

[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl⁶



[12] 发明专利申请公开说明书

A61K 39/395

A61K 51/10 C07K 16/00

C07K 16/30 C12N 15/01

C12P 21/08 G01N 33/574

[21] 申请号 94194907.9

[43]公开日 1997年2月12日

[11] 公开号 CN 1142775A

[22]申请日 94.12.5

[30]优先权

[32]93.12.8 [33]US[31]08/162,912

[86]国际申请 PCT/US94/13668 94.12.5

[87]国际公布 WO95/15769 英 95.6.15

[85]进入国家阶段日期 96.7.29

[71]申请人 免疫医学股份有限公司

地址 美国新泽西州

[72]发明人 H·J·汉森 伦水恩 J·谢文茨

G·L·格里菲思 S·V·戈文丹

[74]专利代理机构 上海专利商标事务所

代理人 章鸣玉

权利要求书 5 页 说明书 43 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 免疫结合物的制备和使用

[57]摘要

本发明涉及含抗体片断的结合物；该抗体片断通过轻链可变区约 18 位的碳水化合物部分共价结合于诊断或治疗剂。本发明还涉及含在轻链可变区约 18 位上有糖基化部位的完整抗体的免疫结合物，该轻链可变区是通过编码该轻链的核苷酸序列的诱变引入抗体的。得到的免疫结合物保留抗体片断或完整抗体的免疫反应性，将诊断或治疗剂导向靶组织。因此，本发明注重这种免疫结合物的诊断和免疫治疗应用。本发明还涉及这种免疫结合物的制备方法。

(BJ)第 1456 号

权 利 要 求 书

1. 突变重组抗体或抗体片断,在所述抗体或抗体片断的轻链约 18 位上具有非天然 Asn 糖基化位点。

2. 按权利要求 1 所述的抗体片断,其中所述抗体片断选自 Fab、Fab'、F(ab)₂、F(ab')₂、Fv 和单链 Fv。

3. 制备糖基化突变重组抗体或抗体片断的方法,其特征在于包括以下步骤:

(a) 培养表达和糖基化含一突变轻链和一重链的突变抗体或抗体片断的转化宿主细胞,所述宿主细胞以一表达载体进行了转化,表达载体中克隆进了编码约在 18 位氨基酸上含非天然 Asn 糖基化位点的突变轻链的突变 DNA 分子;

(b) 从所述培养的宿主细胞回收表达和糖基化的突变抗体或抗体片断。

4. 一种可溶性免疫结合物,包含:

(a) 糖基化的抗体片断,该抗体片断选自 Fab、Fab'、F(ab)₂、F(ab')₂、Fv 和单链 Fv,该抗体片断包括轻链可变区和所述轻链可变区约 18 位氨基酸上结合的碳水化合物部分;

(b) 负载的载体,包含具有至少一个游离氨基的聚合物载体和共价结合于聚合物载体的多种药物、毒素、螯合剂、硼附加物或可检测的标记分子,

其中所述负载的载体通过所述聚合物载体的所述至少一个游离氨基与所述抗体片断的所述碳水化合物部分共价结合,

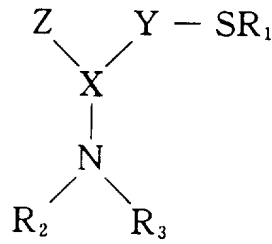
其中所述免疫结合物保持所述抗体片断的免疫反应性。

5. 按权利要求 4 所述的可溶性免疫结合物,其中所述抗体片断是在所述抗体片断的约 18 位氨基酸上具有非天然 Asn 糖基化位点的突变抗体片断。

6. 按权利要求 4 所述的可溶性免疫结合物,其中所述聚合物载体选自氨基葡聚糖、至少 50 个氨基酸长度的多肽和聚酰胺基胺树枝状体。

7. 按权利要求 4 所述的可溶性免疫结合物,其中所述可检测的标记分子选自⁹⁰Y、¹⁸⁶Re 和 Gd^{III}、抗生物素、抗生物素蛋白链菌素和生物素。

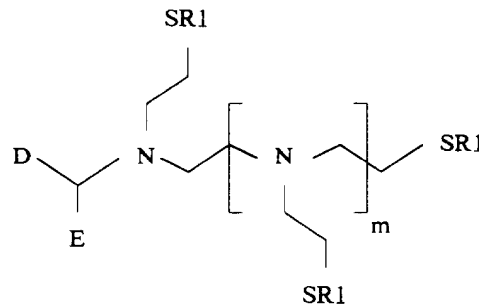
8. 按权利要求 4 所述的可溶性免疫结合物,其中所述螯合剂选自 1,4,7,10-四氮杂环十二烷四乙酸和式(I)所示化合物:



(I)

其中, X 为 CH, 或 X 和 Z 连在一起可为 CO; Y 为 CR_4R_5 、 $\text{CH}_2\text{CR}_4\text{R}_5$ 或 $(\text{CH}_2)_2\text{CR}_4\text{R}_5$, 其中 R_4 和 R_5 相同或不同, 选自氢、烷基、取代烷基、芳基或取代芳基; Z 可为能与所述抗体片断的所述碳水化合物部分反应的任何基团, 或 Z 可为 H; R_1 为在不明显降低所述蛋白质免疫反应性的条件下可除去的巯基保护基团; R_2 和 R_3 可以相同或不同, 各代表酰基或取代酰基, 或氢, 烷基, 芳基, 取代烷基, 或取代芳基, 其中烷基或芳基上的取代基是选自巯基、胺或羧酸或其保护衍生物的金属络合物形成基; R_2 和 R_3 也可以是能与所述抗体片断的所述碳水化合物部分反应的任何基团, 或

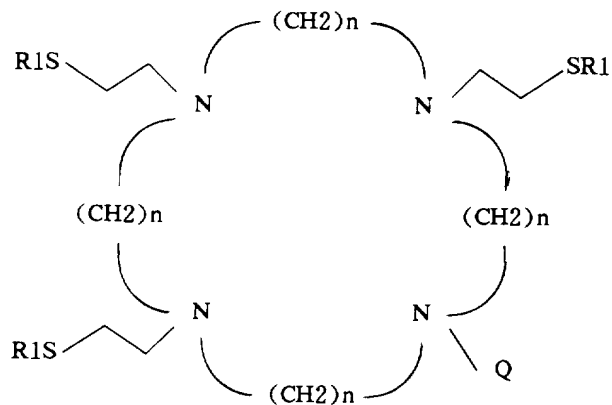
式(II)所述化合物:



(II)

其中, D 为 H 或 CH_2SR_1 ; E 可为能与所述抗体片断的所述碳水化合物部分反应的任何基团, R_1 为在不明显降低蛋白质免疫反应性的条件下可除去的巯基保护基团; m 为 0、1、2 或 3,

或式(III)所示化合物:



(III)

其中, Q 可为能与所述抗体片断的所述碳水化合物部分反应的任何基团; R_1 为在不明显降低蛋白质免疫反应性的条件下可除去的巯基保护基; 每个 n 各自为 2 或 3。

9. 按权利要求 4 所述的可溶性免疫结合物, 其中所述螯合剂经选自氨基硫脲和酰肼组成的化合物的酸不稳定性连结物而共价结合于所述聚合物载体。

10. 制备免疫结合物的方法, 其特征在于: 将负载的载体共价结合于抗体片断的碳水化合物部分,

其中所述抗体片断选自 Fab、Fab'、 $F(ab)_2$ 、 $F(ab')_2$ 、Fv 和单链 Fv, 其中所述抗体片断在所述抗体片断的轻链上在约 18 位氨基酸上含有碳水化合物部分,

其中所述负载的载体包括具有至少一个游离氨基的聚合物载体和共价结合于聚合物载体的多重药物、毒素、螯合剂、硼附加物或可检测的标记分子,

其中所述负载的载体通过所述聚合物载体的所述至少一个游离氨基与所述抗体片断的所述碳水化合物部分共价结合,

其中所述免疫结合物保留所述抗体片断的免疫反应性。

11. 一种可溶性免疫结合物, 包含:

(a) 糖基化的抗体片断, 该抗体片断选自 Fab、Fab'、 $F(ab)_2$ 、 $F(ab')_2$ 、Fv 和单链 Fv, 该抗体片断包括轻链可变区, 所述轻链可变区约 18 位氨基酸上结合有碳水化合物部分;

(b) 至少一个非抗体部分, 该非抗体部分选自药物、毒素、螯合剂、聚乙二醇、硼附加物和可检测的标记分子,

其中每个所述非抗体部分共价结合于所述抗体部分的所述碳水化合物部分,

其中所述免疫结合物保持所述抗体片断的免疫反应性。

12. 按权利要求 11 所述的可溶性免疫结合物, 其中所述抗体片断是在所述抗体片断的约 18 位氨基酸上含非天然 Asn 糖基化位点的突变抗体片断。

13. 按权利要求 11 所述的可溶性免疫结合物, 其中所述可检测的标记分子选自 ^{90}Y 、 ^{186}Re 和 Gd^{III} 、抗生物素、抗生物素蛋白链菌素和生物素。

14. 按权利要求 11 所述的可溶性免疫结合物, 其中所述螯合剂选自 1,4,7,10-四氮杂环十二烷四乙酸和式(I)所示化合物:

其中, Q 可为能与所述抗体片断的所述碳水化合物部分反应的任何基团; R_1 为在不明显降低蛋白质免疫反应性的条件下可除去的巯基保护基; 每个 n 各自为 2 或 3。

15. 按权利要求 11 所述的可溶性免疫结合物, 其中所述螯合剂经选自氨基硫脲和酰肼组成的化合物的酸不稳定性连结物而共价结合于所述聚合物载体。

16. 制备免疫结合物的方法, 其特征在于: 将非抗体部分共价结合于抗体片断的碳水化合物部分,

其中所述抗体片断选自 Fab、Fab'、F(ab)₂、F(ab')₂、Fv 和单链 Fv,

其中所述抗体片断在所述抗体片断的轻链上在约 18 位氨基酸上含有碳水化合物部分,

其中所述非抗体部分选自药物、毒素、螯合剂、聚乙二醇、硼附加物和可检测的标记分子,

其中所述免疫结合物保留所述抗体片断的免疫反应性。

17. 制备免疫结合物的方法, 其特征在于: 将非抗体部分共价结合于抗体片断的碳水化合物部分,

其中所述抗体片断选自 Fab、Fab'、F(ab)₂、F(ab')₂、Fv 和单链 Fv,

其中所述抗体片断在所述抗体片断的轻链上在约 18 位氨基酸上含有碳水化合物部分,

其中所述非抗体部分选自药物、毒素、螯合剂、聚乙二醇、硼附加物和可检测的标记分子,

其中所述免疫结合物保留所述抗体片断的免疫反应性。

18. 用于诊断哺乳动物疾病存在的组合物, 其特征在于: 包括免疫结合物和药学上可接受的载体, 其中所述免疫结合物包含可检测的标记物和抗体片断, 在所述抗体片断的轻链约 18 位氨基酸上连结有碳水化合物部分, 其中所述可检测标记物结合于所述抗体片断的所述碳水化合物部分, 其中所述抗体片断与所述疾病的相关抗原特异性结合。

19. 用于治疗哺乳动物疾病的组合物, 其特征在于: 包括免疫结合物和药学上可接受的载体, 其中所述免疫结合物包含在所述抗体片断轻链约 18 位氨基酸上连结有碳水化合物部分的抗体片断和选自药物、毒素、螯合剂、聚乙二醇、硼附加物和治疗用放射性同位素的非抗体部分, 其中所述非抗体部分共价结合于所述抗体片断的所述碳水化合物部分, 其中所述抗体片断与所述疾病的相关抗原特异性结合。

说明书

免疫结合物的制备和使用

发明背景

1. 发明的领域

本发明涉及诊断和治疗上有用的新颖的免疫结合物。本发明特别涉及包含一种抗体片断的免疫结合物,这种抗体片断通过抗体片断轻链可变区上的碳水化合物部分共价结合于诊断和治疗剂上。本发明还涉及包含一种抗体部分的免疫结合物,这种抗体部分是在轻链可变区含糖基化部位的完整抗体,这种糖基化部位是通过使编码轻链的核苷酸序列突变而引入抗体的。本发明还进一步涉及制备这种结合物的方法。本发明还涉及使用这种结合物的诊断和治疗方法。

2. 相关技术

单克隆抗体可结合于各试剂以形成免疫结合物,用于诊断和治疗。这些试剂包括螯合剂,它们使免疫结合物与放射性同位素形成稳定的结合,及细胞毒剂,例如毒素和化学治疗药物。例如,全身给药通常对病人毒性太大的细胞毒剂可偶联于抗癌抗体,其偶联方式使其毒性效应仅仅针对载有靶抗原的肿瘤细胞。免疫结合物的诊断或治疗效能取决于几种因素。在这些因素中,诊断或治疗剂与抗体的摩尔比和免疫结合物的抗体结合活性是较重要的。

研究者们发现,可直接与抗体连接的诊断或治疗剂的最大数量受抗体分子上可变位点的数目和抗体免疫反应性的丢失的限制。例如,Kulkarni等(*Cancer Research* 41:2700—2706, 1981)报道了可结合到抗体上而不明显降低抗原结合活性的药物分子的数目有一个限度。Kulkarni等发现,甲氨喋呤所获得的最高结合为每分子抗体约十分子甲氨喋呤,尝试将药物-抗体分子比递增超过十则降低了免疫结合物的得率,并损害了抗体活性。Kanellos等(*JNCI* 75:319—329, 1985)报告了类似的结果。

为了获得高的药物-免疫结合物置换水平,又不明显降低抗原结合活性,研究者们研究了水溶性聚合物分子作为药物间接结合中介物的应用。这样的聚合物包括氧化葡聚糖(Arnon et al., *Immunol. Rev.* 62:5—27 (1982))、聚谷氨酸(Greenfield et al., *Antibody Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals* 2:201—216(1989))、人血清白蛋白(Baldwin et al., *NCI Monographs* 3:95—

99(1987))和羧甲基葡聚糖(Schechter et al., *Cancer Immunol. Immunother.* 25:225—230(1987))。

Shih 等(*Int. J. Cancer* 41:832—839 (1988))描述了位点特异性偶联方法,这种方法中,甲氨喋呤经氨基葡聚糖偶联到抗体恒定区或“Fc”区的碳水化合物部分上,产生置换比例高并保持免疫反应性的免疫结合物。晚近,Shih 等(*Int. J. Cancer* 46:1101—1106, 1990)证明了包含经氨基葡聚糖结合到单克隆抗体的 Fc 区碳水化合物部分上的 5-氟尿嘧啶的免疫结合物的效能。在这两个研究中,Shih 等都发现了免疫结合物包含每分子免疫球蛋白有约 30—50 个分子的药物。从而,诊断或治疗剂与抗体 Fc 区碳水化合物部分的间接结合提供了获得具有功能性抗原结合活性和高置换水平的免疫结合物的方法。

用 Fc 区上的碳水化合物部分作为位点特异性结合位点的优点是:所有亚型的抗体都典型地含糖基化的 Fc 区。一般地说,抗体分子在其 Fc 区在按其同型的特征位置上进行糖基化。例如,如 Shih 等所证实的,在 IgG 分子 Fc 区的 CH₂ 区域氨基酸 297 上典型地存在碳水化合物。在远离抗原结合位点的这个位置上,诊断或治疗剂与碳水化合物部分的结合对所得免疫结合物的免疫反应性产生的效应应为最小。

但是,用 Fc 区的碳水化合物部分作为结合位点的缺点是免疫结合需要完整的抗体。抗体片断,特别是 Fab、Fab'、F(ab')₂ 的使用比完整抗体的使用具有优点,因为片断能更好地从毛细血管扩散出来,进入靶组织。例如,见 Brown, “Clinical Use of Monoclonal Antibodies,” in *BIOTECHNOLOGY AND PHARMACY*, Pezzuto et al., eds. Chapman & Hall, pp. 227—249 (1993)。此外,抗体片断确比完整抗体更容易从血液和正常组织清除。例如,完整鼠 IgG 血液半衰期为约 30 小时,而 F(ab')₂ 和 Fab/Fab' 半衰期分别为约 20 小时和 2 小时(同上)。因此,使用抗体片断构建免疫结合物是有利的。在放射免疫治疗和放射免疫诊断的应用上,抗体片断特别有利,在这些情况下,正常组织暴露于放射性同位素必须是最小限度的。

抗体可变区不经常含有能为从抗体片断制备免疫结合物提供潜在结合位点的碳水化合物部分。例如,在约 15—25% 鼠可变区鉴别出天冬酰胺偶联的碳水化合物受体序列。见 Kabat et al., *SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST*, 5th ed. U. S. Department of Health and Human Services (1990)。在抗葡聚糖族抗体的情况下,糖基化位点存在于重链可变区的互补决定区(CDR_s),特别是 CDR₂(同上)。这些抗体的 CDR_s 上 Asn 偶联

