[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl[6]
C07K 16/18
C07K 16/30
A61K 39/395 G01N 33/53

[12]发明专利说明书

[21] ZL 专利号 95195990.5

[45]授权公告日 1999 年 11 月 24 日

[11]授权公告号 CN 1046737C

[22]申请日 95.10.30 [24]颁证日 99.9.4
[21]申请号 95195990.5
[30]优先权
[32]94.11.4 [33]IT [31]MI94A002238
[86]国际申请 PCT/EP95/04239 95.10.30
[87]国际公布 WO96/14340 英 96.5.17
[85]进入国家阶段日期 97.4.30
[73]专利权人 泽特希斯有限公司
地址 意大利米兰
[72]发明人 A·巴托雷利
[56]参考文献
WO92/10197 1992. 6.25 A61K35/00
审查员 贾书瑾

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所
代理人 李 瑛

权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图页数 1 页

[54]发明名称 同种异体和异基因蛋白的抗体,它们在诊断和治疗中的应用及其检测方法

[57]摘要

本发明涉及检测那些能识别提取于哺乳动物器官中的且分子量约为 14Kda 的蛋白的自然抗体的诊断方法。该抗体在对异基因物种给药时具有抗肿瘤活性。

ISSN1008-4274

权 利 要 求 书

1.一种免疫检测天然抗体的方法，该天然抗体能识别那些提取于羊肝并被保藏于 ECACC 的保藏号为 930806103 或者 930806104 的杂交瘤分泌的单克隆抗体所识别的分子量为 14Kda 的蛋白并且存在于大约 93 % 的人类实体瘤中，该方法包括通过直接的，竞争性或三明治型免疫反应，用酶，放射性或荧光化合物，染料或颜料作为检测免疫复合物的标记剂检测所述天然抗体和所述选择性标记的蛋白间的免疫复合物。

2.按照权利要求 1 的方法，其中的免疫复合物用第二个标记的抗物种抗体检测。

3.能识别那些提取于羊肝并被保藏于 ECACC 的保藏号为 930806103 或者 930806104 的杂交瘤分泌的单克隆抗体所识别的分子量为 14Kda 的蛋白的且存在于大约 93 % 的人类实体瘤中的天然抗体。

4.包括抗体或者超免疫血清的细胞毒性组合物，该抗体或者超免疫血清是通过用高氯酸从羊肝脏中提取的并被保藏于 ECACC 的保藏号为 930806103 或者 930806104 的杂交瘤分泌的单克隆抗体所识别的分子量为 14Kda 的蛋白免疫动物或者人而产生的。

说　　明　　书

同种异体和异基因蛋白的抗体，它们在诊断和治疗中的应用及其检测方法

本发明涉及检测那些能识别提取于哺乳动物器官中的且分子量约为14Kda 的蛋白的天然抗体的诊断方法。该抗体在对异基因物种给药时具有抗肿瘤活性。

本发明还涉及纯化形式的该天然抗体以及它们在诊断和治疗中的应用。

WO92/10197 公开了可通过用高氯酸和高渗盐溶液提取哺乳动物器官，特别是肝脏得到的蛋白物质。

已分离出分子量约为 14Kda 的其中一个该物质并进行了部分测序（意大利专利申请 MI 94001469）且证明它是导致所观察到的生物学特性即抗肿瘤活性以及在对和它从其中提取的物种不同的动物给药时产生能够识别肿瘤抗原的抗体的能力的主要蛋白。

该意大利专利申请也公开了两种由保藏于欧洲动物细胞培养物保藏中心（ ECAcc ）（ Porton Donn,索里斯堡，英国，保藏号为 930806103 和 930806104 ）的杂交瘤分泌的单克隆抗体，该抗体能识别肿瘤抗原的以及在该杂交瘤制备中用作抗原的从羊肝脏中提取的 14Kda 蛋白（以下称作 UK114 ）的共同的抗原决定基。

现在已发现能识别从器官（特别是肝脏）中提取的同种异体和异种蛋白的天然抗体是有上述特性并在大约 93 % 的人类实体瘤中存在且循环于哺乳动物血清中。在健康动物或人的血清中以低效价（<1/100 ）正常存在的该抗体可通过注射相应的抗原被刺激，引起效价以及在血清中产生抗肿瘤细胞的胞毒效应的能力的显著提高。

