乳动物表达系统中产生Fc结构域。Fc结构域可也包括其他真核翻译后修饰。

[0240] 抗体可也通过转基因动物产生。例如,美国专利号5,849,992描述了在转基因哺乳动物的乳腺中表达抗体的方法。构建转基因,其包括乳汁特异性(milk-specific)启动子和编码感兴趣的抗体核酸以及用于分泌的信号序列。由这样的转基因哺乳动物的雌性产生的乳汁包括,其中分泌的感兴趣的抗体。可从乳汁纯化抗体,或者,对于一些应用,直接使用。

[0241] (C) 修饰

[0242] 可能以各种方式修饰抑制激肽释放酶的多肽。例如,多肽可被连接至一个或多个聚乙二醇部分,以稳定化合物或延长驻留时间,例如,延长至少2、4、5、8、10、15、20、50、100、500或1000倍。

[0243] 在一个实施方式中,激肽释放酶结合蛋白物理地连接至部分,所述部分提高其稳定性和/或在循环例如,血液、血清、淋巴或其他组织中的驻留,例如,提高至少1.5、2、5、10或50倍。例如,激肽释放酶结合蛋白可连接聚合物,例如,基本上非抗原聚合物,比如聚环氧烷或聚环氧乙烷。适当的聚合物在重量上有很大的不同。可使用数均分子量的范围约200至约35,000(或约1,000至约15,000,和2,000至约12,500)的聚合物。例如,激肽释放酶结合蛋白可缀合至水溶性的聚合物,例如,亲水性聚乙烯聚合物,例如聚乙烯醇和聚乙烯吡咯烷酮。多个聚合物部分可连接至一条多肽,例如,至少两个、三个或四个这样的部分,其例如平均分子量为例如约2,000至7,000道尔顿。这样的聚合物的非限制性列表包括聚环氧烷均聚物,比如聚乙二醇(PEG)或聚丙二醇、聚氧乙烯化的多元醇、其共聚物和其嵌段共聚物,前提是嵌段共聚物的水溶解度被保持。

[0244] 例如,多肽可缀合至水溶性的聚合物,例如,亲水性聚乙烯聚合物,例如聚乙烯醇和聚乙烯吡咯烷酮。这样的聚合物的非限制性例子包括聚环氧烷均聚物,比如聚乙二醇(PEG)或聚丙二醇、聚氧乙烯化的多元醇、其共聚物和其嵌段共聚物,前提是嵌段共聚物的水溶解度被保持。另外有用的聚合物包括聚氧化烯比如聚氧乙烯、聚氧丙烯,以及聚氧乙烯和聚氧丙烯的嵌段共聚物(普卢兰尼克(Pluronic));聚甲基丙烯酸酯、卡波姆;支链或不

分枝的多糖,其包括糖类单体,D-甘露糖、D-和L-半乳糖、岩藻糖、果糖、D-木糖、L-阿拉伯糖、D-葡萄糖醛酸、唾液酸、D-半乳糖醛酸、D-甘露糖醛酸(例如聚甘露糖醛酸或藻酸)、D-葡糖胺、D-半乳糖胺、D-葡萄糖和神经氨酸,其包括同聚多糖和杂多糖,比如乳糖、支链淀粉、淀粉、羟乙基淀粉、直链淀粉、硫酸葡聚糖、葡聚糖、糊精、糖原、或酸性粘多糖的多糖亚单位,例如透明质酸;糖醇类的聚合物比如聚山梨糖醇和聚甘露糖醇;肝素或类肝素。

[0245] 结合蛋白的一个或多个框架和/或CDR氨基酸残基相对于本文所述的结合蛋白包括一个或多个突变(例如,取代(例如,保守取代或非必需氨基酸的取代)、插入或缺失)是可能的。血浆激肽释放酶结合蛋白可具有相对于本文所述的结合蛋白的突变(例如,取代(例如,保守取代或非必需氨基酸的取代)、插入或缺失)(例如,至少一个、两个、三个或四个,和/或小于15、12、10、9、8、7、6、5、4、3或2个突变),例如,对蛋白质功能没有实质影响的突变。突变可出现在框架区、CDR和/或恒定区中。在一些实施方式中,突变出现在框架区中。在一些实施方式中,突变出现在CDR中。在一些实施方式中,突变出现在恒定区中。具体的取代是否是耐受的(即,不不利地影响生物性能比如结合活性),可通过例如评估突变是否是保守的或通过Bowie,等(1990) Science247:1306-1310的方法预测。

[0246] 激肽释放酶结合蛋白可也连接载体蛋白,例如,血清白蛋白,比如人血清白蛋白。例如,翻译融合体(translational fusion)可用于将载体蛋白与激肽释放酶结合蛋白连接。

[0247] (D) 治疗与激肽释放酶系统相关的自身免疫疾病

[0248] 如本文所描述的一种或多种pKa1抑制剂可用于治疗与pKa1系统相关的疾病,包括但不限于糖尿病性黄斑性水肿、视网膜增生、脑外伤、急性脊髓损伤、局部淀粉样变性、自身免疫性疾病比如牛皮癣、多发性硬化、炎症肠疾病、类风湿性关节炎、血管炎、系统性红斑狼疮肾炎、系统性肥大细胞增生症、严重烧伤和神经病性疼痛(糖尿病和带状疱疹后神经痛)。

[0249] 处在发展自身免疫或本文提到的其他pKa1相关疾病风险中的受试者(例如,人患者)可以是例如患有与疾病发展相关的疾病的受试者、已经暴露于与疾病发展相关的环境因素的受试者、具有疾病家族历史的受试者、或携带与疾病发展相关的基因的受试者。

[0250] 受试者可以是需要治疗自身免疫或其他pKa1相关疾病中的一种的人(例如,患疾病或处在发展疾病风险中的人)或非人受试者(例如,自身免疫或其他pKa1相关疾病中的一种的动物模型)。

[0251] 在一些实施方式中,受试者是处在发展自身免疫性疾病比如类风湿性关节炎(RA)、克罗恩氏病(CD)或溃疡性结肠炎(UC)的风险中的受试者(例如,人患者)。自身免疫性疾病是由对受试者的自身身体的异常免疫应答造成的疾病。异常的免疫应答可针对某些器官或组织,这取决于自身免疫性疾病的类型。

[0252] RA是慢性炎症性疾病,其一般影响关节,比如手和/或脚的滑膜关节。RA的炎症反应通常造成软骨的破坏和关节的融合,导致功能和可动性丧失。RA的症状包括肿胀的和/或发热的关节、僵硬、风湿性结节、疲劳、发热和体重减轻。用于RA的示例性治疗包括物理疗法、矫形器(orthoses)、止痛剂、抗炎症药物、类固醇类和缓解疾病的抗风湿性药(DMARD)。

[0253] CD是影响胃肠道的任何部分的炎症肠疾病。症状包括腹部疼痛、腹泻、发热、疲劳和体重减轻。对于CD的示例性治疗包括皮质类固醇、5-氨基水杨酸药物、硫唑嘌呤、氨甲喋

呤、英夫利昔(infliximab)、阿达木单抗(adalimumab)、赛托珠单抗(certolizumab)、那他株单抗(natalizumab)、膳食调整和外科手术。

[0254] UC是大体上影响大肠的炎性肠疾病。症状包括血性和/或含粘液的腹泻、体重减轻、贫血、腹部疼痛和直肠出血。对于UC的示例性治疗包括5-氨基水杨酸药物、皮质类固醇、硫唑嘌呤、布地奈德、英夫利昔、阿达木单抗和外科手术。

[0255] (E) 联合疗法

[0256] 血浆激肽释放酶抑制剂可与作为用于本文所述的疾病或病症的联合疗法的一部分的另一治疗剂一起施用。

[0257] 可以多种不同的配置提供激肽释放酶抑制剂和另一治疗剂的联合疗法。在通过关节内注射施用激肽释放酶抑制剂的情况下,激肽释放酶抑制剂和治疗剂可作为单组合物共同施用,或它们可通过分开注射而被施用。在一些情况下,激肽释放酶抑制剂和治疗剂在时间上接近(例如,注射之间短的时间间隔,比如在相同的治疗期间)或以更宽的间隔被施用,这取决于联合疗法的两种组分的期望的施用计划。当激肽释放酶抑制剂通过全身性(肠胃外)施用而被施用时,激肽释放酶抑制剂和治疗剂可以在时间上接近或以更宽的间隔施用,这取决于联合疗法的两个组分的期望的给药计划。

