

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

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



## [12] 发明专利申请公开说明书

G01N 33/574

G01N 33/68 A61K 39/395

A61K 38/17 G01N 33/577

C12Q 1/68 A61K 48/00

A61K 47/48

[21] 申请号 01812534.4

[43] 公开日 2004 年 3 月 3 日

[11] 公开号 CN 1479871A

[22] 申请日 2001.7.10 [21] 申请号 01812534.4

[30] 优先权

[32] 2000. 7. 10 [33] EP [31] 00114788.3

[86] 国际申请 PCT/EP01/07924 2001.7.10

[87] 国际公布 WO02/04952 英 2002.1.17

[85] 进入国家阶段日期 2003.1.9

[71] 申请人 德国公共权利基金会癌症研究中心

地址 德国海德堡

共同申请人 摩尔研究应用有限公司

[72] 发明人 彼得·阿尔特福格特 米纳·福格尔

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 林晓红

权利要求书 2 页 说明书 14 页 附图 7 页

[54] 发明名称 基于 L1 粘附分子的卵巢和子宫内膜  
肿瘤的诊断和治疗方法

[57] 摘要

一种诊断卵巢或子宫内膜肿瘤或判断其预后的方法，特征在于在患者样品中测定 L1 水平，优选通过抗 L1 抗体测定，存在 L1 则表示存在卵巢或子宫内膜肿瘤或具有易患这种肿瘤的体质。另外，还提供了治疗卵巢或子宫内膜肿瘤的方法。

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

1. 一种诊断卵巢或子宫内膜肿瘤或判断其预后的方法，特征在于在患者样品中测定 L1 水平，存在 L1 则表示存在卵巢或子宫内膜肿瘤，或具有易患这种肿瘤的体质。
2. 权利要求 1 的方法，其中 L1 水平是通过测定作为组织中细胞表面分子的 L1 而测定的。
3. 权利要求 1 的方法，其中所述 L1 水平是通过检测体液中可溶形式 L1 而确定的。
4. 权利要求 3 的方法，其中所述体液是血清。
5. 权利要求 1-4 任一项的方法，其中 L1 水平是通过将患者样品与抗 L1 抗体或其片段接触，然后测定所述抗 L1 抗体或其片段是否结合 L1。
6. 权利要求 5 的方法，其是作为放射性免疫分析或 ELISA 进行的。
7. 权利要求 1-4 任一项的方法，其中所述 L1 水平是通过测定结合患者样品中（重组的）L1 的抗 L1 抗体或其片段的的存在情况而测定的。
8. 权利要求 1-4 任一项的方法，其中 L1 水平是通过测定体液中 L1 mRNA 的存在情况而测定的。
9. 权利要求 8 的方法，其中 L1 mRNA 的检测是通过 RT-PCR 进行的。
10. 一种药物制剂，其含有一种抗 L1 抗体或其片段。
11. 一种药物制剂，其含有一种衍生自 L1 或其片段的肽。
12. 一种药物制剂，其含有一种 L1 反义寡核苷酸。
13. 抗 L1 抗体或其片段在治疗卵巢或子宫内膜肿瘤的中的应用。

14. 衍生自 L1 或其片段的肽在治疗卵巢或子宫内膜肿瘤中的应用。
15. L1 反义寡核苷酸在治疗卵巢或子宫内膜肿瘤中的应用。
16. 一种在需要这种治疗的患者体内治疗卵巢或子宫内膜肿瘤的方法，所述方法包括为患者施用足量的缀合于胞毒剂的 L1 抗体或其片段。
17. 一种在需要这种治疗的患者体内治疗卵巢或子宫内膜肿瘤的方法，所述方法包括为患者施用足量的疫苗制剂形式的衍生自 L1 或其片段的蛋白质。
18. 一种在需要这种治疗的患者体内治疗卵巢或子宫内膜肿瘤的方法，所述方法包括为患者施用足量的 L1 反义寡核苷酸。

## 基于 L1 粘附分子的卵巢和子宫内膜肿瘤的诊断和治疗方法

本发明涉及一种诊断卵巢或子宫内膜肿瘤或判断其预后的方法，其特征在于在患者样品中测定 L1 水平，存在 L1 表示存在卵巢或子宫内膜肿瘤，或具有易患这种肿瘤的体质。这种检测优选是通过一种单克隆抗 L1 抗体或其片段产生的。本发明还涉及用于治疗卵巢和子宫内膜肿瘤的药物制剂。此外，本发明涉及一种治疗卵巢和子宫内膜肿瘤的方法。

特定肿瘤的诊断尤其是基于检测特异性肿瘤抗原 (TAG) 进行的，其可以发源于细胞质，细胞表面和细胞核。就此而论，在组织，个体和种属特异性 TAGs (其在细胞上也生理性呈递为不同的抗原)，与在称为肿瘤特异性新抗原的 TAGs 和作为一种类型的细胞在其肿瘤发生过程中的中间产物 (其在进一步分化中消失) 的 TAGs 之间产生差别。它们是通过免疫化学方法可检测的肿瘤标记，其中最为有用的是胞内抗原 (AG) 或在肿瘤细胞上形成的表面抗原 (逐渐增加的)。有诊断意义的是例如瘤胚抗原 ("OFA")，例如癌胚抗原 (在结肠癌的情况下)，SCC AG ("鳞状上皮细胞癌抗原")，甲胎蛋白 (在原发性肝细胞癌的情况下)，异铁蛋白和胎硫酸糖蛋白 (在胃癌和结肠癌的情况下)， $\alpha$ 2-H 铁蛋白 (在幼儿发生恶性肿瘤的情况中)， $\gamma$ -胎蛋白 (在肉瘤，白血病，乳腺癌的情况中)，及 "Tennessee AG" (tennagen)，"组织多肽抗原" (TPA)，瘤胚膜抗原 (OFMA)，肿瘤特异性移植抗原 (TSTA)，膜结合肿瘤抗原 (MATA) 以及次要的抗原如 "类 A" 抗原，"Forssman" 抗原，WGL 等。到目前为止诊断性使用的另一种肿瘤标记是 CA125 (高度糖基化的细胞粘液素，其主要是在肿瘤细胞中出现并释放)，这种标记目前已经用于诊断人体卵巢癌或子宫内膜癌，

