



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102549014 A

(43) 申请公布日 2012. 07. 04

(21) 申请号 201080045530. 8

(22) 申请日 2010. 08. 16

(30) 优先权数据

2009-230361 2009. 10. 02 JP

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 03. 31

(86) PCT申请的申请数据

PCT/JP2010/063813 2010. 08. 16

(87) PCT申请的公布数据

W02011/040133 JA 2011. 04. 07

(83) 生物保藏信息

FERM BP-11176 2009. 08. 28

(71) 申请人 学校法人东京女子医科大学

地址 日本东京都

(72) 发明人 丸义朗 田中建志 寺井清美

(74) 专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司

公司 11127

代理人 丁香兰 庞东成

(51) Int. Cl.

C07K 16/18 (2006. 01)

A61K 39/395 (2006. 01)

A61P 35/00 (2006. 01)

A61P 35/04 (2006. 01)

C07K 16/46 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

C12N 15/09 (2006. 01)

C12P 21/08 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 7 页

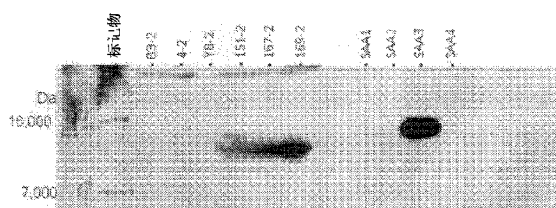
序列表 2 页 附图 1 页

(54) 发明名称

人血清淀粉样蛋白 A3 抗体及其应用

(57) 摘要

本发明的目的在于制作尚未确认在人生物体内存在的人 SAA3 的抗体,解明在人生物体内存在人 SAA3,同时解明人 SAA3 与疾病的关系并提供该疾病的治疗方法。特别是,本发明涉及针对人血清淀粉样蛋白 A3 的人血清淀粉样蛋白 A3 抗体;使用了上述抗体的人血清淀粉样蛋白 A3 的检测和测定试剂盒;上述抗体在癌治疗剂、癌治疗方法、诊断方法等中的应用。



1. 一种针对人血清淀粉样蛋白 A3 的人血清淀粉样蛋白 A3 抗体。
2. 如权利要求 1 所述的人血清淀粉样蛋白 A3 抗体,其中,该抗体为单克隆抗体。
3. 如权利要求 1 所述的人血清淀粉样蛋白 A3 抗体,其中,该抗体通过下述方式获得:作为部分氨基酸序列,使包含序列号 1 表示的人血清淀粉样蛋白 A3 的氨基酸序列的第 49 ~ 60 位的肽与生物体高分子化合物结合,用该结合物使动物免疫,从该动物采集抗体。
4. 如权利要求 3 所述的人血清淀粉样蛋白 A3 抗体,其中,与生物体高分子结合的肽是序列号 1 表示的氨基酸序列的第 38 ~ 60 位的氨基酸序列。
5. 如权利要求 1 所述的人血清淀粉样蛋白 A3 抗体,其中,该抗体识别由序列号 1 表示的人血清淀粉样蛋白 A3 的氨基酸序列的第 49 ~ 60 位构成的肽。
6. 如权利要求 1 所述的人血清淀粉样蛋白 A3 抗体,其中,该抗体识别由序列号 1 表示的人血清淀粉样蛋白 A3 的氨基酸序列的第 38 ~ 48 位构成的肽。
7. 如权利要求 1 所述的人血清淀粉样蛋白 A3 抗体,其中,该抗体为嵌合抗体。
8. 如权利要求 1 所述的人血清淀粉样蛋白 A3 抗体,其中,该抗体为人源化抗体。
9. 如权利要求 1 所述的人血清淀粉样蛋白 A3 抗体,其中,该抗体为完全人抗体。
10. 如权利要求 1 所述的人血清淀粉样蛋白 A3 抗体,其中,该抗体为抗体片段。
11. 一种人血清淀粉样蛋白 A3 抗体的制造方法,其特征在于,作为部分氨基酸序列,使包含序列号 1 表示的人血清淀粉样蛋白 A3 的氨基酸序列的第 48 ~ 60 位的肽与生物体高分子化合物结合,用该结合物使动物免疫,从该动物采集抗体。
12. 如权利要求 11 所述的人血清淀粉样蛋白 A3 抗体的制造方法,其中,与生物体高分子化合物结合的肽是序列号 1 表示的氨基酸序列的第 38 ~ 60 位的氨基酸序列。
13. 一种人血清淀粉样蛋白 A3 的检测和测定方法,其特征在于,使人血清淀粉样蛋白 A3 抗体作用于人样本,检测和测定人样本中的人血清淀粉样蛋白 A3。
14. 一种癌诊断方法,其特征在于,使人血清淀粉样蛋白 A3 抗体作用于人样本,检测和测定人样本中的人血清淀粉样蛋白 A3。
15. 如权利要求 14 所述的癌诊断方法,其中,该方法对包括癌转移的癌浸润进行诊断。
16. 一种人血清淀粉样蛋白 A3 的检测和测定试剂盒,其特征在于,该试剂盒含有人血清淀粉样蛋白 A3 抗体。
17. 如权利要求 16 所述的人血清淀粉样蛋白 A3 的检测和测定试剂盒,其中,该试剂盒用于癌的诊断。
18. 如权利要求 16 所述的人血清淀粉样蛋白 A3 的检测和测定试剂盒,其中,该试剂盒用于包括癌转移的癌浸润的诊断。
19. 一种癌治疗剂,其特征在于,其含有人血清淀粉样蛋白 A3 抗体作为有效成分。
20. 如权利要求 19 所述的癌治疗剂,其中,该癌治疗剂用于抑制包括癌转移的癌浸润。
21. 一种癌治疗方法,其特征在于,用人血清淀粉样蛋白 A3 抗体向癌症患者给药,使生物体内的人血清淀粉样蛋白 A3 与上述抗体结合。
22. 如权利要求 21 所述的癌治疗方法,其中,该方法抑制包括癌转移的癌浸润。

