

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102639563 A

(43) 申请公布日 2012. 08. 15

(21) 申请号 201080053131. 6

(22) 申请日 2010. 11. 23

(30) 优先权数据

09177238. 4 2009. 11. 26 EP

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 05. 24

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2010/067963 2010. 11. 23

(87) PCT申请的公布数据

W02011/064179 EN 2011. 06. 03

(83) 生物保藏信息

DSM ACC3015 2009. 10. 07

DSM ACC3010 2009. 10. 07

DSM ACC3011 2009. 10. 07

DSM ACC3012 2009. 10. 07

DSM ACC3013 2009. 10. 07

DSM ACC3014 2009. 10. 07

(71) 申请人 霍夫曼 - 拉罗奇有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 劳拉·拜迪 马丁·埃贝林

胡格斯·马蒂勒

克里斯蒂亚诺·米廖里尼

雅各布·萨瓦斯特贝利韦尔

托马斯·施奈德 埃莱娜·谢伯科娃

王海燕

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021

代理人 吴小明 王旭

(51) Int. Cl.

C07K 16/18 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 14 页

序列表 4 页 附图 8 页

(54) 发明名称

2 型糖尿病的标记蛋白

(57) 摘要

本发明提供用于早期检测 II 型糖尿病的标记蛋白, 针对所述标记蛋白的抗体, 和它们在用于 II 型糖尿病的诊断方法和药物开发中的应用。

1. 用于诊断 II 型糖尿病或确定个体发展 II 型糖尿病的素因的方法,其包括下述步骤:

测量所述个体的组织样品中嗅介蛋白 4(OLFM4) 多肽水平,其中与代表健康群体的 OLFM4 多肽水平相比,所述个体的所述样品中降低的 OLFM4 多肽水平指示 II 型糖尿病或发展 II 型糖尿病的素因。

2. 权利要求 1 的方法,其中所述组织是血液,优选血浆。

3. 鉴别用于治疗 II 型糖尿病的化合物的方法,其包括下述步骤:

c) 将所述化合物施用给患有 II 型糖尿病的非人动物,

d) 测量步骤 a) 的非人动物的组织样品中 OLFM4 多肽水平,其中与没有被施用化合物的患有 II 型糖尿病的非人动物的组织样品中 OLFM4 多肽水平相比,步骤 a) 的非人动物的组织样品中改变的 OLFM4 多肽水平指示用于治疗 II 型糖尿病的化合物。

4. 权利要求 3 的方法,其中所述组织是血液,优选血浆。

5. 权利要求 3 或 4 的方法,其中所述非人动物是啮齿动物,优选小鼠或大鼠。

6. 权利要求 5 的方法,其中所述啮齿动物是 ZDF 大鼠或 ob/ob 小鼠。

7. OLFM4 多肽用于诊断 II 型糖尿病或用于确定个体发展 II 型糖尿病的素因的应用。

8. 权利要求 7 的应用,其中所述 OLFM4 多肽是人 OLFM4 多肽。

9. 特异性结合 OLFM4 多肽的抗体用于诊断 II 型糖尿病或用于确定个体发展 II 型糖尿病的素因的应用。

10. 权利要求 9 的应用,其中所述抗体结合人 OLFM4 多肽。

11. 用于诊断 II 型糖尿病或确定个体中发展 II 型糖尿病的素因的试剂盒,其包含:

d) 对 OLFM4 多肽特异性的抗体,优选权利要求 13-16 的抗体,

e) 结合 a) 所述抗体的标记抗体,或结合 a) 的被捕获的 OLFM4 多肽的标记抗体,和

f) 用于进行诊断测定的试剂。

12. 权利要求 11 的试剂盒,其中所述对 OLFM4 多肽特异性的抗体结合人 OLFM4 多肽。

13. 针对人 OLFM4 多肽的单克隆抗体。

14. 权利要求 13 的抗体,其中所述抗体包含能够从选自由以下组成的组的杂交瘤细胞系获得的抗体的 V_H 结构域的 CDR1-CDR3:OLFM4 2/3(DSM ACC3012), OLFM4 1/46(DSM ACC3011), OLFM4 2/1(DSM ACC3013), OLFM4 2/14(DSM ACC3014), OLFM4 2/28(DSM ACC3015) 和 OLFM4 1/23(DSM ACC3010),和能够从选自由以下组成的组的杂交瘤细胞系获得的抗体的 V_L 结构域的 CDR1-CDR3:OLFM4 2/3(DSM ACC3012), OLFM4 1/46(DSM ACC3011), OLFM4 2/1(DSM ACC3013), OLFM4 2/14(DSM ACC3014), OLFM4 2/28(DSM ACC3015) 和 OLFM41/23(DSM ACC3010)。

15. 权利要求 13 或 14 的抗体,其中所述抗体包含能够从选自由以下组成的组的杂交瘤细胞系获得的抗体的 V_H 结构域和 V_L 结构域:OLFM42/3(DSM ACC3012), OLFM4 1/46(DSM ACC3011), OLFM4 2/1(DSM ACC3013), OLFM4 2/14(DSM ACC3014), OLFM4 2/28(DSM ACC3015) 和 OLFM4 1/23(DSM ACC3010)。

16. 权利要求 13-15 的抗体,其中所述抗体由选自由以下组成的组的杂交瘤细胞系产生:OLFM4 2/3(DSM ACC3012), OLFM4 1/46(DSM ACC3011), OLFM4 2/1(DSM ACC3013), OLFM4 2/14(DSM ACC3014), OLFM4 2/28(DSM ACC3015) 和 OLFM4 1/23(DSM ACC3010)。

17. 选自由以下组成的组的杂交瘤细胞系:OLFM4 2/3(DSMACC3012), OLFM4 1/46(DSM ACC3011), OLFM4 2/1(DSM ACC3013), OLFM4 2/14(DSM ACC3014), OLFM4 2/28(DSM ACC3015) 和 OLFM41/23(DSM ACC3010)。

18. 核酸序列,其包含编码能够从选自由以下组成的组的杂交瘤细胞系获得的抗体的 V_H 结构域的序列:OLFM4 2/3(DSM ACC3012), OLFM41/46(DSM ACC3011), OLFM4 2/1(DSM ACC3013), OLFM4 2/14(DSMACC3014), OLFM4 2/28(DSM ACC3015) 和 OLFM4 1/23(DSM ACC3010)。

19. 核酸序列,其包含编码能够从选自由以下组成的组的杂交瘤细胞系获得的抗体的 V_L 结构域的序列:OLFM4 2/3(DSM ACC3012), OLFM41/46(DSM ACC3011), OLFM4 2/1(DSM ACC3013), OLFM4 2/14(DSMACC3014), OLFM4 2/28(DSM ACC3015) 和 OLFM4 1/23(DSM ACC3010)。

20. OLFM4 多肽作为胰腺 β -细胞标记的应用。

21. 检测组织样品中胰腺 β -细胞的方法,其包括:

c) 提供个体或非人动物的胰腺组织样品,

d) 检测 a) 所述的组织样品中的 OLFM4 阳性细胞,其中所述 OLFM4 阳性细胞是 β -细胞。

22. 权利要求 21 的方法,其中所述 OLFM4 阳性细胞通过 OLFM4 特异性的抗体检测,所述抗体优选权利要求 13-16 的抗体。

23. 用于检测胰腺组织样品中的 β -细胞的试剂盒,其包含:

a) 对 OLFM4 多肽特异性的抗体,优选权利要求 13-16 的抗体,

b) 结合 a) 所述抗体的标记抗体,和

c) 用于进行免疫组织化学测定的试剂。

24. 基本上如上文所描述的,特别是参照前述实施例的方法和抗体。

2 型糖尿病的标记蛋白

[0001] 本发明提供用于早期检测 II 型糖尿病的诊断标记蛋白,针对所述标记蛋白的抗体和它们在 II 型糖尿病的诊断方法和药物开发中的应用。

[0002] 2 型糖尿病 (Type 2 diabetes) (非胰岛素依赖性糖尿病 (NIDDM)) 是这样的病症,其特征是在在胰岛素抵抗和相对胰岛素缺乏的背景下的高血糖。估计在美国有 2360 万人 (人口的 7.8%) 患有糖尿病,被诊断的有 1790 万人,其中 90% 的是 2 型。随着 1990 至 2005 年间流行率加倍, CDC (疾病控制和预防中心 (Centers for Disease Control and Prevention)) 已经将该增长表征为流行性的。

[0003] 因此,存在对允许早期检测 II 型糖尿病的诊断标记和方法的需求。

[0004] 在第一个目的中,本发明涉及用于诊断 II 型糖尿病或用于确定个体发展 II 型糖尿病的素因的方法,其包括下述步骤:

[0005] 测量所述个体的组织样品中嗅介蛋白 4 (OLFM4) 的多肽水平,其中,与代表健康群体的 OLFM4 多肽水平相比,所述个体的所述样品中 OLFM4 多肽的降低的水平指示 II 型糖尿病或发展 II 型糖尿病的素因 (predisposition)。

[0006] 在一个优选的实施方案中,所述组织是血液,优选血浆。

[0007] 在第二个目的中,本发明提供鉴别用于治疗 II 型糖尿病的化合物的方法,其包括下述步骤:

[0008] a) 将所述化合物施用给患有 II 型糖尿病的非人动物,

[0009] b) 测量步骤 a) 的非人动物的组织样品中 OLFM4 多肽水平,其中与没有被施用化合物的患有 II 型糖尿病的非人动物的组织样品中 OLFM4 多肽水平相比,步骤 a) 的非人动物的组织样品中改变的 OLFM4 多肽水平指示用于治疗 II 型糖尿病的化合物。

[0010] 在一个优选的实施方案中,所述组织是血液,优选血浆。

[0011] 在另一个优选的实施方案中,所述非人动物是啮齿动物,优选小鼠或大鼠,更优选 DIO 小鼠, ob/ob 小鼠或 ZDF 大鼠。

[0012] 在第三个目的中,本发明涉及 OLFM4 多肽用于诊断 II 型糖尿病或用于确定个体发展 II 型糖尿病的素因的应用。

[0013] 在一个优选的实施方案中,所述 OLFM4 多肽是人 OLFM4 多肽。人 OLFM4 的氨基酸序列公开于 Seq. Id. No. 1。

[0014] 在第四个目的中,本发明提供特异性结合 OLFM4 多肽的抗体用于诊断 II 型糖尿病或用于确定个体发展 II 型糖尿病的素因的应用。

[0015] 在一个优选的实施方案中,所述抗体结合人 OLFM4 多肽。

[0016] 在第五个目的中,本发明涉及用于诊断 II 型糖尿病或确定个体中发展 II 型糖尿病的素因的试剂盒,其包含:

[0017] a) 对 OLFM4 多肽特异性的抗体,优选本发明的抗体,

[0018] b) 结合被 a) 的抗体捕获的 OLFM4 的标记抗体 (labeled antibody),或结合 a) 的抗体的标记抗体,和

[0019] c) 用于进行诊断测定的试剂。

[0020] 在一个优选的实施方案中,所述对 OLFM4 多肽特异性的抗体结合人 OLFM4 多肽。

[0021] 本发明的方法可用于监测进行糖尿病疗法的患者中 II 型糖尿病疗法的应答,其通过测量这些患者的组织样品(优选血液样品)中的 OLFM4 多肽水平来进行。与所述疗法开始时 OLFM4 多肽水平相比,在治疗过程中的组织样品中显示改变的 OLFM4 多肽水平的患者对所述糖尿病疗法有应答。

