



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102770529 B

(45)授权公告日 2018.06.05

(21)申请号 201080051890.9

ATCC PTA-11493 2010.11.17

(22)申请日 2010.11.17

ATCC PTA-11494 2010.11.17

(65)同一申请的已公布的文献号

ATCC PTA-11495 2010.11.17

申请公布号 CN 102770529 A

ATCC PTA-11496 2010.11.17

ATCC PTA-11497 2010.11.17

(43)申请公布日 2012.11.07

(30)优先权数据

(73)专利权人 MUSC研究发展基金会

地址 美国南卡罗来纳州

61/261,909 2009.11.17 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

(72)发明人 N·苏特科维斯基 D·弗纳德斯

B·赫尔 S·鲁宾奇克

2012.05.16

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

(86)PCT国际申请的申请数据

司 31100

PCT/US2010/057046 2010.11.17

代理人 余颖

(87)PCT国际申请的公布数据

(51)Int.Cl.

W02011/062997 EN 2011.05.26

G12N 5/00(2006.01)

G12P 21/08(2006.01)

(83)生物保藏信息

审查员 郝佳

ATCC PTA-11490 2010.11.17

ATCC PTA-11491 2010.11.17

ATCC PTA-11492 2010.11.17

权利要求书3页 说明书95页

序列表9页 附图18页

(54)发明名称

针对人核仁素的人单克隆抗体

(57)摘要

本发明提供产生针对人核仁素的人单克隆抗体的方法,生产此类抗体的细胞,以及所述抗体本身。还提供用所述方法诊断和治疗恶性和非恶性疾病的方法,所述疾病在细胞表面表达核仁素影响疾病的病理生理学。

1. 一种分离的人或人源化IgG抗体或其片段,其特征在于结合SEQ ID No.4所示多肽,并且所述抗体或其片段杀灭在细胞表面表达核仁素的癌细胞,所述抗体片段为Fab、Fab'、F(ab')₂或Fv片段,其中所述分离的人或人源化IgG抗体或其片段是由选自下组的保藏号的永生化人B细胞产生的:PTA-11493、PTA-11495、PTA-11490、PTA-11496、PTA-11491、PTA-11492、PTA-11497和PTA-11494,其于2010年11月17日保藏到美国典型培养物保藏中心。

2. 如权利要求1所述的分离的人或人源化IgG抗体或其片段,其特征在于,所述分离的人或人源化IgG抗体是IgG1抗体。

3. 如权利要求1或2所述的分离的人或人源化IgG抗体或其片段,其特征在于,所述分离的人或人源化IgG抗体包含κ轻链。

4. 如权利要求1或2所述的分离的人或人源化IgG抗体或其片段,其特征在于,所述分离的人或人源化IgG抗体包含λ轻链。

5. 如权利要求1或2所述的分离的人或人源化IgG抗体或其片段,其特征在于,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48-96小时,其杀死MCF-7细胞群体的10-100%。

6. 如权利要求1或2所述的分离的人或人源化IgG抗体或其片段,其特征在于,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死MCF-7细胞群体的至少50%。

7. 如权利要求1或2所述的分离的人或人源化IgG抗体或其片段,其特征在于,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死MCF-7细胞群体的至少80%。

8. 如权利要求1或2所述的分离的人或人源化IgG抗体或其片段,其特征在于,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少20%。

9. 如权利要求1或2所述的分离的人或人源化IgG抗体或其片段,当所述抗体或其片段与单独的MCF-7细胞和MCF10A细胞群体及热灭活血清一起孵育72或96小时,所杀死的MCF-7细胞超过所杀死的MCF10A细胞。

10. 如权利要求1或2所述的分离的人或人源化IgG抗体或其片段,其特征在于,所述抗体或其片段是单克隆抗体或其片段。

11. 如权利要求1或2所述的分离的人或人源化IgG抗体或其片段,其特征在于,所述分离抗体或其片段显示针对癌细胞的补体依赖性细胞毒性。

12. 如权利要求1或2所述的分离的人或人源化IgG抗体或其片段,其特征在于,所述分离抗体或其片段显示针对癌细胞的非补体依赖性细胞毒性。

13. 如权利要求1或2所述的分离的人或人源化IgG抗体或其片段,其特征在于,所述分离抗体或其片段在接触时诱导癌细胞的凋亡。

14. 如权利要求1或2所述的分离的人或人源化IgG抗体或其片段,其特征在于,所述分离抗体或其片段杀死AML癌细胞、CLL癌细胞或乳腺癌细胞。

15. 如权利要求1或2所述的分离的人或人源化IgG抗体或其片段,其特征在于,所述分离抗体或其片段降低癌细胞中的BCL-2水平。

16. 如权利要求1或2所述的分离的人或人源化IgG抗体或其片段,其特征在于,所述抗体或其片段连接有治疗剂。

17. 如权利要求16所述的分离的人或人源化IgG抗体或其片段,其特征在于,所述治疗剂是放射性核素、毒素或化疗部分。

18. 一种抗核仁素组合物, 包含一种或多种权利要求1-17中任一项所述分离的人或人源化IgG抗体或其片段。

19. 一种抗核仁素组合物, 包含两种或更多种权利要求1-17中任一项所述分离的人或人源化IgG抗体或其片段。

20. 一种抗核仁素组合物, 包含三种或更多种权利要求1-17中任一项所述的分离的人或人源化IgG抗体或其片段。

21. 一种永生化人B细胞, 其选自保藏为以下保藏号的永生化人B细胞: PTA-11493、PTA-11495、PTA-11490、PTA-11496、PTA-11491、PTA-11492、PTA-11497和PTA-11494, 其于2010年11月17日保藏到美国典型培养物保藏中心。

22. 结合SEQ ID No.4所示多肽的分离的人或人源化IgG抗体或其片段用于制造药物的用途, 所述药物用于杀灭在细胞表面表达核仁素的癌细胞, 所述抗体片段为Fab、Fab'、F(ab')₂或Fv片段, 其中所述分离的人或人源化IgG抗体或其片段是由选自下组的保藏号的永生化人B细胞产生的: PTA-11493、PTA-11495、PTA-11490、PTA-11496、PTA-11491、PTA-11492、PTA-11497和PTA-11494, 其于2010年11月17日保藏到美国典型培养物保藏中心。

23. 如权利要求22所述的用途, 当所述分离的人或人源化IgG抗体或其片段与MCF-7细胞和人AB血清一起孵育48小时, 其杀死所述MCF-7细胞群体的至少20%。

24. 如权利要求22所述的用途, 其特征在于, 所述分离的人或人源化IgG抗体或其片段是单克隆抗体或其片段。

25. 如权利要求22-24中任一项所述的用途, 其特征在于, 所述癌细胞是肺癌细胞, 乳腺癌细胞、前列腺癌细胞、结肠癌细胞、胰腺癌细胞、肾细胞癌细胞、卵巢癌细胞、白血病细胞、黑色素瘤细胞、成胶质细胞瘤细胞、神经母细胞瘤细胞、肉瘤细胞或胃癌细胞。

26. 如权利要求22-24中任一项所述的用途, 其特征在于, 所述分离的人或人源化IgG抗体或其片段连接有治疗剂。

27. 如权利要求26所述的用途, 其特征在于, 所述治疗剂是放射性核素、毒素或化疗剂。

28. 如权利要求22-24中任一项所述的用途, 其特征在于, 所述杀灭包括诱导所述细胞中的凋亡。

29. 如权利要求22-24中任一项所述的用途, 其特征在于, 所述细胞位于人类对象中。

30. 如权利要求22-24中任一项所述的用途, 其特征在于, 所述药物还包括至少一种补充抑制剂或是与至少一种补充疗法联用的。

31. 如权利要求30所述的用途, 其特征在于, 所述至少一种补充疗法包括一种或多种手术、放射治疗、化学治疗、毒素治疗、免疫治疗、激素治疗、抗血管生成治疗或基因治疗或其它生物学疗法。

32. 如权利要求30所述的用途, 其特征在于, 所述至少一种补充抑制剂包括一种或多种放射性核素、化疗剂、毒素、免疫治疗剂、激素、核酸或多肽。

33. 如权利要求32所述的用途, 其特征在于, 所述至少一种补充抑制剂包括毒素, 所述毒素是白喉毒素、外毒素A链、蓖麻毒素A链、相思豆毒素A链、莨菪根毒素A链、 α 八叠球菌、油桐蛋白、石竹素蛋白、美洲商陆蛋白、美洲商陆抗病毒蛋白、苦瓜抑制剂、泻果素、巴豆毒素、肥皂草抑制剂、白树毒素、迈托毒素、局限曲菌素、酚霉素、伊诺霉素、卡奇霉素或单端孢霉烯族毒素。

34. 如权利要求32所述的用途,其特征在于,所述至少一种补充抑制剂包括化疗剂,所述化疗剂是烷基化剂、蒽环类抗生素、细胞骨架扰乱剂、埃博霉素、拓扑异构酶I的抑制剂、拓扑异构酶II的抑制剂、核苷或核苷酸类似物、肽抗生素、铂基试剂、类视黄醇、长春花生物碱。

35. 如权利要求32所述的用途,其特征在于,所述至少一种补充抑制剂包括化疗剂,所述化疗剂是放线菌素D、全反式视黄酸阿扎胞苷、阿霉素硫酸嘌呤、博来霉素、喜树碱、卡铂、卡培他滨、顺铂、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、阿糖胞苷、道诺红菌素、多西他赛、多西氟尿嘧啶、多柔比星、表阿霉素、埃博霉素、依托泊苷、氟尿嘧啶、吉西他滨、羟基脲、过氧化氢、伊达比星、伊马替尼、双氯乙基甲胺、巯基嘌呤、甲氨蝶呤、丝裂霉素C、米托蒽醌、奥沙利铂、紫杉醇、培美曲塞、替尼泊苷、硫鸟嘌呤、戊柔比星、长春碱、长春新碱、长春碱酰胺或长春瑞宾。

36. 治疗有效量的抗核仁素试剂和药学上可接受的载体在制备治疗在细胞表面表达核仁素的哺乳动物癌症所用药物中的用途,其中所述抗核仁素试剂包括结合SEQ ID No. 4所示多肽的分离的人或人源化抗核仁素IgG抗体或其片段,并且所述抗体或其片段杀灭在细胞表面表达核仁素的细胞,所述抗体片段为Fab、Fab'、F(ab')₂或Fv片段,其中所述分离的人或人源化抗核仁素IgG抗体或其片段是由选自下组的保藏号的永生化人B细胞产生的: PTA-11493、PTA-11495、PTA-11490、PTA-11496、PTA-11491、PTA-11492、PTA-11497和PTA-11494,其于2010年11月17日保藏到美国典型培养物保藏中心。

37. 如权利要求36所述的用途,当所述分离的人或人源化抗核仁素IgG抗体或其片段与MCF-7细胞和人AB血清一起孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少20%。

38. 如权利要求36所述的用途,其中所述药物还包含毒素或化疗剂。

39. 如权利要求36-38中任一项所述的用途,所述哺乳动物接受放疗的进一步治疗。

40. 如权利要求36-38中任一项所述的用途,其特征在于,所述哺乳动物是人。

41. 如权利要求36-38中任一项所述的用途,其特征在于,所述分离的人或人源化抗核仁素IgG抗体或其片段是单克隆抗体或其片段。

42. 如权利要求38所述的用途,其特征在于,所述药物包含毒素,所述毒素是白喉毒素、外毒素A链、蓖麻毒素A链、相思豆毒素A链、蒴莲根毒素A链、 α 八叠球菌、油桐蛋白、石竹素蛋白、美洲商陆蛋白、美洲商陆抗病毒蛋白、苦瓜抑制剂、泻果素、巴豆毒素、肥皂草抑制剂、白树毒素、迈托毒素、局限曲菌素、酚霉素、伊诺霉素、卡奇霉素或单端孢霉烯族毒素。

43. 如权利要求38所述的用途,其特征在于,所述药物包含化疗剂,所述化疗剂是烷基化剂、蒽环类抗生素、细胞骨架扰乱剂、埃博霉素、拓扑异构酶I的抑制剂、拓扑异构酶II的抑制剂、核苷或核苷酸类似物、肽抗生素、铂基试剂、类视黄醇、长春花生物碱。

44. 如权利要求38所述的用途,其特征在于,所述药物包含化疗剂,所述化疗剂是放线菌素D、全反式视黄酸阿扎胞苷、阿霉素硫酸嘌呤、博来霉素、喜树碱、卡铂、卡培他滨、顺铂、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、阿糖胞苷、道诺红菌素、多西他赛、多西氟尿嘧啶、多柔比星、表阿霉素、埃博霉素、依托泊苷、氟尿嘧啶、吉西他滨、羟基脲、过氧化氢、伊达比星、伊马替尼、双氯乙基甲胺、巯基嘌呤、甲氨蝶呤、丝裂霉素C、米托蒽醌、奥沙利铂、紫杉醇、培美曲塞、替尼泊苷、硫鸟嘌呤、戊柔比星、长春碱、长春新碱、长春碱酰胺或长春瑞宾。

针对人核仁素的人单克隆抗体

[0001] 交叉参考

[0002] 本申请要求2009年11月17日提交的美国临时专利申请序列号61/261,909的优先权,该申请通过引用全部纳入本文用于所有目的。

[0003] 有关联邦资助的研究的声明

[0004] 本申请在国立卫生研究院国立癌症研究所授予的美国政府基金号NCICA109254-04S1的资助下完成。美国政府可享有本发明的权利。

[0005] 发明背景

[0006] 本发明一般涉及细胞生物学和免疫学领域。更具体地,本发明涉及人核仁素(NCL)的单克隆抗体的生产和使用相关的方法和组合物。

[0007] 抗体是一类称为“生物制品”的试剂。抗体来源可以是多克隆供给,例如人或马血清,或衍生自单克隆来源(单细胞克隆)。伴以控制和选择特异性抗原结合的技术能力,单克隆抗体已产生显著的治疗效果。但是,对某些靶标产生特异性抗体的难度限制了成功,且治疗与诊断试剂的潜力仍远未开发。

[0008] 开发用于人体治疗的单克隆抗体的障碍之一是需要“人源化”这类通常产生于小鼠、大鼠和兔的抗体。若未经人源化恒定区就将这类抗体给予人类患者,这些患者可能受“血清病”的折磨,意味着所述受体产生针对非人抗体序列的内源性免疫应答。科研动物中产生的人源化单克隆抗体可克服这一问题。但是,用于人源化抗体的时间和经济成本会相当可观。

[0009] 核仁素在人慢性淋巴细胞性白血病(CLL)细胞、急性骨髓性白血病(AML)细胞、一些形式的乳腺癌以及其他肿瘤的细胞表面表达。因此,核仁素构成有希望的肿瘤抗原,用作包括抗体在内的治疗剂靶标。

[0010] 发明概述

[0011] 本发明的一方面提供能分泌结合人核仁素的抗体的永生化人B细胞的产生方法,其包括:获取IgM-阳性人B细胞群体;将所述群体:接触爱泼斯坦巴尔病毒(EBV)以使所述人B细胞永生化,接触细胞因子/生长因子/信号传导试剂混合物以诱导IgM向IgG的免疫球蛋白同种型类型转换;并在支持所述永生化和免疫球蛋白同种型类型转换的条件下培养细胞。在一种实施方式中,所述方法还包括选择表达针对人核仁素的抗体的永生化人B细胞。在另一实施方式中,进行的选择包括对永生化B细胞培养基上清液进行免疫测定。在另一实施方式中,细胞因子混合物含有递送辅助刺激信号给人B细胞的试剂。在另一实施方式中,细胞因子混合物含有抗-IgM F(ab')₂白介素(IL)-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10、IL-13、INF α 、BAFF、可溶性CD40L。在另一实施方式中,IgM-阳性人B细胞群体从外周血、扁桃体骨髓、脾脏、淋巴结、脐带血、肝、单采血液成分操作或暗黄层获得。在另一实施方式中,所述方法还包括从步骤(d)的永生化人B细胞分离完整重链和/或轻链的编码核酸。在另一实施方式中,所述方法还包括从步骤(d)的永生化人B细胞分离重链和/或轻链抗原结合区的编码核酸。在另一实施方式中,所述方法还包括将所述核酸克隆入重链和/或轻链框架区的编码核酸中。在另一实施方式中,所述群体的接触还包括EBV浓缩步骤、感染中的离心步骤,或两

者都有。在另一实施方式中,所述方法还包括在步骤(c)后冷冻所述人B细胞群体。在另一实施方式中,所述群体与细胞因子/生长因子/信号传导试剂混合物的接触在步骤(b) (ii)后约0-96小时进行。在另一实施方式中,所述群体与细胞因子/生长因子/信号传导试剂混合物的接触在步骤(b) (ii)后16-20小时进行。在另一实施方式中,所述群体有约50%-99%通过EBV感染而永生化。在另一实施方式中,所述群体有约95%-99%通过EBV感染而永生化。在另一实施方式中,表达人核仁素的抗体的永生化人B细胞的选择在感染后1-4周进行。在另一实施方式中,表达人核仁素的抗体的永生化人B细胞的选择在感染后2-3周进行。在另一实施方式中,表达人核仁素的抗体的永生化人B细胞的选择在解冻所保存的冷冻永生化B细胞后和/或在解冻所保存的由所述永生化B细胞所得冷冻培养基上清液后进行。在另一实施方式中,所述B细胞为抗原静息型(antigen naïve)。在另一实施方式中,所述B细胞为抗原遭遇型(antigen experienced)。

[0012] 本发明的另一方面提供表达能结合人核仁素的IgG抗体的永生化人B细胞。在一种实施方式中,所述永生化人B细胞命名为T-5D1、V-3H11 (3G5)、T-2D3、T-7G7 (1H9)、T-2H3、T-9F9、T-8G4或T-P1C6。

[0013] 本发明的另一方面提供表达能结合SEQ ID No.2所示蛋白的IgG抗体或其片段的永生化人B细胞。在一种实施方式中,所述IgG抗体是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4抗体。在另一实施方式中,所述IgG抗体是IgG1抗体。在另一实施方式中,所述IgG抗体含有κ轻链。在另一实施方式中,所述IgG抗体含有λ轻链。在另一实施方式中,所述B细胞经EBV永生化。在另一实施方式中,所述抗体或其片段是单克隆抗体或其片段。在另一实施方式中,所述抗体或其片段对人基本无免疫原性。在另一实施方式中,所述抗体或其片段是人抗体或其片段。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少10%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少20%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少30%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少40%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少50%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少60%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少70%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少80%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少90%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少100%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MV4-11细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MV4-11细胞群体的至少10%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MV4-11细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MV4-11细胞群体的至少20%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MV4-11细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MV4-11细胞群体的至少30%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MV4-11细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MV4-11细胞群体的至

少40%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MV4-11细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MV4-11细胞群体的至少50%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MV4-11细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MV4-11细胞群体的至少60%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MV4-11细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MV4-11细胞群体的至少70%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MV4-11细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MV4-11细胞群体的至少80%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MV4-11细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MV4-11细胞群体的至少90%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MV4-11细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MV4-11细胞群体的至少100%。在另一实施方式中,所述抗体或其片段结合人核仁素的RNA结合域。在另一实施方式中,所述抗体或其片段使人核仁素的RNA结合域失活。在另一实施方式中,所述分离的抗体或其片段诱发针对癌细胞的补体依赖性细胞毒性。在另一实施方式中,所述分离的抗体或其片段诱发针对癌细胞的非补体依赖性细胞毒性。在另一实施方式中,所述分离的抗体或其片段在接触时诱发癌细胞中的凋亡。在另一实施方式中,所述分离的抗体或其片段抑制或杀死AML癌细胞,CLL癌细胞或乳腺癌细胞。在另一实施方式中,所述分离的单克隆抗体或其片段降低癌细胞中的BCL-2水平。

[0014] 本发明的另一方面提供表达能结合SEQ ID No.1所编码蛋白的IgG抗体或其片段的永生化人B细胞。在一种实施方式中,所述IgG抗体是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4抗体。在另一实施方式中,所述IgG抗体是IgG1抗体。在另一实施方式中,所述IgG抗体含有 κ 轻链。在另一实施方式中,所述IgG抗体含有 λ 轻链。在另一实施方式中,所述B细胞经EBV永生化。在另一实施方式中,所述抗体或其片段是单克隆抗体或其片段。权利要求33所述的分离抗体或其片段,其中,所述抗体或其片段对人基本无免疫原性。在另一实施方式中,所述抗体或其片段是人抗体或其片段。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少10%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少20%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少30%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少40%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少50%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少60%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少70%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少80%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少90%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少100%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MV4-11细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MV4-11细胞群体的至少10%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MV4-11细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MV4-11细胞群体的至少20%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MV4-11细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MV4-11细胞群体的

至少30%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MV4-11细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MV4-11细胞群体的至少40%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MV4-11细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MV4-11细胞群体的至少50%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MV4-11细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MV4-11细胞群体的至少60%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MV4-11细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MV4-11细胞群体的至少70%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MV4-11细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MV4-11细胞群体的至少80%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MV4-11细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MV4-11细胞群体的至少90%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MV4-11细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MV4-11细胞群体的至少100%。在另一实施方式中,所述抗体或其片段结合人核仁素的RNA结合域。在另一实施方式中,所述抗体或其片段使人核仁素的RNA结合域失活。在另一实施方式中,所述分离的抗体或其片段诱发针对癌细胞的补体依赖性细胞毒性。在另一实施方式中,所述分离的抗体或其片段诱发针对癌细胞的非补体依赖性细胞毒性。在另一实施方式中,所述分离的抗体或其片段在接触时诱发癌细胞中的凋亡。在另一实施方式中,所述分离的抗体或其片段抑制或杀死AML癌细胞,CLL癌细胞或乳腺癌细胞。在另一实施方式中,所述分离的单克隆抗体或其片段降低癌细胞中的BCL-2水平。

[0015] 本发明的另一方面提供表达能结合含SEQ ID No.4序列的蛋白的IgG抗体或其片段的永生化人B细胞。在一种实施方式中,所述IgG抗体是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4抗体。在另一实施方式中,所述IgG抗体是IgG1抗体。在另一实施方式中,所述IgG抗体含有κ轻链。在另一实施方式中,所述IgG抗体含有λ轻链。在另一实施方式中,所述B细胞经EBV永生化。在另一实施方式中,权利要求33所述的分离抗体或其片段,其中,所述抗体或其片段是单克隆抗体或其片段。在另一实施方式中,所述抗体或其片段对人基本无免疫原性。在另一实施方式中,所述抗体或其片段是人抗体或其片段。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少10%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少20%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少30%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少40%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少50%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少60%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少70%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少80%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少90%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少100%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MV4-11细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MV4-11细胞群体的至少10%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MV4-11细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MV4-11细胞群体的至少20%。在

另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MV4-11细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MV4-11细胞群体的至少30%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MV4-11细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MV4-11细胞群体的至少40%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MV4-11细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MV4-11细胞群体的至少50%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MV4-11细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MV4-11细胞群体的至少60%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MV4-11细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MV4-11细胞群体的至少70%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MV4-11细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MV4-11细胞群体的至少80%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MV4-11细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MV4-11细胞群体的至少90%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MV4-11细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MV4-11细胞群体的至少100%。在另一实施方式中,所述抗体或其片段结合人核仁素的RNA结合域。在另一实施方式中,所述抗体或其片段使人核仁素的RNA结合域失活。在另一实施方式中,所述分离的抗体或其片段诱发针对癌细胞的补体依赖性细胞毒性。在另一实施方式中,所述分离的抗体或其片段诱发针对癌细胞的非补体依赖性细胞毒性。在另一实施方式中,所述分离的抗体或其片段在接触时诱发癌细胞中的凋亡。在另一实施方式中,所述分离的抗体或其片段抑制或杀死AML癌细胞,CLL癌细胞或乳腺癌细胞。在另一实施方式中,所述分离的单克隆抗体或其片段降低癌细胞中的BCL-2水平。

[0016] 本发明的另一方面提供表达能结合SEQ ID No.3所编码蛋白的IgG抗体或其片段的永生化人B细胞。在一种实施方式中,所述IgG抗体是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4抗体。在另一实施方式中,所述IgG抗体是IgG1抗体。在另一实施方式中,所述IgG抗体含有κ轻链。在另一实施方式中,所述IgG抗体含有λ轻链。在另一实施方式中,所述B细胞经EBV永生化。在另一实施方式中,所述抗体或其片段是单克隆抗体或其片段。在另一实施方式中,所述抗体或其片段对人基本无免疫原性。在另一实施方式中,所述抗体或其片段是人抗体或其片段。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少10%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MV4-11细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MV4-11细胞群体的至少20%。在另一实施方式中,所述抗体或其片段结合人核仁素的RNA结合域。在另一实施方式中,所述抗体或其片段使人核仁素的RNA结合域失活。在另一实施方式中,所述分离的抗体或其片段诱发针对癌细胞的补体依赖性细胞毒性。在另一实施方式中,所述分离的抗体或其片段诱发针对癌细胞的非补体依赖性细胞毒性。在另一实施方式中,所述分离的抗体或其片段在接触时诱发癌细胞中的凋亡。在另一实施方式中,所述分离的抗体或其片段抑制或杀死AML癌细胞,CLL癌细胞或乳腺癌细胞。在另一实施方式中,所述分离的单克隆抗体或其片段降低癌细胞中的BCL-2水平。

[0017] 本发明的另一方面提供表达能特异性结合SEQ ID No.4所示蛋白的分离的人单克隆抗体或其片段。在一种实施方式中,所述抗体或其片段是人抗体或其片段。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少10%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少20%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少30%。在

另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少40%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少50%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少60%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少70%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少80%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少90%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少100%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MV4-11和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MV4-11细胞群体的至少10%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MV4-11细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MV4-11细胞群体的至少20%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MV4-11细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MV4-11细胞群体的至少30%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MV4-11细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MV4-11细胞群体的至少40%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MV4-11细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MV4-11细胞群体的至少50%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MV4-11细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MV4-11细胞群体的至少60%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MV4-11细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MV4-11细胞群体的至少70%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MV4-11细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MV4-11细胞群体的至少80%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MV4-11细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MV4-11细胞群体的至少90%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MV4-11细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MV4-11细胞群体的至少100%。在另一实施方式中,所述抗体或其片段结合人核仁素的RNA结合域。在另一实施方式中,所述抗体或其片段使人核仁素的RNA结合域失活。在另一实施方式中,所述分离的抗体或其片段诱发针对癌细胞的补体依赖性细胞毒性。在另一实施方式中,所述分离的抗体或其片段诱发针对癌细胞的非补体依赖性细胞毒性。在另一实施方式中,所述分离的抗体或其片段在接触时诱发癌细胞中的凋亡。在另一实施方式中,所述分离的抗体或其片段抑制或杀死AML癌细胞,CLL癌细胞或乳腺癌细胞。在另一实施方式中,所述分离的单克隆抗体或其片段降低癌细胞中的BCL-2水平。

[0018] 在本发明的另一方面提供特异性结合人核仁素蛋白的分离抗体或其片段,其中当所述抗体或其片段与MCF-7细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少20%。在一种实施方式中,所述人核仁素的氨基酸序列包含SEQ ID No.2。在另一实施方式中,所述抗体或其片段结合由SEQ ID No.2的氨基酸残基1-283组成的氨基酸序列。在另一实施方式中,所述抗体或其片段是单克隆抗体或其片段。在另一实施方式中,所述抗体或其片段对人基本无免疫原性。在另一实施方式中,所述抗体或其片段是人抗体或其片段。在另一实施方式中,所述抗体或其片段结合人核仁素的RNA结合域。在另一实施方式中,所述抗体或其片段使人核仁素的RNA结合域失活。在另一实施方式中,所述分离的抗体或其片段连接诊断剂或治疗剂。在另一实施方式中,所述分离的抗体或其片段显示针对癌细胞的补体

依赖性细胞毒性。在另一实施方式中,所述分离的抗体或其片段显示针对癌细胞的非补体依赖性细胞毒性。在另一实施方式中,所述分离的抗体或其片段在接触时诱发癌细胞中的凋亡。在另一实施方式中,所述抗体或其片段抑制或杀死AML癌细胞,CLL癌细胞或乳腺癌细胞。在另一实施方式中,所述分离的抗体或其片段降低癌细胞中的BCL-2水平。在另一实施方式中,所述抗体或其片段连接诊断剂。在另一实施方式中,所述诊断剂是放射性核素、荧光团、化学发光化合物、荧光化合物或酶。在另一实施方式中,所述抗体或其片段连接治疗剂。在另一实施方式中,所述治疗剂是放射性核素、毒素或化学治疗部分。

[0019] 本发明的另一方面提供特异性结合人核仁素蛋白的分离抗体或其片段,其中当所述抗体或其片段与MCF-7细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死MV4-11细胞群体的至少10-100% (例如,MV4-11细胞群体的10、20、30、40、50、60、70、80、90或100%)。在另一实施方式中,所述人核仁素的氨基酸序列包含SEQ ID No.2。在另一实施方式中,所述抗体或其片段结合由SEQ ID No.2的氨基酸残基1-283组成的氨基酸序列。在另一实施方式中,所述抗体或其片段是单克隆抗体或其片段。在另一实施方式中,所述抗体或其片段对人基本无免疫原性。在另一实施方式中,所述抗体或其片段是人抗体或其片段。在另一实施方式中,所述抗体或其片段结合人核仁素的RNA结合域。在另一实施方式中,所述抗体或其片段使人核仁素的RNA结合域失活。在另一实施方式中,所述分离的抗体或其片段连接诊断剂或治疗剂。在另一实施方式中,所述分离的抗体或其片段显示针对癌细胞的补体依赖性细胞毒性。在另一实施方式中,所述分离的抗体或其片段显示针对癌细胞的非补体依赖性细胞毒性。在另一实施方式中,所述分离的抗体或其片段在接触时诱发癌细胞中的凋亡。在另一实施方式中,所述抗体或其片段抑制或杀死AML癌细胞,CLL癌细胞或乳腺癌细胞。在另一实施方式中,所述分离的抗体或其片段降低癌细胞中的BCL-2水平。在另一实施方式中,所述抗体或其片段连接诊断剂。在另一实施方式中,所述诊断剂是放射性核素、荧光团、化学发光化合物、荧光化合物或酶。在另一实施方式中,所述抗体或其片段连接治疗剂。在另一实施方式中,所述治疗剂是放射性核素、毒素或化学治疗部分。

[0020] 本发明的另一方面提供抗核仁素的组合物,所述组合物包含特异性结合人核仁素蛋白的一种或多种分离的抗体或其片段,其中当所述一种或多种抗体与MCF-7细胞和人AB血清孵育48-96小时 (例如,48、72或96小时),其杀死MCF-7细胞群体的至少10-100% (例如,10、20、30、40、50、60、70、80、90或100%)。在一种实施方式中,所述一种或多种分离的抗体或其片段是单克隆抗体或其片段。在另一实施方式中,所述一种或多种分离的抗体或其片段对人基本无免疫原性。在另一实施方式中,所述一种或多种分离的抗体或其片段是人抗体或其片段。在另一实施方式中,所述一种或多种分离的抗体或其片段结合人核仁素的RNA结合域。在另一实施方式中,所述一种或多种分离的抗体或其片段灭活人核仁素的RNA结合域。在另一实施方式中,所述人核仁素的氨基酸序列包含SEQ ID No.2。在另一实施方式中,所述一种或多种分离的抗体或其片段结合SEQ ID No.4。在另一实施方式中,所述抗核仁素组合物还包含放射性核素、荧光团、化学发光化合物、荧光化合物、酶、毒素或化疗剂。在另一实施方式中,所述放射性核素、荧光团、化学发光化合物、荧光化合物、酶、毒素或化疗剂偶联所述一种或多种抗体或其片段。在另一实施方式中,所述抗核仁素组合物包含两种或更多种分离的抗体或其片段特异性结合所述人核仁素蛋白,其中当所述一种或多种抗体与MCF-7细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少20%。在另一实施方

式中,所述抗核仁素组合物包含3种或更多种分离的抗体或其片段特异性结合所述人核仁素蛋白,其中当所述一种或多种抗体与MCF-7细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少20%。

[0021] 本发明的另一方面提供抑制或杀死在细胞表面表达核仁素的细胞的方法,所述方法包括使所述细胞接触能结合人核仁素蛋白的抗体或其片段,其中当所述抗体或其片段与MCF-7细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少20%。在一种实施方式中,所述抗体或其片段是人抗体或其片段。在另一实施方式中,所述抗体或其片段是单克隆抗体或其片段。在另一实施方式中,所述抗体或其片段结合SEQ ID No.2。在另一实施方式中,所述抗体或其片段结合SEQ ID No.1所编码的氨基酸序列。在另一实施方式中,所述抗体或其片段结合SEQ ID No.4。在另一实施方式中,所述抗体或其片段结合SEQ ID No.3所编码的氨基酸序列。在另一实施方式中,所述细胞是癌细胞。在另一实施方式中,所述癌细胞是肺癌细胞、乳腺癌细胞、前列腺癌细胞、结肠癌细胞、胰腺癌细胞、肾细胞癌细胞、卵巢癌细胞、白血病细胞、黑色素瘤细胞、成胶质细胞瘤细胞、神经母细胞瘤细胞、肉瘤细胞或胃癌细胞。在另一实施方式中,所述细胞是免疫细胞。在另一实施方式中,所述免疫细胞是淋巴细胞、树突细胞、外周血单核细胞、巨噬细胞或神经胶质细胞。在另一实施方式中,所述免疫细胞是活化免疫细胞。在另一实施方式中,所述免疫细胞是活化B细胞。在另一实施方式中,所述免疫细胞是记忆B细胞。在另一实施方式中,所述免疫细胞是活化T细胞。在另一实施方式中,所述免疫细胞是活化CD4+T细胞。在另一实施方式中,所述免疫细胞是活化CD8+T细胞。在另一实施方式中,所述细胞是血管平滑肌细胞或内皮细胞。在另一实施方式中,所述抗体或其片段连接治疗剂。在另一实施方式中,所述治疗剂是放射性核素、毒素或化疗剂。在另一实施方式中,所述抑制或杀死包括所述细胞中的凋亡。在另一实施方式中,所述细胞位于人类对象中,且所述接触包括将所述抗体或其片段给予所述对象。在另一实施方式中,所述方法还包括使所述细胞接触至少一种补充抑制剂或疗法。在另一实施方式中,所述补充疗法包括一种或多种手术、放射治疗、化学治疗、毒素治疗、免疫治疗、激素治疗、抗血管生成治疗或基因治疗或其它生物学疗法。在另一实施方式中,所述补充抑制剂包括一种或多种放射性核素、化疗剂、毒素免疫治疗剂、激素、核酸或多肽。在另一实施方式中,所述毒素是白喉毒素、外毒素A链、蓖麻毒素A链、相思豆毒素A链、蒴莲根毒素A链、 α 八叠球菌、油桐(*Aleurites fordii*)蛋白、石竹素蛋白、美洲商陆(*Phytolacca americana*)蛋白、美洲商陆抗病毒蛋白、苦瓜(*Momordica charantia*)抑制剂、泻果素、巴豆毒素、肥皂草(*Saponaire officinalis*)抑制剂、白树毒素、迈托毒素(mitogellin)、局限曲菌素、酚霉素、伊诺霉素、卡奇霉素或单端孢霉烯族毒素(tricothecenes)。在另一实施方式中,所述化疗剂是烷基化剂、蒽环类抗生素、细胞骨架扰乱剂、埃博霉素、拓扑异构酶I的抑制剂、拓扑异构酶II的抑制剂、核苷或核苷酸类似物、前体类似物、肽抗生素、铂基试剂、类视黄醇、长春花生物碱,或其衍生物。在另一实施方式中,所述化疗剂是放线菌素D、全反式视黄酸阿扎胞苷、阿霉素硫酸嘌呤、博来霉素、喜树碱、卡铂、卡培他滨、顺铂、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、阿糖胞苷、道诺红菌素、多西他赛、多西氟尿嘧啶、多柔比星、表阿霉素、埃博霉素、依托泊苷、氟尿嘧啶、5-氟尿嘧啶(5FU)、吉西他滨、羟基脲、过氧化氢、伊达比星、伊马替尼、双氯乙基甲胺、巯基嘌呤、甲氨蝶呤、丝裂霉素C、米托蒽醌、奥沙利铂、紫杉醇、培美曲塞、替尼泊苷、替尼泊苷、硫鸟嘌呤、戊柔比星、长春碱、长春新碱、长春碱酰胺或长春瑞宾。

[0022] 本发明的另一方面提供检测在其表面表达核仁素的细胞的方法,所述方法包括使所述细胞接触免疫结合所述核仁素的人抗体或其片段。在一种实施方式中,所述细胞是癌细胞,免疫细胞或在其表面表达核仁素的血管平滑肌细胞,在其表面表达核仁素的内皮细胞,或病毒感染细胞。在另一实施方式中,所述细胞是在其表面表达核仁素的癌前期细胞。在另一实施方式中,所述癌细胞选自下组:肺癌细胞、乳腺癌细胞、前列腺癌细胞、结肠癌细胞、胰腺癌细胞、肾细胞癌细胞、卵巢癌细胞、白血病细胞、黑色素瘤细胞、成胶质细胞瘤细胞、神经母细胞瘤细胞、肉瘤细胞和胃癌细胞。在另一实施方式中,所述免疫细胞是淋巴细胞、树突细胞、外周血单核细胞、巨噬细胞和神经胶质细胞。在另一实施方式中,所述细胞是免疫细胞。在另一实施方式中,所述免疫细胞是活化免疫细胞。在另一实施方式中,所述免疫细胞是活化B细胞。在另一实施方式中,所述免疫细胞是记忆B细胞。在另一实施方式中,所述免疫细胞是活化T细胞。在另一实施方式中,所述免疫细胞是活化CD4+T细胞。在另一实施方式中,所述免疫细胞是活化CD8+T细胞。在另一实施方式中,所述细胞是血管平滑肌细胞或内皮细胞。在另一实施方式中,所述抗体或其片段连接诊断剂。在另一实施方式中,所述诊断剂是放射性核素、荧光团、化学发光化合物、荧光化合物、量子点、纳米颗粒或酶。在另一实施方式中,所述细胞位于人类对象中,且所述接触包括将所述抗体或其片段给予所述对象。在另一实施方式中,所述细胞位于分离的组织样品或细胞悬液中。

[0023] 本发明的另一方面提供哺乳动物中癌症的治疗或预防方法,所述方法包括给予所述哺乳动物治疗有效量的抗核仁素试剂和药学上可接受的载体;其中所述抗核仁素试剂包括抗核仁素抗体或其片段,且当所述抗体或其片段与MCF-7细胞和人AB血清孵育48小时(例如,48、72或96小时),其杀死所述MCF-7细胞群体的至少10-100%(例如,10、20、30、40、50、60、70、80、90或100%)。在一种实施方式中,所述哺乳动物是人。在另一实施方式中,所述哺乳动物中治疗癌症包括治疗肿瘤缺氧。在另一实施方式中,所述哺乳动物中治疗癌症包括抑制肿瘤血管发生。在另一实施方式中,所述抗核仁素抗体或其片段对人基本无免疫原性。在另一实施方式中,所述抗核仁素抗体或其片段是人抗体或其片段。在另一实施方式中,所述抗核仁素单克隆抗体或其片段是单克隆抗体或其片段。在另一实施方式中,所述毒素是白喉毒素、外毒素A链、蓖麻毒素A链、相思豆毒素A链、蒴莲根毒素A链、 α 八叠球菌、油桐(*Aleurites fordii*)蛋白、石竹素蛋白、美洲商陆(*Phytolacca americana*)蛋白、美洲商陆抗病毒蛋白、苦瓜(*Momordica charantia*)抑制剂、泻果素、巴豆毒素、肥皂草(*Saponaire officinalis*)抑制剂、白树毒素、迈托毒素(mitogellin)、局限曲菌素、酚霉素、伊诺霉素、卡奇霉素或单端孢霉烯族毒素(tricothecenes)。在另一实施方式中,所述化疗剂是烷基化剂、蒽环类抗生素、细胞骨架扰乱剂、埃博霉素、拓扑异构酶I的抑制剂、拓扑异构酶II的抑制剂、核苷或核苷酸类似物、前体类似物、肽抗生素、铂基试剂、类视黄醇、长春花生物碱,或其衍生物。在另一实施方式中,所述化疗剂是放线菌素D、全反式视黄酸阿扎胞苷、阿霉素、硫唑嘌呤、博来霉素、喜树碱、卡铂、卡培他滨、顺铂、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、阿糖胞苷、道诺红菌素、多西他赛、多西氟尿嘧啶、多柔比星、表阿霉素、埃博霉素、依托泊苷、氟尿嘧啶、5-氟尿嘧啶(5FU)、吉西他滨、羟基脲、过氧化氢、伊达比星、伊马替尼、双氯乙基甲胺、巯基嘌呤、甲氨蝶呤、丝裂霉素C、米托蒽醌、奥沙利铂、紫杉醇、培美曲塞、替尼泊苷、替尼泊苷、硫鸟嘌呤、戊柔比星、长春碱、长春新碱、长春碱酰胺或长春瑞滨。

[0024] 本发明的另一方面提供哺乳动物中癌症的治疗或预防方法,所述方法包括给予所

述哺乳动物治疗有效量的抗核仁素抗体或其片段,毒素或化疗剂,以及药学上可接受的载体;且当所述抗体或其片段与MCF-7细胞和人AB血清孵育48小时(例如,48、72或96小时),其杀死所述MCF-7细胞群体的至少10-100%(例如,10、20、30、40、50、60、70、80、90或100%)。在一种实施方式中,所述哺乳动物是人。在另一实施方式中,所述哺乳动物中治疗癌症包括治疗肿瘤缺氧。在另一实施方式中,所述哺乳动物中治疗癌症包括抑制肿瘤血管发生。在另一实施方式中,所述抗核仁素抗体或其片段对人基本无免疫原性。在另一实施方式中,所述抗核仁素抗体或其片段是人抗体或其片段。在另一实施方式中,所述抗核仁素单克隆抗体或其片段是单克隆抗体或其片段。在另一实施方式中,所述毒素是白喉毒素、外毒素A链、蓖麻毒素A链、相思豆毒素A链、蒴莲根毒素A链、 α 八叠球菌、油桐蛋白、石竹素蛋白、美洲商陆蛋白、美洲商陆抗病毒蛋白、苦瓜抑制剂、泻果素、巴豆毒素、肥皂草抑制剂、白树毒素、迈托毒素、局限曲菌素、酚霉素、伊诺霉素、卡奇霉素或单端孢霉烯族毒素。在另一实施方式中,所述化疗剂是烷基化剂、蒽环类抗生素、细胞骨架扰乱剂、埃博霉素、拓扑异构酶I的抑制剂、拓扑异构酶II的抑制剂、核苷或核苷酸类似物、前体类似物、肽抗生素、铂基试剂、类视黄醇、长春花生物碱,或其衍生物。在另一实施方式中,所述化疗剂是放线菌素D、全反式视黄酸阿扎胞苷、阿霉素硫酸嘌呤、博来霉素、喜树碱、卡铂、卡培他滨、顺铂、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、阿糖胞苷、道诺红菌素、多西他赛、多西氟尿嘧啶、多柔比星、表阿霉素、埃博霉素、依托泊苷、氟尿嘧啶、5-氟尿嘧啶(5FU)、吉西他滨、羟基脲、过氧化氢、伊达比星、伊马替尼、双氯乙基甲胺、巯基嘌呤、甲氨蝶呤、丝裂霉素C、米托蒽醌、奥沙利铂、紫杉醇、培美曲塞、替尼泊苷、替尼泊苷、硫鸟嘌呤、戊柔比星、长春碱、长春新碱、长春碱酰胺或长春瑞宾。

[0025] 本发明的另一方面提供哺乳动物中癌症的治疗或预防方法,所述方法包括给予所述哺乳动物治疗有效量的抗核仁素抗体或其片段以及药学上可接受的载体,并用放射治疗进一步治疗处理所述哺乳动物,其中当所述抗体或其片段与MCF-7细胞和人AB血清孵育48小时(例如,48、72或96小时),其杀死所述MCF-7细胞群体的至少10-100%(例如,10、20、30、40、50、60、70、80、90或100%)。在一种实施方式中,所述哺乳动物是人。在另一实施方式中,所述哺乳动物中治疗癌症包括治疗肿瘤缺氧。在另一实施方式中,所述哺乳动物中治疗癌症包括抑制肿瘤血管发生。在另一实施方式中,所述抗核仁素抗体或其片段对人基本无免疫原性。在另一实施方式中,所述抗核仁素抗体或其片段是人抗体或其片段。在另一实施方式中,所述抗核仁素单克隆抗体或其片段是单克隆抗体或其片段。在另一实施方式中,所述毒素是白喉毒素、外毒素A链、蓖麻毒素A链、相思豆毒素A链、蒴莲根毒素A链、 α 八叠球菌、油桐蛋白、石竹素蛋白、美洲商陆蛋白、美洲商陆抗病毒蛋白、苦瓜抑制剂、泻果素、巴豆毒素、肥皂草抑制剂、白树毒素、迈托毒素、局限曲菌素、酚霉素、伊诺霉素、卡奇霉素或单端孢霉烯族毒素。在另一实施方式中,所述化疗剂是烷基化剂、蒽环类抗生素、细胞骨架扰乱剂、埃博霉素、拓扑异构酶I的抑制剂、拓扑异构酶II的抑制剂、核苷或核苷酸类似物、前体类似物、肽抗生素、铂基试剂、类视黄醇、长春花生物碱,或其衍生物。在另一实施方式中,所述化疗剂是放线菌素D、全反式视黄酸阿扎胞苷、阿霉素硫酸嘌呤、博来霉素、喜树碱、卡铂、卡培他滨、顺铂、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、阿糖胞苷、道诺红菌素、多西他赛、多西氟尿嘧啶、多柔比星、表阿霉素、埃博霉素、依托泊苷、氟尿嘧啶、5-氟尿嘧啶(5FU)、吉西他滨、羟基脲、过氧化氢、伊达比星、伊马替尼、双氯乙基甲胺、巯基嘌呤、甲氨蝶呤、丝裂霉素C、米托蒽醌、奥沙利铂、紫杉醇、培美曲塞、替尼泊苷、替尼泊苷、硫鸟嘌呤、戊柔比星、长春碱、长春新碱、长春碱酰胺或长春瑞宾。

酰胺或长春瑞宾。

[0026] 本发明的另一方面提供在哺乳动物中治疗或预防癌症的方法,所述方法包括给予所述哺乳动物治疗有效量的抗核仁素剂和药学上可接受的载体;其中所述抗核仁素剂包含特异性结合SEQ ID No.4所示蛋白的抗核仁素抗体或其片段。在一种实施方式中,所述哺乳动物是人。在另一实施方式中,所述哺乳动物中治疗癌症包括治疗肿瘤缺氧。在另一实施方式中,所述哺乳动物中治疗癌症包括抑制肿瘤血管发生。在另一实施方式中,所述抗核仁素抗体或其片段对人基本无免疫原性。在另一实施方式中,所述抗核仁素抗体或其片段是人抗体或其片段。在另一实施方式中,所述抗核仁素单克隆抗体或其片段是单克隆抗体或其片段。在另一实施方式中,所述毒素是白喉毒素、外毒素A链、蓖麻毒素A链、相思豆毒素A链、蒴莲根毒素A链、 α 八叠球菌、油桐蛋白、石竹素蛋白、美洲商陆蛋白、美洲商陆抗病毒蛋白、苦瓜抑制剂、泻果素、巴豆毒素、肥皂草抑制剂、白树毒素、迈托毒素、局限曲菌素、酚霉素、伊诺霉素、卡奇霉素或单端孢霉烯族毒素。在另一实施方式中,所述化疗剂是烷基化剂、蒽环类抗生素、细胞骨架扰乱剂、埃博霉素、拓扑异构酶I的抑制剂、拓扑异构酶II的抑制剂、核苷或核苷酸类似物、前体类似物、肽抗生素、铂基试剂、类视黄醇、长春花生物碱,或其衍生物。在另一实施方式中,所述化疗剂是放线菌素D、全反式视黄酸阿扎胞苷、阿霉素硫唑嘌呤、博来霉素、喜树碱、卡铂、卡培他滨、顺铂、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、阿糖胞苷、道诺红菌素、多西他赛、多西氟尿嘧啶、多柔比星、表阿霉素、埃博霉素、依托泊苷、氟尿嘧啶、5-氟尿嘧啶(5FU)、吉西他滨、羟基脲、过氧化氢、伊达比星、伊马替尼、双氯乙基甲胺、巯基嘌呤、甲氨蝶呤、丝裂霉素C、米托蒽醌、奥沙利铂、紫杉醇、培美曲塞、替尼泊苷、替尼泊苷、硫鸟嘌呤、戊柔比星、长春碱、长春新碱、长春碱酰胺或长春瑞宾。

[0027] 本发明的另一方面提供了在哺乳动物中治疗或预防癌症的方法,所述方法包括给予所述哺乳动物治疗有效量的抗核仁素抗体或其片段,毒素或化疗剂,以及药学上可接受的载体,其中所述抗体或其片段特异性结合SEQ IDNo.4所示蛋白。在一种实施方式中,所述哺乳动物是人。在另一实施方式中,所述哺乳动物中治疗癌症包括治疗肿瘤缺氧。在另一实施方式中,所述哺乳动物中治疗癌症包括抑制肿瘤血管发生。在另一实施方式中,所述抗核仁素抗体或其片段对人基本无免疫原性。在另一实施方式中,所述抗核仁素抗体或其片段是人抗体或其片段。在另一实施方式中,所述抗核仁素单克隆抗体或其片段是单克隆抗体或其片段。在另一实施方式中,所述毒素是白喉毒素、外毒素A链、蓖麻毒素A链、相思豆毒素A链、蒴莲根毒素A链、 α 八叠球菌、油桐蛋白、石竹素蛋白、美洲商陆蛋白、美洲商陆抗病毒蛋白、苦瓜抑制剂、泻果素、巴豆毒素、肥皂草抑制剂、白树毒素、迈托毒素、局限曲菌素、酚霉素、伊诺霉素、卡奇霉素或单端孢霉烯族毒素。在另一实施方式中,所述化疗剂是烷基化剂、蒽环类抗生素、细胞骨架扰乱剂、埃博霉素、拓扑异构酶I的抑制剂、拓扑异构酶II的抑制剂、核苷或核苷酸类似物、前体类似物、肽抗生素、铂基试剂、类视黄醇、长春花生物碱,或其衍生物。在另一实施方式中,所述化疗剂是放线菌素D、全反式视黄酸阿扎胞苷、阿霉素硫唑嘌呤、博来霉素、喜树碱、卡铂、卡培他滨、顺铂、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、阿糖胞苷、道诺红菌素、多西他赛、多西氟尿嘧啶、多柔比星、表阿霉素、埃博霉素、依托泊苷、氟尿嘧啶、5-氟尿嘧啶(5FU)、吉西他滨、羟基脲、过氧化氢、伊达比星、伊马替尼、双氯乙基甲胺、巯基嘌呤、甲氨蝶呤、丝裂霉素C、米托蒽醌、奥沙利铂、紫杉醇、培美曲塞、替尼泊苷、替尼泊苷、硫鸟嘌呤、戊柔比星、长春碱、长春新碱、长春碱酰胺或长春瑞宾。

[0028] 本发明的另一方面提供了在哺乳动物中治疗或预防癌症的方法,所述方法包括给予所述哺乳动物治疗有效量的抗核仁素抗体或其片段和药学上可接受的载体,其中所述抗体或其片段特异性结合SEQ ID No.4所示蛋白。在一种实施方式中,所述哺乳动物是人。在另一实施方式中,所述哺乳动物中治疗癌症包括治疗肿瘤缺氧。在另一实施方式中,所述哺乳动物中治疗癌症包括抑制肿瘤血管发生。在另一实施方式中,所述抗核仁素抗体或其片段对人基本无免疫原性。在另一实施方式中,所述抗核仁素抗体或其片段是人抗体或其片段。在另一实施方式中,所述抗核仁素单克隆抗体或其片段是单克隆抗体或其片段。在另一实施方式中,所述毒素是白喉毒素、外毒素A链、蓖麻毒素A链、相思豆毒素A链、蒴莲根毒素A链、 α 八叠球菌、油桐蛋白、石竹素蛋白、美洲商陆蛋白、美洲商陆抗病毒蛋白、苦瓜抑制剂、泻果素、巴豆毒素、肥皂草抑制剂、白树毒素、迈托毒素、局限曲菌素、酚霉素、伊诺霉素、卡奇霉素或单端孢霉烯族毒素。在另一实施方式中,所述化疗剂是烷基化剂、蒽环类抗生素、细胞骨架扰乱剂、埃博霉素、拓扑异构酶I的抑制剂、拓扑异构酶II的抑制剂、核苷或核苷酸类似物、前体类似物、肽抗生素、铂基试剂、类视黄醇、长春花生物碱,或其衍生物。在另一实施方式中,所述化疗剂是放线菌素D、全反式视黄酸阿扎胞苷、阿霉素硫酸嘌呤、博来霉素、喜树碱、卡铂、卡培他滨、顺铂、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、阿糖胞苷、道诺红菌素、多西他赛、多西氟尿嘧啶、多柔比星、表阿霉素、埃博霉素、依托泊苷、氟尿嘧啶、5-氟尿嘧啶(5FU)、吉西他滨、羟基脲、过氧化氢、伊达比星、伊马替尼、双氯乙基甲胺、巯基嘌呤、甲氨蝶呤、丝裂霉素C、米托蒽醌、奥沙利铂、紫杉醇、培美曲塞、替尼泊苷、替尼泊苷、硫鸟嘌呤、戊柔比星、长春碱、长春新碱、长春碱酰胺或长春瑞滨。

[0029] 本发明的另一方面提供哺乳动物中治疗自身免疫性疾病的方法,所述方法包括给予所述哺乳动物治疗有效量的抗核仁素试剂和药学上可接受的载体;其中所述抗核仁素试剂包括抗核仁素抗体或其片段,且当所述抗体或其片段与MCF-7细胞和人AB血清孵育48小时(例如,48、72或96小时),其杀死所述MCF-7细胞群体的至少10-100%(例如,10、20、30、40、50、60、70、80、90或100%)。在一种实施方式中,所述自身免疫性疾病是斑秃、强直性脊柱炎、抗磷脂综合征(antiphospholipid syndrome)、自身免疫性艾迪森病、哮喘、肾上腺的自身免疫病、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫肝炎、自身免疫性卵巢炎和睾丸炎、自身免疫性血小板减少、贝切特综合征、大疱型类天疱疮、心肌病、口炎性腹泻-皮炎、慢性疲劳免疫功能障碍综合征(CFIDS)、慢性炎症性脱髓鞘多神经病、丘-施二氏综合征、疤痕性类天疱疮、CREST综合征、冷凝集素病、克罗恩氏病、盘状狼疮、特发性混合型冷球蛋白血症、糖尿病(例如I型)、嗜酸细胞性筋膜炎(eosinophilic fasciitis)、纤维肌痛-纤维肌炎、肾小球肾炎、格拉夫斯病、格-巴二氏综合征、桥本甲状腺炎、亨-舍二氏紫癜、特发性肺纤维化、特发性/自身免疫血小板减少性紫癜(ITP)、IgA神经病、青少年关节炎、扁平苔藓、红斑狼疮、美尼尔综合征、混合型结缔组织病、多发性硬化、1型或免疫介导的糖尿病、重症肌无力、天疱疮相关疾病(如寻常性天疱疮)、骨髓增生异常综合征、恶性贫血、结节性多动脉炎、多软骨炎(polychondritis)、多腺体综合征、风湿性多肌痛、多肌炎和皮肌炎、原发性丙种球蛋白缺乏症、原发性胆汁性肝硬化、牛皮癣、牛皮癣关节炎、雷氏现象(Raynaud's phenomenon)、莱特尔综合征、类风湿性关节炎、结节病、硬皮病、斯耶格伦综合征、全身肌强直综合征、系统性红斑狼疮(SLE)、斯维特综合征、斯提耳病、红斑狼疮、高安动脉炎、暂时性动脉炎/巨细胞动脉炎、溃疡性结肠炎、葡萄膜炎、血管炎如疱疹样皮炎血管炎、白癜风和韦格纳肉芽肿

病。炎性疾病的例子包括但不限于：哮喘、脑炎、炎性肠病、慢性阻塞性肺病 (COPD)、变应性疾病、感染性休克、肺纤维化、未分化脊椎关节病变、未分化关节病、关节炎、骨溶解炎症、移植物抗宿主病、荨麻疹或VKH综合征 (Vogt-Koyanagi-Hareda syndrome)。在另一实施方式中，所述哺乳动物是人。在另一实施方式中，所述抗核仁素抗体或其片段对人基本无免疫原性。在另一实施方式中，所述抗核仁素抗体或其片段是人抗体或其片段。在另一实施方式中，所述抗核仁素抗体或其片段是单克隆抗体或其片段。

[0030] 本发明的另一方面提供在哺乳动物中治疗自身免疫性疾病的方法，所述方法包括给予所述哺乳动物治疗有效量的抗核仁素剂和药学上可接受载体；其中所述抗核仁素剂包含特异性结合SEQ ID No.2所示蛋白的人抗核仁素抗体或其片段。在一种实施方式中，所述自身免疫性疾病是斑秃、强直性脊柱炎、抗磷脂综合征、自身免疫性艾迪森病、哮喘、肾上腺的自身免疫病、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫肝炎、自身免疫性卵巢炎和睾丸炎、自身免疫性血小板减少、贝切特综合征、大疱型类天疱疮、心肌病、口炎性腹泻-皮炎、慢性疲劳免疫功能障碍综合征、慢性炎性脱髓鞘多神经病、丘-施二氏综合征、疤痕性类天疱疮、CREST综合征、冷凝集素病、克罗恩氏病、盘状狼疮、特发性混合型冷球蛋白血症、糖尿病 (例如I型)、嗜酸性细胞性筋膜炎、纤维肌痛-纤维肌炎、肾小球肾炎、格拉夫斯病、格-巴二氏综合征、桥本甲状腺炎、亨-舍二氏紫癜、特发性肺纤维化、特发性/自身免疫血小板减少性紫癜 (ITP)、IgA神经病、青少年关节炎、扁平苔藓、红斑狼疮、美尼尔综合征、混合型结缔组织病、多发性硬化、1型或免疫介导的糖尿病、重症肌无力、天疱疮相关疾病 (如寻常性天疱疮)、骨髓增生异常综合征、恶性贫血、结节性多动脉炎、多软骨炎、多腺体综合征、风湿性多肌痛、多肌炎和皮肌炎、原发性丙种球蛋白缺乏症、原发性胆汁性肝硬化、牛皮癣、牛皮癣关节炎、雷氏现象、莱特尔综合征、类风湿性关节炎、结节病、硬皮病、斯耶格伦综合征、全身肌强直综合征、系统性红斑狼疮 (SLE)、斯维特综合征、斯提耳病、红斑狼疮、高安动脉炎、暂时性动脉炎/巨细胞动脉炎、溃疡性结肠炎、葡萄膜炎、血管炎如疱疹样皮炎血管炎、白癜风和韦格纳肉芽肿病。炎性疾病的例子包括但不限于：哮喘、脑炎、炎性肠病、慢性阻塞性肺病 (COPD)、变应性疾病、感染性休克、肺纤维化、未分化脊椎关节病变、未分化关节病、关节炎、骨溶解炎症、移植物抗宿主病、荨麻疹或VKH综合征。在另一实施方式中，所述哺乳动物是人。在另一实施方式中，所述抗核仁素抗体或其片段对人基本无免疫原性。在另一实施方式中，所述抗核仁素抗体或其片段是人抗体或其片段。在另一实施方式中，所述抗核仁素抗体或其片段是单克隆抗体或其片段。

