

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.  
G01N 33/574 (2006.01)



# [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580010431.5

[43] 公开日 2007年7月11日

[11] 公开号 CN 1997896A

[22] 申请日 2005.3.25  
 [21] 申请号 200580010431.5  
 [30] 优先权  
     [32] 2004. 3. 30 [33] US [31] 10/812,357  
 [86] 国际申请 PCT/US2005/010221 2005.3.25  
 [87] 国际公布 WO2005/098434 英 2005.10.20  
 [85] 进入国家阶段日期 2006.9.29  
 [71] 申请人 北海道科学技术振兴财团  
     地址 日本北海道  
 [72] 发明人 箱守仙一郎 斋藤清一

[74] 专利代理机构 北京润平知识产权代理有限公司  
 代理人 周建秋 王凤桐

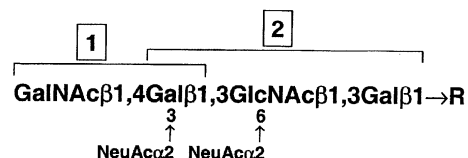
权利要求书 5 页 说明书 14 页 附图 6 页

## [54] 发明名称

作为前列腺癌相关抗原的 RM2 抗原 ( $\beta 1,4$ -GalNAc-disialyl-Lc<sub>4</sub>)

## [57] 摘要

一种由单克隆抗体 RM2 定义的新型糖类抗原  $\beta 1,4$ -GalNAc-disialyl-Lc<sub>4</sub>，该抗原在人类前列腺癌中表达，但是不在良性前列腺肥大或正常前列腺体中表达。通过活组织检查样本的免疫组织学、来自全前列腺切除术的详细说明以及病人血清中 RM2 抗原的定量测定，可将单克隆抗体 RM2 或其它具有类似特异性的抗体用于诊断前列腺癌。



1: 神经节系列结构  
 2: 二唾液酸乳糖系列 1 型结构



7、根据权利要求 1 或 2 所述的方法，其中，所述样本为从全前列腺切除术中获得的样本。

8、根据权利要求 1 或 2 所述的方法，其中，所述样本为血清样本。

9、根据权利要求 2 所述的方法，其中，通过免疫组织学；十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳，然后蛋白印迹分析；定向到结合所述抗原的初级抗体的标记次级抗体；表面等离子体共振光谱法；或分子力显微法检测所述抗原的存在。

10、根据权利要求 2 所述的方法，其中，所述样本为前列腺活组织检查样本，通过免疫组织学、定向到结合所述抗原的初级抗体的标记次级抗体、表面等离子体共振光谱法或分子力显微法检测所述抗原的存在。

11、根据权利要求 2 所述的方法，其中，所述样本为从全前列腺切除术中获得的样本，通过免疫组织学、定向到结合所述抗原的初级抗体的标记次级抗体、表面等离子体共振光谱法或分子力显微法检测所述抗原的存在。

12、根据权利要求 2 所述的方法，其中，所述样本为血清样本，通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳、然后蛋白印迹分析检测所述抗原的存在。

13、根据权利要求 10 所述的方法，其中，所述至少一种抗体定向到由 RM2 单克隆抗体识别的表位。

14、根据权利要求 11 所述的方法，其中，所述至少一种抗体定向到由 RM2 单克隆抗体识别的表位。



20、根据权利要求 16 所述的试剂盒，其中，所述特异性结合所述 RM2 抗原的部分为单克隆抗体。

21、根据权利要求 16 所述的试剂盒，其中，所述特异性结合所述 RM2 抗体的部分定向到由 RM2 单克隆抗体识别的表位。

22、根据权利要求 16 或 17 所述的试剂盒，其中，所述样本为前列腺活组织检查样本。

23、根据权利要求 16 或 17 所述的试剂盒，其中，所述样本为从全前列腺切除术中获得的样本。

24、根据权利要求 16 或 17 所述的试剂盒，其中，所述样本为血清样本。

25、根据权利要求 16 所述的试剂盒，其中，通过免疫组织学；十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳，然后蛋白印迹分析；定向到结合所述抗原的初级抗体的标记次级抗体；表面等离子体共振光谱法；或分子力显微法检测所述抗原的存在。

26、根据权利要求 17 所述的试剂盒，其中，所述样本为前列腺活组织检查样本，通过免疫组织学、定向到结合所述抗原的初级抗体的标记次级抗体、表面等离子体共振光谱法或分子力显微法检测所述抗原的存在。

27、根据权利要求 17 所述的试剂盒，其中，所述样本为从全前列腺切除术中获得的样本，通过免疫组织学、定向到结合所述抗原的初级抗体的标记次级抗体、表面等离子体共振光谱法或分子力显微法检测所述抗原的存在。

28、根据权利要求 17 所述的试剂盒，其中，所述样本为血清样本，通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳，然后蛋白印迹分析检测所述抗原的存在。

29、根据权利要求 17 所述的试剂盒，其中，所述样本为来自机体分泌物的样本，通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳、然后蛋白印迹分析检测所述抗原的存在。

30、根据权利要求 26 所述的试剂盒，其中，所述至少一种抗体定向到由 RM2 单克隆抗体识别的表位。

31、根据权利要求 27 所述的试剂盒，其中，所述至少一种抗体定向到由 RM2 单克隆抗体识别的表位。

32、根据权利要求 28 所述的试剂盒，其中，所述至少一种抗体定向到由 RM2 单克隆抗体识别的表位。

33、一种分离的前列腺组织样本，该样本包括 RM2 抗原。

## 作为前列腺癌相关抗原的 RM2 抗原 ( $\beta$ 1,4- GalNAc-disialyl-Lc<sub>4</sub>)

### 技术领域

本发明是关于一种作为人前列腺癌相关抗原的特异性糖类抗原的鉴定。

### 背景技术

在美国每 2.75 分钟诊断出一例前列腺癌，每年出现超过 230000 例的新病例。前列腺癌是男性中诊断出的最常见的癌症（占有新癌症病例的 32% 以上），每年估计有 29900 名男性死于前列腺癌。在美国，前列腺癌在所有类型癌症中的发病率最高。在其他发达国家也观察到类似趋势。

