



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102171569 A

(43) 申请公布日 2011. 08. 31

(21) 申请号 200980126364. 1

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2009. 05. 11

G01N 33/574 (2006. 01)

(30) 优先权数据

G01N 33/68 (2006. 01)

61/127, 138 2008. 05. 09 US

G01N 33/53 (2006. 01)

61/128, 717 2008. 05. 23 US

A61K 39/395 (2006. 01)

61/188, 209 2008. 08. 07 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 01. 06

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2009/043460 2009. 05. 11

(87) PCT申请的公布数据

W02009/137832 EN 2009. 11. 12

(71) 申请人 杜克大学

地址 美国北卡罗来纳

(72) 发明人 小 E·F·帕茨 M·J·坎帕

E·B·戈特林

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 林晓红

权利要求书 3 页 说明书 23 页

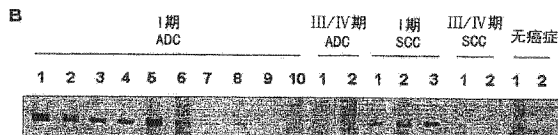
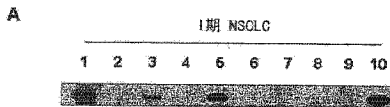
序列表 1 页 附图 6 页

(54) 发明名称

检测和治疗癌症的自身抗体

(57) 摘要

本发明提供了用于检测和 / 或治疗癌症的方法、试剂盒和组合物,其基于在需要其的对象中检测和 / 或施用抗体 (所述抗体任选地是双特异性抗体,具有与癌症相关的自身抗体的免疫反应特性)、与癌症相关的自身抗体的抗原 ;或具有与癌症相关的自身抗体的免疫反应特性的抗体以及与癌症相关的自身抗体的抗原二者。



1. 一种检测对象中癌症的方法,所述方法包括:
检测对象样品中与癌症相关的自身抗体的存在和 / 或量。
2. 一种管理具有潜在癌症的对象的治理的方法,所述方法包括:
检测对象样品中与癌症相关的自身抗体的存在和 / 或量 ;和
基于与癌症相关的自身抗体的存在或量管理具有潜在癌症的对象的治理。
3. 一种对肿瘤或可疑肿瘤进行分子分期的方法,所述方法包括:
检测对象样品中与癌症相关的自身抗体的存在和 / 或量 ;和
基于与癌症相关的自身抗体的存在或量确定肿瘤或可疑肿瘤分子分期。
4. 一种将对象分类到癌症高风险组的方法,所述方法包括:
检测对象样品中与癌症相关的自身抗体的存在和 / 或量 ;和
基于与癌症相关的自身抗体的存在或量将对象分类到具有癌症高风险的组。
5. 权利要求 1-4 中任意一项的方法,其中所述样品是血清样品或血浆样品。
6. 权利要求 1-5 中任意一项的方法,其中所述对象是人类对象。
7. 权利要求 1-6 中任意一项的方法,其中所述癌症是肺癌。
8. 权利要求 1-7 中任意一项的方法,包括检测抗补体因子 H(CFH) 的自身抗体,抗 α - 葡糖苷酶 (GANAB) 的自身抗体,抗 STIP1 (应激诱导磷蛋白 1) 的自身抗体,抗 α - 烯醇化酶的自身抗体,抗 14-3-3 (14-3-3 蛋白 ϵ) 的自身抗体,或抗 HSP 60 (60kDa 热休克蛋白) 的自身抗体,或检测上述自身抗体的任意组合。
9. 权利要求 1-7 中任意一项的方法,包括检测抗表 4 所列一或多种实体的自身抗体,或检测其任意组合。
10. 一种用于检测对象样品中与癌症相关的自身抗体的存在和 / 或量的试剂盒,所述试剂盒包括:
与癌症相关的自身抗体的特异性结合配偶体 ;和
检测对象样品中与癌症相关的自身抗体的存在和 / 或测定其量的说明。
11. 权利要求 10 的试剂盒,包括抗补体因子 H(CFH) 的自身抗体的特异性结合配偶体,抗 α - 葡糖苷酶 (GANAB) 的自身抗体的特异性结合配偶体,抗 STIP1 (应激诱导磷蛋白 1) 的自身抗体的特异性结合配偶体,抗 α - 烯醇化酶的自身抗体的特异性结合配偶体,抗 14-3-3 (14-3-3 蛋白 ϵ) 的自身抗体的特异性结合配偶体,或抗 HSP 60 (60kDa 热休克蛋白) 的自身抗体的特异性结合配偶体,或上述结合配偶体的任意组合。
12. 权利要求 10 的试剂盒,包括抗表 4 所列一或多种实体的自身抗体的特异性结合配偶体,或其任意组合。
13. 权利要求 10 的试剂盒,其中所述结合配偶体与固体支持物缀合,并且包括自身抗体的第二种特异性结合配偶体。
14. 权利要求 13 的试剂盒,其中所述第二种特异性结合配偶体是抗体。
15. 权利要求 12 或 13 的试剂盒,其中所述第二种特异性结合配偶体与可检测基团缀合。
16. 权利要求 15 的试剂盒,其中所述可检测基团选自放射性标记,荧光标记,酶标记和荧光标记组成的组。
17. 权利要求 10 的试剂盒,包括一或多种缓冲剂,蛋白稳定剂,酶底物,背景降低剂,对

照试剂,用于进行检测的装置,以及用于分析和呈现结果的任何必需软件。

18. 一种治疗对象中癌症的方法,所述方法包括给患有癌症的对象施用有效量的具有与癌症相关的自身抗体的免疫反应特性的抗体,所述抗体可任选地是双特异性抗体;施用有效量的与癌症相关的自身抗体的抗原;或施用有效量的具有与癌症相关的自身抗体的免疫反应特性的抗体以及与癌症相关的自身抗体的抗原。

19. 权利要求 18 的方法,其中所述癌症是肺癌。

20. 权利要求 18 或 19 的方法,包括施用抗补体因子 H(CFH) 的抗体,抗 α -葡糖苷酶 (GANAB) 的抗体,抗 STIP1(应激诱导磷蛋白 1) 的抗体,抗 α -烯醇化酶的抗体,抗 14-3-3(14-3-3 蛋白 ϵ) 的抗体,或抗 HSP 60(60kDa 热休克蛋白) 的抗体,或上述抗体的任意组合。

21. 权利要求 18 或 19 的方法,包括施用抗表 4 所列一或多种实体的抗体,或施用其任意组合。

22. 权利要求 18 或 19 的方法,包括施用补体因子 H(CFH) 抗原, α -葡糖苷酶 (GANAB) 抗原,STIP1(应激诱导磷蛋白 1) 抗原, α -烯醇化酶抗原,14-3-3(14-3-3 蛋白 ϵ) 抗原,或 HSP 60(60kDa 热休克蛋白) 抗原,或上述抗原的任意组合。

23. 权利要求 18 或 19 的方法,包括施用从表 4 所列一或多种实体制备的抗原,或施用其任意组合。

24. 权利要求 18-23 中任意一项的方法,包括给对象施用佐剂。

25. 一种治疗对象中癌症的组合物,所述组合物包括有效量的具有与癌症相关的自身抗体的免疫反应特性的抗体,所述抗体可任选地是双特异性抗体;包括有效量的与癌症相关的自身抗体的抗原;或包括有效量的具有与癌症相关的自身抗体的免疫反应特性的抗体以及与癌症相关的自身抗体的抗原;和药学上可接受的载体。

26. 权利要求 25 的组合物,其中所述癌症是肺癌。

27. 权利要求 25 或 26 的组合物,包括抗补体因子 H(CFH) 的抗体,抗 α -葡糖苷酶 (GANAB) 的抗体,抗 STIP1(应激诱导磷蛋白 1) 的抗体,抗 α -烯醇化酶的抗体,抗 14-3-3(14-3-3 蛋白 ϵ) 的抗体,或抗 HSP 60(60kDa 热休克蛋白) 的抗体,或上述抗体的任意组合。

28. 权利要求 25 或 26 的组合物,包括抗表 4 所列一或多种实体的抗体,或其任意组合。

29. 权利要求 25 或 26 的组合物,包括补体因子 H(CFH) 抗原, α -葡糖苷酶 (GANAB) 抗原,STIP1(应激诱导磷蛋白 1) 抗原, α -烯醇化酶抗原,14-3-3(14-3-3 蛋白 ϵ) 抗原,或 HSP 60(60kDa 热休克蛋白) 抗原,或上述抗原的任意组合。

30. 权利要求 25 或 26 的组合物,包括从表 4 所列一或多种实体制备的抗原,或其任意组合。

31. 权利要求 25-30 中任意一项的组合物,包括佐剂。

32. 一种分离的和纯化的抗体,其具有抗补体因子 H(CFH) 的自身抗体的免疫反应特性。

33. 一种分离的和纯化的抗体,其具有抗 α -葡糖苷酶 (GANAB) 的自身抗体的免疫反应特性。

34. 一种分离的和纯化的抗体,其具有抗 STIP1(应激诱导磷蛋白 1) 的自身抗体的免疫

反应特性。

35. 一种分离的和纯化的抗体,其具有抗 α - 烯醇化酶的自身抗体的免疫反应特性。

36. 一种分离的和纯化的抗体,其具有抗 14-3-3 (14-3-3 蛋白 ϵ) 的自身抗体的免疫反应特性。

37. 一种分离的和纯化的抗体,其具有抗 HSP 60 (60kDa 热休克蛋白) 的自身抗体的免疫反应特性。

38. 一种分离的和纯化的抗体,其具有抗表 4 所列一或多种实体的自身抗体的免疫反应特性。

检测和治疗癌症的自身抗体

[0001] 相关申请

[0002] 当前公开的主题要求享有 2008 年 5 月 9 日提交的美国临时专利申请系列号 61/127, 138、2008 年 5 月 23 日提交的美国临时专利申请系列号 61/128, 717 和 2008 年 8 月 7 日提交的美国临时专利申请系列号 61/188, 209 的权益, 这些申请的内容以其全文援引加入本文。

[0003] 资助声明

[0004] 本研究部分得到来自美国国立卫生研究院, 国立癌症学会 (U. S. National Institutes of Health, National Cancer Institute) 的 NCI 资助 5R01-CA109384-03 的支持。因此, 美国政府对当前公开的主题享有一定权利。

技术领域

[0005] 当前公开的主题涉及自身抗体在检测和治疗癌症中的用途。

[0006] 背景

[0007] 癌症一直是重要的世界范围的公众健康议题。一直在探索更有效的检测和治疗癌症的方法。

[0008] 以肺癌为例, 尽管非侵袭性成像的进展提高了检测肺癌的能力, > 75% 的肺癌患者发病时已是晚期疾病, 此时治疗选择有限。Mountain, C.F. Revisions in the International System for Staging Lung Cancer. Chest, 111 :1710-1717, 1997。即使处于临床 I 期肺癌的那些患者最多也只有 60% 的 5 年生存率, 表明所有 I 期患者中的大多数在发病时已患有检测不到的转移性疾病。Mountain, C.F. Revisions in the International System for Staging Lung Cancer. Chest, 111 :1710-1717, 1997。这些统计数据强调了改进早期检测策略的必要性。

[0009] 此外, 肺癌意味着比任意其他恶性肿瘤更多的癌症死亡。尽管诊断能力和治疗在发展, 但在过去数十年间肺癌死亡率没有显著改变。大部分患者患有不宜动手术的疾病, 此时治疗选择包括化疗和放疗很少能够治愈。

[0010] 因此, 对于可用于检测和治疗癌症包括但不限于肺癌的方法的需要仍未得到满足。

[0011] 概述

[0012] 当前公开的主题至少部分涉及检测对象中癌症的方法。在一些实施方案中, 所述方法包括检测对象样品中与癌症相关的自身抗体的存在和 / 或量。

[0013] 还公开了一种管理对具有潜在癌症的对象的治理的方法。在一些实施方案中, 所述方法包括检测对象样品中与癌症相关的自身抗体的存在和 / 或量 ; 和基于与癌症相关的自身抗体的存在或量管理对具有潜在癌症的对象的治理。

[0014] 还公开了一种将肿瘤或可疑肿瘤分子分期的方法。在一些实施方案中, 所述方法包括检测对象样品中与癌症相关自身抗体的存在和 / 或量 ; 和基于与癌症相关自身抗体的存在或量确定肿瘤或可疑肿瘤的分子分期。

[0015] 还公开一种将对象分类到癌症高风险组的方法。在一些实施方案中,所述方法包括检测对象样品中与癌症相关的自身抗体的存在和 / 或量 ;和基于与癌症相关的自身抗体的存在或量将对象分类到具有癌症高风险的组。

[0016] 在当前公开的方法中,所述样品可以是血清样品或血液样品。在当前公开的方法中,所述对象可以是人类对象。

[0017] 在一些实施方案中,所述癌症是肺癌。在一些实施方案中,所述方法包括检测抗补体因子 H(CFH) 的自身抗体,抗 α -葡糖苷酶 (GANAB) 的自身抗体,抗 STIP1 (应激诱导磷蛋白 1 (Stress-induced-phosphoprotein 1)) 的自身抗体,抗 α -烯醇化酶的自身抗体,抗 14-3-3 (14-3-3 蛋白 ϵ) 的自身抗体和 / 或抗 HSP 60 (60kDa 热休克蛋白) 的自身抗体。在一些实施方案中,所述方法包括检测抗表 4 所列一或多种实体的自身抗体或其任意组合。

[0018] 在一些实施方案中,当前公开的主题还提供一种用于检测对象样品中与癌症相关自身抗体的存在和 / 或量的试剂盒。在一些实施方案中,所述试剂盒包括与癌症相关自身抗体的特异性结合配偶体 ;和检测对象样品中与癌症相关自身抗体的存在和 / 或测定其量的说明。在一些实施方案中,所述结合配偶体可以是抗补体因子 H(CFH) 的自身抗体的特异性结合配偶体,抗 α -葡糖苷酶 (GANAB) 的自身抗体的特异性结合配偶体,抗 STIP1 (应激诱导磷蛋白 1) 的自身抗体的特异性结合配偶体,抗 α -烯醇化酶的自身抗体的特异性结合配偶体,抗 14-3-3 (14-3-3 蛋白 ϵ) 的自身抗体的特异性结合配偶体或抗 HSP 60 (60kDa 热休克蛋白) 的自身抗体的特异性结合配偶体。在一些实施方案中,所述结合配偶体可以是抗表 4 所列的一或多种实体的自身抗体的特异性结合配偶体。在一些实施方案中,提供上述结合配偶体的任意组合。