人血清淀粉样蛋白 A3 抗体及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及人血清淀粉样蛋白 A3 抗体及其应用,更详细而言,涉及人血清淀粉样蛋白 A3 抗体、上述抗体的制造方法、利用上述抗体检测和测定人血清淀粉样蛋白 A3 的方法、癌治疗方法、癌诊断方法等。

背景技术

[0002] 已知血清淀粉样蛋白 A(SAA) 是因继发性淀粉样变性而在组织中沉积的淀粉样蛋白 A 蛋白在血中的前体。

[0003] 在鼠、兔、马等中,已知该 SAA 具有 SAA1、SAA2、SAA3 和 SAA4 这 4 种同型。

[0004] 这些 SAA 中,SAA1 和 SAA2 是与白细胞介素 (IL)-1、IL-6、肿瘤坏死因子 (TNF) 等炎性细胞因子应答的急性时相反应物质,SAA4 是高比重脂蛋白 (HDL) 的构成蛋白。

[0005] 另一方面,已知 SAA3 被 Toll 样受体 4(TLR4) 识别,介由核因子 κ B(NF κ B) 活化免疫应答信号,结果促进了癌的转移;并且确认到,若对皮下移植了癌细胞的荷瘤小鼠给予抗 SAA3 抗体,则该一系列的信号转导通路(S100A8-SAA3-TLR4) 被截断,抑制了癌的转移。TLR4 识别作为自然免疫体系的受体的脂多糖 (LPS) 等毒素,负责感染的防御。这暗示了由本来负责感染防御的自然免疫体系所形成的炎症样的环境促进了癌细胞的迁移(非专利文献 1)。如此,暗示了在鼠中 SAA3 与癌的转移有关。

[0006] 另外,由与鼠等的 SAA3 的氨基酸序列的同源性等推测,人的 SAA3 由序列号 1 表示的氨基酸序列构成(专利文献 1)。但是,现实中仅以 mRNA 水平确认了人 SAA3 的存在,实际上并没有确认到人生物体内的蛋白表达。

[0007] 现有技术文献

[0008] 专利文献

[0009] 专利文献 1:日本特表 2006-516194 号公报

[0010] 非专利文献

[0011] 非专利文献 1:Sachie Hiratsuka, Akira Watanabe, Yoshiko Sakurai, Sachiko Akashi-Takamura, Sachie Ishibashi, Kensuke Miyake, Masabumi Shibuya, Shizuo Akira, Hiroyuki Aburatani and Yoshiro Maru. Nature Cell Biol 10:1349-1355(2008).

