

[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl<sup>6</sup>



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 95196182.9

C07K 16/00  
C07K 16/30 C07K 16/18  
C07K 14/00 A61K 39/395  
A61K 41/00 A61K 49/00  
A61K 51/00 G01N 33/574  
C12N 15/02 C12P 21/08

[43]公开日 1997年11月5日

[11] 公开号 CN 1164238A

[22]申请日 95.9.12

[30]优先权

[32]94.9.12 [33]US[31]08/304,524

[86]国际申请 PCT/US95/11554 95.9.12

[87]国际公布 WO96/08514 英 96.3.21

[85]进入国家阶段日期 97.5.12

[71]申请人 国际生物免疫有限公司

地址 美国纽约州

[72]发明人 章江益

阿伦·迈伦

[74]专利代理机构 上海华东专利事务所

代理人 费开远

权利要求书 12 页 说明书 40 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 抗人结肠癌相关抗原的单克隆抗体及其应用

[57]摘要

本文公开了单克隆抗体，特别是 33.28 和 31.1 及嵌合抗体，特别是特异性对人类具有免疫原性的结肠癌相关抗原的糖蛋白抗原的鼠/人嵌合抗体 Chi#1。这些抗体及它们的片段和衍生物可用于人结肠癌、肺癌和卵巢癌的免疫诊断和免疫治疗，并可用于作为免疫治疗剂的抗原的纯化。本文还公开了检测样品中结肠癌相关抗原的方法及结肠癌、肺癌和卵巢癌病人的治疗方法。

# 权利要求书

---

1.一种特异性对人结肠癌相关蛋白抗原的单克隆抗体,所述的抗原具有以下特征:

(1).所述的单克隆抗体是识别所述抗原的蛋白成份的表位,而不是所述抗原的糖成份的表位;

(2).所述抗原在正常的人类组织中不能发现;

(3).所述抗原在除了结肠癌细胞以外其它的人癌细胞上不能发现;以及

(4).所述抗原特异性地对人类具有免疫原性。

2.按权利要求1的抗体,该抗体是小鼠单克隆抗体33.28或是像33.28一样能特异性地结合在同样的结肠癌相关表位的抗体。

3.按权利要求2的抗体,所述结肠癌相关抗原是具有分子量约为61.1KD的蛋白。

4.按权利要求1的抗体,该抗体是小鼠单克隆抗体31.1或是像小鼠单克隆抗体31.1一样能特异性地结合在同样的结肠癌相关表位的抗体。

5.按权利要求4的抗体,所述结肠癌相关抗原是具有分子量约为72KD的蛋白,所述结肠癌相关抗原是糖蛋白,其蛋白成份分子量为61.1KD。

6.按权利要求1的抗体,固定在固相物上。

7.按权利要求1的抗体,它是经标记后能检测的单抗。

8.按权利要求7的抗体,所述可检测的标记是同位素标记。

9.按权利要求1的抗体,与具有细胞毒性放射性核素结合。

10.按权利要求1的抗体,与具有细胞毒性的药物结合。

11.按权利要求1的抗体,与具有细胞毒性的蛋白结合。

12.一种免疫治疗人类结肠癌,乳房癌和卵巢癌的药物组份,包含按权利要求9的一种抗体,及与之结合的一种药物可接受的载体。

13.一种免疫治疗人类结肠癌,乳房癌和卵巢癌的药物组份,包含一个具有治疗效果的量的按权利要求10的一种抗体,及与之结合的一种药物可接受的载体。

14. 一种免疫治疗人类结肠癌，乳房癌和卵巢癌的药物组份，包含一个具有治疗效果的量的按权利要求11的一种抗体，及与之结合的一种药物可接受的载体。

15. 一种具有以下特性的人结肠癌相关蛋白抗原：

(1). 所述抗原的蛋白成份的表位能够在哺乳宿主体内产生抗体，而所述抗原的糖成份表位是不能产生所述抗体；

(2). 所述抗原在正常的人类组织中不能发现；

(3). 所述抗原在除了结肠癌细胞以外其它的人类癌细胞上不能发现；以及

(4). 所述抗原特异性地对人类具有免疫原性。

16. 按权利要求15的抗原，所述抗原是分子量约为61KD的蛋白。

17. 按权利要求15的抗原，所述抗原是分子量约为72KD的蛋白。

18. 按权利要求16的抗原，所述抗原能特异性地结合小鼠单克隆抗体33.28，或是与像小鼠单克隆抗体33.28一样能特异性地结合在同样的结肠癌相关表位的抗体结合。

19. 按权利要求17所述的抗原，所述抗原能特异性地结合小鼠单克隆抗体31.1，或是与像小鼠单克隆抗体31.1一样能特异性地结合在同样的结肠癌相关表位的抗体结合。

20. 一种抗权利要求1的单克隆抗体的单克隆抗体。

21. 一种抗权利要求2的单克隆抗体的单克隆抗体。

22. 一种抗权利要求3的单克隆抗体的单克隆抗体。

23. 一种抗权利要求4的单克隆抗体的单克隆抗体。

24. 一种抗权利要求5的单克隆抗体的单克隆抗体。

25. 一种检测在样品中能与小鼠单克隆抗体33.28结合的结肠癌相关抗原的免疫分析方法包括：

(1). 将所述样品与按权利要求1的抗体接触；及

(2). 通过检测所结合上的抗体来检测所述抗原。

26. 一种检测在样品中能与小鼠单克隆抗体31.1结合的结肠癌相关抗原的免疫分析方法包括：

(1). 将所述样品与按权利要求1的抗体接触；及

(2).通过检测所结合上的抗体来检测所述抗原。

27.一种用于检测结肠癌相关抗原在宿主中的成象方法包括:

(1).将按权利要求7 的标记了的抗体与所述动物接触; 及

(2).检测所述抗原。

28.一种杀死携带结肠癌相关抗原的细胞的方法, 包括将有效量的权利要求1 的抗体和一个具有细胞毒性的效应剂传递给所述细胞。

29.按权利要求28的一种方法, 所述效应剂是选自于一组含有补体和具有依赖于抗体的细胞毒性功能的效应细胞。

30.一种杀死携带结肠癌相关抗原的细胞的方法, 包括将按权利要求9 的抗体传递给所述细胞。

31.一种杀死携带结肠癌相关抗原的细胞的方法, 包括将按权利要求10 的抗体传递给所述细胞。

32.一种杀死携带结肠癌相关抗原的细胞的方法, 包括将按权利要求11 的抗体传递给所述细胞。

33.一种治疗怀疑患有结肠癌带有能与小鼠单克隆抗体33.28或31.1结合的抗原的病人的方法, 包括对所述病人用按权利要求12的组份的有效剂量。

34.一种治疗怀疑患有结肠癌带有能与小鼠单克隆抗体33.28或31.1结合的抗原的病人的方法, 包括给所述病人用按权利要求13的组份的有效剂量。

35.一种治疗怀疑患有结肠癌带有能与小鼠单克隆抗体33.28或31.1结合的抗原的病人的方法, 包括给所述病人用按权利要求14的组份的有效剂量。

36.一种生产用于人结肠癌的临床免疫治疗的具有免疫原性的组份的方法, 包括:

(a)制备一个含有能与小鼠单克隆抗体33.28或31.1结合的抗原的肿瘤或细胞系的细胞膜提取物; 以及

(b)采用按权利要求6的抗体通过亲和纯化分离所述抗原, 这样可生产所述的组份。

37.一种抗人结肠癌的免疫疫苗，包括有效量的按权利要求15的抗原或与传统的疫苗载体联接的它的活性片段。

38.一种抗人结肠癌的免疫疫苗，包括有效量的人结肠癌相关抗原或与传统疫苗载体联接的又能与小鼠单克隆抗体33.28或31.1结合的它的活性片段。

39.一种人结肠癌的免疫治疗方法，包括给病人按需要用含有效剂量按权利要求15的抗原的疫苗或与传统的疫苗载体联接的它的活性片段。

40.一种人结肠癌的免疫治疗方法，包括给病人按需要用含有效剂量人结肠癌相关抗原的疫苗或与传统疫苗载体联接的并能与小鼠单克隆抗体33.28或31.1结合的它的活性片段。

41.按权利要求37的疫苗，剂量有效范围是约0.001-100mg抗原/公斤体重。

42.按权利要求38的疫苗，剂量有效范围是约0.001-100mg抗原/公斤体重。

43.一种诊断人结肠癌的方法包括：

(a) 从怀疑患有结肠癌带有按权利要求15的抗原的病人取组织学标本；

(b) 将标本与能识别所述抗原的单克隆抗体接触；

(c) 对标本进行免疫组化染色；以及

(d) 根据染色检测抗原-抗体复合物的存在。

44.一种诊断人结肠癌的方法包括：

(a) 从怀疑患有结肠癌的带有能与小鼠单克隆抗体33.28或31.1结合的抗原病人取组织学标本；

(b) 将标本与能识别所述抗原的小鼠单克隆抗体接触；

(c) 将标本进行免疫组化染色；以及

(d) 检测抗原-抗体复合物的存在。

45. 按权利要求43的方法，所述染色是亲和素-生物素免疫过氧化物酶染色。

46. 按权利要求44的方法，所述染色是亲和素-生物素免疫过氧化物酶染色。

47.一种用于结肠癌的免疫组化检测的试剂盒包括:

- (a) 小鼠单克隆抗体33.28和31.1及癌胚抗原的单克隆抗体;
- (b) 免疫过氧化物酶及二抗试剂;
- (c) 免疫过氧化物酶; 以及
- (d) 染色剂。

48.一种用于结肠癌的免疫组化检测的试剂盒包括:

- (a) 小鼠单克隆抗体31.1、31.2、33.23、33.28和77及癌胚抗原的单克隆抗体;
- (b) 免疫过氧化物酶及二抗试剂;
- (c) 免疫过氧化物酶; 以及
- (d) 染色剂。

49.一种用于按权利要求15的抗原的检测的区室化试剂盒, 所述试剂盒包括: 装有所述抗原的抗体或活性成份的第一个容器及装有所述抗原的二抗或活性成份的第二个容器, 所述二抗标记了报道分子, 能给出可检测信号。

50. 按权利要求49的试剂盒, 所述的报道分子是放射性同位素、酶、荧光分子、化学发光分子或生物发光分子。

51.按权利要求49的试剂盒, 所述的报道分子是酶。

52.按权利要求49的试剂盒, 所述试剂盒还包括一装有盛酶的底物的第三个容器。

53.一种特异性对人结肠癌相关蛋白抗原的单克隆抗体, 所述抗原具有如下的特征:

(i) 所述的单克隆抗体是识别所述抗原的蛋白质成份的表位, 而不是所述抗原的糖成份的表位。

(ii) 所述抗原在正常的人类组织中不能发现;

(iii) 所述抗原在除了乳癌细胞以外其它的人癌细胞上不能发现, 以及

(iv) 所述抗原特异性地对人类具有免疫性。

54. 按权利要求53的抗体, 该抗体是小鼠单克隆抗体33.28或是像33.28一样能特异地结合在同样的结肠癌相关表位的抗体。

55. 按权利要求54的抗体, 所述结肠癌相关抗原是具有分子量约为61.1KD的蛋白。

56. 按权利要求53的抗体, 所述抗体是小鼠单克隆抗体31.1或是象31.1一样能特异地结合在同样的结肠癌相关表位的抗体。

57. 按权利要求53的抗体, 所述结肠癌相关抗原是具有分子量约为72KD的蛋白, 所述结肠癌相关抗原是糖蛋白, 其蛋白成份的分子量为61.1KD。

58. 一种免疫治疗人乳癌的药物组份, 包括一个具有治疗有效量的按权利要求53的一种抗体及与之结合的一种药物可接受的载体。

59. 一种具有下列特征的人结肠癌相关蛋白抗原:

(i) 所述抗原的蛋白成份的表位能够在哺乳宿主体内产生抗体, 而所述抗原的糖成份的表位是不能产生所述抗体;

(ii) 所述抗原在正常的人体组织中不能发现;

(iii) 所述抗原在除了乳癌细胞以外其它的人类癌组细胞上不能发现; 以及

(iv) 所述抗原特异性地对人类具有免疫原性。

60. 按权利要求59的抗原, 所述抗原是具有分子量约为61KD的蛋白。

61. 按权利要求59的抗原, 所述抗原是具有分子量约为72KD的蛋白。

62. 按权利要求60的抗原, 所述抗原是特异性地与小鼠单克隆抗体33.28结合或是与像小鼠单克隆抗体33.28一样能特异性地结合在同样的结肠癌相关表位的抗体结合。

63. 按权利要求61的抗原, 所述抗原是特异性地与小鼠单克隆抗体31.1结合或是与像小鼠单克隆抗体31.1一样能特异性地结合在同样的结肠癌相关表位的抗体结合。

64. 一种抗按权利要求53的单克隆抗体的单克隆抗体。

65. 一种检测能与样品中的小鼠单克隆抗体33.28结合的结肠癌相关抗原的免疫分析方法包括:

(a) 将所述样品与按权利要求53的抗体接触; 以及

(b) 通过检测抗体的结合来检测所述抗原。

66.一种检测能与样品中的小鼠单克隆抗体31.1结合的结肠癌相关抗原的免疫分析方法包括:

- (a) 将所述样品与按权利要求53的抗体接触; 以及
- (b) 通过检测抗体的结合来检测所述抗原。

67.一种杀死携带结肠癌相关抗原的细胞的方法, 包括将有效量按权利要求53的抗体和一个具有细胞毒性的效应剂传递给所述细胞。

68.一种治疗怀疑患有乳癌带有能与小鼠克隆抗体33.28或31.1结合的抗原的病人的方法, 包括给所述病人用按权利要求58的组份的有效剂量。

69.一种抗人乳癌免疫疫苗, 包括有效量的按权利要求59的抗原或与传统的疫苗载体联接的它的活性片段。

70.一种抗人乳癌免疫疫苗, 包括有效量的人结肠癌相关抗原或与传统疫苗载体联接的并能与小鼠单克隆抗体33.28或31.1结合的它的活性片段。

71.一种人乳癌的免疫治疗方法, 包括给病人按需要用含有有效量按权利要求59的抗原的疫苗或与传统的疫苗载体联接的它的活性片段。

72.一种人乳癌的免疫治疗方法, 包括给病人按需要用含有有效量人结肠癌相关抗原的疫苗或与传统疫苗载体联接的并能与小鼠单克隆抗体33.28或31.1结合的它的活性片段。

73.一种诊断人乳癌的方法, 包括:

- (a) 从怀疑患有乳癌带有按权利要求59的抗原的病人取组织学标本;
- (b) 将标本与能识别所述抗原的单克隆抗体接触;
- (c) 对标本进行免疫组化染色; 以及
- (d) 根据染色检测抗原-抗体复合物的存在。

74.一种诊断人乳癌的方法, 包括:

(a) 从怀疑患有乳癌带有能与小鼠单克隆抗体33.28或31.1的抗原的病人取组织学标本;

- (b) 将标本与能识别所述抗原的小鼠单克隆抗体接触;
- (c) 对标本进行免疫组化染色; 以及
- (d) 检测抗原-抗体复合物的存在。

75.一种用于乳癌的免疫组化检测的试剂盒, 包括:

- (a) 小鼠单克隆抗体31.1和33.28及癌胚抗原的单克隆抗体;



- (b) 免疫过氧化物酶及二抗试剂;
- (c) 免疫过氧化物酶; 以及
- (d) 染色剂。

76. 一种特异性对人结肠癌相关蛋白抗原的单克隆抗体, 所述的抗原具有以下特性:

(i) 所述的单克隆抗体是认识所述抗原的蛋白成份的表位, 而不是所述抗原的糖成份表位;

(ii) 所述抗原在正常的人类组织中不能发现;

(iii) 所述抗原在除了卵巢癌细胞以外其它的人类癌细胞上不能发现; 以及

(iv) 所述抗原特异性地对人类具有免疫原性。

77. 按权利要求76的抗体, 该抗体是小鼠单克隆抗体33.28或是像33.28一样能特异性地结合在同样的结肠癌相关表位的抗体。

78. 按权利要求77的抗体, 所述结肠癌相关抗原是具有分子量约为61.1KD的蛋白。

79. 按权利要求76条抗体, 该抗体是小鼠单克隆抗体31.1或是像小鼠单克隆抗体31.1一样能特异性地结合在同样的结肠癌相关表位的抗体。

80. 按权利要求79的抗体, 所述结肠癌相关抗原是具有分子量约为72KD的蛋白, 所述结肠癌相关抗原是糖蛋白, 其蛋白成份的分子量为61.1KD。

81. 一种免疫治疗人卵巢癌的药物组份, 包括一个具有治疗有效量的按权利要求76的一种抗体及与之结合的一种药物可接受的载体。

82. 一种具有下列特征的人结肠癌相关蛋白抗原:

(i) 所述抗原的蛋白成份的表位能够在哺乳宿主体内产生抗体, 而所述抗原的糖成份的表位是不能产生所述抗体;

(ii) 所述抗原在正常人类组织中不能发现;

(iii) 所述抗原在除了卵巢癌细胞以外其它的人类癌细胞上不能发现; 以及

(iv) 所述抗原特异性地对人类具有免疫原性。

83. 按权利要求82的抗原, 所述抗原是具有分子量约为61KD的蛋白。

84. 按权利要求82的抗原, 所述抗原是具有分子量约为72KD的蛋白。
85. 按权利要求83的抗原, 所述抗原是特异性地与小鼠单克隆抗体33.28结合或是与像小鼠单克隆抗体33.28一样能特异性地结合在同样的结肠癌相关表位的抗体结合。
86. 按权利要求84的抗原, 所述抗原是特异性地与小鼠单克隆抗体31.1结合或是与像小鼠单克隆抗体31.1一样能特异性地结合在同样的结肠癌相关表位的抗体结合。
87. 一种按权利要求76的单克隆抗体的单克隆抗体。
88. 一种检测能与样品中的小鼠单克隆抗体33.28结合的结肠癌相关抗原的免疫分析方法, 包括:
- (a) 将所述样品与按权利要求76的抗体接触; 以及
  - (b) 通过检测抗体的结合来检测所述抗原。
89. 一种检测能与样品中的小鼠单克隆抗体31.1结合的结肠癌相关抗原的免疫分析方法, 包括:
- (a) 将所述样品与按权利要求76的抗体接触; 以及
  - (b) 通过检测抗体的结合来检测所述抗原。
90. 一种杀死携带结肠癌相关抗原的细胞的方法, 包括将有效量的按权利要求76的抗体和一个具有细胞毒性的效应剂传递给所述细胞。
91. 一种治疗怀疑患有卵巢癌带有能与小鼠单克隆抗体33.28或31.1结合的抗原的病人的方法, 包括对前述病人用按权利要求81的组份的有效剂量。
92. 一种抗人卵巢癌的免疫疫苗, 包括有效量的按权利要求82的抗原或与传统的疫苗载体联接的它的活性片段。
93. 一种抗人卵巢癌的免疫疫苗, 包括有效量的人结肠癌相关抗原或与传统疫苗载体联接的又能与小鼠单克隆抗体33.28或31.1结合的它的活性片段。
94. 一种人卵巢癌的免疫治疗方法, 包括给病人按需要用含有有效剂量按权利要求82的抗原的疫苗或与传统的疫苗载体联接的它的活性片段。

95.一种人卵巢癌的免疫治疗方法，包括给病人按需要用含有有效剂量人结肠癌相关抗原的疫苗或与传统疫苗载体联接的并能与小鼠单克隆抗体33.28或31.1结合的它的活性片段。

96.一种诊断人卵巢癌的方法，包括：

(a) 从怀疑患有卵巢癌带有按权利要求82的抗原的病人取组织学标本；

(b) 将标本与能识别所述抗原的单克隆抗体接触；

(c) 对标本进行免疫组化染色；以及

(d) 根据染色检测抗原-抗体复合物的存在。

97.一种诊断人卵巢癌的方法，包括：

(a) 从怀疑患有卵巢癌带有能与小鼠单克隆抗体33.28或31.1结合的抗原的病人取组织学标本；

(b) 将标本与能识别所述抗原的小鼠单克隆抗体接触；

(c) 对标本进行免疫组化染色；以及

(d) 检测抗原-抗体复合物的存在。

98.一种用于卵巢癌的免疫组化检测的试剂盒，包括：

(a) 小鼠单克隆抗体31.1和33.28及癌胚抗原的单克隆抗体；

(b) 免疫过氧化物酶及二抗试剂；

(c) 免疫过氧化物酶；以及

(d) 染色剂。

99.一种特异性对人结肠癌相关蛋白抗原的嵌合抗体，所述抗原具有如下的特征：

(i) 所述单克隆抗体是识别所述抗原的蛋白成份的表位，而不是所述抗原的糖成份的表位；

(ii) 所述抗原在正常的人类组织中不能发现；

(iii) 所述抗原在除了结肠癌细胞以外其它的人癌细胞上不能发现；

以及

(iv) 所述抗原特异性地对人类具有免疫原性。

100.一种按权利要求99的嵌合抗体，该嵌合抗体是小鼠/人嵌合抗体Chi#1。

101. 按权利要求100的嵌合抗体, 所述结肠癌相关抗原是具有分子量约为72KD的蛋白。

102. 一种免疫治疗人结肠癌的药物组份, 包括一个具有治疗有效量的按权利要求99的一种抗体, 及与之结合的一种药物可接受的载体。

103. 按权利要求101的抗原, 所述抗原是特异性地与嵌合抗体Chi#1结合或是与像嵌合抗体Chi#1一样能特异性地结合在同样的结肠癌相关表位的嵌合抗体结合。

104. 一种抗按权利要求99的嵌合抗体的单克隆抗体。

105. 一种检测能与样品中的小鼠/人嵌合抗体Chi#1结合的结肠癌相关抗原的免疫分析方法, 包括:

(a) 将所述样品与按权利要求99的抗体接触; 以及

(b) 通过检测抗体的结合来检测所述抗原。

106. 一种杀死携带结肠癌相关抗原的细胞的方法, 包括将有效量的按权利要求99的抗体和一个具有细胞毒性的效应剂传递给所述细胞。

107. 一种治疗怀疑患有结肠癌带有能与小鼠/人嵌合抗体Chi#1结合的抗原的病人的方法, 包括给所述病人用按权利要求102的组份的有效剂量。

108. 一种抗人结肠癌免疫疫苗, 包括有效量的人结肠癌相关抗原或与传统疫苗载体联接的并能与小鼠/人嵌合抗体Chi#1结合的它的活性片段。

109. 一种人结肠癌的免疫治疗方法, 包括给病人按需要用含有有效量人结肠癌相关抗原的疫苗或与传统疫苗载体联接的并能与小鼠/人嵌合性抗体Chi#1结合的它的活性片段。

110. 一种诊断人结肠癌的方法, 包括:

(a) 从怀疑患有结肠癌带有按权利要求15的抗原的病人取组织学标本;

(b) 将标本与能识别所述抗原的嵌合抗体接触;

(c) 对标本进行免疫组化染色; 以及

(d) 根据染色检测抗原-抗体复合物的存在。

111. 一种诊断人结肠癌的方法, 包括:

(a) 从怀疑患有结肠癌带有能与小鼠/人嵌合抗体Chi#1结合的抗原的病人取组织学标本;

- (b) 将标本与能识别所述抗原的小鼠/人嵌合抗体接触;
- (c) 对标本进行免疫组化染色; 以及
- (d) 检测抗原 - 抗体复合物的存在。

112. 一种用于结肠癌的免疫组化检测的试剂盒, 包括:

- (a) 小鼠/人嵌合抗体Chi#1和癌胚抗原的嵌合抗体;
- (b) 免疫过氧化物酶及二抗试剂;
- (c) 免疫过氧化物酶; 以及
- (d) 染色剂。

# 说明书

---

## 抗人结肠癌相关抗原的单克隆抗体及其应用

这一申请是美国专利申请序号为 No. 08 / 159, 836 ( 1993 年 11 月 30 日申请 ) 的部分继续申请。而 No. 08/159,836 是美国专利申请序号为 N08/117,430(1993 年 9 月 7 日申请), 的部分继续申请, 而 No.08/117,430 又是美国专利申请序号为 No.07/670,816 ( 1991 年 3 月 18 日申请) 的部分继续申请, 而 No.07/670,816 又是美国专利申请序号为 No. 07/176, 337 (1988 年 3 月 31 日申请) 的部分继续申请, 后三项专利目前都已经放弃。

### 发明的背景

#### 发明的领域

这项发明涉及免疫学和医学两个领域。主要指一类新的杂交瘤细胞株, 这类细胞株所分泌的单克隆抗体能特异性地结合临床上所谓的结肠癌相关抗原。这种单克隆抗体对体内免疫检测和免疫治疗是有用的。同时还可以用来检测和纯化结肠癌相关抗原。

#### 技术背景

在癌的发生过程中, 在细胞上出现许多细胞表面分子或标记。这种肿瘤相关标记包括: 癌胚蛋白, 新糖蛋白, 鞘脂以及原来表面蛋白质的修饰。而这些新产生的和结构改变了的分子经常从肿瘤细胞表面脱落下来, 并出现在血清或其它体液中。对这些物质或“肿瘤标志”的检测可为诊断或监测癌性病变的发生发展提供依据。

早期的动物实验发现, 在这些肿瘤标志中, 有一类细胞膜蛋白或糖蛋白抗原具有免疫原性。进一步的实验发现, 当癌症病人的原发灶被手术切除后, 这种抗原能够有效地阻止新的癌组织的生长。

Hollinshead 和 Stewart 用肺癌患者的癌组织制成比较纯的制剂试图将比较相似的肿瘤相关抗原用于临床治疗( Stewart, T.H.M. et al. , Ann. N.Y.Acad. Sci. 277:436(1976)). 以后这一研究工作又进一步开展到黑色素瘤和结肠癌患者, 而不同种类的同种异型较纯制剂是和弗氏佐剂同时使用

的。(Hollinshed, A.C. et al. *Cancer* 49:1387(1982);Hollinshead, A.C. et al., *Cancer* 56:480(1985)).

同时使用弗氏佐剂的原因是由于科学家发现, 这种佐剂与正常组织抗原的共同使用, 可以引起动物受体强烈的自身免疫反应。相反, 若没有同时使用这一佐剂, 则没有副作用的发生。因此, 科学家认为佐剂可以促进宿主巨噬细胞的抗原加工, 并延长抗原在作用部位的反应时间(请查阅 Roitt, I., *Essential Immunology*, 6th Ed., Blackwell Scinetific Publication, Oxford(1988)).