跟观察结果以及天然抗－ UK114 抗体存在的意义的可能解释无关（这些解释和本发明的合法性无关），该抗体及其检测可用于诊断，预后和治疗的目的。

在第一个实施方案中，本发明涉及一种免疫检测天然抗－ UK114 抗体的方法。本发明也涉及纯化的抗－UK114 抗体及其在诊断，治疗和免疫细胞化学中的应用。该检测天然抗体的方法是常规型的且可以依靠直接的，竞争的或者“三明治”型的反应。而该方案既可以使用固体支持物也可以使用免疫沉淀技术。将在免疫测定中使用的抗体和/或者 UK114 －型抗原用酶（例如在 ELISA 技术中）或者用放射性或者荧光，化合物，染料或者色素等进行适当的标记。该免疫复合物信号可以选择性地利用生物素－抗生物素蛋白系统而增强。

该方法的构成以及相应的材料的选择完全属于普通技术人员的技能。

现已发现存在于已用 WO92/10197 公开的蛋白或者纯化的 UK114 处理的病人的血清中的抗－UK114 抗体在体内和体外都具有抗人体肿瘤细胞的细胞毒和溶细胞的活性。在另一实施方案中，本发明还提供了包括单克隆或多克隆抗体或超免疫血清的溶细胞和细胞毒组合物，该抗体是通过用高氯酸从山羊肝脏中提取的并且被保藏于 ECACC 的登记号为 930806103 或者 930806104 的杂交瘤分泌的单克隆抗体所识别的蛋白免疫动物或者人而产生的。

在体内试验中，细胞毒活性在该抗原给药（ UK114 或者 UK101 ）后几天即达到高峰并且在随后的几周缓慢降低。但是，根据 ELISA 法测评的 IgG 型的抗－ UK114 抗体的效价则是随着时间而缓慢提高。因此，可以推测细胞毒性的第一个峰是由于 IgM －型抗体，和/或者其它现在还未知的血清成分而形成的。

无论如何，用于检测抗体和/或者细胞毒性从而使得治疗可以适当地监控的方法的重要性是明显的。

按照本发明无论施用天然抗体还是单克隆抗体都可以充足剂量在胃肠外进行以达到细胞毒效应。这些合适的给药方法基本上和那些已知的疫苗，抗体或者超免疫血清的给药方法相同。本发明和下列的实施例 2－4 为上述抗体的治疗和诊断应用提供了进一步的准则。

下述实施例进一步阐明了本发明。

实施例 1

将2.5 % SDS和5 %巯基乙醇加入10 μ l的山羊肝脏的高氯酸抽提液（ WO92/10197:UK101 ）中。将样品加热至100 ℃， 5分钟，并且取4 μ l用PHAST SYSTEM仪器（ Pharmacia ）进行聚丙烯酰胺8/25梯度凝胶（ Pharmacia ）的SDS - PAGE分析。另外还可以使用高密度的均相凝胶。用Phast - 转移（ Pharmacia ）仪器将分离的蛋白电泳转移。硝化纤维素膜（ 0.22 μ ）事先在加入了20 %甲醇的Tris （ 25mM ）甘氨酸（ 192mM ）缓冲液中平衡。电泳在5V × 20分钟条件下进行（ I A/cm^2 ）。为了防止非特异性结合，在饱和步骤后，将膜与检测的血清一起温育。

选择性存在的抗体的结合可用适当标记的第二抗人 A_3b 以比色法，放射免疫测定法或化学发光法进行检测。

实施例2

酚联免疫吸附测定法（ ELISA ）检测UK114抗体。

使用以下缓冲液:

（ A ）50mM 碳酸氢钠 pH8.5，

（ B ）50mM 磷酸钠 pH7.2，

（ C ）50mM 磷酸钠 pH7.4， 0.1%(w/v) NaN_3

（ D ）40mM 磷酸钾 pH7.4， 150mM NaCl,0.02%(w/v)NaN_3, 0.05(v/v) Tween 20,

（ E ）50mM 磷酸钠 pH7.4， 0.1 % (w/v) NaN_3,0.1% (w/v)BSA，

（ F ）50mM 磷酸钠 pH7.4， 150mM NaCl,0.1%(w/v)NaN_3, 0.5%(w/v)无蛋白酶的 BSA， 0.05%(v/v)Tween20， 正常山羊血清

将3.5ml UK114(3.5mg)的缓冲液A溶液和9 μ l的NHS - LC生物素（ S.P.A.,米兰）的二甲基亚砜溶液（ 2mg/ml ）混合. 将混合物于22 ℃温育3小时并于4 ℃在Spectrapor 6透析管中对缓冲液B进行透析（除去3500D），中间更换几次缩冲液B。

