

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

A61K 31/715 (2006.01)

C08B 37/00 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 00819788.1

[45] 授权公告日 2006 年 12 月 27 日

[11] 授权公告号 CN 1291723C

[22] 申请日 2000.7.3 [21] 申请号 00819788.1

[86] 国际申请 PCT/US2000/018219 2000.7.3

[87] 国际公布 WO2002/002127 英 2002.1.10

[85] 进入国家阶段日期 2003.1.28

[73] 专利权人 生物膜研究所

地址 美国华盛顿

[72] 发明人 S·莱弗里 S-I·哈克莫利

M·斯特劳德

审查员 黄 强

[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 刘晓东

权利要求书 2 页 说明书 19 页 附图 1 页

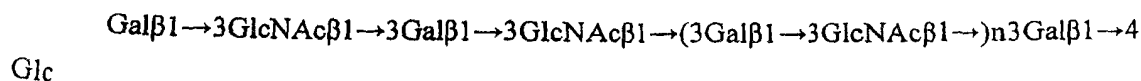
[54] 发明名称

作为肿瘤相关抗原的伸展 1 型链鞘糖脂

[57] 摘要

本发明提供了多种可用作免疫原和肿瘤标记物的化合物。本发明公开了与肿瘤检测相关的方法。显示伸展形式的乳系 1 型链存在于多种癌组织中。本发明还提供了细胞系及由其产生的单克隆抗体。该抗体有许多用途,包括在诊断或治疗方法中的用途。

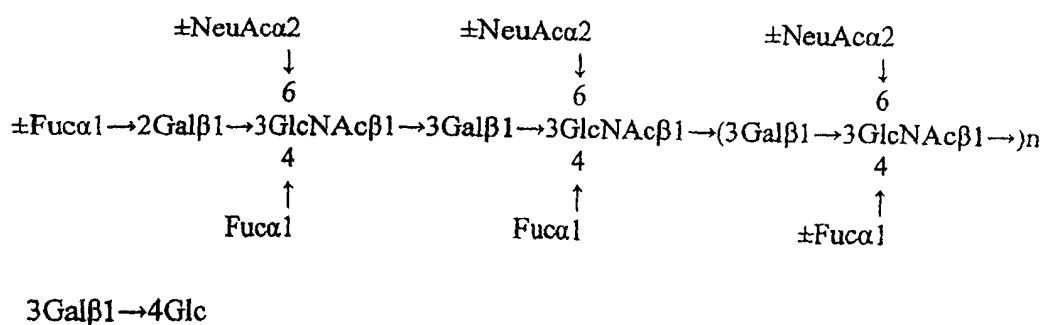
1. 一种分离的化合物，具有通式：



其中n为0或1或更大的整数，有至少两个岩藻糖残基，Gal代表半乳糖，GlcNAc代表N-乙酰葡萄糖胺，并且Glc代表葡萄糖，其中所述的至少两个岩藻糖残基以 $\alpha 1 \rightarrow 4$ 键与GlcNAc残基相连和/或以 $\alpha 1 \rightarrow 2$ 键与末端Gal残基连接，并且进一步包含一个或多个N-乙酰神经氨酸（唾液酸）残基，该N-乙酰神经氨酸残基以 $\alpha 2 \rightarrow 3$ 键与末端的Gal残基相连和/或以 $\alpha 2 \rightarrow 6$ 键与一个或多个亚末端的GlcNAc残基连接。

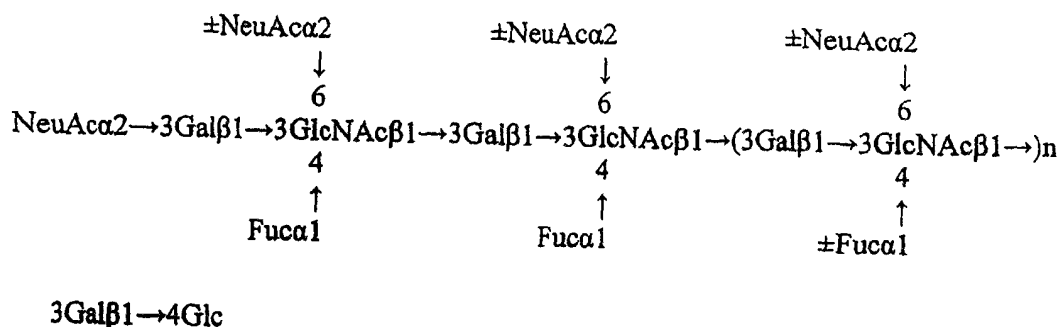
2. 权利要求1的分离的化合物，其中有至少两个唾液酸残基。

3. 权利要求1的分离的化合物，具有通式：



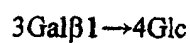
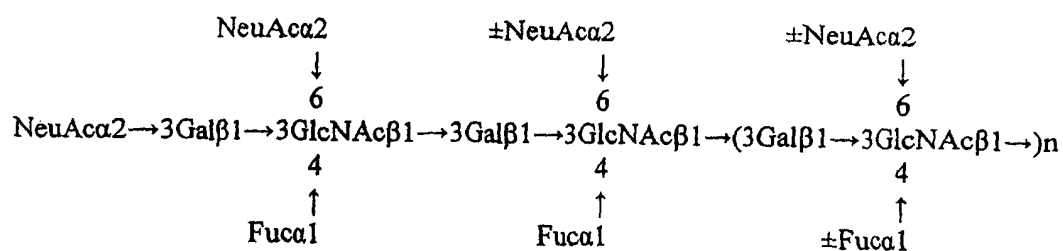
其中Fuc代表岩藻糖，NeuAc代表N-乙酰神经氨酸。

