

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

A61K 39/395

C07K 16/30 G01N 33/574



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01805577.X

[43] 公开日 2003 年 3 月 26 日

[11] 公开号 CN 1406136A

[22] 申请日 2001.2.23 [21] 申请号 01805577.X

[30] 优先权

[32] 2000. 2. 24 [33] SE [31] 0000597 - 5

[86] 国际申请 PCT/SE01/00395 2001. 2. 23

[87] 国际公布 WO01/62286 英 2001. 8. 30

[85] 进入国家阶段日期 2002. 8. 23

[71] 申请人 活跃生物技术股份公司

地址 瑞典隆德

[72] 发明人 T·N·布罗丁

P·J·卡尔斯特罗姆

B·H·K·尼尔森

L·G·欧尔森 M·J·托德森

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利  
商标事务所

代理人 唐伟杰

权利要求书 9 页 说明书 31 页 序列表 3 页  
附图 14 页

[54] 发明名称 对结肠癌具有特异性的新抗体

[57] 摘要

本发明描述了结合在肿瘤细胞内和/或表面上的结合结构；展示和/或表达在肿瘤细胞内或表面上的靶结构；识别并封闭所述靶结构的结合结构；结合或阻断所述靶结构表达的物质；包含所述结合结构、靶结构或物质作为活性成分的药物组合物；包含所述靶结构作为活性成分的疫苗组合物；用于噬菌体筛选的方法；和包括使用上述主题体外和体内诊断和预后、以及治疗人类恶性疾病的方法。

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

1. 可结合在肿瘤细胞内、和/或细胞表面的结合结构，该结合结构主要由实质上通过 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列的第 160-165 位 (CDR1)、第 180-195 位 (CDR2)、第 228-238 位 (CDR3) 氨基酸定义的重链 CDR 结构来确定，而其它结合特异性由一或多个实质上通过 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列的第 23-36 位 (CDR1)、第 52-58 位 (CDR2)、第 91-100 位 (CDR3) 氨基酸定义的轻链 CDR 结构提供。

2. 可结合在肿瘤细胞内、和/或细胞表面的结合结构，所述结合结构含有实质上包含 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列第 23-36 位 (CDR1)、第 52-58 位 (CDR2)、第 91-100 位 (CDR3) 氨基酸的抗体轻链互补决定区 (CDR) 序列，和实质上包含 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列第 160-165 位 (CDR1)、第 180-195 位 (CDR2)、第 228-238 位 (CDR3) 氨基酸的重链 CDR 序列中的一个或多个 CDR 序列。

3. 根据权利要求 1 或 2 的结合结构，其包含所有所述 CDR 序列。

4. 根据权利要求 1-3 之任一项的结合结构，其是抗体和/或它的片段。

5. 根据权利要求 1 或 2 的结合结构，其是抗体和/或它的片段，还含有实质上包含 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列第 1-110 位氨基酸的轻链可变区、和实质上包含 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列第 130-249 位氨基酸的重链可变区。

6. 根据权利要求 5 的结合结构，其中所述抗体包含 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列。

7. 根据权利要求 1 或 2 的结合结构，其强烈地和/或均一地结合在选

自下组的上皮肿瘤细胞内和/或细胞表面：原发性和/或转移性结肠直肠癌、胰腺癌、乳腺癌和肺癌细胞。

8. 根据权利要求 1 或 2 的结合结构，其微弱地和/或不均一地和/或不与肾和/或前列腺癌和/或恶性黑素瘤细胞结合。

9. 根据权利要求 1 或 2 的结合结构，其强烈地与结肠表面上皮和小肠上皮的顶端部分结合。

10. 根据权利要求 9 的结合结构，其与结肠表面上皮细胞的微绒毛和/或刷状缘的细胞表面顶端面结合。

11. 根据权利要求 1 或 2 的结合结构，其微弱地至中等强度地与乳腺上皮和/或其周围结缔组织结合。

12. 根据权利要求 1 或 2 的结合结构，其微弱地和/或不均一地和/或不与正常组织结合，所述正常组织包括脾、肾、肝、肺、皮肤、胰腺、甲状腺、心肌和/或 CNS。

13. 根据权利要求 1 或 2 的结合结构，其通过噬菌体筛选提供。

14. 根据权利要求 13 的结合结构，其中所述噬菌体筛选包括将体内免疫学预先选择的展示在噬菌体颗粒上的结合结构所有组成成分、和通过使用不同表型组织对扣除筛选噬菌体颗粒相结合。

15. 根据权利要求 1 或 2 的结合结构，其中所述序列是 *Macaca fascicularis* 来源的。

16. 根据权利要求 1 或 2 的结合结构，其中所述序列与人来源的相应

序列有至少 78% (V1) 和 86% (Vh) 的氨基酸一致性。

17. 根据权利要求 1 或 2 的结合结构，其在人体中具有低免疫原性或无免疫原性。

18. 根据权利要求 1 或 2 的结合结构，其已通过多肽遗传连接、和/或通过与有机或无机化学分子化学缀合、和/或通过二、寡或多聚化进行衍生化。

19. 根据权利要求 1 或 2 的结合结构，其遗传连接或化学缀合细胞毒性多肽或细胞毒性有机或无机化学分子。

20. 根据权利要求 1 或 2 的结合结构，其遗传连接或化学缀合生物活性分子。

21. 根据权利要求 1 或 2 的结合结构，其遗传连接或化学缀合免疫活化分子。

22. 根据权利要求 1 或 2 的结合结构，其经改变增加或降低了其亲和力和/或亲和性。

23. 根据权利要求 1 或 2 的结合结构，其经改变增加了其产量。

24. 根据权利要求 1 或 2 的结合结构，其经改变以致影响了其药物动力学性质。

25. 根据权利要求 1 或 2 的结合结构，其经改变以致赋予了其新的药物动力学性质。

26. 根据权利要求 1 或 2 的结合结构，其是被标记的，并且其结合是特异的并可被所述结合结构的未标记形式抑制且不被其它结合结构抑制，而且其不抑制具有其它特异性的其它结合结构的结合。

27. 编码权利要求中 6 定义的抗体的 DNA 序列，该 DNA 序列包含 SEQ ID NO:1 所示序列。

28. 展示和/或表达在肿瘤细胞内和/或表面上的靶结构，所述靶结构能够特异地被和特异地与权利要求 1-26 之任一项定义的结合结构、和具有相似结合性质的其它结合结构结合。

29. 根据权利要求 28 的靶结构，能够特异地被所述结合结构封闭和特异地封闭所述结合结构。

30. 根据权利要求 28 的靶结构，其在选自下组的上皮肿瘤细胞内和/或细胞表面上强烈地和/或均一地展示和/或表达：原发性和/或转移性结肠直肠癌、胰腺癌、乳腺癌和肺癌细胞。

31. 根据权利要求 28 的靶结构，其在肾和/或前列腺癌和/或恶性黑色素瘤中微弱地和/或不均一地和/或不展示和/或表达。

32. 根据权利要求 28 的靶结构，其强烈地展示和/或表达在结肠表面上皮和小肠上皮的顶端部分中。

33. 根据权利要求 32 的靶结构，其展示和/或表达与结肠表面上皮细胞的微绒毛和/或刷状缘的细胞表面顶端面相关联。

34. 根据权利要求 28 的靶结构，其在乳腺上皮和/或其周围结缔组织中微弱地至中等强度地展示和/或表达。

35. 根据权利要求 28 的靶结构, 其在正常组织中微弱地和/或不均一地和不展示和/或表达, 所述正常组织包括脾、肾、肺、皮肤、胰腺、甲状腺、心肌和/或 CNS。

36. 根据权利要求 28 的靶结构, 其展示和/或表达与上皮组织相关。

37. 根据权利要求 28 的靶结构, 其在非还原形式下具有 90 和/或 220 千道尔顿的表观分子量。

38. 权利要求 28-37 之任一项定义的靶结构的抗独特型, 该抗独特型特异地被和特异地与对所述靶结构具有类似结合特异性的结合结构结合。

39. 根据权利要求 38 的抗独特型, 其特异地被所述结合结构封闭和特异地封闭所述结合结构。

40. 结合结构, 其识别权利要求 28-37 之任一项定义的靶结构, 并具有无机化学性质。

41. 根据权利要求 40 的结合结构, 其封闭权利要求 1-26 之任一项定义的结合结构的结合。

42. 阻断权利要求 28-37 之任一项定义的靶结构的表达的物质。

43. 根据权利要求 42 的物质, 其是反义寡核苷酸和/或核酶分子。

44. 封闭权利要求 28-37 之任一项定义的靶结构的功能的物质。

45. 包含权利要求 1-26 或 40-41 之任一项定义的结合结构作为活性成分的药物组合物。

46. 包含权利要求 28-37 之任一项定义的靶结构、或权利要求 38 或 39 定义的所述靶结构的抗独特型作为活性成分的药物组合物。

47. 包含权利要求 42-44 之任一项定义的物质作为活性成分的药物组合物。

48. 包含权利要求 28-37 之任一项定义的靶结构、或权利要求 38 或 39 定义的所述靶结构的抗独特型作为活性成分的疫苗组合物。

49. 噬菌体筛选方法，包括将体内免疫学预先筛选的展示在噬菌体颗粒上的结合结构所有组成成分、和利用不同表型组织对扣除筛选噬菌体颗粒相结合。

50. 根据权利要求 49 的方法，其中所述预先筛选的结合结构所有组成成分是来源于灵长类动物的抗体。

51. 根据权利要求 49 的方法，其中所述组织对是匹配的。

52. 根据权利要求 51 的方法，其中所述匹配的组织对来源于相同的个体。

53. 根据权利要求 49 的方法，其中所述组织以冰冻的和/或福尔马林固定/石蜡包埋的组织切片和/或断片和/或细胞悬浮物的形式使用。

54. 人类恶性疾病的体外组织病理学诊断和预后方法，其中将样品与权利要求 1-26 或 40-41 之任一项定义的结合结构以及指示剂接触。

55. 根据权利要求 54 的方法，其中所述样品是组织样品，该组织样品经冰冻和/或福尔马林固定和石蜡包埋后切片。

56. 根据权利要求 54 的方法，该方法包括肿瘤分型。

57. 根据权利要求 54 的方法，该方法包括肿瘤筛选。

58. 根据权利要求 54 的方法，该方法包括肿瘤诊断和预后。

59. 根据权利要求 54 的方法，该方法包括监测恶化前情况。

60. 体外诊断和预后人类恶性疾病的方法，其中测定权利要求 1-26 或 40-41 之任一项的结合结构在体液中的浓度。

61. 体外诊断和预后人类恶性疾病的方法，其中测定体液中包含权利要求 28-37 之任一项定义的靶结构、或权利要求 38 或 39 定义的所述靶结构抗独特型的抗原的浓度。

62. 体外诊断和预后人类恶性疾病的方法，其中测定 a) 包含权利要求 28-37 之任一项定义的靶结构、或权利要求 38 或 39 定义的所述靶结构抗独特型的抗原、与 b) 权利要求 1-26 或 40-41 之任一项定义的结合结构的复合物在体液中的浓度。

63. 体内诊断和预后人类恶性疾病的方法，其中确定人类患者中权利要求 1-26 或 40-41 之任一项的结合结构向肿瘤沉积物的定位。

64. 根据权利要求 63 的方法，其中在确定前给患者施用所述结合结构。

65. 根据权利要求64的方法,其中所述结合结构在肿瘤沉积物中积聚。
66. 根据权利要求63-65之任一项的方法,其是定量的。
67. 治疗人类恶性疾病的方法,其中给人类患者施用权利要求1-26或40-41之任一项定义的结合结构。
68. 根据权利要求67的方法,其中所述结合结构通过遗传连接赋予组合分子改变的药动力学性质的分子而发生了改变。
69. 根据权利要求67的方法,其中所述结合结构通过衍生化发生了改变。
70. 治疗人类恶性疾病的方法,其中给人类患者施用权利要求28-37之任一项定义的靶结构。
71. 根据权利要求70的方法,其中引起针对所述靶结构的免疫应答。
72. 根据权利要求70的方法,其中所述靶结构经遗传和/或化学连接可赋予组合分子改变的药动力学性质的分子而发生了改变。
73. 根据权利要求70的方法,其中所述靶结构通过遗传和/或化学连接可赋予组合分子改变的免疫原性和/或抗原性的分子而发生了改变。
74. 根据权利要求70的方法,其中所述靶结构通过衍生化发生了改变。
75. 根据权利要求70的方法,其中所述靶结构通过遗传修饰发生了改变。

76. 根据权利要求70的方法，其中所述靶结构与可赋予混合物改变的免疫原性的其它分子混合。

77. 根据权利要求70的方法，其中所述靶结构与佐剂混合。

78. 治疗人类恶性疾病的方法，其中给人类患者施用权利要求42-44之任一项定义的物质。

79. 根据权利要求78的方法，其中所述物质通过遗传和/或化学连接可赋予组合分子改变的药理学性质的分子而发生了改变。

80. 根据权利要求78的方法，其中所述物质通过衍生化发生了改变。

81. 根据权利要求78的方法，其中引起针对所述物质的免疫应答。

82. 根据权利要求78的方法，其中所述物质通过遗传和/或化学连接可赋予组合分子改变的免疫原性和/或抗原性的分子而发生了改变。

83. 根据权利要求78的方法，其中所述物质通过遗传修饰发生了改变。

84. 根据权利要求78的方法，其中所述物质与其它分子混合以赋予混合物改变的免疫原性。

85. 根据权利要求78的方法，其中所述物质与佐剂混合。

## 对结肠癌具有特异性的新抗体

### 发明领域

本发明涉及可结合在肿瘤细胞内和/或表面上的结合结构；展示和/或表达在肿瘤细胞内或表面上的靶结构；识别并封闭所述靶结构的结合结构；结合或阻断所述靶结构表达的物质；包含所述结合结构、靶结构或物质作为活性成分的药物组合物；包含所述靶结构作为活性成分的疫苗组合物；用于噬菌体筛选的方法；和包括使用上述主题进行体外和体内诊断和预后、以及治疗人类恶性疾病的方法。

### 发明背景

正常细胞转变成癌细胞与转化细胞和生长的肿瘤的微环境两者的基因型和/或表型的改变均有关(Kerbel RS, 1995)。原则上，这些改变中的一些能够被免疫系统识别例如肿瘤特异性抗原(TSA)，并由此形成肿瘤特异性免疫治疗的基础。尽管突变事件(是引起肿瘤和肿瘤形成的原因)本身可以导致TSA的表达，但次级改变例如正常抗原的不良调节的表达和翻译后修饰可以包括能够用作免疫治疗靶标的大多数肿瘤相关抗原。

与肿瘤表型相关的分子可以使用基因组学和蛋白组学现代技术进行鉴定，这些技术直接涉及靶标本身以鉴定分子修饰和改变的表达水平(Williams KL, 1999)。较为间接地，现还使用杂交瘤来源的单克隆抗体鉴定表征肿瘤表型的肿瘤相关抗原(TAA)(Kohler G, Milstein C, 1976)。