的碳水化合物存在看来增强了抗原结合。见 Wallick et al., J. Exp. Med. 168:1099-1109 (1988); Wright et al., EMBO J. 10:2717-2723 (1991)。然而,通过位点导向诱变在 CDR₂ 引入外加的碳水化合物结合位点,根据引入糖基位点的位置不同而导致对抗原亲和力的增强或减小(Wright 等,同上)。因此,诊断或治疗剂与 VH CDR 区碳水化合物部分结合的可行性是不确定的。

本发明者对碳水化合物结合的研究证明,Pawlak-Byczkowska 等(Cancer Res. 49:4568-4577 (1989))和 Goldenberg 等(J. Clin. Oncol. 9:548(1991))所描述的 IgG 抗体,鼠单克隆抗体 LL2 具有高结合效能。在还原条件下用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)进行的 LL2 结合物分析表明,在 LL2 抗体的轻链可变(VL)区存在糖基化位点。将 LL2 的 VL 区克隆化后,在 VL 区骨架 1(FR₁)序列的 18-20 位上发现 Asn 偶联的糖基化位点。

这些研究提示,在 VL 区内的碳水化合物部分上可能有优先结合。这一意想不到的发现可解释为 VL 区易接近性改善。我们用位点导向诱变除去 Asn 偶联的糖基化位点,发现所得到的蛋白质显示与原来的抗体类似的免疫反应性。这一结果与发明者们的计算机模拟研究相一致,后者提示在轻链 FR₁ 碳水化合物部分和抗原结合位点之间可忽略的或最小限度的相互作用。这些研究表明,诊断或治疗剂与 VL 区 FR₁ 序列碳水化合物部分的结合提供了获得具有功能性抗原结合活性的抗体片断免疫结合物的方法。

本发明提供制备包含诊断或治疗剂的新颖免疫结合物的方法,这些诊断或治疗剂经轻链可变区的碳水化合物部分结合于完整抗体或其抗原结合片断上。

发明概述

本发明涉及突变重组抗体或抗体片断,在所述抗体或抗体片断的轻链约 18 位上具有非天然 Asn 糖基化位点。

本发明还涉及制备糖基化突变重组抗体或抗体片断的方法,包括以下步骤:

- (a) 培养表达和糖基化含一突变轻链和一重链的突变抗体或抗体片断的转化宿主细胞,所述宿主细胞以一表达载体进行了转化,表达载体中克隆进了编码约在 18 位氨基酸上含非天然 Asn 糖基化位点的突变轻链的突变 DNA 分子;
- (b) 从所述培养的宿主细胞回收表达和糖基化的突变抗体或抗体片断。

本发明还涉及可溶性免疫结合物,包含:

- (a) 糖基化的抗体片断,其中抗体片断选自 Fab、Fab'、F(ab)₂ 和 F(ab')₂, 并且其中抗体片断包括轻链可变区和轻链可变区约 18 位氨基酸上结合的碳水

化合物部分；

(b) 中间结合物,包含具有至少一个游离氨基的聚合物载体和共价结合于聚合物载体的多种药物、毒素、螯合剂、硼附加物或可检测的标记分子,其中中间结合物通过聚合物载体的至少一个游离氨基与抗体片断的碳水化合物部分共价结合,其中免疫结合物保持抗体片断的免疫反应性。

而且,本发明涉及可溶性免疫结合物,包含:

(a) 糖基化的抗体片断,其中抗体片断选自 Fab、Fab'、F(ab)₂ 和 F(ab')₂, 并且其中抗体片断包括轻链可变区和轻链可变区约 18 位氨基酸上结合的碳水化合物部分;

(b) 选自药物、毒素、螯合剂、聚乙二醇、硼附加物和可检测的标记分子的非抗体部分,其中非抗体部分共价结合于抗体片断的碳水化合物部分,其中免疫结合物保留抗体片断的免疫反应性。

本发明进一步涉及可溶性免疫结合物,包含:

(a) 突变抗体,其中突变抗体包括轻链可变区和轻链可变区约 18 位氨基酸上结合的碳水化合物部分;

(b) 选自药物、毒素、螯合剂、聚乙二醇、硼附加物和可检测的标记分子的非抗体部分,

其中非抗体部分共价结合于突变抗体的碳水化合物部分,

其中免疫结合物保留突变抗体的免疫反应性。

本发明还涉及可溶性免疫结合物,包含:

(a) 抗体成分,其中抗体成分选自 Fv 和单链抗体,其中抗体成分包括轻链可变区和轻链可变区的约 18 位氨基酸上结合的碳水化合物部分;

(b) 中间结合物,包含具有至少一个游离氨基的聚合物载体和共价结合于聚合物载体的多种药物、毒素、螯合剂、硼附加物或可检测的标记分子,

其中中间结合物通过聚合物载体的至少一个游离氨基与抗体成分的碳水化合物部分共价结合,

其中免疫结合物保留抗体成分的免疫反应性。

本发明进一步涉及可溶性免疫结合物,包含:

(a) 抗体成分,其中抗体成分选自 Fv 和单链抗体,其中抗体成分包括轻链可变区和轻链可变区的约 18 位氨基酸上结合的碳水化合物部分;

(b) 选自药物、毒素、螯合剂、聚乙二醇、硼附加物和可检测的标记分子的非抗体成分,

其中非抗体成分共价结合于抗体成分的碳水化合物部分，其中免疫结合物保留抗体成分的免疫反应性。

本发明还涉及制备免疫结合物的方法，包括以下步骤：

(a) 通过诱变编码轻链的 DNA 分子的核苷酸序列在抗体轻链的约 18 位上引入 Asn 糖基化位点；

(b) 将突变的 DNA 分子克隆到表达载体中；

(c) 用表达载体转化宿主细胞，回收表达含一突变轻链和一重链的突变抗体的转化宿主细胞；

(d) 培养转化宿主细胞，从培养的宿主细胞回收突变抗体；

(e) 从回收的抗体制备抗体片断，其中抗体片断选自 Fab、Fab'、F(ab)₂ 和 F(ab')₂，其中抗体片断包含抗体片断突变轻链上的碳水化合物部分；

(f) 将中间结合物共价结合于抗体片断的碳水化合物部分上，其中中间结合物包含具有至少一个游离氨基的聚合物载体和共价结合于聚合物载体的多种药物、毒素、螯合剂、硼附加物或可检测的标记分子，其中中间结合物通过聚合物载体的至少一个游离氨基与抗体片断的碳水化合物部分共价结合，其中免疫结合物保留抗体片断的免疫反应性。

本发明还涉及用于诊断哺乳动物中疾病存在的方法，包括以下步骤：

(a) 制备包含可检测的标记物和抗体片断的免疫结合物，该抗体片断的轻链约 18 位上结合有碳水化合物部分，其中可检测的标记物结合于抗体片断的碳水化合物部分上，其中抗体片断能与和疾病相关的抗原结合；

(b) 将包含免疫结合物和药学上可接受的载体的组合物对哺乳动物投药；

(c) 用体内造影检测患病部位免疫结合物的存在。

本发明进一步涉及治疗哺乳动物中疾病的方法。包括以下步骤：

(a) 制备包含抗体片断和非抗体部分的免疫结合物，所述抗体片断的轻链约 18 位上结合有碳水化合物部分，非抗体部分选自药物、毒素、螯合剂、硼附加物和放射性同位素，其中非抗体部分共价结合于抗体片断的碳水化合物部分，其中抗体片断能与和疾病相关的抗原结合；

(b) 将包含免疫结合物和药学上可接受的载体的组合物对哺乳动物投药。

本发明中还包括用本发明的免疫结合物进行体外免疫试验和在组织学标本上进行抗原原位检测的改进的方法。

本发明还提供适用于制备本发明的免疫结合物的合适的聚合物载体、螯合剂、可检测的标记分子和偶联部分。

详细描述

1. 概括

本发明涉及包含完整抗体或其抗原结合片断的免疫结合物,该完整抗体或其抗原结合片断通过抗体部分轻链可变区的碳水化合物部分与诊断或治疗剂共价结合。本发明进一步涉及制备这种免疫结合物的方法。本发明还考虑到这种免疫结合物对于诊断和免疫治疗的应用。

2. 定义

在下面的说明书中,大量使用一些术语。此处提供各种定义以利于对本发明的理解。

抗体 本文所用的“抗体”包括单克隆抗体,如鼠抗体、嵌合体抗体或人化的抗体,以及单克隆抗体的抗原结合片断。这种片断包括缺乏完整抗体的 Fc 片断的 Fab、Fab'、F(ab)₂ 和 F(ab')₂。这种片断还包括由轻链可变区组成的分离的片断,由重链和轻链可变区组成的“Fv”片断,以及重组单链多肽分子、其中轻链和重链可变区由肽连结物连结起来。

突变抗体 本文所用的“突变抗体”是在轻链约 18 位氨基酸上具有 Asn 偶联的糖基化位点的完整抗体或其抗原结合片断,这种糖基化位点是通过改变相应的核苷酸序列引入到轻链上的。编码轻链的核苷酸序列的诱变方法包括聚合酶链反应、位点导向诱变和使用有合成的 DNA 寡聚物的聚合酶链反应进行基因合成。

诊断或治疗剂 本文所用的“诊断或治疗剂”是结合到抗体上产生诊断或治疗上有用的免疫结合物的分子或原子。诊断或治疗剂的例子有药物、毒素、整合剂、硼化合物和可检测的标记物。

免疫结合物 本文所用的“免疫结合物”包含抗体和诊断或治疗剂的分子。免疫结合物保留抗体的免疫反应性,即结合后抗体部分具有和结合前大约相同或仅轻度降低的结合抗原的能力。

结构基因 转录成信使 RNA(mRNA),后者然后翻译成特定多肽的特征性氨基酸序列的 DNA 序列。

启动子 引导结构基因转录产生 mRNA 的 DNA 序列。典型地说,启动子位于基因的 5' 区,近似于结构基因的起始密码子。如果启动子是一个可诱导启动子,那么对于诱导剂起反应,转录速率增加。相反,如果启动子是一个组成型启动子,则转录速率不受诱导剂的控制。

强化因子(Enhancer) 一种启动子因子。强化因子可提高特定的基因转录成 mRNA 的效能,不论该强化因子相对于转录起始部位的距离或方向如何。

互补 DNA (cDNA) 互补 DNA 是由逆转录酶作用,从 mRNA 模板形成的单链 DNA 分子。典型地说,采用互补于部分 mRNA 的引物来启动逆转录作用。本领域技术人员还用术语“cDNA”表示由这种单链 DNA 分子和它的互补物组成的双链 DNA 分子。

表达 表达是从结构基因产生多肽的过程。该过程包括基因转录为 mRNA 和 mRNA 翻译为多肽。

克隆化载体 一种 DNA 分子,如质粒、粘性质粒或噬菌体,它具有在宿主细胞中自发复制的能力,用来在基因控制中转化细胞。克隆化载体典型地包含一个或少量限制性内切酶识别部位,在此识别部位,外源性 DNA 序列可以可确定的方式插入而不失去载体的基本生物功能,还包含一个标识基因,它适用于鉴别和选择用克隆化载体转化的细胞。标识基因典型地包括提供四环素抗性和氨苄西林抗性的基因。

表达载体 包含编码外来蛋白质的克隆化的结构基因的 DNA 分子,它使外来蛋白质在重组体宿主中表达。克隆化的基因的表达典型地置于某些调节序列如启动子和强化因子序列的控制之下(即可操纵地偶联于这些调节序列)。启动子序列可以是组成型启动子或可诱导启动子。

重组体宿主 重组体宿主可以是含有克隆化载体或表达载体的任何原核或真核细胞。此术语的意思还包括经过基因工程在宿主细胞的染色体或基因组中含有克隆化的基因的原核或真核细胞。合适的宿主的例子见 Sambrook et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1989)。

3. 通过诱变编码蛋白质的 DNA 序列在抗体的轻链上引入 Asn 糖基化位点的方法

A. 抗体结构和 Asn 偶联的糖基化

抗体分子由重链和轻链两条相同的复制链组成,它们通过二硫链共价地相互结合。关于综合讨论,见:Schultz et al., “Proteins II: Structure—Function Relationship of Protein Families,” in TEXTBOOK OF BIOCHEMISTRY WITH CLINICAL CORRELATIONS, 3rd Ed., T. M. Devlin (ed.), Wiley & Sons, pp. 92—134 (1992); Turner et al., “Antigen Receptor Molecules,” in IMMUNOLOGY, 3rd Ed., Roitt et al., (eds.), Mosby, pp.

4.1—4.20 (1993)。在最普通型的抗体 IgG 中,两条重链各有约 440 个氨基酸,而两条轻链各有约 220 个氨基酸。在具有不同抗原特异性的抗体之间,羧基末端一半轻链和羧基末端 3/4 重链其氨基酸序列是高度恒定的。轻链和重链上的这些恒定区域称作“恒定区”,分别称为 CL 和 CH。CH 区决定特定的抗体是否属于 IgG、IgA、IgD、IgE 或 IgM 抗体类型。一类抗体内的 CH 区是同源的,但明显地区别于其它抗体类型的 CH 区的氨基酸序列。

相反,具有不同抗原特异性的抗体之间,氨基末端一半轻链和氨基末端 1/4 重链的氨基酸序列是高度可变的。因为这些区域形成与抗原结构拓扑学上互补的抗原结合位点(ABS),所以这些可变片断内的特定区域是“高度可变的”,被称作“互补决定区”(CDR_S)。

每条重链与一条轻链相缔合,以使两条链的氨基末端互相接近并包含抗原结合位点。可用蛋白裂解使抗体断裂成小的功能单位。例如,用木瓜蛋白酶使 IgG 分子进行蛋白裂解,导致在每条重链的铰链肽上发生抗体的裂解。木瓜蛋白酶消化的一个产物是羧基末端一半重链,它在“可结晶片断”(Fc)中是共价结合的。Fc 片断不结合抗原。其它裂解产物相同,由与整条轻链缔合的重链的氨基末端组成。这些氨基末端,或“抗原结合片断”(Fab),可结合抗原,其亲和力与完整抗体分子的亲和力相似。

本发明的目的是将诊断或治疗剂共价结合到完整抗体或其抗原结合片断的轻链可变区的 Asn 偶联的碳水化合物部分上。Asn 偶联的糖基化作用也称作“N-偶联的糖基化作用”,是糖残基通过天冬酰胺残基的酰胺氮相偶联的一种糖基化形式。Asn 偶联的寡糖的细胞内合成出现在内质网腔和蛋白质转运到高尔基氏体后。Asn 偶联的糖基化作用发生在糖基化序列:Asn-X-Thr/Ser,其中 X 可以是除脯氨酸和天冬氨酸之外的任何氨基酸。有 36 种可能的三氨基酸序列可编码 Asn 偶联的糖基化。考虑到基因密码的简并性,有 1 千个以上可能的核苷酸序列编码糖基化信号序列。

B. 诱变

用于将 Asn 偶联的糖基化序列引入 18—20 位的特定的核苷酸序列取决于天然存在的核苷酸序列。如下所述,通过将密码子 18 从 AGG 改变为 AAC,可达到将 Asn 偶联的糖基化位点引入 PKAPPA(11)24 蛋白质。核苷酸序列的这种诱变可用本领域技术人员熟知的方法来完成。

例如,用寡核苷酸导向诱变和克隆化的抗体轻链可在 18—20 位引入 Asn 偶联的糖基化位点。在此过程中,为了产生含少量尿嘧啶残基代替胸苷的 DNA

分子,从大肠杆菌 $dut^- ung^-$ 株制备含抗体轻链序列的单股 DNA 模板。这种 DNA 模板可由 M13 克隆化或用 SP6 启动子体外转录而得到。例如,见 Ausubel et al. (eds.), CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons (1987)。用公知的方法合成含突变序列的寡核苷酸(同上)。将寡核苷酸退火,得到单股模板,用 T4 DNA 聚合酶和 T4 DNA 连接酶,产生双股 DNA 分子。用此双股 DNA 分子转化野生型($dut^+ ung^+$)大肠杆菌细胞,有效地回收突变 DNA。

寡核苷酸导向诱变的详情和克隆化 DNA 诱变的有关技术是公知的。例如,见 Ausubel 等,如上;Sambrook 等,如上。

或者,用含所需突变体的寡核苷酸为引物及用抗体轻链可变区的 DNA 克隆,或用从产生感兴趣的抗体的细胞得到的 DNA 作模板,可将 Asn 偶联的糖基化位点引入抗体轻链。这样的技术包括例如实施例 1 所述的聚合酶链反应,也见于 Huse, "Combinatorial antibody Expression Libraries in filamentous Phage," in ANTIBODY ENGINEERING: A PRACTICAL GUIDE, C. Borrebaeck (ed.), W. H. Freeman and Company, pp. 103—120 (1992)。例如,可用 TRANSFORMER™ 位点导向诱变试剂盒(Colntech; Palo Alto, CA),按制造商的说明书进行位点导向诱变。