[0031] 本发明的另一方面提供在哺乳动物中治疗自身免疫性疾病的方法，所述方法包括给予所述哺乳动物治疗有效量的抗核仁素剂和药学上可接受载体；其中所述抗核仁素剂包含特异性结合SEQ ID No.4所示蛋白的抗核仁素抗体或其片段。在一种实施方式中，所述自身免疫性疾病是斑秃、强直性脊柱炎、抗磷脂综合征、自身免疫性艾迪森病、哮喘、肾上腺的自身免疫病、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫肝炎、自身免疫性卵巢炎和睾丸炎、自身免疫性血小板减少、贝切特综合征、大疱型类天疱疮、心肌病、口炎性腹泻-皮炎、慢性疲劳免疫功能障碍综合征、慢性炎性脱髓鞘多神经病、丘-施二氏综合征、疤痕性类天疱疮、CREST综合征、冷凝集素病、克罗恩氏病、盘状狼疮、特发性混合型冷球蛋白血症、糖尿病 (例如I型)、嗜酸性细胞性筋膜炎、纤维肌痛-纤维肌炎、肾小球肾炎、格拉夫斯病、格-巴二氏综合征、桥本甲状腺炎、亨-舍二氏紫癜、特发性肺纤维化、特发性/自身免疫血小板减少性紫癜

(ITP)、IgA神经病、青少年关节炎、扁平苔藓、红斑狼疮、美尼尔综合征、混合型结缔组织病、多发性硬化、1型或免疫介导的糖尿病、重症肌无力、天疱疮相关疾病(如寻常性天疱疮)、骨髓增生异常综合征、恶性贫血、结节性多动脉炎、多软骨炎、多腺体综合征、风湿性多肌痛、多肌炎和皮肌炎、原发性丙种球蛋白缺乏症、原发性胆汁性肝硬化、牛皮癣、牛皮癣关节炎、雷氏现象、莱特尔综合征、类风湿性关节炎、结节病、硬皮病、斯耶格伦综合征、全身肌强直综合征、系统性红斑狼疮、斯维特综合征、斯提耳病、红斑狼疮、高安动脉炎、暂时性动脉炎/巨细胞动脉炎、溃疡性结肠炎、葡萄膜炎、血管炎如疱疹样皮炎血管炎、白癜风和韦格纳肉芽肿病。炎性疾病的例子包括但不限于：哮喘、脑炎、炎性肠病、慢性阻塞性肺病、变应性疾病、感染性休克、肺纤维化、未分化脊椎关节病变、未分化关节病、关节炎、骨溶解炎症、移植抗宿主病、荨麻疹或VKH综合征。在另一实施方式中，所述哺乳动物是人。在另一实施方式中，所述抗核仁素抗体或其片段对人基本无免疫原性。在另一实施方式中，所述抗核仁素抗体或其片段是人抗体或其片段。在另一实施方式中，所述抗核仁素抗体或其片段是单克隆抗体或其片段。

[0032] 本发明的另一方面提供哺乳动物中治疗气道疾病的方法，所述方法包括给予所述哺乳动物治疗有效量的抗核仁素试剂和药学上可接受的载体；其中所述抗核仁素试剂包括抗核仁素抗体或其片段，且当所述抗体或其片段与MCF-7细胞和人AB血清孵育48小时(48、72或96小时)，其杀死所述MCF-7细胞群体的至少10-100% (10、20、30、40、50、60、70、80、90、100%)。在另一实施方式中，所述气道基本是哮喘、慢性阻塞性肺病、特发性肺纤维变性、或肺炎。在另一实施方式中，所述哺乳动物是人。在另一实施方式中，所述抗核仁素抗体或其片段对人基本无免疫原性。在另一实施方式中，所述抗核仁素抗体或其片段是人抗体或其片段。在另一实施方式中，所述抗核仁素抗体或其片段是人抗体或其片段。在另一实施方式中，所述抗核仁素抗体或其片段是单克隆抗体或其片段。

[0033] 本发明的另一方面提供在哺乳动物中治疗气道疾病的方法，所述方法包括给予所述哺乳动物治疗有效量的抗核仁素剂和药学上可接受的载体；其中所述抗核仁素剂包含特异性结合SEQ ID No.2所示蛋白的人抗核仁素抗体或其片段。在另一实施方式中，所述气道基本是哮喘、慢性阻塞性肺病、特发性肺纤维变性、或肺炎。在另一实施方式中，所述哺乳动物是人。在另一实施方式中，所述抗核仁素抗体或其片段对人基本无免疫原性。在另一实施方式中，所述抗核仁素抗体或其片段是人抗体或其片段。在另一实施方式中，所述抗核仁素抗体或其片段是人抗体或其片段。在另一实施方式中，所述抗核仁素抗体或其片段是单克隆抗体或其片段。

[0034] 本发明的另一方面提供在哺乳动物中治疗气道疾病的方法，所述方法包括给予所述哺乳动物治疗有效量的抗核仁素剂和药学上可接受的载体；其中所述抗核仁素剂包含特异性结合SEQ ID No.4所示蛋白的抗核仁素抗体或其片段。在另一实施方式中，所述气道基本是哮喘、慢性阻塞性肺病、特发性肺纤维变性、或肺炎。在另一实施方式中，所述哺乳动物是人。在另一实施方式中，所述抗核仁素抗体或其片段对人基本无免疫原性。在另一实施方式中，所述抗核仁素抗体或其片段是人抗体或其片段。在另一实施方式中，所述抗核仁素抗体或其片段是人抗体或其片段。在另一实施方式中，所述抗核仁素抗体或其片段是单克隆抗体或其片段。

[0035] 本发明的另一方面提供哺乳动物中治疗病毒感染细胞的方法，所述方法包括给予

所述哺乳动物治疗有效量的抗核仁素试剂和药学上可接受的载体；其中所述抗核仁素试剂包括抗核仁素抗体或其片段，且当所述抗体或其片段与MCF-7细胞和人AB血清孵育48小时，其杀死所述MCF-7细胞群体的至少20%。在另一实施方式中，所述病毒感染细胞感染了HIV病毒。在另一实施方式中，所述哺乳动物是人。在另一实施方式中，所述抗核仁素单克隆抗体或其片段对人基本无免疫原性。在另一实施方式中，所述抗核仁素抗体或其片段是人抗体或其片段。在另一实施方式中，所述抗核仁素抗体或其片段是单克隆抗体或其片段。

[0036] 本发明的另一方面提供在哺乳动物中治疗病毒感染细胞的方法，所述方法包括给予所述哺乳动物治疗有效量的抗核仁素剂和药学上可接受的载体；其中所述抗核仁素剂包含特异性结合SEQ ID No.2所示蛋白的人抗核仁素抗体或其片段。在另一实施方式中，所述病毒感染细胞感染了HIV病毒。在另一实施方式中，所述哺乳动物是人。在另一实施方式中，所述抗核仁素单克隆抗体或其片段对人基本无免疫原性。在另一实施方式中，所述抗核仁素抗体或其片段是人抗体或其片段。在另一实施方式中，所述抗核仁素抗体或其片段是单克隆抗体或其片段。

[0037] 本发明的另一方面提供在哺乳动物中治疗病毒感染细胞的方法，所述方法包括给予所述哺乳动物治疗有效量的抗核仁素剂和药学上可接受的载体；其中所述抗核仁素剂包含特异性结合SEQ ID No.4所示蛋白的抗核仁素抗体或其片段。在另一实施方式中，所述病毒感染细胞感染了HIV病毒。在另一实施方式中，所述哺乳动物是人。在另一实施方式中，所述抗核仁素单克隆抗体或其片段对人基本无免疫原性。在另一实施方式中，所述抗核仁素抗体或其片段是人抗体或其片段。在另一实施方式中，所述抗核仁素抗体或其片段是单克隆抗体或其片段。

[0038] 本发明的另一方面提供哺乳动物中治疗或预防非癌病症或疾病的方法，所述病症或疾病的特征为核仁素的表面表达增加，所述方法包括给予所述哺乳动物治疗有效量的抗核仁素试剂和药学上可接受的载体；其中所述抗核仁素试剂包含抗核仁素抗体或其片段，且当所述抗体或其片段与MCF-7细胞和人AB血清孵育48小时（48、72或96小时），其杀死所述MCF-7细胞群体的至少10-100%（例如，10、20、30、40、50、60、70、80、90或100%）。在一种实施方式中，以核仁素表面表达增加为特征的哺乳动物中所述病症或疾病是黄斑变性、糖尿病性视网膜病或炎性疾病。在另一实施方式中，所述哺乳动物是人。在另一实施方式中，所述抗核仁素单克隆抗体或其片段对人基本无免疫原性。在另一实施方式中，所述抗核仁素抗体或其片段是人抗体或其片段。在另一实施方式中，所述抗核仁素抗体或其片段是单克隆抗体或其片段。

[0039] 本发明的另一方面提供在哺乳动物中治疗或预防非癌病症或疾病的方法，所述病症或疾病的特征为核仁素的表面表达增加，所述方法包括给予所述哺乳动物治疗有效量的抗核仁素剂和药学上可接受的载体；其中所述抗核仁素剂包含特异性结合SEQ ID No.2所示蛋白的人抗核仁素抗体或其片段。在一种实施方式中，以核仁素表面表达增加为特征的哺乳动物中所述病症或疾病是黄斑变性、糖尿病性视网膜病或炎性疾病。在另一实施方式中，所述哺乳动物是人。在另一实施方式中，所述抗核仁素单克隆抗体或其片段对人基本无免疫原性。在另一实施方式中，所述抗核仁素抗体或其片段是人抗体或其片段。在另一实施方式中，所述抗核仁素抗体或其片段是单克隆抗体或其片段。

[0040] 本发明的另一方面提供在哺乳动物中治疗或预防非癌病症或疾病的方法，所述病

症或疾病的特征为核仁素的表面表达增加,所述方法包括给予所述哺乳动物治疗有效量的抗核仁素剂和药学上可接受的载体;其中所述抗核仁素剂包含特异性结合SEQ ID No.4所示蛋白的抗核仁素抗体或其片段。在一种实施方式中,以核仁素表面表达增加为特征的哺乳动物中所述病症或疾病是黄斑变性、糖尿病性视网膜病或炎性疾病。在另一实施方式中,所述哺乳动物是人。在另一实施方式中,所述抗核仁素单克隆抗体或其片段对人基本无免疫原性。在另一实施方式中,所述抗核仁素抗体或其片段是人抗体或其片段。在另一实施方式中,所述抗核仁素抗体或其片段是单克隆抗体或其片段。

[0041] 本发明的另一方面提供当与MCF-7细胞和人AB血清孵育48小时,能杀死MCF-7细胞群体的至少50%的抗核仁素剂。在另一实施方式中,所述抗核仁素剂对人基本无免疫原性。

[0042] 本发明的另一方面提供当与MCF-7细胞和MCF10A细胞及热灭活血清孵育72或96小时,所杀死的MCF-7细胞超过所杀死的MCF10A细胞的抗核仁素剂。在另一实施方式中,所述抗核仁素剂对人基本无免疫原性。

[0043] 本发明的另一方面提供当与MCF-7细胞和MCF10A细胞及人AB血清孵育96小时,所杀死的MCF-7细胞超过所杀死的MCF10A细胞的抗核仁素剂。在另一实施方式中,所述抗核仁素剂对人基本无免疫原性。

[0044] 本发明的另一方面提供能特异性结合SEQ ID No.4所示蛋白并抑制或杀死在其细胞表面表达核仁素的一种或多种癌细胞的抗核仁素剂。在另一实施方式中,所述抗核仁素剂对人基本无免疫原性。

[0045] 本发明的另一方面提供通过检测一种或多种癌前细胞中细胞表面核仁素表达来确定对象患癌可能性的方法。

[0046] 本发明的另一方面提供前述权利要求中任一项所述的抗体,其中,所述抗体片段为Fab、Fab'、F(ab')₂或Fv片段;双价抗体;线性抗体;单链抗体;或由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0047] 本发明的另一方面提供前述权利要求中任一项所述的方法,其中,所述方法包括使用抗体片段,其中所述抗体片段为Fab、Fab'、F(ab')₂或Fv片段;双价抗体;线性抗体;单链抗体;或由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0048] 附图简要说明

[0049] 下列附图构成本说明书的一部分并纳入其中以进一步说明本发明的某些方面。可参照这些附图中的一幅或者多幅并结合本文提供的具体实施方式的详述来更好地理解本发明。

[0050] 图1. CLL细胞相对正常B细胞的核仁素和Bcl-2蛋白过量表达。通过密度梯度离心从CLL患者和健康志愿者分离得到外周血淋巴细胞,并用磁激活细胞分选(MACS) CD19免疫磁珠通过正向选择纯化B细胞。通过蛋白印迹法测定细胞的S10提取物中核仁素和Bcl-2蛋白水平。结果相对用已知量核仁素和Bcl-2蛋白外标所得数值标准化。沿X轴的标记N和C分别指明来自个体对象的正常B细胞和CLL细胞。N=来自健康志愿者的CD19+B细胞;C=CD19+CLL细胞。

[0051] 图2A-B. CLL相对正常B细胞和MCF-7相对MCF-10A细胞的核仁素亚细胞定位。核仁素的胞内定位利用小鼠抗人核仁素mAb和FITC-偶联抗小鼠IgG二抗通过间接免疫荧光测定。核用碘化丙锭复染。图2A显示CLL和正常B细胞间的比较。图2B显示MCF-7和MCF-10A细胞

间的比较。

[0052] 图3.MCF-7和MCF-10A细胞内核仁素的亚细胞定位。核仁素的胞内定位利用针对人核仁素的单克隆抗体和FITC-偶联抗小鼠IgG二抗通过间接免疫荧光测定。核用碘化丙锭复染。细胞形态显示为DIC图像。结果为三次单独实验的代表性结果。

[0053] 图4.用抗核仁素抗体对AML-M1患者的骨髓活组织检查(品红染色)显示强烈的核染色。散布的非白血病骨髓元素为阴性(暗蓝色复染)或仅显示核发红。放大倍数为40X。

[0054] 图5A-B.人AML移入小鼠的脾切片和人乳腺癌细胞中的核仁素过量表达。(图5A)小鼠脾中存在两种明确的结节状人白血病浸润。所述白血病浸润为核仁素阳性(品红免疫染色)。周围小鼠脾淋巴细胞为核仁素免疫染色阴性(蓝色复染)。放大倍数为40X。(图5B)含50例石蜡包埋福尔马林固定的人乳腺肿瘤和相邻正常组织的组织阵列(Biomax BR1006)用抗核仁素MabMS3(圣克鲁兹公司(Santa Cruz),1:100)染色,采用Vectastain小鼠试剂盒、DAB底物,并以苏木精复染。代表性情况在Olympus CKX41上以100x放大倍数成像。

[0055] 图6.CLL和正常B细胞中bc1-2hnRNA和bc1-2mRNA的相对表达水平。用RT-PCR测定来自4名CLL患者的CLL细胞和来自4名健康志愿者的正常B细胞中的bc12hnRNA和bc12mRNA水平。结果表示为每组4个测定的均值SEM。*表示与正常B细胞相比 $P<0.001$ 。

[0056] 图7.CLL和正常B细胞的提取物中bc1-2mRNA的衰减。5'-加帽且多腺苷酸化的 $[^{32}\text{P}]$ bc1-2-CR RNA和 $[^{32}\text{P}]$ bc1-2-CR-ARE RNA和由来自4名患者的CLL细胞或来自3名人志愿者的正常B细胞制备的S100提取物一起孵育。在标明的时间取反应化合物的等分试样并通过PAGE和磷成像分析。结果表示为剩余全长RNA平均百分数 $\pm$ SEM与时间的函数。符号:-○-,CLL细胞提取物+ $[^{32}\text{P}]$ bc1-2-CR RNA;-●-,CLL细胞提取物+ $[^{32}\text{P}]$ bc1-2-CR-ARE RNA;-□-,正常B细胞提取物+ $[^{32}\text{P}]$ bc1-2-CR RNA;-■-,正常B细胞提取物+ $[^{32}\text{P}]$ bc1-2-CR-ARE RNA;-▲-,正常细胞提取物+ $[^{32}\text{P}]$ bc1-2-CR-ARE RNA+280nM纯化重组核仁素。

[0057] 图8.体外生产人mAb。分离出扁桃体B细胞并用EBV有效永生化,然后诱导分化成产抗体细胞。将永生化B细胞库接种入多孔板,然后筛选含IgG细胞上清液与重组核仁素的结合。将反应细胞通过有限稀释克隆、扩增,并从培养上清液纯化IgG。将Ig基因亚克隆入生产细胞系用于重组IgG大型生产。参见PCT/US2008/072124。

[0058] 图9A-B.扁桃体B细胞库中的有效EBV感染和诱导分化。(图9A)用GFP标记EBV(EBfaV-GFP)感染24小时后的扁桃体B细胞的流式细胞分析,比较常规上清液感染后的对照(上图)或用浓缩病毒离心感染后的细胞(下图)。GFP荧光表示感染。(图9B)四种B95-8EBV永生化扁桃体B细胞库加或不加抗-IgM F(ab')₂、重组可溶性CD40L和Baff培养。5天(上图)或15天(下图)后通过ELISA分析细胞上清液的IgM和IgG。

[0059] 图10A-B.8种产核仁素特异性人抗体的永生化B细胞系的分离。(图10A)通过ELISA筛选从6株产抗核仁素抗体的人B细胞系所得培养上清液与重组 Δ 1-283Nuc-(His)₆核仁素(缺少1-283位N-末端氨基酸的核仁素)的结合,采用HRP标记的羊抗人IgG和发色底物来检测。通过450nm的分光光度法测定结合。将结果与用含人抗-HA IgG或小鼠抗核仁素MS3的培养上清液所得结果比较。(图10B)通过有限稀释克隆对8株产抗核仁素抗体的B细胞系的亚克隆。3周后,各96孔板的不足10%孔含有小的单克隆集落,然后通过ELISA检测其与上述重组核仁素的结合。通过测定450nm的吸光度评估孔中的核仁素结合。

[0060] 图11.人抗核仁素抗体的分离。通过ELISA(上图)和蛋白印迹法(下图)筛选来自永

生化人B细胞库的上清液与重组 Δ 1-283Nuc- (His) 6核仁素和/或由MV411白血病细胞分离所得内源核仁素的IgG结合。

[0061] 图12. HuMAb与细胞表面核仁素的结合与对MV4-11白血病细胞的细胞毒性。(图12A) 将抗核仁素HuMAb或Rituxan^R (5 μ g/ml) 与MV4-11或正常扁桃体细胞一起冰上孵育30分钟, 清洗, 然后与APC标记的抗人IgG (美天旎公司 (Miltenyi)) 一起孵育。在FACSCaliber上进行流式细胞术, 显示中位荧光强度 (MFI)。

[0062] 图13. 补体介导杀死MV4-11。将从产抗体B细胞系所得上清液与MV411细胞一起 (50% v/v) 在人血清的存在下 (25% v/v) 孵育16小时。对照用星形孢菌素 (25 μ M) 或培养基 (未处理) 处理。然后用碘化丙锭和膜联蛋白V-FITC染色细胞, 并用流式细胞术分析。

[0063] 图14A-C. MCF-7和MV4-11AML细胞的核仁素特异性杀死通过补体依赖性和非依赖性机制发生。(图14A) MCF-7细胞与抗核仁素HuMAb (2 μ g/ml) 一起在人AB血清 (+补体) 或热灭活血清 (-补体) 的存在下孵育。在48-96小时, 通过MTS试验测定活力。(图14B) MCF-7和MCF10A细胞与抗核仁素HuMAb (2 μ g/ml, 上图; 或1mg/ml, 下图) 或AS1411 (20 μ M) 一起在人AB血清 (+补体) 或热灭活血清 (-补体) 的存在下孵育。通过MTS试验在72小时 (上图) 和96小时 (下图) 测定活力。(图14C) MV4-11细胞与抗核仁素HuMAb (2 μ g/ml) 或AS1411 (20 μ M) 一起在人AB血清 (+补体) 或热灭活血清 (-补体) 的存在下孵育。在48-96小时, 通过MTS试验测定活力。

具体实施方式

[0064] 本发明提供特异性结合人核仁素的人单克隆抗体及其使用方法。这些抗体针对在质膜中表达人核仁素的细胞如参与癌症、自身免疫性疾病、病毒性疾病的细胞显示细胞毒性。因此, 所述抗体具有对某些形式的癌症和自身免疫性疾病的治疗潜力, 并可用作诊断剂。

[0065] I. 核仁素

[0066] A. 概述

[0067] 核仁素是能结合DNA、RNA和质膜外表面的多功能蛋白。核仁素在胞内进行多种多样功能的能力与所述蛋白质内的多个结构域相关。其带负电的N-末端结构域通过诱导核仁染色质解凝缩作用调节rDNA转录 (Srivastava等, 1989), 而中央球形结构域含有4个RNA结合域 (RBD) (Serin等, 1997)。已提出核仁素凭借其RBD及其富含RGG的C-末端结构域与前核糖体RNA的结合通过将正确折叠的rRNA和rRNA成熟与核糖体装配的其它必需组件汇集到一起而起到装配因子的作用 (Ginisty等, 2001)。核仁素也可在细胞质与核之间穿梭时参与核糖体向细胞质的输出 (Srivastava和Pollard, 1999)。表1列出了所述核仁素的基因编码和蛋白质序列。

[0068] 表1-核仁素序列

[0069]

SEQ ID NO:	身份	序列
1	人核仁素 编码序列 登 录 号 NM_0053 81 XM_0023 42275	CTTTCGCCTCAGTCTCGAGCTCTCGCTGGCCTTCGGGTGTA CGTGCTCCGGGATCTTCAGCACCCGCGGCCGCCATCGCCGT CGCTTGGCTTCTTCTGGACTCATCTGCGCCACTTGTCCGCT TCACACTCCGCCGCCATCATGGTGAAGCTCGCGAAGGCAGG TAAAAATCAAGGTGACCCCAAGAAAATGGCTCCTCCTCCAA AGGAGGTAGAAGAAGATAGTGAAGATGAGGAAATGTCAGAA GATGAAGAAGATGATAGCAGTGGAGAAGAGGTCGTCATACC TCAGAAGAAAGGCAAGAAGGCTGCTGCAACCTCAGCAAAGA AGGTGGTCGTTTCCCCAACAAAAAGGTTGCAGTTGCCACA CCAGCCAAGAAAGCAGCTGTCACTCCAGGCAAAAAGGCAGC AGCAACACCTGCCAAGAAGACAGTTACACCAGCCAAAGCAG TTACCACACCTGGCAAGAAGGGAGCCACACCAGGCAAAGCA TTGGTAGCAACTCCTGGTAAGAAGGGTGCTGCCATCCCAGC CAAGGGGGGCAAAGAATGGCAAGAATGCCAAGAAGGAAGACA GTGATGAAGAGGAGGATGATGACAGTGAGGAGGATGAGGAG GATGACGAGGACGAGGATGAGGATGAAGATGAAATTGAACC AGCAGCGATGAAAGCAGCAGCTGCTGCCCCCTGCCTCAGAGG ATGAGGACGATGAGGATGACGAAGATGATGAGGATGACGAT GACGATGAGGAAGATGACTCTGAAGAAGAAGCTATGGAGAC TACACCAGCCAAAGGAAAAGAAAGCTGCAAAAGTTGTTCTTG TGAAAGCCAAGAACGTGGCTGAGGATGAAGATGAAGAAGAG GATGATGAGGACGAGGATGACGACGACGACGAAGATGATGA AGATGATGATGATGAAGATGATGAGGAGGAGGAAGAAGAGG AGGAGGAAGAGCCTGTCAAAGAAGCACCTGGAAAACGAAAG AAGGAAATGGCCAAACAGAAAGCAGCTCCTGAAGCCAAGAA ACAGAAAGTGGAAGGCACAGAACCGACTACGGCTTTCAATC TCTTTGTTGGAAACCTAAACTTTAACAATCTGCTCCTGAA TTAAAACTGGTATCAGCGATGTTTTTGCTAAAAATGATCT TGCTGTTGTGGATGTCAGAATTGGTATGACTAGGAAATTTG GTTATGTGGATTTTGAATCTGCTGAAGACCTGGAGAAAGCG TTGGAACTCACTGGTTTGAAGTCTTTGGCAATGAAATTAA ACTAGAGAAACCAAAAGGAAAAGACAGTAAGAAAGAGCGAG ATGCGAGAACACTTTTGGCTAAAAATCTCCCTTACAAAGTC

[0070]

		ACTCAGGATGAATTGAAAGAAGTGTTTGAAGATGCTGCGGA GATCAGATTAGTCAGCAAGGATGGGAAAAGTAAAGGGATTG CTTATATTGAATTTAAGACAGAAGCTGATGCAGAGAAAACC TTTGAAGAAAAGCAGGGAACAGAGATCGATGGGCGATCTAT TTCCCTGTACTATACTGGAGAGAAAGGTCAAAATCAAGACT ATAGAGGTGGAAAGAATAGCACTTGGAGTGGTGAATCAAAA ACTCTGGTTTTAAGCAACCTCTCCTACAGTGCAACAGAAGA AACTCTTCAGGAAGTATTTGAGAAAGCAACTTTTATCAAAG TACCCCAAGAACCAAAATGGCAAATCTAAAGGGTATGCATTT ATAGAGTTTGCTTCATTCGAAGACGCTAAAGAAGCTTTAAA TTCCTGTAATAAAAGGGAAATTGAGGGCAGAGCAATCAGGC TGGAGTTGCAAGGACCCAGGGGATCACCTAATGCCAGAAGC CAGCCATCCAAAACCTCTGTTTGTCAAAGGCCTGTCTGAGGA TACCACTGAAGAGACATTAAAGGAGTCATTTGACGGCTCCG TTCGGGCAAGGATAGTTACTGACCGGGAAACTGGGTCTCTCC AAAGGGTTTTGGTTTTGTAGACTTCAACAGTGAGGAGGATGC CAAAGCTGCCAAGGAGGCCATGGAAGACGGTGAAATTGATG GAAATAAAGTTACCTTGGACTGGGCCAAACCTAAGGGTGAA GGTGGCTTCGGGGGTCGTGGTGGAGGCAGAGGCGGCTTTGG AGGACGAGGTGGTGGTAGAGGAGGCCGAGGAGGATTTGGTG GCAGAGGCCGGGGAGGCTTTGGAGGGCGAGGAGGCTTCCGA GGAGGCAGAGGAGGAGGAGGTGACCACAAGCCACAAGGAAA GAAGACGAAGTTTGAATAGCTTCTGTCCCTCTGCTTTCCCT TTTCCATTTGAAAGAAAGGACTCTGGGGTTTTTTACTGTTAC CTGATCAATGACAGAGCCTTCTGAGGACATTCCAAGACAGT ATACAGTCCTGTGGTCTCCTTGGAAATCCGTCTAGTTAACA TTTCAAGGGCAATACCGTGTTGGTTTTTGACTGGATATTCAT ATAAACTTTTTTAAAGAGTTGAGTGATAGAGCTAACCCTTAT CTGTAAGTTTTGAATTTATATTGTTTCATCCCATGTACAAA ACCATTTTTTCTACAAATAGTTTGGGTTTTGTTGTTGTTT CTTTTTTTTGTTTTGTTTTGTTTTTTTTTTTTTTTGCCTTC GTGGGGTTGTAAAAGAAAAGAAAGCAGAATGTTTTATCATG GTTTTTGCTTCAGCGGCTTTAGGACAAAATTAAGTCAACT CTGGTGCCAGAAAAA
2	人核仁素 全长氨基 酸序列 登 录 号 NP_0053 72 XP_0023 42316	MVKLAKAGKNQGDPKKMAPPPKEVEEDSEDEEMSEDEEDDS SGEEVVIPOKKGKAAATSARKVVSPTKKVAVATPAKKA VTPGKKAATPAKKTVTPAKAVTTPGKKGATPGKALVATPG KKGAAIPAKGAKNGKNAKKEDSDEEEDDDSEDEEDEDDED EDEDEIEPAAMKAAAAAPASEDEDEDDEDDEDDDDDEEDD SEEEAMETTPAKGKKAQVVPVKAKNVAEDEDEEEDDEDDED DDDDEDDEDDEDDEDEEEEEEEEEEPVKEAPGKRKKEMAKQ KAAPEAKKQKVEGTEPTTAFNLFVGNLNFNKSAPELKTGIS DVFAKNDLAVVDVRIGMTRKFGYVDFESAEDLEKALELTGL KVFGNEIKLEKPKGKDSKKERDARTLLAKNLPYKVTQDELK EVFEDAAEIRLVSKDGKSKGIAYIEFKTEADAETFEKQG TEIDGRSISLYYTGEKGQNDYRGGKNSTWSGESKTLVLSN LSYSATEETLQEVFEKATFIKVPQNQNGKSKGYAFIEFASF EDAKEALNSCNKREIEGRAIRLELQGRGSPNARSQPSKTL FVKGLSEDTEETLKESEFDGSVRARIVTDRETGSSKGFV DFNSEEDAKAAKEAMEDGEIDGNKVTLDWAKPKGEGGFGR GGGRGFGGRGGGRGGRGFGGRGRGGFGGRGGFRGGGGG GDHKPQGGKTKFE
3	缺失构建 物氨基酸 序列 Δ1-	aagaaggaaatggccaaacagaaagcagctcctgaagccaa gaaacagaaagtggaaggcacagaaccgactacggctttc aatctctttgttggaacctaaactttaacaaatctgctc ctgaattaaaaactggtatcagcgatgtttttgctaaaaa

[0071]

	283Nuc (缺失 1- 283 残基) 的人核仁 素编码序 列	tgatccttgctggttggtgatgtcagaattggtatgactagg aaatttgggttatgtggattttgaatctgctgaagacctgg agaaagcgttggaactcactgggttgaaagtctttggcaa tgaaattaaactagagaaaacccaaaaggaaaagacagtaag aaagagcgcagatgacgagaacacttttggctaaaaatctcc cttacaagtcactcaggatgaattgaaagaagtgtttga agatgctgcggagatcagattagtcagcaaggatgggaaa agtaaagggattgcttatattgaatttaagacagaagctg atgcagagaaaaacctttgaagaaaagcaggggaacagagat cgatgggacgatctatttccctgtactatactggagagaaa ggtcaaaatcaagactatagaggtggaaagaatagcactt ggagtgggtgaatcaaaaactctgggttttaagcaacctctc ctacagtgcacacagaagaaactcttcaggaagtatttgag aaagcaacttttatcaaagtaccccagaacccaaaatggca aatctaaaggggtatgcatttatagagtttgcttcattcga agacgcctaaagaagcttttaaatctctgtaataaaaaggga attgagggcagagcaatcaggctggagtggcaaggaccca ggggatcacctaatagccagaagccagccatccaaaactct gtttgtcaaaggcctgtctgaggataccactgaagagaca ttaaaggagtcatttgacggctccgttcgggcaaggatag ttactgaccgggaaactgggtcctccaaaggggttggttt tgtagacttcaacagtgaggaggatgccaaagctgccaa gagggcatggaagacgggtgaaattgatggaaataaagtta ccttggactgggccaacctaaggggtgaaggtggcttcgg gggtcgtgggtggaggcagaggcggctttggaggacgaggt ggtggttagaggaggccgaggaggatttggtggcagaggcc ggggaggctttggagggcgaggaggcttccgaggaggcag aggaggaggaggtgaccacaagccacaaggaaaagaagacg aagtttgaagtttaaac
4	人核仁素 缺失构建 物氨基酸 序列 Δ1- 283Nuc (缺失 1- 283 残基)	MAKQKAPEAKKQKVEGTEPTTAFNLFVGNLNFNKSAPELK TGISDVFAKNDLAVVDVRIGMTRKFGYVDFESAEDLEKALE LTGLKVFGEIKLEKPKGKDSKKERDARTLLAKNLPYKVTO DELKEVFEDAAEIRLVSKDGKSKGIAYIEFKTEADAEKTFE EKQGTEIDGRSISLYYTGEKQONQDYRGGKNSTWSGESKTL VLSNLSYSATEETLQEVFEKATFIKVPQNQNGKSKGYAFIE FASFEDAKEALNSCNKREIEGRAIRLELQGPRGSPNARSQP SKTLFVKGLSEDTEETLKESFDGSRARIVTDRETGSSKG FGFVDFNSEEDAKAAKEAMEDGEIDGNKVTLDWAKPKGEGG FGGRGGGRGGFGGRGGGRGGRGGRGGFGGRGRGGFGGRGGFRGG RGGGGDHKPKQKKTKFE

[0072] 所列为人核仁素以及人核仁素N-末端缺失片段的基因组编码区和蛋白质序列。

[0073] 核仁素也称作C23、FLJ45706、FLJ59041和NCL。

[0074] 人NCL基因由14个外显子和13个内含子组成,长约11kb。核仁素蛋白含有多个功能性结构域介导其功能。其N-末端部分含有多个磷酸化位点并富含酸性氨基酸。核仁素的中央部分包括4个RNA结合域(RBD),且C-末端部分含有富含甘氨酸和精氨酸的结构域(称为RGG或GAR结构域)。(Farin等,2009)

[0075] 在一种实施方式中,用核仁素含有RNA结合域的区域产生分离的人抗核仁素抗体。在一种实施方式中,用核仁素缺失1-283残基的区域(SEQ IDNO:4)产生分离的人抗核仁素抗体。在一种实施方式中,本发明提供能特异性靶向核仁素含RNA结构域部分的人抗核仁素抗体。在一种实施方式中,本发明提供能特异性靶向核仁素含RNA结构域部分的分离的人抗核仁素单克隆抗体。在一种实施方式中,本发明提供由人B细胞产生的能特异性靶向核仁素

含RNA结构域部分的分离的人抗核仁素单克隆抗体。在一种实施方式中,人核仁素抗体与核仁素的相互作用破坏核仁素RNA结构域与其它分子的相互作用。在一种实施方式中,人核仁素抗体与核仁素的相互作用破坏核仁素RNA结构域与BCL-2的相互作用。

[0076] 有大量证据支持核仁素在mRNA稳定中的作用。核仁素结合淀粉样前体蛋白mRNA的3'-非翻译区(3'-UTR)并稳定该mRNA(Westmark和Malter,2001)。T细胞活化中所发生IL-2mRNA的稳定也需要核仁素(Chen等,2000)。更多近期研究证明在HL-60细胞中(Sengupta等,2004),慢性淋巴细胞性白血病(CLL)细胞中(Otake等,2007)和MCF-7乳腺癌细胞中(Soundararajan等,2008),核仁素结合bcl-2mRNA的3'-UTR中富含A-U的元件(ARE)。核仁素与bcl-2ARE的结合通过保护bcl-2mRNA免受核糖核酸酶降解而稳定bcl-2mRNA,而MCF-7细胞中shRNA敲减核仁素导致bcl-2mRNA不稳定并降低bcl-2蛋白水平(Soundararajan等,2008)。

[0077] 核仁素存在于多种肿瘤细胞的外表面(Otake等,2007;Soundararajan等,2008;Chen等,2008;Hovanessian等,2000;Sinclair和O'Brien,2002),即使它缺少跨膜结构域或信号序列(Srivastava等,1989;Lapeyre等,1987)。结果表明核仁素并不从MV4-11细胞或K-562细胞分泌入组织培养基中(Soundararajan等,2009)。这表明核仁素在细胞表面上的存在并非肿瘤细胞的细胞表面大分子吸附已分泌核仁素的结果。但是,核仁素进行大量翻译后修饰(Srivastava等,1989;Lapeyre等,1987)。已从多种增殖细胞的表面以糖-磷酸-蛋白质分离出核仁素(Hovanessian等,2000;Pfeifle和Anderer,1983)。也有可能核仁素的棕榈酰化、异戊二烯化、或豆蔻酰化使所述蛋白质的这些疏水区能插入或锚定在质膜中。据信核仁素在质膜与核之间起穿梭蛋白的作用(Hovanessian等,2000)。在增殖的肿瘤细胞中,核仁素通常与从质膜内陷的胞吞囊泡关联(Hovanessian等,2000)。核仁素还对多种配体起细胞表面受体的作用,因为在温度依赖性过程中这些囊泡中结合核仁素的配体被内化。例如,已报道质膜核仁素作为大肠杆菌(*E.coli*)的紧密素- γ (Sinclair和O'Brien,2002),抗-HIV剂中期因子(Said等,2002),层粘连蛋白-1(Kibbey等,1995),DNA纳米颗粒(Chen等,2008)和抗血管发生性假肽HB-19(Destouches等,2008)的受体。核仁素是核中的重要蛋白,在指数生长的真核细胞中参与核糖体生物发生和成熟。就此而言,核仁素的一项重要功能是作为细胞质与核之间参与RNA加工和其它细胞生物学过程的穿梭蛋白。在正常细胞生理中,核仁素主要定位在核与细胞质中,也已显示核仁素在某些情况下特别是多种疾病状态中以磷酸化形式存在于细胞表面。就此而言,细胞膜中的核仁素用作驱动细胞增殖、分化、粘附、有丝分裂发生和血管发生的多种配体的结合蛋白。

[0078] B. 癌症中的核仁素

[0079] 多种迹象提示核仁素是基于抗体的免疫治疗的上佳肿瘤抗原。在多种人肿瘤,包括人慢性淋巴细胞性白血病(CLL)(Otake等,2007),急性骨髓性白血病(AML)(Soundararajan等,2008)和乳腺癌细胞(Soundararajan等,2008)中核仁素在质膜和细胞质中过量表达,但在正常CD19+B细胞(Otake等,2007)、CD33+骨髓细胞(Gattoni-Celli等,2009)及正常乳房上皮细胞(Soundararajan等,2008)中不过量表达。感兴趣的是,植入NOD/SCID小鼠中的来自患者的AML母细胞显示质膜和细胞质中的核仁素强染色,而正常小鼠骨髓细胞和脾淋巴细胞为核仁素阴性(Gattoni-Celli等,2009)。

[0080] 核仁素靶向适体AS1411靶向人核仁素。近来报道了质膜核仁素是人MV4-11白血病

细胞中AS1411的受体(Soundararajan等,2009)。

[0081] AS1411结合在肿瘤细胞外表面过量表达的核仁素并在核仁素从质膜穿梭到细胞质与核时获得胞内通路。已表明AS1411在多种过量表达核仁素的癌细胞系中显示抗增殖活性(表2)。

[0082] 表2-过量表达核仁素和/或在核仁素抑制后被杀死的癌细胞系

[0083]

癌类型:	细胞系:
肺癌	A549、NCI-H322M、NCI-H460、EKVX、HOP-92、NCI-H299、CaLu1、NCI-H1385、NCI-H82、CaLu6
乳腺癌	MCF7、T-47D、BT-549、MDA-N、MDA-MB-231、ZR7S-1
前列腺癌	DU145、PC-3、CA-HPV-10
结肠癌	HCC 2998、HT-29、KM12、HCT-116、SW620、HCT-15、LS174T
胰腺癌	PANC-1、MIA-PaCa-2、PANC-1
肾细胞癌	786-0、CAKI-1、RXF393、TK10、A498、ACHN、SN12C
卵巢癌	IGROV、OVCAR-3、OVCAR-4、OVCAR-5
宫颈癌	HeLa
白血病与淋巴瘤	CCRF-CEM、SR、HL60、K-562、RPMI-6226、U937、Meg0、MV4-11
黑色素瘤	LOX-IMVI、SK-MEL-2、A375、SK-MEL-28、MDA-MB-435
成胶质细胞瘤	SF-268、U87-MG
神经母细胞瘤	IMR 32、Lan 5
肉瘤	HT-1080
胃癌	KATOIII、HGC27

[0084] 数据来自AS1411的NCI肿瘤细胞系筛选(6.3 μ M时 $\geq$ 50%生长抑制)。(Bates等,2009)。

[0085] 抗核仁素抗体也可利用质膜核仁素的穿梭功能并在结合细胞表面核仁素后内化。对本申请重要的发现是将在裸鼠或基质胶栓中生长的人肿瘤血管内皮细胞与多克隆抗核仁素抗体一起孵育导致bcl-2mRNA水平下调和诱发凋亡(Fogal等,2009)。这提示抗核仁素抗体可通过胞内机制和/或抗体依赖性细胞性细胞毒性(ADCC)和补体依赖性细胞毒性(CDCC)引发抗肿瘤效应。

[0086] C.抗体或其片段

[0087] 在一种实施方式中,可用抗核仁素抗体或其片段实施本文公开的任意方法。在一种实施方式中,用抗核仁素抗体或其片段检测在其表面表达核仁素的细胞。在另一实施方式中,用抗核仁素抗体或其片段抑制或杀死在其表面表达核仁素的细胞。在另一实施方式中,用抗核仁素抗体或其片段治疗或预防肿瘤疾病(如,癌症),自身免疫疾病,炎性疾病或

病症,呼吸道疾病,病毒感染或黄斑变性。

[0088] 在一种实施方式中,抗核仁素抗体或其片段偶联、连接或融合有毒素、化疗剂、免疫刺激性核酸序列(例如,CpG序列),放射性核素或免疫治疗剂。在另一实施方式中,所述抗核仁素抗体或其片段偶联、连接或融合有放射性核素、荧光团、化学发光化合物、荧光化合物或酶。在另一实施方式中,用抗核仁素抗体或其片段接触在其表面表达核仁素的细胞。在一种实施方式中,所述细胞是癌前细胞、癌细胞或免疫细胞。

[0089] 在一种实施方式中,所述抗核仁素抗体或其片段是人抗核仁素抗体或片段。在一种实施方式中,所述抗核仁素抗体或其片段是非人抗核仁素抗体或其片段。在一种实施方式中,所述抗核仁素抗体或其片段是嵌合抗核仁素抗体或其片段。在一种实施方式中,所述抗核仁素抗体或其片段是人源化抗核仁素抗体或其片段。

[0090] 在一种实施方式中,抗核仁素抗体片段产生自抗核仁素抗体。在一种实施方式中,所述抗核仁素抗体片段与其亲本抗体具有相同的人核仁素结合特异性。在另一实施方式中,所述抗核仁素抗体片段相对其亲本抗体具有改进的人核仁素结合特异性。在一种实施方式中,所述抗核仁素抗体片段与其亲本抗体具有相同的人核仁素结合亲和力。在另一实施方式中,所述抗核仁素抗体片段相对其亲本抗体具有改进的人核仁素结合亲和力。在一种实施方式中,抗核仁素抗体或其片段是人抗核仁素抗体片段。

[0091] “抗体片段”包含全长抗体的一部分,优选包含其抗原结合区。抗体片段的例子包括Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段;双价抗体;线性抗体;单链抗体分子;和抗体片段形成的多特异性抗体。

[0092] 抗体的木瓜蛋白酶消化产生各含单个抗原结合位点的两个相同抗原结合片段,称为“Fab”片段,和残留的“Fc”片段,该命名反映易于结晶的能力。胃蛋白酶处理产生具有两个抗原结合位点并仍能交联抗原的F(ab')₂片段。

[0093] “Fv”是含有完整抗原结合位点的最小抗体片段。在一种实施方式中,某双链Fv物质由一个重链可变区和一个轻链可变区以紧密非共价结合的二聚体组成。在单链Fv(scFv)物质中,一个重链可变区和一个轻链可变区可以通过柔性肽接头共价连接使得所述轻链和重链能以类似于双链Fv物质的“二聚”结构结合。在该构象中各可变区的三个HVR相互作用限定VH-VL二聚体表面的抗原结合位点。六个HVR共同将抗原结合特异性赋予抗体。但是,即使单个可变区(或仅含3个某抗原特异性HVR的半个Fv)仍具有识别并结合抗原的能力,尽管亲和性通常低于完整的结合位点。

[0094] Fab片段含有重链和轻链可变区,且还含有轻链的恒定区和重链的第一恒定区(CH1)。Fab'片段与Fab片段的区别在于在重链CH1区羧基末端处添加有数个额外残基,包括抗体绞链区的一个或多个半胱氨酸。Fab'-SH是本文对其中恒定区的半胱氨酸残基具有游离巯基的Fab'的命名。F(ab')₂抗体片段最初生成为中间有绞链半胱氨酸成对Fab'片段。还已知抗体片段的其它化学偶联。

[0095] “单链Fv”或“sFv”抗体片段含有抗体的VH和VL区,其中这些结构域存在于单个多肽链中。通常,scFv多肽还包含VH和VL区之间的多肽接头,这使sFv形成抗原结合所需结构。关于sFv的综述参见如Pluckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies(《单克隆抗体的药理学》),第113卷,Rosenburg和Moore编,(纽约施普林格出版社(Springer-Verlag, New York), 1994),第269-315页。

[0096] 术语“双价抗体”指具有两个抗原-结合位点的抗体片段,该片段包含在同一多肽链中相互连接的重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)(VH-VL)。使用长度过短以至于无法在同一条链的两个结构域之间形成配对的接头时,该结构域与另一条链的互补结构域配对,产生两个抗原-结合位点。双价抗体可以是二价或是双特异性的。双价抗体的更详细描述可参见例如:EP404,097;WO 1993/01161;Hudson等,Nat.Med.9:129-134(2003);和Hollinger等,PNAS USA 90:6444-6448(1993)。在Hudson等,Nat.Med.9:129-134(2003)中还描述了三价抗体和四价抗体。

[0097] 本文所用术语“单克隆抗体”指获自基本均一抗体群体的抗体,即除了可能少量存在的突变如天然产生的突变外,群体包含的单独抗体是相同的。因此,定语“单克隆”表示所述抗体特征为不是离散抗体的混合物。在某些实施方式中,这类单克隆抗体通常包括含有结合靶标的多肽序列的抗体,其中所述靶标结合多肽序列通过包括从多个多肽序列中选择单一靶标结合多肽序列的过程获得。例如,所述选择过程可以是从小于多个克隆如杂交瘤克隆、噬菌体克隆或重组DNA克隆的库中选择某独特克隆。应当理解,可以进一步改变所选靶标结合序列,例如,改进其对所述靶标的亲和性,将所述靶标结合序列人源化,改进其在细胞培养中的生产,降低其体内的免疫原性,产生多特异性抗体等,并且含有经改变靶标结合序列的抗体也是本发明的单克隆抗体。不同于通常包含针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂,单克隆抗体制剂中的各单克隆抗体均针对抗原的单一决定簇。在其特异性以外,单克隆抗体制剂的优势还在于它们通常未污染有其它免疫球蛋白。

[0098] 定语“单克隆”表明抗体的特征在于获自基本均一的抗体群,而不应解释为需要通过任何特定方法产生所述抗体。例如,按本发明所述使用的单克隆抗体可由各种技术制得,包括如:杂交瘤方法(例如,Kohler和Milstein,Nature,256:495-97(1975);Hongo等,Hybridoma,14(3):253-260(1995);Harlow等,Antibodies:A Laboratory Manual(《抗体:实验室手册》,冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press),第2版,1988);Hammerling等,收录于Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas(《单克隆抗体与T细胞杂交瘤》),563-681(纽约州埃尔斯威尔公司(Elsevier),1981));重组DNA方法(参见例如,美国专利号4,816,567);噬菌体展示技术(参见例如,Clackson等,Nature,352:624-628(1991);Marks等,J.Mol.Biol.222:581-597(1992);Sidhu等,J.Mol.Biol.338(2):299-310(2004);Lee等,J.Mol.Biol.340(5):1073-1093(2004);Fellouse,PNAS USA101(34):12467-12472(2004);和Lee等,J.Immunol.Methods 284(1-2):119-132(2004);和用于在具有部分或全部人免疫球蛋白基因座或人免疫球蛋白序列编码基因的动物中产生人或类人抗体的技术(参见例如,W01998/24893;W01996/34096;W01996/33735;W01991/10741;Jakobovits等,PNAS USA 90:2551(1993);Jakobovits等,Nature 362:255-258(1993);Bruggemann等,Year in Immunol.7:33(1993);美国专利5,545,807;5,545,806;5,569,825;5,625,126;5,633,425;和5,661,016;Marks等,Bio/Technology 10:779-783(1992);Lonberg等,Nature 368:856-859(1994);Morrison,Nature 368:812-813(1994);Fishwild等,NatureBiotechnol.14:845-851(1996);Neuberger,Nature Biotechnol.14:826(1996);及Lonberg和Huszar,Intern.Rev.Immunol.13:65-93(1995))。

[0099] 定语“多克隆”表明所述抗体获取自非均一抗体群来源的特征。多克隆抗体包含超过一种抗体,例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9或10种抗体。

[0100] 本文所述单克隆抗体包括人、非人、人源化和“嵌合”抗体。“嵌合”抗体是其中重链和/或轻链的一部分与衍生自特定物种或属于特定抗体类型或亚型的抗体的相应序列相同或同源,而所述链的余部与衍生自另一物种或属于另一抗体类型或亚型的抗体的相应序列相同或同源的抗体,以及这种抗体的片段,只要它们显示所需生物学活性(美国专利号4,816,567;和Morrison等,PNAS USA 81:6851-6855(1984))。嵌合抗体包括灵长源化(PRIMATIZED.RTM.)抗体,其中所述抗体的抗原结合区衍生自通过用感兴趣抗原免疫猕猴产生的抗体。

[0101] 非人(如鼠)抗体的“人源化”形式是包含衍生自非人免疫球蛋白最小序列的嵌合抗体。多数情况下,人源化抗体是人免疫球蛋白(受体抗体),其中受体的高变区的残基被非人物种(供体抗体)如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类的高变区(供体抗体)的残基取代,具有所需特异性、亲和性和性能。在一些情况下,人免疫球蛋白的框架区(FR)残基被相应的非人残基所替换。而且,人源化抗体可包含在受体抗体或供体抗体中没有的残基。进行这些修饰以进一步改善抗体性能。通常,所述人源化抗体将基本上包含至少一个、通常两个可变区的全部,其中全部或基本上全部的高变环对应于非人免疫球蛋白的高变环,全部或基本上全部的FR是人免疫球蛋白序列的FR。人源化抗体还可选包含至少一部分免疫球蛋白恒定区(Fc),一般是人免疫球蛋白的Fc。更多的细节参见Jones等,Nature,321:522-525(1986); Riechmann等,Nature,332:323-329(1988);和Presta,Curr.Op.Struct.Biol.,2:593-596(1992)。还可参见下列综述文章及其中引用的参考文献:Vaswani和Hamilton,Ann.Allergy,Asthma&Immunol.1:105-115(1998);Harris,Biochem.Soc.Transactions 23:1035-1038(1995);Hurle和Gross,Curr.Op.Biotech.5:428-433(1994)。

[0102] “人抗体”是具有的氨基酸序列对应于由人产生和/或用本文所述制备人抗体的方法所制得的抗体的序列的抗体。人抗体的这一定义特别排除了包含非人抗原识别残基的人源化抗体。可用本领域已知的各种技术包括噬菌体展示文库产生人抗体。Hoogenboom和Winter,J.Mol.Biol.,227:381(1991);Marks等,J.Mol.Biol.,222:581(1991)。用于制备人单克隆抗体的其它方法还可参见Cole等,Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy(《单克隆抗体和癌症治疗》),ARL出版社(Alan R.Liss),77页(1985);Boerner等,J.Immunol.,147(1):86-95(1991)。还可参见van Dijk和van de Winkel,Curr.Opin.Pharmacol.,5:368-74(2001)。人抗体可通过将抗原给予转基因动物制得,所用动物已经过修饰以相应抗原攻击而生产此类抗体,但其内源基因座已被失活,例如经免疫异种小鼠(关于异种小鼠XENOMOUSE.TM.技术可参见例如,美国专利号6,075,181和6,150,584)。关于通过人B细胞杂交瘤技术产生人抗体,还可参见例如Li等,PNAS USA,103:3557-3562(2006)。

[0103] II.从IgM+B细胞产生人单克隆抗体

[0104] 以下描述获取针对核仁素的人单克隆抗体的一般过程。这些是示例性过程,可以改动而仍保持本发明的基本方面。

[0105] A.获取IgM+B细胞群

[0106] 为了从扁桃体制备B细胞,将扁桃体组织与抗生素混合,切块并剁碎至约1mm³的小块,然后轻柔研磨扁桃体块并通过尼龙粗滤器过滤。然后将悬液在Ficoll缓冲垫层上离心。提取含单核细胞的边界层,清洗并重悬于DPBS中。可通过采用抗体和磁珠的负向选择实现

进一步富集(>95%)。

[0107] 非人哺乳动物、嵌合的、多克隆(例如,血清)和/或单克隆的抗体(Mab)及片段(例如,其蛋白水解消化或融合蛋白产物)是潜在的治疗剂,常用于治疗某些疾病的目的。但是,这类抗体或片段在给予人时可引发免疫应答。这种免疫应答可导致经免疫复合体介导将抗体或片段从循环中清除,并使得重复给予不适于治疗,从而减少对于患者的治疗益处并限制所述抗体或片段的重新给药。例如,包含非人部分的抗体或片段的重复给予可导致血清病和/或过敏性反应。为了避免这些及其它问题,已采用包括嵌合化和人源化在内的多种方法来降低此类抗体及其部分的免疫原性。但是,这些及其它方法仍可能导致抗体或片段具有某些免疫原性、低亲和性、低结合力,或在细胞培养、放大、生产中存在问题和/或产率低。因此,此类抗体或片段可能对于制备或用作治疗蛋白而言不够理想。因此,人细胞表达的抗体可避免这些问题中的很多问题,且对人基本无免疫原性。本文所用“免疫原性的”指具有引起免疫应答的能力。

[0108] 在一种实施方式中,人B细胞表达的人抗核仁素抗体对人基本无免疫原性。在一种实施方式中,人B细胞表达的分离的人抗核仁素单克隆抗体对人基本无免疫原性。

[0109] 为从外周血制备B细胞,将静脉血抽入含肝素钠以防止凝结的注射器中,稀释并在Ficoll缓冲垫层上离心。提取含单核细胞的边界层,清洗并重悬于DPBS中。可如上所述获得进一步富集。

[0110] B.EBV永生化

[0111] 为了通过用EBV上清液接种进行感染,将B细胞以 10^6 – 10^7 个细胞/毫升重悬于完全RPMI培养基中,和等体积已过滤的EBV上清液混合,然后在37℃和5%CO₂下孵育4小时。可通过添加完全RPMI培养基调整培养体积,使得经感染细胞以所需浓度(通常 10^5 – 10^6 个细胞/毫升)重悬用于细胞培养。然后将细胞分入多孔板内,转移至37℃和5%CO₂的组织培养箱。

[0112] 对于离心感染,将B细胞以 10^6 – 10^7 个细胞/毫升重悬于完全RPMI培养基中,并与等体积的10倍超滤浓缩的EBV混合,放入6孔组织培养板的孔内。然后将所述平板在室温下以900g离心1小时,然后将经感染的细胞以所需浓度(通常 10^5 – 10^6 个细胞/毫升)重悬于完全RPMI培养基,分入多孔板并转移至37℃和5%CO₂的组织培养箱。

[0113] 可选地,B细胞可在感染时或感染后接触Toll样受体(Toll Like Receptor,TLR)配体。所述配体可以添加至下列终浓度:Pam3CSK4 (0.1–1μg/ml),酵母聚糖(1–10μg/ml),聚肌胞(1–25μg/ml),LPS(1–5μg/ml),咪喹莫特(1μg/ml)和/或CpG(1–10μg/ml)。

[0114] 感染力根据感染途径而变化。用EBV上清液感染扁桃体B细胞导致约1–5%的B细胞永生化。添加TLR配体大约使感染效率翻倍。用浓缩病毒通过离心感染来感染扁桃体B细胞提高感染效率,24小时后几乎为100%。

[0115] C.培养以诱导免疫球蛋白同种型类别转换和IgG分泌

[0116] 为诱导B细胞分化,免疫球蛋白同种型类别转换和/或IgG分泌,感染后马上、感染后16–20小时和/或以每周间隔(2、3、4或5次)给EBV感染的B细胞添加细胞因子和其它信号转导剂。可将试剂稀释在培养基中并加入细胞至下列终浓度:重组人白介素(IL) IL-4, 0.2ng/ml; IL-5, 0.2ng/ml; IL-6, 0.1ng/ml; IL-9, 0.2ng/ml; IL-10, 0.24ng/ml; IL-13, 1ng/ml; 重组人干扰素-α2a (IFN-α2a), 2,000IU/ml; 重组人BAFF, 1ng/ml; 重组人可溶性CD40L, 5ng/ml; 羊抗人IgM F(ab')₂, 1.4μg/ml(量为约值)。具体的组合包括抗-IgM F(ab')₂,

CD40L+/-BAFF;抗-IgM F(ab')₂,IL-6+/-BAFF;抗-IgM F(ab')₂,CD40L,IL-6+/-BAFF;抗-IgM F(ab')₂,CD40L,IL-6+/-IL4;和抗-IgM F(ab')₂,CD40L与IL-9+/-IL-13。

[0117] 免疫球蛋白同种型类别转换的启动最早可在接触细胞因子/生长因子/信号转导剂混合物后5天测得,该过程在后面十天持续。

[0118] D. 选择永生化B细胞

[0119] 接触细胞因子/生长因子/信号转导剂混合物后,每周一次或在感染后第10-20天采集永生化扁桃体细胞和血液B细胞培养物的培养上清液,合并,并用ELISA或其它筛选形式如点印迹或流式细胞术、蛋白印迹法或功能活性的抑制/促进来检测。可将抗原直接或通过捕获抗体结合在聚苯乙烯(例如,96孔)平板的孔上,使抗原能结合例如过夜。然后清洗平板,封闭,再一式三份或其它平行测定数接触永生化B细胞培养上清液样品或对照。随后,充分清洗平板,然后,加入例如碱性磷酸酯酶(AP)偶联的羊抗人IgG或其它带标记二抗以通过例如发色底物磷酸对硝基苯酯二钠盐的AP转化来检测所结合的IgG。

[0120] 基于以上讨论,免疫球蛋白同种型类别转化和/或IgG分泌在接触细胞因子/生长因子/信号转导剂混合物后立即开始并早在接触后5天即可测得。上清液中的IgG水平在此后10天均在提高。因此,可在约7-21天,约10-21天,约7-10天或约10-14天,或在第7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20或21天选择已进行免疫球蛋白同种型类别转换并分泌IgG的B细胞。

[0121] III. 人Ig轻链和重链的克隆与表达

[0122] 可用多种方法来克隆和表达人免疫球蛋白轻链和重链序列。通过引用纳入本文的Weltschof等(1995)详细描述了本发明人所用的方法。可以克隆可变区或可变+恒定区。