发明内容

[0012] 发明要解决的课题

[0013] 因此,本发明的课题在于制作尚未确认在人生物体内存在的人 SAA3 的抗体,解明在人生物体内存在人 SAA3,同时解明人 SAA3 与疾病的关系,提供该疾病的治疗方法。

[0014] 用于解决课题的方案

[0015] 基于上述见解,本发明人试图根据常规方法在大肠杆菌中表达人 SAA3 的重组蛋白,以此作为抗原来制作抗体,并从人样本中检测人 SAA3,从而解明人 SAA3 的存在。但是,人 SAA3 的重组蛋白的表达量极少,没能以此作为抗原进行免疫。并且,本发明人根据抗体

制作的常规方法,在将由人 SAA3 的特征性氨基酸序列(序列号 1 表示的人 SAA3 的氨基酸序列的第 49 ~ 60 位)构成的肽与生物体高分子的结合物为抗原的情况下,即使免疫几个月,抗体效价也几乎不上升,无法得到令人满意的抗体。

[0016] 于是本发明人发现,通过将包含比人 SAA3 的特征性氨基酸序列稍长的人 SAA3 的部分氨基酸序列的肽与生物体高分子的结合物作为抗原,所免疫的动物的抗体产生能力提高,从而首次得到了针对人 SAA3 的抗体。

[0017] 并且使用该人 SAA3 抗体对健康者和癌症患者的样本进行了蛋白质印迹,结果仅在癌症患者的样品中检测到与人 SAA3 抗体的反应物。另外,上述反应物在凝胶上的位置跟上述人 SAA3 的重组蛋白与人 SAA3 抗体的反应物的位置相同,因此可知在人生物体内存在人 SAA3。

[0018] 由此发现,在人生物体内确实存在人 SAA3,能够用针对人 SAA3 的抗体对其进行检测,并且人 SAA3 与癌有关,基于该发现完成了本发明。

[0019] 即,本发明如下所述。

[0020] (1) 一种针对人血清淀粉样蛋白 A3 的人血清淀粉样蛋白 A3 抗体。

[0021] (2) 一种人血清淀粉样蛋白 A3 抗体的制造方法,其特征在于,作为部分氨基酸序列,使包含序列号 1 表示的人血清淀粉样蛋白 A3 的氨基酸序列的第 48 ~ 60 位的肽与生物体高分子化合物结合,用该结合物使动物免疫,从该动物采集抗体。

[0022] (3) 一种人血清淀粉样蛋白 A3 的检测和测定方法,其特征在于,使人血清淀粉样蛋白 A3 抗体作用于人样本,检测和测定人样本中的人血清淀粉样蛋白 A3。

[0023] (4) 一种癌诊断方法,其特征在于,使人血清淀粉样蛋白 A3 抗体作用于人样本,检测和测定人样本中的人血清淀粉样蛋白 A3。

[0024] (5) 一种人血清淀粉样蛋白 A3 的检测和测定试剂盒,其特征在于,其含有人血清淀粉样蛋白 A3 抗体。

[0025] (6) 一种癌治疗剂,其特征在于,其含有人血清淀粉样蛋白 A3 抗体作为有效成分。

[0026] (7) 一种癌治疗方法,其特征在于,用人血清淀粉样蛋白 A3 抗体向癌症患者给药,使生物体内的人血清淀粉样蛋白 A3 与上述抗体结合。

[0027] 发明效果

[0028] 本发明的人 SAA3 抗体与迄今为止未确认到在人中表达的人 SAA3 结合,因此能够用于研究人 SAA3 在人生物体内起到何种作用。

[0029] 并且,由于已有小鼠 SAA3 与癌的转移有关的启示,因此本发明的人 SAA3 抗体能够用于抑制癌的转移等治疗和诊断等中。

附图说明

[0030] 图 1 是使用人 SAA3 单克隆抗体(h-SAA3-3-1 抗体)基于蛋白质印迹法显示癌症患者血清中存在人 SAA3 的图。

具体实施方式

[0031] 本发明的人 SAA3 抗体只要是能够与人 SAA3 结合的抗体则没有特别限制。并且,这些抗体的制作方法也没有特别限制,例如,除了将人 SAA3 作为抗原以外,可以基于抗

体制作的常规方法 (G.Kohler and C.Milstein, Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, Nature 256495-497(1975).) 进行制作。

[0032] 本发明中,在上述人 SAA3 抗体中,优选与人 SAA3 特异性结合的单克隆抗体。此处,特异性是指与人 SAA3 反应而不与人 SAA1、人 SAA2、人 SAA4 反应,优选仅与人 SAA3 反应。

[0033] 这样的人 SAA3 单克隆抗体例如如下获得:作为部分氨基酸序列,使包含序列号 1 表示的人 SAA3 的氨基酸序列的第 49 ~ 60 位的肽与生物体高分子化合物结合,用该结合物使动物免疫,从该动物采集抗体。

