

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07K 16/28

C12N 5/20 G01N 33/577

A61K 39/395 A61K 49/00



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 95194169.0

[45] 授权公告日 2003 年 10 月 22 日

[11] 授权公告号 CN 1125083C

[22] 申请日 1995.6.2 [21] 申请号 95194169.0

[30] 优先权

[32] 1994.6.8 [33] DE [31] P4419913.9

[32] 1994.9.2 [33] DE [31] P4431297.0

[86] 国际申请 PCT/EP95/02126 1995.6.2

[87] 国际公布 WO95/33771 德 1995.12.14

[85] 进入国家阶段日期 1997.1.16

[71] 专利权人 贝林格尔·英格海姆国际有限公司

地址 联邦德国英格海姆

共同专利权人 卡尔斯鲁尔研究中心

[72] 发明人 冈瑟·R·阿道夫

埃里克·帕特泽尔特

[56] 参考文献

CANCERRESEARCH1993,53(18) 1993-09-01 K.

HEIDER, ET, AL, EXPRESSION, OF, ALTERNATIVELY,

SPLICED, FORMS, OF, THE, CD44EXTRACELLULAR -

MATRIX, RECEPTOR, ON

THEJOURNALOFCELLBIOLOGY1993122(2) 1993-07

-01 MARKO, SALMI, ET, AL, REGULATED, EXPRES-

SION, OF, EXON, V6, CONTAINING, ISOFORMS, OF,

CD44IN, MAN, :DOWNREGULATION

审查员 丁慧萍

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

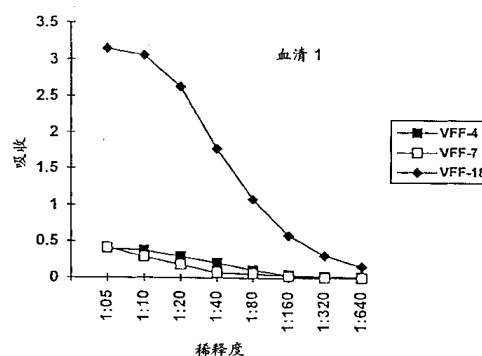
代理人 黄益芬

权利要求书 2 页 说明书 20 页 附图 7 页

[54] 发明名称 抗 CD44v6 单克隆抗体

[57] 摘要

本发明涉及一种对由 CD44 基因外显子 v6 变体编码的抗原表位具有抗表位活性的抗体。该抗体的特征优于现有技术中的抗体，并适合于治疗和诊断上的应用。



- 1、抗 CD44 基因可变外显子 v6 编码的氨基酸序列中抗原表位的抗体，其特征在于，该抗体是由保藏号为 DSM ACC 2174 的杂交瘤细胞系产生的
- 5 抗体 VFF-18。
- 2、保藏号为 DSM ACC 2174 的杂交瘤细胞系。
- 3、抗 CD44 基因可变外显子 v6 编码的氨基酸序列中抗原表位的抗体分子，可以通过对权利要求 1 所述抗体进行化学修饰或酶修饰而获得，其中所述抗体分子在结合特异性和亲和力方面与权利要求 1 所述抗体等效。
- 10 4、权利要求 3 的抗体分子，其特征在於，该抗体分子是权利要求 1 所述抗体的片段，其中所述片段在结合特异性和亲和力方面与权利要求 1 所述抗体等效。
- 5、权利要求 4 的抗体分子，其特征在於，该抗体分子是 Fab 片段或 F(ab')₂ 片段。
- 15 6、权利要求 3 的抗体分子，其特征在於，所述抗体与放射性同位素、放射性化合物、酶、荧光染料、生物素分子、毒素、细胞抑制剂、前药、放射性物质、细胞因子或免疫调节多肽联接。
- 7、权利要求 6 的抗体分子，其特征在於，所述抗体与毒素联接。
- 8、权利要求 3 至 5 中任一项所述的抗体分子，其特征在於，该抗体分
- 20 子与一种放射性同位素联接。
- 9、具有权利要求 1 所述抗体的独特型的重组抗体分子。
- 10、权利要求 9 的重组抗体分子，其特征在於，该重组抗体分子是嵌合的、人源化的、或单链的抗体分子，或者是经链改组产生的抗体分子。
- 11、权利要求 9 或 10 的重组抗体分子，其特征在於，该重组抗体分子
- 25 与另外一个分子联接，或与一个放射性同位素联接。
- 12、与权利要求 1 的抗体识别相同抗原表位的抗体分子。
- 13、权利要求 1 或 3 至 12 中任一项的抗体或抗体分子在人体外或动物体外检测方法中的应用。
- 14、权利要求 13 的应用，其特征在於，所述方法是一种酶联免疫测定
- 30 法或一种放射免疫测定法。
- 15、权利要求 13 的应用，其特征在於，所述方法是免疫组织化学方法。

16、权利要求 1 或 3 至 12 中任一项的药用抗体或抗体分子。

17、权利要求 1 或 3 至 11 中任一项的抗体或抗体分子在制备体内诊断试剂方面的应用。

抗 CD 44v6 单克隆抗体

5 本发明涉及能抗由 CD44 基因变体外显子 v6 编码的抗原表位的单克隆抗体、由其衍生的抗体分子、以及这种抗体和抗体分子在诊断和治疗方面的应用。

近来已发现，无论是大鼠未转移胰腺癌细胞系还是大鼠未转移纤维肉瘤细胞系，对于引发所谓自发转移行为，表面糖蛋白 CD44 变体的表达是必要和充分条件(Gunthert 等, 1991)。最小的 CD44 同型即标准形式的 CD44(或 CD44std)，普遍在包括上皮细胞的不同组织中表达，而一些 CD44 剪切变体(CD44v, CD44var)只在上皮细胞的亚群中表达。由可变剪切而产生 CD44 变体的方法是使 CD44 中 10 个外显子(v1 ~ v10)序列完全剪切，但能以不同组合出现在较大变体中(Screaton 等, 1992; Tolg 等, 1993; Hofmann 等, 1991)。这些变体的不同之处在于，不同氨基酸序列被插入蛋白质细胞外部分的某些位点。这样的变体可在各种人肿瘤细胞以及人肿瘤组织中检测到。因此，近来已详细研究了发生结肠直肠癌情况下 CD44 变体的表达(Heider 等, 1993a)。CD44 变体不在正常人结肠上皮中表达，只在腺管增殖细胞中可检测到微弱的表达。在肿瘤如腺癌的发展后期，所有恶性肿瘤都表达 CD44 变体。在攻击性非 Hodgkin 淋巴瘤中也已发现高水平的变体 CD44 的组织表达(Koopman 等, 1993)。尤其在转移扩散的情况下，外显子 v6 似乎起着特殊作用(Rudy 等, 1993)。在动物模型中，抗 v6 特异性表位的抗体能防止转移细胞的滞留和转移病灶的生长(Seiter 等, 1993)。在结肠癌中，v6 表达与肿瘤发展相互关联(wielenga 等, 1993)。在胃癌中，v6 表达是区分肠道类型肿瘤与扩散类型肿瘤的重要诊断标志(Heider 等, 1993b)。在后两篇论文中，v6 表达用抗 v6 特异性抗原表位的抗体来测定。

现有技术中已知抗外显子 v6 所编码的表位的单克隆抗体(Hofmann 等, 1991; Wielenga 等, 1993)。由于这样的抗体在诊断和治疗中会有高潜力的应用性，因此非常需要特性改进的抗体。

30 本发明的目的是提供一种与已知 v6 特异性抗体相比特性好得多的抗体。

本发明可实现这一目的。本发明涉及一种名称为 VFF-18 的抗体。本发明还涉及分泌这种抗体的杂交瘤细胞系，而且该杂交瘤细胞系已保藏在德国微生物与细胞培养物保藏股份有限公司(DSM-Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH)，其地址为 Mascheroder Weg 1b, 5 D-38124 Braunschweig)，保藏登记号为 DSM ACC2174。

