

[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 200780002928.1

[51] Int. Cl.

*C07K 16/18 (2006.01)*

*A61K 39/395 (2006.01)*

*G01N 33/53 (2006.01)*

[43] 公开日 2009年2月18日

[11] 公开号 CN 101370826A

[22] 申请日 2007.2.8

[21] 申请号 200780002928.1

[30] 优先权

[32] 2006.2.9 [33] US [31] 60/771,651

[86] 国际申请 PCT/EP2007/051229 2007.2.8

[87] 国际公布 WO2007/090872 英 2007.8.16

[85] 进入国家阶段日期 2008.7.23

[71] 申请人 诺瓦提斯公司

地址 瑞士巴塞尔

[72] 发明人 A·萨尔 R·希伦布兰德

A·维塔利蒂

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

代理人 黄革生 林柏楠

权利要求书3页 说明书69页 附图3页

[54] 发明名称

抗分泌型卷曲相关蛋白-4(SFRP-4)的抗体

[57] 摘要

本发明一般涉及 SFRP-4 结合剂的制备和其用途。具体地, 本发明涉及抗 SFRP-4 抗体的制备和它们在 SFRP-4 检测和调节 SFRP-4 介导的功能中的用途。本发明的组合物和方法可用于多种组织中检测改变的 SFRP-4 多肽表达表现出来的病症以及在需要其的受试者中实现此类 SFRP-4 多肽相关病症的治疗性和预防性缓解。

1、抗体组合物，其免疫特异性结合选自 SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 4; 和 SEQ ID NO: 5 的至少一种多肽；并且免疫特异性结合 SEQ ID NO: 2 的多肽。

2、权利要求 1 的抗体，其中所述抗体选自：多克隆抗体；单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体和抗体相关的多肽。

3、药物组合物，其包含权利要求 1 的抗体，和可药用载体。

4、编码抗体或其片段的分离的核酸，所述抗体或其片段免疫特异性结合选自 SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 4; 和 SEQ ID NO: 5 的至少一种多肽；并且免疫特异性结合 SEQ ID NO: 2 的多肽。

5、包含权利要求 4 的核酸的载体。

6、权利要求 5 的载体，其还包含有效连接所述核酸分子的启动子。

7、包含权利要求 5 的载体的宿主细胞。

8、制备抗体或其片段的方法，所述抗体或其片段免疫特异性结合选自 SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 4; 和 SEQ ID NO: 5 的至少一种多肽；并且免疫特异性结合 SEQ ID NO: 2 的多肽，所述方法包括：

(a) 在提供所述抗体或其片段表达的条件下培养含有权利要求 6 的载体的细胞；并

(b) 回收所表达的抗体或其片段。

9、确定样品中免疫反应性多肽的存在或量的方法，该方法包括：

(a) 提供所述样品；

(b) 将样品与权利要求 1 的抗体组合物接触；和

(c) 确定结合所述免疫反应性多肽的抗体组合物的存在或量，从而确定样品中所述免疫反应性多肽的存在或量。

10、治疗或预防分泌型卷曲相关多肽 4 型相关的病症的方法，该方法包括对需要这种治疗或预防的受试者施用有效量的权利要求 1 的抗体组合物以足够的量治疗或预防受试者中分泌型卷曲相关多肽 4 型相关的病症。

11、权利要求 10 的方法，其中所述分泌型卷曲相关多肽 4 型相关的病症选自：脑癌；乳腺癌；前列腺癌；子宫癌；脾脏癌；胰腺癌；结肠癌；直肠癌；小肠癌；胃癌；食管癌；缺血引起的细胞凋亡，心力衰竭；心肌梗塞；中风；神经变性疾病；亨廷顿舞蹈症；外周脱髓鞘病；多发性硬化；阿尔茨海默氏病；肌萎缩侧索硬化；帕金森病；创伤；冠心病；炎症；和炎性肠病。

12、治疗或预防分泌型卷曲相关多肽 4 型相关病症的方法，该方法包括对需要这种治疗或预防的受试者施用有效量的权利要求 4 的核酸以治疗或预防受试者中与 SEQ ID NO: 2 的多肽表达有关的医学状况。

13、权利要求 12 的方法，其中所述分泌型卷曲相关多肽 4 型相关的病症选自：脑癌；乳腺癌；前列腺癌；子宫癌；脾脏癌；胰腺癌；结肠癌；直肠癌；小肠癌；胃癌；食管癌；缺血引起的细胞凋亡，心力衰竭；心肌梗塞；中风；神经变性疾病；亨廷顿舞蹈症；外周脱髓鞘病；多发性硬化；阿尔茨海默氏病；肌萎缩侧索硬化；帕金森病；创伤；冠心病；炎症；和炎性肠病。

14、调节哺乳动物中具有包含 SEQ ID NO: 2 的序列的氨基酸序列的多肽的表达或活性的方法，该方法包括对该哺乳动物施用至少一种权利要求 1 的抗体。

15、抗体组合物用于制造治疗分泌型卷曲相关多肽 4 型相关病症的药物的用途，其中所述抗体组合物是权利要求 1 的抗体组合物。

16、试剂盒，其在一个或多个容器中包含权利要求 3 的药物组合物和使用其中内含物的说明书。

17、试剂盒，其在一个或多个容器中包含权利要求 5 的药物组合物和使用其中内含物的说明书。

18、检测分泌型卷曲相关多肽 4 型多肽生物标志的方法，该方法包括：  
(a) 提供测试样品；

(b) 将测试样品与权利要求 1 的抗体在一定条件下接触，在所述条件下抗体与分泌型卷曲相关多肽 4 型多肽生物标志复合而形成抗体/分泌型卷

曲相关多肽 4 型多肽生物标志复合体;

(c) 检测所述抗体/分泌型卷曲相关多肽 4 型多肽生物标志复合体; 并

(d) 定量测试样品中的抗体/分泌型卷曲相关多肽 4 型多肽生物标志复合体。

19、测定第一个哺乳动物受试者中与分泌型卷曲相关多肽 4 型多肽的改变的水平有关的疾病的存在或对该疾病的倾向的方法, 该方法包括:

(a) 提供来自所述第一个哺乳动物受试者的测试样品;

(b) 将来自所述第一个哺乳动物受试者的测试样品与权利要求 1 的抗体在一定条件下接触, 在所述条件下抗体与分泌型卷曲相关多肽 4 型多肽生物标志复合而形成抗体/分泌型卷曲相关多肽 4 型多肽生物标志复合体;

(c) 检测所述抗体/分泌型卷曲相关多肽 4 型多肽生物标志复合体的水平;

(d) 定量来自所述第一个哺乳动物受试者的样品中分泌型卷曲相关多肽 4 型多肽的表达水平; 和

(e) 比较步骤(a)的样品中分泌型卷曲相关多肽 4 型多肽水平与来自第二个哺乳动物受试者的对照样品中分泌型卷曲相关多肽 4 型多肽的水平, 已知所述第二个哺乳动物受试不患有或不倾向于患所述疾病,

其中与来自第二个哺乳动物受试者的对照样品相比, 第一个受试者中分泌型卷曲相关多肽 4 型多肽表达水平的改变表明存在或倾向于患所述疾病。

## 抗分泌型卷曲相关蛋白 - 4 (SFRP-4) 的抗体

### 发明领域

本发明一般涉及免疫球蛋白、抗体和其片段。具体地，本发明涉及分泌型卷曲相关蛋白 4 型(SFRP-4)结合剂的制备及其用途。

### 发明背景

Wnt 基因家族编码在分化和发育中起关键作用的蛋白质。Wnt 蛋白质与卷曲 (Frizzled) 家族的七次跨膜受体相互作用并激活导向细胞核的信号途径。Dennis 等人, *J. Cell Sci.*, 112(21): 3815-20 (1999)。Wnt-1 信号转导的主要生物化学效应是细胞质 ( $\beta$ ) - 联蛋白的稳定化, 细胞质 ( $\beta$ ) - 联蛋白与 Lef/tcf 家族的转录因子结合, 调节基因表达。最近鉴定了一类新的分泌蛋白——分泌型卷曲相关蛋白 (SFRP), 它们与卷曲蛋白的细胞外的配体结合结构域相似, 提示额外的机理可以调节 Wnt 信号转导。

SFRP-4 是可溶性细胞外糖蛋白, 其通过结合到 Wnts 或卷曲受体而拮抗 Wnt/卷曲途径的信号功能。SFRP-4 在脑、肾、肺、卵巢、前列腺、乳腺和子宫内膜中表达并且对于细胞存活显示出复杂的功能。Jones 等人, *Bioessays* 24: 811-20 (2002)。已经提出 SFRP-4 涉及骨代谢(Fujita 等人, *Geriat. and Gerontol. Intern.* 4: 175-80 (2004)), 排卵 (Drake 等人, *Apoptosis* 8: 389-97 (2003)), 肿瘤抑制 (Hrzenjak 等人, *J. Path.* 204: 19-27 (2004); Horvath 等人, *Clin. Cancer Res.* 10: 615-25 (2004))并且被表征为与骨软化相关的肿瘤表达的循环的尿磷酸盐增多因子(Berndt 等人, *J Clin Invest* 112: 785-94 (2003))。由于涉及这些生物过程, 已经认为 SFRP-4 是癌症、激素调节的生殖性组织疾病和神经变性领域的潜在生物标志 (即, 生物学标志)。因此, 本领域需要用于靶定 (例如结合) 和/或调节 SFRP-4

多肽的额外的物质。

### 发明概述

本发明提供了用于靶定和/或调节 SFRP-4 多肽的物质。本发明提供了抗体组合物,其免疫特异性结合选自 SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 4;和 SEQ ID NO: 5 的 SFRP-4 多肽; 并且免疫特异性结合 SEQ ID NO: 2 的多肽。该抗体可以是多克隆抗体; 单克隆抗体; 嵌合抗体; 人源化抗体; 和抗体相关的多肽。

本发明还提供了制备和使用本发明抗体的方法。本发明因此提供了药物组合物,其含有可药用载体中的本发明抗体。本发明提供了分离的核酸,其编码免疫特异性结合 SFRP-4 多肽的抗体或其片段。本发明还提供了含有本发明核酸的载体和宿主细胞。

本发明还提供了治疗或预防分泌型卷曲相关多肽 4 型 - 相关病症的方法。该病症可以是脑癌; 乳腺癌; 前列腺癌; 子宫癌; 脾脏癌; 胰腺癌; 结肠癌; 直肠癌; 小肠癌; 胃癌; 食管癌; 缺血引起的细胞凋亡, 心力衰竭; 心肌梗塞; 中风; 神经变性疾病; 亨廷顿舞蹈症; 外周脱髓鞘病; 多发性硬化; 阿尔茨海默氏病; 肌萎缩侧索硬化; 帕金森病; 创伤; 冠心病; 炎症; 或炎性肠病。本发明提供了通过施用本发明的抗体调节多肽的表达或活性的方法。

因此, 本发明通过了抗体组合物的用途, 用于生产治疗分泌型卷曲相关多肽 4 型相关病症的药物。

### 附图简述

附图通过实例描述了优选实施方案, 并且不作为限制。

图 1 显示了 His 标记的 SFRP-4 多肽的蛋白质印迹分析。小图 A 显示了 48 小时 (左泳道) 和 144 小时 (右泳道) 培养后在 10  $\mu$ l 培养上清液中检测到免疫反应性 His 标记的 SFRP-4 多肽。小图 B 显示了含有 His 标记的 SFRP-4 的培养上清液 (48 小时样品) 的去糖基化处理的效果。泳道 1:

在含有 His 标记的 SFRP-4 的培养上清液(48 小时样品)中观察到的 SFRP-4 免疫反应性蛋白质;泳道 2: 在模拟品处理的含有 His 标记的 SFRP-4 的培养上清液(48 小时样品)中观察到的 SFRP-4 免疫反应性蛋白质;泳道 3: 在 PNGase 处理的含有 His 标记的 SFRP-4 的培养上清液(48 小时样品)中观察到的 SFRP-4 免疫反应性蛋白质。

图 2 是曲线图, 显示了 SFRP-4 ELISA 标准曲线。

图 3 是高通量蛋白质印迹图, 图表显示了组织中点的大小。测定的组织如下: 1, 胎盘; 2, 空泳道; 3, 脂肪; 4, 膀胱; 5, 脑; 6, 乳腺; 7, 小脑; 8, 宫颈; 9, 结肠; 10, 膈; 11, 十二指肠; 12, 食道; 13, 胆囊; 14, 心脏; 15, 回肠; 16, 空肠; 17, 肾; 18, 肝脏; 19, 肺; 20, 卵巢; 21, 胰腺; 22, 胎盘; 23, 直肠; 24, 骨骼肌; 25, 皮肤; 26, 脾脏; 27, 胃; 28, 睾丸; 29, 胸腺; 30, 甲状腺; 31, 扁桃体; 32, 子宫。

## 发明详述

**术语和定义.** 除非另外定义, 本文使用的所有技术和科学术语一般具有与本发明所属领域普通技术人员通常理解的相同的含义。如本说明书和所附权利要求书中所用的, 单数形式“一个”、“这个”包括复数指代, 除非明确指出相反。例如, 对“一个细胞”的参考包括两个或多个细胞等等的组合。通常, 本文中使用的术语和下文中描述的细胞培养、分子遗传学、有机化学和核酸化学和杂交中的实验步骤是本领域中公知的和常用的。标准技术用于核酸和肽合成。而且, 本文中使用的术语和下文中所述的分析化学和有机合成中的实验室步骤是本领域公知和常用的。标准技术或其修饰用于化学合成和化学分析。将本文中引用的所有参考文献完整并且为了所有目的相同程度地引入本文作为参考, 就好像将每个出版物、专利或专利申请特别并单独为了所有目的完整引入本文作为参考一样。

在下面提供如该说明书中使用的一些术语的定义。其他术语的定义可以见 *Illustrated Dictionary of Immunology*, 第二版, Cruse, J.M. 和 Lewis, R.E., eds. (CRC Press, Boca Raton, Florida, 1995)。

如本文所用，术语“分泌型卷曲相关蛋白-4” (SFRP-4)包括天然存在的 SFRP-4，以及合成或重组的 SFRP-4。此外，术语“分泌型卷曲相关蛋白-4”包括等位基因变体、物种变体、剪接变体和保守的氨基酸替代变体。SFRP-4 基因表达在哺乳动物中产生 SFRP-4 剪接变体。Yam 等人 *Gene* PMID: 16005582 (印刷前电子出版, 2005 年 7 月 7 日)。该术语也包括全长 SFRP-4 以及 SFRP-4 片段。SFRP-4 包括但不限于人 SFRP-4 和鼠 SFRP-4。

如本文所用，活性剂或药物向受试者的施用包括自己施用和通过另一人施用。也还理解如所述的医学状况的治疗或预防的多种模式意指“基本上”，其包括总的以及小于总的治疗或预防，并且其中实现了一些生物学或医学相关的结果。

如本文所用，术语“氨基酸”包括天然存在的氨基酸和合成的氨基酸，以及与天然存在的氨基酸以相似的方式发挥功能的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸是遗传密码编码的氨基酸，以及后来被修饰的那些氨基酸，如羟脯氨酸、 $\gamma$ -羧基谷氨酸，和 O-磷酸丝氨酸。氨基酸类似物指与天然存在的氨基酸具有相同的基本化学结构（即，结合到氢的  $\alpha$ -碳、羧基、氨基，和 R 基）的化合物，例如，高丝氨酸、正亮氨酸、亚砷甲硫氨酸、甲硫氨酸甲基硫。此类类似物具有修饰的 R 基（例如，正亮氨酸）或修饰的肽主链，但是保留与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构。氨基酸模拟物指具有与氨基酸的一般化学结构不同的结构但是以与天然存在的氨基酸相似的方式发挥功能的化合物。氨基酸在本文中可以通过它们公知的三字母符号表示或通过 IUPAC-IUB 生物化学命名委员会 (IUPAC-IUB) 推荐的单字母表示。核苷酸同样可以通过它们通常接受的单字母代码表示。

如本文所用，术语“抗体”指特异结合并识别抗原的多肽，如 SFRP-4 多肽，该多肽包含来自免疫球蛋白基因的构架区或其片段。术语抗体用于意在包括完整抗体，包括单链完整抗体，和其抗原结合片段。

如本文所用，术语“抗体相关的多肽”指结合抗原的抗体片段（包括单链抗体），其可以仅包含可变区，或者包含可变区与下面多肽元件的全部

或部分的组合：抗体分子的铰链区、CH<sub>1</sub>、CH<sub>2</sub>和CH<sub>3</sub>结构域。本发明还包括可变区和铰链区、CH<sub>1</sub>、CH<sub>2</sub>和CH<sub>3</sub>结构域的任何组合。用作本发明结合剂的抗体相关分子包括，例如，但不限于，Fab、Fab'和F(ab')<sub>2</sub>、Fd、单链Fvs(scFv)、单链抗体，二硫键连接的Fvs(sdFv)和包含V<sub>L</sub>或V<sub>H</sub>结构域的片段。实例包括：(i)Fab片段，其是由V<sub>L</sub>、V<sub>H</sub>、C<sub>L</sub>和CH<sub>1</sub>结构域组成的单价片段；(ii)F(ab')<sub>2</sub>片段，其是包含在铰链区通过二硫键连接的两个Fab片段的二价片段；(iii)由V<sub>H</sub>和CH<sub>1</sub>结构域组成的Fd片段；(iv)由抗体的单臂的V<sub>L</sub>和V<sub>H</sub>结构域组成的Fv片段，(v)由V<sub>H</sub>结构域组成的dAb片段(Ward等人, *Nature* 341: 544-546, 1989);和(vi)分离的互补决定区(CDR)。

如本文所用，术语“生物样品”指来自活细胞或被活细胞接触的样品材料。术语“生物样品”意在包括从受试者分离的组织、细胞和生物液体，以及存在于受试者体内的组织、细胞和液体。

如本文所用，术语“CDR嫁接抗体”指抗体，其中“受体”抗体的至少一个CDR被具有希望的抗原特异性的“供体”抗体的CDR“嫁接物”代替。

如本文所用，术语“嵌合抗体”指抗体，其中使用重组DNA技术将来自一个物种的单克隆抗体的Fc恒定区(例如，小鼠Fc恒定区)用来自另一物种的Fc恒定区(例如，人Fc恒定区)代替。一般见，Robinson等人, PCT/US86/02269; Akira等人, 欧洲专利申请184,187; Taniguchi, 欧洲专利申请171,496; Morrison等人, 欧洲专利申请173,494; Neuberger等人, WO 86/01533; Cabilly等人, 美国专利号4,816,567; Cabilly等人, 欧洲专利申请125,023; Better等人, *Science* 240: 1041-1043 (1988); Liu等人, *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 3439-3443 (1987); Liu等人, *J Immunol* 139: 3521-3526 (1987); Sun等人, *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 214-218 (1987); Nishimura等人, *Cancer Res* 47: 999-1005 (1987); Wood等人, *Nature* 314: 446-449 (1985); 和 Shaw等人, *J Natl Cancer Inst* 80: 1553-1559, (1988)。

如本文所用，术语“比较窗口”指选自20到600个氨基酸或核苷酸、通

常约 50 到约 200 个,更通常约 100 到约 150 个氨基酸或核苷酸的任一数目的连续位置片段,其中序列和参考序列在最佳比对后可以与相同数目的连续位置的参考序列比较。

如本文所用,术语“共有 FR”指共有免疫球蛋白序列中的构架(FR)抗体区。抗体的 FR 区不接触抗原。

如本文所用,术语“共有序列”指从相关序列家族中最经常发生的氨基酸(或核苷酸)形成的序列(见例如, Winnaker, *From Genes to Clones* (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany 1987)。即,在蛋白质家族中,共有序列中的每个位置被该家族中该位置最经常发生的氨基酸占据。如果两个氨基酸以相同频率发生,那么任何一个可以包括在共有序列中。

如本文所用,术语“接触”当应用于细胞时指借以将本发明的 SFRP-4 结合剂(例如,抗体、抗体组合物、细胞毒性剂或部分、基因、蛋白质,和/或反义序列)递送到靶细胞或与靶细胞直接靠近放置的方法。该递送可以是体外的或体内的并且可以涉及使用重组载体系统。

如本文所用,术语“细胞毒性部分”指当接近细胞或被细胞吸收时抑制细胞生长或促进细胞死亡的部分。作为非限制性实例,细胞毒性部分可以是化学治疗剂、光活化的毒素或放射性物质。

如本文所用,术语“双抗体”指具有两个抗原结合位点的小抗体片段,所述片段包含连接到相同多肽链( $V_H$   $V_L$ )中的轻链可变结构域( $V_L$ )的重链可变结构域( $V_H$ )。通过使用太短而不能允许相同链上的两个结构域之间配对的接头,强迫结构域与另一链的互补结构域配对并产生两个抗原结合位点。双抗体在例如 EP 404,097; WO 93/11161; 和 Hollinger 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993)中有更完整的描述。

如本文所用,术语“效应细胞”指与免疫应答的识别和活化期相比,涉及免疫应答的效应期的免疫细胞。示例性免疫细胞包括骨髓或淋巴来源的细胞,例如,淋巴细胞(例如,B细胞和T细胞,包括溶细胞性T细胞(CTLs))、杀伤细胞、自然杀伤细胞、巨噬细胞、单核细胞、嗜酸性粒细胞、嗜中性粒细胞、多形核细胞、粒细胞、肥大细胞、和嗜碱性粒细胞。效应细胞表

达特异 Fc 受体并且执行特定免疫功能。效应细胞可以诱导依赖抗体的细胞毒性 (ADCC)，例如，嗜中性粒细胞能够诱导 ADCC。例如，表达 Fc $\alpha$ R 的单核细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和淋巴细胞涉及靶细胞的特异杀伤和抗原向免疫系统的其他组分的呈递，或者结合呈递抗原的细胞。效应细胞也可以吞噬靶抗原、靶细胞、转移的癌细胞或微生物。

如本文所用，术语“表位”指能够特异结合抗体的蛋白质决定簇。表位通常由分子的化学活性表面群如氨基酸或糖侧链组成并且通常具有特定的三维结构特征，以及特定电荷特征。构象和非构象表位是不同的，因为在变性溶剂时，对构象表位的结合丧失，但是对非构象表位的结合不丧失。

如本文所用，术语组合物的“有效量”是足以实现希望的治疗和/或预防效果的量，例如，导致与被治疗的疾病（例如与本文所列的目标多肽相关的疾病）有关的症状的预防或减轻的量。施用于受试者的本发明组合物的量将取决于疾病的类型和严重性和个体的特征，如一般状况、年龄、性别、体重和对药物的耐受性。它也取决于疾病的程度、严重性和类型。技术人员将能够根据这些和其他因素确定合适的剂量。本发明的组合物也可以相互组合，或者与一种或多种额外的治疗化合物组合施用。