例如通过测定CA125的血清水平,或在手术后将组织样品用抗CA125抗体进行免疫组织学染色进行诊断。然而,基于检测CA125的诊断具有许多严重缺点。例如,CA125血清水平提高也可以出现在许多良性疾病中,例如在子宫内膜感染,盆腔感染,肝硬化中,或在月经期或妊娠期。CA125水平提高也可以见于非产科恶性肿瘤的情况中,如乳腺癌,结肠直肠癌,胰腺癌,或肺癌中。因此,这可以导致假阳性的诊断。CA125还见于对结肠腺癌,胃癌,肺癌和不典型的子宫内膜增生进行免疫染色的情况中。针对早期检测卵巢或子宫内膜癌,测定CA125水平并结合超声不能产生任何令人满意的可靠的结果。因此,以其敏感性和特异性,CA125不适用于早期检测卵巢或子宫内膜癌,但更适合(如果可以的话)后期和复发阶段,然而,仍存在上述关于特异性的问题,即诊断上无法接受的假阳性发现。

因此,本发明是基于提供标记物的技术问题,所述标记物可以改良和更特异性诊断卵巢和子宫内膜癌,包括各种肿瘤类型之间的可能的差别,及检测癌转移的可能性,并因此改良治疗措施,例如外科手术措施。进一步的技术问题是通过将L1作为治疗靶,提供一种治疗措施。

通过权利要求书中定性的实施方案,可以解决这个技术问题。

令人惊奇地发现L1粘着分子在卵巢和子宫内膜癌患者的体液(例如血清、腹水和Douglas窝积液)和组织中表现为一种高度特异性标记,尤其是在这些高度浸润形式的肿瘤中。L1是一种200—230kDa的神经元粘着分子,其结构属于Ig超家族。L1是一种与细胞迁移相关的蛋白质,其在脑中参与神经元在小脑和神经纤维束中的迁移。L1具有一些结合配体,L1自身,蛋白多糖神经聚糖和各种整合素(Kadmon等, Differentiation 61: 143-150, 1997)。在本发明的筛选实验中,结果是L1在正常组织中不表达,除了周围神经和神

经节之外。在良性卵巢和子宫内膜肿瘤中，检测不到 L1 表达，而且筛选其它恶性肿瘤（乳腺癌，前列腺癌，宫颈癌）也是阴性的。示出 L1 在高度浸润的卵巢和子宫内膜的浆液性乳头状癌中表达。可溶的 L1 在肿瘤患者的血清和腹水或胸水中可以检测到，但在正常血清和体液中或在患有良性肿瘤的患者体内检测不到。患有子宫内膜的浆液性乳头状癌并累及卵巢的病人，其手术前通过产科刮除术获得的样品是阳性的。因此，L1 作为细胞表面分子在血清和体液中的表达，对早期检测浸润性卵巢和子宫内膜肿瘤是非常有意义的，对预后也是非常有意义的。因此，检测 L1 可以早期发现和准确诊断浸润性卵巢和子宫内膜肿瘤或用于判断其预后。

因此，本发明涉及一种诊断或预测卵巢或子宫内膜肿瘤的复发，特征在于确定患者样品中 L1 水平，存在 L1 表示存在卵巢或子宫内膜肿瘤或具有易患这种肿瘤的体质。

本领域技术人员已知获得患者样品的适当方法。L1 粘着分子可以通过常规方法检测，将已知的 L1 蛋白的氨基酸序列或相应基因的核酸序列作为根据 (Reid, R.A.等, 分子神经科学杂志 3: 127-135, 1992)。就此而论，所述检测可以涉及转录（通过常规方法检测 mRNA 浓度）或 L1 蛋白本身，后者是优选的。“L1 作为存在卵巢或子宫内膜肿瘤或易患这种肿瘤体质的指征”的含义，还包括其中 L1 浓度与对照物（例如健康人的体液或组织）相比较提高的情况。

在本发明方法的一个优选的实施方案中，L1 水平是通过测定组织中作为细胞表面分子的 L1 而确定的。从通过刮除术获得的肿瘤组织和细胞样品中取出适当的组织，优选组织是通过妇产科刮除术获得的。

在本发明方法的另一个实施方案中，L1 水平是通过测定体液中可溶形式 L1 而确定的。适当的体液是血清，腹水或胸水或 Douglas 窝积液，优选是血清。

另一个优选的实施方案不进行检测 L1，但利用（重组的）L1 检测 L1 特异性抗体。为此，将纯化的（重组的）L1 固定在微滴定平板的表面，然后用患者血清温育。然后通过酶缀合的二级抗体和呈色反应检测结合的抗体。

另一个实施方案检测体液样品中的 L1 的 mRNA，体液样品优选的是血清。

本领域技术人员已知检测 L1、L1 mRNA 和 L1 抗体的适当方法，及适当的特异性探针，通过特异性抗体检测 L1 蛋白是优选的，针对可溶形式和在细胞表面形式可使用相同抗体。

在本发明的一个特别优选的实施方案中，L1 水平是通过将患者样品与抗 L1 抗体或其片段接触，然后测定抗 L1 抗体或其片段是否已经结合 L1 而确定。对此可参阅图 6A-C。

在此，适当的抗体可以是单克隆，多克隆或合成抗体或其片段。就此而论，“片段”是指多克隆抗体的所有部分（例如 Fab-、Fv-或“单链 Fv”片段），其具有与完全抗体相同的表位特异性。本领域技术人员已知这种片段的产生。本发明的抗体优选是多克隆抗体。本发明的抗体可以根据标准方法制备，以 L1 的两种形式（可溶的/固定在细胞表面）呈递的 L1 或其合成片段，优选作为免疫原。生产这种多肽或肽及其片段，例如可以通过获得相应的基因，克隆并重组表达而进行。本领域技术人员已知获得单克隆抗体的方法。适于本发明诊断方法的抗 L1 抗体是可以商购的。这些抗体例如是初级人单克隆抗 L1 抗体 15551A (Pharmingen 公司, 美国圣地亚哥)或 MCA1753 (BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching, 德国)。

在本发明方法的一个更优选的实施方案中，L1 水平是通过一种初级单克隆抗 L1 抗体和一种可商购的二级生物素缀合的抗体抗体和链亲和素过氧化物酶而确定的。本领域技术人员熟知进行这种实施方案的方法。

