



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102014955 A

(43) 申请公布日 2011.04.13

(21) 申请号 200880001243.X *A61K 39/00* (2006.01)
(22) 申请日 2008.05.14 *A61K 39/385* (2006.01)
(30) 优先权数据 *A61K 47/48* (2006.01)
60/917,906 2007.05.14 US *A61P 35/00* (2006.01)
61/044,028 2008.04.10 US *G01N 33/566* (2006.01)
(85) PCT申请进入国家阶段日 *G01N 33/574* (2006.01)
2009.06.05 *G01N 33/58* (2006.01)
(86) PCT申请的申请数据
PCT/CA2008/000932 2008.05.14
(87) PCT申请的公布数据
W02008/138139 EN 2008.11.20
(71) 申请人 温哥华生物技术有限公司
地址 加拿大不列颠哥伦比亚省
(72) 发明人 吉祐·葛瑞格·李
(74) 专利代理机构 天津市三利专利商标代理有
限公司 12107
代理人 王景阳
(51) Int. Cl.
A61K 39/395 (2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 27 页 附图 7 页

(54) 发明名称
含醮基广谱癌症标志物

(57) 摘要

一种已知的肿瘤标志物即抗原 CA215 的有效的抗原决定簇,已经证实:在定义的物质中包含一个醮基部分,尽管 CA215 是一种免疫球蛋白重链样分子,却不会与抗人 IgG, IgA 和 IgM 发生免疫反应。这种定义的抗原决定簇可用于制备预防和治疗人体癌症的免疫原组合物,以及可优化动物模型体系的方案及构建。而且提供了用于治疗、诊断的改良方案。

1. 一种主要由含醮基的抗原决定簇组成的物质，与 RP215 单克隆抗体发生免疫反应，但不与人类的抗 IgG 发生明显的免疫反应。

2. 权利要求 1 中所述的物质，其中所述的醮基至少与部分免疫球蛋白的重链样氨基酸序列组成的可变区相连接。

3. 权利要求 2 中所述的物质，其中所述重链样氨基酸序列与 IgG、IgA、IgM 抗体相关。

4. 权利要求 1 或 2 中所述的物质，所述的主要包含载有醮基的 IgG 样氨基酸序列组成的可变区，与 RP215 单克隆抗体发生免疫反应。

5. 权利要求 1 或 2 中所述的物质，所述的主要包含载有醮基的 IgA 样氨基酸序列组成的可变区，与 RP215 单克隆抗体发生免疫反应。

6. 权利要求 1 或 2 中所述的物质，所述的主要包含载有醮基的 IgM 样氨基酸序列组成的可变区，与 RP215 单克隆抗体发生免疫反应。

7. 权利要求 1 中所述的物质，其中所述的抗原决定簇连接于异源物质。

8. 权利要求 1 中所述的物质，表示为免疫原物质。

9. 一种治疗主体中的癌症的方法，其中所述的癌症表达 CA215，所述方法包括给予所述主体包含权利要求 1 中的所述物质的处方或者包含 RP215 单克隆抗体的抗独特型抗体的处方。

10. 权利要求 9 中所述的方法，其中所述的主体是人，并且所述的方法进一步包括使用化学治疗药剂或者使用放射性来治疗所述的主体。

11. 权利要求 9 中所述方法，其中所述的主体为动物肿瘤模型。

12. 一种在样本中检测 CA215 的方法，所述方法包括载有抗人 IgG 的固相载体与所述样本接触，进而所述载体再接触 RP215 单克隆抗体、或者与之发生交叉反应的抗体、或者上述两者之一的免疫特异性片段，其中所述的 RP215 单克隆抗体或交叉反应抗体或上述两者之一的免疫特异性片段被标记或被修饰而含有标记物。

13. 一种在样本中检测 CA215 的方法，所述方法包括应用免疫夹心反应，其中一项为 RP215 单克隆抗体，另一项具有抗人 IgG 的免疫活性。

14. 一种物质包括人源化 RP215 抗体或者其片段。

15. 权利要求 14 中所述的物质，其中所述 RP215 抗体或者其片段与抗肿瘤药物相连接。

16. 权利要求 14 中所述的物质，其中的抗肿瘤药物为抗生长因子或者抗生长因子的受体。

17. 一种对实体肿瘤病人的诊疗方案，其方法包括：

a) 化验一份来自所述病人的体液样品，确定所述样品中是否存在 CA215，当存在 CA215 时，提示所述病人体内存在实体肿瘤，

b) 对所述病人给予人源化形式的抗体，此抗体与 CA215 的抗原决定簇相结合，即可以与连接了检测试剂的 RP215 结合，和 / 或

c) 对所述病人给予人源化形式的抗体，此抗体与 CA215 的抗原决定簇相结合，即可以与连接了细胞毒试剂的 RP215 结合，和 / 或

d) 对所述的病人给予人源化形式的抗体，此抗体与 CA215 的抗原决定簇相结合，即

可以与 RP215 结合。

18. 权利要求 17 中所述的方法，其中该抗体为一种人源化形式的 RP215。

含糖基广谱癌症标志物

技术领域

[0001] 本发明涉及能够区别癌症细胞或组织与正常细胞或组织的并存在于许多人体肿瘤中的蛋白质标志物，特别是涉及所熟知的癌症标志物 CA215 含糖基的抗原决定簇，以及使用此种抗原决定簇的方法。

背景技术

[0002] 所引用的美国专利 US5,650,291，描述了对肿瘤相关抗原，即 CA215 的分离，CA215 存在于一个卵巢肿瘤的细胞株中，也存在于许多人体肿瘤中。针对此抗原已制备出单克隆抗体其中包括 RP215。产生这种单克隆抗体的杂交瘤细胞株已经存放在美国标准生物制品收藏中心，编号为 ATCCHB 10095。在美国专利 US5,650,291 中已经描述，通过 SDS 凝胶电泳，被 RP215 识别的 CA215 最小分子量为 60kD，而在聚集状态下其分子量范围为 100kD 至 2,000kD。应用免疫亲和层析纯化方法，能够从培养的 OC-3-VGH 卵巢肿瘤细胞株提取物或培养液上清中纯化出 CA215。CA215 抗原是细胞膜相关的可溶性抗原，在卵巢癌病人和子宫颈癌病人血清中用 RP215 可以检测出来，而在正常组织中却没有发现这种抗原。Lee, C.Y.G., et al., 在 *Cancer Immunol.Immunother.*(1992) 35 : 19-26. 上叙述了这种抗原以及识别这种抗原的单克隆抗体，在这篇文章中，CA215 被命名为“COX-1”。

[0003] Lee, G., 等人., 在 *J.Clin.Ligand Assay*(2006) 29 : 47-51 上发表的文章，曾经报道在中性环境下经过高碘酸钠处理 CA215 后，用 RP215 抗体与其进行免疫夹心试验，结果发现 CA215 的免疫活性被消除了。作者由此得出结论，与 RP215 反应的 CA215 抗原决定簇可能包含糖基。

[0004] 文章指出，在大约 60% 的癌症中存在能够被 RP215 识别的 CA215 抗原决定簇，详细内容参见 Lee, G., et al., *J.Clin.Ligand Assay*(2006) supra。

[0005] 美国专利 US5,650,291 还进一步描述了含 CA215 抗原肿瘤的定位方法，利用抗 CA215 抗体与之发生免疫反应，进而标识产生这种抗原的细胞。同时也描述了利用各种放射性同位素或毒素标记抗 CA215 的单克隆抗体，用于治疗。

[0006] 本发明更详细地阐述并论证，抗原决定簇的糖基部分位于免疫球蛋白重链样分子的可变区，CA215 的这一有效组分可用于制作疫苗，或用于制备和纯化抗体以进行癌细胞靶向定位。本发明同时证明 CA215 以两种形态存在，一种是在细胞膜上，另一种是分泌形式。

发明内容

[0007] 本发明涉及 CA215 抗原决定簇的必要组份。这个抗原决定簇包括糖基以及至少一部分免疫球蛋白重链样可变区的氨基酸序列。这个抗原决定簇能够与 RP215 单克隆抗体发生特异性免疫反应，但不会与抗人 IgG 发生明显的免疫反应。

[0008] 另一方面，本发明涉及应用最小的抗原决定簇或模拟前者的抗独特型抗体，作

为癌症治疗和预防方法中的有效活性成分。这种抗原决定簇或抗独特型抗体还能够用作亲和纯化以及鉴定单克隆抗体的试剂，进而用作癌症诊断和治疗的试剂。

[0009] 另一方面，本发明涉及改善 CA215 的免疫检测，用直接与抗原结合的选择性单克隆抗体，或者用与 IgG 反应的抗体，作为新的夹心检测的组成部分。

[0010] 另一方面，本发明涉及改进的 RP215 修饰形式的单克隆抗体，包括人源化形式。人源化形式的 RP215 可作为治疗方法，也能够与另外的抗肿瘤组分结合，提高该组分的靶向效应。

[0011] 另一方面，本发明涉及利用 CA215 抗原的分泌型和细胞膜结合型的双重属性特点的方案。该方案中通过检测分泌形式的抗原来实现体液的诊断；或选择性使用本发明中改进的分析系统，随后应用发明中的选择性结合细胞毒素或放射性同位素的人源化抗体来治疗或定位实体肿瘤。

[0012] 附图简要说明

[0013] 图 1 至图 5 是来自人 IgG，RP215 单克隆抗体和 3 个 CA215 各自样本的 N 连接多糖的全部 ESI-MS 质谱图。

[0014] 图 6 显示清洗对结合在 OC-3-VGH 细胞膜上的 CA215 的影响。

[0015] 图 7 显示 OC-3-VGH 细胞系的分泌模式与一个对应该 CA215 分泌形式的杂交瘤细胞系相比较。

[0016] 发明的实现

[0017] 本发明明确了 CA215 的抗原决定簇，由于包含该抗原的糖基，该抗原决定簇能够与 RP215 单克隆抗体发生免疫反应，已经确定了其蛋白部分与包括 IgG、IgA 和 IgM 类在内的免疫球蛋白重链样分子的一致性。虽然免疫球蛋白样部分的轻链也与 CA215 相关，但不象正常免疫球蛋白那样与重链呈 1 : 1 的比例，而且不含有与重链样部分相关的包含糖基的抗原决定簇。CA215 是作为未确定的聚集体存在于癌细胞表面。

[0018] 被 RP215 识别的抗原决定簇所包含的糖基通常不出现在免疫球蛋白中，该糖基与免疫球蛋白样分子的重链可变区相关联。这一鉴定可用于生产更复杂的免疫原性物质，进而用于抑制表面出现 CA215 的肿瘤细胞生长，也可用于产生另外的抗体作为检测试剂或免疫毒素。举例如下：如上所述，60% 的人体癌症中存在 CA215，利用 CA215 有效的抗原决定簇，可制成更为有效的用于肿瘤的预防和治疗免疫原性物质。

[0019] 因此不必使用整个 CA215 抗原作为疫苗来减缓已经罹患的癌症进程，或防止表达此抗原的癌细胞出现可检测出的数量，只需要利用 CA215 中具备抗原决定簇的部分进行检测与治疗。

[0020] 抗原决定簇为构成抗原的重要部分，其不会与抗人 IgG、抗人 IgA 或抗人 IgM 发生免疫反应。糖基化抗原决定簇包含一个独特的成分，该成分区别于人免疫球蛋白，也区别于与之发生免疫反应的 RP215 单克隆抗体。该糖基抗原决定簇成分大约 1-3% 海藻糖，9-15% N-乙酰基半乳糖胺，27-30% N-乙酰基葡萄糖胺，6-15% 葡萄糖，47-51% 甘露糖。这些是大概的数据，在后四种中大约有 1-2% 的误差。糖基抗原决定簇不含 N-乙酰基神经氨酸和 N-乙二醇神经氨酸。

[0021] 抗原决定簇可能也包含至少一小部分与糖基结合的免疫球蛋白重链样蛋白可变区。

[0022] 因此，纯化的 CA215 抗原被确定为一个免疫球蛋白重链样分子，其中与 RP215 发生免疫反应的抗原决定簇部分包含与此氨基酸序列相连的糖基。‘免疫球蛋白重链样分子’的意思是指分子中包括一段氨基酸序列能够与抗免疫球蛋白抗体发生免疫反应。因此，在本例中，显示 CA215 与抗 IgG、抗 IgA 和抗 IgM 发生免疫反应。抗原决定簇与 RP215 发生免疫反应，但不与抗 IgG、抗 IgA 和抗 IgM 发生免疫反应。因此 CA215 蛋白部分的氨基酸序列与免疫球蛋白重链十分相似，上述氨基酸序列可以与抗重链免疫球蛋白抗体发生免疫反应。CA215 还能够与识别免疫球蛋白轻链的抗体发生免疫反应。因此，简单而言，CA215 可被描述为免疫球蛋白样分子。