目前前列腺特异性抗原（Prostate-specific antigen, PSA）用于诊断前列腺癌，因为所述疾病常常伴随着该抗原在血清水平（>6.1 纳克/毫升）上的升高。但是，PSA 是一种蛋白抗原，在正常前列腺和前列腺癌中都有发现。良性前列腺肥大（Benign Prostate Hypertrophy, BPH）和前列腺炎也伴随着 PSA 水平升高，因此 PSA 水平不能作为前列腺癌的决定性指标。

很多类型的癌症发生异常糖基化作用（细胞表面形成异常糖链）。异常糖基化作用的模式和伴随特定类型癌的特异性糖基表位表达已经被用作诊断多种类型人类癌症的标准。

已经开始寻找伴随人前列腺癌表达、但不伴随正常前列腺或良性前列腺肥大表达的异常糖链。本发明是关于一种被称为“RM2 抗原”（ $\beta$  1,4-GalNAc-disialyl-Lc<sub>4</sub>）的结构的鉴定，该结构特异结合单克隆抗体（monoclonal antibody, mAb）RM2。

### 发明内容

本发明基于先前对肾细胞瘤（renal cell carcinoma, RCC）抗原的搜寻结

果，将其应用于前列腺癌的研究。最初，RCC 细胞系 TOS1 被用作免疫原以得到与 RCC 反应的单克隆抗体；该单克隆抗体被称为“RM2”。被 RM2 识别的抗原结构随后被鉴定为  $\beta$  1,4-GalNAc-disialyl-Lc<sub>4</sub> (图 1)。RCC 为相对罕见的癌症类型，并且不是所有 RCC 都表达所述结构。由于泌尿生殖系统的器官具有共同的胚胎发育，对代表不同疾病分期的 35 例前列腺癌病例中 RM2 抗原的表达进行了系统检查。所有这 35 例病例都显示出与单克隆抗体 RM2 的阳性反应性即存在 RM2 抗原，其中 18 例病例为中度或强阳性；17 例病例为弱阳性。所有 35 例正常的腺体中都观察到阴性或非常弱的染色，6 例良性前列腺肥大未观察到染色。中度/强阳性病例和弱阳性病例的中值格里森分数 (Gleason score) 分别为 8 和 7。

良性前列腺肥大中的阴性 RM2 表达，使 RM2 特别适用于诊断。良性前列腺肥大在 PSA 测定中常常伴随轻度到中等程度的升高值 (4-10 纳克/毫升)。由于 RM2 在良性前列腺肥大中不表达，RM2 区分前列腺癌和良性前列腺肥大的能力将在升高的 PSA 为 4-10 纳克/毫升的男性中，用血清 RM2 测试选择活组织检查病例时非常有用。9 个根治性前列腺切除术 (Radical prostatectomy) 样本中，5 个表现出中度/强阳性 (moderately/ strongly positive, m/s) 染色，4 个表现出弱阳性染色 (weakly positive, w)。5 个 m/s 染色病例中的 4 个为病理非器官局限性的 (non-organ confined)，而 4 个 w 染色病例均为器官局限性的。虽然检查的病例数目少，但 RM2 阳性和病理分期之间存在明显相关性 ( $p < 0.02$ )。临床局部前列腺癌中的病理分期预测对选择治疗方案非常重要，即选择根治性前列腺切除术还是放射治疗。上述数据表明 RM2 还可以用于预测临床局部前列腺癌中的病理分期，其中在约 40% 的同时期根治性前列腺切除术组中发现了病理非器官局限性癌。

根据现有数据，经过 PSA 测试的大多数男性病人的 PSA 值显示为 4-10 纳克/毫升。然而，通过活组织检查发现，PSA 值在此范围的病人只有 25%



图 2: 在具有不同格里森分数的前列腺癌活组织检查样本中 RM2 抗原表达的免疫组织学图; A 组: 样本 1 (格里森分数 5+4); B 组: 样本 2 (格里森分数 4+5); C 组: 样本 3 (格里森分数 5+4); D 组: 样本 4 (格里森分数 3+3); E 组: 样本 5 (格里森分数 4+3); F 组: 样本 6 (格里森分数 4+3); 放大倍数: 200 倍; 在正常腺体中观察到阴性 RM2 免疫染色或只观察到弱的 RM2 免疫染色;

图 3: 根治性前列腺切除术样本中 RM2 抗原表达的免疫组织学图; A 组: 样本 1 (格里森分数 3+4); B 组: 样本 2 (格里森分数 4+4); C 组: 样本 3 (格里森分数 4+5); 放大倍数: 200 倍; ms: 中度/强, w: 弱, RP: 根治性前列腺切除术;

图 4: 良性前列腺肥大 (A 组) 和正常前列腺 (B 组) 病例的根治性前列腺切除术样本中 RM2 抗原表达的免疫组织学图; 在良性前列腺肥大中未观察到 RM2 免疫染色, 并且在正常腺体中只观察到很弱的 RM2 染色; 放大倍数: 100 倍;

图 5: 通过 RM2 对前列腺癌细胞系的蛋白印迹分析 (Western blot analysis); A 组: RM2 免疫染色; B 组: 小鼠 IgM 免疫染色 (阴性对照); 1、PC3 (5 微克), 2、LNCap (5 微克), 3、PC3 (10 微克), 4、LNCap (10 微克), 5、PC3 (15 微克), 6、LNCap (15 微克), 7、PC3 (20 微克), 8、LNCap (20 微克), M: 分子量标记(size marker); 除了 LNCap 和 PC3 中的几条其它带, RM2 检测到作为主要带的 49 千道尔顿糖蛋白。