正是由于以上的这些实验结果, 科学家开始尝试着在临床上用特异的人类肿瘤细胞膜的蛋白和糖蛋白作为肿瘤疫苗。接着, 各种各样已被分离的肿瘤相关抗原能够延长患者的存活期, 甚至在一些实验中抑制了转移灶肿瘤的生长。

随着单克隆抗体技术的产生与完善, 科学家便能得到纯化了的抗体, 并以此来纯化和定义不同的肿瘤标志性分子和肿瘤相关抗原, 最后用这些抗体进行免疫诊断和免疫治疗。许多单抗对肿瘤抗原表现出不同程度的选择性, 其中有些抗原可以同时出现在多种不同类型的肿瘤上, 而另一些则表现出很强的肿瘤特异性, 下面就介绍一些:

Herlyn 及其同伴(Proc. Natl. Acad.Sci.USA 76:1438 (1979))通过用人类直肠结肠癌(CRC)细胞来免疫小鼠后得到两种单抗, 这两种单抗都能选择性地与人类 CRC 细胞相互作用。现在已经证明其中一个单抗, 1083 - 17 (17 - 1A 的前体),是与 41KD 的糖蛋白反应的。

Herlyn 等(J.Clin. Immunol.2:135(1982))得到了一个抗 SW116 细胞株膜抗原的单抗, 用这个单抗可以检测体循环中的 CRC 相关抗原。单抗 19 - 9 和 52a 能识别单唾液酸神经节苷脂抗原(Magnani,J.L.等, science 212:55(1981), 在临床上则能与 12 种细胞株中的 8 种、一种胃癌细胞、一种胰腺癌细胞反应。单抗 C414 能与 4/6 的培养 CRC 细胞、胃癌细胞反应。并且, 单抗 19 - 9 和 52a 与肿瘤细胞的结合会被 CRC 患者的血清所抑制。然而, 胃癌患者的血清和胰腺癌患者的血清比 CRC 患者的血清更易于抑制单抗与肿瘤细胞的结合。

1986 年, Girardet 及其同伴 (J. Immunol. 136: 1497 - 1503 (1986))

发现了抗人类结肠癌的单抗。L - D1 单抗能与一种 41KD 的糖蛋白反应，这种糖蛋白可能就是单抗 1083 - 17 - 1A 所识别的抗原(Herlyn et al,1979,参见前述)。单抗 L - C5 则能沉淀分子量分别为 43, 45, 47 和 53 KD 的 LoVo 结肠癌细胞来源的蛋白。L - D1 同时也能与子宫颈癌株反应，L - C5 乳腺癌细胞株反应，但它们与胰腺癌瘤细胞反应如何还不知道。

1987 年，Greiner 及其同伴 ( Science 235 :895-898 (1987) )发现了单抗 06.2, 它能与一种 90 KD 的糖蛋白反应。而在 75 - 80 % 的乳腺癌患者和 90 % 以上的结肠癌患者体内发现了这种糖蛋白的存在。

Sakamoto 及其同伴则发现了一系列通过其他途径能够诊断并治疗人类结肠癌的单抗 (美国专利 4,579,827 (4/1/86) )。而所有这些单抗中没有一种能与分子量分别为 61 或 72 KD 的人类结肠癌相关抗原蛋白反应的性能，正是这一性质使其有别于我们发明的抗体。而且，Sakamoto 的单抗与我们发明的单抗在特异性上没有任何相同之处。

1986 年，Delaloye 及其同事 ( J.Clin. Invest.77 :301 (1986) )用 CEA 特异性的单抗在体内检测结肠直肠癌，具体是借助与 <sup>123</sup>I 标记片段和计算机模拟其释放出的同位素的拓扑结构。然而，这种单抗与我们所发明的单抗没有任何关系。

1986 年，Douillard 及其同事 (Hybridoma 5, Suppl. 1 :S139 (1986))发现了单抗 17 - 1A, 以及它在体外对胃 - 小肠腺癌细胞的毒性，而在某种程度上，单抗 17 - 1A 在免疫治疗试验中是成功的。单抗 17 - 1A 能够识别 38 - 41 KD 的蛋白并有广泛的反应性，但它对结肠癌肿瘤并无特异性，这就表明了它与我们所发明的抗体的明显的差别。

Scannon 等美国专利 4,590,071 ( 5/20/86 )公开的单抗就结合了诸如 ricinA 链的毒蛋白，这些结合成份有治疗黑色素瘤的功能，而这一单抗能特异性识别黑色素瘤抗原。然而，还没有发现针对结肠癌抗原和抗体的单抗，以及这类单抗的使用。

Hollinshead 等在 1972 年( Science 177 :887-889 (1972))已经报道了抗原的相对较纯的制备物，这些抗原制备物含有免疫原性的结肠癌细胞膜抗原，也正是我们的抗体所识别并结合的部位。



在临床上如何评价上述抗原制备物的价值,也已经由 Hollinshead 等(参见前述 1985 )报道了, 主要包括该抗原制备物的免疫原性, 以及通过增强特异性主动免疫以延长患者的存活期。

在 Intl. Symp. Biotech. in Clin. Med., Rome, Italy, April 13-15, 1987 上, Tsang 等在“抗人类结肠癌相关抗原的单抗”一文中简述了本发明的工作。这篇参考文献的公开发表离本专利申请的基本原始申请专利(美国专利申请序号为 07/176,337)的时间还不足一年。

### 发明的概要

本发明的发明者已经制成了能针对结肠癌相关抗原的鼠源单抗和鼠-人嵌合抗体, 而结肠癌相关抗原被认为对人类具有免疫原性。这些在发明者实验室内分离得到的抗原是不同于前面所讲的结肠癌抗原的, 理由如下: 1. 单抗所识别的表位并不是肿瘤相关糖蛋白的糖部分, 而是蛋白部分; 2. 这一抗原在正常的组织中并不表达; 3. 这些抗原具有肿瘤特异性, 存在于结肠癌, 乳房癌和卵巢癌的肿瘤组织内; 4. 这些抗原能同时通过细胞反应和体液反应来增强宿主的抗肿瘤的免疫能力, 因此它们对于人类是有免疫活性的; 5. 抗原的免疫原性对于人类是具有特异性的, 因为只有结肠癌, 乳腺癌和卵巢癌的患者才表现出对这些抗原的免疫学特异性, 而对其它的肿瘤则没有特异性, 这已经通过体内体外的免疫学实验证实了。

本发明的单抗和嵌合抗体能应用于结肠癌, 乳腺癌和卵巢癌的诊断与治疗。例如: 描绘肿瘤的转移; 传递细胞毒性成份至肿瘤部位; 激活诸如抗体依赖性细胞毒性(ADCC)或者补体依赖性细胞毒性(CDC)的宿主效应机制来直接杀死肿瘤细胞。

本发明是一种针对结肠癌相关抗原蛋白的单克隆抗体, 而这种结肠癌相关抗原对人类具有特异的免疫原性, 在正常的人体组织或其它的肿瘤(除了结肠癌, 乳腺癌和卵巢癌以外)内并不能发现这些抗原。另外本发明还包括抗原结合片段或抗体的衍生物。

本发明的另一部分是特异性针对一种人类结肠癌相关蛋白抗原的嵌合抗体, 而在正常的人体组织或其它的肿瘤(除了结肠癌以外)内并不能发现这种抗原。

在一实施例中, 该抗体对一分子量约为 61KD 的 CCAA 蛋白特异。在

另一实施例中，该抗体对一分子量为 72KD 的 CCAA 蛋白特异。在一最佳实施例中该抗体是小鼠单克隆抗体 33.8 或 31.1，或者是与 33、28、31.1 一样能特异地结合在相同的结肠癌相关抗原的抗体。在另一最佳实施例中，抗体是一种小鼠/人嵌合抗体 Chi#1，它如同 31.1 那样能特异性地与相同的结肠癌相关表位结合。

本发明中的抗体是能在固定在固相物上。

本发明包括上述的经标记后能检测的抗体，如同位素标记的抗体。

在附加的实施例中，上述的抗体还能与具有细胞毒性的放射性核素、药物、蛋白结合。

又在另一个实施例中，本发明还包括能抗上述抗体的单抗，即第二次产生的单抗。

在一更深一层的实施例中，本发明还包括第三次产生的单抗，即对抗上述二抗的单克隆抗体。

本发明所针对的结肠癌相关抗原也是唯一的，理由如下：1. 单抗所识别的表位并不是肿瘤相关糖蛋白的糖部分，而是蛋白部分；2. 这一抗原在正常的组织中并不表达；3. 这些抗原具有肿瘤特异性，存在于结肠癌，乳房癌和卵巢癌的肿瘤组织内；4. 这些抗原能同时通过细胞反应和体液反应来增强宿主的抗肿瘤的免疫能力，因此它们对于人类是有免疫活性的；5. 抗原的免疫原性对于人类是具有特异性的，因为只有结肠癌，乳腺癌和卵巢癌的患者才表现出对这些抗原的免疫学特异性，而对其它的肿瘤则没有特异性，这已经通过体内体外的免疫学实验证实了。

到目前为止，所有其它纯化的并已经使用的抗原都不能引发细胞性或体液性免疫反应。

本发明还为结肠癌、乳腺癌和卵巢癌提供了有效的药物组份，该组份是包含有与具有细胞毒性的放射性核素，具有细胞毒性的药物或具有细胞毒性的蛋白结合的在一合适的赋形剂中如上述的抗体、片段或衍生物。

本发明还包括一种免疫检测方法，可以检测样品中能够与鼠单抗 33.28、31.1 或 Chi#1 结合的结肠癌相关抗原的存在。这包括：

(a) 用上述抗体接触样品；以及

(b) 通过检测所结合的抗体来检测抗原的多少。

在另一个最佳实施例中，本发明还提供了用成象的方法来检测宿主中结肠癌相关抗原的存在，这包括：

- (a) 将标记好的抗体接触宿主；以及
- (b) 检测抗原。

本发明包括一个杀死携带有结肠癌相关抗原的细胞的方法，这包括：

- (a) 将上述抗体及一种具有细胞毒性的效应剂传递给细胞；以及
- (b) 杀死细胞。

执行杀死细胞的任务的成份可以是补体，或是在 ADCC 中被激活的效应细胞。也可以是有直接发挥杀死作用的已经结合了细胞毒性成份(放射性核素、药物、蛋白)的标记的抗体。

本发明还提供一种治疗方法来治疗被怀疑已经患上了结肠癌、乳腺癌、卵巢癌的人，这些人往往携带了能与 33.28、31.1 单克隆抗体、Chi#1 结合的抗原，这一治疗可以用如上所述的药物组份的有效剂量。

另外还提供了用于临床免疫治疗结肠癌、乳腺癌、卵巢癌的生产具有免疫原性的组份的方法，这包括：

- (a) 制备一个含有能与 33.28 单抗或 31.1 单抗或 Chi#1 抗体结合的抗原的肿瘤或细胞系的细胞膜提取物；以及
- (b) 运用上述抗体用亲和纯化的方法分离抗原。

这样就能生产具有免疫原性的组份。

在另一实施例中，本发明还包括应用上述的抗原来制成疫苗。

本发明也包括一个检测和诊断结肠癌、乳腺癌、卵巢癌的方法，具体通过标记结合在人类结肠癌相关抗原上生物单抗或嵌合抗体。

在另一实施例中，本发明也包括可以选择性地鉴定结肠癌、乳腺癌、卵巢癌的试剂盒。

### 图表的简要描述

图 1 是一个 Hollinshead “疫苗”的 HPLC 洗脱液特征图象的记录图形，所谓的“疫苗”是指一个部分纯化的结肠癌细胞膜的提取物。

图 2 是一个结肠癌相关抗原的 HPLC 洗脱液的记录图形，这个抗原是通过图 1 中峰 4 内的物质进行亲和纯化所得到的。

图 3 的图象描述单抗 31.1 在异体移植了人类肿瘤 LS - 174T 后的裸

鼠体内的生物分布。

图 4 则是单抗 33.28 在异体移植了人类肿瘤 LS - 174T 后的裸鼠体内的生物分布图象。

### 最佳实施例的说明

本发明提供了抗体，包括单抗和嵌合抗体，这些抗体特异性地能结合具有免疫原性的人类结肠癌相关抗原(CCAA)，这些抗原是天然的蛋白。这些抗体用于诊断和治疗已经患有或正在生成结肠癌、乳腺癌、卵巢癌的病人。

此项发明不仅仅提供了鼠单抗，而且还有由同一个单抗的 V 区所组成的嵌合抗体，它同样能够识别 CCAA 区段。

这里的“区段”是指能被抗体识别并结合的那部分分子。通常，区段由具有化学活性的界面分子簇所构成，比如氨基酸、糖链，这些分子有着特殊的三维结构和特殊的电荷特性。本发明所关注的区段由氨基酸构成。

这里的“抗原”是指能够被一个抗体结合的分子或部分分子，它们还能诱导动物产生能结合到其自身区段上去的抗体。一个抗原可以含有一个或一个以上区段。上述的反应是高度选择性的，抗原只能与相关的抗体反应。

这里的“抗体”是包括完整的免疫球蛋白分子、及它的片段和衍生物，例如 Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv，它们都能与抗原结合。这些抗体片段缺少完整抗体的 Fc 片段，在血液中清除较快，而且比其他完整抗体少了非特异性组织结合(Wahl et al., J.Nucl.Med. 24 :316-325 (1983))。这些片段都是应用很成熟的方法从完整的抗体上剪切下来的，比如应用木瓜蛋白酶和胃蛋白酶就能分别得到 Fab 和 F(ab')<sub>2</sub> 片段。

一个抗体的“衍生物”包含非蛋白结构的化学组分。蛋白的共价修饰包含于这发明中。通过使抗体的靶氨基酸残基与能和选择的侧链或末端残基作用的有机衍生物发生反应，此类修饰即可引入分子内。例如，双功能药物的衍生对抗体或片段与非水溶性支持物或其它大分子载体的连接非常有用。

“疫苗”是指一类用于刺激生物的免疫系统来提供对抗未来感染药物侵害的免疫防护的药物，本发明预期的疫苗对病人的给药可以采用任何已

知或标准技术。这些包括口服，肠插管或支气管-鼻喷雾。其他投药方法，如使微生物达到人或动物血流的静脉注射，在微生物载体不能复制时是可接受的。

本发明的抗体是新颖的。它们是第一个已知的单克隆抗体(mAb)，并且是针对人体内肿瘤抗原致免疫性的 CCAA 特异性的嵌合抗体。现有发明的抗体识别的抗原可诱发结肠癌、乳腺癌和卵巢癌病人的免疫反应，但对其它类型的癌症病人无反应。这些抗原的免疫原性主要表现为细胞介导的免疫性，并可通过以下方法检测：体内延迟皮肤过敏分析 ("皮肤测试")或对外体各种特异性淋巴细胞反应的分析，如淋巴细胞增殖或转移抑制分析。关于免疫原性的普通原则和各种特异性免疫反应的分析参见下列查考文献： Roitt, I., *Essential Immunology*, 6th Ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford(1988); Roitt, I. et al., *Immunology*, C.V.Mosby Co., St.Louis, MO(1985); Klain,J., *Immunology*, Blackwell Scientific Publications, Inc., Cambridge, MA(1990); Klain, J., *Immunology; The Science of Self-Nonself Discrimination*, John Wiley & Sons, New York, NY(1982); Paterson, P.Y., *Textbook of Immunopathology*, Grune and Stratton , New York, (1986).

