



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 91102606.1

[51] Int.Cl<sup>5</sup>

A61K 39/395

[43] 公开日 1991年11月6日

[22] 申请日 91.4.19

[30] 优先权

[32] 90.4.19 [33] US [31] 510,923

[71] 申请人 研究发展基金会

地址 美国内华达

[72] 发明人 米歇尔 G·罗森布仑

[74] 专利代理机构 上海专利事务所

代理人 全永留

A61K 43/00 A61K 45/05

A61K 49/00

说明书页数: 25

附图页数: 7

[54] 发明名称 用于治疗肿瘤病的抗体结合物

[57] 摘要

本发明涉及制备与 240KD 黑素瘤相关抗原对应的抗体的免疫结合物。诸如 ZME-018 抗体结合物的细胞毒素免疫结合物在治疗诸如黑素瘤及带有 ZME-018 抗原的其它肿瘤的增殖性细胞疾病是有用的。这里也揭示了将测定的标记组合物用于这类疾病的诊断。

△  
4  
▽

## 权 利 要 求 书

---

1. 一种组合物，其特征在于它包括 ZME 抗体和选自由细胞毒素部分和可检测标记的部分的结合物。

2. 根据权利要求 1 所述的组合物，其特征在于其中所述的部分是选自由毒素、杀细胞剂、抑制细胞生长药物、生物应答修饰因子及可检测的标记所组成的组。

3. 根据权利要求 2 所述的组合物，其特征在于其中所述部分是 gelonin 。

4. 治疗细胞增殖疾病的方法，其特征在于它包括给需要所述治疗的个体使用杀细胞有效剂量的权利要求 1 组合物。

5. 一种治疗黑素瘤的方法，其特征在于它包括给需要所述治疗的个体使用定向 ZME 抗原的单克隆抗体—gelonin 配对物。

6. 一种防止黑素瘤复发的方法，其特征在于它包括给诊断出带有 ZME 肿瘤抗原的肿瘤个体使用 gelonin 配对的单克隆抗体 ZME 。

7. 根据权利要求 4—6 所述的方法，其特征在于其中所述的个体是人。

8. 一种增加免疫毒素的细胞活性的方法，其特征在于它包括在使用免疫毒素前使用生物应答修饰因子。

9. 根据权利要求 8 所述的方法，其特征在于其中所述的免疫毒素选自由 gelonin 结合单克隆抗体、蓖麻蛋白结合的抗体及 TNF 结合的抗体所组成的组。

10. 根据权利要求 3 所述的方法，其特征在于其中所述的抗体是选自由趋向于黑素瘤细胞的细胞表面抗原的抗体、乳房癌细胞的细胞表面抗原及颈癌细胞的细胞表面抗原所组成的组。

11. 根据权利要求 10 所述的方法，其特征在于其中所述抗体是

**ZME-018 .**

12. 根据权利要求 8 所述的方法,其特征在于其中所述的生物应答修饰因子选自 IFN $\alpha$  和 TNF $\alpha$  所组成的组。

13. 一种增加免疫毒素细胞毒素活性的方法,其特征在于它包括在使用免疫毒素的同时使用生物应答修饰因子。

# 说 明 书

---

## 用于治疗肿瘤病的抗体结合物

本发明一般涉及免疫结合物领域，更具体地说是涉及免疫结合物在治疗癌症中的用途。本发明也涉及用单克隆抗体(MoAbs)和细胞毒素部分的结合物来治疗黑素瘤，这些细胞毒素部分是例如 gelonin、核糖体抑制蛋白质、其它从植物中派出来的细胞毒素部分或是细胞毒素的或抑制细胞生长的生物应答修饰因子。

由于在治疗肿瘤的足够反应要视肿瘤内药物浓度的释放和保持而定，故癌症治疗的精确定向必然是相当关键的。定位疗法是采用单克隆抗体作为特定治疗剂载体的一些研究者的目标。

癌症是西方社会中死亡率和发病率的一个主导原因。有许多类型的癌症，并各具特征。但是，癌症至少有一个共同特征，即细胞生长调节过程中存有缺陷。

黑素瘤，最致命的皮肤癌，是侵袭男女的高转移性的疾病，在诊断后的五年中几乎所有病人都难免一死。外科手术切除去局部恶性肿瘤仅在发病初期还未扩散时才有效。一旦疾病扩散后，外科手术必须附以其它一般方法作为补充以根除病变的细胞或恶性肿瘤细胞。大多数通常使用的补充疗法诸如放射疗法或化疗，它们非局限于对肿瘤细胞的作用，虽然相对而言对恶性肿瘤细胞的杀灭作用较大，但常常会在一定程度上损伤正常细胞。

许多肿瘤表达一些正常细胞表达极微弱或根本不表达的抗原或抗原决定簇。一些肿瘤细胞表达胚胎类型细胞所表达的抗原，而这种抗原不被成熟动物的正常细胞所表达。这些异常表达的抗原被称为肿瘤相关抗原。这些抗原的专一性在于尽管特定的抗原可能被多

于一种肿瘤所表达，但它通常是被表达该抗原的特定肿瘤的所有或大多数细胞所表达。一个肿瘤细胞可以表达一种或多种肿瘤相关抗原。这些肿瘤相关抗原可在细胞的表面上表达（细胞表面抗原）也可以由肿瘤细胞分泌出来（分泌抗原），或仍保留在细胞内（细胞内抗原）。

这些肿瘤相关抗原已被用来检测、诊断并定位肿瘤。在某些情况下肿瘤细胞上肿瘤相关抗原的存在就允许了对肿瘤细胞有特异性的特殊药物及其它治疗手段的定向应用。

抗体通常是由动物免疫系统所产生的对外界抗原或抗原决定簇应答的蛋白质。抗体定向地连接在特定的抗原上。例如，对其它黑素瘤抗原的抗体在全身和腹膜内使用后被用来测定人体中特定的肿瘤位置。

随着针对肿瘤细胞上抗原的特异单克隆抗体的发展，一种减少对正常细胞损害的靶向化疗法已成为可能，因为肿瘤细胞上的抗原不会在正常细胞上出现。与特定抗原或抗原决定簇定向的单克隆抗体可以大量地制备。

为了让抗体用来定位和治疗恶性肿瘤，可给它进行标记。这类放射性同位素标记的单克隆抗体可附于肿瘤细胞表面抗原上，通过体外闪烁照像已成功地使病人体内肿瘤成象 (Deland, Semin Nucl Med. 19(3) 158—65 (Review) (1989); Juhl, Hepalogastroenterology 36 (1): 27 —32 (Review) (1989))。结合药物的抗体可用作一个释放系统，药物通过它可以抗体所定向的特定肿瘤细胞为目标，这是因为全身使用了结合药物的抗体后，抗体有到达肿瘤区域的独特能力。抗体也可与毒素相结合，从而作一个释放系统使毒素定向地运行到特定肿瘤细胞。

通常用于抗体结合物的细胞毒素剂大体分为三类物质：毒素、放射核素和化疗剂。与这三类中每类结合的抗体可作为具有一定效力

的治疗剂但也存在一些特有的问题(Frankel, et al. *Ann, Rev. Med.* 37: 125—142 (1986), Reimann et al. , *J. Clin. Invest.* 82(1): 129—138(1988).). 含有植物毒素的免疫结合物与其它类型的抗体结合物相比有一个独特的长处, 因为:

1. 抗肿瘤活性所需的免疫毒素的剂量一般要比抗体-药物结合物所需的低得多。

2. 毒素与抗体的结合不影响抗体的亲和力。Gelonin 是一种糖蛋白(分子量约为 29—30,000Kd), 从 Gelonium multiforum 种子中纯化而得。Gelonin 属于强核糖体失活植物毒素类。该类核糖体一失活植物毒素的其它组员是相思豆毒素、蓖麻蛋白和 modeccin 的链。与相思豆毒素和蓖麻蛋白一样, Gelonin 通过损伤哺乳动物核糖体的 60s 亚单位来抑制蛋白质合成。虽然相思豆毒素的 A 链(RTA) 已广泛用于免疫毒素, 但 gelonin 对化学和物理处理比 RTA 稳定[Barbieri et al. , *Cancer Swrv.* 1: 489 —520 (1982)]. 此外, gelonin 本身不与细胞结合, 因而是无毒的(除了高浓度外)且在实验室操作中是安全的。核糖体的失活是不可逆的, 不涉及辅助因子并有提示酶促作用的效能。

许多工作者建议或报告了将细胞毒素剂与抗体结合组成“免疫毒素”。单克隆抗体与细菌毒或诸如蓖麻蛋白或相思豆毒素的植物毒素的醇活性部分(A 醇)b 结合组成的免疫毒素有特殊的兴趣。(Nev-elle et al. , *Immunol. Rev.* , 62: 75—92 (1982); Ross et al. , *European J. Biochem.* 104 (1980); Vitteta et al. , *Immunol. Rev.* 62: 158 —183 (1982); Ross et al. , *Cancer Res.* 42: (1982) 457 —464; Trowbridge and Domingo, *Nature (Cond.)* 294: 171—173 (1981)). 以蛋白质重量为基础, Gelonin 和蓖麻蛋白是抑制蛋白质合成活性最大的毒素。Gelonin 在抑制蛋白质合成中比蓖麻蛋白 A 链的活性大 10—1000 倍。像蓖麻蛋白和相思豆毒素的肽链包含两条链, 毒性单位 A 链及

用来与细胞结合的 B 链。与蓖麻蛋白和相思豆毒素不同，gelonin 只由一条链组成，由于它缺少用来与细胞结合的 B 链，极它本身对于完整的细胞是相对无毒的 (Stirpe et al. , *J. Biol Chem* 255: 6947 — 6953 (1980))。哺乳纲细胞明显缺少与 gelonin 分子结合和/或使 gelonin 分子内在化的能力。gelonin 与肿瘤靶向的单克隆抗体的配对物既提供了将 gelonin 连接至细胞上的特定方法又提供使 gelonin — 抗体复合物内在化的途径。这种单克隆抗体诸如定向于特定的肿瘤细胞例如黑素瘤细胞抗原的单抗 ZME 。采用毒素 gelonin 比之采用诸如蓖麻蛋白 A 链毒素的优点之一是与蓖麻蛋白 A 链相比减少了对正常组织的毒性。gelonin 与定向于抗-肿瘤相关抗原的单克隆抗体配对物，它们在肿瘤治疗中是一种有活性。选择性的免疫毒性剂。

以前的研究已阐述了许多含有 gelonin 的抗体—毒素结合物 (Lambert et al. , *J. Biol Chem.* 260: 12035—12038 (1985); Thorpe et al. , *Eur. J. Biochem* 116: 447 —454(1981); Singh et al. , *J. Biol. Chem.* 264: 3089—95 (1989); Scott et al. , *J. Natl. Cancer Inst.* 79: 1163—72 (1987); Tedder et al. , *J. Immunol.* 137(4): 1387 —91 (1986)). 最近 Ozawa, et al (*Int. J. Cancer* 43: 152—157) 已构思了一种由抗体 B467 组成的 gelonin 免疫毒素，该抗体 B467 与接受表皮生长因子(EGF) 的细胞受体相结合。该 B467—gelonin 结合物对 EGF 受体表达的细胞毒素很高但对缺乏受体的细胞的无毒的。Sviam et al (*Cancer Research* 47: 3169 —3173(1987) 制成了抗黑素瘤抗体 9. 2. 2. 7 与 gelonin 结合物，并与相思豆素和蓖麻蛋白 A 链的 9. 2. 2. 7 结合物比较其体内的体外杀细胞活性。这些研究证明 gelonin 结合物体外对抗原阳性细胞确有选择性的细胞毒性效果。体内试验证明：直至总的抗体剂量为 2mg/小鼠时 gelonin 结合物还是无毒的；多次静脉注射 gelonin 免疫毒素足以延迟皮下人体肿瘤异体移植物在裸鼠中的生长。与以相思豆毒素和蓖麻蛋白的结合物相比较，gelonin 结

合物有相似的效力，在体内治疗中选择性更好且对肿瘤定位更准确。

由于连有药物、毒素或放射性元素标记的抗体只与表达特定抗原的肿瘤细胞结合，故只有肿瘤细胞被杀死。相反的，采用放射疗法，来自放射性同位素标记化合物的射线不只局限于接受射线的肿瘤细胞。例如，抗体的新陈代谢或酶促降解可释放放射性标记物，使它们能到达诸如肾或骨髓的其它组织中，对这些器官造成不可接受的放射损伤。放射性同位素标记的抗体有这类问题，就限制了其在治疗剂中的使用或使其在治疗剂中的使用复杂化。

