(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 114555641 A
(43)申请公布日 2022.05.27

(21)申请号 202080054212.1
(22)申请日 2020.07.02
(30)优先权数据
2019902344 2019.07.02 AU
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.01.26
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/AU2020/050690 2020.07.02
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/000018 EN 2021.01.07
(71)申请人 泰利克斯国际有限公司
地址 澳大利亚,维多利亚州
(72)发明人 M·P·维特克罗夫特
C·P·贝伦布鲁赫
(74)专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314
专利代理师 程伟
(51)Int.Cl.
C07K 16/30(2006.01)
G01N 33/534(2006.01)
G01N 33/574(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
A61K 51/10(2006.01)
A61P 13/08(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

权利要求书7页 说明书49页
序列表25页 附图14页

(54)发明名称

对新生儿Fc受体具有减少的亲和力的用于结合PSMA的抗体

(57)摘要

本发明涉及包含与野生型IgG相比含有一个或多个氨基酸取代的重链恒定区的抗PSMA抗体,其中与IgG类野生型抗体相比,该一个或多个氨基酸取代减少该抗体对新生儿Fc受体(FcRn)的亲和力,从而减少该修饰抗体的血清半衰期。具有减少FcRn结合的作用的该一个或多个氨基酸修饰选自位置His310、His433、His435、His436、Ile253。本发明的抗体特别适合用于放射免疫疗法。

CN 114555641 A

1.一种与未修饰形式的抗体相比或与IgG类野生型抗体相比具有减少的FcRn结合亲和力的修饰抗体,该修饰抗体包含:

-重链恒定区,其中在位置His310、His433、His435、His436、Ile253处的一个或多个氨基酸残基与未修饰抗体或IgG类野生型抗体中存在的残基不同,

其中所述抗体特异性结合前列腺特异性膜抗原(PSMA),并且其中该抗体包含:

FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-接头-FR1a-CDR1a-FR2a-CDR2a-FR3a-CDR3a-FR4a

其中:

FR1、FR2、FR3和FR4各自是框架区;

CDR1、CDR2和CDR3各自是互补决定区;

FR1a、FR2a、FR3a和FR4a各自是框架区;

CDR1a、CDR2a和CDR3a各自是互补决定区;

其中任一互补决定区的序列具有如表1中所述的氨基酸序列。

2.如权利要求1所述的修饰抗体,其中特异性结合PSMA的该抗体包含抗原结合位点,该抗原结合位点包含(按N末端到C末端或C末端到N末端的顺序)SEQ ID NO:4或20的氨基酸序列或基本上由其组成或由其组成。

3.如权利要求1或2所述的修饰抗体,其中该抗体包含以下至少一项:

(i)VH,该VH包含含有与SEQ ID NO 1或17中所示的序列至少约80%、至少85%、至少90%、至少92%、至少95%、至少97%、至少99%相同的序列的互补决定区(CDR)1,含有与SEQ ID NO:2或18中所示的序列至少约80%、至少85%、至少90%、至少92%、至少95%、至少97%、至少99%相同的序列的CDR2,以及含有与SEQ ID NO:3或19中所示的序列至少约80%、至少85%、至少90%、至少92%、至少95%、至少97%、至少99%相同的序列的CDR3;

(ii)VH,该VH包含与SEQ ID NO:4或20中所示的序列至少约95%或96%或97%或98%或99%相同的序列;

(iii)VL,该VL包含含有与SEQ ID NO:33中所示的序列至少约80%、至少85%、至少90%、至少92%、至少95%、至少97%、至少99%相同的序列的CDR1,含有与SEQ ID NO:34中所示的序列至少约80%、至少85%、至少90%、至少92%、至少95%、至少97%、至少99%相同的序列的CDR2,以及含有与SEQ ID NO:35中所示的序列至少约80%、至少85%、至少90%、至少92%、至少95%、至少97%、至少99%相同的序列的CDR3;

(iv)VL,该VL包含与SEQ ID NO:36中所示的序列至少约95%相同的序列;

(v)VH,该VH包含含有SEQ ID NO:1或17中所示的序列的CDR1,含有SEQ ID NO:2或18中所示的序列的CDR2,以及含有SEQ ID NO:3或19中所示的序列的CDR3;

(vi)VH,该VH包含SEQ ID NO:4或20中所示的序列;

(vii)VL,该VL包含含有SEQ ID NO:33中所示的序列的CDR1,含有SEQ ID NO:34中所示的序列的CDR2,以及含有SEQ ID NO:45中所示的序列的CDR3;

(viii)VL,该VL包含SEQ ID NO:36中所示的序列;

(ix)VH,该VH包含含有SEQ ID NO:1或17中所示的序列的CDR1,含有SEQ ID NO:2或18中所示的序列的CDR2,以及含有SEQ ID NO:3或19中所示的序列的CDR3;以及VL,该VL包含含有SEQ ID NO:33中所示的序列的CDR1,含有SEQ ID NO:34中所示的序列的CDR2,以及含有SEQ ID NO:35中所示的序列的CDR3;或

(x)VH,该VH包含SEQ ID NO:4或20中所示的序列;和VL,该VL包含SEQ ID NO:36中所示的序列。

4.如权利要求1至3中任一项所述的修饰抗体,其中该抗体的重链恒定区包含His310和His435两者处的氨基酸取代。

5.如权利要求1至4中任一项所述的修饰抗体,其中该抗体的重链恒定区包含在等同于该恒定重链区的Ser228和Leu235的残基处的氨基酸取代。

6.如权利要求1至5中任一项所述的修饰抗体,其中该抗体的重链恒定区包含SEQ ID NO:50或SEQ ID NO:51中所示的氨基酸序列。

7.如权利要求1至6中任一项所述的修饰抗体,其中该抗体包含SEQ ID NO:53和57的序列。

8.一种包含免疫球蛋白部分和与其缀合的非蛋白剂的分子,

其中该免疫球蛋白部分特异性结合PSMA并包含抗原结合位点,该抗原结合位点包括:

FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-接头-FR1a-CDR1a-FR2a-CDR2a-FR3a-CDR3a-FR4a

其中:

FR1、FR2、FR3和FR4各自是框架区;

CDR1、CDR2和CDR3各自是互补决定区;

FR1a、FR2a、FR3a和FR4a各自是框架区;

CDR1a、CDR2a和CDR3a各自是互补决定区;

其中任一互补决定区的序列具有如表1所述的氨基酸序列;

其中该免疫球蛋白部分与野生型免疫球蛋白相比对该FcRn受体的亲和力减少或消除;并且

其中该非蛋白剂包含治疗部分,优选细胞毒素或放射性元素。

9.如权利要求8所述的分子,其中该免疫球蛋白部分包含抗原结合位点,该抗原结合位点基本上由(按N末端到C末端或C末端到N末端的顺序)SEQ ID NO:4或20的氨基酸序列组成或由其组成。

10.如权利要求8或9所述的分子,其中该免疫球蛋白部分包含以下至少一项:

(i)VH,该VH包含含有与SEQ ID NO 1或17中所示的序列至少约80%、至少85%、至少90%、至少92%、至少95%、至少97%、至少99%相同的序列的互补决定区(CDR)1,含有与SEQ ID NO:2或18中所示的序列至少约80%、至少85%、至少90%、至少92%、至少95%、至少97%、至少99%相同的序列的CDR2,以及含有与SEQ ID NO:3或19中所示的序列至少约80%、至少85%、至少90%、至少92%、至少95%、至少97%、至少99%相同的序列的CDR3;

