

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200480040084.6

[51] Int. Cl.  
C07K 16/28 (2006.01)  
G01N 33/74 (2006.01)  
G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2007年6月20日

[11] 公开号 CN 1984930A

[22] 申请日 2004.11.17

[21] 申请号 200480040084.6

[30] 优先权

[32] 2003.11.17 [33] DE [31] 10353593.4

[86] 国际申请 PCT/EP2004/013043 2004.11.17

[87] 国际公布 WO2005/049655 英 2005.6.2

[85] 进入国家阶段日期 2006.7.7

[71] 申请人 慕尼黑大学临床中心

地址 德国慕尼黑

共同申请人 谢菲尔德大学

[72] 发明人 克里斯蒂安·J·斯达斯波格

马丁·彼德林马特 吴子达

戈尤茜沛·玛塔瑞茜

理查德·J·M·罗斯

[74] 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理有限公司

代理人 王达佐 韩克飞

权利要求书 7 页 说明书 29 页 序列表 12 页  
附图 20 页

[54] 发明名称

瘦素拮抗剂及瘦素的定量检测方法

[57] 摘要

本发明涉及特异抗体或融合蛋白，特别是针对瘦素受体 (leptin - R) 或瘦素结合蛋白 (leptin - BP) 的特异抗体 A 或融合蛋白，以及这些抗体或融合蛋白在定量分析、治疗目的和制备治疗药物方面的用途。另外，本发明还涉及在利用本发明的抗体或融合蛋白对溶解的或悬浮的瘦素结合蛋白的样品中的瘦素进行定量测定的方法，还涉及含有该抗体或融合蛋白的诊断试剂和 (诊断) 试剂盒。

1. 针对瘦素受体和/或瘦素结合蛋白的抗体 A，其特征在于所述抗体基本降低和优选地抑制瘦素受体和/或瘦素结合蛋白与配体的相互作用。

2. 如权利要求 1 所述的抗体 A，其特征在于所述抗体针对瘦素受体的细胞外结构域，尤其是瘦素结合蛋白的细胞外结构域。

3. 如权利要求 1 至 2 中任一权利要求所述的抗体 A，其特征在于所述抗体结合在瘦素结合蛋白上的配体结合位点上。

4. 如权利要求 1 至 3 中任一权利要求所述的抗体 A，其特征在于所述的配体为瘦素。

5. 如权利要求 1 至 4 中任一权利要求所述的抗体 A，其特征在于所述的瘦素结合蛋白为溶解或悬浮在液体、优选体液中的生理瘦素结合蛋白。

6. 如权利要求 1 至 5 中任一权利要求所述的抗体 A，其特征在于所述抗体为单克隆抗体。

7. 如权利要求 1 至 6 中任一权利要求所述的抗体 A，其特征在于所述的抗体 A 为抗体 ZMC2。

8. 如权利要求 1 至 7 中任一权利要求所述的抗体 A，其特征在于所述的抗体为人源化的并针对人瘦素受体或人瘦素结合蛋白。

9. 如权利要求 1 至 8 中任一权利要求所述的抗体 A，其特征在于所述的抗体包括选自任一蛋白序列的序列，所述任一蛋白序列的序列选自 SEQ ID NO: 1、2、3、4、6 或 8。

10. 如权利要求 1 至 8 中任一权利要求所述的抗体 A, 其特征在于所述的抗体包括由选自 SEQ ID NO: 2、4、5 或 7 的核酸序列编码的蛋白质序列。

11. 如权利要求 1 至 10 中任一权利要求所述的抗体 A, 其特征在于所述的抗体能够在不影响瘦素中枢作用情况下阻断瘦素的外周作用。

12. 如权利要求 1 至 11 中任一权利要求所述的抗体 A 的片段, 其特征在于所述的片段为  $F(ab')_2$  片段或单链抗体(scFv)或抗体片段。

13. 如权利要求 1 至 11 中任一权利要求所述的抗体 A 或如权利要求 12 所述的抗体 A 的片段作为药物。

14. 融合蛋白, 其含有作为部分 I 的权利要求 1 至 11 中任一权利要求所述的抗体或权利要求 12 所述的抗体 A 的片段, 以及作为部分 II 的抗体、抗体片段或肽, 优选瘦素。

15. 如权利要求 14 所述的融合蛋白, 其特征在于所述的融合蛋白在部分 I 和部分 II 之间含有接头。

16. 如权利要求 15 所述的融合蛋白, 其特征在于所述的接头为约 5 至 40 氨基酸长度, 更优选约 5 至 30 氨基酸长度, 最优选约 5 至 20 氨基酸长度。

17. 如权利要求 15 和 16 所述的融合蛋白, 其特征在于所述的接头含有至少 50% 的甘氨酸残基, 优选为至少 60%、更优选为至少 70%、优选为至少 80% 的甘氨酸残基。

18. 如权利要求 14 至 17 中任一权利要求所述的融合蛋白, 其特征在

于所述的融合蛋白具双特异性。

19. 如权利要求 18 所述的融合蛋白, 其特征在于所述的双特异性融合蛋白以针对瘦素受体和/或瘦素结合蛋白作为第一特异性, 以针对细胞表面蛋白为第二特异性。

20. 如权利要求 14 至 19 中任一权利要求所述的融合蛋白, 其特征在于所述的融合蛋白包含由核酸序列 SEQ ID NO: 7 编码的氨基酸序列。

21. 如权利要求 14 至 19 中任一权利要求所述的融合蛋白, 其特征在于所述的融合蛋白包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 8。

22. 在样品中定量测定结合蛋白/受体的配体的方法, 所述样品含有溶解或悬浮形式的所述配体和瘦素受体/瘦素结合蛋白, 其特征在于向所述待测样品中加入至少一种权利要求 1 至 11 中任一权利要求所述的抗体 A、权利要求 12 所述的抗体 A 的片段、和/或权利要求 14 至 21 中任一权利要求所述的融合蛋白。

23. 如权利要求 22 所述的方法, 其特征在于所述的抗体 A 在所述定量测定之前或期间、优选在所述定量测定之前加入, 和/或与所述样品孵育。

24. 如权利要求 22 或 23 中任一权利要求所述的方法, 其特征在于所述的样品包括液体、优选体液、更优选如血液的人体液。

25. 如权利要求 22 至 24 中任一权利要求所述的方法, 其特征在于所述的结合蛋白/受体的配体为瘦素结合蛋白和/或瘦素受体的配体。

26. 如权利要求 22 至 25 中任一权利要求所述的方法, 其特征在于所述瘦素结合蛋白为可溶的, 优选为瘦素受体和/或激素结合蛋白的可溶部

分、尤其是可溶性激素结合蛋白。

27. 如权利要求 22 至 26 中任一权利要求所述的方法,其特征在于所述配体的定量测定采用将所述配体作为抗原结合到抗体 B、优选单克隆抗体 B 来进行。

28. 如权利要求 22 至 27 中任一权利要求所述的方法,其特征在于所述配体的定量测定通过采用竞争性结合测试、优选“放射免疫分析”(RIA)进行。

29. 如权利要求 22 至 28 中任一权利要求所述的方法,其特征在于所述配体的定量通过测量增加的参数进行,所述的增加的参数为所述待测配体的浓度的函数,优选采用酶联免疫吸附分析(ELISA)和/或夹心分析。

30. 如权利要求 22 至 29 中任一权利要求所述的方法,其特征在于所述的瘦素结合蛋白在定量测定前不从所述待测样品中分离。

31. 如权利要求 22 至 30 中任一权利要求所述的方法,其特征在于加入至少一种抗体 A,以至于所述样品中存在的至少一种抗体 A 的浓度比所述瘦素结合蛋白高,优选浓度高出至少 50%,优选至少 100%,甚至更优选高出至少 200%,最优选至少高出 400%。

32. 如权利要求 22 至 31 中任一权利要求所述的方法,其特征在于所述配体为瘦素。

33. 药物,其含有至少一种权利要求 1 至 11 中任一权利要求所述的抗体 A、权利要求 12 所述的抗体的片段或权利要求 14 至 21 中任一权利要求所述的融合蛋白,以及视情况而定的其它活性试剂以及其它添加剂和/或佐剂。

34. 诊断试剂，其含有至少一种权利要求 1 至 11 中任一权利要求所述的抗体 A、权利要求 12 所述的抗体的片段或权利要求 14 至 21 中任一权利要求所述的融合蛋白，以及视情况而定的佐剂。

35. 基于抗原/抗体反应用于配体的定量测定的试剂盒，其含有互不相同的至少一种第一制剂和一种备用的操作测试分析，所述第一制剂含有至少一种权利要求 1 至 11 中任一权利要求所述的抗体 A、权利要求 12 所述的抗体的片段或权利要求 14 至 21 中任一权利要求所述的融合蛋白。

36. 如权利要求 35 所述的试剂盒，其特征在于所述的第一制剂包括备用的操作测试分析中的抗体 ZMC2、和/或用于校正的制剂、和/或抗体 B，其中测试分析基于用于配体的定量测定的抗原/抗体反应，其中抗体 B 针对所述配体。

37. 如权利要求 36 所述的试剂盒，其特征在于所述的配体为瘦素且所述的抗体 B 针对分子量 16kDa 的瘦素的主要异构体。

38. 如权利要求 35 至 37 中任一权利要求所述的试剂盒，其特征在于所述的抗体 B 为单克隆抗体。

39. 如权利要求 38 所述的试剂盒，其特征在于所述的单克隆抗体 B 针对瘦素。

40. 至少一种权利要求 1 至 11 中任一权利要求所述的抗体 A、权利要求 12 所述的抗体的片段或权利要求 14 至 21 中任一权利要求所述的融合蛋白在测定、优选定量测定生理溶液中的配体中的用途，所述溶液中还含有生理瘦素结合蛋白。

41. 至少一种权利要求 1 至 11 中任一权利要求所述的抗体 A、权利要求 12 所述的抗体的片段或权利要求 14 至 21 中任一权利要求所述的融

合蛋白在制备药物中的用途,所述药物用于治疗由于瘦素水平过量引起的疾病、变化或病理生理变化;能量代谢改变、尤其是诸如神经性食欲缺乏和恶病质的摄食障碍;以及免疫系统的改变,尤其是不必要的免疫系统活化以及自身免疫疾病,所述自身免疫疾病选自多发性硬化(MS),类风湿性关节炎,糖尿病, I 型糖尿病,系统性红斑狼疮(SLE),慢性多发性关节炎,巴塞多病,自身免疫形式的慢性肝炎,溃疡性结肠炎, I 型过敏疾病, II 型过敏疾病, III 型过敏疾病, IV 型过敏疾病, 纤维肌痛, 脱发病, 别赫捷列夫病, 克罗恩病, 重症肌无力, 神经性皮炎, 风湿性多肌痛, 进行性系统性硬化症(PSS), 牛皮癣, 瑞特综合征, 风湿性关节炎, 血管炎病, TH1 介导的疾病, 包括多发性硬化、糖尿病、I 型糖尿病、慢性心力衰竭(CHF)、TNF 介导的疾病、自身免疫结肠炎、类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮以及移植排斥, 用于调节自然产生的调节/抑制 T 细胞的增强的增殖作用并治疗与其有关疾病, 以及与 MAPK/ERK1-2、AKT、p-27-kip1 信号途径有关的疾病, 用于阻断瘦素的免疫作用或用于免疫治疗。

42. 至少一种权利要求 1 至 11 中任一权利要求所述的抗体 A、权利要求 12 所述的抗体的片段、或权利要求 14 至 21 中任一权利要求所述的融合蛋白用于制备药物或权利要求 33 所述的药物用于治疗由于瘦素水平过量引起的疾病、变化或病理生理异常, 能量代谢改变, 尤其是诸如神经性食欲缺乏和恶病质的摄食障碍, 以及免疫系统的改变, 尤其是不必要的免疫系统激活以及自身免疫疾病, 所述自身免疫疾病选自多发性硬化(MS)、类风湿性关节炎、糖尿病、I 型糖尿病、系统性红斑狼疮(SLE)、慢性多发性关节炎、巴塞多病、慢性肝炎的自身免疫型、溃疡性结肠炎、I 型过敏疾病、II 型过敏疾病、III 型过敏疾病、IV 型过敏疾病、纤维肌痛、脱发病、别赫捷列夫病、克罗恩病、重症肌无力、神经性皮炎、风湿性多肌痛、进行性系统性硬化症(PSS)、牛皮癣、瑞特综合征、风湿性关节炎、血管炎病, TH1 介导的疾病, 包括多发性硬化、糖尿病、I 型糖尿病、慢性心力衰竭(CHF)、TNF 介导的疾病、自身免疫结肠炎、类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮和移植排斥, 用于调节自然产生的调节型/抑

---

制型 T 细胞的增强的增殖作用并治疗与其有关疾病，以及与 MAPK/ERK1-2、AKT、p-27-kipl 信号途径有关的疾病，用于阻断瘦素的免疫作用或用于免疫治疗。

## 瘦素拮抗剂及瘦素的定量检测方法

本发明涉及特异抗体或融合蛋白，特别是针对瘦素受体(leptin-R)或瘦素结合蛋白(leptin-BP)的特异抗体 A 或融合蛋白，以及这些抗体或融合蛋白在定量分析、治疗目的和制备治疗药物方面的用途。另外，本发明还涉及利用本发明的抗体或融合蛋白对含溶解的或悬浮的瘦素结合蛋白样品中的瘦素进行定量测定的方法，还涉及含有该抗体或融合蛋白的诊断试剂和(诊断)试剂盒。

瘦素(来源于希腊语 leptos = 瘦)为蛋白质激素，主要从脂肪细胞中分离。1994年，瘦素作为肥胖基因(obesitas gene, ob gene)的遗传产物被发现，其分子量约 16kDa，由 146 个氨基酸构成(Zhang et al. (1994) Nature 372, 425)。瘦素在能量代谢中起重要作用(Friedman et al., (1998) Nature 395, 763-770)。除了与能量代谢有关，瘦素在调节免疫活性细胞(Lord et al., (1998) Nature 394, 6696)或造血细胞(Sierra-Honigmann et al., (1998) Science 281, 1683-1686)中的作用以及在青春期诱导中的允许的功能(Quinton et al., (1999) J Clin Endocrinol Metab 84(7), 2336-41)也被同时描述。瘦素还与糖尿病和慢性心力衰竭(CHF)密切相关(见 E.M. El-Bindary 和 A.Z.Darwish, Volume 7, Nos4/5, July-September 2001, 697-706)。

小鼠(*ob/ob* 小鼠)缺乏瘦素基因(*ob/ob* 小鼠)会导致该小鼠大大超重。由于对 *ob/ob* 小鼠施用瘦素引起进食减少和最终的体重减轻的事实，瘦素作为食欲抑制剂具有某些重要性。总之，情况相当复杂。

瘦素的作用是通过瘦素受体(leptin-R)来介导的(Tartaglia et al., (1995) Cell 83(7), 1263-71)，由此激活细胞内信号级联。瘦素受体属于称为的 I 类细胞因子受体超家族。在该家族的很多受体中，瘦素受体的细胞外部分作为瘦素结合蛋白在血液中循环，对瘦素受体来说也是如此。

瘦素受体的缺乏已鉴定为人类超重问题的因素(Clement et al., (1998) Nature 392, 398-401)。相反地，患有神经性食欲缺乏(减小的食欲)的患者似乎相对于他们减少的脂肪量具有增加的瘦素水平。因此，血液或血清

样品中瘦素浓度的确定是澄清摄食障碍或极度肥胖的基本原因的重要诊断工具。

如上所述, EI-Bindary 和 Darwish(2001)将瘦素与糖尿病和慢性心力衰竭(CHF)紧密联系在一起。EI-Bindary 和 Darwish(2001)研究了 CHF 患者中 TNF- $\alpha$ , 瘦素水平和胰岛素的相互作用。CHF 构成了与几种代谢和内分泌功能失调有关的复合综合征。有积累的证据表明 CHF 的晚期出现的体重减轻和恶病质在该疾病的患者中构成不良预后。尤其是增加的血浆瘦素水平被认为涉及与后期心力衰竭有关的耗损。另外, 慢性心力衰竭以胰岛素过多的状态为特征(Swan et al., Journal of the American College of Cardiology, 1997, 30: 527-32), 其中在这些患者中有导致明显的心脏性恶病质的显著的肌肉和脂肪组织减少(见 Cleland 和 Clark, European heart journal, 1998, 19:1421-2)。由此最近的注意力集中在 CHF 中的细胞因子活性。根据 EI-Bindary 和 Darwish (2001), 在后期 CHF 中有显著的 TNF- $\alpha$  增加。显然地, 在晚期 CHF 患者中循环 TNF- $\alpha$  的水平增加了。可设想 TNF- $\alpha$  可能参与 CHF 晚期病例中出现的心脏代偿失调的恶化。该结果还揭示了 TNF- $\alpha$  和血浆瘦素浓度的相关性。TNF- $\alpha$  可直接作用于脂肪细胞以增加脂肪稳态因子瘦素的产生, 其中血清瘦素水平表现为由 TNF- $\alpha$  所控制。因此, 在后期 CHF 中有显著的胰岛素水平上升并与 TNF- $\alpha$  相关。EI-Bindary 和 Darwish(2001)还发现了在疾病后期血浆瘦素和胰岛素水平之间的正相关性。增加的血浆瘦素和相关的胰岛素增加被认为是另一恶病质引发因子。在后期心力衰竭中, 增加的血浆 TNF- $\alpha$ , 瘦素和胰岛素水平, 以及它们之间的正相关性构成了晚期 CHF 中多种恶性循环之一。

由于更加经常地观察到能量代谢紊乱, 特别是如神经性食欲缺乏(减小的食欲)的摄食障碍, 鉴别出可减小、抑制或甚至阻断瘦素的功能有效的瘦素拮抗剂有重要意义并具有重要经济意义。

因此, 本发明的第一目的是提供 leptin-R 和 leptin-BP 的拮抗剂。这种拮抗剂可适合于与如糖尿病、恶病质、肥胖、慢性心力衰竭(CHF)等等的过高的瘦素水平有关的疾病和/或症状的治疗, 还适合于开发和提供用于这些疾病的药物和/疗法。

采用合适的瘦素拮抗剂(如上所述),通过选择性抑制瘦素受体和/或将瘦素从瘦素结合蛋白中置换出来可容易地在体外检测瘦素的调节机制和特定作用。

根据以上所述,样品中,特别是如血液的生理体液中瘦素的定量是治疗性处理的前提和重要的诊断手段。如激素或其它信使物(配体)的多种物质特异地结合它们的膜受体,该膜受体的细胞外结构域通常溶解或悬浮在液体中。因此,形成了由待测定配体构成的复合物,如瘦素(配体)和瘦素结合蛋白,该复合物影响到(降低)样品中自由配体的水平。为了避免该问题,采用标记的配体并将其加入到样品中。然而,在溶液中结合蛋白可能结合标记的配体,由此导致样品中的配体检测不到。因此,结合蛋白干扰了配体定量测量和诊断。