下文中所用术语“抗体”或“抗体分子”不仅仅指完全的免疫球蛋白，也指结合特异性和亲和力方面等效的物质，以及抗体衍生物和重组抗体分子。

本发明的抗体 VFF-18 按实施例 1 中的方法来制备。该抗体还可用所保藏的杂交瘤细胞系获得。制备本发明抗体衍生物，或者从抗体序列分析开始和/或使用杂交瘤细胞系来生产该抗体，制备具有相同独特型的重组抗体分子，也即在抗原结合位点区(互补决定区，CDR)具有与抗体 VFF-18 相同氨基酸序列的抗体分子，这些都属普通专业人员的技术范围内。因此，这样的衍生物以及重组抗体分子显然也包括在本发明中。

15 举例来说，Fab 或 F(ab')₂ 片段或其它片段可从 VFF-18 抗体的完全免疫球蛋白中产生(Kreitman 等，1993)。例如，在诊断过程中，可将 VFF-18 抗体分子、其片段或者具有相同独特型的重组抗体分子连接到放射性同位素象 ¹³¹I, ¹¹¹In, ^{99m}Tc 或放射性化合物[Larson 等，1991; Thomas 等，1989; Srivastava, 1988]、酶如过氧化物酶或碱性磷酸酶(Catty et Raykundalia, 20 1989)、荧光染料(Johnson, 1989)、或生物素分子(Guesdon 等，1979)。在治疗应用中，可将 VFF-18 或 VFF-18 衍生的抗体分子与毒素(Vitetta 等，1991; Vitetta et Thorpe, 1991; Kreitman 等，1993; Theuer 等，1993)、细胞抑制剂(Schrappe 等，1992)、前药(Wang 等，1992, Senter 等，1989)或放射性物质连接。该抗体还可与细胞因子或免疫调节多肽，例如肿瘤坏死因子或白介素-2 连接。

25 另外，在对抗体 VFF-18 的氨基酸序列进行分析后和/或通过使用能产生这种抗体的杂交瘤细胞系，特别是通过分析这些细胞中所含的基因信息之后，专业人员还能生产与 VFF-18 具相同独特型的重组抗体分子。实现这些目的的方法构成本领域技术的一部分。这样的重组抗体，譬如可以是人源化抗体(Shin 等，1989; Güssow et Seemann, 1991)、双特异抗体(Weiner 等，30 1993; Goodwin, 1989)、单链抗体(scFv, Johnson et Bird, 1991)、完全的免疫球

蛋白或免疫球蛋白片段(Coloma 等, 1992; Nesbit 等, 1992; Barbas 等, 1992), 或者经链改组所生成的抗体(Winter 等, 1994)。人源化抗体可以通过例如 CDR 嫁接来制备(EP-0239400)。构架区也可加以修饰(EP-0519596)。目前, 对于抗体的人源化, 可以使用如 PCR 方法(参考例如 EP 0368684; EP 0438310; 5 WO 9207075)或计算机模拟方法(例如参考 WO 9222653)。也可制备融合蛋白, 例如单链抗体/毒素融合蛋白(Chaudhary 等, 1990; Friedman 等, 1993)。因此这种抗体分子同样也包括在本发明内。

鉴别 VFF-18 的确切抗原表位, 及利用这一知识来制备具相同结合特异性的等价抗体, 也属本领域普通专业人员的技能范围之内的事。准确的抗原表位可以通过实施例 2 中肽结合试验来鉴别, 例如通过改变肽 Hul 的序
10 列。因此, 这样的抗体同样也在本发明的范围内。

本发明的另一方面是 VFF-18 或 VFF-18 衍生的或等效的抗体分子在诊断和治疗中的应用。

诊断方法可以是本身已知的方法, 其中使用本发明抗体分子, 例如酶
15 联免疫测定法(ELISA Catty 及 Raykundalia, 1989)、放射免疫测定法(Catty 及 Murphy, 1989), 免疫组织化学法(Heider 等, 1993b), 或 western 印迹法。较为适宜的是这些方法可以用从机体采得的组织样品或例如从活组织中采得的液体来进行。进行这些试验可以是定性的, 半定量的或定量的。本发明中, 所述抗体或抗体分子可以如现有技术中对其它 v6 特异抗体所说明的那
20 样来使用(WO 9500851), 而且本发明抗体或抗体分子的优越性质意味着这些方法大有改进。

除体外诊断外, 本发明抗体分子也适于体内诊断, 特别是肿瘤诊断。如果该抗体分子携带可检测标记, 则可为诊断目的, 例如体内给肿瘤成像, 或者譬如为放射辅助治疗目的(放射指导的外科手术)而检测该标记。举例来
25 说, 对于为进行免疫闪烁照相(成像)而使用与放射同位素结合的抗体, 有许多可供专业人员实施本发明的方法(Siccardi 等, 1989; Keenan 等, 1987; Perkins 和 Pimm, 1992; Colcher 等, 1987; Thopson 等, 1984)。

治疗应用可以例如类似于使用抗体 1.1 ASML(Seiter 等, 1993)的方法来进行。应用时抗体分子可以全身或局部施药, 例如经静脉(快速输注或长时间输注)、腹膜内、肌内或皮下注射或输注。也可以灌流单个器官或肢体。
30 偶联或未偶联抗体(完全免疫球蛋白、片段、重组嵌合分子、等等)的给药方

法属现有技术(Mulshine 等, 1991; Larson 等, 1991; Vitetta 及 Thorpe, 1991; Vitetta 等, 1991; Broitz 等, 1992; Press 等, 1989; Weiner 等, 1989; Chatal 等, 1989; Sears 等, 1982)。

实施例 2 至 4 证明了 VFF-18 的性质比其它抗 CD44v6 抗体优越。

5

附图说明

图 1: GST-CD44(v3-v10)融合蛋白的示意图。GST = 日本血吸虫 (*Schistosoma japonicum*)的谷胱甘肽-S-转移酶。v3-v10 = 角质形成细胞 CD44 的变体插入片段。箭头标明凝血酶切割位点。

10 图 2: 人和大鼠 CD44 基因外显子 v6 的序列对照。抗体 1.1 ASML(抗大鼠 CD44v6)或 VFF-18(抗人 CD44v6)分别识别的肽 Ral 和 Hul 的序列用粗体字母标出, 使之醒目。相同的氨基酸以星号标出。

图 3: CD44v6 特异性抗体与合成肽的结合。抗体与肽的结合用 ELISA 测定, 测定时将肽固定, 然后同抗体溶液一起温育。经合适的冲洗步骤后, 15 以过氧化物酶偶联的抗小鼠 IgG 抗体来测定所结合的抗体。(A): 在第一次实验中, 证明了大鼠特异性 CD44v6 抗体 1.1 ASML 结合在肽 Ral(KWFEN EWQGK NPPT)上。(B): 在另一次实验中, 合成了由人 CD44v6 序列衍生的 Ral 同源肽。不同的抗人 CD44v6 杂交瘤上清液与此种肽 Hul(QWFGN RWHEG YRQT)结合。此实验表明, VFF-18 与肽结合得比其它所检测的抗 20 体好得多。(C): 为进行定量评定起见, 以不同浓度的纯化抗体重复进行了此实验。该实验也证明, VFF-18 具有比其它抗体更高的结合亲和力。

图 4: 放射标记抗体与肿瘤细胞的结合。三种抗体 VFF-7(抗 v6)、VFF-8(抗 v5), 和 VFF-18(抗 v6)用 N-琥珀酰亚胺基[2,3-³H]丙酸酯进行放射标记, 并用于不同肿瘤细胞系的结合测定。测定时, 使用下列细胞系: 25 CHO-CD44var: 在细胞表面表达人变体 CD44(外显子 v3-v10)的重组仓鼠细胞系(中国仓鼠卵巢); HCT-116、CX-1、HT-29、CaCo、COLO205: 人结肠癌细胞系; A431: 人鳞状细胞癌细胞系。表明了抗体与不同细胞系 CHO-CD44var 有着特异性结合。v6 特异抗体 VFF-7 和 VFF-18 对重组体细胞系的结合具有相同的数量级, 而抗体对不同肿瘤细胞系显示了非常不同 30 的结合行为。在一些情况下, 只可见 VFF-18 的结合和 VFF-8 的较小程度结合(HT-29, CaCo, COLO205), 而在其它细胞系的情况下, VFF-18 的结合