本发明提供了一种抗体（这里称为 ZME—018）的免疫结合物，该抗体可以识别在黑素瘤细胞上的 GP240 抗原。Wilson et al.，讨论的一种抗体(22528S)可识别这个黑素瘤膜抗原(Wilson et al.，Int. J. Cancer 28:293(1981))。该抗原在这里定义为 GP240。与 GP240 结合的抗体 225.28s 在这里进一步定义为 ZME—018。在一个具体实例中，抗体与选自 gelonin、蓖麻蛋白 A 链和相思豆素 A 链所组成组的一种毒素相连接。在另一个具体实例中，ZME 抗体可与诸如阿霉素的杀细胞药或诸如淋巴因子或细胞激动素的生物应答修饰剂相连接。在另一个实例中抗体可用诸如放射性同位素化学发光剂、荧光剂或酶标记物的可检测标记物进行标记。通过给需要这类治疗的个体使用这些杀细胞免疫结合物来治疗肿瘤和预防带有肿瘤相关 GP240 的肿瘤复发。应用该技术领域人员熟知的技术可检测的标记 ZME 免疫结合物可用来诊断和定位肿瘤。这些标记的免疫结合物也可通过该技术领域熟知的方法用来测定生物样品内存在的 GP240 并给体内的肿瘤位置定位。

本发明的一个目的是提供一种细胞毒性组合物，它将特异性结合并杀死肿瘤细胞提供一种特异性地与表达上述的 GP240 抗原的肿瘤细胞结合并杀死它的细胞毒性组合物也是特别作为本发明的一



个目的。在 Hybritech, Inc 中用盐分馏和 DEAE 色谱层析来制备抗体 ZME-018 并通过 SDS PAGE (Wilson et al., Int. J. Cancer 28 293 — 300(1981)) 来判断是否均质。本发明的另一个方面是关于通过使细胞与杀细胞有效量的免疫毒素相接触而杀死人体黑素瘤细胞或表达 ZME(GP240) 抗原的其它肿瘤细胞的方法。

本发明的进一步目的在于提供这样的组合物, 使之对肿瘤细胞有毒性但对正常器官的损伤最小。

图 1 表明 ZME — gelonin 连接和纯化的流程。

图 2 表明用 S — 300 凝胶渗透色谱层析对 ZME — gelonin 的纯化。

图 3 表明从 S — 300 色谱层析出来的高分子量的物质在 Cibachron 一点琼脂糖凝胶交柱上用线性盐梯度洗脱(0—300mM NaCl) 流出简图。显示出两个蛋白质峰: 一个彻底流出峰(馏份 14—20) 和一个用高盐洗脱出的邻接峰(馏份 44—75)。

图 4 表明 gelonin 和 ZME gelonin 结合物的电泳类型。

图 5 表明 ZME(空心圈) 和 ZME gelonin(满圈) 的比較的 ELISA 分析数据。

图 6 表明 ZME — gelonin 和游离 gelonin 对对数期 AAB—527 细胞在 72 小时暴露后的毒性。

图 7 表明 ZME — gelonin 和游离 gelonin 对对数期 AAB — 527 细胞的毒性。

图 8 表明 ZME — gelonin 对抗原阳性靶黑素瘤细胞(AAB—527) 和抗原阴性 T — 24 细胞在培养基中的毒性。

图 9 表明游离抗体对 ZME — gelonin 细胞毒性的影响。

图 10 表明 IFN- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  和 TFN 对 ZME-gelonin 细胞毒性的作用。涂覆的圈表明对只有 ZME-gelonin 的剂量反应。空心的方块表明对 ZME-gelonin 加上 IFN- $\gamma$  的剂量反应。空心的三角形表明在适当量

TNF- $\alpha$  的存在下 ZME-gelonin 的剂量反应。带有空白点的涂满的圈表明在适当量 IFN- $\alpha$  存在下, ZME-gelonin 剂量反应曲线。

图 11 表明 ZME-gelonin 对抗原阻性(A—375, 涂覆的圈)及抗原阴性(CEM, 空立方块)细胞在人体肿瘤起源细胞分析中的作用。

图 12 表明 ZME-gelonin 对从 4 个病人的新鲜活组织中得到的不同型起源细胞存活的细胞毒性作用。

图 13 表明 ZME 抗体和 ZME-gelonin 结合物在带有人体黑素瘤异体移植物的裸鼠中的组织分布。

这里所用的术语“单克隆抗体”表示一种总体均匀的抗体组合物。它并不限定抗体的来源或制备抗体的方法。

黑素瘤细胞在其细胞表面上表达出 240KD(GP240)抗原。已生产出这个抗原的抗体。抗体 ZME-018(Hybritech Inc 生产)是一种能识别存在于大多数人体黑素瘤细胞表面上 240Kd 糖蛋白的鼠的单克隆抗体 IgG<sub>2a</sub>。可以生产出能识别这个 240KD 抗原的表位的 IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2a</sub>和 IgG<sub>2b</sub>同位素的单克隆抗体。用于本发明目的的 ZME 抗原的 240Kd 表位被称为表位。因此, 能识别该 ZME 表位的所有抗体在功能上是等同的。

这些具代表性的杂交培养的细胞分泌出相同的异型抗体, 即所有分泌的抗体都能认出 ZME 表位, 它们保藏在美国保藏中心(ATCC), 保藏号为\_\_\_\_\_。

这些单克隆抗体可通过该领域技术人员熟知的方法来制得。已详细地阐述了制备产生这些抗体的杂交细胞培养物的特征及方法。(Wilson et al. , Int. J. Cancer 28:293 (1981); Imai et al. , Transplant proc. 12:380-383 (1980)). 简而言之, 用鼠骨髓瘤细胞系 Sp2/0—Ag—14 和如 Imai et al. , (1980) Transplant Proc. 12: 380—383)所述的用黑素瘤细胞系 M21 免疫的鼠脾细胞来建立杂交系。分泌单克隆抗体(MoAb)225. 28s 和 465. 12 的杂交系已被亚克隆并在体内和体

外繁殖。两种单克隆抗体都是 IgG<sub>2a</sub> 亚类，在使用前通过在蛋白质 A 琼脂糖凝胶 4B 上 (Pharmacia, Piscataway, NJ, USA) 吸附/洗脱而从小鼠腹水中进行纯化。

杂交产生的抗体与人体黑素瘤细胞反应但不与人体正常细胞反应，这种抗体被进一步特异化。由 ZME 细胞系产生的抗体及杂交产生的功能上等同的抗体与人体黑素瘤细胞上的 ZME 抗原反应。它们也与 70—80% 随机获得的试验黑素瘤反应，但是综述在实施例 4 中表 1 的种种组织无反应。

这里所用的关于例举的鼠单克隆抗人体黑素瘤抗体方面，术语“功能上等同”表示一种单克隆抗体：(a) 横向划分例举的单克隆抗体；(b) 有选择性地结合到诸如人体黑素瘤细胞的表达 ZME 抗原的细胞上；(c) 具有 G 或 M 等型基因；(d) 通过免疫沉淀或夹心免疫分析来测定与 ZME 抗原的结合；(e) 当与 gelonin 结合，则显示组织培养抑制剂量 (TCID)，对 AAB—527 或 A375 系中至少一种最低抑制 50% (所用剂量是 80—100 单位/ml)。

用 N-琥珀酰亚氨基-3-(2-吡啶基二硫代) 丙酸酯 (SPPP) 或 2-亚氨基硫羟烷 (IT) 作为连接剂使抗体 ZME 与 gelonin 结合。结合物在 72 小时组织培养分析中进行抗 AAB—527 和 A375 细胞试验。这两种细胞系的抗体结合物表现出可接受的抗增殖活性 (TCID<sub>50%</sub> 在少于 100 单位毫升时)。

下面实施例给出抗体的进一步详细特征，。

### 免疫化学剂

本发明首要的免疫化学衍生物是免疫毒素 (ZME 抗体与细胞毒素部分或生物应答修饰剂的结合物) 以及标记的衍生物 (例如，放射性标记、酶标记或荧光标记的衍生物)，其中标记提供了识别包括标记了的抗体的免疫复合物的方法。

免疫毒素的细胞毒素部分可以是细胞毒素药物或源于细菌或植

物 (gelonin) 的酶活性毒素或是这类毒素的酶活性片段 (“A 链”)。酶活性毒素及其片段较为优选, 其例子为 gelonin、白喉菌 A 链、未结合的白喉毒素的活性片段、外毒素 A 链 (从 *Pseudomonas aeruginosa* 中得到)、蓖麻蛋白 A 链、相思豆素 A 链、modeccin A 链、 $\alpha$ -次黄嘌呤、*Aleurites fordii* 蛋白质、dianthin 蛋白质、*Phytolacca americana* 蛋白质 (PAPI, PAPII 和 PAP-S)、苦瓜属沙位提 (*Momordica charantia*) 抑制剂、泻果素、巴豆毒蛋白、药用肥皂草属抑制剂、丝裂吉菌素、局限曲霉素、酚霉素和伊诺霉素。首先的是与 gelonin 的结合物。

可与 ZME 抗体结合且用于本发明的生物应答修饰因子包括, 但不局限于, 诸如 IL-1、IL-2 干扰素 ( $\alpha$ 、 $\beta$  或  $\gamma$ )、TNF、LT、TGF- $\beta$  和 IL-6 的淋巴细胞激活素和细胞激活素。这些生物应答修饰因子对肿瘤细胞有种种作用。这些作用是通过直接作用增加肿瘤细胞杀死率及通过增加宿主体防御调节机制而增加肿瘤细胞的杀死率。抗体 ZME 与这些生物应答修饰因子的结合使之在肿瘤内选择性定位, 因而增加了抗增殖作用, 同时抑制了引起对非靶向细胞毒素性的非特异性作用。

在本发明中有用的细胞毒素药包括, 但不限于, 阿霉素 (及其衍生物)、顺-铂络合物 (及其衍生物)、争光霉素和氨甲叶酸 (及其衍生物)。这些细胞毒素药有时对于临床治疗肿瘤复发特别是黑色素瘤是有用的, 但它们有严重的副作用并危及非靶细胞而使其使用复杂化。抗体 ZME 可作为这类药物的有用载体, 为药物释放至肿瘤并增加其进入肿瘤细胞提供了一种有效的手段。另外, 将载有细胞毒素药物的特定抗体释放至肿瘤可以保护诸如肝脏、肾和骨髓敏感区域免受化疗剂的毒性作用。由于所有药物部分与在肿瘤内浓集的抗体结合, 故采用药物与抗体 ZME 结合的释放系统可以降低药物本身的剂量。

单克隆抗体的结合物可采用种种双功能蛋白连接剂而制得。这

类反应剂的例子是 SPDP、IT、诸如胆影酸二甲酯的亚氨基酯·HCl 的双功能衍生物、诸如辛二酸二琥珀酰亚氨基酯的活性酯、诸如戊二醛的醛、诸如双(对-二氮杂苯甲基)-己二胺的双-二氮杂衍生物、诸如双(对-重氮基苯甲酰基)-乙二胺的双重氮基衍生物、诸如 2,6-二异氰酸苯基甲酯的二异氰酸酯及诸如 1,5-二氟-2,4-二硝基苯的二-活性氟化合物。

当结合物用来在体外治疗或诊断目的下杀死人体黑素瘤细胞，典型地将结合物加至细胞培养基中，浓度至少约 10mM。体外使用的配方及给药模式是不苛刻的。通常使用与培养基或灌注基能混溶的水液制剂。

用作诊断和治疗带有诸如黑素瘤 ZME 抗原的细胞毒素放射药物可通过将高线性能量转段(LET)的放射同位素结合至抗体上而制得。这里所用的术语“细胞毒素部分”也包括这类同位素。

用来制备标记抗体的标记物包括可被直接检测的部分，例如荧光素和放射标记物以及诸如酶的必须经反应或衍生化后而检测的部分。这类标记物的例子是<sup>32</sup>P、<sup>125</sup>I、<sup>3</sup>H、<sup>14</sup>C 荧光素及其衍生物、若丹明及其衍生物、丹酰、7-羟基香豆素、荧光素、2,3-dihydrophthalazine-1,4-diones, 辣根过氧化物酶、碱性磷酸酯酶、溶菌酶和葡萄糖-6-磷酸酯脱氢酶。抗体可通过已知方法用这类标记物标记。例如，诸如醛、碳化二亚胺、双马来酰亚胺、imidates、琥珀酰亚胺、双-重氮化的苯胺等的连接剂可用来使抗体与上述的荧光、化学发光剂和酶标记物进行连接。