通常将所谓的免疫分析用于瘦素的浓度分析。它们是基于特异抗体与分析物的相互作用的原理。或者,采用竞争性分析法(如放射免疫分析,RIA),该方法中标记的瘦素与样品中存在的瘦素竞争抗体上的结合位点,由此产生与待测定分析物浓度成反比的信号。但是,现在最经常使用夹心免疫分析法,该方法中,固定的特异抗体结合所述的分析物(“捕获抗体”),接着针对该分析物的不同表位的抗体结合到该分析物,由此也被固定。该测定方法的最著名的例子是具有终点比色的酶联免疫吸附分析(ELISA)。产生信号的其它可能的方式有放射活性、化学发光或(时间分辨的)荧光。

以上提到的所有分析方法都是基于针对例如此情况的激素配体—瘦素的抗体,与待分析样品中激素配体之间高亲和的、特异的结合的原理。

在血清或血液的瘦素测量中的主要干扰源为高亲和瘦素结合蛋白即人血清中可溶的瘦素受体细胞外部分的存在。通常基于采用的分析方法(竞争性分析法或夹心分析法),该瘦素结合蛋白对测量的影响可引起偏高或偏低的数值。在竞争性分析法中,一方面标记的瘦素(作为所谓的“示踪剂”)可被瘦素结合蛋白结合,因此从溶液中去除而导致偏高的浓度。另一方面,瘦素结合蛋白还可在空间上阻断特异抗体与血清样品中瘦素分子的相互作用,因此还可在竞争性分析中引起偏低的浓度。相反,抗体和激素间相互作用的该空间阻碍在夹心免疫分析法中会导致偏低的结

果，因为会结合更少的激素或更少的检测抗体。这种干扰引起的测量结果的偏差在特定的与血液中瘦素浓度相关的生理或病理状况下变得尤其关键。

由于 Leptin-BP 结合样品中的瘦素并由此减少样品中游离瘦素的量，无法实现生理瘦素浓度的准确测定。因此，由于可溶的瘦素结合蛋白的存在，所有的体液瘦素水平的试验数据由瘦素与瘦素结合蛋白间的干扰而造成偏差。

为了开发用于如肥胖、糖尿病和/或慢性心力衰竭(CHF)等等的疾病的标准化诊断方法或治疗处理，需要有结合瘦素受体和/或瘦素结合蛋白的选择性的、特异的和有效的物质或分子。到目前为止，几乎没有已知的选择性地、特异地和有效地结合瘦素受体和/或瘦素结合蛋白的物质或分子。选择性和特异性为定量和定性测定的前提。例如，Gonzales 等 (Gonzales et al., (2003)Mol Hum Reprod 9(3), 151-8)报道了看起来在某种程度上抑制瘦素作用的多克隆抗体。但是，这些多克隆抗体不能再生产，不能人源化并只能获得有限量。

在另一方面，避免测量不准确的可选的方案涉及方法学的提取方法，其在其实实际的测量方法前进行以去除如瘦素结合蛋白。无论如何，这意味着对于采用的方法要明显地更加费力，并可同时导致错误的结果。总体上，目前还没有令人满意的现有方案来解决从待分析样品中去除可溶的瘦素结合蛋白的难题。

因此，本发明的第二目的是提供在含有瘦素结合蛋白或瘦素受体和其配体的样品中获得如瘦素的配体水平的可靠结果的方法。

此目的由本发明解决，其使特别是用于(体液)瘦素测定的检测方法不易受到瘦素结合蛋白的歪曲性干扰的影响。例如，该方法可适用于诸如糖尿病、恶病质、肥胖、慢性心力衰竭(CHF)等等的与过高瘦素水平相关的疾病和/或症状的诊断。

本发明的发明人成功地鉴定和提供了抗体形式的分子，其本质上特异地防止瘦素与瘦素受体(leptin-R)的结合并将结合到瘦素结合蛋白(leptin-BP)的瘦素从该瘦素结合蛋白中置换出来。

对此，本发明提供了针对瘦素受体(leptin-R)和/或瘦素结合蛋白

(leptin-BP)的抗体 A, 特征在于它基本地减少和优选地防止瘦素受体和/或瘦素结合蛋白与其配体即瘦素的相互作用。

“瘦素结合蛋白”或“结合蛋白”(二者都称为 leptin-BP)或“瘦素受体”(leptin-R)在本发明中的含义是包括能与样品中待测定瘦素高亲和性(特异地)结合的所有蛋白。瘦素结合蛋白通常可溶或在样品中以悬浮物存在。

瘦素结合蛋白通常作为瘦素受体的细胞外部分在诸如血清的体液样品中被发现。但其也可位于接近细胞膜的部位。这些瘦素结合蛋白或结合蛋白或瘦素受体的人类序列的例子为序列 O95214, P48357 和 O15243(来源: Swiss-Prot/TrEMBL)。优选地, 它们是人源的瘦素结合蛋白或结合蛋白或瘦素受体, 但本发明还包括其它脊椎动物尤其是诸如大鼠、小鼠、猪、马、牛的哺乳动物的相应蛋白。这些序列的例子为 O02671, Q9MYL0, P48356, Q62959, O89013, Q9JLS8(来源: Swiss-Prot/TrEMBL)。优选地, 所述瘦素结合蛋白为生理学的瘦素结合蛋白, 溶于或悬浮于优选为体液的液体中。

根据本发明, 术语“抗体”包括单克隆抗体、多克隆抗体、特别是多克隆单特异性抗体(即具有不同可变区、但都识别特异的表位的抗体), 以及嵌合抗体、(抗)抗独特型(针对本发明的抗体)和遗传操作的抗体, 它们都以结合或可溶形式存在, 以及如果合适的话可被标记为“标记物”(例如荧光标记物、金标记物, 偶联酶)。术语“抗体”在本发明中的含义典型地是指前述抗体的全长抗体。“全长”(单克隆)抗体在本发明中的含义可以是任何上述的全长形式的本发明抗体。本发明全长抗体典型地包括重链和轻链结构域。本发明抗体的重链包括恒定区  $C_{H1}$ 、 $C_{H2}$  或  $C_{H3}$  结构域和可变重链( $V_H$ )免疫球蛋白结构域。本发明抗体的轻链包括可变轻链免疫球蛋白结构域( $V_L$ )和恒定轻链免疫球蛋白结构域( $C_L$ )。不包括抗体所有上述结构域或区域的抗体为本发明含义中的抗体片段。本发明的抗体片段以下将进一步定义。

除了本发明的这些抗体以外, 本发明的抗体还可以含有其它(蛋白)成分的融合蛋白的部分被提供。以下将定义含有本发明抗体或其片段的融合蛋白。所有上述的实施方案都落入本发明抗体 A 的范围内。

本发明的抗体可属于以下免疫球蛋白种类之一: IgG、IgM、IgE、IgA、GILD, 如果可行的话, 可属于上述种类的亚类, 例如 IgG 的亚类, 或它们的混合物。优选 IgG 及其诸如 IgG1、IgG2、IgG2a、IgG2b、IgG3 或 IgG4 的亚类。特别优选 IgG 亚型 IgG1/k 或 IgG2b/k。

本发明含义的抗体还可以是以高亲和力结合抗原即另一分子的确定的表面构象(表位)的可能由脊椎动物或人工生产方法产生的蛋白质或其它结构, 优选以上提到的免疫球蛋白或多克隆单特异性抗体的单或多克隆(部分)结构。典型地, 这些抗体至少含有免疫球蛋白的可变区, 视情况而定还可含有免疫球蛋白至少一个恒定结构域。

“多克隆抗体”在本申请中的含义典型地为从动物血清中产生的抗体分子的异源混合物, 该动物预先经合适的抗原即本发明的抗体 A 的配体、优选经 leptin-BP 和/或 leptin-R 免疫。

“单克隆抗体”含有特异地针对抗原的基本同源的抗体类, 并且抗体在此显示出基本相同的表位结合位点。具有单特异性的不同的抗体变体也属于以上描述的免疫球蛋白种类。他们也可以是不同的主要的初级种类或亚类的混合物, 优选它们由 IgG 抗体的同源混合物组成。该同源性可由其它的纯化步骤(免疫沉淀、层析, 如利用针对 IgG 的抗体)实现。

也可通过现有技术中已知的方法获得单克隆抗体(例如 Köhler und Milstein, Nature, 256, 495-397, (1975); US-Patent 4,376,110; Ausübel et al., Harlow und Lane “Antikörper”: Laboratory Manual, Gold Spring, Harbor Laboratory (1988); Ausubel et al., (eds), 1998, Current Protocols in Molecular Biology (分子生物学现代方法), John Wiley & Sons, New York)。上述文献整体上包括在本发明中。“单克隆”特别意味着人工构建体的产物, 其中产生抗体的细胞(B 细胞)与永生肿瘤细胞(hybridom)融合产生杂交瘤细胞。都仅针对一种表位的特异的抗体由该细胞产生。在体外培养产生本发明单克隆抗体的杂交瘤细胞克隆。

本发明“遗传操作的抗体”也可采用上述公开物中描述的方法产生。

本发明“嵌合抗体”为含有来自不同动物种类的不同成分分子(例如具有来自单克隆小鼠抗体的可变区和人免疫球蛋白的恒定区的抗体)。嵌合抗体在给药时优选一方面用来降低的免疫原性, 另一方面用来增加

产量，例如从杂交瘤细胞系产生较高产率的鼠单克隆抗体，但它们也与较高的免疫原性相关。因此，优选采用人/鼠嵌合抗体。嵌合抗体和它们的生产方法为现有技术中已知的方法。(Cabilly et al. Proc. Natl. Sci. USA 81: 3273-3277 (1984); Morrison et al. Proc. Acad. Sci USA 81: 6851-6855 (1984); Boulianne et al. Nature 312 643-646 (1984); Cabilly et al., EP-A-125023; Neuberger et al. Nature 314: 268-270 (1985); Taniguchi et al., EP-A-171496; Morrison et al., EP-A-173494; Neuberger et al. WO 86/01533; Kudo et al., EP-A- 184187; Sahagan et al., J. Immunol. 137: 1066-1074 (1986); Robinson et al. WO 87/02671; Liu et al., Proc. Acad. Sci USA 84: 3439-3443 (1987); Sun et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 84: 214218 (1987); Better et al., Science 240: 1041-1043 (1988) und Harlow und Lane, Antikörper : A Laboratory Manual, 如上所引用的)。这些文献也包括在本发明中，如同它们的整体被公开。

本发明的“抗独特型抗体”为识别决定簇的抗体，该决定簇通常与本发明抗体的抗原结合位点相关，例如抗瘦素结合蛋白抗体。抗独特型抗体可通过免疫相同种类和相同基因型的动物(如小鼠品系)作为单克隆抗体起始点而获得，该单克隆抗体被本发明的抗独特型抗体靶向。该免疫的动物将通过产生针对该独特型决定簇的抗体(即针对本发明的抗独特型抗体)识别该免疫抗体的独特型决定簇，(U.S. 4,699,880)。本发明的抗独特型抗体还用作免疫原以在另一动物中引起免疫应答并在那里诱导所谓的抗抗独特型抗体的产生。该抗抗独特型抗体在其表位设计方面可以但非必须与引起抗独特型反应的原始单克隆抗体相同。这允许通过采用针对单克隆抗体的独特型决定簇的抗体鉴别表达同样特异性抗体的其它克隆。

为了诱导诸如 BALB/c 小鼠的各个动物中抗独特型抗体的结合，可以采用针对在体液中溶解或悬浮的诸如瘦素结合蛋白的生理配体的生理结合蛋白的单克隆抗体。从这种免疫小鼠的脾中取出的细胞可用来产生抗独特型杂交瘤细胞系，该抗独特型杂交瘤细胞系分泌抗独特型单克隆抗体。此外，抗独特型单克隆抗体还可以偶联到介质(KLH, “匙孔血蓝蛋白”)上，并随后用来进一步免疫 BALB/c 小鼠。这些小鼠的血清含有

抗独特型抗体，其表现出原始单克隆抗体的结合性能并对生理配体的在体液中溶解或悬浮的生理结合蛋白(见以下优选的例子)特异。因此，抗独特型单克隆抗体具有它们自己的独特型表位或“独特位”，特征在于与待检测的表位的结构相类似的结构。

在本发明优选的实施方案中，本发明的抗体针对瘦素受体的细胞外结构域，特别是瘦素结合蛋白。在更加优选的实施方案中，本发明的抗体 A 针对瘦素结合蛋白上的瘦素结合位点，该位点为配体(如瘦素)所结合。此外，该配体优选瘦素。在本文中，术语“针对瘦素结合蛋白上的瘦素结合位点的抗体”指该抗体作为结合表位特异地和高亲和性地结合到瘦素结合蛋白上的配体(如瘦素)结合位点。

另外，本发明的抗体也可以为双特异性的，换言之，它也可以其两互补位(paratope)识别不同的表位，优选同一蛋白或多肽上了两不同的表位(参见上述)。最后，两互补位可在结构上不同，但它们仍然结合相同的表位或至少这些表位的交叠区域。

根据另一实施方案，本发明的抗体 A 被人源化并针对人瘦素受体或人瘦素结合蛋白。抗体的人源化在现有技术中是已知的，可通过大量不同的标准方法来进行。因此，人或人源化的抗体也被理解为本发明的抗体。

本申请的抗体“片段”也包括在本发明中。“本申请的抗体片段”典型地可包括本申请的抗体的任何片段，无论是单克隆或多克隆抗体的片段。因此本发明抗体的片段可包括例如本发明抗体的重链恒定区，如  $C_{H1}$ 、 $C_{H2}$  或  $C_{H3}$ 、可变重链( $V_H$ )免疫球蛋白结构域、可变轻链免疫球蛋白结构域( $V_L$ )、或恒定轻链免疫球蛋白结构域( $C_L$ )。恒定重链免疫球蛋白结构域为典型地包含  $C_{H3}$  结构域和/或  $C_{H2}$  结构域和/或  $C_{H1}$  结构域的  $F_c$  片段。可变轻链免疫球蛋白结构域优选为包含  $V_L$  结构域的  $F_{ab}$  片段。还包括所有的具有一个或两个互补于抗原的结合位点的截短或修饰的抗体片段，例如由轻和重链构成的对应抗体结合位点的抗体部分，如  $F_v$ -、 $F_{ab}$ -、或  $F_{(ab')_2}$  片段或单链抗体片段( $scF_v$ )。优选诸如  $F_v$ -、 $F_{ab}$ -或  $F_{(ab')_2}$  的截短的双链片段。 $F_{ab}$  和  $F_{(ab')_2}$  片段不含出现在完整抗体中的  $F_c$  片段，因此它们会在血液循环中更快地输送并显示出比完整抗体少得多的非组织特异性结

合。在本发明中，强调本发明抗体的  $F_{ab}$  和  $F(ab')_2$  片段可用在本发明下的本发明方法中。这些片段典型地通过采用如木瓜蛋白酶(用于产生  $F_{ab}$ -片段)或胃蛋白酶(用于产生  $F(ab')_2$  片段)的酶蛋白水解产生，或通过化学氧化或通过抗体基因的遗传操作产生。

另外，本发明的抗体片段典型地为本发明抗体功能上的等同物。

“功能上的等同物”在本发明中的含义指本发明的抗体的片段、变异体等优选特异识别 leptin-R 或 leptin-BP 序列。更加优选地，本发明抗体的功能同系物特异识别 leptin-R 或 leptin-BP 的表位。甚至更加优选地，本发明抗体的功能同系物特异识别 leptin-R 或 leptin-BP 的瘦素结合位点。本发明抗体的功能同系物意味着该同系物能够将瘦素从其与 leptin-R 或 leptin-BP 的结合中置换出来。

本发明抗体的“功能同系物”还理解为与本发明的全长抗体相比，对 leptin-R 或 leptin-BP 具有增加的或降低的亲亲和性和/或增加降低的将瘦素从其与 leptin-R 或 leptin-BP 的结合中置换出来的能力。本发明的这种高亲和抗体优选包括 SEQ ID NO: 5 编码的氨基酸序列或由该氨基酸序列组成，或包括氨基酸序列 SEQ ID NO: 6。具有调节的活性的这些抗体可引起不同的生物学特性。此外，本领域人员可选择各个情况所需的具有特异亲和性的抗体。

在更加优选的实施方案中，本发明抗体的片段包括由选自 SEQ ID NOs: 2、4、5 或 7 的核酸序列编码的蛋白序列或由选自 SEQ ID NOs: 2、4、5 或 7 的核酸序列编码的蛋白序列组成。可选择地，这种片段包括选自 SEQ ID NOs: 1、2、3、4、6 或 8 的蛋白序列或由选自 SEQ ID NOs: 1、2、3、4、6 或 8 的蛋白序列组成。

在特定的实施方案中，本发明的抗体 A 为抗体 ZMC2。ZMC2 为针对人瘦素在人瘦素结合蛋白上的结合位点的单克隆抗体，并且在本发明的框架内为完成该任务已对其进行了优化。该单克隆抗体 ZMC2 已经由申请人根据布达佩斯条约的规定在不伦瑞克的 DSMZ(德国微生物和细胞保藏中心)以有活力的形式已于 2003 年 9 月 25 日进行了保藏，保藏机构指定保藏号为 DSM ACC 2618，同时注明“ZMC2”。

任何以上提到的本发明抗体的“变异体”，特别是本发明抗体 ZMC2

的变异体也可由本发明预料到。抗体的变异体，特别是 ZMC2 的变异体在本发明中的含义典型地包括特定序列，该序列相对于如 ZMC2 的本发明全长抗体的氨基酸序列，所述抗体完整氨基酸序列中至少一个、两个或多个氨基酸、优选 1-5、1-10、1-15、1-20 个氨基酸被改变，即删除、置换或增加。本发明抗体的变异体，特别是 ZMC2 的变异体优选为本发明未改变的全长抗体的功能同系物，特别是 ZMC2 的功能同系物。

