

211573

申請日期	80. 4. 12
案 號	80102833
類 別	C07K 1/28 A61K 39/295

公告本  
A4  
C4

(以上各欄由本局填註)

發明 專利 說明書  
新型

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

一、發明名稱	中文	防治贅生物之抗體共軛物
	英文	Antibody Conjugates for Treatment of Neoplastic Disease
二、發明人	姓名	麥克羅森布魯
	籍貫 (國籍)	美 國
	住、居所	美國德州休斯頓市北羅倫得區 8810 號
三、申請人	姓名 (名稱)	美國研究發展基金會
	籍貫 (國籍)	美 國
	住、居所 (事務所)	美國內華達州卡森市北區街 402 號
	代表人 姓名	杰姆士威勒

經濟部中央標準局印製

裝 訂 線

## 五、發明說明( I )

## 發明範圍

本發明係概要地涉及免疫共軛物領域，更特定而言，係關於免疫共軛物在癌症治療上的用途，本發明亦涉及使用由單株抗體(MOABS)和細胞毒害性基團例如 gelonin，此係一種核糖體抑制性蛋白質，其它衍生自植物之細胞毒害性基團，或細胞毒害性或細胞抑制性生物反應改質劑所組成之共軛物類對抗黑色細胞瘤之治療作用。

## 發明背景

精確地做癌症標的治療必需性由於足量的腫瘤反應係依藥物在腫瘤內治療濃度之運輸和持續情形而定，因而顯示係重要的，位置一導向的療法已經成為許多研究開發人員的一個目標，其中係利用單株抗體以做為治療劑之特定載體。

癌症在西方世界的死亡率和罹病率係一主要導因，癌症的種類有許多種，每一種具備有其個別特性，不過，癌症至少具備一種相同特質，他們同樣都有細胞生長調節程序的缺陷。

黑色細胞瘤，係最具殺傷力的皮膚癌，是一種高度可轉移性疾病，可同時侵患兩性且幾乎在診斷後五年內一定致死。手術移除局部的惡性增生物經證實僅僅在病症尚未擴散至主要患部以外區域時為有療效，一旦病症擴散，該手術步驟須合併其它更多的一般處理以移除罹病或惡性細胞。一般所採行補充療程例如放射線治療或化學治療法其中絕大部份其療程並不局限於腫瘤細胞且，儘管此類方法對於惡質細胞具有較大程度的摧毀效應，並通常對正常細

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明(2)

胞有某些程度的影響。

許多腫瘤基因表現具備有抗原或抗原性決斷物質，此於正常細胞係極少或完全不呈基因表現的，某些腫瘤細胞所基因表現的抗原是由胚胎細胞型態做基因表現但並不由成熟動物體的正常細胞做基因表現，這些異常基因表現的抗原已知係腫瘤一相關連的抗原，這些抗原是專一的，而一種特殊抗原可由超過一種腫瘤細胞做基因表現，它通常可由基因表現它的特殊腫瘤的全部或大部份細胞基因表現而得，一種腫瘤細胞可基因表現出一種或超過一種的腫瘤相關連性抗原，這些腫瘤相關連性抗原可經基因表現於細胞表面(細胞表面抗原)，可由腫瘤細胞分泌出來(經分泌之抗原)或可存留於細胞內(細胞內抗原)。

這些腫瘤相關連性抗原的存在業經利用以偵測，診斷以及定位出腫瘤，在某些情況而言，在腫瘤細胞上存在的腫瘤相關連性抗原已經可令特定藥物合中合標而其它的治療方法則意指對腫瘤細胞之特定作用。

抗體是蛋白質類，一般係動物的免疫系統對外來抗原或抗原性決斷物質所反應生成者。抗體會特定地鍵結至其認定的抗原。舉例而言，作用於其它黑色細胞瘤抗原的抗體業經利用以於人體全身和腹腔內投與後證實特殊腫瘤位置。

令化學治療劑計對著腫瘤細胞作用並降低其對於正常細胞的影響的一種方法在發展出可對抗並不發生於正常細胞上的腫瘤細胞上的抗原的單株抗體 MoAbs 時已經是可能

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明(3)

進行了，特定作用於特殊抗原或抗原性決斷物質的單株抗體可做大量製備生產。

經標識的抗體可經使用以做為惡質疾病之定位作用和治療作用，腫瘤細胞表面的此類放射性標識的單株抗體業經成功地利用以於病人藉著外在閃爍呈像法做腫瘤成像 (Deland, Semin. Nucl. Med. 19 (3) : 158-65 (Review)(1989); Juhl, Hepatogastroenterology 36 (1) : 27-32 (Review),(1989) 。偶合至藥物上的抗體，可經用做一種傳輸系統，藉此藥物可對該抗體所認定的特定腫瘤細胞做目標選定作用，此係基於在全身性給藥後抗體的特定能力係可定位出腫瘤位置，抗體亦可經偶合至毒素上且因而做為一傳輸系統以摧毀特殊腫瘤細胞上的毒素。

最常使用做為抗體共軛物的細胞毒害劑主要分成三大類：毒素，放射性特別核 (Radiorudides) 和化學治療劑，抗體與這些類別的製備中每一種做共軛接合時可做成具有實質優點之治療劑但亦具備了些特定的難題缺點 (Frankel, et al Ann.Rev. Med. 37 : 125-142(1986) ; Reimann et al. J. Clin. Inest. 82 (1) : 129-138 (1988).) 。含有植物毒素的免疫共軛物毒素的免疫共軛物亦可對其它型態的抗體共軛物提供一特定優點，此係由於：

1. 用以抗腫瘤活性的免疫毒素的需要劑量，一般而言，遠低於使用抗體—藥物共軛物所需用的劑量。

2. 毒素於抗體上的共軛作用並不影響抗體的親和力。

Gelonin 是一種醣蛋白 (分子量大約為 29-30,000 kd)

## 五、發明說明(4)

係自 *Gelonium multiforum* 的種子純化而得，Gelonin 是屬於強力核糖體不活化性植物毒素的一類毒素，此類核糖體不活化性植物毒素的其它成員則有 abrin, ricin 和 modecin 的鏈。Gelonin, 如同 abrin 和 ricin, 可藉由破壞哺乳動物的核糖體 60S 次單元而抑制蛋白質合成，儘管 ricin (RTA) 的 A 鏈已經廣被使用於免疫毒素，gelonin 則顯然對於化學性和物理性處理方面是較 RTA 更穩定 (Barbieri et al., *Cancer Surv.* 1 : 489-520 (1982))。再者，gelonin 本身並不鍵結到細胞上，因此是不具毒性的 (在高濃度下為例外) 且在實驗室的操作上是安全的，對於核糖體的不活化作用是不可回復的，顯示並不涉及輔因子且是有效率地發生進行，這意味著 Gelonin 是以酵素的方式活動。

早先的數位研究人員有報告指陳連接細胞毒害性製劑到抗體上以製備“免疫毒素”。特別有意義的是，免疫毒素是單株抗體共軛至細菌或植物來源的例如 ricin 或 abrin 的毒毒的酵素活性部位 (A 鏈) (Nevelle 等人, *Immunol. Rev.*, 62 : 75-92 (1982) ; Ross et al, *European J. Biochem.* 104 (1980) ; Vitteta et al., *Immunol. Rev.* 62: 158-183 (1982); Ross et al, *Cancer Res.* 42 : (1982) 457-464 ; Trowbridge 和 Domingo , *Nature (Cond.)* 294 :171-173 (1981)。

Gelonin 和 ricin 是最具活性的毒素，其可於蛋白質重量基礎上抑制蛋白質的合成。Gelonin 在抑制蛋白質合成方面較 ricin A 鏈具 10 到 1000 倍更強的活性，ricin 和 abrin 類的肽類由兩鏈所組成，一個 A 鏈是毒性單元而一個 B 鏈

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

打

線

## 五、發明說明(5)

是經由鏈結至細胞上而作用，不同於 ricin 和 abrin 的是，gelonin 是由單一鏈所組成，且，因為它欠缺鏈結至細胞的 B 鏈，其本身對完整細胞相對上是非毒害性的 (Stirpe et al, J. Biol. Chem. 255 : 6947-6953 (1980)。哺乳動物細胞顯然不具備鏈結和 / 或向內轉移天然的 gelonin 分子的能力，gelonin 與一種腫瘤靶的性單株抗體的共軛物，例如單株抗體 ZME 連接至例如黑色細胞瘤細胞的某些腫瘤細胞上存在的一種抗原，可同時提供了鏈結 gelonin 到細胞的一種特殊方法以及令 gelonin - 抗體複合物內部轉移化的一個路徑。

使用毒素 gelonin 較使用例如 ricin A 鏈的毒素有一優點是較 ricin A 鏈可降低對正常組織的毒性，偶合含一種單株抗體之 Gelonin 可直接作用至一種抗腫瘤相關連的抗原，此係腫瘤療法中一種活性的且具選擇性的免疫毒性劑。

早期的研究業已記述了數種含 gelonin 的抗體 - 毒素共軛物 ( Lambert et al, J. Biol. Chem. 260 : 12035-12038 (1985) ; Thorpe et al., Eur J. Biochem 116 : 447-454 ; Singh et al., J. Biol. Chem. 264 : 3089-95 (1989) ; Scott et al., J. Natl. Cancer Inst. 79 : 1163-72 (1987) ; Tedder et al, J. Immunol. 137(4) : 1387-91 (1986)。近來 Ozawa et al (Int. J. Cancer 43 : 152-157) 則已做成一 gelonin 免疫毒素其組成含抗體 B467 可鏈結至上皮細胞生長因子 (EGF) 的細胞受器上，此 B467-gelonin 共軛物對 EGF 受器基因表現細胞具高度細胞毒性但對受器缺乏性細胞則是非

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明(6)

細胞毒害性的。Sivam et al (Cancer Research 47 : 3169-3173(1987)) 製備了抗黑色細胞瘤抗體 9.2.2.7 與 gelonin 的一種共軛物並與一種 abrin 和 ricin A 鏈的 9.2.2.7 共軛物比較其於試管內和活體內的細胞毒害活性。這些研究證實了 gelonin 共軛物呈現了於試管內對抗抗原一陽性細胞實質的選擇性細胞毒害效應。活體內試驗則證實在老鼠個體內達 2mg 總抗體量並不具有毒性且多重靜脈注射給與 gelonin 免疫毒素可明顯地阻斷無毛老鼠身上異體移植之人類皮下腫瘤移植物的生長。較諸含 abrin 和 ricin 的共軛物，gelonin 共軛物是具有相類似效力，在活體內治療性質有更顯著的較佳選擇力以及腫瘤局部化作用。

由於偶合有藥物，毒素或放射活性標識物之抗體僅僅鍵結至基因表現出一種特殊抗原的腫瘤細胞，則僅有腫瘤細胞會被殺死，反過來說，在放射線治療時，源自放射標識化合物的幅射線並不單一局限於幅射線被吸收的腫瘤細胞。舉例而言，抗體經代謝或酵素分解作用可釋出幅射標識物並因而使之分布至其它組織例如腎臟或骨髓，這對這些器官導致不可接受性幅射線損傷，幅射標識抗體由於這些問題而限制或複雜了其做為治療劑的用途。

## 發明摘要

本發明提出可辨識黑色細胞瘤細胞上的 GP 240 抗原的一種抗體(本文所指係 ZME-180)的免疫共軛物類。抗體中的一種(225.28 S)由 Wilson 等人提出(Wilson et al, Int. J. Cancer 28 : 293 (1981) 可辨識此黑色細胞瘤細胞

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明(7)