4. 权利要求1的分离的化合物，具有通式：



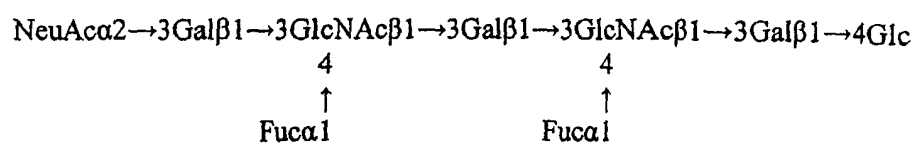
其中Fuc代表岩藻糖，NeuAc代表N-乙酰神经氨酸。

5. 权利要求1的分离的化合物，具有通式：



其中Fuc代表岩藻糖，NeuAc代表N-乙酰神经氨酸。

6. 分离的化合物，具有通式：



其中 NeuAc 代表 N-乙酰神经氨酸，Fuc 代表岩藻糖。

作为肿瘤相关抗原的伸展1型链鞘糖脂

技术领域

本发明一般涉及新型人肿瘤相关抗原。本发明尤其涉及伸展1型链鞘糖脂及其用途，例如，作为免疫原和肿瘤标记物。

发明背景

尽管已投入巨大的财力和人力资源，肿瘤仍然是主要死亡原因之一。当前的肿瘤治疗，只能治愈50%左右发展成恶性肿瘤的患者。在大部分恶性肿瘤中，转移是主要致死原因。

转移是继发性瘤集落在远距离部位的形成。在大多数人恶性肿瘤中，远距离转移通常太小以至于在治疗原发瘤时很难被发现。而且，转移性集落的蔓延性发端，通常在转移性疾病临床症状明显以前发生。次生瘤的大小、寿命、其散布的解剖学位置及其异质性组成都是妨碍手术切除和限制抗癌药物递送至转移性集落处的浓度的因素。因此，要提高当前肿瘤治疗的有效性，需要在肿瘤细胞从原发位置传播前检测出恶性肿瘤。

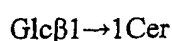
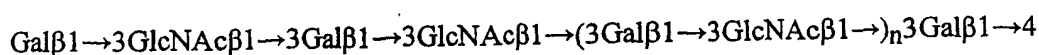
已观察到异常糖基化作用是大多数类型肿瘤的普遍特征。用于人肿瘤诊断的大多数糖抗原带有聚乳糖胺（polylactosamine）结构，即其包含Gal β 1 $\rightarrow$ 3/4GlcNAc。聚乳糖胺通常根据其聚乳糖胺单元结构分为两类。具有Gal β 1 $\rightarrow$ 3GlcNAc结构的聚乳糖胺称为1型链，具有Gal β 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc结构的聚乳糖胺为2型链。在大多数癌中发现的最常见的肿瘤相关抗原具有乳系（lacto-series）2型链结构，通常被唾液酸化和/或岩藻糖基化。正常细胞和组织中富含1型链抗原，其也是癌相关抗原。例如：2 $\rightarrow$ 3唾液酸化的Le^a抗原（N19-9抗体确定的CA19-9抗原）就是一种癌相关的1型链抗原。然而，基于检测这些已知抗原的癌诊断方法受到假阳性率高和/或假阴性率高的阻碍。

鉴于当前癌诊断方法存在的困难，本领域需要对组合物和方法加

以改进。本发明满足了这一需要，并进一步提供了其它相关优势。

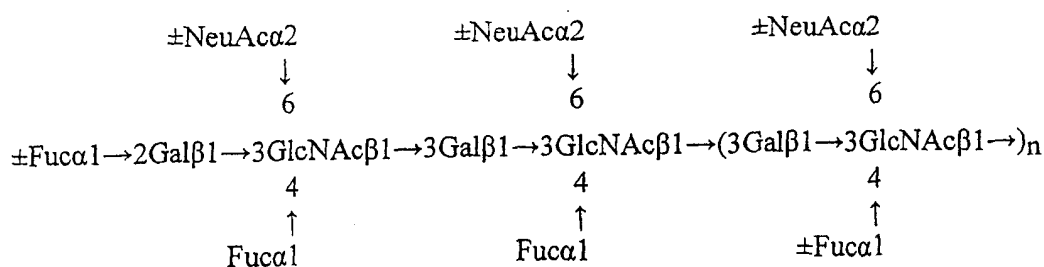
发明概述

简而言之，本发明提供了分离的化合物及通过检测这些化合物来筛选肿瘤的方法。一方面，本发明提供了一种分离的化合物，有或没有岩藻糖基和/或唾液酸残基，具有通式：



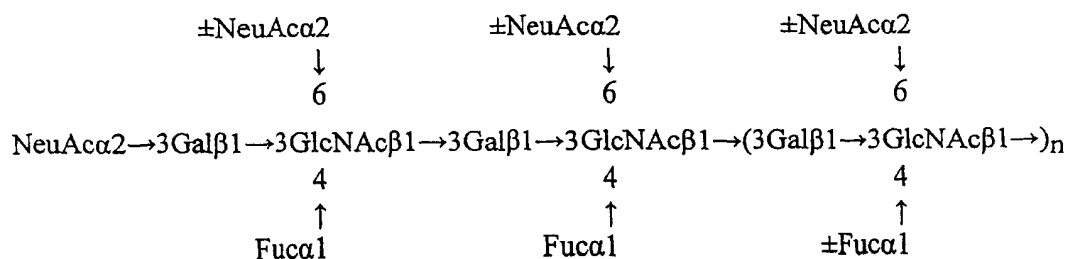
其中n为0或1或以上的整数，至少有两个岩藻糖基和/或一个或多个唾液酸残基，Gal代表半乳糖，Glc代表葡萄糖，GlcNAc代表N-乙酰葡萄糖胺，Cer代表神经酰胺，其中所述的至少两个岩藻糖残基以 $\alpha 1 \rightarrow 4$ 键与GlcNAc残基连接，和/或以 $\alpha 1 \rightarrow 2$ 键与末端的Gal残基连接，所述的一个或多个唾液酸残基以 $\alpha 2 \rightarrow 3$ 键与末端的Gal残基连接，和/或以 $\alpha 2 \rightarrow 6$ 键与一个或多个亚末端的GlcNAc残基连接。