[0034] 作为上述包含序列号 1 表示的人 SAA3 的氨基酸序列的第 49 ~ 60 位的肽,可以举出例如由序列号 1 表示的人 SAA3 的氨基酸序列的第 19 ~ 60 位构成的肽,更优选由第 30 ~ 60 位的氨基酸序列构成的肽,特别优选由第 38 ~ 60 位的氨基酸序列构成的肽。若使用这样的肽,能够得到识别由序列号 1 表示的人血清淀粉样蛋白 A3 的氨基酸序列的第 49 ~ 60 位构成的肽和由第 38 ~ 48 位构成的肽的人 SAA3 单克隆抗体。并且,作为这些肽,可以是在大肠杆菌等中表达的肽,也可以是合成肽,从糖链等问题考虑,优选合成肽。

[0035] 作为上述与肽结合的生物体高分子化合物,可以举出例如牛血清白蛋白、源于钥孔鲷的血蓝蛋白、卵白蛋白等。

[0036] 上述肽与生物体高分子化合物的结合可以通过例如碳二亚胺法、马来酰亚胺法等公知的结合方法进行。

[0037] 如上得到的上述肽与生物体高分子化合物的结合物溶解于生理盐水等溶剂中后,添加聚乙烯基吡咯烷酮并搅拌,然后与完全弗氏佐剂混合,形成佐剂。

[0038] 根据常规方法通过皮下给药等将该佐剂向兔、小鼠等动物以 2 ~ 3 周间隔给药 1 次至多次,免疫几个月。免疫后,当动物的抗体效价达到 $2^5 \sim 10$ 左右时,终止免疫。

[0039] 根据常规方法由如上终止了免疫的动物采集血液,分离血清,纯化抗体组分,从而可以得到人 SAA3 抗体。

[0040] 并且,可以根据常规方法,通过聚乙二醇使利用上述结合物使小鼠免疫而得到的脾脏细胞与骨髓瘤细胞融合,制作杂交瘤细胞,并对该杂交瘤进行筛选,从而得到人 SAA3 单克隆抗体。

[0041] 对于该杂交瘤,使用人 SAA3 或由其部分肽构成的肽等,根据常规方法进行筛选即可。作为用于筛选的部分肽,可以举出人 SAA3 的特异性序列(序列号 1 表示的人 SAA3 的氨基酸序列的第 49 ~ 60 位)。

[0042] 如上得到的产生人 SAA3 单克隆抗体中,将产生特别是识别由序列号 1 表示的人 SAA3 的氨基酸序列的第 49 ~ 60 位构成的肽的人 SAA3 单克隆抗体(以下称为“h-SAA3-3-1 抗体”)的杂交瘤细胞命名为 h-SAA3-3-1,于 2009 年 8 月 28 日在独立行政法人产业技术综合研究所专利生物保藏中心(日本国茨城县筑波市东 1 丁目 1 番地中央第 6:邮编 305-8566)进行了国际保藏(FERM BP-11176)。

[0043] 这样得到的本发明的人 SAA3 抗体与人 SAA3 结合。因此,通过使本发明的人 SAA3 抗体作用于人的血液、血清、尿、组织等人样本,能够检测和测定人样本中的人 SAA3。并且,特别是使用 h-SAA3-3-1 抗体作为本发明的人 SAA3 抗体时,与人样本中的人 SAA3 特异结合,因此能够以良好的精度检测和测定。

[0044] 作为检测和测定人样本中的人 SAA3 的方法,可以使用 RIA 法、ELISA 法、荧光抗体法、凝集法等通常在免疫化学测定法中使用的各种方法。这些方法中,作为本发明的人 SAA3 抗体与人 SAA3 的结合手段,可以利用直接吸附法、夹心法、竞争法。

[0045] 对用本发明的人 SAA3 抗体检测和测定人样本中的人 SAA3 的方法进行具体说明。首先,使根据常规方法制作的人 SAA3 的多克隆(兔等的多克隆抗体、小鼠以外的抗体)抗体在板或微粒上形成固相,接着,使人样本与固相的人 SAA3 抗体反应。清洗后,使作为 2 次抗体的人 SAA3 抗体与固相的人 SAA3 反应。对于 2 次抗体,用 HRP、ALP、RI 等直接标记后使用,或者不标记而直接使用,然后,进一步用 HRP、ALP、RI 等对抗小鼠 IgG 等 3 次抗体进行标记并测定。关于测定方法,根据各自的灵敏度,适当选择 RI 法、显色法、荧光法、发光法、胶体金法等即可。

[0046] 并且,为了能够进行上述检测和测定,可以根据常规方法在板或微粒等上将本发明的人 SAA3 抗体标记化、固相等,由此制成人 SAA3 的检测和测定试剂盒。