[0258] 在其他实施方式中,激肽释放酶抑制剂可与用于治疗或预防自身免疫性疾病牵涉的炎症的其他化合物组合施用。示例性抗炎剂包括,例如,类固醇类(例如,皮质醇、可的松、氟氢可的松、强的松(Prednisone)、6[α]-甲基强的松、曲安西龙(triamcinolone)、倍他米松或地塞米松),非甾类抗炎药物(NSAIDs(例如,阿司匹林、对乙酰氨基酚(acetaminophen)、托美丁(tolmetin)、异丁苯丙酸、甲芬那酸(mefenamic acid)、吡罗昔康(piroxicam)、萘丁美酮(nabumetone)、罗非考昔(rofecoxib)、塞来昔布(celecoxib)、依托度酸(etodolac)或尼美舒利(nimesulide))。在另一实施方式中,其他治疗剂是抗生素(例如,万古霉素、青霉素、阿莫西林、氨苄青霉素、头孢噻肟、头孢曲松钠、头孢克肟(cefixime)、利福平甲硝基羟乙唑、多西环素或链霉素)。在另一实施方式中,其他治疗剂是PDE4抑制剂(例如,罗氟司特(roflumilast)或咯利普兰(rolipram))。在另一实施方式中,其他治疗剂是抗组胺剂(例如,苯甲嗪(cyclizine)、羟嗪、异丙嗪(promethazine)或苯海拉明(diphenhydramine))。

[0259] 抗炎剂的进一步例子包括,例如,醋氯芬酸(aceclofenac)、阿西美辛(acemetacin)、e-乙酰氨基己酸、对乙酰氨基酚、醋氨沙洛(acetaminosalol)、乙酰苯胺(acetanilide)、乙酰水杨酸、S-腺苷蛋氨酸(adenosylmethionin)、阿氯芬酸(alclofenac)、阿氯米松(alclometasone)、阿芬太尼(alfentanil)、阿尔孕酮(algestone)、烯丙罗定(allylprodine)、阿明洛芬(alminoprofen)、阿洛普令(aloxiprin)、阿法罗定(alphaprodine)、双乙酰水杨酸铝、安西奈德(amcinonide)、氨芬酸(amfenac)、氨氯苯噁嗪(aminochlorthenoxazin)、3-氨基-4-羟基丁酸、2-氨基-4-甲基吡啶、氨丙吡酮(aminopropylon)、氨基比林(aminopyrine)、阿米西群(amixetrine)、水杨酸铵、安吡昔康(ampiroxicam)、呱氨托美丁(amtolmetin guacil)、阿尼利定(anileridine)、安替比林(antipyrine)、安曲非宁(antrafenine)、阿扎丙宗(apazone)、倍氯米松(beclomethason)、苄达酸(bendazac)、贝诺酯(benorylate)、苯噁洛芬(benoxaprofen)、苄哌立隆(benzpiperylon)、苄达明(benzydamine)、苄吗啡(benzylmorphine)、柏莫洛芬

(bermoprofen)、倍他米松、倍他米松-17-戊酸盐、贝齐米特(bezitramide)、[α]-没药醇、溴芬酸()、对溴乙酰苯胺、5-溴水杨酸乙酸酯、溴水杨醇、布西丁(bucetin)、布氯酸(bucloxic acid)、布可隆(bucolome)、布地奈德(budesonide)、丁苯羟酸(bufexamac)、布马地宗(bumadizon)、丁丙诺啡(buprenorphine)、布他西丁(butacetin)、布替布芬(butibufen)、布托啡诺(butorphanol)、卡马西平(carbamazepine)、卡必芬(carbiphen)、卡洛芬(caiprofen)、卡沙兰(carsalam)、氯代丁醇、氯泼尼松(chloroprednisone)、氯西诺嗪(chlorthenoxazin)、水杨酸胆碱、辛可芬(cinchophen)、桂美辛(cinmetacin)、西拉马朵(ciramadol)、环氯茛酸(clidanac)、氯倍他索(clobetasol)、氯可托龙(clocortolone)、氯美辛(clometacin)、氯尼他秦(clonitazene)、氯尼辛(clonixin)、氯吡酸(clopirac)、氯泼尼醇(cloprednol)、丁香、可待因、可待因甲基溴、磷酸可待因、硫酸可待因、可的松、可的伐唑(cortivazol)、克罗丙胺(cropropamide)、克罗乙胺(crotethamide)和环佐辛(cyclazocine)。

[0260] 抗炎剂的进一步实施例包括地夫可特(deflazacort)、去氢睾酮(dehydrotestosterone)、地素吗啡(desomorphine)、地索奈德(desonide)、去羟米松(desoximetasone)、地塞米松、地塞米松-21-异烟酸酯、右奥沙屈(dexoadrol)、右吗拉胺(dextromoramide)、右丙氧芬(dextropropoxyphene)、去氧皮质酮(deoxycorticosterone)、地佐辛(dezocine)、地恩丙胺(diampromide)、双吗啡酮(diamorphone)、双氯芬酸(diclofenac)、二苯米唑(difenamizole)、联苯吡胺(difenpiramide)、二氟拉松(diflorasone)、二氟可龙(diflucortolone)、二氟尼柳(diflunisal)、二氟泼尼酯(difluprednate)、二氢可待因、醋氢可待酮(dihydrocodeinone enol acetate)、双氢吗啡、乙酰水杨酸二羟铝、地美沙朵(dimenoxadol)、地美庚醇(dimepheptanol)、二甲噻噻丁烯、吗苯丁酯(dioxaphetyl butyrate)、地匹哌酮(dipipanone)、diprocetyl、安乃近(dipyrone)、地他唑(ditazol)、卓喜康(droxicam)、依莫法宗(emorfazone)、苯乙氨茴酸(enfenamic acid)、甘草次酸(enoxolone)、依匹唑(epirizole)、依他佐辛(eptazocine)、依特柳酯(etersalate)、乙水杨胺(ethenzamide)、依索庚嗪(ethoheptazine)、依托沙秦(ethoxazene)、乙基甲基噻丁烯、乙基吗啡、依托度酸(etodolac)、依托芬那酯(etofenamate)、依托尼秦(etonitazene)、定子香酚(eugenol)、联苯乙酸(felbinac)、芬布芬(fenbufen)、芬克洛酸(fenclozic acid)、芬度柳(fendosal)、非诺洛芬(fenoprofen)、芬太尼(fentanyl)、芬替酸(fentiazac)、非普地醇(fepradinol)、非普拉酮(feprazone)、夫洛非宁(floctafenine)、氟扎可特(fluzacort)、氟二氯松(flucoronide)、氟芬那酸(flufenamic acid)、氟米松(flumethasone)、氟尼缩松(flunisolid)、氟尼辛(flunixin)、氟诺洛芬(flunoxaprofen)、氟轻松缩丙酮(flucinolone acetonide)、醋酸氟轻松(flucinolone)、氟轻松缩丙酮、氟考丁酯(flucortin butyl)、醋酸肤轻松fluocoitolone、氟苯乙砒(fluoresone)、氟米龙(fluorometholone)、氟培龙(fluperolone)、氟吡丁(flupirtine)、氟泼尼定(fluprednidene)、氟泼尼龙(fluprednisolone)、氟丙喹酮(fluproquazone)、氟氢缩松(flurandrenolide)、氟比洛芬(flurbiprofen)、氟替卡松(fluticasone)、氟甲酰龙(formocortal)和磷柳酸(fosfosal)。

