



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103403550 B

(45) 授权公告日 2015. 08. 19

(21) 申请号 201180056079. 4

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

(22) 申请日 2011. 09. 30

代理人 林毅斌 梁谋

(30) 优先权数据

61/388158 2010. 09. 30 US

61/503950 2011. 07. 01 US

(51) Int. Cl.

G01N 33/543(2006. 01)

G01N 33/574(2006. 01)

C07K 16/00(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013. 05. 22

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2011/067092 2011. 09. 30

(56) 对比文件

WO 2005/047542 A1, 2005. 05. 26, 全文.

WO 2007/002811 A2, 2007. 01. 04, 全文.

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/042009 EN 2012. 04. 05

审查员 王在竹

(83) 生物保藏信息

DSM ACC3091 2010. 09. 08

(73) 专利权人 德国癌症研究中心

地址 德国海德堡

专利权人 海德堡吕布莱希特-卡尔斯大学

(72) 发明人 H. 岑特格拉夫 A. 冯戴姆林

D. 卡佩尔

权利要求书1页 说明书10页

序列表1页 附图3页

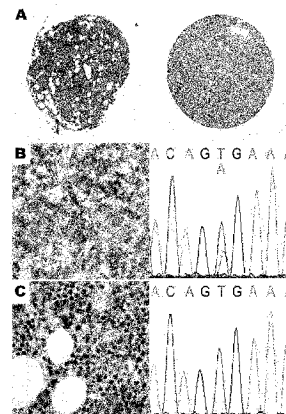
(54) 发明名称

使用与 BRAF V600E 特异性结合的抗体诊断癌症的工具和方法

(57) 摘要

本发明涉及诊断检验和诊断工具的领域。具体地,考虑的是用于在怀疑罹患癌症的受试者的样本中诊断癌症的方法,该方法包括使所述样本和与 BRAF 多肽上的由 SEQ ID NO. 1 所表征的表位特异性结合的抗体在允许所述抗体和所述表位结合的条件下相接触,并确定所述抗体与所述表位的结合,由此诊断癌症。还考虑的是与 BRAF 多肽上的由 SEQ ID NO. 1 所表征的表位特异性结合的抗体和包含这种抗体的装置或试剂盒。

CN 103403550 B



1. 与 BRAF 多肽上的由 SEQ ID NO 1 所表征的表位特异性结合的抗体在制备用于在怀疑罹患癌症的受试者的样本中诊断癌症的试剂盒中的用途,所述诊断癌症包括:

a) 将所述样本和与 BRAF 多肽上的由 SEQ ID NO 1 所表征的表位特异性结合的抗体在允许所述抗体与所述表位结合的条件下相接触;和

b) 确定所述抗体与所述表位的结合,由此诊断癌症。

2. 权利要求 1 的用途,其中所述抗体为单克隆抗体。

3. 权利要求 1 的用途,其中所述抗体为以保藏号 DSM ACC3091 保藏的抗体。

4. 权利要求 1 的用途,其中所述诊断癌症包括确定是否存在癌细胞。

5. 权利要求 4 的用途,其中所述癌细胞在组织样本中。

6. 权利要求 5 的用途,其中所述组织样本为组织切片样本。

7. 权利要求 1 的用途,其中所述诊断癌症还包括基于步骤 b) 中得到的诊断来建议或不建议抗癌疗法的步骤。

8. 权利要求 7 的用途,其中所述抗癌疗法选自:抗 BRAF 反义 RNA、抗 BRAF siRNA 或抗 BRAF 微小 RNA 药物,抗 BRAF 抗体,索拉非尼,RAF-265,PLX-4032,西妥昔单抗和 GDC-0879。

9. 与 BRAF 多肽中的由 SEQ ID NO: 1 所表征的表位特异性结合的抗体。

10. 权利要求 9 的抗体,其中所述抗体为单克隆抗体。

11. 以保藏号 DSM ACC 3091 保藏的抗体。

12. 用于诊断癌症的装置,所述装置包括

a) 包含权利要求 9-11 中任一项的抗体的分析单元,其中所述分析单元使得能够在施用至该分析单元的样本中,确定所述抗体与 BRAF 多肽中的由 SEQ ID NO: 1 所表征的表位的特异性结合;和

b) 评估单元,所述评估单元包括用于评价由所述分析单元确定的结合的实施准则和用于确诊的实施准则。

13. 权利要求 12 的装置,其中所述样本为组织样本。

14. 权利要求 13 的装置,其中所述组织样本为组织切片样本。

15. 用于诊断癌症的试剂盒,所述试剂盒包含权利要求 9-11 中任一项的抗体。

16. 权利要求 9-11 任一项的抗体在生产用于诊断癌症的诊断工具中的用途。

17. 包含权利要求 9-11 任一项的抗体的诊断工具。

## 使用与 BRAF V600E 特异性结合的抗体诊断癌症的工具和方法

[0001] 本发明涉及诊断检验和诊断工具的领域。具体地,考虑的是用于在怀疑罹患癌症的受试者的样本中诊断癌症的方法,该方法包括使所述样本和与 BRAF 多肽上的由 SEQ ID NO 1 所表征的表位特异性结合的抗体在允许所述抗体和所述表位结合的条件下相接触,并确定所述抗体与所述表位的结合,由此诊断癌症。还考虑的是与 BRAF 多肽上的由 SEQ ID NO 1 所表征的表位特异性结合的抗体和包含这种抗体的装置或试剂盒。

### [0002] 背景

[0003] 在美国,癌症是继心血管疾病之后的第二大致死原因。三个美国人中就有一人在他或她一生中发展为癌症,并且每四个美国人中就有一人死于癌症。尽管在传统的治疗方法——切除、放射和化疗上具有深刻的经验,但大多数人类恶性肿瘤仍遵循致命的临床过程。一种新开发的肿瘤疗法为所谓的靶疗法。该方法依赖于引发或促进个体患者肿瘤特征性分子改变的肿瘤治疗。对所述改变的认识可能决定对优选类型的延长生命疗法乃至治愈性疗法的选择。

[0004] 已在多个肿瘤系列中描述了在 V-RAF 鼠类肉瘤病毒致癌基因同源物 B1 (BRAF) 中的突变,所述肿瘤系列包括黑色素瘤(Davies 等 2002 Nature 417: 949-54)、乳头状甲状腺癌(Basolo 等 2001 J Clin Endocrinol Metab 印刷前电子出版)、结肠癌(French 等 2008 Clin Cancer Res 14: 3408-15)、卵巢癌(Davies 等 2002 Nature 417: 949-54)及其他癌症。BRAF 是与细胞增殖有关的 RAS/RAF/MEK/ERK- 信号转导途径的一部分。该途径的激活导致促进恶变。