膜抗原，此抗原因此可因著命名 GP 240 加以認定。鍵結 GP 240 抗原的抗體 225.28S 業經命名且進一步在本文中經引述為 ZME-018。在一具體實施例中，該抗體經與一選自 gelonin, ricin A 鏈和 abrin A 鏈的一種毒素做偶合處理。在另一具體實施例中該 ZME 抗體則可與一種細胞毒殺性藥物例如 Adriamycin 或一種生物反應改質劑例如 lymphokine 或 cytokine 做偶合處理。在另一具體實施例中抗體可用一種可偵測的標識物例如放射標識物，化學發光物，螢光物，或一種酵素標識物做標識處理。此類細胞毒殺性免疫共軛物可經由投與這些細胞毒殺性免疫共軛物至需要此種治療的個體內則可有效治療並預防含攜有腫瘤相關連之 GP 240 的腫瘤之復發。該類可偵測性經標識之 ZEM 免疫共軛物在技藝中已知的技術可有效用做腫瘤之診斷及定位作用，這些經標識的免疫共軛物亦可用以測定 GP 240 抗原在生物標本中的存在情形以及利用技藝中熟悉的方法在活體內定位出腫瘤位置。

本發明的目的之一係提出一種可特定地鍵結並加以殺死腫瘤細胞的細胞毒性組合物，特定而言，本發明的一個目的是提出一種細胞毒性組合物，它可特定地鍵結並殺死可基因表現出如上文所述之 GP 240 抗原的腫瘤細胞，抗體 ZME-018 在 Hybritech, INC 利用鹽分鑷法和 DEAE 色層分析法製備而得並藉 SDS PAGE 令之均質化 (Wilson et al., Int J. Cancer 28:293-300 (1981))。本發明的另一觀點提到一種殺死人類黑色細胞瘤細胞，或可基因表現得

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明(8)

ZME (GP 240) 抗原的任何其它腫瘤細胞的方法，此係令細胞與一有效細胞毒殺量之一種免疫毒素接觸而達成。

本發明的進一步目的則是提出一種組合物它對腫瘤細胞是毒性的但對正常組織則只有最低程度的傷害。

## 附圖說明

圖 1 說明 ZME-gelonin 的偶合作用和純化作用流程圖。

圖 2 說明 ZME-gelonin 藉 S-300 膠體穿透作用色層分析法所進行的純化作用。

圖 3 說明在 Cibachron-Blue sepharose 分離柱中灌入得自 S-300 色層分析法的高分子量物質後並用一線性鹽類濃度梯度 ( 0-300 mM NaCl ) 抽提方法大綱。可見到有二個蛋白質高峯：一個是流經 ( flow through ) 高峯 ( 14-20 濃度分率 ) 以及一個是鍵結住的高峯 ( bound peak ) 係以高鹽分率 ( 44-75 濃度分率 ) 抽提而得。

圖 4 說明 gelonin 和 ZME gelonin 共軛物的電泳型態。

圖 5 說明比較 ZME ( 空心圓圈 ) 和 ZME gelonin ( 實心圓圈 ) 的 ELISA 分析法數據。

圖 6 說明對數一相 ( log-phase ) AAB-527 細胞在接收到 ZME-gelonin 和游離的 gelonin 72 小時後的細胞毒性作用。

圖 7 說明 ZME-gelonin 和游離的 gelonin 對對數一相 AAB-527 細胞的細胞毒性作用。

圖 8 說明 ZME-gelonin 在培養基中對抗原陽性的靶的黑色細胞瘤細胞 ( AAB-527 ) 和抗原陰性的 T-24 細胞的細

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明(9)

胞毒性作用。

圖 9 說明游離抗體對 ZME-gelonin 的細胞毒害作用的影響。

圖 10 說明 IFN- $\alpha$  , IFN-r 和 TNF 在 ZME-gelonin 細胞毒性的效應，空心圓圈表示僅有 ZME-gelonin 的劑量—反應關係，空心菱形表示 ZME-gelonin 加上 IFN-r 的劑量—反應關係。空心三角形表示 ZME-gelonin 在有固定量 TNF- $\alpha$  的存在下其劑量—反應關係。實心圓圈在虛線上是表示在有固定量 IFN- $\alpha$  存在下的 ZME-gelonin 的劑量—反應曲線圖。

圖 11 說明 ZME-gelonin 在人類腫瘤幹細胞測定方法中對抗原陽性 (A-375 , 實心圓圈) 和抗原陰性 (CEM , 空心矩形) 細胞的效應。

圖 12 說明 ZME-gelonin 對於得自 4 位病人的新近生體切片標本的不同細胞品系之幹細胞倖存情形的細胞毒殺效應。

圖 13 說明 ZME-gelonin 共軛物在攜有人類黑色細胞癌異體移植物的無毛老鼠的組織分布情形。

## 發明詳述

本文所採用的“單株抗體”一辭意指一種抗體組合物中具有一均質抗體族群，這並不用以限制了其抗體的來源或其製造的方法方式。

黑色細胞瘤細胞基因表現一種 240 KD (GP 240) 抗原於其細胞表面，作用於此抗原的抗體業經製造生產。抗體

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

打

線

五、發明說明(10)

81年2月7日	修正 補充
---------	----------

ZME-018 (取自 Hybritech 公司) 是一種老鼠單株抗體 IgG<sub>2a</sub> 可辨識一種在大多數人類黑色細胞瘤細胞上的 240 KD 醣蛋白。可辨識此 240 KD 抗原的一種 epitope 的 IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub>, 和 IgG<sub>2b</sub> 異型型態的單株抗體可經製備生成, ZME 抗原的此一 240 KD epitope 在符合本發明的目的下經合名為 ZME epitope。因此, 可辨識此 ZME epitope 的所有抗體其功能是相同的。

這些代表性的融合瘤培養基的細胞可分泌出相同特異型態的抗體, 意即, 全部均可辨識 ZME epitope, 業經存檔於 American type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852 ("ATCC") 且核准有許可字號 HB11009。

這些單株抗體可由技藝中熟悉的方法製備, 製備可生成這些抗體的融合瘤培養細胞的步驟特點有詳細的記載 (Wilson et al. Int. J. Cancer 28:293(1981); Imai et al, Transplant Proc. 12:380-383 (1980), 簡言之, 融合瘤是以老鼠脊髓瘤細胞品系 SP2/0-Ag-14 和取自老鼠經以黑色細胞瘤細胞品系 M21 做免疫處理的脾細胞依 Imai et al 所述方法融合製備 ( (1980) Transplant Proc. 12:380-383 )。由融合瘤所分泌的單株抗體 (MoAb) 225.28S 和 465.12 業經次分株培養且於試管內和活體內做推廣, 這兩種單株抗體是屬於 IgG<sub>2a</sub> 次級屬且是自老鼠腹水藉吸收作用 / 提取作用自蛋白質 A Sepharose 4B (Pharmacia, Piscataway, NJ, USA) 在其使用之前做純化處理。

(請先閱讀背面之注意事項再為本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明(11)

融合瘤所產製的抗體可與人類黑色細胞瘤細胞反應但並不與人類正常細胞反應的特質業經進一步證實，ZME細胞品系所產製的抗體以及融合瘤所產製功能相等的抗體均可與人體黑色細胞瘤細胞上的ZME抗原反應，他們亦與受測之隨機取得之黑色細胞瘤中70-80%反應，且對數種組織呈現並無反應，詳見實例4摘要記錄於表1。

如同本文中所採用之實例說明的小鼠單株抗一人類黑色細胞瘤抗體，“功能上相等”一辭意指一種單株抗體係(a)交叉阻斷一種例示的單株抗體；(b)選擇性地鍵結至基因表現ZME抗原例如人類黑色細胞瘤的細胞上；(c)具備G或M異形型態；(d)鍵結至ZME抗原係由免疫沈澱作用或三明治免疫測定法所測定；及(e)當共軛至gelonin時，呈現出至少50%的組織培養抑制劑量(TCID)對抗了AAB-527，或A375細胞品系中至少一種，這是指在使用每毫升80-100單位的劑量下。

利用N-J二醯亞胺-3-(2-吡定基二硫基)丙酸鹽(SPDP)或2-亞胺thiolane(IT)做為偶合劑以令抗體ZME共軛至gelonin，該共軛物於一72-小時組織培養測定分析法中與AAB-527和A375細胞做測試，此類抗體共軛物對這些細胞品系呈有抗增殖作用(TCID)50%係小於100單元毫升)。

這些抗體的特徵之進一步詳論在下列實例做說明。

## 免疫化學物質

本發明的免疫化學物質衍生物其中首要重要的有免疫

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

打

線

## 五、發明說明(12)

毒素 (ZME 抗體和一個細胞毒害的基團或一種生物反應改質劑的共軛物類和標識的 (例如, 放射線標識, 酵素一標識, 氣色素一標識) 衍生物其中的該標識物提供了確認包含有經標識之抗體的免疫複體的一種方法。

免疫毒素的細胞毒性基團可為一種細胞毒性物或一種源自細菌或植物 (gelonin) 的一種酵素活性毒素, 或此一毒素的一個酵素活性片段 ("A 鏈")。此酵素活性毒素和片段因此是較適用的且例示有 gelonin, 白喉 A 鏈, 白喉毒素的非鍵結活性片段, 外毒素 A 鏈 (源自綠膿桿菌), ricin A 鏈, abrin A 鏈, modeccin A 鏈, alpha-sarcin, Aleurites fordii 蛋白質, dianthin 蛋白質, Phytoiaccia americana 蛋白質 (PAPI, PAP II, 和 PAP-S), momordica charantia 抑制劑, curcin, crotin, saponaria officinalis 抑制劑, mitogellin, restrictocin, phenomycin, 和 enomycin。其中最佳的是與 gelonin 的共軛組合。

可經偶合至 ZME 抗體的生物反應改質劑且可在本發明中採用的有, 但並不局限於此, 淋巴動素 (lymphokines) 和細胞動素 (Cytokines) 例如 IL-1, IL-2, 干擾素 ( $\alpha$ ,  $\beta$ , 或  $\gamma$ ) TNF, LT, TGF- $\beta$ , 和 IL-6。這些生物反應改質劑對腫瘤細胞有許多作用效應。這些效應有直接作用以增強腫瘤細胞殺傷力以及藉強宿主防禦調節步驟以增強腫瘤細胞殺傷力, 抗體 ZME 與這些生物反應改質劑的共軛作用可令之於腫瘤內有選擇性定位作用, 因此而加強了抗一增殖效應而且抑制導致非一靶的細胞的毒害作用的非一特定

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明(13)

效應。

在本發明中可採用的細胞毒害藥物包括有，但並不局限於此，艾徽素(adriamycin) (及其衍生物)，cis-platinum 複體(及其衍生物)，bleomycin 和 methotrexate (及其衍生物)，這些細胞毒性藥物在復發性腫瘤，特別是黑色細胞瘤的臨床處置上有時是很有用的，但其用途伴有嚴重的副作用且對非一靶的細胞造成損傷。抗體 ZME 可做為這類藥物的有效載體，此同時係傳輸至腫瘤並加強其進入腫瘤細胞內的一種有效方法，此外，特定抗體傳輸細胞毒害藥物至腫瘤的情況對敏感部位例如肝臟，腎臟和骨髓可保護以免受化學治療劑的有害作用。使用共軛至做為傳輸系統的抗體 ZME 的藥物則可使用較低劑量之藥物，這是因為全部藥物部份係共軛至抗體上，而這些抗體則集中濃縮於腫中。

單株抗體的共軛物可利用數種雙功能蛋白質偶合劑以製備生成。此類試劑的實例有 SPDP ; IT, 亞胺酯類的雙功能衍生物例如二甲基 adipimidate ·HCl, 活性酯類例如二丁醯亞胺辛二酸酯，醛類例如戊醛，雙一疊氮基化合物例如雙(對一疊氮基)已烷聯胺，雙一重氮衍生物例如雙-(對一重氮基)乙烯聯胺，二異氰酸鹽例如甲次苯基 2,6-二異氰酸鹽，以及雙一活性氮化合物例如 1,5-二氮-2,4-二硝基苯。

