

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810222416.2

[51] Int. Cl.

C07K 16/30 (2006.01)

C12N 5/20 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

A61K 49/00 (2006.01)

[43] 公开日 2010年3月24日

[11] 公开号 CN 101676300A

[22] 申请日 2008.9.16

[21] 申请号 200810222416.2

[71] 申请人 中国科学院生物物理研究所

地址 100101 北京市朝阳区北沙滩大屯路15号

[72] 发明人 阎锡蕴 安云鹤 韩伟 冯静
杨东玲

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司

代理人 王旭

权利要求书2页 说明书23页 附图7页

[54] 发明名称

抑制结肠癌生长的抗体及其用于制备腺癌诊断剂的应用

[57] 摘要

本发明提供一种单克隆抗体，其具有下列特征：1) 抗体为 IgM 类免疫球蛋白，抗体轻链类型 κ 型；2) 识别抗原为粘蛋白表面涎酸化的糖链结构；3) 特异识别结直肠腺癌、子宫内膜腺癌及胰腺癌组织，不识别相应的正常组织。具体而言所述单克隆抗体由保藏号为 CGMCC No. 2643 的杂交瘤细胞分泌，其重链可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示，轻链氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示。本发明还提供将所述单克隆抗体用于制备诊断剂或试剂盒的应用，所述诊断剂或试剂盒可应用于癌症的筛查，早期诊断，治疗监测及肿瘤成像，本发明为早期准确诊断结直肠癌、子宫内膜癌以及胰腺癌提供了一种新型工具。

1. 一种单克隆抗体, 所述抗体具有下列特征: 1) 抗体为 IgM 类免疫球蛋白, 抗体轻链类型 κ 型; 2) 识别抗原为粘蛋白表面涎酸化的糖链结构。
2. 权利要求 1 所述的单克隆抗体, 其特异识别结直肠腺癌、子宫内膜腺癌及胰腺癌组织, 不识别相应的正常组织。
3. 权利要求 1 所述的单克隆抗体, 其由保藏编号为 CGMCC No. 2643 的杂交瘤细胞系分泌。
4. 权利要求 1-3 任一项所述的单克隆抗体, 其重链可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所显示, 其轻链氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2 所显示。
5. 一种基因工程抗体, 其与权利要求 3 或 4 所述的单克隆抗体具有 30% 以上同源序列, 其中包括 Fab 片段, F(ab)' 片段, Fd 片段, Fv 片段和 Fc 片段, 也包括具有同源序列的各片段相互组合, 或利用部分具有同源序列的各片段与其它蛋白、肽链形成的衍生物。
6. 一种编码权利要求 1-5 任一项所述的单克隆抗体的核苷酸序列。
7. 权利要求 1 至 5 中任何一项所述的单克隆抗体在制备用于体内诊断或体外诊断肿瘤的诊断剂或试剂盒中的应用。
8. 权利要求 7 所述的应用, 其中体外诊断包括: 直接或间接标记权利要求 1-5 任一项所述的单克隆抗体, 利用酶联免疫吸附实验(ELISA), 免疫胶体金技术, 免疫组织化学染色, 免疫荧光或 Western-blot 检测手段建立的相应诊断方法。
9. 权利要求 7 所述的应用, 其中体内诊断包括: 直接或间接标记权利要求 1-5 任一项所述的单克隆抗体, 注射或服用所述标记抗体, 依据所述抗体与肿瘤抗原结合反应进行肿瘤组织和细胞的定位, 肿瘤成像, 肿瘤发生和发展诊断, 治疗后监视以及肿瘤杀伤效果评价。
10. 权利要求 7 所述的应用, 其中所述肿瘤选自由表达涎酸化糖链结构的肿瘤所组成的组。
11. 权利要求 7 所述的应用, 其中所述肿瘤选自由甲状腺癌, 乳腺癌, 膀胱癌, 胃癌, 皮肤癌, 肺癌, 头颈癌, 卵巢癌, 精巢癌, 胰腺癌, 食道癌, 结直肠腺癌, 和子宫内膜腺癌组成的组。

12. 一种诊断剂，其用于诊断肿瘤，包含权利要求 1-5 任一项所述的单克隆抗体作为活性成分。

13. 权利要求 12 所述的诊断剂，其中所述肿瘤选自由结直肠癌，子宫内膜癌和胰腺癌组成的组。

14. 一种试剂盒，其用于诊断肿瘤，包含权利要求 1-5 任一项所述的单克隆抗体。

15. 权利要求 14 所述的试剂盒，其中所述肿瘤选自由结直肠癌，子宫内膜癌和胰腺癌组成的组。

抑制结肠癌生长的抗体及其用于制备腺癌诊断剂的应用

技术领域

本发明属于生物医药技术领域，具体而言本发明提供特异识别结直肠腺癌、子宫内膜腺癌以及胰腺癌细胞糖链抗原，并能抑制结肠肿瘤细胞生长的单克隆抗体及分泌该抗体的杂交瘤细胞，以及所述抗体在制备用于早期诊断结直肠癌、子宫内膜癌以及胰腺癌的诊断剂中的应用。

背景技术

结直肠癌指大肠内膜上皮细胞的恶性改变，包括异常分化，异常增殖以及细胞代谢和分泌异常等。临床上结直肠癌的绝大多数(>95%)为腺癌，其它类型的结直肠癌很少，包括淋巴瘤，良性瘤，恶性肉瘤等。结直肠腺癌的发生原因，诊断治疗和预防一直是基础医学和临床医学的研究重点。

结直肠癌的死亡率居肿瘤死亡的第二位。美国每年诊断为结直肠癌的病例超过 13 万，死亡大于 5 万，死亡率约 40%。结直肠癌在我国是第三位常见消化道肿瘤，位于食管癌和胃癌之后，但每年死于结直肠癌的病例估计超过 4 万人，约占肿瘤 5.8%。我国结直肠癌发病一个明显特点是平均发病年龄 45 岁左右，比欧美等国提前 12-18 年，其中直肠癌较多，约占 60%。近二十年，随着我国经济增长和人们生活水平的逐步提高，我国结直肠癌的发病人数逐年增加，发病更趋于年轻化。多年的临床研究发现，如果能够早期发现和准确诊断，几乎所有的结直肠癌都能在一定程度上进行治疗(Sanduleanu and Stockbrugger, 2003)，因此有效的诊治手段对减少结直肠癌的死亡有重要意义。

胰腺癌为恶性程度极高的消化道肿瘤，其死亡率占我国恶性肿瘤的第六位，在美国位于第四位。近年来，胰腺癌的发病率呈上升趋势，五年生存率仍很低，在诊断后的中位生存期为 4~6 个月 (Coppola, 2000)。胰腺

癌因其独特的解剖位置，症状隐匿，早期诊断非常困难，目前尚无有效的早期诊断方法。目前，用于临床的肿瘤抗原检测，均为非特异性的肿瘤相关抗原，只能通过选择适当的肿瘤标志物进行联合检测，来提高检测的灵敏性和有效性。

子宫内膜癌是发生于子宫内膜的一组上皮性的恶性肿瘤，又称子宫体癌。以来源于子宫内膜腺体的腺癌最为常见，称为子宫内膜腺癌。子宫内膜癌为女性生殖道常见恶性肿瘤，发病率占女性生殖道恶性肿瘤20%~30%，且呈不断上升趋势，占女性全身肿瘤7%。在子宫内膜癌的治疗中，手术作为首选治疗已为世界范围所接受；术后化疗逐渐受到重视；但其早期诊治仍为当前主要问题。传统的诊断方法是根据临床表现，辅助检查结果综合分析，如内膜组织学的检查方可确诊。

糖基化的变更是癌细胞的普遍特征，并且有一些类型的糖链结构被公认为肿瘤发生、发展的标志物，对特异性的肿瘤标志物检测可以达到早期诊断肿瘤的目的(Ho et al., 1988;Kim, 1990;Kim, 1998a)。消化道内膜上皮细胞发生恶变时往往引起糖基化改变，主要改变之一是粘蛋白(Mucin)在肿瘤中的过度表达，另一改变是粘蛋白的不完全糖基化。已有的研究资料表明肿瘤细胞不完全糖基化的结果是产生 Tn, T 和涎酸化 Tn (S-Tn) 抗原，这些抗原结构在正常情况下很少见(Boland et al., 1986;Itzkowitz et al., 1989;Bresalier et al., 1991;Itzkowitz et al., 1992;Kim, 1998b;Hara et al., 2000)。尽管糖基化作用以及改变的糖链在肿瘤发生和发展过程中的病理作用机制还不清楚，但肿瘤特异的糖链结构已经成为肿瘤监测的标记物，用于发现肿瘤的早期改变，肿瘤发展和预后，肿瘤治疗效果评价，甚至可以成为肿瘤治疗的靶标。

尽管结直肠癌的检出并不十分困难，但目前对于不同时期的结直肠癌诊断方法不一(Zhang et al., 2002;Winawer, 2005)。传统的检查方法有肠镜，钡餐透视和肠道内容物检测等，诊断往往依赖临床医生根据检查结果，结合实践经验作出的推断。而对于局限于粘膜的早期肿瘤，传统检测方法很难作出准确的判断，需要灵敏的检测手段，现在已经建立了多种在分子水平检测技术，如 RT-PCR, DNA 探针检测以及特异的肿瘤细胞标记物检测等方法(Finkelstein et al., 1996a;Finkelstein et al., 1996b;Hammel 和 Soussi,