[0019] 在一些实施方案中,所述结合配偶体缀合到固相支持物上,所述试剂盒包括自身抗体的第二种特异性结合配偶体。在一些实施方案中,所述第二种特异性结合配偶体可以是抗体。在一些实施方案中,所述第二种特异性结合配偶体可以缀合可检测基团。所述可检测基团可以选自包括但不限于放射性标记,荧光标记,酶标记和荧光标记的组。所述试剂盒可包括一或多种缓冲剂,蛋白质稳定剂,酶底物,背景降低剂,对照试剂,用于进行检测的装置,以及用于分析和呈现结果的任何必需软件。

[0020] 在一些实施方案中,当前公开的主题还提供一种治疗对象中癌症的方法。在一些实施方案中,所述方法包括给患有癌症的对象施用有效量的具有与癌症相关的自身抗体的免疫反应特性的抗体 (其任选地是双特异性抗体),与癌症相关的自身抗体的抗原,或具有与癌症相关的自身抗体的免疫反应特性的抗体和与癌症相关的自身抗体的抗原二者。

[0021] 在一些实施方案中,所述癌症是肺癌。在一些实施方案中,所述施用包括施用抗补体因子 H(CFH) 的抗体,抗 α -葡糖苷酶 (GANAB) 的抗体,抗 STIP1 (应激诱导磷蛋白 1) 的抗体,抗 α -烯醇化酶的抗体,抗 14-3-3 (14-3-3 蛋白 ϵ) 的抗体或抗 HSP 60 (60kDa 热休克蛋白) 的抗体。在一些实施方案中,所述方法包括施用抗表 4 所列一或多种实体的抗体。在一些实施方案中,可以施用上述抗体的任意组合。在一些实施方案中,所述施用包括施用补体因子 H(CFH) 抗原, α -葡糖苷酶 (GANAB) 抗原,STIP1 (应激诱导磷蛋白 1) 抗原, α -烯醇化酶抗原,14-3-3 (14-3-3 蛋白 ϵ) 抗原或 HSP 60 (60kDa 热休克蛋白) 抗原。在一些实施方案中,所述方法包括施用从表 4 所列一或多种实体制备的抗原。在一些实施方案中可以施用上述抗原的任意组合。在一些实施方案中,给对象施用佐剂。

[0022] 当前公开的主题还提供了用于治疗对象中癌症的组合物,所述组合物包括有效量的具有与癌症相关的自身抗体的免疫反应特性的抗体(其任选地是双特异性抗体),与癌症相关的自身抗体的抗原或具有与癌症相关的自身抗体的免疫反应特性的抗体和与癌症相关的自身抗体的抗原二者;以及药学上可接受的载体。任选地,所述癌症是肺癌。

[0023] 在一些实施方案中,所述组合物可包括抗补体因子 H(CFH) 的抗体,抗 α -葡糖苷酶(GANAB)的抗体,抗 STIP1(应激诱导磷蛋白 1)的抗体,抗 α -烯醇化酶的抗体,抗 14-3-3(14-3-3 蛋白 ϵ)的抗体或抗 HSP 60(60kDa 热休克蛋白)的抗体。在一些实施方案中,所述组合物包括抗表 4 所列一或多种实体的抗体。在一些实施方案中,所述组合物包括上述抗体的任意组合。在一些实施方案中,所述组合物可包括补体因子 H(CFH) 抗原, α -葡糖苷酶(GANAB)抗原,STIP1(应激诱导磷蛋白 1)抗原, α -烯醇化酶抗原,14-3-3(14-3-3 蛋白 ϵ)抗原或 HSP 60(60kDa 热休克蛋白)抗原。在一些实施方案中,所述组合物可包括从表 4 所列一或多种实体制备的抗原。在一些实施方案中,所述组合物可包括上述抗原的任意组合。在一些实施方案中,所述组合物可包括佐剂。

[0024] 在一些实施方案中,当前公开的主题还提供分离和纯化的抗体,其具有下列自身抗体的免疫反应特性:抗补体因子 H(CFH)的自身抗体,抗 α -葡糖苷酶(GANAB)的自身抗体,抗 STIP1(应激诱导磷蛋白 1)的自身抗体,抗 α -烯醇化酶的自身抗体,抗 14-3-3(14-3-3 蛋白 ϵ)的自身抗体或抗 HSP 60(60kDa 热休克蛋白)的自身抗体。在一些实施方案中,当前公开的主题还提供分离和纯化的抗体,其具有抗表 4 所列一或多种实体的自身抗体的免疫反应特性。

[0025] 因此,当前公开的主题的目的是提供用于检测和治疗癌症的新的方法和组合物。完全或部分通过当前公开的主题实现这种目的以及其他目的。

[0026] 当前公开的主题的目的已在上文陈述,在浏览了下面的说明、附图和实施例后其他目的和优点将是明显的。

[0027] 附图简述

[0028] 图 1A 和 1B 是用 NSCLC 患者血清探查的两个免疫印迹。

[0029] 图 1A 是混合血清印迹:使用 10 份 I 期 NSCLC 患者的个体血清样品探查含来自 5 例晚期 NSCLC 患者的混合血清的印迹。

[0030] 图 1B 是 CFH 印迹:使用个体的 I 期、III/IV 期和正常血清样品探查含纯化 CFH 的印迹。

[0031] 图 2A、2B 和 2C 显示 A549 相对 H661 细胞中 CFH 的表达、分泌和结合。

[0032] 图 2A 是显示 CFH RNA 的 RT-PCR 图片。从 A549 或 H661 细胞分离的 RNA 合成 cDNA,然后利用 CFH 特异性引物通过 RT-PCR 扩增。产物在琼脂糖凝胶上进行电泳。

[0033] 图 2B 是分泌的 CFH 的免疫印迹。A549 和 H661 细胞在 75cm² 烧瓶中生长到 80% 铺满。将浓缩的条件培养基或 100ng 纯化 CFH 进行 SDS-PAGE,印迹,并用山羊抗人 CFH 一抗探查。

[0034] 图 2C 是显示来自 CFH 结合测定的数据的条形图。在 4°C 利用 ¹²⁵I 标记的 CFH 将细胞一式三份温育 30 分钟。洗涤细胞,利用 γ 计数器检测结合 cpm。对于竞争性接合,在添加 ¹²⁵I 标记的 CFH 之前 30 分钟向温育中添加 10 μ g 未标记的 CFH。CFH* = 放射性标记的 CFH。n. s. = 不显著。亮条:CFH*;暗条:CFH*+CFH。

[0035] 图 3 是显示 CFH 自身抗体存在 (+ ;暗条) 或不存在 (- ;亮条) 条件下肺癌细胞的 C3 沉积的条形图 ;数值是 3 位患者 IgG 样品各个的三次测量值的平均数。

[0036] 图 4 显示中等分化的肺腺癌显示对 CFH 的弥散性 3+ 肿瘤细胞免疫染色 (放大倍数 200×) 的图。

[0037] 图 5 是用于检测自身抗体的 Surf-Blot 分析。

[0038] 图 6 显示对通过 2D-PAGE 分离的混合腺癌细胞系裂解物的考马斯染色。切除环状样点用于测序。

[0039] 图 7 是裂解物针对肺腺癌患者的稀释血清的 Western 印迹。将信号对应图 6 的相应样点。

[0040] 图 8 和 9 是利用 NSCLC 患者血清 (图 8, 左) 和匹配对照 (图 9, 右) 探查的纯化 CFH 的 Surf-Blots。

[0041] 详细说明

[0042] 根据当前公开的主题, 为检测 (较佳的是早期检测) 对象中的癌症提供方法和组合物。还为治疗对象中的癌症提供方法和组合物。

[0043] 除非另外定义, 所有此处使用的技术和科学术语与当前描述的主题所属领域的普通技术人员通常所理解的具有相同的含义。所有此处提及的出版物、专利申请、专利和其他参考文献均以其全文援引加入本文。

[0044] I. 定义

[0045] 尽管下列术语被认为是本领域普通技术人员公知的, 仍阐明下列定义以有利于解释当前公开的主题。

[0046] 按照长期存在的专利法惯例, 当应用于本申请包括权利要求时, 术语“一个”和“一种”表示“一或多个 / 种”。

[0047] 除非另外指出, 在说明书和权利要求中使用的所有表示成分的数量、反应条件等等的数字应被理解为在所有情况下用术语“约”修饰。因此, 除非相反的提示, 本说明书和所附权利要求中阐述的参数的数值区域是近似值, 其可以根据当前公开的主题设法获得的所需特性而变化。

[0048] “氨基酸序列”和术语如“肽”, “多肽”和“蛋白”此处可互换使用, 不是旨在将氨基酸序列限定到与所述蛋白分子有关的完整的、天然氨基酸序列 (即只包含天然存在的蛋白中发现的那些氨基酸的序列)。当前公开的主题的蛋白和蛋白片段可以通过重组方法产生或从天然存在的来源分离。蛋白片段可以是任意大小, 例如其大小范围可以是 4 个氨基酸残基到完整的氨基酸序列减去一个氨基酸。

[0049] 术语“抗体”包括完整抗体以及与感兴趣的一或多个蛋白以足够的特异性结合的任意抗体片段或双特异性抗体。

[0050] 如本文使用的, 术语“样品”使用其最广的含义。在某种意义上, 其旨在包括来自生物学来源的样本。生物样品可以获自动物 (包括人), 包括液体, 固体, 组织和气体。生物样品包括血液制品, 如血浆, 血清等等。

[0051] 如本文使用的, 术语“对象”是指任意动物 (例如哺乳动物), 包括但不限于人, 非人灵长类动物, 啮齿动物等等, 它们是特定疗法的接受者。术语“对象”和“患者”此处可以互换使用, 如但不限于涉及人类对象。

[0052] 如本文使用的,术语“具有潜在癌症的对象”是指表现一或多种指示癌症的症状或针对癌症进行筛查(例如在常规身体筛查期间)的对象。具有潜在癌症的对象还可以具有一或多种危险因素。怀疑患有癌症的对象通常还未接受癌症检测。但是,“怀疑患有癌症的对象”还可以包括已接受初步诊断(例如显示不确定的肺部结节的CT扫描)但其所处癌症阶段还未知的个体。该术语进一步包括曾经患有癌症的人(例如处于症状缓解期的个体)。

[0053] 如本文使用的,术语“具有癌症风险的对象”是指具有一或多种患上癌症的危险因素的对象。

[0054] II. 典型的实施方案

[0055] II. A. 检测方法

[0056] 在一些实施方案中,当前公开的主题提供从样品(包括但不限于血液样品)检测对象癌症的方法。在一些实施方案中,当前公开的主题可以通过寻找对象血清中特定抗体的存在来进行。当确信这些抗体存在时,癌症是有可能的。未患癌症的个体在他们的血清中没有这些抗体。

[0057] 因此,此处提供的用于检测癌症包括但不限于肺癌的方法使用对象自身的抗体(被称为“与癌症相关的自身抗体”)作为一种新的血清试验的基础。目前没有用于肺癌以及其他癌症类型的血清试验。其他典型的癌症类型包括黑色素瘤,腺癌,恶性神经胶质瘤,前列腺癌,肾癌,膀胱癌,胰腺癌,甲状腺癌,结肠癌,直肠癌,脑癌,肝癌,乳腺癌,卵巢癌,实体瘤,实体瘤转移瘤,血管纤维瘤,晶体后纤维增生症,血管瘤和Kaposi's肉瘤。在浏览了当前公开的内容后,其他示例性的癌症对本领域的普通技术人员来说是显而易见的。

[0058] 在一些实施方案中,当前公开的主题直接解决了肺癌检测的问题。因为大于3/4的对象表现晚期肺癌(此时治疗选择有限),早期检测可能潜在地每年拯救数以万计的生命。因此,当前公开的主题可用于下列典型的非限制性临床方案:(1)确定具有癌症高风险的个体;(2)将在成像研究中具有非特异性病变的患有癌症的对象与未患有癌症的对象区分;(3)追踪癌症对象以预测预后。

[0059] 单独或组合起来,当前公开的与癌症相关的自身抗体标记物为癌症(包括但不限于肺癌)的早期检测和肿瘤的分子分期提供重要的临床应用。典型的自身抗体标记物包括但不限于抗以下物质的自身抗体:补体因子H(CFH), α -葡糖苷酶(GANAB),STIP1(应激诱导磷蛋白1), α -烯醇化酶,14-3-3(14-3-3蛋白 ϵ)和HSP 60(60kDa热休克蛋白)。其他典型的自身抗体标记物包括但不限于分别抗下文表2-4所列实体的自身抗体。

[0060] 还提供将对象分类到癌症(包括但不限于肺癌)的高风险组的方法。所述方法可以包括检测对象样品中与癌症相关的自身抗体的存在和/或量并基于对象样品中与癌症相关的自身抗体的存在和/或量确定对象是否应被分类到具有肺癌高风险的组。

[0061] 在一些实施方案中,提供一种管理患有癌症或具有潜在癌症的对象的治理的方法。所述方法可以包括检测对象样品中与癌症相关的自身抗体的存在和/和/或量;和基于对象样品中与癌症相关的自身抗体的存在和/或量管理患有癌症或具有潜在癌症的对象的治理。

[0062] 确定当前公开的自身抗体在各种动物组织中的存在或水平。在一些实施方案中,在动物组织或体液中检测自身抗体。在一些实施方案中,在体液包括血浆,血清,全血,粘液和/或尿液中检测自身抗体。在一个具体实施方案中,在血清中检测自身抗体。

[0063] 可以在当前公开的方法中确定对象样品中与癌症相关的自身抗体的存在和 / 或水平。典型的自身抗体标记物包括但不限于抗以下物质的自身抗体：补体因子 H(CFH)， α - 葡糖苷酶 (GANAB)，STIP1 (应激诱导磷蛋白 1)， α - 烯醇化酶，14-3-3(14-3-3 蛋白 ϵ) 和 HSP 60 (60kDa 热休克蛋白)。其他典型的抗体标记物包括但不限于分别抗下文表 2-4 所列实体的自身抗体。但是，当前公开的主题不限于这些自身抗体。与癌症或癌症进展有关的任意自身抗体也包括在此处提供的组中，并且属于当前公开主题的范围以内。可以使用任意合适的方法来鉴定适用于当前公开的方法的其他癌症自身抗体，包括但不限于下文说明性实施例和下文 II. C. 部分描述的方法。

[0064] 从上述实施方案可以看出，当前公开的方法和组合物可用于筛查癌症对象，癌症的早期检测和管理具有潜在癌症或患有已知癌症的对象的对象的治疗。例如，当前公开的方法和组合物可用于在成像或其他已知的检测肿瘤的方法之前筛选对象，以及用于将对象确定为具有癌症的高风险或更高风险。例如可以将具有高风险临床特点并且自身抗体筛选的试验结果提示肺癌高概率或更高风险的那些对象进行 CT 扫描。对于试验结果提示癌症低概率的对象可以在他们常规随访期间使用自身抗体筛选进行再评估。