或者,通过合成带有互相引发的寡核苷酸的轻链基因,这些寡核苷酸之一含有所需的突变体,可将糖基化位点引入免疫球蛋白轻链。构建大的合成基因的技术是本领域技术人员熟悉知的。见,例如,Uhlmann, Gene 71:29—40 (1988); Wosnick et al., Gene 60:115—127 (1988); Ausubel et al., supra。

简言之,如果满足两个要求,则可在任何抗体轻链的约 18 位氨基酸上引入 Asn 偶联的糖基化位点。第一、为了设计含所需突变体的互补寡核苷酸,必须得到包括编码感兴趣的抗体轻链第 18—20 位氨基酸的密码子和在其周围的核苷酸序列。第二、必须有接近克隆化的抗体 DNA 或产生感兴趣的抗体的细胞的途径。给予了这两个限定,本发明完成了包括鼠的、人化的或嵌合的抗体的免疫结合物,其中诊断或治疗剂经位于轻链可变区约 18 位氨基酸的碳水化合物部分与抗体成分结合。这样的抗体包括完整抗体和抗原结合片断 Fab、Fab'、F(ab)₂ 和 F(ab')₂。

此外,本发明着眼于含 Fv 片断或单链抗体的免疫结合物的制备。如上面所讨论的,Fv 片断包含重链和轻链可变区的非共价缔合。相反,单链抗体包含通过肽连结物连结的来自特定抗体可变区的重链和轻链多肽链。例如见:Bird et al.,

Science 242:423—426 (1988); Ladner et al., U. S. Patent No. 4,946,778; 和 Pack et al., Bio/Technology 11:1271—1277 (1993)。

一般来说, Fv 片断和单链抗体缺乏结合某些诊断或治疗剂如放射性金属的部位。但是, Asn 偶联的糖基化位点引入 Fv 片断或单链抗体的轻链可变区, 如上所述, 为各种诊断或治疗剂的结合提供了碳水化合物部分。虽然 Fv 片断和单链抗体典型地由原核宿主细胞产生, 但是真核宿主细胞是较好的宿主细胞。哺乳动物细胞是最好的宿主细胞。

本发明提供在轻链可变区的约 18—20 位氨基酸上引入 Asn 偶联的糖基化位点的方法, 但要理解的是, 本发明并不受到这样的限制。对于本领域普通技术人员来说, 会出现这样的可能性, 即在轻链可变区的可选择部位或甚至在重链可变区上引入糖基化位点。本发明的免疫结合物可用在这种可选择的糖基化位点上结合了碳水化合物部分的完整抗体、抗体片断和单链抗体来制备, 只要诱变的抗体或片断保留抗原结合活性。合适的可选择的糖基化位点可用本领域技术人员熟知的分子模拟技术加以鉴定。例如, 见: Lesk et al., “Antibody Structure and Structural Predictions Useful in Guiding Antibody Engineering,” in ANTI-BODY ENGINEERING: A PRACTICAL GUIDE, C. Borrebaeck (ed.), W. H. Freeman and Company, pp. 1—38 (1992); Cheetham, “Engineering Antibody Affinity” Id. at pp. 39—67。

4. 表达和分离突变抗体 DNA 序列蛋白质产物的方法

A. 表达突变抗体的方法

如实施例 1 所述, 在诱变核苷酸序列后, 将突变 DNA 插入克隆化载体, 用于进一步分析, 如确定 DNA 序列。为了表达突变 DNA 序列编码的多肽, DNA 序列必须可操纵地偶联于控制表达载体中转录表达的调节序列, 然后引入原核或真核宿主细胞。除了诸如启动子和强化因子等转录调节序列外, 表达载体包括翻译调节序列和标记基因, 这种标记基因适合于携带表达载体的细胞的选择。

对于在原核宿主中表达的合适的启动子可以是可抑制的、组成型的或可诱导的。合适的启动子是本领域技术人员熟知的, 包括能识别 T4、T3、Sp6 和 T7 聚合酶的启动子, 噬菌体(λ)的 P_R 和 P_L 启动子。大肠杆菌的 trp、recA、热休克和 lacZ 启动子、枯草杆菌(B. subtilis)的 α -淀粉酶和 σ^{28} -特异性启动子, 芽胞杆菌属噬菌体的启动子, 链霉菌属启动子, 噬菌体(λ)的 int 启动子, pBR322 的 β -内酰胺酶的 bla 启动子, 及氯霉素乙酰基转移酶基因的 CAT 启动子。原核细胞启动子见以下综述: Glick, J. Ind. Microbiol. 1:277—282 (1987); Watson et al.,

MOLECULAR BIOLOGY OF THE GENE, 4th Ed., Benjamin Cummins (1987); Ausubel et al., supra, and Sambrook et al., supra.

一种特别可取的原核细胞宿主是大肠杆菌。较佳的大肠杆菌株包括 Y1088, Y1089, CSH18, ER1451, 和 ER1647 (例如, 见 Brown (Ed.), MOLECULAR BIOLOGY LABFAX, Academic Press (1991))。另一较佳的宿主是枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*), 包括如下株: BR151, YB886, MI119, MI120, 和 B170 (例如, 见 Hardy, "Bacillus Cloning Methods," in DNA CLONING: A PRACTICAL APPROACH, Glover (Ed.), IRL Press (1985))。

制备大肠杆菌中抗体片断的方法是本领域技术人员熟知的。例如, 见 Huse, "Combinatorial Antibody Expression Libraries in Filamentous Phage," in ANTIBODY ENGINEERING: A PRACTICAL GUIDE, C. Borrebaeck (Ed.), W. H. Ereeman and Company, pp. 103—120 (1992); Ward, "expression and Purification of Antibody Fragments Using *Escherichia coli* as a Host," Id. at pp. 121—138 (1992)。本领域技术人员还知道在大肠杆菌中制备由重链和轻链可变区组成的 Fv 片断。同上。还见于 Whitlow et al., "Single-Chain Fv Proteins and their Fusion Proteins," in NEW TECHNIQUES IN ANTIBODY GENERATION, Methods 2(2) (1991)。

此外, 克隆化抗体在原核细胞中的表达系统可以购得。例如, IMMUNO ZAP™ 克隆和表达系统 (Stratagene Cloning Systems; La Jolla, CA) 为抗体轻链和重链在大肠杆菌中的表达提供了载体。

因为突变 DNA 序列在原核细胞中的表达需要随后的体外糖基化, 因此, 本发明更可取地包括突变 DNA 序列在真核细胞, 特别是在哺乳动物、昆虫和酵母细胞中的表达。特别可取的真核细胞是哺乳动物细胞。哺乳动物细胞对克隆化的多肽提供翻译后修饰, 包括适当的折迭和糖基化。例如, 这样的哺乳动物宿主细胞包括 COS-7 细胞 (ATCC CRL 1651)、非分泌型骨髓瘤细胞 (SP2/0-AG14; ATCC CRL 1581)、中国仓鼠卵细胞 (CHO-K1; ATCC CCL 61)、大鼠垂体细胞 (GH₁; ATCC CCL 82)、HeLa S₃ 细胞 (ATCC CCL 2.2) 和大鼠海马细胞 (H-4-II-E; ATCC CRL 1548)。

对于哺乳动物宿主, 转录和翻译调节信号可得自病毒来源, 如腺病毒、牛乳头状瘤病毒和猿猴病毒。而且, 可采用来自哺乳动物表达产物如肌动蛋白、胶原蛋白或肌球蛋白的启动子。或者, 可采用原核细胞启动子 (如噬菌体 T3 RNA 聚合酶启动子), 其中原核细胞启动子是由真核生物启动子调节的 (例如, 见 Zhou

et al., *Mol. Cell. Biol.* 10:4529—4537 (1990); Kaufman et al., *Nucl. Acids Res.* 19:4485—4490 (1991)。可以选择考虑到阻抑或激活的转录起始调节信号,以便调节基因的表达。

一般来说,真核细胞调节区会包括足以导向 RNA 合成起始的启动子区。这样的真核生物启动子包括小鼠 metallothionein I 基因(Hamer et al., *J. Mol. Appl. Gen.* 1:273—288 (1982)); 疱疹(Herps)病毒的 TK 启动子(McKnight, *Cell* 31:355—365 (1982)); 猴病毒 40(SV40)早期启动子(Benoist et al., *Nature (London)* 290:304—310 (1981)); 鲁斯(Rous)肉瘤病毒启动子(Gorman et al., *supra*); 巨细胞包涵体病毒(Cytomegalovirus)启动子(Foecking et al., *Gene* 45:101 (1980)); 酵母 gal 4 基因启动子(Johnston, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 79:6971—6975 (1982); Silver, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 81:5951—5955 (1984)); 及 IgG 启动子(Orlandi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:3833—3837 (1989))。

强的调节序列是本发明最好的调节序列。这种较佳调节序列的例子包括 SV40 启动子强化因子(Gorman, “High Efficiency Gene Transfer into Mammalian cells,” in *DNA CLONING: A PRACTICAL APPROACH*, Volume II, Glover (ed.), IRL Press pp. 143—190 (1985)), h CMV-MIE 启动子强化因子(Bebbington et al., *Bio/Technology* 10:169—175 (1992)), 和抗体重链启动子(Orlandi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:3833—3837 (1989))。较佳的还有轻链表达的 κ (Kappa)链强化因子和 IgH 强化因子(Gillies, “Design of Expression Vectors and Mammalian Cell Systems Suitable for Engineered Antibodies,” in *ANTIBODY ENGINEERING: A PRACTICAL GUIDE*, C. Borrebaeck (Ed.), W. H. Freeman and Company, pp. 139—157 (1992); Orlandi et al., *supra*)。

突变抗体编码序列和可操纵地偶联的启动子可作为非复制 DNA 分子引入真核细胞,这种 DNA 分子可以是线性分子,或封闭的共价环状分子则更佳。这种分子不能自动复制,因此可通过被引入序列的瞬时表达而出现蛋白质的表达。更好地通过被引入序列整合到宿主染色体中而出现持久表达。

较好的是,被引入的序列会掺入质粒或能在接受宿主上自动复制的病毒载体中。几种可能的载体系统可用于此目的。一类载体利用提供自动复制的染色体外质粒的 DNA 要素,其中染色体外质粒来自动物病毒,如牛乳头状瘤病毒、多瘤病毒、腺病毒或猴病毒 40。第二类载体依赖于所需基因组或 cDNA 序列整

合到宿主染色体中。mRNA 的最适合成可能还需其它要素。这些要素可包括拼接信号,以及转录启动子、强化因子和终止信号。掺入这些要素的 cDNA 表达载体包括以下文献所描述的那些:Okayama, *Mol. Cell. Biol.* 3:280 (1983), Sambrook et al., *supra*, Ausubel et al., *supra*, Bebbington et al., *supra*, Orlandi et al., *supra*, and Fouser et al., *Bio/Technology* 10:1121—1127 (1992); Gillies, *supra*。包括内含子(intron)序列的基因组 DNA 表达载体已被 Orlandi 等(同上)描述,一般还见于 Lerner et al., (Eds.), *NEW TECHNIQUES IN ANTIBODY GENERATION*, *Methods* 2(2) (1991)。

为了得到表达完整抗体的哺乳动物细胞,可将包含突变抗体轻链的表达载体共同转染到带抗体重链表达载体的哺乳动物细胞中。例如,见 Orlandi 等,同上。或者,可用含突变抗体轻链的表达载体转染含重链表达载体的哺乳动物细胞,以及可用重链表达载体转染含包括突变轻链的表达载体的哺乳动物细胞。此外,可用包括编码突变抗体轻链的 DNA 片断及编码抗体重链的 DNA 片断的单一表达载体转染哺乳动物细胞。例如,见 Gillies, *supra*; Bebbington et al., *supra*。这些方法中任何一种均会产生表达具有突变抗体轻链的完整抗体分子的转染细胞。标准的转染技术是本领域公知的。例如,见 Sambrook et al., *supra*; Ausubel et al., *supra*。

B. 从转染细胞分离突变抗体的方法

用合适的药物选择携带表达载体的转染细胞。例如,可用 G418 选择携带具有氨基糖苷磷酸转移酶基因的表达载体的转染细胞。Southern et al., *J. Mol. Appl. Gen.* 1:327—341 (182)。或者,可用匀霉素-B(hygromycin-B)选择携带具有匀霉素-B 磷酸转移酶基因的表达载体的转染细胞。Palmer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:1055—1059 (1987)。或者,可用氨喋呤和麦考酚酸选择携带具有黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶基因的表达载体的转染细胞。Mulligan et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:2071—2076 (1981)。

产生突变抗体的转染细胞可用各种方法加以鉴别。例如,可用任何免疫检测试验鉴别这种转染瘤(transfectomas)。实施例 1 提供了用于这种目的的酶联免疫吸附试验(ELISA)的实例。

在鉴别转染瘤后,培养细胞并从培养物上清液中分离抗体。分离技术包括用 A 蛋白琼脂糖(用于分离完整抗体)进行亲和层析、体积排阻色谱法和离子交换色谱法。详情见例如 Coligan et al., (eds.), *CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY*, John Wiley & Sons (1991)。

5. 制备免疫结合物的方法

A. 抗体片断的制备

本发明着眼于从完整的突变抗体或从抗原结合抗体片断制备免疫结合物。抗体片断可从转染瘤得到,通过转染瘤产生的完整突变抗体的蛋白裂解,或通过在轻链 18—20 位上具有天然存在的 Asn 偶联糖基化位点的完整抗体的蛋白裂解。

通过用具有已诱变的重链结构基因的转染细胞可从转染瘤直接得到抗体片断。例如,如果在 CH1 区域序列后插入终止密码子,则转染瘤应产生 Fab 片断。或者,如果在编码重链绞链区的序列后插入终止密码子,则转染瘤应产生 Fab' 或 F(ab')₂ 片断。

或者,可用公知的蛋白水解技术从完整抗体制备抗体片断。例如,见 Coligan et al., *suprs.* 作为实例,实施例 2 提供了用木瓜蛋白酶得到 Fab 片断的方法。此外,F(ab')₂ 片断可用胃蛋白酶消化完整抗体而得到。用常规的二硫键还原剂,如半胱氨酸、二硫苏糖醇(DTT)等,可将二价片断裂解为一价片断。

B. 结合方法

(i) 间接结合

通过将诊断或治疗剂间接结合到完整抗体或其抗原结合片断上,可制成免疫结合物。这样的技术在以下文献中描述:Shih et al., *Int. J. Cancer* 41:832—839 (1988); shih et al., *Int. J. Cancer* 46:1101—1106 (1990); 和 Shih et al., U. S. Patent No. 5,057, 313。一般方法是将具有氧化的糖部位的抗体成分与一种载体聚合物反应,这种载体聚合物有至少一个游离氨基,并载有众多药物、毒素、螯合物或硼附加物,或载有可检测的标记物。这一反应产生初级 Schiff 碱(亚胺)键,该键可通过还原成二级胺形成最终结合物而得到稳定。

载体聚合物较佳为氨基葡聚糖或至少 50 个氨基酸残基的多肽,尽管其它实质上等价的聚合物载体也可被使用。为了在诊断和治疗使用中易于给药和有效地对针目标,最终免疫结合物以溶于水性溶液(如哺乳动物血清)为宜。因此,载体聚合物上的加溶官能团将提高最终免疫结合物的血清溶解度。如下所述,加溶官能团对于免疫结合物在体外免疫测定和原位检测中的应用也是重要的。特别是,以氨基葡聚糖为宜。

制备具有氨基葡聚糖载体的免疫结合物的过程典型地从葡聚糖聚合物开始,较有利地是从平均分子量约 10,000—100,000 的葡聚糖开始。将葡聚糖与氧化剂反应,使达到其碳水化合物环部分有控制的氧化,以产生醛基。根据常规方

法,用糖解化学试剂如 NaIO_4 方便地进行这种氧化。

然后,将氧化的葡聚糖与多元胺反应,较佳为二胺,更佳为一或多羟基二胺。合适的胺包括乙二胺、丙二胺、或其它类似聚亚甲基二胺类,二亚乙基三胺或类似多胺,1,3-二氨基-2-羟基丙烷,或其它类似羟基化二胺类或多胺类,等等。用过量与葡聚糖的醛基有关的胺以确保醛官能团基本上完全转变为希夫氏碱基。

用还原剂,如 NaBH_4 、 NaBH_3CN 等,引起所得希夫氏碱中间体的还原稳定化作用。所得加成化合物可通过常规大小的柱提纯,以除去交联葡聚糖。

引入胺官能团的葡聚糖衍生其它常规方法也可使用,例如,与溴化氰反应,然后与二胺反应。

然后,将氨基葡聚糖与准备携带的活性型的特殊药物、毒素、螯合物、硼附加物或标记物的衍生物反应,较佳为用常规方法制备的羧基活化的衍生物,例如,用二环己基碳二亚胺(DCC)或其水溶性变体,形成中间体加成化合物。