另一方面，本发明提供具有下列通式的上述化合物：



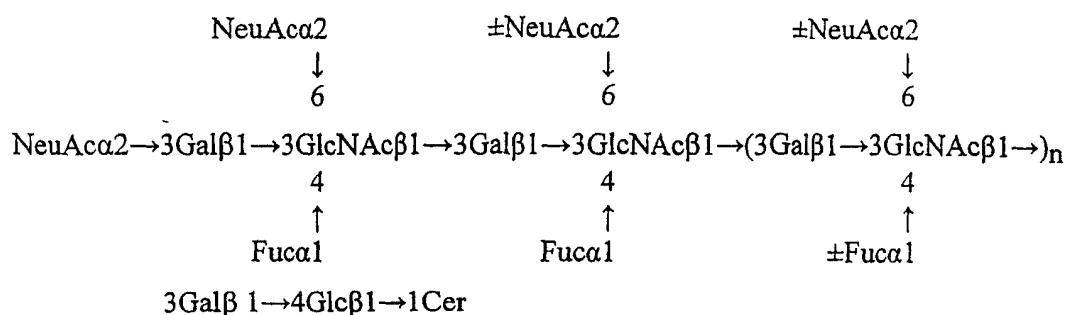
其中Fuc代表岩藻糖，NeuAc代表N-乙酰神经氨酸。

另一方面，本发明提供第一次描述的具有下列通式的化合物：



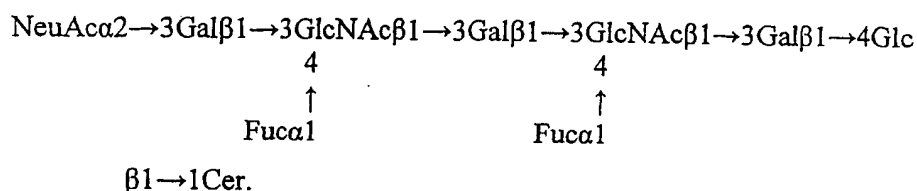
其中Fuc代表岩藻糖，NeuAc代表N-乙酰神经氨酸。

另一方面，本发明提供第一次描述的具有下列通式的化合物：

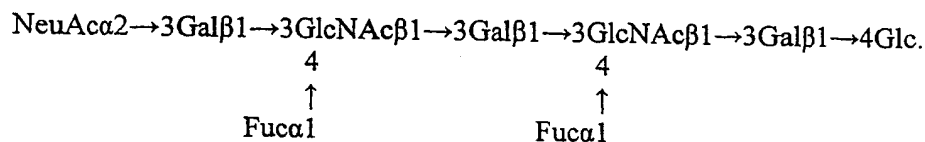


其中Fuc代表岩藻糖，NeuAc代表N-乙酰神经氨酸。

另一实施方案中，本发明还提供具有下列通式的分离的化合物：



再一方面，本发明还提供包含具有下列通式的表位分离的化合物：



在其它方面，本发明中任何化合物都可用作制备多克隆或单克隆抗体的免疫原。

本发明另外还提供了肿瘤筛选的方法。这些方法包括（a）自温血动物分离生物标本；和（b）测定样品中化合物的存在或量。

附图简述

图1为伸展的唾液酸Le^a的¹H-NMR（核磁共振）光谱，化学位移从4.20 ppm到5.60 ppm，包括糖I（Glc）、II（Gal）、III（GlcNAc）、IV（Gal）、V（GlcNAc）和VI（半乳糖和标作F_{III}的与III GlcNAc连接的岩藻糖和标作F_{IV}的与V GlcNAc连接的岩藻糖）。在此光谱中，所有F_V和F_{III}异质子光谱用F_V-1和F_{III}-1标记。另外，岩

藻糖的C5质子光谱用F_{III}-5和 Fv-5标记的多偶合标记。标记为Cis的光谱是指鞘氨醇的Cis双键，用R-5和R-4代表鞘氨醇光谱。

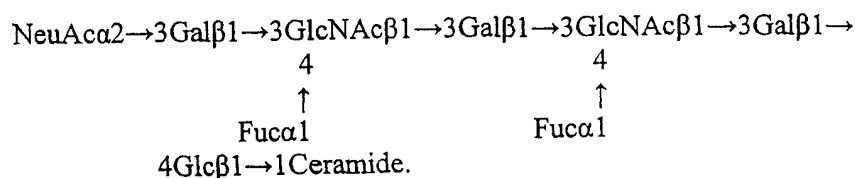
发明详述

本发明一般涉及与癌检测相关的化合物与方法。更具体而言，本发明内容显示，癌组织中存在伸展形式的乳系1型链。

如上所述，已知正常细胞和组织中富含乳糖胺I型链（Galβ1→3GlcNAc）。虽然已检测到具有伸展2型链（即Galβ1→4GlcNAc核心结构的重复的）的聚乳糖胺抗原，但还未检测到具有伸展1型链的聚乳糖胺抗原。因此一般认为乳系1型链不存在伸展形式。

如本发明所公开的，伸展形式的乳系I型链（即Galβ1→3GlcNAcβ1→[3Galβ1→3GlcNAcβ→]_n3Galβ1→R，有或没有唾液酸和/或岩藻糖残基）存在于肿瘤组织中。通过将糖脂组分（从肿瘤细胞中提取）过制备柱和薄层层析，分离到两个代表性的伸展形式乳系1型链。

从结肠腺癌细胞系Colo205的单唾液酰神经节苷脂（monosialyl ganglioside）组分中纯化出同质性的慢迁移唾液酸化-Lewis（sLe^a）活性鞘糖脂（GSL）。该化合物通过HPLC（高效液相层析）和在两种不同溶剂中的制备性HPTLC（高效薄层层析）得以纯化，用α-sLe^a单克隆抗体（MAb）NKH-1经TLC免疫染色强染色。弱酸水解（1%乙酸，100°C 1小时）产生与二聚Le^a标准GSL共迁移，且α-二聚Le^a MAb ST-421可使其强染色快迁移组分。通过¹H-NMR光谱证实其结构为唾液酸-二聚Le^a（见以下结构）。



除上述的特殊糖脂外，Le^a-Le^a和Le^b-Le^a表位与可能以含有附加的[3Galβ1→3GlcNAcβ1→]_n单元的伸展1型链存在。此外，Le^a-Le^a和Le^b-Le^a表位可能由糖蛋白如高分子量粘蛋白样血清糖蛋白所携带。