[0023] 本发明确定的抗原决定簇可以被制成疫苗用于癌症的治疗与预防。对于动物模型如小鼠、大鼠、兔、豚鼠等以优化药物配方和方案给予这种疫苗。对人可以使用本发明的免疫原物质附加如放射线、化学治疗等治疗方式一起实施。

[0024] 对癌症组织和正常组织的免疫组织化学染色研究已经证实其中确认的抗原决定簇以不同的染色程度存在于多种人体癌症。抗原决定簇在人体卵巢癌、子宫颈癌、子宫内膜癌、结肠癌、胃癌、肠癌、食道癌、乳腺癌和肺癌等都显示很强的染色。特定对象的肿瘤组织能够通过免疫染色来评估抗原决定簇的不同水平，从而提供了用于设计适宜疫苗的信息，既可以含有抗原决定簇本身也可以含有模拟其的抗独特型抗体，下面进一步进行讨论。

[0025] 此外，使用本发明的抗原决定簇以使患癌对象产生内源性抗体，抗原决定簇也可以用于产生另外的抗体用于检测和自身治疗。“抗体”包括完整的免疫球蛋白，也包括其免疫特异性的片段，如，Fab，Fab2 和 Fv 片段等。抗体可以是以已知的标准技术制备的单克隆抗体，以及在标准技术条件下经重组操作获得的人源化抗体，嵌合抗体。嵌合抗体是由一个物种相关的可变区与另一个物种相关的恒定区结合而成的抗体或是单链抗体。单克隆抗体的使用重组生产手段的操作技术已经成熟了。本发明的抗原决定簇也可作为其它合适抗体的纯化与鉴定工具来使用。

[0026] 不论是为了用于诊断或作为疫苗制剂而制备的单克隆抗体或多克隆抗体，任何免疫原物质组份中可能包含相适应的佐剂，如弗氏不完全佐剂、明矾以及其他多样化的已知技术的佐剂等。另外，抗原决定簇可能会与其他成分结合，如 KLH 或破伤风毒素等，以增强免疫原性。因此，本发明也包括该抗原决定簇蛋白与其他不同蛋白的融合。

[0027] 针对本发明定义的抗原决定簇而产生的抗体能够通过放射性同位素、荧光素以及体外实验中的标记酶来标记，用于检测癌细胞的存在。抗体也可以结合毒素用于治疗。

[0028] 除了用本发明所定义的抗原决定簇制备免疫原制剂，模仿此抗原决定簇的抗独特型抗体可从与 RP215，或者能同 RP215 识别一样的抗原决定簇的免疫原发生免疫反应的宿主分离而获得。通过由纯化的 RP215 单克隆抗体或其 Fab 片段或其人源化形式致免疫的小鼠或其它适合的宿主即可诱导产生抗独特型免疫反应，从而得到抗独特型单克隆抗体。例如，可使用 BALB/C 小鼠。常规的单克隆抗体的制备，通过细胞融合以及通过经 RP215 或其 Fab 片段或经能识别本发明的抗原决定簇的半抗原等的筛选，可以确定为抗独特型抗体的单克隆抗体。这些抗独特型单克隆抗体能够作为免疫原引导抗体针对靶癌细胞。因此抗独特型抗体能够替代 CA215 抗原决定簇用于癌症的治疗以及其他的相

关应用。

[0029] 适合本发明定义的抗原决定簇的制剂都是那些常规的免疫原物质，并且已经被确定，例如，Remington's Pharmaceutical Sciences, latest edition, Mack Publishing Co., Easton, PA, 供参考。给药方案依赖于情况的特点，主管医生作出的医嘱，恶性肿瘤的严重程度。优化建立在群体或者个体基础上的上述方案是一种普遍的技能。

[0030] 通过鉴定位于免疫球蛋白样部分上的 CA215 抗原决定簇，改善了针对此抗原的免疫检测方法。之前 RP215 单克隆抗体同时作为标准免疫夹心实验中的夹心结构的两个成分，该免疫夹心实验使用了包括酶、放射性同位素和荧光素等多种标记用于检测。由于 CA215 及其抗原决定簇通常以聚合形式或多倍体形式存在，所以这种方法是可行的。然而经过改良，使用可以与人免疫球蛋白（最好为 IgG）发生免疫反应的抗体作为夹心实验的一种成分，这样单体形式的 CA215 也可以被检测。

[0031] 同时考虑通过调整编码可变区的核苷酸序列，以改良 RP215 结构。这样，可以将 RP215 进行人源化或者修饰以增强它的免疫特异性。人源化形式的该抗体特别适合治疗方面的应用。人源化形式可以是完整的免疫球蛋白、或者可以仅包括可变区如 Fab 或 Fab2，或者是重组产生的 Fv 单链抗体或其部分。任何 RP215 的免疫特异性部分都可以通过修饰，从而不会引发人体的免疫反应。

[0032] 这些抗体、片段或修饰形式都可以连结其他生物活性物质，如抗肿瘤药物，其中包括能够与不良的生长因子发生免疫反应的免疫球蛋白或其片段。在此连结物中 RP215 成为靶向物质，自身也成为抗肿瘤因子。这种形式的 RP215 可以与多种抗肿瘤药物结合，如红豆杉醇 (paclitaxel)、雷帕霉素 (rapamycin)、烟曲霉素 (fumagillin)，或可以与生长因子抑制剂或其受体结合，如抗促性腺激素释放素受体 (anti-GNRH receptor)、抗红细胞生长因子 (anti-EGF)、抗红细胞生长因子受体 (anti-EGFR)、抗血管内皮细胞生长因子 (anti-VEGF)、抗血管内皮细胞生长因子受体 (anti-VEGFR) 等等。

[0033] 抗肿瘤药物包括如上所述的小分子，也包括可以对抗生长因子或其受体的抗体或其片段，这些抗生长因子或抗生长因子受体是指与这些因子或受体发生免疫反应的免疫球蛋白或其片段。

[0034] 在本发明的改进方案中，最初步骤是诊断是否出现了恶性肿瘤，其特征为出现来自上皮细胞的体液中 CA215 抗原。这些体液可以是血清、血浆、血液、尿液、唾液等等。应用 RP215 或其上述的修饰形式进行检测。也可使用本发明所述的改良的检测方法。

[0035] 一旦作出诊断，通过注射造影可以进行肿瘤的定位。在人体，将人源化形式的 RP215 连结可成像的标记，如放射性同位素、荧光素染料，或发光系统等。荧光蛋白可以与蛋白融合或连结抗体。此外，该抗体还可以作为用于治疗实体肿瘤的细胞毒素的靶向物。

具体实施方式

[0036] 下面结合实施例进行说明，但本发明并不限于此。

[0037] 实施例 1

[0038] 具有含糖基的抗原决定簇的免疫球蛋白样分子 CA215 在分泌形式以及膜结合形

式中的特性

[0039] 在此例中确定了 CA215 的本质为免疫球蛋白样物质，且证实了此癌症相关抗原同时以分泌型和膜结合型两种分子形态存在，且具不同的分子量。此外，与 RP215 发生免疫反应的 CA215 抗原决定簇包含醣基部分。

[0040] 纯化的 CA215 来源于 OC-3-VGH 癌细胞培养液，具体方法如上文中引用并结合的美国专利 US5,650,291 中所述。

[0041] 纯化 CA215 的氨基端氨基酸序列分析得到与正常人 IgG 一致的序列 (VELVESGA)。

[0042] 免疫蛋白印迹实验证实了 CA215 的免疫球蛋白特性。OC-3-VGH 癌细胞提取物、培养液或亲和层析纯化的 CA215 在 SDS-PAGE 分离并转移 CA215 蛋白到硝基纤维膜。

[0043] 使用酶标记的 RP215 或碱性磷酸酶标记的抗人 IgG 直接培养后，将硝基纤维膜用显色检测的基质 (Bio-Rad Labs) 培育使蛋白质带呈色。在使用硝基纤维膜的间接结合试验中使用未标记的 RP215 或未标记的抗人免疫球蛋白作为第一抗体，用酶标记山羊抗小鼠 IgG 或兔抗山羊 IgG 作为第二抗体。广泛研究的结果总结在表 1 中。

[0044] 表 1. 以各种抗体为探针，用免疫蛋白印迹实验确定来源于癌细胞提取物、细胞培养液或纯化的 CA215 蛋白位于硝基纤维膜上的待测蛋白带的分子量

[0045]

初始抗体	第二抗体	蛋白来源	分子量 (KDa)	染色强度
RP215-HRP	--	OC-3-VGH 癌细胞	55	+
抗人 IgG (Mab)	--	纯化 CA215	60	++
			25	+
RP215 (Mab)	山羊抗小鼠 IgG-ALP	OC-3-VGH 癌细胞	53-70	+++
	山羊抗小鼠 IgG-ALP	细胞培养液	50-54	+
	山羊抗小鼠 IgG-ALP	纯化 CA215	50-52	++
	山羊抗小鼠 IgG-ALP	胃蛋白酶处理的纯 化 CA215	50-60 24	++ +
抗人 IgG (Mab)	山羊抗小鼠 IgG-ALP	OC-3-VGH 癌细胞	55-70 28	+++ ++
	山羊抗小鼠 IgG-ALP	纯化 CA215	52-60	++
抗人 IgA (Mab)	山羊抗小鼠 IgG-ALP	OC-3-VGH 癌细胞	57-70	++
抗人 IgM (Mab)	山羊抗小鼠 IgG-ALP	OC-3-VGH 癌细胞	53-70	++
抗人 Ig κ 轻 链 (Mab)	山羊抗小鼠 IgG-ALP	OC-3-VGH 癌细胞	46-53	++
			20-27	+
抗人 Ig λ 轻 链 (Mab)	山羊抗小鼠 IgG-ALP	OC-3-VGH 癌细胞	56 23-32	++ +

[0046] HRP：辣根过氧化物酶，ALP：碱性磷酸酶，Mab：单克隆抗体

[0047] 无论蛋白质来源于 OC-3-VGH 癌细胞提取物、培养液或经亲和层析纯化的 CA215，使用 RP215 的直接或间接免疫蛋白印迹实验都显示同样的蛋白质结合图形。在分子量为 60KDa 部位可观察到一条很强的蛋白质宽带，另有一小部分蛋白带在 90KDa 的位置检测到。

[0048] 无论是使用碱性磷酸酶标记的山羊抗人 IgG 的直接试验或使用该抗体作为第二标记物的间接试验，抗人 IgG (γ 链特异性) 单克隆抗体在 60KDa 部位都出现蛋白质宽带。抗人 IgG 单克隆抗体的轻链 κ 链和 λ 链虽然染色较浅，同样也在较低分子量 (25-30KDa) 部位出现蛋白带。抗人 IgA 和抗人 IgM 单克隆抗体蛋白识别蛋白带与 RP215 单克隆抗体一样也出现在 60KDa 分子量位置。

[0049] 如表所示，来源于癌细胞的 IgG 其相对浓度显著高于人 IgA 和人 IgM (小于等于 IgG 的 5-10%)。由亲和层析纯化的经胃蛋白酶消化前与消化后的 CA215 显示，经胃蛋白酶消化后再进行免疫蛋白印迹实验，残留的 CA215Fab 片断能够在低分子量范围 (约 30KDa) 被 RP215 单克隆抗体检出。

[0050] 更多的直接证据证实了癌细胞中的 CA215 会与人 IgG、人 IgA 或人 IgM 发生交叉免疫反应，被 RP215 识别的独特的抗原决定簇存在于这些来源于癌细胞的免疫球蛋白样分子，可按如下方法获得：

[0051] 抗人 IgG 单克隆抗体 (Cox-100)，抗人 IgA 和抗人 IgM 以标准程序分别包被于微孔反应盘。将 OC-3-VGH 细胞培养液加入微孔，加入辣根过氧化物酶标记的 RP215 作为检测抗体。以一步法夹心免疫试验在室温反应过夜，使用 1/200 的辣根过氧化物酶标记的 RP215 以及 10 μ g/ml 正常小鼠 IgG。