[0123] 也可用其它技术,例如Takekoshi等(2001)描述的技术。该文献中,用市售试剂盒(RNeasy迷你试剂盒,凯杰公司(Qiagen))从沉淀细胞分离全细胞RNA。用随机9聚体、核苷酸和逆转录酶(Takara公司, RNA-PCR试剂盒, 天津)合成cDNA,并通过聚合酶链式反应(PCR)扩增,重链和轻链引物特异性针对人免疫球蛋白(Ig)。采用“降落”PCR方案,即,3轮各95℃变性1分钟、退火1分钟、72℃延伸2分钟,共进行11轮循环。退火温度以1℃步幅从65变化到55℃。降落循环后进行退火温度为55℃的25轮循环。所得PCR产物在琼脂糖中凝胶纯化并用Qiaquick离心柱(凯杰公司)提取。然后将轻链和重链Fc基因克隆入表达载体pFab1-His2的NheI/AscI和SfiI/NotI位点中。将含有轻链(κ和λ)和Fc重链基因(γ和μ)的接合pFab1-His2载体引入感受态大肠杆菌JM109细胞(大阪的东洋有限公司(Toyobo))。转化后,将大肠杆菌细胞接种到LB/氨苄青霉素(50μg/ml)平板上。将分离的细菌菌落在含氨苄青霉素(50μg/ml)和MgCl₂(1.5mM)的2ml SB培养基中30℃培养。用异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)诱导Fab蛋白生成。沉淀来自细菌培养物的细胞,重悬于0.3ml含蛋白酶抑制剂混合物(完全型,勃林格殷格翰公司(Boehringer Mannheim))的B-PER(皮尔斯公司(Pierce))中,室温摇动5分钟。细胞裂解液以15,000G离心10分钟,然后收集含有Fab抗体部分的所得上清液。

[0124] 上述纯粹为示例性,可以采用其它方法。

[0125] IV. 抗体制备

[0126] 克隆后,可将来自人轻链和重链的核酸插入适当的表达载体并转入支持抗体制备的宿主细胞(例如,产生抗体的细胞)。所考虑用于制备的具体细胞系有293细胞,CHO细胞,

COS细胞或多种形式的骨髓瘤细胞,一些缺失IgG。这些细胞可以两种基本方式用于人MAb制备。首先,可将骨髓瘤或永生化细胞注入与为初始融合体提供体细胞和骨髓瘤细胞所用类型具有组织相容性的动物(例如,同系基因型小鼠)中(通常为腹膜腔中),或注入用于注射非相容性细胞的免疫缺陷型动物中。可选地,上述动物在注射前经烃类特别是油类如异十八烷(四甲基十四烷)预处理。接受注射的动物产生肿瘤,分泌由转染骨髓瘤产生的特异性单克隆抗体。然后可抽取所述动物的体液,如血清或腹水以提供高浓度人MAb。其次,可体外培养个体细胞系,将人MAb天然分泌入培养基,可从所述培养基容易地获得高浓度人MAb。

[0127] 需要时,任一方法制备的人MAb可以利用过滤、离心和多种层析方法如HPLC或亲和层析进一步纯化。本发明所述单克隆抗体的片段可从如此制备的单克隆抗体获得,所采用的方法包括用酶如胃蛋白酶或木瓜蛋白酶消化,和/或通过化学还原来切割二硫键。

[0128] 在一种实施方式中,人抗核仁素抗体由永生化人B细胞制备。在一种实施方式中,人抗核仁素抗体的制备所用方法为例如PCT/US2008/072124或美国专利申请12/671,936中所示,其全文通过引用纳入本文。

[0129] 在一种实施方式中,分离的人抗核仁素抗体的cDNA可通过从如本发明所述产生抗体同源物的杂交瘤细胞克隆编码抗核仁素抗体轻链和重链的cDNA或基因组DNA来制备(利用产生特异性抗体B细胞与骨髓瘤融合)。在一种实施方式中,分离的人抗核仁素抗体由人B细胞制备。在一种实施方式中,细胞转染有分离自人B细胞的一种或多种多核苷酸序列,其中所述多核苷酸序列编码人抗核仁素抗体。可将编码所述多肽的cDNA或基因组DNA插入表达载体,使得基因都与其自身的转录和翻译表达控制序列操作性连接。然后可以选出与所用的表达宿主细胞相容的表达载体和表达控制序列。通常,两种基因都插入同一表达载体。

[0130] 可用原核或真核细胞作为表达宿主。优选真核宿主细胞中的表达,引物这类细胞比原核细胞更可能装配并分泌正确折叠且免疫活性的抗体。但是,由于不正确折叠而制得为无活性的任何抗体可以用熟知的方法复性(Kim和Baldwin,1982)。有可能所述宿主细胞将产生完整抗体的部分,例如轻链二聚体或重链二聚体,这些也是本发明所述的抗体同源物。

[0131] 应当理解,上述过程的变化在本发明的范围内。在一种实施方式中,宿主细胞转化有编码本发明抗体同源物的轻链或重链(但非两者)的DNA。还可利用重组DNA技术去除轻链或重链其一或两者中非核仁素结合必需的一些或全部编码DNA。这类截短DNA分子所表达的分子是本发明所述的抗体同源物。在一种实施方式中,产生双功能抗体,其中一条重链和一条轻链是人抗核仁素抗体的同源物,而其它轻链和重链特异性针对核仁素以外的抗原或核仁素的另一表位。

[0132] 在一种实施方式中,将编码分离的人抗核仁素抗体的DNA转入优选的哺乳动物细胞系用于以“量产”或商业化量的表达。早已认识到中国仓鼠卵巢细胞(CHO细胞)是重组或非内源DNA的优秀表达媒介。参见美国专利4,816,567。已开发了一系列DHFR缺陷型CHO细胞株,这些细胞株允许扩增所插入的特定蛋白编码DNA或DNA序列,如美国专利5,981,214中所示。用于“量产”或商业量表达的其它哺乳动物细胞系包括但不限于:293HEK细胞,HeLa细胞,COS细胞,NIH3T3细胞,Jurkat细胞,NSO细胞和HUVEC细胞。文献中已鉴定了适用于表达重组蛋白的其它哺乳动物细胞系,并可同样适用于本申请所述发明中。

[0133] A. 抗体的氨基酸序列变体

[0134] 在一种实施方式中,本发明所述抗核仁素抗体包含相比野生型经过修饰的氨基酸序列。例如,可能需要改进所述抗体的结合亲和性和/或其它生物学特性。抗核仁素抗体的氨基酸序列变体通过在抗核仁素抗体链的编码核酸中引入适当的核苷酸改变或通过肽合成制备。这类修饰包括,例如,所述抗核仁素抗体的氨基酸序列中残基的缺失和/或插入和/或取代。可进行缺失、插入和取代的任意组合以实现最终构建物,只要所述最终构建物具有所需特性。所述氨基酸改变还可改变所述抗核仁素抗体的翻译后加工,例如改变糖基化位点的数量或位置。

[0135] 鉴定抗核仁素抗体中用于突变的优选位置的某些残基或区域的可用方法称为“丙氨酸扫描突变”,如Cunningham和Wells, Science (1989) 所述。此处鉴定出某残基或靶残基的基团(例如,带电残基如arg、asp、his、lys和glu)并用中性或带负电氨基酸(最优选丙氨酸或聚丙氨酸)取代以影响氨基酸与抗原的相互作用。随后,将功能上对所述取代敏感的那些氨基酸位置通过在取代位点处或为取代位点引入额外或其它变体加以改良。因此,虽然引入氨基酸序列变异的位点已预先确定,但突变本身的性质无需预先确定。例如,为了分析某给定位点处突变的性能,在靶密码子或区域处进行丙氨酸扫描或随机诱变,并用所表达的抗核仁素抗体变体筛选所需活性。

[0136] 氨基酸序列插入包括氨基-和/或羧基-末端融合,长度范围从一个残基到含一百或更多残基的多肽,以及序列内插入单个或多个氨基酸残基。末端插入的示例包括含N-末端甲硫氨酰基残基的抗核仁素抗体或融合有表位标签的抗体。抗核仁素抗体分子的其它插入变体包括将酶或提高抗体血清半衰期的多肽融合到所述抗体的N-或C-末端。

[0137] 另一类变体是氨基酸取代变体。这些变体在所述抗核仁素抗体分子中移除至少一个氨基酸残基并在其位置插入不同的残基。通过选择能显著改变其维持(a)所述取代的区域中多肽骨架的结构,例如片层或螺旋构型,(b)靶位点处分子的电荷或疏水性,或者(c)侧链本体的取代来实现抗核仁素抗体生物学性质的实质改变。根据共同的侧链性质将天然产生的残基分组:(1)疏水的:正亮氨酸、met、ala、val、leu、ile;(2)中性亲水的:Cys、ser、thr;(3)酸性的:Asp、glu;(4)碱性的:Asn、gln、his、lys、arg;(5)影响链取向的残基:Gly、pro;(6)芳香族:Trp、tyr、phe。

[0138] 还可进行非保守取代将一种类型的成员更换为另一种类型的成员。不参与维持所述拮抗剂适当构型的任意半胱氨酸也可取代,通常用丝氨酸,以改善所述分子的氧化稳定性并防止异常交联。相反地,所述拮抗剂可添加半胱氨酸键改善其稳定性(特别是所述抗核仁素抗体是抗体片段如Fv片段时)。

[0139] 一类取代变体涉及取代亲本抗体(例如,人源化或人抗体)的一个或多个高变区残基。通常,就进一步改进所选的所得变体将具有相对用来产生该变体的亲本抗体有改善的生物学性质。产生此类取代变体的便捷方式是利用噬菌体展示的亲和成熟。简要说,突变几个高变区位点(如,6-7个位点),以便在各位点上产生所有可能的氨基取代。如此产生的抗体变体以单价方式由丝状噬菌体颗粒展示为包装在各颗粒内的M13基因III产物的融合物。然后,如本文所述筛选噬菌体展示变体的生物活性(如拮抗剂活性)。为了鉴定用于修饰的候选高变区位点,可进行丙氨酸扫描诱变以鉴定显著影响抗原结合的高变区残基。可选或补充地,抗原抗体复合物晶体结构的分析可有利于鉴定抗体和核仁素之间的接触点。此类接触残基和毗邻残基是如本文所述技术进行取代的候选残基。一旦产生此类变体,如本文

所述对所述变体组进行筛选,可选出一种或多种相关试验中具有优异性质的抗体用于进一步开发。

[0140] B. 抗体的糖基化变体

[0141] 在一种实施方式中,所述抗核仁素抗体经过修饰,相对野生型抗体具有改变的糖基化。抗体在其恒定区的保守位置被糖基化(Jefferis和Lund,1997;Wright和Morrison,1997)。免疫球蛋白的寡糖侧链影响蛋白质的功能(Boyd等,1996;Wittwe和Howard,1990),以及糖蛋白部分之间的分子内相互作用,这会影响所述糖蛋白的构型及其呈现的三维表面(Jefferis和Lund,1996)。寡糖还可用来基于特异性识别结构将给定糖蛋白靶向某些分子。例如,已报道在无半乳糖苷化IgG中,寡糖部分‘翻’出其CH2间空间且末端的N-乙酰葡萄糖胺残基成为可供结合甘露糖结合蛋白(Malhotra等,1995)。用糖肽酶去除中国仓鼠卵巢(CHO)细胞生成的CAMPATH-1H(重组人源化鼠单克隆IgG1抗体,识别人淋巴细胞的CDw52抗原)的寡糖导致补体介导裂解(CMCL)的完全消减(Boyd等,1996),而用神经氨酸酶选择性去除唾液酸残基导致DMCL没有损失。也已报道抗体的糖基化影响抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。具体地,已报道具有四环素调节表达 $\beta(1,4)$ -N-乙酰葡萄糖胺基转移酶III(GnTIII)的CHO细胞具有改进的ADCC活性(Umana等,1999),GnTIII是催化形成截开型GlcNAc的糖基转移酶。

[0142] 抗体的糖基化通常为N-连接或O-连接。N-连接指糖部分连接天冬酰胺残基的侧链。三肽序列天冬酰胺-X-丝氨酸和天冬酰胺-X-苏氨酸为酶促连接糖部分与天冬酰胺侧链的识别序列,其中X为脯氨酸以外的任意氨基酸。因此,多肽中任意这些三肽序列的存在产生潜在的糖基化位点。O-连接糖基化指糖类N-乙酰半乳糖胺、半乳糖或木糖之一连接羟氨基酸,最常见为丝氨酸或苏氨酸,尽管5-羟脯氨酸或5-羟赖氨酸也可使用。

[0143] 抗体的糖基化变体是抗体的糖基化模式有改变的变体。改变是指缺失一种或多种抗体中所见糖部分,添加一种或多种糖部分给抗体,改变糖基化的组成(糖基化模式)、糖基化的广度等。

[0144] 给抗体添加糖基化位点可通过改变氨基酸序列使其含有一个或多个上述三肽序列(用于N-连接糖基化位点)而实现。所述改变还可通过用一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基添加或取代初始抗体的序列(用于O-连接糖基化位点)而实现。类似地,可通过抗体的天然糖基化位点中的氨基酸改变实现糖基化位点的去除。

[0145] 氨基酸序列通常通过改变其基础核酸序列来改变。用多种本领域已知方法制备编码抗核仁素抗体的氨基酸序列变体的核酸分子。这些方法包括但不限于,从天然来源分离(在天然产生氨基酸序列变体的情况中)或通过前对前期制备的抗核仁素抗体的变体或非变体形式的寡核苷酸介导(或定点)诱变、PCR诱变和盒式诱变制备。

[0146] 也可改变抗体的糖基化(包括糖基化模式)而不改变其氨基酸序列或基础核苷酸序列。糖基化主要依赖于用于表达抗体的宿主细胞。由于用来表达作为潜在治疗剂的重组糖蛋白如抗体的细胞很少是天然细胞,可预期抗体的糖基化模式有显著改变(参见例如,Hse等,1997)。在宿主细胞的选择以外,在重组生成抗体中影响糖基化的因素还包括生长模式,培养基组成,培养密度,供氧,pH,纯化方案等。已提出多种方法来改变特定宿主生物体中的糖基化模式,包括引入或过量表达某些参与寡糖生成的酶(美国专利5,047,335;5,510,261和5,278,299)。可从糖蛋白酶促除去糖基化或某些类型的糖基化,例如,采用糖苷内切酶H(Endo H)。此外,重组宿主细胞可经过基因工程改造,例如产生某些类型多糖的加

工的缺陷型。这些及类似技术是本领域熟知。

[0147] 抗体的糖基化结构可方便地采用常规的糖分析技术分析,包括凝集素层析,NMR,质谱,HPLC,GPC,单糖成分分析,连续酶消化,和HPAEC-PAD,其采用高pH阴离子交换层析基于电荷分离寡糖。已知为分析目的释放寡糖的方法,且包括但不限于:酶处理(常用肽-N-糖苷酶F/内切- β -半乳糖苷酶),利用强碱环境的消除以主要释放O-连接结构,和利用无水肼的化学方法以释放N-和O-连接的寡糖。

[0148] C. 抗体的其它修饰

[0149] 在一种实施方式中,抗核仁素抗体配制为免疫脂质体。含所述抗体的脂质体用本领域已知方法如Epstein等,(1985);Hwang等,(1980);和美国专利4,485,045和4,544,545中所述方法制备。美国专利5,013,556中公开了循环时间延长的脂质体。

[0150] 可通过反相蒸发方法,利用包含磷脂酰胆碱、胆固醇和PEG-衍生的磷脂酰乙醇胺(PEG-PE)的脂质组合物产生特别有用的脂质体。使脂质体通过孔隙大小确定的滤器挤出,以得到具有所需直径的脂质体。可以如Martin等,J.Biol.Chem. (1982)中所述,通过二硫互换反应将本发明抗体的Fab'片段偶联于脂质体。所述脂质体中可选含有化学治疗剂(如多柔比星)。参见Gabizon等(1989)。

[0151] 在一种实施方式中,抗核仁素抗体可通过将抗体偶联于前药激活酶而用于ADEPT,所述前药激活酶能将前药(如肽酰化疗剂,参见W081/01145)转变为活性药物。参见例如,W088/07378和美国专利4,975,278。

[0152] 用于ADEPT的免疫偶联物的酶组分包括能够作用于前药,并使其转变为更具活性的呈现所需生物学性质的任何酶。

[0153] 可用于本发明方法的酶包括但不限于:用于将含磷酸前药转变为游离药物的碱性磷酸酶;用于将含硫酸前药转变为游离药物的芳基硫酸酯酶;用于将无毒性5-氟胞嘧啶转变为抗癌药5-氟尿嘧啶的胞嘧啶脱氨酶;用于将含肽前药转变为游离药物的蛋白酶,如沙雷菌蛋白酶、嗜热菌蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶、羧基肽酶和组织蛋白酶(如组织蛋白酶B和L);用于转变含有D-氨基酸取代基的前药的D-丙氨酰羧基肽酶;用于将糖基化的前药转变为游离药物的糖切割酶如 β -半乳糖苷酶和神经氨酸酶;用于将 β -内酰胺衍生药物转变为游离药物的 β -内酰胺酶;和分别用于将在胺氮上用苯氧基乙酰基或苯基乙酰基衍生的药物转变为游离药物的青霉素酰胺酶,如青霉素V酰胺酶或青霉素G酰胺酶。或者,可用本领域中称为“抗体酶(abzyme)”的具有酶活性的抗体将本发明的前药转化成游离的活性药物(参见例如,Massey,1987)。抗体-抗体酶偶联物可如本文所述制备用于递送所述抗体酶给所需的细胞群。

[0154] 可通过本领域熟知技术,例如使用前述异源双功能交联剂,将所述酶共价结合于抗核仁素抗体。或者,可利用本领域熟知的重组DNA技术构建包含至少连接于本发明的酶的至少某功能活性部分的本发明抗体的至少抗原结合区的融合蛋白(参见例如,Neuberger等,1984)。

[0155] 在本发明的一种实施方式中,抗核仁素抗体包含抗体片段而非完整抗体。在此情况中,所述抗体片段可经过修饰以提高其血清半衰期。例如,这可用通过将补救受体结合表位掺入抗体片段中(例如,通过抗体片段中适当区域的突变,或通过所述表位掺入肽标签然后融合到所述抗体片段的任一末端或其中间,例如,通过DNA或肽合成)而实现。参见1996

年10月17日公开的WO 96/32478。

[0156] 所述补救受体结合表位通常构成某区域,其中来自Fc区的一个或两个环的任意一个或多个氨基酸残基被转移至所述抗体片段的类似位置。更优选转移所述Fc区一个或两个环的3个或更多残基。更优选所述表位取自Fc区(例如,IgG的Fc区)的CH2结构域,并转移至所述抗体的CH1、CH3或V_H区,或超过一种此类区域。或者,所述表位取自Fc区的CH2结构域,并转移至所述抗体片段的C_L区或V_L区或两者。

[0157] 在一种实施方式中,抗核仁素抗体经过共价连接修饰。共价连接可包括但不限于通过化学合成或通过所述抗体的酶促或化学切割。所述抗体的其它类型共价修饰可通过使抗体的靶定氨基酸残基与有机衍生剂反应而引入分子内,所述有机衍生剂能够与所选侧链或者N-或C-末端残基反应。通过引用纳入本文的美国专利5,534,615中描述了多肽的示例性共价修饰。所述抗体的一类共价修饰包括将连接所述抗体与多种非蛋白性聚合物,所述聚合物如聚乙二醇、聚丙二醇或聚氧化烯,连接方式参见4,640,835;4,496,689;4,301,144;4,670,417;4,791,192或4,179,337。

[0158] 在另一实施方式中,抗核仁素抗体(例如,人抗体)通过与另一异源多肽或氨基酸序列融合或结合而修饰。

[0159] 在一种实施方式中,人抗核仁素抗体经过修饰以包含靶向免疫偶联部分,使得能有效产生针对肿瘤或病原体的先天性和获得性免疫应答。在一种实施方式中,分离的人抗核仁素单克隆抗体经过修饰以包含靶向免疫偶联部分,使得能有效产生针对肿瘤或病原体的先天性和获得性免疫应答。在一种实施方式中,人B细胞产生的分离的人抗核仁素单克隆抗体经过修饰以包含靶向免疫偶联部分,使得能有效产生针对肿瘤或病原体的先天性和获得性免疫应答。所述免疫偶联物可以适于同时满足获得针对所述靶标肿瘤或病原体的有效的抗体-和/或细胞介导的免疫应答的多种关键要求,这些要求包括但不限于:(i) 诱导或增长抗原呈递细胞(APC)/树突细胞(DC)对肿瘤或病原体抗原或抗原决定簇的摄取和交叉呈递;(ii) 促进靶细胞环境中树突细胞(DC)的成熟;(iii) 提供CD4+T细胞辅助以产生针对所述肿瘤或病原体的CD8+T细胞记忆和抗体;(iv) 将所述靶肿瘤细胞对抗体依赖性细胞毒性(ADCC)和T细胞介导死亡致敏。此类免疫偶联抗体可用于肿瘤性疾病、感染疾病和其它病症的靶向免疫治疗或免疫预防。例如,模式识别受体(PRR)如Toll样受体,识别不同感染性微生物(细菌、真菌、原生动物、病毒)表达的病原相关分子模式(PAMP)和受损宿主组织释放的分子(损伤相关分子模式/警报素)。给分离的人抗核仁素抗体加成PAMP偶联提供包含能被PRR识别的核酸或蛋白质的部分,最终导致消除所述抗核仁素抗体结合的靶细胞的免疫应答。能与抗核仁素抗体结合的PAMPs的示例包括但不限于已知的病毒性和病原性表位,例如聚次黄嘌呤核糖-聚胞嘧啶核苷酸,脂多糖(LPS),脂质A,鞭毛蛋白,富含GU的单链短RNA,未甲基化的CpG-寡脱氧核糖核苷酸。

[0160] 在一种实施方式中,抗核仁素抗体(例如人抗体)融合或结合有标签多肽,其提供了抗标签抗体可以选择性结合的表位。所述表位标签可以在所述抗核仁素抗体的氨基或羧基末端。抗核仁素抗体的这类表位标签形式的存在可以利用针对所述标签多肽的抗体测定。而且,提供所述表位标签使所述抗核仁素抗体能采用抗标签抗体或结合所述表位标签的另一类型亲和介质通过亲和纯化容易地纯化。本领域熟知多种标签多肽及其相应抗体。表3列出了可与本发明的抗核仁素抗体融合的示例性表位标签的非限制性小结。示例包括

多组氨酸(多his)或多组氨酸甘氨酸(多-his-gly)标签;流感HA标签及其抗体12CA5(Field等,1988);c-myc标签及其8F9、3C7、6E10、G4、B7和9E10抗体(Evan等,1985);和单纯疱疹病毒糖蛋白D(gD)标签及其抗体(Paborsky等,1990)。其它标签多肽包括Flag-肽(Hopp等,1988);KT3表位肽(Martin等,1992); α -微管蛋白表位肽(Skinner等,1991);和T7基因10蛋白肽标签(Lutz-Freyermuth等,1990)。

[0161] 表3-亲和和标签的序列

[0162]

SEQ ID NO:	标签:	氨基酸序列:
5	多-Arg	RRRRR (SEQ ID NO:5)
6	多-Lys	KKKK (SEQ ID NO:6)
7	多-His	HHHHH (SEQ ID NO:7)
8	FLAG	DYKDDDDK (SEQ ID NO:8)
9	Strep-标签 II	WSHPQFEK (SEQ ID NO:9)
10	c-myc	EQKLISEEDL (SEQ ID NO:10)
11	S	KETAAAKFERQHMDs (SEQ ID NO:11)
12	HAT	KDHLIHNVHKEFHAAHNK (SEQ ID NO:12)
13	3x FLAG	DYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDK (SEQ ID NO:13)
14	钙调节蛋白结合肽	KRRWKKNFIAVSAANRFKKISSSGAL (SEQ ID NO:14)
15	SBP	MDEKTTGWRGGHVVEGLAGELEQLRARLEHHPQGGQ REP (SEQ ID NO:15)
16	壳质结合域	TNPGVSAWQVNTAYTAGQLVTYNGKTYKCLQPHTSL AGWEPSNVPALWQLQ (SEQ ID NO:16)
17	谷胱甘肽 S-转移酶	蛋白质
18	麦芽糖结合蛋白	蛋白质

[0163] 在一种实施方式中,人抗核仁素抗体连接有纳米颗粒。在一种实施方式中,分离的人抗核仁素单克隆抗体连接有纳米颗粒。在一种实施方式中,人B细胞表达的人抗核仁素抗体连接有纳米颗粒。已报道细胞表面核仁素用作由聚乙二醇化聚赖氨酸和DNA所组成的DNA纳米颗粒的受体(Chen等,2008)。在一种实施方式中,所述抗体-纳米颗粒偶联物可比未偶联抗体更快速且更广泛地穿透在其表面表达核仁素的细胞。在一种实施方式中,所述细胞是癌细胞,肿瘤细胞,病毒感染细胞,淋巴细胞或活化淋巴细胞。

[0164] D.细胞系的保藏

[0165] 表达免疫特异性结合一种或多种核仁素(NCL)多肽(例如,SEQ ID NO:4或其片段)的抗体的细胞系于2010年11月17日保藏至弗吉尼亚州玛纳萨斯大学大道10801号的美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection)作为原始保藏,其保藏号为ATCC PTA-11490,ATCC PTA-11491,ATCC PTA-11492,ATCC PTA-11493,ATCC PTA-11494,ATCCPTA-11495,ATCC PTA-11496和ATCC PTA-11497。根据布达佩斯条约进行保藏,对所保藏材料公众可用性的所有限制将在专利授权时不可撤回地消除,但37C.F.R.1.808(b)中指出的要求除外,且保藏期限符合37C.F.R.1.806。

[0166] V诊断

[0167] 在一种实施方式中,人抗核仁素抗体用于确定人中癌细胞的存在。在一种实施方式中,分离的人抗核仁素单克隆抗体用于确定人中癌细胞的存在。在一种实施方式中,人B细胞生成的分离的人抗核仁素单克隆抗体用于确定人中癌细胞的存在。

[0168] 在一种实施方式中,人抗核仁素抗体用于确定人样品中癌细胞的存在。在一种实施方式中,分离的人抗核仁素单克隆抗体用于确定人样品中癌细胞的存在。在一种实施方式中,提供人B细胞表达的分离的人抗核仁素单克隆抗体并用于确定人样品中癌细胞的存在。术语人样品用于指来自对象的生物采集品,包括但不限于细胞、组织、血浆、血清、全血、痰或唾液。在一种实施方式中,将人对象样品所得检测结果与对照样品所得结果进行比较。在一种实施方式中,分离的人抗核仁素单克隆抗体用于确定对象中癌细胞的存在。在一种实施方式中,由人B细胞表达的分离的人抗核仁素单克隆抗体用于确定对象中癌细胞的存在。在一种实施方式中,所述测定通过将人抗核仁素抗体与人癌细胞表面的核仁素结合来完成。术语“癌症”和“癌”是用于描述哺乳动物的生理病症,其典型特征是细胞生长失控。癌的例子包括但不限于:急性淋巴细胞性白血病;髓细胞性白血病;急性髓细胞性白血病;慢性髓细胞性白血病;肾上腺皮质癌肾上腺皮质癌;AIDS相关癌症;AIDS相关淋巴瘤;肛门癌;儿童小脑星形细胞瘤;儿童脑星形细胞瘤;基底细胞癌;胆管癌;肝外癌;膀胱癌;膀胱癌;骨肉瘤;骨肉瘤/恶性纤维组织细胞瘤;脑干神经胶质瘤;脑瘤;脑瘤;脑干神经胶质瘤;脑肿瘤,小脑星形细胞瘤;脑肿瘤,脑星形细胞瘤/恶性神经胶质瘤;脑肿瘤,室管膜瘤;脑肿瘤,成神经管细胞瘤;脑肿瘤,幕上原发性神经外胚层肿瘤;脑肿瘤,视觉通路和下丘脑神经胶质瘤;女性乳腺癌;男性乳腺癌;支气管腺瘤/类癌;伯基特氏淋巴瘤;癌瘤;中枢神经系统淋巴瘤;小脑星形细胞瘤;脑星形细胞瘤/恶性神经胶质瘤;宫颈癌;慢性淋巴细胞白血病;慢性髓细胞白血病;慢性骨髓增生性疾病;结肠癌;结直肠癌;皮肤T细胞淋巴瘤;B细胞淋巴瘤子宫内膜癌;室鼓膜瘤;食管癌;食管癌;尤因氏家族肿瘤;颅外生殖细胞肿瘤;性腺外生殖细胞肿瘤;肝外胆管癌;眼癌,眼内黑色素瘤,眼癌,视网膜母细胞瘤;胆囊癌;胃癌;胃肠道类癌肿瘤;生殖细胞肿瘤,颅外;生殖细胞肿瘤,卵巢;妊娠滋养细胞肿瘤;神经胶质瘤;神经胶质瘤,儿童脑干;神经胶质瘤,儿童脑星形细胞瘤;神经胶质瘤,儿童视觉通路和下丘脑;毛细细胞白血病,头颈癌;肝细胞(肝)癌,成人(原发性);肝细胞(肝)癌,儿童(原发性);何杰金氏淋巴瘤;妊娠期何杰金氏淋巴瘤;下咽癌;下丘脑和视觉通路神经胶质瘤,眼内黑色素瘤;胰岛细胞癌(内分泌胰腺);卡波西氏肉瘤;肾(肾细胞)癌;肾癌;喉癌;白血病,急性淋巴细胞性;白血病,急性淋巴细胞性;白血病,急性骨髓性;白血病,急性骨髓性;白血病,慢性淋巴细胞性;白血病,慢性髓细胞性;唇和口腔癌;肝癌,成人(原发性);肝癌,儿童(原发性);肺癌,非小细胞性;肺癌,小细胞性;淋巴瘤,艾滋病相关性;淋巴瘤,伯基特氏;淋巴瘤,皮肤T细胞性,见蕈样肉芽肿病和塞扎里(Sezary)综合征;淋巴瘤,何杰金氏;淋巴瘤,妊娠期何杰金氏;淋巴瘤,非何杰金氏;淋巴瘤,妊娠期非何杰金氏;淋巴瘤,原发性中枢神经系统性;巨球蛋白血症,瓦尔登斯特氏(Waldenstrom's);恶性骨/骨肉瘤的纤维组织细胞瘤;髓母细胞瘤;黑色素瘤;黑色素瘤,眼内(眼);梅克尔(Merkel)细胞癌;间皮瘤,成人恶性;间皮瘤;具有隐匿性原发性的转移性颈部鳞癌;多发性内分泌瘤样综合征;多发性骨髓瘤/浆细胞肿瘤的蕈样肉芽肿;骨髓增生异常综合征;骨髓增生异常/骨髓增生性疾病;髓细胞性白血病,慢性;髓细胞性白血病,成人急性;髓细胞系白血病,儿童急性;骨髓瘤,多发性;骨髓增生性疾病,慢性;鼻腔和鼻窦癌;鼻咽癌;神经母细胞瘤;非何杰金氏淋巴瘤;妊娠期非何杰金氏淋巴瘤;口癌;口腔癌;唇和口咽癌;骨肉瘤/骨的恶性纤维组织细胞瘤;卵巢癌;卵巢上皮癌;卵巢生殖细胞癌;卵巢低度恶性潜能的肿瘤;胰腺癌;胰腺癌;胰腺癌,胰岛细胞性;甲状旁腺癌;阴茎癌;嗜铬细胞瘤;松果体母细胞瘤和幕上原发性神经外胚层肿瘤;垂体瘤;浆细胞

肿瘤/多发性骨髓瘤;胸膜肺母细胞瘤;妊娠与乳腺癌;妊娠与霍奇金淋巴瘤的;妊娠和何杰金氏淋巴瘤;妊娠与非何杰金氏淋巴瘤;原发性中枢神经系统淋巴瘤;前列腺癌;直肠癌;肾细胞(肾)癌;肾细胞(肾)癌;肾盂和输尿管,移行细胞癌;视网膜母细胞瘤;横纹肌肉瘤;涎腺癌;涎腺癌;肉瘤,尤文家族肿瘤;肉瘤,卡波济氏;肉瘤,软组织性;肉瘤,软组织性;肉瘤,子宫性;塞扎里综合征;皮肤癌(非黑色素瘤);皮肤癌;皮肤癌(黑色素瘤);皮肤癌,梅克尔细胞性;小细胞肺癌;小肠癌;软组织肉瘤;软组织肉瘤;鳞状细胞癌,见皮肤癌(非黑色素瘤);具有隐匿性原发性的颈部鳞癌,转移性;胃癌;胃癌,幕上原发性神经外胚层肿瘤;T细胞淋巴瘤,皮肤性,见蕈样肉芽肿和塞扎里综合征;睾丸癌;胸腺瘤;胸腺瘤和胸腺癌;甲状腺癌;甲状腺癌;肾盂和输尿管移行细胞癌;滋养细胞肿瘤,妊娠性;输尿管和肾盂,移行细胞癌;尿道癌;子宫癌,子宫内膜性;子宫肉瘤;阴道癌;视觉通路和下丘脑神经胶质瘤;外阴癌;瓦尔登斯特氏巨球蛋白血症;和肾母细胞瘤。

[0169] 在一种实施方式中,人抗核仁素抗体用于确定增生性疾病的存在。在一种实施方式中,分离的人抗核仁素单克隆抗体用于确定增生性疾病的存在。在一种实施方式中,人B细胞生成的人抗核仁素抗体用于确定增生性疾病的存在。本文所用术语“细胞增生性疾病”,“增生性疾病”和“瘤性疾病”指与某些程度的细胞增殖异常相关的疾病。

[0170] 在一种实施方式中,人抗核仁素抗体用于确定某恶性疾病的存在,所述疾病中核仁素在细胞表面或细胞质中表达。在一种实施方式中,分离的人抗核仁素单克隆抗体用于确定某恶性疾病的存在,所述疾病中核仁素在细胞表面或细胞质中表达。在一种实施方式中,提供由人B细胞表达的分离的人抗核仁素单克隆抗体并用于确定某恶性疾病的存在,所述疾病中核仁素在细胞表面或细胞质中表达。本文所用术语“恶性疾病”指进行性或转移性疾病或者以小肿瘤负荷为特征的疾病,例如微小残留病(minimal residual disease)。能用人抗核仁素抗体确定其存在的恶性疾病的示例包括但不限于白血病(例如,急性髓细胞性,急性淋巴细胞性和慢性髓细胞性)和癌症(例如,乳腺癌、肺癌、甲状腺癌或胃肠癌或黑色素瘤)。

[0171] 在一种实施方式中,人抗核仁素抗体用于确定某非恶性细胞增生性疾病的存在,所述疾病中核仁素在细胞表面或细胞质中表达。在一种实施方式中,分离的人抗核仁素单克隆抗体用于确定某非恶性细胞增生性疾病的存在,所述疾病中核仁素在细胞表面或细胞质中表达。在一种实施方式中,提供由人B细胞表达的分离的人抗核仁素单克隆抗体并用于确定某非恶性细胞增生性疾病的存在,所述疾病中核仁素在细胞表面或细胞质中表达。例如,可用分离的人抗核仁素单克隆抗体确定非恶性细胞增生性疾病的存在的非恶性细胞增生性疾病的具体非限制性示例包括但不限于疣、良性前列腺增生、皮赘和非恶性肿瘤。例如,分离的人抗核仁素单克隆抗体可通过靶向表征此类需去除病症的不希望的细胞用来确定细胞增生性疾病为良性前列腺增生或不希望的生殖器疱疹。在一种实施方式中,分离的人抗核仁素单克隆抗体用于确定某血管发生性肿瘤细胞的存在,所述细胞中核仁素在细胞表面或细胞质中表达。

[0172] 在一种实施方式中,人抗核仁素用于确定肿瘤的存在。本文所用“肿瘤”是指所有的成瘤性细胞生长和增殖,无论是恶性的还是良性的,以及所有的癌前和癌变的细胞和组织。

[0173] 在一种实施方式中,人抗核仁素抗体用于确定患有自身免疫性疾病的对象中在细胞表面或细胞质中表达人核仁素的细胞。在一种实施方式中,分离的人抗核仁素单克隆抗

体用于确定患有自身免疫性疾病的对象中在细胞表面或细胞质中表达人核仁素的细胞。在一种实施方式中,提供由人B细胞表达的分离的抗核仁素单克隆抗体并用于确定患有自身免疫性疾病的对象中在细胞表面或细胞质中表达人核仁素的细胞。在一种实施方式中,人抗核仁素抗体用于确定淋巴细胞中在其表面或细胞质中表达人核仁素的细胞。在一种实施方式中,分离的人抗核仁素单克隆抗体用于确定淋巴细胞中在其表面或细胞质中表达人核仁素的细胞。在一种实施方式中,提供由人B细胞表达的分离的抗核仁素单克隆抗体并用于确定淋巴细胞中在其表面或细胞质中表达人核仁素的细胞。在一种实施方式中,所述淋巴细胞包括B细胞,T细胞或天然杀伤细胞。在一种实施方式中,所述淋巴细胞包括CD4阳性或CD8阳性细胞。

[0174] 在一种实施方式中,人抗核仁素抗体用于确定活化淋巴细胞或记忆细胞中在其表面或细胞质中表达人核仁素的细胞。在一种实施方式中,分离的人抗核仁素单克隆抗体用于确定活化淋巴细胞或记忆细胞中在其表面或细胞质中表达人核仁素的细胞。在一种实施方式中,提供由人B细胞表达的分离的抗核仁素单克隆抗体并用于确定活化淋巴细胞或记忆细胞中在其表面或细胞质中表达人核仁素的细胞。在一种实施方式中,所述活化淋巴细胞包括活化的B细胞,T细胞或天然杀伤细胞。

[0175] 术语“自身免疫疾病或病症”指对象中以对其自身的细胞、组织和/或器官产生免疫反应而引起的细胞、组织和/或器官损伤为特征的病症。术语“炎症性疾病”可与术语“炎症病症”互换使用,指对象中以炎症,优选慢性炎症为特征的病症。自身免疫性疾病可能与或不与炎症相关联。而且,炎症可能是或不是由自身免疫性疾病引起的。因此,某些疾病既可能被鉴定为自身免疫病,又可被鉴定为炎症性疾病。可用人抗核仁素抗体诊断的示例性自身免疫性疾病或病症包括但不限于:斑秃、强直性脊柱炎、抗磷脂综合征、自身免疫性艾迪森病、哮喘、肾上腺的自身免疫病、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫肝炎、自身免疫性卵巢炎和睾丸炎、自身免疫性血小板减少、贝切特病、大疱型类天疱疮、心肌病、口炎性腹泻-皮炎、慢性疲劳免疫功能障碍综合征、慢性炎症性脱髓鞘多神经病、丘-施二氏综合征、疤痕性类天疱疮、CREST综合征、冷凝集素病、克罗恩氏病、盘状狼疮、特发性混合型冷球蛋白血症、糖尿病(例如I型)、糖尿病性视网膜病、嗜酸细胞性筋膜炎、纤维肌痛-纤维肌炎、肾小球肾炎、格拉夫斯病、格-巴二氏综合征、桥本甲状腺炎、亨-舍二氏紫癜、特发性肺纤维化、特发性/自身免疫血小板减少性紫癜(ITP)、IgA神经病、青少年关节炎、扁平苔藓、红斑狼疮、美尼尔综合征、混合型结缔组织病、多发性硬化、1型或免疫介导的糖尿病、重症肌无力、天疱疮相关疾病(如寻常性天疱疮)、骨髓增生异常综合征、恶性贫血、结节性多动脉炎、多软骨炎、多腺体综合征、风湿性多肌痛、多肌炎和皮肌炎、原发性丙种球蛋白缺乏症、原发性胆汁性肝硬化、牛皮癣、牛皮癣关节炎、雷氏现象、莱特尔综合征、类风湿性关节炎、结节病、硬皮病、斯耶格伦综合征、全身肌强直综合征、系统性红斑狼疮、斯维特综合征、斯提耳病、红斑狼疮、高安动脉炎、暂时性动脉炎/巨细胞动脉炎、溃疡性结肠炎、葡萄膜炎、血管炎如疱疹样皮炎血管炎、白癜风和韦格纳肉芽肿病。炎症性疾病的例子包括但不限于:哮喘、肠炎、炎性肠病、慢性阻塞性肺病、变应性疾病、感染性休克、肺纤维化、未分化的脊椎关节病、未分化的关节病、关节炎、炎性骨质溶解、移植物抗宿主病、荨麻疹、VKH综合征,慢性肺炎和慢性病毒或细菌感染所致的慢性炎症。

[0176] 在一种实施方式中,人抗核仁素抗体用于确定病毒感染细胞中在其表面或细胞质

中表达人核仁素的细胞。在一种实施方式中,分离的人抗核仁素单克隆抗体用于确定病毒感染细胞中在其表面或细胞质中表达人核仁素的细胞。在一种实施方式中,提供由人B细胞表达的分离的抗核仁素单克隆抗体并用于确定病毒感染细胞中在其表面或细胞质中表达人核仁素的细胞。核仁素在病毒感染细胞的细胞表面表达(Hovanessian等,2006;Bose等,2004;Izumi等,2001)。能感染细胞的病毒示例包括但不限于:逆转录病毒(Retroviridae)(例如,人免疫缺陷病毒,如HIV-1(也称为HTLV-III、LAV或HTLV-III/LAV或HIV-III);和其它分离株如HIV-LP);小核糖核酸病毒(Picornaviridae)(例如,脊髓灰质炎病毒、甲肝病毒;肠道病毒、人柯萨奇病毒、鼻病毒、埃可病毒群);杯状病毒(Calciviridae)(例如,导致胃肠炎的毒株);披盖病毒科(Togaviridae)(例如,马脑炎病毒、风疹病毒);黄病毒(Flaviridae)(例如,登革热病毒、脑炎病毒、黄热病病毒);日冕形病毒(Coronaviridae)(例如,冠形病毒);弹状病毒(Rhabdoviridae)(例如,水泡性口炎病毒、狂犬病病毒);纤丝病毒(Filoviridae)(例如,埃博拉病毒);副黏病毒(Paramyxoviridae)(例如,副流行性感冒病毒,腮腺炎病毒、麻疹病毒、呼吸道合胞体病毒);正粘病毒(Orthomyxoviridae)(例如,流感病毒);布尼亚病毒(Bunyaviridae)(例如,汉坦病毒、本呷(bunga)病毒、白蛉病毒和内罗(Nairo)病毒);沙状病毒(Arenaviridae)(出血热病毒);呼肠病毒(Reoviridae)(例如,呼肠病毒、环状病毒和轮状病毒);双股双节RNA病毒(Bimaviridae);肝DNA病毒(Hepadnaviridae)(乙肝病毒);微小病毒(Parvoviridae)(细小病毒);乳头瘤病毒(Papovaviridae)(乳头瘤病毒、多瘤病毒);腺病毒(Adenoviridae)(大多数腺病毒);疱疹病毒(Herpesviridae)(1型和2型单纯疱疹病毒(HSV)、水痘带状疱疹病毒、巨细胞病毒(CMV)、疱疹病毒);劳氏肉瘤病毒(RSV),禽类白血病病毒(ALV)和禽类成髓细胞血症病毒(AMV),和C型B组病毒(包括猫白血病病毒(FeLV)、长臂猿白血病病毒(GALV)、脾坏死病毒(SNV)、网状内皮组织增殖病毒(RV)和猿肉瘤病毒(SSV)),D-型逆转录病毒包括马森-法衣扎猴(Mason-Pfizer monkey)病毒(MPMV)和1型猿逆转录病毒(SRV-1),复合逆转录病毒包括慢病毒的亚组、T细胞白血病病毒和泡沫病毒,慢病毒包括HIV-1、HIV-2、SIV、绵羊髓鞘脱落病毒(Visna virus)、猫免疫缺陷病毒(FIV)和犬免疫缺陷病毒(EIAV)、猿T细胞白血病病毒(STLV)和牛白血病病毒(BLV),泡沫病毒包括人泡沫病毒(HFV)、猿泡沫病毒(SFV)和牛泡沫病毒(BFV),痘病毒(Poxviridae)(天花病毒、牛痘病毒、痘病毒);和虹彩病毒(Iridoviridae)(例如,非洲猪瘟病毒);和未分类病毒(例如,海绵样脑病的病因、丁型肝炎的病因(认为是乙肝病毒的缺陷性卫星型)、非甲非乙型肝炎(1类=内部传染;2类=肠胃传染(即丙型肝炎))的病因;诺瓦克(Norwalk)和相关病毒以及星状病毒)、分枝杆菌(Mycobacterium)(结核分枝杆菌(Mycobacterium tuberculosis)、牛型分枝杆菌(M. bovis)、鸟-胞内分枝杆菌(M. avium-intracellulare)、麻风分枝杆菌(M. leprae)),肺炎球菌(Pneumococcus),链球菌(Streptococcus),葡萄球菌(Staphylococcus),白喉菌(Diphtheria),利斯特菌(Listeria),丹毒丝菌(Erysipelothrix),炭疽(Anthrax),破伤风菌(Tetanus),梭状芽孢杆菌(Clostridium),混合厌氧菌,奈瑟氏菌(Neisseria),沙门氏菌(Salmonella),志贺氏菌(Shigella),嗜血杆菌(Hemophilus),大肠杆菌(Escherichia coli),克雷伯氏菌(Klebsiella),肠杆菌(Enterobacter),沙雷氏菌(Serratia),假单胞菌(Pseudomonas),博代杆菌(Bordetella),野兔热弗朗西丝菌(Francisella tularensis),耶尔森菌(Yersinia),霍乱弧菌(Vibrio cholerae),巴尔(Bartonella),军团菌

(Legionella),螺旋体(Spirochaetes)(密螺旋体(Treponema)、钩端螺旋体(Leptospira)、疏螺旋体(Borrelia)),真菌,放线菌(Actinomyces),立克次体(Rickettsia),支原体(Mycoplasma),衣原体(Chlamydia),原生动物(包括变形虫(Entamoeba)、疟原虫(Plasmodium)、利什曼虫(Leishmania)、锥虫(Trypanosoma)、弓形虫(Toxoplasma)、肺囊虫(Pneumocystis)、巴倍虫(Babesia)、贾第鞭毛虫(Giardia)、隐孢子虫(Cryptosporidium)、毛滴虫(Trichomonas)),蠕虫(旋毛虫(Trichinella)、丝虫(Wucheraria)、盘尾(Onchocerca)、血吸虫(Schistosoma)、线虫(Nematodes)、绦虫(Cestodes)、吸虫(Trematodes))和病毒性肺炎。已知本发明所述组合物能靶向的抗原的其它示例,例如美国专利公开号2007/0066554中所公开的那些。在另一实施方式中,偶联物可包含本文所述的抗原或细胞组分,但添加靶向部分和免疫刺激性核酸分子。

[0177] 在一种实施方式中,在利用抗核仁素抗体的治疗和/或诊断应用中使用可检测标记。“可检测标记”是允许检测所结合抗体的化合物和/或元素。本领域已知很多适当的成像试剂以及将它们与抗体结合的方法(参见例如,美国专利5,021,236,4,938,948和4,472,509,其各自通过引用纳入本文)。所用成像部分可用是顺磁离子;放射性同位素;荧光团;NMR-可检测物质;X-射线成像剂。其它试剂包括酶、半抗原、荧光标记、磷光分子、化学发光分子、发色团、光亲和分子、有色颗粒或配体,例如生物素。

[0178] 在一方面,所述可检测标记包括顺磁离子。顺磁离子的示例包括但不限于铬(III),锰(II),铁(III),铁(II),钴(II),镍(II),铜(II),钕(III),钐(III),铽(III),钆(III),钷(II),铽(III),镱(III),铈(III)和/或铈(III),特别优选钆。在其它情况如X-射线成像中可用的离子包括但不限于镧(III),金(III),铅(II)和铋(III)。在一方面,所述可检测标记包括放射性同位素。放射性同位素的示例包括但不限于:¹²⁴铯,¹²⁵铯,⁷⁴砷,²¹¹砷,¹⁰³钷,¹⁴⁰钷,⁷铍,²⁰⁶铋,²⁰⁷铋,¹⁰⁹镅,¹¹⁵镅,⁴⁵钙,¹⁴碳,¹³⁹铈,¹⁴¹铈,¹⁴⁴铈,¹³⁷铯,⁵¹铬,³⁶氯,⁵⁶钴,⁵⁷钴,⁵⁸钴,⁶⁰钴,⁶⁷铜,¹⁶⁹铒,¹⁵²铕,⁶⁷镱,¹⁵³钆,¹⁹⁵金,¹⁹⁹金,¹⁷⁵铟,¹⁷⁵⁺¹⁸¹铟,¹⁸¹铟,氢,¹²³碘,¹²⁵碘,¹³¹碘,¹¹¹铟,¹⁹²铪,⁵⁵铁,⁵⁹铁,⁸⁵氩,²¹⁰铅,¹⁷⁷镱,⁵⁴锰,¹⁹⁷汞,²⁰³汞,⁹⁹钼,¹⁴⁷钆,²³⁷镱,⁶³镍,⁹⁵铌,¹⁸⁵⁺¹⁹¹铀,¹⁰³钷,³²磷,¹⁸⁴铂,¹⁴³镨,¹⁴⁷钆,²³³镨,²²⁶镭,¹⁸⁶镭,¹⁸⁸镭,⁸⁶铷,¹³⁰钇,¹⁰⁶钇,⁴⁴钪,⁴⁶钪,⁴⁵钪,⁷⁵硒,^{110m}银,¹¹¹银,²²钠,⁸⁵锶,⁸⁹锶,⁹⁰锶,³⁵硫,¹⁸²钽,^{99m}锝,^{125m}碲,¹³²碲,¹⁶⁰铽,²⁰⁴铽,²²⁸钍,²³²钍,¹⁷⁰钪,¹¹³锡,⁴⁴钛,¹⁸⁵钨,⁴⁸钪,⁴⁹钪,⁸⁸钪,⁹⁰钪,⁹¹钪,¹⁶⁹铪,⁶⁵铪和⁹⁵铪。

[0179] 在一种实施方式中,因其低能量和适于长程检测而使用¹²⁵碘,^{99m}锝和/或¹¹¹铟。本发明的放射性标记单克隆抗体可按照本领域熟知的方法制得。例如,单克隆抗体可通过接触碘化钠和/或碘化钾与化学氧化剂如次氯酸钠或酶促氧化剂如乳过氧化物酶而碘化。本发明所述单克隆抗体可通过配体交换过程来用^{99m}锝标记,例如通过用亚锡溶液还原高锝酸盐,将所还原的锝整合到葡聚糖凝胶柱上并将所述抗体施用到该柱上。或者,可采用直接标记技术,例如,通过将高锝酸盐,还原剂如SNCI₂,缓冲溶液如邻苯二甲酸钠钾溶液和所述抗体一起孵育。将金属离子形式存在的放射性同位素与抗体结合的常用中间功能团是二乙烯三胺五乙酸(DTPA)或乙二胺四乙酸(EDTA)。

[0180] 在一种实施方式中,可检测标记包括荧光标记。荧光标记的示例包括但不限于Alexa 350,Alexa 430,AMCA,BODIPY 630/650,BODIPY650/665,BODIPY-FL,BODIPY-R6G,BODIPY-TMR,BODIPY-TRX,级联蓝(Cascade Blue),Cy3,Cy5,6-FAM,异硫氰酸荧光素,HEX,6-JOE,俄勒冈绿488,俄勒冈绿500,俄勒冈绿514,太平洋蓝,REG,罗丹明绿,罗丹明红,肾造

影剂,ROX,TAMRA,TET,四甲基若丹明,和/或德克萨斯红。

[0181] 本发明考虑的另一类抗体偶联物是主要针对体外应用的那些抗体偶联物,其中所述抗体连接有二级结合配体和/或在接触生色底物后将产生带色产物的酶(酶标签)。合适酶的示例包括但不限于脲酶,碱性磷酸酶,(辣根)过氧化氢酶或葡萄糖氧化酶。具体的二级结合配体是生物素和/或亲和素与链霉亲和素化合物。这类标记的使用为本领域技术人员熟知,且已有描述,例如在美国专利3,817,837;3,850,752;3,939,350;3,996,345;4,277,437;4,275,149和4,366,241中;这些均已通过引用纳入本文。

[0182] 将分子与抗体位点特异性结合的另一种已知方法包括使抗体与基于半抗原的亲标记反应。本质上,基于半抗原的亲标记与抗原结合位点中的氨基酸反应,从而破坏该位点并阻断特异性抗原反应。但是,这可能是不利的,因为导致丧失所述抗体偶联物的抗原结合。

[0183] 含有叠氮基的分子也可用来通过低强度紫外线产生的反应性氮烯中间体与蛋白质形成共价键(Potter和Haley,1983)。具体而言,嘌呤核苷酸的2-和8-叠氮类似物已用作定位光子来鉴定细胞粗提物中的核苷酸结合蛋白(Owens和Haley,1987;Atherton等,1985)。所述2-和8-叠氮核苷酸也已用来测定纯化蛋白的核苷酸结合域(Khatoun等,1989;King等,1989;Dholakia等,1989)并能用作抗体结合剂。

[0184] 本领域已知多种方法用于将抗体与其偶联部分结合或偶联。一些结合方法涉及使用金属螯合复合物,例如采用与抗体结合的有机螯合剂如二乙烯三胺五乙酸酐(DTPA);乙二胺四乙酸;N-氯-对-甲苯磺酰胺;和/或四氯-3 α -6 α -二苯基甘脲-3(美国专利4,472,509和4,938,948)。单克隆抗体也可在偶合剂如戊二醛或高碘酸的存在下与酶反应。在这些偶合剂的存在下或通过异硫氰酸盐反应制得含荧光标记物的偶联物。美国专利4,938,948中,采用单克隆抗体和结合于用接头如甲基-对-羟基苯甲亚胺酯或N-琥珀酰亚胺-3-(4-羟基苯基)丙酸盐结合所述抗体的可检测成像部分实现了乳腺癌的成像。

[0185] 在其它实施方式中,考虑通过利用不改变抗体结合部位的反应条件在免疫球蛋白的Fc区中选择性引入巯基进行免疫球蛋白的衍生化。公开了按此方法制得的抗体偶联物呈现改进的持久性、特异性和灵敏性(美国专利5,196,066,通过引用纳入本文)。文献也已报道效应物或报告分子的位点特异性结合,其中所述报告分子或效应分子与Fc区中的糖残基结合(O'Shannessy等,1987)。已报道该方法产生具有诊断和治疗前景的抗体,其正在进行临床评定。

[0186] 在一种实施方式中,本发明提供用人抗核仁素抗体所得诊断结果的数据传送方法。所述诊断试验可用于检测癌症或自身免疫性疾病。传送数据的示例可以通过网络公开本文所述任意方法的结果。在一种实施方式中,采集用人抗核仁素抗体对生物样品或对象进行诊断方法的结果,并通过数码方式例如传真、电子邮件、电话或全球通信网络如互联网(World Wide Web)传送所述信息。例如,数据可通过网站公布传送,例如通过预订或选择/保护网站接入和/或通过电子邮件和/或通过电话、IR、电台、电视或其他频率信号,和/或经缆线的电子信号和/或通过卫星传送和/或通过盘、压缩盘(CD)、计算机、硬盘或以电子形式包含所述信息的其它设备,和/或传送所述信息的书面形式,例如通过传真传送等。因此,本发明包括用户按本发明所述进行并传送所得信息;例如传送给一方或多方,他们然后进一步利用一些或全部所述数据或信息,例如用于制造产品,如治疗剂、试验和诊断测试品

等等。本发明包括用于存储或接收或传送含有本发明所述的方法或这些方法的应用所得信息的数据或信息的盘、CD、计算机或其它设备或工具。因此，本发明包括传送信息的方法包括进行本文所述方法并传送所得结果。

[0187] 在一方面，本发明提供进行开展业务的方法，其包括进行或使用本文所述方法中的一些或全部，并将用人抗核仁素抗体进行的诊断试验的结果通信或传送或透露，优选用以交换补偿，例如费用。优选地，所述信息的通信、传送或透露是通过电子方式，例如，通过因特网或电子邮件，或通过本文所述的任何其它传送方式。因此，本发明包括开展业务的方法。

[0188] 例如，第一方，某“客户”，可以例如通过本文提及的任意传送方式，向第二方，“供应商”，要求信息，所要求的可以是此前备妥或是专门定制的对于本发明所述方法和试验的结果的信息，例如，通过电子方式如通过因特网（例如要求输入网站）或通过电子邮件要求信息。所述供应商可以传送该信息，例如，通过本文提及的任意传送方式，优选通过电子方式，例如因特网（例如，保护或预订或选择接入网站）或电子邮件。所述信息可来自应所述要求进行本文所述某方法的一些或全部或使用本文某方法，或来自进行本文某方法的一些或全部，并由进行本文某方法的一些或全部或用本文的某算法产生的信息库。然后通过回应所述要求来允许所述客户接入所述库或从所述库选择数据而满足所述要求。

[0189] 因此，本发明还进一步包括从进行或使用本文发明来采集信息，例如，以电子形式（例如，上述传送形式）。

[0190] 例如，某客户医院可发现其需要确定某疾病如癌症的存在。所述医院可以联系精通本发明方法的某供应商以利用本文所述方法或本发明考虑的任何其它方法来快速测试或筛选来自对象的样品。筛选的结果可以收费传送回客户医院。

[0191] VI. MAb的治疗应用

[0192] A. 人单克隆抗核仁素抗体

[0193] 在一种实施方式中，提供可用于抑制或杀死癌细胞的人抗核仁素抗体。在另一实施方式中，提供可用于抑制或杀死癌细胞的分离的人抗核仁素单克隆抗体。在另一实施方式中，提供可用于抑制或杀死癌细胞的由人B细胞表达的分离的人抗核仁素单克隆抗体。在一种实施方式中，癌细胞在其表面或细胞质中表达人核仁素。可被人抗核仁素抗体抑制或杀死的癌细胞的示例包括但不限于：急性淋巴细胞性白血病；髓细胞性白血病；急性髓细胞性白血病；慢性髓细胞性白血病；肾上腺皮质癌肾上腺皮质癌；AIDS相关癌症；AIDS相关淋巴瘤；肛门癌；儿童小脑星形细胞瘤；儿童脑星形细胞瘤；基底细胞癌；胆管癌；肝外癌；膀胱癌；膀胱癌；骨癌；骨肉瘤/恶性纤维组织细胞瘤；脑干神经胶质瘤；脑瘤；脑瘤；脑干神经胶质瘤；脑肿瘤，小脑星形细胞瘤；脑肿瘤，脑星形细胞瘤/恶性神经胶质瘤；脑肿瘤，室管膜瘤；脑肿瘤，成神经管细胞瘤；脑肿瘤，幕上原发性神经外胚层肿瘤；脑肿瘤，视觉通路和下丘脑神经胶质瘤；女性乳腺癌；男性乳腺癌；支气管腺瘤/类癌；伯基特氏淋巴瘤；癌瘤；中枢神经系统淋巴瘤；小脑星形细胞瘤；脑星形细胞瘤/恶性神经胶质瘤；宫颈癌；慢性淋巴细胞白血病；慢性髓细胞白血病；慢性骨髓增生性疾病；结肠癌；结直肠癌；皮肤T细胞淋巴瘤；B细胞淋巴瘤子宫内膜癌；室鼓膜瘤；食管癌；食管癌；尤因氏家族肿瘤；颅外生殖细胞肿瘤；性腺外生殖细胞肿瘤；肝外胆管癌；眼癌，眼内黑色素瘤，眼癌，视网膜母细胞瘤；胆囊癌；胃癌；胃肠道类癌肿瘤；生殖细胞肿瘤，颅外；生殖细胞肿瘤，卵巢；妊娠滋养细胞肿瘤；神经胶