本发明还提供“融合蛋白”。本发明的融合蛋白典型地包括部分 I 和部分 II，其中部分 I 可以是融合到作为部分 II 的其它(蛋白)成分的任何本发明抗体或抗体片段。典型地，这种融合蛋白的部分 I 体现为全长抗体。可选择地，这种融合蛋白的部分 I 可包括任何上述本发明抗体的片段，优选 V<sub>H</sub> 或 V<sub>L</sub>。本发明融合蛋白作为部分 II 的(蛋白)成分典型地包括本发明的任何抗体或抗体片段，或与其它蛋白质形成相互作用的肽或蛋白质，该其它蛋白例如 leptin-R 和/或 leptin-BP 的配体，优选瘦素或瘦素片段或瘦素变异体。优选特异识别本发明融合蛋白靶向的细胞的组分作为成分 II。靶向的细胞典型的为脂肪细胞、结缔组织细胞和其它瘦素结合细胞。用在本发明融合蛋白中的瘦素片段优选截短的瘦素分子，其仍然能够结合到 leptin-R 或 leptin-BP 的瘦素结合位点。用在本发明融合蛋白中的瘦素变异体优选包括一个或多个氨基酸置换但仍然能够结合到 leptin-R 或 leptin-BP 的瘦素结合位点的全长瘦素分子。因此，本发明的融合蛋白优选为“双特异性的”，即它能够结合两个靶分子，其中部分 I 特异于靶分子 I，部分 II 特异于靶分子 II。如果本发明的融合蛋白包括例如瘦素作为融合蛋白的部分 II，它可作为所谓的“超级拮抗剂”。这是因为瘦素作为二聚体结合。结果，由作为部分 I 的本发明抗体(或其片段，都作为拮抗剂)和作为部分 II 的瘦素(或其片段，或高亲和性瘦素分子)组成的融合蛋白使融合蛋白以更高的强度和更高的特异性结合 leptin-R 或 leptin-BP，并以高于如此的发明抗体的效率将瘦素从其与 leptin-R 或 leptin-BP 的结合中置换出来。

典型地通过采用酶切、蛋白合成或通过那些生化或分子生物学领域的专业人员所知的重组方法来提供作为融合蛋白成分(部分 I 或 II)的发明抗体。

本发明融合蛋白可包括作为部分 I 的发明抗体(或其片段, 都作为拮抗剂)和作为部分 II 的第二抗体。可选择地, 本发明融合蛋白可包括作为部分 I 的发明抗体(或其片段, 都作为拮抗剂)和作为部分 II 的本发明抗体的 scFv 片段。这种融合蛋白使将抗体靶向到特定的细胞类型成为可能, 例如为了由此获得双特异性融合蛋白。优选地, 该双特异性融合蛋白针对作为第一特异性的瘦素受体和/或瘦素结合蛋白作为第一特异性并针对细胞表面蛋白作为部分 II 第二特异性。本发明的如 ZMC2 的抗体可连接到如针对 CD4(或 CD1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、CD25、CD44 等)的 CD4-F<sub>ab</sub> 的抗体。例如, 识别特定免疫细胞的细胞表面蛋白的抗体使本发明的融合蛋白特异地结合到免疫细胞。这种情况下, 可改变两个 F<sub>ab</sub> 的亲合性以获得有利的效果。例如, 高亲和性的 CD4-F<sub>ab</sub> 作为双特异性抗体就会定向到 CD4 细胞。

本发明融合蛋白的部分 I 和 II 任选地可由接头序列连接。优选地, 该接头具有约 5-40 氨基酸的长度, 更优选 5-30 的氨基酸长度, 最优选 5-20 的氨基酸长度。还优选该接头包括含有至少 50%甘氨酸残基、优选至少 60%、更优选至少 70%、最优选至少 80%甘氨酸残基的序列。

在特别优选的实施方案中, 本发明的融合蛋白包括 SED ID NO: 7 核酸序列编码的蛋白序列或蛋白序列 SED ID NO: 8, 或由 SED ID NO: 7 核酸序列编码的蛋白序列或蛋白序列 SED ID NO: 8 组成。

此外, 本发明的发明抗体、其片段或融合蛋白还可具有共价(或非共价)偶联的分子或基团, 例如荧光标记物或其它标记物, 例如金标记物或能被第三种分子识别的特异表位。

这里公开的本发明的主题还为上述发明抗体的混合物(组合物), 例如单克隆抗体的混合物、或单克隆抗体与抗体片段的混合物、抗独特型抗体的混合物等等。

本发明的另一实施方案为用于优选地定量测定样品中配体的方法, 该样品包含例如溶解或悬浮形式的结合蛋白的所述配体, 其中将本发明的至少一种抗体 A 或发明融合蛋白加到待测定的所述样品中(步骤 a)。本发明的这种方法(步骤 a)之后可为在所述样品中测定所述配体浓度的第二步(步骤 b)。

用于本发明方法的“抗体 A”如前所定义。

根据本发明的方法，所述抗体 A 或发明融合蛋白可在样品中定量测定如瘦素的配体浓度之前或测定过程中加到所述样品中，优选在之前加到所述样品中，和/或可与所述样品一起孵育。

特别优选本发明的抗体 A 准确地和高亲和性地结合瘦素结合蛋白的配体结合位点。由于如抗体 A 或发明的融合蛋白的本发明的分子的结合，引起配体(瘦素)从瘦素结合蛋白的置换，防止同时所述配体的结合。这种置换明显地依赖于所加抗体 A 或发明融合蛋白的增加。因此，相对瘦素结合蛋白摩尔浓度大大过量的抗体 A 或发明融合蛋白对于进行本发明的方法来说是极为有利的。

配体(如瘦素)从该置换“释放”，由于没有瘦素结合蛋白的结合活性的空间抑制，该配体接着能被定量地测定。

用在本发明中的“配体”典型地包括以高亲和性结合到瘦素受体和/或瘦素结合蛋白并允许在特定的分析中测定它们浓度的所有化合物，以及例如用于医学目的而测定的所有化合物。例如信使物质，诸如激素、如神经递质的递质，细胞外信号肽或蛋白，细胞因子，趋化因子、淋巴因子等等都是本发明意义上的化合物。瘦素是本发明优选的配体。配体在本发明中的含义还可以是“生理配体”。这种“生理配体”典型地为上述含义中的配体，其在脊椎动物体内、特别是体液中被发现，而不是外源添加的。相应地，这也适用在生理条件下被自然发现于生理结合蛋白，这也适用于生理配体的瘦素结合蛋白。

“样品”在本发明中的含义典型地被理解为待检测的任何类型的溶液，特别是医学相关物质的溶液，诸如血液、淋巴液、血清、尿液、液剂，以及以加工形式存在的，为样品处理做好准备的。同样地，优选在本发明方法的待测样品中含有液体，优选体液，更优选人体液，特别是血液或人血液。

“体液”被理解为从脊椎动物、尤其是哺乳动物中得到的每一种液体，特别是从人类得到的每一种液体。对人类来说，这会例如是血液、尿液、淋巴液，但也可是来自人细胞的胞溶质制品。

术语“溶解或悬浮形式”在本发明中的含义被理解为液体介质中的

瘦素结合蛋白或广义上的配体的任何形式的溶液。这还包括例如瘦素结合蛋白刚好要沉淀或已经沉淀的情况，只要它仍是溶液的组成部分。

本发明方法上下文中的“定量测定”理解为任何技术人员已知的用于测定溶于样品中的分析物的方法。这明显地包括例如通过采用在标准品同时存在下的色谱方法定量，特别是利用抗体和配体(抗原)间的高亲和相互作用通过竞争性分析法或结合分析法的定量，该竞争性分析法或结合分析法例如也为 ELISA 形式的夹心分析法。本发明的特别的优点在于，在无需任何努力的情况下，将特异的拮抗剂抗体或发明的融合蛋白加入到如这里公开的样品中可以与实际上所有已知的、特别是可购得的用于定量分析各个分析物(配体)测试试剂盒或测试系统联合使用。

在本发明的方法中，优选所述抗体 A 或发明的融合蛋白在定量测定之前或期间，优选在定量测定之前加入和/或与样品一起孵育。

待测试样品典型地与抗体 A 或发明的融合蛋白一起孵育。这里使用的术语“孵育”理解为反应状态，其中让反应伴侣，换言之，抗体 A 或发明的融合蛋白与瘦素结合蛋白相互反应。典型地，将抗体 A 或发明的融合蛋白加入到含有瘦素结合蛋白和瘦素的样品中。该孵育通常进行有限的时间段，这种情况下例如为 6、12、18 或 24 小时。术语孵育应主要被理解为在采用抗体 B 检测配体(瘦素)的定量测定(例如采用可购得的测试试剂盒)之前的在先步骤，例如进行 6、12、18 或 24 小时。

在本发明方法的另一优选的实施方案中，所述瘦素结合蛋白为所述配体的生理伴侣。

当瘦素和/或瘦素结合蛋白从外部加入(外源的)，例如在注射或其它方式吸收作为患者或测试人的配体的瘦素后，本发明的方法也是有用的。

本发明的方法可用于测量任何“结合蛋白”的配体。结合蛋白为与其它蛋白相互作用的蛋白。结合蛋白的例子为与瘦素相互作用的瘦素结合蛋白或瘦素受体。用在本发明方法中的所述结合蛋白优选为可溶的，更优选为可溶的(瘦素)受体。

在本发明方法的优选实施方案中。由“结合蛋白”结合的配体为肽类化合物和/或激素，优选肽类激素，特别是瘦素，或激素结合蛋白。术语“肽类的”这里理解为包括各成分主要采用肽键(如 R1-NH-C(O)-R2)

连接在一起的任何化合物。

如果用作本发明方法的配体，则激素结合蛋白优选为结合亲和激素的结合蛋白(见下)。这里的“激素”理解为化学信使物质，其在与其合成和释放位点隔一段距离的地方起作用。激素优选由诸如垂体、生殖腺或松果体的内分泌腺体产生。其例子为生长激素或黄体化激素 LTH、胰岛素、褪黑激素、胰高血糖素、胃泌素、血管紧张素、P物质、白细胞介素、加压素、内啡肽、脑啡肽、松弛素、心房利钠因子或还有瘦素。

在本发明方法的特别优选的实施方案中，该方法中使用的配体为人瘦素，瘦素结合蛋白为人瘦素结合蛋白。此外，抗体 A 或发明的融合蛋白优选针对在瘦素结合蛋白上的瘦素结合位点。

另外，如果定量测定本发明方法的结合蛋白的配体，优选加入另一抗体 B，优选单克隆抗体 B。这种“抗体 B”，优选“单克隆抗体 B”典型地为抗配体抗体，即针对本发明的任何配体但不针对 leptin-R 或 leptin-BP 的抗体。有利的是，通过采用竞争性结合测试，优选“放射免疫分析”(RIA)来进行本发明方法中的定量测定。同样地，通常惯用的是，通过读取由待测定配体的浓度决定的信号进行配体浓度定量测定，优选通过采用酶联免疫吸附分析(ELISA)和/或合适的夹心分析法进行。

在本发明方法的另一优选的实施方案中，在定量测定之前不将瘦素结合蛋白从待测样品中分离。特别是，这意味着与现有技术中的配体浓度测定方法相比，在其定量分析之前将瘦素结合蛋白从样品中提取出来对公开的本发明来说不是必要的。在现有技术中，事实上进行各种形式的提取，其中待测定的例如激素的配体保留在样品中，而例如通过沉淀和/或具有确定分子量排阻极限的过滤、如亲和色谱或 HPLC 的色谱方法、确定的配体尺寸的透析等等方法从样品中分离结合蛋白。优选采用本发明的方法时，确实可以省去该步骤。由于对抗体 A 或发明融合蛋白的选择，无论抗体 A/本发明融合蛋白还是抗体 A/本发明融合蛋白与瘦素结合蛋白形成的复合物都不与待测定的配体结合。因此，在样品中的测定不再受配体/配体结合蛋白相互作用的干扰或歪曲，即使复合的瘦素结合蛋白保留在样品中。但是，采用用于定量测定的高亲和抗体 B 并不干扰，因为它们不与抗体 A/本发明的融合蛋白、瘦素结合蛋白或二者形成的复

合物结合，而只与配体自身结合。

尤其是在本发明特别有利的和优选的方法中观察到该优点，该方法中抗体 A/本发明的融合蛋白以这种方式加入，即加入后抗体 A 的摩尔浓度为等于或优选大于瘦素结合蛋白的摩尔浓度，优选至少高 50%、更优选高两倍、更优选至少高三倍以及尤其为瘦素结合蛋白浓度的 4 倍高。

这种以相对于瘦素结合蛋白加入过量的抗体 A/本发明的融合蛋白确实是特别有利的，因为在充分过量的抗体 A/本发明的融合蛋白存在下所有的配体都从瘦素结合蛋白完全地置换出来，由此变得可以测量。因为瘦素结合蛋白被定量地复合，它不再干扰配体的浓度。

向样品中加入准确的和足够量的特定抗体 A 或本发明的融合蛋白，以提供无干扰现象情况下的配体定量测量，这可由专业人员通过简单的初步试验来确定。优化的添加依赖于所述样品中的瘦素结合蛋白量，并最终依赖于定量检测系统或待测定的配体的量。

在本发明优选的实施方案中，含有人血液的样品中的配体通过采用针对配体的抗体 B 进行定量测定，该抗体 B 优选单克隆抗体 B。其中，配体和瘦素结合蛋白优选以溶解或悬浮形式存在，并且抗体 A/发明的融合蛋白针对瘦素结合蛋白上的配体结合位点。优选将保藏的单克隆抗体 ZMC2 作为抗体 A，以大大过量于瘦素结合蛋白量的方式在定量测定配体之前或期间、优选在步骤 b(通过加入和孵育抗体 B 定量测定)之前加到待测样品中。

优选地，用在本发明方法中的配体为瘦素。

本发明方法典型地通过向待测样品中加入高度过量的特异性的优选的抗体 A 或本发明的融合蛋白来防止瘦素结合蛋白对瘦素的干扰。抗体 A 或发明的融合蛋白针对瘦素结合蛋白。用在本发明方法中的抗体 A 优选单克隆抗体 ZMC2。选择它是因为它在瘦素结合蛋白分子上的结合位点恰好与瘦素分子的位点结合相同的特别首选的特性。如果加入过量的抗体 A，它使瘦素分子从其与瘦素结合蛋白的结合中置换出来。瘦素被“释放”，并由此可采用任何用于瘦素的免疫分析法测量，而没有瘦素结合蛋白在空间上引起的阻断。由于“抗瘦素结合蛋白抗体”(抗体 A)自身或本发明的融合蛋白自身不干扰用于瘦素(配体)测量的“抗瘦素抗体”(抗

体 B), 则将抗体 A/本发明的融合蛋白和瘦素结合蛋白从样品中去除是不相关的。事实上, 例如具有瘦素置换特性的特异的抗瘦素结合蛋白抗体 ZMC2 或本发明的融合蛋白在透析之前加入到样品中。在与 ZMC2 孵育后, 配体测定按照各制造商的指导进行。

本发明的另一实施方案涉及含有至少一种发明的抗体 A 和/或至少一种发明的融合蛋白的药物或疫苗。优选公开含有至少一种抗体或本发明的融合蛋白以及任选的添加剂和/佐剂的药物或疫苗。最后, 其它的活性物质可以存在于本发明的药物或疫苗中。含有至少一种本发明的抗体 A 和/或本发明的融合蛋白的药物或疫苗适合例如用于过量瘦素水平的治疗。本发明的抗体可抑制、优选完全抑制所有瘦素受体结合位点。结果, 瘦素不能结合到其瘦素受体和/或治疗性抗体 A/本发明的融合蛋白将结合到瘦素结合蛋白的瘦素从其结合位点置换出来。

根据进一步的实施方案, 抗体 A/本发明的融合蛋白或含有至少一种抗体 A/本发明的融合蛋白的药物或疫苗可在医疗上作为瘦素拮抗剂使用, 或用于抑制人瘦素生理作用的药物的制备。因为它对瘦素结合受体的瘦素结合位点的结合本发明的抗体 A/本发明的融合蛋白阻断所述的生理作用。

因此, 含有一种或多种本发明的抗体 A 和/或本发明的融合蛋白的药物或疫苗(如果可行的话还包括佐剂或添加剂)还可用于那些显示非生理性增加的瘦素水平的疾病、病症或状态的治疗目的。根据本发明, 这也意味着这种本发明的抗体 A/融合蛋白, 或含有至少一种抗体 A 的药物或疫苗用于治疗(或用于制备用于治疗的药物)所有那些过量的瘦素水平为病因的疾病、病症或病理生理状态, 例如能量代谢疾病、诸如厌食或恶病质的病理的摄食障碍。本发明的抗体 A 或本发明的融合蛋白、含有抗体 A 的药物或疫苗也可用于 TH1 介导的疾病的治疗, 这些疾病包括多发性硬化、糖尿病、1 型糖尿病、慢性心力衰竭(CHF)、TNF 介导的疾病、自身免疫性结肠炎、风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、以及移植排斥, 用于调节天然产生的调节性/抑制性 T 细胞的增强的增殖和与此有关疾病以及与 MAPK/ERK1-2、AKT、p-27-kipl 信号途径相关的疾病的治疗。

此外, 有实验结果记录了瘦素值与自身免疫性疾病素因的相关性。

本发明的抗体 A、含有抗体 A 或本发明的融合蛋白的药物或疫苗也可用于阻断瘦素的免疫作用。本发明的抗体 A、融合蛋白、含有抗体 A 或融合蛋白的药物或疫苗由此可用于免疫治疗。

通过给药至少一种本发明的抗体 A、或本发明的融合蛋白或其相关的本发明药物或疫苗，可在不降低其血清浓度情况下阻断病理生理性增加的细胞外瘦素浓度的作用。因此，将本发明的药物或疫苗还用来治疗如神经性食欲缺乏和不同阶段的恶病质的疾病是高度有益的和有希望的。在胰岛素依赖的糖尿病病例中造成多种后遗症的瘦素过多分泌，也可通过本发明的瘦素拮抗剂或含有至少一种抗体 A 的药物或疫苗来治疗。

如果合适的话，对受过量瘦素水平影响的患者的治疗性处理可与降低瘦素分泌的药物或活性物质联合进行。

本发明的药物或疫苗、本发明的抗体 A 或本发明的融合蛋白特别优选用于或可用来制备药物，该药物用于与不希望的免疫系统激活以及自身免疫疾病有关的状态的治疗。自身免疫疾病可选自多发性硬化(MS)、类风湿性关节炎、糖尿病、I 型糖尿病、系统性红斑狼疮(SLE)、慢性多发性关节炎、巴塞多病、慢性肝炎自身免疫型、溃疡性结肠炎、I 型过敏疾病、II 型过敏疾病、III 型过敏疾病、IV 型过敏疾病、纤维肌痛(fibromyalgie)、脱发、别赫捷列夫(Bechterew)病、克罗恩(Crohn)病、重症肌无力、神经性皮炎、风湿性多肌痛、进行性系统性硬化症(PSS)、牛皮癣、瑞特综合征、风湿性关节炎、血管炎病(vaskulitis)等等。

在特定的实施方案中，本发明的药物、本发明的抗体 A 或本发明的融合蛋白可用于或发挥阻断抗体 A 的外周作用。“外周”作用由通过间接阻断瘦素受体而抑制瘦素作用所引起。相反，瘦素的“中枢”抑制则是由于治疗性化合物与瘦素的直接作用。瘦素外周性地作用于例如免疫系统，而中枢作用是基于其与中枢控制器官如下丘脑的结合。瘦素结合到下丘脑导致体重控制作用。对于治疗某些免疫病症来说，瘦素与其受体的相互作用应被抑制，然而其它身体部位(如下丘脑)的瘦素浓度应保持不变以免相当的体重减轻/体重增加。