[0005] 用于癌症治疗的靶疗法的分子靶标之一为在人 BRAF 基因的第 600 位密码子上缬氨酸换成谷氨酸(V600E)。大约 8% 的所有人类肿瘤携带这种特定的突变。BRAF 上的 V600E 突变造成了蛋白质结构性活化。这在黑色素瘤和甲状腺瘤中尤其常见。临床前分析显示了 RAF 抑制物在具有 BRAF V600E 突变的肿瘤中的选择性活性,其不影响正常细胞的 ERK 信号传导(Poulikakos 2010, Nature 464: 427-30)。用特定抑制物靶向该 V600E 突变的疗法目前处于临床试验中(Chapman 2009, European Journal of Cancer Supplements 7: 5)。

[0006] 目前对 BRAF V600E 突变的诊断分析的黄金标准是 DNA 测序。然而该方法有某些局限性:用于 DNA 提取的组织中肿瘤细胞的百分数需要相当的高。太多含非肿瘤细胞的杂质将导致假阴性测序结果。DNA 分析程序是费时的,因为首先,病理学家必须初选出用于 DNA 提取的合适材料,需要进行 DNA 提取,然后才能进行 DNA 测序。本发明可在大面积的非突变正常组织中鉴定出具有 BRAF 突变的很小的肿瘤岛(tumor islet)。使用常规病理实验室中提供的设备,本发明的 BRAF V600E 突变的分析可在几个小时内完成。

### [0007] 发明概述

[0008] 因此,本发明涉及用于在怀疑罹患癌症的受试者的样本中诊断癌症的方法,所述方法包括:

[0009] a) 使所述样本和与 BRAF 多肽上的由 SEQ ID NO 1 所表征的表位特异性结合的抗体在允许所述抗体与所述表位结合的条件下相接触;和

- [0010] b) 确定所述抗体与所述表位的结合,由此诊断癌症。
- [0011] 在本发明方法的一个优选实施方案中,所述抗体为单克隆抗体。
- [0012] 在本发明方法的另一个优选实施方案中,所述抗体为以保藏号 DSM ACC3091 保藏的抗体。
- [0013] 在本发明方法的一个优选实施方案中,所述诊断癌症包括确定是否存在癌细胞。
- [0014] 在前述本发明方法的一个优选实施方案中,所述癌细胞在组织样本中。
- [0015] 在前述本发明方法的一个优选实施方案中,所述组织样本为组织切片样本。
- [0016] 在本发明方法的一个优选实施方案中,所述方法还包括基于步骤 b) 中获得的诊断来建议抗癌疗法的步骤。
- [0017] 在前述本发明方法的一个优选实施方案中,所述抗癌疗法选自:抗 BRAF 反义 RNA、抗 BRAF siRNA 或抗 BRAF 微小 RNA 药物,抗 BRAF 抗体,索拉非尼(sorafenib),西妥昔单抗(cetuximab),RAF-265,PLX-4032 和 GDC-0879。
- [0018] 本发明还涉及与 BRAF 多肽上的由 SEQ ID NO: 1 所表征的表位特异性结合的抗体。
- [0019] 在本发明抗体的一个优选实施方案中,所述抗体为单克隆抗体。
- [0020] 本发明还涉及由“Deutsches Krebsforschungszentrum”, Heidelberg, GERMANY 根据布达佩斯条约在 2010 年 9 月 8 日以保藏号 DSM ACC 3091 保藏于“DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH”, 38124 Braunschweig, GERMANY 中的抗体。
- [0021] 本发明涉及用于诊断癌症的装置,所述装置包括
- [0022] a) 包含本发明抗体的分析单元,其中所述分析单元使得能够在施用至该分析单元的样本中,确定所述抗体与 BRAF 多肽中的由 SEQ ID NO: 1 所表征的表位的特异性结合;和
- [0023] b) 评估单元,所述评估单元包括用于评价由所述分析单元确定的结合的实施准则和用于确诊的实施准则。
- [0024] 在本发明的装置的一个优选实施方案中,所述样本为组织样本。
- [0025] 在本发明的前述装置的一个优选实施方案中,所述组织样本为组织切片样本。
- [0026] 本发明还涉及用于诊断癌症的试剂盒,所述试剂盒包含本发明抗体。

#### 附图说明

[0027] 图 1 显示了用连有 KLH 的免疫原肽免疫接种得到的不同单克隆抗体的蛋白质印迹分析,所述免疫原肽具有如附随的实施例中所述的 SEQ ID NO: 1。大部分产生的杂交瘤克隆除了显示与既定的 95 kDa V600E BRAF 条带结合外,还显示了非特异性结合,例如克隆 53、62 和 449。克隆 263 显示了与 95 kDa V600E BRAF 条带的特异性结合。通过该杂交瘤克隆产生的抗体在组织切片中进一步测试。该杂交瘤克隆自身由“Deutsches Krebsforschungszentrum”, Heidelberg, GERMANY 根据布达佩斯条约在 2010 年 9 月 8 日以保藏号 DSM ACC 3091 保藏于“DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH”, 38124 Braunschweig, GERMANY 中。

[0028] 图 2 显示了 V600E BRAF 阳性肿瘤(福尔马林固定和石蜡包埋的黑色素瘤)的组织切片和来自通过基因组序列分析确定的具有野生型 BRAF 的黑色素瘤的对照的免疫染色。

在所有测试的克隆中,只有用杂交瘤克隆 263 产生的抗体才观察到免疫染色。

[0029] 图 3 显示了图 2 所示的已用杂交瘤克隆 263 的抗体免疫染色的组织切片的区域放大。图片显示抗体使肿瘤细胞的细胞质染色,并因此显示出 V600E BRAF 多肽的亚细胞定位。

[0030] 图 4 显示了通过免疫组织化学和直接测序进行的 BRAF-V600E 检测;用 VE1 染色的 HCL (左)和脾边缘区淋巴瘤(右)的典型 TMA 核心(A)。用 VE1 免疫染色的荷载不同肿瘤(例 B - 100%,例 C - 10%)的骨髓活组织检查的典型切片(400 倍原始放大)(左栏),和含有 BRAF 第 600 位密码子的相对应的 DNA 序列。在例 C 中通过 VE1 免疫组织化学可检测到最小的浸润,而 DNA 测序不能检测到突变。显微图用配备 DP50-CCD 照相机的 Olympus BX-51 光学显微镜拍摄并用 Cell-A 软件处理(全部来自 Olympus, Hamburg, Germany)。

#### [0031] 发明详述

[0032] 本发明涉及用于在怀疑罹患癌症的受试者的样本中诊断癌症的方法,所述方法包括:

[0033] a)使所述样本和与 B-Raf 多肽上的由 SEQ ID NO 1 所表征的表位特异性结合的抗体在允许所述抗体与所述表位结合的条件下相接触;和

[0034] b) 确定所述抗体与所述表位的结合,由此诊断癌症。

[0035] 本文所用术语“诊断”意指评估受试者是否罹患癌症。如本领域技术人员所理解,这种评估通常不意指对所有被鉴定的受试者(即 100%)都是无误的。然而,该术语要求可鉴定出统计学显著的部分受试者(例如群体研究中的一组)。使用各种熟知的统计学评价方法,例如,置信区间确定、p-值确定、学生 t 检验、Mann-Whitney 检验等,本领域技术人员可轻易确定一部分是否统计学显著。可在 Dowdy 和 Wearden, Statistics for Research, John Wiley & Sons, New York 1983 中找到详细资料。优选的置信区间为至少 90%、至少 95%、至少 97%、至少 98% 或至少 99%。p-值优选为 0.1、0.05、0.01、0.005 或 0.0001。更优选至少 60%、至少 70%、至少 80% 或至少 90% 的群体受试者可通过本发明方法正确地鉴定。本发明诊断包括相关癌症的监测、确认和细分类的方法的应用。

[0036] 此外,诊断还包括为受试者建立预后。依照本发明方法确诊为罹患癌症的受试者会有表达 BRAF V600E 多肽的癌细胞。BRAF V600E 的存在是受试者中可能有不幸结果的先兆指示。因此,本发明方法还可应用于风险分级方法(risk stratification approach),并且由此用于确定罹患癌症的个体受试者所需的重症监护和住院治疗的量。

[0037] 本文所用术语“癌症”指任何恶性肿瘤。恶性肿瘤指由生物体中受损细胞的不期望生长、入侵和某些条件下的转移产生的疾病。产生癌症的细胞在遗传学上是受损的,并通常失去了控制细胞分裂、细胞迁移行为、分化状态和/或细胞死亡机制的能力。大多数癌症形成肿瘤,但某些造血癌症,例如白血病,并非如此。依照本发明的癌症包括表达按本文别处所说明的 BRAF V600E 突变多肽的癌细胞。优选的癌症类型选自:黑色素瘤、乳头状甲状腺癌、结肠癌、卵巢癌和乳腺癌。由于其肿瘤体中 50% 或更高的非常高的 BRAF V600E 突变比率,癌症更优选为黑色素瘤或乳头状甲状腺癌。依照本发明的癌症还优选为造血癌症,优选白血病包括成熟 B-细胞瘤形成。所述癌症更优选为多毛细胞性白血病。不同癌症的症状和分期体系为本领域所熟知,并描述于病理学的标准教科书中。本文所用癌症包括任何阶段、等级、形态学特征、侵入性、侵占性或恶性的癌症或从而影响的组织或器官。

[0038] 术语“样本”指分离的细胞样本,或指来自组织或器官的样本。可通过例如活组织

检查从任何组织或器官中获得组织或器官样本。可通过分离技术例如离心或细胞分选从体液例如淋巴、血液、血浆、血清和分泌排泄液(liquor)等中或从组织或器官中获得分离的细胞。优选从表达或产生本文所提及的肽的那些细胞、组织或器官中获得细胞、组织或器官样本。可通过本领域技术人员熟知的常规技术从受试者获得样本,例如切开活组织检查包括从受试者抽吸组织或细胞材料。对于通过切开活组织检查不能容易达到的区域,可进行手术,且优选进行微创手术。

[0039] 本文所用术语“受试者”涉及动物,优选为哺乳动物,且更优选为人。本发明方法优选应用于根据临床表现症状怀疑罹患癌症的受试者或由于潜在增加的诱因而怀疑罹患癌症的受试者。

[0040] 术语“抗体”指与 BRAF V600E 多肽特异性结合的所有类型的抗体。本发明抗体与由 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列所表征的表位特异性结合。本发明抗体优选为单克隆抗体、多克隆抗体、单链抗体、嵌合抗体或这些抗体的仍有能力结合 BRAF V660E 多肽特别是 SEQ ID NO: 1 所示的表位的任何片段或衍生物。本文所用术语抗体所包括的这些片段和衍生物包括双特异抗体、合成抗体、Fab 片段、F(ab)<sub>2</sub> Fv 片段或 scFv 片段或任何这些抗体的化学修饰衍生物。本发明优选考虑的化学修饰包括目的在于使抗体与如本说明书别处所说明的可检测标记偶联的那些修饰。用于本发明抗体的情况下的特异性结合是指该抗体不与除了 BRAF V600E 突变多肽之外的其他多肽(包括野生型 BRAF 或 BRAF 突变蛋白)发生交叉反应,或者甚至更优选不与除了 SEQ ID NO: 1 所示的表位之外的任何表位发生交叉反应。可通过各种熟知技术检测特异性结合。优选按附随的实施例所述来检测特异性结合。通常可通过使用例如在 Harlow 和 Lane “Antibodies, A Laboratory Manual”, CSH Press, Cold Spring Harbor, 1988 中所述的方法获得抗体或其片段。

[0041] 可通过包括小鼠骨髓瘤细胞与源自免疫接种的哺乳动物(优选免疫接种的小鼠)的脾细胞融合的技术制备单克隆抗体(Köhler 1975, Nature 256, 495 和 Galfré 1981, Meth. Enzymol. 73, 3)。优选具有 SEQ ID NO: 1 所示表位的免疫原肽应用于哺乳动物。具有 SEQ ID NO: 1 所示序列的肽优选与载体蛋白缀合,例如牛血清白蛋白、甲状腺球蛋白和匙孔血蓝蛋白(KLH)。根据宿主种类,可用各种佐剂以提高免疫反应。这样的佐剂优选包括弗氏佐剂、无机凝胶例如氢氧化铝、和表面活性物质例如溶血卵磷脂、pluronic polyols、聚阴离子、肽、油类乳化剂、匙孔血蓝蛋白和二硝基苯酚。随后可用熟知的杂交瘤技术、人 B 细胞杂交瘤技术和 EBV 杂交瘤技术制备与 BRAF V600E 中具有 SEQ ID NO: 1 序列的表位特异性结合的单克隆抗体。优选通过下面附随的实施例中所述的方法获得本发明抗体。抗体优选为单克隆抗体或如上所述的其衍生物。抗体更优选为由“Deutsches Krebsforschungszentrum”, Heidelberg, GERMANY 根据布达佩斯条约在 2010 年 9 月 8 日以保藏号 DSM ACC 3091 保藏于“DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH”, 38124 Braunschweig, GERMANY 中的抗体。

[0042] 本文所用术语“BRAF 多肽”指由 v-Raf 鼠类肉瘤病毒致癌基因同源物 B1 致癌物所编码的多肽。BRAF 多肽为丝氨酸/苏氨酸激酶,其在与细胞增殖有关的 RAS/RAF/MEK/ERK-信号转导途径中起作用。该途径的激活导致促进恶变。BRAF 致癌基因和 BRAF 多肽的结构为本领域所熟知。BRAF 多肽优选指如 Sithanandam 1990, Oncogene 5 (12): 1775 - 80