[0022] 在另一个目的中,本发明涉及针对人 OLFM4 多肽的单克隆抗体。

[0023] 在一个优选的实施方案中,所述抗体是这样的抗体,其包含能够从选自由以下组成的组的杂交瘤细胞系获得的抗体的 V_H 结构域的 CDR1-CDR3 :OLF4 2/3(DSM ACC3012), OLF4 1/46(DSM ACC3011), OLF4 2/1(DSM ACC3013), OLF4 2/14(DSM ACC3014), OLF4 2/28(DSM ACC3015) 和 OLF4 1/23(DSMACC3010),和能够从选自由以下组成的组的杂交瘤细胞系获得的抗体的 V_L 结构域的 CDR1-CDR3 :OLF42/3(DSM ACC3012), OLF4 1/46(DSM ACC3011), OLF4 2/1(DSMACC3013), OLF4 2/14(DSM ACC3014), OLF4 2/28(DSM ACC3015) 和 OLF4 1/23(DSM ACC3010)。

[0024] 在另一个优选的实施方案中,所述抗体是嵌合抗体,其包含能够从选自由以下组成的组的杂交瘤细胞系获得的抗体的 V_H 结构域和 V_L 结构域 :OLF4 2/3(DSM ACC3012), OLF4 1/46(DSM ACC3011), OLF4 2/1(DSM ACC3013), OLF4 2/14(DSM ACC3014), OLF4 2/28(DSMACC3015) 和 OLF4 1/23(DSM ACC3010)。

[0025] 在另一个优选的实施方案中,所述抗体由选自由以下组成的组的杂交瘤细胞系产生 :OLF4 2/3(DSM ACC3012), OLF4 1/46(DSM ACC3011), OLF4 2/1(DSM ACC3013), OLF4 2/14(DSM ACC3014), OLF4 2/28(DSM ACC3015) 和 OLF4 1/23(DSM ACC3010)。

[0026] 用于检测和 / 或测量生物学样品中的多肽的方法是本领域熟知的,包括但不限于蛋白质印迹, ELISAs 或 RIAs,或各种蛋白组学技术。可以产生用于检测多肽或肽片段目的的识别 OLFM4 多肽 / 其片段的单克隆或多克隆抗体或其肽片段(例如通过用纯化的蛋白免疫兔来产生),或者可以使用识别所述多肽或肽片段的已知抗体。例如,能够结合变性蛋白的抗体(如多克隆抗体)可用于在蛋白质印迹中检测 OLFM4 多肽 / 其片段。用于测量标记的方法的一个实例是 ELISA。这种类型的蛋白定量是基于能够捕获特异性抗原的抗体,和能够检测被捕获的抗原的第二抗体。用于制备和使用抗体的方法和上文提及的测定法描述于 Harlow, E. 和 Lane, D. Antibodies :A Laboratory Manual, (抗体 :实验室手册)(1988), Cold Spring Harbor Laboratory Press(冷泉港实验室出版社)中。

[0027] 在另一个目的中,本发明提供检测组织样品中胰腺 β -细胞的方法,其包括:

[0028] a) 提供个体或非人动物的胰腺组织样品,

[0029] b) 检测 a) 所述的组织样品中的 OLFM4 阳性细胞,其中所述 OLFM4 阳性细胞是 β -细胞。

[0030] 在一个优选的实施方案中,所述 OLFM4 阳性细胞通过 OLFM4 特异性的抗体检测,所述抗体优选本发明的抗体。

[0031] 用于检测人个体或非人动物的组织样品中的 β -细胞的方法可用于评估 II 型糖尿病疗法对胰腺生理学 / 组织学的作用。例如,在开发用于治疗 II 型糖尿病的化合物的过程中,本发明的检测 β -细胞的方法可用于评估所述化合物是否对胰腺的生理学 / 组织学有作用,即,该化合物是否能够逆转 II 型糖尿病动物模型中 II 型糖尿病对胰腺的一些作

用。

[0032] 在另一个目的中,本发明提供用于检测胰腺组织样品中的 β -细胞的试剂盒,其包含:

[0033] a) 对 OLFM4 多肽特异性的抗体,优选本发明的抗体,

[0034] b) 结合 a) 所述抗体的标记抗体或对 OLFM4 多肽特异性的标记抗体,和

[0035] c) 用于进行免疫组织化学测定的试剂。

[0036] 多肽嗅介蛋白 4(Olfactomedin 4, OLFM4) 的同义词是 hGC-1 和 GW112。

[0037] 术语“多肽”用于本文中时是指氨基酸的聚合物,而不是指具体长度。因此,肽、寡肽和肽片段包含于多肽的定义中。

[0038] 术语“化合物”用于本文中,在关于本发明的测定中描述的“测试化合物”或“药物候选化合物”的背景下使用。因此,这些化合物包括有机或无机化合物,由合成获得或从天然来源获得。这些化合物包括无机或有机化合物如多核苷酸、脂质或激素类似物,其特征在于相对低的分子量。其它生物聚合有机测试化合物包括:包含约 2 至约 40 个氨基酸的肽和包含约 40 至约 500 个氨基酸的更大的多肽,如抗体或抗体缀合物。

[0039] 术语“抗体”涵盖各种形式的抗体结构,包括但不限于完整抗体和抗体片段。本发明所述的抗体优选是人源化抗体、嵌合抗体或进一步遗传改造的抗体,只要其保留了本发明所述的特有性质。

[0040] “抗体片段”包括全长抗体的一部分,优选其可变结构域,或至少其抗原结合位点。抗体片段的实例包括双抗体(diabodies)、单链抗体分子和由抗体片段形成的多特异性抗体。scFv 抗体是例如在 Houston, J. S., Methods in Enzymol. (酶学方法) 203(1991) 46-96) 中描述的抗体。另外,抗体片段包括具有 VH 结构域特性(即能够与 VL 结构域组装在一起)的单链多肽,或具有结合 ANG-2 的 VL 结构域特性(即能够与 VH 结构域组装在一起)的单链多肽,所述组装形成功能性抗原结合位点并由此提供所述性质。

[0041] 术语“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”用于本文中时是指单一氨基酸组成的抗体分子的制备物。

[0042] 术语“嵌合抗体”是指这样的抗体,其包含来自一个来源或物种的可变区,即结合区,和获自不同来源或物种的恒定区的至少一部分,所述抗体通常通过重组 DNA 技术制备。包含鼠可变区和人恒定区的嵌合抗体是优选的。本发明涵盖的其它优选形式的“嵌合抗体”是其中来自最初抗体的恒定区已经被修饰或改变从而产生本发明的性质的那些抗体,所述性质尤其是关于 C1q 结合和/或 Fc 受体(FcR)结合的性质。此类嵌合抗体也称为“类型转换抗体”。嵌合抗体是表达的免疫球蛋白基因的产物,所述基因包含编码免疫球蛋白可变区的 DNA 片段和编码免疫球蛋白恒定区的 DNA 片段。产生嵌合抗体的方法涉及常规重组 DNA,并且基因转染技术是本领域熟知的。参见例如 Morrison, S. L., 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (美国国家科学院学报) 81(1984) 6851-6855; 美国专利号 5, 202, 238 和 5, 204, 244。

[0043] 术语“人抗体”用于本文中时意欲包括具有获自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体。人抗体是现有技术水平中熟知的(van Dijk, M. A., 和 van de Winkel, J. G., Curr. Opin. Chem. Biol. (当前化学生物学观点) 5(2001) 368-374)。人抗体也可在这样的转基因动物(例如小鼠)中产生,所述转基因动物能够在免疫后产生人抗体的完整库或选择物,同时没有内源免疫球蛋白产生。在此类种系突变小鼠中转移人种系免疫

球蛋白基因阵列经抗原激发后将导致人抗体的产生(参见例如, Jakobovits, A., 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA(美国国家科学院学报)90(1993)2551-2555; Jakobovits, A., 等人, Nature(自然)362(1993)255-258; Bruggemann, M., 等人, Year Immunol.(年度免疫学)7(1993)33-40)。人抗体也可在噬菌体展示文库中产生(Hoogenboom, H. R., 和 Winter, G., J. Mol. Biol.(分子生物学杂志)227(1992)381-388; Marks, J. D., 等人, J. Mol. Biol.(分子生物学杂志)222(1991)581-597)。也可获得 Cole 等人 and Boerner 等人的技术用于制备人单克隆抗体(Cole 等人, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy(单克隆抗体和癌症疗法), Alan R. Liss, p. 77(1985); 和 Boerner, P., 等人, J. Immunol.(免疫学杂志)147(1991)86-95)。如在本发明所述的嵌合和人源化抗体中已经提及的, 术语“人抗体”用于本文中时还包括这样的抗体, 其在恒定区被修饰以产生本发明所述的性质, 尤其是关于 C1q 结合和 / 或 FcR 结合的性质, 例如通过“类型转换”, 即改变或突变 Fc 部分(例如从 IgG1 到 IgG4 和 / 或 IgG1/IgG4 突变)来产生。

[0044] 术语“表位”包括能够特异性结合抗体的任何多肽决定簇。在某些实施方案中, 表位决定簇包括化学活性表面成组分子如氨基酸、糖侧链、磷酸基或磺酰基, 以及在某些实施方案中, 可具有特定三维结构特性, 和 / 或特定电荷特性。表位是这样的抗原区域, 该区域被抗体结合。

[0045] “可变结构域”(轻链可变结构域(V_L)、重链可变结构域(V_H))用于本文中时表示直接涉及抗体与抗原结合的轻链和重链结构域对中的每一个。可变轻链和重链结构域具有相同的一般结构, 且每个结构域包括四个构架(FR)区, 其序列是普遍保守的, 并通过三个“高变区”(或互补决定区, CDR)相连。所述构架区采用 β -折叠构象, 且 CDR 可以形成连接所述 β -折叠结构的环。每个链中的 CDR 通过构架区保持其三维结构, 且与来自另一条链的 CDR 一起形成抗原结合位点。抗体重链和轻链 CDR3 区在按照本发明的抗体的结合特异性 / 亲和力中起特别重要的作用, 且因此提供本发明的另一个目的。

[0046] 术语“抗体的抗原结合部分”在用于本文中时, 指负责抗原结合的抗体的氨基酸残基。抗体的抗原结合部分包括来自“互补决定区”或“CDR”的氨基酸残基。“构架”或“FR”区是除本文中定义的高变区残基以外的那些可变结构域区。因此, 抗体的轻链和重链可变结构域从 N-末端到 C-末端包括结构域 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, 和 FR4。特别地, 重链的 CDR3 是主要对抗原结合作出贡献的区域并且定义抗体的性质。CDR 和 FR 区根据 Kabat 等, Sequences of Proteins of Immunological Interest(免疫学目的蛋白序列), 第 5 版, Public Health Service(公共卫生局), National Institutes of Health(国立卫生研究所), 贝塞斯达, MD(1991)的标准定义和 / 或来自“高变环”的那些残基来确定。

[0047] 单克隆抗体可使用杂交瘤方法(如由 Kohler 和 Milstein, Nature(自然)256: 495(1975)描述的那些)制备。在杂交瘤方法中, 小鼠、仓鼠或其它适当的宿主动物典型地用免疫剂免疫以诱导淋巴细胞, 所述淋巴细胞产生或能够产生特异性结合所述免疫剂的抗体。

