



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103732627 A

(43) 申请公布日 2014. 04. 16

(21) 申请号 201280038342. 1

俞香淑 黄海民

(22) 申请日 2012. 06. 04

(74) 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002

(30) 优先权数据

代理人 王朋飞 刘成春

10-2011-0053509 2011. 06. 02 KR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(51) Int. Cl.

2014. 01. 29

C07K 16/30 (2006. 01)

(86) PCT国际申请的申请数据

G01N 33/53 (2006. 01)

PCT/KR2012/004396 2012. 06. 04

G01N 33/574 (2006. 01)

(87) PCT国际申请的公布数据

C12N 5/16 (2006. 01)

W02012/165926 KO 2012. 12. 06

(83) 生物保藏信息

KCTC 11873BP 2011. 02. 21

(71) 申请人 韩国生命工学研究院

地址 韩国大田广域市

(72) 发明人 赵恩伟 许昌圭 高正宪 禹美京

权利要求书2页 说明书17页

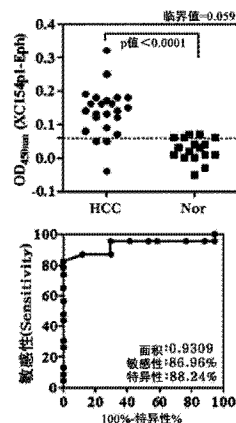
序列表6页 附图10页

(54) 发明名称

包含抗-ATIC 自身免疫抗体的肝癌诊断标记物以及包含其抗原的肝癌诊断用组合物

(57) 摘要

本发明涉及一种与 ATIC 特异性结合的自身免疫抗体(autoantibody) 或者包含其抗原结合部位(antigen-binding site, Paratope)的片段; 一种包括测定所述片段表达水平的制剂的肝癌诊断用组合物; 一种生产所述自身免疫抗体的杂交瘤细胞株; 一种包含所述组合物的肝癌诊断用试剂盒; 利用所述组合物的肝癌诊断方法; 以及一种利用所述自身免疫抗体的肝癌治疗剂的筛选方法。使用本发明的抗-ATIC 特异反应性自身免疫抗体作为肝癌诊断标记物, 可利用血液、血浆、血清、淋巴液等非侵袭性的生物样品, 以约 87% 的敏感性和约 88% 的特异性诊断肝癌的发生与否。并且, 可以仅利用本发明中鉴定的氨基酸序列, 便可简单诊断出肝癌, 因此对于肝癌诊断用试剂盒的开发非常有效。



1. 与 ATIC 特异性结合的自身免疫抗体或者包含其抗原结合部位的片段。
2. 根据权利要求 1 所述的自身免疫抗体或者包含其抗原结合部位的片段,其特征在在于,所述自身免疫抗体或者包含其抗原结合部位的片段识别选自 SEQ NO. 17 至 SEQ NO. 20 的氨基酸序列。
3. 根据权利要求 2 所述的自身免疫抗体或者包含其抗原结合部位的片段,其特征在在于,所述自身免疫抗体或者包含其抗原结合部位的片段识别 SEQ NO. 17 的氨基酸序列。
4. 根据权利要求 1 所述的自身免疫抗体或者包含其抗原结合部位的片段,其特征在在于,所述自身免疫抗体包括包含 SEQ NO. 3 的重链 CDR1、SEQ NO. 4 的重链 CDR2、SEQ NO. 5 的重链 CDR3 的重链可变区 ;和包含 SEQ NO. 6 的轻链 CDR1、SEQ NO. 7 的轻链 CDR2、SEQ NO. 8 的轻链 CDR3 的轻链可变区。
5. 根据权利要求 1 所述的自身免疫抗体或者包含其抗原结合部位的片段,其特征在在于,所述自身免疫抗体包含 SEQ NO. 1 的重链氨基酸序列以及 SEQ NO. 2 的轻链氨基酸序列。
6. 根据权利要求 1 所述的自身免疫抗体或者包含其抗原结合部位的片段,其特征在在于,其由保藏编号 KCTC11873BP 的杂交瘤细胞株产生。
7. 一种与权利要求 1 所述的自身免疫抗体特异性结合的抗原片段,其特征在在于,其具有选自 SEQ NO. 17 至 SEQ NO. 20 的氨基酸序列。
8. 一种肝癌诊断用组合物,其特征在在于,其包括测定权利要求 1 所述的自身免疫抗体或者包含其抗原结合部位的片段的表达水平的制剂。
9. 根据权利要求 8 所述的肝癌诊断用组合物,其特征在在于,所述自身免疫抗体或者包含其抗原结合部位的片段特异性识别选自 SEQ NO. 17 至 SEQ NO. 20 的氨基酸序列。
10. 根据权利要求 8 所述的肝癌诊断用组合物,其特征在在于,所述制剂是能与所述自身免疫抗体特异性结合的多肽。
11. 根据权利要求 10 所述的肝癌诊断用组合物,其特征在在于,与所述自身免疫抗体特异性结合的多肽是选自 SEQ NO. 17 至 SEQ NO. 20 的氨基酸序列。
12. 一种杂交瘤细胞株,其特征在在于,其可产生权利要求 1 所述的自身免疫抗体。
13. 根据权利要求 12 所述的杂交瘤细胞株,其特征在在于,所述杂交瘤细胞株是保藏编号为 KCTC11873BP 的细胞株。
14. 一种包含权利要求 8 至 11 中任意一项中所述组合物的肝癌诊断用试剂盒。
15. 根据权利要求 14 所述的试剂盒,其特征在在于,所述试剂盒可使用选自蛋白免疫印迹法、酶联免疫吸附法、放射免疫分析法、放射免疫扩散法、双向扩散法、火箭免疫电泳法、组织免疫染色法、免疫沉淀分析法、补体结合分析法、流式细胞分析法以及蛋白质芯片法中的一种方法。
16. 一种肝癌诊断方法,其特征在在于,其包括利用权利要求 8 至 11 中任意一项中所述的组合物,检测出与 ATIC 特异性结合的自身免疫抗体或者包含其抗原结合部位的片段步骤。
17. 根据权利要求 16 所述的肝癌诊断方法,其特征在在于,包括:
 - (a) 从肝癌疑似个体的样品中测定与 ATIC 特异性结合的自身免疫抗体或者包含其抗原结合部位的片段的表达水平的步骤 ;以及
 - (b) 将所述表达水平,与正常对照组样品中与 ATIC 特异性结合的自身免疫抗体或者包含其抗原结合部位的片段的表达水平进行比较的步骤。

18. 根据权利要求 17 所述的肝癌诊断方法,其特征在于,所述样品为从个体分离的选自全血、血清、血液、血浆、唾液、尿、痰、淋巴液、脑脊液以及细胞间液中的一种。

19. 根据权利要求 17 所述的肝癌诊断方法,其特征在于,测定所述自身免疫抗体或者包含其抗原结合部位的片段表达水平而使用的方法可以是选自蛋白免疫印迹法、酶联免疫吸附法、放射免疫分析法、放射免疫扩散法、双向扩散法、火箭免疫电泳法、组织免疫染色法、免疫沉淀分析法、补体结合分析法、流式细胞分析法以及蛋白质芯片法中的一种方法。

20. 一种肝癌治疗剂的筛选方法,其特征在于,其包括:

(a) 测定与 ATIC 特异性结合的自身免疫抗体或者包含其抗原结合部位的片段的表达水平的步骤;

(b) 给予肝癌治疗用备选物质的步骤;以及

(c) 确认与所述步骤(a)相比,与 ATIC 特异性结合的自身免疫抗体或者包含其抗原结合部位的片段的表达水平降低的步骤。

包含抗-ATIC 自身免疫抗体的肝癌诊断标记物以及包含其抗原的肝癌诊断用组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及一种与ATIC (5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase/IMP cyclohydrolase, 5-氨基咪唑-4-羧胺核苷酸甲酰转移酶/IMP 环化水解酶) 特异性结合的自身免疫抗体(auto antibody) 或者包含其抗原结合部位(antigen-binding site, Paratope) 的片段; 一种与所述自身免疫抗体特异性结合的抗原片段; 一种包括测定所述自身免疫抗体或者包含其抗原结合部位的片段表达水平的制剂的肝癌诊断用组合物; 一种生产所述自身免疫抗体的杂交瘤细胞株以及一种包含本发明组合物的肝癌诊断用试剂盒。并且, 本发明还涉及利用本发明组合物的肝癌诊断方法以及利用所述自身免疫抗体的肝癌治疗剂的筛选方法。

背景技术

[0002] 在韩国、日本、台湾、中国、大部分的东南亚国家中, 包括肝炎、肝硬变、肝癌等的肝脏疾病是患病患者最多的单一疾病; 而在韩国, 以不同脏器为基准时, 肝癌在所有癌症中位列第5位(9.2%) (卫生福利部, 2007), 且韩国男性的肝癌死亡率位列全世界首位。

[0003] 到目前为止, 为诊断肝癌通常要实施组织学检查或检测甲胎蛋白(Alpha fetal protein, AFP) 等肝癌标记物。并且, 有几种生物标记物用于所述诊断、预后判定, 其中最为熟知的是所述APF 以及PIVKA-II, 但其仍存在很多涉及敏感性的缺陷。最近, 还随着基因组学(Genomics)、蛋白质组学(Proteomics)的研究, 报道出了几种新种类的肝癌标记物候选蛋白质和基因, 其中所报道出的基因主要是将组织作为对象的基因, 且现状为仍不能明确阐明其能否由血液分泌以及通过血液进行诊断。其原因是由于在所述生物标记物的本质特性方面, 大部分肿瘤标记物的发掘是以不同组织的基因表达差异为中心进行的; 在生物标记物的性质方面, 即使生物标记物可能在组织中的基因表达量很高, 但也不说明通过尿液或者血清对其进行诊断。因此, 为了诊断的便利, 发掘一种能够由血液或者尿液分泌的肿瘤标记物非常重要, 且还需要与之前方法不同的, 分析生物标记物, 诊断包括肝癌的肝脏疾病的诊断方法。

[0004] 为解决所述问题, 已有多种从血液、组织、排泄物开发出的肿瘤标记物, 但大多数肿瘤标记物会出现没有癌症时还能被检测出的情况。因此, 利用这些诊断标记物的癌症诊断方法, 只能作为辅助手段, 其本身不能单独作为诊断道具而使用。

[0005] 并且, 免疫系统在形成个体的初期构建了一种能区分自体(self) 和非自体(non-self) 的独特的系统, 其结果发育成在个体的正常状态下, 仅对暴露于免疫系统的外源性抗原, 诱导抗原-抗体反应(humoral immune response)、免疫细胞反应(cellular immune response) 的免疫系统。然而, 还确认了在患有特定疾病时, 其对来源于自身的抗原(self-antigen) 也会生成抗体, 其原因是此时与正常时不同, 相关抗原的表达部位的细胞内表达的蛋白质, 向细胞外分泌, 或表现出变形的形态, 或者表现出的一些特征与正常个体不同所致。1970年之后, 连续报道出发生癌症时, 会随着癌症细胞的非正常生

长,产生对于来源于癌症细胞的抗原的自身免疫抗体,并将所述抗原称为癌症相关抗原(tumor-associated antigen;TAA)。至目前为止,确认的癌症相关抗原的种类非常多,其中HER-2/neu oncoprotein 被报道出作为存在于细胞膜的受体蛋白质,可诱导自身免疫抗体;也有报道称 p53 作为具有抑制癌症细胞生长功能的蛋白质,也能诱导自身免疫抗体。从以上结果,可推测有可能存在更多的对于癌症相关抗原的自身免疫抗体,因此不断的有人试图筛选出大量的癌症相关自身免疫抗体。

[0006] 并且,有结果表明相比于检测出一种自身免疫抗体,一次检测出多种不同的自身免疫抗体的癌症诊断方法可能更为有效,因此对自身免疫抗体的多重检测成为了检测的重要课题。例如,有报道称可通过一次性共同检测出对 ASB-9、SERAC1、RELT 的自身免疫抗体,可以以 100% 的特异性以及 80% 的敏感性诊断出乳腺癌(L. Zhong et al. Breast Cancer Res10 :3 (2008) R40);还确认了可通过一次性共同检测出对 PIM1、MAPKAPK3、ACVR2B 的自身免疫抗体,可以以 74% 的特异性、83% 的敏感性诊断出大肠癌(I. Babel et al. Mol Cell Proteomics8 :1 (2009) 2382-2395)。如上所述,随着利用癌症相关自身免疫抗体的癌症诊断显示出非常高的有效性,发掘新型癌症相关自身免疫抗体成为了探索癌症生物标记物的重要领域。

[0007] 为鉴定自身免疫抗体,使用的是将癌症相关蛋白质的表达文库作为对象,分析癌症患者的血液反应性,从而寻找自身免疫抗体的重组 cDNA 表达文库的血清学分析(serological analysis of recombinant c DNA expression libraries of human tumors with autologous serum, SEREX)技术。然而,所述方法在文库水平上,在使癌症细胞相关蛋白质表达至具备最大限度的多样性方面较有限,并且由于蛋白质的最终产物在转录(transcription)后也会经过多个翻译后修饰过程(post translational modification, PTM),由于不能反映这一点,蛋白质表达文库存在明显不能用于自身免疫抗原的检测的缺陷。