或者,通过戊二醛缩合反应或通过蛋白质上活化羧基与氨基葡聚糖上的胺基的反应,可将诸如 pokeweed 抗病毒蛋白或蓖麻蛋白 A 链等多肽毒素偶联到氨基葡聚糖上。

放射性金属螯合剂或磁共振增强剂是本领域公知的。典型的是 1,4,7,10-四氮杂环十二烷四乙酸(DOTA)、乙二胺四乙酸(EDTA)和二亚乙基三胺五乙酸(DTAA)的衍生物。这些螯合剂典型地在侧链上有基团,通过这些基团可将螯合剂连接到载体上。这些基团包括诸如异硫氰酸苄酯,通过此基团可将 DOTA、DTPA 或 EDTA 偶联到载体的氨基上。或者,螯合剂上的羧基或氨基可通过激活或先前的衍生化然后偶联(均为公知的方法)而偶联到载体上。

通过本领域公知的常规方法,可将诸如酶、荧光化合物、电子转移剂等标记物连结到载体上。如下面所述,这些标记的载体及由它们制成的免疫结合物可用于体外免疫试验或原位检测。

硼附加物,如卡硼烷,可用常规方法连结在抗体成分上。例如,如本领域中所公知的,用侧链上的羧基官能团制备卡硼烷。通过卡硼烷上羧基的激活和与载体上胺的缩合,可获得卡硼烷与载体,如氨基葡聚糖的结合,以产生中间体结合物。如下面所述,然后将这样的中间体结合物与抗体成分连结以产生治疗上有用的免疫结合物。

作为氨基葡聚糖的替换物,可将聚酰胺基胺树枝状体(polyamidoamine dendrimer)用作载体聚合物。用例如 Tomalia 等的方法(Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 29:138—175, 1990)可制备合适类型的树枝状体分子。用这种方法

制得的显示相同的大小、形状和电荷,在分子的表面带有一定量的伯胺基,它们都可用于结合目的。聚酰胺基胺树枝状体还带有叔胺基,它们在生理 pH 的水溶液中会被质子化,赋予载体分子水溶性。

多肽载体也可被用来代替氨基葡聚糖或聚酰胺基胺树枝状体,但多肽载体链上必须至少具有 50 个氨基酸残基,以 100—5000 个氨基酸残基为佳。氨基酸中至少有一些应为赖氨酸残基或谷氨酸或天冬氨酸残基。赖氨酸残基的侧基胺和谷氨酸、天冬氨酸的侧基羧化物对于结合药物、毒素、螯合剂或硼附加物是便利的,合适的多肽载体的例子包括聚赖氨酸、聚谷氨酸、聚天冬氨酸及其共聚物,以及这些氨基酸和其它氨基酸如丝氨酸的混合聚合物,它们赋予生成物负荷的载体和免疫结合物以满意的溶解性能。

中间结合物与抗体成分的结合由以下作用完成:抗体成分的碳水化合物部分的氧化,以及所生成的醛(和酮)羰基与载有药物、毒素、硼附加物或标记物后载体上留下的氨基进行反应。或者,中间结合物可经氨基与氧化的抗体成分结合,这些氨基是在载有诊断或治疗剂后的中间结合物中已经引入的氨基。氧化作用可以用化学方法(如用 NaIO_4 或其它糖解试剂)或酶学方法(如用神经氨酸苷酶和半乳糖氧化酶)来完成。在氨基葡聚糖载体的情况下,不是氨基葡聚糖的所有氨基典型地用于携带诊断或治疗剂的。氨基葡聚糖的剩余氨基与氧化的抗体成分缩合,形成希夫氏碱加合物,然后通常用氢硼化物还原剂将希夫氏碱加合物还原稳定化。

按照本发明,用类似的方法制备其它免疫结合物。载体分子和诊断或治疗剂之间的化学计量宜调整到有负载的树枝状体和多肽载体具有留作与抗体成分的氧化碳水化合物部分缩合用的游离氨基。如果必需,可通过诸如用 DCC 激活或与过量二胺反应,使多肽载体上的羧基转化成胺。

用常规技术,如在 Sephacryl S-300 或类似基质上进行的体积排阻色谱法,将最终的免疫结合物纯化。

对抗体片断的间接结合在实施例 4 中阐述。

(ii) 直接结合

免疫结合物可选择用抗体成分和诊断或治疗剂直接结合来进行制备。除了诊断或治疗剂是直接和氧化的抗体成分结合的外,一般方法与间接结合法相似。螯合剂与抗体片断的直接结合在实施例 3 中阐述。经偶联于氧化的轻链碳水化合物部分上制备免疫结合物的一个特殊优点是氧化反应为诊断或治疗剂的结合提供多个位点。因为轻链碳水化合物部分并不紧密结合在抗原结合部位上,因此

该方法提供了不使用聚合载体而将多种诊断或治疗剂直接结合于抗体片断的途径,以提高抗体负载容量。在负载的中间载体分子伴有不利的免疫结合物药代动力学的情况下,这是有利的。

人们会意识到,对于下面所述的整合剂,其它诊断或治疗剂可被替换。本领域技术人员能不经实验而设想出结合方案。

而且,本领域技术人员会认识到结合方法的很多可能的改变。在一个实施例中,为了改变血、淋巴或其它细胞外液中完整抗体或其抗原结合片断的药化动力学性质,可用碳水化合物部分结合聚乙二醇(PEG)。这对于在放射免疫诊断(RAID)中使用以放射金属[特别是^{99m}Tc(^{99m}Tc)]标记的抗体片断是特别有利的。

^{99m}Tc(^{99m}Tc)是治疗和诊断应用上特别有吸引力的放射性同位素,因为它是所有核医学部门容易得到的,价格不贵,给病人最小的放射剂量,具有理想的核成象性能。它的半衰期为6小时,这意味着镍标记抗体的快速导向(targeting)是合乎需要的。因此,比完整免疫球蛋白显示快速导向动力学的抗体片断,如F(ab')₂和F(ab)₂,尤其是Fab和Fab',对于用Tc-99m标记的RAID应用是较适宜的。用Tc-99m标记的片断来成象的主要缺点是放射活性在肾脏的较高摄取和滞留,导致此器官区域的成象困难。已发现,PEG与Tc-99m标记的抗体片断的结合引起该片断的肾脏摄取和保留量的显著降低。见美国专利申请No. 08/309,319,全文在此引作参考。

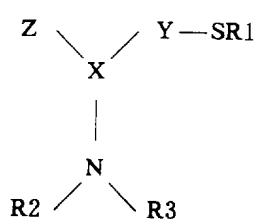
为了将PEG与轻链碳水化合物偶联,可用本领域公知的方法,用高碘酸将碳水化合物部分氧化,并与载有亲核基团的PEG衍生物偶联。例如PEG肼(Shearwater Polymers, Inc., Huntsville, Al)与抗体片断混合,生成脎。或者,可将PEG-胺与氧化的碳水化合物反应,生成希夫氏碱,然后用氰基氢硼化钠还原处理,形成稳定的仲胺键。PEG与Fab抗体片断的结合在实施例8中阐述。

在一个较佳实施方案中,一旦抗体片断与PEG结合,它就能在控制的条件下用还原剂进行处理,产生游离巯基,使该片断被Tc-99m直接标记。抗体片断的控制还原方法是本领域技术人员熟知的。例如,见美国专利5,128,119,全文在此引作参考。在另一较佳实施方案中,通过与巯基化剂如Traut试剂反应,或如美国专利申请No. 08/253,772所述,可以非位点特异性的方式在PEG结合的抗体片断上产生游离巯基,接着用Tc-99m直接标记。

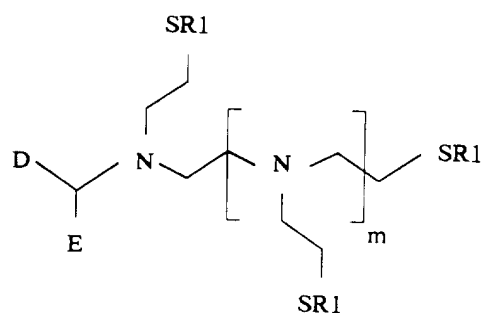
在另一较佳实施方案中,将氨基末端双官能团整合剂(BFC)联结于抗体或抗体片断的氧化的轻链碳水化合物上。这些双官能团试剂含侧基巯基和氨基,将

其作适当的处理,以紧密地结合放射活性金属,如 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{111}Ag 和 ^{67}Cu 。通过BFC上的胺或胍官能团可达到BFC与抗体的结合,这些官能团可分别与氧化的碳水化合物上的醛官能团形成亚胺或脎键。亚胺键可通过用诸如氰基氢硼化钠之类还原剂的还原反应而达到稳定。在结合阶段,整合剂基团的巯基掩蔽为硫醇酯或二硫化物,在结合物制备后去保护基。

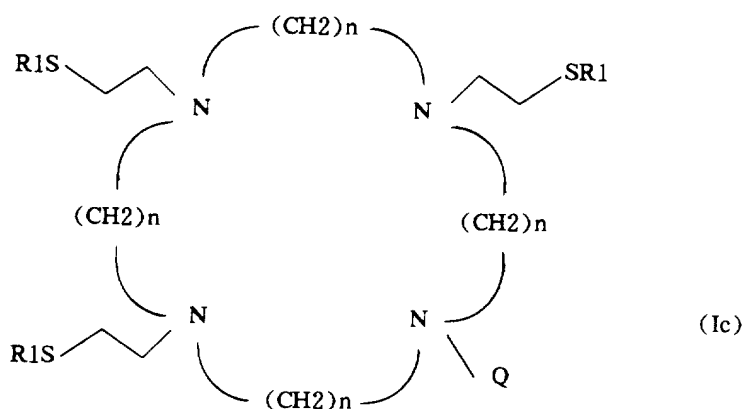
BFC可用如下通式Ia、Ib和Ic表示:



(Ia)



(Ib)



(Ic)

在通式Ia中,X为CH,或X和Z连在一起可为CO;Y为 CR_4R_5 、 $\text{CH}_2\text{CR}_4\text{R}_5$ 或 $(\text{CH}_2)_2\text{CR}_4\text{R}_5$,其中 R_4 和 R_5 相同或不同,选自氢、烷基、取代烷基、芳基或取代芳基;Z可为能与蛋白质的氧化碳水化合物基团反应和/或复合的任何基团,或Z可为H; R_1 为可在不明显降低蛋白质免疫活性的条件下除去的巯基保护基团; R_2 和 R_3 可以相同或不同,各代表酰基或取代酰基,或氢,烷基,芳基,取代烷基,或取代芳基,其中烷基或芳基上的取代基是选自巯基、胺或羧酸或其保护衍生物的金属络合物形成基; R_2 和 R_3 也可以是能与蛋白质上氧化碳水化合物基团反应和/或复合的任何基团。

在式Ib中,D为H或 CH_2SR_1 ;E可为能与蛋白质上氧化碳水化合物基团反应和/或复合的任何基团; R_1 为可在不明显降低蛋白质免疫活性的条件下除去

使用抗体-抗生物素蛋白(或抗体-抗生物素蛋白链菌素)结合物,接着传送结合于生物素基团的同位素;在预定步骤使用抗体-生物素结合物,接着传送结合于抗生物素(或抗生物素蛋白链菌素)基团的同位素;或在预定步骤使用抗体-生物素结合物,然后传送抗生物素(抗生物素蛋白链菌素)基团,继而传送结合于生物素基团的同位素。作为次级导向载体可能发现同样用途的其它试剂对是例如:单股核酸的两个互补序列;酶及其特异性底物;或蛋白质及其特异性酰基,如内因子和维生素 B₁₂。

如美国专利申请 No. 08/051,144 所述,另外的导向步骤也是可行的,使用一种以上放射性标记也是可能的,该文献全文引用于此作为参考。在抗体靶部位达到较高治疗量的其它方法包括例如掺入抗体-生物素(抗生物素)-放射性同位素结合物作为后一步同位素传送载体,导向有抗体-抗生物素(生物素)预导向的靶部位。此例中,抗体-生物素(抗生物素)-放射性同位素结合物有两个部位,即抗原和抗生物素(生物素),它们可被作为靶。例如,见美国专利申请 No. 08/062,662,在此全文引作参考。

抗体片断上轻链碳水化合物的存在,使合适的预导向剂与抗体片断如 F(ab')₂ 的结合具有位点特异性。或者,在载游离巯基的 Fab' 片断的情况下,碳水化合物和硫醇官能团的存在使两种不同基团产生位点特异性结合,这两种基团各可有不同的化学性质。

制备预导向结合物(划线处)的图例如下:

(抗生物素-硫醇)+(马来酰亚胺-L-酰肼)→(抗生物素-L-酰肼)

2(抗生物素-L-酰肼)+(CHO-Fab'-S-S-Fab'-CHO)→(抗生物素)₂-F(ab')₂

(抗生物素)₂-F(ab')₂ 用 2-巯基乙醇还原,生成 2×抗生物素-Fab'-SH

抗生物素+(琥珀酰亚胺-L-马来酰亚胺)→(抗生物素-L-马来酰亚胺)

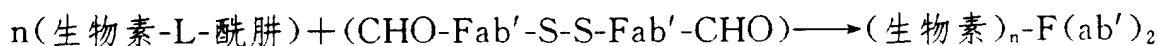
(抗生物素-L-马来酰亚胺)+(抗生物素-Fab'-SH)→(抗生物素)₂-Fab'

(抗生物素-CHO)+(酰肼-L-酰肼)→(抗生物素-L-酰肼)

2(抗生物素-L-酰肼)+(CHO-Fab'-S-S-Fab'-CHO)→(抗生物素)₂-F(ab')₂

(抗生物素)₂-F(ab')₂ 用 2-巯基乙醇还原,生成 2(抗生物素-Fab'-SH)

抗生物素-Fab'-SH+(抗生物素-马来酰亚胺)→(抗生物素)₂-Fab'



其中, n 为整数, 通常为从 1 至约 30; L 指一个连结物, 碳水化合物、烷基、酰基, 或一种结合, 它分开两个不同的反应性官能团, 它包含市售蛋白质交联剂。在上述实施例中, 可用抗生物素蛋白链菌素代替抗生物素。当需要时, 分别用标准试剂, 如高碘酸钠和 2-巯基乙醇, 可将碳水化合物部分氧化以产生醛, 并将二硫键还原以产生游离的硫醇。用已知的巯基化剂, 如 2-iminothiolane, 可将巯基引到抗生物素上。在使用前, 可任选地阻断抗生物素(抗生物素蛋白链菌素)-Fab' 结合物的游离巯基, 例如, 用碘乙酰胺。或者, 游离巯基可用作进一步修饰用的反应基团, 例如通过用 Tc-99m 的放射标记, 或通过诸如经马来酰亚胺反应而激活的聚乙二醇(PEG)衍生物这样的药剂结合, 继而偶联到游离巯基上。

基于 $\text{F(ab}')_2$ 的抗生物素蛋白链菌素/抗生物素结合物保留 2 个非立体阻碍的抗原结合位点和 8 个生物素结合位点, 单价 Fab' 单位每个 Fab' 携带 1 个或 2 个抗生物素蛋白链菌素/抗生物素单元, 完全保持生物素结合能力。碳水化合物的使用意味着几个生物素单位可经氧化的碳水化合物偶联到每一个片断分子上, 而不干扰该片断的抗原结合能力。

在本发明的另一实施方案中, 与远离抗原结合位点的轻链糖残基的结合保证了在第二抗体是抗独特型(antiidiotypic)抗体时, 不发生随后给予的清除第二抗体的结合干扰。在这种情况下, 第二抗体通过其抗原结合位点与循环抗体结合, 导向抗体经肝脏清除。应用此系统的优点是在清除步骤中导向抗体的第二位点(例如抗生物素或生物素)不被阻断。

在本发明的另一实施方案中, 载有放射性核素的螯合剂可经可代谢键连结于氧化的轻链糖上, 在放射治疗和放射诊断应用上使用抗体片断经常遇到的一个问题是放射标记抗体片断在肾脏有积聚的潜在危险。当使用酸或碱不稳定性连结物来形成结合物时, 可发生放射性螯合剂从抗体上裂解下来的不利情况。如果螯合剂分子量比较低, 它不留在在肾脏而从尿中排出, 从而减少肾脏的放射性暴露。

适于这种应用的低分子螯合剂包括例如上述双官能团螯合剂和 DOTA 或 DTPA 型螯合剂。这些分子每一种都能用本领域公知的标准方法进行修饰, 产生活性官能团, 它们能与抗体片断的氧化碳水化合物上的羰基形成酸不稳定性键。合适的酸不稳定性键的例子包括脲和氨基硫脲官能团。它们是通过氧化的碳水化合物与分别载有脲、氨基硫脲和硫卡巴脲官能团的螯合剂反应而形成的。