2000;Lassmann et al., 2002), 可以灵敏地对结直肠癌进行早期诊断。然而, 灵敏的分子检测技术 RT-PCR, DNA 探针检测却因特异性低在临床应用较少, 目前体外诊断主要是依靠对多种肿瘤标记物的检测, 再综合分析结果进行判定。

目前结直肠癌的诊断仍采用传统的检查方法结合临床症状来确定, 主要原因是现有的肿瘤标记物抗体对肿瘤的识别存在特异性差和识别抗原不确定等因素, 造成检出结直肠癌的敏感性和特异性低(秦晓光,1995)。在大多文献报道中, 单克隆抗体对结直肠癌的敏感性和特异性分别为 30-60% 和 20-50%。CEA, CA19-9, CA72-4 等抗原的单克隆抗体对结直肠癌的辅助诊断, 如抗 CEA 单克隆抗体识别癌胚抗原, 由于大多数肿瘤都不同程度的表达 CEA, 所以抗 CEA 单抗用于诊断某一肿瘤的特异性差。但为提高结直肠癌的检出率, 在临床上多种单克隆抗体联用能提高检出阳性率见表 1, 由此成为诊断肿瘤的选择(吴道红,2004; 徐笑红, 1998)。

表 1 CA-724,CA19-9,CEA 和 CA-50 对不同肿瘤的阳性结果

组别	n	CA-724		CA-199		CA-50		CEA		联检	
		n	阳性率(%)	n	阳性率(%)	n	阳性率(%)	n	阳性率(%)	n	阳性率(%)
胃癌组	165	90	54.55	86	52.12	49	29.70	45	27.27	140	84.85
肠癌组	153	68	44.44	66	43.14	46	30.06	78	50.98	118	77.12
肝癌组	107	24	22.43	68	63.55	12	11.21	14	13.08	79	73.83
胰腺癌组	68	47	69.12	50	73.53	20	29.41	21	30.88	63	92.65
食道癌组	52	19	36.54	19	36.54	13	25.00	12	23.08	28	53.85
正常对照组	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

目前, 胰腺癌的诊断主要通过一些常用肿瘤标志物的联合检测来实现, 如 CA19-9, CA50, CA242 等指标, 它们对于诊断肿瘤发生, 监测预后及复发起到了重要作用。目前最常用的是将 CEA, CA19-9 和 CA242 联用。CA19-9 在胰腺癌中的敏感性最强 (80%), 但特异性很低 (43%), CEA

与 CA242 联用后可将特异性提高至 92%，但三者联用后，灵敏度仅为 29% (Ni et al., 2005)。这些指标的特异性及敏感性尚不能满足临床需要，因此需要寻找新的诊断及联合诊断指标进一步提高胰腺癌的早期诊断率。

近年来，在子宫内膜癌的诊断中，糖类抗原成为发展迅速，应用广泛的肿瘤标志物，主要为糖蛋白与糖脂，抗原决定簇定位于糖链或蛋白核上，它们的出现为临床肿瘤的诊断带来方便，如 CA19-9，CA72-4，CA125，CA15-3 等 (Yamazawa et al., 2005; Hareyama et al., 1996; Cherchi et al., 2002; Lo et al., 1999)。这些糖类抗原的敏感性均在 30%~67%之间。CA19-9 与 CA125 联用，敏感性可高达 83.3%，特异性为 87.2%，可见联合检测可有效提高正确诊断率，对子宫内膜癌的辅助诊断具有一定价值。

几十年来，单克隆抗体在疾病的诊断和治疗中发挥重要作用，特别是针对表达特异性抗原的疾病，单克隆抗体与抗原的反应检测可以作为疾病诊断的“金”标准。但是，与其他非肠道肿瘤不同的是，结直肠癌常常过度分泌表达表面高度糖基化的粘蛋白，由于形成“糖被”覆盖粘蛋白，识别蛋白抗原表位的单克隆抗体受空间位阻影响，不能有效发挥结合作用，因而在诊断上用处不大，相反，能够识别、结合粘蛋白糖链的单克隆抗体成为诊治结直肠癌的重要工具。

本发明提供的单克隆抗体命名为 3P9，经过检测单克隆抗体对结肠癌细胞的选择性结合，而与正常结肠细胞不结合特性，多轮筛选获得。与目前临床应用 IgG 类抗体不同，3P9 为 IgM 类单克隆抗体，因此具有不同于 IgG 的抗体结构、生化特性和生物学功能。我们的实验证明，3P9 单克隆抗体分子量大于 600KD，识别、结合靶抗原表位为 s-Tn 结构，特异识别结直肠癌变细胞，能够抑制结肠癌细胞的迁移和引起结肠癌细胞凋亡。单独使用该抗体的免疫组化染色即可较为准确地诊断各种分化程度的结直肠癌，子宫内膜癌，胰腺癌的癌变程度，确定癌变区域，改变目前使用多种抗体联合诊断此类癌症敏感性和/或特异性低的现状。3P9 单克隆抗体抑制结肠肿瘤生长和引起细胞凋亡的功能，显示出 3P9 单克隆抗体在结肠腺癌的治疗方面潜在的应用价值。

发明内容

本发明的目的是提供一种单克隆抗体，所述单克隆抗体可与癌症抗原特异性结合，从而可以用于制备诊断癌症的诊断剂或试剂盒。

具体地，本发明提供以下：

1. 一种单克隆抗体，所述抗体具有下列特征：1) 抗体为 IgM 类免疫球蛋白，抗体轻链类型 κ 型； 2) 识别抗原为粘蛋白表面涎酸化的糖链结构。在一个实施方案中，所述涎酸化的糖链结构为 s-Tn(涎酸 N-乙酰半乳糖苷)糖链结构。
2. 以上 1 所述的单克隆抗体，其特异识别结直肠腺癌、子宫内膜腺癌及胰腺癌组织，不识别相应的正常组织。
3. 以上 1 所述的单克隆抗体，其由保藏编号为 CGMCC No. 2643 的杂交瘤细胞系分泌。
4. 以上 1 所述的单克隆抗体，其重链可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所显示，其轻链氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2 所显示。
5. 一种基因工程抗体，其与以上 3 或 4 所述的单克隆抗体具有 30% 以上同源序列，其中包括 Fab 片段，F(ab)' 片段，Fd 片段，Fv 片段和 Fc 片段，也包括具有同源序列的各片段相互组合，或利用部分具有同源序列的各片段与其它蛋白、肽链形成的衍生物。
6. 一种编码以上 1-5 任一项所述的单克隆抗体的核苷酸序列。
7. 以上 1 至 5 中任何一项所述的单克隆抗体在制备用于体内诊断或体外诊断肿瘤的诊断剂或试剂盒中的应用。
8. 以上 7 所述的应用，其中体外诊断包括：直接或间接标记以上所述的单克隆抗体，利用酶联免疫吸收实验(ELISA)，免疫胶体金技术，免疫组织化学染色，免疫荧光，Western-blot 检测手段建立的相应诊断方法。
9. 以上 7 所述的应用，其中体内诊断包括：直接或间接标记以上所述的单克隆抗体，注射或服用所述标记抗体，依据所述抗体与肿瘤抗原结合反应进行肿瘤组织和细胞的定位，肿瘤成像，肿瘤发生和发展诊断，治疗后监视以及肿瘤杀伤效果评价。
10. 以上 7 所述的应用，其中所述肿瘤选自由表达涎酸化糖链结构的肿瘤所组成的组。在一个实施方案中，所述肿瘤选自由甲状腺癌，乳腺癌，膀胱癌胃癌，皮肤癌，肺癌，头颈癌，卵巢癌，精巢癌，胰腺癌，食道癌，

结直肠腺癌，和子宫内膜腺癌组成的组。在一个实施方案中，所述肿瘤选自胰腺癌，结直肠腺癌，和子宫内膜腺癌组成的组。

11. 一种诊断剂，其用于诊断肿瘤，包含以上 1-5 任一项所述的单克隆抗体作为活性成分。在一个实施方案中，所述肿瘤为结直肠癌，子宫内膜癌和胰腺癌。

12. 一种试剂盒，其用于诊断肿瘤，包含以上 1-5 任一项所述的单克隆抗体。在一个实施方案中，所述肿瘤为结直肠癌，子宫内膜癌和胰腺癌。

本发明用人结肠癌细胞为抗原，通过免疫小鼠获得一株高表达 IgM 类抗体的杂交瘤细胞株(CGMCC No. 2643)，通过对该抗体的生化分析和结合表位鉴定，确定本发明提供的抗体能特异性识别粘蛋白糖基化的糖链结构。对 213 例正常及 519 例肿瘤组织切片的对比免疫组化染色分析，此抗体特异识别各种分化程度的结直肠腺癌、子宫内膜腺癌以及胰腺癌组织和细胞，对相应的正常组织不识别。因此，该抗体可用于结直肠腺癌、子宫内膜腺癌以及胰腺癌的早期诊断，治疗监测，筛查以及肿瘤成像。

附图说明

图 1. 3P9 单克隆抗体类型鉴定。A. 检测 3P9 单抗的抗体类别和轻链型光吸收值；B. 典型的 IgM 型免疫球蛋白结构示意图。

图 2. 3P9 单克隆抗体的纯化和生化特性。A. 经预装柱 Sephadex-200 层析的纯化图谱，峰 A, B, C, D, E 分别为不同洗脱体积下的洗脱峰；B. 点杂交 (Dot blotting) 检测洗脱峰中纯化抗体，结果显示抗体主要集中在第一峰 (A)；C. 纯化抗体的 native SDS-PAGE 电泳图；D. 纯化抗体的还原性 SDS-PAGE 电泳结果图。