噬菌体展示技术已经成为杂交瘤技术、以及一些应用中甚至特别方法的成熟替代技术，用于通过抗原驱动的筛选原则而非通过纯粹筛选制备单克隆抗体(Hoogenboom HR等, 1998)。该技术的基础是噬菌体颗粒，这些噬菌体颗粒在其表面上展示其基因组中编码的特定抗体片段，从而允许就遗传包装的形式选择噬菌体和其编码的DNA。假设可获得与抗体可变区重链和轻链基因互补的引物，则可以通过聚合酶链式反应(PCR)从任

何物种的免疫或非免疫动物中扩增待插入噬菌体载体中的抗体基因，并构建大的噬菌体抗体文库。

在细胞、组织切片和其它生物学材料上筛选噬菌体文库产生了与所用的复杂抗原物质内的成分结合的单克隆抗体或肽(Hoogenbeem HR 等 1998, Tordsson J 等 1997)。使用复杂抗原从直接阳性筛选得到的结果是来自总组织反应库的特异性的分选，偏向于高度表达的和占免疫优势的抗原并偏向于高亲和性相互作用。相反为了鉴定代表特异表型的差异表达抗原，必须使用扣除方法。

### 发明概述

根据本发明，提供与肿瘤细胞、尤其是上皮肿瘤细胞如结肠直肠、胰腺、乳腺和肺癌细胞结合的结合结构，如抗体。还提供展示和/或表达在这些肿瘤细胞中和/或表面上的靶结构。

还提供使用组织切片或组织切片和细胞的组合作为用于噬菌体筛选的材料的新扣除筛选方法。

因此，在本发明一个方面中，本发明涉及可以结合在肿瘤细胞中和/或细胞表面上的结合结构，该结合结构主要由实质上通过 SEQ ID NO: 2 所示氨基酸序列第 160 - 165 位(CDR1)、180 - 195 位(CDR2)、228-238 位(CDR3) 氨基酸定义的重链 CDR 结构来确定，而其它的结合特异性由一个或多个实质上通过 SEQ ID NO: 2 所示氨基酸序列第 23 - 26 位(CDR1)、52 - 58 位(CDR2)、91-100 位(CDR3)氨基酸定义的轻链 CDR 结构提供。

在再一方面，本发明涉及可结合在肿瘤细胞中和/或细胞表面上的结合结构，所述结合结构含有实质上包含 SEQ ID NO: 2 所示氨基酸序列第 23 - 26 位(CDR1)、52 - 58 位(CDR2)、91-100 位(CDR3)氨基酸的抗体轻链互补决定区(CDR)序列，和实质上包含 SEQ ID NO: 2 所示氨基酸序列第 160 - 165 位(CDR1)、180 - 195 位(CDR2)、228-238 位(CDR3) 氨基酸的重链 CDR 序列中的一个或多个。

一个实施方案中，所述结合结构包含所有的所述 CDR 序列。

在再一实施方案中，所述结合结构是抗体和/或其片段，在进一步的实施方案中含有实质上包含 SEQ ID NO: 2 所示氨基酸序列第 1 - 110 位

氨基酸的轻链可变区、和实质上包含 SEQ ID NO: 2 所示氨基酸序列第 130 - 249 位氨基酸的重链可变区。在再一实施方案中，所述抗体包含 SEQ ID NO:2 所示整个氨基酸序列。

在一个实施方案中，所述结合结构强烈地和/或均一地结合在上皮肿瘤细胞的内部和/或细胞表面上，其中所述上皮肿瘤细胞选自原发性和/或转移性结肠直肠、胰腺、乳房和肺癌细胞。在再一实施方案中，所述结合结构与肾和/或前列腺癌和/或恶性黑素瘤细胞微弱地和/或不均一地和/或不结合。在另一实施方案中，所述结合结构强烈地与结肠表面上皮和小肠上皮的顶端部分结合。在再一实施方案中，所述结合结构与结肠表面上皮细胞的微绒毛和/或刷状缘的细胞表面端面结合。在再一实施方案中，所述结合结构与乳腺上皮和/或其周围结缔组织有微弱至中等程度的结合。

在其它实施方案中，所述结合结构与正常组织（包括脾、肾、肝、肺、皮肤、胰腺、甲状腺、心肌、和/或 CNS）有微弱和/或不均匀的结合和/或没有结合。

在一个实施方案中，所述结合结构通过噬菌体筛选提供，在再一实施方案中噬菌体筛选包括将体内免疫学预选择展示在噬菌体颗粒上的结合结构所有组成成分（repertoire）、和通过使用不同表型组织对扣除筛选噬菌体颗粒相结合。在再一实施方案中，所述序列是 *Macaca fascicularis* 来源的，该序列可以与人类来源的相应序列有至少 78% (V1) 和 86% (Vh) 的氨基酸一致性。

在再一实施方案中，所述结合结构在人体中具有低的免疫原性或无免疫原性。

在一个实施方案中，所述结合结构通过遗传连接多肽，和/或通过化学缀合有机或无机化学分子、和/或通过二、寡或多聚化衍生而来。

在其它实施方案中，所述结合结构遗传连接或化学缀合细胞毒性多肽或细胞毒性有机或无机化学分子；或生物活性分子；或免疫活化分子。

在其它实施方案中，对所述结合结构进行改变以增加或降低其亲和力和/或亲和性；或增加其产量；或影响其药物动力学性质；或赋予其新

的药物动力学性质。

在再一实施方案中，对所述结合结构进行标记，该结合结构的结合是特异的并可被所述结合结构的未标记形式抑制，而不被其它结合结构抑制，而且它不抑制具有其它特异性的其它结合结构的结合。

在另一方面，本发明涉及编码以上定义的抗体的 DNA 序列，所述抗体即包含 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列的抗体，其 DNA 序列包含 SEQ ID NO:1 所示序列。

另一方面，本发明涉及展示和/或表达在肿瘤细胞内和/或表面上的靶结构，所述靶结构能够特异地被和特异地与以上定义的结合结构、及具有相似结合性质的其它结合结构结合。

在一个实施方案中，所述靶结构能够特异地被所述结合结构封闭和特异地封闭所述结合结构。

在其它实施方案中，所述靶结构强烈地和/或均一地展示和/或表达在上皮肿瘤细胞内和/或细胞表面上，所述上皮肿瘤细胞选自原发性和/或转移性结肠直肠、胰腺、乳腺和肺癌细胞。

在再其它实施方案中，所述靶结构在肾和/或前列腺癌和/或恶性黑色素瘤中有微弱和/或不均一的和/或没有展示和/或表达。

在其它实施方案中，所述靶结构强烈地展示和/或表达在结肠表面上皮和小肠上皮的端部。

在再其它实施方案中，所述靶结构的展示和/或表达涉及结肠表面上皮细胞的微绒毛和/或刷状缘细胞表面的端面。

在其它实施方案中，所述靶结构在乳腺上皮和/或其周围结缔组织中有微弱至中等程度的展示和/或表达。

在再其它实施方案中，所述靶结构在正常组织（包括脾、肾、肝、肺、皮肤、胰腺、甲状腺、心肌、和/或 CNS（中枢神经系统））中有微弱和/或不均一的和/或没有展示和/或表达。

在另一实施方案中，所述靶结构的展示和/或表达与上皮组织相关。

在再一实施方案中，所述靶结构在其非还原形式时具有 90 和/或 220 千道尔顿的表观分子量。

在再一方面，本发明涉及以上定义的靶结构的抗独特型，该抗独特型特异地被和特异地与对于所述靶结构具有相似结合特异性的结合结构结合。

在一个实施方案中，所述抗独特型特异地被所述结合结构封闭并特异地封闭所述结合结构。

在再一方面，本发明涉及识别以上定义的靶结构并是有有机化学性质的结合结构。在一个实施方案中，该结合结构阻断以上定义的结合结构的结合。

在另一方面，本发明涉及阻断上述靶结构表达的物质。

在一个实施方案中，所述物质是反义寡核苷酸和/或核酶分子。

在再一方面，本发明涉及阻断上述靶结构的功能的物质。

在再一方面，本发明涉及包含至少一种上述结合结构作为活性成分的药物组合物。

在再一方面，本发明涉及包含上述靶结构、或所述靶结构的上述抗独特型作为活性成分的药物组合物。

在再一方面，本发明涉及包含上述定义物质作为活性成分的药物组合物。

在再一方面，本发明涉及包含上述靶结构、或所述靶结构的上述抗独特型作为活性成分的疫苗组合物。

在再一方面，本发明涉及用于噬菌体筛选的方法，其包括将体内免疫学预选择展示在噬菌体颗粒上的结合结构所有组成成分、和通过利用不同表型的组织对扣除筛选噬菌体颗粒相结合。

在所述方法的一个实施方案中，所述预选择的结合结构所有组成成分是来源于灵长类的抗体。

在所述方法的再一实施方案中，所述组织对是匹配的。优选地，所述匹配的组织对来源于相同的个体。

在其它实施方案中，所述组织的使用形式是冰冻和/或甲醛固定/石蜡包埋的组织切片和/或断片（fragment）和/或细胞悬浮物。

在再一方面，本发明涉及体外组织病理学诊断和预后人类恶性疾病

的方法，其中将样品和至少一种上述定义的结合结构以及指示剂接触。优选地，所述样品是组织样品，其在冰冻和/或甲醛固定和石蜡包埋后进行切片。

在一些实施方案中，所述方法包括肿瘤分型、肿瘤筛选、肿瘤诊断和预后、以及恶化前情况的监视。

在再一方面，本发明涉及体外诊断和预后人恶性疾病的方法，其中测定至少一种上述结合结构的体液浓度。

在再一方面，本发明涉及体外诊断和预后人类恶性疾病的方法，其中测定包含上述靶结构、或所述靶结构的上述抗独特型的抗原的体液浓度。

在再一方面，本发明涉及体外诊断和预后人类恶性疾病的方法，其中测定 a) 包含上述靶结构，或所述靶结构的上述抗独特型的抗原，与 b) 至少一种上述结合结构的复合物的体液浓度。

在再一方面，本发明涉及体内诊断和预后人类恶性疾病的方法，其中测定至少一种上述结合结构在人类患者肿瘤沉积物 (tumor deposits) 的定位。在一个实施方案中，在测定前给患者施用所述结合结构。在再一实施方案中，所述结合结构积聚在肿瘤沉积物中。在再一实施方案中，所述方法是定量的。

在再一方面，本发明涉及治疗人类恶性疾病的方法，其中给人类患者施用至少一种上述结合结构。

在所述方法的其它实施方案中，所述结合结构已通过遗传连接可赋予组合分子改变的药理学性质的分子，或通过衍生化进行了改变。

在再一方面，本发明涉及治疗人类恶性疾病的方法，其中给人类患者施用以上定义的靶结构。在所述方法的一个实施方案中，引起针对所述靶结构的免疫应答。

在其它实施方案中，所述靶结构通过遗传和/或化学连接可赋予组合分子改变的药理学性质的分子，或通过遗传和/或化学连接可赋予组合分子改变的免疫原性和/或抗原性的分子、或通过衍生化、或通过遗传修饰，发生了改变。在所述方法的其它实施方案中，所述靶结构与其它

分子混合以赋予混合物改变的免疫原性、或与佐剂混合。

在再一方面，本发明涉及治疗人类恶性疾病的方法，其中给人类患者施用以上定义的物质。在所述方法的其它实施方案中，所述物质通过遗传和/或化学连接可赋予组合分子改变的**药物动力学性质**的分子、或通过衍生化，进行了改变。在一个实施方案中，引起针对所述物质的免疫应答。在所述方法的其它实施方案中，所述物质通过遗传和/或化学方式与可赋予组合分子改变的**免疫原性和/或抗原性**的分子连接；或通过遗传修饰，进行了改变。在再其它实施方案中，所述物质与其它分子混合以使混合物具有改变的免疫原性、或与佐剂混合。

### 发明详述

在根据本发明的筛选方法中，使用组织切片或组织切片和细胞的组合作为用于噬菌体筛选的材料。轻度固定的组织切片应当是极大地保留了原始结构和表型的生物材料。

使用免疫结肠癌噬菌体文库在匹配的自体结肠和结肠癌组织对(从6名不同患者切除的)上进行扣除筛选，发展并应用了此方法。选择的特异性中的一个在此称作 K293，其与此筛选中使用的所有肿瘤均一地反应，但与正常结肠的反应极为有限。具有 K293 特异性模式的克隆常常是在最后的筛选循环中被发现的，这提示了基于组织的该扣除方法的功能性。

K293 确定的肿瘤相关抗原(TAA) 优选由患者中出现的肿瘤表型而非体外培养肿瘤细胞系表达，这突出了当旨在鉴定针对治疗上适合的新肿瘤相关抗原的试剂时使用组织切片作为筛选材料的优点和适当性。

而且，K293 抗体表现出与结肠直肠、胰腺、肺和乳腺癌有强烈的反应性，并且当在大量正常组织上测试时表现出极为有限的反应性。我们证实了细胞表面反应性并证实循环系统中缺少明显水平的抗原，提示该抗原对于靶向肿瘤是适合的。这也被 K293 Fab 超抗原 SEA (D227A) 所支持，该超抗原在使用异源移植的人肿瘤细胞的人源化 SCID 模型中显示出初步迹象的定向治疗活性。

最后，使用固定的 K293 抗体片段通过亲和层析，可以实现对蛋白质

组分的纯化。该组分在非还原 SDS 凝胶层析中表现为 MW 35-45 kDa 的条带，并且经肽消化和测序得到三个肽片段序列，支持了与 GAPDH（甘油醛-3-磷酸脱氢酶）的同源性。

本研究提示了鉴定正常和患病组织之间的表型差异、以及间接地鉴定编码差异表达分子的基因的策略。该策略被应用于鉴定结肠癌相关抗原和与这些抗原反应的抗体。从一个更宽的角度，此发展的方法同样可以用于其它研究领域，使用组织对例如正常对发炎的或成熟对未成熟的组织以鉴定炎症疾病或发育状态的标记和靶。

我们对使用组织切片作为抗原来源来扣除噬菌体文库的效力在一个模型系统中进行了评价。使用编码代表宽反应性(C215)和肿瘤特异的(1F)特异性的 scFv 抗体的噬菌体，可以从一个结合的噬菌体抗体中明确地扣除另一个。后者有一个轻微的简化，因为 1F 抗原在小肠组织中不是完全缺乏而是有微弱表达(Tordsson 等，待发表)。由此，1F 噬菌体还存在的次要扣除，可能会降低这两个特异噬菌体的分离。

此外，当使用生长在 SCID 小鼠中的 Colo 205 肿瘤的丙酮固定组织切片，而非使用培养的完整结肠 205 细胞进行阳性筛选步骤（以及使用子宫组织切片进行阴性筛选步骤）时，1F 噬菌体产量的降低比 C215 噬菌体产量的降低高了 12 至 16 倍(图 2 和未显示的数据)。原因可能是 1F 抗原对固定敏感或 1F scFv 噬菌体的结合对用于此基于组织的筛选方法的苛刻洗涤敏感。