质瘤;神经胶质瘤,儿童脑干;神经胶质瘤,儿童脑星形细胞瘤;神经胶质瘤,儿童视觉通路和下丘脑;毛细胞白血病,头颈癌;肝细胞(肝)癌,成人(原发性);肝细胞(肝)癌,儿童(原发性);何杰金氏淋巴瘤;妊娠期何杰金氏淋巴瘤;下咽癌;下丘脑和视觉通路神经胶质瘤,眼内黑色素瘤;胰岛细胞癌(内分泌胰腺);卡波西氏肉瘤;肾(肾细胞)癌;肾癌;喉癌;白血病,急性淋巴细胞性;白血病,急性淋巴细胞性;白血病,急性骨髓性;白血病,急性骨髓性;白血病,慢性淋巴细胞性;白血病,慢性髓细胞性;唇和口腔癌;肝癌,成人(原发性);肝癌,儿童(原发性);肺癌,非小细胞性;肺癌,小细胞性;淋巴瘤,艾滋病相关性;淋巴瘤,伯基特氏;淋巴瘤,皮肤T细胞性,见蕈样肉芽肿病和塞扎里(Sezary)综合征;淋巴瘤,何杰金氏;淋巴瘤,妊娠期何杰金氏;淋巴瘤,非何杰金氏;淋巴瘤,妊娠期非何杰金氏;淋巴瘤,原发性中枢神经系统性;巨球蛋白血症,瓦尔登斯特氏(Waldenstrom's);恶性骨/骨肉瘤的纤维组织细胞瘤;髓母细胞瘤;黑色素瘤;黑色素瘤,眼内(眼);梅克尔(Merkel)细胞癌;间皮瘤,成人恶性;间皮瘤;具有隐匿性原发性的转移性颈部鳞癌;多发性内分泌瘤样综合征;多发性骨髓瘤/浆细胞肿瘤的蕈样肉芽肿;骨髓增生异常综合征;骨髓增生异常/骨髓增生性疾病;髓细胞性白血病,慢性;髓细胞性白血病,成人急性;髓细胞系白血病,儿童急性;骨髓瘤,多发性;骨髓增生性疾病,慢性;鼻腔和鼻窦癌;鼻咽癌;神经母细胞瘤;非何杰金氏淋巴瘤;妊娠期非何杰金氏淋巴瘤;口癌;口腔癌;唇和口咽癌;骨肉瘤/骨的恶性纤维组织细胞瘤;卵巢癌;卵巢上皮癌;卵巢生殖细胞瘤;卵巢低度恶性潜能的肿瘤;胰腺癌;胰腺癌;胰腺癌,胰岛细胞性;甲状旁腺癌;阴茎癌;嗜铬细胞瘤;松果体母细胞瘤和幕上原发性神经外胚层肿瘤;垂体瘤;浆细胞肿瘤/多发性骨髓瘤;胸膜肺母细胞瘤;妊娠与乳腺癌;妊娠与霍奇金淋巴瘤的;妊娠与何杰金氏淋巴瘤;妊娠与非何杰金氏淋巴瘤;原发性中枢神经系统淋巴瘤;前列腺癌;直肠癌;肾细胞(肾)癌;肾细胞(肾)癌;肾盂和输尿管,移行细胞癌;视网膜母细胞瘤;横纹肌肉瘤;涎腺癌;涎腺癌;肉瘤,尤文家族肿瘤;肉瘤,卡波济氏;肉瘤,软组织性;肉瘤,软组织性;肉瘤,子宫性;塞扎里综合征;皮肤癌(非黑色素瘤);皮肤癌;皮肤癌(黑色素瘤);皮肤癌,梅克尔细胞性;小细胞肺癌;小肠癌;软组织肉瘤;软组织肉瘤;鳞状细胞癌,见皮肤癌(非黑色素瘤);具有隐匿性原发性的颈部鳞癌,转移性;胃癌;胃癌,幕上原发性神经外胚层肿瘤;T细胞淋巴瘤,皮肤性,见蕈样肉芽肿和塞扎里综合征;睾丸癌;胸腺瘤;胸腺瘤和胸腺癌;甲状腺癌;甲状腺癌;肾盂和输尿管移行细胞癌;滋养细胞肿瘤,妊娠性;输尿管和肾盂,移行细胞癌;尿道癌;子宫癌,子宫内膜性;子宫肉瘤;阴道癌;视觉通路和下丘脑神经胶质瘤;外阴癌;瓦尔登斯特氏巨球蛋白血症;和肾母细胞瘤。

[0194] 在一种实施方式中,人抗核仁素抗体用于将对象样品中癌细胞的活力比不接触人抗核仁素抗体的细胞降低30-80%。在一种实施方式中,分离的人单克隆抗核仁素抗体用于将对象样品中癌细胞的活力比不接触人抗核仁素抗体的细胞降低30-80%。在一种实施方式中,提供由人B细胞生成的分离的人单克隆抗核仁素抗体并用于使对象样品中癌细胞的活力比不接触人抗核仁素抗体的细胞降低30-80%。

[0195] 在一种实施方式中,人抗核仁素抗体用于将对象中癌细胞的活力比不接触人抗核仁素抗体的细胞降低30-80%。在一种实施方式中,分离的人抗核仁素单克隆抗体用于使对象中癌细胞的活力比不接触人抗核仁素抗体的细胞降低30-80%。在一种实施方式中,提供由人B细胞生成的分离的人抗核仁素单克隆抗体并用于使对象中癌细胞的活力比不接触人抗核仁素抗体的细胞降低30-80%。

[0196] 在一种实施方式中,将人抗核仁素抗体给予患有有一种或多种形式癌症的人对象。在一种实施方式中,将分离的人抗核仁素单克隆抗体给予患有有一种或多种形式癌症的人对象。在一种实施方式中,至少一种或多种形式的癌症被人抗核仁素抗体抑制或杀死。在一种实施方式中,将分离的人抗核仁素单克隆抗体给予人对象,其中所述癌症耐受其它癌症治疗。在一种实施方式中,提供由人B细胞生成的分离的人抗核仁素单克隆抗体,给予人对象,其中所述癌症耐受其它癌症治疗。例如,癌症可以耐受放疗、化疗或生物制剂疗法。在一种实施方式中,所述人对象的免疫系统对分离的人抗核仁素抗体的耐受优于对分离的非人抗核仁素抗体。在另一实施方式中,所述人对象的免疫系统对分离的人抗核仁素抗体的耐受优于对分离的人源化抗核仁素抗体。在另一实施方式中,所述人对象的免疫系统对分离的人抗核仁素抗体的耐受优于对分离的嵌合抗核仁素抗体。

[0197] 在一种实施方式中,作为辅助治疗的部分,人抗核仁素抗体用于抑制或杀死细胞。在一种实施方式中,作为辅助治疗的部分,分离的人抗核仁素单克隆抗体用于抑制或杀死细胞。在一种实施方式中,提供由人B细胞表达的分离的抗核仁素单克隆抗体并用作辅助治疗的部分。辅助治疗可包括化疗、放疗、激素治疗、靶向治疗或生物制剂治疗。本文所用辅助治疗指在初步治疗后给予的治疗以降低癌症复发的风险。

[0198] 在一种实施方式中,人抗核仁素抗体与辅助治疗联用于抑制或杀死细胞。在一种实施方式中,分离的人抗核仁素单克隆抗体与辅助治疗联用于抑制或杀死细胞。在一种实施方式中,提供由人B细胞表达的分离的抗核仁素单克隆抗体并作为辅助治疗的部分。辅助治疗可包括化疗、放疗、激素治疗、靶向治疗或生物制剂治疗。

[0199] 在一种实施方式中,人抗核仁素抗体用于抑制或杀死某非恶性细胞增生性疾病的细胞,其中核仁素在细胞表面或细胞质中表达。在一种实施方式中,分离的人抗核仁素单克隆抗体用于抑制或杀死某非恶性细胞增生性疾病的细胞,其中核仁素在细胞表面或细胞质中表达。在一种实施方式中,所述分离的人抗核仁素单克隆抗体由人B细胞表达。例如,可用抗核仁素抗体治疗或抑制的非恶性细胞增生性疾病的具体非限制性示例包括但不限于疣、良性前列腺增生、皮赘和非恶性肿瘤。例如,分离的人抗核仁素单克隆抗体可通过靶向表征此类需去除病症的不希望的细胞用来确定细胞增生性疾病为良性前列腺增生或不希望的生殖器疱疹。肿瘤中内皮细胞的细胞表面核仁素表达已显示为肿瘤血管发生的独特标记物(Christian等,2003)。在一种实施方式中,人抗核仁素抗体用于抑制或杀死对象中的细胞包括血管发生性肿瘤。在一种实施方式中,分离的人抗核仁素单克隆抗体用于抑制或杀死对象中的细胞包括血管发生性肿瘤。在一种实施方式中,提供由人B细胞表达的分离的人抗核仁素单克隆抗体,其能抑制或杀死对象中的细胞包括血管发生性肿瘤。本文所用的血管发生性肿瘤指肿瘤细胞具有血管网络增生穿透癌性生长提供养分和氧气并去除废产物。

[0200] 在一种实施方式中,人抗核仁素抗体用于抑制或杀死对象中肿瘤缺氧条件下的肿瘤细胞。在一种实施方式中,分离的人抗核仁素单克隆抗体用于抑制或杀死对象中肿瘤缺氧条件下的肿瘤细胞。在一种实施方式中,提供由人B细胞表达的分离的人抗核仁素单克隆抗体,其能抑制或杀死对象中肿瘤缺氧条件下的肿瘤细胞。肿瘤缺氧发生在肿瘤细胞被去除氧气的情况中。肿瘤缺氧可能是肿瘤组织中高度细胞增殖导致较高细胞密度从而加重局部供氧负担的结果。

[0201] 在一种实施方式中,人抗核仁素抗体用于抑制或杀死对象中在其表面表达人核仁

素的淋巴细胞。在一种实施方式中,分离的人抗核仁素单克隆抗体用于抑制或杀死对象中在表面表达人核仁素的淋巴细胞。在一种实施方式中,提供分离的人抗核仁素单克隆抗体,其用于抑制或杀死对象中在其表面表达人核仁素的淋巴细胞。在一种实施方式中,所述淋巴细胞包括B细胞,T细胞或天然杀伤细胞。在一种实施方式中,所述淋巴细胞包括CD4阳性或CD8阳性细胞。

[0202] 在一种实施方式中,人抗核仁素抗体用于抑制或杀死对象中在其表面表达人核仁素的活化淋巴细胞或记忆细胞。在一种实施方式中,分离的人抗核仁素单克隆抗体用于抑制或杀死对象中在其表面表达人核仁素的活化淋巴细胞或记忆细胞。在一种实施方式中,提供由人B细胞表达的分离的人抗核仁素单克隆抗体,其用于抑制或杀死对象中在其表面表达人核仁素的活化淋巴细胞或记忆细胞。在又一种实施方式中,所述活化淋巴细胞包括活化的B细胞,T细胞或天然杀伤细胞。在一种实施方式中,人抗核仁素抗体用于抑制或杀死患有自身免疫性疾病的对象中的细胞。在一种实施方式中,分离的人抗核仁素单克隆抗体用于抑制或杀死患有自身免疫性疾病的对象中的细胞。在一种实施方式中,提供由人B细胞表达的分离的人抗核仁素单克隆抗体,其用于抑制或杀死患有自身免疫性疾病的对象中的细胞。

[0203] 在一种实施方式中,人抗核仁素抗体用于抑制或杀死患有自身免疫性疾病的对象中的细胞。在一种实施方式中,分离的人抗核仁素单克隆抗体用于抑制或杀死患有自身免疫性疾病的对象中的细胞。在一种实施方式中,提供由人B细胞表达的分离的人抗核仁素单克隆抗体,其能抑制或杀死患有自身免疫性疾病的对象中的细胞。CD40和CD40配体相互作用介导T-依赖性B细胞应当和有效T细胞初敏,且已显示核仁素与CD40配体相互作用。(Geahlen等,1984)在一种实施方式中,分离的人抗核仁素单克隆抗体用于抑制或杀死患有自身免疫性疾病的对象中的细胞,其中所述细胞以活化CD40受体为特征。在一种实施方式中,所述细胞在其表面或细胞质中表达人核仁素。在一种实施方式中,所述细胞是淋巴细胞。在一种实施方式中,所述淋巴细胞是B细胞或T细胞。在一种实施方式中,所述淋巴细胞是活化的。可通过使用人抗核仁素抗体诊断的示例性自身免疫性疾病或病症包括但不限于:斑秃、强直性脊柱炎、抗磷脂综合征、自身免疫性艾迪森病、哮喘、肾上腺的自身免疫病、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫肝炎、自身免疫性卵巢炎和睾丸炎、自身免疫性血小板减少、贝切特综合征、大疱型类天疱疮、心肌病、口炎性腹泻-皮炎、慢性疲劳免疫功能障碍综合征、慢性炎性脱髓鞘多神经病、丘-施二氏综合征、疤痕性类天疱疮、CREST综合征、冷凝集素病、克罗恩氏病、盘状狼疮、特发性混合型冷球蛋白血症、I型糖尿病、糖尿病性视网膜病、嗜酸性细胞性筋膜炎、纤维肌痛-纤维肌炎、肾小球肾炎、格拉夫斯病、格-巴二氏综合征、桥本甲状腺炎、亨-舍二氏紫癜、特发性肺纤维化、特发性/自身免疫血小板减少性紫癜(ITP)、IgA神经病、青少年关节炎、扁平苔藓、红斑狼疮、美尼尔综合征、混合型结缔组织病、多发性硬化、I型或免疫介导的糖尿病、重症肌无力、天疱疮相关疾病(如寻常性天疱疮)、恶性贫血、结节性多动脉炎、多软骨炎、多腺体综合征、风湿性多肌痛、多肌炎和皮肌炎、原发性丙种球蛋白缺乏症、原发性胆汁性肝硬化、牛皮癣、牛皮癣关节炎、雷氏现象、莱特尔综合征、类风湿性关节炎、结节病、硬皮病、斯耶格伦综合征、全身肌强直综合征、系统性红斑狼疮、斯维特综合征、斯提耳病、红斑狼疮、高安动脉炎、暂时性动脉炎/巨细胞动脉炎、溃疡性结肠炎、葡萄膜炎、血管炎如疱疹样皮炎血管炎、白癜风和韦格纳肉芽肿病。炎症性疾病的例子

包括但不限于：哮喘、肠炎、炎性肠病、慢性阻塞性肺病、过敏性疾病、感染性休克、肺纤维化、未分化的脊椎关节病、未分化的关节病、关节炎、炎性骨质溶解、移植物抗宿主病、荨麻疹、VKH综合征，慢性肺炎和慢性病毒或细菌感染所致的慢性炎症。

[0204] 在另一实施方式中，人抗核仁素抗体用于抑制或杀死被病毒感染对象中的细胞。在另一实施方式中，分离的人抗核仁素单克隆抗体用于抑制或杀死被病毒感染对象中的细胞。在一种实施方式中，提供由人B细胞表达的分离的人抗核仁素单克隆抗体，其能抑制或杀死被病毒感染的对象中的细胞。能感染细胞的病毒示例包括但不限于：逆转录病毒(Retroviridae) (例如，人免疫缺陷病毒，如HIV-1 (也称为HTLV-III、LAV or HTLV-III/LAV或HIV-III)；和其它分离株如HIV-LP)；小核糖核酸病毒(Picornaviridae) (例如，脊髓灰质炎病毒、甲肝病毒；肠道病毒、人柯萨奇病毒、鼻病毒、埃可病毒群)；杯状病毒(Calciviridae) (例如，导致胃肠炎的毒株)；披盖病毒科(Togaviridae) (例如，马脑炎病毒、风疹病毒)；黄病毒(Flaviridae) (例如，登革热病毒、脑炎病毒、黄热病病毒)；日冕形病毒(Coronaviridae) (例如，冠形病毒)；弹状病毒(Rhabdoviridae) (例如，水泡性口炎病毒、狂犬病病毒)；纤丝病毒(Filoviridae) (例如，埃博拉病毒)；副黏病毒(Paramyxoviridae) (例如，副流行性感冒病毒，腮腺炎病毒、麻疹病毒、呼吸道合胞体病毒)；正粘病毒(Orthomyxoviridae) (例如，流感病毒)；布尼亚病毒(Bunyaviridae) (例如，汉坦病毒、本岬(bunga)病毒、白蛉病毒和内罗(Nairo)病毒)；沙状病毒(Arena viridae) (出血热病毒)；呼肠病毒(Reoviridae) (例如，呼肠病毒、环状病毒和轮状病毒)；双股双节RNA病毒(Bimaviridae)；肝DNA病毒(Hepadnaviridae) (乙肝病毒)；微小病毒(Parvovirida) (细小病毒)；乳头泡病毒(Papovaviridae) (乳头瘤病毒、多瘤病毒)；腺病毒(Adenoviridae) (大多数腺病毒)；疱疹病毒(Herpesviridae) (1型和2型单纯疱疹病毒(HSV)、水痘带状疱疹病毒、巨细胞病毒(CMV)、疱疹病毒)；劳氏肉瘤病毒(RSV)，禽类白血病毒(ALV)和禽类成髓细胞血症病毒(AMV))，和C型B组病毒(包括猫白血病毒(FeLV)、长臂猿白血病毒(GALV)、脾坏死病毒(SNV)、网状内皮组织增殖病毒(RV)和猿肉瘤病毒(SSV))，D-型逆转录病毒包括马森-法衣扎猴(Mason-Pfizer monkey)病毒(MPMV)和1型猿逆转录病毒(SRV-1)，复合逆转录病毒包括慢病毒的亚组、T细胞白血病毒和泡沫病毒，慢病毒包括HIV-1、HIV-2、SIV、绵羊髓鞘脱落病毒(Visna virus)、猫免疫缺陷病毒(FIV)和犬免疫缺陷病毒(EIAV)、猿T细胞白血病毒(STLV)和牛白血病毒(BLV)，泡沫病毒包括人泡沫病毒(HFV)、猿泡沫病毒(SFV)和牛泡沫病毒(BFV)，痘病毒(Poxyviridae) (天花病毒、牛痘病毒、痘病毒)；和虹彩病毒(Iridoviridae) (例如，非洲猪瘟病毒)；和未分类病毒(例如，海绵样脑病的病因、丁型肝炎的病因(认为是乙肝病毒的缺陷性卫星型)、非甲非乙型肝炎(1类=内部传染；2类=肠胃传染(即丙型肝炎))的病因；诺瓦克(Norwalk)和相关病毒以及星状病毒)、分枝杆菌(Mycobacterium) (结核分枝杆菌(Mycobacterium tuberculosis)、牛型分枝杆菌(M. bovis)、鸟-胞内分枝杆菌(M. avium-intracellulare)、麻风分枝杆菌(M. leprae))，肺炎球菌(Pneumococcus)，链球菌(Streptococcus)，葡萄球菌(Staphylococcus)，白喉菌(Diphtheria)，利斯特菌(Listeria)，丹毒丝菌(Erysipelothrix)，炭疽(Anthrax)，破伤风菌(Tetanus)，梭状芽孢杆菌(Clostridium)，混合厌氧菌，奈瑟氏菌(Neisseria)，沙门氏菌(Salmonella)，志贺氏菌(Shigella)，嗜血杆菌(Hemophilus)，大肠杆菌(Escherichia coli)，克雷伯氏菌(Klebsiella)，肠杆菌

(Enterobacter), 沙雷氏菌 (Serratia), 假单胞菌 (Pseudomonas), 博代杆菌 (Bordatella), 野兔热弗朗西丝菌 (Francisella tularensis), 耶尔森菌 (Yersinia), 霍乱弧菌 (Vibrio cholerae), 巴尔 (Bartonella), 军团菌 (Legionella), 螺旋体 (Spirochaetes) (密螺旋体 (Treponema)、钩端螺旋体 (Leptospira)、疏螺旋体 (Borrelia)), 真菌, 放线菌 (Actinomyces), 立克次体 (Rickettsia), 支原体 (Mycoplasma), 衣原体 (Chlamydia), 原生动物 (包括变形虫 (Entamoeba)、疟原虫 (Plasmodium)、利什曼虫 (Leishmania)、锥虫 (Trypanosoma)、弓形虫 (Toxoplasma)、肺囊虫 (Pneumocystis)、巴倍虫 (Babesia)、贾第鞭毛虫 (Giardia)、隐孢子虫 (Cryptosporidium)、毛滴虫 (Trichomonas)), 蠕虫 (旋毛虫 (Trichinella)、丝虫 (Wucheraria)、盘尾 (Onchocerca)、血吸虫 (Schistosoma)、线虫 (Nematodes)、绦虫 (Cestodes)、吸虫 (Trematodes)) 和病毒性肺炎。已知本发明所述组合物能靶向的抗原的其它示例, 例如美国专利公开号 2007/0066554 中所公开的那些。本发明的另一方面, 偶联物可包含本文所述的抗原或细胞组分, 但添加靶向部分和免疫刺激性核酸分子。

[0205] 在一种实施方式中, 人抗核仁素抗体用于抑制或杀死来自对象的样品中作为疾病存在指示剂的细胞。在一种实施方式中, 分离的人抗核仁素单克隆抗体用于抑制或杀死来自对象的样品中作为疾病预后指示剂的细胞。在一种实施方式中, 提供由人 B 细胞表达的分离的人抗核仁素单克隆抗体用于抑制或杀死来自对象的样品中作为疾病预后指示剂的细胞。所测试疾病的示例包括但不限于恶性肿瘤, 非恶性肿瘤、自身免疫性疾病、炎症疾病和感染疾病。

[0206] B. 抗体偶联物

[0207] 在一种实施方式中, 本发明提供连接有至少一种治疗剂以形成抗体偶联物的分离的人抗核仁素抗体。在一种实施方式中, 连接或共价结合或复合有至少一种治疗剂如分子或部分的分离的人抗核仁素抗体的功效。治疗剂包括具有所需活性如细胞毒性的分子。在一种实施方式中, 能结合抗体的治疗剂包括但不限于毒素 (如催化抑制蛋白合成延伸步骤的肽免疫毒素), 抗肿瘤剂, 治疗性酶, 放射性核素, 抗病毒剂, 如本文所述的螯合剂, 细胞因子, 生长因子, 或寡核苷酸或多核苷酸。偶联方法与前文就诊断剂所述相似。

[0208] 在一种实施方式中, 分离的人抗核仁素抗体与酶活性毒素或其片段偶联。酶活性毒素及其片段的示例包括但不限于白喉 A 链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素 A 链 (来自绿脓假单胞菌)、蓖麻毒蛋白 A 链、相思豆毒蛋白 A 链、蒴莲根毒素 A 链、 α -八叠菌素、油桐蛋白、石竹素蛋白、美洲商陆蛋白 (PAPI、PAPII 和 PAP-S)、美洲商陆抗病毒蛋白、苦瓜抑制剂、泻果素、巴豆毒蛋白、肥皂草抑制剂、白树毒素、迈托毒素 (mitogellin)、局限曲菌素、酚霉素、依诺霉素、卡奇霉素或单端孢霉烯族毒素。

[0209] 在另一实施方式中, 分离的人抗核仁素抗体偶联有放射性核素。适合放射性核素的示例包括但不限于:¹²⁴铈,¹²⁵铈,⁷⁴砷,²¹¹砷,¹⁰³钋,¹⁴⁰钋,⁷铍,²⁰⁶铋,²⁰⁷铋,²¹²铋,¹⁰⁹镅,¹¹⁵镅,⁴⁵钙,¹⁴碳,¹³⁹铈,¹⁴¹铈,¹⁴⁴铈,¹³⁷铯,⁵¹铬,³⁶氯,⁵⁶钴,⁵⁷钴,⁵⁸钴,⁶⁰钴,⁶⁷钴,¹⁶⁹铈,¹⁵²铈,⁶⁷镱,¹⁵³钆,¹⁹⁵金,¹⁹⁹金,¹⁷⁵铪,¹⁷⁵⁺¹⁸¹铪,¹⁸¹铪,³氢,¹²³碘,¹²⁵碘,¹³¹碘,¹¹¹铟,¹³¹铟,¹⁹²铪,⁵⁵铁,⁵⁹铁,⁸⁵氦,²¹⁰铅,¹⁷⁷镱,⁵⁴镱,¹⁹⁷汞,²⁰³汞,⁹⁹钼,¹⁴⁷钼,²³⁷镎,⁶³镍,⁹⁵铈,¹⁸⁵⁺¹⁹¹铈,¹⁰³钪,³²磷,¹⁸⁴铂,¹⁴³镱,¹⁴⁷铈,²³³镱,²²⁶镱,¹⁸⁶镱,¹⁸⁸镱,⁸⁶铷,¹³⁰钪,¹⁰⁶钪,⁴⁴钪,⁴⁶钪,⁴⁵硒,⁷⁵硒,^{110m}银,¹¹¹银,²²钠,⁸⁵锶,⁸⁹锶,⁹⁰锶,³⁵硫,¹⁸²钽,^{99m}钽,^{125m}碲,¹³²碲,¹⁶⁰铀,²⁰⁴铀,²²⁸铀,²³²铀,¹⁷⁰铀,¹¹³锡,⁴⁴钛,¹⁸⁵钨,⁴⁸钒,⁴⁹

钷,⁸⁸钷,⁹⁰钷,⁹¹钷,¹⁶⁹镱,⁶⁵锌和/或⁹⁵锆。

[0210] 所述抗体与细胞毒剂的偶联可以利用多种双功能蛋白偶联剂完成,例如N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶二巯基)丙酸盐(SPDP),亚氨基四氢噻吩(IT),亚胺酸酯的双功能衍生物(如己二酸亚氨酸二甲酯HCL),活性酯(如二琥珀酰亚胺基辛二酸酯),醛(例如戊二醛),双叠氮化合物(例如双(p-叠氮苯甲酰基)己二胺),双重氮衍生物(例如双-(p-重氮苯甲酰基)-乙二胺),二异氰酸酯(例如甲苯2,6-二异氰酸酯)和双活性氟化合物(例如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。例如,蓖麻毒素免疫毒素可按Vitetta等(1987)所述制备。碳-14-标记的1-异硫氰苄基-3-亚甲二氧基三胺五乙酸(MX-DTPA)为用于偶联放射性核素与抗体的示例性螯合剂。参见WO 94/11026。

[0211] 在一种实施方式中,分离的人抗核仁素抗体偶联有细胞因子。术语“细胞因子”是对细胞群体所释放的作为分子间介体作用于另一细胞蛋白质的统称。这类细胞因子的例子是淋巴因子、单核因子和传统的多肽激素。细胞因子包括生长激素,如人生长激素、N-甲硫氨酰基人生长激素和牛生长激素;甲状旁腺激素;甲状腺素;胰岛素;胰岛素原;松弛素;松弛素原;糖蛋白激素,如促卵泡激素(FSH)、促甲状腺激素(TSH)和黄体生成素(LH);肝生长因子;成纤维细胞生长因子;促乳素;胎盘催乳素;肿瘤坏死因子- α 和- β ;缪勒管抑制物质;小鼠促性腺素相关肽;抑制素;活化素;血管内皮生长因子;整联蛋白;血小板生成素(TPO);神经生长因子,如NGF- β ;血小板生长因子;转化生长因子(TGF),如TGF- α 和TGF- β ;胰岛素样生长因子-I和-II;红细胞生成素(EPO);骨诱导因子;干扰素如干扰素- α 、- β 和- γ ;集落刺激因子(CSF),如巨噬细胞-CSF(M-CSF);粒细胞-巨噬细胞-CSF(GM-CSF);和粒细胞-CSF(G-CSF);白介素(IL),如IL-1、IL-1 α 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-11、IL-12;和其它多肽因子,包括LIF和kit配体(KL)。本文所用术语“细胞因子”包括天然来源或重组细胞培养物来源的蛋白质,以及天然序列细胞因子的生物活性等同物。

[0212] 在另一实施方式中,分离的人抗核仁素抗体偶联有化疗剂。多种也描述为“化疗剂”的化合物起诱发DNA损伤的作用。适于和分离的人抗核仁素抗体偶联的化疗剂类别包括但不限于:烷化剂、蒽环类、细胞骨架破坏剂、埃博霉素类、I型拓扑异构酶抑制剂、II型拓扑异构酶抑制剂,核苷和核苷类似物与前体类似物,肽抗生素,铂基试剂,类视黄醇或长春花生物碱及衍生物。这些组内的具体化疗剂包括但不限于放线菌素D、全反式视黄酸阿扎胞苷、阿霉素硫唑嘌呤、博来霉素、喜树碱、卡铂、卡培他滨、顺铂、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、阿糖胞苷、道诺红菌素、多西他赛、多西氟尿嘧啶、多柔比星、表阿霉素、埃博霉素、依托泊苷、氟尿嘧啶、5-氟尿嘧啶(5FU)、吉西他滨、羟基脲、过氧化氢、伊达比星、伊马替尼、双氯乙基甲胺、巯基嘌呤、甲氨蝶呤、丝裂霉素C、米托蒽醌、奥沙利铂、紫杉醇、培美曲塞、替尼泊苷、替尼泊苷、硫鸟嘌呤、戊柔比星、长春碱、长春新碱、长春碱酰胺、长春瑞宾。本发明还包括一种或多种DNA破坏剂的组合的应用,无论所述破坏剂是基于辐射或是实际的化合物,例如X射线与顺铂的应用或顺铂与依托泊苷的应用。

[0213] 在另一实施方式中,分离的人抗核仁素抗体偶联有抗病毒剂。可与分离的人抗核仁素抗体一起使用的抗病毒剂的示例包括但不限于底物与底物类似物,抑制剂和严重损害、减弱或另行破坏病毒感染细胞的其它试剂。底物类似物包括氨基酸和核苷类似物。底物可偶联有毒素或其他杀病毒物质。抑制剂包括整合酶抑制剂、蛋白酶抑制剂、聚合酶抑制剂和转录酶抑制剂如逆转录酶抑制剂。

[0214] 可与分离的人抗核仁素抗体一起使用的具体抗病毒剂包括但不限于:更昔洛韦, 盐酸缬更昔洛韦, 奥司他韦(达菲), 扎那米韦(乐感清), 阿巴卡韦, 阿昔洛韦, 阿德福韦, 金刚烷胺, 安泼那韦, 安普利近, 阿比朵尔, 阿扎那韦, 艾它普拉(Atripla), 波西普韦, 西多福韦, 可比韦, 达鲁那韦, 地拉韦啉, 地达诺新, 二十二烷醇, 依度尿苷, 依法韦仑, 恩曲他滨, 依非韦伦, 恩夫韦地, 恩替卡韦, 泛昔洛韦, 福米韦生, 福沙那韦, 膦甲酸, 膦乙酸, 融合抑制剂(如恩夫韦地), 伊巴他滨, 异丙肌苷, 碘苷, 咪喹莫特, 茚地那韦, 肌苷, 整合酶抑制剂, III型干扰素, II型干扰素, I型干扰素, 干扰素, 拉米夫定, 洛匹那韦, 洛韦安, 马拉韦诺, 吗啉胍, 奈非那韦, 奈韦拉平, 奈克萨韦(nexavir), 核苷类似物, 聚乙二醇干扰素 α -2a, 喷昔洛韦, 帕拉米韦, 普来可那利(pleconaril), 鬼臼毒素, 蛋白酶抑制剂, 拉替拉韦, 逆转录酶抑制剂, 利巴韦林, 金刚乙胺, 利托那韦, 嘧啶抗病毒剂, 沙奎那韦, 司他夫定, 协同增强剂(抗逆转录病毒), 替诺福韦, 替诺福韦酯, 替拉那韦, 三氟胸苷, 三协唯, 醋胺金刚胺, 恩曲他滨和替诺福韦联用, 伐昔洛韦(Valtrex), 委可韦洛(vicriviroc), 阿糖腺苷, 韦拉米啉, 扎西他滨和齐多夫定。

[0215] 可用于和分离的人抗核仁素抗体一起使用的核苷类似物的示例包括阿昔洛韦(ACV), 更昔洛韦(GCV), 法昔洛韦, 膦甲酸, 利巴韦林, 扎西他滨(ddC), 齐多夫定(AZT), 司他夫定(D4T), 拉米夫定(3TC), 双脱氧胞苷(ddI), 阿糖胞苷, 双脱氧肌苷, 依度尿苷, 氟尿苷, 碘苷, 异丙肌苷, 2'-脱氧-5-(甲氨基)尿苷, 三氟胸苷和阿糖腺苷。

[0216] C. 药物组合物和给药

[0217] 设想就对需要给药的对象而言, 抗体将悬浮于适于给予宿主的制剂中。在一种实施方式中, 所述抗体是单克隆抗体。在一种实施方式中, 所述单克隆抗体是抗核仁素抗体。在一种实施方式中, 所述抗核仁素单克隆抗体是人抗核仁素单克隆抗体。本发明的水性组合物包含分散在药学上可接受的制剂和/或水性介质中的有效量抗体。短语“制药上和/或药学上可接受的”指组合物在恰当地给予动物特别是人时不产生不利、过敏性和/或其它不良反应。

[0218] 本文所用术语“药学上可接受的载体”包括任何溶剂, 分散介质, 包衣, 抗菌剂和/或抗真菌剂, 等渗剂和/或吸收延迟剂, 等等。本领域熟知这些介质和试剂用于药物活性物质的用途。除非任何常规介质或试剂都与活性成分不相容, 否则应考虑在治疗组合物中使用这些介质或试剂。也可在组合物中引入补充活性成分。就人的给药而言, 制品应当满足FDA生物制品标准部(Office of Biologics standards)要求的无菌性、致热原性、常规安全 and/或纯度标准。

[0219] 在一种实施方式中, 本发明的人抗核仁素抗体可在任何无菌、生物相容性药物载体中给予, 所述载体包括但不限于盐水、缓冲盐水、右旋糖和水。任意这些分子可以单独, 或与其它试剂、药物或激素一起和适当赋形剂、佐剂和/或药学上可接受载体一起混合在药物组合物中给予患者。本发明的一种实施方式中, 所述药学上可接受的载体是药学上无活性的。

[0220] 药物组合物的给予经口或肠胃外实现。肠胃外递送的方法包括局部、动脉内(例如, 直接到肿瘤), 肌肉内, 皮下, 髓内的, 鞘内的, 心室内, 静脉内, 腹膜内或鼻内给予。除了活性成分外, 这些药物组合物还可包含合适的药学上可接受的载体, 包括利于将活性化合物加工成药学可用制剂的赋形剂和其它化合物。制剂和给药技术的更多细节可参见最新版

的Remington's Pharmaceutical Sciences(《雷明顿药物科学》)(宾夕法尼亚州伊斯顿的麦克出版公司(Maack Publishing Co.,Easton,PA))。

[0221] 可使用本领域熟知的药学上可接受的载体,以口服给药合适剂量,配制用于口服给药的药物组合物。此类载体使药物组合物可以配制为片剂、丸剂、糖衣剂、胶囊剂、液体、凝胶剂、糖浆、浆液、混悬剂等适于患者消化。参见PCT公开号WO 93/23572。

[0222] 可通过以下方法获得口服用途的药物制剂:将活性化合物与固体赋形剂混合,任选将所得混合物研磨,在加入合适的补充化合物后将该混合物加工成颗粒,如果需要,获得片剂或糖衣剂芯体。合适的赋形剂是糖或蛋白质填充物,包括但不限于糖,包括乳糖、蔗糖、甘露醇或山梨糖醇;来自玉米、小麦、稻米、土豆或其它植物的淀粉;纤维素,如甲基纤维素、羟丙基甲基-纤维素或羧甲基纤维素钠;胶质物,包括阿拉伯胶和黄芪胶;以及蛋白质如明胶和胶原。需要的话,可加入崩解剂或增溶剂,如交联聚乙烯吡咯烷酮、琼脂、藻酸或其盐,如藻酸钠。

[0223] 糖衣剂芯体提供有合适的包衣剂,如浓缩糖溶液联合使用,其中还可包含阿拉伯胶、滑石粉、聚乙烯吡咯烷酮、卡波姆凝胶、聚乙二醇和/或二氧化钛、漆溶液和合适的有机溶剂或溶剂混合物。可将染料或颜料加入片剂或糖衣剂包衣中,用于标示产品或表征活性化合物的量(即剂量)。

[0224] 可口服使用的其它药物制剂包括明胶制成的压接(push-fit)胶囊,以及明胶和包衣剂(coating)(如甘油或山梨糖醇)制成的密封胶囊。压接胶囊可包含与填充剂或粘合剂,如乳糖或淀粉;润滑剂,如滑石粉或硬脂酸镁以及任选稳定剂混合的活性组分。在软胶囊中,活性化合物可溶解或悬浮于含有或不含稳定剂的合适液体,如脂肪油、液体石蜡或液体聚乙二醇中。

[0225] 用于肠胃外给药的药物组合物包括活性化合物的水性溶液。就注射而言,本发明的药物组合物可配制在水性溶液中,优选生理相容性缓冲液,如汉克斯(Hank's)溶液、林格(Ringer's)溶液或生理缓冲盐水。水性注射悬液可包含增加悬液粘度的物质,如羧甲基纤维素钠、山梨糖醇或右旋糖苷。此外,活性化合物的悬液可制备为合适的油性注射悬液。合适的亲脂性溶剂或运载体包括脂肪油如芝麻油,或合成脂肪酸酯如油酸乙酯或甘油三酯,或脂质体。悬液可任选包含合适的稳定剂或增加化合物溶解度以制备高浓缩溶液的试剂。

[0226] 对于局部或鼻腔给药,在制剂中使用适合要渗透的特定屏障的渗透剂。本领域通常已知此类渗透剂。

[0227] 本发明的药物组合物可用与本领域已知方式的相似方式制造(例如,通过常规的混合、溶解、造粒、制造糖衣剂、淘选、乳化、包胶、包封或冻干工艺的方法)。

[0228] 所述药物组合物可提供为盐,并可用多种酸形成,包括但不限于与阴离子形成的盐,例如衍生自氢氯酸、磷酸、乙酸、草酸、酒石酸等的盐,以及与阳离子形成的盐,例如衍生自钠、钾、铵、钙、氢氧化铁、异丙胺、三乙胺、2-乙基氨基乙醇、组氨酸、普鲁卡因等的盐。在水性或其它质子溶剂中盐比对应的游离碱形式更易于溶解。在其它情况中,所述制品可以是冻干粉末,在1-50mM组氨酸、0.1%-2%蔗糖和2-7%甘露醇中,pH为4.5-5.5范围内,在使用前与缓冲液组合。

[0229] 载体还可以是包含水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)及其合适的混合物以及植物油的溶剂或分散介质。可通过使用包衣如卵磷脂、如果是分散体则保

持所需粒度以及使用表面活性剂,来维持合适的流动性。可以通过各种抗菌剂和抗真菌剂,例如,对羟基苯甲酸酯类、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等引起微生物作用的防止。在很多情况中,优选包括等张剂,例如糖类或氯化钠。可通过将延迟吸收的试剂例如单硬脂酸铝和明胶用于组合中来延长可注射组合物的吸收。

[0230] 制备含有配制于可接受载体中的本发明化合物的药物组合物后,可将其放置于合适的容器中,并贴上用于治疗所示病症的标签。对于人端粒酶蛋白及核酸的给药,此标签可包括给药的量、频率和方法。

[0231] 适用于本发明的药物组合物包括包含有效量活性组分以达到预期目的的组合物。“治疗有效量”或“药理学有效量”是公认的短语,指某试剂能有效引起需要的药理结果的用量。因此,治疗有效量是足以缓解待治疗疾病症状的量。确定就给定应用而言的有效量(例如,治疗有效量)的一种有效试验是测定对细胞存活的效果。实际给予的量将取决于待施用治疗的个体,并优选为经优化的用量从而实现所需效果而没有显著副作用。

[0232] 对于任何化合物,治疗有效剂量的初始评估可在细胞培养试验或任意适当的动物模型中进行。动物模型还可用于获得合适的浓度范围和给药途径。此类信息还可用于确定人体中有用的给药剂量和途径。

[0233] 在动物中,“治疗有效量”是与没有治疗的典型临床结果相比,导致治疗结果为临床结果改善的化合物用量。“改善的临床结果”指,所述治疗的结果为,例如,预期寿命延长,并发症减少,症状减少,身体不适减少和/或住院减少。改善的临床结果可以定量为接受给药并经过某段时间后改善疾病状态的对象的一定百分数。所述接受给药并改善其疾病状态的对象的一定百分数可以是约1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%或10%。所述接受给药并改善其疾病状态的对象的一定百分数可以是约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或85%。所述接受给药并改善其疾病状态的对象的一定百分数可以是约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。测定临床结果改善的某段时间可以是1、2、3、4、5、6或7天。测定临床结果改善的某段时间可以是1、2、3或4周。测定临床结果改善的某段时间可以是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多年。

[0234] 对于癌症,“改善的临床结果”包括预期寿命更长。还包括肿瘤生长速度的减缓或停滞,导致肿瘤尺寸缩小,转移速度减慢或生活质量改善(例如,身体不适减轻或活动能力提高)。

[0235] 对于免疫系统的调节,若个体患有涉及免疫抑制的疾病,则“改善的临床结果”指所述个体中免疫应答幅度提高。对于免疫系统被抑制的个体,“改善的临床结果”还可指对传染疾病易感性降低。对于涉及过度活跃的免疫系统的疾病,“改善的临床结果”可以指免疫应答幅度降低。两种情况中,改善的临床结果都可以涉及上述的生活质量改善。

[0236] 治疗有效量指蛋白质、多肽、肽、抗体、寡核苷酸或多核苷酸、激动剂或拮抗剂能缓解症状或病症的量。此类化合物的治疗功效和毒性可在细胞培养或实验动物中通过标准药理学方法确定(例如,ED₅₀,对群体中50%治疗有效的剂量;和LD₅₀,对群体中50%致死的剂量)。治疗与毒性效果间的剂量比是治疗指数,可表示为比例,ED₅₀/LD₅₀。优选具有高治疗指数的药物组合物。获自细胞培养试验和动物研究的数据可用于配制人体应用的剂量范围。这类化合物的剂量优选属于毒性很小或无毒性的包括ED₅₀在内的循环浓度范围。该剂量可根据所用剂型、患者的敏感性和所用给药途径在此范围内变化。

[0237] 确切剂量由各医师根据待治疗的患者进行选择。对剂量和给药进行调整以提供足够水平的活性部分或维持所需效果。需要考虑的其它因素包括疾病状况的严重性(例如,肿瘤的尺寸和位置;对象的年龄、体重和性别;饮食、给药的时间和频率、联合用药、对治疗的反应敏感性以及耐受/响应)。给药可以是每天,隔天,每周,隔周,每月,隔月,或其任意变化。含人抗核仁素抗体剂型的给药可以持续至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10天。含人抗核仁素抗体剂型的给药可以持续至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10周。含人抗核仁素抗体剂型的给药可以持续至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12月。含人抗核仁素抗体剂型的给药可以持续至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12年。一种或多种试剂(例如,人抗核仁素抗体和其它试剂)的给药可以是间歇性的;例如,给药可以是每2天1次,每3天1次,每5天1次,每周1次,每月1或2次,等等。根据特定制剂的半衰期和清除率,长效药物组合物可每3-4天,每周或每2周给予1次。文献提供了对递送的具体剂量和方法的指南(参见,美国专利4,657,760;5,206,344和5,225,212,通过引用纳入本文)。在一种实施方式中,含人抗核仁素抗体组合物所给予患者的剂量为患者体重的约0.1mg/kg-500mg/kg。用量,形式和/或不同形式的用量可在给药的不同时间有变化。在一种实施方式中,将人抗核仁素抗体给予对象。所述对象可以是男性或女性,并可以是任意人种或民族,包括但不限于高加索人,非裔美国人,非洲人,亚洲人,西班牙人、印度人等。所述对象可以是任意年龄,包括新生儿、婴儿、幼儿、儿童、青少年、成人和老年。对象还可包括动物对象,特别是哺乳动物对象,例如狗、猫、马、小鼠、大鼠等,筛选用于兽医学或药用药品开发目的。对象还包括但不限于那些患有、已经接触或此前诊断为患有增殖性疾病例如癌症或自身免疫性疾病如病毒性疾病如HIV或AIDS的对象。

[0238] D. 核仁素表达癌症和非恶性细胞

[0239] 在一种实施方式中,按本发明所述制备的分离的人抗核仁素抗体用于治疗多种细胞,包括癌性和非癌性细胞。在一种实施方式中,所述分离的人抗核仁素抗体是单克隆抗体。在另一实施方式中,所述分离的人抗核仁素抗体是多克隆抗体。本文此前已描述术语“癌”。可被分离的人抗核仁素抗体抑制或治疗的癌类型的示例包括但不限于:急性淋巴细胞性白血病;髓细胞性白血病;急性髓细胞性白血病;慢性髓细胞性白血病;肾上腺皮质癌;肾上腺皮质癌;AIDS相关癌症;AIDS相关淋巴瘤;肛门癌;儿童小脑星形细胞瘤;儿童脑星形细胞瘤;基底细胞癌;胆管癌;肝外癌;膀胱癌;膀胱癌;骨癌;骨肉瘤/恶性纤维组织细胞瘤;脑干神经胶质瘤;脑瘤;脑瘤;脑干神经胶质瘤;脑肿瘤,小脑星形细胞瘤;脑肿瘤,脑星形细胞瘤/恶性神经胶质瘤;脑肿瘤,室管膜瘤;脑肿瘤,成神经管细胞瘤;脑肿瘤,幕上原发性神经外胚层肿瘤;脑肿瘤,视觉通路和下丘脑神经胶质瘤;女性乳腺癌;男性乳腺癌;支气管腺瘤/类癌;伯基特氏淋巴瘤;癌瘤;中枢神经系统淋巴瘤;小脑星形细胞瘤;脑星形细胞瘤/恶性神经胶质瘤;宫颈癌;慢性淋巴细胞白血病;慢性髓细胞白血病;慢性骨髓增生性疾病;结肠癌;结直肠癌;皮肤T细胞淋巴瘤;B细胞淋巴瘤子宫内膜癌;室鼓膜瘤;食管癌;食管癌;尤因氏家族肿瘤;颅外生殖细胞肿瘤;性腺外生殖细胞肿瘤;肝外胆管癌;眼癌,眼内黑色素瘤,眼癌,视网膜母细胞瘤;胆囊癌;胃癌;胃肠道类癌肿瘤;生殖细胞肿瘤,颅外;生殖细胞肿瘤,卵巢;妊娠滋养细胞肿瘤;神经胶质瘤;神经胶质瘤,儿童脑干;神经胶质瘤,儿童脑星形细胞瘤;神经胶质瘤,儿童视觉通路和下丘脑;毛细胞白血病,头颈癌;肝细胞(肝)癌,成人(原发性);肝细胞(肝)癌,儿童(原发性);何杰金氏淋巴瘤;妊娠期何杰金氏淋巴瘤;下咽癌;下丘脑和视觉通路神经胶质瘤,眼内黑色素瘤;胰岛细胞癌(内分泌胰腺);卡波西氏肉

瘤;肾(肾细胞)癌;肾癌;喉癌;白血病,急性淋巴细胞性;白血病,急性淋巴细胞性;白血病,急性骨髓性;白血病,急性骨髓性;白血病,慢性淋巴细胞性;白血病,慢性髓细胞性;唇和口腔癌;肝癌,成人(原发性);肝癌,儿童(原发性);肺癌,非小细胞性;肺癌,小细胞性;淋巴瘤,艾滋病相关性;淋巴瘤,伯基特氏;淋巴瘤,皮肤T细胞性,见蕈样肉芽肿病和塞扎里(Sezary)综合征;淋巴瘤,何杰金氏;淋巴瘤,妊娠期何杰金氏;淋巴瘤,非何杰金氏;淋巴瘤,妊娠期非何杰金氏;淋巴瘤,原发性中枢神经系统性;巨球蛋白血症,瓦尔登斯特氏(Waldenstrom's);恶性骨/骨肉瘤的纤维组织细胞瘤;髓母细胞瘤;黑色素瘤;黑色素瘤,眼内(眼);梅克尔(Merkel)细胞癌;间皮瘤,成人恶性;间皮瘤;具有隐匿性原发性的转移性颈部鳞癌;多发性内分泌瘤样综合征;多发性骨髓瘤/浆细胞肿瘤的蕈样肉芽肿;骨髓增生异常综合征;骨髓增生异常/骨髓增生性疾病;髓细胞性白血病,慢性;髓细胞性白血病,成人急性;髓细胞系白血病,儿童急性;骨髓瘤,多发性;骨髓增生性疾病,慢性;鼻腔和鼻窦癌;鼻咽癌;神经母细胞瘤;非何杰金氏淋巴瘤;妊娠期非何杰金氏淋巴瘤;口癌;口腔癌;唇和口咽癌;骨肉瘤/骨的恶性纤维组织细胞瘤;卵巢癌;卵巢上皮癌;卵巢生殖细胞癌;卵巢低度恶性潜能的肿瘤;胰腺癌;胰腺癌;胰腺癌,胰岛细胞性;甲状旁腺癌;阴茎癌;嗜铬细胞瘤;松果体母细胞瘤和幕上原发性神经外胚层肿瘤;垂体瘤;浆细胞肿瘤/多发性骨髓瘤;胸膜肺母细胞瘤;妊娠与乳腺癌;妊娠与霍奇金淋巴瘤的;妊娠和何杰金氏淋巴瘤;妊娠与非何杰金氏淋巴瘤;原发性中枢神经系统淋巴瘤;前列腺癌;直肠癌;肾细胞(肾)癌;肾细胞(肾)癌;肾盂和输尿管,移行细胞癌;视网膜母细胞瘤;横纹肌肉瘤;涎腺癌;涎腺癌;肉瘤,尤文家族肿瘤;肉瘤,卡波济氏;肉瘤,软组织性;肉瘤,软组织性;肉瘤,子宫性;塞扎里综合征;皮肤癌(非黑色素瘤);皮肤癌;皮肤癌(黑色素瘤);皮肤癌,梅克尔细胞性;小细胞肺癌;小肠癌;软组织肉瘤;软组织肉瘤;鳞状细胞癌,见皮肤癌(非黑色素瘤);具有隐匿性原发性的颈部鳞癌,转移性;胃癌;胃癌,幕上原发性神经外胚层肿瘤;T细胞淋巴瘤,皮肤性,见蕈样肉芽肿和塞扎里综合征;睾丸癌;胸腺瘤;胸腺瘤和胸腺癌;甲状腺癌;甲状腺癌;肾盂和输尿管移行细胞癌;滋养细胞肿瘤,妊娠性;输尿管和肾盂,移行细胞癌;尿道癌;子宫癌,子宫内膜性;子宫肉瘤;阴道癌;视觉通路和下丘脑神经胶质瘤;外阴癌;瓦尔登斯特氏巨球蛋白血症;和肾母细胞瘤。

[0240] 已知表达核仁素的癌细胞包括肺癌(例如,非小细胞肺癌),乳腺癌,前列腺癌,结肠癌,胰腺癌,肾细胞癌,卵巢癌,白血病(例如,AML、CLL),黑色素瘤,成胶质细胞瘤,神经母细胞瘤,肉瘤和胃癌。此外,表达核仁素的非癌细胞包括免疫细胞如树突细胞,外周血单核细胞,巨噬细胞和神经胶质细胞,以及血管平滑肌细胞和内皮细胞。在一种实施方式中,本发明的抗体用于治疗患有过度免疫和过度血管发生性疾病的对象,后者在通过引用纳入本文的美国专利公开号2009/0191244中有描述。

[0241] i. 急性骨髓性白血病

[0242] 急性骨髓性白血病(AML)也称为急性髓细胞性白血病,是血液细胞骨髓系的癌症,特征为异常白细胞快速生长累积在骨髓中并干扰正常血细胞生成。AML是影响成人的最常见急性白血病,其发病率随年龄增长。尽管AML是相对罕见的疾病,约占美国癌症死亡的1.2%,但预期其发病率随人口老化而提高。

[0243] AML的症状由白血病细胞取代正常骨髓引起,这种取代导致红细胞、血小板和正常白细胞减少。这些症状包括疲劳,呼吸急促,容易淤伤和出血以及感染风险提高。尽管已鉴

定了多种AML风险因子,该疾病的具体病因仍不明了。作为急性白血病,AML迅速发展且若不治疗通常在数周或数月内即致命。

[0244] AML有多种亚类,这些亚类间的治疗和预后都不同。根据亚类,五年生存率从5-70%不等,复发率从30-95%不等。AML最初用化疗进行治疗希望能引起康复,患者可以继续接受补充化疗或造血干细胞移植。对AML遗传学的近期研究开发了能更好预测患者可能存活的长短以及药物是否可能有效的测试。

[0245] 导致AML诊断的最初症状通常为非特异性,涉及一种或多种血细胞减少症,例如,贫血症、嗜中性白细胞减少症和/或血小板减少症。尽管常见外周血中的过量异常白细胞(白细胞增多)和未成熟血细胞(母细胞),有时可见白血病母细胞,AML还可表现为孤立的血小板、红细胞减少,甚至有低白细胞计数(白细胞减少症)。尽管当有循环白血病母细胞时,可以通过检查外周血涂片做出AML的假定诊断,确定性诊断通常需要检查取自骨髓吸出的细胞及活组织检查。

[0246] 通过光学显微术以及流式细胞术检查骨髓或血液以诊断白血病的存在,区分AML和其它类型的白血病(例如,急性成淋巴细胞性白血病),并划分疾病的亚类(见下文)。通常还通过常规细胞遗传学或荧光原位杂交测试骨髓或血液样品的多种染色体畸变。还可进行遗传研究以寻找基因如FLT3,核磷蛋白和bcr/abl等中的具体突变,其可能影响疾病的结果。

[0247] 血液和骨髓涂片的细胞化学染色有助于区分AML和ALL以及AML的次级分类。联用髓过氧化物酶或苏丹黑染料和非特异性酯酶染剂将提供大多数情况中所需的信息。髓过氧化物酶或苏丹黑反应在确立AML的鉴定和与ALL相区分中最为有用。用非特异性酯酶染剂鉴定AML中的单核细胞组分并将低分化的单核母细胞白血病与ALL相区分。

[0248] AML的诊断和分类可能有难度,并应当由合格的血液病理学家或血液学家进行。在简单情况中,某些形态学特征(例如棒状小体(Auer rod))或特定流式细胞结果的存在可以区分AML与其它白血病;但没有此类特征时,诊断会更困难。

[0249] 根据广泛采用的WHO标准,AML的诊断由证明超过20%的血液和/或骨髓涉及白血病性成髓细胞来确立。必需谨慎区分AML和“前白血病性”症状如骨髓发育不良或骨髓增生综合征,其治疗方法不同。

[0250] 由于急性前髓细胞性白血病(APL)具有最高的可治愈性,并需要独特的治疗形式,快速确立或排除这一亚类白血病的诊断很重要。对血液或骨髓进行的荧光原位杂交常用于该目的,因为其容易鉴定表征APL的染色体易位(t[15;17])。

[0251] AML中的恶性细胞是成髓细胞。在正常血细胞生成中,成髓细胞是骨髓白细胞的未成熟前体;正常的成髓细胞会逐渐成熟为成熟的白细胞。但是,在AML中,单个成髓细胞累积遗传改变将所述细胞“冻结”在其未成熟状态并阻止分化。这种突变本身不引起白血病;但是,当这种“分化停滞”与破坏控制增殖的基因的其它突变组合时,导致细胞的未成熟克隆的非受控生长,产生AML的临床实体。

[0252] AML的很多多样性和异种性源于白血病性转化可发生在分化途径的多个不同步骤这一事实。AML的现代分类方案认识到白血病细胞(以及白血病)的特征和行为可取决于分化被中断的阶段。

[0253] 可在很多患有AML的患者中发现特异性细胞遗传异常;染色体异常的类型往往具

有预后意义。染色体易位编码异常融合蛋白,通常为性质改变能引起“分化停滞”的转录因子。例如,在急性前髓细胞性白血病中,t(15;17)易位产生PML-RAR α 融合蛋白,其结合多个骨髓特异性基因的启动子中的视黄酸受体元件并抑制骨髓分化。

[0254] AML的临床体征和症状是由于细胞的白血病性克隆随着生长而倾向于取代或干扰骨髓中正常血细胞发育这一事实。这导致嗜中性白细胞减少症、贫血症和血小板减少症。进而,AML的症状往往由于这些正常血液要素的数量低而造成。在稀有病例中,患者可能在骨髓外发生绿色瘤或白血病细胞的实体瘤,这可能根据其位置导致多种症状。

[0255] AML的治疗主要为化疗,并分为两阶段:诱导和缓解后(或巩固)治疗。诱导治疗的目的是通过将白血病细胞量降低至不可检出水平来实现完全缓解;巩固治疗的目的是消除残余的不可检出疾病并实现治愈。

[0256] 通常对除M3以外的所有FAB亚类用阿糖胞苷(ara-C)和蒽环(例如道诺红菌素或伊达比星)给予诱导化疗。该诱导化疗方案称为“7+3”(或“3+7”),因为连续7天持续静脉内输液给予阿糖胞苷而连续3天静脉内推注给予蒽环。达到70%的患者将用此方案实现缓解。可采用其它替代诱导方案包括仅用高剂量阿糖胞苷或在研药剂。由于治疗的毒性效果,包括骨髓抑制和感染风险提高,诱导化疗不能给予非常年长者,选项可包括较低强度的化疗或姑息治疗。

[0257] AML的M3亚类也称作急性前髓细胞性白血病,几乎普遍用药物ATRA(全反式视黄酸)加以诱导化疗进行治疗。当前髓细胞将其颗粒释放入外周循环时必须小心以避免弥散性血管内凝血(DIC),使APL的治疗变困难。熟知APL用充分记载的治疗方案可以治愈。

[0258] 诱导阶段的目的是实现完全缓解。完全缓解并不意味着疾病已治愈;而是表示用已有的诊断方法没有测得疾病。约有50%-75%的新诊断成人中获得完全缓解,尽管这可能随前述预后因子而变化。缓解时长取决于原始白血病的预后特征。通常,没有巩固治疗则所有缓解都会失败。

[0259] 即使在实现完全缓解后,白血病细胞可能仍以小到不能用现有诊断技术检测的数量存在。若不给予进一步缓解后或巩固治疗,几乎所有患者终将复发。因此,需要更多治疗以消除不可检测的疾病并预防复发,即实现治愈。