在一最佳实施例中，本发明抗体是鼠源单克隆抗体指定为 33.28。在另一最佳实施例中，抗体是鼠源单克隆抗体指定为 31.1。在再一个最佳实施例中，抗体是识别由 33.28 确认的表位的嵌合抗体。在另再一实施例中，抗体是识别由 31.1 确认的表位的嵌合抗体。

本发明的嵌合抗体包含不同免疫球蛋白 (Ig)的重链 (H)和轻链 (L)。嵌合 H 链包含一个来自特异性对由 33.28 或 31.1 识别的表位的非人体抗体的 H 链的抗原结合区，它至少与人体 H 链 C 区一部分连接(C<sub>H</sub>)。

一个最佳的嵌合 L 链包含一个来自 33.28 或 31.1 的单克隆抗体的 L 链的抗原结合区，它至少与人体 L 链 C 区的一部分连接(C<sub>L</sub>)。

或者，一个最佳的嵌合 H 链包含一个来自 33.28 或 31.1 的单克隆抗体的 L 链的抗原结合区，它至少与人体 L 链 C 区的一部分连接(C<sub>L</sub>)。

文中的术语 "抗原结合区"是指抗体分子中与抗原作用，并提供抗体特异性和抗原亲和性的氨基酸残基部分。抗体区域包括对维持抗原结合残

基的适当构型而必需的 "框架" 氨基酸残基。

文中的术语 "嵌合抗体" 包括单价、二价或多价免疫球蛋白。一个单价嵌合抗体是由通过二硫键连接的嵌合 H 和 L 链组成的二聚体。一个二价嵌合抗体是由两个至少通过一个二硫键连接的 HL 二聚体构成的四聚体。同样也可获得多价嵌合抗体, 例如, 通过 H 链 C 区的聚合 (如, IgM H 或  $\mu$  链)。

本发明也提供 mAb 或嵌合抗体的衍生物。它包括由为产生功能类似于 Ig 片段的分子类型而截短或修饰的基因所编码的蛋白。这种修饰包括加入编码细胞毒蛋白如植物和细菌毒素的基因序列, 但不局限于此。这些片断和衍生物可来源于原核和真核宿主, 类似本文中描述的重组方式。它们可来源于化学过程, 如完整 Ig 分子的蛋白切割, 或文献中讲述的其它化学修饰或衍生方式。此类衍生组分可提高溶解性、吸收率、生物半衰期和其它有益特性, 同样也可选择地消除或减弱抗体蛋白的任何有害副作用。能够产生此类作用的组分已有报道。(见文献 Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th ed., Hack Publishing Co., Easton, PA(1980))。

具有相同或不同 V 区结合特异性的嵌合 H 和 L 链的抗体、片段或衍生物可通过不同多肽链的连接来制备 (见文献 Sear 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72:353-357(1975))。通过这种方法, 表达嵌合 H 链 (或其衍生物) 的宿主与表达嵌合 L 链 (或其衍生物) 的宿主进行分别培养, 在培养基质中链自发连接, 然后恢复装配的 Ig、片段或衍生物。

产生对 CCAA 特异的 mAb 的小鼠杂交瘤细胞, 如本发明的 33.28 和 31.1 的 mAb, 是通过小鼠融合配偶体细胞, 如 SP2/0 细胞, 与 CCAA 免疫化小鼠的脾脏细胞融合而成。

小鼠可通过含有目的抗原的粗或半纯制备物免疫化, 如 Hollinsheed "疫苗" 是半纯化的结肠癌细胞膜制备物。为使小鼠免疫化, 可采用多种传统方法。例如小鼠可接受抗原制备物的基本和激发(boosting)免疫法。

细胞融合可通过免疫领域熟知的标准程序完成 (见文献 Kohler and Milstain, Nature 256: 495-497 (1975) and 美国专利 No.4,376,110; Hartlow, E. et al, supra; Campbell, A., "Monoclonal Antibody Technology" In: Laboratory

Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Volume 13(Burdon, R., et al, eds.), Elsevier, Amsterdam(1984); Kennett et al., Monoclonal Antibodies (Kennett et al., eds. pp.365-367, Plenum Press, NY,1980); da St. Groth, S.F., et al., J. Immunol. Meth. 35; 1-21(1980); Galfre, G., et al., Methods Enzymol. 73:3-46(1981); Goding, J.W. 1987, Monoclonal Antibodies; Principles and Practice, 2nd ed. Academic Press, London, 1987 ).

融合配偶体细胞系和融合、选择杂交瘤细胞以及筛选 mAb 的方法已很成熟。(见文献 Hartlow,E. et al.,Supra; Kawamoto,T. et al, Meth. Enzymol. 121:266-277(1986); Kearney, J.F. et al., J. Immunol.123 :1548-1550(1979); Kilmartin, J.V. et al, J. Cell Biol. 93:576-582(1982); Kohler, G. et al., Eur. J. Immunol. 6:292-295(1976); Lane,D. P. et al., J. Immunol. Meth. 47:303-307(1981); Mueller, U.W. et al., J. Immunol. Meth. 87:193-196(1986); Pontacorvo, G., Somatic Cell Genet. 1:397-400(1975); Sharo.J.,et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:1420-1424(1979); SHulman, M. et al, Nature 276:269-270(1978); Springer, T.A.(ed), Hybridoma Technology in the Biosciences and Medicine, Plenum Press, New York, 1985; and Taggart, R.T. et al., Science 219:1228-1230(1982)).

本发明的 mAb 可通过以下方法大量制备: 向小鼠腹腔注射分泌抗体的杂交瘤细胞, 适当时间之后, 收集含有高效价 mAb 的腹水, 并分离 mAb。或者, 可通过体外培养杂交瘤细胞并从细胞培养基中分离 mAb。

编码本发明嵌合抗体的 C 区的人体基因来源于表达、产生人体 Ig 的细胞。人体 H 链 C 区可来源于任何已知种类或同型的人体 H 链, 包括  $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$  或  $\theta$ 。由于 H 链类型负责抗体的多种效应功能, 选择 H 链 C 区应受目的效应功能的指导, 如补体固定或抗体依赖性细胞毒性。理想的 H 链 C 区来源于  $\gamma$  1(IgG1),  $\gamma$  3 (IgG3),  $\gamma$  4 (IgG4)和  $\mu$  (IgM)。

人体 L 链 C 区可来源于人体同型 L 链, 卡巴或  $\lambda$ 。

编码人体 IgC 区的基因可通过标准克隆技术从人体细胞中获得 ( Sambrook.J. et al, Molecular cloning; A Laboratory Manual, 2 nd Edition, Cold Spring Harbor, Press, Cold Spring Haxbor,NY(1989))。人体 C 区基因存在于知表达两类 L 链和五类 H 链的基因克隆中。嵌合抗体片段, 如 F(ab')<sub>2</sub>

和 Fab, 可通过设计经适当截短的嵌合 H 链基因而获得, 例如, 编码 F(ab')<sub>2</sub> 片段 H 部分的嵌合基因包括编码 CH1 区和 H 绞链区的 DNA 序列, 尾随一个翻译终止密码子以产生截短分子。

通常, 现有发明的嵌合抗体是通过克隆编码 CCAA 特异性抗体的 H 和 L 链抗原结合区的 DNA 片段而制备, 优先是非人体基因, 最佳的是 33.28 或 31.1 中的基因, 然后把这些片段同编码人体 H 链 C 区和 L 链 C 区的 DNA 片段相连, 以制备编码嵌合 Ig 的基因。

因此, 在一最佳实施例中, 创造的融合基因至少编码一个非人体起源的 Ag 结合区, 如带有连接片段 (J) 的功能重排的 V 区, 并且至少与一个编码部分人体 C 区的第二 DNA 片段相连。这种融合可应用 PCR 完成如由 Ternando 等所报道的(见文献 Miami Symp.Short Reports 3:88,1993)。

编码抗体结合区的 DNA 可以是基因组 DNA 或 cDNA。选取染色体基因片段作为编码小鼠 V 区抗原结合片段的 DNA 源的一种方便选择就是应用 cDNA 构建嵌合 Ig 基因(见文献 Liu et al.,Proc.Natl. Acad. Sci. USA 84:3439(1987)和 J.Immunology 139:3521(1987))。cDNA 的应用要求适合于宿主细胞的基因表达元素应与基因结合, 以获得目的蛋白的合成。应用 cDNA 序列比基因组序列(含内含子)更有利, 因为 cDNA 序列可在缺少适当 RNA 剪接系统的细菌或其它宿主中表达。

因此, 在应用编码抗体 V 区的 cDNA 方式中, 制备嵌合抗体的方法可概括为如下几步:

1. 从产生 mAb 的细胞系中分离 mRNA, 克隆和 cDNA 产物来源于此。
2. 以纯化 mRNA 制备全长 cDNA 文库, 从中适当的 L 和 H 链的 V 区基因片段可以: (I) 以适当探针鉴定; (II) 测序; (III) 与 C 区基因片段匹配。
3. 由 cDNA 制备物和克隆制备 C 区基因片段。
4. 如上所述, 通过连接克隆的特异 V 区基因和克隆的人体 C 区基因, 可构建编码完整的 H 或 L 链的序列。
5. 在选择的宿主中, 包括原核和真核细胞, 表达和制备嵌合 L 和 H 链。



所有 Ig H 和 L 基因及它们编码的 mRNA 的一个共同特征就是 J 区。H 和 L 链的 J 区有不同的序列，但序列同源性较高(>80%)，尤其在 C 区附近。此同源性在这种方法中得到了应用，并且 H 和 L 链的 J 区的相同序列可用来设计寡核苷酸引物，用于在 J 区中引入有用的限制位点，以便以后 V 区片段与人体 C 区片段的连接。

从人体细胞中制备的 C 区 cDNA 载体可经定位诱变在人体序列的相似位置加入限制位点。例如，人们可克隆完整的人体卡巴链 C 区和完整的人体  $\gamma - 1$ C 区。在这种情况下，以基因组 C 区克隆作为 C 区载体源的其他方法，不能使这些基因在缺乏清除插入序列的必需酶的细菌系统中表达。克隆的 V 区片段被剪出并连接于 L 或 H 链的 C 区载体。或者，人体  $\gamma - 1$ C 区可如此修饰：引入终止密码子，进而产生编码 Fab 分子的 H 链部分的基因序列。这样，带有 V 和 C 区的编码序列可转移入适当的表达载体中，用来在适当的宿主如原核和真核细胞中进行表达。

如果连接导致一个连续地可翻译序列，而没有改变或中断三联子阅读框架，两个 DNA 编码序列可称为是“可操作地连接”。如果此连接导致基因表达元素的正常功能，从而使 DNA 编码序列表达，那么此 DNA 编码序列就被可操作地连接于该基因表达元素了。

表达载体包括质粒或其它载体。其中较佳的是携带含恰当嵌入限制位点的功能完整的人体 H 或 L 链 C 区序列的载体，以便任何带有适当粘性末端的 H 或 L 链 V 区序列可轻易地插入。这样，含人体 H 或 L 链 C 区序列的载体就作为在任何适当宿主中表达任何目的完整 H 或 L 链的中间物。

典型地，小鼠-人体抗体可从构建物中天然的小鼠 H 和 L 链 V 区的染色体基因启动子驱动基因来合成；剪接通常出现于小鼠 J 区的剪接供点和人体 C 区前剪接受点之间；也可出现于人体 H 链 C 区内剪接区域之间；聚腺苷酸化和转录终止发生于人体天然染色体编码区位点的下游。

对 cDNA 基因表达有用的基因表达元件包括：(a)病毒转录启动子和它们的增强子元件，如 SV40 早期启动子((见文献 Okayama H. et al, Mol. Cell Biol. 3 :280(1983)), 鲁氏肉瘤病毒 LTR (见文献 Gorman.C,等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:6777(1982)) 和 Moloney 小鼠白血病病毒 LTR (见文献

Grosschedd, R. et al, Cell 41:885(1985) )。 (b) 衍生于 SV40 晚期区域的剪接区域和聚腺苷酸化位点 (见文献 Okayama 等, 参见前述)。(c) 聚腺苷酸化位点, 如 SV40 内 (见文献 Okayama 等, 参见前述)。