[0065] 当在成像研究中检测到不确定的肺部结节的情况下（无论是在筛查试验中检测到或针对其他症状进行的），可以使用当前公开的方法和此处提供的组合物。那些自身抗体筛选的试验结果提示癌症低风险的对象可以定期接受成像检查。具有高风险临床特点以及与恶性肿瘤高风险有关的自身抗体筛查结果的对象可以被确定需要立即的干预 (intervention)。

[0066] 在浏览了当前公开的内容后对本领域技术人员显而易见，任何适合确定与癌症相关的自身抗体的存在和 / 或水平的方法都可以使用。例如，用于检测自身抗体的方法可以包括利用纯化蛋白的免疫印迹，ELISA 和 / 或蛋白测定法。

[0067] 在一些实施方案中，利用本领域技术人员公知的技术检测自身抗体，如凝胶电泳和使用结合配偶体。例如，补体因子 H(CFH)， α - 葡糖苷酶 (GANAB)，STIP1 (应激诱导磷蛋白 1)， α - 烯醇化酶，14-3-3(14-3-3 蛋白 ϵ) 和 / 或 HSP 60 (60kDa 热休克蛋白) 多肽或其片段可以用做结合配偶体。其他典型的结合配偶体包括但不限于下文表 2-4 所列的实体。

[0068] 此外，抗体可以用作结合配偶体。当前公开主题的抗体可以是任何单克隆或多克隆抗体，只要它正确的识别所需靶分子。在一些实施方案中，根据任何常规抗体或抗血清制备方法产生针对免疫原的抗体。此外，此处用做免疫原的蛋白不限于任何特定类型的免疫原。例如，当前公开主题的自身抗体的片段可以用做免疫原。所述片段可以通过任何方法获得，包括但不限于表达编码蛋白的基因片段，蛋白的酶处理，化学合成等等。

[0069] 抗体结合通过本领域已知技术检测（例如放射免疫测定，ELISA (酶联免疫吸附测定)，“夹心”免疫测定，免疫放射测定，凝胶扩散沉淀反应，免疫扩散测定，原位免疫测定（例如使用胶体金，酶或放射性同位素标记例如），Western 印迹，沉淀反应，凝集测定（例如凝胶凝集测定，血凝测定等等），补体结合测定，免疫荧光测定，蛋白 A 测定和免疫电泳测定等等。典型的免疫测定描述于美国专利 5, 599, 677 和 5, 672, 480，在此分别援引加入本文。在浏览了当前公开的内容包括实施例后，本领域技术人员将熟悉众多具体的免疫测定形式及其变化，它们将用于实现当前公开主题的方法。

[0070] 在一些实施方案中，通过检测一抗上的标记检测结合自身抗体的抗体。在一些实

实施方案中,通过检测二抗或其他试剂与一抗的结合来检测一抗。在另一些实施方案中,所述二抗是标记的。根据已知的技术,用于产生可检测信号的方法包括使用放射性标记(例如 ^{35}S , ^{125}I , ^{131}I), 荧光标记, 酶标记(例如辣根过氧化物酶, 碱性磷酸酶), 荧光标记(例如荧光素)等等, 在浏览当前公开的内容后这些对于本领域技术人员来说是显而易见的。在本领域许多方法已知可用于在免疫测定中检测结合, 它们在当前公开主题的范围内。

[0071] 在一些实施方案中, 免疫测定包括自身抗体的特异性抗体和用于产生可检测信号的方法。可以根据已知技术将抗体固定到支持物(如珠, 平板或载片)上并与液相的试验样品接触。然后将支持物与液相分离并检测支持物相或液相中与自身抗体存在有关的可检测信号。

[0072] 当前公开的主题包括用于检测自身抗体的试剂盒。在一些实施方案中, 试剂盒包括与癌症相关的自身抗体的特异性抗体, 产生如上所述的可检测信号必需的试剂和缓冲液。在一些实施方案中, 试剂盒包含进行检测测定必需的所有成分, 包括所有对照, 进行测定的说明以及用于分析和呈递结果的任何必需软件。

[0073] 可以采用多种方式产生用于实现当前公开主题的方法的检测试剂盒。在一些实施方案中, 检测试剂盒包括抗体或抗体片段(与缀合到固相支持物的与癌症相关的自身抗体特异性结合)以及与可检测基团缀合的第二种这类抗体或抗体片段。在一些实施方案中, 试剂盒还包括辅助试剂如缓冲剂和蛋白稳定剂, 并且可以包括(必要时)可检测基团是其一部分(例如酶底物)的可检测信号生成系统的其他成员; 用于降低试验背景干扰的物质; 对照试剂; 用于进行测试的装置等等, 在浏览了当前公开的内容后这些对本领域技术人员来说是显而易见的。

[0074] 在一些实施方案中, 试剂盒包括一或多种与癌症相关的自身抗体的特异性抗体或抗体片段, 以及各种抗体(与可检测基团缀合)的特异性结合配偶体。可以同样包括如上所述的辅助剂。检测试剂盒可以采用任何合适的方式包装, 通常将所有组分以及用于进行测试的图表或打印说明书包装在单一容器中。

[0075] 在一些实施方案中, 自身抗体的检测测定是自动化的。用于免疫测定自动化的方法包括美国专利 5, 885, 530, 4, 981, 785, 6, 159, 750 和 5, 358, 691 描述的那些方法, 其援引加入本文。在一些实施方案中, 结果的分析 and 呈递也是自动化的。采用这样的方式, 临床医生可以采用任何合适的方法或装置得到测试结果。因此, 在一些实施方案中, 临床医生不需要理解原始数据, 因为数据将会以其最有用的形式直接呈现给临床医生。然后临床医生能立刻利用所述信息优化对象的护理。当前公开的主题提供能够在进行测定的实验室, 信息提供者, 医务人员和对象之间接收、处理和传递信息的任何方法。

[0076] II. B. 治疗方法

[0077] 当前公开的主题还提供用于治疗对象癌症的组合物和方法。在一些实施方案中, 当前公开的主题包括给癌症对象施用有效量的具有与癌症相关的自身抗体的免疫反应特性的抗体(一些情况下其可以是双特异性抗体), 与癌症相关的自身抗体的抗原或具有与癌症相关的自身抗体的免疫反应特性的抗体和与癌症相关的自身抗体的抗原二者。

[0078] 在一些实施方案中, 施用抗补体因子 H(CFH) 的抗体, 抗 α -葡糖苷酶 (GANAB) 的抗体, 抗 STIP1(应激诱导磷蛋白 1) 的抗体, 抗 α -烯醇化酶的抗体, 抗 14-3-3(14-3-3 蛋白 ϵ) 的抗体或抗 HSP 60(60kDa 热休克蛋白) 的抗体或上述抗体的任意组合。在一些实

施方案中,所述施用包括施用补体因子H(CFH) 抗原, α -葡糖苷酶(GANAB) 抗原,STIP1(应激诱导磷蛋白1) 抗原, α -烯醇化酶抗原,14-3-3(14-3-3 蛋白 ϵ) 抗原或HSP 60(60kDa 热休克蛋白) 抗原。

[0079] 可以施用的其他典型抗体包括但不限于分别抗下文表 2-4 所列实体的抗体。可以施用这些抗体的任何组合,以及这些抗体与上文刚刚所列的那些的任何组合。可以施用的其他典型抗原包括但不限于从下文表 2-4 所列实体制备的抗原。可以施用这些抗原的任何组合,以及这些抗原与上文刚刚所列的那些的任何组合。因此,在一些实施方案中,可以施用上述抗原的任意组合。

[0080] 在一些实施方案中,给对象施用双特异性抗体——如但不限于包含补体抑制性抗体的部分(CFH, CD46, CD55, CD35 和 CD59) 与另一种肿瘤蛋白(例如 EGFR) 和 / 或佐剂组合。因此,在一些实施方案中本文提供的是使用补体抑制性蛋白(可与抗肿瘤蛋白的另一种抗体组合) 的双特异性抗体疗法。

[0081] 在一些实施方案中,待治疗的组织是患有实体瘤,转移瘤或其他类型的癌症的对象的癌组织。一种示例性的癌症类型是肺癌。其他示例性癌症包括黑色素瘤,腺癌,恶性神经胶质瘤,前列腺癌,肾癌,膀胱癌,胰腺癌,甲状腺癌,结肠癌,直肠癌,脑癌,肝癌,乳腺癌,卵巢癌,实体瘤,实体瘤转移瘤,血管纤维瘤,晶体后纤维增生症,血管瘤和 Karposi' s 肉瘤。在浏览了当前公开的内容后,其他示例性的癌症对本领域的普通技术人员来说是显而易见的。

[0082] 在一些实施方案中,当前公开的主题涉及所述方法联合其他疗法(例如抗实体瘤和控制转移瘤建立的传统化疗或手术) 的实施。可以在化疗或手术之前、期间或之后进行当前公开主题的治疗组合物的施用。例如,可以实施当前公开的主题用于长期维持。作为其他的实例,可以在化疗之后(此时肿瘤组织将对毒性攻击产生应答) 实施当前公开的主题。作为进一步的实例,可以在手术后(此时实体瘤已经被除去) 实施当前公开的主题作为抗转移瘤的预防措施。

[0083] 治疗剂施用的剂量范围取决于药剂的形式及其功效(将在本文进一步描述),其是足以产生预期效果(其中疾病症状被改善) 的量。剂量不应大到引起不良副作用,如高粘稠度综合征,肺水肿,充血性心衰等等。通常,剂量将随对象的年龄,健康状况,性别和疾病程度而变化,可以由本领域技术人员确定。在任何并发症的情况下,剂量还可以由私人医生调整。

[0084] 有效量是足以在被治疗组织中产生可检测效果的抗体(具有与癌症相关的自身抗体的免疫反应特性) 和 / 或与癌症相关的自身抗体的抗原的量。在一些实施方案中,预期效果是转移瘤的预防。如此,治疗不是必须在具体组织中,而可以是全身性治疗。因此,在一些实施方案中,有效量是整体来看足以在个体中产生所需状态的维持(如但不限于转移瘤缺失) 的抗体(具有与癌症相关的自身抗体的免疫反应特性) 和 / 或与癌症相关的自身抗体的抗原的量。可以按照下文实施例的描述或通过本领域技术人员已知的其他方法进行测量。

[0085] 当前公开的治疗组合物可以通过注射或随时间逐步输注进行肠胃外施用。尽管待治疗的组织通常可以通过全身性施用在体内达到,因此最常见的是通过治疗组合物的静脉内施用进行治疗,其他组织和输送方法也存在可能性(被靶向的组织含靶分子)。因此,治

疗组合物可以被吸入或另外提供给肺,和 / 或可以静脉内,腹腔内,肌内,皮下,腔内,经皮肤施用,并且可以通过蠕动法输送。

[0086] 例如,通过单位剂量的注射,常规静脉内施用当前公开主题的治疗组合物。当用于当前公开主题的治疗组合物时,术语“单位剂量”是指适用于对象的单一剂量的物理分离单位,每个单位包含预定量的活性材料(经计算预计产生所需治疗效果)以及所需稀释剂;即载体或运载体(vehicle)。

[0087] 按照与制剂相容的方式和有效量施用组合物。待施用的数量取决于待治疗的对象,对象系统利用活性成分的能力以及所需治疗效果的程度。所需施用活性成分的准确量取决于医师的判断,对每个个体都是特定的。施用的合适方式也是可以变化的,但典型的是初次施用继之以一或多个小时间隔的重复剂量(通过后续注射或其他施用)。

[0088] 如本文使用的,当涉及组合物、载体、稀释剂和试剂时,术语“药学可接受”、“生理可耐受”及其语法变化可以互换使用,表示材料能够给哺乳动物施用并且不产生不良的生理作用如恶心,眩晕,胃紊乱(gastric upset)等等。在一些实施方案中,药学可接受的载体是对于人来说药学可接受的。

[0089] 药理学组合物(包含溶解或分散在其中的活性成分)的制备是本领域熟知的,无需基于制剂进行限制。通常这类组合物被制备成注射用液体溶液或悬液;但是还可以制备成使用前适于作为溶液或于液体中的悬液的固体形式。所述制剂也可以被乳化。

[0090] 活性成分可以与赋形剂(其是药学上可接受的并且与活性成分相容)混合并且其量适用于此处描述的治疗方法。合适的赋形剂是例如水,盐水,葡萄糖,甘油,乙醇等等及其组合。此外,如果需要,组合物可以包含少量辅助物质如湿润剂或乳化剂,pH缓冲剂等,其增强活性成分的效力。

[0091] 治疗组合物可以包括其中成分的药学上可接受的盐。药学上可接受的盐包括与无机酸如例如盐酸或磷酸或有机酸如醋酸、酒石酸、扁桃酸等等形成的酸加成盐(与多肽的自由氨基形成)。与自由羧基形成的盐还可以来源于无机碱如例如氢氧化钠,氢氧化钾,氢氧化铵,氢氧化钙或氢氧化铁和有机碱如异丙胺,三甲胺,2-乙基氨基乙醇,组氨酸,普鲁卡因等等。

[0092] 生理可耐受载体是本领域公知的。示例性的液态载体是无菌水溶液,其不包含除了活性成分和水之外的材料,或包含缓冲液如生理pH值的磷酸钠,生理盐水或这两者,如磷酸盐缓冲盐水。更进一步,水性载体可以包含一种以上缓冲盐,以及盐如氯化钠和氯化钾,葡萄糖,聚乙二醇和其他溶质。

[0093] 液体组合物还可以包含除了水以外的液相和排除水外的液相。这类其他额外液相的实例是甘油,植物油如棉花子油,和水油乳浊液。

[0094] II. B. 1. 抗原性多肽

[0095] 在一些实施方案中,当前公开的主题提供治疗组合物,其包括与癌症相关的自身抗体的抗原性多肽。典型的抗原性多肽包括补体因子H(CFH), α -葡糖苷酶(GANAB),STIP1(应激诱导磷蛋白1), α -烯醇化酶,14-3-3(14-3-3蛋白 ϵ),HSP 60(60kDa热休克蛋白)或其片段或类似物。其他典型的抗原性多肽包括但不限于下文表2-4所列的实体。

[0096] 在一个实施方案中,当前公开主题的多肽包括不超过约100个氨基酸残基,优选不超过约60个残基,更优选不超过约30个残基。肽可以是线性或环状的。因此,应理解主