所公开的人 BRAF 多肽和所述特定的 BRAF 多肽的变体,包括等位基因变体、直向同源物和同源物。人 BRAF 在其他生物体,例如啮齿动物中的直向同源物也为本领域所熟知。本发明方法所涉及的 BRAF 多肽包含如 SEQ ID NO: 1 所示的表位,因此在第 600 位氨基酸或与其相对应的氨基酸位置上有缬氨酸(V)到谷氨酸(E)的氨基酸替换。

[0043] 本文提及的使样本接触是指,使抗体与样本进行物理接触,因此如果所述样本包含 BRAF V600E 多肽的话,抗体与所述多肽上如 SEQ ID NO: 1 所示的表位特异性结合。可以理解的是,在足够使抗体与 BRAF V600E 多肽特异性结合的时间内和条件下进行本文所指的接触。根据样本的性质,可能需要预处理步骤来释放出 BRAF V600E 或使 BRAF V600E 多肽中的表位解掩蔽,以使抗体可接近并能与其特异性结合。此外,根据样本的种类,处理可能不同。例如,用于分析是否存在 BRAF V600E 多肽的组织样本优选进行匀浆处理,并且例如通过 SDS PAGE 或其他蛋白分离方法分离或分开组织中含有的蛋白质。用上文所定义的抗体,通过免疫学方法例如蛋白印迹分析所分离的蛋白质中是否存在 BRAF V600E 多肽。这些方法还包括孵育步骤,该步骤可使抗体与 BRAF V600E 多肽特异性结合。为增加特异性,进行洗涤步骤。如何进行这些措施为本领域技术人员所熟知。如果使用组织切片作为样本(即组织切片样本),可理解的是,设想不仅仅分析是否存在 BRAF V600E 多肽,还分析其细胞或亚细胞定位。因此,组织应保持完整并可在抗体结合之前或之后通过组织化学染色技术进行染色。用于组织切片免疫染色的合适技术为本领域技术人员所熟知。根据组织切片样本是否已被包埋在包埋介质(例如石蜡)中,可能需要去除所述的包埋介质。相关的技术也为本领域所熟知。

[0044] 本文所用的确定抗体结合是指与样本所包含的 BRAF V600E 多肽(若有的话)特异性结合的抗体的检测。用于检测与抗原特异性结合的抗体的方法也为本领域所熟知。应用于本发明方法中的抗体可优选自身与可检测标记物偶联,例如放射性同位素(例如碘化镉放射性同位素)、荧光或化学发光剂(例如 FITC、罗丹明)、通过转化底物能产生可检测信号的酶(例如辣根过氧化物酶、萤火虫荧光素酶或  $\beta$  半乳糖苷酶)、荧光蛋白(例如绿色、蓝色或红色荧光蛋白)。合适的可检测标记物为本领域所熟知。应用于本发明方法的抗体还优选可与能吸引检测剂的试剂偶联。这样的试剂可以是生物素。在这种情况下,可使用偶联抗生物素蛋白或链霉抗生物素蛋白的检测剂,其在与被结合的抗体的生物素结合时将用作可检测标记物。在这种情况下,合适的可检测标记物为上文提及的那些标记物,更优选使用酶作为这种情况下的可检测标记物。此外,可用第二抗体来检测第一抗体,即与样本的 BRAF V600E 多肽结合的应用于本发明方法的抗体。这种第二抗体可与如上所述的可检测标记物偶联。因此,在后面的情况下,第二抗体与第一抗体结合后将产生可检测信号,从而能检测到被结合的第一抗体。与第二抗体结合的抗体的检测原理为本领域所熟知,并常规应用于例如确定组织切片上的抗体结合。根据可检测标记物的类型,通过使用阅读器系统,可应用不同的方法检测可检测标记物所产生的信号。这些系统包括自动化信号阅读装置,例如 ELISA 或 RIA 阅读器,还包括用于可检测信号的人工检测或自动化检测的显微装置。此外,阅读器系统可确定样本的附加信息,例如显微系统可以可视化地显示组织切片的细胞或者自动化信号阅读器还可确定样本中含有的另外的生物标记物。

[0045] 概括地讲,预料不到地发现依照本发明方法所述的抗体可用于在怀疑罹患所述癌症的受试者的样本中诊断如本文所说的癌症。本发明方法能够对受试者体内的 BRAF 状态

进行快速、简易且可靠的分析,由此可用于诊断癌症。可更快地获得诊断结果,所述结果作为临床医生或病理学家决定可能的疗法、预后和临床健康管理管理和 / 或恰当的癌症分类的重要基础,并且可靠性提高,因为与基因测序分析相比较,还能检测到在其他不显著的组织中的个体肿瘤细胞,甚至在癌症样本的品质较低的情况下。

[0046] 在本发明方法的优选实施方案中,所述诊断癌症包括确定是否存在癌细胞。所述癌细胞优选在组织样本内,所述组织样本更优选是组织切片样本。

[0047] 可优选通过确定样本中存在癌细胞来诊断癌症。如果在样本中鉴定出癌细胞,则受试者确实罹患癌症的怀疑可被证实。同样地,样本中不存在癌细胞优选指示为未患有癌症的受试者的样本。在后一种情况的样本优选为代表怀疑其中罹患癌症的受试者中癌症的样本。例如,样本从看似受癌症影响的并且作为怀疑患者罹患癌症的依据的那些组织中取得。可理解为,在本发明的这一方面,样本不应从已知未受影响或未怀疑受癌症影响的组织取得,因为这样的样本可造成假阴性的诊断结果。

[0048] 具体而言,当组织样本且优选组织切片样本用于本发明方法时,诊断还包括个体癌细胞的鉴定。因此,本发明方法可应用于组织或组织切片中的癌细胞成像,以确定癌症的程度和 / 或癌症的同质性。受影响组织中的癌症程度的确定对基于药物的疗法以及特别是手术是至关重要的,在手术的情况中需要通过活组织检查来确认癌症的所有部分确实从受影响的组织或器官中被去除。在某些方面,可能有不能通过本发明方法鉴定的癌细胞,但例如由于其形态学又显然是癌细胞。既包括通过本发明方法鉴定出的癌细胞又包括不能通过本发明方法鉴定出的癌细胞的癌症可采用联合药物而非单一药物处理。

[0049] 在本发明方法的优选实施方案中,所述方法还包括基于步骤 b) 中获得的诊断来建议抗癌疗法的步骤。

[0050] 本文所用术语“建议”是指为受试者提出抗癌疗法的建议或为受试者排除某种抗癌疗法(即不建议)。这样的建议将任选与其他信息(例如来自组织病理学调查的信息)一起用作临床医生对个体受试者施用或不施用某种抗癌疗法的依据。基于本发明方法步骤 b) 中确定的诊断,即“癌症”或“非癌症”的诊断,对抗癌疗法提出建议。可理解的是,只有在通过本发明方法确诊“癌症”的情况下,才建议抗癌疗法。在基于本发明方法确诊“非癌症”的情况下,建议可以是终止抗癌疗法。如上文所述,样本来源的受试者的其它信息也可用于改进建议。一方面,如果本发明方法鉴定出癌细胞但在所调查的癌症中通过例如组织病理学分析检测出本发明方法没有鉴定出的其它癌细胞,可建议联合抗癌疗法,例如联用不同的抗肿瘤药物。