Ig cDNA 基因可如此表达 (见文献 Liu 等, 参见前述, 及 Weidle 等, Gene 51: 21(1987))): 以 SV40 早期启动子及其增强子, 小鼠 Ig H 链启动子的增强子, SV40 晚期区域 mRNA 剪接, 兔  $\beta$ -珠蛋白插入序列, Ig 和兔  $\beta$ -珠蛋白聚腺苷酸化位点和 SV40 聚腺苷酸化位点作为表达元件。对于由部分 cDNA, 部分基因组 DNA 组成的 Ig 基因 (见文献 Whittle 等, Protein Engineering 1:499(1987)), 转录启动子可以是人体 "CMV", 衍生于 CMV 和小鼠/人 Ig 启动子的增强子, 或衍生于天然染色体 Ig 序列的 mRNA 剪接和聚腺苷酸化区。

在一实施例中, 为了在啮齿类细胞内表达 cDNA, 转录启动子是病毒 LTR 序列, 转录启动子的增强子或是小鼠 Ig H 链增强子, 或是病毒 LTR 增强子, 剪接区是包含大于 31bp 的内含子, 并且聚腺苷酸化和转录终止区来自对应于合成 Ig 链的天然染色体序列。在其它方式中, 编码其它蛋白的 cDNA 序列结合于上述表达元件, 以获得哺乳细胞中蛋白的表达。

每个融合基因装配或插入于一个表达载体, 然后用一个编码嵌合 H 或 L 链的基因进行单独转染能够表达嵌合 Ig 链基因产物的受体细胞; 或者用一个编码嵌合 H 和 L 链的基因共同转染。在允许掺入基因表达的条件下培养转染的受体细胞, 并从培养物中恢复表达的 Ig 链、完整抗体或片段。在实施例中, 编码嵌和 H 和 L 链的融合基因或其部分, 装配于不同的表达载体, 再用来共同转染受体细胞。

每个载体可包含两个选择基因, 一个用于细菌系统的选择, 另一个用于真核系统的选择, 因此每个载体具有不同对基因。这个策略产生了细菌系统内融合基因的指导生产、允许扩增的载体。进而, 此类在细菌宿主中制备和扩增的基因可用于共同转染真核细胞, 并允许携带目的转染基因的共转染细胞的选择。

在细菌系统中可以选择使用的基因有抗氨苄青霉素基因和抗氯霉素基因。在真核转染中选择基因以黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶基因 (gpt) 和 Tn5 磷酸转移酶基因 (neo) 为好。选择表达 gpt 的细胞的依据是这一基因

所编码的酶以黄嘌呤作为底物来合成嘌呤核苷酸，而同类的内源性的酶则不然。在含有霉酚酸的培养基上，单磷酸次黄嘌呤无法转化为单磷酸黄嘌呤和黄嘌呤，只有表达了gpt的细胞方可存活。neo的产物阻止了G418和新霉素类抗生素对蛋白质合成的抑制作用。

这二种方法可同时选用亦可顺序进行以使免疫球蛋白链基因由二种不同的DNA载体介导进入真核细胞表达。但真核细胞不需要不同的选择标记。一条H链载体和一条L链载体各有一个同样的选择标记，可以同时转染。筛选出未转染的细胞后，克隆的大部分将包含完整的含H和L链载体的拷贝。

或者，编码嵌合性H和L链的融合基因可能装配在同一表达载体上。

对于表达载体的转染和嵌合性抗体的产生，受转染的细胞系以骨髓瘤细胞优先。骨髓瘤细胞可以合成、聚集和分泌有转染的免疫球蛋白基因编码的免疫球蛋白并具备使免疫球蛋白糖基化的机制。而特别优先的受转染的细胞系是Ig-non-producing骨髓瘤细胞SP2/0(ATCC #CRL 8287)。SP 2/0只产生转染的基因编码的免疫球蛋白。骨髓瘤细胞可培养获得，或接种于小鼠的腹腔中生长，分泌的免疫球蛋白可以从腹水中获得。其它合适的受转染细胞包括淋巴细胞比如人或非人类来源的B淋巴细胞，人类或非人类来源的杂交瘤细胞，或种间的异种杂交瘤细胞。

本发明的携带嵌合抗体的表达载体可用不同的方法导入合适的宿主细胞。这些方法包括生物化学方法，如转化、转染、连接，原生质融合、钙磷酸沉淀法，多价阳离子试剂法，如二乙胺乙基葡聚糖(DEAE)，及其它的物理机械法，如电穿孔法、直接微量注射法和微投射物轰击法(Johnston et al, Science 240:1538(1988)).将DNA导入淋巴细胞的较好的方法是电穿孔法(Dotter et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:7161(1984); Yoshikawa, K et al, Jan. J. Cancer Res. 77:1122-1133)。在这过程中，DNA在电脉冲下掺入受转染细胞。一般在转染后，细胞要在完全培养基中恢复24小时，然后接种于96孔培养板的选择性培养基中。G418筛选的浓度为0.4-0.8mg/ml。霉酚酸筛选使用6ug/ml的浓度加0.25mg/ml黄嘌呤。电穿孔技术可使 SP2/0 细

胞的转染频率达 $10^{-5}$ 至 $10^{-4}$ 。在原生质融合方法中，溶菌酶被用来剥离含有嵌合抗体基因的重组质粒的有粘膜炎的细胞壁。在聚乙二醇作用下，原生质球体与骨髓瘤细胞融合。

本发明的嵌合性免疫球蛋白基因也可在哺乳动物非淋巴细胞或其它真核细胞中表达，如酵母菌，或在原核细胞、在特定的细菌中表达。

酵母菌对免疫球蛋白H和L链的产生具有重要的优越性。它可进行翻译后肽修饰反应，包括糖基化。许多重组DNA的方法的出现即利用增强启动子序列和高拷贝数质粒，这样可用在酵母菌中获得所需的蛋白质。酵母菌可识别克隆的哺乳动物基因产物的前导序列并分泌含有前导序列的肽（如：前肽）（Hitziman, et al, 11th International Conference on Yeast, Genetics and Molecular Biology, Montpellier, France, September 13-17, 1982）

通常酵母菌的基因表达系统的好坏可从产物的水平、分泌的情况、嵌合H和L链蛋白和嵌合抗体的稳定水平来判断。任何一种结合了启动基因和终止因子的酵母基因表达系统都可使用。这些启动基因和终止因子是从在富含葡萄糖的培养基中大量培养的酵母菌产生的活跃表达的编码糖酵解酶的基因中得来的。已知的糖酵解基因也可提供有效的转译控制信号，例如，可使用磷酸甘油激酶（CPK）的基因的启动基因和终止因子。许多手段可用来判断选择在酵母中克隆的免疫球蛋白cDNA的最佳表达质粒。（参见 Glover, D.M. ed., DNA Cloning, Vol II pp.45-66, IRL Press, 1985）

细菌菌株可用来作为生产本发明所描述的抗体分子或抗体片段的宿主。E.Coli K12菌株如E. Coli W3110（ATCC 27325）和其它的肠杆菌株如 *Salmonella typhimurium* 或 *Serratia Marcascery* 和各种假单胞杆菌属都可利用。

含有来自与宿主细胞种类相配的复制子和控制序列的质粒载体用来与这些细菌宿主连接。载体带有复制位点和能提供表型选择能力的特定基因。细菌中由克隆的免疫球蛋白cDNA编码的嵌合抗体或抗体链的产生的表达质粒的评价可由多种方法完成。（参见 Glover, D.M. ed., DNA Cloning, Vol I, IRL Press, 1985）。

其它优先使用的宿主是可以在体内、体外生长的哺乳动物细胞。哺乳动物细胞提供对免疫球蛋白分子的翻译后的修饰，其中包括：先导肽的除

去、折叠以及H链和L链r-糖基化抗体分子的装配，功能性抗体蛋白的分泌。

除了以上提及的淋巴来源的细胞外，能用来作为宿主生产抗体蛋白的哺乳类细胞包括一些成纤维细胞来源的细胞，如Vero. (ATCC CRL 81) CHO-Ki (ATCC CRL 61)。

在哺乳类细胞内表达已克隆的H链、L链的载体系统有许多。(参见Glover, D.M. ed., DNA Cloning. Vol. II pp.143-238, IRL Press, 1985)不同的途径都能得到完整的H<sub>2</sub>L<sub>2</sub>抗体。正如前面所述，完全可以在同一个细胞内共同表达H链、L链，并使之在细胞内结合从而得到完整的四聚体的H<sub>2</sub>L<sub>2</sub>抗体。在同一宿主细胞内，无论使用相同或不同的质粒都能得到共同表达。编码H链、L链的基因可以放在一个质粒中，然后在转染到细胞内，最后表达。另外一种方法是：编码一条链的质粒，如L链，首先转染到细胞内，然后带有第二个特殊标志并编码H链的质粒再转染到这些细胞内。无论用那一种途径，都能得到H<sub>2</sub>L<sub>2</sub>分子。另外，在质粒上再增加编码一些因子的话，得到的H<sub>2</sub>L<sub>2</sub>分子还将具有诸如高产量、稳定性好等特点。

除了单抗与嵌合抗体之外，本发明还能生产专门针对单抗与嵌合抗体的可变区(V)的抗Id抗体。一个抗Id抗体是专门识别与另一个抗体的抗原结合区有关的专一性决定簇的抗体，如代号为33.28的抗CCAA的抗体就称为独特型或Id抗体。通过用Id抗体或抗原结合物免疫与其具有相同种属和基因型的动物，就能得到抗Id抗体。也可进一步用抗Id抗体作为免疫原去免疫另一个动物，从而得到抗-抗Id抗体的动物。其实这种抗-抗Id抗体相同于原来诱导产生的抗Id抗体的抗体。这样，通过使用针对单抗独特位的抗体，就可能区分表达相同特异性的抗体的其它克隆。

因此，本发明的单抗和嵌合抗体可以用来在适合的动物中诱导抗Id抗体，如BALB/C小鼠。这些免疫了的小鼠的脾细胞可以用来产生抗Id杂交瘤进而分泌抗Id单抗。接着将抗Id单抗整合在一个载体(如KIH)上，并用来免疫另外的BALB/c小鼠；最后，这种小鼠的血清中就含有抗-抗Id抗体，这种抗体能特异性结合到最初单抗的CCAA段。

本发明的抗体以及它们的抗原结合片段及衍生物可以具有多种诊断、监测和治疗癌症的功能，包括结肠癌、乳癌和卵巢癌。这些用途都由Schlom,J.总结于 *Cancer Res.* 46:3225-3238 (1986)。

当它们被用来作为诊断时，本发明抗体可以在免疫诊断中检查体液诸如血清、尿液、脑脊液、痰、渗出液中是否有CCAA的存在。如果用适当的免疫标记物标记后，这些抗体也可以用来扫描或免疫成象以确定原发癌和转移癌的位置，甚至于可以用来确定有癌细胞转移的淋巴结。

本发明的抗体也适用于免疫病理分析。比如肿瘤分化的诊断，以及依据CCAA表达的肿瘤的亚型的分析，这种判断对于预测肿瘤的转移可能性、治疗结果及预后都是非常重要的。

特别值得一提的是，由于本发明的单抗和嵌合抗体的特异性便能够确定出正在生长的异源性肿瘤中细胞的不同类型。通过流式细胞仪的方法可以应用这些抗体来确定组成肿瘤的肿瘤细胞的种类和交叉配对。这在手术和治疗前进行。运用本发明的抗体以及其它的单抗来确定肿瘤细胞的亚型是指：**A** 哪一种抗原制剂最适合得到特异性活度高的免疫治疗。**B** 哪一种单抗或嵌合性抗体对ADCC是有效验的。**C** 哪种抗体或单抗的组合最适用于预测治疗后的病人是否会有复发和转移的出现。

除了诊断应用外，通过监测体液中CCAA的存在，肿瘤的放射成象，或者通过检测淋巴结和骨髓活检、体液细胞、转移的呼出细胞，本发明的抗体也适用于监测病程的发展。

综合本发明抗体的治疗途径，包括1.直接的细胞毒性途径，这包括通过补体CDC或者效应细胞ADCC的两种途径；2.与抗肿瘤药物、毒素、放射性核素连接。在体外实验中，这些抗体能够除去血液循环和骨髓中的肿瘤细胞。

所有这些方法将在以下的章节中详细描述。学习并掌握这里所提供的方法介绍，具有一般实践水平的人也将能够知道，在诊断、监测和实际的治疗实践中，如何使用本发明的抗体。

本发明最适用的动物是哺乳动物，这里指的是哺乳纲的生物体。尤其适用于人类。

这里所谓的“治疗”是指当治疗对象用了我们的抗体片段或衍生物，用于预防、缓解和治愈结肠癌、乳癌和卵巢癌。

本发明的抗体的所有药物成份都是有助于达到一定的医疗目的的。具备常规的治疗结肠癌、乳癌和卵巢癌以及有关疾病的临床技能，就可以掌握这些抗体片段、衍生物的剂量和治疗方案。例如，可以通过非肠道途径、皮下、静脉、肌肉、腹腔、经皮和颊部给药。除此以外，可以单独或同时进行口服，而给药剂量则取决于患者的年龄、健康状况、体重、有无合并用药、治疗频率、期望的疗效等因素。

本发明的范围的组成是由所有这些抗体片段、衍生物所组合的方式所决定的，而这取决于所要达到的治疗目的。当个别病人调整药物组成时，可以在技术允许范围内决定各有效成份量的最适范围。有效剂量是特定的嵌合性或单克隆抗体所结合的其它治疗成份的存在和性质、病人的临床症状综合的结果。这一有效剂量可以在10ng/kg - 100mg/Kg体重范围内变动。最好是在0.1-10mg/Kg体重范围内。

除了有药理活性的成份外，新的药物化学组成可以包括适当的药物化学载体，这其中包括赋形剂、佐剂。因为这些赋形剂和佐剂能加速活性成份制剂化过程。制剂中有效成份和赋形剂的含量在0.01%-99%范围内，最好是20% - 75%。

本发明适用于肠道给药的抗体、抗体片段、衍生物制剂，无论是一种可检测的标记形式、结合形式或非结合形式，均可包括无菌的水性溶液、非水性溶液、悬浊液和乳剂。水溶液有丙二醇、聚乙二醇、植物油如橄榄油，以及可注射的有机酯如油酸乙酯，水性载体包括水、乙醇/水溶液、乳剂或悬浊液，这些载体中都含有盐、缓冲介质，非肠道途径载体则包括NaCl溶液、右旋糖林格氏液、右旋糖和氯化钠、乳酸盐林格氏液或固定油类，静脉内注射剂的载体主要有液体和营养补充剂组成，它们往往是在右旋糖林格氏液的基础上制成的，当然防腐剂和其它的添加剂也是必不可少的，比如抗微生物成份、抗氧化剂、螯合成份、惰性气体等，具体请看 Remington's Pharmaceutical Science, 16th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1980.

