

[ 19 ] 中华人民共和国国家知识产权局

[ 51 ] Int. Cl<sup>7</sup>  
G01N 33/574



# [12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 96199248.4

[45] 授权公告日 2004 年 5 月 26 日

[11] 授权公告号 CN 1151377C

[22] 申请日 1996. 12. 5 [21] 申请号 96199248. 4  
[30] 优先权  
[32] 1995. 12. 6 [33] DE [31] 19545472. 3  
[32] 1996. 4. 17 [33] DE [31] 19615074. 4  
[86] 国际申请 PCT/EP1996/005448 1996. 12. 5  
[87] 国际公布 WO1997/021104 德 1997. 6. 12  
[85] 进入国家阶段日期 1998. 6. 22  
[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 卡尔斯鲁厄研究中心  
[72] 发明人 卡尔-海因茨·海德 冈瑟·阿道夫  
埃林伯格·奥斯特曼  
埃里克·帕特泽尔特  
马利斯·斯普罗尔  
审查员 颜 丛

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所  
代理人 范明娥

权利要求书 2 页 说明书 38 页 附图 5 页

[54] 发明名称 诊断及治疗鳞状细胞癌的方法

[57] 摘要

本发明是关于诊断和治疗鳞状细胞癌的方法，它基于作为分子目标的 CD 44 基因的变体外显子 v6 的表达。在优选的实施方案中，为此目的而使用 v6-特异性抗体分子，特别是单克隆抗体 BIWA-1 (VFF-18)。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种体外诊断鳞状细胞癌的方法，该方法是基于抗体分子与由基因 CD 44 的可变外显子 v6 编码的表位的结合作用，其特征是，使用识别氨基酸序列 WFGNRWHEGYR 的抗体分子，所述序列是基于 CD44 基因可变外显子所编码的结构域序列。  
5
2. 根据权利要求 1 的方法，其特征是，使用单克隆抗体 BIWA - 1，也称为 VFF - 18，该抗体由具有登记号 DSM ACC2174 的杂交瘤细胞系产生。
3. 根据权利要求 1 或 2 的方法，其特征是，抗体分子为单克隆抗体，  
10 免疫球蛋白的 Fab - 或 F(ab')<sub>2</sub> - 片段，通过重组方法制备的抗体。
4. 根据权利要求 3 的方法，其中通过重组方法制备的抗体是指通过重组方法制备的嵌合抗体或人源化抗体，双功能抗体或单链抗体。
5. 一种抗体分子在根据权利要求 1 至 4 之一的方法中的用途，该抗体分子与氨基酸序列 WFGNRWHEGYR 结合，所述序列是基于 CD44 基因可变外  
15 显子所编码的结构域序列。
6. 根据权利要求 5 的用途，其特征是，该抗体分子是单克隆抗体 BIWA - 1，也称为 VFF - 18，该抗体由具有登记号 DSM ACC2174 的杂交瘤细胞系产生。
7. 根据权利要求 5 或 6 的用途，其特征是，该抗体分子是单克隆抗体、  
20 免疫球蛋白的 Fab - 或 F(ab')<sub>2</sub> - 片段，通过重组方法制备的抗体。
8. 根据权利要求 7 的用途，其中通过重组方法制备的抗体是指通过重组方法制备的嵌合抗体或人源化抗体，双功能抗体或单链抗体。
9. 结合氨基酸序列 WFGNRWHEGYR 的抗体分子的用途，用于制备治疗鳞状细胞癌用的药物组合物，所述序列是基于 CD44 基因可变外显子所编  
25 码的结构域序列。
10. 根据权利要求 9 的用途，其特征是，该抗体分子是单克隆抗体 BIWA - 1，也称为 VFF - 18，该抗体由登记号 DSM ACC2174 的杂交瘤细胞系产生。
11. 根据权利要求 9 或 10 的用途，其特征是，该抗体分子是单克隆抗  
30 体、免疫球蛋白的 Fab - 或 F(ab')<sub>2</sub> - 片段，通过重组方法制备的抗体。
12. 根据权利要求 11 的用途，其中通过重组方法制备的抗体是指通过

重组方法制备的嵌合抗体或人源化抗体，双功能抗体或单链抗体。

13. 根据权利要求 9 或 10 的用途，其特征是，将该抗体分子与放射性同位素、光可激活的化合物、放射性化合物、酶、荧光染料、生物素分子、毒素、细胞抑制剂、前体药物、具有不同特异性的抗体分子、细胞因子或其他的免疫调节多肽相连结。

14. 根据权利要求 11 的用途，其特征是，将该抗体分子与放射性同位素、光可激活的化合物、放射性化合物、酶、荧光染料、生物素分子、毒素、细胞抑制剂、前体药物、具有不同特异性的抗体分子、细胞因子或其他的免疫调节多肽相连结。

15. 根据权利要求 12 的用途，其特征是，将该抗体分子与放射性同位素、光可激活的化合物、放射性化合物、酶、荧光染料、生物素分子、毒素、细胞抑制剂、前体药物、具有不同特异性的抗体分子、细胞因子或其他的免疫调节多肽相连结。

16. 一种用以实施权利要求 1 至 3 之一的方法的制剂，其特征是，它是一种结合到氨基酸序列 WFGNRWHEGYR 的抗体或抗体分子，所述序列是基于 CD44 基因可变外显子所编码的结构域序列。

## 诊断及治疗鳞状 细胞癌的方法

5

本发明是关于诊断及治疗鳞状细胞癌的方法，它基于 CD 44 基因的可变外显子 v6 的表达，本发明还涉及用于这些方法的制剂，以及其用途。

10 近期研究表明，表面糖蛋白 CD 44 的变体的表达，是在大鼠的非-转移性胰腺癌细胞系，以及大鼠的非-转移性纤维肉瘤细胞系中诱发所谓的自发性转移行为的必要和充分条件(Gunthert 等人，1991)。然而，最小的 CD 44-同种型、标准型的 CD 44 都在包括上皮细胞等的多种不同组织中广泛表达，但是 CD 44 的某些剪接变体(CD 44v)仅在上皮细胞的亚群中表达。CD 44-同种型是通过另一种剪接方式产生，该方式将 CD 44 中的 10 个外显子的序列(v1-v10)完全删除，但在较大的变体中可能发生不同的组合

15 (Screaton 等人，1992; Heider 等人，1993; Hofmann 等人，1991)。变体的差异在于，在蛋白质的细胞外部分的特定位置插入不同的氨基酸序列。这种变体可在不同的人类肿瘤细胞和在人体肿瘤组织中检测到。因此，目前已经在研究 CD 44-变体在结直肠致癌中的表达(Heider 等人，1993)。在正常人类的结肠上皮中没有 CD 44-变体的表达，而在腔穴的增殖细胞中，仅

20 可检测到轻微的表达。在肿瘤进展的后期，例如在腺癌中，所有的恶性变体表达 CD 44 的变体。此外，目前已经在已激活的淋巴细胞中，以及在非-何杰金(Hodgkin)淋巴瘤中，证实了 CD 44-剪接变体的表达(Koopman 等人，1993)。

已有多种方法可以利用 CD 44-基因的变异外显子在肿瘤和正常组织

25 中的差异表达进行诊断和治疗(WO 94/02633、WO 94/12631、WO 95/00658、WO 95/00851、EP 0531300)。

也已经研究了变异的 CD 44-分子在鳞状细胞癌中的表达。Salmi 等人(1993)利用 v6-特异性抗体 Var3.1 发现，肿瘤细胞中 v6 的表达比在正常细胞中降低。利用 v6-特异性抗体 11.9, Brooks 等人(1995)对鼻咽癌实现了异

30 质性染色。仅在 2/12 个病例中达到强染色，在大部分的病例中通过免疫组织学仅能检测到轻微病灶性 v6-表达。

本发明的目的是发展用于诊断和治疗鳞状细胞癌的新颖方法，并提供用于这类方法的制剂。

通过本发明已经完成这个目标。它涉及用于诊断和治疗鳞状细胞癌的方法，该方法是基于作为分子标记或标靶的 CD 44 基因的变异外显子 v6 的表达。特别是，本发明是关于以 v6 在鳞状细胞癌中强有力的均一表达为基础的方法，令人惊讶地发现，这与现有技术中得知的教导相反。具有相应特异性的抗体分子特别适合作为载体用于活体内选择性到达鳞状细胞癌。

优选方法的特征在于，使用识别氨基酸序列 QWFGNRWHEGYRQT 的抗体分子，更优选识别氨基酸序列 WFGNRWHEGYR。特别优选由 1994 年 7 月 6 日，以登记号 DSM ACC 2174 保藏在 DSM - Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D - 38124 Braunschweig, Germany(WO 95/33771)的杂交瘤细胞系分泌的单克隆抗体 BIWA - 1(克隆系 VFF - 18)，以及该抗体的衍生物。

本发明的其他方面是这类抗体分子在本发明方法中的用途，以及实施这些方法的制剂。

已知 CD 44 - 基因的变异外显子 v6 的核酸和氨基酸序列(Screaton 等人, 1992, Tolg 等人 1993)。变性或等位变体的存在，对于本发明的实施不太重要；因此这类变体明显也包含在内。

人类 CD 44 - 基因的外显子 v6 的序列为：

20           Q    A    T    P    S    S    T    T    E    E    T    A  
          TC   CAG GCA ACT CCT AGT AGT ACA ACG GAA GAA ACA GCT  
          T    Q    K    E    Q    W    F    G    N    R    W    H    B    G  
          ACC CAG AAG GAA CAG TGG TTT GGC AAC AGA TGG CAT GAG GGA  
          Y    R    Q    T    P    R    E    D    S    H    S    T    T    Q  
25   TAT CGC CAA ACA CCC AGA GAA GAC TCC CAT TCG ACA ACA GGG  
          T    A  
          ACA GCT G.

本发明可利用特异于外显子 v6 编码的表位的多克隆或单克隆抗体来进行，所述表位特别是在氨基酸序列 QWFGNRWHEGYRQT 内的表位，最好是在氨基酸序列 WFGNRWHEGYR 内的表位。制备针对已知氨基酸序列的抗体，可根据原本已知的方法(Catty, 1989)来进行。例如可以合成该序列的肽，

并使用该肽在免疫程序中作为抗原。另一方法是制备一种含有所要求的氨基酸序列的融合蛋白，方法是将编码该序列的核酸整合至表达载体内，并在宿主生物中表达该融合蛋白(所述核酸可以合成方式制备，或例如通过聚合酶链反应(PCR)从适当的探针制备)。然后在免疫程序中，使用该融合蛋白(可任选  
5 纯化形成)作为抗原然后通过适当方法选择插入-特异性的抗体，或者在单克隆抗体的情况下，选择表达插入-特异性抗体的杂交瘤。这类方法在现有技术中是已知的。Heider 等人(1993, 1996a)和 Koopman 等人(1993)描述了针对 CD 44 变体表位的抗体的制备。

然而，根据本发明方法，也可以使用其他由多-或单克隆抗体衍生的抗  
10 体分子，例如免疫球蛋白的 Fab - 或 F(ab')<sub>2</sub> - 片段、由重组方法制备的单链抗体(scFv)、嵌合型或人源化抗体，以及其他对由外显子 v6 编码的表位呈特异性结合的分子。Fab - 或 F(ab')<sub>2</sub> - 片段或其他片段，例如可从抗体 BIWA - 1(VFF - 18)或其他抗体的完整的免疫球蛋白产生(Kreitman 等人, 1993)。本领域技术人员也有能力制备重组的 v6 - 特异性抗体分子。尤其是，在分析  
15 抗体 BIWA - 1(VFF - 18)的氨基酸序列，和/或使用产生该抗体的杂交瘤细胞系(尤其是其中含有遗传讯息)后，它可以产生具有像 BIWA - 1(VFF - 18)一样的独特型的重组抗体，也就是在抗原结合部位区(互补决定区，CDR)具有像 BIWA - 1(VFF - 18)一样的氨基酸序列的抗体分子。这类方法在现有技术中是已知的。这类重组抗体分子可以是例如人源化抗体(Shin 等人，  
20 1989；Gussow 和 Seemann, 1991)、双特异性或双功能性抗体(Weiner 等人，1993；Goodwin, 1989；Featherstone, 1996)、单链抗体(scFv, Johnson 和 Bird, 1991)、完整的或片段化的免疫球蛋白(Coloma 等人，1992；Nesbit 等人，1992；Barbas 等人，1992)，或通过链改组(chain shuffling)而产生的抗体(Winter 等人，1994)。人源化抗体可通过例如 CDR - 移植而制备(EP  
25 0239400)。也可以修饰框架区(EP 0519596；WO 9007861)。关于人源化抗体，现在可以使用诸如 PCR 之类的方法(参见例如 EP 0368684；EP 0438310；WO 9207075)，或计算机-模拟(参见例如 WO 9222653)。也可以制备并使用融合蛋白，例如单链抗体/毒素融合蛋白(Chaudhary 等人，1990；Friedman 等人，1993)。术语“抗体”和“抗体分子”，不仅是指多克隆和单  
30 克隆抗体，还指在本段所讨论的结构上衍生自免疫球蛋白并可用原本已知的方法来制备的所有化合物。

利用对 BIWA - 1(VFF - 18)的表位(参见图 1、图 4)的了解,来制备具有相同结合特异性的等效抗体,也在普通技术人员的能力范围内。因此这样的抗体也包括在本发明之内。