[0008] 为应对所述问题,最近进行着以蛋白质组学技术为基础的发掘自身免疫抗体的研究。蛋白质组学技术是指包括将癌症相关蛋白质利用双向电泳(2D-PAGE)分开之后,将癌症患者的血浆作为自身免疫抗体的样品,确认显示反应性的蛋白质点后,再用质谱分析技术进行鉴定过程的技术,简称血清学蛋白质组分析(serological proteome analysis, SERPA)技术。并且,还有制备结合从患者血液分离出的抗体的亲和层析树脂(affinity chromatography resin),后使蛋白质流经所述层析树脂,从而用色谱分析法对获取的蛋白质进行鉴定的多重亲和蛋白分析(Multiple affinity protein profiling, MAPPING)技术。并且,还有通过制备将癌症细胞的匀浆分成数千个流分的蛋白质芯片,后检测其对患者血液的反应性,探寻自身免疫抗体的方法。

[0009] 如上所述的多种蛋白质组学分析技术具有能直接确认对仍然维持翻译后修饰(PTM)特性的癌症细胞相关蛋白质的抗体反应性的优点,因此能确认出很多使用 SEREX 技术无法探寻到的自身免疫抗体,但其也还是比较有限。首先是由于抗体的含量少。欲分析的对象为两个以上的混合物时,会对其中含量多的一个首先进行分析,因此其余的可能从可检测的范围中排除掉。患者的血清为很多抗体的混合物,由于构成其的自身免疫抗体的含量差异以及对抗原的亲合力差异决定可进行分析的水平,因此有可能无法对目的自身免疫抗体进行分析。其次,由于进行分析时的自身免疫抗体样品依赖于患者,因此对由癌

症的发生而产生的自身免疫抗体进行系统地分析比较有限,并且为了实验大量采集患者的血液是非常困难的,因此进行实验本身就有受到很大的限制。最后是关于抗体进行反应的抗原决定簇的保存的问题。根据目前所知的免疫学知识,抗原反应部位可分成两种:一种是依赖蛋白质序列的顺序表位(sequential epitope),另一种是依赖蛋白质结构的构象表位(conformational epitope)。在生物体内,对特定抗原诱导出抗体时,反映免疫细胞抗体首次接触的抗原的状态,其说明抗原-抗体反应在溶液状态下进行,且抗原蛋白质具备能维持在血液内溶解状态的结构。因此,对体外进行的抗原-抗体反应进行检测时,在溶液状态下反应能较好的反映原来的结合状态,因此是比较优选的抗原-抗体反应的检测条件。然而使用所述 SERPA 分析方法时,为了对蛋白质混合液的分析采用在双向电泳,即将待分析的蛋白质利用十二烷基硫酸钠(SDS)和尿素(urea)变形后铺开状态下检测与抗体的反应的方法。因此,存在抗原决定簇是依赖蛋白质序列的顺序表位时可以检测出,但如果为依赖蛋白质结构的构象表位时就无法检测出的问题。

[0010] 如上所述的可作为现有的癌症发生相关标记物使用的自身免疫抗体的研究,由于其实用性不高、诊断效果甚微,因此要将自身免疫抗体作为癌症诊断用生物标记物使用,仍存在一定的困难。并且自身免疫抗体的检测方法还无法囊括那么多情况,并还需要过多的实验,其实施仍受限,因此仍无法发掘诊断肝癌的自身免疫抗体的标记物。

发明内容

[0011] 本发明要解决的技术问题

[0012] 本发明人为开发用于肝癌诊断的自身免疫抗体不断努力的结果,开发出了在肝癌模型小鼠中有效的癌症相关自身免疫抗体的鉴定方法,并确认了与 ATIC 特异性结合的自身免疫抗体可在肝癌模型小鼠中被诱导。并且,从肽库筛选出与其发生特异性反应的抗原结合部位(表位)表达噬菌体,设计出了用于检测自身免疫抗体的酶联免疫吸附实验(ELISA)法,并确认了利用所述方法可诊断人体肝癌个体,从而完成了本发明。

[0013] 技术方案

[0014] 本发明的一个目的在于,提供一种与 ATIC 特异性结合的自身免疫抗体或者包含其抗原结合部位的片段。

[0015] 本发明的另一目的在于,提供与本发明自身免疫抗体特异性结合的抗原片段。

[0016] 本发明的另一目的在于,提供一种包括测定所述自身免疫抗体或者包含其抗原结合部位的片段表达水平的制剂的肝癌诊断用组合物。

[0017] 本发明的另一目的在于,提供一种生产所述自身免疫抗体的杂交瘤细胞株。

[0018] 本发明的另一目的在于,提供一种包含本发明组合物的肝癌诊断用试剂盒。

[0019] 本发明的另一目的在于,提供一种利用本发明组合物的肝癌诊断方法。

[0020] 本发明的另一目的在于,提供一种利用本发明自身免疫抗体的肝癌治疗剂的筛选方法。

[0021] 有益效果

[0022] 使用本发明的抗-ATIC 特异反应性自身免疫抗体作为肝癌诊断标记物,可避免使用侵袭性的诊断方法,而是采用非侵蚀性的血液、血浆、血清、淋巴液等生物样品,以约 87% 的敏感性和约 88% 的特异性诊断肝癌的发生与否。并且,本发明鉴定了与上述标记物反

应的序列,从而无需为鉴定标记物设计复杂的反应物质,仅利用已鉴定的氨基酸序列便可简单诊断出肝癌,因此对于肝癌诊断用试剂盒的开发非常有效。

附图说明

[0023] 图1表示肝癌小鼠来源的XC154自身免疫抗体的获得以及利用其的癌症诊断方法的方案。通过确认从HBx肝癌模型小鼠来源的B细胞杂交瘤克隆获得的自身免疫抗体对于肝癌细胞的反应性,从而获得了XC154抗体。固定肝癌细胞株HepG2、Hepalcl7细胞,并将细胞膜通透化后,用肝癌模型小鼠来源的自身免疫抗体进行了处理,与标有荧光标记物的二抗反应后,采用流式细胞分析法(flow cytometric analysis)进行确认。设计出了一种利用形成环形结构的噬菌体表达环肽库(Ph.D.-C7C Phage Display Peptide Library kit;新英格兰生物实验室有限公司),筛选出模拟对应于通过淘选方法获得的XC154抗体表位的噬菌体,并利用筛选出的噬菌体确认肝癌患者和正常人的差异的方法。

[0024] 图2a以及2b是TAB-XC154自身免疫抗体的互补决定区(complementarity determining regions, CDR)序列,表示获得的XC154抗体的重链可变区(V_H ,图2a)和轻链可变区(V_L ,图2b)的互补决定区的分析结果。对从XC154抗体生成B细胞杂交瘤提取的总RNA的cDNA进行合成,并利用重链可变区互补决定区引物和轻链可变区互补决定区引物,通过聚合酶链式反应(PCR)扩增后,连接(ligation)于pTOP Blunt V2载体,从而制备重组质粒。在宿主细胞中扩增重组质粒后,进行提取,然后对相应部位进行碱基序列分析。通过分析碱基序列确认蛋白质序列后,以卡巴特(Kabat)CDR的定义为基础,决定CDR序列。

[0025] 图3是为确认XC154对于各种癌症细胞的反应性而进行的流式细胞分析(a)以及细胞内染色(b)的结果。进行癌症细胞内染色后,利用流式细胞分析方法分析XC154抗体对于各种癌症细胞的反应性的结果,确认不仅在HepG2, SK-Hep1等肝癌细胞株,还在其他多种癌症细胞中显示出较高的反应性。并且,通过荧光染色方法确认XC154抗体识别的抗原蛋白质在细胞内的表达位置的结果,确认了在癌症细胞株HepG2, Hepa-1cl7中,主要集中到了细胞质中的细胞膜侧,而与此相比,确认了在正常人的肝脏细胞Chang细胞株中则主要集中于细胞质中。

[0026] 图4是为确认XC154自身免疫抗体的特异反应性抗原蛋白质进行的蛋白免疫印迹结果。对多种种类的癌症细胞株的细胞匀浆以及未添加血清的细胞培养液进行定量,每50 μ g的样品在10%的SDS-PAGE上展开后,利用XC154抗体进行蛋白免疫印迹反应,结果确认了其识别64KDa左右分子量的蛋白质(M,分子量标记物;1, Hepalcl7;2, HepG2;3, HT-29)。

[0027] 图5为筛选TAB-XC154抗体的特异反应性表位表达噬菌体的结果,表示利用XC154抗体对噬菌体环肽库进行筛选,从而筛选出XC154抗体特异反应性抗原表达噬菌体的结果。图5a是分五次进行了利用XC154抗体的淘选,并筛选出了4种具有不同肽序列的噬菌体(XC154p1、XC154p2、XC154p4、XC154p9)。图5b是利用ELISA法确认了其对于XC154抗体的反应性的结果,从而确认了XC154p1噬菌体对TAB-XC154抗体的特异反应性最高。

[0028] 图6表示由XC154p1表位表达噬菌体引起的TAB-XC154抗体的细胞反应的竞争性抑制。确认了筛选出的XC154p1噬菌体能够模拟与TAB-XC154抗体结合的抗原的表位结构,从而可竞争性抑制TAB-XC154抗原-抗体的结合。固定肝癌细胞株HepG2,前列腺癌细

胞株 LNCap/LN3 细胞,并将细胞膜通透化后,使用与 XC154p1 噬菌体预先进行反应的 XC154 抗体进行处理,与标有荧光标记物的二抗反应后,采用流式细胞分析法进行确认。从结果中确认了 XC154p1 噬菌体几乎完全抑制了细胞表达抗原的抗体反应,从而确认了噬菌体表达的表位很好的模拟了原有抗原的抗原决定簇的结构。

[0029] 图 7 表示利用 XC154p1 表位表达噬菌体诊断肝癌的结果。使用 TAB-XC154 抗体特异反应性肽表达噬菌体 XC154p1 作为包被抗原的 ELISA 法,对肝癌患者和正常人的血清进行分析。从而结果可确认,将临界值(cutoff)定为 0.059 时,其可以以 86.96% 的敏感性(sensitivity)和 88.24% 的特异性(specificity)区别出肝癌患者。

[0030] 图 8 表示利用 XC154p1 表位表达噬菌体诊断乳腺癌的结果。使用 XC154 抗体特异反应性肽表达噬菌体 XC154p1 作为包被抗原的 ELISA 法,进行对乳腺癌患者以及正常人的血清分析时,无法将乳腺癌患者的血清与正常人的血清区分开,这与肝癌时明显不同。

[0031] 图 9 表示对 XC154 抗体特异反应性抗原蛋白质的鉴定。图 9a 表示 XC154 抗体反应性抗原蛋白质的纯化。制备 TAB-XC154 抗体反应性抗原过表达的 LnCap-LN3 细胞匀浆,利用阴离子交换树脂 HitrapQ-sepharose 进行分级提取,纯化所述抗原部分。对所述抗原过量存在的流分进行浓缩,在 SDS-PAGE 上进行展开,后提取 XC154 抗原的相应部位,进行胶内酶切(in-gel digestion)后,利用质谱分析法进行蛋白质鉴定。图 9b 表示 XC154 抗体特异反应性抗原蛋白质的质谱分析结果。对 XC154 抗原进行蛋白质鉴定的结果,确认了 ATIC 具有最高的分值。ATIC 与嘌呤的合成相关,被认为是对癌症细胞增殖发挥最主要功能的蛋白质,计算出的蛋白质分子量为 64.5kDa,其与 XC154 抗原的分子量类似。

[0032] 图 10 表示经鉴定的 XC154 抗体特异反应性抗原蛋白质的验证。图 10a 表示利用 siRNA 抑制 ATIC 的表达。将特异性地作用于 ATIC 的 siRNA 转染至 HepG2 细胞内,48 小时后通过逆转录聚合酶链式反应确认相关基因表达的结果,确认了抑制 50% 以上的表达。图 10b 表示抑制 ATIC 基因表达后,为确认 XC154 抗体反应而进行的流式细胞分析的结果。通过上述与上述相同的方法,确认 XC154 抗体对处理了 siRNA 的细胞的反应性的确认结果,确认了抗体反应性降低了 20% 左右。图 10c 表示抑制 ATIC 基因表达后,为确认 XC154 抗体的反应性而进行的蛋白免疫印迹的结果。为确认表达受到抑制的蛋白质是否为 XC154 抗体反应蛋白质,进行了蛋白免疫印迹。结果确认了 ATIC 表达受到抑制的细胞中, XC154 抗体反应也消失,从而确认了 XC154 抗原是 ATIC。

[0033] 最佳实施方式

[0034] 为实现所述目的,本发明一方面,提供一种与 ATIC 特异性结合的自身免疫抗体或者包含其抗原结合部位的片段。

[0035] 本发明中的术语“ATIC (5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase/IMP cyclohydrolase,5-氨基咪唑-4-羧胺核苷酸甲酰转移酶/IMP 环化水解酶)”是催化嘌呤从头(de novo)合成过程中的最后两个步骤反应的,具备两种功能的蛋白质。嘌呤和嘧啶的合成过程是生成 DNA 以及 RNA 合成所必须的核苷酸的反应,虽然在正常细胞中基本不会发挥作用,但在癌症细胞等分裂较快的细胞中则非常活跃。但是,ATIC 和癌症发生相关联的研究结果几乎还没有被报道过。本发明中首次在肝癌患者血液中确认了抗-ATIC 自身免疫抗体,并阐明了利用与其发生特异性反应的新型表位结构可诊断肝癌。