(ii)VH,该VH包含与SEQ ID NO:4或20中所示的序列至少约95%或96%或97%或98%或99%相同的序列;

(iii)VL,该VL包含含有与SEQ ID NO:33中所示的序列至少约80%、至少85%、至少90%、至少92%、至少95%、至少97%、至少99%相同的序列的CDR1,含有与SEQ ID NO:34中所示的序列至少约80%、至少85%、至少90%、至少92%、至少95%、至少97%、至少99%相同的序列的CDR2,以及含有与SEQ ID NO:35中所示的序列至少约80%、至少85%、至少90%、至少92%、至少95%、至少97%、至少99%相同的序列的CDR3;

(iv)VL,该VL包含与SEQ ID NO:36中所示的序列至少约95%相同的序列;

(v)VH,该VH包含含有SEQ ID NO:1或17中所示的序列的CDR1,含有SEQ ID NO:2或18中所示的序列的CDR2,以及含有SEQ ID NO:3或19中所示的序列的CDR3;

(vi)VH,该VH包含SEQ ID NO:4或20中所示的序列;

(vii)VL,该VL包含含有SEQ ID NO:33中所示的序列的CDR1,含有SEQ ID NO:34中所示的序列的CDR2,以及含有SEQ ID NO:45中所示的序列的CDR3;

(viii)VL,该VL包含SEQ ID NO:36中所示的序列;

(ix)VH,该VH包含含有SEQ ID NO:1或17中所示的序列的CDR1,含有SEQ ID NO:2或18中所示的序列的CDR2,以及含有SEQ ID NO:3或19中所示的序列的CDR3;以及VL,该VL包含含有SEQ ID NO:33中所示的序列的CDR1,含有SEQ ID NO:34中所示的序列的CDR2,以及含有SEQ ID NO:35中所示的序列的CDR3;或

(x)VH,该VH包含SEQ ID NO:4或20中所示的序列;和VL,该VL包含SEQ ID NO:36中所示的序列。

11.如权利要求8至10中任一项所述的分子,其中该免疫球蛋白部分包含在等同于该恒定重链区的His310和/或His435的残基处的氨基酸取代,从而减少或消除该免疫球蛋白部分对该FcRn受体的亲和力。

12.如权利要求8至11中任一项所述的分子,其中该免疫球蛋白部分进一步包含在等同于该恒定重链区的Ser228和Leu235的残基处的一个或多个氨基酸取代,从而减少该部分对激活Fcγ受体的亲和力或稳定该部分。

13.如权利要求8至12中任一项所述的分子,其中该非蛋白剂包含放射性同位素形式的治疗剂。

14.如权利要求8至13中任一项所述的分子,其中该非蛋白剂包含选自由以下组成的组的放射性同位素:锕-225(^{225}Ac),砹-211(^{211}At),铋-212和铋-213(^{212}Bi、^{213}Bi),铜-64和铜-67(^{64}Cu、^{67}Cu),镓-67和镓-68(^{67}Ga和^{68}Ga),铟-111(^{111}In),碘-123、碘-124、碘-125或碘-131(^{123}I、^{124}I、^{125}I、^{131}I)(^{123}I),铅-212(^{212}Pb),镥-177(^{177}Lu),镭-223(^{223}Ra),钐-153(^{153}Sm),钪-44和钪-47(^{44}Sc、^{47}Sc),锶-90(^{90}Sr),锝-99(^{99m}Tc),钇-86和钇-90(^{86}Y、^{90}Y),以及锆-89(^{89}Zr)。

15.如权利要求13或14所述的分子,其中该放射性同位素选自:锕-225(^{225}Ac)、砹-211(^{211}At)和碘-123(^{123}I)。

16.一种治疗个体的前列腺癌的方法,该方法包括向有需要的个体施用如权利要求1至7中任一项所述的抗体或如权利要求8至15中任一项所述的分子。

17.如权利要求1至7中任一项所述的抗体或如权利要求8至15中任一项所述的分子在制造用于治疗前列腺癌的药物中的用途。

18.如权利要求1至7中任一项所述的抗体或如权利要求8至15中任一项所述的分子,用于治疗前列腺癌。

19.一种药物组合物,其包含如权利要求1至7中任一项所述的抗体或如权利要求8至15中任一项所述的分子。

20.一种治疗性IgG分子,其包含:

-重链和轻链,其中每条链包含可变区和恒定区;

-其中该重链的恒定区与IgG类野生型抗体相比包含一个或多个氨基酸取代,其中与

IgG类野生型抗体相比，该一个或多个氨基酸取代减少该抗体对新生儿Fc受体(FcRn)的亲和力，从而减少该修饰单克隆抗体的血清半衰期；以及

-缀合至这些重链或轻链的一个或多个氨基酸残基的放射性同位素；

-其中该IgG分子包含：

(i)VH，该VH包含含有与SEQ ID NO 1或17中所示的序列至少约80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％相同的序列的互补决定区(CDR)1，含有与SEQ ID NO:2或18中所示的序列至少约80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％相同的序列的CDR2，以及含有与SEQ ID NO:3或19中所示的序列至少约80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％相同的序列的CDR3；

(ii)VH，该VH包含与SEQ ID NO:4或20中所示的序列至少约95％或96％或97％或98％或99％相同的序列；

(iii)VL，该VL包含含有与SEQ ID NO:33中所示的序列至少约80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％相同的序列的CDR1，含有与SEQ ID NO:34中所示的序列至少约80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％相同的序列的CDR2，以及含有与SEQ ID NO:35中所示的序列至少约80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％相同的序列的CDR3；

(iv)VL，该VL包含与SEQ ID NO:36中所示的序列至少约95％相同的序列；

(v)VH，该VH包含含有SEQ ID NO:1或17中所示的序列的CDR1，含有SEQ ID NO:2或18中所示的序列的CDR2，以及含有SEQ ID NO:3或19中所示的序列的CDR3；

(vi)VH，该VH包含SEQ ID NO:4或20中所示的序列；

(vii)VL，该VL包含含有SEQ ID NO:33中所示的序列的CDR1，含有SEQ ID NO:34中所示的序列的CDR2，以及含有SEQ ID NO:45中所示的序列的CDR3；

(viii)VL，该VL包含SEQ ID NO:36中所示的序列；

(ix)VH，该VH包含含有SEQ ID NO:1或17中所示的序列的CDR1，含有SEQ ID NO:2或18中所示的序列的CDR2，以及含有SEQ ID NO:3或19中所示的序列的CDR3；以及VL，该VL包含含有SEQ ID NO:33中所示的序列的CDR1，含有SEQ ID NO:34中所示的序列的CDR2，以及含有SEQ ID NO:35中所示的序列的CDR3；或

(x)VH，该VH包含SEQ ID NO:4或20中所示的序列；和VL，该VL包含SEQ ID NO:36中所示的序列。

21.如权利要求20所述的治疗性IgG分子，其中该重链的可变区(VH)包含如以下任一项中所示的氨基酸序列：SEQ ID NO:4。

22.如权利要求20至21中任一项所述的治疗性IgG分子，其中该轻链的可变区包含如以下任一项中所示的氨基酸序列：SEQ ID NO:36。

23.如权利要求20至22中任一项所述的治疗性IgG分子，其中该一个或多个氨基酸取代包括在该重链恒定区中的位置His310或His435处的取代，优选地其中这些氨基酸取代在His310和His435两者处。

24.如权利要求20至23中任一项所述的治疗性IgG分子，其中该修饰抗体进一步包含：(a)与IgG类野生型抗体相比减少该抗体对一个或多个Fcγ受体的亲和力的一个或多个氨基酸取代；和/或(b)与IgG类野生型抗体相比增加该修饰抗体中的CH1-CH2铰链区的稳定性