与仅有阳性筛选比较(Tordsson 等，待发表)，增加使用子宫切片进行的阴性筛选步骤不改变从细胞得到的 C215 和 1F 噬菌体的相对产量，这证实了该系统的特异性以及使用这些特异性通过免疫组织化学方法早先发现的与子宫的阴性反应。

总之，尽管该模型中缺少最佳的肿瘤特异噬菌体，但仍证明了基于组织的噬菌体吸附的有效性和特异性，由此为扣除发现方案提供了基础。此外，在每个筛选循环中（噬菌体产量的损失最小）或在两个筛选循环间重复吸附步骤还将增加吸附的效力。

由于这些文库筛选是在证实了每个扣除筛选循环中重复的阴性吸附

步骤更为有效之前进行的，所以在所有的 7 个筛选循环中都仅使用了单次吸附。这可能并不是一个缺陷。可以预期，通过在每个筛选循环中进行不同次数的吸附而实现的不同强度阴性筛选将起到如同调谐器的作用。由此，可以逐渐地使筛选结果从针对高(广泛)表达抗原的抗体(无阴性吸附)偏向于针对严格差异表达的抗原的抗体(重复的阴性筛选)。

然而，从模型试验得到的本数据证明阳性筛选的力量远远大于阴性筛选的力量。而且，我们在一至两次筛选循环的狭窄范围内以低频率发现了一些特异性，之后持续的筛选循环似乎使筛选过滤器饱和并且特异性的组成朝向具有更广泛反应性的抗体变化。

在此扣除文库筛选过程中观察到为了获得高百分数的结合噬菌体需要许多筛选循环。这应与当在细胞或组织切片上进行阳性筛选时通常足够的 2-3 个循环相比。这说明对于文库中的大多数特异性该筛选充当了有效过滤器，并可以为设计最佳的筛选策略提供基础。例如，较小的富集因素使得在达到最佳筛选循环之前可以使用较大数量的肿瘤。这将使筛选偏向于鉴定共同表达的肿瘤限制性抗原。

大多数针对肿瘤相关抗原的单克隆抗体是通过杂交瘤技术产生的鼠源抗体。然而，更经常的是在人类和近人类的物种中成功引起区分正常人类抗原之间的微小变异(例如同种抗原)的抗体应答。

在一个大的患者群体中仅频繁的 TAA 是免疫治疗的实际有用靶标。这将独特的个体肿瘤特异性突变排除在外，但这些突变事实上代表肿瘤特异性抗原。由于在大多数情况下频繁表达的肿瘤特异性抗原是正常或最小改变的(例如翻译后修饰的)抗原，用人肿瘤免疫的灵长类可能是针对这些肿瘤相关抗原的抗体的上佳来源。

通过这些所有组成成分和扣除噬菌体筛选相结合，进一步分割该所有组成成分是不可能的，而且可以更好地控制特异性的结果。与直接的阳性筛选(Tordsson 等，待发表)比较，当使用根据本发明的基于组织的扣除筛选时从免疫结肠癌文库鉴定到完全不同的抗肿瘤抗体组，这就支持了此假说。

由 K293 特异性代表的所选克隆在该筛选方案所包括的所有结肠直肠

癌组织中显示出高度均匀的染色，并在正常结肠上皮中表现出极为有限的反应性。该扣除筛选过滤器规定了一个狭窄的表型特异性以允许通过，这发现于正常和恶性结肠上皮之间的小差异中，此差异在 6 个个体（即每一这样成对的组织所来源的患者）中是共同的。从此特异性分析，明显地 K293 型特异性几乎完全满足了为此过滤器设置的标准。

以前使用真核细胞进行扣除筛选以鉴定细胞表面抗原。然而，与使用细胞进行噬菌体筛选时不同，组织切片将允许鉴定出针对体内表达的所有组织成分（包括被不可能或难于体外再现的组织环境因子或结构调节的抗原）的试剂。

测试的 4 个结肠直肠癌细胞系中的两个无论是作为体外培养细胞还是体内生长在 SCID 小鼠中时均没有表达检测水平的 K293 抗原。此外，体外培养的另 5 个细胞系也是抗原表达阴性的（未显示）。

当体外培养结肠癌细胞时，所观察到的 K293 抗原在患者来源的肿瘤中的频繁和均一表达似乎在很大程度上丧失了。此外，在异种宿主中体内培养这些细胞也不能诱导该表达。

K293FabSEA/E11 融合蛋白是用于扩展的 K293 特异性分析的形式，它使得可以增加灵敏性并降低背景。该结构被证明与大量的结肠、胸和肺癌反应。在这些肿瘤的大多数中，K293FabSEA/E11 在 90% 或更多的恶性细胞上是阳性的。反应并不局限于原发性肿瘤，因为结肠转移癌也极为频繁地表现出强的反应性。另一方面，在前列腺或肾细胞癌中没有产生反应，而且在恶性黑素瘤中也仅观察到有限的反应。

仅在结肠和小肠上皮的顶端部分中以及在正常胸腺的腺上皮和其周围基质中发现了正常组织的反应性。

电子显微镜清楚地显示，K293FabSEA/E11 与表达在正常和恶性细胞表面的抗原结合。在正常结肠粘膜中，反应定位在表面上皮细胞微绒毛周沿的顶端细胞表面。在高度分化的肿瘤中端部染色也占优势，而低至中等分化的肿瘤倾向于在细胞表面的所有面上为均匀的阳性。

尽管在赘生性腺体形成中 K293FabSEA/E11 确实与粘蛋白样物质反应，但在结肠癌患者的血浆库中不能检测到该抗原。该库表现出高水平

的 CA242 结肠癌抗原，说明患者有高的肿瘤负荷。由于 K293FabSEA/E11 在检测的 12 个原发性肿瘤的 12 个中以及在 3/4 转移性结肠癌中是强阳性的，所以这说明该表位在循环抗原上并没有高表达。

K293FabSEA/E11 显示出以下几个特征，这些特征使得它作为用于靶向肿瘤的候选者是有意义的：1) 它识别高频率的阳性原发性肿瘤和转移瘤，2) 它展示出有限的正常组织反应性，3) 它与肿瘤细胞表面上表达的抗原结合，和 4) 癌症患者外周血中检测不到与之结合的抗原。

K293FabSEA/E11 在靶向肿瘤中的潜在用途进一步被使用携带人源化肿瘤的 SCID 小鼠进行的治疗实验所支持。与非定向的对照 FabSEA 融合蛋白相比，K293FabSEA/E11 显示出在腹腔中生长的 LS174T 肿瘤减少了 80% 以上。生长在 SCID 小鼠中的未处理的 LS174T 肿瘤的免疫组织化学检测说明，仅 50% 恶性细胞是 K293FabSEA/E11 阳性的（数据未显示）。这说明一些 K293Fab 阴性肿瘤细胞可能潜在地被旁观者效应，即可能被 T 淋巴细胞释放的细胞因子杀死。因此，在从结肠直肠癌患者切除的肿瘤（表现出较高百分数的阳性细胞）中，治疗效果应潜在地增加。

K293 抗原可能属于“隐蔽”抗原组，这些抗原总是存在于正常组织中，但在正常情况下不暴露于免疫系统。在结肠和小肠中，该抗原并不出现在会暴露于循环抗体和免疫活性细胞的细胞基底面。然而，在许多肿瘤样品中，K293 抗原被发现分布在整個细胞膜上并因此将暴露于循环系统。

K293FabSEA/E11 似乎与现有常使用的结肠癌结合抗体的特异性谱不同。因此它不可能与这些已知的靶分子结合。K293FabSEA/E11 对正常结肠的顶端染色显示出与使用抗 CEA 抗体所观察到的反应相似。然而，据报道抗 CEA 抗体也与粒细胞和/或巨噬细胞反应。而且，CEA 抗原可以容易地在循环系统中被检测到，并用作结肠-直肠癌的血清标记。结肠癌反应性抗体 B3、19-9 和 B72.3 在正常结肠中均具有有效的不均一反应性，且表现出与 K293 不同的特异性。对 MUC-1、-2、-3、-4 抗原，这也是事实，这些抗原与 K293 所识别的抗原在正常结肠中具有不同的分布。

根据本发明此发展的基于组织的扣除噬菌体筛选方法将为靶发现技

术增添一个新的方面。基因组学和蛋白组学的基础是对差异表达的基因和蛋白质的鉴定。这些方法直接涉及靶标本身的展示，而本发明技术使用噬菌体展示试剂的文库来仔细分析细胞和组织表达的靶标。

针对新靶标的试剂的鉴定为分析表位的组织分布和纯化及表征其相应抗原提供了有效手段。成功亲和纯化的证据和通过对 K293 抗体的推测靶抗原的序列分析进行的表征，举例说明了这些抗体探针具有有效快速地鉴定靶标的强大潜能。3 个 10 氨基酸长度的肽表现出与甘油醛-3-磷酸脱氢酶分子的一致性，提示它可能是 K293 的靶标。

尽管基因组学可以导致对靶基因的鉴定，但该技术却不能得到在翻译后修饰中在蛋白质水平上添加的改变的信息。各种组织中遗传表达的有用信息可以通过检索基因表达数据库(电子的 Northern 印迹)来提供，而直接的证据将需要使用原位杂交。

蛋白质组学可以用于检测某些类型的翻译后修饰。然而，对所鉴定蛋白质的组织分布的分析将需要基于其氨基酸序列制备用于原位杂交的 DNA 探针，或制备针对该蛋白质的抗体试剂。

基因组学和蛋白质组学均不能够覆盖例如糖和脂以及非蛋白质性质的其它生物学分子。已经证实将噬菌体展示技术与蛋白质组学结合在一起是有力的自动技术，或更具体地这意味着筛选针对双相凝胶(由 CaT 公司(Cambridge, 英国)提供)上蛋白质点的抗体噬菌体。毫无疑问这将产生针对新抗原的试剂，但受到蛋白质组学及以下事实的限制：暴露在变性蛋白质上的许多表位在体内并不是暴露的，而且检测不到在体内暴露在折叠蛋白上的许多表位。当然，通过使用该扣除噬菌体选择方法产生的试剂，该技术也可以以逆向方式用于检测靶蛋白质点，之后进行质谱和序列分析以鉴定靶标。

所选抗体，尤其是 K293 特异性，用作肿瘤靶向部分具有几个优点。这些包括以高度均一结合的方式与大部分结肠直肠癌肿瘤，以及潜在地与其它常见肿瘤类型的肿瘤反应性。重要的是，使用标准的方法学，正常组织的反应性是极为有限的，而且在癌症患者的循环系统中不能检测到靶抗原。而且，灵长类抗体(与人免疫球蛋白序列高度同源)预期不

会在人体中诱导强烈的异种抗体反应（导致免疫复合物的形成和清除）。

用于噬菌体筛选的本策略的基础是将从灵长类中体内预先选择的结合结构（抗体）所有组成成分与窄范围的滤器组合用于扣除筛选。

本发明再一个考虑的应用涉及使用大的非免疫文库以避免免疫偏倚例如免疫优势，而这将抵消所设计的选择策略的分析力。这些包括通过使用组织切片所代表的真实体内表型、改变背景抗原环境以提高代表表型的“共同特征（common denominators）”的抗原、以及特异阻断（使用克隆的抗体）常常得到鉴定的表位进行的扣除筛选。

本工作清除地阐明了，可以使用噬菌体筛选作为规定靶标定向策略的发现工具，而且筛选的设计标准对于该成功发现是关键性的。

本发明现通过以下非限制性实施例以及附图作举例说明。

## 实施例 1

### 有效的扣除筛选模型

根据本发明的噬菌粒文库扣除筛选的原理显示在图 1 中。待进行扣除筛选（目的是鉴定肿瘤相关抗原）的文库集合中的单个噬菌体可以根据它们编码的抗体的特异性方式，即 1) 广泛的组织反应性、2) 肿瘤限制性、和 3) 非特异性，进行理想的分类。噬菌粒文库还具有很大部分不展示其编码的抗体的噬菌体。这些噬菌体在阴性筛选步骤中不能被特异地吸附，但可以在细菌中增殖噬菌体之前在阳性筛选步骤中将其洗掉。

具有广泛反应性的噬菌体 C215 scFv 可与上皮细胞粘着分子 Ep-CAM 反应，其与更具有肿瘤限制的噬菌体特异性 1F scFv（以前从噬菌体文库中鉴定到的）混合（ $2.5 \times 10^7$  C215 和  $1.3 \times 10^6$  1F scFv 噬菌体）并用于图 2A 所示模型实验中。这些噬菌体特异性在表达 C215 的组织即小肠的切片上或在两种抗原均为阴性的组织即子宫的切片上孵育。组织切片吸附后，留在上清液中的特异性噬菌体使用 Colo 205 细胞进行阳性筛选。

使用集落滴定分析不同抗生素抗性转导单位（不同的噬菌体克隆）在非选择的和选择的噬菌体库中的相对组成，并针对每一噬菌体特异性描述噬菌体的产率。数据显示，与子宫切片吸附相比，在小肠切片上的

吸附降低了广泛反应性 C215 噬菌体的产率 33 倍。

其它特异性即 1F 的相应降低仅为 1.2 倍。与原始混合物比较，噬菌体 (1F/C215) 的比例在使用小肠切片进行筛选后改变了 50 倍 (使用子宫切片改变了 1.8 倍)。

在重复实验中当使用小肠切片时噬菌体比例改变了 17 倍 (使用子宫切片改变了 1.4 倍)。组织切片在两个筛选步骤中的使用显示出扣除效率的降低。与使用子宫进行吸附的相应组比较，小肠/Colo205 SCID 肿瘤和小肠/原发性结肠癌切片的组合使用确实使 C215 特异性噬菌体产量分别降低了 4 倍和 3 倍。然而，通过重复吸附步骤两次，吸附效率增加至 25 倍 (数据未显示)。大数量的特异性噬菌体被用于这些实验中， $3.8 \times 10^9$  和  $1.2 \times 10^{10}$  C215 和 1F 噬菌体，背景为  $6.1 \times 10^{10}$  非特异性 D1.3 噬菌体，说明小肠组织切片的高吸附能力。

在图 2.B 所示的实验中，使用同样大量的噬菌体，即  $7.2 \times 10^9$  C215、 $2.2 \times 10^{10}$  1F 和  $4.2 \times 10^{10}$  D1.3 噬菌体，并使用子宫、小肠或肺切片进行两个重复的阴性组织吸附，然后使用 Colo205 肿瘤切片进行阳性筛选。与子宫吸附相比，小肠和肺组织切片吸附分别显著地 ( $p < 0.05$ ,  $n=4$ ) 降低 C215 噬菌体丰度 (C215/D1.3 噬菌体产量) 11 和 2.2 倍。相反，用于吸附的组织的选择并不影响 1F 噬菌体的丰度 (超过 D1.3 噬菌体 55 - 64 倍) (小肠和子宫分别降低 1.1 和 0.9 倍)。