图 3. 3P9 单克隆抗体与牛颌下腺粘蛋白 (BSM) 的结合反应。

图 4. 过碘酸钠氧化对单克隆抗体 3P9 与牛颌下腺粘蛋白结合反应的影响。

图 5. 神经氨酸酶对单克隆抗体 3P9 与牛颌下腺粘蛋白结合反应的影响。

图 6. 胰蛋白酶对单克隆抗体 3P9 与牛颌下腺粘蛋白结合反应的影响。

图 7. 单克隆抗体 B72.3 与单克隆抗体 3P9 的竞争结合。

图 8. 3P9 单克隆抗体识别人结直肠腺癌组织细胞。单克隆抗体 3P9 与结直肠腺癌结合的着色区主要在结直肠腺上皮的细胞质和细胞膜上，同时在腺腔内也有弥漫的着色；而在正常结直肠组织中没有阳性着色信号。箭头所示为黄棕色阳性着色部位。

图 9. 3P9 单克隆抗体识别人子宫内膜腺癌组织细胞。单克隆抗体 3P9 与子宫内膜腺癌结合的着色区主要在其腺上皮的细胞质和细胞膜上，同时在腺腔内也有弥漫的着色；而在正常子宫内膜组织中没有阳性着色信号。箭头所示为黄棕色阳性着色部位。

图 10. 3P9 单克隆抗体识别人胰腺癌组织细胞。单克隆抗体 3P9 与胰腺癌结合的着色区主要在其腺上皮的细胞质和细胞膜上，同时在腺腔内也有弥漫的着色；而在正常胰腺组织中没有阳性着色信号。箭头所示为黄棕色阳性着色部位。

图 11. 3P9 单克隆抗体抑制结肠肿瘤细胞的迁移。A-G 为分别加入 100ug/ml, 50ug/ml, 25ug/ml, 12.5ug/ml, 6.3ug/ml, 3ug/ml, 0ug/ml 系列稀释单克隆抗体 3P9 处理原代结肠癌移植瘤细胞 HCT-8 20 小时后，划痕区细胞的迁移均受到抑制，且这种抑制作用呈现剂量依赖性；H 为培养前划痕区细胞生长情况。

图 12. 3P9 单克隆抗体重链可变区氨基酸序列及轻链氨基酸序列。

SEQ.ID.NO: 1. 3P9 单克隆抗体重链可变区氨基酸序列；

SEQ.ID.NO: 2. 3P9 单克隆抗体轻链氨基酸序列。

将经克隆筛选获得的稳定表达单克隆抗体的细胞株 3P9 于 2008 年 8 月 27 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 (CGMCC, 中国, 北京朝阳区大屯路), 保藏号为 CGMCC No.2643。

具体实施方式

下文将参考实施例和附图详细描述本发明，所述实施例仅是意图举例说明本发明，而不是意图限制本发明的范围。本发明的范围由后附的权利要求具体限定。

实施例一、3P9 单克隆抗体杂交瘤细胞株的建立和单克隆抗体的产生

材料: 1. 细胞 SW1116 结肠癌细胞系, 购自美国 ATCC (American Type Culture Collection, ATCC No. CCL-233), SP2/0 小鼠骨髓瘤细胞 (ATCC No. CRL-1581)。2. 培养基 无血清 DMEM, 高糖 DMEM, HAT, HT 培养基

购自 Gibco 公司，胎牛血清购自武汉三利公司，细胞培养板为 Corning 产品

3.试剂 聚乙二醇 PEG(MW 4000)购自 Sigma 公司，其它试剂均为国产分析纯

4.动物 BALB/c 小鼠购自中国医学科学院实验动物研究所。

5. 抗体鉴定 使用小鼠单抗分型试剂 Sigma ImmunoType Kit 抗体亚型检测试剂盒。

方法：1. 小鼠免疫 以 1×10^7 /ml SW1116 细胞悬液与福氏完全佐剂 (Sigma)各 0.5ml 混和乳化，腹腔注射 0.2ml/只小鼠；2 周后以不完全福氏佐剂(Sigma)的混合乳化悬液二次免疫，再过两周以不含佐剂的细胞悬液直接尾静脉注射加强免疫，末次免疫 3 天后取出脾脏分离淋巴细胞。向脾脏注射约 0.2-0.5ml 无血清培养基 DMEM 使其胀大，再用弯曲的注射针头多点刺破脾膜，用挤压的方法使淋巴细胞从中逸出。

2. 杂交瘤细胞株的建立 将小鼠骨髓瘤细胞 sp2/0 与上述小鼠免疫脾细胞按 1:5 混合离心，加 1ml 聚乙二醇 PEG 在 37℃ 水浴中融合，加入 15ml 含 15%胎牛血清的高糖 DMEM 后移入 T75 培养瓶，融合细胞于 37℃、5% 二氧化碳培养箱中培养过夜，加入 HAT 培养基，使细胞浓度为 1×10^6 /ml，分细胞悬液入两块 96 孔板 (0.2ml/孔) 37℃、5%二氧化碳培养箱培养 3 天，以 HT 培养基半量换液，1 周后以 HT 培养基培养；7-20 天后选择有克隆生长的培养孔，检测上清中是否有抗体表达，运用酶联免疫吸附 (ELISA) 的方法 (Yan et al., 2003) 筛选出抗体表达阳性克隆。

3.- 阳性杂交瘤细胞的亚克隆 采用有限稀释法 (倍比稀释) 连续克隆杂交瘤细胞 3 次筛选出稳定表达抗体的细胞株，冻存于液氮中。

4.- 腹水抗体制备 采用小鼠腹腔注射杂交瘤细胞收集腹水的方法制备，方法参见文献(Mathews et al., 1980;Rammohan et al., 1983)。

结果：经克隆筛选获得一株稳定表达单克隆抗体的细胞株 3P9，将所述细胞株于 2008 年 8 月 27 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 (CGMCC，中国，北京朝阳区大屯路)，保藏号为 CGMCC No.2643。

细胞培养上清中抗体含量 100-200ng/ml，腹水中抗体含量 2-5mg/ml。

小鼠单抗分型试剂鉴定单抗亚型为 IgM 类抗体，抗体轻链为 κ 型(图

1), 说明该细胞株能稳定高表达 IgM/ κ 型单克隆抗体。

实施例二、3P9 单克隆抗体的纯化和生化特性

材料：3P9 单克隆抗体腹水由杂交瘤细胞腹腔接种 BALB/c 小鼠收获腹水获得；预装层析柱 Sephadex-200, 柱体积 100ml, Pharmacia 产品, 辣根过氧化物酶 (HRP) 羊抗鼠 IgM 抗体购自 Sant Cruz 公司, ECL 荧光检测试剂盒购自 Pierce 公司, 使用 AKTA FPLC 蛋白层析系统纯化。

方法：将上述腹水 4℃ 解冻, 15,000g 离心 20 分钟, 收集上清, 0.2 μ m 膜除菌; pH7.2, 0.01M PBS 平衡预装柱, 腹水 5ml 上样; pH7.2, 0.01M PBS 洗脱, 流速 1ml/分钟, 收集各洗脱峰; 洗脱峰样品 10 μ l 点在硝酸纤维素膜上, 自然风干后做点杂交 (Dot blotting) 鉴定; 蛋白生化特性用 native SDS-PAGE 和还原性 SDS-PAGE 电泳分析; 蛋白生物学活性用 Western blotting 测定。

点杂交：5% 脱脂牛奶室温封闭 1 小时, PBST 洗涤三次, 再用 PBS 洗涤三次, 1:2000 稀释辣根过氧化物酶 (HRP) 羊抗鼠 IgM 抗体室温孵育 1 小时, 加增强化学发光剂 (enhanced chemiluminescence, ECL.) 显色。

结果：腹水经过 Sephadex-200 洗脱下五个峰 (图 2A), 第一峰面积最大, 占 30% 总峰面积。点杂交结果 (图 2B) 显示, 功能抗体组分主要存在于第一峰, 第二峰含量微少, 其余为杂蛋白峰。收集的第一峰蛋白 native SDS-PAGE 电泳结果 (图 2C) 经 Qaulity One 软件分析, 蛋白纯度达 95%; 还原性 SDS-PAGE 电泳结果 (图 2D) 显示为约 75KD 蛋白带。

实施例三、3P9 单克隆抗体与牛颌下腺粘蛋白的结合

材料：3P9 单克隆抗体由腹水抗体经 Sephadex-200 纯化获得; 纯化牛颌下腺粘蛋白 (BSM, bovine submaxillary mucin) (Sigma), 辣根过氧化物酶 (HRP) 羊抗鼠 IgM 抗体购自 Sant Cruz 公司; 96 孔酶联免疫吸附测定板购自美国 Corning Costar 公司。

方法：包被液稀释 BSM 至 50ng/ml, 每个板孔加 100 μ l, 室温 2 小时或 4℃ 过夜, 甩去包被液, PBS 洗涤, 2%BSA-PBS 封闭 1 小时, 加 50 μ l