[0047] 作为具体的人 SAA3 的检测和测定试剂盒,可以举出含有抗体固相板或微粒、清洗用溶液、本发明的人 SAA3 抗体、抗小鼠 IgG 标记抗体、显色剂、反应终止液的试剂盒。

[0048] 通过利用这些人 SAA3 的检测和测定方法、及试剂盒,能够以 0.1 ~ 10ng/mL 的灵敏度检测和测定人样本中的人 SAA3 浓度。

[0049] 另外,由于人 SAA3 的表达是癌症患者、特别是转移至脑、肝、肺等的癌症患者所特有的,因此通过利用上述人 SAA3 的检测和测定方法、及试剂盒来检测和测定人样本中的人 SAA3,能够诊断癌和癌的转移。

[0050] 具体地说,通过在健康者(包括未诊断为癌的癌症患者)的血清、尿等人样本中检测出人 SAA3 来进行癌的诊断。并且,也通过在癌症患者的血清、尿等人样本中检测出人 SAA3 来进行癌转移的诊断。需要说明的是,癌转移至肺的癌症患者的人 SAA3 浓度比癌转移至肺以外的部位的癌症患者高很多。因此,利用上述人 SAA3 的检测和测定方法、及试剂盒定期地监控癌症患者的人 SAA3 浓度,能够在其浓度升高时做出具有癌转移至肺的预兆或者癌已经转移至肺的诊断。

[0051] 此外,已知小鼠 SAA3 抗体可抑制癌的转移(非专利文献 1)。因此,也可以通过将本发明的人 SAA3 抗体给药至癌症患者,使血液、血清、组织等生物体内的人 SAA3 与上述抗体结合,从而抑制人 SAA3 对于 TLR4 的效果,因此能够用于人的包括癌转移的癌浸润的抑制剂等癌治疗剂和癌治疗方法。此处,包括癌转移的癌浸润是指癌自身向周边组织扩展、癌的转移、在已经发现癌转移的情况下出现的癌转移从一处向另一处发展的状况。需要说明的是,如上所述,癌转移至肺的癌症患者的人 SAA3 浓度比癌转移至肺以外的部位的癌症患者高很多,因此本发明的人 SAA3 抗体特别能够抑制癌向肺转移。

[0052] 特别是在使用 h-SAA3-3-1 抗体作为上述癌治疗剂或治疗方法中所用的本发明的人 SAA3 抗体时,与人样本中或人生物体内的人 SAA3 特异性结合,因此能够提供高效的癌治疗剂 and 治疗方法。

[0053] 在将本发明的人 SAA3 抗体用于抑制人的包括癌转移的癌浸润等的癌的治疗剂时,优选以基因工程学的方式对如上述那样由人以外的动物获得的抗体进行改变,以嵌合抗体、人源化抗体、完全人抗体和它们的抗体片段的形式使用。

[0054] 此处,嵌合抗体是指将上述动物的抗体的恒定区替换成人的抗体的恒定区的抗

体。该嵌合抗体例如可以基于 Co 等的文献 (Co MS and Queen C, Humanized antibodies for therapy, Nature 351. 501 (1991)) 中记载的方法来制作。

[0055] 并且, 人源化抗体是指将上述动物的抗体的人 SAA3 的结合区替换成人的抗体的结合区的抗体。该人源化抗体例如可以基于 Riechmann 等的文献 (L. Riechmann, M. Clark, H. Waldmann, G. Winter, Reshaping human antibodies for therapy. Nature 332. 323 (1998)) 中记载的方法来制作。

[0056] 此外, 完全人抗体是指与人所产生的抗体同样的抗体。该完全人抗体例如可以基于 Green 等的文献 (Green LL, Hardy MC, Maynard-Currie CE et al, Antigen-specific human monoclonal antibodies from mice engineered with human Ig heavy and light chain YACs, Nature Genetics 7. 13 (1994)) 中记载的方法来制作。

[0057] 进而, 抗体片段是指用酶等使上述抗体片段化的物质, 可以举出例如 Fv、Fab、F(ab')₂ 等人 SAA3 的结合区所保持的抗体片段。

[0058] 需要说明的是, 关于上述嵌合抗体、人源化抗体、完全人抗体和它们的抗体片段, 各种公司提供了委托服务, 因而也可以利用这些委托服务。

[0059] 必要时, 上述各种抗体可以在进一步纯化后根据常规方法制剂化。作为该癌治疗剂的剂形, 可以举出注射剂等非口服的剂形。该癌治疗剂优选通过静脉内给药等进行给药。在制剂化时, 可以使用适合于上述剂形的公知的药物用载体、添加剂等。