當在試管內使用以殺死人類黑色細胞瘤細胞以做為治療或診斷目的時，該共軛物典型上係以至少大約 10 nM 濃度

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明(14)

添加至細胞培養基中。在試管內使用的投藥配方和模式並不嚴格。可與培養基或灌注基質相容的水性配方則係一般所採用者。

用來診斷和治療攜有 ZME 抗原的腫瘤例如黑色細胞瘤的細胞毒性放射藥劑可由令高線性能量傳送 (LET) 放射同位素共軛至抗體製備而行。"細胞毒害部份"一辭在本文中所採用者係包含了此類同位素。

用在製造抗體的經標識轉化物的標識物包括可直接偵測的基團例如氬色素和放射標識物以及別的基團，例如酵素，這須經反應或衍化方可偵測。此類標識物的實例有  $^{32}\text{P}$ ， $^{125}\text{I}$ ， $^3\text{H}$ ， $^{14}\text{C}$ ，螢光和其衍生物，薔薇紅和其衍生物，dansyl，umbelliferone，luciferia，2,3-dihydrophthalzainediones，山葵過氧化酶，鹼性磷酸酯酶，溶菌酶，和葡萄糖-6-磷酸鹽去氫酶，這些抗體可用已知方法將此類標識物標識上去，舉例來講，偶合劑例如醛類，二醯亞胺，二馬來亞胺，亞胺酸酯，丁二醯亞胺，雙一重氮化 benzadine 和其同類物可經採用以令抗體與上述螢光劑，化學發光劑和酵素標識物做偶合處理。

抗體和經標識的抗體或用在數種免疫呈像免疫分析測定步驟中以偵測可基因表現 ZME 抗原的腫瘤例如黑色細胞瘤在病人身上的存在情形或監測在已診斷患有癌病的病人該癌病的狀態。當用以監測一個癌病狀態時，則可採用定量免疫分析步驟，此種監測分析乃定期執行且比較所得數據以斷定病人的腫瘤是增大或減小，一般可採用的分析技

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明(15)

術包括直接和間接分析法，直接分析法係令取自病人的組織樣本或細胞與一經標識的抗體培養，如樣本為攜有 ZME 抗原的細胞包括黑色細胞，該經標識的抗體可運接作用至這些細胞，在洗滌該組織或細胞以移除未連接的標識抗體後，則檢視該樣本是否存有經標識之免疫複合體。

在診斷用途方面，抗體典型係做成套組型式 (Kit form)。這些套組典型上的組成含：抗體在適當容器中呈經標識型式，培養作用和洗滌作用的試劑，依標識物本質而定的受質或衍化劑，抗原 ZME 控制和說明亦經包含在內。

本發明之免疫毒素在一個經診斷罹患含 ZME 抗原性決斷物之腫瘤的病人身上投與則可令該細胞毒害劑命中目標且於該部位的濃度乃足以殺死腫瘤細胞，由於令細胞毒害劑擊中集中於靶的，專其它器官，組織和細胞的非一特定毒性則可消除或降低。

當在活體內使用以治療時，該免疫毒素以治療有效劑量投與至病人身上（亦即，足可消除或減少病人腫瘤大小之劑量）。一般係以注射途徑給與，以靜脈注射較佳，給與的劑量和給藥頻率則依癌病的本質（初發的或轉移的）和其族群大小，特殊的免疫毒素的特質，例如其醫療指數，病人，和病人病史而定，免疫毒素投與的量典型的範圍為病人體重之大約 0.1 到大約 10 mg/kg。

在注射途徑給藥時，免疫毒素合併了藥學上可接受之注射載劑經配方成單一劑量注射型式（溶液，懸浮液，乳劑），此類載劑本質上係非毒性的和不具療效的，此載劑

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

打

線

## 五、發明說明(16)

的實例有水，鹽水，林格氏液，葡萄糖溶液，和5%人類血清白蛋白。非水性劑載劑例如固定油和油酸乙酯亦可經採用，酯小體可用做載體，該載體劑可包含小量添加劑例如加強等張性和化學安定性的物質，例如，緩衝劑和防腐劑，該免疫毒素一般係於此類溶劑中配方濃度為大約0.1 mg/ml 到 10 mg/ml。

gelonin 毒素係依 Stripe et al 的方法自 gelonium multiflorum 的種子純化而得，簡言之，gelonin 是令該種子在緩衝鹽溶液 (PH 7.4) 中行均質化作用抽取而得，其上清液在 5mM 磷酸鈉 (PH 6.5) 做透析處理而濃縮且 gelonin 依實例 1 所述離子交換色層分析法做進一步純化處理，gelonin 毒素的純度可由高效能液體色層分析法 (HPLC) 和 Sodium dodecylsulphate-polyacrylamide 膠體電泳分析法 (SDS-Page) 做評估。Gelonin 毒素之移行呈一單一帶狀，其大約分子量為 29-30,000 道爾頓。

Gelonin 毒素活性係依實例 2 所述之於一不含細胞系統內的蛋白質合成抑制作用加以測量。

令實例 5 所述之經 SPDP 改質之抗體 ZME-018 與實例 3 和 6 所述之經 iminothiolane 改質的 gelonin 做共軛處理，含 gelonin 之抗體共軛物依實例 7 所述於 Sephadex G-75 分離柱做柱狀色層分析法之純化處理。

gelonin 一共軛之抗體的毒性藉蛋白質合成抑制作用而測定而其抗增殖作用係由試管內和活體內測試而定。

下列實例提供了本發明之製備，特性和免疫毒素單株

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明(17)

抗體的用途之詳細說明，這些實例並不因而限制了本發明的領域。

## 實 例 1

## Gelonin 之純化作用

令 *Gelonin multiflorum* 的種子脫皮並於均質混合器中與 8 體積之含有 5mM 磷酸鈉的 0.14M NaCl (PH 7.4) 研碎其核果，該均質液於 4°C 連續攪拌下過夜，於冰上冷卻並於 0°C 在 35,000 倍 g 下離心計 20 分鐘。移去上清液，以 5mM 磷酸鈉做透析 (PH 6.5) 並用 Pm10 濾器做濃縮。令該樣本於一 CM-52 離子交換樹脂分離柱 (20 × 1.5 cm) 以 5mM 磷酸鈉 (PH 6.5) 平衡化使之分層，附着到離子交換樹脂之物質可用 400 ml 0 到 0.3M 呈線性 NaCl 濃度梯度於 4°C 以每小時 25 毫升速率抽提，收集 5 ml 分離液，令分離液於分光計於 280 nm 做偵測，gelonin 在大約分離液 50 - 70 時被抽提出來且係最末主要抽提物高峯，收集分離液 55 - 70，在雙重蒸餾水中透析並藉凍晶乾燥作用使之濃縮，每一製備物的純度和分子量於高效能色層分析法利用含 50mM 磷酸鈉緩衝液，PH 7.4 的 TSK 300 膠質穿透作用分離柱和 15 % sodium dodecylsulphate-polyacrylamide 膠體電泳法 (SDS-page) 做檢測。Gelonin 移行呈單一帶狀分子量大約為 29-30,000。

## 實 例 2

## Gelonin 活性分析法

gelonin 活性在一不含細胞之蛋白質合成作用抑制作

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明(18)

用分析法做監測，不含細胞之蛋白質合成作用抑制作用係由接續式添加 50  $\mu$ l 兔紅血球溶解產物，在使用前解凍，在每次添加後做混合下列成份劑：0.5 ml 0.2 M Tris HCl (PH 7.8)，8.9 ml 乙二醇，和 0.25 ml 1M HCl 以進行分析測驗。

20 微升的一種鹽—胺基酸—能量混合物 (SAEM) 其組成含：0.375 M KCl，10mM  $Mg(CH_3CO_2)_2$ ，15 mM 葡萄糖，0.25-10mM 胺基酸 (白胺酸除外)，5mM ATP，1mM GTP，50 mM Tris-HCl (PH 7.6)。10 $\mu$ l 肌氨酸酞磷酸鹽—肌氨酸酞焐酸催化酶，8 $\mu$ l  $^{14}C$  白胺酸 (Amersham, 348 mCi mmol)，並添加 1.5 $\mu$ l 含有不同濃度之 gelonin 混合物之溶液，此混合液於 30 $^{\circ}C$  做 60 分鐘培養， $^{14}C$ -白胺酸之併入作用是以一小份混合物令合成之蛋白質沈澱於玻璃纖維濾器，並以 10% TCA 和丙酮洗滌而監測，並於 Beta 一計數器利用 Aquasol 閃爍流體以進行放射活性之監測，具備特殊活性不低於  $4 \times 10^9$  U/mg 之 gelonin 可採用於與抗體之共軛作用，一單位的 gelonin 活性是可導致 [ $^{14}C$ ] 白胺酸在不含細胞的分析測試中其蛋白質併入作用有 50% 的抑制作用時的 gelonin 蛋白質含量。

## 實 例 3

## Gelolin 與 Iminothiolane 的改質作用

在一 Centricon 10 微濃縮機中令 Gelolin 含於磷酸鹽緩衝鹽液濃縮至 2 毫克 / ml。令三羥三乙胺鹽酸鹽 (TEA/HCl)，PH 8.0 和 EDTA 添加至 60mM TEA/HCl 和 1mM EDTA

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

打

線

## 五、發明說明(19)

PH 8.0 的終末濃縮液，令 2-Iminothiolane 濃溶液 ( 20 mM ) 添加至 1mM 終末濃縮液且此樣本於 4°C 培養 90 分鐘其間並通有氮氣。

在一預先以 5 mM bis-tris 醋酸鹽緩衝劑做平衡處理之 Sephadex G-25 ( 1×24cm ) ， PH 5.8 其中含 50 mM NaCl 和 1 mM EDTA ，做膠質濾過作用以移除過量之 iminothiolane ，於一微濃度測定板利用 Bradford 染料接合分析法測定分離液之蛋白質含量，簡言之，在每一小池 ( well ) 中添加 40 毫升樣本，100  $\mu$ l 磷酸鹽緩衝鹽液 ( PBS ) 和 40  $\mu$ l 色素濃縮液。於 Dynatech Microelisa 自動閱讀器於 600 nm 檢讀其吸光情形，gelonin 抽取物並不佔容積 ( 大約係分離液 14-20 ) 。收集這些分離液並使用 Centricon-10 微濃縮。

## 實 例 4

對抗 ZME 黑色細胞瘤抗原之單株抗

體的製備和特質確認作用

分泌抗體的融合瘤

在一隻 8 週大雌性 BALB/C st 鼠 ( SCRF Breeding Colony , La Jolla , 加州 ) 腹腔注射 ( i.p. )  $10^7$  人類黑色細胞瘤 M21 細胞並於 2 週後追加 i.p. 注射  $5 \times 10^6$  M21 細胞，一隻 50 週大雄性 NZB/B 鼠 ( SCRF Breeding Colony ) 經以  $5 \times 10^6$  BW5 黑色細胞瘤細胞處理並以月間隔追加注射 5 次的  $5 \times 10^6$  BW5 ， M51 ， Colo 38 ， BW5 和 M21 黑色細胞瘤細胞，追加注射 3 天後，殺死該鼠，並取出脾