总之，C215 噬菌体的阴性组织切片吸附是 Ep-CAM 组织抗原依赖性的并显示出高达 33 倍的效率。数据还显示扣除筛选依赖于阴性和阳性筛选步骤的效率。

## 材料和方法

### 动物

*Macaca fascicularis* 猴保存在瑞典传染病控制研究所 (Stockholm)。用人结肠直肠肿瘤的粗悬浮液在有或没有明矾佐剂 (每种两个个体) 的情况下皮下免疫猴。在第 21、35 和 49 天给予加强剂量。

从 Bomnice, Ry, 丹麦获得重度联合免疫缺陷 (SCID) 雌性小鼠 (C.B-17)。在无病原的条件下将这些小鼠保存在 Macrolone 笼 (III) 中，

喂食来自 Special Diets Services (Essex, 英国) 的无菌球形大鼠食料和可随意获得的无菌水。8-12 周龄小鼠 (每个细胞系两只小鼠) 在两肋腹皮下注射悬浮在 200  $\mu$ l 1% Balb/c 血清中的  $2 \times 10^6$  结肠癌细胞、Colo205、WiDr、HT29 或 LS174T。使肿瘤生长至直径 4-5 mm 大小, 然后切除并冷冻以进行免疫组织化学。

所有的动物均根据瑞典法律进行保存, 而且实验获得地方委员会的赞同。

### 细胞和组织

人结肠直肠细胞系, Colo201、Colo205、Colo320DM、SW480、SW620、WiDr、HT29 和 LS174T 来自美国典型组织培养物保藏中心, Rockville, MD; Colo137 来自 CanAg AB, Gothenburg, 瑞士。在补加了 10% 热灭活的胎牛血清 (FBS) (来自 Gibco) 和 0.1 mg/ml 硫酸庆大霉素 (Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, 以色列) 的 RPMI 1640 培养基 (Gibco) 中, 培养细胞。人肿瘤和正常组织获自 Lund University Hospital 和 Malmo General Hospital (瑞士)。对于扣除文库筛选, 使用从 6 个个体获得的成对原发性结肠直肠癌和正常结肠上皮组织 (位于距离肿瘤损伤至少 5cm 的位置)。

### 文库和噬菌体模型

用于文库和噬菌体模型的噬菌粒载体、用于扩增的引物和通过对插入该噬菌粒载体中的  $\lambda$  轻链和重链基因的聚合酶链式反应 (PCR) 组装的 scFv 基因以前已有描述 (Tordsson 等, (1997) 和 Tordsson 等(待发表))。简单地说, 使用 Promega 的 RNA 分离试剂盒和 PE Biosystems (Stockholm, 瑞士) 的 RNA PCR 试剂盒, 从脾脏的总 RNA 扩增 cDNA。用于该研究的 D1.3、C215 和 1F scFv 模型噬菌体分别编码氨苄青霉素、氯霉素和四环素抗生素抗性基因, 以允许在噬菌体混合物中通过使用含有不同抗生素的琼脂平板进行集落滴定分析各个噬菌体的滴度。展示的抗体与鸡蛋溶菌酶 (D1.3)、抗上皮细胞粘着分子 (C215) 和至今未知的上皮肿瘤细胞表面分子 (1F, Tordsson 等待发表) 反应。

### 扣除筛选

阴性筛选组织（结肠、小肠或子宫）的切片在载片上空气干燥，在冰冷的丙酮中固定然后在含有 20% FBS 的 TBS 中重新水化。文库噬菌体，在 20% FBS 中  $10^{10}$  或  $10^{11}$ ，或模式噬菌体克隆混合物，“微文库”与这些切片在 4℃ 湿润的空气中孵育 15-24 小时，以吸附不需要的噬菌体特异性。

将经吸附的噬菌体溶液转移并按上述用于阳性筛选的方式在结肠癌肿瘤切片上孵育。在 TBS 缓冲液中洗涤这些切片 6 次 10 分钟，然后在 Genenase 缓冲液、1M NaCl、10mM Tris-HCl、6mM CaCl<sub>2</sub>、1mM EDTA, pH 8.0 中洗涤两次 5 分钟。用 400 μl 33 μg/ml Genenase 的 Genenase 缓冲液在室温洗脱噬菌体。使用 1ml 10 × 浓缩的大肠杆菌 (*E. coli.*) 菌株 DH5 α F' O.D.<sub>600</sub> 1.0 拯救洗脱的噬菌体。感染的细菌在补加了氨苄青霉素至 0.1 mg/ml 或氯霉素 (50 μg/ml) 的 2 × YT 中稀释，并在 24-37℃ 下培养 1-24 小时（直到 O.D.<sub>600</sub> 达到 0.5）。

加入辅助噬菌体 M13K07 (MOI 接近 10)，持续孵育 2 小时，之后加入卡那霉素至终浓度 70 μg/ml，并 250rpm 和 28℃ 下振摇该培养物直到 O.D.<sub>600</sub> 达到 2-3 (1-2 天)。离心沉淀细菌，并通过两次 PEG/NaCl 沉淀和离心沉淀上清液中的噬菌体。在 TBS 中稀释该噬菌体沉淀。

对于四环素和氯霉素模式噬菌体，在集落滴定前 37℃ 孵育 45 分钟。对于氯霉素抗性文库噬菌体结构，该抗性表达期延长至 2 小时。

作为替代组织切片的另一种方案，在模式实验中使用在含有 1% BSA 的 PBS 中的活细胞进行阳性筛选。转移吸附后的噬菌体并在 3 百万 Colo 205 细胞上孵育 1 小时。洗涤细胞三次 10 分钟，然后用 100 μl Genenase 按上述进行洗脱。在上述实验中，加入具有降低的感染能力并编码抗生素抗性基因 ( $10^{12}$ /ml) 的噬菌体以减少潜在的非特异性结合位点。

在模式实验中使用组织切片进行阴性和阳性筛选步骤，在与特异性噬菌体相同的浓度范围内使用非特异性噬菌体 D1.3 scFv。

## 实施例 2

在第二次最后的筛选循环中观察到文库特异性的后期富集并发现最佳的

## 多样性

尽管小, 与内对照噬菌体 D1.3 scFv 相比文库噬菌体的产量在第 6 个和第 7 个筛选循环中增加, 说明文库中组织特异性噬菌体发生富集。

通过培养来自最后 4 个筛选循环的文库噬菌体感染的细菌克隆 (260 - 280 克隆/筛选循环) 产生 scFv 抗体。scFv 抗体与结肠癌和结肠的组织切片结合的频率、和文库噬菌体与内对照噬菌体比较的相对产量 (文库富集) 显示在图 3。组织反应性 scFv 抗体 (29/280) 在第 5 个筛选循环前均不能得到证实, 提示阴性吸附抑制了具有通常的广泛反应性的特异性的富集。

在使用相同文库在结肠癌细胞上进行阳性筛选 (Tordsson 等, 待发表)、使用黑素瘤文库在黑素瘤组织切片上进行阳性筛选 (Tordsson 等, 1997) 和在多种肿瘤细胞上进行阳性筛选 (未发表的结果) 的之前研究中, 在第 2 或第 3 个筛选循环中已经获得高比例的特异性噬菌体。

此外, 之前从结肠癌文库中未筛选出的新特异性现在使用此发展的用于扣除组织切片筛选的方法得到鉴定。代表 6 个鉴定的特异性组的 scFv 抗体克隆的免疫组织化学染色图显示在图 4 中。抗体 K302 scFv 强烈地与结肠癌组织反应 (A), 还广泛地与结肠的上皮、固有层和淋巴集结细胞反应 (B, C)。K293 scFv 与肿瘤组织中的细胞和沉积物 (可能地粘蛋白) 反应 (D)、并仅与正常结肠上皮的腔面反应, 且不与淋巴集结反应 (E, F)。K320 scFv 抗体与结肠癌组织中的肿瘤细胞和推测浸润细胞 (G) 反应。该抗体强烈地与深入隐窝的正常结肠上皮反应, 但与固有层内的细胞不反应 (H)。K294 scFv 反应的图案提示结肠 (I) 和结肠癌 (未显示) 中所识别抗原的细胞内定位。克隆 IIID9 scFv 与结肠癌细胞反应但不与沉积物或浸润细胞反应 (J)。它比 K293 scFv 与结肠隐窝更深处反应, 但似乎比 K320 scFv 具有更大的局限性 (K)。最后的抗体特异性, IID11scFv, 染色衬在血管内部的表面层 (极可能是内皮细胞, L)。

特异性图案的组成在最后 3 个筛选循环过程中改变 (表 1)。在第 5 个筛选循环中仅发现两种图案, 最限于肿瘤的组 K293、和最广泛反应性的 K302 组。在最后循环中 K293 组的高比例降低且 K302 组增加, 而在第

5 和第 6 个筛选循环之间它们的比例无显著改变。其它的 4 种特异性图案出现在第 6 个筛选循环中。这些图案中的 3 个在最后的循环中消失。

总之，第 2 次最后的筛选循环显示出最佳的特异性组多样性以及文库中特异噬菌体相对非特异性噬菌体的高数量，而广泛反应性 K302 特异性组在最后的筛选循环后占主要。这说明选择最佳的筛选循环对于发现广泛多种的多样性是重要的，并提示阴性筛选过滤在达到第 6 个筛选循环是有效的，之后它被饱和。

表 1. 每个筛选循环(R) 结合的 scFv 特异性的频率(%)

特异性组:	R5	R6	R7
K293	69	65	28
K302	31	31	71
K320	0	1.1	0
K294	0	1.1	1.7
IIID9	0	0.6	0
IID11	0	0.6	0
结合物的总频率	10	65	89

### 实施例 3

通过 K293 超抗原融合蛋白显示频繁和均一的肿瘤选择性抗原表达

重新克隆最限于肿瘤的特异性组的代表 K293，以遗传连接免疫学效应分子超抗原葡萄球菌肠毒素 A 即 SEA 的 D227A 突变体 (D227A)。发酵罐培养该融合蛋白并纯化，用于证实与所用 5 个肿瘤的均一反应性。与 Ep-CAM 特异性融合蛋白 C215 Fab-SEA (D227A) 相比，融合蛋白质 K293 scFv-SEA (D227A) 的反应性证实结肠癌肿瘤的同等均一染色，显示在图 5。使用 K293 scFv SEA (D227A) 融合蛋白，证实肿瘤导管内部沉积物的染色和在表面上皮的局限结肠反应性。

### 材料和方法

scFv 抗体和 scFv-SEA (D227A) 的产生

用来自第 6 和第 7 个文库筛选循环的噬菌体转导的大肠杆菌非抑制

菌株HB2151的单独克隆在微孔板(Nunc)的2 ×YT培养基(补加100 μg/ml 氨基青霉素)中37℃培养17小时。将等分试样转移至具有低磷酸培养基和抗生素的微孔板中以从phoA启动子表达scFv,然后30℃培养17小时。通过2200rpm离心7分钟沉淀细胞,将上清液转移至含有等量/孔的PBS中的1%牛血清白蛋白(BSA)的平板中。根据Tordsson等(1997)和标准方法,通过发酵产生scFv-SEA(D227A)融合蛋白并使用兔抗SEA偶联的亲合柱纯化。在三明治型ELISA中使用抗SEA和生物素化的抗SEA抗体作为捕获和检测抗体定量该纯化的融合蛋白。使用生物素化的兔抗SEA抗体通过免疫印迹分析验证融合蛋白的完整性。

### 免疫组织化学

在冰冷的丙酮中固定切片(6-8 μm)并在150mM NaCl、50mM Tris pH 7.6 (TBS)中的20%FBS内重新水化。用亲和素和生物素(Vector Laboratories, Burlingame, CA)阻断内源性生物素。第一scFv(培养物上清液)或scFv-SEA(D227A)融合蛋白5 μg/ml与切片孵育1小时。使用针对C端标签ATPAKSE的兔抗血清及随后使用生物素化的山羊抗兔抗体(DAKO A/S)1 μg/ml检测scFv。使用亲和纯化和生物素化的兔抗SEA抗体5 μg/ml检测这些融合蛋白。

这些试剂和以下试剂,即1/110稀释在50 mM Tris pH 7.6中的StreptABCComplex HRP(DAKO A/S),孵育30分钟。所有步骤之间在TBS中洗涤这些切片3次。在溶解于含有0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的Tris pH 7.6中的0.5 mg/ml 3,3'-二氨基联苯胺四盐酸盐(Sigma)中进行染色反应8分钟。10分钟后在0.5%甲基绿中复染,在自来水中洗涤载片10分钟并在70-99%乙醇和二甲苯中逐渐脱水,然后放在DPX介质(Sigma)中。

### scFv 指纹分析

通过聚合酶链式反应扩增scFv基因(scFv特异性的代表)。使用微孔板细菌培养物的等分试样5 μl,以及与转染细菌的噬菌粒载体中scFv基因的5'和3'区(phoA启动子中和M13基因III中的区域)互补的引物。通过1%琼脂糖凝胶电泳,分析扩增的scFv基因的Hinf I限制性图谱。选择具有独特图谱或原型图谱的克隆,并作为每个免疫组织化学特

异性组的代表。

#### 实施例 4

体外 K293 抗原表达的缺少或下调反映了基于组织的（保持了真实的体内表型）筛选原则的优点

从患者切除的肿瘤（与培养的肿瘤细胞相比）的温和固定冰冻组织切片是复合抗原的来源（用于噬菌体筛选），该来源极为类似于原始的肿瘤表型。与和患者来源的肿瘤的均一和频繁反应性相比，通过流式细胞仪 K293 scFv-SEA (D227A) 抗体微弱地与 2/9 结肠癌细胞系 (HT29 和 LS174T) 反应，且与 7/9 结肠癌细胞系 (Colo201、Colo205、Colo137、Colo320DM、SW480、SW620、和 WiDr) 不反应，不同地与 C215 Fab-SEA (D227A) 有中等至强的反应（表 2，及未显示的结果）。使阴性细胞系中的两种 (Colo205 和 WiDr) 和两种弱反应性细胞系在 SCID 小鼠的皮下生长。

使用免疫组织化学分析 K293 scFv-SEA (D227A) 与这些肿瘤的反应性。Colo205 肿瘤完全为阴性，而 WiDr 肿瘤的肿瘤细胞是阴性但沉积物（deposited material）是阳性。HT29 肿瘤的小部分细胞（大约 5-10%）及沉积物是阳性。LS174T 肿瘤的约 50% 细胞为不均一的阳性，而沉积物是阳性。因此，K293 表位在原发性患者肿瘤中的频繁和均一表达无论在体外培养的肿瘤细胞系还是在生长在异种宿主中来源于肿瘤的细胞系中均未观察到。这证实，使用组织切片作为噬菌体选择的抗原来源对于发现肿瘤限制性 K293 特异性是必需的。