[0060] 使用本发明的人 SAA3 抗体作为上述癌治疗剂时, 其给药量取决于癌症患者的癌症种类、年龄、体格、性别等以及抗体的性质等, 不能一概而论, 本发明的人 SAA3 抗体例如为每天 5 ~ 100mg/ 人、优选为 2 ~ 10mg/ 人。

[0061] 实施例

[0062] 以下, 举出实施例对本发明进行详细说明, 但本发明不受这些实施例的任何限定。

[0063] 实施例 1

[0064] 人 SAA3 单克隆抗体的制作:

[0065] 通过 EMCS (马来酰亚胺法) 使作为载体蛋白的卵白蛋白 (OVA) 与由序列号 1 表示的氨基酸序列构成的人 SAA3 的第 38 ~ 60 位的合成肽 (由 Operon 公司获得) (以下, 将该肽称为 “23-SAA3”) 结合, 得到 OVA 合成肽。

[0066] 将该 OVA 合成肽 2mg 溶解于 0.3ml 的生理盐水中后, 加入 50% 聚乙烯基吡咯烷酮 (PVP) 0.6ml, 搅拌后, 加入完全弗氏佐剂 1.1ml, 利用均浆器 (OmniMixer : 50,000 转) 得到软膏状的佐剂 (A. Arimura, H. Sato, T. Kumasaka, et al., Production of Antiserum to LH-RH-Releasing Hormone (LH-RH) Associated with Conadal Atrophy in Rabbits: Development of Radio-immunoassays for LH-RH, Endocrinology. 93:1092 (1973))。

[0067] 将 0.2ml 上述得到的佐剂分别皮下给药至小鼠 (3 只)。在第 1、3 和 5 周进行给药, 3 次给药后由小鼠的尾部采集少量血液, 进行抗体效价的测定。使观察到抗体效价上升的小鼠再次免疫 (加强免疫), 免疫后 3 天摘除脾脏。利用聚乙二醇使摘除的脾脏细胞与骨髓瘤细胞 (P₃X63Ag8 • U1 (P₃U1)) 融合。之后, 使细胞分散于 HAT 培养基 200ml 中, 向 10 个 96 孔微孔板分别分注 100 μ l。融合后, 在第 10 和 15 天通过利用 23-SAA3 固相的 ELISA 法进行分析。

[0068] 其结果, 23-SAA3 为明显的阳性的有 15 个。将该杂交瘤细胞分别移至 24 孔板, 进

行第二次的分析。选出最终显示强抗体效价的 5 个细胞。

[0069] 接着,将这 5 个杂交瘤细胞在甲基纤维素培养基下再克隆,得到单克隆抗体的杂交瘤细胞。

[0070] 在 RPMI1640 培养基 FCS10% 中培养上述得到的 5 个杂交瘤细胞,产生 5 种人 SAA3 单克隆抗体。使 23-SAA3、由序列号 1 表示的氨基酸序列构成的人 SAA3 的第 49 ~ 60 位的合成肽(由 Operon 公司获得)(以下,将该肽称为“12-SAA3”)、小鼠 SAA1 的合成肽(以下,将该肽称为“合成肽”)与固相(微孔板 10ng/孔)结合,使用所得到的结合物调查 5 种人 SAA3 单克隆抗体的反应性。在 TBS-T(含有 10% HS)溶液中进行固相的封闭,用 TBS-T(IgG+IgM)溶液进行二次抗体的稀释。并且,作为阳性对照,使用将小鼠血清稀释 50 倍而得到的物质。此外,作为测定装置,使用 Thermo Fisher 公司的 Multi-Scan JX。这些结果列于表 1。并且,用小鼠单克隆分型测试试剂盒(HyCult biotechnology)确定这些抗体的亚型。该结果列于表 2。

[0071] 【表 1】

固相抗原 抗体	23-SAA3	12-SAA3	合成肽	无
No.1	1.494	0.709	0.081	0.138
No.3	1.745	0.867	0.089	0.107
No.6	1.619	0.569	0.097	0.127
No.7	1.255	0.362	0.086	0.134
No.9	0.847	0.096	0.092	0.099
阳性对照	2.581	1.811	0.121	0.150

[0073] 【表 2】

[0074]