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

打

線

## 五、發明說明(20)

臟細胞懸浮液以  $0.172 \text{ NH}_4\text{Cl}$  含於  $0.01 \text{ M Tris}$  , PH 7.2 的溶液處理 10 分鐘以溶解紅血球，隨後，這些脾臟細胞依 Gefter 等人所述方法 ( ( 1977 ) Somat. Cell Genet. 3: 231 ) 與 SP2/0Ag 14 細胞做融合處理，但其中更動的步驟如下： $5 \times 10^7$  脾臟細胞和  $10^7$  sp2/0Ag 14 細胞於 MEM 與  $0.3 \text{ ml } 30\% \text{ ( v/v )}$  聚乙二醇 1000 (PEG) (Baker 化學公司，Phillipsburg, N. J. ) 做混合配種，洗滌在與 PEG 培養過的細胞，並於  $2 \times 10^6$  細胞/ml 含於 D-MEM 的濃度下培養過夜。次日，令該細胞懸浮於  $40 \text{ ml HAT}$  培養基質中並微量吸取至微濃度測定板 ( Costar #3596 , Cambridge , 麻州 ) 的大約 400 個小池中 (  $0.1 \text{ ml/小池}$  ) ，以週間隔添加一滴 ( 大約  $25 \text{ ml}$  ) 的 HAT 培養基質，2—3 週後，經篩選以做進一步研究的融合瘤在 D-MEM 與  $10\% \text{ FBS}$  做培養，令融合瘤分布至組織培養基並於經  $0.5 \text{ ml Pristane}$  (Pfaltz 和 Bauer , Inc. , Stamford , Conn. ) 處理的 BALB/C 鼠之腹腔中生長，陳舊的培養基質和腹腔液乃用做抗體來源。

融合瘤的無性生殖株依據例如 Cotten et al 所述 Eur. J. Immunol. 3:136 (1973) 之已知組織培養技術於試管內生長。

融合瘤所產製的抗體可與人類黑色細胞瘤細胞反應但不與正常人類細胞反應的情形業經進一步確認。

如表 1 所示，他們並不與大多數正常受測組織反應。ZME 細胞品系所生產的抗體和融合瘤產製之功能相當的抗體可與位於人類黑色細胞瘤細胞例如 M-21 上的 ZME 抗原反

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

打

線

## 五、發明說明(21)

應。

## 實 例 5

## 單株抗體 ZME-018 與 SPDP 的改質作用

製備 N-J 二醯亞胺基 3-(2-吡 二 基) (丙酸鹽) ( SPDP ) 含於二甲基甲醯胺或含於無水二甲基甲醯胺的 3 ml 濃溶液，由於晶體 SPDP 可進行水解作用，化學反應活性交叉交連劑的真實濃度可藉分光計方法經由二光束分光計分析於 260 nm 的吸光度而測定。SPDP 濃溶液的濃度可依下列公式計算出來：

$$\frac{\text{吸光度}(260\text{ nm})\text{變化}}{0.02 \times 103\text{ ml mmol}} \times \frac{(3.01)}{0.01} = \text{mmoles/SPDP}$$

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

打

線

## 五、發明說明(22)

表 1

抗體 ZME-018 (225.285) 的正常組織反應能力

組 織	反 應 能 力
膀 胱	0 / 3
大 腦 皮 質	0 / 2
軟 皮	0 / 2
大 腸	0 / 2
乳 頭	1 / 2
十 二 指 腸	0 / 1
子 宮 內 膜	0 / 1
腎	0 / 2
肝	0 / 1
肺	0 / 4
淋 巴 結	0 / 3
乳 腺	0 / 3
卵 巢	0 / 1
胰	0 / 1
週 邊 血 管	
淋 巴 球	0 / 4
週 邊 神 經	0 / 1
攝 護 腺	0 / 2
唾 液 腺	0 / 3
骨 骼 肌	0 / 1
皮 膚	0 / 5
脾	0 / 1
胃	0 / 3
甲 狀 腺	0 / 2
扁 桃 腺	0 / 1
丸	0 / 5

※摘自 Giacomini, et al. Cancer Research 44:1281-1287,

※※樣本抗原陽性數目 / 受測樣本數目

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

打

線

## 五、發明說明(23)

今在 1.0 ml 磷酸鹽緩衝鹽水 ( PBS ) 中一毫克的單株抗體 ZME 添加至一玻璃試管，緩緩加入大約 5 倍多的莫耳濃度 SPDP 濃溶液至試管中 ( 大約  $10\mu\text{l}$  濃溶液 )，混合均勻。於室溫培養該混合物計 30 分鐘，在培養期間每 5 分鐘攪拌混合之。

利用膠體濾過作用色層分析法在一預先以含 0.5mM EDTA ( 緩衝液 A ) 之 100 mM 磷酸鈉緩衝液 PH 7.0 做平衡化處理之 Sephadex G-25 分離柱移除樣本中過量之未反應 SPDP。收集分離液 ( 0.5 ml ) 並利用 Bradford 染料結合分析法 ( Bradford, Anal. Biochem. 72:248-254 (1976) ) 分析其蛋白質含量，使用 Bio-TEK 微平板自動檢讀機監測一個含 96 個小池之平板其中的吸光情形 ( 600 nm )。抽提出的抗體不佔體積 ( 分離液 14-20 ) 並收集集中這些分離液且保存於  $4^{\circ}\text{C}$ ，此蛋白質於 Centricon-30 微濃縮機中做濃縮，Centricon 中滯留液以含有 EDTA (0.5mM) 之 100 mM 磷酸鹽緩衝液 PH 7.0 洗滌之，該抗體經濃縮成終末容積為大約 0.5-0.75 ml。

## 實 例 6

SPDP- 改質之單株抗體 ZME-018 與

Imiothiolane- 改質之 Gelonin 的共軛作用

如實例 1 所述製備得之 1 毫克純化 gelonin ( 2 mg/ml 於 PBS ) 經以實例 3 所述以 iminothiolane 做改質處理，依實例 4 方法改質的單株抗體 ZME 經與等重之實例 3 的改質 gelonin 混合，此比例對應較諸抗體之 5 倍莫耳濃度過量之

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明(24)

gelonin，調整此混合物之 PH 值為 7.0 經由添加 0.05 M TEA/HCl 緩衝劑 PH 8.0 而達致並在氮氣下 4°C 培養該混合物達 20 小時，令碘乙醯胺 (0.1 M) 加入成 2 mM 之終末濃度以阻斷任何殘存游離之硫氫基並於大約 25°C 繼續培養另 4 小時，該反應混合物貯存於 4°C 直到藉膠體濾過作用做純化處理。

## 實 例 7

## Gelonin - 單株抗體 15A8 複體

## 之純化作用

自實例 6 的反應混合物在一以 PBS 預平衡化之 Sephadex S-300 分離柱 (1.6 × 31 cm) 依膠體濾過作用以移除未共軛之 gelonin 和低分子量產物。

令實例 6 之反應混合物在充填至 Sephadex 分離柱之前先以 Centricon 30 微濃縮成大約 1 ml。令分離柱以 PBS 洗滌，收集 1 ml 分離液且令 50  $\mu$ l 藉 Bradford 染料結合分析法 (Bradford, Anal. Biochem 72:248 (1976)) 以分析其中的蛋白質。

如圖 2 所示，游離的一和 gelonin - 共軛的抗體抽出不佔體積 (大約分離液 28-40)，但未共軛之 gelonin 抽取物在大約分離液 45-65 中。

為移除未共軛之 ZME-018，將取自 S-300 分離柱之高分子尖峯 (分離液 28-40) 投與至預先以含有 0.1 M NaCl 之 10 mM 磷酸鹽緩衝液 (PH 7.2) 做平衡之 Blue Sepharose CL-6B (1 × 24 cm) 之親和力色層分析分離柱，在樣本充

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明(25)

填後，以 30 ml 緩衝液洗滌該分離柱以完全洗出未共軛的抗體，該分離柱再以一線性鹽濃度梯度為 10 mM 磷酸鹽緩衝液 PH 7.2 含 0.1 至 2 M NaCl 液洗提，洗提出的分離液藉 Bradford 染料結合分析法測定蛋白質含量。

圖 2 說明了 S-300 分離柱的抽取作用概圖並證實 gelonin 可自 gelonin- 抗體共軛物和未共軛的抗體分離出來，前述二者抗體在第一個尖峯同時洗提出來（大約分離液 28-40）。此洗提作用模式可藉圖 4 所示之 50  $\mu$ l 在 5-20 % 梯度非還原性 SDS 聚丙醯胺膠體的電泳分析法加以證實，偶合的混合物呈現於 lane 3，顯示的有游離的 gelonin (lane 2) 的分離帶狀，游離抗體 (lane 1) 分離帶和每一抗體分子上偶合有一分子 gelonin 之分離帶以及每一抗體分子上偶合有二分子 gelonin 之分離帶。S-300 分離柱的不佔體積尖峯中含游離抗體和抗體 - gelonin 共軛物者出現在 lane 4。

將未共軛之抗體在預先以含 0.1 M NaCl 之 10mM 磷酸鹽緩衝液，PH 7.2 預先平衡 Blue Sepharose CL-6B 之親和力色層分析法之分離柱自 gelonin 共軛抗體中移除，在 S-300 充填洗提樣本後，以 30 ml 相同緩衝液洗滌此分離柱以完全洗提出未共軛抗體。

gelonin- 共軛的抗體係連接在分離柱上且可用在 10 mM 磷酸鹽緩衝液，PH 7.2 中呈線性鹽濃度梯度之 0.1 至 2 M NaCl 液加以洗提。如圖 3 所示抗體 - gelonin 複體於大約 0.7 M NaCl 時洗提析出，圖 3 係圖示 Blue Sepharose 分離柱之洗提作用概圖。抽提出分離液中蛋白質含量可藉 Bradford

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明(26)

染料鍵結分析法而測定，集中含蛋白質之分離液並於 5 至 20 % 濃度梯度非還原性聚丙烯酰胺膠體上的電泳分析法以確認其洗提作用模式，ZME-gelolin 複體之電泳分析型式圖示於圖 4，流貫 (Flow-through) 尖峯 (分離液 14-20) 僅含游離抗體 (圖 4, lane 5) 而以高濃度鹽洗提之分離液 50-80 含有不含未共軛 gelolin 或抗體 ZME-gelolin 共軛體 (圖 4, lane 6)，其終末產物含 ZME 抗體偶合有 1, 2 和 3 個 gelolin 分子，每個抗體分子平均含 gelolin 含量為 1.5 分子。

實例 2 所述兔紅血球在試管內的轉譯作用系統可經採用以估測近乎純 gelolin-ZME 抗體複體之 gelolin 活性，在此分析法中一單位活性經定義為較諸未處理之對照組要產生 50 % 蛋白質合成抑制作用時所需之蛋白質量，利用此分析法，原質 gelolin 和 ZME-gelolin 共軛物二者的特殊活性經測定分別為  $2 \times 10^8$  U/mg 和  $8.2 \times 10^5$  U/mg。近年純淨的 gelolin-ZME 抗體在紅血球溶解產物分析法中是具有活性的，原始樣本經 1:1000 稀釋可導致大約 50 % 之蛋白質合成抑制作用，即  $^{14}\text{C}$ -白胺酸併入蛋白質之併入作用有 50 % 降低作用，因此，原始製備物的活性是 1000  $\mu\text{/ml}$ 。

## 實 例 8

## 細 胞 培 養 法

ZME-抗原陰性之人類膀胱癌 (T-24) 人類子宮頸癌或 ZME 抗原陽性之人類轉移性黑色細胞瘤細胞 A375M 或 AAB-527 利用含有 10 % 熱一不活化之小牛血清加上 10mM 非必