在本发明方法的另一个优选实施方案中，所述患者样品是固定的，例如是石蜡切片。患者样品也可以是通过常规方法吸附于塑料平皿壁上，这样 L1 不丧失其结合特异性，例如与特异性抗体的结合特异性。

在本发明方法的另一个优选的实施方案中，所述抗 L1 抗体或其片段是固定的，即其吸附于例如塑料平皿壁上，而不丧失其与 L1 的结合特异性。

抗体的结合可以通过常规方法检测，例如 Western 印迹，ELISA，放射性免疫分析(RIA)等，RIA 和 ELISA 是优选的。

本发明的方法的上述优选实施方案之一是通过 RT-PCR 检测 L1 mRNA。已经发现，通过 L1 的外显子 27 可区分人 L1 的不同亚型(即造血系统 L1 和神经系统 L1)。造血系统 L1 不表达外显子 27(Ebeling 等, Eur J Immunol 26: 2508-2516, 1996)。此外显子编码 L1 胞浆末端的 4 个氨基酸。使用针对 L1 此区域的特异性引物，通过 RT-PCR 发现卵巢肿瘤(细胞系和肿瘤标本)表达神经系统形式的 L1，其特征为具有 12 个核苷酸的插入(图 4)。使用相同的引物还发现在肿瘤病人的血清中可以检测到 L1 特异性的 mRNA。通过 RT-PCR 检测肿瘤衍生的 mRNA 是用 ELISA 检测蛋白以外的一种灵敏的诊断技术。

基于本发明，生产了一种用于本发明诊断方法的试剂盒，并优选含有抗 L1 抗体或其片段，及 L1 或其结合活性部分作为对照。“结合活性部分”是指一种与所述抗体反应的片段，所述抗体最好是完整分子与其反应的抗体。根据试剂盒的生产，所述抗体可以缀合于另一种单位，例如一种标记，和/或其可以固定于一种固体载体(底物)上。所述试剂盒还可以含有一种二级抗体，以检测 L1/抗体复合物。所述抗体或其片段可以以游离形式存在或固定于固体载体上，例如固定于塑料平皿，试管，微滴定平板，试条上。所述试剂盒还

可以含有阐述抗体或其片段在检测易患肿瘤的体质或肿瘤存在情况的分析中的使用说明书。所述试剂盒还可以含有检测标记的适当试剂，或标记阳性和阴性对照物的试剂，冲洗溶液，稀释缓冲液等。

在通过上述抗 L1 抗体或其片段诊断性检测卵巢或子宫内膜肿瘤阳性的情况中，可以根据已知方法通过致敏的肿瘤特异性 T 淋巴细胞进行免疫治疗，使用这些抗体或其片段，或使用衍生自 L1（在已知氨基酸序列的基础上）并优选长度为至少 9—12 个氨基酸的肽进行致敏。另外，也可以使用抗 L1 的抗体，目的是使用 L1 作为肿瘤特异性靶抗原。

因此，本发明还涉及一种药物制剂，其含有一种抗 L1 抗体或其片段或衍生自 L1 的肽，或一种 L1 的反义寡核苷酸。

所述抗体优选是单克隆抗体。在一个特别优选的实施方案中，所述单克隆抗体是一种源自动物（例如小鼠）的抗体，一种人化的抗体或一种嵌合抗体或其片段。类似人抗体或人化抗体的嵌合抗体的潜在抗原性降低，然而，其对靶细胞的亲和性未降低。嵌合和人化抗体及类似人抗体的抗体的产生分别见于 Queen 等，美国科学院报 86 (1989), 10029, 和 Verhoeyan 等，科学 239 (1988), 1534)所述。人源化的免疫球蛋白具有可变的框架区，其基本源自人免疫球蛋白（称为受体免疫球蛋白），和互补决定区，其基本源自非人免疫球蛋白（例如小鼠）（称为供体免疫球蛋白）。如果存在恒定区，其也基本源自人免疫球蛋白。当施用于人类患者时，人源化的（和人的）抗体比小鼠或其它种属抗体具有许多有利之处：(a)人免疫系统应不认为人化抗体的恒定区是外源的，因此对抗这种注入的抗体的所述抗体应答，应小于对抗完全外源小鼠抗体或部分外源嵌合抗体的应答；(b)由于人化抗体的效应器区域是人，其与人免疫系统的其它部分的相互作用更好；及(c)注入的人化抗体的半衰期基本等于天然发生的人抗体的半衰期，这样与其它种属抗体相比可以较少量和较低

频率施用。

在一个优选的实施方案中，抗 L1 单克隆抗体标记了  $^{125}\text{I}$ ，以用于显像和腹腔内或静脉内注射，如 VanZanten-Przybysz, I. (Int J Cancer 92: 106-114, 2001) 所述。稳定结合了细胞毒性药物的抗 L1 单克隆抗体可以用于注射，以杀灭肿瘤细胞。这种细胞毒性药物例如是放射性核素，毒性蛋白（例如皂草素），化疗剂或具有其它特异性的抗体（例如抗 T 细胞抗体，例如 CD3），以形成双重功能的抗体，其通过胞毒性 T 细胞杀灭肿瘤细胞。

在另一个优选的实施方案中，卵巢或子宫内膜肿瘤过量表达的 L1 可用来引导细胞毒性 T 淋巴细胞，以在原位杀灭肿瘤细胞。

A) 可将 L1 序列衍生的肽接种到肿瘤病人。优选地，使用一种混合物，所述混合物包括一种乳剂，其包括 HLA-A1 (ATEGWFIGF 和 GSDDSLADY)、HLA-A 2 (LLANAYIYV 和 WLDEDGTTV) 和 HLA-A 3 (VLTGYVLSY) 限制的 L1 肽和 G-CSF，以及 Montanide ISA-51 佐剂 (Seppic, Fairfield, NJ, USA)。病人接种的疫苗包含 5 种 L1 肽（每种 50-200 微克，优选为 100 微克）和 150-200 微克（优选 190 微克）的 HLA-DR 限制性的破伤风辅助肽 AQYIKANSKFIGITEL。该肽是破伤风毒素的 p2 肽（830-844 残基）加上一个氨基端的丙氨酸以防止 N 端的谷氨酸残基形成焦谷氨酸。破伤风 p2 肽是一种混杂的 HLA-DR 分子的结合物。疫苗与 150-200 毫克（优选 225 毫克）GM-CSF 和 Montanide ISA-51 佐剂一同施用。病人优选地在第 0、7、14、28、35 和 42 天进行免疫共 6 次，如 Yamshchikov 等 (Int J Cancer 92: 703 (2001)) 所述。各个病人的时间表、剂量和免疫次数可由医生依据肿瘤的种类、肿瘤的生长速度、有无转移以及病人的数据（如体重、身高等）等来决定。