[0052] 表 2 中该试验结果证实了 OC-3-VGH 癌细胞培养液中存在人免疫球蛋白样分子。ODs 代表样本的吸光度，ODn 代表阴性对照 (培养基) 的吸光度。

[0053] 表 2

[0054]

包被抗体 / 抗原	捕捉抗体	吸光度 (OD _{s650} /OD _{n650})
Cox-100 抗人 IgG (Mab)	RP215-HRP	13.6
抗人 IgA (Mab)	RP215-HRP	1.7
抗人 IgM (Mab)	RP215-HRP	2.2

[0055] 已得到的用以证实抗免疫球蛋白抗体与 OC-3-VGH 癌细胞中的 CA215 直接结合的其他数据，如表 3A 所示。在这个例子中进行的试验作为间接的二步法 ELISA 试验，第一抗体与样本在室温下培养过夜，之后加入标记碱性磷酸酶的山羊抗小鼠 IgG 在 37°C 反应 1 小时。ODs 代表样本的吸光度，ODn 代表对应正常小鼠 IgG 浓度的吸光度。

[0056] 表 3A

[0057]

捕捉抗体	吸光度 (OD _{s405} /OD _{n405})

1.25 μ g/ml 抗人 IgG ₂ (MAb)	9.1
2.5 μ g/ml 抗人 IgG ₃ (MAb)	1.4
1.125 μ g/ml Cox-100	12.9
1.125 μ g/ml RP215 (MAb)	11.6
5 μ g/ml 抗人 Ig κ 链 (MAb)	1.5
5 μ g/ml 抗人 Ig λ 链 (MAb)	2.8

[0058] 通过同源分析已进一步证明 CA215 为一种与 IgG 重链相似的免疫球蛋白样分子。表 3B 显示用 MALDI-TOF MS 质谱分析的结果。

[0059] 表 3B. 由 MALDI-TOF MS 质谱分析经胰蛋白酶处理的 CA215 肽链的氨基酸序列
同源性

[0060]

肽链片断	序列同源性
1. K. DVLITITLTPK. V	免疫球蛋白重链可变区 (66%)
2. K. APQVYTIPPK. E	免疫球蛋白 γ 重链 3 (87%)
3. R. VNSAAFPAPIEK. T	免疫球蛋白 γ 重链 3 (88%)
4. K. APQVYTIPPKEQMAK. D	免疫球蛋白 γ -3 链 C 区 (重链病蛋白 X 62%)
5. R. SVSELPIMHQDWLNGK. E	免疫球蛋白重链 (72%)
6. K. NTQPIMDTDGSYFVYSK. L	免疫球蛋白 γ -1 重链恒定 (61%)
7. K. SSGTSYPDVLK. C	免疫球蛋白重链可变区 (64%)
8. K. VCNVSWIK. Q	免疫球蛋白重链 (75%)
9. RTLYLQMNSLR	免疫球蛋白重链可变区 (100%)
10. SLVVAVVAPDNRNPAFTTMGWLFLK	免疫球蛋白重链可变区 (70%)
11. GDRVITITWR	免疫球蛋白重链可变区 (88%)
12. GLSDSVRSCR	免疫球蛋白重链可变区 (75%)
13. TAKGSTGMEILLSTLENTK	免疫球蛋白重链可变区 VH (61%)
14. KVTCVVVDISKD	免疫球蛋白重链 (88%)
15. GPLCGCCPGRSSQK	免疫球蛋白可变区 (43%)
16. AELGGLSPR	免疫球蛋白重链亚群 VIII V-D-J 区 (85%)
17. DGSISILGSDDATTCHIVVLR	免疫球蛋白重链可变区 (100% - 7/7)
18. RTLYLQMNSLR	免疫球蛋白重链可变区 (100%)
19. KCELNCQAMGYR	免疫球蛋白 γ 链, V 区 (100%)
20. LSGSCRSTDSLHPCPPTALPR	免疫球蛋白重链可变区 (33%)
21. APTVVLMMTK	免疫球蛋白重链可变区 (85% - 5/6)

[0061]

22. ATSRGCITIIIGGGDTATCCA	免疫球蛋白重链可变区 (69% - 9/13)
23. MSTRYHQAASDSYLELIK	免疫球蛋白重链可变区 (87% - 7/8)
24. SLPGSPKSSHLLSPLR	免疫球蛋白重链 (VH4) V 区 (VDJ)
25. GGNSGGSSSICYVLLGFIGTSK	免疫球蛋白重链 VJH1 区 (77%)
26. AEDTAVYYCAKTLTIR	免疫球蛋白重链可变区 (100%)
27. GLECI GYMYSSGSSSFYNPSLKSR	免疫球蛋白重链可变区 (100%)
28. MAYLQQTLAGPSGTR	免疫球蛋白重链可变区 (88% - 8/9)
29. KGHQDSCPFELTACPNEGCTSQVPR	免疫球蛋白重链可变区 (75% - 6/8)
30. GLEWVSAVSGSGTTTTYYADSUK	免疫球蛋白重链可变区 (91%)
31. LSSVTAADTNVYYCAR	免疫球蛋白重链 VH DJ 区 (93%)
32. AETLVFSTHAVISM R	免疫球蛋白重链可变区 (70% - 7/10)

[0062] Cox-100 为一种单克隆抗体，其来源于 CA215 致免疫小鼠，摘取其脾脏，进行细胞融合以及筛选从而得到，上述筛选使用了用于制备单克隆抗体的标准技术。Cox-100 能够与 CA215 发生反应，并且与人 IgG 交叉反应。

[0063] 如此，CA215 序列与人免疫球蛋白重链序列同源。

[0064] 在表 3C 中，CA215 的部分氨基酸序列与之前已报道的一些其他的癌细胞或组织的人免疫球蛋白重链序列一起排序比较。清楚地表明 CA215 不是一个单独明确定义分子，而是许多人免疫球蛋白重链分子的混合（如 IgG、IgA、IgM 和许多可变区的变形）。这些免疫球蛋白混合物的特殊性质是存在能够普遍地被 RP215 单克隆抗体识别的的特异性糖基相关抗原决定簇。

[0065] 表 3C. 由 MALDI-TOF MS 质谱分析推断的 CA215 部分氨基酸序列与已知人癌细胞免疫球蛋白重链的氨基酸序列比较

[0066]

	FR1	CDR1
T47D (IgG)	EVQLVLSGGGLVQPGGSLRLSCAASRFSSR	ISGMR
ZR75-1 (IgM)	EVQLVQSGAEVKKPGTSLKISCKGSGYSFT	SYWIG
ZR75-1 (IgG)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFNFN	TYAMT
SKBR3 (IgG)	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSVS	SGYYYSW
SKBR3 (IgA)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGLSFS	SSGMN
MDA-MB-231 (IgM)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	SYWMD
LUNG CANCER	EVQLLESGAEVKKPGESLKI SCEASGYTFG	TYWIG
CA215	KSSGTSYFPDVLKC KVCN----- (SLVVAAVAPDNRNPAFT?) (ATSRGCTTHGGGDTATCCAK?) (MAYLQQTLAGPSGTR?)	YVSW (TMG?)
	FR2	CDR2
T47D (IgG)	WVRQAPGKIEEVA	PFWNGGSQK YCADSVT
ZR75-1 (IgM)	WVRQMPGKGLEWMG	I IYPGDS DTRYSPSFQG
ZR75-1 (IgG)	WVRQAPGKGLEWVS	T IAADGTWTSNAD FVRG
SKBR3 (IgG)	RIRQHPGKGLEWIG	YIYNGSTYENPSLKS
SKBR3 (IgA)	WVRQASGKGLEWVG	RIGSKAASD TFSYAASVRG
MDA-MB-231 (IgM)	WVRQVPGKGLWVS	RISPDGRITTYADSVEG
LUNG CANCER	WVRQMPGKGLEWMG	I IYPGDS DTTY SPSFRG
CA215	IKQ-----GLEWVS (WLFK?) (GLECIG)	AVSGSGT TTYAD SUK YMYSSGSSFYNP SLKSR?) G
	FR3	CDR3
T47D (IgG)	GRFTFSETELRPCSLCKCTVNLRARP5 I PAP	
GITVPIIPRI CPRN		
ZR75-1 (IgM)	QVTISADKSISLAYLQWSSLKASDTAMYYCAR	QEIVAFS
ZR75-1 (IgG)	RLTISRDNRSRNTLYLQMNSLRAEDTAIFYCAK	DWYDY
SKBR3 (IgG)	RASISVDISKQFSLKLSVTAADTAVYYCAR	DIRHTYGP
SKBR3 (IgA)	RFFISRDDSKKIVYLYQMNSLKTEDTAVYYCSR	
QKCGGDCHIPKM		
MDA-MB-231 (IgM)	RFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAG	GYLSSH
LUNG CANCER	QVTI SVDKPINTAYLQWDSLKASDTAIFYCAR	WDVMIGFYTA
CA215	DRVTITWR RTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK TLTR (LSSVTAADTNYYYCAR?) (MAYLQQTLAGPSGTR?)	
	HI	CH
T47D (IgG)	YFDSGGGLVTVSS	ASTKGPSVFPL
ZR75-1 (IgM)	YYYMDVWVGKTTTVSS	GSASPPFS
ZR75-1 (IgG)	WGQGLVLTALL	
TVSTGLHGXGPIGLPP		
SKBR3 (IgG)	YNCYMDVWVGKTTTVSS	GLHQGPIGLPP
SKBR3 (IgA)	YYYMDVWVGQTTTVSS	ASPTSPKVF
MDA-MB-231 (IgM)	DYWGRGTLTVSS	GE CIRPNFPFP
LUNG CANCER	DYWGGQTQTVS	SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAVLGLCLV KDYFPEPVTV
CA215 TAKGSTGMEILL STLENTK (?)..
CA215 (constant region)		

GNSGGSSSICYVLLGFIGTSKLSGSCRSTDSLHPCPPTALPRAELGGILSPRKDVLITITLTPK		
VTCVYVDISKD-----		
RSVSELPMHQDWLNGKERVNSAAFPAPIEKTKAPQVYTIPPKEQMAKD-----		
KGIHQDSQPEFI TACPNEGCTSQVPRKNTQPIMDTDGSYFYYSKI		
*Note: The following sequences cannot be mapped due to microheterogeneity: 1.		
GPLCGCCPGRSSQK; 2. APTVVI MMTK; 3. EMSTRYHQAAASDSYLELIK; 4.		
SLPGSPKDSHLLSPLR.		

[0067] 表 3D 中，经 MALDI-TOF MS 质谱分析和逆转录 - 聚合酶链反应推断的 CA215 恒定区氨基酸序列与基因库提供的抗人结肠癌抗体重链恒定区的氨基酸序列进行比较。

[0068] 表 3D. 比较经 MALDI-TOF MS 质谱分析和逆转录 - 聚合酶链反应推断的 CA215 恒定区的氨基酸序列与抗人结肠癌重链恒定区的氨基酸序列 (AHCCHCgb AAB28159.1)

[0069]

HCCHC
 KDVLIIHLTPKVTCTVVVDISKDDPFVQFSWTFVDDVEVIITAQTQPREEQF
 A215 by MALDI-TOF MS KDVLIIHLTPKVTCTVVVDISKD

SLLE
 A215 by RT-PCR

FVFN~~AK~~TKPRFFQF

HCCHC NSTFRSVSE LPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISK TKG---

A215 by MALDI-TOF MS N-TKRSVSE LPIMHQDWLNGKE.... RVNSAAFPAPIEKT.....