抗体和标记抗体可用于许多免疫成像或免疫分析方法中以检测病人或监视已诊断出患有癌症者中表达 ZME 抗原的诸如黑素瘤的肿瘤的存在。当用来监测癌症的状态时可采用定量免疫分析方法。这类监测分析定期地进行，比较结果以决定病人的肿瘤是否增加或减少。可用的普通分析技术包括直接和间接分析。直接分析包括将采

自病人的组织或细胞样品与带有标记的抗体一起孵育。如果样品细胞包括黑素瘤细胞 ZME 抗体带有标记的抗体就与这些细胞结合。洗涤组织或细胞以除去未结合的标记抗体后，组织样品即可测定标记免疫复合物的存在。

诊断用的抗体典型地为配套形式。这些典型的配套物包括：在合适容器中标记形式的抗体、用来孵育和洗涤的试剂以及视标记物性质而定的基础物质或派生剂。也可包括抗原 ZME 的对照物及指令。

给已诊断出带有 ZME 抗原决定簇的肿瘤病人使用本发明的免疫毒素可以使细胞毒素剂定位并浓缩在杀死肿瘤细胞所需的部位。通过使细胞毒素剂如此定向，可以消除或减少其它器官、组织和细胞的非特定毒性。

当用于体内治疗时，给病人使用治疗有效量的免疫毒素（治疗有效量即是消除或减少病人肿瘤的量）。它们通常是非肠道给药，较好地是静脉内给药。剂量及疗程视癌症的性质（初期或转移性的）及其种类、特定免疫毒素的特征（例如其治疗指数）、病人及病史而定。所用免疫毒素量典型的范围为 0.1—10/ng/Kg 病人的体重。

非肠道使用的免疫毒素辅以药学上可接受的非肠道的赋形剂而配成单位剂量的注射剂（溶液、悬浮液、乳剂）。这类赋形剂本身无毒且无疗效。这类赋形剂的例子是水、盐水、Ringer's 溶液、右旋糖溶液和 5% 血清白蛋白。也可使用诸如不挥发油和油酸乙酯的非水性赋形剂。磷脂可用作载体。赋形剂可含有微量的诸如增加等渗性和化学稳定性的添加物，例如缓冲液和防腐剂。免疫毒素在这类赋形剂中典型地配成浓度为 0.1mg/ml 至 10mg/ml。

通过 Stirpe, et al 的方法从 gelonium multiflorum 的种子中均化 Gelorin。简单地说，通过在缓冲盐水溶液 (pH7.4) 中均化而使 gelonin 从种子中萃取出来。在 5mM 磷酸钠 (pH6.5) 中渗析后浓缩上

清液，gelonin 再用如实施例 1 所述的离子交换色谱层析纯化用高压液相色谱(HPLC)和十二烷基硫酸钠-聚乙酰胺凝胶电泳(SDS-Page)分析 gelonin 毒素的纯度。Gglonin 毒素迁移成一单区带，其分子量为 29—30,000 道尔顿。

如实施例 2 所述通过无细胞系统中的蛋白质合成抑制不测量 Gelonin 毒素活性。

如实施例 5 所述的用 SPDP 修饰的抗体 ZME-018 与实施例 3 和 6 所述的亚氨基硫羟烷修饰的 gelonin 相结合。如实施例 7 所述通过在 Sephadex G—75 柱上的柱色谱层析纯化结合抗体的 gelonin 。

通过蛋白质合成抑制来决定 gelonin 配对的抗体的毒性，用体外和体内试验测定其抗增殖活性。

下列实施例详细叙述了本发明免疫毒素单克隆抗体的制备、特征及其使用。这些实施例不限制本发明。

### 实施例 1

#### gelonin 的纯化

将 *Gelonium multiflorum* 的种子去壳，用 8 倍体积含 5mM 磷酸钠的 0.14M NaCl 液(pH7.4)在均化器中研磨硬果。使均化物在 4℃ 下过夜。在 0℃ 下及冰冷却和搅拌下以 35,000 次 g 速度离心 20 分钟。除去上清液在 5mM 磷酸钠液中渗析并用 pm10 滤器浓缩，样品在用 5mM 磷酸钠平衡的 CM—52 和离心交换柱上(20 × 1.5cm)分层。结合至离子交换树脂上的物质用 400ml 0—0.3M 线性 NaCl 溶液梯度在 4℃ 下以 25ml/小时的速率洗脱。每次收集馏份 5ml，在分光光度机上于 280nm 处观察馏份。gelonin 约在 55—70 馏份流出，是最后的流出高峰。收集馏份 55—70，在重蒸水中渗析，通过冷冻干燥浓缩。在高压液相色谱中用 TSK3000 凝胶渗透柱用 50mM 磷酸钠缓冲液(pH7.4)洗脱以及 15% 十二烷基硫酸钠-聚乙酰胺凝胶电泳(SDS-page)来检查每个制备产品的纯度及分子量。Gelonin 迁移成一

个单一区带，分子量约为 29—30,000 道尔顿。

### 实施例 2

#### Gelonin 活性的分析

在无细胞的蛋白质合成抑制分析中监测 Gelonin 的活性。在使用前马上解冻兔网状细胞溶解物，并在 50ml 兔网状细胞溶解物中依次加入下列组分：0.5ml 0.2M Tris HCl(pH7.8)、8.9ml 乙二醇和 0.25ml 1M HCl，每次加入后混合来进行无细胞蛋白质合成抑制分析。

取 20 微升组成为：0.375MKCl、10mM Mg(CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>)<sub>2</sub>、15mM 葡萄糖、0.25—10mM 氨基酸（亮氨酸除外）、5mM ATP、1mM GTP、50mM TMS-HCl(pH7.6)、10 $\mu$ l 肌酸酐磷酸酯-肌酸酐磷酸酯酚、8 $\mu$ l<sup>14</sup>C 亮氨酸（Amersham 348 毫居里/mmol）的盐-氨基酸-能量混合物（SAEM）并加入含有不同浓度 gelonin 混合物的 1.5  $\mu$ l 溶液。使混合物在 30 $^{\circ}$ C 下孵育 60 分钟。通过在玻璃纤维过滤器上沉淀出所合成的蛋白质，用 10% TCA 和丙酮洗涤，在  $\beta$ -计数器上用 Aquasol 闪烁流体测定放射活性而测得与混合物成倍数关系的掺入的<sup>14</sup>C-亮氨酸。不低于 4  $\times$  10<sup>9</sup>  $\mu$ /mg 的有特定活性的 Gelonin 用来与抗体结合。gelonin 活性单位是在无细胞分析中引起掺入 [<sup>14</sup>C] 亮氨酸 50% 抑制的 gelonin 蛋白质的量。

### 实施例 3

#### 用亚氨基硫羧烷修饰的 Gelonin

使在磷酸盐缓冲盐水中的 Gelonin 于 Centricon 10 微型浓缩器中浓缩至约 2 mg/ml。加入三乙醇胺氯化氢（TEA/HCl）、(pH8.0) 和 EDTA 直至最后的 TEA/HCl 浓度为 60mM 及 1mM EDTA, pH8.0。将 2-亚氨基硫羧烷贮存溶液（20mM）加至最终浓度为 1mM，使样品在氮气流下于 4  $^{\circ}$ C 下孵育 90 分钟。

在预先用含有 50mM NaCl 和 1mM EDTA 的双-三乙酸盐缓冲液



pH5.8 预平衡的 Sephadex G—25 柱上凝胶过滤而除去过量的亚氨基硫羟烷。用 Badford 染料结合分析在微滴定板上分析馏份中蛋白质的含量。简而言之，在每个坑中加入 40 $\mu$ l 样品、100  $\mu$ l 磷酸盐缓冲的盐水 (PBS) 和 40 $\mu$ l 样品、100  $\mu$ l 磷酸盐缓冲的盐水 (PBS) 和 40 $\mu$ l 染料浓缩物。在 Dynatech Micritlisa 自动读出器中读出 600nm 处的吸光度。Gelonin 在空隙体积处流出 (约在馏份 14—20)。收集这些馏份并用 Centricin —10 微浓缩器浓缩。

#### 实施例 4

对 ZME 黑素瘤抗原的单克隆抗体的制备及特征  
分泌抗体的杂交系

用 107 人黑素瘤 M21 细胞腹腔内注入 8 周龄雌性 BALB/C 鼠 (SCRF 喂养繁殖 La Jolla, Calif), 2 周后再用  $5 \times 10^6$  M21 细胞增加腹腔内注射。对 50 周龄的雄性 NZB/B 鼠 (SCRF 喂养繁殖) 先注入  $5 \times 10^6$  BW5 黑素瘤细胞, 每隔一个分别再用  $5 \times 10^6$  BW5、M51、Co-lo38、BW5 和 M21 增加注射 5 次, 增加注射后三天, 杀死小鼠, 取出脾脏, 用手术刀分离出脾细胞而制成细胞悬浮液。用 0.17NH<sub>4</sub>Cl 在 0.01M Tns pH7.2 中处理脾细胞悬浮液 10 分钟以溶去红血球细胞。然后, 如 Gefter et al. (1977) Somat, Cell Genet 3:731 所述用下列微小修饰使 SP2/OAg14 细胞与这些脾细胞融合:  $5 \times 10^7$  脾细胞和  $10^7$  SP<sub>2</sub>/OAg14 细胞用 0.3ml 30% (V/V) 聚乙二醇 1000 (PEG) (Baker 化学公司, phillipsburg N. J.) 在 MEM 中进行杂交。用 PEG 孵育后洗涤细胞, 在  $2 \times 10^6$  细胞/每毫升 D—MEN 浓度中培养过夜。第二天使细胞悬浮液在 40ml HAT 基质中并吸进约微滴定板 400 克中 (0.1ml/坑) (Costar # 3596, Cambridge Mass) 间隔一周如一滴 (约 25ml) MAT 基质。2—3 周后, 选作进一步研究的杂交物在含 10% FBS 的 D-MEN 中培育。杂交物放在组织培养物中并在已注射 0.5ml Pristane (Pfaltz 和 Bauer, Inc. Stamford, Conn) 的 BALB/C 鼠的腹腔

内生长。投入使用的培养基和腹水可用作抗体来源。

根据诸如 Cotten et al, Eur, J. Immunol. 3. 136(1973) 所述的组织培育技术在体外使杂交细胞的无性繁殖细胞系生长。

与人黑素瘤细胞反应但不与正常人细胞反应的产生抗体的杂交物被进一步特异化。

如表 1 所示, 它们与大多数正常受试的组织不反应。由 ZME 细胞系产生的抗体及功能上相等的形成杂交物的抗体与诸如 M-21 的人黑素瘤上的 ZME 抗原反应。

表 1

抗体 ZME-018 (225.285)\* 的正常组织反应活性

<u>组织</u>	<u>反应活性**</u>
膀胱	0/3
大脑皮层	0/2
软骨	0/2
结肠	0/2
乳头	1/2
十二指肠	0/1
子宫内膜	0/1
肾	0/2
肝	0/1
肺	0/4
淋巴节	0/3
乳腺	0/3
卵巢	0/1
胰脏	0/1
外周血管淋巴细胞	0/4
外周神经	0/1

前列腺	0/2
唾液腺	0/3
骨骼肌	0/1
皮肤	0/5
脾	0/1
胃	0/3
甲状腺	0/2
扁桃体	0/1
睾丸	0/5

\* 来自 P. Giacomini, et al. Cancer Research 44:1281—1287, 1984

\*\* 阳性抗原样品数 / 试验样品数

#### 实施例 5

#### 用 SPDP 修饰单克隆抗体 ZME-018

将 N-琥珀酰亚氨基 3-(2-吡啶基二硫代) 丙酸酯 (SPDP) 在无水二甲基甲酰胺中制成 3mg/ml 的贮存溶液。由于结晶 SPDP 可进行水解，通过分析在 260nm 处双束分光光度计的吸光度，用分光光度方法测定化学活性交联剂的真正浓度。SPDP 贮存的浓度用下式来计算：

$$\frac{\text{吸光度的改变}(260\text{nm})}{0.02 \times 103\text{ml}/\text{mmol}} \times \frac{(3.01)}{0.01} = \text{毫摩尔数}/\text{ml}/\text{SPDP}$$

将在 1.0ml 磷酸盐缓冲的盐水 (PBS) 中的 1mg 单克隆抗体 ZME 加至玻璃管中。不断混合搅拌下；将 5-倍摩尔过量 SPDP 贮存溶液 (约 10 $\mu$ l 贮存溶液) 的慢慢加入试管中。在室温下使混合物孵化 30 分钟，在孵化期间每 5 分钟搅拌一次。