B) 衍生自病人的树突状细胞可以用上述 L1 肽进行激活，如 Lau 等 (J Immunother 24: 66-78 (2001)) 所述。树突状细胞优选地由来

自肿瘤病人的、具有塑料粘附性的外周血单个核细胞，与 IL-4 和 GM-CSF 在无血清培养基中共同孵育 8 天而获得。此树突状细胞再经 L1 肽（每种 50 微克/毫升）过夜激活，然后用于（静脉）输注。

在进一步优选的实施方案中，卵巢或子宫内膜肿瘤过量表达的 L1 可以用 L1 反义寡核苷酸治疗。鉴于迁移是肿瘤细胞播散的前提条件，因此应当清除肿瘤细胞内的 L1。这可通过现有的反义技术而实现。可用 L1 反义寡核苷酸来下调肿瘤细胞的 L1 的表达。其优选地对应于序列 AGGCTGTCGTCACTGCCCA 并是人类 L1 序列 +3593/3611 核苷酸的反转互补。硫代磷酸寡聚核苷酸优选地注射入病人的腹腔，剂量为 1-12 毫克/公斤，以使寡核苷酸达到足够高的浓度。各个病人的时间表、剂量和免疫次数可由医生依据肿瘤的种类、肿瘤的生长速度、有无转移以及病人的数据（如体重、身高等）等来决定。

## 附图简述

图 1

A: 子宫内膜卵巢腺癌由管状腺组成，并由分泌非粘液素的复层上皮分界。用抗 L1 抗体进行免疫组织化学染色示出强异质性膜染色。

B: 卵巢浆液性癌示出乳头状和隙状外形，在基质中具有实体瘤块。用抗 L1 染色示出强阳性免疫组织化学染色。

C: 具有散布的肿瘤腺和结缔组织生成反应的网膜。通过抗 L1 抗体示出肿瘤细胞的强同源免疫染色。

D: 由卵巢癌细胞浸润的阑尾壁。通过抗 L1 抗体对肿瘤细胞的强同源染色。正常粘膜腺和淋巴组织无染色。小末梢神经束示出强阳性染色。

E: 阴道壁示出在固有层中的小肿瘤块，及在扩张的淋巴组织中

的小瘤栓。用抗 L1 免疫染色示出强同源染色。

F: 在子宫肌膜的淋巴组织中卵巢癌栓, 示出通过抗 L1 对肿瘤细胞的异质性染色。

图 2: 从刮宫物中检测 L1

A: 从刮宫术获得的组织

B: 来自卵巢腺瘤的对照切片

图 3: 通过 ELISA 检测体液(1F-14F)和血清(1S-32S)中可溶的 L1。样品 4F, 5F, 8F, 12F 和 23F 源自女性卵巢癌患者。

图 4: PCR 外显子 27 经 PCR 分析后的 1%琼脂糖凝胶

分离来自卵巢肿瘤标本或已知细胞系 (AR、OAW、Me163) 的 mRNA 并转录成 cDNA。以该 cDNA 作为模板对外显子 27 进行 PCR 分析。使用编码两种形式的质粒作为对照 (-RSLE/+RSLE)。

图 5: 比较两种不同的 ELISA 形式

A: 如实施例 2 所示, 微滴定板以 L1 单克隆抗体 1 包被, 继之以 3%的 BSA/TBS 封闭, 并与病人的血清一同孵育。所结合的可溶性 L1 用生物素化的 L1 单克隆抗体检测, 继而用链霉抗生物素蛋白-过氧化物酶检测。这种 ELISA 形式可检测二聚体 (多聚体) 和单体的 L1。

B: 与 A 中所述过程相似, 但可溶性 L1 用 L1 单克隆抗体 1 继而用链霉抗生物素蛋白-过氧化物酶检测。该 ELISA 形式仅可检测二聚体 (多聚体) 的 L1。

图 6: A: 卵巢肿瘤标本经裂解后使用抗 L1 胞浆部分的抗体, 通过 SDS-PAGE 和 Western 印迹分析

B: 肿瘤病人的血清以偶联了琼脂糖的 L1 抗体进行免疫沉淀, 经 SDS-PAGE 分离, 用相同的抗 L1 抗体进行 Western 印迹分析

C: 用 ELISA 分析肿瘤病人和正常个体的血清中的可溶性 L1。括号内为各组的病人编号。

以下实施例阐述了本发明：

实施例 1：对刮宫组织的检测示出 L1 表达分别与肿瘤的临床发展进程和病理程度之间的高度相关。

根据标准方法将肿瘤组织包埋于石蜡中，并制作系列切片。在存在 1mmol EDTA(pH 8.0)的情况下，在微波炉中处理切片（10 分钟，92° C）之后，利用 MCA1753 抗体(Biozol Diagnostica Vertiebs GmbH)进行组织免疫染色。利用酶偶联的二级抗体检测结合的初级抗体（载体 ABC 试剂盒；[www.vectorlabs.com](http://www.vectorlabs.com)）。一些染色实例示于图 1。临床数据示于表 1A 和 1B。

图 2 示出 L1 也可以利用刮宫组织检测。使用上述方法，得到与肿瘤切片相似的染色模式。利用刮宫物测定 L1 可以在表 1A 和 1B 的含义内在手术前对肿瘤早期分类。