为了诊断的目的,可将抗体分子,优选是 BIWA - 1 抗体分子、其片段, 5 或具有相同独特型的重组抗体分子,与诸如  $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$  之类的放射性同位素相联结,或是与放射性化合物(Larson 等人, 1991; Thomas 等人, 1989; Srivastava, 1988), 诸如过氧化物酶或碱性磷酸酶之类的酶(Catty 和 Raykundalia, 1989)、和荧光染料(Johnson, 1989)或生物素分子(Guesdon 等人, 1979)相联结。为了治疗之目的,可使 v6 - 特异性抗体分子,优选 BIWA - 10 1(VFF - 18) - 抗体分子或 VFF - 18 - 衍生的抗体分子,例如其片段或具有相同独特型的重组抗体分子,与放射性同位素,如  $^{90}\text{Y}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{186}\text{Re}$ 、 $^{188}\text{Re}$ 、 $^{153}\text{Sm}$ 、 $^{67}\text{Cu}$ 、 $^{212}\text{Bi}$ 、 $^{213}\text{Bi}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ (Quadri 等人, 1993; Lenhard 等人, 1985; Vriesendrop 等人, 1991; Wilbur 等人, 1989; Mara - veyas 等人, 1995a, Jurcic 和 Scheinberg, 1994)、毒素(Vitetta 等人, 1991; Vitetta 和 Thorpe, 1991; Kreitman 15 等人, 1993; Theuer 等人, 1993)、细胞抑制剂(Schrappe 等人, 1992)、前体药物(Wang 等人, 1992; Senter 等人, 1989)、光可激活的物质(Hemming 等人, 1993)、具有不同特异性的抗体分子或放射性化合物联结。该抗体分子也可联结细胞因子或一些其他的免疫调节多肽,例如与肿瘤坏死因子、淋巴毒素(Reisfeld 等人, 1996)或白细胞介素 - 2(Becker 等人, 1996)联结。 20 也可以对抗体分子进行修饰以用于预瞄准系统,例如利用链霉亲和素或生物素(Goodwin, 1995)。

有利的是,本发明的诊断方法可用于研究得自患者的样品,例如得自活组织检查的样品,所述患者是怀疑有鳞状细胞癌,或是已经做出诊断但需要进一步对该肿瘤进行表征者。检测含有由可变外显子 v6 编码的氨基酸 25 序列的变体 CD 44 - 分子,可在蛋白质水平上利用抗体来进行,或是在核酸水平上使用特异性核酸探针或引物来进行聚合酶链反应(PCR)。因此,本发明也关于适合作为探针或引物用于这类方法的抗体分子和核酸,以及这些抗体和核酸在诊断和分析鳞状细胞癌中的用途。例如,可利用抗体,通过原本已知的方法对组织切片进行免疫组织化学,从而进行检测。也可用其 30 其他的免疫学方法,使用抗体来研究得自组织样品的提取物或体液,所述方法如 Western 印迹法,酶联免疫吸附试验(ELISA, Catty 和 Raykundalia, 1989)、

放射免疫分析(RIA、Catty 和 Murphy, 1989)或相关的免疫分析。这些研究可以是定性的、半-定量的或定量的。

除了体外的诊断外, 具有本发明特异性的抗体分子亦适用于在活体内诊断鳞状细胞癌。如果该抗体分子带有可检测的标记, 则可以为了诊断目的而对该标记进行检测, 例如使肿瘤在体内呈像, 或是供放射性引导的手术使用。例如, 使用与放射性同位素相结合的抗体以进行免疫闪烁照相法(呈像), 作为实施本发明的基础, 本领域技术人员可使用许多方法(Siccardi 等人, 1989; Keenan 等人, 1987; Perkins 和 Pimm, 1992; Colcher 等人, 1987; Thompson 等人, 1984)。

因此, 可使用通过检测和/或定量变异的 CD 44 - 表位 v6 的表达所获得的数据来诊断和预后。将这些数据和其他的预后参数, 例如肿瘤的等级相结合是有利的。

具有本发明特异性的抗体分子可(选择与细胞毒制剂混合), 有利于鳞状细胞癌的治疗。它们可全身性或局部施用, 例如经由静脉内的途径(如快速浓注(bolus)或连续输液), 或经由腹腔内、肌肉内、皮下或其他注射/输液。投予偶联型或非偶联型抗体(它们为完整的免疫球蛋白、片段、重组人源化分子或其类似物的形式)的方法是现有技术中已知的(Mulshine 等人, 1991; Larson 等人, 1991; Vitetta 和 Thorpe, 1991; Vitetta 等人, 1991; Breitz 等人, 1992, 1995; Press 等人, 1989; Weiner 等人, 1989; Chatal 等人, 1989; Sears 等人, 1982)。它们可在治疗方面使用, 例如, 与抗体 1.1ASML(Seiter 等人, 1993)同样的方式。未经修改的单克隆抗体如果本身具有适于细胞毒作用(例如补体-诱发或抗体-诱发的细胞毒性)的内在效应子功能, 则可直接用于治疗(Riethmuller 等人, 1994)。适于这种应用的单克隆抗体, 为 IgG2a 同种型的鼠抗体, 或人类 IgG1 型的抗体。也可施用未改性的抗体, 以便经由抗-独特型的机制来诱发患者自己的抗肿瘤反应(Baum 等人, 1993; Khazaeli 等人, 1994)。

根据治疗应用的优选的具体实施例, 将人源化的 v6 - 特异性免疫球蛋白或其 F(ab')<sub>2</sub> 片段与 <sup>90</sup>Y (Quadri 等人, 1993; Vriesendorp 等人, 1995)、<sup>131</sup>I(Maraveyas 等人, 1995 a, 1995 b; Juweid 等人, 1995; Press 等人, 1995; Thomas 等人, 在: Catty 1985, 第 230 - 239 页)、<sup>186</sup>Re (Breitz 等人, 1992, 1995)或其他适当的放射性同位素连结, 并用于鳞状细胞癌的放射性免

疫治疗中。例如,可利用整合连接物,如 ITCB - DTPA(异硫氰酰苄基 - 二亚乙基三胺五乙酸),将抗体 BIWA - 1,人源化 BIWA - 1,或 BIWA - 1 的 F(ab')<sub>2</sub> 片段,或人源化抗体,与 <sup>90</sup>Y 连结,达到 5 - 20 毫居里/毫克的比活性,优选 10 毫居里/毫克。然后以 0.1 到 1 毫居里/公斤体重的剂量,将该

5 制剂给药于抗原 - 阳性肿瘤的患者,优选的是 0.3 到 0.5 毫居里/公斤体重。如果该抗体分子与 <sup>131</sup>I 连结,则投药计划可能为例如,对 2 毫居里/毫克比活性的情况,以 6 周的间隔给药 2 × 150 毫居里。本领域技术人员可利用原来已知的方法(Maraveyas 等人, 1995a, 1995b),定出最大剂量。当给药的蛋白质的总量为 2 到 5 毫克时,则可通过快速静脉内浓注(bolus)的形式给药。

10 在较大量蛋白质的情况下,注射可能是较适当的投药方法。使用单克隆抗体,可能需要在给药前,将该制剂与过量的(例如十倍摩尔过量)无放射活性的抗体混合;在该情况下,最好是以静脉注射的形式给予该制剂,例如用 15 分钟的时间给药。这可重复进行。该治疗可与外部的放射性治疗相结合。也可辅以骨髓移植;在治疗期间,当到达骨髓的剂量超过 1.6Gy 时,尤其必需这种

15 处理。

根据本发明的抗体分子,也可回体(*ex vivo*)用于纯化 CD 34 - 阳性的干细胞和前体细胞制品(免疫净化)。也可使用自体骨髓移植来支持鳞状细胞癌的放疗和化疗。因此必需给予不含肿瘤细胞的造血干细胞和前体细胞的制品。这可通过与本发明抗体分子一起温育来完成,例如抗体 - 毒素偶联物

20 (Myklebust 等人, 1994; DE P 196 48 209 7)。

也可将根据本发明的抗体分子,以重组构建体的形式导入 T 淋巴细胞的 T 细胞受体中。这类经过重排的 T - 淋巴细胞可选择性地与表达抗原的肿瘤细胞相结合,并发展出细胞毒活性,因此它们可用于治疗鳞状细胞癌(PCT/欧洲专利 9604631 号; Altenschmidt 等人, 1996)。

## 25 附图

图 1: 通过结合人 CD44v6 序列衍生的合成肽来确定 BIWA - 1 的表位特异性。用抗体 1.1ASML 来测试得自大鼠 CD44v6 的相应肽。以 ELISA 确定结合,在 ELISA 中肽是固定在微滴板上(参见 Heider 等人, 1996b, 图 2)。

-: 无结合, +/-: 稍有结合; +: 强结合。

30 图 2: 用 CD44v6 - 特异性单克隆抗体 BIWA - 1,来进行喉部鳞状细胞癌(a)和食道癌的肝转移(b)的免疫组织化学分析。在这两种情况下,观察抗

体与肿瘤细胞膜的反应。原始放大 40x, 苏木精复染。

图 3: 抗原与各种 CD44v6 - 特异性 mAb 的结合的比较。在细胞 ELISA 中测定四种不同的 CD44v6 - 特异性 mAb 和人类 SCC A - 431 - 细胞的结合。MAb BIWA - 1 对肿瘤细胞呈显出比其他 MAb 更高的亲和力。

5 图 4: mAb BIWA - 1 的精细表位作图。通过竞争性 ELISA, 测量 BIWA - 1 对各种重叠合成肽的结合, 这些肽跨越 CD44v6 - 编码区的氨基酸 18 - 32。最弱结合的序列(肽 v6(19 - 29))下有画线。

图 5: 在 A - 431 异种移植的裸鼠中  $^{125}\text{I}$  - BIWA - 1 的生物分布。在注射后的 4、24、48、120 和 168 小时, 得到的按 % ID/克(平均值  $\pm$  标准差)表示的抗体累积。

#### 实施例

#### 实施例 1: CD44v6 在鳞状细胞癌中的表达

#### 组织

用 mAb BIWA - 1(克隆 VFF - 18), 以免疫组织化学法分析总共 126 例石蜡包埋的肿瘤样品的 CD44v6 的表达。样品包括 31 例原发性鳞状细胞癌(15 例喉部, 16 例皮肤), 91 例淋巴结转移(喉部,  $n = 38$ ; 肺,  $n = 27$ ; 食道,  $n = 11$ ; 口腔,  $n = 11$ ; 扁桃体,  $n = 4$ ), 以及 4 例肝转移(食道)。

#### 抗体

通过聚合酶链反应(PCR)从人类角质细胞 - cDNA 扩增 HPKII 型 CD44v 的完整变体区域(Hofmann 等人, 1991)。使用两种 PCR 引物: 5' - CAGGCTGGGAGCCAAATGAAGAAAATG - 3' 和 5' - TGATAAGGAACGATTGACATTAGAGTTGGA - 3'如同 Hofmann 所述, 前者位于 LCLC 97 - 变体区域的 25 - 52 位, 后者位于 1013 - 984 位, 它们含有 EcoRI 识别位点, 用于将 PCR 产物直接克隆到载体 pGEX - 2T 内(Smith 等人, 1988)。所得的构建体(pGEX CD44v HPKII, v3 - v10)编码大约 70kD 的融合蛋白, 其由得自日本吸血虫(*Schistosoma japonicum*)的谷胱甘肽 - S - 转移酶和人类 CD 44 的外显子 v3 - v10 组成(图 1; Heider 等人, 1993)。在大肠杆菌(*E.coli*)中表达该融合蛋白, 然后在谷胱甘肽 - 琼脂糖上进行亲和纯化(Smith 等人, 1988)。

30 用经过亲和纯化的融合蛋白, 根据下列计划, 腹腔内免疫接种雌性 Balb/c 小鼠:

第1次免疫接种 90微克融合蛋白在弗氏(Freund's)完全佐剂中

第2次和第3次免疫接种 50微克融合蛋白在弗氏不完全佐剂中

以4周间隔免疫接种。在最后一次免疫接种后第14天,连续3天以在PBS中的10微克融合蛋白免疫接种动物。在第二天使用聚乙二醇4000,将  
5 得自具有高抗体效价的动物的脾细胞与P3.X63 - Ag 8.653小鼠骨髓瘤细胞融合。然后在微滴板中的HAT - 培养基中筛选杂交瘤细胞(Kohler和Milstein, 1975; Kearney等人, 1979)。

测定在血清中的抗体效价,或筛选杂交瘤上清液,都用ELISA进行。在该试验中,所有微滴板的第一个都用融合蛋白(GST - CD44v3 - 10)覆盖,  
10 或仅用谷胱甘肽 - S - 转移酶覆盖。然后将其与系列稀释的血清样品或杂交瘤上清液一起温育,并利用偶联过氧化物酶的抗小鼠免疫球蛋白的抗体来检测特异性抗体。任何仅与谷胱甘肽 - S - 转移酶反应的杂交瘤都被弃去。剩下的抗体,首先在ELISA中,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)进行鉴定(Koopman等人,  
15 1993)。在人的皮肤切片上测试其免疫组织化学反应性。