通过在用含 0.5mM EDTA 的 100mM 磷酸钠缓冲液 pH7.4 (缓冲液 A) 预平衡的 Sephadex G—25 柱 (1 $\times$ 24cm) 上的凝胶过滤色谱

层析从样品中除去过量未反应的 SPPP。收集组份(0.5ml),用 Bradford 染料结合分析 (Bradford Anal. Biochem. 72: 248 —254 (1976)) 进行蛋白质含量分析。用 Bio —TEK 微板自动读出器测出 96—坑板上的吸光度(600nm)。抗体在空隙体积处流出(馏份 14—20),汇集这些馏份并保持在 4 °C 下。使蛋白质在 Centricon—30 微浓缩器中浓缩蛋白质。用 100mM 含 EDTA (0.5mM)的磷酸钠缓冲液 pH7.0 洗 Centricon 的保留物。使抗体浓缩成最终体积 0.5—0.75ml。

### 实施例 6

#### SPDP 修饰的单克隆抗体 ZME-018 与亚氨基 硫羟烷修饰的 Gelonin 结合

如实施例 3 所述,将如实施例 1 所述的而制得的 1mg 纯化 gelonin(2mg/ml 在 PBS 中)用亚氨基硫羟烷进行修饰。如实施例 4 所述同修饰的单克隆抗体 ZME 与等重量如实施例 3 所述的修饰的 gelonin 相混合。与抗体相比该部分过量 5 倍摩尔的 gelonin 通过加入 0.05M TEA/HCl 缓冲液 pH8.9 而将混合物调节至 pH7.0,在氮气下于 4 °C 下使混合物孵化 20 小时。将碘代乙酰胺(0.1M)加至最后浓度为 2mM 以封闭任何剩余的游离巯基。在 25°C 下继续孵化 1 小时。使该反应混合物在 4 °C 下贮存直至用凝胶过滤纯化。

### 实施例 7

#### Gelonin-单克隆抗体 15A8 复合物的纯化

通过用 PBS 预平衡的 Sephadex 3—300 柱(1.6×31cm)上的凝胶过滤而从实施例 6 的反应混合物中除去未结合的 Gelonin 及低分子量产物。

在进入 Sephadex 柱前使实施例 6 的反应混合物在 Centricon 30 微型浓缩器中浓缩至 1ml。柱用 PBS 洗涤。馏份每次收集 1ml,用 Bradford 染料结合分析 (Bradford, Anal. Biochem 72: 248 (1976))分析 50ul 等分试样的蛋白质。

如图 2 所示, 在空隙体积 (约为馏份 28—40) 中洗脱出游离的抗体和结合 gelonin 的抗体, 而来结合的 gelonin 在约馏份 45—65 处洗脱出来。

为了除去未结合的 ZME-018, 用在用含 0.1M NaCl 的 10mM 磷酸钠缓冲液 (pH7.2) 预平衡的兰琼脂糖凝胶 CL—6B (1×24m) 和色谱柱上层析来自 S—300 柱的高分子量峰 (馏份 28—40)。进样后, 用 30ml 缓冲液洗涤柱, 彻底洗脱出来结合的抗体。用在 10mM 磷酸钠缓冲液 (pH7.2) 中的 0.1—2M NaCl 液的线性盐梯度洗脱柱。用 Bradford 染料结合分析来测定馏份的蛋白质含量。

图 2 表明 S—300 柱的洗脱分布, 它表明 gelonin 可从其与抗体的结合物和未结合的抗体中分离出来, 而后二者都在第一个峰中洗脱出现 (约为组份 28—40)。该洗脱类型可通过如图 4 所示的 50 $\mu$ l 等分试样在 5—20% 梯度非还原 SDS 聚丙烯酰胺凝胶上的电泳来证实。连接的混合物负载于通路 3。这里显示出游离 gelonin (通路 2)、游离抗体 (通路 1) 和一份子 gelonin 与一分子抗体连接的区带及两分子 gelonin 与一分子抗体连接的区带。S—300 柱的空隙体积峰含有游离抗体和抗体-gelonin 结合物, 它们负载在通路 4 上。

用含 0.1M NaCl 的 10mM 磷酸钠缓冲液 pH7.2 预平衡兰琼脂糖凝胶 CL—6B 柱 (1×24cm) 在此柱上亲和层析从 gelonin 结合的抗体中除去来结合的抗体。在 S—300 洗脱样品进样后, 柱用 30ml 相同的缓冲液彻底洗脱出来结合的抗体。

gelonin 结合的抗体结合至柱上并用 0.1—2M NaCl 在 10mM 磷酸钠缓冲液 pH7.2 中的线性盐梯度溶液洗脱。抗体-gelonin 复合物在用约 0.7M NaCl 液时洗脱出来如图 3 所示, 图 3 展示了兰琼脂糖凝胶柱的洗脱简图。用 Bradford 染料结合分析不测定洗脱馏份中蛋白质的含量。汇集含蛋白质的组份, 洗脱模式用在 5—20% 梯度非还原的聚丙烯酰胺凝胶上的电泳来证实。ZME-gelonin 复合物的电泳

模式如图 4 所示。完全流出峰（馏份 14—20）只含游离抗体（图 4、通路 5），而用高盐洗脱出的组馏份（馏份 50—80）含有 ZME-gelolin 结合物而无未结合的 gelolin 或抗体（图 4，通路 6）。最后的产物含有与 1, 2 和 3 gelolin 分子连接的 ZME 抗体。平均的 gelolin 含量是 1.5 分子/每抗体分子。

如实施例 2 所述在体外的免网状细胞转化系统被用来估算基本纯净的 gelolin-ZME 抗体复合物的 gelolin 活性。在此分析中的一个活性单位定义为与未处理对照物相比蛋白质合成 50% 抑制所需的蛋白质量，用此分析，天然 gelolin 和 ZME-gelolin 结合物的特异活性依次是  $2 \times 10^8 \text{u/mg}$  和  $8.2 \times 10^5 \text{u/mg}$ 。在网状细胞分析中基本纯净的 gelolin-ZME 抗体是活性的。原始样品以 1:1000 释释可产生约 50% 蛋白质合成的抑制，即减少了 50%  $^{14}\text{C}$ -亮氨酸掺入蛋白质。这样，原始制备物的活性是 1000U/ml。

## 实施例 8

### 细胞培养方法

将 ZME 抗原阳性的人膀胱癌 (T-24) 人颈癌或 2ME 抗原阳性的人转移性黑素瘤肿瘤细胞 A375M 或 AAB-527 保存在添加了 10% 加热失活的胎牛血清、100mM 不必需的氨基酸、2mM L-谷氨酸、1mM 丙酮酸钠、维生素和抗生素的最小必需基质 (MEM) 培养物中。培养的细胞进行常规筛选，未发现真菌性感染。

#### A. 细胞增殖分析

在 37°C 下，将细胞系保存 5%  $\text{CO}_2$ -潮湿空气孵化器中的完全基质内培育。在与 TNF、免疫毒素、 $\text{IFN } \alpha$  和  $\text{IFN } \gamma$  结合的分析中，洗涤培养物，并用依地酸分离，然后以  $25 \times 10^3$  细胞/毫升的密度再悬浮于全基质。将 200ml 等分试样分散配入 96-坑的微滴定板中，然后让细胞粘附。这引起了细胞的广泛播种。24 小时后该基质用含不同浓度的免疫毒素、TNF、 $\text{IFN } \gamma$  或  $\text{IFN } \alpha$  的基质所代替。让细胞孵育

72 小时并通过结晶紫染色来分析相对细胞的增殖。

## B. 结晶紫染色

用含有适量钙和镁的 PBS 洗涤细胞三次并用含 0.5% (V/V) 结晶紫的甲醇染色。用 150 $\mu$ l soreson's 枸橼酸盐缓冲液 (0.1M 枸橼酸钠, pH4.2 50% (V/V) 乙醇) 在室温下使结合的染料洗脱 1 小时。用 Bio-Teck 微板读出计测量 600nm 处的吸光度。相对的增殖 (RCP) 由下式算出:

$$RCP = \frac{\text{平均吸光度(药物处理过)}}{\text{平均吸光度(未经药物处理)}} \times 100$$

## C. 人体肿瘤克隆分析

在临床所指的活组织检查过程中从黑素瘤病人中得到肿瘤组织检查的样品。在无菌操作下, 制备肿瘤细胞悬浮液 (Leibovitz, et al., Int. J. Cell Cloning 1:478—485(1983))。另外, 也对来自美国保藏中心 (马里兰州洛克维尔) 的 A375P 黑素瘤和 CEM 白血病细胞系进行试验。采用标准化方法将肿瘤细胞平皿接种到含 10% 胎牛血清的全基质存在下的半固体基 (琼脂糖) 上, 对新鲜肿瘤而言每 0.5ml 培养板含 100,000 细胞, 细胞系则含 10,000 细胞, 这样在 HTCA 中测定 ZME-gelonin 对新鲜肿瘤细胞悬浮液和细胞系的作用。(Hamburger, et al., Science 197: 461—463 (1977); Salmon, et al., N. Engl. J. Med. 298: 1321—1327 (1978); Salmon, et al., J. Clin. Oncol. 7: 1346—1350 (1989))。在肿瘤细胞平皿接种后将上述制得的 ZME-gelonin 马上加至培养皿中进行试验。平皿中加入 ZME-gelonin, 四个浓度 0.025ng/ml 至 250ng/ml 的每个一式三份。除了未处理对照平皿外, 也对未结合的 ZME-18 单克隆抗体和游离 gelonin 进行对照试验。在 37 $^{\circ}$ C 含 5%CO<sub>2</sub> 的空气潮湿孵育器中使细胞系和肿瘤细胞培养物培养平均 10 天, 用生存染色和调节至最佳的自动分析计数仪来评估克隆形成 (Shoemaker, et al. Cancer Res. 45 2145—2153

(1985))(Salmon, et al., Int. J. Cell Cloning 2: 142—160 (1984)。在相同的实验中测定相关于未处理对照物的 ZME—018 处理培养物的存活百分率。然后作图画出剂量—反应曲线。

### 实施例 9

#### 连接 Gelonin 的和未连接 Gelonin 的 ZME 抗体与 靶细胞结合的比较

分析结合 gelonin 的和未结合 gelonin ZME 抗体与靶细胞结合的能力。通过 ELISA 分析来试验 ZME-gelonin 免疫毒素与抗原阳性 (AAB—527 细胞) 或抗原阴性 (T-24 细胞) 的结合。

在微滴定板的每个坑中加入 5 万个靶细胞 (AAB—527) 或非靶细胞 (T—24)。在 37℃ 下使细胞在板上干燥过夜。然后细胞用冷 PBS 洗涤三次并通干燥空气过夜。处理后细胞表面抗原决定子的有抗原活性。

细胞贴住后, 用洗涤缓冲液 (9.68 克 Tris、64.8 克 Tris、64.8 克氯化钠、16ml 吐温 20、800mg 乙基汞硫代水杨酸钠在 8 升重蒸水中) 洗涤平板。将抗体样品在含有 1% 牛血清白蛋白 (W/V) 的洗涤缓冲液 (稀释缓冲液) 中稀释, 将 0.02 至 50 $\mu$ g/ml 各种浓度的结合或不结合 ZME 抗体的 50 $\mu$ l 物质加至坑中。在 4℃ 下孵育 1 小时后, 除去上清液, 坑用洗涤缓冲液洗涤两次。

将从 Bio-Rad (生物放射) 中所得的且在稀释缓冲液中稀释 1:1000 (V/V) 的辣根过氧化物酶结合的山羊抗鼠 IgG (HPGAM) 50 $\mu$ l 加至每个坑中。在 4℃ 将平板孵育 1 小时并用洗涤缓冲液将坑洗涤两次。在室温下于黑暗中将每坑 50 $\mu$ l 基质溶液 (80mM 枸橼酸盐磷酸盐 (pH5.0), 1mM 2,2'-连氨基-双(3-乙基苯-噻唑啉-6-磺酸) (ABTS) 二铵盐 (SIGMA CHEMICAL CO) 和 4 $\mu$ l 30% 过氧化氢) 的平板孵育 30 分钟后, 向每个坑中加入 25 $\mu$ l 4N 硫酸。在 Elisa 读出计上测定 492nm 的吸光度。



