

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
A61K 39/00
A61K 39/385 C07K 7/00
C07K 14/705 C07K 14/72



[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 98805055.2

[45] 授权公告日 2004 年 10 月 13 日 [11] 授权公告号 CN 1170593C

[22] 申请日 1998.5.12 [21] 申请号 98805055.2
[30] 优先权
[32] 1997.5.12 [33] US [31] 60/046,201
[86] 国际申请 PCT/US1998/009957 1998.5.12
[87] 国际公布 WO1998/051337 英 1998.11.19
[85] 进入国家阶段日期 1999.11.12
[71] 专利权人 埃弗顿有限公司
地址 美国加利福尼亚州
[72] 发明人 D·米凯利 M·卡普林
S·A·沃森 S·格兰姆斯
审查员 赵 超

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所
代理人 陈文青

权利要求书 1 页 说明书 26 页 附图 16 页

[54] 发明名称 缩胆囊素 - B/胃泌素受体的免疫原性组合物以及治疗肿瘤的方法

[57] 摘要

本发明涉及用于治疗胃泌素依赖性肿瘤的免疫原、免疫原性组合物以及方法。免疫原包含与间隔臂以及免疫原性载体偶联的来自 CCK - B/胃泌素受体的肽。免疫原能在体内诱导出抗体，该抗体与肿瘤细胞中的 CCK - B/胃泌素受体结合，从而阻止刺激生长的肽激素与受体结合，并抑制了肿瘤细胞生长。免疫原还包含用于被动免疫的针对 CCK - B/胃泌素受体的抗体。本发明还涉及用本发明抗体来检测在体内或来自组织活检的胃泌素依赖性肿瘤的诊断方法。

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

-
1. 一种免疫原，它包含通过间隔臂肽与免疫原性载体偶联的来自人 CCK-B/胃泌素受体的肽，其中肽具有 序列表中 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列。
- 5 2. 根据权利要求 1 所述的免疫原，其中间隔臂肽具有 序列表中 SEQ ID NO: 3 所示的序列。
3. 根据权利要求 1 或 2 所述的免疫原，其中免疫原性载体选自白喉类毒素、破伤风类毒素和牛血清白蛋白。
4. 一种抗 CCK-B/胃泌素受体组合物，它包含针对 SEQ ID NO:1 所示的肽的
- 10 抗体和药学上可接受的载体。
5. 根据权利要求 4 所述的组合物，其中抗体与一受体结合，该受体具有 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列。
6. 根据权利要求 4 所述的组合物，其中抗体是嵌合的或人源化的。
7. 一种药物组合物，它包含治疗有效量的权利要求 1 所述的免疫原和药学
- 15 上可接受的载体。
8. 根据权利要求 7 所述的组合物，其中受体与胃泌素依赖型肿瘤相关。

缩胆囊素-B/胃泌素受体的免疫原性组合物以及治疗肿瘤的方法

5

发明背景

激素胃泌素通过其 5'羧基末端的氨基酸与胃泌素/缩胆囊素(CCK)-B 受体以高亲和力结合。 CCK-B/胃泌素受体是一种细胞质膜蛋白, 它通过 G 蛋白与细胞内信号转导通道相连, 进而再来控制各种基因的表达。

胃泌素是一种肽激素, 其以两种形式存在, 三十四胃泌素(G34)和十七胃泌素(G17), 由位于胃窦处的专一化细胞 G 细胞合成和分泌。激素分泌到循环血液中并与胃中的特异性细胞(即间接或直接影响胃酸产生的肠嗜铬样(ECL)细胞和壁细胞)结合。在组织学上, 已将胃泌素激素与胃酸分泌的刺激相关联(Edkins, J.S. 1905)。(本文引用的全部文献的全部引证见权利要求前的参考文献部分。)在最近几年, 越来越多的证据表明, 胃泌素可能在肠胃肠道内作为一种营养因子(Johnson, L. 1997)起作用, 且它会促进肠胃肠道癌(Watson 等人, 1989, Dickinson, C.J. 1995)以及非肠胃肠道癌(包括小细胞肺癌)(Rehfeld 等人, 1989)的生长。在胃泌素的翻译后加工时, 它是“成熟的”羧基酰胺化形式, 其通过羧基末端结合胃泌素/CCK-B 受体(Kopin 等人, 1992)。

已经表明, 几种肿瘤(例如结肠直肠、胃、胰和肝细胞腺癌)在其质膜上具有 CCK-B/胃泌素受体, 并且以高度细胞增殖对胃泌素反应(Rehfeld, J.F. 1972, Upp 等人, 1989 和 Watson 等人, 1993)。另外, 更近时期, 发现这些癌细胞有许多也分泌胃泌素, 因此影响了自主增殖通道(Van-Solinge 等人, 1993, Nemeth 等人, 1993 和 Seva 等人, 1994)。

CCK-B/胃泌素受体属于 G 蛋白偶联受体家族, 具有 7 个跨膜结构域, 对 CCK 和胃泌素的亲和力相同(Soll 等人, 1984)。该受体命名为 CCK-B 型受体, 因为它主要见于脑中(Wank 等人, 1992)。随后发现该受体与胃壁细胞和 ECL 细胞中的外周 CCK/胃泌素受体相同(Nakata 等人, 1992)。已经在许多正常组织(Fourmy 等人, 1984, Grider 等人, 1990)和肿瘤组织(Singh 等人, 1990, Watson 等人, 1993)中明确鉴定出该受体, 并用大鼠胰腺癌细胞系 AR42J 作了深入的研究(Scemama 等人, 1987)。AR42J CCK-B/胃泌素受体的 cDNA 已经被克隆和测序, 其与大鼠和人脑中的 CCK-B/胃泌素受体的 DNA 序列同源性大于 90%, 与犬壁细胞 CCK-B/胃泌素受体 cDNA 的序列同源性大于 84%(Wank, S.A. 1995), 这证明即使在物种之间

的序列同源性也很高。

肽激素 G17 和 G34 结合正常细胞细胞膜上的 CCK-B/胃泌素受体。然而, 已经发现, G17(不是 G34)刺激了胃泌素依赖性癌细胞的生长。尤其是血清伴随的 G17, 它具有以受肿瘤细胞中 CCK-B/胃泌素受体介导的内分泌方式(Watson 等人, 1993)刺激结肠直肠癌生长的潜在能力。胃泌素-17 看来特别涉及刺激结肠直肠癌的生长, 这可能是由于它对肿瘤细胞上的 CCK-B/胃泌素受体的亲和力高于其它胃泌素激素种类(Rehfeld 1972 和 1993)。发现 CCK-B/胃泌素受体在 56.7%的人原代结肠直肠癌上以高亲和力形式表达(Upp 等人, 1989)。已经假设由于这些肿瘤内源性产生胃泌素前体肽, 可能也存在潜在的自分泌环(Van-Solinge 等人, 1993 和 Nemeth 等人, 1993)。所得 G17 配体/受体复合物通过调节细胞功能的第二信使刺激细胞生长(Ullrich 等人, 1990)。G17 和 CCK-B/胃泌素受体的结合导致激活磷脂酰肌醇分解、激活蛋白激酶 C, 从而导致细胞内钙离子浓度增加和通过促分裂素激活蛋白激酶诱导 c-fos 和 c-jun 基因(这已经涉及细胞增殖的调节)(Tadisco 等人, 1995)。另外, 胃泌素与 CCK-B/胃泌素受体的结合还伴随了随后酪氨酸激酶 pp125FADK(粘着斑激酶, 它在促有丝分裂信号传递中也起作用)的磷酸化增加(Tanaguchi 等人, 1994)。

在许多实验性肠胃癌中, 已经从体外和体内治疗上评价了许多高亲和力 CCK-B/胃泌素受体拮抗剂。例如, 丙谷胺, 一种谷氨酸衍生物(Seva 等人, 1990; Harrison 等人, 1990 和 Watson 等人, 1991a); 苯唑普(Benzotript), 一种色氨酸的 N 酰基衍生物; L-365,260, 一种阿斯普西林(Aspercillin)的衍生物(Bock 等人, 1989), 以及 CI-988, 一种模拟 CCK C 端五肽序列的分子(Hughes 等人, 1990), 这些分子已表明可有效中和外源性胃泌素对体外和体内肠胃肿瘤生长的作用(Watson 等人 and Romani 等人, 1994)。然而, 这些拮抗剂有严重的毒副作用, 并缺乏特异性, 因为它们封闭正常细胞中受体(如 G34 和 CCK)的所有潜在配体的作用。最近, 还描述了高效选择性 CCKB/胃泌素受体拮抗剂如 YM022(Yuki 等人, 1997)和 YF476(Takinami 等人, 1997)。

丙谷胺和苯唑普已经在临床前研究中作了广泛评价。这些化合物的主要问题是它们缺乏潜力, 代替 G17 所需的浓度相对较高(Watson 等人, 1992a; Watson 等人, 1992b)。尽管如此, 丙谷胺和苯唑普还是抑制了许多细胞系的基础性增殖和胃泌素刺激的增殖(Seva 等人, 1990; Watson 等人, 1991a)。另外, 丙谷胺还增加了携带胃泌素敏感性小鼠结肠肿瘤 MC26 的异种移植小鼠的存活, 从对照动物的 25 天到受治疗动物的 39 天。

由于此类针对胃泌素/CCKB 受体的胃泌素拮抗剂的特异性很低, 因此, 用胃泌素拮抗剂可能不能有效地控制肿瘤生长的抑制。另外, 识别并结合胃泌素的细胞受体并不结合所有的测试抑制物(Seva 等人, 1994)。因此, 如果在自分泌生长级联反应中不能完全抑制胃泌素与受体的结合, 那么胃泌素拮抗剂可能就不能阻断促进肿瘤生长的这一机制。

发明概述

本发明提供治疗胃泌素依赖性肿瘤的免疫原性组合物和免疫方法。该方法包括用抗 CCK-B/胃泌素受体免疫原或抗 CCK-B/胃泌素受体抗体主动或被动免疫患者。该免疫原产生的抗体对肿瘤细胞上的 CCK-B/胃泌素受体有特异性, 并且阻断了胃泌素对受体的生长促进效应。该抗体阻止了肽激素与胃泌素依赖性肿瘤细胞上的 CCK-B/胃泌素受体的结合; 因此, 肿瘤生长停滞。另外, 令人惊奇的是, 对该受体 NH₂-末端有特异性的抗体在结合受体时被内化并迅速转座到肿瘤细胞的细胞质中和细胞核中。该内化作用可发生于早至细胞接触抗体后 10 秒时。抗体/受体复合物的迅速内化接着引起受影响的肿瘤细胞经历凋亡或自杀。

本发明的免疫原包含从人 CCK-B/胃泌素受体衍生获得的天然的或合成的肽, 作为免疫原的免疫模拟(immunomimic)部分。此免疫原还可包含与免疫模拟肽一个末端相连的间隔臂肽序列。免疫原还可与蛋白载体, 如白喉类毒素、破伤风类毒素、牛血清白蛋白等偶联。

在一个实例中, 针对 CCK-B/胃泌素受体的免疫接种方法包括主动免疫, 其中用本发明的免疫原免疫患者。该免疫原刺激产生针对肿瘤细胞上 CCK-B/胃泌素受体的抗体。

抗 CCK-B/胃泌素受体免疫原产生的抗体结合肿瘤细胞上的 CCK-B/胃泌素受体并有效地阻止肽激素与受体结合, 从而抑制了肿瘤细胞分裂的自分泌生长刺激通道, 并最终抑制了肿瘤的生长。

在本发明的另一个实例中, 治疗方法包括被动免疫, 其中给予患者足够浓度的针对 CCK-B/胃泌素受体的抗体, 以结合肿瘤细胞的 CCK-B/胃泌素受体, 抗体阻断了肽激素与受体的结合。激素与其受体结合的受阻抑制了肿瘤细胞的生长刺激通道, 从而抑制了激素依赖性肿瘤的生长。在本发明该方面的一个较佳实例中, 人治疗的抗体可以用本领域熟知的方法产生的嵌合的、人源化的或人单克隆抗体。另外, 该抗 CCK-B/胃泌素受体抗体还可与细胞毒性分子(如霍乱毒素)、或标记了放射性核素(如 ¹²⁵I 和 ¹³¹I)的放射活性分子偶联, 以增强杀死肿瘤细胞的

作用。

本发明还提供了一种诊断胃泌素肿瘤反应性的方法，该方法包括用本发明的抗体通过免疫化学方法检测组织活检中的胃泌素依赖性(含有 CCK-B/胃泌素)肿瘤。本发明的特异性抗 CCK-B/胃泌素受体抗体可用于检测系统，用诸如生物素、辣根过氧化物酶和荧光素等化合物标记，通过标准免疫化学程序来检测肿瘤组织中的 CCK-B/胃泌素受体。

本发明还提供了诊断胃泌素依赖性肿瘤的方法，该方法包括用抗 CCK-B/胃泌素受体抗体在体内检测胃泌素依赖性(含有 CCK-B/胃泌素受体)肿瘤。该方法包括，通过静脉注射给予患有结肠直肠肿瘤的患者有效剂量的放射性标记的抗 CCK-B/胃泌素受体抗体，用标准闪烁扫描方法显影或检测细胞膜结合有抗 CCK-B/胃泌素受体抗体的肿瘤细胞。在本发明的这一方面，抗 CCK-B/胃泌素受体抗体应用放射性核素如 ^{111}In 、 ^{90}Y 和 ^{131}I 标记。

具体而言，本发明提供了一种免疫原，它包含通过间隔臂肽与免疫原性载体偶联的来自人 CCK-B/胃泌素受体的肽，其中肽具有序列表中 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列。

