

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00806081.9

[43] 公开日 2002 年 6 月 26 日

[11] 公开号 CN 1355882A

[22] 申请日 2000.4.10 [21] 申请号 00806081.9
 [30] 优先权
 [32] 1999.4.9 [33] KR [31] 1999/12568
 [32] 1999.10.12 [33] KR [31] 1999/43935
 [86] 国际申请 PCT/KR00/00329 2000.4.10
 [87] 国际公布 WO00/62062 英 2000.10.19
 [85] 进入国家阶段日期 2001.10.9
 [71] 申请人 韩美药品工业株式会社
 地址 韩国京畿道
 [72] 发明人 陈承嫻 申 勋 林昌基

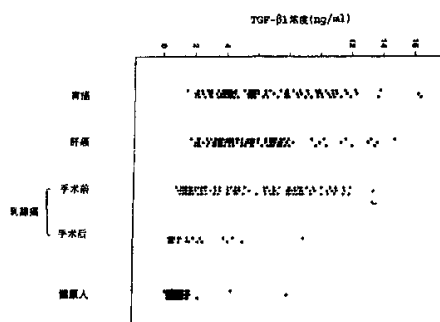
[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司
 代理人 胡交宇

权利要求书 2 页 说明书 17 页 附图页数 3 页

[54] 发明名称 定量转化生长因子 - $\beta 1$ 的方法以及通过使用该方法检测癌症的方法

[57] 摘要

通过用一种 TGF - $\beta 1$ 特异的受体处理样品从而在 TGF - $\beta 1$ 与此受体 之间形成复合物并测量此复合物的量而定量一种样品中的 TGF - $\beta 1$ 的 量。



ISSN 1008-4274

权利要求书

1. 一种定量样品中 TGF- β 1 的量的方法，包括用一种 TGF- β 1 特异的受体处理样品从而在 TGF- β 1 与此受体之间形成一种复合物，并测定此复合物的量。
5
2. 权利要求 1 的方法，包括
 - (a) 将 TGF- β 1 特异的受体结合到一种固体支持物上；
 - (b) 将此样品加入此被支持的受体从而形成 TGF- β 1-受体复合物；
 - 10 (c) 将一种结合了一种标记物的 TGF- β 1 特异的抗体结合到此复合物上；和
 - (d) 使用该标记物作为检测标记测定 TGF- β 1 的量。
3. 权利要求 1 或 2 的方法，其中 TGF- β 1 特异的受体是 TGF- β 1 III 型受体。
15
4. 权利要求 2 的方法，其中 TGF- β 1 特异的抗体是一种通过用 TGF- β 1 或其中的一个部分免疫一种哺乳动物所制备的抗体。
5. 权利要求 4 的方法，其中此抗体是一种单克隆抗体或多克隆抗体抗体。
6. 权利要求 5 的方法，其中此单克隆抗体是用一种杂交瘤细胞系
20 hTGF-46(KCTC 0460BP)生产的。
7. 权利要求 1 或 2 的方法，其中在此样品中 TGF- β 1 的浓度是 30 pg/ml 或更低。
8. 权利要求 2 的方法，其中此标记物是辣根过氧化物酶，生物素或荧光。
- 25 9. 一种在患者中检测癌症的方法，包括用 TGF- β 1 特异的受体处理取自患者的体液样品从而在此受体与存在于此样品中的 TGF- β 1 之间形成复合物；测量此复合物的量从而定量此样品中的 TGF- β 1 的浓度；并且将此 TGF- β 1 浓度与健康人的进行比较。
10. 权利要求 9 的方法，包括
 - 30 (a) 将 TGF- β 1 特异的受体结合到一种固体支持物上；

(b) 将此样品加入此被支持的受体从而形成 TGF- β 1-受体复合物;

(c) 将一种结合了一种标记物的 TGF- β 1 特异的抗体结合到此复合物上;

5 (d) 使用该标记物作为检测标记测定 TGF- β 1 的量, 从而确定此样品中 TGF- β 1 的浓度; 和

(e) 将此 TGF- β 1 浓度与健康人的比较。

11. 权利要求 9 或 10 的方法, 其中此 TGF- β 1 特异的受体是 TGF- β 1 III型受体。

10 12. 权利要求 10 的方法, 其中此 TGF- β 1 特异的抗体是一种通过使用 TGF- β 1 或其中的一个部分免疫一种哺乳动物所制备的抗体。

13. 权利要求 13 的方法, 其中此抗体是一种单克隆抗体或一种多克隆抗体。

14. 权利要求 13 的方法, 其中此单克隆抗体是用一种杂交瘤细胞系
15 hTGF-46(KCTC 0460BP)生产的。

15. 权利要求 9 或 10 的方法, 其中此样品中的 TGF- β 1 的浓度是 30 pg/ml 或更低。

16. 权利要求 10 的方法, 其中此标记物是辣根过氧化物酶, 生物素或荧光。

20 17. 权利要求 9 或 10 的方法, 其中此癌选自胃癌, 肝癌, 乳腺癌, 肺癌, 直肠结肠癌, 前列腺癌和子宫颈癌。

18. 权利要求 9 或 10 的方法, 其中此体液是血浆或尿。

19. 一种检测癌的组合, 包括一种 TGF- β 1 特异的受体和一种 TGF- β 1 特异的抗体的。

25 20. 权利要求 19 的组合, 其中此 TGF- β 1 特异的受体是 TGF- β 1 III型受体。

21. 一种杂交瘤细胞系, 它是产生人 TGF- β 1 特异的单克隆抗体的 hTGF-46(KCTC 0460)。

30 22. 一种由杂交瘤细胞系 hTGF-46(KCTC 0460BP)产生的 TGF- β 1 特异的单克隆抗体。

定量转化生长因子- β 1 的方法以及 5 通过使用该方法检测癌症的方法

本发明的领域

本发明涉及一种定量一种体液中转化生长因子- β 1(TGF- β 1)的浓度的方法，一种通过使用相同的方法检测癌症的方法，一种检测癌症的组
10 合物，以及一种 TGF- β 1 特异的单克隆抗体。

本发明的背景

转化生长因子 β (TGF- β) 调节数种细胞的生长和分化，其作用模式依赖于细胞的染色体构型和其它生长因子的存在(Sporn 等. 科学(*Science*)
15 233, 532-534(1986); 以及 Roberts 与 Sporn. 癌症研究进展(*Adv. Cancer Res.*)
51, 107-145(1998))。