实施例 2：ELISA 示出在肿瘤患者的血清和腹水中存在 L1，观测到 L1 的存在与肿瘤类型（卵巢和子宫内膜肿瘤）之间的相关性。

使用“捕获”ELISA 测试体液（腹水，血清）样品中可溶的 L1 的存在情况。为此，将微滴定平板用实施例 1 中所述人抗 L1 抗体包被（浓度：1ug/ml），然后用 PBS 中 3% BSA 进行封闭步骤（45 分钟，室温），以消除与平板的非特异性结合。将所述体液以不同浓度加入（体液与含 3% BSA 的 PBS 的比值为 1:2 和 1:10），及在室温进行温育 1 小时。因此，随后在 Tris 缓冲的盐溶液（TBS，pH8.0，存在 0.02% Tween-20）中进行 4 次冲洗。通过加入人生物素缀合的抗 L1 抗体测定结合的可溶的 L1。为此，将生物素化抗体 MCA1753 加入微滴定平板中 1 小时。随后进行上述 4 次冲洗步骤。用过氧化物酶缀合的链霉抗生物素蛋白(Dianova Hamburg, 德国)在室温另外温育 1 小时。最后，进行 4 次冲洗。

之后，将底物溶液加入微滴定平板中，在出现显色反应之上，

在 ELISA 读数器上评价结果。结果示于图 3。

### 实施例 3: 检测可溶性 L1 的一种新 ELISA 形式

实施例 2 中所述的 ELISA 使用的是用 L1 mAb 1 (捕获单克隆抗体) 包被微滴定平板, 及用生物素化的 (或其它标记的) L1 mAb 2 (检测单克隆抗体) 检测可溶的 L1。这种类型的 ELISA 称为 G/K 形式。我们已经研制了另一种形式的 ELISA, 其中我们使用这两种抗体捕获和检测 L1 的相同 mAb (K/K 形式)。在图 5A 和 5B 中, 示出使用阳性血清 (CA526, 卵巢肿瘤患者) 和一些得自不相关肿瘤的对照血清进行的这两种类型的 ELISA 对比。观测到图 5B 中新 ELISA 形式与图 5A 所示先前形式相比, 提供了较好的信号/噪音比 (约 5—8 倍)。因为只有当用于捕获的抗体未被封闭时才能进行 K/K 形式, 因此这些结果意味着在血清样品中, 可溶的 L1 是二聚体或多聚体。用单体和二聚体 L1 (L1-Fc 融合蛋白是二聚体) 进行的这两种 ELISA 的对照数据 (图 5 所示) 支持这个观点。

### 实施例 4: 在肿瘤样品中检测 L1 mRNA 的 PCR 分析

进行 PCR 分析的引物序列推导自人 L1 cDNA 序列 (EMBL, 登记号 M 74387)。为检测肿瘤组织或患者血清样品中编码 L1 的人 mRNA, 使用商购的试剂盒 (Roche Molecular Biochemicals) 分离 mRNA, 并转录至 cDNA 中。一种嵌套式 PCR 使用以下引物组合进行: 第一次, 扩增引物 1: ACTGAGGGCTGGTTCATC (有义), 引物 2: CTTGCACTGTACTGGCCA (反义) (45 秒, 94° C, 循环一次; 1 分钟, 94° C, 1 分钟, 56° C, 1 分钟, 72° C, 循环 30 次)。针对第二次 PCR, 使用 1ul 的第一次 PCR 反应物, 使用引物 1: ACTCAGTGAAGGATAAGGAG (有义), 引物 2: TTGAGCGATGGCTGCTGCT。在另一个方案中, 使用以下引物: 引物 1: AGGTCCCTGGAGAGTG (有义); 引物 2: TTGAGCGATGGCTGCTGCT (反义)。PCR 反应温度如上述, PCR

---

产物优选在含有 0.5ug/ml 溴化乙锭的 2%琼脂糖凝胶上分离。或者，将所述凝胶用标记的 L1 寡核苷酸探针 (TCTGAGGCCCGACCGATGAAAGATGAGACCTTC)通过 southern 印迹进行印迹及杂交以提高敏感性。

表 1: 卵巢癌

病例序号	组织学类型	组织学分级	浆膜表面种植	网膜种植	远处转移	临床分期	随诊 (月)	复发	转归	LI 染色
1	浆液性	中-差	+	+	-	IIIc	9		AWD	+
2	浆液性	差	+	+	肺、乳腺	IIIc/IV	1		DOD	+
3	浆液性	中-差	+	+	脑	IV	24	+	DOD	+
4	浆液性	中-差	-	+	-	IIIc	36	+	DOD	+
5	浆液性	中-差	+	+	-	IIIc	26	+	DOD	+
6	浆液性	中-差	-	+	-	IIIc/IV	35	+	DOD	+
7	浆液性	中-差	+	+	-	IIIc	22	+	DOD	+
8	浆液性	良	+	-	-	Ic	22	-	NED	-
10	浆液性	差	-	+	-	IIIc	62	+	DOD	+
11	浆液性	差	+	+	肺、肝脏	IIIc/IV	18	+	DOD	+
13	浆液性	差	-	-	-	Ic	77	-	NED	-
14	浆液性	差	+	-	肝脏	IIIc	5	-	AWD	+
15	浆液性	差	+	-	-	IIIc	11	-	AWD	+
16	浆液性	差	+	-	-	IIIc	11	-	AWD	+
24	浆液性	中	+	-	-	III	11	不详	AWD	+
24	浆液性	中	+	-	肺	IV	21	+	AWD	+
17	子宫内膜样	中	-	-	-	Ic	20	-	NED	-
18	子宫内膜样	中	-	-	-	Ic	54	-	NED	-
19	子宫内膜样	差	-	-	-	Ic	55	-	NED	-
20	子宫内膜样	差	-	-	-	Ic	26	-	NED	-
21	子宫内膜样	中	-	-	-	Ic	45	-	NED	-
22	子宫内膜样	中	-	-	-	Ia	38	-	NED	-
23	子宫内膜样	差	-	-	-	Ib	6	-	NED	-
25	子宫内膜样	中	+	+	-	IIIc	6	-	AWD	+
26	子宫内膜样	中	+	+	-	IIIc	35	不详	DOD	+
27	子宫内膜样	差	-	-	肝脏	IIIc	12	-	DOD	+
28	子宫内膜样	中	-	-	阴道	IIIc	20	+	AWD	+
29	子宫内膜样	差	+	+	肺	IV	17	-	DOD	+
30	子宫内膜样	差	+	+	-	IIIc	6	+	AWD	+
31	子宫内膜样	中-差	+	+	肺	IV	6	+	AWD	+
32	子宫内膜样	中	+	+	-	IIIc	35	不详	NED	+