[0261] 抗炎剂的进一步包括龙胆酸、格拉非宁(glafenine)、葡美新(glucametacin)、水

杨酸乙二醇酯、愈创蓝油烃(guaiazulene)、哈西奈德(halcinonide)、卤倍他索(halobetasol)、卤米松(halometasone)、haloprednone、海洛因、二氢可待因酮(hydrocodone)、氢氨基甲酸酯(hydro cortamate)、氢化可的松(hydrocortisone)、氢化可的松醋酸酯、氢化可的松琥珀酯、氢化可的松半琥珀酸酯、氢化可的松21-赖氨酸酯、氢化可的松环戊丙酸酯、氢吗啡酮、羟基哌替啶(hydroxypethidine)、异丁芬酸(ibufenac)、布洛芬(ibuprofen)、异丁普生(ibuproxam)、咪唑水杨酸酯、吲哚美辛(indomethacin)、吲哚布洛芬(indoprofen)、三苯唑酸(isofezolac)、异氟泼尼松(isoflupredone)、异氟泼尼松乙酸酯、isoladol、异美沙酮(isomethadone)、异尼辛(isonixin)、伊索克酸(isoxepac)、伊索昔康(isoxicam)、凯托米酮(ketobemidone)、酮洛芬(ketoprofen)、酮咯酸(ketorolac)、对乙酰乙氧苯胺、利非他明(lefetamine)、左洛啡烷(levallorphan)、左啡诺(levorphanol)、左苯甲酰吗吩烷(levophenacyl-morphan)、罗芬太尼(lofentanil)、氯那唑酸(lonazolac)、氯诺昔康(lornoxicam)、洛索洛芬(loxoprofen)、赖氨酸乙酰水杨酸酯、马泼尼酮(mazipredone)、甲氯灭酸、甲羟松(medrysone)、甲芬那酸、美洛昔康(Meloxicam)、哌替啶(meperidine)、甲基泼尼松(meprednisone)、美普他酚(meptazinol)、美沙拉嗪(mesalamine)、间唑辛(metazocine)、美沙酮(methadone)、左美丙嗪(methotrimeprazine)、甲基泼尼松龙(methylprednisolone)、甲基泼尼松龙乙酸酯、甲基泼尼松龙琥珀酸钠、甲基泼尼松龙suleptnate、甲噻吩嗪乙酸(metiazinic acid)、甲氧夫啉(metofoline)、美托酮(metopon)、莫非保松(mofebutazone)、莫苯唑酸(mofezolac)、莫米松(mometasone)、吗拉宗(morazone)、吗啡、盐酸吗啡、硫酸吗啡、水杨酸吗啡和麦罗啡(myrophine)。

[0262] 抗炎剂的进一步例子包括萘丁美酮(nabumetone)、纳布啡(nalbuphine)、烯丙吗啡(nalorphine)、1-萘基水杨酸酯、萘普生(naproxen)、那碎因(narceine)、奈福泮(nefopam)、二烟酰吗啡(nicomorphine)、尼芬那宗(nifenazone)、尼氟灭酸(niflumic acid)、尼美舒利(nimesulide)、5'-硝基-2'-丙氧基乙酰苯胺, 去甲左啡诺(norlevorphanol)、去甲美沙酮(normethadone)、去甲吗啡(normorphine)、二苯哌己酮(norpipanone)、奥沙拉秦(olsalazine)、鸦片(opium)、奥沙西罗(oxaceprol)、oxametacine、奥沙普秦(oxaprozin)、羟考酮(oxycodone)、氧吗啡酮(oxymorphone)、羟基保泰松(oxyphenbutazone)、阿片全碱(papaveretum)、帕拉米松(paramethasone)、瑞尼托林(paranyline)、帕沙米特(parsalmide)、喷他佐辛(pentazocine)、哌立索唑(perisoxal)、非那西丁(phenacetin)、苯吗庚酮(phenadoxone)、非那佐辛(phenazocine)、苯偶氮吡啶胺盐酸盐(phenazopyridine hydrochloride)、非诺可(phenocoll)、苯哌利定(phenoperidine)、苯吡唑酮(phenopyrazone)、非诺吗烷(phenomorphan)、苯基乙酰水杨酸酯、保泰松(phenylbutazone)、苯基水杨酸酯、非尼拉朵(phenyramidol)、吡酮洛芬(piketoprofen)、去痛定(piminodine)、哌布宗(pipebuzone)、哌吡唑酮(piperylone)、氯氟吡唑酸(pirazolac)、氰苯双哌酰胺(piritramide)、吡罗昔康(piroxicam)、吡洛芬(pirprofen)、普拉洛芬(pranoprofen)、泼尼卡酯(prednicarbate)、泼尼松龙(prednisolone)、强的松(prednisone)、强的松龙戊酸酯(prednival)、泼尼立定(prednylidene)、丙谷美辛(proglumetacin)、丙庚嗪(proheptazine)、二甲哌替啶(promedol)、丙帕他莫(propacetamol)、异丙哌替啶(properidine)、丙吡胺(propiram)、右

丙氧芬(propoxyphene)、异丙安替比林(propyphenazone)、普罗喹宗(proquazone)、丙替嗪酸(protizinic acid)、普罗沙唑(proxazole)、雷米那酮(ramifenazone)、瑞芬太尼(remifentanil)、利马唑甲硫酸盐(rimazolium metilsulfate)、乙酰水杨酰胺(salacetamide)、水杨苷(salicin)、水杨酰胺、水杨酰胺O-乙酸、水杨酸、水杨酰硫酸、双水杨酯(salsalate)、沙维林(salverine)、西美曲特(simetride)、舒芬太尼(sufentanil)、硫氮磺胺吡啶(sulfasalazine)、舒林酸(sulindac)、超氧化物歧化酶、舒洛芬(suprofen)、琥保松(suxibuzone)、氟烟酰胺酯(talniflumate)、替尼达普(tenidap)、替诺昔康(tenoxicam)、特罗芬那酯(terofenamate)、粉防己碱(tetrandrine)、噻唑啉丁氮酮(thiazolinobutazone)、噻洛芬酸(tiaprofenic acid)、噻拉米特(tiaramide)、替利定(tilidine)、替诺立定(tinoridine)、替可的松(tixocortol)、托芬那酸(tolfenamic acid)、托美丁(tolmetin)、曲马多(tramadol)、去炎松(triamcinolone)、曲安奈德(triamcinolone acetonide)、托品酸酯(tropesin)、氯苄吡醇(viminol)、联苯丁酸(xenbucin)、希莫洛芬(ximoprofen)、扎托洛芬(zaltoprofen)和佐美酸(zomepirac)。

[0263] (F) 施用

[0264] 患者一般是人,但是也可以是非人哺乳动物。人患者包括成年人,例如,年龄在19-25、26-40、41-55、56-75之间,以及76和更年长的患者,以及儿科患者,例如,年龄在0-2、3-6、7-12和13-18之间的患者。

[0265] 术语“药学上可接受的”组合物指可与本文所述的激肽释放酶抑制剂一起施用至患者的无毒的载体或赋形剂。选择载体或赋形剂,以与组合物的生物学或药理学活性相容。本文所述的激肽释放酶抑制剂(在联合疗法的情况下,和其他治疗剂)可以任何适当的方式局部或全身性施用,用于递送抑制量的抑制剂和/或其他治疗剂至患者,包括但不限于全身性施用比如,例如,静脉内施用和吸入施用。肠胃外施用尤其优选用于激肽释放酶抑制剂。

[0266] 对于肠胃外施用,激肽释放酶抑制剂可被静脉内、肌内、腹膜内或皮下注射。皮下注射和静脉内(i.v.)施用是肠胃外施用的优选路径。局部(关节内)注射也是有用的。

[0267] 典型地,用于通过注射施用的组合物是无菌等渗水性缓冲液中的溶液(例如,磷酸钠/磷酸钾缓冲盐水)。其他药学上可接受的载体包括但不限于无菌水、盐水溶液和缓冲盐水(包括缓冲液,如磷酸盐或乙酸盐)、醇、植物油、聚乙二醇、明胶、乳糖、直链淀粉、硬脂酸镁、滑石、硅酸、石蜡等。在必要的情况下,组合物可也包括增溶剂和在注射位点缓解疼痛的局部麻醉剂比如利多卡因、防腐剂、稳定剂、湿润剂、乳化剂、盐、润滑剂等,只要它们不与活性化合物有害地反应。类似地,组合物可包括常规的赋形剂,例如,适于肠胃外、肠或鼻内施用而不与活性化合物有害地反应的药学上可接受的有机或无机载体物质。一般而言,成分被分别提供或以单位剂型混合在一起,例如,在以活性单位指示活性剂量的气密性密封容器比如安瓿、药囊,或小瓶中作为干燥冷冻干燥粉末或无水浓缩物。在通过输注施用组合物的情况下,组合物可用包含无菌药理学级“注射用水”或生理盐水的注射瓶被分配。在组合物通过注射而被施用的情况下,可提供注射用无菌水或生理盐水的容器(例如,安瓿或小瓶),从而可在施用之前混合成分。

[0268] 用于皮下施用分离的激肽释放酶抑制剂的示例性制剂包括包含缓冲剂(例如,组氨酸或磷酸缓冲液)和冷冻保护剂(例如,蔗糖或蔗糖和甘露醇,任选地包括葡聚糖比如葡聚糖40)的缓冲液,并且可被冷冻干燥用于储存和分配,如在美国公开申请号2007-0213275

(2007年3月9日提交的美国系列号11/716,278)中描述的。

[0269] 在一个实施方式中,根据任何批准的程序,激肽释放酶抑制剂作为静脉内输注而被施用至患者。在另一实施方式中,激肽释放酶抑制剂作为皮下丸剂被施用至患者。在另一实施方式中,激肽释放酶抑制剂通过关节内注射被施用至患者。静脉内和关节内施用通常通过健康护理专业人员在临床环境(例如,医院、急救或医生办公室)的进行,但是皮下注射可自己施用或由健康护理专业人员施用。

