



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102725416 A

(43) 申请公布日 2012. 10. 10

(21) 申请号 201080038855. 3

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2010. 06. 29

*G12P 21/08* (2006. 01)

(30) 优先权数据

*G01N 33/53* (2006. 01)

199618 2009. 06. 29 IL

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 02. 29

(86) PCT申请的申请数据

PCT/IL2010/000524 2010. 06. 29

(87) PCT申请的公布数据

W02011/001432 EN 2011. 01. 06

(83) 生物保藏信息

CNCM I-4335 2010. 06. 28

CNCM I-4331 2010. 06. 24

(71) 申请人 两合生物科技公司

地址 以色列耶路撒冷

(72) 发明人 奥利·德瓦瑞 塔玛拉·桑德勒

(74) 专利代理机构 北京邦信阳专利商标代理有

限公司 11012

代理人 王昭林 尹吉伟

权利要求书 2 页 说明书 38 页

序列表 2 页 附图 18 页

(54) 发明名称

新抗体及它们在治疗和诊断方法中的应用

(57) 摘要

本发明提供特异识别 KTPAF50 蛋白的多克隆和单克隆抗体, 以及包含其的组合物。本发明同样提供 KTPAF50 特异抗体在诊断和治疗如癌症、自体免疫疾病、移植排斥、神经退行性疾病和糖尿病的状况中的应用。

1. 一种特异识别 KTPAF50 蛋白或其任何片段或衍生物的抗体。
2. 根据权利要求 1 所述的抗体,其特征在於,所述 KTPAF50 蛋白由 SEQ ID NO :1 或 SEQ ID NO :2 表示。
3. 一种特异识别源自 KTPAF50 的肽的抗体。
4. 根据权利要求 3 所述的抗体,其特征在於,所述源自 KTPAF50 的肽由 SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :5、SEQ ID NO :6 和 SEQ ID NO :7 中的任何一个表示。
5. 一种包含特异识别 KTPAF50 蛋白或其任何片段或衍生物的抗体作为活性组分的组合物。
6. 根据权利要求 5 所述的组合物,进一步包含制药学可接受的载体、赋形剂或稀释液。
7. 根据权利要求 5 和 6 任意一项所述的组合物,用在诊断方法中。
8. 根据权利要求 7 所述的组合物,用于诊断一种自体免疫疾病和癌症。
9. 根据权利要求 5 或 6 任意一项所述的组合物,用于治疗癌症。
10. 根据权利要求 5 或 6 任意一项所述的组合物,用于任何一种癌症或自体免疫疾病的预后。
11. 根据权利要求 8 所述的组合物,其特征在於,所述癌症选自肺癌、乳腺癌和卵巢癌。
12. 根据权利要求 8 所述的组合物,其特征在於,所述自体免疫疾病是炎性肠道疾病。
13. 一种产生抗体的细胞系,其特征在於,所述细胞系产生根据权利要求 1-4 任一项所述的抗体。
14. 一种杂交瘤细胞系,所述杂交瘤是 3E3G7 或 5E11H3 中的任一种。
15. 一种源自在权利要求 13 或 14 任意一项中所定义的细胞系的抗体。
16. 根据权利要求 1-4 和 15 任意一项所述的抗体的应用,用于制备诊断组合物。
17. 根据权利要求 16 所述的应用,其特征在於,所述组合物用于诊断任何一种癌症和自体免疫疾病。
18. 根据权利要求 17 所述的应用,其特征在於,所述癌症选自肺癌、乳腺癌和卵巢癌。
19. 根据权利要求 17 所述的应用,其特征在於,所述自体免疫疾病是炎性肠道疾病。
20. 根据权利要求 1-4 和 15 任意一项所述的抗体的应用,用于制备治疗组合物。
21. 根据权利要求 20 所述的应用,其特征在於,所述组合物用于治疗选自以下的状况:癌症、自体免疫疾病、神经退行性疾病、糖尿病和移植排斥。
22. 一种用于在个体中诊断癌症的方法,所述方法包括步骤:
  - a、提供来自所述个体的样品;
  - b、用至少一种根据权利要求 1-4 和 15 任意一项所述的抗体,或根据权利要求 5-8 任意一项所述的组合物接触所述样品;
  - c、通过检测方法检测所述至少一种抗体和它的特异抗原复合物的形成;从而通过复合物的检测表示所述个体患有癌症。
23. 根据权利要求 22 所述的方法,其特征在於,所述样品是血液样品。
24. 根据权利要求 22 或 23 任意一项所述的方法,其特征在於,所述抗体是根据权利要求 4 和 15 的抗体,所述癌症是肺癌。
25. 一种用于在个体中诊断自体免疫疾病的方法,所述方法包括步骤:
  - a、提供来自所述个体的样品;

b、用至少一种根据权利要求 1-4 和 15 任意一项所述的抗体,或根据权利要求 5-8 任意一项所述的组合物接触所述样品;

c、通过检测方法检测所述至少一种抗体和它的特异抗原复合物的形成;  
从而通过复合物的检测显示所述个体患有自体免疫疾病。

26. 根据权利要求 25 所述的方法,其特征在于,所述样品是血液样品。

27. 根据权利要求 25 或 26 任意一项所述的方法,其特征在于,所述自体免疫疾病是 IBD。

28. 一种治疗癌症的方法,所述方法包括:对需要的个体施用治疗有效量的至少一种抗 KTPAF50 抗体或其组合或包含其的组合物。

29. 一种抑制细胞生长的方法,所述方法包括:用有效量的至少一种抗 KTPAF50 抗体或其组合或包含其的组合物接触细胞。

30. 一种抑制细胞因子表达的方法,所述方法包括:用有效量的至少一种抗 KTPAF50 抗体或其组合或包含其的组合物接触表达所述细胞因子的细胞。

31. 根据权利要求 30 所述的方法,其特征在于,所述细胞因子是促炎性细胞因子。

32. 根据权利要求 30 或 31 任意一项所述的方法,其特征在于,所述细胞因子选自 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  或 IL-10。

33. 一种用于癌症的诊断、监测治疗功效或评估预后中至少一种的试剂盒,所述试剂盒包括以下成分:

a、至少一种根据权利要求 1-4 和 15 任意一项所述的抗体或根据权利要求 5-8 任意一项所述的组合物;以及

b、用于实现检测样品中抗原存在的说明书,其中所述抗原被所述抗体特异识别。

34. 根据权利要求 33 所述的试剂盒,所述试剂盒进一步包括至少一种以下成分:

a、至少一种用于收集被测样品的工具;

b、至少一种用于检测所述抗原被所述抗体识别所必需的试剂;和

c、至少一种对照样品。

35. 一种用于自体免疫疾病的诊断和监测治疗功效或评估预后中至少一种的试剂盒,所述试剂盒包括以下成分:

a、至少一种根据权利要求 1-4 和 15 任意一项所述的抗体,或根据权利要求 5-8 任意一项所述的组合物;以及

b、用于实现检测样品中抗原存在的说明书,其中所述抗原被所述抗体特异识别。

36. 根据权利要求 35 所述的试剂盒,所述试剂盒进一步包括至少一种以下成分:

a、至少一种用于收集被测样品的工具;

b、至少一种用于检测所述抗原被所述抗体识别所必需的试剂;和

c、至少一种对照样品。

## 新抗体及它们在治疗和诊断方法中的应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及新抗体以及它们在治疗和诊断方法中的应用,具体地,涉及在治疗和诊断自体免疫疾病和癌症中的应用。

### 背景技术

[0002] 在本申请中提到的所有出版物、包括它们所引用的全部参考文献通过引用的方式全文并入本文中。

[0003] 组织特异蛋白和它们的表达水平是生物体健康状态极好的指示物以及在患病状态下用于治疗的目标。

[0004] 可以根据引起疾病的机制对影响人类的疾病进行分类。例如,具有免疫成分或病因的疾病包括传染病、急性和慢性炎性疾病、癌症、移植病和自体免疫疾病。

[0005] 术语炎性肠道疾病 (IBD) 涵盖了一组疾病,其中肠子发炎 (变红并肿胀),可能是身体抵抗其自身的肠组织的免疫反应的结果,并因此被认为是自体免疫疾病。

[0006] 已经描述了两种主要类型的 IBD:溃疡性结肠炎 (UC) 和克罗恩病 (CD)。如所述名字所暗示的,溃疡性结肠炎限于结肠 (大肠)。尽管克罗恩病涉及从嘴巴到肛门的胃肠道的任何部分,但它最主要地影响小肠和 / 或结肠。

[0007] 当有严重的炎症时,所述疾病被认为是处于活跃期,且这个人能够感受状况的突然发作。当炎症程度减轻 (或不存在) 时,这个人通常没有症状,则这个疾病被认为是好转。

[0008] 引起炎性肠道疾病的原因并不完全清楚。一种未知的因素 / 介质 (或因素的组合) 触发了身体免疫系统以产生持续的不受控制的肠道炎症反应。作为炎症反应的结果,肠壁受破坏,导致出血性腹泻和腹痛。

[0009] 遗传因素、传染因素、免疫因素和心理因素均影响 IBD 的发展。对于 IBD 的发展,有遗传倾向 (或可能的感病性)。但是,激活身体免疫系统的触发因素仍未被确定。能够开启身体免疫系统的因素包括传染性介质 (尚未确定)、对抗原 (如,来自牛奶的蛋白) 的免疫应答或自体免疫作用。由于肠子经常暴露于能够引起免疫反应的物质,最新的假设是生物体不能避开正常的免疫应答。

[0010] IBD 是一种慢性疾病,并且受影响的个体要经历疾病突然发作并引起症状的时期,然后症状消失或减轻且恢复健康的好转期。

[0011] 症状可以从轻微向严重变化,并通常取决于所涉及的肠道部分。它们包括:腹部抽筋和疼痛、出血性腹泻、肠运动的剧烈要求、发烧、没有食欲、体重减轻、贫血 (由于失血)。

[0012] 炎性肠道疾病的肠并发症包括:从溃疡处大量出血、肠穿孔 (破裂)、狭窄和阻塞 (在患有克罗恩病的病人中,狭窄通常是炎性的,并常常由内科治疗解决),固定的或纤维化的 (结疤) 狭窄可能需要内窥镜或外科干涉以解除障碍物。在溃疡性结肠炎中,结肠狭窄应当被假定为是恶性 (癌) 的。漏管 (异常通道) 和肛周疾病在患有克罗恩病的病人中更常见。中毒性巨结肠 (结肠的急性非梗阻性膨胀) 是一种有生命危险的溃疡性结肠炎并发症,并需要进行紧急的外科干预。在诊断大约 8-10 年后,溃疡性结肠炎中结肠癌的风险

开始明显上升高于普通人群。如果涉及整个结肠,克罗恩病中的癌风险可能与溃疡性结肠炎的风险相当。在克罗恩病中,小肠恶性肿瘤的风险提高。

[0013] IBD 的肠外牵连指涉及除肠子以外器官的并发症。这些仅影响小百分比的患有 IBD 的人群。患有 IBD 的人可能有关节炎、皮肤状况、眼睛发炎、肝病和肾病,以及骨损失。

[0014] 目前主要通过一系列检查和试验进行 IBD 的诊断,包括:粪便检测、粪便隐血试验、全血计数、电解质检测、LFT(测量丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶、碱性磷酸酶、白蛋白、总蛋白和胆红素水平)。

[0015] 放射医学(如,腹部 X-射线或钡灌肠剂)和内窥镜方法(如,结肠镜检查 and 乙状结肠镜检查)同样可以用于 IBD 诊断。

[0016] 明显地,仍然没有用于 IBD 的明确的诊断方法,且仍需要用作 IBD 的鉴别诊断和特异诊断的分子标记物。

[0017] 癌症类型的非限定性例子包括肾上腺皮质癌、恶性黑色素瘤、非黑色素瘤皮肤癌、皮肤 T 细胞淋巴瘤、卡波济肉瘤、膀胱癌、结肠癌、结肠直肠癌、直肠癌、神经外胚层和松果体癌、儿童脑干神经胶质瘤、儿童小脑星形细胞瘤、儿童脑星形细胞瘤、儿童成神经管细胞瘤、儿童视路神经胶质瘤、脑膜瘤、混合性神经胶质瘤、少突神经胶质瘤、星形细胞瘤、室鼓膜瘤、垂体腺瘤、转移性腺癌、听神经瘤、椎旁恶性畸胎瘤、乳腺癌、导管癌、乳腺癌形成、卵巢癌、类癌瘤、宫颈癌、子宫癌、子宫内膜癌、阴道癌、外阴癌、妊娠滋养细胞癌、输卵管癌、子宫肉瘤、白血病、淋巴瘤(霍奇金病和非霍奇金病)、成神经细胞瘤、眼癌、软组织肉瘤、肾母细胞瘤、范科尼贫血、朗格罕组织细胞增生症、肾横纹肌肉瘤样瘤、肝癌、成神经细胞瘤、视网膜母细胞瘤、绒膜癌、内分泌癌、子宫内膜癌、食道癌、尤文肉瘤、眼癌、胃癌、胃肠癌、泌尿系统肿瘤、神经胶质瘤、妇科癌、头颈癌、肝细胞癌、下咽癌、胰岛细胞肿瘤、肾癌、喉癌、肺癌、淋巴瘤、男性乳癌、黑色素瘤、间皮瘤、多发性骨髓瘤、鼻咽癌、非黑色素瘤皮肤癌、食道癌、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、垂体癌、前列腺癌、肾细胞癌、眼癌、横纹肌肉瘤、肉瘤、皮肤癌、扁平细胞癌、胃癌、睾丸癌、胸腺癌、甲状腺癌、移行细胞癌、滋养层细胞癌、子宫癌、急性淋巴性白血病、急性骨髓性白血病、腺囊癌、肛门癌、骨癌、肠癌、导管癌、脂肪肉瘤、成神经细胞瘤、肾胚细胞瘤和骨肉瘤。

[0018] 炎性疾病包括:败血病、内毒素血症、胰腺炎、葡萄膜炎、肝炎、腹膜炎、角膜炎、SIRS 和受伤诱导炎症。

[0019] 与生育相关的疾病包括男性不育和女性不育。男性不育可以由多种问题引起。一些更通常的疾病列出如下:

[0020] - 缺乏精子生成:90%的男性不育是由不能产生足够的精子而引起。当无精子产生时发生无精症(Azospemia),当产生很少量的精子时被诊断为精子减少;

[0021] - 精索静脉曲张;

[0022] - 其它疾病:能够引起男性不育的其它疾病包括睾丸的发育异常或损伤(由内分泌紊乱或炎症引起)、附腺疾病、性能力问题、暴露于乙烯雌酚(DES)(一种在 20 世纪 50 和 60 年代使用的合成雌激素,能够引起男性生殖管囊肿)、睾丸未降和如染色体异常的罕见情况中的遗传疾病。

[0023] 女性不育同样可以由多种问题引起。一些更通常的疾病是多囊卵巢病、盆腔炎、排卵功能障碍、子宫纤维瘤、子宫内膜异位和免疫性不育。

[0024] 碳水化合物代谢紊乱以多种形式出现。最常见的紊乱是后天的。碳水化合物代谢中后天性或次生紊乱 (secondary derangement), 如糖尿病酮症酸中毒、高渗性昏迷和低血糖症均影响中枢神经系统。在糖尿病中同样可以看到周围神经疾病的许多形式和变异。碳水化合物代谢的剩余疾病是罕见的代谢的先天性障碍 (如, 遗传缺陷)。

[0025] 碳水化合物代谢的后天性紊乱在美国和全世界都是常见的。在酒鬼和采用胰岛素进行治疗的患有糖尿病的病患中, 低血糖症是引起神经性疾病, 特别是急性精神衰退、记忆力下降、迷失方向、意识不清和昏迷的常见原因。源自其它原因的血胰岛素过多是罕见的, 但是胰腺癌可能是原因。糖尿病及其多种神经学并发症是在成年病患中治疗的最常见疾病之一。

[0026] 碳水化合物代谢的遗传性紊乱是罕见的。丙酮酸脱氢酶 (PDH) 复合物的严重缺陷和被称为戊糖尿症的良性化合物异常在非常少的 (2-6 个) 病人中有报道。

[0027] 低血糖症、糖尿病酮症酸中毒和高渗性昏迷均是潜在致命的但可能可医治的状况。

[0028] 在 WO 2009/083968 中, 本发明人描述了一种蛋白, 命名为 KTPAF50, 显示它在胎盘、肾 (成人和胎儿)、胰腺和睾丸中特异表达, 而在造血组织中, 该蛋白在休眠和活跃的 CD8<sup>+</sup> 细胞、休眠和活跃的单核细胞以及休眠和活跃的 CD19<sup>+</sup> 细胞中发现。

[0029] 令人惊讶地, 在本发明中, 本发明人表示, 在开发抗 KTPAF50 特异抗体时, KTPAF50 的表达可能与特定疾病状态相关, 特别是在癌症和自体免疫疾病中。

[0030] 甚至更出乎意料地, 本发明人表示 KTPAF50 特异抗体是细胞生长和细胞因子表达的有效调节物。

[0031] 因此, 本发明的一个目的是提供特异识别 KTPAF50 的抗体以及它们在诊断和治疗癌症、自体免疫疾病、移植排斥、神经退行性疾病和糖尿病中的应用。

[0032] 如将通过说明书和以下实施例所显示的, 本发明的诊断方法特别适于检测和监测某些类型的癌症和自体免疫疾病。

[0033] 随着描述的进行, 本发明的这些和其它应用和目的将变得显而易见。

## 发明内容

[0034] 在一个方面, 本发明涉及一种特异识别 KTPAF50 蛋白或其任何片段或衍生物的抗体, 以及包含它的组合物。所述 KTPAF50 蛋白由 SEQ ID NO :1 或 SEQ ID NO :2 表示。

[0035] 本发明同样涉及一种特异识别源自 KTPAF50 多肽的抗体以及包含它的组合物, 所述多肽由 SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :5、SEQ ID NO :6 和 SEQ ID NO :7 中的任何一个表示。

[0036] 本发明所描述的抗体或包含其的组合物, 用在诊断和 / 或治疗方法中。

[0037] 具体地, 所述抗体或包含其的组合物用于诊断或预后一种癌症或自体免疫疾病, 以及用于治疗癌症。

[0038] 在另一方面, 本发明提供一种产生抗体的细胞系, 或一种杂交瘤细胞系, 其中所述细胞系产生特异识别 KTPAF50 蛋白或源自 KTPAF50 蛋白的肽的抗体。本发明同样提供由这些细胞系产生的抗体。

[0039] 在另一方面, 本发明提供抗体在制备诊断或治疗组合物中的应用, 所述抗体特异识别 KTPAF50 蛋白或源自 KTPAF50 蛋白的肽。

[0040] 在一种实施方式中,本文提供的诊断组合物用于诊断任何一种癌症和自体免疫疾病。

[0041] 本发明提供的治疗组合物用于治疗选自以下的状况:癌症、自体免疫疾病、神经退行性疾病、糖尿病和移植排斥。

[0042] 在另一方面,本发明提供一种在个体中诊断任何一种癌症或自体免疫疾病的方法,所述方法包括步骤:

[0043] a) 提供来自所述个体的样品;

[0044] b) 用至少一种抗体或包含其的组合物接触所述样品,所述抗体特异识别 KTPAF50 蛋白或源自 KTPAF50 蛋白的肽;

[0045] c) 通过检测方法,检测所述至少一种抗体和它的特异抗原的复合物的形成;

[0046] 从而通过复合物的检测显示所述个体患有癌症或自体免疫疾病。

[0047] 在所述方法的一种实施方式中,所述样品是血液样品。

[0048] 在所述方法的另一种具体实施方式中,所述癌症选自肺癌、乳腺癌和卵巢癌。

[0049] 在另一种实施方式中,本发明提供一种治疗癌症的方法,所述方法包括对需要的个体施用治疗有效量的至少一种抗 KTPAF50 抗体或其组合,或包含其的组合物。

[0050] 本发明进一步提供一种抑制细胞生长或抑制细胞因子表达的方法,所述方法包括用有效量的至少一种抗 KTPAF50 抗体或其组合,或包含其的组合物接触细胞。在一种具体的实施方式中,所述细胞是表达细胞因子的细胞。

[0051] 本发明的抗体抑制其表达的具体细胞因子是 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  或 IL-10。

[0052] 在另一方面,本发明提供一种用于对癌症或自体免疫疾病进行诊断、检测治疗功效或评估预后中任何一种的试剂盒,所述试剂盒包括以下成分:

[0053] a) 至少一种根据本发明的抗体或包含其的组合物;和

[0054] b) 用于完成在样品中检测抗原存在的说明书,其中所述抗原由本发明的所述抗体特异识别。

[0055] 所述试剂盒可以进一步包括至少一种以下成分:

[0056] a) 至少一种收集被检测样品的工具;

[0057] b) 用于检测所述抗原由所述抗体识别的必要的至少一种试剂;和

[0058] c) 至少一种对照样品。

## 附图说明

[0059] 图 1:显示抗 KTPAF50 抗体对 KTPAF50 抗原的特异性的校准曲线。

[0060] 图 2:显示从患有肺癌 (LC) 的病患和健康个体 (H) 获得的人血清中 KTPAF50 浓度的柱状图。

[0061] 图 3A-3C:抗 KTPAF50 单克隆抗体对雌性 Balb/C 脾细胞生存能力的效果。

[0062] 图 3A:显示在用刃天青孵育 4 小时后测量的、用抗 KTPAF50 抗体处理 24 小时的效果的柱状图。

[0063] 图 3B:显示在用刃天青孵育 24 小时后测量的、用抗 KTPAF50 抗体处理 24 小时的效果的柱状图。

[0064] 图 3C:显示在用刃天青孵育 24 小时后测量的、用抗 KTPAF50 抗体处理 48 小时的

效果的柱状图。

[0065] 缩写词:抗 PRT3 1 = 3E3G7 抗体;抗 PRT3 2 = 5E11H3 抗体;Treat. =处理;rel. cont. =相对于对照。

[0066] 图 4A-4F:抗 KTPAF50 单克隆抗体对雌性或雄性 C57/黑鼠脾细胞的生存能力的效果。

[0067] 图 4A:显示在来自雄性 C57/黑鼠的细胞中,在用刃天青孵育 24 小时后测量的、用抗 KTPAF50 抗体处理 24 小时的效果的柱状图。

[0068] 图 4B:显示在雌性 C57/黑鼠中,在用刃天青孵育 24 小时后测量的、用抗 KTPAF50 抗体处理 24 小时的效果的柱状图。

[0069] 图 4C:显示在来自雄性 C57/黑鼠的细胞中,在用刃天青孵育 24 小时后测量的、用抗 KTPAF50 抗体处理 48 小时的效果的柱状图。

[0070] 图 4D:显示在雌性 C57/黑鼠中,在用刃天青孵育 24 小时后测量的、用抗 KTPAF50 抗体处理 48 小时的效果的柱状图。

[0071] 图 4E:显示在来自雄性 C57/黑鼠的细胞中,在用刃天青孵育 4.5 小时后测量的、用抗 KTPAF50 抗体处理 72 小时的效果的柱状图。

[0072] 图 4F:显示在雌性 C57/黑鼠中,在用刃天青孵育 4.5 小时后测量的、用抗 KTPAF50 抗体处理 72 小时的效果的柱状图。

[0073] 缩写词:抗 PRT3 1 = 5E11H3 抗体;抗 PRT3 2 = 3E3G7 抗体;Treat. =处理;rel. cont. =相对于对照。

[0074] 图 5:在 C57/黑鼠处理的脾细胞的培养基中 KTPAF50 浓度。

[0075] 缩写词:f. =雌性;m. =雄性。

[0076] 图 6A-6C:用抗 KTPAF50 抗体处理 24 小时之后,人单核细胞的生产能力。

[0077] 图 6A:显示用刃天青孵育 2 小时后测量的、用抗 KTPAF50 抗体处理 24 小时的效果的柱状图。

[0078] 图 6B:显示用刃天青孵育 4 小时后测量的、用抗 KTPAF50 抗体处理 24 小时的效果的柱状图。

[0079] 图 6C:显示用刃天青孵育 24 小时后测量的、用抗 KTPAF50 抗体处理 24 小时的效果的柱状图。

[0080] 缩写词:抗 PRT3 1 = 5E11H3 抗体;抗 PRT3 2 = 3E3G7 抗体;rel. =相对的;cont. =对照;treat. =处理。

[0081] 图 7A-7B:用抗 KTPAF50 抗体处理 48 小时后人单核细胞的生存能力。

[0082] 图 7A:显示用刃天青孵育 2 小时后测量的、用抗 KTPAF50 抗体处理 48 小时的效果的柱状图。

[0083] 图 7B:显示用刃天青孵育 4 小时后测量的、用抗 KTPAF50 抗体处理 48 小时的效果的柱状图。

[0084] 缩写词:抗 PRT3 1 = 5E11H3 抗体;抗 PRT3 2 = 3E3G7 抗体;rel. =相对的;cont. =对照;treat. =处理。

[0085] 图 8A-8E:KTPAF50 抗体对 TNF- $\alpha$  在人单核细胞中表达的效果。

[0086] 图 8A:TNF- $\alpha$  校准。

- [0087] 图 8B :显示用 KTPAF50 抗体处理 24 小时对 TNF- $\alpha$  表达的效果的柱状图。
- [0088] 图 8C :显示用 KTPAF50 抗体处理 48 小时对 TNF- $\alpha$  表达的效果的柱状图。
- [0089] 图 8D :显示用 KTPAF50 抗体处理 120 小时对 TNF- $\alpha$  表达的效果的柱状图。
- [0090] 图 8E :显示用 KTPAF50 抗体处理 144 小时对 TNF- $\alpha$  表达的效果的柱状图。
- [0091] 缩写词 :抗 PRT3 1 = 5E11H3 ;抗 PRT3 2 = 3E3G7 ;cont. =对照。
- [0092] 图 9A-9E :KTPAF50 抗体对 INF- $\gamma$  在人单核细胞中表达的效果。
- [0093] 图 9A :INF- $\gamma$  校准。
- [0094] 图 9B :显示用 KTPAF50 抗体处理 24 小时对 INF- $\gamma$  表达的效果的柱状图。
- [0095] 图 9C :显示用 KTPAF50 抗体处理 48 小时对 INF- $\gamma$  表达的效果的柱状图。
- [0096] 图 9D :显示用 KTPAF50 抗体处理 120 小时对 INF- $\gamma$  表达的效果的柱状图。
- [0097] 图 9E :显示用 KTPAF50 抗体处理 144 小时对 INF- $\gamma$  表达的效果的柱状图。
- [0098] 缩写词 :抗 PRT3 1 = 5E11H3 ;抗 PRT3 2 = 3E3G7 ;conc. =浓度。
- [0099] 图 10A-10E :KTPAF50 抗体对 IL-10 在人单核细胞中表达的效果。
- [0100] 图 10A :IL-10 校准。
- [0101] 图 10B :显示用 KTPAF50 抗体处理 24 小时对 IL-10 表达的效果的柱状图。
- [0102] 图 10C :显示用 KTPAF50 抗体处理 48 小时对 IL-10 表达的效果的柱状图。
- [0103] 图 10D :显示用 KTPAF50 抗体处理 120 小时对 IL-10 表达的效果的柱状图。
- [0104] 图 10E :显示用 KTPAF50 抗体处理 144 小时对 IL-10 表达的效果的柱状图。
- [0105] 缩写词 :抗 PRT3 1 = 5E11H3 ;抗 PRT3 2 = 3E3G7 ;conc. =浓度。
- [0106] 图 11 :在孵育 24 小时和 144 小时后,在人单核细胞培养基中 KTPAF50 蛋白的存在。
- [0107] 图 12A-12F :用抗 KTPAF50 抗体处理后,通过光学显微镜显现的细胞形态变化。
- [0108] 图 12A :对照。
- [0109] 图 12B :用 100  $\mu$  l 抗 KTPAF50 抗体 ( $\alpha$ -PRT3 1) 处理的细胞。
- [0110] 图 12C :用 100  $\mu$  l 抗 KTPAF50 抗体 ( $\alpha$ -PRT3 2) 处理的细胞。
- [0111] 图 12D :用 100ng/ml 的 KTPAF50 蛋白处理的细胞。
- [0112] 图 12E :用 500ng/ml 的 KTPAF50 蛋白处理的细胞。
- [0113] 图 12F :用 1000ng/ml 的 KTPAF50 蛋白处理的细胞。

### 具体实施方式

[0114] 在之前的报导中,发明人描述了一种蛋白,命名为 KTPAF50(在本文中也被指定为 PRT3),提供了它的表达模式和生物学活性(WO 2009/083968)。出于本发明的目的,WO 2009/083968 的内容通过引用的方式全文并入本文中。

[0115] 更特别地,WO 2009/083968 描述了 KTPAF50 表达模式。此外,WO 2009/083968 提供了无信号肽的 KTPAF50 全长蛋白的序列(本文中的 SEQ ID NO :1),以及有信号肽的 KTPAF50 全长蛋白的序列(本文中的 SEQ ID NO :2)。此外,在 WO 2009/083968 中还描述了 36 个氨基酸长的 N 末端肽,在本文中描述为 SEQ ID NO :4。

[0116] 在本发明中,发明人描述了抗体的开发,所述抗体识别并结合 KTPAF50 蛋白和/或源自 KTPAF50 的肽。

[0117] 令人惊讶地,如在下面实施例 1 中所描述的,所述抗体显示出在某些种类癌症、特

别是肺癌中对所述蛋白的特异识别,这与在 WO 2009/083968 中描述的 KTPAF50 的组织表达不直接相关。

[0118] 本发明人同样证明了 KTPAF50 特异抗体是细胞生存能力的有效调节物,并因此可以用作调节细胞生长的重要工具。

[0119] 出乎意料地, KTPAF50 特异抗体在本文中显示出作为促炎性细胞因子表达的有效调节物。这些结果暗示了在免疫系统的自我平衡中 KTPAF50 的关键作用并假定了抗体作为潜在免疫调节物。