现有技术中对瘦素过量的治疗，例如通过抗瘦素抗体的给药，降低

了身体内的瘦素水平。给药时，可实现抗瘦素抗体对患者免疫病症的积极作用。但是，同时可出现副作用，例如由于如在下丘脑游离瘦素水平的降低出现的体重增加。本发明的拮抗剂使避免现有技术中抗瘦素抗体的副作用成为可能。这里公开的本发明抗瘦素受体抗体治疗选择性地阻断某些组织的瘦素受体但不改变其它组织的瘦素应答性(下丘脑中的中枢作用)，从而不降低患者的瘦素水平。作为例子，在使用诸如 ZMC2 的本发明的抗体 A 时，可以在不对体重起作用的情况下防止免疫反应，即在诸如 ZMC2 的本发明的抗体 A 或本发明的融合蛋白治疗过程中没有明显的体重变化。

典型地，用在本发明的药物或疫苗中的发明的抗体 A 或发明的融合蛋白可以冻干粉末的形式得到，含有 0.5mg 至 100mg 的本发明抗体 A 以及其它添加剂，例如甘氨酸、甘露糖和/或一水合磷酸钠。该冻干粉末可在合适的水溶液中提供并随后例如通过皮下每天注射一次或几次给药。

原则上，本发明的药物也可以液体剂形施给药，特别是以注射溶液形式。合适的添加剂和/或佐剂为例如溶液或稀释剂、稳定剂、悬浮介质、缓冲剂、防腐剂以及着色剂、膨胀剂和/或粘结剂。待施用佐剂及剂量的选择取决于该药物是否应采用肠道外、血管内、静脉内、腹膜内或肌内给药。悬浮液和溶液以及容易还原的干制剂适用于所有的肠道外应用。

本发明的另一实施方案为诊断试剂，其含有至少一种本发明的抗体或融合蛋白以及视情况而定的添加剂和/或佐剂。“诊断试剂”理解为对例如确定的疾病的诊断有用的制剂或佐剂。

本发明的另一实施方案为含有互不相同的至少一种第一制剂和一种备用的操作测试分析物的试剂盒，该第一制剂含有至少一种本发明的抗体 A 或融合蛋白，

该试剂盒基于抗原/抗体反应用于配体定量测定，该配体在该测试中作为抗原。试剂盒理解为包装形式的不同成分的联合形式。这种情况下，其特别为含有为配体定量分析所需的不同成分的诊断试剂盒。

这样的试剂盒为优选的，即第一制剂含有针对配体结合位点的抗体 A 或融合蛋白，该配体优选瘦素，特别优选人瘦素，在优选人的瘦素结合蛋白上，和/或除了第一制剂和备用的操作测试分析物外，基于抗原/抗体

反应用于配体的定量测定，其还含有用于校正的制剂。

特别优选的实施方案为本发明的试剂盒，其中第一制剂含有抗体 ZMC2(保藏的，见上)和/或用于校正的制剂和/或抗体 B 处于备用的随附的操作测试分析物中，其中测试分析物基于抗原/抗体反应用于配体的定量测定，其中优选为单克隆抗体 B 的抗体 B 针对该配体。

优选地，配体为瘦素，抗体 B 针对分子量 16kDa 的瘦素的主要异构体。

本发明的另一实施方案为至少一种抗体在测定、优选定量测定生理瘦素结合蛋白的生理配体、优选瘦素中的应用。

本发明的另一实施方案为制备本发明抗体即针对瘦素结合蛋白的抗体的方法，包括下列步骤：(a)用重组产生的瘦素结合蛋白免疫动物，(b)从所述动物中分离出免疫细胞，(c)与骨髓瘤细胞系融合形成杂交瘤细胞培养物，(d)选择对所述瘦素结合蛋白有高度特异性的克隆。可对所有适于该目的的动物进行免疫，例如小鼠、兔子、猪、马等。为了从发明的克隆(其产生例如特异地针对瘦素结合蛋白的配体结合位点的抗体)中分离出产生针对瘦素结合蛋白抗体的这种克隆，在步骤(e)中用一种(非选择性的)抗瘦素捕获抗体将合适的介质(例如微量滴定板孔、聚苯乙烯小球、塑料管)一一包被。在另一步骤(f)中，将瘦素结合蛋白以及随后的配体(如瘦素)添加进来。为此，配体优选为带标记的(例如通过采用生物素化、加上标记(放射活性标记、荧光标记物、酶标记物(辣根过氧化物酶)等等))或可采用相应的抗配体抗体检测，以便能够检测所述配体与结合包被有捕获抗体的接受者中的瘦素结合蛋白结合的特性。因此，备选的方法有例如放射活性、化学发光、比色法或酶反应。在清洗步骤后，可鉴定出那些在加入配体后没有显示信号的“孔”或“小球”。在该情况下，捕获抗体阻断配体结合位点。因此，由于捕获抗体干扰该配体，结合位点不再能用于配体的结合。

最后，本发明的抗体 A 或融合蛋白可通过进行竞争性结合分析来鉴定。如上所述，这里需要包被过程，于是在该方法中，每一孔(例如微量滴定板的)都包括有抗瘦素结合蛋白抗体，其不会特异性地识别配体结合位点。在瘦素结合蛋白加入后，将可能令人感兴趣的抗体或融合蛋白(每

一种都具有特异识别配体结合位点的特性)加入到每一具有标记的配体的上述孔中。随着特异于配体结合位点的抗体的浓度增加,每一孔中的配体的信号密度会减小。该方法可用于本发明针对瘦素受体和/或瘦素结合蛋白的抗体的选择。

作为采用杂交瘤细胞的备选方法,也可采用所谓的“噬菌体展示”方法(Morphosys or Cambridge Antibody Technologies),以便产生可能的本发明抗体并进行选择,如上所述。

在以下部分,将通过实施例对本发明做更加详细地描述,但并非将本发明限定到这些实施例。

#### 实施例和附图:

##### 附图说明:

图 1: 显示实施例 2 中的检测结果。该结果证实,加入本发明的抗体可减小或消除瘦素通过瘦素受体介导的影响。

图 2A: 显示 ZMC2/F<sub>ab</sub> 轻链的蛋白序列(修改的)。

图 2B: 描绘 pComb3/ZMC2,F<sub>ab</sub> 载体(轻链)的开放阅读框的核苷酸序列以及其翻译成的 ZMC2/F<sub>ab</sub> 轻链的编码蛋白序列(参阅图 2A)。起始和终止密码子以黑体字母表示,限制性位点加有下划线,引物序列加有双下划线。pComb3/ZMC2,F<sub>ab</sub> 载体的序列以斜体字母表示。

图 3A: 描绘 ZMC2/F<sub>ab</sub> 重链-His 的蛋白序列。

图 3B: 显示 pComb3/ZMC2,F<sub>ab</sub>-His 载体(重链)的开放阅读框的核苷酸序列以及其翻译成的 ZMC2/F<sub>ab</sub> 重链-His 的重链的编码蛋白序列(参阅图 3A)。起始和终止密码子以黑体字母表示,限制性位点加有下划线,引物序列加有双下划线。pComb3/ZMC2,F<sub>ab</sub>-His 载体的序列以斜体字母表示。His 标签由虚线(.....)表示。

图 4A: 公开了高亲和性克隆 ZMC2 ScFv(1C3)的核苷酸序列。V<sub>L</sub> 序列表示为黑体。V<sub>H</sub> 序列加有双下划线。之间的接头用正常字母表示。该载体的序列表示为斜体字母。E 标签用虚线显示。限制性位点(SfiI 和 NotI)加有下划线,引物序列加有双下划线。

图 4B: 显示由图 4A 中所示高亲和性克隆 ZMC2 ScFv(1C3)的核苷酸

序列编码的翻译的蛋白序列。公开的部分为从 V<sub>H</sub> 至 E 标签结尾的序列。

图 5A: 描绘 ZMC2 重链-瘦素构建体的核苷酸序列。公开的是 1203bp 核苷酸序列, 其中起始和终止密码子显示为黑体, 限制性位点加有下划线。ZMC2 重链由虚线(.....)表示, (G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub> 接头加有双下划线。瘦素序列以(.....)线表示, 载体序列以斜体字母表示。his 标签以(.....)线表示。

图 5B: 显示 ZMC2 重链-瘦素构建体的翻译蛋白序列(参照图 5A)。ZMC2 重链由虚线(.....)表示, (G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub> 接头加有双下划线。瘦素序列以单线表示, 该载体序列以斜体字母表示。his 标签以(.....)线表示。

图 6: 描述 ELISA 中 ZMC2 抗体与人 leptin-R 的结合。图 6 清楚地显示 ZMC2 抗体以剂量依赖的方式结合到人 leptin-R(参阅实施例 3)。

图 7: 显示在(过量)瘦素存在下 ZMC2 抗体与人 leptin-R 的竞争性结合实验结果的柱状图。在 X-轴上标有不同浓度(ng/ml)的瘦素(10000、1000、100、10、1 和 0.1ng/ml, 且 ZMC2 的浓度为 10ng/ml)。Y 轴显示 450nm 的吸光度(OD 450nm)。可以看出, ZMC2 与 leptin-R 的结合显然非常牢固。只有大大过量的瘦素才可将 ZMC2 抗体从与人 leptin-R 的结合中置换出来(参阅实施例 4)。

图 8: 显示 HEK293 细胞中对瘦素刺激应答的荧光素酶活性的剂量效应的柱状图。为此, 用 Ob-Rb 和 STAT3 荧光素酶报告基因构建体瞬间转染 HEK293 细胞, 并用各种剂量的瘦素刺激 2 小时。接着, 对荧光素酶活性进行测量并用  $\beta$  半乳糖苷酶校正。在 X 轴上标有不同浓度(ng/ml)的瘦素(1、5、10、20、50、100、250、1000 ng/mg)。Y 轴显示相对于未刺激细胞诱导的倍数。从图 8 可知, 采用瘦素诱导 HEK293 细胞达到一最高水平, 此外没有观察到进一步的刺激作用(参阅实施例 5)。

图 9: 在柱状图中描述 ZMC2 抗体对瘦素信号的抑制作用的剂量效应。用 leptin-R 和 STAT3 荧光素酶报告基因构建体瞬间转染 HEK293 细胞, 并用瘦素(5 ng/ml)刺激 2 小时。不同剂量的 ZMC2 抗体(ug/ml, 见 X 轴)加入到培养物中, 对荧光素酶活性进行测量并用  $\beta$  半乳糖苷酶校正。结果表示为相对于未刺激细胞的诱导倍数。在 X 轴上标有不同浓度(ng/ml)的瘦素(0、12.5 和 100 ng/mg)和 ZMC2(10、5、1、0.5 和 0.1 ng/mg)。从图 9 可知, ZMC2 抗体显示出以剂量效应方式对瘦素信号的抑制作用(参

阅实施例 6)。

图 10: 显示 ZMC2 抗体与小鼠 leptin-R 结合的柱状图。ZMC2 抗体的结合采用尾随有 SAV-HRP 的生物素化第二抗体检测。产生的颜色的 OD 值在 450nm 处测量。在 X 轴上标出不同浓度的瘦素(ng/ml)和 ZMC2(ng/ml)。从图 10 可知, ZMC2 抗体以剂量依赖的方式结合到小鼠 leptin-R, 且其结合仅可以高浓度的瘦素置换出来(参照实施例 7)。

图 11: 在柱状图中描述了在瘦素活化的人单核细胞中用 ZMC2 抗体阻断 TNF- $\alpha$  产生。人单核细胞在 PBS、瘦素(250 ng/ml)、ZMC2(10 ng/ml)+瘦素和 ZMC2(5 ng/ml)+瘦素存在下培养。Y 轴显示表达 TNF- $\alpha$  的单核细胞百分比(参阅实施例 8)。

图 12A: 描绘了增殖分析, 显示了不同浓度 ZMC2 抗体存在下在自体人血清中人 PBL 的 okt3(优化剂量 100 ng/ml)刺激作用。在图 12A 中, ZMC2 在有或无外源瘦素(100 ng/ml)存在下出现(从 0.01, 0.1, 1 和 10  $\mu$ g/ml)。从图 12A 可知, ZMC2 有较小的增强 PBL 增殖的效果, 该 PBL 增殖由瘦素减弱(参阅实施例 9)。

图 12B: 显示不同剂量瘦素下在自体人血清中人 PBL 的 okt3(优化剂量 100 ng/ml)刺激作用, 并显示更多的 ZMC2 单克隆抗体剂量效应点(0, 0.005, 0.05, 0.5, 5, 50  $\mu$ g/ml)。图 12B 中的曲线为两阶段的, 在 ZMC2 处理后较弱的增强增殖又被瘦素减弱(参阅实施例 9)。

图 12C-D: 显示用供体(在如图 12A 和 B 所示的同样的分析中)、来自 R&D systems 的激动型抗瘦素受体抗体和来自 R&D systems 的另一抗人瘦素处理进行的比较实验。该激动型抗 ObR2 抗体以与拮抗型 ZMC2 类似的方式增强增殖, 抗瘦素在低剂量时增强增殖。当采用 ZMC2 时增殖作用被瘦素逆转, 但依然被抗 ObR2 刺激。在幼稚/记忆细胞的混合群体; 在存在于血清的瘦素控制记忆细胞增殖情况下, 加入阻断性的抗体 ZMC2 因此轻微地增强增殖, 其随后可逆转。因此, ZMC2 作为拮抗型抗体(参阅实施例 9)发挥作用。

图 13: 显示类似图 12 中公开的增殖分析的结果图, 但延长到更长的时间段(增殖 4 天(96 小时))。图 13 显示不同剂量瘦素下在自体人血清中人 PBL 的 okt3(优化剂量 100 ng/ml)刺激作用, 并显示更多的 ZMC2 单克

隆抗体剂量效应点(0, 0.005, 0.05, 0.5, 5, 50  $\mu\text{g/ml}$ )。ZMC2 抗体刺激增殖, 但随后明显地被瘦素的加入所逆转。因此, 对于混合 T 细胞的群体的整体反应来说, ZMC2 显然作为拮抗剂与 leptin-R 反应(参阅图 10)。

图 14A-C: 显示 ob/ob 和 ob/+小鼠的摄食实验(参见实施例 11)图: 选择 3 组小鼠; 都是雌性; 这些小鼠起初用低剂量的瘦素处理以保持体重恒定。该处理为 100  $\mu\text{g/天}$  ip+Rec 瘦素 0.5 $\mu\text{g/g}$  体重, 共 5 天。在图 14A 中, 体重变化百分比在用瘦素单独处理期间为平坦的, 在无 ZMC2 抑制时, 如果体重不是不变, 就是体重仅轻微增加或非常小的减少。对杂合子(图 14B, 参阅实施例 11)平行处理, 基本显示出类似的结果。仅用同样剂量的 ZMC2, 未经处理的小鼠随时间轻微增加体重; 在对比实验中(图 14C, 参阅实施例 9), 2%FCS 存在下, 用小鼠抗-CD3(称为 2C11)(0.0001、0.001、0.01、0.1、1、10、100  $\mu\text{g/ml}$ )刺激来自正常小鼠(B6)的脾细胞的增殖剂量反应。从图 14C 可知, 在 10-100 $\mu\text{g/ml}$  可得到明显的抑制作用。

图 15: 显示凝胶电泳图。加到凝胶上的样品来自利用源自有自身免疫倾向的 NOD 小鼠的抗-CD3 刺激实验。从凝胶可知, ERK1/2 磷酸化被 leptin-R 阻断抗体减少。

图 16: 显示 pComb3/ZMC2,F<sub>ab</sub>-His 克隆的质粒图谱。

图 17: 显示纯化重组 F<sub>ab</sub> ZMC2 期间的免疫印记实验。从免疫印记可以看出, 重组 F<sub>ab</sub> ZMC2 以可溶组分表达, 该印记显示  $\kappa$  轻链的正确尺寸的蛋白质。

图 18: 显示纯化 His 标记的 F<sub>ab</sub> ZMC2 期间的免疫印记实验。从免疫印记可以看出, His 标记的 F<sub>ab</sub> ZMC2 可在钴柱上纯化。

图 19: 显示纯化的 F<sub>ab</sub> ZMC2 抗体的聚丙烯酰胺凝胶的考马斯蓝染色。

图 20A: 显示 ZMC2 和重组表达的 F<sub>ab</sub> ZMC2 对人瘦素的结合实验的柱状图图。Y 轴显示在 450nm 的吸收值(OD 450nm)。

图 20B: 显示重组 F<sub>ab</sub> ZMC2 对瘦素诱导的 SIE 活化的作用。从图 20A 可知, ZMC2 的重组 F<sub>ab</sub> ZMC2(rF<sub>ab</sub>)和化学制备的 F<sub>ab</sub> ZMC2(cF<sub>ab</sub>)阻断瘦素信号。

## 实施例

### 实施例 1:

#### 抗体 A(针对 leptin-BP)的生产

采用根据通常已知方法(参考 Titermax®的宣传品)重组生产的 leptin-BP 对超过 20 只 Balb/c 小鼠反复免疫。当实现针对 leptin-BP 的高效价, 将脾从动物中取出, 再按照 Köhler 和 Milstein 描述的方法 (Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity(分泌预定特异性抗体的融合细胞的连续培养), Nature, 1975, Aug. 7;256(5517):495-7)通过与鼠骨髓瘤细胞系的融合产生杂交瘤细胞培养物。还根据通常已知的方法(有限稀释、用标记抗原筛选杂交瘤细胞培养物上清液)对那些产生对 leptin-BP 有高亲和性和特异性的单克隆抗体克隆进行选择。

大多数选择的克隆针对 leptin-BP 分子上的这些表位, 即它们位于瘦素结合位点的外部。为了选择本发明的针对结合位点内表位的抗体 A, 起初采用在结合位点外部结合 leptin-BP 的许多抗体之一。通过将所有针对 leptin-BP 的单克隆抗体(尽可能多)作为捕获抗体应用到例如微量滴定板(具有高吸附性表面的聚乙烯板)的各分离孔(或, 也可采用其它方法, 如包被的聚乙烯小球、包被的塑料管)。随后, 加入重组 leptin-BP, 其主要以仍未知的排列结合到包被的抗体(根据激素受体的作用位点内或外的每一表位结合)。最后, 添加标记的(我们采用生物素化的)瘦素, 现在其只结合到具有可自由接近的结合位点的 leptin-BP 分子(即包被抗体不干扰瘦素结合)。通过添加链霉亲和素-辅进行结合抗体的测定, 该链霉亲和素-辅结合到结合的生物素化瘦素, 并可在荧光计中测量(在添加增强液 (enhancement solution)后时间解析荧光法)。或者, 该步骤也可采用类似的方法(放射活性、酶反应/比色法或化学发光)完成。