### 具体实施方式

A、RM2 抗原和抗体。人类肿瘤通过与鞘糖脂或糖蛋白结合的特异性糖类抗原的表达而得到辨别 (Hakomori, S. 1989 Adv. Cancer Res. 52, 257-331; Hakomori, S. 1996 Cancer Res. 56, 5309-5318), 基于这一普通概念, 描述在

RCC 中高度表达的慢迁移神经节苷脂 (slow-migrating ganglioside) 的存在 (Saito, S., Orikasa, S., Ohyama, C., Satoh, M. 和 Fukushi, Y. (1991) *Int.J.Cancer* 49, 329-334)。通过用 RCC 细胞系 TOS1 免疫小鼠, 然后反复克隆分泌能识别由 RCC 组织表达的慢迁移神经节苷脂的抗体的杂交瘤, 建立单克隆抗体 RM2 (Saito, S., Levery, S. B., Salyan, M. E. K., Goldberg, R. I., 和 Hakomori, S. 1994 *J.Biol.Chem.* 269, 5644-5652)。通过一维和二维的  $^1\text{H}$  核磁共振 ( $^1\text{H-NMR}$ ) 以及质谱对由所述称作“RM2 抗原”的单克隆抗体 RM2 识别的抗原的结构为进一步系统研究明确了该结构为  $\beta\text{l,4-GalNAc-disialyl-Lc}_4$  (图 1)。所述结构非常新, 由“神经节系列 (ganglio-series)” (图 1 中 1 区) 和“二唾液酸乳糖系列 1 型链 (disialyl lacto-series type 1 chain)” (图 1 中 2 区) 基团组成 (Ito, A., Levery, S. B., Saito, S., Satoh, M., 和 Hakomori, S. 2001 *J.Biol.Chem.* 276, 16695-16703)。

B、作为前列腺癌相关抗原的 RM2 抗原。由于泌尿生殖组织和器官与个体发育相关, 本发明的发明人假定在 RCC 中表达的抗原可能也在其他泌尿生殖癌中, 特别是在发生率和死亡率最高的前列腺癌中表达。对从 40 例前列腺癌病例中取得的活组织检查样本进行了初步研究。活组织检查样本包括了前列腺癌的所有分期, 大多数为晚期的样本。也就是说约 66% 的活组织检查样本取自患有“非器官局限性”前列腺癌的患者。用标准组织学操作将组织用福尔马林固定并用石蜡包埋。40 个样本中, 35 个样本的结构保存完好, 能够评价免疫组织学结果。18 例为中度或强阳性, 17 例为弱阳性。下面描述这些病例。

### 活组织检查样本

#### 1、18 例中度/强阳性病例

- 年龄 (中值): 72.5 岁
- PSA 值 (中值): 40 纳克/毫升 (值域 2.5-3797 纳克/毫升)

- 格里森分数（中值）：8（全部 18 个病例）

3 个病例评分为 6

5 个病例评分为 7

3 个病例评分为 8

7 个病例评分为 9

- 临床分期

局部化（localization）程度（T）

T2 及低于 T2：6 例

T3 及高于 T3：12 例

发生转移

D2 分期（转移至骨或远淋巴结，超越局部淋巴结）：5 例

D1 分期（转移至局部淋巴结）：1 例

未发生转移

T1c-T4N0M0：12 例

（T1c：4 例，T2：2 例，T3：5 例，T4：1 例）

## 2、17 例弱阳性病例

- 年龄（中值）：71 岁

- PSA 值（中值）：37 纳克/毫升（值域 7-1723 纳克/毫升）

- 格里森分数（中值）：7（全部 17 个病例）

3 个病例评分为 6

7 个病例评分为 7

4 个病例评分为 8

3 个病例评分为 9

- 临床分期

局部化（localization）程度（T）

T2 及低于 T2: 6 例

T3 及高于 T3: 11 例

发生转移

D2 分期 (转移至骨或远淋巴结, 超越局部淋巴结): 4 例

D1 分期 (转移至局部淋巴结): 1 例

未发生转移

T1c-T3N0M0: 12 例

(T1c: 3 例, T2: 3 例, T3: 6 例)

根治性前列腺切除术样本 (共 9 例)

- 年龄 (中值): 65 岁
- PSA 值 (中值): 6.1 纳克/毫升 (值域 4.4-13.2 纳克/毫升)

1、5 例中度/强阳性病例

- 格里森分数 7: 3 例
- 格里森分数 8: 1 例
- 格里森分数 9: 1 例
- 非器官局限性 (pT3 及高于 pT3): 4 例
- 器官局限性 (pT2 及低于 pT2): 1 例

2、4 例弱阳性病例

- 格里森分数 8: 2 例
- 格里森分数 9: 2 例
- 器官局限性 (pT2 及低于 pT2): 4 例

C、作为肿瘤细胞糖蛋白的 RM2 抗原。如上面 A 部分所述, 原本发现 RM2 为鞘糖脂 (二唾液酸神经节苷酯)。然而在肿瘤细胞中出现的一些抗原能通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 及随后的蛋白印迹分析而检



根据本发明，诊断前列腺癌的方法可以为任何能够检测样本中 RM2 抗原的存在或水平升高的方法，所述样本中 RM2 抗原的存在或水平升高与前列腺癌的发生相互关联。检测 RM2 抗原存在或水平升高的方法的例子包括“三明治”免疫测定法 ("sandwich" immunoassays)、电喷射离子化作用 (electrospray ionization, ESI) 和基质辅助激光解吸/离子化作用 (matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI) 质谱 (mass spectrometry, MS) 和表面胞质基因共振 (surface plasmon resonance, SPR) 光谱法。