[0051] 本文所用术语“抗癌疗法”包括基于手术的疗法、基于放射的疗法、基于药物的疗法或其联合疗法。所述基于药物的抗癌疗法优选为影响 B-Raf 多肽的疗法,且更优选为影响具有如 SEQ ID NO: 1 所示的表位的 B-Raf 多肽的疗法。合适的药物可干扰 B-Raf 多肽的蛋白质活性或者干扰 B-Raf 致癌基因或其转录物的转录或翻译。所述抗癌药物优选选自:抗 Raf 反义 RNA、抗 Raf siRNA 或抗 Raf 微小 RNA 药物,抗 -Raf 抗体,和小分子。特别优选的药物为索拉非尼(sorafenib)、RAF-265、PLX-4032 或 GDC-0879。

[0052] 此外,依照本发明方法的建议在某些情况下还包括对某种疗法的否定建议。例如,如果药物的治疗靶在 BRAF V600E(其具有结构性活性,因此不依赖于上游的信号活化)的信号转导级联的上游起作用,则可合理推定目标是抑制该上游治疗靶的药物不是对 BRAF



V600E 阳性癌症的单独疗法的适用基础。已报道 EGF 受体(EGFR) 作为 BRAF 的上游活化剂。此外, EGFR 抑制物被用于癌症治疗。特别有意义的是抗 EGFR 抗体, 例如西妥昔单抗(cetuximab)。设想在本发明方法的优选实施方案中, 建议还指排除对通过本发明方法确诊为患有癌症的受试者(即, 在癌细胞中表达 BRAF V600E 多肽的受试者)的某种疗法。这种疗法优选为是在激活 BRAF 多肽的信号转导途径中抑制上游组分活性的疗法。更优选的是, 这种组分为 EGFR, 且合适的药物为抗-EGFR 抗体, 例如西妥昔单抗。

[0053] 本发明还涉及与 BRAF 多肽中的由 SEQ ID NO: 1 所表征的表位特异性结合的抗体。

[0054] 所述抗体更优选为如本文别处更详细定义的单克隆抗体。

[0055] 本发明还涉及由“Deutsches Krebsforschungszentrum”, Heidelberg, GERMANY 根据布达佩斯条约在 2010 年 9 月 8 日以保藏号 DSM ACC 3091 保藏于“DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH”, 38124 Braunschweig, GERMANY 中的抗体。

[0056] 本发明抗体可用于免疫化学试验, 例如蛋白印迹、ELISAs、放射免疫试验、免疫组织化学试验、免疫沉淀或本领域已知的其他免疫化学试验。具体而言, 抗体用于实施如上所述的本发明方法。

[0057] 本发明还涉及用于诊断癌症的装置, 所述装置包括

[0058] a) 包含上文所述的本发明抗体的分析单元, 其中所述分析单元使得能够在施用至该分析单元的样本中, 确定所述抗体与 BRAF 多肽中的由 SEQ ID NO: 1 所表征的表位的特异性结合; 和

[0059] b) 评估单元, 所述评估单元包括用于评价由所述分析单元确定的结合的实施准则和用于确诊的实施准则。

[0060] 本文所用术语“装置”涉及至少包含彼此可操作连接的前述分析单元和评价单元的系统。如何以可操作的方式连接装置各单元依赖于包含于装置中的单元的类型。例如, 当应用用于样本的自动化分析的单元时, 为了通过评价单元获得期望的结果, 可通过例如计算机程序处理从所述自动化操作的分析单元获得的数据。在这种情况下, 各单元优选包含于单一装置中。分析单元可包含固体支持物上固定形式的抗体。这种分析单元对于液体样本特别有用。用本发明的装置调查的样本优选为组织样本, 且更优选为组织切片样本。因此, 另一方面, 抗体可包含于检测溶液中, 该检测溶液将被分析单元施加到例如组织切片的组织样本中。检测溶液可贮藏在分析单元或单独的小瓶中, 甚至在装置的外部。评价单元, 优选为计算机或数据处理设备, 包括用于评价由分析单元确定的结合的实施准则, 即运算法则, 由此根据信号类型、信号强度和关于组织的信号位置(在组织样本的情况下), 评价结合为显著或非显著结合。对于评价为非显著结合的样本, 则确诊为“非癌症”。如果得到的评价结果为显著结合, 则确诊为癌症。

[0061] 最后, 本发明涉及用于诊断癌症的试剂盒, 所述试剂盒包含上述的本发明抗体。

[0062] 本文所用术语“试剂盒”是指以现成方式提供的前述抗体和说明书的集合, 该集合用于在样本中诊断癌症。抗体和说明书优选在单一容器中提供。试剂盒还优选包含为进行诊断所必需的其他组分。这些组分可以是抗体结合的检测所需要的辅助试剂、用于预处理待分析样本的试剂或校准标准。

[0063] 本说明书引用的所有参考文献通过引用以其全部公开内容及本说明书中特别提及的公开内容结合于本文中。

## 实施例

[0064] 以下实施例仅用于阐明本发明。无论如何,不应解释为限制本发明的范围。

[0065] 实施例 1:特异性靶向 BRAF V600E 突变多肽的抗体的产生

[0066] 与 BRAF 的第 596 位到第 606 位氨基酸序列相匹配并包含 V → E 替换的合成肽 GLATEKSRWSG (SEQ ID NO: 1) 通过商业化制备。用 Husar 软件包 (DKFZ, Heidelberg, Germany) 选择合适的序列区域。该肽与 KLH (匙孔血蓝蛋白) 缀合以形成免疫原肽。使用六周龄雌性 C57 黑鼠 (black sex mice) (Charles River, Sulzfeld, Germany)。依照下列时间表,始终注射 100 μL 体积到小鼠的后肢中:

[0067] 第 1 天:将溶解于 PBS 的 20 μg 免疫原肽按 1:1 的比例与完全弗氏佐剂一起注射入小鼠。

[0068] 第 5 天:将溶解于 PBS 的 20 μg 免疫原肽按 1:1 的比例与不完全弗氏佐剂一起注射入小鼠。

[0069] 第 11 天:将溶解于 PBS 的 20 μg 免疫原肽注射入小鼠。

[0070] 第 18 天:将溶解于 PBS 的 20 μg 免疫原肽注射入小鼠。

[0071] 在第 19 天,从小鼠中抽取血液,分离得到血清,对含有 BRAF V600E 的肿瘤蛋白或 BRAF 野生型蛋白进行蛋白印迹测试。在第 46 天,将溶解于 PBS 的 20 μg 免疫原肽注射入小鼠。在第 47 天,从小鼠中提取血液,分离得到血清,对含有 BRAF V600E 或 BRAF 野生型蛋白的肿瘤蛋白进行蛋白印迹测试。第 48 天,处死小鼠。取出腿弯部淋巴结,分离细胞并与 SP2/0 系瘤细胞融合以产生杂交瘤细胞。最后,培养杂交瘤细胞,挑选并分离出单细胞以产生纯的克隆。通过蛋白印迹分析克隆的上清液来检测产生 BRAF V600E 特异性抗体的克隆。