比 VFF-7 好得多。

图 5: 测定正常人血清中含外显子 v6 的可溶性 CD44 变体。将 3 种 v6 特异抗体 VFF-4、VFF-7、和 VFF-18 在夹心 ELISA 中用作包被抗体。在所有这三种情况下, 均使用过氧化物酶连接的 CD44std 特异抗体(BU-52, std = 标准)作为检测抗体。在这些试验((A)及(B))中, 显示出两种不同正常人血清在不同稀释度时的信号。在这两种情况下, 用 VFF-18 观察到比用另两种抗体强得多的信号。

图 6: 含 v6 的 CD44 变体的血清水平。用两种不同 ELISA 测定 6 名健康供者血清中可溶解 CD44var 的含量。在一次试验中使用 VFF-7 作为包被抗体, 而在另一次试验中使用 VFF-18 作为包被抗体; 两种抗体均识别外显子 v6。在这两种情况下, 将 CHO 细胞中产生的重组可溶性 CD44 变体(外显子 v3-v10)作为对照制剂。在平均情况下, VFF-18 ELISA 显示出比 VFF-7 ELISA 高 3.5 倍的值。这意味着, VFF-18 比 VFF-7 能更好地识别血清中出现的可溶性 CD44var。

15

实施例

实施例 1: 单克隆抗体 VFF-18 的制备

20 pGEX 融合蛋白的克隆

将 CD44v 的 HPKII 型(Hofmann 等, 1991)整个可变区经聚合酶链反应(PCR)从人角质形成细胞 cDNA 中扩增。正如 Hofmann 等所述, LCLC97 可变区的 5'-CAGGCTGGGAGCCAAATGAAGAAAATG-3', 位置 25-52, 和 5'-TGATAAGGAACGATTGACATTAGAGTTGGA-3', 位置 1013-984, 用做 PCR 引物, 这两个 PCR 引物包含 EcoRI 识别位点用来将 PCR 产物直接克隆到载体 pGEX-2T 中(Smith 等, 1988)。所得构建体(pGEX CD44v HPKII, v3-v10)编码大约 70 千道尔顿的融合蛋白, 由日本血吸虫(*Schistosoma japonicum*)的谷胱甘肽-S-转移酶和人 CD44 外显子 v3-v10 组成(图 1; Heider 等, 1993a)。融合蛋白在大肠杆菌(*E.coli*)中表达, 然后在谷胱甘肽琼脂糖上进行亲和层析纯化(Smith 等, 1988)。

30

免疫和筛选

根据下面方法，用亲和纯化后的融合蛋白对雌性 Balb/C 小鼠腹膜内免疫接种：

- 5 1.免疫接种：弗氏完全佐剂中 90 μ g 融合蛋白
- 2.和 3.免疫接种：弗氏不完全佐剂中 50 μ g 融合蛋白。

诸免疫接种各隔四星期进行。最后一次接种后 14 天，动物另外在三天连续时间内用溶于磷酸盐缓冲盐水(PBS)中的 10 μ g 融合蛋白免疫接种。继后一天，用聚乙二醇 4000 使具有高抗体效价的动物脾细胞与 P3.X63-Ag 10 8.653 小鼠骨髓瘤细胞融合。继而在微量滴定平板上在 HAT 培养基中选择杂交瘤细胞(Köhler 及 Milstein, 1975; Kearney 等, 1979)。

- 用 ELISA 分别进行血清中抗体效价的测定和杂交瘤上清液的筛选。在该试验中，首先用融合蛋白(GST-CD44v3-10)或只用谷胱甘肽 S-转移酶包被微量滴定平板。然后，用血清样品或杂交瘤上清液的系列稀释物进行温育，
- 15 用抗小鼠免疫球蛋白过氧化物酶偶联的抗体来检测特异性抗体。弃除只与谷胱甘肽-S-转移酶反应的杂交瘤。然后用结构域特异性融合蛋白(外显子 v3, 外显子 v5 + v6, 外显子 v6 + v7, 外显子 v8-v10)鉴定保留的抗体(Koopman 等, 1993)，然后在人皮肤切片上测试这些抗体的免疫组织化学反应性。然后通过合成肽 Hul(QWFGN RWHEG YRQT)的结合来鉴别抗体 VFF-18。
 - 20 Hul 序列是人 CD44 外显子 v6 的一个片段。

实施例 2: CD44v6 特异抗体与合成肽的结合

应用 ELISA 测定 CD44v6 特异抗体与合成肽的结合。

溶液：

- 25 包被缓冲液：0.05M 碳酸钠，pH9.6
- 测定缓冲液：PBS(磷酸盐缓冲盐水)
- 0.5 % BSA(牛血清白蛋白)
- 0.05 % Tween 20

底物溶液: Kierkegaard & Perry Laboratories 公司，Gaithersburg Md, USA;

- 30 TMB 过氧化物酶底物：过氧化物酶溶液 B(H_2O_2)1:1。

在 4℃ 下，将肽(50 μ g/ml，溶于包被缓冲液中)在购自 Bio Products 公

司的 NUNC Maxisorp 免疫平板(1.1 ASML)或 Acti A 平板上(VFF 抗体)固定过夜。在 Acti A 平板情况下,肽与平板共价结合。接着,用 PBS/0.05 % Tween 20 冲洗平板,平板表面空出来的吸附位点用测定缓冲液封阻(室温,1 小时),然后再次用 PBS/0.05 % Tween 20 冲洗。经封阻后,用溶于 20mM 碳酸氢钠的 10mM 硼氢化钠(pH9.0)还原 Acti A 平板(室温下摇荡 1 小时),再用 PBS/0.05 % Tween 20 冲洗三次。然后,将溶于浓度在 0.02 和 10.0 μg/ml 之间的测定缓冲液中的杂交瘤上清液或抗体溶液加到小孔中并在滴定板振荡器中室温温育 2 小时。随后,用 PBS/0.05 % Tween 20 冲洗平板三次。然后,加入以合适稀释度溶于测定缓冲液的辣根过氧化物酶偶联抗小鼠 IgG 抗体 100 μl/孔。在滴定板振荡器上室温温育 2 小时后,冲洗三次,并向各孔中加入底物溶液。10-15 分钟后,用 2M 硫酸停止显色,用光度计在 450nm(参考 690nm)测定吸收值。

在第一次实验中测定了大鼠 CD44v6 特异性抗体 1.1 ASML 对肽 Ral(KWFEN EWQGK NPPT)的结合(表 1, 图 3(A))。

15

表 1

1.1 ASML μg/ml	吸收
10.00	1.652
5.00	1.702
2.50	1.658
1.25	1.595
0.63	1.502
0.31	1.211
0.16	0.971
0.08	0.686
0.04	0.458
0.02	0.270

在另一组实验中,合成了与 Ral 同源、从人 CD44v6 序列衍生的肽(Hul, QWFGN RWH EG YRQT)。使不同抗人 CD44v6 抗体与 Hul 结合。该试验表明,与所检测的其它抗体相比,VFF-18 与这种肽的结合亲和力高得出乎预料(表 2, 图 3(B))。

20

表 2

抗体	吸收值
VFF-2	0.067
VFF-4	1.333
VFF-7	0.199
VFF-18	2.384

此外，为进行定量评价，还以不同浓度纯化的抗人 CD44v6 抗体与肽 Hul 结合。这里也可以看到，与其它抗体相比，VFF-18 显然具有更好的结合亲和性(表 3，图 3(C))。

表 3

μg/ml 抗体	VFF-4	VFF-7	VFF-18
10.000	1.225	0.247	2.320
3.333	1.404	0.226	2.550
1.111	0.853	0.094	2.483
0.370	0.336	0.054	2.426
0.123	0.163	0.028	1.354
0.041	0.086	0.025	0.615
0.014	0.048	0.021	0.266
0.005	0.036	0.031	0.095
0.002	0.021	0.021	0.061