本发明的抗体、抗体片段及其衍生物也有助于治疗已经存在或正在发展中的结肠癌、乳腺癌和卵巢癌，这种治疗是通过非肠道途径给予单剂量或多剂量的抗体、抗体片段或衍生物或者是缀合物。

本发明的抗体之所以能发挥治疗效用，是由于它们能够对抗那些有CCAA在其表面的细胞，具体作用是通过介导ADCC和/或CDC来完成的。不管是内源性的还是外源性的效应细胞，(对ADCC)或补体成份(对CDC)都可以成为抗体发挥效应的手段。

本发明的抗体、抗体片段、衍生物也可以作为免疫偶合物发挥治疗效用。(参见Dillman,R.O.,Ann. Int Med. 111:592-603 (1989))。它们可以与细胞毒性蛋白，包括(但不限于这些)Ricin-A,假单胞杆菌毒素,白喉毒素和肿瘤坏死因子偶合。将毒素偶合到抗体或其它配体上的技术是可行的(见Olsnes,S. et al.,Immunol. Today 10:291-295 (1989))。植物和细菌的毒素最能够破坏蛋白的合成，从而达到杀死细胞的目的。

本发明的抗体还能缀合到其它类型的有治疗作用的物质中。这些物质包括(但不限于这些)诊断用的放射性同位素、细胞毒性成份(如细胞毒性放射性核素、药物和蛋白)。能够偶联于抗体上的并能运输到体内作用部位的放射性核素例如有 $^{212}\text{Bi}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{186}\text{Re}$ 、 $^{90}\text{Y}$ (这些还没有详尽的列出)。放射性核素能够在局部通过放射性照射细胞以达到其细胞毒性作用。这也就是一般的放射性治疗的机理。

上面所说的能够结合到抗体上的具有治疗作用的细胞毒性药物包括道诺红菌素,doxorubicin,氨甲蝶呤和丝裂霉素C,但不限于这些。细胞毒性药物会影响许多重要的活动,如DNA、RNA和蛋白质的合成,详细可见Goodman,A.C.,et al,Goodman and Gilman's THE PHARMACOLOGY BASIS OF THERAPEUTICS,7th Ed.,Macmillan Publishing Co.,1985。

本发明抗体还有一个优势,它可以和别的单克隆抗体、嵌合抗体、淋巴因子、促红细胞生成生长因子等联合使用,这物质都能增加效应细胞的活力与数目。

本发明的抗体、片段及衍生物附着在一个固体支持物上,能够从体液组织和细胞提取物中除去可溶性结肠癌相关抗原。在一最佳实施例中,它们被用于除去血液和血浆中的可溶性肿瘤抗原。在另一最佳实施例中,抗



体被用于体外的免疫吸附装置中（见 *Seminars in Hematology*, Vol.26 (2 Suppl. 1) (1989)）。病人的血液与其它体液经过吸附的抗体后，可部分或完全除去循环中的 CCAA（游离的或是免疫复合物）、包含携带 CCAA 的细胞，接着将这些体液输回体内。这一免疫吸附的方法可以持续流动的状态中完成，可插入或不插入细胞离心这一步骤。参见实例 Terman.D.S. et al., *J. Immunol.* 117:1971-1975 (1976)。

本发明也提供了上述抗体，片段或是衍生物，都作了检测性的标记，如下文所述。

本发明的抗体可用于免疫分析，对样品中 CCAA 或细胞中 CCAA 进行检测或定量。这样的免疫分析法一般如下，将生物样品与本发明的抗体一起温育，这抗体具有可检测的标记，能识别肿瘤抗原；检出与样品结合在一起的标记了的抗体。

因此，从这方面考虑本发明，生物样品可用硝化纤维素或其它能固定细胞、细胞碎片或可溶性蛋白、糖蛋白的固体支持物或载体进行处理，再以适当的缓冲液冲洗，然后加入本发明中标记过的抗体；再次用缓冲液洗固定相支持物，使未结合的抗体除去。与固定相支持物结合的抗体的量可用传统的方法测出。

固定相支持物或载体是指任何能与抗原或抗体结合的物质。常用的有玻璃、聚苯乙烯、聚丙烯、聚乙烯、葡聚糖、尼龙、淀粉酶、天然或人工纤维素、聚乙烯酰胺、琼脂糖和磁铁矿 (magnetite)。载体的性质可以在某种程度上可溶或不溶性的。只要连接的分子能与 CCAA 或 CCAA 特异性抗体结合，支持物的材料可以是任何可能的结构形状。因此，它可以是如圆珠子般球形的、如同试管的内面般圆柱形的、如杆状物的外表面、纸或试纸般平面的等等。比较适合的支持物有聚苯乙烯珠。熟练的技术人员还知道其它结合抗体或抗原的适合的载体，或能用常规实验来确定哪种载体是适用的。

同一批抗体的结合活性可用一些常用方法来确定。熟练的技术人员可通过常规实验判断每一项指标的操作方法和最佳分析条件。

比较本发明的抗体的方法之一是将抗体与一种酶连结，用酶分析法 (EIA) 或酶联免疫吸附分析法 (ELISA) 来检测，当这种酶与底物接触时，

会发生反应产生一种可检测的化学物质，例如用分光光度计法、荧光测定法或可见光法测定。在一个补充的实施例中是将这种酶去标记一种本发明的抗体的配体。这种配体可以是本发明的抗体的恒定区与可变区，诸如异源性抗小鼠免疫球蛋白抗体。另外，结合配体可以是一个能与本发明的抗体结合的非抗体蛋白，如葡萄球菌蛋白A或链球菌蛋白G。

可用以标记本发明的抗体的CCAA特异性抗体，或这些抗体的结合配体的酶可包括以下列出的，但不仅限于这些：苹果酸脱氢酶、葡萄球菌核酸酶、 $\delta$ -5-类固醇异构酶、酵母菌酒精脱氢酶、 $\alpha$ -磷酸甘油脱氢酶、磷酸丙糖异构酶、辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、天冬酰胺酶、葡萄糖氧化酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶、核糖核酸酶、脲酶、过氧化氢酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、糖淀粉酶和乙酰胆碱酯酶。

如果对本发明的抗体或结合配体进行放射性标记，就可以用放射免疫分析法检测CCAA（参见Work, T.S. et al, Laboratory Techniques and Biochemistry in Molecular Biology, North Holland Publishing Company, N.Y.

(1978)）。放射性同位素可用 $\gamma$ -计数器或闪烁计数器或放射自显影的方法来检测。而应用于本发明的抗体的同位素即是人们所经常使用的那些。

荧光复合物也可用来标记抗体或结合配体。当用荧光标记过的抗体暴露于一定波长的光时，它的存在可因荧光而测出。最常用的荧光标记复合物有异硫氰酸荧光素、罗丹明、藻红蛋白、藻青蛋白、异藻青蛋白、邻苯二醛和荧光胺。

抗体也可用发射荧光的金属来标记，如 $^{152}\text{Eu}$ ，或其它的镧系。这些金属可用金属螯合剂如DTPA或EDTA连结到抗体上。

本发明的抗体也可用结合化学发光复合物标记。标记了的抗体在化学反应过程中发出光，从而被检测到。特别常用的一些化学发光标记物有鲁米诺、鲁米诺异构体、咪唑、 $\gamma$ 吡啶盐和草酸酯。

同样，生物发光物质也可用来标记本发明的抗体，无论是片段还是衍生物。生物发光物质是从生物系统中发现的一种化学发光物质，在这一系统中有一种催化蛋白能提高化学发光反应的效率。生物发光蛋白的存在由它所发出的光来确定。用于标记的重要的生物发光复合物有荧光素、荧光素酶和sequorin。

如果标记物是放射性 $\gamma$ 射线发射体，抗体的片段或衍生物的检测可通过闪烁计数法完成；如果标记物是一种荧光物质，可通过荧光测定法；在酶标法中，用比色法来完成检测，这方法需要一种酶的底物，或者通过与预先准备的标准品与底物的酶反应程度的比较来检测。

原位检测需要从病人取得组织学标本，并准备好标本的标记了的抗体，或未标记的抗体加上标记了的结合配体。通过这样一个过程，不仅能检测抗原的存在，并且还可了解它在检测组织中的分布情况。用本发明，具有一般技术的人很容易发现许多组织学方法（如染色法）经过改良后可用作原位检测。这些方法包括例如免疫组织化学染色法。在一最佳实施例中，亲和素-生物素免疫过氧化物酶染色法能被使用，这种试剂盒在筹划之中。

用本发明的单克隆抗体或嵌合抗体制成的试剂盒可用以评估结肠癌、乳癌和卵巢癌的免疫组织特性。组织学研究的结果是用来评价表达单抗31.1和33.28的抗原的肿瘤细胞亚群。

结肠癌检测试剂盒包含免疫组织化学分析所需的试剂如下：

A、单克隆抗体31.1，33.28或鼠/人嵌合性抗体Chi #1,和癌胚抗原的单抗(CEA)，后者是结肠组织免疫组化的标准单克隆。

B、免疫过氧化物酶试剂，（封阻试剂）例如羊血清；二抗，如羊抗鼠抗体。

C、免疫过氧化物酶和。

D、棕色显色试剂。

类似的试剂盒可用于乳癌和卵巢癌的免疫组化分析。免疫过氧化物酶技术是采用Sternberger的。一抗（单抗或嵌合抗体）作为抗原可与多个二抗相结合。二抗形成了一抗与辣根过氧化物酶-抗过氧化物酶复合物连接的“桥梁”。

这里所提的试剂盒可用来研究结肠、癌变、息肉的变化以确定恶变的程度，研究良性息肉转化部位是否被忽略，研究肠炎以检查任何未觉察的变化。类似的试剂盒可用于研究乳癌和卵巢癌。

计划中的另一种类似上述试剂盒的试剂盒采用结肠癌的五种单克隆抗体，对所有肿瘤亚群进行损伤分型和交叉配血。

本发明的抗体，片段或是衍生物，都能适用于免疫测定分析中，也称为“双层”分析法或“三明治”分析法。在一般的免疫测定分析中，一定数量的未标记抗体（或抗体的片段）与固体支持物连结，这一支持物不溶于待测液体，加入标记了的可溶性抗体，这样通过对固相抗体、抗原和标记抗体三种物质形成的复合物的检测，可测定或定量测定待测物。

典型和最好的免疫测定分析包括“正向”分析。与固相结合抗体首先与待测样品混合，样品中的肿瘤抗原先与抗体形成固相抗体-CCAA复合物；经过一段时间的稳定后，清洗固相支持物除去剩余的样品，还包括未结合的抗原；然后再加入包含未知数量的标记抗体（作为报道分子）的溶液；再经过稳定，标记抗体与CCAA结合的固相支持物通过未标记抗体结合在一起，再次清洗固相支持物，去除未反应的标记抗体。这种方法可以只是简单的测定出CCAA是否存在，或者也可以对它进行定量，这可与已知抗原数量的标准样品比较标记抗体的测量来进行。这种“二层”分析法和“三明治”分析法可参见Wide的描述（Radioimmune Assay Method, Kirkham, ed., E. & S. Livingstone, Edinburgh, 1970, pp. 199-206）。

另一种可用于测定CCAA的“三明治”分析法被称为“同步”和“反向”分析法。同步法中包含了一个温育的过程，就是将抗体结合于固体支持物上而标记了的抗体也同时加入待测样品中。当温育完成后，清洗固体支持物以除去剩余的液体样品和未结合的标记抗体。与上述“正向”法中同样，测定与固体支持物联接的标记抗体。

在反向法中，首先加入液体样品的标记抗体，然后加入未标记的抗体，经过一段时间后与固相支持物结合。经过第二次温育，冲洗固定相，清除剩余待测样品和未结合的标记抗体，用“同步”和“正向”分析法测定结合的标记抗体，在一个实例中，联合使用本发明的抗体的特殊的分离表位可构建一个更灵敏的三位的免疫放射测定分析法。

用本发明的抗体体内检测结肠癌、乳癌和卵巢癌，一般的技术人员可用不同的标记物和不同的标记方法。本发明抗体可用的标记物类型，例如有放射性同位素、顺磁性同位素和可用PET（正电子发射断层显象）成象的复合物。一般的技术人员还知道其它的标记方法或者通过常规实验来确定某一种方法。另外，技术人员可通过标准的技术来进行结合标记。

若是为体内诊断的目的，选择放射性核素取决于所具备的检测仪器。所选择的放射性核素的衰变必须是所具备的仪器能检测到的。一般来说，任何使诊断图象显象的传统方法都可用于本发明。