[0036] 本发明中使用的术语“自身免疫抗体(autoantibody)”指能与自体成分发生特异性反应的抗体,还称为自身抗体或者自体抗体。一般,由于个体不会对自身原有的本质发生免疫反应,因此不会产生抗体。但在特定情况下,有可能将自身原有的物质识别成抗原,并生成抗体,从而引起全身型红斑狼疮(systemic lupus erythematosus)以及风湿性关节炎(rheumatoid arthritis)等自身免疫性疾病(autoimmune disease)。与上述不同的是,本发明的自身免疫抗体是指对于与伴随着异常的癌症细胞生长一同产生的癌症细胞来源的抗原而产生的抗体,具体为对于癌症来源抗原,即对 ATIC 生成的抗体,在本发明中与“抗-ATIC 自身免疫抗体”或“与 ATIC 特异性结合的自身免疫抗体”混用。

[0037] 本发明中的一个实施例中,确认了从肝癌模型小鼠来源的杂交瘤克隆获得的自身免疫抗体对于肝癌细胞的反应性,并命名为“XC154 自身免疫抗体”或“TAB-XC154 自身免疫抗体”。之后,鉴定对于所述抗体的特异反应性抗原蛋白质的结果,最终确认是具有 64.5kDa 分子量的 ATIC,并可确认所述自身免疫抗体为抗-ATIC 自身免疫抗体(图 9 以及图 10)。

[0038] 本发明中的术语“抗原结合部位(antigen-binding site, paratope)”是指抗体中与抗原结合的部位。所述抗原结合部位是抗体的 Fv 部位中小的部位,其包括抗体重链和轻链的一部分,并与抗原的抗原决定簇(antigenic determinant, epitope)结合。

[0039] 本发明中所述自身免疫抗体或者包含其抗原结合部位的片段,优选可识别选自 SEQ NO. 17 至 SEQ NO. 20 的氨基酸序列,更优选识别 SEQ NO. 17 的氨基酸序列。

[0040] 本发明中的一个实施例中,为鉴定所述自身免疫抗体的具体抗原决定簇的序列,从肽表达文库中筛选 XC154 抗体特异反应性抗原的结果,确认了其可与选自 CLPSWFHRC (Cys-Leu-Pro-Ser-Trp-Phe-His-Arg-Cys; SEQ NO. 17)、CAPSWLHRC (Cys-Ala-Pro-Ser-Trp-Leu-His-Arg-Cys; SEQ NO. 18)、CSPSGLFSC (Cys-Ser-Pro-Ser-Gly-Leu-Phe-Ser-Cys; SEQ NO. 19)、CTPSWFHRC (Cys-Thr-Pro-Ser-Trp-Phe-His-Arg-Cys; SEQ NO. 20) 的一个以上的氨基酸序列特异性发生反应,还确认了与其中的 CLPSWFHRC (Cys-Thr-Pro-Ser-Trp-Phe-His-Arg-Cys; SEQ NO. 17) 的氨基酸序列显示出最高的反应性(图 5)。

[0041] 一般,一个抗体分子中包括两个重链(heavy chain)和两个轻链(light chain),每个重链和轻链在其 N-末端包含可变区。每个可变区包括 3 个互补决定区(Complementarity determining region: CDR)和 4 个骨架区(framework regions: FRs),互补决定区决定抗体的抗原结合特异性,由可变区的骨架区所维持,其以非常短的肽序列的形式存在。作为优选的本发明自身免疫抗体重链可变区的一部分,其可包括 SEQ NO. 3 的 CDR1 序列、SEQ NO. 4 的 CDR2 序列或者 SEQ NO. 5 的 CDR3 序列组成的自身免疫抗体或者包含其抗原结合部位的片段,可以是同时包括所述 CDR1、CDR2 以及 CDR3 序列的自身免疫抗体或者其片段。并且,作为本发明自身免疫抗体轻链可变区的一部分,其可包括 SEQ NO. 6 的 CDR1 序列、SEQ NO. 7 的 CDR2 序列或者 SEQ NO. 8 的 CDR3 序列组成的自身免疫抗体或者包含其抗原结合部位的片段,可以是同时包括所述 CDR1、CDR2 以及 CDR3 序列的自身免疫抗体或者其片段。并且,本发明显然还包括编码所述序列的核酸序列。

[0042] 本发明的自身免疫抗体中,作为重链可变区序列,优选由 SEQ NO. 1 的氨基酸序列构成的自身免疫或者包含其抗原结合部位的片段;作为轻链可变区序列,优选包括由 SEQ NO. 2 构成的自身免疫抗体或者包含其抗原结合部位的片段。并且,所述重链以及轻链可根

据需要分别使用或同时使用,并且可根据技术人员的目的,通过通常的基因工程方法,对多种 CDR 序列以及轻链和重链进行自由组合。

[0043] 本发明的一个实施例中,为研究所述自身免疫抗体的特性而分析互补决定区序列,结果确认了本发明的自身免疫抗体包括:包含 SEQ NO. 3 的重链 CDR1;SEQ NO. 4 的重链 CDR2;SEQ NO. 5 的重链 CDR3 的重链可变区;和包含 SEQ NO. 6 的轻链 CDR1;SEQ NO. 7 的轻链 CDR2;SEQ NO. 8 的轻链 CDR3 的轻链可变区,并确认了自身免疫抗体包含 SEQ NO. 1 的重链氨基酸序列以及 SEQ NO. 2 的轻链氨基酸序列(图 2)。

[0044] 本发明的自身免疫抗体包括:编码包含两个全长的重链或实现抗体-抗原结合并具有抗体分子的免疫学活性片段的多聚核苷酸。并且,本发明的抗体还包括:编码包含两个全长的轻链或实现抗体-抗原结合并具有抗体分子的免疫学活性的片段的多聚核苷酸。具有抗体分子免疫活性的片段是指保留抗原结合功能的片段,抗体片段的例子包括:(i) 由轻链的可变区(V_L)以及重链的可变区(V_H)和轻链的恒定区(C_L)以及重链的第一个恒定区(C_{H1})构成的 Fab 片段;(ii) 由 V_H 以及 C_{H1} 结构域构成的 Fd 片段;(iii) 由单克隆抗体的 V_L 以及 V_H 结构域构成的 Fv 片段;(iv) 由 V_H 结构域构成的 dAb 片段;(v) 分离的 CDR 域;(vi) 包含两个连接的 Fab 片段的 2 价片段 $F(ab')_2$ 片段;(vii) 通过肽连接将 V_H 结构域以及 V_L 结构域以形成抗原结合部位的方式进行结合的单链 Fv 分子(scFv);(viii) 双特异性单链 Fv 二聚体;以及(ix) 通过基因融合制备的多价或者多特异性片段,即双特异抗体(dia body)等,但并不仅限于此。

[0045] 本发明的自身免疫抗体或者包含其抗原结合部位的片段,优选由保藏编号为 KCTC11873BP 的杂交瘤细胞株产生的自身免疫抗体或者包含其抗原结合部位的片段。

[0046] 本发明另一方面,提供一种与所述 ATIC 特异性结合的自身免疫抗体特异性结合的抗原片段。

[0047] 本发明的“与 ATIC 特异性结合的自身免疫抗体特异性结合额抗原片段”包括所有能与所述自身免疫抗体特异性结合的蛋白质,而不仅限于特定的蛋白质或者多肽。所述抗原如果能被抗-ATIC 自身免疫抗体所识别,可优选包括其片段或者其变形体等。所述抗原至少由 9 个氨基酸构成,优选包括 12 个以上的氨基酸。

[0048] 所述抗原可以是能被本发明自身免疫抗体标记物识别的抗原决定簇的序列。如果所述序列是能被本发明自身免疫抗体识别的序列,则不会被序列的大小或种类所限制,所述序列优选为 7 个氨基酸末端有半胱氨酸的多肽序列。所述 7 个氨基酸末端有半胱氨酸的序列可为选自:CLPSWFHRC (Cys-Leu-Pro-Ser-Trp-Phe-His-Arg-Cys;SEQ NO. 17)、CAPSWLHRC (Cys-Ala-Pro-Ser-Trp-Leu-His-Arg-Cys;SEQ NO. 18)、CSPSGLFSC (Cys-Ser-Pro-Ser-Gly-Leu-Phe-Ser-Cys;SEQ NO. 19)、CTPSWFHRC (Cys-Thr-Pro-Ser-Trp-Phe-His-Arg-Cys;SEQ NO. 20) 的一种以上的氨基酸序列,且由于所述半胱氨酸的存在,形成环形结构,从而使自身免疫抗体的识别更为有效。但是,本发明的自身免疫抗体可识别的序列的种类不限于所述例子。

[0049] 本发明另一方面,提供一种包含测定所述自身免疫抗体或者包含其抗原结合部位的片段表达水平的制剂的肝癌诊断用组合物。

[0050] 本发明中的术语“诊断”是指确认病理状态的存在或者特征,而本发明的目的不仅在于确认肝癌的发病与否,还包括判断经过肝癌的治疗后,对应个体是否发生复发、转移、

药物反应性、耐药性等。利用本发明的与 ATIC 特异性结合的自身免疫抗体时,优选从肝癌疑似个体的样品中确认 ATIC 表达水平,从而不仅可预测该个体的肝癌发病与否,还可预测预后的好坏与否。

[0051] 本发明中的术语“样品”可为选自全血、血清、血液、血浆、唾液、尿、痰、淋巴液、脑脊液以及细胞间液中的一种以上的样品,其肝癌诊断指标,即抗-ATIC 自身免疫抗体的表达水平显示出差异。但所述“样品”并不仅限于此。

[0052] 本发明中的术语“诊断标记物、诊断用标记、为进行诊断的标记或诊断标记(diagnosis marker)”是指能将癌症细胞与正常细胞进行区分,从而进行诊断的物质,其可包括相比于正常细胞或者预后较好的癌症细胞,预后较差的细胞中显示增加或减少的多肽或者核酸(例:mRNA 等)、脂质、糖脂、糖蛋白或者糖(单糖、双糖、寡糖等)等有机生物分子等。根据本发明的目的,本发明的肝癌诊断标记物是抗-ATIC 自身免疫抗体,其相比于具备正常肝脏个体的全血、血液、血清或者血浆等,在患有肝癌的个体的全血、血液、血清或者血浆等中特异性地显示出更高的表达。

[0053] 本发明中的术语“肝癌(liver cancer)”是指起源于肝细胞的癌症。肝癌包括最初从肝脏发病的原发性肝癌,以及在其他组织发病的癌症转移至肝脏而发病的转移性肝癌。对于发病原因,目前还不明确,但大多患者患有肝硬变,且表明在患有肝硬变的患者和慢性活动性乙型肝炎、或乙型肝炎带菌者(carrier)中易发生肝癌。本发明人还确认了使用本发明自身抗体标记物时,可以以非常高的敏感性以及特异性诊断出个体是否得了肝癌。

[0054] 本发明中测定与 ATIC 特异性结合的自身免疫抗体或包含其抗原结合部位的片段表达水平的制剂,是指通过确认在肝癌发病或者疑似个体的全血、血清、血液、血浆、淋巴液以及细胞间液等中表达增加的标记物,即抗-ATIC 自身免疫抗体或者包含其抗原结合部位的片段的表达水平,从而可用于检测的分子,优选为可与所述自身免疫抗体特异性结合的多肽。所述与自身免疫抗体特异性结合的多肽选自 CLP SWFHRC (Cys-Leu-Pro-Ser-Trp-Phe-His-Arg-Cys;SEQ NO. 17)、CA PSWLHRC (Cys-Ala-Pro-Ser-Trp-Leu-His-Arg-Cys;SEQ NO. 18)、CSPSGLFSC (Cys-Ser-Pro-Ser-Gly-Leu-Phe-Ser-Cys;SEQ NO. 19)、CTPSWFHRC (Cys-Thr-Pro-Ser-Trp-Phe-His-Arg-Cys;SEQ NO. 20)中的氨基酸序列。对此进行分析的方法的例子包括蛋白免疫印迹法(Western blot)、ELISA 法、放射免疫分析法(radioimmunoassay)、放射免疫扩散法、双向扩散法、火箭免疫电泳法、组织免疫染色法、免疫沉淀分析法、补体结合分析法、流式细胞分析法(FACS)以及蛋白质芯片法等,但并不仅限于此。通过所述分析方法,可比较正常对照组的抗原-抗体复合体的生成量和肝癌发病或疑似个体中的抗原-抗体复合体的生成量,并可通过其分析结果对实际的肝癌疑似个体中是否发生肝癌进行诊断。

[0055] 诊断肝癌的方法可通过本发明的抗-ATIC 自身免疫抗体以及与其发生特异性结合的抗原间的抗体-抗原反应实现。本发明中的术语“抗原-抗体复合物”是指肝癌标记物,即自身免疫抗体和对其特异性的抗原的结合物,而抗原-抗体复合体的生成量可通过检测标签(detection label)的信号强度进行定量。

[0056] 所述检测标签可选自酶、荧光物、配体、发光物、微粒(micro particle)、氧化还原反应分子(예 독스 분자)以及放射性同位素组成的组中,但并不仅限于此。