[0072] 用来自表达突变型 (V600E) 和野生型 (wt) BRAF 的细胞系的蛋白提取物进行的蛋白印迹分析证实了杂交瘤克隆 53、62、449 和 263 与 BRAF V600E 相结合。因此,这些抗体对通过蛋白印迹检测 BRAF V600E 突变非常有用。根据布达佩斯条约,克隆 263 由“Deutsches Krebsforschungszentrum”, Heidelberg, GERMANY 根据布达佩斯条约在 2010 年 9 月 8 日以保藏号 DSM ACC 3091 保藏于“DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH”, 38124 Braunschweig, GERMANY 中。

[0073] 实施例 2:克隆 263 的抗体特异地靶向组织切片中表达 BRAF V600E 突变多肽的肿瘤细胞

[0074] 通过带有电冷却的样本夹 (Cool-Cut™; Thermo Fisher Scientific) 的 Microm HM 355 S™ 切片机 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 将福尔马林固定和石蜡包埋的切片切成 4 μm。其后,切片在 80°C 下干燥 15 分钟并在 Ventana BenchMark XT® 免疫染色机 (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA) 上用抗 BRAF V600E 的抗体 (克隆 263) 进行染色。Ventana 染色程序包括用细胞调节剂 1 (pH 8) 预处理 60 分钟,随后用未稀释的 BRAF V600E 杂交瘤上清液在 37°C 孵育 32 分钟。抗体孵育后进行 Ventana 标准信号放大,包括使用 Ventana 放大器试剂盒, UltraWash, 复染用一滴苏木精进行 4 分钟及用一滴靛蓝试剂进行 4 分钟。使用 ultraView™ Universal Red v3 检测试剂盒 (Ventana Medical

Systems) 进行发光检测。随后,将玻片从免疫染色机上移走,用含有一滴洗涤剂的水洗涤并封固。当省略第一抗体 BRAF V600E (克隆 263) 时不会检测到色原。当肿瘤细胞对 BRAF V600E 显示出强细胞质染色时免疫反应记为阳性。弱弥散染色和巨噬细胞染色不记为阳性。

[0075] 通过免疫组织化学在福尔马林固定和石蜡包埋的组织切片(来自于具有预定序列状态的肿瘤)上进行的 BRAF V600E 突变分析证实了杂交瘤克隆 263(见图 2)与 BRAF V600E 突变黑色素瘤专一性结合,而不与野生型 BRAF 黑色素瘤结合。重要地是,如图 1 所示的同样通过蛋白印迹与 BRAF V600E 结合的克隆 53、62 和 449 并没有在福尔马林固定和石蜡包埋的组织切片上识别该突变。然而,仅对特定的鼠克隆 263 观察到特异性结合(见图 2 和更高放大倍数的图 3)。

[0076] 克隆 263 由“Deutsches Krebsforschungszentrum”, Heidelberg, GERMANY 根据布达佩斯条约在 2010 年 9 月 8 日以保藏号 DSM ACC 3091 保藏于“DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH”, 38124 Braunschweig, GERMANY 中。

[0077] 实施例 3:克隆 263 的抗体特异地靶向和鉴定表达 BRAF V600E 突变多肽的多毛细胞性白血病

[0078] 所有人源材料得自肿瘤疾病国家中心组织库(Tissue Bank of the National Center for Tumor Diseases, NCT)和海德尔堡病理学学院普通病理学系(Department of General Pathology, Institute for Pathology, Heidelberg)。分析了由石蜡包埋组织中构建的组织微阵列(TMA),该组织微阵列共载有 208 例成熟 B- 细胞肿瘤,包括浆细胞瘤(n=26)、滤泡性淋巴瘤(n=34)、弥漫性大 B- 细胞淋巴瘤(n=41)、原发性纵膈 B- 细胞淋巴瘤(n=25)、套细胞淋巴瘤(n=17)、结外边缘区淋巴瘤(n=16)、多毛细胞性白血病(n=3)和霍奇金淋巴瘤(n=46)。为进一步检查,评估了另外来自有多毛细胞性白血病(共 n=35)的骨髓(n=34)或脾(n=1)的完整切片和来自有脾边缘区淋巴瘤(SMZL)的骨髓(n=4)的完整切片。

[0079] 免疫组织化学如下进行:将来自 TMA 和骨髓或脾的切片切成 4 微米,于 80°C 干燥 15 分钟,并使用 Ventana 提供的标准试剂在自动化免疫染色机(Ventana BenchMark XT, Ventana Medical Systems, Tucson, Arizona, USA)上将切片暴露于 BRAF V600E 特异的小鼠单克隆抗体(克隆 VE1)。用细胞调节剂 1 预处理后,在 37°C 用 VE1 杂交瘤上清液孵育 32 分钟,并通过放大器试剂盒,ultra-Wash,用 ultraView Universal DAB 检测试剂盒进行发色检测和用苏木精及靛蓝试剂分别复染色 4 分钟来连续地进行信号增强。通过不了解突变状态的三个病理学家(DC、AvD、MA)来评价免疫染色过的玻片。

[0080] 还可通过直接 DNA 测序来检测 BRAF V600E。从患有 HCL 和 SMZL 的患者(n=39)的福尔马林固定石蜡包埋组织中提取 DNA。先前已描述了引物序列和直接测序程序(Schindler 2011, Acta Neuropathol 121: 397-405)。

[0081] 用 BRAF V600E 特异性抗体对 208 例人成熟 B- 细胞淋巴瘤进行的关于 BRAF-V600E 突变体活化的筛查在 3 例 HCL 中鉴定出 2 个阳性样本。其他全部淋巴瘤病例都是阴性。不包括在初始组织微阵列分析中的另外 34 例 HCL 骨髓活组织检查和 1 例脾活组织检查分析证实了 35 例中的 31 例(87%)有突变 BRAF V600E 蛋白的强细胞质表达。基因组 DNA 的直接测序证实了 31 例免疫组织化学阳性 HCL 中的 24 例(77%)存在 BRAF-V600E 突变。在 7 例表达 BRAF-V600E 的骨髓活组织检查中,通过直接测序无法检测到 BRAF 突变。该 7 例中