实施例 3：放射标记的 CD44v6 特异性抗体与肿瘤细胞系的结合

10 抗体的放射标记

将 1mCi N-琥珀酰亚胺基-[2,3-³H]丙酸酯([³H]-NSP, Amersham, 1mCi/ml) 在硅烷化样品细管中，在 0℃喷水抽真空下蒸发几乎至干。加入 15 μg 抗体(1mg/ml，溶于 PBS, pH7.4)，并在 4℃温育 48 小时。接着过量的 [³H]-NSP 通过与 PBS 中的 30μl 1M 甘氨酸在室温下反应 20 分钟而猝灭。用 Sephadex G-25-M 柱(柱容积 15ml)并以 PBS/0.5% BSA 为洗脱缓冲液，将标记的抗体与 [³H]-甘氨酸分离。 [³H]-标记的抗体出现在外水体积中。在检测小鼠免疫

球蛋白用的 ELISA 中测定抗体的量，并计算特异活性。

放射标记抗体与肿瘤细胞的结合

用 N-琥珀酰亚胺基-[2,3-³H]丙酸酯对 3 种抗体 VFF-7(抗 v6)、VFF-8(抗 v5)和 VFF-18(抗 v6)进行放射性标记，并用于对不同肿瘤细胞系的结合检测中。检测时，使用了下面的细胞系：CHO-CD44var：在细胞表面表达人变体 CD44(外显子 v3-v10)的重组仓鼠细胞系(中国仓鼠卵巢); HCT-116, CX-1, HT-29, CaCo, COLO 205：人结肠癌细胞系；A431：人鳞状细胞癌细胞系。

细胞在 12 孔的组织培养平板上接种，在 CO₂ 温育箱中在 37℃ 保温过夜，接着用 PBS 冲洗一次，并用乙醇固定(室温下 1 分钟)。然后，用培养基(RPMI 1640/10% 胎牛血清)冲洗一次并与放射性抗体(250000dpm/孔，培养基中)结合。在培养平板振荡器中室温温育 25 小时后，将平板用 PBS/0.5% BSA 冲洗三次，细胞用 0.1M NaOH/1% Triton X-100 溶解，并以闪烁计数器测定放射性。在过量 100 倍的未标记抗体存在下测定非特异性结合。结合以标准化的细胞数(400000 个细胞)为准计。测定抗体的特异活性后，以 fmol 表示被结合抗体的量。

表 4 和图 4 示出抗体对不同细胞系的特异性结合。v6 特异性抗体 VFF-7 和 VFF-18 与重组细胞系 CHO-CD44var 的结合数值大致相同，但这些抗体对于不同肿瘤细胞系显示出极其不同的结合行为。在一些情况下，只可见 VFF-18 结合，和较小程度的 VFF-8 结合(HT-29, CaCo, COLO 205)，而在其它细胞系的情况下，VFF-18 结合比 VFF-7 好很多。

表 4

细胞系	VFF-7 fmol	VFF-8 fmol	VFF-18 fmol
CHO CD44var	33.50	68.42	46.52
HCT-116	1.44	11.08	20.22
CX-1	0.19	2.20	9.48
HT-29	0.00	2.60	26.07
CaCo	0.03	2.81	12.57
COLO 205	0.00	0.32	2.88
A431	8.19	42.32	38.73

实施例 4: 测定血清中可溶性 CD44v6 的 ELISA

溶液:

包被缓冲液: 0.05M 碳酸钠, pH9.6

5 测定缓冲液: PBS(磷酸盐缓冲盐水)

0.5 % BSA(牛血清白蛋白)

0.05 % Tween 20

样品稀释剂: Bender MedSystems 公司, 维也纳(Vienna), 奥地利(Austria)

底物溶液: Kierkegaard & Perry Laboratories 公司, Gaithersburg MD, 美国;

10 TMB 过氧化物酶底物: 过氧化物酶溶液 B(H₂O₂)1:1。

用 5 μg/ml CD44v6 特异性抗体包被微量滴定平板(Nunc-Immuno plate MaxiSorp F 96)(4℃下保温过夜)。然后, 用 PBS/0.05 % Tween 20 冲洗平板, 平板表面上空的吸附位点用测定缓冲液封阻(室温, 1 小时), 再冲洗平板一次。用样品稀释剂将血清样品至少以 1:5 的比例预稀释, 再在平板中用样品
15 稀释剂连续以 1:2 的比例进行稀释。紧接着, 在测定缓冲液中以适宜的稀释度(1:3000-1:10000)加入 50 μl/孔辣根过氧化物酶偶联的抗 CD44std 抗体(克隆 BU-52, The Binding Site, Birmingham)。在振荡器上室温温育 3 小时后, 用 PBS/0.05 % Tween 20 冲洗三次, 并加入底物溶液。10 至 15 分钟后, 用 2M 硫酸停止显色, 用光度计在 450nm(参考 690nm)处测定吸收值。

20 为定量测定, 与血清样品平行制备了可溶性 CD44 标准样品溶于测定缓冲液的系列稀释样品。此制剂在表达可溶性 CD44v3-v10 的重组仓鼠细胞(CHO)上清液中纯化。CD44v3-v10 是一种含有外显子 v3 至 v10 编码肽序列的人 CD44 变体。

表 5 和图 5 表明正常人血清中含有外显子 v6 的可溶性 CD44 变体。三
25 种 v6 特异性抗体 VFF-4、VFF-7 和 VFF-18 分别用作夹心 ELISA 中的包被抗体。在所有这三种情况下, 均以过氧化物偶联的 CD44std 特异性抗体(BU-52, std = 标准)作检证抗体。在这些测试中, 显现出两种不同正常人血清在不同稀释度时的信号。在(A)和(B)的两种情况下, 可观察到 VFF-18 的信号比其它两种抗体强得多。

30

表 5A 血清 1

稀释度	VFF-4	VFF-7	VFF-18
1:5	0.406	0.417	3.143
1:10	0.378	0.289	3.055
1:20	0.296	0.179	2.630
1:40	0.207	0.072	1.778
1:80	0.109	0.062	1.084
1:160	0.050	0.030	0.594
1:320	0.026	0.008	0.318
1:640	0.012	0.007	0.159

表 5B 血清 2

稀释度	VFF-4	VFF-7	VFF-18
1:5	1.690	1.280	3.290
1:10	1.756	1.185	3.321
1:20	1.564	0.857	3.163
1:40	1.213	0.468	3.050
1:80	0.699	0.208	2.537
1:160	0.336	0.061	1.666
1:320	0.138	0.014	0.988
1:640	0.054	0.018	0.546

- 5 表 6 和图 6 显示了含 CD44 变体的 v6 的血清水平。用两种不同的 ELISA 测定了 6 个健康供者血清中可溶性 CD44var 的含量。在一个试验中,用 VFF-7 作包被抗体,而在另一个试验中用 VFF-18 作包被抗体;两种抗体均能识别外显子 v6。在两种情况下,都用 CHO 细胞中生产的重组可溶性 CD44 变体(外显子 v3-v10)作为对照制剂。VFF-18-ELISA 显示出平均比 VFF-7-ELISA
- 10 高 3.5 倍的数值。这意味着,与重组体蛋白质相比,VFF-18 比 VFF-7 能更好地识别血清中产生的可溶性 CD44var。

表 6

供者	VFF-7 ng/ml	VFF-18 ng/ml	VFF-18/VFF-7
1	18.2	75.9	4.17
2	32.1	85.5	2.66
3	22.4	87.6	3.91
4	27.7	91.6	3.31
5	26.8	98.3	3.67
6	95.4	332	3.48
平均值			3.53
SD			0.52
CV %			14.9%