BIWA - 1(VFF - 18; 其制备和特性亦可参见WO 95/33771)仅与含有由外显子v6编码的结构域的融合蛋白结合。为了更进一步限制该抗体的表位,在ELISA结合试验中使用代表v6结构域的不同部分的各种合成肽(图1)。14个氨基酸的肽v6D显示出最强的结合作用。所以, BIWA - 1的表位  
20 完全或部分落在由外显子v6编码的结构域的序列QWFGNRWHEGYRQT之中。该序列与抗体1.1ASML的结合表位是同源的,后者在治疗性大鼠模型中使用,且其对大鼠CD44 v6是特异性的(图1)。

#### 免疫组织化学

在与第一抗体一起温育前,将在洛提西斯醇(Rotihistol)(Roth, 德国)中的  
25 石蜡切片(4μm)脱蜡三次,每次10分钟,然后在逐渐提高的酒精系列中再水化。以蒸馏水简单地冲洗切片,然后在0.01M钠 - 柠檬酸盐缓冲液中,在微波炉(Sharp R - 6270型)中以600瓦烘烤三次,每次各10分钟。在每次微波温育后,将切片冷却20分钟。在最后一次冷却阶段后,以PBS冲洗载体,并与正常的山羊血清(10%,在PBS中)一起预温育。在PBS中冲洗3次后,  
30 将切片与第一抗体(BIWA - 1: 5微克/毫升;鼠IgG(同种型 - 对应的阴性对照组)5微克/毫升,在PBS/1% BSA中)一起温育1小时。用于染色反应的阳

性对照组是正常人类皮肤切片，因为角质细胞表达含有 v3 - v10 的 CD 44 - 同种型。利用在 PBS 中的 0.3 %  $H_2O_2$  来阻断内源的过氧化物酶，并将切片与生物素化的第二抗体(抗 - 小鼠 IgG - F(ab')<sub>2</sub>, DAKO 公司)一起温育 30 分钟。为了显色，将切片与辣根过氧化物酶一起温育 30 分钟，该酶偶联生物素而以链霉亲和素 - 生物素 - 过氧化物酶复合物形式存在(DAKO Corp.)。然后在 3,3 - 氨基 - 9 - 乙基 - 咔唑底物(Sigma Immunochemicals)中保温该切片 5 - 10 分钟，利用  $H_2O$  使反应终止，并以苏木精复染。用 Zeiss Axioskop 光学显微镜来评价染色，并如下定量颜色的强度：+++，强表达；++，中等的表达；+，弱表达；-，不清楚或未检测到表达。只有具有清楚膜染色的肿瘤细胞被评为阳性。粗略地测定在每个切片中阳性肿瘤细胞的百分比，形成两组：局部阳性肿瘤(低于 10 % 的与抗体反应的肿瘤细胞的 10 %)，阳性肿瘤(10 % 或 10 % 以上的阳性肿瘤细胞)。如果在与该抗体反应的阳性细胞中，肿瘤细胞少于 80 %，则指示相对应的百分比。

利用 CD44v6 - 特异性单克隆抗体 BIWA - 1 来分析 126 例各种来源的鳞状细胞癌。在除了一个样品外的全部样品中，观察到含有 CD44v6 的同种型的表达。大部分样品显示抗原在 80 - 100 % 的肿瘤细胞中表达，且染色被限制在肿瘤细胞的膜上。在基质组织、淋巴细胞、肌肉细胞或内皮细胞上未观察到反应。

为了定量 CD44v6 - 分子在这些肿瘤细胞上的表达，将正常人类皮肤的切片，与肿瘤切片并行地染色。正常皮肤角质细胞表达高水平的 CD 44 - 同种型，并且都属于到目前为止已经描述的正常细胞中 CD44v6 的最强表达子。因此，使用角质细胞的染色作为参考，并在我们的评估系统中将其归类为“强”(+++)。在大部分受检查的肿瘤样品中，肿瘤细胞的染色与皮肤角质细胞的染色相当，或甚至更强，仅有一些病例显示出弱的肿瘤染色(3 例淋巴结转移)，或中等的肿瘤染色(2 例原发性癌，10 例转移)。染色反应在特定的肿瘤切片中是非常均一的，且在切片中大部分的肿瘤细胞具有相同的染色强度。原发性肿瘤与转移灶的 CD44v6 表达模式未观察到明显的差异。在表 1 中列出结果的详细概要，而实例示于图 2 中。

表 1: CD44v6 在鳞状细胞癌中的表达

| 样品    |    |  | 肿瘤类型 |    | BIWA - 1 的反应性 |
|-------|----|--|------|----|---------------|
| 46937 | 86 |  | 原发性  | 喉部 | + + +         |
| 4687  | 90 |  | 原发性  | 喉部 | + + +         |
| 8372  | 90 |  | 原发性  | 喉部 | + + +         |
| 17427 | 90 |  | 原发性  | 喉部 | + + +         |
| 27298 | 90 |  | 原发性  | 喉部 | + + +         |
| 46908 | 90 |  | 原发性  | 喉部 | + + +         |
| 51334 | 90 |  | 原发性  | 喉部 | + + +         |
| 51402 | 91 |  | 原发性  | 喉部 | + + +         |
| 60414 | 91 |  | 原发性  | 喉部 | + + +         |
| 61733 | 91 |  | 原发性  | 喉部 | + + +         |
| 12280 | 92 |  | 原发性  | 喉部 | + + +         |
| 23140 | 92 |  | 原发性  | 喉部 | + + +         |
| 31792 | 92 |  | 原发性  | 喉部 | + + +         |
| 32214 | 92 |  | 原发性  | 喉部 | + + +         |
| 10209 | 95 |  | 原发性  | 喉部 | + + +         |
| 2366  | 86 |  | 原发性  | 皮肤 | + + +         |
| 2574  | 86 |  | 原发性  | 皮肤 | + + +         |
| 9916  | 86 |  | 原发性  | 皮肤 | + + / + + +   |
| 2696  | 87 |  | 原发性  | 皮肤 | + + +         |
| 8906  | 87 |  | 原发性  | 皮肤 | + + +         |
| 8191  | 88 |  | 原发性  | 皮肤 | + + +         |
| 8354  | 88 |  | 原发性  | 皮肤 | + + 50 %      |
| 11963 | 88 |  | 原发性  | 皮肤 | + +           |
| 5590  | 90 |  | 原发性  | 皮肤 | + + / + + +   |
| 530   | 92 |  | 原发性  | 皮肤 | + + +         |
| 2583  | 94 |  | 原发性  | 皮肤 | + + +         |
| 11337 | 94 |  | 原发性  | 皮肤 | + + +         |
| 10901 | 95 |  | 原发性  | 皮肤 | + + +         |

|       |    |       |       |    |             |
|-------|----|-------|-------|----|-------------|
| 11557 | 95 |       | 原发性   | 皮肤 | + + +       |
| 11744 | 95 |       | 原发性   | 皮肤 | + + +       |
| 11917 | 95 |       | 原发性   | 皮肤 | + + +       |
| 4688  | 90 | I     | 淋巴结转移 | 喉部 | + + / + + + |
| 4688  | 90 | II    | 淋巴结转移 | 喉部 | -           |
| 8374  | 90 |       | 淋巴结转移 | 喉部 | + + +       |
| 17428 | 90 |       | 淋巴结转移 | 喉部 | + + +       |
| 27300 | 90 |       | 淋巴结转移 | 喉部 | + + +       |
| 36942 | 90 |       | 淋巴结转移 | 喉部 | + + +       |
| 46909 | 90 |       | 淋巴结转移 | 喉部 | + +         |
| 51336 | 90 |       | 淋巴结转移 | 喉部 | + + +       |
| 41108 | 91 |       | 淋巴结转移 | 喉部 | + + +       |
| 51398 | 91 |       | 淋巴结转移 | 喉部 | + + +       |
| 60416 | 91 |       | 淋巴结转移 | 喉部 | + + +       |
| 61734 | 91 |       | 淋巴结转移 | 喉部 | + + +       |
| 1318  | 92 | I     | 淋巴结转移 | 喉部 | + + +       |
| 1318  | 92 | II    | 淋巴结转移 | 喉部 | + + +       |
| 1318  | 92 | III   | 淋巴结转移 | 喉部 | + + +       |
| 1318  | 92 | IV    | 淋巴结转移 | 喉部 | + + +       |
| 2863  | 92 | I     | 淋巴结转移 | 喉部 | + + +       |
| 2863  | 92 | II    | 淋巴结转移 | 喉部 | + + +       |
| 5745  | 92 | I     | 淋巴结转移 | 喉部 | + + +       |
| 5745  | 92 | II    | 淋巴结转移 | 喉部 | + + +       |
| 8969  | 92 | I     | 淋巴结转移 | 喉部 | + + +       |
| 8969  | 92 | II    | 淋巴结转移 | 喉部 | + + +       |
| 8969  | 92 | III   | 淋巴结转移 | 喉部 | + +         |
| 8969  | 92 | IV    | 淋巴结转移 | 喉部 | + + +       |
| 8969  | 92 | 2/I   | 淋巴结转移 | 喉部 | + + +       |
| 8969  | 92 | 2/II  | 淋巴结转移 | 喉部 | + + +       |
| 8969  | 92 | 2/III | 淋巴结转移 | 喉部 | + +         |

|       |    |       |       |    |             |
|-------|----|-------|-------|----|-------------|
| 8969  | 92 | 2/IV  | 淋巴结转移 | 喉部 | + / + +     |
| 9366  | 92 |       | 淋巴结转移 | 喉部 | + + +       |
| 9509  | 92 |       | 淋巴结转移 | 喉部 | + + +       |
| 9566  | 92 |       | 淋巴结转移 | 喉部 | + + +       |
| 12283 | 92 |       | 淋巴结转移 | 喉部 | + + +       |
| 14046 | 92 |       | 淋巴结转移 | 喉部 | + + +       |
| 31787 | 92 |       | 淋巴结转移 | 喉部 | + + +       |
| 49228 | 92 |       | 淋巴结转移 | 喉部 | + + + 50 %  |
| 29228 | 93 |       | 淋巴结转移 | 喉部 | + + +       |
| 29829 | 93 |       | 淋巴结转移 | 喉部 | + +         |
| 29804 | 95 |       | 淋巴结转移 | 喉部 | + + / + + + |
| 15293 | 91 |       | 淋巴结转移 | 肺  | + 25 %      |
| 1667  | 92 |       | 淋巴结转移 | 肺  | + 20 %      |
| 2757  | 92 | I     | 淋巴结转移 | 肺  | + + +       |
| 2757  | 92 | II    | 淋巴结转移 | 肺  | + + +       |
| 2757  | 92 | III   | 淋巴结转移 | 肺  | + + +       |
| 2757  | 92 | IV    | 淋巴结转移 | 肺  | + + +       |
| 4790  | 92 |       | 淋巴结转移 | 肺  | + + +       |
| 6168  | 92 | I     | 淋巴结转移 | 肺  | + + 50 %    |
| 6168  | 92 | II    | 淋巴结转移 | 肺  | + + +       |
| 6168  | 92 | III   | 淋巴结转移 | 肺  | + + +       |
| 6168  | 92 | IV    | 淋巴结转移 | 肺  | + + +       |
| 7206  | 92 |       | 淋巴结转移 | 肺  | + + +       |
| 7531  | 92 | I     | 淋巴结转移 | 肺  | + + +       |
| 7531  | 92 | II    | 淋巴结转移 | 肺  | + + +       |
| 7531  | 92 | III   | 淋巴结转移 | 肺  | + + / + + + |
| 7531  | 92 | IV    | 淋巴结转移 | 肺  | + + +       |
| 10324 | 92 |       | 淋巴结转移 | 肺  | + + +       |
| 10519 | 92 | II    | 淋巴结转移 | 肺  | + + +       |
| 10519 | 92 | RM II | 淋巴结转移 | 肺  | + + +       |

|       |    |     |       |    |                      |
|-------|----|-----|-------|----|----------------------|
| 10958 | 92 |     | 淋巴结转移 | 肺  | + + +                |
| 11425 | 92 | I   | 淋巴结转移 | 肺  | + + +                |
| 11425 | 92 | II  | 淋巴结转移 | 肺  | + + +                |
| 13055 | 92 |     | 淋巴结转移 | 肺  | + + / + + +          |
| 13055 | 92 | II  | 淋巴结转移 | 肺  | 局部的 + + +            |
| 13055 | 92 | III | 淋巴结转移 | 肺  | + + +                |
| 15663 | 92 |     | 淋巴结转移 | 肺  | + + +                |
| 16713 | 92 |     | 淋巴结转移 | 肺  | + + +                |
| 14980 | 91 | I   | 淋巴结转移 | 食道 | + + +                |
| 14980 | 91 | II  | 淋巴结转移 | 食道 | + + +                |
| 16641 | 91 | I   | 淋巴结转移 | 食道 | + + +                |
| 16641 | 91 | II  | 淋巴结转移 | 食道 | + + +                |
| 16641 | 91 | III | 淋巴结转移 | 食道 | + + +                |
| 1059  | 92 |     | 淋巴结转移 | 食道 | +                    |
| 1710  | 92 | I   | 淋巴结转移 | 食道 | + + +                |
| 1710  | 92 | II  | 淋巴结转移 | 食道 | + + +                |
| 1710  | 92 | III | 淋巴结转移 | 食道 | + + +                |
| 11502 | 92 | I   | 淋巴结转移 | 食道 | + + +                |
| 11502 | 92 | II  | 淋巴结转移 | 食道 | + +                  |
| 202   | 92 |     | 淋巴结转移 | 口腔 | + + 60 %             |
| 6030  | 92 |     | 淋巴结转移 | 口腔 | + / + + / + + + 25 % |
| 7335  | 92 | I   | 淋巴结转移 | 口腔 | + + +                |
| 7335  | 92 | II  | 淋巴结转移 | 口腔 | + + +                |
| 15324 | 92 | II  | 淋巴结转移 | 口腔 | + + + 70 %           |
| 16164 | 92 | I   | 淋巴结转移 | 口腔 | + + +                |
| 16164 | 92 | II  | 淋巴结转移 | 口腔 | + + + 50 %           |
| 16164 | 92 |     | 淋巴结转移 | 口腔 | + + / + + +          |
| 16836 | 92 | I   | 淋巴结转移 | 口腔 | + + +                |
| 16836 | 92 | II  | 淋巴结转移 | 口腔 | + + +                |
| 16836 | 92 | III | 淋巴结转移 | 口腔 | + + +                |

|       |    |    |       |     |                 |
|-------|----|----|-------|-----|-----------------|
| 6228  | 92 | I  | 淋巴结转移 | 扁桃体 | + + +           |
| 6228  | 92 | II | 淋巴结转移 | 扁桃体 | + + +           |
| 6618  | 92 |    | 淋巴结转移 | 扁桃体 | + + +           |
| 11840 | 92 |    | 淋巴结转移 | 扁桃体 | + +             |
| 14172 | 91 | 4  | 淋巴结转移 | 食道  | + + +           |
| 14172 | 91 | 5  | 淋巴结转移 | 食道  | + + +           |
| 4131  | 94 | 1  | 淋巴结转移 | 食道  | + / + +         |
| 8438  | 94 |    | 淋巴结转移 | 食道  | 局部的 + + / + + + |