题多肽无需与抗原性多肽的天然氨基酸残基序列相同,只要它包括产生免疫应答所需要的序列。

[0097] 主题多肽包括与癌症相关的自身抗体的抗原性多肽的任何类似物、片段或化学衍生物。这类多肽可以进行各种改变、取代、插入和缺失,其中这类改变为其使用提供一些优点。在这点上,与癌症相关的自身抗体的抗原性多肽对应于天然抗原的序列而不是与其相同,其中进行一或多个改变并且在此处指定的一或多种测定中其保留行使作为与癌症相关的自身抗体的抗原性多肽的功能的能力。因此,多肽可以是肽衍生物各种形式中的任意一种,包括酰胺,与蛋白的缀合物,环化肽,聚合肽,类似物,片段,化学修饰肽和类似衍生物。

[0098] 术语“类似物”包括具有与癌症相关的自身抗体的抗原性多肽的序列基本上相同的氨基酸残基序列的任何多肽,其中一或多个残基已经被功能类似残基保守取代并且其显示此处描述的抗原性活性。保守取代的实例包括一种非极性(疏水)残基如异亮氨酸,缬氨酸,亮氨酸或甲硫氨酸取代另一种;一种极性(亲水)残基取代另一种残基,如精氨酸和赖氨酸之间取代,谷氨酰胺和天门冬酰胺之间取代,甘氨酸和丝氨酸之间取代;一种碱性残基如赖氨酸,精氨酸或组氨酸取代另一种;或一种酸性残基如天冬氨酸或谷氨酸取代另一种。

[0099] 短语“保守取代”还包括使用化学衍生的残基代替非衍生残基,只要这种多肽显示需要的抑制活性。

[0100] “化学衍生物”是指具有一或多个通过功能性侧基反应化学衍生的残基的主题多肽。这类衍生分子包括例如以下那些分子,其中游离氨基被衍生形成盐酸胺, p- 甲苯磺酰基, 苄氧羰基, t- 丁氧羰基, 氯乙酰基或甲酰基。游离羧基可以被衍生形成盐, 甲酯和乙酯或其他类型的酯或酰胺。游离羟基可以被衍生形成 O- 酰基或 O- 烷基衍生物。组氨酸的咪唑氮可以被衍生形成 N-im- 苄基组氨酸。化学衍生物还包括那些含一或多个 20 个标准氨基酸的天然氨基酸衍生物的肽。例如: 4- 羟脯氨酸可以取代脯氨酸; 5- 羟基赖氨酸可以取代赖氨酸; 3- 甲基组氨酸可以取代组氨酸; 高丝氨酸可以取代丝氨酸; 和鸟氨酸可以取代赖氨酸。当前公开主题的多肽还包括相对于多肽序列(其序列在本文显示)具有一或多个残基添加和/或缺失的任何多肽,只要所需的活性被维持。术语“片段”是指具有比本文公开的多肽序列更短的氨基酸残基序列的任何主题多肽。

[0101] 当目前公开主题的多肽具有与癌症相关的自身抗体的抗原性多肽序列不同的序列时,它通常是因为已经进行了一或多个保守或非保守取代,通常不超过约 30%、优选不超过 10%的氨基酸残基被取代。还可以在多肽的任意末端添加额外的残基,用于提供“接头”,如此当前公开主题的多肽还可以方便地附着到标记或固体基质或载体上。

[0102] 氨基酸残基接头通常是至少一个残基,可以是 40 或者更多个残基,更常见的是 1 到 10 个残基,但不形成抗原性表位。用于连接的典型氨基酸残基是酪氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、谷氨酸和天冬氨酸等等。此外,除非另作说明,主题多肽可以和与癌症相关的自身抗体的抗原性多肽不同,这通过末端 NH₂ 酰化例如乙酰化或巯基乙酸酰胺化、通过末端羧基酰胺化例如用氨、甲胺以及类似末端修饰所修饰的序列导致。众所周知,末端修饰可用于降低蛋白酶消化的敏感性,因此用于延长多肽在溶液(尤其是存在蛋白酶的生物体液)中的半衰期。在这点上,多肽环化也是有用的末端修饰,因为环化形成的稳定结构也是有益的。

[0103] 当前公开主题的任何肽可以使用药学上可接受盐的形式。能够与当前公开主题的

肽反应的合适酸包括无机酸如三氟乙酸 (TFA), 盐酸 (HCl), 氢溴酸, 高氯酸, 硝酸, 硫氰酸, 硫酸, 磷酸醋酸, 丙酸, 羟基乙酸, 乳酸, 丙酮酸, 草酸, 丙二酸, 琥珀酸, 马来酸, 富马酸, 邻氨基苯甲酸, 肉桂酸, 萘磺酸, 对氨基苯磺酸等等。

[0104] 能够与当前公开主题的肽形成盐的合适碱包括无机碱如氢氧化钠, 氨水, 氢氧化钾等等; 和有机碱如单、双和三烷基和芳基胺类 (例如三乙胺, 二异丙胺, 甲胺, 二甲胺等等), 和任选地取代的乙醇胺 (例如乙醇胺, 二乙醇胺等等)。

[0105] 可以通过多肽领域技术人员已知的任意技术 (包括重组 DNA 技术) 合成当前公开主题的肽 (此处也称为主题多肽)。合成化学技术如固相 Merrifield 型合成可用于以下目的: 纯度, 抗原特异性, 去除非所需副产品, 简化生产等等。可以参见许多可用技术的概述, 关于固相肽合成可以参见 Steward *et al.*, "Solid Phase Peptide Synthesis", W. H. Freeman Co., San Francisco, 1969; Bodanszky, *et al.*, "Peptide Synthesis", John Wiley & Sons, Second Edition, 1976; J. Meienhofer, "Hormonal Proteins and Peptides", Vol. 2, p. 46, Academic Press (New York), 1983; Merrifield, *Adv Enzymol*, 32:221-96, 1969; Fields *et al.*, *Int. J. Peptide Protein Res.*, 35:161-214, 1990; 和美国专利 4, 244, 946, 经典溶液合成可以参见 Schroder *et al.*, "The Peptides", Vol. 1, Academic Press (New York), 1965, 以上每篇均援引加入本文。可用于这类合成的合适保护基在上文以及 J. F. W. McOmie, "Protective Groups in Organic Chemistry", Plenum Press, New York, 1973 中描述, 其援引加入本文。

[0106] 通常, 固相合成法可包括向生长肽链上顺序添加一或多个氨基酸残基或适当保护的氨基酸残基。通常, 利用合适的、选择性可移除的保护基来保护第一氨基酸残基的氨基或者羧基。不同的、选择性可移除的保护基用于含反应性侧基的氨基酸如赖氨酸。

[0107] 利用固相合成为例, 保护或衍生的氨基酸通过其未保护的羧基或氨基附着到惰性固体支持物。然后选择性去除氨基或羧基的保护基, 序列中具有互补 (氨基或羧基) 基团的下一个氨基酸在适于形成酰胺键的条件下与已经附着到固体支持物上的残基混合并反应。然后从新添加的氨基酸残基上去除氨基或羧基的保护基, 然后添加下一个氨基酸 (适当保护的), 诸如此类。在所有期望的氨基酸按照正确顺序连接后, 顺序或同时去除任何残留的末端和侧基保护基 (和固体支持物) 以提供最终的线性多肽。

[0108] 例如上述制备获得的线性多肽可以反应形成它们相应的环肽。用于环化肽的示例性方法描述于 Zimmer *et al.*, *Peptides* 1992, pp. 393-394, ESCOM Science Publishers, B. V., 1993。通常, 将叔丁氧羰基保护的肽甲酯溶于甲醇并添加氢氧化钠溶液, 混合物在 20°C 反应以水解去除甲酯保护基。在蒸发溶剂后, 利用醋酸乙酯从酸化的水溶剂中提取叔丁氧羰基保护的肽。然后在温和酸性条件于二噁烷共溶剂中去除叔丁氧羰基保护基。在 1-羟基苯并三唑和 N-甲基吗啉存在的条件下通过将线性肽的稀释溶液与二环己基碳二亚胺在二氯甲烷和二甲基甲酰胺的混合物中反应将如此获得的具有游离氨基和羧基端的未保护线性肽转变为其对应的环肽。然后通过层析纯化获得的环肽。

[0109] II. B. 2. 抗体

[0110] 在一些实施方案中, 当前公开的主题还提供与癌症相关的自身抗体以及用于分离自身抗体和 / 或用于产生具有与自身抗体相同的免疫反应特性 (例如抗原识别特性) 的抗体的方法。具有这类特性的抗体可被称作 "自身抗体模拟物"。

[0111] 因此,短语“具有与癌症相关的自身抗体的免疫反应特性的抗体”包括但不限于此处公开的与癌症相关的自身抗体本身或自身抗体模拟物。此外,具有与癌症相关的自身抗体的免疫反应特性的抗体可以是上文描述的双特异性抗体。

[0112] 本文提供用于产生自身抗体模拟物和分离自身抗体的典型方法,包括在实施例中。典型的抗体包括但不限于分别抗以下物质的抗体:补体因子H(CFH), α -葡糖苷酶(GANAB),STIP1(应激诱导磷蛋白1), α -烯醇化酶,14-3-3(14-3-3蛋白 ϵ)和HSP 60(60kDa热休克蛋白)。其他典型的抗体包括但不限于分别抗下文表2-4所列实体的抗体。

[0113] 此处使用采用各种语法形式的术语“抗体或抗体分子”作为集合名词,其表示免疫球蛋白分子和/或免疫球蛋白分子的免疫活性部分的群,即包含抗体结合位点或互补位的分子。“抗体结合位点”是由重链和轻链可变区和高变区组成的抗体分子的结构部分,其特异性结合抗原。还包括获自骆驼(例如美洲驼)的仅重链抗体和抗体片段。用于产生这类抗体和抗体片段的一般技术提供于Frenken, Leon G. J., *et al.*, *Journal of Biotechnology* 78(2000)11-21,其以全文援引加入本文。

[0114] 用于当前公开主题的示例性抗体是完整的免疫球蛋白分子,基本上完整的免疫球蛋白分子,单链免疫球蛋白或抗体,包含互补位的免疫球蛋白分子的那些部分,包括本领域已知为Fab, Fab', F(ab')₂和F(v)的那些部分,它们还被称为抗体片段。

[0115] 采用各种语法形式的短语“单克隆抗体”是指只包含一种能够与特定表位免疫反应的抗体结合位点的抗体分子群。因此单克隆抗体通常对与其免疫反应的任意表位显示单一结合亲和力。因此单克隆抗体包含具有多个抗体结合位点(每种对不同的表位是免疫特异性的)的抗体分子,例如双特异性单克隆抗体。

[0116] 单克隆抗体通常由称为杂交瘤的单细胞的克隆(只分泌(产生)一种类型的抗体分子)产生的抗体组成。通过将抗体生成细胞与骨髓瘤或其他自保持细胞系融合形成杂交瘤细胞。这类抗体的制备首先描述于Kohler and Milstein, *Nature* 256:495-497(1975),其描述援引加入本文。其他方法描述于Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, CRC Press, Inc. (1987)。针对这样制备的杂交瘤上清液筛选抗体分子(即自身抗体模拟物)的存在,所述抗体分子与癌症相关的自身抗体的抗原发生免疫反应。

[0117] 简单来说,为了形成产生单克隆抗体组合物的杂交瘤,将骨髓瘤或其他自保持细胞系与获自哺乳动物(用抗原来源进行超免)脾的淋巴细胞融合,如Cheresh *et al.*, *J. Biol. Chem.* 262:17703-17711(1987)所述。

[0118] 建议用于制备杂交瘤的骨髓瘤细胞系来自淋巴细胞的相同种。通常,129 G1X+品系的小鼠是典型的哺乳动物。用于当前公开主题的典型小鼠骨髓瘤包括次黄嘌呤-氨基蝶呤-胸苷-敏感(HAT)细胞系P3X63-Ag8.653和Sp2/0-Ag14,其获自ATCC, Manassas, Virginia,名称分别为CRL 1580和CRL 1581。

[0119] 通常使用聚乙二醇(PEG)1500将脾细胞与骨髓瘤细胞融合。通过它们对HAT的敏感性选择融合的杂交体。利用实施例中描述的酶联免疫吸附测定(ELISA)鉴定产生当前公开主题的单克隆抗体的杂交瘤。

[0120] 还可以通过引发单克隆杂交瘤培养物(包括包含杂交瘤(分泌具有适当特异性的抗体分子)的营养培养基)产生当前公开主题的单克隆抗体。在足够杂交瘤将抗体分子分泌入培养基的条件下和时间段内维持培养物。然后收集包含抗体的培养基。然后通过公知

的技术进一步分离抗体分子。用于制备这些组合物的培养基是本领域公知和商品化供应的,包括合成培养基,近交小鼠等等。示例性的合成培养基是 Dulbecco' s 最低必需培养基 (DMEM-Dulbecco *et al.*, *Virology* 8:396(1959)),添加有 4.5gm/l 葡萄糖,20mM 谷氨酰胺和 20%胎牛血清。示例性的近交小鼠品系是 Balb/C。

[0121] 产生单克隆抗体、杂交瘤细胞或杂交瘤细胞培养物的其他方法也是公知的。参见例如如 Sastry, *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 86:5728-5732(1989); 和 Huse *et al.*, *Science* 246:1275-1281(1989) 描述的从免疫学所有组成成分分离单克隆抗体的方法。

[0122] 当前公开的主题还提供杂交瘤细胞,和包含杂交瘤细胞(产生当前公开主题的单克隆抗体)的培养物。因此,在一些实施方案中,当前公开的主题提供具有如实施例所述的与癌症相关的自身抗体的免疫反应特性的单克隆抗体(自身抗体模拟物)。

[0123] 无需过多实验就可以确定单克隆抗体是否具有与当前公开主题的单克隆抗体相同(即等同)的特异性(免疫反应特性),通过查清前者是否阻止后者结合预选的靶分子进行。如果被检测的单克隆抗体与当前公开主题的单克隆抗体竞争(在标准竞争测定中,当前公开主题的单克隆抗体与存在于固相上的靶分子的结合减弱所显示),则有可能两种单克隆抗体结合相同或密切相关的表位。

[0124] 另一种确定单克隆抗体是否具有当前公开主题的单克隆抗体的特异性的方法是将当前公开主题的单克隆抗体与靶分子(所述单克隆抗体与其通常是反应性的)预温育,然后添加待测单克隆抗体以确定待测单克隆抗体结合靶分子的能力是否被抑制。如果待测的单克隆抗体被抑制,则其很可能与当前公开主题的单克隆抗体具有相同或功能等同的表位特异性。