如图 5 所示, 60 分钟暴露后天然的 ZME 和 ZME gelonin 结合物与靶细胞结合得均很好。令人惊奇地是, ZME-gelonin 结合物与靶细胞的结合比天然的 ZME 好。这个结合性的增加并非归功于 SPOP 对抗体的修饰, 因为 SPOP 修饰的 ZME 和天然 ZME 行为一致。此结合性的增加也不是由于靶细胞对分子中 gelonin 部份的结合, 因为用天然 gelonin 对靶细胞进行预先处理表明对抗体或免疫毒素与其结合均无影响。如 ELISA 试验所估计, ZME 和 ZME-gelonin 都不和抗原阴性 T-24 细胞结合。

### 实施例 10

#### Gelonin 和 Gelonin—ZME 抗体复合物的细胞毒性

在抗原阳性细胞连续(72 小时)暴露于免疫毒素或天然 gelonin 后, 进行 ZME—gelonin 结合物的细胞毒性研究。如图 6 所示, 当抗原阳性的 AAB—527 细胞暴露于约 0.1/mM ZMEgelonin 时, 可观察到 50% 细胞死亡。当细胞暴露于天然 gelonin, 要求 100nM 浓度 gelonin 不减少相对于未处理对照的 50% 细胞数。

然后用实施例 2 所决定的单位基础, 将靶细胞用种种浓度的 ZME-gelonin 或种种浓度的 gelonin 处理。如图 7 所示, 用 50 单位/ml ZME-gelonin 结合物可得到 50% 细胞毒性, 而游离的 gelonin 要  $1 \times 10^7$  单位/ml 才能达到相同效果。

在对数相培养期中测定 ZME-gelonin 抗原—阴性 T-24 细胞的作用。如图 8 所示, 只用 gelonin 要 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  浓度来产生在 AAB-527 细胞中的 50% 细胞毒性, 这与 AAB-S27 细胞中所发现的相似。浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$  的 ZME-gelonin 在靶 T-24 细胞中产生 50% 细胞毒性。但是, ZME-gelonin 免疫毒素对非靶 T-24 细胞即使在最高试验浓度时也无细胞毒性。

为了进一步表明 ZME-gelonin 细胞毒素性是通过 ZME 细胞表面抗原传递的, 将能达到 80% 细胞毒性的 ZME-gelonin 固定剂量加至

存在有游离 ZME 抗体或一个不相关抗体(15A8,不与黑素瘤细胞结合的抗体)的靶对数期黑素瘤细胞培养物中。如图 9 所示, ZME 抗体存在量增加抑制了 ZME-gelonin 结合物的细胞毒性,而 15A8 抗体无此作用。因此, ZME-gelonin 结合物的细胞毒性是直接通过 ZME 抗体结合至靶细胞上的 ZME 抗原而传递的。

### 实施例 11

#### 用 IFN $\alpha$ 、IFN $\gamma$ 和 TNF 调节 ZME-gelonin 的细胞毒性

为了表明种种生物应答修饰因子对免疫毒素细胞毒性的影响,将对数期的黑素瘤细胞用固定剂量的 IFN  $\alpha$ (200 $\mu$ /ml)、IFN  $\gamma$ (20,000  $\mu$ /ml)或  $\gamma$ TNF- $\alpha$ (20,000  $\mu$ /ml)处理 24 小时。预先确定这些剂量对这些细胞的细胞毒性效果最小(约 20%)。然后用各种剂量 ZME-gelonin 处理细胞 72 小时。如图 10 所示,用  $\gamma$ IFN $\gamma$  处理引起对 ZME-gelonin 免疫毒素的敏感性增加 2 倍。但是,用  $\gamma$ IFN  $\alpha$  和 TNF 预处理则均引起免疫毒素敏感性 2-对数增加。向抗原阳性细胞中加入固定剂量的  $\gamma$ IFN  $\alpha$ 、 $\gamma$ IFN  $\gamma$  或  $\gamma$ TNF 导致 ZME-gelonin 毒素的细胞毒性增加。可产生免疫毒素细胞毒性的最大增加,其余依次为  $\gamma$ IFN  $\alpha$  和  $\gamma$ IFN  $\gamma$ 。

用  $\gamma$ IFN  $\alpha$  和  $\gamma$ TNF 预处理但不用  $\gamma$ IFN  $\alpha$  观察到 ZME-gelonin 细胞毒性作用的实际增长。尽管已观察到 IFN  $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  可以向上调节一些诸如 p-97 黑素瘤表面抗原,但它们对能被 ZME 认出的高分子量抗原(GP240)几乎无作用。(Murray, et al., Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 27: 313 (1986); Greiner, et al., Cancer Res. 44: 3208—3214 (1984); Greiner, et al., Cancer Res. 46: 4984—4990 (1986); Groacomini, et al., J. Immunol. 133: 1649—1655(1984); Imai, et al., J. Immunol. 127: 505-509 (1981); Murray, et al., J. Biol. Res. Mod. 7:172—161 (1988.)). 因此, TNF  $\alpha$  和 IFN  $\alpha$  诱导的

ZME-gelolin 活性增加的机制是不清楚的，但可能涉及抗体内在化速率的改变、免疫毒素的细胞化过程的改变或任何一个干扰一传递酶的调节。

由于只有表面含 ZME 抗原的细胞被 gelolin ZME 免疫毒素杀死，故该免疫毒素是高效的方法来定向并杀死 ZME 抗原相关的肿瘤细胞，同时最大限度地减少或防止对正常非肿瘤相关抗原细胞的损伤。

### 实施例 12

#### 人体肿瘤克隆分析(HTCA)中 ZME-gelolin

#### 免疫毒素的作用

用人体肿瘤克隆分析，也可分析 ZME-gelolin 对四个黑素瘤病人活体取出的细胞的活性。

如实施例 8C 所述在 HTCA 中也分析对人体细胞在培养物中的体外细胞毒性。将各种剂量的 ZME—gelolin 免疫毒素加至抗原阳性(A-375 黑素瘤)和抗原阴性 CME 细胞系中。加入后 72 小时分析克隆的存活率。如图 11 所示，0.25 和 2500mg/ml 间的免疫毒素剂量引起几乎抗原阳性细胞系克隆存活的完全抑制(满圈)。单独的 ZME-018 和游离的 gelolin 或其两者的结合物都无细胞毒性。甚至免疫毒素试验的最高浓度对抗原阴性系(CEM)无作用(空心方块)。

ZME-gelolin 对 4 种不同的新鲜活体样本的作用如图 12 所示。在试验的最高免疫毒素剂量(250ng/ml)时，在两种样本中发现黑素瘤克隆形成细胞的存活率减少 80—90%。在此剂量下有一个病人显示 50% 细胞生长抑制，而另一个病人不显示出免疫结合物的细胞毒性。第三样本仅显示克隆数的少许减少。用最高细胞毒性剂量处理的第四个样本则出现生长的增加。另外，低剂量时在一个样本中观察到生长的增加，而较高剂量则产生实际的细胞毒性。如同在细胞系实验中，以试验剂量加入未结合的 ZME-018 和游离的 gelolin

是无细胞毒性的。

既然 HTSCA 分析不是正确无疑的，在此试验系统中约 75% 临床活性抗肿瘤剂是阳性的。在 HTSCA 中无活性的试剂已经证明临床上是非活性的。因此，在 HTSCA 中 ZME-gelolin 结合物的活性有 75% 的临床阳性概率。

### 实施例 13

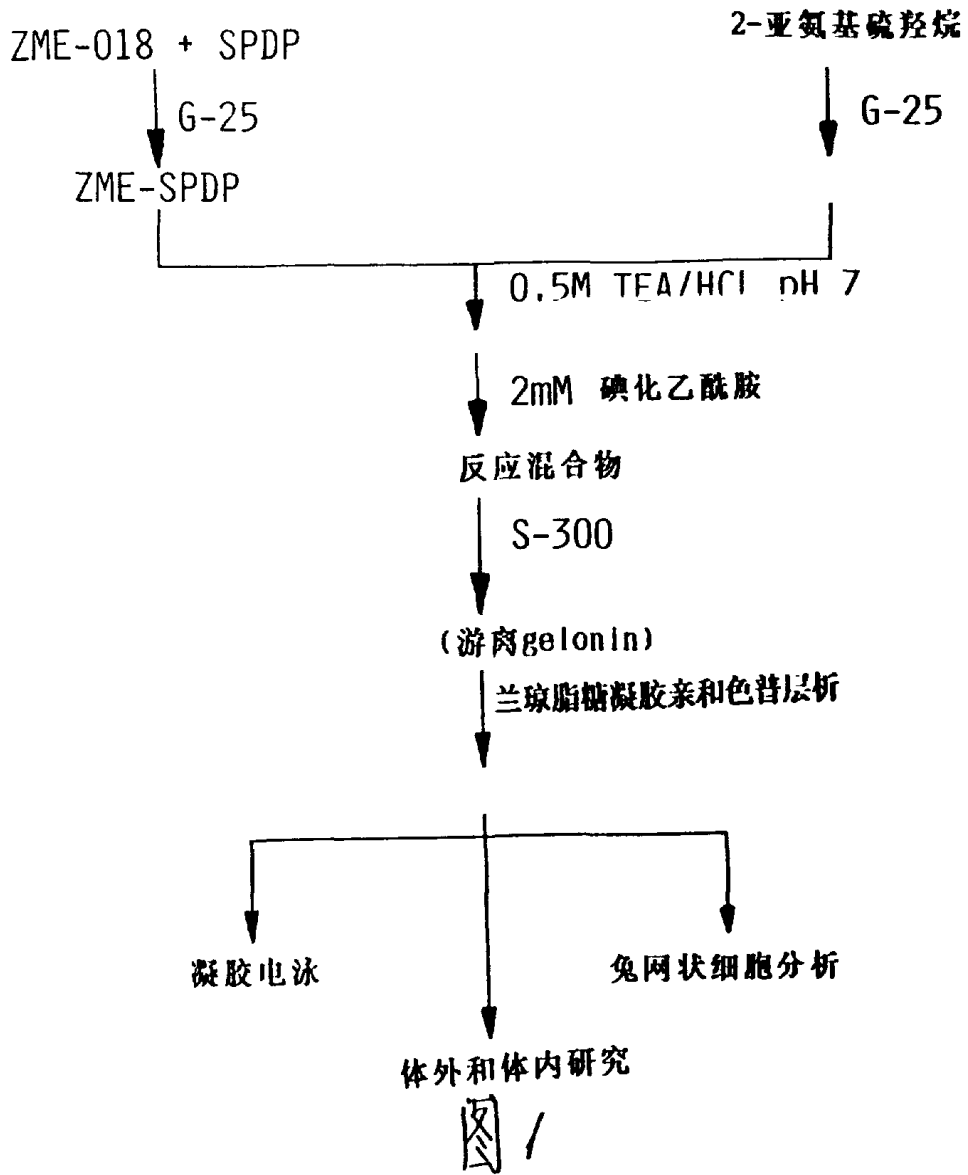
#### ZME 抗体的组织分布

将<sup>125</sup>I 标记的 ZME 抗体的组织分布与相关的免疫毒素 (ZME—gelolin) 和不相关免疫毒素 (158A-gelolin) 相比较。给 5 只有人体黑素瘤异体移植物的裸鼠的尾部静脉静注每个抗体或抗体结合物。每个动物接受用 0.5 $\mu$  Ci<sup>125</sup>I 标记的在 100  $\mu$ l 总体积磷酸盐缓冲的盐水中的 10mg 总蛋白质。

如图 13 所示，不相关 15A8-gelolin 结合物不是特定地至肿瘤组织内 (J/B 比率 0.5)。相反，相关 ZME 和 ZME—gelolin 结合物表明特异地进入肿瘤组织 (T/B 比率依次为 2.0 和 1.5)。在使用 ZME 或 ZME—gelolin 后，肿瘤对<sup>125</sup>I 的吸收无统计学上的显著差异。该技术领域的内行将欣然认为本发明可以很好地执行上述目的并得到结果和优点及其中利益。这里所述的化合物、方法、过程和技术是优选的代表实例，只是例举而不是来限制本发明的范围。该技术领域人员所作出的改变及其它使用也包括于本发明精神中并被权利要求书所定义。