为了发现针对结合位点的抗体, 微量滴定板用针对 leptin-BP 但不影响瘦素结合的抗体包被, 该抗体是根据上述方法选择的。leptin-BP 的添加引起 leptin-BP 分子的对准结合, 换言之具有自由可接近的瘦素结合位点。随后, 添加生物素化的瘦素并同时添加其它针对 leptin-BP 的单克隆抗体(又一次, 每一抗体位于微量滴定板上的各自的孔中)。由此如果抗体

针对结合位点, 它应以浓度依赖方式阻断生物素化瘦素的结合。这可以通过信号密度的减小进行检测(检测方法我们又采用时间解析荧光法(链霉亲和素-镧)。在反转试验的证实中通过添加未标记的瘦素将针对 leptin-BP 的生物素化抗体置换出来。有可能出现生物素化抗体与非标记瘦素竞争在受体结合位点上结合的情况, 即该单克隆抗体的表位位于该瘦素/瘦素受体的相互作用位点。

### 实施例 2:

本发明抗体的有效性的核实以及在干扰瘦素结合蛋白存在下有关的对通常的定量测量方法的改进

将瘦素结合蛋白固定在微量滴定板上, 让瘦素结合位点为可自由接近的。这采用针对瘦素结合蛋白的其它抗体完成, 该抗体不结合在激素受体作用位点之内, 而是结合在激素受体作用位点之外。接着, 添加标记的(生物素化的)瘦素。然后, 将含有增加浓度的本发明抗体 ZMC2 的缓冲溶液添加到孵育溶液中。孵育 2 小时后, 添加特异性结合生物素的荧光染料对结合到固定瘦素结合蛋白的标记瘦素的量进行测定。随着 ZMC2 浓度的增加, 生物素化的瘦素的结合减少, 由此证实 ZMC2 的置换作用。

另外, 采用 ZMC2 在细胞培养分析中证实对瘦素受体的功能性阻断。为此, 用人瘦素受体以及 STAT3 荧光素酶报告基因瞬间转染 HEK293 细胞。该构建体使观察或测定细胞内瘦素引起的信号级联活化成为可能。

如图 1 所示, 向细胞培养物添加瘦素引起荧光素酶活性增加 7-8 倍(与不含有瘦素的对照相比)。与对照抗体(不相关特异性的抗体, 本例中为针对 KLH 的抗体)相比, 将本发明的抗体 ZMC2 添加到该样本中(5ug/ml)抑制了该活化作用。

### 实施例 3

ELISA 中 ZMC2 抗体与人 leptin-R 的结合

为了检测 ZMC2 抗体与人 leptin-R 的结合, 将 ELISA 板用重组人 leptin-R 包被(200ng/孔), 且添加不同浓度的 ZMC2 抗体(1000、333、111、37、12.3、4.1、1.3、0.45、0.15、0.05、0.016、0.005、0.0018、0.0006 ng/ml)。

随后用跟随有 SAV-HRP 的生物素化第二抗体进行 ZMC2 抗体与 leptin-R 的结合的检测, 在 450nm 处测量信号(产生的颜色的 OD)。结果, ZMC2 抗体以剂量依赖方式与人 leptin-R 结合, 如从相应的柱状图可知(见图 6)。

#### 实施例 4

##### ZMC2 抗体结合人 leptin-R 的特异性

为了进行(过量)瘦素存在下 ZMC2 抗体与人 leptin-R 的竞争性结合实验, 将 ELISA 板用重组人 leptin-R 包被(200ng/孔)。在有或无 ZMC2 抗体存在下向孔中添加不同浓度的瘦素(10000、1000、100、10、1、0.1 ng/ml)。如果添加 ZMC2 的话, 其浓度为 10 ng/ml。随后用跟随有 SAV-HRP 的生物素化第二抗体进行 ZMC2 抗体结合的检测, 在 450nm 处测量信号(产生的颜色的 OD)。从图 7 可知, 只有较大过量的瘦素才能置换 ZMC2 抗体与人 leptin-R 的结合。因此, ZMC2 抗体与人 leptin-R 的结合为高度特异的。

#### 实施例 5

##### 荧光素酶活性应答瘦素刺激的剂量效应

为了检测荧光素酶活性应答瘦素刺激的剂量效应, 用 leptin-Rb 以及 STAT3 荧光素酶报告基因构建体瞬间转染 HEK293 细胞, 并用不同剂量的瘦素刺激 2 小时。2 小时后, 用不含有瘦素的新鲜培养基替换培养基, 在细胞裂解前进一步培养 4 小时。随后, 测量荧光素酶的活性并用  $\beta$ -半乳糖苷酶校正, 该  $\beta$ -半乳糖苷酶用作转染对照。结果显示在图 8 中。显示的值相对于未刺激细胞的诱导倍数。该诱导为剂量依赖的, 并在 50-1000 ng/ml 瘦素时达到最大值。

#### 实施例 6

##### ZMC2 抗体对瘦素信号的抑制作用的剂量反应

为了得到 ZMC2 抗体对瘦素信号的抑制作用的剂量反应, 用 leptin-Rb 以及 STAT3 荧光素酶报告基因构建体瞬间转染 HEK293 细胞, 并用瘦素 (5 ng/ml) 刺激 2 小时。在添加瘦素(如果不含有 ZMC2, 0 ng/ml; 如果含

有 ZMC2, 12.5 ng/ml)之前不同剂量的 ZMC2 抗体(10、5、1、0.5 和 0.1  $\mu\text{g/ml}$ , 如果含有瘦素)。随后, 测量荧光素酶的活性并用  $\beta$ -半乳糖苷酶校正。结果显示在图 9 中的柱状图中, 表示为相对于未刺激细胞的诱导倍数。结果 ZMC2 表现出剂量反应方式的瘦素信号抑制作用。

### 实施例 7

#### ZMC2 抗体对小鼠 leptin-R 的结合

用重组小鼠 leptin-R 包被(200 ng/孔)ELISA 板, 且添加不同浓度的 ZMC2 抗体、瘦素、生长激素或其组合(ng/ml)。随后用跟随有 SAV-HRP 的生物素化第二抗体检测 ZMC2 的结合, 在 450nm 处测量所产生颜色的 OD。结果以柱状图显示在图 10 中。从图中可知, ZMC2 抗体以剂量依赖方式与小鼠 leptin-R 结合, 并且只有用高剂量的瘦素才能置换其结合。

### 实施例 8

#### 在瘦素活化的人单核细胞中 ZMC2 对 TNF- $\alpha$ 产生的阻断

为了该实验, 由瘦素活化的人单核细胞诱导 TNF- $\alpha$  产生。在诱导 TNF- $\alpha$  产生后, 在有和无瘦素(250 ng/ml)存在下向单核细胞添加 ZMC2(10 和 5 ng/ml)。结果显示于图 11。从图 11 可知, ZMC2 能阻断由瘦素活化的人单核细胞产生 TNF- $\alpha$ 。Y 轴显示表达 TNF- $\alpha$  的单核细胞的百分比(% 双阳性(CD14 和 TNF- $\alpha$  阳性)单核细胞)。

### 实施例 9

#### okt3 对自体人血清中人 PBL 的刺激作用(抗 CD3 实验)

为了测量 okt3(最佳剂量 100 ng/ml)对自体人血清中人 PBL 的刺激作用, 将细胞在 ZMC2 抗体存在(从 0、0.1、1 和 10  $\mu\text{g/ml}$ )和有或无外源瘦素存在(100 ng/ml)下培养。60 分钟达到最多的 DNA 合成后收集细胞。对增殖进行了测量(cpm), 如图 12A 所示。ZMC2 对由瘦素减弱的 PBL 增殖有较小的增强作用。如从以下实验可知, 该增殖的增强可由瘦素逆转。由此 ZMC2 作为拮抗剂发挥作用。此外, 在瘦素存在下人体对抗-CD3 刺激的应答依赖于 PBL 中幼稚/记忆细胞的相对比例; 幼稚细胞越多, 应答

瘦素的增殖增强作用越明显；或者，存在越多记忆细胞，瘦素诱导的增殖抑制作用越明显(然而尽管记忆细胞的增殖减弱了，IFN-g 的分泌增加了)。

在图 12B、C 和 D 中，显示了不同浓度瘦素(10 和 100 ng/ml)下 okt3(最佳剂量 100 ng/ml)对自体人血清中人 PBL 的刺激作用和更多个点 ZMC2 单克隆抗体剂量反应(0.0001、0.001、0.01、0.1、1、10、100 ug/ml)。可以看出，曲线为双阶段的，在用 ZMC2 处理后有轻微的增强增殖的趋势，其又被瘦素减弱；利用供体在同样的分析中进行了两项实验，即来自 R&D systems 的激动型抗瘦素受体抗体(抗-ObR2)(图 12C)和来自 R&D systems 的另一抗人瘦素处理(图 12D)。抗-ObR2 以与 ZMC2 类似的方式增强增殖，抗瘦素在低剂量时增强增殖，该增殖被瘦素逆转。这里，当瘦素存在于血清中控制记忆细胞增殖时，研究了对幼稚/记忆细胞混合群体的作用。添加阻断性的单克隆抗体 ZMC2 轻微地增强增殖，当添加瘦素时其可被逆转。因此，ZMC2 作为拮抗型抗体发挥作用，而抗-ObR2 作为激发型抗体发挥作用。

#### 实施例 10:

##### 延长增殖实验

为了更好地确定 ZMC2 的作用，在更长的时间段进行了增殖实验，以观察当细胞将进入细胞周期后期时增殖增强是否更加明显。因此，增殖测量进行了 4 天(96 h)，令人吃惊的是，ZMC2 抗体仍然刺激增殖，其中一参见混合 T 细胞群体的整体反应—因瘦素的添加减小了增殖，ZMC2 显示为拮抗剂(见图 13)。还可由瘦素的添加减弱了增殖的现象可另外测量 ZMC2 的特异性。

#### 实施例 11

##### 对 ob/ob 和 ob/+小鼠: 3 组小鼠进行的摄食实验

为了摄食实验，选出 ob/ob 和 ob/+小鼠，都为雌性。对于 ob/ob，小鼠用低剂量瘦素处理以维持体重，即既不减小体重，也不增加体重，如同通常情况。通常，每两天 1 克体重为小鼠的典型喂食。该实验中的处

理为 100  $\mu\text{g}/\text{天}$  ip+Rec 瘦素 0.5 $\mu\text{g}/\text{g}$  体重, 共 5 天。从图 14A 可知, 在用瘦素单独处理期间, 以百分比表示的体重变化曲线为平坦的, 说明该处理是起作用的。无抗体抑制时, 如果体重不变, 就是体重仅轻微增加。在对比实验中使用杂合小鼠(见图 14B), 因为它们比正常小鼠的瘦素少。单独用同样剂量的抗体平行处理杂合子。未处理的小鼠随时间显示出增加体重的趋势(不如 ob/ob 小鼠明显); 用抗体处理的在体重方面类似, 但停止后体重比对照增加更多。

#### 来自正常小鼠(B6)的脾细胞的增殖

2%FCS 存在下, 用小鼠抗-CD3(称为 2C11) (0.0001、0.001、0.01、0.1、1、10、100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )刺激来自正常小鼠(B6)的脾细胞的增殖剂量反应。从图 14C 可知, 在 10-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  可得到明显的抑制作用。

<110> Grosshadern-Innenstadt 慕尼黑大学临床中心

<120> 瘦素拮抗剂及瘦素的定量检测方法

<130> LM01P002WO

<150> DE 103 53 953.4

<151> 2003-11-17

<160> 8

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 272

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(270)

<223> Xaa = 未知或其它

<400> 1

Xaa His Asn Pro Ile Pro Met Pro Pro Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu  
1 5 10 15

Leu Ala Ala Gln Pro Ala Met Ala Glu Leu Val Met Thr Gln Ser Pro  
20 25 30

Lys Phe Met Ser Thr Ser Ile Gly Asp Arg Val Asn Ile Thr Cys Lys  
35 40 45

Ala Thr Gln Asn Val Arg Thr Ala Val Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro  
50 55 60

Gly Gln Ser Pro Gln Ala Leu Ile Phe Leu Ala Ser Asn Arg His Thr  
65 70 75 80

Gly Val Pro Ala Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
85 90 95

Leu Thr Ile Asn Asn Val Lys Ser Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys  
100 105 110

Leu Gln His Trp Asn Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu  
115 120 125

Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro  
130 135 140

Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu  
145 150 155 160

Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly  
165 170 175

Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser  
180 185 190

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp  
195 200 205

Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr  
210 215 220

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

Ser Arg Val Lys Arg Xaa Gln Ser Xaa Gly Gly Pro Gly Thr Pro Ile  
245 250 255

Arg Pro Ile Gly Xaa Pro Tyr Tyr Asn Ser Leu Gly Gly Gly Phe Gln  
260 265 270

<210> 2  
<211> 818  
<212> DNA  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(818)  
<223> n = a, t, g, c, 未知或其它

<220>  
<221> CDS  
<222> (3)..(818)  
<223>

<400> 2  
na ngt cat aat cca ata cct atg cct acg gca gcc gct gga ttg tta 47  
Xaa His Asn Pro Ile Pro Met Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu  
1 5 10 15

tta ctc gct gcc caa cca gcc atg gcc gag ctc gtg atg acc cag tct 95  
Leu Leu Ala Ala Gln Pro Ala Met Ala Glu Leu Val Met Thr Gln Ser  
20 25 30

cca aaa ttc atg tcc aca tca ata gga gac agg gtc aat atc acc tgc 143  
Pro Lys Phe Met Ser Thr Ser Ile Gly Asp Arg Val Asn Ile Thr Cys  
35 40 45

aag gcc act cag aat gtt cgt act gct gtt acc tgg tat caa cag aaa	191
Lys Ala Thr Gln Asn Val Arg Thr Ala Val Thr Trp Tyr Gln Gln Lys	
50 55 60	
cca ggg cag tct cct caa gca ctg att ttc ttg gca tcc aac cgg cac	239
Pro Gly Gln Ser Pro Gln Ala Leu Ile Phe Leu Ala Ser Asn Arg His	
65 70 75	
act ggt gtc cct gct cga ttc aca ggc agt gga tct ggg aca gat ttc	287
Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe	
80 85 90 95	
act ctc acc att aac aat gtg aaa tct gaa gac ctg gca gat tat ttc	335
Thr Leu Thr Ile Asn Asn Val Lys Ser Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe	
100 105 110	
tgt cta caa cat tgg aat tat cct ctc acg ttc ggc tcg ggg aca aag	383
Cys Leu Gln His Trp Asn Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys	
115 120 125	
ttg gaa ata aaa cgg gct gat gct gca cca act gta tcc atc ttc cca	431
Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro	
130 135 140	
cca tcc agt gag cag tta aca tct gga ggt gcc tca gtc gtg tgc ttc	479
Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe	
145 150 155	
ttg aac aac ttc tac ccc aaa gac atc aat gtc aag tgg aag att gat	527
Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp	
160 165 170 175	
ggc agt gaa cga caa aat ggc gtc ctg aac agt tgg act gat cag gac	575
Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp	
180 185 190	
agc aaa gac agc acc tac agc atg agc agc acc ctc acg ttg acc aag	623
Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys	
195 200 205	
gac gag tat gaa cga cat aac agc tat acc tgt gag gcc act cac aag	671
Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys	
210 215 220	
aca tca act tca ccc att gtc aag agc ttc aac agg gga gag tgt tag	719
Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys	
225 230 235	
taa tct aga gtt aag cgg ccg caa tcg agg ggg ggc ccg gta ccc caa	767
Ser Arg Val Lys Arg Pro Gln Ser Arg Gly Gly Pro Val Pro Gln	
240 245 250	
ttc gcc cta tag ggg ngc cgt att aca att cac tgg gcg gcg gtt ttc	815
Phe Ala Leu Gly Xaa Arg Ile Thr Ile His Trp Ala Ala Val Phe	
255 260 265	
aan	818
Xaa	

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 292

<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(292)  
<223> Xaa =未知或其它

<400> 3

Leu Ala Xaa Arg Gly Gly Gly Arg Lys Ile Xaa Phe Xaa Arg Glu Thr  
1 5 10 15

Val Ile Met Lys Tyr Leu Xaa Ala Tyr Gly Pro Ala Ala Gly Leu Leu  
20 25 30

Leu Leu Ala Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val Lys Leu Leu Glu Ser  
35 40 45

Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Glu Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr  
50 55 60

Ile Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Asp Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln  
65 70 75 80

Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Gly Gly  
85 90 95

Ser Thr Tyr Phe Asn Ser Leu Phe Lys Ser Arg Leu Ser Ile Thr Arg  
100 105 110

Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Glu Met Asp Ser Leu Gln Thr  
115 120 125

Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Lys His Asp Gly His Glu Thr  
130 135 140

Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ser Lys  
145 150 155 160

Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln  
165 170 175

Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro  
180 185 190

Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val  
195 200 205

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser  
 210 215 220

Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys  
 225 230 235 240

Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val  
 245 250 255

Pro Arg Asp Cys Thr Ser His His His His His His Xaa Ala Ser Leu  
 260 265 270

Val Val Ala Val Ala Leu His Ser Phe Val Xaa Ile Lys Ala Asn Arg  
 275 280 285

Arg Pro Ala Xaa  
 290

<210> 4  
 <211> 876  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(876)  
 <223> n = a, t, g, c, 未知或其它