本发明另一方面提供了一种抗 CCK-B/胃泌素受体组合物，它包含针对 SEQ ID NO:1 所示的肽的抗体和药学上可接受的载体。

本发明还有一个方面提供了一种药物组合物，它包含治疗有效量的上述免疫原和药学上可接受的载体。

附图简述

图 1A 和 1B 描述了 CCK-B/胃泌素受体及其 7 个跨膜结构域的示意图。

图 2 显示了用针对 CCK-B/胃泌素受体肽 1 的免疫原免疫家兔所产生的抗体的 ELISA 试验数据。

图 3 显示了用针对 CCK-B/胃泌素受体肽 4 的免疫原免疫的家兔所产生的抗体的 ELISA 试验数据。

图 4 显示了抑制性 ELISA 试验获得的数据，该试验用来评价所产生的针对 GRP1-DT 免疫原的亲合纯化抗体的特异性。

图 5 的条状图显示了 ^{125}I -人 G17 与 AR42J 细胞的结合受肽抑制剂抑制的数据。

图 6 的条状图是免疫金标记的 AR4- $^{\circ}\text{C}$ J 肿瘤细胞的细胞内含颗粒分布。

图 7 是用针对肽 1 的抗体对腺癌细胞核膜的蛋白抽提物进行 Western 印迹分

析的照片。

图 8 是用针对肽 1 的抗体对腺癌细胞的核外和质膜蛋白抽提物进行 Western 印迹分析的照片。

图 9 的点状图描述对照以及抗 CCK-B/胃泌素受体处理过的动物的 C170HM2 5 肿瘤重量。

图 10 的点状图描述对照和抗 CCK-B/胃泌素受体处理过的动物的 C170HM2 肿瘤的横截面积。

图 11 的条状图显示对照和抗 CCK-B/胃泌素受体处理过的动物的 C170HM2 肿瘤平均重量。

图 12 的条状图显示对照和抗 CCK-B/胃泌素受体处理过的动物的 C170HM2 肿瘤的平均横截面积。

5 图 13 的条状图显示对照和抗 CCK-B/胃泌素受体处理过的动物体内 C170HM2 肿瘤平均数。

图 14 的条状图显示对照和抗 CCK-B/胃泌素受体处理过的动物中 C170HM2 肝转移肿瘤重量的中值。

10 图 15 的条状图显示对照和抗 CCK-B/胃泌素受体处理过的动物中 C170HM2 肿瘤的横截面积的中值。

图 16 的条状图显示对照和抗 CCK-B/胃泌素受体处理过的动物中 C170HM2 肿瘤数目的中值。

图 17 的条状图显示对照和抗 CCK-B/胃泌素受体处理过的动物中肝 C170HM2 肿瘤数目的平均值和中值。

15 图 18 的条状图显示对照和抗 CCK-B/胃泌素受体处理过的动物中肝 C170HM2 肿瘤重量的平均值和中值。

图 19 的条状图显示对照和抗 CCK-B/胃泌素受体处理过的动物中 C170HM2 肝肿瘤转移的横截面积的平均值和中值。

20 图 20 显示了对照(正常家兔血清)和抗 GRP1 处理过的裸鼠 C170HM2 肝肿瘤异种移植中放射性标记 ^{125}I 抗体的浓度。

图 21 的条状图显示对照和抗 GRP1 处理过的裸鼠每个异种移植肝的 C170HM2 肝肿瘤数平均值。

图 22 的条状图显示了对照和抗 GRP1 处理过的裸鼠的肝异种移植物的 C170HM2 肝肿瘤重量的平均值。

25 图 23 显示了对照和抗 GRP1 处理过的裸鼠的 C170HM2 肝肿瘤异种移植蛋白的 Western 印迹。

图 24 是用光学显微镜摄下的组织切片的照片，照片显示了对照小鼠 C170HM2 肝异种移植物的苏木精/伊红染色的切片。

30 图 25 是光学显微镜摄下的组织切片的照片，照片显示了经家兔抗 GRP1 抗体处理过的小鼠 C170HM2 肝异种移植植物经苏木精/伊红染色的切片。

发明详述

本发明的方法涉及治疗动物(包括人)胃泌素激素依赖性肿瘤, 并包括给予患者抗 CCK-B/胃泌素受体免疫原, 免疫原在受免疫患者体内产生抗体与肿瘤细胞上的 CCK-B/胃泌素受体结合, 从而防止激素与受体结合, 以便抑制激素的促进生长效应。更重要的是, 从临床角度来看, 受体/抗 GRP1 复合物迅速内化, 横穿细胞质进入细胞核。这表现为触发了受影响细胞的自杀(凋亡)。

免疫原包含人 CCK-B/胃泌素受体的天然或合成的肽作为免疫模拟物。特别是, 已经开发出两种合成的肽作为免疫模拟物。这些肽从 CCK-B/胃泌素受体的氨基酸序列开发出来, 有免疫原性, 能在体内和体外与肿瘤细胞的内源性 CCK-B/胃泌素受体交叉反应。肽 1 由 CCK-B/胃泌素受体序列的氨基酸 5-21 组成: KLNRS VQGTGP GPGASL(肽 1, 序列表中 SEQ ID NO: 1)。肽 1 组成了受体的氨基端, 其位于细胞膜的胞外表面上(见图 1)。

在另一个实例中, 免疫原包括肽 4, 其由 CCK-B/胃泌素受体的下列氨基酸序列组成: GPGAH RALSG APISF(肽 4, 序列表中 SEQ ID NO: 2)。肽 4 是受体的第 4 个胞外结构域的一部分, 它也在质膜的外侧(见图 1)。

免疫原还可包含延伸肽或间隔臂(spacer)肽以使免疫模拟性肽突出于蛋白载体上并增强其与淋巴细胞受体结合的能力。合适的间隔臂肽序列是氨基酸序列 SSPPPPC(丝氨酸(Ser)间隔臂, 序列表中 SEQ ID NO: 3)。然而, 其它间隔臂肽也同样适用。然后, 使免疫模拟性肽(有或没有间隔臂)通过羧基端的半胱氨酸残基与蛋白载体(如白喉类毒素)偶联。间隔臂肽在免疫学上与 CCK-B/胃泌素受体衍生的肽无关, 且因此应能增强而非决定受体衍生肽的特异性免疫原性。

患者体内肿瘤细胞的 CCK-B/胃泌素受体的存在和密度可通过使标记的抗受体抗体与肿瘤活检样品获得的样品反应来测定。抗受体抗体可用放射活性示踪物、染料或荧光标记物作标记。另外, 可用标准技术从患者的肿瘤活检样品来体外评价肿瘤细胞对胃泌素的反应性。肿瘤活检样品经 CCK-B/胃泌素受体抗体试验呈阳性的患者是用本发明方法治疗的典型候选者。

将有效剂量范围为 0.001-2 毫克的免疫原性组合物给予患者来治疗肠胃癌症。免疫原性组合物的有效剂量应能在免疫后 1-3 个月在患者体内引发免疫应答, 该免疫应答包括产生针对 CCK-B/胃泌素受体的有效水平的抗体滴度。在对患者免疫后, 用标准临床程序(如超声和磁共振显象(MRI))监控免疫原的有效性, 以检测肿瘤的存在和大小。针对受体的抗体滴度水平还可从取自患者的血样来监测。加强免疫应按需给予, 以维持有效的抗体滴度。胃泌素依赖性癌症(如胃、肝、

胰腺和结肠直肠癌)根据此方法的有效治疗应导致抑制肿瘤生长并使肿瘤体积减小。

5 本发明的抗 CCK-B/胃泌素受体免疫原引起的抗体可通过三种可能的机制对胃泌素依赖性肿瘤产生抗营养效应: (i)抑制胃泌素与其受体的结合, (ii)降解或破坏肿瘤细胞增殖的信号转导通道; 和(iii)在受体/抗体复合物内化并迁移到细胞核中时诱导细胞凋亡(细胞自杀)。

10 在本发明的另一个实例中, 将抗 CCK-B/胃泌素受体抗体给予患有 CCK-B/胃泌素受体反应性肿瘤的患者。该抗体特异性结合肿瘤细胞上的 CCK-B/胃泌素受体。抗体和受体的结合阻止了胃泌素与其在细胞膜中的配体的结合, 因此, 抑制了胃泌素依赖性肿瘤细胞的生长信号, 使肿瘤生长停滞。抗体宜为能有效地结合靶受体的嵌合或人化抗体或其片段, 它可用标准方法制得, 如美国专利 No. 5,023,077, 5,468,494, 5,607,676, 5,609,870, 5,688,506 和 5,662,702 中所公开的那些。这些外源产生的抗体还利用它们对肿瘤细胞生长的抑制或将毒性物质输送给肿瘤细胞来杀死质膜上携带 CCK-B/胃泌素受体的肿瘤细胞。较佳的治疗用抗
15 CCK-B/胃泌素抗体是与受体蛋白胞外结构域 1 和 4(图 1 中分别显示成 GRP-1 和 GRP-4)反应的那些抗体。特别佳的是特异性识别并结合对应于肽 1 和 4 的受体蛋白氨基酸序列的抗体。这种免疫接种方法中的肿瘤生长抑制还通过超声显影和 MRI 来监测, 并根据患者的需要给予重复免疫。

20 抗体抑制肿瘤细胞生长并杀死肿瘤细胞的效果可通过将细胞毒性分子与抗 CCK-B/胃泌素抗体偶联来增强。细胞毒性分子可以是毒素, 例如是霍乱毒素、蓖麻毒素、 α -鹅膏蕈碱或标记的放射活性分子(例如用 ^{125}I 或 ^{131}I)、或化疗剂(例如胞嘧啶阿拉伯糖苷或 5-氟尿嘧啶)。

25 抗体除了可用 ^{125}I 和 ^{131}I 作放射性标记外, 抗 CCK-B/胃泌素受体抗体还可用放射性核素如 ^{111}In 和 ^{90}Y 标记。在本发明的这一方面, 抗体可用来体内检测和诊断具有 CCK-B/胃泌素受体的肿瘤, 方法是将这些抗体给予患者, 并检测含有 CCK-B/胃泌素受体的肿瘤细胞上结合的抗体。在注射后约 1-2 小时放射标记的抗 CCK-B/胃泌素抗体达到肿瘤, 用以前公开的标准闪烁方法(Harrison's Principles of Internal Medicine, Isselbacher 等人编辑, 第 13 版, 1994)使放射活性“热点”显影。

30 给予患者治疗胃泌素依赖性肿瘤的免疫原组合物可以是各种形式。这些形式包括(例如)固体、半固体和液体剂型, 例如粉末、液体溶液、悬液、栓剂以及可注射和可灌輸溶液。较佳的形式取决于打算采用的给药方式以及治疗用途。组合

物包含本发明的免疫原以及合适的药学上可接受的组分，并且可能包括其它药物制剂、载体、佐剂、赋形剂等。合适的佐剂可包括去甲胞壁酰二肽(nor-MDP, Peninsula Labs., CA)，和油如 Montanide ISA 703(Seppic, Inc., Paris, France)，它们可用标准方法混合。较佳的是，组合物是单位剂量形式。一次或在一段时间内给予活性化合物用于免疫或作为药剂的量将取决于受治疗对象、给药方式和形式、

5 和治疗医师的判断。

用于被动免疫的本发明抗 CCK-B/胃泌素受体抗体宜用药学上可接受的载体(如盐溶液例如磷酸缓冲盐溶液)静脉给予患者。

本发明还提供了一种药物组合物，该组合物含有通过间隔臂肽与免疫原性载体偶联的 SEQ ID NO: 1 所示的肽，和药学上可接受的载体。这些组合物特别可用于治疗具有治疗胃泌素依赖性肿瘤的患者，这些肿瘤携带了具有 SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列的 CCK-B/胃泌素受体。

10

实施例 1

GRP1-DT 和 GRP4-DT 偶联物的制备

15 用标准固相肽合成方法制得 CCK-B/胃泌素受体肽。为使免疫原能诱导特异性免疫应答，合成羧基端各有间隔臂序列 SSPPPPC(序列表中 SEQ ID NO: 3)的肽 1 和肽 4。随后，用一端为琥珀酰亚胺酯而另一端为马来酰亚胺的异双功能连接剂，利用下述方法 A 或方法 B，通过间隔臂序列末端肽氨基酸残基半胱氨酸使这些肽与载体(白喉类毒素(DT))上的氨基偶联。

20 方法 A：如以前在美国专利 No. 5,023,077 中所述的，将肽 1 或 4 连接在载体上通过如下方式实现。将干的肽溶解在 0.1M 磷酸钠缓冲液(pH8.0)和 30 倍摩尔过量的二硫苏糖醇(DTT)中。在水饱和的氮气气氛下搅拌溶液 4 小时。通过在 G10 Sephadex 柱(用 0.2M 乙酸平衡)层析，将含还原半胱氨酸的肽与其它组分分离。将肽冻干并真空保藏至使用。用异双功能连接剂如ε-马来酰亚胺己酸 N-羟基琥珀酰亚胺酯(EMCS)处理激活载体，此连接剂的比例足以在每 10⁵ 分子量载体中激活约 25 个游离的氨基。在白喉类毒素的具体例子中，用量为每 20 毫克白喉类毒素中加入 6.18 毫克 EMCS(纯度为 75%)。

25

将每 20 毫克等份白喉类毒素溶解在 1 毫升 0.2M 磷酸钠缓冲液(pH6.45)中，从而激活白喉类毒素。将等份 6.18 毫克 EMCS 溶解在 0.2 毫升二甲基甲酰胺(DMF)中。在暗处将 50 微升 EMCS 滴加入 DT 同时搅拌。在暗处培育 2 小时后，使混合物在 G50 Sephadex 柱(用含有 0.1mM EDTA 的 0.1M 柠檬酸钠缓冲液(pH6.0)平衡)上层析。

30

在暗处，将含有 EMCS 激活的白喉类毒素的组分在 PM10 超滤膜上浓缩。用 Lowry 法或 Bradford 法测定浓缩物的蛋白含量。载体的 EMCS 含量这样来测定：使激活的载体与半胱氨酸-HCl 一起培育，然后和 10mM Ellman's 试剂 5,5'-二硫代

35

-双(2-硝基苯甲酸)10mM 反应。用 5-硫代-2-硝基苯甲酸于 412nm 的摩尔消光系数为 13.6×10^3 ，将含半胱氨酸-HCl 的空白管和含半胱氨酸-HCl 以及载体的样品管之间的光密度差转换成 EMCS 基团含量。

另用 Ellman's 试剂测定该肽的还原半胱氨酸含量(-SH)。将约 1 毫克肽溶解在 1 毫升氮气饱和的水中，使该溶液的 0.1 毫升等份与 Ellman's 试剂反应。用 5-硫代-2-硝基苯甲酸的摩尔消光系数(13.6×10^3)计算游离的半胱氨酸-SH。将含有的游离-SH 足以与载体上 25 个 EMCS 激活的各个氨基反应的肽量溶解在含有 0.1mM EDTA 的 0.1M 柠檬酸钠缓冲液(pH6.0)中，于暗处滴加入 EMCS 激活的载体中。在所有肽溶液加入载体中后，使混合物于暗处在水饱和氮气气氛下培育过夜。

在 G50 Sephadex 柱上(用 0.2M 碳酸氢铵平衡)层析，将通过 EMCS 与载体连接的肽偶联物与混合物的其它组分分离。将空柱体积中洗脱的偶联物冻干，20℃干燥贮藏至使用。

对所得偶联物可作肽含量特征分析，肽含量可通过本领域技术人员已知的许多方法(包括重量增加、氨基酸分析等)来测定。用该方法制得带间隔臂序列的肽 1 和 4 与白喉类毒素的偶联物经测定具有有效的肽/载体比值(每 100KD MW 载体有 5-35 摩尔肽)，并且认为均适于用作免疫原来免疫受测试动物。较佳的是，每 100KD MW 的 DT 有 10-30 摩尔范围的肽产生了有效的免疫应答。

方法 B：在一个较佳的方法中，含有 GRP1 偶联于 DT 以及 GRP4 偶联于 DT 的偶联物可在室温下用下列方法制备。将纯化的 DT(400 毫克)溶解在氮气饱和的 20 毫升 0.5M 磷酸盐缓冲液(pH6.6)中，形成 20 毫克/毫升的 DT 溶液。将 DT 溶液置于 60 毫升棕色玻璃瓶(作为反应容器和过滤贮器)中。将 EMCS 偶联剂(123.6 毫克)溶解在 2.0 毫升二甲基甲酰胺中。在 15 分钟内将 EMCS 溶液滴加入 DT 溶液中同时连续搅拌。给瓶加盖，在室温下再搅拌混合物 1 小时 45 分钟，形成活化的 DT(M-DT)。然后用 Amicon Model TFC10 细通道超滤系统借助操作手册 I-113G 和 XM50 渗流超滤膜对 M-DT 进行渗滤纯化。用 420 毫升磷酸盐缓冲液洗 M-DT 两次，每次浓缩至 20 毫升，然后用 420 毫升含有 0.1M EDTA 的 0.1M 柠檬酸钠缓冲液(pH=6.0)洗一次，将溶液浓缩至 20 毫升。