[0120] 因此,在第一个方面,本发明提供一种抗体,所述抗体特异识别 KTPAF50 蛋白或其任何片段或衍生物。具体地,所述 KTPAF50 蛋白由 SEQ ID NO :1 或 SEQ ID NO :2 表示。如之前在 WO 2009/083968 中所描述的,SEQ ID NO :1 是 50aa 长,涉及没有信号肽的 KTPAF50 蛋白。SEQ ID NO :2 是 74aa 长,涉及包括信号肽的全长 KTPAF50 蛋白。

[0121] 如在本文中定义的,本发明的抗体通常是天然来源或天然产生的。因此,所述抗体是多克隆抗体或单克隆抗体。可选地,本发明的抗体可以是合成产生的,如通过化学合成,或者通过从各自的产生抗体的细胞或细胞系分离特异 mRNA 而重组产生。然后应当将所述特异 mRNA 经过标准分子生物学操作(获得 cDNA、将所述 cDNA 引入表达载体中等)以产生重组产生的抗体。所述技术对于本领域技术人员是公知的。

[0122] 抗蛋白的多克隆抗体的产生是本领域技术人员公知的技术,此外,该技术在 Current Protocols in Immunology, John E. Coligan 等.(eds.), Wiley 和 Sons Inc. 的第 2 章中有描述。

[0123] 可以从免疫的动物(特别是大鼠或小鼠)的脾或淋巴结获取 B 细胞,然后在促进杂交细胞生长的条件下通过与永生化 B 细胞融合而制备单克隆抗体。产生单克隆抗体的技术在许多文献和教科书中有描述,如上面提到的 Current Protocols in Immunology 的第 2 章。如在那篇文章的第 2 章所述,可以以与蛋白免疫的动物的脾或淋巴结细胞相同的方式,将这些动物的脾或淋巴结细胞用于产生单克隆抗体。产生单克隆抗体的技术进一步由 Kohler 和 Milstein [Kohler 和 Milstein (1975) Nature 256 ;495-497], 和在 US 4, 376, 110 中描述。

[0124] 下面的实施 2 描述了由本发明人生产的 30 种 KTPAF50 特异单克隆抗体。表 2 表示了每一种抗体的抗原特异性,表 3 显示了它们的抗原亲和力。

[0125] 术语“抗体”同样意味着包括完整分子及其片段,如能够结合抗原的抗体的 scFv、Fv、Fab'、Fab、双特异性抗体、线性抗体、F(ab')<sub>2</sub> 抗原结合片段 [Wahl 等 (1983) J. Nucl. Med. 24, 316-325]。

[0126] 根据本文公开的适用于完整抗体分子的方法,以及适用于本发明公开的抗体的其它应用,抗体的 Fab 和 F(ab')<sub>2</sub> 和其它片段可用于检测生物样品中的蛋白,所述蛋白作为生产本发明抗体的抗原。这样的片段例如可以通过使用酶如木瓜蛋白酶(以产生 Fab 片段)或胃蛋白酶(以产生 F(ab')<sub>2</sub> 片段)经过蛋白裂解而产生。因此,根据计划的应用,本发明抗体的 Fab 和 F(ab')<sub>2</sub> 和其它片段可以用多种标签标记。这些标签可以是便于检测的可检测标签,或能够杀死肿瘤细胞的毒性标签,或可以诱导其它细胞或物质杀死肿瘤细胞的“诱导”标签。

[0127] 如果抗体能够与分子(抗原)特异反应,且因此所述抗体与所述分子结合,则所述

抗体被称为是“能够结合”或“识别”所述分子。术语“表位”意思是指能够被抗体结合,且同样能够由所述抗体或产生所述抗体的细胞识别的任何分子的部分。表位或“抗原决定簇”通常由分子如氨基酸或糖侧链的化学活性表面集团组成,并具有特异的三维结构特性以及特异的电荷特性。

[0128] “抗原”是能够被抗体识别和结合的分子或分子一部分。抗原可以有一个或多于一个的表位。上述的特异反应意思是表示上述抗原将以高度选择性和特异性的方式与它对应的抗体反应,而不与大量由其它抗原引起的其它抗体反应。

[0129] 本发明提供的抗体,特别是对于多克隆抗体,可以是任何同种型, IgG、IgM、IgE、IgA 或 IgD。

[0130] 所述单克隆抗体同样可以是任何同种型。

[0131] 本文提供的以及在表 2 中呈现的单克隆抗体通常是 IgG 同种型。

[0132] 在本发明中,用于产生本发明的 KTPAF50 特异抗体的抗原对应于全长蛋白或源自 KTPAF50 蛋白的肽。

[0133] 本文使用的术语“肽”表示肽、多肽或蛋白。所述肽可以通过遗传工程方法在宿主细胞中表达或通过其它合适的方式而合成获得。除非有其它说明,肽通常由天然存在的 L-氨基酸组成。

[0134] 与肽分子相关的术语“生物学特性”指肽发挥至少一种体外或体内作用的能力,包括但不限于本说明书中描述的生物学活性,所述作用可能由全长 KTPAF50 肽或 KTPAF50 肽发挥。例如,生物学特性包括治疗癌症、免疫系统相关疾病、病毒疾病和基于炎症疾病的能力。

[0135] 关于所述抗体,“生物学特性”或“生物学活性”通常指抗体特异识别表位并因此与表位结合的能力。所述表位可以是全长蛋白的一部分或者包含在蛋白的片段或肽中。如在实施例中所证明的及在图中所例示的,图 1 显示了抗 KTPAF50 抗体与 KTPAF50 蛋白的特异性。类似地,图 3 显示了与 T101 蛋白相关的抗 T101 抗体的特异性。

[0136] 术语“与未修饰的分子相比没有明显影响修饰的分子的生物学特性”意思是表示所述修饰的分子保持了与未修饰的分子性质上相似的生物学活性。

[0137] 关于与本发明相关的修饰的肽,这意味着它保持了 SEQ ID NO :1、SEQ ID NO :2、SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :5、SEQ ID NO :6、SEQ ID NO :7 的蛋白的一种或多种生物学特性。为了测定肽是否保持了与未修饰的分子性质上相似的生物学活性,可以进行一种或多种测试,如体外、体内或临床实验,其中修饰的肽和对应的平行测试的未修饰的肽(即全长 KTPAF50 肽或 KTPAF50 肽)进行比较;或者进行一种实验,其中对修饰的肽进行测试以测定它是否与未修饰的肽有相似的生物学作用,所述未修饰的肽的生物学作用从分开操作的实验获知。这样的实验可以以例如在 WO 2009/083968 中描述的方式进行。

[0138] 修饰的肽可以是包括至少 8、12、15、20、25、30、35、40 个或至少 45 个氨基酸残基的连续序列,所述连续序列与包括在 KTPAF50 肽中的至少 8、12、15、20、25、30、35、40 个或至少 45 个氨基酸残基的对应序列有一定程度的一致性,所述一定程度的一致性至少 70%、优选地至少 80%、更优选地至少 90% 及特别地至少 95%。

[0139] 本发明同样提供能够识别源自 KTPAF50 的修饰的肽的抗体,例如,所述修饰的肽是其中一个或多个氨基酸被另一种氨基酸保守取代。如在本文中所使用的,“保守取代”指

一类中的某一氨基酸由同一类的某一氨基酸取代,其中一类是通过共同的物理化学氨基酸侧链性质和在天然发现的同源蛋白中的高取代频率定义。已经分类了6种一般种类的氨基酸侧链,包括:类 I (Cys);类 II (Ser、Thr、Pro、Ala、Gly);类 III (Asn、Asp、Gln、Glu);类 IV (His、Arg、Lys);类 V (Ile、Leu、Val、Met);和类 VI (Phe、Tyr、Trp)。例如,Asp 取代为类 III 的另一种残基,如 Asn、Gln 或 Glu 的取代是保守取代。

[0140] 在一种实施方式中,在氨基酸序列中仅有一个取代。

[0141] 在另一种实施方式中,有两个取代。在另一种实施方式中,有三个取代。取代的最大数量不应当超出在未取代的序列中留下至少 70%、期望至少 80%、优选地 90%、最优选地至少 95% 的氨基酸的氨基酸数量。在一种具体实施方式中,包括高达 3 个,有时高达 6 个被其它氨基酸取代的氨基酸残基的取代是保守取代。

[0142] 在另一种实施方式中,一个或多个氨基酸可以由 D-氨基酸、优选地对应的 D-氨基酸取代。在一种具体实施方式中,所有的氨基酸都是 D-氨基酸。

[0143] 因此,应当理解为本发明涉及能够识别蛋白、多肽或肽的抗体,所述蛋白、多肽或肽包含与本文公开的序列 (SEQ ID NO :1、SEQ ID NO :2、SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :5、SEQ ID NO :6、SEQ ID NO :7) 结构相似的序列并具有基本上相等或更高的活性。所述蛋白、多肽或肽的结构变化包括一个或多个缺失、添加或取代。可以在所述序列的任何位点发生的缺失或添加的数量将通常少于总氨基酸数量的 25%,优选地少于 10%。

[0144] 优选的取代是不期望改变所述蛋白、多肽或肽的二级结构的变化,即保守变化。下表显示了可以与原始氨基酸(左侧)替换的氨基酸(右侧)。

[0145]

<u>原始残基</u>	<u>例示的取代</u>
Ala	Gly; Ser
Arg	Lys
Asn	Gln; His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Ala; Pro
His	Asn; Gln

[0146]

Ile	Leu; Val
Leu	Ile; Val
Lys	Arg; Gln; Glu
Met	Leu; Tyr; Ile
Phe	Met; Leu; Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp; Phe
Val	Ile; Leu

[0147] 同样可以根据它们的基本特征,如电荷、侧链大小等等对氨基酸进行分组。下表显示了相似氨基酸的组。优选的取代是一个组中的氨基酸与相同组中的氨基酸替换,如下:

[0148] 1、小的脂肪族,非极性 :Ala、Ser、Thr、Pro、Gly ;

[0149] 2、极性的负电荷残基和它们的氨基化合物 :Asp、Asn、Glu、Gln ;

[0150] 3、极性的正电荷残基 :His、Arg、Lys ;

[0151] 4、大的脂肪族非极性残基 :Met、Leu、Ile、Val、Cys ;

[0152] 5、大的芳香族残基 :Phe、Tyr、Trp。

[0153] 更多关于氨基酸取代和蛋白质结构的内容可以在 Schulz 等, Principles of Protein Structure, Springer-Verlag, New York, NY, 1979 和 Creighton, T. E., Proteins : Structure and Molecular Properties, W. H. Freeman & Co., San Francisco, CA 1983 中找到。

[0154] 如在下文详细描述,优选的上面详述的保守氨基酸取代期望基本上保留或增加由本发明抗体所识别的蛋白的作用或活性。当然,任何氨基酸取代、添加或缺失被认为是在本发明的范围内,其中得到的蛋白、多肽或肽是本发明抗体识别的抗原,即与本发明抗体识别的蛋白有基本上相等或较高作用的抗原。

[0155] 由本发明抗体识别的蛋白可以通过常规化学方法产生,如固相合成(使用如 Fmoc 和 BOC 技术)和溶液相合成。如在下文提到的 Current Protocols in Molecular Biology 第 16 章中详细描述,这些蛋白、多肽或肽同样可以在细菌或昆虫细胞或其它体内真核转录系统中产生。产生之后,从产生它们的细胞纯化所述蛋白、多肽或肽。肽纯化方法是本领域技术人员已知的并在如 Ausubel 等 (eds.) Current Protocols in Molecular Biology, 第 16 章, John Wiley 和 Sons, 2006 和 Coligan 等 (eds.) Current Protocols in Protein Science, 第 5 和第 6 章, John Wiley 和 Sons, 2006 中详细描述。有利地,所述蛋白、多肽或肽可以作为与第二种蛋白(如谷胱甘肽 S 转移酶 (GST))等、或序列标签(如组氨酸标签 (His 标签) 序列)的融合物产生。如在上文提及的 Current Protocols in Molecular Biology 第 16 章和在 His 标签蛋白表达和纯化试剂盒(购自 Qiagen GmbH, 德国)的说明书中所详细描述,融合物或标签蛋白的应用简化了纯化程序。

[0156] 由本发明抗体识别的蛋白同样可以在无细胞系统中使用如细胞提取物或核糖体合成。

[0157] 可以进一步修饰本发明的抗原以提高它们的功能、亲和力或稳定性。例如,可以使用环化作用以赋予肽更高的稳定性和 / 或全面提高的性能。已经开发了许多不同的环化方法,包括侧链环化和骨架环化。这些方法在现有技术中充分记载 [ 如, Yu 等, *Bioorg. Med. Chem.* 7, 161-75, 1999, Patel 等, *J. Pept. Res.* 53, 68-74, 1999, Valero 等, *J. Pept. Res.* 53, 56-67, 1999, Romanovskis 等, *J. Pept. Res.* 52, 356-74, 1998, Crozet 等, *Mol. Divers.* 3, 261-76, 1998, Rivier 等, *J. Med. Chem.* 41, 5012-9, 1998, Panzone 等, *J. Antibiot. (Tokyo)*, 51, 872-9, 1998, Giblin 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 12814-8, 1998, Limal 等, *J. Pept. Res.* 52 :121-9, 1998, 和 US 5, 444, 150]。

[0158] 一种具体的环化方法涉及通过使用苯环的对位取代的氨基酸衍生物的两性分子的  $\alpha$ -螺旋的稳定作用 [Yu 等 (1999) *id. ibid.*]。另一种具体环化方法是骨架环化,如在 Reissmann 等, *Biomed. Pept. Proteins Nucleic Acids* 1 :51-6, 1994-95 和其参考文献中所公开的。同样可以使用另一种涉及骨架与侧链连接的环化方法 [Reissmann 等 (1994-95) *id. ibid.*]。

[0159] 但是,根据本发明,由本发明抗体识别的蛋白可以在其 N 末端和 / 或 C 末端用相同或不同的有机基团扩展,所述有机基团不是天然存在的或合成的氨基酸。作为这样扩展的一个例子,所述蛋白、多肽或肽可以用 N-乙酰基在 N 末端和 / 或 C 末端扩展。

[0160] 为了改进肽的结构,由本发明抗体识别的蛋白可以通过它们的 N 末端与十二烷基半胱氨酸 (LC) 残基连接和 / 或通过它们的 C 末端与半胱氨酸 (C) 残基连接,或与适于将肽与用于免疫的佐剂连接的其它残基连接。

[0161] 在另一方面,本发明提供一种包含至少一种本发明描述的抗体作为活性组分的组合物。因此,所包含的作为本发明组合物的活性试剂的所述抗体是识别并结合 KTPAF50、其任何片段、类似物或衍生物的抗体或片段。

[0162] 所述组合物可以包括来自于不同杂交瘤的单克隆抗体的组合。例如,根据表 2 中所描述的杂交瘤,所述组合物可以包括来自于两个、三个、四个、五个或更多个杂交瘤细胞系的抗体。

[0163] 在一种实施方式中,所述组合物用于诊断方法中。

[0164] 所述抗体或包含其的所述组合物可用于癌症和自体免疫疾病的诊断。

[0165] 具体地,所述抗体或包含其的所述组合物可以用于诊断肺癌或 IBD。

[0166] 在另一种实施方式中,包含至少一种本发明所描述的抗体的所述组合物可以用于治疗癌症。

[0167] 在另一种实施方式中,包含至少一种本发明所描述的抗体的所述组合物可以用于癌症的预后。在进行癌症治疗的病患中存在预后的显著需要,其中具有用于治疗功效的指示物是必要的。因此,包含本发明所描述的至少一种抗体的组合物,通过检查或测定 KTPAF50 的水平,应当能够测定治疗的效果。

[0168] 组合物的制备是本领域公知的并已经在多篇文章和教科书中描述,见,如 Remington's *Pharmaceutical Sciences*, Gennaro A. R. ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990, 以及特别是其中的 1521-1712 页。

[0169] 本发明的组合物可以进一步包含至少一种制药学可接受的佐剂、载体、稀释液或赋形剂。

[0170] 术语“制药学可接受的载体”意思是任何惰性的、无毒材料，它们与所述活性组分不反应。有时基于期望形式的制剂选择所述载体。有时载体也可以具有促进将活性组分递送或渗透至目标组织的效果，用于促进药物的稳定性、减缓清除速率、给予慢释放性质、减少不期望的副反应效果等。所述载体也可以是稳定制剂的物质（如，防腐剂），用于为制剂提供可食用的滋味等。所述载体可以是通常使用的那些的任何一种，并仅由化学-物理因素限定，如溶解度和缺乏与本发明抗体的反应性，以及给药途径。所述载体可以包括添加剂、着色剂、稀释剂、缓冲液、崩解剂、润湿剂、防腐剂、增味剂和药理学相容的载体。此外，所述载体可以是佐剂，佐剂定义为以可预测方式影响所述活性组分作用的物质。载体的典型例子包括：(a) 液体溶液，其中有效量的活性物质溶解在稀释液中，如水、盐溶液、原汁、醇、糖浆等；(b) 胶囊（如包含如表面活性剂、滑润剂和惰性装填物的普通硬壳或软壳凝胶类型）、片剂、糖锭（其中活性物质在调味料中，如蔗糖和阿拉伯树胶或黄芪胶中，或者所述活性物质在惰性基质中，如凝胶或甘油中）和锭剂，每一种都包含预定量的活性试剂作为固体或颗粒；(c) 粉末；(d) 在合适液体中的悬浮液；(e) 合适的乳状液；(f) 脂质体制剂；以及其它。

[0171] 在另一种实施方式中，本发明的组合物同样可选地进一步包括其它活性试剂，例如但不限于：抗生素、细胞因子、淋巴因子、生长因子、激素。

[0172] 本发明同样提供产生抗体的细胞系，所述细胞系产生根据本发明的抗体。因此，本发明提供产生抗 KTPAF50 的单克隆抗体的杂交瘤细胞系。

[0173] 在一种实施方式中，所述产生抗体的细胞是克隆分离的并是永生的以产生产生抗体的细胞系，这同样是本发明的目的。可以根据本领域技术人员已知的方法和如在 Lanzavecchia 等, 2007 [Lanzavecchia A, Corti D, Sallusto F. (2007) Human monoclonal antibodies by immortalization of B cells. *Curr Opin Biotechnology*; 18(6) :523-8] 描述的方法完成细胞永生。

[0174] 下面的实施例 2 和表 2 和表 3 列出了本发明人生产的所有杂交瘤、用于产生它们的具体抗原和通过 ELISA 测量的它们对于抗原的亲和力。

[0175] 因此，本发明同样提供一种产生抗体的细胞系或杂交瘤细胞系。

[0176] 具体地，本发明提供以下杂交瘤细胞系：3E3G7、5E11H3、2B6A3、2B6A12、2B6G2、2B6H1、5E11B5、5E11B8、5E11H5、3E1F9、3E1F11、3E1G4、3E1G6、2A8B8、2A8B12、2A8H7、6E2B6、6E2C5、6E2C9、6E2D4、7D4D6、7D4E12、7D4F9、7D4H10、6F5A1、6F5C9、6F5C12、3E3B3 和 3E3C8。

[0177] 两种杂交瘤细胞系（3E3G7 和 5E11H3）保藏在法国巴斯德研究所国家微生物保藏中心 (CNCM) (25, Rue du Docteur Roux, F-75724, 巴黎, Cedex 15, 法国)，这是一家根据布达佩斯规定的保藏机构，所述保藏内容如下：

[0178]

杂交瘤	保藏日期	CNCM 参考号	登记号
5E11H3	2010 年 6 月 24 日	CNCM-28435.1006	CNCM I-4331
3E3G7	2010 年 6 月 28 日	CNCM-28440.1006	未知

[0179] 在提交本申请副本或其后续申请的国家，根据外国专利法的要求，可以得到所述

保藏物。但是,应当理解,所述保藏物的可用性并不构成对在废除由政府行为所授予的专利权下实践本发明的许可。

[0180] 此外,根据用于微生物保藏的布达佩斯条约的规定,保存本发明的杂交瘤保藏物且公众可利用所述保藏物,即,在所有必要的注意下保存它们,以使得在最近一次要求提供保藏物样品之后的至少五年期间以及在任何情况下、在保藏日之后至少 30 年期间或可能出版的公开所述培养物的任何专利的可实施期间妥善保藏它们以保持它们存活和无污染。由于保藏物的状态,当保藏处不能按照要求提供样品时,本保藏人了解应当替换保藏物的义务。当公开保藏物的专利被授权时,所有关于对本发明培养的保藏物的公众可用性的限制将不能撤回地移除。

[0181] 因此,本发明同样提供由所述细胞系产生的抗体。

[0182] 在另一方面,本发明提供如本发明所描述的识别 KTPAF50 的抗体在制备诊断组合物中的应用。具体地,所述组合物用于诊断任何一种癌症和自体免疫疾病。

[0183] 因此,本发明提供抗 KTPAF50 抗体在制备用于癌症诊断的诊断组合物中的应用。

[0184] 当本文涉及癌症时,它包括但不限于:骨髓白血病,如慢性骨髓性白血病、伴有化脓的急性骨髓性白血病、急性前髓细胞性白血病、伴有嗜碱性粒细胞增加的急性非淋巴细胞性白血病、急性单核细胞性白血病、伴有嗜酸性粒细胞增多的急性骨髓单核细胞性白血病,恶性淋巴瘤如 Burkitt 淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤,淋巴细胞性白血病,如急性成淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病,骨髓及外骨髓增殖疾病,实体瘤如良性脑膜瘤、唾液腺混合肿瘤、嘴唇和口腔、咽、喉、鼻旁窦内肿瘤,结肠腺瘤,腺癌如小细胞肺癌、肾癌、子宫癌、前列腺癌、膀胱癌、卵巢癌、结肠癌,肉瘤,脂肪肉瘤、黏液样肉瘤、滑液肉瘤、横纹肌肉瘤(胞状的)、骨外黏液样软骨肉瘤、尤文氏瘤,其它包括睾丸和卵巢无性细胞瘤,视网膜母细胞瘤、威尔姆斯瘤、成神经细胞瘤、恶性黑色素瘤、间皮瘤、乳腺癌、皮肤癌、前列腺癌和卵巢癌、眼睑癌、眼球结膜癌、眼球结膜的恶性黑色素瘤、葡萄膜的恶性黑色素瘤、视网膜母细胞瘤、泪腺癌、眼眶肉瘤、脑瘤、脊髓瘤、动脉血管瘤、血管肉瘤和卡波济肉瘤。

[0185] 如在下文实施例 1 和图 2 中所证明的, KTPAF50 血清水平在肺癌中升高并因此显示出抗 KTPAF50 抗体在肺癌诊断中有价值。

[0186] 本发明的抗体或包含其的组合物同样可用于诊断乳腺癌和卵巢癌。

[0187] 此外,本发明提供了抗 KTPAF50 抗体在制备用于诊断自体免疫疾病的诊断组合物中的应用。

[0188] 如在本文所涉及的,自体免疫疾病包括炎性肠道疾病 (IBD)、克罗恩病、多发性硬化 (MS)、自体免疫性葡萄膜炎、自体免疫性视网膜炎、自体免疫性甲状腺炎、桥本氏病、胰岛炎、干燥综合征、自然流产、实验性自体免疫性心肌炎、风湿性关节炎 (RA)、狼疮 (SLE)、牛皮癣和糖尿病,特别是 I 型糖尿病。自体免疫疾病的其它例子包括急性坏死性出血性脑炎、阿狄森氏病、血中丙球蛋白缺乏、过敏性哮喘、过敏性鼻炎、斑秃、淀粉样变性病、强直性脊柱炎、抗 GBM/ 抗 TBM 肾炎、抗磷脂综合征 (APS)、自体免疫性再生障碍性贫血、自体免疫性家族性自主神经异常、自体免疫性肝炎、自体免疫性高血脂、自体免疫性免疫缺陷、自身免疫性内耳疾病 (AIED)、自体免疫性心肌炎、自体免疫血小板减少性紫癜 (ATP)、轴突和神经元神经病、Bal 氏病、Behnet 氏病、大疱性类天疱疮、心肌症、巨大淋巴结增生症、口炎性腹泻 (非热带性)、查加斯病、慢性疲劳综合征、慢性炎性脱髓鞘性多发性神经病 (CIDP)、

Churg-Strauss 综合征、瘢痕性类天疱疮 / 良性黏膜性类天疱疮、科干综合征、冷凝集素病、先天性心传导阻滞、萨科奇病毒性心肌炎、CREST 病、原发性混合型冷球蛋白血症、脱髓鞘性神经病、皮炎、德维克氏病、盘状红斑狼疮、Dressler 综合征、子宫内膜异位、嗜酸性筋膜炎、结节性红斑、实验性过敏性脑脊髓炎、Evan 综合征、纤维性肌痛、纤维性肺泡炎、巨细胞动脉炎（颞动脉炎）、古德帕斯丘综合征、格雷夫氏病、格林巴利综合征、溶血性贫血、过敏性紫癜肾炎、妊娠疱疹、低丙种球蛋白血症、特发性血小板减少性紫癜（ITP）、IgA 肾病、免疫调节性脂蛋白、包涵体性肌炎、胰岛素依赖型糖尿病（1 型）、间质性膀胱炎、青年类风湿性关节炎、青年糖尿病、川崎病、朗 - 伊二氏综合征、白细胞破裂性脉管炎、扁平苔藓、硬化性苔藓、木样结膜炎、线性 IgA 病（LAD）、莱姆病、梅尼艾氏病、显微镜下多动脉炎、混合结缔组织病（MCTD）、蚕食性角膜溃疡、Mucha-Habermann 病、重症肌无力、肌炎、嗜睡症、嗜中性白血球减少症、眼瘢痕性类天疱疮、骨关节炎、复发性风湿病、副肿瘤性小脑变性、阵发性夜间血红蛋白尿（PNH）、Parsonnage-特纳综合征、扁平部睫状体炎（外周葡萄膜炎）、天疱疮、外周神经病、静脉周围性脑脊髓炎、恶性贫血、POEMS 综合征、结节性动脉周围炎、I 型、II 型和 III 型自体免疫性多腺体综合征、风湿性多肌痛、多肌炎、心肌梗死后综合征、心包切开后综合征、孕酮皮炎、原发性胆汁性肝硬化、牛皮癣性关节炎、特发性肺纤维化、坏疽性脓皮病、单纯性红细胞再生障碍性贫血、雷诺现象、反射性交感神经性营养不良、赖特综合征、复发性多软骨炎、多动腿综合征、风湿热、肉样瘤病、施密特综合征、巩膜炎、硬皮病、精子和睾丸自体免疫性、僵人综合征、亚急性细菌性心内膜炎（SBE）、交感性眼炎、大动脉炎、颞动脉炎 / 巨细胞性动脉炎、血小板减少性紫癜（TTP）、自体免疫性甲状腺病、Tolosa-Hunt 综合征、横贯性脊髓炎和坏死性脊髓病、溃疡性结肠炎、未分化结缔组织病（UCTD）、脉管炎、水泡性皮肤病、白癜风和韦格纳肉芽肿。

[0189] 在另一方面，本发明提供本发明所描述的、特别是针对 KTPAF50 的抗体在制备治疗癌症、自体免疫疾病、移植排斥、神经退行性疾病和糖尿病的治疗性组合物中的应用。

[0190] 具体地，所述组合物用于治疗癌症。

[0191] 如在实施例 3 中所显示的，用 KTPAF50 特异抗体的治疗引起细胞生存能力的降低，暗示这些抗体可以用于诱导细胞死亡，或诱导细胞凋亡。在癌细胞中诱导细胞死亡可以是消除它们的有效方式。

[0192] 因此，本发明提供一种治疗癌症的方法，所述方法包括对需要的个体施用治疗有效量的至少一种本发明的抗体或其组合。

[0193] 此外，本发明提供的抗体或其片段可以用于定量或定性地检测样品中用作产生本发明抗体的抗原的蛋白。这可以通过给出视觉可检测的信号的技术完成，它可以是任何荧光（免疫荧光）、酶反应的发色产物、沉淀产生、化学发光或生物发光。使用荧光标记或颜色标记的抗体和如下描述的光显微方法、流式细胞术或荧光定量检测。可以用于检测所述抗体的其它技术和标记物包括但不限于胶体金、放射性标签、GFP（绿色荧光蛋白）等等，抗生物素蛋白 / 链霉亲和素 - 生物素、磁珠以及对实际结合敏感的物理系统，如纳米技术系统。

[0194] 本发明提供的抗体及其片段可以用于组织学染色，如免疫组织化学、免疫荧光检测或免疫电子显微术，以及用于蛋白的原位检测。可以通过从个体获取组织学标本，并用所述标记的本发明抗体接触所述标本来完成原位检测。通过对生物学样品（所述标本）涂覆或覆盖所述标记的抗体（或片段）接触所述抗体（或片段）。通过使用这样的方法，不仅可