的一个或多个氨基酸取代。

25.如权利要求24所述的治疗性IgG分子，其中减少该抗体对Fcγ受体的亲和力的该一个或多个氨基酸取代包括位置Leu235处的取代。

26.如权利要求24或25所述的治疗性IgG分子，其中增加该抗体中的CH1-CH2铰链区的稳定性的该一个或多个氨基酸取代包括IgG分子处的取代。

27.如权利要求20至26中任一项所述的治疗性抗体，其中该重链包含如SEQ ID NO:53中所示的氨基酸序列。

28.如权利要求20至27中任一项所述的治疗性IgG分子，其中该轻链包含如SEQ ID NO:57中所示的氨基酸序列。

29.如权利要求20至28中任一项所述的治疗性IgG分子，其中该抗体包含如53所示的氨基酸序列，并且该抗体包含SEQ ID NO:57所示的氨基酸序列。

30.一种结合或特异性结合前列腺特异性膜抗原(PSMA)的抗原结合位点，该抗原结合位点包含：

FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-接头-FR1a-CDR1a-FR2a-CDR2a-FR3a-CDR3a-FR4a

其中：

FR1、FR2、FR3和FR4各自是框架区；

CDR1、CDR2和CDR3各自是互补决定区；

FR1a、FR2a、FR3a和FR4a各自是框架区；

CDR1a、CDR2a和CDR3a各自是互补决定区；

其中任一互补决定区的序列具有如表1中所述的氨基酸序列。

31.如权利要求30所述的抗原结合位点，该抗原结合位点包含(按N末端到C末端或C末端到N末端的顺序)SEQ ID NO:20的氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成。

32.如权利要求30或31所述的抗原结合位点，该抗原结合位点包含抗体的抗原结合结构域，其中该抗原结合结构域结合或特异性结合PSMA，其中该抗原结合结构域包含以下至少一项：

(i)VH，该VH包含含有与SEQ ID NO:17中所示的序列至少约80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％相同的序列的互补决定区(CDR)1，含有与SEQ ID NO:18中所示的序列至少约80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％相同的序列的CDR2，以及含有与SEQ ID NO:19中所示的序列至少约80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％相同的序列的CDR3；

(ii)VH，该VH包含与SEQ ID NO 4或20中所示的序列至少约95％或96％或97％或98％或99％相同的序列；

(iii)VL，该VL包含含有与SEQ ID NO:33中所示的序列至少约80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％相同的序列的CDR1，含有与SEQ ID NO:34中所示的序列至少约80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％相同的序列的CDR2，以及含有与SEQ ID NO:35中所示的序列至少约80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％相同的序列的CDR3；

(iv)VL，该VL包含与SEQ ID NO:36中所示的序列至少约95％相同的序列；

(v)VH，该VH包含含有SEQ ID NO:17中所示的序列的CDR1，含有SEQ ID NO:18中所示的

序列的CDR2,以及含有SEQ ID NO:19中所示的序列的CDR3;

(vi)VH,该VH包含SEQ ID NO:4或20中所示的序列;

(vii)VL,该VL包含含有SEQ ID NO:33中所示的序列的CDR1,含有SEQ ID NO:34中所示的序列的CDR2,以及含有SEQ ID NO:45中所示的序列的CDR3;

(viii)VL,该VL包含SEQ ID NO:36中所示的序列;

(ix)VH,该VH包含含有SEQ ID NO:17中所示的序列的CDR1,含有SEQ ID NO:18中所示的序列的CDR2,以及含有SEQ ID NO:19中所示的序列的CDR3;以及VL,该VL包含含有SEQ ID NO:33中所示的序列的CDR1,含有SEQ ID NO:34中所示的序列的CDR2,以及含有SEQ ID NO:35中所示的序列的CDR3;或

(x)VH,该VH包含SEQ ID NO:20中所示的序列;和VL,该VL包含SEQ ID NO:36中所示的序列。

33.如权利要求30至32中任一项所述的抗原结合位点,其中该抗原结合结构域进一步包含以下至少一项:

(i)VH,该VH包含含有与SEQ ID NO:25中所示的序列至少约80%、至少85%、至少90%、至少92%、至少95%、至少97%、至少99%相同的序列的框架区(FR)1,含有与SEQ ID NO:26中所示的序列至少约80%、至少85%、至少90%、至少92%、至少95%、至少97%、至少99%相同的序列的FR2,含有与SEQ ID NO:27中所示的序列至少约80%、至少85%、至少90%、至少92%、至少95%、至少97%、至少99%相同的序列的FR3,以及含有与SEQ ID NO:28中所示的序列至少约80%、至少85%、至少90%、至少92%、至少95%、至少97%、至少99%相同的序列的FR4;

(ii)VL,该VL包含含有与SEQ ID NO:41中所示的序列至少约80%、至少85%、至少90%、至少92%、至少95%、至少97%、至少99%相同的序列的FR1,含有与SEQ ID NO:42中所示的序列至少约80%、至少85%、至少90%、至少92%、至少95%、至少97%、至少99%相同的序列的FR2,含有与SEQ ID NO:43中所示的序列至少约80%、至少85%、至少90%、至少92%、至少95%、至少97%、至少99%相同的序列的FR3,以及含有与SEQ ID NO:44中所示的序列至少约80%、至少85%、至少90%、至少92%、至少95%、至少97%、至少99%相同的序列的FR4;

(iii)VH,该VH包含含有SEQ ID NO:25中所示的序列的FR1,含有SEQ ID NO:26中所示的序列的FR2,含有SEQ ID NO:27中所示的序列的FR3,以及含有SEQ ID NO:28中所示的序列的FR4;

(iv)VL,该VL包含含有SEQ ID NO:41中所示的序列的FR1,含有SEQ ID NO:42中所示的序列的FR2,含有SEQ ID NO:43中所示的序列的FR3,以及含有SEQ ID NO:44中所示的序列的FR4;或

(v)VH,该VH包含含有SEQ ID NO:25中所示的序列的FR1,含有SEQ ID NO:26中所示的序列的FR2,含有SEQ ID NO:27中所示的序列的FR3,以及含有SEQ ID NO:28中所示的序列的FR4;以及VL,该VL包含含有SEQ ID NO:41中所示的序列的FR1,含有SEQ ID NO:42中所示的序列的FR2,含有SEQ ID NO:43中所示的序列的FR3,以及含有SEQ ID NO:44中所示的序列的FR4。

34.如权利要求30至33中任一项所述的抗原结合位点,其中该抗原结合位点是抗体,优

选裸抗体。

35.如权利要求30至33中任一项所述的抗原结合位点,其中该抗原结合位点缀合至包括放射性标记在内的标记或细胞毒性剂。

36.如权利要求30至35中任一项所述的抗原结合位点,其中该抗原结合位点是包含在该抗体恒定结构域CH2-CH3区中的一个或多个氨基酸取代的IgG免疫球蛋白,其相对于野生型抗体Fc区减少该抗体对新生儿Fc受体(FcRn)的结合亲和力。

37.如权利要求36所述的抗原结合位点,其中该IgG免疫球蛋白与野生型IgG免疫球蛋白相比包含在该重链恒定区的位置His310、His435、Ile253处的一个或多个氨基酸取代。

38.如权利要求37所述的抗原结合位点,其中该一个或多个氨基酸修饰选自在等同于H310和H435的残基处的氨基酸取代,优选地其中这些氨基酸取代在H310和H435残基两者处。

