

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

A61K 38/55

C07K 16/28 C07K 14/81

G01N 33/53 A61K 39/395

A61P 29/00

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00806871.2

[43]公开日 2002年5月15日

[11]公开号 CN 1349410A

[22]申请日 2000.4.28 [21]申请号 00806871.2

[30]优先权

[32]1999.4.29 [33]US [31]60/132,748

[32]1999.5.6 [33]DK [31]PA199900613

[32]1999.10.1 [33]US [31]60/157,384

[32]1999.10.1 [33]DK [31]PA199901402

[86]国际申请 PCT/DK00/00213 2000.4.28

[87]国际公布 W000/66151 英 2000.11.9

[85]进入国家阶段日期 2001.10.29

[71]申请人 诺沃挪第克公司

地址 丹麦鲍斯韦

[72]发明人 汉斯·J·弗洛德加德

伦纳特·林德博姆 索伦·比约恩

[74]专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 巫肖南 黄益芬

权利要求书 11 页 说明书 35 页 附图页数 13 页

[54]发明名称 结合肝素的拮抗剂在缓激肽释放的抑制中的应用

[57]摘要

本发明涉及治疗或预防由所述哺乳动物,尤其可产生 HBP 的哺乳动物体内缓激肽释放所致疾病的方法,其中该 HBP 可与 HBP 拮抗剂、例如结合至少一种人 HBP 表位的单克隆抗体结合,该方法包括对所述哺乳动物给予有效减少哺乳动物体内缓激肽释放的用量的 HBP 拮抗剂。此外,本发明涉及用于测定哺乳动物是否产生与 HBP 拮抗剂、例如结合至少一种人 HBP 表位的单克隆抗体结合的 HBP 的方法和试剂盒以及一种检测 HBP 拮抗剂的方法。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

权 利 要 求 书

1. 一种用于预防或治疗由哺乳动物中缓激肽释放导致的疾病的方法，其中所述哺乳动物产生与 HBP 拮抗剂结合的 HBP，所述方法包括对有相应需要的所述哺乳动物给予有效减少所述哺乳动物中缓激肽释放的用量的哺乳动物 HBP 拮抗剂。

5
2. 根据权利要求 1 所述方法，其中所述 HBP 拮抗剂的用量为约 10mg - 约 1g/单位剂型。
3. 根据权利要求 1 所述方法，其中所述 HBP 拮抗剂的用量为约 0.1 - 10 100mg/kg 体重。
4. 根据权利要求 1 所述方法，其中所述 HBP 拮抗剂的用量为约 0.5 - 50mg/kg 体重。
5. 根据权利要求 1 所述方法，其中所述 HBP 拮抗剂的用量为约 1 - 25mg/kg 体重。
- 15 6. 根据权利要求 1 所述方法，其中所述疾病选自系统性炎症应答综合征、局部缺血再灌注、过敏反应和同种异体移植物排斥。
7. 根据权利要求 1 所述方法，其中所述疾病是成人呼吸窘迫综合征。
8. 哺乳动物 HBP 拮抗剂在制备用于预防或治疗由哺乳动物中缓激肽释放导致的疾病的药剂中的用途，其中所述哺乳动物产生能与 HBP 拮抗剂结合的 HBP。

20
9. 根据权利要求 8 所述用途，其中所述 HBP 拮抗剂的用量为约 10mg - 约 1g/单位剂型。
10. 根据权利要求 8 所述用途，其中所述 HBP 拮抗剂的用量为约 0.1 - 100mg/kg 体重。
- 25 11. 根据权利要求 8 所述用途，其中所述 HBP 拮抗剂的用量为约 0.5 - 50mg/kg 体重。
12. 根据权利要求 8 所述用途，其中所述 HBP 拮抗剂的用量为约 1 - 25mg/kg 体重。
13. 根据权利要求 8 所述用途，其中所述疾病选自系统性炎症应答综合征、局部缺血再灌注、过敏反应和同种异体移植物排斥。

30
14. 根据权利要求 8 所述用途，其中所述疾病是成人呼吸窘迫综合征。

15. 一种用于治疗或预防由哺乳动物中缓激肽释放导致的疾病的方法，其中所述哺乳动物产生与抑酶肽或其类似物结合的 HBP，所述方法包括对有相应需要的所述哺乳动物给予有效减少所述哺乳动物中缓激肽释放的用量的抑酶肽或其类似物。

5 16. 根据权利要求 15 所述方法，其中所述抑酶肽类似物是在 15-19 位上含有至少一个突变的抑酶肽变体。

17. 根据权利要求 15 所述方法，其中所述疾病选自系统性炎症应答综合征、局部缺血再灌注、过敏反应和同种异体移植物排斥。

18. 根据权利要求 15 所述方法，其中所述疾病是成人呼吸窘迫综合征。

10 19. 抑酶肽或其类似物在制备用于减少哺乳动物中缓激肽释放的药剂中的用途，其中所述哺乳动物产生能与抑酶肽或其类似物结合的 HBP。

20. 根据权利要求 19 所述用途，其中所述抑酶肽类似物是在 15-19 位上含有至少一个突变的抑酶肽变体。

15 21. 抑酶肽或其类似物在制备用于治疗带有能与抑酶肽或其类似物结合的 HBP 的患者体内的系统性炎症应答综合征、局部缺血再灌注、过敏反应和同种异体移植物排斥的药剂中的用途。

22. 抑酶肽或其类似物在制备用于治疗带有能与抑酶肽或其类似物结合的 HBP 的患者体内的成人呼吸窘迫综合征的药剂中的用途。

20 23. 一种用于预防或治疗由哺乳动物中缓激肽释放导致的疾病的方法，其中所述哺乳动物能产生与结合至少一种 HBP 表位的单克隆抗体结合的 HBP，其中所述表位与前激肽释放酶-H-激肽原复合物结合并激活缓激肽的释放，所述方法包括对有相应需要的所述哺乳动物给予能结合至少一种 HBP 表位的单克隆抗体，其中所述表位以有效减少所述哺乳动物中缓激肽释放的量与前激肽释放酶-H-激肽原复合物结合并激活缓激肽的释放。

25 24. 根据权利要求 23 所述方法，其中所述哺乳动物是人类患者且所述 HBP 是人 HBP。

25. 根据权利要求 23 所述方法，其中所述单克隆抗体是人单克隆抗体。

30 26. 结合至少一种 HBP 表位的单克隆抗体在制备用于预防或治疗由哺乳动物中缓激肽释放导致的疾病的药剂中的用途，其中所述表位与前激肽释放酶-H-激肽原复合物结合并激活缓激肽；其中所述哺乳动物产生能与结合至少一种 HBP 表位的所述单克隆抗体结合的 HBP，其中所述表位与前激肽释放

酶-H-激肽原复合物结合并激活缓激肽。

27. 根据权利要求 26 所述用途，其中所述哺乳动物是人类患者且所述 HBP 是人 HBP。

28. 根据权利要求 26 所述用途，其中所述单克隆抗体是人单克隆抗体。

5 29. 根据权利要求 26 所述用途，其用于制备可有效治疗系统性炎症应答综合征、局部缺血再灌注、过敏反应和同种异体移植物排斥的药剂。

30. 根据权利要求 26 所述用途，其用于制备可有效治疗成人呼吸窘迫综合征的药剂。

10 31. 一种鉴定 HBP 拮抗剂的方法，所述方法包括下列步骤：(a)在有 HBP 存在以及有和没有疑为所述拮抗剂的物质存在的情况下培养内皮细胞；和(b)检测所述物质对内皮细胞通透性的任何影响；其中所述内皮细胞的通透性与当在有 HBP 而没有所述物质存在的情况下培养时所述细胞的通透性相比降低，则表明所述物质是一种拮抗剂。

15 32. 根据权利要求 31 所述方法，其中在步骤(a)中，内皮细胞首先在有所述 HBP 存在的情况下培养并测定所述细胞的通透性，然后在有所述物质存在的情况下培养所述细胞。

33. 根据权利要求 31 所述方法，其中在步骤(a)中，首先在有所述物质的情况下培养内皮细胞，然后在有所述 HBP 存在的情况下培养所述细胞。

20 34. 根据权利要求 31 所述方法，其中在有 HBP 的情况下培养一种内皮细胞样品，然后在有 HBP 和所述物质存在的情况下培养第二种样品。

35. 根据权利要求 31 所述方法，其中所述哺乳动物 HBP 是人 HBP。

25 36. 一种用于鉴定 HBP 拮抗剂的方法，该方法包括下列步骤：(a)使 HBP 与那些能与 HBP 发生相互作用的第二种物质和疑为 HBP 拮抗剂的第二种物质一起培养；和(b)检测疑为拮抗剂的所述第二种物质对 HBP 与所述第一种物质相互作用的任何影响；其中所述 HBP 与所述第一种物质之间相互作用的减弱指示所述第二种物质是 HBP 拮抗剂。

30 37. 一种鉴定与天然 HBP 上至少一种表位结合的单克隆抗体的方法，其中所述表位与前激肽释放酶-H-激肽原复合物结合并激活缓激肽的释放；所述方法包括下列步骤：(a)在有 HBP 存在以及有和没有疑为所述拮抗剂的物质存在的情况下培养内皮细胞；和(b)检测所述物质对内皮细胞通透性的任何影响；其中所述内皮细胞的通透性与当在有 HBP 而没有所述物质存在的情况下

培养时所述细胞的通透性相比降低,表明所述单克隆抗体与所述 HBP 上的至少一种表位结合。

38. 根据权利要求 37 所述方法,其中所述天然 HBP 是人 HBP。

5 39. 一种鉴定与天然 HBP 上至少一种表位结合的单克隆抗体的方法,其中所述表位与前激肽释放酶-H-激肽原复合物结合并激活缓激肽的释放;所述方法包括下列步骤:(a)在有 HBP 存在以及有和没有怀疑与所述 HBP 上至少一种表位结合的单克隆抗体存在的情况下保温前激肽释放酶-H-激肽原复合物;和(b)检测所述抗体对缓激肽释放的任何影响;缓激肽释放的减少表明所述抗体与所述 HBP 上的至少一种表位结合。

10 40. 根据权利要求 39 所述方法,其中所述前激肽释放酶-H-激肽原复合物与固体支持物结合。

41. 根据权利要求 39 所述方法,进一步包括在有内皮细胞存在的情况下培养步骤(a)中的混合物。

15 42. 根据权利要求 39 所述方法,进一步包括在有血小板存在的情况下培养步骤(a)中的混合物。

43. 权利要求 39 所述方法,其中所述天然 HBP 是天然人 HBP。

44. 根据权利要求 39 所述方法,其中缓激肽的释放使用一种免疫测定法来检测。

20 45. 一种用于测定哺乳动物是否产生与 HBP 拮抗剂结合的 HBP 的方法,该方法包括下列步骤:(a)从患者体内分离 HBP 或产生 HBP 的细胞或组织;(b)使与 HBP 发生相互作用的物质、组织、细胞或其成分和所述 HBP 拮抗剂与所述 HBP 或产生 HBP 的细胞或组织一起保温;和(c)检测所述 HBP 拮抗剂对 HBP 与所述物质、组织、细胞或其成分的相互作用的影响;相互作用减弱表明所述 HBP 与所述 HBP 拮抗剂结合。

25 46. 根据权利要求 45 所述方法,其中所述 HBP 首先与所述拮抗剂一起保温,然后与能与 HBP 发生相互作用的物质、组织、细胞或其成分一起保温。

47. 根据权利要求 45 所述方法,其中所述 HBP 首先与能与 HBP 发生相互作用的物质、组织、细胞或其成分一起保温,然后与所述拮抗剂一起保温。

30 48. 一种试剂盒,它包括:(a)HBP 拮抗剂;(b)HBP 或产生 HBP 的细胞;和(c)一种与 HBP 发生相互作用的物质、组织、细胞或其成分。

49. 根据权利要求 48 所述检测试剂盒,其中所述 HBP 被标记。

50. 根据权利要求 48 所述检测试剂盒,其中所述检测试剂盒包括与 HBP 发生相互作用的一种物质。

51. 根据权利要求 50 所述检测试剂盒,其中所述物质是 H-激肽原。

52. 根据权利要求 50 所述检测试剂盒,其中所述物质被标记。

5 53. 根据权利要求 50 所述检测试剂盒,进一步包括珠。

10 54. 一种用于测定哺乳动物是否产生与结合天然 HBP 上至少一种表位的单克隆抗体结合的 HBP 的方法,其中所述表位与前激肽释放酶-H-激肽原复合物结合并激活缓激肽的释放;该方法包括下列步骤:(a)从所述哺乳动物体内分离 HBP 或产生 HBP 的细胞或组织;(b)在有或没有所述抗体存在的情况下使所述 HBP 或产生 HBP 的细胞或组织与内皮细胞一起培养;和(c)检测所述抗体对内皮细胞通透性的任何影响;通透性降低表明所述 HBP 与所述抗体结合。

55. 根据权利要求 54 所述方法,其中所述哺乳动物是人类患者。

56. 根据权利要求 54 所述方法,其中所述天然 HBP 是天然的人 HBP。

15 57. 一种用于测定哺乳动物是否产生与结合天然 HBP 上至少一种表位的单克隆抗体结合的 HBP 的方法,其中所述表位与前激肽释放酶-H-激肽原复合物结合并激活缓激肽的释放;该方法包括下列步骤:(a)从所述哺乳动物体内分离 HBP 或产生 HBP 的细胞或组织;(b)使所述 HBP 或产生 HBP 的细胞或组织与前激肽释放酶-激肽原复合物一起培养;和(c)检测所述 HBP 对缓激肽从前激肽释放酶-H-激肽原复合物中释放的任何影响;缓激肽释放减少表明
20 所述 HBP 与所述抗体结合。

58. 一种检测试剂盒,它包括(a)与 HBP 表位结合的单克隆抗体;(b)天然人 HBP;和(c)与固体支持物结合的前激肽释放酶-H-激肽原复合物。

说明书

结合肝素的拮抗剂在缓激肽 释放的抑制中的应用

5

发明领域

本发明涉及一种用于治疗或预防由哺乳动物体内缓激肽释放导致的疾病的方法，所述哺乳动物特别是一种产生肝素结合蛋白的哺乳动物，这种肝素结合蛋白与肝素结合蛋白拮抗剂结合，该方法包括对所述哺乳动物给予有效减少哺乳动物体内缓激肽释放的用量的肝素结合蛋白拮抗剂。此外，本发明涉及用于测定哺乳动物是否产生与肝素结合蛋白拮抗剂结合的肝素结合蛋白的方法和试剂盒以及一种用于检测肝素结合蛋白拮抗剂的方法。

发明背景

15 炎症

急性炎症反应由几个特征组成，包括血管管径和紧张性的改变以及导致富含蛋白质之渗出物形成的血管通透性的增加(Lewis 在《炎症中的介质》(Mediators of Inflammation)中所述，Wright, Bristol, U. K., 1986)。一旦中性粒细胞(PMN)接受了趋化信号，它们就移近血管内皮细胞并通过在内皮和中性粒细胞表面上合成的特异性粘附分子与所述内皮细胞粘附。在中性粒细胞结合在内皮细胞上之后，存在诱导血管通透性并使中性粒细胞迁移入间质组织空间的内皮裂隙通道。

接触相(contact phase)系统包括三种酶因子：因子 XI(F XI)、因子 XII(F XII)和血浆前激肽释放酶(pre-kallekrein)(PK)和分别与 F XI 和 PK 形成等摩尔复合物的非酶辅因子 H-激肽原(HK)。接触相存在于单核细胞、成纤维细胞和中性粒细胞上。由内皮细胞和诸如高岭土等非细胞性荷负电表面暴露的特异性结合位点统称“接触相”，它们允许在局部装配关键成分。酶原 F XII 向活性酶 F XIIa 的转化激活接触相系统自身(Colman 等，1986，《标准肿瘤学和血液学综述》(Crit. Rev. Oncol. Hematol.)5: 57-85)。表面结合的 F XII 和通过 HK 锚定该表面的 PK 的相互激活会产生 F XIIa 和 PKa，由此放大起始信号。然后因子 XIIa 激活因子 XI 且启动凝固的固有途径。已知 PK 还水解 HK 而产生

有效力的九肽、即缓激肽(Kaplan 和 Silverberg, 1987, 《血液》(Blood)70: 1-15)。据认为激肽是产生疼痛的炎性过程的主要介质、它们诱发血管舒张并因直接对内皮细胞的作用而增加血管通透性, 从而使内皮细胞回缩并使中性粒细胞迁移和血浆成分渗出成为可能(Oyvin 等, 1970, *Experientia* 26: 843-844)。

5 还有文献提及局部产生前列腺素和一氧化氮 NO(Hall, 1992, 《药理疗法》(Pharmacol. Ther.)56: 131-190)。因此, 激活接触相系统可以产生多种有害影响, 例如炎症、败血性休克、成人呼吸窘迫综合征、弥漫性血管内凝血、因心血管外科手术导致的手术后出血。

10 特别地, 当中性粒细胞与内皮细胞结合时, 通过内毒素的存在并通过细菌感染可以激活接触相系统(Colman 等在 1997 《血液》(Blood)90: 3819-3843 中综述)。例如, 已经发现在脓毒症中, 激活因子 XII 和前激肽释放酶可产生裂解, 这种裂解会使它们活化成与 C1-抑制剂快速反应而形成因子 XIIa-C1-抑制剂和激肽释放酶-C1-抑制剂复合物的酶。在模拟的心肺分流术中观察到激肽释放酶-C1-抑制剂复合物的形成显著增加。

15 有人发现抑酶肽(一种纤溶酶和血浆激肽释放酶的抑制剂)可在心脏手术后减少出血并减少手术后增加的出血时间。特别地, 发现抑酶肽可减少模拟的体外分流模型中的激肽释放酶-C1-抑制剂和 C1-C1-抑制剂复合物(Wachtfogel 等, 1993, 《胸腔心血管手术杂志》(J. Thorac. Cardiovasc Surg.)106: 1)。当将抑酶肽加入到灌注了肝素抗凝的全血的心肺分流回路中
20 时, 抑酶肽确实补充了肝素的作用(Bannan 等, 1998, 《英国血液学杂志》(Brit. J. Haem.)101: 455-461)。因此, 抑酶肽对那些被发现具有肝素结合回路的出血具有附加的止血有利作用。

25 当将内皮细胞储存在器官保护溶液中时抑酶肽还可以提高内皮细胞在含氧量低的冷储存条件下的存活力并改善在完整器官模型中对肺和心肌的保存(Sunamori 等, 1991, 《胸腔手术年鉴》(Ann. Thor. Surg.)52: 971-978 和 Roberts 等, 1998, 《胸腔手术年鉴》66: 225-230)。此外, 尽管发现缓激肽可增加血管通透性, 但是抑酶肽降低了这种通透性和中性粒细胞计数(O' Brien 等, 1997, 《加拿大生理学与药理学杂志》(Can. J. Physiol. Pharmacol.)75: 741-749 和 Dwenger 等, 1995, 《欧洲临床化学和临床生物化学杂志》(Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.)34: 207-214)。

肝素结合蛋白

近来已经确定了分离自人和猪的外周中性粒细胞的两种极为相关蛋白质的共价结构(参见 H. Flodgaard 等, 1991, 《欧洲生物化学杂志》(Eur. J. Biochem.)197: 535-547; J. Pohl 等, 1990, 《FEBS 通讯》(FEBS Lett.)272: 200 ff.)。这两种蛋白质表现出与中性粒细胞弹性蛋白酶的高度相似性, 但由于 5 195 位活性丝氨酸和 57 位活性组氨酸的选择性突变(胰凝乳蛋白酶编号方式(B. S. Hartley: “丝氨酸蛋白酶中的同源性”(Homologies in Serine-Proteinases) - Phil. Trans. Roy. Soc.)系列 257, 1970, p. 77ff.)), 这些蛋白质缺乏蛋白酶活性。已经将这些蛋白质根据其对肝素的高度亲合性而分别命名为人肝素结合蛋白(hHBP)和猪肝素结合蛋白(pHBP)。

10 Schafer 等(Schafer 等, 1984, 《感染性免疫》(Infect. Immun.)53: 651)已经根据抗菌活性命名了蛋白质阳离子抗微生物蛋白质(CAP37)。HBP 与 LPS 的类脂 A 成分以及内毒素强力结合($K_{\text{ass}} = 0.8 \times 10^9 \text{M}^{-1}$)。已经提示 HBP 的杀菌作用是由于结合类脂 A 所导致的(Petersen 等, 1993, 《欧洲生物化学杂志》B214: 271-279; Flodgaard 等, 1994, 《细胞生物化学杂志》(J. Cell. Biochem.)
15 增刊 18A: 摘要 E505; Pereira 等, 1993, 《美国国家科学院学报》(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)90: 4733-4737)。推定的天然 HBP 的类脂 A/LPS 结合位点是定位在 HBP 上碱性与酸性区(patch)之间的不带电区, 其包括 20-26 位和 41-43 位的残基。在类脂 A/LPS 结合位点上, Phe25、Cys26、Cys42 和 Phe43 形成一种适合于结合脂肪酸链或类脂 A 的葡糖胺基糖环的疏水袋。紧接此袋
20 的是离子袋和亲水袋(Asn20、Gln21 和 Arg23), 这种离子袋和亲水袋很适合于结合类脂 A 中葡糖胺基连接的磷酸基(Iversen 等, 1997, 《天然结构生物学》(Nature Struct. Biology)4: 265-268)。

此外, 在粪便性腹膜炎的动物模型中, 已经证实 HBP 治疗可以挽救小鼠免受致命损伤(Mercer-Jones 等, 1996, 在《外科手术论坛》中所述, pp.
25 105-108; 和 Wickel 等, 1997, 第 4 届创伤休克和脓毒病的免疫后果的国际讨论会 - (4th International Congress on the Immune Consequences of Trauma, Shock and Sepsis), Munich, Germany, pp. 413-416)。已经有人提出可以将肝素结合蛋白或其结合 LPS 的部分用于治疗败血性休克(WO95/28949, 美国专利号 5,458,874, 5,607,916 和 5,650,392)。