为了制备 GRP1-DT 偶联物，将 2.02 毫升 M-DT 溶液(含有 22.3 毫克 M-DT)置于 10 毫升棕色玻璃管中，然后将 13 毫克 GRP1 肽溶解在柠檬酸盐缓冲液中，获得 40 毫克/毫升肽，滴加入 M-DT 溶液同时搅拌。为了制备 GRP4-DT 偶联物，将 2.21 毫升 M-DT 溶液(含有 24.4 毫克 M-DT)置于 10 毫升棕色玻璃管中，然后将 13 毫克 GRP4 肽溶解在柠檬酸盐缓冲液中，获得 40 毫克/毫升肽，并滴加入 M-

DT 溶液中同时搅拌。

使反应在暗处进行过夜。从反应容器中取出每个偶联物，并分别在 12000-14000MW 截留透析管中用 500 毫升 0.1M 碳酸氢铵溶液换液 5 次透析。将每个偶联物冻干。然后用氨基酸分析法分析偶联物，测得 GRP1-DT 的肽与 DT 替代比值为每 10^5 MW DT 有 21.8 个肽，GRP4-DT 的肽与 DT 替代比为每 10^5 MW DT 有 21.1 个肽。

用该方法制得的带间隔臂的肽 1 和 4 与 DT 的偶联物具有有效的肽/载体比(每 100KD MW 载体有 5-35 摩尔肽)，这些偶联物均被认为适于用作免疫原。产生有效免疫应答的较佳比例范围为每 100KD MW 的 DT 有 10-25 摩尔肽。

10 免疫原的制备

用上述含有肽 1 或肽 4 以间隔臂偶联于 DT 的本发明的免疫原来免疫家兔。免疫原的制备如下：将偶联物溶解在 0.15M 磷酸钠缓冲盐溶液(pH7.3)中至浓度为 3.79 毫克/毫升。将偶联物溶液加入 Montanide ISA(703)佐剂(Seppic, Inc.)中，偶联物溶液与 Montanide ISA 703 之比为 30:70(重量:重量)，然后用 Silverson 匀化器 15 8000RPM 匀化混合物 3 分钟，形成含有 1 毫克/毫升偶联物的乳液。

免疫和样品收集

用由 0.1 毫克 GRP1-DT 或 GRP4-DT 偶联物组成的 0.1 毫升免疫原肌内注射家兔。每只家兔于 0 至 4 周注射免疫原。在实验的 6 和 8 周，收集每只家兔的血液。从每一血样制备血清并-20 °C 保藏至用于测定抗 CCK-B/胃泌素受体抗体存在的试验。

20 酶联免疫吸附试验(ELISA)

用固相 ELISA 筛选每一免疫家兔针对肽 1 和肽 4 产生的抗血清的反应或交叉反应。ELISA 如下进行：用 25 微升/孔 10 微克/毫升连接牛血清白蛋白(BSA)的肽 1(GRP1-BSA)、或连接 BSA 的肽 4(GRP4-BSA)抗原(0.1M 甘氨酸-HCl, pH9.5 缓冲液配)包被聚苯乙烯 96 孔板(IMMULON II Dynatech)。将这些孔板 4 °C 培育过夜，随后用缓冲液洗涤。

用 1% BSA-FTA 凝血缓冲液(pH7.2)将从免疫家兔获得的抗血清连续作 10^{-1} 至 10^{-8} 范围的稀释。每孔 25 微升测试抗血清与各测试肽室温培育 1 小时。培育后，用缓冲液充分洗涤平板，除去所有未结合的抗体。每个孔用 25 微升生物素化的山羊抗家兔 IgG(H+L)(在 1% BSA-FTA 稀释缓冲液中以 1:1000 稀释)室温下处理 1 小时。在洗涤平板除去未结合的抗家兔试剂后，使每个孔和 25 微升亲和素-碱性磷酸酶偶联物(1%BSA-FTA 缓冲液中 1:1000 稀释)室温培育 1 小时。充分洗板除

去未结合的亲和素-碱性磷酸酶试剂, 并和 25 微升 1 毫克/毫升 p-硝基苯磷酸盐 (PNPP)(用含有 0.01% $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 的 10%二乙醇胺缓冲液(pH9.8)配)一起培育。使平板显色脂质反应物在 490 纳米波长下的吸光值达到光密度为 0.8-1.5。为了测试家兔产生的抗血清的特异性, 也用 DT 免疫家兔, 对于 ELISA 测试, 用 DT 作为抗原包板以测定产生的抗载体抗血清的反应性。

图 2 显示用肽 1/GRP1 作为抗原的 ELISA 结果, 图 3 显示了用肽 4/GRP4 作为抗原的 ELISA 结果。从图 2 可以看出, ELISA 结果显示经肽 1-间隔臂-DT 偶联物免疫的家兔产生了特异性结合肽 1 的高滴度抗体, 即使抗血清在高稀释度 (1:100,000)下抗体仍能结合肽 1。同样, 图 3 表明经肽 4-间隔臂-DT 偶联物免疫的家兔产生了高滴度的抗肽 4 抗体。从图 2 和 3 看出, 经各个肽免疫的家兔产生的抗体在低抗血清浓度下能与各肽特异性结合。数据表明, 抗肽 1 和抗肽 4 抗体结合 CCK-B/胃泌素受体的肽 1 和 4 的能力很强。数据还表明, 用本发明的偶联物免疫家兔引发了分别针对肽 1 和肽 4 的强免疫应答反应。另外, 经肽 1 或肽 4 偶联物免疫的家兔看来是正常的, 在实验期间没有表现出任何疾病或病理性症状。

实施例 2

进行下列实验以在家兔内建立针对实施例 1 中用方法 B 制得的含 Ser 间隔臂的 GRP1-DT 肽的抗体特异性。进行一系列测试以评价 GRP1-DT 免疫诱导出的并用 GRP1-Ser Sepharose 柱免疫吸附亲和纯化的家兔抗体的特异性。

用抑制性 ELISA 评价亲和纯化抗体的 GRP1-Ser 肽特异性。实验的进行如下: 使 50 微升 2 微克/毫升偶联物溶液(甘氨酸缓冲液配, 0.1M, pH=9.5)4 °C 培育过夜, 以将 GRP1-Ser-BSA 偶联物包被于 96 孔板(Immulon U bottom)上。使亲和纯化的抗 GRP1 抗体(最终浓度为 10ng/ml)与不同抑制剂(连续 1:10 稀释)结合并在室温下培育 1 小时。抑制剂包括 GRP1-Ser、GRP1 EPT、Ser、人胃泌素 17(1-9)-Ser 间隔臂(hG17(9)-Ser)、GRP1 EPT+Ser、和缓冲液(没有抑制剂)。培育缓冲液由 PBS+0.5%BSA+0.05%吐温 20+0.02% NaN_3 组成。随后的步骤采用相同的缓冲液, 只是没有 BSA。洗涤 96 孔板去除未结合的 GRP1-Ser-BSA, 加入抗体+抑制剂的混合物(50 微升/孔)。1 小时后, 洗涤平板, 加入山羊抗家兔 Ig(H+L)碱性磷酸酶偶联物(Zymed)(1:2000 稀释)。培育 1 小时后, 洗涤平板除去未结合的试剂, 加入 50 微升/孔 pNPP 底物(Sigma)溶液(1 毫克/毫升以底物缓冲液(PBS+0.1 毫克/毫升 MgCl_2 +10%二乙醇胺+0.02% NaN_3 配)。培育 60 分钟后, 在 MRX 读数

计(Dynatech Laboratories)上测定吸收值。对每一浓度样品作一式两份测定并计算平均值。从所有数值中减去背景结合值(用亲和纯化的家兔抗 GnRH 抗体建立),对于测试的每种抑制剂计算相对于未加入抑制剂(抗 GPR1 抗体+缓冲液)的抑制%: 抑制%=(100)(1-((A_{未抑制}-A_{抑制})/A_{未抑制})), 其中 A 为吸收值。结果显示在图 4 中,

图 4 表示抗体结合的抑制百分数是抑制剂浓度的函数。从该图中可以看出, GRP1-Ser 肽完全抑制了抗体与 GRP1-Ser-BSA 的结合。用不含 Ser 间隔臂序列的 GRP1 EPT 肽(GRP1 EPT 加 Ser 间隔臂等摩尔混合物)获得了约 60%的抑制。这些肽不能产生完全的抑制表明, 抗体的比例对于包含 GRP1 和 Ser 间隔臂序列两种元件的表位是特异性的。而 Ser 间隔臂序列本身或携带 Ser 间隔臂的不相关肽(hG17(9)-Ser, (由 hG17 氨基末端 9 个残基以及 Ser 间隔臂组成)没有获得抑制。这些 ELISA 结果证明, 亲和纯化抗体制备物对 GRP1-Ser 肽有特异性, 且 60%的结合活性针对肽的胃泌素受体表位组分。

15 实施例 3

AR42J 肿瘤细胞(欧洲动物细胞保藏中心, Porton Down, UK)系从大鼠胰腺癌获得, 已明确知道有 CCK-B/胃泌素受体。因此, 测试了 AR42J 以确认 CCK-B/胃泌素受体的表达以及放射性配体抑制的 hG17 受体的特异性。AR42J 细胞在完全 RPMI1640(Sigma)中 7%CO₂ 下 37 °C 培育, RPMI 中添加了 10%FCS(Gemini Bioproducts)、2mM 谷氨酰胺(JRH Biosciences)、1mM 丙酮酸钠(JRH B.)和 50 微克/毫升庆大霉素(Gemini Bioproducts)。用含 0.25%EDTA 的 PBS 从 175cm² T 形瓶收获细胞, 然后用 PBS(没有 EDTA)洗两次, 离心(400 X g 10 分钟)。所有操作均维持细胞于 0-4 °C。用缓冲液制备单细胞悬液, 调节细胞浓度至 10⁶ 细胞/毫升。将 1 毫升细胞悬液等份加入 12X75 毫米培养管中, 然后离心细胞并弃去上清液。将细胞重悬于含有人 G17(hG17)、促性腺激素释放激素(GnRH)或没有肽的 PBS(0.1 毫升/管)中。肽浓度为 1.0ng/ml、100ng/ml 和 10μg/ml。每管中加入含有约 26300CPM(比活, 2200Ci/毫摩尔)的 0.1 毫升 ¹²⁵I-hG17(NEN)等份。振荡试管, 然后培育 15 分钟。用 PBS 洗细胞两次, 然后在 γ 计数器(Wallac)中计数。样品作一式两份测定。减去背景计数, 然后用下列公式计算每种抑制剂抑制 ¹²⁵I-hG17 结合的百分数: 抑制%=(100)(1-((CPM_{未抑制}-CPM_{抑制})/CPM_{未抑制}))。

放射性配体结合抑制测试的结果显示在图 5 中, 其表明了单个值的平均值(±SE)。从图中可以看出, ¹²⁵I-hG17 与 AR42J 细胞的结合被 G17 抑制。抑制的程

度随加入抑制剂的量而增加,至每管1微克hG17(测试肽最高浓度)为32%抑制。相反,GnRH在两个测试最高浓度(100pg GnRH获得6%的抑制被认为系非特异性)下没有产生抑制,这表明hG17的抑制对胃泌素有特异性。这些结果确认了AR42J肿瘤细胞在细胞表面表达有胃泌素受体。

5

实施例4

用免疫荧光法评价GRP1-Ser特异性抗体与AR42J细胞的结合。如前述实施例那样培养生长AR42J细胞,用细胞刮器从175cm²T形瓶收获细胞,用缓冲液(有0.02%NaN₃的PBS)洗两次,然后离心(400 X g 7分钟)。所有操作均维持细胞在
10 0-4℃。以缓冲液制备单个细胞悬液,调节细胞浓度至10⁶个细胞/毫升。将细胞悬液加入1.5毫升微量离心管(1毫升/管)中。离心使细胞沉淀,抽吸上清液。将细胞重悬于含有肽抑制剂(1.0毫克/毫升)的缓冲液(0.1毫升/管)中。抑制剂包括GRP1-Ser、GnRH、hG17(9)-Ser和缓冲液(没有抑制剂)。抗体包括家兔抗GRP1-Ser(100微克/毫升)、亲和纯化的家兔抗DT(阴性对照,100微克/毫升)、小
15 鼠抗AR42J抗血清(阳性对照,1:100稀释,热灭活)或正常小鼠血清,将抗体加入合适的试管中并混合。培育细胞1小时并不时搅拌。然后用缓冲液洗细胞三次,每管中加入0.1毫升荧光素标记的山羊抗家兔IgG(Antibodies Incorporated)(1:50稀释)。经小鼠血清处理的细胞用荧光素抗小鼠IgG试剂(Zymed)显色。振荡细胞使其重悬,然后培育1小时。再洗细胞三次,然后重悬于甘油:PBS(1:1,v:v)中(50
20 微升/管)。用每管所含物质制备湿标本(wet mount),用Laborlux 12荧光显微镜(Leitz)检测细胞。荧光按0至4级评分,0表示背景荧光(用正常小鼠血清获得),4表示最大荧光(用小鼠抗AR42J阳性对照抗血清获得)。

免疫荧光测试的结果显示在表1中。从表中可以看出,在没有肽抑制剂存在下用抗GRP1-Ser抗体处理的AR42J细胞有很强的荧光,这表明抗体与细胞结合。
25 家兔抗-DT抗体没有产生荧光染色,这表明抗GRP1-Ser抗体所观察到的染色不是家兔免疫球蛋白的非特异性细胞表面结合的结果。另外,显示出结合对GRP1-Ser肽有特异性。GRP1-Ser的加入完全抑制了结合,而不相关的肽(包括hG17(9)-Ser和GnHR)却不能抑制。由于GRP1表位包含胃泌素受体的残基5-21,结论是抗GRP1-Ser抗体对AR42J细胞表达的胃泌素受体有特异性。

30

表 1

抗体	抑制剂			
制备物	GRP1-Ser	hG17(9)-Ser	GnHR	缓冲液
家兔抗 GRP1-Ser	0	3+	2+	3+
家兔抗 DT	0.5+	0.5+	0.5+	0.5+
小鼠抗 AR42J				4+
正常小鼠血清				0

实施例 5

将传代 16-18 代的 AR42J 细胞培育在含有 10%FCS 和 2mM 谷氨酰胺的 RPMI-1640 培养基中。所有细胞在湿度 100%、5%CO₂ 的空气下维持于 37℃，在 T75 瓶(Falcon, London, UK)中生长至 80%铺满，在 0.02% EDTA 处理以将粘附细胞变为悬浮后进行传代。使细胞和实施例 1 所述的抗 CCK-B/胃泌素受体抗体(aGR)一起培育 10 秒、30 秒、30 分钟和 1 小时，该抗体用本发明的 CCK-B/胃泌素肽 1 受体免疫原在家兔内产生，并已在肽 1 制备的柱中经亲和层析纯化。