[0260] 缓解后治疗的具体类型按患者的预后因素(见上文)和一般健康而个别考虑。对于预后良好的白血病(即,inv(16),t(8;21),和t(15;17)),患者通常进行额外的3-5疗程的强化化疗,称为巩固化疗。对于高复发风险的患者(例如,具有高风险细胞遗传学、潜在MDS或治疗相关AML的难治性患者),若患者能耐受移植并有合适供体,通常推荐同种异体干细胞移植。对于中等风险AML(正常的细胞遗传学或细胞遗传改变不属于风险良好或高风险组)的最佳缓解后治疗较不明确,且取决于具体情况,包括患者的年龄和总体健康,患者的个人取向以及是否有合适的干细胞供体。

[0261] 尽管采用攻击性治疗,但仅有20%-30%的患者能享受长期的无病存活。对于复发AML的患者,若尚未进行过干细胞移植,唯一证明可能治愈的治疗就是干细胞移植。在2000年,美国批准单克隆抗体连接的细胞毒剂吉姆单抗奥佐米星(麦罗塔,Mylotarg)用于年龄超过60岁的复发AML患者,他们是不适合高剂量化疗的候选人。

[0262] 可给予不适合干细胞移植候选人或在干细胞移植后复发的复发AML患者临床试验中的治疗,因为常规治疗选项有限。在研药剂包括细胞毒性药物如克罗拉滨以及靶向治疗

剂如法呢基转移酶抑制剂、地西他滨和MDR1 (多重耐药蛋白) 的抑制剂。由于复发AML的治疗选项如此有限,可给予的另一选项是姑息治疗。

[0263] 对于复发的急性前髓细胞性白血病 (APL),三氧化二砷已在试验中测试并得到美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准。如同ATRA,三氧化二砷对其它亚类的AML不起作用。

[0264] 急性骨髓性白血病是可治愈的疾病;具体患者的治愈机会取决于多个预后因素。AML中最重要的一项预后因素是细胞遗传学,或白血病细胞的染色体结构。某些细胞遗传学异常与很好的结果关联 (例如,急性前髓细胞性白血病中的t (15;17) 易位)。约一半AML患者具有“正常”细胞遗传学;他们属于中等风险组。已知多种其他细胞遗传学异常与治疗后的预后差及高复发风险相关联。

[0265] 从先前存在的骨髓异常增生综合征或骨髓组织增生性疾病产生的AML (所谓继发性AML) 的预后更差,针对另一在前恶性肿瘤的化疗后产生的治疗相关AML同样如此。这两种情况都与不利的细胞遗传异常率高相关联。

[0266] 在一些研究中,年龄>60岁和乳酸脱氢酶水平升高也与结果较差相关联。和大多数癌症形式一样,体力状态 (即,患者的总体身体状况和活动水平) 也在预后中起主要作用。

[0267] 已显示FLT3内部串联重复 (ITD) 在AML中产生较差预后。用更攻击性的治疗如在初始缓解中的干细胞移植治疗这些患者未见提高长期存活,因此这一预后特征此时的临床意义尚不明确。FLT3的ITD可能与造血细胞组织增生有关。

[0268] 研究人员正在研究AML中c-KIT突变的临床意义。这些为优势且临床相关的突变,因为酪氨酸激酶抑制剂如伊马替尼和舒尼替尼可以在药理上阻断c-KIT的活性。作为预后因子或治疗靶标的其他在研基因包括CEBPA、BAALC、ERG和NPM1。

[0269] 临床试验中的治愈率在20-45%范围内,但是应当注意,临床试验往往只包括年轻患者和那些能耐受攻击性治疗的患者。对于所有AML患者 (包括年长的以及不能耐受攻击性治疗的患者) 的总体治愈率很可能较低。前髓细胞性白血病的治愈率可以高达98%。

[0270] ii. 慢性淋巴细胞性白血病

[0271] B细胞慢性淋巴细胞性白血病 (B-CLL) 也称为慢性淋巴性白血病 (CLL),是白血病的最常见类型。白血病是异常和恶性的白细胞瘤性增生。CLL涉及特定的白细胞亚类,称为B细胞的淋巴细胞。B细胞源于骨髓,在淋巴结中发育,通常抗击感染。CLL中,B细胞的DNA受损,因此不能通过生成抗体来抗击感染。此外,它们的生长失去控制并在骨髓和血液中积累,排挤其中的健康血细胞。

[0272] CLL是成人疾病,但在稀有病例中可发生在青少年中且偶见于儿童 (遗传的)。新诊断为患有CLL的人中大多数 (>75%) 超过50岁,且多数为男性。多数人诊断未见症状,为常规血液检测得到高白细胞计数,但随着发展CLL导致淋巴结、脾和肝脏肿大并最终有贫血症和感染。早期CLL不作治疗,而晚期CLL用化疗剂与单克隆抗体治疗。存活从5年到超过25年。现在可以通过检测DNA突变更精确预测存活长度;患有较慢发展疾病的患者可放心并可以终生无需任何治疗。

[0273] 尽管最初未了解,现在认为CLL与称作小淋巴细胞性淋巴瘤 (SLL) 的疾病一致,那是一类非何杰金氏淋巴瘤,主要出现在淋巴结中。世界卫生组织认为CLL和SLL是一种疾病的不同阶段,而不是两种不同疾病。

[0274] 分期、确定疾病的程度采用Rai分期系统或Binet分类进行并主要基于是否存在血

小板或红细胞计数低。早期疾病无需治疗。

[0275] 近期出版物提出基于细胞的成熟状态CLL存在两组或三组预后组。这一区分是基于按免疫球蛋白可变区重链(IgV_H)基因突变状态分辨的淋巴细胞成熟度。高风险患者具有未呈现细胞模式IgV_H抗体基因区中DNA少有突变,而低风险区患者显示抗体基因区DNA的显著突变表明成熟淋巴细胞。

[0276] 因为难以进行IgV_H抗体DNA改变的评估,分化群38(CD38)或Z链相关蛋白激酶-70(ZAP-70)的存在可以是CLL高风险亚型的代用标记物。它们的表达与更不成熟的细胞状态和更快速的疾病进程相关。

[0277] 除了成熟状态外,CLL患者的预后还有赖于肿瘤细胞群内的遗传变化。这些遗传变化可通过针对染色体部分的荧光探针采用称作荧光原位杂交(FISH)的技术来鉴定。在CLL细胞中识别4种主要的遗传异常对疾病行为有较大影响。

[0278] 靶向细胞周期调节蛋白p53的染色体17短臂的部分缺失(de1 17p)特别有害。具有这一异常的患者在其需要治疗之前的间隔显著较短且存活更短。在5-10%的CLL患者中发现这一异常。染色体11上长臂的缺失(de1 11q)也不利,但程度不及de1 17p。所述异常靶向ATM基因并在CLL中不常发生(5-10%)。三体12,额外的染色体12,相对常见,发现于20-25%的患者,并提示中等预后。染色体13的长臂缺失(de1 13q)是CLL中最常见的异常,约50%患者的细胞含有这一缺陷。这些患者具有最好的预后,大多数存活很多年,甚至几十年,而无需治疗。该缺失靶向的基因是可能产生小抑制性RNA分子来影响重要死亡抑制基因产物表达的片段。

[0279] 大多数人诊断而未见症状,为常规血液检测得到高白细胞计数。不常见的,CLL表现为淋巴结肿大而没有高白细胞计数或血液中未见疾病迹象。这被称为小淋巴细胞性淋巴瘤。在一些个体中,只在肿瘤细胞控制骨髓导致贫血症产生疲劳或虚弱时才发现疾病。

[0280] 该疾病易于诊断。通常因全血计数(CBC)测试中出现淋巴细胞增多而最初怀疑CLL,淋巴细胞增多是白细胞其中一类的增加。这通常是常规医师探访时的偶然发现。最通常淋巴细胞计数每mm³(微升)血液超过4000个细胞,但可高得多。年长个体中出现淋巴细胞增多可能强烈提示CLL猜测,且应当进行证实性诊断测试,特别是流式细胞分析,除非临床上无必要。

[0281] CLL的诊断是基于对血液、骨髓或组织中异常B淋巴细胞群体或在细胞表面显示不寻常但特征性分子模式来证实。这一非典型分子模式包括细胞表面标记物分化群5(CD5)和分化群23(CD23)的共表达。此外,某个体内的所有CLL细胞为无性系的,在遗传上相同。实践中,这由全部异常B细胞群中只检测到互斥抗体轻链κ或λ中一种而推知。正常B淋巴细胞由多种不同的产抗体细胞组成,形成一种同时含有κ和λ表达细胞的混合物。缺少产κ和λ的B细胞的正常分布是表明无性系的一种根据,无性系是确立B细胞恶性肿瘤(B细胞非何杰金淋巴瘤)的关键要素。

[0282] 需要用来证实无性系和标记物分子表达的显微镜检查外周血和流式细胞分析淋巴细胞的组合来确立CLL的诊断。两者都可用少量血液方便地完成。流式细胞仪是能检查流体中个体细胞上的分子表达的仪器。这要求施用针对标记分子的特异性抗体,所述抗体含有仪器能识别的荧光标签。CLL,淋巴细胞在遗传上为无性系的B细胞系(表达标记分子分化群19(CD19)和CD20),并特征性表达标记分子CD5和CD23。显微镜下,该细胞在形态上与正常

淋巴细胞相似,但稍小,涂到玻片上时易碎而产生很多破碎的细胞(破碎细胞)。

[0283] CLL治疗着重于控制疾病及其症状而非完全治愈。CLL通过化疗、放疗、生物制剂疗法或骨髓移植治疗。有时通过外科(肿大脾脏的脾切除术)或放疗(肿胀淋巴结的“缩瘤”)治疗症状。

[0284] 初始的CLL治疗根据具体的诊断和疾病的进展而改变,甚至视卫生保健医师的偏好和经验而定。有数十种药剂用于CLL治疗,且有相当多的科研活动在研究它们的单独或彼此联用。

[0285] 尽管通常认为不可治愈,在多数情况中CLL进展缓慢。患有CLL的很多人正常和活跃生活多年,在一些情况中生活数十年。由于发作缓慢,早期CLL通常不治疗,因为据信早期CLL干预并不改善存活时间或生活品质。而是随时间监控病症以检测疾病模式中的任何变化。

[0286] 但患者的临床症状或血液计数表明疾病进展到会影响患者生活品质时决定开始CLL治疗。通常较难确定何时以及采用何种手段开始治疗,研究显示过早治疗该疾病没有存活优势。国立癌症研究院(National Cancer Institute)工作组发布了治疗指南,在开始治疗前需满足特定的标记。

[0287] 尽管已显示嘌呤类似物氟达拉滨作为一线治疗所给出的应答率优于苯丁酸氮芥,但没有迹象表明早用氟达拉滨能改善总体存活,且一些医师宁可保留氟达拉滨用于复发性疾病。Mab治疗包括阿来组单抗(针对CD52)和利妥昔单抗(针对CD20)。

[0288] 联合化疗选项对新诊断的和复发性CLL都有效。新近的随机试验显示联用嘌呤类似物(氟达拉滨)与烷化剂(环磷酰胺)比单一药剂产生更高的应答率和更久的无进展存活,所述联用有:

[0289] FC(氟达拉滨与环磷酰胺)

[0290] FR(氟达拉滨与利妥昔单抗)

[0291] FCR(氟达拉滨、环磷酰胺与利妥昔单抗)

[0292] CHOP(环磷酰胺、多柔比星、长春新碱和泼尼松龙)

[0293] 同种异体骨髓(干细胞)移植由于其风险而很少用作CLL一线治疗。对使用降低强度的同种异体干细胞移植的兴趣正在增加,该方法为具有合适供体的选定患者提供了治愈前景。

[0294] 现行研究比较不同形式的骨髓移植以确定哪些患者是最佳候选人,在不同情况中哪种方法最好。有较高风险因CLL死亡的年轻患者可考虑造血干细胞移植(HSCT)。自体干细胞移植术是使用患者自身血液细胞的较低风险治疗形式,并非治愈性。同种异体干细胞移植的骨髓摧毁性(骨髓杀死)形式是采用来自健康供体的血液细胞进行的高风险治疗,可治愈一些患者,但多数患者不能耐受该治疗。中间水平的称为低强度条件性同种异体干细胞移植可被年长或虚弱的患者更好的耐受。

[0295] “难治性”CLL是不再对治疗作有利应答的疾病。该情况中,考虑更攻击性的治疗,包括来那度胺,黄酮吡醇和骨髓(干细胞)移植。单克隆抗体阿来组单抗(针对CD52)可用于患有难治性的基于骨髓的疾病。

[0296] iii乳腺癌

[0297] 乳腺癌是起始于乳房通常在乳导管或小叶的内壁中的癌症。有多种乳腺癌,具有

不同的分期(扩散),侵袭性和遗传构成。采用最佳治疗,10年无病存活率从98%到10%不等。治疗选自手术、药物(化疗)和放射。2004年,美国有216,000例浸润性乳腺癌和40,000例死亡。全球范围内,乳腺癌是第二常见癌症,仅次于肺癌(占有癌症发病的10.4%,两个性别均计入)且是第五大癌症死亡原因。2004年,乳腺癌在全球导致519,000例死亡(占癌症死亡的7%,几乎占有所有死亡的1%)。乳腺癌的女性发病率约是男性的约100倍,但在两性中的存活率相同。

[0298] 乳腺癌的最初症状或主观征兆通常是与周围乳房组织感觉不同的肿块。根据Merck Manual《默克手册》,超过80%的乳腺癌病例是女性感觉到肿块时发现的。据美国癌症学会(American Cancer Society)称,由医师测得的乳腺癌的最初医学征兆或客观指示通过乳房X线照片发现。位于腋窝的淋巴结中发现肿块指示乳腺癌。肿块以外的乳腺癌指示可包括乳房大小或形状改变、皮肤凹陷、乳头内陷或自发的单乳头溢液。确定是否存在乳腺癌中疼痛(“乳房痛”)是不可靠的工具,但可能指示其它乳房健康问题。

[0299] 当乳腺癌侵入真皮淋巴管-乳房皮肤中的淋巴小血管-其表现可与皮肤炎症相似,并因此称为炎性乳腺癌(IBC)。炎性乳腺癌的症状包括乳房的疼痛、肿胀、发热和发红,以及称作“桔皮”的皮肤桔皮结构。乳腺癌报道的另一综合症状为乳房的佩吉特病(Paget's disease)。该病症表现为湿疹样皮肤变化如发红和乳头皮肤的温和剥落。随着佩吉特病发展,症状可包括麻刺感、痒、敏感性提高、烧灼和疼痛。乳头还可有溢出。诊断为佩吉特病的近半女性还在乳房中有肿块。

[0300] 乳腺癌有时表现为转移性疾病,即癌症扩散到初始器官以外。转移性乳腺癌将根据转移位置导致各种症状。常见转移位点包括骨、肝、肺和脑。无法解释的体重减轻有时能预示隐匿性乳腺癌,发热或发冷也可。骨或关节疼痛有时可显现转移性乳腺癌,黄疸或神经病学症状也可。这些症状为“非特异性”,意味着也可能是很多其它病症的表现。

[0301] 已鉴定的主要风险因子是性别、年龄、生育、激素、高脂饮食、酒精摄入、肥胖和环境因素如抽烟、辐射和轮班工作。95%的乳腺癌病例病因学不明,而约5%的新乳腺癌可归于遗传性综合征。具体地,根据蛋白发生突变的位置,乳腺癌易感基因BRCA1和BRCA2的携带者患乳腺癌和卵巢癌的风险提高30-40%。专家相信95%的遗传乳腺癌可追踪到这两个基因之一。遗传性乳腺癌可以是位点特异性遗传乳腺癌形式——癌症仅仅影响乳房或是乳房-卵巢以及其它癌症综合征。乳腺癌可遗传自女性和男性亲属。

[0302] 乳腺癌亚型基于免疫组化分类。亚型定义通常如下:

[0303] 正常(ER+,PR+,HER2+,细胞角蛋白5/6+和HER1+)

[0304] 管腔A(ER+和/或PR+,HER2-)

[0305] 管腔B(ER+和/或PR+,HER2+)

[0306] 三重阴性(ER-,PR-,HER2-)

[0307] HER2+/ER- (ER-,PR-和HER2+)

[0308] 未分类(ER-,PR-,HER2-,细胞角蛋白5/6-和HER1-)

[0309] 在三重阴性乳腺癌细胞中,癌症的生长不由雌激素或黄体酮,或由来自HER2蛋白的生长信号驱动。由于相同标记,此类癌细胞对激素疗法如他莫西芬或芳香酶抑制剂或靶向HER2受体的治疗如Herceptin®没有应答。发现约10-20%的乳腺癌为三重阴性。重要的是鉴定这些类型癌症以避免不太可能成功的昂贵治疗及其毒性,并着重于能用来治疗三重

阴性乳腺癌的治疗。类似于其它形式的乳腺癌,三重阴性乳腺癌可用手术、放射治疗和/或化疗来治疗。特别有希望的一种方法是“新辅助”疗法,其在手术前提供化疗和/或放疗。另一新药疗法是利用多聚(ADP-核糖)聚合酶或PARP抑制剂。

[0310] 尽管上述筛选技术可用于确定癌症的可能性,仍需要进一步测试来证实筛选测得的肿块是否为癌,而不是其它良性情况如单纯性囊肿。在临床情况中,乳腺癌常用临床乳房检查(由经培训的医学从业者进行的乳房检查)、乳房造影和细针头抽吸细胞学的“三重测试”来诊断。也用于筛选的乳房造影和临床乳房检查还可指示某肿块是癌症的大致可能性,并可鉴定任何其它损伤。细针头抽吸与细胞学(FNAC)可在GP办公处完成,若需要可采用局部麻醉,其包括尝试从肿块提取小部分流体。澄清流体说明所述肿块很可能不是癌性的,但带血流体可送去在显微镜下检查癌性细胞。总之,这三种工具可用于以良好的准确度诊断乳腺癌。其它活检选项包括核心活检和切除活检,核心活检去除乳腺肿块的切片,而切除活检去除整个肿块。

[0311] 乳腺癌筛查是试图在其他方面健康的个体中发现癌症。对女性最常见的筛查方法是联用X射线乳房造影法和临床乳房检查。在高于正常风险的女性如具有强烈癌症家族史的那些女性中,补充工具可包括遗传测试或乳房核磁共振造影。

[0312] 乳房自测是过去广泛推广的一种筛查形式,但由于多项大型研究显示其不具备对女性的生存益处且常导致显著焦虑而已被冷落。其原因被认为是由于可被检测的癌症倾向于已处于相对晚期,而其它方法倾向于鉴定处于较早期的癌症,其治愈疗法往往更为可能。

[0313] X射线乳房造影法采用X射线检查乳房的任何非典型团块或肿块。有多国在超过一定年龄的女性中推荐定期乳房X线造影作为筛查工具。

[0314] 针对乳腺癌的遗传测试通常涉及测试BRCA基因中的突变。除了对具有较高乳腺癌风险的那些人以外,这通常并非推荐技术。

[0315] 乳腺癌治疗的主流是已定位肿瘤时的手术,佐以可能的辅助激素疗法(用他莫西芬或芳香酶抑制剂),化疗,和/或放疗。目前,术后的治疗推荐(辅助治疗)遵循一定模式。根据临床标准(年龄、癌症类型、大小、转移),患者大致分为高风险和低风险病例,各风险分类遵循不同的治疗规则。治疗可能性包括放疗、化疗、激素治疗和免疫治疗。

[0316] 靶向癌症疗法是靶向癌细胞的特定特征如使癌细胞能快速或异常生长的蛋白质的治疗方法。靶向疗法损伤正常、健康细胞的可能性通常比化疗低。一些靶向疗法为如本身免疫系统天然产生的抗体般起作用的抗体。这些类型的靶向疗法有时称为免疫靶向疗法。

[0317] 目前有3种靶向疗法被医生们用于治疗乳腺癌。贺赛汀(Herceptin®,曲妥珠单抗)通过阻断癌细胞接收指示细胞生长的化学信号来针对HER2阳性乳腺癌起作用。泰克泊(Tykerb®,拉帕替尼泊)通过阻断能导致非受控细胞生长的某些蛋白质来针对HER2阳性乳腺癌起作用。安维汀(Avastin®,贝伐珠单抗)通过阻断癌细胞赖以生长和发挥功能的新血管生长来起作用。

[0318] 激素(抗雌激素)治疗以两种方式针对激素受体阳性乳腺癌起作用:首先,通过降低体内的雌激素量,其次,通过阻断雌激素在体内的作用。女性体内的大多数雌激素由卵巢产生。雌激素使激素受体阳性乳腺癌生长。因此,降低雌激素的量或阻断其作用有助于缩减激素受体阳性乳腺癌并降低激素受体阳性乳腺癌再发(复发)的风险。激素治疗药物对激素受体阴性乳腺癌没有效果。

[0319] 有多种激素治疗药物,包括芳香酶抑制剂,选择性雌激素受体调节剂和雌激素受体下调剂。在一些情况中,可手术切除卵巢和输卵管以治疗激素受体阳性乳腺癌或作为对极高乳腺癌风险女性的预防性手段。也可采用药物暂时关闭卵巢。

[0320] 在计划治疗时,医生也可采用PCR测试,如基于基因表达预测乳腺癌复发风险的Oncotype DX或微阵列测试。在2007年2月,首个乳腺癌预测测试获得了美国食品药品监督管理局(FDA)正式批准。这种新型基因测试有助于预测患有早期乳腺癌的女性是否会在5-10年内复发,能帮助影响初始肿瘤治疗的攻击性。

[0321] 放疗也用于帮助破坏能在术后逗留的癌细胞。当以正确剂量递送时,放射可使复发风险降低50-66%。

[0322] E. 联合治疗

[0323] 耐受单一药剂的肿瘤细胞是临床肿瘤学中的主要问题。目前癌症研究的一个目标是发现改善已有疗法功效的方式。一种方式是在称作联合治疗的方法中联用疗法。在一种实施方式中,本发明提供一种联合治疗,其中抗核仁素抗体和至少一种其它试剂组成用于接触“靶细胞”的组合物。在一方面,抗核仁素抗体和至少一种其它试剂的所述组合以将所述细胞有效杀死或抑制其增殖的组合量使用。

[0324] 在一种实施方式中,所述方法还包括使所述细胞接触人抗核仁素抗体和一种或多种补充试剂或因子。在一种实施方式中,所述方法还包括将所述细胞接触包括两种试剂的单一组合物或药物制剂,或者通过将所述细胞同时接触两种不同组合物或制剂来实现,其中一种组合物包括抗核仁素抗体而另一种包括所述试剂。

[0325] 在另一实施方式中,所述方法包括在接触其它试剂之前或之后以数分钟到数周的间隔接触抗核仁素抗体。在所述其他试剂和抗核仁素抗体分别应用于细胞的实施方式中,一般需保证各递送的时间之间没有显著的时间段,从而所述试剂和抗核仁素抗体仍可在细胞上产生有利的组合效果。在该情况下,预期可用两种形式在相互间隔约12-24小时内接触所述细胞,更优选地在相互间隔约6-12小时内,最优选延迟时间仅约12小时。但在一些情况中,可能需要显著延长治疗时间,其中各给药之间间隔数天(2、3、4、5、6或7)到数周(1、2、3、4、5、6、7或8)。

[0326] 在另一实施方式中,所述方法包括所述抗核仁素抗体或所述其它试剂的施用一次以上。以抗核仁素抗体为“A”,其它试剂为“B”,所述抗核仁素抗体或所述其它试剂的组合包括如下示例:

[0327] A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B B/A/A A/B/B B/B/B/A B/B/A/B

[0328] A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A B/A/B/A B/A/A/B B/B/B/A

[0329] A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A A/B/B/B B/A/B/B B/B/A/B

[0330] 考虑了其它组合。同样,为了实现杀死细胞,以有效杀死所述细胞的组合量将两种试剂递送给细胞。

[0331] 适用于组合疗法的试剂或因子是在施用于细胞时引发DNA损伤的任何化合物或治疗方法。具体地,此类试剂是前文VI (C) (i) - (iii) 部分所述的那些。按本发明治疗癌症中,将肿瘤细胞接触某试剂和所述抗核仁素抗体。这可通过用辐射照射局部肿瘤位点或给予对象治疗有效量的含化疗化合物的药物组合物。

[0332] 多种也称作“化疗剂”的化合物起诱导DNA损伤的作用,所有这些可用于本文所述

的联合治疗中。在一种实施方式中,所述“其它试剂”包括化疗剂。本发明的化疗剂类别包括但不限于:烷化剂、蒽环类、细胞骨架破坏剂、埃博霉素类、II型拓扑异构酶抑制剂、核苷类似物与前体类似物,肽抗生素,铂基试剂,类视黄醇或长春花生物碱及衍生物。这些组内的具体化疗剂包括但不限于放线菌素D、全反式视黄酸阿扎胞苷、阿霉素硫酸嘌呤、博来霉素、喜树碱、卡铂、卡培他滨、顺铂、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、阿糖胞苷、道诺红菌素、多西他赛、多西氟尿嘧啶、多柔比星、表阿霉素、埃博霉素、依托泊苷、氟尿嘧啶、5-氟尿嘧啶(5FU)、吉西他滨、羟基脲、过氧化氢、伊达比星、伊马替尼、双氯乙基甲胺、巯基嘌呤、甲氨蝶呤、丝裂霉素C、米托蒽醌、奥沙利铂、紫杉醇、培美曲塞、替尼泊苷、硫鸟嘌呤、戊柔比星、长春碱、长春新碱、长春碱酰胺、长春瑞宾。本发明还包括一种或多种DNA破坏剂的组合的应用,无论所述破坏剂是基于辐射或是实际的化合物,例如X射线与顺铂的应用或顺铂与依托泊苷的应用。

[0333] 考虑直接交联核酸特别是DNA的试剂能促进DNA损伤得到与抗核仁素抗体协同的抗肿瘤组合物。可采用试剂如顺铂和其它DNA烷化剂。顺铂已广泛用于治疗癌症,临床应用所用的有效剂量为总计3周期的每3周一次持续5天 $20\text{mg}/\text{m}^2$ 。顺铂不经口吸收,因此必须通过静脉内、皮下、瘤内或腹膜内注射来递送。

[0334] 损伤DNA的试剂还包括干扰DNA复制、有丝分裂和染色体分离的化合物。此类化疗化合物包括阿霉素也称多柔比星,依托泊苷,维拉帕米,鬼臼毒素等。这些化合物在治疗瘤的临床情况中广泛采用,剂量为阿霉素以21天间隔经静脉推注给予 $25\text{--}75\text{mg}/\text{m}^2$,依托泊苷静脉内给予 $35\text{--}50\text{mg}/\text{m}^2$ 或口服双倍静脉内剂量。

[0335] 破坏核酸前体和亚基的合成及保真度的试剂也导致DNA损伤。同样已开发了一些核酸前体。已进行广泛测试的特别有用的试剂已能方便获得。同样,瘤性组织优选采用如5-氟尿嘧啶(5-FU)等试剂,使该试剂特别适用于靶向瘤性细胞。尽管毒性显著,5-FU能用于多种载体,包括外用载体,但常用静脉内给予3-15毫克/千克/天的剂量。

[0336] 造成DNA损伤并已广泛使用的其他因素包括通常称为 γ 射线、X射线和/或将放射性同位素直接递送给肿瘤细胞。还包括其它形式的DNA损伤因素,如微波和紫外线辐射。所有这些因素很有可能会对DNA前体、DNA复制和修复、染色体装配和维持造成各种DNA损伤。X射线的剂量范围为从长时间的每日剂量50-200伦琴(3-4周)到单次剂量2000-6000伦琴。放射性同位素的剂量范围差异很大,取决于所述同位素的半衰期、发射辐射的强度和类型、以及肿瘤细胞的摄入。

[0337] F. 免疫检测试剂盒

[0338] 在另一些实施方式中,本发明考虑用于上述免疫检测方法的免疫检测试剂盒。所述免疫检测试剂盒将在适当容器用具中包含人抗核仁素抗体和可选的免疫检测试剂。

[0339] 在某些实施方式中,所述抗体可预结合于固体载体,如柱基质和/或微量滴定板的孔。所述试剂盒的免疫检测试剂可采用多种形式中的任一种,包括那些与给定抗体关联或结合的可检测标记。也考虑关联或附于二级结合配体的可检测标记。示例性二级配体是针对一抗具有结合亲和性的那些二抗。

[0340] 适用于本发明试剂盒的其它合适免疫检测试剂包括含二抗与三抗的双组分试剂,所述二抗对一抗有结合亲和性,所述三抗对二抗有结合亲和性,所述三抗连接有可检测标记。如上所述,本领域已知多种示例性标记,所有此类标记都可用于与本发明联用。

[0341] 所述试剂盒还可包括适当分装的核仁素组合物,带或不带标记,可用作制备检测

试验的标准曲线。所述试剂盒可包含抗体-标记偶联物,其可为全偶联形式、中间体形式或待试剂盒用户偶联的单独部分。所述试剂盒的组分可包装在水性介质中或以冻干形式包装。

[0342] 所述试剂盒的容器用具通常包括至少一种小瓶、试管、烧瓶、瓶、注射器或其它容器用具,其中所述抗体可放置,或优选适当分装于其中。本发明的试剂盒通常还可包括用于在封闭限制件中容纳所述抗体、抗原和任意其它试剂容器用于市售的用具。此类容器可包括注塑或吹塑的塑料容器,所需小管保持于其中。

[0343] VII. 实施例

[0344] 下列实施例用于说明本发明的优选实施方式。本领域的普通技术人员应理解,根据代表本发明人所发现技术的实施例中公开的技术能很好地实施本发明,从而可将其视为实施本发明的优选模式。但是,根据本发明公开的内容,本领域普通技术人员应理解,在不偏离本发明精神和范围的前提下,可对所公开的具体实施方式进行许多变化,同时仍能获得相同或类似的结果。

[0345] 本发明的一方面提供能分泌结合人核仁素的抗体的永生化人B细胞的产生方法,其包括:获取IgM-阳性人B细胞群体;将所述群体:接触爱泼斯坦巴尔病毒(EBV)以使所述人B细胞永生,接触细胞因子/生长因子/信号传导试剂混合物以诱导IgM向IgG的免疫球蛋白同种型类型转换;并在支持所述永生化和免疫球蛋白同种型类型转换的条件下培养细胞。在一种实施方式中,所述方法还包括选择表达针对人核仁素的抗体的永生化人B细胞。在另一实施方式中,进行的选择包括对永生化B细胞培养基上清液进行免疫测定。在另一实施方式中,细胞因子混合物含有递送辅助刺激信号给人B细胞的试剂。在另一实施方式中,细胞因子混合物含有抗-IgM F(ab')₂白介素(IL)-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10、IL-13、INF α 、BAFF、可溶性CD40L。在另一实施方式中,IgM-阳性人B细胞群体从外周血、扁桃体骨髓、脾脏、淋巴结、脐带血、肝、单采血液成分操作或暗黄层获得。在另一实施方式中,所述方法还包括从步骤(d)的永生化人B细胞分离完整重链和/或轻链的编码核酸。在另一实施方式中,所述方法还包括从步骤(d)的永生化人B细胞分离重链和/或轻链抗原结合区的编码核酸。在另一实施方式中,所述方法还包括将所述核酸克隆入重链和/或轻链框架区的编码核酸中。在另一实施方式中,所述群体的接触还包括EBV浓缩步骤、感染中的离心步骤,或两者都有。在另一实施方式中,所述方法还包括在步骤(c)后冷冻所述人B细胞群体。在另一实施方式中,所述群体与细胞因子/生长因子/信号传导试剂混合物的接触在步骤(b)(i)后0-96小时进行。在另一实施方式中,所述群体与细胞因子/生长因子/信号传导试剂混合物的接触在步骤(b)(i)后约16-20小时进行。在另一实施方式中,所述群体有约50%-99%通过EBV感染而永生。在另一实施方式中,所述群体有约95%-99%通过EBV感染而永生。在另一实施方式中,表达人核仁素的抗体的永生化人B细胞的选择在感染后1-4周进行。在另一实施方式中,表达人核仁素的抗体的永生化人B细胞的选择在感染后2-3周进行。在另一实施方式中,表达人核仁素的抗体的永生化人B细胞的选择在解冻所保存的冷冻永生化B细胞后和/或在解冻所保存的由所述永生化B细胞所得冷冻培养基上清液后进行。在另一实施方式中,所述B细胞为抗原静息型。在另一实施方式中,所述B细胞为抗原遭遇型。

[0346] 本发明的另一方面提供表达能结合人核仁素的IgG抗体的永生化人B细胞。在一种实施方式中,所述永生化人B细胞命名为T-5D1、V-3H11(3G5)、T-2D3、T-7G7(1H9)、T-2H3、T-

9F9、T-8G4或T-P1C6。

[0347] 本发明的另一方面提供表达能结合SEQ ID No. 2所示蛋白的IgG抗体或其片段的永生化人B细胞。在一种实施方式中,所述IgG抗体是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4抗体。在另一实施方式中,所述IgG抗体是IgG1抗体。在另一实施方式中,所述IgG抗体含有κ轻链。在另一实施方式中,所述IgG抗体含有λ轻链。在另一实施方式中,所述B细胞经EBV永生化。在另一实施方式中,所述抗体或其片段是单克隆抗体或其片段。在另一实施方式中,所述抗体或其片段对人基本无免疫原性。在另一实施方式中,所述抗体或其片段是人抗体或其片段。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少10%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少20%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少30%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少40%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少50%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少60%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少70%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少80%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少90%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少100%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死MV4-11细胞群体的至少10%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死MV4-11细胞群体的至少20%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死MV4-11细胞群体的至少30%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死MV4-11细胞群体的至少40%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死MV4-11细胞群体的至少50%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死MV4-11细胞群体的至少60%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死MV4-11细胞群体的至少70%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死MV4-11细胞群体的至少80%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死MV4-11细胞群体的至少90%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死MV4-11细胞群体的至少100%。在另一实施方式中,所述抗体或其片段结合人核仁素的RNA结合域。在另一实施方式中,所述抗体或其片段使人核仁素的RNA结合域失活。在另一实施方式中,所述分离的抗体或其片段诱发针对癌细胞的补体依赖性细胞毒性。在另一实施方式中,所述分离的抗体或其片段诱发针对癌细胞的非补体依赖性细胞毒性。在另一实施方式中,所述分离的抗体或其片段在接触时诱发癌细胞中的凋亡。在另一实施方式中,所述分离的抗体或其片段抑制

或杀死AML癌细胞,CLL癌细胞或乳腺癌细胞。在另一实施方式中,所述分离的单克隆抗体或其片段降低癌细胞中的BCL-2水平。

[0348] 本发明的另一方面提供表达能结合SEQ ID No.1所编码蛋白的IgG抗体或其片段的永生化人B细胞。在一种实施方式中,所述IgG抗体是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4抗体。在另一实施方式中,所述IgG抗体是IgG1抗体。在另一实施方式中,所述IgG抗体含有 κ 轻链。在另一实施方式中,所述IgG抗体含有 λ 轻链。在另一实施方式中,所述B细胞经EBV永生化。在另一实施方式中,所述抗体或其片段是单克隆抗体或其片段。如权利要求33所述的分离抗体或其片段,其中,所述抗体或其片段对人基本无免疫原性。在另一实施方式中,所述抗体或其片段是人抗体或其片段。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少10%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少20%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少30%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少40%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少50%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少60%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少70%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少80%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少90%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少100%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与所述MCF-7细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死MV4-11细胞群体的至少10%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与所述MCF-7细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死MV4-11细胞群体的至少20%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与所述MCF-7细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死MV4-11细胞群体的至少30%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与所述MCF-7细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死MV4-11细胞群体的至少40%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与所述MCF-7细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死MV4-11细胞群体的至少50%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与所述MCF-7细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死MV4-11细胞群体的至少60%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与所述MCF-7细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死MV4-11细胞群体的至少70%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与所述MCF-7细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死MV4-11细胞群体的至少80%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与所述MCF-7细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死MV4-11细胞群体的至少90%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与所述MCF-7细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死MV4-11细胞群体的至少100%。在另一实施方式中,所述抗体或其片段结合人核仁素的RNA结合域。在另一实施方式中,所述抗体或其片段使人核仁素的RNA结合域失活。在另一实施方式中,所述分离的抗体或其片段诱发针对癌细胞的补体依赖性细胞毒性。在另一实施方式中,所述分离的抗体或其片段诱发针对癌细胞的非补体依赖性细胞毒性。在另一实

施方式中,所述分离的抗体或其片段在接触时诱发癌细胞中的凋亡。在另一实施方式中,所述分离的抗体或其片段抑制或杀死AML癌细胞,CLL癌细胞或乳腺癌细胞。在另一实施方式中,所述分离的单克隆抗体或其片段降低癌细胞中的BCL-2水平。

[0349] 本发明的另一方面提供表达能结合含SEQ ID No.4序列的蛋白的IgG抗体或其片段的永生化人B细胞。在一种实施方式中,所述IgG抗体是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4抗体。在另一实施方式中,所述IgG抗体是IgG1抗体。在另一实施方式中,所述IgG抗体含有κ轻链。在另一实施方式中,所述IgG抗体含有λ轻链。在另一实施方式中,所述B细胞经EBV永生化。在另一实施方式中,如权利要求33所述的分离抗体或其片段,其中,所述抗体或其片段是单克隆抗体或其片段。在另一实施方式中,所述抗体或其片段对人基本无免疫原性。在另一实施方式中,所述抗体或其片段是人抗体或其片段。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少10%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少20%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少30%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少40%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少50%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少60%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少70%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少80%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少90%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少100%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与所述MCF-7细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死MV4-11细胞群体的至少10%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与所述MCF-7细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死MV4-11细胞群体的至少20%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与所述MCF-7细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死MV4-11细胞群体的至少30%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与所述MCF-7细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死MV4-11细胞群体的至少40%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与所述MCF-7细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死MV4-11细胞群体的至少50%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与所述MCF-7细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死MV4-11细胞群体的至少60%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与所述MCF-7细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死MV4-11细胞群体的至少70%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与所述MCF-7细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死MV4-11细胞群体的至少80%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与所述MCF-7细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死MV4-11细胞群体的至少90%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与所述MCF-7细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死MV4-11细胞群体的至少100%。在另一实施方式中,所述抗体或其片段结合人核仁素的RNA结合域。在另一实施方式中,所述抗体或其片段使人核仁素的RNA结合域失活。在另一实施方式中,所述分离的抗体或其片段诱发针对癌细胞的补体依赖

性细胞毒性。在另一实施方式中,所述分离的抗体或其片段诱发针对癌细胞的非补体依赖性细胞毒性。在另一实施方式中,所述分离的抗体或其片段在接触时诱发癌细胞中的凋亡。在另一实施方式中,所述分离的抗体或其片段抑制或杀死AML癌细胞,CLL癌细胞或乳腺癌细胞。在另一实施方式中,所述分离的单克隆抗体或其片段降低癌细胞中的BCL-2水平。

[0350] 本发明的另一方面提供表达能结合SEQ ID No.3所编码蛋白的IgG抗体或其片段的永生化人B细胞。在一种实施方式中,所述IgG抗体是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4抗体。在另一实施方式中,所述IgG抗体是IgG1抗体。在另一实施方式中,所述IgG抗体含有κ轻链。在另一实施方式中,所述IgG抗体含有λ轻链。在另一实施方式中,所述B细胞经EBV永生化。在另一实施方式中,所述抗体或其片段是单克隆抗体或其片段。在另一实施方式中,所述抗体或其片段对人基本无免疫原性。在另一实施方式中,所述抗体或其片段是人抗体或其片段。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少20%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与所述MCF-7细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死MV4-11细胞群体的至少20%。在另一实施方式中,所述抗体或其片段结合人核仁素的RNA结合域。在另一实施方式中,所述抗体或其片段使人核仁素的RNA结合域失活。在另一实施方式中,所述分离的抗体或其片段诱发针对癌细胞的补体依赖性细胞毒性。在另一实施方式中,所述分离的抗体或其片段诱发针对癌细胞的非补体依赖性细胞毒性。在另一实施方式中,所述分离的抗体或其片段在接触时诱发癌细胞中的凋亡。在另一实施方式中,所述分离的抗体或其片段抑制或杀死AML癌细胞,CLL癌细胞或乳腺癌细胞。在另一实施方式中,所述分离的单克隆抗体或其片段降低癌细胞中的BCL-2水平。

[0351] 本发明的另一方面提供表达能结合SEQ ID No.4所示蛋白的分离的人单克隆抗体或其片段。在一种实施方式中,所述抗体或其片段是人抗体或其片段。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少10%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少20%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少30%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少40%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少50%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少60%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少70%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少80%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少90%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞群体和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少100%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死MV4-11细胞群体的至少10%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死MV4-11细胞群体的至少20%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与MCF-7细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死MV4-11细胞群体的至少30%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段

与所述MCF-7细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死MV4-11细胞群体的至少40%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与所述MCF-7细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死MV4-11细胞群体的至少50%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与所述MCF-7细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死MV4-11细胞群体的至少60%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与所述MCF-7细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死MV4-11细胞群体的至少70%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与所述MCF-7细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死MV4-11细胞群体的至少80%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与所述MCF-7细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死MV4-11细胞群体的至少90%。在另一实施方式中,当所述抗体或其片段与所述MCF-7细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死MV4-11细胞群体的至少100%。在另一实施方式中,所述抗体或其片段结合人核仁素的RNA结合域。在另一实施方式中,所述抗体或其片段使人核仁素的RNA结合域失活。在另一实施方式中,所述分离的抗体或其片段诱发针对癌细胞的补体依赖性细胞毒性。在另一实施方式中,所述分离的抗体或其片段诱发针对癌细胞的非补体依赖性细胞毒性。在另一实施方式中,所述分离的抗体或其片段在接触时诱发癌细胞中的凋亡。在另一实施方式中,所述分离的抗体或其片段抑制或杀死AML癌细胞,CLL癌细胞或乳腺癌细胞。在另一实施方式中,所述分离的单克隆抗体或其片段降低癌细胞中的BCL-2水平。

[0352] 在本发明的另一方面提供特异性结合人核仁素蛋白的分离抗体或其片段,其中当所述抗体或其片段与MCF-7细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少20%。在一种实施方式中,所述人核仁素的氨基酸序列包含SEQ ID No.2。在另一实施方式中,所述抗体或其片段结合由SEQ ID No.2的氨基酸残基1-283组成的氨基酸序列。在另一实施方式中,所述抗体或其片段是单克隆抗体或其片段。在另一实施方式中,所述抗体或其片段对人基本无免疫原性。在另一实施方式中,所述抗体或其片段是人抗体或其片段。在另一实施方式中,所述抗体或其片段结合人核仁素的RNA结合域。在另一实施方式中,所述抗体或其片段使人核仁素的RNA结合域失活。在另一实施方式中,所述分离的抗体或其片段连接诊断剂或治疗剂。在另一实施方式中,所述分离的抗体或其片段显示针对癌细胞的补体依赖性细胞毒性。在另一实施方式中,所述分离的抗体或其片段显示针对癌细胞的非补体依赖性细胞毒性。在另一实施方式中,所述分离的抗体或其片段在接触时诱发癌细胞中的凋亡。在另一实施方式中,所述抗体或其片段抑制或杀死AML癌细胞,CLL癌细胞或乳腺癌细胞。在另一实施方式中,所述分离的抗体或其片段降低癌细胞中的BCL-2水平。在另一实施方式中,所述抗体或其片段连接诊断剂。在另一实施方式中,所述诊断剂是放射性核素、荧光团、化学发光化合物、荧光化合物或酶。在另一实施方式中,所述抗体或其片段连接治疗剂。在另一实施方式中,所述治疗剂是放射性核素、毒素或化学治疗部分。

[0353] 在本发明的另一方面提供特异性结合人核仁素蛋白的分离抗体或其片段,其中当所述抗体或其片段与MCF-7细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MV4-11细胞群体的至少10-100% (例如,MV4-11细胞群体的10、20、30、40、50、60、70、80、90或100%)。在另一实施方式中,所述人核仁素的氨基酸序列包含SEQ ID No.2。在另一实施方式中,所述抗体或其片段结合由SEQ ID No.2的氨基酸残基1-283组成的氨基酸序列。在另一实施方式中,所述抗体或其片段是单克隆抗体或其片段。在另一实施方式中,所述抗体或其片段对人基本无免疫原性。在另一实施方式中,所述抗体或其片段是人抗体或其片段。在另一实施方式中,

所述抗体或其片段结合人核仁素的RNA结合域。在另一实施方式中,所述抗体或其片段使人核仁素的RNA结合域失活。在另一实施方式中,所述分离的抗体或其片段连接诊断剂或治疗剂。在另一实施方式中,所述分离的抗体或其片段显示针对癌细胞的补体依赖性细胞毒性。在另一实施方式中,所述分离的抗体或其片段显示针对癌细胞的非补体依赖性细胞毒性。在另一实施方式中,所述分离的抗体或其片段在接触时诱发癌细胞中的凋亡。在另一实施方式中,所述抗体或其片段抑制或杀死AML癌细胞,CLL癌细胞或乳腺癌细胞。在另一实施方式中,所述分离的抗体或其片段降低癌细胞中的BCL-2水平。在另一实施方式中,所述抗体或其片段连接诊断剂。在另一实施方式中,所述诊断剂是放射性核素、荧光团、化学发光化合物、荧光化合物或酶。在另一实施方式中,所述抗体或其片段连接治疗剂。在另一实施方式中,所述治疗剂是放射性核素、毒素或化学治疗部分。

[0354] 本发明的另一方面提供抗核仁素的组合物,所述组合物包含特异性结合人核仁素蛋白的一种或多种分离的抗体或其片段,其中当所述一种或多种抗体与MCF-7细胞和人AB血清孵育48-96小时(例如,48、72或96小时),其杀死MCF-7细胞群体的至少10-100%(例如,10、20、30、40、50、60、70、80、90或100%)。在一种实施方式中,所述一种或多种分离的抗体或其片段是单克隆抗体或其片段。在另一实施方式中,所述一种或多种分离的抗体或其片段对人基本无免疫原性。在另一实施方式中,所述一种或多种分离的抗体或其片段是人抗体或其片段。在另一实施方式中,所述一种或多种分离的抗体或其片段结合人核仁素的RNA结合域。在另一实施方式中,所述一种或多种分离的抗体或其片段灭活人核仁素的RNA结合域。在另一实施方式中,所述人核仁素的氨基酸序列包含SEQ ID No.2。在另一实施方式中,所述一种或多种分离的抗体或其片段结合SEQ ID No.4。在另一实施方式中,所述抗核仁素组合物还包含放射性核素、荧光团、化学发光化合物、荧光化合物、酶、毒素或化疗剂。在另一实施方式中,所述放射性核素、荧光团、化学发光化合物、荧光化合物、酶、毒素或化疗剂偶联所述一种或多种抗体或其片段。在另一实施方式中,所述抗核仁素组合物包含两种或更多种分离的抗体或其片段特异性结合所述人核仁素蛋白,其中当所述一种或多种抗体或其片段与MCF-7细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少20%。在另一实施方式中,所述抗核仁素组合物包含3种或更多种分离的抗体或其片段特异性结合所述人核仁素蛋白,其中当所述一种或多种抗体或其片段与MCF-7细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少20%。

[0355] 本发明的另一方面提供抑制或杀死在细胞表面表达核仁素的细胞的方法,所述方法包括使所述细胞接触能结合人核仁素蛋白的抗体或其片段,其中当所述抗体或其片段与MCF-7细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少20%。在一种实施方式中,所述抗体或其片段是人抗体或其片段。在另一实施方式中,所述抗体或其片段是单克隆抗体或其片段。在另一实施方式中,所述抗体或其片段结合SEQ ID No.2。在另一实施方式中,所述抗体或其片段结合SEQ ID No.1所编码的氨基酸序列。在另一实施方式中,所述抗体或其片段结合SEQ ID No.4。在另一实施方式中,所述抗体或其片段结合SEQ ID No.3所编码的氨基酸序列。在另一实施方式中,所述细胞是癌细胞。在另一实施方式中,所述癌细胞是肺癌细胞,乳腺癌细胞、前列腺癌细胞、结肠癌细胞、胰腺癌细胞、肾细胞癌细胞、卵巢癌细胞、白血病细胞、黑色素瘤细胞、成胶质细胞瘤细胞、神经母细胞瘤细胞、肉瘤细胞或胃癌细胞。在另一实施方式中,所述细胞是免疫细胞。在另一实施方式中,所述免疫细胞是

淋巴细胞、树突细胞、外周血单核细胞、巨噬细胞或神经胶质细胞。在另一实施方式中,所述免疫细胞是活化免疫细胞。在另一实施方式中,所述免疫细胞是活化B细胞。在另一实施方式中,所述免疫细胞是记忆B细胞。在另一实施方式中,所述免疫细胞是活化T细胞。在另一实施方式中,所述免疫细胞是活化CD4+T细胞。在另一实施方式中,所述免疫细胞是活化CD8+T细胞。在另一实施方式中,所述细胞是血管平滑肌细胞或内皮细胞。在另一实施方式中,所述抗体或其片段连接治疗剂。在另一实施方式中,所述治疗剂是放射性核素、毒素或化疗剂。在另一实施方式中,所述抑制或杀死包括所述细胞中的凋亡。在另一实施方式中,所述细胞位于人类对象中,且所述接触包括将所述抗体或其片段给予所述对象。在另一实施方式中,所述方法还包括使所述细胞接触至少一种补充抑制剂或疗法。在另一实施方式中,所述补充疗法包括一种或多种手术、放射治疗、化学治疗、毒素治疗、免疫治疗、激素治疗、抗血管生成治疗或基因治疗或其它生物学疗法。在另一实施方式中,所述补充抑制剂包括一种或多种放射性核素、化疗剂、毒素免疫治疗剂、激素、核酸或多肽。在另一实施方式中,所述毒素是白喉毒素、外毒素A链、蓖麻毒素A链、相思豆毒素A链、莨菪根毒素A链、 α 八叠球菌、油桐蛋白、石竹素蛋白、美洲商陆蛋白、美洲商陆抗病毒蛋白、苦瓜抑制剂、泻果素、巴豆毒素、肥皂草抑制剂、白树毒素、迈托毒素、局限曲菌素、酚霉素、伊诺霉素、卡奇霉素或单端孢霉烯族毒素。在另一实施方式中,所述化疗剂是烷基化剂、蒽环类抗生素、细胞骨架扰乱剂、埃博霉素、拓扑异构酶I的抑制剂、拓扑异构酶II的抑制剂、核苷或核苷酸类似物、前体类似物、肽抗生素、铂基试剂、类视黄醇、长春花生物碱,或其衍生物。在另一实施方式中,所述化疗剂是放线菌素D、全反式视黄酸阿扎胞苷、阿霉素硫酸嘌呤、博来霉素、喜树碱、卡铂、卡培他滨、顺铂、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、阿糖胞苷、道诺红菌素、多西他赛、多西氟尿嘧啶、多柔比星、表阿霉素、埃博霉素、依托泊苷、氟尿嘧啶、5-氟尿嘧啶(5FU)、吉西他滨、羟基脲、过氧化氢、伊达比星、伊马替尼、双氯乙基甲胺、巯基嘌呤、甲氨蝶呤、丝裂霉素C、米托蒽醌、奥沙利铂、紫杉醇、培美曲塞、替尼泊苷、替尼泊苷、硫鸟嘌呤、戊柔比星、长春碱、长春新碱、长春碱酰胺或长春瑞宾。

[0356] 本发明的另一方面提供检测在其表面表达核仁素的细胞的方法,所述方法包括使所述细胞接触免疫结合所述核仁素的人抗体或其片段。在一种实施方式中,所述细胞是癌细胞,免疫细胞或在其表面表达核仁素的血管平滑肌细胞,在其表面表达核仁素的内皮细胞,或病毒感染细胞。在另一实施方式中,所述细胞是在其表面表达核仁素的癌前细胞。在另一实施方式中,所述癌细胞选自下组:肺癌细胞,乳腺癌细胞、前列腺癌细胞、结肠癌细胞、胰腺癌细胞、肾细胞癌细胞、卵巢癌细胞、白血病细胞、黑色素瘤细胞、成胶质细胞瘤细胞、神经母细胞瘤细胞、肉瘤细胞和胃癌细胞。在另一实施方式中,所述免疫细胞是淋巴细胞、树突细胞、外周血单核细胞、巨噬细胞和神经胶质细胞。在另一实施方式中,所述细胞是免疫细胞。在另一实施方式中,所述免疫细胞是活化免疫细胞。在另一实施方式中,所述免疫细胞是活化B细胞。在另一实施方式中,所述免疫细胞是记忆B细胞。在另一实施方式中,所述免疫细胞是活化T细胞。在另一实施方式中,所述免疫细胞是活化CD4+T细胞。在另一实施方式中,所述免疫细胞是活化CD8+T细胞。在另一实施方式中,所述细胞是血管平滑肌细胞或内皮细胞。在另一实施方式中,所述抗体或其片段连接诊断剂。在另一实施方式中,所述诊断剂是放射性核素、荧光团、化学发光化合物、荧光化合物、量子点、纳米颗粒或酶。在另一实施方式中,所述细胞位于人类对象中,且所述接触包括将所述抗体或其片段给予所

述对象。在另一实施方式中,所述细胞位于分离的组织样品或细胞悬液中。

[0357] 本发明的另一方面提供哺乳动物中癌症的治疗或预防方法,所述方法包括给予所述哺乳动物治疗有效量的抗核仁素试剂和药学上可接受的载体;其中所述抗核仁素试剂包括抗核仁素抗体或其片段,且当所述抗体或其片段与MCF-7细胞和人AB血清孵育48小时(例如,48、72或96小时),其杀死所述MCF-7细胞群体的至少10-100%(例如,10、20、30、40、50、60、70、80、90或100%)。在一种实施方式中,所述哺乳动物是人。在另一实施方式中,所述哺乳动物中治疗癌症包括治疗肿瘤缺氧。在另一实施方式中,所述哺乳动物中治疗癌症包括抑制肿瘤血管发生。在另一实施方式中,所述抗核仁素抗体或其片段对人基本无免疫原性。在另一实施方式中,所述抗核仁素抗体或其片段是人抗体或其片段。在另一实施方式中,所述抗核仁素单克隆抗体或其片段是单克隆抗体或其片段。在另一实施方式中,所述毒素是白喉毒素、外毒素A链、蓖麻毒素A链、相思豆毒素A链、蒴莲根毒素A链、 α 八叠球菌、油桐蛋白、石竹素蛋白、美洲商陆蛋白、美洲商陆抗病毒蛋白、苦瓜抑制剂、泻果素、巴豆毒素、肥皂草抑制剂、白树毒素、迈托毒素、局限曲菌素、酚霉素、伊诺霉素、卡奇霉素或单端孢霉烯族毒素。在另一实施方式中,所述化疗剂是烷基化剂、蒽环类抗生素、细胞骨架扰乱剂、埃博霉素、拓扑异构酶I的抑制剂、拓扑异构酶II的抑制剂、核苷或核苷酸类似物、前体类似物、肽抗生素、铂基试剂、类视黄醇、长春花生物碱,或其衍生物。在另一实施方式中,所述化疗剂是放线菌素D、全反式视黄酸阿扎胞苷、阿霉素硫酸嘌呤、博来霉素、喜树碱、卡铂、卡培他滨、顺铂、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、阿糖胞苷、道诺红菌素、多西他赛、多西氟尿嘧啶、多柔比星、表阿霉素、埃博霉素、依托泊苷、氟尿嘧啶、5-氟尿嘧啶(5FU)、吉西他滨、羟基脲、过氧化氢、伊达比星、伊马替尼、双氯乙基甲胺、巯基嘌呤、甲氨蝶呤、丝裂霉素C、米托蒽醌、奥沙利铂、紫杉醇、培美曲塞、替尼泊苷、替尼泊苷、硫鸟嘌呤、戊柔比星、长春碱、长春新碱、长春碱酰胺或长春瑞滨。

[0358] 本发明的另一方面提供哺乳动物中癌症的治疗或预防方法,所述方法包括给予所述哺乳动物治疗有效量的抗核仁素抗体或其片段,毒素或化疗剂,以及药学上可接受的载体;且当所述抗体或其片段与MCF-7细胞和人AB血清孵育48小时(例如,48、72或96小时),其杀死所述MCF-7细胞群体的至少10-100%(例如,10、20、30、40、50、60、70、80、90或100%)。在一种实施方式中,所述哺乳动物是人。在另一实施方式中,所述哺乳动物中治疗癌症包括治疗肿瘤缺氧。在另一实施方式中,所述哺乳动物中治疗癌症包括抑制肿瘤血管发生。在另一实施方式中,所述抗核仁素抗体或其片段对人基本无免疫原性。在另一实施方式中,所述抗核仁素抗体或其片段是人抗体或其片段。在另一实施方式中,所述抗核仁素单克隆抗体或其片段是单克隆抗体或其片段。在另一实施方式中,所述毒素是白喉毒素、外毒素A链、蓖麻毒素A链、相思豆毒素A链、蒴莲根毒素A链、 α 八叠球菌、油桐蛋白、石竹素蛋白、美洲商陆蛋白、美洲商陆抗病毒蛋白、苦瓜抑制剂、泻果素、巴豆毒素、肥皂草抑制剂、白树毒素、迈托毒素、局限曲菌素、酚霉素、伊诺霉素、卡奇霉素或单端孢霉烯族毒素。在另一实施方式中,所述化疗剂是烷基化剂、蒽环类抗生素、细胞骨架扰乱剂、埃博霉素、拓扑异构酶I的抑制剂、拓扑异构酶II的抑制剂、核苷或核苷酸类似物、前体类似物、肽抗生素、铂基试剂、类视黄醇、长春花生物碱,或其衍生物。在另一实施方式中,所述化疗剂是放线菌素D、全反式视黄酸阿扎胞苷、阿霉素硫酸嘌呤、博来霉素、喜树碱、卡铂、卡培他滨、顺铂、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、阿糖胞苷、道诺红菌素、多西他赛、多西氟尿嘧啶、多柔比星、表阿霉素、埃博霉素、依

托泊苷、氟尿嘧啶、5-氟尿嘧啶(5FU)、吉西他滨、羟基脲、过氧化氢、伊达比星、伊马替尼、双氯乙基甲胺、巯基嘌呤、甲氨蝶呤、丝裂霉素C、米托蒽醌、奥沙利铂、紫杉醇、培美曲塞、替尼泊苷、替尼泊苷、硫鸟嘌呤、戊柔比星、长春碱、长春新碱、长春碱酰胺或长春瑞宾。