39.如权利要求38所述的抗原结合位点,其中这些氨基酸取代是His310Ala和/或His435Gln。

40.如权利要求30至39中任一项所述的抗原结合位点,其中该抗原结合位点是包含修饰该抗体与激活Fcγ受体的结合的一个或多个氨基酸取代的IgG免疫球蛋白,优选地其中该氨基酸修饰是从Leu235修饰为谷氨酸。

41.如权利要求30至40中任一项所述的抗原结合位点,其中该抗原结合位点包含在Ser228处的铰链稳定氨基酸修饰,其中优选地该在Ser228处的氨基酸修饰是修饰为脯氨酸。

42.一种诊断、监测或预断受试者的疾病、障碍或感染的体内方法,该方法包括:

(a)向受试者施用有效量的如权利要求1至7中任一项所述的抗体或如权利要求30至41中任一项所述的抗原结合位点,所述抗体或抗原结合位点特异性结合与疾病、障碍或感染相关的抗原;

(b)使该抗体或抗原结合位点集中在所述受试者中发现所述抗原的部位处;以及

(c)检测所述抗体或抗原结合位点;

由此检测到高于背景或标准水平的所述抗体或抗原结合位点指示该受试者患有所述疾病、障碍或感染。

43.如权利要求42所述的方法,其中该抗体或抗原结合位点缀合至放射性标记,优选地其中该放射性标记选自由以下组成的组:锕-225(^{225}Ac),砹-211(^{211}At),铋-212和铋-213(^{212}Bi、^{213}Bi),铜-64和铜-67(^{64}Cu、^{67}Cu),镓-67和镓-68(^{67}Ga和^{68}Ga),铟-111(^{111}In),碘-123、碘-124、碘-125或碘-131(^{123}I、^{124}I、^{125}I、^{131}I)优选(^{124}I),铅-212(^{212}Pb),镥-177(^{177}Lu),镭-223(^{223}Ra),钐-153(^{153}Sm),钪-44和钪-47(^{44}Sc、^{47}Sc),锶-90(^{90}Sr),锝-99(^{99m}Tc),钇-86和钇-90(^{86}Y、^{90}Y),以及锆-89(^{89}Zr)。

44.如权利要求43所述的方法,其中该放射性标记选自:镓-67和镓-68(^{67}Ga和^{68}Ga)、碘-124(^{124}I)和锆-89(^{89}Zr)。

对新生儿Fc受体具有减少的亲和力的用于结合PSMA的抗体

技术领域

[0001] 本发明涉及抗体、组合物和生产抗体的方法，特别是用于放射免疫疗法的与放射性同位素缀合的具有减少的血清半衰期的特定抗体。

[0002] 相关申请

[0003] 本申请要求澳大利亚临时申请AU 2019902344的优先权，将其全部内容通过引用特此并入。

背景技术

[0004] 放射疗法是一种重要的肿瘤疗法形式。已经开发出多种放射疗法来治疗肿瘤。其中放射免疫疗法(RAIT)是一种提供放射疗法的新兴方法。它使用抗体或抗体片段将放射性同位素导向特定的组织和细胞，从而增强肿瘤治疗的特异性并减少毒性。RAIT通过使用低剂量率辐射进一步减少其副作用。

[0005] 对健康组织和器官的辐射损害是与放射疗法相关的主要问题。这种损害主要归因于辐射生成的活性氧物质，其氧化功能上重要的生物分子，如核酸、碳水化合物、脂质和脂蛋白，并损害组织和细胞。它们涉及多个生物过程，例如抗微生物防御、炎症、致癌作用和老化。如由体重减轻所反映的，骨髓抑制和血细胞损失(如白细胞(WBC)和血小板计数降低)以及造血毒性是辐射损害最值得注意的后果。毒性严重限制了RAIT的辐射剂量，并降低了肿瘤治疗的有效性。

[0006] 已经开发了许多方法来试图减轻辐射的造血毒性。干细胞移植(SCT)和骨髓移植(BMT)是最常用的方法。然而，这些方法是侵入性的、昂贵的，并且可能导致正在接受治疗的个体住院更长时间。

[0007] 其他方法包括使用细胞因子刺激免疫系统和血红素调节蛋白(如HP5b)，以在辐射暴露期间关闭造血。这些方法在小型研究中在对抗造血毒性方面实现了不同程度的成功，但又需要将患者暴露于进一步的用药和治疗，因此在很大程度上仍未得到使用。

[0008] 仍然需要用于减轻与放射免疫疗法相关的毒性的新方法。

[0009] 在本说明书中对任何现有技术的提及并不是承认或暗示此现有技术形成任何管辖权的公知常识的一部分，或者此现有技术可合理地预期被理解为被认为与本领域技术人员已知的其他现有技术是相关的和/或与之组合。

发明内容

[0010] 本发明提供了一种用于放射免疫疗法的IgG类修饰抗体，该IgG类修饰抗体包含与IgG类野生型抗体相比具有一个或多个氨基酸取代的重链恒定区，其中与IgG类野生型抗体相比，该一个或多个氨基酸取代减少该抗体对新生儿Fc受体(FcRn)的亲和力，从而减少该修饰抗体的血清半衰期。

[0011] 在一个实施例中，一个或多个氨基酸取代选自IgG分子的重链恒定区2(CH2)中的取代，这些取代减少IgG分子对FcRn的亲和力。可替代地，一个或多个氨基酸取代可以在IgG

分子的重链恒定区3(CH3)中,从而减少IgG分子对FcRn的亲和力。仍进一步地,氨基酸取代可包括在CH2区中的至少一个取代,以及在IgG分子的CH3区中的至少一个取代,由此这些取代减少IgG对FcRn的亲和力。

[0012] 在某些优选的实施例中,一个或多个氨基酸取代可以在IgG的残基His310、His433、His435、His436或Ile253中的一个或多个处。优选地,氨基酸取代包括在重链恒定区中的位置His310或His435处的取代。更优选地,减少抗体对FcRn的亲和力的氨基酸取代在His310和His435两者处。

[0013] 在某些实施例中,修饰抗体保留了结合一种或多种Fc-γ受体的能力,并且因此在某些实施例中,修饰抗体保留了刺激效应子应答(包括ADCC)的能力。

[0014] 在替代性实施例中,减少FcRn受体的亲和力的一种或多种氨基酸修饰也减少对Fcγ受体的亲和力。修饰抗体与IgG类野生型抗体相比可进一步包含一个或多个氨基酸取代,其中这些氨基酸取代进一步减少该抗体对一个或多个Fcγ受体的亲和力。

[0015] 在另一个实施例中,修饰抗体与IgG类野生型抗体相比进一步包含一个或多个氨基酸取代,其中与IgG类野生型抗体相比,这些氨基酸取代增加该修饰抗体中的CH1-CH2铰链区的稳定性。

[0016] 在一个实施例中,修饰抗体与诊断或治疗剂缀合。诊断或治疗剂可以直接或间接地与抗体缀合,例如通过卤化氨基酸残基。优选地,通过接头或螯合剂部分将诊断或治疗剂间接地与抗体缀合。在一个实例中,修饰抗体与螯合部分缀合,该螯合部分选自由以下项组成的组:TMT(6,6″-二[N,N″,N″′-四(羧甲基)氨基甲基)-4'-(3-氨基-4-甲氧基苯基)-2,2':6',2″-三联吡啶)、DOTA(1,4,7,10-四氮杂环十二烷-NN',N″(N″′-四乙酸)、TCMC、DO3A、CB-DO2A、NOTA、Diamsar、DTPA、CHX-A″-DTPA、TETE、Te2A、HBED、DFO、DFOsq和HOPO或如本文所述的其他螯合剂。