AWD: 带病生存 DOD: 死于疾病 NED: 无疾病迹象

表 2: 子宫癌

病例序号	组织学类型	组织学分级	浆膜表面和网膜种植		累及附件	临床分期	随诊(月)	复发	转归	刮除术	L1染色	
			+	-							子宫内膜	卵巢
1	子宫内膜样	差	+	+	+	IIC	?	+	DOD	ND	+	+
2	子宫内膜样	中	+	+	+	IV	21	+	DOD	ND	+	+
3	浆液性	差	+	+	+	IIIC		不详		+	+	+
4	浆液性	差	+	+	+	III		不详		+	+	+
5	浆液性	中	+	+	+	*		不详		ND	+	+
6	浆液性	差	+	+	+	*		不详		+	+	+
7	浆液性	差	+	+	+	IV	10	+	DOD	ND	+	+
8	浆液性	差	+	+	+	IV	5	+	DOD	+	+	+
9	浆液性	差	+	+	+	IIIC	26	+	DOD	ND	+	+
10	浆液性	中-差	+	+	+	IIIC	22	+	DOD	ND	+	+
11	浆液性	差	-	-	-	Ib	6	-	NED	-	-	-
12	浆液性	中-差	-	-	-	Ic	28	-	NED	-	-	-

\* 仅有 2 例高度进展期的子宫内膜样型子宫癌并伴有附件累及, 如表 2 所示。这些肿瘤的子宫内膜和卵巢的 L1 均为阳性, 病人的预后差。此外, 所有 38 例低临床分期的子宫内膜样型肿瘤的 L1 均为阴性, 且病人预后良好(随诊 8-54 个月)。

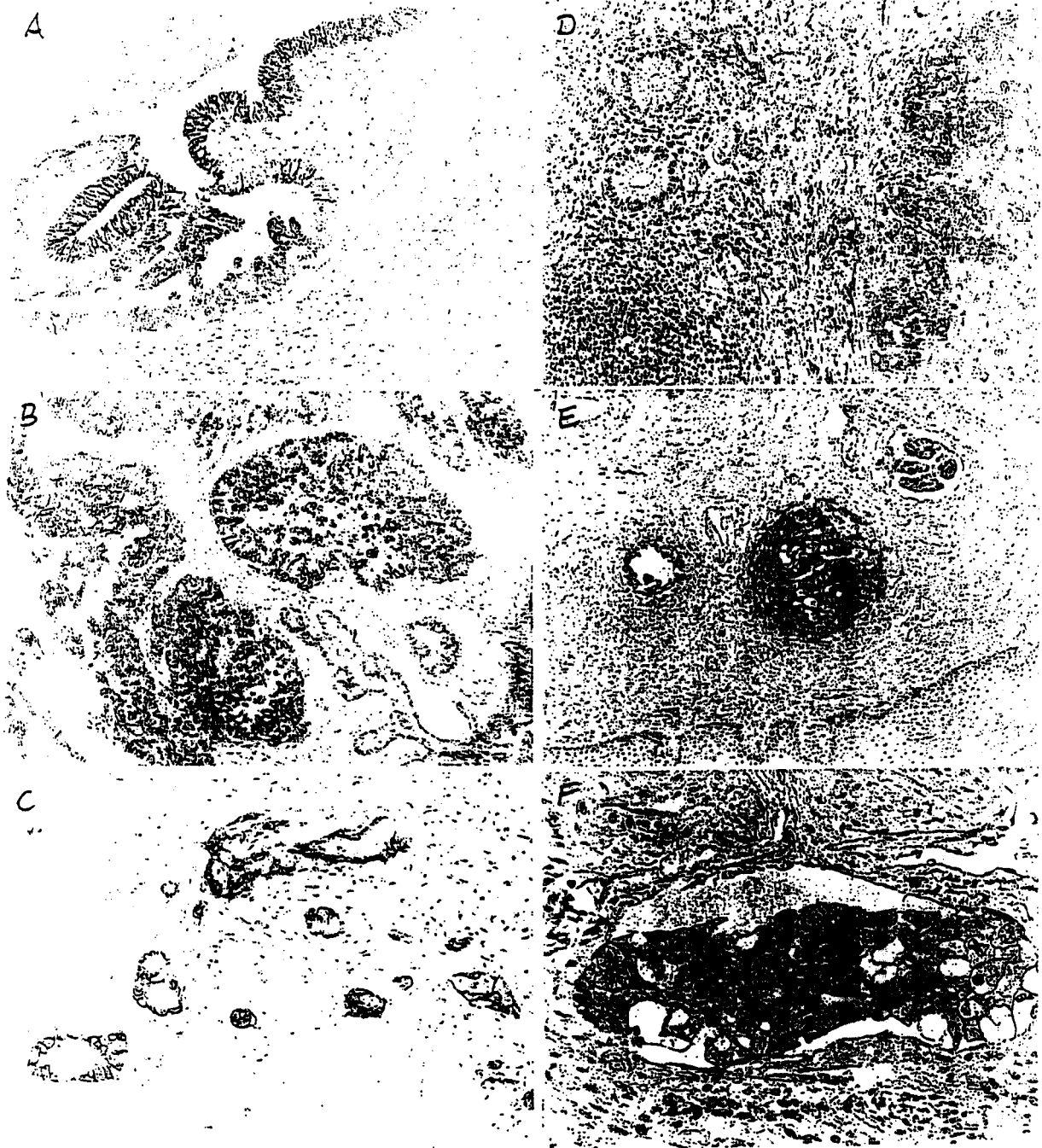


图1

A. 子宫内膜卵巢腺癌由管状腺组成，并由分泌非粘液素的复层上皮分界。用抗L1抗体进行免疫组织化学染色示出强异质性膜染色。B. 卵巢浆液性癌示出乳头状和隙状外形，在基质中具有实体瘤块。用抗L1染色示出强阳性免疫组织化学染色。C. 具有散布的肿瘤腺和结缔组织生成反应的网膜。通过抗L1抗体示出肿瘤细胞的强同源免疫染色。D. 由卵巢癌细胞浸润的阑尾壁。通过抗L1抗体对肿瘤细胞的强同源染色。正常粘膜腺和淋巴组织无染色。小末梢神经束示出强阳性染色。E. 阴道壁示出在固有层中的小肿瘤块，及在扩张的淋巴组织中的小瘤栓。用抗L1免疫染色示出强同源染色。F. 在子宫肌膜的淋巴组织中卵巢癌栓，示出通过抗L1对肿瘤细胞的异质性染色。