[0270] 下面针对DX-88(非天然存在的激肽释放酶抑制剂,SEQ ID NO:2)描述了可评估用于确定用于全身性施用激肽释放酶抑制剂的剂量的参数。据报道,血浆中循环前激肽释放酶的总量是约500nM至600nM(Silverberg等,“The Contact System and Its Disorders,” in Blood:Principles and Practice of Hematology,Handin,R等,eds,J B Lippincott Co.,Philadelphia,1995)。如果所有的前激肽释放酶被激活,以化学剂算方式,约520纳摩尔/L的DX-88(DX88)可用于抑制激肽释放酶。具有5L血浆的个体需要2.6微摩尔剂量的DX-88,或约18mg,基于DX-88的分子量是7,054道尔顿。这根据如下计算:DX88的 K_i 是0.025nM。当期望血浆激肽释放酶(PK)的浓度是,例如,1nM时,针对紧密结合抑制剂的下式指示游离DX-88的浓度是12.0nM。因此,需要的DX-88的总量是499+12或511nM。

$$[0271] \quad [DX88_{总}] = \frac{K_{i,app}[pKal - DX88]}{[DX88_{游离}]} + [pKal - DX88]$$

$$[0272] \quad 511nM = (0.025)(499) / (1) + (499)$$

[0273] 如果不是所有的前激肽释放酶均被激活或如果一部分激肽释放酶被内源性抑制剂,例如,C1酯酶抑制剂(C1INH)失活,则剂量可成比例降低。因此,在某些实施方式中,以单剂量或以在二十四小时期间内分散的一个或多个剂量,可将约5、10、15、20、30、40、60、80、120、250、500、600、700、800、1000mg的DX-88施用至受试者。在实践中,考虑数个其他因素可提供需要的DX-88剂量的更精确的评估,比如患者年龄、体重和病况的严重程度()。

[0274] 在一些实施方式中,以约1-500mg/m²,优选地约1-250mg/m²,1-100mg/m²的剂量施用激肽释放酶抑制剂多肽。

[0275] (G) 设备和试剂盒

[0276] 包括激肽释放酶抑制剂的药学组合物可用医学设备施用。设备可被设计具有如下特征:比如便携性、室温储存和易于使用,从而其可用于医院或急救室/急救护理设施外部的环境(例如,通过在家里的患者或护理人员或在医生办公室)。设备可包括,例如,一个或多个用于储存包括分离的激肽释放酶抑制剂的药学制品的箱(housing),并且可被配置为递送一个或多个单位剂量的剂或多种剂。

[0277] 使用适当的注射或注入设备(例如,导管、注入泵、植入物等),静脉内施用可通过丸剂或输注进行。例如使用导管和输注泵或可移植设备,皮下注射可作为输注。许多其他设备、植入物、递送系统和模块也是已知的。

[0278] 当激肽释放酶抑制剂作为冷冻干燥粉末被分配时,其在使用之前必须重构。可使用手动重构(例如,通过经过注射孔注射至包含冷冻干燥制剂的容器中,手动添加稀释剂至冷冻干燥制剂),或可以在被配置为自动重构的设备中提供激肽释放酶抑制剂(例如,自动添加稀释剂至冷冻干燥制剂),比如BECTON-DICKINSON BD™ Liquid Dry Injector(液体干燥注射器)。

[0279] 分离的激肽释放酶抑制剂可提供在试剂盒中。在一个实施方式中,试剂盒包括(a)包含包括分离的激肽释放酶抑制剂的组合物的容器,和(b)涉及本文所述的方法和/或剂的治疗性益处的用途的信息材料。

[0280] 在某些实施方式中,试剂盒包括也包括另一治疗剂。例如,试剂盒包括第一容器,其包含包括分离的激肽释放酶抑制剂的组合物,和第二容器,其包括其他治疗剂。分离的激肽释放酶抑制剂和其他治疗剂可提供在相同的容器中,用于其中激肽释放酶抑制剂和治疗剂作为单组合物施用的方法中。

[0281] 不限制试剂盒的信息材料的形式。在一个实施方式中,信息材料可包括关于化合物的产生的信息、化合物的分子量、浓度、失效日期、生产批次或生地址信息等。在一个实施方式中,信息材料涉及施用分离的激肽释放酶抑制剂的方法,例如,以适当的剂量、给药形式或施用方式(例如,本文所述的剂量、剂型或施用方式)来治疗受试者()。信息可以各种形式被提供,包括印刷文本、计算机可读的材料、视频记录或音频记录,或提供实质材料的链接或地址的信息。

[0282] 除了分离的激肽释放酶抑制剂(并且,如果存在的话,另外治疗剂(一种或多种)),试剂盒中的组合物可包括其他成分,比如溶剂或缓冲液、稳定剂或防腐剂。分离的激肽释放酶抑制剂(和其他治疗剂,如果存在的话)可以任何形式被提供,例如,液体、干燥或冷冻干燥形式,优选地基本上纯的和/或无菌的。当剂以液体溶液被提供时,液体溶液优选地是水溶液。当试剂以干燥形式被提供时,重构一般是通过添加适当的溶剂。溶剂,例如,无菌水或缓冲液,可任选地提供在试剂盒中。

[0283] 试剂盒可包括一个或多个容器,用于组合物或包含剂的组合物。在一些实施方式中,试剂盒包含分开的容器、分隔物、分隔空间,用于组合物和信息材料。例如,组合物可包含在瓶子、小瓶或注射器中,并且信息材料可包含在塑料套筒或包装中。在其他实施方式中,试剂盒分开的元件包含在单个未分隔的容器中。例如,组合物包含在瓶子、小瓶或注射器中,其连接标签形式的信息材料。在一些实施方式中,试剂盒包括多个(例如,一包)单个容器,其各自包含一个或多个单位剂型(例如,本文所述的剂型)的剂。容器可包括组合单位剂量,例如以期望的比例,例如包括分离的激肽释放酶抑制剂和另一治疗剂的单位。例如,试剂盒包括多个注射器、安瓿、箔包装、薄膜包装(blister pack)或医学设备,例如,其各自包含单组合单位剂量。试剂盒的容器可以是气密的、防水的(例如,对于水分或蒸发的改变不渗透),和/或避光的。

[0284] 试剂盒任选地包括适于施用组合物的设备,例如,注射器或其他适当的递送设备。可使设备预先载入两种剂中的一种或两者,或可以是空的,但是适于装载。

实施例

[0285] 提供下述实施例,用于进一步阐释并且不是限制性的。

[0286] 实施例1:切割的高分子量激肽原(HMWK)和自身免疫性疾病之间的关系

[0287] 为了确定自身免疫性疾病中切割的HMWK的水平,如下描述的,利用使用LiCor检测的蛋白质印迹测量获得自类风湿性关节炎(RA)、溃疡性结肠炎(UC)和克罗恩氏病(CD)的患者,以及健康的受试者的血浆样品中完整的和切割的HMWK的量。

[0288] (i) 样品制备

[0289] 通过添加10 μ L的10X抗蛋白酶抑制剂混合物至90 μ L 100%HMWK缺陷血浆中,制备处理的HMWK缺陷血浆。使用之前,使溶液静置至少30分钟。

[0290] 通过添加5 μ L的贮存液(1.61mg/mL)至15 μ L处理的HMWK缺陷血浆中,制备单链HMWK的1:4中间体。通过添加5 μ L的贮存液(2.01mg/mL)至15 μ L处理的HMWK缺陷血浆中,制备双链HMWK的1:4中间体。

[0291] 通过添加3.35 μ L的1:4单链HMWK中间体和2.69 μ L 1:4双链HMWK中间体至23.96 μ L处理的HMWK缺陷血浆中,制备45 μ g/mL处理的HMWK缺陷对照血浆溶液。

[0292] 通过添加5 μ L的血浆样品至95 μ L的1X TBS,将各个样品稀释至1X TBS中的5%血浆(1:20)。通过添加5 μ L的4X样品缓冲液至15 μ L的5%样品,制备非还原的样品。通过添加5 μ L的4X样品缓冲液和2 μ L的10X还原剂至13 μ L的5%样品,制备还原的样品。

[0293] 使用加热块,在95 $^{\circ}$ C,加热所有的样品5分钟。将各个样品短暂离心,以从样品管的帽中去除任何溶液。

[0294] (ii) 凝胶装载、电泳(running)和转印

[0295] 通过添加100ml的20X电泳缓冲液至1,900ml的去离子水制备Tris-乙酸酯电泳缓冲液。在所有试验中,4 μ L体积的单色蛋白质标记物被用作对照。13 μ L体积的非还原的样品和还原的样品被添加至凝胶1的凝胶泳道。使凝胶在125伏特下电泳~2小时。