如本文所用，“表达”包括但不限于下面的一种或多种：基因转录成前体 mRNA；前体 mRNA 的剪接和其他加工以产生成熟 mRNA；mRNA 稳定性；成熟 mRNA 向蛋白质的翻译（包括密码子选择和 tRNA 可得性）；和翻译产物的糖基化和/或其他修饰（如果正确表达和功能所需）。

如本文所用，“融合多肽”包括有效连接到多肽的 SFRP-4 多肽，前一多肽具有对应于与 SFRP-4 多肽不实质同源的多肽（例如，与 SFRP-4 多肽不同并且来自相同或不同生物的多肽）的氨基酸序列。

如本文所用，术语“基因”指 DNA 区段，其含有 RNA 产物的受调节的生物合成的所有信息，包括启动子、外显子、内含子和其他控制表达的非翻译区。

如本文所用，术语“基因型”指在个体中一对同源染色体上基因座中一个或多个多态性或突变位点上发现的核苷酸对的未定相的 5'到 3'序列。如

本文所用，基因型包括完整基因型和/或亚基因型。

如本文所用，术语“人序列抗体”包括具有来自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区（如果存在）的抗体。本发明的人序列抗体可以包括不由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基（例如，通过体外随机或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变导入的突变）。可以在非人转基因动物中产生此类抗体，如 PCT 公布号 WO 01/14424 和 WO 00/37504 中所述。然而，如本文所用的术语“人序列抗体”不意在包括这样的抗体，其中来自另一哺乳动物（如小鼠）的种系的 CDR 序列已经被嫁接到人构架序列（例如，人源化抗体）上。

如本文所用，术语“同一的”或百分比“同一性”当在两个或多个核酸或多肽序列的上下文中使用时，指（当在比较窗口或指定区上为了最大一致性进行比较和比对时）在特定区域（例如，编码本文所述的抗体的核苷酸序列或本文所述抗体的氨基酸序列）上相同或具有特定百分比的相同氨基酸残基或核苷酸（例如，约 60% 同一性，优选 65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更高同一性）的两个或多个序列或子序列，如使用 BLAST 或 BLAST 2.0 序列比较算法用下述默认参数或者通过手工比对和视觉检查测定（见例如，NCBI 网站）测量。然后说此类序列是“实质同一的”。该术语也指或者可以应用于测试序列的互补序列。该术语也包括具有缺失和/或添加的序列，以及具有替代的序列。如下文所述，优选的算法可以考虑空位等等。优选地，同一性存在于至少约 25 个氨基酸或核苷酸长度的区域上，或者更优选存在于 50 - 100 个氨基酸或核苷酸长度的区域上。

“分离的”或“纯化的”多肽或其生物活性部分基本上没有来自细胞或组织来源的细胞物质或其他污染性多肽，其中 SFRP-4 结合剂来自所述细胞或组织来源，或者当化学合成时基本上没有化学前体或其他化学品。例如，为抗 SFRP-4 抗体的分离的 SFRP-4 结合剂将没有干扰该结合剂的诊断或治疗用途的物质。此类干扰性物质可以包括酶、激素和其他蛋白质性质和非蛋白质性质的溶质。

如本文所用，术语“完整抗体”指具有通过二硫键连接的至少两条重(H)链多肽和两条轻(L)链多肽的抗体。

如本文所用，术语“免疫应答”指淋巴细胞、抗原呈递细胞、吞噬细胞、粒细胞和上面细胞或肝脏产生的可溶性大分子（包括抗体、细胞因子和补体）的协调作用，其导致癌细胞、转移的肿瘤细胞、恶性黑素瘤、侵入性病原体、病原体感染的细胞或组织，或（对于自身免疫或病理性炎症的情况）正常人细胞或组织的选择性伤害、破坏或从人体的清除。

如本文所用，术语“免疫交叉反应”和“免疫反应性”可互换使用，指与使用相同（“免疫反应性”）或不同（“免疫交叉反应”）抗原产生的抗体特异反应的抗原。一般地，抗原是 SFRP-4，其变体或子序列。

如本文所用，术语“免疫反应状况”指允许针对抗原的特定表位产生的抗体结合到该表位的状况，可以检测到所述结合的程度大于该抗体结合到基本上所有其他表位的程度，通常高于背景结合至少两倍，优选高于背景至少五倍。免疫反应状况取决于抗体结合反应的形式并且通常是用于免疫测定方案中的那些。免疫测定形式和条件的描述见 Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Publications, New York, 1988)。

如本文所用，术语“淋巴细胞”指在血液、淋巴和淋巴组织中发现的任何单核细胞、非吞噬白细胞，例如，B 和 T 淋巴细胞。

如本文所用，术语“医学状况”包括但不限于，表现为希望治疗和/或预防的一种或多种生理和/或心理症状的任何状况或疾病，并且包括以前和新鉴定的疾病和其他病症。

如本文所用，术语“调节剂”包括抑制剂和活化剂。抑制剂是例如结合、部分或完全阻断刺激、降低、阻止、延迟活化、失活、脱敏或下调 SFRP-4 多肽活性的物质，例如，拮抗剂。活化剂是例如结合、刺激、增加、打开、活化、促进、增强活性、敏化或上调 SFRP-4 多肽活性的物质，例如，激动剂。调节剂包括例如改变 SFRP-4 多肽与下列物质相互作用的物质：结合活化剂或抑制剂的蛋白质、受体，包括蛋白质、肽、脂类、糖类、多糖，

或上面的组合,例如,脂蛋白、糖蛋白,等等。调节剂包括天然存在的 SFRP-4 多肽的遗传修饰的形式(例如,具有改变的活性),以及天然存在的和合成的配体、拮抗剂、激动剂、小化学分子等等。

如本文所用,术语“单克隆抗体”指来自单个克隆(包括任何真核、原核或噬菌体克隆)的抗体,并且不指产生它的方法。单克隆抗体组合物显示出对具体表位的单结合特异性和亲和性。可以使用本领域已知的多种技术制备单克隆抗体,包括但不限于,杂交瘤、重组和噬菌体展示技术。

如本文所用,术语“中和抗体”指能够消除或显著降低 SFRP-4 多肽或 SFRP-4 样多肽的至少一种生物功能的抗体分子。

如本文所用,术语“核苷酸对”指在两条核苷酸链之间相互结合的两个核苷酸。

如本文所用,术语“可药用载体”意在包括与药物施用相容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗细菌和抗真菌化合物、等渗和吸收延迟化合物,等等。

如本文所用,术语“多克隆抗体”指来自产生至少两种不同抗体的细胞系的抗体制剂。该术语的使用包括至少两种抗体的制备物,其含有特异结合抗原的不同表位或区域的抗体。

如本文所用,术语“多核苷酸”指任何 RNA 或 DNA,其可以是未经修饰的或经修饰的 RNA 或 DNA。

如本文所用,术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可被互换使用,指包含通过肽键或修饰的肽键相互连接的至少两个或多个氨基酸的聚合物,即,肽等构物。多肽指短链,通常称作肽、糖肽或寡聚体,和较长链,通常称作蛋白质。多肽可以含有不同于 20 种基因编码的氨基酸的氨基酸。多肽包括通过天然过程如翻译后加工修饰或者通过本领域公知的化学修饰技术修饰的氨基酸序列。此类修饰在基本教科书并且在更详细的专著和大部头的研究文献中详细描述。

如本文所用,术语“重组的”当例如涉及细胞、核酸、蛋白质或载体使用时,表示所述细胞、核酸、蛋白质或载体已经通过导入异源核酸或蛋白

质而被修饰或者指天然核酸或蛋白质的改变，或者所述物质来自被这样修饰的细胞。

如本文所用，术语“单链抗体”或“单链 Fv (scFv)”指 Fv 片段的两个结构域  $V_L$  和  $V_H$  的抗体融合分子。尽管 Fv 片段的两个结构域  $V_L$  和  $V_H$  由单独的基因编码，但是使用重组方法通过合成接头可以将它们连接，所述接头可以使得所述两个结构域成为单个蛋白质链，其中  $V_L$  和  $V_H$  区配对形成单价分子，称作单链 Fv (scFv)。见例如，Bird 等人, *Science* 242: 423-426 (1988); 和 Huston 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 5879-5883 (1988)。此类单链抗体被术语“抗体”片段包括，并且可以通过重组技术或者通过完整抗体的酶促或化学切割制备。

如本文所用，术语“小分子”指分子量小于约 5 kDa 并且更优选小于约 2 kDa 的组合物。小分子可以是例如核酸、肽、多肽、糖肽、肽模拟物、糖类、脂类、脂多糖、或者这些的组合，或者其他有机或无机分子。

如本文所用，术语“特异结合”指 SFRP-4 结合剂和抗原之间的接触，其结合亲和力为至少  $10^{-6}$  M。优选的结合剂以至少约  $10^{-7}$  M，优选  $10^{-8}$  M 到  $10^{-9}$  M、 $10^{-10}$  M、 $10^{-11}$  M 或  $10^{-12}$  M 的亲和力结合。

如本文所用，术语“严格杂交条件”指通常在核酸的复杂混合物中探针将与它的靶标子序列杂交但是不与其他序列杂交的条件。严格条件是依赖序列的并且将在不同的环境中不同。较长的序列在较高温度特异杂交。关于核酸杂交的详细教导见 Tijssen, “Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays”, *Techniques in Biochemistry and Molecular Biology – Hybridization with Nucleic Probes* (1993)。通常，选择严格条件为比在确定的离子强度和 pH 下特定序列的热溶解温度( $T_m$ )低约 5-10°C。 $T_m$  是在平衡时与靶标互补的 50% 探针与靶序列杂交（因为靶序列过量存在，在  $T_m$  下，平衡时 50% 的探针被占据）时的温度（在确定的离子强度、pH 和核酸浓度下）。加入去稳定剂如甲酰胺也可以实现严格条件。对于选择性或特异性杂交，阳性信号为背景的至少两倍，优选 10 倍背景杂交。示例性严格杂交条件可以如下：50% 甲酰胺，5x SSC，和 1% SDS，

在 42°C 温育，或者 5x SSC, 1% SDS, 在 65°C 温育，在 0.2x SSC, 和 0.1% SDS 65°C 下洗涤。

如本文所用，术语“受试者”指该受试者优选为哺乳动物，如人，但是也可以是动物，如驯养动物（例如，狗、猫等等）、农场动物（例如，奶牛、绵羊、猪、马等等）和实验动物（例如，猴、大鼠、小鼠、兔、豚鼠等等）。

如本文所用，术语“靶细胞”指受试者（例如人或动物）中任何细胞，其可以被本发明的 SFRP-4 结合剂靶定。

如本文所用，术语“治疗剂”意指化合物（例如，SFRP-4 结合剂），其当以有效量存在时，对需要其的受试者产生希望的治疗效果。

本发明的一个或多个实施方案的细节在下面的描述中给出。尽管与本文描述的相似或等同的任何方法和材料可以用于实施或检验本发明，但是现在描述优选的方法和材料。本发明的其他特征、目的和优点将从说明书和权利要求书看是显而易见的。通常，根据生产商的说明书进行酶促反应和纯化步骤。一般根据本领域的常规方法和多种一般参考文献进行技术和步骤。一般见，Sambrook 等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第二版 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989), 其在该文件的全文中提供。

## 本发明的组合物

**概述.** 本发明提供了针对 SFRP-4 多肽的 SFRP-4 结合剂、其片段和变体。SFRP-4 是 SFRP 家族成员，其含有与卷曲蛋白的推定的 Wnt 结合位点同源的富含半胱氨酸的结构域。Wnt 网络影响从发育细胞命运、细胞极性和粘附到肿瘤发生和凋亡的生物过程。Jones 等人, *Bioessays* 24: 811-20 (2002)。SFRP 作为 Wnt 信号转导的可溶性调节剂。通过选择性剪接机理从 SFRP-4 基因的哺乳动物表达可以得到多种蛋白质产物。Yam 等人 *Gene* PMID: 16005582 (印刷前电子出版 (Epub ahead of print), 2005 年 7 月 7 日)。编码人 SFRP-4 的核苷酸序列 (NM\_003014.2; SEQ ID NO: 1) 在表

1 中显示。

表 1  
编码人分泌型卷曲相关蛋白的核酸

```

1  ggcgggttcg  cgccccgaag  gctgagagct  ggcgctgctc  gtgccctgtg  tgccagacgg
61  cggagctccg  cggccggacc  ccgcgcccc  gctttgctgc  cgactggagt  ttgggggaag
121 aaactctcct  gcgccccaga  agatttcttc  ctcggcgaag  ggacagcgaa  agatgagggt
181 ggcaggaaga  gaaggcgctt  tctgtctgcc  ggggtcgag  cgcgagagg  cagtgccatg
241 ttctctcca  tcctagtggc  gctgtgectg  ttgctgcacc  tggcgtggg  cgtgcgccc
301 gcgccctgcg  aggcggtgcg  catccctatg  tgcggcaca  tgccctgaa  catcacgcg
361 atgccaacc  acctgcacca  cagcacgcag  gagaaccca  tcctggccat  cgagcagtac
421 gaggagctgg  tggacgtgaa  ctgcagcgcc  gtgctgcgct  tcttctctg  tgccatgtac
481 gcgcccattt  gcaccctgga  gttcctgcac  gacctatca  agccgtgcaa  gtcggtgtgc
541 caacgcgcgc  gcgacgactg  cgagcccctc  atgaagatgt  acaaccacag  ctggcccga
601 agcctggcct  gcgacgactg  gctgtctat  gaccgtggcg  tgtgcatttc  gcctgaagcc
661 atcgtcacgg  acctccgga  gcatgttaag  tggatagaca  tcacaccaga  catgatggt
721 caggaaaggc  ctcttgatgt  tgactgtaaa  cgcctaagcc  ccgatcggtg  caagtgtaaa
781 aagggtgaagc  caactttggc  aacgtatctc  agcaaaaact  acagctatgt  tattcatgcc
841 aaaataaaag  ctgtgcagag  gagtggctgc  aatgaggtca  caacggtggt  ggatgtaaaa
901 gagatcttca  agtcctcctc  acccatccct  cgaactcaag  tcccgtcat  tacaattct
961 tcttgccagt  gtccacacat  cctgccccat  caagatgttc  tcatcatgtg  ttacgagtg
1021 cgttcaagga  tgatgcttct  tgaaaattgc  ttagttgaaa  aatggagaga  tcagcttagt
1081 aaaagatcca  tacagtggga  agagaggctg  caggaacagc  ggagaacagt  tcaggacaag
1141 aagaaaacag  ccgggcgcac  cagtcgtagt  aatccccca  aaccaagg  aaagcctcct
1201 gctcccaaac  cagccagtcc  caagaagaac  attaaaacta  ggagtgccca  gaagagaaca
1261 aaccogaaaa  gagtgtgagc  taactagttt  ccaaagcgga  gacttccgac  ttcttacag
1321 gatgaggctg  ggcattgctt  gggacagcct  atgtaaggcc  atgtgccctt  tgccctaaca
1381 actcactgca  gtgctcttca  tagacacatc  ttgcagcatt  tttcttaagg  ctatgcttca
1441 gtttttcttt  gtaagccatc  acaagccata  gtggtaggtt  tgccctttgg  tacagaagg
1501 gagttaaagc  tgggtgaaaa  ggcttattgc  attgcattca  gagtaacctg  tgtgcatact
1561 ctagaagagt  agggaaaata  atgcttgta  caattcgacc  taatatgtgc  attgtaaaat
1621 aaatgccata  tttcaaacia  aacacgtaat  ttttttacag  tatgttttat  taccttttga
1681 tatctgttgt  tgcaatgtta  gtgatgtttt  aaaatgtgat  gaaaataata  tgtttttaag
1741 aaggaacagt  agtggaatga  atgttaaaa  atctttatgt  gtttatggtc  tgcaagaagg
1801 tttttgtgat  gaaaggggat  tttttgaaaa  attagagaag  tagcatatgg  aaaattataa
1861 tgtgtttttt  taccaatgac  ttcagtttct  gtttttagct  agaaacttaa  aaacaaaaat
1921 aataataaag  aaaaataaat  aaaaaggaga  ggcagacaat  gtctggattc  ctgttttttg
1981 gttacctgat  ttccatgatc  atgatgcttc  ttgtcaacac  cctcttaagc  agcaccagaa
2041 acagtgagtt  tgtctgtacc  attaggagtt  aggtactaat  tagttggcta  atgctcaagt
2101 attttatacc  cacaagagag  gtatgtcact  catcttactt  cccaggacat  ccaccctgag
2161 aataatttga  caagcttaaa  aatggccttc  atgtgagtgc  caaattttgt  tttcttcat
2221 ttaaatattt  tctttgccta  aatacatgtg  agaggagtta  aatataaatg  tacagagagg
2281 aaagttgagt  tccacctctg  aaatgagaat  tacttgacag  ttgggatact  ttaatcagaa
2341 aaaaagaact  tatttgcagc  attttatcaa  caaatttcat  aattgtggac  aattggaggc
2401 atttatttta  aaaaacaatt  ttattggcct  tttgctaaca  cagtaagcat  gtattttata
2461 aggcattcaa  taaatgcaca  acgcccacaa  gaaataaaa  cctatctaata  cctactctcc
2521 actacacaga  ggtaatcact  attagtattt  tggcatatta  ttctccagg  gtttgcttat
2581 gcacttataa  aatgatttga  acaataaaa  ctaggaaacct  gtatacatgt  gtttcataac
2641 ctgctcctt  tgcttggccc  tttattgaga  taagttttcc  tgtcaagaaa  gcagaaacca
2701 tctcatttct  aacagctgtg  ttatattcca  tagtatgcat  tactcaaca  actgttgtgc
2761 tattggatac  ttaggtggtt  tcttactgaa  caatactgaa  taaacatctc  accggaattc

```

SEQ ID NO: 1

人 SFRP-4 多肽的氨基酸序列 (NP\_003005.1; SEQ ID NO: 2) 在表 2 中显示。

表 2

## 人分泌型卷曲相关蛋白

MFLSILVALCLWLHLALGVRGAPCEAVRIPMCRHMPWNITRMPNHLHHSTQENAILAIEQYEE  
 LVDVNCSAVLRFFFCAMYAPICTLEFLHDPIKPKCSVCQRARDDCEPLMKMYNHSWPESLACD  
 ELPVYDRGVCISPEAIVTDLPEDVKWIDITPDMMVQERPLDVDCRRLSPDRCKCKKVKPTLAT  
 YLSKNYSYVIHAKIKAVQRS GCNEVTTVVVDVKEIFKSSSPIPRTQVPLITNSSCQCPHILPHQ  
 DVLIMCYEWR SRMMLLENCLVEKWRDQLSKRSIQWEERLQEQRRTVQDKKKTAGRTSRSNPPK  
 PKGKPPAPKPASPKNIKTRSAQKRTNPKRV

SEQ ID NO: 2

一方面，本发明的目的是提供用于制备本发明的 SFRP-4 结合剂的免疫原性组合物。为此，使用 Biobench2 (Novartis) 和国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information) 的 BLAST 网络服务分析人 SFRP-4 多肽的氨基酸序列以鉴定用作本发明结合剂的靶标的 SFRP-4 结构域 (见实施例 1)。该分析导致鉴定了四个 SFRP-4 结构域，其在下面的表 3 中概述。

表 3

## 人分泌型卷曲相关蛋白的靶结构域

靶结构域	氨基酸	氨基酸序列	SEQ ID NO:
1	305-319	AGRTSRSNPPKPKGK	3
2	292-305	QEQRRTVQDKKKT	4
3	103-116	RARDDCEPLMKMYN	5
4	228-239	SPIPRTQVPLIT	6

通过用于产生多肽的任何技术，如化学合成、分子生物学技术、SFRP-4 多肽的蛋白酶解或化学降解，可以制备靶结构域。在一个实施方案中，通过化学合成制备 SFRP-4 靶结构域。肽的化学合成方法是本领域公知的。在一个实施方案中，修饰 SFRP-4 靶结构域以方便缀合到另一化合物，例如，卵白蛋白、匙孔血蓝蛋白。一般见下面的“多克隆抗血清和免疫原的制备”。在另一实施方案中，将半胱氨酸残基掺入到 SFRP-4 靶结构域的 C-

末端以促进 SFRP-4 靶结构域缀合到另一化合物。包含本发明的靶结构域并且可用于缀合到另一化合物的序列在下面表 4 中详述。

表 4

## 人的分泌型卷曲相关蛋白

靶结构域	ID No.	氨基酸序列	SEQ ID NO:
1	EP040755	AGRTSRSNPPKPKGKC	7
2	EP040756	QEQRRTVQDKKKTAC	8
3	EP040757	RARDDCEPLMKMYNC	9
4	EP040758	SPIPRTQVPLITC	10

SFRP-4 靶结构域 1 到 4 可以单独使用，或者组合使用，作为免疫原以产生本发明的 SFRP-4 结合剂（见实施例 1）。在一个实施方案中，本发明的免疫原性组合物包含选自：SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 9; 和 SEQ ID NO: 10 的至少一种多肽。

许多人和动物肿瘤，如乳腺、前列腺、子宫、脾脏、结肠和其他组织的肿瘤产生 SFRP-4。因此，SFRP-4 的表达是病理状况的生物标志，所述病理状况为诸如癌症（例如，脑、乳腺、前列腺、子宫、脾脏、胰腺、胃肠道（例如，结肠、直肠、小肠、胃、食道），缺血导致的细胞凋亡（例如，心力衰竭、心肌梗塞；中风）；神经变性疾病（例如，亨廷顿舞蹈症、外周脱髓鞘病、多发性硬化、阿尔茨海默氏病、肌萎缩性侧索硬化、帕金森病、创伤）；冠心病、炎症（例如，炎性肠病）。一般见 Wong, S 等人, *J. Pathol.* 196: 145-153 (2002); Schumann J 等人, *Cardiovascular Res.* 45: 720-728 (2002); Jones 等人, *Bioessays* 24: 811-20 (2002); Horvath LG 等人, (2004) *Clin. Cancer Res.* 10: 615-25 (2004); Abuh Jawdeh 等人 *Lab Invest.* 79: 439-47 (1999) 以及实施例 III。因此，本发明的多个方面涉及 SFRP-4 结合剂的制备、表达和表征。针对靶标结合结构域 1 到 4 每一个的 SFRP-4 结合剂可以单独或组合使用，用来检测试样（例如，生物样品）中的 SFRP-4 多肽（又名目标多肽）以及调节 SFRP-4 介导的功能。同样地，