30 HBP 最初是因其抗生素特性和 LPS 结合特性而被研究(Gabay 等, 1989, 美国国家科学院学报 86: 5610-5614 和 Pereira 等, 1993, 美国国家科

学院学报 90: 4733-7)。然而, 目前累积的证据支持了 HBP 除其抗菌作用外还因其对补充和激活单核细胞的影响(Pereira 等, 1990, 《临床研究杂志》(J. Clin. Invest.)85: 1468-1476 和 Rasmussen 等, 1996, FEBS 通讯 390: 109-112)、对补充 T 细胞的影响(Chertov 等, 1996, 《生物化学杂志》(J. Bio. Chem.)271: 2935-2940)而参与炎症的进展。

已经发现 HBP 可诱发内皮细胞和成纤维细胞收缩(Østergaard 和 Flodgaard, 1992, 《白细胞生物学杂志》(J. Leuk. Biol.)51: 316-323)。在这方面, WO 93/05396 中公开了一种通过使 HBP 或产生 HBP 的细胞与疑为 HBP 抑制剂的物质及能够与 HBP 发生相互作用的组织或细胞一起保温来筛选 HBP 抑制剂的方法; 相互作用减少(例如内皮细胞收缩)表明该物质是一种 HBP 抑制剂。

WO99/26647 号申请中公开了肝素结合蛋白在调节或预防哺乳动物细胞凋亡中的用途。该申请还公开了 HBP 可以使大鼠胰岛瘤细胞从 IL-1 诱发的凋亡中获救。

还发现人肝素结合蛋白而非猪肝素结合蛋白可与抑酶肽(BPTI)结合(Petersen 等, 欧洲生物化学杂志 214: 271-279)。特别地, BPTI 仍然能够以 $K_d = 0.1 \times 10^{-6}M$ 结合 HBP(Petersen 等, 1993, 欧洲生物化学杂志 B214: 271-279)。已经将 HBP 的 P1 特异性确定为主要是 Lys 或 Leu(Kiczak 等, 1999, 《生物化学》(Biol. Chem.)380: 101-105)。已经提示 HBP 中影响 BPTI 结合的最主要残基是 Gly169、Gly175、Ser192 和 Asp201, 相当于胰蛋白酶中的 Asp189、Ser195、Gly216 和 Asp226(Petersen 等, 1993, 欧洲生物化学杂志 B214: 271-279)。Kiczak 等 1999, 生物化学 380: 101-106 使用噬菌体展示法构建了抑酶肽 P1 侧链上的突变体的文库。他们发现 HBP 对 P1 Lys 和对不带电的 P1 氨基酸 Leu、Thr、Met、Gln 表现出强亲和力。

发明简述

已经令人意外地发现肝素结合蛋白(HBP)可作为中性粒细胞诱发的血管渗漏和伴有缓激肽形成的接触相系统的活化中的信号连接, 且它特别在 PK 介导的 HK 裂解中起作用从而获得缓激肽序列。另外, 已经发现 HBP 拮抗剂可降低内皮细胞的通透性。本文所定义的“HBP 拮抗剂”是与肝素结合蛋白结合并抑制肝素结合蛋白的作用的物质。

本发明涉及一种用于治疗或预防由哺乳动物、特别是人类患者、特别是产生与 HBP 拮抗剂结合的 HBP 的哺乳动物体内缓激肽释放所导致的疾病的方法，该方法包括对有相应需要的所述哺乳动物给予有效调节或减少所述哺乳动物体内缓激肽释放的用量的哺乳动物肝素结合蛋白拮抗剂。所述疾病包括但不限于系统性炎症应答综合征、局部缺血再灌注(ischemia reperfusion)、过敏反应和同种异体移植物排斥。这类疾病还包括成人呼吸窘迫综合征、即系统性炎症应答综合征的一种副作用。过敏反应可以因心肺分流术、肺部外科手术、头部外伤和严重整体外伤过程中 PMN 的不适宜活化而发生。通过防止 HBP 与内皮细胞和/或与接触相系统接触可以调节或减少缓激肽的释放。在一个具体实施方案中，HBP 拮抗剂调节或减少激肽释放酶介导的 H-激肽原的裂解，该裂解获得缓激肽序列。本发明进一步涉及 HBP 拮抗剂在制备用于治疗带有与 HBP 拮抗剂结合的 HBP 的患者体内系统性炎症应答综合征、局部缺血再灌注(ischemia reperfusion)、过敏反应和同种异体移植物排斥的药剂中的应用。可以将 HBP 拮抗剂进一步用于治疗系统性炎症应答综合征并发症、即成人呼吸窘迫综合征或制备用于治疗该病的药剂。

在一个具体实施方案中，本发明涉及一种用于预防由哺乳动物、特别是人类患者、特别是产生与 HBP 拮抗剂结合的 HBP 的哺乳动物体内缓激肽释放所导致的疾病的方法，该方法包括对有相应需要的所述哺乳动物给予有效调节或减少所述哺乳动物体内缓激肽释放的用量的结合 HBP 的 Kunitz 型丝氨酸蛋白酶抑制剂结构域或其类似物或其衍生物。

在另一个具体实施方案中，本发明涉及一种用于治疗或预防由哺乳动物、特别是人类患者、特别是产生与结合 HBP 上至少一种表位的单克隆抗体结合的 HBP 的哺乳动物体内缓激肽释放所导致的疾病的方法，其中所述表位结合前激肽释放酶-H-激肽原复合物并激活缓激肽的释放；该方法包括对有相应需要的所述哺乳动物给予有效调节或减少所述哺乳动物体内缓激肽释放的用量的结合 HBP 上至少一种表位的单克隆抗体，其中所述表位结合前激肽释放酶-H-激肽原复合物并激活缓激肽。

本发明还涉及用于检测 HBP 拮抗剂的方法。在一个实施方案中，所述方法包括下列步骤：(a)在有 HBP 存在以及有和没有疑为所述拮抗剂的物质存在的情况下培养内皮细胞；和(b)检测所述物质对内皮细胞通透性的任何影响；其中所述内皮细胞的通透性与当在有 HBP 而没有所述物质存在的情况下

培养时所述细胞的通透性相比降低表明所述物质是一种拮抗剂。在另一个实施方案中，所述方法包括下列步骤：(a)使 HBP 与能与 HBP 发生相互作用的
5 第一种物质和疑为 HBP 拮抗剂的第二种物质一起保温；和(b)检测疑为拮抗剂的所述第二种物质对 HBP 与所述第一种物质的相互作用的任何影响。

5 在一个具体实施方案中，本发明涉及一种鉴定与 HBP、特别是人 HBP 的至少一种表位结合的单克隆抗体的方法，其中所述表位与前激肽释放酶-H-激肽原复合物结合并激活缓激肽的释放。在一个实施方案中，所述方法包括下列步骤：(a)在有 HBP 存在以及有和没有怀疑与 HBP、特别是人 HBP 的
10 至少一种表位结合的单克隆抗体存在的情况下培养内皮细胞，其中所述表位与前激肽释放酶-H-激肽原复合物结合并激活缓激肽的释放；和(b)检测所述物质对内皮细胞通透性的任何影响；其中所述内皮细胞的通透性与当在有 HBP 而没有所述抗体存在的情况下培养时所述细胞的通透性相比降低表明所述抗体是与 HBP 上至少一种表位结合的单克隆抗体，其中所述表位与前激肽释放酶-H-激肽原复合物结合并激活缓激肽的释放。在另一个实施方案中，
15 所述方法包括下列步骤：(a)在有 HBP 存在以及有和没有怀疑与 HBP、特别是人 HBP 上至少一种表位结合的单克隆抗体存在的情况下培养前激肽释放酶-H-激肽原复合物，其中所述表位与前激肽释放酶-H-激肽原复合物结合并激活缓激肽的释放；和(b)检测所述抗体对缓激肽释放的任何影响，缓激肽释放减少表明所述抗体与 HBP 上的至少一种所述表位结合。

20 本发明还涉及用于测定哺乳动物是否产生与 HBP 拮抗剂结合的 HBP 的方法和试剂盒。所述方法包括下列步骤：(a)从所述哺乳动物、特别是人类患者体内分离 HBP 或产生 HBP 的细胞或组织；(b)使与 HBP 发生相互作用的物质、组织、细胞或其成分及所述 HBP 拮抗剂与所述 HBP 或产生 HBP 的细胞或组织一起保温；和(c)检测所述肝素结合拮抗剂对 HBP 与所述物质、组
25 织、细胞或其成分的相互作用的影响；相互作用减少表明所述 HBP 与所述 HBP 拮抗剂结合。检测试剂盒包括：(a)HBP 拮抗剂；(b)天然 HBP；和(c)与 HBP 发生相互作用的物质、组织、细胞或其成分。

在一个具体实施方案中，本发明还涉及用于测定哺乳动物、特别是人类患者是否产生与结合天然 HBP、特别是人 HBP 上至少一种(on)表位的单克隆
30 抗体结合的 HBP 的方法和试剂盒，其中所述表位与前激肽释放酶-H-激肽原复合物结合并激活缓激肽的释放；所述方法包括下列步骤：(a)从所述哺乳动

物体内分离 HBP 或产生 HBP 的细胞或组织；(b)在有或没有所述抗体存在的情况下使所述 HBP 或产生 HBP 的细胞或组织与内皮细胞一起培养；和(c)检测所述抗体对内皮细胞通透性的任何影响，通透性降低表明所述 HBP 与所述抗体结合。在另一个实施方案中，所述方法包括下列步骤：(a)从所述哺乳动物体内分离 HBP 或产生 HBP 的细胞或组织；(b)在有或没有所述抗体存在的情况下使所述 HBP 或产生 HBP 的细胞或组织与前激肽释放酶-H-激肽原复合物一起保温；和(c)检测所述 HBP 对缓激肽从前激肽释放酶-H-激肽原复合物中释放的任何影响，缓激肽释放减少表明所述 HBP 与所述抗体结合。本发明的试剂盒包括：(a)与天然 HBP、特别是人 HBP 上的至少一种表位结合的单克隆抗体，其中所述表位与前激肽释放酶-H-激肽原复合物结合并激活缓激肽的释放；(b)天然人 HBP；和(c)与固体支持物结合的前激肽释放酶-H-激肽原复合物。

附图简述

- 15 图 1 表示与第二抗体山羊抗小鼠 F(ab)₂ 交联的 CD18 的影响。
- 图 2 表示 HBP(25 - 75 μ g/ml)对单层内皮细胞的通透性的剂量依赖性效应。
- 图 3 显示使用 HBP 多克隆抗血清对 HBP 诱发的 EC 通透性增加的抑制作用。
- 20 图 4 显示抗 HBP 抗体在 PMN 分泌对内皮细胞屏障功能的作用中的影响。
- 图 5 显示使用针对缓激肽的单克隆抗体 MBK3 对缓激肽诱导型和 HBP 诱导型 EC 通透性增加的抑制作用。在 0 时对与 mAb MBK3(40 μ g/ml)一起预温的 EC 单层的薄层侧给予缓激肽(100nM；图 5a)或 HBP(75 μ g/ml；图 5b)。
- 25 图 6 表示使用针对血浆激肽释放酶的单克隆抗体 PKH4 对 HBP 诱发的 EC 通透性增加的抑制作用。HBP(75 μ g/ml；实心符号)或缓激肽(100nM；空心符号)。
- 图 7 表示肽 HKH20 处理对 HBP 诱发的 EC 通透性增加的抑制作用。
- 图 8 表示肽 SDD31 处理对 HBP 诱发的 EC 通透性增加的抑制作用。
- 30 图 9 表示抑酶肽处理对 HBP 诱发的 EC 通透性增加的抑制作用。
- 图 10：人单核细胞的 II-6 释放。在有图中所示量的 LPS 和/或天然

HBP/[R23S, F25E]HBP/[G175Q]HBP 存在的情况下将所述单核细胞在 1ml 不含血清的培养基中培养 24 小时。

图 11:(A)使用 ³H-LPS 饱和天然 HBP、[R23S, F25E]HBP 和 [G175Q]HBP 和(B)使用固定的、浓度递增的未标记 BPTI 竞争对 ¹²⁵I-BPTI 的结合。(C)以 %0 nM 未标记 BPTI 表示的 ¹²⁵I-BPTI 的浓度。HBP 与 [R23S, F25E]HBP 之间在结合上的表现差异在“结果”部分讨论。条形(bar)表示标准差。

发明详述

肝素结合蛋白

10 在本文的上下文中，术语“肝素结合蛋白”(“HBP”)指(i)蛋白水解失活的；(ii)储存在多形核白细胞嗜天青颗粒中；和(iii)可作为单核细胞化学引诱物和/或激活单核细胞的蛋白质。优选 HBP 来自哺乳动物、特别是人。特别地，HBP 是一种成熟人 HBP，它与表示为 SEQ ID NO: 1 的氨基酸序列具有至少约 80% 的同一性、更优选至少约 90%、甚至更优选至少约 95%，最
15 优选至少约 97%(下文的“同源多肽”)，它们定性地保留了所述 HBP 的活性。

SEQ ID NO:1:

Ile Val Gly Gly Arg Lys Ala Arg Pro Arg Gln Phe Pro Phe Leu Ala Ser Ile Gln Asn Gln Gly Arg
His Phe Cys Gly Gly Ala Leu Ile His Ala Arg Phe Val Met Thr Ala Ala Ser Cys Phe Gln Ser
Gln Asn Pro Gly Val Ser Thr Val Val Leu Gly Ala Tyr Asp Leu Arg Arg Arg Glu Arg Gln Ser
20 Arg Gln Thr Phe Ser Ile Ser Ser Met Ser Glu Asn Gly Tyr Asp Pro Gln Gln Asn Leu Asn Asp
Leu Met Leu Leu Gln Leu Asp Arg Glu Ala Asn Leu Thr Ser Ser Val Thr Ile Leu Pro Leu Pro
Leu Gln Asn Ala Thr Val Glu Ala Gly Thr Arg Cys Gln Val Ala Gly Trp Gly Ser Gln Arg Ser
Gly Gly Arg Leu Ser Arg Phe Pro Arg Phe Val Asn Val Thr Val Thr Pro Glu Asp Gln Cys Arg
Pro Asn Asn Val Cys Thr Gly Val Leu Thr Arg Arg Gly Gly Ile Cys Asn Gly Asp Gly Gly Thr
Pro Leu Val Cys Glu Gly Leu Ala His Gly Val Ala Ser Phe Ser Leu Gly Pro Cys Gly Arg Gly
25 Pro Asp Phe Phe Thr Arg Val Ala Leu Phe Arg Asp Trp Ile Asp Gly Val Leu Asn Asn Pro Gly
Pro Gly Pro Ala

所述同源多肽的氨基酸序列因插入或缺失了一个或多个氨基酸残基和/或用不同氨基酸残基取代了一个或多个氨基酸残基而不同于表示为 SEQ ID NO: 1 的氨基酸序列。优选氨基酸的改变属于最小性质上的改变，其为不会
30 显著影响蛋白质的折叠和/或活性的保守氨基酸取代；小的缺失，一般为 1-约 30 个氨基酸的缺失；小的氨基-或羧基-末端延伸，诸如氨基末端的甲硫氨

酸残基；最高约达 20-25 个残基的小接头肽；或通过改变净电荷或另一种功能而有利于纯化的小的延伸，诸如聚组氨酸段、抗原表位或结合结构域。

保守取代的实例是在碱性氨基酸(诸如精氨酸、赖氨酸和组氨酸)、酸性氨基酸(诸如谷氨酸和天冬氨酸)、极性氨基酸(诸如谷氨酰胺和天冬酰胺)、疏水氨基酸(诸如亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸)、芳香氨基酸(诸如苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸)和小氨基酸(诸如甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸和甲硫氨酸)的各组范围。那些通常不改变比活性的氨基酸取代在本领域中是公知的且由例如 H. Neurath 和 R. L. Hill 在 1979 蛋白质, Academic Press, New York 中描述。最常见互换是：Ala/Ser、Val/Ile、Asp/Glu、Thr/Ser、Ala/Gly、Ala/Thr、Ser/Asn、Ala/Val、Ser/Gly、Tyr/Phe、Ala/Pro、Lys/Arg、Asp/Asn、Leu/Ile、Leu/Val、Ala/Glu、Asp/Gly 以及它们的反向互换。

该术语特别用来包括 HBP 的肽片段、特别是具有与天然 HBP 相似的趋化作用的片段。此外，在本发明方法中使用的 HBP 与诸如抑酶肽和/或针对天然人 HBP 的单克隆抗体等 HBP 拮抗剂结合。成熟形式的天然人 HBP 具有表示为 SEQ ID NO: 1 的氨基酸序列且另外它是(i)蛋白水解失活的；(ii)储存在多形核白细胞的嗜天青颗粒中；并(iii)可作为单核细胞的化学引诱物和/或激活单核细胞的蛋白。

HBP 可以分离自血小板，使用美国专利号 5,814,602 中所述方法可以从人血液中获得。更具体地说，所述蛋白质可通过对血小板提取物的分级分离而产生。使用肝素-Sepharose 进行的柱层析可以方便地达到这一目的。这类层析方法包括首先将血小板提取物上样至该柱，再用 0.5M - 3M NaCl 进行梯度洗脱，产生两个洗脱峰。第一个在 1.2M NaCl 前后的峰可以在 280nm 测定为较大蛋白质峰，公知它本身是血小板因子(PF₄)。在 1.8M NaCl 前后，蛋白质的量低于所用系统的检测极限，但该区域中的级分具有血管生成活性。另外通过 C₄ 柱上的微内径反相 HPLC 来纯化活性级分，可以在 214nm 处测到一个完全纯的蛋白质峰，该蛋白质与现有的、用不同类型血小板所得猪或人的 HBP 相同。

如果将 HBP 用于检测 HBP'拮抗剂，那么它应优选通过如下的重组 DNA 方法获得。编码 HBP 的核酸序列可以通过现有标准方法如，S. L. Beaucage 和 M. H. Caruthers, 1981, 四面体通讯(Tetrahedron Letters)22: 1859-1869 所述磷酰胺法；或 Matthes 等, 1984, 欧洲分子生物学组织杂志(EMBO Journal)3;

801-805 所述方法来合成。根据磷酰胺(phosphoamidite)法, 在例如自动 DNA 合成仪中合成寡核苷酸、将其纯化、退火、连接并克隆入合适的载体。

5 用于分离或克隆编码本发明方法中使用的肝素结合蛋白的核酸序列的技术在本领域中是公知的, 包括从基因组 DNA 中分离、由 cDNA 制备或其组合。由这类基因组 DNA 克隆本发明的核酸序列可以通过如下方式实现, 例如使用众所周知的聚合酶链反应(PCR)或表达文库的抗体筛选来检测具有共有结构特征的克隆的 DNA 片段。参见, 例如 Innis 等, 1990, 方法与应用指南(A Guide to Methods and Application), Academic Press, New York。可以使用其它核酸扩增方法, 诸如连接酶链反应(LCR)、连接活化转录(LAT)和基于
10 核酸序列的扩增(NASBA)。

然后将核酸序列插入重组表达载体中, 这种重组表达载体可以是可便利地进行重组 DNA 过程的任意载体。对载体的选择通常依赖于它将被引入的宿主细胞。因此, 该载体可以是自主复制载体, 即以染色体外实体形式存在的载体, 其复制与染色体的复制无关, 例如质粒。另一方面, 载体可以是当
15 引入宿主细胞时, 整合入宿主细胞基因组并与它所整合入的染色体一起复制的一种载体。

编码 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2 的核酸序列可以可操作地与编码异源原序列(pro)和/或信号序列的核酸连接。另一方面, 可以将分别编码 SEQ ID NOS: 4(信号序列 + 成熟 HBP)和 6(信号序列 + 原序列 + 成熟 HBP)、SEQ ID
20 NOS: 3 和 5 的核酸插入重组载体中。

SEQ ID NO:2:

atcgttgccg gccggaaggc gagccccgc cagttcccgt tcctggcctc cattcagaat caaggcaggc actctgcgg
gggtgccctg atccatgcc gcttcgtgat gaccgcggcc agctgctcc aaagccagaa ccccggggt agcaccgtgg
tgctgggtgc ctatgacctg aggcggcggg agaggcagtc ccgccagacg tttccatca gcagcatgag cga-
gaatggc tacgaccccc agcagaacct gaacgacctg atgctgcttc agctggaccg tgaggccaac
25 ctcaccagca gcgtgacgat actgccactg cctctgcaga acgccacggt ggaagccggc accagatgcc
aggtagccgg ctgggggagc cagcgcagtg gggggcgtct ctcccgttt cccagggtcg tcaactgac tgtgaccccc
gaggaccagt gtcgccccaa caactgtgac accggtgtgc tcaccgccc cggtggcatc tgcaatgggg ac-
gggggcac ccccctcgtc tgcgagggcc tggcccacgg cgtggcctcc tttccctgg ggccctgtgg ccgaggccct
gactcttca cccgagtggc gctctccga gactggatcg atggcgttt aaacaatccg ggaccggggc cagcctag

30

SEQ ID NO:3:

ggctccagcc ccctttgga catcgttggc ggccggaagg cgaggccccg ccagtccccg tcttggcct ccattcagaa
tcaaggcagg cacttctgcg ggggtgccct gatccatgcc cgcttcgtga tgaccgcggc cagctgcttc caaagccaga
acccccgggt tagcaccgtg gtgctgggtg cctatgacct gaggcgggcg gagaggcagt cccgccagac gtttccatc
5 agcagcatga gcgagaatgg ctacgacccc cagcagaacc tgaacgacct gatgctgctt
cagctggacc gtgaggccaa cctcaccagc agcgtgacga tactgccact gcctctgcag aacgccacgg
tggaagccgg caccagatgc caggtggccg gctgggggag ccagcgcagt ggggggctc tctcccgtt
tccagggttc gtcaacgtga ctgtgacccc cgaggaccag tgtcgccca acaacgtgtg caccgggtgtg ctacccgcc
gcggtggcat ctgcaatggg gacgggggca cccccctgt ctgaggggc ctggcccaag gcgtggcctc ctttccctg
gggccctgtg gccgaggccc tgactcttc acccgagtgg cgctcttccg agactggatc gatggcggtt taaacaatcc
10 gggaccgggg ccagcctag