将细胞固定在 1%戊二醛中 1 小时，用标准技术制备细胞用于免疫电子显微镜(ImmunoEM)研究。2000rpm 离心细胞悬液 2 次 2 分钟，然后将细胞沉淀重悬于磷酸缓冲盐溶液(PBS)中，用 LR 白塑料树脂过滤细胞沉淀。切成厚度为 70-90nm 的超薄切片置于 Pioloform 涂布的镍栅格上。将栅格置于正常山羊血清(Dako, High Wycome, UK)(0.1%牛血清白蛋白(BSA)(Sigma, Poole, Dorset)配)中并室温培育 30 分钟。用 PBS 清洗栅格，然后和第二抗体生物素偶联的山羊抗家兔抗体(金标记)(1:50 稀释在 1%BSA 中)一起室温培育 1 小时。进行没有第二抗体的对照实验。在最后 PBS 洗涤后，在饱和的水性醋酸双氧铀和 Reynold's 柠檬酸铅中复染色栅格各 3 分钟。计数在细胞膜上、细胞质内、细胞核膜上以及细胞核内的金颗粒。由独立观察者计数每栅格中的 25 个细胞。对于对照，使 AR42J 与抗体接触至少 1 秒，采用没有 CCK-B/胃泌素受体的肝细胞。另用接触正常 IgG 的 AR42J 细胞作为对照来测定抗 CCK-B/胃泌素受体抗体的非特异性结合。这些试验的结果显示在表 2 和图 6 中。

表 2
AR42J 细胞中 CCK-B/胃泌素受体免疫金颗粒的分布

	细胞膜	细胞质	核膜	核质
金颗粒数	14.2(±0.97)	43.3(±2.32)	9.3(±0.81)	51.4(±3.32)
细胞内分布百分数	12%	36.6%	7.9%	43.5%

(25 个细胞的平均值±SEM，重复 5 次)

表 2 和图 6 表明，与 CCK-B/胃泌素受体相连的免疫抗体金颗粒位于腺癌细胞的质膜、细胞质、核膜和核质上，这进一步证明抗体/受体复合物被细胞内化。

从表 2 看出，采用针对 CCK-B/胃泌素受体氨基末端的抗血清所作的免疫电子显微镜研究表明，在培育 1 小时后，免疫金标记的 CCK-B/胃泌素受体抗体的分布迅速内化，12%的抗体受体复合物与细胞膜结合，36.6%在细胞质内，7.9%在核膜中，非常令人惊奇的是，43.5%在细胞核内。发现细胞核内 CCK-B/胃泌素受体免疫反应性强的区域在染色质上，这提示特异性结合位点起着调节 DNA 的作用。

用偶联于金珠的抗免疫球蛋白(免疫金珠)的这些电子显微镜研究揭示抗受体/受体复合物在肿瘤细胞中发生极为迅速的翻转(turnover)；早在接触抗体 10 秒时就可可在细胞核内检测到复合物(如图 6 所示)。

实施例 6

使腺癌细胞系,即 AR42J、HCT116、C170HM2、Lovo、ST16 和 MGLVA1 在体外生长,并如实施例 3 所述那样进行收获。将 30x T-75 瓶的细胞悬浮在 5 毫升匀化缓冲液(1mM 碳酸氢钠、2mM 氯化镁、1nM 苯甲磺酰氯、40mM 氯化钠、10 微升亮抑酶肽、1μM 抑胃酶肽 5μM EDIA)中。在匀化器中冲击 5 次(每次 5 秒),进行匀化。对于核外膜,4℃ 500g 离心 7 分钟使组织碎片沉淀。弃去沉淀,使上清液 4℃ 500g 离心,以进一步除去碎片。使上清液 4℃ 48000g 再离心 1 小时。将含有核外膜制备物的沉淀悬于 Tris/NP-40 溶液(0.1M TRIZMA、0.5% NONIDET P40[Sigma Chemical])中。

对于核膜制备物,在第二匀化缓冲液(25mM Tris-HCl, pH7.4, 0.1% TRITON 100, 0.32M 蔗糖, 3mM MgCl₂, 2mM EGTA, 0.1mM 精胺四盐酸, 2mM PMSF, 10mM 苯并亚胺(bezomidine)盐酸盐, 3mM EGTA 氨基乙腈盐酸盐[Sigma])中匀化后,通过 4℃ 400g 离心 10 分钟使组织碎片沉淀。将沉淀重悬于 55%(0.2M)蔗糖(HPLC 水配)中。4℃ 60000g 离心该混合物 1 小时。用 0.4%NONIDET P40(用不

含 TRITON 100 的匀化缓冲液配)洗涤沉淀。4℃ 700g 离心沉淀 15 分钟,重悬于不含 TRITON 100 的匀化缓冲液中。

用 Lowey 法(用 Pierce 的试剂盒)测定蛋白含量。将含有 10-15 微克的样品上样于 8-16%Tris/甘氨酸梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳 PAGE(Novex R 和 D 系统在 Tris/甘氨酸缓冲液中,并在 125 伏恒压、36mA 下跑 90 分钟。将凝胶固定在 10%冰醋酸中 1 小时,将样品点样在硝酸纤维素膜上。使膜在 1%BSA 中培育 1 小时,然后和 GRP1 抗血清(有和没有预吸收)一起培育 1 小时。用亲和素:生物素-过氧化物酶复合物方法以二氨基-联苯胺(besidene)为底物检测抗体结合。用针对肽 1 产生的家兔抗血清(家兔抗 GRP1 抗血清)作的 Western 印迹结果分析显示在图 7 和 8 中。

如图 7 所示,蛋白分子量标记的范围从 116、66、45 到 29kDa。印迹显示,在所有被研究的腺癌细胞中(即 HCT116、C170HM2、LoVo、ST16 和 MGLVA1(除 AP5LV 外))均在大约 43kDa 处显示了显著的抗肽 1 免疫活性条带。该蛋白对应于截短形式的 CCK-B/胃泌素受体。一些细胞系(HCT116 和 C170HM2)显示出分子量在 60-100KDa 范围内的至少其它 3 条条带。数据表明,抗 CCK-B/胃泌素受体抗体能识别并结合肿瘤细胞中 CCK-B/胃泌素受体的不同同种型。

图 8 显示了 C170HM2 和 HCT160 腺癌细胞核外(ENM)和质膜的 Western 印迹结果。如图 8 所示,测试腺癌细胞系的 ENM CCK-B/胃泌素受体证明存在两条强烈染色的条带:一条约为 43kDa,另一条大约 66KDa。当只对质膜组分染色时,出现了在大约 66KDa 处的单个条带。因此,Western 印迹研究确认了免疫电子显微镜研究的结果,即 CCK-B/胃泌素受体存在于腺癌肿瘤细胞中,但是免疫电子显微镜研究没有区分 CCK-B/胃泌素受体的同种型。数据表明,本发明的免疫原引发了能识别和结合受体不同同种型的抗 CCK-B/胃泌素受体抗体,这对于治疗这些肿瘤是有利的。

实施例 7

将 C170HM2 腺癌细胞腹膜内注射入裸鼠中,使肿瘤在肝中生长。对照小鼠接受磷酸缓冲盐溶液(PBS)的灌输,试验小鼠接受一种抗 CCK-B/胃泌素受体抗体的灌输。在组 1 中,每只小鼠每天灌输 0.5 毫克针对肽 1 产生的家兔抗 CCK-B/胃泌素受体抗体(家兔抗肽 1, Rbt@GRP1)。在组 2 中,每只小鼠每天接受 0.5 毫克针对肽 4 产生的家兔抗 CCK-B/胃泌素受体抗体(家兔抗肽 4, Rbt@GRP1)。灌输抗体后 40 天期间研究小鼠,处死并取出肿瘤进行研究。用标准技术评价肿

瘤的重量、大小和横截面积。结果显示在图 9 和 10 中。

如图 9 和 10 所示, 在小鼠中植入结肠直肠癌细胞系 C170HM2 而不加处理导致大肿瘤块迅速生长(经肿瘤重量或肿瘤大小以及肿瘤的肿瘤横截面积测得)。然而, 用家兔抗肽 1 或家兔抗肽 4 抗体灌输动物导致有可检测肿瘤的动物数量显著降低, 并使患肿瘤动物的肿瘤重量和大小明显比对照低。在计算肿瘤平均重量、肿瘤平均体积、或肿瘤平均数时, 可以看到相同的效果。这些数据显示在图 11、12 和 13 中。

通过计算肿瘤数、重量和大小的中值(median), 进一步了解其在群体内的分布。结果显示在图 14、15 和 16 中。从这些图可以看出, 家兔抗肽 1 免疫原在抑制肿瘤生长方面始终比家兔抗肽 4 更有效。然而, 与对照处理相比, 家兔抗肽 1 和家兔抗肽 4 均表现出了很强的肿瘤抑制活性。

实施例 8

用结肠癌细胞系 C170HM2 通过实施例 7 所述的方法(只是初始细胞接种量更高)在裸鼠内产生更大的肿瘤负荷。C170HM2 是肝侵袭性异种移植模型。对照和试验小鼠也用实施例 7 描述的方法处理。

灌输抗体 40 天后, 处死小鼠, 取出肝肿瘤并进行研究。图 17、18 和 19 显示了这些试验的结果。图 17 显示了对照以及抗 CCK-B/胃泌素受体抗体治疗动物的肝肿瘤数的平均值和中值。数据表明, 家兔抗 CCK-B/胃泌素受体抗体(家兔 @GRP)有效地抑制了肝内转移性肿瘤的生长。在与对照比较时, 用家兔抗肽 1, 小鼠肝内肝肿瘤平均数在数值上明显降低(斯徒登特 T 试验) $p=0.0084$, 肝肿瘤数中值 $p=0.0016$ (Mann Whitney)。用抗肽 4 抗体处理的小鼠也显示出肝肿瘤数平均值减少; 然而, 该动物中的肝肿瘤平均数与对照相比没有差别。

图 18 表明抗肽 1 和抗肽 4 抗体还能减少肝转移肿瘤重量的平均值和中值(与对照动物相比)。图 19 中的数据表明, 抗 CCK-B/胃泌素受体处理过的小鼠肝肿瘤横截面积的平均值和中值与对照动物相比也显著降低。

数据表明, 抗 CCK-B/胃泌素受体抗体有效地控制了胃泌素依赖性结肠癌在肝(这种癌转移性扩散的主要部位)内的扩散和生长。

实施例 9

我们进行这些研究来确认 GRP1 对 C170HM2 细胞的免疫反应性。研究的目的是为了评价针对 GRP1 产生的抗血清的肿瘤定位作用, 并测定其对裸鼠肝内

C170HM2 细胞生长的治疗效果。如上述实施例 7 所述, 将 C170HM2 细胞腹膜内注射入裸鼠内。在家兔内产生 GRP1 抗血清。抗血清用 ^{125}I 作放射性标记, 并给
予已通过尾静脉注射建立起 C170HM2 异种移植的裸鼠。对照小鼠接受 ^{125}I 放射
性标记的正常家兔血清。在注射单剂 ^{125}I 抗体后渐增的时间点处死小鼠。根据每
5 分钟每克组织(CPM/g)的计数测定放射活性, 并计算肝/肝肿瘤比。

图 20 显示了结合于肝肿瘤的放射性标记的家兔抗 GRP1 抗体(与对照相比)。从图中看出, 与肝肿瘤组织结合的家兔抗 GRP1 抗体多于对照。图 20 还表明, 对于放射性标记的正常家兔血清和 GRP1 抗血清, y 轴的肝肿瘤/肝比值随着 x 轴时间的增加而增加。正常家兔血清在第 1 天的比值为 1 并保持不变至第 5 天。这表
10 明肝肿瘤和正常肝内的放射性标记水平是相同的。GRP1 抗血清比值呈指数型累积, 在第 5 天达到 2。这表明放射性标记的 GRP1 抗血清特异性地定位于 C170HM2 肝肿瘤内。

实施例 10

15 GRP1 抗血清对 C170HM2 异种移植的治疗性效果

C170HM2 肿瘤异种移植通过腹膜内注射细胞来引起。用三种不同的细胞接种物来产生 3 种水平的肿瘤负荷。从第 0 天起, 通过每天尾静脉注射被动给予 GRP1 抗血清。治疗在第 40 天终止。

GRP1 抗血清对肿瘤“摄取率(take rate)”的影响

20 评价的最初参数是肝内肿瘤平均数, 其显示在图 21 中。将正常家兔抗血清处理的对照编在增加细胞接种物的组中。如图 21 所示, 对照组中, 每个肝的肿瘤平均数在 1 至 3 之间。GRP1 抗血清处理组中, 对所有三次细胞接种物, 每个肝的肿瘤平均数均低于 1, 所有 3 个试验均是有意义的(一次接种, $n=18$, $p=0.003$; 2 次接种, $n=12$, $p=0.0001$ 和 3 次接种, $n=20$, $p=0.0068$, Mann Whitney 分
25 析)。

GRP1 抗血清对建立的肿瘤重量影响

图 22 显示了正常家兔血清处理过的对照(左图)对于 3 次增加细胞接种的肿瘤重量平均值。图中还显示了 GRP1 抗血清处理后的裸鼠肿瘤重量平均值, 所有 3 次细胞接种使肝重量平均值减少 60%, 所有 3 个试验均是有意义的(一次接种,
30 $p=0.0016$; 2 次接种, $p=0.0084$, 和 3 次接种, $p=0.0001$, Mann Whitney 分析)。

Western 印迹测定 C170HM2 异种移植中的 GRP1 免疫反应性

从 3 个试验中 2 个的 C170HM2 异种移植制备核外膜蛋白。通过 Western 印

迹用 GRP1 抗血清来分析它们。图 23 是 Western 印迹的照片，表明正常家兔血清处理的异种移植物中有 2 个免疫反应性条带在 74 和 50kDa，前一条带表现出最强的免疫反应性。在 GRP1 抗血清处理过的异种移植物中，有两条免疫活性条带以及在对照异种移植或体外生长的细胞中没有发现的中间条带。该 50kDa 条带显示 5 出最强的免疫反应性。这表明在 GRP1 抗血清处理的异种移植中，较大比例的 CCKB/胃泌素受体可能作为内化形式存在。

C170HM2 异种移植物的组织学分析

图 24 显示了 C170HM2 异种移植物侵入裸鼠肝的显微图片。肿瘤通常由坏死中心以及在侵入肝时挤压肝细胞的活的前移边缘组成。用 TUNEL 法测定 C170HM2 10 肿瘤的活的前移边缘中的凋亡程度，阳性细胞用原位杂交显影。图 25 显示了凋亡细胞存在于 GRP1 抗血清处理的异种移植物中的活肿瘤细胞中，但不存在于正常家兔血清处理的肿瘤中。