[0057] 使用酶作为检测标签时可利用的酶,例如可为 β -葡萄糖醛酸酶, β -D-葡萄糖苷

酶, β -D-半乳糖苷酶, 脲酶, 过氧化物酶或者碱性磷酸酶, 乙酰胆碱酯酶, 葡萄糖氧化酶, 己糖激酶和 GDPase、RNAse, 葡萄糖氧化酶和荧光素酶、磷酸果糖激酶、磷酸烯醇丙酮酸羧激酶、天冬氨酸转氨酶、磷酸烯醇丙酮酸脱羧酶(포스포놀피루베이트데카복실라제)、 β -内酰胺酶等, 但并不仅限于此。荧光物可为例如荧光素、异硫氰酸盐、罗丹明、藻红蛋白、藻青蛋白、别藻蓝蛋白、邻苯二醛、荧光胺等, 但并不仅限于此。配体可为例如生物素衍生物等, 但并不仅限于此。发光物可为例如吖啶酯、荧光素、荧光素酶等, 但并不仅限于此。微粒可为例如胶体金、着色的乳胶等, 但并不仅限于此。氧化还原反应分子可为例如二茂铁、钆络合物、紫罗碱、苯醌、钛离子、铯离子、二酰亚胺、1,4-苯醌、氢醌、 $K_4W(CN)_8$ 、 $[Os(bpy)_3]^{2+}$ 、 $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ 、 $[Mo(CN)_6]^{4-}$ 等, 但并不仅限于此。放射性同位素可为例如 3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{36}Cl 、 ^{51}Cr 、 ^{57}Co 、 ^{58}Co 、 ^{59}Fe 、 ^{90}Y 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{186}Re 等, 但并不仅限于此。

[0058] 本发明人为鉴定与本发明自身免疫抗体结合的表位序列, 使用在 7 个氨基酸序列末端存在半胱氨酸而形成环形结构的噬菌体呈现环肽库体系, 优选在筛选与抗-ATIC 自身免疫抗体特异性结合的噬菌体的同时, 从筛选出的噬菌体中纯化与本发明抗体, 即抗-ATIC 自身免疫抗体具有良好反应性的组, 用包被抗原处理后, 确认了与结合于所述抗原的免疫抗体的反应性, 从而确认了这些氨基酸序列(表 1)。

[0059] 本发明另一方面, 提供一种包括测定所述自身免疫抗体或者包含其抗原结合部位的片段表达水平的制剂的肝癌诊断用组合物的诊断肝癌的用途。

[0060] 所述包括测定所述自身免疫抗体或者包含其抗原结合部位的片段表达水平的制剂的肝癌诊断用组合物如上所述, 本发明中可利用与 ATIC 特异性结合的自身免疫抗体或者包含其抗原结合部位的片段本身, 或者包括测定其表达水平的制剂的组合物, 用于诊断肝癌的用途。

[0061] 本发明另一方面, 提供一种生产本发明自身免疫抗体的杂交瘤细胞株。

[0062] 本发明的术语“杂交瘤”是指将两种细胞人工融合而制备成的细胞, 即利用聚乙二醇等可引起细胞融合的物质或使用某些种类的病毒使两个以上的同种细胞或异种细胞发生融合的细胞。杂交瘤将不同细胞具有的不同功能整合至一个细胞内, 杂交瘤中最有代表性的是淋巴细胞。特别是在骨髓瘤细胞(myeloma cell)或存在于脾脏或者淋巴结的淋巴细胞中, 融合抗体生成细胞的前体细胞(B 细胞)而得的杂种细胞, 可制备出单克隆抗体, 故广泛应用于研究和临床中。此外, 还有制备淋巴因子(生理活性物质)的 T 细胞与其肿瘤细胞(杂交瘤)等也被普遍使用。本发明中的生产自身免疫抗体的杂交瘤, 可由本领域技术人员对本领域已公知的细胞进行适当的变形后使用。本发明的一个实施例中, 将以 HBx 转染的小鼠中, 确认为发生了肝癌的个体的脾脏细胞确保为 B 细胞群, 与小鼠骨髓瘤细胞 Sp2/0 进行细胞融合, 制备杂交瘤细胞群, 筛选出生成 TAB-XC154 克隆分泌抗体的杂交瘤细胞株, 并于 2011 年 2 月 21 日将其保藏于韩国生命工学研究院典型培养物保藏中心, 获得保藏编号 KCTC11873BP。所述细胞株优选保藏编号为 KCTC11873BP 的细胞株。

[0063] 本发明另一方面, 提供一种包含本发明组合物的肝癌诊断用试剂盒。

[0064] 本发明的肝癌诊断用试剂盒可包括: 用于测定诊断肝癌的标记物, 即抗-ATIC 自身免疫抗体或者包含其抗原结合部位的片段表达水平的引物、探针或者选择性识别标记物的抗体, 以及适用于分析方法的一种或者一种以上的其他组成成分的组合、溶液或者装置。

[0065] 并且,本发明中用于测定由编码所述诊断标记物 ATIC 的基因来编码的蛋白质表达水平的试剂盒,为了实现抗体的免疫学检测,还可包括适当的缓冲溶液、显色酶或者用荧光物质标记的二抗以及显色基质等。作为所述基质,可利用由硝酸纤维素膜、聚乙烯树脂合成的 96 孔板,由聚苯乙烯树脂合成的 96 孔板以及由玻璃制成的载玻片等;作为显色酶可使用过氧化物酶(peroxidase)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase)等;作为荧光物质可使用 FITC、RITC 等;作为显色基底液可使用 2,2'-氨基-二(3-乙基-苯并噻唑啉磺酸-6)铵盐(ABTS)或者邻苯二胺(OPD)、四甲基联苯胺(TMB)。

[0066] 所述试剂盒中,为测定蛋白质水平而进行的分析方法包括:蛋白免疫印迹法(Western blot)、ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)、放射免疫分析法(radioimmunoassay)、放射免疫扩散法、双向扩散法、火箭免疫电泳法、组织免疫染色法、免疫沉淀分析法、补体结合分析法、流式细胞分析法以及蛋白质芯片法等,但并不仅限于此,且本发明的试剂盒优选为使用 ELISA 方法的试剂盒。

[0067] 为测定蛋白质表达水平进行的 ELISA 方法包括:利用识别附着于固体支持体的抗原的标记抗体的直接 ELISA;利用在识别附着于支持体的抗原的抗体复合体中,识别捕获抗体的标记抗体的间接 ELISA;在附着于固体支持体的抗体和抗原的复合体中,利用识别抗原的另一种标记抗体的直接夹心 ELISA;在附着于固体支持体的抗体和抗原复合体中,与识别抗原的另一种抗体反应后,利用能识别该抗体的二抗的间接夹心 ELISA 等多种 ELISA 方法。例如,可通过在固体支持体上附着上抗体,与样品反应后,再附着能识别抗原-抗体复合物的抗原的标记抗体,利用酶进行显色;或对识别抗原-抗体复合体的抗体,附着标记的二抗,再利用酶进行显色的夹心 ELISA 法进行检测。通过确认诊断标记物抗-ATIC 自身免疫抗体的表达程度,确认肝癌的发生与否。优选使用选自 SEQ NO. 17 至 20 中的氨基酸序列用作捕获抗-ATIC 自身免疫抗体的捕获子时,更优选使用 SEQ NO. 17 的氨基酸序列,可以以较高的敏感性和特异性诊断癌症。

[0068] 本发明的一个实施例中,利用肽噬菌体文库对与本发明自身免疫抗体反应的表位序列进行鉴定,并利用所述鉴定的序列与样品中的自身免疫抗体,即一抗进行反应,再将其与二抗(抗-人 IgGAM-HRP)进行反应,从而确认抗原-抗体复合体的生成与否以及其生成量,结果从正常个体和肝癌个体的血清中可观察到明显不同的图案(图 7)。利用所述方法检测抗-ATIC 自身免疫抗体以及利用其诊断肝癌时,可以以较高的特异性和敏感性诊断出肝癌。本发明优选实施例中利用 ELISA 进行检测的结果,确认了其可以以约 87% 的敏感性和约 88% 的特异性,区分以及诊断出正常个体和肝癌个体(图 7)。并且,利用相同的方法对乳腺癌患者血清进行检测的结果,显示所述方法无法将乳腺癌患者的血清与正常个体区分开,从而确认了本发明的方法对于诊断肝癌显示出特异性(图 8)。

[0069] 本发明的术语“敏感性”,是指对患有疾病的个体能检测出是阳性的比例,其是使用诊断方法时,实际能多好的检测出相关个体的基准。并且,术语“特异性”是指将正常个体检测出是阴性的比例,其是能多好的区分出未患有相关疾病的个体的基准。

[0070] 并且,还可利用对所述诊断标记物使用一种以上的抗体的蛋白免疫印迹。从样品中分离总蛋白质,利用电泳将蛋白质以大小进行分离后,转移至硝酸纤维素膜,并与抗体反应。对生成的抗原-抗体复合体的量,利用标记抗体确认的方法,确认由基因表达生成的蛋白质的量,从而确认肝癌的发生与否。并且,还可利用所述标记物的一种以上的抗体进行组

织免疫染色。从发生肝癌或者疑似个体中采集组织并进行固定后,利用本领域公知的技术制备石蜡包埋块儿。将其制备成几 μm 厚度的切片,贴至载玻片后,通过公知的方法,将其与本发明的包含自身免疫抗体的抗原结合部位的片段进行反应。之后,将未反应的抗体洗脱下来,并用所述记载的检测标签中的一种进行标记,在显微镜下解读抗体的标记与否。并且,还可利用将所述标记物的一种以上的抗体,以极高的密度,排列于基板上的特定位置的蛋白质芯片。利用蛋白质芯片分析样品的方法是,从样品中分离蛋白质,将分离出的蛋白质与蛋白质芯片混合形成抗原-抗体复合体,并对其进行解读,确认蛋白质的存在或者表达程度,从而确认肝癌的发生与否。

[0071] 本发明另一方面,提供一种利用本发明组合物的肝癌的诊断方法,其包括检测与 ATIC 特异性结合的自身免疫抗体或者包含其抗原结合部位的片段的步骤。

[0072] 本发明的肝癌诊断方法优选包括以下步骤:a)从肝癌疑似个体的样品中,测定与 ATIC 特异性结合的自身免疫抗体或者包含其抗原结合部位的片段的表达水平的步骤;以及 b)将所述表达水平与正常对照组样品中与 ATIC 特异性结合的自身免疫抗体或者包含其抗原结合部位的片段的表达水平进行比较的步骤。

[0073] 本发明中的术语“个体”是指包括人的哺乳类动物,具体包括马、狗、猫、猪、山羊、兔子、仓鼠、猴子、豚鼠(guinea pigs)、大鼠、小鼠、蜥蜴、蛇、羊、牛、鱼以及鸟,优选包括人。

[0074] 本发明中的术语“对照组”是指来源于抗-ATIC 自身免疫抗体的表达较发生肝癌或者疑似个体相比较低的个体的样品,其为利用本发明中的抗-ATIC 自身免疫抗体的抗原-抗体反应诊断肝癌时,成为基准的样品。

[0075] 本发明中的术语“样品”可为选自全血、血清、血液、血浆、唾液、尿、痰、淋巴液、脑脊液以及细胞间液中的一种以上的样品,其肝癌诊断指标,即抗-ATIC 自身免疫抗体的表达水平显示出差异。但所述“样品”并不仅限于此。

[0076] 本发明中为测定所述蛋白质表达水平而使用的方法包括蛋白免疫印迹法、ELISA 法、放射免疫分析法、放射免疫扩散法、双向扩散法、火箭免疫电泳、组织免疫染色法、免疫沉淀分析法、补体结合分析法、FACS 法以及蛋白质芯片法等,但并不仅限于此。对于所述测定蛋白质表达水平方法的详细内容如上所述。

[0077] 本发明另一方面,提供一种利用本发明自身免疫抗体的肝癌治疗剂的筛选方法,具体包括:(a)测定与 ATIC 特异性结合的自身免疫抗体或者包含其抗原结合部位的片段的表达水平的步骤;(b)给予肝癌治疗用备选物质的步骤;以及(c)确认与所述步骤(a)相比,与 ATIC 特异性结合的自身免疫抗体或者包含其抗原结合部位的片段的表达水平降低的步骤。

[0078] 本发明的所述步骤(a)中,作为测定与 ATIC 特异性结合的自身免疫抗体或者包含其抗原结合部位的片段的表达水平的步骤,可使用所述常规测定表达水平的方法,不受特别的限制。

[0079] 本发明的所述步骤(b)以及(c)是给予肝癌治疗用备选物质的步骤,以及确认与所述步骤(a)相比,与 ATIC 特异性结合的自身免疫抗体或者包含其抗原结合部位的片段的表达水平降低的步骤。

[0080] 本发明的术语“肝癌治疗用备选物质”是指有望具有治疗肝癌的作用的物质,可使用有望具有直接或间接使肝癌好转或改善肝癌的物质,不受特别的限制,可包括化合物、基

因或者蛋白质等所有有望具有治疗功能的物质。本发明的筛选方法中,确认给予所述备选物质前后,抗-ATIC 自身免疫抗体或者包含其抗原结合部位的片段表达水平的同时,所述表达水平较给药前降低时,可决定相应的备选物质为肝癌治疗剂。