在哺乳动物中存在三种形式的 TGF- β 因子, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, 并且, 在这些当中, 据信 TGF- β 1 在生理机制和疾病进展中发挥关键的作用。已经报道它在一种发病过程中作用反常, 例如, 癌症发生。
20 这暗示 TGF- β 1 作为癌症诊断中的一种肿瘤标志是有用的, 并且一种定量一种体液中的 TGF- β 1 的高精度的方法在癌症诊断中可能是决定性的。

欧洲专利公开第 0 722 773 A1 号(EP Publication No. 0 722 773 A1)公开一种通过用一种吸附剂, OH-碳酸化的羟基磷灰石, 接触一种含有 TGF- β 1 的血液样品, 从而吸附其中的 TGF- β 1, 用一种缓冲液洗脱被吸附的 TGF- β 1, 并用紫外分光光度法确定被洗脱的 TGF- β 1 的量的检测癌症的方法。然而, 这个方法忍受着有限的敏感性和为测量值的大波动所证明的不精确的问题。
25

因此, 已经存在一个开发一种改进的定量血浆中 TGF- β 1 的量的方法的需要。
30

本发明的概述

因此，本发明的一个目的是提供一种定量一种样品中 TGF- β 1 的量的具有高精度和敏感性的方法。

5 本发明的另一个目的是提供一种通过使用所说的方法检测癌症的方法。

本发明的进一步的目的是提供一种检测癌症的组合物。

本发明的又一个目的是提供一种 TGF- β 1 特异的单克隆抗体和一种生产此单克隆抗体的杂交瘤细胞系。

10 根据本发明的一个方面，提供了一种定量一种样品中 TGF- β 1 的量的方法，包括：用一种 TGF- β 1 特异的受体处理此样品从而在 TGF- β 1 与此受体之间形成一种复合物，并测量此复合物的量。

附图简述

15 本发明的上述目的和特征，从以下优选的实施方案的描述连同附图一起将变得显而易见，其中：

图 1 分别说明在实施例 1 中获得的 TGF- β 1 III型和 II 型受体的光密度-TGF- β 1 浓度相关曲线；

20 图 2 描述从健康人，胃癌患者，肝癌患者和乳腺癌患者获得的血浆样品中各自的 TGF- β 1 浓度分布；以及

图 3 描绘从健康人，肺癌患者，直肠结肠癌患者，前列腺癌患者和子宫颈癌患者获取的血浆样品中各自的 TGF- β 1 浓度分布。

本发明的详细描述

25 在本发明中可以被使用的 TGF- β 1 特异的受体包括 TGF- β I 型，II 型，III型受体(R I，R II 和 R III)，并优选 TGF- β 1 III型受体，R III。这些 TGF- β 1 受体可以根据一种常规的方法(Burand, J.P.等.病毒学(Virology) 101, 286-290(1980))通过在一种哺乳动物或昆虫细胞系中表达一种 TGF- β 1 受体基因而获得。例如，此 TGF- β 1 受体可以如下获得：
30 用一种含有一种 TGF- β 1 受体基因的重组杆状病毒感染一种昆虫细胞

系，例如，Sf21 (Invitrogen, Netherlands)；提取在此昆虫细胞中表达的不溶于水的受体蛋白；用盐酸胍或尿素溶解此不溶于水的受体蛋白；通过去除胍或尿素重新折叠被溶解的受体蛋白，从而恢复对 TGF- β 1 的亲合力。

5 在本发明中可以使用的 TGF- β 1 特异的抗体可以通过用 TGF- β 1 或其中的一个部分免疫一种哺乳动物制备。此 TGF- β 1 特异的抗体可以是仅对 TGF- β 1 具有特异性的一种单克隆抗体或一种多克隆抗体。

一种定量一种体液，例如，血浆或尿中的 TGF- β 1 的量的优选方法，根据本发明包括：

- 10 (a) 将一种 TGF- β 1 特异的受体结合到一种固体支持物上；
- (b) 将一种体液样品加入此被支持的受体中从而形成一种 TGF- β 1-受体复合物；
- (c) 将一种与一种标记物结合的 TGF- β 1 特异的抗体结合到此复合物上；和
- 15 (d) 使用此种作为一种检测标记的标记物测量 TGF- β 1 的量。

在本发明中可以被使用的代表性标记物包括辣根过氧化物酶，生物素和荧光。

本发明的第一个优选实施方案包括：将 TGF- β 1 受体结合到一种固体支持物上，例如，一块微量滴定板的孔；将一种适当稀释的含有 TGF- β 1 的样品加入到此 TGF- β 1 受体中，从而使得 TGF- β 1 与此 TGF- β 1 受体之间能够形成一种复合物；用一种磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤此支持物；向其中加入一种生色的酶联抗-TGF- β 1 抗体并形成生色的酶；以及测量所产生的溶液的光密度从而定量此样品中 TGF- β 1 的含量。

在本发明的第二个优选实施方案中，一种含有一种 TGF- β 1 特异的受体的液体可以被用于替换被支持的 TGF- β 1 受体。在这个方法中，一种样品中的 TGF- β 1 的量可以如下定量：将此样品加入此含有 TGF- β 1 特异的受体的液体中；加入一种 TGF- β 1 特异的与其中一种标记物结合的抗体；沉淀一种抗体-TGF- β 1 受体复合物；并且测量其光密度。

本发明的方法能够检测在 30 pg/ml 或更低的一个非常低浓度范围的 TGF- β 1。

以上方法在癌症诊断中特别有用，因为癌症患者体液中的 TGF- β 1 浓度显然不同于健康人的那个。因此，癌症可以通过重复以上方法从而定量患者体液样品，例如血浆或尿中 TGF- β 1 水平，并将此 TGF- β 1 浓度与健康人的那个比较而被检测。

- 5 本发明的检测一种癌症的方法的一个优选实施方案包括：
- (a) 将一种 TGF- β 1 特异的受体结合到一种固体支持物上；
 - (b) 将一种体液样品加入此被支持的受体中从而形成此 TGF- β 1-受体复合物；
 - (c) 将一种 TGF- β 1 特异的与一种标记物结合的抗体结合到此复合物
 - 10 上；
 - (d) 使用此种作为一种诊断标记物的标记物测量 TGF- β 1 的量；和
 - (e) 将此 TGF- β 1 量与健康人的那个比较。