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(876)  
 <223>

<400> 4  
 ttg gcc ncc cgc ggt ggc ggc cgc aaa att nta.ttt nca agg gag aca 48  
 Leu Ala Xaa Arg Gly Gly Gly Arg Lys Ile Xaa Phe Xaa Arg Glu Thr  
 1 5 10 15

gtc ata atg aaa tac ctt ttn gcc tac ggg cca gcc gct gga ttg tta 96  
 Val Ile Met Lys Tyr Leu Xaa Ala Tyr Gly Pro Ala Ala Gly Leu Leu  
 20 25 30

tta ctc gct gcc caa cca gcc atg gcc cag gtg aaa ctg ctc gag tca 144  
 Leu Leu Ala Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val Lys Leu Leu Glu Ser  
 35 40 45

gga cct ggc ctg gtg gcg ccc tca gag agc ctg tcc atc aca tgc act 192  
 Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Glu Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr  
 50 55 60

atc tca ggg ttc tca tta acc gac gat ggt gta agc tgg att cgg cag 240  
 Ile Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Asp Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln  
 65 70 75 80

cct cca gga aag ggt ctg gag tgg ctg gga gta ata tgg ggt ggt gga 288

Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Leu	Gly	Val	Ile	Trp	Gly	Gly	Gly		
				85					90					95			
agc	aca	tac	ttt	aat	tca	ctt	ttc	aaa	tcc	aga	ctg	agc	atc	acc	agg		336
Ser	Thr	Tyr	Phe	Asn	Ser	Leu	Phe	Lys	Ser	Arg	Leu	Ser	Ile	Thr	Arg		
			100					105					110				
gac	aac	tct	aag	agc	caa	gtt	ttc	tta	gaa	atg	gac	agt	cta	caa	act		384
Asp	Asn	Ser	Lys	Ser	Gln	Val	Phe	Leu	Glu	Met	Asp	Ser	Leu	Gln	Thr		
		115					120					125					
gat	gac	aca	gcc	atg	tac	tac	tgc	gcc	aaa	cat	gac	gga	cac	gag	act		432
Asp	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys	His	Asp	Gly	His	Glu	Thr		
	130					135					140						
atg	gac	tat	tgg	ggt	caa	gga	acc	tca	gtc	acc	gtc	tcc	tca	tcc	aaa		480
Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ser	Lys		
145					150					155					160		
acg	aca	ccc	cca	tct	gtc	tat	cca	ctg	gcc	cct	gga	tct	gct	gcc	caa		528
Thr	Thr	Pro	Pro	Ser	Val	Tyr	Pro	Leu	Ala	Pro	Gly	Ser	Ala	Ala	Gln		
				165					170					175			
act	aac	tcc	atg	gtg	acc	ctg	gga	tgc	ctg	gtc	aag	ggc	tat	ttc	cct		576
Thr	Asn	Ser	Met	Val	Thr	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Tyr	Phe	Pro		
			180					185					190				
gag	cca	gtg	aca	gtg	acc	tgg	aac	tct	gga	tcc	ctg	tcc	agc	ggt	gtg		624
Glu	Pro	Val	Thr	Val	Thr	Trp	Asn	Ser	Gly	Ser	Leu	Ser	Ser	Gly	Val		
		195					200					205					
cac	acc	ttc	cca	gct	gtc	ctg	cag	tct	gac	ctc	tac	act	ctg	agc	agc		672
His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Asp	Leu	Tyr	Thr	Leu	Ser	Ser		
	210					215					220						
tca	gtg	act	gtc	ccc	tcc	agc	acc	tgg	ccc	agc	gag	acc	gtc	acc	tgc		720
Ser	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Thr	Trp	Pro	Ser	Glu	Thr	Val	Thr	Cys		
225					230					235					240		
aac	ggt	gcc	cac	ccg	gcc	agc	agc	acc	aag	gtg	gac	aag	aaa	att	gtg		768
Asn	Val	Ala	His	Pro	Ala	Ser	Ser	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Ile	Val		
				245					250					255			
ccc	agg	gat	tgt	act	agt	cat	cat	cat	cat	cat	cat	taa	gct	agc	cta		816
Pro	Arg	Asp	Cys	Thr	Ser	His	His	His	His	His	His		Ala	Ser	Leu		
			260					265						270			
gtg	gtg	gcg	gtg	gct	ctc	cat	tcg	ttt	gtg	ang	ata	aag	gcc	aat	cgn		864
Val	Val	Ala	Val	Ala	Leu	His	Ser	Phe	Val	Xaa	Ile	Lys	Ala	Asn	Arg		
			275					280					285				
aga	cct	gcn	cna														876
Arg	Pro	Ala	Xaa														
		290															
<210>	5																
<211>	832																
<212>	DNA																
<213>	Mus musculus																
<220>																	
<221>	misc_feature																

&lt;222&gt; (1)..(832)

&lt;223&gt; n = a, t, g, c, 未知或其它

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (38)..(814)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 5

```

atnctttntt gttcctttct atgcggccca gccggcc atg gcc cag gtc cag ctg      55
                                     Met Ala Gln Val Gln Leu
                                     1           5

cag gag tca gga act gaa gtg gta aag cct ggg got tca gtg aag ttg      103
Gln Glu Ser Gly Thr Glu Val Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu
          10                15                20

tcc tgc aag gct tct ggc tac atc ttc aca agt tat gat ata gac tgg      151
Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Ser Tyr Asp Ile Asp Trp
          25                30                35

gtg agg cag acg cct gaa cag gga ctt gag tgg att gga tgg att ttt      199
Val Arg Gln Thr Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Trp Ile Phe
          40                45                50

cct gga gag ggg agt act gaa tac aat gag aag ttc aag ggc agg gcc      247
Pro Gly Glu Gly Ser Thr Glu Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Arg Ala
55                60                65                70

aca ctg agt gta gac aag tcc tcc agc aca gcc tat atg gag ctc act      295
Thr Leu Ser Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Thr
          75                80                85

agg ctg aca tct gag gac tct gct gtc tat ttc tgt gct aga ggg gac      343
Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Asp
          90                95                100

tac tat agg cgc tac ttt gac ttg tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc      391
Tyr Tyr Arg Arg Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
          105                110                115

gtc tcc tca tgt gga ggc ggt tca ggc gga ggt ggc tct ggc ggt ggc      439
Val Ser Ser Cys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
          120                125                130

gga tct gac att gag ctc acc cag tct cca gca atc atg tct gca tct      487
Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser
135                140                145                150

cca ggg gag agg gtc acc atg acc tgc agt gcc agc tca agt ata cgt      535
Pro Gly Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Ile Arg
          155                160                165

tac ata tat tgg tac caa cag aag cct gga tcc tcc ccc aga ctc ctg      583
Tyr Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Arg Leu Leu
          170                175                180

att tat gac aca tcc aac gtg gct cct gga gtc cct ttt cgc ttc agt      631
Ile Tyr Asp Thr Ser Asn Val Ala Pro Gly Val Pro Phe Arg Phe Ser
          185                190                195

```

ggc agt ggg tct ggg acc tct tat tct ctc aca atc aac cga atg gag 679  
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Asn Arg Met Glu  
 200 205 210

gct gag gat gct gcc act tat tac tgc cag gag tgg agt ggt tat cct 727  
 Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Glu Trp Ser Gly Tyr Pro  
 215 220 225 230

ctc acg ttc ggc tcg ggc acc aag cgg gaa atc aaa cgg gcg gcc gca 775  
 Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Arg Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala  
 235 240 245

ggt gcg ccg gtg ccg tat ccg gat ccg ctg gaa ccg cgt gccgcataga 824  
 Gly Ala Pro Val Pro Tyr Pro Asp Pro Leu Glu Pro Arg  
 250 255

ctggtgaa 832

<210> 6  
 <211> 259  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(832)  
 <223> n = a, t, g, c, 未知或其它

<400> 6

Met Ala Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Thr Glu Val Val Lys Pro  
 1 5 10 15

Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr  
 20 25 30

Ser Tyr Asp Ile Asp Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Gln Gly Leu Glu  
 35 40 45

Trp Ile Gly Trp Ile Phe Pro Gly Glu Gly Ser Thr Glu Tyr Asn Glu  
 50 55 60

Lys Phe Lys Gly Arg Ala Thr Leu Ser Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr  
 65 70 75 80

Ala Tyr Met Glu Leu Thr Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr  
 85 90 95

Phe Cys Ala Arg Gly Asp Tyr Tyr Arg Arg Tyr Phe Asp Leu Trp Gly  
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Cys Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
 115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro  
 130 135 140

Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Ser  
 145 150 155 160

Ala Ser Ser Ser Ile Arg Tyr Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly  
 165 170 175

Ser Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Asn Val Ala Pro Gly  
 180 185 190

Val Pro Phe Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu  
 195 200 205

Thr Ile Asn Arg Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln  
 210 215 220

Glu Trp Ser Gly Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Arg Glu  
 225 230 235 240

Ile Lys Arg Ala Ala Ala Gly Ala Pro Val Pro Tyr Pro Asp Pro Leu  
 245 250 255

Glu Pro Arg

<210> 7  
 <211> 1252  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(1252)  
 <223> n = a, t, g, c, 未知或其它

<400> 7  
 tcgctgcccc accagccatg gccaggtga aactgctcga gtcaggacct ggctggtgg 60  
 cgccctcaga gagcctgtcc atcacatgca ctatctcagg gttctcatta accgacgatg 120  
 gtgtaagctg gattcggcag cctccaggaa agggctctgga gtggctggga gtaatatggg 180  
 gtgggtggaag cacatacttt aattcacttt tcaaaccag actgagcatc accagggaca 240  
 actctaagag ccaagttttc ttagaaatgg acagtctaca aactgatgac acagccatgt 300  
 actactgcbc caaacatgac ggacacgaga ctatggacta ttgggggtcaa ggaacctcag 360  
 tcaccgtctc ctcatccaaa acgacacccc catctgtcta tccactggcc cctggatctg 420  
 ctgcccacaa taactccatg gtgaccctgg gatgctggt caagggctat ttcctgagc 480

cagtgcagct gacctggaac totggatccc tgtccagcgg tgtgcacacc ttcccagctg 540  
 tcctgcagtc tgacctctac actctgagca gctcagtgac tgtcccctcc agcacctggc 600  
 ccagcgagac cgtcacctgc aacgttgccc acccggccag cagcaccaag gtggacaaga 660  
 aaattgtgcc cagggattgt actagtgggtg goggaggtag tggtagcggtg 720  
 gcggagggtc tggtagcgga ggttccgaat tcctcgaggt gcccatcaa aaagtccaag 780  
 atgacaccaa aaccctcacc aagacaattg tcaccaggat caatgacatt tcacacacgc 840  
 agtcagtcct ctccaaacag aaagtcaccg gtttggactt cattcctggg ctccacccca 900  
 tcctgacctt atccaagatg gaccagacac tggcagtcct ccaacagatc ctccaccagta 960  
 tgcoctccag aaacgtgatc caaatatcca acgacctgga gaacctccgg gatcttcttc 1020  
 acgtgctggc cttctctaag agctgccact tgcctgggc cagtggcctg gagaccttg 1080  
 acagcctggg ggggtgtcctg gaagcttcag gctactccac agaggtgggtg gccctgagca 1140  
 ggctgcaggg gtctctgcag gacatgctgt ggcagctgga cctcagccct gggtgacta 1200  
 gtcacatca tcacatcat taagctagcc tagtgggtggc ggtggctctc ca 1252

<210> 8  
 <211> 401  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(401)  
 <223> Xaa = 未知或其它

<400> 8

Met Ala Gln Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro  
1 5 10 15

Ser Glu Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Ile Ser Gly Phe Ser Leu Thr  
20 25 30

Asp Asp Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
35 40 45

Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Phe Asn Ser Leu  
50 55 60

Phe Lys Ser Arg Leu Ser Ile Thr Arg Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val  
65 70 75 80

Phe Leu Glu Met Asp Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr  
85 90 95

Cys Ala Lys His Asp Gly His Glu Thr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ser Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr  
 115 120 125

Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu  
 130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp  
 145 150 155 160

Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu  
 165 170 175

Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser  
 180 185 190

Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser  
 195 200 205

Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Thr Ser Gly  
 210 215 220

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
 225 230 235 240

Gly Gly Ser Glu Phe Leu Glu Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp  
 245 250 255

Thr Lys Thr Leu Ile Lys Thr Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser  
 260 265 270

His Thr Gln Ser Val Ser Ser Lys Gln Lys Val Thr Gly Leu Asp Phe  
 275 280 285

Ile Pro Gly Leu His Pro Ile Leu Thr Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr  
 290 295 300

Leu Ala Val Tyr Gln Gln Ile Leu Thr Ser Met Pro Ser Arg Asn Val  
 305 310 315 320

Ile Gln Ile Ser Asn Asp Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val  
 325 330 335

Leu Ala Phe Ser Lys Ser Cys His Leu Pro Trp Ala Ser Gly Leu Glu

---

340				345				350							
Thr	Leu	Asp	Ser	Leu	Gly	Gly	Val	Leu	Glu	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Thr
		355					360					365			
Glu	Val	Val	Ala	Leu	Ser	Arg	Leu	Gln	Gly	Ser	Leu	Gln	Asp	Met	Leu
	370					375					380				
Trp	Gln	Leu	Asp	Leu	Ser	Pro	Gly	Cys	Thr	Ser	His	His	His	His	His
385					390					395					400
His															

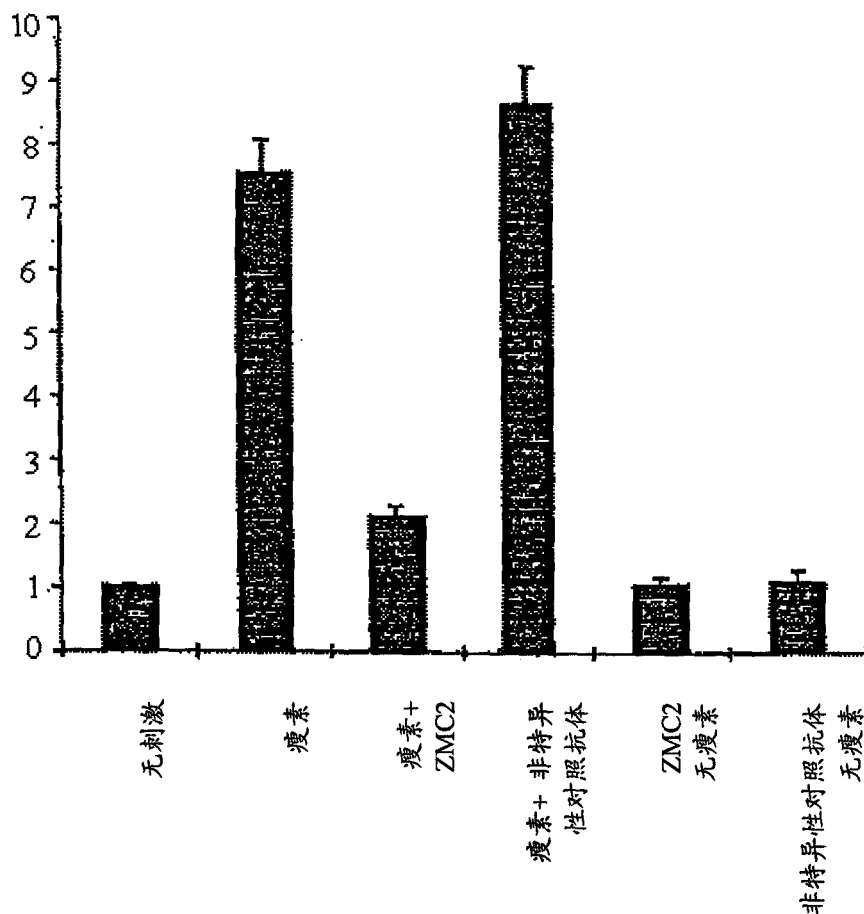


图 1

A)

XHNPIPMPPAAAGLLLLAAQPAMAELVMTQSPKFMSTSIGDRVNITCKAT  
 QNVRTAVTWYQQKPGQSPQALIFLASNRHTGVPARFTGSSSGTDFTLTIN  
 NVKSEDLADYFCLQHWNYPLTFGSGTKLEIKRADAAPT<sup>VSIFPPS</sup>SEQLT  
 SGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDS<sup>YSMS</sup>  
 STLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKS<sup>FNRGEC</sup>\*\*SRVKRXQ<sup>SXG</sup>  
 GPGTPIRPIGX<sup>PYYNSLGGGFQ</sup>

B)

DNA: NANGTCATAATCCAATACCTATGCTACGGCAGCCGCTGGATTGTTATTAC  
 +3: X H N P I P M P T A A A G L L L L L  
 pComb3 载体 SacI VL(x) 引物  
 DNA: TCGCTGCCCAACCAGCCATGGCCGAGCTCGTGATGACCCAGTCTCCAAAAT  
 +3: A A Q P A M A E L V M T Q S P K F  
 DNA: TCATGTCCACATCAATAGGAGACAGGGTCAATATCACCTGCAAGGCCACTC  
 +3: M S T S I G D R V N I T C K A T Q  
 DNA: AGAATGTTCGTACTGCTGTTACCTGGTATCAACAGAAACCAGGGCAGTCTC  
 +3: N V R T A V T W Y Q Q K P G Q S P  
 DNA: CTCAGCACTGATTTTCTTGGCATCCAACCGGCACACTGGTGTCCCTGCTC  
 +3: Q A L I F L A S N R H T G V P A R  
 DNA: GATTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATTAACAATG  
 +3: F T G S G S G T D F T L T I N N V  
 DNA: TGAAATCTGAAGACCTGGCAGATTATTTCTGTCTACAACATTGGAATTATC  
 +3: K S E D L A D Y F C L Q H W N Y P  
 DNA: CTCTCACGTTCCGCTCGGGGACAAAGTTGGAATAAAACGGGCTGATGCTG  
 +3: L T F G S G T K L E I K R A D A A  
 DNA: CACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGAG  
 +3: P T V S I F P P S S E Q L T S G G  
 DNA: GTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACA<sup>ACTT</sup>TACCCCAAAGACATCAATG  
 +3: A S V V C F L N N F Y P K D I N V  
 DNA: TCAAGTGAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCTGAACAGTT  
 +3: K W K I D G S E R Q N G V L N S W  
 BclI  
 DNA: GGACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCCTCA  
 +3: T D Q D S K D S T Y S M S S T L T  
 DNA: CGTTGACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCA  
 +3: L T K D E Y E R H N S Y T C E A T  
 CL(x) 引物  
 DNA: CTCACAAGACATCAACTTCA<sup>CCCAT</sup>TGTCAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGT  
 +3: H K T S T S P I V K S F N R G E C  
 终止 XbaI NotI KpnI  
 DNA: GTTAGTAATCTAGAGTTAAGCGGCCGCAATCGAGGGGGGGCCCGGTACCCC  
 +3: \* \* S R V K R P Q S R G G P V P Q  
 DNA: AATTCGCCCTATAGGGNGCCGTATTACAATTCCTGCGCGCGGTTTTC  
 +3: F A L \* G X R I T I H W A A V F X  
 DNA: AN  
 +3:

图 2

A)

LAXRGGGRKIXFXRETVMKYLXAYGPAAGLLLLAAQPAMAQVKLLES  
 GLVAPSELSITCTISGFSLTDDGVSWIRQPPGKLEWLGVWGGGSTYF  
 NSLFKSRLSITRDNKSQVFLMDSLQTDDTAMYYCAKHDGHETMDYWGQ  
 GTSVTVSSSKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWN  
 SGLSSGVHTFPVAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNVVAPASSTK  
 VDKKIVPRDCTSHHHHHH\*ASLVVAVALHSFVXIKANRRPAX

B)

DNA: TTGGCCNCCC CGGTGGCGCCGCAAATNTATTNCAAGGGAGACAGTC  
 -1: L A X R G G G R K I X F X R E T V

DNA: ATAATGAAATACCTTTNGCCTACGGCCAGCCGCTGGATTGTTATTACTC  
 -1: I M K Y L X A Y G P A A G L L L L  
 pComb3 载体 XhoI V<sub>h</sub>b 引物