具体实施方式

[0081] 以下,将通过下述实施例详述本发明。下述实施例仅是为了例示本发明,而不能解释为本发明的保护范围仅限于下述实施例。

[0082] 实施例 1:获得 HBx 小鼠来源的 XC154 自身免疫抗体

[0083] 为获得癌症发生时,一起产生的自身免疫抗体,使用了 HBx 转化小鼠,已知其发生的肝癌与人肝癌具有类似的形态。从饲养中的 HBx 转化小鼠中,取确认发生了肝癌的个体的脾脏(spleen)细胞,将此作为 B 细胞,并与小鼠骨髓瘤细胞 Sp2/0 进行细胞融合,制备成 B 细胞杂交瘤细胞。细胞融合根据一般的 B 细胞杂交瘤细胞的制备方法。融合的细胞利用次黄嘌呤-氨基蝶呤-胸苷培养基(hypoxanthine-aminopterin-thymidine medium, HAT 培养基)进行 1 次筛选,仅取形成克隆的细胞再进行培养。对在细胞培养液中,能检测出癌症细胞反应抗体的细胞重新进行选择,继续培养。

[0084] 自身免疫抗体对于癌症细胞的反应性的确认,是通过固定以及通透化(fixation&permeabilization)的癌症细胞株进行细胞内染色(intracellular staining)后,利用流式细胞测定法(flow cytometric analysis)进行分析。详细说明如下:将聚集至 70-80% 的 HepG2 或者 Hepalclc7 细胞用胰蛋白酶处理,从培养板解离下来,用 PBS 洗涤后,每 2×10^5 个细胞用 100 μ l 的固定/破膜(Cytofix/Cytoperm)溶液(BD 公司),在 4°C 条件下处理 20 分钟,进行固定以及通透化。反应后分别加入 1ml 的固定/破膜(Cytofix/Cytoperm)溶液(BD 公司)混匀后,以 1700rpm 离心 5 分钟,通过获得细胞沉淀的方法对细胞进行洗涤。结束洗涤后添加 50 μ l 的一抗溶液(B 细胞杂交瘤细胞培养液或者纯化的一抗溶液),在 4°C 条件下反应 40 分钟。反应结束后,细胞洗涤三次,用抗小鼠 Igs-FITC (DaKo 公司),4°C 条件下反应 40 分钟。反应结束后,再次将细胞洗涤三次,用 300 μ l 的 PBS 重悬细胞沉淀,并用流式细胞仪(BD 公司)进行分析。通过获得与抗体反应相应的荧光数值的平均值,比较各个反应。作为没有抗体反应的对照组,添加了 50 μ l 没有一抗的 DMEM 培养基。

[0085] 结果,可从 B 细胞杂交瘤细胞中确认多种自身免疫抗体生成的克隆,但本发明中进行了对于其中之一,即 TAB-XC154 克隆分泌抗体的分析(图 1)。于 2011 年 2 月 21 日将生成 TAB-XC154 克隆分泌抗体的杂交瘤细胞株包藏于韩国生命工学研究院(KRIBB)典型培养物保藏中心(KCTC),并获得保藏编号 KCTC11873BP。

[0086] 实施例 2:对 XC154 抗体的互补决定区(Complementary Determining Region, CDR)的分析以及抗体的纯化

[0087] 确认 XC154 抗体能特异性识别癌症细胞中表达的抗原后,为得到关于 XC154 抗体的抗原识别特异性的信息,分析了所述抗体的互补决定区序列。详细方法如下:

[0088] 收集 10^6 个左右的 XC154 抗体生成细胞,利用 RNA 提取试剂盒(Qiagen 公司)提取总 RNA。利用互补 DNA 合成(complementary DNA (cDNA) synthesis)试剂盒(Invitrogen 公司)从 5 μ g 的总 RNA 合成出了 cDNA,并利用合成出的 1 μ g 的 cDNA 和小鼠重链恒定区引物(Mouse Heavy chain constant region primer)F5'-CTT CCG GAA TTC S AR GTN

MAG CTG SAG SAG TCW GG-3' (SEQ NO. 21)、R5' -GGA AGA TCT GAC ATT TGG GAA GGA CTG ACT CTC-3' (SEQ NO. 22) 和小鼠轻链恒定区引物(Mouse light chain constant region primer)F5' -GGG AGC TCG AYAT TGT GMT SAC MCA RW C TMC A-3' (SEQ NO. 23)、R5' -GGT GCA TGC GGA TAC AGT TGG TGC AGC ATC-3' (SEQ NO. 24) 进行聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR) 扩增小鼠重链和轻链的包含 CDR 的部位后, 又使用 TOP Cloner Blunt kit (Enzymomics 公司) 连接于 pTOP B blunt V2 载体。重组质粒转化(transformation) 至 E. coli DH5 α , 接种至包含氨苄西林(ampicilin) 的 LB 合成培养基板上, 在 37 $^{\circ}$ C 条件下培养 15 小时。将各个在平板中形成的集落, 分别在 LB 液体合成培养基培养 12 小时以上, 提取质粒, 并分析相关碱基序列。通过分析出的碱基序列决定蛋白质序列, 将其利用卡巴特 CDR 的定义为基准进行分析, 决定 XC154 抗体的 CDR (图 2)。

[0089] 为分析 XC154 抗体的特异性反应, 需要纯化成单一成分的自身免疫抗体。因此, 本发明中将大量培养 XC154 抗体形成克隆的细胞培养液或抗体生成细胞注射至小鼠腹腔, 取得腹水液(ascites fluid) 用于抗体的纯化。对 XC154 抗体分型(isotyping) 的结果, 确认为 IgM, 并且为了纯化 IgM 的亲亲和层析, 使用甘露醇结合蛋白(MBP) - 琼脂糖(Mannose-binding protein immobilized agarose) 或者蛋白 L 琼脂糖(P rotein L agarose)。纯化的抗体进行 SDS-PAGE 后, 利用考马斯亮蓝染色(comassie staining) 进行确认, 并用考马斯亮蓝法(Bradford) 定量后使用。

[0090] 实施例 3: 确认 XC154 抗体特异反应性抗原在各种癌症细胞中的表达

[0091] 为确认 XC154 抗体对于多种癌症细胞株的反应性, 以上述实施例 1 的方法对各种癌症细胞进行细胞内染色后, 利用流式细胞测定方法进行分析(图 3)。从结果中, 确认了 XC154 抗体反应蛋白质在 HepG2、SK-Hep-1 等肝癌细胞株和 HeLa、LNCap-LN3、A549 等多种种类的癌症细胞株中均过表达。

[0092] 并且, 为确认在细胞内的表达位置, 进行细胞内染色后利用共聚焦荧光显微镜观察, 在细胞质的位置或者细胞膜的位置能确认比较强的染色(图 3)。

[0093] 实施例 4: XC154 自身免疫抗体特异反应性抗原蛋白质的确认

[0094] 利用蛋白免疫印迹的方法, 在癌症细胞株中确认了 XC154 抗体特异反应性抗原蛋白质的表达。收集待分析的细胞溶于 NP40 缓冲液(NP40 缓冲液: 包含 1.0%(v/v) 的 NP40, 蛋白酶抑制剂混合物(protease inhibitor cocktail (Roche 公司) 的 PBS) 作为蛋白质分析样品使用。利用考马斯亮蓝(Bradford) 法进行蛋白质的定量。将准备好的蛋白质样品, 以 50 μ g 量, 在 10% 还原的 SDS-PAGE 条件下进行展开, 并转移至聚偏二氟乙烯膜(PVDF 膜)。结束转移后, 浸渍于 5%(w/v) 脱脂奶(skim milk)/TBS (三羟甲基氨基甲烷缓冲盐水, Tris-buffered saline) 进行封闭(blocking), 后用一抗处理。作为一抗, 将纯化的 XC154 抗体, 以 0.1 μ g/ml 的浓度稀释于封闭溶液后使用。一抗处理完后, 利用 TBST (包含 0.1% (v/v) 吐温-20 的 TBS) 充分洗涤, 再用二抗(抗-小鼠 IgGAM- 辣根过氧化物酶) 进行处理, 利用增强化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL) 的方法确认抗体反应蛋白质的条带。其结果, 确认了在 HepG2 肝癌细胞株以及 HT29 大肠癌细胞中, XC154 抗体特异反应性抗原蛋白质的条带是具有 64KDa 左右分子量的条带(图 4)。

[0095] 从以上结果, 确认了肝癌小鼠来源的自身免疫抗体识别在人肝癌细胞中表达的特定蛋白质。因此, 根据所述结果, 发明人尝试着从随机的肽表达文库筛选出 XC154 抗体的抗

原决定簇类似物,从而推导出一种抗体检测法。

[0096] 实施例 5 :XC154 抗体特异反应性肽抗原表达噬菌体 (phage) 的探索

[0097] XC154 抗体特异反应性抗原决定簇是在确认人体血清中是否含有对于相同抗原决定簇的自身免疫抗体的检测法中最为重要的因素。为了作为 XC154 抗体特异反应部位,使用简便的抗原决定簇,而不是使用整个抗原蛋白质,从随机肽表达文库中筛选出了 XC154 抗体特异反应性肽抗原。作为肽表达文库使用了以随机序列表达七个氨基酸,两端具有半胱氨酸残基,从而形成环形的七个氨基酸结构的噬菌体呈现环肽库 (Ph. D. -C7C Phage Display Peptide Library kit ;新英格兰生物实验室有限公司),淘选过程根据制造商的指示进行。

[0098] 将 300ng 的 XC154 抗体与表达 2×10^{11} 个不同肽的噬菌体病毒体 (v i r i o n), 在 200μ l TBST 溶液中混合,在常温条件下反应 20 分钟,又与用预封闭溶液 (0.1M NaHCO_3 , pH8.6, 5mg/ml 的牛血清白蛋白 (BSA), 0.02% (w/v) 的 NaN_3) 处理的 25μ l 蛋白质 L 琼脂糖珠 (protein L-agar ose bead) 混合后,在常温下反应 15 分钟。抗体反应噬菌体,以抗体-噬菌体-蛋白质 L-琼脂糖结合体的形态,通过离心回收沉淀物,后用 TBST 洗涤几次后,利用 1ml 的 pH2.2 的溶出液 (0.2M 甘氨酸-盐酸, pH2.2, 1mg/ml 的 BSA) 处理而溶出。后迅速加入 pH9.1 的 1M Tris-HCl 溶液,使其变成中性 pH。溶出的噬菌体中的一部分,用于滴定 (titr ation) 噬菌体水,而其余的用于扩增噬菌体。对于扩增的噬菌体,重新通过所述方法进行淘选。

[0099] 其结果,对 XC154 抗体进行五次淘选过程之后,获得了四个具有不同肽序列的噬菌体。利用 XC154 抗体进行淘选的过程中,至第 4 次时可以观察到随着次数的增加,扩增的噬菌体数增加,从而特异性结合的噬菌体也增加 (图 5a)。获得的噬菌体中随机取 10 个,利用 DN A 碱基序列分析方法决定肽部位的序列,并决定由此获得的氨基酸序列 (表 1)。比较获得的抗原类似物的序列的结果,PSWFHR 的序列可在 6 种抗原类似物序列中反复确认,从而可预测作为抗原类似物时所述序列非常重要。

[0100] 表 1

[0101]

噬菌体	表位序列	序列目录
XC154p1	C L P S W F H R C	SEQ NO. 17
XC154p2	C A P S W L H R C	SEQ NO. 18
XC154p4	C S P S G L F S C	SEQ NO. 19
XC154p9	C T P S W F H R C	SEQ NO. 20

[0102] 为确认通过 XC154 抗体的特异性结合选择的噬菌体对于 XC154 抗体的反应性,将噬菌体作为包被抗原, XC154 抗体作为一抗实施了 ELISA 法。详细内容如下:通过肽序列决定结果确认了筛选出不同序列的噬菌体 (XC154p1、XC154p2、XC154p4、XC154p9),对其进行扩增后,用 PEG/NaCl 溶液处理进行部分纯化,从而作为 ELISA 包被抗原使用。在 100μ l 的包被溶液 (0.1M 的碳酸氢钠缓冲液, pH8.6) 中,将纯化的噬菌体稀释后,添加至 96 孔

Maxisorp ELISA 板中,每孔 1010 个。为包被抗原,添加了噬菌体的平板,在 4℃ 条件下保管 16 小时以上。包被噬菌体后,每孔添加 300 μ l 的脱脂奶溶液(5% (w/v)脱脂奶/TBST),并在常温下反应 1 小时,对抗原包被后剩余的部位进行封闭。封闭后利用 TBST(包含 0.1% 的吐温-20 的 TBS)洗涤 2 次,以 100ng/ μ l 的浓度添加 XC154 抗体,在常温下反应 90 分钟。反应后再用 TBST 洗涤 6 次,并使用以 1:2500 的比例稀释的二抗(抗-小鼠 IgGAM-辣根过氧化物酶(Pierce 公司))进行处理。用二抗处理时也在常温下反应 90 分钟,用 TBST 洗涤 6 次后,使用四甲基联苯胺溶液(TMB)作为辣根过氧化物酶(HRP)的底物,进行显色反应,并在 450nm 处测定吸光度,对抗原-抗体反应进行定量。结果,确认了作为抗原使用的四个噬菌体中 XC154p1 具有最高的反应性(图 5b)。