# 说明书附图

连接和纯化流程图



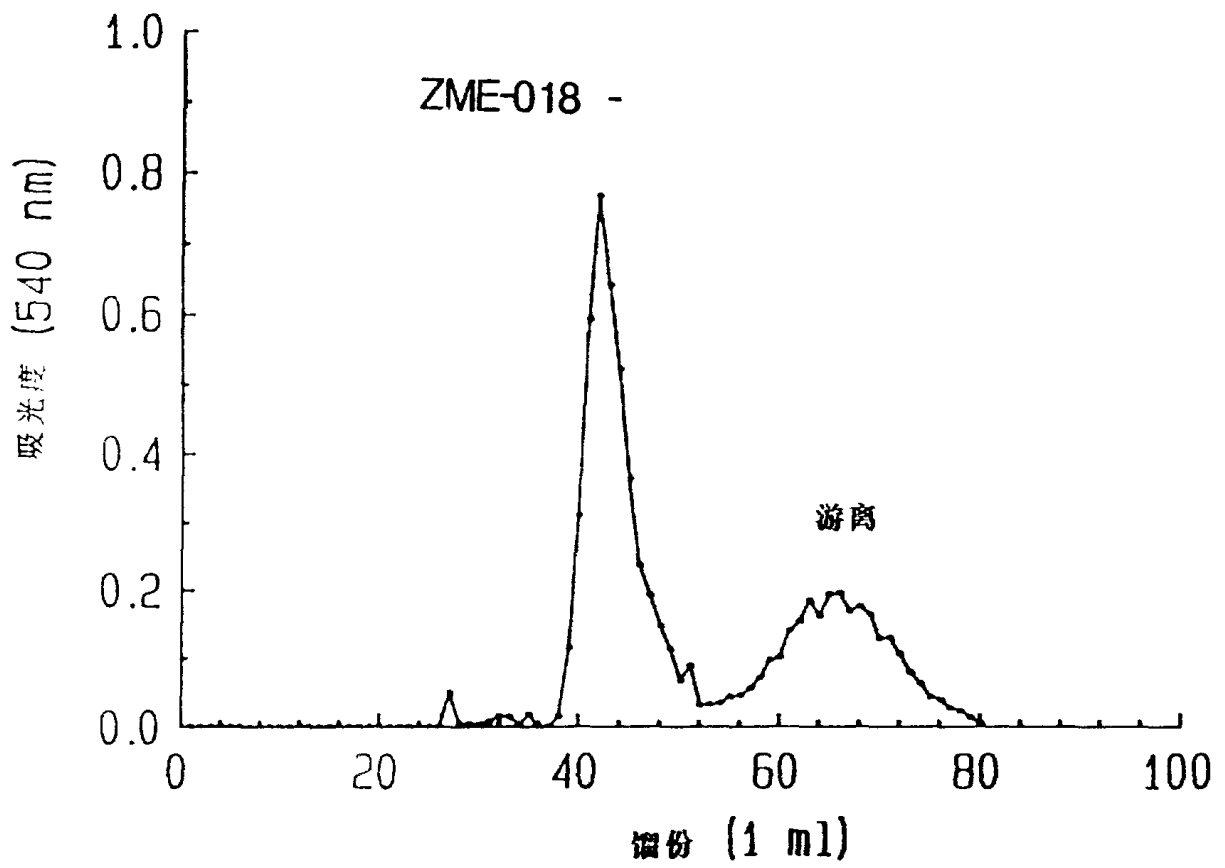
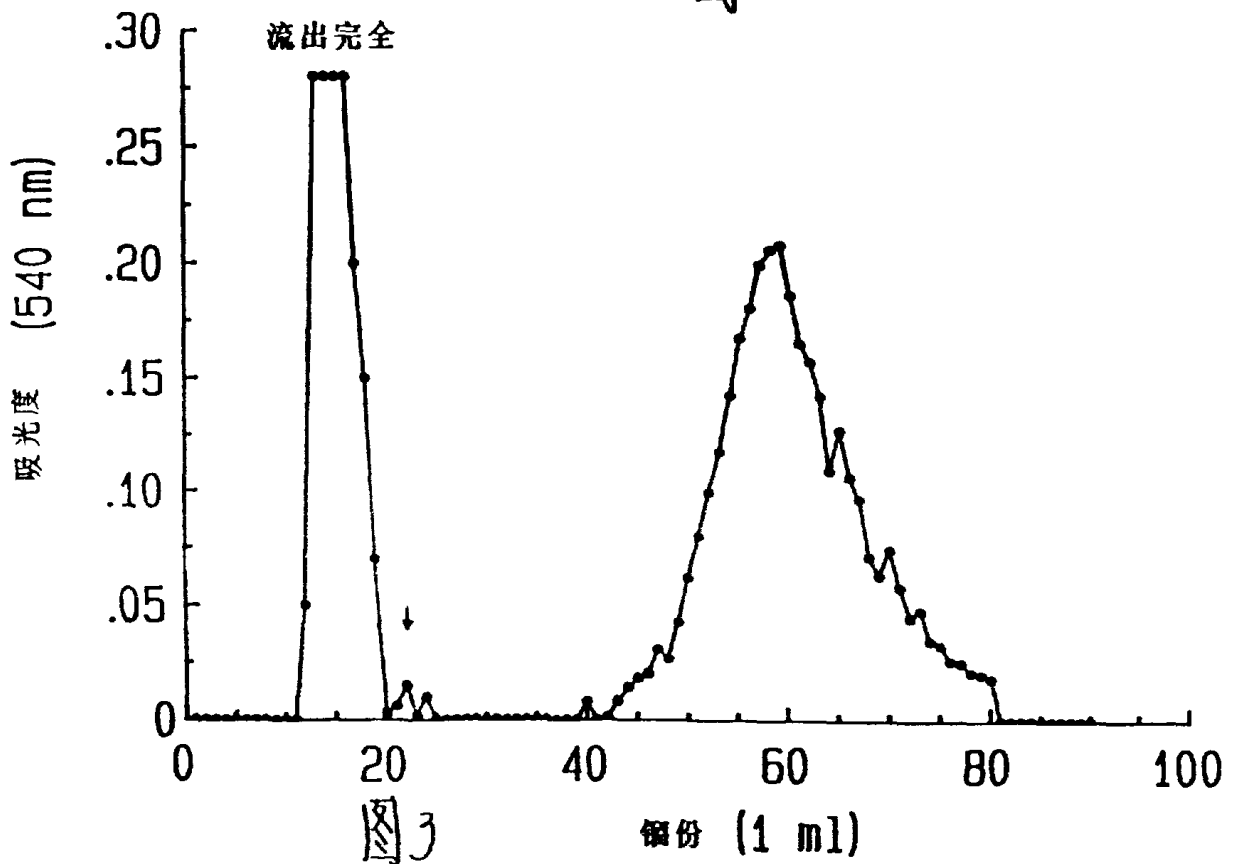