本发明的多个方面还涉及诊断/治疗诊断方法和试剂盒，其使用本发明的 SFRP-4 结合剂鉴定倾向于医学状况的个体或者将个体关于药物反应性、副作用或者最佳的药物剂量分类。SFRP-4 可以单独使用，或者与其他生物标志组合使用，所述生物标志为例如凋亡或增殖相关的标志（例如，c-myc、细胞周期蛋白-D1）；Wnt-途径标志（见例如，Etheredge 等人，*Stem Cells* 22:849-860 (2004)）；Erb1；或前列腺特异抗原。

在其他方面，本发明提供了使用 SFRP-4 结合剂预防或治疗 SFRP-4 介导的病症以及筛选和/或验证配体，例如，结合 SFRP-4 多肽的小分子的方法。特别地，本发明的 SFRP-4 结合剂可用于预防性治疗，或治疗性治疗表现为 SFRP-4 多肽表达的改变（例如，增加或减少）的病症，例如，癌症（例如，脑、乳腺、前列腺、子宫、脾脏、胰腺、胃肠道（例如，结肠、直肠、小肠、胃、食道），缺血导致的细胞凋亡（例如，心力衰竭、心肌梗塞；中风）；神经变性疾病（例如，亨廷顿舞蹈症、外周脱髓鞘病、多发性硬化、阿尔茨海默氏病、肌萎缩性侧索硬化、帕金森病、创伤）；冠心病、炎症（例如，炎性肠病）。下面是阐明这些方面的多种具体的实施方案。

**本发明的 SFRP-4-结合剂。** 在一个方面，本发明提供了 SFRP-4 结合剂组合物，又名结合剂。本发明的结合剂可以按照本发明多肽的表位或部分描述或详细说明，所述表位或部分被结合剂识别或特异结合，例如，位于 SFRP-4 多肽表面的 SFRP-4 多肽区域（例如，疏水区）。作为靶定抗体生产的手段，可以通过本领域任一种公知的方法产生显示亲水性和疏水性区的亲水性图，所述方法包括例如 Kyte-Doolittle 或 Hopp-Woods 方法，使用或不使用傅立叶变换（见例如，Hopp & Woods, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 78: 3824-3828 (1981)；Kyte & Doolittle, *J. Mol. Biol.* 157: 105-142 (1982)）。表位或者多肽部分可以如本文描述，例如，通过 N-末端和 C-末端位置，通过连续氨基酸残基的大小来描述。本发明包括特异结合本发明的多肽并允许排除其的结合剂。

也可以按照它们的交叉反应性来描述或详细说明本发明的结合剂。包

括不结合本发明的目标多肽的任何其他类似物、直向同源物或同源物的结合剂。本发明也包括这样的结合剂，其不结合与本发明的目标多肽具有小于 95%、小于 90%、小于 85%、小于 80%、小于 75%、小于 70%、小于 65%、小于 60%、小于 55%、小于 50% 同一性（如使用本领域中已知和本文描述的方法计算）的多肽。本发明还包括这样的结合剂，所述结合剂仅仅结合在严格杂交条件下与本发明的多核苷酸杂交的多核苷酸编码的多肽。本发明的结合剂也可以按照它们的结合亲和力来描述或详细说明。优选的结合亲和力包括解离常数或  $K_d$  小于  $10^{-6}$  M、 $5 \times 10^{-6}$  M、 $10^{-7}$  M、 $5 \times 10^{-7}$  M、 $10^{-8}$  M、 $5 \times 10^{-8}$  M、 $10^{-9}$  M、 $5 \times 10^{-9}$  M、 $10^{-10}$  M、 $5 \times 10^{-10}$  M、 $10^{-11}$  M、 $5 \times 10^{-11}$  M、 $10^{-12}$  M、 $5 \times 10^{-12}$  M、 $10^{-13}$  M、 $5 \times 10^{-13}$  M、 $10^{-14}$  M、 $5 \times 10^{-14}$  M、 $10^{-15}$  M 和  $5 \times 10^{-15}$  M 的那些。

本发明范围内的 SFRP-4 结合剂包括例如，但不限于，特异结合目标多肽的单克隆、多克隆、嵌合、人源化的抗体、双抗体和人单克隆和人多克隆抗体，其同源物、衍生物或片段。如本文所用，“SFRP-4 样”多肽指与 SFRP-4 多肽不同但是与本发明的 SFRP-4 结合剂免疫反应的多肽。SFRP-4 样多肽可以来自与 SFRP-4 多肽相同的生物或不同生物。SFRP-4 样多肽可以由与 SFRP-4 多肽相同的基因或不同基因编码。用作本发明结合剂的抗体包括，例如但不限于，IgG（包括 IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub> 和 IgG<sub>4</sub>）、IgA（包括 IgA<sub>1</sub> 和 IgA<sub>2</sub>）、IgD、IgE 或 IgM 和 IgY。

在另一实施方案中，本发明的结合剂是针对 SFRP-4 多肽的抗体相关的多肽、其同源物或衍生物。典型地，结合剂的抗原结合区，例如，抗 SFRP-4 结合区将在本发明结合剂的结合特异性和亲和力中是最关键的。在一些实施方案中，SFRP-4 结合剂是抗 SFRP-4 多肽抗体，如抗 SFRP-4 多肽单克隆抗体、抗 SFRP-4 多肽嵌合抗体，和抗 SFRP-4 多肽人源化抗体，其已经例如被抗体的缺失、添加或替代部分修饰。例如，可以修饰抗 SFRP-4 多肽抗体以增加抗体的半寿期，例如，血清半寿期、稳定性或亲和力。

在一个实施方案中，对 SFRP-4 多肽的特定结构域特异的抗体的选择通过产生杂交瘤来促进，所述杂交瘤结合到具有这种结构域的 SFRP-4 多

肽的片段。从而，本文也提供了 SFRP-4 结合剂，其是对 SFRP-4 多肽内的希望的结构域特异的抗体，或其衍生物、片段、类似物或同源物。

本发明还包括对于本发明的结合剂是抗独特型的抗体。本发明的结合剂可以是单特异的、双特异的、三特异的或者更大的多特异性。多特异性结合剂可以对本发明的 SFRP-4 多肽的不同表位是特异的或者可以对本发明的多肽以及对异源组合物，如异源多肽或固相支持体材料是特异的。见例如，WO 93/17715; WO 92/08802; WO 91/00360; WO 92/05793; Tutt 等人, *J. Immunol.* 147: 60-69 (1991); 美国专利号 5,573,920, 4,474,893, 5,601,819, 4,714,681, 4,925,648; 6,106,835; Kostelny 等人, *J. Immunol.* 148: 1547-1553 (1992)。本发明的结合剂可以来自任何动物来源，包括鸟类和哺乳动物。优选地，结合剂是人、鼠、兔、山羊、豚鼠、骆驼、马或者鸡。

本发明的结合剂适合施用于受试者，在所述受试者中，希望例如调节 SFRP-4 功能。因此，本发明的另一目的是提供 SFRP-4 结合剂组合物，其是 SFRP-4 调节剂，例如，SFRP-4 多肽的功能拮抗剂或功能激动剂。本发明的目的还是提供 SFRP-4 结合剂组合物，其是 SFRP-4 多肽的部分拮抗剂和部分激动剂。同样包括结合 SFRP-4 多肽的中和性抗 SFRP-4 抗体。在优选实施方案中，将纯化本发明的结合剂：（1）至如通过 Lowry 方法测定(Lowry 等人, *J. Biol. Chem.* 193: 265. 1951)的按重量计大于 95% 的抗体，最优选按重量计大于 99%，（2）至通过使用旋杯式测序仪足够得到 N-末端或内部氨基酸序列的至少 15 个残基的程度，或（3）至通过 SDS-PAGE 在还原或非还原条件下使用考马斯蓝或优选银染为同质性。分离的结合剂包括重组细胞内原位的多肽，因为抗体的天然环境的至少一种组分将不存在。然而，通常，将通过至少一个纯化步骤制备 SFRP-4 结合剂，例如，分离的抗 SFRP-4 抗体。

本发明还涉及基于结构的方法，其用于鉴定、设计和产生作为 SFRP-4 多肽调节剂的化合物。

本发明的结合剂可以单独或与其他组合物组合使用。本发明的 SFRP-4

结合剂可以进一步重组融合到异源多肽的 N-或 C-末端或者化学缀合（包括共价和非共价缀合）到多肽或其他组合物。例如，本发明的 SFRP-4 结合剂可以重组融合到或缀合到用作检测测定法中标记的分子和效应分子，如异源多肽、药物或毒素。见例如，WO 92/08495；WO 91/14438；WO 89/12624；美国专利号 5,314,995；和 EP 0 396 387。

在一些实施方案中，本发明的 SFRP-4 结合剂是抗 SFRP-4 抗体或抗 SFRP-4 抗体相关的多肽，其偶联或者缀合到一个或多个治疗或细胞毒性部分以产生本发明的 SFRP-4 结合剂缀合蛋白。本发明的 SFRP-4 结合剂缀合蛋白可以用于修饰给定的生物学应答或者产生生物学应答（例如，以募集效应分子）。治疗部分将不被理解为局限于典型的化学治疗剂。例如，治疗部分可以是具有希望的生物学活性的蛋白质或多肽。此类蛋白质可以包括例如，酶促活性毒素，或者其活性片段，如相思豆毒蛋白、蓖麻毒蛋白 A、假单胞菌外毒素，或者白喉毒素；蛋白质，如肿瘤坏死因子或  $\alpha$  干扰素；或者生物应答修饰剂，如淋巴因子、白介素 - 1 (“IL-1”)、白介素 - 2 (“IL-2”)、白介素 - 6 (“IL-6”)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (“GM-CSF”)、粒细胞集落刺激因子 (“G-CSF”)，或其他生长因子。

### 制备本发明的 SFRP-4-结合剂的方法

**概述。**最初，选择可以针对其产生结合剂（例如，抗 SFRP-4 抗体）的目标多肽。产生针对目标多肽的结合剂的技术是本领域技术人员公知的。

将理解不仅天然存在的抗体适于作为根据本公开使用的结合剂，而且针对 SFRP-4 多肽的重组工程化的抗体和抗体片段，例如，抗体相关的多肽也是合适的。

可以进行本文给出的技术的结合剂，例如，抗 SFRP-4 抗体包括单克隆和多克隆抗体，和抗体片段，如 Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fd、scFv、双抗体、抗体轻链、抗体重链和/或抗体片段。已经描述了用于含有抗体 Fv 的多肽（如 Fab'和 F(ab')<sub>2</sub> 抗体片段）的高通量生产的方法。见美国专利号 5,648,237。

起源物种是可用于产生本发明的结合剂或结合剂文库的任何物种，例如，大鼠、小鼠、兔、鸡、猴、人，等等。

在优选实施方案中，SFRP-4 结合剂是抗 SFRP-4 抗体。噬菌体或噬菌粒展示技术是可用于得到本发明结合剂的技术。用于本发明的抗 SFRP-4 抗体是“人抗体”（例如，从人分离的抗体）或“人序列抗体”。通过本领域已知的多种方法（包括噬菌体展示方法）可以制备人抗体。也见美国专利号 4,444,887、4,716,111、5,545,806, 和 5,814,318; 和 WO 98/46645、WO 98/50433、WO 98/24893、WO 98/16654、WO 96/34096、WO 96/33735, 和 WO 91/10741。已经描述了通过筛选聚合噬菌体颗粒可用于鉴定编码多聚体多肽复合体成员的核酸序列的方法。Rudert 等人，美国专利号 6,667,150。而且，可以产生重组免疫球蛋白。Cabilly, 美国专利号 4,816,567; Cabilly 等人, U.S. 6,331,415 和 Queen 等人, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86: 10029-10033, 1989。产生和克隆单克隆抗体的技术是本领域技术人员公知的。本发明的 SFRP-4 结合剂优选具有高免疫反应性，即高百分比的正确折叠的抗体分子，从而它们可以特异结合它们的目标抗原。编码本发明的结合剂，如抗体的序列可以在大肠杆菌 (*E. coli*) 中表达，如下述。此类表达通常导致至少 80%、90%、95% 或 99% 的免疫反应性。

**多克隆抗血清和免疫原的制备。** 产生本发明抗体或抗体片段的方法通常包括用纯化的 SFRP-4 多肽或用表达 SFRP-4 多肽的细胞免疫受试者（通常非人受试者，如小鼠或兔）。SFRP-4 的任何免疫原性部分可以用作免疫原。合适的免疫原性制剂可以含有例如，重组表达的 SFRP-4 多肽或化学合成的 SFRP-4 多肽。使用用于多克隆和单克隆抗体制备的标准技术，分离的 SFRP-4 多肽，或者其部分或片段可以用作免疫原来产生结合 SFRP-4 多肽的 SFRP-4 结合剂，或者部分或片段。可以使用全长 SFRP-4 多肽，或者备选地，本发明提供了 SFRP-4 多肽片段作为免疫原的用途。SFRP-4 多肽包含 SEQ ID NO: 1 中显示的氨基酸序列的至少 4 个氨基酸残基，并且包含 SFRP-4 多肽的表位，使得针对该肽产生的抗体与 SFRP-4 多肽形成特异免疫复合体。优选地，抗原肽包含至少 5、8、10、15、20

或 30 个氨基酸残基。较长的抗原肽有时比较短的抗原肽优选，这取决于用途和根据本领域技术人员公知的方法。通常，免疫原将至少为约 8 个氨基酸残基长度，优选至少约 10 个氨基酸残基长度。给定表位的多聚体有时比单体更有效。

如果需要，通过融合或缀合到半抗原如匙孔血蓝蛋白 (KLH) 或卵白蛋白 (OVA) 可以增加 SFRP-4 (或其片段) 的免疫原性。许多此类半抗原是本领域已知的。也可以组合 SFRP-4 多肽与常规的佐剂，如弗氏完全或不完全佐剂，以增强受试者对所述多肽的免疫反应。用于增强免疫反应的多种佐剂包括但不限于，弗氏佐剂 (完全和不完全)、矿物凝胶 (例如，氢氧化铝)、表面活性物质 (例如，溶血卵磷脂、普流罗尼多元醇、聚阴离子、肽、油乳液、二硝基苯酚，等等)、人佐剂，如卡介苗和小棒杆菌 (*Corynebacterium parvum*)，或者类似的免疫刺激化合物。这些技术是本领域的标准技术。

合适的免疫后，可以从受试者血清制备 SFRP-4 结合剂，例如，抗 SFRP-4 多克隆抗体。如果希望，可以从哺乳动物 (例如，从血液) 分离针对 SFRP-4 多肽的抗体分子并通过公知的技术如多肽 A 层析进一步纯化以得到 IgG 级分。

**单克隆抗体。** 在本发明的一个实施方案中，结合剂是抗 SFRP-4 单克隆抗体。在本发明的一个实施方案中，抗 SFRP-4 单克隆抗体是人抗 SFRP-4 单克隆抗体。为了制备针对具体 SFRP-4 多肽的单克隆抗体，或者其衍生物、片段、类似物或同源物，可以利用通过连续细胞系培养产生抗体分子的任何技术。此类技术包括，但不限于，杂交瘤技术 (见例如，Kohler & Milstein, 1975. *Nature* 256: 495-497); 三瘤技术; 人 B 细胞杂交瘤技术 (见例如，Kozbor, 等人, 1983. *Immunol. Today* 4: 72) 和 EBV 杂交瘤技术以产生人单克隆抗体 (见例如，Cole, 等人, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy* (Alan R. Liss, Inc., 1985) pp. 77-96)。人单克隆抗体可以用于实施本发明并且可以通过使用人杂交瘤 (见例如 Cote, 等人, *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 2026-2030 (1983)) 或通过用 EB 病毒在体外转化人 B 细胞 (见例如，

Cole, 等人, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy* (Alan R. Liss, Inc., 1985) pp. 77-96)来产生。备选地, 使用常规方法, 通过免疫受试者并从受试者的脾脏分离杂交瘤可以制备表达抗 SFRP-4 单克隆抗体的杂交瘤。见例如, Galfre & Milstein, *Methods Enzymol* 73: 3-46 (1981)。使用标准方法筛选杂交瘤将产生不同特异性(例如, 对于不同的表位)和亲和力的单克隆抗体。具有希望的性质(例如, SFRP-4 结合)的选择的单克隆抗体可以如杂交瘤所表达的使用, 它可以结合到分子, 如聚乙二醇(PEG)以改变它的性质, 或者可以分离编码它的 cDNA, 测序并以多种方法操作。杂交瘤技术包括本领域已知的和 Harlow 等人, *Antibodies: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 349 (1988); Hammerling 等人, *Monoclonal Antibodies And T-Cell Hybridomas*, 563-681 (1981)中教导的那些技术。用于产生杂交瘤和单克隆抗体的其他方法是本领域技术人员公知的。

**噬菌体展示技术** 如上面指出的, 通过应用重组 DNA 和噬菌体展示技术可以产生本发明的结合剂。例如, 使用本领域已知的多种噬菌体展示方法可以制备本发明的结合剂, 例如, 抗 SFRP-4 抗体。在噬菌体展示方法中, 功能抗体结构域被展示在噬菌体颗粒的表面上, 所述噬菌体颗粒携带编码它们的多核苷酸序列。通过用抗原, 通常结合到或被捕获到固体表面或小珠的抗原直接选择, 从所有组成成分或组合抗体文库(例如, 人或鼠)选择具有希望的结合性质的噬菌体。用于这些方法中的噬菌体通常是丝状噬菌体, 包括 fd 和 M13, Fab、Fv 或二硫键稳定的 Fv 抗体结构域重组融合到噬菌体基因 III 或基因 VIII 蛋白。此外, 方法可以适于构建 Fab 表达文库(见, 例如, Huse, 等人, *Science* 246: 1275-1281, 1989)以允许快速和有效鉴定对 SFRP-4 多肽具有希望的特异性的单克隆 Fab 片段, 例如, 多肽或其衍生物、片段、类似物或同源物。可以用于制备本发明结合剂的噬菌体展示方法的其他实例包括在 Huston 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.*, 85: 5879-5883, 1988; Chaudhary 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.*, 87: 1066-1070, 1990; Brinkman 等人, *J. Immunol. Methods* 182: 41-50,

1995; Ames 等人, *J. Immunol. Methods* 184: 177-186, 1995; Kettleborough 等人, *Eur. J. Immunol.* 24: 952-958, 1994; Persic 等人, *Gene* 187: 9-18, 1997; Burton 等人, *Advances in Immunology* 57: 191-280, 1994; PCT/GB91/01134; WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; WO96/06213; WO92/01047 (Medical Research Council 等人); WO97/08320 (Morphosys); WO92/01047 (CAT/MRC); WO91/17271 (Affymax); 和美国专利号 5,698,426、5,223,409、5,403,484、5,580,717、5,427,908、5,750,753、5,821,047、5,571,698、5,427,908、5,516,637、5,780,225、5,658,727 和 5,733,743 中公开的那些。Lohning, 美国专利号 6,753,136 已经描述了通过用二硫键连接多肽将多肽在噬菌体颗粒表面上展示的方法。如上面的参考文献中所述, 噬菌体选择后, 可以从噬菌体分离抗体编码区并用于产生完整抗体, 包括人抗体, 或者任何其他希望的抗原结合片段, 并在任何希望的宿主(包括哺乳动物细胞、昆虫细胞、植物细胞、酵母和细菌)中表达。例如, 使用本领域已知的方法, 如 WO 92/22324; Mullinax 等人, *BioTechniques* 12: 864-869, 1992; 和 Sawai 等人, *AJRI* 34: 26-34, 1995; 和 Better 等人, *Science* 240: 1041-1043, 1988 中公开的那些方法, 也可以使用重组产生 Fab、Fab'和 F(ab')<sub>2</sub> 片段的技术。

通常, 可以针对合适的抗原选择被克隆到展示载体中的杂交抗体或杂交抗体片段以便鉴定保持良好的结合活性的变体, 因为抗体或抗体片段将存在于噬菌体或噬菌粒颗粒的表面上。见例如, Barbas III 等人, *Phage Display, A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001)。然而, 其他载体形式可以用于该方法, 如将抗体片段文库克隆到裂解性噬菌体载体(修饰的 T7 或 λZap 系统)用于选择和/或筛选。

**编码 Sfrp-4-结合剂的核酸的文库。** 上面的方法得到编码 SFRP-4 结合剂, 例如, 抗 SFRP-4 抗体链的核酸序列的文库, 所述 SFRP-4 结合剂对 SFRP-4 多肽或 SFRP-4 样多肽具有特定亲和力。核酸文库通常具有至少 5、

10、20、50、100、1000、 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$ 或 $10^9$ 个不同的成员。通常，单个成员不构成文库中总的序列的25%或50%以上。通常，至少25%、50%、75%、90%、95%、99%或99.9%的文库成员编码对SFRP-4多肽或SFRP-4样多肽具有特定亲和力的SFRP-4结合剂。在双链抗SFRP-4抗体文库的情况下，认为分别编码重链和轻链的一对核酸区段是文库成员。核酸文库可以以游离形式存在，作为任一载体的组分或者作为载体的组分被转染到宿主细胞中。Wigler等人，美国专利号6,303,313; 6,479,243已经描述了可用于产生基因文库的不需要体内步骤的方法，所述基因编码抗原结合分子或抗体。

**重组SFRP-4结合剂的表达** 如上文指出，通过应用重组DNA技术可以产生本发明的结合剂。编码本发明的SFRP-4结合剂的重组多核苷酸构建体通常包括有效连接到抗SFRP-4抗体链的编码序列的表达控制序列，包括天然结合的或者异源启动子区。同样地，本发明的另一方面包括含有编码本发明的SFRP-4结合剂的一种或多种核酸序列的载体。为了重组表达一种或多种本发明的多肽，通过本领域公知并且如下文详述的重组DNA技术，将含有编码SFRP-4结合剂的核苷酸序列的全部或部分的核酸插入到合适的克隆载体，或者表达载体（例如，含有转录和翻译所插入的多肽编码序列的必要元件的载体）中。Lerner等人，美国专利号6,291,160; 6,680,192已经描述了产生载体的不同群体的方法。

通常，用于重组DNA技术的表达载体通常是质粒的形式。一旦载体已经被掺入到合适的宿主中，就在适于高水平表达编码SFRP-4结合剂的核苷酸序列的条件下保持宿主，并收集和纯化SFRP-4结合剂，例如，交叉反应性抗SFRP-4抗体。一般见美国申请号20020199213。载体也可以编码信号肽，例如，果胶酸裂合酶，所述信号肽用于指导细胞外抗体片段的分泌。见美国专利号5,576,195。