DTPA 的硫卡巴胍衍生物的制备和结合在实施例 15 中阐述。

或者,可用碱可裂解性连结物,它们被用于促进双官能团螯合剂-⁹⁹Tc 标记的片断从肾脏清除。例如,见 Weber et al., *Bioconjug. Chem.* 1:431 (1990)。双官能团螯合剂与轻链碳水化合物经胍键的偶联可在连结间隔物臂中掺入碱敏感性酯基。这种含酯连结物单位的例子为乙二醇二(琥珀酰亚胺基琥珀酸亚乙酯)(EGS, 购自 Pierce chemical Co., Rockford, IL), 它有 2 个 1,4-二丁酸单位的 2 个末端 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)酯衍生物,每个经 2 个烷酯连结于单个乙二醇基团。一个 NHS 酯可被合适的含胺 BFC(如 2-氨基苄基 DTPA)取代,而另一个 NHS 酯与限量胍反应。所生成的胍用于与抗体或抗体片断的轻链碳水化合物偶联,形成含 2 个烷酯官能团的抗体-BFC 键。这种结合物在生理 pH 下是稳定的,但在碱性 pH 下易裂解。

在本发明的另一实施方案中,通过将诊断或治疗剂连结于碳水化合物部分和游离巯氢基(巯基)上,可构建“二价免疫结合物”。这一游离巯基可位于抗体成分的绞链区。

6. 免疫结合物用于诊断和治疗

A. 免疫结合物用于诊断

用放射标记的单克隆抗体进行诊断成象的方法是公知的。例如,见 Srivastava (ed.), *RADIOLABELED MONOCLONAL ANTIBODIES FOR IMAGING AND THERAPY*, Plenum Press (1988); Chase, “Medical Applications of Radioisotopes,” in *REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES*, 18th Edition, Gennaro et al. (eds.) Mack Publishing Co., PP. 624—652 (1990); 和 Brown, “Clinical Use of Monoclonal Antibodies,” in *BIOTECHNOLOGY AND PHARMACY*, Pezzuto et al. (eds.), Chapman & Hall, pp. 227—249 (1993)。这种技术也称作免疫闪烁照相法(immunoscintigraphy), 采用 r-照相机检测结合于单克隆抗体上的 r 发射的放射性同位素的定位。诊断成象法可用于诊断心血管疾病和感染性疾病。Brown, 同上。

本发明注目于免疫结合物诊断心血管疾病的应用,例如,含抗肌球蛋白片断的免疫结合物可用于伴有急性心肌梗塞的心肌坏死成象。含结合血小板和血纤维蛋白的抗体片断的免疫结合物可用于深部静脉血栓形成的成象。此外,含结合于活化血小板的抗体片断的免疫结合物可用于动脉粥样硬化斑的成象。

本发明的免疫结合物还可用于感染性疾病的诊断。例如,含结合特异性细菌抗原的抗体片断的免疫结合物可用于脓肿定位。此外,含结合粒细胞和炎性白细

胞的抗体片断的免疫结合物可用于细菌感染部位的定位。

大量研究评估了单克隆抗体在癌的闪烁照相检测上的应用。例如,见 Brown(同上)及其中的文献。研究复盖了实体瘤的主要类型,如黑素瘤、结肠直肠癌、卵巢癌、乳癌、肉瘤和肺癌。本发明注目于用含结合可确定癌的肿瘤标记物的抗体片断的免疫结合物检测癌。这些肿瘤标记物的例子包括癌胚抗原、甲胎蛋白、癌基因产物、肿瘤相关细胞表面抗原和坏死相关细胞内抗原。

除了诊断外,单克隆抗体成象可用于监测治疗反应,检测疾病的复发和引导后续的临床结论。

对于诊断成象,可用中介官能团将放射性同位素直接或间接地结合到抗体片断上。这种中介官能团包括 DOTA、DTPA 和 EDTA。传送给患者的辐射剂量保持在尽可能低的水平。这是通过同位素的选择来达到的,此种选择是将最短半衰期、最少体内存留和可检出和精确测量的同位素的最小量进行最佳结合。可结合于抗体、适于诊断成象的放射性同位素的例子包括^{99m}Tc 和¹¹¹In。

研究表明,抗体片断,特别是 Fab 和 Fab', 提供有利的肿瘤/本底比 (Brown, 同上)。用 Fab 和 Fab' 抗体片断制备免疫结合物是本发明的一个较佳实施方案。但是,使用 T(ab)₂ 或 T(ab)'₂ 导向载体时保持二价,导致比一价片断高的靶部位抗体绝对量,在某些组织可导致较好的靶:非靶比。

为了体内诊断的目的,本发明中有用的免疫结合物还可用顺磁性离子来标记。磁共振成象特别有用的元素包括 Gd^{III}、Mn、Dy 和 Fe 离子。

在本发明的一个实施方案中,将多重整合剂分子,如 DTPA, 直接结合于抗体片断的氧化轻链碳水化合物上,使大量顺磁性离子发生整合,而不需要中介载体。人们观察到,某些类型中介载体的使用对用金属整合剂得到的磁共振成象结果具有有害的作用。例如,见 Wiener, et al., Magnetic Resonance in Medicine 31:1-8(1994)。因此,整合剂的这种方式的直接结合消除了这种问题。

在本发明的另一实施方案中,免疫结合物用聚酰胺基胺树枝状体作为中介载体,用于整合基团如 DTPA 的附着。这种树枝状体被证明用作磁共振成象的顺磁性离子的载体,比其它分子具有几个优点。例如,见 wiener 等, 同上。

本发明还注目于使用免疫结合物体外检测特殊抗原的存在。在这样的免疫试验中,可在液相中或结合于固体载体上来利用免疫结合物。例如,可将完整抗体或其抗原结合片断附着于聚合物,如氨基葡聚糖,以便将抗体成分连结到不溶性支持物如聚合物包被的珠、板或管上。

或者,可用本发明的免疫结合物检测从组织学样本制得的组织切片上特殊

抗原的存在。这样的原位检测可通过将可检性标记免疫结合物施用于组织切片上而完成。原位检测可用于测定受检测组织中特定抗原的存在和该抗原的分布。原位检测的一般技术是本领域技术人员熟知的,例如,见 Ponder, "Cell Marking Techniques and Their Application," in MAMMALIAN DEVELOPMENT: A PRACTICAL APPROACH, Monk (ed.), IRL Press, pp. 115—138 (1987); Coligan et al., *supra*。

可检标记物,如酶、荧光化合物、电子转移剂等,可用本领域公知的常规方法连结到载体上。这些标记载体和由它们制成的免疫结合物可用于体外免疫试验和原位检测,如标记物直接与抗体结合所制成的抗体结合物一样。但是,本发明的免疫结合物载有多重标记物,在抗体或抗体片断与靶抗原的结合只达到低程度的情况下,即可提高免疫试验或组织学方法的灵敏度。

B. 免疫结合物用于治疗

免疫结合物可用于治疗病毒和细菌感染性疾病、心血管疾病、自身免疫性疾病和癌症。Brown, *supra*。这种治疗的目的是将放射性、毒素或药物的细胞毒剂量释放到靶细胞,而使非靶组织的暴露降低到最小程度。

如上面所讨论的,放射性同位素通过螯合剂可直接或间接地连结到完整抗体或其抗原结合片断上。例如, ^{67}Cu 因其 61.5 小时半衰期和富产 β 粒子和 γ 射线而被认为是放射免疫治疗较有希望的放射线同位素之一,可用螯合剂对溴乙酰胺基苄基四乙胺基四乙酸(TETA)与抗体成分结合。Chade, *supra*。或者,发射高能 β 粒子的 ^{90}Y 可用二亚乙基三氨基五乙酸(DTPA),或更好用四氮杂环十二烷四乙酸(DOTA),如此处所述,与完整抗体或其抗体片断偶联。

抗体片断轻链碳水化合物部分在多价螯合剂分子的直接结合上的应用对 DOTA 用作 ^{90}Y 螯合剂所伴有的问题提供了有吸引力的潜在的解决。现已证明, DOTA 是较佳的 ^{90}Y 螯合剂,因为 ^{90}Y -DOTA 配合物的高结合常数和很低的解离速率。例如,见 Camera et al., J. Nucl. Med. 35:882—888 (1994)。然而,由于金属结合很低的动力学,因而难以得到 DOTA 免疫结合物 ^{90}Y 标记上的高掺入。例如,见 Wu et al., Bioorg. Med Chem. Lett. 4:449—454 (1994)。Wu 等(同上)最近讨论了聚酰胺基胺树枝状体中介物用于将 10—11 个 DOTA 分子经非位点特异性方法结合于完整抗体,这增加了 ^{90}Y 配合率,将结合物的特异活性提高到可接受的水平。在本发明中,同样高数量的 DOTA 分子可直接结合到抗体片断的轻链碳水化合物上,增加了 ^{90}Y 配合率,使不用中间结合物而能制备高掺入的结合物。或者,在载有两种类型碳水化合物的 IgG 上,轻链碳水化合物可

和重链碳水化合物一起用作载半抗原的部位,从而增加免疫结合物载半抗原的容量。

或者,可将类似于 Wu 等所用的树枝状体用作中间载体,可有更大量 DOTA 分子结合,可达到免疫结合物中⁹⁰Y 的更高掺入。Wu 等用非位点特异性结合方法,吸达到 1:1 树枝状体与抗体比率。在本发明中,轻链碳水化合物上存在大量糖残基,它们都是潜在的结合部位,使载体:抗体比率大于整体。此外,因为碳水化合物不侵害抗原结合位点,免疫结合物的免疫活性不会明显降低。

或者,可将硼附加物,如卡硼烷,连结到完整抗体或其抗原结合片断上,如本领域所公知的,卡硼烷可制成侧链上有羧基官能团。通过激活卡硼烷上的羧基及与载体上的胺缩合,可达到卡硼烷与载体(如氨基葡聚糖)的连结。然后将此中间结合物结合于抗体成分。在投用免疫结合物后,用热中子辐射硼附加物,并转化为放射性原子,这些放射性原子经 α 发射衰变产生高毒性、短射程效应。

此外,免疫结合物可制成其中治疗剂是毒素或药物。制备这种免疫结合物有用的毒素包括蓖麻蛋白、红豆碱、pokeweed 抗病毒蛋白、gelonin、白喉毒素和假单孢菌内毒素。制备这种免疫结合物有用的药物包括阿霉素、柔红霉素、甲氨喋呤、美法林(melphalin)、苯丁酸氮芥、长春生物碱类、5-氟脲嘧啶和丝裂霉素-C。

C. 免疫结合物的投用

通常,免疫结合物的投用剂量根据诸如患者年龄、体重、性别、一般医学情况和已往医学史等因素而改变。典型地较合乎需要的是提供接受者免疫结合物的剂量在约 1 μ g/kg 至 10mg/kg(药剂的量/患者体重)的范围内,但也可投用较低或较高的剂量。例如,很多研究证明了用 0.1—1.0mg 剂量的成功的诊断成象,而另一些研究用超过 10mg 的剂量显示定位作用改善。Brown(同上)。

对于治疗应用,通常每天投用约 10—200mg 免疫结合物,共数天。为了降低患者的敏感性,可能需要降低剂量和/或采用从其它种来的抗体和/或低变态反应性抗体,如杂交人或初级抗体。

给患者投用免疫结合物可采用静脉内、动脉内、腹腔内、肌肉内、皮下、胸膜内、鞘内注射,经区域导管输注,可经伤口内直接注射。当注射投用免疫结合物时,可以连续输注,或单次或多次注射。

用于热中子激活治疗的载硼附加物载体的免疫结合物通常以类似的方法进行。但是,在进行中子辐射前须等到非导向免疫结合物清除掉为宜。如从美国专利 No. 4,624,846 所获悉的,使用第二抗体可加速这种清除。

本发明的免疫结合物可按已知方法配方制成药学上有用的组合物,免疫结

合物和药学上可接受的载体就这样合并混合物中。如果组合物的投用可被接受治疗的患者耐受,这种组合就被叫作“药学上可接受的载体”。磷酸盐缓冲的灭菌盐水是药学上可接受的载体的一个例子。其它合适的载体是本领域技术人员熟知的。例如,见 REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18th Ed. (1990)。

为了免疫治疗的目的,以治疗有效量给病人投用免疫结合物和药学上可接受的载体。免疫结合物和药学上可接受的载体的合用被称作以“治疗有效量”投用,如果所投量是生理学上显著的。如果一种药剂的存在导致接受治疗的患者生理学上可测定的变化,则该药剂是生理学上显著的。

在治疗应用中,可用外加的药学方法控制免疫结合物的作用时间。通过使用聚合物来复合或吸收免疫结合物可制成缓释制剂。例如,生物相容性聚合物包括 poly (ethylene-co-vinyl acetate) 基质及硬脂酸二聚物和癸二酸的聚酞共聚物基质。Sherwood et al., Bio/Technology 10:1446-1449 (1992)。免疫结合物从这种基质释放的速率取决于免疫结合物的分子量、基质内免疫结合物的量和分散的颗粒的大小。Saltzman et al., Biophysical. J. 55:163-171 (1989); and Sherwood et al., supra。其它固体剂型在 REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18th Ed. (1990) 中描述。

在一般描述本发明后,通过参考下面的实施例将更容易理解本发明,这些实施例是作为例证提出的,除非详细说明,它们不是为了限制本发明。

实施例 1

用在轻链可变区 FR1 区域缺乏天然存在的 Asn 糖基化位点的单克隆抗体制备免疫结合物

(a) 通过诱变引入 Asn 糖基化位点

通过改变编码氨基酸残基 18—20 的核苷酸序列,在单克隆抗体轻链可变区 FR1 区域的第 18 位氨基酸上引入 Asn 糖基化位点。作为例示,在用 MPC-11 细胞制成的鼠单克隆抗体 PKAPPA (11)24 的轻链可变区骨架 1 序列上发现氨基酸序列 Arg₁₈ Val₁₉ Ser₂₀ (Rabbitts et al., Can. J. Biochem. 58:176-187 (1980); Kabat et al., SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, U. S. Department of Health and Human Services (1993))。18 位上的 Arg 残基是由 AGG 序列编码的(同上)。因此,诱变技术的目的是将核苷酸序列从 AGG 改变成编码 Asn 的 AAC。

按照 Orlandi 等的一般方法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:3833-3837

(1989)。用聚合酶链反应(PCR)技术引入 Asn 糖基化位点。在此方法中,从约 5×10^8 MPC-11 细胞(ATCC CCL 167)制备细胞总 RNA,用标准方法在寡(dT)纤维素上从总 RNA 选出 mRNA。用 VKIFOR 引物,即 Orlandi 等描述的 VK 区 3' 引物,进行第一股 cDNA 合成。将含 $10\mu\text{g}$ mRNA、 20pmol VKIFOR 引物、 $250\mu\text{M}$ 每一 dNTP、 10mM 二硫苏糖醇、 100mM Tris-HCl (pH8.3)、 10mM MgCl_2 和 140mM KCl 的 $50\mu\text{l}$ 反应混合物 70°C 培育 10 分钟,然后冷却。加入逆转录酶(46 单位),将混合物 42°C 培育 1 小时。反应混合物 90°C 加热 5 分钟终止反应。

或者,采用以 VKIFOR 为引物的 SUPERSRIPT™ 预扩增系统(Gibco/BRL; Gaithersburg, MD),从 MPL-11 细胞所得的细胞总 RNA 合成第一股 cDNA,除了第 18—20 氨基酸编码 Asn 糖基化位点的外,用编码 VK 区开头 20 个氨基酸的 5' 引物扩增 VK 序列。如上所述,在本实施例中,18 位氨基酸残基由 AAC 编码。PCR 反应混合物含 $10\mu\text{l}$ 第一股 cDNA 产物, $9\mu\text{l}$ $10\times$ PCR 缓冲液(500mM KCl、 100mM Tris-HCl (pH8.3), 15mM MgCl_2 和 0.01% (W/V) 明胶), $5\mu\text{l}$ VKIFOR 和 5' 引物,及 5 单位 AMPLITAQ™ DNA 聚合酶(Perkin Elmer Cetus; Norwalk, CA)。将混合物用石蜡油复盖,用预设计加热程序板控制温度循环 30 次。典型的循环包括: 94°C 变性 1 分钟, 50°C 退火 1.5 分钟和 72°C 聚合 1.5 分钟。

将 DNA 样品用乙醚提取 2 次,苯酚提取 1 次,苯酚/氯仿提取 1 次,然后用乙醇沉淀。或者,可用下面的琼脂糖电泳提纯 DNA 样品。

用标准技术在 2% 琼脂糖凝胶上提纯扩增了的 VK 片断。然后用限制性内切酶 PvuII 和 BglII 消化约 300 个碱基对的 VK 片断,并连结到克隆化载体的互补限制区。各种克隆化载体均有市售。例如, pGEM™ 载体(Promega; Madison, WI)和 ZAP EXPRESS™ 载体(Stratagene Cloning Systems; La Jolla, CA)对于克隆 VK 片断是有用的。或者,可使用含合适的免疫球蛋白启动子和引导(leader)序列的载体。例如,见 Orlandi et al., supra。用标准的氯化钙方法将连结的 DNA 转化到 DH5 α 活化的大肠杆菌细胞。