以上方法在检测胃癌，肝癌，乳腺癌，肺癌，直肠结肠癌，前列腺癌和子宫颈癌中特别有效。

- 15 在此检测一种癌症的方法中可以被使用的一种组合物包括一种 TGF- β 1 受体，优选 RIII，和一种 TGF- β 1 特异的抗体。

为了改进敏感性，此单克隆抗体可以如下获得：根据一种常规的细胞融合方法，使用 TGF- β 1 或其中的一种抗原决定簇部分作为一种免疫原，制备一种生产 TGF- β 1 特异的单克隆抗体的杂交瘤细胞系；并从此

20 杂交瘤细胞系分离此单克隆抗体。例如，这样一种杂交瘤细胞系可以如下制备：用人 TGF- β 1 免疫一种小鼠；根据 Kohler 和 Milstein(欧洲免疫学杂志(*Eur. J. Immunol.*), 6, 511-519(1976))所描述的细胞融合方法，将小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞融合；通过使用 ELISA 选择一种仅对人 TGF- β 1 具有特异性的杂交瘤细胞系；使用一种免疫扩散的方法，确定此杂

25 交瘤细胞系所产生的单克隆抗体的亚类；并且，选择一种分泌 IgG1 亚类的具有最高抗体滴度的杂交瘤细胞系。这样获得的此杂交瘤细胞系被定名为 hTGF-46，并根据关于因专利程序之微生物保藏物的国际识别的布达佩斯条约的条款(*The Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganism for the Purpose of Patent Procedure*) 在 1998 年

30 4 月 20 日保藏在韩国典型培养物保藏中心(Korean Collection for Type

Culture)(地址: #52, Oun-dong, Yusong-ku, Taejon 305-600, Republic of Korea), 其保藏号为 KCTC 0460BP。

杂交瘤细胞系 hTGF-46 起源于 β -淋巴瘤, 并且在产生 TGF- β 1 特异的 IgG1 亚类的抗体的同时连续地分裂。此杂交瘤细胞系可以在含有
5 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基(Gibco-BRL, USA)中在 37°C 在 5% CO₂ 的空气中和 100% 湿度下培养。细胞数在 12 到 14 小时内倍增。此杂交瘤细胞系悬浮在此培养基中, 自身不结合到培养瓶的底部, 呈圆形, 直径为 15 到 20 μ m。

为了用此杂交瘤细胞系生产大量的 TGF- β 1 特异的单克隆抗体, 将
10 此杂交瘤细胞系注射到一种小鼠中, 并当其腹腔膨胀时获取含有高浓度的杂交瘤细胞的腹水从而分离来自其中的此单克隆抗体。

当 TGF- β 1, - β 2, 和 - β 3 进行电泳随后进行 Western 印迹时, 本
发明的此单克隆抗体仅识别 TGF- β 1, 但是不识别 TGF- β 2 或- β 3。这
暗示此单克隆抗体对 TGF- β 1 有独特的特异性。本发明的此单克隆抗体
15 还对人 TGF- β 1 显示高亲和力, 并且结合到对应于 TGF- β 1 的第 5 到 80
氨基酸残基的表位区域。

计划用以下的实施例进一步说明本发明, 而不限制其范围。

进一步地, 以下给出的固体在液体中的混合物, 液体在液体中混合
物和固体在液体中的混合物的百分数分别基于 wt/wt, vol/vol 和 wt/vol,
20 除非另外明确说明。

实施例 1: TGF- β 1 对受体的敏感性

(步骤 1) TGF- β 1 III型受体的制备

25

使用引物 RIII和 RIII2(SEQ ID Nos: 1 和 2), 用含有一个人 TGF- β 1 III
型受体的全长 cDNA 的质粒 pCEP4 (Invitrogen, Netherlands)进行聚合酶链
式反应(PCR), 从而获得编码包括 400 氨基酸残基(1 到 400)的此受体的
一个细胞外结构域的一个 DNA 片段。这样获得的 DNA 片段被插入杆状
30 病毒载体 pCRBac(Invitrogen,Netherlands), 从而获得重组质粒 pCRBac-

TGFR。用此重组质粒 pCRBac-TGFR 转化了 *E. coli* 细胞，并在一种选择培养基，含有氨苄青霉素的 LB 培养基上选择了被转化的 *E. coli* 细胞。

使用脂质体转染法(Burand, J.P., 病毒学(Virology), 101, 286-290(1980)), 将载体 pCRBac-TGFR 和 Bac-N-Blue DNA(Invitrogen, Netherlands)共同导入昆虫细胞系 Sf21(Invitrogen, Netherlands)中, 并培养 3 天, 从而获得一种病毒产物。3 天之后, 用 lacZ 基因作为一种选择性标记, 对这样获得的病毒进行了噬斑分析, 从而选择此重组病毒。使用正向引物(SEQ ID NO: 3)和反向引物(SEQ ID NO: 4), 对这样获得的重组病毒进行了 PCR, 从而确认此 TGF- β 1 受体基因的存在。野生杆状病毒显示了 839 bp PCR 产物, 而此重组病毒给出了一个 1.5 kbp PCR 产物。

用此重组病毒感染昆虫细胞系 SF21, 并在此后培养 5 天。离心此培养物, 从而去除细胞碎片并收集含有病毒的上清。

用此上清接种昆虫细胞系 Sf21, 并在此后在 27°C 在含有 10% 胎牛血清(FBS), 7.3% TC yeastolate 和 73% 乳清蛋白水解产物的 Grace 昆虫培养基(Invitrogen, Netherlands)中培养 72 天。离心此培养物, 从而收集细胞, 并用 PBS 洗涤此细胞。向其中加入蛋白裂解溶液(50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM NaCl, 10 mM β -巯基乙醇, 1% Triton X-100 和 2 mM BMSF), 并在此后在 100°C 加热所产生的溶液 10 分钟, 从而制备一种样品。

用此样品在 12.5% SDS-聚丙烯酰胺凝胶中进行了 SDS-PAGE, 并用考马斯亮蓝对所产生的凝胶染色。如下对此凝胶进行了 Western 印迹: 将在凝胶上被分离的蛋白电转移到一张膜上, 从 R&D Systems Inc., USA (美国研究与发展系统股份有限公司)获得的 TGF- β 1 受体的抗体结合此膜上的蛋白, 并在此后使用结合了辣根过氧化物酶(HRP)的抗 IgG 第二抗体分析 TGF- β 1(Chemicon, USA), 从而确认 TGF- β 1 III型受体的表达。