A215 by RT-PCR

STYRVVS~~VI~~LVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGGIRGC

HCCHCRPKAPQVYT
 YPPKEQMAKDKY
 A215 by MALDI-TOF MS KAPQVYT IPP -
 EQMAKDKY
 A215 by RT-PCR

GHMORGQLGPPSALGVTAVPTSVPTGQPREPQVYTLPPSREEMTKNOV

HCCHC SLTCMI
 DFFPLDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKL
 A215 by MALDI-TOF MS ---TCVVVD-ISKD... ..
 NLTQPIMDTDGSYFVYSKL
 A215 by RT-PCR SLTCLYKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK IT

[0070] 分析 CA215 的糖基部分，进而验证高碘酸盐在夹心试验中破坏抗原的免疫活性的能力，从而确定抗原决定簇中存在糖基。验证方法如下

[0071] 经过磷酸缓冲液清洗的 OC-3-VGH 细胞（浓度 1×10^6 /ml）用 100mM 的高碘酸钠培育 30 分钟，再用含 0.5% 牛血清白蛋白的磷酸缓冲液清洗细胞，然后将细胞以 1×10^4 /ml 浓度置于微孔反应盘并干燥，再用含 0.5% 牛血清白蛋白磷酸缓冲液进行封闭。直接用辣根过氧化物酶标记的 RP215 进行酶联免疫试验，在 37℃ 反应 1 小时，清洗，用 TMB 基质着色。未经过高碘酸钠处理的癌细胞包被的微孔反应盘作为对照用以比较。经过高碘酸盐处理的癌症细胞包被的微孔反应盘与酶标 RP215 之间的结合明显减弱。另外，加入 10-100 μ g/ml 的山羊抗人 IgG 减少了辣根过氧化物酶标 RP215 与癌细胞包被的微孔反应盘之间的结合，减少程度与加入量有关，提示山羊抗人 IgG 与辣根过氧化物酶标 RP215 竞争性地与完整 CA215 抗原相结合。具体结果见表 4。

[0072] 表 4. 直接结合试验以揭示，对 OC-3-VGH 癌细胞使用高碘酸钠的处理对于辣根过氧化物酶标 RP215 与 OC-3-VGH 癌细胞包被的微孔反应盘之间的连接的效果，以及当存在山羊抗人 IgG 时的结合抑制作用。

[0073]

实验状况	450nm 吸光度	
	未经高碘酸钠处理	经过高碘酸钠处理
RP215-HRP (10 μ g/ml) + 正常鼠 IgG (10 μ g/ml)	2.153 (100%)	0.797 (37%)
RP215-HRP (10 μ g/ml) + 正常鼠 IgG (10 μ g/ml) + 山羊抗人 IgG (20 μ g/ml)	0.961 (45%)	0.333 (15%)
RP215-HRP (10 μ g/ml) + 正常鼠 IgG (10 μ g/ml) + 山羊抗人 IgG (50 μ g/ml)	0.471 (22%)	0.252 (12%)
RP215-HRP (10 μ g/ml) + 正常鼠 IgG (10 μ g/ml) + 山羊抗人 IgG (100 μ g/ml)	0.163 (8%)	0.158 (7%)

[0074] 100%代表最大结合率

[0075] 在表 5, 图 6, 图 7 中进一步确认, CA215 在 OC-3-VGH 细胞中同时存在分泌型和膜结合型。表 5 显示免疫蛋白印迹实验的结果。反应膜用检测试剂处理, 检测试剂分别包含固定的完整 OC-3-VGH 细胞, 或 OC-3-VGH 培养液, 或纯化的抗原。如同所示, 不管何种检测方法, 培养液与纯化抗原一样都只在 54-55KDa 分子量出现一个结果, 而完整细胞在分子量为 50-56KDa 和 68-73KDa 都出现结果。在表 5 中, N/A 表示“无法应用”, ND 表示“未完成”。

[0076] 表 5. 还原条件下, 以 RP215 和抗人 IgG 为探针, 对 OC-3-VGH 细胞、细胞培养液和纯化 CA215 进行免疫蛋白印迹实验

[0077]

免疫蛋白印迹实验		来源于不同硝基纤维束的检测带的分子量 (KDa)		
初级抗体	第二抗体	OC-3-VGH 完整细胞	OC-3-VGH 细胞培养液	纯化 CA215
RP215	GAM IgG-ALP	56/68	55	55
MAH IgG	GAM IgG-ALP	55-73	55	54
MAH IgA-ALP	--	50		
MAH IgM-ALP	--	70		

[0078] MAHIgG：小鼠抗人 IgG；

[0079] GAMIgG-ALP：碱性磷酸酶标记的山羊抗小鼠 IgG；

[0080] MAHIgA-ALP：碱性磷酸酶标记的小鼠抗人 IgA；

[0081] MAHIgM-ALP：碱性磷酸酶标记的小鼠抗人 IgM。

[0082] 图 6 显示用 PBS 连续洗涤对 RP215 与 OC-3-VGH 细胞结合的影响。如图所示，即使连续洗涤 5 次在与细胞结合的部分也没有可测定的变化。

[0083] 这与图 7 中的结果相反，图 7 中显示，不论培养液获取自 OC-3-VGH 细胞还是类似的标准杂交瘤分泌系统，在 HRP 检测系统中基于 450nm 处的吸光度显示为相似的分泌模式。

[0084] 因此，显示分泌型与膜结合型同时产生，但分子量不同。分泌型的分子量大约为 55KDa，膜结合型的分子量大约为 73KDa。

[0085] 实施例 2

[0086] 亲和纯化 CA215 的糖基成分

[0087] 亲和纯化 CA215 的糖基成分的分析通过合同由美国 ComplexCarbohydrate Research Center (Athens, Georgia, USA) 完成。为了对比，也进行了正常人 IgG 以及 RP215 单克隆抗体的成分分析。

[0088] 糖基成分的比较分析的结果见表 6。其中由于认定葡萄糖为主要的污染成分，因此葡萄糖的数值不易于精确测量。

[0089] 表 6. 中性糖以及氨基糖成分（不包括葡萄糖）

[0090]

样本编号	氨基糖及糖的形式	(nmoles/ μ g)	摩尔百分数
人 IgG (不含硫)	海藻糖 (Fucose)	0.0077	7.93
	N-乙酰半乳糖胺 (N-acetyl-galactosamine)	0.0068	6.99
	N-乙酰葡萄糖胺 (N-acetyl-glucoseamine)	0.0394	40.72
	半乳糖 (Galactose)	0.0053	5.46
	葡萄糖 (Glucose)	ND	ND
	甘露糖 (Mannose)	0.0376	38.90
	N-乙酰神经胺酸 (N-acetyl-Neuraminic acid)	0	0
	N-乙二醇神经胺酸 (N-glycol-Neuraminic acid)	0	0
	总计	0.0967	100
RP215 单克隆抗体 (不含硫)	海藻糖 (Fucose)	0.0085	5.03
	N-乙酰半乳糖胺 (N-acetyl-galactosamine)	0	0
	N-乙酰葡萄糖胺 (N-acetyl-glucoseamine)	0.0762	45.16
	半乳糖 (Galactose)	0.0076	4.48
	葡萄糖 (Glucose)	ND	ND
	甘露糖 (Mannose)	0.0765	45.33
	N-乙酰神经胺酸 (N-acetyl-Neuraminic acid)	0	0
	N-乙二醇神经胺酸 (N-glycol-Neuraminic acid)	0	0
	总计	0.1688	100
CA215 (070305A)	海藻糖 (Fucose)	0.0018	2.46
	N-乙酰半乳糖胺	0.0154	9.45

[0091]

	(N-acetyl-galactosamine)		
	N-乙酰葡萄糖胺 (N-acetyl-glucoseamine)	0.0442	27.05
	半乳糖 (Galactose)	0.0229	14.05
	葡萄糖 (Glucose)	ND	ND
	甘露糖 (Mannose)	0.0789	48.35
	N-乙酰神经胺酸 (N-acetyl-Neuraminic acid)	0	0
	N-乙二醇神经胺酸 (N-glycol-Neuraminic acid)	0	0
	总计	0.1633	100
CA215 (070305B)	海藻糖 (Fucose)	0.0018	2.46
	N-乙酰半乳糖 (N-acetyl-galactosamine)	0.0095	13.04
	N-乙酰葡萄糖胺 (N-acetyl-glucoseamine)	0.0208	28.40
	半乳糖 (Galactose)	0.0042	5.68
	葡萄糖 (Glucose)	ND	ND
	甘露糖 (Mannose)	0.0369	50.41
	N-乙酰神经胺酸 (N-acetyl-Neuraminic acid)	0	0
	N-乙二醇神经胺酸 (N-glycol-Neuraminic acid)	0	0
总计	0.0731	100	

[0092] 正常人 IgG 与 RP215 (小鼠 IgG) 具有相似的糖基成分, 尽管人 IgG 含有 N 乙酰基半乳糖胺而 RP215 没有。CA215 显示与正常人 IgG 及小鼠 IgG 的含糖比例不同, CA215 包含较低百分比的 N-乙酰氨基葡萄糖 (27-28% 相对于 40-45%), 而甘露糖含量却明显高于 IgG (48-50% 相对于 38-45%)。

[0093] 实施例 3

[0094] N- 连结与 O- 连结的寡糖形态

[0095] 除糖基的总体成分, 与人 IgG、RP215 以及 CA215 相关的 N- 连结多糖的结构也经电喷射离子化质谱分析 (ESI-MS) 确定。

[0096] 实验开始, 将样本溶于 1ml 超纯水中, 分别将人 IgG、RP215 单克隆抗体、CA215 样本 B 各 800 μ l 以及 900 μ l CA215 样本 A, 以及全部 CA215 样本 C 用吸液管装入带螺帽的试管并冷冻干燥。这些干燥的样本用 100 μ l 碳酸氢铵缓冲液 (50mM, pH8.4) 溶解, 然后立即用 25mM 二硫苏糖醇进行还原 (50°C, 45 分钟), 用 90mM 碘乙酰胺进行酰胺基甲基化 (室温避光, 45 分钟)。然后用胰蛋白酶消化 (37°C, 过夜), 再将第二种酶, 即多肽 N-糖苷酶 F (New England BioLabs) 加入到每个胰蛋白酶消化的样本中, 37°C 下, 培养 18 小时以释放 N 连结的多糖。酶解后将样本注入 C18 反相柱。各样本中的 N 连结多糖可被 5% 醋酸洗脱, 然后冻干。

[0097] 将每个样本中冷冻干燥的 N 连结部分溶于二甲基亚砜, 然后经氢氧化钠和甲基

碘甲基化，加入水终止反应。O-甲基化的糖基被二氯甲烷萃取出来。

[0098] 有机相经过浓缩干燥再溶于甲醇用于多糖结构的分析

[0099] 所有 5 个样本 N 连结多糖的结构经电喷射离子化质谱分析 (ESI-MS) 确定，使用了 LCQ-MS (Thermo Finnigan) 四极离子收集器。每个样本 (~ 5pmol/μl) 以恒定的流速 1 μl/min 通过注射泵 (Harvard Apparatus) 直接注入仪器并以 3.5kV 喷射。应用 35 的标准化碰撞能以及 2Da 的绝缘质量窗口来获得 MSn。

[0100] 结果如表 7-10 和图 1-5 所示，由于样本太少而且无法得到定义的峰值，因此表中没有 CA215 样本 C 的结果。在表 9 和 10 中，加亮的区域代表只存在于 CA215 的结构，而在 IgG 和 RP215 中都没有。

[0101] 另外，可能由于样本量太少，没有发现唾液酸。

[0102] 表 7. 人 IgG 的 N- 连接多糖图谱

[0103]

Observed Mass {M-Na}	Charge state	Proposed Structure	Structure
● 1332	double	GlcNAc ₂ Man ₃ Hex ₂ Fuc ₁	
▲ 1334	double	GlcNAc ₂ Man ₃ Hex ₂ Fuc ₁	
● 1378	double	GlcNAc ₄ Man ₃ Hex ₂ NeuAc ₁	
● 1387	double	GlcNAc ₃ Man ₃ Hex ₂ Fuc ₁	
◇ 1345	double	GlcNAc ₄ Man ₃ Hex ₂ Fuc ₁ NeuAc ₁	
◇ 1350	double	GlcNAc ₃ Man ₃ Hex ₂ NeuAc ₁	
◇ 1408	double	GlcNAc ₄ Man ₃ Hex ₂ NeuAc ₂	
● 1427	double	GlcNAc ₃ Man ₃ Hex ₂ Fuc ₁ NeuAc ₁	
● 1485	double	GlcNAc ₄ Man ₃ Hex ₂ Fuc ₁ NeuAc ₂	
● 1648	double	GlcNAc ₃ Man ₃ Hex ₂ Fuc ₁ NeuAc ₂	
● 1836	single	GlcNAc ₄ Man ₃ Fuc ₁	
● 1866	single	GlcNAc ₄ Man ₃ Hex ₁	
● 1997	single	GlcNAc ₃ Man ₃	

[0104] ● 甘露糖

[0105] ▲ 半乳糖



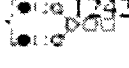
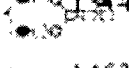
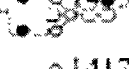
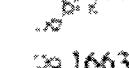