通过流式细胞仪 K293 表位在两种细胞系上的微弱表达提示，所识别的 TAA 可以在肿瘤细胞表面表达。体内的表面表达通过在肿瘤细胞上（来源于切除的原发性结肠癌并用分散酶（一种中性蛋白酶）和胶原酶处理将该肿瘤解离为细胞悬浮物）进行的流式细胞测定得到验证。作为 Ep-CAM+ 细胞（使用 mAb C215 检测的）与其它细胞（例如成纤维细胞、血细胞和平滑肌细胞）分离的肿瘤细胞通过复染显示 K293scFv-SEA (D227A) 反应性（图 6）。在提取细胞所需的 o. n. 酶学处理后，大部分 Ep-CAM 阳性肿瘤细胞是 K293 反应性的（约 60%）。

尽管有不同的强度，但使用来自切除的原发性肿瘤的细胞在三个其它的实验中可以证实 K293scFv-SEA (D227A) 反应性，支持了 K293 TAA 在自体宿主的肿瘤细胞表面上表达。

表 2. K293 抗体均一染色原发性结肠癌，但仅微弱地和不均一地染色体外培养的或异种宿主（即在 SCID 小鼠皮下）的结肠癌细胞系

细胞系	流式细胞测定	在 SCID 小鼠中皮下生长	原发性结肠癌
Colo205	阴性	阴性	用于选择的 5 个原发性结肠癌为均一的染色*
WiDr	阴性	阴性*	
HT29	弱阳性	5-10%阳性细胞*	
LS174T	弱阳性	50% 不均一的阳性*	

\*沉积物是强阳性。

## 材料和方法

### 流式细胞测定

使用生物素化的兔抗 SEA 抗体和亲和素-PE，阐明了与葡萄球菌肠毒素 A (SEA) 遗传连接的抗体和培养的或新鲜制备的肿瘤细胞的反应性。

原发性人结肠癌细胞来源于同一天切除的结肠直肠癌肿瘤，并在使用前（少于 4 小时）保存在冰上 150mM NaCl 中。将肿瘤切成小块并在含有 1mg/ml 胶原酶(Sigma)、0.1 mg/ml 透明质酸酶(Sigma)、2.4 mg/ml 分散酶(Sigma)和 20 μg/ml 脱氧核糖核酸酶(Sigma) 稀释在 RPMI 1640 培养基(Gibco, Middlesex, UK) 中的溶液中室温缓慢摇动过夜。通过过滤将肿瘤细胞与组织碎片分离，用 PBS/1%BSA 洗涤一次然后用 5 μg/ml C215 mAb/1/20 稀释的兔抗小鼠 FITC(Dakopatts) 和用 5 μg/ml K293scFv-SEA (D227A)/ 1/1000 稀释的生物素化多克隆兔抗 SEA 抗体/1/20 稀释的亲和素-PE 进行染色。

### 实施例 5

#### K293FabSEA/E11 强烈地和频繁地染色上皮细胞肿瘤

在各种人肿瘤上的免疫组织化学反应总结在表 3 中。K293FabSEA/E11 在来自结肠、胰腺、肺和乳房的腺癌中显示出强阳性反应（图 7）。在恶

性细胞中和在腺体结构的粘蛋白样/脱落物 (mucin-like/shed material) 中发现强反应。在肾或前列腺癌中没有获得反应, 而两个恶性黑素瘤的一个显示出弱至中等的反应。在结肠癌中所有 12 个检测过的肿瘤均为强阳性染色。

各肿瘤中阳性恶性细胞的比例从 75 至 100% 变动。6 个乳腺肿瘤中的 5 个发现强阳性, 阳性恶性细胞频率为 75-100%。尽管结肠和乳腺癌中阳性细胞的频率在 75 至 100% 变动, 但大多数肿瘤显示出超过 90% 的阳性反应。2 个测试过的胰腺肿瘤也都在超过 90% 的恶性细胞中显示出强反应。

在非小肺癌 (NSCLC) 中, 2 个是鳞状细胞癌, 4 个是肺腺癌。所有均显示出恶性细胞的强染色。在两个检测的鳞状细胞癌中在超过 90% 肿瘤细胞中观察到阳性染色。在腺癌中, 2 个显示出 90% 肿瘤细胞反应性而 2 个在少于 10% 的肿瘤细胞上为阳性。

K293FabSEA/E11 在不同结肠癌上的反应性方式似乎与肿瘤的分化程度有关。在高分化的肿瘤中, 恶性细胞的顶端染色占主要。在这些高度分化的肿瘤的一些中, 恶性细胞的基侧面完全为阴性, 而顶端部分是强阳性。在低和中等分化肿瘤中, 免疫反应并不偏向于某个部分, 而是在恶性细胞中十分均一地分布。

表 3. 肿瘤组织反应性, K293FabSEA/E11

结肠癌, 原发性肿瘤	在 12/12 肿瘤中强染色, 75-100% 肿瘤细胞反应性, 在粘蛋白样/脱落物中也观察到强反应。
结肠癌, 转移	在 3/4 肿瘤*中强染色, 75-100% 肿瘤细胞反应性
胰腺癌	在 2/2 肿瘤中强染色, 约 90% 肿瘤细胞反应性
乳腺癌	在 5/6 中强反应 (75-100% 肿瘤细胞反应性), 在粘蛋白样/脱落物中也观察到反应。
非小细胞肺癌 (NSCLC)	在 6/6 中强反应, 2/6 中 <10% 肿瘤细胞反应性, 4/6 中为 >90%, 在粘蛋白样/脱落物中也观察到反应。
恶性黑素瘤	在 1/2 中弱至中等反应 (约 90% 肿瘤细胞反应性), 在 1/2 中为阴性。
前列腺癌	2/2 为阴性
肾癌	2/2 为阴性

\*阳性转移瘤中的一个福尔马林固定并石蜡包埋的。

### 实施例 6

K293FabSEA/E11 显示出极为有限的正常组织交叉反应性

在研究的器官中，正常组织反应性限于结肠、小肠和乳房。在结肠中观察到上皮细胞顶端部分强染色(图 8)。在两个测试的来自小肠的活检组织的一个中也有此发现。可能这些活检组织收集自不同区域，说明 K293FabSEA/E11 仅与小肠的某些部分反应。在乳房组织中在上皮细胞中和周围基质的部分中观察到弱至中等的反应(图 8)。在胃、脾、肾、肝、肺、皮肤、胰腺、甲状腺、心肌或 CNS 中未观察到反应(表 4)。

表 4. 正常组织反应性, K293FabSEA/E11

结肠	在上皮的顶端部分中强反应, 5/5
小肠	在 1/2 的上皮中强反应
胃	2/2 为阴性
乳房	在上皮和周围基质部分中弱至中等反应, 2/2
脾	2/2 为阴性
肾	2/2 为阴性
肝	2/2 为阴性
肺	2/2 为阴性
皮肤	2/2 为阴性
胰腺	2/2 为阴性
甲状腺	1/1 为阴性
心肌	1/1 为阴性
CNS	1/1 为阴性

### 材料和方法

#### 免疫组织化学

#### 用于光学显微镜的冰冻切片

肿瘤和正常组织是由 the Department of Surgery, Lund University

Hospital 惠赠, 在液氮中预先冰冻并储存在 $-70^{\circ}\text{C}$ 的异戊烷中使其快速冷冻。进行冰冻切片后, 切片空气干燥过夜。切片在冷丙酮中固定, 用亲和素/生物素(Vector, Burlingame CA)封闭内源性生物素, 然后和一抗 K293FabSEA/E11 孵育 1 小时。

通过遗传上将 K293 VH 和 VL 基因(从筛选自文库的 scFv 获得的)与猕猴 CH1 和 C- $\lambda$  基因融合, 制备融合蛋白。将组合的 Fab 与超抗原葡萄球菌肠毒素 AE 的嵌合突变体(D227A, (表现出强烈降低的 MHC II 类结合) E11)连接。该结构 K293FabSEA/E11 表现出极低水平的非特异性结合, 并允许通过二抗多克隆兔抗 SEA 抗血清(通过标准方法制备并生物素化的)作灵敏的检测。

二抗孵育 30 分钟, 之后是链霉亲和素-生物素/HRP (Dakopatts, Copenhagen)步骤再 30 分钟。所有步骤之间均使用 0.05 M Tris pH 7.6 和 0.15M NaCl 进行 3 次洗涤。使用二氨基联苯胺(DAB)作为色素原, 且切片在 0.5%甲基绿中复染。作为阳性对照, 使用泛上皮反应性融合蛋白 C215FabSEA (D227A)。使用非组织反应性 Fab 和 SEA-D227A 之间的融合蛋白或非一抗作为阴性对照。所有抗体的使用浓度是  $5\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 。结果分别表示为阴性、弱、中等或强染色。

用于光学显微镜的石蜡切片

在 4%甲醛(Sigma, St. Louis MO)中  $4^{\circ}\text{C}$  过夜固定淋巴结肠癌转移的肿瘤组织。在 PBS 中洗涤后, 将组织脱水并包埋在石蜡(Histolab AB, Gothenburg, 瑞典)中。制备石蜡切片并使之  $37^{\circ}\text{C}$  干燥过夜。按上述方法使切片脱蜡、重新水化并进行免疫组织化学染色。

## 实施例 7

### K293FabSEA/E11 识别表面表达的抗原

与  $8\ \mu\text{m}$  冰冻切片相比, 在薄切片上可以更准确地阐明免疫反应的亚细胞定位。在  $2\ \mu\text{m}$  塑料切片中可以显示结肠癌细胞的顶端以及基底侧面细胞膜染色(图 9A)。该组织样品还加工用于电子显微镜观察。在电子显微镜的分辨率下, 可以阐明免疫反应定位在恶性细胞的外表面上。染色

后对 2  $\mu$ m 半薄切片的显微镜观察和对正常结肠的电子显微镜观察也证实免疫反应定位在腔上皮内微绒毛的外表面水平(图 9B 和 C)。

## 材料和方法

### 用于光学显微镜和电子显微镜的塑料切片

根据以下描述加工肿瘤和正常组织材料。将新鲜切除的材料在 4% 甲醛(Sigma, St. Louis MO)和 0.25% 戊二醛(TAAB, Berkshire)的混合物中固定 2 小时。在 PBS 中洗涤后,通过在含有 30% 蔗糖的 PBS 中洗涤过夜对组织进行冰冻保护,然后按上述在异戊烷/液氮中快速冷冻。50  $\mu$ m 自由飘浮的冰冻切片与用于光学显微镜的相同抗体一起孵育,但孵育时间不同。一抗孵育过夜,二抗孵育 3 小时,之后链霉亲和素-生物素/HRP 再孵育 3 小时。在 DAB 中反应后,切片在 1% OsO<sub>4</sub> (Standard supplies, Kallered) 中后固定,脱水并在 Epon (Agar Scientific Ltd, Stansted, U. K.) 中包埋。

用于光学显微镜的半薄切片(2  $\mu$ m)和用于电子显微镜的超薄切片(50-60 nm)在超薄切片机(LKB, Bromma, 瑞典)上制备。用 1% 甲基绿复染半薄切片。超薄切片在超染料(LKB, Bromma)中 2% 乙酸双氧铀和柠檬酸铅中染色。

## 实施例 8

### K293FabSEA/E11 在结肠癌患者的血清中检测不到循环抗原

图 10 显示了,在分别与结肠直肠癌患者和一名健康自愿者的血浆样品孵育后,放射性标记的 SEA 融合蛋白结构和循环肿瘤抗原的组分大小。

对于 K293Fab-SEA/E11,与和健康个体的血浆孵育相比,当与癌症患者的血浆孵育时发现蛋白质复合物多了不到 1.5 倍。另一方面,对于 C242-Fab 结构(阳性对照),当与癌症患者的血浆孵育时复合物形式增加了 8 倍。因此, K293Fab-SEA/E11 不识别癌症患者的任何循环抗原。

## 材料和方法

### 测试的化合物制剂

使用 Iodogen 预先包被的试管(Pharmacia-Amersham Biotech)

(Fraker 和 Speck, 1978) 用  $^{125}\text{I}$  标记 50  $\mu\text{g}$  K293Fab-SEA/E-11、C215Fab-SEA<sub>mut.9</sub> 和 C242Fab-SEA<sub>mut.23</sub>, 得到比活性 10  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ 。就通过 HPLC 测定的蛋白质浓度和比放射活性, 确定这些标记的测试化合物(见下)。

从结肠直肠癌患者 (n=12) 收集血浆样品, 通过商业分析法 (CanAG Diagnostics AB, Gothenburg, 瑞典) 证明有高水平的循环 CA242 抗原, 并从一个健康自愿者收集血浆, 表现出极低水平的血清 CA242。

#### 分析血浆中的测试溶解

未稀释的血浆样品 50  $\mu\text{l}$  与 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  测试化合物(稀释在 PBST 中) 在环境温度下孵育 60 分钟, 并摇动孵育混合物。所有样品均通过 HPLC 分析(见下)。

由于血浆样品含有针对 SEA 的抗体并能够产生假阳性相互作用信号, 所以将它们与蛋白质 A 一起孵育以除去免疫球蛋白。此清除步骤后, 抗 SEA 抗体含量为 <10 pmol/ml。与蛋白质 A 孵育后, 在汇集的癌症患者血浆中 CA242 的血浆含量是 479U/ml, 而在健康供体样品中少于 20U/ml。

通过大小排阻 HPLC 分析这些标记的测试化合物和制备的样品。将 50  $\mu\text{l}$  样品注射 (Waters 717 Auto Sampler) 在 TSK G3000 SW 柱 (7.5  $\times$  600 mm, Toso Haas) 上并分离。用 10mM PBS (pH=7.4) 以 1.0ml/min 的流速在室温洗脱样品。用连续偶联在一起的 UV 检测器 (A280 nm, Waters 486) 和放射活性检测器 (Flo-One, A-515-AX) 进行检测, 并根据样品在 35 - 60 分钟期间收集数据。含有结合测试化合物的复合物的组分在色谱中表现为较早出现的比测试化合物本身高的分子量峰。含有碘化片段或游离碘的组分表现为低分子量峰。对放射活性色谱求积分, 复合的测试化合物和低分子量峰的面积表示为总面积的百分数。

## 实施例 9

### 结肠癌活性抗体 K293 所识别的肿瘤相关抗原的纯化

从人结肠癌组织制备肿瘤提取物。将提取物加至两个柱上, 一个与 C215Fab-SEAm9 偶联的对照及前置柱, 以及一个偶联 K293Fab-SEAm9 的

柱。在将组织提取物上柱时这些柱连续地连接，但在碱洗脱结合蛋白的过程中将这些柱分开。

从 K293Fab-SEAm9 偶联柱收集洗脱组分，中和、浓缩然后通过 SDS-PAGE 在非还原条件下分析(图 11)。高 pH 洗脱的组分中在约 35-45 kDa 处观察到主要条带(图 11 中标记的 A)。切下主要条带并用胰蛋白酶进行蛋白水解消化。分离产生的胰蛋白酶解肽片段并确定这些分离的肽中三个的头 10 个 N 端氨基酸残基的序列(图 12)。确定的 3 个短 N 端肽序列(序列表 SEQ ID NO 3-5)显示出与人蛋白质甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GADPH)的部分完全同源(图 13)。