[0296] 将iBlot滤纸放置在去离子水中并且浸透5分钟。解开阳极堆栈底(Anode Stack, Bottom)并且放置在iBlot的印记表面,其中铜侧朝下。当完成凝胶电泳时,打开两个凝胶盒并且去除凝胶。将凝胶放置在转印膜上。将预浸泡的滤纸放置在凝胶的顶部。解开阴极堆栈顶部(Cathode Stack, Top)并且放置在滤纸顶部,铜侧朝上。使用印迹辊,轻轻排出堆栈中的气泡。将一次性海绵放入iBlot盖中。打开iBlot并且选择程序P0。

[0297] 当完成iBlot转印时,打开iBlot并且丢弃海绵、阴极堆栈和凝胶。从iBlot单独去除各个膜,并且将其放入包含20ml的Odyssey封闭缓冲液的塑料盘中。将膜在板摇床上在室温温育1小时。

[0298] (iii) 用LiCor检测的蛋白质印记试验

[0299] 通过添加57.14 μ L的小鼠抗LC HMWK,克隆#11H05(贮备浓度1.4mg/mL)至80ml的Odyssey封闭液+0.2%Tween-20,制备1 μ g/mL一级抗体溶液。从塑料盘去除封闭缓冲液。将20ml体积的一级抗体溶液添加至各个盘,并且将膜在板摇床上在室温温育1小时。通过添加5.33 μ L的贮备液至80ml的Odyssey封闭液+0.2%Tween-20,以1:15,000稀释度制备山羊抗小鼠IgG IRDye 680溶液。从塑料盘去除一级抗体溶液。用20mL 1X PBS+0.1%Tween-20洗涤膜五分钟,然后丢弃洗涤液。重复3次,总共洗涤4次。将20ml体积的山羊抗小鼠IgG IRDye 680溶液添加至各个盘。用铝箔覆盖盘,以使膜和二抗溶液避光。将膜在板摇床上在室温温育1小时。从塑料盘去除二抗溶液。用20mL 1X PBS+0.1%Tween-20洗涤膜五分钟,然后丢弃洗涤液。重复3次,总共洗涤4次。用PBS洗涤膜并且在LiCor Odyssey CLx上扫描。用铝箔覆盖膜,使其干燥过夜。将干燥膜放置在保护盖片中,并且保存稍后使用。

[0300] (iv) 结果:

[0301] 对照处理的HMWK缺陷血浆掺杂(spiked) 45 μ g/mL单链和双链HMWK,如预期产生约120和95kDa的条带。正常人血浆产生约120和100kDa的条带,其中21.3%的HMWK被切割。包含抗蛋白酶抑制剂混合物的患者样品与在柠檬酸钠中收集的患者样品相比产生明显不同

的结果。相比还原的双链HMWK,其中加入抗蛋白酶抑制剂的收集的患者样品包含明显更多的单链HMWK。该结果指示抗蛋白酶抑制剂混合物的添加对于防止HMWK收集之后的切割是必要的。

[0302] 在该研究中检查来自许多UC、CD、RA和HAE患者的血浆样品。对照样品和正常人血浆产生预期的结果。HAE发作样品比HAE基础样品包含更多的切割的HMWK。如下面表1和图1中显示,来自自身免疫患者的大部分样品,尤其是类风湿性关节炎样品,仅仅产生46kDa处的条带,指示切割HMWK的水平与自身免疫性疾病,比如RA、UC和CD相关。更具体而言,发现RA发作与大量切割的HMWK相关;发现克罗恩氏病具有中等量的切割的HMWK;并且发现溃疡性结肠炎具有中等量的切割的HMWK。

[0303] 总之,该研究的结果指示自身免疫性疾病比如CD、UC和RA血浆中的接触激活。因此,抑制接触激活的剂,比如pKa1的抑制剂(例如,本文所述的那些)可有效治疗这样的疾病。此外,该研究的结果指示切割的HMWK的水平可用作鉴定患自身免疫性疾病比如CD、UC和RA或处在自身免疫性疾病比如CD、UC和RA风险中的患者的可靠的生物标记和/或作为评估这样的自身免疫性疾病的治疗效力的生物标记。

[0304]

表 1.RA、UC 和 CD 患者中切割的 HMWK 的水平

UID	年龄	性别	药物治疗	诊断	疾病阶段	切割的 HMWK%
106659	34	雄性	潘太沙(Pentasa) 500mg	克罗恩病，高胆固醇	发作(flare)	3
104006	50	雌性	潘太沙 500mg	克罗恩病	稳定	12.2
100929	59	雄性	环丙沙星、甲硝基羟乙唑	克罗恩病	稳定	32.7
118166	62	雄性	磺甲硝咪唑 500mg	克罗恩病	稳定	10.3
105772	22	雌性	美沙拉嗪(Lialda)	克罗恩病	稳定	95.7
72211	53	雌性	Canasa 栓剂、维生素 C	溃疡性结肠炎	稳定	13.1
96319	78	雄性	美沙拉嗪片(Asacol)、Canasa、氢化可的松、普利乐(PriLOSEC)、泰来诺(Tylenol)、ASA、地尔硫卓(Diltazem)、氯羟去甲安定(Lorazepam)、Align probiotic、维生素	溃疡性结肠炎	稳定	4.4
93587	24	雌性	Canasa 栓剂、胃溃宁(Carafate)、奥美拉唑(Omeprazole)、美沙拉嗪片、瑞米凯德(Remicade)	溃疡性结肠炎	稳定	100
92122	21	雌性	强的松、美沙拉嗪、瑞米凯德、扑热息痛(Percocet)	溃疡性结肠炎	稳定	4.9
94441	77	雄性	美沙拉嗪、氯吡格雷	溃疡性结肠炎	发作	16.5
147603	72	雌性	依那西普(Enbrel)、阿拉瓦(Arava)20mg、叶酸(Folic acid)1mg、Azelpadine 500mg、左甲状腺素(Synthroid)、175mg	类风湿性关节炎(发作)，4/5 的患者处于 100%	发作	100
100953	50	雌性	羟氯喹(Plaquenil)、美洛昔康、MTX、强的松	类风湿性关节炎(RA)，高血压(HTN)、粘液囊炎	发作	100
72015	36	雌性	氨甲喋呤、叶酸、MTX、钙和维生素 D、强的松	类风湿性关节炎(RA)	发作	100
31567	49	雌性	依那西普、泰来诺、甲基强的松龙(Medrol)、普利乐、西酞普兰(Citalopram)、HCT、鱼油、甲氧基甲基苯乙酸(Naprosyn)	类风湿性关节炎(RA)	发作	100
33503	44	雌性	左甲状腺素、阿巴西普(Orencia)、强的松、安必恩(Ambien)、氨甲喋呤、二氢可待因酮、叶酸	类风湿性关节炎(RA)	发作	46.2

[0305] 参考文献

[0306] 遍及该申请引用的所有引用的参考文献的内容,包括参考文献文章、公布的专利、公开的或非公开的专利申请,以及下面列举的那些通过引用以它们的整体并入本文,为了本文的目的或本文的主题。在冲突的情况下,以本申请,包括本文的任何定义为准。

[0307] 等同原则和范围

[0308] 仅仅使用常规实验,本领域技术人员将认识到,或能够确认,本文所述的公开的具体实施方式的许多等同方式。本公开的范围不旨在限于上面所描述的,而是如所附的权利要求中阐释。

[0309] 在权利要求中,冠词比如“一个(a)”、“一个(an)”和“所述(the)”可意为是一个或多个,除非相反指出或从上下文其他是明显得出。如果一个、大于一个或所有的组成员出现于、应用于或以其他方式与给定产物或方法相关,则认为权利要求或说明书满足在组的一个或多个成员之间包括“或”,除非有相反指出或从上下文另外显而易见。本公开包括了这样的实施方式:其中组的一个确定的成员出现于、应用于或以其他方式与给出产物或方法相关。本公开包括这样的实施方式:其中大于一个或所有的组成员出现于、应用于或以其他方式与给定产物或方法相关。