本发明的重组表达载体包含编码具有SFRP-4结合性质的化合物的核酸，所述载体为适于在宿主细胞中表达所述核酸的形式，这意味着该重组表达载体包括有效连接到待表达的核酸序列的一种或多种调节序列，所述

调节序列是基于将用于表达的宿主细胞选择的。此类调节序列描述于例如 Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology*, 185 (Academic Press, San Diego, Calif., 1990)。在一个实施方案中, 编码本发明的 SFRP-4 结合剂的多核苷酸有效连接到 *ara B* 启动子并在宿主细胞中表达。见美国专利 5,028,530。可以将本发明的表达载体导入宿主细胞, 从而产生如本文所述的核酸编码的多肽或肽, 包括融合多肽(例如, SFRP-4 结合剂, 等等)。

本发明的另一方面涉及表达 SFRP-4 结合剂的宿主细胞, 其含有编码一种或多种 SFRP-4 结合剂的核酸。可以设计本发明的重组表达载体用于在原核或真核细胞中表达 SFRP-4 结合剂。例如, 可以在细菌细胞如大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、昆虫细胞(使用杆状病毒表达载体)、真菌细胞, 例如, 酵母、酵母细胞或哺乳动物细胞中表达 SFRP-4 结合剂。合适的宿主细胞在 Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology*, 185 (Academic Press, San Diego, Calif., 1990) 中进一步讨论。备选地, 可以例如使用 T7 启动子调节序列和 T7 聚合酶, 在体外转录和翻译重组表达载体。已经描述了通过表达随机产生的多核苷酸序列用于制备筛选具有预定性质的多肽(例如, SFRP-4 结合剂)的方法。见美国专利号 5,763,192; 5,723,323; 5,814,476; 5,817,483; 5,824,514; 5,976,862; 6,492,107; 6,569,641。

最通常用载体在大肠杆菌中进行原核生物中多肽的表达, 所述载体含有指导融合或非融合多肽的表达的组成型或诱导型启动子。典型的融合表达载体包括 pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith & Johnson, *Gene* 67: 31-40 (1988)), pMAL (New England Biolabs, Beverly, Mass.) 和 pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, N.J.), 其分别将谷胱甘肽 S-转移酶(GST)、麦芽糖 E 结合多肽, 或者多肽 A 融合到目标重组多肽。

合适的诱导型非融合大肠杆菌表达载体的实例包括 pTrc (Amrann 等人, (1988) *Gene* 69: 301-315) 和 pET 11d (Studier 等人, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology*, 185 (Academic Press, San Diego,

Calif., 1990) pp. 60-89)。Pack 等人, 美国专利号 6,294,353; 6,692,935 已经描述了通过多肽融合定向装配不同的活性肽或蛋白质结构域以产生多功能多肽的方法。在大肠杆菌中使重组多肽如 SFRP-4 结合剂的表达最大化的一种策略是在蛋白酶解切割该重组多肽的能力受损的宿主细菌中表达该多肽。见例如, Gottesman, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology*, 185 (Academic Press, San Diego, Calif., 1990) pp. 119-128。另一种策略是改变将插入到表达载体的核酸的核酸序列使得每个氨基酸的各密码子为在表达宿主如大肠杆菌中被优先利用的那些密码子(见例如, Wada, 等人, *Nucl. Acids Res.* 20: 2111-2118, 1992)。可以通过标准 DNA 合成技术进行本发明的核酸序列的此类改变。

在另一实施方案中, SFRP-4 结合剂表达载体是酵母表达载体。用于在酵母酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中表达的载体的实例包括 pYepSec1 (Baldari, 等人, 1987. *EMBO J.* 6: 229-234), pMFa (Kurjan & Herskowitz, *Cell* 30: 933-943, 1982), pJRY88 (Schultz 等人, *Gene* 54: 113-123, 1987), pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, Calif.), 和 picZ (InVitrogen Corp, San Diego, Calif.)。备选地, 可以使用杆状病毒表达载体在昆虫细胞中表达 SFRP-4 结合剂。可用于在培养的昆虫细胞(例如, SF9 细胞)中表达多肽如 SFRP-4 结合剂的杆状病毒载体包括 pAc 系列(Smith, 等人, *Mol. Cell. Biol.* 3: 2156-2165, 1983)和 pVL 系列(Lucklow & Summers, *Virology* 170: 31-39 (1989))。

在再一个实施方案中, 使用哺乳动物表达载体在哺乳动物细胞中表达编码本发明的 SFRP-4 结合剂的核酸。哺乳动物表达载体的实例包括例如, 但不限于, pCDM8 (Seed, *Nature* 329: 840, 1987)和 pMT2PC (Kaufman 等人, *EMBO J.* 6: 187-195, 1987)。当用于哺乳动物细胞中时, 通常通过病毒调节元件提供表达载体的控制功能。例如, 常用的启动子来自多瘤、腺病毒 2、巨细胞病毒, 和猿猴病毒 40。对于可用于表达本发明的 SFRP-4 结合剂的用于原核和真核细胞两者中的其他合适的表达系统, 见例如, Sambrook 等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 第二版的第 16

和 17 章 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989)。

在另一实施方案中, 重组哺乳动物表达载体能够指导核酸优先在特定细胞类型中表达(例如, 用组织特异性调节元件表达所述核酸)。组织特异性调节元件是本领域已知的。合适的组织特异性启动子的非限制性实例包括白蛋白启动子(肝脏特异的; Pinkert, 等人, *Genes Dev.* 1: 268-277 (1987)), 淋巴特异性启动子(Calame & Eaton, *Adv. Immunol.* 43: 235-275 (1988)), 尤其 T 细胞受体的启动子 (Winoto & Baltimore, *EMBO J.* 8: 729-733 (1989)) 和免疫球蛋白的启动子 (Banerji, 等人, *Cell* 33: 729-740 (1983); Queen & Baltimore, *Cell* 33: 741-748 (1983)), 神经元特异性启动子(例如, 神经丝启动子; Byrne & Ruddle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5473-5477 (1989)), 胰腺特异性启动子(Edlund 等人, *Science* 230: 912-916 (1985)), 和乳腺特异性启动子(例如, 乳清启动子; 美国专利号 4,873,316 和欧洲申请公布号 264,166)。也包括发育调节的启动子, 例如, 鼠 *hox* 启动子(Kessel & Gruss, *Science* 249: 374-379 (1990)) 和甲胎蛋白启动子(Campes & Tilghman, *Genes Dev.* 3: 537-546 (1989))。

本发明的另一方面涉及宿主细胞, 其中已经在该宿主细胞中导入了本发明的重组表达载体。宿主细胞可以是任何原核或真核细胞。例如, SFRP-4 结合剂可以在细菌细胞如大肠杆菌、昆虫细胞、酵母或哺乳动物细胞中表达。哺乳动物细胞是用于表达编码免疫球蛋白或其片段的核苷酸区段的优选宿主。见 Winnacker, *From Genes To Clones*, (VCH Publishers, NY, 1987)。

用于转化或转染宿主细胞的合适的方法可以见 Sambrook, *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd Ed.* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989), 和其他实验室手册。

重组多肽的纯化是本领域公知的并且包括硫酸铵沉淀、亲和层析纯化技术、柱层析、离子交换纯化技术、凝胶电泳等等(一般见 Scopes, *Protein Purification* (Springer-Verlag, N.Y., 1982))。

核酸的表达以提供多克隆抗 SFRP-4 抗体的文库。可以表达核酸文库以产生对 SFRP-4 多肽或 SFRP-4 样多肽具有特异亲和力的 SFRP-4 结合剂（如抗 SFRP-4 结合抗体）的多克隆文库。从核苷酸文库的组成确定此类文库的组成。从而，此类文库通常具有具有不同氨基酸组成的至少 5、10、20、50、100、1000、 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$  或  $10^9$  个成员。通常，单个成员不构成文库中总的多肽的 25% 或 50% 以上。抗 SFRP-4 抗体链文库中对 SFRP-4 多肽或 SFRP-4 样多肽具有特异亲和力的抗 SFRP-4 抗体的百分比通常低于编码抗 SFRP-4 抗体链的对应核酸的百分比。该差异是由于并不是所有多肽都折叠成适合结合的结构这一事实，尽管它们具有支持适当折叠的合适的一级氨基酸序列。在一些文库中，至少 25%、50%、75%、90%、95%、99% 或 99.9% 的抗 SFRP-4 抗体链对目标分子具有特异亲和力。再一次，在多链抗体文库中，认为每个抗 SFRP-4 抗体（如 Fab 或完整抗体）是文库成员。不同的抗 SFRP-4 抗体链在它们对靶标的良好结合特异性和亲和性方面相互不同。一些此类文库包含结合相同抗原（如 SFRP-4 多肽）上不同表位的成员。此类文库可以包含至少两个成员，这些成员结合相同的抗原而不相互竞争。

上面方法得到的人抗 SFRP-4 抗体的多克隆文库与人抗体的天然群体的区别在于本文库中高百分比的高亲和力结合剂，以及本文库通常不显示出天然群体中存在的抗体的相同的多样性。多样性降低的文库可以来自非人类转基因动物，该动物提供不包括所有人免疫球蛋白基因的来源材料。例如，一些多克隆抗体文库没有具有  $\lambda$  轻链的抗 SFRP-4 抗体。本发明的一些抗 SFRP-4 多克隆抗体文库具有由少于 10、20、30 或 40 种  $V_H$  基因编码的抗体重链。本发明的一些多克隆抗 SFRP-4 抗体文库具有由少于 10、20、30 或 40 种  $V_L$  基因编码的抗体轻链。

**单链抗体** 在一个实施方案中，本发明的结合剂是单链抗 SFRP-4 抗体。根据本发明，可以改造技术用于产生对 SFRP-4 多肽特异的单链抗体（见例如，美国专利号 4,946,778）。可以用于产生本发明的单链 Fv 和抗体的技术的实例包括美国专利号 4,946,778 和 5,258,498; Huston 等人，

*Methods in Enzymology*, 203: 46-88, 1991; Shu, L. 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 7995-7999, 1993;和 Skerra 等人, *Science* 240: 1038-1040, 1988 中描述的那些。

**嵌合和人源化抗体** 在一个实施方案中, 本发明的结合剂是嵌合抗 SFRP-4 抗体。在一个实施方案中, 本发明的结合剂是人源化的抗 SFRP-4 抗体。在本发明的一个实施方案中, 供体和受体抗体是来自不同物种的单克隆抗体。例如, 受体抗体是人抗体(以减小它在人体中的抗原性), 在该情况下, 所得的 CDR 嫁接的抗体被称作“人源化”抗体。

包含人和非人部分的重组抗 SFRP-4 抗体(如嵌合的和人源化单克隆抗体)可以用标准重组 DNA 技术制备, 在本发明的范围内。对于一些用途, 包括本发明的结合剂在人类中的体内用途以及这些结合剂在体外检测测定法中的用途, 优选使用嵌合的、人源化的或人的抗 SFRP-4 抗体。此类嵌合和人源化的单克隆抗体可以通过本领域已知的重组 DNA 技术产生。此类有用的方法包括, 例如, 但不限于, 国际申请号 PCT/US86/02269; 美国专利号 5,225,539; 欧洲专利申请号 184,187; 欧洲专利申请号 171,496; 欧洲专利申请号 173,494; PCT 国际申请号 WO 86/01533; 美国专利号 4,816,567; 5,225,539; 欧洲专利申请号 125,023; Better, 等人, 1988. *Science* 240: 1041-1043; Liu, 等人, 1987. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 3439-3443; Liu, 等人, 1987. *J. Immunol.* 139: 3521-3526; Sun, 等人, 1987. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 214-218; Nishimura, 等人, 1987. *Cancer Res.* 47: 999-1005; Wood, 等人, 1985. *Nature* 314: 446-449; Shaw, 等人, 1988. *J. Natl. Cancer Inst.* 80: 1553-1559; Morrison (1985) *Science* 229: 1202-1207; Oi, 等人 (1986) *BioTechniques* 4: 214; Jones, 等人, 1986. *Nature* 321: 552-525; Verhoeyan, 等人, 1988. *Science* 239: 1534; Morrison, *Science* 229: 1202, 1985; Oi 等人, *BioTechniques* 4: 214, 1986; Gillies 等人, *J. Immunol. Methods*, 125: 191-202, 1989; 美国专利号 5,807,715;和 Beidler, 等人, 1988. *J. Immunol.* 141: 4053-4060 中描述的方法。例如, 可以使用多种技术人源化抗体, 所述技术包括 CDR 嫁接(EP 0 239 400; WO 91/09967;

美国专利号 5,530,101; 5,585,089; 5,859,205; 6,248,516; EP460167), 贴面或表面重建 (EP 0 592 106; EP 0 519 596; Padlan E. A., *Molecular Immunology*, 28: 489-498, 1991; Studnicka 等人, *Protein Engineering* 7: 805-814, 1994; Roguska 等人, *PNAS* 91: 969-973, 1994), 和链改组 (美国专利号 5,565,332)。在一个实施方案中, 将编码鼠抗 SFRP-4 单克隆抗体的 cDNA 用特别选择的限制酶消化以除去编码 Fc 恒定区的序列, 并用编码人 Fc 恒定区的 cDNA 的等同部分代替 (见 Robinson 等人, PCT/US86/02269; Akira 等人, 欧洲专利申请 184,187; Taniguchi, 欧洲专利申请 171,496; Morrison 等人, 欧洲专利申请 173,494; Neuberger 等人, WO 86/01533; Cabilly 等人 U.S. Patent No. 4,816,567; Cabilly 等人, 欧洲专利申请 125,023; Better 等人 (1988) *Science* 240: 1041-1043; Liu 等人 (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 3439-3443; Liu 等人 (1987) *J Immunol* 139: 3521-3526; Sun 等人 (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 214-218; Nishimura 等人 (1987) *Cancer Res* 47: 999-1005; Wood 等人 (1985) *Nature* 314: 446-449; 和 Shaw 等人 (1988) *J Natl Cancer Inst* 80: 1553-1559); 美国专利号 6,180,370; 美国专利号 6,300,064; 6,696,248; 6,706,484; 6,828,422)。

**CDR 抗体。** 在一个实施方案中, 本发明的结合剂是抗 SFRP-4 CDR 抗体。通常, 用于产生抗 SFRP-4 CDR 抗体的供体和受体抗体是来自不同物种的单克隆抗体; 通常, 受体抗体是人抗体 (以减小它在人体中的抗原性), 在该情况下, 所得的 CDR 嫁接的抗体被称作“人源化”抗体。嫁接可以是受体抗体的单个  $V_H$  或  $V_L$  内单个 CDR (或甚至单个 CDR 的部分) 的嫁接, 或者可以是  $V_H$  和  $V_L$  的一个或两者内多个 CDR (或其部分) 的嫁接。通常, 受体抗体的所有可变结构域中所有三个 CDR 将被对应的供体 CDR 替代, 尽管仅仅需要替代必要数目的 CDR 以允许所得的 CDR 嫁接的抗体与 MetAp3 的足够结合。产生 CDR 嫁接的和人源化抗体的方法由 Queen 等人 美国专利号 5,585,089, 美国专利号 5,693,761; 美国专利号 5,693,762; 和 Winter U.S. 5,225,539; 和 EP 0682040 教导。用于制备  $V_H$

和 V<sub>L</sub> 多肽的方法由 Winter 等人, 美国专利号 4,816,397; 6,291,158; 6,291,159; 6,291,161; 6,545,142; EP 0368684; EP0451216; EP0120694 教导。

从相同家族和/或相同的家族成员选择合适的构架区候选者后, 通过将来自最初物种的 CDR 嫁接到杂交构架区产生重链和轻链可变区之一或两者。关于任一上面的方面具有杂交可变链区的杂交抗体或杂交抗体片段的装配可以使用本领域技术人员已知的常规方法完成。例如, 通过寡核苷酸合成和/或 PCR 可以产生编码本文所述的杂交可变结构域的 DNA 序列(即, 基于目标物种的构架区和来自最初物种的 CDR)。也可以使用合适的限制酶从最初的物种抗体分离编码 CDR 区的核酸并将其通过用合适的连接酶连接而连接到目标物种构架中。备选地, 通过位点定向诱变可以改变最初物种抗体的可变链的构架区。

因为从对应于每个构架区的多个候选者的选择构架杂种, 所以根据本文所述的原理构建导致存在序列的许多组合。因此, 可以装配杂种文库, 该文库的成员具有各构架区的不同组合。此类文库可以是序列的电子数据库集合或者杂种的物理集合。

该方法通常不改变嫁接的 CDR 侧翼的受体抗体的 FR。然而, 通过替换给定 FR 的某些残基以使得 FR 与供体抗体的对应 FR 更相似, 有时可以提高所得抗 SFRP-4 CDR 嫁接的抗体的抗原结合亲和力。优选的替代位置包括与 CDR 相邻或者能够干扰 CDR 的氨基酸残基(见例如, US 5,585,089, 特别是 12-16 栏)。或者可以用供体 FR 开始并将其修饰使得与受体 FR 或者人共有 FR 更相似。用于进行这些修饰的技术是本领域已知的。尤其, 如果所得的 FR 对于该位置适合人共有 FR, 或者与这种共有 FR 有至少 90% 或以上同一性, 那么这样做与具有完全人 FR 的相同抗体相比不会显著增加所得经修饰的抗 SFRP-4 CDR 抗体的抗原性。

通过 T 细胞表位修饰对治疗蛋白的去免疫。已经表明临床使用的许多治疗蛋白引起不想要的抗体应答, 其在一些情况中与不利事件有关。在本发明的一个实施方案中, 使得重组的抗 SFRP-4 抗体、SFRP-4 多肽或 SFRP-4 结合剂对于给定物种是非免疫原性的或者免疫原性降低的, 这可以

通过在它们的氨基酸序列中鉴定给定物种 T 细胞的一个或多个潜在表位并修饰该氨基酸序列以去除至少一个 T 细胞表位来实现。当暴露于所述给定物种的免疫系统时，这消除或减小了多肽或蛋白质的免疫原性。单克隆抗体和其他免疫球蛋白样分子从这种去免疫方法中尤其受益，例如，可以将小鼠来源的免疫球蛋白去免疫用于人类治疗用途。关于本领域中去免疫多肽或蛋白质的方法，见例如，Carr, 等人 美国专利申请 20030153043; 和 De Groot, 等人, *AIDS Res. and Human Retroviruses* 13: 539-541 (1997); Schafer, 等人, *Vaccine* 16: 1880-1884 (1998); De Groot, 等人, *Dev. Biol.* 112: 71-80 (2003); De Groot, 等人, *Vaccine* 19: 4385-4395 (2001); Reijonen 和 Kwok *Methods* 29: 282-288; Novak, 等人, *J. Immunology* 166: 6665-6670 (2001)。

**特应抗体** 通过本领域已知的技术可以产生含有 SFRP-4 多肽的独特型的抗体片段，所述片段包括但不限于：(i) 通过抗体分子的胃蛋白酶消化产生的 F(ab')<sub>2</sub> 片段；(ii) 通过还原 F(ab')<sub>2</sub> 片段的二硫键产生的 Fab 片段；(iii) 通过用木瓜蛋白酶和还原性化合物处理抗体分子产生的 Fab 片段；和 (iv) Fv 片段。见例如，Greenspan 等人, *FASEB J.* 7: 437-444, 1993 和 Nissinoff, *J. Immunol.* 147: 2429-2438, 1991。例如，结合并竞争性抑制多肽多聚化和/或本发明多肽与配体的结合的抗体可以用于产生抗独特型，该抗独特型“模拟”多肽多聚化和/或结合结构域，并且结果，结合并中和目标多肽和/或它的配体。这种中和性抗独特型或这种抗独特型的 Fab 片段可以用于治疗方案中中和目标多肽配体。例如，这种抗独特型抗体可以用于结合本发明的多肽和/或结合到它的配体/受体，从而调节，例如，相对于不存在抗独特型抗体时观察到的生物活性水平，增加或减小目标多肽生物活性。

**融合蛋白** 在一个实施方案中，本发明的结合剂是融合蛋白。加入肽部分以方便多肽的处理是本领域熟悉的和常规技术。本发明的 SFRP-4 结合剂可以融合到标志序列，如方便融合多肽纯化的肽。在优选实施方案中，标志氨基酸序列是六聚组氨酸肽，如 pQE 载体中提供的标记(QIAGEN,

Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, Calif., 91311), 它们的许多是可以通过商业途径得到的。如 Gents 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 821-824, 1989 中所述, 六聚组氨酸提供了融合蛋白的方便的纯化。在用于纯化的肽标记中, “HA”标记对应于来自流感血细胞凝集素蛋白的表位。Wilson 等人, *Cell* 37: 767, 1984。

从而, 使用本发明的多核苷酸或多肽可以工程化这些上面的融合物的任一种。而且, 融合蛋白可以显示出增加的体内半寿期。

具有二硫键连接的二聚体结构(由于 IgG)的融合蛋白在结合和中和其他分子中可以比仅仅单体分泌型蛋白或蛋白片段更有效。Fountoulakis 等人, *J. Biochem.* 270: 3958-3964, 1995。

类似地, EP-A-O 464 533 (加拿大同族专利 2045869)公开了融合蛋白, 其包含免疫球蛋白分子的恒定区的多种部分以及另一人蛋白质或其部分。在许多情况中, 融合蛋白中 Fc 部分在治疗和诊断中是有益的, 从而可以导致例如, 改善的药物代谢动力学性质。见 EP-A 0232 262。备选地, 融合蛋白被表达、检测和纯化后, 将希望缺失 Fc 部分。例如, 如果将融合蛋白用作免疫的抗原, 那么 Fc 部分可以阻碍治疗和诊断。在药物发现中, 例如, 已经将人蛋白质, 如 hIL-5 与 Fc 部分融合用于高通量筛选测定以鉴定 hIL-5 的拮抗剂。Bennett 等人, *J. Molecular Recognition* 8: 52-58, 1995; K. Johanson 等人, *J. Biol. Chem.*, 270: 9459-9471, 1995。

在一个实施方案中, 使用编码候选结合剂的基因组 DNA 或 EST 作为融合蛋白的部分制备本发明的 SFRP-4 结合剂, 所述融合蛋白当在宿主细胞中表达时形成内含体。已经描述了可用于制备基因组 DNA 或 EST 的方法, 所述基因组 DNA 或 EST 编码作为融合蛋白的部分(其当在宿主细胞中表达时形成内含体)的候选结合剂。见美国专利号 6,653,068; U.S.S.N. 20040157291。例如, 内含体可用于产生结合剂, 例如, SFRP-4 结合剂, 其特异结合目标(多)肽。