考虑到此处提供的教导, 其它伸展形式的乳系1型链化合物可从生物原料如肿瘤组织中分离, 或在结构鉴定后化学(和/或酶催化)合成, 这对本领域普通技术人员是显而易见的。简要地, 与脂类或蛋白质结合的糖的结构可基于降解、质谱分析, 包括电子碰撞直接探针(electron-impact direct-probe)(EI)和快速原子轰击(FAB)、甲基化分析(如下所述的方法和, 例如Nudelman等人, *J. Biol. Chem.* 261:5487-5495, 1986)进行测定。降解分析可通过化学和/或酶催化完成, 如通过糖苷酶降解。降解分析显示的糖序列可通过甲基化分析(例如Hakomori, *J. Biochem.* 55:205-208, 1964)、再以过甲基化(permethyated)糖的化学电离质谱分析(例如Stellner等人, *Arch. Biochem. Biophys.* 155:464-472, 1974; Levery等人, *Meth. Enzymol.* 138:13-25, 1987)来确定。或者, 联合使用这些方法, 对过甲基化聚糖或适当降解后的完整聚糖进行EI质谱分析(例如, kannagi等人, *J. Biol. Chem.* 259:8444-8451, 1984; Nudelman等人, *J. Biol. Chem.* 263:13942-13951, 1988)。糖序列的同质性可根据多种化学和物理标准阐明, 包括完整的或甲基化聚糖的质子NMR及FAB质谱分析。一旦确定了糖的结构, 可通过本领域的普通技术人员所熟知的技术合成糖或其衍生物或其非糖类功能等价物。

本发明的化合物可用作制备多克隆和单克隆抗体(MAb)的免疫原。多克隆抗体可按标准方法制备。例如: 简言之, 多克隆抗体可通过用本发明中的化合物免疫动物、然后采集其血清来制备。通常优选在采集血清之前, 在首次免疫后, 再进行一次或多次的加强免疫。MAb通常可采用Kohler和Milstein的方法(*Nature* 256:495-497, 1975; *Eur. J. Immunol.* 6:511-519, 1976)制备。简言之, 取自经本发明中化合物免疫的动物的淋巴结和/或脾, 与骨髓瘤细胞融合产生杂交细胞系("杂交瘤"或"克隆")。每一杂交瘤分泌单一的免疫球蛋白, 并且象骨髓瘤细胞一样, 具有无限分裂的潜能。代替杂交瘤制备单克隆抗体的另一方法是用噬菌体和细菌建立MAb的表达文库(例

如 Sastry 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5728, 1989; Huse 等人, Science 246:1275, 1989)。可以用本领域普通技术人员所熟知的多种方法来筛选具有目的特异性的抗体。

为了增强它们的免疫原性,可能想要将本发明中的化合物与载体联合使用。适当的载体包括灭活的细菌、匙孔血蓝蛋白、甲状腺球蛋白、牛血清白蛋白和它们的衍生物。例如:所有或部分的GSL Le^a-Le^a或Le^b-Le^a的糖残基可与载体联合。本发明中的化合物可通过多种方法与载体联合,包括吸附和共价连接。

使用本发明中化合物作为免疫原的典型实例是用Le^b/Le^a抗原免疫小鼠。简言之,从Colo205细胞中分离的Le^b/Le^a与酸处理的明尼苏打沙门氏菌(*Salmonella minnesotae*)悬浮液联合,经尾静脉注射给BALB/c小鼠,间隔10天重复注射三次。最后一次注射后,采集免疫小鼠的脾细胞,与骨髓瘤细胞融合。建立杂交瘤IMH2(显示对免疫原的选择性反应性),并保藏在ATCC(American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110 USA),为ATCC NO. HB 11026。该杂交瘤产生具有IgG3同种型的Mab 1MH2。

用于检测伸展形式的1型链抗原如Le^a-Le^a和/或Le^b-Le^a抗原的方法可用来筛选肿瘤。例如GSL Le^b-Le^a和GSL Le^a-Le^a,可分别用从多种肿瘤样本制备的中性糖脂组分中的Mab 1MH2和Mab ST-421(根据Watanabe等人, *Jpn. J. Cancer Res (Gann)* 76:43-52, 1985建立)进行TLC免疫染色来检测。这些样本包括来自结肠癌、乳腺癌、何杰金氏病(Hodgkin's disease)、胆囊癌和胚胎性横纹肌肉瘤的组织。例如, GSL Le^a-Le^a在来自脾、肝、肾、胎盘和肺正常组织的糖脂组分中检测不到。考虑到此处提供的教导,可采用本发明方法中的多种方法检测肿瘤相关的伸展1型抗原(包括利用特异针对肿瘤相关伸展1型抗原的结合配偶体;例如GSL Le^a-Le^a和 Le^b-Le^a),这对于本领域普通技术人员来说是显而易见的。例如,可按上述方法制备Le^a-Le^a或Le^b-Le^a表位的特异性抗体,在一定条件下令抗体与生物样本接

触（例如温育），并持续一段时间，足以使免疫复合物形成后，测定免疫复合物的存在。

可通过多种已知方法检测上述抗原和该抗原特异性抗体之间形成的免疫复合物的存在，例如放射免疫测定（RIA）和酶联免疫吸附测定（ELISA）。适当的免疫测定包括David等人（美国专利4,376,110）的双单克隆抗体夹心免疫测定方法；单克隆-多克隆抗体夹心试验（Wide等人，in Kirkham and Hunter, eds., *Radioimmunoassay Methods* E. and S. Livingstone, Edinburgh, 1970）；Gordon等人（美国专利4,452,901）的“western印迹”法；标记配基的免疫沉淀法（Brown等人，*J. Biol. Chem.* 255:4980-4983, 1980）；如Raines和Ross（*J. Biol. Chem.* 257:5154-5160, 1982）描述的酶联免疫吸附测定；免疫组化方法，包括使用荧光染料（Brooks等人，*Clin. Exp. Immunol.* 39:477, 1980）；及活性抑制（Bowen-Pope等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:2396-2400, 1984）。除上述免疫测定外，也可采用许多其它免疫测定方法，包括美国专利：3,817,827；3,850,752；3,901,654；3,935,074；3,984,533；3,996,345；4,034,074；和4,098,876所描述的。

根据检测目的，抗体可以标记也可以不标记。不标记时，抗体可用于凝集试验。此外，未标记抗体也可同能与免疫复合物反应的标记分子联合使用，或者同能与直接针对化合物的抗体反应的标记抗体（第二抗体）（如免疫球蛋白特异性抗体）联合使用。或者，可以直接标记抗体。标记时的报告基团可包括放射性同位素、荧光团、酶、发光物（luminescers）或染料颗粒。这些及其它标记都是本领域众所周知的，并描述于例如在下列美国专利：3,766,162；3,791,932；3,817,837；3,996,345；和4,233,402中。