[0310] 此外,本公开包括所有这样的变型、组合和排列:其中来自一个或多个列举的权利要求的一个或多个限制、要素、条款和描述性术语被引入另一权利要求中。例如,从属于另一权利要求的任何权利要求可被修饰,以包括在从属于相同基础权利要求的任何其他权利要求中出现的一个或多个限制。在要素作为清单出现的情况下,例如,以马库什组形式,也公开了要素的各个子组,并且可从组中去除任何要素(一种或多种)。一般而言,应理解,在本公开或本公开的方面被指包括具体的要素和/或特征的情况下,本公开的某些实施方式或本公开的方面由或基本上由这样的要素和/或特征组成。为了简化的目的,那些实施方式未在本文中明确阐释。也注意到,术语“包括”和“包含”旨在是开放式的,并且允许囊括其他要素或步骤。在给出范围的情况下,包括端点。此外,除非另外指出或另外从上下文显而易见,本领域普通技术人员理解,表达为范围的值可认为为本公开的不同实施方式中该叙述范围内的任何具体的值或子范围,至该范围下限的十分之一界限,除非上下文明确相反指出。

[0311] 本申请引用各种公布的专利、公开的专利申请、期刊文献和其他出版物,其所有均通过引用并入本文。如果在任何并入的参考文献和本说明之间存在冲突,以本说明书为准。另外,落入现有技术内的本公开任何具体的实施方式可明确从权利要求的任何一项或多项中排除。因为这样的实施方式视为是本领域普通技术人员已知的,他们可被排除,即使该排除未在本文中明确阐释。本公开任何具体的实施方式可从任何权利要求中排除,出于任何原因,无论时候与现有技术存在相关。

[0312] 仅仅使用常规实验,本领域技术人员认识到或能够确认本文所述的具体实施方式的许多等同方式。本文所述的实施方式的范围不旨在限于上面的描述,而是如在所附的权利要求中阐释。本领域技术人员认识到可对该描述做出各种改变和修饰,而不背离如下述权利要求中限定的本公开的精神和范围。

序列表

<110> 戴埃克斯有限公司

<120> 自身免疫性疾病的诊断和治疗

<130> D0617.70057W000

<150> US 61/893,542

<151> 2013-10-21

<160> 7

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

<211> 58

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

[0001]

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(4)

<223> Xaa 可以是除了 Cys 以外的任何氨基酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(11)

<223> Xaa 可以是除了 Cys 以外的任何氨基酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> Xaa 可以是除了 Cys 以外的任何氨基酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (15)..(29)

<223> Xaa 可以是除了 Cys 以外的任何氨基酸

<220>

<221> misc_feature
<222> (31)..(32)
<223> Xaa 可以是除了 Cys 以外的任何氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(35)
<223> Xaa 可以是除了 Cys 以外的任何氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (39)..(50)
<223> Xaa 可以是除了 Cys 以外的任何氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (52)..(54)
<223> Xaa 可以是除了 Cys 以外的任何氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (56)..(58)
<223> Xaa 可以是除了 Cys 以外的任何氨基酸

[0002]

<400> 1

Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Cys Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa
20 25 30

Phe Xaa Xaa Gly Gly Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
35 40 45

Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa
50 55

<210> 2
<211> 60

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 2

Glu Ala Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys
1 5 10 15

Arg Ala Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys
20 25 30

Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu
35 40 45

Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
50 55 60

[0003]

<210> 3

<211> 638

<212> PRT

<213> 智人

<400> 3

Met Ile Leu Phe Lys Gln Ala Thr Tyr Phe Ile Ser Leu Phe Ala Thr
1 5 10 15

Val Ser Cys Gly Cys Leu Thr Gln Leu Tyr Glu Asn Ala Phe Phe Arg
20 25 30

Gly Gly Asp Val Ala Ser Met Tyr Thr Pro Asn Ala Gln Tyr Cys Gln
35 40 45

Met Arg Cys Thr Phe His Pro Arg Cys Leu Leu Phe Ser Phe Leu Pro

50	55	60
Ala Ser Ser Ile Asn Asp Met Glu Lys Arg Phe Gly Cys Phe Leu Lys		
65	70	75 80
Asp Ser Val Thr Gly Thr Leu Pro Lys Val His Arg Thr Gly Ala Val		
	85	90 95
Ser Gly His Ser Leu Lys Gln Cys Gly His Gln Ile Ser Ala Cys His		
	100	105 110
Arg Asp Ile Tyr Lys Gly Val Asp Met Arg Gly Val Asn Phe Asn Val		
	115	120 125
Ser Lys Val Ser Ser Val Glu Glu Cys Gln Lys Arg Cys Thr Ser Asn		
	130	135 140
[0004]		
Ile Arg Cys Gln Phe Phe Ser Tyr Ala Thr Gln Thr Phe His Lys Ala		
145	150	155 160
Glu Tyr Arg Asn Asn Cys Leu Leu Lys Tyr Ser Pro Gly Gly Thr Pro		
	165	170 175
Thr Ala Ile Lys Val Leu Ser Asn Val Glu Ser Gly Phe Ser Leu Lys		
	180	185 190
Pro Cys Ala Leu Ser Glu Ile Gly Cys His Met Asn Ile Phe Gln His		
	195	200 205
Leu Ala Phe Ser Asp Val Asp Val Ala Arg Val Leu Thr Pro Asp Ala		
	210	215 220
Phe Val Cys Arg Thr Ile Cys Thr Tyr His Pro Asn Cys Leu Phe Phe		

225	230	235	240
Thr Phe Tyr Thr Asn Val Trp Lys Ile Glu Ser Gln Arg Asn Val Cys			
245	250	255	
Leu Leu Lys Thr Ser Glu Ser Gly Thr Pro Ser Ser Ser Thr Pro Gln			
260	265	270	
Glu Asn Thr Ile Ser Gly Tyr Ser Leu Leu Thr Cys Lys Arg Thr Leu			
275	280	285	
Pro Glu Pro Cys His Ser Lys Ile Tyr Pro Gly Val Asp Phe Gly Gly			
290	295	300	
Glu Glu Leu Asn Val Thr Phe Val Lys Gly Val Asn Val Cys Gln Glu			
305	310	315	320

[0005]

Thr Cys Thr Lys Met Ile Arg Cys Gln Phe Phe Thr Tyr Ser Leu Leu			
325	330	335	
Pro Glu Asp Cys Lys Glu Glu Lys Cys Lys Cys Phe Leu Arg Leu Ser			
340	345	350	
Met Asp Gly Ser Pro Thr Arg Ile Ala Tyr Gly Thr Gln Gly Ser Ser			
355	360	365	
Gly Tyr Ser Leu Arg Leu Cys Asn Thr Gly Asp Asn Ser Val Cys Thr			
370	375	380	
Thr Lys Thr Ser Thr Arg Ile Val Gly Gly Thr Asn Ser Ser Trp Gly			
385	390	395	400
Glu Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu Gln Val Lys Leu Thr Ala Gln Arg			

405	410	415
His Leu Cys Gly Gly Ser Leu Ile Gly His Gln Trp Val Leu Thr Ala		
420	425	430
Ala His Cys Phe Asp Gly Leu Pro Leu Gln Asp Val Trp Arg Ile Tyr		
435	440	445
Ser Gly Ile Leu Asn Leu Ser Asp Ile Thr Lys Asp Thr Pro Phe Ser		
450	455	460
Gln Ile Lys Glu Ile Ile Ile His Gln Asn Tyr Lys Val Ser Glu Gly		
465	470	475
480		
Asn His Asp Ile Ala Leu Ile Lys Leu Gln Ala Pro Leu Asn Tyr Thr		
485	490	495
[0006]		
Glu Phe Gln Lys Pro Ile Cys Leu Pro Ser Lys Gly Asp Thr Ser Thr		
500	505	510
Ile Tyr Thr Asn Cys Trp Val Thr Gly Trp Gly Phe Ser Lys Glu Lys		
515	520	525
Gly Glu Ile Gln Asn Ile Leu Gln Lys Val Asn Ile Pro Leu Val Thr		
530	535	540
Asn Glu Glu Cys Gln Lys Arg Tyr Gln Asp Tyr Lys Ile Thr Gln Arg		
545	550	555
560		
Met Val Cys Ala Gly Tyr Lys Glu Gly Gly Lys Asp Ala Cys Lys Gly		
565	570	575
Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Lys His Asn Gly Met Trp Arg Leu		

580

585

590

Val Gly Ile Thr Ser Trp Gly Glu Gly Cys Ala Arg Arg Glu Gln Pro
595 600 605

Gly Val Tyr Thr Lys Val Ala Glu Tyr Met Asp Trp Ile Leu Glu Lys
610 615 620

Thr Gln Ser Ser Asp Gly Lys Ala Gln Met Gln Ser Pro Ala
625 630 635

<210> 4

<211> 262

<212> PRT

<213> 智人

<400> 4

[0007]