[0103] 实施例 6:利用 XC154p1 表位表达噬菌体的, XC154 抗体对于肝癌细胞反应的竞争性抑制

[0104] 为确认通过抗体特异性筛选出的噬菌体,是否充分模拟了癌症细胞表达抗原蛋白质的抗原决定簇(表位),在通过流式细胞分析法测定与 XC154 抗体的细胞表达抗原蛋白质的反应时,添加 XC154 抗体特异反应性噬菌体,从而确认反应是否被竞争性抑制。

[0105] 流式细胞测定法的具体方法如实施例 1 所述。比较了作为一抗仅单独用 XC154 抗体处理时的情况和将 XC154 抗体与 XC154p1 噬菌体预先混合反应 1 小时后处理时的情况。抗体每次使用 100ng,噬菌体每次使用 1011 或者 1012 个。作为对照组使用了不表达抗原肽的 M13 噬菌体(Eph),并在 HepG2 以及 LnCap-Ln3 细胞中确认反应。

[0106] 观察图 6 显示的结果,可知在上述条件下, XC154p1 噬菌体可抑制 90% 以上的 XC154 抗体对于 HepG2 或者 LnCap-LN3 细胞的反应。所述结果证实了 XC154p1 噬菌体可充分模拟 XC154 抗体特异反应性抗原蛋白质的表位部分。

[0107] 实施例 7:利用 XC154p1 表位表达噬菌体诊断肝癌

[0108] 一般在蛋白质抗原中,可刺激机体免疫系统,诱导抗体反应的部位(表位)限定于全部蛋白质结构中仅为 20 个以内长度的氨基酸的特定部位。并且,已知所述表位部位的特性在人、小鼠、山羊等不同个体中均发挥类似的作用。根据所述内容,可预测从肝癌模型小鼠获得的自身免疫抗体反应表位发挥相同的作用。将确认了 XC154 抗体反应特异性的 XC154p1 噬菌体用于人自身免疫抗体的检测,确认了其可检测出人血清内自身免疫抗体。详细内容如下所述。

[0109] 在 ELISA 平板的每个孔中,添加稀释于 100 μ l 的 0.1M 碳酸氢钠缓冲液(pH8.6)溶液的 100ng 的抗 M13 噬菌体抗体,并在 4℃ 条件下包被 16 小时。包被后,去除多余的抗体,每孔添加 300 μ l 无蛋白封闭缓冲液(protein-free blocking buffer, Pierce 公司)进行封闭。封闭后,用 TBST 洗涤 2 次,每孔添加稀释于 100 μ l 无蛋白封闭缓冲液的 10^{10} 个 XC154p1 噬菌体进行处理。处理后,用 TBST 洗涤 6 次,将肝癌患者以及正常人血清作为一抗进行处理。一抗反应在常温下维持 2 小时,反应后用 TBST 洗涤 6 次,从而将多余的抗体洗去。作为二抗将抗-人 IgGAM-HRP (anti-human IgGAM-HRP, Pierce 公司)以 1:5000 的比例稀释于无蛋白封闭溶液,用 100 μ l 处理后在常温下反应 90 分钟。反应后,重新用 TBST 洗涤 6 次,每孔添加 100 μ l 的 TMB 溶液进行 HRP 反应后,在 450nm 处测定吸光度。利用 XC154p1 测定对于人血清的 ELISA,反复进行 3 次以上确认了重现性,并将其中最具代表性的结果通过图 7 显示。

[0110] 如图 7 所示,利用 XC154p1 噬菌体可将正常人和肝癌患者血清,以 86.96% 的敏感性和 88.24% 的特异性区分开。根据上述结果,可判断本发明中提出的利用 XC154 抗体抗原决定簇类似物 XC154p1 噬菌体的人血清 ELISA 法可用于肝癌诊断方法。

[0111] 实施例 8:利用 XC154p1 表位表达噬菌体诊断乳腺癌

[0112] 为确认利用 XC154p1 噬菌体能否诊断乳腺癌患者,利用上述相同的方法,对乳腺癌患者血清进行 ELISA 方法。

[0113] XC154 抗体是从肝癌模型小鼠获得的自身免疫抗体,对其他种类的癌症细胞株的反应性也非常高,因此对于乳腺癌的诊断效果也是比较可期待的。但正如图 8 所示,乳腺癌患者血清与肝癌患者的血清不同,没有显示与正常血清不同的结果。

[0114] 综合以上结果,利用模拟对于 XC154 自身免疫抗体的抗原反应部位的 XC154p1 噬菌体抗原,可构成对诊断肝癌具有特异性的 ELISA 诊断方法。

[0115] 实施例 9:确认 XC154 抗体识别的蛋白质

[0116] 通过以上结果,可确认 XC154 自身免疫抗体是对于肝癌具有非常大意义的生物标记物。为进一步公开 XC154 自身免疫抗体对于肝癌的含义,有必要确认抗原蛋白质,并进一步阐明其在肝癌发生过程中的作用。为此发明人进行了鉴定 XC154 抗体特异反应性抗原蛋白质的过程。详细内容如下。

[0117] 为确认 XC154 抗体特异反应性抗原蛋白质,将相应抗原蛋白质表达较多的 LN-Cap-LN3 细胞匀浆(使用 RIPA 缓冲液),利用 HiTrap-Q (G E healthcare 公司)层析柱进行分级提取。通过对各个流分的蛋白免疫印迹结果,筛选包含 XC154 抗体特异反应性抗原蛋白质的流分,将所述流分沉淀于丙酮进行浓缩。经过浓缩的蛋白质,利用 8-10% 的 SD S-PAGE 凝胶进行分离,其中的一部分用于通过蛋白免疫印迹确认 XC154 抗原的存在,另外一部分利用考马斯亮蓝确认条带后,切出 XC154 抗体反应位置相应的蛋白质条带,进行利用胰蛋白酶的胶内酶解(图 9a)。利用质谱分析法对经胶内酶解提取出的肽流分进行分析,从而获得对蛋白质序列的信息。从结果中确认了 XC154 抗体反应抗原是 A TIC (5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase/IMP cyclohydrolase,5-氨基咪唑-4-羧胺核苷酸甲酰转移酶/IMP 环化水解酶)(图 9b)。

[0118] 为验证利用质谱分析法确认的蛋白质鉴定结果,确认了对于利用 siRNA 抑制 ATIC 表达的细胞,XC154 抗体反应是否减少。具体内容如下:抑制 ATIC 表达的 siRNA 使用的是由 Bioneer 公司提供的 siRNA,利用脂质体 2000 (Lipofectamine2000, Invitrogen 公司)转入 HepG2 细胞内。siRNA 处理 48 小时后收集细胞,提取总 RNA,以 5 μ g 的 RNA 为模板合成 cDNA。再将合成的 cDNA 为模板,利用与 ATIC 基因具有特异性的引物进行聚合酶链式反应,并将其结果利用 1% 琼脂糖凝胶进行分析(图 10a)。从结果中可确认 50% 以上的 ATIC 的表达被抑制。对于通过 RT-PCR 确认了 ATIC 表达被抑制的细胞,利用上述方法进行对 XC154 抗体的流式细胞分析。从结果中确认了在 ATIC 表达被抑制时,XC154 抗体特异性反应减少(图 10b)。蛋白免疫印迹结果中也可确认相同倾向。用对于 ATIC 的 siRNA 处理后,进行蛋白免疫印迹结果,显著降低了 XC154 抗体反应抗原蛋白质的量(图 10c)。从所述结果可确认 XC154 抗体特异反应性抗原蛋白质是 ATIC。

[0119] 国际承认用于专利程序的微生物保存布达佩斯条约

[0120] 保藏证明

- [0121] 国际表
 [0122] 按照 Rule7.1 发出
 [0123] 至 :赵恩伟
 [0124] 韩国大田市儒城区科学路 111 韩国生命工学研究院
 [0125] 邮编 305-806
 [0126]

I. 微生物鉴定	
保藏人提供的鉴定参考: TAB-XC154 (小鼠 B 细胞杂交瘤细胞系)	国际保藏机构登记号: KCTC 11873BP
II. 科学描述和/或建议的分类学名称	
根据以上 I 鉴定的微生物附有: <input checked="" type="checkbox"/> 科学描述 <input type="checkbox"/> 建议的分类学名称 (如果必要, 划“×”标记)	
III. 收到和受理	
本国际保藏机构接受根据以上 I 鉴定的微生物, 该微生物收到日为 2011 年 2 月 21 日 。	
V. 国际保藏机构	
名称: 韩国生命工学研究院典型培养物保藏中心 地址: 韩国大田市儒城区科学路 111 韩国生命工学研究院, 邮编 305-806	有权代表国际保藏机构的人员或授权官员的签字: 李正肃 日期: 2011 年 3 月 14 日

- [0127] 上述内容与原文内容一致, 特此证明。
 [0128] 2011 年 6 月 2 日
 [0129] 代理人 孙民

[0001]

序列表

<110> 韩国生命工学研究院
 <120> 包含抗-ATIC自身免疫抗体的肝癌诊断标记物以及包含其抗原的肝癌诊断用组合物
 <130> KHP13212669.0
 <150> KR 10-2011-0053509
 <151> 2011-06-02
 <160> 24
 <170> KopatentIn 2.0
 <210> 1
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 重链可变区
 <400> 1
 Gly Xaa Lys Leu Gln Gly Ser Gly Ala Gly Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Lys Gly Leu Gly Trp Ile
 35 40 45
 Gly Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Ile Asn Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Arg Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Gly Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 100 105 110
 Gly Ser Gln Ser Phe Pro Asn Val
 115 120
 <210> 2
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 轻链可变区
 <400> 2
 Xaa Ile Val Leu Xaa Xaa Xaa Thr Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Asn Asn Met
 20 25 30
 Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Thr Gly Ser Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45
 Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Asn
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Gly Ala Gly
 65 70 75 80
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Phe Thr

[0002]

序列表

	85	90	95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Gly Leu Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro			
	100	105	110
Thr Val Ser			
	115		
<210>	3		
<211>	10		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	重链可变区的CDR1		
<400>	3		
Gly Tyr Ala Phe Ser Asn Tyr Trp Met Asn			
1	5		10
<210>	4		
<211>	17		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	重链可变区的CDR2		
<400>	4		
Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Ile Asn Tyr Asn Gly Lys Phe Lys			
1	5	10	15
Gly			
<210>	5		
<211>	3		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	重链可变区的CDR3		
<400>	5		
Gly Thr Tyr			
1			
<210>	6		
<211>	10		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	轻链可变区的CDR1		
<400>	6		
Ser Ala Ser Ser Ser Val Asn Asn Met Tyr			
1	5		10
<210>	7		
<211>	7		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	轻链可变区的CDR2		

[0003]

序列表

<400> 7
 Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser
 1 5

<210> 8
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 轻链可变区的CDR3

<400> 8
 Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Phe Thr
 1 5

<210> 9
 <211> 360
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 重链可变区

<400> 9
 gaggtkaagc tgcaggagtc tggggctgag ctggtgaagc ctggggcctc agtgaagatt 60
 tcctgcaaaa cttctggcta cgcattcagt aactactgga tgaattgggt gaagcagaga 120
 cctggaaagg gtcttgagtg gatiggacag atttatcctg gagatggtga tattaattat 180
 aaigggaaagt tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag aacagcctac 240
 atgcaactca gcagtetgac ctctgaggac tetgegtet attctgtgc aagagggact 300
 tattggggcc aagggactct ggtaactgic tctgcagaga gtcagtctct cccaaatgic 360
 360

<210> 10
 <211> 345
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 轻链可变区

<400> 10
 gayattgtgc tcaacmarwc tacageaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcaec 60
 atgacctgca gtgccagctc aagtgfaaat aacatglact ggtatcagca gaagacagga 120
 tcctcccaca gactctgat ttatgacaca tccaaactgg cttctggagt cctgtttgt 180
 ttcagtgcca atgggtctgg gaactcttac tctctcaaa tcagecgaat ggaggctgaa 240
 gatctgcca cttattactg ccaacagtgg agtagttatc catcactgtt cggagggggg 300
 accaagctag aactanaacg ggetgatgct gcaccaactg tatcc 345
 345

<210> 11
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>

[0004]

序列表

<223>	重链可变区的CDR1	
<400>	11	
	ggctacgcat tcagtaacta ctggatgaat	30
<210>	12	
<211>	51	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	重链可变区的CDR2	
<400>	12	
	cagatttatc ctggagatgg tgatattaat tataatggaa agttcaeggg c	51
<210>	13	
<211>	9	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	重链可变区的CDR3	
<400>	13	
	gggacttat	9
<210>	14	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	轻链可变区的CDR1	
<400>	14	
	agtgccagct caagtgtaaa taacatgtac	30
<210>	15	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	轻链可变区的CDR2	
<400>	15	
	gacacatcca acctggettc t	21
<210>	16	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	轻链可变区的CDR3	
<400>	16	
	caacagtgga gtagttatcc attcagc	27
<210>	17	
<211>	9	
<212>	PRT	

[0005]

序列表

- <213> 人工序列
- <220>
<223> XC154p1的表位
- <400> 17
Cys Leu Pro Ser Trp Phe His Arg Cys
1 5
- <210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
- <220>
<223> XC154p2的表位
- <400> 18
Cys Ala Pro Ser Trp Leu His Arg Cys
1 5
- <210> 19
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
- <220>
<223> XC154p4的表位
- <400> 19
Cys Ser Pro Ser Gly Leu Phe Ser Cys
1 5
- <210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
- <220>
<223> XC154p9的表位
- <400> 20
Cys Thr Pro Ser Trp Phe His Arg Cys
1 5
- <210> 21
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223> 重链恒定区正向引物
- <400> 21
cttccggaat tcsargtnma gctgsagsag tcwgg
- <210> 22
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223> 重链恒定区反向引物