在免疫复合物检测的一个优选实施方案中，报告基团与抗体结合。检测免疫复合物的步骤包括基本上除去任何未结合的抗体，然后检测报告基团的存在。未结合抗体指那些没有与抗原结合的抗体。

在另一个优选实施方案中，报告基团同能结合抗原特异性抗体的第二抗体结合。免疫复合物的检测步骤包括（a）基本上除去任何未结合的抗体（即不与抗原结合的抗体），（b）加入第二抗体，（c）基本上除去任何未结合的第二抗体，然后（d）检测报告基团的存在。例如，当抗原特异性抗体来自小鼠时，第二抗体为抗-鼠抗体。

在免疫复合物检测的第三个优选实施方案中，报告基团同能与免疫复合物结合的分子相结合。检测步骤包括（a）加入该分子，（b）基本上除去任何未结合分子，然后（c）检测报告基团的存在。能与免疫复合物结合的分子实例是蛋白质A。

采用标记抗原的免疫测定可代替通常的标记抗体、标记的第二抗体或标记的与免疫复合物反应的分子的使用。此类测定（“间接”或“竞争性”）中，样品内的抗原将与标记的抗原竞争该抗体。

本领域普通技术人员显然在本发明中可以采用多种检测免疫复合物方法。适用于任一方法的报告基团包括，放射性同位素、荧光团、酶、发光物和染料颗粒。此外，应意识到可使用本发明中肿瘤相关的伸展1型抗原的特异性结合配体（而不是抗体）来检测该抗原，以及可通过类似上述免疫复合物的检测方法检测该结合配体与抗原间形成的复合物。

提供以下实施例是为了说明而绝不构成限制。

实施例

实施例1 用从肿瘤和正常组织制备的中性糖脂的单克隆抗体NCC-ST-421进行HPTLC免疫染色与免疫测定

A. 单克隆抗体与免疫测定

Mab ST-421如前所述建立（watanabe等人，Jpn. J. Cancer Res. (Gann) 76:43-52, 1985）。识别1型链N-乙酰乳糖胺（Gal β 1 $\rightarrow$ 3G1cNAc β 1 $\rightarrow$ R）的Mab MNH-1，在发明人的实验室制备；识别2型链N-乙酰乳糖胺（Gal β 1 $\rightarrow$ 4G1cNAc β 1 $\rightarrow$ R）的Mab 1B2，按以前所述建立（Young等人，J. Biol. Chem. 256:10967-10972, 1981）。抗-

Le^a MAb 获自Chembiomed Ltd (Edmonton, Alberta, Canada)。抗-Le^y MAb AH6 按以前描述建立 (Abe 等人, J. Biol. Chem. 258, :11793-11797, 1983), 不表现与Le^b的任何交叉反应性。抗-Le^b MAb购自Chembiomed Ltd. (Edmonton, Alberta, Canada), 表现与1型H链的交叉反应性。另一抗-Le^b MAb购自Monocarb (Lund, Sweden), 表现与Le^b、1型H链和Le^y的交叉反应性。通过最初由Magnani 等人 (Magnani 等人, Anal. Biochem. 109:399 - 402, 1980) 所描述方法的改进方法 (Kannagi 等人, J. Biol. Chem., 257:4438-4442, 1982; Kannagi 等人, J. Biol. Chem. 257:14865-14874, 1982), 采用Whatman HPTLC板 (HP - KF) 进行HPTLC免疫染色。

B. 糖脂制剂

所用糖脂样品为分离的或由酶催化合成。VI³NeuAcnLc₆、IV³NeuAcIII⁴FucLc₄、VI²FucnLc₆和IV²FucLc₄分别从人胎盘、肝腺癌、人O型红细胞和猪肠中分离, 用IHW (55:25:20) 抽提后, 再进行Folch分配、DEAE - Sephadex层析和Iatrobeds 6RS 8010柱的HPTLC (Magnani 等人, J. Biol. Chem. 257:14365-14369, 1982; Watanabe 等人, J. Biol. Chem. 254:8223-8229, 1979; Hakomori 等人, J. Immunol. 98:31-38, 1967; Stellner 等人, Biochemistry 12:656-661, 1973)。nLc₆和III⁴FucLc₄通过在1%乙酸中加热样品 100°C 1 小时而分别使 VI³NeuAcnLc₆ 和 IV³NeuAcIII⁴FucLc₄去唾液酸化制备。IV³GlcNAcnLc₄、IV³Gal β 1 → 3 - GlcNAcnLc₄、IV³Gal β 1 → 3[Fuc1 → 4]GlcNAcnLc₄和 IV³Galβ1 → 3[Fuc1 → 4]GlcNAcIII³FucnLc₄ (Le^a-Le^x) 均通过酶促合成制备。IV³Gal β 1 → 3GlcNAcIII³FucnLc₄通过用岩藻糖苷酶处理 IV³Gal β 1 → 3[Fuc1 → 4]GlcNAcIII³FucnLc₄, 即100μg糖脂与含0.05单位的牛肾α-L-岩藻糖苷酶 (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo) 的0.2 M柠檬酸盐缓冲液 (pH 4.5) 于37°C温育2小时来制备。IV²III⁴Fuc₂Lc₄、V³III³Fuc₂nLc₆和 VI²V³Fuc₂nLc₆采用生物合成制备, 方法是以

IV²FucLc₄、nLc₆和 VI²FucnLc₆为底物，用来自Colo205的a1→3/4岩藻糖基转移酶（分别）使其a1→3岩藻糖化。通过在二倍体积的50 mM Hepes缓冲液（pH 7.0）、0.5 M蔗糖、1 mM EDTA和1% Triton CF-54在Potter Elvehjem匀浆器中于4°C匀浆，从Colo205细胞中溶解得到a1→3/4岩藻糖基转移酶。匀浆物以100,000 ×g离心1 小时，上清液经透析后浓缩至细胞原始体积。酶制剂于-80°C保存备用。

酶促a1→3/4岩藻糖基化在总体积为1 ml的含1 mg 鞘糖脂（GSL）底物、1 mg 脱氧牛磺胆酸、10μmol MnCl₂、25μmol Hepes缓冲液（pH7.0）、5μmolCDP-胆碱、6μmol GDP - 岩藻糖和500μl酶制剂的反应混合物中进行。该反应混合物于37°C温育16小时，然后冻干，用异丙醇-己烷-水（IHW）（55:25:20）超声抽提，离心。上清液经Iatrobeads 6RS - 8010柱HPLC，用从55:40:5到55:25:20的IHW梯度洗脱200分钟。按2毫升收集组分，根据在50:40:10的氯仿-甲醇-水中的HPTLC迁移，合并含有终产物的收集管。用苔黑酚喷剂显色GSL带。