[0125] 确定单克隆抗体是否具有当前公开主题的单克隆抗体的特异性的其他方法是测定所研究抗体 CDR 区的氨基酸残基序列。在其 CDR 区具有相同或功能等同的氨基酸残基序列的抗体分子具有相同的结合特异性。用于测序多肽的方法是本领域已知的。

[0126] 抗体的免疫特异性,其靶分子结合能力以及抗体显示对表位的伴随亲和力 (attendant affinity) 由与抗体发生免疫反应的表位决定。表位特异性至少部分地由包含抗体的免疫球蛋白重链可变区的氨基酸残基序列以及部分地由轻链可变区氨基酸残基序列决定。术语“具有...的结合特异性”或“具有...的结合偏好”的使用表示等同的单克隆抗体显示相同或类似的免疫反应(其可包括结合)特性并且竞争结合预选的靶分子。

[0127] 人源化单克隆抗体提供比鼠单克隆抗体特定的优势,尤其当它们用于人类治疗时。具体地,人抗体不会作为“外源”抗原被快速从循环清除,并且不会以与外源抗原和外源抗体相同的方式激活免疫系统。制备“人源化”抗体的方法通常是本领域公知的,可以轻易地用于当前公开主题的抗体。因此,在一些实施方案中,当前公开的主题提供当前公开主题的单克隆抗体通过移植引入人免疫系统的成分被人源化而且基本上不干扰抗体结合抗原的能力。人源化抗体还可以利用被工程化以产生人源化抗体的动物产生,如获自以下来源的动物: Medarex of Annandale, New Jersey, United States of America(小鼠)和 Abgenix, Inc., of Fremont, California, United States of America(小鼠)。

[0128] 本文还提供产生抗体(尤其是单克隆抗体,和更加尤其是单链单克隆抗体)的分子克隆法的用途。单链抗体产生已经在本领域被描述,参见美国专利 5,260,203,其内容援引加入本文。为此,从免疫动物的脾分离的 RNA 制备组合免疫球蛋白噬菌粒或噬菌体展示

文库,然后通过在内皮组织上淘选来挑选表达合适抗体的噬菌粒。这种方法还可以用于制备人源化抗体。这种方法相对于常规杂交瘤技术的优势在于可以产生并在一轮内筛选大约 10^4 倍抗体,并且通过在单链上的H和L链组合产生新的特异性,这进一步增加了发现合适抗体的机会。因此,当前公开主题的抗体或当前公开主题的抗体的“衍生物”涉及单多肽链结合分子,其具有的结合特异性和亲和力基本上类似于本文所述抗体轻链和重链集合物可变区的结合特异性和亲和力。

[0129] “Fv”是包含完整抗原识别和结合位点的最小抗体片段。在双链Fv类型中,该区域由通过紧密非共价结合的一个重链可变区和一个轻链可变区的二聚体组成。在单链Fv类型(scFv)中,一个重链可变区和一个轻链可变区可以通过柔性肽接头共价连接,由此轻链和重链可以类似于双链Fv类型的“二聚体”结构缔合。它位于以下构型中,即每个可变区的3个CDR相互作用以在VH-VL二聚体的表面限定出抗原结合位点。总的来说,6个CDR给抗体赋予抗原结合特异性。但是,甚至单个可变区(或者只包括对抗原特异的3个CDR的Fv的一半)也具有识别和结合抗原的能力,尽管其亲和力低于完整的结合位点。scFV的综述可以参见Pluckthun, *in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)。

[0130] 在一些实施方案中,本文提供制备抗体噬菌体展示文库作为发现新的自身抗体抗原的工具。使用患有各个阶段和各种组织学的肿瘤的肺癌患者集合的外周血淋巴细胞或淋巴结的mRNA制备抗体噬菌体展示文库,然后针对肿瘤(例如肺肿瘤蛋白)进行筛选以鉴定结合肿瘤蛋白的噬菌体抗体。然后利用亲和力捕获或免疫印迹策略使用噬菌体表达的抗体鉴定抗原蛋白。这些癌症抗体噬菌体文库的制备和使用提供可补充的资源。

[0131] 然后通过癌症患者群和非癌症对照群的血清中测定自身抗体抗这些抗原的发生率来验证鉴定的抗原多肽。这个验证步骤将确保用于后续血清自身抗体检验的所有抗原实际上都是癌症(如但不限于肺癌)自身抗体,而不是文库中的噬菌体抗体偶然结合的蛋白。所述方法可以如下进行:在包含一组经验证的肿瘤自身抗原的抗原微阵列上温育患者血清,然后利用各种检测结合的人免疫球蛋白的方法之一确定免疫反应性模式。免疫反应性模式可以用做自身抗体特征(signature),其可以提示癌症(如但不限于肺癌)的存在。

[0132] III. 实施例

[0133] 现在参考下文所附实施例(其中显示代表性的实施方案)将更全面描述当前公开的主题。但是当前公开的主题可以采用不同形式实施,并且不应被解释为局限于本文阐述的实施方案。此外,提供这些实施方案以便当前公开的内容是彻底和完整的并且将实施方案的范围全面地传达给本领域技术人员。

[0134] 实施例概述

[0135] 下列实施例涉及在早期肺癌患者中发现功能性自身抗体。

[0136] 肺癌是最常见的癌症,对于显示晚期疾病的大多数患者来说只有15%能达到总共5年存活期。作为早期检测策略的一部分,这些实施例涉及分子标记物(可以检测早期阶段疾病)的发现和追踪(pursuit)。可以寻找存在于肺癌I期患者(不存在于患有晚期疾病的患者中)的自身抗体。在实施例1-4中显示28位I期非复发性NSCLC患者中的14位对针对补体因子H(CFH)的自身抗体是阳性的(50%),而28位晚期NSCLC患者中只有3位具有所述自身抗体($p = 0.003$)。CFH是灭活因子C3b的补体保护性蛋白,而因

子 C3b 的沉积导致溶胞攻击复合物 (cytolytic attack complex) 的形成。与来自缺乏抗 CFH 抗体的患者的 IgG 相比,向 A549 肺腺癌细胞中添加来自抗 CFH 抗体阳性的患者的 IgG 导致细胞表面上补体激活增加 ($p = 0.01$)。这些发现第一次表明 CFH 自身抗体是早期肺癌的分子标记物并且可以在通过增加肿瘤细胞上的补体激活来抑制肿瘤生长中起作用。

[0137] 实施例 5 涉及癌症患者中 α -葡糖苷酶 (GANAB) 自身抗体的发现并提供癌症分子标记物的另一实例。

[0138] 实施例 6 和 7 涉及其他自身抗体的发现并提供癌症分子标记物的其他实例。

[0139] 实施例 1

[0140] 尽管单克隆抗体在许多恶性肿瘤中被用作治疗剂,但认为针对肿瘤的宿主免疫应答主要受细胞免疫调节。O. J. Finn, *J Immunol* 178,2615 (Mar 1,2007)。NSCLC 和大多数肿瘤中的体液免疫未被充分表征,自身抗体通常不与独特临床表型相关。假设早期肺癌患者可能具有针对肿瘤细胞蛋白的自身抗体(而晚期患者可能没有),并且这些自身抗体可能对限制转移有功能作用。作为解决这一问题的第一步,制备包含 5 位晚期 NSCLC 患者的混合血清的免疫印迹。利用来自一组 10 位早期 NSCLC 患者(其至少 2 年没有复发)的个体血清样品探查所述印迹。利用抗人 IgG 辣根过氧化物酶 (HRP) 偶联物二抗探查免疫印迹以检测抗体-抗原复合物。尽管检测到数条不同的免疫反应条带,但在 10 位早期疾病患者的 4 位中观察到 150kDa 条带(图 1A)。

[0141] 通过以下方法鉴定印迹上的免疫反应性 150kDa 条带:将展示免疫印迹的条带与已经用考马斯蓝染色的相邻凝胶泳道比对,然后切割所述条带,将蛋白进行凝胶内胰蛋白酶消化, MALDI-TOF 肽指纹分析和 MS/MS 测序。序列分析鉴定所述条带是血浆铜蓝蛋白和补体因子 3、4A 和 H 的混合物。使用抗纯化的血浆铜蓝蛋白以及补体因子 3 和 H 的免疫印迹分析将 CFH 鉴定为免疫反应蛋白。CFH 是人血浆蛋白,其抑制补体级联中 C3 转变酶的形成和活性。S. Rodriguez de Cordoba, J. Esparza-Gordillo, E. Goicoechea de Jorge, M. Lopez-Trascasa, P. Sanchez-Corral, *Mol Immunol* 41,355 (Jun,2004)。现有研究显示 CFH 分泌并结合一些 NSCLC 细胞系的膜,起保护性蛋白的作用,保护肿瘤细胞抗补体介导的胞毒性。D. Ajona et al., *Cancer Res* 64,6310 (Sep 1,2004); D. Ajona, Y. F. Hsu, L. Corrales, L. M. Montuenga, R. Pio, *J Immunol* 178,5991 (May 1,2007)。这是第一次报告早期 NSCLC 中针对 CFH 的自身抗体。

[0142] 实施例 2

[0143] 为了确定 CFH 自身抗体是否可用于区分早期和晚期患者,将纯化的 CFH 在凝胶上电泳,印迹到膜上,然后用 28 位 I 期患者、28 位 III/IV 期患者的血清以及 12 位没有患癌的对照患者的血清探查所述膜。结果的典型样本被显示(图 1B)。总的说来,28 位非复发 I 期患者中的 14 位(50%)对 CFH 自身抗体显示阳性,包括 17 位腺癌 (ADC) 患者中的 10 位和 11 位鳞状细胞癌 (SCC) 患者中的 4 位,而 28 位晚期 NSCLC 患者中的 3 位(10.7%)具有自身抗体,包括 16 位 ADC 中的 2 位和 12 位 SCC 中的 1 位。早期相对于晚期 NSCLC 中 CFH 自身抗体发生率的差异是统计学显著的 ($p = 0.003$)。12 位未患癌症的个体中没人具有 CFH 自身抗体。

[0144] 实施例 3

[0145] CFH 是由肝脏,单核细胞和巨噬细胞产生并分泌的补体抑制蛋白。发现它还与癌

细胞有关,包括肺、结肠、卵巢、膀胱和神经胶质的癌细胞。D. Ajona et al., *Cancer Res* 64,6310 (Sep 1, 2004); D. Ajona, Y. F. Hsu, L. Corrales, L. M. Montuenga, R. Pio, *J Immunol* 178,5991 (May 1, 2007); E. Wilczek et al., *Int J Cancer* 122,2030 (May 1, 2008); S. Junnikkala et al., *Br J Cancer* 87,1119 (Nov 4, 2002); Z. Z. Cheng et al., *Clin Chem* 51,856 (May, 2005); P. Gasque, A. Thomas, M. Fontaine, B. P. Morgan, *J Neuroimmunol* 66, 29 (May, 1996); S. Junnikkala et al., *J Immunol* 164,6075 (Jun 1, 2000)。有证据表明CFH和其他补体调节蛋白,包括CD35(CR1), CD46(MCP), CD55(DAF)和CD59(保护素)保护肿瘤细胞免受补体系统的攻击。K. Jurianz et al., *Mol Immunol* 36,929 (Sep-Oct, 1999)。CFH通过在液相和膜上结合关键的补体成分C3b来抑制补体旁路。S. Rodriguez de Cordoba, J. Esparza-Gordillo, E. Goicoechea de Jorge, M. Lopez-Trascasa, P. Sanchez-Corral, *Mol Immunol* 41,355 (Jun, 2004)。它作为因子I介导的蛋白水解和C3b失活的辅因子,并加速C3bBb转变酶(在膜上产生C3b)的衰变。S. Rodriguez de Cordoba, J. Esparza-Gordillo, E. Goicoechea de Jorge, M. Lopez-Trascasa, P. Sanchez-Corral, *Mol Immunol* 41, 355 (Jun, 2004)。C3b的沉积起始细胞溶解膜攻击复合物的形成。K. M. Murphy, P. Travers, M. Walport, *Janeway's Immunobiology* (Garland Science, London, England, ed. 7th, 2007)。

[0146] 为了检查NSCLC患者中发现的CFH自身抗体是否能够增加C3b在细胞膜上的沉积,利用两种肺癌细胞系进行C3沉积测定。D. Ajona et al., *Cancer Res* 64,6310 (Sep 1, 2004)。这种测定使用识别C3、C3b和iC3b(C3b的切割产物)的放射性标记的单克隆抗体。作为这个实验的前提,之前的观察证实(D. Ajona et al., *Cancer Res* 64,6310 (Sep 1, 2004))A549细胞系表达(图2A),分泌(图2B)和结合(图2C)CFH,而H661细胞系则不是,因此可用作阴性对照。

[0147] 然后挑选三(3)位患有早期疾病的患者(他们具有CFH自身抗体(2位患者患有ADC, 1位患者患有SCC))和3位患有晚期疾病并且无自身抗体的患者(2位患者患有ADC, 1位患者患有SCC)。从他们血清中的每一份提取IgG级分,将其独立地加入正常对照血清(用作补体的来源)的稀释液中;然后将每份样品的一半添加到A549细胞,一半添加到H661细胞。与来自没有CFH自身抗体的患者的IgG相比,来自具有CFH自身抗体的患者的IgG显示在A549细胞表面C3沉积显著增加($p = 0.01$)。在H661阴性对照细胞系中,C3沉积在CFH自身抗体存在的条件下与其缺失条件下是不能区别的($p = 0.19$) (图3)。

[0148] 实施例4

[0149] CFH的主要功能是通过加速C3b的去除和C3转变酶C3bBb的失活抑制补体介导的裂解。S. Rodriguez de Cordoba, J. Esparza-Gordillo, E. Goicoechea de Jorge, M. Lopez-Trascasa, P. Sanchez-Corral, *Mol Immunol* 41,355 (Jun, 2004)。已经示出针对补体抑制蛋白的中和抗体增加C3b沉积,以及与抗其他补体保护蛋白的抗体组合,在表达和结合所述蛋白的细胞系中增加胞毒性。K. Jurianz et al., *Mol Immunol* 36,929 (Sep-Oct, 1999)。一些患者发展出抗CFH抗体而一些没有的原因仍是未解决的问题。先前的研究已经描述了溶血性尿毒症综合征(HUS)患者中的CFH自身抗体。M. A. Dragon-Durey et al., *JAm Soc Nephrol* 16,555 (Feb, 2005)。该研究中没有患者患有任何肾病,表明肺癌患者中的CFH自身抗体识别与HUS中识别的表位不同的表位。8份肿瘤(一半来自具有CFH自身

抗体的患者,一半来自没有 CFH 自身抗体的患者)的免疫组织化学在所有样品中显示弥散性肿瘤细胞染色。针对 CFH 免疫染色的肺腺癌的典型切片示于图 4。所有被检查的肿瘤表达 CFH 但不是所有患者发展出抗体的事实说明仅仅 CFH 表达不足以在患者中产生抗体应答,并且提示抗原如何呈递给免疫系统是重要的。