DNA: GCTGCCCAACCAGCCATGGCCAGGTGAAACTGCTCGAGTCAGGACCTGGC  
 -1: A A Q P A M A Q V K L L E S G P G

DNA: CTGGTGGCGCCTCAGAGACCTGTCCATCACATGCACTATCTCAGGGTTC  
 -1: L V A P S E S L S I T C T I S G F

DNA: TCATTAACCGACGATGGTGTAGCTGGATTCCGCGACCTCCAGGAAGGGT  
 -1: S L T D D G V S W I R Q P P G K G

DNA: CTGGAGTGGCTGGGAGTAATATGGGGTGGTGAAGCACATACTTTAATTCA  
 -1: L E W L G V I W G G G S T Y F N S

DNA: CTTTCAAATCCAGACTGAGCATCACCAGGGACAACCTAAGAGCCAAGTT  
 -1: L F K S R L S I T R D N S K S Q V

DNA: TTCTTAGAAATGGACAGTCTACAACTGATGACACAGCCATGTACTACTGC  
 -1: F L E M D S L Q T D D T A M Y Y C

DNA: GCCAAACATGACGGACACGAGACTATGGACTATGGGGTCAAGGAACCTCA  
 -1: A K H D G H E T M D Y W G Q G T S

DNA: GTCACCGTCTCCTCATCCAAAACGACACCCCATCTGTCTATCCACTGGCC  
 -1: V T V S S S K T T P P S V Y P L A

DNA: CCTGGATCTGCTGCCAAACTAACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTGGTC  
 -1: P G S A A Q T N S M V T L G C L V

DNA: AAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTACCTGGAACCTCTGGATCCCTG  
 -1: K G Y F P E P V T V T W N S G S L

DNA: TCCAGCGGTGTGCACACCTCCAGCTGTCTGCAGTCTGACCTCTACACT  
 -1: S S G V H T F P A V L Q S D L Y T

DNA: CTGAGCAGCTCAGTGACTGTCCCCTCCAGCACCTGGCCAGCGAGACCGTC  
 -1: L S S S V T V P S S T W P S E T V

DNA: ACCTGCAACGTTGCCCAACCCGCGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATT  
 -1: T C N V A H P A S S T K V D K K I  
 C<sub>H1</sub>(γ1) 引物 SpeI His 标签 终止

DNA: GTGCCAGGGATGTACTAGTCATCATCATCATCATTAAGCTAGCCTA  
 -1: V P R D C T S H H H H H H \* A S L

DNA: GTGGTGGCGGTGGCTCTCCATTCGTTTGTGANGATAAAGGCCAATCGNAGA  
 -1: V V A V A L R S F V X I K A N R R

DNA: CCTGCNCNA  
 -1: P A X

图 3

A)

ATNCTTNTTGTTCCTTCTATGCGGCCAGCCGGCCATGGCCCAGGTCCAGCTG  
CAGGAGTCAGGAAGTGAAGTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGTTGTCCT  
GCAAGGCTTCTGGCTACATCTTCACAAGTTATGATATAGACTGGGTGAGGCAG  
ACGCCTGAACAGGGACTTGAGTGGATTGGATGGATTTTTCTGGAGAGGGGA  
GTACTGAAATACAATGAGAAGTTCAAGGGCAGGGCCACACTGAGTGTAGACAA  
GTCCTCCAGCACAGCCTATATGGAGCTCACTAGGCTGACATCTGAGGACTCTG  
CTGTCTATTTCTGTGCTAGAGGGGACTACTATAGGCGCTACTTTGACTTGTGGG  
GCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCATGTGGAGGCGGTTCAAGGCGGAGG  
TGGCTCTGGCGGTGGCGGATCTGACATTGAGCTCACCCAGTCTCCAGCAATCA  
TGTCTGCATCTCCAGGGGAGAGGGTCAACATGACCTGCAGTGCCAGCTC  
AAGTATACGTTACATATATTGGTACCAACAGAAGCCTGGATCCTCCCCCA  
GACTCCTGATTTATGACACATCCAACGTGGCTCCTGGAGTCCCTTTTCGC  
TTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTATTCTCTCACAATCAACCGAAT  
GGAGGCTGAGGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGGAGTGGAGTGGTTAT  
CCTCTCACGTTCCGGCTCGGGCACCAAGCGGGAAATCAAACGGGCGGCCGC  
AGGTGCGCCGGTGCCGTATCCGGATCCGCTGGAACCGCGTGCCGCATAGACT-  
GTTGAA

B)

MAQVQLQESGTEVVKPGASVKLSCKASGYIFTSYDIDWVRQTPEQGLEWIG  
 WIFPGEGST EYNEKFKGRATLSVDKSSSTAYMELTRLTSEDSAVYFCARG  
 DYYRRYFDLWGQGTTFVTVSSGGGSGGGGSGGGSDIELTQSPAIMASAP  
 GERVTMTCSASSIRYIYWYQQKPGSSPRLLIYDTSNVAPGVPFRFSGSG  
 SGTSYSLTINRMEAEDAATYYCQEWSGYPLTFGSGTKREIKRAAGAPVP  
 YPDPLEPR

图 4

A)

tcgctgcccaaccagccATGgcccaggtgaaactgctcgagtcaggacctgcctggtg  
cgccctcagagagcctgtccatcacatgcactatctcagggttctcattaaccgacgatg  
gtgtaagctggattcggcagcctccaggaagggtctggagtggctgggagtaatgg  
gtggtgaagcacatactttaattcaatccagactgagcatcaccaggaca  
actctaagaccagttttcttagaatggacagtcacaaactgatgacacagccatg  
actactgcgccaaacacaccccatctgtctatccactggccctggatcg  
ctgcccaaactaactggtgaccctgggatgcctggtcaagggctattcctgac  
cagtgacagtgacctggaactctggatccctgtccagcggtgtgcacaccttccagct  
tcctgcagtctgacctcactctgagcagctcagtgactgtcccctccagcacctgc  
ccagcgagaccgtcacctgcaacgttgcccaccggccagcagcaccaaggtggacaa  
aaattgtgcccaggattgtactagtggtgccgaagtagtggtgccgagtagcqt  
gcqgagttctggtgccgaggttccgaattcctcgaggtgcccatccaaaagtccag  
atgacacaaaccctcatcaagacaattgtcaccaggatcaatgacatttcacacacg  
agtcagtcctccaaacagaagtcaccggttggacttcattcctgggctccaccca  
tcctgaccttacaagatggaccagacactggcagtctaccaacagatcctcaccagt  
tgccttcagaacgtgatccaatatccaacgacctggaacctccggatcttct  
acgtgctggccttctaagagctgccacttgccctggccagtgccctggacctg  
acagcctgggggtgtcctggaagctcaggctaccagaggtggtgccctgaca  
ggctgcagggtctgcaggacatgctgtggcagctggacctcagccctggtgcact  
gtcatcatcatcatcatTAAgctagcctagtggtggcggtggctcca

B)

Maqvklesgpglvapseslsitctisgfsltddgvswirqppgklewlgviwggsty  
fnslfksrlsitrdnsksgvflemdslgtddtamyycakhdghetmdywggtsvtvss  
kttppsvyplapgsaaqtnsmvtlgclvkyfpepvtvtwnsglssgvhtfpavlqsdl  
ytlsssvtpsstwpsetvtcnvahpasstkvdkivprdctsgqqqsgqqqsgqqqsg  
ggseflevpigkvqddtktliktivtrindishtqsvsskqkvtgldfipglpiltlsk  
mdqtlavyqqiltsmpsrnviqisndlenlrdllhvlafskshlpwasgletldslgv  
leasgystevvalsrlggslqdmlwqldlspgctshhhhh