SEQ ID NO:4

Gly Ser Ser Pro Leu Leu Asp Ile Val Gly Gly Arg Lys Ala Arg Pro Arg Gln Phe Pro Phe Leu
Ala Ser Ile Gln Asn Gln Gly Arg His Phe Cys Gly Gly Ala Leu Ile His Ala Arg Phe Val Met Thr
Ala Ala Ser Cys Phe Gln Ser Gln Asn Pro Gly Val Ser Thr Val Val Leu Gly Ala Tyr Asp Leu
15 Arg Arg Arg Glu Arg Gln Ser Arg Gln Thr Phe Ser Ile Ser Ser Met Ser Glu Asn Gly Tyr Asp
Pro Gln Gln Asn Leu Asn Asp Leu Met Leu Leu Gln Leu Asp Arg Glu Ala Asn Leu Thr Ser
Ser Val Thr Ile Leu Pro Leu Pro Leu Gln Asn Ala Thr Val Glu Ala Gly Thr Arg Cys Gln Val Ala
Gly Trp Gly Ser Gln Arg Ser Gly Gly Arg Leu Ser Arg Phe Pro Arg Phe Val Asn Val Thr Val
Thr Pro Glu Asp Gln Cys Arg Pro Asn Asn Val Cys Thr Gly Val Leu Thr Arg Arg Gly Gly Ile
Cys Asn Gly Asp Gly Gly Thr Pro Leu Val Cys Glu Gly Leu Ala His Gly Val Ala Ser Phe Ser
20 Leu Gly Pro Cys Gly Arg Gly Pro Asp Phe Phe Thr Arg Val Ala Leu Phe Arg Asp Trp Ile Asp
Gly Val Leu Asn Asn Pro Gly Pro Gly Pro Ala

SEQ ID NO:5

atgaccggc tgacagtctt ggccctgctg gctggtctgc tggcgtctc gagggccggc tccagcccc tttggacat
cgttggcggc cggaaggcga ggccccgcca gttcccgttc ctggcctcca ttcagaatca aggcaggcac tctgcgggg
25 gtgccctgat ccatgcccgc ttctgatga ccgcgggccag ctgcttcaa agccagaacc ccggggtag caccgtggtg
ctgggtgcct atgacctgag gcggcgggag aggcagtccc gccagacgtt ttccalcagc agcatgagcg
agaatggcta cgacccccag cagaacctga acgacctgat gctgctttag ctggaccgtg agccaacct caccag-
cagc gtgacgatac tgccactgcc tctgcagaac gccacggtgg aagccggcac cagatgccag gtggccggct
gggggagcca gcgcagtggg gggcgtctc cccgtttcc caggttctc aacgtgactg tgacccccga ggaccagtgt
cgccccaca acgtgtgcac cgggtgtctc acccgccgcg gtggcatctg caatggggac gggggcacc
30 ccctctctg cgagggcctg gccacggcg tggcctctt ttcctgggg cctgtggcc gaggcctga ctcttcacc
cgagtggcgc tcttccgaga ctggatgat ggcgtttaa acaatccggg accggggcca gcctag

SEQ ID NO:6

Met Thr Arg Leu Thr Val Leu Ala Leu Leu Ala-Gly Leu Leu Ala Ser Ser Arg Ala Gly Ser Ser
Pro Leu Leu Asp Ile Val Gly Gly Arg Lys Ala Arg Pro Arg Gln Phe Pro Phe Leu Ala Ser Ile
Gln Asn Gln Gly Arg His Phe Cys Gly Gly Ala Leu Ile His Ala Arg Phe Val Met Thr Ala Ala
Ser Cys Phe Gln Ser Gln Asn Pro Gly Val Ser Thr Val Val Leu Gly Ala Tyr Asp Leu Arg Arg
5 Arg Glu Arg Gln Ser Arg Gln Thr Phe Ser Ile Ser Ser Met Ser Glu Asn Gly Tyr Asp Pro Gln
Gln Asn Leu Asn Asp Leu Met Leu Leu Gln Leu Asp Arg Glu Ala Asn Leu Thr Ser Ser Val
Thr Ile Leu Pro Leu Pro Leu Gln Asn Ala Thr Val Glu Ala Gly Thr Arg Cys Gln Val Ala Gly
Trp Gly Ser Gln Arg Ser Gly Gly Arg Leu Ser Arg Phe Pro Arg Phe Val Asn Val Thr Val Thr
Pro Glu Asp Gln Cys Arg Pro Asn Asn Val Cys Thr Gly Val Leu Thr Arg Arg Gly Gly Ile Cys
Asn Gly Asp Gly Gly Thr Pro Leu Val Cys Glu Gly Leu Ala His Gly Val Ala Ser Phe Ser Leu
10 Gly Pro Cys Gly Arg Gly Pro Asp Phe Phe Thr Arg Val Ala Leu Phe Arg Asp Trp Ile Asp Gly
Val Leu Asn Asn Pro Gly Pro Gly Pro Ala

编码 HBP 的核酸序列也可以可操作地连接合适的终止子, 诸如人生长激素终止子(Palmiter 等, 出处同上)。载体可以进一步包括其它元件。这些元件包括据聚腺苷酸化信号(例如来自 SV 40 或腺病毒 5 E1b 区)、转录增强子序列(例如 SV 40 增强子)和翻译增强子序列(例如编码腺病毒 VA RNA 的序列)。重组表达载体还可以包括使载体在所选宿主细胞中复制的 DNA 序列。所述载体还可以包括选择标记, 例如一种基因、其产物补充宿主细胞中的缺陷, 诸如编码二氢叶酸还原酶(DHFR)的基因或产生耐药性的基因, 所述药物例如是新霉素、遗传霉素、氨基青霉素或潮霉素。

20 在一个具体实施方案中, HBP 可如下生成, 在允许表达 HBP 的条件下, 将含有编码成熟 HBP 及其之前的 N-末端延伸的 DNA 序列的宿主细胞在合适培养基中培养, 并从所述培养基中回收 N-末端延伸型的 HBP。

N-末端延伸可以是约 5 - 约 25 个氨基酸残基、特别是约 8 - 约 15 个氨基酸残基的序列。N-末端序列中氨基酸残基的性质并不关键。

25 为了有利于生产成熟 HBP, 一般优选编码 N-末端延伸型 HBP 的 DNA 序列包括编码蛋白酶切割位点的 DNA 序列, 所述蛋白酶切割位点位于编码 N-末端延伸的 DNA 序列与编码成熟 HBP 的 DNA 序列之间。合适的蛋白酶切割位点的实例是带有所述氨基酸序列的肠激酶切割位点、带有所述氨基酸序列的因子 Xa 切割位点。

30 另一方面, 可以在允许表达 HBP 的条件下于合适培养基中培养含有编码成熟 HBP 及其之前的信号序列的 DNA 的宿主细胞, 并从所述培养基中回收

成熟 HBP。

用于连接分别编码 HBP 或 N-末端延伸型 HBP、 Δ pro-HBP(信号 + 成熟 HBP)、启动子和终止子的核酸序列并使它们插入含有复制所必需信息的合适载体的方法对在本领域技术人员来说是众所周知的(参见, 例如

5 Sambrook 等, 出处同上)。

引入了表达载体的宿主细胞可以是能够产生 HBP 的任意细胞且优选是真核细胞, 诸如无脊椎动物(昆虫)细胞或脊椎动物细胞、例如哺乳动物细胞、特别是昆虫和哺乳动物细胞。一个优选的实施方案中, 所述哺乳动物细胞是可以在用编码哺乳动物 HBP 的核酸转染后在厌氧条件下培养的细胞。在一个更为优选的实施方案中, 所述哺乳动物细胞是腺病毒转化的细胞或来源于胚胎细胞的细胞。正如本文所定义的, 来源于胚胎细胞的细胞是获自胚胎细胞原代培养物的细胞或来自胚胎细胞原代培养物原始传代的细胞系的细胞。这类腺病毒转化的细胞或来源于胚胎的细胞的实例是人胚胎肾(HEK)细胞、特别是 HEK 293 细胞。所述昆虫细胞可以是例如, 鳞翅目或果蝇属的细胞。

用于转染哺乳动物细胞和表达引入所述细胞的 DNA 序列的方法描述在下列文献中:例如 Kaufman 和 Sharp, 1982, 分子生物学杂志(J. Mol. Biol.)159: 601-621; Southern 和 Bergm, 1982, 分子应用遗传学杂志(J. Mol. Appl. Genet.)1: 327-341; Loyter 等, 1982, 美国国家科学院学报(79: 422-426; Wigler 等, 1978, 细胞 14: 725; Corsaro 和 Pearson, 1981, 体细胞遗传学(Somatic Cell Genetics)7: 603; Graham 和 van der Eb, 1973, 病毒学(Virology)52: 456; Fraley 等, 1980, JBC 225: 10431; Capecchi, 1980, 细胞 22: 479; Wiberg 等, 1983, NAR 11: 7287; 和 Neumann 等, 1982, 欧洲分子生物学组织杂志 1: 841-845。可以如美国专利号 4,745,051 中所述用杆状病毒载体适当转染昆虫细胞。

用于培养所述细胞的培养基可以是适合于使哺乳动物细胞生长的任意常用培养基, 诸如含血清或不含血清而含有适当添加物的培养基或适合于使哺乳动物细胞生长的培养基。合适的培养基可获自商品供应商或可以按照公开的配方(参见美国典型培养物保藏中心的目录)制备。然后筛选这些细胞的抗生素抗性。随后, 用诸如趋化试验等本领域中公知的试验和分析单核细胞的细胞因子释放的试验来分析所选克隆的 HBP 活性(例如, 参见 Rasmussen

等, 1996, FEBS 通讯 390: 109-112)。

由所述细胞产生的 HBP 然后通过常规方法从培养基中回收, 其包括: 通过离心或过滤从培养基中分离宿主细胞; 用硫酸铵等盐类沉淀上清液或滤液中的蛋白质成分; 用各种层析方法如离子交换层析、亲和层析等进行
5 纯化。

如果 HBP 是 N-末端延伸型 HBP, 在从培养基中回收后, 用适当蛋白酶裂解 N-末端延伸型 HBP 有利于产生成熟(和有活性的)HBP。适当酶的实例包括但不限于肠激酶和因子 Xa。

HBP 拮抗剂

10 HBP 拮抗剂可以是抗 HBP 的多克隆或单克隆抗体。可以将下列方法用于获得抗 HBP 多克隆抗体。为了生产抗体, 可以用 HBP、优选人 HBP 注射使各种宿主动物被免疫, 这些动物包括但不限于家兔、小鼠、大鼠、绵羊、山羊等。在一个实施方案中, HBP 可以与牛血清清蛋白(BSA)或匙孔血蓝蛋白(KLH)等免疫原性载体偶联。根据宿主的不同种类, 可以使用各种佐剂来
15 增强免疫应答, 所述佐剂包括但不限于: 弗氏(完全和不完全)佐剂; 矿物胶如氢氧化铝; 表面活性物质, 诸如溶血卵磷脂、多聚醇类(pluronic polyol)、聚阴离子; 肽类; 油乳剂; 匙孔血蓝蛋白; 二硝基苯酚; 和 BCG(卡介苗)和小棒杆菌等强效人类佐剂。

下列方法可用于获得与 HBP、特别是人 HBP 的至少一种表位结合的单
20 克隆抗体, 其中所述表位与前激肽释放酶-H-激肽原复合物结合并激活缓激肽的释放。在一个优选的实施方案中, 所述单克隆抗体是人单克隆抗体。可以使用通过传代细胞系培养而生产抗体分子的任意技术。这些技术包括但不限于最初由 Kohler 和 Milstein 开发的杂交瘤技术(1975, 自然 256: 495-497)以及 trioma 技术、人 B 细胞杂交瘤技术(Kozbor 等, 1983, 今日免疫学
25 (Immunology Today)4: 72)和生产人单克隆抗体的 EBV 杂交瘤技术(Cole 等, 1985, 在单克隆抗体和癌症治疗(Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy)中所述, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96)。在本发明的另一个实施方案中, 可以应用目前的技术在转基因动物中产生单克隆抗体(PCT/US90/02545; Green, 1999, 免疫学方法杂志(J. Immunol. Methods)231: 11-23 和美国专利号
30 5,625,126 和 5,633,425)。根据本发明, 可以使用人抗体且可以通过使用人杂交瘤(Cole 等, 1983, 美国国家科学院学报 80: 2026-2030)或通过体外用 EBV

转化人 B 细胞(Cole 等, 1985, 在单克隆抗体和癌症治疗, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96 中所述)获得人抗体。

5 根据本发明, 产生单链抗体的技术(美国专利号 4,946,778)适于生产 HBP 特异性单链抗体。本发明的另一个实施方案应用构建 Fab 表达文库的技术(Huse 等, 1989, 科学 246: 1275-1281)快速而简便地鉴定具有所需 HBP 特异性的单克隆 Fab 片段。

10 可以通过公知技术生产含有抗体分子独特型的抗体片段。例如, 这类片段包括但不限于: 可以通过用胃蛋白酶消化抗体分子产生的 F(ab')₂ 片段; 可以通过还原 F(ab')₂ 片段的二硫键而产生的 Fab' 片段; 和可以通过用木瓜蛋白酶和还原剂处理抗体分子产生的 Fab 片段。

15 在抗体的生产中, 对所需抗体的筛选可以通过本领域公知的技术来完成, 如放射免疫分析; ELISA(酶联免疫吸附试验); “夹心”免疫分析; 放射免疫测量试验; 凝胶扩散沉淀素反应; 免疫扩散试验; 原位免疫测定法(例如, 使用胶体金、酶或放射性同位素标记); 蛋白质印迹; 沉淀反应; 凝集试验(例如, 凝胶凝集试验、血凝试验); 补体固定试验; 免疫荧光分析; 蛋白 A 试验; 和免疫电泳试验等。在一个实施方案中, 通过检测第一抗体上的标记来检测抗体结合。在另一个实施方案中, 通过检测第二抗体或试剂与第一抗体的结合来检测第一抗体。在进一步的实施方案中, 对所述第二抗体进行标记。用于在免疫分析中检测结合的许多方式在本领域中是公知的且它们属于
20 本发明的范围。

另一方面, 可以使用噬菌体展示技术产生抗 HBP 抗体的文库(例如, 参见 Koscienska 等, 1998, Acta Biochimica Polonica 45: 705-720)。可以对该文库进行筛选并可以将最强的结合者用作 HBP 拮抗剂。

25 HBP 拮抗剂还可以是含有与 HBP 结合的 Kunitz 型丝氨酸蛋白酶抑制剂结构域的多肽。包括 Kunitz 型丝氨酸蛋白酶抑制剂结构域的多肽一般含有约 60 个残基并在二硫键中有 6 个特殊间隔的半胱氨酸。在一个具体实施方案中, 如果 HBP 是人 HBP, 那么 Kunitz 型抑制剂可以是也称作 BPTI 的与 HBP 结合的抑酶肽或其类似物。在一个优选的实施方案中, 所述抑酶肽类似物在 12-19 位和 34-39 位上带有突变, 特别优选突变发生在 15-19 位上。可以使用的其它类似物公开在下列参考文献中: 美国专利 5,162,498、5,316,923、
30 5,395,922、5,514,585、5,510,249、5,591,603、5,618,915、5,621,074、5,673,090、

5,618,696 和 5,576,294。在一个最具体的实施方案中，所述突变是 A16H、K15A、I18M、I19S、R17T。

可以使用各种方法获得包括 Kunitz 型结构域的多肽的较大文库($10^7 - 10^9$)。例如，可以对各个使用易错聚合酶链反应(Saiki 等, 1988, 科学 93: 487-491)。当 Taq 聚合酶在扩增时引入错误的核苷酸时，在这种条件下运行的 PCR 反应将会在每种相应 Kunitz 型结构域中随机引入不正确的核苷酸。可以在噬菌体颗粒上展示该文库以便筛选与 HBP 的最佳结合者。

另一方面，可以通过应用简并寡核苷酸使特异性环发生突变(Schier 等, 1996, 基因 169: 147-153)。在 PCR 反应中将合成的随机寡核苷酸引入 Kunitz 型结构域，可生成在特定的环中带有变体的文库。

在另一方法中，可以通过 DNA 改组产生文库(Stemmer 等, 1994, 自然 370: 389-391)。可以将这种方法用于同源 Kunitz 型结构域之间的重组。简言之，将编码每种变体的 DNA 混合并切割成小片段。然后将这些片段在常规 PCR 反应中重新装配。在该反应过程中，这些小片段因为它们彼此互补而彼此连接，致使所包含的基因发生重组。

检测方法

通过测定疑为 HBP 拮抗剂的物质是否与 HBP 结合可以检测肝素结合蛋白(HBP)拮抗剂，其通过：(a)使与 HBP 发生相互作用的第一种物质和疑为 HBP 拮抗剂的第二种物质与 HBP 一起保温；和(b)检测疑为拮抗剂的所述第二种物质对 HBP 与所述第一种物质的相互作用的任何影响；其中 HBP 与第一种物质的相互作用减少表示第二种物质是 HBP 拮抗剂。

可以标记 HBP 或第一种物质。该标记优选自酶、着色或发荧光的物质、放射性同位素和复合试剂。

用作标记物质的酶的实例是过氧化物酶类(诸如辣根过氧化物酶)、磷酸酶类(诸如酸性或碱性磷酸酶)、B-半乳糖苷酶、尿素酶、葡糖氧化酶、碳酸酐酶、乙酰胆碱酯酶、葡糖淀粉酶、溶菌酶、苹果酸脱氢酶、葡糖-6-磷酸脱氢酶、b-葡糖苷酶、蛋白酶类、丙酮酸脱羧酶、酯酶类、萤光素酶等。

酶自身不可检测，必须与底物结合以催化反应，其终产物是可检测到的。可以用于本发明方法中的底物的实例包括过氧化氢/四甲基联苯胺或氯苯酚或邻苯二胺(o-phenylenediamine)或 3-(对羟苯基)丙酸或鲁米诺、羟基吲哚磷酸酯(indoxyl phosphate)、对硝基苯基磷酸酯、硝基苯基半乳糖、4-甲基伞

形基(umbelliferyl)-D-吡喃半乳糖苷或萤光素。

另一方面，被标记的物质可以包括着色或发荧光的物质(包括金颗粒)、着色或发荧光的胶乳颗粒、染料颗粒、萤光素、藻红蛋白或藻蓝蛋白。

5 可以用于本目的的放射性同位素可以选自 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{111}In 、 ^3H 、 ^{32}P 、 ^{14}C 和 ^{35}S 。可以用 γ -计数器或闪烁计数器按照本领域中公知的方式测定这些同位素发出的放射活性。

10 可以用于本目的的复合试剂可以选自生物素(与抗生物素蛋白或链霉抗生物素蛋白形成复合体)、抗生物素蛋白(与生物素形成复合体)、蛋白 A(与免疫球蛋白形成复合体)和凝集素(与碳水化合物受体形成复合体)。由于所述复合物并不可以直接被检测到，所以必须标记与复合试剂一起形成复合体的物质。标记可以使用上述用于(fro)标记酶的标记物质中的任意一种来进行。

15 在一个具体实施方案中，可以通过使用例如 Amersham Pharmacia Biotech 的 SPA 技术来检测 HBP 拮抗剂与 HBP 的结合。简单地说，来自脐静脉内皮细胞(HUVEC)的生物素化胞质膜与链霉抗生物素蛋白偶联的 PVT SPA 珠结合。这些珠可以获自 Amersham Pharmacia Biotech。将标记的人激肽原(例如 ^3H 、 ^{125}I)加入到所述膜上，直到激肽原的结合位点饱和为止。以不断增加的浓度加入 HBP 以便置换标记的激肽原并测定所掺入的标记的减少。绘制标准置换曲线。测试 HBP 拮抗剂抑制 HBP 介导的置换胞质膜上放射性激肽原的能力。特别地，用高达过量摩尔的各种浓度的 HBP 拮抗剂与 HBP 一起保温并测定 HBP 抑制 HBP 介导的从所述膜中置换标记型激肽原的能力。

25 另一方面，可以通过在有 HBP 存在和有和没有疑为拮抗剂的物质存在的情况下培养内皮细胞来检测 HBP 拮抗剂。在一个具体实施方案中，所述拮抗剂是一种与 HBP、优选人 HBP 的至少一种表位结合的单克隆抗体，其中所述表位与前激肽释放酶-H-激肽原复合物结合并激活缓激肽的释放，在一个优选的实施方案中，所述单克隆抗体是一种人单克隆抗体。在一个实施方案中，在 37°C 下先将所述抗体和 HBP 预保温约 10 分钟，再与内皮细胞一起保温。通过如下文实施例所述测定跨内皮电阻或测定清蛋白清除量来测定所述物质对内皮细胞通透性的影响。通透性降低表明所述物质确实起 HBP 拮抗剂的作用。

30 在一个具体实施方案中，可以通过将抗体与 HBP 和前激肽释放酶-H-激肽原复合物一起保温来检测与 HBP 的至少一种表位结合的单克隆抗体，其中

所述表位与前激肽释放酶-H-激肽原复合物结合并激活缓激肽的释放。正如在实施例章节进一步详述的，HBP 与前激肽释放酶-H-激肽原复合物结合，由此刺激缓激肽的释放。与 HBP 的至少一种表位结合的单克隆抗体会减少或阻止缓激肽释放。使用例如免疫分析等本领域中公知的方法可以检测缓激肽的释放。

5 在一个实施方案中，包被缓冲液含有 0.05% 吐温、15.9mM 碳酸钠、35mM 碳酸氢钠，pH 9.6。加入 H-激肽原并在 4℃ 下保温过夜。除去包被缓冲液并用含有约 50M 锌的 Tris 缓冲液(pH 7.4)洗涤平板。然后加入前激肽释放酶并在室温下将该混合物保温 1 小时。随后加入 HBP 的 Tris 缓冲液溶液，约 5
10 分钟后，开始每间隔约 10 分钟取样、持续约 1 小时，并分析缓激肽的释放。在一个实施方案中，可以使用市售 ELISA 试验(MARKIT-M Bradykin, Dainippon Pharmaceutical Co. Ltd.)检测缓激肽的释放。在这类试验中，使样品中的缓激肽和过氧化物酶标记的缓激肽与由微条孔上包被的抗家兔 IgG 抗体(山羊)俘获的抗 BK 抗体(家兔)发生竞争性反应。根据与抗缓激肽抗体结合的过氧化物酶标记型缓激肽的酶活性来确定缓激肽的浓度。