## 材料和方法

### 肿瘤组织的溶解

表达 K293 抗原的人结肠癌组织由瑞典医院提供并在 ABR 组织库中冻存于-70℃中。用手术刀将冰冻的结肠癌组织切成片，并转移至含有 4℃ 预冷的等渗蔗糖缓冲液(0.25 M 蔗糖，10mM KCl，1.5 mM MgCl<sub>2</sub>，50mM Tris-HCl 25℃下 pH 7.4)和 1% (v/v) Nonidet P-40 (NP-40)和蛋白酶抑制剂(Complete™ Protease Inhibitor Cocktail Tablet, Boehringer Mannheim)的试管中。用 Ultra-Turrax 匀浆器匀浆组织片，并置于 0℃ 溶解。11000 rpm (Hettich centrifuge, Universal 30 RF 转头)离心溶解的溶液，以去除大多数细胞碎片。4℃下 108000 ×g 再次离心上清液(Beckman ultracentrifuge, Ti-60 转头)，最后通过 0.2 μm Minisart plus 滤器(Sartorius A G, Gottingen, 德国)过滤。

### 亲和纯化组织抗原

根据厂家说明，使抗体 K293Fab-SEAm9 和 C215Fab-SEAm9 与 NHS 活化的 HiTrap® 柱(Pharmacia Biotech, Uppsala, 瑞典)偶联。与 C215Fab-SEAm9 偶联的对照及前置柱和与 K293Fab-SEAm9 偶联的柱连续连接，并用起始缓冲液(20 mM Tris-HCl，4℃下 pH 7.5，含有 0.2% NP-40)预先洗涤。然后，将提取物以 0.1ml/min 加载至柱上并重新循环流过物，然后用起始缓冲液洗涤柱子。用二乙胺梯度(从 pH 7 开始 20 分钟内达到 pH 11)洗脱每个柱上结合的抗原。收集 0.5ml 组分，用 0.1 ml 1M Tris-HCl

(pH 6.7) 中和并储存在  $-20^{\circ}\text{C}$ 。使用 Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, 瑞典) AKTA FPLC 系统,  $4^{\circ}\text{C}$  进行纯化。汇集洗脱的组分, 中和然后在 SDS-PAGE 上分析。切下确定的蛋白条带并储存在  $4^{\circ}\text{C}$ 。然后用胰蛋白酶消化蛋白质, 并在蛋白质分析中心 (Karolinska Institute, Stockholm, 瑞典) 确定各肽的 N 端肽序列。

### 实施例 10

K293FabSEA/E11 能够抑制肿瘤在重度联合免疫缺陷 (SCID) 小鼠中生长

超抗原 SEA 能够激活 T 淋巴细胞以产生细胞因子和细胞毒性。当超抗原与肿瘤反应性抗体融合后, 使其靶向肿瘤细胞。然后超抗原在肿瘤区域的定位导致选择性杀死肿瘤细胞。

本实验结果表示在图 14 中, 该图显示了用 K293FabSEA/E11 处理的动物与用非靶向的 NRML-05 (抗黑素瘤) FabSEA (D227A) 处理的对照动物相比肿瘤质量减少 80%。

### 材料和方法

用 0.2ml 载体 (PBS-1%Balb/c 血清) 中的  $5 \times 10^6$  LS174T 结肠癌细胞 (ATCC, Rockville, MD) i.p. 注射重度联合免疫缺陷 (SCID) 小鼠 (Bommice, Ry, 丹麦)。24 小时后, 用通过 Ficoll-Hypaque 分离获自瑞典 Lund 大学医院的血液供体的白细胞层制备的  $20 \times 10^6$  人外周血单核细胞 (PBMC) i.p. 注射小鼠。肿瘤注射后第 1、3 和 6 天, 用  $100 \mu\text{g}$  NRML-05FabSEA/D227A (6 只动物) 或  $100 \mu\text{g}$  K293FabSEA/E11 (7 只动物) 处理动物。在第 51 天, 处死动物, 去除肿瘤结并测定质量。

### 参考文献

- Hoogenboom HR, de Bruine AP, Hufton SE, Hoet RM, Arends JW, Roovers RC. Antibody phage display technology and its applications. (1998) Immunotechnology 4:1
- Kerbel RS. Significance of tumor-host interactions in cancer growth and metastases. (1995) Cancer Metastasis Rev 14:259

- Kohler G, Milstein C. Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. (1976) Eur J Immunol 6:511
- Tordsson J, Abrahmsen L, Kalland T, Ljung C, Ingvar C Brodin T. Efficient selection of scFv antibody phage by adsorption to in situ expressed antigens in tissue sections. (1997) J Immunol Methods 210:11
- Tordsson J, Lavasani S, Ohlsson L, Karlström P, Svedberg H, Abrahmsén L and Brodin T. A3 - a novel colon and pancreatic cancer reactive antibody from a primate phage library selected using intact tumor cells. Submitted to Int J Cancer.
- Williams KL. Genomes and proteomes: towards a multi-dimensional view of biology. (1999) Electrophoresis 20:678

#### 附图说明

图 1. 扣除筛选的原理。特异吸附广泛反应性噬菌体(黑)和通过在阳性筛选过程中进行洗涤减少未展示和非特异的噬菌体(白)。然后洗脱肿瘤局限性噬菌体(格子花纹)。

图 2. 有效的扣除筛选。在子宫或小肠组织切片上阴性吸附然后在 Colo205 细胞上阳性筛选(A)。在子宫、小肠或肺组织切片上两次重复的吸附, 和在 Colo205 肿瘤组织切片(B)上阳性筛选。

图 3. 从扣除选择的文库中最后富集一组组织特异性噬菌体。

图 4. 文库选择的 scFv 的免疫组织化学染色图案。用 K302 scFv 染色结肠癌(A)、结肠上皮(B)和淋巴集结(C)并用 K293 scFv (D-F)染色。用 K320 scFv 染色结肠癌(G)和结肠上皮(H)并用 IIID9 scFv (J, K)染色。用 K294 scFv (I)染色结肠上皮并用 IID11scFv (L)染色结肠血管。

图 5. 在 100 nM 下, K293 scFv-SEA (D227A)与结肠癌(A)和结肠(B)的免疫组织化学反应性, 以及 C215 Fab-SEA (D225A)与结肠癌(C)和结肠(D)的免疫组织化学反应性。(A)中柱是 100  $\mu$ m。

图 6. 对从切除的原发性人结肠癌新鲜制备的结肠癌细胞进行流式细胞测定。细胞由大小、粒径(A、B)控制并以 Ep-CAM 表达作为上皮细胞的标志, 用  $5 \mu\text{g/ml}$  K293scFv-SEA (D227A) (灰线)或非原发性抗体融合蛋白阴性对照(黑线)对这些细胞染色(C)。

图 7. 不同肿瘤的 K293FabSEA/E11 染色. A. 中等分化的结肠癌的染色显示出在腺体结构中恶性细胞(箭头)和粘蛋白样物质(m)均为强染色. B. 高度分化结肠癌的染色说明恶性细胞有强的顶端染色(箭头)而赘生性腺体(b)的基底部分无反应性. C. 乳腺肿瘤中恶性细胞强染色(箭头). D. 肺腺癌中恶性细胞强染色(箭头). A 中柱代表  $50 \mu\text{m}$ , 对 B-D 也是一样有效。

图 8. A. 正常结肠的 K293FabSEA/E11 染色。注意上皮细胞的顶端染色(箭头)。在面朝结肠腔的上皮中发现免疫反应, 而隐窝(c)是阴性. B. 正常乳房的 K293FabSEA/E11 染色。在腺上皮(g)中和周围基质部分(s)中观察到弱至中等的染色. C. 用泛上皮标志 C215 和 SEA (D227A)之间的 FabSEA 融合蛋白(FabC215SEA-D227A)染色正常乳房。注意腺上皮细胞(g)的强标记。在基质部分(s)未观察到反应. D. 正常乳房阴性对照(无一抗)说明在腺上皮细胞(g)中和在基质部分(s)中无反应. A 中柱代表  $50 \mu\text{m}$ . B 中柱代表  $50 \mu\text{m}$ , C 和 D 中也是同样。

图 9. 结肠癌(A)和正常结肠(B)的半薄切片, 用 K293FabSEA/E11 染色。在结肠癌切片中, 肿瘤细胞的基底(箭头 b)、顶端(箭头 a)以及侧面部分均为阳性染色。在正常结肠中, 在上皮细胞的顶端表面(箭头)观察到阳性染色。电子显微镜显示免疫反应定位在正常结肠上皮细胞中微绒毛的表面(C, 箭头)。A 中柱代表  $30 \mu\text{m}$ , B 中也一样。

图 10. 分析抗体 SEA 融合蛋白与结肠癌患者以及健康个体的血浆成分的复合物形成。对高分子量区域中洗脱的放射活性百分数进行绘图。注意 C242FabSEA 和结肠癌患者血浆的高度结合。

图 11. 从 K293 偶联的亲和柱上洗脱的组分的非还原 SDS-PAGE 分析(1 泳道)。切下标记为 A 的主要条带进行氨基酸序列分析。指出了所用分子量标准的位置。

图 12. K293 亲和纯化分离的 35 - 45 kDa 蛋白条带 (标记为 A) (见图 1) 的三个胰蛋白酶解肽片段的 N 端序列, 见序列表 ID Nos: 3-5.

图 13. 序列表 ID NO 2:1, 2 和 3 的肽序列与甘油醛 3-磷酸脱氢酶蛋白质序列 (Swiss prot. 数据库索取号 P04406) 的比对。

图 14. FabSEA 融合蛋白对 LS-174T 肿瘤细胞在补充了人外周学单个核细胞 (PBMC) 的 SCID 小鼠中生长的免疫治疗效果。注意肿瘤重量 (mg) 在用 K293FabSEA/E11 处理后减少。

## 序列表

&lt;110&gt; Active Biotech AB

&lt;120&gt; 对结肠癌具有特异性的新抗体

&lt;130&gt; 2000449

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;160&gt; 2

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 747

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Macaca fascicularis

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(747)

<223> K293 可变区(scFv); PRT(aa)-序列 V1  
(1-110), mod Huston (111-129), Vh (130-249)

&lt;400&gt; 1

```

cac gtt ata ttg act cag tcg ccc tct gtg tct ggc tct cct gga cag      48
His Val Ile Leu Thr Gln Ser Pro Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
   1                   5                   10                   15

tcg gtc acc ctc tcc tgc act gga acc agc aat gac atc ggt ggc tat      96
Ser Val Thr Leu Ser Cys Thr Gly Thr Ser Asn Asp Ile Gly Gly Tyr
                   20                   25                   30

gat tat gtc tcg tgg tat cag cat cac cca ggc aaa gcc ccc aag ctc      144
Asp Tyr Val Ser Trp Tyr Gln His His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
                   35                   40                   45

atg att tac aat gtc aat aag cgg ccc tca ggg gtc tct gag cgc ttc      192
Met Ile Tyr Asn Val Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Glu Arg Phe
                   50                   55                   60

tct ggc tcc aag tct gcc aac acg gcc tcc ctg acc atc tct gga ctc      240
Ser Gly Ser Lys Ser Ala Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
                   65                   70                   75                   80

cag gat gac gat gag gct gat tac tat tgc agt tcc tat gca cgc cgg      288
Gln Asp Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Ala Arg Arg
                   85                   90                   95

gac act tac att ttc ggt ggt ggg acc cgg ctc acc gtc cta ggt caa      336
Asp Thr Tyr Ile Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu Gly Gln
                   100                  105                  110

gcc aac ggt gaa ggc ggc tct ggt ggc ggg gga tcc gga ggc ggc ggt      384
Ala Asn Gly Glu Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
                   115                  120                  125

```

tct gag gtg cag ctg cag gag tgg ggc cca gga ctg gtg aag cct tcg 432  
 Ser Glu Val Gln Leu Gln Glu Trp Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser  
 130 135 140

gag acc ctg tcc ctc acc tgc gct gtc tct ggt ttc tcc atc agc agt 480  
 Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Phe Ser Ile Ser Ser  
 145 150 155 160

ggt tat ggc tgg agc tgg atc cgt cag tcc cca ggg aag gga ctg gaa 528  
 Gly Tyr Gly Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
 165 170 175

tgg att gga gac atc tct tat agt ggg aac tcc agg tac aac ccg tcc 576  
 Trp Ile Gly Asp Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Ser Arg Tyr Asn Pro Ser  
 180 185 190

ctc aag agt cga gtc acc att tca aga gac acg tcc aag aac cag ttc 624  
 Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe  
 195 200 205

tcc ctg aag ctg acc tct gtg acc gcc gcg gac acg gcc gtg tat tac 672  
 Ser Leu Lys Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
 210 215 220

tgt gcg aga cat gat aga ggc tgg cac gaa tac ttc gac ttc tgg ggc 720  
 Cys Ala Arg His Asp Arg Gly Trp His Glu Tyr Phe Asp Phe Trp Gly  
 225 230 235 240

cag gga gtc ctg gtc acc gtt tcc tca 747  
 Gln Gly Val Leu Val Thr Val Ser Ser  
 245

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 249

&lt;212&gt; PRT

<213> *Macaca fascicularis*

&lt;400&gt; 2

His Val Ile Leu Thr Gln Ser Pro Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln  
 1 5 10 15

Ser Val Thr Leu Ser Cys Thr Gly Thr Ser Asn Asp Ile Gly Gly Tyr  
 20 25 30

Asp Tyr Val Ser Trp Tyr Gln His His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu  
 35 40 45

Met Ile Tyr Asn Val Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Glu Arg Phe  
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Ala Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu  
 65 70 75 80

Gln Asp Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Ala Arg Arg  
 85 90 95

Asp Thr Tyr Ile Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu Gly Gln  
 100 105 110

---

Ala Asn Gly Glu Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
115 120 125

Ser Glu Val Gln Leu Gln Glu Trp Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser  
130 135 140

Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Phe Ser Ile Ser Ser  
145 150 155 160

Gly Tyr Gly Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
165 170 175

Trp Ile Gly Asp Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Ser Arg Tyr Asn Pro Ser  
180 185 190

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe  
195 200 205

Ser Leu Lys Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
210 215 220

Cys Ala Arg His Asp Arg Gly Trp His Glu Tyr Phe Asp Phe Trp Gly  
225 230 235 240