80 - 100 % 的肿瘤细胞与 BIWA - 1 呈阳性的反应。在较少肿瘤细胞与该抗体反应的情况下，给出所得的百分比。

实施例 2：CD44v6 在肾细胞癌、前列腺癌和结肠癌的肝转移灶中的表达组织

- 5 分析 19 例肾细胞癌(12 例透明细胞、5 例易染细胞、1 例难染细胞、1 例肾良性瘤)，16 例前列腺原发性腺癌和 19 例前列腺癌的淋巴结转移，以及 30 例结肠癌的肝转移。

抗体

BIWA - 1(参见实施例 1)

## 10 免疫组织化学

其方法参见实施例 1。

- 与鳞状细胞癌对比，在大部分受试的肾细胞癌和前列腺癌中，未检测到 CD44v6 - 同种型的表达，或仅有局部的表达。在表达程度高于局部表达的前列腺癌中，与正常前列腺上皮的染色相比较，染色主要是弥射性胞质染色并且较弱或不均一。在 50 % 受试的结肠癌肝转移病例中，检测到表达程度高于局部表达的 CD44v6 同种型。在大部分的情况下，染色是模糊到中等的，但在样品中通常少于 100 % 的肿瘤细胞呈显有 BIWA - 1 的任何染色。其结果概述于表 2 中。

表 2：在前列腺腺癌、肾细胞癌和结直肠癌的肝转移中 CD44v6 的表达

| 肿瘤类型  |       | n  | BIWA - 1 的反应性 |      |    |
|-------|-------|----|---------------|------|----|
|       |       |    | 阴性            | 局部阳性 | 阳性 |
| 前列腺腺癌 | 原发性   | 16 | 8             | 3    | 5  |
| 前列腺腺癌 | 淋巴结转移 | 19 | 15            | 2    | 2  |
| 肾细胞癌  | 原发性   | 19 | 17            | 0    | 2  |
| 结直肠癌  | 肝转移   | 30 | 7             | 8    | 15 |

实施例 3： CD44v6 - 特异性抗体的特征  
细胞系

从美国典型培养物收集中心 (American Type Culture Collec -  
5 tion)(Rockwell MD)获得人类 SCC 细胞系 A - 431(外阴自发性表皮样癌), 并  
根据制造商的指南进行培养。通过 FACS 分析, 使用 FITC - 偶联的 mAb BIWA  
- 1, 来测定含有同种型的 CD44v6 的表面表达。

动力学常数的分析

通过表面胞质基因组共振 (Surface Plasmon Resonance)(SPR), 使用  
10 BIAcore 2000 系统(Pharmacia Biocensor), 测定出单克隆抗体 CD44v6 - 相互  
作用的亲和力和动力学。将含有由外显子 v3 - v10 编码的区域的谷胱甘肽 -  
S - 转移酶 - CD 44 - 融合蛋白(GST/CD44v3 - v10)固定在 CM5 传感器芯  
片(Sensor Chip)上, 根据制造商的指南进行氨基偶联法。以 5 微升/分钟的流  
速, 将在 HBS(10mM HEPES pH 7.4, 150mM 氯化钠, 3.4mM EDTA, 0.05 %  
15 BIA 核心表面活性剂 P20)中之各种浓度的抗体(8 - 132nM)注射到抗原 - 特  
异性的表面上。以 SPR 信号的变化来记录相互作用。在缓冲液流(HBS)中对  
抗体的解离观察 5 分钟。利用 15 微升 30mM HCl 的单脉冲, 再生该芯片的表  
面。利用 Pharmacia Biocensors BIA 评估软件, 第 2.1 版, 进行数据分析和动  
力学常数的计算。

20 以这种方式比较 BIWA - 1 和其他 CD44v6 - 特异性 mAb(VFF4 、  
VFF7、 BBA - 13(IgG1, R & D Systems, Abingdon, UK))的抗原亲和力。在  
两个分开的实验中, 测定各种抗体的动力学和亲和力常数。表 3 列出 4 种 mAb  
的结合速率( $K_a$ )、离解速率( $K_d$ )和离解常数( $K_d$ )的值。所有的 mAb 都显示有  
类似的  $K_a$  和  $K_d$ , BBA - 13 例外, 它具有低 3 倍的  $K_a$ , 还有 VFF7, 与其  
25 他 mAb 相比较, 它具有明显较高的离解速率(5 倍)。这导致 VFF7 和 BBA -

13的结合亲和力低于 VFF 4 和 BIWA - 1。BIWA - 1 在全部所研究抗体中 Kd 最低。

表 3：各种 CD44v6 - 特异性 mAb 的动力学和亲和力常数

| 抗体       | $K_a(M^{-1}S^{-1})$ | $K_d(S^{-1})$        | $K_d(M)$              |
|----------|---------------------|----------------------|-----------------------|
| VFF4     | $1.1 \times 10^5$   | $2.6 \times 10^{-5}$ | $2.4 \times 10^{-10}$ |
| VFF7     | $1.1 \times 10^5$   | $1.2 \times 10^{-4}$ | $1.1 \times 10^{-9}$  |
| BIWA-1   | $1.3 \times 10^5$   | $2.2 \times 10^{-5}$ | $1.7 \times 10^{-10}$ |
| BBA - 13 | $3.7 \times 10^4$   | $2.3 \times 10^{-5}$ | $6.2 \times 10^{-10}$ |

使用 ELISA 分析抗体 - 蛋白质的相互作用。

- 5        在 37 °C 下，以每孔  $5 \times 10^4$  的量，在 96 - 孔培养板(Falcon Microtest III, Bectob Dickinson, Lincoln Park, NJ)中，以带有 10 % 胎牛血清的 RPMI 1640 来培养表达 CD44v6 的 A - 431 细胞。用 PBS/0.05 % 吐温 20 冲洗后，以冰冷的乙醇固定细胞 1 分钟，接着是冲洗的步骤。在室温下与第一抗体(VFF4、VFF7、BIWA - 1、BBA - 13，1 毫微克/毫升到 600 毫微克/毫升，均溶于试验缓冲溶液：PBS/0.5 % BSA/0.05 % 吐温 20)一起培养 1 小时，接着冲洗 3 次。所使用的第二抗体为兔 - 抗小鼠 - IgG - 辣根过氧化物酶偶联的抗体(DAKO Corporation, Copenhagen, Denmark；以试验缓冲溶液稀释 1:6000)(在室温下 1 小时)。在 3 次冲洗步骤后，使用 TMB 溶液(Kirkegaard and Perry, Gaithersburg, USA)显色。使用 Hewlett - Packard ELISA 阅读器来测定其消光。
- 10
- 15

图 3 表示由 BIAcore 分析所测定的抗体的相对亲和力反应在与肿瘤细胞的相互作用中，其中 BIWA - 1 清楚地显示最高的结合亲和力。

- 由 CD 44 - 外显子 v6 编码的蛋白质结构域，包括 45 个氨基酸(图 4)。为了更正确地定义由 BIWA - 1 识别的表位，在 ELISA 分析中使用一系列合成肽。预备实验显示它们结合位于中央的 14 体(氨基酸群 18 - 31；图 4，也可参见图 1)，但是不结合该区以外的肽。因此合成第二系列肽，并在竞争性 ELISA 中测试(图 4)。结果表明肽 19 - 29(WFGNRWHEGYR)代表高亲和力结合所需的最小结构。删除 C - 末端的精氨酸基团导致结合作用减弱 100 倍以上。
- 20

- 25    实施例 4：在有异种移植物的裸鼠中放射性碘化的 CD44v6 - 抗体的生物分布

#### A - 431 - 异种移植模型

将  $5 \times 10^6$  个经过培养的 A - 431 细胞(人类女阴的表皮样癌), 皮下注射到 8 周龄的雌性 BALB/c nu/nu 裸鼠(B & K Universal, Renton, WA)左侧中线处。在两周内使用带有 A - 431 肿瘤的异种移植动物, 进行生物分布的实验(肿瘤重量: 40 - 50 毫克)。

#### 放射性碘化的 BIWA - 1

使用异双功能的交联剂琥珀酰亚氨基 4 - (N - 顺丁烯二酰亚氨基 - 甲基)环己烷 - 1 - 羧酸酯将蛋白 G - 纯化的 mAb BIWA - 1(鼠 IgG1)偶联到抗生蛋白链菌素。将抗生蛋白链菌素 - 赖氨酰基与二硫苏糖醇预先处理抗体而产生的还原型抗体半胱氨酰基连结。得到 1:1 的偶联物(> 90 %), 并通过离子交换层析法进一步纯化。在生物分布实验中, 用对 - 碘苯基标记试剂(PIP; NEN Dupont, Wilmington, DE)经由带有  $^{125}\text{I}$  的赖氨酸的伯胺来标记 BIWA - 1/SA, 接着进行 Willbur 等人(1989)的方法。以 SA 或  $^{125}\text{I}$  标记 BIWA - 1 并不会影响该抗体在小鼠中的免疫反应性或药物动力学。

#### 15 生物分布实验

经由背侧尾部静脉, 对用人类 A - 431 肿瘤异种移植的裸鼠静脉内注射有 5 - 7 微居里  $^{125}\text{I}$  标记的 50 微克 mAb BIWA - 1(比放射性 0.1 - 0.14 毫居里/毫克)。在  $n = 3$  的动物组中, 在注射后 4、24、48、120 和 168 小时的时间点进行时间 - 生物分布的研究。在所选定的时间, 称重小鼠, 从眼眶后采血, 并通过颈椎脱臼法将其杀死。收集九种器官和组织并将其称重: 血液、尾巴、肺、肝、脾、胃、肾、小肠和肿瘤。在  $\gamma$  - 闪烁计数器(Packard Instrument Company, Meriden, CT)上对该组织的放射性计数, 与注射抗体制品的标准品比较, 将  $^{125}\text{I}$  的能量窗设定在 25 - 80keV。计算出每克组织的注射剂量的百分比(% ID/克)。

25 预实验已表明 BIWA - 1 不会与鼠 CD44v6 - 抗原交叉 - 反应。表 4 和图 5 表示放射性在肿瘤和正常组织中的吸收作用。碘化的 BIWA - 1 显示迅速的肿瘤吸收(在注射后 4 小时为 7.6 % 注射剂量/克), 它在 48 小时后增加到 18 % ID/克以上, 然后在直到 120 小时保持不变的。在注射后 7 天(168 小时), 肿瘤仍然含有 15.3 % ID/每克组织。就各个时间段计算出肿瘤: 组织之比, 并将其示于表 4 中。在注射后 24 小时, 肿瘤: 血液之比为 0.48, 并在第 7 天增加到 3.16。在正常组织中摄入很少, 且最有可能由组织活检中的血

库背景所引起。利用 <sup>125</sup>I - 标记的 BIWA - 1 选择性体内靶向裸鼠中的人类 SCC - 异种移植物，结果表明在 SCC 患者的诊断和治疗中，该单克隆抗体具有很高的作为靶载体的潜力。