图2A

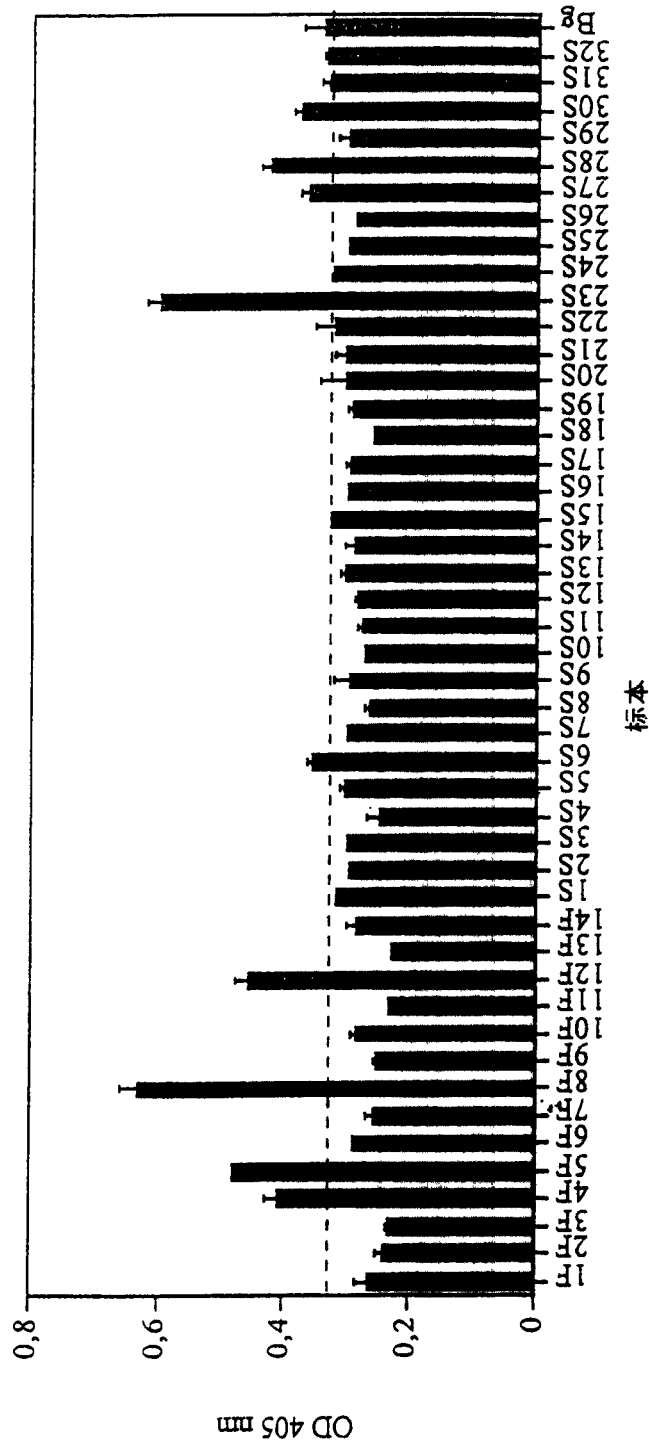


图2B



图3

通过ELISA检测体液（1F-14F）和血清（1S-32S）中可溶的L1。



样品4F, 5F, 8F, 12F和23S源自女性卵巢癌患者。

图4



分离来自卵巢肿瘤标本或已知细胞系 (AR、OAW、Me163) 的mRNA并转录成cDNA。

以该cDNA作为模板对外显子27进行PCR分析。使用编码两种形式的质粒作为对照 (-RSLE/+RSLE)

图5A

捕获: L1单克隆抗体1  
检测: L1单克隆抗体2

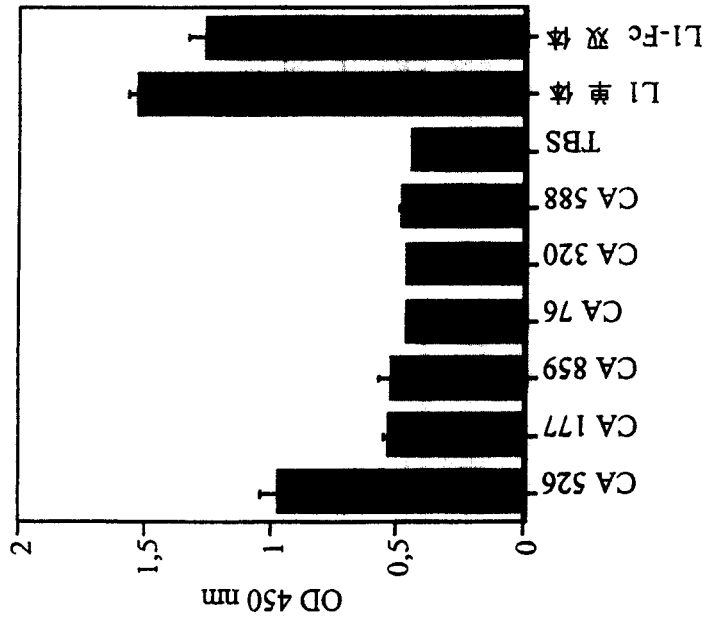
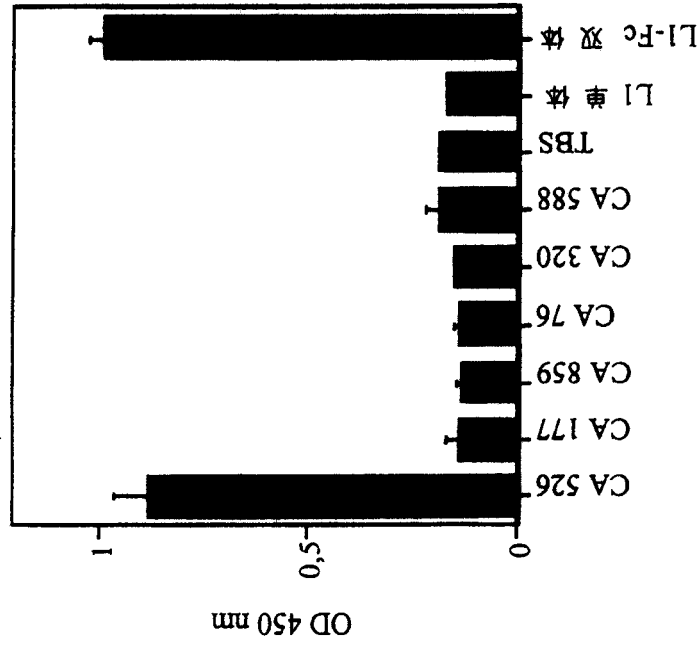