因为此 TGF- β 1 受体不溶解于水, 所以向此样品中加入 8 M 盐酸胍, 并搅拌所产生的溶液 1 小时。所产生的溶液在 7,000 rpm 离心 40 分钟, 并在此后将上清调整到 2 mg/ml 蛋白浓度。为了恢复此 TGF- β 1 受体结合 TGF- β 1 的活性, 将所产生的溶液加入一种折叠缓冲液中(100 mM

Tris, 0.5 M 精氨酸, 0.2 M EDTA, pH 8.0), 至蛋白浓度为 150 μ g/ml, 并在 10 $^{\circ}$ C 保存 40 小时, 所产生的溶液用 20 mM Tris 溶液(pH 8.0), 接连地按照每 4 小时两次, 过夜之后一次, 并在此后每 2 小时两次透析, 从而有效地重新折叠此 TGF- β 1 受体。

5

(步骤 2)TGF- β 1III型受体对 TGF- β 1 的敏感性

将在步骤 1 中获得的每一份 2 μ g 的 TGF- β 1III型受体放置于一块微量滴定板的孔中, 并将所产生板子在环境温度保存 24 小时, 从而将此受体结合在此板上。将 2 ng 的纯化的 TGF- β 1(R&D systems Inc., USA)溶解在 PBS 中, 并连续稀释。将每一个稀释溶液按 100 μ l 的量加入孔中, 并在此后在环境温度保存 3 小时, 从而使此 TGF- β 1 能够结合此受体。用含有 0.05% Tween 20(PBST)的 PBS 洗涤各孔, 并在此后向其中加入结合 HRP 的抗-TGF- β 1 抗体(R&D systems Inc., USA)。将产生的板子在室温保存 1.5 小时。用 PBST 洗涤每一个孔。向其中加入 100 μ l 的 TMB-ELISA(Gibco-BRL,USA), 一种 HRP 底物, 并将所产生的板子在室温放置 20 分钟从而显色。通过加入 25 μ l 2N 硫酸终止了此显色反应。在 450 nm 的测量波长和 570 nm 的校正波长测定了此反应混合物的光密度, 并将结果绘制成图, 从而获得一条标准的光密度-浓度相关曲线。

20 图 1 说明这样获得的相关曲线是一条相关系数为 0.999, 斜率为 0.28 的直线。此斜率代表在这些测量中所使用的受体的敏感性, 并且此 TGF- β 1III型受体被认为对 TGF- β 1 结合具有良好的敏感性。在图 1 中的相关曲线还说明本方法可以检测极低浓度的 TGF- β 1, 低至 10 pg/ml。

25 使用 TGF- β 1 II型受体(R&D systems Inc., USA)重复了以上过程, 从而确定 TGF- β 1 II型受体的敏感性。这些结果也被绘制在图 1 中, 说明使用 TGF- β 1 II型受体获得的相关曲线也是一条相关系数为 0.999, 斜率为 0.57 的直线。因此, II型受体也可以被用于定量 TGF- β 1 的浓度, 但是其敏感性显著地比III型受体的那个低。

30 实施例 2: TGF- β 1III型受体对 TGF- β 1 的特异性

除了使用含有 2,000 pg/ml TGF- β 1, 2,000 pg/ml TGF- β 2 和 2,000 pg/ml TGF- β 3(R&D Systems Inc., USA)的混合物替换了 TGF- β 1 之外, 重复了实施例 1 的步骤 2 的过程。使用 2,000 pg/ml TGF- β 1 作为一个对照, 重复了实施例 1 的步骤 2 的过程。结果被显示在表 I 中。

表 I

	TGF- β 1	TGF- β 1+ TGF- β 2+ TGF- β 3
TGF- β 1III型受体	100%	91.5%

正如从表 I 可以见到的一样, TGF- β 1III型受体仅与 TGF- β 1 结合, 不与 TGF- β 2 或 TGF- β 3 发生交叉反应。

实施例 3: 使用单克隆抗体测量癌症患者的血浆 TGF- β 1 浓度

从 101 个健康人, 111 胃癌患者, 100 个肝癌患者和 151 个乳腺癌患者获得血液样品。用含有 0.081 ml 作为一种抗凝剂的 15% 乙二胺四乙酸(EDTA)的真空容器收集血液样品, 并在此后将所获得的混合物在 3,000 rpm 离心 20 分钟, 从而获得一种血浆样品。将 0.1 ml 的此血浆样品加到 0.1 ml 的 2.5 N 乙酸/10 M 尿素溶液中。将所产生的混合物在室温保存 10 分钟, 并用 0.1 ml 的含有 1 M 乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)的 2.7 N NaOH 中和。用 PBST 4 倍稀释这样获得的被活化的血浆, 从而获得一种进行以下测量其 TGF- β 1 浓度之过程的血浆样品。

0.1 ml 的这样获得的血浆样品溶液, 以及 0.1 ml 一份的 TGF- β 1 标准溶液(0, 100, 1,000 和 2,000 pg/ml)被分别地加入到一块含有 TGF- β 1III型受体的 96-孔板的孔中, 在室温保存 3 小时, 并在此后, 用 PBST 洗涤了 3 次。将纯化的 TGF- β 1 单克隆抗体-HRP 复合物(Sigma)加入每一个孔, 并在此后将此板在室温保存 1.5 小时, 此后用 PBST 洗涤这些孔 3 次。将 100 μ l 的 TMB-ELISA(Gibco-BRL, USA), 一种 HRP 底物, 加

入每一个孔，并将此板在室温保存 20 分钟从而显色。通过加入 25 μ l 的 2 N 硫酸终止了此显色反应。在 450 nm 的测量波长和 570 nm 的校正波长测定了此反应混合物的光密度。基于使用标准溶液获得的校正曲线，确定了此血浆样品的 TGF- β 1 浓度，并将结果显示于表 II 和图 2。

5

表 II

血浆样品组		平均值 \pm 标准误差 (ng/ml)	范围
胃癌 (n=111)		6.53 \pm 0.31	1.5 – 16.35
肝癌(n=100)		5.89 \pm 0.3	1.77 –14.76
乳腺癌	手术前 (n=117)	5.49 \pm 0.32	0.87 – 13.44
	手术后 (n=34)	2.15 \pm 0.42	0.46 - 9
健康人(n=101)		1.03 \pm 0.08	0.27 – 8