**SFRP-4-结合剂缀合蛋白。** 如上面指出, 在一些优选实施方案中, 本发明的 SFRP-4 结合剂是抗 SFRP-4 抗体, 其偶联或缀合到一种或多种治

疗或细胞毒性剂以产生本发明的 SFRP-4 结合剂缀合蛋白。任选地，本发明的 SFRP-4 结合剂用作 SFRP-4 结合剂 - 细胞毒素缀合分子，如通过施用用于治疗癌性疾病所示例。本领域技术人员将显而易见的是，多种双功能或多功能试剂（同或异功能的（如在 Pierce Chemical Co., Rockford, IL. 的目录中描述的那些）可以用作接头基团。例如，通过氨基、羧基、巯基或者氧化的糖类残基可以实现偶联（见例如，美国专利号 4,671,958）。

作为备选的偶联方法，例如，可以通过糖基化位点的氧化的糖类基团将部分偶联到本发明的 SFRP-4 结合剂，如美国专利号 5,057,313 和 5,156,840 中所述。将 SFRP-4 结合剂偶联到部分的再一个备选方法是通过使用非共价结合对，如链霉抗生物素蛋白/生物素，或者抗生物素蛋白/生物素。在这些实施方案中，所述对的一个成员共价偶联到 SFRP-4 结合剂并且结合对的另一成员共价偶联到所述部分。

**可切割的接头。** 当细胞毒性或治疗部分没有本发明的免疫缀合物的 SFRP-4 结合部分时更有效时，可以希望使用接头基团，该接头基团在内化到细胞期间或之时可以被切割，或者在细胞外环境中随时间被逐渐切割。已经描述了许多不同的可切割的接头基团。细胞毒性部分从这些接头基团的细胞内释放的实例包括例如，但不限于，通过二硫键的还原切割（例如，美国专利号 4,489,710），通过光不稳定键的照射（例如美国专利号 4,625,014），通过衍生化的氨基酸侧链的水解（例如，美国专利号 4,638,045），通过血清补体介导的水解（例如，美国专利号 4,671,958），和酸催化的水解（例如，美国专利号 4,569,789）切割。

在一个实施方案中，本发明的 SFRP-4 结合剂偶联到一个以上的治疗、细胞毒性和/或成像部分。通过多衍生化本发明的 SFRP-4 结合剂，可以同时实现几种细胞毒性策略，SFRP-4 结合剂可以用作几种显影技术的造影剂，或者可以标记治疗抗体用于通过显影技术示踪。在一个实施方案中，细胞毒性部分的多个分子偶联到一个 SFRP-4 结合剂。在一个实施方案中，本发明的 SFRP-4 结合剂偶联到选自：细胞毒性部分；治疗部分和标记/成像部分的至少两个部分的混合物。即，一种以上类型的部分可以偶联到一

种 SFRP-4 结合剂。例如，治疗部分，如多核苷酸或反义序列可以缀合到连接化学毒性或放射毒性部分的 SFRP-4 结合剂，以增加化学或放射毒性疗法的有效性，以及降低得到希望的治疗效果必需的剂量。不管具体的实施方案，可以以多种方法制备具有一个以上部分的免疫缀合物。例如，一个以上的部分可以直接偶联到 SFRP-4 结合剂，或者可以使用提供多个附着位点的接头（例如，树状聚体）。备选地，可以使用能够容纳一种以上细胞毒性部分的载体。

如上面解释的，SFRP-4 结合剂可以以多种方式带有所述部分，包括直接或通过接头基团共价结合，和非共价结合。在一个实施方案中，SFRP-4 结合偶联的蛋白可以与包裹载体组合。这在化学毒性治疗实施方案中尤其有用，因为它们可以允许治疗组合物随时间逐渐释放 SFRP-4 结合剂化学毒性部分而将其在靶细胞附近浓缩。

**缀合放射性核素的 SFRP-4-结合剂。** 在一个实施方案中，本发明的 SFRP-4 结合剂偶联细胞毒性部分，该细胞毒性部分为放射性核素。用作本发明的细胞毒性部分的优选的放射性核素是适于药理学施用的放射性核素。

**化学毒性部分。** 在一个实施方案中，本发明的 SFRP-4 结合剂偶联化学毒性部分。用于本发明的优选的化学毒性剂包括，但不限于，小分子药物，如甲氨蝶呤，和嘧啶和嘌呤类似物。

**蛋白质毒素。** 在一个实施方案中，本发明的 SFRP-4 结合剂偶联蛋白质毒素部分。用作本发明的细胞毒性部分的优选的毒素蛋白质包括，例如，但不限于，放线菌属 (*Actinomycetes*) 或链霉菌属 (*Streptomyces*) 抗生素、多卡米星、紫杉醇、细胞松弛素 B、短杆菌肽 D、溴化乙锭、吐根碱、丝裂霉素、依托泊苷、替尼泊苷、长春新碱、长春碱、秋水仙素、阿霉素、柔红霉素、二羟基炭疽杆菌素 didne、米托蒽醌、光辉霉素、放线菌素 D、1-去氢睾酮、糖皮质激素类、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、普萘洛尔，和嘌呤霉素和其类似物或同系物。用作细胞毒性部分的优选的毒素蛋白质还包括蓖麻毒蛋白、相思豆毒蛋白、白喉毒素、霍乱毒素、多花白树毒蛋

白、假单胞菌外毒素、志贺氏菌毒素、美洲商陆抗病毒蛋白、和医学生物化学领域中已知的其他毒素蛋白。由于这些毒素物质可以在受试者中引起不希望的免疫应答（尤其静脉内注射时），所以优选将它们包裹在载体中由于偶联到本发明的 SFRP-4 结合剂，例如，本发明的 SFRP-4 抗体和抗体相关的多肽。

**酶促活性毒素。** 在一个实施方案中，本发明的 SFRP-4 结合剂与酶促活性毒素偶联。酶促活性毒素可以是细菌或植物来源的，或者是这种毒素的酶促活性片段（“A 链”）。用于本发明的酶促活性毒素和其片段是白喉 A 链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素 A 链（来自铜绿假单胞菌（*Pseudomonas aeruginosa*））、蓖麻毒蛋白 A 链、相思豆毒蛋白 A 链、塑莲根毒蛋白 IIA 链、 $\alpha$ -帚曲毒素、油桐（*Aleurites fordii*）蛋白、香石竹毒蛋白、美洲商陆（*Phytolacca americana*）蛋白（PAPI、PAPII 和 PAP-S）、苦瓜（*Momordica charantia*）抑制剂、麻风树毒蛋白、巴豆毒蛋白、*Saponaire officinalis* 抑制剂、多花白树毒蛋白、丝林霉素（mitogellin）、局限曲菌素、酚霉素和伊诺霉素。使用多种双功能蛋白偶联剂制备本发明的 SFRP-4 结合剂与细胞毒性部分的缀合物。此类试剂的实例是 SPDP、IT、亚氨酸酯的双功能衍生物，如二甲基己二酸 HCl，活性酯，如辛二酸二琥珀酰亚胺酯、醛类，如戊二醛、二-叠氮基化合物，如二（对-叠氮基苯甲酰基）己二胺、二-重氮化衍生物，如二-（对-二重氮化苯甲酰基）-乙二胺、二异氰酸酯，如 2,6-二异氰酸亚苯酯，和双活性氟化合物，如 1,5-二氟-2,4-二硝基苯。毒素的裂解部分可以结合抗体，如 SFRP-4 结合剂的 Fab 部分。

**治疗部分。** 在一个实施方案中，本发明的 SFRP-4 结合剂与治疗部分偶联。用于将此类治疗部分缀合到本发明的 SFRP-4 结合剂的技术是公知的。见例如，Arnon 等人，“Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy”，in *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld 等人 (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom 等人，“Antibodies For Drug Delivery”，in *Controlled Drug Delivery (2nd Ed.)*,

Robinson 等人 (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera 等人 (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin 等人 (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), 和 Thorpe 等人, "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.*, 62: 119-58 (1982).

标记的 SFRP-4-结合剂。在一个实施方案中, 本发明的 SFRP-4 结合剂与标记部分, 如可检测的基团偶联。缀合到本发明的 SFRP-4 结合剂的具体标记或可检测的基团不是本发明的关键方面, 只要它不显著干扰本发明的 SFRP-4 结合剂与 SFRP-4 多肽或 SFRP-4 样多肽的特异结合。可检测基团可以是具有可检测的物理或化学性质的任何物质。此类可检测标记已经在免疫测定和成像领域中是成熟的, 通常, 可用于此类方法的多数任何标记可以用于本发明。从而, 标记是通过分光、光化学、生物化学、免疫化学、电学、光学或化学手段可检测的任何组分。在本发明有用的标记包括磁珠 (例如, Dynabeads™)、荧光染料 (例如, 异硫氰酸荧光素、德克萨斯红、罗丹明, 等等), 放射性标记 (例如,  $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{121}\text{I}$ 、 $^{112}\text{In}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ), 其他成像剂, 如微泡 (用于超声成像)、 $^{18}\text{F}$ 、 $^{11}\text{C}$ 、 $^{15}\text{O}$ 、(用于正电子成像术)、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{111}\text{In}$  (用于单光子发射成像术)、酶 (例如, 辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶和 ELISA 中常用的其他酶), 和量热标记, 如胶体金或有色玻璃或塑料 (例如, 聚苯乙烯、聚丙烯、乳胶, 等等) 珠。描述此类标记的用途的专利包括美国专利号 3,817,837; 3,850,752; 3,939,350; 3,996,345; 4,277,437; 4,275,149; 和 4,366,241, 将它们每个都完整地并且为了所有目的引入本文作为参考。也见 *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals* (第六版, Molecular Probes, Inc., Eugene OR.)。

标记可以直接或间接偶联到根据本领域公知方法的测定法的希望的组分。如上面指出，可以使用多种标记，标记的选择取决于所需的灵敏度、用化合物缀合的容易性、稳定性要求、可利用的仪器，和处理规定。

通常通过间接手段附着非放射性标记。通常，将配体分子（例如，生物素）共价结合到分子。然后配体结合到抗配体（例如，链霉抗生物素蛋白）分子，该分子是固有地可检测的或者共价结合到信号系统，如可检测的酶、荧光化合物，或者化学发光化合物。可以使用许多配体和抗配体。当配体具有天然的抗配体，如生物素、甲状腺素和皮质醇时，它可以与经标记的、天然存在的抗配体一起使用。备选地，任何半抗原或抗原化合物可以与抗体，如抗 SFRP-4 抗体联合使用。

也可以将分子直接缀合到产生信号的化合物，例如，通过用酶或荧光团缀合。作为标记的目的酶将只要是水解酶类，尤其磷酸酶、酯酶和糖苷酶，或者氧化还原酶，尤其过氧化物酶。可用作标记部分的荧光化合物包括，但不限于，例如，荧光素和其衍生物，罗丹明和它的衍生物、丹磺酰、伞形酮等等。可用作标记部分的化学发光化合物包括，但不限于，例如，萤光素，和 2,3-二氢酞嗪二酮，例如，鲁米诺。关于可以使用的多种标记系统或产生信号的系统的综述，见美国专利号 4,391,904。

检测标记的手段是本领域技术人员公知的。从而，例如，当标记是放射性标记时，检测手段包括闪烁计数器或如放射自显影中的胶卷。当标记是荧光标记时，它可以通过用合适波长的光激发荧光染料并检测所得的荧光来检测。通过胶卷，使用电子探测器如电荷耦合器件(CCDs)或者光电倍增管等等可以通过视觉检测荧光。类似地，通过为酶提供合适的底物并检测所得的反应产物来检测酶标记。最后，简单的比色标记可以通过观察与该标记相关的颜色来检测。从而，在多种浸渍片测定法中，缀合的金通常呈粉红色，而多种缀合的小珠呈现该小珠的颜色。

一些测定法形式不需要使用标记的组分。例如，凝集测定法可以用于检测目标抗体如抗 SFRP-4 抗体的存在。在该情况中，抗原包被的颗粒被包含目标抗体的样品凝集。在该形式中，没有组分需要被标记并且通过简

单的目测检测目标抗体的存在。

**药物组合物的剂型。** 可以将本发明的 SFRP-4 结合剂掺入到适于施用的药物组合物中。药物组合物通常包含至少一种 SFRP-4 结合剂和适于施用于受试者的形式的可药用载体。通过被施用的具体组合物，以及通过用于施用组合物的具体方法部分决定可药用载体。因此，有多种合适的药物组合物剂型用于施用抗体组合物（见例如，*Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18<sup>th</sup> ed., Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania, 1990）。通常将药物组合物配制为无菌的、基本上等渗的并且完全符合美国食品和药物管理局的优质生产规范（GMP）规定。

术语“可药用的”、“生理学上耐受的”和其语法变型当指组合物、载体、稀释剂和试剂时，可互换使用并且表示所述物质能够施用于受试者而不以将阻止组合物施用的程度产生不希望的生理学效应。例如，“可药用赋形剂”指可用于制备药物组合物的赋形剂，其通常是安全、无毒的和所希望的，并且包括兽医使用和人药物使用可接受的赋形剂。此类赋形剂可以是固体、液体、半固体，或者对于气雾剂组合物的情况，为气体的。“可药用盐和酯”指可药用的并且具有希望的药理学性质的盐和酯。本领域技术人员将没有困难地确定施用本发明的具体药物和组合物的适当定时、顺序和剂量。

此类载体或稀释剂的优选实例包括，但不限于，水、盐水、林格液、葡萄糖溶液，和 5% 人血清白蛋白。也可以使用脂质体和非水性载体，如不挥发油。此类介质和化合物用于药学活性物质的用途是本领域公知的。除了与 SFRP-4 结合剂不相容的常规介质或化合物外，设想其用于组合物中。补充性活性化合物也可以掺入到组合物中。

在一个实施方案中，用载体制备 SFRP-4 结合剂，所述载体将保护 SFRP-4 结合剂免于从身体快速清除，如控释制剂，包括植入物和微囊化的递送系统。可以使用生物可降解的、生物相容的聚合物，如乙烯乙酸乙烯酯、聚酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯、和聚乳酸。制备此类制剂的方法将是本领域技术人员显而易见的。也可以从 Alza Corporation 和 Nova Pharmaceuticals, Inc 通过商业途径获得所述材料。脂质体悬浮液（包括用

抗病毒抗原的单克隆抗体靶向受感染细胞的脂质体)也可以用作可药用载体。这些可以根据本领域技术人员已知的方法制备,如美国专利号4,522,811中所述。

特别有利的是以剂量单位形式配制口服或肠胃外组合物以容易施用和剂量的统一。如本文所用的剂量单位形式指适于作为待治疗的受试者的单一剂量的物理上分散的单位;每个单位含有预定量的结合剂,所述量经计算与所需的药物载体结合产生所希望的治疗效果。本发明的剂量单位形式的规格受到如下因素决定并取决于这些因素:结合剂的独特特征和待实现的具体治疗效果,和配制用于治疗受试者的此类 SFRP-4 结合剂的领域中固有的限制。

本发明的核酸分子可以插入到载体中并用作基因治疗载体。可以通过例如静脉内注射、局部施用(见例如,美国专利号5,328,470)或通过立体定位注射(见例如,Chen,等人,1994. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 3054-3057)向受试者递送基因治疗载体。基因治疗载体的药物制剂可以包括可接受的稀释剂中的基因治疗载体,或者可以包含缓释基质,其中包埋基因递送载体。备选地,当可以从重组细胞完整产生完整的基因递送载体,如逆转录病毒载体时,药物制剂可以包括产生基因递送系统的一种或多种细胞。药物组合物可以与施用说明书一起包括在容器、包装或分配器中。

#### 鉴定和表征本发明的 SFRP-4 结合剂

鉴定 /或筛选本发明的结合剂的方法。可用于鉴定和筛选对 SFRP-4 多肽具有所希望的特异性的结合剂,例如抗 SFRP-4-抗体和抗 SFRP-4 抗体相关多肽的方法包括本领域已知的任何免疫学介导的技术。通过本领域普通技术人员公知的多种方法可以在体外检测免疫应答的组分。例如,(1)可以将细胞毒性 T 淋巴细胞与放射性标记的靶细胞温育并通过放射性的释放检测这些靶细胞的裂解,(2)可以将辅助 T 淋巴细胞与抗原和抗原呈递细胞温育并通过标准方法测量细胞因子的合成和分泌(Windhagen A; 等人, *Immunity*, 2: 373-80, 1995), (3)可以将抗原呈递细胞与完整蛋白质抗

原温育并通过 T 淋巴细胞活化测定法或者生物物理方法检测所述抗原在 MHC 上的呈递(Harding 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 86: 4230-4, 1989), (4) 可以将肥大细胞与交联它们的 Fc- $\epsilon$  受体的试剂温育并通过酶免疫测定法测量组胺释放(Siraganian 等人, *TIPS*, 4: 432-437, 1983);和 (5) 酶联免疫吸附测定法 (ELISA)。

类似地,通过本领域技术人员公知的多种方法也可以检测模型生物(例如,小鼠)或人类受试者中免疫应答的产物。例如,(1) 应答接种的抗体产生可以通过当前用于临床实验室的标准方法如 ELISA 容易地检测;(2) 通过擦伤皮肤表面并放置无菌容器来捕获擦伤部位上迁移的细胞来检测免疫细胞向炎症部位的迁移(Peters 等人, *Blood*, 72: 1310-5, 1988);(3)使用  $^3\text{H}$ -胸苷可以测量应答促分裂原或混合淋巴细胞反应中外周血单核细胞的增殖;(4) 通过将 PBMC 与经标记的颗粒一起置于孔中,可以测量 PBMC 中的粒细胞、巨噬细胞和其他吞噬细胞的吞噬能力(Peters 等人, *Blood*, 72: 1310-5, 1988);和 (5) 通过用抗 CD 分子如 CD4 和 CD8 的抗体标记 PBMC 并测量表达这些标记的 PBMC 的分数来测量免疫系统细胞的分化。

在一个实施方案中,使用候选结合剂在可复制的遗传包装表面上的展示选择本发明的 SFRP-4 结合剂。见例如,美国专利号 5,514,548; 5,837,500; 5,871,907; 5,885,793; 5,969,108; 6,225,447; 6,291,650; 6,492,160; EP 585 287; EP 605522; EP 616640; EP 1024191; EP 589 877; EP 774 511; EP 844 306。已经描述了可用于产生/选择丝状噬菌体颗粒的方法,所述颗粒含有编码具有希望的特异性的结合分子的噬菌粒基因组。见例如, EP 774 511; US 5871907; US 5969108; US 6225447; US 6291650; US 6492160。

在一个实施方案中,使用候选结合剂在酵母宿主细胞表面上的展示来选择本发明的 SFRP-4 结合剂。Kieke 等人, *Protein Eng.* 1997 Nov; 10(11): 1303-10 已经描述了通过酵母表面展示分离 scFv 多肽的方法。

在一个实施方案中,使用核糖体展示选择本发明的 SFRP-4 结合剂。Mattheakis 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 9022-26, 1994; 和 Hanes 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 4937-42, 1997 已经描述了使用核糖体

展示鉴定肽文库中配体的方法。

在一个实施方案中，使用候选结合剂的 tRNA 展示选择本发明的 SFRP-4 结合剂。Merryman 等人, *Chem. Biol.*, 9: 741-46, 2002 已经描述了使用 tRNA 展示在体外选择配体的方法。

在一个实施方案中，使用 RNA 展示选择本发明的 SFRP-4 结合剂。Roberts 等人 *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 94: 12297-302, 1997; 和 Nemoto 等人, *FEBS Lett.*, 414: 405-8, 1997 已经描述了使用 RNA 展示文库选择肽和蛋白质的方法。Frankel 等人, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 13: 506-12, 2003 已经描述了使用非天然 RNA 展示文库选择肽和蛋白质的方法。

在一个实施方案中，本发明的 SFRP-4 结合剂在革兰氏阴性细菌的周质中表达并且与经标记的 SFRP-4 多肽混合。见 WO 02/34886。在表达对 SFRP-4 多肽具有亲合力的重组多肽的克隆中，结合到结合剂的经标记 SFRP-4 的浓度升高并且允许细胞与文库的剩余部分分离，如 Harvey 等人, *Proc. Natl Acad. Sci.* 22: 9193-98 2004 和美国专利号 2004/0058403 中所述。

选择所希望的 SFRP-4 结合剂后，设想通过本领域技术人员已知的任何技术以大体积产生所述结合剂，例如，原核或真核细胞表达等等。可以产生例如但不限于抗 SFRP-4 杂种抗体或其片段的 SFRP-4 结合剂，这可通过使用常规技术构建表达载体来完成（如根据本文所述的技术工程化），所述表达载体编码抗体重链，其中 CDR 和如果需要，可变区构架的最小部分（其是保持最初物种抗体结合特异性所需的）来自最初物种抗体并且抗体的剩余部分来自目标物种免疫球蛋白，其可以如本文所述的操作，从而产生用于表达杂种抗体重链的载体。

**SFRP-4 结合测量。** 在一个实施方案中，SFRP-4 结合测定法指测定法形式，其中将 SFRP-4 多肽和 SFRP-4 结合剂在适于 SFRP-4 多肽和 SFRP-4 结合剂之间结合的条件下混合并评估 SFRP-4 多肽和 SFRP-4 结合剂之间结合的量。将结合的量与合适的对照比较，所述对照可以是不存在 SFRP-4 多肽时结合的量、存在非特异性免疫球蛋白组合物时结合的量或者两者。可以通过任何合适的方法评估结合量。结合测定方法包括例如，

ELISA、放射性受体结合测定法、闪烁亲近测定法、细胞表面受体结合测定法、荧光能量转移测定法、液相层析、膜过滤测定法，等等。用于直接测量 SFRP-4 结合 SFRP-4 结合剂的生物物理测定法为例如，核磁共振、荧光、荧光偏振、表面等离子体共振(BIACOR 芯片)等等。通过本领域已知的标准测定法，如放射性配体结合测定法、ELISA、FRET、免疫沉淀、SPR、NMR (2D-NMR)、质谱法等等测定特异结合。如果候选 SFRP-4 结合剂的特异结合比不存在候选 SFRP-4 结合剂时观察到的结合大至少 1%，那么候选 SFRP-4 结合剂可以用作本发明的 SFRP-4 结合剂。