[0359] 本发明的另一方面提供哺乳动物中癌症的治疗或预防方法,所述方法包括给予所述哺乳动物治疗有效量的抗核仁素抗体或其片段以及药学上可接受的载体,并用放射治疗进一步治疗处理所述哺乳动物,其中当所述抗体或其片段与MCF-7细胞和人AB血清孵育48小时(例如,48、72或96小时),其杀死所述MCF-7细胞群体的至少10-100%(例如,10、20、30、40、50、60、70、80、90或100%)。在一种实施方式中,所述哺乳动物是人。在另一实施方式中,所述哺乳动物中治疗癌症包括治疗肿瘤缺氧。在另一实施方式中,所述哺乳动物中治疗癌症包括抑制肿瘤血管发生。在另一实施方式中,所述抗核仁素抗体或其片段对人基本无免疫原性。在另一实施方式中,所述抗核仁素抗体或其片段是人抗体或其片段。在另一实施方式中,所述抗核仁素单克隆抗体或其片段是单克隆抗体或其片段。在另一实施方式中,所述毒素是白喉毒素、外毒素A链、蓖麻毒素A链、相思豆毒素A链、蒴莲根毒素A链、 α 八叠球菌、油桐蛋白、石竹素蛋白、美洲商陆蛋白、美洲商陆抗病毒蛋白、苦瓜抑制剂、泻果素、巴豆毒素、肥皂草抑制剂、白树毒素、迈托毒素、局限曲菌素、酚霉素、伊诺霉素、卡奇霉素或单端孢霉烯族毒素。在另一实施方式中,所述化疗剂是烷基化剂、蒽环类抗生素、细胞骨架扰乱剂、埃博霉素、拓扑异构酶I的抑制剂、拓扑异构酶II的抑制剂、核苷或核苷酸类似物、前体类似物、肽抗生素、铂基试剂、类视黄醇、长春花生物碱,或其衍生物。在另一实施方式中,所述化疗剂是放线菌素D、全反式视黄酸阿扎胞苷、阿霉素硫酸嘌呤、博来霉素、喜树碱、卡铂、卡培他滨、顺铂、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、阿糖胞苷、道诺红菌素、多西他赛、多西氟尿啶、多柔比星、表阿霉素、埃博霉素、依托泊苷、氟尿嘧啶、5-氟尿嘧啶(5FU)、吉西他滨、羟基脲、过氧化氢、伊达比星、伊马替尼、双氯乙基甲胺、巯基嘌呤、甲氨蝶呤、丝裂霉素C、米托蒽醌、奥沙利铂、紫杉醇、培美曲塞、替尼泊苷、替尼泊苷、硫鸟嘌呤、戊柔比星、长春碱、长春新碱、长春碱酰胺或长春瑞宾。

[0360] 本发明的另一方面提供在哺乳动物中治疗或预防癌症的方法,所述方法包括给予所述哺乳动物治疗有效量的抗核仁素剂和药学上可接受的载体;其中所述抗核仁素剂包含特异性结合SEQ ID No.4所示蛋白的抗核仁素抗体或其片段。在一种实施方式中,所述哺乳动物是人。在另一实施方式中,所述哺乳动物中治疗癌症包括治疗肿瘤缺氧。在另一实施方式中,所述哺乳动物中治疗癌症包括抑制肿瘤血管发生。在另一实施方式中,所述抗核仁素抗体或其片段对人基本无免疫原性。在另一实施方式中,所述抗核仁素抗体或其片段是人抗体或其片段。在另一实施方式中,所述抗核仁素单克隆抗体或其片段是单克隆抗体或其片段。在另一实施方式中,所述毒素是白喉毒素、外毒素A链、蓖麻毒素A链、相思豆毒素A链、蒴莲根毒素A链、 α 八叠球菌、油桐蛋白、石竹素蛋白、美洲商陆蛋白、美洲商陆抗病毒蛋白、苦瓜抑制剂、泻果素、巴豆毒素、肥皂草抑制剂、白树毒素、迈托毒素、局限曲菌素、酚霉素、伊诺霉素、卡奇霉素或单端孢霉烯族毒素。在另一实施方式中,所述化疗剂是烷基化剂、蒽环类抗生素、细胞骨架扰乱剂、埃博霉素、拓扑异构酶I的抑制剂、拓扑异构酶II的抑制剂、核苷或核苷酸类似物、前体类似物、肽抗生素、铂基试剂、类视黄醇、长春花生物碱,或其衍生物。在另一实施方式中,所述化疗剂是放线菌素D、全反式视黄酸阿扎胞苷、阿霉素硫酸嘌呤、博来霉素、喜树碱、卡铂、卡培他滨、顺铂、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、阿糖胞苷、道诺红菌

素、多西他赛、多西氟尿嘧啶、多柔比星、表阿霉素、埃博霉素、依托泊苷、氟尿嘧啶、5-氟尿嘧啶(5FU)、吉西他滨、羟基脲、过氧化氢、伊达比星、伊马替尼、双氯乙基甲胺、巯基嘌呤、甲氨蝶呤、丝裂霉素C、米托蒽醌、奥沙利铂、紫杉醇、培美曲塞、替尼泊苷、替尼泊苷、硫鸟嘌呤、戊柔比星、长春碱、长春新碱、长春碱酰胺或长春瑞宾。

[0361] 本发明的另一方面提供了在哺乳动物中治疗或预防癌症的方法,所述方法包括给予所述哺乳动物治疗有效量的抗核仁素抗体或其片段,毒素或化疗剂,以及药学上可接受的载体,其中所述抗体或其片段特异性结合SEQ ID No. 4所示蛋白。在一种实施方式中,所述哺乳动物是人。在另一实施方式中,所述哺乳动物中治疗癌症包括治疗肿瘤缺氧。在另一实施方式中,所述哺乳动物中治疗癌症包括抑制肿瘤血管发生。在另一实施方式中,所述抗核仁素抗体或其片段对人基本无免疫原性。在另一实施方式中,所述抗核仁素抗体或其片段是人抗体或其片段。在另一实施方式中,所述抗核仁素单克隆抗体或其片段是单克隆抗体或其片段。在另一实施方式中,所述毒素是白喉毒素、外毒素A链、蓖麻毒素A链、相思豆毒素A链、蒴莲根毒素A链、 α 八叠球菌、油桐蛋白、石竹素蛋白、美洲商陆蛋白、美洲商陆抗病毒蛋白、苦瓜抑制剂、泻果素、巴豆毒素、肥皂草抑制剂、白树毒素、迈托毒素、局限曲菌素、酚霉素、伊诺霉素、卡奇霉素或单端孢霉烯族毒素。在另一实施方式中,所述化疗剂是烷基化剂、蒽环类抗生素、细胞骨架扰乱剂、埃博霉素、拓扑异构酶I的抑制剂、拓扑异构酶II的抑制剂、核苷或核苷酸类似物、前体类似物、肽抗生素、铂基试剂、类视黄醇、长春花生物碱,或其衍生物。在另一实施方式中,所述化疗剂是放线菌素D、全反式视黄酸阿扎胞苷、阿霉素硫唑嘌呤、博来霉素、喜树碱、卡铂、卡培他滨、顺铂、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、阿糖胞苷、道诺红菌素、多西他赛、多西氟尿嘧啶、多柔比星、表阿霉素、埃博霉素、依托泊苷、氟尿嘧啶、5-氟尿嘧啶(5FU)、吉西他滨、羟基脲、过氧化氢、伊达比星、伊马替尼、双氯乙基甲胺、巯基嘌呤、甲氨蝶呤、丝裂霉素C、米托蒽醌、奥沙利铂、紫杉醇、培美曲塞、替尼泊苷、替尼泊苷、硫鸟嘌呤、戊柔比星、长春碱、长春新碱、长春碱酰胺或长春瑞宾。

[0362] 本发明的另一方面提供了在哺乳动物中治疗或预防癌症的方法,所述方法包括给予所述哺乳动物治疗有效量的抗核仁素抗体或其片段和药学上可接受的载体,其中所述抗体或其片段特异性结合SEQ ID No. 4所示蛋白。在一种实施方式中,所述哺乳动物是人。在另一实施方式中,所述哺乳动物中治疗癌症包括治疗肿瘤缺氧。在另一实施方式中,所述哺乳动物中治疗癌症包括抑制肿瘤血管发生。在另一实施方式中,所述抗核仁素抗体或其片段对人基本无免疫原性。在另一实施方式中,所述抗核仁素抗体或其片段是人抗体或其片段。在另一实施方式中,所述抗核仁素单克隆抗体或其片段是单克隆抗体或其片段。在另一实施方式中,所述毒素是白喉毒素、外毒素A链、蓖麻毒素A链、相思豆毒素A链、蒴莲根毒素A链、 α 八叠球菌、油桐蛋白、石竹素蛋白、美洲商陆蛋白、美洲商陆抗病毒蛋白、苦瓜抑制剂、泻果素、巴豆毒素、肥皂草抑制剂、白树毒素、迈托毒素、局限曲菌素、酚霉素、伊诺霉素、卡奇霉素或单端孢霉烯族毒素。在另一实施方式中,所述化疗剂是烷基化剂、蒽环类抗生素、细胞支架扰乱剂、埃博霉素、拓扑异构酶I的抑制剂、拓扑异构酶II的抑制剂、核苷或核苷酸类似物、前体类似物、肽抗生素、铂基试剂、类视黄醇、长春花生物碱,或其衍生物。在另一实施方式中,所述化疗剂是放线菌素D、全反式视黄酸阿扎胞苷、阿霉素硫唑嘌呤、博来霉素、喜树碱、卡铂、卡培他滨、顺铂、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、阿糖胞苷、道诺红菌素、多西他赛、多西氟尿嘧啶、多柔比星、表阿霉素、埃博霉素、依托泊苷、氟尿嘧啶、5-氟尿嘧啶(5FU)、吉西他

滨、羟基脲、过氧化氢、伊达比星、伊马替尼、双氯乙基甲胺、巯基嘌呤、甲氨蝶呤、丝裂霉素 C、米托蒽醌、奥沙利铂、紫杉醇、培美曲塞、替尼泊苷、替尼泊苷、硫鸟嘌呤、戊柔比星、长春碱、长春新碱、长春碱酰胺或长春瑞宾。

[0363] 本发明的另一方面提供哺乳动物中治疗自身免疫性疾病的方法,所述方法包括给予所述哺乳动物治疗有效量的抗核仁素试剂和药学上可接受的载体;其中所述抗核仁素试剂包括抗核仁素抗体或其片段,且当所述抗体或其片段与MCF-7细胞和人AB血清孵育48小时(例如,48、72或96小时),其杀死所述MCF-7细胞群体的至少10-100%(例如,10、20、30、40、50、60、70、80、90或100%)。在一种实施方式中,所述自身免疫性疾病是斑秃、强直性脊柱炎、抗磷脂综合征、自身免疫性艾迪森病、哮喘、肾上腺的自身免疫病、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫肝炎、自身免疫性卵巢炎和睾丸炎、自身免疫性血小板减少、贝切特综合征、大疱型类天疱疮、心肌病、口炎性腹泻-皮炎、慢性疲劳免疫功能障碍综合征、慢性炎症性脱髓鞘多神经病、丘-施二氏综合征、疤痕性类天疱疮、CREST综合征、冷凝集素病、克罗恩氏病、盘状狼疮、特发性混合型冷球蛋白血症、糖尿病(例如I型)、嗜酸细胞性筋膜炎、纤维肌痛-纤维肌炎、肾小球肾炎、格拉夫斯病、格-巴二氏综合征、桥本甲状腺炎、亨-舍二氏紫癜、特发性肺纤维化、特发性/自身免疫血小板减少性紫癜(ITP)、IgA神经病、青少年关节炎、扁平苔藓、红斑狼疮、美尼尔综合征、混合型结缔组织病、多发性硬化、1型或免疫介导的糖尿病、重症肌无力、天疱疮相关疾病(如寻常性天疱疮)、骨髓增生异常综合征、恶性贫血、结节性多动脉炎、多软骨炎、多腺体综合征、风湿性多肌痛、多肌炎和皮肌炎、原发性丙种球蛋白缺乏症、原发性胆汁性肝硬化、牛皮癣、牛皮癣关节炎、雷氏现象、莱特尔综合征、类风湿性关节炎、结节病、硬皮病、斯耶格伦综合征、全身肌强直综合征、系统性红斑狼疮、斯维特综合征、斯提耳病、红斑狼疮、高安动脉炎、暂时性动脉炎/巨细胞动脉炎、溃疡性结肠炎、葡萄膜炎、血管炎如疱疹样皮炎血管炎、白癜风和韦格纳肉芽肿病。炎症性疾病的例子包括但不限于:哮喘、脑炎、炎性肠病、慢性阻塞性肺病、变应性疾病、感染性休克、肺纤维化、未分化脊椎关节病变、未分化关节病、关节炎、骨溶解炎症、移植物抗宿主病、荨麻疹或VKH综合征。在另一实施方式中,所述哺乳动物是人。在另一实施方式中,所述抗核仁素抗体或其片段对人基本无免疫原性。在另一实施方式中,所述抗核仁素抗体或其片段是人抗体或其片段。在另一实施方式中,所述抗核仁素抗体或其片段是单克隆抗体或其片段。

[0364] 本发明的另一方面提供在哺乳动物中治疗自身免疫性疾病的方法,所述方法包括给予所述哺乳动物治疗有效量的抗核仁素剂和药学上可接受的载体;其中所述抗核仁素剂包含特异性结合SEQ ID No.2所示蛋白的人抗核仁素抗体或其片段。在一种实施方式中,所述自身免疫性疾病是斑秃、强直性脊柱炎、抗磷脂综合征、自身免疫性艾迪森病、哮喘、肾上腺的自身免疫病、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫肝炎、自身免疫性卵巢炎和睾丸炎、自身免疫性血小板减少、贝切特综合征、大疱型类天疱疮、心肌病、口炎性腹泻-皮炎、慢性疲劳免疫功能障碍综合征、慢性炎症性脱髓鞘多神经病、丘-施二氏综合征、疤痕性类天疱疮、CREST综合征、冷凝集素病、克罗恩氏病、盘状狼疮、特发性混合型冷球蛋白血症、糖尿病(例如I型)、嗜酸细胞性筋膜炎、纤维肌痛-纤维肌炎、肾小球肾炎、格拉夫斯病、格-巴二氏综合征、桥本甲状腺炎、亨-舍二氏紫癜、特发性肺纤维化、特发性/自身免疫血小板减少性紫癜(ITP)、IgA神经病、青少年关节炎、扁平苔藓、红斑狼疮、美尼尔综合征、混合型结缔组织病、多发性硬化、1型或免疫介导的糖尿病、重症肌无力、天疱疮相关疾病(如寻常性天疱疮)、骨

髓增生异常综合征、恶性贫血、结节性多动脉炎、多软骨炎、多腺体综合征、风湿性多肌痛、多肌炎和皮肌炎、原发性丙种球蛋白缺乏症、原发性胆汁性肝硬化、牛皮癣、牛皮癣关节炎、雷氏现象、莱特尔综合征、类风湿性关节炎、结节病、硬皮病、斯耶格伦综合征、全身肌强直综合征、系统性红斑狼疮、斯维特综合征、斯提耳病、红斑狼疮、高安动脉炎、暂时性动脉炎/巨细胞动脉炎、溃疡性结肠炎、葡萄膜炎、血管炎如疱疹样皮炎血管炎、白癜风和韦格纳肉芽肿病。炎性疾病的例子包括但不限于：哮喘、脑炎、炎性肠病、慢性阻塞性肺病、变应性疾病、感染性休克、肺纤维化、未分化脊椎关节病变、未分化关节病、关节炎、骨溶解炎症、移植物抗宿主病、荨麻疹或VKH综合征。在另一实施方式中，所述哺乳动物是人。在另一实施方式中，所述抗核仁素抗体或其片段对人基本无免疫原性。在另一实施方式中，所述抗核仁素抗体或其片段是人抗体或其片段。在另一实施方式中，所述抗核仁素抗体或其片段是单克隆抗体或其片段。

[0365] 本发明的另一方面提供在哺乳动物中治疗自身免疫性疾病的方法，所述方法包括给予所述哺乳动物治疗有效量的抗核仁素剂和药学上可接受的载体；其中所述抗核仁素剂包含特异性结合SEQ ID No.4所示蛋白的抗核仁素抗体或其片段。在一种实施方式中，所述自身免疫性疾病是斑秃、强直性脊柱炎、抗磷脂综合征、自身免疫性艾迪森病、哮喘、肾上腺的自身免疫病、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫肝炎、自身免疫性卵巢炎和睾丸炎、自身免疫性血小板减少、贝切特综合征、大疱型类天疱疮、心肌病、口炎性腹泻-皮炎、慢性疲劳免疫功能障碍综合征、慢性炎性脱髓鞘多神经病、丘-施二氏综合征、疤痕性类天疱疮、CREST综合征、冷凝集素病、克罗恩氏病、盘状狼疮、特发性混合型冷球蛋白血症、糖尿病（例如I型）、嗜酸细胞性筋膜炎、纤维肌痛-纤维肌炎、肾小球肾炎、格拉夫斯病、格-巴二氏综合征、桥本甲状腺炎、亨-舍二氏紫癜、特发性肺纤维化、特发性/自身免疫血小板减少性紫癜（ITP）、IgA神经病、青少年关节炎、扁平苔藓、红斑狼疮、美尼尔综合征、混合型结缔组织病、多发性硬化、1型或免疫介导的糖尿病、重症肌无力、天疱疮相关疾病（如寻常性天疱疮）、骨髓增生异常综合征、恶性贫血、结节性多动脉炎、多软骨炎、多腺体综合征、风湿性多肌痛、多肌炎和皮肌炎、原发性丙种球蛋白缺乏症、原发性胆汁性肝硬化、牛皮癣、牛皮癣关节炎、雷氏现象、莱特尔综合征、类风湿性关节炎、结节病、硬皮病、斯耶格伦综合征、全身肌强直综合征、系统性红斑狼疮、斯维特综合征、斯提耳病、红斑狼疮、高安动脉炎、暂时性动脉炎/巨细胞动脉炎、溃疡性结肠炎、葡萄膜炎、血管炎如疱疹样皮炎血管炎、白癜风和韦格纳肉芽肿病。炎性疾病的例子包括但不限于：哮喘、脑炎、炎性肠病、慢性阻塞性肺病、变应性疾病、感染性休克、肺纤维化、未分化脊椎关节病变、未分化关节病、关节炎、骨溶解炎症、移植物抗宿主病、荨麻疹或VKH综合征。在另一实施方式中，所述哺乳动物是人。在另一实施方式中，所述抗核仁素抗体或其片段对人基本无免疫原性。在另一实施方式中，所述抗核仁素抗体或其片段是人抗体或其片段。在另一实施方式中，所述抗核仁素抗体或其片段是单克隆抗体或其片段。

[0366] 本发明的另一方面提供哺乳动物中治疗气道疾病的方法，所述方法包括给予所述哺乳动物治疗有效量的抗核仁素试剂和药学上可接受的载体；其中所述抗核仁素试剂包括抗核仁素抗体或其片段，且当所述抗体或其片段与MCF-7细胞和人AB血清孵育48小时（48、72或96小时），其杀死所述MCF-7细胞群体的至少10-100%（10、20、30、40、50、60、70、80、90、100%）。在另一实施方式中，所述气道基本是哮喘、慢性阻塞性肺病、特发性肺纤维变性、或

肺炎。在另一实施方式中,所述哺乳动物是人。在另一实施方式中,所述抗核仁素抗体或其片段对人基本无免疫原性。在另一实施方式中,所述抗核仁素抗体或其片段是人抗体或其片段。在另一实施方式中,所述抗核仁素抗体或其片段是单克隆抗体或其片段。

[0367] 本发明的另一方面提供在哺乳动物中治疗气道疾病的方法,所述方法包括给予所述哺乳动物治疗有效量的抗核仁素剂和药学上可接受的载体;其中所述抗核仁素剂包含特异性结合SEQ ID No.2所示蛋白的人抗核仁素抗体或其片段。在另一实施方式中,所述气道基本是哮喘、慢性阻塞性肺病、特发性肺纤维变性、或肺炎。在另一实施方式中,所述哺乳动物是人。在另一实施方式中,所述抗核仁素抗体或其片段对人基本无免疫原性。在另一实施方式中,所述抗核仁素抗体或其片段是人抗体或其片段。在另一实施方式中,所述抗核仁素抗体或其片段是人抗体或其片段。在另一实施方式中,所述抗核仁素抗体或其片段是单克隆抗体或其片段。

[0368] 本发明的另一方面提供在哺乳动物中治疗气道疾病的方法,所述方法包括给予所述哺乳动物治疗有效量的抗核仁素剂和药学上可接受的载体;其中所述抗核仁素剂包含特异性结合SEQ ID No.4所示蛋白的抗核仁素抗体或其片段。在另一实施方式中,所述气道基本是哮喘、慢性阻塞性肺病、特发性肺纤维变性、或肺炎。在另一实施方式中,所述哺乳动物是人。在另一实施方式中,所述抗核仁素抗体或其片段对人基本无免疫原性。在另一实施方式中,所述抗核仁素抗体或其片段是人抗体或其片段。在另一实施方式中,所述抗核仁素抗体或其片段是人抗体或其片段。在另一实施方式中,所述抗核仁素抗体或其片段是单克隆抗体或其片段。

[0369] 本发明的另一方面提供哺乳动物中治疗病毒感染细胞的方法,所述方法包括给予所述哺乳动物治疗有效量的抗核仁素试剂和药学上可接受的载体;其中所述抗核仁素试剂包括抗核仁素抗体或其片段,且当所述抗体或其片段与MCF-7细胞和人AB血清孵育48小时,其杀死所述MCF-7细胞群体的至少20%。在另一实施方式中,所述病毒感染细胞感染了HIV病毒。在另一实施方式中,所述哺乳动物是人。在另一实施方式中,所述抗核仁素单克隆抗体或其片段对人基本无免疫原性。在另一实施方式中,所述抗核仁素抗体或其片段是人抗体或其片段。在另一实施方式中,所述抗核仁素抗体或其片段是单克隆抗体或其片段。

[0370] 本发明的另一方面提供在哺乳动物中治疗病毒感染细胞的方法,所述方法包括给予所述哺乳动物治疗有效量的抗核仁素剂和药学上可接受的载体;其中所述抗核仁素剂包含特异性结合SEQ ID No.2所示蛋白的人抗核仁素抗体或其片段。在另一实施方式中,所述病毒感染细胞感染了HIV病毒。在另一实施方式中,所述哺乳动物是人。在另一实施方式中,所述抗核仁素单克隆抗体或其片段对人基本无免疫原性。在另一实施方式中,所述抗核仁素抗体或其片段是人抗体或其片段。在另一实施方式中,所述抗核仁素抗体或其片段是单克隆抗体或其片段。

[0371] 本发明的另一方面提供在哺乳动物中治疗病毒感染细胞的方法,所述方法包括给予所述哺乳动物治疗有效量的抗核仁素剂和药学上可接受的载体;其中所述抗核仁素剂包含特异性结合SEQ ID No.4所示蛋白的抗核仁素抗体或其片段。在另一实施方式中,所述病毒感染细胞感染了HIV病毒。在另一实施方式中,所述哺乳动物是人。在另一实施方式中,所述抗核仁素单克隆抗体或其片段对人基本无免疫原性。在另一实施方式中,所述抗核仁素

抗体或其片段是人抗体或其片段。在另一实施方式中,所述抗核仁素抗体或其片段是单克隆抗体或其片段。

[0372] 本发明的另一方面提供哺乳动物中治疗或预防非癌病症或疾病的方法,所述病症或疾病的特征为核仁素的表面表达增加,所述方法包括给予所述哺乳动物治疗有效量的抗核仁素试剂和药学上可接受的载体;其中所述抗核仁素试剂包含抗核仁素抗体或其片段,且当所述抗体或其片段与MCF-7细胞和人AB血清孵育48小时(48、72或96小时),其杀死所述MCF-7细胞群体的至少10-100%(例如,10、20、30、40、50、60、70、80、90或100%)。在一种实施方式中,以核仁素表面表达增加为特征的哺乳动物中所述病症或疾病是黄斑变性、糖尿病性视网膜病或炎性疾病。在另一实施方式中,所述哺乳动物是人。在另一实施方式中,所述抗核仁素单克隆抗体或其片段对人基本无免疫原性。在另一实施方式中,所述抗核仁素抗体或其片段是人抗体或其片段。在另一实施方式中,所述抗核仁素抗体或其片段是单克隆抗体或其片段。

[0373] 本发明的另一方面提供在哺乳动物中治疗或预防非癌病症或疾病的方法,所述病症或疾病的特征为核仁素的表面表达增加,所述方法包括给予所述哺乳动物治疗有效量的抗核仁素剂和药学上可接受的载体;其中所述抗核仁素剂包含特异性结合SEQ ID No.2所示蛋白的人抗核仁素抗体或其片段。在一种实施方式中,以核仁素表面表达增加为特征的哺乳动物中所述病症或疾病是黄斑变性、糖尿病性视网膜病或炎性疾病。在另一实施方式中,所述哺乳动物是人。在另一实施方式中,所述抗核仁素单克隆抗体或其片段对人基本无免疫原性。在另一实施方式中,所述抗核仁素抗体或其片段是人抗体或其片段。在另一实施方式中,所述抗核仁素抗体或其片段是单克隆抗体或其片段。

[0374] 本发明的另一方面提供在哺乳动物中治疗或预防非癌病症或疾病的方法,所述病症或疾病的特征为核仁素的表面表达增加,所述方法包括给予所述哺乳动物治疗有效量的抗核仁素剂和药学上可接受的载体;其中所述抗核仁素剂包含特异性结合SEQ ID No.4所示蛋白的抗核仁素抗体或其片段。在一种实施方式中,以核仁素表面表达增加为特征的哺乳动物中所述病症或疾病是黄斑变性、糖尿病性视网膜病或炎性疾病。在另一实施方式中,所述哺乳动物是人。在另一实施方式中,所述抗核仁素单克隆抗体或其片段对人基本无免疫原性。在另一实施方式中,所述抗核仁素抗体或其片段是人抗体或其片段。在另一实施方式中,所述抗核仁素抗体或其片段是单克隆抗体或其片段。

[0375] 本发明的另一方面提供当与MCF-7细胞和人AB血清孵育48小时,能杀死MCF-7细胞群体的至少50%的抗核仁素剂。在另一实施方式中,所述抗核仁素剂对人基本无免疫原性。

[0376] 本发明的另一方面提供当与MCF-7细胞和MCF10A细胞及热灭活血清孵育72或96小时,所杀死的MCF-7细胞超过所杀死的MCF10A细胞的抗核仁素剂。在另一实施方式中,所述抗核仁素剂对人基本无免疫原性。

[0377] 本发明的另一方面提供当与MCF-7细胞和MCF10A细胞及人AB血清孵育96小时,所杀死的MCF-7细胞超过所杀死的MCF10A细胞的抗核仁素剂。在另一实施方式中,所述抗核仁素剂对人基本无免疫原性。

[0378] 本发明的另一方面提供能特异性结合SEQ ID No.4所示蛋白并抑制或杀死在其细胞表面表达核仁素的一种或多种癌细胞的抗核仁素剂。在另一实施方式中,所述抗核仁素剂对人基本无免疫原性。

[0379] 本发明的另一方面提供通过检测一种或多种癌前细胞中细胞表面核仁素表达来确定对象患癌可能性的方法。

[0380] 本发明的另一方面提供前述权利要求中任一项所述的抗体,其中,所述抗体片段为Fab、Fab'、F(ab')₂或Fv片段;双价抗体;线性抗体;单链抗体;或由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0381] 本发明的另一方面提供前述权利要求中任一项所述的方法,其中,所述方法包括使用抗体片段,其中所述抗体片段为Fab、Fab'、F(ab')₂或Fv片段;双价抗体;线性抗体;单链抗体;或由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0382] 实施例1-材料与方法

[0383] 扁桃体B细胞的分离和培养。为制备来自扁桃体的B细胞,将扁桃体组织置于无菌皮氏培养皿内(VWR国际公司,目录号#25384-088),培养皿内含20-30ml补充了1x抗生素-抗真菌素(吉布可公司/英杰公司,目录号15240-062)的杜尔伯科磷酸盐缓冲盐水(DPBS,不含CaCl₂或MgCl₂;纽约州格兰德岛的吉布可公司/英杰公司,目录号14190144)。用解剖刀将所述组织切块并剁碎至约1mm³的小块。通过在两片无菌显微玻片(VWR目录号12-550-34)的毛玻璃表面之间温和研磨扁桃体块释放其它淋巴细胞,通过70μm尼龙滤过滤器(BD Falcon目录号352350,BD生物科学公司,马萨诸塞州贝德福德橡树园2号(Two Oak Park, Bedford, MA))过滤来制备单细胞制品。该悬液加载在Ficoll(瑞典乌普萨拉的安法玛西亚生物科技公司(Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden),目录号17-1440-03)缓冲垫层(35ml样品加载在15ml Ficoll)上并1500G分离20分钟。提取含单核细胞的边界层,用DPBS清洗2次(1300G,7分钟),计数并以10⁸个细胞/毫升重悬于DPBS中。用加拿大温哥华的干细胞技术有限公司(StemCell Technologies Inc.)的StemSep负向选择人B细胞富集试剂盒抗体混合物(目录号14064A)和磁珠(目录号19150)获取高度富集(>95%)的B细胞群体,根据厂商的使用说明,作以下改动以在“The Big Easy”EasySep磁力(干细胞技术有限公司目录号18001)上使用。所有步骤在层流生物安全柜中于室温下进行。将细胞悬液置入14ml的无菌圆底聚丙烯管(VWR目录号60818-689)中,与等体积StemSep负向选择人B细胞富集试剂盒抗体混合物混合,并孵育10分钟。然后,添加体积与抗体混合物体积相等的磁珠悬液,再孵育10分钟。用DPBS将管内体积调至10ml,将管(除去盖)置入磁场10分钟,然后单次倾倒将管中内容物(仍在磁场中)轻轻倒入第二根无菌14ml管中。将含非B细胞附于其壁的初始管从磁场移除,将第二管插入进行10分钟的清除孵育。第一和第二次负向选择步骤后获得的已富集B细胞悬液倒入15ml Falcon管中,用DPBS清洗(1300G,7分钟)并重悬于适当体积的完全RPMI培养基中(通常为10⁵-10⁶个细胞/毫升)用于在37℃,5%CO₂组织培养箱中体外培养。完全RPMI培养基含RPMI 1640(吉布可公司/英杰公司目录号11875-093),补充有10%胎牛血清(FBS,犹他州洛根的海克隆公司(HyClone),目录号SH30088.03,批号AQC23460),和100U/ml青霉素,100μg/ml链霉素(目录号15140-122),2mM L-谷氨酰胺(目录号25030-081,1mM丙酮酸钠(目录号11360-070),10mM HEPES(目录号15630-080),0.1%2-巯基乙醇(目录号21985.023)和0.1%弗氏克隆混合物(Falk's Cloning Cocktail),该混合物由50mMα-硫代甘油(西格玛公司,目录号M6145)、20μM浴酮灵二磺酸(西格玛公司,目录号B1125)、100mM丙酮酸钠(目录号11360-070)、1M HEPES pH 7.4(目录号15630-080)组成。L-谷氨酰胺、丙酮酸钠、青霉素/链霉素和HEPES获自吉布可公司/英杰公司。或者,将细胞以10⁸个细胞/毫升

重悬于完全RPMI培养基中,如下所述,用于用浓缩的爱泼斯坦巴尔病毒(Epstein-Barr virus,EB病毒)储液离心感染以制备永生化扁桃体B细胞文库。

[0384] 外周血B细胞的分离和培养。为制备外周血的B细胞,取静脉血(至多180ml)入60ml注射器中,注射器内含有1-5ml柠檬酸或硫酸肝素以避免凝结,用等体积DPBS稀释,加载在Ficoll缓冲层垫上(35ml稀释样品加载在15ml Ficoll上)并以2000rpm分离20分钟。采集血清(来自上层)并分装成等分试样保存。提取含单核细胞的边界层,用DPBS清洗2次(1300G,7分钟),计数并以 10^8 个细胞/毫升重悬于DPBS中。B细胞的高纯群体采用StemSep负向人B细胞富集试剂盒(干细胞技术有限公司)按上文就扁桃体B细胞分离所述获得。将分离的B细胞清洗(1300G,7分钟)并以 10^5 - 10^6 个细胞/毫升重悬于完全RPMI培养基(上述)中,在37℃,5%CO₂组织培养箱中培养。或者,将细胞以 10^8 个细胞/毫升重悬于完全RPMI培养基中用于用浓缩的EB病毒储液离心感染以制备下述永生化外周血B细胞文库。

[0385] EBV储液制备。为制备感染性EB病毒(EBV)储液,将慢性感染了EBV的B95-8毒株的猴淋巴瘤母细胞样细胞系(LCL) B95-8细胞(Miller和Lipman,1973),或EBfaV-GFP细胞(Speck等,1999;如下所述)在完全RPMI培养基(上述)中以约 10^5 - 2×10^5 个细胞/毫升的细胞密度在37℃,5%CO₂组织培养箱中培养。

[0386] 通过用豆蔻酸-佛波醇-乙酸酯(PMA,10ng/ml,卡巴开公司(Calbiochem),目录号524400)处理约140ml细胞培养物(含B95-8EBV或重组EBfaV-GFP)诱导其进入裂解性病毒生成期。用PMA孵育4小时后,从培养上清液中除去PMA,并用RPMI培养基替换。所述细胞培养3-4天直至高度融合,此时通过离心(1300G,7分钟)去除细胞,将培养上清液通过150ml Nalgene 0.45μm真空滤器(康宁公司目录号430320)过滤以除去细胞碎片。过滤后的上清液或者以1ml-1.8ml等份试样于液氮中速冻用于在1.5ml艾本德(Eppendorf)管或2ml冷冻管中-80℃保存,或者如下所述通过超滤浓缩。

[0387] EBV浓缩。通过将经过滤的病毒悬液(140ml)加载到2个容积为70ml的Centricon Plus-70(100K MW截留)单元(马萨诸塞州比莱瑞卡的密理博公司)中,或通过依序加载60ml病毒上清液到单个容积为60ml的JumboSep300K单元(密歇根州安娜堡的珀尔公司(Pall Corp.))上加载3次以浓缩至多150ml的经过滤病毒储液,来进行病毒浓缩所有步骤在冰上或于4℃按厂商说明进行。将Centricon过滤单元离心(2000G)15-45分钟(每15分钟检测),直至达到最小滞留物体积(每过滤单元约0.5ml)。弃去滤液,将含病毒的浓缩液用完全PRMI培养基重悬至总体积14ml(或初始培养上清液体积的1/10)。将JumboSep单元在3000G离心,并得到约15ml滞留物或10X浓缩的病毒储液。将1ml-1.8ml等份的浓缩病毒储液转移入冷冻管中,在液氮中速冻并转移至-80℃冰箱以保存。

[0388] 通过接种感染B细胞。将B细胞以 10^6 - 10^7 个细胞/毫升重悬于完全RPMI培养基中,与等体积或至多2体积的经过滤EBV上清液混合,然后置于T-25瓶并在组织培养箱中以37℃和5%CO₂孵育4-6小时。然后通过添加完全RPMI培养基调整培养体积,使得经感染细胞以所需浓度(通常 10^5 - 10^6 个细胞/毫升)重悬用于细胞培养,分入多孔板中并转移至37℃和5%CO₂的组织培养箱中。

[0389] 通过用浓缩EBV储液离心感染进行B细胞感染。将B细胞以 10^6 - 10^7 个细胞/毫升重悬于完全RPMI培养基中并与等体积或至多2体积的10X浓缩EBV混合,或以 2×10^6 - 2×10^7 个细胞/毫升直接重悬于10x浓缩的EBV储液中,并置入6孔组织培养板(葛莱娜第一生化有限公

司(Greiner bio-one),目录号65760)的孔内。(EBV储液浓缩超过10X导致感染效率降低。)然后将平板在900G室温离心1-2小时,将被感染的细胞以所需浓度(通常为 10^5 - 10^6 个细胞/毫升)重悬于完全RPMI培养基或含用于诱导分化的细胞因子与信号转导试剂的完全RPMI培养基中。将经感染的细胞分入多孔板内,转移至37℃和5%CO₂的组织培养箱。为产生永生化B细胞文库,通常将 $\sim 10^7$ 个细胞重悬在200ml含有细胞因子和信号转导试剂的培养基中,并接种在10个圆底96孔板(每孔 $\sim 10^4$ 个细胞/200μL)。

[0390] TLR配体存在下的感染。如上所述用EBV的B95-8毒株感染B细胞,在感染时补充Toll样受体(TLR)配体。所述配体以下列终浓度添加:脂蛋白Pam3CSK4 (0.5μg/ml),酵母聚糖(1μg/ml),聚肌胞苷酸(聚I:C) (25μg/ml),脂多糖(LPS) (5μg/ml),咪喹莫特(1μg/ml),未甲基化CpGDNA (1μg/ml)。所有TLR配体(来自英韦沃基公司(InVivoGen Inc))由Mohamed Salem博士(MUSC)提供。

[0391] 通过淋巴母细胞样细胞系长出评估B细胞永生化效率。感染后12小时,对B细胞计数并以2倍系列稀释分入96孔圆底板(葛莱娜公司目录号650180)的孔内,孔的各连续行含有的细胞数量是前一行所含的一半。第一行含有每孔50,000个细胞,系列稀释的最后一行含有每孔24个细胞。细胞于37℃和5%CO₂下在组织培养箱中孵育9天,此时淋巴母细胞样细胞的长出可在显微镜下观察。基于淋巴母细胞样细胞增殖是由EBV永生化孔内至少1个B细胞产生的这一假设来评估永生化效率。因此,该效率从能显微观察到稳定的淋巴母细胞样细胞增殖的含最少每孔细胞数的微孔的行来计算,并表示为1个永生化事件/初始分入孔内的细胞数量。

[0392] 流式细胞术采用MUSC流式细胞中心的Becton Dickinson公司FACSCalibur仪器按已确立的方法来进行。用EBfaV-GFP感染B细胞的感染效率通过在感染后24小时测得绿色荧光蛋白来评估。用于鉴定人B细胞的抗体获自BD生物科学公司,并特异性针对人CD20、CD19、CD23、CD27、CD30、CD38、IgD、IgM和IgG。

[0393] 诱导B细胞分化和IgG分泌。在感染后随即或者在感染后16-20小时添加细胞因子和其它信号转导剂至EBV感染的B细胞中并以周为间隔再添加2次以确定它们在永生化过程中对B细胞分化的影响。将所有试剂稀释在完全RPMI培养基中并加入细胞至下列终浓度:重组人白介素(IL) IL-4,0.2ng/ml;IL-5,0.2ng/ml;IL-6,0.1ng/ml;IL-9,0.2ng/ml;IL-10,2.4ng/ml;IL-13,1ng/ml;重组人干扰素-α (IFN-α2a),2,000IU/ml;重组人BAFF,1ng/ml;重组人可溶性CD40L,5ng/ml;羊抗人IgM F(ab')₂,1.4μg/ml。IL-4(目录号200-04),IL-5(目录号200-05),IL-6(目录号200-06),IL-9(目录号200-09),IL-10(目录号200-10),IL-13(目录号200-13),CD40L(目录号310-02)和BAFF(目录号310-13)获自派罗科技公司(PeproTech,新泽西州洛基山)。IFN-α2a (Roferon^R-A)来自罗氏制药,而羊抗人IgM(Fab')₂(目录号109-006-129)来自杰克逊免疫研究实验室公司(Jackson Immune Research Laboratories Inc.)。

[0394] 产生用于核仁素结合研究的永生化B细胞库。如上所述通过用10x浓缩的B95-8病毒离心感染来感染扁桃体或外周血B细胞。离心感染后随即将细胞重悬于已添加CD40L (5ng/mL)、BAFF (1ng/ml) 和羊抗人IgM (Fab')₂ (1.4μg/ml) (用于12个样品)的完全PRMI培养基中。通常将包含 $\sim 10^7$ 个感染的B细胞的扁桃体库重悬在200ml含有细胞因子和信号转导剂混合物的培养基中,并接种在10个圆底96孔板(每孔 $\sim 10^4$ 个细胞/200μL)。外周血库以

10^6 B细胞/20ml培养基加混合物重悬,并以每孔 $\sim 10^4$ 个细胞/200 μ L接种入圆底96孔板。

[0395] 通过ELISA测定人免疫球蛋白IgM和IgG生成。从感染后5天起在不同时间点采集培养上清液并-20℃冷冻保存至通过针对IgM和IgG的捕获ELISA进行定量测定。以含有2 μ g/ml羊抗人IgG UNLB或抗人IgM UNLB(南方生物技术公司(Southern Biotech))的0.05M碳酸盐-重碳酸盐缓冲液,pH 9.6,用100 μ L/孔包被Costar EIA/RIA 96孔板。带盖平板在4℃孵育过夜。第二天,将平板用1xPBS/0.05%吐温-20(200 μ l/孔)清洗4次,并用1xPBS/1%BSA(300 μ l/孔)室温450rpm振荡封闭1小时。然后将平板用1xPBS/0.05%吐温-20(350 μ l/孔)清洗2次,将样品和标准品(人IgG和人IgM标准品(西格玛公司)稀释在1xPBS/1%BSA中并施用于平板(100 μ l/孔)。产生含从3.9ng/mL到1000ng/mL范围的2倍稀释及仅含培养基的标准曲线。然后将平板在室温以450rpm振荡孵育1小时。清洗后,将平板用200 μ l/孔的1xPBS/0.05%吐温-20清洗4次,然后加入1:4000稀释于1xPBS/1%BSA的检测抗体(羊抗人IgG或IgM AP-偶联物(南方生物技术公司,目录号2040-04或2020-04)(100 μ l/孔)。将平板在室温以450rpm振荡孵育1小时。清洗后,通过用Multiskan Spectrum酶标仪(赛默实验系统公司(ThermoLabsystems))检测OD₄₀₅来测定比色底物对硝基苯酯磷酸钠盐(PNPP,皮尔斯公司(Peirce)目录号37620)的AP转化。用MultiScan软件根据纯化人IgG和IgM标准品的标准曲线校准来计算培养上清液样品中的人免疫球蛋白水平。

[0396] 核仁素结合ELISA。通过ELISA筛选重组核仁素结合由用含重组核仁素(0.5-2 μ g/ml)的无Ca/Mg的1X DPBS于4℃包被过夜的平板来进行。第二天,将平板用1x PBS/0.05%吐温-20(300 μ L/孔)清洗3次并用含1xSuperBlock蛋白质(赛默科学公司(Thermo Scientific),目录号37545)的2.5mM Tris,0.15M NaCl,pH 7.4于室温450rpm振荡封闭1小时。清洗后,加入一抗,其由1:100稀释于封闭缓冲液中的小鼠抗核仁素MS-3MAb对照(圣克鲁兹生物技术公司(Santa Cruz Biotechnology, Inc.),目录号sc-8031)或含抗核仁素抗体的B细胞培养上清液(纯,100 μ L/孔)组成。室温450rpm振荡孵育2小时后,清洗平板并添加检测抗体,其由以1:5000稀释于封闭缓冲液而用于培养上清液的羊抗人IgG-HRP MAb(南方生物技术公司,目录号2040-05)或以1:2000稀释于封闭缓冲液用于检测小鼠MS3MAb对照的MS3羊抗小鼠IgG-HRP MAb(圣克鲁兹生物技术公司,目录号sc-2055)。用100 μ L/孔的TMB+发色团(丹麦大科公司(Dako),S1599)使平板显色,并用分光光度法以OD₄₅₀吸光来定量。

[0397] 重组人核仁素蛋白的产生与分离。用携带编码284-707残基和6个组氨酸的截短核仁素基因的重组pET21a质粒[pET Δ 1-283Nuc-(His)6](Yang等,2002)转化大肠杆菌(E.coli)并通过超声裂解。如此前所述制备并纯化重组人核仁素(Sengupta等,2004)。简而言之,将大肠杆菌培养至A₆₀₀=0.6,然后用0.4mM异丙基-1-硫基- β -D-吡喃半乳糖于30℃诱导过夜。诱导后,将细胞团块重悬于缓冲液A(20mM磷酸钠缓冲液,pH 7.4,500mM NaCl,10mM咪唑,1mM苯甲基磺酰氟)中并通过超声裂解。将裂解液在12,000g离心30分钟。将上清液加载到用缓冲液A平衡并清洗过的1.7ml金属螯合(POROS MC-M)柱(BioCAD SPRINT灌注层析系统)上,然后用含0-200mM咪唑的缓冲液C线性梯度洗脱。通过透析除去咪唑,并将蛋白质在Microcon浓缩器中浓缩。用布拉德福德(Bradford)试验测定蛋白浓度,并用SDS-PAGE分析评估蛋白质纯度。

[0398] 从MV4-11细胞分离内源性核仁素。通过按厂商说明将小鼠抗人核仁素MAb MS-3(圣克鲁兹公司)偶联于超连接生物支持基质(Ultralink Biosupport medium)(皮尔斯公

司)产生人核仁素亲和柱。简要说,将1mg MS-3MAb用pH 9.0的0.1M碳酸缓冲液透析,并添加柠檬酸钠至终浓度0.6M。添加干珠(0.25g)并室温混合2小时,倒入柱中并用PBS清洗。收集洗脱液和清洗液以确定偶联效率,其通常为~94%。将6ml pH 9.0的3M乙醇胺加入柱以封闭残留的结合位点,然后将柱两端封闭并于室温下翻转混合2.5小时。然后将柱用PBS,1M NaCl,再用PBS依次清洗,并加载MV4-11细胞提取液。为制备细胞提取液,用PBS清洗MV4-11细胞,沉淀且重悬于含蛋白酶和磷酸酶抑制剂的裂解缓冲液中并于冰上孵育15分钟。将裂解液在10,000g离心20分钟,并将上清液加载到MS-3MAb亲和柱上。将柱用20体积的Tris缓冲液(pH 7.5)清洗,并用抗原/抗体洗脱缓冲液(皮尔斯公司)洗脱所结合的蛋白质。采集1ml组分并用PD10柱脱盐。浓缩蛋白质部分并用SDS-PAGE经银染和用MS-3抗核仁素MAb进行蛋白印迹来分析。

[0399] 克隆5D1。初始筛选和初级亚克隆。接收扁桃体样品处理入5x 96孔板内:库(T031009)。对平板集合筛选平板集合和孔集合(合并对于P031109和T031009的孔集合)。推定的阳性孔(T031009-5D1和-5G5,P030909-3D1和-3G5)各从1个孔扩增至3个孔中。进行ELISA验证,鉴定反应性孔(T031009-5D1和P031109-3G5)。将所述孔亚克隆入1个平板的1000个细胞/孔和2个平板的100个细胞/孔。

[0400] 二级亚克隆。将3个亚克隆平板(1x 1000个细胞/孔和2x 100个细胞/孔)作为单个平板集合来筛选,无反应性,并重新筛选。证实活性孔。T031009-5D1孔1E7和1G7具有最高的反应性,并被各自亚克隆入单独的96孔板上的60个孔内。

[0401] 三级亚克隆。将2个亚克隆平板(T031009-5D1-1E7和T031009-5D1-1G7)作为单个平板集合筛选3次,无反应性;但阳性对照小鼠单克隆抗体(MS-3)也为无活性,表明核仁素抗原已降解,不幸的是,没有剩余可供进一步筛选。平板分两份,将多余细胞单独收集并长出,冷冻等分试样。将平板集合和长出的复制集合对新的未降解核仁素进行再测试。孔1C11和1G2(均来自T031009-5D1-1G7)为弱反应性,并选出来亚克隆。

[0402] 四级亚克隆。2周后将2个亚克隆平板作为平板集合筛选,无反应性,并在一周后再筛选,在多个孔显示弱反应性。筛选单独的孔,T031009-5D1-1G7孔1F10和1G2具有最高的反应性,并被各自亚克隆入单独的96孔板上的60个孔内。

[0403] 第5轮亚克隆。2周后将亚克隆平板作为单一列的集合筛选,在1和2孔中各有极低的反应性,一周后再次筛选,并在2天后再筛选全平板集合,2天后单独的孔得以证实。T031009-5D1-1G7-1F10孔1D10具有最高的反应性,并被亚克隆入单个96孔板上的60个孔内。

[0404] 第6轮亚克隆。16天后将亚克隆平板作为单一列的集合筛选,有3个活性孔。4天后进行全平板筛选,T031009-5D1-1G7-1F10-1D10孔1B4具有最高的反应性,并在2天后亚克隆入单个96孔板上的60个孔内。

[0405] 第7轮亚克隆。17天后将亚克隆平板作为单一列的集合筛选,无反应性,并在10天后再筛选,4个孔中有中等反应性,另2孔中有弱反应性。2天后进行全平板的筛选,T031009-5D1-1G7-1F10-1D10-1B4孔1C7具有最高的反应性,并在2天后亚克隆入单个96孔板上的60个孔内。合并其余活性孔,扩增并于-80℃冷冻(T031009-5D1-1G7-1F10-1D10-1B4)。

[0406] 第8轮亚克隆。3周后将亚克隆平板作为单一列的集合筛选,所有6个孔都为中等活性。完成全平板筛选,有很多强或中等活性孔。T031009-5D1-1G7-1F10-1D10-1B4-1C7孔

1G10具有最高的反应性,并被亚克隆入单个96孔板上的60个孔内。合并其余活性孔。11天后,亚克隆平板显示真菌污染迹象,并被丢弃。扩增来自合并其余的活性细胞(T031009-5D1-1G7-1F10-1D10-1B4-1C7)并在4天后亚克隆入10个96孔板中。2周后筛选这些亚克隆平板,T031009-5D1-1G7-1F10-1D10-1B4-1C7孔8B9和8E10具有最高的核仁素反应性并在次日被各自亚克隆入单个96孔板的60个孔内。9天后,亚克隆平板又显示真菌污染迹象,并被丢弃。解冻并扩增来自冷冻的合并T031009-5D1-1G7-1F10-1D10-1B4细胞,并在10天后亚克隆入5个96孔板中。2周后,筛选平板的核仁素反应性,T031009-5D1-1G7-1F10-1D10-1B4孔2E3和4C9于次日证实为阳性,并被各自亚克隆入单个96孔板的60个孔内。10天后,筛选平板的核仁素反应性,T031009-5D1-1G7-1F10-1D10-1B4-2E3孔2D10和2G5具有最高的反应性,并于次日被各自亚克隆入单个96孔板的60个孔内。

[0407] 第9轮亚克隆。17天后,筛选亚克隆平板的核仁素反应性,T031009-5D1-1G7-1F10-1D10-1B4-2E3-2D10孔1F7具有最高的核仁素反应性,并于次日通过有限稀释亚克隆入10个96孔板内。克隆集落随时间缓慢显现,并在4-6周之间筛选核仁素反应性。有3个孔(6G10、2F8、6B3)具有反应性。因为克隆T031009-5D1-1G7-1F10-1D10-1B4-2E3-2D10-1F7-6B3的优良生长特性而将其扩增用于功能性抗体测试。

[0408] 克隆3H11。初始筛选和初级亚克隆。接收志愿者的外周血样品,处理入5x 96孔板内:库(P031009)。筛选平板集合和孔集合(合并对于P031109和T031009的孔集合)。推定的阳性孔(T031009-5D1和-5G5,P031109-3D1和-3G5)各从1个孔扩增至3个孔中,且P031109-3G5鉴定为活性孔。它被亚克隆入1个平板的500个细胞/孔和2个平板的50个细胞/孔。

[0409] 二级亚克隆。将3个亚克隆平板(1x 500个细胞/孔和2x 50个细胞/孔)作为单个平板集合来筛选反应性,无反应性。再筛选平板集合。证实活性孔,P031109-3G5孔1D9和1D11具有最高的反应性,并被各自亚克隆入单个96孔板上的60个孔内。

[0410] 三级亚克隆,损失及恢复。将2个亚克隆平板(P031109-3G5-1D9和P031109-3G5-1D11)作为单一平板集合筛选2次,无反应性;但阳性对照小鼠单克隆抗体(MS-3)也为无活性,提示核仁素抗原已降解,不幸的是,没有剩余可供进一步筛选。平板分成两份,将多余细胞单独收集并长出,冷冻等分试样。将平板集合和长出的复制集合对新的未降解核仁素进行测试。原始的亚克隆平板丧失反应性而长出的复制上清液测得阳性。将扩增自P031109-3G5-1D9的这些细胞亚克隆入10个96孔板并培养。

[0411] 四级亚克隆。将10个亚克隆平板(P031109-3G5-1D9)作为单个平板集合筛选,反应性差。再筛选平板集合上清液,为弱反应性。测试单独的孔。P031109-3G5-1D9孔3H11具有最高的反应性,并被亚克隆入单个96孔板上的60个孔内。

[0412] 第5轮亚克隆。将亚克隆平板作为单一系列的集合筛选,无任何反应性,再筛选有2个阳性孔。进行全平板的筛选。P031109-3G5-1D9-3H11孔1F8具有最高的反应性,并被亚克隆入单个96孔板上的60个孔内。

[0413] 第6轮亚克隆。将亚克隆平板作为单独列的集合筛选,有4个孔显示反应性。进行全平板的筛选,P031109-3G5-1D9-3H11-1F8孔1C7具有最高的反应性,并被亚克隆入单个96孔板上的60个孔内。

[0414] 第7轮亚克隆。将亚克隆平板作为列集合筛选,有2个孔中有弱反应性。完成再筛选,在5个孔中有中等反应性。进行全平板的筛选,P031109-3G5-1D9-3H11-1F8-1C7孔1F8具

有最高的反应性,并被亚克隆入单个96孔板上的60个孔内。合并其余活性孔,扩增并于-80℃冷冻(P031109-3G5-1D9-3H11-1F8-1C7)。

[0415] 第8轮亚克隆。将亚克隆平板作为单独列的集合筛选,有2个高活性孔和4个中等活性孔。完成全平板筛选,有多个强活性孔。P031109-3G5-1D9-3H11-1F8-1C7-1F8孔1C3具有最高的反应性,并被亚克隆入单个96孔板上的60个孔内。合并其余活性孔。11天后,亚克隆平板显示真菌污染迹象,并被丢弃。扩增来自合并其余的活性细胞(P031109-3G5-1D9-3H11-1F8-1C7-1F8)并在7天后亚克隆入10个96孔板中。2周后筛选这些亚克隆平板,P031109-3G5-1D9-3H11-1F8-1C7-1F8孔8B9和8E10具有最高的核仁素反应性并在次日被各自亚克隆入单个96孔板的60个孔内。9天后,亚克隆平板又显示真菌污染迹象,并被丢弃。解冻并扩增冷冻的合并P031109-3G5-1D9-3H11-1F8-1C7细胞,并在10天后亚克隆入5个96孔板中。2周后,筛选平板的核仁素反应性,P031109-3G5-1D9-3H11-1F8-1C7孔2D2和2G9于次日证实为阳性,并被各自亚克隆入单个96孔板的60个孔内。10天后,筛选平板的核仁素反应性,P031109-3G5-1D9-3H11-1F8-1C7-2G9孔2E4和2G3具有最高的反应性,并于次日被各自亚克隆入单个96孔板的60个孔内。

[0416] 第9轮亚克隆。17天后,筛选亚克隆平板的核仁素反应性,P031109-3G5-1D9-3H11-1F8-1C7-2G9-2E4孔1B9具有最高的核仁素反应性,并于次日通过有限稀释亚克隆入10个96孔板内。克隆集落随时间缓慢显现,并在4-6周之间筛选核仁素反应性。有4个孔(8D2、3F3、2C6、9B7)具有反应性。因为克隆P031109-3G5-1D9-3H11-1F8-1C7-2G9-2E4-1B9-2C6的优良生长特性而将其扩增用于功能性抗体测试。

[0417] 克隆2D3。初始筛选和初级亚克隆。接收扁桃体样品处理入10x 96孔板内:库(T031609A)。11天后就平板集合和孔集合对其进行筛选。3天后进行ELISA验证,鉴定出活性孔(T031609A-2D3)并于2天后亚克隆入1个平板的1000个细胞/孔和2个平板的100个细胞/孔。

[0418] 二级亚克隆。将3个亚克隆平板(1x 1000个细胞/孔和2x 100个细胞/孔)作为单一平板集合来筛选,无反应性,并于1周后再次重新筛选。证实活性孔。T031609A-2D3孔1C7和1E3具有最高的反应性,并被各自亚克隆入单独的96孔板上的60个孔内。

[0419] 三级亚克隆。将2个亚克隆平板(T031609A-2D3-1C7和T031609A-2D3-1E3)作为单一平板集合筛选并重复,无反应性;但阳性对照小鼠单克隆抗体(MS-3)也为无活性,表明核仁素抗原已降解,不幸的是,没有剩余可供进一步筛选。平板分两份,将多余细胞单独收集并长出,冷冻等分试样。将平板集合和长出的复制集合对新的未降解核仁素进行测试。选出活性孔1F4(来自T031609A-2D3-1C7)并亚克隆。

[0420] 四级亚克隆。筛选亚克隆上清液(T031609A-2D3-1C7-1F4),无反应性,再次筛选有弱反应性。孔1B11和1F3具有最高的反应性,并选出用于亚克隆。各孔亚克隆入单独的96孔板上的60个孔中。

[0421] 第5轮亚克隆。将亚克隆平板作为单列的集合筛选,无反应性,再次筛选,以平板集合再次筛选并完成验证。平板T031609A-2D3-1C7-1F4-1B11的孔1C9具有最高的反应性,并被亚克隆入单个96孔板上的60个孔内。

[0422] 第6轮亚克隆。将亚克隆平板作为单独列的集合筛选,有3个孔显示反应性。进行全平板的筛选。平板T031609A-2D3-1C7-1F4-1B11-1C9的孔1G6具有最高的反应性,并被亚克

隆入单个96孔板上的60个孔内。

[0423] 第7轮亚克隆。将亚克隆平板作为单独列的集合筛选,1个孔有弱反应性。进行再筛选,在2个孔中有中等反应性。进行全平板的筛选,T031609A-2D3-1C7-1F4-1B11-1C9-1G6孔1E10具有最高的反应性,并被亚克隆入单个96孔板上的60个孔内。合并其余活性孔,扩增并于-80℃冷冻(T031609A-2D3-1C7-1F4-1B11-1C9-1G6)。

[0424] 第8轮亚克隆。将亚克隆平板作为单独列的集合筛选,有4个活性孔。完成全平板筛选,有中等反应性。平板T031609A-2D3-1C7-1F4-1B11-1C9-1G6-1E10的孔1F3具有最高的反应性,并被亚克隆入单个96孔板上的60个孔内。合并其余活性孔。11天后,亚克隆平板显示真菌污染迹象,并被丢弃。扩增来自合并其余的活性细胞(T031609A-2D3-1C7-1F4-1B11-1C9-1G6-1E10)并在7天后亚克隆入10个96孔板中。2周后筛选这些亚克隆平板,T031609A-2D3-1C7-1F4-1B11-1C9-1G6-1E10孔10F7和10G7具有最高的核仁素反应性并在次日被各自亚克隆入单个96孔板的60个孔内。9天后,亚克隆平板又显示真菌污染迹象,并被丢弃。解冻并扩增冷冻的合并T031609A-2D3-1C7-1F4-1B11-1C9-1G6细胞,并在10天后亚克隆入5个96孔板中。2周后,筛选平板的核仁素反应性,T031609A-2D3-1C7-1F4-1B11-1C9-1G6孔1B6和5F4于次日证实为阳性,并被各自亚克隆入单个96孔板的60个孔内。10天后,筛选平板的核仁素反应性,T031609A-2D3-1C7-1F4-1B11-1C9-1G6-5F4孔2F10和2G6具有最高的反应性,并于次日被各自亚克隆入单个96孔板的60个孔内。