以测定所述抗原的存在,也可以测定检测组织的分布。使用本发明,本领域普通技术人员将容易地意识到可以修改任意多种组织学方法,如染色方法,以实现这样的原位检测。

[0195] 可以标记和直接检测本发明抗体的一种方式是将其与酶连接并用于酶免疫测定(EIA)。当之后与合适的底物接触时,这种酶与所述底物反应以产生化学基团,所述化学基团可以通过例如分光光度计、荧光方式或视觉方式检测。可以用于可检测地标记所述抗体的酶包括但不限于:苹果酸脱氢酶、葡萄球菌核酸酶、 $\delta$ -5-类固醇异构酶、酵母醇脱氢酶、 $\alpha$ -甘油磷酸脱氢酶、磷酸甘油醛异构酶、辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、天冬酰胺酶、葡糖氧化酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶、核糖核酸酶、脲酶、过氧化氢酶、葡萄糖 6-磷酸脱氢酶、葡糖淀粉酶和乙酰胆碱-酯酶。所述检测可以通过使用酶的发色底物的比色方法完成。所述检测也可以通过底物与相似制备的标准物的酶反应程度的视觉比较来完成(该方法适于可溶的有色产物和不可溶的有色产物,如在硝化纤维或塑料支撑物上)。

[0196] 在本发明中,在合适的例子中,通过使用与所述配体或反应抗体反应的二抗或其它配体可以进一步帮助检测所述抗体与抗原的反应,所述二抗或其它配体与不同表位特异或非特异反应。

[0197] 酶免疫测定,如免疫荧光测定(IFA)、光度测定、酶联免疫吸附测定(ELISA)、ELISPOT 测定以及免疫印迹可以容易地适于完成具体抗体的检测。

[0198] 同样可以使用的其它检测系统包括基于使用源自金黄色葡萄球菌 Cowan 株 I 的蛋白 A、来自 C 群链球菌(26RP66 株)的蛋白 G 的那些,或者使用生物素-抗生物素蛋白结合反应的系统。

[0199] 本发明抗体可以在其中使用的免疫酶检测的其它方法是蛋白质印迹和点印迹。所述样品通过电泳分离并转移至硝化纤维膜或其它合适的支撑物上。然后将需要被检测的样品(如,培养物上清液)与所述膜接触并通过已经描述的方法检测形成的免疫复合物的存在。在本方法的一种变化形式中,在膜上的线或斑点中涂覆纯化的抗体并使之结合。随后将所述膜与需要检测的样品在培养之前或之后接触,并使用本文描述的技术检测形成的免疫复合物。

[0200] 同样可以通过凝集检测抗体-抗原复合物的存在。例如,根据本发明的抗体可以用于包覆例如形成均质悬浮液的乳胶微粒。当与样品,如含有所述抗体所识别的特异抗原的血清混合时,引起所述乳胶微粒凝集并从视觉上可以检测大凝集物的存在。

[0201] 可用于通过免疫测定技术测定抗体的免疫学和免疫测定方法的综述,见 Basic 和 Clinical Immunology [D. Stites 等.(eds.) (1994) Basic and Clinical Immunology, 第 8 版]。

[0202] 通过使用其中通过本领域已知方法标记有可检测基团的抗体或配体,可以促进检测抗体和抗原的反应。这样的可检测基团允许沉淀或颜色变化的视觉检测、通过显微镜方法的视觉检测、或通过光谱测定或辐射测量的自动检测等等。可检测的基团的例子包括荧光素和若丹明(用于荧光显微镜法),辣根过氧化物酶和碱性磷酸酶(用于光学显微镜法或电子显微镜法和生物化学检测以及用于通过颜色变化的生物化学检测),和生物素-链霉亲和素(用于光学或电子显微镜法)。所述检测方法和使用的基团可以选自例如上表或通过应用于如此选择的标准的其它合适例子 [Harlow 和 Lane (1988) 抗体:实验室手册,冷泉港实验室,冷泉港, NY]。

[0203] 可以通过使用任意多种其它免疫测定完成检测。例如,通过放射性标记的抗体或抗体片段,通过使用放射性免疫测定(RIA)可能检测抗原。RIA的详细描述可以在Laboratory Techniques and Biochemistry in Molecular Biology, Work, T.S.等, North Holland Publishing Company, NY(1978)中发现,具体参考Chard, T的题目为“An Introduction to Radioimmune Assay and Related Techniques”章节,通过引用的方法并入本文中。通过使用 $\gamma/\beta$ 计数器或闪烁计数器的方法或通过自动射线照相术可以检测放射性同位素。

[0204] 同样可以用荧光化合物标记根据本发明的抗体。当所述荧光标记的抗体暴露于合适波长的光时,由于荧光然后可以检测它的存在。最常使用的荧光标记化合物是异硫氰酸荧光素、若丹明、藻红蛋白、藻蓝蛋白、别藻蓝蛋白、邻苯二甲醛和荧光胺。

[0205] 同样可以使用发出荧光金属如 $^{152}\text{E}$ 或其它稀土元素可检测地标记所述抗体。可以使用这样的金属螯合基团如二乙三胺五乙酸(ETPA)将这些金属与所述抗体连接。

[0206] 同样可以通过将抗体与化学发光化合物连接来可检测地标记所述抗体。然后通过检测在化学反应过程中产生的发光的存在来检测所述化学发光标记的抗体的存在。具体有用的化学发光标记化合物的例子是鲁米诺、异鲁米诺、theromatic acridinium 酯、咪唑、吡啶盐和草酸酯。

[0207] 同样,生物发光化合物也可以用于标记本发明的抗体。生物发光是一类在生物系统中发现的化学发光,其中催化蛋白增加了化学发光反应的功效。通过检查发光的存在测定生物发光蛋白的存在。用于标记目的的重要生物发光化合物是萤光素、萤光素酶和水母蛋白。

[0208] 本发明的抗体分子可以适于在免疫测定(也被认为是“双位点”或“夹心法”测定)中使用。在典型的免疫测定中,将一定量未标记的抗体(或抗体的片段)结合在固体支撑物或载体并加入一定量可检测标记的可溶抗体以使得检测和/或量化固相抗体、抗原和标记的抗体形成的三元复合物。

[0209] 可以放射性标记本发明抗体以用于成像许多不同的癌症。放射性同位素如 $\text{In}^{111}$ 和 $\text{Tc}^{99}$ 用于标记抗体并通过成像技术使之可见。放免液闪法(RIS)是能够使得肿瘤体内成像的有用检测。这使用放射性标记的抗体和标准的 $\gamma$ -闪烁照相机完成。

[0210] 因此,本发明可用于作为检测或指示个体中肿瘤或癌症的存在的筛选方法。当与本文所描述的可检测标记物直接连接时,通过将抗体或其片段注入需要诊断的个体中并通过成像检测,所述抗体或其片段可用于体内检测抗原(或其片段),并借助于成像技术使之可见,指示癌细胞的存在。

[0211] 此外,本发明使用的抗体可以与细胞毒素药物联合,其本身或作为组合物的一部分用于癌症的治疗。

[0212] 因此,如上所提及的,本发明提供的抗体适于作为毒性药物的递送系统以杀死癌细胞或前癌细胞。

[0213] 细胞毒素药物的一个例子是抗增殖药物分子,其可以共价地与所述抗体直接连接或通过连接物与所述抗体连接,且其中所述抗体可选地由癌细胞富含的或由癌细胞分泌的蛋白酶特异切割,因此通过蛋白酶的作用优先地在癌细胞内、附近或在癌细胞上释放抗增殖药物。

[0214] 抗增殖药物的例子是：环磷酰胺、苯丁酸氮芥、马利兰、美法仑、噻替哌、异环磷酰胺、氮芥、甲氨蝶呤、5-氟尿嘧啶阿糖胞苷、6-硫鸟嘌呤、6-巯基嘌呤、阿霉素、道诺霉素、伊达比星、更生霉素、博莱霉素、丝裂霉素、普卡霉素、鬼臼毒素类、长春新碱、长春碱、vinclestin、依托泊苷、替尼泊苷、卡莫司汀、洛莫司汀、司莫司汀、链脲菌素、肾上腺类皮质激素、雌激素、抗雌激素、孕激素、芳香酶抑制剂、雄激素、抗雄激素、达卡巴嗪、六甲嘧胺、羟基脲、米托坦、丙卡巴肼、顺铂、卡铂、美法仑、甲氨蝶呤和苯丁酸氮芥。

[0215] 可选地，所述抗体可以将特定物质如金属离子（铁或锌或其它）携带进肿瘤，并因此作为将毒性物质（如本文之前所述的放射性或细胞毒性化学物质，即，如蓖麻毒素或细胞毒素烷化剂或细胞毒素前药的毒素）递送至肿瘤的工具或载体。所述抗体和所述毒素或放射性同位素的连接可以是化学连接。直接连接的毒素的例子是阿霉素、苯丁酸氮芥、蓖麻毒素、假单胞菌外毒素等。可以产生具有针对抗原和针对毒素的双特异性的杂交毒素。这样的二价分子可用于结合肿瘤或将细胞毒性药物递送至肿瘤或结合并活化细胞毒性淋巴细胞，如结合  $T_3$ - $T_1$  受体复合物。

[0216] 如在实施例 3、4 和 6 以及它们各自的图片中所显示的，本发明抗体能够抑制细胞生长。

[0217] 因此，在另一方面，本发明提供一种抑制细胞生长的方法，所述方法包括用有效量的至少一种抗 KTPAF50 抗体或其组合或包含其的组合物接触细胞。所述方法可以是体外方法或离体方法。

[0218] 同样如在实施例 6 中所显示的，本发明的抗体能够抑制细胞因子，特别是  $TNF-\alpha$ 、 $IFN-\gamma$  或  $IL-10$  的表达。

[0219] 因此，在另一方面，本发明提供一种抑制细胞因子表达的方法，所述方法包括用有效量的至少一种抗 KTPAF50 抗体或其组合或包含其的组合物接触表达所述细胞因子的细胞。所述方法可以是体外方法或离体方法。

[0220] 具体地，本发明提供一种抑制促炎性细胞因子的方法。

[0221] 促炎性细胞因子通过诱导炎症起作用。这些细胞因子作为内源性热源 ( $IL1$ 、 $IL6$ 、 $TNF-\alpha$ )，通过巨噬细胞和间质细胞（包括纤维原细胞、上皮细胞和内皮细胞）上调次级调节物和促炎性细胞因子的合成，刺激急性期蛋白的产生或吸引炎性细胞。

[0222] 促炎性细胞因子包括  $IL-1$ 、 $TNF-\alpha$ （肿瘤坏死因子  $\alpha$ ）、 $INF-\gamma$ （干扰素  $\gamma$ ）、 $TNF-\beta$ 、 $IL-4$ 、 $IL-5$ 、 $IL-6$ 、 $IL-10$  和  $IL-13$ 。这些细胞因子涉及  $Th1$  和  $Th2$  淋巴细胞的调节。

[0223]  $TNF-\alpha$  的下调已经特别显示出对自体免疫疾病如风湿性关节炎、IBD 和牛皮癣的治疗很重要。

[0224] 因此，本发明的抗 KTPAF50 抗体或包含其的组合物是治疗这些人类自体免疫疾病的极其有力工具。

[0225] 在本文中，本发明的抗体也可以用于治疗移植排斥，以及自体免疫疾病、神经退行性疾病和糖尿病。

[0226] 因此，本发明提供一种治疗选自以下状况的方法：癌症、自体免疫疾病、移植排斥、神经退行性疾病和糖尿病，所述方法包括对需要的个体施用治疗有效量的 KTPAF50 特异抗体或包含其的组合物。

[0227] 可以使用所述抗体治疗的具体自体免疫疾病是 IBD、风湿性关节炎和牛皮癣。

[0228] 神经退行性疾病是慢性和进行性疾病,特征是神经元在运动系统、感官系统或认知系统中选择性和对称性地缺失。神经退行性疾病的非详尽列表包括:阿尔茨海默病、帕金森病、肌萎缩侧索硬化症、亨廷顿病、家族性淀粉样多神经病和 Tau 病变。

[0229] 糖尿病的特征是高血糖,因为生物体不能产生足够的胰岛素或所述细胞不能对产生的胰岛素作出应答。该高血糖产生典型的多尿(频繁撒尿)、烦渴(增加口渴)和多食(增加饥饿)的症状。三种主要类型的糖尿病是:1型糖尿病,由身体不能产生胰岛素而产生,可以用胰岛素治疗;2型糖尿病,由抗胰岛素性而产生;和孕期糖尿病,其中之前从未得过糖尿病的孕妇在怀孕期间有高水平的血糖。其它形式的糖尿病包括:由于胰岛素分泌的遗传缺陷导致的先天性糖尿病、囊肿性纤维化相关的糖尿病、由高剂量糖皮质激素诱导的类固醇糖尿病和几种形式的单基因糖尿病。

[0230] 本发明同样提供一种用于评估已经被诊断的癌症预后的方法。具体地,重要的是在治疗前、治疗中和治疗后持续进行。可选地,所述方法同样适用于癌症筛选,特别适用于当所述要被检测的样品是血液样品的时候,所述血液样品是从病患取得的“患者最容易接受”类型的样品之一。

[0231] 因此,在另一方面,本发明提供一种用于在个体中诊断癌症的方法,所述方法包括步骤:

[0232] a、提供来自所述个体的样品;

[0233] b、用至少一种本发明的抗体-抗 KTPAF50 抗体,或包含其的组合物接触所述样品;

[0234] c、通过检测方法检测所述至少一种抗体和它的特异抗原复合物的形成;

[0235] 从而通过复合物的检测表示所述个体患有癌症。

[0236] 当本文涉及个体时,所述个体可以是哺乳动物、人或非人类。非人哺乳动物包括但不限于:母牛、马、狗、猫、小鼠、大鼠、豚鼠等。通常,所述个体是人,特别是病患或健康个体。

[0237] 在本发明的诊断方法的一个实施方式中,所述样品是血液样品。

[0238] 在本发明的诊断方法的另一个实施方式中,使用抗 KTPAF50 抗体或包含其的组合物,所述癌症选自肺癌、乳腺癌和卵巢癌。

[0239] 因此,本发明同样提供一种监测癌症治疗功效的方法。监测治疗功效对于估测癌症治疗的预后是必要的。因此,本文描述的诊断方法可以在癌症治疗之前、之中或之后在个体中实现,且将从每一个时间点获得的结果(至少两个抗原-抗体复合物之间的关系模式)与在正常人群中同样复合物模式进行比较分析。与正常人群的模式最接近的个体模式表示治疗成功。

[0240] 本文涉及的癌症治疗表示根除疾病的任何治疗,包括放射线疗法、化学疗法等。

[0241] 本发明的抗体同样可以用于高通量筛选在人和鼠免疫系统中诱导免疫反应的化合物,以及筛选特别是在消化系统和其它系统中诱导炎症和癌症的化合物的多元免疫测定,其中本发明抗体可以用于彼此互相结合或与其它抗体组合。多元免疫测定是本领域技术人员已知的并已经由 Anderson 和 Davison 描述 [Anderson 和 Davison (1999) Am. J. Pathol. 154 :1017-1022]。

[0242] 如在本文中所使用的以描述本发明,“肿瘤”、“癌症”、“恶性增殖性疾病”和“恶性肿瘤”均相当地涉及组织或器官的增生。如果所述组织是淋巴或免疫系统的一部分,恶性细

胞可以包括循环细胞的非实体瘤。其它组织或器官的恶性肿瘤可以产生实体瘤。通常,非实体瘤和实体瘤例如是癌症、黑色素瘤、白血病和淋巴瘤。

[0243] 癌症和肿瘤包括但不限于:骨髓白血病,如慢性骨髓性白血病、伴有化脓的急性骨髓性白血病、急性前髓细胞性白血病、伴有嗜碱性粒细胞增加的急性非淋巴细胞性白血病、急性单核细胞性白血病、伴有嗜酸性粒细胞增多的急性骨髓单核细胞性白血病,恶性淋巴瘤如 Burkitt 淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤,淋巴细胞性白血病,如急性成淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病,骨髓及外骨髓增殖疾病,实体瘤如良性脑膜瘤、唾液腺混合肿瘤、嘴唇和口腔、咽、喉、鼻旁窦内肿瘤,结肠腺瘤,腺癌如小细胞肺癌、肾癌、子宫癌、前列腺癌、膀胱癌、卵巢癌、结肠癌,肉瘤,脂肪肉瘤、黏液样肉瘤、滑液肉瘤、横纹肌肉瘤(胞状的)、骨外黏液样软骨肉瘤、尤文氏瘤,其它包括睾丸和卵巢无性细胞瘤,视网膜母细胞瘤、威尔姆斯瘤、成神经细胞瘤、恶性黑色素瘤、间皮瘤、乳腺癌、皮肤癌、前列腺癌和卵巢癌、眼睑癌、眼球结膜癌、眼球结膜的恶性黑色素瘤、葡萄膜的恶性黑色素瘤、视网膜母细胞瘤、泪腺癌、眼眶肉瘤、脑瘤、脊髓瘤、动脉血管瘤、血管肉瘤和卡波济肉瘤。

[0244] 本文描述的用于癌症的检测、诊断、预后评估、筛选和治疗的方法适于癌症的任何阶段。

[0245] 在另一种实施方式中,在癌症的任何阶段实施本发明方法,且与目前所使用的特别是用于癌症诊断的其它技术相比,本发明方法是最有利的。当与例如乳腺 X 光摄影检查术相比,本发明描述的诊断方法是基于血液检查并具有潜在更小的假阳性结果频率,其中所述乳腺 X 光摄影检查术除了具有相对高程度的假阳性结果(其在许多需要进行伴有不必要的恐慌的进一步活组织检查的病患中体现)之外,还在技术上引起病患特别不适。所有目前宏观水平的诊断工具,如乳房 X 线照片、直肠指检(DRE)和(分别用于乳腺癌、前列腺癌和卵巢癌的)超声波检查都仅在疑似肿瘤块已经发展到视觉可检测的尺寸之后才能够诊断癌症,导致较低的生存率并降低了病患的生活品质。例如,对于乳腺癌,仅在美国,对怀疑具有乳房损害的女性,每年接受大约三千万的乳房 X 线照相术并进行多于一百万的外科乳房活组织检查。

[0246] 在这方面,熟悉分期癌症的系统是重要的。分期基于对癌症发展的认知。癌细胞分裂和生长不受控制或指令以形成肿瘤。当肿瘤生长时,它可以侵袭邻近器官和组织。癌细胞也可以从肿瘤脱离并进入血液或淋巴系统中。通过穿过血液或淋巴系统移动,癌症可以从原来位点扩散以在其它器官中形成新的肿瘤,这被命名为转移。

[0247] 多数种类的癌症具有 TNM(肿瘤尺寸、结转移、转移)命名,但是一些没有。例如,脑癌和脊髓癌是根据它们的细胞类型和级别分类。不同的分期系统同样可以用于许多血癌或骨髓癌,如淋巴瘤。Ann Arbor 分期方案通常用于分期淋巴瘤并已经被 AJCC(美国癌症联合会)和 UICC(国际抗癌联盟)采用。但是,其它血癌或骨髓癌,包括大多数种类的白血病,没有明确的分期系统。另一种分期系统用于分期宫颈癌、子宫癌、卵巢癌、阴道癌和外阴癌,由国际妇产科联合会开发。该系统使用 TNM 格式。此外,使用 TNM 系统或儿童肿瘤协会(管理儿科临床实践的协会)的分期标准对儿童癌症分期。

[0248] 所述 TNM 分期系统如下:T 描述肿瘤的尺寸以及它是否已经侵袭邻近组织,N 描述转移的任何淋巴结,M 描述转移的存在。

[0249] 原发肿瘤(T)

- [0250] TX 不能评估原发肿瘤
- [0251] T0 没有原发肿瘤迹象
- [0252] Tis 原位癌（没有扩散至邻近组织的早期癌症）
- [0253] T1、T2、T3、T4 原发肿瘤的尺寸和 / 或范围
- [0254] 局部淋巴结 (N)
- [0255] NX 不能评估局部淋巴结
- [0256] N0 没有局部淋巴结转移（在淋巴结中没有发现癌症）
- [0257] N1、N2、N3 局部淋巴结转移（扩散的数量和 / 或范围）
- [0258] 远处转移 (M)
- [0259] MX 不能评估远处转移
- [0260] M0 没有远处转移（癌症还没有扩散至身体的其它部位）
- [0261] M1 远处转移（癌症已经扩散至身体的其它部位）
- [0262] 一种根据 TNM 系统的实施例可以是：乳腺癌 T3 N2 M0，表示大肿瘤已经从乳房扩散至外面邻近的淋巴结，但是还没有扩散至身体的其它部位。前列腺癌 T2 N0 M0 表示肿瘤仅位于前列腺中且没有扩散至淋巴结或身体任何其它部位。
- [0263] 许多癌症登记处，如 NCI 的监察，流行病学调查及最终结果监视 (SEER) 使用概要分期。该系统用于所有类型的癌症。它将癌症案例分成五个主要类型：
- [0264] - 原位是早期癌症，它仅存在于其开始的细胞层中；
- [0265] - 定位是癌症限于其开始的器官中，没有扩散的迹象；
- [0266] - 局部是癌症已经扩散出原始（原发）位点至邻近的淋巴结或器官和组织；
- [0267] - 远处是癌症已经从原发位点扩散至远处器官或远处淋巴结；
- [0268] - 未知用于描述没有足够信息以显示阶段的案例。
- [0269] 另一种通常使用的分期系统使用罗马数字：
- [0270] 0 阶段：原位癌（仅存在于其开始的细胞层中的早期癌症）。
- [0271] I、II、III 阶段：更高数字表示更大范围的疾病、更大的肿瘤尺寸和 / 或所述肿瘤扩散至邻近淋巴结和 / 或邻近原发肿瘤的器官。
- [0272] IV 阶段：所述癌症已经扩散至另一个器官。
- [0273] 因此，本发明提供的癌症诊断和检测方法，如使用本文描述的标记的抗体，对于癌症的分期非常有用（因为随着它的生长，肿瘤发生变化）。如，特别是在癌症的早期时，它能够检测和 / 或定位生长，而通过其它目前可用的技术不能检测到。
- [0274] 因此，在另一方面，本发明提供一种用于在个体中诊断自体免疫疾病的方法，所述方法包括步骤：
- [0275] a、提供来自所述个体的样品；
- [0276] b、用至少一种根据本发明的抗体或包含其的组合物接触所述样品，所述抗体是抗 KTPAF50 抗体；
- [0277] c、通过检测方法检测所述至少一种抗体和它的特异抗原复合物的形成；
- [0278] 从而通过复合物的检测显示所述个体患有自体免疫疾病。
- [0279] 上述方法也可以用于自体免疫疾病的预后，由此检测复合物并比较治疗期间不同时间点（治疗前、治疗中和治疗后）时它的水平，提供治疗功效的评估并得出个体患有或可

能患有自体免疫疾病。

[0280] 在本发明的所述诊断方法的一种实施方式中,所述样品是血液样品。

[0281] 如在本文中所定义的,“样品”指从个体、通常是哺乳动物个体获得的任何样品。生物学样品的例子包括体液和组织标本。所述样品的来源可以源自这样的生理学介质,如血液、血清、血浆、母乳、脓、脑脊髓液、拭样、组织刮屑、洗涤物、尿液、粪便、从体腔清洗获得的漂洗流体、痰、从身体区域(咽喉、阴道、耳、眼、皮肤、伤口组织如淋巴结等)取得的拭子。组织标本包括脾、淋巴结和任何包含淋巴细胞的组织的活组织切片。

[0282] 本说明书和权利要求书中的术语“样品”在本文中使用它最宽的范围。

[0283] 代表性地,初始而非流体的拭子和样品与液体介质接触,液体介质然后与检测试剂接触。

[0284] 在本发明的一种具体实施方式中,在本发明方法中使用的所述样品是任何一种体液或源自培养物的样品。

[0285] 源自培养物的样品可以是细胞提取物、介质样品或来自体液的培养物,如来自血液样品的培养物。

[0286] “全血”意思是从动物或人收集的血液。全血可以用肝磷脂、EDTA、柠檬酸盐和其它防止凝固和凝结的任意物质收集。

[0287] 可以用固相支撑物或载体如硝化纤维,或能够固定细胞、细胞微粒或可溶蛋白的其它固相支撑物或载体处理生物学样品。然后可以用合适的缓冲液清洗所述支撑物或载体,随后用如上所述的本发明的可检测标记的抗体处理。然后可以用缓冲液第二次清洗所述固相支撑物或载体以移除未结合抗体。然后通过常规方法检测所述固体支撑物或载体上的结合抗原或标记物的量。

[0288] “固相支撑物”、“固相载体”、“固体支撑物”、“固体载体”、“支撑物”或“载体”指能够结合抗原或抗体的任何支撑物或载体。公知的支撑物或载体包括:玻璃、聚苯乙烯、聚丙烯、聚乙烯、葡聚糖、尼龙淀粉酶、天然和改性纤维素、聚丙烯酰胺和磁铁矿。出于本发明的目的,所述载体的性质可以是一定程度可溶或不可溶。所述支撑物材料实际上可能具有任何可能的结构构造,只要连接的分子能够结合抗原或抗体。因此,所述支撑物或载体构造可以是球形,如在珠子内;圆柱形,如在测试管的内表面,或在杆的外表面。在同一管内,对于不同抗原可以使用不同载体。可选地,所述表面可以是平的,如薄片、测试条等。特定支撑物或载体包括聚苯乙烯珠。本领域技术人员将知道用于结合抗体或抗原的许多其它合适载体,或通过例行试验将能够确定这些载体。

[0289] 当对于具体环境是惯例的或必须的时,其它步骤如清洗、搅动、摇动、过滤等可以加入至所述测定中。

[0290] 如在本文中所定义的,“培养基”指可以用于维持样品以实践本发明的任何培养基,包括但不限于:含有或不含有胎牛(牛)血清的 RPMI 1640,优选地补充有合适的抗生素和谷氨酸盐,以及可选地补充有其它添加剂如抗真菌剂、非必要氨基酸、DTT、丙酮酸钠等。可以用于实践本发明的其它培养基包括但不限于:Eagles 培养基、Dulbecco 培养基、McCoy 培养基、199 培养基、Waymouth 培养基和含有或不含有补充物的无血清培养基。在另一种实施方式中,所述刺激物是没有培养基。

[0291] 本发明同样提供一种治疗癌症的方法,包括对需要的个体施用治疗有效剂量的本

发明抗体。具体地,当用于治疗时,所述抗体与细胞毒素药物连接,或作为用于将毒性物质递送至靶细胞的载体。在本文中,靶细胞是被本发明抗体识别的细胞,它意味着表达肿瘤相关抗原的细胞,并因此与异常生长相关。

[0292] 在另一方面,本发明提供一种用于癌症的诊断、监测治疗功效或评估预后中任意一种的试剂盒,所述试剂盒包括以下成分:

[0293] a、至少一种在本文本发明中描述的抗体或包含其的组合物;以及

[0294] b、用于实现检测样品中抗原存在的说明书,其中所述抗原被所述抗体特异识别。

[0295] 所述试剂盒可以进一步包括至少一种以下成分:

[0296] a、至少一种用于收集被测样品的工具;

[0297] b、至少一种用于检测所述抗原被所述抗体识别所必需的试剂;和

[0298] c、至少一种对照样品。

[0299] 本发明还提供一种用于癌症的诊断和/或评估预后的试剂盒。

[0300] 所述试剂盒实质上用于检测个体中肿瘤抗原特异抗体。所述个体可以是哺乳动物、人或非人类。通常所述个体是人病患、癌症病患或健康个体。

[0301] 在另一方面,本发明还提供一种用于自体免疫疾病的诊断和监测治疗功效以及预后中至少一种的试剂盒,所述试剂盒包括以下成分:

[0302] a、至少一种在本文本发明中描述的抗体,或包含其的组合物;以及

[0303] b、用于实现检测样品中抗原存在的说明书,其中所述抗原被所述抗体特异识别。

[0304] 相似地,所述试剂盒可以进一步包括至少一种以下成分:

[0305] a、至少一种用于收集被测样品的工具;

[0306] b、至少一种用于检测所述抗原被所述抗体识别所必需的试剂;和

[0307] c、至少一种对照样品。

[0308] 在一种实施方式中,任何这样的试剂盒可以是抗体(或识别试剂)捕捉测定试剂盒,如 ELISA 试剂盒,其包括固体支撑物、至少一种如在本文中定义的抗体,以及适当时可选地二抗。所述试剂盒可以进一步可选地包括任何其它必要的试剂,如如上所述的可检测的基团、酶底物和显色剂。所述抗体捕捉诊断试剂盒可选地是免疫印迹试剂盒,通常包括上文所述的成分和试剂。本发明的诊断试剂盒包括的具体试剂和其它成分可以根据所述试剂盒中实践的具体诊断方法选自本领域可用的那些。这样的试剂盒可以用于检测生物学样品中的抗体,所述生物学样品如从个体获得的组织或体液,特别是在培养前和/或后的全血、PBMC 或白细胞。

[0309] 当在本发明的方法中提及合适方法时,所述合适方法可以是免疫亲和方法、酶测定或用于检测结构特征的方法等。

[0310] 当所述合适方法是免疫亲和方法时,所述方法是酶联免疫吸附测定(ELISA)、蛋白质印迹、免疫沉淀、FACS 或任何其它使用本发明描述的抗体的免疫亲和方法中的任意一种。

[0311] 在一种具体的实施方式中,通过捕捉 ELISA 实现检测。

[0312] 捕捉 ELISA(也被认为是“三明治”ELISA)是一种量化皮克至微克量物质(如激素、细胞信号转导化学物质、传染病抗原和细胞因子)的灵敏测定。当需要被分析的物质太稀而不能结合聚苯乙烯微孔板(如在细胞培养上清液中的蛋白)或不能与塑料(如小的有机分子)很好结合时,特别追求这类 ELISA。根据经验确定对于捕捉抗体、样品、对照和检测

抗体的最佳稀释以及孵育周期并需要广泛的滴定。理想地,实验者可以使用酶标记的检测抗体。但是,如果检测抗体是未标记的,所述二抗将不能与包覆抗体或样品交叉反应。应当包括合适的阴性和阳性对照物。