[0017] 在另一个实例中,修饰抗体缀合至双功能接头,例如溴乙酰基、硫醇、琥珀酰亚胺酯、TFP酯、马来酰亚胺或使用本领域已知的任何胺或硫醇修饰化学。

[0018] 优选地,诊断或治疗剂是放射性同位素。合适的同位素的实例包括:锕-225(^{225}Ac),砹-211(^{211}At),铋-212和铋-213(^{212}Bi、^{213}Bi),铜-64和铜-67(^{64}Cu、^{67}Cu),镓-67和镓-68(^{67}Ga和^{68}Ga),铟-111(^{111}In),碘-123、碘-124、碘-125或碘-131(^{123}I、^{124}I、^{125}I、^{131}I)(^{123}I),铅-212(^{212}Pb),镥-177(^{177}Lu),镭-223(^{223}Ra),钐-153(^{153}Sm),钪-44和钪-47(^{44}Sc、^{47}Sc),锶-90(^{90}Sr),锝-99(^{99m}Tc),钇-86和钇-90(^{86}Y、^{90}Y),锆-89(^{89}Zr)。

[0019] 与IgG类未修饰抗体相比具有减少的FcRn结合亲和力的IgG类修饰抗体可以是可用于将诊断剂或治疗剂靶向生物位点的任何抗体。抗体可以是任何IgG类,包括IgG1(人或鼠)、IgG2、IgG4、鼠IgG2a。在优选的实例中,抗体是可用于将诊断或治疗剂靶向或递送至癌细胞的任何抗体。合适的抗体的实例包括IgG1抗体曲妥珠单抗(Herceptin®)、利妥昔单抗(Rituxan®)、贝伐珠单抗(Avastin®)、狄诺塞单抗(Unituxin®)、IgG2抗体帕尼单抗(Vectibix®)、IgG4抗体派姆单抗(Keytruda®)、纳武单抗(Opdivo®)、鼠IgG2a抗体托西莫单抗(Bexxar®)和鼠IgG1抗体替伊莫单抗(ibritumomab)(Zevalin®)。其他实例包括吉妥珠单抗(Mylotarg®)、本妥昔单抗(Adcetris®)、英妥珠单抗(Besponsa®)、格巴妥木单抗(CDX-011)、阿奈妥单抗(BAY 94-9343)、米妥昔单抗(IMGN853)迪妥昔珠单抗(ABT-414)、

洛伐妥珠单抗(Rova-T)和他伐达妥昔单抗(SGN-CD33A)。

[0020] 本发明还提供了与IgG类未修饰抗体相比或与IgG类野生型抗体相比具有减少的FcRn结合亲和力的IgG类修饰抗体,其包含:

[0021] -与IgG类野生型抗体相比具有一个或多个氨基酸取代的重链恒定区,其中与IgG类野生型抗体相比,该一个或多个氨基酸取代减少该抗体对新生儿Fc受体(FcRn)的亲和力,从而减少该修饰抗体的血清半衰期。

[0022] 其中所述抗体特异性结合前列腺特异性膜抗原(PSMA),并且其中该抗体包含:

[0023] FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-接头-FR1a-CDR1a-FR2a-CDR2a-FR3a-CDR3a-FR4a

[0024] 其中:

[0025] FR1、FR2、FR3和FR4各自是框架区;

[0026] CDR1、CDR2和CDR3各自是互补决定区;

[0027] FR1a、FR2a、FR3a和FR4a各自是框架区;

[0028] CDR1a、CDR2a和CDR3a各自是互补决定区;

[0029] 其中任一互补决定区的序列具有如下表1所述的氨基酸序列。优选地,框架区具有也如下表1中所述的氨基酸序列,包括特定残基处的氨基酸变化,这种变化可以通过比对衍生自每种抗体的各个框架区来确定。本发明还包括CDR1、CDR2和CDR3是来自VH的序列,CDR1a、CDR2a和CDR3a是来自VL的序列的情况,或者CDR1、CDR2和CDR3是来自VL的序列,CDR1a、CDR2a和CDR3a是来自VH的序列的情况。

[0030] 更具体地,本发明提供了与IgG类未修饰抗体相比或与IgG类野生型抗体相比具有减少的FcRn结合亲和力的IgG类修饰抗体,其包含:

[0031] -重链恒定区,其中在位置His310、His433、His435、His436、Ile253处的一个或多个氨基酸残基与未修饰抗体或IgG类野生型抗体中存在的残基不同,

[0032] 其中所述抗体特异性结合前列腺特异性膜抗原(PSMA),并且其中该抗体包含:

[0033] FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-接头-FR1a-CDR1a-FR2a-CDR2a-FR3a-CDR3a-FR4a

[0034] 其中:

[0035] FR1、FR2、FR3和FR4各自是框架区;

[0036] CDR1、CDR2和CDR3各自是互补决定区;

[0037] FR1a、FR2a、FR3a和FR4a各自是框架区;

[0038] CDR1a、CDR2a和CDR3a各自是互补决定区;

[0039] 其中任一互补决定区的序列具有如下表1所述的氨基酸序列。优选地,框架区具有也如下表1中所述的氨基酸序列,包括特定残基处的氨基酸变化,这种变化可以通过比对衍生自每种抗体的各个框架区来确定。本发明还包括CDR1、CDR2和CDR3是来自VH的序列,CDR1a、CDR2a和CDR3a是来自VL的序列的情况,或者CDR1、CDR2和CDR3是来自VL的序列,CDR1a、CDR2a和CDR3a是来自VH的序列的情况。

[0040] 在一个实施例中,特异性结合PSMA的抗体包含抗原结合位点,该抗原结合位点基本上由(按N末端到C末端或C末端到N末端的顺序)SEQ ID NO:4或20的氨基酸序列组成。

[0041] 在另一个实施例中,特异性结合PSMA的抗体包括以下至少一项:

[0042] (i)VH,该VH包含含有与SEQ ID NO 1或17中所示的序列至少约80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％相同的序列的互补决定区(CDR)1,含有与SEQ ID NO:2或18中所示的序列至少约80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％相同的序列的CDR2,以及含有与SEQ ID NO:3或19中所示的序列至少约80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％相同的序列的CDR3;

[0043] (ii)VH,该VH包含与SEQ ID NO:4或20中所示的序列至少约95％或96％或97％或98％或99％相同的序列;

[0044] (iii)VL,该VL包含含有与SEQ ID NO:33中所示的序列至少约80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％相同的序列的CDR1,含有与SEQ ID NO:34中所示的序列至少约80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％相同的序列的CDR2,以及含有与SEQ ID NO:35中所示的序列至少约80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％相同的序列的CDR3;

[0045] (iv)VL,该VL包含与SEQ ID NO:36中所示的序列至少约95％相同的序列;

[0046] (v)VH,该VH包含含有SEQ ID NO:1或17中所示的序列的CDR1,含有SEQ ID NO:2或18中所示的序列的CDR2,以及含有SEQ ID NO:3或19中所示的序列的CDR3;

[0047] (vi)VH,该VH包含SEQ ID NO:4或20中所示的序列;

[0048] (vii)VL,该VL包含含有SEQ ID NO:33中所示的序列的CDR1,含有SEQ ID NO:34中所示的序列的CDR2,以及含有SEQ ID NO:45中所示的序列的CDR3;

[0049] (viii)VL,该VL包含SEQ ID NO:36中所示的序列;