图 5

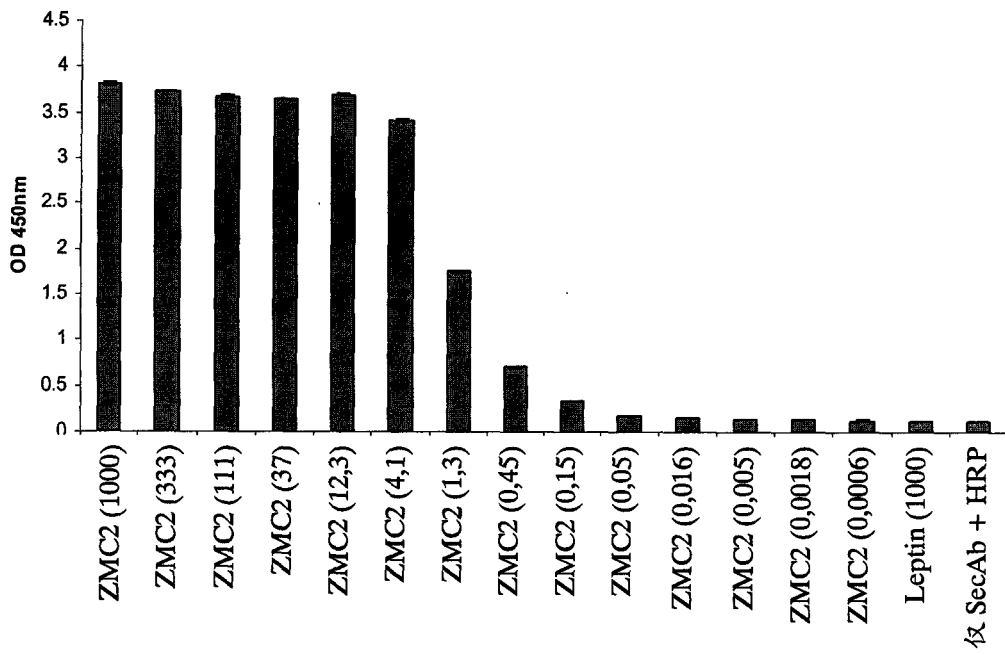


图 6

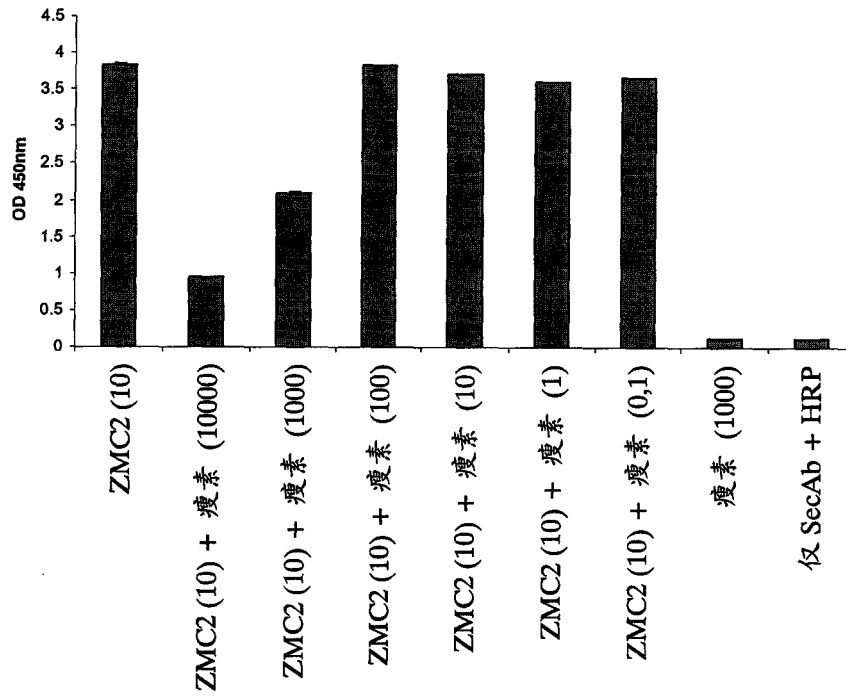


图 7

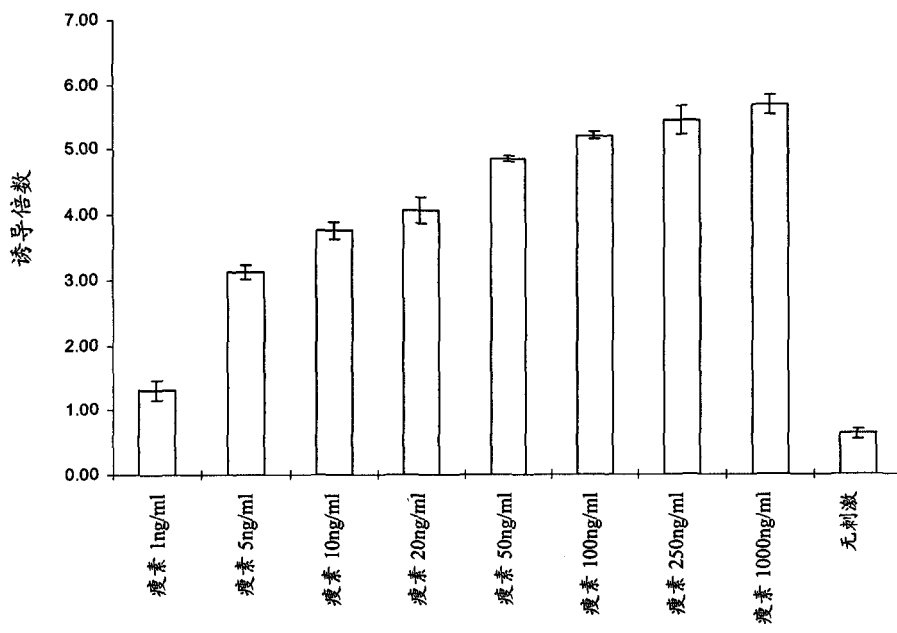


图 8

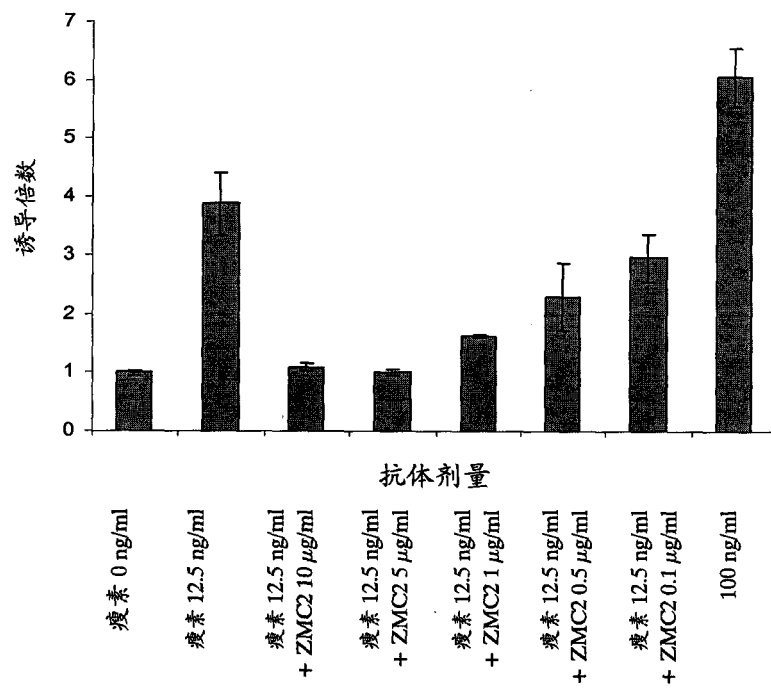


图 9

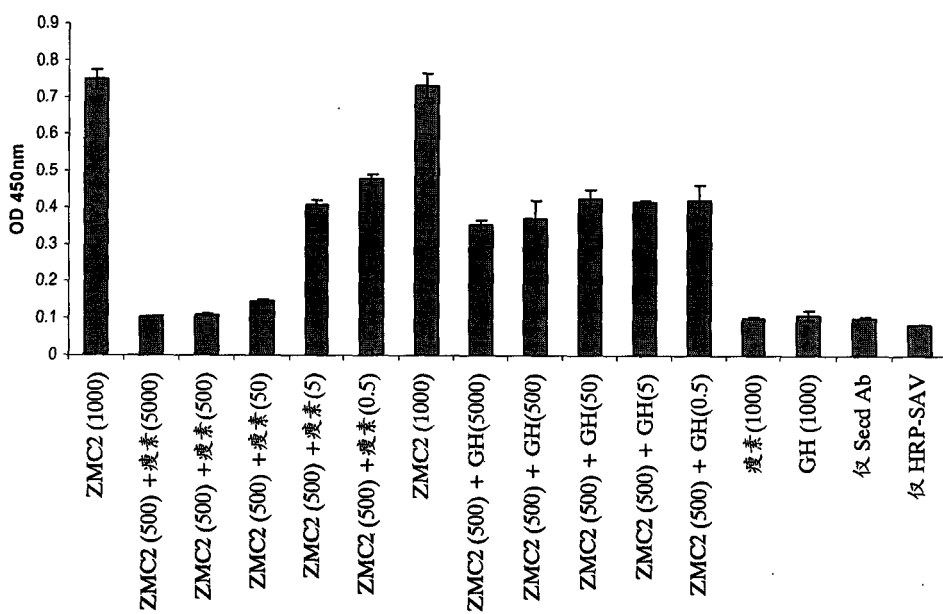


图 10

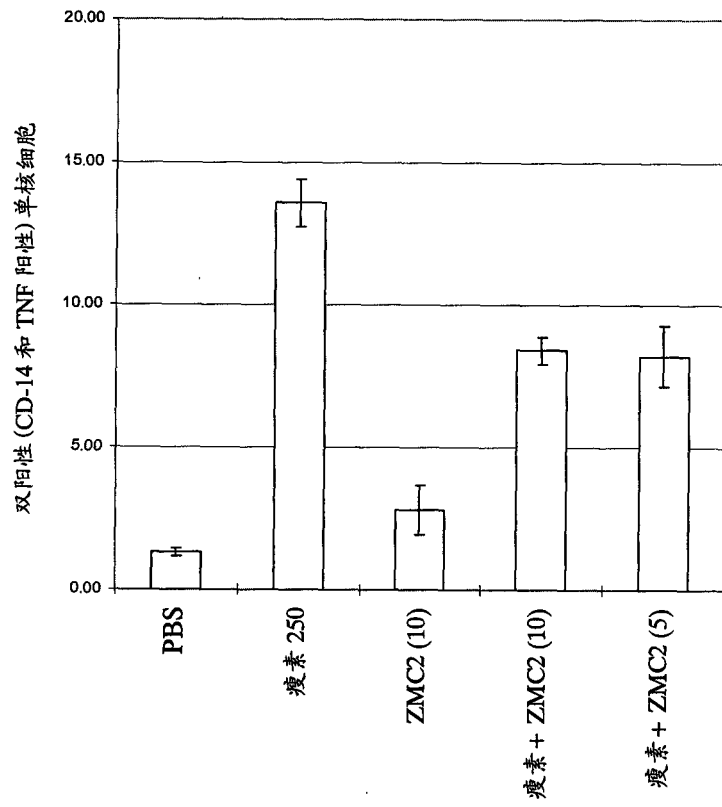


图 11

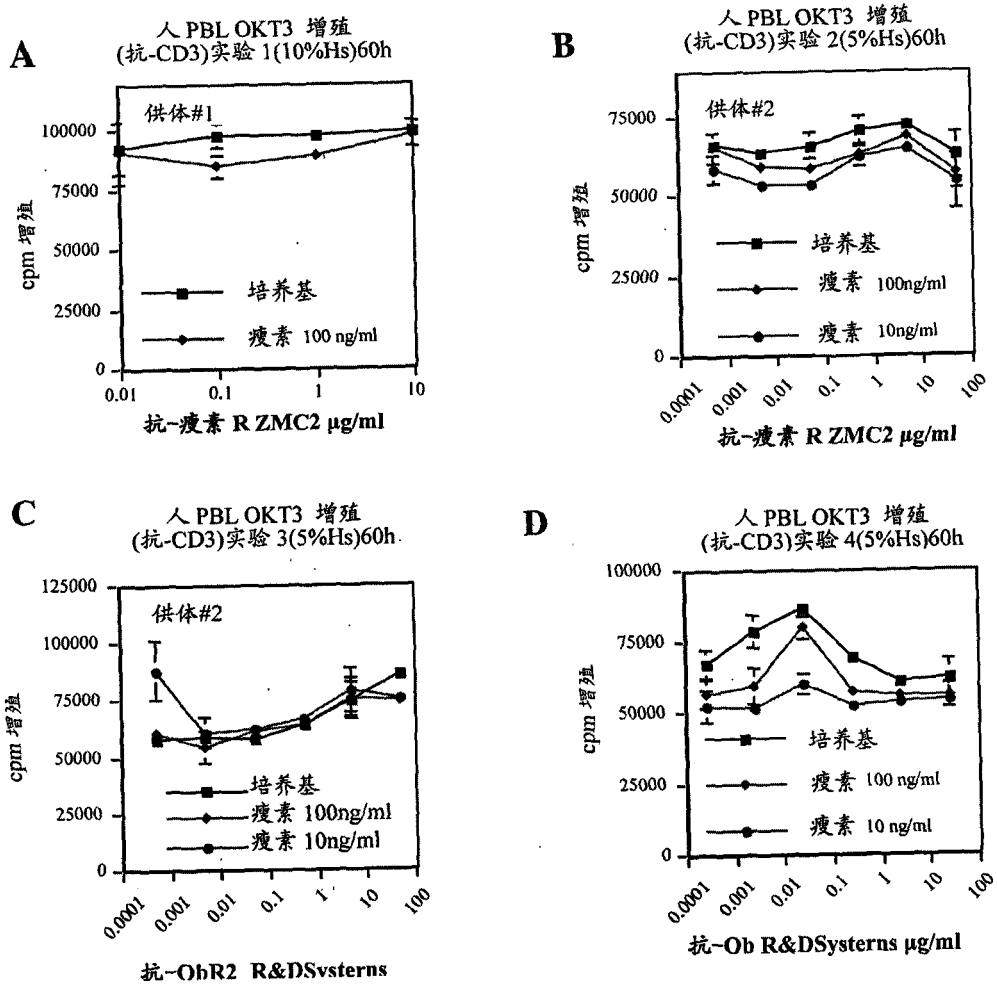


图 12

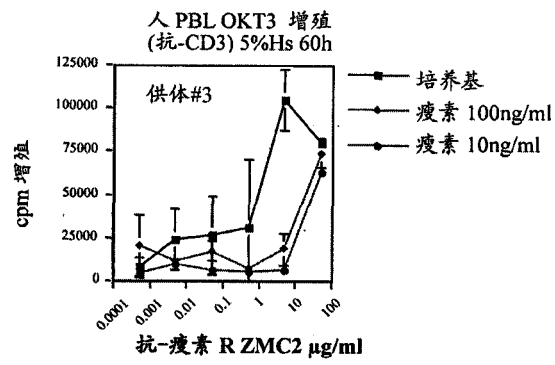


图 13

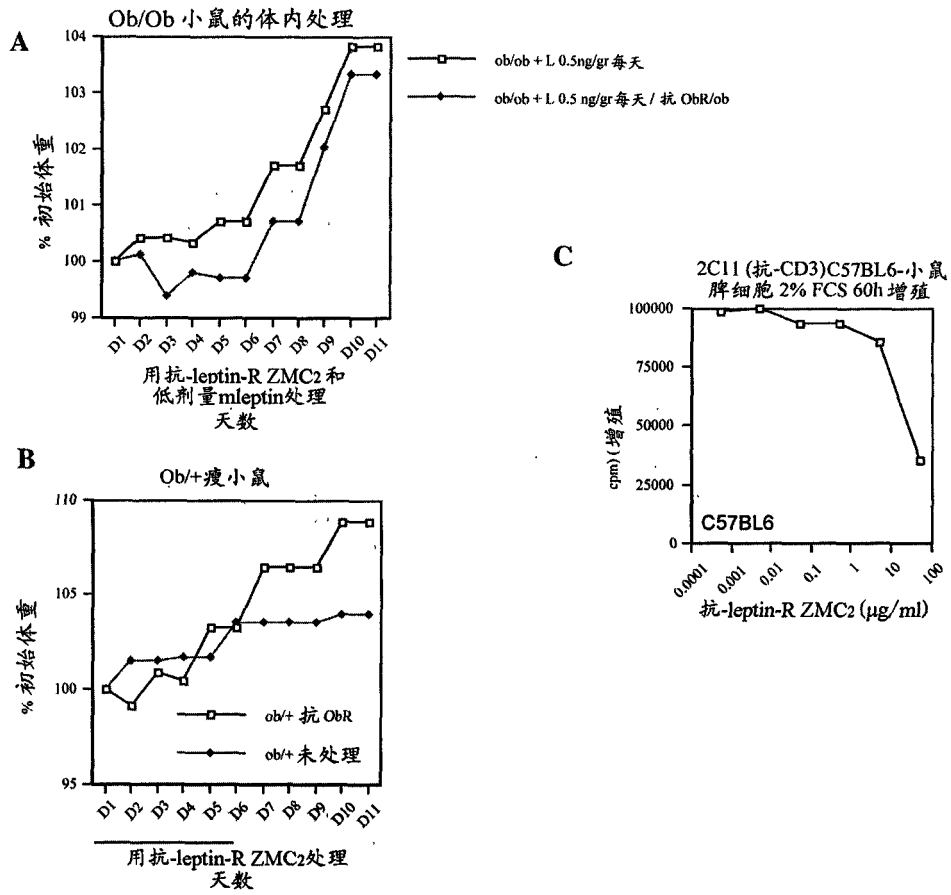


图 14

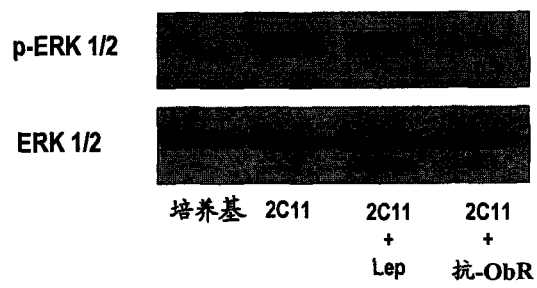


图 15

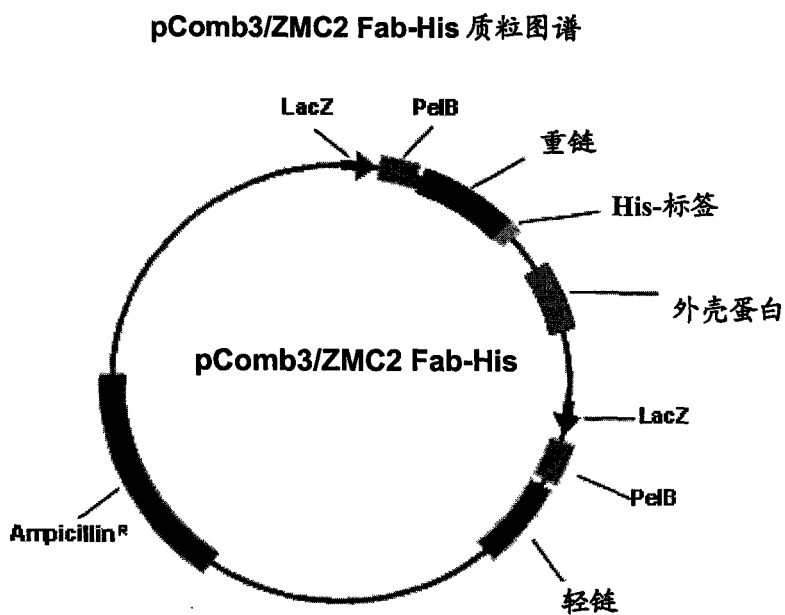


图 16

### 重组 Fob 的免疫印迹检测

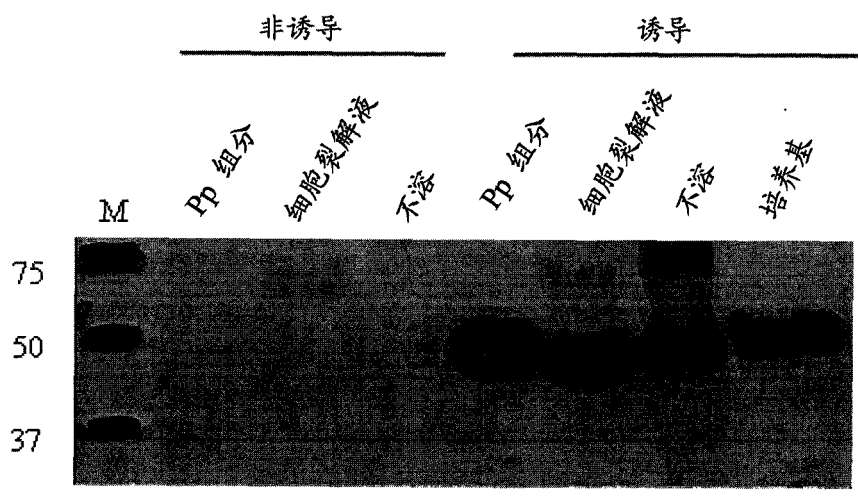


图 17

纯化Fab的免疫印迹检测

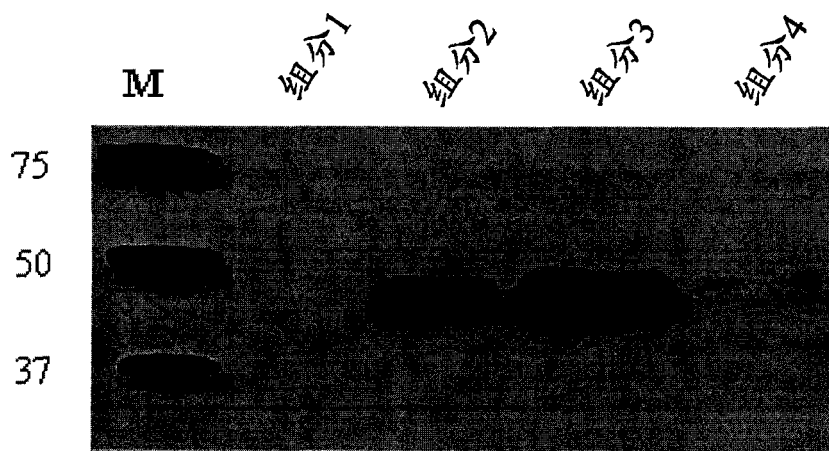


图 18

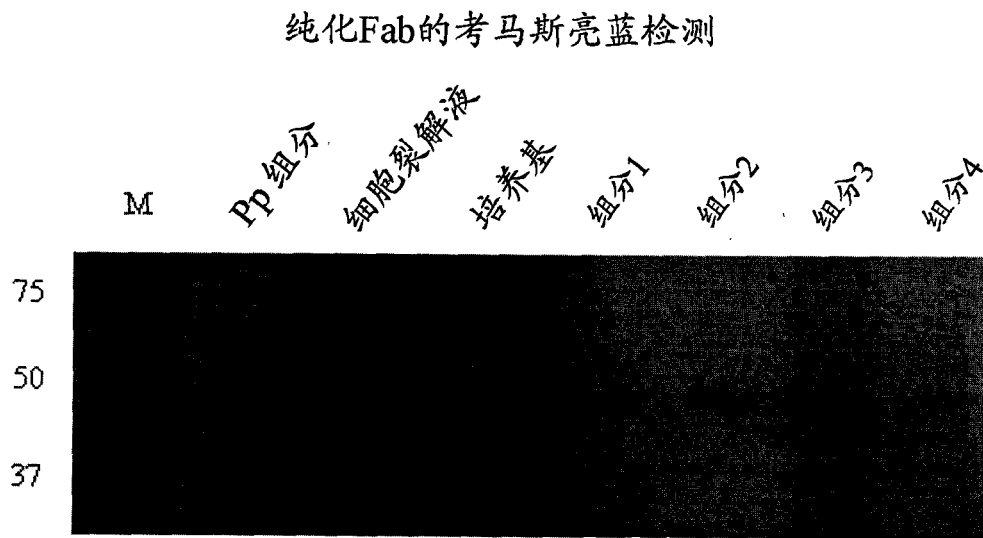
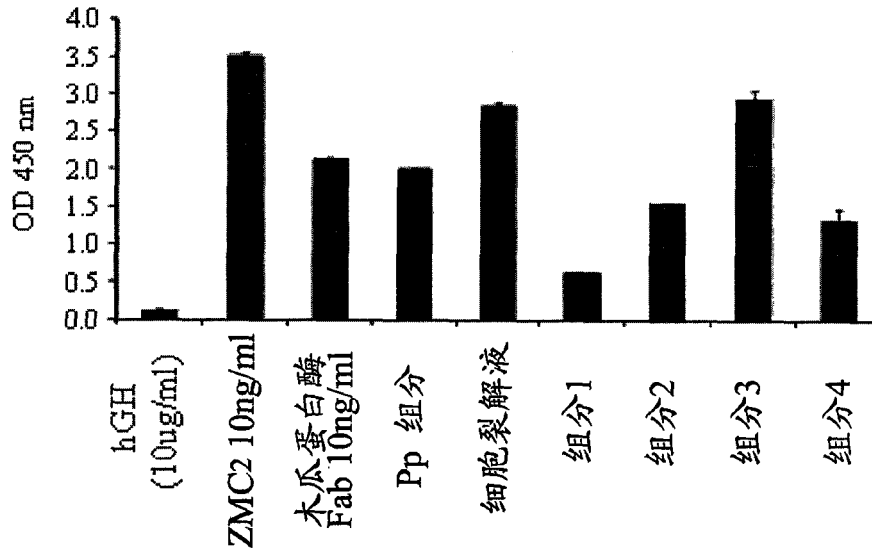


图 19

A)

ZMC2和重组表达的Fab对人Leptin-R的结合



B)

重组Fab对瘦素诱导的SIE活化的作用

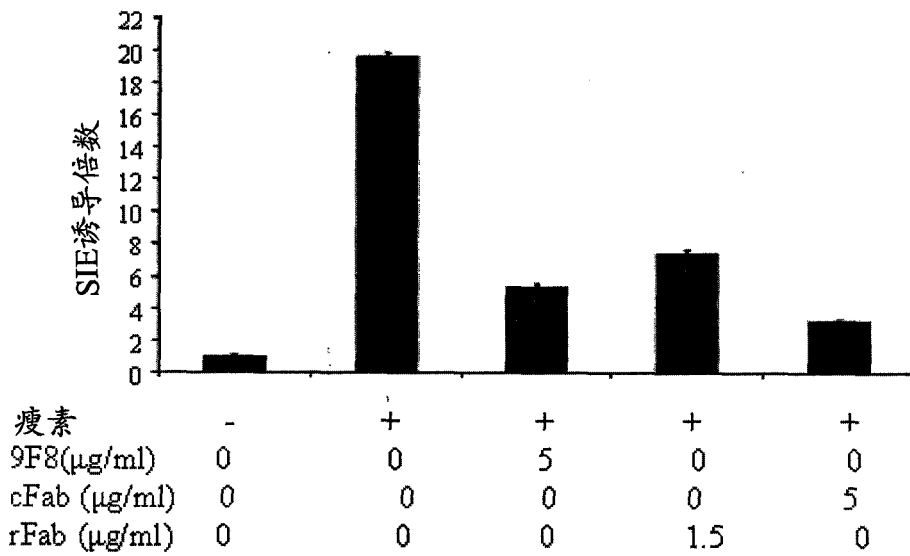


图 20

专利名称(译)	瘦素拮抗剂及瘦素的定量检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN1984930A</a>	公开(公告)日	2007-06-20
申请号	CN200480040084.6	申请日	2004-11-17
[标]申请(专利权)人(译)	谢菲尔德大学		
申请(专利权)人(译)	谢菲尔德大学		
当前申请(专利权)人(译)	谢菲尔德大学		
[标]发明人	克里斯蒂安J 斯达斯波格 马丁彼德林马特 吴子达 戈尤茜沛玛塔瑞茜 理查德J M 罗斯		
发明人	克里斯蒂安·J·斯达斯波格 马丁·彼德林马特 吴子达 戈尤茜沛·玛塔瑞茜 理查德·J·M·罗斯		
IPC分类号	C07K16/28 G01N33/74 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/74 G01N2333/715 C07K2316/95 C07K16/2869 C07K2317/55 G01N2333/575 C07K2317/56 C07K2316/96 A61P1/04 A61P1/14 A61P1/16 A61P3/00 A61P3/10 A61P17/00 A61P17/06 A61P17/14 A61P19/02 A61P21/00 A61P21/04 A61P25/00 A61P29/00 A61P35/00 C07K2317/74 C07K2317/75 C07K2317/76		
代理人(译)	韩克飞		
优先权	10353593 2003-11-17 DE		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

**摘要(译)**  
 本发明涉及特异抗体或融合蛋白，特别是针对瘦素受体(leptin - R)或瘦素结合蛋白(leptin - BP)的特异抗体A或融合蛋白，以及这些抗体或融合蛋白在定量分析、治疗目的和制备治疗药物方面的用途。另外，本发明还涉及在利用本发明的抗体或融合蛋白对溶解的或悬浮的瘦素结合蛋白的样品中的瘦素进行定量测定的方法，还涉及含有该抗体或融合蛋白的诊断试剂和(诊断)试剂盒。

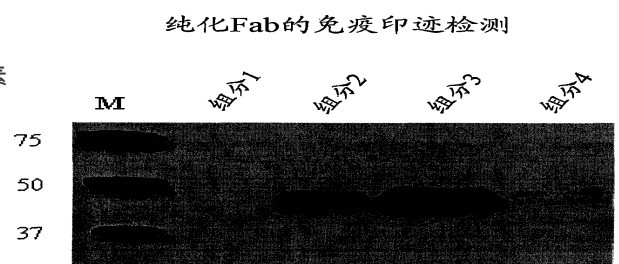


图 18