数据表明，针对 CCKB/胃泌素受体氨基端表位产生的抗血清选择性地定位于肝侵入性 C170HM2 肿瘤内。GRP1 表位的中和诱导出对肿瘤“摄取率”和已建 15 立肿瘤的总瘤荷有明显影响。这种肿瘤抑制性效应可能是由于(a)封闭 CCKB/胃泌素受体而诱导了总的细胞静止效应和/或(b)抗体靶向细胞核而可能导致凋亡的间接效应。

参考文献

1. Bock, M.G., DiPardio, R.M., Evans, B.E., Rittle, K.E., Whitter, A., Veber, D, Anderson, E., 和 Freidinger, A. "Benzodiazepine、胃泌素和脑缩胆囊素受体配体": L-365,260. *J. Med. Chem.*, 32:13-17, 1989.
2. Curtis, B.M., Widmer, M.B., de Roos, P., Qwarnstrom, E.E. "IL-1 及其受体转位到细胞核" *J. Innumol.* 1990; 144:1295-1303.
3. Dickinson C.J. "胃泌素加工和结肠癌的关系"(编辑) *Gastroenterology* 1995; 1384-1388.
4. Edkins, J.S.. "胃泌素分泌的化学机制" *Proc. Soc. Lond.* 1905; 76:376.
5. Fourmy, D., Zahidi, A., Pradayroll, I., Vay ssette, J., Ribet, A. "CCK/胃泌素受体结合与狗胰腺泡中淀粉酶释放的关系" *Regul. Pept.* 1984; 10:57-68.
6. Grider, J.R., Malchlouf, G.M. "胃和胆囊肌肉细胞上的缩胆囊素和胃泌素的不同受体" *Am J. Physiol.* 1990; 259:G184-G190.
7. *Harrison's Principles of Internal Medicine*, Isselbacher 等人编辑 第 13 版, 1690-1691 页, 1994.
8. Holt, S. J., Alexander, P., Inman, C., Davies, D. "表皮生长因子诱导的核蛋白酪氨酸磷酸化伴随表皮生长因子受体转位进入细胞核" *Biochem. Pharm.* 1994; 43:117-126.
9. Hughes, J., Boden, P., Costall, B., Domeney, A., Kelly, E., Horwell, D.C., Hunter, J.C., Pinnock R.D.,和 Woodruff, G.N. "具有强效 anxiolytic 活性的一类选择性 B 型缩胆囊素受体拮抗剂的开发" *Proc. Natl. Acad Sci.*, 87:6728-6732, 1990.
10. Johnson L. "肠胃激素的营养肌动蛋白的新方面" *Gastroenterology* 1997; 72:788-792.
11. Kopin, A.S., Lee, Y.M., McBride, E.W., Miller, L.J., Lu, M., Lin, H.Y., Kolakowski, L.F., Beinborn, M. "犬壁细胞胃泌素受体的表达克隆和性质鉴定" *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 1992; 89:3605-3609.
12. Laudron P.M. "从受体内化到细胞核转位: 长期药物学的新目标" *Biochem. Pharm.* 1994; 47:3-13.
13. Le Meuth, V., Philouz-Rome, V., LeHuerou-Luron, L.; Formal, M., Vaysse, N., Gespach, C., Guilloteau, P., Fourmy, D. "缩胆囊素/胃泌素受体的 A 和 B 亚型在

- 生长的牛胰的分化表达" *Endocrinology* 1993; 133:1182-1191.
14. Matsumoto, M., Park, J., Yamada, T. "胃泌素受体鉴定: 胃泌素受体在犬胃部壁细胞上的亲和交联" *Am. J. Physiol.* 1987; 252:G143-147.
 15. Nakata, H., Matsui, T., Ito, M., Taniguchi, T., Narabayashi, Y., Arima, N., Nakamura, A., Kinoshita, Y., Chibara, K., Hosoda, S., Chiba, T. "Mastomys natalensis 的 ECL 癌样肿瘤的胃泌素受体的克隆和鉴定" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992; 187:1151-1157.
 16. Narayan, S., Chicone, L., Singh, P. "胃泌素与豚鼠结肠粘膜结合的性质鉴定" *Mol. Cell. Biochem.* 1992; 112:163-171.
 17. Palnaes, Hansen C., Stadil, F., Rehfeld, J.F. "甘氨酸延伸的胃泌素的代谢以及对人体内胃酸分泌的影响" *Digestion* 1996; 57:22-29.
 18. Podlecki, D. A., Smith. R. M., Kao, M., Tsai, P., Huecksteadt, T., Brandenburg, D., Lasher, R.S., Jarett, L., Olefsky, J.M. "胰岛素受体的细胞核转位" *J. Biol. Chem.* 1987; 262:3362-3368.
 19. Rehfeld, J.F., Bardram, L., Hilsted, L. "人支气管癌中的胃泌素: 前胃泌素恒定表达但加工不同" *Cancer Res.* 1989; 49:2840-2843.
 20. Romani. R., Howes, L.G., and Morris D.L. "强效的胃泌素受体拮抗剂(GRA)新家族在体外和体内抑制了人结肠直肠癌细胞系" *Procs, AACR*, 35:397 (Abstract), 1994.
 21. Scemama, J.L., Fourmy, A., Zahidi, L., Praydayrol, L., Susini, C., Ribet, A. "大鼠胰腺泡细胞系(AR4-2J)上胃泌素受体的鉴定, 研究胃泌素介导细胞生长和增殖的一种可能的模型" *Gut* 1987;28:233-236.
 22. Seva, C., Dickinson, C.J., Yamada, T. "甘氨酸延伸的前胃泌素的促进生长的效应" *Science* 1994; 265:410-412.
 23. Singh, P., Owlia, A., Espeijo, R., Dai, B. "新的胃泌素受体介导 Swiss 3T3 成纤维细胞上胃泌素的促有丝分裂效应并加工胃泌素的中间产物, 缺少可检测的缩胆囊素(CCK)-A 和 CCK-B 受体" *J. Biol. Chem.* 1995; 270:8429-8438.
 24. Singh, P., Townsend, Jr. C.M., Thompson, J.C., Narayan, S., Guo, Y.S. "结肠癌中的激素: 过去和展望研究" *Cancer J.* 1990; 3:28-33.
 25. Soll, A.H., Amiran, L.P., Thomas. T., Reedy, T.J., Elashoff, J.D. "分离的犬壁细胞上的胃泌素受体" *J. Clin. Invest.* 1984; 73:1434-1447.
 26. Taniguchi, T., Matsui, T., Ito. M., Marayama, T., Tsukamoto, T., Katakami, Y.,

- Chiba, T., Chihara, K. "缩胆囊素-B/胃泌素受体信号通道参与 p125FAK 和 p42MAP 的酪氨酸磷酸化" *Oncogene* 1994; 9:861-867.
27. Todisco, A., Takeuchi, Y., Seva, C., Dickinson, C.J., Yamada, T. "胃泌素和甘氨酸延伸的前胃泌素加工的中间产物诱导不同程序的 early 基因激活" *J. Biol. Chem.* 1995; 279:28337-28341.
28. Ulrich, A., Schlessinger, J. "具有酪氨酸激酶活性的受体的信号转导" *Cell* 1990; 61:203-212.
29. Wank, S.A. "缩胆囊素受体" (编辑). *Am. J. Physiol.* 1995; 269:G628-G646.
30. Wank, S.A., Pisegna, J.R., de Weerth, A. "脑和肠胃缩胆囊素受体家族: 结构和功能性表达" *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 1992; 89:8691-8695.
31. Watson, S.A., Durrant, L.G., Crosbie, J.D, Morris D.L. "原代人结肠直肠和胃癌细胞对胃泌素的体外生长反应" *Int. J. Cancer* 1989; 43:692-696.
32. Watson, S.A., Durrant, L.G., Elston, P., and Morris, D.L. "胃泌素受体拮抗剂 (L-365,260)对肠胃肿瘤细胞的抑制效果" *Cancer*,
33. Watson, S.A., Steele, R. "肠胃肿瘤细胞上的胃泌素受体", 《GI 肿瘤中的胃泌素受体》. R.G. Landes Co., Austin TX:CRC 1993 20 页

序列表

(1) 一般信息:

5

(i) 申请人:

姓名: Aphton Corporation

街道: 26 Harter Avenue

城市: Woodland

10

州: California

国家: USA

邮编: 95776-1049

电话: 916-668-5100

电传: 916-666-1314

15

(ii) 发明名称: 缩胆囊素-B/胃泌素的免疫原性组合物
以及治疗肿瘤的方法

(iii) 序列数目: 3

20

(iv) 通信地址:

(A) 收件人: Dimitrios T. Drivas, White & Case

(B) 街道: 1155 Avenue of the Americas

(C) 城市: 纽约

25

(D) 州: NY

(E) 国家: USA

(F) 邮编: 10036-2787

(v) 计算机可读形式:

30

(A) 记录介质类型: 软盘

(B) 计算机: IBM PC 兼容型

(C) 操作系统: PC-DOS/MS-DOS

(D) 软件: PatentIn Release #1.0, Version #1.30

35

(vi) 本申请资料:

(A) 申请号:

(B) 申请日:

(C) 分类:

(viii) 律师/代理人信息:

5 (A) 姓名: Drivas, Dimitrios T..

(B) 登记号: 32,218

(C) 参考/案卷号: 1102865-0032

(ix) 通讯信息:

10 (A) 电话: (212) 819-8200

(B) 电传: (212) 354-8113

(2) SEQ ID NO:1 的信息:

15

(i) 序列特征:

(A) 长度: 17 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 不相关

20 (D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假想: 无

(iv) 反义: 无

25 (v) 片段类型: N 端

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:1:

Lys Leu Asn Arg Ser Val Gln Gly Thr Gly Pro Gly Pro Gly Ala Ser Leu

1

5

10

15

30 (2) SEQ ID NO:2 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 15 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

35 (C) 链型: 不相关

(D) 拓扑结构：线性

- 5 (ii) 分子类型：肽
 (iii) 假想：无
 (iv) 反义：无
 (v) 片段类型：内部

(xi) 序列描述：SEQ ID NO:2:
 Gly Pro Gly Ala His Arg Ala Leu Ser Gly Ala Pro Ile Ser Phe
 10 1 5 10 15