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

修正  
8/12/74  
補充

## 五、發明說明(27)

需性胺基酸，2 mM L-鐵醯胺，1 mM 丙酮酸鈉，維他命和抗生素之最低限度必須培養基(MEM)做培養保存。規律地篩選培養細胞且證實不具黴漿菌感染。

## A. 細胞增殖作用分析法

細胞品系於 37°C 在 5% CO<sub>2</sub> 一濕潤空氣培養器在完整培養基做培養。對 TNF，免疫毒素，TNF $\alpha$  和 IFN $\gamma$  的分析測定時，洗滌該培養基，使用維爾烯令之分離，且令之重呈懸浮於完全培養基中呈密度 25 × 10<sup>3</sup> 細胞/ml，令 200 ml 液分散至一 96 個小池之微濃度測定平板且隨之令細胞附着其上，結果是有零星分布之細胞族群，24 小時後該基培基質以含有不同成份之下列免疫毒素，毒素，TNF，IFN $\gamma$ ，或 TNF $\alpha$  之一的培養基取代之，細胞經 72 小時培養並用結晶紫染色分析相對細胞增殖作用。

## B. 結晶紫染色

細胞以含有鈣和鎂之 PBS 洗滌三次並用含有 0.5% (v/v) 甲醇做固定及染色，於室溫下用 150  $\mu$ l 之 Sorenson's 檸檬酸鹽緩衝劑 (0.1 M 檸檬酸鈉，PH 4.2-50% (v/v) 乙醇) 以一小時將結合之染料洗提出來，在一 Bio-Teck microplate 檢讀機於 600 nm 測量其吸光度，相對細胞增殖作用 (RCP 之計算如下：

$$RCP = \frac{\text{平均吸光度 (經藥物處理)}}{\text{平均吸光度 (未經藥物處理)}} \times 100$$

## C. 人類腫瘤族群分析法

在臨床指示下的生體切片步驟中自黑色細胞瘤病人取

## 五、發明說明(28)

得腫瘤生體切片標本，腫瘤細胞懸浮液以無菌方式配製 (Leibovitz, et al, Int. J. Cell Cloning 1:478-485 (1983))，此外，來自 American Type Culture Collection (Rockville, MD) 的 A375P 黑色細胞瘤和 CEM 白血病細胞品系亦做測試，ZME-gelonin 對新鮮配製之黑色細胞瘤細胞懸浮液和細胞品系的作用效應測試可於 HTCA 利用腫瘤細胞平鋪於半固體培養基 (琼脂糖) 在含有 10% 小牛血清之完全培養基存在下的標準程序下做評估，每 0.5 ml 培養平板含 100,000 細胞用做新鮮配製之腫瘤和 10,000 細胞係為細胞品系 (Hamburger, et al, Science 197:461-463 (1977) ; Salmon, et al, N. Engl. J. Med. 298:1321-1327 (1978) ; Salmon, et al, J. Clin Oncol. 7:1346-1350 (1989)，依上述方式製備的 ZME-gelonin 在腫瘤細胞鋪成平板狀後立即將之添加至細胞培養板以便測試，令 0.025 mg/ml 至 250 ng/ml 四種濃度的每一濃度之 ZME-gelonin 加到一份三份平板上，除了未經處理之對照平板外，未共軛之 ZME-018 單株抗體和游離的 gelonin 亦做平行測試，細胞品系和腫瘤培養細胞在一濕潤化培養器中於 37 °C 含 5% CO<sub>2</sub> 的空氣中培養平均 10 天，且以一種生存能力染色評估族群之形成 (Shoemaker, et al, Cancer Res. 45:2145-2153 (1985) 且一自動影像分析器可做族群計算 (Salmon et al, Int. J. Cell Cloning 2:142-160 (1984))。在相同試驗中同時測定 ZME-018 處理過之培養細胞和未經處理之對照組的倖存百分率，劑量—反應曲線隨後經繪製成圖。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

打

線

## 五、發明說明(29)

## 實 例 9

## 共軛的和未共軛的 gelonin 對

## 靶的細胞結合情之比較

對含 gelonin 共軛和未共軛之 ZME 抗體在靶的細胞的結合能力做評估，以 ELISA 分析法測試 ZME-gelonin 免疫毒素在抗原陽性 (AAB-527 細胞) 或抗原陰性 (T-24 細胞) 的接合情形。

在微濃度測定板的每一小池中加入 5 萬個靶的細胞 (AAB-527 細胞) 或非一靶的細胞 (T-24 細胞)，這些細胞於 37 °C 在平板上乾燥過夜，這些細胞隨之用三次變化之冷 PBS 洗滌且風乾過夜，經此處理後細胞表面抗原決定成份仍可保持抗原活性。

在細胞附着上去之後，該平板以 Washing 緩衝劑洗滌 (9.68 g Tris, 64.8 g 氯化鈉, 16 ml Tween 20, 800 mg thimerasol 含於 8 公升雙重蒸餾水)，抗體樣本在含有 1 % 豬血清白蛋白 (w/v) 的 Washing 緩衝劑 (稀釋用緩衝劑) 做稀釋。0.2 至 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  不同濃度之共軛的或未共軛的 ZME 抗體 50 毫升經添加於小池中，於 4 °C 培養 1 小時後，移去上清液並用 Washing 緩衝液洗滌小池二次。

在每一小池中添加得自 Bio-Rad 並經 1:1000 (v/v) (HPGAM) 稀釋於稀釋緩衝液中之山葵過氧化酶共軛之羊抗一鼠 IgG 每小池 50 毫升，該平板於 4 °C 培養 1 小時並用 Washing 緩衝液洗滌小池二次，於室溫下黑暗中該平板用 50  $\mu\text{l}$  受質溶液 (80 mM 檸檬酸鹽磷酸鹽 (PH 5.0))，

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

打

線

## 五、發明說明(30)

1 mM 2, 2' AZINO-雙(3-乙基苯並-噻唑啉-6-磺酸)(ABTS)二銨鹽(Sigma化學公司)和4  $\mu$ l 30%雙氧水)培養30分鐘後,在每一小池中添加25  $\mu$ l 4N硫酸,其於492 nm之吸光度於Elisa檢讀器測試。

如圖5所示,在60分鐘接觸後原質ZME和ZME gelonin共軛物二者均對靶的細胞鍵結良好,令人驚奇的是,ZME-gelonin共軛物對靶的細胞之鍵結較原質抗體更好,這種增加並不是SPDP對抗體之改質作用,因為SPDP-改質之ZME與原質ZME的能力是相同,這種增加亦非由於靶的細胞對分子中的gelonin部份之鍵結之故,因為以原質gelonin部份之鍵結之故,因為以原質gelonin做預處理之靶的細胞對抗體或免疫毒素鍵結並無作用。

ZME或ZME-gelonin在Elisa分析法估測並不鍵結至抗原陰性之T-24細胞。

## 實 例 10

## Gelonin和Gelonin - ZME複體的細胞毒性

ZME-gelonin共軛物之細胞毒性研究係於抗原一陽性細胞經連續(72小時)接觸免疫毒素或原質gelonin後執行,如圖6所示,當抗原陽性之AAB-527細胞接觸到大約0.1/nM ZME gelonin,可觀察到大約50%細胞死亡,當細胞接觸原質gelonin時,需要100 nM gelonin濃度以降低細胞數至50%未經處理之對照組。

靶的細胞隨後用不同濃度之ZME-gelonin或單一gelonin依實例2測定之單元基礎做測試,如圖7所示,使用50

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

打

線

## 五、發明說明(31)

單元 / ml 之 ZME-gelonin 共軛物可得 50 % 細胞毒性而為致相同效應則需  $1 \times 10^7$  單元 / ml 之游離 gelonin 。

ZME-gelonin 的效應在對數量培養中依抗原一陰性之 T-24 細胞之抗性而測定，如圖 8 所示，單一 gelonin 在 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  之濃度可產生 50 % 對 AAB-S 27 細胞之細胞毒性，類似於 AAB-S 27 細胞所發現者。ZME-gelonin 對靶的 T-24 細胞於 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  濃度產生 50 % 細胞毒性。然而，ZME-gelonin 免疫毒素即使在最高受測濃度對非靶的之 T-24 細胞並不具細胞毒性。

為要進一步證實 ZME gelonin 之細胞毒性係經由 ZME 細胞表面抗原所調節，添加可達 80 % 細胞毒性之固定劑量 ZME-gelonin 到存在有不合 ZME 抗體或一種不相關連的抗體 (15A8, 一種不連接到黑色細胞瘤的抗體) 的培養基之靶的對數相黑色細胞瘤細胞，如圖 9 所示，遞增數量之 ZME 抗體的存在壓抑了 ZME-gelonin 共軛物之細胞毒性而 15A8 抗體則無效應。因此，ZME-gelonin 共軛物之細胞毒性係直接由 ZME 抗體對靶的細胞上 ZME 抗原的鍵結而調節。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(32)

8	年12月7日	修正 補充
---	--------	----------

## 實例 11

ZME-gelmin 細胞毒性與 IFN  $\alpha$  ,  
IFN  $\gamma$  和 TNF 之調節作用

為證實以教種生物反應改質在免疫毒素細胞毒性的治療效應，對教相黑色細胞瘤細胞以固定劑量之 IFN  $\alpha$  ( 200 u/ml )，IFN  $\gamma$  ( 20 000 u/ml 或 rTNF- $\alpha$  ( 20,000 u/ml ) 處理 24 小時，這些劑量預經測定對這些細胞具有最小(大約 20%)之細胞毒害效應，這些細胞隨之以數種 ZME-gelmin 劑量處理 72 小時，如圖 10 所示，以 rIFN  $\gamma$  處理則產生對 ZME-gelmin 免疫毒素的敏感度 2 倍增加。然而，以 rIFN  $\alpha$  和 TNF 二者同時預處理則同時導致對免疫毒素之敏感度 2 個對數的增加，添加固定劑量之 rIFN  $\alpha$ ，rIFN  $\alpha$  或 rTNF 至抗原陽性的細胞可導致 ZME-gelmin 毒素之細胞毒性之加強。以 rTNF- $\alpha$  處理導致其後有  $\gamma$ IFN  $\alpha$  和 rIFN  $\gamma$  在免疫毒素細胞毒性之最大增加量。

ZME-gelmin 細胞毒性效應之實質強化作用可見諸 rIFN  $\alpha$  和 rTNF 之預處理但非 rIFN  $\gamma$ 。然而有些觀察顯示 IFN  $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  可向上一調節某些黑色細胞瘤細胞表面抗原例如 P-97，該製劑對 ZME 所辨認之高分子量抗原 ( GP 240 ) 則無甚效應 ( Murray, et al, Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 27 : 313 ( 1986 ) ; Greiner, et al, Cancer Res. 44 : 3208-3214 ( 1984 ) ; Greiner, et al, Cancer Res. 46 : 4984-4990 ( 1986 ) ; Groacomini, et al, J. Immunol 133 : 1649-1655 ; Imai, et al, J. Immunol. 127

(請先閱讀背面之注意事項再打本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明(33)

: 505-509 (1981) ; Murray, et al, J. Biol. Res. Mod. 7 : 152-161 (1988) )。因此,  $TNF\alpha$  和  $IFN\alpha$  誘生之 ZME-gelolin 活性強化作用機轉不明但可能涉及抗體內部轉移化作用之改變, 免疫毒素之細胞修補程序之改變或數種干擾素-調節之酵素之中任一酵素之調節作用。

由於僅有含細胞表面 ZME 抗原的細胞被 gelolin ZME 免疫毒素殺死, 此免疫毒素在尋找靶的物和殺死含 ZME 腫瘤相關連抗原的細胞方面是一有效率方法且對正常非腫瘤相關連攜有抗原之細胞的傷害降至最低或避免之。