使用用于 PSA 分析的、具有双重单克隆抗体化验的“三明治”法 (McCormack RT 等人, "Molecular forms of prostate-specific antigen and the human kallikrein gene family: a new era", *Urology* 45(5):729-44, 1995; Karazanashvili G, Abrahamsson PA, "Prostate specific antigen and human glandular kallikrein 2 in early detection of prostate cancer", *J. Urology* 169(2): 445-457, 2003), 发现了一种与 RM2 抗原有反应性的 49 千道尔顿的糖蛋白, 正如蛋白印迹分析证实, 该糖蛋白为从肿瘤细胞中释放出来的主要糖蛋白。此外, 通过用 RM2 进行蛋白印迹分析在各种前列腺癌细胞系中检测到较少的糖蛋白带 (88 千道尔顿、98 千道尔顿、130 千道尔顿) (见图 5A 及其附图说明)。在雄激素依赖 LNCap 细胞和非雄激素依赖 PC3 细胞中都发现了所述 RM2-反应性糖蛋白。将定向在所述前列腺癌细胞系中表达的非 RM2 表位的 RM2 和其它单克隆抗体结合, 将有助于建立高效的具有双重单克隆抗体化验的三明治法。

基于电喷射离子化作用和基质辅助激光解吸/离子化作用质谱的显著进步, 所述方法已经被应用于对患有特定癌症的病人血清中肿瘤相关糖蛋白的分析, 例如 Johnson PJ 等人, "Structures of disease-specific serum alpha-fetoprotein isoforms", *Br. J. Cancer* 83(10): 1330- 1337, 2000; Poon TC 等人, "Comprehensive proteomic profiling ... of hepatocellular carcinoma and its

subtypes", Clin. Chem. 49(5): 752-760, 2003。顺应这种趋势，表面增强激光解吸 / 离子化作用 - 飞行时间 - 质谱 ( surface-enhanced laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry, SELDI-TOF-MS) 用于鉴定糖蛋白抗原的特征 (Merchant M, Weinberger SR, "Recent advancements in surface-enhanced laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry", Electrophoresis 21: 1164-1167, 2000)。事实上，病人血清中的 RM2 糖蛋白可以被附着在凝胶上的抗体所捕获，然后洗脱被吸附的抗原，并用 ESI-MS、MALDI-MS 或 SELDI-TOF-MS 分析。

表面胞质基因共振光谱高度灵敏并且能检测弱的相互作用 (Matsuura K 等人, " A quantitative estimation of carbohydrate-carbohydrate interaction ... by surface plasmon resonance", J. Am. Chem. Soc. 122(30): 7406-7407, 2000; Hernaiz MJ 等人, " A model system mimicking glycosphingolipid clusters to quantify carbohydrate self-interactions by surface plasmon resonance", Angew. Chem. Intl. Ed. 41(9): 1554-1557, 2002)。这是一种通过结合附着在表面胞质基因层上的抗体来测定病人血清中的抗原的很有前景的方法，例如用附着在金膜 (gold film) ("自装配单层(self-assembled monolayer)", SAM) 上的 RM2 抗体的抗原结合片段 (Fab) 衍生物来检测病人血清中存在的抗原。

在优选方法中，样本与特异性结合 RM2 抗原的部分接触，然后通过检测该部分与 RM2 抗原的特异性结合，检测该抗原的存在。与 RM2 抗原特异性反应的部分的例子为特异性结合 RM2 抗原的抗体。

在本发明的上下文中，抗体可以理解为包括多克隆抗体和单克隆抗体、单链抗体、抗体片段 (如抗体可变片段 (Fv)、抗原结合片段 (Fab) 和胃蛋白酶消化后的抗体片段 (F(ab')<sub>2</sub>)、嵌合抗体、表面重建抗体 (resurfaced antibody) 和人源化抗体。

本领域普通技术人员能够从多种温血动物，例如马、牛、各种家禽、兔、

小鼠、仓鼠或大鼠，很容易地制备抗 RM2 抗原的多克隆抗体。例如能用引起哺乳动物抗体应答的免疫原形式的 RM2 抗原免疫哺乳动物（如小鼠、仓鼠或兔）。可以通过检测血浆或血清中的抗体滴度监测免疫作用的进展。免疫后可以得到抗血清，从所述抗血清中分离出多克隆抗体。

本发明的方法优选使用单克隆抗体。特异性结合 RM2 抗原的单克隆抗体可以用常规的技术很容易地制得。例如，可以通过由 Kohler 和 Milstein 1975 年首创的杂交瘤技术（*Nature* 256, 495-497）制备单克隆抗体；还参见 US RE 32011、US 4902614、US 4543439 和 US 4411993，这些文件的全部内容在此并入作为参考；还参见 *Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses*, Plenum Press, Kennett, McKean 和 Bechtol (eds.), 1980 以及 *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow and Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988。其他技术也可以用于构建单克隆抗体（例如，见 William D. Huse 等人，1989, "Generation of a Large Combinational Library of the Immunoglobulin Repertoire in Phage Lambda," *Science* 246:1275-1281；L. Sastry 等人，1989 "Cloning of the Immunological Repertoire in *Escherichia coli* for Generation of Monoclonal Catalytic Antibodies: Construction of a Heavy Chain Variable Region-Specific cDNA Library," *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 86:5728-5732；Kozbor 等人，1983 *Immunol. Today* 4, 72 re the human B-cell hybridoma technique；Cole 等人，1985 *Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy*, Allen R. Bliss, Inc., pages 77-96 re the EBV-hybridoma technique to produce human monoclonal antibodies；并还参见 Michelle Alting-Mees 等人，1990 "Monoclonal Antibody Expression Libraries: A Rapid Alternative to Hybridomas," *Strategies in Molecular Biology* 3:1-9)。免疫化学筛选杂交瘤细胞以产生与 RM2 抗原特异性反应的抗体，单克隆抗体得以分离。