参考文献

- Barbas C F, Bjorling E, Chiodi F, Dunlop N, Cababa D, Jones T M, Zebedee S L, Persson M A A, Nara P L, Norrby E, Burton D R. “重组的人 Fab 片段体外中和人的 1 型免疫缺陷病毒” Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:9339 - 9343(1992).
- 5 Breitz H B, Weiden P L, Vanderheyden J - L, Appelbaum J W, Bjorn M J, Fer M F, Wolf S B, Ratcliff B A, Seiler C A, Foisie D C, Fisher D R, Schroff R W, Fritzberg A R, Abrams P G. 铼 - 186 标记的单克隆抗体用于进行放射免疫治疗的临床实验: I 期试验结果. J. Nucl. Med. 33:1099 - 1112(1992).
- 10 Catty, D., Raykundalia, C. ELISA 和相关免疫测. In: Catty, D(Hrsg). Antibodies Vol. II. IRL Press Oxford(1989), 97 - 152, pp105 - 109 .
- Catty, D., Murphy, G. 应用放射标记的免疫测定. In: Catty, D(Hrsg). Antibodies
15 Vol. II. IRL Press Oxford(1989), pp77 - 96 .
- Chatal J - F, Saccavini J - C, Gestin J - F, Thedrez P, Curtet C, Kremer M, Guerreau D, Nolibe D, Fumoleau P, Guillard Y. 为治疗卵巢癌对患者腹膜内注射的铟 111 标记的 OC 125 单克隆抗体生物分布. Cancer Res. 49:3087 -
20 3094(1989).
- Chaudhary V K, Batra J K, Galdo M G, Willingham M C, Fitzgerald D J, Pastan I. 将大肠杆菌中功能可变区的抗体基因克隆为单链免疫毒素的快速方法. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:1066(1990).
- 25 Colcher D, Esteban J, Carrasquillo J A, Sugarbaker P, Reynolds J C, Bryant G, Larson S M, Schlom J. 单克隆抗体(B 72.3)在癌症患者腔内和静脉内给药的互补作用. Cancer Res. 47:4218 - 4224(1987).
- 30 Coloma M J, Hastings A, Wims L A, Morrison S L. 用聚合酶链反应产生的可变区表达抗体分子的新运载体. J. Immunol. Methods 152:89 - 104(1992).

- Friedmann P N, McAndrew S J, Gawlak S L, Chace D, Trail P A, Brown J P, Siegall C B. BR96 sFv - PE40, 选择性杀死癌细胞的有效单链免疫毒素
Cancer Res. 53:334 - 339(1993).
- 5
- Goodwin D A. 关于用抗肝素嵌合的抗体来对人肿瘤进行标靶特异单克隆抗体问题的新探索. J. Nucl. Med. Biol. 16:645(1989).
- Gunthert, U., Hofmann, M., Rudy, W., Reber, S., Zoller, M., HauBmann, I.,
10 Matzku, S., Wenzel, A., Ponta, H., 和 Herrlich, P., 糖蛋白 CD44 的新变体使大鼠癌细胞转移成为可能. Cell 65:13 - 24(1991).
- Guesdon, J.I., Ternynck, T., Avrameas, S.J. Histochem. Cytochem. 27:1131(1979).
- 15
- Gussow D, Seemann G.单克隆抗体的人源化作用. Methods Enzymol. 203:99 - 121(1991):
- Heider, K. - H., Hofmann, M., Horst, E., van den Berg, F., Ponta, H., Herrlich, P.,
20 和 Pals, S.T.大鼠转移相关的 CD44 变体的人同系物在结肠直肠癌和腺瘤性息肉中被表达. J. Cell Biol. 120:227 - 233(1993a).
- Heider, K - H., Dammrich, J., Skroch - Angel, P., Muller - Hermelink, H - K., Vollmers, H - P., Herrlich, P., 和 Ponta, H. CD44 剪切变体在肠和扩散型人胃癌
25 和正常胃粘膜中的分化表达. Cancer Res. 53:4197 - 4203(1993b).
- Hofmann, M., Rudy, W., Zoller, M., Tolg, C., Ponta, H., Herrlich P., 和 Gunthert, U. 大鼠体内 CD44 剪切变体具有新陈代谢行为: 同源序列在人肿瘤细胞系中表达. Cancer Res. 51:5292 - 5297(1991).
- 30
- Johnson, G. D.免疫荧光. In: Catty, D(Hrsg). Antibodies Vol. II. IRL Press

Oxford(1989), 179 - 200, pp180 - 189 .

Johnson S, Bird R E.单克隆抗体单链衍生物的构建和其在大肠杆菌中的产生. *Methods Enzymol.* 203:88 - 98(1991).

5

Kearney, J.F., Radbruch A., Liesegang B., Rajewski K. 新的小鼠骨髓瘤细胞系丧失了免疫球蛋白表达但可构建分泌抗体的杂交细胞系. *J. Immunol.* 123:1548(1979).

- 10 Keenan A M, Weinstein J N, Carrasquillo J A, Bunn P A, Reynolds J C, Foon K A et al.免疫淋巴闪烁法和皮肤 T 细胞淋巴瘤患者对 ^{111}In - 标记的 T101 单克隆抗体的剂量依赖性. *Cancer Res.* 47:6093 - 6099(1987).

- 15 Kohler, G., Milstein, C.预先测定的特异性分泌抗体及融合细胞的连续培养. *Nature* 265:495(1975)

Koopman, G., Heider, K. - H., Horts, E., Adolf, G.R., van den Berg, F., Ponta, H., Herrlich, P., Pals, S.T.活化的人淋巴细胞和凝集、Non-Hodgkin's 淋巴瘤表达大鼠转移相关 CD44 变体的同系物. *J. Exp. Med.* 177:897 - 904(1993).

20

Kreitman R J Hansen H J, Jones A L, FitzGerald D J P, Goldenberg D M, Pastan I. 含有抗体 LL2 或 LL2 - Fab' 的以假单孢菌外毒素为基础的免疫毒素诱导小鼠中皮下人 B - 细胞淋巴瘤的退化. *Cancer Res.* 53:819 - 825(1993).

- 25 Larson S M, Cheung N - K V, Leibel S A. 放射同位素缀合物. In: DeVita V T, Hell - man S, Rosenberg S A(Eds.).癌症的生物治疗. *J. B. Lippincott Comp., Phila - delphia*, 496 - 511(1991).

- 30 Mulshine J L, Magnani J L, Linpoila R I:单克隆抗体在治疗固体癌中的应用. In: DeVita V T, Hellman S, Rosenberg S A(Eds.).癌症的生物治疗. *J.B. Lippincott Comp., Philadelphia*, pp563 - 588(1991).

- Nesbit M, Fu Z F, McDonald - Smith J, Steplewski Z, Curtis P J.从杆状病毒表达系统生产一种能识别人结肠直肠癌细胞的功能单克隆抗体. J. Immunol. Methods 151:201 - 208(1992).
- 5 Perkins A C, Pimm M V. 癌免疫和免疫治疗中 γ 闪烁照相法的作用. Eur. J. Nucl. Med. 19:1054 - 1063(1992).
- Press O W, Eary J F, Badger C C, Martin P J, Appelbaum F R, Levy R, Miller R, Brown S, Nelp W B, Krohn K A, Fisher D, DeSantes K, Porter B, Kidd P, Thomas E D, Bernstein I D.用放射标记的 MB - 1(抗 - CD37)抗体治疗顽固的 Non - Hodgkin's 淋巴瘤. J. Clin. Oncol. 7:1027 - 1038(1989).
- 10 Rudy, W., Hofmann, M., Schwartz - Albiez, R., Zoller, M., Heider, K. - H., Ponta, H., Herrlich, P.在转移性的大鼠肿瘤细胞系中表达的两种主要CD44蛋白是由不同剪切变体衍生的: 每种蛋白各自足以具有转移行为. Cancer Res. 53:1262 - 1268(1993).
- 15 Schrappe M, Bumol T F, Apelgren L D, Briggs S L, Koppel G A, Markowitz D D, Mueller B M, Reisfeld R A.4 - 去乙酰基长春灭瘟碱 - 3 - 羧基酰肼和单克隆抗体化学免疫缀合物对于人神经胶质瘤异种移植的长期生长的抑制. 9.2.27. Cancer Res. 52:3838 - 3844(1992).
- 20 Screatton, G. R., Bell, M.V., Jackson, D.G., Cornelis, F.B., Gerth, U., 和 Bell,J.I. 编码淋巴细胞返巢受体 CD44 的 DNA 基因组结构显露出至少 12 种可变剪切外显子. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:12160 - 12164(1992).
- 25 Sears H F, Mattis J, Herlyn D, Hayry P, Atkinson B, Ernst C, Steplewski Z, Koprowski H. 单克隆抗体在治疗胃肠癌中的 I 期临床试验. Lancet 30 1982(1):762 - 765(1982).