本发明还提供了 SFRP-4 多肽和 SFRP-4 结合剂的共结晶作为测定分子相互作用的方法。适于 SFRP-4 结合剂和 SFRP-4 之间结合的条件将取决于所述化合物和它的配体并且可以由本领域普通技术人员容易地确定。

**SFRP-4 结合剂生物活性的测量。** 可以将本发明的 SFRP-4 结合剂，如抗 SFRP-4 抗体和抗 SFRP-4 抗体相关多肽指定为包含本文公开的比活性的生物活性的激动剂或拮抗剂。例如，使用本领域已知的方法可以制备为 SFRP-4 结合剂的 SFRP-4 激动剂和拮抗剂。见例如，WO 96/40281；美国专利号 5,811,097；Deng 等人, *Blood* 92: 1981-1988, 1998；Chen 等人, *Cancer Res.*, 58: 3668-3678, 1998；Harrop 等人, *J. Immunol.* 161: 1786-1794, 1998；Zhu 等人, *Cancer Res.*, 58: 3209-3214, 1998；Yoon 等人, *J. Immunol.*, 160: 3170-3179, 1998；Prat 等人, *J. Cell. Sci.*, 111: 237-247, 1998；Pitard 等人, *J. Immunol. Methods*, 205: 177-190, 1997；Liutard 等人, *Cytokine*, 9: 233-241, 1997；Carlson 等人, *J. Biol. Chem.*, 272: 11295-11301, 1997；Taryman 等人, *Neuron*, 14: 755-762, 1995；Muller 等人, *Structure*, 6: 1153-1167, 1998；Bartunek 等人, *Cytokine*, 8: 14-20, 1996。使用已经被开发用来测量 SFRP-4 多肽的生物活性的任一常规体内和体外测定法可以表征 SFRP-4 结合剂的生物活性，即激动剂或拮抗剂性质。

### 本发明的 SFRP-4-结合剂的用途

**概述.** 本发明的结合剂可用于本领域已知的涉及 SFRP-4 多肽的定位和/或定量的方法中（例如，用于测量合适的生理样品中 SFRP-4 多肽的水平，用于诊断方法中，用于成像多肽，等等）。在一个实施方案中，含有抗体来源的结合结构域的 SFRP-4 结合剂用作药理学活性组合物。本发明的结合剂可用于通过标准技术如亲和层析或免疫沉淀分离 SFRP-4 多肽。本发明的 SFRP-4 结合剂可以方便从生物样品如细胞纯化天然的免疫反应性 SFRP-4 多肽或免疫反应性 SFRP-4 样多肽以及在宿主系统中表达的重组产生的免疫反应性 SFRP-4 多肽或 SFRP-4 样多肽。此外，SFRP-4 结合剂可以用于检测免疫反应性 SFRP-4 多肽或免疫反应性 SFRP-4 样多肽（例如，细胞裂解物或细胞上清液中）以便评估免疫反应性多肽的丰度和表达模式。本发明的 SFRP-4 结合剂可以在诊断上用于监测组织中免疫反应性 SFRP-4 多肽水平和/或免疫反应性 SFRP-4 样多肽水平作为临床测试步骤的一部分，例如，以便确定给定治疗方案的功效。如上面指出的，通过将本发明的 SFRP-4 结合剂偶联（如物理连接）到可检测的物质可以方便检测。

**SFRP-4 多肽表达的检测.** 用于检测生物样品中 SFRP-4 多肽或 SFRP-4 样多肽的存在或缺失的示例性方法包括从受试者得到生物样品并将生物样品与能够检测 SFRP-4 多肽或 SFRP-4 样多肽的本发明的 SFRP-4 结合剂接触，从而检测生物样品中 SFRP-4 多肽或 SFRP-4 样多肽的存在。SFRP-4 结合剂的实例是针对 SEQ ID NO: 1 产生的抗体，其能够结合到 SFRP-4 多肽或 SFRP-4 样多肽，优选具有可检测标记的抗体。术语“标记的”关于结合剂意在包括通过将可检测物质偶联（如物理连接）到结合剂直接标记结合剂，以及通过与被直接标记的另一化合物的反应性间接标记结合剂。间接标记的实例包括使用荧光标记的二级抗体和用生物素对 DNA 探针的末端标记检测一级抗体，使得它可以用荧光标记的链霉抗生物素蛋白检测。

本发明的检测方法可以用于在体外以及体内检测生物样品中 SFRP-4 多肽或 SFRP-4 样多肽。用于检测 SFRP-4 多肽或 SFRP-4 样多肽的体外技



理解受试者的尺寸和使用的成像系统将决定产生诊断图像所需的成像部分的量。对于放射性同位素部分的情况，对于人类受试者，所注射的放射性的量将通常为约 5 到 20 毫居里  $^{99m}\text{Tc}$ 。经标记的 SFRP-4 结合剂将然后优先在含有特定目标多肽的细胞位置积累。例如，在 S. W. Burchiel 等人, *Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer* 13 (1982) 中描述了体内肿瘤成像。

从而，本发明提供了医学状况，如 SFRP-4 相关的病症的诊断方法，其包括 (a) 通过测量个体的细胞或体液中本发明的 SFRP-4 结合剂的结合来测定多肽的表达；(b) 比较基因表达水平与标准 SFRP-4 多肽表达水平，从而与标准表达水平相比所测定的 SFRP-4 多肽表达水平的升高或降低表明医学状况。

**诊断用途** 本发明的 SFRP-4 结合组合物可用于诊断方法中。同样，本发明提供了使用本发明的结合剂的方法，所述结合剂可用于诊断受试者中的 SFRP-4 相关的医学状况。可以选择本发明的结合剂使得它们对 SFRP-4 多肽具有任一水平的表位结合特异性和非常高的结合亲和力。通常，结合剂的结合亲和力越高，可以在免疫测定中进行越严格的洗涤条件以非特异性除去结合的物质而不除去目标多肽。因此，可用于诊断测定法中的本发明的 SFRP-4 结合剂通常具有至少  $10^8$ 、 $10^9$ 、 $10^{10}$ 、 $10^{11}$  或  $10^{12} \text{ M}^{-1}$  的结合亲和力。此外，希望用作诊断试剂的 SFRP-4 结合剂具有足够的动力学结合速率 (on-rate) 以便在标准条件下在至少 12 小时内，优选至少 5 小时内，更优选至少 1 小时内达到平衡。

本发明的一些方法使用本发明的抗 SFRP-4 抗体和抗 SFRP-4 抗体相关的多肽组合物的多克隆制剂作为诊断试剂，其他方法使用单克隆分离物。多克隆混合物的使用与由一种单克隆抗 SFRP-4 抗体制备的组合物相比具有许多优点。通过结合到 SFRP-4 多肽上的多个位点，多克隆抗 SFRP-4 抗体或其他多肽可以比结合到 SFRP-4 多肽或 SFRP-4 样多肽上的单个位点的单克隆抗体产生更强的信号 (用于诊断)。此外，多克隆制剂可以结合到原型目标序列的许多变体 (例如，等位基因变体、物种变体、株系变

体、药物诱导的逃避变体)，而单克隆抗体可以仅仅结合到原型序列或者其更窄范围的变体。然而，单克隆抗 SFRP-4 抗体对于在存在或可能存在密切相关的抗原时检测单个抗原是有利的。

在使用根据上述方法制备的多克隆人抗 SFRP-4 抗体的方法中，制剂通常含有各种各样的 SFRP-4 结合剂，如抗体，它们对目标多肽具有不同的表位特异性。在使用单克隆抗体的一些方法中，希望有不同表位结合特异性的两种抗体。通过竞争结合测定法可以测定表位结合特异性的差异。

尽管为人类抗体的 SFRP-4 结合剂可以用作任何类型样品的诊断试剂，但是它们最常用作人生物样品的诊断试剂。SFRP-4 结合剂可以用于检测多种标准测定形式中的给定 SFRP-4 多肽。此类形式包括免疫沉淀、蛋白质印迹、ELISA、放射免疫测定法、和免疫测定。见 Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Publications, New York, 1988); 美国专利号 3,791,932; 3,839,153; 3,850,752; 3,879,262; 4,034,074, 3,791,932; 3,817,837; 3,839,153; 3,850,752; 3,850,578; 3,853,987; 3,867,517; 3,879,262; 3,901,654; 3,935,074; 3,984,533; 3,996,345; 4,034,074; 和 4,098,876。可以从受试者的任何组织或体液得到生物样品。

免疫测定或夹层测定法是本发明的诊断方法的优选形式。见美国专利号 4,376,110、4,486,530、5,914,241 和 5,965,375。此类测定法使用固定到固相的一种 SFRP-4 结合剂，如抗 SFRP-4 抗体，或者抗 SFRP-4 抗体的群体，和另一抗 SFRP-4 抗体，或者抗 SFRP-4 抗体的群体。通常，抗 SFRP-4 抗体或抗 SFRP-4 抗体的群体的溶液是经标记的。如果使用抗体群体，那么该群体通常含有结合目标多肽内不同的表位特异性的抗体。因此，相同的群体可以用于固相和溶液抗体。如果使用抗 SFRP-4 单克隆抗体，那么具有不同结合特异性的第一种和第二种 SFRP-4 单克隆抗体用于固相和溶液相。固相和溶液抗体可以以任一顺序或同时接触目标抗原。如果固相抗体首先接触，那么测定法被称作正向测定法。相反，如果溶液抗体首先接触，那么该测定法被称作反向测定法。如果靶标同时接触两种抗体，那么该测定法被称作同时测定法。接触 SFRP-4 多肽与抗 SFRP-4 抗体后，将

样品温育一段时间，该时间通常为约 10 分钟到约 24 小时，通常约 1 小时。然后进行洗涤步骤以去除不特异结合用作诊断试剂的抗 SFRP-4 抗体的样品组分。当固相和溶液抗体在单独的步骤中结合时，可以在任一或两个结合步骤后进行洗涤。洗涤后，通常通过检测通过结合经标记的溶液抗体连接到固相的标记来定量结合。通常对于给定的抗体对或者抗体群体和给定的反应条件，从含有已知浓度的目标抗原的样品制备校准曲线。然后从校准曲线插值读出被测试的样品中 SFRP-4 多肽的浓度。可以通过平衡时结合的经标记的溶液抗体的量或者通过达到平衡前一系列时间点处结合的经标记的溶液抗体的动力学测量来测量分析物。这种曲线的斜率是样品中 SFRP-4 多肽浓度的度量。

用于上述方法的合适的支持物包括例如，硝酸纤维素膜、尼龙膜，和衍生化的尼龙膜，以及颗粒，如琼脂糖、基于葡聚糖的凝胶、浸渍片、微粒、微球、磁性颗粒、试管、微量滴定孔、SEPHADEX™ (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway N.J)，等等。通过吸收或者共价连接进行固定化。任选地，可以将抗 SFRP-4 抗体连接到接头分子，如生物素用于附着到表面结合的接头，如抗生物素蛋白。

**预测医学。** 本发明还涉及预测医学领域，其中将诊断测定法、预后测定法、药物基因组学和监测临床试验用于预后（预测）目的以预防性治疗受试者。因此，本发明的一方面涉及用于测定生物样品（例如，血液、血清、细胞、组织）中 SFRP-4 多肽表达的诊断测定法，其目的是确定受试者是否受与异常 SFRP-4 多肽表达有关的疾病或病症的折磨或者处于发生所述疾病的危险中。

本发明还提供了用于确定个体是否处于发生与 SFRP-4 多肽表达或活性有关的病症危险中的预后（或预测）测定法。这种测定法可以用于预后或预测目的以便在特征是 SFRP-4 多肽或与 SFRP-4 多肽有关的病症发作前预防性治疗个体。此外，本发明的方法也可以用于评估个体是否表达 SFRP-4 或 SFRP-4 的多态形式，在该情况中，本发明的 SFRP-4 结合剂对 SFRP-4 多肽比对它的多态形式有更大的亲和力（或者反之亦然）。

受试者的具体组织（或者血液）中某些多肽的水平可以表明给定药物当施用于受试者时的毒性、功效、清除率或代谢速率。本文描述的方法也可以用于确定受试者中此类多肽的水平以帮助预测此类受试者对这些药物的应答。本发明的另一方面提供了测定个体中的 SFRP-4 表达从而为该个体选择合适的治疗或预防化合物的方法（在本文中称作“药物基因组学”）。药物基因组学允许基于个体的基因型选择用于治疗性或预防性治疗个体的化合物（例如药物）（例如，检查个体的基因型以确定该个体应答具体化合物的能力）。

本发明的 SFRP-4 结合剂与 SFRP-4 多肽或者 SFRP-4 样多肽的结合例如可以用于鉴定患有与 SFRP-4 多肽或 SFRP-4 样多肽表达或活性有关的病症或者处于患所述病症的危险中的受试者，如上述。备选地，可以用预后测定法鉴定患有或者有危险患有所述疾病或病症的受试者。从而，本发明提供了鉴定与异常的 SFRP-4 多肽或 SFRP-4 样多肽表达或活性有关的疾病或病症的方法，其中从受试者得到测试样品并检测 SFRP-4 结合剂结合，其中 SFRP-4 多肽或 SFRP-4 样多肽的改变的存在诊断受试者患有或有危险患有与异常的 SFRP-4 多肽或 SFRP-4 样多肽表达或活性有关的疾病或病症。如本文所用，“测试样品”指从目的受试者得到的生物样品。

此外，本文所述的预后测定法可以用于确定是否可以对受试者施用化合物（例如，激动剂、拮抗剂、肽模拟物、多肽、肽、核酸、小分子、或者其他药物候选者）以治疗与异常的 SFRP-4 多肽或 SFRP-4 样多肽表达或活性有关的疾病或病症。例如，此类方法可以用于确定是否可以用化合物有效治疗受试者的 SFRP-4 多肽或 SFRP-4 样多肽相关的病症。从而，本发明提供了确定是否可以用化合物有效治疗受试者的与异常的 SFRP-4 多肽或 SFRP-4 样多肽表达或活性有关的病症，其中得到测试样品并使用 SFRP-4 结合剂检测 SFRP-4 多肽或 SFRP-4 样多肽（例如，其中 SFRP-4 多肽或 SFRP-4 样多肽的存在诊断该受试者可以用所述化合物施用以治疗与异常的 SFRP-4 多肽或 SFRP-4 样多肽表达或活性有关的病症）。

测定从受试者得到的血液或组织样品中 SFRP-4 多肽或 SFRP-4 样多

肽的水平并与从没有所述疾病的个体得到的血样或相同组织类型样品中发现的水平相比较。与从健康个体得到的样品相比，在从怀疑患有 SFRP-4 多肽或 SFRP-4 样多肽相关疾病的个体得到的样品中 SFRP-4 多肽或 SFRP-4 样多肽的过多（或不足）表明在被检测的受试者中 SFRP-4 多肽或 SFRP-4 样多肽相关的疾病。可以需要进一步检测来进行阳性诊断。

已知在许多疾病中某些 SFRP-4 多肽或 SFRP-4 样多肽分子的过表达（或表达不足）程度表明患有该疾病的受试者是否可能应答具体类型的疗法或治疗。从而，检测样品中 SFRP-4 多肽或 SFRP-4 样多肽的方法可以用作预后的方法，例如，用以评价该个体将应答所述疗法或治疗的可能性。测定来自受试者的合适的组织或血样中相关预后多肽的水平并与合适的对照（例如，患有相同疾病但是有利地应答所述治疗的受试者中的水平）比较。与对照相比，样品中预后多肽过表达（或表达不足）的程度可以预测该受试者将不会有利地应答所述治疗或疗法的可能性。相对于对照过表达（或者表达不足）越大，受试者将应答治疗的可能性越低。

有许多疾病中某些目标多肽（在本文中称作“预测多肽”）的过表达（或表达不足）的程度已知表明该个体是否将患病。从而，检测样品中 SFRP-4 多肽或 SFRP-4 样多肽的方法可以用作预测个体是否将患病的方法。测定来自有危险患病的个体的合适组织或血样中相关预测多肽的水平并与合适的对照（例如，没有患所述疾病危险的个体中的水平）比较。与对照相比，样品中预测性多肽过表达（或者表达不足）的程度可以表明该个体将患所述疾病的可能性。相对于对照的过表达（或者表达不足）越高，该个体将患所述疾病的可能性越大。

例如，通过利用包含至少一种探针试剂，例如，本文所述的 SFRP-4 结合剂的预包装的诊断试剂盒可以进行本文所述的方法，所述试剂盒可以方便地用于例如诊断背景中来诊断显示出涉及 SFRP-4 多肽或 SFRP-4 样多肽的疾病或病症的症状或家族史的受试者。此外，其中表达 SFRP-4 多肽或 SFRP-4 样多肽的任何细胞类型或组织可以用于如本文所述的预后测定法中。

## SFRP-4-结合剂的预防性和治疗性用途

**概述** 本发明的 SFRP-4 结合剂可以用于预防或治疗疾病。特别地，本发明提供了治疗有危险（或者易感）与异常 SFRP-4 结合剂表达或活性有关的病症或患有所述病症的个体的预防性和治疗性方法。因此，本发明提供了受试者中 SFRP-4 相关的医学状况，如 SFRP-4 病症的相关预防和/或治疗的方法，其包括对需要其的受试者施用有效量的 SFRP-4 结合剂。例如，可以对受试者施用本发明的 SFRP-4 结合剂组合物以替换 SFRP-4 多肽不存在或降低的水平（例如，胰岛素），补充不同多肽的不存在或降低的水平（例如，抗 SFRP-4 抗体），抑制多肽的活性（例如，癌基因），活化 SFRP-4 多肽的活性（例如，通过结合到受体），通过与游离配体竞争降低膜结合的受体的活性（例如，用于减轻炎症的可溶性 TNF 受体），或引起所希望的应答（例如，血管生长）。

本发明的 SFRP-4 结合剂可以用于与受试者中多种病症有关的潜在预防性和治疗性应用，包括但不限于：涉及骨细胞的发育、分化和活化的那些；血液循环细胞如红细胞和血小板的疾病或病理；多种免疫学病症和/或病理；肺病和病症；自身免疫和炎症性疾病；心血管疾病；代谢疾病；生殖疾病、肾病、糖尿病、脑创伤、癌生长和转移（例如，脑、乳腺、前列腺、子宫、胰腺、胃肠道（例如，结肠、直肠、小肠、胃、食管）的癌）；病毒感染、癌治疗、牙周病；组织再生（例如，神经和骨）；急性淋巴母细胞白血病；神经胶质瘤；神经病；神经变性病症；造血病症；缺血引起的细胞凋亡（例如，心力衰竭、心肌梗塞；中风）；神经变性疾病（例如，亨廷顿舞蹈症、外周脱髓鞘病、多发性硬化、阿尔茨海默氏病、肌萎缩侧索硬化、帕金森病、创伤）；冠心病；和炎症（例如，炎症肠病）。

当在体内用于治疗时，将本发明的 SFRP-4 结合剂，例如抗 SFRP-4 抗体以有效量（即，具有希望的治疗效果的量）施用于受试者。通常将它们肠胃外施用。剂量和剂量方案将取决于 SFRP-4 相关疾病或病症的程度、使用的具体的 SFRP-4 结合剂的特征，例如，它的治疗指数、受试者和受

试者的病史。有利地将 SFRP-4 结合剂在 1-2 周的时间内静脉内地连续施用以治疗脉管系统中的细胞和皮下和腹膜内施用以治疗局部的淋巴结。任选地，在附属治疗如放射、化学治疗性治疗或者施用肿瘤坏死因子、干扰素或者其他细胞保护或免疫调节剂的组合循环期间进行施用。

对于肠胃外施用，将结合可药用肠胃外载体以单位剂量可注射形式（溶液剂、混悬剂、乳剂）配制 SFRP-4 结合剂。此类载体是内在无毒的，并且是非治疗的。

抗 SFRP-4 IgM 抗体的使用对于某些应用是优选的，然而，IgG 分子比 IgM 分子更小，因此更能够定位到某些类型的受感染细胞。有证据表明体内补体活化导致多种生物效应，包括炎症应答的诱导和巨噬细胞的活化。Unanue & Benecerraf, *Textbook of Immunology, 2nd Edition* (Williams & Wilkins 1984) p. 218. 伴随炎症的增加的血管舒张可以增加多种物质在受感染细胞中定位的能力。因此，本发明详细说明了该类型的 SFRP-4 抗体可以以多种方式治疗性使用。此外，抗原，如纯化的 SFRP-4 多肽、其片段或类似物(Hakomori, *Ann. Rev. Immunol.* 2: 103, 1984)或者涉及此类抗原的抗独特型抗体(Nepom 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 2864, 1985; Koprowski 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 216, 1984)可以用于在人类受试者中诱导活性免疫应答。此类应答包括形成抗体，所述抗体能够活化人的补体以产生希望的生物效应，例如，靶细胞破坏。

**疾病和病症。** 特征是升高（相对于不患有疾病或病症的受试者）水平或生物活性的 SFRP-4 多肽的疾病和病症可以用拮抗（即减小或抑制）活性的基于 SFRP-4 结合剂的治疗化合物治疗，可以将所述化合物以治疗或预防性方式施用。可以利用的治疗性化合物包括，但不限于：(i)前述 SFRP-4 结合剂；和 (ii) 编码 SFRP-4 结合剂的核酸。

特征是降低（相对于不患有疾病或病症的受试者）水平或生物活性的 SFRP-4 多肽的疾病和病症可以用增加（即激动）SFRP-4 活性的基于 SFRP-4 结合剂的治疗化合物治疗。可以以治疗或预防性方式施用上调活性的治疗剂。可以利用的治疗剂包括但不限于，增加生物利用率的 SFRP-4

结合剂。

通过定量 SFRP-4 结合剂诱导的肽和/或 RNA, 通过得到受试者组织样品 (例如, 从活组织检查组织) 并在体外测定其 RNA 或肽水平、表达的 SFRP-4 多肽的结构或活性 (或者前述多肽的 mRNA), 可以容易地检测升高或降低的水平。本领域公知的方法包括, 但不限于, 免疫测定法 (例如, 通过蛋白质印迹分析、免疫沉淀, 接着十二烷基硫酸钠 (SDS) 聚丙烯酰胺凝胶电泳、免疫细胞化学, 等等) 和/或杂交测定法以检测 mRNA 的表达 (例如, Northern 测定法、斑点印迹、原位杂交, 等等)。