## 實例 12

## ZME-gelolin 免疫毒素在人類

## 腫瘤族群分析法 (HTCA) 的作用

ZME-gelolin 的活性可用人類腫瘤族群分析法對取自 4 位患黑色細胞癌的病人生體切片細胞做評估。

在試管內對抗人類培養細胞之細胞毒性亦可以實例 8C 所述之 HTCA 做評估, 將數種 ZME-gelolin 免疫毒素劑量添加至一抗原陽性 (A-375 黑色細胞瘤) 和抗原陰性 CEM 細胞品系中。在添加 72 小時後評估族群之倖存情形, 如圖 11 所示, 介於 0.25 和 2500ng/ml 之免疫毒素劑量對抗原一陽性細胞品系 (實心圓圈) 的族群倖存可產生近乎完全的壓制作用。ZME-018 和單獨的游離 gelolin 或合併在一起係非細胞毒性的, 對抗原陰性品系 (CEM) 即使在受測免疫毒素之最高濃度仍是不具效應的 (空心四方形)。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明(34)

圖 12 顯示 ZME-gelolin 對抗 4 種不同新鮮取得之生體切片樣本的效應，在最高受測免疫毒素濃度 (250ng/ml) 於兩個樣本中發現黑色細胞瘤族群形成細胞之倖存情形有 80 到 90 降低情形，在此劑量有一病人呈現 50% 細胞生長的抑制作用，而一位病人顯示不其有免疫共軛物之細胞毒性，在第 3 個樣本可見到僅僅不高 (25%) 的族群數下降，在第 4 個樣本於最高免疫毒素劑量下可見到細胞生長加強現象。此外，在一樣本於低劑量時可見生長強化現象，然而較駕劑量則產生實質細胞毒性。如同在細胞品系實驗，在受測劑量添加未共軛之 ZME-018 和游離的 gelolin 並不具有細胞毒害性。

然而 HTSCA 分析法並非絕對無誤的，大約 75% 臨床上有效之抗腫瘤劑在此測試系統中呈陽性反應。在 HTSCA 中不活性製劑目前經證實在臨床上不活性。因此，ZME-gelolin 共軛物在 HTSCA 的活性有 75% 率呈現面臨臨床價值。

## 實例 13

## ZME 抗體在組織的分布情形

<sup>125</sup>I 標識之 ZME 抗體之組織分布情形經與相關連的免疫毒素 (ZME-gelolin) 和不相關連的免疫毒素 (15A8-gelolin) 做比較，於 5 隻攜有人類黑色細胞瘤外來移植物之無毛老鼠的尾巴靜脈以靜脈注射每一種抗體或抗體一共軛物，每隻動物接受總體積 100  $\mu$ l 之磷酸塩一緩衝之食塩水含 0.5  $\mu$ Ci <sup>125</sup>I 標識之 10 mg 總蛋白質量。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

打

線

## 五、發明說明(35)

如圖 13 如示，不相關連的 15A8-gelolin 共軛物並不特  
定地沈積至腫瘤組織上 ( T / B 分率 0.5 )。相較而言，  
相關連之 ZME 和 ZME-gelolin 共軛物均呈現有特定的區域  
化沈積作用 ( T / B 分率分別為 2.0 和 1.5 )，投與 ZME  
或 ZME-gelolin 後腫瘤汲取的 <sup>125</sup>I 並不具有統計學上的差  
異。熟悉技藝的人員相當肯定本發明並足以實踐上述的目  
標並獲致上述之目的和優點，以及本文提及者，本文所述  
之化合物，方法，步驟和技術目前係目前較佳具體實施例  
的代表，並用以為實施範例，且並不用以限制本發明範籌  
，其間的改變和其他用途可發生於具備本發明精神的技藝  
並受附帶之專利申請範圍所定義。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 四、中文發明摘要(發明之名稱: 防治贅生物之抗體共軛物)

一種抗體連接到攜有抗原的一種 240 KD 黑色細胞瘤的免疫共軛物經製備完成。細胞毒害性免疫共軛物例如 ZME-018 抗體供軛物可有效用以治療細胞增殖性疾病例如黑色細胞瘤以及其它攜有 ZME-018 抗原的腫瘤，此處亦揭示用以診斷此類疾病之台偵測性經標識之組合物。

## 英文發明摘要(發明之名稱: ANTIBODY CONJUGATES FOR TREATMENT OF NEOPLASTIC DISEASE)

Immunoconjugates of an antibody to a 240 kD melanoma tumor associated antigen were prepared. Cytotoxic immunoconjugates such as ZME-018 antibody conjugate are useful for treating proliferative cell diseases such as melanoma as well as other tumors which bear the ZME-018 antigen. Detectably labeled compositions for diagnosis of such diseases are also disclosed.

附註：本案已向 美 國(地區) 申請專利，申請日期：1990.4.19. 案號：510,923

211573

A7

B7

C7

81年12月7日 修正 補充

公告本

六、申請專利範圍

1. 一種組合物，包含一由可辨識黑色細胞瘤細胞上 GP240 抗原之 ZME 抗體與白樹素所組成之共軛物。
2. 一種用於治療細胞增殖性疾病之藥學組合物，係由如申請專利範圍第 1 項之組合物之一有效殺死細胞劑量所組成。
3. 一種用於治療黑色細胞瘤之藥學組合物，係由一與白樹素耦合之以黑色細胞瘤細胞上 ZME (GP240) 抗原為標的之單株抗體所組成。
4. 一種藥學組合物，係用於預防經診斷具有一帶 ZME 腫瘤相關抗原之腫瘤之個體內黑色細胞瘤復發之治療中，包含一與白樹素共軛之可辨識黑色細胞瘤細胞上 GP240 抗原之單株 ZME 抗體。
5. 一種藥學組合物，係用於強化一由白樹素與可辨識黑色細胞瘤細胞上 GP240 抗原之單株 ZME 抗體所組成共軛物之細胞毒害活性之治療中，包含一於所述共軛物投施前施用之由重組干擾素  $\alpha$  (rIFN $\alpha$ )、重組干擾素  $\gamma$  (rIFN $\gamma$ )、及腫瘤壞死因子  $\alpha$  (rTNF $\alpha$ ) 所組成之集團中選出之生物反應改質劑。
6. 如申請專利範圍第 5 項之藥學組合物，其中所述抗體為 ZME-018。
7. 如申請專利範圍第 5 項之藥學組合物，其中所述生物反應改質劑係由 rIFN $\alpha$  及 rTNF $\alpha$  所組成之集團中選出。
8. 一種用於治療細胞增殖性疾病之藥學組合物，係由重組干擾素  $\alpha$  (rIFN $\alpha$ )、重組干擾素  $\gamma$  (rIFN $\gamma$ )、及腫瘤壞死因子  $\alpha$  (rTNF $\alpha$ ) 所組成之集團中選出之生物反應改質劑及一與白樹素共軛之 ZME-018 抗體所組成。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