Met Trp Phe Leu Val Leu Cys Leu Ala Leu Ser Leu Gly Gly Thr Gly
1 5 10 15

Ala Ala Pro Pro Ile Gln Ser Arg Ile Val Gly Gly Trp Glu Cys Glu
20 25 30

Gln His Ser Gln Pro Trp Gln Ala Ala Leu Tyr His Phe Ser Thr Phe
35 40 45

Gln Cys Gly Gly Ile Leu Val His Arg Gln Trp Val Leu Thr Ala Ala
50 55 60

His Cys Ile Ser Asp Asn Tyr Gln Leu Trp Leu Gly Arg His Asn Leu
65 70 75 80

Phe Asp Asp Glu Asn Thr Ala Gln Phe Val His Val Ser Glu Ser Phe
85 90 95

	Pro His Pro Gly Phe Asn Met Ser Leu Leu Glu Asn His Thr Arg Gln	
	100	105 110
	Ala Asp Glu Asp Tyr Ser His Asp Leu Met Leu Leu Arg Leu Thr Glu	
	115	120 125
	Pro Ala Asp Thr Ile Thr Asp Ala Val Lys Val Val Glu Leu Pro Thr	
	130	135 140
	Gln Glu Pro Glu Val Gly Ser Thr Cys Leu Ala Ser Gly Trp Gly Ser	
	145	150 155 160
	Ile Glu Pro Glu Asn Phe Ser Phe Pro Asp Asp Leu Gln Cys Val Asp	
	165	170 175
[0008]	Leu Lys Ile Leu Pro Asn Asp Glu Cys Lys Lys Val His Val Gln Lys	
	180	185 190
	Val Thr Asp Phe Met Leu Cys Val Gly His Leu Glu Gly Gly Lys Asp	
	195	200 205
	Thr Cys Val Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Met Cys Asp Gly Val Leu	
	210	215 220
	Gln Gly Val Thr Ser Trp Gly Tyr Val Pro Cys Gly Thr Pro Asn Lys	
	225	230 235 240
	Pro Ser Val Ala Val Arg Val Leu Ser Tyr Val Lys Trp Ile Glu Asp	
	245	250 255
	Thr Ile Ala Glu Asn Ser	
	260	

<210> 5
<211> 644
<212> PRT
<213> 智人

<400> 5

Met Lys Leu Ile Thr Ile Leu Phe Leu Cys Ser Arg Leu Leu Leu Ser
1 5 10 15

Leu Thr Gln Glu Ser Gln Ser Glu Glu Ile Asp Cys Asn Asp Lys Asp
20 25 30

Leu Phe Lys Ala Val Asp Ala Ala Leu Lys Lys Tyr Asn Ser Gln Asn
35 40 45

[0009] Gln Ser Asn Asn Gln Phe Val Leu Tyr Arg Ile Thr Glu Ala Thr Lys
50 55 60

Thr Val Gly Ser Asp Thr Phe Tyr Ser Phe Lys Tyr Glu Ile Lys Glu
65 70 75 80

Gly Asp Cys Pro Val Gln Ser Gly Lys Thr Trp Gln Asp Cys Glu Tyr
85 90 95

Lys Asp Ala Ala Lys Ala Ala Thr Gly Glu Cys Thr Ala Thr Val Gly
100 105 110

Lys Arg Ser Ser Thr Lys Phe Ser Val Ala Thr Gln Thr Cys Gln Ile
115 120 125

Thr Pro Ala Glu Gly Pro Val Val Thr Ala Gln Tyr Asp Cys Leu Gly
130 135 140

	Cys Val His Pro Ile Ser Thr Gln Ser Pro Asp Leu Glu Pro Ile Leu	
	145 150 155 160	
	Arg His Gly Ile Gln Tyr Phe Asn Asn Asn Thr Gln His Ser Ser Leu	
	165 170 175	
	Phe Met Leu Asn Glu Val Lys Arg Ala Gln Arg Gln Val Val Ala Gly	
	180 185 190	
	Leu Asn Phe Arg Ile Thr Tyr Ser Ile Val Gln Thr Asn Cys Ser Lys	
	195 200 205	
	Glu Asn Phe Leu Phe Leu Thr Pro Asp Cys Lys Ser Leu Trp Asn Gly	
	210 215 220	
[0010]	Asp Thr Gly Glu Cys Thr Asp Asn Ala Tyr Ile Asp Ile Gln Leu Arg	
	225 230 235 240	
	Ile Ala Ser Phe Ser Gln Asn Cys Asp Ile Tyr Pro Gly Lys Asp Phe	
	245 250 255	
	Val Gln Pro Pro Thr Lys Ile Cys Val Gly Cys Pro Arg Asp Ile Pro	
	260 265 270	
	Thr Asn Ser Pro Glu Leu Glu Glu Thr Leu Thr His Thr Ile Thr Lys	
	275 280 285	
	Leu Asn Ala Glu Asn Asn Ala Thr Phe Tyr Phe Lys Ile Asp Asn Val	
	290 295 300	
	Lys Lys Ala Arg Val Gln Val Val Ala Gly Lys Lys Tyr Phe Ile Asp	
	305 310 315 320	

	Phe	Val	Ala	Arg	Glu	Thr	Thr	Cys	Ser	Lys	Glu	Ser	Asn	Glu	Glu	Leu
					325					330					335	
	Thr	Glu	Ser	Cys	Glu	Thr	Lys	Lys	Leu	Gly	Gln	Ser	Leu	Asp	Cys	Asn
				340					345					350		
	Ala	Glu	Val	Tyr	Val	Val	Pro	Trp	Glu	Lys	Lys	Ile	Tyr	Pro	Thr	Val
			355					360					365			
	Asn	Cys	Gln	Pro	Leu	Gly	Met	Ile	Ser	Leu	Met	Lys	Arg	Pro	Pro	Gly
		370					375					380				
	Phe	Ser	Pro	Phe	Arg	Ser	Ser	Arg	Ile	Gly	Glu	Ile	Lys	Glu	Glu	Thr
	385					390					395					400
[0011]	Thr	Val	Ser	Pro	Pro	His	Thr	Ser	Met	Ala	Pro	Ala	Gln	Asp	Glu	Glu
					405					410					415	
	Arg	Asp	Ser	Gly	Lys	Glu	Gln	Gly	His	Thr	Arg	Arg	His	Asp	Trp	Gly
				420					425					430		
	His	Glu	Lys	Gln	Arg	Lys	His	Asn	Leu	Gly	His	Gly	His	Lys	His	Glu
			435					440					445			
	Arg	Asp	Gln	Gly	His	Gly	His	Gln	Arg	Gly	His	Gly	Leu	Gly	His	Gly
		450					455					460				
	His	Glu	Gln	Gln	His	Gly	Leu	Gly	His	Gly	His	Lys	Phe	Lys	Leu	Asp
	465					470				475						480
	Asp	Asp	Leu	Glu	His	Gln	Gly	Gly	His	Val	Leu	Asp	His	Gly	His	Lys
					485					490					495	

His Lys His Gly His Gly His Gly Lys His Lys Asn Lys Gly Lys Lys
500 505 510

Asn Gly Lys His Asn Gly Trp Lys Thr Glu His Leu Ala Ser Ser Ser
515 520 525

Glu Asp Ser Thr Thr Pro Ser Ala Gln Thr Gln Glu Lys Thr Glu Gly
530 535 540

Pro Thr Pro Ile Pro Ser Leu Ala Lys Pro Gly Val Thr Val Thr Phe
545 550 555 560

Ser Asp Phe Gln Asp Ser Asp Leu Ile Ala Thr Met Met Pro Pro Ile
565 570 575

[0012] Ser Pro Ala Pro Ile Gln Ser Asp Asp Asp Trp Ile Pro Asp Ile Gln
580 585 590

Ile Asp Pro Asn Gly Leu Ser Phe Asn Pro Ile Ser Asp Phe Pro Asp
595 600 605

Thr Thr Ser Pro Lys Cys Pro Gly Arg Pro Trp Lys Ser Val Ser Glu
610 615 620

Ile Asn Pro Thr Thr Gln Met Lys Glu Ser Tyr Tyr Phe Asp Leu Thr
625 630 635 640

Asp Gly Leu Ser

<210> 6

<211> 362

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 6

Gln Glu Ser Gln Ser Glu Glu Ile Asp Cys Asn Asp Lys Asp Leu Phe
1 5 10 15

Lys Ala Val Asp Ala Ala Leu Lys Lys Tyr Asn Ser Gln Asn Gln Ser
20 25 30

Asn Asn Gln Phe Val Leu Tyr Arg Ile Thr Glu Ala Thr Lys Thr Val
35 40 45

Gly Ser Asp Thr Phe Tyr Ser Phe Lys Tyr Glu Ile Lys Glu Gly Asp
50 55 60

[0013]