[0150] 实施例 1-4 的讨论

[0151] 癌症如肺癌的早期检测仍是一个难题。新的分子标记物(不仅可以检测和表型疾病,而且可以辅助确定合适的靶向疗法)将具有巨大的临床效益。我们选择检测 NSCLC 患者的自身抗体有两个原因。首先,使用单克隆抗体治疗肿瘤,我们假设一些患者可以使用他们自己的抗体来调节肿瘤特性。其次,自身抗体理论上可以鉴定特定的异常靶,因此可以在诊断上使用。这是发现指向肿瘤抑制的可能机制的自身抗体的首次研究。

[0152] 在实施例 1-4 中,一半的早期肺癌患者具有 CFH 自身抗体,这一发现表明 CFH 自身抗体可用作早期疾病的标记物。数据还显示 CFH 自身抗体造成肿瘤细胞上 C3 相关蛋白沉积的增加,但先前的报道显示单一补体抑制蛋白的失活不足以引起胞毒性。D. Ajona, Y. F. Hsu, L. Corrales, L. M. Montuenga, R. Pio, *J Immunol* 178, 5991 (May 1, 2007); S. Junnikkala et al., *J Immunol* 164, 6075 (Jun 1, 2000); S. Varsano, L. Rashkovsky, H. Shapiro, D. Ophir, T. Mark-Bentankur, *Clin Exp Immunol* 113, 173 (Aug, 1998)。因此认为 CFH 自身抗体在引起肿瘤生长限制和转移抑制的宿主防御机制中起作用。

[0153] 实施例 1-4 使用的材料和方法

[0154] 患者。对于初次自身抗体筛选,将 5 位 III 期或 IV 期 NSCLC 患者的血清样品混合并且如下所述对所述混合物进行免疫印迹。来自另外 10 位早期 NSCLC 患者(包括 4 位男性和 6 位女性,平均年龄为 66.6 岁(范围是 57-72 岁))的血清分别用于探查印迹。对于肺癌患者的 CFH 免疫印迹测量,使用患有 I 期 NSCLC 的 28 位患者(14 位男性和 14 位女性,平均年龄为 65.5 岁(范围是 51-78 岁))和患有 III 期或 IV 期 NSCLC 的 28 位患者(16 位男性和 12 位女性,平均年龄为 64 岁(范围是 41-83 岁))的个体血清样品。另外也招募了未患癌症的 12 位对照患者。被挑选参与该研究的所有癌症患者满足下列标准:1)组织学上确认的 NSCLC;2)之前没有针对肺癌进行化疗或放射;和 3)对于早期患者,在诊断后至少 2 年内没有复发迹象。所有血清在治疗前从 Duke University Medical Center, Durham, North Carolina, United States of America 获得。在收集用于医学研究的生物样本前,Institutional Review Board 获得了患者的知情同意书。血清在液氮中冷冻并保存在 -80°C 。

[0155] 免疫印迹分析。为了分析晚期 NSCLC 患者的人血清,首先按照制造商的说明书利用 Albumin and IgG Depletion 试剂盒 (GE Healthcare, Piscataway, New Jersey, United States of America) 处理 $15\ \mu\text{l}$ 等份血清混合物。在还原条件下在包含单个制备孔的 10% 聚丙烯酰胺凝胶中通过 SDS-PAGE 分离耗尽血清中的蛋白 ($400\ \mu\text{g}$),然后将转移到聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜上。将 PVDF 膜置于 Surf-Blot 装置 (Idea Scientific Company, Minneapolis, Minnesota, United States of America) 中,其在印迹上为多个样品产生通道。为了分析纯化的蛋白,在凝胶的多个孔中进行 $0.5\ \mu\text{g}$ 等份纯化的人 CFH (Complement Technology Inc., Tyler, Texas, United States of America) 的电泳并将其转移到 PVDF 上。将患者血清按照 1 : 1000 的稀释度用 50mM Tris-HCl, 137mM NaCl, pH 7.6 和 5% (w/

v) 脱脂奶粉 (MTBS) 进行稀释以用于探查印迹。使用山羊抗人 IgG γ 链-HRP (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, California, United States of America) 作为二抗并用 MTBS 进行 1 : 40,000 稀释。利用 SuperSignal West Femto 化学发光检测系统 (Pierce, Rockford, Illinois, United States of America) 检测结合的抗体。

[0156] 免疫反应蛋白的鉴定。在非还原条件下将两等份混合晚期血清 (耗竭白蛋白和 IgG) 在 SDS-PAGE 凝胶的相邻泳道上电泳。非还原条件是必需的,因为在还原条件下丰富的血清蛋白 α -2 巨球蛋白电泳时具有与感兴趣的条带相同的分子量,但在非还原条件下是 \sim 320kDa。R. Sayegh, J. T. Awwad, C. Maxwell, B. Lessey, K. Isaacson, J Clin Endocrinol Metab 80, 1021 (Mar, 1995)。将一条泳道中的蛋白转移到 PVDF 进行免疫印迹分析,并将其其他泳道中的蛋白用考马斯蓝染色。利用 1 : 1000 稀释的图 1A 中血清 #5 和 1 : 40,000 稀释的山羊抗人 γ -链 IgG-HRP 进行免疫印迹分析。利用 Luminol Western Blot HRP Substrate (Boston Bioproducts, Worcester, Massachusetts, United States of America) 检测免疫复合物。使用免疫印迹鉴定考马斯染色凝胶上电泳显示相同分子量的条带。然后将所述条带中的蛋白进行凝胶内胰蛋白酶消化并通过 MALDI-TOF 肽指纹分析和 MS/MS 测序进行鉴定。从切除的条带鉴定出血浆铜蓝蛋白和补体因子 3, 4A 和 H。使用血清 #5 探查包含纯化的血浆铜蓝蛋白以及补体因子 3 和 H 的免疫印迹, CFH 被鉴定为免疫反应蛋白。

[0157] 癌细胞系。从美国典型培养物保藏中心获得 A549 (肺腺癌) 和 H661 (肺大细胞癌) 细胞系。在添加 10% FBS 的 F-12K 培养基中维持 A549, 在含有添加 10% FBS 的 Glutamax 培养基 (Invitrogen, Carlsbad, California, United States of America) 的 RPMI 1640 中维持 H661。在 37°C, 5% CO₂/95% 空气中维持这两种细胞系。

[0158] 细胞系的 CFH mRNA 表达。利用 High Pure RNA Isolation Kit (Roche Applied Science, Indianapolis, Indiana, United States of America) 从 A549 和 H661 细胞分离总 RNA 并利用 Transcriptor 逆转录酶 (Roche Applied Science) 从 1 μ g 的 RNA 合成 cDNA。在总体积 50 μ l 中用 0.5 μ l cDNA (来自 20 μ l cDNA 反应体积) 或 0.5 μ l 水, CFH 特异性引物和 Apex Taq MasterMix (Genesee Scientific, San Diego, California, United States of America) 进行 PCR。正向引物的序列是 5'-GGAACCACTCAATGCAAAG-3' (SEQ ID NO:1), 反向引物的序列是 5'-AAGCTTCTGTTTGGCTGTCC-3' (SEQ ID NO:2)。循环条件如下: 94°C 起始变性 2 分钟 (min), 然后是 30 个循环: 94°C 15 秒 (s), 52°C 30s 和 72°C 45s。将等份反应物在 1.7% (w/v) TAE-琼脂糖凝胶上电泳并用 GelStar (Lonza, Rockland, Maine, United States of America) 显影。预期的扩增子大小是 277bp, 通过序列分析证实产物为 CFH DNA。

[0159] 条件培养基中的 CFH。A549 和 H661 细胞生长到 80% 铺满, 吸出培养基, 用 PBS 清洗细胞 3 次, 无血清培养基清洗细胞 2 次。向每个 75cm² 烧瓶中添加无血清培养基 (10ml), 在 37°C /5% CO₂ 温育细胞 26.5h。收集培养基, 通过离心去除剩余细胞, 使用 10,000MWC 离心浓缩机将培养基浓缩 10 倍, 然后使用 30,000MWC 离心浓缩机 (Sartorius, Goettingen, Germany) 进一步浓缩 5 倍。测定总的蛋白浓度, 然后通过 SDS-PAGE 沿着 100ng 纯化的人 CFH 分离来自各个细胞系的 12 μ g 蛋白。将蛋白印迹到 PVDF 上, 然后利用溶于 MTBS 的 0.2 μ g/ml 的山羊抗人 CFH (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, California, United States of America) 进行探查。二抗是 1 : 20,000 稀释的驴抗山羊 IgG-HRP (Santa Cruz)。利用 SuperSignal West Femto 底物 (Pierce) 进行检测。

[0160] CFH 细胞结合测定。A549 和 H661 细胞在 75cm² 烧瓶中生长到 80% 铺满,用 0.25% 胰蛋白酶-EDTA (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, United States of America) 使细胞脱离。收集细胞,并以 2×10⁶/ml 的浓度在 50 μl 结合缓冲液 (溶于 PBS 的 1% BSA, 0.1% 叠氮化钠) 中重悬。按照制造商说明书使用 Iodobeads (Pierce, Rockford, Illinois, United States of America) 利用 ¹²⁵I 标记纯化的 CFH (Complement Technology, Inc.)。使用 Micro Bio-Spin 6 层析柱 (Bio-Rad, Hercules, California, United States of America) 去除未缀合的碘。向 ¹²⁵I 标记的 CFH (1 μg 蛋白于 50 μl) 中添加细胞 (50 μl), 将混合物在 22°C 温育 30 分钟。对于竞争性结合, 首先将细胞与 10 μg 未标记的 CFH 温育 30 分钟, 然后添加 ¹²⁵I 标记的 CFH。细胞用 PBS 清洗 3 次, 在 γ 计数器 (Packard) 中检测结合的 cpm。每次检测重复 3 次。

[0161] 血清 IgG 的制备。向 3 位患者血清的每份混合样品 (500 μl) 中添加等体积 0.9% NaCl。在 4°C 恒定混合条件下向该溶液滴加饱和硫酸铵 (1000 μl)。在 4°C 利用持续混合在 2 小时时段内允许沉淀形成。通过在 4°C 12,000×g 离心 15 分钟收集沉淀。将沉淀溶于冷的 PBS 缓冲液。在 4°C 用 4 升 PBS 将 IgG 溶液透析过夜。通过 Bradford 蛋白测定 (Bio-Rad) 计算沉淀 IgG 的浓度。将最终的 IgG 浓度调整为 6mg/ml。

[0162] C3 相关片段的沉积。我们制备了添加 0.1% (w/v) 明胶和 1mM MgCl₂ 的 Veronal-缓冲盐水 (VBS), pH 7.4 (GVBS), 如前述 (E. Wagner, H. Jiang, M. M. Frank, in *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods* J. B. Henry, Ed. (W. B. Saunders Company, Philadelphia, PA, 2001) pp. 892-913), 但没有加 CaCl₂ 以避免激活经典途径。A549 和 H661 细胞在 75-cm² 烧瓶中生长到 80% 铺满, 然后用胰蛋白酶-EDTA 脱离。收集细胞并以 2×10⁶/ml 的浓度在 GVBS 中重悬。向 GVBS 中添加患者 IgG (1.5mg/ml 终浓度) 和正常人血清 (1 : 8 终稀释度), 总体积为 100 μl。平行反应只包含溶于 GVBS 的正常人血清用于数据标准化。将这些混合物在 4°C 温育 30 分钟, 添加到细胞 (100 μl) 中并在 37°C 温育 30 分钟。为了终止反应, 添加 1ml 冰冷 GVBS, 将混合物离心, 吸出上清。作为背景对照, 首先将正常人血清在 56°C 温育 30 分钟以灭活补体成分。使用如上所述的 Iodobeads 利用 ¹²⁵I 标记山羊抗人 C3 抗体 (Complement Technology, Inc.)。细胞用 PBS 清洗并在 22°C 与 ¹²⁵I 标记的抗 C3 抗体温育 30 分钟。细胞用 PBS 清洗 3 次, 在 γ 计数器中检测结合的 cpm。每次检测重复 3 次。收集数据, 减去背景 (加热的正常血清的 cpm), 然后利用来自未加热的正常血清的 cpm 将获得的值标准化。

[0163] 免疫组织化学。在标准的去石蜡化后, 利用山羊抗人 CFH 抗血清 (Quidel, San Diego, California, United States of America) 在各个切片 (5-7 μm 厚) 上进行免疫组织化学。在室温下利用未稀释的驴血清封闭内源过氧化物酶活性和非特异性蛋白结合位点 10 分钟后, 使用 1 : 1000 稀释的一抗, 将载片在室温下温育 1h。按照制造商说明书使用山羊-HRP 多聚体试剂盒 (BioCare Medical, Concord, California, United States of America) 检测免疫复合物。利用色原体 3,3'-二氨基联苯胺检测结合的抗体并用 Harris 苏木精进行复染。在盖片前将载片进行脱水和清理。

[0164] 统计分析。使用 Fisher's 精确检验计算统计学显著性。

[0165] 实施例 5

[0166] 在一些患者中还发现抗 α-葡萄糖苷酶 (GANAB) 的自身抗体。根据本文实施例 1-4

描述的方法鉴定这些自身抗体。这些自身抗体也可以用做本文公开方法的治疗剂和 / 或诊断剂。

[0167] 实施例 6

[0168] 材料和方法。从诊断患有非小细胞肺癌的患者收集血清样品。利用来自 3 种肺癌细胞系的裂解物混合物进行 Western 印迹 (图 5)。然后利用来自这些患者的血清探查印迹。利用 2D-PAGE 和 Western 印迹 (图 6 和 7) 进一步分析包含许多分离条带 (对应于蛋白和自身抗体的复合物) 的样品。然后将利用患者血清探查裂解物蛋白时产生的信号与染色凝胶对应。从凝胶上切除对应样点, 送到 Duke Proteomics Core Facility (Duke University, Durham, North Carolina, United States of America) 进行蛋白的消化和通过纳米级液相层析-串联质谱法分析得到的肽。鉴定后, 购买纯化的蛋白。随后, 通过 Western 印迹利用 20 位 NSCLC 患者和 20 位匹配对照的血清确定针对这些蛋白以及补体因子 H (CFH) 和 α -葡萄糖苷酶的自身抗体的存在 (图 8 和 9)。

[0169] 表 1: NSCLC 患者群组和匹配对照的特征。

[0170]