- Seiter, S., Arch, R., Reber, S., Komitowski, D., Hofmann, M., Ponta, H., Herrlich, P., Matzku, S., Zoller, M. 使用抗变体 CD44 防止肿瘤转移. *J.Exp. Med.* 177:443 - 455(1993).
- 5 Senter P D, Schreiber G J, Hirschberg D L, Ashe S A, Hellstrom K E, Hellstrom I. 用单克隆抗体 - 碱性磷酸酶缀合物增强磷酸化丝裂霉素 C 和鬼臼乙叉甙衍生物的体外和体内抗肿瘤活性. *Cancer Res.* 49:5789 - 5792(1989).
- Shin S - U, Morrison S L. 嵌合抗体分子的生产 and 性质. *Methods Enzymol.* 10 178:459 - 475(1989).
- Smith, D.B., Johnson, K.S. 在大肠杆菌中表达的与谷胱甘肽 S - 转移酶融合物多肽的一步纯化法. *Gene* 67:31 - 40(1988).
- 15 Srivastava S C(Hrsg). 用于成像和治疗的放射标记单克隆抗体. *Life Sciences Series A* 152, Plenum New York(1988).
- Tolg, C., Hofmann, M., Herrlich, P., 和 Ponta, H. 自 10 个变体外显子进行剪切选择建立的 CD44 变异性. *Nucleic Acids. Res.* 21:1225 - 1229(1993).
- 20 Theuer C P, Kreitman R J, FitzGerald D J, Pastan I. 用不需要活性的蛋白酶解的假单胞菌外毒素 A 的重组体形式生成免疫毒素. *Cancer Res.* 53:340 - 347(1993).
- 25 Thompson C H, Stacker S_A, Salehi N, Lichtenstein M, Leyden M J, Andrews J T. 肺癌淋巴结转移的免疫闪烁照相法检测. *Lancet* 1984(2):1245 - 1247(1984).
- Thomas G D, Kydes P W, Bradwell A R. 肿瘤抗体的免疫检测和抗体标记的方法. In: Catty D(Ed.). *Antibodies*. IRL Press Oxford, (1989), pp223 - 244.
- 30 Vitetta E S, Thorpe P E. Immunotoxins. In: DeVita V T, Hellman S, Rosenberg S

A(Eds.). 癌症的生物治疗. J.B. Lippincott Comp., Philadelphia, 482 - 495(1991)

5 Vitetta E S, Stone M, Amlot P, Fay J, May R, Till M, Newman J, Clark P, Collins R, Cunningham D, Ghetie V, Uhr J W, Thorpe P E. 对 B 细胞淋巴瘤患者的 I 期免疫毒素试验. Cancer Res. 51:4052 - 4058(1991).

10 Wang S - M, Chern J - W, Yeh M - Y, Ng J C, Tung E, Roffler S R. 癌症治疗中抗体定向酶缀合物对葡萄糖苷酸前药的特异性活化. Cancer Res. 52:4484 - 4491(1992).

15 Weiner L M, O'Dwyer J, Kitson J, Comis R L, Frankel A E, Bauer R J, Koprad M S, Groves E S. 抗肺癌单克隆抗体 260F9 重组体的蓖麻毒蛋白 A 链免疫缀合物的 I 期评价. Cancer Res. 53:4754 - 4756(1993).

Winter, G., Griffith, A. D., Hawkins, R. E., Hoogenboom, H. R. 用噬菌体展示技术来制备抗体. Ann. Rev. Immunol. 12:433 - 455(1994).

国际格式 INTERNATIONAL FORM

[专利程序上的关于微生物保藏的国际承认的
布达佩斯条约]

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF
PATENT PROCEDURE

以下遵照国际保藏单位的规则 10.2 发行

VIABILITY STATEMENT

issued pursuant to Rule 10.2 by the INTERNATIONAL
DEPOSITORY AUTHORITY identified on the following
page

存活证明

姓名 Boehringer Ingelheim Int.GmbH (贝林格尔, 英格海姆国际有限公司)
申请人
地址 Postfach 200
55216 Ingelheim am Rhein (D-55216 德国莱茵河畔英格尔海姆市
第 200 号邮政信箱)

I. 寄存人	II. 微生物表示
姓名 Boehringer Ingelheim Int.GmbH	保藏编号: DSM ACC2174
地址 Postfach 200 55216 Ingelheim am Rhein	保藏日期: 1994 年 06 月 07 日
III. 存活试验结果	
关于 II 栏微生物的存活情况, 于 1994 年 06 月 07 日进行了试验, 其结果表明该微生物	
☒ 存活	
☐ 不存活	
IV. 存活试验时使用的条件 (只限于结果否定的情况)	
☐ 微生物条件记录书的副本 _____ 份	
V. 国际保藏单位	
名称: DSM-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH (DSM - 德国微生物与细胞培养物保藏股份有限公司) 地址: Mascheroder Weg 1b (马霞奥达路 1b 号) D-38124 Braunschweig (D-38124 德国布朗斯维克市) 1994 年 06 月 17 日	

国际格式 INTERNATIONAL FORM

[专利程序上的关于微生物保藏的国际承认的
布达佩斯条约]

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF
PATENT PROCEDURE

以下遵照国际保藏单位的规则 7.1 发行

VIABILITY STATEMENT

issued pursuant to Rule 7.1 by the INTERNATIONAL
DEPOSITORY AUTHORITY identified on the bottom of
this page.

保 藏 证 明

姓名 Boehringer Ingelheim Int.GmbH (贝林格尔.英格海姆国际有限公司)
寄存人

地址 Postfach 200

55216 Ingelheim am Rhein (D-55216 德国莱茵河畔英格尔海姆市
第 200 号邮政信箱)

I. 微生物表示	
(寄存人提交的识别表示) VFF-18	保藏编号: DSM ACC2174
II. 科学的性质以及分类学上的位置	
I 栏的微生物附有记载下述事项的文件 ☐ 科学的性质 ☐ 分类学的位置	
III. 受理以及保藏	
本国际保藏单位于 1994 年 06 月 07 日 (原寄存日) 保藏受理的 I 栏的微生物。	
IV. 移交请求的受理	
本国际保藏单位于 ____ 年 ____ 月 ____ 日 (原保藏日) 受领了 I 栏的微生物, 并于 ____ 年 ____ 月 ____ 日受领了由原保藏向基于布达佩斯条约保藏的移交请求。	
V. 国际保藏单位	
名称: DSM-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH (DSM - 德国微生物与细胞培养物保藏股份有限公司) 地址: Mascheroder Weg 1b (马霞奥达路 1b 号) D-38124 Braunschweig (D-38124 德国布罗斯维克市) 1994 年 06 月 17 日	