具有确定结构的各种GSL的特征在于可与特异性MAb的反应性，即Le^b/Le^a抗原与抗-Le^b MAb反应而不与抗-Le^y MAb AH6反应；Le^y/Le^x与AH6反应而不与抗-Le^b或抗-Le^x MAb反应；Le^a/Le^a和 Le^a/Le^x与抗-Le^a MAb和MAb ST-421反应。

C. TLC免疫染色

从多种肿瘤样本制备的中性糖脂组分的TLC免疫染色显示存在比-Le^a-活性神经酰胺五糖迁移慢、而与抗-Le^a MAb交叉反应的阳性带。该带可被MAb NCC-ST-421强染色，且见于迄今检验过的大多数肿瘤中。实例来自结肠癌、乳腺癌、何杰金氏病、胆囊癌和胚胎性横纹肌肉瘤。

实施例2，二聚化Le^a抗原和Le^b-Le^a抗原的分离

A. 肿瘤组织的制备

Colo205细胞（ATCC）（semple等人，Cancer Res. 38:1345-

1355, 1978) 在含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基中培养。收集细胞, 约每7天传代一次。收集的细胞用胰蛋白酶消化, 离心, 用磷酸盐缓冲盐水 (pH 7.4) 洗两次, 用细胞计数器计数。经皮下给6只无胸 (裸) 小鼠每只注射 4×10^6 细胞。2周后切除肿瘤 (每个大约2 ml) 并保存于 -80°C 备用。

B. 从Colo205肿瘤中分离慢迁移 Le^a -活性组分 (二聚化 Le^a)

约200 g肿瘤使用异丙醇-己烷-水 (IHW) (55:25:20) 抽提, 再进行Folch分配、DEAE - sephadex层析和在Iatrobeads 6RS - 8010柱上进行HPLC。以从55:40:5到55:25:20的IHW梯度洗脱上层相中性组分200分钟。按2毫升收集组分, 根据在氯仿-甲醇-水 (50:40:10) 中的HPTLC迁移来合并组分。慢迁移 Le^a -活性组分 (通过TLC免疫染色显示) 进一步通过在Merck HPTLC板 (Silica Gel 60, Merck, Darmstadt, Germany) 上的制备性TLC来纯化, 并用于结构的性质鉴定。

C. Le^b - Le^a 抗原的分离

迁移正好在二聚化 Le^a 抗原之下的阳性带 (根据实施例1用MAb NCC-ST-421 免疫染色) 用上面B部分描述的方法纯化。

实施例3 二聚化 Le^a 抗原和 Le^b - Le^a 抗原的性质鉴定

A. 酶促降解

依次用0.5单位的 α -岩藻糖苷酶 (牛肾)、0.5单位 β -半乳糖苷酶 (刀豆) 和0.5单位 β -N-乙酰葡萄糖胺酶 (牛附睾) (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo) 水解进行1 mg的二聚化 Le^a 的酶促降解。所有反应均在0.2 M柠檬酸钠 (pH 4.5) 中进行, 37°C 震荡水浴4小时。用制备性HPTLC纯化每种降解产物。

B. IMH2的体外细胞毒性

1. 细胞系

Colo205最初从美国典型培养物中心 (American Type Culture Collection) (ATCC) 获得, 在补充有10%胎牛血清、mM L-谷氨酰

胺、100IU/ml青霉素和10 μ g/ml链霉素的RPMI-1640培养基中培养。人表皮样癌A431细胞系（Macleod等人，J. Cell. Physiol. 127:175 - 182, 1986）最初由Dr. Carol MacLeod（Gildred Cancer Facility, UCSD School of Medicine, San Diego, CA）赠送。此细胞系表达表皮生长因子受体上的Le^a、Le^b、Le^x、Le^y和ALe^b（Gooi.等人，Biosci. Reports 5:83 - 94, 1985）。A431细胞在补充有5%胎牛血清、1 mM谷氨酰胺、110 mg/l丙酮酸钠、100 IU/ml青霉素和10 μ g/ml链霉素的Dulbecco's modified Eagle's medium（Irvine Scientific, Santa Ana, CA）中培养。接种细胞（约5 x 10⁵/ml），长满后收集，先用EDTA处理，再用含Ca²⁺和Mg²⁺的PBS洗涤。这些细胞用作体外细胞毒性测定的靶细胞，或用于皮下接种5 x 10⁶细胞于裸鼠来测定致瘤性。人红白血病K562细胞（Lozzio等人；Blood 45:321 - 334, 1975）用作测定体系中淋巴细胞自然杀伤（NK）活性的对照。

2. 抗体-依赖的细胞毒性（ADCC）和补体-依赖的细胞毒性（CDC）

用于ADCC测定的人外周血白细胞（HPBL）（用作效应细胞）从健康志愿供者血液的白细胞（buffy coat）组分中获得。简言之，用Ficoll - Hypaque梯度溶液，以2000 rpm离心20分钟，分离单核细胞（Mishell等人，in Mishell, B.B and Shiigi, S.M. (eds.), Selected Methods in Cellular Immunology, pp. 3 - 27, W.H. Freeman & Co., San Francisco, CA, 1980）。小鼠脾细胞和小鼠腹膜巨噬细胞（效应细胞）按Mishell等人以前的描述制备，但做如下一些修改。靶细胞（5 x 10⁶）通过与100 μ l的⁵¹Cr于37℃温育90分钟进行标记。洗涤（3x）并温育（37℃，1小时）后，细胞（1 x 10⁶/ml）悬浮于补充有25 mM HEPES缓冲液和3%牛血清白蛋白的RPMI-1640中。20 μ l的标记细胞、100 μ l的IMH2或ST- 421，和100 μ l的效应细胞悬浮液在U型底的微量滴定板（Corning, NY）中混合。用非特异性小鼠免疫球蛋白（Sigma, St. Louis, MO）作阴性对照。温育4小