35

[0006]

序列表

<400>	22		
ggaagatctg acatttggga aggactgact ctc			33
<210>	23		
<211>	32		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	轻链恒定区正向引物		
<400>	23		
gggagctcga yatttgmts acmcarwctm ca			32
<210>	24		
<211>	30		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	轻链恒定区反向引物		
<400>	24		
ggtgcatgcg gatacagttg gtgcagcatc			30

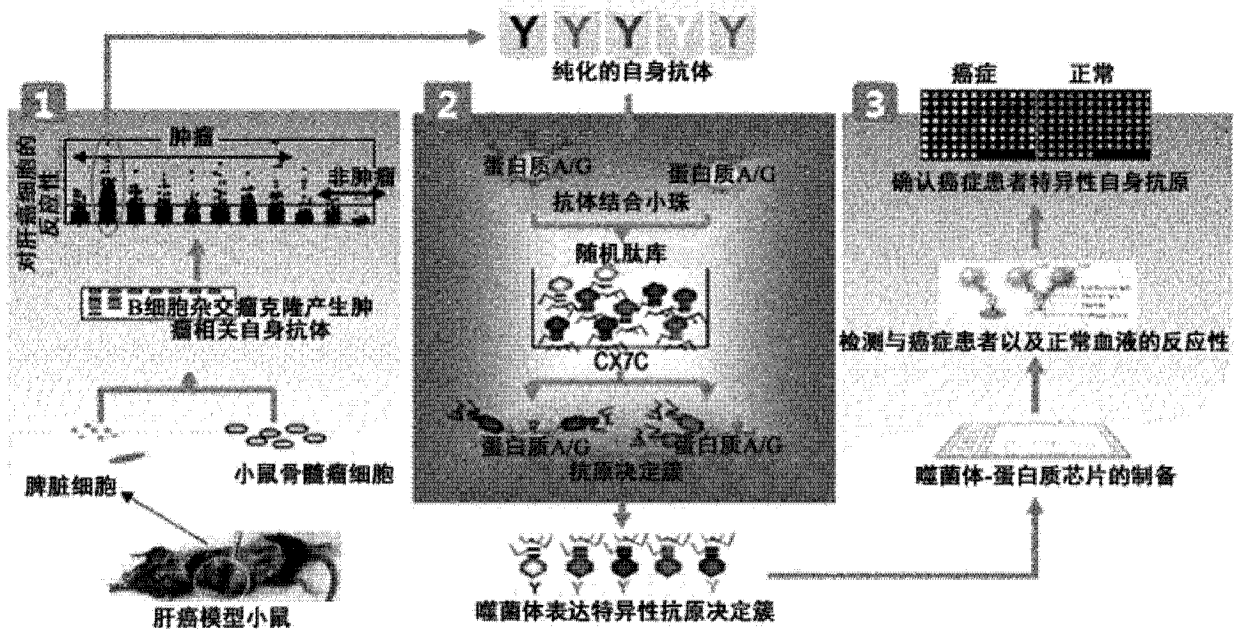


图 1

TAB-XC154-V_H

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
GAG G	GTK X	AAG K	CTG L	CAG Q	GAG G	TCT S	GGG G	GCT A	GAG G	CTG L	GTG V	AAG K	CCT P	GGG G
												CDR-H1:a.a. 26-35		
16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
GCC A	TCA S	GTG V	AAG K	ATT I	TCC S	TGC C	AAA K	ACT T	TCT S	GGC G	TAC Y	GCA A	TTC F	AGT S
31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
AAC N	TAC Y	TGG W	ATG M	AAT N	TGG W	GTG V	AAG K	CAG Q	AGA R	CCT P	GGA G	AAG K	GGT G	CTT L
												CDR-H2:a.a. 50-66		
46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
GAG G	TGG W	ATT I	GGA G	CAG Q	ATT I	TAT Y	CCT P	GGA G	GAT D	GGT G	GAT D	ATT I	AAT N	TAT Y
61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75
AAT N	GGA G	AAG K	TTC F	AAG K	GGC G	AAG K	GCC A	ACA T	CTG L	ACT T	GCA A	GAC D	AAA K	TCC S
76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
TCC S	AGA R	ACA T	GCC A	TAC Y	ATG M	CAA Q	CTC L	AGC S	AGT S	CTG L	ACC T	TCT S	GAG G	GAC D
												CDR-H3:a.a. 99-101		
91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105
TCT S	GCG A	GTC V	TAT Y	TTC F	TGT C	GCA A	AGA R	GGG G	ACT T	TAT Y	TGG W	GGC G	CAA Q	GGG G
106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
ACT T	CTG L	GTC V	ACT T	GTC V	TCT S	GCA A	GAG G	AGT S	CAG Q	TCC S	TTC F	CCA P	AAT N	GTC V

图 2a

TAB-XC154-V_L

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
GAY X	ATT I	GTG V	CTC L	ACM X	CAR X	WCT X	ACA T	GCA A	ATC I	ATG M	TCT S	GCA A	TCT S	CCA P
												CDR-L1:a.a. 24-33		
16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
GGG G	GAG G	AAG K	GTC V	ACC T	ATG M	ACC T	TGC C	AGT S	GCC A	AGC S	TCA S	AGT S	GTA V	AAT N
31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
AAC N	ATG M	TAC Y	TGG W	TAT Y	CAG Q	CAG Q	AAG K	ACA T	GGA G	TCC S	TCC S	CCC P	AGA R	CTC L
												CDR-L2:a.a. 49-55		
46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
CTG L	ATT L	TAT Y	GAC D	ACA T	TCC S	AAC N	CTG L	GCT A	TCT S	GGA G	GTC V	CTT P	GTT V	CGT R
61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75
TTC F	AGT S	GGC G	AAT N	GGG G	TCT S	GGG G	ACC T	TCT S	TAC Y	TCT S	CTC L	ACA T	ATC I	AGC S
76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
CGA R	ATG M	GAG G	GCT A	GAA G	GAT D	GCT A	GCC A	ACT T	TAT Y	TAC Y	TGC C	CAA Q	CAG Q	TGG W
												CDR-L3:a.a. 88-96		
91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105
AGT S	AGT S	TAT Y	CCA P	TTC F	ACG T	TTC F	GGA G	GGG G	GGG G	ACC T	AAG K	CTA L	GAA G	CTA L
106	107	108	109	110	111	112	113	114	115					
AAA K	CGG R	GCT A	GAT D	GCT A	GCA A	CCA P	ACT T	GTA V	TCC S					