(2) SEQ ID NO:3 的信息：

- 15 (i) 序列特征：
 (A) 长度：7 氨基酸
 (B) 类型：氨基酸
 (C) 链型：不相关
 (D) 拓扑结构：线性

- 20 (ii) 分子类型：肽

(xi) 序列描述：SEQ ID NO:1:
 Ser Ser Pro Pro Pro Pro Cys
 1 5

CCKB/胃泌素受体
7个跨膜结构域

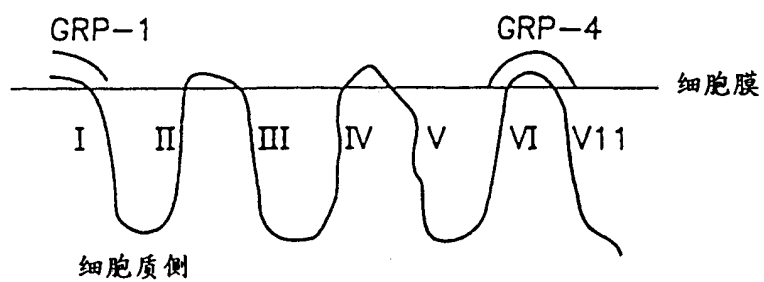


图 1 A

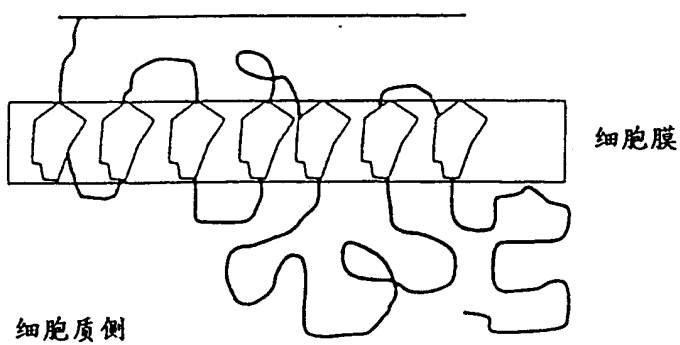


图 1 B

GRP1或DT免疫家兔产生的血清GRP1 ELISA

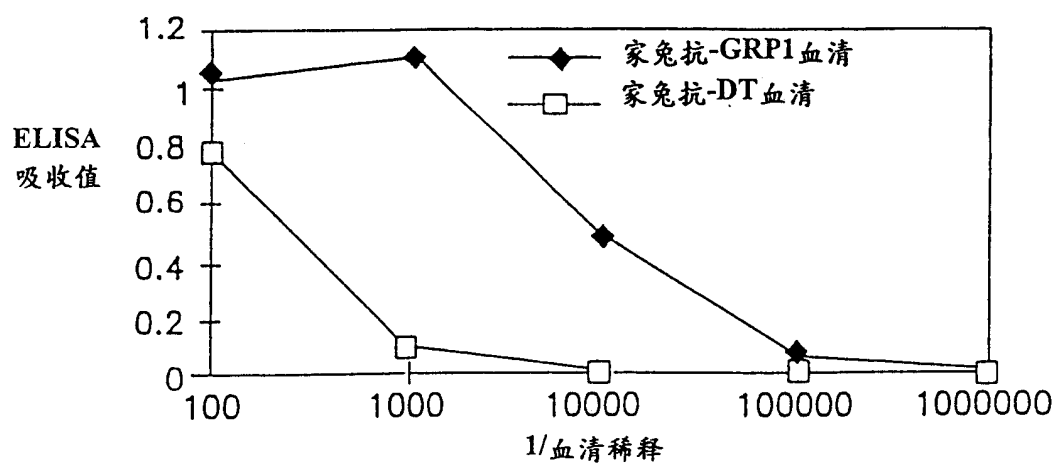


图 2

GRP4或DT免疫家兔产生的血清GRP4 ELISA

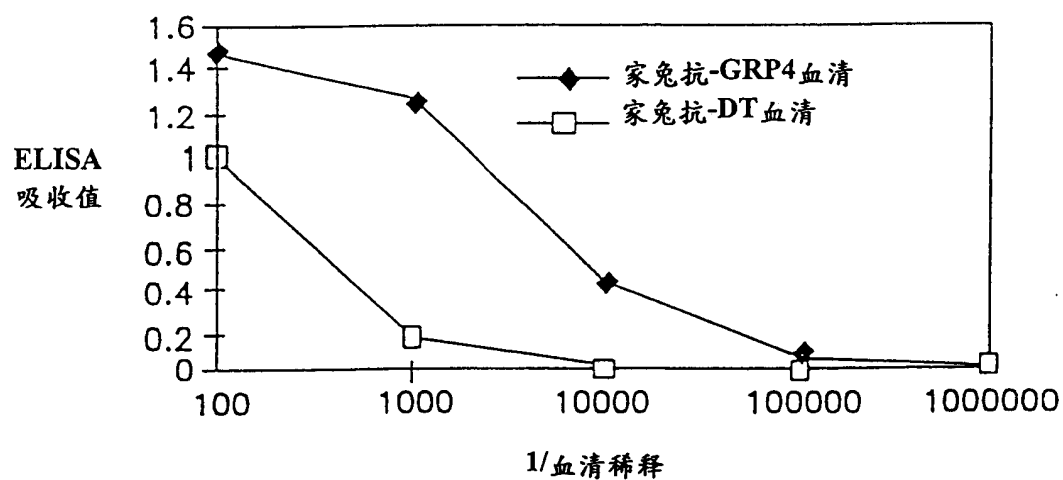
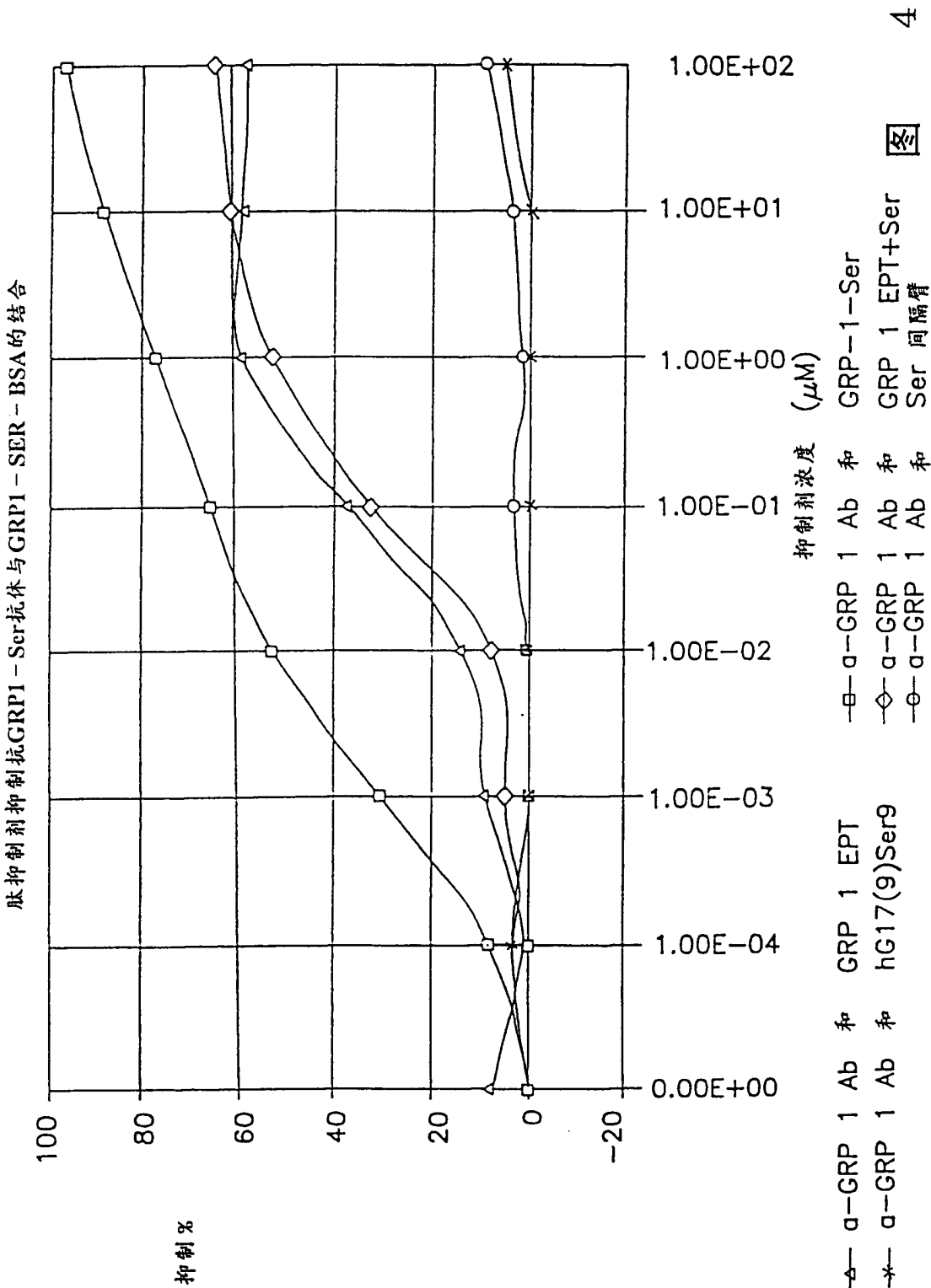


图 3



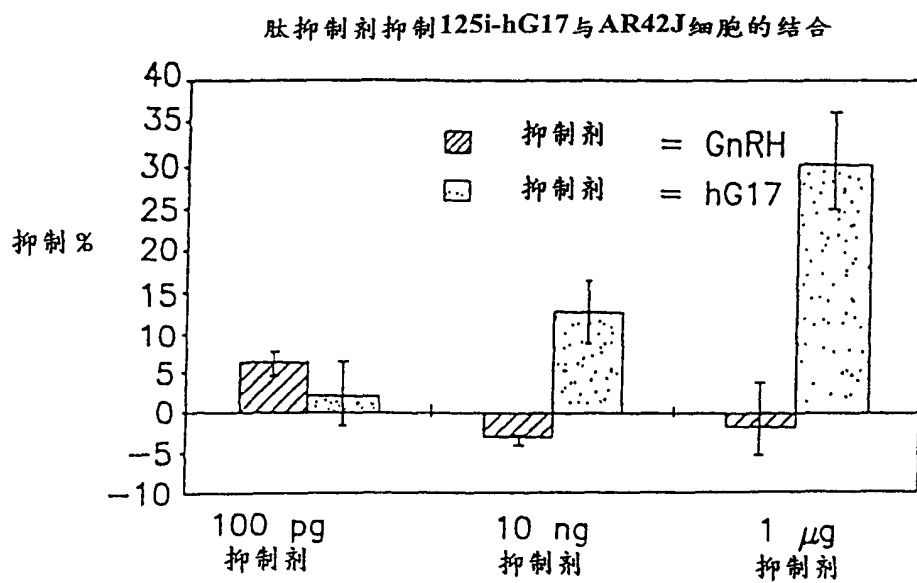


图 5

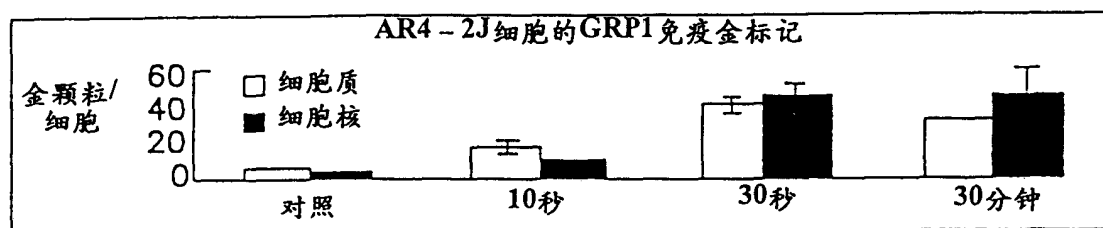
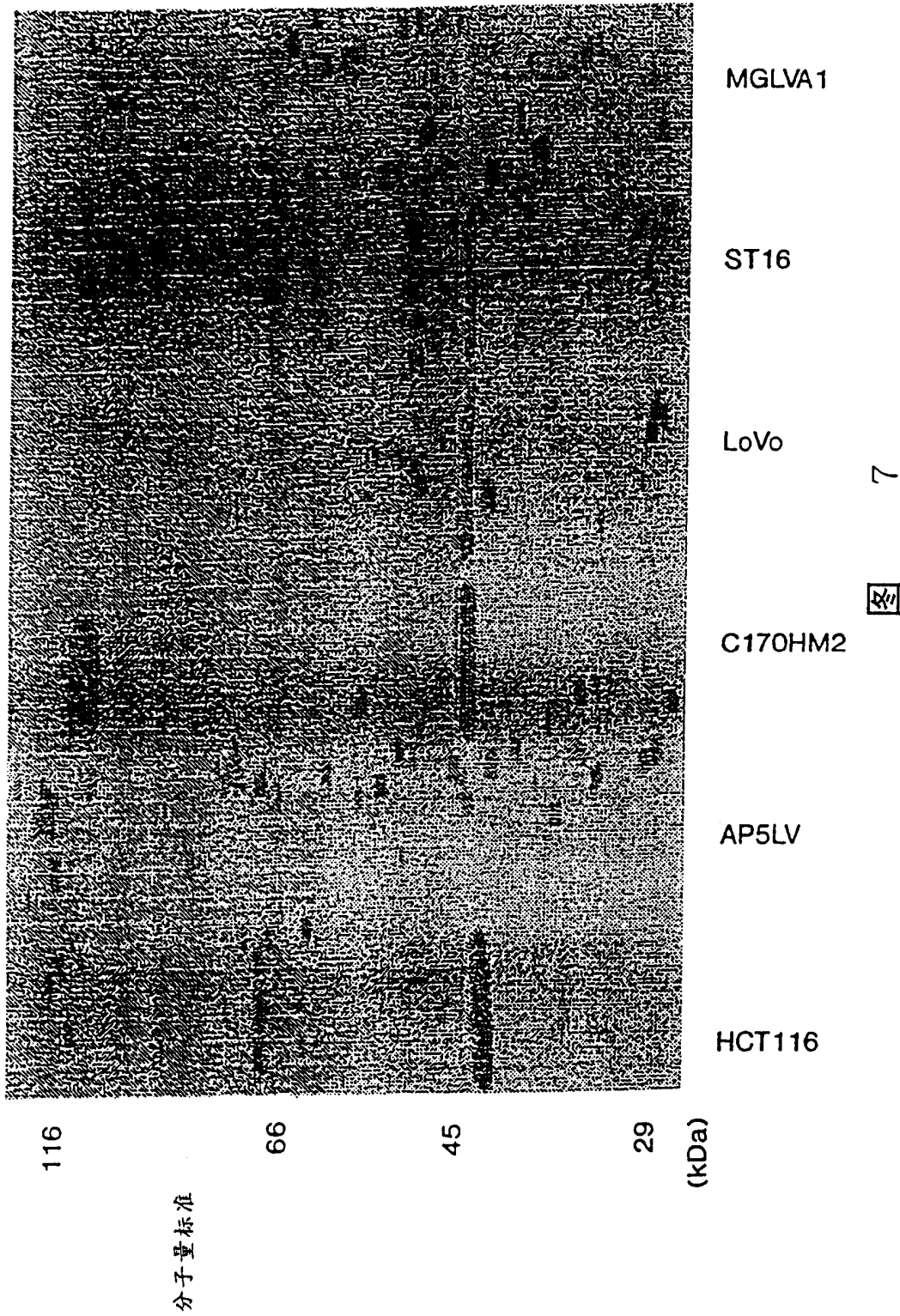