有 2 例的肿瘤细胞含量低于 15%。代表例如图 4 所示。然而,在剩余的 5 例中,超过 50% 的细胞是 HCL。涉及处理来自 FFPE 材料的 DNA 的问题可能是造成假阴性直接测序结果的原因。重要地是,在 4 个免疫阴性病例中没有检测出 BRAF-V600E 突变。另外,没有鉴定出其他 BRAF 第 600 位密码子的突变。这些数据证实了 BRAF-V600E 突变的激活在 HCL 中为非常频繁发生的事件。这强烈表明突变的 BRAF 是引起结构性 ERK 活化的关键分子机制,并可能是在 HCL 的致癌基因转化中必需的分子事件。此外,研究结果显示了在低肿瘤细胞负载的淋巴瘤中检测 BRAF-V600E 突变时,用 BRAF V600E 突变特异性的抗体进行的免疫组织化学可能比直接 DNA 测序更加灵敏。因此,BRAF V600E 特异性抗体可能是对确认 HCL 诊断和监测轻微后遗症的重要的新标记物。此外,本发明结果暗示 HCL 可响应新产生的特异性抑制 BRAF V600E 活性的分子化合物。汇总这些研究结果,表明 BRAF-V600E 突变是 HCL 的发病机理中至关重要的分子事件,并通过使用 VE1 的免疫组织化学易于检测。

[0001]

CPCH1360922P

序 列 表

- <110> 德国癌症研究中心  
海德堡吕布莱希特-卡尔斯大学
- <120> 使用与 BRAF V600E 特异性结合的抗体诊断癌症的工具和方法
- <130> DK10239PC
- <150> US 61/388,158
- <151> 2010-09-30
- <150> US 61/503,950
- <151> 2011-07-01
- <160> 3
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 11
- <212> PRT
- <213> 人(Homos sapiens)
- <400> 1

Gly Leu Ala Thr Glu Lys Ser Arg Trp Ser Gly  
 1                                  5                                  10

- <210> 2
- <211> 9
- <212> DNA
- <213> 人
- <400> 2  
acagtgaaa 9
- <210> 3
- <211> 9
- <212> DNA
- <213> 人
- <400> 3  
acagagaaa 9