[0425] 第9轮亚克隆。17天后,筛选亚克隆平板的核仁素反应性,T031609A-2D3-1C7-1F4-1B11-1C9-1G6-5F4-2F10孔1D8具有最高的核仁素反应性,并于次日通过有限稀释亚克隆入10个96孔板内。克隆集落随时间缓慢显现,并在4-6周之间筛选核仁素反应性。有3个孔(9D7、2A12、3E4)具有反应性。因为克隆T031609A-2D3-1C7-1F4-1B11-1C9-1G6-5F4-2F10-1D8-2A12的优良生长特性而将其扩增用于功能性抗体测试。

[0426] 克隆7G7。初始筛选和初级亚克隆。接收扁桃体样品并处理入10x 96孔板内:库(T031609B)。就平板集合和孔集合对其进行筛选。进行ELISA验证,鉴定出活性孔T031609B-1H9,将该孔亚克隆入3个平板(1个平板的1000个细胞/孔和2个平板的100个细胞/孔)。

[0427] 二级亚克隆。将3个亚克隆平板(1x 1000个细胞/孔和2x 100个细胞/孔)作为单一平板集合来筛选,无活性,此后再次筛选。证实活性孔。T031609B-1H9孔1G2和1G9具有最高的反应性,并被各自亚克隆入单独的96孔板上的60个孔内。

[0428] 三级亚克隆,损失及恢复。将2个亚克隆平板(T031609B-1H9-1G2和T031609B-1H9-1G9)作为单一平板集合筛选3次,无反应性;但阳性对照小鼠单克隆抗体(MS-3)也为无活性,表明核仁素抗原已降解,不幸的是,没有剩余可供进一步筛选。平板分成两份,将多余细胞单独收集并长出,冷冻等分试样。将平板集合和长出的复制集合对新的未降解核仁素进行测试,但为无活性。于06-03-09解冻来自T031609B-1H9-1G2的冷冻等份试样,并接种入10个96孔板用于再次培养。

[0429] 四级亚克隆。将10个亚克隆平板(T031609B-1H9-1G2)作为列集合筛选,无反应性。再次筛选来自10个经合并平板的上清液,有弱反应性。测试单独的孔。T031609B-1H9-1G2孔7G7具有最高的反应性,并被亚克隆入单个96孔板上的60个孔内。

[0430] 第5轮亚克隆。将亚克隆平板作为单一列的集合筛选,无任何反应性,此后再筛选有1个活性孔。再次筛选全平板集合,T031609B-1H9-1G2-7G7孔1B9具有最高的反应性,并被

亚克隆入单个96孔板上的60个孔内。

[0431] 第6轮亚克隆。将亚克隆平板作为单独列的集合筛选,有2个活性孔。完成全平板集合的筛选,T031609B-1H9-1G2-7G7-1B9孔1D6具有最高的反应性,并被亚克隆入单个96孔板上的60个孔内。

[0432] 第7轮亚克隆。将亚克隆平板作为列集合筛选,4个孔中有弱反应性,再次筛选在4孔中有中等反应性。完成全平板的筛选,T031609B-1H9-1G2-7G7-1B9-1D6孔1E3具有最高的反应性,并被亚克隆入单个96孔板上的60个孔内。合并其余活性孔,扩增并于-80℃冷冻(T031609B-1H9-1G2-7G7-1B9-1D6)。

[0433] 第8轮亚克隆。将亚克隆平板作为单独列的集合筛选,有5个中等活性孔。完成全平板筛选,有多个中等反应性。T031609B-1H9-1G2-7G7-1B9-1D6-1E3孔1D9具有最高的反应性,并被亚克隆入单个96孔板上的60个孔内。合并其余活性孔。11天后,亚克隆平板显示真菌污染迹象,并被丢弃。扩增来自合并其余的活性细胞(T031609B-1H9-1G2-7G7-1B9-1D6-1E3)并在7天后亚克隆入10个96孔板中。2周后筛选这些亚克隆平板,T031609B-1H9-1G2-7G7-1B9-1D6-1E3孔3G10和3G11具有最高的核仁素反应性并在次日被各自亚克隆入单个96孔板的60个孔内。9天后,亚克隆平板又显示真菌污染迹象,并被丢弃。解冻并扩增冷冻的合并T031609B-1H9-1G2-7G7-1B9-1D6细胞,并在10天后亚克隆入5个96孔板中。2周后,筛选平板的核仁素反应性,T031609B-1H9-1G2-7G7-1B9-1D6孔3D9和4B7于次日证实为阳性,并被各自亚克隆入单个96孔板的60个孔内。10天后,筛选平板的核仁素反应性,T031609B-1H9-1G2-7G7-1B9-1D6-4B7孔2C10和2F11具有最高的反应性,并于次日被各自亚克隆入单个96孔板的60个孔内。

[0434] 第9轮亚克隆。17天后,筛选亚克隆平板的核仁素反应性,T031609B-1H9-1G2-7G7-1B9-1D6-4B7-2F11孔2E6具有最高的反应性,并于次日通过有限稀释亚克隆入10个96孔板内。克隆集落随时间缓慢显现,并在4-6周之间筛选核仁素反应性。有4个孔(2B9、7F2、1C4、10G11)具有反应性。因为克隆T031609B-1H9-1G2-7G7-1B9-1D6-4B7-2F11-2E6-7F2的优良生长特性而将其扩增用于功能性抗体测试。

[0435] 克隆2H3。初始筛选和初级亚克隆。接收2份扁桃体样品,合并并处理入单个库中,该库由10x 96孔板组成(T060809)。10天后就平板集合和孔集合对其进行筛选。次日进行ELISA验证筛选,鉴定出活性孔T060809-2H3并在3天后亚克隆入单个平板的60个孔内。

[0436] 二级亚克隆。将亚克隆平板作为单一系列的集合筛选,无显著反应性,再筛选列集合,再次筛选全平板。T060809-2H3孔1B8和1E7具有最高的反应性,并被各自亚克隆入单独的96孔板上的60个孔内。

[0437] 三级亚克隆。将亚克隆平板作为单独列的集合筛选,有多个孔显示反应性。完成全平板的筛选。活性孔T060809-2H3-1B8 1C10和T060809-2H3-1E7 1F5具有最高的反应性,并被各自亚克隆入单独的96孔板上的60个孔内。

[0438] 四级亚克隆。将亚克隆平板作为单独列的集合筛选,T060809-2H3-1B8-1C10有多个活性孔。完成全平板集合的筛选,孔1F9具有最高的反应性,并被亚克隆入单个96孔板上的60个孔内。合并其余活性孔,扩增并于-80℃冷冻(T060809-2H3-1B8-1C10)。

[0439] 第5轮亚克隆。将亚克隆平板作为单列的集合筛选,无反应性,此后再次筛选,完成全平板筛选,多个孔中有中等反应性。T060809-2H3-1B8-1C10-1F9孔1G3具有最高的反应

性,并被亚克隆入单个96孔板上的60个孔内。合并其余活性孔。11天后,亚克隆平板显示真菌污染迹象,并被丢弃。扩增来自合并其余的活性细胞(T060809-2H3-1B8-1C10-1F9)并在7天后亚克隆入10个96孔板中。2周后筛选这些亚克隆平板,T060809-2H3-1B8-1C10-1F9孔2D8和3F9具有最高的核仁素反应性并在次日被各自亚克隆入单个96孔板的60个孔内。9天后,亚克隆平板又显示真菌污染迹象,并被丢弃。解冻并扩增冷冻的合并T060809-2H3-1B8-1C10细胞,并在10天后亚克隆入5个96孔板中。2周后,筛选平板的核仁素反应性,T060809-2H3-1B8-1C10孔1B7和1D6于次日证实为阳性,并被各自亚克隆入单个96孔板的60个孔内。10天后,筛选平板的核仁素反应性,T060809-2H3-1B8-1C10-1D6孔2D11和2E9具有最高的反应性,并于次日被各自亚克隆入单个96孔板的60个孔内。

[0440] 第6轮亚克隆。17天后,筛选亚克隆平板的核仁素反应性,T060809-2H3-1B8-1C10-1D6-2D11孔2C7具有最高的核仁素反应性,并于次日通过有限稀释亚克隆入10个96孔板内。克隆集落随时间缓慢显现,并在4-6周之间筛选核仁素反应性。有4个孔(3D8、10C3、7G9、1H4)具有反应性。因为克隆T060809-2H3-1B8-1C10-1D6-2D11-2C7-1H4的优良生长特性而将其扩增用于功能性抗体测试。

[0441] 克隆9F9。初始筛选和初级亚克隆。接收2份扁桃体样品,合并并处理入单个库中,该库由10x 96孔板组成(T061509)。10天后就平板集合和孔集合对其进行筛选。次日进行ELISA验证,鉴定活性孔T061509-9F9,次日将其亚克隆入1个平板的60个孔内。

[0442] 二级亚克隆。将亚克隆平板作为单一系列的集合筛选,无任何反应性,此后再次筛选。然后再次筛选全平板。T061509-9F9孔1D11具有最高的反应性,并被亚克隆入单个96孔板上的60个孔内。

[0443] 三级亚克隆。将亚克隆平板作为单独列的集合筛选,有1个活性孔。此后完成全平板集合的筛选,T061509-9F9-1D11孔1D10具有最高的反应性,并被亚克隆入单个96孔板上的60个孔内。

[0444] 四级亚克隆。将亚克隆平板作为单独列的集合筛选,无反应性,再次筛选仍无反应性。此后完成全平板筛选,有中等反应性。T061509-9F9-1D11-1D10孔1F9具有最高的反应性,并被亚克隆入单个96孔板上的60个孔内。合并其余活性孔,扩增并于-80℃冷冻(T061509-9F9-1D11-1D10)。

[0445] 第5轮亚克隆。将亚克隆平板作为单独列的集合筛选,有多个活性空。完成全平板筛选,有中等反应性。T061509-9F9-1D11-1D10-1F9孔1B6具有最高的反应性,并被亚克隆入单个96孔板上的60个孔内。合并其余活性孔。11天后,亚克隆平板显示真菌污染迹象,并被丢弃。扩增来自合并其余的活性细胞(T061509-9F9-1D11-1D10-1F9)并在7天后亚克隆入10个96孔板中。2周后筛选这些亚克隆平板,T061509-9F9-1D11-1D10-1F9孔6B9和9D3具有最高的核仁素反应性并在次日被各自亚克隆入单个96孔板的60个孔内。9天后,亚克隆平板又显示真菌污染迹象,并被丢弃。解冻并扩增冷冻的合并T061509-9F9-1D11-1D10细胞,并在10天后亚克隆入5个96孔板中。2周后,筛选平板的核仁素反应性,T061509-9F9-1D11-1D10孔2C7和2F8于次日证实为阳性,并被各自亚克隆入单个96孔板的60个孔内。10天后,筛选平板的核仁素反应性,T061509-9F9-1D11-1D10-2F8孔2D11和2B6具有最高的反应性,并于次日被各自亚克隆入单个96孔板的60个孔内。

[0446] 第6轮亚克隆。17天后,筛选亚克隆平板的核仁素反应性,T061509-9F9-1D11-

1D10-2F8-2D11孔1F4具有最高的核仁素反应性,并于次日通过有限稀释亚克隆入10个96孔板内。克隆集落随时间缓慢显现,并在4-6周之间筛选核仁素反应性。有3个孔(4E8、1C7、8A6)具有反应性。因为克隆T061509-9F9-1D11-1D10-2F8-2D11-1F4-4E8的优良生长特性而将其扩增用于功能性抗体测试。

[0447] 克隆8G4。初始筛选和初级亚克隆。接收扁桃体样品并处理入永生库中,该库由10x 96孔板组成(T081009)。11天后,筛选该文库对核仁素的反应性。进行ELISA验证,鉴定活性孔(T081009-8G4),将其亚克隆入单个平板的60个孔内。

[0448] 二级亚克隆。19天后筛选亚克隆平板,鉴定出2个孔具有核仁素反应性(T081009-8G4孔1C9和1F3)。孔1F3具有最高的反应性,并在3天后亚克隆入单个96孔板上的60个孔内。

[0449] 三级亚克隆。3周后,筛选亚克隆平板,多个孔具有核仁素反应性。T081009-8G4-1F3孔2G4和2H3具有最高的反应性,并于次日亚克隆入单个96孔板上的60个孔内。合并其余活性孔。5天后,亚克隆平板显示真菌污染迹象,并被丢弃。扩增来自合并其余的活性细胞(T081009-8G4-1F3)并在2周后亚克隆入10个96孔板中。13天后筛选这些亚克隆平板,T081009-8G4-1F3孔4G2和5B9具有最高的核仁素反应性并在2天后被各自亚克隆入单个96孔板的60个孔内。

[0450] 四级亚克隆。3周后筛选这些亚克隆平板,T081009-8G4-1F3-4G2孔1E9和2F5具有最高的核仁素反应性并在次日被各自亚克隆入单个96孔板的60个孔内。

[0451] 第5轮亚克隆。13天后筛选这些亚克隆平板,T081009-8G4-1F3-4G2-2F5孔2C10和2E8孔具有最高的核仁素反应性并在次日被各自亚克隆入单个96孔板的60个孔内。

[0452] 第6轮亚克隆。25天后,筛选亚克隆平板,T081009-8G4-1F3-4G2-2F5-2E8孔2D11具有最高的核仁素反应性。4天后,将孔2D11通过有限稀释亚克隆入10个96孔板中。克隆集落随时间缓慢显现,并在17-33天之间筛选核仁素反应性。多个孔(7E9、4C9、4D9、6A3、10F8、8B3)具有反应性。因为克隆T081009-8G4-1F3-4G2-2F5-2E8-2D11-8B3的优良生长特性而将其扩增用于功能性抗体测试。

[0453] 克隆P1C6。初始筛选和初级亚克隆。接收外周血样品并处理入永生库中,该库由10x 96孔板组成(PB120909)。9天后,筛选该文库对核仁素的反应性。进行ELISA验证,鉴定活性孔(PB120909-1C6),3天后将其亚克隆入单个平板的60个孔内。

[0454] 二级亚克隆。3周后筛选亚克隆平板,鉴定出2个孔具有核仁素反应性(PB120909-1C6孔1H2和1H9)。将两者各自亚克隆入单个96孔板的60个孔内。

[0455] 三级亚克隆。17天后筛选亚克隆平板,PB120909-1C6-1H9孔2F4和2G3具有最高的核仁素反应性并被各自亚克隆入单个96孔板的60个孔内。

[0456] 四级亚克隆。3周后筛选亚克隆平板,PB120909-1C6-1H9-2G3孔2E7和2C9具有最高的核仁素反应性并被各自亚克隆入单个96孔板的60个孔内。

[0457] 第5轮亚克隆。17天后筛选亚克隆平板,PB120909-1C6-1H9-2G3-2C9孔1G6和1H10具有最高的核仁素反应性并被在次日各自亚克隆入单个96孔板的60个孔内。

[0458] 第6轮亚克隆。2周后筛选亚克隆平板,PB120909-1C6-1H9-2G3-2C9-1G6孔1F5具有最高的核仁素反应性。3天后,将孔1F5通过有限稀释亚克隆入10个96孔板中。克隆集落随时间缓慢显现,并在22-28天之间筛选核仁素反应性。多个孔(3C7、7D6、10F9、10G10)具有反应性。因为克隆PB120909-1C6-1H9-2G3-2C9-1G6-1F5-3C7的优良生长特性而将其扩增用于功

能性抗体测试。

[0459] 实施例2-结果

[0460] B-CLL细胞的质膜和细胞质中的核仁素和Bcl-2蛋白相比正常人志愿者的B细胞有过量表达。CLL在其大多数临床过程中为无痛,且无性系B细胞在无痛期通过避免凋亡而在骨髓中积累(Klein等,2000)。CLL细胞通过过量表达抗凋亡蛋白Bcl-2来避开凋亡。在没有已知促进bcl-2转录的基因重排的情况下观察到bcl-2mRNA和蛋白的高水平表达(Bakhshi等,1985;Robertson等,1996;Steube等,1995)。发明人之一发现,与健康志愿者的正常CD19+B细胞相比,患者CLL细胞中的bcl-2mRNA高度稳定(Otake等,2007)。此外,发明人证明CLL细胞中bcl-2mRNA的稳定性增强是稳定化蛋白核仁素与bcl-2mRNA的3'-UTR中ARE元件相结合的直接结果。而且,来自所有被检查患者的CLL细胞的细胞质中核仁素都过量表达(图1)。

[0461] 从17名未经治疗CLL的患者和9名健康志愿者获取外周血样品。从各血液样品分离单核细胞,并通过免疫磁珠分离利用正向选择泛B细胞标记物CD19来从该部分纯化B细胞。然后将来自患者的CD19+CLL细胞中的核仁素和Bcl-2蛋白的细胞溶质水平与来自健康志愿者的CD19+B细胞中的水平相比较(Otake等,2007)。检查核仁素的细胞质水平是因为有假说认为这是bcl-2mRNA稳定化的位点。核仁素和Bcl-2蛋白的非核(细胞质)水平通过S10提取物的免疫印迹确定。为准确比较不同患者的免疫印迹结果,将免疫印迹中核仁素和Bcl-2蛋白条带的积分密度值(IDV)对用已知量核仁素和Bcl-2外标所得的IDV值进行标准化。该分析发现,与9名正常志愿者的B细胞相比,17名患者的CLL细胞中的Bcl-2水平升至11倍($p < 0.001$)而核仁素水平升至26倍($p < 0.001$) (图1)。此外,提高的Bcl-2蛋白水平与核仁素水平提高正相关(皮尔逊相关性=0.83, $p < 0.001$)。CLL和正常B细胞间未见核部分中核仁素水平有显著差异。在包括处于疾病早期未经在前治疗患者在内的所有CLL患者中,核仁素均一地过量表达这一事实提示bcl-2mRNA的核仁素稳定化是CLL发病机理的早期事件,而非疾病进展的特征或化疗的副现象。

[0462] B-CLL细胞的质膜和细胞质中的核仁素和Bcl-2蛋白相比正常人志愿者的B细胞有过量表达。对来自患者的CLL细胞和来自健康志愿者的B细胞进行共聚焦显微镜研究验证免疫印迹所得结果。核仁素的定位采用抗核仁素MAb和FITC-抗小鼠IgG二抗通过间接免疫荧光测定。DNA用碘化丙啶染色。图2A中的重叠图像表明核仁素存在于CLL细胞的质膜、细胞质和核中,但仅存在于B细胞的核中。这些结果与免疫印迹一致,后者表明核仁素在CLL细胞中的质膜与细胞质定位而正常B细胞中则不然。

[0463] 核仁素在MCF-7乳腺癌细胞中也比MCF-10A正常乳房上皮细胞有高度过量表达。核仁素在MCF-7和MDA-MB-231乳腺癌细胞以及MCF-10A正常乳房上皮细胞中的胞内定位如上所述由间接免疫荧光测定(Soundararajan等,2008)。图2B中的重叠图像表明核仁素遍布于MCF-7细胞的核、质膜与细胞质(绿色荧光),而正常MCF-10A细胞中仅在核中测得核仁素。对于MDA-MB-231乳腺癌细胞也同样如此(Soundararajan等,2008)。

[0464] 核仁素和Bcl-2蛋白还在MCF-7和MDA-MB-231乳腺癌细胞的质膜和细胞质中比MCF-10A正常乳房上皮细胞有过量表达。核仁素的胞内定位利用针对核仁素的一抗和FITC-偶联抗小鼠IgG二抗(绿色荧光)通过间接免疫荧光测定。DNA用碘化丙啶染色(红色荧光)。图3中的重叠图像表明核仁素遍布于MCF-7细胞的核(黄色荧光)、质膜与细胞质(绿色荧光),而正常MCF-10A细胞中仅在核中测得核仁素。核仁素在MDA-MB-231乳腺癌细胞中的胞

内定位 (Soundararajan等, 2008) 与MCF-7细胞中类似。

[0465] 来自患者的AML母细胞植入NOD/SCID小鼠显示强烈的核仁素染色。对核仁素为肿瘤特异性抗原且在人AML病理中起作用的进一步证据来自人AML异种移植研究。评估来自骨髓的活检组织样品的母细胞细胞质和/或核中的核仁素表达。在保存的骨髓活检组织的石蜡包埋组织切片的玻片上进行免疫组化分析。在所有情况中, 比较AML母细胞与周围的正常骨髓元素。发明人观察到抗核仁素染色在AML母细胞中强烈(品红染色), 而骨髓的正常元素(深蓝色复染)为弱阳性或完全阴性(图4)。在目前测试的所有AML样品中都观察到核仁素的强表达。

[0466] 对10只NOD-SCID雄性小鼠(11周龄)各自腹膜内注射25 μ g的抗缺乏唾液酸基GM抗体(anti-asialo GM antibody)并在Cs137辐照器中照射2.3Gy。同一天, 这10只小鼠中的5只各自腹膜内注射来自诊断患有AML的人对象的 2×10^7 个PBMC。该对象中至少60%的PBMC为AML母细胞。腹膜内注射PBMC 4个月以后, 处死所有小鼠。腹膜内注射有AML细胞的5只小鼠其中2只的脾脏肿大并在脾脏表面及其内部显示结节性损伤。处理各小鼠的部分脾脏以使脾细胞脱离并通过流式细胞术分析人CD45+细胞的存在。在有异常脾脏的小鼠中, 一些脾细胞被抗人CD45抗体染色, 表明这些小鼠已被植入人AML细胞。发明人接着对已植入和对照NOD/SCID小鼠进行组织病理学和免疫组化分析(图5A)。脾中白血病性植入的结节区为惊人的核仁素表达阳性。

[0467] 核仁素还在人乳腺癌中比正常乳房组织有高度过量表达。此外, 在包含来自50名患者的肿瘤与正常毗邻乳房组织的人乳腺癌组织阵列上进行的核仁素免疫组化表明, 核仁素在肿瘤中比正常毗邻组织相比有过量表达。就大多数乳腺癌常见形式描述了代表性结果(图5B)。核仁素在浸润性导管癌(8/8的测试病例)和髓样癌(6/6的病例)中高度表达, 而在粘蛋白性腺癌(8/8的病例)中度表达, 但在毗邻的正常组织中未测得(图5B)。

[0468] 上述图1-5B的结果为核仁素在某些人肿瘤细胞表面上作为肿瘤特异性抗原过量表达提供了有力证据。对于人CLL(和可能的AML及乳腺癌), 核仁素过量表达是该疾病发病机理中的早期事件。视为“化学性”“抗核仁素抗体(Soundararajan等, 2008; Soundararajan等, 2009)的核仁素靶向配体AS1411在针对难治和复发AML的II期临床试验中显示有希望的活性(临床试验官方识别号(Clinical Trials.gov Identifier) NCT00512083)。因此, 综合考虑这些结果表面核仁素是开放治疗性抗体的出色靶标。

[0469] Bcl-2 mRNA在CLL细胞中的稳定性相对正常B细胞有提高。CLL细胞中Bcl-2相对正常B细胞的过量表达可导致bcl-2 mRNA转录增强, bcl-2 mRNA稳定性提高或bcl-2 mRNA翻译效率提高。难以由标准方法采用放线菌素D阻断转录来测定原代CLL细胞中的mRNA稳定性, 因为CLL细胞中的bcl-2 mRNA非常稳定, 需要用放线菌素D长时间孵育, 这对细胞有毒性。为克服这一问题, 发明人测定了CLL细胞中和来自健康志愿者的正常B细胞中的新生未剪接核内异质bcl-2 mRNA(hnRNA)和成熟bcl-2 mRNA的水平。该方法已成功用于在多种细胞中确定mRNA转录与mRNA衰变的相对速率。将来自各样品的等量RNA逆转录并用两组引物对进行实时PCR。一个反应含有与第一内含子退火的引物(以选择性扩增hnRNA)而一个反应含有与两个毗邻外显子中的序列退火的引物(以选择性扩增经剪接的成熟RNA)。发明人发现CLL细胞中bcl-2 mRNA与bcl-2 hnRNA的比例是正常B细胞的3倍($p < 0.001$) (图6)。CLL细胞bcl-2 mRNA/bcl-2 hnRNA的比例高达3倍完全是由于CLL细胞中的bcl-2 mRNA水平(相对 β -肌动蛋白mRNA

为 $3.3 \pm 0.4\text{SEM}$)比正常B细胞中的bc1-2mRNA水平(相对 β -肌动蛋白mRNA为 $1.1 \pm 0.2\text{SEM}$)有提高。bc1-2hnRNA的水平在CLL细胞(相对 β -肌动蛋白mRNA为 $6.5 \pm 1.4\text{SEM}$)和正常B细胞(相对 β -肌动蛋白mRNA为 $5.5 \pm 1.4\text{SEM}$)未观察到显著差异。这些结果表明bc1-2mRNA在CLL细胞中比在正常B细胞中相对更稳定。此外, bc1-2mRNA转录的速率在CLL细胞中未见相对较高, 因为若其属实则bc1-2mRNA/hnRNA比例在CLL中会比正常B细胞中降低。

[0470] 核仁素过量表达上调bc1-2mRNA的机理。采用体外RNA衰变系统通过追踪制备自纯化CLL细胞和正常B细胞的提取物中bc1-2RNA转录本的衰变速率来检查核仁素稳定化bc1-2mRNA的机理(Sengupta等, 2004)。这些试验中采用加帽且多腺苷酸化的mRNA来模拟体内衰变, 其中涉及受帽刺激由聚(A)特异性核糖核酸酶(PARN)脱腺苷化, 然后由mRNA体被外来体快速衰变(Chen等, 2001; Mukherjee等, 2002)。将 ^{32}P -标记的bc1-2-ARE转录本与来自CLL和正常B细胞的胞质S100提取物在聚(A)存在下一起孵育, 以激活脱腺苷化。如图7所示, 正常B细胞提取物中bc1-2的衰变比CLL细胞提取物中更快。来自4名患者的CLL细胞胞质提取物中bc1-2RNA的平均半衰期由数据外推估算为72分钟, 而正常B细胞提取物中转录本的平均半衰期为12分钟(图7)。正常B细胞提取物中bc1-2-CR(编码区)-ARE RNA转录本的快速衰变为高度ARE依赖性, 因为在正常B细胞和CLL细胞提取物中缺少ARE的bc1-2mRNA编码区转录本(bc1-2-CR RNA)的衰变速率相似。还需要着重注意的是, 向正常B细胞提取物中添加280nM纯化的重组核仁素 $[\Delta 1-283\text{Nuc}-(\text{His})_6]$ 显著减缓bc1-2-ARE的衰变速率(外推半衰期为62分钟)。综合考虑, 这些结果表明核仁素通过结合bc1-2mRNA 3'-UTR中的ARE来使bc1-2mRNA稳定并保护mRNA免于降解。

[0471] 核仁素特异性人抗体的开发。总之, 上述初步研究表明核仁素是基于抗体来免疫治疗CLL和AML并可能用于某些形式乳腺癌的有希望的肿瘤抗原靶标。发明人因此致力于产生特异性针对核仁素的治疗性人MAb, 采用的新型体外方法用于从人扁桃体所产生的永生化B细胞文库来生成MAb。该技术有多项优势, 包括: 1) 所有步骤体外进行快速生成抗体; 2) 无需人体免疫接种; 3) 所得抗体完全为人源因此不会被排斥也不会引起血清病。该技术的发明得到了国立癌症研究院的支持, 联邦政府对本发明拥有某些权益。2008年8月提交了世界专利申请(PCT/US2008/072124)。图8显示该技术的概况。从来自健康儿童的扁桃体切除样品分离人B细胞, 然后用EB病毒有效感染(EBV)产生大量的B细胞转化。用模拟B细胞受体信号转导和T细胞辅助的试剂诱导经感染B细胞分化。由于扁桃体是B细胞的丰富来源, 该过程通常能分离出 10^7 - 10^8 个各具有独特抗体特异性的B细胞。图9A显示有效感染过程, 显示出用含绿色荧光蛋白标记基因的重组EBV病毒(EBfaV-GFP (Speck等, 1999a; Speck等, 1999b)的10x浓缩病毒储液离心感染扁桃体B细胞后, 24小时后有近100%的扁桃体B细胞被感染。然后将受感染细胞在专有的分化混合物(Diff-Ckt1)存在下以每孔 10^3 - 10^4 个细胞接种入96孔板, 分化混合物由重组CD40L、Baff和抗人IgM (Fab')₂组成, 能用2周时间诱导免疫球蛋白(Ig)同种型从IgM到IgG的类别转换。由图9B可见, IgG分泌至培养上清液的水平通常在1-4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 范围内。该过程可重现地产生分泌多克隆IgG的EBV永生化扁桃体B细胞文库, 取决于分离自单独扁桃体的B细胞数量, 估计抗体特异性有 10^6 - 10^7 。然后可对文库的细胞培养上清液筛选对不同感兴趣抗原的特异性结合。然后通过有限稀释克隆分离出产生的IgG具有所需特异性的B细胞, 并从培养上清液纯化IgG。对于更大规模制备, 可通过将无性系B细胞的Ig基因亚克隆入常用于产生生物制品的哺乳动物表达载体和转运细胞系来生成

IgG。至此,发明人已产生超过40个文库(数据未显示),已筛选这些文库对多种抗原性靶标的反应性。

[0472] 这一平台技术非常适用于产生具有治疗影响的自身抗体,例如针对肿瘤抗原如核仁素的抗体。通常,预期健康儿童不会对自身蛋白如核仁素产生强烈的二次抗体应答,因为自体反应的B细胞通常没有接收其存活和分化成IgG分泌型浆细胞所需的足量T细胞辅助。相反,自体反应的B细胞在体内成为耐受型或者缺失。但是,这些数据表明可能从扁桃体或外周血中采用EBV来永生自体反应B细胞来恢复少有的核仁素活性B细胞,并用分化混合物人工驱动它们进行Ig同种型类别转换并将核仁素特异性IgG分泌至体外。采用这一方法,发明人用酶联免疫吸附测定(ELISA)筛选了针对核仁素特异性IgG的12个永生扁桃体文库。由图10可见,分离出6株人B细胞系,其产生的IgG抗体与细菌中生成的重组人核仁素(Δ 1-283Nuc-(His)6)强烈反应。作为阳性对照,将结合与小鼠抗核仁素MAb MS3(圣克鲁兹生物技术公司)所得结合作比较,同时以同一方式产生来自人B细胞系的培养上清液,但产生特异性针对H5血凝素的IgG1抗体(人抗-HA)用作阴性对照。

[0473] 人抗核仁素抗体的初步鉴定。为测试这些抗核仁素抗体中的任意或者全部是否可能具有治疗潜力,发明人开始用进一步的ELISA分析、蛋白质印迹、流式细胞术、免疫组化和MV4-11细胞的细胞毒性杀伤来鉴定所述抗体。初始对4种抗体用ELISA作进一步筛选以测试它们是否识别纯化自MV4-11人白血病细胞的内源性核仁素和带His-标签的重组核仁素(细菌中产生的 Δ 1-283Nuc-(His)6;Ishimaru等,2009)。由图11可见,顶部图中4株B细胞里有3株(5D1、7G7和2D3)与内源性核仁素的反应强度和小鼠抗核仁素MS3相当(或更高),而所有4株都不同程度地结合带his-标签的重组体。此外,蛋白质印迹显示4种培养上清液中有3种(5D1、3H11和2D3)与带his-标签的重组核仁素反应(图11,下图)。因此,所述抗体对内源性和带his-标签的蛋白质具有不同的结合模式,并在蛋白质印迹分析中有不同反应,可能表明各抗体识别不同的蛋白表位。

[0474] 没有CDCC或ADCC的情况下对MV4-11细胞和MCF-7乳腺癌细胞的抗核仁素细胞毒性。图12进一步表明所有的抗-NUC HuMAb结合MV4-11AML细胞上的细胞表面核仁素,但它们不结合不在细胞表面表达核仁素的正常扁桃体细胞。相反,利妥昔单抗结合正常扁桃体细胞但不结合MV4-11细胞。此外,抗NUC HuMAb对MV4-11细胞有细胞毒性(图14C)。MV4-11细胞与各抗体(2 μ g/ml)一起孵育后,在48、72和96小时通过MTS试验测定线粒体功能。图14C显示,到96小时,细胞活度响应各抗体下降至未处理细胞的~30-80%范围内。相比之下,在与核仁素靶向配体AS1411(20 μ M)一起孵育后,细胞活度降至未处理细胞的~40-60%,而与对照IgG一起孵育未见变化。该试验在没有补体和没有ADCC所需效应细胞的情况下进行,表明抗核仁素HuMAb独立于CDCC和ADCC起作用。表4显示这些结果的小结。总之,这些结果提供有力证据证明所分离的6个抗体中每个都有不同的结合特征且结合人核仁素上的不同表位和/或对该蛋白具有不同的亲和性。

[0475] 尽管结合分析具有基本的显著性,以治疗观点来看最重要的标准是抗体能介导细胞毒性。为此,发明人设定了一种基于流式细胞术的简单试验通过碘化丙啶(PI)和膜联蛋白-V染色来测定凋亡和/或细胞死亡的诱导。膜联蛋白-V结合磷脂酰丝氨酸残基,该残基暴露于细胞膜上是凋亡诱导中的早期事件。在凋亡的后期或在坏死性细胞死亡中,膜完整性的破坏使细胞可通透非活体染料PI,这可通过流式细胞术测得。将MV4-11细胞在各抗体和

人血清存在下培养16小时,血清用作补体来源且为检测补体依赖性细胞毒性(CDCC)所需,此后将细胞用PI和膜联蛋白V-FITC染色。由图13可见,MV4-11细胞经人抗HA抗体处理(阴性对照)与未处理的细胞相比,膜联蛋白-V或PI染色未显示显著变化。相反,与未处理或抗HA处理的细胞相比,各抗核仁素抗体诱发膜联蛋白-V染色的平均荧光强度迁移约3倍。用凋亡的化学诱导剂星形孢菌素(25 μ M)处理的细胞中也可见相似的迁移。抗核仁素抗体5D1和7G7是最具细胞毒性的抗体,16小时后有38-40%的细胞为PI和/或膜联蛋白-V染色阳性,而对照抗HA处理中仅有16%,同时其它抗核仁素抗体在~30%细胞中诱导细胞毒性。表4中小总结了各抗体针对MV4-11白血病细胞的相对细胞毒性活性。这些初步数据表明需要更全面的细胞毒性测试,特别是针对抗体5D1和7G7。

[0476] 用MCF-7乳腺癌细胞进行了相似实验,发现该细胞对抗核仁素HuMAb比MV4-11细胞更敏感。在没有补体的情况下,抗核仁素HuMAb在96小时后将细胞活度抑制至低于未处理细胞的20%,而AS1411仅将细胞活度降至未处理细胞的80%,且对照人IgG没有效果(图14A,左图)。在添加有人AB血清(25%v/v)作为补体来源的平行实验中测试补体依赖性细胞毒性。由图14A右图可见,添加补体增强了抗体的细胞毒性效果,早至48小时即显著抑制细胞活度,到96小时已完全抑制。图14B显示就MCF-7细胞而言细胞毒性为选择性,因为HuMAb对不表达细胞表面核仁素的MCF-10A正常乳房上皮细胞的细胞活度没有影响。因此,我们的抗核仁素HuMAb组特异性结合人AML和乳腺癌细胞系上表达的细胞表面核仁素,且能诱导显著的肿瘤细胞毒性,该毒性不依赖于ADCC与CDCC的免疫机制,但可被血清补体强化。

[0477] 表4-进行人抗核仁素抗体鉴定的结果小结

[0478]

人抗 Nuc	ELISA 重组 ^a /内源 ^b		Western	FACS	细胞毒性 MV4-11 ^c /MCF-7 ^d		重链	轻链	IHC
2D3	+++	++	++	++	++	++++	IgG1	λ	n.d.
2H3	+++	n.d.	n.d.	+	++	+++	IgG1	κ	n.d.
3H11	++++	-	++	++	++	++++	IgG1	λ	n.d.
5D1	+++	+	++	++++	+++	++++	IgG1	κ	+
7G7	+++	+++	-	++	+++	+++	IgG1	κ	n.d.
9F9	++++	n.d.	n.d.	++	++	++++	IgG1	κ	+
8G4	+++	n.d.	n.d.	+++	+++	++++	IgG1	λ	n.d.
P1C6	+++	n.d.	n.d.	+++	+++	++++	IgG1	κ	n.d.

[0479] ^a结合重组1-283Nuc-(His)6核仁素;^b结合纯化自MV4-11白血病细胞的核仁素;^c96小时MTS试验测得的针对MV4-11细胞的细胞毒性;^d96小时MTS试验测得的针对MCF-7细胞的细胞毒性;n.d.:未进行。

[0480] *****

[0481] 根据本文公开的内容,本文描述和要求的所有组合物和/或方法无需过多实验即可进行和执行。虽然参考优选的实施方式描述了本发明的组合物和方法,但本领域技术人员应理解,各种改变适用于组合物和/或方法以及本文所述方法的各个步骤或各步骤的顺序而不背离本发明的概念、精神和范围。更具体说,应理解,某些化学和生理相关试剂可代替本文所述的试剂,同时实现相同或类似的结果。认为本领域技术人员所明白的所有这些类似的替代品或改进都在所附权利要求所定义的本发明的精神、范围和概念内。

[0482] VIII. 参考文献

[0483] 下列参考文献和本申请全文引用的任何其它文献都通过引用具体纳入本文,它们对本文陈述的内容提供示例性、程序上或其他细节上的补充。

[0484] 美国专利3,817,837

[0485] 美国专利3,850,752

[0486] 美国专利3,939,350

[0487] 美国专利3,996,345

[0488] 美国专利4,179,337

[0489] 美国专利4,275,149

[0490] 美国专利4,277,437

[0491] 美国专利4,301,144

[0492] 美国专利4,366,241

[0493] 美国专利4,472,509

[0494] 美国专利4,485,045

[0495] 美国专利4,496,689

[0496] 美国专利4,544,545.

[0497] 美国专利4,640,835

[0498] 美国专利4,657,760

[0499] 美国专利4,670,417

[0500] 美国专利4,791,192

[0501] 美国专利4,816,567

[0502] 美国专利4,938,948

[0503] 美国专利4,975,278

[0504] 美国专利5,013,556

[0505] 美国专利5,021,236

[0506] 美国专利5,047,335

[0507] 美国专利5,196,066

[0508] 美国专利5,206,344

[0509] 美国专利5,225,212

[0510] 美国专利5,278,299

[0511] 美国专利5,510,261

[0512] 美国专利5,534,615

[0513] 美国专利申请12/671,936

[0514] 美国专利公开号2009/0191244

[0515] 美国专利公开号2007/0066554

[0516] 美国专利公开号2007/0066554

[0517] Atherton等,Biol.Reprod.,32(1):155-171,1985.

[0518] Bakhshi等,Cell,41(3):899-906,1985.

[0519] Bates等,Exp.Mol.Path.,86:151,2009.

- [0520] Bose等,J.Virol.,78:8146,2004.
- [0521] Boyd等,Mol.Immunol.,32:1311-1318,1996.
- [0522] Chen等,Cell,107 (4) :451-64,2001.
- [0523] Chen等,Genes Dev.,14 (10) :1236-48,2000.
- [0524] Chen等,Mol.Ther.,16 (2) :333-42,2008.
- [0525] Christian等,J.Cell Biol.,163:871-878,2003.
- [0526] Cunningham和Wells,Science,244:1081-1085,1989.
- [0527] Destouches等,PLoS ONE,3 (6) :e2518,2008.
- [0528] Dholakia等,J.Biol.Chem.,264 (34) :20638-20642,1989.
- [0529] Epstein等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,82:3688,1985.
- [0530] Evan等,Molec.Cell.Biol.5:3610-3616,1985.
- [0531] Farin等,PLoS ONE,4 (7) :6128,2009.
- [0532] Field等,Mol.Cell.Biol.,8:2159-2165,1988.
- [0533] Fogal等,Angiogenesis,12 (1) :91-100,2009.
- [0534] Gabizon等,J.National Cancer Inst.,81 (19) :1484,1989.
- [0535] Gattoni-Celli等,Am.J.Hematol.,84 (8) :535-8,2009.
- [0536] Geahlen等,Biochim.Biophys.Acta.,804:169-175.1984.
- [0537] Ginisty等,J.Biol.Chem.,276 (17) :14338-43,2001.
- [0538] Hopp等,BioTechnology,6:1204-1210,1988.
- [0539] Hovanessian等,Cell Research,16:174-181,2006.
- [0540] Hovanessian等,Exp.Cell Res.,261 (2) :312-28,2000.
- [0541] Hse等,J.Biol.Chem.,272:9062-9070,1997.
- [0542] Hwang等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,77:4030,1980.
- [0543] Ishimaru等,Mol.Cancer Res.,7 (8) :1354-66,2009.
- [0544] Izumi等,Viral Research,76 (1) :17-29,2001.
- [0545] Jefferis和Lund,Chem.Immunol.,65:111-128,1997.
- [0546] Jefferis和Lund,Current Opin.Biotech.,7:409-416,1996.
- [0547] Khattoon等,Ann.Neurol,26 (2) :210-215,1989.
- [0548] Kibbey等,J.Neurosci.Res.,42 (3) :314-22,1995.
- [0549] Kim和Baldwin,Ann.Rev.Biochem.,51:459-89,1982.
- [0550] King等,J.Biol.Chem.,264 (17) :10210-10218,1989.
- [0551] Klein等,Leukemia,14 (1) :40-6,2000.
- [0552] Lapeyre等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,84 (6) :1472-6,1987.
- [0553] Lutz-Freyermuth等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,87:6393-6397,1990.
- [0554] Malhotra等,Nature Med.,1:237-243,1995.
- [0555] Martin等,J.Biol.Chem.,257:286-288,1982.
- [0556] Martin等,Science,255:192-194,1992.
- [0557] Massey,Nature,328:457-458,1987.
- [0558] Miller和Lipman,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,70:190-194,1973.

- [0559] Mukherjee等,Embo.J.,21(1-2):165-74,2002.
- [0560] Neuberger等,Nature,312:604-608,1984.
- [0561] O' Shannessy等,Anal.Biochem.,163(1):204-9,1987.
- [0562] Otake等,Blood,109(7):3069-75,2007.
- [0563] Owens和Haley,Biochem.Biophys.Re.s Commun.,142(3):964-971,1987.
- [0564] Paborsky等,Protein Engineering,3(6):547-553,1990.
- [0565] PCT申请PCT/US2008/072124
- [0566] PCT申请W0 81/01145
- [0567] PCT申请W0 88/07378
- [0568] PCT申请W0 93/23572
- [0569] PCT申请W0 94/11026
- [0570] PCT申请W0 96/32478
- [0571] Pfeifle和Anderer,Biochim.Biophys.Acta,762(1):86-93,1983.
- [0572] Potter和Haley,Methods Enzymol,91:613-633,1983.
- [0573] Remington's Pharmaceutical Sciences《雷明顿药物科学》,宾夕法尼亚州伊斯顿的麦克出版公司(Maack Publishing Co.,Easton,PA),1990.
- [0574] Robertson等,Leukemia,10(3):456-9,1996.
- [0576] Said等,J.Biol.Chem.,277(40):37492-502,2002.
- [0577] Sengupta等,J.Biol.Chem.,279(12):10855-63,2004.
- [0578] Serin等,J.Biol.Chem.,272(20):13109-16,1997.
- [0579] Sinclair和O'Brien,J.Biol.Chem.,277(4):2876-85,2002.
- [0580] Skinner等,J.Biol.Chem.,266:15163-15166,1991.
- [0581] Soundararajan等,Cancer Res.,68(7):2358-65,2008.
- [0582] Soundararajan等,Mol.Pharmacol.,76(5):984-91,2009.
- [0583] Speck等,Arch.Virol.,144(6):1123-37,1999b.
- [0584] Speck等,J.Gen.Virol.,80(Pt 8):2193-2203,1999a.
- [0585] Srivastava和Pollard,Faseb J.,13(14):1911-22,1999.
- [0586] Srivastava等,FEBS Lett.,250(1):99-105,1989.
- [0587] Steube等,Leukemia,9(11):1841-6,1995.
- [0588] Takekoshi等,J.Biochem.,130:299-303,2001.
- [0589] Umana等,Mature Biotech.,17:176-180,1999.
- [0590] Vitetta等,Science,238:1098,1987.
- [0591] Weltschof等,J.Immunol.Methods,179:203-214,1995.
- [0592] Westmark和Malter,Brain Res.Mol.Brain Res.,90(2):193-201,2001.
- [0593] Wittwe和Howard,Biochem.,29:4175-4180,1990.
- [0594] Wright和Morrison,Trends Biotechnol.,15:26-32,1997).
- [0595] Yang等,Nucl Acids Res.,30:2251-2260,2002.

序列表

<110> N·苏特科维斯基 (SUTKOWSKI, NATALIE)
D·弗纳德斯 (FERNANDES, DANIEL)
B·赫尔 (HOEL, BRIAN)
S·鲁宾奇克 (RUBINCHIK, SEMYON)

<120> 针对人核仁素的人单克隆抗体

<130> MESCLP0036W0

<140> 未知

<141> 2010-11-17

<160> 16

<170> PatentIn 3.5 版

<210> 1

<211> 2732

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 1

[0001]

```

cttctgcctc agtetogagc tctcgttggc cttcgggtgt acgtgctccg ggatcttcag      60
cacccegggc cggcatcgcc gtcgtttggc ttcttctgga ctcattctgc ccacttgctc      120
gtttcacact cggcggccat catggtgaag ctgcggaagg caggtaaaaa tcaaggtgac      180
cccaagaaaa tggctcctcc tccaaaggag gtagaagaag atagtgaaga tgaggaaaig      240
tcagaagatg aagaagatga tagcagtggg gaagagggtc tcatacctca gaagaaaggc      300
aagaaggetg ctgcaacctc agcaaagaag gtggctgttt ccccaacaaa aaagggttgc      360
gttgccacac cagccaagaa agcagctgtc acfccaggca aaaaggcagc agcaacacct      420
gccaagaaga cagttacacc agccaaagca gttaccacac ctggcaagaa gggagccaca      480
ccaggcaaaag cattggtagc aactcctggt aagaagggtg ctgcatccc agccaagggg      540
gcaagaatg gcagaatgc caagaaggaa gacagtgatg aagaggagga tgatgacagt      600
gaggagatg aggaggatga cgaggacgag gatgaggatg aagatgaat tgaaccagca      660
gcatgaaag cagcagctgc tgcctctgcc tcagaggatg aggacgatga ggatgacgaa      720
gatgatgagg atgacgatga cgatgaggaa gatgactctg aagaagaagc tatggagact      780
acaccagcca aaggaaagaa agctgcaaaa gtgttctctg tgaagccaa gaacgtggtt      840
gaggatgaag atgaagaaga ggaatgatg gacgaggatg acgacgacga cgaagatgat      900
gaagatgatg atgatgaaga tgatgaggag gaggaagaag aggaggagga agagcctgtc      960
aaagaagcac ctggaaaacg aaagaaggaa atggccaaac agnaagcagc tctgaagcc      1020
aagaaacaga aagtgggaagg cacagaaccg actacggett tcaatctctt tgttggaac      1080
ctaaacttta acaaatctgc tctgaatta aaacttggtc tcagcgatgt ttttgctaaa      1140
aatgatcttg ctgttgtgga tgcagaatt ggtatgaata ggaattttgg ttatgtggat      1200
tttgaatctg ctgaagacct ggagaaagcg ttggaactca ctggtttgaa agtctttggc      1260
aatgaaatta aactagagaa accaaaagga aaagacagta agaaagagcg agatgcgaga      1320
acacttttgg ctaaaaatct ccttacaaa gtcactcagg atgaattgaa agaagtgttt      1380
gaagatgctg cggagatcag attagtcagc aaggatggga aaagtaaagg gattgcttat      1440
attgaattta agacagaagc tgatgcagag aaacctttg aagaaaagca gggaaacagag      1500
atcgatgggc gateiatctt cctgiactat actggagaga aaggtcaaaa tcaagactat      1560
agagggtgaa agaatagcac ttggagtgtt gaatcaaaaa ctctgtgttt aagcaacctc      1620
tctacagtgc caacagaaga aactcttcag gaagtatttg agaaagcaac ttttatcaaa      1680

```



```

gtacccaga accaaaatgg caaatctaaa gggtatgcat ttatagagtt tgcctcatic 1740
gaagacgcta aagaagcttt aaattectgt aataaaaagg aaattgaggg cagagcaatc 1800
aggctggagt tgcaggacc caggggatca cctaatgcca gaagccagcc atccaaaact 1860
ctgtttgtca aaggcctgtc ttaggatacc actgaagaga cattaaagga gtcatttgac 1920
ggctccgttc gggcaaggat agttactgac cgggaaactg ggtcctccaa agggtttggt 1980
ttttagact tcaacagtga ggaggatgcc aaagetgcca aggaggccat ggaagacggt 2040
gaaattgatg gaaataaagt taccttggac tggcccaaac ctaagggtga aggtggcttc 2100
gggggtcgtg gtggaggcag aggcggcttt ggaggacgag gtggtggtag aggaggccga 2160
ggaggatttg gtgcagagg ccggggagggc tttggagggc gaggaggctt ccgaggaggc 2220
agaggaggag gaggtagcca caagccacaa ggaagaaga cgaagtttga atagcttcgt 2280
tcctctgtct ttcctcttct catttgaaag aaaggactct ggggttttta ctgttacctg 2340
atcaatgaca gagccttctg aggacattcc aagacagtat acagtectgt ggtctecttg 2400
gaaatccgtc tagtlaacat ttcaagggca ataccgtgtt ggttttgact ggataattcat 2460
ataaactttt taaagagttg agtgatagag ctaaccetta tctgtaagtt ttgaatttat 2520
attgtttcat cccatgtaca aaaccatttt ttctacaaa tagtttgggt tttgttgtg 2580
tttctttttt ttgtttgtt ttgtttttt tttttttgc gtctgtgggg ttgtaaaaga 2640
aaagaaagca gaatgttita tcatgtttt tcttcagcg gctttaggac aaattaaaag 2700
tcaactctgg tgcagaaaa aaaaaaaaaa aa 2732

```

<210> 2

<211> 710

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 2

[0002]

```

Met Val Lys Leu Ala Lys Ala Gly Lys Asn Gln Gly Asp Pro Lys Lys
1          5          10          15
Met Ala Pro Pro Pro Lys Glu Val Glu Glu Asp Ser Glu Asp Glu Glu
20          25          30
Met Ser Glu Asp Glu Glu Asp Asp Ser Ser Gly Glu Glu Val Val Ile
35          40          45
Pro Gln Lys Lys Gly Lys Lys Ala Ala Ala Thr Ser Ala Lys Lys Val
50          55          60
Val Val Ser Pro Thr Lys Lys Val Ala Val Ala Thr Pro Ala Lys Lys
65          70          75          80
Ala Ala Val Thr Pro Gly Lys Lys Ala Ala Ala Thr Pro Ala Lys Lys
85          90          95
Thr Val Thr Pro Ala Lys Ala Val Thr Thr Pro Gly Lys Lys Gly Ala
100         105         110
Thr Pro Gly Lys Ala Leu Val Ala Thr Pro Gly Lys Lys Gly Ala Ala
115         120         125
Ile Pro Ala Lys Gly Ala Lys Asn Gly Lys Asn Ala Lys Lys Glu Asp
130         135         140
Ser Asp Glu Glu Glu Asp Asp Ser Glu Glu Asp Glu Glu Asp Asp
145         150         155         160
Glu Asp Glu Asp Glu Asp Glu Asp Glu Ile Glu Pro Ala Ala Met Lys
165         170         175
Ala Ala Ala Ala Ala Pro Ala Ser Glu Asp Glu Asp Asp Glu Asp Asp
180         185         190
Glu Asp Asp Glu Asp Asp Asp Asp Asp Glu Glu Asp Asp Ser Glu Glu
195         200         205

```

[0003]

Glu Ala Met Glu Thr Thr Pro Ala Lys Gly Lys Lys Ala Ala Lys Val
 210 215 220
 Val Pro Val Lys Ala Lys Asn Val Ala Glu Asp Glu Asp Glu Glu Glu
 225 230 235 240
 Asp Asp Glu Asp Glu Asp Asp Asp Asp Glu Asp Asp Glu Asp Asp
 245 250 255
 Asp Asp Glu Asp Asp Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Pro
 260 265 270
 Val Lys Glu Ala Pro Gly Lys Arg Lys Lys Glu Met Ala Lys Gln Lys
 275 280 285
 Ala Ala Pro Glu Ala Lys Lys Gln Lys Val Glu Gly Thr Glu Pro Thr
 290 295 300
 Thr Ala Phe Asn Leu Phe Val Gly Asn Leu Asn Phe Asn Lys Ser Ala
 305 310 315 320
 Pro Glu Leu Lys Thr Gly Ile Ser Asp Val Phe Ala Lys Asn Asp Leu
 325 330 335
 Ala Val Val Asp Val Arg Ile Gly Met Thr Arg Lys Phe Gly Tyr Val
 340 345 350
 Asp Phe Glu Ser Ala Glu Asp Leu Glu Lys Ala Leu Glu Leu Thr Gly
 355 360 365
 Leu Lys Val Phe Gly Asn Glu Ile Lys Leu Glu Lys Pro Lys Gly Lys
 370 375 380
 Asp Ser Lys Lys Glu Arg Asp Ala Arg Thr Leu Leu Ala Lys Asn Leu
 385 390 395 400

 Pro Tyr Lys Val Thr Gln Asp Glu Leu Lys Glu Val Phe Glu Asp Ala
 405 410 415
 Ala Glu Ile Arg Leu Val Ser Lys Asp Gly Lys Ser Lys Gly Ile Ala
 420 425 430
 Tyr Ile Glu Phe Lys Thr Glu Ala Asp Ala Glu Lys Thr Phe Glu Glu
 435 440 445
 Lys Gln Gly Thr Glu Ile Asp Gly Arg Ser Ile Ser Leu Tyr Tyr Thr
 450 455 460
 Gly Glu Lys Gly Gln Asn Gln Asp Tyr Arg Gly Gly Lys Asn Ser Thr
 465 470 475 480
 Trp Ser Gly Glu Ser Lys Thr Leu Val Leu Ser Asn Leu Ser Tyr Ser
 485 490 495
 Ala Thr Glu Glu Thr Leu Gln Glu Val Phe Glu Lys Ala Thr Phe Ile
 500 505 510
 Lys Val Pro Gln Asn Gln Asn Gly Lys Ser Lys Gly Tyr Ala Phe Ile
 515 520 525
 Glu Phe Ala Ser Phe Glu Asp Ala Lys Glu Ala Leu Asn Ser Cys Asn
 530 535 540
 Lys Arg Glu Ile Glu Gly Arg Ala Ile Arg Leu Glu Leu Gln Gly Pro
 545 550 555 560
 Arg Gly Ser Pro Asn Ala Arg Ser Gln Pro Ser Lys Thr Leu Phe Val
 565 570 575
 Lys Gly Leu Ser Glu Asp Thr Thr Glu Glu Thr Leu Lys Glu Ser Phe
 580 585 590
 Asp Gly Ser Val Arg Ala Arg Ile Val Thr Asp Arg Glu Thr Gly Ser
 595 600 605
 Ser Lys Gly Phe Gly Phe Val Asp Phe Asn Ser Glu Glu Asp Ala Lys

610	615	620
Ala Ala Lys Glu Ala Met Glu Asp Gly Glu Ile Asp Gly Asn Lys Val		
625	630	635
Thr Leu Asp Trp Ala Lys Pro Lys Gly Glu Gly Phe Gly Gly Arg		
	645	650
Gly Gly Gly Arg Gly Gly Phe Gly Gly Arg Gly Gly Gly Arg Gly Gly		655
	660	665
Arg Gly Gly Phe Gly Gly Arg Gly Arg Gly Gly Phe Gly Gly Arg Gly		670
	675	680
Gly Phe Arg Gly Gly Arg Gly Gly Gly Gly Asp His Lys Pro Gln Gly		685
	690	700
Lys Lys Thr Lys Phe Glu		
705	710	

<210> 3
 <211> 1298
 <212> DNA
 <213> 智人(Homo sapiens)

[0004]

<400> 3
 aagaaggaaa tggccaaaca gaaagcagct cctgaagcca agaaacagaa agtgggaaggc 60
 acagaaccga ctacggcttt caatctcttt gttaggaace taaactttta caaatctgct 120
 cctgaattaa aaactggtat cagcgatgtt ttgctaaaa atgactctgc tgtgtggat 180
 gtcagaattg gtatgactag gaaatttgggt tatgtggatt ttgaatctgc tgaagacctg 240
 gagaagagct tggnaactcac tggtttgaaa gtccttggca atgaatttaa actagagaaa 300
 ccaaaaggaa aagacagtaa gaaagagcga gatgcagaa cacttttggc taataatctc 360
 ccttacaag tcaactcagga tgaattgaaa gaagtggttg aagatgctgc ggagatcaga 420
 ttagtcagca aggatgggaa aagtaagggt attgcttata ttgaatttaa gacagaagct 480
 gatgcagaga aaacctttga agaaaagcag ggaacagaga tcgatgggcg atctatttcc 540
 ctgtactata ctggagagaa aggtcaaaat caagactata gaggtggaaa gaatagcact 600
 tggagtgttg aatcaaaaac tctggtttta agcaacctct cctacagtgc aacagaagaa 660
 actcttcagg aagtatttga gaaagcaact ttatcaaaag taccacagaa ccaaaatgac 720
 aaatctaaag ggtatgcatt tatagagttt gcttcattcg aagacgctaa agaagcttta 780
 aattctgtat ataaaaggga aattgagggc agagcaatca ggctggagtt gcaaggaccc 840
 aggggatcac ctaatgccag aagccagcca tcaaaaactc tgtttgtcaa aggcctgtct 900
 gaggatacca ctgaagagac attaaaggag tcatttgacg gctccgttcg ggcgaaggata 960
 gttactgacc gggaaacttg gtctccaaa gggtttggtt ttgtagactt caacagttag 1020
 gaggatgcca aagctgccc aaaggccatg gaagacggtg aaattgatgg aaataaagtt 1080
 accttggact gggccaaacc taagggtgaa ggtggcttcg ggggtcgtgg tggaggcaga 1140
 ggcggctttg gaggacgagg tgggtgtaga ggagccgag gaggatttgg tggcagagcc 1200
 cggggaggct ttggaggcgc aggaggcttc cgaggagcca gaggaggagg aggtgaccac 1260
 aagccacaag gaaagaagac gaagtittgaa gtttaaac 1298

<210> 4
 <211> 427
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 4
 Met Ala Lys Gln Lys Ala Ala Pro Glu Ala Lys Lys Gln Lys Val Glu
 1 5 10 15

[0005]