[0313] 所使用的捕捉或包覆抗体应当在碳酸盐-重碳酸盐缓冲液或 PBS 中稀释。代表性地,以  $0.2 \sim 10 \mu\text{g/ml}$  覆盖捕捉抗体。优选地,使用亲和纯化的抗体或最低程度使用 IgG 片段。通常,样品在 PBS 中稀释至  $10\text{ng} \sim 10 \mu\text{g/孔}$  的范围(最敏感的测定,需要更少量的样品)。

[0314] 如在本文说明书中所使用的,术语“可检测的基团”表示任何原子、分子或其一部分,可以直接或间接地监测它们的存在、缺乏或水平。一个实施例包括放射性同位素。其它实施例包括 (i) 可以催化显色或光发射(发光)反应的酶和 (ii) 荧光团。假如可检测的基团本身是可检测的,例如,在荧光团的情况下,可以直接检测可检测的基团。可选地,可以间接检测可检测的基团。在后一种情况下,优先使用与可检测基团反应的其本身可以直接检测的第二种基团。所述可检测基团可以是抗体固有的。例如,抗体的恒定区可以作为间接可检测的基团,具有直接可检测的基团的二抗可以与其特异结合。

[0315] 因此,二抗是在本发明方法中检测所述抗体的特别合适的方法。所述二抗可以是其本身与可检测的基团连接。本发明抗体可以被可检测标记的一种方式是通过将所述抗体与酶连接。当之后与合适的底物接触时,这种酶将与所述底物反应以产生化学基团,所述化学基团可以通过例如分光光度计、荧光方式或视觉方式检测。可以用于可检测地标记所述抗体的酶包括但不限于:辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、苹果酸脱氢酶、葡萄球菌核酸酶、 $\delta$ -5-类固醇异构酶、酵母菌醇脱氢酶、 $\alpha$ -甘油磷酸脱氢酶、磷酸丙糖异构酶、天冬酰胺酶、葡糖氧化酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶、核糖核酸酶、脲酶、过氧化氢酶、葡萄糖 6-磷酸脱氢酶、葡糖淀粉酶和乙酰胆碱酯酶。

[0316] 所述检测可以通过比色方法实现,所述方法使用酶的发色底物。所述检测也可以通过底物与相似制备的标准物的酶反应程度的视觉比较来完成。

[0317] 所述一抗结合的固体支撑物可以是任何不溶于水、不悬浮于水的固体支撑物。合适的固体支撑物的例子包括:如聚苯乙烯的大珠子、滤纸、试管和微孔板。所述一抗可以通过共价结合或吸附的方式与固体支撑物结合。使用固体支撑物的优势是对于固相和液相的分离不需要离心步骤。

[0318] 上述固体支撑物可以包括聚合物如聚苯乙烯、琼脂糖、琼脂糖凝胶、纤维素、玻璃珠和纤维素或其它聚合物的磁性微粒。所述固体支撑物可以是大的或小的珠子或微粒、管子、板的形式或其它形式。

[0319] 作为固体支撑物,优选使用试管或微孔板,它们的内壁覆盖有一抗,如本发明发明人制备的特异抗体或其任何片段或衍生物。

[0320] 本发明方法中使用的“测量”包括估计、定量、计算或推理在特定样品中存在的生物标记物的量。这可以通过测量终点指示完成,所述终点指示例如可以是可检测产物的出现、例如底物水平的任何可检测的变化或产物出现速率的变化或底物的消失;或者通过测量与本发明描述的生物标记物结合的抗体的量完成。

[0321] 在所有所述检测试剂盒中,用于收集被测样品的工具可以是拭子、吸液管或相似的收集工具,且所述孵育方式可以是置于板、试管、玻璃或塑料表面、孔或吸水纸一条带上

的液体或半固体培养基,或相似方式。

[0322] 应当意识到,已经设计了任何版式的试剂盒以使得所述测试在扫描仪上进行并将结果实时输入至计算机中。这将保证可以将全部信息通过邮件直接发送至所有相关人员并且可以完整保存这些信息以用于未来参考。

[0323] 在所述试剂盒的另一种实施方式中,所述样品是任何体液和源自培养物的样品。

[0324] 与本发明抗体接触的样品可以安排在阵列中。

[0325] 本发明的方法和试剂盒中使用的术语“阵列”表示识别试剂,即,至少一种本发明的抗体的“编址”空间排列。所述阵列的每一个“地址”都是包含识别试剂的预定的特异空间区。例如,一个阵列可以是多个容器(试管)、板、微板中的微孔,每一个都包含了不同抗体。阵列也可以是在不同区域(点、线、列)中容纳不同和已知识别试剂(例如,抗体)的任何固体支撑物。所述阵列优选地包括内置的合适对照物,如不含有样品的区域,不含有抗体的区域,不含有二者的区域(即,仅含有溶剂和试剂的区域)和含有被所述抗体识别的合成或分离蛋白或肽的区域(阳性对照)。将在下文连同本发明提供的试剂盒更详细地描述用于本发明阵列的固体支撑物。

[0326] 适用于本发明试剂盒的固体支撑物代表性地基本上不溶于液相。本发明的固体支撑物是但不限于:特定类型的支撑物。更确切地,大量的支撑物可以使用且是本领域技术人员已知的。因此,有用的固体支撑物包括固体和半固体基质,如气凝胶和水凝胶、树脂、珠子、生物芯片(包括薄膜覆盖的生物芯片)、微流控芯片、硅芯片、多孔板(也称为微孔板或微板)、膜、过滤器、导电和不导电的金属、玻璃(包括显微镜载物片)和磁性支撑物。有用的固体支撑物的更具体例子包括硅胶、高分子膜、微粒、衍生的塑料薄膜、玻璃珠、棉花、塑料珠、氧化铝凝胶、多糖如琼脂糖凝胶、尼龙、乳胶珠、磁珠、顺磁性珠、超顺磁性珠、淀粉等。

[0327] 应当进一步注意,本发明任何方法和试剂盒中包括的任何试剂应当以包埋、连结、连接、粘合放置或融合至任何上述固体支撑物材料的试剂提供。

[0328] 应当注意,本发明的方法和试剂盒使用的任何抗体同样可以是多克隆抗体、单克隆抗体、重组抗体,如嵌合抗体或源自本发明抗体的单链抗体(ScFv)。

[0329] 本发明由权利要求书限定,权利要求书的内容应当被认为是包括在说明书公开的内容中。

[0330] 应当理解,本发明公开和描述的内容不限于本文公开的具体实施例、过程步骤和材料,因为这些过程步骤和材料可以稍微变化。同样应当理解,本文使用的术语仅出于描述具体实施方式的目的而使用,并不意味着限制本发明,因为本发明的范围将仅由所附的权利要求书和其等价形式限制。

[0331] 必须应当注意的是,除非另有其它明确的表述,在本说明书和所附的权利要求书中使用的单数形式“一个”、“一种”和“所述”包括复数指示物。

[0332] 除非内容有其他需要,在贯穿本说明书和随后的权利要求书中,词语“包含”和变化形式如“包括”、“含有”应当被理解为暗示包括指定的整数或步骤或整数或步骤的集合,但不是排除任何其它整数或步骤或整数或步骤的集合。

[0333] 以下的实施例代表了本发明人在实现本发明方面中使用的技术。应当意识到,虽然这些技术例示了用于实现本发明的优选实施方式,本领域技术人员根据本发明公开的内容,将意识到可以做出多种修正而不背离本发明计划的范围。

[0334] 除非另有说明,本文使用的所有技术和科学术语具有本发明所属领域的普通技术人员所通常理解的含义。

[0335] 实施例

[0336] 方法

[0337] 一些免疫学技术并没有在本文公开的每一个实施例中详细描述,例如 ELISA,因为它们是本领域技术人员公知的,并在如 Harlow 和 Lane (1988) 抗体:实验室手册,冷泉港实验室中详细描述。

[0338] 普通分子生物学方法

[0339] 一些分子生物学方法并没有在本文中详细描述,因为它们是本领域技术人员公知的。这样的方法包括:PCR、cDNA 的表达、人细胞转染等。描述这些方法的教科书如 Sambrook 等 (1989) 分子克隆,实验室手册,冷泉港实验室, ISBN:0879693096 ;F. M. Ausubel (1988) Current Protocols in Molecular Biology, ISBN:047150338X, John Wiley & Sons, Inc. 此外,一些免疫学技术并没有在本文公开的每一个实施例中详细描述,例如蛋白质印迹,因为它们是本领域技术人员公知的。见,如 Harlow 和 Lane (1988) 抗体:实验室手册,冷泉港实验室。

[0340] ELISA 常规方案

[0341] 通过使用与容易测定的酶连接的抗体或抗原,酶联免疫吸附测定 (ELISA) 结合了抗体的特异性和简单酶测定的灵敏度。ELISA 可以提供了一种实用的抗原或抗体浓度测量方法。ELISA 是一种五步过程:1) 用经过 PBS 稀释的抗原包被微孔板的孔,在 4°C 下过夜孵育并清洗;2) 用 PBS 中的 BSA/FCS 封闭未结合的位点以防止假阳性结果,孵育 1 小时并清洗;3) 向孔中加入抗体,孵育 1 小时并清洗;4) 加入与酶连接的抗人 IgG,孵育 1 小时并清洗;5) 最终,底物与酶的反应产生了有色产物,指示阳性反应。

[0342] FACS 方案

[0343] 1、收获细胞、清洗并在悬浮液中用冰冷 PBS、10% FCS、1% 叠氮化钠调整至  $1-5 \times 10^6$  细胞/ml 的浓度。

[0344] 2、加入 0.1-10  $\mu$ g/ml 的初级标记的抗体。如果需要,在 3% BSA/PBS 中稀释所述抗体。

[0345] 3、在室温或 4°C 下将细胞 + 抗体孵育至少 30 分钟。

[0346] 4、通过在 400g 下离心 5 分钟并在 500  $\mu$ l-1ml 的冰冷 PBS、10% FCS、1% 叠氮化钠中重悬浮清洗细胞三次。

[0347] 5、所述细胞然后准备用于流式细胞仪分析。

[0348] 用于检测 KTPAF50 的 ELISA 方案

[0349] 1、标准曲线:在 PBS (Biological Industries, 目录号 02-023-5A) 中制备梯度稀释的 PRT3,从 2000pg/ml 至 31pg/ml。

[0350] 2、将样品在 37°C 浴中快速解冻。

[0351] 3、将 70  $\mu$ l 的每一种血液样品 (未稀释) 一式两份和 70  $\mu$ l 的标准样品一式三份放置于 Maxisorp96 孔板 (NUNC, F96 Maxisorp, 目录号 442404) 中,并在 4°C 下摇动孵育过夜。

[0352] 4、清洗:用 300  $\mu$ l 的含有 0.05% TW-20 (Amresco, 目录号 0777-1L) 的 PBS 清洗板

4 次。

[0353] 5、封闭：向每个孔中加入 300  $\mu$ l 的封闭缓冲液，封闭缓冲液是含有 5% BSA (MP biomedical, 目录号 160069) 的 PBS, 并在室温下摇动孵育 1 小时。

[0354] 6、清洗：同步骤 4。

[0355] 7、检测：用稀释液（含有 0.05% TW-20、0.1% BSA 的 PBS）以 1 : 250 比例稀释 KTPAF50 特异抗体（亲和纯化的）。向每个孔中加入 100  $\mu$ l 的检测抗体，并在室温下摇动孵育 2 小时。

[0356] 8、清洗：同上述步骤 4。

[0357] 9、HRP 偶联：用稀释液以 1 : 200 比例稀释山羊抗兔 HRP 偶联抗体 (Cell signaling, 目录号 7074)。向每个孔中加入 100  $\mu$ l 的 HRP 偶联物，并在室温下摇动孵育 30 分钟。

[0358] 10、清洗：同上述步骤 4，但清洗 5 次而非 4 次。

[0359] 11、显色：向每个孔中加入 100  $\mu$ l 的 TMB (3,3',5,5' - 四甲基联苯胺，辣根过氧化物酶底物，Millipore, 目录号 ES001-500ML)。加入 50  $\mu$ l 的 2N  $H_2SO_4$  (Frutarom, 目录号 5552540)，显现出蓝色。

[0360] 12、读板：用酶标仪在 450nm 处检测吸光率。

[0361] 多克隆抗体的制备

[0362] 使用制备多克隆抗体的标准方法在兔子中制备多克隆抗体。

[0363] 在制备 KTPAF50 特异的多克隆抗体中使用的抗原是对应于 KTPAF50 蛋白 C-末端的最后 14 个氨基酸的肽 (EKGAAFSPIYPRRK)，所述肽对应的序列指定为 SEQ ID NO. 3。

[0364] 图 1 显示了 KTPAF50 特异抗体对它的抗原的特异性的曲线。

[0365] KTPAF50 特异的单克隆抗体的制备和校准

[0366] 抗 KTPAF50 单克隆抗体由 Genemed Synthesis 有限公司 (San Antonio, TX, 美国) 根据抗体领域技术人员已知的标准方法定制。通过 ELISA 进行抗体亲和力的校准，如下：

[0367] 1、用 PBS 将 KTPAF50 肽稀释至 1000、500、100 和 0ng/ml 以产生校准曲线。在两块 MAXISORP™ ELISA Nunc Immuno™ 板 (Nunc#442404) 上一式两份将这些浓度放置 30 份。在 4°C 下将这些板缓慢摇动孵育过夜。

[0368] 2、孵育后，用含有 0.05% 吐温 20 的 PBS (300  $\mu$ l/孔) 将板清洗 4 次。

[0369] 3、向每个孔加入 300  $\mu$ l 的含有 1% BSA 的 PBS 以封闭孔，然后在 4°C 下缓慢摇动孵育过夜。

[0370] 4、孵育后，按照步骤 2 的描述清洗板。将 100  $\mu$ l 的 30 种单克隆 KTPAF50 抗体每一种一式两份加入至每一个 KTPAF50 稀释曲线中。作为对照，在每一块板上放置一份多克隆 KTPAF50 抗体 (1 : 250 稀释)，并将板在 37°C 下孵育 1 小时。

[0371] 5、孵育后，如步骤 2 的描述清洗板。向每一个孔中加入 50  $\mu$ l 的用含有 0.1% BSA、0.05% 吐温 20 的 PBS 以 1 : 200 比例稀释的过氧化物酶 - 亲和纯化的山羊抗小鼠 IgG (Jackson ImmunoResearch#115-035-206)。将板在 37°C 下孵育 1 小时。

[0372] 6、孵育后，如步骤 2 中的描述清洗板。向每个孔中加入 100  $\mu$ l 的 TMB/E (Millipore#ES001-500ML)，并在 37°C 下孵育 15 分钟。

[0373] 7、向每个孔中加入 50  $\mu$ l 的 2N  $H_2SO_4$ 。

- [0374] 8、用酶标仪在 450nm 处读板。
- [0375] TDS 方法（来自 eBioscience™）
- [0376] 1、用 100  $\mu$  l/ 孔的含有捕捉抗体的包被缓冲液包被康宁 9018ELISA 板（如在分析检验中所说明的进行稀释，其包括有成套试剂）。将板密封并在 4℃ 下孵育过夜。
- [0377] 2、抽吸孔并用多于 250  $\mu$  l/ 孔的清洗缓冲液将孔清洗 5 次。在每个清洗步骤中流出湿透的时间（ $\sim$  1 分钟）增加清洗的效力。用吸水纸从板中移除残留的缓冲液。
- [0378] 3、用 4 份 DI 水稀释 1 份 5 $\times$  浓缩的测定稀释液。用 200  $\mu$  l/ 孔的 1 $\times$  测定稀释液封闭孔，并在室温下孵育 1 小时。
- [0379] 4、重复清洗 5 次。
- [0380] 5、对于标准曲线，向合适的孔中加入 100  $\mu$  l/ 孔的稀释标准物，并由最优标准物制备 2 倍梯度稀释物以制备标准曲线。向合适的孔中加入 100  $\mu$  l/ 孔的样品。将板覆盖或密封并在室温下孵育 2 小时（或在 4℃ 下孵育过夜以达到最大灵敏度）。
- [0381] 6、重复清洗 5 次。
- [0382] 7、加入 100  $\mu$  l/ 孔的用 1 $\times$  测定稀释液 \* 稀释的检测抗体。将板密封并在室温下孵育 1 小时。
- [0383] 8、重复清洗 5 次。
- [0384] 9、加入 100  $\mu$  l/ 孔的用 1 $\times$  测定稀释液 \* 稀释的抗生物素蛋白 -HRP\*。将板密封并在室温下孵育 30 分钟。
- [0385] 10、在最后一次清洗中，在抽吸前用清洗缓冲液将孔湿透 1-2 分钟，并总共重复清洗 7 次。
- [0386] 11、向每个孔中加入 50  $\mu$  l 的终止溶液、100  $\mu$  l/ 孔的底物溶液。将板在室温下孵育 15 分钟并用 50  $\mu$  l 的终止溶液终止反应。
- [0387] 12、在 450nm 处读板。如果可以使用波长减少，从 450nm 的值减去 570nm 的值，并分析数据。
- [0388] 用于 Thawing Poietics® 细胞的方案
- [0389] DNA 酶 I 可以防止培养细胞和单核细胞的丛生，且将 DNA 酶 I 加入至培养基中。
- [0390] 1、将冷冻细胞的小瓶在 37℃ 水浴中迅速解冻。
- [0391] 2、最大量 2ml 的细胞悬浮液无菌转移至 50ml 的圆锥管中。
- [0392] 3、用 1ml 预热的含有 10% FBS 或 1% BSA, 和 20U/ml 的 DNA 酶 I 的培养基冲洗小瓶。
- [0393] 4、总体积是 5ml, 每次加入几滴培养基后轻柔旋转（= 3 分钟）。
- [0394] 5、通过逐滴加入 1ml-2ml 体积的培养基以提高体积，每次加入培养基后轻柔旋转（= 5-10 分钟）。
- [0395] 6、在室温下，将细胞悬浮液在 200 $\times$ g 下离心 15 分钟。
- [0396] 7、用残留的培养基轻柔地再悬浮细胞小球。
- [0397] 8、通过加入 1ml-2ml 体积的培养基用清洗培养基慢慢提升体积以填满管子，每次加入培养基后轻柔旋转。
- [0398] 9、在室温下，将细胞悬浮液在 200 $\times$ g 下离心 15 分钟。
- [0399] 10、小心地移除 2ml 的清洗物并用残留的 2ml 培养基轻柔地重悬浮细胞小球。计

数细胞。如果细胞计数低于期望值,如果需要可以对步骤 7 得到的上清液进行进一步清洗并合并细胞。

[0400] 11、将细胞在 37°C 下、在 5% 的 CO<sub>2</sub> 中静止 1 小时,再一次计数,然后进行培养。

[0401] \* 对于添加 DNA 酶,应当制备 20ml 的含有 10% FBS 和 20U/ml 的 DNA 酶 I (Sigma D 4513) 的培养基。含有 DNA 酶的培养基用于稀释细胞。

[0402] 动物

[0403] 从 Harlan Israel 购得 Balb/C 小鼠。

[0404] 在本申请中涉及的序列

[0405]

SEQ. ID. No.	序列	描述
SEQ. ID. No.1	LRRREQAERGSRRCAIAGEERAMLSP SPLPETPFSPEKGAAFSPYPRRK	全长 KTPAF50 (无信号肽)
SEQ. ID. No.2	MPGHSRLLSILVSGLCVVGSSIGVLRR REQAERGSRRCAIAGEERAMLSPSPL PETPFSPEKGAAFSPYPRRK	全长 KTPAF50
SEQ. ID. No.3	EKGAAFSPYPRRK	C-末端肽
SEQ. ID. No.4	LRRREQAERGSRRCAIAGEERAMLSP SPLPETPFS	N-末端肽
SEQ. ID. No.5	LRRREQAERGSRRCA	N-末端肽
SEQ. ID. No.6	PEKGAAFSPYPRRK	C-末端肽
SEQ. ID. No.7	CAIAGEERAMLSPSP	肽氨基酸 38-52

[0406] 实施例 1 :人血液样品中 KTPAF50 的检测

[0407] 从 Asterand ® 获得 50-65 岁的男性和女性的 19 份人血清样品 :9 份样品来自患有肺癌的病患,10 份样品来自健康个体。所有的样品保存在 -80°C 直至使用。

[0408] 使用多克隆抗 KTPAF50 抗体检测血液样品中 KTPAF50 蛋白的存在。如可以在图 2 中所见到的,KTPAF50 的表达在肺癌样品中明显更高。

[0409] 因此,抗 KTPAF50 抗体可以用作检测肺癌的诊断方式。

[0410] 实施例 2 :抗 KTPAF50 的特异单克隆抗体的产生

[0411] 使用 KTPAF50 肽 (见下表的抗原 1、2 或 3) 或全长 KTPAF50 蛋白作为抗原产生 KTPAF50 特异单克隆抗体。抗原在下列表 1 中描述。抗原 2 基本上同样用于制备多克隆抗体,在它的 N- 末端具有脯氨酸并且在它的 C- 末端具有半胱氨酸。所述抗体委托 Genemed Synthesis 有限公司 (San Antonio, TX, 美国) 制备。

[0412] 表 1 :用于生产单克隆抗体的抗原

[0413]

抗原	名称	SEQ.ID.NO.	序列
抗原 1	1 号肽	SEQ.ID.NO.5	LRRREQAERGSRRRC
抗原 2	2 号肽	SEQ.ID.NO.6	PEKGAAFSPYPRRK
抗原 3	3 号肽	SEQ.ID.NO.7	CAIAGEERAMLSPSP
抗原 4	蛋白 81869	SEQ.ID.NO.1	LRRREQAERGSRRRC CAIAGEERAML SPSPLPETPFSPEKGAAFSPYPRRK

[0414] 由 Genemed Synthesis 有限公司 (SanAntonio, TX, 美国) 制备了 30 种不同的单克隆抗体并检验了它们对 KTPAF50 的亲合力。

[0415] 表 2 概述了每一种杂交瘤的抗原特异性。

[0416] 表 2 :杂交瘤的抗原特异性

[0417]

杂交瘤	抗原
2B6A3	抗原 2 (SEQ. ID NO. 6)
2B6A12	抗原 2 (SEQ. ID NO. 6)
2B6G2	抗原 2 (SEQ. ID NO. 6)
2B6H1	抗原 2 (SEQ. ID NO. 6)
5E11B5	抗原 2 (SEQ. ID NO. 6)
5E11B8	抗原 2 (SEQ. ID NO. 6)
5E11H3	抗原 2 (SEQ. ID NO. 6)
5E11H5	抗原 2 (SEQ. ID NO. 6)
3E1F9	抗原 2 (SEQ. ID NO. 6)
3E1F11	抗原 2 (SEQ. ID NO. 6)
3E1G4	抗原 2 (SEQ. ID NO. 6)
3E1G6	抗原 2 (SEQ. ID NO. 6)
2A8B8	抗原 2 (SEQ. ID NO. 6)
2A8B12	抗原 2 (SEQ. ID NO. 6)
2A8H7	抗原 2 (SEQ. ID NO. 6)

6E2B6	抗原 3 (SEQ. ID NO. 7)
6E2C5	抗原 3 (SEQ. ID NO. 7)
6E2C9	抗原 3 (SEQ. ID NO. 7)
6E2D4	抗原 3 (SEQ. ID NO. 7)
7D4D6	抗原 3 (SEQ. ID NO. 7)
7D4E12	抗原 3 (SEQ. ID NO. 7)
7D4F9	抗原 3 (SEQ. ID NO. 7)
7D4H10	抗原 3 (SEQ. ID NO. 7)
6F5A1	抗原 3 (SEQ. ID NO. 7)
6F5B6	抗原 3 (SEQ. ID NO. 7)
6F5C9	抗原 3 (SEQ. ID NO. 7)
6F5C12	抗原 3 (SEQ. ID NO. 7)
3E3B3	抗原 3 (SEQ. ID NO. 7)
3E3C8	抗原 3 (SEQ. ID NO. 7)
3E3G7	抗原 3 (SEQ. ID NO. 7)

[0418]

[0419] 表 3 中概述了每一种单克隆抗体的亲和力校准曲线的结果。

[0420] 表 3 :抗 KTPAF50 单克隆抗体的校准

[0421]

MAB 1 (6E2B6)					MAB 2 (6E2C5)				
KTPAF50 (ng/ml)	1	2	平均-零	STD dev	KTPAF50 (ng/ml)	1	2	平均-零	STD dev
<b>1000</b>	0.616	0.555	0.065	72	<b>1000</b>	0.455	0.61	0.159	183
<b>500</b>	0.613	0.329	-0.050	335	<b>500</b>	0.205	0.209	-0.167	5
<b>100</b>	0.518	0.319	-0.102	235	<b>100</b>	0.173	0.173	-0.201	0
<b>0</b>	0.662	0.379	0.521	334	<b>0</b>	0.378	0.369	0.374	11
MAB 3 (6E2C9)					MAB 4 (6E2D4)				
KTPAF50 (ng/ml)	1	2	平均-零	STD dev	KTPAF50 (ng/ml)	1	2	平均-零	STD dev
<b>1000</b>	0.903	1.073	0.468	200	<b>1000</b>	1.1	1.135	0.744	41
<b>500</b>	0.219	0.209	-0.307	12	<b>500</b>	0.233	0.199	-0.158	40
<b>100</b>	0.173	0.21	-0.329	44	<b>100</b>	0.299	0.177	-0.136	144
<b>0</b>	0.426	0.355	0.391	84	<b>0</b>	0.274	0.261	0.268	15
MAB 5 (7D4D6)					MAB 6 (7D4E12)				
KTPAF50 (ng/ml)	1	2	平均-零	STD dev	KTPAF50 (ng/ml)	1	2	平均-零	STD dev
<b>1000</b>	1.076	1.222	0.925	172	<b>1000</b>	1.101	1.026	0.731	88
<b>500</b>	0.223	0.295	0.035	85	<b>500</b>	0.38	0.461	0.088	95
<b>100</b>	0.178	0.175	-0.048	4	<b>100</b>	0.224	0.328	-0.057	123
<b>0</b>	0.204	0.245	0.225	48	<b>0</b>	0.23	0.436	0.333	243

[0422]

MAB 7 (7D4F9)					MAB 8 (7D4H10)				
KTPAF50 (ng/ml)	1	2	平均-零	STD dev	KTPAF50 (ng/ml)	1	2	平均-零	STD dev
1000	0.812	0.474	0.419	398	1000	0.437	0.498	0.135	72
500	0.405	0.147	0.052	304	500	0.148	0.128	-0.195	24
100	0.211	0.147	-0.046	75	100	0.098	0.102	-0.233	5
0	0.398	0.189	0.294	246	0	0.161	0.115	0.138	54
MAB 9 (6F5A1)					MAB 10 (6F5B6)				
KTPAF50 (ng/ml)	1	2	平均-零	STD dev	KTPAF50 (ng/ml)	1	2	平均-零	STD dev
1000	0.655	0.751	0.521	113	1000	0.693	0.493	0.433	236
500	0.142	0.13	-0.046	14	500	0.158	0.178	0.007	24
100	0.135	0.126	-0.052	11	100	0.135	0.145	-0.021	12
0	0.2	0.164	0.182	42	0	0.183	0.138	0.161	53
MAB 11 (6F5C9)					MAB 12 (6F5C12)				
KTPAF50 (ng/ml)	1	2	平均-零	STD dev	KTPAF50 (ng/ml)	1	2	平均-零	STD dev
1000	0.476	0.659	0.386	216	1000	3.147	3.168	2.997	25
500	0.197	0.224	0.029	32	500	2.468	2.501	2.324	39
100	0.155	0.184	-0.013	34	100	2.874	2.656	2.605	257
0	0.155	0.162	0.159	8	0	0.197	0.743	0.470	643
MAB 13 (3E3B3)					MAB 14 (3E3C8)				
KTPAF50 (ng/ml)	1	2	平均-零	STD dev	KTPAF50 (ng/ml)	1	2	平均-零	STD dev
1000	???	???	#DIV/0!	#DIV/0!	1000	???	???	#DIV/0!	#DIV/0!
500	???	???	#DIV/0!	#DIV/0!	500	???	???	#DIV/0!	#DIV/0!
100	???	???	#DIV/0!	#DIV/0!	100	4.063	4.104	3.710	0.029
0	0.711	0.209	0.460	0.355	0	0.145	0.126	0.136	0.013
MAB 15 (3E3G7)					MAB 16 (2B6A3)				
KTPAF50 (ng/ml)	1	2	平均-零	STD dev	KTPAF50 (ng/ml)	1	2	平均-零	STD dev
1000	???	???	#DIV/0!	#DIV/0!	1000	0.436	0.304	-0.004	0.093
500	???	???	#DIV/0!	#DIV/0!	500	0.105	0.1	-0.271	0.004
100	3.959	3.918	3.418	0.029	100	0.098	0.104	-0.273	0.004

[0423]