正如在描述各患者组的血浆 TGF- β 1 浓度分布模式的图 2 中可以看到的一样，癌症患者的血浆样品呈现与健康人组的那个显然不同的 TGF- β 1 浓度模式。这暗示上述癌症可以根据以上过程通过测量血浆 TGF- β 1 浓度被检测。

10

实施例 4：使用单克隆测量癌症患者的血浆 TGF- β 1 浓度

使用从 288 个健康人，29 个肺癌患者，48 个直肠-结肠癌患者，50 个前列腺癌患者和 88 个宫颈癌患者所获得的血液样品，重复了实施例 3 的过程，从而测量各血浆 TGF- β 1 浓度，并将结果显示在表 III 和图 3 中。

15

20

表III

血浆样品	平均值±标准误差 (ng/ml)	标准偏差
肺癌(n=20)	8.48 ± 1.27	4.16
直肠结肠癌(n=48)	5.19±0.87	3.69
前列腺癌(n=50)	4.12±0.53	2.30
子宫颈癌(n=88)	8.55±0.92	5.25
健康人(n=288)	1.77±0.05	0.05

P<0.01

- 5 正如在说明各患者组的血浆 TGF-β 1 浓度分布模式的图 3 中可以看到的一样，癌症患者的血浆样品呈现与健康人组的那个显然不同的 TGF-β 1 浓度模式。这暗示上述癌症可以根据以上过程通过测量血浆 TGF-β 1 浓度而被检测。

10 实施例 5: 使用多克隆抗体测量癌症患者的血浆 TGF-β 1 浓度

除了使用了一种多克隆抗体代替此单克隆抗体以外，使用从 50 个健康人，50 个肝癌患者，和 50 个乳腺癌患者所获得的血液样品，重复了实施例 3 的过程，从而测量各血浆 TGF-β 1 浓度，并将结果显示于表 IV。

15

表IV

血浆	平均值±标准 误差(ng/ml)	标准偏差	范围 (ng/ml)
肝癌(n=50)	5.14±0.57	2.92	1.44 – 16.96
乳腺癌(n=50)	5.31±0.46	1.67	2.07 – 10.27
健康人(n=50)	1.19±0.08	0.29	0.70 – 1.9

P<0.05

正如在表IV中可以看见的一样，癌症患者的血浆样品呈现与健康人组的那个显然不同的 TGF- β 1 浓度模式。这暗示上述癌症可以根据以上过程通过测量血浆 TGF- β 1 浓度而被检测。

5 实施例 6: 生产一种 TGF- β 1 单克隆抗体的杂交瘤细胞系的制备

(步骤 1)免疫小鼠

将 TGF- β 1 与等体积的弗氏完全佐剂混合，直至此混合物变成液体，并且所产生的混合物按 100 μ l/小鼠的量，注射到一只 7 周龄的 Balb/c 小鼠的尾静脉。2 周之后，将与弗氏不完全佐剂混合的与第一次注射中相同量的 TGF- β 1，注射到此小鼠的尾静脉。在 4 到 5 天之后，从尾获得小量血液，并通过 ELISA 确认了 TGF- β 1 抗体的存在。此后，在下面的细胞融合过程之前 3 到 4 天，用溶解在 0.85% PBS 中的 30 μ g 的人 TGF- β 1 静脉注射。

(步骤 2)细胞融合

在此细胞融合过程中使用骨髓瘤细胞 SP2/0·Ag14(ATCC CRL 1581) 作为一种母细胞。此母细胞在含有 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基中培养，同时维持 5×10^5 /ml 的最大细胞密度。

使用乙醚麻醉在步骤 1 中所获得的被免疫的小鼠，并摘除其脾脏，从而用组织匀浆器匀浆。将所产生的匀浆悬浮在 HBSS (Gibco-BRL, USA) 中，并将所产生的悬浮液放置于一支 15 ml 离心管中离心。重复此过程两次，从而彻底地洗涤脾细胞。将此母细胞，SP2/0·Ag14 细胞，悬浮在 HBSS 中并离心之。重复此过程两次。脾细胞和 SP2/0·Ag14 分别被悬浮在 10 ml 的 HBSS 中从而计数每一种悬浮液中的细胞数量。将从各悬浮液获得的 10^8 个脾细胞和 10^7 个 SP2/0·Ag14 细胞在一支离心管中混合，此后离心，从而使细胞沉淀。用手指轻轻敲打此离心管从而分散被沉淀的细胞，并在此后，在 37°C 保存 1 分钟。历时 1 分钟向其中加入 1 ml 的

含有 45% PEG(w/v)和 5% DMSO 的 HBSS, 此后摇动此管 1 分钟。历时 3 分钟向其中加入 9 ml 的 RPMI 培养基, 并在此后向其中加入 RPMI 培养基直至细胞悬浮液的总体积变成 50 ml, 同时摇动此管。将所产生的悬浮液离心, 并将这样获得的细胞沉淀按 $1-2 \times 10^5/\text{ml}$ 的浓度重新悬浮在 HAT 培养基(Gibco-BRL, USA)中。将 0.2 ml 一份的所产生的悬浮液置于一块 96-孔微量滴定板的孔中, 并在此后在培养箱中培养了数天, 条件维持在 37°C , 5% CO_2 和 100% 湿度。

(步骤 3) 生产单克隆抗体的杂交瘤细胞系的选择

10

如同下面所描述的一样, 使用人 TGF- β 1 抗原对在步骤 2 中获得的杂交瘤细胞系进行了 ELISA, 从而获得特异性地与 TGF- β 1 反应的细胞。

将人 TGF- β 1 抗原按 $50 \mu\text{l}$ ($2 \mu\text{g}/\text{ml}$)/孔的量加入一块微量滴定板的孔中, 并在室温保存 12 小时, 从而将抗原结合到孔的表面上。用 PBST 洗涤了这些孔, 从而去除没有结合的抗原。