15 另一方面，可以将前激肽释放酶和 H-激肽原按等摩尔量加入到单层内皮细胞中并在 37℃ 下保温 1 小时。随后加入 HBP，约 5 分钟后开始每间隔约 10 分钟取样、持续约 1 小时，且从加入 HBP 后的并使用上述方法检测缓激肽的释放。

20 在另一个实施方案中，可以将前激肽释放酶和 H-激肽原按等摩尔量加入到含有 ACE(血管紧张素转化酶)抑制剂的血浆溶液中并在 37℃ 下保温 1 小时。随后加入 HBP，约 5 分钟后，开始每间隔约 10 分钟取样、持续约 1 小时并使用上述方法检测缓激肽的释放。

治疗方法

25 本发明的组合物包括水溶液的一部分。该溶液优选是生理上可接受的，使得除将所需的构建体输送给患者外，该溶液也不会对患者的电解质和容量平衡产生不利影响。用于该组合物的含水介质由此可以包括、例如 pH7- 7.4 的生理盐水(0.9% NaCl, 0.15M)或它的其它可药用盐。有效溶液可以通过制药领域熟在的任何方法制备，例如《Remington 氏药物科学》(Remington's
30 Pharmaceutical Science)(Gennaro, A. 编辑), Mack Pub., 1990 中所述。

HBP 拮抗剂的浓度范围很宽，即从低于约 0.5% (诸如从 1% 开始)到高至

15-20%(重量比)。所述组合物的单位剂量一般可以含有约 10mg-约 1g 的 HBP 拮抗剂。可以通过体外或体内方法测定治疗有效剂量。

5 可通过局部、皮下或通过静脉注射来给予 HBP 拮抗剂。临床医师会根据具体病情和所治疗的具体个体开据处方剂量。根据由临床主管医师确定的参数来谨慎采用和调整剂量以及给药频率。优选的给药途径例如可以是经腹膜内注射。腹膜内静脉注射 HBP 拮抗剂可以每 24 小时进行一次, 剂量范围在 0.1-100mg/kg 体重、尤其是 0.5-50mg/kg 体重、特别是 1-25mg/kg 体重。可以每 24 小时给予 1-4 次剂量或通过导管连续给药。另一方面, 可以通过在外科手术过程中连续静脉输注来给予治疗, 然后在手术后继续治疗 1-4 10 天。

仅将 HBP 拮抗剂给予那些产生与 HBP 拮抗剂结合的 HBP 的患者。为了确定患者是否产生了这类 HBP, 使用上述方法从患者血液的血小板中分离患者的 HBP。可以使用上述方法来检测 HBP 与 HBP 拮抗剂(例如一种单克隆抗体)的结合或 HBP 对内皮细胞通透性的影响, 并将它们与天然 HBP 的影响进行比较。另一方面, 还可以使用 WO93/05396 中所述方法测定在有或没有 HBP 拮抗剂存在的情况下, HBP 对内皮细胞或成纤维细胞收缩或单核细胞凝集的影响。细胞收缩或凝集程度下降表明存在 HBP 与 HBP 拮抗剂的相互作用。可以用于测定患者是否产生这类 HBP 的检测试剂盒包括: (a)HBP 拮抗剂; 15 (b)HBP 或产生 HBP 的细胞; 和(c)与 HBP 发生相互作用的物质、组织、细胞或其成分。 20

在一个具体实施方案中, HBP 或产生 HBP 的细胞或组织分离自患者。使 HBP 或产生所述 HBP 的细胞或组织与内皮细胞一起保温, 在有或没有与 HBP 的至少一种表位结合的单克隆抗体存在的情况下测定对通透性的影响, 其中所述表位与前激肽释放酶-H-激肽原复合物结合并激活缓激肽的释放。将这种影响与天然人 HBP 的影响进行比较。在一个具体实施方案中, 天然人 HBP 可以是与这类单克隆抗体结合的重组 HBP。另一方面, 在有前激肽释放酶-H-激肽原复合物存在和有单克隆抗体存在的情况下培养 HBP 或产生 HBP 的细胞或组织。测定单克隆抗体对缓激肽释放的影响。在有抗体存在的情况下缓激肽释放减少表示患者产生了与所述抗体结合的 HBP。在这类情 25 况中, 检测试剂盒包括: (a)与 HBP 上的至少一种表位结合的单克隆抗体, 其中所述表位与前激肽释放酶-H-激肽原复合物结合并激活缓激肽的释放; (b) 30

天然人 HBP；和(c)与固体支持物结合的前激肽释放酶-H-激肽原复合物。

实施例

实施例 1：活化的中性粒细胞通过经 β_2 整联蛋白的信号传输引发内皮屏障功能的改变

5 材料和方法

试剂

培养基-199、RPMI-1640(含有 L-谷氨酰胺)、胎牛血清(FBS)、胰蛋白酶-EDTA、磷酸缓冲盐水(PBS)和 Hanks 平衡盐溶液(HBSS)均来自 Life
10 Technologies(Gaithersburg, MD, USA)。明胶、胶原酶、青霉素、链霉素、过氧化氢酶、牛血清清蛋白(BSA)、N-甲酰基-甲硫氨基-亮氨酸-苯丙氨酸(fMLP)、Evans 蓝染料、十六烷基三甲基溴化铵和四甲基联苯胺获自 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)。H₂O₂ 获自 E. Meck(Darmstadt, Germany)。生物基质 I 获自 Biomedical Technologies Inc.(Stoughton, MA, USA)，而葡聚糖
15 糖 70(Macrodex)和 Ficoll-Paque 来自 Pharmacia Biotech AB(Uppsala, Sweden)。基础培养基由 M-199 和的 1:1 混合物组成，其中补充了 20% 的加热失活的 FBS、青霉素(100U/ml)和链霉素(100 μ g/ml)。针对 β_2 -整联蛋白共有 β -链(CD18)的单克隆抗体 IB4 由 Rockefeller 大学的 Samuel D. Wright 博士赠送给 Pharmacia & Upjohn(Uppsala, Sweden)的 Claes Lundberg 博士提
20 供，识别整联蛋白 α_m 链(CD11b)的 mAb 60.1 由 Karolinska Institutet 的 Manuel Patarroyo 博士提供，mAb DREG 200(抗-L-选择蛋白)是 Stanford 大学 Eugene Butcher 所赠，mAb SK11(抗-L-选择蛋白)来自 Becton Dickson(San José , CA)，mAb G44-26(抗-CD44)获自 PharMingen(San Diego, CA)。山羊抗小鼠 IgG 的 F(ab')₂ 获自 Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.(West Grove,
25 PA)，家兔抗小鼠 IgG 的 FITC-偶联型 F(ab')₂ 片段来自 Dako/A/S(Glostrup, 丹麦)。

内皮细胞

分离人脐静脉内皮细胞(HUVEC)和牛主动脉内皮细胞(BAEC)并如文献所述进行培养(Gautam 等, 1998, 英国药理学杂志(Brit. J. Pharm.)125: 1109-
30 1114)。通过短暂(2 分钟)的胰蛋白酶-EDTA 处理(0.25% 胰蛋白酶/0.01% EDTA)使第一至第五代 HUVEC 或 BAEC 脱附并将其重新铺在 0.2 μ m 孔径大

小的 Anopore 无机膜或 3.0 μ m 孔径大小的聚碳酸酯膜(Tissue Culture inserts, 10mm; NUNC, Roskilde, 丹麦)上。为了促进细胞分化并促进内皮细胞(EC)的粘附, 将膜用 50 μ l 生物基质 I(167 μ g/ml)预处理并风干。以 2×10^5 个细胞/膜的密度接种 EC 并在 37 $^{\circ}$ C 和含 5% CO₂ 的潮湿空气下于培养基中培养。每日显微镜观察, EC 生长至铺满单层, 测量通过单层的电阻(Gautam 等, 1998, 英国药理学杂志 125: 1109-1114)。

EC 屏障功能的测定

用两种不同方法评估刺激诱导的 EC 通透性的改变。为了测定跨内皮电阻(TEER), 将插入有 EC 的膜转入电阻测定室(具体内容参见 Gautam 等, 1998, 英国药理学杂志 125: 1109-1114)。将分别充入 2ml 和 400 μ l 培养基的测定室(下部/内腔(luminal)隔室)及膜插入物(上部/内腔隔室)置于细胞培养箱内。在 37 $^{\circ}$ C 下用准确置于每一隔室内彼此相关联并与单层细胞相关联的位置的电极测定穿过 EC 单层的电阻。通过扣除在接种内皮细胞前测定的包被了生物基质的相应裸膜的电阻可获得各 EC 单层的电阻。

在独立的实验中, 将 Evans 蓝染料偶联的清蛋白(EBA)用作 EC 单层的大分子通透性的标记。在刺激 EC 前, 将上部隔室内的培养基换成含有 EBA 的培养基(培养基含有混合了终浓度为 0.67mg/ml 的 Evans 蓝染料的 4% BSA)。按照分光光度法测定 620nm 处光吸收值来确定上部和下部隔室的液体样品中的 EBA 浓度(Titertek Multiskan MCC; Flow Laboratories, Solna, Sweden)。

按照下列关系式计算清蛋白的清除: $V1 = A2 \times V2 \times 1/A1$, 其中 V1 是清除体积(即内腔培养基因清蛋白扩散至内腔以外(abluminal)隔室中而清除了清蛋白之后的理论体积), V2 是内腔以外体积, 而 A1 和 A2 分别是内腔培养基及内腔以外培养基的吸收值。从应答各自特异性刺激而获得的清除体积中扣除无任何刺激时的基线清除体积(平均 $0.08 \pm 0.03 \mu$ l/分钟)。

PMN 的制备和定量

人 PMN 如所述(Gautam 等, 1998, 英国药理学杂志 125: 1109-1114)分离自富含白细胞的血浆, 以 $2-5 \times 10^7$ 个细胞/ml 的浓度将其重新悬浮于培养基中。PMN 的纯度 >98%, 通过台盼蓝染色排除法测定的其存活率 >95%。PMN 在加入到 EC 单层前, 与抗细胞表面分子的单克隆抗体一起保温 30 分钟, 所述单抗随后与第二 mAb 交联(参见实验方法)。

在某些实验中, 通过 PMN 在应用前的温度转变可上调 CD11b/CD18 的

细胞表面表达。在 4℃和有抗 CD18 mAb IB4 存在的情况下将 PMN 保温 10 分钟、转至 37℃下 10 分钟，然后回到 4℃下再 10 分钟，随后洗涤两次。按照相同方案但使用载体而非抗体制备不经抗体处理的 PMN。

5 PMN 对 EC 的粘附和跨内皮细胞的迁移通过检测 PMN 特异性髓过氧化物酶(MPO)来进行定量。简言之，使 PMN 在 0.5% 十六烷基三甲基溴化铵中裂解并离心，用分光光度法将上清液中的酶活性测定为：MPO 催化的 H₂O₂-四甲基联苯胺氧化还原反应中发生的 650nm 处吸收值的改变(Suzuki 等，1983，生物化学年鉴(Anal. Biochem.)132: 345-352)。粘附和迁移的 PMN 的 MPO 活性分别与加入到 EC 单层中的 PMN 总数的 MPO 活性相关。

10 实验步骤

在将膜插入物转入电阻测定室(保持在 37℃下)前，用补充了 10mM HEPES 的新鲜培养基(37℃)取代插入物和室内的培养基。在某些实验中，将 EC 单层在刺激前与 10μg/ml 除莠霉素 A 于 37℃一起保温 15 分钟并洗涤两次。将含有或不含与细胞表面分子结合的单克隆抗体的 PMN(2×10⁶)加入到上部隔室内(PMN: EC 之比 = 10: 1)并使之在 EC 单层上沉淀 10 分钟。用加入到下部隔室的 fMLP(10⁻⁷M)或通过第二抗体，即山羊抗小鼠 IgG F(ab')₂ 片段与细胞表面分子的抗体交联来诱导 PMN 的活化。在刺激开始前和刺激开始后的每分钟测定跨内皮电阻，直到达到电阻变化的平台期，然后每间隔 5 分钟测定一次。在研究跨过 EC 单层的清蛋白通透性和 PMN 迁移的实验中，插入物中的培养基含有 EBA。攻击后，每隔 5-10 分钟将膜插入物转入含有新鲜培养基的新孔中。所有保温均在 37℃下进行。在实验结束时，在 4℃下以 425g 将下部的孔离心 20 分钟并分析上清液中的 EBA 含量。通过分析孔中剩余沉淀的 MPO 活性来对已经迁移过单层的 PMN 进行定量。抽吸膜插入物中的培养基以便对未粘附的 PMN 进行定量，从插入物中取出含有 EC 的膜以便对粘附的 PMN 级分进行定量。

25 在独立的实验中，在 37℃下，将用抗 CD18 mAb IB4(6μg/2×10⁶个细胞)预处理 30 分钟的纯化型 PMN 用含或不含山羊抗小鼠 F(ab')₂ 的培养基培养 10 分钟。通过在室温下以 300×g 离心 15 分钟使 PMN 沉淀，离心含有 PMN 分泌产物的不含细胞的上清液以便用于体内实验(参见下文)或与 EC 单层一起使用。在后一种设定中，将膜/EC 插入物中的培养基换成含有 PMN 分泌物的培养基，如上所述记录对 TEER 和清蛋白通透性的影响。在某些情况中，

含有 PMN 分泌物的培养基在应用前进行加热培养(80℃、15 分钟)。

EC 胞内[Ca²⁺]和 f-肌动蛋白形成的测定

用 Ca²⁺敏感性荧光探针 fluo-3/AM(Molecular Probes Europe BV, Leiden, 荷兰)测定 EC 胞内游离 Ca²⁺的改变。在 37℃ 下用加入到顶部和基底外侧部表面的 fluo-3/AM(含有 2% FCS 和 10mM HEPES 的 HBSS 溶液 3μM)将膜上铺满的 BAEC 单层培养 30 分钟。将所述单层洗涤 3 次并用新鲜 HBSS 室温避光培养 20 分钟以使染料酯完全水解。将抗 CD18 或抗-L-选择蛋白处理的 PMN 加入到 EC 中, 如上所述用第二抗体 mAb 诱导受体交联。在独立的实验中, 用含有 PMN 分泌物的培养基(见上文)在无 PMN 时刺激 EC。用激光扫描共聚焦成象系统(Insight Plus; Meridian Instruments Inc., Okemon, Michigan)连续记录荧光强度, 从而测定应答这些刺激时 EC[Ca²⁺]的改变。

为了分析 EC 中应答 PMN 活化所致的 f-肌动蛋白形成, 将在生物基质包被的盖玻片上长满的 EC 单层与进行了 CD18 抗体交联的 PMN 或与等同于上述方法的含 PMN 分泌物的培养基于 37℃ 培养 15 分钟。用 IB4-处理的 PMN 所培养的 EC 作对照。在室温下将所述单层在 3.7% 甲醛的 PBS 溶液中固定 10 分钟、洗涤两次, 用 0.2% Triton X-100 的 PBS 溶液渗透(4℃ 下 1 分钟)。将细胞洗涤两次, 37℃ 下用 FITC-偶联型鬼笔环肽对肌动蛋白纤丝染色 20 分钟。再进行 3 次洗涤后, 用激光扫描共聚焦成象系统(Insight Plus; Meridian Instruments Inc., Okemon, Michigan)观测内皮细胞。

20 体内实验

为了研究 PMN 分泌产物对体内微血管通透性的作用, 对仓鼠颊囊微循环进行活体显微镜检。如文献详述(Raud & Lindbom, 1994, 微循环免疫学(Immunology of the Microcirculation), Academic Press, 1994, 第 7 章), 使已麻醉的叙利亚(Syrian)金黄仓鼠的左颊囊外翻, 以备在用保持生理温度、pH 和气压的碳酸氢盐缓冲液连续过量灌注的情况下进行显微镜观察。静脉注射(250mg/kg 体重)FITC-偶联型葡聚糖(分子量 : 150000)作为血浆示踪物以观察对大分子的血管通透性改变。使用 Leitz Orthoplan 显微镜在低放大倍数的荧光下观察暴露的颊囊中的微脉管系统并将其记录在图像(Video)中。通过监控记录, 停止过量灌注并将 37℃ 下含有 CD18 交联诱发的 PMN 分泌的 1ml 培养基局部施用在所述颊囊上。在平行实验中, 使用不进行交联但抗 CD18 处理的 PMN 培养基。

结果

5 将用抗 CD18 mAb(IB4)预处理的 PMN(2×10^6)加入到 EC/膜插入物(EC的内腔侧/电阻室上部隔室)中, 静置 10 分钟。与第二抗体山羊抗小鼠 F(ab)₂交联的 CD18 引发 TEER 的显著降低, 其在 1 分钟内显现, 在 15 分钟后到其最大值(对照值为 36 ± 13)且在整个观察期内保持这一水平(图 1)。单独用 IB4 处理 PMN 或在没有 IB4 存在的情况下用第二抗体 mAb 处理 PMN 均没有使 TEER 发生任何改变。

10 在另外的实验中研究在导致跨 EC 单层之大分子通量和 PMN 迁移的增加中 CD18 交联的量。将用饱和浓度的 IB4 预处理的 PMN 加入到 EC/膜插入物中并使之在含有 EBA 的培养基中静置 10 分钟。以类似方式用山羊抗小鼠 F(ab)₂ 诱导 CD18 交联, 按有规律的间隔将含有 PMN/EBA 的膜插入物转移至含有新鲜培养基的新孔中。在没有第二抗体存在的情况下, 存在微小而连续的清蛋白清除, $0.08 \pm 0.03 \mu\text{l} \cdot \text{分钟}^{-1}$ (平均值 \pm SD, $n=13$), 它不会随时间发生改变且实际上与在含有未处理的 PMN 的膜插入物中发现的自发性清除率相当。相反, CD18 交联所激发的 PMN 活化引起清蛋白清除率增加, 它随时间逐步增加(图 1)。清蛋白清除量的净增从第一个 5 分钟期间的 $0.5 \pm 0.1 \mu\text{l}$ 提高至 60 分钟后的 $20.0 \pm 4.5 \mu\text{l}$ (平均值 \pm SD, $n=10$)的总量。不同于增加的清蛋白清除量, CD18 交联没有产生可测定的 PMN 对 EC 的粘附或跨内皮细胞的迁移(图 1)。对 CD18 交联后 60 分钟时不同隔室内的 MPO 活性的分析显示, 20 所加入的 PMN $91 \pm 6\%$ (平均值 \pm SD, $n=9$)回收在上部隔室内的培养基中, 而在 EC/膜单元或下部隔室内的培养基中没有检测到显著的 MPO 活性。对本实验结束时洗涤的透明(transparent)膜的直接镜检证实不存在与 EC 单层粘附的 PMN。

25 用 Ca^{2+} 敏感性荧光团 fluo-3 标记单层内皮细胞并通过共聚焦激光扫描显微镜监测受刺激诱发的 EC[Ca^{2+}]改变。向 EC 单层中加入抗 CD18 处理的 PMN 没有导致 EC[Ca^{2+}]发生改变。然而, CD18 与第二抗体 mAb 的交联引起 EC 中胞质游离[Ca^{2+}]快速增加, 这种增加在约 100 秒后到达最高点且然后缓慢下降。抗体以相同方式与 L-选择蛋白交联不能诱导 EC[Ca^{2+}]发生任何改变, 而用 fMLP 刺激未处理的 PMN 后观察到与由 CD18 交联诱导的类似的 30 Ca^{2+} -应答(参见, Gautam 等, 1998, 英国药理学杂志 125: 1109-1114)。胞内 Ca^{2+} -活性改变与 EC 对 PMN 活化的功能性应答之间的因果关系通过用钙螯

合剂 BAPTA AM 预处理内皮细胞的实验来证实。这种处理完全抑制了 EC 细胞内游离 Ca^{2+} 的升高和应答 CD18 交联所导致的 TEER 改变。

5 在进一步的实验中，EC 单层与 PMN 一起培养且然后用 FITC-偶联的鬼笔环肽对肌动蛋白纤丝染色。共聚焦激光扫描显微镜显示在没有第二抗体存在的情况下用 IB4-处理的 PMN 所培养的内皮细胞显示极少的应力纤维和沿该细胞与相邻细胞直接接触之边缘的肌动蛋白薄带。另一方面，用进行了 CD18 交联的 PMN 培养的内皮细胞显示出 f-肌动蛋白含量以及应力纤维的数量和密度的显著增加。

10 为了研究由 PMN 分泌的因子是否可以控制最终导致 EC 通透性增加的那些应答，用山羊抗小鼠 $F(ab')_2$ 将用抗 CD18 mAb IB4 预处理并经洗涤已除去未结合抗体的 PMN (2×10^6) 保温 30 分钟且然后通过温和离心使之沉降。向 EC 单层中添加不含细胞的上清液引起 TEER 下降和清蛋白清除的增加，两者具有等同于加至 EC 的 PMN 中发生 CD18 交联后的变化幅度和耗时。此外，所述上清液使 EC $[Ca^{2+}]$ 和 f-肌动蛋白含量与分布发生改变。此外，对仓鼠颊囊的体内制备物局部给予含有 PMN 分泌物的上清液引起血浆从后毛细血管和小静脉中迅速渗漏。在施用后 1.5 分钟内即可观察到渗漏点且在约 5 分钟后显示出最大的反应。在用缓冲液洗涤组织后，渗漏缓慢减少。这种对微血管通透性的作用在加热处理 PMN-衍生的分泌物后消失，表明是一种热敏感因子负责其通透性增加活性。对颊囊施用不进行交联但经 IB4-处理的 PMN 不会产生任何可观察到的血浆渗漏。

20 讨论

多形核白细胞在急性炎症中粘附至内皮细胞的内表面并回到血管外组织中关键依赖于 β_2 整联蛋白的功能。大分子的血管通透性的增加伴随此细胞应答而被诱导，导致血浆渗出和水肿形成。上述实验结果已经为活化型 PMN 25 内经由 β_2 整联蛋白的跨膜(外-内)信号传输与这些细胞诱导 EC 屏障功能障碍的能力之间的因果关系提供了证据。已证实抗体诱导的 β_2 整联蛋白的连接与聚集引起与在化学引诱物刺激 PMN 后观察到的相似的 EC 通透性增加。这种细胞通讯在没有 PMN 与 EC 的物理性结合的情况下发生，从而表明 PMN 粘附和结构连接本身不会将信号直接转入 EC，由此介导通透性应答。而是，30 β_2 整联蛋白的配体结合通过胞内信号级联启动 PMN 的分泌和化学信使的释放，这一过程能够使 EC 通透性发生 PMN-依赖性改变。此外，已证实通过