0	0.131	0.125	0.128	0.004	0	0.118	0.116	0.117	0.001
<b>MAB 17 (2B6A12)</b>					<b>MAB 18 (2B6G2)</b>				
KTPAF50 (ng/ml)	1	2	平均-零	STD dev	KTPAF50 (ng/ml)	1	2	平均-零	STD dev
1000	0.301	0.285	0.069	0.011	1000	0.389	0.57	0.147	0.128
500	0.12	0.125	-0.102	0.004	500	0.152	0.35	-0.082	0.140
100	0.108	0.106	-0.118	0.001	100	0.143	0.363	-0.080	0.156
0	0.133	0.124	0.129	0.006	0	0.203	0.487	0.345	0.201
<b>MAB 19 (2B6H1)</b>					<b>MAB 20 (5E11B5)</b>				
KTPAF50 (ng/ml)	1	2	平均-零	STD dev	KTPAF50 (ng/ml)	1	2	平均-零	STD dev
1000	0.41	0.295	0.128	0.081	1000	0.381	0.331	0.023	0.035
500	0.233	0.316	0.050	0.059	500	0.297	0.313	-0.028	0.011
100	0.223	0.244	0.009	0.015	100	0.312	0.238	-0.058	0.052
0	0.244	0.374	0.309	0.092	0	0.259	0.221	0.240	0.027
<b>MAB 21 (5E11B8)</b>					<b>MAB 22 (5E11H3)</b>				
KTPAF50 (ng/ml)	1	2	平均-零	STD dev	KTPAF50 (ng/ml)	1	2	平均-零	STD dev
1000	0.435	0.404	0.238	0.022	1000	0.483	0.463	0.313	0.014
500	0.53	0.405	0.286	0.088	500	0.444	0.451	0.287	0.005
100	0.291	0.256	0.092	0.025	100	0.311	0.274	0.132	0.026
0	0.3	0.203	0.252	0.069	0	0.218	0.282	0.250	0.045
<b>MAB 23 (5E11H5)</b>					<b>MAB 24 (3E1F9)</b>				
KTPAF50 (ng/ml)	1	2	平均-零	STD dev	KTPAF50 (ng/ml)	1	2	平均-零	STD dev
1000	0.369	0.437	0.221	0.048	1000	0.354	0.377	0.205	0.016
500	0.357	0.376	0.185	0.013	500	0.484	0.369	0.266	0.081
100	0.276	0.288	0.100	0.008	100	0.462	0.336	0.239	0.089
0	0.222	0.297	0.260	0.053	0	0.433	0.364	0.399	0.049
<b>MAB 25 (3E1F11)</b>		<b>MAB 26 (3E1G4)</b>		<b>MAB 27 (3E1G6)</b>		<b>MAB 28 (2A8B8)</b>			
KTPAF50 (ng/ml)	1	KTPAF50 (ng/ml)	1	KTPAF50 (ng/ml)	1	KTPAF50 (ng/ml)	1		
1000	0.37	1000	0.293	1000	0.254	1000	0.156		
500	0.293	500	0.273	500	0.232	500	0.422		

	<b>100</b>	0.355	<b>100</b>	0.246	<b>100</b>	0.183	<b>100</b>	0.208
	<b>0</b>	0.655	<b>0</b>	0.676	<b>0</b>	0.652	<b>0</b>	0.651
	<b>MAB 29 (2A8B12)</b>		<b>MAB 30 (2A8H7)</b>					
[0424]	KTPAF50 (ng/ml)	1	KTPAF50 (ng/ml)	1				
	<b>1000</b>	0.666	<b>1000</b>	0.285				
	<b>500</b>	0.379	<b>500</b>	0.694				
	<b>100</b>	0.326	<b>100</b>	0.232				
	<b>0</b>	0.696	<b>0</b>	0.88				

[0425] \* ??? 表示所述值高于仪器的范围

[0426] 实施例 3 : 单克隆 KTPAF50 抗体对雌性 Balb/C 脾细胞的生存能力的作用

[0427] 检测了 30 种 KTPAF50 特异单克隆抗体对脾细胞生存能力的作用。使用刃天青测定检测生存能力。

[0428] 方法：

[0429] 1、收获一只雌性 Balb/C(20 周)的脾，用 1×RBC 裂解缓冲液 (eBioscience#00-4333) 裂解红细胞。

[0430] 2、将所述细胞分至两个 F96MicroWell™ 板 (Nunc#167008)。将在 200 μl 核型培养基 (Biological industries 01-201-1B) 中的 50,000 个细胞置于每一块板的 5×5 个孔中。将所述细胞在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 下孵育 24 小时。

[0431] 3、孵育后，向每一个孔中加入以下物质，一式五份：

[0432] a、对照 (抗 p53 抗体 [Santa Cruz CS-65334]-10 μl)

[0433] b、100ng/ml KTPAF50

[0434] c、1000ng/ml KTPAF50

[0435] d、15 μl 的 α-KTPAF501 (杂交瘤 3E3G7)

[0436] e、15 μl 的 α-KTPAF502 (杂交瘤 5E11H3)。

[0437] 4、在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 下，第一块板孵育 24 小时，第二块板孵育 48 小时。

[0438] 孵育之后，向每一个孔中加入 20 μl 的刃天青 (R&D systems#AR002)，并使用酶标仪在 4 小时和 24 小时检测所述孔的荧光 (530/590nm)。

[0439] 所述结果在图 3A-3C 中显示。基本上，在用 3E3G7 和 5E11H3 处理的培养物中，在处理 24 小时之后和用刃天青孵育 4 小时之后，细胞的生存能力分别减少至 54% 和 58% (图 6A)。在用 3E3G7 和 5E11H3 处理的培养物中，在用刃天青孵育 24 小时之后，细胞的生存能力减少得甚至更显著，分别减少至 29% 和 35% (图 6B)。

[0440] 用 KTPAF50 特异抗体处理 48 小时，细胞生存能力的减少水平与 24 小时处理的水平相似 (图 6C)。

[0441] 所述结果清楚地显示了抗 KTPAF50 单克隆抗体可以显著地减少 Balb/C 脾细胞的生存能力,说明 KTPAF50 在保持小鼠脾细胞的生存能力中起关键作用。用特异单克隆抗体消除 KTPAF50 活性可以作为治疗小鼠中诱导的自体免疫疾病的非常有利的工具。相似地, KTPAF50 特异单克隆抗体可以用于人临床试验。

[0442] 实施例 4:单克隆 KTPAF50 抗体对 C57/ 黑鼠脾细胞生存能力的作用

[0443] 检测了 30 种 KTPAF50 特异单克隆抗体对脾细胞生存能力的作用。使用刃天青测定检测生存能力。

[0444] 方法:

[0445] 1、收获一只雌性和一只雄性 C57/ 黑鼠 (8 周) 的脾,用  $1 \times$ RBC 裂解缓冲液 (eBioscience#00-4333) 裂解红细胞。

[0446] 2、将所述细胞分至两个 F96MicroWell™ 板 (Nunc#167008)。将在  $200 \mu$ l 核型培养基 (Biological industries 01-201-1B) 中的 50,000 个细胞置于每一块板的  $5 \times 5$  个孔中。将所述细胞在  $37^\circ\text{C}$ 、 $5\%$   $\text{CO}_2$  下孵育 24 小时。

[0447] 3、孵育后,向每一个孔中加入以下物质,一式五份:

[0448] a、对照 (抗 p53 抗体 [Santa Cruz CS-65334]- $10 \mu$ l)

[0449] b、 $15 \mu$ l 的抗 KTPAF50 抗体 1 (抗体 5E11H3)

[0450] c、 $15 \mu$ l 的抗 KTPAF50 抗体 2 (抗体 3E3G7)

[0451] d、 $100\text{ng/ml}$  KTPAF50

[0452] e、 $500\text{ng/ml}$  KTPAF50。

[0453] 4、在  $37^\circ\text{C}$ 、 $5\%$   $\text{CO}_2$  下,第一块板孵育 24 小时,第二块板孵育 48 小时,第三块板孵育 72 小时。

[0454] 5、孵育之后,向每一个孔中加入  $20 \mu$ l 的刃天青 (R&D systems#AR002),并使用酶标仪在 4 小时和 24 小时检测荧光 ( $530/590\text{nm}$ )。

[0455] 所述结果显示在图 7A-7F 中。基本上,在用 5E11H3 和 3E3G7 处理的培养物中,在处理 24 小时之后和用刃天青孵育 24 小时之后,来自雄性的细胞的生存能力减少至  $36\%$  (图 4A),在用 5E11H3 和 3E3G7 处理的培养物中,来自雌性的细胞的生存能力分别减少至  $52\%$  和  $58\%$  (图 4B)。用 KTPAF50 特异抗体处理 48 小时,来自雄性和雌性的细胞的细胞生存能力减少的水平与来自雌性细胞处理 24 小时的水平相当 (图 4C 和 4D)。

[0456] 用所述抗体延长处理 (处理 72 小时) 并没有表现出进一步减少细胞的生存能力 (图 4E 和 4F)。

[0457] 所述结果清楚地显示了抗 KTPAF50 单克隆抗体可以显著地减少 C57B1/6 脾细胞的生存能力,说明 KTPAF50 在保持小鼠脾细胞的生存能力中起关键作用。用特异单克隆抗体消除 KTPAF50 活性可以作为治疗小鼠中诱导的自体免疫疾病的非常有利的工具。相似地, KTPAF50 特异单克隆抗体可以用于人临床试验。

[0458] 实施例 5

[0459] 进一步用 KTPAF50 抗体处理,使用 ELISA 测定评估细胞中上清液中 KTPAF50 的存在。

[0460] 方法:

[0461] 1、将来自 A 阶段的 24 小时对照样品 (方法中的步骤 4) 放置在 Maxisorp 酶标板

上 (Maxisorp#442404)。每孔 100  $\mu$  l, 一式三份。作为零对照, 同样放置核型培养基, 一式三份。同样放置梯度稀释的 PRT3 (2000-63pg/ml) 用于量化。将板在 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜。

[0462] 2、在孵育后, 用多吸液管使用 300  $\mu$  l 含有 0.05% TW-20 (Amresco #0777-1L) 的 PBS 将板清洗 4 次。

[0463] 3、使用含有 5% BSA (MP biomedical#160069) 的 PBS 封闭所述板。每孔中加入 300  $\mu$  l。在室温下摇动孵育 1 小时。

[0464] 4、如步骤 2 的描述清洗所述板。

[0465] 5、用稀释液 (含有 0.05% TW-20、0.1% BSA 的 PBS) 以 1 : 250 的比例稀释 PRT3 多克隆抗体 (亲和纯化的)。向每孔中加入 100  $\mu$  l 抗体。将板在室温下摇动孵育 2 小时。

[0466] 6、如步骤 2 的描述清洗所述板。

[0467] 7、用稀释液以 1 : 200 比例稀释山羊抗兔 HRP 偶联抗体 (Cell signaling, 7074)。向每个孔中加入 100  $\mu$  l 的 HRP 偶联物。将板在室温下摇动孵育 30 分钟。

[0468] 8、如步骤 2 的描述清洗所述板, 但清洗 5 次而非 4 次。

[0469] 9、向每个孔中加入 100  $\mu$  l 的 TMB (Millipore<sup>TM</sup>, ES001-500ML)。显色后, 加入 50  $\mu$  l 的 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Frutarom, 5552540) 以终止反应。

[0470] 10、用酶标仪在 450nm 处读板。

[0471] 所述结果在图 5 中显示, 证实了上清液中 mKTPAF50 的存在。

[0472] 实施例 6 : 单克隆 KTPAF50 抗体对人单核细胞的作用

[0473] 分析了 KTPAF50 抗体对人单核细胞的细胞生存能力、细胞因子表达、上清液中 KTPAF50 蛋白的存在和细胞形态的作用。

[0474] A、使用刃天青测定检测细胞生存能力。

[0475] 方法 :

[0476] 1、根据正式方法 (见附录 B) 复苏人外周血单核细胞 (HPBMC) (Lonza#CC-2702) 并在外周血核型培养基 (Biological industries#01-201-1B) 中培养。

[0477] 2、将所述细胞分至两块 F96 MicroWell<sup>TM</sup> 板 (Nunc#167008)。将在 200  $\mu$  l 核型培养基中的 50,000 个细胞置于每一块板的 4 $\times$ 5 个孔中。将所述细胞在 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 下孵育 24 小时。

[0478] 3、孵育后, 向每一个孔中加入以下物质, 一式四份 :

[0479] a、对照 (抗 p53 抗体 [Santa Cruz CS-65334]-10  $\mu$  l)

[0480] b、10  $\mu$  l 的抗 KTPAF50 抗体 1 (5E11H3)

[0481] c、25  $\mu$  l 的抗 KTPAF50 抗体 1 (5E11H3)

[0482] d、10  $\mu$  l 的抗 KTPAF50 抗体 2 (3E3G7)

[0483] e、25  $\mu$  l 的抗 KTPAF50 抗体 2 (3E3G7)。

[0484] 4、在 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 下, 将第一块板孵育 24 小时, 第二块板孵育 48 小时。

[0485] 孵育后, 向每个孔中加入 20  $\mu$  l 的刃天青 (R&D systems#AR002), 并使用酶标仪在 2、4 和 24 小时 (孵育 24 小时后) 或在 2 或 4 小时 (孵育 48 小时后) 测量荧光值 (530/590nm)。所述结果分别显示在图 6A-6C 和 7A-7B 中。

[0486] B、用抗 KTPAF50 抗体处理后, 使用 ELISA 测定分析培养基 (上清液) 中细胞因子表达的变化。

[0487] 方法：

[0488] 1、根据复苏方法（见上）复苏人外周血单核细胞（HPBMC）（Lonza #CC-2702）并在外周血核型培养基（Biological industries 01-201-1B）中培养所述细胞。

[0489] 2、将所述细胞分至 4 个 6 孔 Multidishes 板（Nunc#140675）。在每个孔中，将 1M 细胞加入至 2ml 核型培养基中。将细胞在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 下孵育 24 小时。

[0490] 3、孵育后，向每个孔中加入以下物质：

[0491] a、对照

[0492] b、100 μl 的抗 KTPAF50 抗体 1 (5E11H3)

[0493] c、10 μl 的抗 KTPAF50 抗体 2 (3E3G7)

[0494] d、100ng/ml KTPAF50

[0495] e、500ng/ml KTPAF50

[0496] f、1000ng/ml KTPAF50。

[0497] 4、在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 下，将所述板孵育 24、48、120 和 144 小时。

[0498] 5、孵育后，将板置于冰上，收集样品并将样品在 300G 下离心 10 分钟。取出培养基（上清液）以用于 ELISA 测定。

[0499] 6、将样品置于 Maxisorp 酶标板（Nunc#442404）上以用于 ELISA 测定。根据生产商的指示（TDS 方法，见上），下述 ELISA 试剂盒用于检测各自的细胞因子。

[0500] a、人 TNF-α (eBioscience™#88-7346)。1 : 10 稀释样品。

[0501] b、人 IFN-γ (eBioscience™#88-7316)。1 : 10 稀释样品。

[0502] c、人 IL-10 (eBioscience™#88-7106)。1 : 6 稀释样品。

[0503] d、PRT-3。样品不稀释。

[0504] 用抗 KTPAF50 抗体处理 24 小时或 48 小时，TNF-α 表达没有变化（图 8B-8C），但是处理 120 小时，明显减低（图 8D）；且在 144 小时处理中，使用抗体 5E11H3 发生降低（图 8E）。

[0505] 使用抗 KTPAF50 抗体处理后，IFN-γ 表达降低，且该降低随时间增强（图 9B-9E）。

[0506] 用抗 KTPAF50 抗体处理抑制了 IL-10 的表达（图 10A-10D）。

[0507] 这些结果强烈地证明了 KTPAF50 特异抗体可以下调由人外周血白细胞分泌的人促炎性细胞因子，如 TNF-α 和 IFN-γ。因此，本文提供的单克隆抗体是治疗人自体免疫疾病、移植排斥和其它相似状况的潜在药物候选物。

[0508] C、使用 ELISA 测定分析培养基中 KTPAF50 的存在。

[0509] 方法：

[0510] 1、将来自 B 阶段的两种对照样品（方法中的步骤 6）放置在 Maxisorp 酶标板上（Maxisorp#442404）。每孔 100 μl，一式三份。作为零对照，同样放置核型培养基，一式三份。将板在 4°C 下孵育过夜。

[0511] 2、在孵育后，用多吸液管使用 300 μl 含有 0.05% TW-20 (Amresco#0777-1L) 的 PBS 将板清洗 4 次。

[0512] 3、使用含有 5% BSA (MP biomedical#160069) 的 PBS 封闭所述板。每孔中加入 300 μl。在室温下摇动孵育 1 小时。

[0513] 4、如步骤 2 的描述清洗所述板。

[0514] 5、用稀释液（含有 0.05% TW-20、0.1% BSA 的 PBS）以 1 : 250 的比例稀释 KTPAF50 多克隆抗体（亲和纯化的）。向每孔中加入 100  $\mu$  l 抗体。将板在室温下摇动孵育 2 小时。

[0515] 6、如步骤 2 的描述清洗所述板。

[0516] 7、用稀释液以 1 : 200 比例稀释山羊抗兔 HRP 偶联抗体 (Cell signaling#7074)。向每个孔中加入 100  $\mu$  l 的 HRP 偶联物。将板在室温下摇动孵育 30 分钟。

[0517] 8、如步骤 2 的描述清洗所述板，但清洗 5 次而非 4 次。

[0518] 9、向每个孔中加入 100  $\mu$  l 的 TMB (Millipore™#ES001-500ML)。显色后，加入 50  $\mu$  l 的 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Frutarom#5552540) 以终止反应。

[0519] 10、用酶标仪在 450nm 处读板。

[0520] 所述结果在图 11 中显示，证实了上清液中 KTPAF50 的存在。

[0521] D、通过光学显微镜分析用抗 KTPAF50 抗体处理后，人单核细胞的形态变化

[0522] 方法：

[0523] 1、根据复苏方法（见上）复苏人外周血单核细胞 (HPBMC) (Lonza#CC-2702) 并在外周血核型培养基 (Biological industries 01-201-1B) 中培养所述细胞。

[0524] 2、将所述细胞分至 4 个 6 孔 Multidishes 板 (Nunc#140675)。在每个孔中，将 1M 细胞加入至 2ml 核型培养基中。将细胞在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 下孵育 24 小时。

[0525] 3、孵育后，向每个孔中加入以下物质：

[0526] a、对照；

[0527] b、100  $\mu$  l 的抗 KTPAF50 抗体 1 (5E11H3)

[0528] c、10  $\mu$  l 的抗 KTPAF50 抗体 2 (3E3G7)

[0529] d、100ng/ml KTPAF50

[0530] e、500ng/ml KTPAF50

[0531] f、1000ng/ml KTPAF50。

[0532] 4、在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 下，将所述板孵育 120 小时，并使用光学显微镜（放大倍数  $\times$ 100）和 CCD 照相机显像（图 15A-15F）。

[0533] 用 PHA 处理的人外周血细胞增殖，导致细胞大量丛生。所述结果清楚地显示了在 PHA 处理之后，用抗 KTPAF50 单克隆抗体处理，观察到完全抑制了这些细胞的增殖。这使得本发明提供的抗体可以作为调节增殖的有力工具，以及作为用于涉及细胞不期望的增殖的任何状况如癌症、涉及炎性过程的疾病等的治疗剂。

[0001]

## 序列表

<110> 两合生物科技有限公司  
 <120> 新抗体及它们在治疗和诊断方法中的应用  
 <130> FP1V111483ZL/ILLU/RR  
 <150> IL 199618  
 <151> 2009-06-29  
 <160> 7  
 <170> PatentIn version 3.3  
 <210> 1  
 <211> 50  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <400> 1  
 Leu Arg Arg Arg Glu Gln Ala Glu Arg Gly Ser Arg Arg Cys Ala Ile  
 1 5 10 15  
 Ala Gly Glu Glu Arg Ala Met Leu Ser Pro Ser Pro Leu Pro Glu Thr  
 20 25 30  
 Pro Phe Ser Pro Glu Lys Gly Ala Ala Phe Ser Pro Ile Tyr Pro Arg  
 35 40 45  
 Arg Lys  
 50  
 <210> 2  
 <211> 74  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <400> 2  
 Met Pro Gly His Ser Arg Leu Leu Ser Ile Leu Val Ser Gly Leu Cys  
 1 5 10 15  
 Val Val Gly Ser Ser Ile Gly Val Leu Arg Arg Arg Glu Gln Ala Glu  
 20 25 30  
 Arg Gly Ser Arg Arg Cys Ala Ile Ala Gly Glu Glu Arg Ala Met Leu  
 35 40 45  
 Ser Pro Ser Pro Leu Pro Glu Thr Pro Phe Ser Pro Glu Lys Gly Ala  
 50 55 60  
 Ala Phe Ser Pro Ile Tyr Pro Arg Arg Lys  
 65 70  
 <210> 3  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <400> 3  
 Glu Lys Gly Ala Ala Phe Ser Pro Ile Tyr Pro Arg Arg Lys  
 1 5 10  
 <210> 4  
 <211> 36  
 <212> PRT

[0002]