[0048] 许多熟知的用于融合淋巴细胞和永生细胞系的方案中的任何方案都可用于产生本发明的单克隆抗体的目的(参见例如, G. Galfre 等人(1977)Nature(自然)266: 55052; Gefter 等人 Somatic Cell Genet.(体细胞遗传学), 上文引用; Lerner, Yale J. Biol. Med.(耶鲁生物学医学杂志), 上文引用; Kenneth, Monoclonal Antibodies(单克隆抗体), 上

文引用)。此外,普通技术工作人员将理解此类方法有许多变化,它们也将是有用的。典型地,永生细胞系(例如骨髓瘤细胞系)获自与淋巴细胞相同的哺乳动物物种。例如,可通过融合来自用本发明的免疫原性制剂免疫的小鼠的淋巴细胞和永生小鼠细胞系来制备鼠杂交瘤。优选的永生细胞系是小鼠骨髓瘤细胞系,其对含有次黄嘌呤、氨嘌呤和胸苷的培养基(“HAT 培养基”)敏感。许多骨髓瘤细胞系中的任何细胞系都可用作根据标准技术的融合配偶体,所述细胞系例如 P3-NS1/1-Ag4-1, P3-x63-Ag8.653 或 Sp2/0-Ag14 骨髓瘤系。这些骨髓瘤系可从 ATCC 获得。典型地, HAT- 敏感的小鼠骨髓瘤细胞使用聚乙二醇(“PEG”)融合小鼠脾细胞。然后使用 HAT 培养基选择融合产生的杂交瘤细胞,该培养基杀死未融合的和非生产性融合的骨髓瘤细胞(未融合的脾细胞几天后死去,因为它们未被转化)。产生本发明的单克隆抗体的杂交瘤细胞通过筛选杂交瘤培养物上清中获得结合的抗体来检测,例如使用标准 ELISA 测定。

[0049] 抗体可使用重组方法和组成(例如如美国专利号 4,816,567 中所描述)产生。在一个实施方案中,提供编码本文描述的抗-OLFM4 抗体的分离的核酸。此类核酸可编码包含抗体的 V_L 的氨基酸序列和/或包含抗体的 V_H 的氨基酸序列(例如,抗体的轻链和/或重链)。在另一个实施方案中,提供包含此类核酸的一个或多个载体(例如表达载体)。在另一个实施方案中,提供包含此类核酸的宿主细胞。在一个此类实施方案中,宿主细胞包含(例如已经被转化了):(1) 包含核酸的载体,所述核酸编码包含抗体的 V_L 的氨基酸序列和包含抗体的 V_H 的氨基酸序列,或(2) 包含编码包含抗体的 V_L 的氨基酸序列的核酸的第一载体,和包含编码包含抗体的 V_H 的氨基酸序列的核酸的第二载体。在一个实施方案中,宿主细胞是真核的,例如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或淋巴样细胞(例如, Y0, NS0, Sp20 细胞)。在一个实施方案中,提供制造抗-TMEM27 抗体的方法,其中所述方法包括在适合所述抗体表达的条件下培养包含编码所述抗体的核酸的宿主细胞,如上文所提供的,并且任选地从所述宿主细胞(或宿主细胞培养基)中回收所述抗体。

[0050] 对于本发明的抗体的重组产生,将例如如上文所描述的编码抗体的核酸分离并且插入到一个或多个载体中,用于进一步在宿主细胞中克隆和/或表达。此类核酸可使用常规程序(例如通过使用能够特异性结合编码抗体重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)容易地分离并且测序。

[0051] 用于克隆或表达编码抗体的载体的适当的宿主细胞包括本文描述的原核或真核细胞。例如,抗体可在细菌中产生,尤其是当糖基化和 Fc 效应子功能不需要的时候。对于在细菌中表达抗体片段和多肽,参见例如美国专利号 5,648,237, 5,789,199, 和 5,840,523。(也参见 Charlton, *Methods in Molecular Biology* (分子生物学中的方法), 卷 248 (B. K. C. Lo, 编辑, Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254, 描述了在大肠杆菌 (*E. coli*.) 中表达抗体片段)。表达后,抗体可从细菌细胞糊中以可溶性级分分离并且可进一步纯化。

[0052] 从产生单克隆抗体的杂交瘤细胞中克隆抗体基因的方法是本领域技术人员已知的。例如,可变重链和轻链结构域 (V_H 和 V_L) 的遗传信息可使用聚合酶链反应 (PCR) 通过免疫球蛋白特异性引物从杂交瘤细胞中扩增 (*Methods Mol Med.* 2004 ;94 :447-58)。编码可变重链和轻链结构域 (V_H 和 V_L) 的核酸可然后在适当载体中克隆用于在宿主细胞中表达。

[0053] 附图简述:

[0054] 图 1A :使用抗体对 OLFM4-1/23 和 OLFM4-2/3 通过 ELISA 检测在 10 个人血浆样品

中的 OLFM4 多肽,

[0055] 图 1B :使用抗体对 OLFM4-2/1 和 OLFM4-2/28 通过 ELISA 检测在 10 个人血浆样品中的 OLFM4 多肽,

[0056] 图 1C :使用抗体对 OLFM4-2/28 和 OLFM4-2/14 通过 ELISA 检测在 10 个人血浆样品中的 OLFM4 多肽,

[0057] 图 2A :使用单克隆抗体 OLFM4-2/1 与 10 个人血浆样品的免疫沉淀 (IP),

[0058] 图 2B :使用单克隆抗体 OLFM4-2/3 与 10 个人血浆样品的免疫沉淀 (IP),

[0059] 图 2C :使用单克隆抗体 OLFM4-2/28 与 10 个人血浆样品的免疫沉淀 (IP),

[0060] 图 2D :使用单克隆抗体 OLFM4-2/14 与 10 个人血浆样品的免疫沉淀 (IP),

[0061] 图 3A :使用抗体对 OLFM4 2/1 和 OLFM4 2/28 通过 ELISA 检测在选自下述组的人受试者的血浆样品中的 OLFM4 多肽 :健康对照,空腹血糖受损 (IFG),糖耐量减低 (IGT),空腹血糖受损 + 糖耐量减低 (IFG+IGT),1 型糖尿病患者 (T1D) 和 2 型糖尿病患者 (T2D),

[0062] 图 3B :使用抗体对 OLFM4 2/28 和 OLFM4 2/14 通过 ELISA 检测在选自下述组的人受试者的血浆样品中的 OLFM4 多肽 :健康对照,空腹血糖受损 (IFG),糖耐量减低 (IGT),和空腹血糖受损 + 糖耐量减低 (IFG+IGT),1 型糖尿病患者 (T1D) 和 2 型糖尿病患者 (T2D),

[0063] 图 4A :使用单克隆抗体 hOLFM4 1/46 的人组织阵列的免疫组织化学 (IHC) 染色,

[0064] 图 4B 和 C :使用单克隆抗体 hOLFM4 1/46 对人胰岛染色 (OLFM4 :绿色,胰高血糖素 :红色,DAPI :蓝色)。

实施例

[0065] 本发明的单克隆抗人 OLFM4 抗体

[0066] 下述五种产生针对人 OLFM4 的单克隆抗体的小鼠杂交瘤细胞系已经于 2009 年 10 月 7 日以霍夫曼 - 拉罗奇有限公司 (F. Hoffmann-La Roche Ltd.) 的名义保藏于 DSMZ-(德国微生物和细胞培养物保藏中心 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH)) 并且收到下列保藏号 :

[0067] OLMF4-1/23 = DSM ACC3010

[0068] OLMF4-1/46 = DSM ACC3011

[0069] OLMF4-2/3 = DSMACC3012

[0070] OLMF4-2/1 = DSM ACC3013

[0071] OLMF4-2/14 = DSM ACC3014

[0072] OLMF4-2/28 = DSM ACC3015

[0073] 产生针对人 OLFM4 的小鼠单克隆抗体 (小鼠 OLFM4 mAbs)

[0074] 用于产生单克隆抗体的重组人 OLFM4 融合多肽的氨基酸序列如下给出 :

[0075] GSGGSVSQLFSNFTGSVDDRGTCQCSVSLPDTTFPVDRVERLEFTAHVLSQKFEKE

[0076] LSKVREYVQLISVYEKLLNLTVRIDIMEKDTISYTELDFELIKVEVKEMEKLVIQL

[0077] KESFGGSSEIVDQLEVEIRNMTLLVEKLETLDKNNVLAIRREIVALKTKECEASK

[0078] DQNTPVVHPPTPGSCGHGGVVNISKPSVVQLNWRGFSYLYGAWGRDYSPQHPN

[0079] KGLYVAPLNTDGRLLLEYRLYNTLDDLLLYINARELRTYGQSGTAVYNNMYV

[0080] NMYNTGNIARVNLTTNTIAVTQTLPNAAAYNNRFSYAVAWQDIDFAVDENGLWVI

[0081] YSTEASTGNMVISKLNDDTLQVLNTWYTKQYKPSASNAFMVCGVLYATRTMNTR

[0082] TEEIFYDYDTNTGKEGKLDIVMHKMQEKVQSINYNPFDQLYVYNDGYLL-

[0083] NYDLSVLQKPQHSHHHHHH (Seq. Id. No. 2)

[0084] 将小鼠用在昆虫细胞中产生的偶联 His 标签的重组 OLFM4 5 μg/ 注射免疫。在第 0, 13 和 28 天在 ImmunEasy 佐剂 (ALHY-DROGEL 2% +CPG-ODN) 中以 20 μl 的体积 ip 进行免疫。通过从第 41 天采血, 通过 ELISA 评价动物对重组的 OLFM4 的免疫应答。在第 56 天超加强 (Superboost) (PBS 中的 5 μg 重组 OLFM4 iv) 2 只选择的动物, 2 天后融合脾细胞与 PAI- 细胞。通过 ELISA 针对重组的 OLFM4 进行杂交瘤筛选以及克隆评价。

[0085] ELISA 特异性验证

[0086] 在 ELISA 中使用三对本发明的 mAbs :

[0087]

	包被 -mAb	检测 -mAb
1	OLFM4-1/23	OLFM4-2/3- 生物素
2	OLFM4-2/1	OLFM4-2/28- 生物素
3	OLFM4-2/28	OLFM4-2/14- 生物素

[0088] 10 个对照人血浆的 ELISA- 结果

[0089] 测定的结果在图 1A- 图 1C 中给出 :

[0090] Hu 1-Hu 10 :对照人血清 (血液供体人血浆)

[0091] 阳性对照 (OLFM4) :INS-1 hOLFM4 WT F11

[0092] 阴性对照 (med) :培养基

[0093] 使用三种不同 ELISA 测定测试 10 个人血浆样品给出非常相似的结果。这验证了测定的特异性。这些样品进一步用于通过免疫沉淀 (IP) 定性验证这些 ELISA 结果。

[0094] 通过 IP (免疫沉淀 (IP)) - 最终选择的 mAb 对 :血液供体人血浆和 INS-1 hOLFM4 WT F11/ 培养基) 定性证实 ELISAs

[0095] 使用在之前 ELISA 中使用的人血浆样品来进行免疫沉淀 (IP), 用于评价通过不同技术是否获得相似结果 (参见图 2A-D)。ELISA 和 IP 结果之间完全匹配。这非常重要, 因为它是使用两种不同技术的结果的定性证实。