该途径诱导的血管通透性改变是 EC 的涉及细胞骨架重排和可逆性胞间隙形成的活性酪氨酸激酶依赖性应答的结果, 表明 PMN-衍生因子在这一方面的非裂解性功能。

5 为了更具体地研究该过程中活化 PMN 可以将信号转入 EC 的机理, 通过 CD11/CD18 的抗体交联来模拟 PMN/EC 相互作用和 β 2 整联蛋白的粘附依赖性接合(engagement)。通过 β 2 整联蛋白的抗体交联、避免化学引诱物诱导的细胞活化, 已经证实 β 2 整联蛋白受体本身通过胞内信号传输而接合和聚集可引起 EC 通透性增加。由于这种应答在不考虑 PMN 与 EC 粘附的情况下发生, 所以 PMN 与 EC 之间的信号转移并非归因于 CD11/CD18 与 EC 表面上
10 对应受体之间的相互作用, 而是必须通过释放 PMN-衍生的信使分子来完成。在 PMN 悬浮液中发生 CD18 交联后获得的不含细胞的上清液诱导 EC 超通透性的能力可进一步支持所述理论。

实施例 2: 将中性粒细胞衍生的 HBP(HBP) 鉴定为中性粒细胞诱导的血管血浆渗漏中的信号连接物

15 在实施例 1 中, 经由 β -2 整联蛋白的 PMN 粘附是 PMN 诱导的对内皮细胞通透性之影响的先决条件且 Ca^{2+} 依赖性跨膜信号通过这种粘附激活 β -2 整联蛋白诱导的可溶性因子的分泌, 其直接引发 EC 屏障功能的改变。

正如本文实施例 2 中所述, 将该可溶性因子确定为人 HBP。实施例 2 还描述了 HBP 与接触相系统的相互作用的特征。

20 材料和方法

试剂

培养基-199、RPMI-1640(含有 L-谷氨酰胺)、胎牛血清(FBS)、胰蛋白酶-EDTA、磷酸缓冲盐水(PBS)和 Hanks 平衡盐溶液来自 Life Technologies(Gaithersburg, MD, USA)。明胶、胶原酶、青霉素、链霉素、牛血清清蛋白(BSA)、Evans 蓝染料和 FITC-偶联型鬼笔环肽获自 Sigma
25 Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)。Fluo-3/AM 获自 Molecular Probes(Eugene, OR, USA)。生物基质 I 来自 Biomedical Technologies Inc.(Stoughton, MA, USA)。葡聚糖 70(Macrodex)和 Ficoll-Paque 来自 Pharmacia Biotech AB(Uppsala, Sweden)。基础培养基由 M-199 和 RPMI-1640 的 1:1 混合物组成, 其中 RPMI-1640 补充了 20% 的加热失活的 FBS、青霉素(100U/ml)和链
30 霉素(100 μ g/ml)。针对 β_2 -整联蛋白中共有 β -链(CD18)的单克隆抗体 IB4 由

Rockefeller 大学的 Samuel D. Claes 博士赠送给的 Pharmacia & Upjohn(Uppsala, Sweden)的 Claes Lundberg 博士提供。山羊抗小鼠 IgG 的 F(ab')₂ 获自 Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.(West Grove, PA)。

5 按照下列步骤制备多克隆 HBP 抗体。给新西兰白家兔皮下注射 50μg 用弗氏完全佐剂(FCA)乳化的人肝素结合蛋白(HBP)，随后加强注射 3 次 50μg 用弗氏不完全佐剂(FIA)乳化的人 HBP、每隔两周一次。在最后一次注射后 10 天，对动物取血并分离血清。

10 按照下列步骤制备单克隆 HBP 抗体。通过皮下注射 20μg 纯化的人 HBP 的 FCA 溶液、随后注射两次 20μg 的人 HBP 的 FIA 溶液使 RBF 小鼠来免疫。给高反应者小鼠通过静脉内加强注射 20μg 的 HBP 并在 3 天后采集脾。使脾细胞与骨髓瘤细胞 Fox 细胞系融合。在 HBP 特异性 ELISA 中筛选产生抗 HBP 抗体的上清液。通过标准 FACS 方法筛选与巨噬细胞胞内部分结合的阳性细胞系。克隆阳性细胞系并在上述两种试验中再次测试。通过蛋白 A 亲和层析来纯化单克隆抗体。

15 内皮细胞

如 Jaffe 等在 1973 临床研究杂志 52: 2745-2756 中所述从新鲜脐带中分离人脐静脉内皮细胞(HUVEC)，用 Booyse 等在 1975, 血栓素质性出血(Thromb. Diath. Haemorrh.)24: 825-839 中所述方法略加改良来分离牛主动脉内皮细胞(BAEC)。简单地说，用 0.25% 胶原酶溶液将脐静脉或牛主动脉的内腔培养 20 10 分钟，用 PBS 洗去未脱壁的内皮细胞。使采集的细胞沉淀并重新悬浮于培养基中、接种在组织培养瓶内并在标准条件下培养。每隔 48 小时换一次培养基，直到培养物长满为止(3-5 天)。将第一至第五代中的 HUVEC 或 BAEC 用于本实验。EC 的鉴定和纯度测定基于圆石形态和因子 VIII/vWf 抗原的鉴定(Booyse 等, 1975, 血栓素质性出血 24: 825-839)。细胞中的因子 25 VIII/vWf 染色均匀。

在通透膜上的接种

通过短暂(2 分钟)的胰蛋白酶-EDTA 处理(0.25% 胰蛋白酶/0.01% EDTA)使培养的 EC 脱壁，将其重新铺在 0.2μm 孔径的 Anopore 无机膜或 3.0μm 孔径的聚碳酸酯膜(Tissue Culture inserts, 10mm; NUNC, Roskilde, 丹麦)上。30 为了促进细胞分化并促进 EC 的粘附，将膜用 50μl 生物基质 I(167μg/ml)处理并使之风干。以 2×10^5 个细胞/膜的密度接种 EC 并在 37℃ 和含 5% CO₂ 的潮

湿空气中于培养基中培养。EC 长成铺满的单层细胞，如每日显微镜观察并测定跨单层的电阻所估计的。

跨内皮电阻(TEER)的测定

5 为了测定跨 EC 单层的电阻，将膜插入物转入电阻测定室(ENDOHM-12; World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA)，该电阻测定室已被改变以便确保在重复测量期间将电极准确置于彼此相关并与膜插入物相关的位置。该室(下部隔室)和膜插入物(上部隔室)分别充有 2ml 和 400 μ l 培养基。在 37 $^{\circ}$ C 下使用置于细胞培养箱中的仪器进行全部测定。使用与电阻室中电极连接的欧姆计(EVOM; World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA)直接读取
10 电阻。通过扣除在接种内皮细胞前测定的包被了生物基质的相应裸膜的电阻可获得各 EC 单层的电阻。

清蛋白清除的测定

将 Evans 蓝染料偶联型清蛋白(EBA)用作 EC 单层的大分子通透性标记。将终浓度为 0.67mg/ml 的该染料与含有 4% BSA 的培养基混合。在分析清蛋白
15 通透性的实验中，将上部隔室内的培养基换成含有 EBA 的培养基。通过按照分光光度法测定 620nm 处的吸收值来确定上部和下部隔室的液体样品中的 EBA 浓度(Titertek Multiskan MCC; Flow Laboratories, Solna, Sweden)。按照下列关系式计算清蛋白的清除： $V1 = A2 \times V2 \times 1/A1$ ，其中 V1 是清除体积(即上部培养基因白蛋白扩散至基底外侧隔室而具有的理论体积)，V2 是基底
20 外侧体积，而 A1 和 A2 分别是上部和基底外侧培养基的吸收值。从应答各自特异性刺激而获得的清除体积中扣除在没有任何刺激的情况下的基线清除体积 $0.08 \pm 0.01 \mu$ l/分钟。

PMN 的分离与活化

25 使通过葡聚糖沉淀从人全血中获得的白细胞丰富的血浆小心置于 Ficoll-Paque 上层并以 400g 离心 30 分钟。将含有 PMN 的沉淀重新悬浮并用冰冷的 PBS 洗涤两次(400g, 7 分钟)。以 $2 - 5 \times 10^6$ 个细胞/ml 的终浓度将 PMN 重新悬浮于培养基中。PMN 的纯度 >98% 且通过台盼蓝排除法测定的存活率 >95%。

30 如上所述诱导中性粒细胞表面上 CD18 分子的抗体交联。简言之，用 10μ g/ml 的抗 CD18 mAb IB4 的 HBSS 溶液将纯化的 PMN(5×10^6 /ml)培养 30 分钟。在培养期间，使温度从 4 $^{\circ}$ C 转变到 37 $^{\circ}$ C 以便增加 CD11/CD18 的表面

表达。将所述细胞洗涤两次，通过添加山羊抗小鼠 IgG 的 F(ab')₂ 片段(按 1:20 稀释)完成 CD18 的交联。通过在室温下以 300g 离心 15 分钟使 PMN 沉淀，收集不含细胞的上清液。在独立的实验中，在将用 mAb IB4 预培养的 PMN 加入到 EC 单层中后诱导 CD18 的抗体交联(参见下文)。

5 实验步骤

在将膜插入物转入电阻测定室(保持在 37°C 下)前，用补充了 10mM HEPES 的新鲜培养基(37°C)取代插入物和所述室内的培养基。将 HBP(25 - 100μg/ml) 或 PMN 分泌产物加入到上部或下部隔室，每分钟测定一次跨内皮电阻，直到达到平台期，然后每隔 5 分钟测定一次。在独立的实验中，将用 mAb IB4(10μg/ml)预培养的 PMN(2 × 10⁶)加入到上部隔室中(PMN: EC 之比 = 10:1)并使之沉淀 10 分钟。通过经加入按 1:20 稀释的山羊抗小鼠 IgG F(ab')₂ 使白细胞 CD18 进行抗体交联从而诱导 PMN 的活化。在研究跨 EC 单层的清蛋白通透性的实验中，插入物中的培养基含有 EBA。在本实验过程中，每隔 5 - 10 分钟将膜插入物转入含有新鲜培养基的新孔中。所有的培养均在 37°C 下进行。在本实验后，抽吸下部孔中的培养基并分析 EBA 含量。

15 EC 胞内 Ca²⁺和 F-肌动蛋白分布的测定

用 Ca²⁺敏感性荧光探针 fluo-3/AM 测定 EC 细胞内游离 Ca²⁺的改变。在 37°C 下，用加入到上部和基底外侧表面的 fluo-3/AM 溶液(含有 2% FCS 和 10μM HEPES 的 3μM HBSS 溶液)将在生物基质 I 包被的膜上长满的 HUVEC 或 BAEC 单层培养 30 分钟。将该单层洗涤 3 次，在使染料酯完全水解成其钙敏感性游离酸形式前，将其用新鲜的 HBSS 室温避光培养 20 分钟。用加入到上部表面的 HBP 刺激 EC。通过使用激光扫描共聚焦成象系统(Insight Plus; Meridian Instruments Inc., Okemom, Michigan)连续记录荧光强度来测定应答 HBP 刺激所致的 EC[Ca²⁺]改变。

25 为了分析应答 PMN 所致的 EC 中 f-肌动蛋白的分布，在 37°C 下用 HBP 或只用载体将在生物基质包被的盖玻片上长满的 EC 单层培养 15 分钟。将所述单层用培养基洗涤两次并在室温下于 3.7% 甲醛的 PBS 溶液中固定。EC 用 0.2% Triton X-100 的 PBS 溶液渗透(4°C 下 1 分钟)、洗涤两次并在 37°C 下用 FITC-偶联型鬼笔环肽对肌动蛋白纤丝染色 20 分钟。将内皮细胞再用 PBS 洗
30 涤 3 次并用激光扫描共聚焦成象系统观测。

蛋白质印迹分析

将纯化的 HBP 或 PMN 分泌物的样品加入到 SDS 样品缓冲液中并煮沸 5 分钟。将所述样品加入到 SDS 聚丙烯酰胺梯度凝胶(3-10%)上进行电泳。将蛋白质电泳式转到硝酸纤维素膜上(Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA)以便进行免疫印迹分析。通过在牛奶中将硝酸纤维素膜保温 2 小时来封闭其它结合位点。使用蛋白质印迹分析来检测 HBP。

结果

活化的 PMN 释放 HBP

通过 CD18 的抗体交联来活化混悬液中的 PMN。将 PMN 离心, 收集上清液, 进行 SDS-PAGE。使用直接针对 HBP 的抗体进行蛋白质印迹分析可在 PMN 分泌物中鉴别出 27kD 的一条明显带。使用家兔 IgG 对照没有发现特异性带。

HBP 增加 EC 单层的通透性

向上部隔室加入 HBP(75 μ l/ml)引起跨内皮电阻显著降低, 其在 1 分钟内显现, 在 15 分钟后达到其最大值(对照的 30% \pm 3%), 且在整个观察期间均保持不变(图 2)。用 HBP 攻击还导致 EC 大分子通透性的增加, 其表现为清蛋白清除的进行性增强, 在 60 分钟内产生 20.4 \pm 3.4 μ l 的净清除体积(图 2)。EC 对 HBP 刺激的应答显然是剂量依赖性的, 正如通过用 25 和 50 μ g/ml HBP 使稳态 TEER 不明显降低所例示(图 2)。然而, 所述应答中发生改变的速率就所有 HBP 剂量而言是相同的。

用来自单层细胞基底外侧的 HBP 刺激 EC(将 HBP 加入到下部隔室中)引起与上部刺激类似的 EC 通透性改变, 不过, 这种情况是在稍高的浓度下发生。

HBP 的中和作用减弱 PMN 诱导的 EC 通透性的增加

用抗 HBP 的家兔抗血清纯化型 IgG 中和所述蛋白质的活性。在用 HBP(75 μ l/ml)刺激前, 向 EC 单层中添加 HBP 抗体(50 μ l/ml)明显减弱了 TEER 中被诱发的改变和对大分子的通透性。TEER 改变的发生有一定的潜伏期, 可达到对照的 75% \pm 5%(图 3), 显著抑制 HBP 所诱导系的应答至约 65%。类似地, 清蛋白的流出量被抑制了约 60%, 在 60 分钟内净清除体积达到 8.64 \pm 1.74 μ l(图 3)。用非特异性家兔 IgG(50 μ l/ml)处理对 HBP 诱导的 TEER 降低没有影响, 在 15 分钟后达到对照的 31% \pm 5%。

测定 HBP 抗体是否也能抑制由活化 PMN 引发的 EC 屏障功能的改变。

通过白细胞 CD18 的抗体交联来活化悬浮液中的 PMN 并将它们离心。将含有 PMN 分泌产物的上清液(参见材料和方法章节)转至 EC 单层。在有抗 HBP 抗体时, TEER 的降低和大分子通透性的增加与无抗 HBP 时对 PMW 分泌物刺激的应答相比明显受到抑制(图 4)。当将 PMN 加至 EC 单层并因此使 PMN 分泌产物直接接触 EC 单层后诱导 CD18 的抗体交联时, 获得了几乎相同的作用。

HBP 的刺激可增加 EC 细胞内游离 Ca^{2+}

用激光扫描共焦显微镜术测定是否 EC 通过胞质 Ca^{2+} 增加来应答 HBP 刺激。向载有 Ca^{2+} 敏感性荧光团 fluo-3/AM 的长满的 HUVEC 或 BAEC 单层中 10 添加 HBP(75 μ l/ml)可诱发荧光强度的快速增加, 其在 1 分钟内达到最大值, 然后逐步下降到基线水平。这种胞内 Ca^{2+} 转移清楚地表明了 EC 对 HBP 刺激的活性应答。

HBP 的刺激可诱导对 EC 微丝的识别

用 FITC-偶联型鬼笔环肽对用 HBP(75 μ l/ml)或仅用培养基培养 15 分钟的已长满的 EC 单层染色肌动蛋白微丝, 用激光扫描共焦显微镜观测。与显示出低密度 F-肌动蛋白应力纤维和沿细胞边缘显著密集的外周带的未处理之 EC 相比, 在 F-肌动蛋白含量和 HBP 刺激型 EC 的分布方面存在明显改变。跨越细胞的 F-肌动蛋白应力纤维的密度增加和外周带破裂表明 HBP 刺激导致 EC 细胞骨架的重排。

20 HBP 可增加体内血管通透性

给仓鼠颊囊微脉管局部施用 HBP(75 μ l/ml), 可在 2 分钟内产生后毛细血管和较大的小静脉中荧光示踪物的可视渗漏斑点。在攻击后的 7-10 分钟时观察到了最大渗漏反应。然后渗漏缓慢下降并在 30 分钟内完全消失。

25 用针对缓激肽的单克隆抗体 MBK3 抑制缓激肽诱导型和 HBP 诱导型 EC 通透性增加

在 0 时对已用抗缓激肽单抗 MBK3(40 μ g/ml)预培养的 EC 单层细胞内腔侧给予缓激肽(100nM; 图 5a)或 HBP(75 μ g/ml ; 图 5b)(Haasemann 等, 1991, 免疫学杂志 147: 3882-3982)。MBK3 完全阻止了由缓激肽或 HBP 诱导的 EC 通透性增加。通过对组胺诱导型通透性改变的抑制作用的缺乏证明 mAb 作用的特异性(在用缓激肽或 HBP 刺激后 15 分钟时给予组胺), N = 6。

用针对血浆激肽释放酶的单克隆抗体 PKH4 抑制 HBP 诱导型 EC 通透性增加

在 0 时对已用 mAb PKH4(40 μ g/ml) 预培养的 EC 单层细胞内腔侧给予 HBP(75 μ g/ml ; 实心符号) 或缓激肽(100nM; 空心符号)。结果如图 6 示。PKH4 阻止了由 HBP 诱导的 EC 通透性增加, 但没有阻止由缓激肽诱导的通透性改变。PKH4-处理不影响由组胺诱导的通透性改变(在用 HBP 刺激后 15 分钟时给予组胺), N = 6。

通过肽 HKH20 处理来抑制 HBP 诱导型 EC 通透性增加

用 HKH20(3 μ g/ml) 将 EC 单层培养 30 分钟, 这种处理可替换表面结合型 H-激肽原。在洗涤后, 在 0 时对 EC 细胞内腔侧给予 HBP(75 μ g/ml)、15 分钟后给予缓激肽(100nM)。使 HK 通过结构域 5 和 6 锚定 EC 表面, 其中结构域 5 最为重要。在结构域 5 中对人 HK 与 EC 结合所必需的最小氨基酸序列由具有下列序列的 20 个氨基酸肽 (HKH20) 来代表: HKHGHGHHKKNKGKKNKGK(SAQ ID NO: 7)(人 H-激肽原 479-498)。这种肽抑制 HK 与 EC 的结合(Hasan 等, 1995, 生物化学杂志 270: 19256-19261; 和 Herwald 等, 1996, 生物化学杂志 271: 13040-13047)。结果如图 7 中所示。EC 经 HKH20 处理可阻止 HBP 诱导型 EC 通透性增加, 但不能阻止由随后给予缓激肽诱导的通透性改变, N = 6。

通过肽 SDD31 处理来抑制 HBP 诱导型 EC 通透性增加

用 SDD31(3 μ g/ml) 将 EC 单层培养 30 分钟。SDD31 也称作 HK31, 它是一种来源于人 H-激肽原(HK) 结构域 6 的肽, 它阻断 HK 与血浆激肽释放酶和因子 XII 的结合(Tait 等, 1986, 生物化学杂志 261: 15396-15401; 和 Vogel 等, 1990, 生物化学杂志 265: 12494-12502)。它具有序列 SDDDWIPDIQTDPNGLSFNPISDFPDTTSPK(SAQ ID NO: 8)(人 H-激肽原 565-595)。洗涤后, 在 0 时对 EC 内腔侧给予 HBP(75 μ g/ml)、15 分钟后给予缓激肽(100nM)。结果如图 8 中所示。EC 经 SDD31 处理大大阻止了 HBP 诱导的 EC 通透性增加, EC 对缓激肽直接刺激的应答在 SDD31 处理后可以持续下去, N = 6。

通过抑酶肽处理来抑制 HBP 诱导的 EC 通透性增加

在 0 时对已用抑酶肽预培养(100 μ g/ml; 30 分钟)的 EC 单层细胞内腔侧给予 HBP(75 μ g/ml)。结果如图 9 中所示。抑酶肽处理大大阻止了 HBP 诱导的 EC 通透性增加, 但对随后给予缓激肽(100nM)所诱导的通透性改变没有阻止作用, N = 6。

HBP 突变体(G175N)因突变而不能结合抑酶肽，但其三维结构和特异性表面电荷分布没有改变。当在渗漏模型中进行测试时，这种突变体诱导缓激肽的释放并增加 EC 通透性。然而，添加抑酶肽无抑制作用。使用猪 HBP 获得了相似的结果，所述猪 HBP 与人 HBP 极为同源但因已退化的催化裂隙中 R 的存在而不能与抑酶肽结合。

5 实施例 3：肝素结合蛋白的两种突变体

已经生产了两种人 HBP 突变体[R23S,F25E]HBP 和[G175Q]HBP 以便研究推定型类脂 A/LPS 结合位点和 BPTI(牛胰腺胰蛋白酶抑制剂)结合位点上残基的结构-功能关系。G175Q 突变不改变该蛋白质的结构，但结合 BPTI 的能力已消除，且该突变体对脂多糖(LPS)诱导的细胞因子从人单核细胞中的释放仅介导极为有限的刺激作用。类脂 A/LPS 结合特性与天然 HBP 的结合特性相当。R23S、F25E 突变不会影响类脂 A/LPS 和 BPTI 的结合或脂多糖(LPS)诱导的细胞因子从人单核细胞中的释放。

10 材料和方法

15 突变蛋白的构建

Pwo DNA 聚合酶来自 Boehringer Mannheim，BamH1 和 T4 DNA 连接酶来自 New England Biolabs，草地夜蛾(sf9)细胞和 pVL1393 转移质粒来自 Invitrogen，TC100 和 SE900-II 产于 Novo Nordisk A/S，胎(Foetal)牛血清(FCS)来自 GibcoBRL。所有其它化学品均属于可获得的最精细(finest)级。