<213> 智人

<400> 4

Leu Arg Arg Arg Glu Gln Ala Glu Arg Gly Ser Arg Arg Cys Ala Ile  
1 5 10 15

Ala Gly Glu Glu Arg Ala Met Leu Ser Pro Ser Pro Leu Pro Glu Thr  
20 25 30

Pro Phe Ser Pro  
35

<210> 5

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人

<400> 5

Leu Arg Arg Arg Glu Gln Ala Glu Arg Gly Ser Arg Arg Cys  
1 5 10

<210> 6

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人

<400> 6

Pro Glu Lys Gly Ala Ala Phe Ser Pro Ile Tyr Pro Arg Arg Lys Cys  
1 5 10 15

<210> 7

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 7

Cys Ala Ile Ala Gly Glu Glu Arg Ala Met Leu Ser Pro Ser Pro  
1 5 10 15

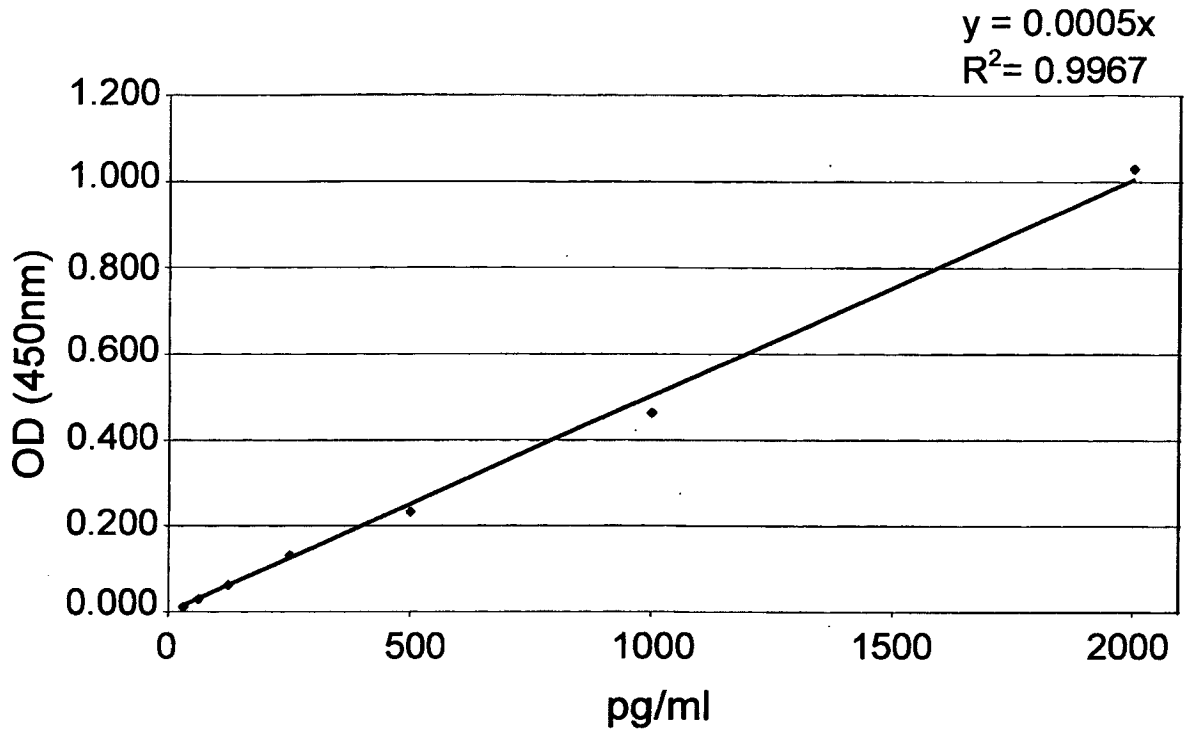


图 1

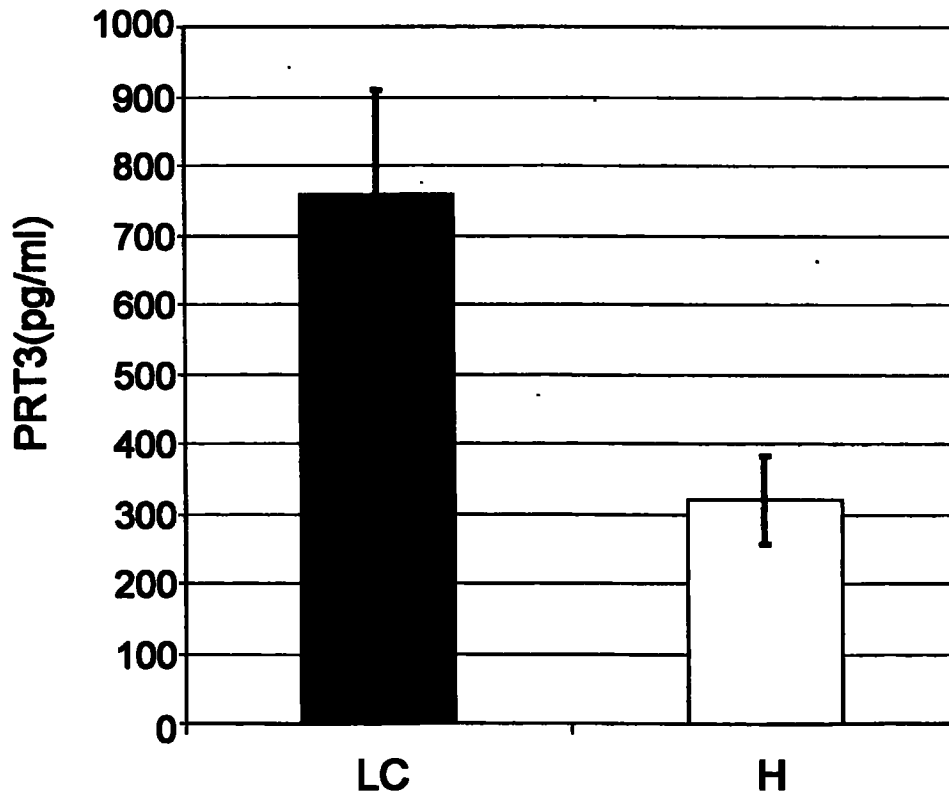


图 2

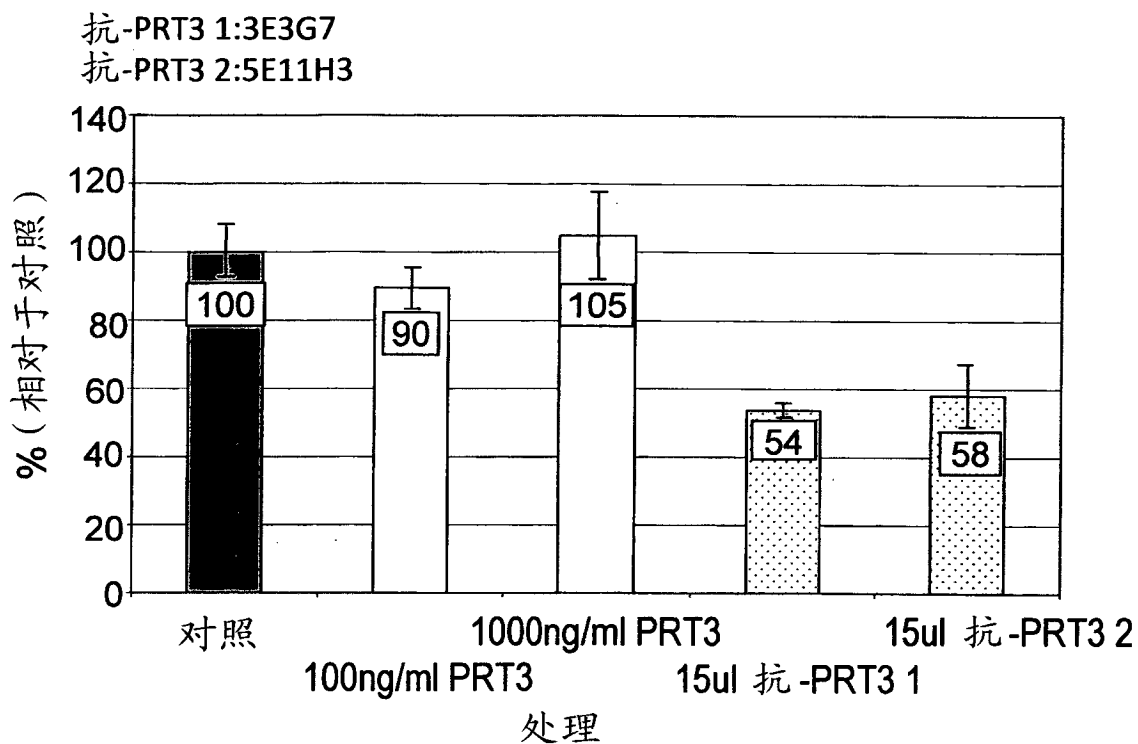


图 3A

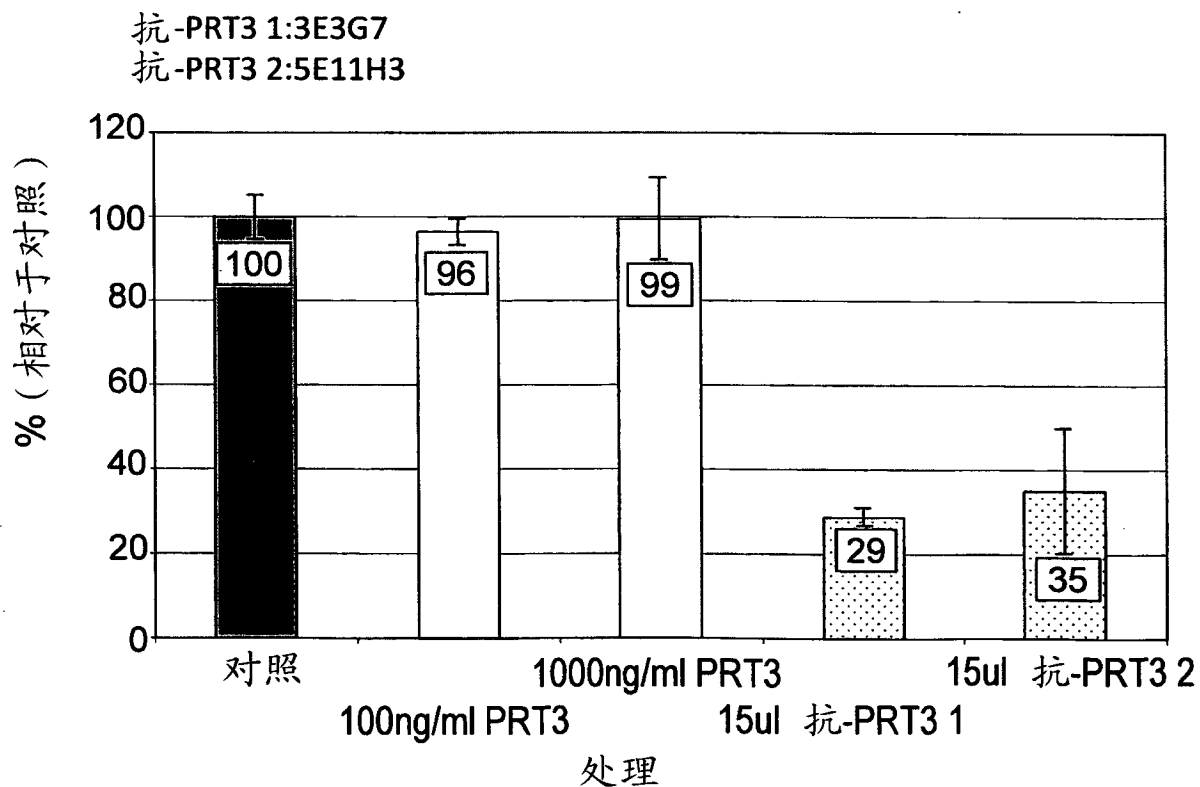


图 3B

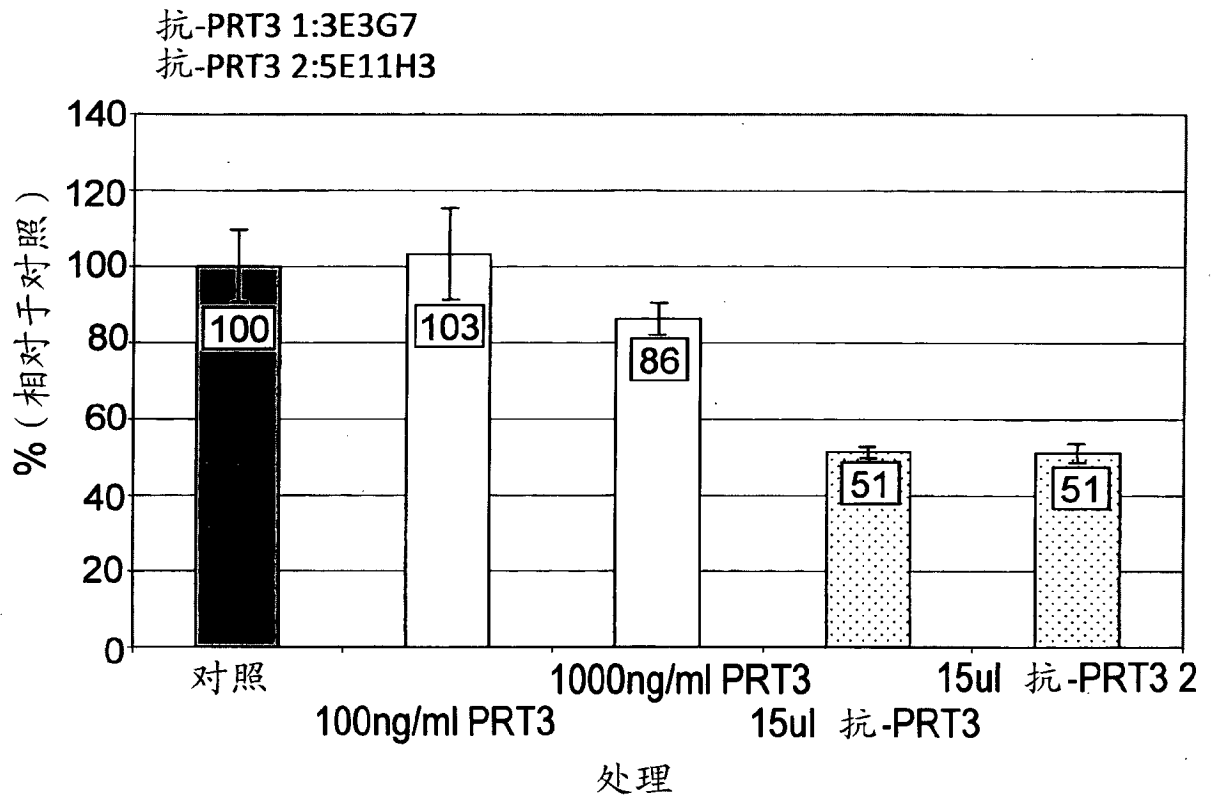


图 3C

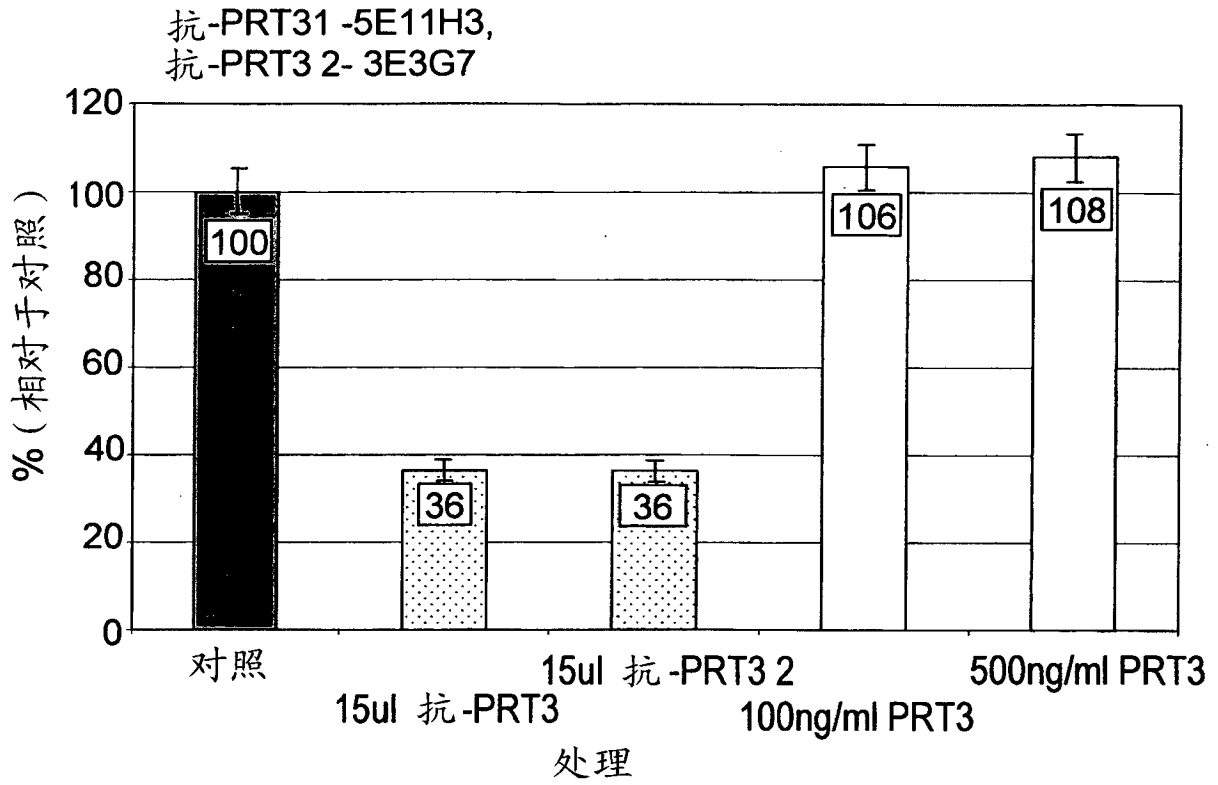


图 4A

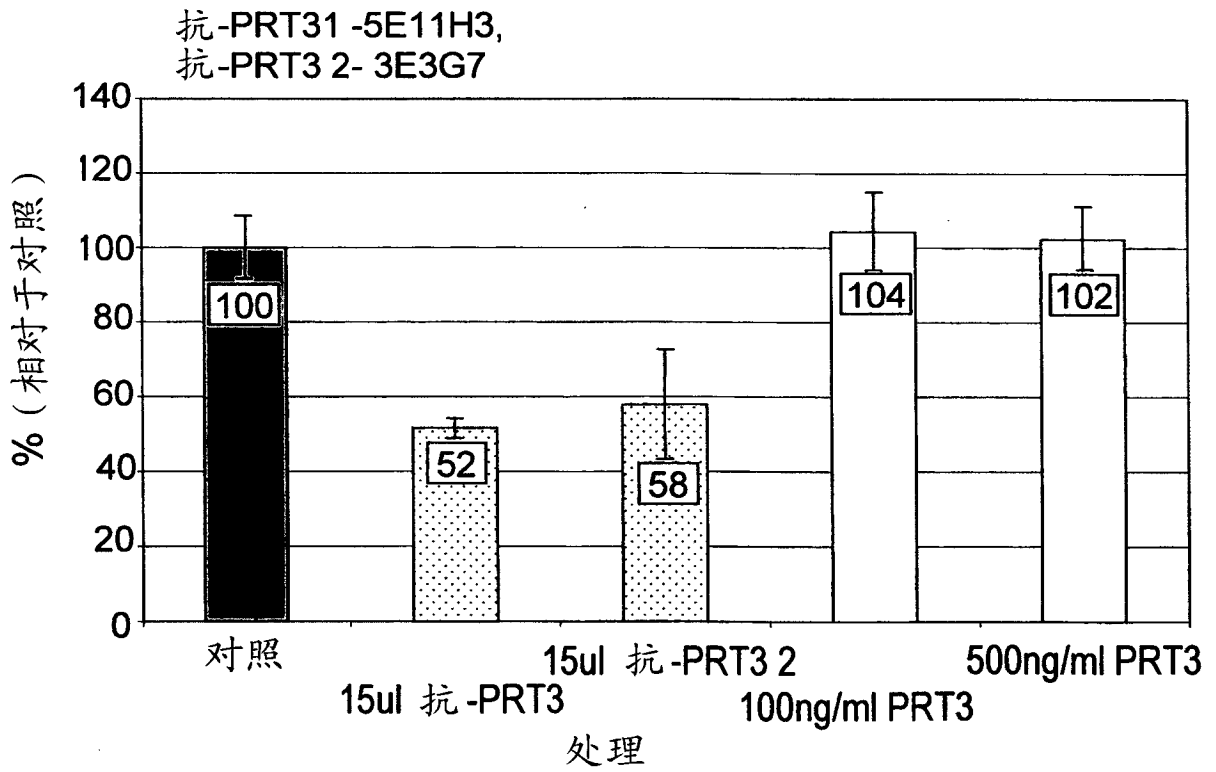


图 4B

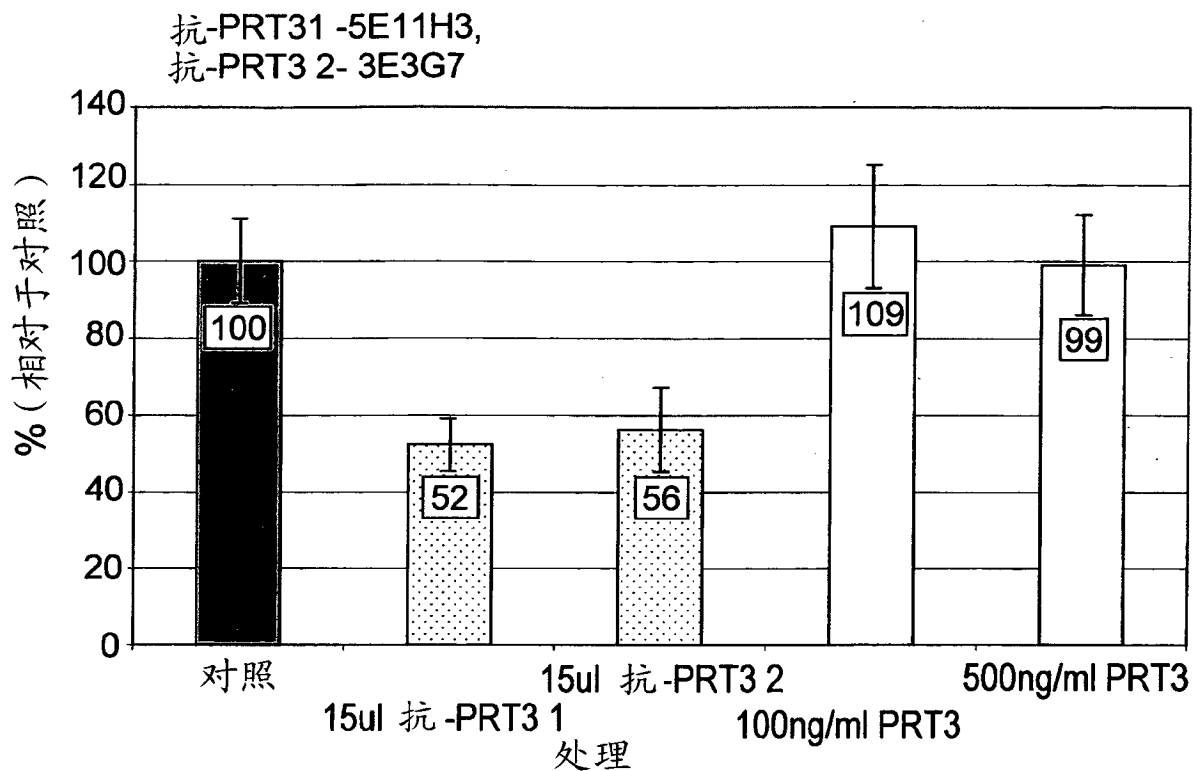


图 4C

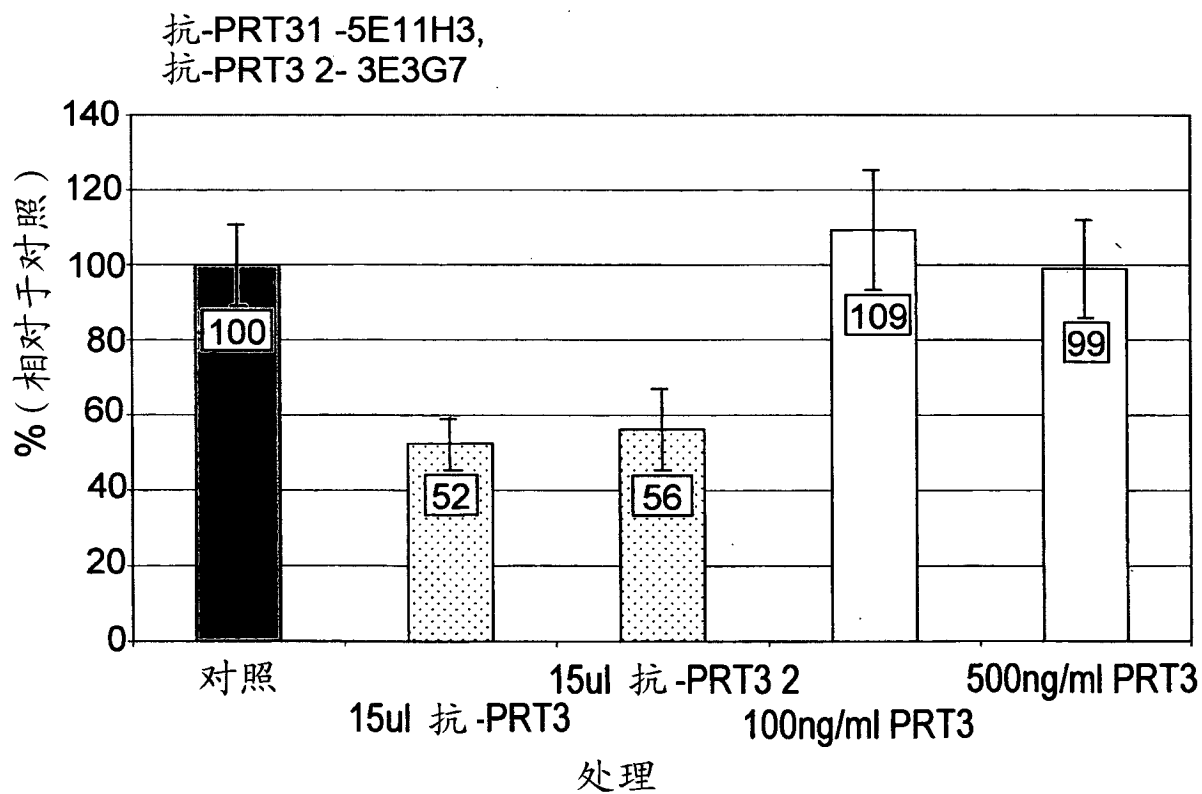


图 4D

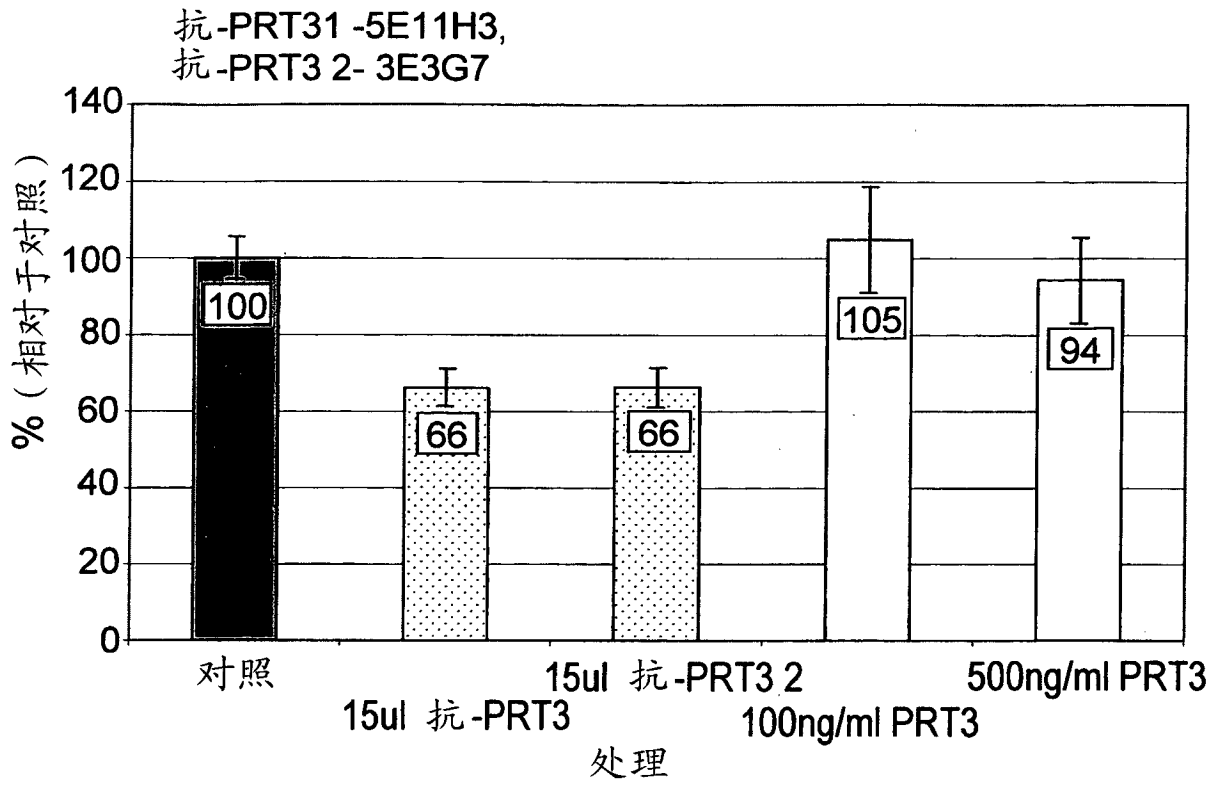


图 4E

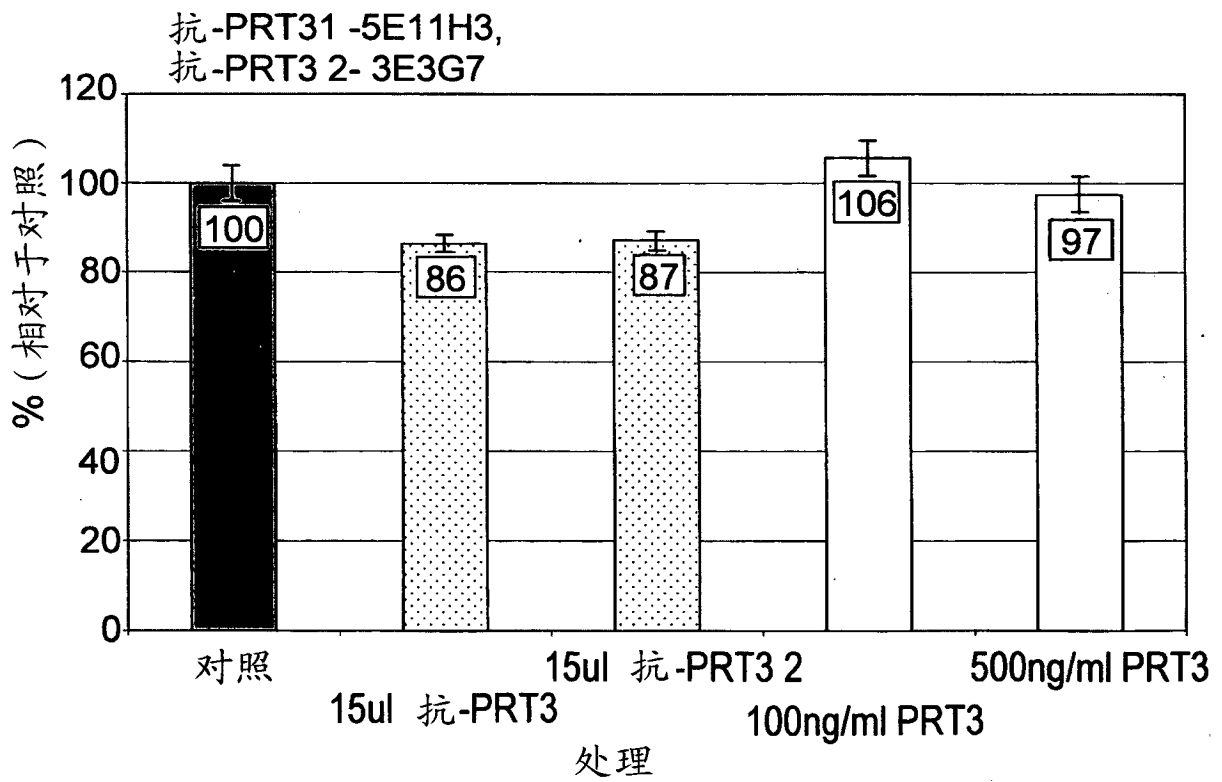


图 4F

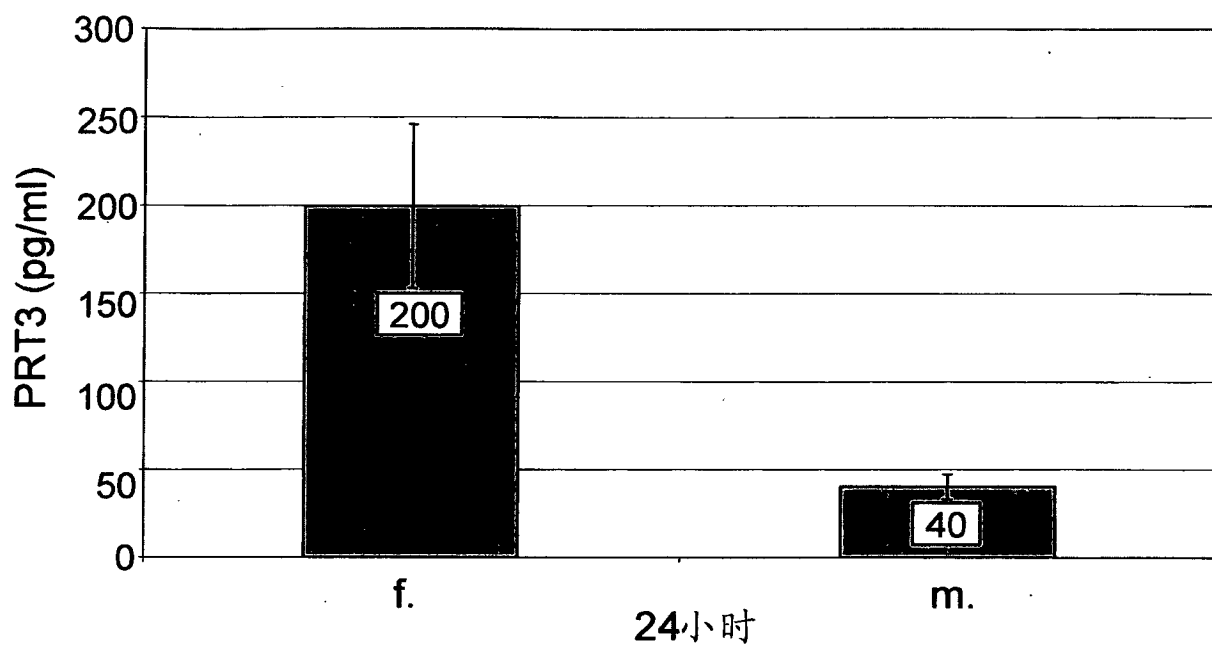


图 5