	No. 1	No. 3	No. 6	No. 7	No. 9
亚型	IgG1	IgG1	IgG1, A	IgG2b	IgG2a

[0075] 由该结果可知,抗体 No. 1、3、6 和 7 是特异性识别人 SAA3 的 N 端区域的 12-SAA3 的单克隆抗体。另一方面,由于抗体 No. 9 不识别 12-SAA3 而识别 23-SAA3,因此可知抗体 No. 9 是特异性识别由序列号 1 表示的氨基酸序列构成的人 SAA3 的第 38 ~ 48 位的单克隆抗体。并且,可知所有抗体的亚型为 IgG。

[0076] 比较例 1

[0077] 人 SAA3 单克隆抗体的制作:

[0078] 通过 EMCS(马来酰亚胺法)使作为载体蛋白的卵白蛋白(OVA)与由序列号 1 表示的氨基酸序列构成的人 SAA3 的第 49 ~ 60 位的合成肽(由 Operon 公司获得)(以下,将该肽称为“12-SAA3”)结合,得到 OVA 合成肽。将该 OVA 合成肽 2mg 溶解于 0.3ml 的生理盐水中后,加入 50% 聚乙烯基吡咯烷酮(PVP)0.6ml,搅拌后,加入完全弗氏佐剂 1.1ml,利用均浆器(OmniMixer:50,000 转)得到软膏状的佐剂。将 0.2ml 上述得到的佐剂分别皮下给药至小鼠(3 只)。给药以 2 ~ 3 周的间隔进行 6 ~ 8 个月,但是仅观察到抗体效价的略微的上升。并且尝试改变成多种的佐剂 TiterMax Gold(CytRx Corporation)等,但是没有发现效果。由于长期的免疫致敏,在细胞融合时脾脏观察到纤维化,良好的细胞少,无法得到阳

性的杂交瘤。

[0079] 比较例 2

[0080] 使用大肠杆菌的人血清淀粉样蛋白 A3 的表达：

[0081] 克隆人血清淀粉样蛋白 A3 的基因序列（登录号：AY209188）并重组到载体 pGEX4T-1 中，用大肠杆菌使其表达。在 LB 培养基中培养该大肠杆菌。由该大肠杆菌纯化人 SAA3，结果只得到 1mg 的极少量的蛋白。按照比较例 1 中所述的步骤制作佐剂并给药 2 次，但无法得到抗体，因效率差而终止实验。

[0082] 实施例 2

[0083] 人血清中的人 SAA3 的检测：

[0084] 使用实施例 1 中得到的抗体 No. 9 的人 SAA3 单克隆抗体（h-SAA3-3-1 抗体）和以下样品，根据常规方法进行蛋白质印迹。通过 ECL PLUS 的发光法进行基于蛋白质印迹的检测。其结果示于图 1。

[0085] < 样品 >

[0086] 健康者的血清：B3-2、4-2、Y8-2

[0087] 癌症患者的血清：151-2^{*1}、167-2^{*2}、169-2^{*3}

[0088] *1 血清采集时癌向脑转移的胃癌患者

[0089] *2 血清采集时癌向肝脏转移的大肠癌患者

[0090] *3 血清采集时癌向肺转移的胃癌患者

[0091] 表达蛋白（阳性对照）：SAA1、SAA2、SAA3^{*4}、SAA4

[0092] *4 比较例 2 中得到的样品

[0093] 由蛋白质印迹的结果确认在癌症患者的 3 个样品中存在人 SAA3。并且，癌向肺转移的胃癌患者的样品（169-2）的人 SAA3 浓度非常高。由此可知，在发现肺转移的癌症患者中人 SAA3 高浓度表达，并且在转移至（脑或肝）的例子中人 SAA3 的表达为低浓度，由此可知人 SAA3 浓度与肺转移有关。

[0094] 实施例 3

[0095] 人 SAA3 检测和测定试剂盒：

[0096] 使实施例 1 中得到的抗体 No. 1、3、6 或 7 的单克隆抗体在微孔板的孔中形成固相，并进行封闭和清洗。另外，将实施例 1 中得到的 h-SAA3-3-1 抗体进行 Fab 处理后，用辣根过氧化物酶（HRP）标记。使上述微孔板和 HRP 标记抗体与作为 HRP 的显色底物的 3,3',5,5' - 四甲基联苯胺（TMB）组合，制作人 SAA3 检测和测定试剂盒。

[0097] 向上述制作的人 SAA3 检测和测定试剂盒的微孔板的孔中添加重组 SAA3 或血清（人样本），于室温反应 1 小时。将孔清洗后，添加 4 μg/mL 的 HRP 标记 h-SAA3-3-1 抗体，于室温反应 1 小时。将孔清洗后，添加 TMB，于室温进行 30 分钟酶反应，反应停止后，测定 Abs450。