特征	癌症 (n = 20)	对照 (n = 20)
年龄 (岁)	60.25 ± 9.14	60.25 ± 9.22
性别		
男性	10	10
女性	10	10
吸烟史 (吸烟年包数)	54.33 ± 28.27	54.30 ± 29.38

[0171] 表 2: 样点 #1 的蛋白质组结果。

[0172]

蛋白名称	Swiss Prot 登录号	分子量 (kDa)	pI	匹配的肽	蛋白覆盖率 (%)
应激诱导磷蛋白 1	P31948	62.6	6.40	40	55
双功能嘌呤生物合成蛋白 PURH	P31939	64.6	6.27	15	29
热休克蛋白 60	P10809	61.0	5.70	5	12
UDP-葡萄糖 6-脱氢酶	O60701	55.0	6.73	5	10
D-3-磷酸甘油酸脱氢酶	O43175	56.7	6.29	4	8

[0173] 表 3 :具有对每种靶蛋白的自身抗体的患者数

[0174]

靶蛋白	NSCLC 患者	对照
14-3-3 ^ε	4/20	4/20
HSP-60	6/20	9/20
STI1	12/20	11/20
α - 葡糖苷酶	3/20	3/20
CFH	6/20	4/20

[0175] 讨论。从 2D-PAGE 和 Western 印迹切除的样点鉴定的蛋白包括应激诱导磷蛋白 1 (STI1), α - 烯醇化酶, HSP-60 和 14-3-3^ε。具有针对这些蛋白的自身抗体的 NSCLC 患者数目看起来与对照没有显著差别。关于这一发现存在许多可能解释。首先, 该样品的规模太小以至于不能将这一结论推广到整个 NSCLC 患者群。此外, 确定将用于所述测定法的蛋白浓度是困难的。尽管增加浓度能够检测以低效价存在于血清中的自身抗体, 它还可能导致其他自身抗体非特异性结合的可能性。此外, 一些患者可能具有针对被突变或选择性剪接的蛋白区域的自身抗体。这类样品将不识别纯化的蛋白, 从而在这种测定法中会被认定为假阴性。但是, 这种方法确定了用于鉴定 NSCLC 患者中自身抗体的靶的成功方案并且已经鉴定了 4 种这类蛋白。这些蛋白可以存在于微阵列上以检测更多 NSCLC 患者的自身抗体状况。

[0176] 实施例 7

[0177] 在一些患者中也发现了抗表 2-4 所列实体的自身抗体。根据本文实施例 1-6 描述的方法鉴定这些自身抗体。这些自身抗体也可以用做本文公开方法的治疗剂和 / 或诊断剂。

[0178] 表 4

[0179]

蛋白名称	基因名称	Uniprot ID (Swiss Prot 登录号)
α -烯醇化酶	ENO1	P06733
应激诱导磷蛋白 1	STIP1	P31948
缺氧上调 1(Hypoxia up-regulated 1)	HYOU1	Q9Y4L1
14-3-3 ϵ	YWHAE	P62258
HSP60	HSPD1	P10809
GRP78	HSPA5	P11021
补体因子 H	CFH	P08603
中性 α -葡糖苷酶 AB	GANAB	Q14697
波形蛋白	VIM	P08670
过氧化物氧还蛋白-1	PRDX1	Q06830
延伸因子 1- α	EEF1A1	P68104
cyclophylin A	PPIA	P62937
Ran GTPase	RAN	P62826
HSP70	HSPA1A	P08107
蛋白二硫键异构酶 A3	PDIA3	P30101
硫氧还蛋白	TXN	P10599
转酮醇酶	TKT	Q16832
视黄醛脱氢酶	ALDH1A1	P00352
Stathmin 1	STMN1	P16949
核仁素	NCL	P19338
延伸因子 Tu, 线粒体	TUFM	P49411
p53	TP53	P04637
14-3-3 θ	YWHAQ	P27348
PGP9.5	UCHL1	P09936
膜联蛋白1	ANXA1	P04083
蛋白激酶a催化亚单位	PRKACA	P17612

[0180] 参考文献

[0181] 此处所列的所有参考文献,包括专利,专利申请,数据库引用(包括但不限于 Swiss Prot 登录号)和科学文献均以其为此处使用的方法学、技术和/或组合物进行补充、解释或提供背景或教导此处使用的方法学、技术和/或组合物的程度援引加入本文。

[0182] 1. O. J. Finn, J Immunol 178,2615(Mar 1,2007).

[0183] 2. S. Rodriguez de Cordoba, J. Esparza-Gordillo, E. Goicoechea de Jorge, M. Lopez-Trascasa, P. Sanchez-Corral, Mol Immunol 41,355(Jun,2004).

[0184] 3. D. Ajona et al., Cancer Res 64,6310(Sep 1,2004).

[0185] 4. D. Ajona, Y. F. Hsu, L. Corrales, L. M. Montuenga, R. Pio, J Immunol 178,

5991 (May 1, 2007).

[0186] 5. E. Wilczek et al., *Int J Cancer* 122, 2030 (May 1, 2008).

[0187] 6. S. Junnikkala et al., *Br J Cancer* 87, 1119 (Nov 4, 2002).

[0188] 7. Z. Z. Cheng et al., *Clin Chem* 51, 856 (May, 2005).

[0189] 8. P. Gasque, A. Thomas, M. Fontaine, B. P. Morgan, *J Neuroimmunol* 66, 29 (May, 1996).

[0190] 9. S. Junnikkala et al., *J Immunol* 164, 6075 (Jun 1, 2000).

[0191] 10. K. Jurianz et al., *Mol Immunol* 36, 929 (Sep–Oct, 1999).

[0192] 11. K. M. Murphy, P. Travers, M. Walport, *Janeway's Immunobiology* (Garland Science, London, England, ed. 7th, 2007), pp.

[0193] 12. M. A. Dragon-Durey et al., *J Am Soc Nephrol* 16, 555 (Feb, 2005).

[0194] 13. E. Gumus et al., *Int J Urol* 11, 1070 (Dec, 2004).

[0195] 14. P. J. Mintz et al., *Nat Biotechnol* 21, 57 (Jan, 2003).

[0196] 15. S. Varsano, L. Rashkovsky, H. Shapiro, D. Ophir, T. Mark-Bentankur, *Clin Exp Immunol* 113, 173 (Aug, 1998).

[0197] 16. R. Sayegh, J. T. Awwad, C. Maxwell, B. Lessey, K. Isaacson, *J Clin Endocrinol Metab* 80, 1021 (Mar, 1995).

[0198] 17. E. Wagner. H. Jiang, M. M. Frank, in *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods* J. B. Henry, Ed. (W. B. Saunders Company, Philadelphia, PA, 2001) pp. 892–913.

[0199] 应理解当前公开的主题的各种细节可以在不偏离当前公开的主题的范围的情况下被改变。此外,上述说明只是为了解释目的,而不是为了限制目的。

[0001]

序列表

<110> 杜克大学

<120> 检测和治疗癌症的自身抗体

<130> 180/255 PCT

<150> US 61/127, 138

<151> 2008-05-09

<150> US 61/128, 717

<151> 2008-05-23

<150> US 61/188, 209,

<151> 2008-08-07

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificially synthesized oligonucleotide primer

<400> 1

ggaaccacct caatgcaaag

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificially synthesized oligonucleotide primer