在此使用的术语“抗体”意指包括与 RM2 抗原特异性反应的抗体片段。

抗体可以用常规技术片段化并用与上述完整抗体同样方法筛选有用的片段。例如，F(ab')<sub>2</sub> 片段可以通过用胃蛋白酶（pepsin）处理抗体产生。可以处理得到的 F(ab')<sub>2</sub> 片段，还原二硫键以制备 Fab' 片段。

单链抗体可以通过用联结子（linker）连接可变重链和可变轻链而制备（参见例如 Huston 等人，1988 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85, 5879-5883 和 Bird 等人，1988 Science, 242, 423-426 这两篇文件的全部内容在此并入作为参考）。

本发明还考虑到了嵌合抗体衍生物，即结合了非人类动物的可变区和人类恒定区的抗体分子。嵌合抗体分子可以包括，例如，结合来源于小鼠、大鼠或其它种的抗体的结构域和人类恒定区的抗原。制备嵌合抗体的各种方法已经得到描述，并且能用于制备包括免疫球蛋白可变区的嵌合抗体，所述免疫球蛋白可变区能够识别分化细胞或肿瘤细胞表面的挑选的抗原。参见例如，Morrison 等人，1985; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81, 6851; Takeda 等人，1985, Nature 314, 452; Cabilly 等人，US 4816567; Boss 等人，US 4816397; Tanaguchi 等人，欧洲专利公开 EP 171496; 欧洲专利公开 EP 0173494、英国专利 GB 2177096B。

本发明还考虑了表面重建单克隆抗体的应用。文献例如参见 US 5639641 中清楚地描述了表面重建抗体的方法，所述文献的全部内容在此并入作为参考。

人源化抗体也可以用于本发明的方法。人源化抗体的方法为本领域公知，在文献中得以描述，例如，Padlan, E.等人，1991 Molecular Immunology, vol. 28, pp. 489-498、美国专利公开 20020034765 A1 以及美国专利公开 2004/0058414 A1。

因此，用于本发明方法的适合的抗体包括多克隆抗体、单链多克隆抗体、多克隆抗体片段、单克隆抗体、单链单克隆抗体、单克隆抗体片段、嵌合抗



型。

F、物质组合物：本发明还提供了一种分离的或纯化的含有 RM2 抗原的前列腺组织样本。所述组织样本通过用本领域公知的方法分离和/或纯化。在 Hakomori S 和 Kannagi R, "Carbohydrate antigens in higher animals", in: Handbook of Experimental Immunology; Vol. 1: Immunochemistry (Weir DM, Herzenberg LA, Blackwell C, Herzenberg LA, eds.), 4th ed., Blackwell Scientific Publications (Oxford; Boston), chap. 9 (pp. 9.1-9.39)中总结了鞘糖脂和糖蛋白的分离方法。如上述所指出的，所述抗原为糖蛋白（相对分子质量（Mr）为 50 千道尔顿）。这很重要，因为许多病例中，与糖蛋白抗原相比，鞘糖脂抗原并不以高水平释放。

通过本领域公知的方法，不论纯化的、分离的或未分离纯化的组织样品都能用于制备特异性结合 RM2 抗原的单克隆抗体。参见例如 Saito, S., Levery, S. B., Salyan, M. E. K., Goldberg, R. I.和 Hakomori, S. 1994 J.Biol. Chem. 269, 5644-5652，该文献的全部内容在此并入作为参考。

在此所有出版物和专利申请在相同程度上并入作为参考，相当于每篇单独的出版物和专利申请是特别并且单独指明需要并入作为参考的。虽然为了清楚和理解的目的，通过附图和实施例在一定程度上详细描述了本发明，很显然一定的改变和变化都包含在本发明权利要求的范围内。

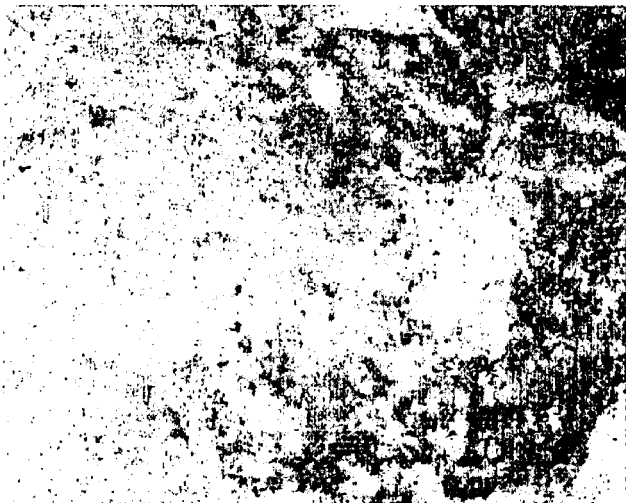


**A**



格里森分数  $5+4=9$   
中度/强染色  
活组织检查 ( $\times 200$  倍)

**B**

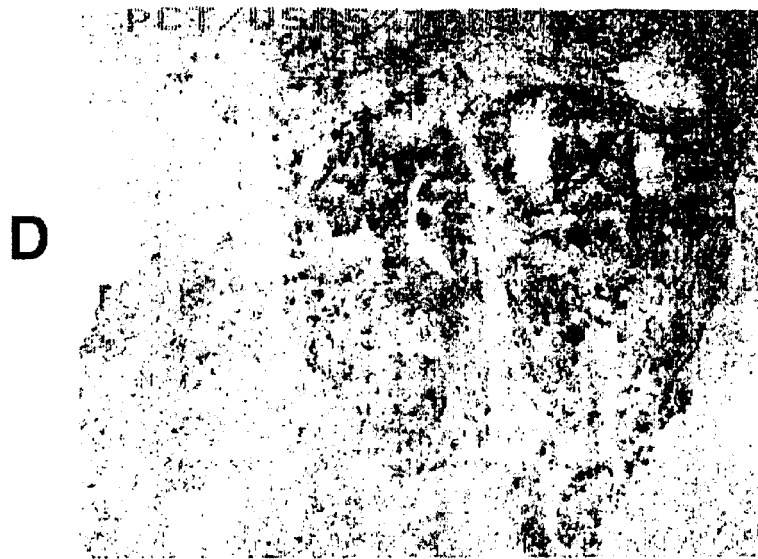


格里森分数  $4+5=9$   
中度/强染色  
活组织检查 ( $\times 200$  倍)