[0098] 工业实用性

[0099] 本发明的人 SAA3 抗体与人 SAA3 结合，因此能够用于研究人 SAA3 在人生物体内起到何种作用。

[0100] 并且，由于已有小鼠 SAA3 与癌有关的启示，因此本发明的人 SAA3 抗体能够用于癌的治疗和诊断等中。

[0001]

序列表

<110> 东京女子医科大学

<120> 人血清淀粉样蛋白 A3 抗体及其应用

<130> PF-100022-W0

<150> JP2009-230361

<151> 2009-10-02

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 60

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 发明人: 丸义朗, 田中建志, 寺井清美

<220>

<221> SIGNAL

<222> (1)..(18)

<220>

<221> mat_peptide

<222> (19)..(60)

<400> 1

Met Lys Leu Ser Thr Gly Ile Ile Phe Cys Ser Leu Val Leu Gly Val
-15 -10 -5

Ser Ser Gln Gly Trp Leu Thr Phe Leu Lys Ala Ala Gly Gln Gly Thr
-1 1 5 10

Lys Asp Met Trp Lys Ala Tyr Ser Asp Met Lys Glu Ala Asn Tyr Lys

[0002]

15

20

25

30

Lys Phe Arg Gln Ile Leu Pro Cys Leu Gly Glu Leu

35

40

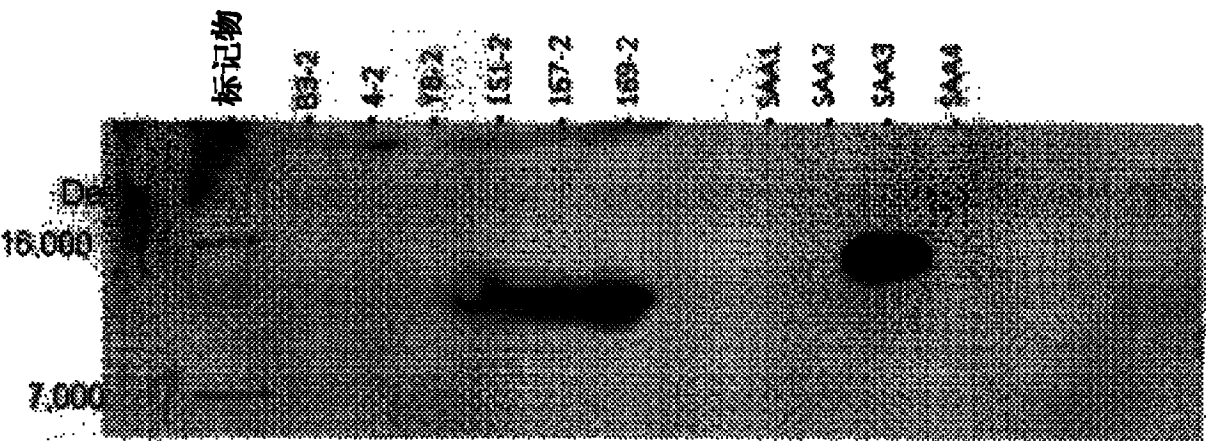


图 1

专利名称(译)	人血清淀粉样蛋白A3抗体及其应用		
公开(公告)号	CN102549014A	公开(公告)日	2012-07-04
申请号	CN201080045530.8	申请日	2010-08-16
[标]申请(专利权)人(译)	学校法人东京女子医科大学		
申请(专利权)人(译)	学校法人东京女子医科大学		
当前申请(专利权)人(译)	学校法人东京女子医科大学		
[标]发明人	丸义朗 田中建志 寺井清美		
发明人	丸义朗 田中建志 寺井清美		
IPC分类号	C07K16/18 A61K39/395 A61P35/00 A61P35/04 C07K16/46 G01N33/53 C12N15/09 C12P21/08		
CPC分类号	G01N2333/4709 C07K14/00 G01N33/57484 C07K16/18 A61P35/00 A61P35/04		
优先权	2009230361 2009-10-02 JP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明的目的在于制作尚未确认在人生物体内存在的人SAA3的抗体，解明在人生物体内存在人SAA3，同时解明人SAA3与疾病的关系并提供该疾病的治疗方法。特别是，本发明涉及针对人血清淀粉样蛋白A3的人血清淀粉样蛋白A3抗体；使用了上述抗体的人血清淀粉样蛋白A3的检测和测定试剂盒；上述抗体在癌治疗剂、癌治疗方法、诊断方法等中的应用。