Gln Gly Val Leu Val Thr Val Ser Ser  
245

图 1

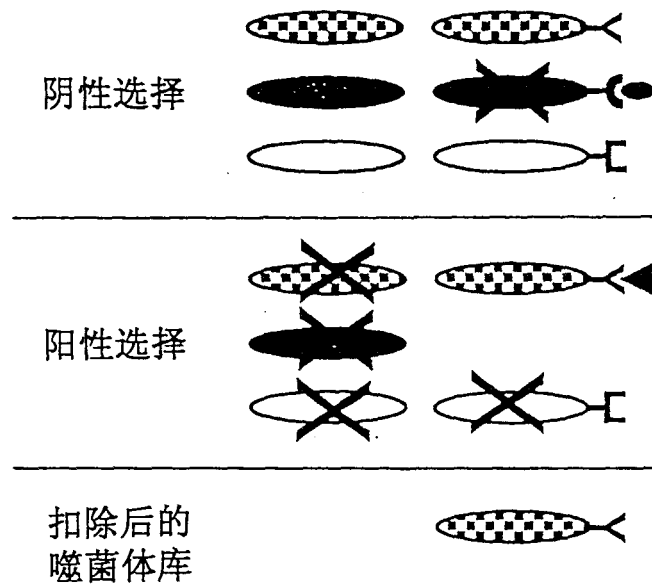


图 2

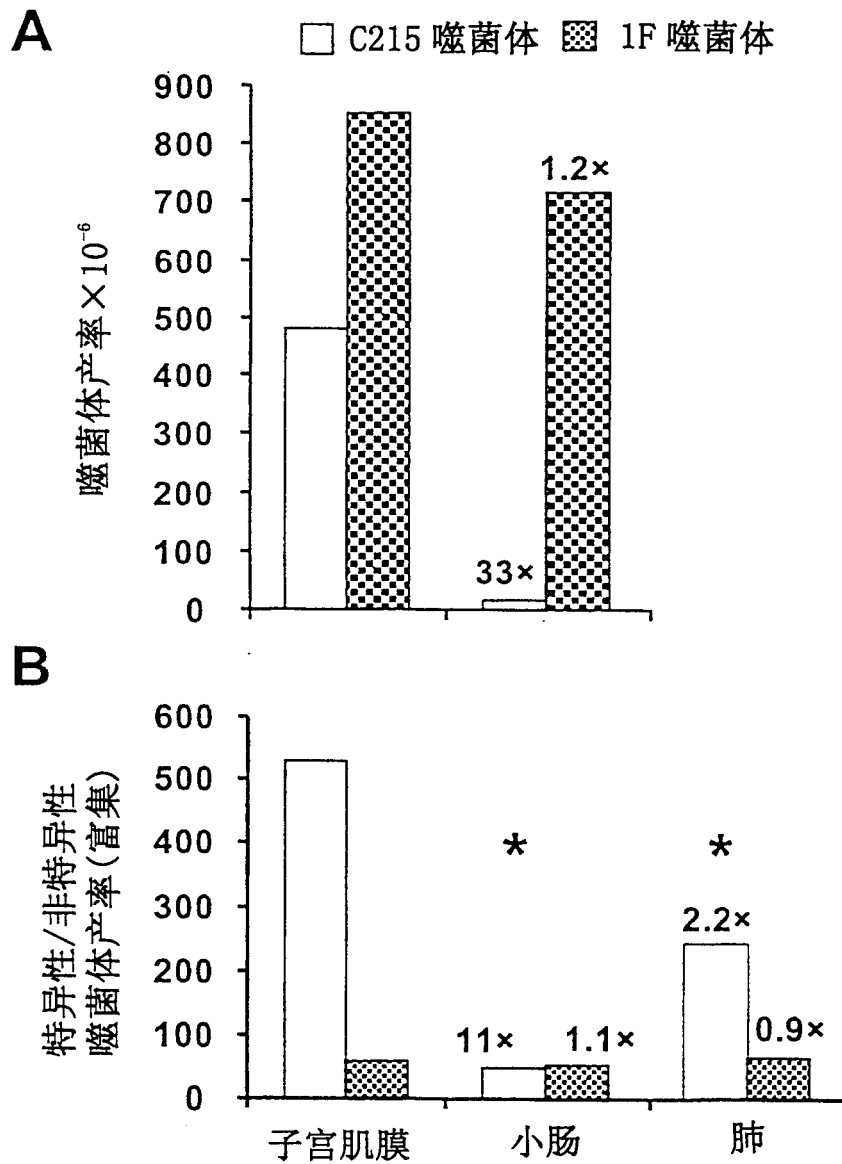


图 3

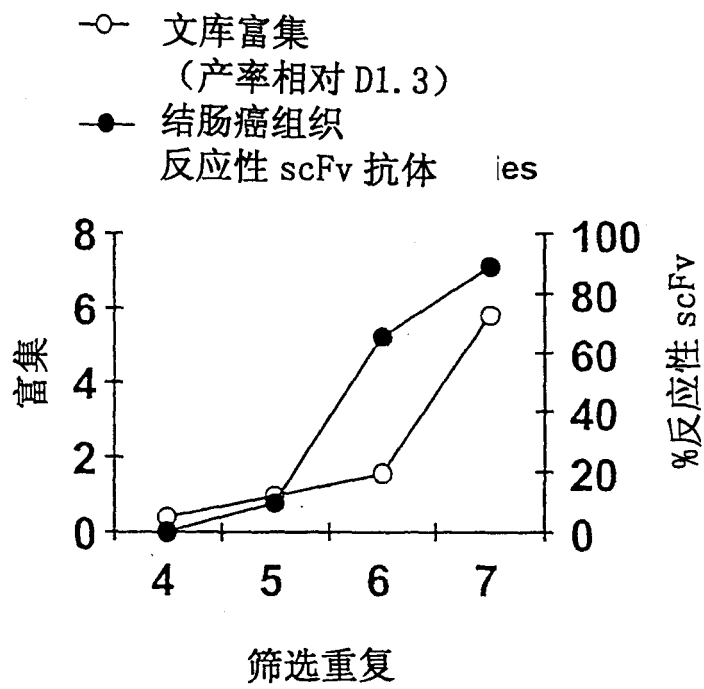


图 4

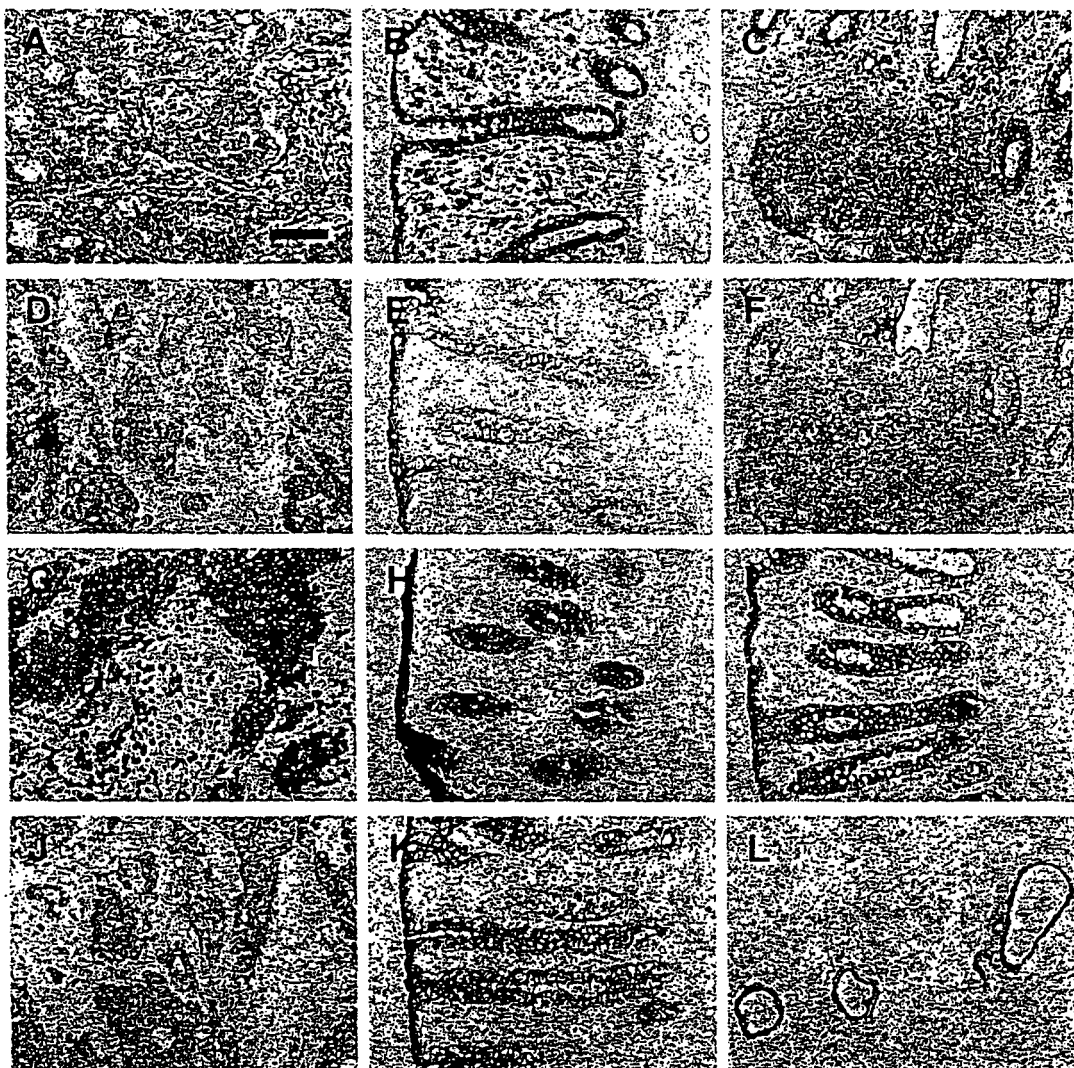


图 5

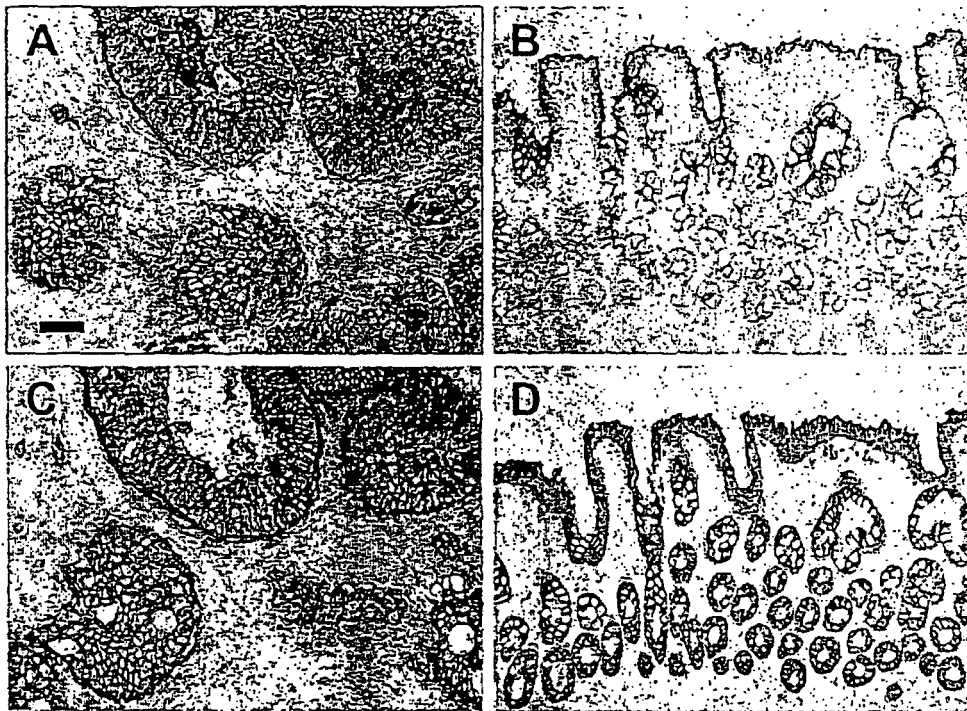


图 6

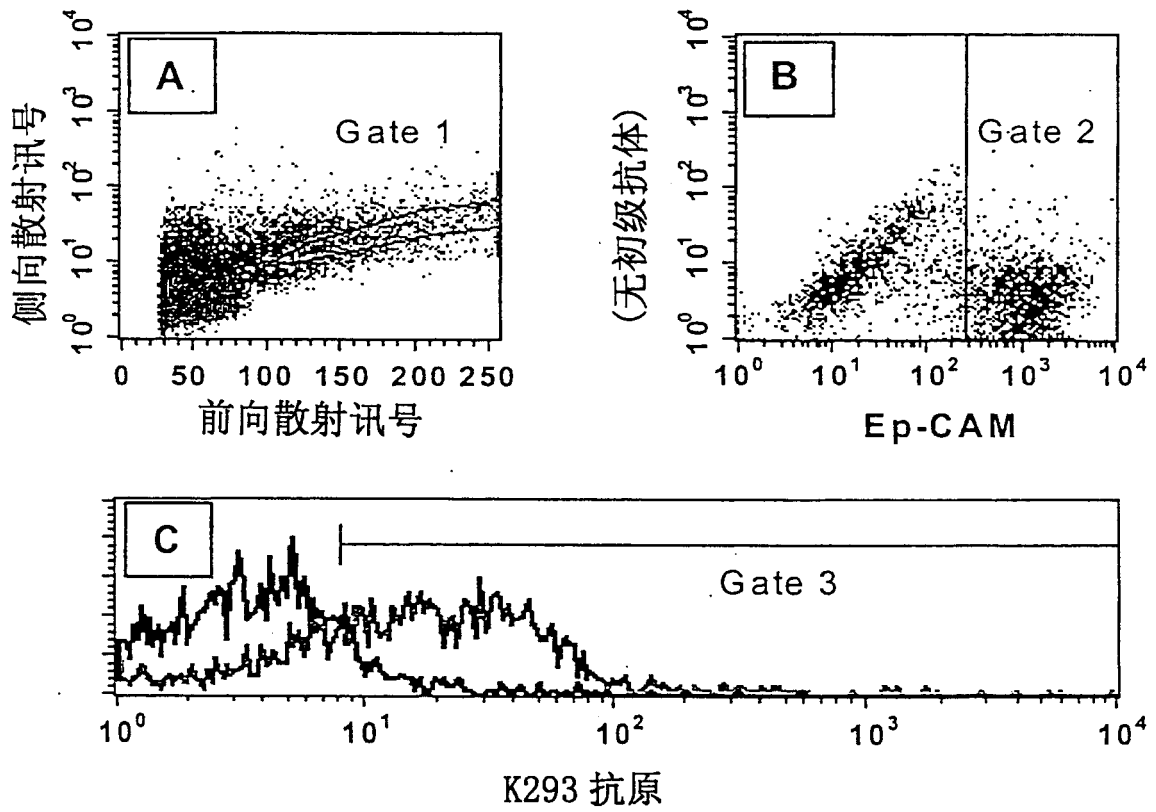


图 7

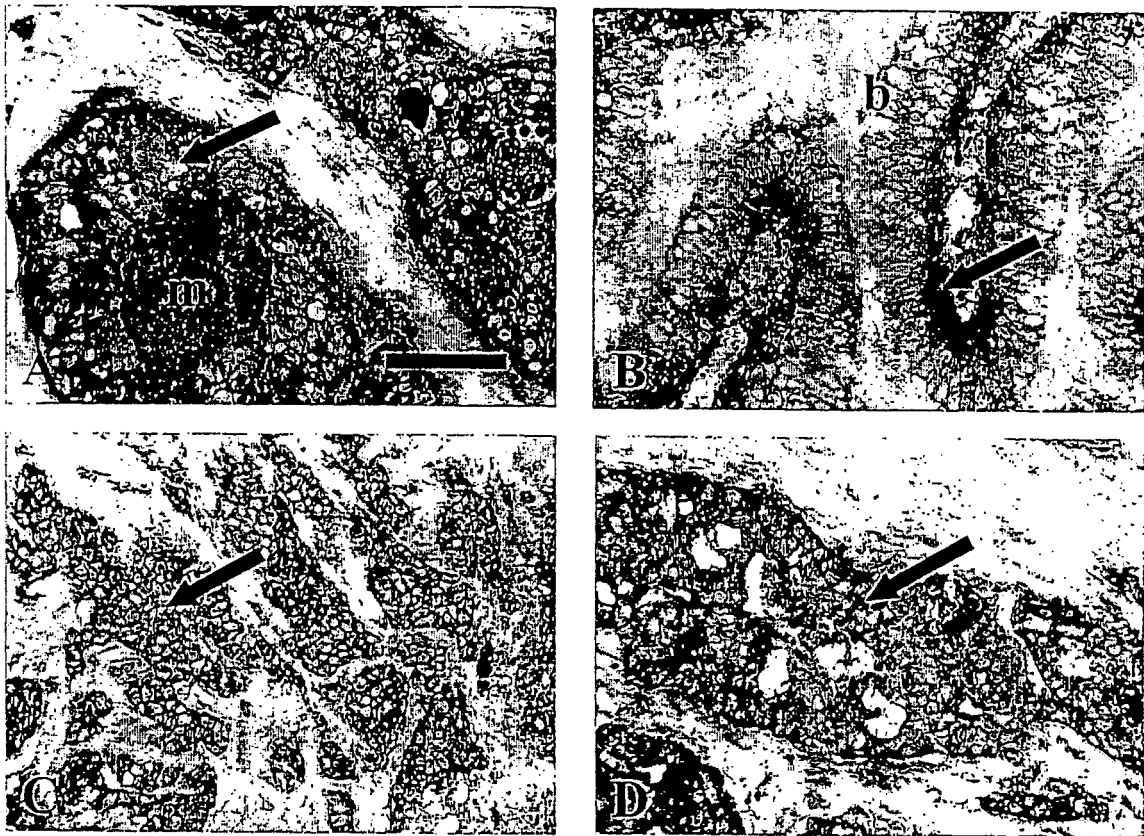


图 8

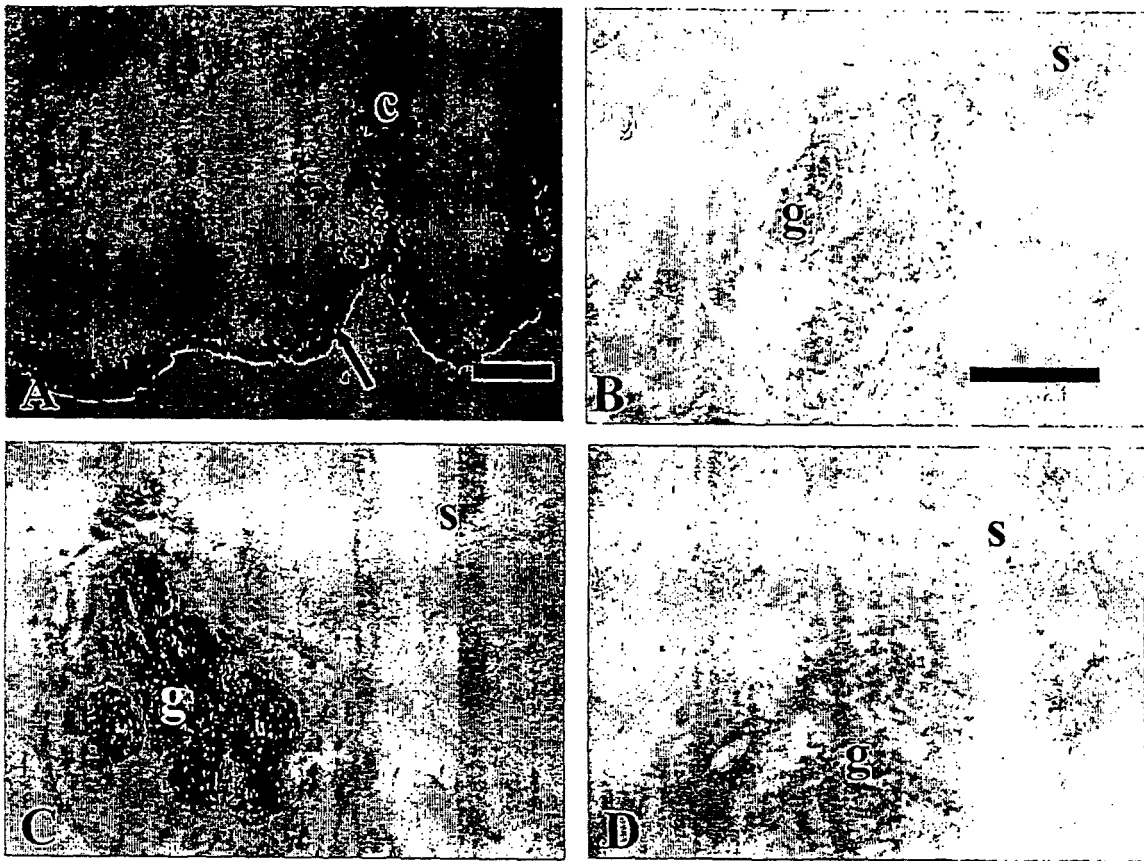


图 9





图 10

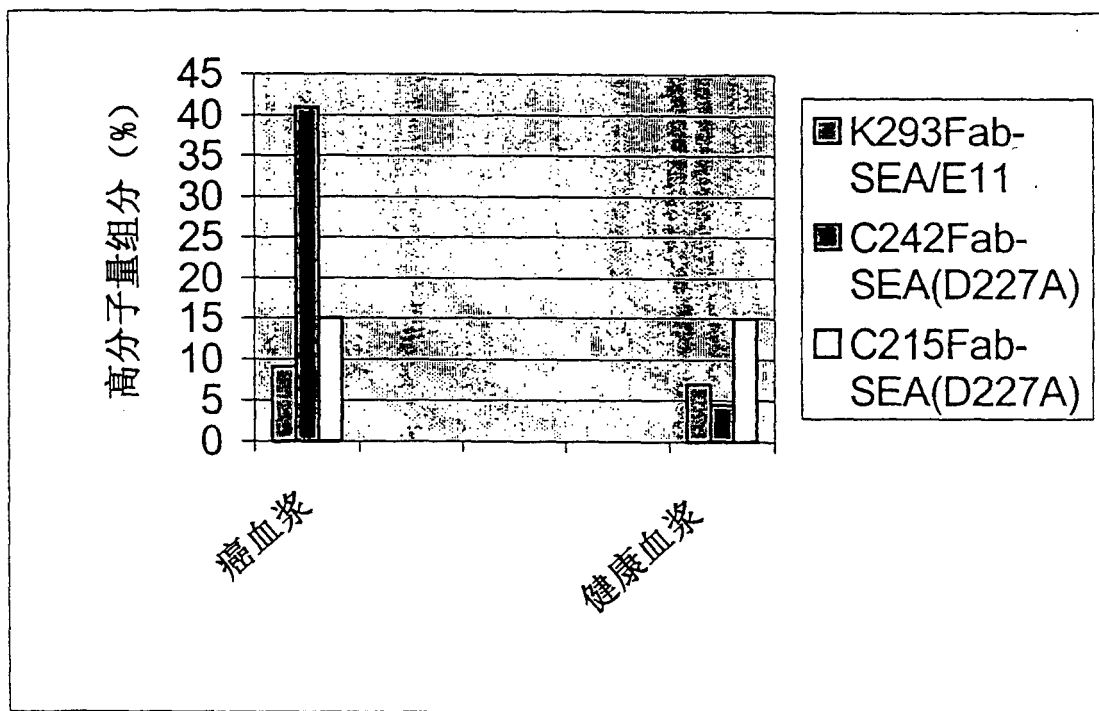


图 11

1

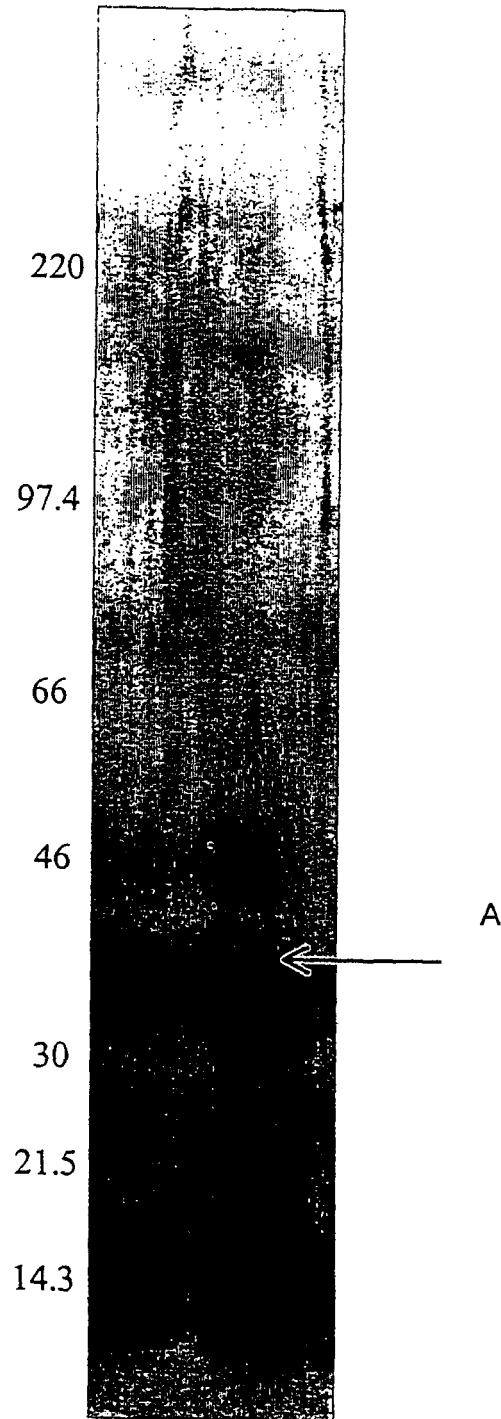
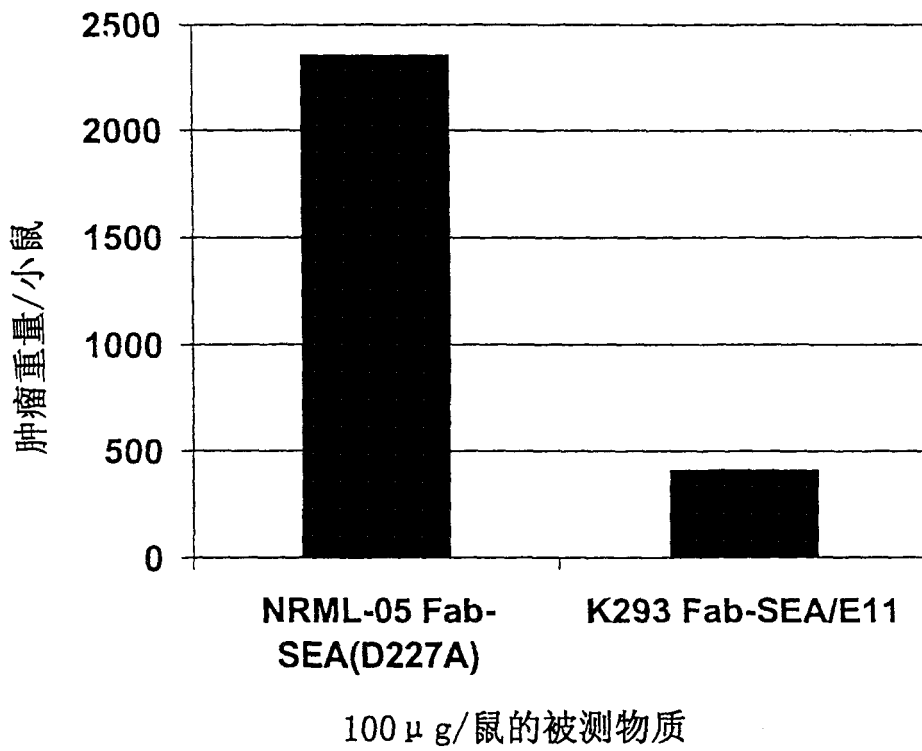




图 14



专利名称(译)	对结肠癌具有特异性的新抗体		
公开(公告)号	<a href="#">CN1406136A</a>	公开(公告)日	2003-03-26
申请号	CN01805577.X	申请日	2001-02-23
[标]申请(专利权)人(译)	活跃生物技术股份公司		
申请(专利权)人(译)	活跃生物技术股份公司		