[0096] 在 IP 实验中使用下述样品和抗体 :

[0097] 样品 :

[0098]

泳道	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
		人血浆号											阳性和 阴性对 照		
样品	MWM	1	2	3	4	5	6	7	9	8	10	MWM	11	12	MWM

[0099] MWM:分子量标记;对照与 ELISA 测定中相同。

[0100] 抗体:

[0101] 图 2A:OLFM4-2/1

[0102] 图 2B:OLFM4-2/3

[0103] 图 2C:OLFM4-2/28

[0104] 图 2D:OLFM4-2/14

[0105] IP 测定的结果在图 2A-D 中给出。

[0106] 在 ELISA 中的阳性样品 (#1-5 和 #7-10) 在 IP 中也是阳性的。在 ELISA 中阴性的样品 (#6) 在 IP 中也是阴性。将 INS-1 OLFM4 上清和培养基分别用作阳性和阴性对照。这是通过 IP 定性确认 ELISA 结果。

[0107] 人横断面队列 (cross sectional cohort) 的 ELISA 结果:在前驱糖尿病 (pre-diabetic) 和糖尿病患者 (Bratislava 队列) 中 OLFM4 显著降低。

[0108] 图 3A+3B

[0109] 人血浆队列

[0110] 受试者筛选

[0111] 满足下述入选标准的来自门诊病人门诊部登记簿的具有 T2D 代谢风险的大约 200 受试者:

[0112] 性别:男性

[0113] 年龄:40-55 岁

[0114] BMI:25-32kg/m²

[0115] HbA1C ≤ 7.0%

[0116] 进行口服葡萄糖耐受测试 (75g)。排除标准包括以前已知葡萄糖代谢改变,使用已知改变胰岛素分泌或作用的药物,和存在肝或内分泌疾病。在收集血液样品前,使用标准方案评估身高和重量。体重指数 (BMI) 计算为重量 (千克) 除以高度 (米) 的平方。在 10-12 小时过夜禁食后并且在 2 小时葡萄糖负荷后,将来自肘前静脉的全血样品 (20ml) 收集到 EDTA 试管中。为了获得适当的禁食状态,向参加者提供关于食物种类和它们最后摄入时间的精确说明。通过离心分离的血浆在分析前以 1ml 的等分试样 (10x) 存储于 -80℃。

[0117] 在该研究中招募签署知情同意书并且满足合格标准的患者。斯洛伐克科学院 (Slovak Academy of Sciences) 实验内分泌学研究所 (Institute of Experimental Endocrinology) 的伦理委员会 (The Ethical committee) 批准了所述研究的方案。

[0118] 诊断

[0119] 将受试者根据 ADA 指南 2005 (Diabetes Care. (糖尿病护理) 2005 年 1 月;28 增刊 1:S37-42) 分为 4 个不同的组:

[0120] 健康对照:禁食血浆葡萄糖 (FPG) < 5.6mmol/l 并且正常葡萄糖耐受 (NGT) < 7.8mmol/l。

[0121] 空腹血糖受损 (IFG):IFG 定义为 FPG 值在 ≥ 5.6 和 < 6.9mmol/l 之间并且在激发后 2 小时正常糖耐量 (NGT) < 7.8mmol/l。

[0122] 糖耐量减低 (IGT):IGT 定义为负荷后 2 小时葡萄糖浓度在 ≥ 7.8 和 < 11.1mmol/l 之间。

[0123] 空腹血糖受损和葡萄糖耐受 (IFG+IGT) : IGT+IFG 定义为 FPG 值在 ≥ 5.6 和 $< 6.9 \text{ mmol/l}$ 之间并且激发后 2 小时的 NGT 值在 ≥ 7.8 和 $< 11.1 \text{ mmol/l}$ 之间。

[0124] 另外, 还选择了来自门诊病人门诊部登记簿的一组 8 名 1 型糖尿病患者和一组 11 名 2 型患者。患有血脂异常的患者用降血脂剂 (hypolipidemic agents) (例如他汀类 (statins) 或贝特类 (fibrates)) 治疗。

[0125] 糖尿病受试者的总结表

[0126]

	T1DM	T2DM
年龄	25-50	40-55
性别	男性	男性
BMI (体重指数)	25-30	27-30
疾病持续时间(年)	5-25	3 -6
HbA1c (%)	7.0-9.0	7.0-9.0
抗糖尿病疗法	胰岛素	饮食或二甲双胍 (Metformin) 或 SU

[0127] 患有 1 型糖尿病 (T1-DM), 2 型糖尿病 (T2-DM), 糖耐量减低 (IGT), 空腹血糖受损 (IFG), 糖耐量减低 (IGT) 和 IFG+IGT 的受试者的平均人体测量和实验室特征

[0128]

	对照	IFG	IGT	IFG + IGT	T2DM	T1DM
数目	10	9	10	9	11	8
年龄	46.7 $\pm$ 3.1	49. $\pm$ 2	50 $\pm$ 1	50 $\pm$ 1	50 $\pm$ 1	46 $\pm$ 2
BMI	24.1 $\pm$ 0.4	29.5 $\pm$ 0.7	30.2 $\pm$ 0.5	29.9 $\pm$ 0.8	30.1 $\pm$ 0.5	25.6 $\pm$ 0.4
糖尿病持续时间	NA	NA	NA	NA	3.9	18 $\pm$ 2
HbA1c	<7	6.2 $\pm$ 0.1	5.9 $\pm$ 0.2	5.9 $\pm$ 0.2	7.8 $\pm$ 0.2	7.4 $\pm$ 0.5
禁食葡萄糖	5.1 $\pm$ 0.1	6.6 $\pm$ 0.1	5.6 $\pm$ 0.1	6.7 $\pm$ 0.1	9.8 $\pm$ 0.6	8.2 $\pm$ 0.6
负荷后葡萄糖	<7.8	6.4 $\pm$ 0.5	9.2 $\pm$ 0.3	10.2 $\pm$ 0.3	NA	NA
胆固醇	4.7 $\pm$ 0.3	6.3 $\pm$ 0.4	5.6 $\pm$ 0.3	5.3 $\pm$ 0.3	5.3 $\pm$ 0.4	4.8 $\pm$ 0.3
甘油三酯	1.3 $\pm$ 0.2	3.2 $\pm$ 1.2	2.1 $\pm$ 0.3	2.7 $\pm$ 0.4	2.8 $\pm$ 0.7	0.8 $\pm$ 0.1

[0129] 在 ELISA 测定中使用下述 OLFM4 单克隆抗体对：

[0130] 图 3A :抗体 :2/1-2/28

[0131] 图 3B :抗体 :2/28-2/14

[0132] 横断面队列的 ELISA 结果显示在前驱糖尿病患者 (IFG+IGT, IFG 和 IGT) 中 OLFM4 水平比在健康对照患者中显著更低 (图 3A 和 3B)。OLFM4 水平在 T2DM 患者中也更低。有趣的是, OLFM4 水平在 T1DM 患者中更高, 尽管不显著 (Dunnett' s 修正的 ANOVA)。T2DM 和 T1DM 组患者均在进行治疗中。

[0133] 鉴于 OLFM4 在未治疗的前驱糖尿病患者中显著降低, 我们认为 OLFM4 可用作早期 T2D 发病的标记。

[0134] OLFM4 作为胰腺 β -细胞的标记

[0135] 使用单克隆抗体 hOLFM4 1/46 的人组织阵列 (Human Tissue Array) 的免疫组织化学 (IHC) 染色。可靠的 (robust) 结果显示任何测试的组织中没有特异性染色, 而在人胰岛 (人胰腺切片) 的 β -细胞中检测到非常强且特异性的信号。注意在组织微阵列中胰腺切片显示阴性, 因为在这种组织微阵列的胰腺点中仅有外分泌组织并且没有胰岛结构存在。

[0136] 图 4A :用单克隆抗体 hOLFM4 1/46 染色的人组织阵列

[0137] 图 4B 和 C :用单克隆抗体 hOLFM4 1/46 染色的人胰岛 (OLFM4 :绿色, 胰高血糖素 :红色, DAPI :蓝色)。

[0138] 材料和方法

[0139] ELISA 方案

[0140] 包被:

[0141] 包被 -mAb :PBS 中 $5 \mu\text{g/ml}$, $100 \mu\text{l}$ /孔

[0142] →在湿润箱中在 4°C 过夜

[0143] → 2x 洗涤 PBS- 吐温

[0144] 封闭:

[0145] B- 缓冲液

[0146] $200 \mu\text{l}$ /孔

[0147] →在 37°C 1h

[0148] → 2x 洗涤 PBS- 吐温

[0149] 样品和检测 -mAb:

[0150] 生物素化检测 -mAb, 在 B- 缓冲液中 $1 \mu\text{g/ml}$: $25 \mu\text{l}$ /孔

[0151] 样品 (人血浆): 在 B- 缓冲液中稀释, 从未稀释的血浆开始, 以 1 : 2 进行到 1 : 128 (8 个浓度) $30 \mu\text{l}$ /孔

[0152] 向平板添加第一个 $25 \mu\text{l}$ 检测 -mAb, 然后 $30 \mu\text{l}$ 样品

[0153] →在湿润箱中在振荡器上 4°C 过夜

[0154] → 4x 洗涤 PBS- 吐温

[0155] 缀合物:

[0156] PIERCE 链霉抗生物素 (Streptavidine)-HRP0 (No 21126), $1 \mu\text{g/ml}$, 在 B- 缓冲液中

[0157] $50 \mu\text{l}$ /孔

[0158] →在室温 1h

[0159] → 4x 洗涤 PBS- 吐温

[0160] 底物:

[0161] 3,3',5,5' - 四甲基联苯胺 (TMB), 100 μ l/ 孔

[0162] 5min 后用 0.5M H_2SO_4 , 100 μ l/ 孔停止反应

[0163] 在 450nm 读数

[0164] 细胞培养

[0165] 多西环素 (doxycycline) 可诱导大鼠胰岛素瘤 INS-1 hOLFM4 WT 和 INS-1hOLFM4-His 稳定细胞系 (分别为表达野生型 (hOLFM4 WT) 和带 His 标签的 (hOLFM4-His) 人 OLFM4 形式) 如先前所述 (Wang 等人 2001) 进行培养。两种 INS-1 细胞系均在 RPMI 1640+GlutaMAX-1 培养基 (Invitrogen, 卡尔斯巴德, CA) 中培养, 所述培养基含有 10mM Hepes (pH 7.4), 1mM 丙酮酸钠, 50 μ M 2- 巯基乙醇, 10% 热灭活胎牛血清 (FBS), 青霉素和链霉素。添加五十 μ g/ml G418 硫酸盐 (Promega, 麦迪逊, WI) 和 50 μ g/ml zeosin (Invitrogen) 用于生长选择。通过 500ng/ml 多西环素 (Dox) (Sigma) 诱导 hOLFM4 WT 和 hOLFM4-His 的过表达达 96 小时。细胞在潮湿的保温箱中在 37°C 和 5% CO_2 (下标 2) 中生长。

[0166] 免疫沉淀 (IP) 和免疫印迹 (蛋白质印迹, WB)