[0106] □ 海藻糖

[0107] ◇ N-乙酰葡萄糖胺

[0108] N-乙酰神经氨酸

[0109] 表 8. 通过 ESI-MS 测定的 RP215 单克隆抗体的 N- 连接多糖图谱

[0110]

Observed Mass (M-Na)	Charge state	Proposed Structure	Structure
	double	GlcNAc ₄ Man ₃ Hex ₂ Fuc ₁	
	double	GlcNAc ₄ Man ₃ Hex ₂ Fuc ₁	
	double	GlcNAc ₄ Man ₃ Hex ₂ NeuGe ₂	
	double	GlcNAc ₄ Man ₃ Hex ₂ Fuc ₁ NeuAc ₁	
	double	GlcNAc ₅ Man ₃ Hex ₂ Fuc ₂ NeuGe ₁	
	single	GlcNAc ₃ Man ₃	
	single	GlcNAc ₄ Man ₃	
	single	GlcNAc ₄ Man ₃ Fuc ₁	
	single	GlcNAc ₂ Man ₃ Hex ₁	

[0111] ● 甘露糖

[0112] ▲ 半乳糖

[0113] □ 海藻糖

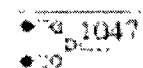
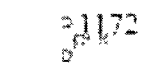
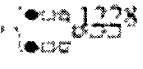
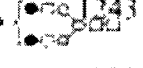
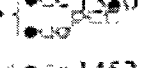

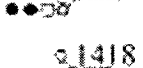
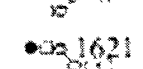


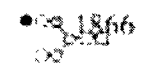
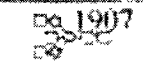

[0114] ◇ N-乙酰葡萄糖胺

[0115] ◆ N-乙酰神经氨酸

[0116] N-乙二醇神经氨酸

[0117] 表 9. 通过 ESI-MS 测定的 CA215 样本 A 的 N-连接多糖图谱

[0118]

Observed Mass (M-Na)	Charge state	Proposed Structure	Structure
 1047	double	GlcNAc ₁ Man ₃ Hex ₂	
 1172	single	GlcNAc ₂ Man ₃	
 1228	double	GlcNAc ₂ Man ₃ Hex ₂ NeuAc ₁	
 1243	double	GlcNAc ₄ Man ₃ Hex ₂ NeuGc ₁	
 1320	double	GlcNAc ₄ Man ₃ Hex ₂ Fuc ₁ NeuGc ₁	
 1452	double	GlcNAc ₃ Man ₃ Hex ₃ NeuAc ₁	
 1467	double	GlcNAc ₂ Man ₃ Hex ₃ NeuGc ₁	
 1418	single	GlcNAc ₂ Man ₃	
 1621	single	GlcNAc ₇ Man ₃ Hex ₁	
 1663	single	GlcNAc ₄ Man ₃	
 1836	single	GlcNAc ₄ Man ₃ Fuc ₁	
 1866	single	GlcNAc ₄ Man ₃ Hex ₁	
 1907	single	GlcNAc ₅ Man ₃	

[0119] ● 甘露糖

[0120] ▲ 半乳糖

[0121] □ 海藻糖
















[0122] ◇ N- 乙酰葡萄糖胺

[0123] ◆ N- 乙酰神经氨酸

[0124] N- 乙二醇神经氨酸

[0125] 表 10. 通过 EMI-MS 测定的 CA215 样本 B 的 N- 连接多糖图谱

[0126]

Observed Mass {M-Na}	Charge state	Proposed Structure	Structure
 1047	double	GlcNAc ₄ Man ₃ Hex ₂	
 1084	double	GlcNAc ₄ Man ₃ Hex ₂ Fuc ₁	
 1169	double	GlcNAc ₃ Man ₃ Hex ₂	
 1228	double	GlcNAc ₄ Man ₃ Hex ₂ NeuAc ₁	
 1242	double	GlcNAc ₄ Man ₃ Hex ₂ NeuGc ₁	
 1345	double	GlcNAc ₄ Man ₃ Hex ₂ Fuc ₁ NeuAc ₁	
 1381	double	GlcNAc ₄ Man ₃ Hex ₂ Fuc ₁ NeuGc ₁	
 1366	double	GlcNAc ₃ Man ₃ Hex ₂ NeuGc ₁	
 1428	double	GlcNAc ₄ Man ₃ Hex ₂ NeuGc ₂	
 1525	double	GlcNAc ₄ Man ₃ Hex ₂ Fuc ₁ NeuGc ₂	
 1580	single	GlcNAc ₂ Man ₅	
 1663	single	GlcNAc ₄ Man ₃	
 1785	single	GlcNAc ₃ Man ₆	
 1837	single	GlcNAc ₄ Man ₃ Fuc ₁	
 1907	single	GlcNAc ₃ Man ₃	

[0127] ●甘露糖

[0128] ▲半乳糖

[0129] □海藻糖

[0130] ◇ N- 乙酰葡萄糖胺

[0131] ◆ N- 乙酰神经氨酸

[0132] N- 乙二醇神经氨酸

[0133] 一般来说，在人 IgG 和 RP215 中检测到的主要离子具有一个糖基化结构 (N/Z 1836)。虽然在 CA215 样本中也可检测到，但该信号并不像在人 IgG 和 RP215 中一样占主要地位。在所有样本中都检测到了岩藻糖化和唾液酸化的多糖。

[0134] 另外，测定了 O- 连结糖的比例，结果如表 11 所示。

[0135] 表 11. 通过 HPAEC 分析 O- 多糖的单糖成分

[0136]

样本名	分析物	(nmoles/ μ g)	摩尔百分数
人 IgG (Sigma)	海藻糖 (Fucose)	0.0702	4.1
	N-乙酰半乳糖胺 (N-acetyl-galactosamine)	0.3360	19.7
	N-乙酰葡萄糖胺 (N-acetyl-glucoseamine)	0.7958	46.8
	半乳糖 (Galactose)	0.3717	21.8
	葡萄糖 (Glucose)	ND	ND
	甘露糖 (Mannose)	ND	ND
	N-乙酰神经胺酸 (N-acetyl-Neuraminic acid)	0.1276	7.6
	N-乙二醇神经胺酸 (N-glycol-Neuraminic acid)	ND	ND
	总计	1.7013	100.0
RP215 单克隆抗体 070801A	海藻糖 (Fucose)	0.0692	6.2
	N-乙酰半乳糖胺 (N-acetyl-galactosamine)	0.2004	18.1
	N-乙酰葡萄糖胺 (N-acetyl-glucoseamine)	0.3569	32.2
	半乳糖 (Galactose)	0.3475	31.4
	葡萄糖 (Glucose)	ND	ND
	甘露糖 (Mannose)	ND	ND
	N-乙酰神经胺酸 (N-acetyl-Neuraminic acid)	0.0838	7.6
	N-乙二醇神经胺酸 (N-glycol-Neuraminic acid)	0.0501	4.5
	总计	1.1079	100.0
CA215 0700801-1	海藻糖 (Fucose)	0.0981	14.8
	N-乙酰半乳糖胺 (N-acetyl-galactosamine)	0.0961	14.5
	N-乙酰葡萄糖胺 (N-acetyl-glucoseamine)	0.1371	20.7
	半乳糖 (Galactose)	0.1473	22.3
	葡萄糖 (Glucose)	ND	ND
	甘露糖 (Mannose)	ND	ND
	N-乙酰神经胺酸 (N-acetyl-Neuraminic acid)	0.1320	20.0
	N-乙二醇神经胺酸 (N-glycol-Neuraminic acid)	0.0508	7.7

[0137]

	总计	0.6614	100.0
CA215 070801-4	海藻糖 (Fucose)	ND	ND
	N-乙酰半乳糖胺 (N-acetyl-galactosamine)	ND	ND
	N-乙酰葡萄糖胺 (N-acetyl-glucoseamine)	ND	ND
	半乳糖 (Galactose)	ND	ND
	葡萄糖 (Glucose)	ND	ND
	甘露糖 (Mannose)	ND	ND
	N-乙酰神经胺酸 (N-acetyl-Neuraminic acid)	0.3512	100.0
	N-乙二醇神经胺酸 (N-glycol-Neuraminic acid)	ND	ND
	总计	0.3512	100.0
CA215 070801-5	海藻糖 (Fucose)	ND	ND
	N-乙酰半乳糖胺 (N-acetyl-galactosamine)	0.4961	34.2
	N-乙酰葡萄糖胺 (N-acetyl-glucoseamine)	0.3506	24.2
	半乳糖 (Galactose)	0.3539	24.2
	葡萄糖 (Glucose)	ND	ND
	甘露糖 (Mannose)	ND	ND
	N-乙酰神经胺酸 (N-acetyl-Neuraminic acid)	0.2307	15.9
	N-乙二醇神经胺酸 (N-glycol-Neuraminic acid)	0.0198	1.3
	总计	1.4511	100.0

[0138] 实施例 4

[0139] 糖基抗原决定簇的定位

[0140] 应用免疫蛋白印迹实验方法证实, 该 RP215 特异性糖基相关的抗原决定簇位于癌细胞产生的 CA215 免疫球蛋白重链的 Fab 区。对一些免疫球蛋白重链的 CDR1、CDR2 和 CDR3 区进行氨基酸分析可以确定糖基化位点。具体比较参见表 12。

[0141] 表 12

Cell Lines or Tissues	Last 6 amino acid in FR1	CDR1	CDR2	CDR3	
T1TD	SRFSSR	TSGMR	PFWNGGSQKYCADSVT	GIIVPBPRLCPRN	IgG
ZR75-1	SGYSFT	SYWIG	IYPGDSDFRYSPSFQG	QBIVAFS	IgM
ZR75-1	SGFNEN	TYAMT	TLAADGTWTSNADFVRG	DWYDY	IgG
SKBR3	SGGSVS	SGYYYWS	YIYYNGSTYENPSLKS	DIKHTYGNP	IgG
SKBR3	SGLSFS	SSGMN	RIGSKAASDRTSYAASVRG	QGCGGDCHIPKM	IgA
MDA-MB-231	SGFTFS	SYWMD	RISPDGRTTTYADSVEG	GYLSSH	IgM
Lung Cancer	SGYTFG	TYWIG	IYPGDSDFRYSPSFQG	WDVMIGIYTA	
Dakki	SGFTFS	DYGMT	GITSSVLTYYADSVKG	AQGFAPPAS	
EM-9	SGFRFD	DYAMH	GISWNSDTIDYADSVKG	TKEGGVTDIDPFDI	
MC176	SGYRFT	GYYMH	RINPNSGGINYAQRFOG	TREDSGSYEY	
Daudi	SGYSIT	SYIHH	KTDNDGRDADYAQRFOG	VRENGQKCFDY	

[0143] 一个一致的与丝氨酸或苏氨酸连结的 O- 连结糖基化位点，总是位于靠近 FR1 与 CDR1 之间的连接部位，因此提示 RP215 特异性抗原决定簇与这一部位丝氨酸或苏氨酸的存在有关。如果缺乏 O- 连结糖基化位点则 RP215 将无法识别 CA215。

[0144] 实施例 5

[0145] RP215 的体内效能

[0146] 虽然将 RP215 单克隆抗体加入 OC-3-VGH 卵巢癌细胞培养液中对癌细胞生长没有影响，但是这些抗体有效地抑制了体内肿瘤的生长。在体外实验，将高达 200 μg/ml 浓度的人 IgG 或山羊抗人 IgG 加入细胞培养中也不会抑制细胞的生长。

[0147] 4 组裸鼠，分别在每只的近乳房部位经皮下植入 0.2ml, 2×10⁶ 细胞，生长周期为 2-3 周。当出现明显肿瘤后开始进行治疗。实验设计参见表 13。单克隆抗体的放射性标记具有为 12.5 μCi/mg 的特异放射性。

[0148] 表 13

[0149]

序号	分组	动物数量	剂量
1	阴性对照	4	培养液
2	阳性对照	4	环磷酰胺 (60mg/kg)
3	高剂量抗体 (裸露的)	4	RP215 单克隆抗体 (10mg/kg)
4	低剂量抗体 (裸露的)	4	RP215 单克隆抗体 (2mg/kg)
5	I ¹³¹ 标记抗体 (高剂量)	4	RP215 单克隆抗体 (10mg/kg + 125 μCi)
6	I ¹³¹ 标记抗体	4	RP215 单克隆抗体 (6mg/kg + 75 μCi)
7	I ¹³¹ 标记抗体	4	RP215 单克隆抗体 (2mg/kg + 25 μCi)