当前申请(专利权)人(译)	活跃生物技术股份公司		
[标]发明人	TN布罗丁 PJ卡尔斯特罗姆 BHK尼尔森 LG欧尔森 MJ托德森		
发明人	T·N·布罗丁 P·J·卡尔斯特罗姆 B·H·K·尼尔森 L·G·欧尔森 M·J·托德森		
IPC分类号	G01N33/50 A61K31/7088 A61K39/00 A61K39/385 A61K39/39 A61K39/395 A61K45/00 A61K47/48 A61K48/00 A61P35/00 C07K14/82 C07K16/30 C07K16/32 C12N9/00 C12N15/09 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/574		
CPC分类号	C07K2317/622 C07K2319/00 A61K47/48615 C07K2317/21 C07K16/3046 A61K2039/505 C07K2317/55 C07K16/30 G01N33/57419 A61K47/6863		
代理人(译)	唐伟杰		
优先权	0000597 2000-02-24 SE		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明描述了结合在肿瘤细胞内和/或表面上的结合结构；展示和/或表达在肿瘤细胞内或表面上的靶结构；识别并封闭所述靶结构的结合结构；结合或阻断所述靶结构表达的物质；包含所述结合结构、靶结构或物质作为活性成分的药物组合物；包含所述靶结构作为活性成分的疫苗组合物；用于噬菌体筛选的方法；和包括使用上述主题体外和体内诊断和预后、以及治疗人类恶性疾病的方法。