<400> 2

aagcttctgt ttggctgtcc

20

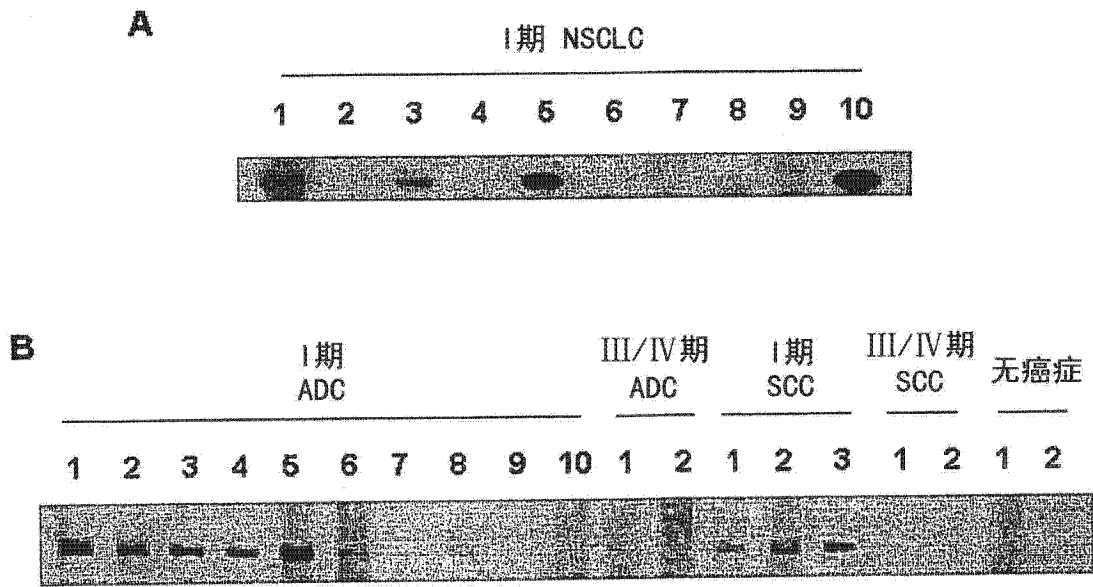


图 1

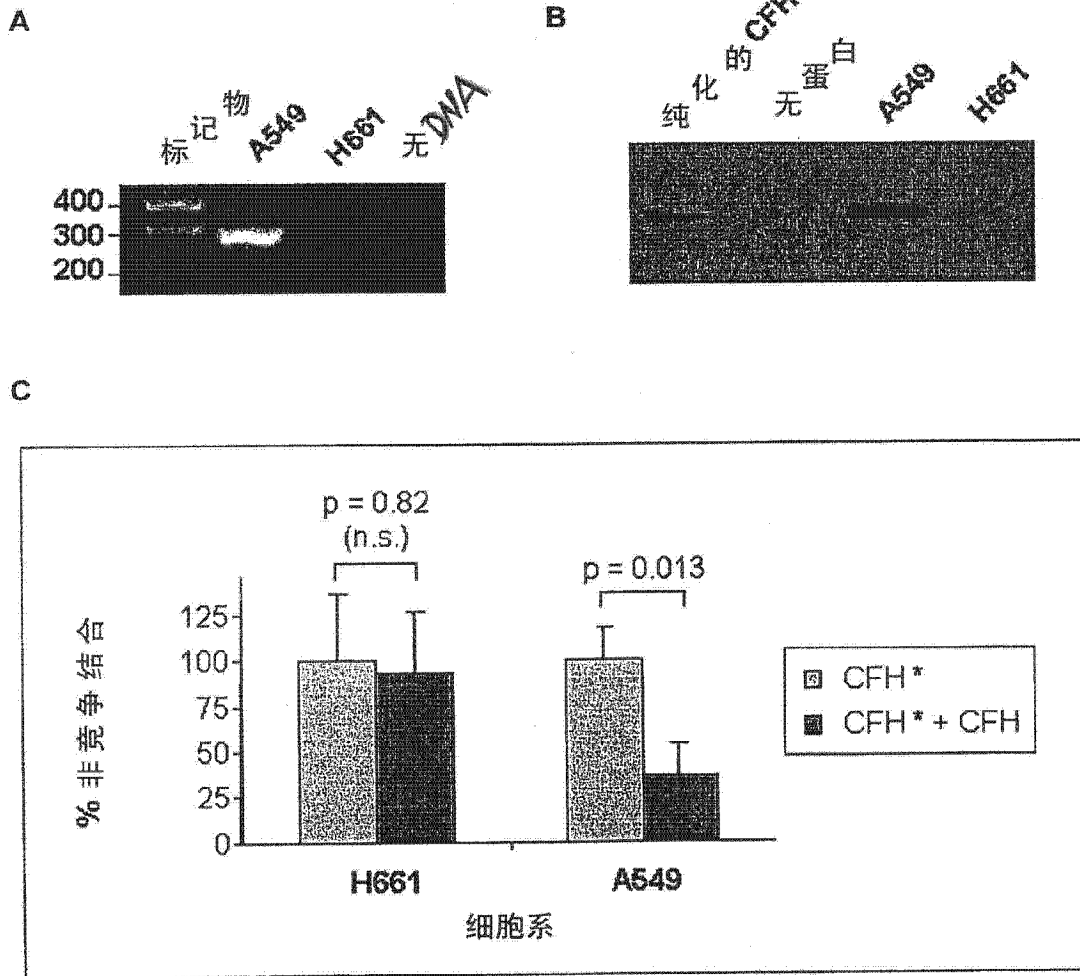


图 2

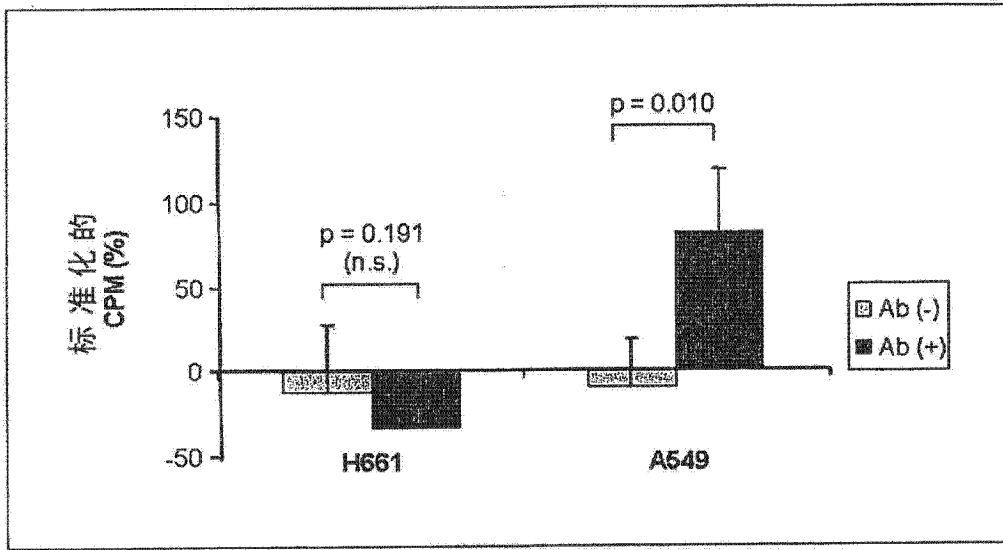


图 3

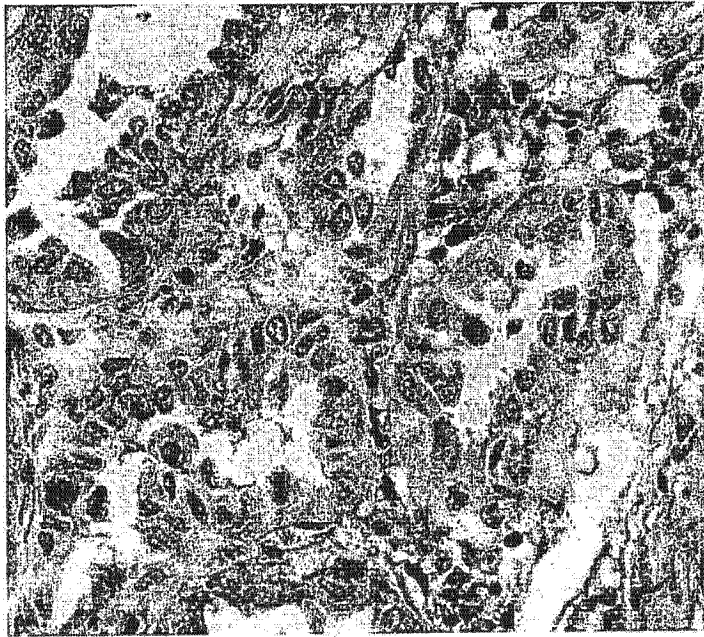


图 4

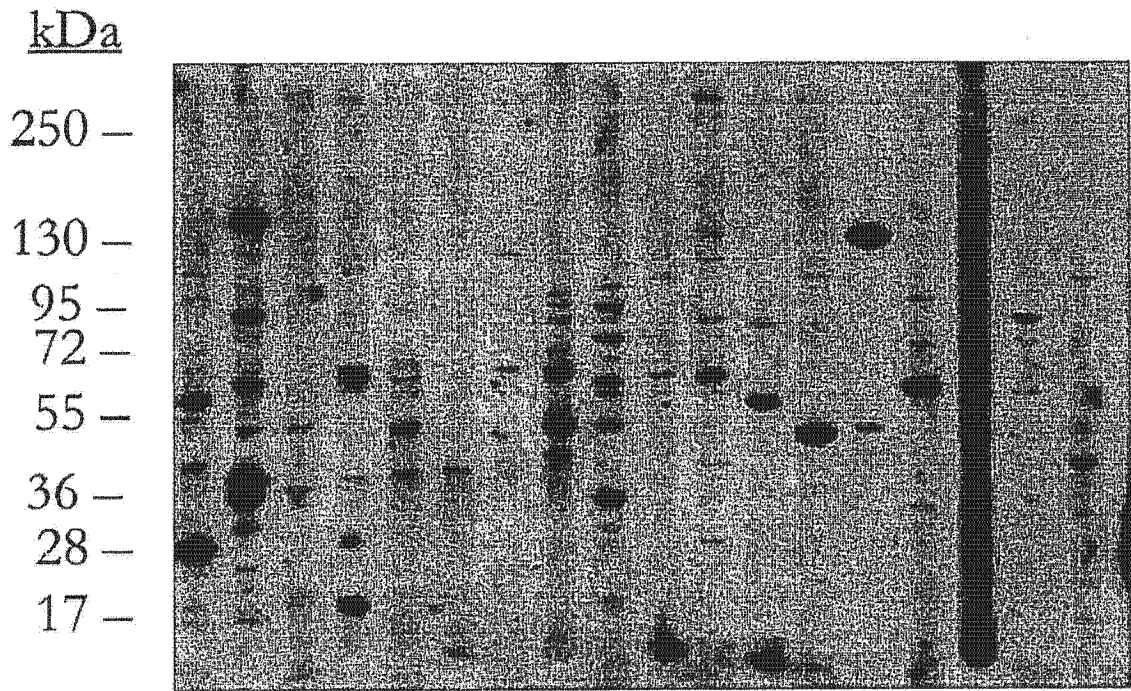


图 5

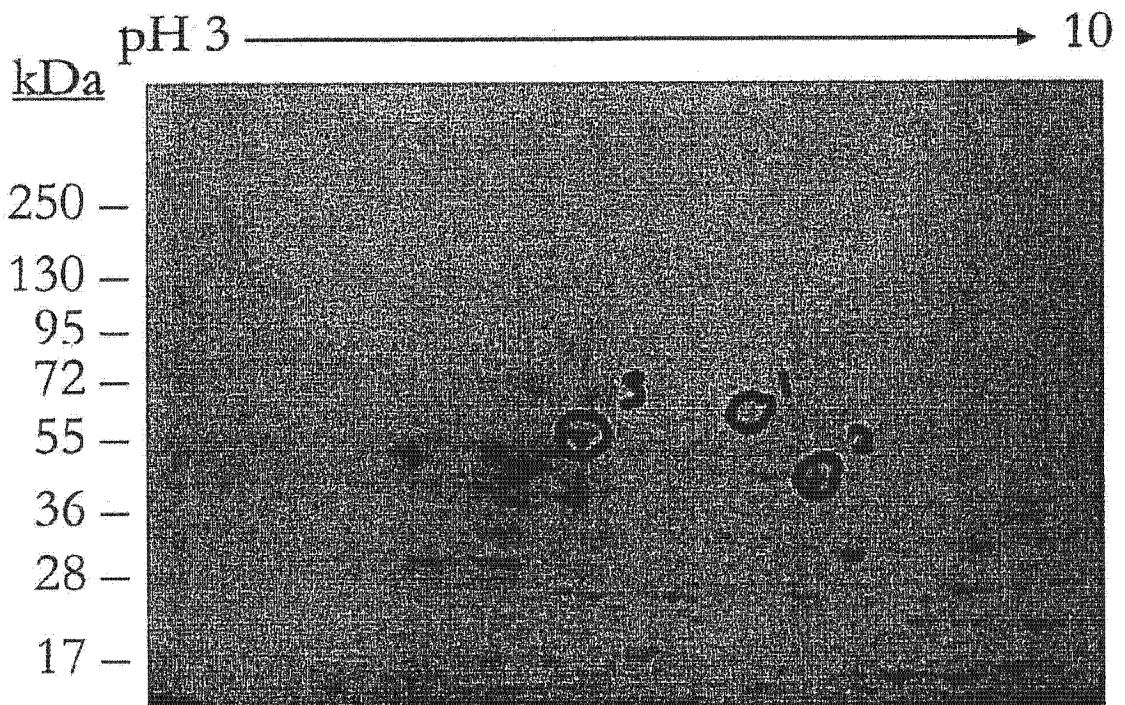


图 6

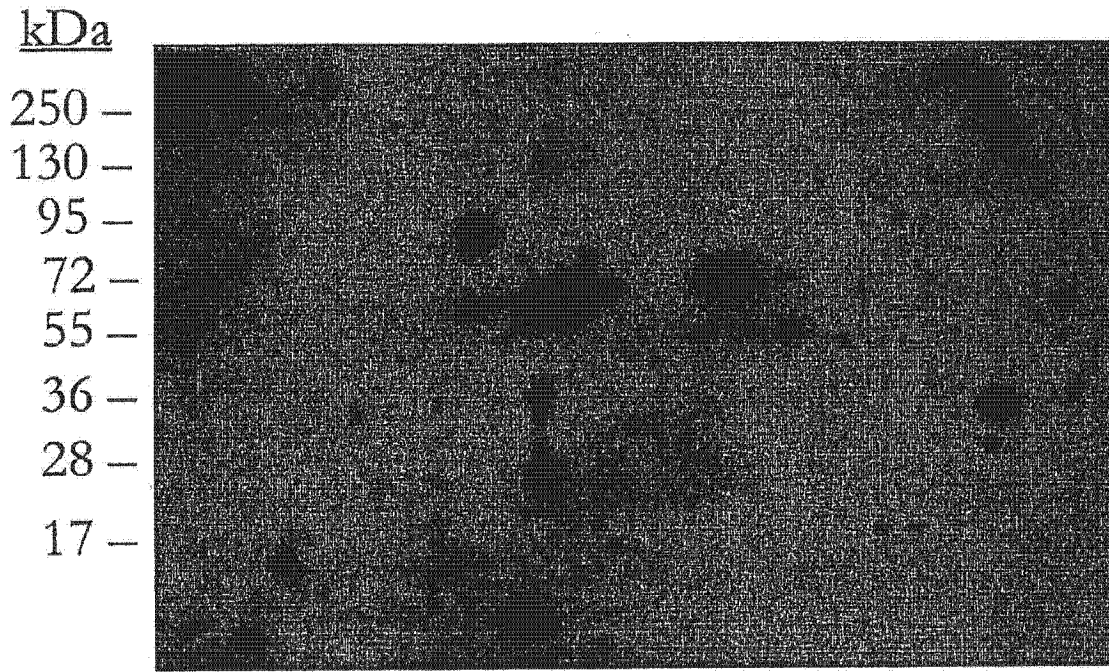


图 7

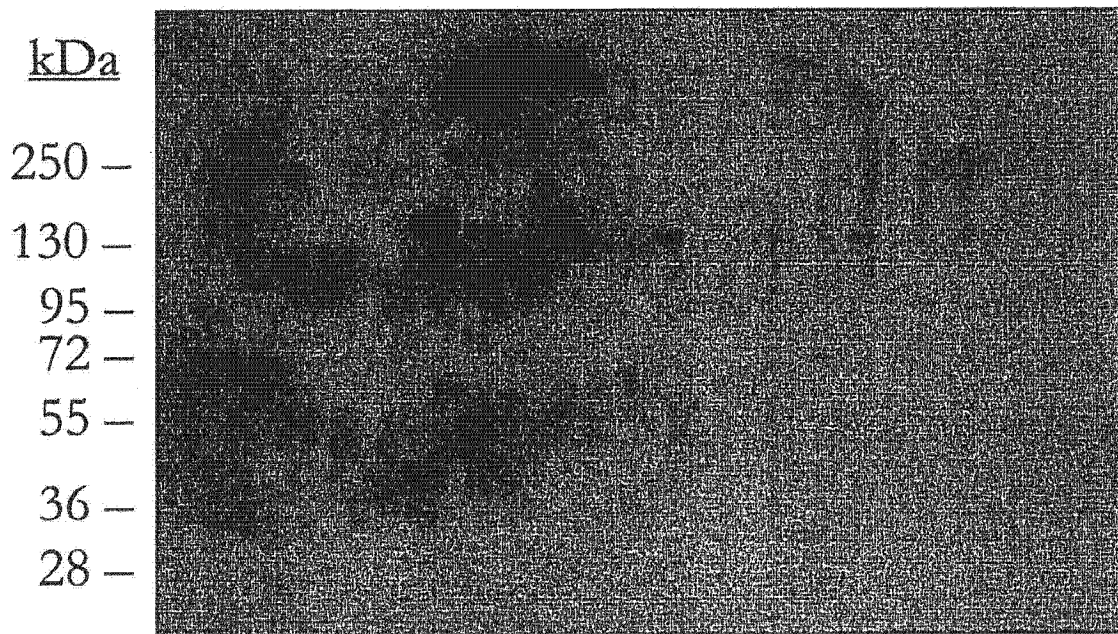


图 8

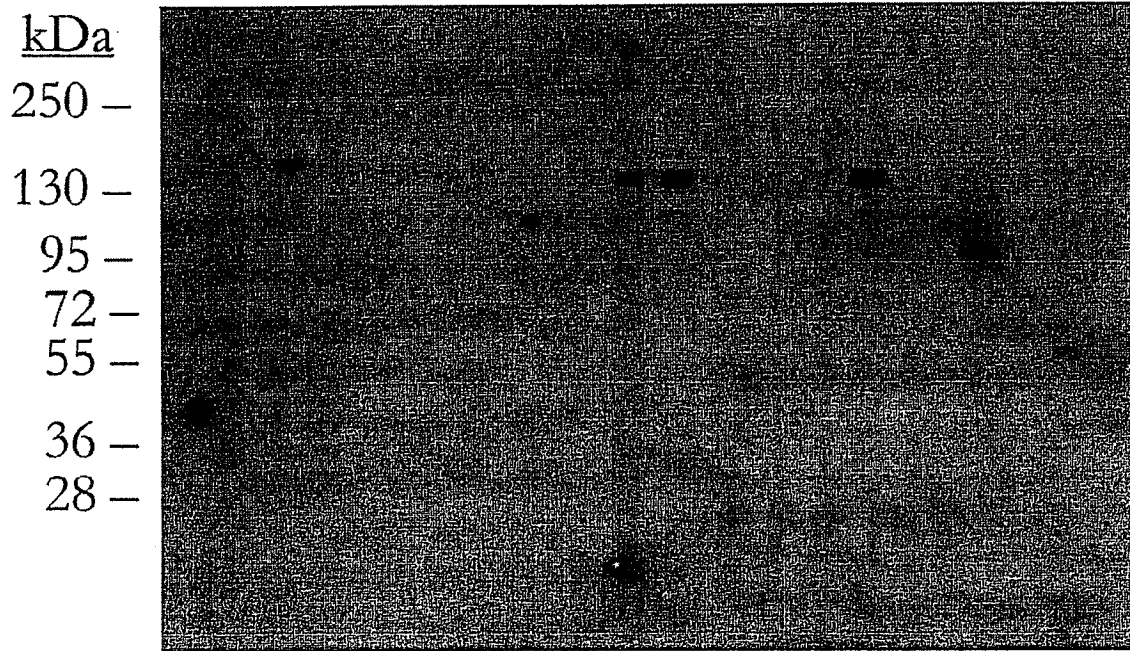


图 9

专利名称(译)	检测和治疗癌症的自身抗体		
公开(公告)号	CN102171569A	公开(公告)日	2011-08-31
申请号	CN200980126364.1	申请日	2009-05-11
[标]申请(专利权)人(译)	杜克大学		
申请(专利权)人(译)	杜克大学		
当前申请(专利权)人(译)	杜克大学		
[标]发明人	小EF帕茨 MJ坎帕 EB戈特林		
发明人	小E·F·帕茨 M·J·坎帕 E·B·戈特林		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/68 G01N33/53 A61K39/395		
CPC分类号	C07K16/18 C07K2317/10 C07K2317/21 C07K2317/734 C07K16/40 A61K2039/505 G01N33/574 C07K2317/76 C07K16/30		
代理人(译)	林晓红		
优先权	61/188209 2008-08-07 US 61/128717 2008-05-23 US 61/127138 2008-05-09 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了用于检测和/或治疗癌症的方法、试剂盒和组合物，其基于在需要其的对象中检测和/或施用抗体(所述抗体任选地是双特异性抗体，具有与癌症相关的自身抗体的免疫反应特性)、与癌症相关的自身抗体的抗原；或具有与癌症相关的自身抗体的免疫反应特性的抗体以及与癌症相关的自身抗体的抗原二者。