表 4： <sup>125</sup>I - BIWA - 1 在带有 A - 431 - 肿瘤的裸鼠身上，在注射后各种时间的肿瘤： 组织之比

| 肿瘤与下列组织之比 | 4 小时              | 24 小时 | 48 小时 | 120 小时 | 168 小时 |
|-----------|-------------------|-------|-------|--------|--------|
| 血液        | 0.22 <sup>a</sup> | 0.48  | 1.31  | 2.60   | 3.16   |
| 尾巴        | 1.18              | 2.62  | 7.70  | 12.28  | 13.06  |
| 肺         | 0.40              | 1.03  | 2.65  | 7.04   | 4.82   |
| 肝         | 0.94              | 1.18  | 2.28  | 3.57   | 3.24   |
| 脾         | 1.40              | 1.84  | 4.00  | 4.86   | 4.42   |
| 胃         | 3.89              | 7.37  | 19.40 | 25.56  | 33.96  |
| 肾         | 0.82              | 1.31  | 2.72  | 2.79   | 2.53   |
| 小肠        | 3.54              | 6.24  | 11.94 | 19.24  | 27.78  |

a 平均值(n = 3); SD < 7 %

实施例 5： CD44v6 在大量人类肿瘤中的差异表达

在较广泛的研究中，利用单克隆抗体 BIWA - 1(克隆 VFF - 18)经免疫组织化学方法检测总共 544 个肿瘤样品的 CD44v6 的表达。样品经手术取出后，立即包埋在石蜡中或冷冻在液氮中，并储存在 - 70 °C 直到需要为止。分析下列的肿瘤： 基细胞癌(n = 16)，乳房的腺癌(AC)(n = 55)，结肠的 AC(n = 83)，头和颈的鳞状细胞癌(SCC)(n = 125)，肺癌(n = 120)，前列腺 AC(n = 34)，肾细胞癌(n = 27)，皮肤的 SCC(n = 15)和胃的 AC(n = 69)。通过常规手术或活检获得组织，获得肿瘤样品的同时获得正常组织。按照实例 1 来进行免疫组织化学研究。

表 5 表示用 mAb BIWA - 1 对 397 个不同类型的肿瘤进行免疫组织化学分析的概要。

表 5: CD44v6 在人类肿瘤中的表达

| 类型                      |        | 总数  | 阳性案例* |     |
|-------------------------|--------|-----|-------|-----|
|                         |        |     | n     | %   |
| 基细胞癌                    | 原发性肿瘤  | 16  | 10    | 62  |
| 乳房 AC                   | 原发性肿瘤  | 17  | 15    | 88  |
|                         | 淋巴结转移瘤 | 34  | 31    | 91  |
|                         | 肝转移瘤   | 4   | 4     | 100 |
| 结肠 AC                   | 淋巴结转移瘤 | 51  | 21    | 41  |
|                         | 肝转移瘤   | 26  | 13    | 50  |
|                         | 脑转移瘤   | 6   | 6     | 100 |
| 喉部 SCC                  | 淋巴结转移瘤 | 18  | 18    | 100 |
| 肺 AC                    | 原发性肿瘤  | 35  | 15    | 43  |
| 肺 SCC                   | 原发性肿瘤  | 9   | 9     | 100 |
| 食道 SCC                  | 原发性肿瘤  | 20  | 20    | 100 |
| 前列腺 AC                  | 原发性肿瘤  | 16  | 5     | 31  |
|                         | 淋巴结转移瘤 | 18  | 0     | 0   |
| RCC                     | 原发性肿瘤  | 27  | 5     | 18  |
| SCLC                    | 原发性肿瘤  | 31  | 7     | 23  |
| 胃 AC                    | 原发性肿瘤  | 22  | 15    | 68  |
|                         | 淋巴结转移瘤 | 43  | 16    | 37  |
|                         | 肝转移瘤   | 4   | 4     | 100 |
|                         | 总数     | 397 |       |     |
| *: > 10 % 的肿瘤细胞阳性       |        |     |       |     |
| AC: 腺癌; RCC: 肾细胞癌       |        |     |       |     |
| SCLC: 小细胞肺癌; SCC: 鳞状细胞癌 |        |     |       |     |

在小细胞肺癌、肾细胞癌和前列腺 AC 中, 未观察到反应性或仅有很少的反应性。所有受检的其他类型肿瘤, 都不同程度表达含有 CD44v6 的同种型。在大部分受检的乳房 AC 中, 显示可与 BIWA1 反应, 而受检的 SSC(喉部、肺和食道)的全部病例都表达 CD44v6。

研究另外 185 例各种类型和类别的 SCC 病例与 BIWA 1 的反应性。这些

包括 67 例原发性 SCC(喉部,  $n = 15$ ; 口腔,  $n = 16$ ; 口咽,  $n = 3$ ; 皮肤,  $n = 15$ ), 77 例淋巴结转移(喉部,  $n = 12$ ; 肺,  $n = 27$ ; 食道,  $n = 11$ ; 口腔,  $n = 6$ ; 口咽,  $n = 7$ ; 下咽部,  $n = 10$ ; 扁桃体,  $n = 4$ ), 以及 3 例肝转移(食道)。表 6 综述了所有受检的 SSC 样品的免疫组织化学分析。

5 表 6: CD44v6 在鳞状细胞癌中的表达

| 类型                                                       |     | 总数  | 阴性 |    | 局部阳性 |   | 阳性 |     |
|----------------------------------------------------------|-----|-----|----|----|------|---|----|-----|
|                                                          |     |     | n  | %  | n    | % | n  | %   |
| 下咽部                                                      | LNM | 10  | 0  | 0  | 0    | 0 | 10 | 100 |
| 口咽                                                       | PT  | 3   | 0  | 0  | 0    | 0 | 3  | 100 |
|                                                          | LNM | 7   | 0  | 0  | 0    | 0 | 7  | 100 |
| 喉部                                                       | PT  | 15  | 0  | 0  | 0    | 0 | 15 | 100 |
|                                                          | LNM | 30  | 1  | 3  | 0    | 0 | 29 | 97  |
| 肺                                                        | PT  | 18  | 2  | 11 | 0    | 0 | 16 | 89  |
|                                                          | LNM | 27  | 0  | 0  | 1    | 4 | 26 | 96  |
| 食道                                                       | PT  | 20  | 0  | 0  | 1    | 5 | 19 | 95  |
|                                                          | LNM | 11  | 0  | 0  | 0    | 0 | 11 | 100 |
|                                                          | LM  | 3   | 0  | 0  | 0    | 0 | 3  | 100 |
| 口腔                                                       | PT  | 16  | 0  | 0  | 0    | 0 | 16 | 100 |
|                                                          | LM  | 6   | 0  | 0  | 0    | 0 | 6  | 100 |
| 皮肤                                                       | PT  | 15  | 0  | 0  | 0    | 0 | 15 | 100 |
| 扁桃腺                                                      | LNM | 4   | 0  | 0  | 0    | 0 | 4  | 100 |
| 总数                                                       |     | 185 |    |    |      |   |    |     |
| 局部阳性: < 10 % 的肿瘤细胞阳性; LNM: 淋巴细胞转移;<br>PT: 原发性肿瘤; LM: 肝转移 |     |     |    |    |      |   |    |     |

发现含有 CD44v6 的同种型除了 3 个肿瘤样品(1 例喉部, 2 例肺)外在全部样品中表达。大部分的样品显示, 抗原在单一切片的 80 到 100 % 的肿瘤细胞中表达, 且染色主要集中在肿瘤细胞的膜上。在喉部、食道和咽下部的癌中, 发现最均匀的染色模式, 切片中大部分的肿瘤细胞具有相同强度的染色。

## 参考文献

- Alteoschmidt U, Kahl R, Moritz D, Schnierle BS, Gerstmayer B, Wels W, Groner B, 通过基因工程定向幼稚 T - 淋巴细胞而细胞溶解表达 neu/erb B - 2, erbB - 3 和 erbB - 4 受体的肿瘤细胞, 临床癌症研究(Clinical Cancer Res.)2:1001 - 1008(1996).
- Barbas CF, Bjorling E, Chiodi F, Dunlop N, Cababa D, Jones TM, Zebedee SL. Persson MAA, Nara PL, Norrby E, Burton DR, 重组人 Fab 片段中和体内的人 - I 型免疫缺失病毒, 自然科学研究院进展, Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 89:9339 - 9343(1992).
- 10 Baum RP, Noujaim AA, Nanci A, Moebus V, Hertel A, Nieson A, Donnerstag B, Sykes T, Boniface G, Hor G. 用 MA b OC125 和 B43.13 重复刺激 HAMA 下的卵巢癌患者的临床进程, 杂交瘤(Hybridoma)12(5):583 - 589(1993).
- Becker JC, Varki N, Gillies SD, Furukawa K, Reisfeld RA, 通过诱导细胞免疫应答, 使抗体白细胞介素 2 融合蛋白克服肿瘤不均一性, 自然科学研究院进展
- 15 展 USA93:7826 - 7831(1996).
- Breitz HB, Weiden PL, Vanderheyden J - L, Appelbaum JW, Bjorn MJ, Fer MF, Wolf SB, Ratcliff BA, Sciler CA, Foisie DC, Fisher DR, Schroff RW, Fritzberg AR, Abrams PG. 用铈 - 186 - 标记的单克隆抗体对放射免疫治疗的临床经验: I 期试验结果, 核医学(J.Nucl.Med)33::1099 - 1112(1992).
- 20 Breitz HB, Durham JS, Fisher DR, Weiden PL, DeNardo GL, Goodgold HM, Nelp WB. 腹膜内注射铈 186 标记的单克隆抗体的药效应和正常器官的放射性计量测定, 核医学 36:754(1995).
- Brooks, L., Niedobitek, G., Agathangelou, A., Farrell, P.J. 在鼻咽癌中变体 CD 44 的表达与 LMP - 1 的表达无关. Am.J.Pathol.146(5):1102 - 12(1995).
- 25 Catty, D(Hrsg), 抗体(Antibodies)卷. I 和 II. IRL Press Oxford(1989).
- Catty, D., Raykundalia, C. ELISSA 和有关免疫测定. 在 Catty, D(Ed.) 抗体(Antibodies) 卷 II. IRL Press Oxford(1989), 97 - 152, 见 105 - 109 页.
- Catty, D., Murphy, G. 用放射性标记的免疫测定, 在: Catty, D(Ed.). 抗体, 卷 II. IRL Press Oxford(1989), 77 - 96.
- 30 Chatal J - F, Saccavini J - C, Gestin J - F, Thedrez P, Curtet C, Kremer M, Guerreau D, Nolibe D, Fumoleau P, Guillard Y. 腹膜注入患有卵巢癌病人的铈

- 111 - 标记的 OC.125 单克隆抗体的分布, 癌症研究(Cancer Res.)49:3087 - 3094(1989).
- Chaudhary VK, Batra JK, Galdo MG, Willingham MC, Fitzgerald DJ, Pastan I. 一种在作为单链免疫毒素的大肠埃希杆菌中克隆功能性不同区抗体基因的快速方法, 自然科学研究院进展 U.S.A.87:1066(1990).
- Colcher D, Esteban J, Carrasquillo JA, Sugarbaker P, Reynolds JC, Bryant G, Larson SM, Sehlom J.单克隆抗体(B72.3)在癌症病人中的腔间互补和静脉给药, 癌症研究, 47:4218 - 4224(1987).
- Colorna MJ, Hastings A, Wims LA, Morrison SL.使用聚合酶反应产生的不同区对抗体分子表达的新颖载体, 免疫方法, (J.Immunol. Methods)152:89 - 104(1992).
- Featherstone C.双特异性抗体: 新的奇异药包, Lancet 348:536(1996).
- Friedmann PN, McAndrew SJ, Gawlak SL.Chace D, Trail PA, Brown JP, Siegall CB. BR96 sFv - PE40, 一种选择性消灭癌细胞的有力单链免疫毒素, 肿瘤研究 53:334 - 339(1993).
- Gerretsen M, Visser GWM, Brakenhoff RH, van Walsum M, Snow GB, van Dongen GAMS.用  $^{186}\text{Re}$  标记的单克隆抗体 E48 完全分离小鳞状细胞癌异种移植, 细胞生物物理(Cell Biophysics)24:125:135 - 141(1994).
- Goodwin DA.使用抗 - 半抗原嵌合抗体对人肿瘤寻找特异性抗体靶问题的新方法, 核药物生物(J.Nucl.Med.Biol.)16:645(1989).
- Goodwin DA.肿瘤予寻靶: 近似底线, 核医学(J.Nucl.Med.)36(5):876 - 879(1995).
- Gumthert U., Hofmann, M., Rudy, W., Rober, S., Zsller, M., Haussmann, I., Matzku, S., Wenzel, A., Ponta, H., and Herrlich.P.一种糖蛋白 CD 44 的新变体使鼠癌细胞具有转移能力, 细胞(Cell) 65:13 - 24(1991).
- Guesdon., J.L., Ternynck, T., Avramcas, S. J. 组织化学细胞化学(Histochem. Cytochem.)27:1131(1979).
- Gussow D, Seemann G.单克隆抗体的人源化, 酶学方法。(Methods Entymol.)203:99 - 122(1991):
- Heider, K. - H., Hofmann, M., Horst, E., van den Berg, F., Ponta, H., Herrlich, P., and Pals, S.T. CD 44 的鼠转移有关变体的人类同系物在结肠癌和腺瘤息肉中