系列稀释纯化的 3P9 单克隆抗体 37℃温育 1 小时, PBS 或 PBST 洗涤, 加 50ul 辣根过氧化物酶 (HRP) 羊抗鼠 IgM 抗体(PBS 2,000 倍稀释) 37℃温育 1 小时, PBS 洗涤或 PBST 洗涤, 加 200ul 显色液(配方: 5.1ml 的 0.2 M 磷酸氢二钠溶液, 加入 4.9 ml 的 0.1M 柠檬酸溶液, 加 10 μ l 30% 过氧化氢和 4 mg 邻苯二胺 (OPD)) 室温显色 10 min, 加入 20 μ l 2 M H₂SO₄ 终止反应, 490 nm 下检测光吸收值。

结果: 以初浓度为 100ng/ml 的纯化抗体测定时, 吸收值约 0.55, 2 倍系列稀释后呈明显对数下降 (图 3)。纯化 3P9 单克隆抗体与 BSM 结合曲线表明结合反应与抗体浓度有关, 符合抗原抗体结合解离特征。

实施例四、过碘酸钠抑制 3P9 单克隆抗体与牛颌下腺粘蛋白的结合

材料: 3P9 单克隆抗体由腹水抗体经 Sephadex-200 纯化获得; 纯化牛颌下腺粘蛋白(BSM, bovine submaxillary mucin) (Sigma), 过碘酸钠购自 Sigma 公司, 辣根过氧化物酶 (HRP) 羊抗鼠 IgM 抗体购自 Sant Cruz 公司; 96 孔酶联免疫吸附测定板购自美国 Corning Costar 公司。

方法: 包被液(15mM 碳酸钠, 35mM 碳酸氢钠)稀释 BSM 至 50ng/ml, 每个板孔加 100ul, 室温 2 小时或 4℃过夜, 甩去包被液, PBS 洗涤, 加 100ul 系列稀释过碘酸钠室温置放 20 分钟, 弃过碘酸钠溶液加 200ul 包被液中和 5 分钟, PBS 洗涤, 加 2%BSA-PBS 封闭 1 小时, 加 50ul 纯化 3P9 单克隆抗体 (200ng/ml) 37℃温育 1 小时, PBS 洗涤或 PBST 洗涤, 加 50ul 辣根过氧化物酶 (HRP) 羊抗鼠 IgM 抗体(PBS 2,000 倍稀释) 37℃温育 1 小时, PBS 洗涤或 PBST 洗涤, 加 200ul 显色液(配方: 5.1ml 的 0.2 M 磷酸氢二钠溶液, 加入 4.9 ml 的 0.1M 柠檬酸溶液, 加 10 μ l 30% 过氧化氢和 4 mg 邻苯二胺 (OPD)) 室温显色 10 min, 加入 20 μ l 2 M H₂SO₄ 终止反应, 490 nm 下检测光吸收值。

结果: 经过碘酸钠处理后, 光吸收值随过碘酸钠剂量增大而降低, 表现出明显剂量依赖关系。大于 1 μ g 过碘酸钠处理抗原后的光吸收值小于 0.3 (图 4), 说明过碘酸盐的氧化作用影响了抗体与 BSM 结合。由于过碘酸盐能引起粘蛋白表面的糖链结构和构象变化, 而不影响肽链结构, 所以 3P9 抗体结合粘蛋白 BSM 的表位结构是糖链而非肽链。

实施例五、神经氨酸酶抑制 3P9 单克隆抗体与牛颌下腺粘蛋白的结合

材料：腹水经 Sephadex-200 纯化获得纯化 3P9 单克隆抗体；冻干纯化牛颌下腺粘蛋白(BSM, bovine submaxillary mucin) (Sigma)，神经氨酸酶购自 Sigma 公司，辣根过氧化物酶(HRP)羊抗鼠 IgM 抗体购自 Sant Cruz 公司；96 孔酶联免疫吸附测定板购自美国 Corning Costar 公司。

方法：包被液稀释 BSM 至 50ng/ml，每个板孔加 100ul，室温 2 小时或 4℃过夜，甩去包被液，PBS 洗涤三次，分别加入 100ul 1ug/ml 和 0.1ug/ml 的神经氨酸酶溶液 (PBS 配制) 37℃置放 30 分钟，弃神经氨酸酶溶液加 1M EDTA (乙二胺四乙酸) 溶液 200ul 室温置放 5 分钟，PBS 洗涤，加 2%BSA-PBS 封闭 1 小时，加 50ul 纯化 3P9 单克隆抗体 (200ng/ml) 37℃温育 1 小时，PBS 洗涤或 PBST 洗涤，加 50ul 辣根过氧化物酶 (HRP) 羊抗鼠 IgM 抗体(PBS 2,000 倍稀释) 37℃温育 1 小时，PBS 洗涤或 PBST 洗涤，加 200ul 显色液(配方：5.1ml 的 0.2 M 磷酸氢二钠溶液，加入 4.9 ml 的 0.1M 柠檬酸溶液，加 10 μl 30% 过氧化氢和 4 mg 邻苯二胺 (OPD)) 室温显色 10 min，加入 20 μl 2 M H₂SO₄ 终止反应，490 nm 下检测光吸收值。

结果：经 10ng 和 100ng 神经氨酸酶处理后，处理组的对光吸收值较对照组有明显降低 (图 5)，进一步说明 3P9 单克隆抗体与 BSM 结合表位是糖链部分，并与涎酸化的糖链结构有关，神经氨酸酶对糖链的改变抑制了抗体对抗原表位的识别与结合。

实施例六、3P9 单克隆抗体与牛颌下腺粘蛋白的结合不受胰蛋白酶作用的影响

材料：3P9 单克隆抗体由腹水抗体经 Sephadex-200 纯化获得；纯化牛颌下腺粘蛋白(BSM, bovine submaxillary mucin) (Sigma)，胰蛋白酶购自 Sigma 公司，辣根过氧化物酶 (HRP) 羊抗鼠 IgM 抗体购自 Sant Cruz 公司；96 孔酶联免疫吸附测定板购自 Corning Costar 公司。

方法：包被液稀释 BSM 至 50ng/ml，每个板孔加 100ul，室温 2 小时或 4℃过夜，甩去包被液，PBS 洗涤，加 100ul 系列梯度胰蛋白酶，37℃

置放 30 分钟，弃胰蛋白酶溶液加 1M EDTA 溶液 200ul 室温置放 5 分钟，PBS 洗涤，加 2%BSA-PBS 封闭 1 小时，加 50ul 纯化 3P9 单克隆抗体 (200ng/ml) 37°C 温育 1 小时，PBS 洗涤或 PBST 洗涤，加 50ul 辣根过氧化物酶 (HRP) 羊抗鼠 IgM 抗体(PBS 2,000 倍稀释) 37°C 温育 1 小时，PBS 洗涤或 PBST 洗涤，加 200ul 显色液(配方：5.1ml 的 0.2 M 磷酸氢二钠溶液，加入 4.9 ml 的 0.1M 柠檬酸溶液，加 10 μ l 30% 过氧化氢和 4 mg 邻苯二胺 (OPD))室温显色 10 min，加入 20 μ l 2 M H₂SO₄ 终止反应，490 nm 下检测光吸收值。

结果：经梯度胰蛋白酶处理后，除各处理组光吸收值较未处理组有微小降低外，未出现光吸收值明显变化，各组吸收值均高于 0.7，各组间无差别 (图 6)，结果表明胰蛋白酶对粘蛋白肽链的改变不影响 3P9 单克隆抗体与 BSM 结合反应，证明抗体识别，结合的抗原表位是非肽链结构。

实施例七、单克隆抗体 B72.3 竞争 3P9 单克隆抗体与牛颌下腺粘蛋白的结合

材料：3P9 单克隆抗体由腹水抗体经 Sephadex-200 纯化获得；纯化牛颌下腺粘蛋白(BSM, bovine submaxillary mucin) (Sigma)，单克隆抗体 B72.3 工作液购自中杉金桥公司，辣根过氧化物酶 (HRP) 羊抗鼠 IgG 抗体购自 Sigma 公司；96 孔酶联免疫吸附测定板购自 Corning Costar 公司。

方法：单克隆抗体 B72.3 工作液 200ul 与梯度量增加的 3P9 单克隆抗体混合 (3P9 单克隆抗体的初始浓度为 600ng/ml)，每个梯度以稀释液 (PBS) 补足 500ul，混和均匀。包被液稀释 BSM 至 50ng/ml，每个板孔加 100ul，室温 2 小时或 4°C 过夜，甩去包被液，PBS 洗涤，加 100ul 上述系列单克隆抗体混合液，室温置放 1 小时，PBS 洗涤，加 2%BSA-PBS 封闭 1 小时，加 50ul 纯化 3P9 单克隆抗体 (200ng/ml) 37°C 温育 1 小时，PBS 洗涤或 PBST 洗涤，加 50ul 辣根过氧化物酶 (HRP) 羊抗鼠 IgG 抗体(PBS 2,000 倍稀释) 37°C 温育 1 小时，PBS 洗涤或 PBST 洗涤，加 200ul 显色液(配方：5.1ml 的 0.2 M 磷酸氢二钠溶液，加入 4.9 ml 的 0.1M 柠檬酸溶液，加 10 μ l 30% 过氧化氢和 4 mg 邻苯二胺 (OPD))室温显色 10 min，加入 20 μ l 2 M H₂SO₄ 终止反应，490 nm 下检测光吸收值。