20 [R23S,F25E]HBP 突变体

使用 PCR 重叠延伸技术构建[R23S,F25E]HBP 突变体(Ho, S. N. Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K.和 Pease, L. R.(1989)基因(Amst.)77: 51-59)。通过使用寡核苷酸 1+2 和 3+6 经 PCR 制备两种部分重叠的突变片段，使用寡核苷酸 1+6 连接所得片段(表 1)。将天然人 HBP cDNA 用作 PCR 反应的模板。所得的 cDNA 编码 19 个氨基酸的原肽、222 个氨基酸的成熟部分和 3 个氨基酸的 C-末端延伸部分。将 BamH1 位点引入突变 cDNA 的每一侧以备克隆。将突变的片段连入 pVL1393 转移质粒(Invitrogen)。使用 Qiagen 中型制备(midiprep)试剂盒制备用于转染的 DNA。在纯化后，对所述插入片段进行测序。

30

表 1：用于构建[R23S,F25E]HBP 和[G175Q]HBP 突变体的寡核苷酸

序号	序列
1.	5' -CCGGGGATCCGATGACCCGGCTGACAGTCCTGG-3' (SEQ ID NO:9)
2.	5' -GGCACCCCCGCACTCGTGGCTGCCTTGATTCTG-3' (SEQ ID NO:10)
3.	5' -CAGAATCAAGGCAGCCACGAGTGCGGGGGTGCC-3' (SEQ ID NO:11)
4.	5' -GAGGGGGGTGCCCTGGTCCCCATTGCA-3' (SEQ ID NO:12)
5.	5' -TGCAATGGGGACCAGGGCACCCCCCTC -3' (SEQ ID NO:13)
6.	5' -CCGGGGATCCAACACTAGGCTGGCCCCGGTCCCGG-3' (SEQ ID NO:14)

[G175Q]HBP 突变体

一般如上所述构建该构建体。通过使用寡核苷酸 1 + 4 和 5 + 6 经 PCR 制备两种部分重叠的突变片段，使用寡核苷酸 1 + 6 连接所得的片段(表 1)。

5 表达和纯化

将 sf9 昆虫细胞维持在补充了 10% FCS 的 TC100 培养基中。在感染前，将该培养基换成不含血清的 SF900-II。如文献中对天然人 HBP 所述在不含血清的培养基中表达两种突变体，并从培养物上清液中纯化突变体(Rasmussen, P. B., Bjørn, S., Hastrup, S., Nielsen, P. F., Norris, K., Thim, L., Wiberg, F. C., 10 和 Flodgaard, H.(1996), FEBS 通讯 390: 109-112)。

测定 LPS 诱导的 IL-6 从单核细胞中的释放

分离人单核细胞并如所述处理(Rasmussen, P. B., Bjørn, S., Hastrup, S., Nielsen, P. F., Norris, K., Thim, L., Wiberg, F. C., 和 Flodgaard, H.(1996), FEBS 通讯 390: 109-112)，但不包括从培养基中除去 1% 的非必需氨基酸。

15 测定 ³H-LPS 与 HBP 的结合

通过如(Linde, V., Bjørn, S., Kastrup, J. S., 和 Flodgaard, H., 2000, 生物技术(Biotechniques)28; 218-222)所述的闪烁近似性分析技术测定对脂多糖(³H-LPS)的亲合力。将全部样品重复进行测试、一式三份。

对 ³I-BPTI 与 HBP 结合的测定

20 使用基本上如对 LPS 分析所述的 SPA 试验评价对 BPTI 的亲合力(Linde, V., Bjørn, S., Kastrup, J. S., 和 Flodgaard, H., 2000, 生物技术 28; 218-222)但试验方法略有改动。将 ³H-LPS 交换成 ³I-BPTI(由 Novo Nordisk A/S 制备)并将缓冲液改变成包括 0.05% BSA 和 0.05% Triton X-100 的 PBS(20mM 磷酸盐 pH 7.4 和 150mM NaCl)。通过用固定的浓度增加的未标记 BPTI 进行竞争性

研究来测定 HBP 和突变体的相对亲和力。

结果

生物学鉴定

比较两种突变体与天然 HBP 的生物活性中,以剂量依赖性方式促进体外
5 LPS-诱导的 Il-6 从人单核细胞中释放的能力。用闪烁近似性试验(SPA)测定
两种突变体和 HBP 的 LPS 亲和力(Linde, V., Bjørn, S., Kastrup, J. S., 和
Flodgaard, H., 2000, 生物技术 28; 218-222)。两种突变体以饱和方式结合
 ^3H -LPS, 它们的表观 K_d (约 0.7g/mL)与天然 HBP 中所见相似(图 11a)。此外,
按照相似的闪烁近似性试验测定两种突变体和天然 HBP 对 BPTI 的亲和力,
10 其中将 ^3I -BPTI 用作 HBP 的配体。[R23S,F25E]HBP 突变体和[G175Q]HBP
结合 BPTI, 而[G175Q]HBP 突变体未见结合(图 11b)。通过添加固定的浓度
增加的未标记 BPTI 所进行的竞争性研究表明: ^3I -BPTI 以约 7nM 的相似表
观 IC_{50} 值结合 HBP 和[R23S,F25E]HBP。如图 11c 所示, [R23S,F25E]HBP
显然具有比 HBP 更大的结合能力。这种差异可能是由于[R23S,F25E]HBP 结
15 合所用不同形式的碘化 BPTI 的能力所造成的。然而, 较大的结合能力没有
影响 ^3I -BPTI 的亲和力。此外, 已经通过竞争性实验研究了 ^3H -LPS 置换结合
天然 HBP 的 ^3I -BPTI 及反向置换的能力:通过添加多达 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的未标记 LPS
来竞争对 ^3I -BPTI 的结合。通过添加多达 50mM 的未标记 BPTI 来竞争对
20 ^3H -LPS 的结合。在两种情况中均没有观察到抑制作用, 这表明 LPS 和 BPTI
结合位点定位在 HBP 分子的不同部分上。

体外生物活性试验数据证实: 与[R23S,F25E]HBP 和天然 HBP 相反,
[G175Q]HBP 对脂多糖(LPS)诱导的细胞因子从人单核细胞中的释放仅介导
极有限的刺激作用(图 10)。

本文所述和要求保护的本发明并不局限于本文所公开的特殊实施方案
25 的范围, 因为这些实施方案用来解释本发明的几个方面。任何相同的实施方
案均属于本发明的范围。实际上, 可以根据上述描述对包括本文表明和描述
的实施方案在内的本发明作各种修改, 这对本领域技术人员来说是显而易见的。
这类修改也属于所附权利要求的范围。

本文引入了各种参考文献, 将其全部公开内容引入作为参考。

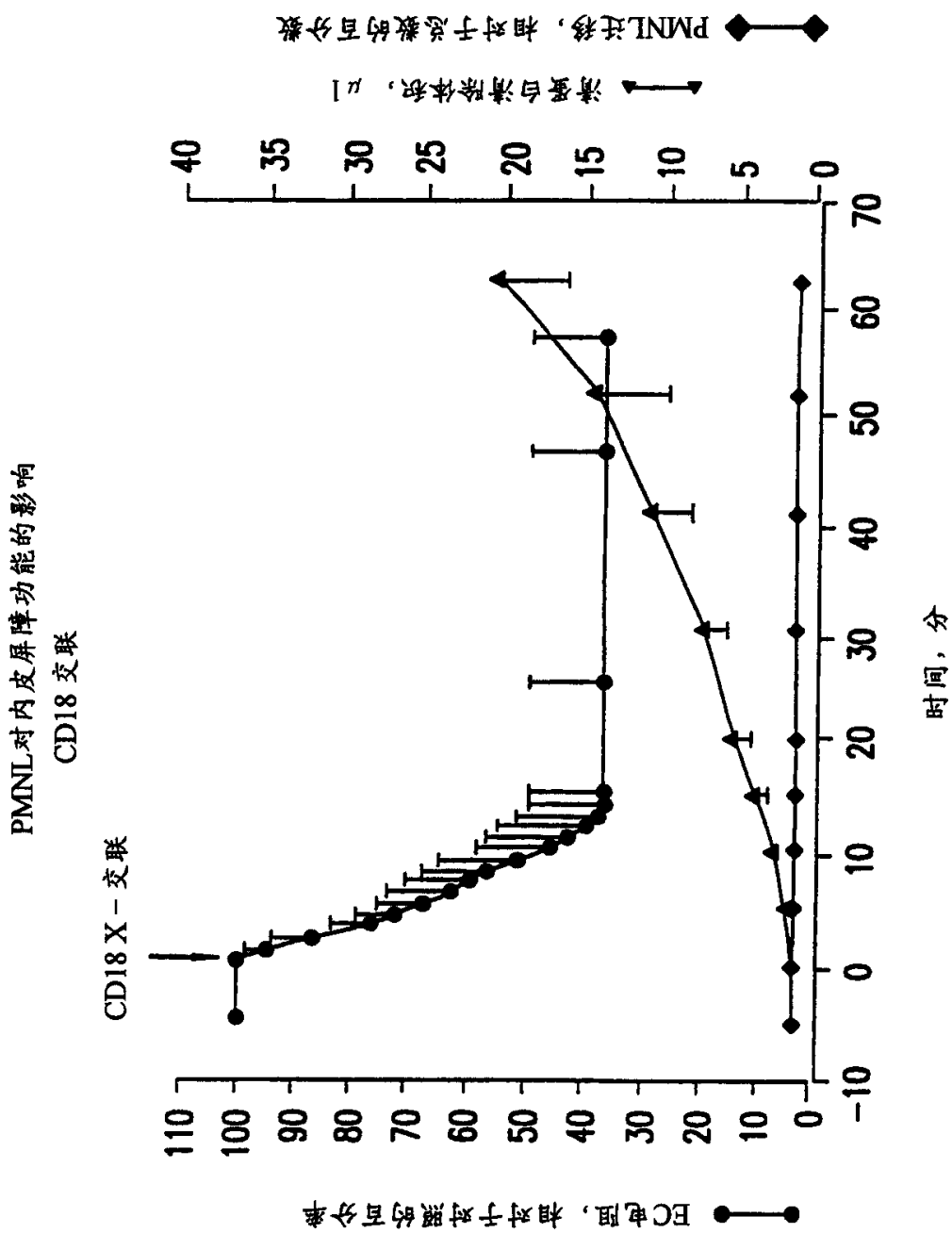


图 1

HBP 对内皮屏障功能的效应
尖端刺激

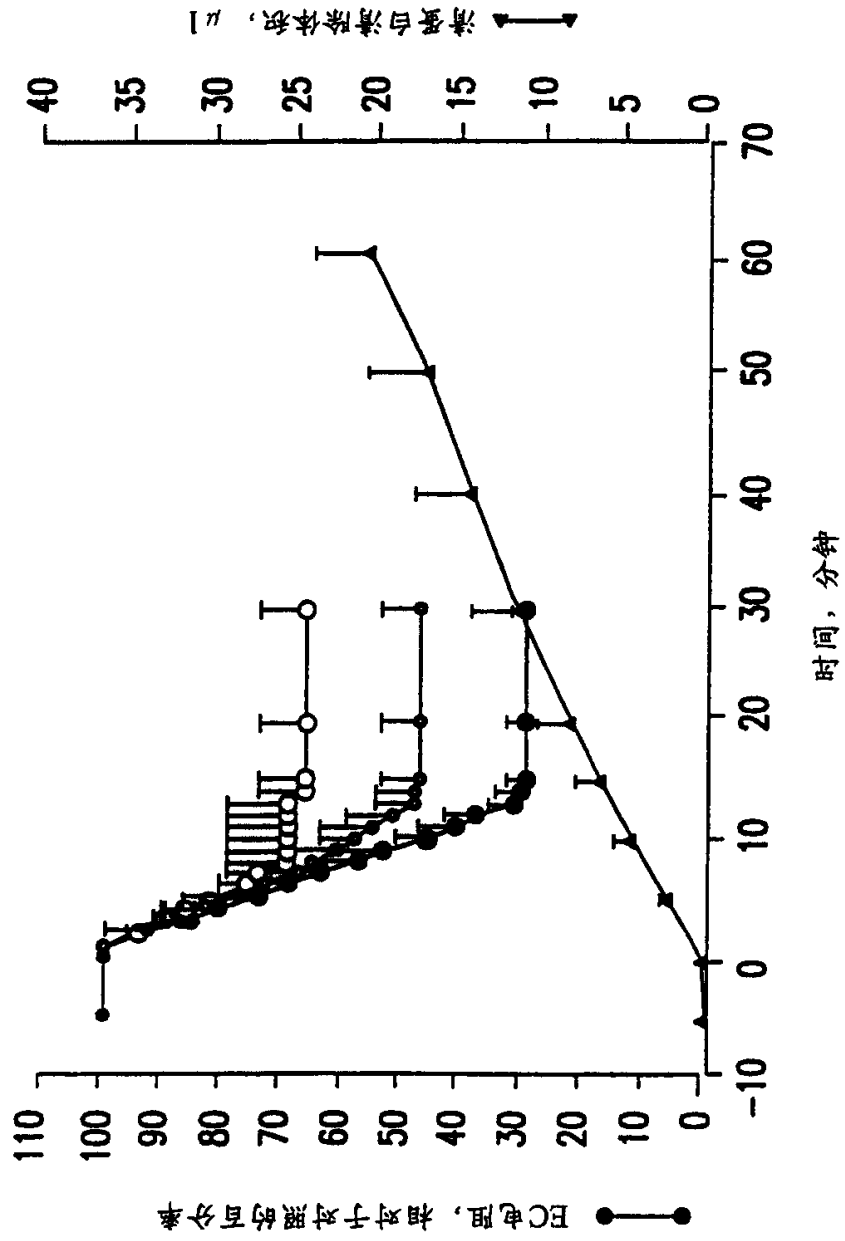


图 2

HBP 对上皮屏障的影响
抗-HBP处理

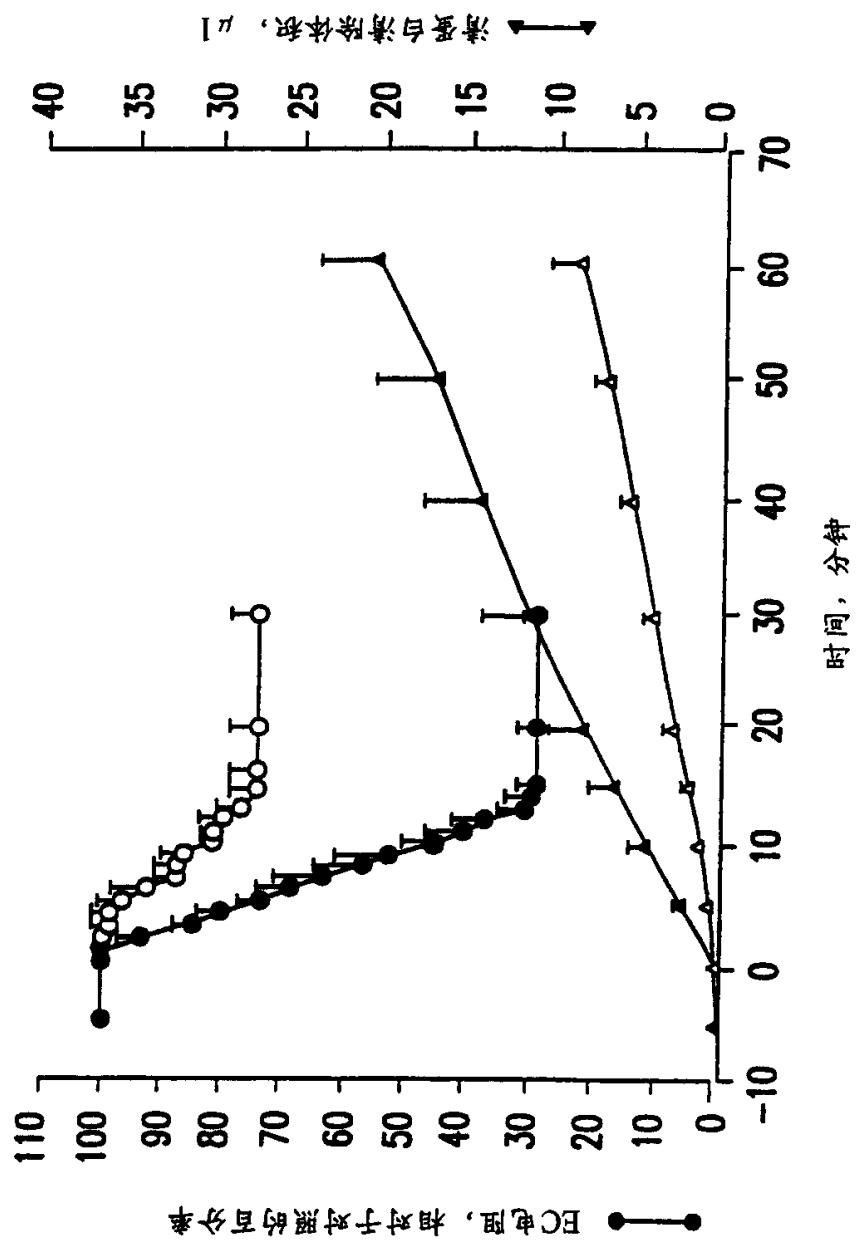
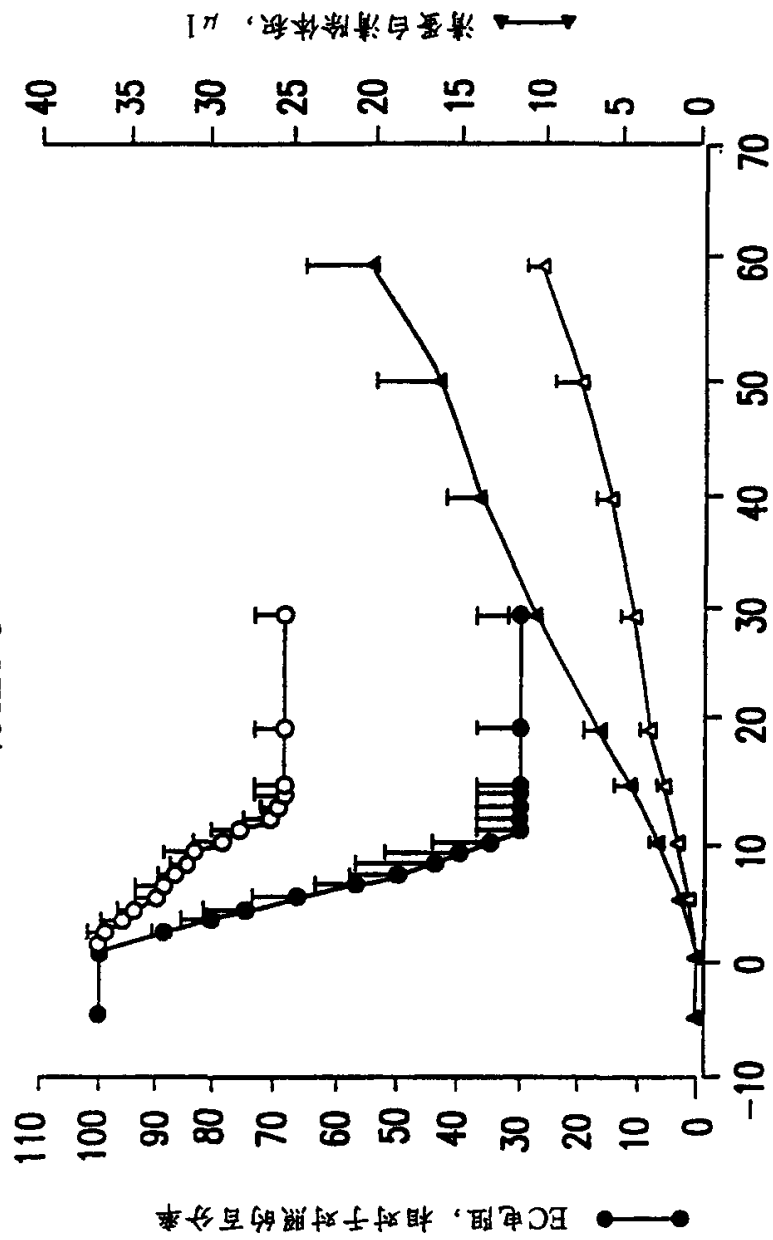