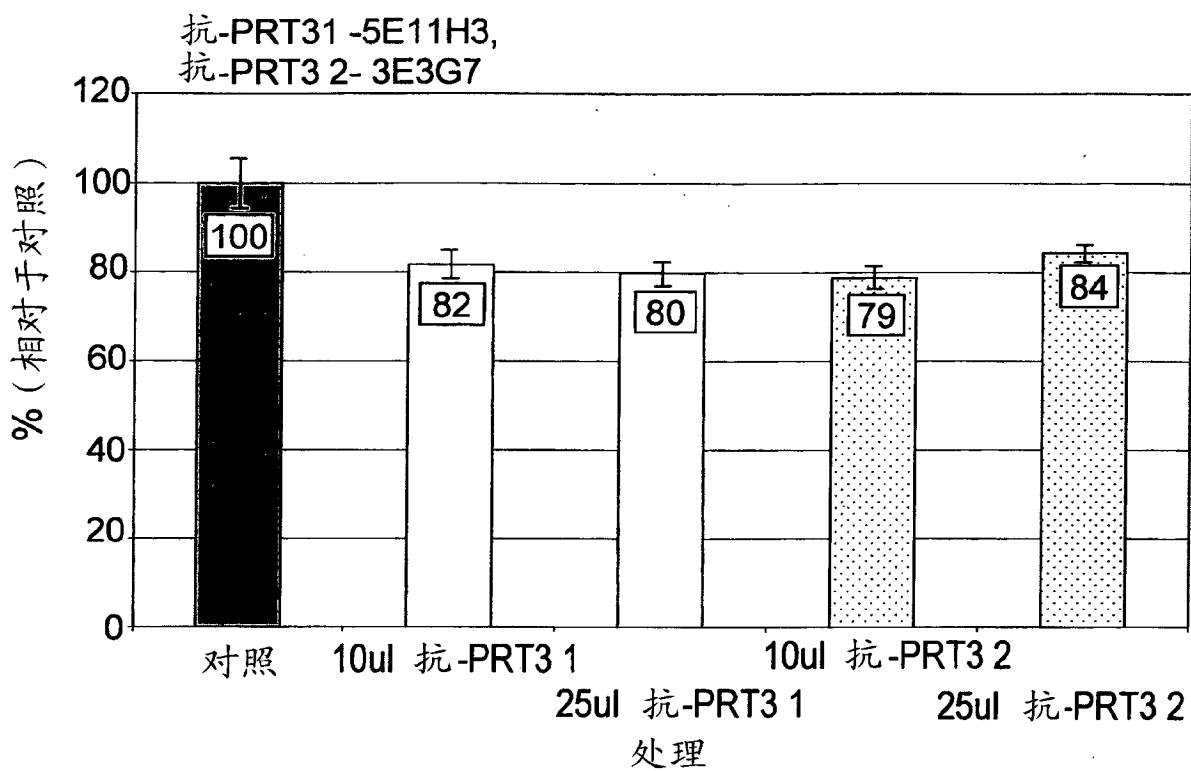


图 6A

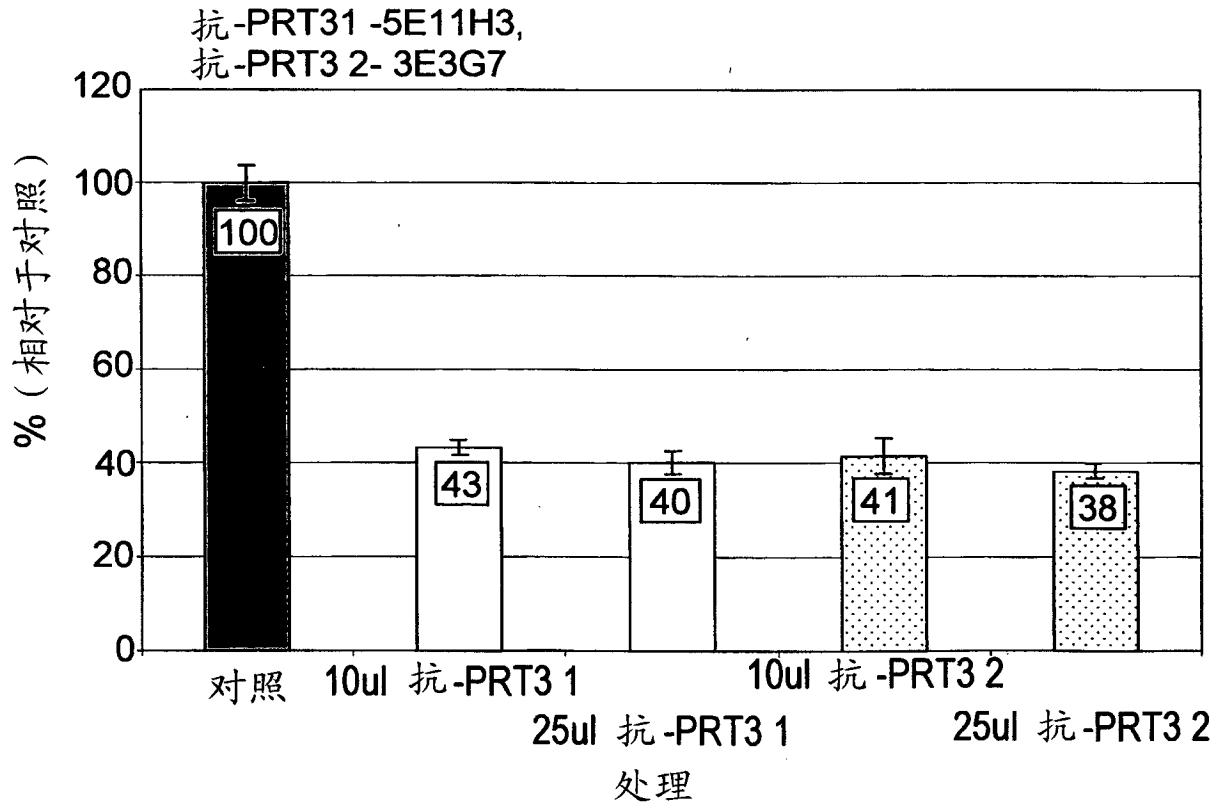


图 6B

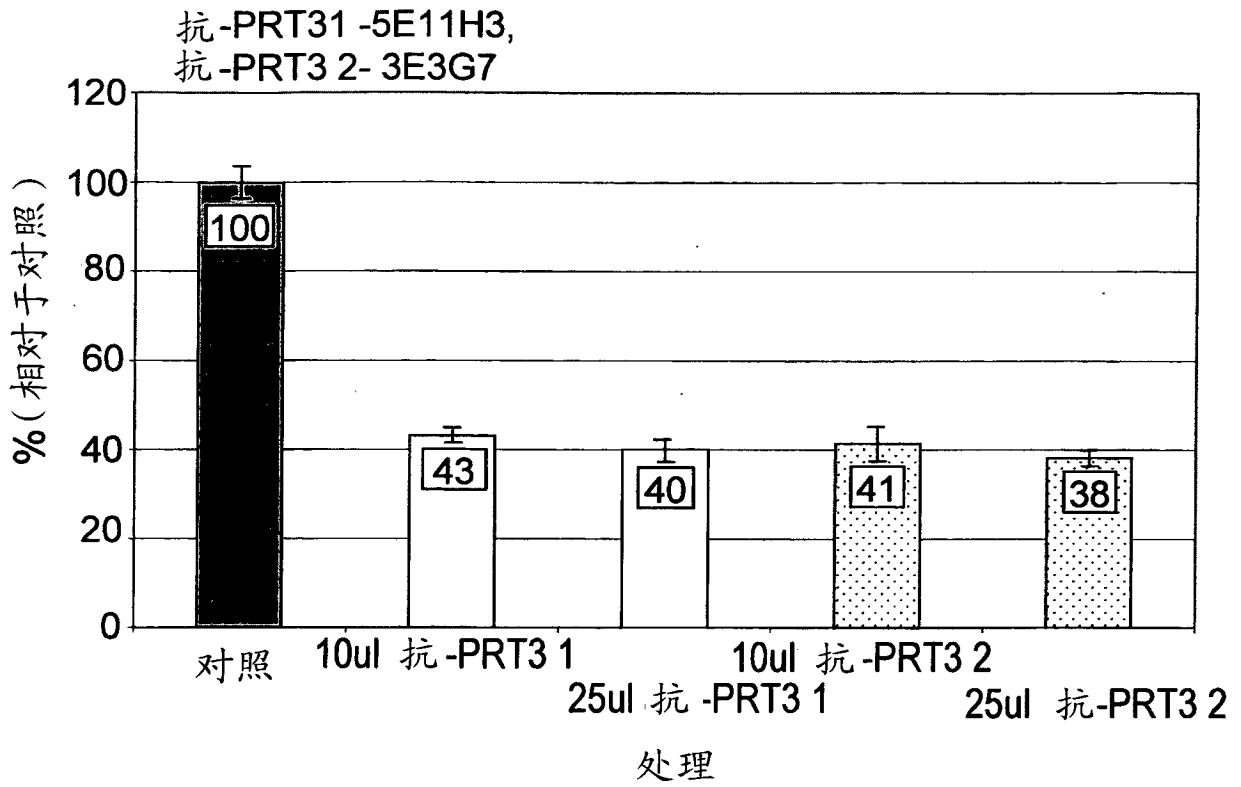


图 6C

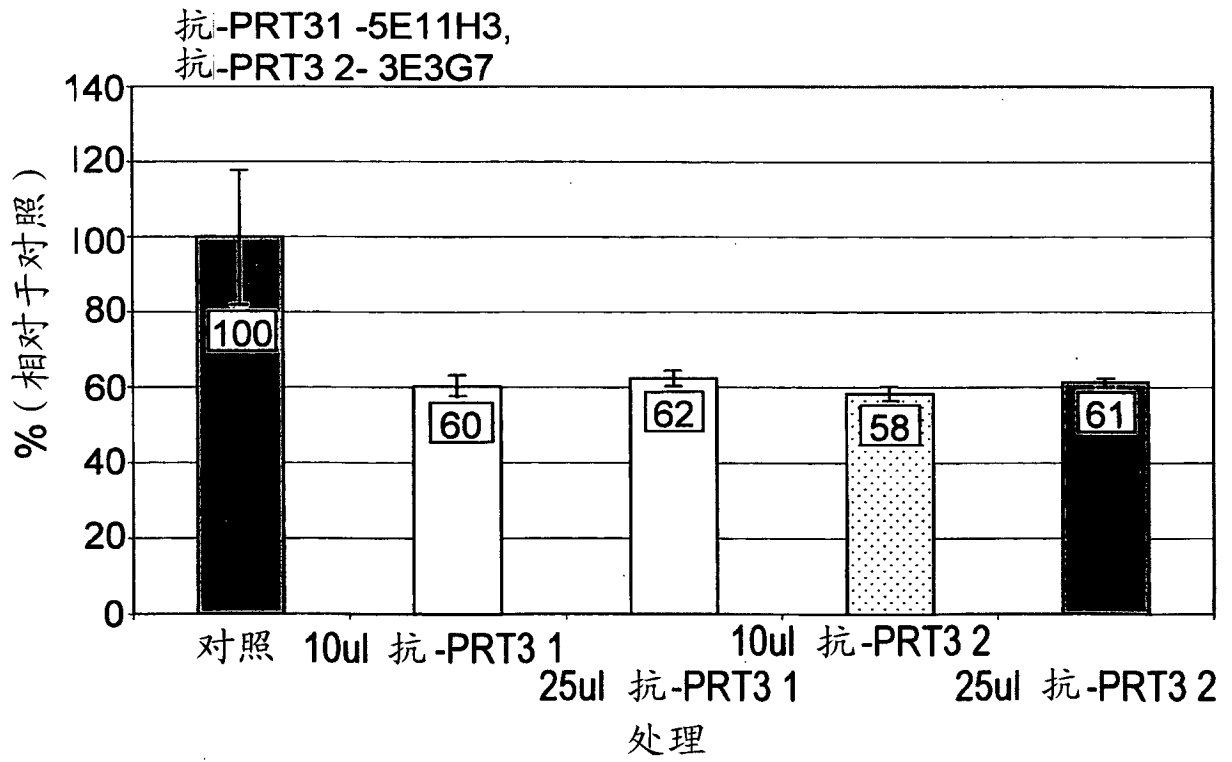


图 7A

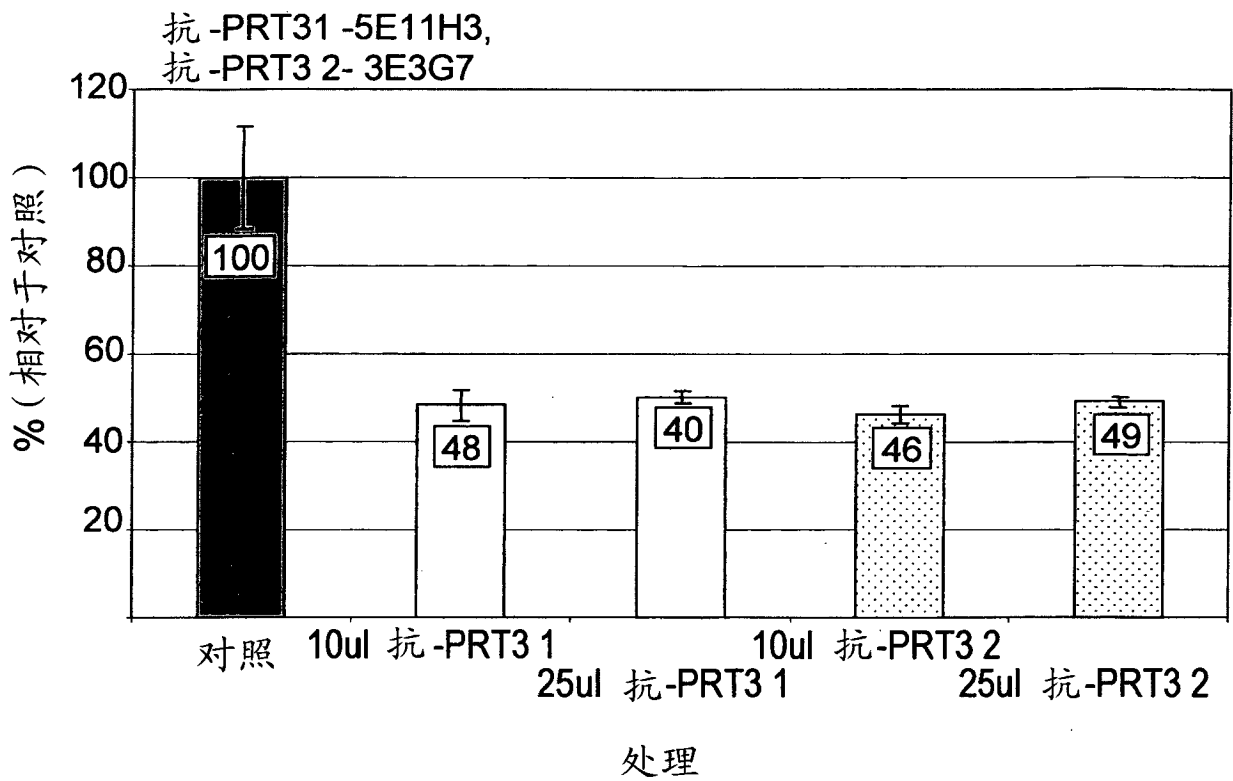


图 7B

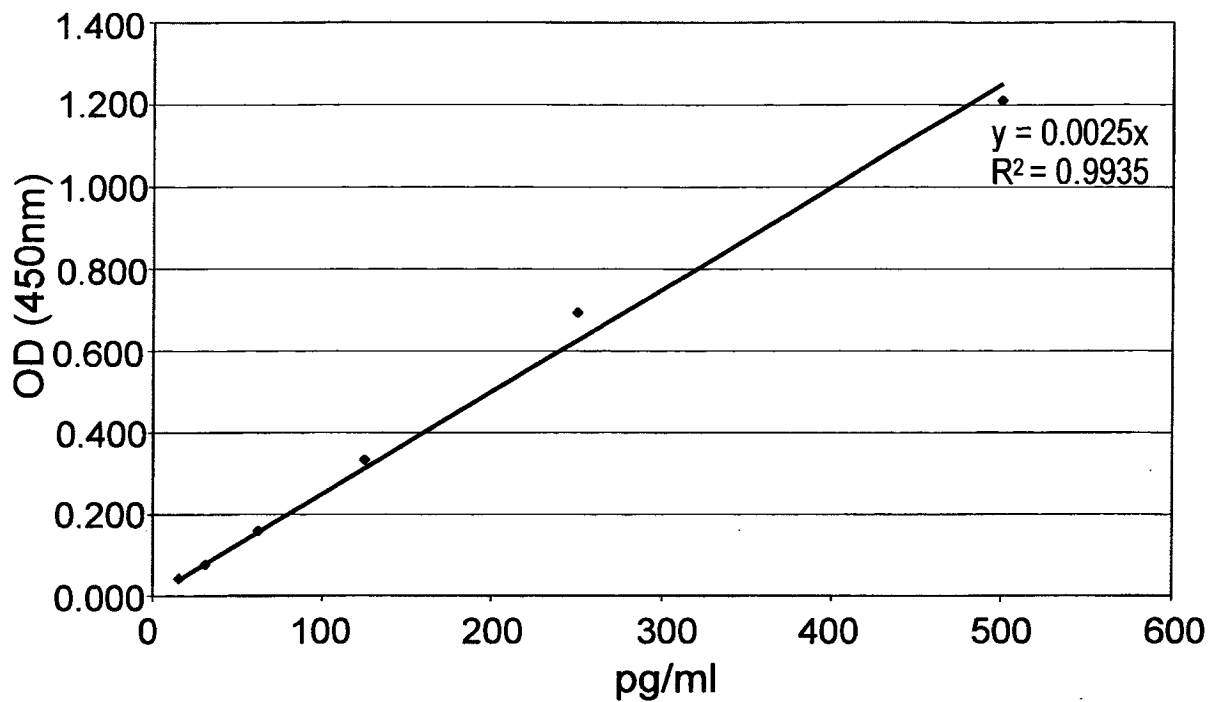


图 8A

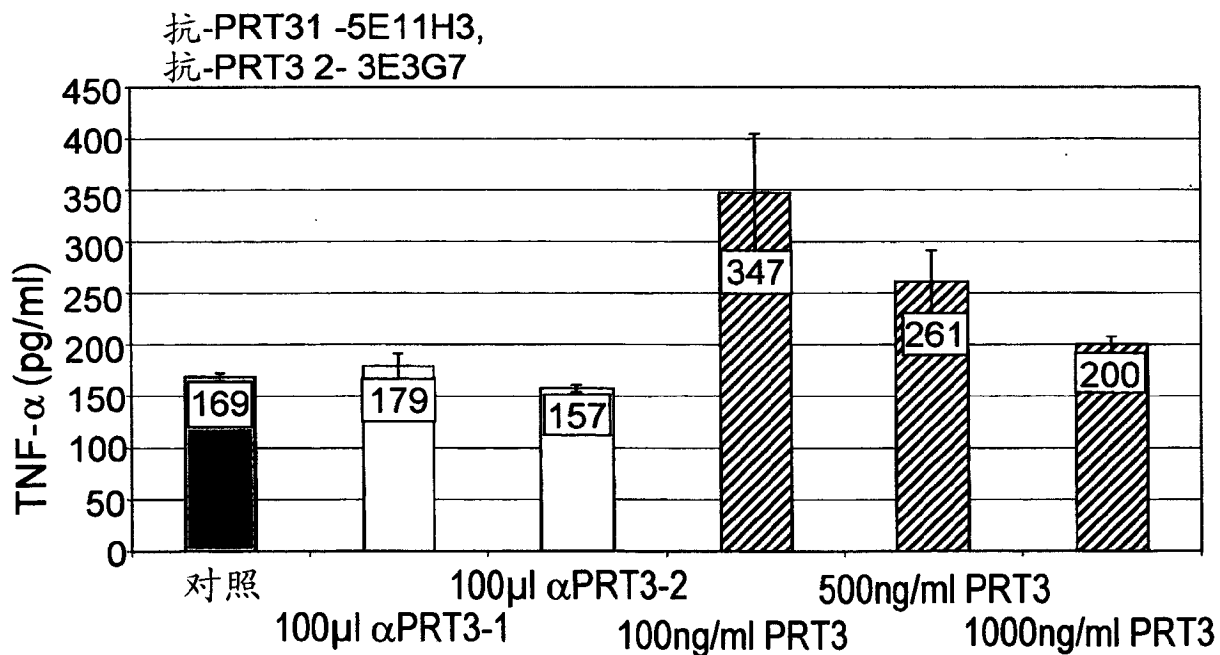


图 8B

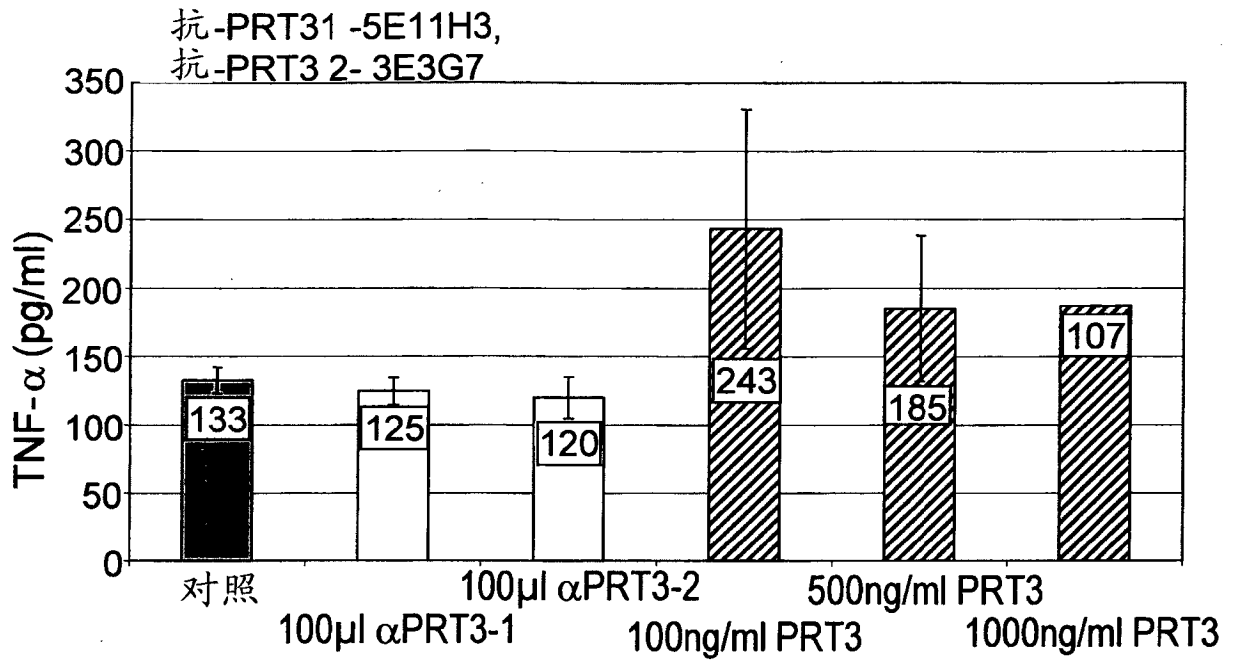


图 8C

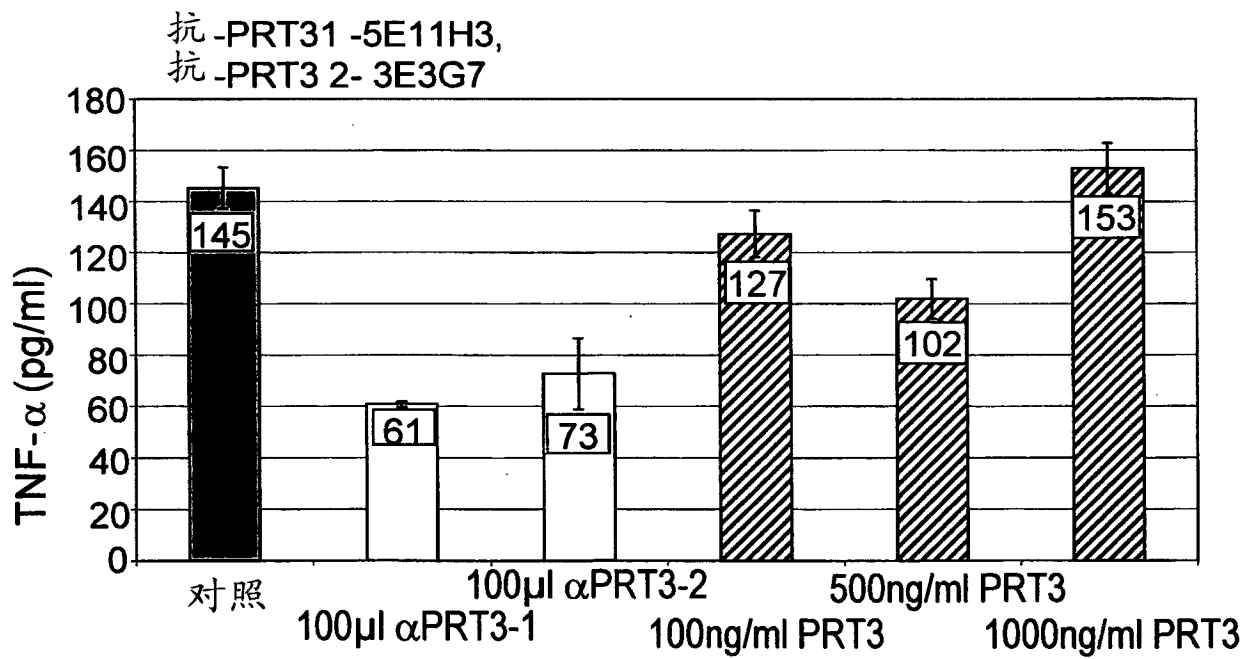


图 8D

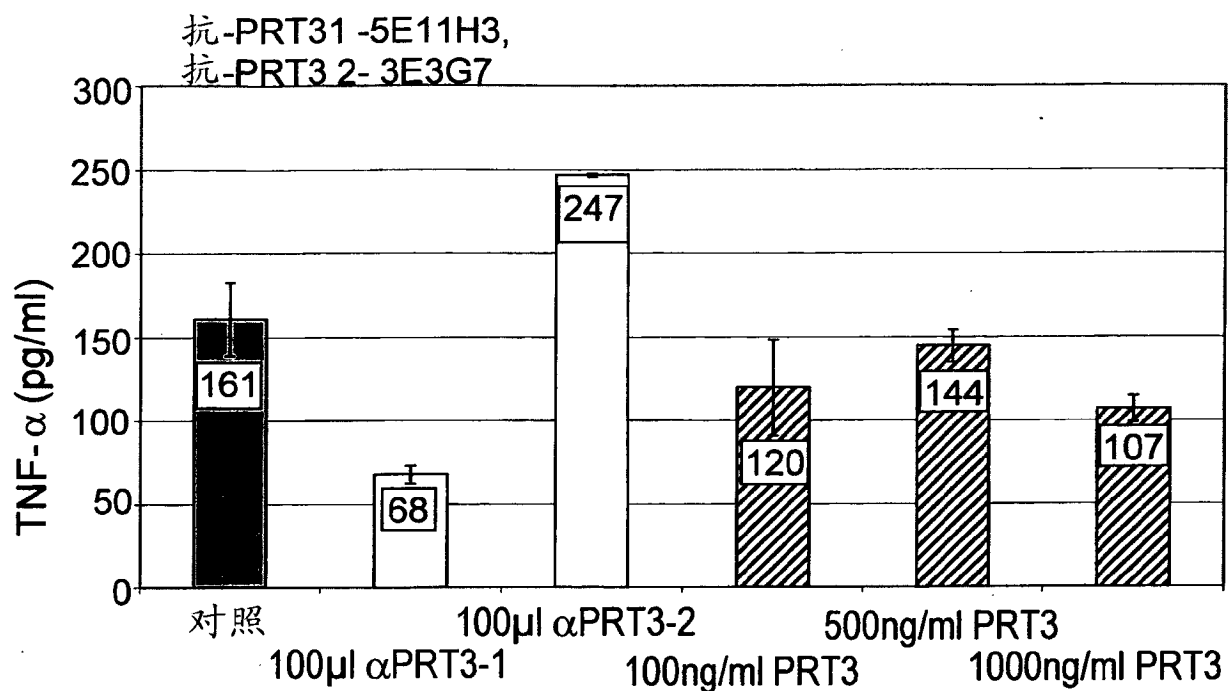


图 8E

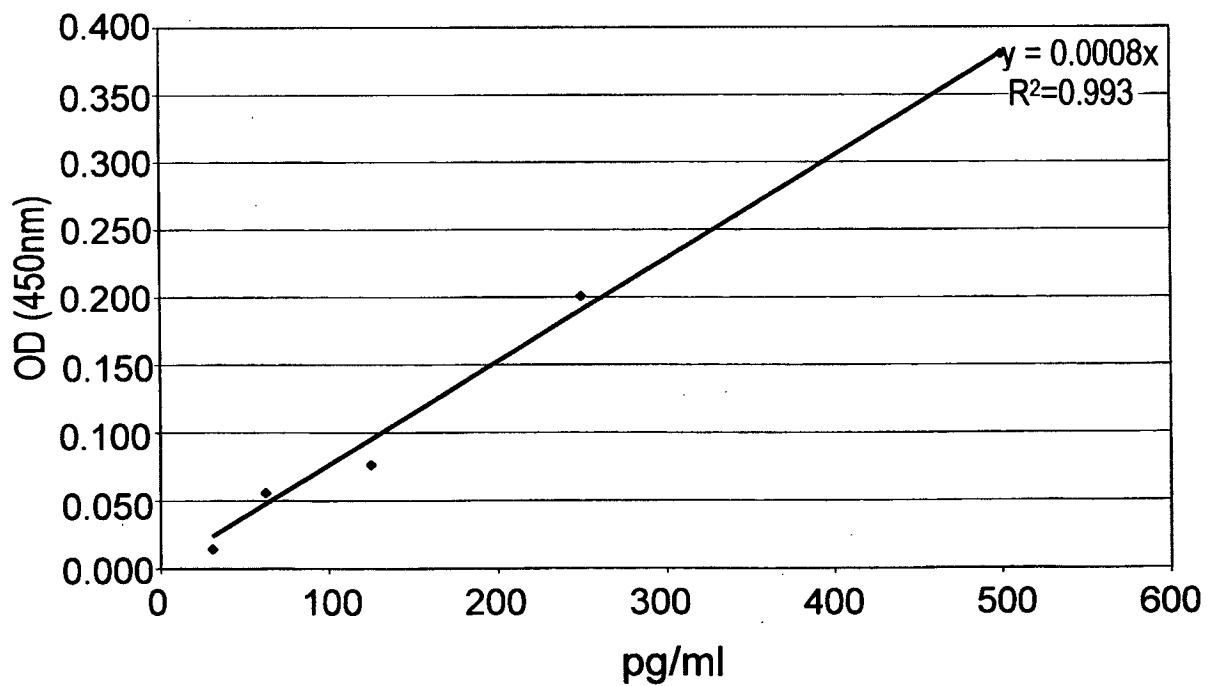


图 9A

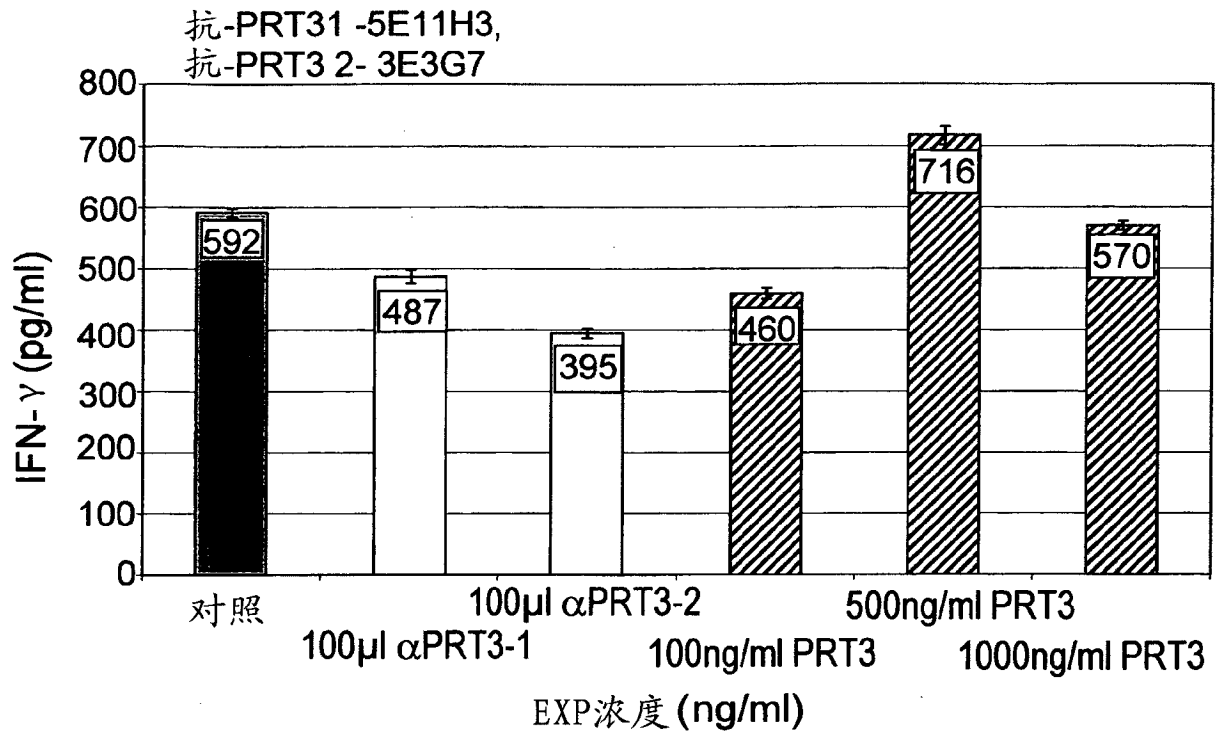


图 9B

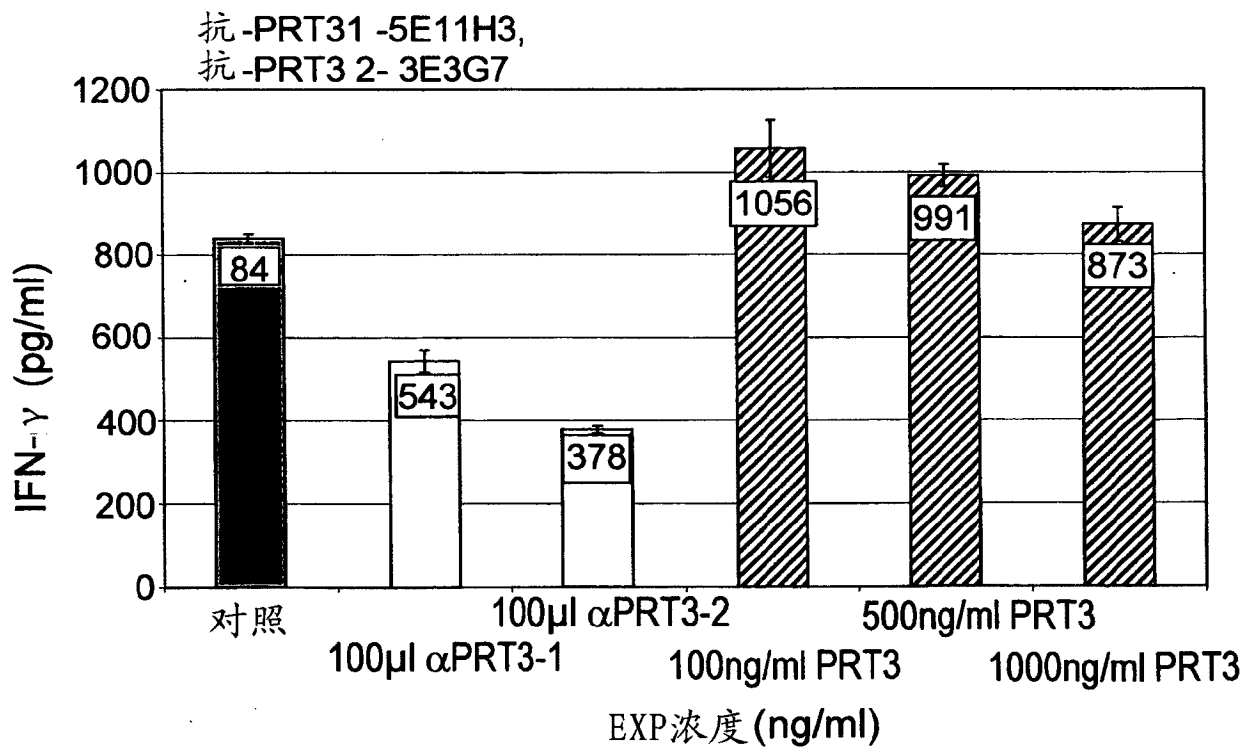


图 9C

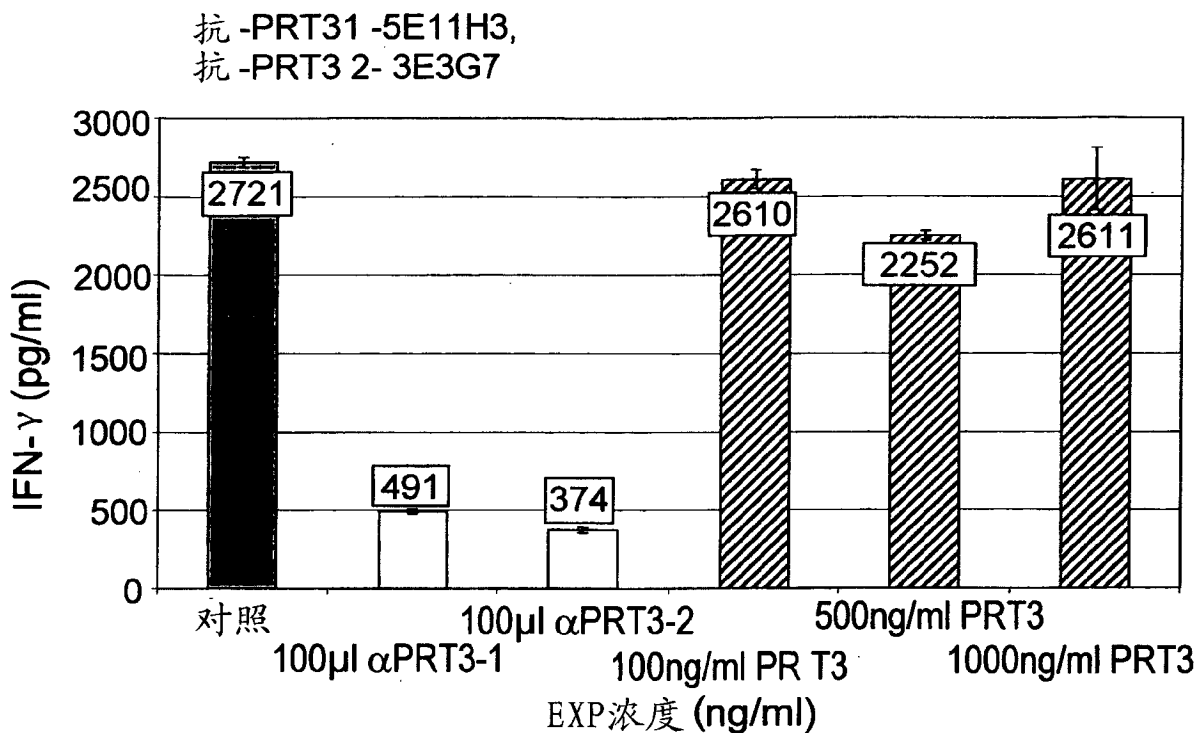


图 9D

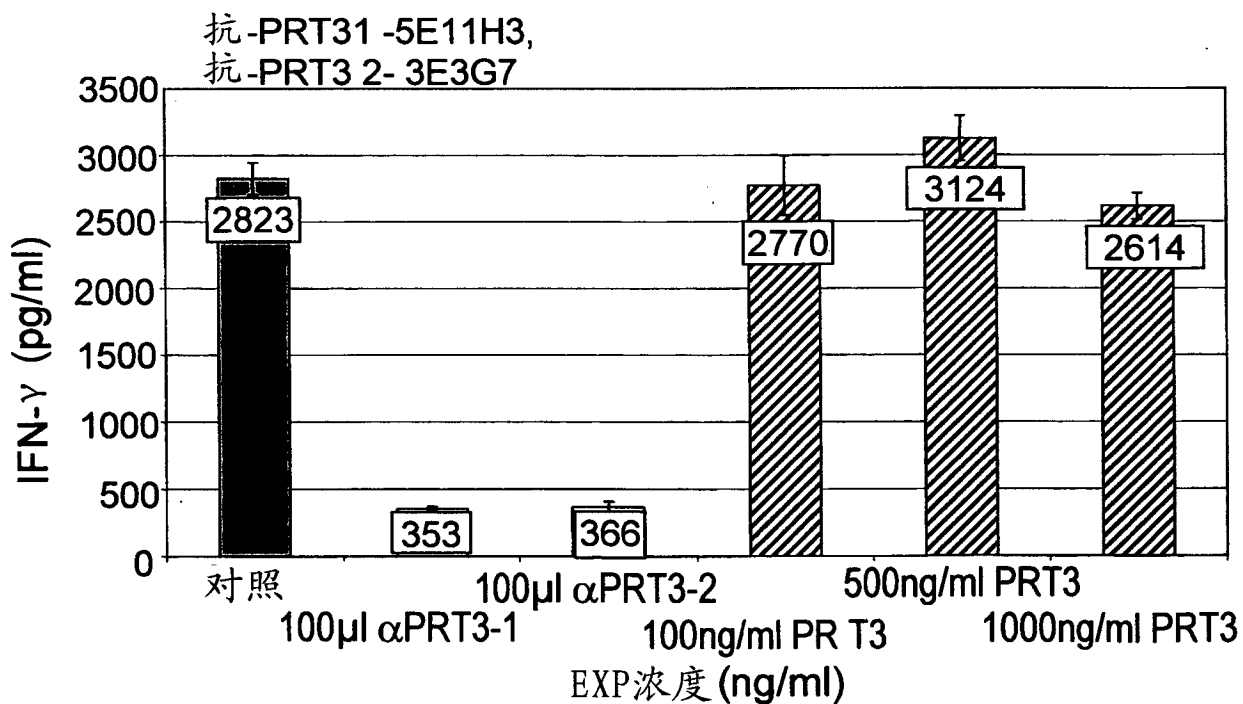


图 9E

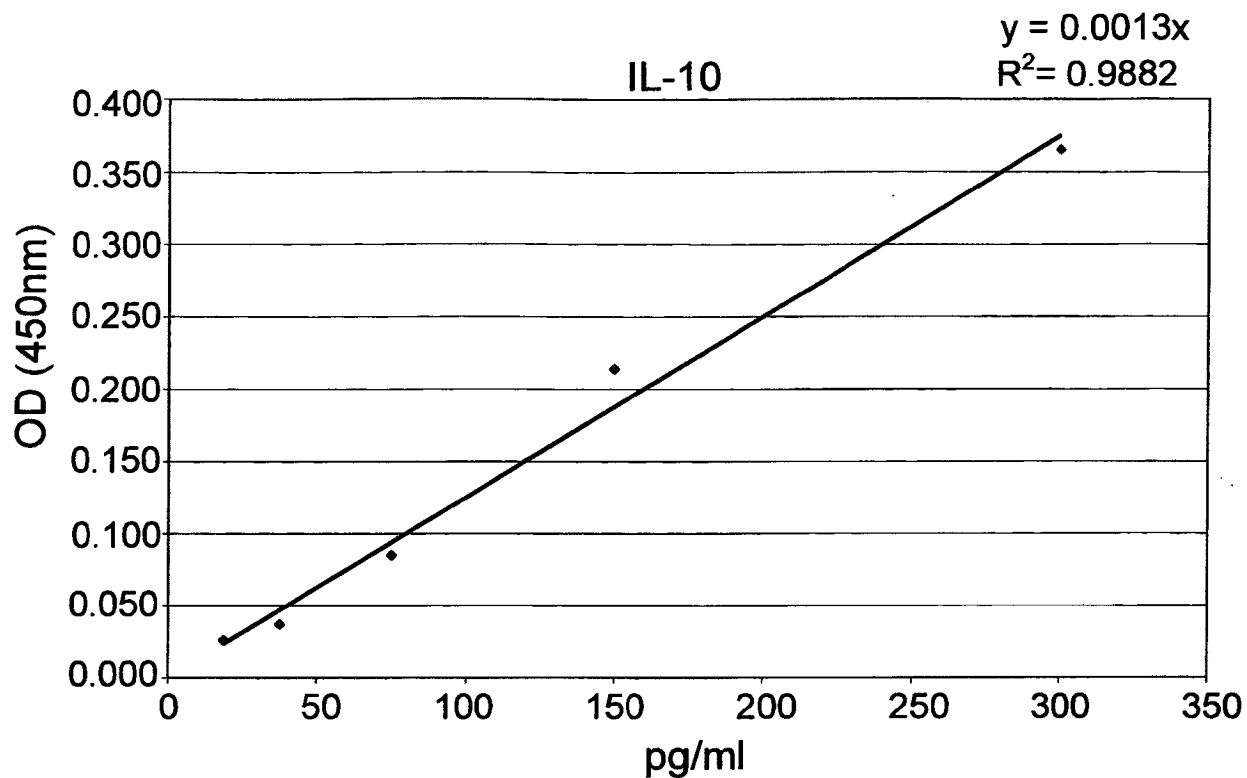


图 10A

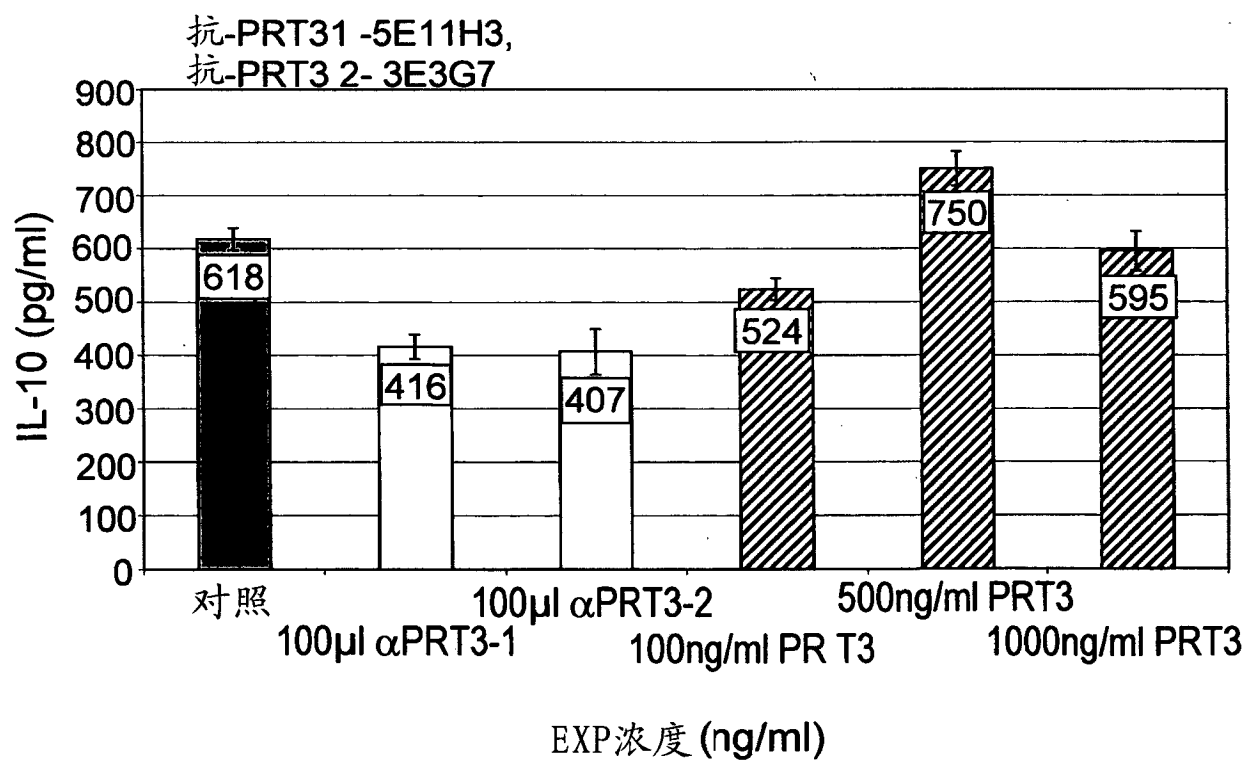


图 10B

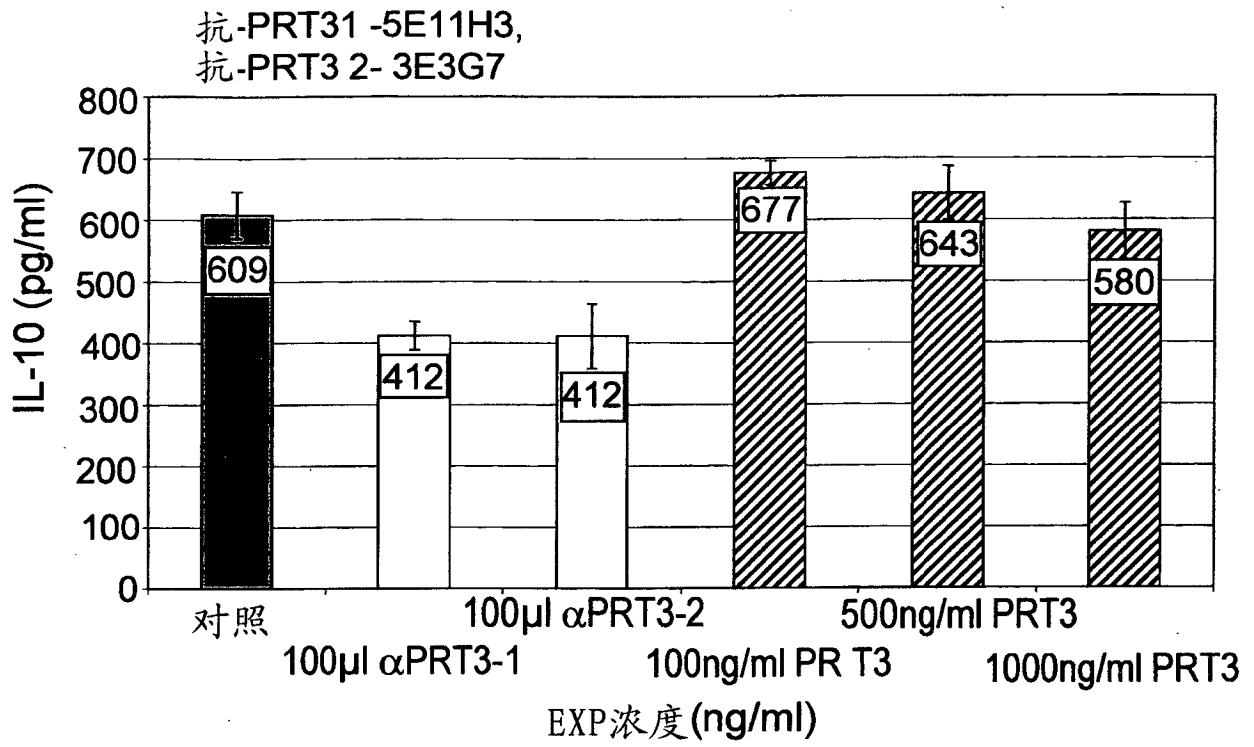


图 10C

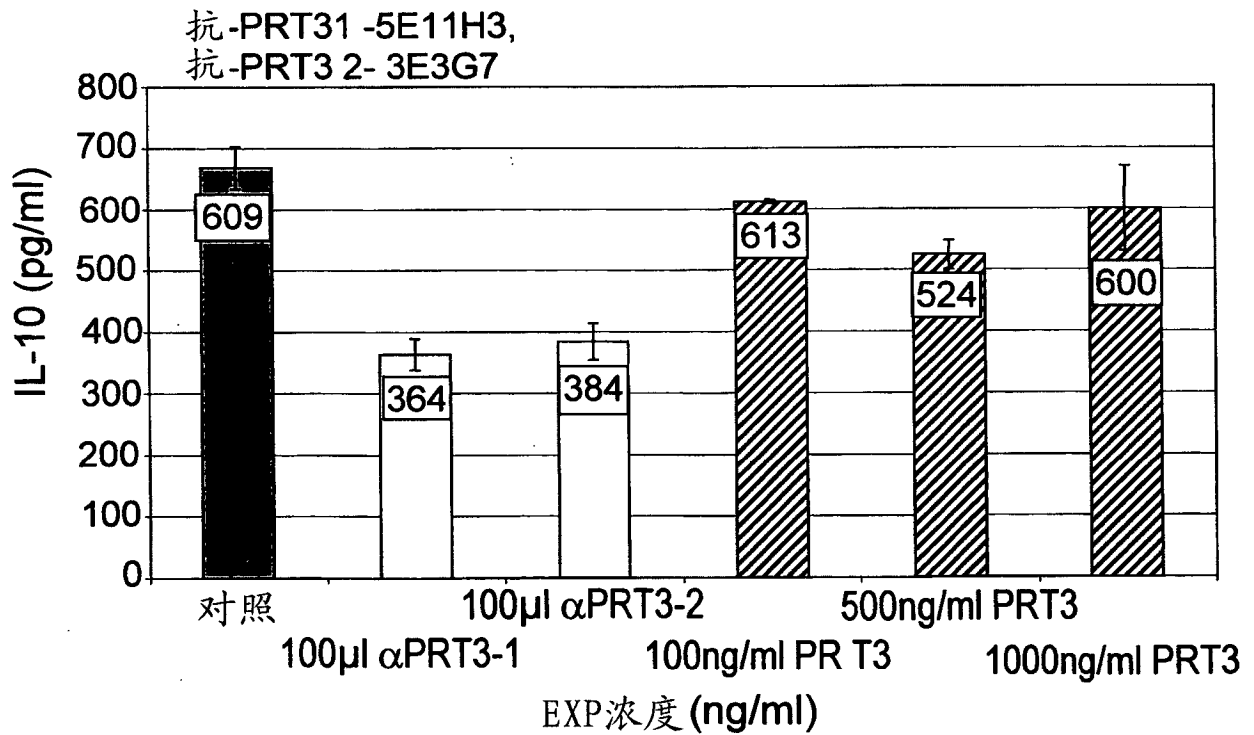


图 10D

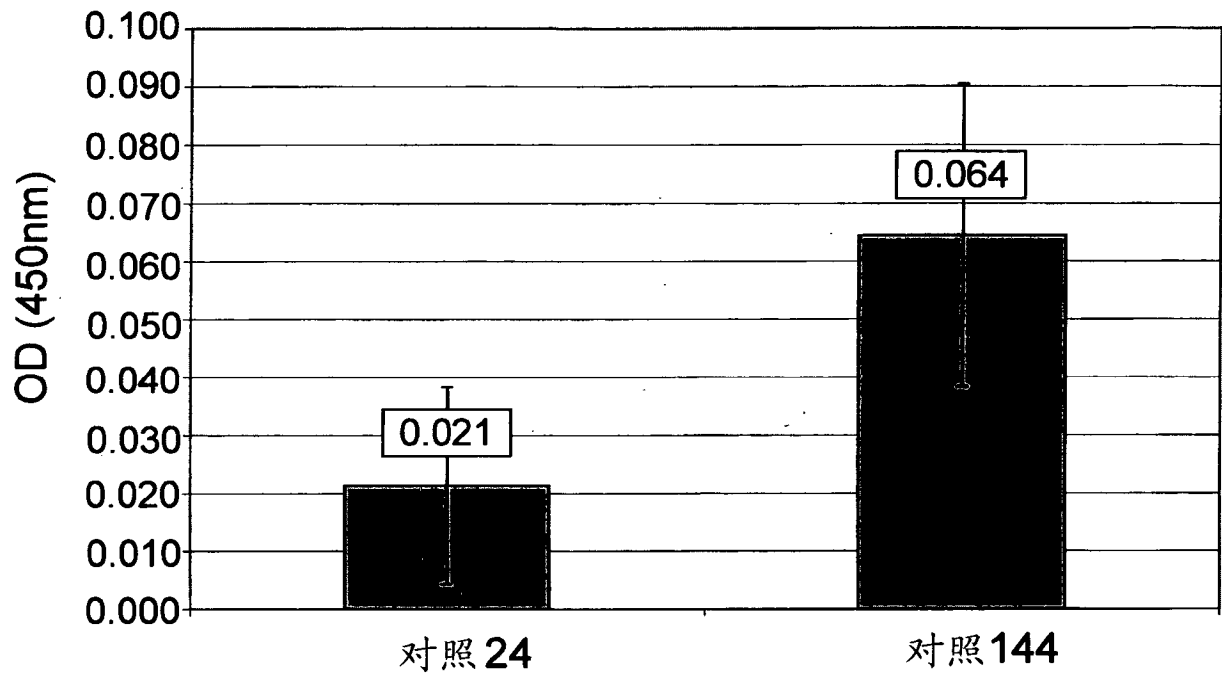
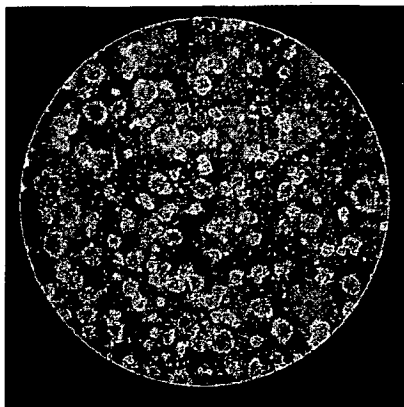
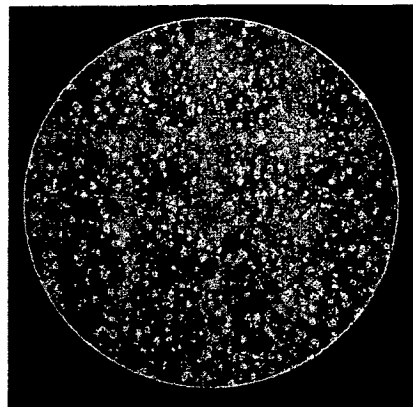


图 11



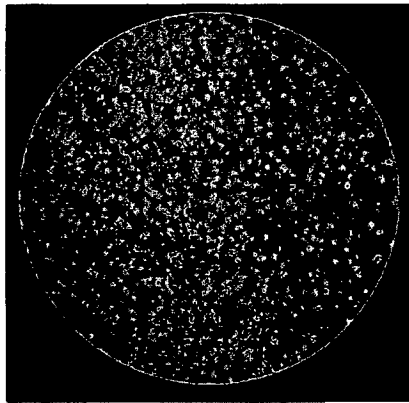
对照

图 12A



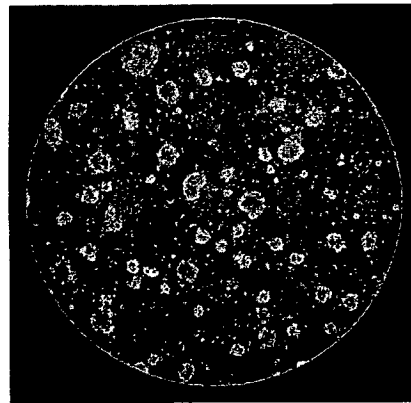
100µl of  $\alpha$ -PRT3 1

图 12B



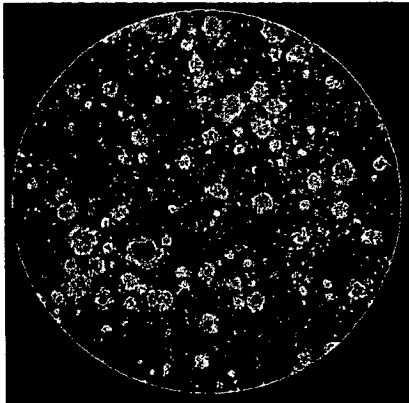