为了分析克隆化的 DNA,在 SOC(2% 细菌用胰胨、 0.5% 细菌用一酵母浸膏、 10mM NaCl、 2.5mM KCl、 10mM MgCl_2 、 10mM MgSO_4 、和 10mM 葡萄糖)中将转化体(transformants) 37°C 培养过夜。SOC 培养基含适当的抗生素以选择含载体的细菌得以生长。例如, SOC 培养基含 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 氨苄西林以选择携带 pGEM™ 载体的细菌得以生长。用标准技术制备克隆的小质粒(Miniplasmid)

DNA 制品。并用其作限制消化分析。用 Sanger et al. , (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:5463—5467 (1977)) 的二脱氧法对阳性克隆的 DNA 测序。用 DNA 序列测定结果确认 PCR 反应并未引入不需要的突变,突变是在 18—20 区域引入的。

(b) 哺乳动物细胞的转染

用限制性内切酶从 staging 载体切下含 18 位上有 Asn 糖基化位点的 VK 序列的 DNA 片断。然后将此 DNA 片断克隆进合适的哺乳动物表达载体。这一表达载体应含恒定区、免疫球蛋白强化因子、强化因子和药物选择标记物的编码序列(例如,匀霉素抗性基因)。例如,见 Orlandi et al. , supra。

用标准技术,通过电插入将含突变 VK 区的线性化轻链表达载体 10 μ g 和线性化重链表达载体 10—30 μ g 共转染到哺乳动物细胞中。例如,用 Co et al. , J. Immunol. 148:1149—1154 (1992) 的技术或用 Sambrook et al. , supra, 或 CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Ausubel et al. , eds. , John Wiley & Sons (1989) 中描述的类似技术,转染约 10⁶ 个 SP2/0-AG14 非分泌性骨髓瘤细胞(ATCC CRL 1581)。转染后,细胞在 96 孔微量滴定板上在无血清完全杂并瘤培养基(GIBCO/BRL)中于 37 $^{\circ}$ C、5%二氧化碳下生长。两天后,加入含适当选择药物(如匀霉素)的培养基开始选择过程。典型地,在电插入后 2—3 周形成克隆。将克隆转移到 24 孔碟上进行扩展。

(c) 分泌抗体的转染瘤克隆的测试

用 ELISA 测试法选择分泌抗体的转染瘤克隆。简言之,将从融合孔得到的上清液稀释,每种稀释液 100 μ l,加三份到用绵羊抗小鼠 IgG 特异性抗体(The Binding Site Ltd. ; San Diego, CA)预包被的 ELISA 微量滴定板上。微量滴定板室温培养 1 小时后,用洗涤缓冲液(含 0.05%聚山梨醇酯-20 的 PBS)洗板三次,除去未结合的蛋白质。使结合的抗体与联结了过氧化物酶的山羊抗小鼠 IgG 特异性抗体(HyClone Laboratories; Logan, Utah)反应。用洗涤缓冲液洗板三次后,每孔加 100 μ l 底物溶液(3.3mg/ml 邻苯二胺和 0.12%过氧化氢(以 0.02M 柠檬酸盐缓冲液,pH (5.0)配成))。在黑暗中显色 30 分钟,每孔加入 50 μ l 4M HCl 停止反应。用自动 ELISA 板读数仪(Bio-Tek Instrument; Winooski, VT)测定在 490nm 处吸光度。

或者,用以山羊抗人 Fab 或 κ 特异性抗体(Jackson ImmunoResearch; West Grove, PA)包被 ELISA 微量滴定板和用联结过氧化物酶的山羊抗人 Fc 特异性抗体(Jackson ImmunoResearch; West Grove, PA)测定结合抗体,可检测嵌

合的或人化的突变抗体。

(d) 抗体纯化和分析

使转染瘤生长成 500ml 无血清培养基的培养物,直至融合。将培养物离心使细胞成团,上清液经 0.2μ 膜过滤。使上清液依靠重力以 $0.5-1\text{ml/分}$ 速率通过 3ml A 蛋白柱,分离抗体。然后用 20ml PBS 洗柱,用含 0.1M 甘氨酸和 10mM EDTA 的溶液($\text{pH}3.5$) 10ml 洗脱结合的抗体。在 $10\mu\text{l}$ 3M Tris ($\text{pH}8.6$)的存在下,收集 1ml 洗脱部分。测定在 280nm 处吸光度,检出抗体的存在,将显示本底以上吸光度的洗脱部分集中,过滤,对 PBS 透析,用 Centricon 30(Amicon; Beverly, MA)浓缩。抗体的最终浓缩液用 ELISA 测定,用含 0.01% (W/V)叠氮化钠的 PBS 将抗体浓缩液调整为 1mg/ml 。

用标准技术,在还原条件下,通过纯化的抗体或抗体片断在 $4-20\%$ 梯度 SDS-聚丙烯酰胺凝胶上的电泳,确定轻链糖基化作用。例如,见 CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, Coligan et al., eds., John Wiley & Sons (1991)。轻链糖基化的存在以较高的表观分子量和多条轻链带的存在为象征。

(e) 结合物的制备

如下面所述,可用直接或间接方法得到免疫结合物。

实施例 2

抗体片断的制备

通过诱变重链表达载体中的重链结构基因,可从转染瘤得到 Fab、Fab'、 F(ab)_2 或 F(ab')_2 片断。通过插入接着 CH1 区序列的终止密码子完成 Fab 表达。可是, Fab' 或 F(ab')_2 表达是通过在编码重链绞链区的序列后插入终止密码子而完成的。用 Coligan et al., supra 所描述的体积排阻色谱法、离子交换色谱法或亲和层析法,从转染瘤培养物上清液中提纯抗体片断。或者,用一种市售纯化系统,和 Quick MAB 柱 (Sterigen; Santa Clara, CA),来纯化片断。

或者,可用蛋白分解从完整抗体制备抗体片断。这些技术是本领域技术人员熟知的。例如,见 Coligan et al., supra, pp. 2.8.1-2.8.10。也见 Stanworth et al. "Immunochemical Analysis of Human and Rabbit Immunoglobulins and Their Subunits," in HANDBOOK OF EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY, Vol. 1, D. M. Weir, ed., Blackwell Scientific pp 12.1-12.46 (1986) 和 Parham, "Preparation and Purification of Active Fragments from Mouse Monoclonal Antibodies," Id. at pp. 14.1-14.23。

作为例子,可用预活化的木瓜蛋白酶从得自 IgG 2a 和 IgG 2b 的 IgG1 或

Fab 片断制备 F(ab)₂ 片断,如下所述。木瓜蛋白酶的激活方法是将 2mg/ml 木瓜蛋白酶(2×重结晶的悬浮液, Sigma # P3125)和 0.05M 半胱氨酸(游离碱, 结晶形; Sigma # C7755)在 37℃ 水浴中培养 30 分钟。为了除去半胱氨酸,将木瓜蛋白酶/半胱氨酸混合物施加于以 20ml 乙酸盐/EDTA 缓冲液(0.1M 乙酸盐, 3mM EDTA, pH5.5)平衡过的 PD-10 柱(Pharmacia # G-25)。测量在 280nm 处的吸光度来分析流分,合并含蛋白质的 2 个或 3 个流分。用下式得出预活化木瓜蛋白酶的浓度:

$$\text{吸光度}_{280\text{nm}}/2.5 = \text{预活化木瓜蛋白酶 mg/ml}$$

为了制备用于消化的抗体,用 10mg 抗体,在 2—5ml PBS 中,对乙酸盐/EDTA 缓冲液透析。将 500μg 预活化木瓜蛋白酶加到透析过的抗体溶液中,将混合物涡旋。在 37℃ 水浴中培养 6—12 小时后,加入结晶碘乙酰胺(Sigma # I 6125)至终浓度为 0.03M,使木瓜蛋白酶失活。然后将混合物对 1 升 PBS (pH8.0)4℃ 透析 6—12 小时。

为了除去未消化的抗体和 Fc 片断,将混合物施加于用 PBS(pH8.0)平衡过的 A 蛋白-琼脂糖柱。按每份 2ml 收集未结合的流分,并合并,浓缩至总体积为 5ml 或小于 5ml 后,用体积排阻色谱法将蛋白质分级,用 SDS-PAGE 分析结果。

实施例 3

在 F(ab')₂ 片断轻链可变区的 FR1 区域
的碳水化合物部分直接结合

(a) 鼠 LL2 F(ab')₂ 片断与螯合剂的结合

LL2 是已显示对非何杰金氏(Non-Hodgkins)B 细胞淋巴瘤的诊断和治疗有效的鼠单克隆抗体(Goldenberg et al., J. Clin. Oncol. 9:548—564 (1991); Murthy et al., Eur. J. Nucl. Med. 19: 394—401 (1992))。LL2 F(ab')₂ 片断与氨基苄基 DTPA (DTPA)或含长链连结物的 DTPA 衍生物—CSNH(CH₂)₁₀ NH₂(LC-DTPA)结合。简言之,通过用偏高碘酸钠(5.68mg/ml 的溶液 210μl) 0℃ 处理 1 小时,使在约 1ml 用 50mM 乙酸盐缓冲的 0.9% 盐水(ABS; pH 5.3)中的 LL2 F(ab')₂ 片断(2.5mg)在黑暗中氧化。将反应混合物用乙二醇(20μl)处理以分解未反应的高碘酸盐,用以 PBS(pH 6.1)平衡过的 Sephadex G-50/80 柱(Pharmacia; Piscataway, NJ)纯化已氧化的抗体片断。然后将氧化的片断与过量 DTPA 或 LC-DTPA 反应。室温下经 40 小时后,用 NaBH₃CN 还原 Schiff 碱。用以 0.1 M 乙酸盐(pH 6.5)平衡的离心过的体积排阻柱(Sephadex G-50/80)提纯结合的抗体。测定在 280nm 处吸光度,测得抗体结合物的浓度。

用金属结合试验测得每分子抗体片断的整合剂分子比。该试验是这样进行的：将等分试样 LL2 F(ab')₂-整合剂结合物与 0.1M 乙酸铵(pH7)和 2M 三乙醇胺混合,将混合物与加了乙酸钴⁵⁷的已知过量的乙酸钴在室温下培养。30 分钟后,加入 EDTA(pH7)至终浓度 10mM。再培养 10 分钟后,用即时薄层色谱法(ITLC)分析混合物,用 10mM EDTA 展开。通过在 γ -计数仪上将 ITLC 条分段计数测得结合于抗体的放射活性的部分。结果表明,每个抗体片断有约 6 分子 DTPA,每个抗体片断有约 5 分子 LC-DTPA。

(b) LL2 F(ab')₂-整合剂结合物的免疫反应性测定

用 ELISA 试验测定 LL2 F(ab')₂-DTPA 和 LL2 F(ab')₂-LC-DTPA 结合物的免疫反应性。结果证明,LL2 F(ab')₂ 与 DTPA 和 LC-DTPA 的结合物显示同样的对 LL2 抗独特型抗体的结合活性。

此外,在竞争结合试验中测试 LL2 F(ab')₂-DTPA 和 LL2 F(ab')₂-LC-DTPA 结合物的免疫反应性。在这些实验中,用人嵌合 LL2 (IgG/ κ) 与 LL2 F(ab')₂ 或其结合物竞争对 Raji 淋巴瘤细胞(ATCC CCL 86)的结合。将 Raji 细胞在补充了 10% 胎牛血清和 2mM 谷氨酰胺的 DMEM 培养基中培养。细胞维持于 37°C、5% 二氧化碳中。细胞培养基和成分得自 Gibco/BRL (Gaithersburg, MD)。

在这些研究中,在各种浓度 LL2 F(ab')₂ 或其结合物存在下,在补充了 1% 胎牛血清和 0.01% (W/V) 叠氮钠的 PBS 100 μ l (终体积) (PBS-FA) 中,将 1 μ g 嵌合 LL2 (IgG/ κ) 与 5 \times 10⁵ 个 Raji 细胞一起培养。混合液于 4°C 培养 30 分钟,然后用 PBS 洗涤三次,除去未结合的抗体。加入含以异硫氰酸荧光素标记的山羊抗人 Fc 特异性抗体的溶液(在 PBS-FA 中的贮备液 20 倍稀释浓度) 100 μ l, 4°C 培养 30 分钟。测定竞争后嵌合 LL2 残余结合程度,用 PBS 洗涤混合物三次后,用 FACSCAN 荧光激活细胞分检器测定荧光强度。这些研究的结果证明,LL2 F(ab')₂ 和其结合物显示同样的对 Raji 细胞的结合。

因此,这些研究证明,两种结合物与未结合的 LL2 F(ab')₂ 片断相比,均有免疫反应并显示结合活性。

(c) 用 ¹¹¹ 铟标记

LL2 F(ab')₂-整合剂结合物用 ¹¹¹ 铟标记如下。用乙酸铵将氯化铟¹¹¹ 缓冲于 pH5.5,使乙酸盐终浓度为约 0.2M。加乙酸铟¹¹¹ 到 LL2 F(ab')₂-结合物的 0.1M 乙酸盐(pH6.5) 溶液中,混合物培养约 1 小时。反应混合物含 9.7 μ g LL2 F(ab')₂-DTPA 和 72.6 μ Ci¹¹¹ 铟,或 10 μ g LL2 F(ab')₂-LC-DTPA 和

126.7 μ Ci¹¹¹铈。

通过将标记混合物与 10mM EDTA 培养 10 分钟,接着作 ITLC 测定,用 10mM EDTA 展开,分析¹¹¹铈的掺入程度。在此试验中,未结合的¹¹¹铈移动到溶液前沿,而抗体结合的¹¹¹铈保留在原位。通过 ITLC(与人血清蛋白共同点样),用水:乙醇:氨(5:2:1)溶液展开,测试任何胶态¹¹¹铈的存在。在此系统中,原位的放射活性部分代表胶态¹¹¹铈。此外,用放射性高压液相色谱法(放射性 HPLC)分析全部标记混合物。

这些研究结果表明,¹¹¹铈标记的 LL2 F(ab')₂-DTPA 有 7.47 μ Ci/ μ g 蛋白质的比放射性,用 ITLC 测定¹¹¹铈掺入量为 97.4%,或用放射性-HPLC 测定¹¹¹铈掺入量为 92.5%。另外,¹¹¹铈标记的 LL2 F(ab')₂-LC-DTPA 的比放射性为 12.67 μ Ci/ μ g 蛋白质,¹¹¹铈掺入 95.6%(用 ITLC 测定)或 94%(用放射性 HPLC 测定)。胶态¹¹¹铈的量典型地为约 1—3%。

(d) 用⁹⁰钇标记

如上所述制备 LL2 F(ab')₂-整合剂结合物。用⁹⁰钇标记结合物如下。简言之,将市售氯化钇⁹⁰(DuPont NEN; 17.68 μ l; 5.63mCi)用 35.4 μ l 0.5M 乙酸盐(pH 6.0)缓冲。将溶液室温下放置 5—10 分钟,然后用于放射标记。

⁹⁰钇标记的 LL2 F(ab')₂-DTPA 是这样制备的:乙酸盐⁹⁰(128.7 μ Ci)和 LL2 F(ab')₂-DTPA (30 μ g; 8.3 μ l)混合,室温下培养 1 小时,用 90 μ l 0.1M 乙酸盐(pH 6.5)稀释。⁹⁰钇标记的 LL2 F(ab')₂-LC-DTPA 的制备:乙酸盐⁹⁰(109.5 μ Ci)和 LL2 F(ab')₂-LC-DTPA (30 μ g; 7.6 μ l)混合,室温下培养 1 小时,用 90 μ l 0.1M 乙酸盐(pH 6.5)稀释。如上所述,在两个溶剂系统用 ITLC 和 HPLC 检测标记过程的结果。

⁹⁰钇标记的 LL2 F(ab')₂-DTPA 的比放射性为 4.29 μ Ci/ μ g 蛋白质,而⁹⁰钇标记的 LL2 F(ab')₂-LC-DTPA 的比放射性为 3.65 μ Ci/ μ g 蛋白质。放射性 HPLC 分析表明,LL2 F(ab')₂-DTPA 中掺入⁹⁰钇 96%,而 LL2 F(ab')₂-LC-DTPA 中掺入⁹⁰钇 90%。

实施例 4

F(ab')₂ 片断轻链可变区 FR1 区域

碳水化合物部分的间接结合

(a) 中间结合物的制备

用 Shih 等的方法(Int. J. Cancer 41:832—839 (1988)),将鼠 LL2 F(ab')₂ 片断经葡聚糖与阿霉素结合。简言之,溶解 1g 葡聚糖(m. w. 18KD; Sigma