图 2b

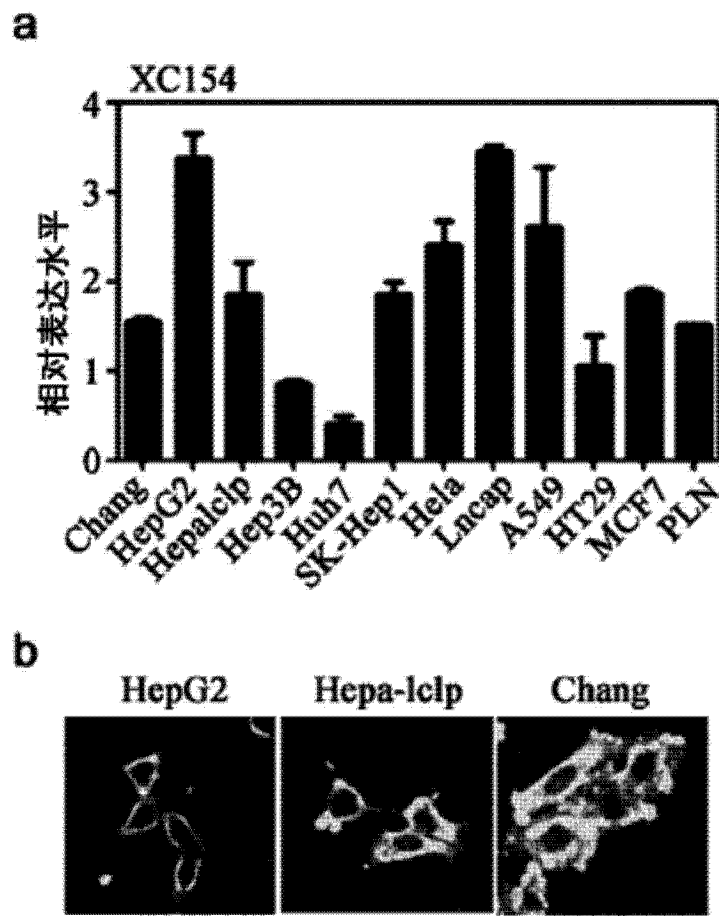


图 3

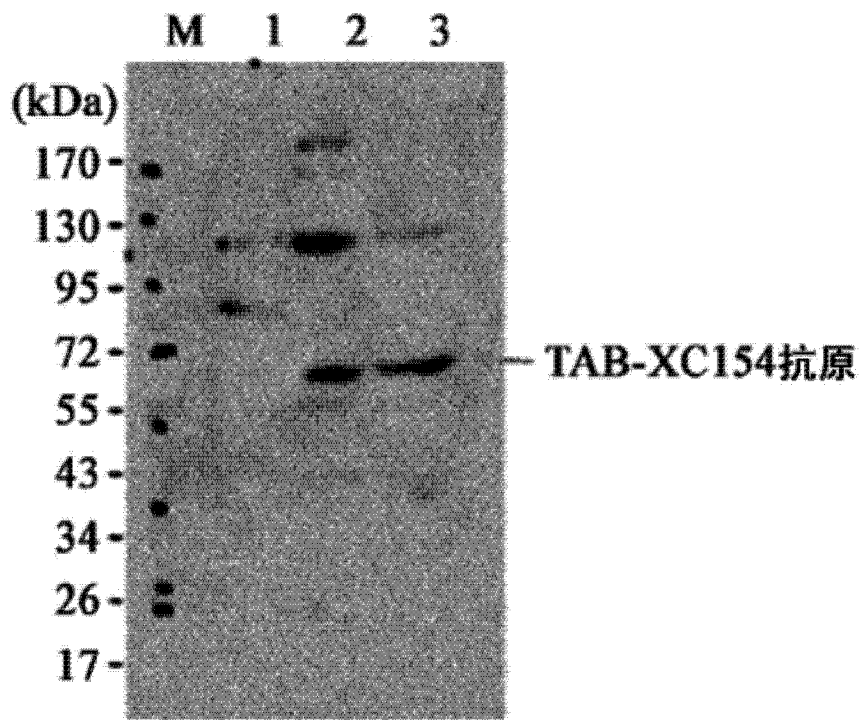


图 4

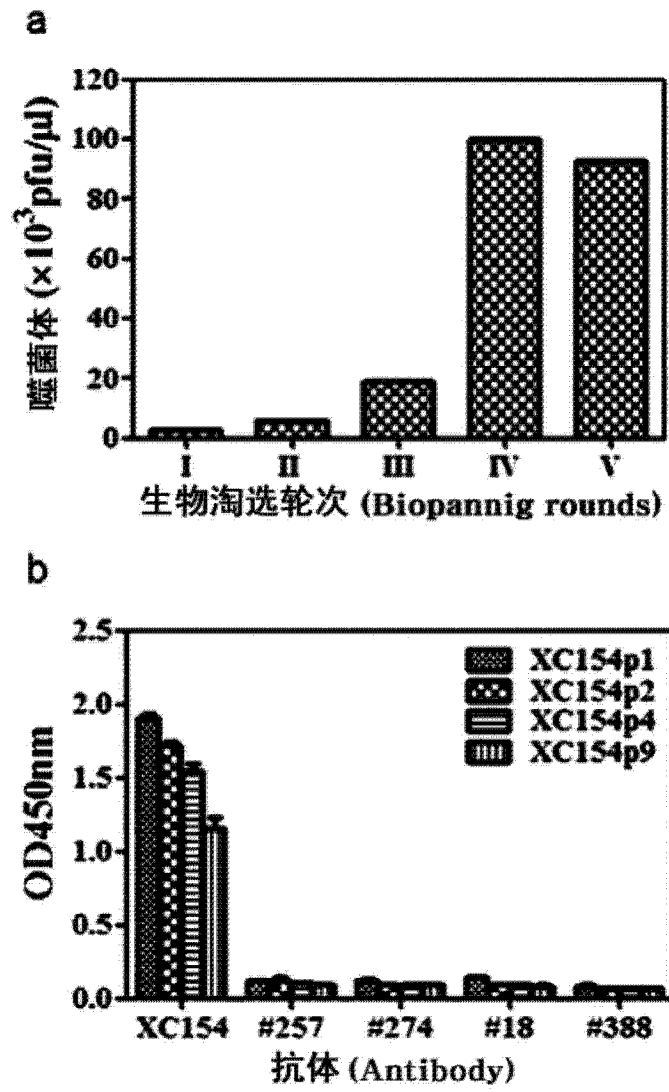


图 5

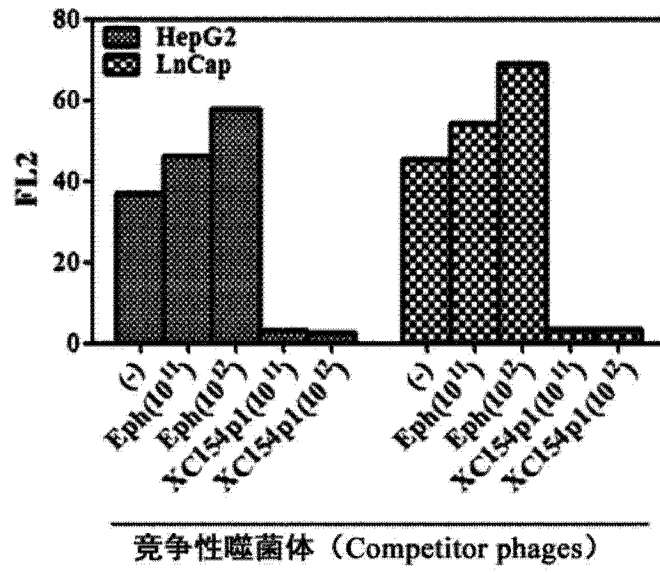


图 6

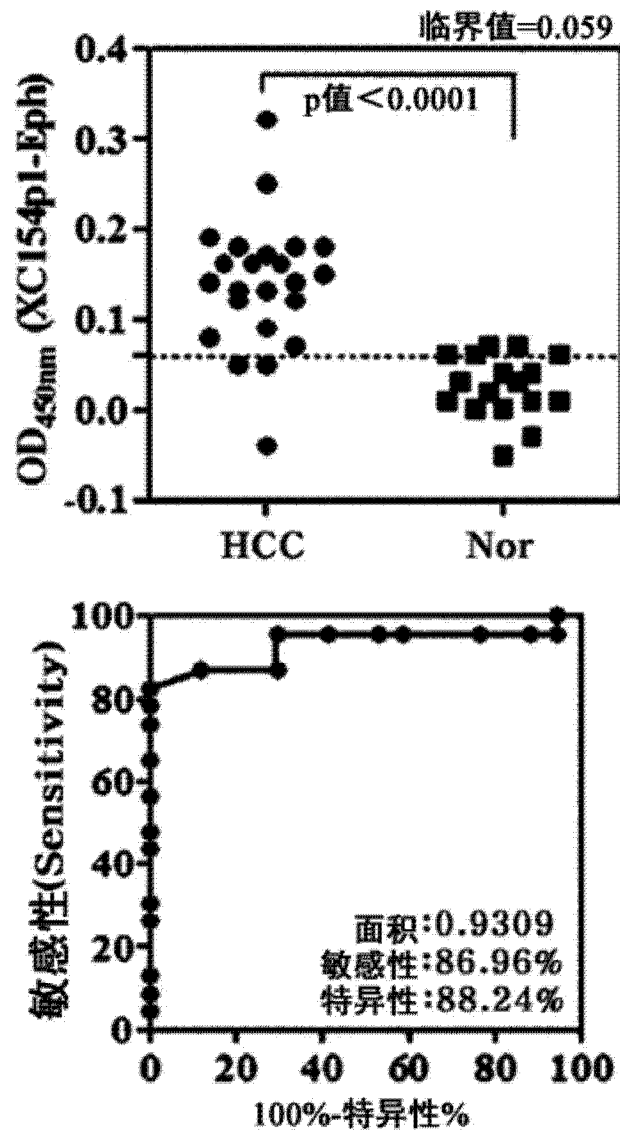


图 7

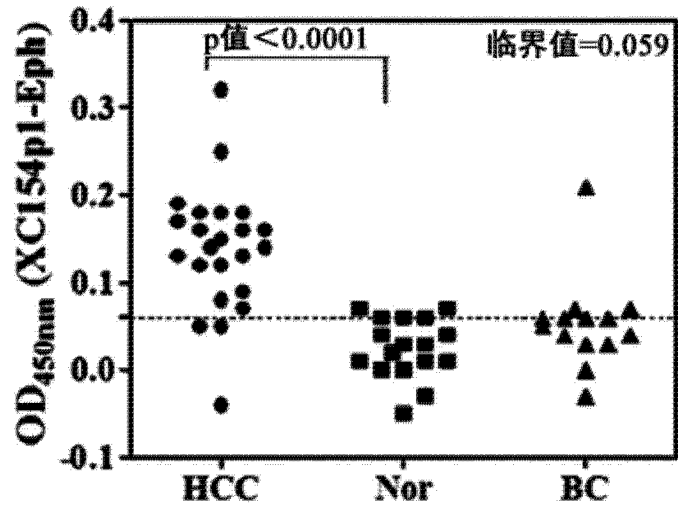


图 8

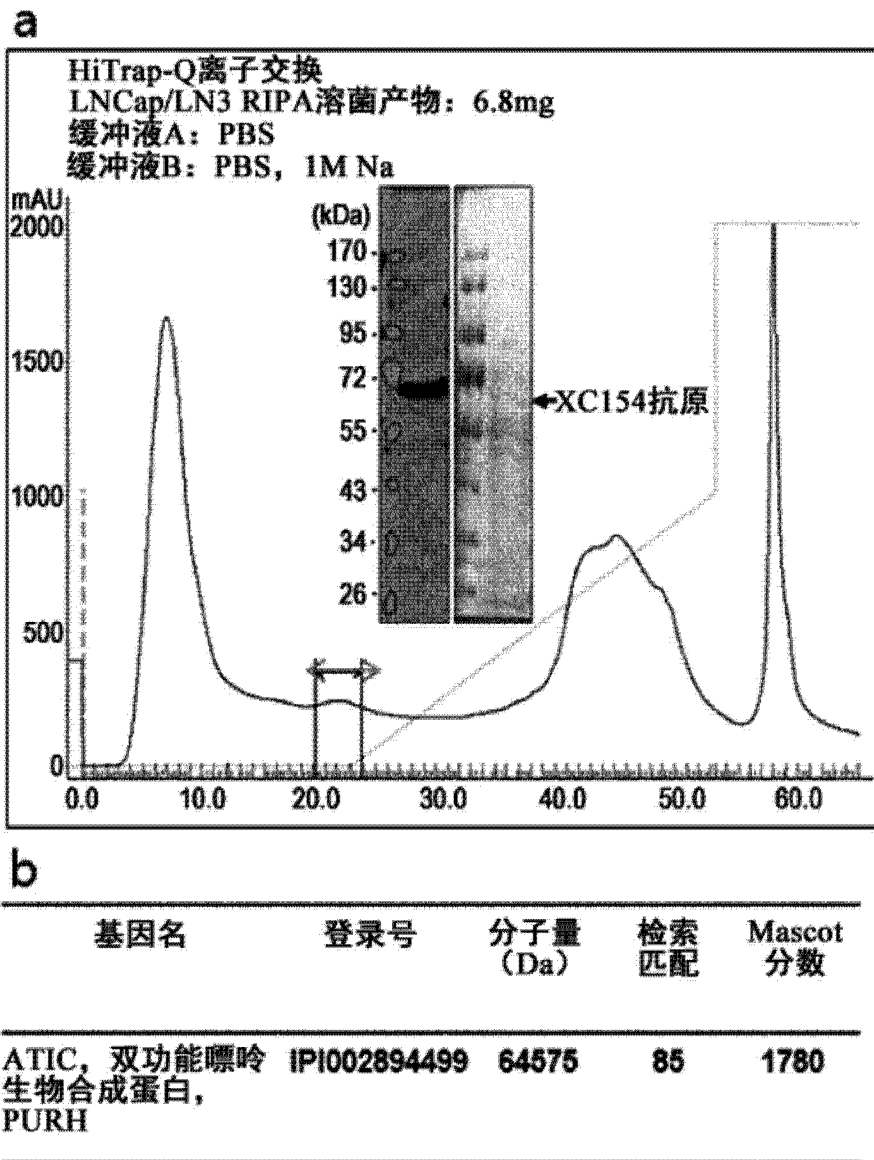


图 9

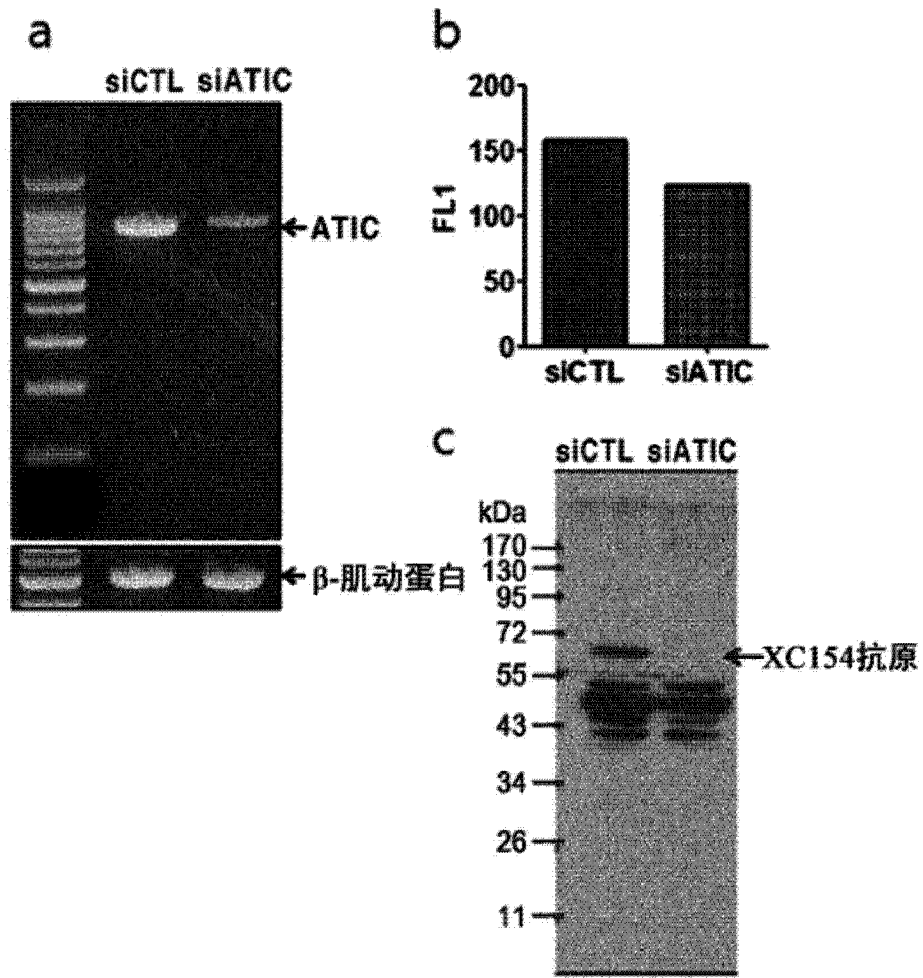


图 10

专利名称(译)	包含抗-ATIC自身免疫抗体的肝癌诊断标记物以及包含其抗原的肝癌诊断用组合物		
公开(公告)号	CN103732627A	公开(公告)日	2014-04-16
申请号	CN201280038342.1	申请日	2012-06-04
[标]申请(专利权)人(译)	韩国生命工学研究院		
申请(专利权)人(译)	韩国生命工学研究院		
当前申请(专利权)人(译)	韩国生命工学研究院		
[标]发明人	赵恩伟 许昌圭 高正宪 禹美京 俞香淑 黄海民		
发明人	赵恩伟 许昌圭 高正宪 禹美京 俞香淑 黄海民		
IPC分类号	C07K16/30 G01N33/53 G01N33/574 C12N5/16		
CPC分类号	C07K16/40 G01N33/564 G01N33/57438		
代理人(译)	王朋飞		
优先权	1020110053509 2011-06-02 KR		
其他公开文献	CN103732627B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种与ATIC特异性结合的自身免疫抗体 (autoantibody) 或者包含其抗原结合部位 (antigen-binding site , Paratope) 的片段 ; 一种包括测定所述片段表达水平的制剂的肝癌诊断用组合物 ; 一种生产所述自身免疫抗体的杂交瘤细胞株 ; 一种包含所述组合物的肝癌诊断用试剂盒 ; 利用所述组合物的肝癌诊断方法 ; 以及一种利用所述自身免疫抗体的肝癌治疗剂的筛选方法。使用本发明的抗-ATIC特异反应性自身免疫抗体作为肝癌诊断标记物 , 可利用血液、血浆、血清、淋巴液等非侵袭性的生物样品 , 以约87%的敏感性和约88%的特异性诊断肝癌的发生与否。并且 , 可以仅利用本发明中鉴定的氨基酸序列 , 便可简单诊断出肝癌 , 因此对于肝癌诊断用试剂盒的开发非常有效。

I. 微生物鉴定	
保藏人提供的鉴定参考: TAB-XC154 (小鼠 B 细胞杂交瘤细胞系)	国际保藏机构登记号: KCTC 11873BP
II. 科学描述和/或建议的分类学名称	
根据以上 I 鉴定的微生物附有:	
<input checked="" type="checkbox"/> 科学描述	
<input type="checkbox"/> 建议的分类学名称 (如果必要, 划“x”标记)	
III. 收到和受理	
本国际保藏机构接受根据以上 I 鉴定的微生物, 该微生物收到日为 2011 年 2 月 21 日 。	
V. 国际保藏机构	
名称: 韩国生命工学研究院典型培养物保藏中心 地址: 韩国大田市佛城区科学路 111 韩国生命工学研究院, 邮编 305-806	有权代表国际保藏机构的人员或授权官员的签字: 李正肃 日期: 2011 年 3 月 14 日