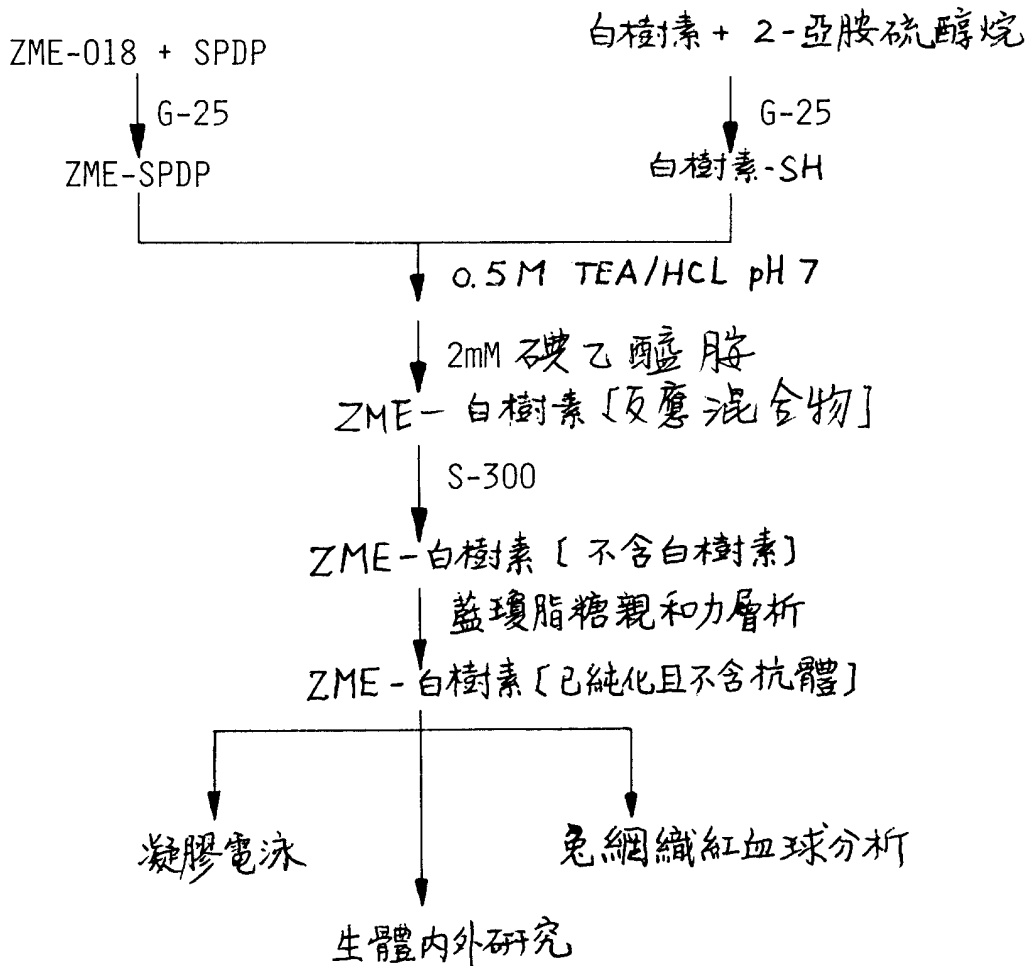
211573

修正  
補充  
本8月27日

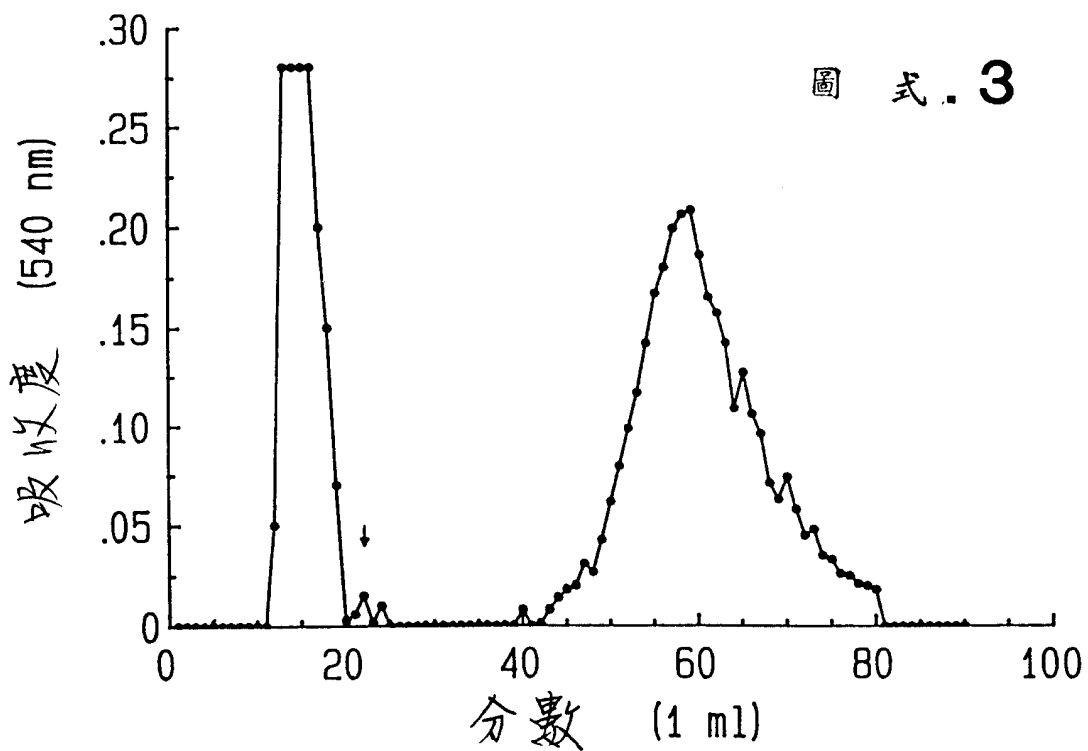
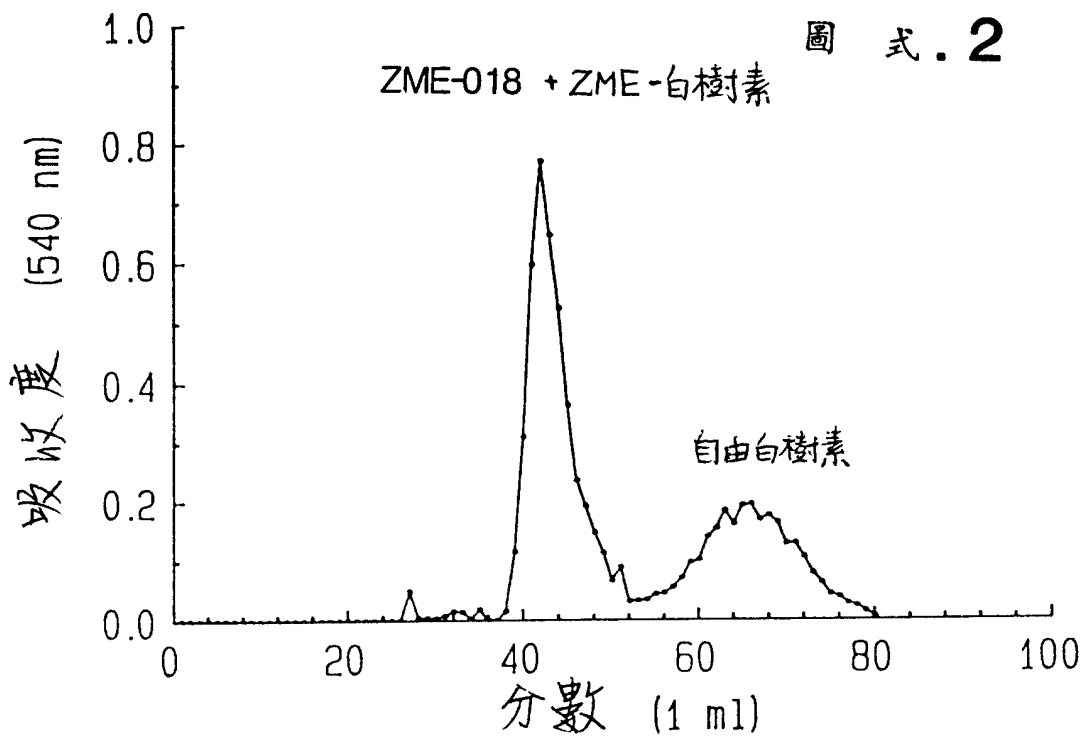
公告本

# ZME-白樹素偶合及純化作用流程圖

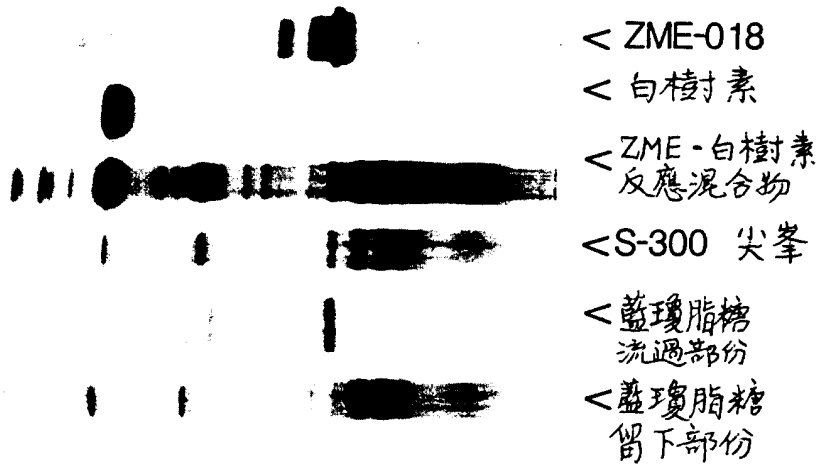
圖式. 1



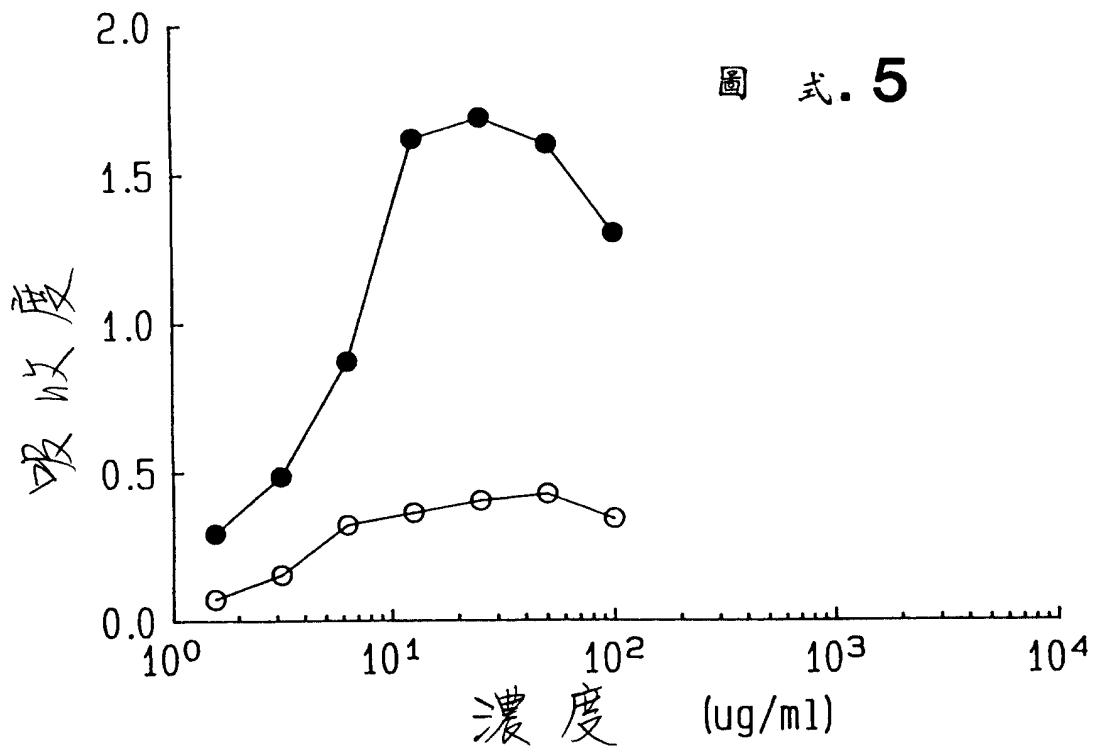
211573

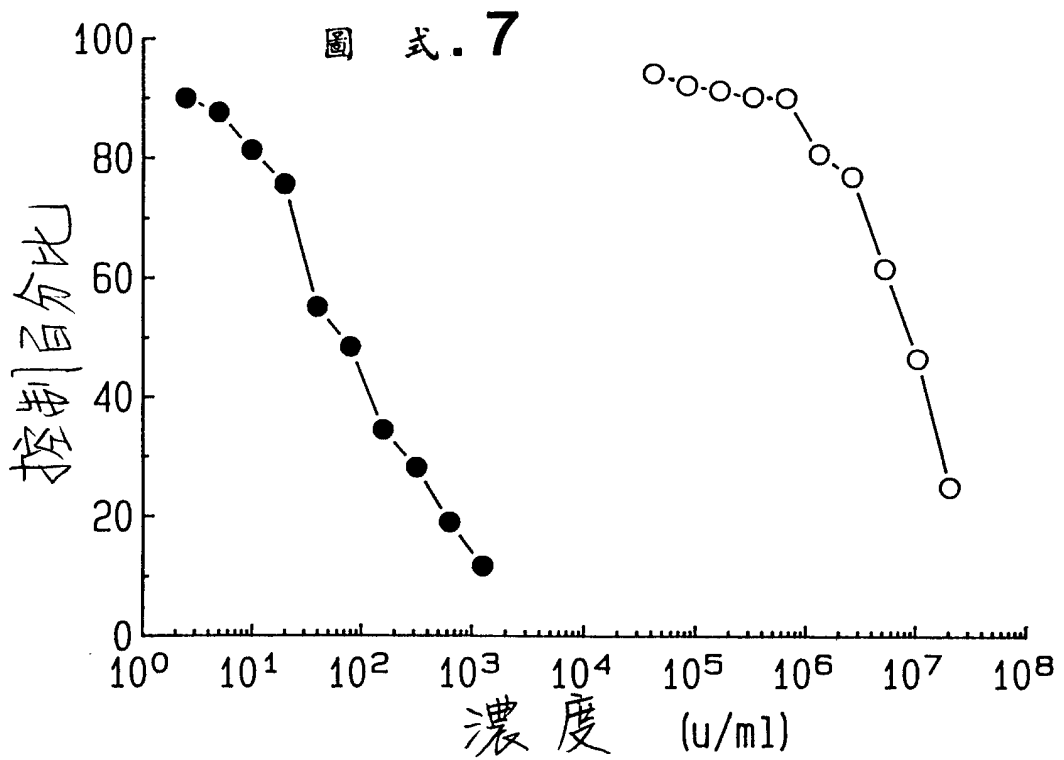
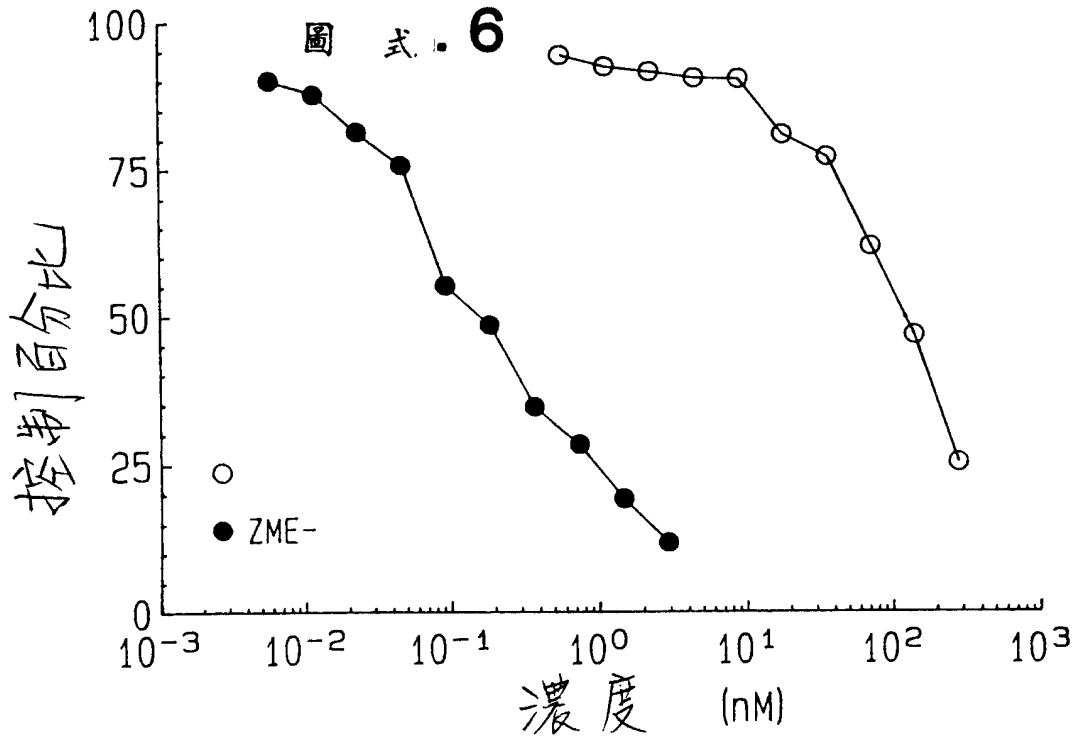