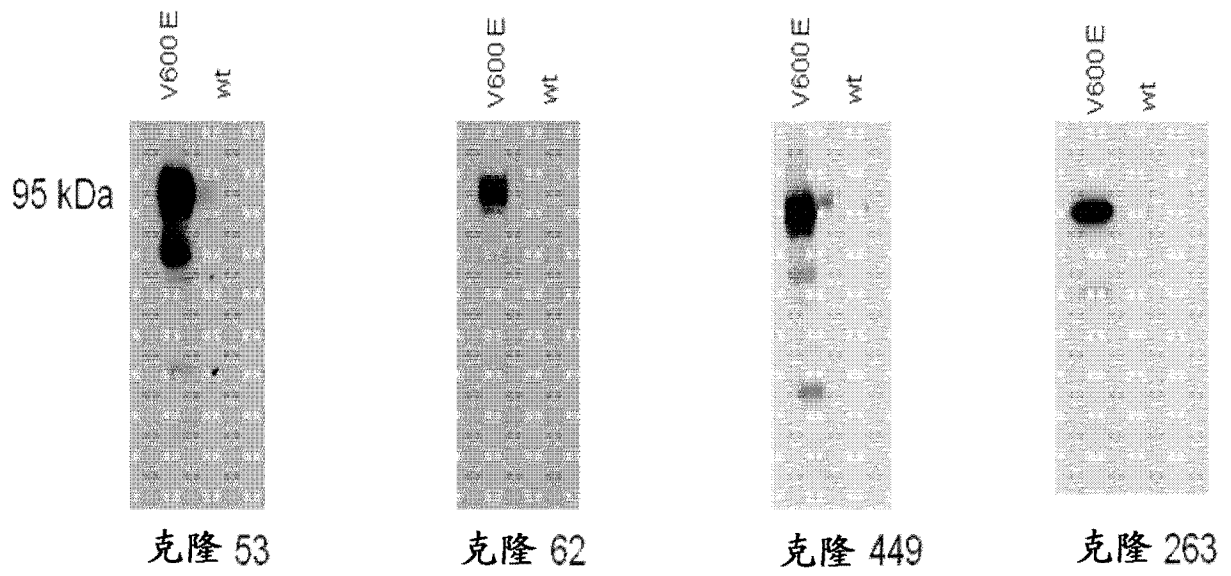


图 1

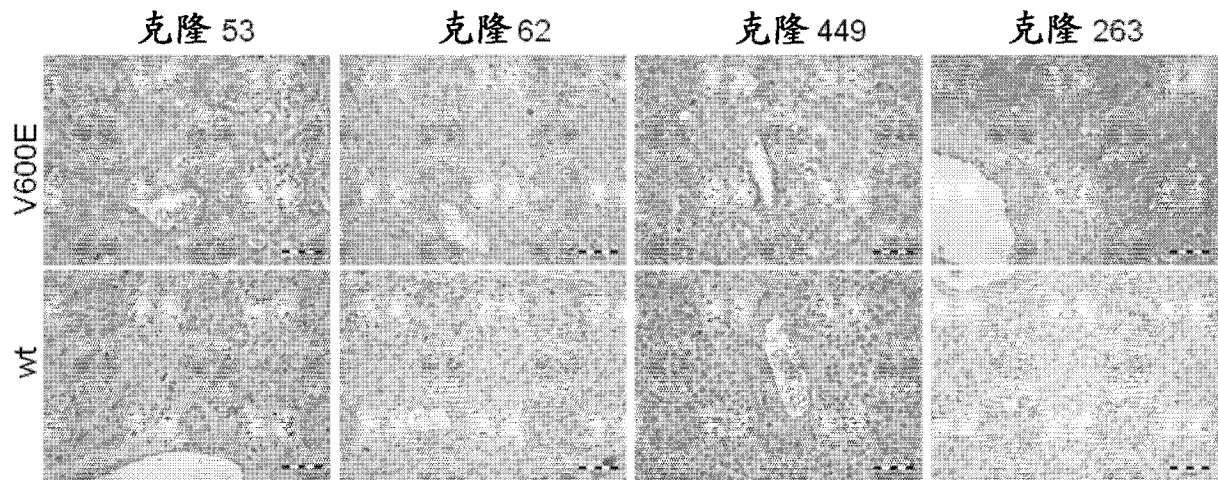


图 2

克隆 263

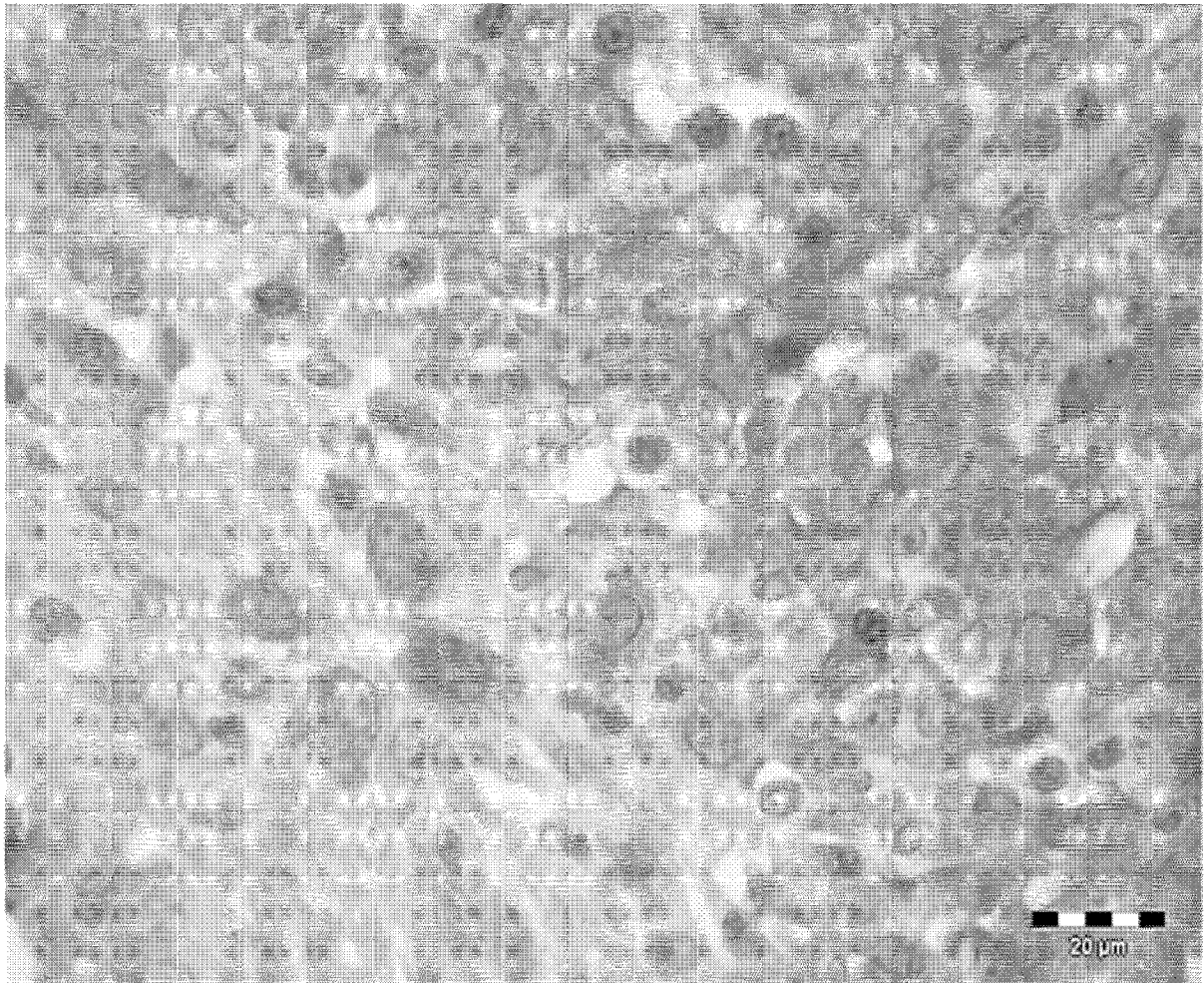


图 3

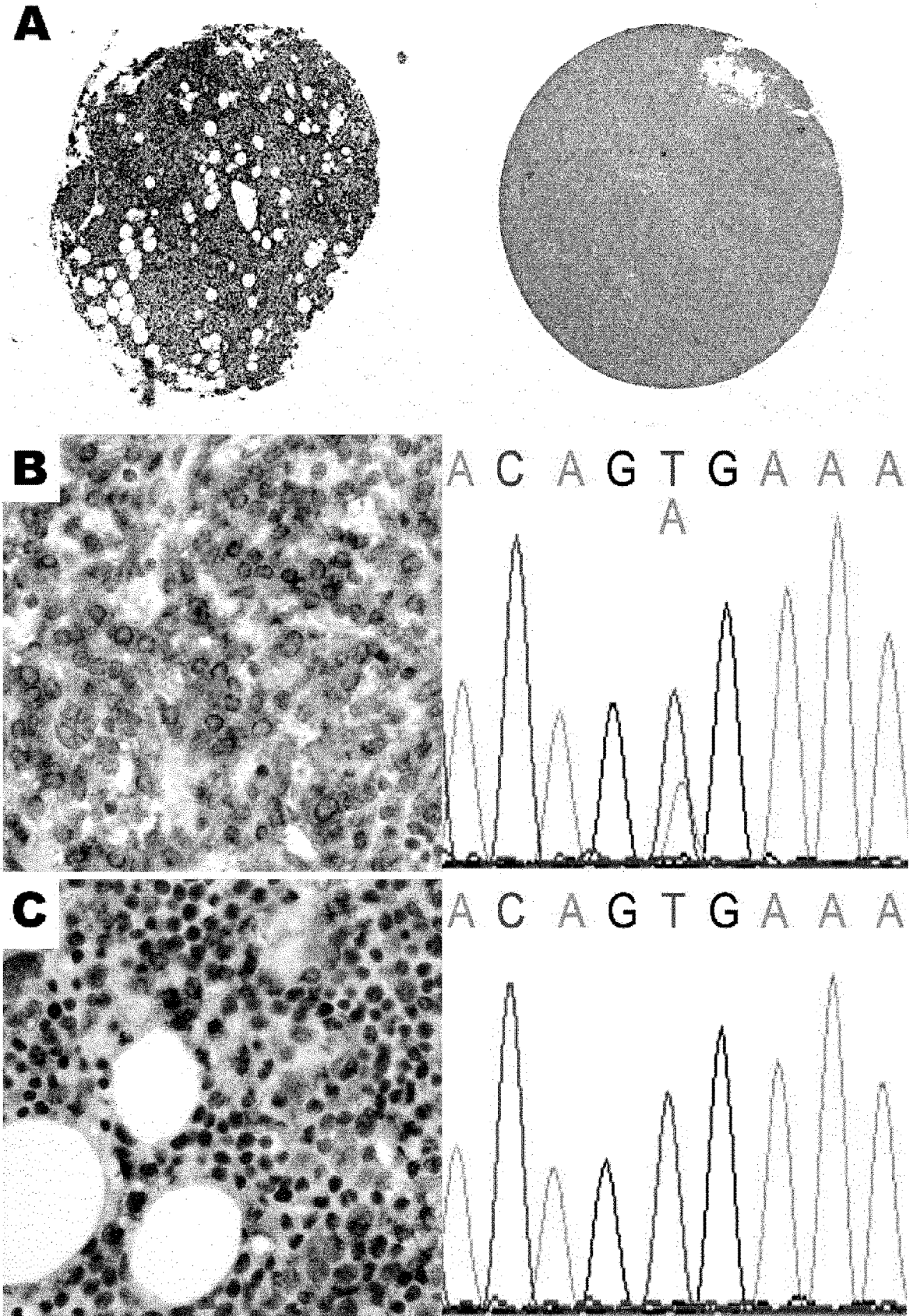


图 4