选择体内成象系统的诊断用放射性核素的另一重要因素是放射性核素的半衰期要足够长，这样当靶组织达最大摄取时仍可被测出；半衰期又要短，使对人体造成的放射性危害达到最小。在具体实验中，用于体内成象的放射性核素不放出粒子，但产生大量的140 - 200Kev范围的光子，光子易于用 $\gamma$  - 照相机检测。

为了体内诊断的目的，放射性核素可用一个中介的功能团作为媒介直接或间接的被连结到抗体上，常用于结合以金属离子形式存在的放射性同位素的中介功能团是螯合剂，二亚乙基三胺五乙酸（DTPA）和乙二胺四乙酸（EDTA）。可结合到本发明的抗体的金属离子例如有 $^{99m}\text{Tc}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{97}\text{Ru}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{72}\text{As}$ ,  $^{89}\text{Zr}$ 和 $^{201}\text{Tl}$ 。

单抗33.28和31.1，以及嵌合抗体Chi#1可用来加速其它单抗的产生，这些单抗可与同一抗原或免疫交叉反应性结肠癌相关性抗原相结合。首先，这些抗体可与层析柱连结，并用来免疫纯化结肠癌相关抗原。这些纯化的抗原反过来又刺激了某些动物的免疫反应。其次，反应的动物的脾细胞可与无限增殖化细胞融合，产生的杂交瘤细胞可根据分泌的抗体来筛选，它们是与纯化的抗原结合的抗体，和/或与结肠癌相关抗原结合的抗体，它们被33.28或31.1抗体或嵌合抗体Chi#1竞争性抑制了。

以上是对我们的发明的一个大致描述，通过一些具体实例可进一步了解我们的发明，这些例示只为了举例说明的目的，并不限止本发明的范围。

## 实施例I

### 结肠癌相关抗原的制备和特征

按照Hollinshead的描述（Cancer,56;480（1985）），抗原制剂是从混合的结肠癌膜中获得的。这种抗原性物质要进行纯化，使膜中不再含有HL - A抗原，并除去了大部分的非免疫原性糖蛋白。这种抗原制剂的最终状态应显示出仅诱发活跃的结肠癌、乳癌和卵巢癌的病人的迟发性过敏反应。

将新鲜取出的标本的肿瘤细胞制成盐悬液。按传统方法得到单细胞悬液，以400xg速度离心10分钟，保留上清液，将细胞沉淀再次悬浮，离心。以电子显微镜确定仅有膜物质而不是完整的细胞存在，内含的蛋白以Lowry法测定。

然后用低频率超声处理膜物质，使它成为膜蛋白悬浊液。用Sephadex-6200凝胶过滤分离溶液。2ml收集一管，记录220到280um的吸收率。收集单个峰蛋白的部分混合在一起，用Diafle超滤法浓缩。用Sephadex-G200分离IB和IIA，这是由Hollinshead等定义的（参见前述）；再进一步以梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）纯化。于结肠癌病人作皮试，试验上面制备的蛋白片段是否能诱发阳性的迟发性超敏反应。这些具有免疫原性的片段含有结肠癌相关抗原（CCAA），并被作为免疫原和制备单抗的筛选物。

经过梯度PAGE，确定了与癌胚抗原（Gold,P. et al.,J. Exp. Med. 122:467-481（1965）;Hollinshead,A. et al.,Cancer 56:480（1985））不同的双带抗原并得到了分离，组成这种抗原带的示踪染色显示长为6.3和6.6cm。抗原的生物化学分析证明它是糖蛋白。根据分子量为76.5KDa的转铁蛋白的电泳迁移率（6.4-6.5cm），可以估计抗原的分子量。

## 实施例II

### 单克隆抗体的制备和筛选

如上所述的用CCAA免疫BALB/C鼠，剖取脾细胞，与小鼠骨髓瘤细胞SP2/0-Ag14融合杂交，从它们的克隆和产物中可获得抗人结肠癌相关抗原（CCAA）的单克隆抗体。

建立五个杂交克隆，如下所述，称为31.2,31.1,77,33.23和33.28。经ELISA分析五种单抗均与CCAA和两个结肠癌细胞系（SW480和SW620）强烈反应，其中对31.1和33.28作了详细研究。

#### A、免疫和细胞融合

按照Hollonshead的临床试验的描述（Hollinshead.et al,），取BALB/C小鼠，腹腔注射50 μgCCAA在完全佐剂中乳化，十天后对这些小鼠加强免

疫，静脉注射同剂量的CCAA盐溶液。三天后处死，取脾细胞。将 $5 \times 10^7$ 小鼠脾细胞和 $10^7$ SP2/Ag<sup>14</sup>骨髓瘤细胞置于40%聚乙二醇（MW - 1500）中温育，使细胞融合。

### B、杂交克隆的筛选

检测产生CCAA特异性抗体的杂交瘤克隆，可用Tsang的酶联免疫吸附分析法（Tsang et al, JNCI 77:1175 (1986)）。将CCAA固定于聚苯乙烯微孔板上（100ng/孔）。上清液中的抗体与固定的抗原结合，加上与过氧化物酶连接的小鼠免疫球蛋白特异性的第二抗体，以检测连结了的鼠单抗。接着加入过氧化物酶的显色底物D-苯二胺。孔中显色反应的吸收率 $> 0.500$ 个单位的视为阳性。吸收率在0.01到0.09范围内则为阴性。

经ELISA确定为阳性的杂交瘤再用间接免疫荧光法筛选。用下表1列出的已经鉴定过的不同的肿瘤细胞和正常细胞。所有的肿瘤细胞系从ATCC获得。将细胞与培养的杂交瘤细胞上清液用磷酸缓冲液以1: 2的比例稀释后于4℃共同温育1小时。冲洗细胞，与荧光标记的羊抗鼠免疫球蛋白抗体一起温育。用PBS冲洗细胞三次，用荧光显微术观察。结果列于表1。

表1抗结肠癌相关抗原单克隆抗体和人培养细胞的间接免疫荧光反应性

细 胞	单抗的反应性				
	31.2	77	31.1	33.28	33.23
<u>肿瘤细胞系</u>					
SW948 (COL)	-	+	-	-	-
HCT116 (COL)	-	-	-	+	-
WIDR (COL)	+	+	+	+	+
COLO320 (COL)	+	+	+	-	-
HS619 (COL)	-	-	-	-	-
HS853 (COL)	-	-	-	-	-
CACO-2 (COL)	+	+	-	-	-
SK-CO-1 (COL)	+	+	-	+	+
HT-29 (COL)	+	+	-	+	+

SW1116 (COL)	+	-	-	+	+
SW480 (COL)	+	+	+	+	+
SW620 (COL)	+	+	+	+	+
231 (BR)	-	-	-	-	-
CAMA-1 (BR)	-	-	-	-	-
PAN-1 (PAN)	-	-	+	-	-
MIA (PAN)	-	-	+	-	-
HS766T (PAN)	-	-	-	-	-
M-14 (MEL)	-	-	-	-	-
HT1080 (FIB)	-	-	-	-	-
LM (OS)	-	-	-	-	-
TE-85 (OS)	-	-	-	-	-
<u>正常皮肤纤维细胞</u>	-	-	-	-	-
<u>骨髓细胞</u>	-	-	-	-	-
<u>正常人外周血单核细胞</u>	-	-	-	-	-

A.培养细胞悬液用PBS按1: 2稀释

B.根据对照所得的膜荧光强度确定阳性(+)或阴性(-)。

C.COL: 结肠癌; BR: 乳癌; PAN: 胰腺癌; FIB: 纤维肉瘤

### 实施例III

#### 单克隆抗体及其反应性的分析

上面所述的抗CCAA单抗的生产和检测也要用新鲜人体组织检测其反应性。表2列出的组织类型置于低温恒温器中, 均用3.5%的甲醛磷酸缓冲液固定, 再用PBS冲洗三次。在间接的免疫荧光研究中, 将组织与单抗一起温育, 然后用荧光标记的二抗染色。

如表2所示, 单抗31.1和33.28对结肠癌细胞具有高度的特异性。这表明所用的抗原(CCAA)对结肠癌高度特异性, 而且, 是结肠癌病人的免疫原(DH反应阳性), 对小鼠藻红蛋白兴奋性试验也是良好的免疫原。用正向



对抗90°光散射检测的细胞来建立引发区。如表4所示，31.1和33.28的单抗都能与结肠癌细胞连接。二者与PBMC细胞的连结则不明显。

表2 用新鲜人体组织间接免疫荧光检测抗CCAA单抗反应性

组织	单抗的 反应性	
	33.28	31.1
<u>肿瘤</u>		
结肠癌	3/3	3/3
胰腺癌	0/2	0/2
黑色素瘤	0/2	0/1
乳癌	0/2	0/1
<u>正常组织</u>		
胎盘	0/1	0/1
肝脏	0/1	0/1
结肠	0/3	0/3
脾脏	0/1	0/1
胸腺	0/1	0/1
肌肉	0/1	0/1

a.腹水用PBS按1: 50 稀释。低温切片(4-6 μM 厚)用3.5%福尔马林磷酸缓冲液固定10分钟,然后用PBS洗三次。若不立即使用,将切片置于-70℃保存。

结果按试验结果阳性数量/阴性数量表示。

表3列出的是单抗的免疫吸附分析结果。三种结肠癌细胞系(HT-29, WIDR和SW620)和一种骨肉瘤细胞系(LM)用来吸附与异硫氰酸荧光素连接的单抗31.1和33.28。取接种了杂交瘤的小鼠腹水,以1: 50稀释,加入吸附细胞中。混合液4℃温育1小时,用 $2 \times 10^7$ 细胞(表3中A)或 $10^4$ 细胞(表3中B)吸附抗体(表3)。骨肉瘤细胞系无吸附31.1或33.28的活性,而结肠癌细胞则有。

表3 单抗的免疫吸附分析

单 抗	吸 附 细 胞							
	HT-29		WIDR		SW620		LM	
	A	B	A	B	A	B	A	B
33.28	-	+	-	+	-	+	+	+
31.1	-	+	-	+	-	+	+	+

抗体31.1、33.28和对照单抗与肿瘤细胞HT29、WIDR和SW480及外周血单核细胞(PBMCs)的结合情况可用细胞荧光测定分析法获得。采用Ortho光谱III细胞荧光自显影图，带有一个氩激光器可激活荧光素和藻红蛋白。用正向对抗90°光散射检测的细胞来建立引发区。如表4所示，31.1和33.28的抗体均能与结肠癌细胞相连，而单抗则不能与PBMC结合。

表4 细胞荧光分析测定结果

细胞	单抗细胞染色百分数		
	33.28	31.1	对照
HT29	51.0	53.9	9.2
WIDR	21.0	ND	8.1
SW480	37.0	32.0	3.8
PBMC	2.1	2.1	ND

单克隆抗体的重链和轻链的类型可用免疫扩散法测定。31.1单抗是带有Kappa轻链的IgG1,33.28单抗则是有Kappa轻链的IgG2a(表5)。这与过去的19.9单抗完全不同(Herlyn, M. et al, J. Biol. Chem. 257:14365-14369 (1982)),它是属于IgG1类的(Herlyn D. et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:4761-4765 (1982))。重要的是, IgG2a型的抗体对免疫治疗更为有效。

( Cilcher,D.et al,Proc. Natl. Acad. Sci. USA.78:3199-3203 ( 1981 ). ) .19.9单抗对结肠肿瘤也有反应性，但它是胰腺癌作为抗原免疫而来的，对结肠具有交叉反应性。这与B72.3单抗(【citation】)有些类似，它是以乳癌组织为免疫原获得的抗体，也对结肠有反应活性。

表5 单克隆抗体的同种型

培养悬液	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgM	轻链	
					卡巴	λ
31.2	-	+	-	-	+	-
31.1	+	-	-	-	+	-
77	-	-	+	-	+	-
33.23	-	+	-	-	+	-
33.28	-	+	-	-	+	-

#### 实施例IV

##### 结肠癌相关抗原的特性

用蛋白质印迹(western blot)分析法测定取自SW480和SW620结肠癌细胞系的可溶性蛋白可确定上述单克隆抗体结合的抗原的分子量。结果发现这两个细胞系中分子量为61.1KDa和72KDa的抗原能与33.28和31.1单抗起反应。在Western blot分析中，这些单抗不能与人外周血单核细胞或其它组织类型的肿瘤细胞系反应。

为了更好的确定本发明的单克隆抗体对CCAA免疫反应的特异性，并确立单抗是否会与已用于临床治疗的细胞膜制剂中的免疫原成份发生反应(Hollinshead et al,supra)，上述的致免疫制剂将用高效液相色谱仪(HPLC)分析处理。

分析显示4个较显著的峰，于结肠癌病人作皮试，观察每个峰的免疫反应性（用DH诱发）。在10个受试病人中，仅第4个峰的蛋白的皮试为阳性。峰4的抗原与33.28单抗能起反应，而31.1单抗与峰3的抗原反应，峰3是第二个最显著的峰。

上文引用的参考文献与这里的结果是一致的。

### 实施例V

#### 结肠癌相关抗原的亲纯化

用33.28单抗将从HT-29细胞系中提取的抗原用亲和层析法分离出来。经纯化的33.28IgG5mg连接到CNBr激活的琼脂糖凝胶电泳4B上。柱子用PH 11.5的0.05M二乙胺预洗脱，然后用0.14M NaCl/0.01M Tris (PH 8.0)平衡。将CCAA制剂注入柱子中，再用PH 11.5 0.05M的二乙胺洗脱。洗脱下的部分加入PH8.0的IM Tris-HCl中和。