将在步骤 2 中获得的此杂交瘤细胞培养物按 $50 \mu\text{l}$ /细胞的量加入每一个孔中, 并在 37°C 保存 1 小时。用 PBST 洗涤这些孔, 从而去除此培养物。向其中加入羊抗鼠 IgG-HRP(Sigma, USA), 在室温保存 1 小时, 并用 PBST 洗涤。向其中加入 $100 \mu\text{l}$ 的底物溶液(OPD, Sigma), 在室温保存 20 分钟, 并在 492 nm 测量了所产生的反应混合液的光密度。

最先选择了分泌针对人 TGF- β 1 抗原的具有高特异性的抗体的杂交瘤细胞系, 并使用人 TGF- β 1, - β 2 和 - β 3 对这些杂交瘤细胞系中的每一种都进行了 ELISA, 从而筛选仅对人 TGF- β 1 抗原具有特异性的杂交瘤细胞。对这样获得的杂交瘤细胞中的每一种进行了有限稀释, 从而获得 7 个产生一种单克隆抗体的杂交瘤细胞系克隆, hTGF-7, -8, -31, -46, -70, -119 和 -207。每一个克隆都被冷冻干燥。

离心杂交瘤细胞培养物, 并将上清进行 ELISA, 从而确定此抗体滴度, 并在此后用免疫分型试剂盒(immunotype kit)(Sigma, USA)分析, 从而确定此抗体的亚类。将结果显示于表 V。

30

表 V

克隆号	光密度(492 nm)	亚类
HTGF-46	2.125	IgG1
HTGF-7	1.644	IgG1
HTGF-70	2.590	IgG1
HTGF-8	2.395	IgG1
hTGF-207	1.735	IgG1
hTGF-119	2.462	IgG1
HTGF-31	2.282	IgG1

正如表 V 中可以看见的一样, 全部 7 个克隆都是 IgG1。

- 5 在这 7 个克隆当中, 选择了具有最高滴度的克隆, hTGF-46, 并腹膜内注射给一只小鼠。此后, 收集其腹水, 并进行了 Western 印迹。结果说明此杂交瘤细胞系克隆 hTGF-46 分泌一种对人 TGF- β 1 具有高特异性的单克隆抗体。根据关于因专利程序之微生物保藏物的国际识别的布达佩斯条约的条款, 在 1998 年 4 月 20 日将此杂交瘤细胞系 hTGF-46 保藏
- 10 藏在韩国典型培养物保藏中心(地址: #52, Oun-dong, Yusong-ku, Taejon 305-600, Republic of Korea), 其保藏号为 KCTC 0460BP。

实施例 7: TGF- β 1 的单克隆抗体的生产

- 15 为了使用在实施例 6 中获得的杂交瘤细胞系生产 TGF- β 1 的单克隆抗体, 给 Balb/c 小鼠腹膜内注射了 0.5 ml 的降植烷, 并在 1 周之后, 给每一只小鼠注射了 5×10^6 个杂交瘤细胞。从具有膨胀的腹腔的小鼠获取含有高浓度的杂交瘤细胞的腹水, 并在 10,000 rpm 离心, 从而去除此杂交瘤细胞。上清被保存在 -20°C 。

- 20 柱子用蛋白 G 珠子填充, 并在此后用 $1 \times \text{PBS}$ 洗涤了 4 次。将 2 ml 的上清按 5 滴/分钟的速率一滴一滴地上样到此柱子上, 并将 0.1 M 甘氨酸-盐酸溶液按 1 滴/10 分钟的速率引进此柱子从而洗脱 IgG。

HRP 在含有 1.25% 戊二醛 0.1 M 磷酸钠缓冲液(pH 6.5)中被活化，并将被活化的 HRP 对碳酸盐缓冲液(pH 9.2)透析。将被透析的 HRP 与此 IgG 反应，从而获得一种结合了 HRP 的 IgG。在此反应完成之后，通过在 280 nm 和 403 nm 测量此反应混合液的光密度确定了 RZ 值(A_{403}/A_{280})。

5 为了确定酶联抗体的活性，用 1 μ g 的 TGF- β 1 包被了一块微量滴定板的每一个孔，并在此后与此结合了 HRP 的 IgG 反应，从而确定活性。进一步地，对此结合了 HRP 的抗体进行了 Western 印迹，从而确定其活性。

实施例 8: Western 印迹

10

为了检查在实施例 7 中获得的 TGF- β 1 特异的单克隆抗体是否与 TGF- β 2 和 TGF- β 3 反应，如下对此单克隆抗体进行了 SDS-PAGE 和 Western 印迹。

在 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶上对人 TGF- β 1, - β 2 和 - β 3 蛋白进行了 SDS-PAGE，并在此后将其电转移到一张硝酸纤维素滤膜上。将此膜与此单克隆抗体反应数小时。所产生的膜在室温用牛血清白蛋白处理 12 到 14 小时，从而封闭这些蛋白的非特异反应。用含有 0.5% Tween 20 的 PBS 洗涤此膜 3 次，并在此后与结合了 HRP 的抗小鼠 IgG(Sigma, USA)在室温反应。用含有 0.5% Tween 20 的 PBS 洗涤此膜 3 次，此后，向此

15 膜加入一种底物缓冲液(TMB, Gibco-BRL, USA)从而显色。

20

结果说明了本发明的此单克隆抗体仅与人 TGF- β 1 反应，并且不与人 TGF- β 2 和 - β 3 反应。因此，本单克隆仅对人的 TGF- β 1 具有特异性。

尽管关于以上特定实施例，本发明已经被描述了，应该承认本领域中的熟练人员可以对本发明进行各种修饰和改变并仍然在被附加的权利

25 要求书所规定的范围中。

微生物国际保藏证明（译文）

5

保藏人	Choe, Yong-Kyung
地址	韩国大田
保藏号	KCTC 0480BP
微生物分类命名	HTGF-46
国际保藏单位名称	韩国生物科学和生物技术研究院韩国典型培养物保藏中心
代理机构盖章	