211573

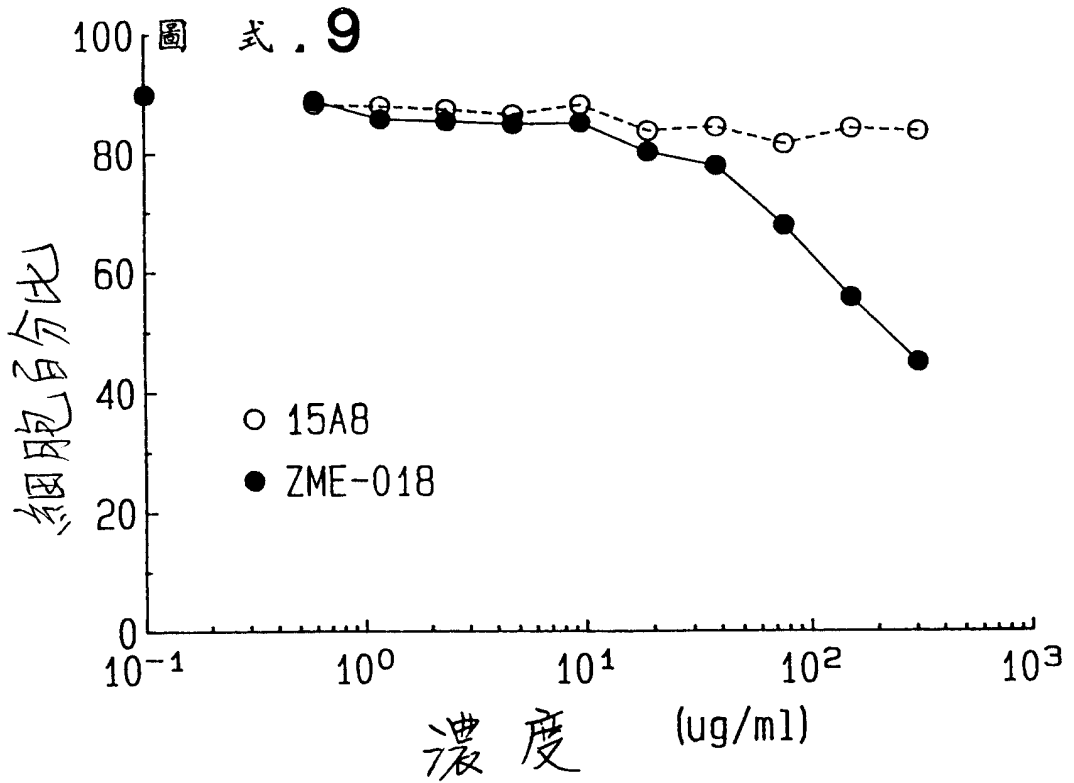
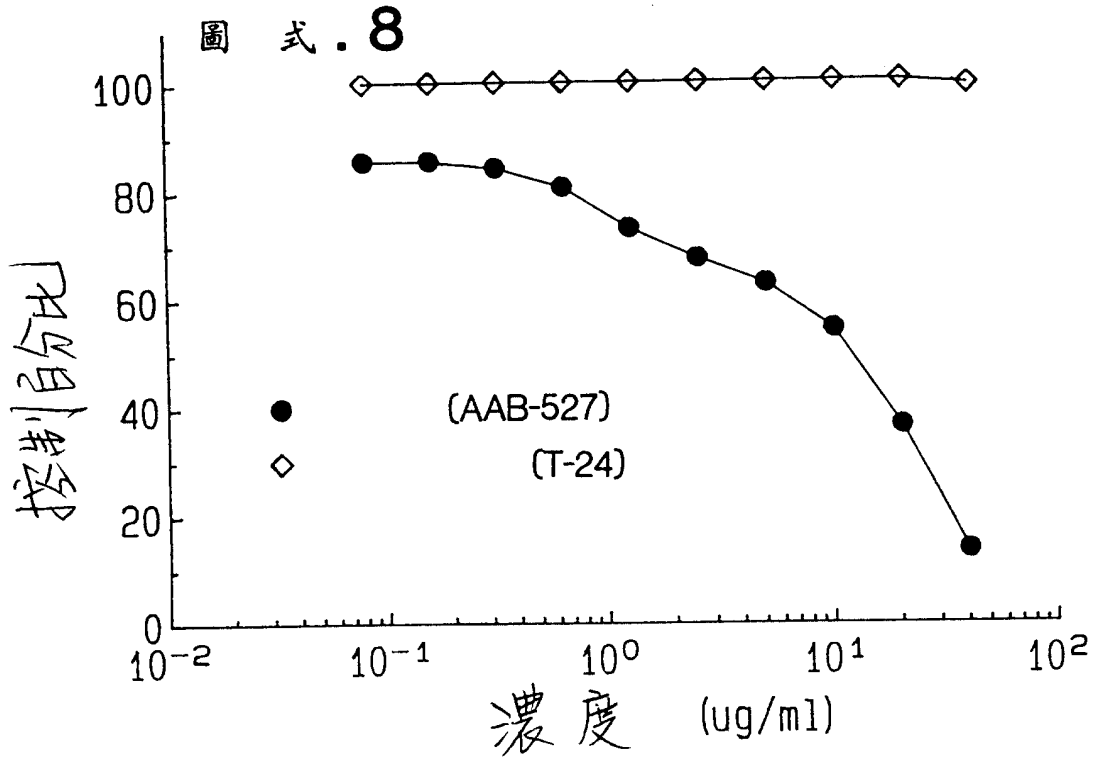


圖式. 4

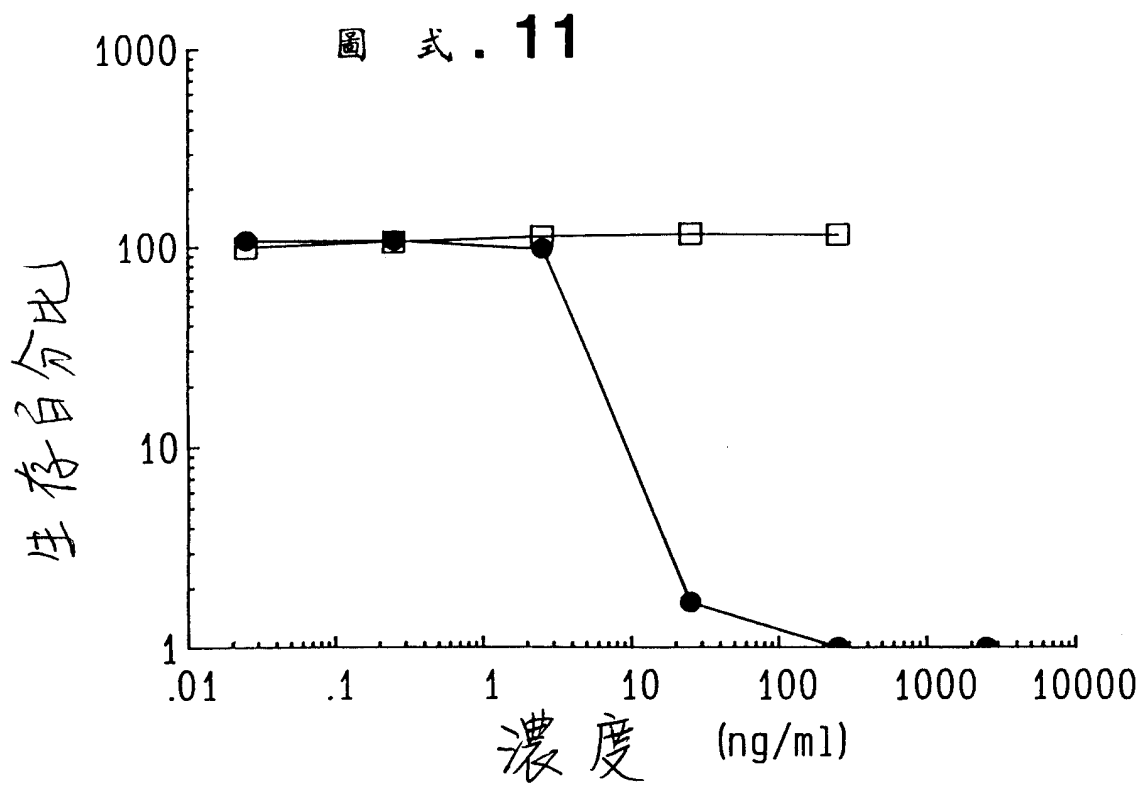
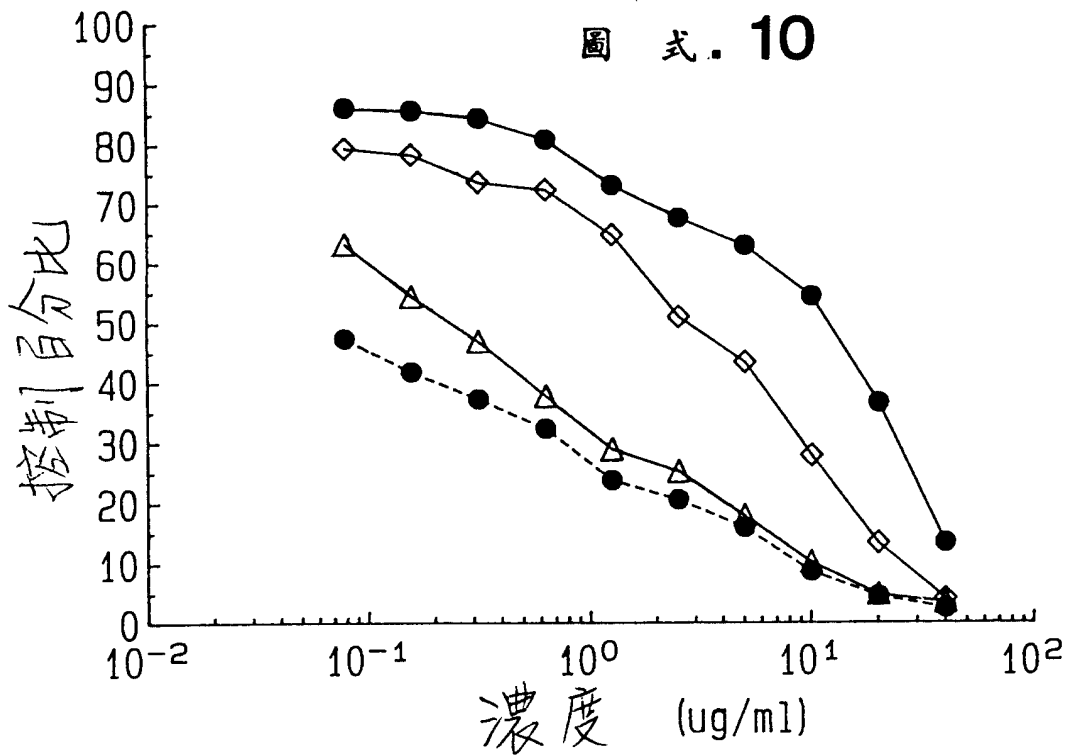




211573



211573



211573