- 的表达, 细胞生物学(J.Cell Biol.)120:227 - 233(1993).
- Heider, K. - H., Mulder, J. - W.R, Ostermanu, E., Susani, S., Patzelt, E., Pals, S.T., Adolf, G. R.与转移肿瘤细胞有关的细胞表面糖蛋白 CD 44 的剪接变体在人和猴的正常组织中的表达, 欧洲癌症(Eur.J.Cancer)31A:2385 - 2391(1995).
- Heider KH, Ratschek M, Zatloukal K, Adolf GR. CD 44 同种型在人类肾细胞癌中的表达, 魏尔啸结构(Virchows Arch.)428:267 - 273(1996a).
- Heider KH, Sproll M., Susani S, Patzelt E, Beaumier P, Ostermann E, Ahorn H, Adolf GR.表征对 CD44v6 特异性的高亲合性单克隆抗体作为免疫治疗鳞状细胞癌的候选者, 癌症免疫学免疫治疗(Cancer Immunol. Immunothre.)出版中 1996.
- Hemming AW, Davis NL, Finley RJ.光动力学治疗鳞状细胞癌: 评价抗 - EGFR 单克隆抗体 - prophyrin 共轭体, 外科肿瘤学协会: 46 届癌症研讨会年报, 3 月(Society of Surgical Oncology, 46th Annual Cancer Symposium. March)18 - 21, 1993, Los Angeles.CA, p.67
- Hofmann, M., Rudy, W., Zoller, M., Tolg, C., Ponta, H., Herrlich P., and Gunthert, U. CD 44 剪接变体使鼠具有转移性质: 同源序列在人类肿瘤细胞系中的表达, 癌症研究(Cancer Res.)51:5292 - 5297(1991).
- Johnson, G.D.免疫荧光,在: Catty, D(Hrsg)抗体(Antibodies)卷 II.IRL Press Oxford (1989).179 - 200, 见 180 - 189 页。
- Johnson S, Bird RE.单克隆抗体的单链衍生物的构建及其在大肠埃希杆菌中的产物, 酶分子方法(Methods Enzymol.)203:88 - 98(1991).
- Jureic JG, Scheinberg DA.在放射免疫治疗肿瘤中的最新进展, 在免疫学中的最近见解, (Current Opinion in Immunology)6:715 - 721(1994).
- Juweid M, Sharkey RM, Markowitz A, Behr T, Suayne LC, Dunn R, Hansen HJ, Shevitz J, Leung S - O, Rubin AD, Herskovic T, Hanley D, Goldenberg DM.用放射性标记的鼠、嵌合的或人源化 LL2, 一种抗 CD22 单克隆抗体治疗非何杰金淋巴瘤, 癌症研究(补充)(Cancer Res.(Suppl.))55:5899 - 5907(1995).
- Keamey, J.F., Radbruch A., Liesegang B., Rajewski K.一种新的鼠骨髓瘤细胞系, 它已失去免疫球蛋白表达但可构建分泌抗体的杂交细胞系, 免疫学(J.Immunol.)123:1548(1979).

- Keenan AM, Weinstein JN, Carraquillo JA, Bunn PA, Reynolds JC, Foon KA 等人, 对患有皮肤 T - 细胞淋巴瘤的病人的免疫淋巴闪烁法以及依赖于  $^{111}\text{In}$  - 标记的 T101 单克隆抗体的计量, 癌症研究(Cancer Res.)47:6093 - 6099(1987).
- 5 Khazaeli MB, Conry RM, LoBuglio AF.对单克隆抗体的人类免疫应答, 免疫治疗, (J.Immunother.)15:42 - 52(1994).
- Kohler, G., Milstein, C.连续培养融合细胞分泌的予限定特异性的抗体, 自然(Nature)265:495(1975).
- Koopman, G., Heider, K - H., Horts, E., Adolf, G.R., van den Berg, F., Ponta, H.,
- 10 Herrlich, P., Pals, S.T.活化的人类淋巴细胞和攻击性非何杰金淋巴瘤表达一种 CD 44 的有关鼠转移的变体的同系物, 实验药物(J.Exp.Med.)177:897 - 904(1993).
- Kreitman RJ Haosen HJ, Jones AL, Fitz Gerald DJP, Goldenberg DM, Pastan I. 含抗体 LL2 或 LL2 - Fab'的假单孢菌外毒素基的免疫毒素诱导鼠中的皮下人
- 15 B - 细胞淋巴瘤的退化, 癌症研究(Cancer Res.)53:819 - 825(1993).
- Larson SM, Cheung N - K V, Leibel SA.放射性同位素共轭体, 在: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA(Ed.).癌症的生物治疗 J.B.Lippincott Comp., Phila - delphia, 496 - 511(1991).
- Lenhard RE, Order SE, Spunberg JJ, Asbell SO, Leibel SA.同位素免疫球蛋白, 一种对晚期何杰金病的新颖全身治疗, 临床肿瘤(J.Clin Oncol.)3:1296 - 1300(1985).
- 20 Maraveyas A, Myers M, Stafford N, Rowlinson - Busza G, Stewart JSW, Epenetos AA.用于治疗头和颈癌的一种结合外部放射治疗的放射性标记的抗体, 重构用于局部组织放射性剂量计算的喉的理论性模型, 癌症研究 55:1020 - 1027(1995a).
- 25 Maraveyas A., Stafford N, Rowlinson - Busza G, Stewart JSW, Epenetos AA.对原发性头和颈的鳞状细胞癌患者中的特异性和控制性放射性标记的单克隆抗体的药物动力学、生物分布以及剂量测定, 癌症研究, 55:1060 - 1069(1995b).
- 30 Mulshinc JL, Magnani JL, Limnaoila RI: 在实体肿瘤治疗中单克隆抗体的应用, 在: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA(Ed.)癌症的生物治疗, J.B.

- Lippincott Comp., Philadelphia, 563 - 588(1991).
- Myklebust AT, Godal A, Juell S, Pharo A, Fodstad O.用于由人骨髓中消除乳腺癌细胞的二种抗体基方法的比较, 癌症研究 54:209 - 214(1994).
- Nesbit M., Fu ZF, McDonald - Smith J, Steplowski Z, Curtis PJ.由杆状病毒表达系统识别人类结肠直肠癌细胞的功能性单克隆抗体的制备, 免疫方法, (J.Immunol.Methods)151:201 - 208(1992).
- Perkins AC, PimmMV,用于癌症免疫学和免疫治疗中的  $\gamma$  - 闪烁法的任务, 欧洲核医学, (Eur.J.Nucl.Med)19:1054 - 1063(1992).
- Press OW, Eary JF, Badger CC, Martin PJ, Appelbaum FR, Levy R, Miller R, Brown S, Nelp WB, Krohn KA, Fisher D, DeSantes K, Porter B, Kidd P, Thomas ED, Bernstein ID.用放射性标记的 MB - 1(抗 - CD37)抗体治疗顽固性非何杰金淋巴瘤, 临床肿瘤(J.Clin.Oncol)7:1027 - 1038(1989).
- Press OW, Eary JF, Appelbaum FR. Martin PJ, Nelp WB Glenn S, Fisher DJ, Porter B, Metthews DC Gooley T, Bernstein ID.用自身干细胞移植复发 B 细胞淋巴瘤的  $^{131}\text{I}$  - B1(抗 CD20)抗体疗法的二期试验, Lancet 346:336 - 340(1995).
- Quadri SM, Vriesendorp HM, Leichner PK, Williams JR.在裸鼠和狗中铟 - 111 和钇 - 90 标记的衔接物共轭体的评价, 核医学(J.Nucl.Med)34:938 - 945(1993).
- Reisfeld RA, Gillies SD, Mendelsohn J, Varki NM, Becker JC.通过抗体 - 淋巴细胞毒素融合蛋白在痴愚 nu/nu 鼠中抑制人类肺黑素瘤的转移瘤中包括 B - 淋巴细胞, 癌症研究(Cancer res.)56:1707 - 1712(1996).
- Riethmuller G, Schneider - Gadick E, Schimok G, Schmiegel W 等人, 单克隆抗体用于切除 Dukes'C 结肠直肠癌的辅助治疗的随机试验, 柳叶刀(Lancet)343:1177 - 1183(1994).
- Salmi, M., Gron - Virta, K, Sointu, P., Greoman, R., Kalimo, H, Jalkanen S.调节含 CD 44 同种型的外显子 v6 在人中的表达: 在鳞状细胞源的肿瘤恶生转移期间进行下调, 细胞生物学, (J.Cell Biol.)122:431 - 442(1993).
- Sambrook, J., Fritsch E.E., Maniatis I., 分子克隆 Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor(1989).
- Schrapp M., Burnol TF, Apclgren LD, Briggs SL, Koppel GA, Markowitz DD,

- Mueller BM, Reisfold RA.通过 4 - 去乙酰长春花碱 - 3 - 羧基酰肼和单克隆抗体 9.2.27 的化学免疫共轭体长期抑制人类神经胶质瘤异种移植的生长, 癌症研究, (Cancer Res.)52:3838 - 3844(1992).
- Screaton, G.R., Bell, M.V., Jackson, D.G., Comelis, F.B., Gerth, U., and Bell, J.I.
- 5 编码淋巴细胞反巢受体 CD 44 的 DNA 的基因结构展示至少 12 个交替剪接的外显子, 自然科学院进展, (Proc. Natl. Acad. Sci.)U.S.A.89:12160 - 12164(1992).
  - Sears HF, Mattis J, Herlyn D, Hayry P, Atkinson B, Emst C. Steplewski - Z. Koprowski H.在治疗胃肠肿瘤中单克隆抗体的 I - 期临床试验, 柳叶刀
  - 10 (Lancel)1982(1):762 - 765(1982).
  - Seiter, S., Arch, R., Reber, S., Komitowski, D., Hofmann, M., Ponta, H.; Herrlich, P.,Matzku, S., Zoller, M.通过抗 - 变体 CD 44 而防止形成肿瘤转移, 实验医学, (J.Exp. Med.)177:443 - 455(1993).
  - Senter PD, Schreiber GJ, Hirschberg DL, Ashe SA, Hellstrom KE, Hellstrom I.
  - 15 通过单克隆抗体 - 碱性磷酸酶共轭体加强磷酸化丝裂霉素 C 和鬼臼乙叉甙衍生物的体内体外的抗肿瘤活性, 癌症研究 (Cancer Res.)49:5789 - 5792(1989).
  - Shin S - U, Morrison SL.嵌合抗体分子的制备和性质, 酶学方法, (Methods Enzymol.)178:459 - 476(1989).
  - 20 Sicardi AG, Buraggi GL, Callegaro L, Colella AC, Defilippi PG 等人, 通过抗 - 癌胚抗原单克隆抗体的放射标记的 F(ab)<sub>2</sub> 片段的腺癌的免疫闪烁法: 一种多中心研究, 癌症研究(Cancer Res.)49:3095 - 3103(1989).
  - Smith, D.B., Johnson, K.S.用谷胱甘肽 S - 转移酶一步纯化在作为融合的埃希杆菌中表达的多肽, 基因(Gene)67:31(1988).
  - 25 Srivastava SC(Ed).用于成像和治疗的放射性标记的单克隆抗体, 生活科学系列, (Life Sciences Series)A152, Plenum New York(1988).
  - Tolg, C., Hofmann, M., Herrlich, P., and Ponta, H.由 10 个变体外显子剪接选择建立 CD 44 的可变性, 核酸研究, (Nucleic Acids. Res.)21:1225 - 1229(1993).
  - Theuer CP, Kreitman RJ, FitzGerald DJ, Pastan I.使用一种对活性必需蛋白水解的假单胞菌外毒素 A 的重组体形式制成的免疫毒素, 癌症研究, (Cancer Res.)53:340 - 347(1993).
  - 30

- Thomas, G.D., Dykes, P.W., Bradwell, A.R.用于对抗体放射标记的肿瘤免疫检测和方法的抗体, 在: Catty, D.(Ed.)抗体, 卷 II.IRL Press Oxford, 223 - 224(1989).
- Thompson CH, Stacker SA, Salchi N, Lichtenstein M, Leyden MJ, Andrews JT.
- 5 用于检测淋巴结由乳腺癌转移的免疫闪烁法, 柳叶刀, (Lancet)1984(2):1245 - 1247(1984).
- Vitetta ES, Thorpe PE. 免疫毒素在 Devita VT, Hellman S, Rosenberg SA(Ed.) 癌症的生物治疗 J.B.Lippincott Comp., Philadelphia, 482 - 495(1991).
- Vitetta ES, Stone M, Amlot P, Fay, J, May R, Till M, Newman J, Clark P, Collins
- 10 R, Cunningham D, Ghetie V, Uhr JW, Thorpe PE.对 B - 细胞淋巴瘤患者的 I 期免疫毒素试验, 癌症研究, (Cancer Res.)51:4052 - 4058(1991).
- Vriesendorp HM, Herbst JM, Germack MA, Klein JL, Leichner PK, Loudenslager DM, Order SE.对钇 - 标记的抗铁蛋白治疗何杰金症后期的 I - II 期研究, 包括放射治疗肿瘤学组 87 - 01, 临床肿瘤, (J.Clin Oncol.)9:918
- 15 - 928(1991).
- Vriesendorp HM, Morton JD, Quadri SM.对何杰金症的放射标记的免疫球蛋白治疗的五个连续研究的评论, 癌症研究(增补), (Cancer Res.(Suppl.))55:5888s - 5892s(1995).
- Wang S - M, Chern J - W, Yeh M - Y, Ng JC, Tung E, Roffier SR.用于癌症
- 20 治疗的由抗体导向酶共轭体的葡糖醛酸酐原制剂的比活性, 癌症研究(Cancer Res.)52:4484 - 4491(1992).
- Weiner LM, O'Dwyer J, Kitson J, Comis RL, Frankel AE, Bauer RJ, Kopnrad MS, Groves ES.对一种抗乳腺癌单克隆抗体 260F9 - 重组体蓖麻毒蛋白 A 链免疫共轭体的 I 期评价, 癌症研究(Cancer Res.)49:4062 - 4067(1989).
- 25 Wilbur, D.S., Hadley, S.W., Hylarides, M.D., Abrams.P.G., Beaumier, P.A., Morgan, A.C., Reno, J.M., Fritzberg, A.R.一种用于标记放射治疗癌的单克隆抗体的稳定放射性碘化剂的开展, 核医学(J.Nucl.Med.)30:216 - 226(1989).
- Winter, G., Griffith, A.D., Hawkins, R.E, Hoogenboom, H.R.通过噬菌体显示工艺制备抗体, 免疫学的年度评论(Ann.Rev.Immunol.)12, 433 - 455(1994).