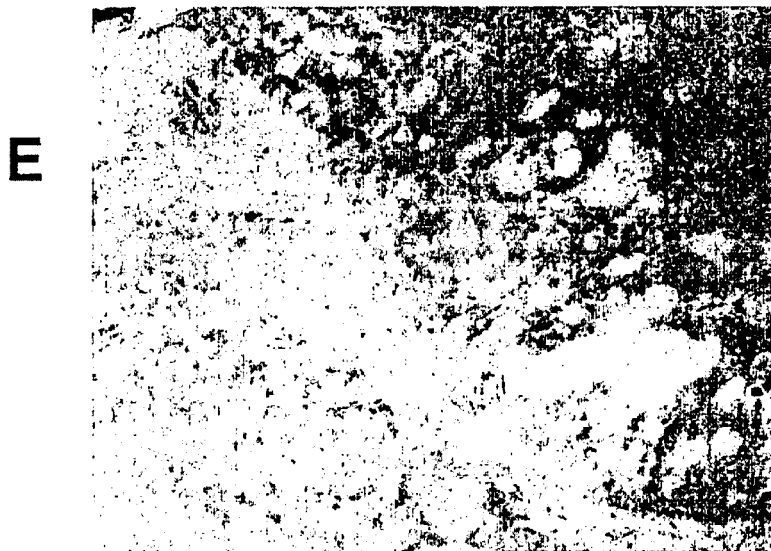
**C**



格里森分数  $5+4=9$   
中度/强染色  
活组织检查 ( $\times 200$  倍)



格里森分数  $3+3=6$   
弱染色  
活组织检查 ( $\times 200$  倍)



格里森分数  $4+3=7$   
弱染色  
活组织检查 ( $\times 200$  倍)



格里森分数  $4+3=7$   
弱染色  
活组织检查 ( $\times 200$  倍)