Chemical Co., St. Louis, MO) 在 70ml 水中制备氨基葡聚糖。加入 0.5g 偏高碘酸钠将葡聚糖部分氧化生成多醛葡聚糖, 溶液室温下搅拌过夜。用 Amicon cell (YM10 膜; MWCO=10,000) 浓缩混合物后, 用 Sephadex G-25 色谱法提纯多醛葡聚糖后, 冷冻干燥, 得到约 900g 白色粉末。然后用 2 当量 1,3-二氨基-2-羟基丙烷在水相中在室温下将多醛葡聚糖处理 24 小时。向混合物中加入氢硼化钠(每 2.15mmol 1,3-二氨基-2-羟基丙烷加 0.311mmol) 使生成的 Schiff 碱稳定化。将混合物室温培养 6 小时。用 Sephadex G-25 柱提纯氨基葡聚糖。

阿霉素(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) 的活化: 在干的反应小瓶中的 0.1mmol 阿霉素中加入 1ml 无水 DMF, 再加入 N-羟基琥珀酰亚胺(23mg, 0.2mmole; Sigma) 的无水 DMF (750ml) 溶液和 1,3-二环己基碳化二亚胺(41.5mg, 0.2mmol; Sigma) 的无水 DMF (750 μ l) 溶液。在无水条件下, 将反应混合物在室温下、黑暗中搅拌 16 小时。在此溶剂系统中, 副产物, 即脲衍生物不能很好地沉淀。将沉淀离心, 溶液存于 -20 $^{\circ}$ C 密封瓶中。

将氨基葡聚糖(18KD; 10mg) 溶解在 2ml PBS (pH 7.2) 中, 逐渐加入 0.7ml 上述 N-羟基琥珀酰亚胺活化的阿霉素溶液, 制成阿霉素-葡聚糖中间结合物。每摩尔氨基葡聚糖存在 50 摩尔阿霉素。溶液在室温下搅拌 5 小时, 除去沉淀后, 用 Sephadex G-25 柱提纯结合物。阿霉素-葡聚糖结合物的特征是阿霉素/葡聚糖之比为 14。

或者, 如 Shih 等(Int. J. Cancer 41:832-839 (1988)) 所述, 将阿霉素与 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基) 碳二亚胺反应, 制成阿霉素-葡聚糖结合物。又见 Shih et al., Cancer Research 51:4192-4198 (1991)。

(B) 中间结合物与 LL2 F(ab')₂ 的位点特异性连接

通过用偏高碘酸钠(800 μ l 21.5mg/ml 溶液) 室温处理 60 分钟, 将 5ml PBS (pH5.5) 中的 LL2 F(ab')₂ 片断(25mg) 在黑暗中氧化。用乙二醇(50 μ l) 处理反应混合物, 使未反应的高碘酸盐分解, 用以 0.05M HEPES (pH7.4) 平衡的 Sepadex G-25 柱提纯氧化的抗体片断。然后将氧化的片断浓缩成 5mg/ml (在 0.05M HEPES (pH7.4) 中), 并与阿霉素-葡聚糖结合物(22mg) 反应。室温下 24 小时后, 用 NaBH₃CN 还原 Schiff 碱。用 Sephadex CL-6B 柱提纯结合的抗体。

用这种方法, 可以将约 9 个阿霉素分子偶联在 1 个 LL2 F(ab')₂ 片断上, 在轻链可变区 FR₁ 区域的碳水化合物位点上。这个比值是通过测阿霉素浓度(A₄₈₂) 和蛋白质浓度(A₂₈₀) 而确定的。用上述流动细胞计数法测得, 结合物保留

了未结合 LL2 F(ab')₂ 片断的 80% 免疫活性。

实施例 5

人化 MN14 的 VK FR₁ 区域上 Asn 偶联的 糖基化位点的引入

将 Asn 偶联的糖基化位点引入人化 MN14 的 VKFR₁ 区域,这是结合癌胚抗原的抗体。简言之,用实施例 1 中所述的 PCR 法,将编码 Arg₁₈ 的核苷酸序列诱变成编码 Asn₁₈ 的核苷酸序列。在这种情况下,将从用于人化 MN14 的轻链表达载体而来的 DNA 用作 PCR 模板。将 Orlandi 等的 VKFORI 引物用作 3' 端引物。5' 端引物由编码 MN14 VK 区开头 20 个氨基酸的 57 聚物组成,除了在 18 位编码 Asn 的密码子之外。将约 300 个碱基对的 PCR 产物用 Pvu II 和 Bgl II 消化,并连接到 staging 或克隆化载体的互补位点上。采用标准的氯化钙方法,如见 Ausubel et al., supra,用 staging 或克隆化载体转化 DH5 α 活性细胞。

将含有在 18 位氨基酸上有 Asn-糖基化位点的人化 MN14 VK 序列的 DNA 片断亚克隆进带 pShyg 的轻链表达载体。用线性化轻链表达载体和用线性化重链表达载体通过电插入将 SP2/0-AG14 非分泌性骨髓瘤细胞共转染。用匀霉素-B 选择转染瘤,并培养产生抗体。

在 SDS-PAGE 还原凝胶上纯化和分析抗体。糖基化的人化 MN 14 的轻链与非糖基化的 MN 14 轻链相比,移动成多条带,并以较高的分子量移动。此结果表明,新的 Asn 偶联的糖基化位点被用于碳水化合物加成。

显然,糖基化 MN 14 抗体和非糖基化 MN 14 抗体的 MN 14 阻断活性被发现是基本相同的。因此,在人化 MN 14 的 VK FR₁ 区上的糖基化并不影响免疫反应性。

实施例 6

F(ab')₂ 片断轻链可变区 FR1 区域的 碳水化合物部分上 DOTA 的直接结合

(a) 鼠 RS7 F(ab')₂ 片断与 DOTA 的结合

MAb RS7 是对肺、胃、膀胱、乳房、卵巢、子宫和前列腺癌有反应性的快速内在化抗体(Stein et al., 1990, Cancer Res., 50:1330—1336)。用上面描述的方法,将糖基化位点 NVT 引入 RS7 的 VK 区 18—20 位上。如上所述,将糖基化的 RS7 在 SP2/0-AG14 骨髓瘤细胞中表达,制备 F(ab')₂。

将 2mg RS7 的 F(ab')₂ 片断用 1ml 0.1M 磷酸盐缓冲的 0.9% 氯化钠溶液 (pH7.2)(PBS) 配制,在其中加入 400 μ l 2.84mg/ml 偏高碘酸钠。将反应混合物

在黑暗中、室温下搅拌 90 分钟,加入 20 μ l 乙二醇终止氧化反应。在用 PBS (pH6.1)平衡的 Sephadex G-25 体积排阻柱(Pharmacia; Piscataway, NJ)提纯氧化的抗体片断。用 Centricon 30 (Amicon; Beverley, MA)将抗体再浓缩成 2mg/ml,用过量 2-对氨基苄基-1,4,7,10-四氮杂环十二烷基四乙酸(NH₂-B₂-DOTA)处理。将混合物 4 $^{\circ}$ C 反应 48 小时。加入 10 倍摩尔过量(对抗体而言)的氰基硼氢钠,接着搅拌 30 分钟,使 Schiff 碱就在混合物中还原。用离心体积排阻柱(Sephadex G-50/80)提纯 DOTA-F(ab')₂ 结合物,该柱用酸洗的成分和无金属缓冲介质制成,以 0.1M 乙酸盐缓冲的 0.9%氯化钠溶液(ABS, pH6.5)平衡过。用在 280nm 处的吸光度测定抗体结合物的浓度,用实施例 3 所述钴⁵⁷结合试验测定每摩尔抗体的螯合剂的比例。

用 81 μ l 0.5M ABS (pH6)处理市售氯化钷⁹⁰(8.9mCi, 27 μ l),将溶液涡旋混合,放置 15 分钟,然后用于下面的标记。

在酸洗过的塑料小瓶中所放的 DOTA 标记的 RS7 F(ab')₂ 结合物(1mg, 73 μ l)中,加入乙酸钷⁹⁰(4.94mCi, 60 μ l)ABS 液。将小瓶内容物轻轻地涡旋混合,于室温下放置 1 小时。然后,边搅拌边向标记的小瓶中加入 850 μ l 0.1M ABS。如实施例 3 所述,用二溶剂系统即时薄层色谱法和高效液相色谱法测试标记结果。

实施例 7

用聚酰胺基胺树枝状体作为中间载体
在 F(ab')₂ 片断轻链可变区 FR1 区域的
碳水化合物部分的间接结合

(a) 中间结合物的制备

将按上述氧化的鼠 RS7 F(ab')₂ 片断,通过形成 2 个聚酰胺基胺树枝状体,与 DOTA 结合。树枝状体用 Tomalia 等的方法(Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 29: 138-175 (1990))制备。将树枝状体(10 μ M,在 8ml 水中)与 150 μ M 2-(对-异硫氰酸根合苄基)-1,4,7,10-四氮杂环十二烷基四乙酸在 40 $^{\circ}$ C、pH9 的条件下反应 24 小时,周期性加入 0.2M NaOH 以维持溶液 pH 于 9.0。用配有 3000MW 截值滤膜的搅拌室(stirred cell) (Amicon, MA)进行超滤,除去未反应的配基。冷冻干燥后,将树枝状体螯合剂结合物再悬浮于 ABS,如实施例 6 所述,结合到 RS7 F(ab')₂ 片断上。

实施例 8

Hz-PEQ(甲氧基聚乙二醇酰肼)与 F(ab')₂ 轻链碳水化合物部分的结合

结合草案(a)

在 pH6.0°C 条件下,用高碘酸钠(20mM 终浓度)将 IMMU-LL2-F(ab')₂ 碳水化合物部分氧化 90 分钟。以离心沉降柱(centrifuged spin-column)技术,用 Sephadex G-50-80,在 PBS (pH6.0)中,从过量的高碘酸盐中分离出氧化的片断。加入摩尔过量(50 和 300 倍)的甲氧基-PEG 酰肼(MW 5000, Shearwater Polymers, Inc., Huntsville, AL),到纯化的氧化中间体中,得到胺键合。反应在室温下进行 2 小时。用含 Sephadex G-50-80, 0.1M 磷酸钠(pH7)的离心沉降柱提纯产物,用体积排阻 HPLC,采用 BioSil SEC-400 柱,以 0.2M 磷酸钠, 0.02% 叠氮化钠(pH6.8)洗脱,对产物进行分析。

结果表明,采用 50 倍摩尔过量的反应,有 16% 未修饰的 F(ab')₂,采用 300 倍摩尔过量的 Hz-PEG 反应,只有 2.3% 未修饰的 F(ab')₂。

结合草案(b)

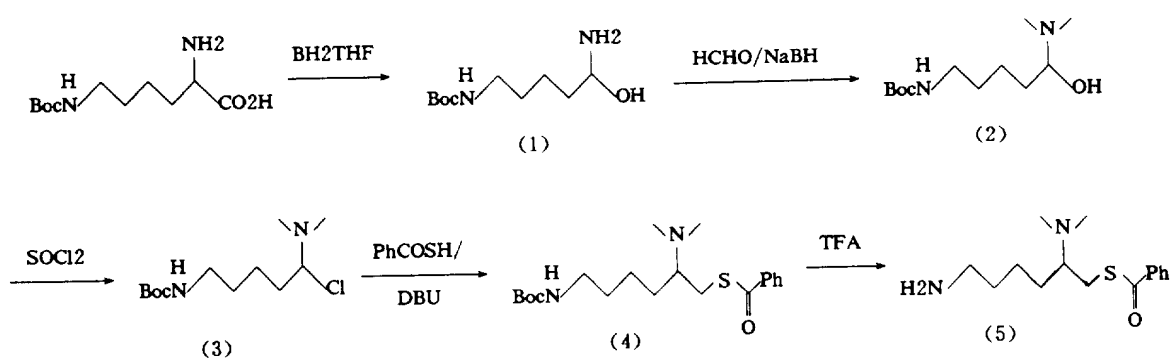
在 26°C 下,用 29.4 μ l 0.5 M NaIO₄ ($700 \times 2.1 \times 10^{-8}$ mol) 将 IMMU-LL2 F(ab)₂, 200 μ l (2.1mg, 2.1×10^{-8} mol) 氧化 45 分钟。在两个连续的 2.4ml 离心沉降柱(Sephadex G-50-80, 0.1M 磷酸钠, pH7) 上从过量 NaIO₄ 中分离出氧化的片断。

将 205 μ l (1.52mg, 1.52×10^{-8} mol) 氧化的 IMMU-LL2 F(ab')₂ 与 22.8mg ($300 \times 1.52 \times 10^{-8}$ mol) 甲氧基-Hz-PEG (MW 5000) 于 25°C 培养 1 小时,完成甲氧基-Hz-PEG 与氧化的片断的结合。在 Sephadex-G-50-80 沉降柱(4 个连续的 2.4ml 柱)上提纯结合物,用 0.1M 磷酸钠(pH7)洗脱。在用 0.2M 磷酸钠、0.15M 氯化钠、0.02% 叠氮钠(pH6.8)洗脱的 BioSil 400 体积排阻柱上进行的 HPLC 分析显示两个新的峰:7.4 分钟(16.9%)和 8.3 分钟(83.1%)。

实施例 9

双官能团整合剂(5)的制备

下面的实施例阐述了本发明中所用的特别好的双官能团整合剂的制备方法。用本实施例中制备的双官能团整合剂放射性标记具有侧基巯基的蛋白质或抗体,并在放射免疫成象或放射免疫治疗方法中使用标记的蛋白质或抗体,这属于本领域技术人员的技术范围之内。反应顺序如下所示。



(a) 向冷却于 4℃ 氩气下的 N-ε-(叔丁氧基羰基)赖氨酸的四氢呋喃(THF)溶液中,边搅拌边滴加甲硼烷-四氢呋喃复合物(1 当量)。2 小时后,通过小心加入含水 THF 使过量甲硼烷分解。然后将反应混合物与 5M 氢氧化钠一起回流 10—18 小时,分解硼酸酯。此含水溶液用氯仿完全提取,用盐水洗涤,无水硫酸钠干燥,在旋转蒸发器上浓缩至干,得到 2-氨基-6-N(叔丁氧基羰基)氨基-1-己醇(1)。

(b) 将化合物(1)于 4℃ 下溶于乙醇,并在溶液中通入甲醛气体(在氩气流中加热仲甲醛而制成)10 分钟。然后缓缓加入硼氢化钠(10 当量),温度保持于 4℃。将混合物蒸发至干,滴加 0.1M HCl 到残渣中,接着很快地加入饱和碳酸氢钠溶液。该溶液以乙酸乙酯萃取,盐水洗涤,有机层用无水硫酸钠干燥,并浓缩至干。产物再用甲醛和硼氢化钠作如上处理,得到 2-(N,N-二甲基氨基)-6-[N-(叔丁氧基羰基)氨基]-1-己醇,(2)。

(c) 在 4℃ 下,向(2)的二氯甲烷溶液中加入无水碳酸钾(20 当量),将悬浮液剧烈搅拌,同时滴加过量亚硫酸氯。1 小时后,在旋转蒸发器上除去溶剂和过量亚硫酸氯,残渣用乙酸乙酯得取。蒸发至干,得到 1-(N,N-二甲基氨基)-5-(叔丁氧基羰基)氨基-1-氯甲基戊烷,(3),如果需要,该产物可用硅胶色谱法进一步提纯。

(d) 向(3)的甲苯溶液中加入 1,8-二氮杂二环[5.4.0]十一碳-7-烯(2.2 当量),接着加硫代苯甲酸(1.1 当量),将溶液回流出热。在硅胶板上用薄层色谱法(TLC)监测反应的进程,用 5% 磷钼酸甲醇液显色。反应完成时,将有机提取物蒸发至干,残渣再溶于氯仿,用水洗一次,用无水硫酸钠干燥,蒸发,得到粗品 S-苯甲酰基-2-(N,N-二甲基氨基)-5-(叔丁氧基羰基)氨基硫醇,(4)。用快速色谱法将此化合物进一步提纯。

(e) 在室温下边搅拌边向(4)的二氯甲烷溶液中加入三氟乙酸(10当量)。2小时后,将溶剂蒸发至干,得到(5),该产物直接用于和抗体片断氧化的碳水化合物部分结合。

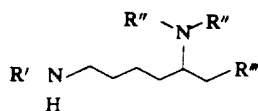
实施例 10

双官能团整合剂(5)与氧化抗体的偶联

将 LL2 F(ab')₂ 片断(2.5mg)放在约 1ml 50mM 乙酸盐缓冲的 0.9% 盐水 (ABS; pH5.3) 中,在黑暗中,用偏高碘酸钠(210μl 5.68mg/ml 的溶液)0℃处理 1 小时,进行氧化。反应混合物用乙二醇(20μl)处理,分解未反应的高碘酸盐,将氧化的抗体片断用以 PBS(pH6.1)平衡的 Sephadex G-50/80 粒(Pharmacia; Piscataway, NJ)提纯。然后将氧化的片断与过量整合剂(5)反应。室温下反应 40 小时后,用 NaBH₃CN 还原希夫氏碱。用以 0.1M 乙酸盐(pH6.5)平衡的离心体积排阻柱(Sephadex G-50/80)提纯结合抗体。测定 280nm 处吸光度,测得抗体结合物的浓度。