图2



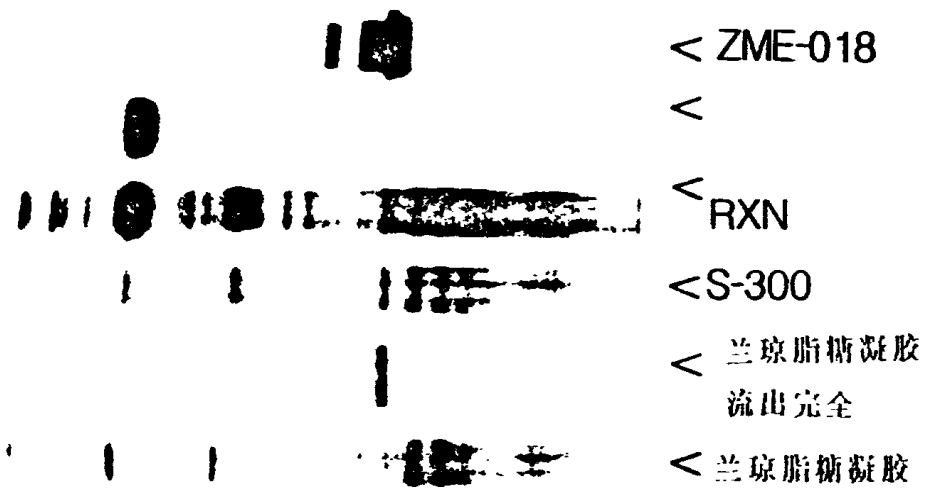


图 4

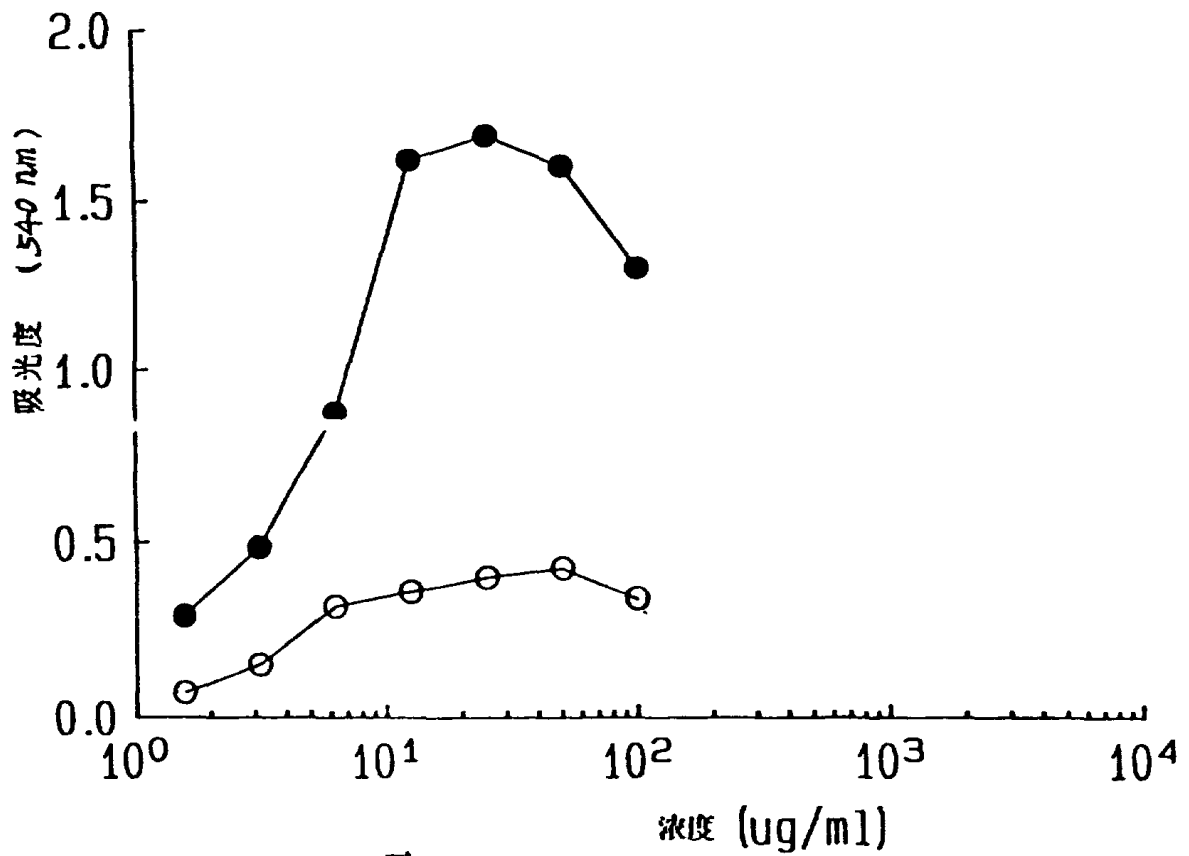


图 5

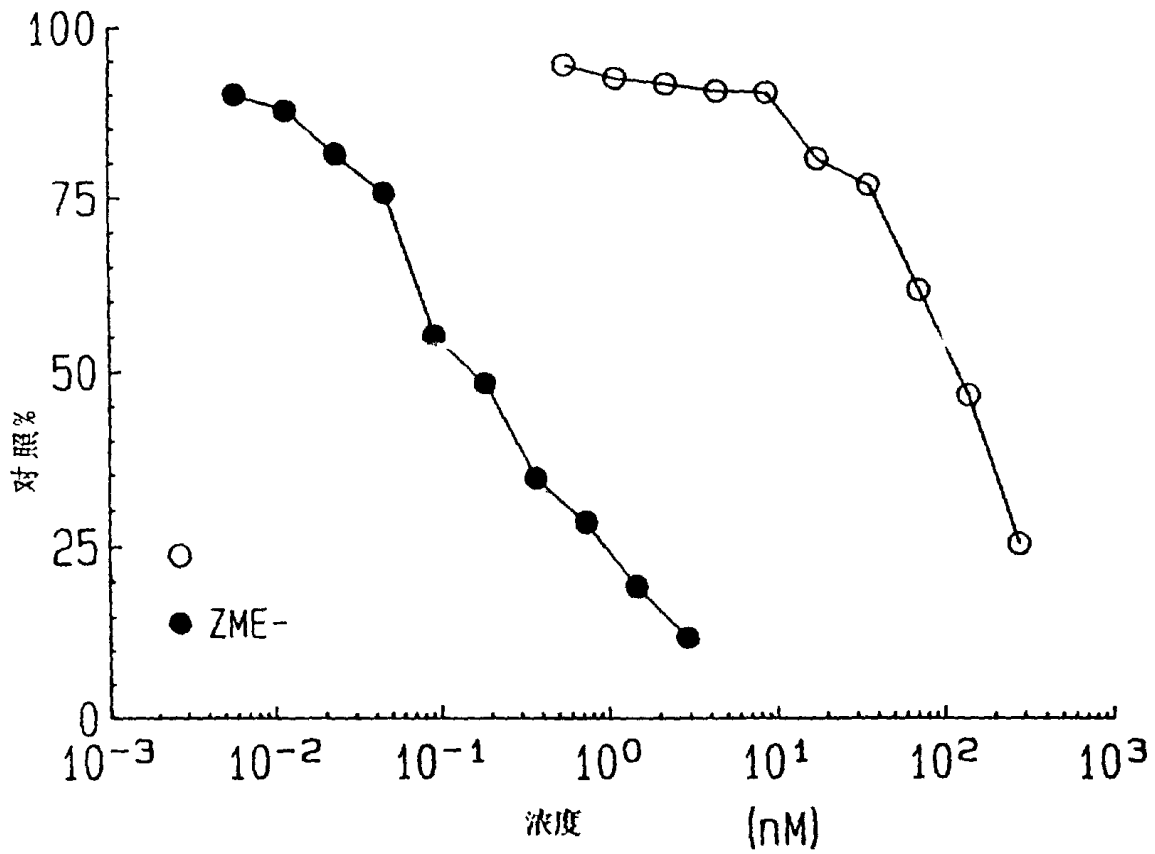


图 6

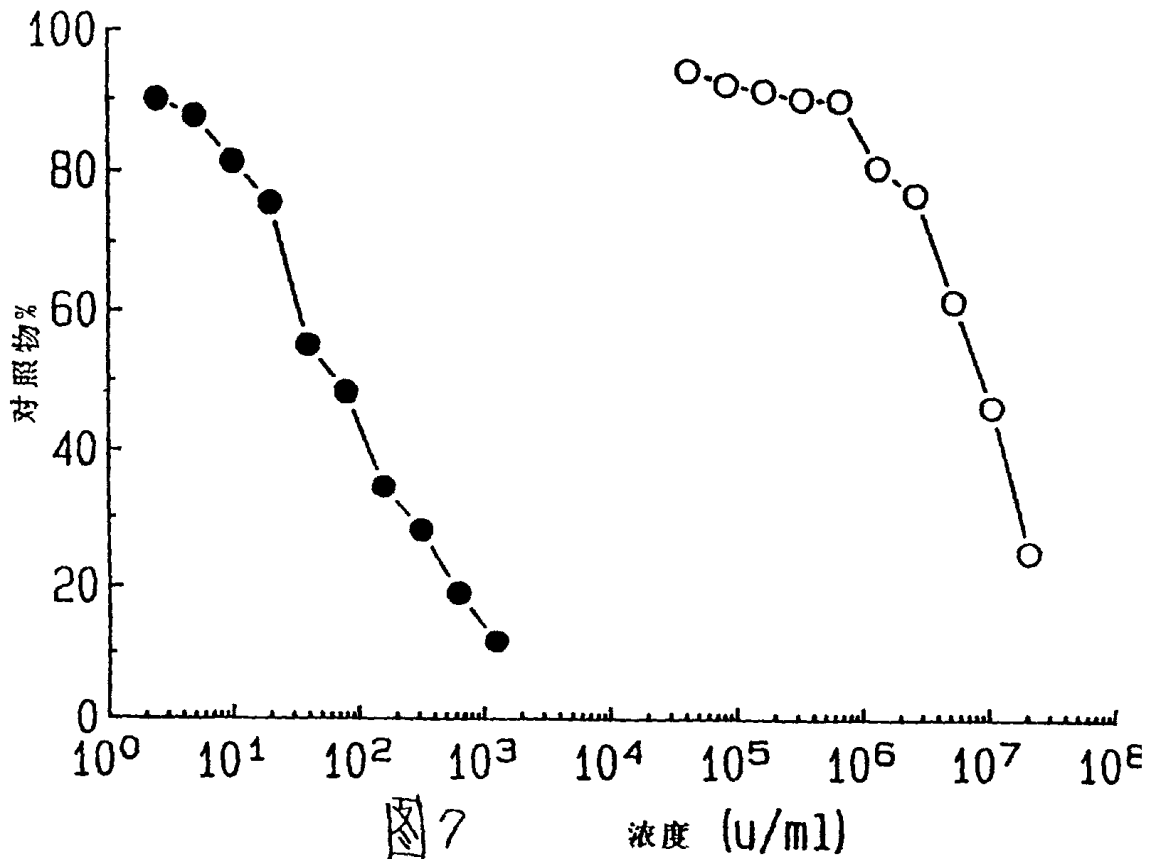


图 7



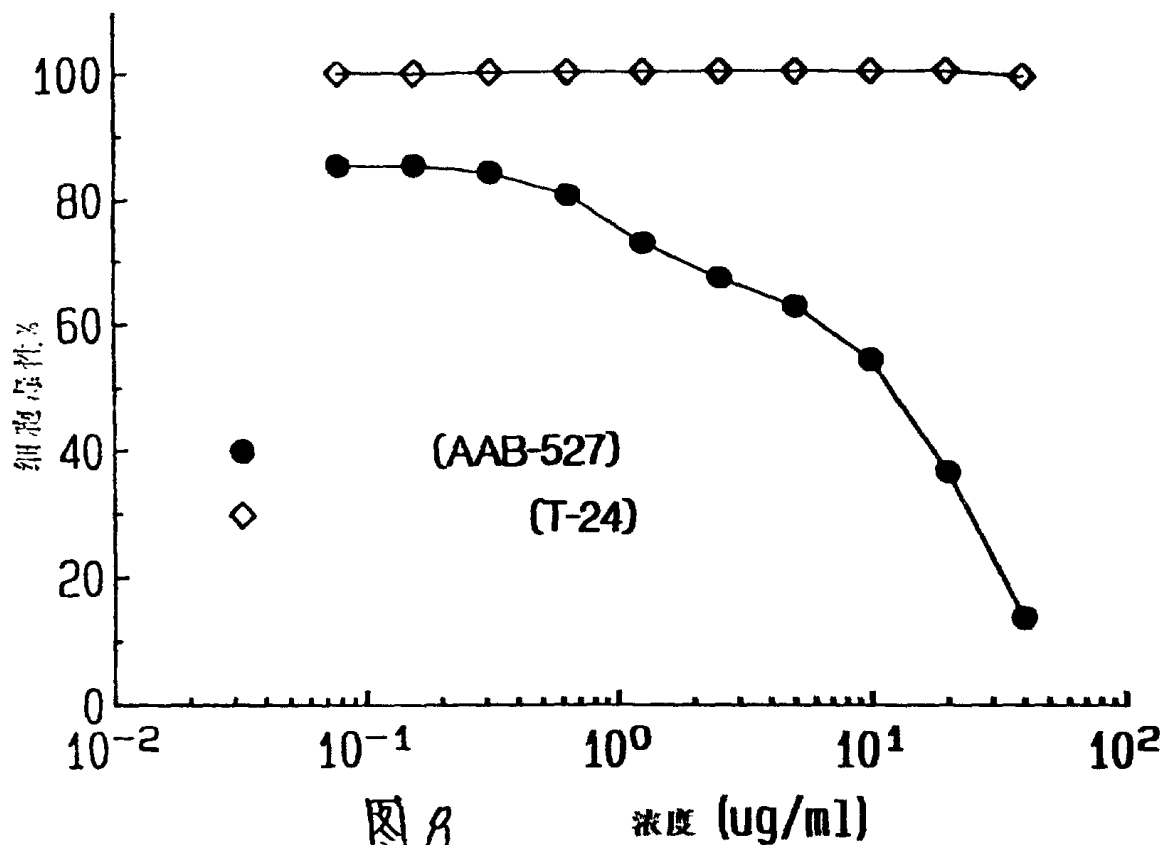


图 8