结果：单克隆抗体 B72.3 与纯化 BSM 有特异性结合；随单克隆抗体 3P9 量的增加，单克隆抗体 B72.3 与 BSM 结合明显减少（图 7），表明单克隆抗体 3P9 竞争结合抗原表位，进一步确定抗原表位为 s-Tn(涎酸 N-乙酰半乳糖苷)糖链结构。

实施例八、免疫组化分析 3P9 单克隆抗体对人肿瘤组织抗原的识别

材料：高密度多组织癌症和正常人组织芯片（货号：CC00-08-001）购自陕西超英生物科技有限公司。其包括来自 495 例病人的 500 个组织样品，囊括了 12 种人类最常见的癌症类型，包括结肠癌，子宫内膜癌，胰腺癌，乳腺癌，胃癌，肝癌，肺癌，肾癌，皮肤癌，头颈癌，卵巢癌，精巢癌，膀胱癌，脑癌，前列腺癌，甲状腺癌等。每种癌症类型包括约 25 个癌变组织样品和 5 个正常组织样品。每个组织样品的直径为 0.6mm，厚度 5 μ m（详细信息见此产品说明书）。其它样品包括人结肠癌组织（52 例），直肠癌组织（50 例），子宫内膜癌组织（6 例），食道癌（25 例）及相应的正常组织包括正常人结肠组织（48 例），直肠组织（50 例），子宫内膜癌组织（3 例）取自中国医学科学院肿瘤医院肿瘤研究所分子肿瘤国家重点实验室，中国人民解放军 301 和 306 医院，北京法医研究所。辣根过氧化物酶（HRP）羊抗鼠 IgM 抗体购自 Sant Cruz 公司；DAB 显色试剂盒购自中杉金桥公司（产品编号：ZLI-9033），其它试剂购自北京化学试剂公司。

方法：冻存组织解冻后以 4%多聚甲醛固定 16-24 小时。固定后的实验材料放入 70%酒精中，1 小时后更换 70%酒精一次，经上行梯度（80%，90%，100%）酒精脱水，进行常规石蜡包埋，5 μ m 厚度切片。制备石蜡组织切片的具体步骤参见赵宗江《组织细胞分子学实验原理与方法》，中国中医药出版社，2003 年，第一版。免疫组化染色采用常规方法：切片经二甲苯脱蜡，下行梯度（100%，90%，80%，70%，50%，30%，）酒精复水；在含有 0.3% 过氧化氢的甲醇中室温闭光孵育 30 分钟去除内源性过氧化物酶的干扰；PBS 冲洗三次，每次 5 分钟；将切片置于 10mM 柠檬酸钠缓冲液（pH6.0）煮沸 10 分钟，以修复抗原；让切片在缓冲液中自然冷却，然后用 PBS 冲洗三次，每次 5 分钟；5%羊血清（北京中杉金桥，PBS 稀释羊血清）封闭 1 小时；弃去封闭液，用含有 3P9 单克隆抗体的一抗稀释液

(1:1000 封闭液稀释) 覆盖实验组切片, 对照组切片仍然用 5%羊血清覆盖, 用含有标记的二抗 (辣根过氧化物酶偶联的羊抗鼠 IgM, Santa Cruz 公司, 1:500 封闭液稀释) 覆盖实验组和对照组切片, 37 孵育 1 小时; PBS 冲洗三次, 每次 5 分钟; 最后用新鲜配置的 DAB 显色试剂盒显色; 显微镜下观察显色至合适程度, PBS 冲洗终止显色反应; 用苏木精溶液复染切片 1-2 分钟; 自来水冲洗切片 10 分钟; 上行梯度酒精 (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 100%) 脱水, 二甲苯透明后树脂封片; 37°C 烘箱内烘干切片后观察并拍照。

结果: 3P9 单克隆抗体对各种癌症类型的阳性检出率差别很大 (表 2), 结合程度也有很大差别。其中对结肠腺癌的检出率最高, 达 71.8%, 其次是子宫内膜腺癌 (68%), 直肠腺癌 (62%), 胰腺癌 (55.6%), 并且对这些癌症的结合程度最强。

表 2. 人肿瘤组织 3P9 抗原检测。

肿瘤类型	3P9 免疫染色		阳性率 (%)
	病例总数	阳性例数	
脑癌	19	0	0
霍普金斯	9	0	0
纤维肉瘤	10	0	0
脂肪肉瘤	10	0	0
肝细胞癌	19	0	0
肾细胞癌	20	0	0
前列腺癌	15	1	6.7
甲状腺癌	20	1	5
乳腺癌	31	1	3.2
膀胱癌	19	2	10.5
胃癌	24	7	29.2
皮肤癌	30	7	23.3
肺癌	31	7	22.6
头颈癌	20	5	25
卵巢癌	34	13	38.2
精巢癌	19	8	42.1
胰腺癌	18	10	55.6
食道癌	25	14	56
直肠腺癌	50	31	62
子宫内膜腺癌	25	17	68
结肠腺癌	71	51	71.8

1. 3P9 单克隆抗体对人结直肠腺癌组织细胞抗原的识别

单克隆抗体 3P9 识别、结合结直肠腺癌细胞及其分泌物，呈现强黄棕色(如图 8 中箭头所显示)显色反应，而正常组织无显色反应（图 8），说明单克隆抗体 3P9 能够特异识别、结合人结直肠腺癌细胞及分泌表达的产物，即抗原。对 125 例临床结肠腺癌组织和正常组织的免疫组化结果分析显示，单克隆抗体 3P9 识别人结肠腺癌的敏感性 71.8%,(51/71) ，特异性 79.6%(43/54)，阳性预测值（PPV）82.3%（51/62），阴性预测值（NPV）68.3%（43/63）；对 100 例临床直肠腺癌组织和正常组织的免疫组化结果分析显示，单克隆抗体 3P9 识别人直肠腺癌的敏感性 62%,(31/50) ，特异性 62%(31/50)，阳性预测值（PPV）62%（31/50），阴性预测值（NPV）62%（31/50）见表 3。

表 3. 3P9 单克隆抗体检测结直肠腺癌，子宫内膜腺癌，胰腺癌的敏感性和特异性分析。

肿瘤类型	特异性 (%)	敏感性 (%)	PPV (%)	NPV (%)
子宫内膜腺癌	100	68	100	60
结肠腺癌	79.6	71.8	82.3	68.3
直肠腺癌	62	62	62	62
胰腺癌	100	55.6	100	46.7

PPV：阳性预测值；NPV：阴性预测值；

2. 3P9 单克隆抗体对人子宫内膜腺癌组织细胞抗原的识别

单克隆抗体 3P9 识别、结合子宫内膜腺癌细胞及其分泌物，呈现强黄棕色显色反应（如图 9 中箭头所显示），而正常组织无显色反应（图 9），说明单克隆抗体 3P9 能够识别、结合人子宫内膜腺癌细胞及分泌表达的产物。对 37 例临床子宫内膜腺癌组织和正常组织的免疫组化结果分析显示，单克隆抗体 3P9 识别人子宫内膜腺癌的敏感性 68%(17/25)，特异性 100%(12/12)，阳性预测值（PPV）100%（17/17），阴性预测值（NPV）60%（12/20）见表 3。

3. 3P9 单克隆抗体对人胰腺癌组织细胞抗原的识别

单克隆抗体 3P9 识别、结合胰腺癌细胞及其分泌物，呈现强黄棕色显色反应(如图 10 中箭头所显示)，而正常组织无显色反应（图 10），说明单

克隆抗体 3P9 能够识别、结合人胰腺癌细胞及分泌表达的产物。对 25 例临床胰腺癌组织和正常组织的免疫组化结果分析显示，单克隆抗体 3P9 识别人胰腺癌的敏感性 55.6%,(10/18)，特异性 100%(7/7)，阳性预测值(PPV) 100% (10/10)，阴性预测值 (NPV) 46.7% (7/15) 见表 3。

4. 3P9 单克隆抗体对不同癌症的阳性检出率与肿瘤分化程度的关系

免疫组化结果表明，3P9 对不同癌症的检出率有随肿瘤分化程度的降低而下降的趋势，这在结肠腺癌，子宫内膜腺癌和胰腺癌中尤为明显。但通过 χ^2 检验这些癌症不同分化程度之间阳性检出率的差别，发现并没有显著性差异 (表 4)，说明单克隆抗体 3P9 对不同癌症的阳性检出率与肿瘤的分化程度没有相关性。

表 4. 3P9 抗原检测阳性率与肿瘤分化程度的关系。

肿瘤类型	免疫染色强度				P 值
	(-)	(+)	(++)	(+++)	
结肠癌 (42.1)					
亚型					
腺癌 (42.1)	11	1	4	3	-
分级					
I (100)	0	0	0	1	NS
II (55.6)	4	1	4	0	
III (22.2)	7	0	0	2	
UND (0)	0	0	0	0	
子宫内膜癌 (68.4)					
亚型					
腺癌 (68.4)	6	7	2	4	-
分级					
I (66.7)	1	2	0	0	NS
II (77.8)	2	4	1	2	
III (57.1)	3	1	1	2	
UND (0)	0	0	0	0	
胰腺癌 (55.6)					
亚型					
腺癌(55.6)	8	6	1	3	-
分级					
I (0)	1	0	0	0	NS
II (75)	3	6	0	3	
III (20)	4	0	1	0	
UND (0)	0	0	0	0	

(-) 没有阳性染色或阳性细胞数所占比例小于 10%; (+) 阳性细胞数所占比例大于或等于 10%但小于 25%; (++) 阳性细胞数所占比例大于或等于 25%但小于 50%; (+++) 阳性细胞数所占比例大于或等于 50%; NS, 没有显著性差异; UND, 未知分化程度。