连接在33.28亲和基质上并被洗脱下来的物质再用HPLC处理。洗脱的CCAA制剂用启动缓冲液（0.01M磷酸钾缓冲液，PH7.0）调节，加入Synchropak Wax Weak阴离子交换HPLC柱（250×4.6mm）中，并用以0.01M磷酸钾缓冲液配制的0-1MNaCl溶液梯度洗脱，洗脱速度为1ml/分。阴离子交换层析采用惠普（Hewlett-Packard）HPLC（HP1090,HP,Arondals,PA）。

结果列于图2，用33.28单抗从HT-29细胞分离的抗原性物质产生的峰与第4个峰吻合，并且对人的免疫反应性也相似，表明可利用33.28单抗来分离致人免疫的结肠癌制剂。

### 实施例VI

#### 单克隆抗体33.28和31.1的ADCC活性

为了具有治疗作用，一种免疫原性肿瘤抗原特异性单克隆抗体应具备以下特征：（A）对肿瘤组织的高度特异性；（B）对正常人体组织无交叉反应性；（C）与破坏肿瘤相关的生物学活性，如依赖抗体的细胞毒性作用。

单抗33.28和31.1的ADCC活性可用结肠癌细胞系WIDR作为靶细胞来检测。黑色素瘤细胞系M-14则作为特异性对照。分析ADCC采用传统的<sup>51</sup>Cr 4小时释放分析法，以人PBMC作为效应细胞，结果用同位素释放百分数（分解%）（表6）来表示。分解的底数为8.3%，当效应细胞和靶细胞的比例为100:1时，33.28单抗导致肿瘤细胞分解率达40.3%，而31.1单抗为51.8%。

表6 单抗33.28和31.1的ADCC活性  
靶细胞释放百分数（E: T比值）

抗体或对照	WIDR			M-14		
	25	50	100	25	50	100
33.28	23.1	40.3	45.3	6.9	8.4	9.0
31.1	14.3	26.7	51.8	7.5	6.4	8.7
OSA1	10.0	9.2	12.2	11.4	14.8	10.9
NMS	12.2	11.7	13.1	14.2	15.0	11.1
PBS	8.2	5.1	7.6	11.0	14.2	10.5

ADCC用<sup>51</sup>Cr 4小时释放分析法分析。<sup>51</sup>Cr释放的底数是8.3%。E: T比值表示效应细胞与靶细胞的比值。单抗或血清以1:100稀释后检测；OSA1——骨肉瘤相关抗原的单抗；NMS——正常小鼠血清；WIDR——结肠癌细胞系；M14——黑色素瘤细胞系。

### 实施例VII

#### 循环血液中带有单抗33.28和31.1的CCAA的检测

检测79例未知的血清样品中的循环CCAA（表7）可以用来检测本发明的单抗。这一分析是建立在ELISA分析法中血清抑制单抗与CCAA的结合

的原理的基础上的。50例正常血清无一出现假阳性，10例活跃的结肠癌病人的血清9例为阳性，结肠癌治愈一年后的病例未出现阳性。

表7 循环结肠癌相关抗原的检测  
(血清抑制单抗与CCAA的结合的数量)

供体物	样品数	33. 28		31 .1	
		<15% (阴性)	>15% (阳性)	<15% (阴性)	>15% (阳性)
结肠癌	10	3	7	2	8
结肠癌(切除)	4	4	0	4	0
乳癌	9	9	0	9	0
黑色素瘤	5	5	0	5	0
前列腺癌	1	1	0	1	0
正常血清	50	50	0	50	0

结肠癌相关抗原用ELISA法检测。每次分析取100 $\mu$ l血清。

### 实施例VIII

其它对结肠癌有反应性的单抗的特异性比较

用ELISA方法进一步研究肿瘤特异性(表8)。将单抗31.1与CC49比较，CC49是从B-72.3提纯的结肠直肠癌特异性单克隆抗体，对照用小鼠骨髓瘤蛋白。31.1单抗与结肠直肠癌反应的范围比CC49小，但它具有更高的特异性，与胃肿瘤或正常结肠组织的交叉反应性则较低或没有。

表8 使用单抗31.1、CC49和MOPC-21的正常与肿瘤组织的ELISA结果

组 织	31.1	CC49	MOPC-21
结肠直肠癌			
1.COCA2A	-	+++	-
2.COCA2	-	+++	-
3.COCA3	+	++	-
4.COCA4	+++	+++	-
5.G820	±	++	-
6.G853	+++	++	-
7.G817	+++	+++	-
8.G781	-	-	-
其它癌			
1.乳腺癌1	-	-	-
2.乳腺癌2	-	-	-
3.肺癌1	-	-	-
4.肺癌2	-	-	-
5.卵巢癌D106	-	-	-
6.卵巢癌5	-	-	-
7.卵巢癌V5	-	-	-
8.卵巢癌V45	-	-	-
9.卵巢癌V43	-	-	-
10.胃癌14A	++	+++	-
11.胃癌12A	-	+++	-
12.胃癌15A	-	-	-
其它正常组织			
1.子宫内膜E21	-	-	-

2.子宫内膜EC19	-	-	-
3.子宫内膜EC17	-	+	-
4.子宫内膜EC18	-	-	-
(RBC)			
5.红细胞1	-	-	-
6.红细胞2	-	-	-
7.红细胞3	-	-	-
8.红细胞4	-	-	-
9.红细胞5	-	-	-
10.红细胞6	-	-	-
11.红细胞7	-	-	-
12.红细胞8	-	-	-
13.红细胞9	-	-	-
14.红细胞10	-	-	-
15.红细胞11	-	-	-
16.粒细胞	-	-	-
17.385	-	-	-
18.386	-	-	-
19.正常脾 3	-	-	-
20.392 (正常脾)	-	-	-
21.395 (正常肝脏)	-	-	-
22.387 (正常肾脏)	-	-	-
23.398 (正常脾)	-	-	-
24.390 (正常肝脏)	-	-	-
25.正常脾 # 1	-	-	-
26.正常脾 # 2	-	-	-
27.800 (正常结肠)	-	++	-
28.正常结肠 (GW)	-	++	-
29.正常结肠 (Meloy)	-	-	-
30.正常结肠	-	-	-



31.G1155B (正常结肠)	-	-	-
32.G1164B (正常结肠)	-	-	-
33.正常结肠	±	-	-
34.正常胃A	-	-	-
35.正常胃B	-	-	-
36.正常胃C	-	-	-
37.正常肺	-	-	-
38.正常肝脏	-	-	-

CC49 - NCI 结肠直肠的单克隆抗体  
MOPC - 21 - 骨髓瘤蛋白阴性对照  
所有单抗为40ng/孔, POGAM稀释度为1: 3000

### 实施例 IX

#### 单抗33.28和31.1在体内肿瘤部位的分布

本发明的单抗在体内的分布行为, 是研究了<sup>125</sup>I标记的单抗和异体移植了结肠癌LS - 174T的无胸腺裸鼠内的药代动力学后得到的。而种植了黑色素A375的小鼠作为对照。放射部位指数(放射标记物在肿瘤部位的浓度/放射标记物在周围组织的浓度)即表示单抗在肿瘤内相对于周围组织(肝脏和脾脏)的相对单克隆抗体的浓度。表 - 9是<sup>125</sup>I标记的单抗31.1和33.28的生物分布。结果发现, 单抗显著地集中在肿瘤部位, 远高于正常组织(肝脏和脾脏)内的分布, 在96小时为正常组织的6倍, 而在168小时时为12倍。图3 和图4 是单抗在肿瘤组织和血液、肝脏内的放射分布指数。

表9  $^{125}\text{I}$  标记的单抗在带瘤的无胸腺裸鼠内的生物分布

组织	96小时		168小时	
	LS174T	A375	LS1745T	A375
<b>A.mAb 31.1</b>				
血液	7.30	NA	4.67	4.42
肿瘤	21.92	NA	25.43	2.91
肝脏	3.74	NA	2.16	1.24
脾脏	3.68	NA	2.41	1.32
<b>B.mAb 33.28</b>				
血液	7.80	NA	5.58	3.95
肿瘤	13.12	NA	15.50	2.24
肝脏	2.55	NA	1.74	1.68
脾脏	2.31	NA	1.70	1.92

结果用注射剂量/组织重量(克)表示

LS174T - 结肠癌; A375 - 黑色素瘤

### 实施例 X

#### 免疫组织化学的研究

应用特异性单抗的选择性地定义肿瘤种群的能力, 就可以通过免疫组织化学的方法在血清中发现肿瘤标记物, 从而描绘新生物的产生过程和新生物的细胞种群的特征。

运用免疫过氧化物酶染色法, 用50种以上的结肠癌对单抗31.1和33.28. 进行试验。实验发现, 这两种单抗对于结肠新生物有很高的反应性, 而对于邻近的正常组织则反应性很低。当检查单抗对息肉有无反应性时发现, 良性部位, 如: 绒毛-管状腺瘤与单元毫无反应。只有在已经恶变的腺瘤部位出现与单抗的反应。当用普通的碳水化合物-抗原所诱导的单抗来检查类似的组织, 发现无论是正常组织还是新生组织, 都能与这种单抗反应。

在单抗3.11和33.28的实验中发现，两个单抗分别与肿瘤组织中不同种群的细胞反应。这提示不同的癌基因产生不同的细胞表面抗原。

### 实施例 XI

选择性地结合石蜡包埋的良性和恶性的乳房组织的上皮细亚群

应用亲和素 - 生物素染色法来研究单抗3.11和33.28在41个经福尔马林固定后，石蜡包埋的良性和恶性乳房标本。在未经酶处理之前，在细胞表面和胞浆内这两种抗体的染色都是阳性。单抗31.1对33%的导管致癌剂为阳性，对25%的良性乳房疾病的标本为阳性；单抗33.28对48%的导管癌的为阳性，对35%的良性乳房疾病的标本为阳性。10 - 75%的细中群染色阳性。这些结果说明，单抗3.11和33.28所定义的抗原选择性地在一部分患有乳房疾病的妇女体内有表达，这一结果将有助于这一疾病的诊断。

### 实施例 XII

选择性地结合上新鲜冰冻的良性和恶性卵巢肿瘤的上皮细胞的亚群

应用亲和素 - 生物素间接免疫过氧化物酶检测的方法，研究单抗31.1和33.28在来自21个卵巢肿瘤新鲜冰冻的活检组织。结果，4/7和乳头状粘液腺瘤，1/1的粘蛋白刺激性腺瘤，1/2的子宫内膜样腺瘤的组织出现局部染色阳性。且没有发现非上皮性卵巢肿瘤单抗染色阳性。这些结果说明，单抗31.1和33.28所定义的抗原选择性地在一部分患有卵巢癌的妇女体内表达，这一结果同样将有助于这一疾病的诊断。

### 实施例 XIII

人类结肠癌组织及细胞株对单抗31.1和33.28的免疫反应性

用单抗31.1和33.28来考察细胞株的免疫反应性，这些细胞株包括结肠腺癌，淋巴瘤，白血病和成神经细胞瘤。

应用亲和素-生物素免疫过氧化物酶染色法,发现单抗31.1和33.28能很强地结合上结肠腺癌细胞株, WIDR和HT-29,而在细胞株KGI-a、HL-60、Molt-3和JUKRAT上则没有反应。两个抗体对淋巴瘤细胞株JY的反应都弱。单抗33.28还与白血病细胞株K562和成神经细胞瘤细胞株U87, MG有较弱的反应。这些结果与前面所述的流式细胞术和免疫荧光反应的结果一致。单抗只能与结肠腺癌细胞株反应,而与其他的肿瘤细胞株则没有反应,但与SKBR-3乳癌细胞则没有反应。

两个单抗都表现了只能与结肠腺癌组织反应的特性(单抗33.28与84%的细胞反应,单抗31.1与64%的细胞反应),而与正常组织或淋巴瘤,白血病和成神经细胞瘤则没有反应。这些结果说明这些抗体能够作为考察肿瘤标记和细胞生物学的工具。

#### 实施例XIV

##### 抗人类结肠直肠癌相关抗原的嵌合抗体的表达和特征

嵌合小鼠/人重链基因是这样得到的,用PCR的方法,将抗体31.1的重链的可变区的外显子剪接到人类 $\gamma$ 链的恒定区上去。随后,将31.1的嵌合抗体基因克隆到一个反转录病毒表达载体plgpCXII并转染到细胞株PA317。转染细胞PA317H与另一个细胞PA317一起培养,后者含有一个表达在反转录病毒表达载体plneoCXII中和SP2/00-Ag14细胞中的不相关的小鼠/嵌合轻链基因。经传导的SP2/-A14细胞能够产生完整的嵌合抗体Ch#1,它能与辣根过氧化物酶结合的羊抗人IgGFc片段在酶联反应中反应,这说明了Ch#1的恒定区是人种的。细胞荧光测量分析表明,Ch#1能够染色人类结肠直肠癌细胞株HT-29和LS174T,但是与人类肺癌细胞株则没有反应。抗体依赖的细胞介导的细胞毒性实验(ADCC)显示Ch#1能够溶解LS174T细胞。这些结果说明Ch#1具有对小鼠31.1单抗特异性抗原结合的能力,这也进一步说明这种嵌合抗体能够在结肠癌的预后评价中发挥作用。

以上我们详细的描述了本发明,在已经实验证实的相同的参数、浓度和条件允许的范围内可以使用这一技术。

当本发明在描述中被限制在一些特殊的实施例时，也应该理解它也是可以进行修饰的。本发明申请中提到的重要特征、和下面所提的权利要求范围，意图覆盖所欲改变本发明的变化、用途和适用范围的行为。