[0150] 小鼠在使用抗体治疗后的第 16 天杀死。通过重量测定每只小鼠肿瘤的大小，一并称量小鼠体重。结果如表 14 所示。

[0151] 表 14

[0152]

分组	小鼠编号	体重	肿瘤重量	肿瘤平均重量	%
阴性对照	1	22.23	0.148	0.13075	100
	2	22.51	0.133		
	3	23.16	0.104		
	4	21.14	0.138		
阳性对照 (环磷酰胺 (60mg/kg))	1	21.18	0.098	0.09575	73.2
	2	21.42	0.096		
	3	23.37	0.098		
	4	21.18	0.091		
高剂量抗体 (10mg/kg)	1	21.43	0.088	0.0865	66.2
	2	23.05	0.077		
	3	22.15	0.095		
	4	23.56	0.086		
低剂量抗体 (2 mg/kg)	1	21.76	0.103	0.10225	78.2
	2	20.57	0.122		
	3	21.98	0.080		
	4	22.64	0.104		
I ¹³¹ 标记抗体 (高剂量) (10mg/kg + 125 μ Ci)	1	20.26	0.034	0.4575	35
	2	25.71	0.075		
	3	20.25	0.048		
	4	22.6	0.026		
I ¹³¹ 标记抗体 (中等剂量) (6mg/kg + 75 μ Ci)	1	20.47	0.068	0.0705	53.9
	2	22.91	0.076		
	3	23.00	0.049		
	4	23.05	0.089		
I ¹³¹ 标记抗体 (低剂量) (2mg/kg + 25 μ Ci)	1	20.03	0.154	0.11675	89.2
	2	21.46	0.083		
	3	22.12	0.108		
	4	20.38	0.122		

[0153] 实验显示, 与用 60mg/kg 环磷酰胺作为阳性对照比较, 用未标记同位素的抗体剂量在 10mg/kg 时肿瘤明显缩小。同等剂量的 I¹³¹ 标记抗体使肿瘤缩小更明显。

[0154] 实施例 6

[0155] RP215 可变区的核苷酸序列

[0156] 为了人源化 RP215 以及作为基因突变的目标以获得具有更利于与 CA215 发生免疫反应的特性的抗体, 测定了编码 RP215 重链与轻链可变区的核苷酸序列, 如表 15 所示, 并包括由此推断的对应氨基酸序列。

[0157] 表 15.RP215 单克隆抗体可变区的核苷酸序列以及推断的氨基酸序列

[0158]

Region	Length (bp)	Nucleotide Sequence
H Chain Variable Region Signal Peptide	19 amino acids	1 atgagatggagatgatcatcctcttcttctggaagaaagctcagaggtgtcagctcc 57 N R W S C I I L F L V A T A T G V S S
H Chain Variable Region	112 amino acids	1 caggctcccaactgcaagcagcctggggctcagctctctgatgacctggg Q V C L C Q P S A E L V X P G 46 gcttcagtgcaagctgtctctgcaagcctctctggctacacattcaat A S V K M S C K A S G Y T V C 91 gactactggatgcaactgggtgcaagcagcctgggcaagcctt D Y W M H H M V K Q R P G Q L 136 gaggatcggagcagctgctacttctgatagttactactaggtac E K T G A T D T S D S Y T K Y 181 aatcaaaagttccaggacagggccacatgactgttagagcaatcc N C K F K D K A T L T V D E S 226 tccagcagcagccttccatgcagctcagcagcctgacatctgaggac S S T A F M Q L S S L T S E D 271 tctgggtctataactgctcagcagcctcctctctgactcagcctc S A V Y V C A R S I Y D W G Q 316 gggactctggtcactgtctctgca 339 G T L V T V S A
L Chain Variable Region -Signal Peptide	21 amino acids	1 atggatccacagaccaggtccctcatgttctctctgctctgggtc M E S Q T Q V L H F L L L W V 46 tctggctggtcctctgtgca 63 S G G A C A
L Chain Variable Region	112 amino acids	1 gacatctgtgatgacacagctctccatcctcctggctatgtcagta D I V M T C S P S S L A M S V 46 ggacagcaggctcactatgagctgcaagctccagtcagagcctttta G C K V T M S C K S R Q R L L 91 aatagtagcctatcacaagcctatcttggcctcgttaccagcagaaa N S S N Q K S Y L A W Y Q Q X 136 ccagcagcgtctctcttacttctcttataacttgcactccactagg P G Q S P K L L V Y F A S T R 181 gaatctggygtccctgctcagctcagcagcagcagcagcagcagc E S G V P C R P I E S G S S T 226 gatctcactcttccctcagcagcagcagcagcagcagcagcagc D F T L T I S S V Q A E D L A 271 gattactctctgcaagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc C Y F C Q Q H Y S T P S T F G 316 gggggcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc 339 G G T R L E I K

[0159] 利用这些信息，设计并生产出能与 CA215 发生免疫反应的其它形式的单克隆抗体，其中包括其人源化的形式。

[0160] 实施例 7

[0161] RP215 的人源化

[0162] 利用实施例 6 中的信息可以制备出人源化形式的 RP215 (hRP215)。

[0163] 此外，利用实施例 6 中所述的人的恒定区以及鼠源的可变区制造出了嵌合的 RP215 单克隆抗体 (chRP215)。

[0164] 获得 RP215、hRP215 和 chRP215 的纯化形式，并进行比较：

[0165] 分别以 5 μg/ml 抗体包被微孔反应盘过夜。在微孔反应盘中加入浓缩的

OC-3-VGH 细胞培养液 (以提供 CA215), 再加入辣根过氧化物酶标 RP215 抗体作为检测抗体。该检测抗体在每个微孔反应盘中在 37°C 下培养 60 分钟。30 分钟后加入 TMB 基质显色 20 分钟, 最后终止反应。用 ELISA 酶标仪在 450nm 下测定强度。在几个实验中, 向微孔反应盘中加入了 10 μ g/ml 人 IgG, 但对于信号强度没有明显影响。具体结果见表 16。

[0166] 表 16

[0167]

包被抗体	酶联免疫夹心试验	酶联免疫夹心试验
	相对信号强度 未加人 IgG	相对信号强度 加人 IgG (10 μ g/ml)
RP215	100%	100%
hRP215	20.6%	21.4%
chRP215	14.5%	15.4%

[0168] 结果显示, 虽然 hRP215 与 chRP215 表现为较低的亲和结合力, 但依然能够与 CA215 发生特异性结合, 且不受人 IgG 的影响。

[0169] 另一个实验中, RP215 包被的微孔反应盘与碱性磷酸酶标记的山羊抗人 IgG 或该抗体的 Fab 或 Fc 段不发生结合。然而 RP215 与山羊抗小鼠 IgG 表现出强的结合。

[0170] hRP215 几乎不与山羊抗小鼠 IgG 结合, 但与山羊抗人 IgG 结合很强, 结果与 chRP215 相似。

[0171] 结果如表 17 所示。

[0172] 表 17

[0173]

检测抗体	微孔反应盘中的包被抗体			
	RP215	hRP215	chRP215	hIgG
山羊抗小鼠 IgG	100%	~ 5%	~ 7%	~ 3%
山羊抗人 IgG	< 5%	100%	~ 10%	70%
山羊抗人 IgFc	< 5%	150%	45%	100%
山羊抗人 IgFab	< 1%	70%	10%	40%

[0174] a: 为了对比, 山羊抗小鼠 IgG 以及山羊抗人 IgG 的信号强度被调节至 100%

[0175] 如表 17 所示, 微孔反应盘分别被 RP215、hRP215、chRP215 和人 IgG 包被。在第一行中, 将 RP215 的与山羊抗小鼠 IgG 之间的反应结果标准化为 100%, 如第一行所示, 山羊抗小鼠 IgG 与人源化或嵌合形式的 RP215 结合较弱。

[0176] 如第二行所示, 当用山羊抗人 IgG 作为检测抗体时, 并且将人源化 RP215 定为

100%，其与人 IgG 结合较弱，与嵌合 RP215 或鼠源 RP215 结合很差。

[0177] 如第三行所示，当用山羊抗人 IgFc 作为检测抗体时，其与人源化 RP215 或人 IgG 强烈结合，但与嵌合 RP215 结合较弱，与 RP215 本身几乎不结合。

[0178] 如第四行所示，当用山羊抗人 Ig Fab 作为检测抗体时，检测到其与人源化 RP215 强烈结合，与人 IgG 结合相对较弱，同预想中一样，其与嵌合 RP215 或 RP215 结合很弱。

[0179] 据此得出结论：

[0180] (1) 与人 IgG 同山羊抗小鼠 IgG 之间的交叉反应活性类似，hRP215 以及 chRP215 与山羊抗小鼠 IgG 之间的交叉反应活性很低。

[0181] (2) 与人 IgG 同山羊抗人 IgFc 之间的交叉反应活性类似，hRP215 以及 chRP215 两者都与山羊抗人 IgFc 具有较高的结合活性，相较之下鼠源 RP125 与山羊抗人 IgFc 结合很弱。相反，嵌合 RP215 与山羊抗人 IgFab 结合活性很弱。

[0182] 这些结果证明人源化抗体保留了与 CA215 抗原结合的特性和人源的特征，避免了鼠源的特征。

[0183] 实施例 8

[0184] 分析癌细胞株是否存在 CA215

[0185] 应用免疫蛋白印迹实验及夹心酶联免疫试验，对来自美国生物制品存储中心和其他来源的 30 多种癌细胞株，测试其是否存在 RP215 特异性抗原决定簇。以下列举的这些癌细胞株的细胞提取物或培养液中存在 RP215 相关的抗原决定簇 ($\geq 90\%$)。

[0186] 乳腺癌细胞株：

[0187] MCF7 (HTB-22)，MDA-MB-231 (HTB-26)，MDA-MB-468 (HTB-132)，MDA-435，T-47D (HTB-133)

[0188] 子宫颈癌细胞株：

[0189] C-33A (HTB-31)，ME-180 (HTB-33)

[0190] 结肠癌细胞株：

[0191] HCT 115 (ABM)，HCT 116 (CCL-247)，HT29 (HTB-38)，SW-48 (CCL-231)

[0192] 肝癌细胞株：

[0193] Hep3B (HB-8064)，HepG2 (HB-8065)，Hep-2 (CCL-23)

[0194] 肾癌细胞株：

[0195] 293 (UBC)

[0196] 肺癌细胞株：

[0197] A549 (CCL-185)，Calu-6 (HTB-56)，H441 (HTB-174)，MRC-5 (CCL-171)，WI-38 (CCL-75)

[0198] 淋巴癌：

[0199] HEL (ABM)

[0200] 黑色素瘤：

[0201] MMAN，MMRU，SK-Mel-3 (HTB-69)

[0202] 神经母细胞瘤：

[0203] SH-SY5Y (CRL-226)，Neuro (CCL-131)

- [0204] 骨癌细胞株：
- [0205] U-20S (HTB-96)
- [0206] 卵巢癌细胞株：
- [0207] Skov-3 (HTB-77)， OC-3-VGH (Taiwan)
- [0208] 前列腺癌细胞株：
- [0209] DU145 (HTB-81)， PC-3 (CRL-1435)
- [0210] 然而在一些癌细胞株中不能轻易地证明存在 RP215 特异性抗原决定簇，如：SiHa (HTB-35， 子宫颈癌)， JEG-3 (HTB-36， 胎盘) and Jurkat (TIB-152， T-cell 淋巴瘤)。