图5B

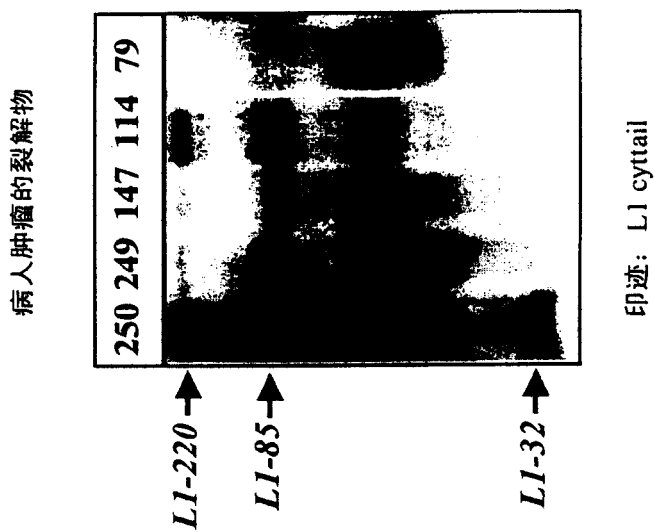
捕获: L1单克隆抗体1  
检测: L1单克隆抗体1



A: 微滴定板以L1单克隆抗体1包被, 继之以3%的BSA/TBS封闭, 并与病人的血清一同孵育。所结合的可溶性L1用生物素化的L1单克隆抗体2检测, 继而用抗生物素蛋白链霉素-过氧化酶检测。注意这种ELISA形式可检测双体(多体)和单体的L1。

B: 与A中所述过程相似, 但可溶性L1用L1单克隆抗体1检测, 继而用抗生物素蛋白链霉素-过氧化酶检测。注意该ELISA形式仅可检测双体(多体)的L1。

图6A



A: 卵巢肿瘤标本经裂解后使用抗L1胞浆部分的抗体, 通过SDS-PAGE和Western印迹分析

图6B

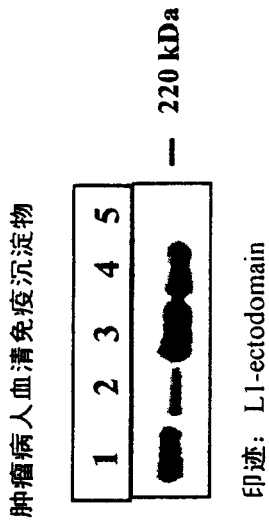
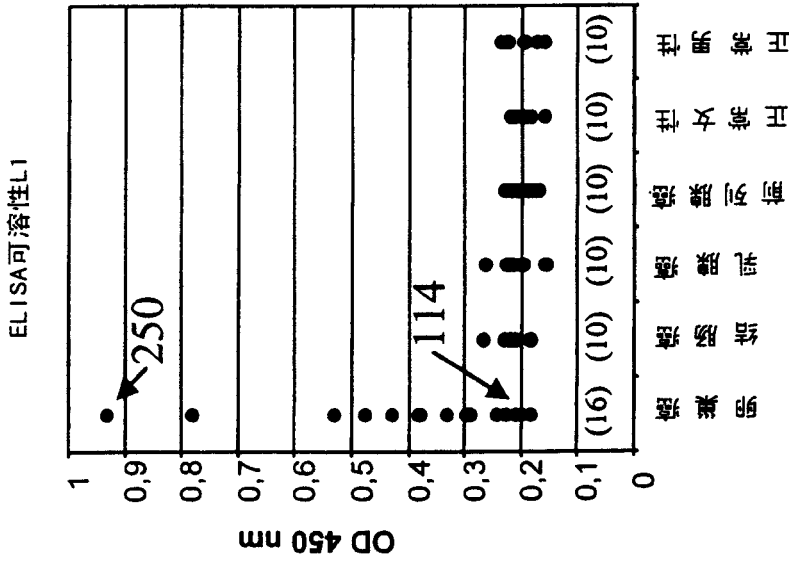


图6C



B: 肿瘤病人的血清以偶联了琼质糖的L1抗体进行免疫沉淀, 经SDS-PAGE分离, 用相同的抗L1抗体进行Western印迹分析

C: 用ELISA分析肿瘤病人和正常个体的血清中的可溶性L1。括号内为各组的病人编号。

专利名称(译)	基于L1粘附分子的卵巢和子宫内膜肿瘤的诊断和治疗方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN1479871A</a>	公开(公告)日	2004-03-03
申请号	CN01812534.4	申请日	2001-07-10
[标]申请(专利权)人(译)	德国公共权利基金会癌症研究中心 摩尔研究应用有限公司		
申请(专利权)人(译)	德国公共权利基金会癌症研究中心 摩尔研究应用有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	德国公共权利基金会癌症研究中心 摩尔研究应用有限公司		
[标]发明人	彼得阿尔特福格特 米纳福格尔		
发明人	彼得·阿尔特福格特 米纳·福格尔		
IPC分类号	G01N33/53 A61K31/7088 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P35/00 C12N15/09 C12Q1/68 G01N33/566 G01N33/574 G01N33/68 A61K38/17 G01N33/577 A61K47/48		
CPC分类号	G01N33/57442 G01N2333/70503 G01N2333/70596 G01N33/57449		
代理人(译)	林晓红		
优先权	2000114788 2000-07-10 EP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

一种诊断卵巢或子宫内膜肿瘤或判断其预后的方法，特征在于在患者样品中测定L1水平，优选通过抗L1抗体测定，存在L1则表示存在卵巢或子宫内膜肿瘤或具有易患这种肿瘤的体质。另外，还提供了治疗卵巢或子宫内膜肿瘤的方法。