SFRP-4 与多种疾病和病症有关, 它们都可以受到 SFRP-4 结合剂的开发的影响。

本发明提供了使用 SFRP-4 结合剂检测、预防或治疗 SFRP-4 介导的病症的方法。特别地, 本发明的 SFRP-4 结合剂可以用于预防性治疗或治疗性治疗表现为 SFRP-4 多肽表达的改变 (例如增加或减小) 的病症, 例如, 癌症 (例如, 脑、乳腺、前列腺、子宫、脾脏、胰腺、胃肠道 (例如, 结肠、直肠、小肠、胃、食道); 缺血导致的细胞凋亡 (例如, 心力衰竭、心肌梗塞; 中风); 神经变性疾病 (例如, 亨廷顿舞蹈症、外周脱髓鞘病、多发性硬化、阿尔茨海默氏病、肌萎缩性侧索硬化、帕金森病、创伤); 冠心病、炎症 (例如, 炎症肠病)。

本发明的 SFRP-4 结合剂可以用于检测、预防或治疗性治疗乳腺癌。Wong 和同事检查了 SFRP 的作用和它与乳腺癌中 Wnt 信号途径的关系。用人乳腺的浸润性导管癌的 70 个样品进行了 SFRP、Wnt-1、APC、 $\beta$ - 联蛋白和它的靶基因 c-myc 和细胞周期蛋白 D1 的原位杂交和免疫组织化学分析。与相邻的正常组织相比, SFRP mRNA 在 62 个肿瘤样品中下调, 在 8 个肿瘤样品中升高。然而, 在肿瘤进展过程中, SFRP mRNA 在肿瘤和相邻组织中稳定升高。有趣的是, 具有腋淋巴结转移的病例数目在具有升高的 SFRP 的组中比在具有降低的 SFRP 组中显著更低, 提示 SFRP 可以在浸润性乳腺癌中作为预后因子。Wong 等人, *J. Pathol.* 196: 145-153, 2002。

本发明的 SFRP-4 结合剂可用于检测、预防或治疗性治疗具有凋亡敏感的肌细胞表型的受试者中的超负荷诱导的心力衰竭、心肌肥大、和细胞凋亡。Schumann 和同事比较了来自非心力衰竭和心力衰竭的组织样品中 SFRPs 的心肌 mRNA 表达和可溶性  $\beta$ - 联蛋白的水平。Schumann, 等人 (2002) *Cardiovascular Res* 45: 720-728, 2002。与供体心脏相比, 在衰竭的心室中促凋亡 sFRP3 和 4 但不是 sFRP 1 和 2 的 mRNA 水平升高。患有扩张型心肌病或冠心病的患者之间没有显著差异。sFRPs 3 和 4 在心肌细胞中表达并且它们的表达与促凋亡的 Fas/Fas 拮抗剂的 mRNA 表达比例相关, 但是与抗细胞凋亡的 bcl-xL 的 mRNA 水平负相关。结果支持如下假设: 在衰竭的人心肌中, 通过两种内源 Wnt 拮抗剂的增强的表达而减弱 Wnt/ $\beta$ - 联蛋白途径。这可以促进超负荷的人心肌的凋亡敏感表型。

本发明的 SFRP-4 结合剂可以用于检测、预防或治疗性治疗子宫癌, 如子宫内膜癌。Hrzenjak 和同事已经观察到在子宫内膜间质肉瘤中分泌型卷曲相关蛋白 4 和  $\beta$ - 联蛋白表达的负相关性。Hrzenjak 等人, *J Pathol.* 204(1): 19-27, 2004。cDNA 阵列分析后, 选择并测序了在子宫内膜间质肉瘤中失调的 300 种以上的基因。最显著失调的基因是 SFRP, 尤其 SFRP4 的基因。与正常的子宫内膜相比, SFRP4 的表达在低级子宫内膜间质肉瘤 (ESS; n = 10) 和未分化的子宫内膜肉瘤 (UES; n = 4) 中都降低, 在后一更侵入性的形式中水平更低。通过定量实时 PCR 分析和原位杂交在石蜡包埋的组织上证实了这些结果。此外, Wnt 信号途径的一种重要的组分—— $\beta$ - 联蛋白的表达以与 SFRP4 相反的方式被调节, 在未分化的肉瘤中尤其增加。Wnt 信号途径的活化还受到免疫组织化学证明的支持, 该证明表明  $\beta$ - 联蛋白被转移到 UES 的细胞核中。因此, SFRP4 是推定的肿瘤抑制子, 其涉及 Wnt 途径的失调和 ESS 和 UES 的发病机理。

本发明的 SFRP-4 结合剂可用于检测、预防或治疗性治疗子宫癌, 例如, 子宫内膜癌和乳腺癌。Abuh-Jawdeh 和同事使用差别展示技术鉴定了与正常子宫内膜相比在人子宫内膜癌中差别表达的基因, 并克隆了 SFRP。Abuh-Jawdeh, G 等人, *Lab Invest.* 79: 439-47, 1999。使用原位杂交, 确定

SFRP 被间充质细胞表达但不被上皮细胞表达。在子宫内膜周期中 SFRP 的表达被调节：它在增殖期子宫内膜的间质中表达但不在分泌的或月经期子宫内膜中被显著检测到，提示 SFRP 受到激素调节。此外，SFRP mRNA 的表达在子宫内膜增生和癌和原位和浸润性乳腺癌的间质中被显著上调。这些结果表明 SFRP 作为 Wnt 卷曲信号途径的调节物并且涉及子宫内膜生理和致癌作用。

本发明的 SFRP-4 结合剂可用于检测、预防或治疗性治疗前列腺癌。Horvath 和同事已经阐明分泌型卷曲相关蛋白 4 的膜表达预测局部前列腺癌中的良好预后并且在体外抑制 PC3 细胞增殖。Horvath 等人, *Clin. Cancer Res.* 10: 615-25, 2004。因为 SFRP-4 mRNA 在前列腺癌 (PC) 中过表达，所以 Horvath 的研究的目的是在正常和恶性前列腺组织中确定 SFRP-4 蛋白质表达的模式并确定表达的改变是否与疾病发展和预后有关，以及确定 PC 的体外模型中 SFRP-4 过表达的表型。Kaplan-Meier 分析揭示那些其 PC 在 >20% 的细胞中表达膜 SFRP-4 的患者与具有 ≤20% 的膜表达的那些患者相比具有提高的无复发存活 ( $P = 0.002$ )。此外，当用 Gleason 分数 ( $P = 0.006$ )，病理阶段 ( $P = 0.002$ )，和手术前前列腺特异性抗原水平 ( $P = 0.004$ ) 建模时，膜 SFRP-4 表达 ( $P = 0.04$ ) 是复发的独立预测子。此外，体外研究表明当与对照 PC3-空载体细胞比较时，用 SFRP-4 转染的 PC3 细胞的增殖速率降低 ( $P < 0.0001$ )。PC3-SFRP-4 细胞中磷酸化的糖原合酶激酶 3β 的降低的水平提示该表型受到“Wnt/β-联蛋白”途径的介导。这些数据提示 SFRP4 表达对于局限性 PCR 可以是预后的，局限性 PCR 可能是作为 PC 细胞增殖的抑制效应的结果。

**预防方法。** 一方面，本发明提供了预防受试者中与异常 SFRP-4 表达或活性有关的疾病或状况的方法，其包括对受试者施用调节 SFRP-4 多肽表达或至少一种 SFRP-4 多肽活性的 SFRP-4 结合剂。

通过例如本文所述的任一种诊断或预后测定法或其组合可以鉴定处于疾病危险的受试者，所述疾病由异常的 SFRP-4 多肽表达或活性引起或者促进。在预防性应用中，将 SFRP-4 结合剂的药物组合物或药物施用于对

疾病或状况(例如免疫疾病)敏感或处于所述疾病或状况危险中的受试者,施用的量足够消除或减小该疾病的危险、降低其严重性或者延迟其发作,包括该疾病的生物化学、组织学和/或行为症状,它的并发症和该疾病发展期间出现的中间病理表型。可以在异常特征性症状表现之前进行预防性 SFRP-4 结合剂的施用,使得该疾病或病症在它的发展中被预防,或备选地,被延迟。取决于异常的类型,例如,作为 SFRP-4 激动剂或 SFRP-4 拮抗剂的 SFRP-4 结合剂可以用于治疗受试者。可以基于本文所述的筛选测定法确定合适的化合物。

**治疗方法。** 本发明的另一方面包括为了治疗目的调节受试者中 SFRP-4 多肽表达或活性的方法。本发明的调节方法涉及将细胞与本发明的 SFRP-4 结合剂接触,所述结合剂调节与细胞相关的 SFRP-4 多肽活性的一种或多种活性。在治疗应用中,对怀疑患有或已经患有这种疾病的受试者施用组合物或药物,施用的量足够治愈,或至少部分阻止所述疾病的症状(生物化学的、组织学的和/或行为的),包括它的并发症和疾病发展中的中间病理表型。将足够完成治疗或预防性治疗的量定义为治疗或预防有效剂量。

调节 SFRP-4 多肽活性的化合物在本文描述,并且可以包括例如,编码 SFRP-4 结合剂的核酸或 SFRP-4 结合剂多肽。在一个实施方案中, SFRP-4 结合剂刺激一种或多种 SFRP-4 多肽活性。此类刺激化合物的实例包括 SFRP-4 结合剂和已经导入细胞中的编码 SFRP-4 结合剂的核酸分子(即多核苷酸)。在另一实施方案中, SFRP-4 结合剂抑制一种或多种 SFRP-4 多肽活性。这些调节方法可以在体外(例如,通过培养细胞与 SFRP-4 结合剂)或备选地,在体内(例如,通过对受试者施用 SFRP-4 结合剂)进行。同样地,本发明提供了治疗受 SFRP-4 相关疾病或病症折磨的个体的方法,所述疾病或病症的特征是 SFRP-4 多肽或编码 SFRP-4 多肽的核酸分子的异常表达或活性。在一个实施方案中,该方法涉及施用 SFRP-4 结合剂(例如,通过本文描述的筛选测定法鉴定的化合物)或调节(例如,上调或下调) SFRP-4 表达或活性的 SFRP-4 结合剂的组合。在另

一实施方案中，该方法涉及施用 SFRP-4 结合剂或编码 SFRP-4 结合剂的核酸分子作为弥补降低或异常的 SFRP-4 表达或活性的疗法。在 SFRP-4 多肽被异常下调的情况下，希望刺激 SFRP-4 活性。

**确定基于 SFRP-4 结合剂的治疗剂的生物学效应。** 在本发明的多种实施方案中，进行合适的体外或体内测定法以确定特定的基于 SFRP-4 结合剂的治疗剂的效果和其施用是否适应于受试者中受影响的组织的治疗。

在多种实施方案中，可以用涉及受试者病症的类型的代表细胞进行体外测定法以确定基于给定 SFRP-4 结合剂的治疗剂是否对细胞类型发挥希望的效果。在人类受试者中测试前，可以在合适的动物模型系统中测试用于疗法的 SFRP-4 结合剂，所述动物模型系统包括但不限于，大鼠、小鼠、鸡、奶牛、猴、兔，等等。类似地，对于体内测试，可以在施用于人类受试者前使用本领域中已知的任何动物模型系统。

**治疗方案和有效剂量。** 一些组合物包括本发明的多种（例如，两种或多种）SFRP-4 结合剂的组合。在一些组合物中，组合物的每种 SFRP-4 结合剂是结合到 SFRP-4 多肽的不同的、预先选择的表位的单克隆抗体或人序列抗体。

用于治疗 SFRP-4 相关病症和疾病的本发明的 SFRP-4 结合剂（如抗 SFRP-4 抗体或者抗 SFRP-4 抗体细胞毒素缀合物）的有效剂量取决于许多不同的因素而变，所述因素包括施用方式、目标位点、受试者的生理状态、受试者是人还是动物、施用的其他药物，和治疗是预防性还是治疗性的。通常，受试者是人，但也可以治疗非人哺乳动物，包括转基因哺乳动物。需要滴定治疗剂量以优化安全性和功效。

典型地，足够实现治疗或预防效果的本发明组合物的有效量为每千克体重每天约 0.000001 mg 到每千克体重每天约 10,000 mg。优选地，剂量范围为每千克体重每天约 0.0001 mg 到每千克体重每天约 100 mg。对于用 SFRP-4 结合剂（如抗 SFRP-4 抗体）施用，剂量范围为每天约 0.0001 到 100 mg/kg 宿主体重，更通常 0.01 到 5 mg/kg 宿主体重。例如，剂量可以为每天 1 mg/kg 体重或 10 mg/kg 体重或每天 1-10 mg/kg 的范围内。示例性治疗

方案需要每两周施用一次或每月一次或每3到6个月一次。在一些方法中，同时施用具有不同结合特异性的两种或多种 SFRP-4 结合剂，在该情况中，施用的每种抗体的剂量落入所示范围内。通常在多个场合施用 SFRP-4 结合剂，如抗 SFRP-4 抗体。单次剂量之间的间隔可以为每周、每月或每年。间隔也可以是不规则的，如通过测量受试者中抗体的血液水平指示。在一些方法中，调节剂量以实现血浆 SFRP-4 结合剂，如抗 SFRP-4 抗体浓度为 1-1000  $\mu\text{g/ml}$ ，在一些方法中为 25-300  $\mu\text{g/ml}$ 。备选地，SFRP-4 结合剂，如抗 SFRP-4 抗体可以作为持续释放制剂施用，在该情况下，需要较低频率的施用。剂量和频率取决于受试者中 SFRP-4 结合剂的半寿期而变。通常，人抗 SFRP-4 抗体显示出最长的半寿期，接着是人源化的抗 SFRP-4 抗体、嵌合抗 SFRP-4 抗体，和非人抗 SFRP-4 抗体。施用剂量和频率可以取决于治疗是预防性或治疗性而变。在预防性应用中，在长时间期间内以相对稀少的间隔施用相对较低的剂量。一些受试者在他们的剩余的生命中持续接受治疗。在治疗应用中，有时需要相对较短间隔的相对高的剂量直到疾病的发展降低或者终止，优选直到受试者显示出疾病症状的部分或完全减轻。之后，可以对患者施用预防方案。编码 SFRP-4 免疫原的核酸的剂量为每个受试者约 10 ng 到 1 g、100 ng 到 100 mg、1  $\mu\text{g}$  到 10 mg，或 30-300  $\mu\text{g}$  DNA。感染性病毒载体的剂量为每剂 10-100 或更多的病毒体。

**毒性。** 优选地，本文描述的 SFRP-4 结合剂的有效剂量将提供治疗效果而不引起对受试者的实质毒性。本文描述的 SFRP-4 结合剂的毒性可以通过细胞培养或实验动物中的标准药理学步骤确定，例如，通过测定 LD<sub>50</sub> (群体 50% 的致死剂量) 或 LD<sub>100</sub> (群体 100% 的致死剂量)。毒性和治疗效果之间的剂量比为治疗指数。从这些细胞培养测定法和动物研究得到的数据可以用于设计用于人类中无毒的剂量范围。本文描述的 SFRP-4 结合剂的剂量优选位于循环浓度范围内，其包括有很小或没有毒性的有效剂量。剂量可以取决于使用的剂型和利用的施用途径在该范围内改变。各医生根据受试者的状况可以选择确切的剂型、施用途径和剂量。见例如，Fingl 等人, In: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Ch. 1 (1975)。

**试剂盒。** 本发明的范围内还包括试剂盒，其包含本发明的 SFRP-4 结合剂组合物（例如，抗体细胞毒素缀合物、单克隆抗体、人序列抗体、人抗体、多特异性和双特异性分子）和使用说明。试剂盒可以用于检测生物样品中 SFRP-4 多肽或 SFRP-4 样多肽的存在。例如，试剂盒可以包含：能够检测生物样品中 SFRP-4 多肽或 SFRP-4 样多肽的经标记的 SFRP-4 结合剂；用于测定样品中 SFRP-4 多肽或 SFRP-4 样多肽的量的手段；用于比较样品中 SFRP-4 多肽或 SFRP-4 样多肽的量与标准品的手段。所述化合物可以包装在合适的容器中。试剂盒可以还包含使用试剂盒检测 SFRP-4 多肽或 SFRP-4 样多肽的使用说明书。

给出下面的实施例以便更完整地阐明本发明的优选实施方案。该实施例不应被理解为限制本发明范围，其通过所附权利要求限定。

## 实施例

### 实施例 I

#### 抗-SFRP-4 抗体制备

**SFRP-4 多肽抗原的克隆。** 得到编码全长人 SFRP-4 多肽的 cDNA 克隆 (OriGene Rockville, MD; 10K selection B061-B064\_O09\_gi|8400733|ref|NM\_003014.2)。使用来自 Hoffmann-La Roche Inc. 的高保真 DNA 聚合酶 (High Fidelity DNA Polymerase) (Nutley, NJ; 产品号 1732650) 在 65°C 扩增除去终止密码子的可读框。用下面的引物扩增编码人 SFRP-4 多肽的核酸序列：有义引物 5'CCCAAGCTTGCAGTGCCATGTTCTCTCCATCC3' (SEQ ID NO: 11); 反义引物 5'GCTCTAGATCATCAATGGTGATGGTGATGATGCACTCTTTTCGGTTTGTCTC3' (SEQ ID NO: 12)。通过凝胶纯化扩增子 (Qiagen Inc., Valencia, CA; 产品号 28704) 并根据生产商的使用说明连接到 pCR-XL-TOPO 中 (Invitrogen, Carlsbad, CA; 产品号 45-0008)。由 Solvias AG (Basel, 瑞士) 证实序列保真性。在宿主菌株大肠杆菌 Top10

(Invitrogen, Carlsbad, CA; 产品号 44-0301)中扩增 TOPO-构建体。将插入片段用 *HindIII* 和 *XbaI* 切割, 纯化并使用 T4 DNA 连接酶(Roche Pharmaceuticals, Inc., Nutley, NJ; 产品号 481220)连接到 pRS5a (来源: Novartis)中。将 pRS5a 构建体称作“pSFRP4fullHis” (PlasNova 检索号: NPL006815)。将 pSFRP4fullHis 构建体编码的天然 Kozac 和前导序列、完整编码序列(CDS)和 His 标记直接连接到人 SFRP-4 多肽的最后一个氨基酸。使用国家生物信息中心 (National Center for Biotechnology Information) 的 BLAST 网络服务分析 DNA 和氨基酸序列。

**SFRP-4 抗原的转染和表达** 将 HEK293 Ebna 细胞在标准生长条件下接种在 6 孔群 ( $10^6$  个细胞/孔) 中并过夜培养; 在 95% 汇合时, 根据生产商的使用说明书 (Invitrogen, Carlsbad, CA; 产品号 11668-027) 用 Lipofectamine 2000 以 2  $\mu$ g pSFRP4fullHis 或 pRS5a 对照转染每孔中的细胞。每孔含有 2.5mL 培养基。为了瞬时生产, 48 小时后将细胞转移到无 FCS 的 DMEM (Invitrogen-Gibco, Carlsbad, CA; 产品号 31966-021) 中。每 72 小时取培养上清液样品并通过蛋白质印迹分析 His 标记的重组 SFRP-4 的存在。使用 HRP 标记的抗-His 标记抗体 (Quiagen, No. 34460) 和化学发光底物 (Roche, No. 2015196) 根据生产商的说明书检测蛋白质。为了选择稳定的细胞系, 在 48 小时后将细胞转移到含有 10% (v/v) FCS 和 250  $\mu$ g/ml Zeocine 的 Dulbecco 改良的 Eagles 培养基 (DMEM) 中。如上述分析重组 SFRP-4 生产。用编码  $\beta$ -半乳糖苷酶的 pRK-LacZ-1 (Novartis Pharma AG) 进行对照转染。48 小时内在细胞水平上通过用生色底物 (Stratagene, La Jolla, Calif.; 产品号 200384-2) 染色显示酶活性。

**SFRP-4 生产** 将 Hek293 Ebna 细胞用 pRK-LacZ-1、pRS5a 或 pSFRP4fullHis 转染。如通过 pRK-LacZ-1 对照的原位  $\beta$ -半乳糖苷酶染色估计的, 转染效率为约 60%。用 pSFRP4fullHis 转染的细胞显示出改变的生长行为。它们在转移到无 FCS 的培养基后形成团聚体并在 72 小时后死亡。在 8-10 周的选择后得到仅仅一些稳定的细胞系。相比, 仅仅含有载体的对照显示出正常的生长行为。

无 FCS 的培养上清液的蛋白质印迹分析表明被转染的细胞成功产生并分泌了重组 SFRP-4。观察到 55 kDa 处的带，其对应于糖基化蛋白的分子量。（图 1，小图 A，48 小时泳道；也见图 1，小图 B，泳道 1）。在 72 小时后的时间点，SFRP-4 多肽生产水平降低并且蛋白质被检测为从 50 到 40 kDa 大小的成片条带（图 1，小图 A，144h 泳道）。

**用 PNGase F 对 SFRP-4 的去糖基化** 为了研究低分子量片段的形成是否是由于部分糖基化或蛋白酶解，在 48 小时和 144 小时取产生 SFRP-4 的细胞培养物的无 FCS 的培养上清液。根据生产商的使用说明书用肽：N-糖苷酶 F(PNGase F) (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, 产品号 P0704L)处理 48 小时上清液(见图 1)。在去糖基化实验中，用 PNGase F 处理 48 小时采集的样品（图 1，小图 B，泳道 1 到 3）。肽：N-糖苷酶 F（也称作 PNGase F）是酰胺酶，其在 N-连接的糖蛋白的高甘露糖、杂合且复杂的寡糖的最内部的 GlcNAc 和天冬酰胺残基之间切割(Maley 等人, *Anal. Biochem.*, 180, 195-204, 1989)。含有 SFRP-4 的培养上清液的 PNGase F 处理将 55 kDa 带 SFRP-4 免疫反应性多肽转化为作为 40 kDa 的不同带迁移的多肽（图 1，小图 B，泳道 1 和泳道 2 对泳道 3）。该实验表明随时间发生的片段形成是由于部分糖基化而不是蛋白酶解降解。

假设受损的细胞生理可以通过所观察到的分泌型 SFRP-4 的部分糖基化反映出来。稳定细胞系是非常差的 SFRP-4 生产者。因此用瞬时系统产生用于 ELISA 显影的材料。这里，通过转染的 Hek293 Ebna 细胞产生 SFRP-4 72 小时。没有使用抗生素引起选择压力。从 200 ml 培养上清液得到 50  $\mu$ g 完全糖基化的天然 SFRP-4 多肽的总产量。

**SFRP-4 多肽抗原的纯化和定量** 在无 FCS 的培养基中 72 小时后收集产生 SFRP-4 的细胞的培养上清液。通过 1.25 ml Ni-NTA 柱(Sigma-Aldrich, USA; 产品号 H8286)从 200 ml 上清液纯化重组的 SFRP-4。用含有 10mM 咪唑的磷酸盐缓冲液 (pH8) 平衡柱子。用注射器以约 2 ml/min 的流速应用培养上清液。用含有 250mM 咪唑的磷酸盐缓冲液 (pH8) 洗脱重组 SFRP-4。用 0.5 ml Microcon YM-30 (Millipore Corporation, Bedford, MA;