时后，用装有悬挂平板固定器（hanging plate-holder）的离心机中离心滴定板（500 x g，2分钟），每孔中取100 μ l上清液，用 γ 计数器测量放射性。每实验组测定三次。根据公式（[A - B] x 100）/C计算特异性裂解百分数，其中A =裂解实验细胞的cpm，B=未裂解靶细胞的cpm；C=全部靶细胞的cpm。自发性释放不超过最大能释放的标记放射活性的15%。

对于CDC， ^{51}Cr -释放测定使用与ADCC相似的方法进行，除了加入100 μ l稀释的人血清代替效应细胞作为补体来源。血清在56 $^{\circ}\text{C}$ 灭活30分钟，用作对照。特异性裂解百分数按如上所述方法计算。

因为Colo205细胞已经鉴定为表达伸展1型链Le^a/Le^a和 Le^b/Le^a抗原，其分别与MAb ST-421和MAb IMH2强反应，所以评价了IMH2对Colo205的细胞毒效应，并与ST-421的进行了比较。两个单克隆抗体对Colo205细胞均表现出显著的ADCC杀伤。这种杀伤与效应细胞与靶细胞比例（E:T）及单克隆抗体的浓度有关。细胞毒效应在E:T比例为100:1-200:1，单克隆抗体浓度为35-70 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时最大。无论E:T比例或单克隆抗体浓度如何，对照小鼠IgG和其他非特异性单克隆抗体都没有表现出细胞毒效应。用小鼠脾细胞施行同样的细胞毒性试验时，相应的值仅为7%和17%裂解（E:T比例200:1，单克隆抗体浓度30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）。单克隆抗体对A431细胞表现出弱细胞毒效应（表）。表中比较了Colo205、A431和K562细胞的IMH2-依赖的最大裂解。高裂解值（例如，IMH2和ST-421对Colo205分别为65%和94%的裂解）只在HPBL存在时显著；用小鼠脾细胞时，裂解值小得多，如以前用ST-421时所观察到的那样（Watanabe等人，Cancer Res. 51:2199 - 2204, 1991）。由IMH2和ST-421介导的CDC与补体浓度和所用单克隆抗体浓度近似地相关。

表 MAb ST-421和IMH2对Colo205、A431和K562细胞的MAb-依赖的细胞毒效应

靶细胞	抗体/反应性 ^b	裂解百分数		
		效应细胞+MAb+	效应细胞+MAb-	效应细胞-MAb+
Colo205	ST-421+	94.5	2.7	0.8
	IMH2+	65.0	2.7	0.7
A431	ST-421±	14.4	10.9	1.1
	IMH2±	7.6	9.2	0.6
K562 ^c	ST-421-	48.2	36.2	0.5
	IMH2-	44.8	36.2	0.3

a. 在E:T（效应细胞：靶细胞）比例为100:1时IMH2（35μg/ml）和ST-421（100倍稀释的腹水）的裂解百分数。

b. 用流式细胞术测定，+、阳性；±、弱阳性；- 阴性。

c. 在没有MAb存在的情况下也可观察到对K562细胞的高细胞毒素效应，这被认为是反映自然杀伤细胞活性。

C. 体内的肿瘤抑制

用作体内实验的Colo205和A431细胞体外培养，用培养基洗涤二次，以PBS重新达到要求的细胞密度。细胞（ $5 \times 10^6/100\mu\text{l}$ ）皮下注射入5-到7-周龄的无胸腺BALB/c小鼠背部，注射后立即开始单克隆抗体腹腔给药。纯化的IMH2（1.1 mg/ml）或在腹水中相应IgG浓度（1.1 - 1.2 ng/ml）的ST - 421，每天以0.2 ml/动物剂量腹腔注射一次，注射2周。由同一观测者每周3次测量肿瘤的宽度和长度。肿瘤重量估计为（宽度²×长度）/2。对照动物接受由小鼠骨髓瘤细胞系NS1在BALB/c小鼠中产生的腹水蛋白。每次实验每组用7只小鼠，实验重复两次。以两次实验的肿瘤重量的平均值绘图。

MAb IMH2和ST-421都显著抑制Colo205肿瘤在裸鼠中的生长。相

反,两种MAb抗体都表现出对A431肿瘤生长的最小抑制效应。因此,识别抗原的高表达似乎对抗体-依赖的体内肿瘤生长抑制的易感性是必需的。

D. IMH2与多种肿瘤和正常组织的反应性

多种肿瘤及邻近正常组织取自用福尔马林固定并用石蜡包埋的手术标本。此外,从事故遇难者新鲜尸体剖检获得脑、胸腺、肺、肝、胃、结肠、肾、肾上腺、脾、胰、子宫(带有子宫内膜)和皮肤正常组织和一些肿瘤组织。手术和尸体剖检标本均为Department of Pathology, Swedish Medical Center, Seattle, WA, 和 Biomembrane Institute的Ms. Debbie Bennett惠供。样本切片(3 μ m厚),用xylene脱蜡,乙醇脱水,用第一MAb处理,然后用生物素化第二MAb和过氧化物酶缀合的抗生物素蛋白处理,用3',3'-二氨基联苯胺染色。用0.3% H₂O₂处理切片20分钟以阻断内源性过氧化物酶活性。一些切片与小鼠IgG一起温育作为阴性对照。生物素化羊抗鼠IgM、抗生物素蛋白和生物素购自Vectastain(Burlingame, CA)。

MAb IMH2与结肠、直肠、肝、胰和子宫内膜肿瘤的反应强且发生率高(表I)。相反,其不表现与包括隐窝区和杯形细胞在内的末端结肠和直肠正常粘膜的反应性。其与肺腺癌反应而不与大或小细胞癌反应。5例鳞细胞癌中的一例表现出强阳性反应性。MAb IMH2不与正常脑、肺、脾、皮肤组织或包括粒细胞在内各种血细胞反应。

观察到的具有强染色的正常组织位置如下:胸腺小体和胸腺上皮性网状细胞(胸腺细胞呈阴性);粘膜上皮和胃粘膜分泌腺(固有层、浆膜和肌肉层呈阴性);肾上腺髓质和皮层。强度中等到弱阳性染色的正常组织位置为:肾近端和远端卷曲的上皮细胞(其它部分呈阴性);胰岛(Langerhan's islets)细胞(胰其它部分呈阴性);盲肠粘膜;尿道上皮。在肝细胞中观察到非常弱的染色(肝的其它部分、小叶下结缔组织、中央静脉、胆管和肝巨噬细胞(Kupffer's cell)呈阴性)。这些结果概括于表I。