[0167] 将 60-90% 汇合细胞在存在或不存在 500ng/ml 多西环素情况下在 10cm 培养皿中培养 96 小时。将上清 (细胞培养基) 在无菌条件下收获, 在 2000rpm 离心 10 分钟, 并存储在 4°C。将细胞在 1X PBS 中洗涤两次并用 1mL 裂解缓冲液裂解。5 分钟后, 将细胞在 1.5mL Eppendorf 管中收集并全速离心 5 分钟。收集上清 (全细胞提取物), 等分, 在液氮中速冻并存储在 -80°C。对于 IP, 将 3mL 上清 (细胞培养基) 与 1 μ g 每种 mAb 混合并在轨道式振荡器上 4°C 温育 48 小时。将在 1X PBS- 吐温 (0.05%) 中稀释 50% 的二十五 μ L 蛋白质 A Sepharose CL-4B 添加到每个反应中并在 RT 在轨道式振荡器上温育 1 小时。将试管通过旋转获得沉淀 (spin-down) 并且将沉淀用 1X PBS- 吐温 (0.05%) 洗涤 2 次和用 1X PBS 洗涤 1 次。将三十五 μ L 的 1X LDS-SB/10% β -ME 添加到每个沉淀并且将样品剧烈涡旋 (哪个词: 被涡旋?) 且通过旋转获得沉淀, 然后装载于 SDS-PAGE 胶中。免疫印迹, 使用增强的化学发光 (Pierce, Rockford, IL, USA) 检测, 如以前所述 (WangH, J Biol Chem (生物化学杂志) 2001) 进行。

[0168] 免疫组织化学 (IHC)

[0169] 将福尔马林固定的石蜡包埋 (FFPE) 的切片用于组装玻片。将玻片浸泡在二甲苯 (x2), 100% EtOH, 95% EtOH, 80% EtOH, 70% EtOH, 和 1XPBS 中 (各自 3 分钟) 对样品进行顺次脱水。通过将玻片浸泡在 1X 柠檬酸盐缓冲液中并将它们在微波炉 (在 850 瓦特) 煮沸 3 分钟进行抗原修复。用水淋洗玻片两次后, 将细胞用 100 μ L 1X PBS 中的 0.2% Triton 在 RT 透性化 (permeabilized) 10 分钟。用 1X PBS 洗涤 3 次后, 用 1X PBS 中的 2% BSA 在 RT 进行封闭 30' 至 1h。再用 1X PBS 洗涤三次, 然后进行初级 Ab 温育 (在 37°C 1-2 小时或在 4°C 0/N)。再用 1X PBS 洗涤三次后, 在黑暗中的 RT 与次级 Ab 温育 1h。再进行三次洗涤并且进行 DAPI 染色 (在黑暗中的 RT 5-10 分钟)。三次最终洗涤并且组装盖玻片。

[0170] 将 FDA 标准人组织微阵列 (T8234700, Biochain) 用小鼠抗 -OLFM4 单克隆抗体染

色,随后用 Alexa 488 缀合的驴抗小鼠和 Alexa 555 驴抗兔次级抗体 (Invitrogene) 染色。
 [0171] 通过 Asterand 获得的人胰腺切片与小鼠抗 -OLFM4 单克隆抗体和兔抗 -胰高血糖素多克隆抗体两者共染色,随后用 Alexa 488 缀合的驴抗小鼠和 Alexa 555 驴抗兔次级抗体 (Invitrogene) 染色。

[0172] 尽管显示和描述了目前本发明的优选实施方案,应当明确理解本发明不限于此,而是可以在后附权利要求书的范围内以其他方式体现和实施。

PCT

打印输出 (原来为电子形式)

(本页不是国际申请的一部分并且不计算为国际申请的一页)

0-1	表 PCT/RO/134 (SAFE) 关于保藏的微生物或其它生物材料的说明 (PCT实施细则13之2)	
0-1-1	使用下述软件制作	PCT Online Filing Version 3.5.000.221 MT/FOP 20020701/0.20.5.9
0-2	国际申请号	
0-3	申请人或代理人档案号	26396 WO
1	以下说明涉及在说明书下述部分提及的已保藏的微生物或其它生物材料:	
1-1	页	3
1-2	行	5
1-3	保藏的鉴定	
1-3-1	保藏单位名称	DSMZ 德国微生物和细胞培养物保藏中心
1-3-2	保藏单位地址	Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 德国
1-3-3	保藏日期	2009年10月7日 (07.10.2009)
1-3-4	保藏号	DSMZ ACC3010
1-5	本说明是为下述指定国作的	所有指定国
2	以下说明涉及在说明书下述部分提及的已保藏的微生物或其它生物材料:	
2-1	页	3
2-2	行	3
2-3	保藏的鉴定	
2-3-1	保藏单位名称	DSMZ 德国微生物和细胞培养物保藏中心
2-3-2	保藏单位地址	Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 德国
2-3-3	保藏日期	2009年10月7日 (07.10.2009)
2-3-4	保藏号	DSMZ ACC3011
2-5	本说明是为下述指定国作的	所有指定国

[0173]

[0174]

PCT

打印输出(原来为电子形式)

(本页不是国际申请的一部分并且不计算为国际申请的一页)

3	以下说明涉及在说明书下述部分提及的已保藏的微生物或其它生物材料:	
3-1	页	3
3-2	行	3
3-3	保藏的鉴定	
3-3-1	保藏单位名称	DSMZ 德国微生物和细胞培养物保藏中心
3-3-2	保藏单位地址	Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 德国
3-3-3	保藏日期	2009年10月7日 (07.10.2009)
3-3-4	保藏号	DSMZ ACC3012
3-5	本说明是为下述指定国作的	所有指定国
4	以下说明涉及在说明书下述部分提及的已保藏的微生物或其它生物材料:	
4-1	页	3
4-2	行	4
4-3	保藏的鉴定	
4-3-1	保藏单位名称	DSMZ 德国微生物和细胞培养物保藏中心
4-3-2	保藏单位地址	Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 德国
4-3-3	保藏日期	2009年10月7日 (07.10.2009)
4-3-4	保藏号	DSMZ ACC3013
4-5	本说明是为下述指定国作的	所有指定国
5	以下说明涉及在说明书下述部分提及的已保藏的微生物或其它生物材料:	
5-1	页	3
5-2	行	4
5-3	保藏的鉴定	
5-3-1	保藏单位名称	DSMZ 德国微生物和细胞培养物保藏中心
5-3-2	保藏单位地址	Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 德国
5-3-3	保藏日期	2009年10月7日 (07.10.2009)
5-3-4	保藏号	DSMZ ACC3014
5-5	本说明是为下述指定国作的	所有指定国

[0175]

PCT

打印输出（原来为电子形式）

（本页不是国际申请的一部分并且不计算为国际申请的一页）

6	以下说明涉及在说明书下述部分提及的已保藏的微生物或其它生物材料；	
6-1	页	3
6-2	行	4
6-3	保藏的鉴定	
6-3-1	保藏单位名称	DSMZ 德国微生物和细胞培养物保藏中心
6-3-2	保藏单位地址	Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, 德国
6-3-3	保藏日期	2009年10月7日 (07.10.2009)
6-3-4	保藏号	DSMZ ACC3015
6-5	本说明是为下述指定国作的	所有指定国

由受理局填写

0-4	本表已经和国际申请一起收到 (是或否)	
0-4-1	授权官员	

由国际局填写

0-5	国际局收到本表日期：	
0-5-1	授权官员	

[0001]

序列表

<110> 霍夫曼-拉罗奇有限公司

<120> 2 型糖尿病的标记蛋白

<130> 26396 EP

<150> EP09177238.4

<151> 2009-11-26

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 510

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<220>

<221> 信号

<222> (1).. (20)

<220>

<221> mat_肽

<222> (21).. (510)

<400> 1

```

Met Arg Pro Gly Leu Ser Phe Leu Leu Ala Leu Leu Phe Phe Leu Gly
-20              -15              -10              -5
Gln Ala Ala Gly Asp Leu Gly Asp Val Gly Pro Pro Ile Pro Ser Pro
      -1  1              5              10
Gly Phe Ser Ser Phe Pro Gly Val Asp Ser Ser Ser Ser Phe Ser Ser
      15              20              25
Ser Ser Arg Ser Gly Ser Ser Ser Ser Arg Ser Leu Gly Ser Gly Gly
      30              35              40
Ser Val Ser Gln Leu Phe Ser Asn Phe Thr Gly Ser Val Asp Asp Arg
45              50              55              60
Gly Thr Cys Gln Cys Ser Val Ser Leu Pro Asp Thr Thr Phe Pro Val
      65              70              75
Asp Arg Val Glu Arg Leu Glu Phe Thr Ala His Val Leu Ser Gln Lys
      80              85              90
Phe Glu Lys Glu Leu Ser Lys Val Arg Glu Tyr Val Gln Leu Ile Ser

```

[0002]

95	100	105
Val Tyr Glu Lys Lys Leu Leu Asn Leu Thr Val Arg Ile Asp Ile Met		
110	115	120
Glu Lys Asp Thr Ile Ser Tyr Thr Glu Leu Asp Phe Glu Leu Ile Lys		
125	130	135
Val Glu Val Lys Glu Met Glu Lys Leu Val Ile Gln Leu Lys Glu Ser		
145	150	155
Phe Gly Gly Ser Ser Glu Ile Val Asp Gln Leu Glu Val Glu Ile Arg		
160	165	170
Asn Met Thr Leu Leu Val Glu Lys Leu Glu Thr Leu Asp Lys Asn Asn		
175	180	185
Val Leu Ala Ile Arg Arg Glu Ile Val Ala Leu Lys Thr Lys Leu Lys		
190	195	200
Glu Cys Glu Ala Ser Lys Asp Gln Asn Thr Pro Val Val His Pro Pro		
205	210	215
Pro Thr Pro Gly Ser Cys Gly His Gly Gly Val Val Asn Ile Ser Lys		
225	230	235
Pro Ser Val Val Gln Leu Asn Trp Arg Gly Phe Ser Tyr Leu Tyr Gly		
240	245	250
Ala Trp Gly Arg Asp Tyr Ser Pro Gln His Pro Asn Lys Gly Leu Tyr		
255	260	265
Trp Val Ala Pro Leu Asn Thr Asp Gly Arg Leu Leu Glu Tyr Tyr Arg		
270	275	280
Leu Tyr Asn Thr Leu Asp Asp Leu Leu Leu Tyr Ile Asn Ala Arg Glu		
285	290	295
Leu Arg Ile Thr Tyr Gly Gln Gly Ser Gly Thr Ala Val Tyr Asn Asn		
305	310	315
Asn Met Tyr Val Asn Met Tyr Asn Thr Gly Asn Ile Ala Arg Val Asn		
320	325	330
Leu Thr Thr Asn Thr Ile Ala Val Thr Gln Thr Leu Pro Asn Ala Ala		
335	340	345
Tyr Asn Asn Arg Phe Ser Tyr Ala Asn Val Ala Trp Gln Asp Ile Asp		
350	355	360
Phe Ala Val Asp Glu Asn Gly Leu Trp Val Ile Tyr Ser Thr Glu Ala		
365	370	375
Ser Thr Gly Asn Met Val Ile Ser Lys Leu Asn Asp Thr Thr Leu Gln		
385	390	395
Val Leu Asn Thr Trp Tyr Thr Lys Gln Tyr Lys Pro Ser Ala Ser Asn		
400	405	410
Ala Phe Met Val Cys Gly Val Leu Tyr Ala Thr Arg Thr Met Asn Thr		
415	420	425
Arg Thr Glu Glu Ile Phe Tyr Tyr Tyr Asp Thr Asn Thr Gly Lys Glu		
430	435	440
Gly Lys Leu Asp Ile Val Met His Lys Met Gln Glu Lys Val Gln Ser		
445	450	455
		460