将微量滴定孔于4 ℃用100 μ l BSA - 生物素（ 5 μ g/ml的缓冲液C溶液)包被24小时,然后洗涤并用100 μ l抗生蛋白链菌素（ 5 μ g/ml

的缓冲液 E 的溶液）处理。在第二次 4 ℃过夜温育后，洗涤各孔并于 4 ℃用 100 μ l 的 UK114 - 生物素以不同浓度（ 2， 1 和 0.5 μ g/ml 的缓冲液 E 的溶液）处理 24 小时。洗涤后，各孔被封闭。

除了在第三次温育步骤中使用缓冲液 E 代替 UK114 - 生物素溶液外，可按照相同的步骤制作未包被抗原孔。

该洗涤步骤可通过加入 300 μ l/孔的缓冲液 D 三次而进行。封闭可以通过加入 300 μ l 的含有 10 % 的蔗糖和不同的封闭剂（ 1 % 和 5 % 的牛血清白蛋白， 1 % 的甘氨酸，加入 3 % 的聚乙烯吡咯烷酮的 1 % 的 BSA， 5 % 的正常山羊血清）的缓冲液 C 而进行。室温 30 分钟后，弃去封闭液并在真空室干燥，然后包入聚乙烯和钴箔中 4 ℃贮存备用。

ELISA 步骤

在测定前将血清样品和阴性对照按 1： 21 用缓冲液 F 稀释。将 100 μ l 样品和标准溶液（ 1， 2， 4 和 8 μ /ml 的缓冲液 F 的溶液）加入包被孔中并在水平振荡器上（ 400 - 500rpm ）于室温温育 1 小时。用 300 μ l 缓冲液 D 洗涤各孔四次，然后加入 100 μ l 的溶解于 Stabilgen 缓冲液中的 1： 3000 的山羊抗人 IgG 辣根过氧化物酶标记的抗体溶液。在水平振荡器（ 400 - 500rpm)上室温温育 1 小时后，洗板并用 100 μ l Blue Star 溶液（ H_2O_2/TMB ）展开。在室温下（ 18 - 24 ℃）温育 15 分钟后，加入 100 μ l 1M H_2SO_4 终止反应，在双波长光度计上以 630nm 为参比波长读取 450nm 处的光密度（ OD ）。

OD 值高于 8 μ /ml 的标准液的样品可在测定前作进一步稀释。

样品的浓度可从标准曲线上计算出。

测定受过免疫治疗的病人体内的效价

对那些经受 UK101 治疗的病人进行抗 UK114 抗体效价测评发现仅仅在 UK101 给药（ 4 次皮下注射）15 天后，抗体应答在 28 % 乳癌患者和 46 % 结肠癌患者体内比背景值高。从开始 UK101 治疗 40 天后，可以分别在 63 % 结肠癌和 97 % 乳癌患者体内检测出抗 UK114 抗体效价的增加（图 1 和 2 ）。

实施例 3

抗 UK114 抗体对肿瘤细胞系的细胞毒效应

该细胞毒性研究使用分别用由保藏于ECACC的第930806103号杂交瘤P3D1DII分泌的单克隆抗体和兔多克隆抗UK114抗体（rAb）间接免疫荧光表面染色阳性和阴性的KATO－III（胃癌）和NICH（小细胞肺癌）肿瘤细胞系。该细胞毒性是在异源的（豚鼠）或者同源的补体存在下或者在纯化的人单核细胞存在下，将细胞系和不同浓度的mAb P3D1DII，Rb抗114Ab或者作为对照和无关的单克隆或多克隆抗体一起培养不同的时间，以该细胞系中释放的^{51}Cr的百分数来测评的。现已发现除了无关的对照抗体外，mAb P3D1DII和抗UK114rAb都能诱导KATO－III的补体依赖性细胞毒性，但当热灭活或者C9缺陷性血清用作补体源时则没有这种情况。当C9缺陷性血清用纯化的C9再生时，细胞毒性便得到恢复。此外，当KATO－III用作靶细胞时，Rb抗UK114Ab而并非无关的RbAb诱导抗体依赖性细胞毒性（ADCC）。用纯化的抗原预吸收抗UK－114Ab消除了抗体诱导的细胞毒性。相反，对于NICH没有观察到补体细胞毒性或者ADCC。这些结果提示抗UK114抗体对表面表达UK114抗原的肿瘤细胞系具有潜在的补体和抗体细胞依赖性细胞毒性。