图 2

PMN分泌对表皮屏障功能的影响

抗-HBP处理



时间, 分钟

图 4

缓激肽诱导的对内皮屏障功能的作用
MBK3-处理

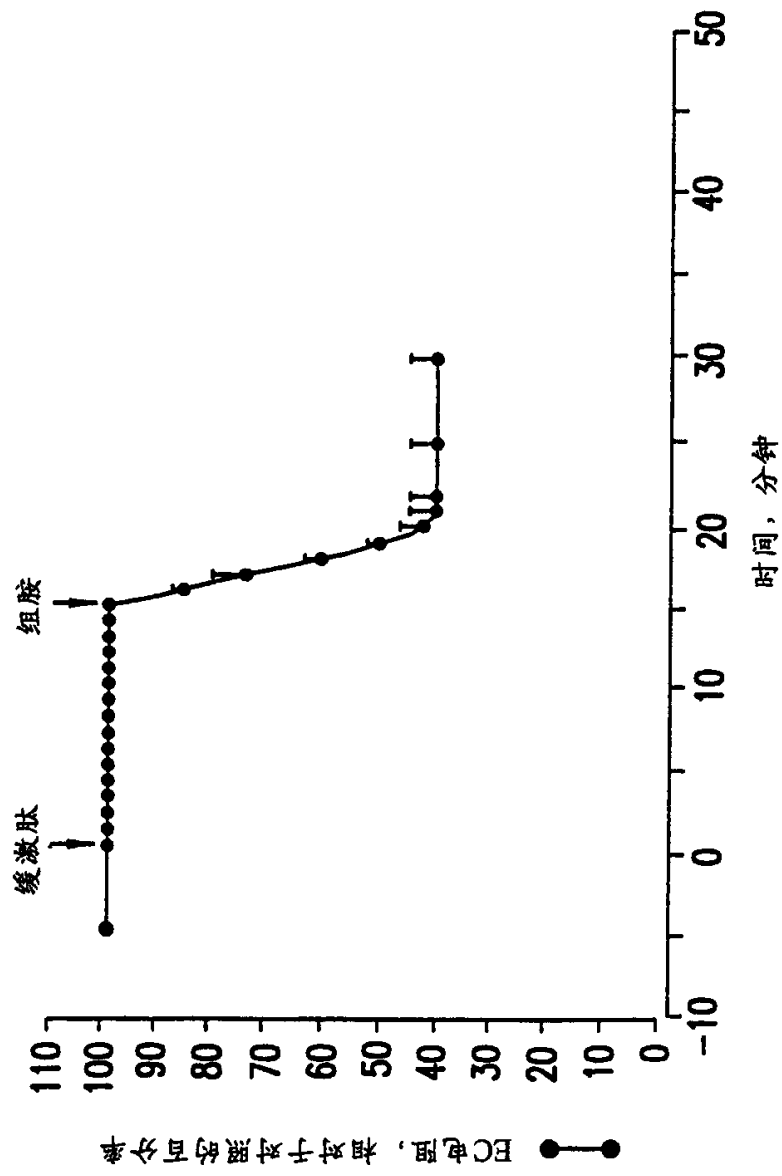


图 5a

HBP诱导的对内皮屏障功能的作用
MBK-3处理

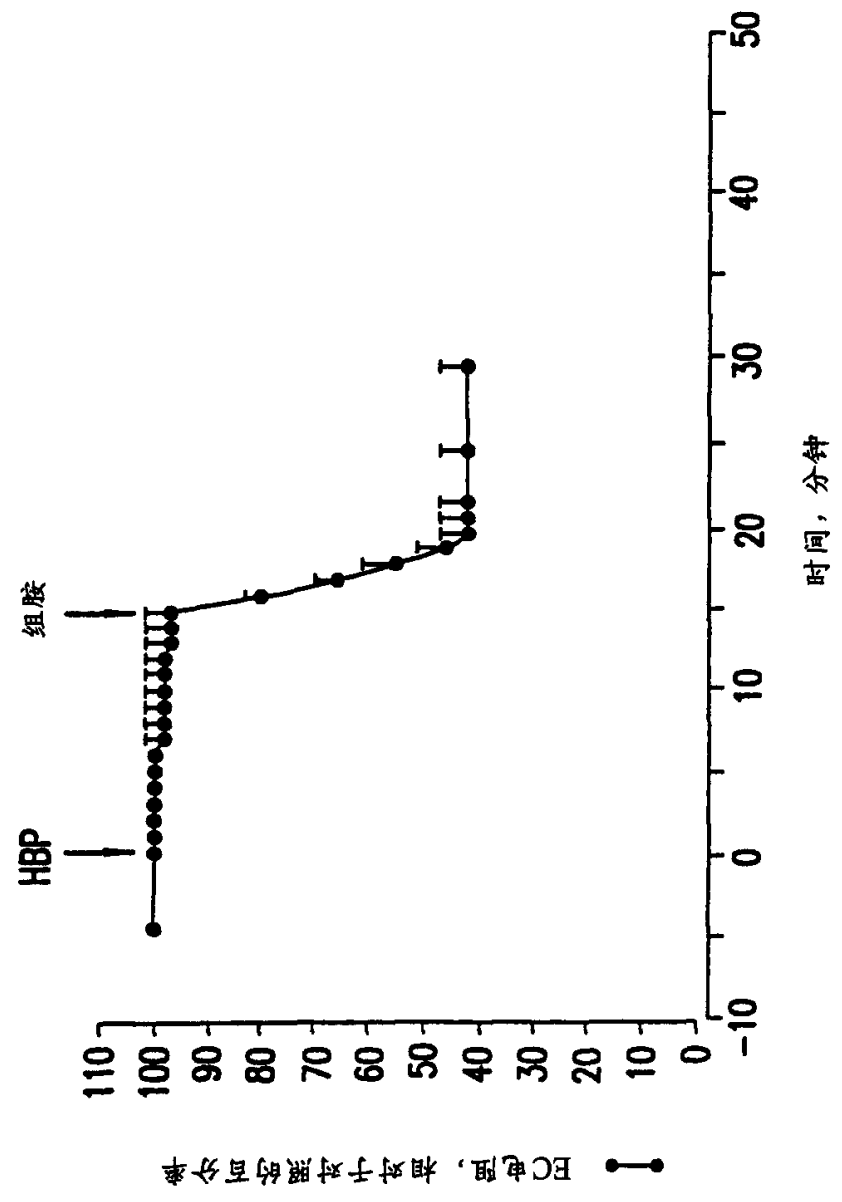


图 5b

HBP诱导的对内皮屏障功能的作用
PKH4-处理

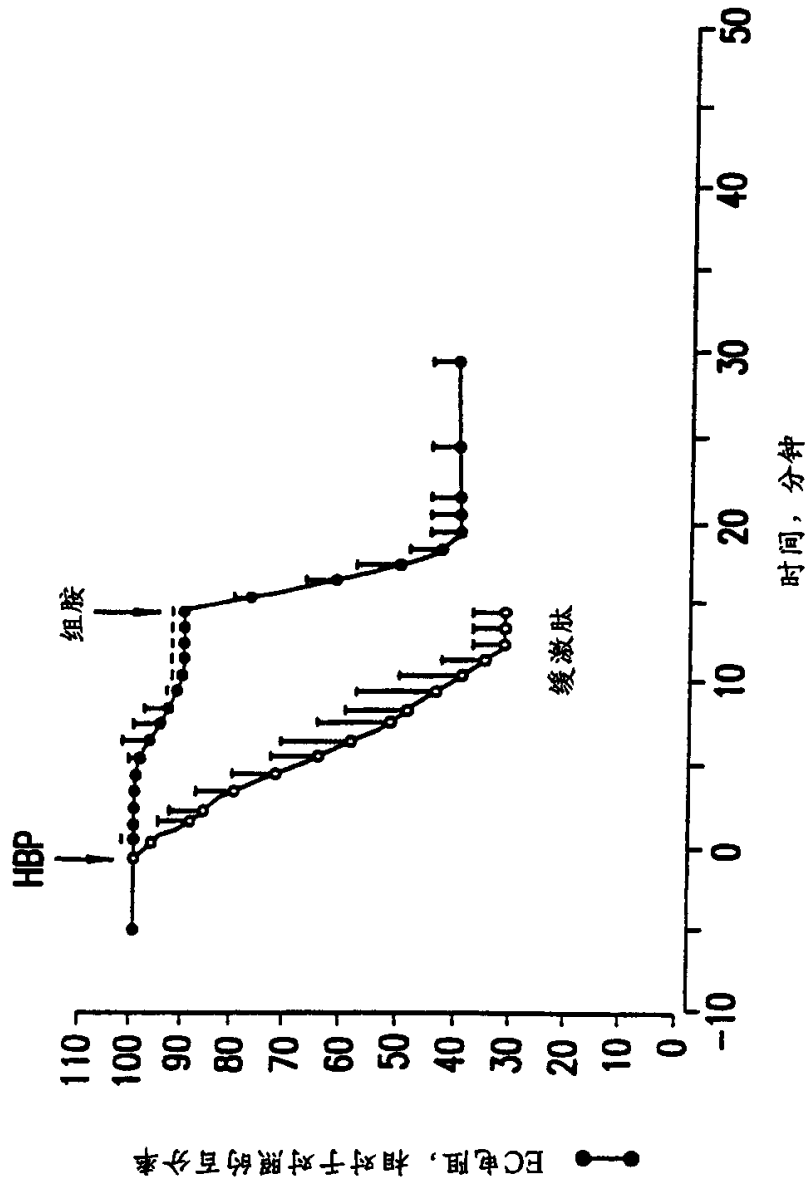


图 6

HBP诱导的对内皮屏障功能的作用
HKH20 处理

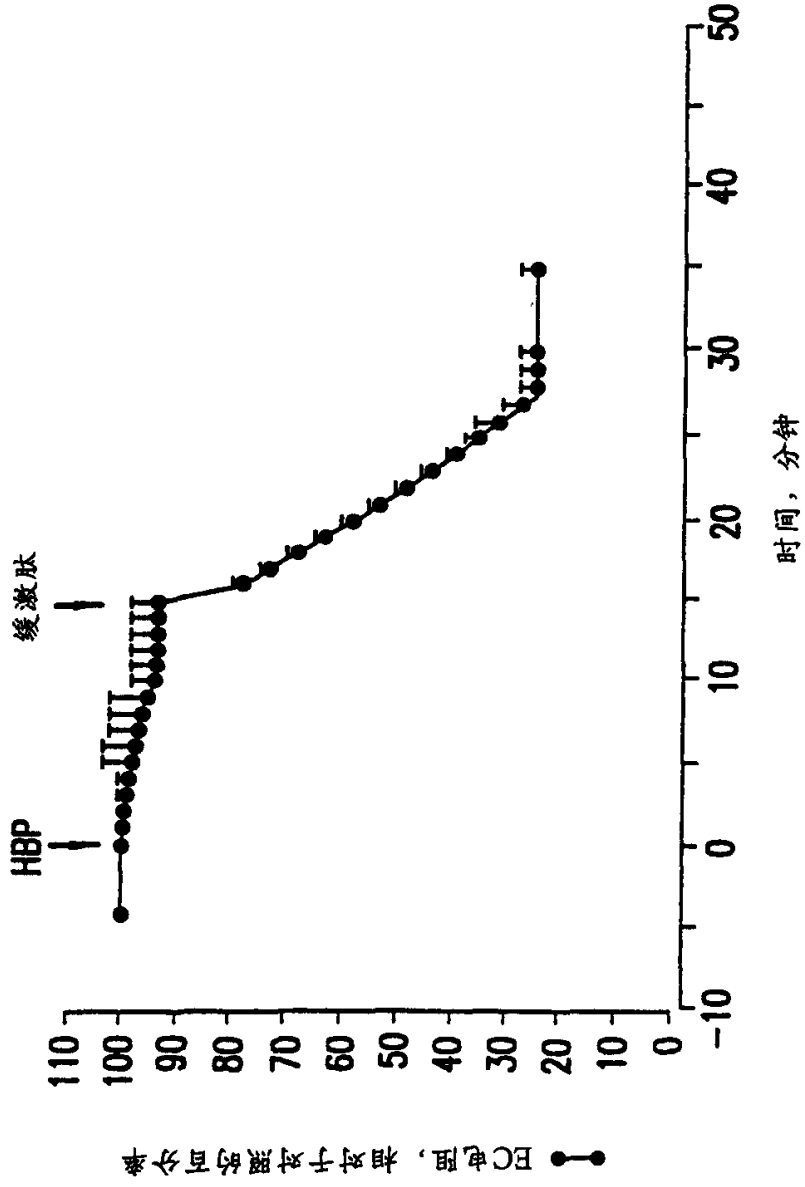


图 7

HBP 诱导的对内皮屏障功能的作用
HK31/SDD31 处理

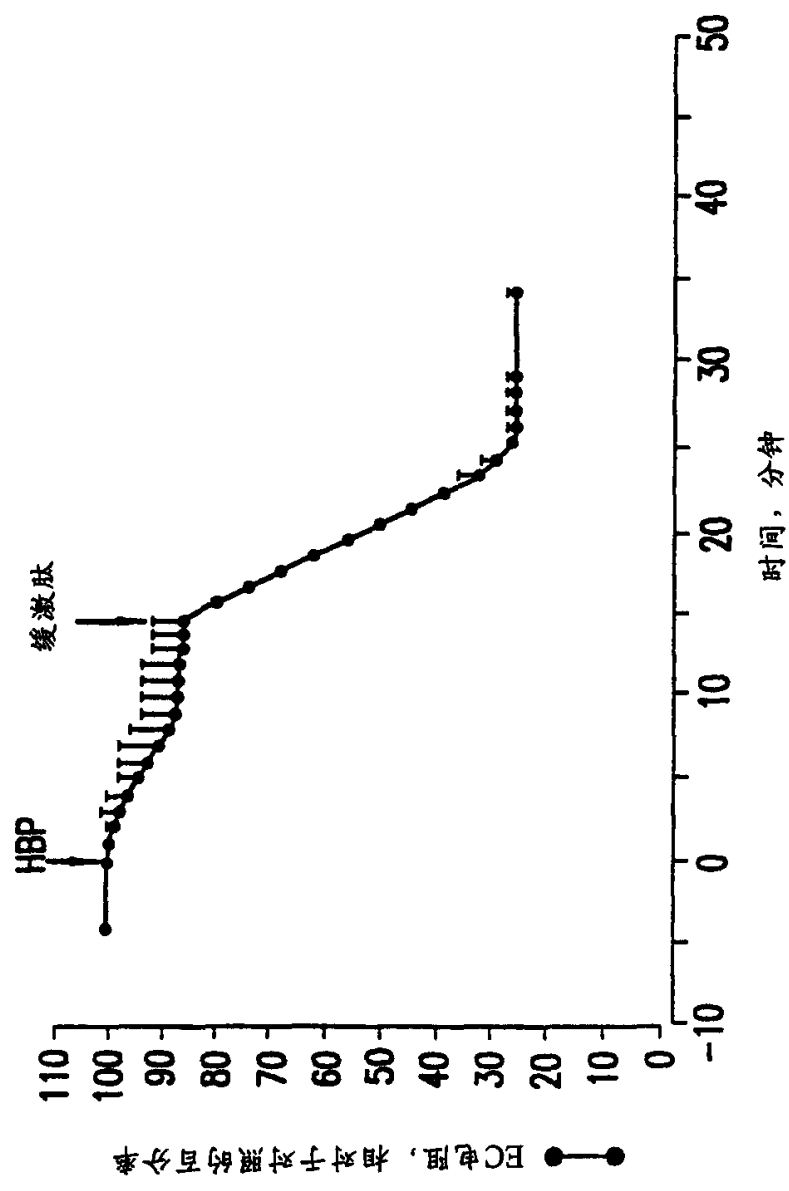


图 8

HBPP 诱导的EC屏障功能上的改变
抑酶肽处理

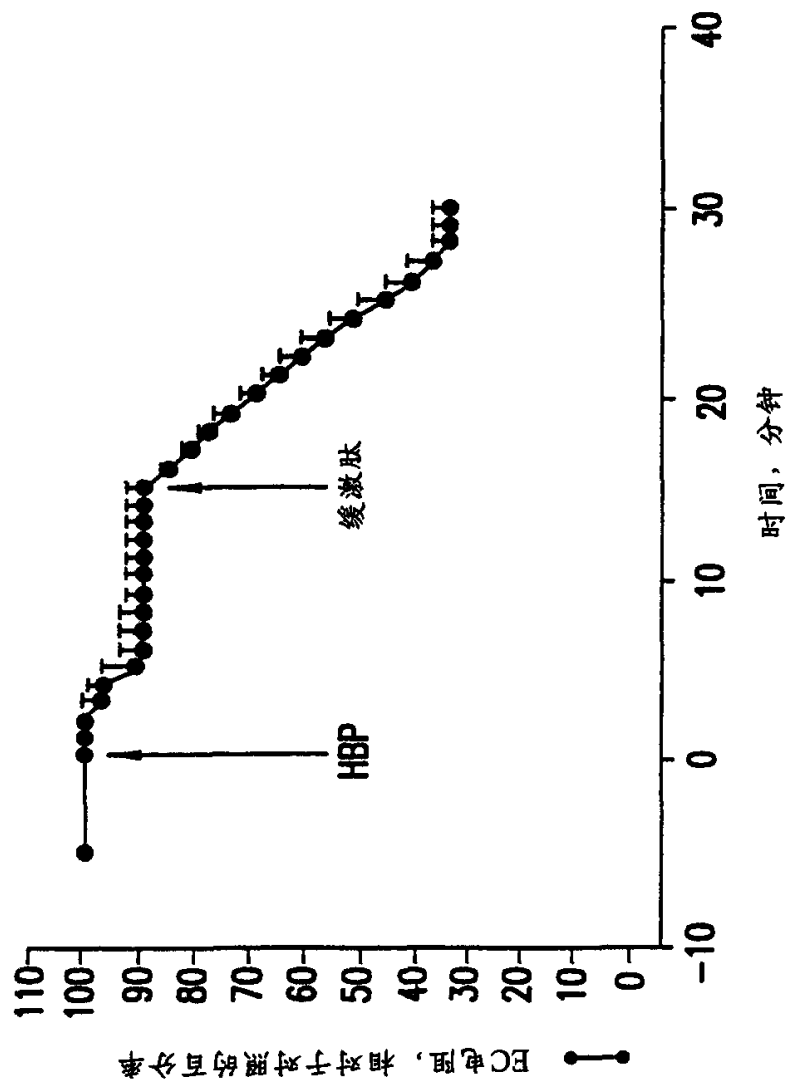


图 9

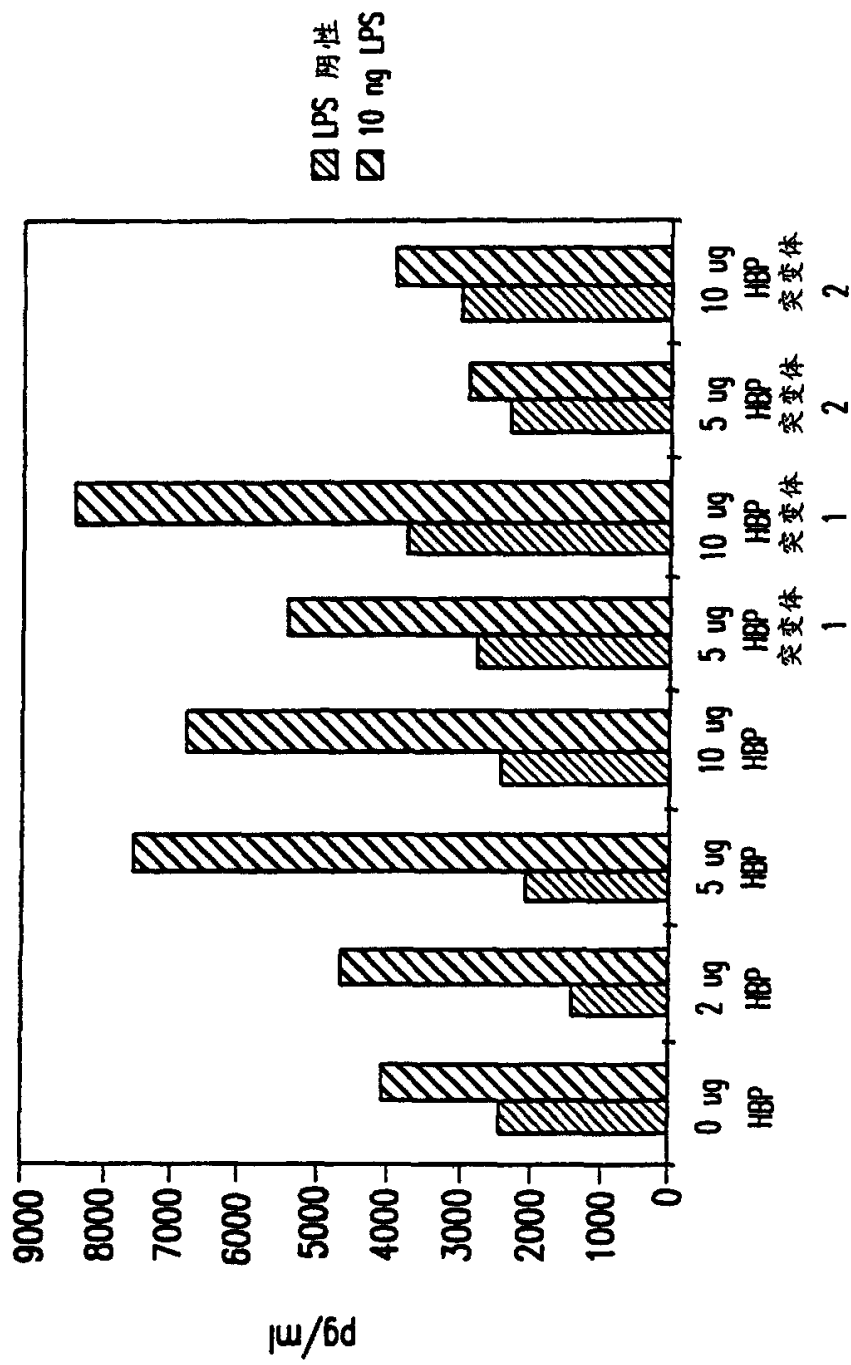


图 10

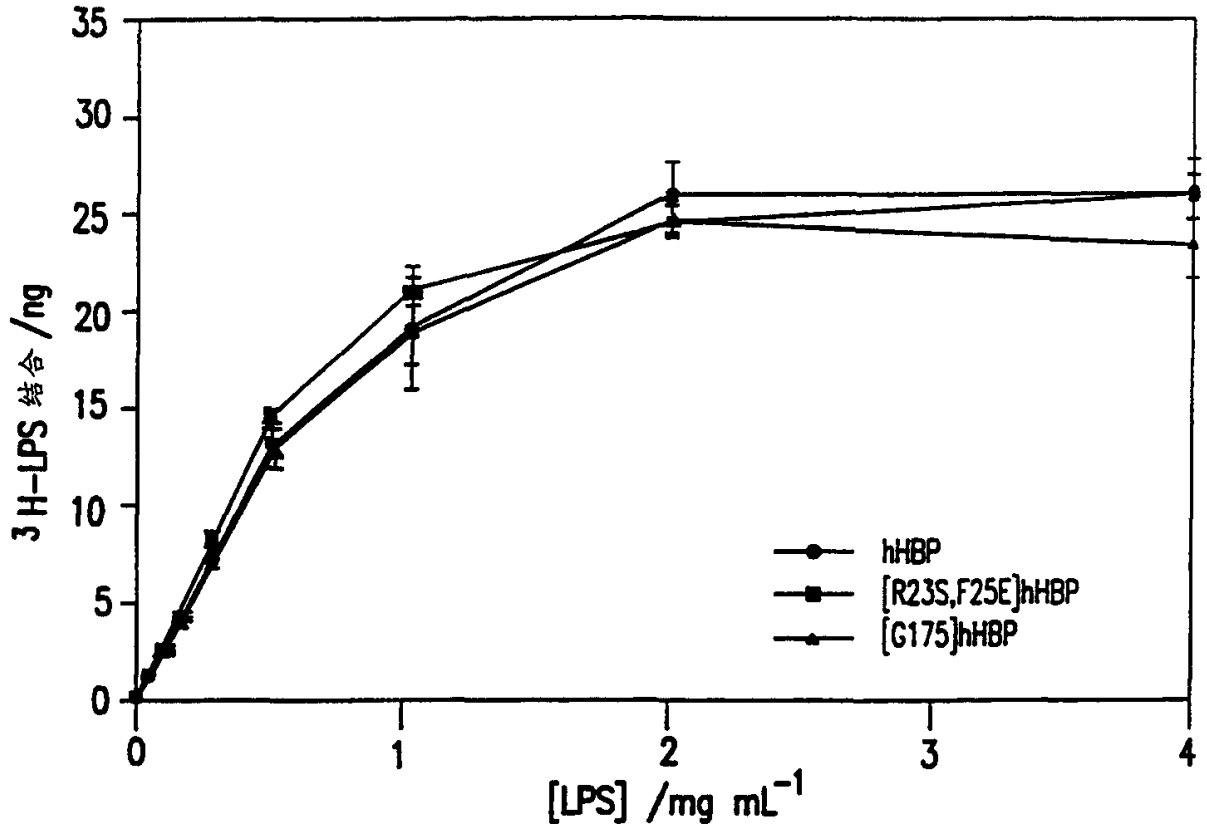


图 11a

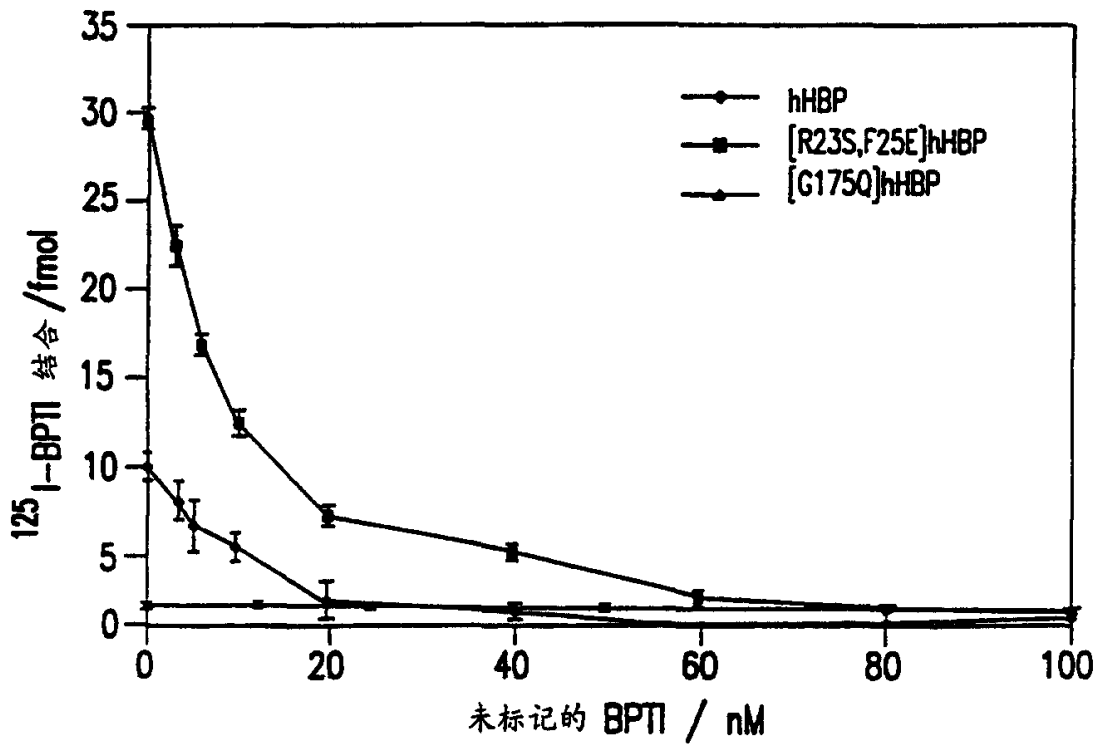


图 11b

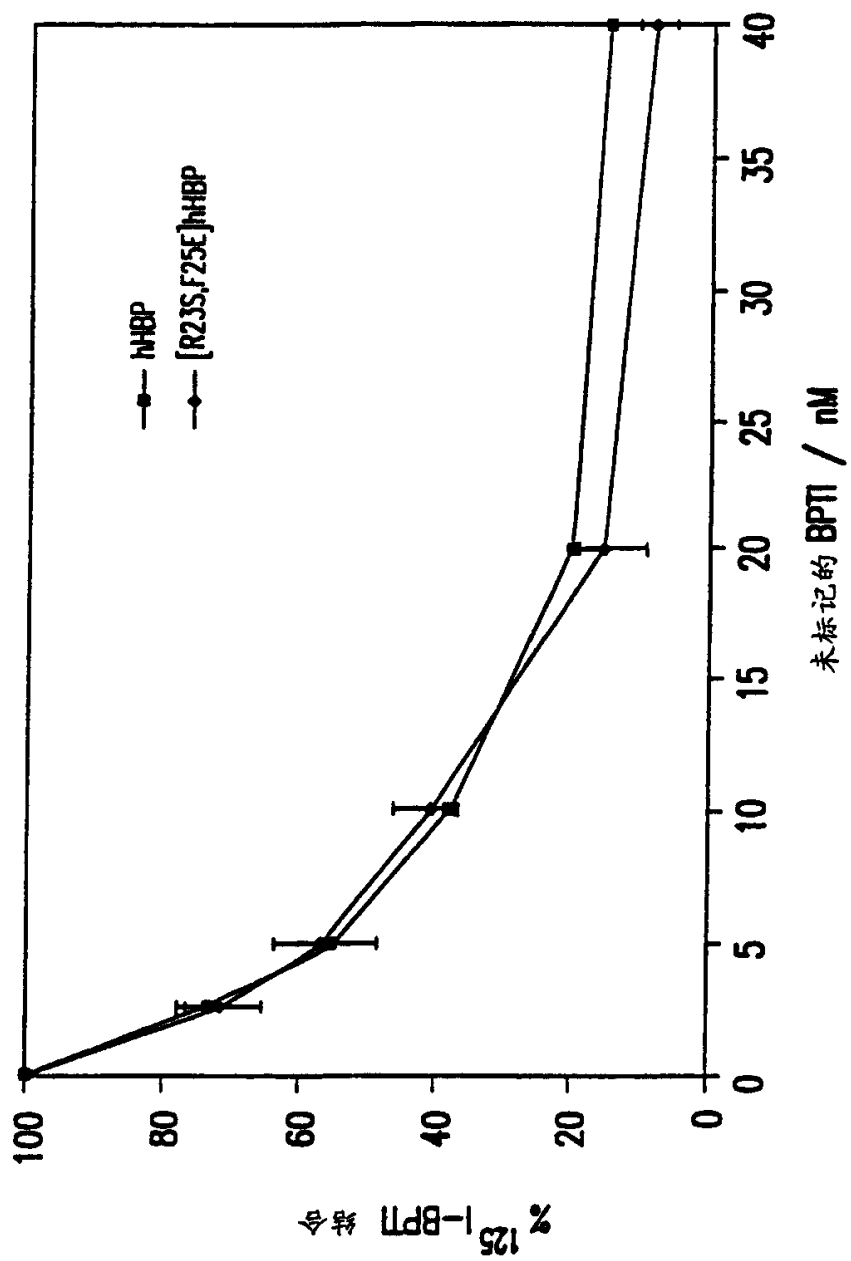


图 11c

序列表

<110> NOVO NORDISK A/S

<120> 结合肝素的拮抗剂在缓激肽释放的抑制中的应用

<130> 5694-WO, JWKi

<150> 60/132,748

<151> 1999-04-29

<150> PA 1999 00613

<151> 1999-05-06

<150> 60/157,384

<151> 1999-10-01

<150> PA 1999 01402

<151> 1999-10-01

<160> 14

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

<210> 1

<211> 225

<212> PRT

<213> 人

<400> 1

```

Ile Val Gly Gly Arg Lys Ala Arg Pro Arg Gln Phe Pro Phe Leu Ala
 1                    5                                10                15
Ser Ile Gln Asn Gln Gly Arg His Phe Cys Gly Gly Ala Leu Ile His
                20                                25                30
Ala Arg Phe Val Met Thr Ala Ala Ser Cys Phe Gln Ser Gln Asn Pro
                35                                40                45
Gly Val Ser Thr Val Val Leu Gly Ala Tyr Asp Leu Arg Arg Arg Glu
 50                    55                                60
Arg Gln Ser Arg Gln Thr Phe Ser Ile Ser Ser Met Ser Glu Asn Gly
65                    70                                75                80
Tyr Asp Pro Gln Gln Asn Leu Asn Asp Leu Met Leu Leu Gln Leu Asp
                85                                90                95
Arg Glu Ala Asn Leu Thr Ser Ser Val Thr Ile Leu Pro Leu Pro Leu
                100                               105                110
Gln Asn Ala Thr Val Glu Ala Gly Thr Arg Cys Gln Val Ala Gly Trp
                115                               120                125

```

Gly Ser Gln Arg Ser Gly Gly Arg Leu Ser Arg Phe Pro Arg Phe Val
 130 135 140
 Asn Val Thr Val Thr Pro Glu Asp Gln Cys Arg Pro Asn Asn Val Cys
 145 150 155 160
 Thr Gly Val Leu Thr Arg Arg Gly Gly Ile Cys Asn Gly Asp Gly Gly
 165 170 175
 Thr Pro Leu Val Cys Glu Gly Leu Ala His Gly Val Ala Ser Phe Ser
 180 185 190
 Leu Gly Pro Cys Gly Arg Gly Pro Asp Phe Phe Thr Arg Val Ala Leu
 195 200 205
 Phe Arg Asp Trp Ile Asp Gly Val Leu Asn Asn Pro Gly Pro Gly Pro
 210 215 220
 Ala
 225

<210> 2
 <211> 678
 <212> DNA
 <213> 人

<400> 2
 atcgttggcg gccggaaggc gaggeccccg cagttcccgt tccctggcctc cattcagaat 60
 caaggcaggc acttctgcgg ggggtgccctg atccatgccc gcttcgtgat gaccgcggcc 120
 agctgcttcc aaagccagaa cccccggggt agcaccgtgg tgctgggtgc ctatgacctg 180
 aggcggcggg agaggcagtc ccgccagacg ttttccatca gcagcatgag cgagaatggc 240
 tacgaccccc agcagaacct gaacgacctg atgctgcttc agctggaccg tgaggccaac 300
 ctcaccagca gcgtgacgat actgccactg cctctgcaga acgccacggt ggaagccggc 360
 accagatgcc aggtggccgg ctgggggagc cagcgcagtg gggggcgtct ctcccgtttt 420
 cccaggttcg tcaacgtgac tgtgaccccc gaggaccagt gtcgccccaa caacgtgtgc 480
 accggtgtgc tcacccgccg cgggtggcatc tgcaatgggg acggggggcac cccctcgtc 540
 tgcgagggcc tggeccacgg cgtggcctcc ttttccctgg ggccctgtgg ccgagccct 600
 gactttctca cccgagtggc gctcttccga gactggatcg atggcgtttt aaacaatccg 660
 ggaccggggc cagcctag 678

<210> 3
 <211> 698
 <212> DNA
 <213> 人

<400> 3
 ggctccagcc cctttttgga catcgttggc ggccggaagg cgaggccccg ccagttcccg 60
 tccctggcctc cattcagaat caaggcaggc acttctgcgg ggggtgccctg atccatgccc 120
 gcttcgtgat gaccgcggcc agctgcttcc aaagccagaa cccccggggt agcaccgtgg 180
 tgctgggtgc ctatgacctg aggcggcggg agaggcagtc ccgccagacg ttttccatca 240
 gcagcatgag cgagaatggc tacgaccccc agcagaacct gaacgacctg atgctgcttc 300
 agctggaccg tgaggccaac ctcaccagca gcgtgacgat actgccactg cctctgcaga 360
 acgccacggt ggaagccggc accagatgcc aggtggccgg ctgggggagc cagcgcagtg 420
 gggggcgtct ctcccgtttt cccaggttcg tcaacgtgac tgtgaccccc gaggaccagt 480
 gtcgccccaa caacgtgtgc accggtgtgc tcacccgccg cgggtggcatc tgcaatgggg 540

```

acggggggcac ccccctcgtc tgcgagggcc tggcccacgg cgtggcctcc ttttcctgg      600
ggccctgtgg ccgaggccct gactttctca cccgagtggc gctcttccga gactggatcg      660
atggcgtttt aaacaatccg ggaccggggc cagcctag                                698

```

```

<210> 4
<211> 232
<212> PRT
<213> 人

```

```

<400> 4
Gly Ser Ser Pro Leu Leu Asp Ile Val Gly Gly Arg Lys Ala Arg Pro
1          5          10          15
Arg Gln Phe Pro Phe Leu Ala Ser Ile Gln Asn Gln Gly Arg His Phe
20          25          30
Cys Gly Gly Ala Leu Ile His Ala Arg Phe Val Met Thr Ala Ala Ser
35          40          45
Cys Phe Gln Ser Gln Asn Pro Gly Val Ser Thr Val Val Leu Gly Ala
50          55          60
Tyr Asp Leu Arg Arg Arg Glu Arg Gln Ser Arg Gln Thr Phe Ser Ile
65          70          75          80
Ser Ser Met Ser Glu Asn Gly Tyr Asp Pro Gln Gln Asn Leu Asn Asp
85          90          95
Leu Met Leu Leu Gln Leu Asp Arg Glu Ala Asn Leu Thr Ser Ser Val
100         105         110