[0003]

Tyr Tyr Arg Leu Tyr Asn Thr Leu Asp Asp Leu Leu Leu Tyr Ile Asn			
	245	250	255
Ala Arg Glu Leu Arg Thr Tyr Gly Gln Gly Ser Gly Thr Ala Val Tyr			
	260	265	270
Asn Asn Asn Met Tyr Val Asn Met Tyr Asn Thr Gly Asn Ile Ala Arg			
	275	280	285
Val Asn Leu Thr Thr Asn Thr Ile Ala Val Thr Gln Thr Leu Pro Asn			
	290	295	300
Ala Ala Tyr Asn Asn Arg Phe Ser Tyr Ala Val Ala Trp Gln Asp Ile			
305	310	315	320
Asp Phe Ala Val Asp Glu Asn Gly Leu Trp Val Ile Tyr Ser Thr Glu			
	325	330	335
Ala Ser Thr Gly Asn Met Val Ile Ser Lys Leu Asn Asp Thr Thr Leu			
	340	345	350
Gln Val Leu Asn Thr Trp Tyr Thr Lys Gln Tyr Lys Pro Ser Ala Ser			
	355	360	365
Asn Ala Phe Met Val Cys Gly Val Leu Tyr Ala Thr Arg Thr Met Asn			
	370	375	380
Thr Arg Thr Glu Glu Ile Phe Tyr Tyr Asp Thr Asn Thr Gly Lys Glu			
385	390	395	400
Gly Lys Leu Asp Ile Val Met His Lys Met Gln Glu Lys Val Gln Ser			
	405	410	415
Ile Asn Tyr Asn Pro Phe Asp Gln Lys Leu Tyr Val Tyr Asn Asp Gly			
	420	425	430
Tyr Leu Leu Asn Tyr Asp Leu Ser Val Leu Gln Lys Pro Gln His His			
	435	440	445
His His His His			
	450		