图 2

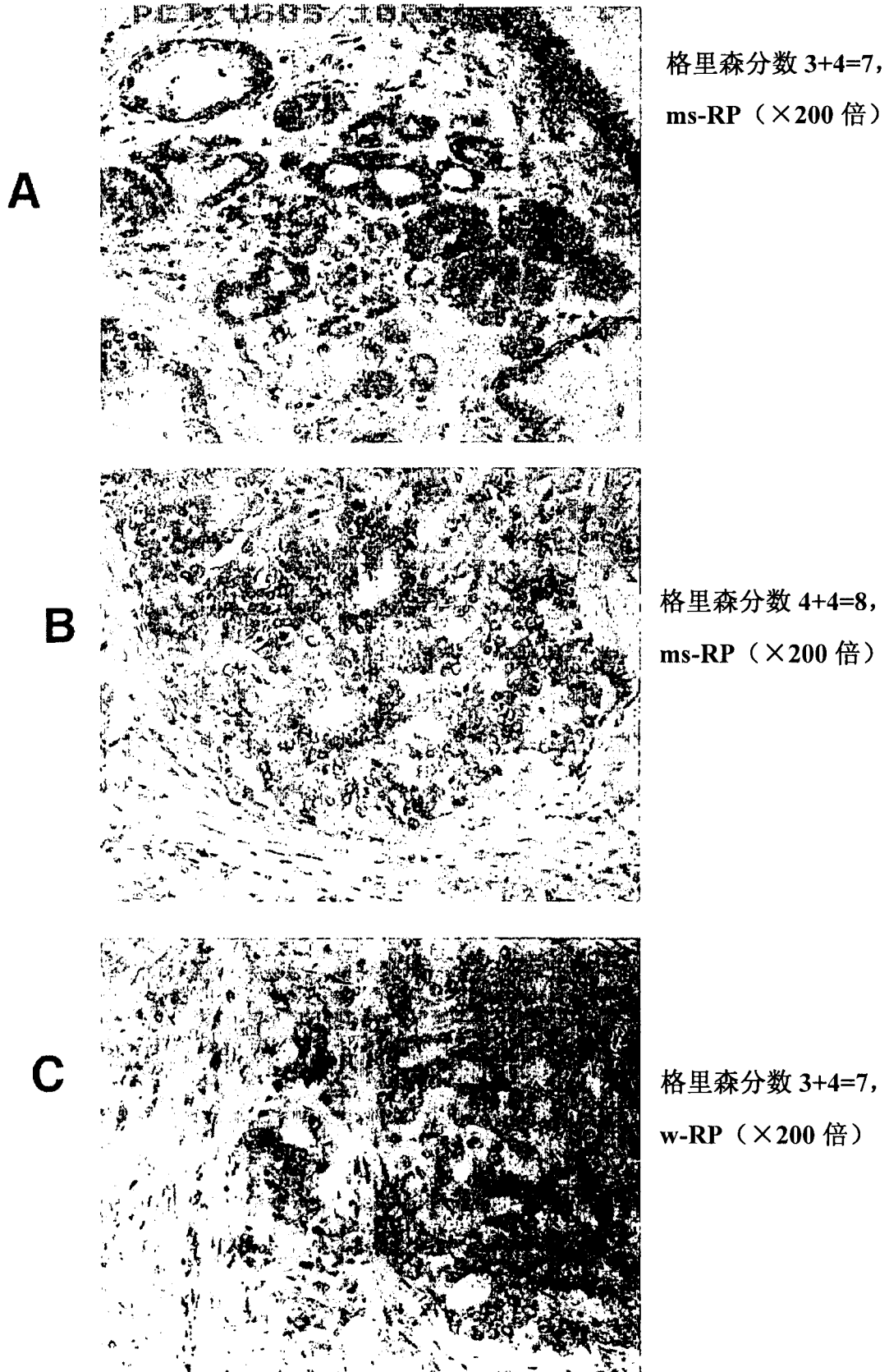


图 3

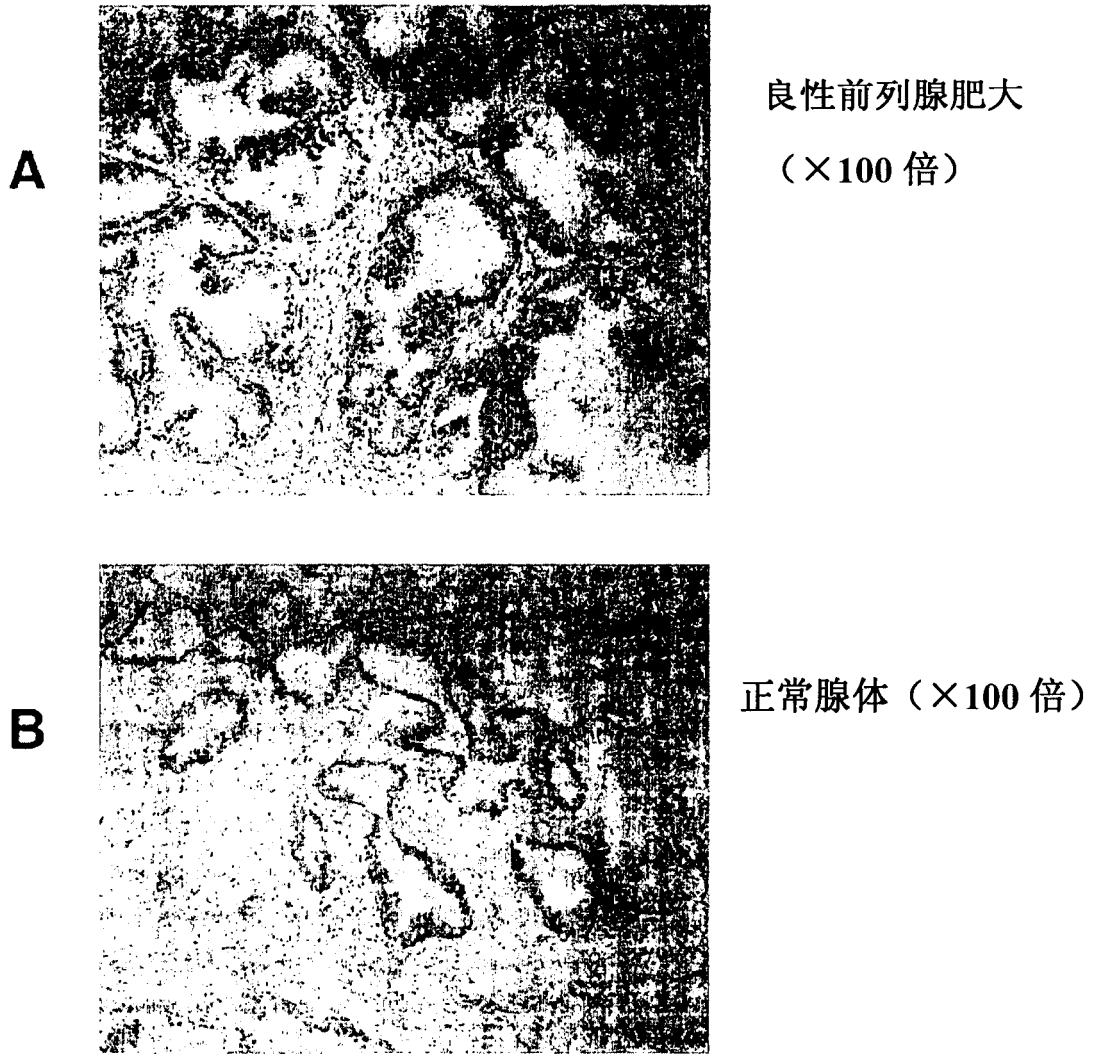


图 4

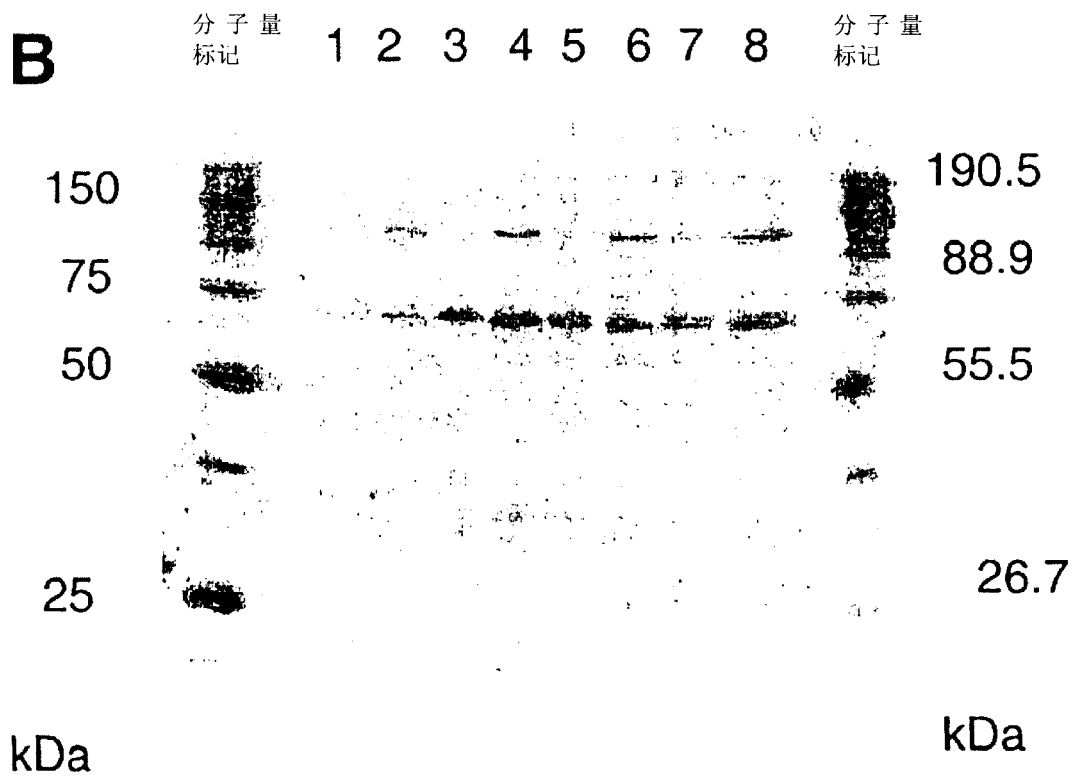
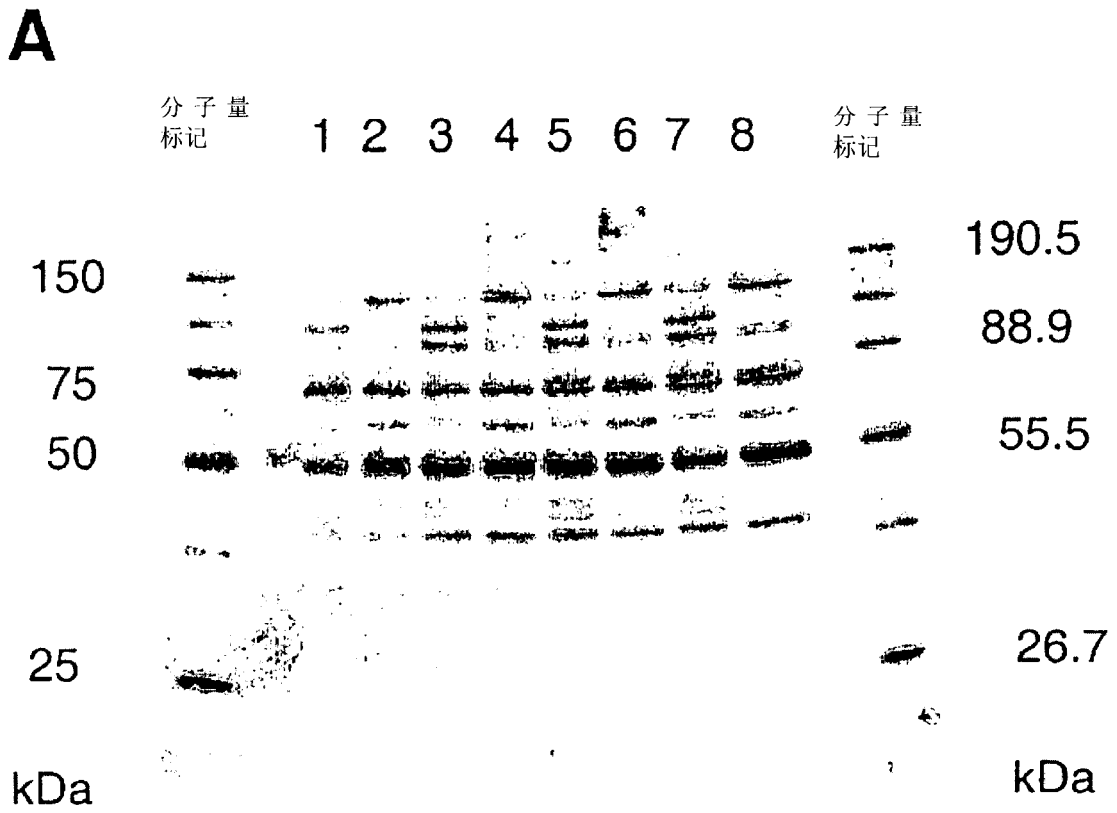
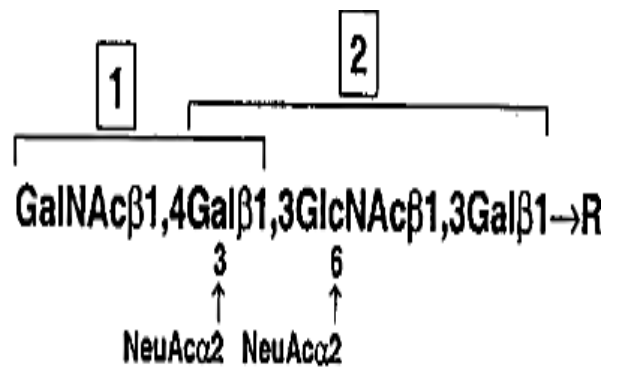


图 5

专利名称(译)	作为前列腺癌相关抗原的RM2抗原( $\beta$ 1,4 - GalNAc - disialyl - Lc4)		
公开(公告)号	<a href="#">CN1997896A</a>	公开(公告)日	2007-07-11
申请号	CN200580010431.5	申请日	2005-03-25
[标]发明人	箱守仙一郎 斋藤清一		
发明人	箱守仙一郎 斋藤清一		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/53 G01N33/567		
CPC分类号	G01N33/5308 G01N33/57434 G01N2400/00		
代理人(译)	周建秋 王凤桐		
优先权	10/812357 2004-03-30 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

一种由单克隆抗体RM2定义的新型糖类抗原 $\beta$ 1,4 - GalNAc - disialyl - Lc4, 该抗原在人类前列腺癌中表达, 但是不在良性前列腺肥大或正常前列腺体中表达。通过活组织检查样本的免疫组织学、来自全前列腺切除术的详细说明以及病人血清中RM2抗原的定量测定, 可将单克隆抗体RM2或其它具有类似特异性的抗体用于诊断前列腺癌。



- 1: 神经节系列结构
- 2: 二唾液酸乳糖系列1型结构