表I. 用Mab IMH2对正常组织和癌的免疫组织学染色。

组织	染色	位置/注释
正常		
脑	-	
肺	-	包括支气管(broncheolar)上皮
脾	-	
直肠	-	包括隐窝区
结肠	-	- 11/12, $\pm$ 1/12
盲肠	+	
皮肤	-	
粒细胞	-	
淋巴细胞	-	
胰	+	胰岛+, 其余-
肝	$\pm$	肝细胞弱+ / $\pm$ 其余--
胸腺	++	胸腺小体、上皮和网状细胞++, 胸腺细胞-
胃	+++	粘膜、腺细胞(见正文)
肾	+	管状上皮弱+(见正文)
肾上腺	+++	
子宫/子宫内膜	- / +	子宫内膜- 或 弱+; - 9/15, $\pm$ 2/15, + 4/15 (总阳性率4/15=27%)
癌		
结肠/直肠	+ / +++	++++ 4, ++ 6, +4, $\pm$ 1, - 1 (总阳性率14/16=88%)
肝(原发)	++	2/3
胰腺	+++	2/2
肺腺癌	++	2/4
鳞状的	+	1/5
大细胞	-	0/3
小细胞	-	0/5
子宫内膜	- / +++	+++ 4, ++ 11, + 6/24, $\pm$ /-3 (总阳性率21/24=88%)

E. IMH2与来自Lewis和分泌腺状态已知患者的正常和恶性的结肠和膀胱组织的反应性

Le^b和Le^y决定簇的表达与个体分泌腺状态有关(Sakamoto等人, Molec. Immun. 21:1093 - 1098, 1984; Ørntoft等人, J. Urol. 138:171 - 176, 1987), 而Lewis抗原在某些肿瘤中的表达与宿主Lewis状态无关(Ørntoft等人, Lab. Invest. 58:576 - 583, 1988; Ørntoft等人, Blood 77:1389 - 1396, 1991)。因此, 研究

了MAb IMH2与来自Lewis和分泌腺状态已知患者的正常和恶性的结肠和膀胱组织的反应性。结果概括于表II和III。IMH2与直肠肿瘤而不与正常的直肠组织反应,该反应性与分泌腺状态无关。相反,IMH2与正常盲肠反应,而与所研究的单一盲肠肿瘤样品反应较弱。该结果表明IMH2表位在正常和恶性结肠组织中的表达趋势与大家公认的ABH抗原表达模式相似。真正的Lewis⁻阴性(Le^{a-b-})个体(Ørntoft等人, Lab. invest. 58:576-583, 1988),在正常和恶性的结肠组织均表达IMH2表位(表II和III)。

IMH2表位在正常尿道上皮中表达,但在膀胱癌中其表达减弱至不同程度。似乎有非典型程度的相关性,即IMH2表位在高度侵袭性肿瘤中的表达量最低。这种趋势也与ABH抗原在正常和恶性的膀胱组织的表达相似。但与结肠组织相反,IMH2表位在A型血个体膀胱组织中的表达与分泌腺状态相关。真正的Lewis⁻阴性(Le^{a-b-})个体在正常的和恶性的膀胱组织中均表达IMH2表位。

表II. 用MAb IMH2对正常和恶性的结肠组织免疫组织学染色:与宿主Lewis 状态的关系。

	正常		恶性	
	直肠	盲肠	直肠	盲肠
A Le ^{a-b+}	0/5	1/1	3/4	1/1
A Le ^{a+b-}	0/4	ND	2/2	ND
O Le ^{a-b+}	0/2	ND	2/3	ND
O Le ^{a+b-}	0/2	ND	1/1	ND
真正的Le ^{a-b-}	0/1	1/1 ^a	1/1	0/1
非真正的 Le ^{a-b-}	0/2	ND	1/1	0/1

^a非分泌腺

数字表示阳性标本除以调查标本总数。ND =未确定的。Le^{a-b-}个

体（真正的和非真正的）的表型状态，通过唾液a1→4岩藻糖基转移酶活性，及红细胞与抗-Le^a和抗-Le^b MAb的反应性来确定。表型定义可参见Holmes等人， Arch. Biochem. Biophys. 274:14 - 25, 1989, 以及Ørntoft等人， Lab. Invest. 58:576 - 583, 1988.

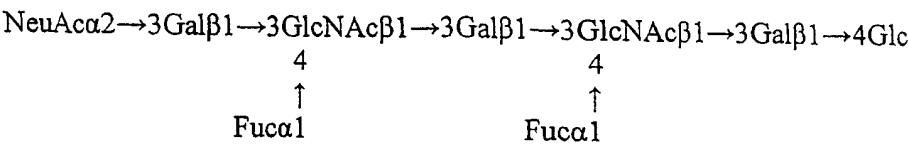
表III. 用MAb IMH2对正常和恶性的膀胱组织免疫组织学染色：与宿主Lewis状态的关系。

	膀胱癌		
	正常	非侵袭性	侵袭性
ALe ^{a-b+}	4/4	1/1	1/2
A Le ^{a+b-}	0/2	1/2	1/3
O Le ^{a-b+}	1/1	1/1	1/2
O Le ^{a+b-}	2/2	1/1	0/1
真正的Le ^{a-b-}	2/2	ND	0/1
非真正的Le ^{a-b-}	ND	ND	ND

主要脚注同表II

F. 伸展的唾液酸化Le^a（或 S Le^a - Le^a）的分离

用高效薄层色谱技术检验Colo205细胞单唾液酰-神经节苷脂组分导致或致使一种主要的神经节苷脂的分离。抽提这一主带并进行性质鉴定。其结构鉴定为：



该结构经¹H-NMR 光谱证实。

SLe^a - Le^a 上的伸展唾液酸- Le^a 结构通过用唾液酸酶的酶促降解产生与 Le^a-Le^a 相同的化合物（其通过薄层色谱分析以及单克隆抗体

ST-421 免疫染色确证) 来确定。初始的唾液酸 Le^a - Le^a 或伸展的 Le^a 没有表现出与 MAb ST-421 的任何反应性。但这一化合物表现出与针对唾液酸- Le^a 的 MAb 如 N-19-9、NKH-1 和 NKH- 2 的反应性。