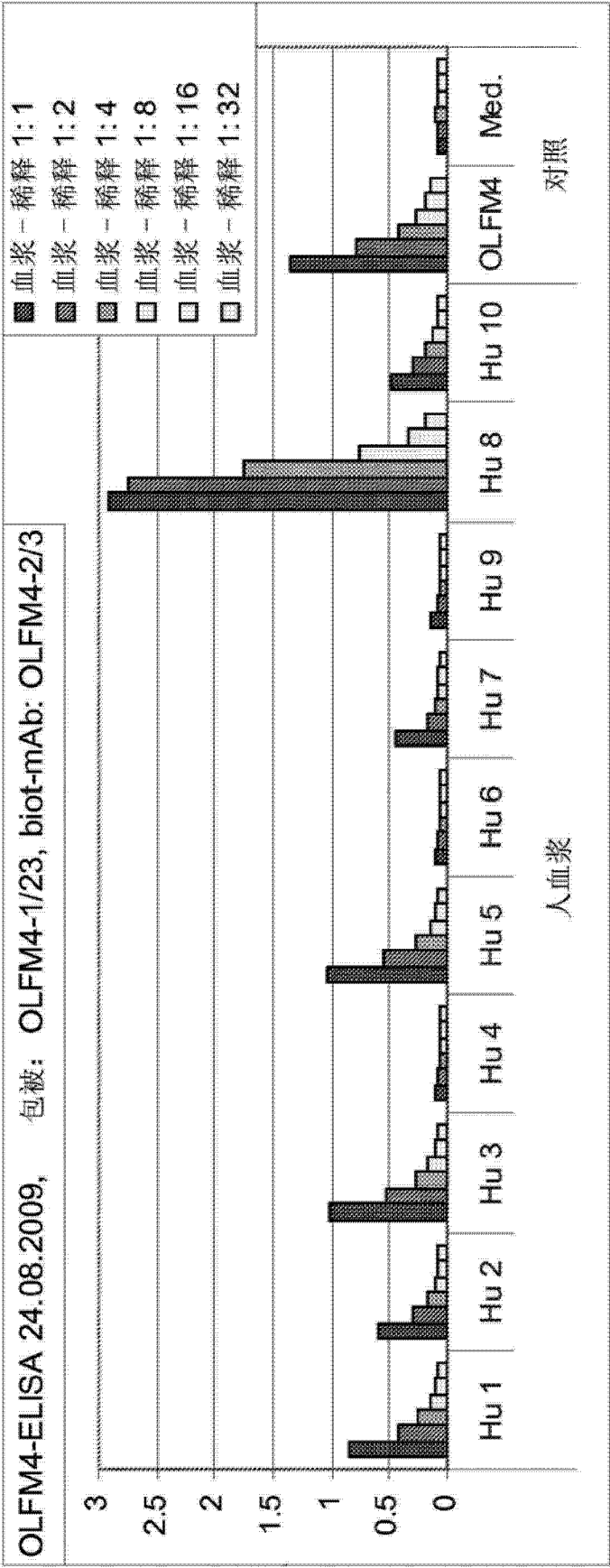


图 1A

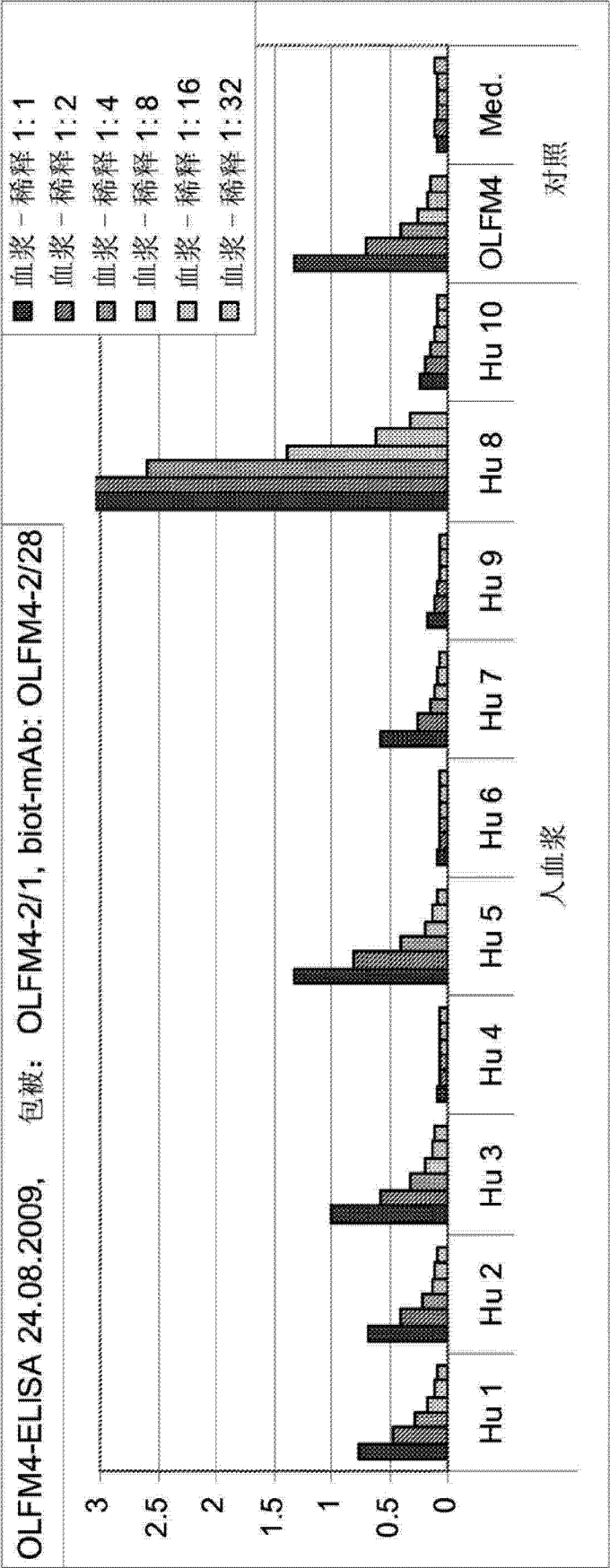


图 1B

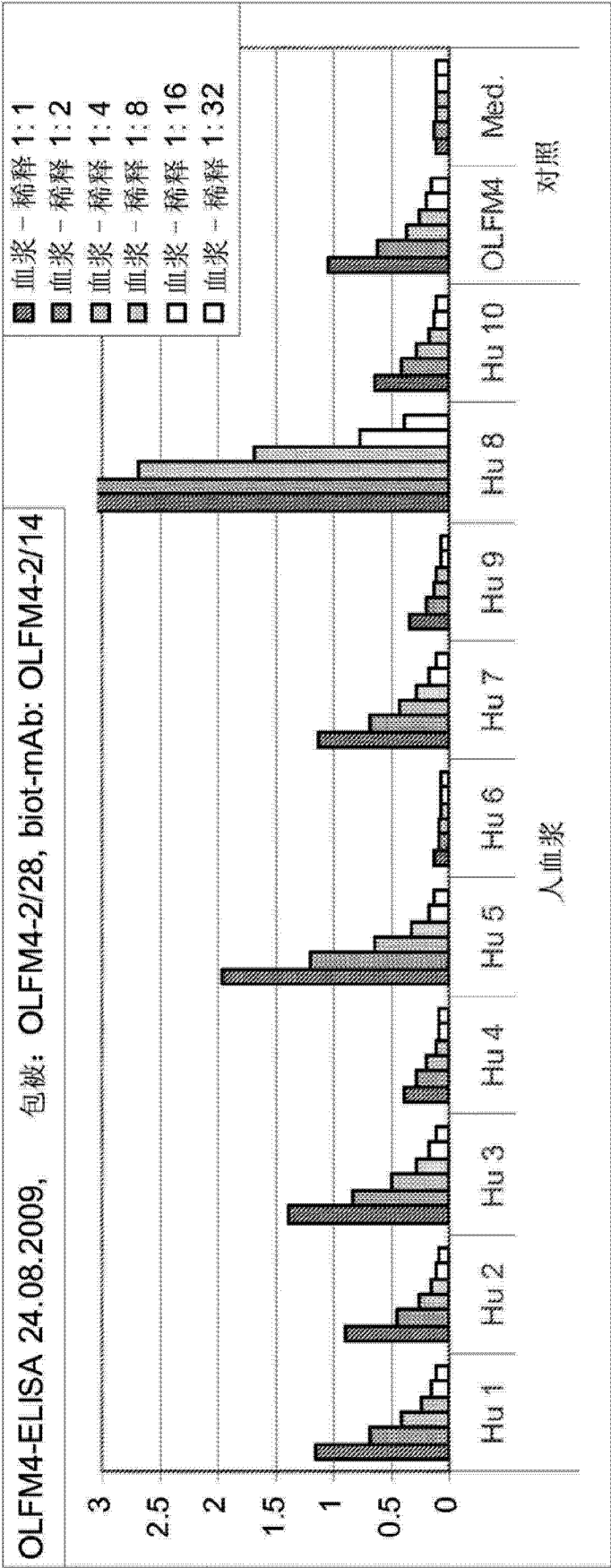


图 1C

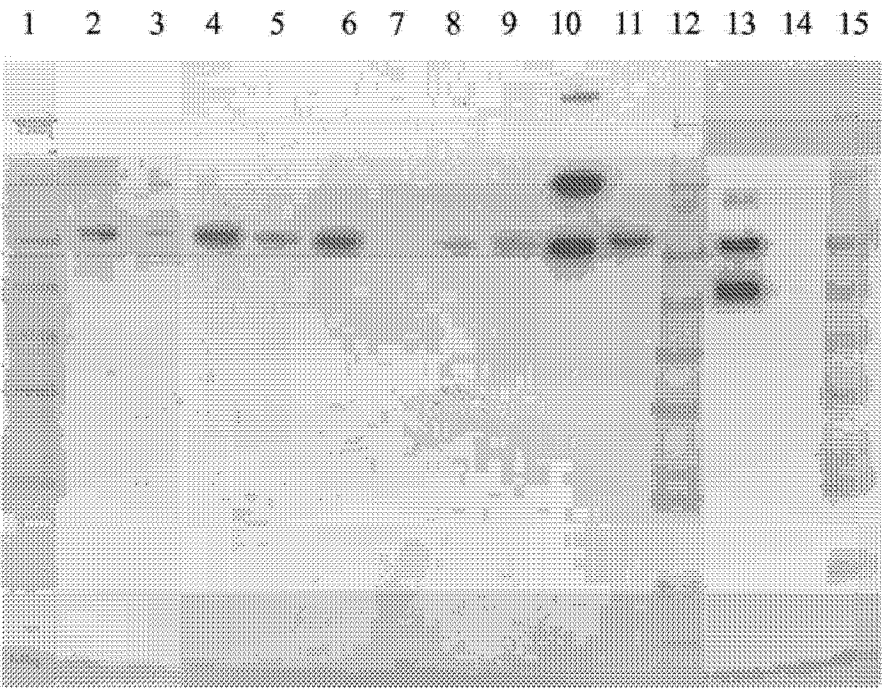


图 2A

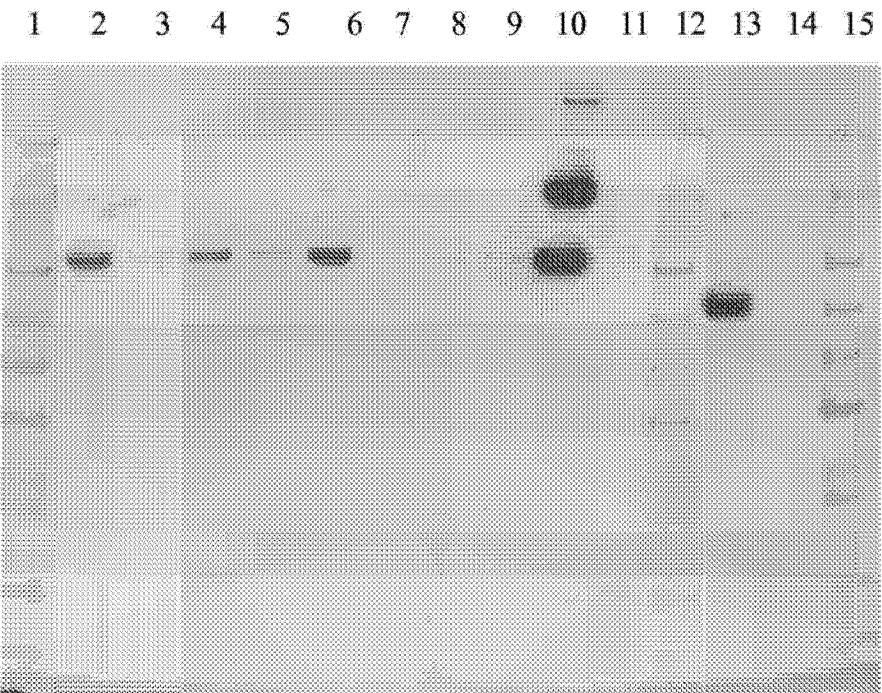


图 2B

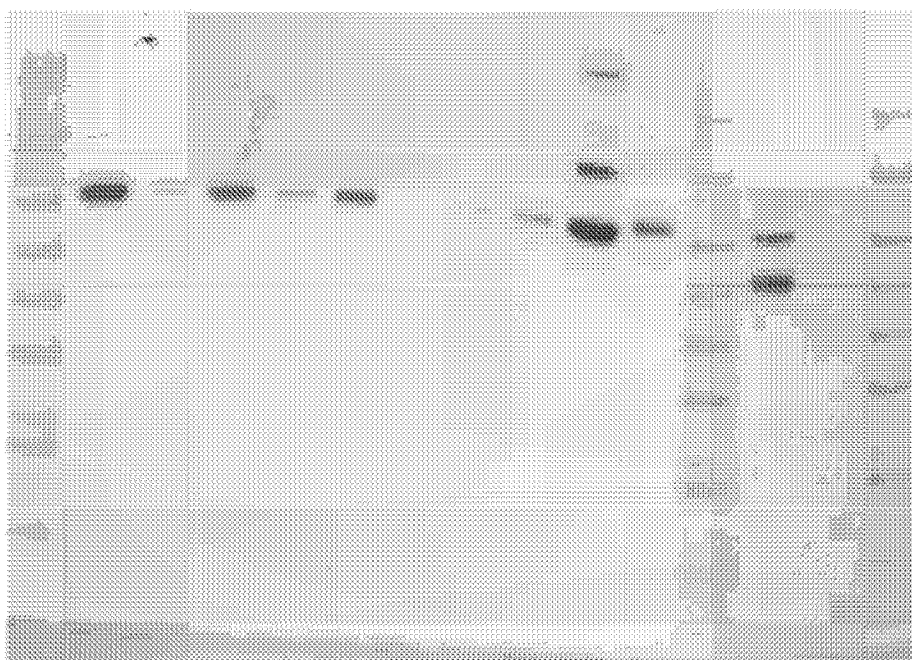


图 2C

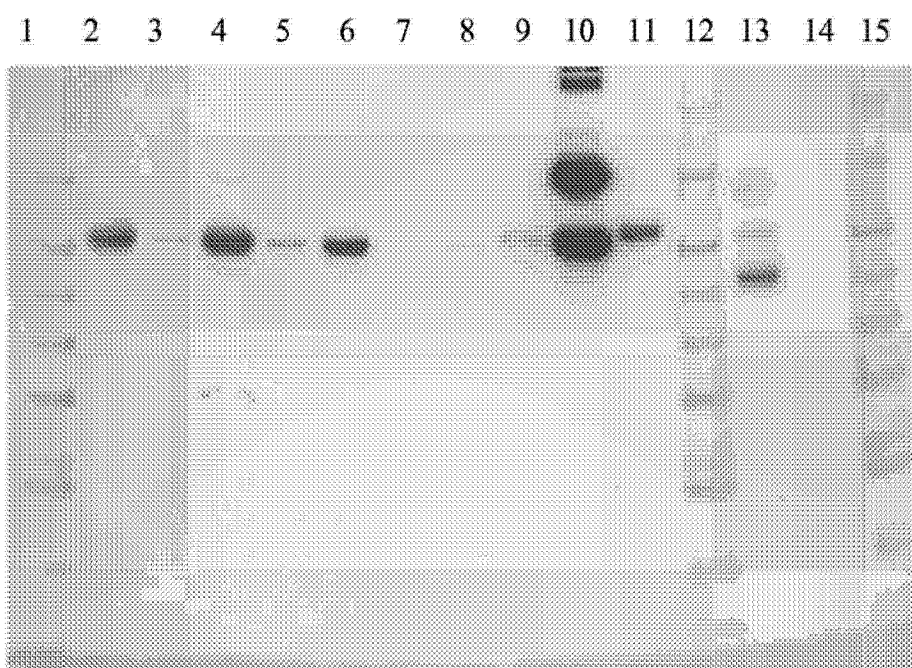


图 2D

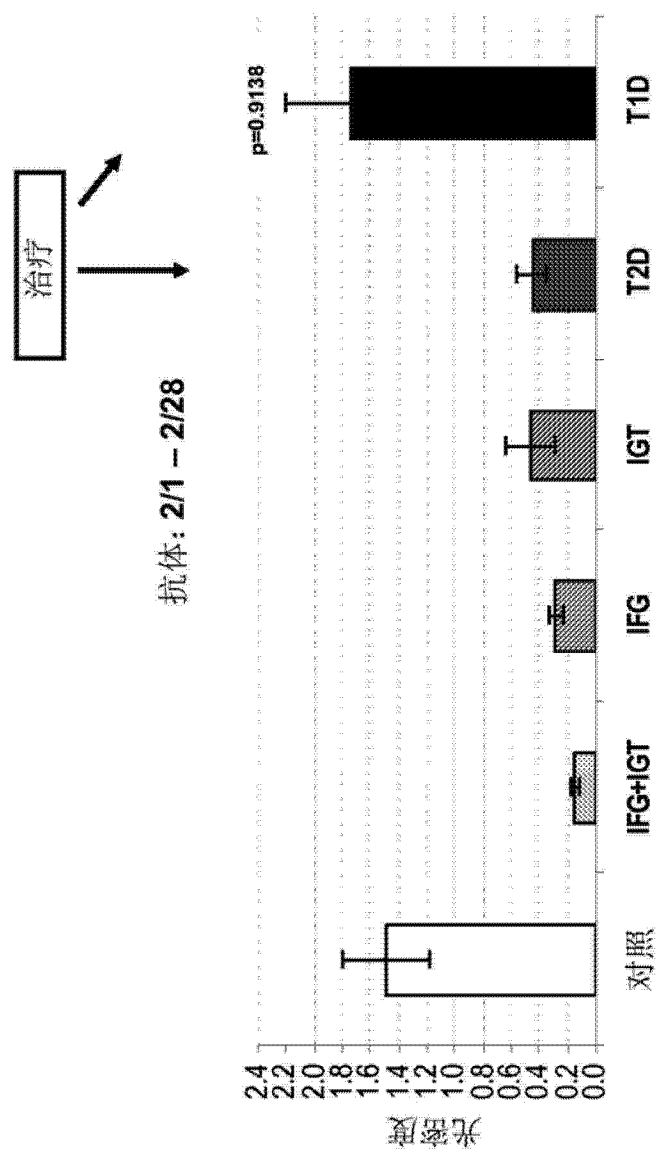


图 3A

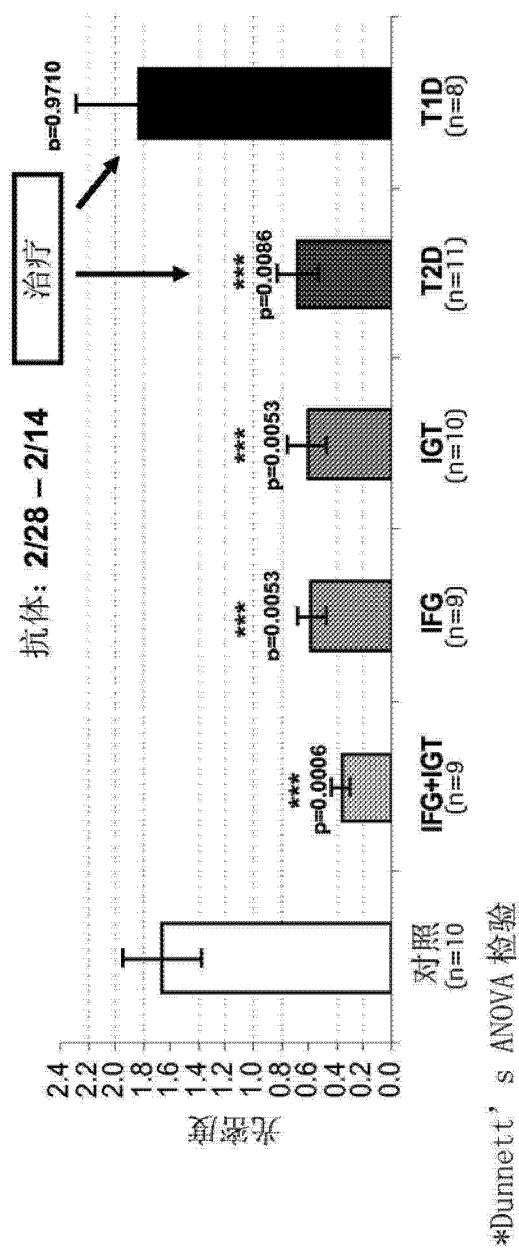


图 3B

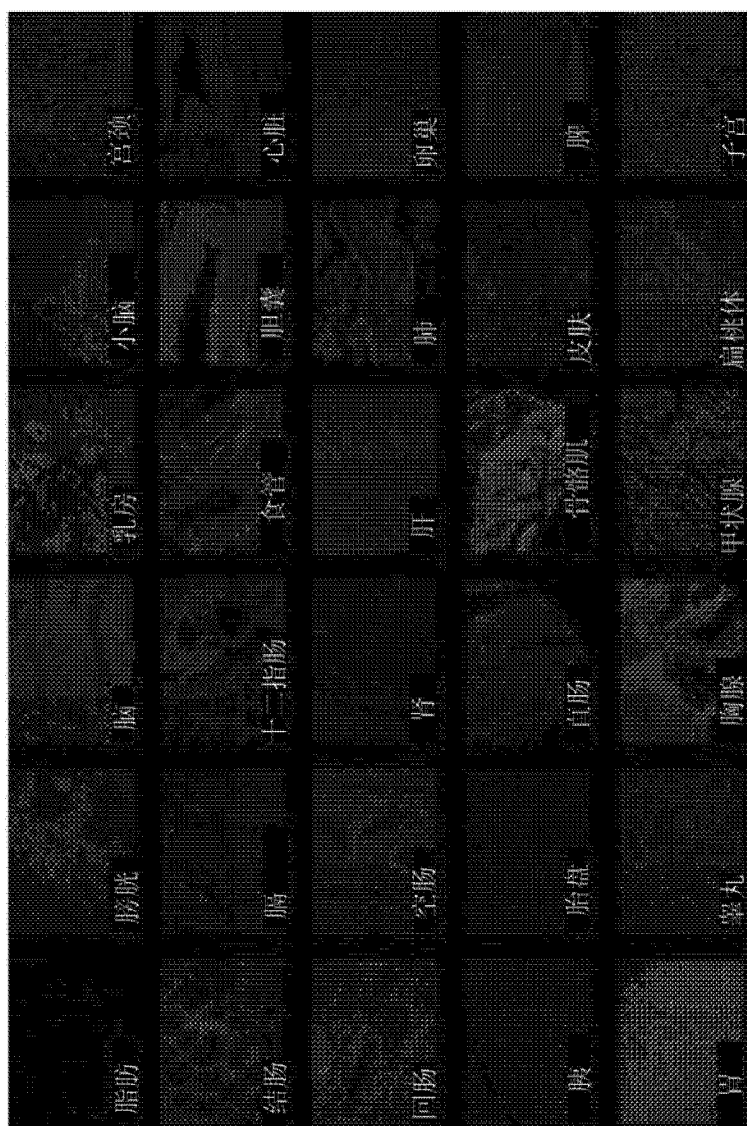


图 4A



图 4B

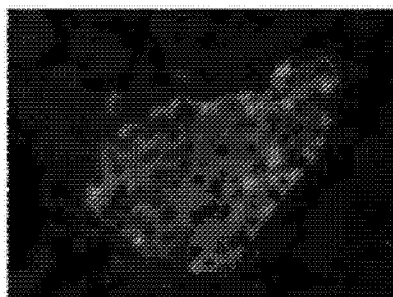


图 4C

专利名称(译)	2型糖尿病的标记蛋白		
公开(公告)号	CN102639563A	公开(公告)日	2012-08-15
申请号	CN201080053131.6	申请日	2010-11-23
申请(专利权)人(译)	霍夫曼-拉罗奇有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	霍夫曼-拉罗奇有限公司		
[标]发明人	劳拉拜迪 马丁埃贝林 胡格斯马蒂勒 克里斯蒂亚诺米廖里尼 雅各布萨瓦斯特贝利韦尔 托马斯施奈德 埃莱娜谢伯科娃 王海燕		
发明人	劳拉·拜迪 马丁·埃贝林 胡格斯·马蒂勒 克里斯蒂亚诺·米廖里尼 雅各布·萨瓦斯特贝利韦尔 托马斯·施奈德 埃莱娜·谢伯科娃 王海燕		
IPC分类号	C07K16/18 G01N33/53		
CPC分类号	C07K16/18 G01N2500/00 G01N2800/042		
代理人(译)	吴小明 王旭		
优先权	2009177238 2009-11-26 EP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供用于早期检测II型糖尿病的标记蛋白，针对所述标记蛋白的抗体，和它们在用于II型糖尿病的诊断方法和药物开发中的应用。

33	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
34															
35															
36															
37															
38															
39															
40															
41															
42															
43															
44															
45															
46															
47															
48															
49															
50															
51															
52															
53															
54															
55															
56															
57															
58															
59															
60															
61															
62															
63															
64															
65															
66															
67															
68															
69															
70															
71															
72															
73															
74															
75															
76															
77															
78															
79															
80															
81															
82															
83															
84															
85															
86															
87															
88															
89															
90															
91															
92															
93															
94															
95															
96															
97															
98															
99															
100															
101															
102															
103															
104															
105															
106															
107															
108															
109															
110															
111															
112															
113															
114															
115															
116															
117															
118															
119															
120															
121															
122															
123															
124															
125															
126															
127															
128															
129															
130															
131															
132															
133															
134															
135															
136															
137															
138															
139															
140															
141															
142															
143															
144															
145															
146															
147															
148															
149															
150															
151															
152															
153															
154															
155															
156															
157															
158															
159															
160															
161															
162															
163															
164															
165															
166															
167															
168															
169															
170															
171															
172															
173															
174															
175															
176															
177															
178															
179															
180															
181															
182															
183															
184															
185															
186															
187															
188															
189															
190															
191															
192															
193															
194															
195															
196															
197															
198															
199															
200															
201															
202															
203															
204															
205															
206															
207															
208															
209															
210															
211															
212															
213															
214															
215															
216															
217															
218															
219															
220															
221															
222															
223															
224															
225															
226															
227															
228															
229															
230															
231															
232															
233															
234															
235															
236															
237															
238															
239															
240															
241															
242															
243															
244															
245															
246															
247															
248															
249															
250															
251															
252															
253															
254															
255															
256															
257															
258															
259															
260															
261															
262															
263															
264															
265															
266															
267															
268															
269															
270															
271															
272															
273															
274															
275															
276															
277															
278															
279															
280															
281															
282															
283															
284															
285															
286															
287															
288															
289															
290															
291															
292															
293															
294															
295															
296															
297															
298															
299															
300															
301															
302															
303															
304															
305															
306															
307															
308															
309															
310															
311															
312															
313															
314															
315															
316															
317															
318															
319															
320															
321															
322															
323															
324															
325															
326															
327															
328															
329															
330															
331															
332															
333															
334															
335															
336															
337															
338															
339															
340															
341															
342															
343															
344															
345															
346															
347															
348															
349															
350															
351															
352															
353															
354															
355															
356															
357															
358															
359															
360															
361															
362															
363															
364															
365															
366															
367															
368															
369															
370															
371															
372															
373															
374															
375															
376															
377															
378															
379															
380															
381															
382															
383															
384															
385															
386															
387															
388															
389															
390															