Cys Pro Val Gln Ser Gly Lys Thr Trp Gln Asp Cys Glu Tyr Lys Asp
65 70 75 80

Ala Ala Lys Ala Ala Thr Gly Glu Cys Thr Ala Thr Val Gly Lys Arg
85 90 95

Ser Ser Thr Lys Phe Ser Val Ala Thr Gln Thr Cys Gln Ile Thr Pro
100 105 110

Ala Glu Gly Pro Val Val Thr Ala Gln Tyr Asp Cys Leu Gly Cys Val
115 120 125

His Pro Ile Ser Thr Gln Ser Pro Asp Leu Glu Pro Ile Leu Arg His
130 135 140

Gly Ile Gln Tyr Phe Asn Asn Asn Thr Gln His Ser Ser Leu Phe Met

145	150	155	160
Leu Asn Glu Val	Lys Arg Ala Gln Arg Gln Val Val Ala Gly Leu Asn		
	165	170	175
Phe Arg Ile Thr Tyr Ser Ile Val Gln Thr Asn Cys Ser Lys Glu Asn			
180	185	190	
Phe Leu Phe Leu Thr Pro Asp Cys Lys Ser Leu Trp Asn Gly Asp Thr			
195	200	205	
Gly Glu Cys Thr Asp Asn Ala Tyr Ile Asp Ile Gln Leu Arg Ile Ala			
210	215	220	
Ser Phe Ser Gln Asn Cys Asp Ile Tyr Pro Gly Lys Asp Phe Val Gln			
225	230	235	240
[0014]			
Pro Pro Thr Lys Ile Cys Val Gly Cys Pro Arg Asp Ile Pro Thr Asn			
	245	250	255
Ser Pro Glu Leu Glu Glu Thr Leu Thr His Thr Ile Thr Lys Leu Asn			
260	265	270	
Ala Glu Asn Asn Ala Thr Phe Tyr Phe Lys Ile Asp Asn Val Lys Lys			
275	280	285	
Ala Arg Val Gln Val Val Ala Gly Lys Lys Tyr Phe Ile Asp Phe Val			
290	295	300	
Ala Arg Glu Thr Thr Cys Ser Lys Glu Ser Asn Glu Glu Leu Thr Glu			
305	310	315	320
Ser Cys Glu Thr Lys Lys Leu Gly Gln Ser Leu Asp Cys Asn Ala Glu			

	325	330	335
	Val Tyr Val Val Pro Trp Glu Lys Lys Ile Tyr Pro Thr Val Asn Cys		
	340	345	350
	Gln Pro Leu Gly Met Ile Ser Leu Met Lys		
	355	360	
<210>	7		
<211>	255		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成多肽		
<400>	7		
[0015]	Ser Ser Arg Ile Gly Glu Ile Lys Glu Glu Thr Thr Val Ser Pro Pro		
	1 5 10 15		
	His Thr Ser Met Ala Pro Ala Gln Asp Glu Glu Arg Asp Ser Gly Lys		
	20 25 30		
	Glu Gln Gly His Thr Arg Arg His Asp Trp Gly His Glu Lys Gln Arg		
	35 40 45		
	Lys His Asn Leu Gly His Gly His Lys His Glu Arg Asp Gln Gly His		
	50 55 60		
	Gly His Gln Arg Gly His Gly Leu Gly His Gly His Glu Gln Gln His		
	65 70 75 80		
	Gly Leu Gly His Gly His Lys Phe Lys Leu Asp Asp Asp Leu Glu His		
	85 90 95		

Gln Gly Gly His Val Leu Asp His Gly His Lys His Lys His Gly His
100 105 110

Gly His Gly Lys His Lys Asn Lys Gly Lys Lys Asn Gly Lys His Asn
115 120 125

Gly Trp Lys Thr Glu His Leu Ala Ser Ser Ser Glu Asp Ser Thr Thr
130 135 140

Pro Ser Ala Gln Thr Gln Glu Lys Thr Glu Gly Pro Thr Pro Ile Pro
145 150 155 160

Ser Leu Ala Lys Pro Gly Val Thr Val Thr Phe Ser Asp Phe Gln Asp
165 170 175

[0016]

Ser Asp Leu Ile Ala Thr Met Met Pro Pro Ile Ser Pro Ala Pro Ile
180 185 190

Gln Ser Asp Asp Asp Trp Ile Pro Asp Ile Gln Ile Asp Pro Asn Gly
195 200 205

Leu Ser Phe Asn Pro Ile Ser Asp Phe Pro Asp Thr Thr Ser Pro Lys
210 215 220

Cys Pro Gly Arg Pro Trp Lys Ser Val Ser Glu Ile Asn Pro Thr Thr
225 230 235 240

Gln Met Lys Glu Ser Tyr Tyr Phe Asp Leu Thr Asp Gly Leu Ser
245 250 255

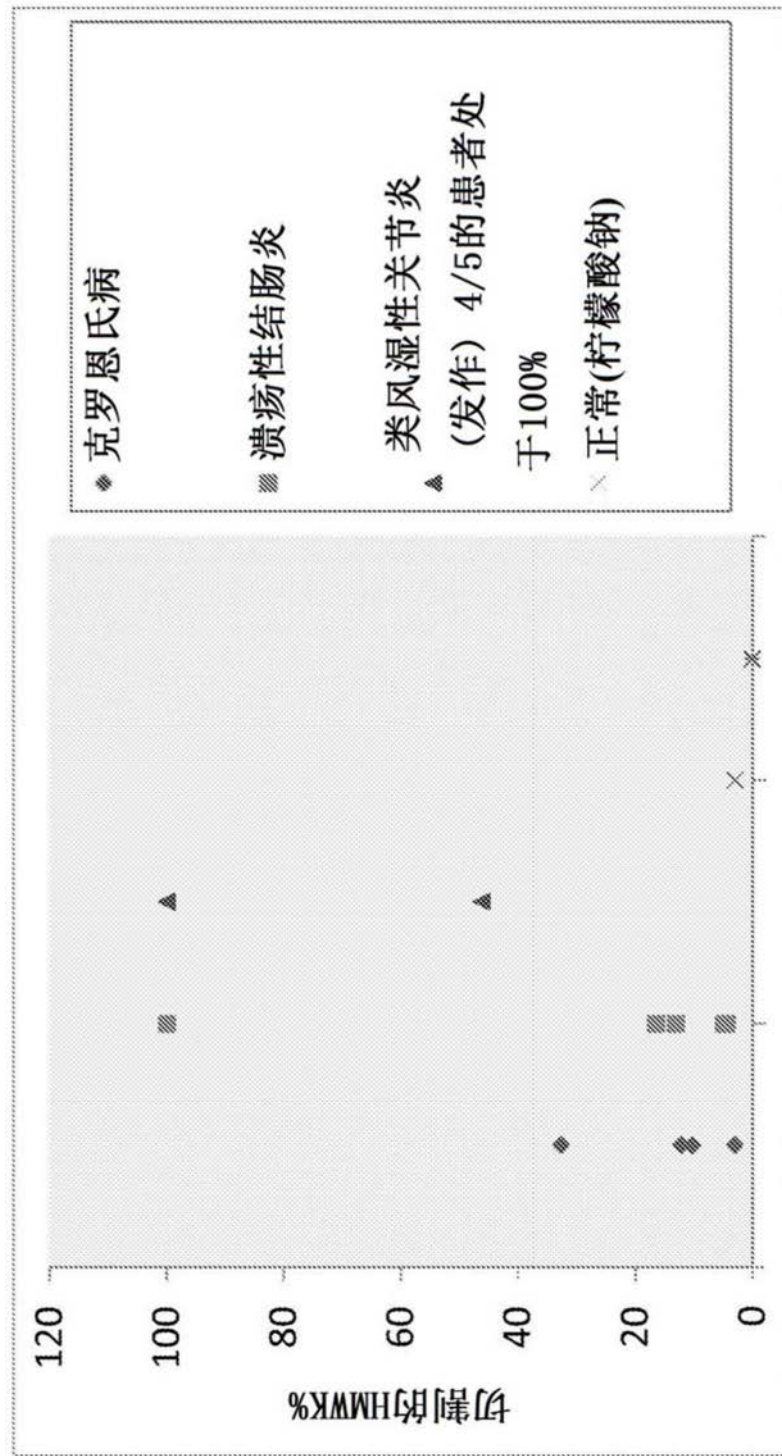


图1