实施例九、3P9 单克隆抗体抑制肿瘤细胞的迁移

材料：结肠癌裸鼠移植瘤 HCT-8 由中国医学科学院肿瘤医院肿瘤研究所动物室提供，胰蛋白酶，胶原酶 I 购自 Sigma 公司，细胞培养板为 Falcon (Becton Dickinson. Labware, Franklin Lakes, NJ, USA) 产品，细胞培养液为 DMEM(含 10%胎牛血清，青霉素 100U/ml，链霉素 50ug/ml)，其余试剂购自北京化学公司。

方法：将结肠癌裸鼠移植瘤切成 1mm^3 小块，参照《动物细胞培养基本技术指南》(科学出版社，R.I.弗雷谢尼，2000 年，第四版) 方法制备原代结肠癌移植瘤细胞 HCT-8。HCT-8 细胞生长成单层时，用移液枪头在单层细胞上划痕，弃培养液，PBS 洗细胞两次，加入含系列稀释单克隆抗体 3P9 的 DMEM 培养液，常规细胞培养 20 小时，在相差显微镜下观察划痕区细胞生长情况。

结果：与培养前划痕(图 11H)相比，单克隆抗体 3P9 抑制 HCT-8 原代结肠癌细胞迁移，且抑制作用呈现剂量依赖性(图 11A-G)。

参考文献

- Boland, C. R., J. A. Roberts, B. Siddiqui, J. Byrd, and Y. S. Kim, 1986, Cancer-associated colonic mucin in cultured human tumor cells and athymic (nude) mouse xenografts, *Cancer Res.*, 46(11): 5724-5729.
- Bresalier, R. S., Y. Niv, J. C. Byrd, Q. Y. Duh, N. W. Toribara, R. W. Rockwell, R. Dahiya, and Y. S. Kim, 1991, Mucin production by human colonic carcinoma cells correlates with their metastatic potential in animal models of colon cancer metastasis, *J. Clin. Invest.*, 87(3): 1037-1045.
- Cherchi PL, Capobianco G, Ambrosini G, Fadda GM, Piga MD, Ruiu G, Fattorini F, Dessole S, 2002, Intracystic evaluation of tumor markers in benign and malignant ovarian pathology, *Eur J Gynaecol Oncol.*, 23(2):163-5.
- Coppola D, 2000, Molecular prognostic markers in pancreatic cancer, *Cancer Control*, 7(5): 421-427
- Finkelstein, S. D., R. Przygodzki, V. E. Pricolo, S. A. Sakallah, P. A. Swalsky, A. Bakker, R. Lanning, K. I. Bland, and D. L. Cooper, 1996b, Prediction of Biologic Aggressiveness in Colorectal Cancer by p53/K-ras-2 Topographic Genotyping, *Mol. Diagn.*, 1(1): 5-28.
- Finkelstein, S. D., R. Przygodzki, V. E. Pricolo, S. A. Sakallah, P. A. Swalsky, A. Bakker, R. Lanning, K. I. Bland, and D. L. Cooper, 1996a, Prediction of Biologic Aggressiveness in Colorectal Cancer by p53/K-ras-2 Topographic Genotyping, *Mol. Diagn.*, 1(1): 5-28.
- Hammel, P., and T. Soussi, 2000, Serum p53 antibody assay: evaluation in colorectal cancer, *Rev. Med. Interne*, 21(2): 167-173.
- Hara, A., M. Saegusa, H. Mitomi, M. Kurihara, K. Ishihara, K. Hotta, and I.

Okayasu, 2000, Colonic mucin-carbohydrate components in colorectal tumors and their possible relationship to MUC2, p53 and DCC immunoreactivities, *Pathol. Res. Pract.*, 196(3): 159-166.

Hareyama, H., Sakuragi, N., Makinoda, S., and Fujimoto, S. 1996, Serum and tissue measurements of CA72-4 in patients with endometrial carcinoma, *J Clin Pathol.*, 49(12): 967-970.

Ho, S. B., N. W. Toribara, R. S. Bresalier, and Y. S. Kim, 1988, Biochemical and other markers of colon cancer, *Gastroenterol. Clin. North Am.*, 17(4): 811-836.

Itzkowitz, S. H., E. J. Bloom, T. S. Lau, and Y. S. Kim, 1992, Mucin associated Tn and sialosyl-Tn antigen expression in colorectal polyps, *Gut*, 33(4): 518-523.

Itzkowitz, S. H., M. Yuan, C. K. Montgomery, T. Kjeldsen, H. K. Takahashi, W. L. Bigbee, and Y. S. Kim, 1989, Expression of Tn, sialosyl-Tn, and T antigens in human colon cancer, *Cancer Res.*, 49(1): 197-204.

Kim, Y. S., 1990, Carbohydrate antigen expression in colorectal cancer, *Semin.Cancer Biol.*, 1(3): 189-197.

Kim, Y. S., 1998b, Mucin glycoproteins in colonic neoplasia, *Keio J.Med.*, 47(1): 10-18.

Kim, Y. S., 1998a, Mucin glycoproteins in colonic neoplasia, *Keio J.Med.*, 47(1): 10-18.

Lassmann, S., M. Bauer, R. Soong, J. Schreglmann, K. Tabiti, J. Nahrig, R. Ruger, H. Hofler, and M. Werner, 2002, Quantification of CK20 gene and protein expression in colorectal cancer by RT-PCR and immunohistochemistry reveals inter- and intratumour heterogeneity, *J.Pathol.*, 198(2): 198-206.

Lo SS, Khoo US, Cheng DK, Ng TY, Wong LC, Ngan HY. 1999, Role of serial tumor markers in the surveillance for recurrence in endometrial cancer, *Cancer Detect Prev.*, 23(5): 397-400.

Mathews, H. L., M. J. Brunda, and P. Minden, 1980, The use of cellular immunoadsorbents to prepare antibody that distinguishes between syngeneic surface antigens on two guinea pig hepatocarcinomas, *J.Immunol.*, 124(3): 1141-1147.

Ni XG, Bai XF, Mao YL, Shao YF, Wu JX, Shan Y, Wang CF, Wang J, Tian YT, Liu Q, Xu DK, Zhao P. 2005, The clinical value of serum CEA, CA19-9, and CA242 in the diagnosis and prognosis of pancreatic cancer, *Eur J Surg Oncol.*, 31(2): 164-9.

Rammohan, K. W., H. F. McFarland, W. J. Bellini, J. Gheuens, and D. E. McFarlin, 1983, Antibody-mediated modification of encephalitis induced by hamster neurotropic measles virus, *J. Infect. Dis.*, 147(3): 546-550.

Sanduleanu, S., and R. W. Stockbrugger, 2003, Screening for colorectal cancer: medical and economic aspects, *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.*, 239: 73-77.

Winawer, S. J., 2005, Screening of colorectal cancer: progress and problems, *Recent Results Cancer Res.*, 166: 231-244.

Xiyun Yan, Dongling Yang, Yi Shen, et al., 2003, A novel anti-CD146 monoclonal antibody, AA98, inhibits angiogenesis and tumor growth, *Blood*, 102: 184-191

Zhang, Y. L., Z. S. Zhang, B. P. Wu, and D. Y. Zhou, 2002, Early diagnosis for colorectal cancer in China, *World J.Gastroenterol.*, 8(1): 21-25.

秦晓光, 1995, 肿瘤标志物应用中的若干问题, *中华医学检验杂志*, 18(4):

197

吴道宏, 2004, 血清 CEA、CA19-9、CA724 检测与大肠癌分化程度、临床分期的关系. 解放军医学杂志, 29(1): 69-70

徐笑红, 1998, 四项肿瘤糖类抗原对结肠癌与直肠癌的诊断敏感性评价, 临床检验杂志, 16(5)

序列表

<110> 中国科学院生物物理研究所

<120> 一种抑制人结肠肿瘤生长的新型抗体及其在制备用于早期诊断结直肠癌、子宫内膜癌以及胰腺癌的诊断剂中的应用

<130> IB085793

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 99

<212> PRT

<213> 3P9杂交瘤细胞株

<220>

<221> 3P9单克隆抗体重链可变区氨基酸序列

<222> (1)..(99)

<223>

<400> 1

Gln Val Lys Leu Gln Glu Leu Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His
20 25 30

Ala Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Lys Glu Phe

<210> 2

<211> 186

<212> PRT

<213> 3P9杂交瘤细胞株

<220>

<221> 3P9单克隆抗体轻链氨基酸序列

<222> (1)..(186)

<223>

<400> 2

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

Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asn Val Gly Ala Gly
20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Glu Ser
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Asn Ser Arg Pro Asn
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala
100 105 110

Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly
115 120 125

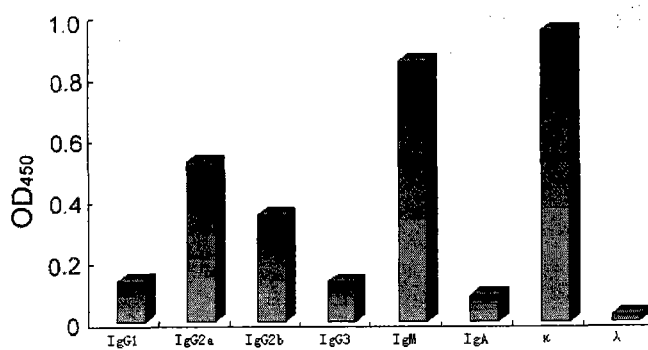
Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile
130 135 140

Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu
145 150 155 160

Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Gly Arg Val
180 185

A



B

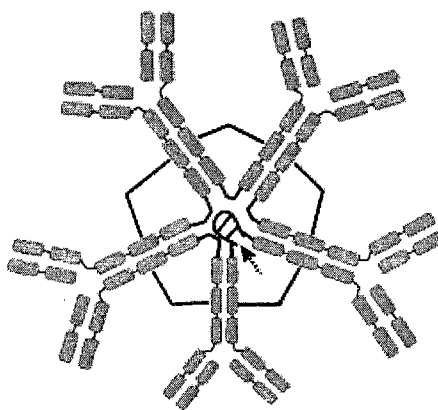


图 1

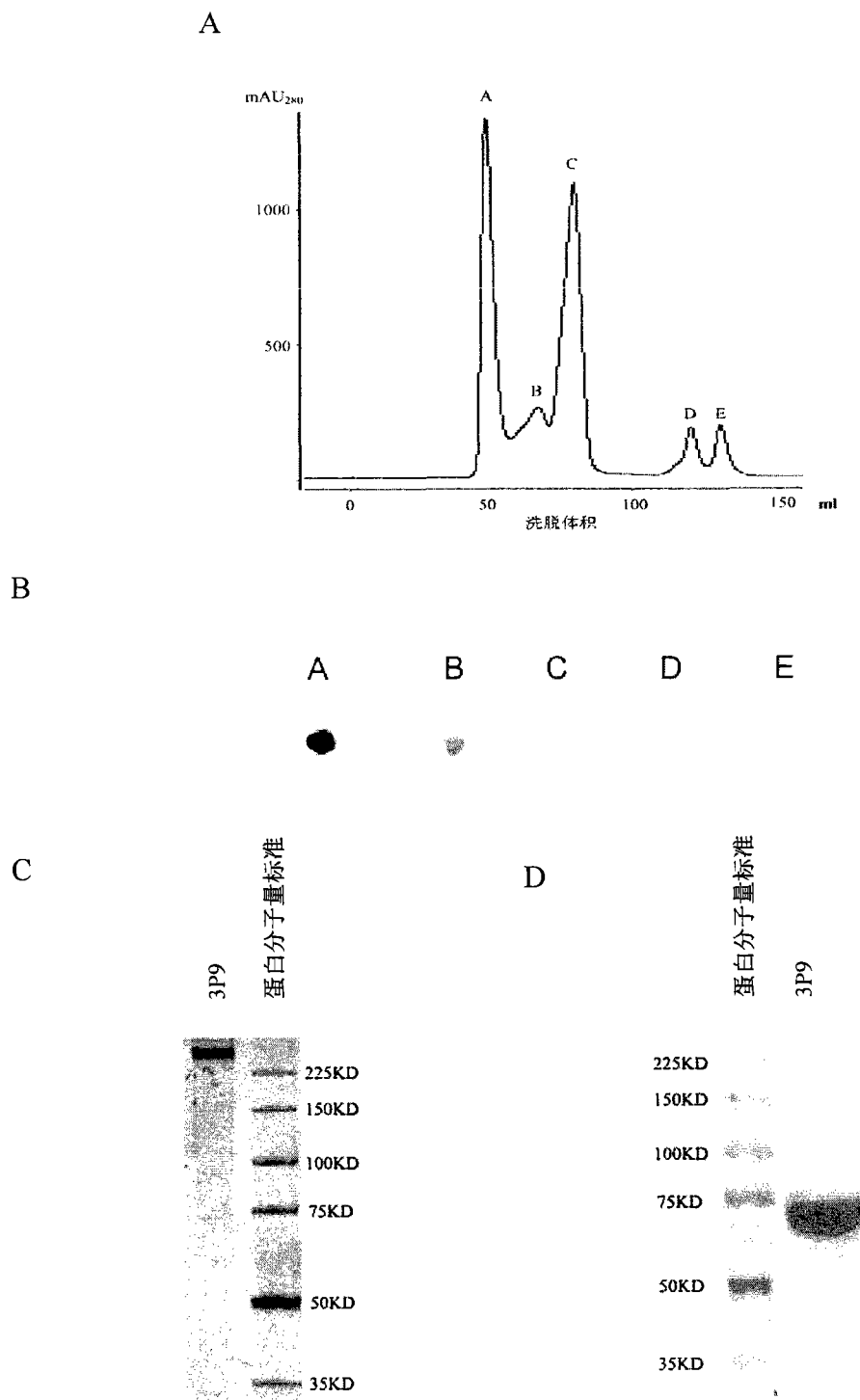
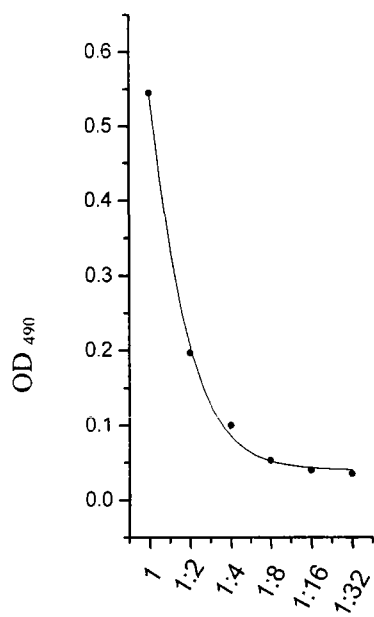