Gly Thr Glu Pro Thr Thr Ala Phe Asn Leu Phe Val Gly Asn Leu Asn
 20 25 30
 Phe Asn Lys Ser Ala Pro Glu Leu Lys Thr Gly Ile Ser Asp Val Phe
 35 40 45
 Ala Lys Asn Asp Leu Ala Val Val Asp Val Arg Ile Gly Met Thr Arg
 50 55 60
 Lys Phe Gly Tyr Val Asp Phe Glu Ser Ala Glu Asp Leu Glu Lys Ala
 65 70 75 80
 Leu Glu Leu Thr Gly Leu Lys Val Phe Gly Asn Glu Ile Lys Leu Glu
 85 90 95
 Lys Pro Lys Gly Lys Asp Ser Lys Lys Glu Arg Asp Ala Arg Thr Leu
 100 105 110
 Leu Ala Lys Asn Leu Pro Tyr Lys Val Thr Gln Asp Glu Leu Lys Glu
 115 120 125
 Val Phe Glu Asp Ala Ala Glu Ile Arg Leu Val Ser Lys Asp Gly Lys
 130 135 140
 Ser Lys Gly Ile Ala Tyr Ile Glu Phe Lys Thr Glu Ala Asp Ala Glu
 145 150 155 160
 Lys Thr Phe Glu Glu Lys Gln Gly Thr Glu Ile Asp Gly Arg Ser Ile
 165 170 175
 Ser Leu Tyr Tyr Thr Gly Glu Lys Gly Gln Asn Gln Asp Tyr Arg Gly
 180 185 190
 Gly Lys Asn Ser Thr Trp Ser Gly Glu Ser Lys Thr Leu Val Leu Ser
 195 200 205
 Asn Leu Ser Tyr Ser Ala Thr Glu Glu Thr Leu Gln Glu Val Phe Glu
 210 215 220
 Lys Ala Thr Phe Ile Lys Val Pro Gln Asn Gln Asn Gly Lys Ser Lys
 225 230 235 240
 Gly Tyr Ala Phe Ile Glu Phe Ala Ser Phe Glu Asp Ala Lys Glu Ala
 245 250 255
 Leu Asn Ser Cys Asn Lys Arg Glu Ile Glu Gly Arg Ala Ile Arg Leu
 260 265 270
 Glu Leu Gln Gly Pro Arg Gly Ser Pro Asn Ala Arg Ser Gln Pro Ser
 275 280 285
 Lys Thr Leu Phe Val Lys Gly Leu Ser Glu Asp Thr Thr Glu Glu Thr
 290 295 300
 Leu Lys Glu Ser Phe Asp Gly Ser Val Arg Ala Arg Ile Val Thr Asp
 305 310 315 320
 Arg Glu Thr Gly Ser Ser Lys Gly Phe Gly Phe Val Asp Phe Asn Ser
 325 330 335
 Glu Glu Asp Ala Lys Ala Ala Lys Glu Ala Met Glu Asp Gly Glu Ile
 340 345 350
 Asp Gly Asn Lys Val Thr Leu Asp Trp Ala Lys Pro Lys Gly Glu Gly
 355 360 365
 Gly Phe Gly Gly Arg Gly Gly Arg Gly Gly Phe Gly Gly Arg Gly
 370 375 380
 Gly Gly Arg Gly Gly Arg Gly Gly Phe Gly Gly Arg Gly Arg Gly Gly
 385 390 395 400
 Phe Gly Gly Arg Gly Gly Phe Arg Gly Gly Arg Gly Gly Gly Gly Asp
 405 410 415
 His Lys Pro Gln Gly Lys Lys Thr Lys Phe Glu
 420 425

<210> 5
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 5

Arg Arg Arg Arg Arg
1 5

<210> 6
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 6

Lys Lys Lys Lys
1

[0006]

<210> 7
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 7

His His His His His His
1 5

<210> 8
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 8

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

<210> 9

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 9

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys

1 5

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 10

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu

1 5 10

[0007]

<210> 11

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 11

Lys Glu Thr Ala Ala Ala Lys Phe Glu Arg Gln His Met Asp Ser

1 5 10 15

<210> 12

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 12

Lys Asp His Leu Ile His Asn Val His Lys Glu Phe His Ala His Ala

1 5 10 15

His Asn Lys

<210> 13

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 13

Asp	Tyr	Lys	Asp	His	Asp	Gly	Asp	Tyr	Lys	Asp	His	Asp	Ile	Asp	Tyr
1				5					10					15	
Lys	Asp	Asp	Asp	Asp	Lys										

<210> 14

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

[0008]

<400> 14

Lys	Arg	Arg	Trp	Lys	Lys	Asn	Pro	Ile	Ala	Val	Ser	Ala	Ala	Asn	Arg
1				5					10					15	
Phe	Lys	Lys	Ile	Ser	Ser	Ser	Gly	Ala	Leu						
				20				25							

<210> 15

<211> 38

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 15

Met	Asp	Glu	Lys	Thr	Thr	Gly	Trp	Arg	Gly	Gly	His	Val	Val	Glu	Gly
1				5					10					15	
Leu	Ala	Gly	Glu	Leu	Glu	Gln	Leu	Arg	Ala	Arg	Leu	Glu	His	His	Pro
				20				25					30		
Gln	Gly	Gln	Arg	Glu	Pro										

<210> 16

<211> 51

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 16

[0009]

Thr	Asn	Pro	Gly	Val	Ser	Ala	Trp	Gln	Val	Asn	Thr	Ala	Tyr	Thr	Ala
1				5				10					15		
Gly	Gln	Leu	Val	Thr	Tyr	Asn	Gly	Lys	Thr	Tyr	Lys	Cys	Leu	Gln	Pro
			20					25					30		
His	Thr	Ser	Leu	Ala	Gly	Trp	Glu	Pro	Ser	Asn	Val	Pro	Ala	Leu	Trp
		35					40					45			
Gln	Leu	Gln													
		50													

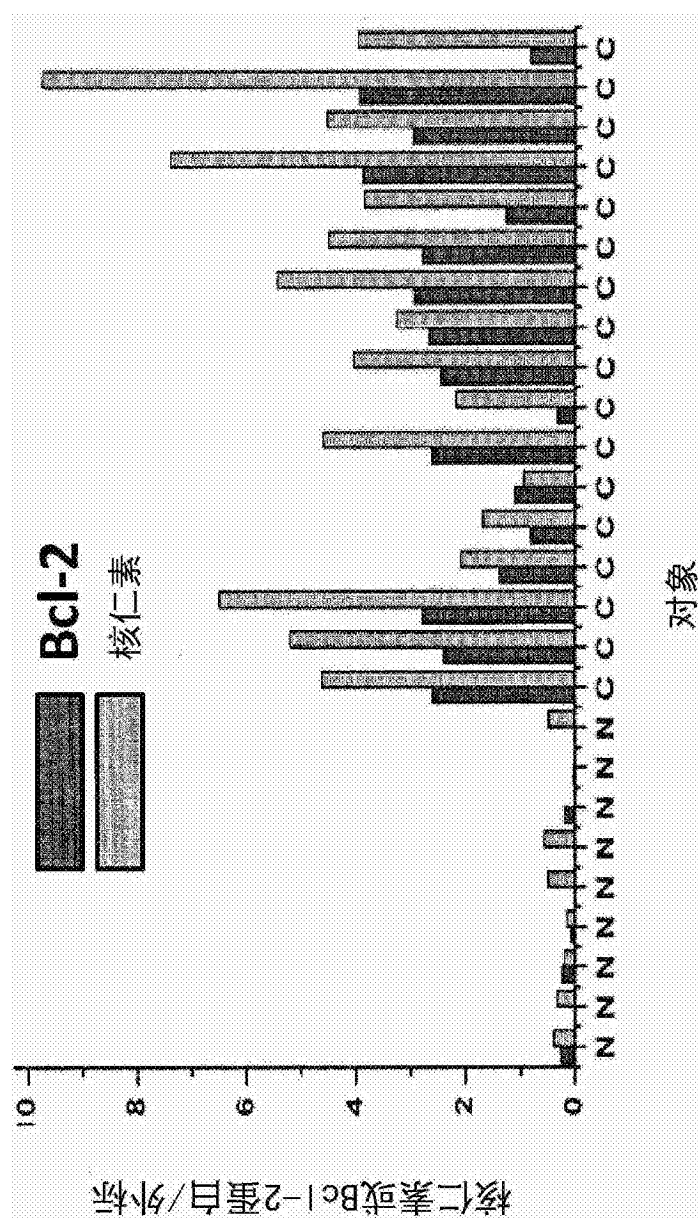


图 1

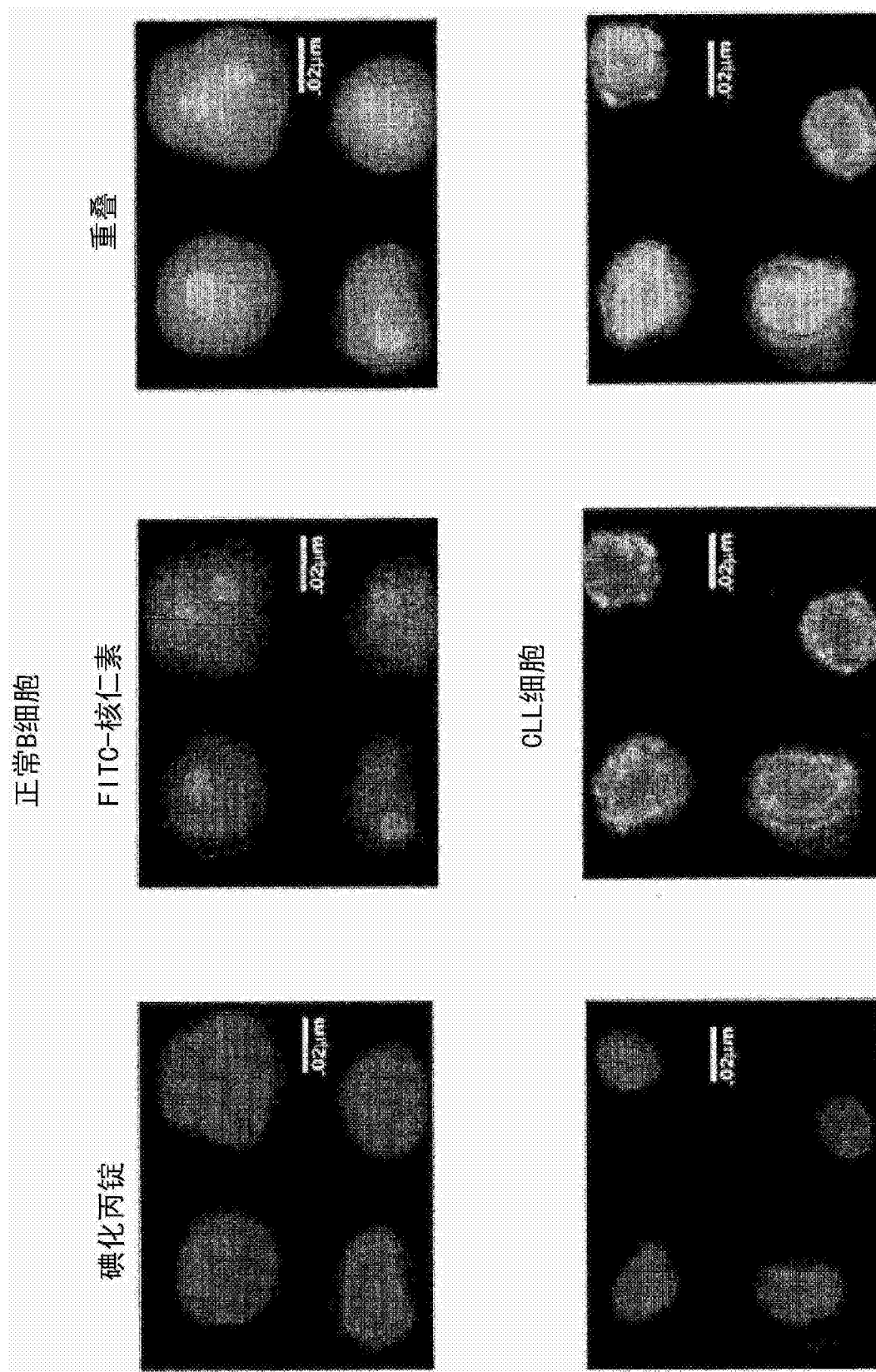


图2A

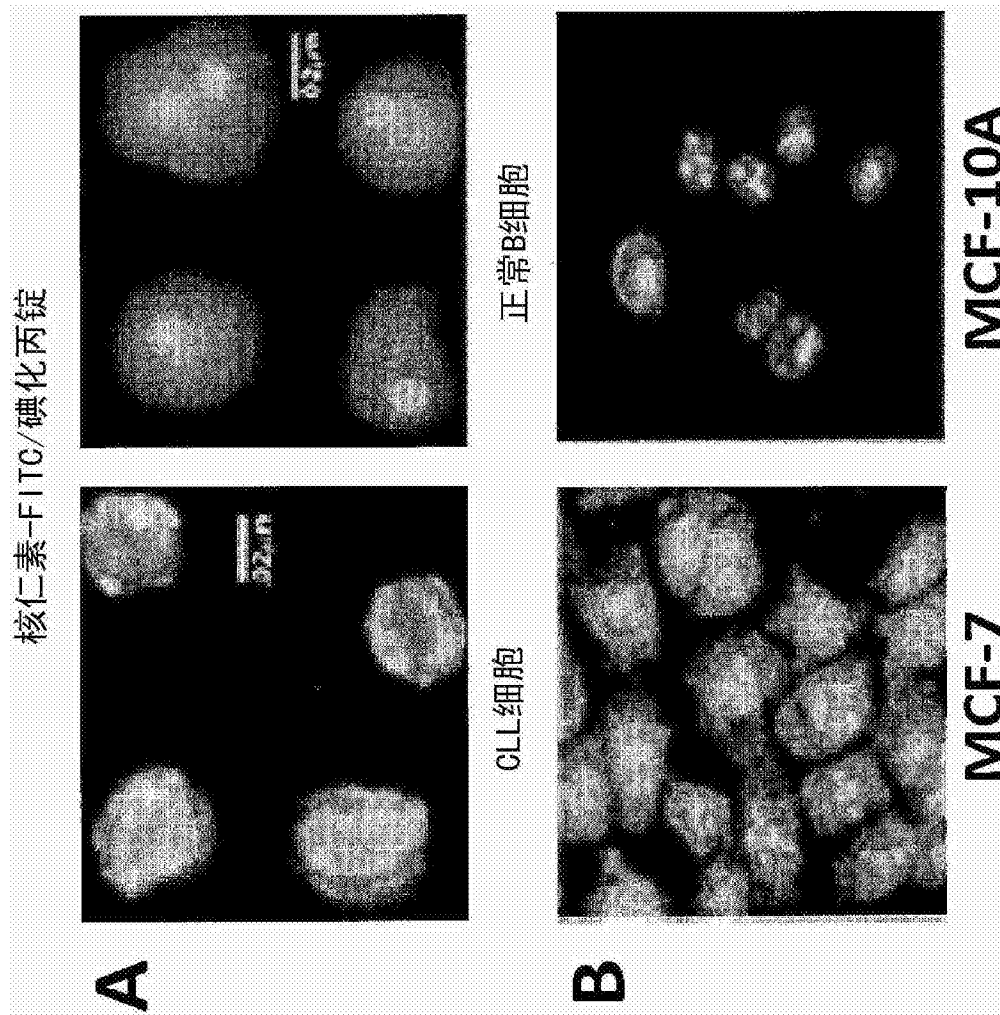


图2B

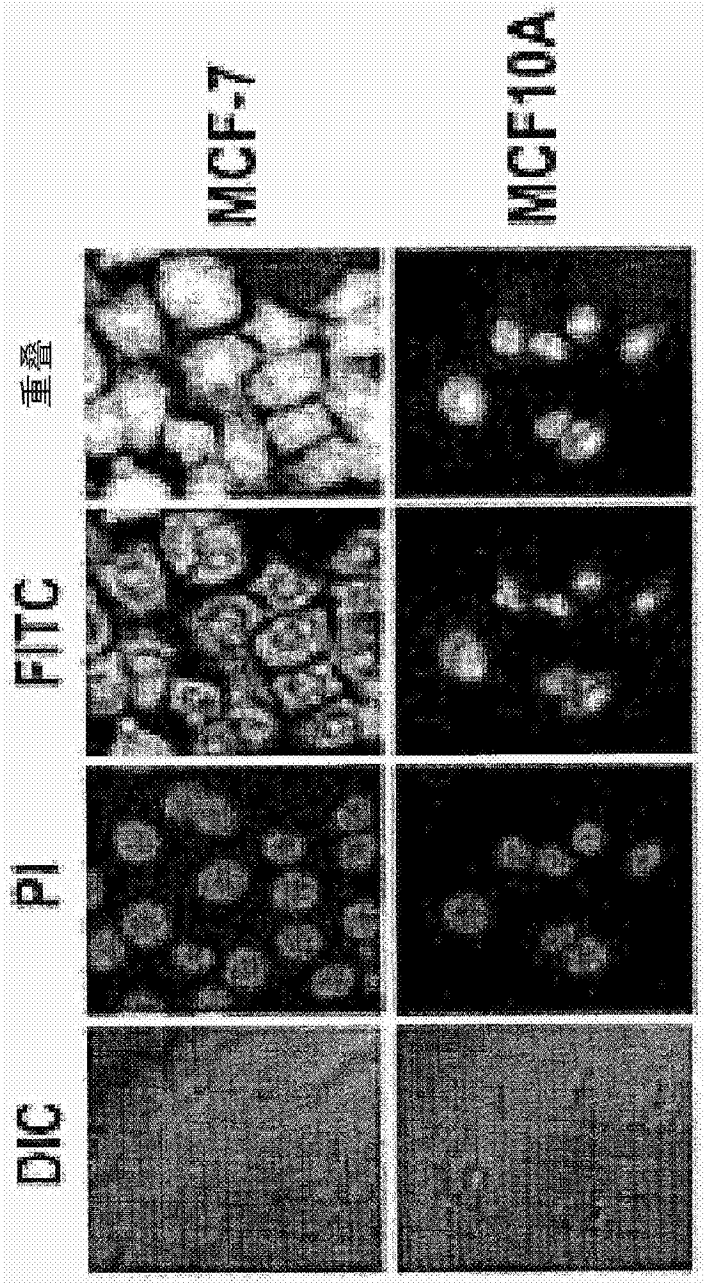


图3

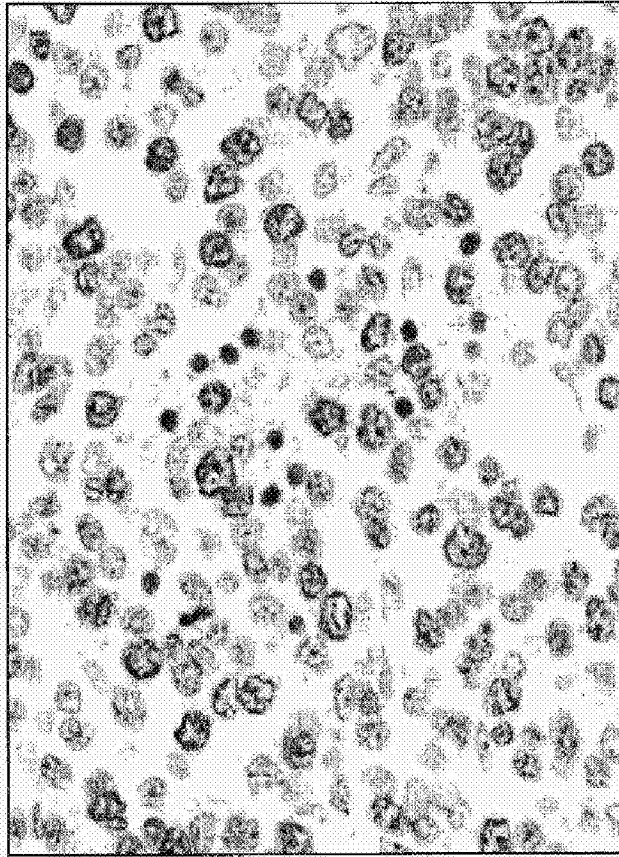


图4

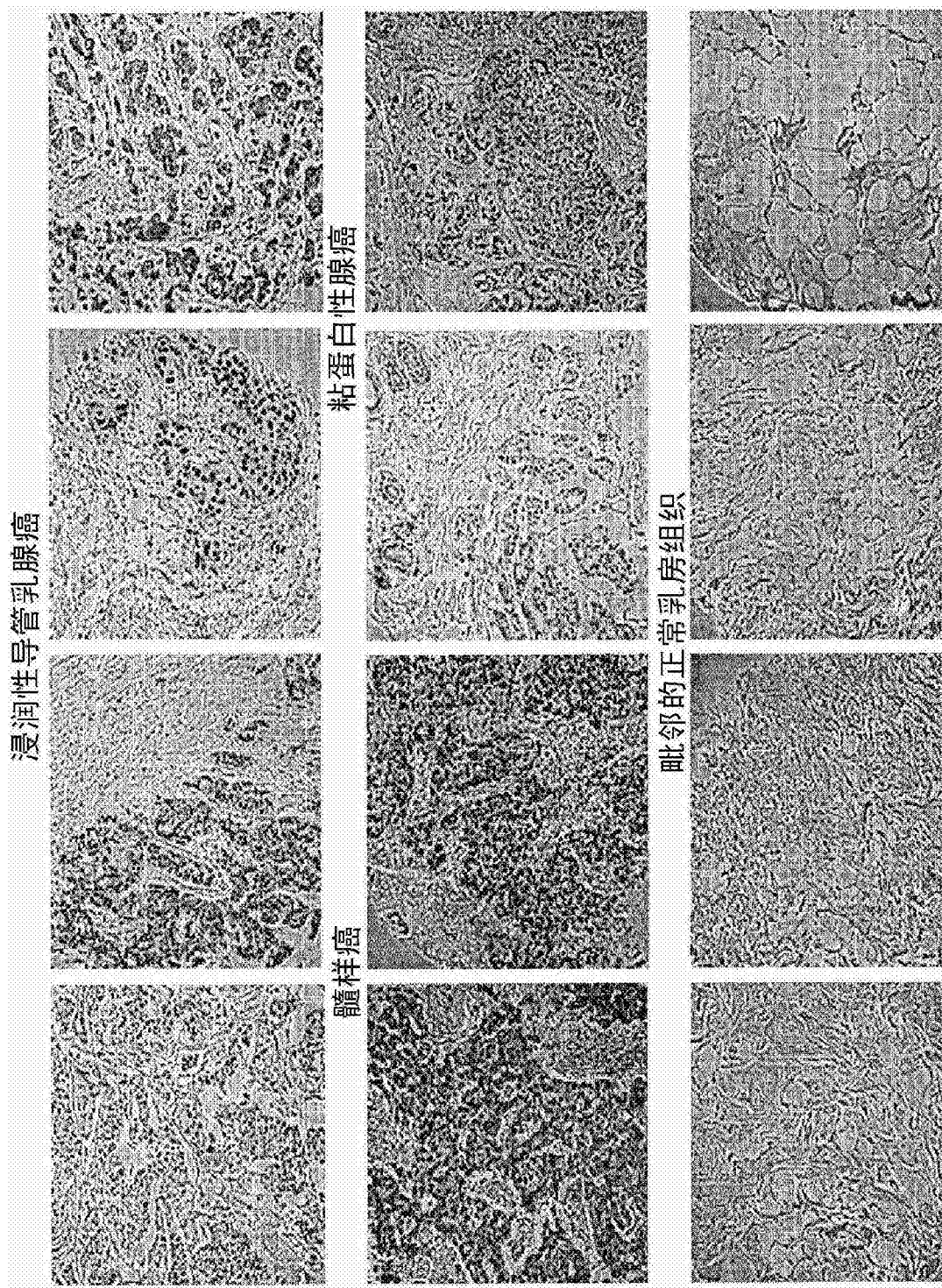


图5A

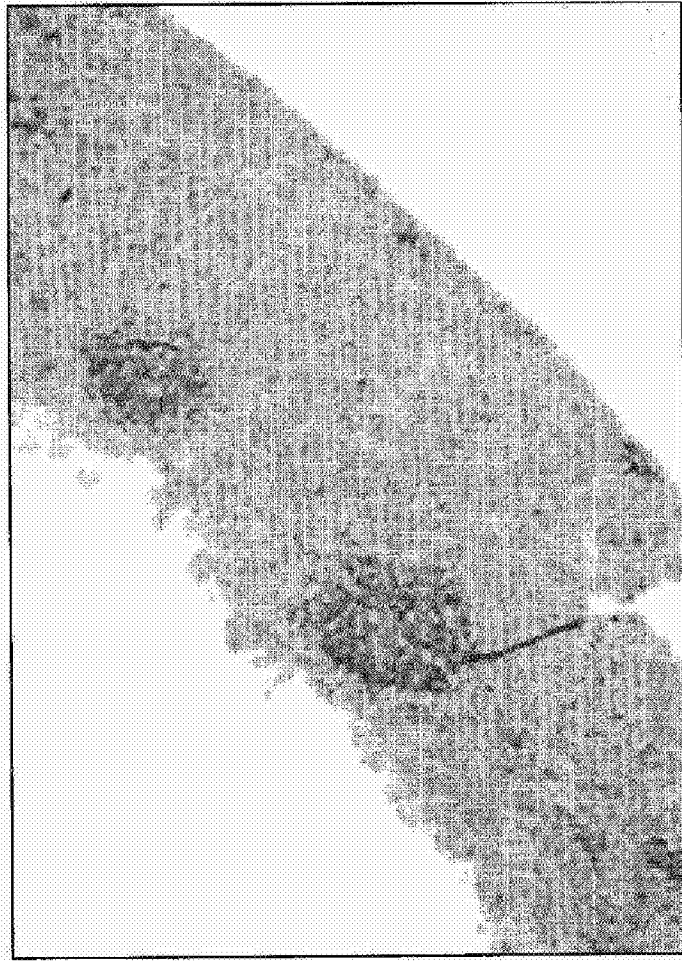


图5B

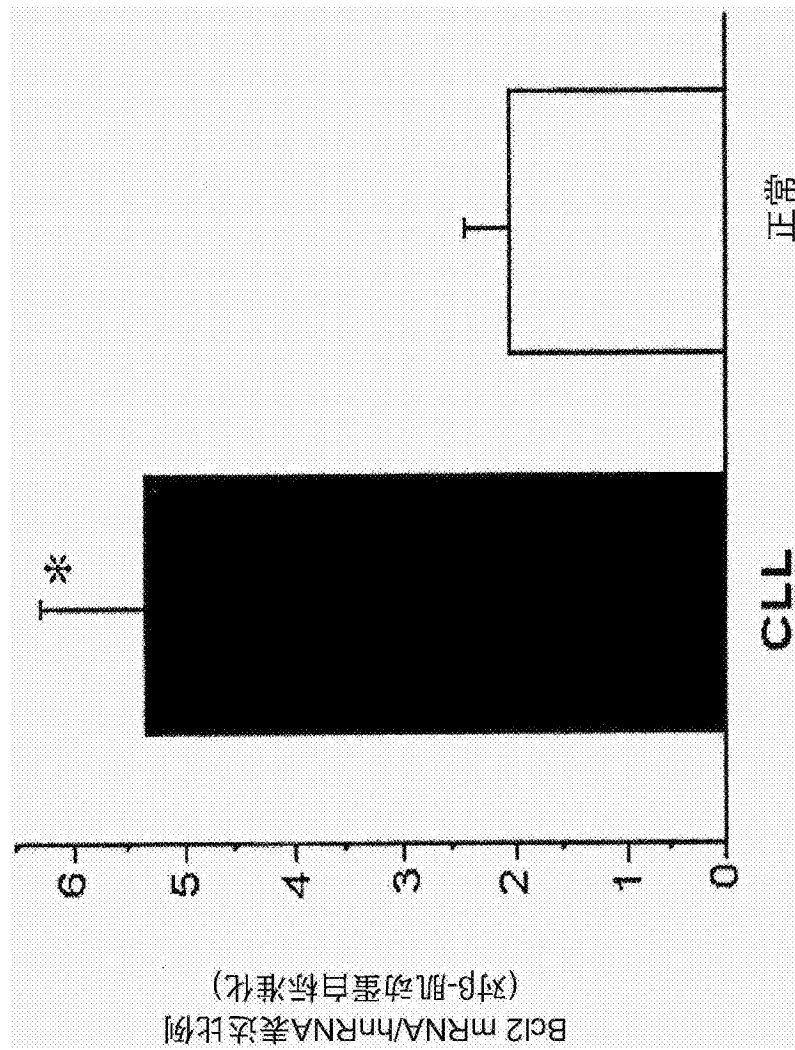


图6

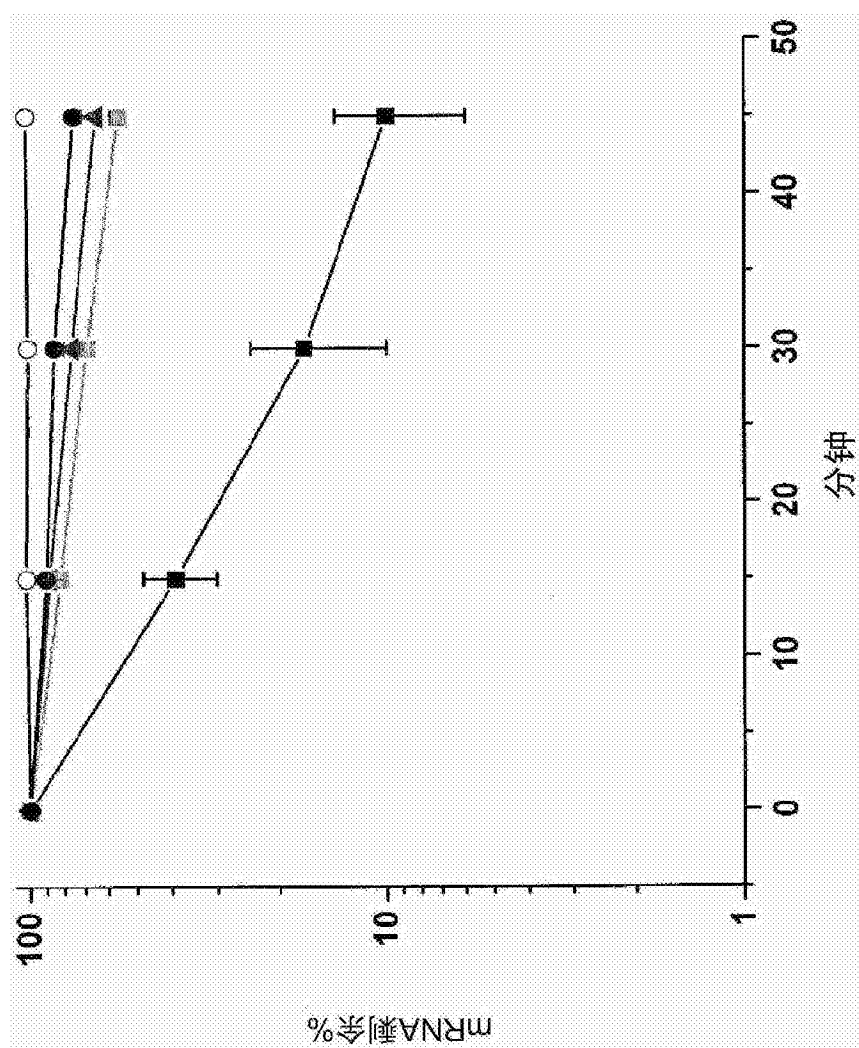


图7

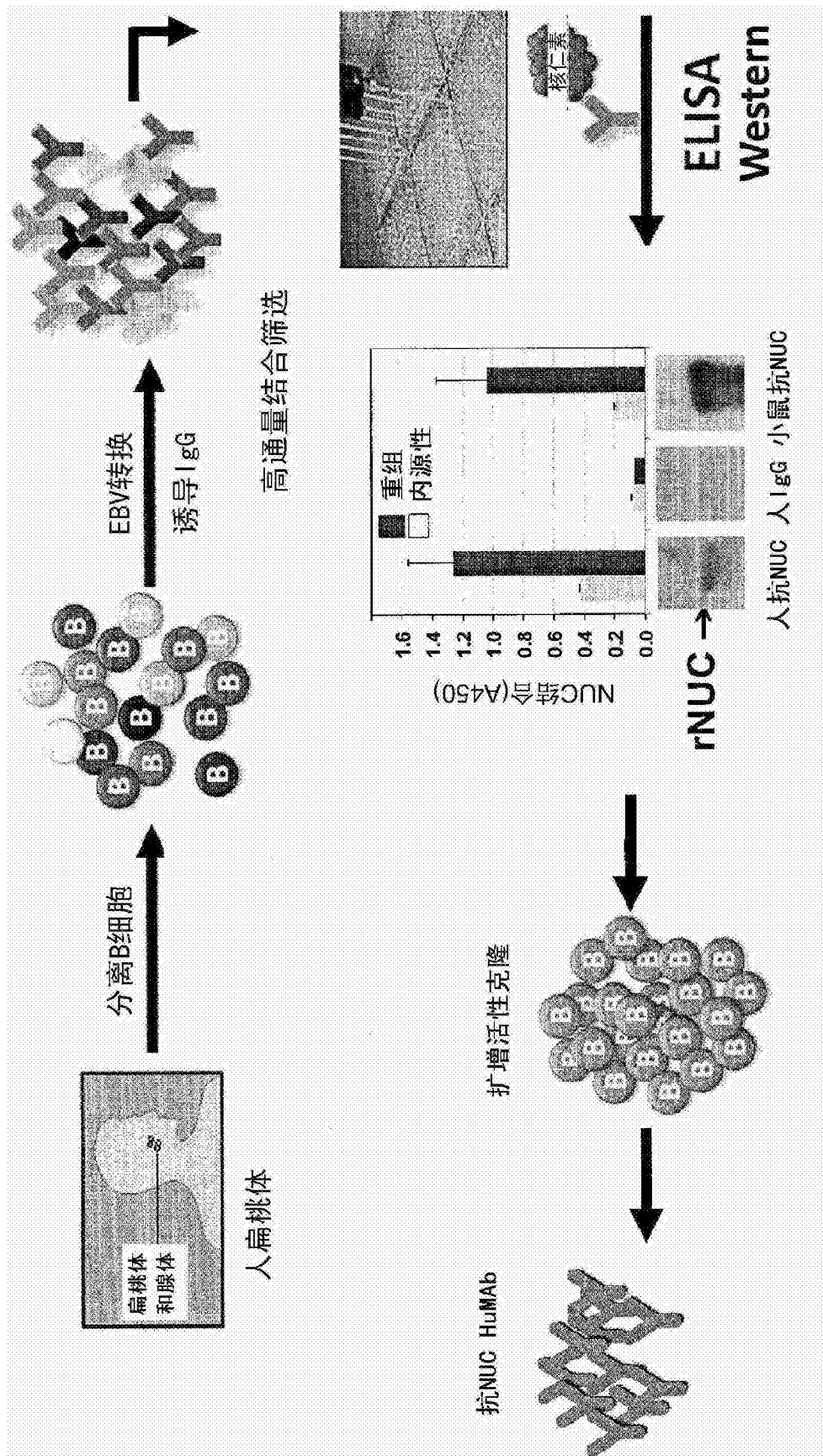


图8

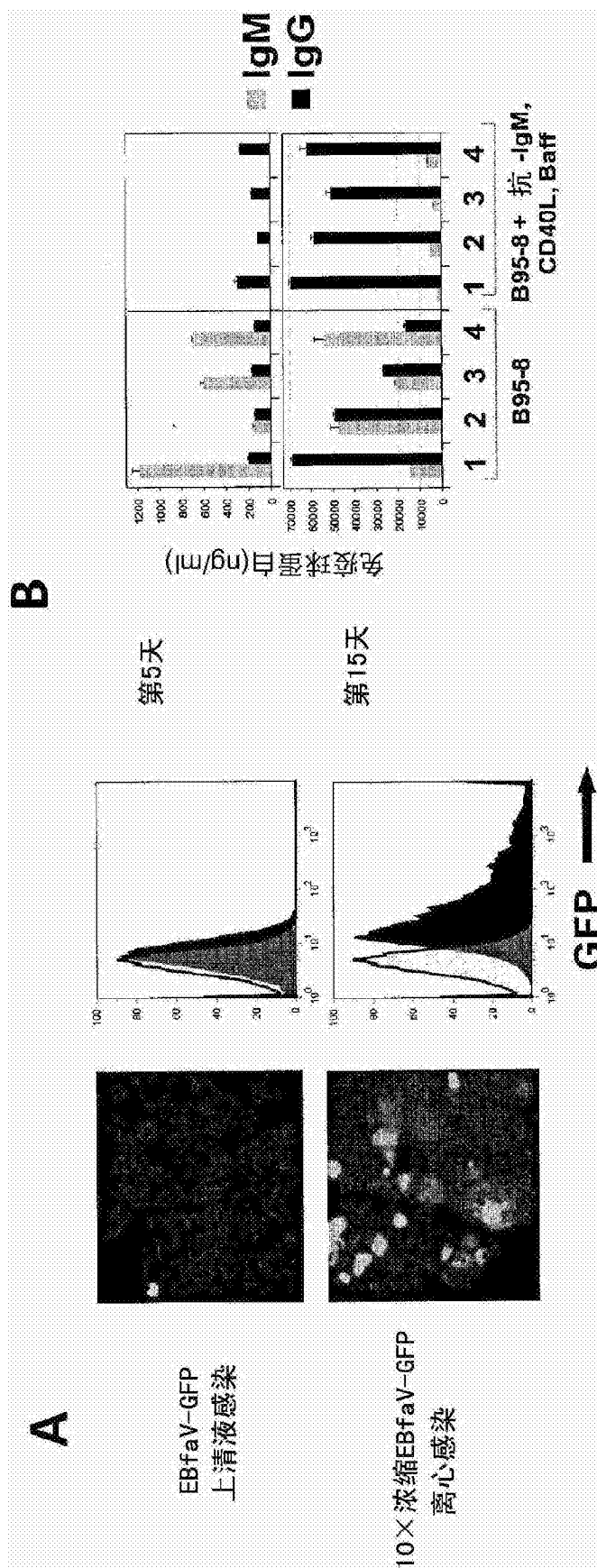
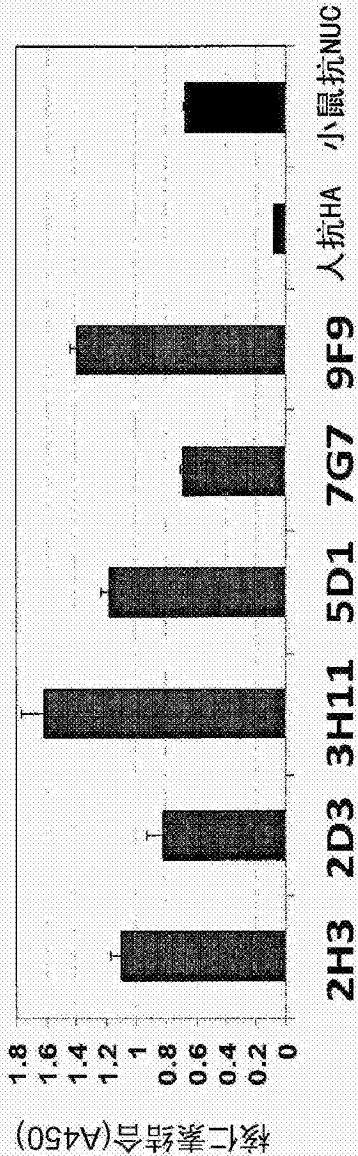


图9

B



抗体	孔	A450
3H11	1F8	0.629
3H11	3A3	0.593
3H11	4H12	0.299
5D1	2G3	0.457
5D1	3C10	0.575
5D1	4G2	0.336
5D1	4H12	0.589
8G4	1A11	0.633
8G4	2G2	0.308
8G4	4B6	0.698
P1C6	1C7	0.636
P1C6	2B9	0.685
P1C6	4H7	0.660
7G7	1G9	0.579
7G7	3C2	0.711
7G7	4C7	0.657
7G7	4G9	0.389
7G7	5B1	0.526
9F9	1A7	0.707
9F9	3D4	0.624
9F9	5A8	0.702
9F9	5D2	0.662
2D3	2B1	0.642
2D3	3 E4	0.674
2H3	1C5	0.387
2H3	1H5	0.583
2H3	2H8	0.562
2H3	3F3	0.587
2H3	4C6	0.692
2H3	4C12	0.701
2H3	4 E3	0.399
2H3	5D3	0.793
阴性对照		0.090
小鼠抗NCL	MS3	0.889

图10

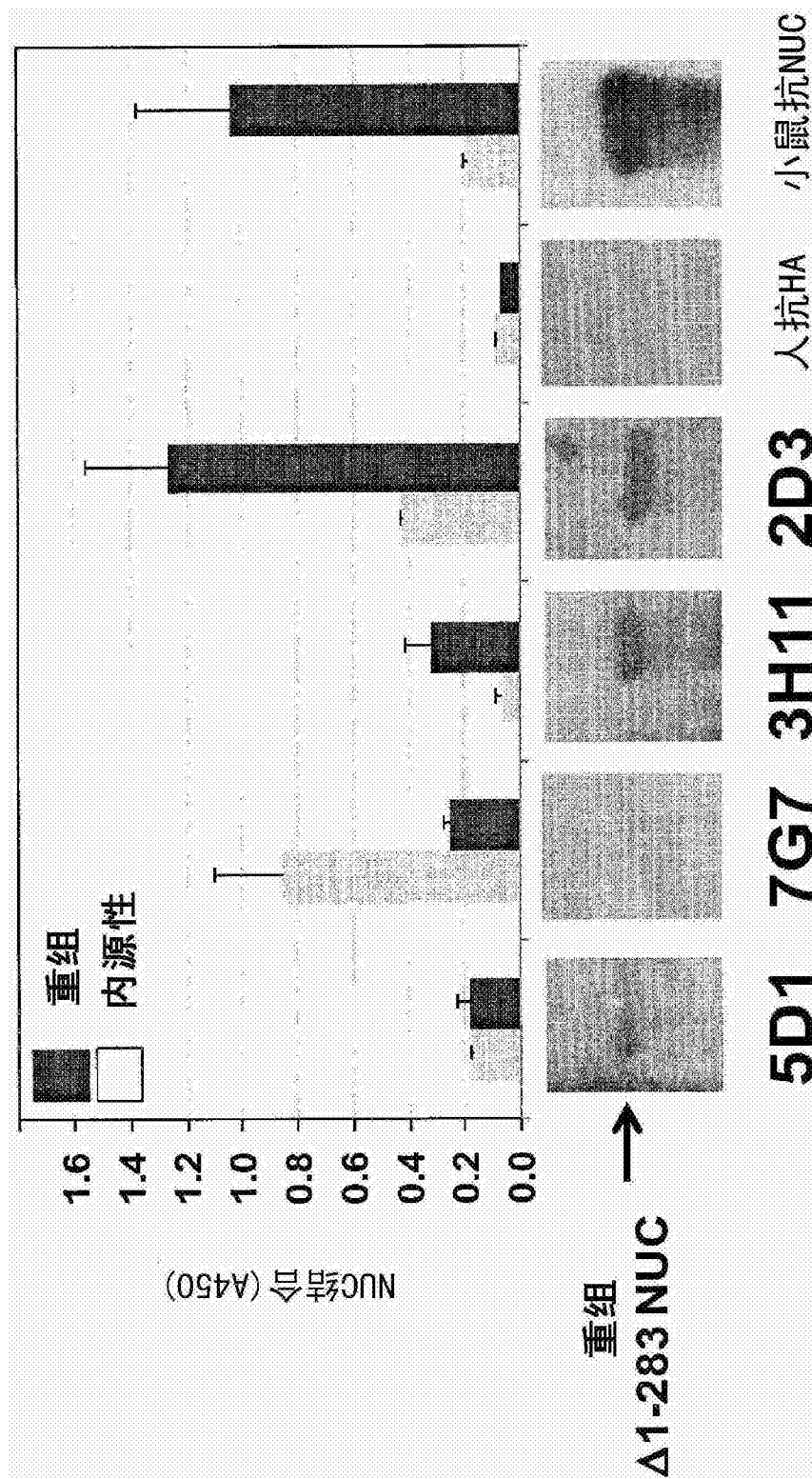


图11

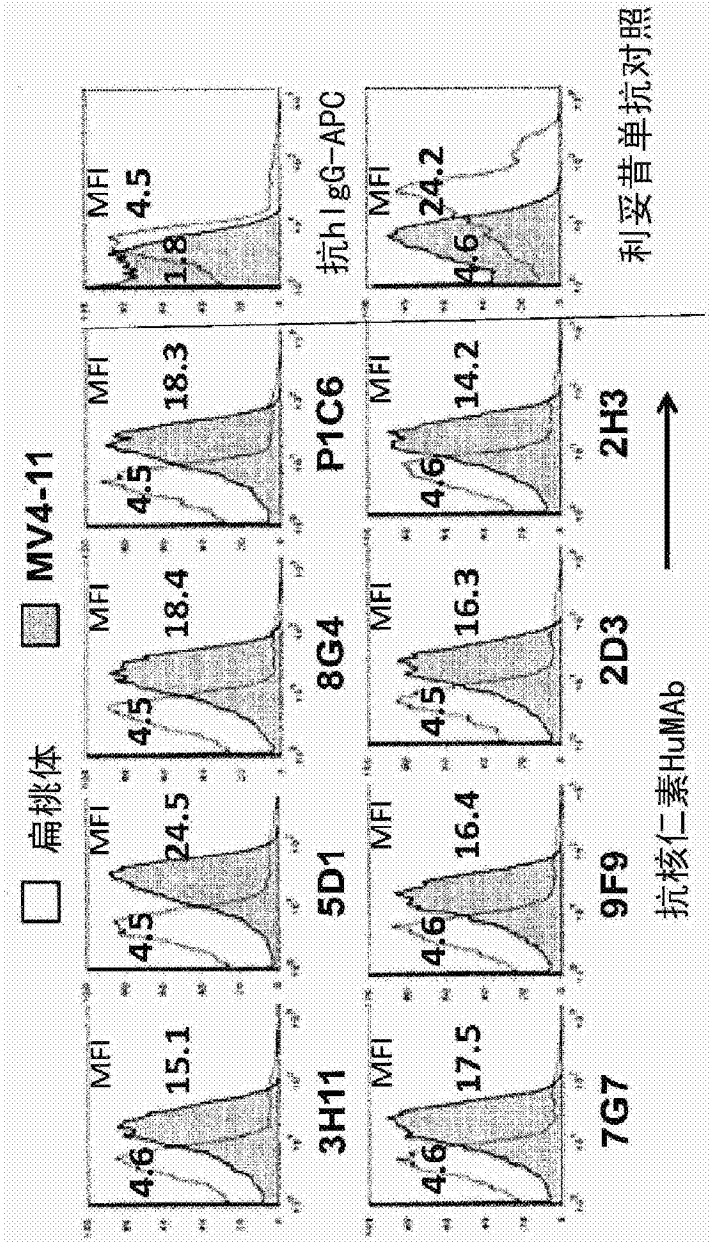


图12

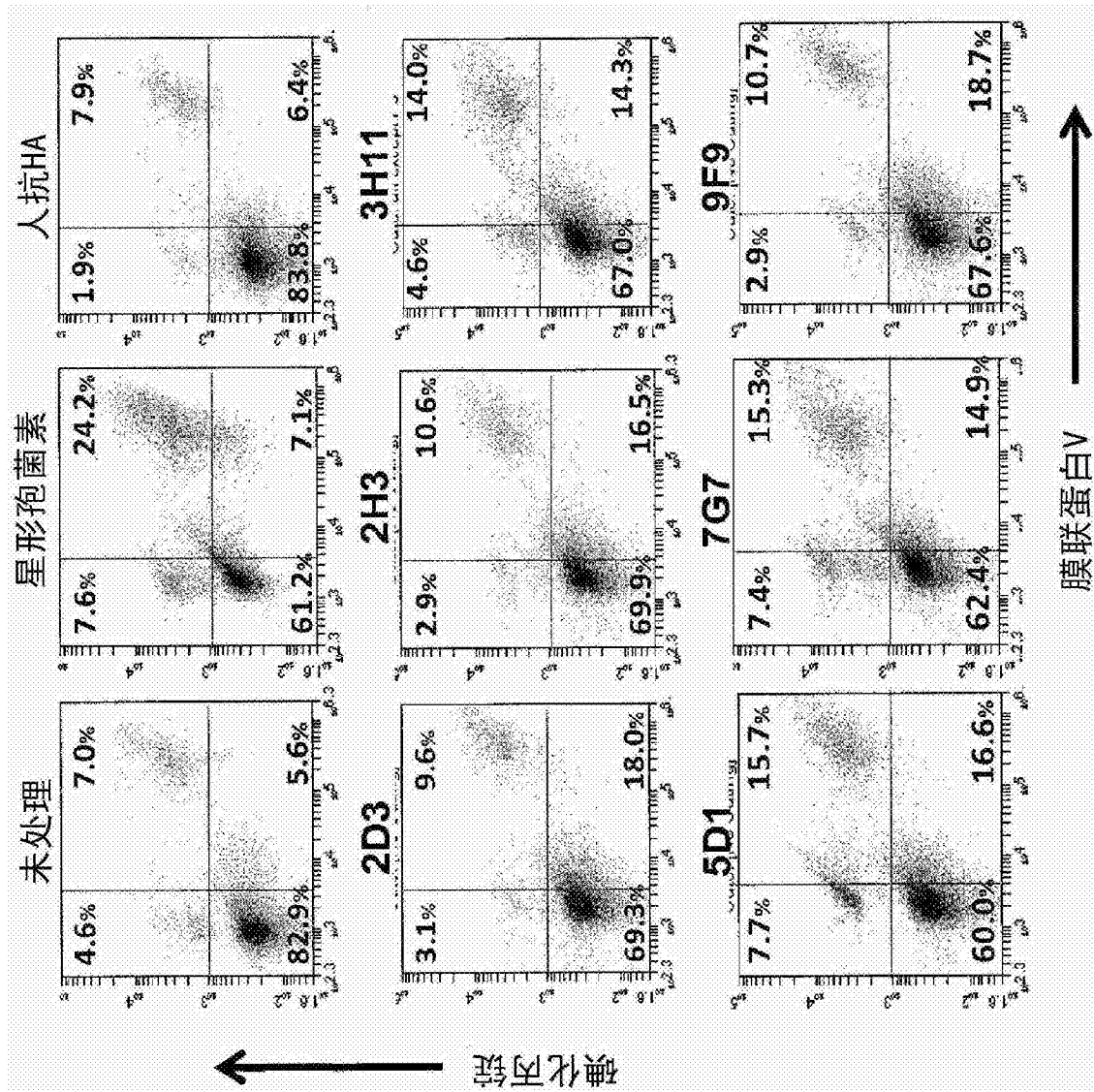


图13

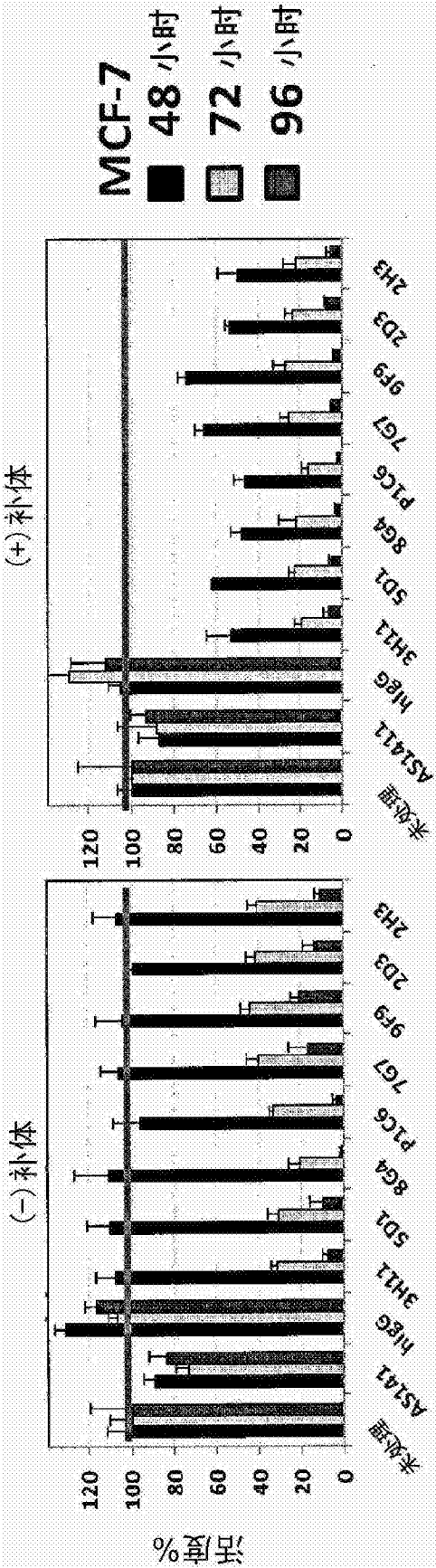


图14A

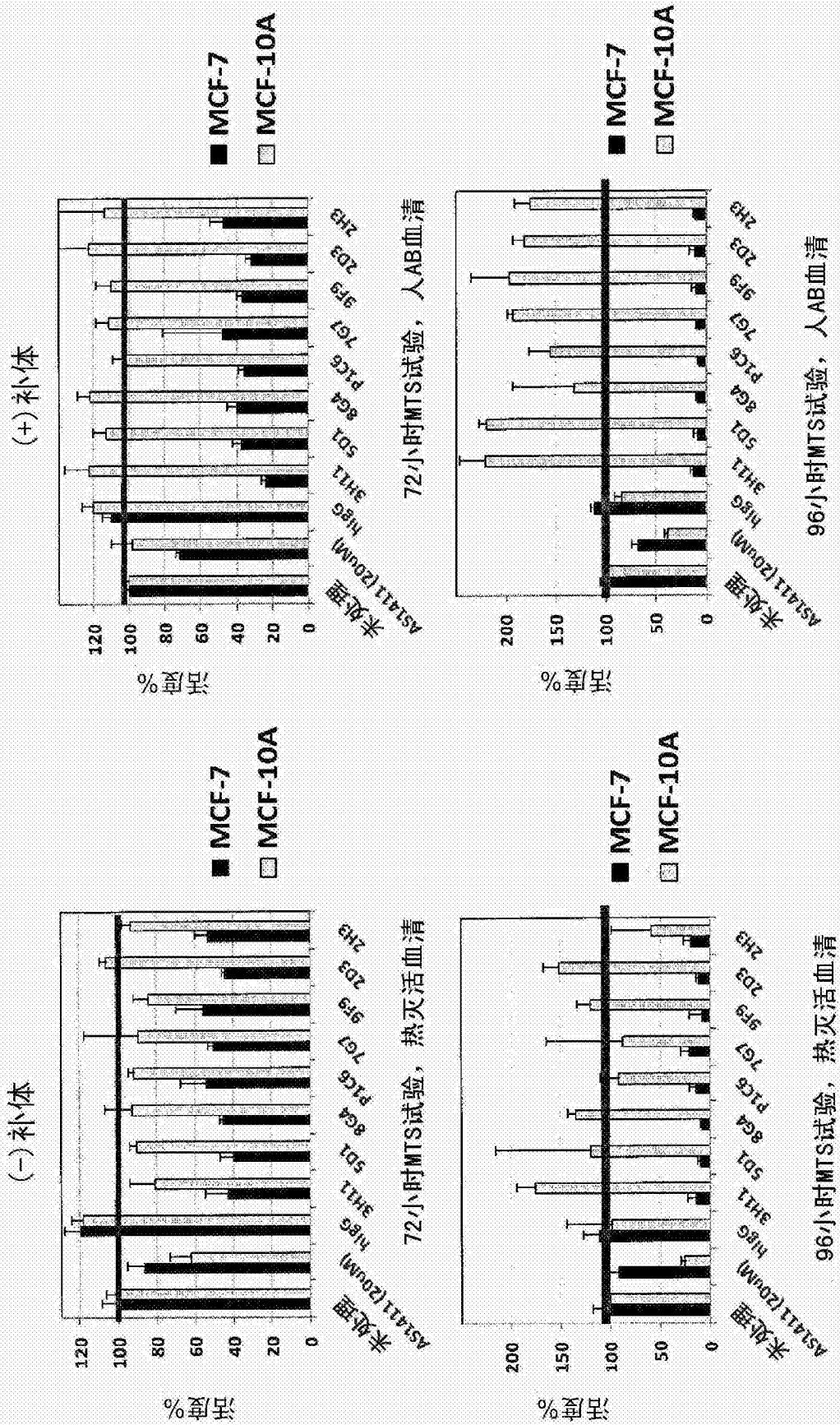


图14B

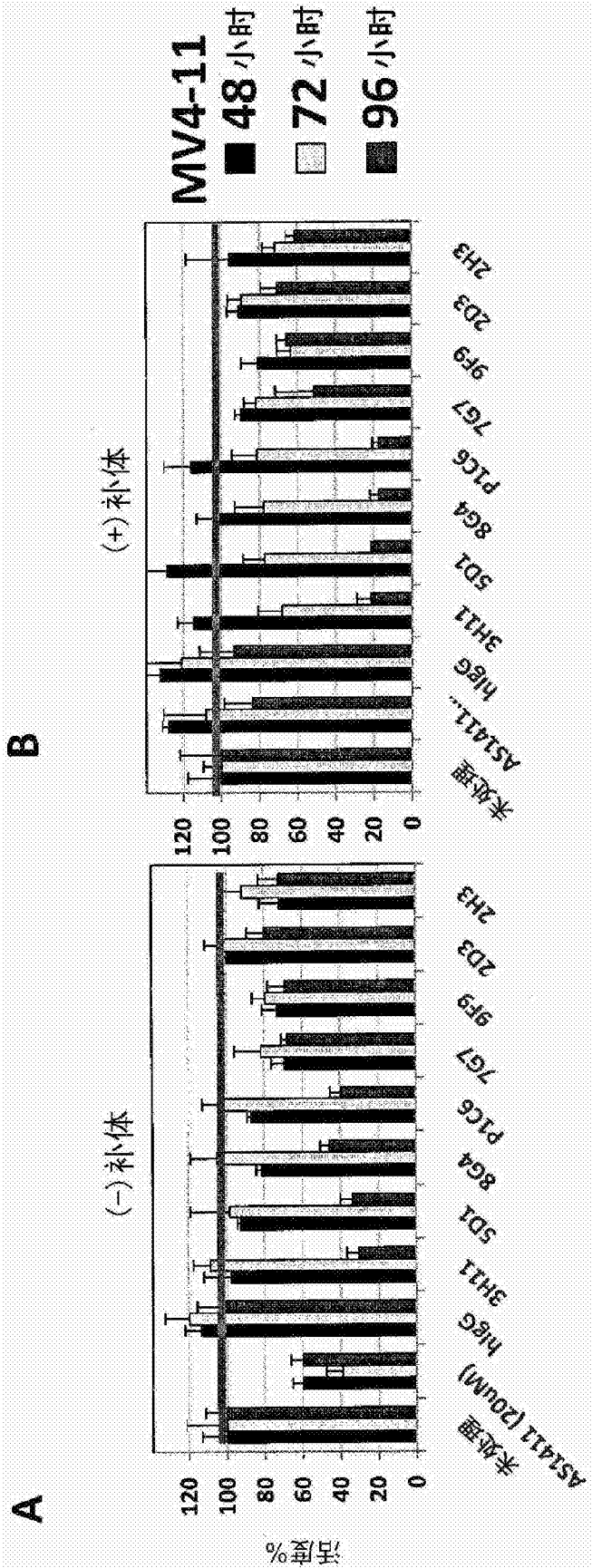


图14C