实施例4

用人肿瘤细胞系异种移植的裸鼠体内的抗UK114抗体的细胞毒性

用1×10^6HT29人结肠腺癌细胞皮下注射以攻击裸鼠。8小时后，在它们的肿瘤部位注射0.2ml的用UK114免疫兔而产生的抗UK114兔超免疫（1/12效价）血清。分别在攻击后第7，11，14，18，21，25天重复以上处理过程。另一组小鼠则用已对UK－114给药发生临床反应并产生抗UK114抗体的肿瘤病人的血清进行类似的处理。

对照组只接受赋形剂。该处理组显示出统计学意义上的寿命的明显延长和肿瘤携带数的降低。和对照组相比，处理组的肿瘤潜伏期也明显延长。作为例子，用兔抗血清和人血清所得的结果记载于下表。

处理	肿瘤携带数	潜伏期（天）	存活时间（天）
对照	12/12	9	30
兔抗UK114血清	2/12	28	84
人抗UK114血清	5/20	23	67

说　明　书　附　图

结肠癌患者抗 UK114 抗体在 UK101 治疗过程中的增加

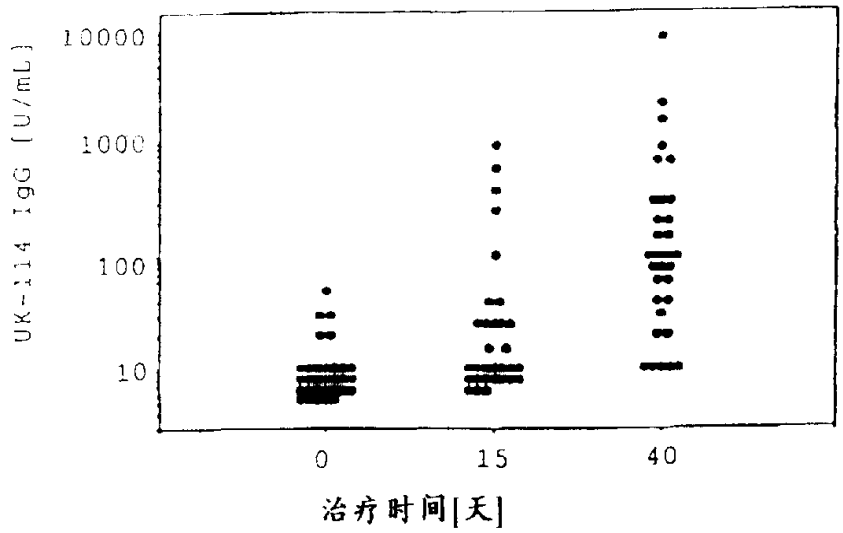


图 1

胸部肿瘤患者抗 UK114 抗体在 UK101 治疗过程中的增加

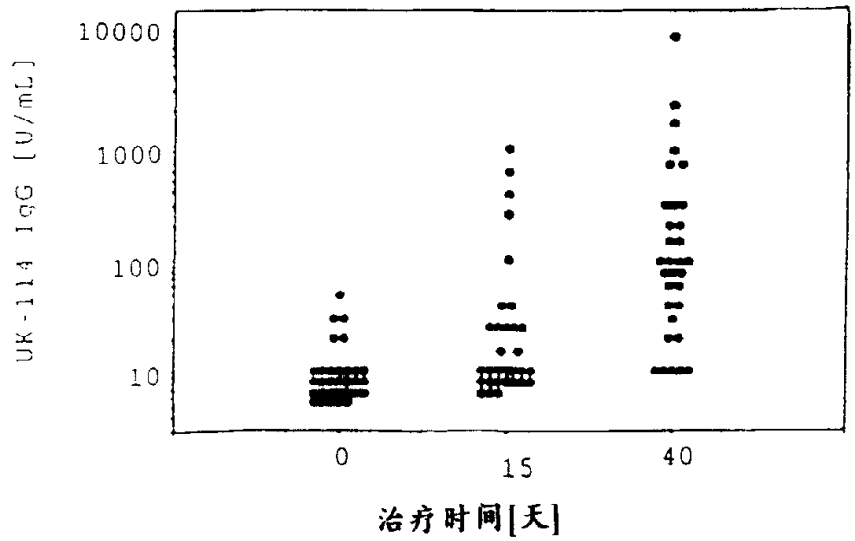


图 2