## 序列一览表

## (1)一般数据:

## (i)申请人:

- 5 (A)姓名: Boehringer Ingelheim international GmbH  
(B)街: Rheirtstrasse  
(C)市镇: Ingelheim  
(E)国家: Germany  
(F)邮政编码: 55216  
(G)电话: + 49 - (0) - 6132 - 772770
- 10 (H)传真: + 49 - (0) - 6132 - 774377  
(A)姓名: Forschungszentrum Karlsruhe GmbH  
(B)街: Postfach 3640  
(C)市镇: Karlsruhe  
(K)国家: Germany  
(F)邮政编码: 76021
- 15 (A)姓名: Heider, Karl - Heinz  
(B)街: Hervicusgasse 4/3/21  
(C)市镇: Vienna  
(B)国家: Austria  
(E)邮政编码: 1120
- 20 (A)姓名: Adolf, Guenther  
(B)街: Stiftgasse 15 - 17/10  
(C)市镇: Vienna  
(E)国家: Austria  
(F)邮政编码: 1070
- 25 (A)姓名: Ostermann Elinborg  
(B)街: Mauerbachstr.56/6  
(C)市镇: Vienna  
(E)国家: Austria  
(F)邮政编码: 1140
- 30 (A)姓名: Patzelt, Eirk

- (B)街: Hans - Buchmueller - Gasse 8  
(C)市镇: Purkersdorf  
(E)国家: Austria  
(F)邮政编码: 3002
- 5 (A)姓名: Sprall, Narlies  
(B)街: Schwenkgasse 3  
(C)市镇: Vienna  
(E)国家: Austria  
(F)邮政编码: 1120
- 10 (ii)发明名称: 诊断及治疗鳞状细胞癌的方法  
(iii)序列数: 16  
(iv)计算机可读版本:  
(A)数据载体: 软盘  
(B)电脑: IBM PC 兼容
- 15 (C)操作系统: PC - DOS/MS - DOS  
(D)软件: 专利放弃(Patentln Release) # 1.0 第 1.30 版(EPO)  
(2)关于序列 1 的资料:  
(i)序列特征:  
(A)长度: 129 个碱基对  
(B)性质: 核苷酸  
(C)股型: 双股  
(D)拓扑学: 两种
- 20 (ii)分子性质: 基因组 DNA  
(ix)特征:
- 25 (A)名称/关键: 外显子  
(B)位置: 1..129  
(C)其他资料: /产物 = “CD 44”  
/标记 - v6  
/注记 - “基因库登记号 L05411”
- 30 /文献出处 - ([1])  
(ix)特征:

(A)名称/关键: CDS

(B)位置: 3..128

(x)出版信息:

(A)作者: Screateon, GR

5

Bell, MV

Jackson, DG

Cornelis, FB

Gerth, U

Bell, JI.,

10

(B)标题: 编码淋巴细胞反巢受体 CD 44 的 DNA 的基因结构  
显示至少 12 个交替剪接外显子

(C)期刊: Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.

(D)卷: 89

(F)页数: 12160 - 12164

15

(D)日期: 1992 年 12 月

(K)序列 1 的主要基: 自 1 至 129

(x)出版信息:

(H)文件编号: 德国专利 195 45 472.3.,

(I)申请日: 1995 年 12 月 16 日

20

(x)出版信息:

(H)文件编号: 德国专利 196 15 074.4

(I)申请日: 1996 年 4 月 17 日

(xi)序列描述: 序列 1

TC CAG GCA ACT CCT AGT AGT ACA ACG GAA GAA ACA GCT ACC  
25 CAG AAG 47

Gln Ala Thr Pro Ser Ser Thr Thr Glu Glu Thr Ala Thr Gln Lys

1

5

10

15

GAA CAG TGG TTT GGC AAC AGA TGG CAT GAG GGA TAT CGC CAA  
ACACCG 95

30

Glu Gln Trp Phe Gly Asn Arg Trp His Glu Gly Try Arg Gln Thr Pro

20

25

30

AGAGAA GAC TCC CAT TCG ACA ACA GGG ACA GCT G 129

Arg Glu Asp Ser His Ser Thr Thr Gly Thr Ala

35 40

(2)关于序列 2 的数据:

5 (i)序列特征:

(A)长度: 42 个氨基酸

(B)性质: 氨基酸

(D)拓扑学: 直线

(ii)分子性质: 蛋白质

10 (xi)序列描述: 序列 2:

Gln Ala Thr Pro Ser Ser Thr Thr Glu Glu Thr Ala Thr Gln Lys Glu

1 5 10 15

Gln Trp Phe Gly Asn Arg Trp His Glu Gly Tyr Arg Gln Thr Pro Arg

20 25 30

15 Glu Asp Ser His Ser Thr Thr Gly Thr Ala

35 40

(2)关于序列 3 的数据:

(i)序列特征:

(A)长度: 14 个氨基酸

20 (B)性质: 氨基酸

(C)股型: 单股

(D)拓扑学: 直线

(ii)分子性质: 肽

(x)出版信息:

25 (H)文件编号: 德国专利 195 45 472.3

(I)申请日: 1995 年 12 月 6 日

(x)出版信息:

(H)文件编号: 德国专利 196 15 074.4

(I)申请日: 1996 年 4 月 17 日

30 (xi)序列描述: 序列 3

Gln Trp Phe Gly Asn Arg Trp HIS Glu Gly Tyr Arg Gln Thr

1

5

10

(2)关于序列 4 的数据:

(i)序列特征:

5

(A)长度: 27 个碱基对

(B)性质: 核苷酸

(C)股型: 单股

(D)拓扑学: 直线

(ii)分子性质: 其他核酸

10

(A)说明: /desc = “PCR 引物”

(x)出版信息:

(H)文件编号: 德国专利 195 45 472.3

(I)申请日: 1995 年 12 月 6 日

(x)出版信息:

15

(H)文件编号: 德国专利 196 15 074.4

(I)申请日: 1996 年 4 月 17 日

(xi)序列描述: 序列 4

CAGGCTGGGA GCCAAATGAA GAAAATG

(2)关于序列 5 的数据:

20

(i)序列特征:

(A)长度: 30 个碱基对

(B)性质: 核苷酸

(C)股型: 单股

(D)拓扑学: 直线

25

(ii)分子性质: 其他核酸

(A)说明: /desc = “PCR 引物”

(x)出版信息:

(H)文件编号: 德国专利 195 45 472.3

(I)申请日: 1995 年 12 月 6 日

30

(x)出版信息:

(H)文件编号: 德国专利 196 15 074.4

(I)申请日: 1996 年 4 月 17 日

(xi)序列描述: 序列 5

TGATAAGGAA CGATTGACAT TAGAGTTGGA

(2)关于序列 6 的数据:

5 (i)序列特征:

(A)长度: 11 个氨基酸

(B)性质: 氨基酸

(C)股型: 单股

(D)拓扑学: 直线

10 (ii)分子性质: 核苷酸

(x)出版信息:

(H)文件编号: 德国专利 195 45 472.3

(I)申请日: 1995 年 12 月 6 日

(x)出版信息:

15 (H)文件编号: 德国专利 196 15 074.4

(I)申请日: 1996 年 4 月 17 日

(xi)序列描述: 序列 6

Trp Phe Gly Asn Arg Trp His Glu Gly Tyr Arg

1

5

10

20 (2)关于序列 7 的数据:

(i)序列特征:

(A)长度: 43 个氨基酸

(B)性质: 氨基酸

(C)股型: 单股

25 (D)拓扑学: 直线

(ii)分子性质: 肽

(x)出版信息:

(H)文件编号: 德国专利 195 45 472.3

(I)申请日: 1995 年 12 月 6 日

30 (x)出版信息:

(H)文件编号: 德国专利 196 15 074.4

(I)申请日: 1996 年 4 月 17 日

(xi)序列描述: 序列 7

Gln Ala Thr Pra Ser Ser Thr Thr Glu Glu Thr Ala Thr Gln Lys Glu  
 1 5 10 15  
 5 Gln Trp Phe Gly Asn Arg Trp His Glu Gly Tyr Arg Gln Thr Pro Arg  
 20 25 30  
 Glu Asp Ser His Ser Thr Thr Gly Thr Ala Ala  
 35 40

(2)关于序列 8 的数据:

10 (i)序列特征:

(A)长度: 11 个氨基酸

(B)性质: 氨基酸

(C)股型: 单股

(D)拓扑学: 直线

15 (ii)分子性质: 肽

(x)出版信息:

(H)文件编号: 德国专利 195 45 472.3

(I)申请日: 1995 年 12 月 6 日

(x)出版信息:

20 (H)文件编号: 德国专利 196 15 074.4

(I)申请日: 1996 年 4 月 17 日

(xi)序列描述: 序列 8

Ser Ser Thr Thr Glu Glu Thr Ala Thr Gln Lys  
1 5 10

25 (2)关于序列 9 的数据:

(i)序列特征:

(A)长度: 10 个氨基酸

(B)性质: 氨基酸

(C)股型: 单股

30 (D)拓扑学: 直线

(ii)分子性质: 肽

## (x)出版信息:

(H)文件编号: 德国专利 195 45 472.3

(I)申请日: 1995 年 12 月 6 日

## (x)出版信息:

5 (H)文件编号: 德国专利 196 15 074.4

(I)申请日: 1996 年 4 月 17 日

## (xi)序列描述: 序列 9

Glu Glu Thr Ala Thr Gln Lys Glu Gln Trp

1 5 10

## 10 (2)关于序列 10 的数据:

## (i)序列特征:

(A)长度: 11 个氨基酸

(B)性质: 氨基酸

(C)股型: 单股

15 (D)拓扑学: 直线

## (ii)分子性质: 肽

## (x)出版信息:

(H)文件编号: 德国专利 195 45 472.3

(I)申请日: 1995 年 12 月 6 日

## 20 (x)出版信息:

(H)文件编号: 德国专利 196 15 074.4

(I)申请日: 1996 年 4 月 17 日

## (xi)序列描述: 序列 10

Thr Ala Thr Gln Lys Glu Gln Trp Phe Gly Asn

25 1 5 10

## (2)关于序列 11 的数据:

## (i)序列特征:

(A)长度: 14 个氨基酸

(B)性质: 氨基酸

30 (C)股型: 单股

(D)拓扑学: 直线

(ii)分子性质: 肽

(x)出版信息:

(H)文件编号: 德国专利 195 45 472.3

(I)申请日: 1995 年 12 月 6 日

5 (x)出版信息:

(H)文件编号: 德国专利 196 15 074.4

(I)申请日: 1996 年 4 月 17 日

(xi)序列描述: 序列 11

Gln Trp Phe Gly Asn Arg Trp His Glu Gly Tyr Arg Gln Thr

10      1                      5                      10

(2)关于序列 12 的数据:

(i)序列特征:

(A)长度: 11 个氨基酸

(B)性质: 氨基酸

15 (C)股型: 单股

(D)拓扑学: 直线

(ii)分子性质: 肽

(x)出版信息:

(H)文件编号: 德国专利 195 45 472.3

20 (I)申请日: 1995 年 12 月 6 日

(x)出版信息:

(H)文件编号: 德国专利 196 15 074.4

(I)申请日: 1996 年 4 月 17 日

(xi)序列描述: 序列 12

25 Asn Arg Trp His Glu Gly Tyr Arg Gln Thr Pra

1                      5                      10

(2)关于序列 13 的数据:

(i)序列特征:

(A)长度: 11 个氨基酸

30 (B)性质: 氨基酸

(C)股型: 单股

(D)拓扑学: 直线

(ii)分子性质: 肽

(x)出版信息:

(H)文件编号: 德国专利 195 45 472.3

5 (I)申请日: 1995 年 12 月 6 日

(x)出版信息:

(H)文件编号: 德国专利 196 15 074.4

(I)申请日: 1996 年 4 月 17 日

(xi)序列描述: 序列 13

10 Glu Gly Tyr Arg Gln Thr Pro Arg Glu Asp Ser

1 5 10

(2)关于序列 14 的数据:

(i)序列特征:

(A)长度: 10 个氨基酸

15 (B)性质: 氨基酸

(C)股型: 单股

(D)拓扑学: 直线

(ii)分子性质: 肽

(x)出版信息:

20 (H)文件编号: 德国专利 195 45 472.3

(I)申请日: 1995 年 12 月 6 日

(x)出版信息:

(H)文件编号: 德国专利 196 15 074.4

(I)申请日: 1996 年 4 月 17 日

25 (xi)序列描述: 序列 14

Thr Pro Arg Glu Asp Ser His Ser Thr Gly

1 5 10

(2)关于序列 15 的数据:

(i)序列特征:

30 (A)长度: 42 个氨基酸

(B)性质: 氨基酸

(C)股型: 单股

(D)拓扑学: 直线

(ii)分子性质: 肽

(x)出版信息:

5 (H)文件编号: 德国专利 195 45 472.3

(I)申请日: 1995 年 12 月 6 日

(x)出版信息:

(H)文件编号: 德国专利 196 15 074.4

(I)申请日: 1996 年 4 月 17 日

10 (xi)序列描述: 序列 15

Frp Ala Asp Pro Asn Ser Thr Thr Glu Glu Ala Ala Thr Gln Lys Glu

1 5 10 15

Lys Trp Phe Glu Asn Glu Trp Gln Gly Lys Asn Pro Pro Thr Pro Ser

20 25 30

15 Glu Asp Ser His Val Thr Glu Gly Thr Thr

35 40

(2)关于序列 16 的数据:

(i)序列特征:

(A)长度: 14 个氨基酸

20 (B)性质: 氨基酸

(C)股型: 单股

(D)拓扑学: 直线

(ii)分子性质: 肽

(x)出版信息:

25 (H)文件编号: 德国专利 195 45 472.3

(I)申请日: 1995 年 12 月 6 日

(x)出版信息:

(H)文件编号: 德国专利 196 15 074.4

(I)申请日: 1996 年 4 月 17 日

30 (xi)序列描述: 序列 16

Lys Trp Phe Glu Asn Glu Trp Gln Gly Lys Asn Pro Pro Thr

1 5 10

| 肽   | 序列                                          | 结合      |
|-----|---------------------------------------------|---------|
| 人类  |                                             |         |
| v6  | QATPSSTTEETATQKEQWFGNRWHEGYRQTPREDSHSTTGTA  | BIWA-1  |
| v6A | SSTTEETATQK                                 | -       |
| v6B | EETATQKEQW                                  | -       |
| v6C | TATQKEQWFGN                                 | +/-     |
| v6D | QWFGNRWHEGYRQT                              | +       |
| v6E | NRWHEGYRQTP                                 | -       |
| v6F | EGYRQTPREDS                                 | -       |
| v6G | TPREDSHSTG                                  | -       |
| 大鼠  |                                             |         |
| v6  | WADPNSTTEEAATQKEKWFENEWQGKNPPTPSEDSHVTEGT T | 1.1ASML |
|     | KWFENEWQGKNPPT                              | +       |

图 1

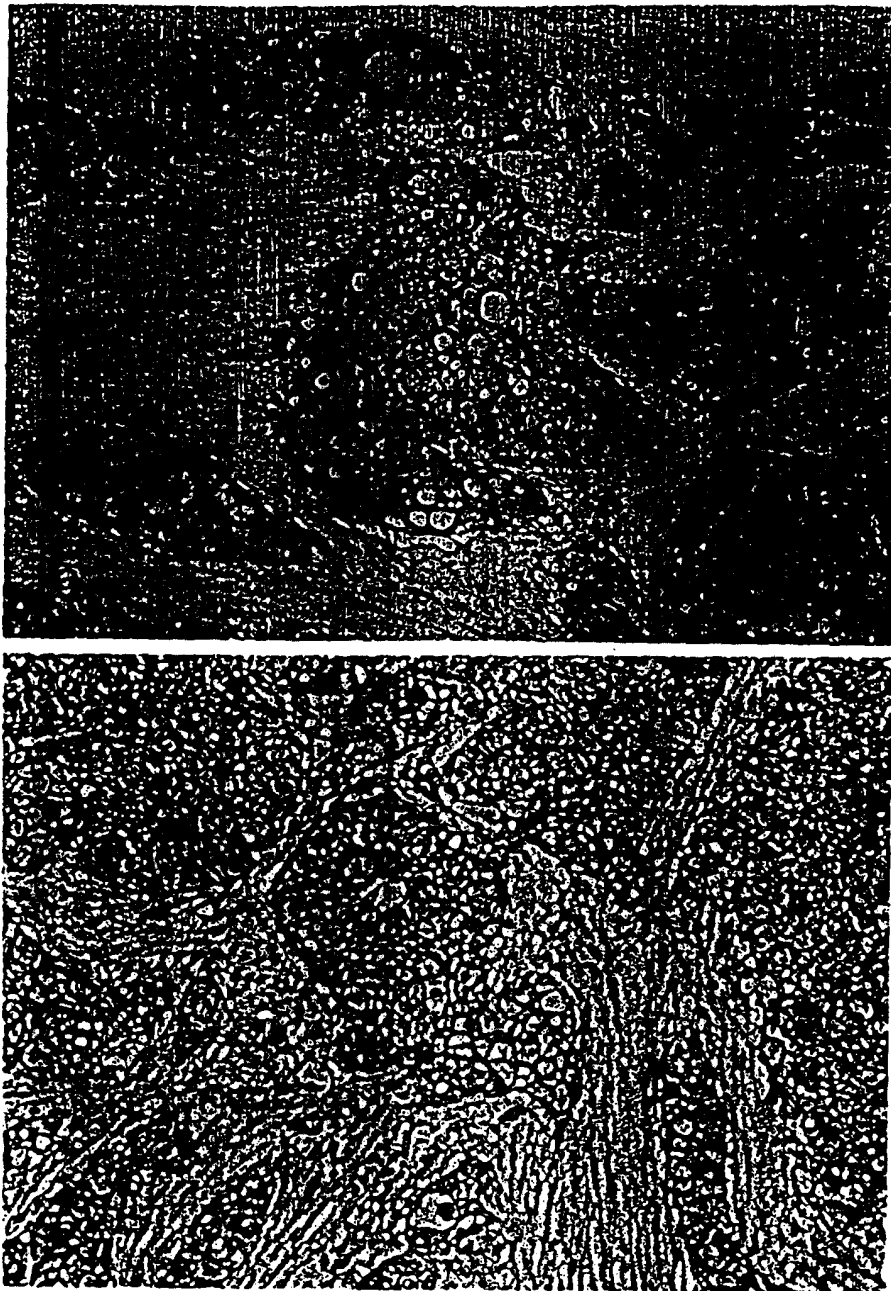


图 2

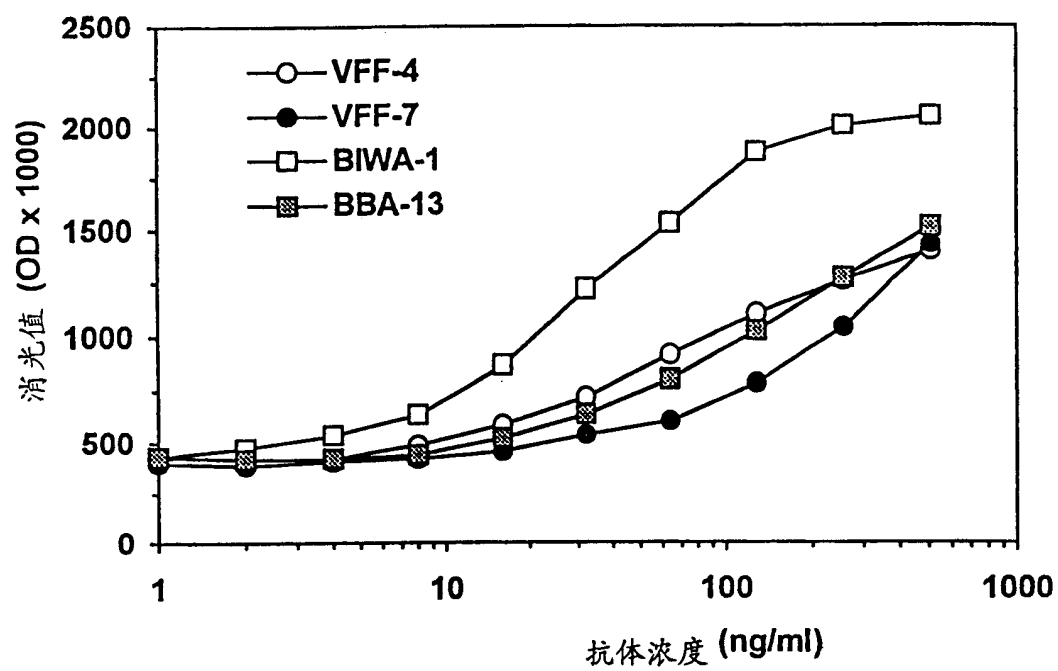


图 3

| 肽          | 序列                                                           |
|------------|--------------------------------------------------------------|
| v6 (18-31) | QWF GNRWH EGYRQ T                                            |
| v6 (18-29) | QWF GNRWH EGYR                                               |
| v6 (19-30) | WF GNRWH EGYRQ                                               |
| v6 (19-29) | <u>WF GNRWH EGYR</u>                                         |
| v6 (19-28) | WF GNRWH EGY                                                 |
| v6 (20-29) | F GNRWH EGYR                                                 |
| v6 (21-29) | GNRWH EGYR                                                   |
| v6 (22-29) | NRWH EGYR                                                    |
| v6 (22-32) | NRWH EGYRQ TP                                                |
| v6         | IQATP SSTTE ETATQ KEQWF <u>GNRWH EGYRQ</u> TPRED SHSTT GTAAA |

图 4

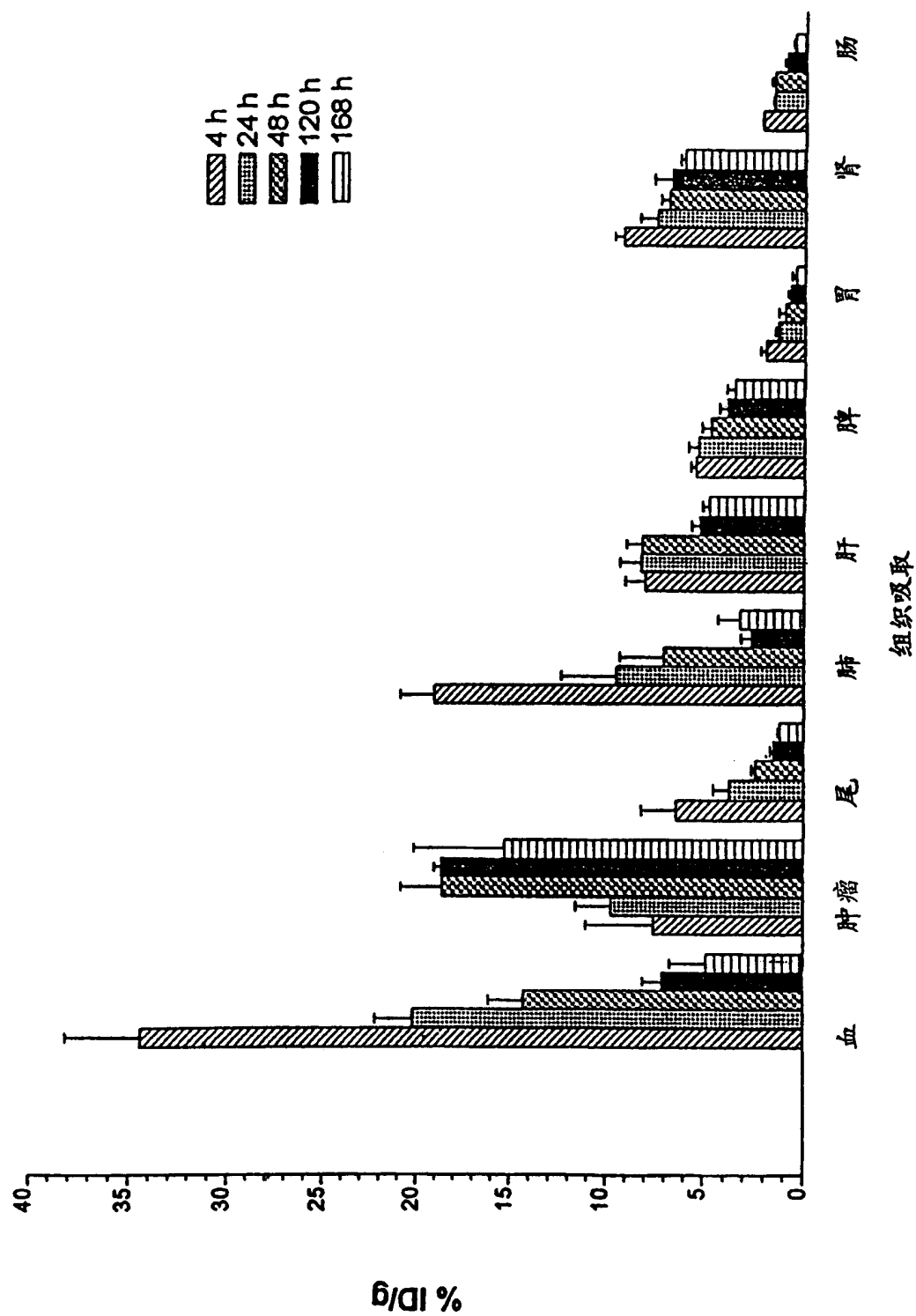


图 5