图 2



纯化 3P9 单克隆抗体稀释倍数

图 3

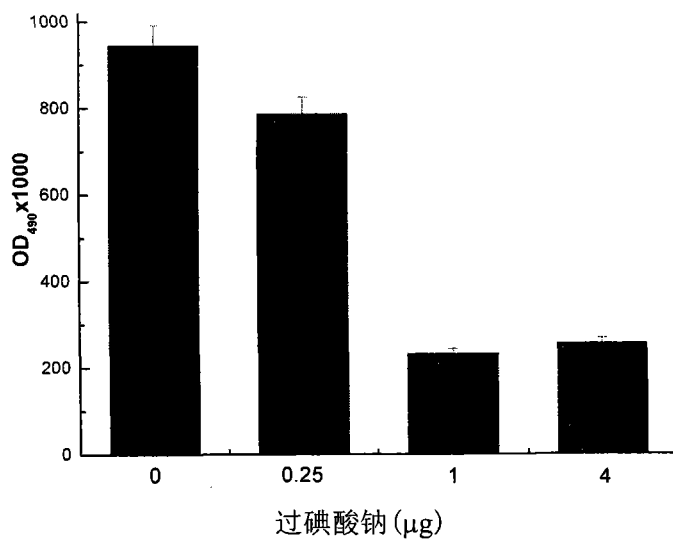


图 4

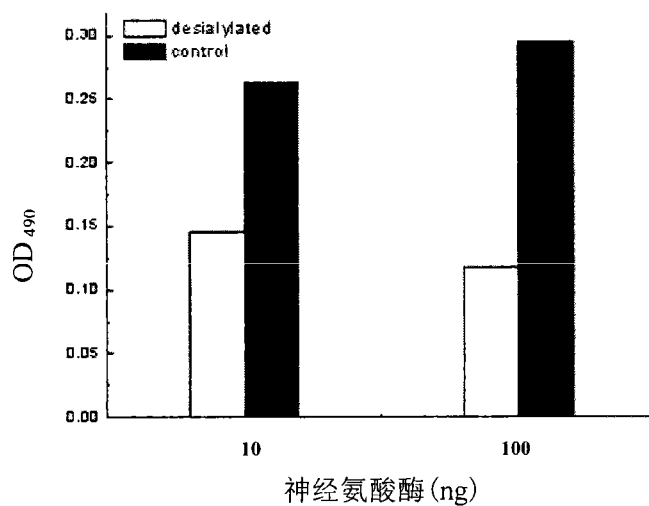


图 5

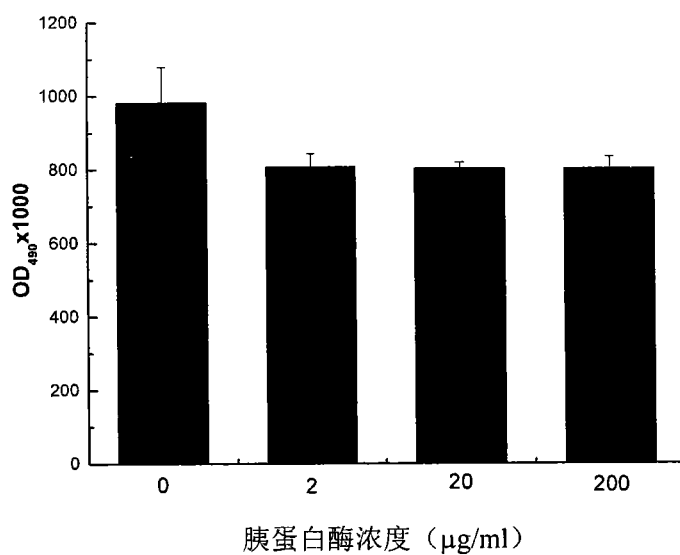


图 6

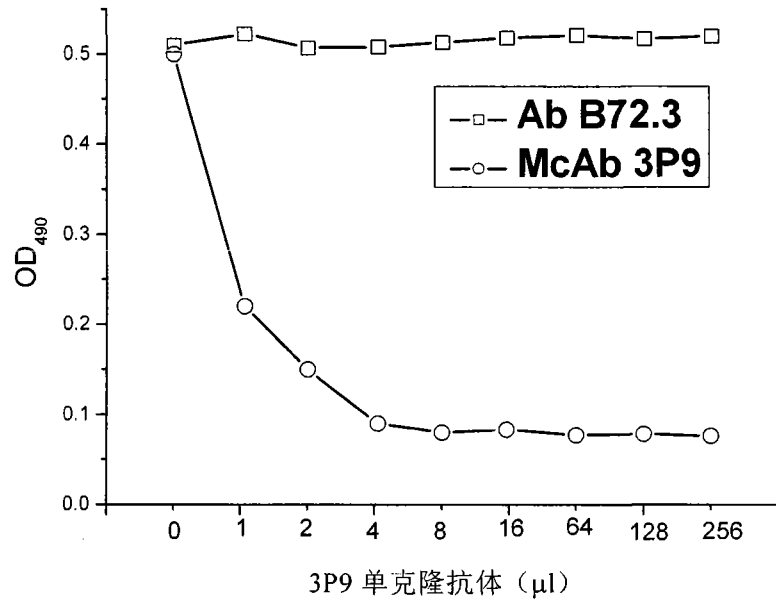


图 7

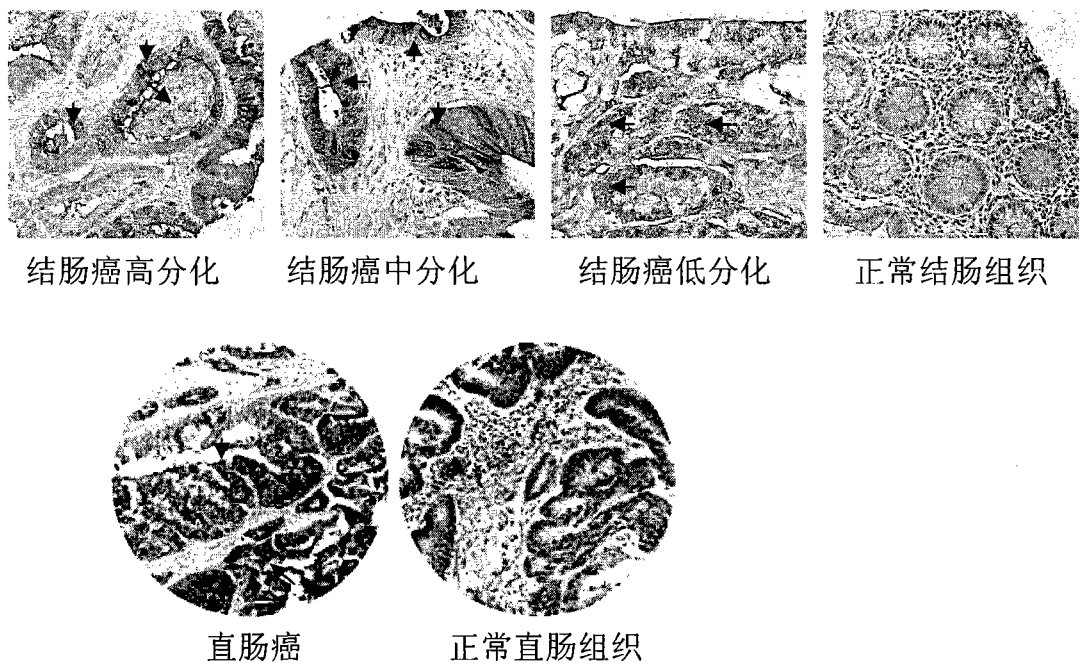


图 8

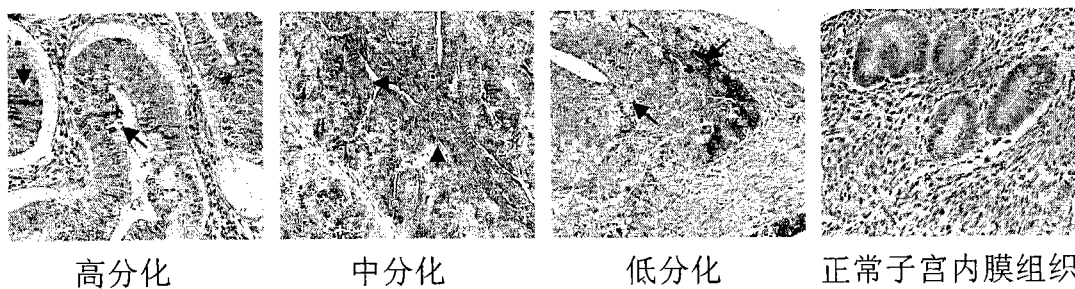


图 9

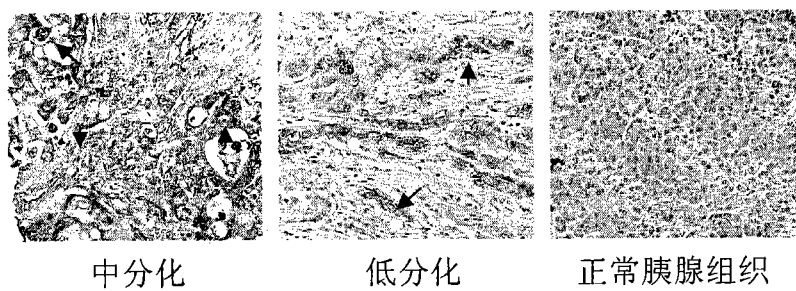


图 10

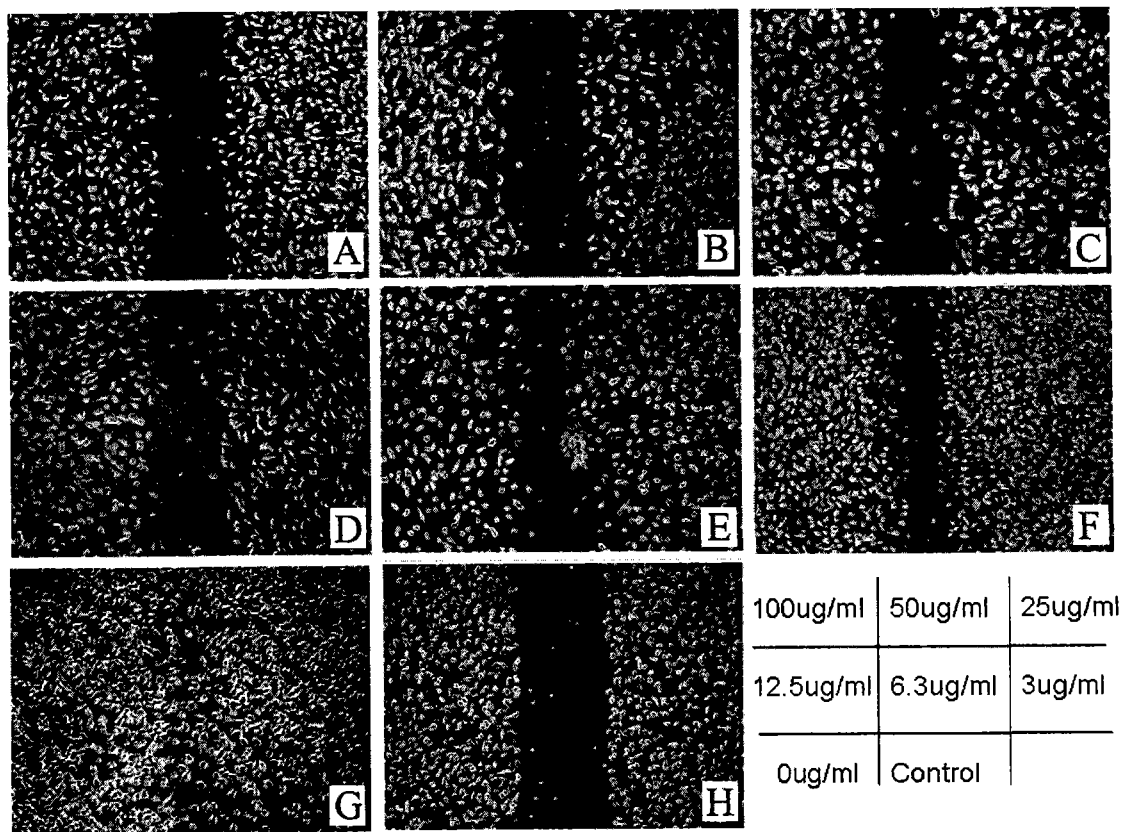


图 11

SEQ.ID.NO: 1

1 QVKLQELGAE LVKPGASVKI SCKASGYTFT DHAIHWVKQK
PEQGLEWIGY
51 VSPGNGDIKY NEKFKDKATL TADKSSSTAY MQLNSLTSED
SAVYFCKEF

SEQ.ID.NO: 2

1 DILLTQSPAI LSVSPGERVS FSCRASQNVG AGIHWYQORT
NGSPRLLIKY
51 SSESISGIPS RFSGSGSGTD FTLTISSVES EDIADYYCQQ
TNSRPNTFGG
101 GTKLEIKRAD AAPTVSIFPP SSEQLTSGGA SVVCFLNNFY
PKDINVKWKI
151 DGSERQNGVL NSWTDQDSKD STYSMSSTLT LTKGRV

图 12