Thr Ile Leu Pro Leu Pro Leu Gln Asn Ala Thr Val Glu Ala Gly Thr
115         120         125
Arg Cys Gln Val Ala Gly Trp Gly Ser Gln Arg Ser Gly Gly Arg Leu
130         135         140
Ser Arg Phe Pro Arg Phe Val Asn Val Thr Val Thr Pro Glu Asp Gln
145         150         155         160
Cys Arg Pro Asn Asn Val Cys Thr Gly Val Leu Thr Arg Arg Gly Gly
165         170         175
Ile Cys Asn Gly Asp Gly Gly Thr Pro Leu Val Cys Glu Gly Leu Ala
180         185         190
His Gly Val Ala Ser Phe Ser Leu Gly Pro Cys Gly Arg Gly Pro Asp
195         200         205
Phe Phe Thr Arg Val Ala Leu Phe Arg Asp Trp Ile Asp Gly Val Leu
210         215         220
Asn Asn Pro Gly Pro Gly Pro Ala
225         230

```

```

<210> 5
<211> 756
<212> DNA
<213> 人

```

```

<400> 5
atgacccggc tgacagtccct ggccctgctg gctgggtctgc tggcgtctc gagggccggc      60
cccagccccc ttttggacat cgttggcggc cgggaaggcga ggccccgcca gttcccgttc      120

```

ctggcctcca	ttcagaatca	aggcaggcac	ttctgcgggg	gtgccctgat	ccatgcccgc	180
ttcgtgatga	ccgcgggccag	ctgcttccaa	agccagaacc	ccgggggttag	caccgtggtg	240
ctgggtgcct	atgacctgag	gcggcgggag	aggcagtcce	gccagacggt	ttccatcagc	300
agcatgagcg	agaatggcta	cgacccccag	cagaacctga	acgacctgat	gctgcttcag	360
ctggaccgtg	aggccaacct	caccagcagc	gtgacgatac	tgccactgcc	tctgcagaac	420
gccacggtgg	aagccggcac	cagatgccag	gtggccggct	gggggagcca	gcgcagtggg	480
gggcgtctct	cccgttttcc	caggttcgtc	aacgtgactg	tgacccccga	ggaccagtgt	540
cgcccccaaca	acgtgtgac	cggtgtgctc	acccgccgcg	gtggcatctg	caatggggac	600
gggggcaacc	ccctcgtctg	cgagggcctg	gcccacggcg	tgccctcctt	ttccctgggg	660
ccctgtggcc	gaggccctga	cttcttcacc	cgagtggcgc	tcttccgaga	ctggatcgat	720
ggcgtttttaa	acaatccggg	accggggcca	gcctag			756

<210> 6
 <211> 251
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 6

Met	Thr	Arg	Leu	Thr	Val	Leu	Ala	Leu	Leu	Ala	Gly	Leu	Leu	Ala	Ser
1				5					10						15
Ser	Arg	Ala	Gly	Ser	Ser	Pro	Leu	Leu	Asp	Ile	Val	Gly	Gly	Arg	Lys
			20					25					30		
Ala	Arg	Pro	Arg	Gln	Phe	Pro	Phe	Leu	Ala	Ser	Ile	Gln	Asn	Gln	Gly
			35				40					45			
Arg	His	Phe	Cys	Gly	Gly	Ala	Leu	Ile	His	Ala	Arg	Phe	Val	Met	Thr
						55					60				
Ala	Ala	Ser	Cys	Phe	Gln	Ser	Gln	Asn	Pro	Gly	Val	Ser	Thr	Val	Val
65					70					75					80
Leu	Gly	Ala	Tyr	Asp	Leu	Arg	Arg	Arg	Glu	Arg	Gln	Ser	Arg	Gln	Thr
				85					90					95	
Phe	Ser	Ile	Ser	Ser	Met	Ser	Glu	Asn	Gly	Tyr	Asp	Pro	Gln	Gln	Asn
				100				105					110		
Leu	Asn	Asp	Leu	Met	Leu	Leu	Gln	Leu	Asp	Arg	Glu	Ala	Asn	Leu	Thr
		115					120					125			
Ser	Ser	Val	Thr	Ile	Leu	Pro	Leu	Pro	Leu	Gln	Asn	Ala	Thr	Val	Glu
		130				135					140				
Ala	Gly	Thr	Arg	Cys	Gln	Val	Ala	Gly	Trp	Gly	Ser	Gln	Arg	Ser	Gly
145					150					155					160
Gly	Arg	Leu	Ser	Arg	Phe	Pro	Arg	Phe	Val	Asn	Val	Thr	Val	Thr	Pro
				165					170					175	
Glu	Asp	Gln	Cys	Arg	Pro	Asn	Asn	Val	Cys	Thr	Gly	Val	Leu	Thr	Arg
			180					185					190		
Arg	Gly	Gly	Ile	Cys	Asn	Gly	Asp	Gly	Gly	Thr	Pro	Leu	Val	Cys	Glu
		195					200					205			
Gly	Leu	Ala	His	Gly	Val	Ala	Ser	Phe	Ser	Leu	Gly	Pro	Cys	Gly	Arg
	210					215					220				
Gly	Pro	Asp	Phe	Phe	Thr	Arg	Val	Ala	Leu	Phe	Arg	Asp	Trp	Ile	Asp
225					230					235					240
Gly	Val	Leu	Asn	Asn	Pro	Gly	Pro	Gly	Pro	Ala					

245

250

<210> 7
<211> 19
<212> PRT
<213> 人

<400> 7

His Lys His Gly His Gly His His Lys Lys Asn Lys Gly Lys Lys Asn
1 5 10 15
Gly Lys His

<210> 8
<211> 31
<212> PRT
<213> 人

<400> 8

Ser Asp Asp Asp Trp Ile Pro Asp Ile Gln Thr Asp Pro Asn Gly Leu
1 5 10 15
Ser Phe Asn Pro Ile Ser Asp Phe Pro Asp Thr Thr Ser Pro Lys
20 25 30

<210> 9
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> pcr 引物

<400> 9

ccggggatcc gatgaccggt ctgacagtcc tgg 33

<210> 10
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> pcr 引物

<400> 10

ggcaccctcg cactcgtggc tgccttgatt ctg 33

<210> 11
<211> 33
<212> DNA

<213> 人工序列
 <220>
 <223> pcr 引物
 <400> 11
 cagaatcaag gcagccacga gtgcgggggt gcc 33
 <210> 12
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> pcr 引物
 <400> 12
 gaggggggtg ccctgggcc cattgca 27
 <210> 13
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> pcr 引物
 <400> 13
 tgcaatgggg accagggcac cccctc 27
 <210> 14
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> pcr 引物
 <400> 14
 ccggggatcc aactaggctg gccccgggcc egg 33

专利名称(译)	结合肝素的拮抗剂在缓激肽释放的抑制中的应用		
公开(公告)号	CN1349410A	公开(公告)日	2002-05-15
申请号	CN00806871.2	申请日	2000-04-28
[标]申请(专利权)人(译)	诺沃挪第克公司		
申请(专利权)人(译)	诺沃挪第克公司		
当前申请(专利权)人(译)	诺沃挪第克公司		
[标]发明人	汉斯J弗洛德加德 伦纳特林德博姆 索伦比约恩		
发明人	汉斯·J·弗洛德加德 伦纳特·林德博姆 索伦·比约恩		
IPC分类号	A61K38/00 A61K38/55 A61K39/395 A61K45/00 A61P9/10 A61P11/00 A61P29/00 A61P37/08 C07K14/47 C07K16/28 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/68 C07K14/81		
CPC分类号	G01N2400/40 G01N33/5088 G01N2410/06 G01N33/5064 A61K38/57 G01N2500/20 G01N33/5008 G01N2333/96455 C07K14/4723 A61K38/55 C07K16/28 A61K2039/505 G01N33/68 G01N33/502 A61P11/00 A61P29/00		
优先权	60/132748 1999-04-29 US 199900613 1999-05-06 DK 60/157384 1999-10-01 US 199901402 1999-10-01 DK		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及治疗或预防由所述哺乳动物,尤其可产生HBP的哺乳动物体内缓激肽释放所致疾病的方法,其中该HBP可与HBP拮抗剂、例如结合至少一种人HBP表位的单克隆抗体结合,该方法包括对所述哺乳动物给予有效减少哺乳动物体内缓激肽释放的用量的HBP拮抗剂。此外,本发明涉及用于测定哺乳动物是否产生与HBP拮抗剂、例如结合至少一种人HBP表位的单克隆抗体结合的HBP的方法和试剂盒以及一种检测HBP拮抗剂的方法。