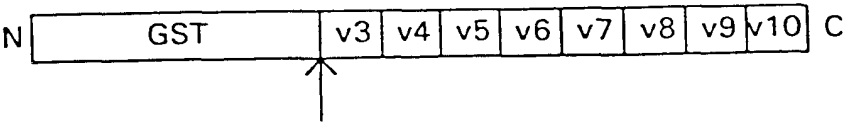


图 1

 * * * * * * * * * * * * * * * * * *

鼠： WADPNSTTEEAATQKEKWFENEWQGKNPPTPSEDSHVTEGT T

人： QATPSSTTEETATQKEQWFGNRWHEGYRQTPREDSHSTTGTA

肽 Ral 或 Hul

图 2

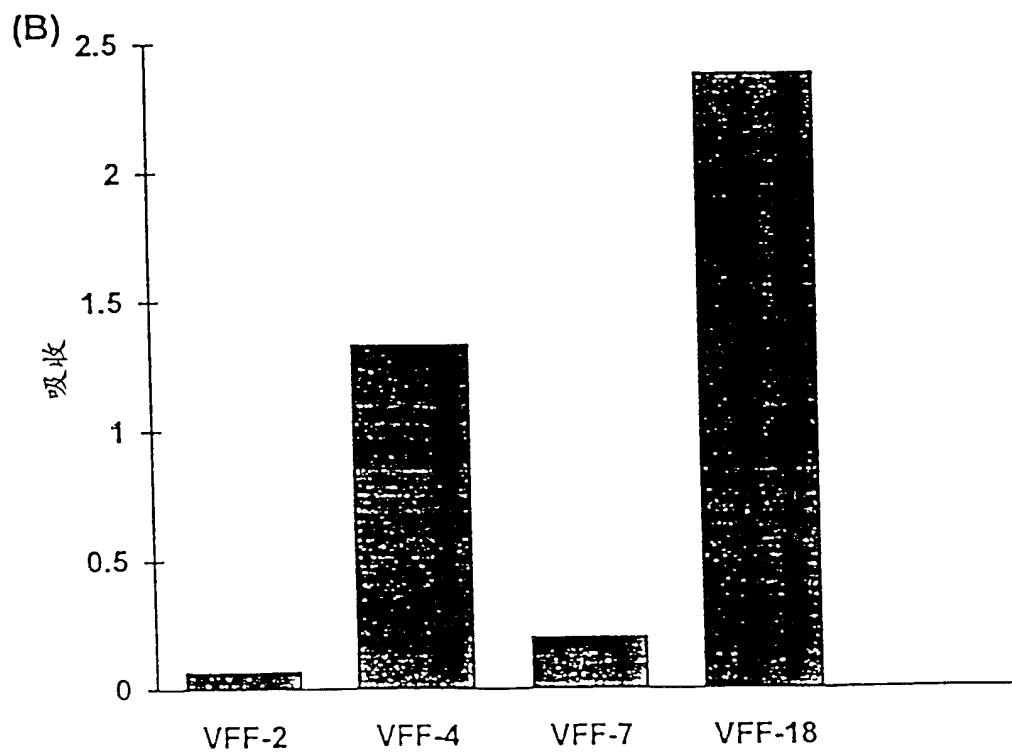
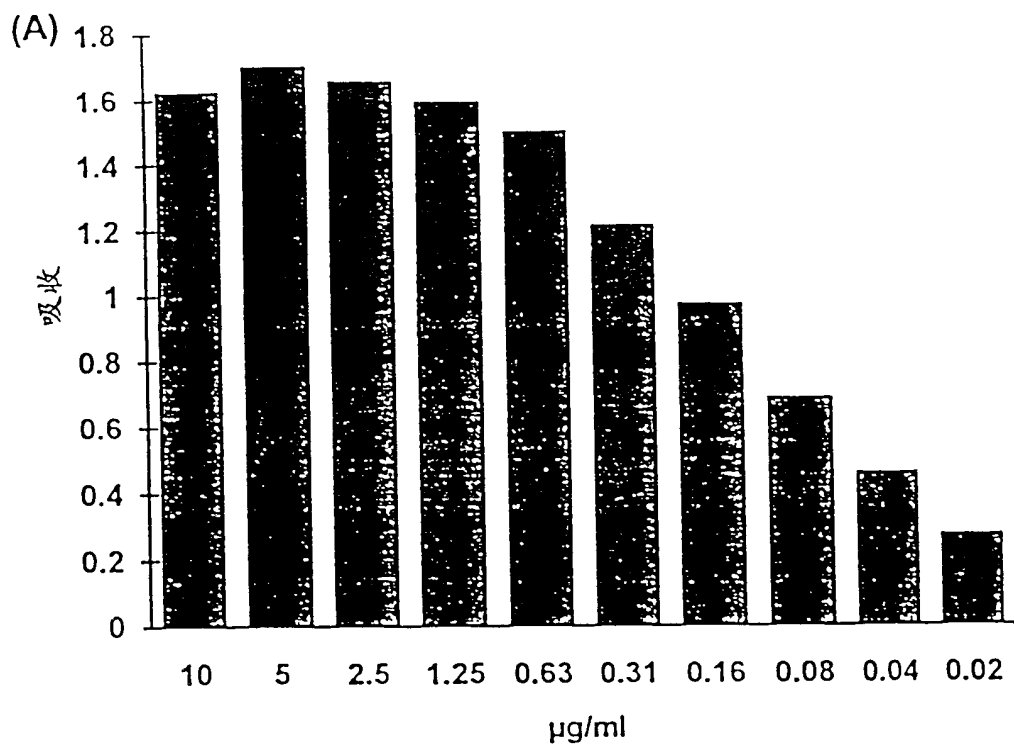


图 3

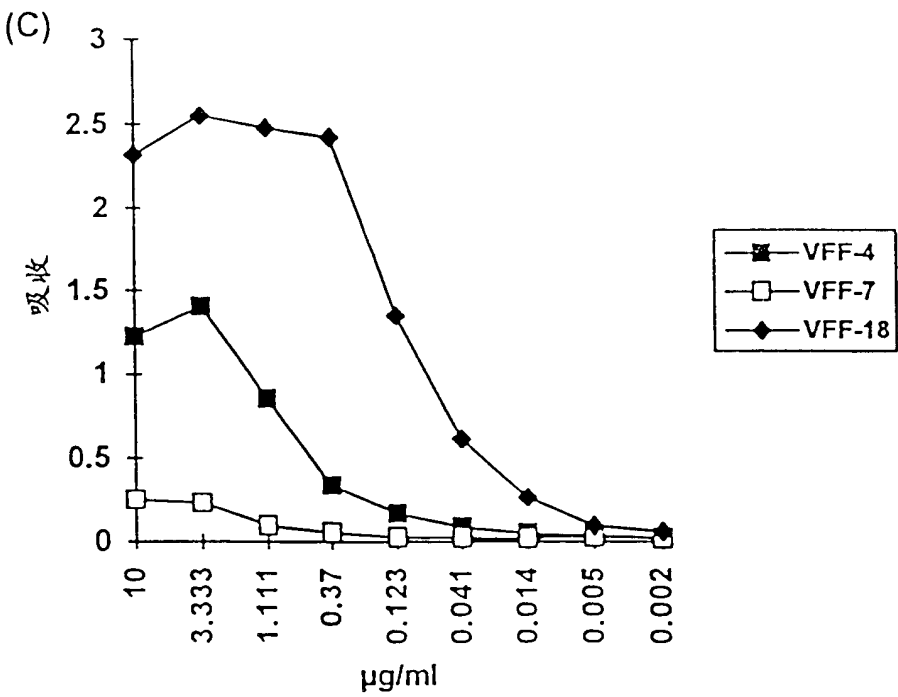


图 3(续)