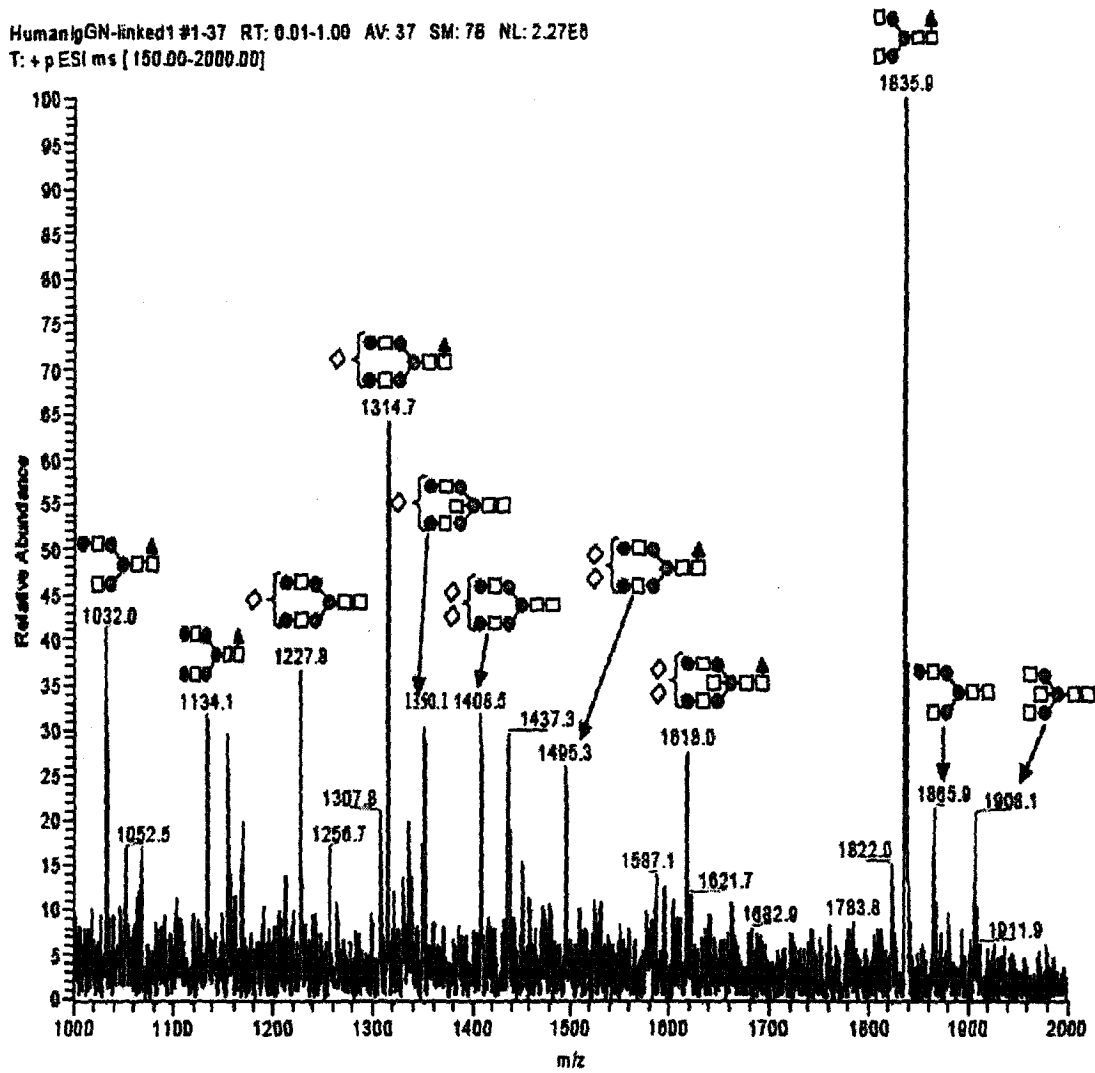


图 1. 来源于人 IgG 的 N-连接多糖的完整 ESI-MS 谱

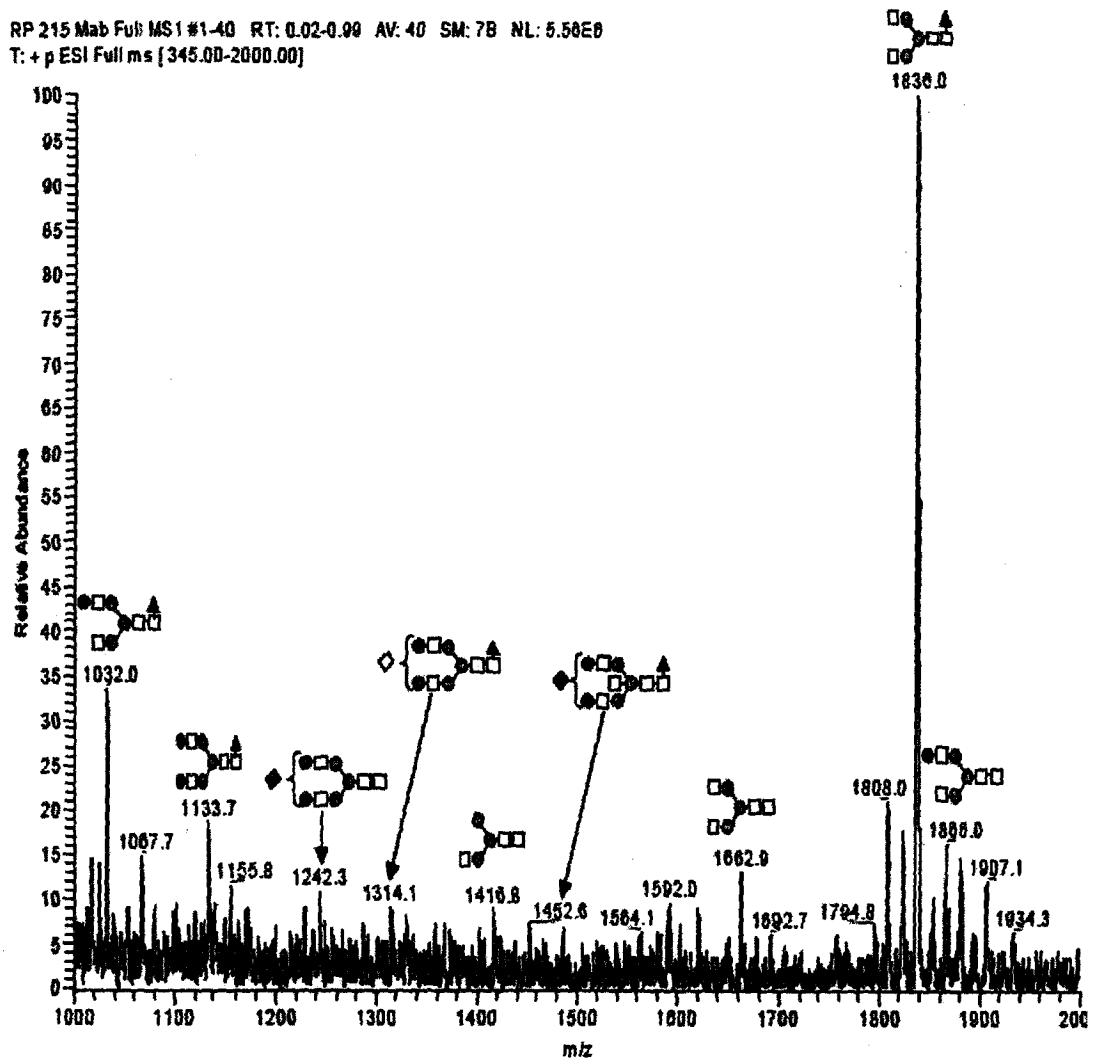


图 2. 来源于 RP215 单克隆抗体的 N- 连接多糖的完整 ESI-MS 谱

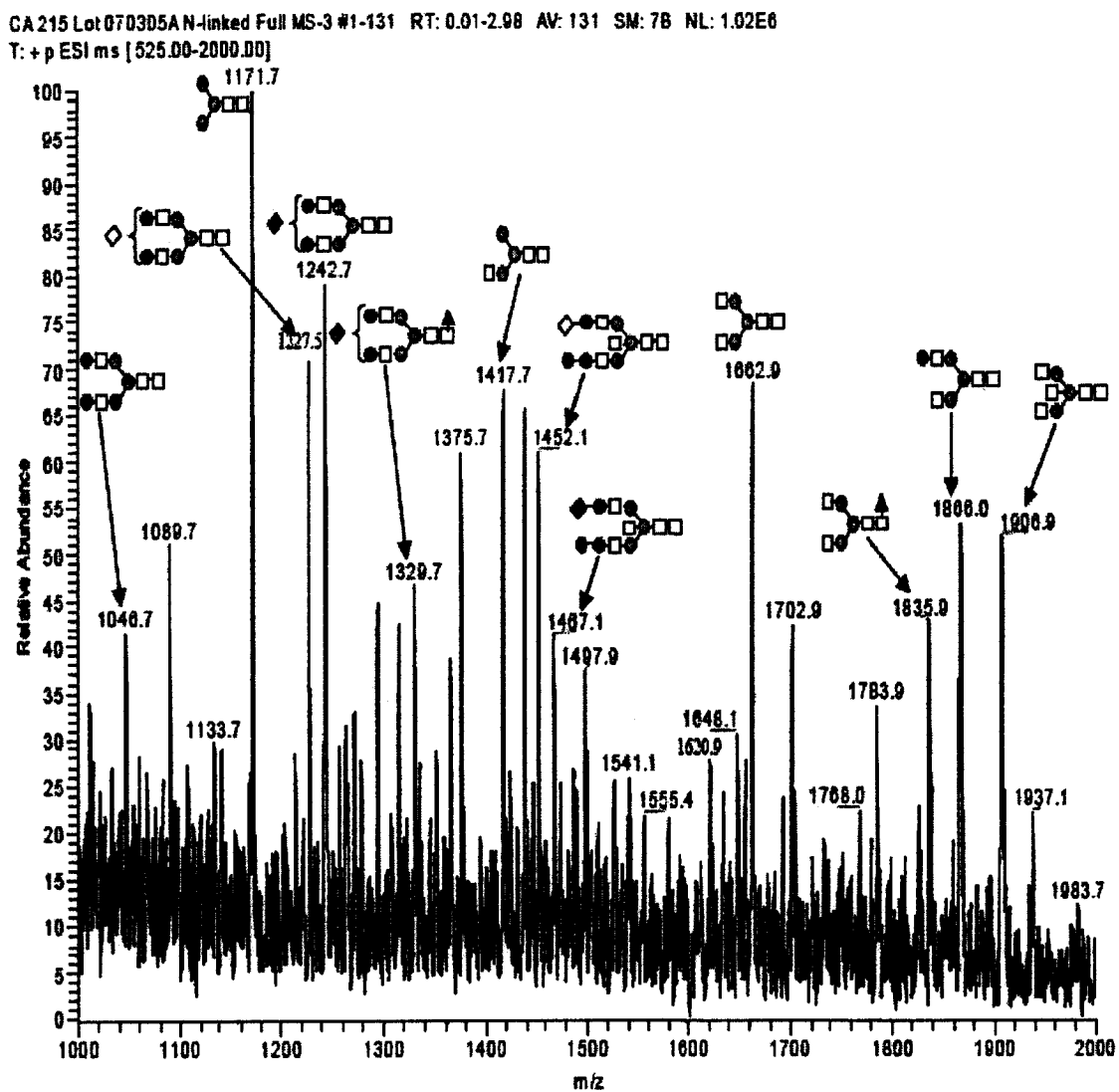


图 3. 来源于 CA215 样本的 N- 连接多糖的完整 ESI-MS 谱