实施例 11

双官能团整合剂(10)的制备



(6) R' = Boc, R'' = CH₂CO₂^tBu, R''' = OH

(7) R' = Boc, R'' = (CH₂)₂OH, R''' = OH

(8) R' = Boc, R'' = (CH₂)₂Cl, R''' = Cl

(9) R' = Boc, R'' = (CH₂)₂SCOPh, R''' = SCOPh

(a) 边搅拌边向 2-氨基-6-N(叔丁氧羰基)氨基-1-己醇(1)的无水乙腈溶液中加入无水碳酸钠,接着加溴乙酸叔丁酯(2.2当量)。将混合物回流搅拌 6—10 小时,然后用乙酸乙酯提取。溶液蒸发至干,用硅胶色谱法提纯,得到(6),得率 68—75%。

(b) 在室温下,边搅拌边向(6)的二氯甲烷溶液中加入三氟乙酸(10当量)。1小时后真空除去溶剂,残渣溶于干 THF。将溶液冷却至 4℃,经 15 分钟滴加甲硼烷-THF 复合物(3当量)。搅拌 2 小时后,用含水 THF 分解过剩的甲硼烷,通过与 5 M 氢氧化钠水溶液回流 10—18 小时分解硼酸酯。用乙酸乙酯提取混合物,用盐水洗涤有机溶液,用无水硫酸钠干燥,真空蒸发至干。残渣用 THF : 水 (1 : 1) 溶解,用 0.1M NaOH 将 pH 调至 10。分次加入碳酸二丁酯(Di-t-butyl dicarbonate)(2.2当量),需要时加 0.1M NaOH 保持 pH 于 9—10。完成加成反应后 1 小时,将溶液用乙酸乙酯萃取,有机层干燥,真空蒸发。残渣用硅胶色谱法

得到(7)。

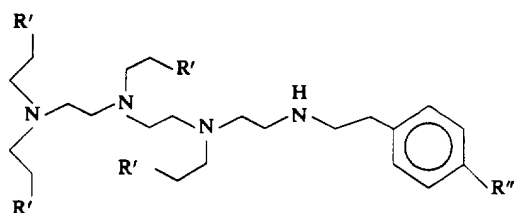
(c) 向冷却至 4℃ 的(7)的氯仿溶液中加入无水碳酸钾(20 当量), 悬浮液剧烈搅拌, 同时滴加过量亚硫酸氯。1 小时后, 在旋转蒸发器上除去溶剂和过量的亚硫酸氯, 残渣用乙酸乙酯提取, 蒸发至干, 得到(8)。

(d) 向(8) 的甲苯溶液中加入 1,8-二氮杂二环[5.4.0]十一碳-7-烯(1.8 当量/氯化物基团), 接着加入硫代苯甲酸(1.4 当量/氯化物基团), 将溶液回流加热。在硅胶板上用薄层色谱法(TLC)监测反应的进程, 用 5% 磷钼酸乙醇液显色。当反应完成时, 将有机提取物蒸发至干, 残渣再溶于氯仿, 用水洗 1 次, 用无水硫酸钠干燥, 真空蒸发, 得到粗品(9), 该产物用快速色谱法提纯。(9)的¹H NMR 谱(400MHz)显示信号于: 7.95 (m, 6H), 7.55 (t, 3H, J=8), 7.42 (m, 6H), 3.25—2.75 (m, 13H), 1.6—1.2 (m, 6H), 1.44 (s, 9H)。

(e) 在室温下边搅拌边向(9)的二氯甲烷溶液中加入三氟乙酸(10 当量)。24 小时后将溶剂蒸干, 得到(10), 如面的实施例 10 所述, 该产物直接用于结合反应。

实施例 12

双官能团整合剂(14)的制备



(11) $R' = \text{OH}, R'' = \text{NO}_2$

(12) $R' = \text{OH}, R'' = \text{NHBOc}$

(13) $R' = \text{SCOPh}, R'' = \text{NHBOc}$

(14) $R' = \text{SCOPh}, R'' = \text{NH}_2$

(a) 向二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)二酐的 DMF 溶液中加入三乙胺(1 当量), 接着加入 4-硝基苯乙胺(0.25 当量)。搅拌 2 小时后, 加入 0.1M NaOH(过量)。1 小时后, 用 0.1M HCl 将溶液酸化, 真空蒸发。将有机残渣溶解在无水 THF 中, 用硫酸镁干燥, 冷却于 4℃。经 15 分钟滴加甲硼烷-THF 复合物(6 当量)。搅拌 2 小时后, 加入 0.1M HCl 分解硼酸酯。加入过量饱和碳酸氢钠溶液, 用乙酸乙酯提取混合物。有机溶液用盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 真空蒸干, 得到(11)。

(b) 边搅拌边向(11)的甲醇溶液中加入钯炭催化剂(0.1 当量)。将悬浮液置于氢气氛围下, 使还原反应进行到 TLC 指示无(11)存在。将反应混合物用氩气吹扫 3 次, 滤去催化剂, 蒸发至干。用 THF : 水(1 : 1)溶解残渣, 用 0.1M NaOH 调节 pH 至 10。分次加入碳酸二叔丁酯(2.2 当量), 需要时加 0.1M

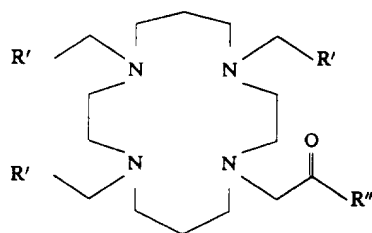
NaOH 使 pH 维持于 9—10。加成反应完成 1 小时后,将溶液用乙酸乙酯萃取,真空蒸发。残渣用硅胶色谱法得到(12)。

(c) 在 4℃下,向(12)的氯仿溶液中加入无水碳酸钾(20 当量),将悬浮液剧烈搅拌,同时滴加过量亚硫酸氯。1 小时后,在旋转蒸发器上除去溶剂和过量亚硫酸氯,残渣用乙酸乙酯提取。真空除去溶剂,将残渣溶解在甲苯中。加入 1,8-二氮杂二环[5.4.0]十一碳-7-烯(2.2 当量),接着加入硫代苯甲酸(1.1 当量),溶液加热回流。5 小时后,蒸干有机提取物,将残渣再溶于氯仿,用水洗一次,用无水硫酸钠干燥,真空蒸发,得到粗品(13),该产物用快速色谱法进一步提纯。

(d) 在室温下,向(13)的二氯甲烷溶液中加入三氟乙酸(10 当量)。2 小时后蒸干溶剂,如上面实施例 10 所述,残渣直接用于结合反应。

实施例 13

双官能团整合剂(19)的制备



(15) $R' = \text{CO}_2^t\text{Bu}$, $R'' = \text{O}^t\text{Bu}$

(16) $R' = \text{CH}_2\text{OH}$, $R'' = \text{NH}(\text{CH}_2)_2 - p - \text{C}_6\text{H}_4\text{NO}_2$

(17) $R' = \text{CH}_2\text{OH}$, $R'' = \text{NH}(\text{CH}_2)_2 - p - \text{C}_6\text{H}_4\text{NHBoc}$

(18) $R' = \text{CH}_2\text{SCOPh}$, $R'' = \text{NH}(\text{CH}_2)_2 - p - \text{C}_6\text{H}_4\text{NHBoc}$

(19) $R' = \text{CH}_2\text{SCOPh}$, $R'' = \text{NH}(\text{CH}_2)_2 - p - \text{C}_6\text{H}_4\text{NH}_2$

(a) 向 1,4,8,11-四氮杂环十四烷的无水乙腈溶液中加入无水碳酸钠,接着加入溴乙酸叔丁酯(6 当量)。将混合物加热回流 6—10 小时,然后用乙酸乙酯提取。蒸干溶液,用硅胶色谱法提纯,得到(15)。

(b) 在室温下向(15)的二氯甲烷溶液中加入三氟乙酸(10 当量)。24 小时后,将溶剂蒸干,残渣溶于最小量的 DMF。将溶液冷却至 4℃,加入亚硫酸氯(过量)。2 小时后,将溶液真空蒸发除去过量亚硫酸氯,并加入三乙胺(10 当量),然后加入 4-硝基苯乙胺(0.25 当量)。分次加入粉末状硼氢化钠以还原剩余的酰基团,然后加入 0.1M HCl。将溶液用乙酸乙酯萃取,用盐水洗涤有机溶液,真空蒸发。残渣用硅胶色谱法得到纯品(16)。

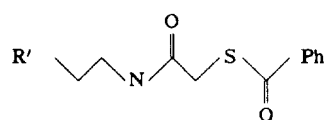
(c) 边搅拌边向(16)的甲醇溶液中加入钨炭催化剂(0.1当量)。将悬浮液置于氢气氛围下,使还原反应进行到TLC指示无(16)存在。将反应混合物用氩气吹扫3次,滤去催化剂,蒸发至干。残渣用THF:水(1:1)溶解,用0.1M NaOH将pH调节至10,分次加入碳酸二叔丁酯,需要时加入0.1M NaOH使pH维持在9—10。加成反应完成后1小时,用乙酸乙酯萃取溶液,将有机层干燥,真空蒸发。残渣用硅胶色谱法得到(17)。

(d) 在4°C下,向(17)的氯仿溶液中加入无水碳酸钾(20当量),将悬浮液剧烈搅拌,同时滴加过量亚硫酸氯。1小时后,在旋转蒸发器上除去溶剂和过量的亚硫酸氯,残渣用乙酸乙酯提取。真空去除溶剂,残渣溶解在甲苯中。加入1,8-二氮杂二环[5.4.0]十一碳-7-烯(1.8当量/氯化物基团),然后加入硫代苯甲酸(1.4当量/氯化物)将溶液加热回流。5小时后,将有机提取物蒸发至干,残渣再溶于氯仿,用水洗1次,用无水硫酸钠干燥,真空蒸发,得到粗品(18),再用快速色谱法提纯。

(e) 在室温下,向(18)的二氯甲烷溶液中加入三氟乙酸(10当量)。2小时后将溶剂蒸干,得到(19)。如上面实施例10所述,直接用于结合反应。

实施例 13

双官能团整合剂(21)的制备



(20) R' = NHBoc

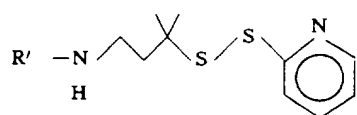
(21) R' = NH₂

(a) 向冷却至4°C的N-Boc N'-甲基乙二胺的二氯甲烷溶液中加入三乙胺(10当量),接着加入氯乙酰氯(1.1当量)。搅拌30分钟后,加水,分离有机层,干燥,真空浓缩至干。用甲苯溶解残渣,加入1,8-二氮杂二环[5.4.0]十一碳-7-烯(2.2当量),然后加入硫代苯甲酸(1.1当量),将溶液加热回流。5小时后,将有机提取物蒸发至干,残渣再溶于氯仿,用水洗一次,用无水硫酸钠干燥,真空蒸发,得到粗品(20),用快速色谱法进一步提纯。

(b) 在室温下,向(20)的二氯甲烷溶液加入三氟乙酸(10当量)。2小时后,将溶剂蒸干,得到(21),如上面实施例10所述,直接用于结合反应。

实施例 14

双官能团整合剂(23)的制备



(23) R' = NHBoc

(24) R' = NH₂

(a) 向冷却至 4°C 的 N-Boc-胍的二氯甲烷溶液中加入三乙胺(10 当量), 然后加二甲基丙烯酰氯(1.1 当量)。搅拌 30 分钟后, 加水, 分离有机层, 干燥, 真空浓缩至干。用甲苯溶解残渣, 加入 1,8-二氮杂二环[5.4.0]十一碳-7-烯(2.2 当量), 然后加入硫代苯甲酸(1.1 当量), 将溶液加热回流。5 小时后, 将有机提取物蒸发至干, 残渣再溶于氯仿, 用水洗涤一次, 用无水硫酸钠干燥, 真空蒸发至干, 得到粗品(22), 用快速色谱法提纯。用甲醇钠甲醇液将硫醇基去保护, 将硫醇再保护成 2-吡啶硫基实体。

(b) 在室温下向(22)的二氯甲烷溶液中加入三氟乙酸(10 当量)。2 小时后将溶剂蒸发至干, 得到(23), 如上面实施例 10 所述, 直接用于结合反应。

实施例 15

DTPA 氨基脲衍生物的制备, 结合和放射性标记,

产生具有酸不稳定性键的免疫结合物

(a) 对-(硫代氨基脲基)苄基-DTPA 的制备

将对-(异氰酸根合)苄基 DTPA(19.7 μ mol)放在 0.5ml 水中, 与 6.6 μ l 55% 水合胍的水溶液(6 当量)混合, 用固体碳酸钠将溶液的 pH 调节为 9.13。将清彻的反应混合物 37°C 培养 4 小时。然后将 pH 提高到 12.8, 用高真空泵除去水。残渣用异丙醇提取两次以除去残余的胍, 并溶解在 0.3ml 水中。将 pH 调节到 6.5, 得到所需产物的水溶液, 浓度为 60 μ mol/ml。

(b) 对-(硫代氨基脲基)苄基-DTPA 与氧化的抗体片断 LL2 F(ab')₂ 碳水化合物部分的偶联

用终浓度 14.3mM 的偏高碘酸钠处理 LL2 F(ab')₂ 片断(0.8ml; 1.95mg/ml)(在 50mM 乙酸盐缓冲的盐水(pH5.3 中), 0°C(冰浴)培养 1 小时。用乙二醇(2 μ l)分解过量的高碘酸盐, 在以 0.1M 磷酸盐缓冲液(pH7)平衡的离心体积排阻柱上提纯氧化的抗体。

将氧化抗体的溶液配成 150mM, 相对于氯化钠, 将 pH 调节至 6.2(用固体磷酸钠, 一价的), 然后用 300 倍摩尔过量的对-(硫代氨基脲基)苄基-DTPA 处理。将反应混合物涡旋, 在黑暗中室温培养 18 小时。在以 0.1M 乙酸盐(pH6.5)平衡的离心体积排阻柱上提纯结合物, 在 Centricon 30 浓缩器上浓缩。

结合物的 HPLC 分析显示一个单峰, 与未修饰的抗体的峰保留时间相同。

(c) 每个 LL2 F(ab')₂ 的整合剂数目的测定

将 40 μ g 上述结合物用过量乙酸钴标记, 以 50—200,000cpm 钴⁵⁷放射性同

位素示踪。30 分钟后,用 EDTA 将标记混合物配成 10mM,分析抗体中钴的掺入(用浸渍硅胶的玻璃纤维条进行 ITLC,用 10mM EDTA 作色谱展开)。从结合于抗体的放射活性分数,结合物和所用 Co/⁵⁷Co 溶液的相对摩尔量,得到每个抗体片断的螯合剂数目为 1.25。

(d) 用 Y-90 放射标记结合物

将 5 μ l(50 μ g)对-(硫代缩氨基脲基)苄基-DTPA-F(ab')₂ 结合物在 0.1mM 乙酸钠(pH6.5)中的溶液与 4 μ l Y-90 乙酸盐(95.5 μ Ci)混合,培养 1 小时,作掺入分析。在与 10mM EDTA 培养 10 分钟后,对标记混合物的等分试样进行即时薄层色谱分析。Y-90 掺入量为 77.3%,1.2%放射活性存在于胶体状态。放射性 HPLC 显示掺入量为 64%。

(e) 用 In-111 放射标记结合物

将 60 μ g 对-(硫代缩氨基脲基)苄基-DTPA-F(ab')₂ 结合物溶液与 124 μ Ci 乙酸钠¹¹¹(以 0.22M 乙酸铵缓冲的氯化铟¹¹¹混合,放在室温下 45 分钟。与 10mM EDTA 培养后分析标记混合物的等分试样,显示结合物中掺入 In¹¹¹ 86%。用 0.1M 乙酸盐将样品稀释到 90 μ l,与 10 μ l 0.1 M DTPA 溶液(pH7)培养 10 分钟。用体积排阻色谱法进行 2 次相继的提纯,得到 In¹¹¹标记的结合物。

上面提到特别好的实施方案,但可以理解,本发明并不受此限制。本领域普通技术人员会想起对所公开的实施方案可作各种改变,这些改变在本发明的范围内,由下面的权利要求所限定。

本说明书中提到的所有出版物和专利申请表示与本发明有关的本领域技术人的技术水平。所有出版物和专利申请均在此引为参考,其程度就好象每个出版物或专利申请都明确地、分别地指出其全文引为参考一样。