序列表

<110> 韩美药品工业株式会社

<120> 定量转化生长因子- β 1的方法以及通过使用该方法检测癌症的方法

<130> PCA00418/HMY

<150> KR 1999-12568

<151> 1999-04-09

<150> KR 1999-43935

<151> 1999-10-12

<160> 4

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> Primer RIII1

<400> 1

atggcagtga catccac

18

<210> 2

<211> 12

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> Primer RIII2

<400> 2

atttgggctt cc

12

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 正向引物

<400> 3
tttactgttt tcgtaacagt ttg 24

<210> 4
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反向引物

<400> 4
caacaacgca cagaatctag c 21

说明书附图

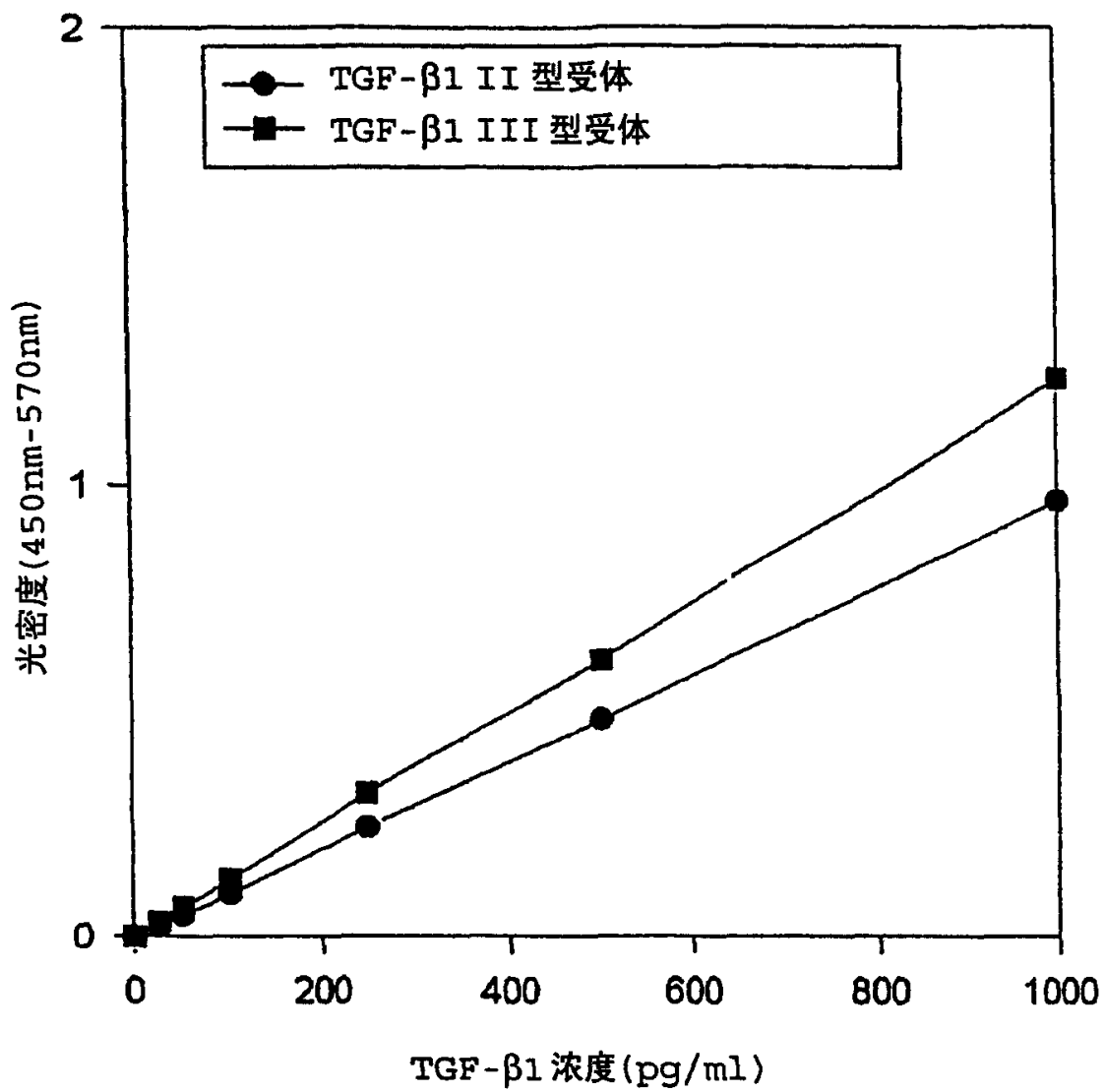


图 1