[0050] (ix)VH,该VH包含含有SEQ ID NO:1或17中所示的序列的CDR1,含有SEQ ID NO:2或18中所示的序列的CDR2,以及含有SEQ ID NO:3或19中所示的序列的CDR3;以及VL,该VL包含含有SEQ ID NO:33中所示的序列的CDR1,含有SEQ ID NO:34中所示的序列的CDR2,以及含有SEQ ID NO:35中所示的序列的CDR3;或

[0051] (x)VH,该VH包含SEQ ID NO:4或20中所示的序列;和VL,该VL包含SEQ ID NO:36中所示的序列。

[0052] 优选地,重链恒定区包含His310和His435两者处的氨基酸取代。该抗体还可包含在等同于该恒定重链区的Ser228和Leu235的残基处的氨基酸取代。

[0053] 在任何实施例中,抗体包含含有如SEQ ID NO:49至51中任一项所示的氨基酸序列的重链恒定区,优选地其中该重链恒定区包含SEQ ID NO:50中所示的序列。

[0054] 在仍另一个实施例中,抗体的重链包含SEQ ID NO:49至56中任一项所示的序列,优选地如SEQ ID NO:53中所示的。

[0055] 仍进一步地,在优选的实施例中,抗体的轻链恒定区包含如SEQ ID NO:52中所示的序列。更优选地,抗体包含含有如SEQ ID NO:57中所示的氨基酸序列的轻链。

[0056] 在特别优选的实施例中,抗体包含SEQ ID NO:53中所示的氨基酸序列和SEQ ID NO:57中所示的序列。

[0057] 本发明还提供了包含免疫球蛋白部分和与其缀合的非蛋白剂的分子,

[0058] 其中该免疫球蛋白部分特异性结合肿瘤相关抗原,

[0059] 其中该免疫球蛋白部分与野生型免疫球蛋白相比对该FcRn受体的亲和力减少或消除;并且

[0060] 其中该非蛋白剂包含治疗部分，如细胞毒素或放射性元素。

[0061] 免疫球蛋白部分可包含可用于结合肿瘤相关抗原的任何抗体，包括但不限于曲妥珠单抗(Herceptin®)、利妥昔单抗(Rituxan®)、贝伐珠单抗(Avastin®)、狄诺塞单抗(Unituxin®)、帕尼单抗(Vectibix®)、派姆单抗(Keytruda®)、纳武单抗(nivolumab)(Opdivo®)、托西莫单抗(Bexxar®)、替伊莫单抗(Zevalin®)、吉妥珠单抗(Mylotarg®)、本妥昔单抗(Adcetris®)、英妥珠单抗(Besponsa®)、格巴妥木单抗(CDX-011)、阿奈妥单抗(BAY 94-9343)、米妥昔单抗(IMGN853)迪妥昔珠单抗(ABT-414)、洛伐妥珠单抗(Rova-T)和他伐达妥昔单抗(SGN-CD33A)，或如本文所述的任何其他抗体。

[0062] 本发明提供了包含免疫球蛋白部分和与其缀合的非蛋白剂的分子，

[0063] 其中该免疫球蛋白部分特异性结合PSMA并包含抗原结合位点，该抗原结合位点包括：

[0064] FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-接头-FR1a-CDR1a-FR2a-CDR2a-FR3a-CDR3a-FR4a

[0065] 其中：

[0066] FR1、FR2、FR3和FR4各自是框架区；

[0067] CDR1、CDR2和CDR3各自是互补决定区；

[0068] FR1a、FR2a、FR3a和FR4a各自是框架区；

[0069] CDR1a、CDR2a和CDR3a各自是互补决定区；

[0070] 其中任一互补决定区的序列具有如下表1所述的氨基酸序列；

[0071] 其中该免疫球蛋白部分与野生型免疫球蛋白相比对该FcRn受体的亲和力减少或消除；并且

[0072] 其中该非蛋白剂包含治疗部分，如细胞毒素或放射性元素。

[0073] 优选地，框架区具有也如下表1中所述的氨基酸序列，包括特定残基处的氨基酸变化，这种变化可以通过比对衍生自每种抗体的各个框架区来确定。本发明还包括CDR1、CDR2和CDR3是来自VH的序列，CDR1a、CDR2a和CDR3a是来自VL的序列的情况，或者CDR1、CDR2和CDR3是来自VL的序列，CDR1a、CDR2a和CDR3a是来自VH的序列的情况。优选地，该免疫球蛋白部分具有在等同于恒定重链区中的His310和/或His435残基处的氨基酸取代。该免疫球蛋白部分还可包含在等同于恒定重链区的Ser228和Leu235的残基处的氨基酸取代。

[0074] 优选地，该非蛋白剂包含放射性元素。

[0075] 本发明还提供了包含免疫球蛋白部分和与其缀合的非蛋白剂的分子，

[0076] 其中该免疫球蛋白部分特异性结合PSMA并包含：抗原结合位点，该抗原结合位点基本上由(按N末端到C末端或C末端到N末端的顺序)SEQ ID NO:4或20的氨基酸序列组成；

[0077] 其中该免疫球蛋白部分与野生型免疫球蛋白相比对该FcRn受体的亲和力减少或消除；并且

[0078] 其中该非蛋白剂包含治疗部分，如细胞毒素或放射性元素。

[0079] 优选地，该免疫球蛋白部分具有在等同于恒定重链区中的His310和/或His435残基处的氨基酸取代。该免疫球蛋白部分还可包含在等同于恒定重链区的Ser228和Leu235的残基处的氨基酸取代。

[0080] 本发明还提供了包含免疫球蛋白部分和与其缀合的非蛋白剂的分子，

[0081] 其中该免疫球蛋白部分与野生型免疫球蛋白相比对FcRn受体的亲和力减少或消除，并且其中该免疫球蛋白部分特异性结合PSMA且包含以下至少一项：

[0082] (i)VH，该VH包含含有与SEQ ID NO 1或17中所示的序列至少约80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％相同的序列的互补决定区(CDR)1，含有与SEQ ID NO:2或18中所示的序列至少约80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％相同的序列的CDR2，以及含有与SEQ ID NO:3或19中所示的序列至少约80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％相同的序列的CDR3；

[0083] (ii)VH，该VH包含与SEQ ID NO:4或20中所示的序列至少约95％或96％或97％或98％或99％相同的序列；

[0084] (iii)VL，该VL包含含有与SEQ ID NO:33中所示的序列至少约80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％相同的序列的CDR1，含有与SEQ ID NO:34中所示的序列至少约80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％相同的序列的CDR2，以及含有与SEQ ID NO:35中所示的序列至少约80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％相同的序列的CDR3；

[0085] (iv)VL，该VL包含与SEQ ID NO:36中所示的序列至少约95％相同的序列；

[0086] (v)VH，该VH包含含有SEQ ID NO:1或17中所示的序列的CDR1，含有SEQ ID NO:2或18中所示的序列的CDR2，以及含有SEQ ID NO:3或19中所示的序列的CDR3；

[0087] (vi)VH，该VH包含SEQ ID NO:4或20中所示的序列；

[0088] (vii)VL，该VL包含含有SEQ ID NO:33中所示的序列的CDR1，含有SEQ ID NO:34中所示的序列的CDR2，以及含有SEQ ID NO:45中所示的序列的CDR3；

[0089] (viii)VL，该VL包含SEQ ID NO:36中所示的序列；

[0090] (ix)VH，该VH包含含有SEQ ID NO:1或17中所示的序列的CDR1，含有SEQ ID NO:2或18中所示的序列的CDR2，以及含有SEQ ID NO:3或19中所示的序列的CDR3；以及VL，该VL包含含有SEQ ID NO:33中所示的序列的CDR1，含有SEQ ID NO:34中所示的序列的CDR2，以及含有SEQ ID NO:35中所示的序列的CDR3；或