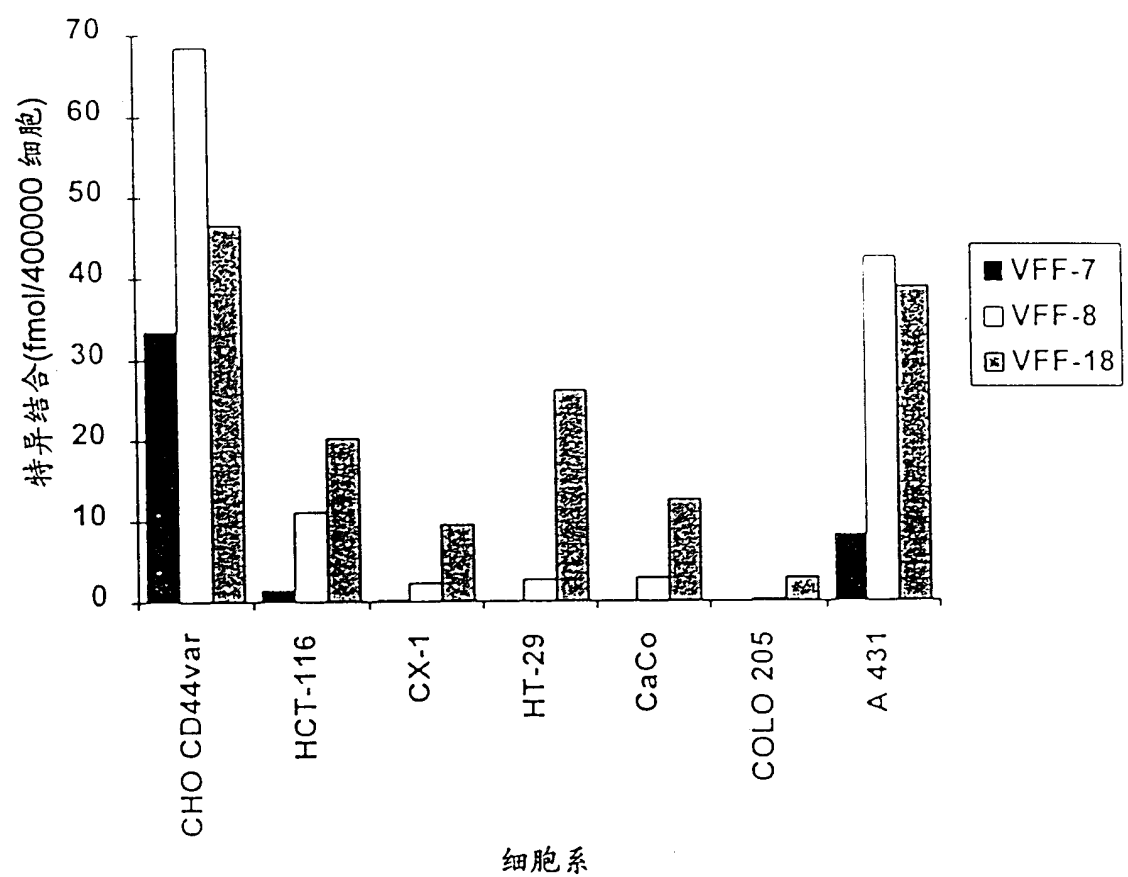


图 4

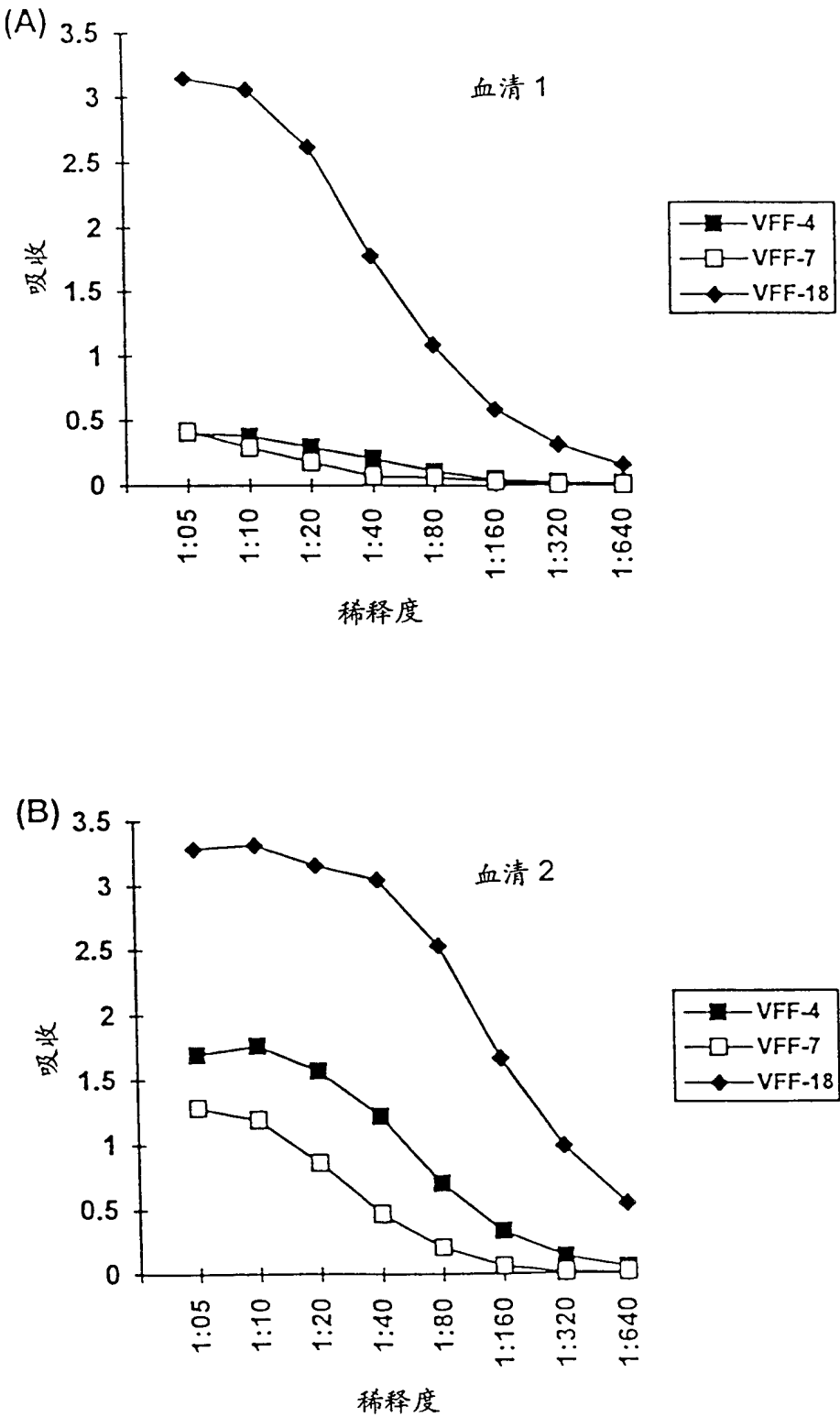


图 5

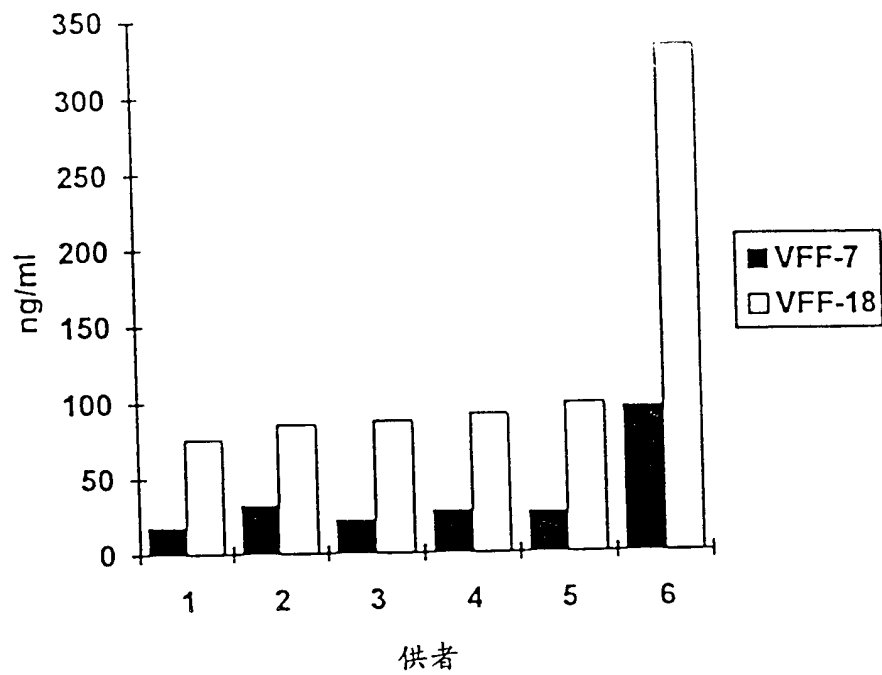


图 6