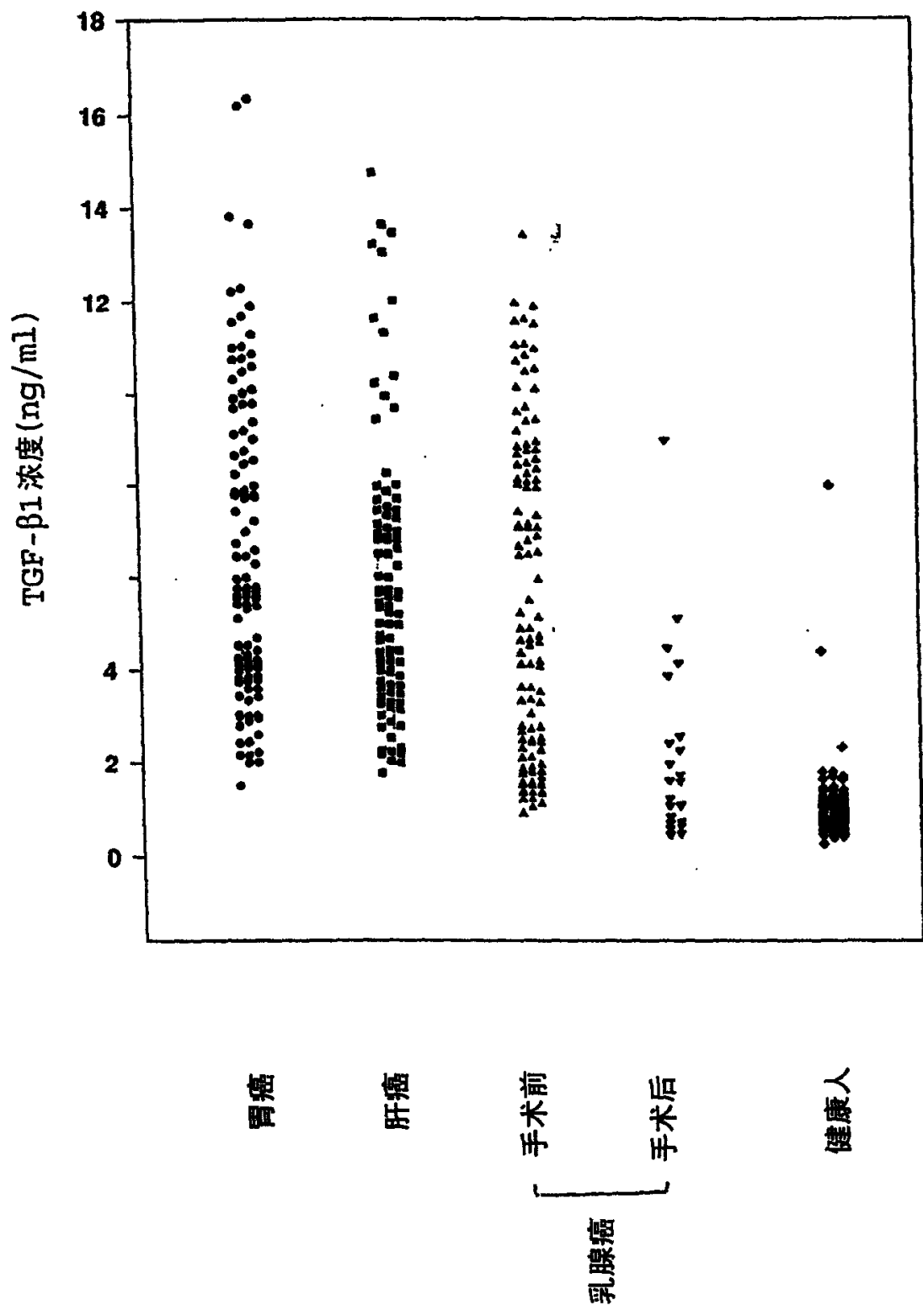


图 2

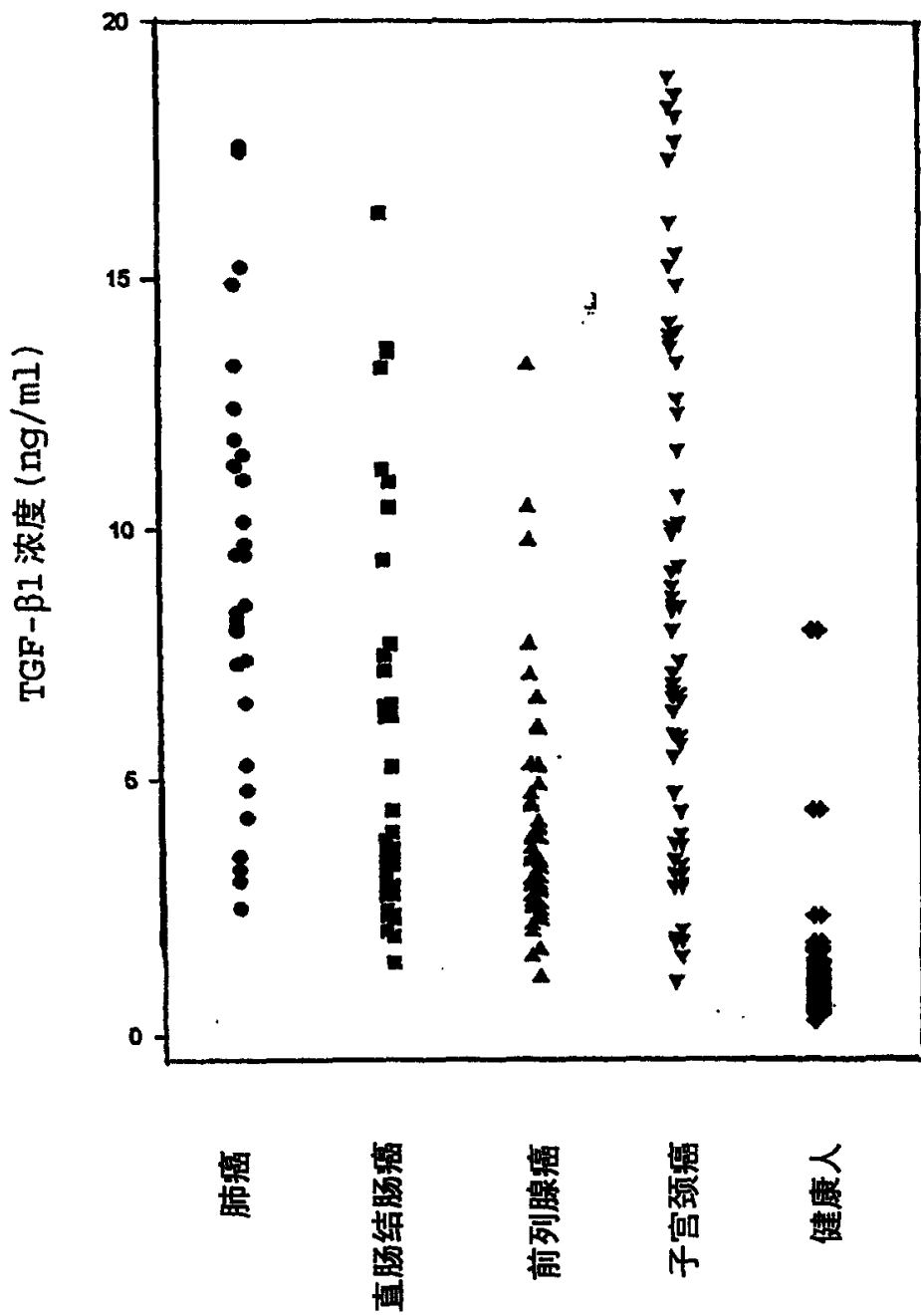


图 3

专利名称(译)	定量转化生长因子 - β 1的方法以及通过使用该方法检测癌症的方法		
公开(公告)号	CN1355882A	公开(公告)日	2002-06-26
申请号	CN00806081.9	申请日	2000-04-10
[标]申请(专利权)人(译)	韩美药品株式会社		
申请(专利权)人(译)	韩美药品工业株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	韩美药品工业株式会社		
[标]发明人	陈承嫒 申勋 林昌基		
发明人	陈承嫒 申勋 林昌基		
IPC分类号	C07K16/22 C12N5/10 C12P21/08 G01N33/574 G01N33/577 G01N33/74 G01N33/53		
CPC分类号	G01N2333/495 G01N33/57488 G01N33/74		
优先权	1019990043935 1999-10-12 KR 1019990012568 1999-04-09 KR		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

通过用一种TGF - β 1特异的受体处理样品从而在TGF - β 1与此受体之间形成复合物并测量此复合物的量而定量一种样品中的TGF - β 1的量。