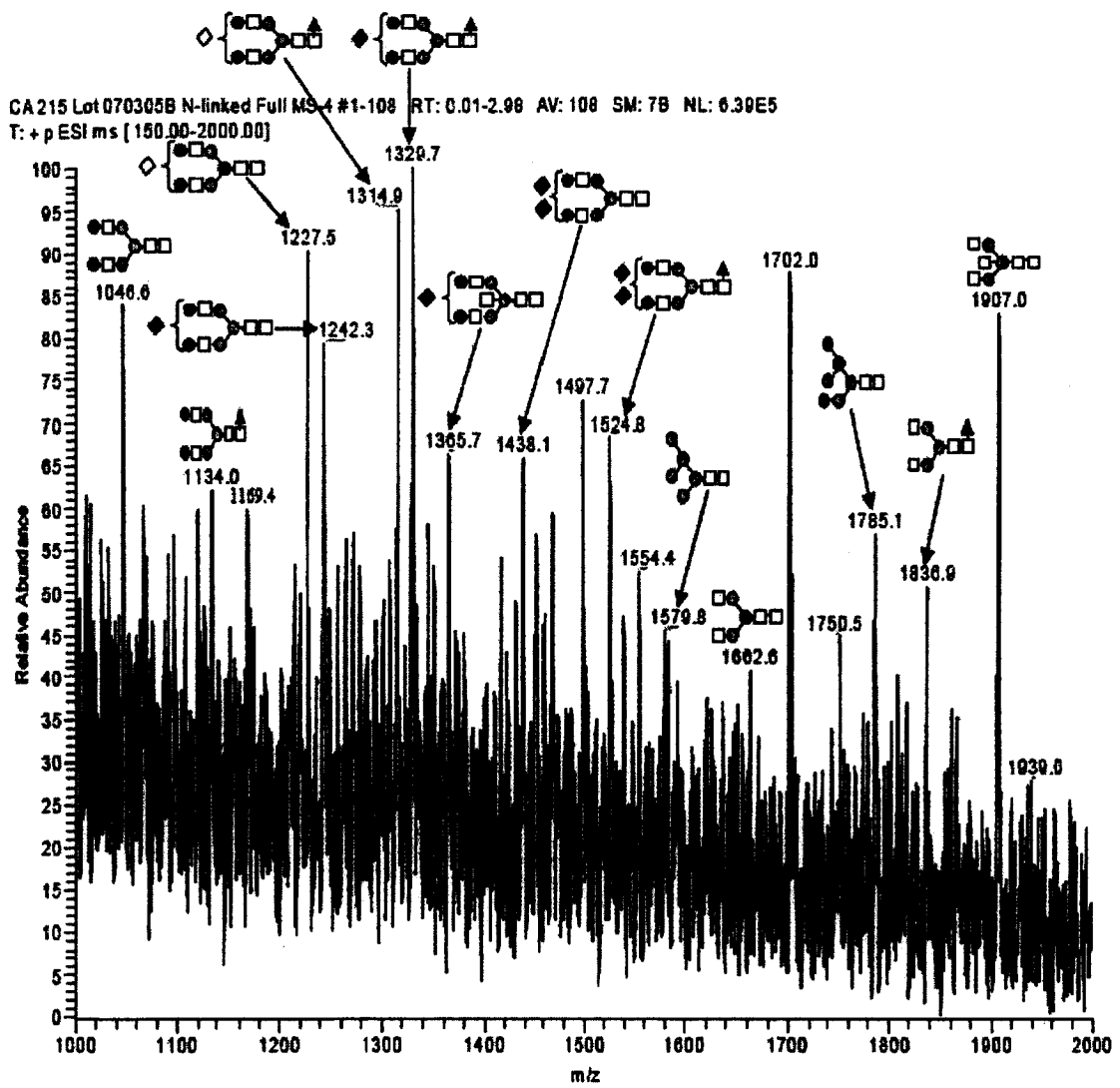


图 4. 来源于 CA215 样本的 N- 连接多糖的完整 ESI-MS 谱

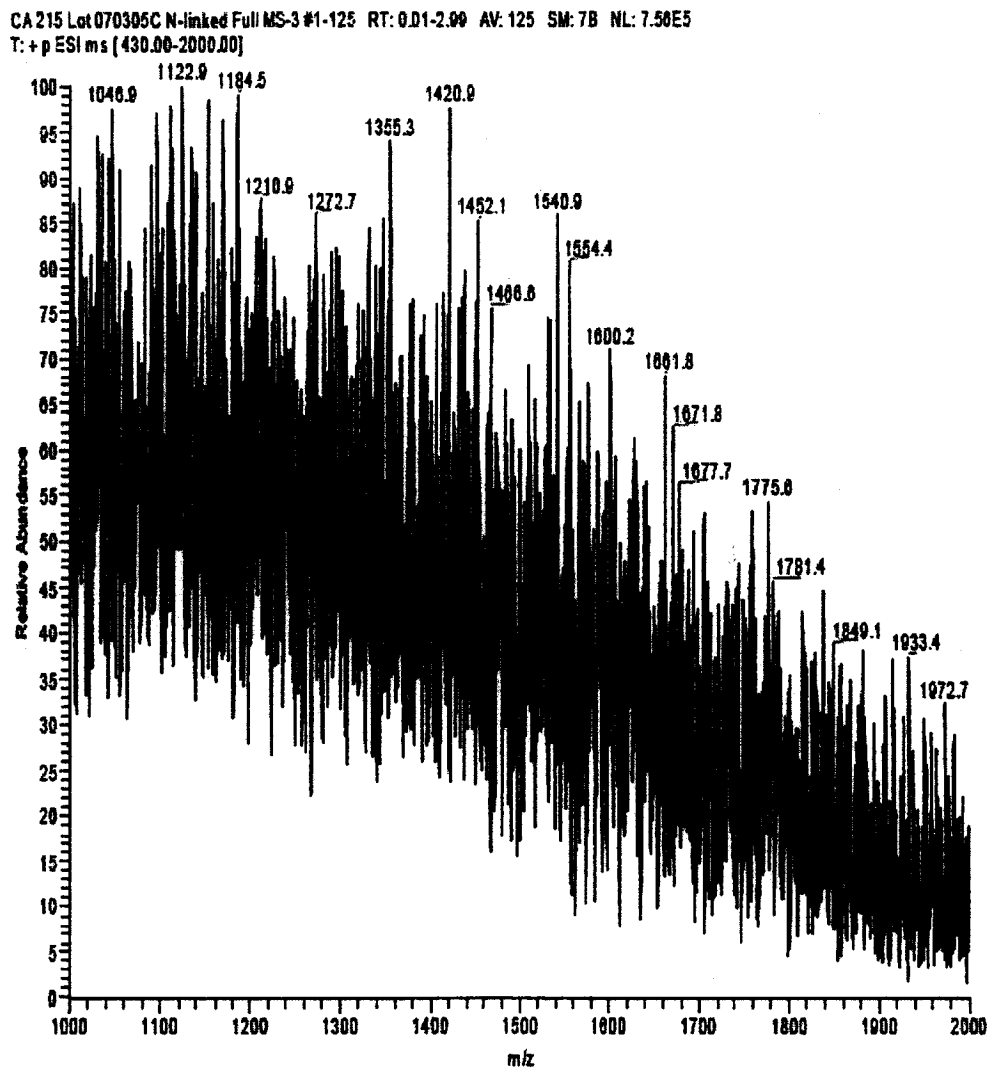


图 5. 来源于 CA215 样本的 N- 连接多糖的完整 ESI-MS 谱

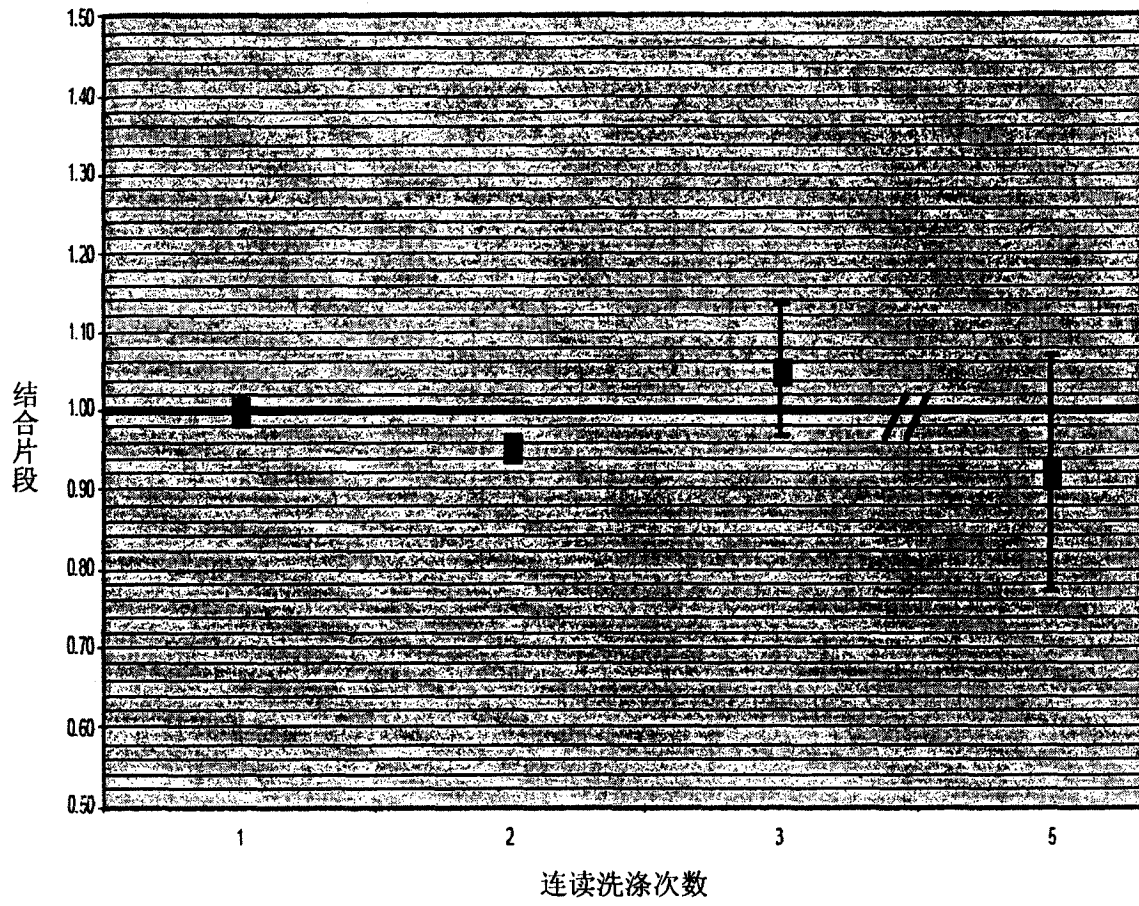


图 6

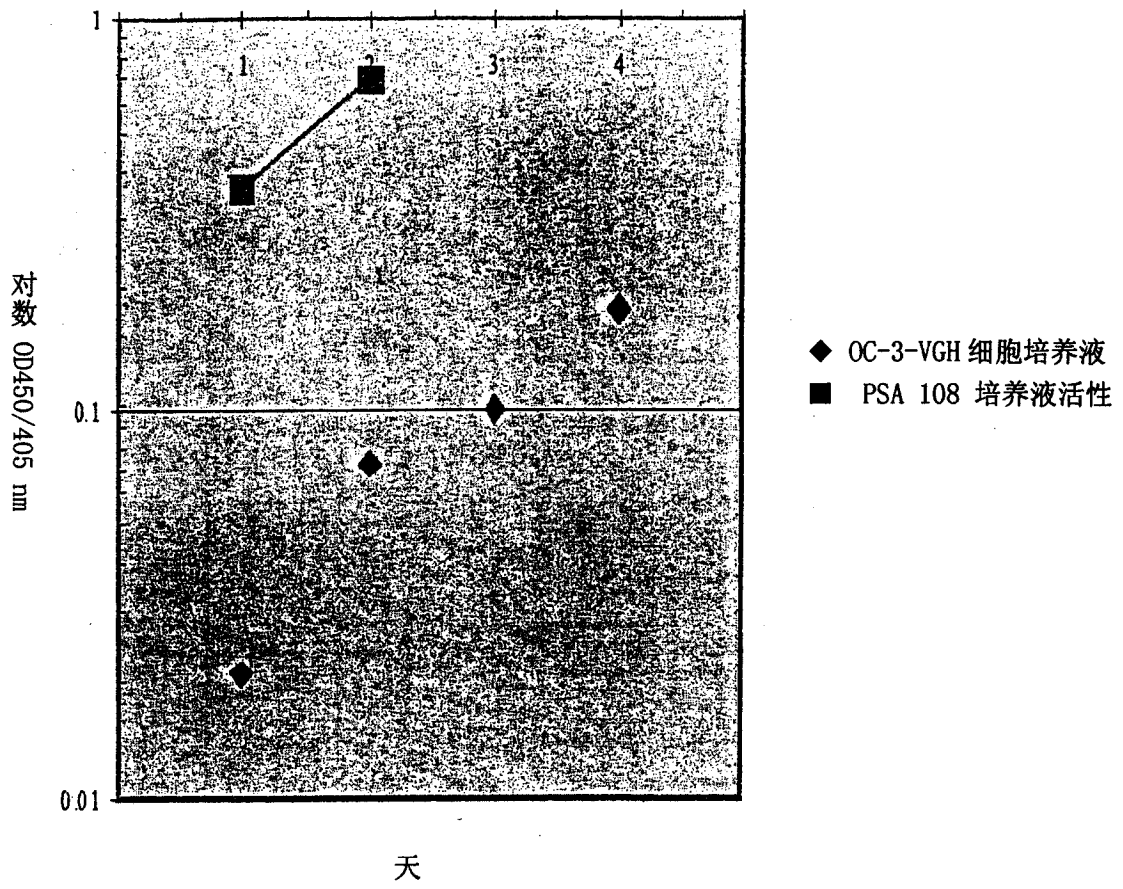


图 7