391															
392															
393															
394															
395															
396															
397															
398															
399															
400															
401															
402															
403															
404															
405															
406															
407															
408															
409															
410															
411															
412															
413															
414															
415															
416															
417															
418															
419															
420															
421															
422															
423															
424															
425															
426															
427															
428															
429															
430															
431															
432															
433															
434															
435															
436															
437															
438															
439															
440															
441															
442															
443															
444															
445															
446															
447															
448															
449															
450															
451															
452															
453															
454															
455															
456															
457															
458															
459															
460															
461															
462															
463															
464															
465															
466															
467															
468															
469															
470															
471															
472															
473															
474															
475															
476															
477															
478															
479															
480															
481															
482															
483															
484															
485															
486															
487															
488															
489															
490															
491															
492															
493															
494															
495															
496															
497															
498															
499															
500															
501															
502															
503															
504															
505															
506															
507															
508															
509															
510															
511															
512															
513															
514															
515															
516															
517															
518															
519															
520															
521															
522															
523															
524															
525															
526															
527															
528															
529															
530															
531															
532															
533															
534															
535															
536															
537															
538															
539															
540															
541															
542															
543															
544															
545															
546															
547															
548															
549															
550															
551															
552															
553															
554															
555															
556															
557															
558															
559															
560															
561															
562															
563															
564															
565															
566															
567															
568															
569															
570															
571															
572															
573															
574															
575															
576															
577															
578															
579															
580															
581															
582															
583															
584															
585															
586															
587															
588															
589															
590															
591															
592															
593															
594															
595															
596															
597															
598															
599															
600															
601															
602															
603															
604															
605															
606															
607															
608															
609															
610															
611															
612															
613															
614															
615															
616															
617															
618															
619															
620															
621															
622															
623															
624															
625															
626															
627															
628															
629															
630															
631															
632															
633															
634															
635															
636															
637															
638															
639															
640															
641															
642															
643															
644															
645															
646															
647															
648															
649															
650															
651															
652															
653															
654															
655															
656															
657															
658															
659															
660															
661															
662															
663															
664															
665															
666															
667															
668															
669															
670															
671															
672															
673															
674															
675															
676															
677															
678															
679															
680															
681															
682															
683															
684															
685															
686															
687															
688															
689															
690															
691															
692															
693															
694															
695															
696															
697															
698															
699															
700															
701															
702															
703															
704															
705															
706															
707															
708															
709															
710															
711															
712															
713															
714															
715															
716															
717															
718															
719															
720															
721															
722															
723															
724															
725															
726															
727															
728															
729															
730															
731															
732															
733															
734															
735															
736															
737															
738															
739															
740															
741															
742															
743															
744															
745															
746															
747															
748															
749															
750															
751															
752															
753															
754															
755															
756															
757															
758															
759															
760															
761															
762															
763															
764															
765															
766															
767															
768															
769															
770															
771															
772															
773															
774															
775															
776															
777															
778															
779															
780															
781															
782															
783															
784															
785															
786															
787															
788															
789															
790															
791															
792															
793															
794															
795															
796															
797															
798															
799															
800															
801															
802															
803															
804															