产品号 42409)将洗脱液浓缩到 300  $\mu$ l。

用 BCA 方法(Pierce Chemical Co., Rockford, IL, 产品号 23235)测定蛋白质浓度。在 NuPAGE 4-12 % Bis-Tris 凝胶 (Invitrogen, Carlsbad, CA, 产品号 NP0323BOX)上使用具有 10%  $\beta$  巯基乙醇的 Laemmli 样品缓冲液(Bio-Rad, Hercules, CA, 产品号 161-0737)、NuPAGE 电泳缓冲液 (Bio-Rad, Carlsbad, CA; 产品号 NP0002)和考马斯亮蓝 R-250 (BioRad Laboratories, Hercules, CA, 产品号 161-0436)测定蛋白质纯度。凝胶在 NuPAGE 电泳系统 (Invitrogen, Carlsbad, CA)中进行电泳。

**SFRP-4 肽制备用于多克隆抗体产生。** 使用 Biobench2 (Novartis)和国际生物信息中心的 BLAST 网络服务分析 SFRP-4 的氨基酸序列。人 SFRP-4 的两种肽 (对应于氨基酸残基 292-305 和氨基酸 305-319) 基于它们的潜在抗原性、疏水性、表面概率、糖基化概率和特异性被选择作为免疫原。所选择的肽在人和猕猴 (*Macaca fascicularis*) SFRP-4 中是相同的。

**肽合成和偶联。** 在 Eurogentec GmbH (Liege, 比利时)合成所选的肽  $\text{H}_2\text{NQEQRRTVQDKKKTAC-CONH}_2$  (又名, EP040756; SEQ ID NO: 8)和  $\text{H}_2\text{N-AGRTSRSNPPKPKGKC-CONH}_2$  (又名, EP040755; SEQ ID NO: 7) 并缀合到匙孔血蓝蛋白 (KLH) 或卵白蛋白 (OVA)。

**抗体产生。** 将两只新西兰白兔 (New Zealand White rabbits) (Eurogentec, Liege, Belgium) SZ2067 和 SZ2068 各自用 200  $\mu$ g/ml KLH-缀合的 EP040755 和 EP040756 的混合物在第 0、14、28 和 56 天免疫。在第 87 天收获免疫血清。对于每种肽, 在树脂柱 (Eurogentec GmbH, Liege, 比利时)上亲和纯化来自第 87 天的 10ml 免疫血清 (每只兔 5ml)。

**柱制备和抗体纯化 (Eurogentec, Liege, 比利时)。** 对于每种肽, 根据标准步骤将 5ml 各自的游离肽 (EP040755 或 EP040756) 通过半胱氨酸缀合到 AF-氨基 TOYOPEARL 650 M (Tosoh)来制备小规模亲和柱 (1 ml 树脂)。向 10ml 抗血清中加入 0.2 克 NaCl。使用前用 2 \* 5 ml 100 mM 甘氨酸, pH 2.5, 接着通过补充 20g/l NaCl 的 3 \* 5 ml PBS 洗涤亲和柱。将血清应用于柱上并回收穿过峰。这重复 5 次。

用补充 20g/l NaCl 的 3 \* 5 ml PBS 洗涤柱子并用 1 ml 100 mM 甘氨酸, pH 2.5 洗脱。在含有 100 µl 1M Tris 缓冲液, pH 8.5 的管中回收抗体。将洗脱液对 5 升 PBS 透析两次, 每次 4 小时。将 BSA 加入到 1% 叠氮化钠中至 0.1% 的终浓度。

**抗体产生的检测。** 使用标准方法通过直接 ELISA 分析抗 SFRP-4 抗体产生。简言之, 将 OVA 缀合的肽 EP040755 和 EP040756 以 1 µg/mL 的浓度分别包被到 Maxisorb™ (Nunc) 上。洗涤并用 Superblock™ (Pierce) 封闭介质封闭平板。加入不同稀释度的血清样品和亲和纯化的抗体并在室温温育 3 小时。通过 HRP 缀合的山羊抗兔 IgG Fc 抗体 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, Penn.; 产品号 111-035-046) 和生色底物 (Roche Diagnostics (a.k.a., Roche Molecular Systems, Inc.), Alameda, Calif.; 产品号 1484281) 检测结合的兔抗体。用 Molecular Devices Thermomax 微量培养板读出器检测信号强度并用 Softmax Pro 3.1 分析数据。

**抗体表征。** 使用标准方法通过直接 ELISA 分析抗体质量。将重组 SFRP-4 以 0-300 ng/mL 的浓度包被到 Maxisorb™ (Nunc) 上。洗涤并用 Superblock™ (Pierce) 封闭介质封闭平板。加入不同稀释度的血清样品和亲和纯化的抗体并在室温温育 3 小时。通过 HRP 缀合的山羊抗兔 IgG Fc 抗体 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, Penn.; 产品号 111-035-046) 和生色底物 (Roche Diagnostics (a.k.a., Roche Molecular Systems, Inc.), Alameda, CA; 产品号 1484281) 检测结合的兔抗体。用 Molecular Devices Thermomax 微量培养板读出器检测信号强度并用 Softmax Pro 3.1 分析数据。

通过蛋白质印迹 (WB) 使用 HRP 缀合的山羊抗兔 IgG Fc 抗体 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania; 产品号 111-035-046) 和用于检测的化学生色底物 (Hoffmann-La Roche Inc., Nutley, New Jersey; 产品号 2015196) 额外评估抗 EP040755。

**多克隆抗体产生。** 将大鼠抗血清和亲和纯化的抗 EP040755 和抗 -EP040756 在直接 ELISA 中检测各自 OVA-偶联的肽的能力与免疫前血清

比较。两种兔的抗血清都检测到抗原和重组 SFRP-4 多肽。亲和纯化的抗体检测到它们各自的抗原。然而，仅仅纯化的抗 EP040755 也检测到重组的 SFRP-4 多肽。该抗体(1  $\mu$ g/ml)检测到 8 ng/ml 重组的 SFRP-4 多肽。基于人体中 SFRP-4 多肽的已知的血清/血浆浓度为 5.5-80 ng/ml，认为该抗体足够灵敏以测量猴子血浆中的 SFRP-4。用亲和纯化的抗 EP040755 建立猴血浆中的抗 SFRP-4 ELISA。在蛋白质印迹分析中，使用抗 EP040755 对 SFRP-4 的检测极限为 75 ng 绝对量。

**结论。** 产生了天然的重组 SFRP-4 和 SFRP-4 特异性多克隆抗体。用该材料成功地建立了 ELISA 来测量 AFI030 研究(BMD R0250736-04)中猕猴血浆样品，如下面实施例 II 中详述。

## 实施例 II

开发用于定量生物样品中免疫反应性 SFRP-4 多肽的定量 SFRP-4 的 SFRP-4 ELISA

本研究的目的是构建可用于检测生物样品中 SFRP-4 免疫反应性多肽的 SFRP-4 ELISA 测定法。特别地，开发 SFRP-4 ELISA 测定法并用于在 4 周的时间内检测雌性卵巢切除的猕猴 (*Macaca fascicularis*) 血清中 SFRP-4 免疫反应性多肽。

**通过 ELISA 定量血浆中的 SFRP-4。** 使用特定夹层 ELISA 测定法测定 SFRP-4。用于 SFRP-4 的夹层 ELISA 利用该蛋白质的两种特异性多克隆抗体：如上面实施例 I 中详述的抗 SFRP-4 肽 EP040755 的亲和纯化的兔抗体和来自 R&D Systems 的山羊抗 SFRP-4 抗体 (目录号 A1827)。在每个微量滴定板上运行含有已知浓度的 SFRP-4 多肽的校准标准品。从校准曲线得到未知样品中的浓度 (见图 2)。在下面的表 5 到 7 中详述了试剂和测定参数。

表 5

化学试剂:

PBS 缓冲液

Roche No. 166789

BSA	牛血清白蛋白; Sigma: No. A-7888-50G
Tween <sup>®</sup> 20	Axon Lab AG No. A-1389,0500
包被缓冲液	Pierce No. 28382
测定缓冲液	磷酸盐缓冲液+ 0.05 % Tween 20 + 1 % BSA
洗涤缓冲液	磷酸盐缓冲液+ 0.05 % Tween 20
封闭缓冲液	磷酸盐缓冲液+ 0.05 % Tween 20 + 2 % BSA
BM 蓝 POD-底物	Roche No. 1484281
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2N	Novartis No. N43
生物学试剂:	
猕猴血浆	来源: 内部对照基质库 Cs 用猕猴血浆的相等部分混合物制备, 批号: CmoPla002, CmoPla042, CmoPla043, CmoPla044, CmoPla45.
专属试剂:	
SFRP-4-重组蛋白	来源: 在 MAD (CH) 内部生产
包被抗体	山羊抗-SFRP-4, R&D Systems No. A1827
检测抗体	兔抗-SFRP-4 (来源: Eurogentec), 亲和纯化的抗 SFRP-4 肽 EP040755 的 pAb
二级抗体	山羊抗兔 IgG Fc-HRP, Jackson No. 111-035-046
测定法:	
测定法工作范围	15.7- 1000 ng/mL
测定极限	LLOQ: 15.7 ng/mL, 被定义为完成接受标准的最低 C-值 ULOQ: 1000 ng/mL, 被定义为完成接受标准的最高 C-值
接受标准	平均准确度: 80 % 到 120 % (在 LLOQ 和 ULOQ 70 % -130 %) 平均精确度: CV ≤ 15 % (在 LLOQ 和 ULOQ 20 %)
特异性	该测定法对于 SFRP-4 是特异的

**样品制备.** 在测试期开始时(第1天)和尸检即刻前(第29或30天)从每只雌性卵巢切除的猕猴得到血液。从每个试样得到血浆并冷冻备用。在 SFRP-4 ELISA 测定当天,在室温下解冻冷冻的血浆样品(含有肝素的试管)。所有样品都未经稀释而进行分析。以一式两份进行校准标准品和未知样品测定,并从每个值计算算术平均值。

**测定步骤.** 每个温育步骤后,用洗涤缓冲液自动洗涤微量滴定板3轮(见表6)。

表6

包被	山羊-抗-SFRP-4, 包被缓冲液中 3 µg/mL 100 µL/孔, 4°C 过夜
封闭	封闭缓冲液 200 µL/孔, 室温 1 h
Cs 和未知样品的温育	50 µL/孔 Cs 或未知样品 室温下 3 h
检测抗体的温育	兔-抗-SFRP-4-EP040755, 测定缓冲液中 2 µg/ml 50 µL/孔, 室温下 1h
二级抗体的温育	山羊-抗-兔 IgG Fc-HRP, 测定缓冲液中 1: 5000 50 µL/孔, 室温下 1h, 黑暗中
酶促反应和检测	POD-底物 50 µL/孔, 室温下 20 分钟, 黑暗中 加入 50 µL/孔 H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2N 终止反应

**SFRP-4 ELISA 校准曲线.** 检查所有标准品的准确性并拟合我们的接受标准(见表7)。

表7

校准模型	4-参数 Logistic (4PL)拟合 $y = ((A-D)/(x/C)^B)+D$
y	减去非特异结合(NSB)的光密度后的光密度

<b>X</b>	<b>C 样品中 SFRP-4 的浓度</b>
<b>A</b>	<b>对应于 X 轴的低值渐近线的 Y 值</b>
<b>B</b>	<b>描述该曲线怎样快速从曲线中心的渐近线过渡</b>
<b>C</b>	<b>对应于 A 和 D 间中点的 X-值</b>
<b>D</b>	<b>对应于 X 轴高值渐近线的 Y-值</b>

用于校准和数据采集的软件 **SoftMaxPro 版本 3.1.1 (S1)**

验证所有标准品的准确性以拟合我们的接受标准。

结果总结. 开发了具有 15.7 ng/ml 灵敏度的夹层 ELISA 以测定未稀释的猕猴血浆中的 SFRP-4。检测所有动物血浆中的 SFRP-4 (见表 8)。

表 8

**SFRP-4 血浆浓度(ng/ml)**

<b>动物 id</b>	<b>第 1 天</b>	<b>第 30 天</b>
<b>B611551</b>	<b>35.05</b>	<b>34.16</b>
<b>B611552</b>	<b>32.55</b>	<b>35.75</b>
<b>B611553</b>	<b>32.57</b>	<b>28.04</b>
<b>B611554</b>	<b>33.71</b>	<b>32.42</b>
<b>B611555</b>	<b>54.26</b>	<b>53.83</b>
<b>B611556</b>	<b>42.57</b>	<b>40.06</b>
<b>B611557</b>	<b>36.20</b>	<b>39.37</b>
<b>B611558</b>	<b>34.22</b>	<b>44.00</b>

成功地开发了定量猕猴血浆中 SFRP-4 的夹层 ELISA。以前已经在内部开发了参考蛋白和抗 SFRP-4 抗体(BMD R0250736-03;一般见实施例 I)。该测定法足够灵敏,可以用来分析生物样品(例如,血浆)中 SFRP-4 免疫反应性多肽。

实施例 III

通过高通量蛋白质印迹分析定量所选组织中 SFRP-4 免疫反应性蛋白质

高通量蛋白质印迹。根据生产商的说明书 (BioCAT GmbH, Heidelberg, 德国) 进行高通量蛋白质印迹 - 31 种人类成年正常组织 (目录号 W8234480-B)。用 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  亲和纯化的兔抗 SFRP4 EP040755 (见实施例 I) 作为一级抗体。使用 20  $\text{ng}/\text{mL}$  山羊抗兔 IgG (H+L)-HRP (Pierce 目录号 34075) 作为检测抗体。见图 3。

用 31 种不同的个体人组织的高通量蛋白质印迹表明在心脏中具有最高的 SFRP-4 蛋白质水平。这可以用于检测 SFRP-4 作为心肌梗塞、肌病或者冠心病的疾病生物标志 (诊断、预后、疾病分期、药物效果)。

高通量蛋白质印迹表明在结肠、直肠、十二指肠中高水平的 SFRP-4, 但是在回肠、空肠、食道中水平较低但是仍然高于平均表达。这可以用于检测 SFRP-4 作为结直肠癌和消化道的其他癌的疾病生物标志 (诊断、预后、疾病分期和药物效果) 和作为消化道的炎性疾病级别的标志。

高通量蛋白质印迹表明在脾脏和胰腺中 SFRP-4 高于平均水平。这可以用于检测 SFRP-4 作为脾脏或胰腺癌的疾病生物标志 (诊断、预后、疾病分期和药物效果)。

高通量蛋白质印迹表明在子宫中 SFRP-4 高于平均水平。这可以用于检测 SFRP-4 作为子宫癌的疾病生物标志 (诊断、预后、疾病分期和药物效果)。

高通量蛋白质印迹表明在脑中 SFRP-4 高于平均水平。这可以用于检测 SFRP-4 作为神经变性疾病 (例如, 亨廷顿舞蹈症、ALS、阿尔茨海默氏病、MS、帕金森病、外周脱髓鞘病) 和脑肿瘤的疾病生物标志 (诊断、预后、疾病分期和药物效果)。

## 等同方案

本发明不局限于本申请中描述的具体实施方案, 它们意在作为本发明的个别方面的单纯说明。如本领域技术人员显而易见的, 可以对本发明做

出许多修饰和变型而不背离它的精神和范围。根据前面的描述，除了本文列举的那些外，本发明范围内的功能等同方法和装置将是本领域技术人员显而易见的。此类修饰和变型意在落入所附权利要求的范围内。本发明意在仅仅受到所附权利要求以及此类权利要求等同方案的完整范围的限制。将理解本发明不限于具体的方法、试剂、化合物组成或生物系统，它们当然可以改变。还将理解本文中所用的术语仅仅用于描述具体实施方案的目的，并且不意在限定。

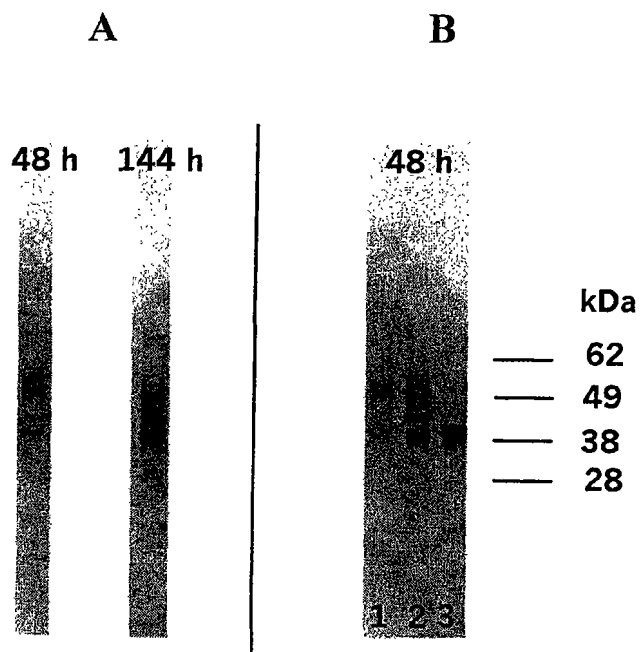


图 1

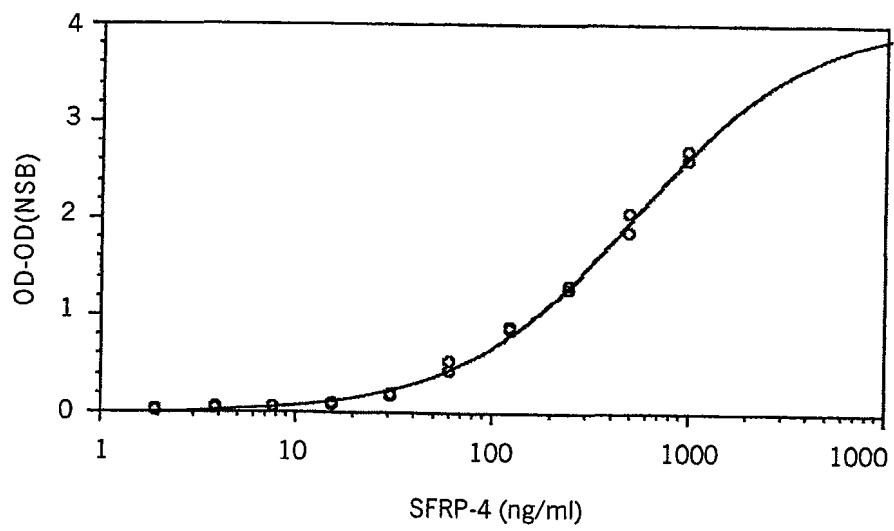
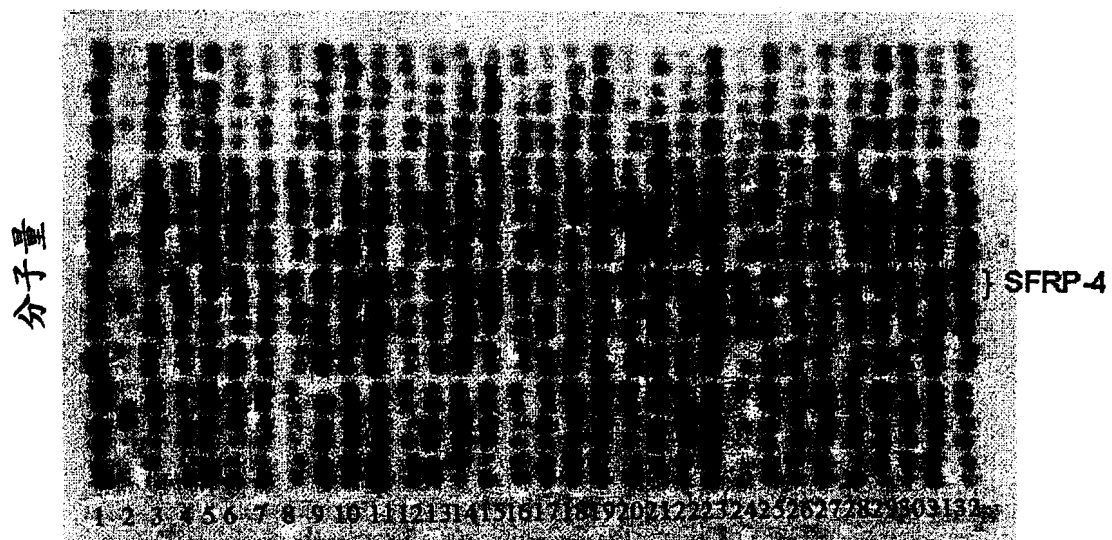


图 2



组织

斑点号	大小 (kDa)	斑点号	大小 (kDa)
1	213 和以上	13	46-51
2	161-213	14	42-46
3	131-161	15	39-42
4	112-131	16	35-39
5	98-112	17	33-35
6	88-98	18	30-33
7	80-88	19	28-30
8	74-80	20	26-28
9	68-74	21	25-26
10	64-68	22	23-25
11	57-64	23	22-23
12	51-57	24	22 和更少

图 3

专利名称(译)	抗分泌型卷曲相关蛋白 - 4(SFRP - 4)的抗体		
公开(公告)号	<a href="#">CN101370826A</a>	公开(公告)日	2009-02-18
申请号	CN200780002928.1	申请日	2007-02-08
[标]申请(专利权)人(译)	瑞士商诺华公司		
申请(专利权)人(译)	诺瓦提斯公司		
当前申请(专利权)人(译)	诺瓦提斯公司		
[标]发明人	A萨尔 R希伦布兰德 A维塔利蒂		
发明人	A·萨尔 R·希伦布兰德 A·维塔利蒂		
IPC分类号	C07K16/18 A61K39/395 G01N33/53		
CPC分类号	C07K16/18 A61K2039/505 A61P1/04 A61P9/00 A61P9/04 A61P9/10 A61P17/02 A61P21/00 A61P25/00 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/28 A61P29/00 A61P35/00 A61P43/00		
优先权	60/771651 2006-02-09 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明一般涉及SFRP - 4结合剂的制备和其用途。具体地，本发明涉及抗SFRP - 4抗体的制备和它们在SFRP - 4检测和调节SFRP - 4介导的功能中的用途。本发明的组合物和方法可用于多种组织中检测改变的SFRP - 4多肽表达表现出来的病症以及在需要其的受试者中实现此类SFRP - 4多肽相关病症的治疗性和预防性缓解。