图 6

用家兔抗GRP1抗血清作的WESTERN印迹染色



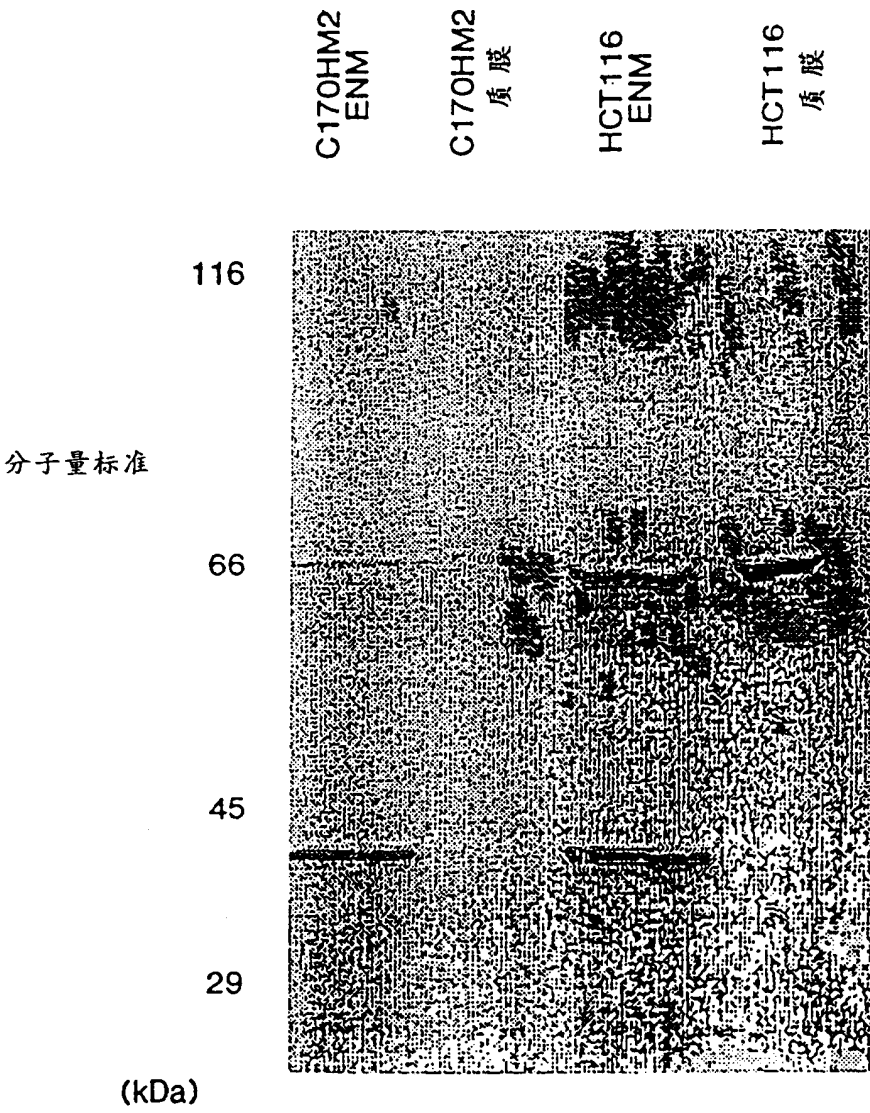


图 8

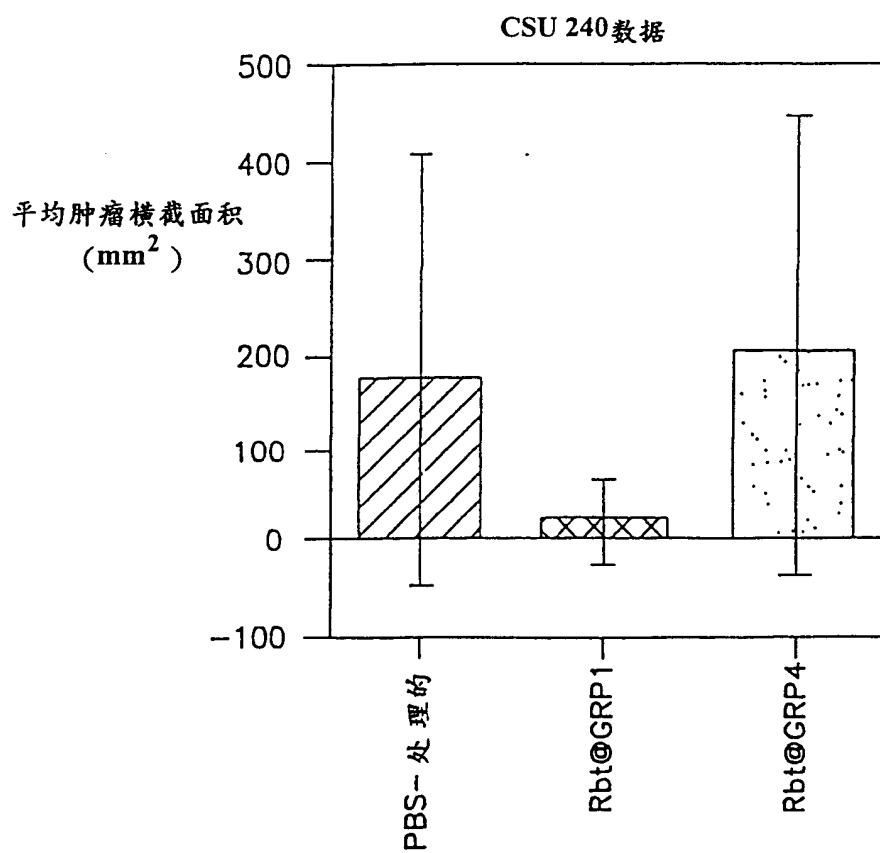
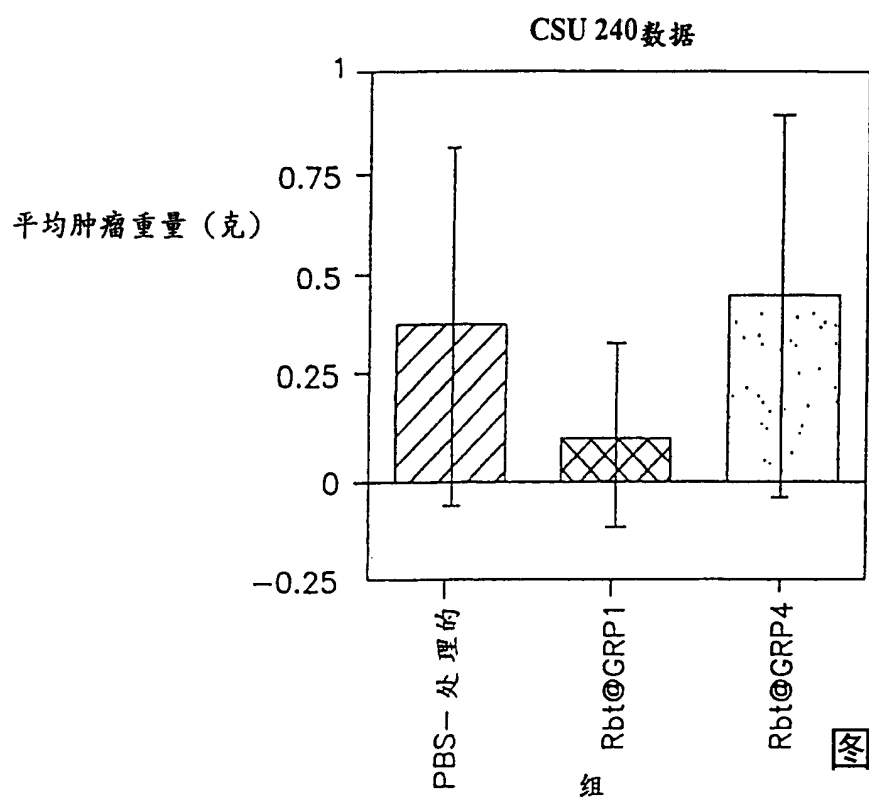