100μl of α-PRT3 2

图 12C



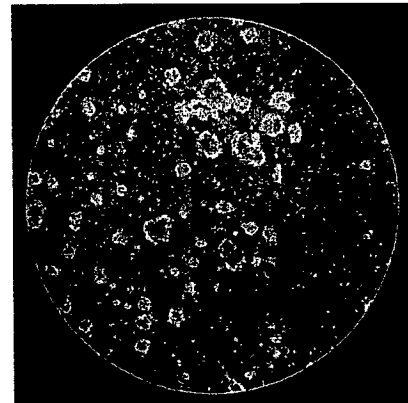
100ng/ml PRT3

图 12D



500ng/ml PRT3

图 12E



1000ng/ml PRT3

图 12F

专利名称(译)	新抗体及它们在治疗和诊断方法中的应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN102725416A</a>	公开(公告)日	2012-10-10
申请号	CN201080038855.3	申请日	2010-06-29
[标]申请(专利权)人(译)	两合生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	两合生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	两合生物科技有限公司		
[标]发明人	奥利德瓦瑞 塔玛拉桑德勒		
发明人	奥利·德瓦瑞 塔玛拉·桑德勒		
IPC分类号	C12P21/08 G01N33/53		
CPC分类号	G01N2800/28 G01N2800/042 C07K16/18 G01N33/57484 C07K2317/73 G01N2800/24 C07K2316/96 A61P1/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P11/02 A61P11/06 A61P17/00 A61P17/06 A61P17/14 A61P19/00 A61P19/02 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/02 A61P25/28 A61P27/02 A61P27/16 A61P29/00 C07K2317/76 A61K39/39533 A61K39/39558 C07K14/4748 G01N33/57423 G01N33/577		
代理人(译)	王昭林		
优先权	199618 2009-06-29 IL		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)	<u>原始残基</u>	<u>例示的取代</u>
<p>本发明提供特异识别KTPAF50蛋白的多克隆和单克隆抗体，以及包含其的组合物。本发明同样提供KTPAF50特异抗体在诊断和治疗如癌症、自体免疫疾病、移植排斥、神经退行性疾病和糖尿病的状况中的应用。</p>	Ala	Gly; Ser
	Arg	Lys
	Asn	Gln; His
	Asp	Glu
	Cys	Ser
	Gln	Asn
	Glu	Asp
	Gly	Ala; Pro
	His	Asn; Gln