[0091] (x)VH，该VH包含SEQ ID NO:4或20中所示的序列；和VL，该VL包含SEQ ID NO:36中所示的序列。

[0092] 优选地，该免疫球蛋白部分具有在等同于恒定重链区中的His310和/或His435残基处的氨基酸取代。该免疫球蛋白部分还可包含在等同于恒定重链区的Ser228和Leu235的残基处的氨基酸取代。优选地，该非蛋白剂包含放射性元素。

[0093] 在任何实施例中，免疫球蛋白包含含有如SEQ ID NO:49至51中任一项所示的氨基酸序列的重链恒定区，优选地其中重链恒定区包含SEQ ID NO:50中所示的序列。

[0094] 在仍另一个实施例中，免疫球蛋白包含SEQ ID NO:53至56(优选53)中任一项所示的序列。

[0095] 在任何实施例中，免疫球蛋白包含含有SEQ ID NO:52的序列的轻链恒定区。在一个实施例中，免疫球蛋白包含具有如SEQ ID NO:57中所示的氨基酸序列的轻链。

[0096] 在特别优选的实施例中，免疫球蛋白包含SEQ ID NO:53和57中所示的序列。

[0097] 本发明还提供了一种治疗个体的癌症的方法，该方法包括向有需要的个体施用包

含免疫球蛋白部分和如前文所述缀合的非蛋白剂的分子。

[0098] 本发明还提供了一种用于生成适合用于放射免疫疗法的抗体的方法，该方法包括：

[0099] -提供具有抗原结合位点的抗体，该抗原结合位点特异性结合存在于需要放射免疫疗法的细胞或组织上的表位；

[0100] -将至少一个氨基酸取代引入该抗体的重链恒定区以生成修饰抗体，其中该至少一个氨基酸取代选自由在残基His310、His435和Ile253处的氨基酸取代组成的组，从而引起所述抗体对FcRn的结合亲和力和/或所述抗体的血清半衰期的改变；

[0101] -将该修饰抗体与放射性元素缀合，

[0102] 从而生成适合用于放射免疫疗法的抗体。

[0103] 在某些实施例中，抗体是如本文所述的抗体，包括具有如下表1中所述的任一互补决定区、框架区、轻链可变区或重链可变区的抗体。优选地，修饰抗体还包含在等同于恒定重链区的Ser228和Leu235的残基处的氨基酸取代。优选地，使用螯合剂(例如DOTA)将放射性物质与修饰抗体缀合。

[0104] 本发明还提供了一种生成用于治疗疾病的抗体-放射性同位素的免疫缀合物的方法，该方法包括：

[0105] -提供具有抗原结合位点的抗体，该抗原结合位点特异性结合存在于需要放射免疫疗法的细胞或组织上的表位；

[0106] -将至少一个氨基酸取代引入该抗体的重链恒定区以生成修饰抗体，其中该至少一个氨基酸取代选自由在氨基酸残基His310、His435和Ile253处的取代组成的组，从而引起所述抗体对FcRn的结合亲和力和/或所述抗体的血清半衰期的改变；

[0107] -将该修饰抗体与放射性元素缀合，

[0108] 从而生成用于治疗疾病的抗体-放射性同位素免疫缀合物。

[0109] 优选地，抗体是如本文所述的抗体，包括具有如下表1中所述的任一互补决定区、框架区、轻链可变区或重链可变区的抗体。优选地，修饰抗体还包含在等同于恒定重链区的Ser228和Leu235的残基处的氨基酸取代。优选地，使用螯合剂(例如DOTA)，将放射性元素缀合至修饰抗体。更优选地，修饰抗体包含氨基酸取代His310Ala和His435Gln。

[0110] 优选地，该疾病是癌症，包括前列腺癌或肾细胞癌。

[0111] 本发明进一步提供了一种生产修饰抗体的方法，该修饰抗体与未修饰形式的抗体相比具有改变的FcRn结合亲和力和/或改变的血清半衰期，其中所述方法包括：

[0112] (a)提供表达载体(优选可复制表达载体)，其包含可操作地连接到编码免疫球蛋白重链的至少一个恒定区的核酸分子的合适启动子，其中来自该重链恒定区的选自由氨基酸残基His310、His435和Ile253组成的组的至少一个氨基酸被不同于未修饰抗体中存在的氨基酸的氨基酸取代，从而引起FcRn结合亲和力和/或血清半衰期的改变；

[0113] (b)用所述载体转化宿主细胞；以及

[0114] (c)培养所述转化的宿主细胞以产生所述修饰抗体。

[0115] 任选地，这种方法进一步包括：制备包含可操作地连接到编码互补免疫球蛋白轻链的DNA的启动子的第二表达载体(优选可复制表达载体)，并进一步用所述第二载体转化所述细胞系。

[0116] 一种用于改变在放射免疫疗法中使用的抗体的血清半衰期的方法，该方法包括：

[0117] -提供具有抗原结合位点的抗体，该抗原结合位点特异性结合存在于需要放射免疫疗法的细胞或组织上的表位；

[0118] -将至少一个氨基酸取代引入该抗体的重链恒定区以生成修饰抗体，其中该至少一个氨基酸取代选自由在氨基酸残基His310、His435和Ile253处的取代组成的组，从而引起所述抗体对FcRn的结合亲和力和所述抗体的血清半衰期的改变。

[0119] 优选地，该方法进一步包括将修饰抗体与放射性元素缀合。优选地，该抗体是如本文所述的用于结合PSMA的抗体，包括具有如下表1中所述的任一互补决定区、框架区、轻链可变区或重链可变区的抗体。优选地，该修饰抗体还包含在等同于该恒定重链区的Ser228和Leu235的残基处的氨基酸取代，包括Ser228Pro和/或Leu235Glu。更优选地，修饰抗体包含氨基酸取代His310Ala和His435Gln。

[0120] 一种用于减少在放射免疫疗法中使用的抗体的毒性的方法，该方法包括

[0121] -提供具有抗原结合位点的抗体，该抗原结合位点特异性结合存在于需要放射免疫疗法的细胞或组织上的表位；

[0122] -将至少一个氨基酸取代引入该抗体的重链恒定区以生成修饰抗体，其中该至少一个氨基酸取代选自由在氨基酸残基His310、His435和Ile253处的取代组成的组，其中这些氨基酸取代减少该修饰抗体的血清半衰期和/或增加该修饰抗体从循环中的清除率，

[0123] 从而当将该抗体缀合至放射性元素用于放射免疫疗法时减少该抗体的毒性。

[0124] 在任何实施例中，减少抗体的毒性包括减少放射性同位素在循环中长期保留会另外导致的多种毒性作用(包括血液学毒性、吸收入骨毒性和骨髓辐照毒性)。

[0125] 在任何实施例中，通过确定在施用于个体后该抗体或免疫缀合物的肿瘤:血液比率来评估本文所述的放射性标记抗体或放射免疫缀合物的毒性。

[0126] 在本发明的任何实施例中，当在施用抗体后至少8小时确定比率时，本发明的修饰抗体的肿瘤:血液比率是不具有如本文所述的对该重链恒定区的这些修饰的未修饰抗体的至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少6倍、至少8倍或至少10倍、或更多。可替代地，在向个体施用抗体后至少24、48、72或120小时确定该比率。在某些实施例中，当在施用抗体后至少120小时确定比率时，本发明的修饰抗体的肿瘤:血液比率是不具有如本文所述的对该重链恒定区的这些修饰的未修饰抗体的至少50倍、至少100倍、至少200倍或至少300倍。