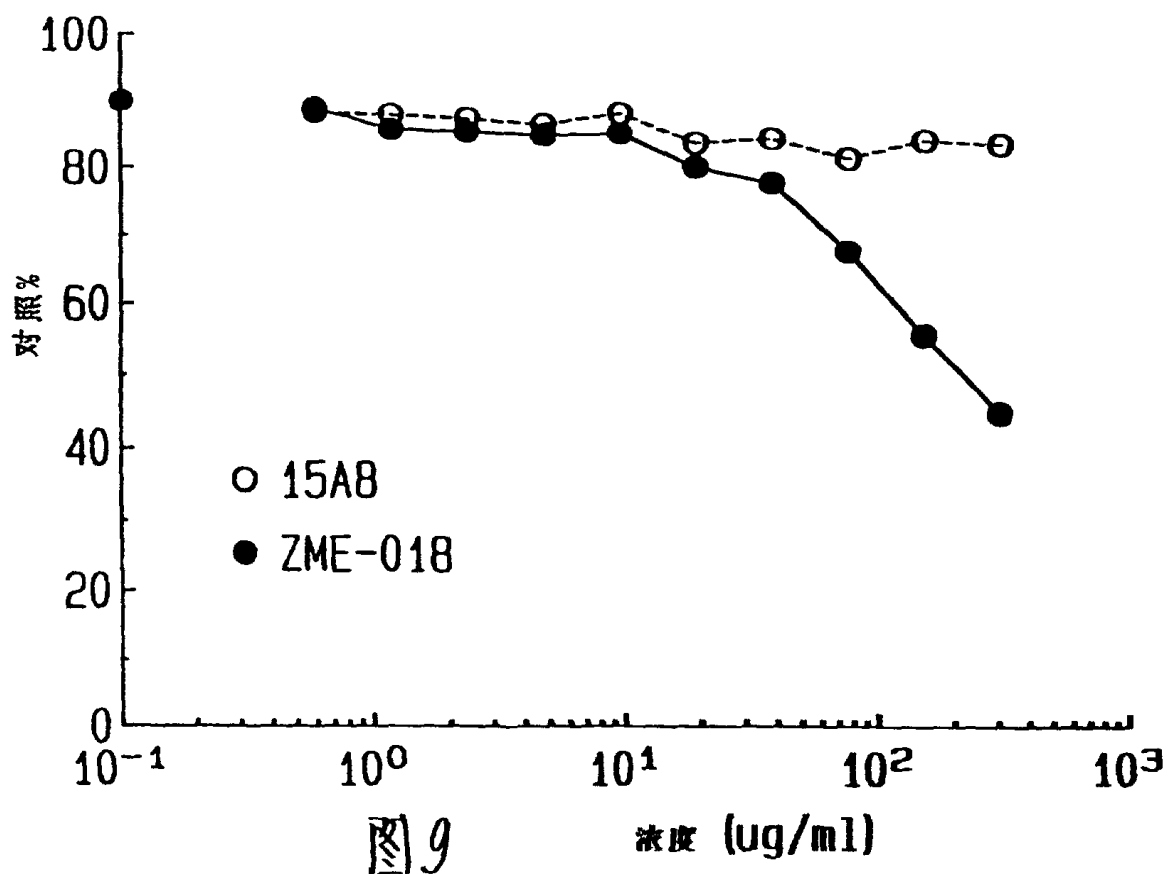


图 9

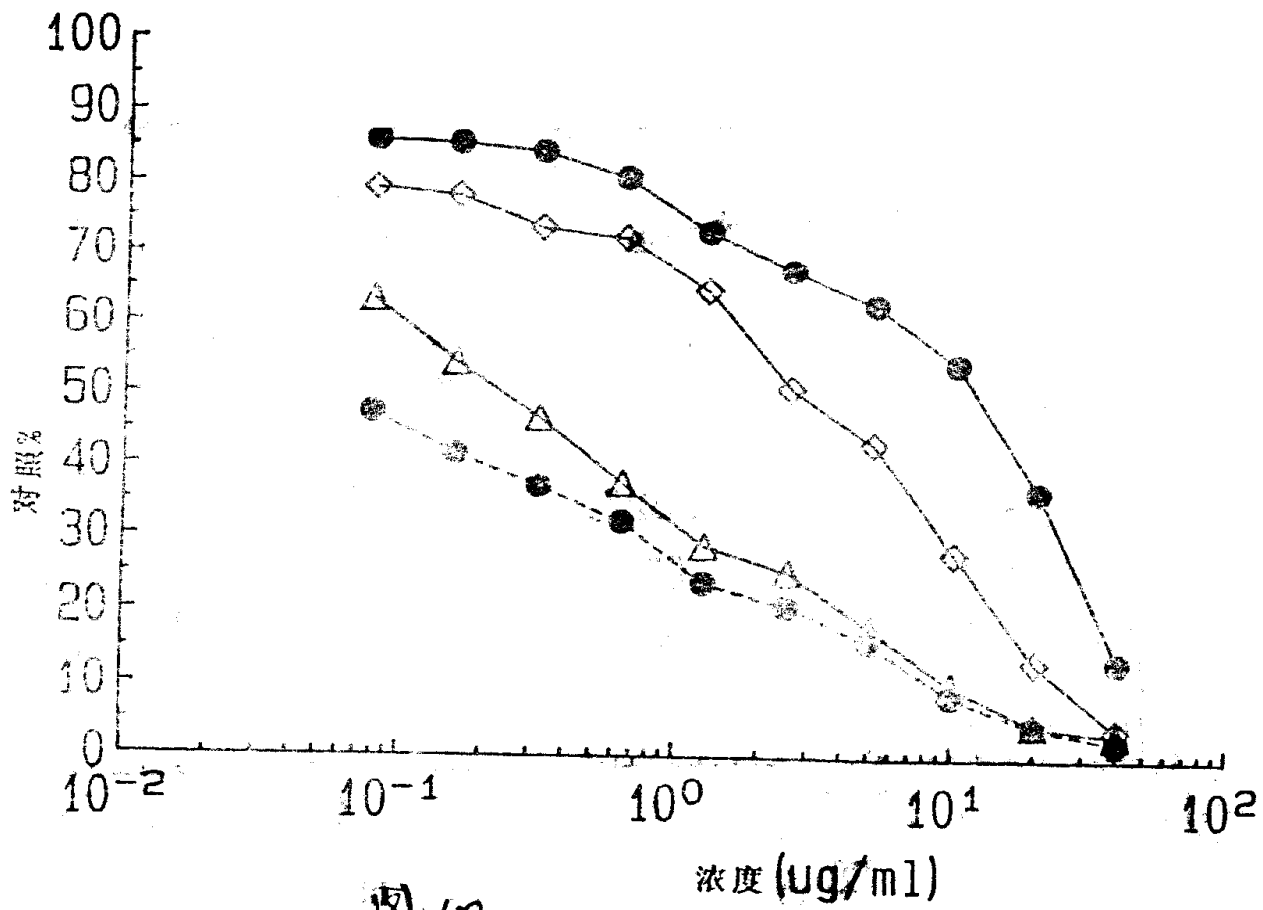


图 10

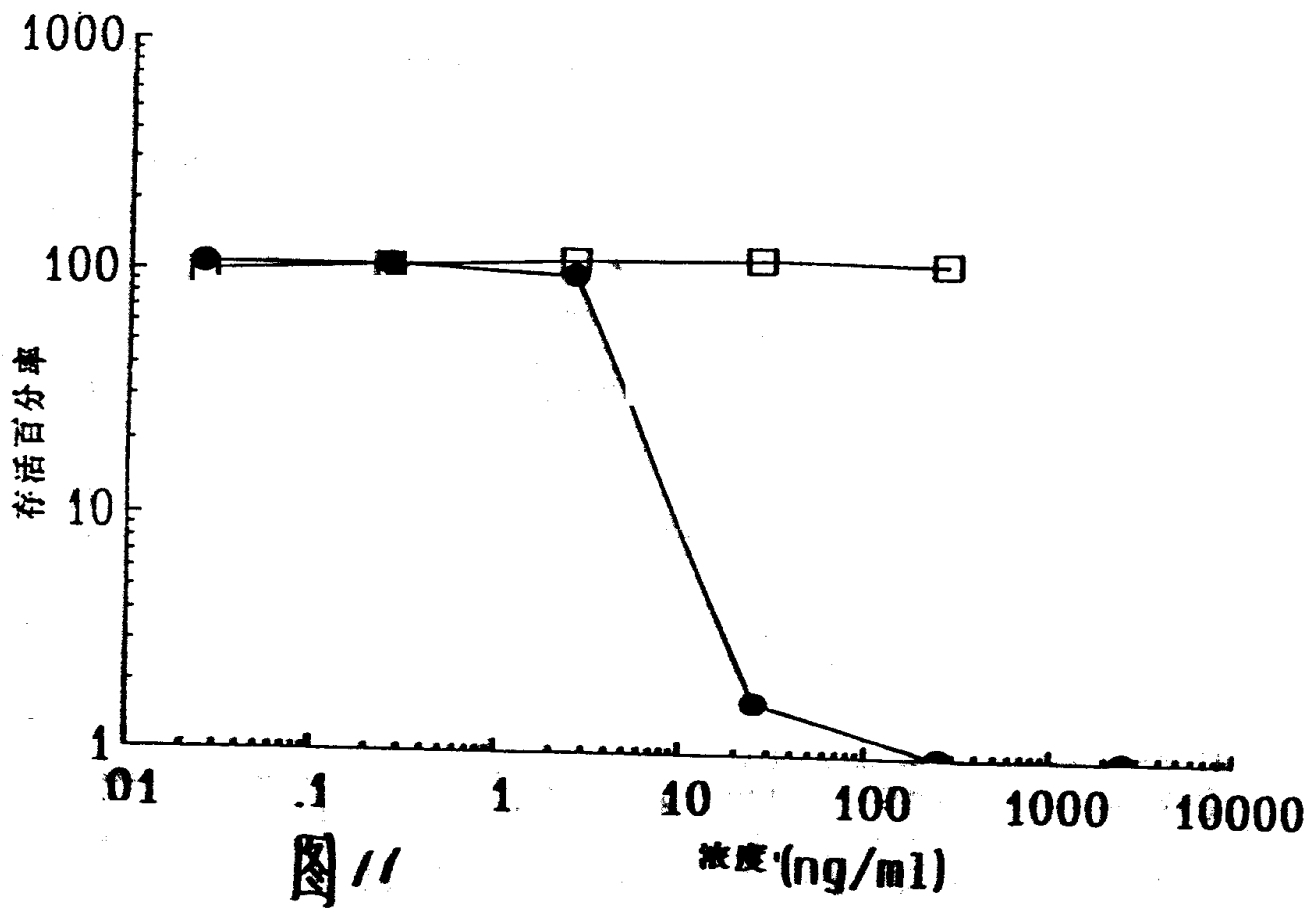


图 11

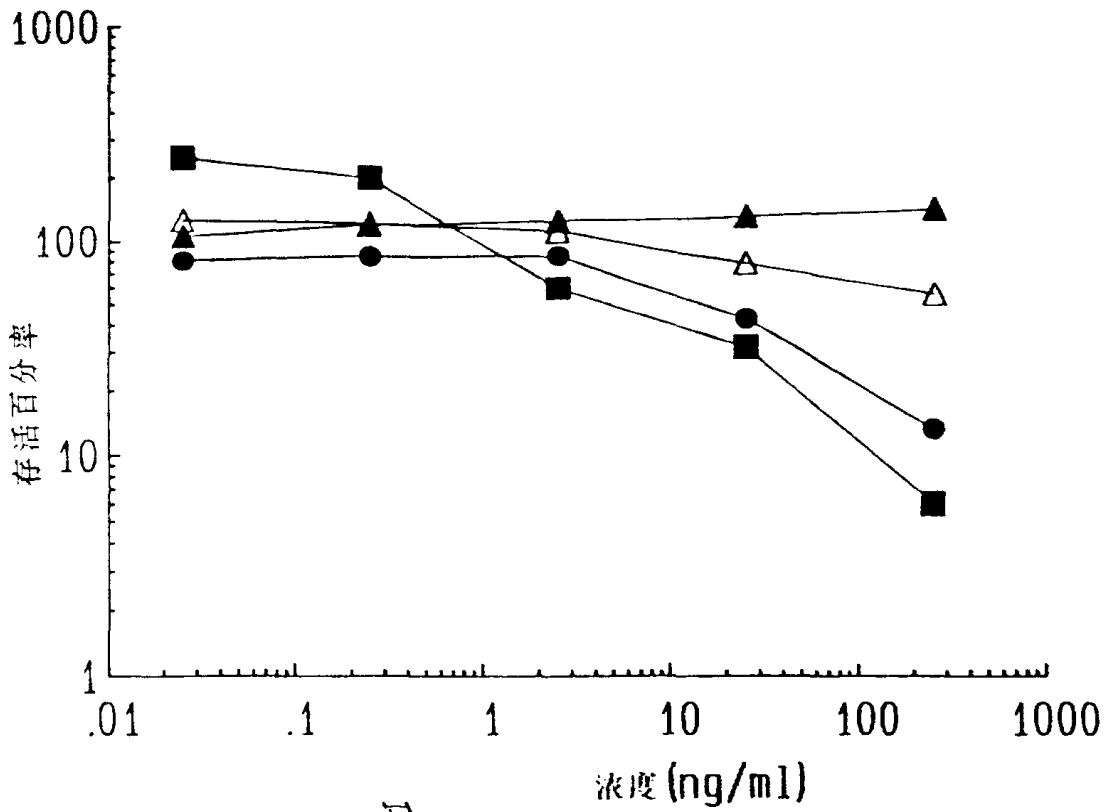


图 12

带有A-375M裸鼠中放射标记免疫结合物的组织分布

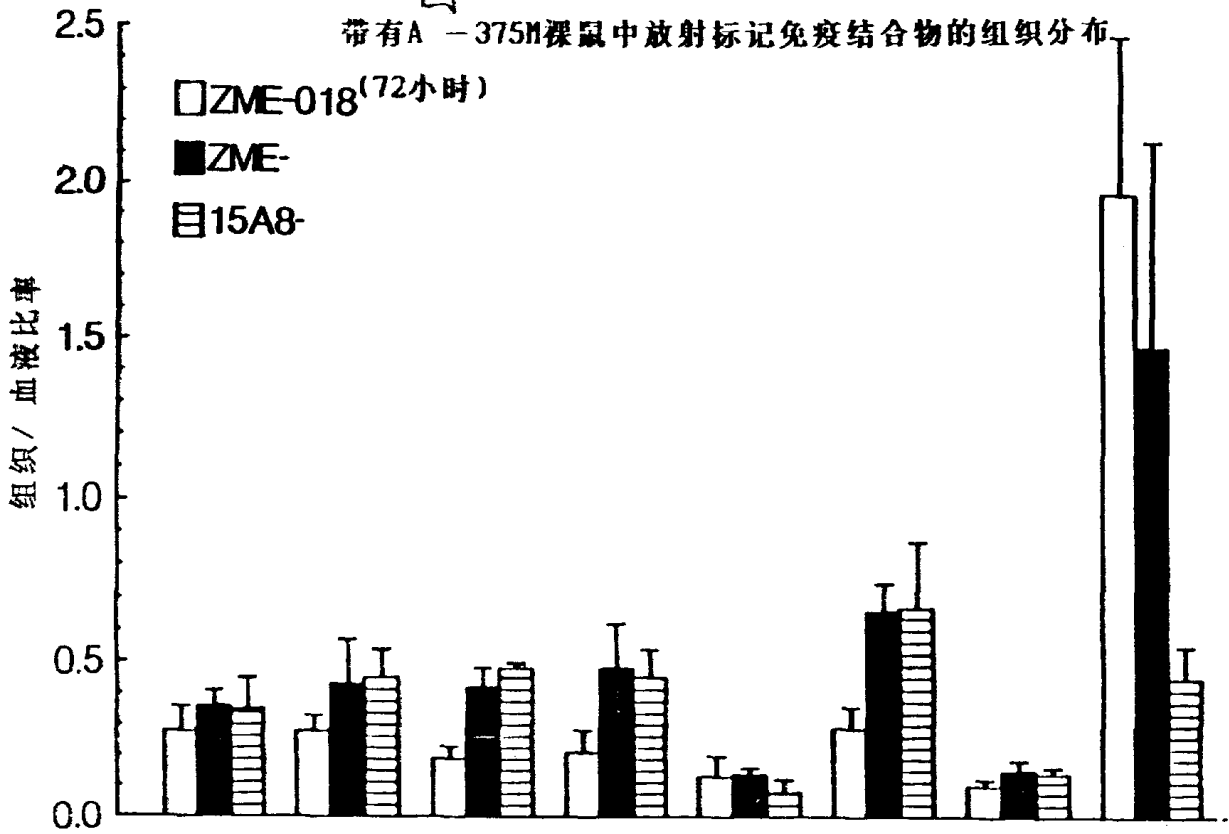


图 13