图 1 2

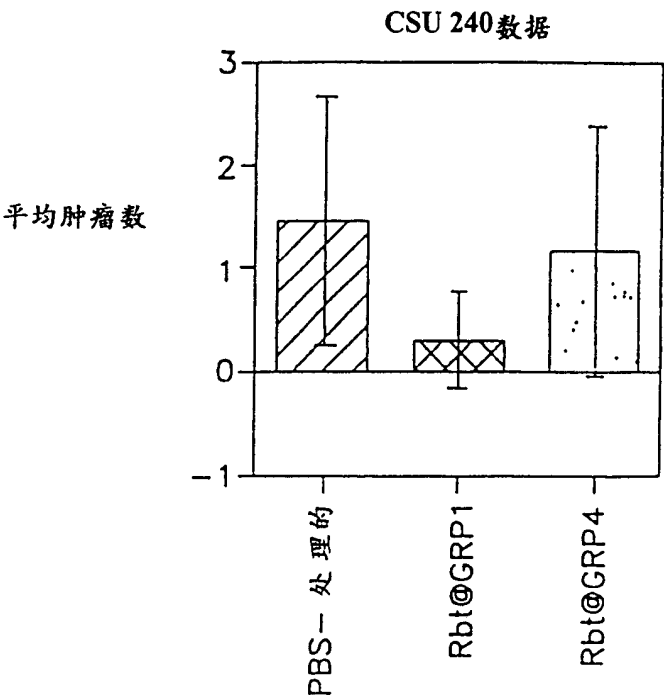


图 1 3

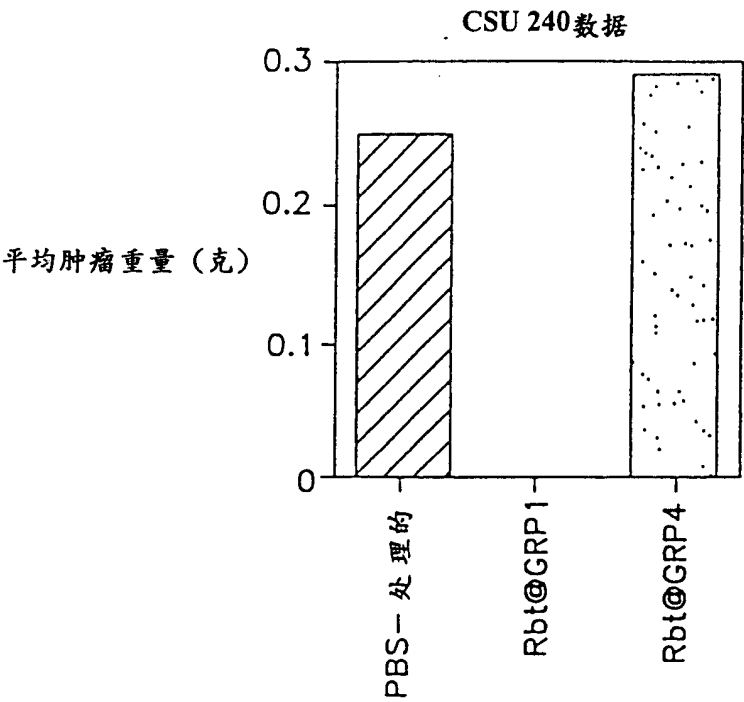


图 1 4

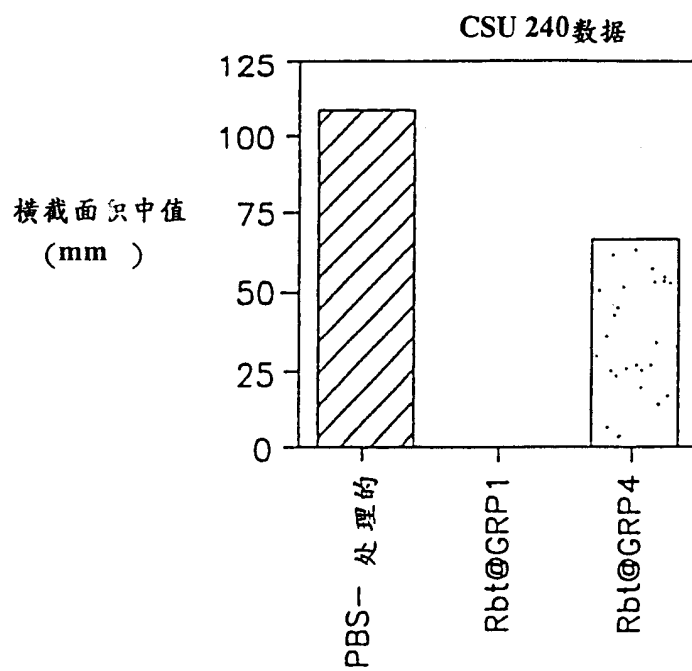


图 15

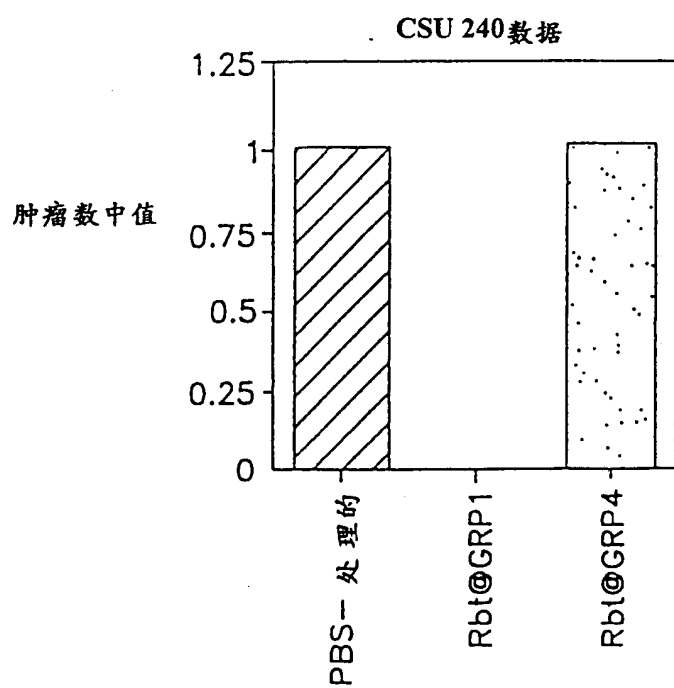


图 16

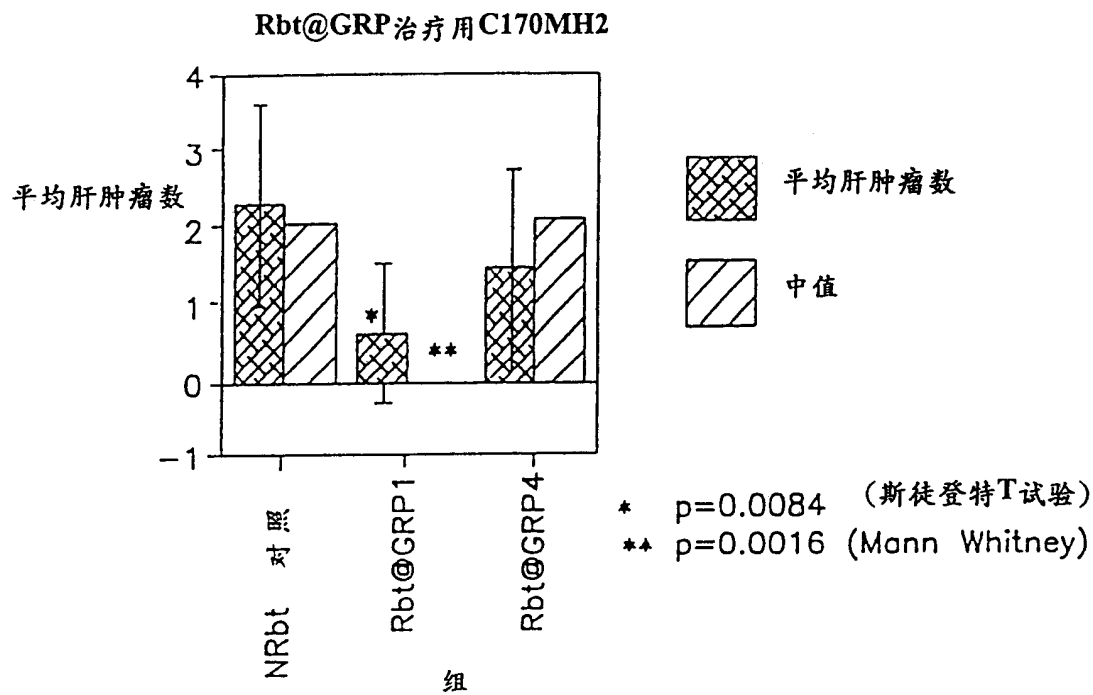


图 17

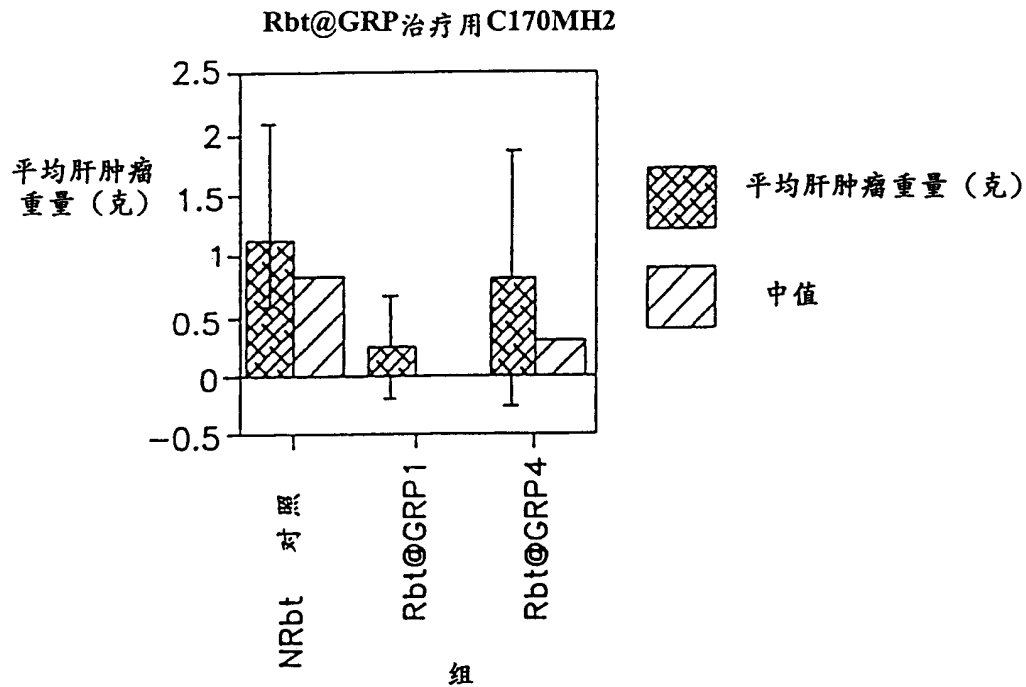


图 18

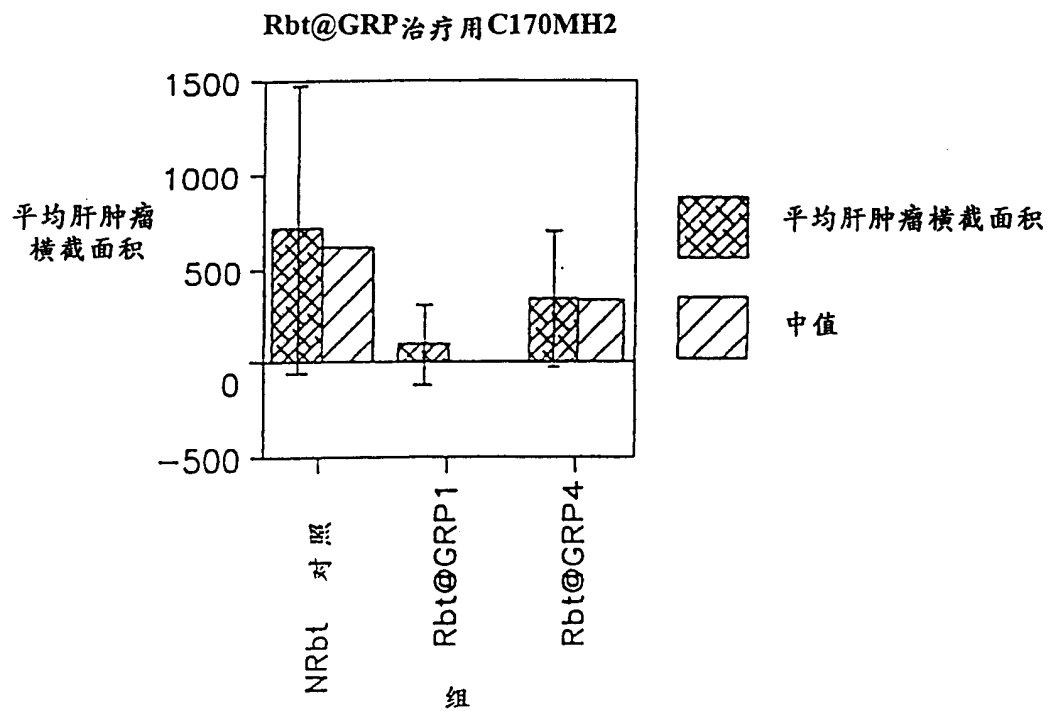


图 19

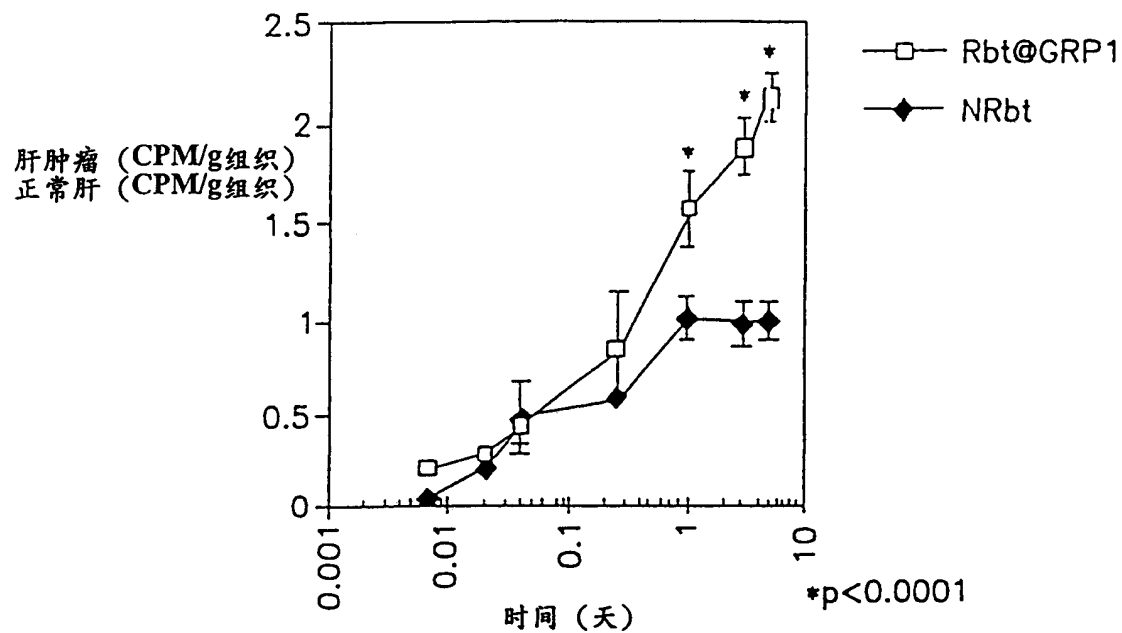


图 20

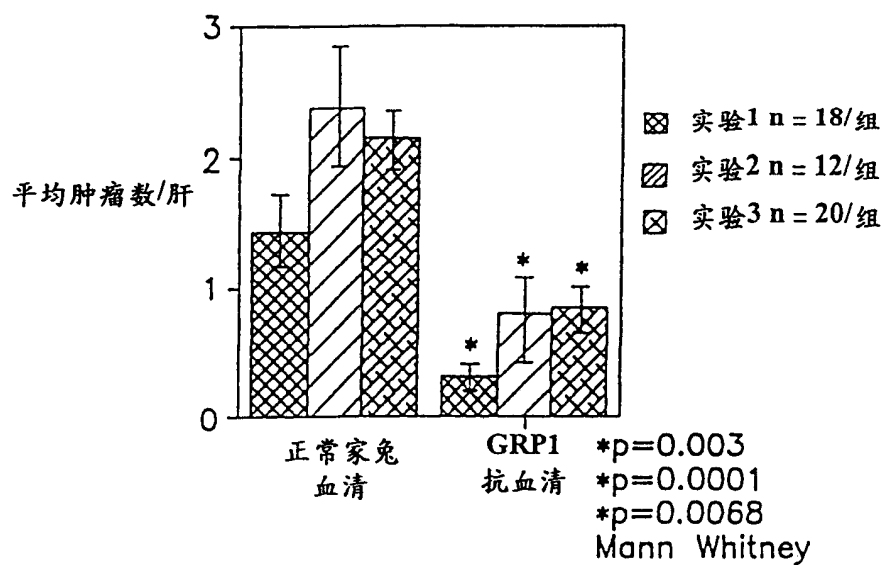


图 2 1

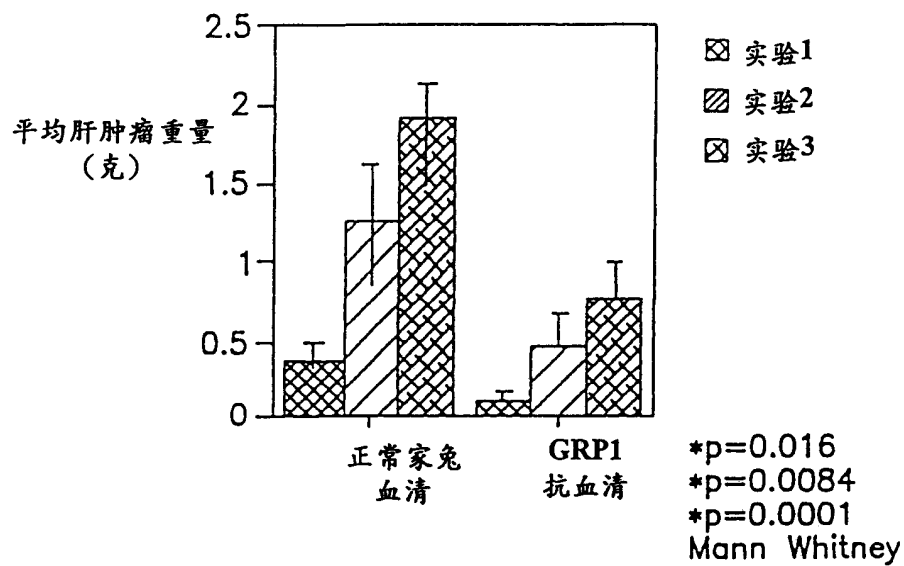


图 2 2

用WESTERN印迹评价C170HM2异种移值中的GRP1免疫反应性

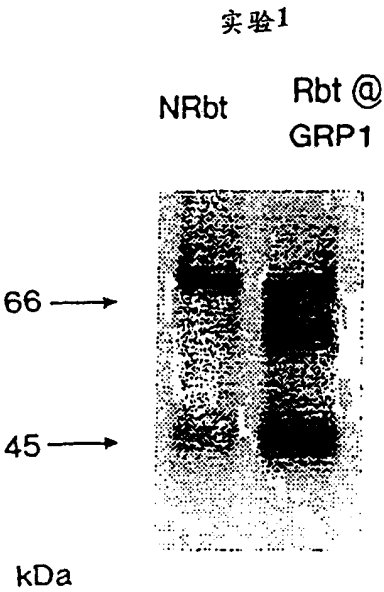


图 2 3 A

用WESTERN印迹评价C170HM2异种移值中的GRP1免疫反应性

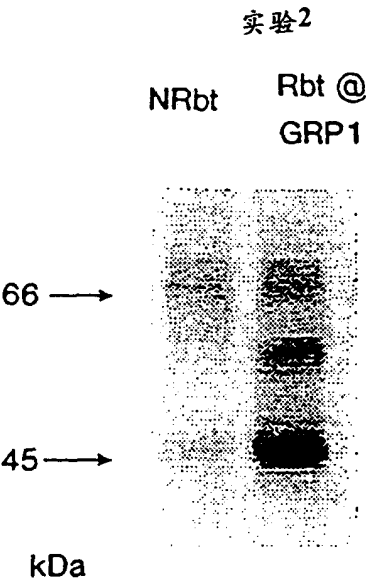


图 2 3 B

CI70HM2肿瘤的组织学分析
由活的前移边缘和坏死中心组成

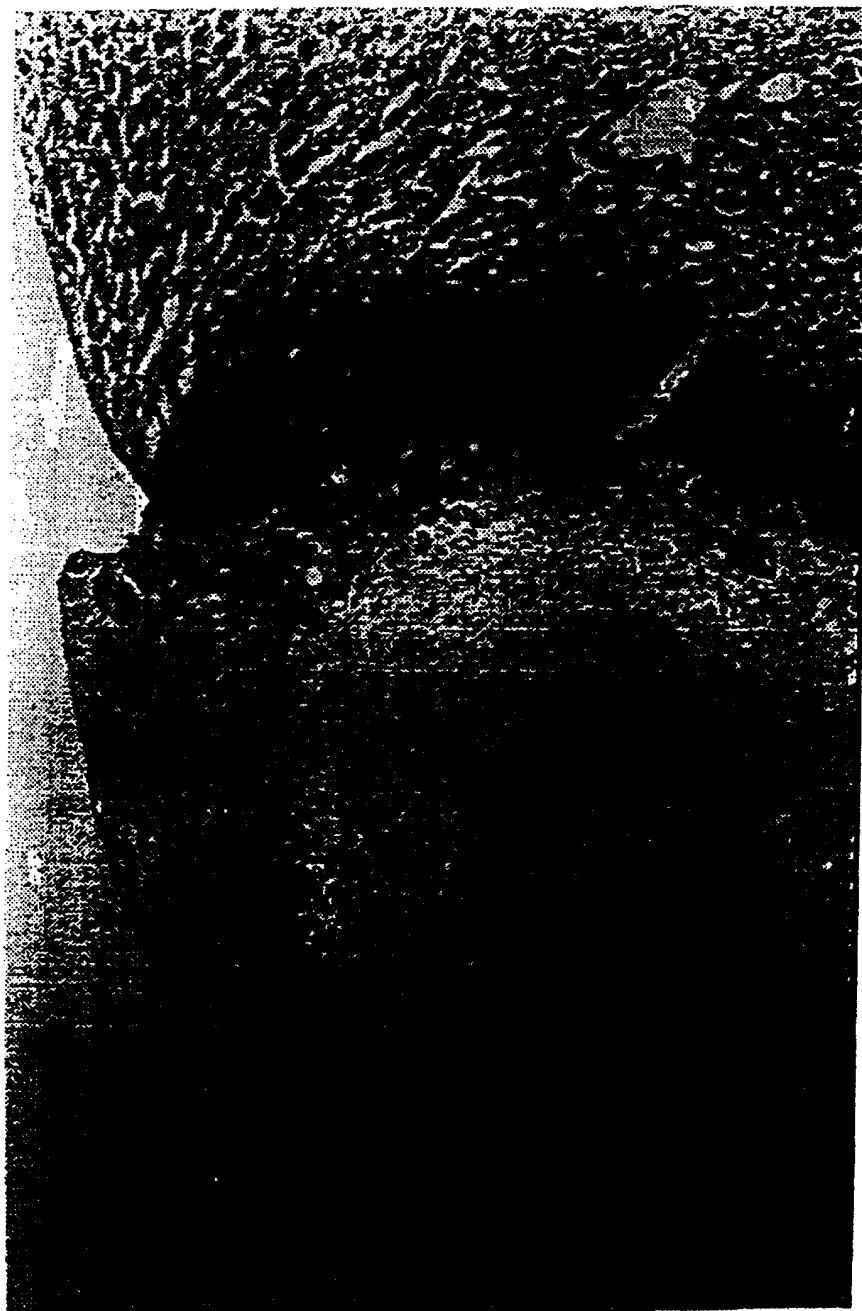


图 24

C170HM2肿瘤的组织学分析
在家兔抗GRP1处理组中活肿瘤内凋亡性细胞证据

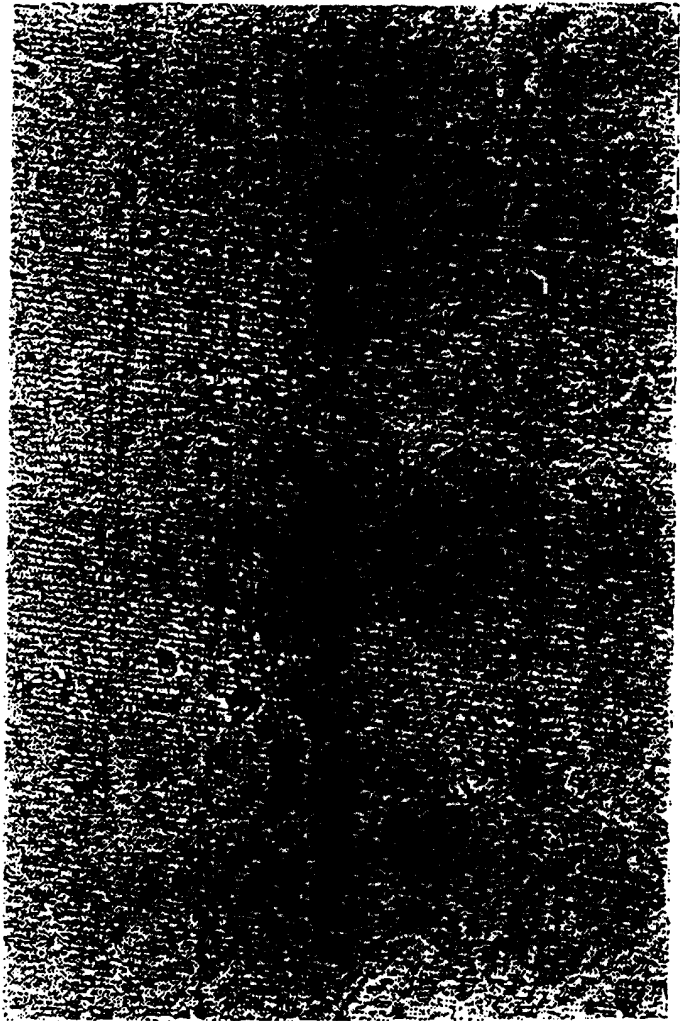


图 25