[0127] 在本发明的任何实施例中，本文所述的经修饰的抗体与未修饰抗体相比具有减少或改变的血清半衰期，其血清清除率是未修饰抗体的至少两倍、至少三倍或更多。

[0128] 在本发明的特别优选实施例中，本文所述抗体适合用于治疗诊断对中，其中该治疗诊断对包含1)偶联至显像剂的抗体和2)偶联至用于疗法的药剂的抗体。例如，首先当抗体与适合用于放射成像的放射性同位素偶联时，可将其用作诊断剂;其次当抗体与适合用于疗法的放射性同位素或细胞毒性剂偶联时，可将其用作治疗剂。

[0129] 本发明还提供了一种诊断、监测或预断受试者的疾病、障碍或感染的体内方法，该方法包括：

[0130] (a)向受试者施用有效量的如本文所述的修饰抗体，所述修饰抗体特异性结合与疾病、障碍或感染相关的抗原；

[0131] (b)使该修饰抗体集中在所述受试者中发现所述抗原的部位处;以及

[0132] (c)检测所述修饰抗体；

[0133] 由此检测到高于背景或标准水平的所述修饰抗体指示该受试者患有所述疾病、障碍或感染。

[0134] 本发明提供结合或特异性结合前列腺特异性膜抗原(PSMA)的抗原结合位点。优选地，本发明的抗原结合位点结合或特异性结合人PSMA。

[0135] 本发明提供了用于结合PSMA的抗原结合位点，该抗原结合位点包含：

[0136] FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-接头-FR1a-CDR1a-FR2a-CDR2a-FR3a-CDR3a-FR4a

[0137] 其中：

[0138] FR1、FR2、FR3和FR4各自是框架区；

[0139] CDR1、CDR2和CDR3各自是互补决定区；

[0140] FR1a、FR2a、FR3a和FR4a各自是框架区；

[0141] CDR1a、CDR2a和CDR3a各自是互补决定区；

[0142] 其中任一框架区或互补决定区的序列如本文所述。

[0143] 本发明提供了用于结合PSMA的抗原结合位点，该抗原结合位点包含：

[0144] FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-接头-FR1a-CDR1a-FR2a-CDR2a-FR3a-CDR3a-FR4a

[0145] 其中：

[0146] FR1、FR2、FR3和FR4各自是框架区；

[0147] CDR1、CDR2和CDR3各自是互补决定区；

[0148] FR1a、FR2a、FR3a和FR4a各自是框架区；

[0149] CDR1a、CDR2a和CDR3a各自是互补决定区；

[0150] 其中任一互补决定区的序列具有如下表1所述的氨基酸序列。优选地，框架区具有也如下表1中所述的氨基酸序列，包括特定残基处的氨基酸变化，这种变化可以通过比对衍生自每种抗体的各个框架区来确定。本发明还包括CDR1、CDR2和CDR3是来自VH的序列，CDR1a、CDR2a和CDR3a是来自VL的序列的情况，或者CDR1、CDR2和CDR3是来自VL的序列，CDR1a、CDR2a和CDR3a是来自VH的序列的情况。

[0151] 本发明提供抗原结合位点，该抗原结合位点包含(按N末端到C末端或C末端到N末端的顺序)SEQ ID NO:4或20的氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成。

[0152] 本发明还提供了包含抗体的抗原结合结构域的抗原结合位点，其中该抗原结合结构域结合或特异性结合PSMA，其中该抗原结合结构域包含以下至少一项：

[0153] (i)VH，该VH包含含有与SEQ ID NO 1或17中所示的序列至少约80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％相同的序列的互补决定区(CDR)1，含有与SEQ ID NO:2或18中所示的序列至少约80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％相同的序列的CDR2，以及含有与SEQ ID NO:3或19中所示的序列至少约80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％相同的序列的CDR3；

[0154] (ii)VH，该VH包含与SEQ ID NO:4或20中所示的序列至少约95％或96％或97％或98％或99％相同的序列；

[0155] (iii)VL，该VL包含含有与SEQ ID NO:33中所示的序列至少约80％、至少85％、至

少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％相同的序列的CDR1，含有与SEQ ID NO:34中所示的序列至少约80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％相同的序列的CDR2，以及含有与SEQ ID NO:35中所示的序列至少约80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％相同的序列的CDR3；

[0156] (iv)VL，该VL包含与SEQ ID NO:36中所示的序列至少约95％相同的序列；

[0157] (v)VH，该VH包含含有SEQ ID NO:1或17中所示的序列的CDR1，含有SEQ ID NO:2或18中所示的序列的CDR2，以及含有SEQ ID NO:3或19中所示的序列的CDR3；

[0158] (vi)VH，该VH包含SEQ ID NO:4或20中所示的序列；

[0159] (vii)VL，该VL包含含有SEQ ID NO:33中所示的序列的CDR1，含有SEQ ID NO:34中所示的序列的CDR2，以及含有SEQ ID NO:45中所示的序列的CDR3；

[0160] (viii)VL，该VL包含SEQ ID NO:36中所示的序列；

[0161] (ix)VH，该VH包含含有SEQ ID NO:1或17中所示的序列的CDR1，含有SEQ ID NO:2或18中所示的序列的CDR2，以及含有SEQ ID NO:3或19中所示的序列的CDR3；以及VL，该VL包含含有SEQ ID NO:33中所示的序列的CDR1，含有SEQ ID NO:34中所示的序列的CDR2，以及含有SEQ ID NO:35中所示的序列的CDR3；或

[0162] (x)VH，该VH包含SEQ ID NO:4或20中所示的序列；和VL，该VL包含SEQ ID NO:36中所示的序列。

[0163] 在本发明的任何方面，该抗原结合结构域进一步包含以下至少一项：

[0164] (i)VH，该VH包含含有与SEQ ID NO:9或25中所示的序列至少约80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％相同的序列的框架区(FR)1，含有与SEQ ID NO 10或26中所示的序列至少约80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％相同的序列的FR2，含有与SEQ ID NO:11或27中所示的序列至少约80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％相同的序列的FR3，以及含有与SEQ ID NO:12或28中所示的序列至少约80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％相同的序列的FR4；

[0165] (ii)VL，该VL包含含有与SEQ ID NO:41中所示的序列至少约80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％相同的序列的FR1，含有与SEQ ID NO:42中所示的序列至少约80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％相同的序列的FR2，含有与SEQ ID NO:43中所示的序列至少约80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％相同的序列的FR3，以及含有与SEQ ID NO:44中所示的序列至少约80％、至少85％、至少90％、至少92％、至少95％、至少97％、至少99％相同的序列的FR4；

[0166] (iii)VH，该VH包含含有SEQ ID NO:9或25中所示的序列的FR1，含有SEQ ID NO:10或26中所示的序列的FR2，含有SEQ ID NO:11或27中所示的序列的FR3，以及含有SEQ ID NO:12或28中所示的序列的FR4；

[0167] (iv)VL，该VL包含含有SEQ ID NO:41中所示的序列的FR1，含有SEQ ID NO:42中所示的序列的FR2，含有SEQ ID NO:43中所示的序列的FR3，以及含有SEQ ID NO:44中所示的序列的FR4；或

[0168] (v)VH，该VH包含含有SEQ ID NO:9或25中所示的序列的FR1，含有SEQ ID NO:10或

26中所示的序列的FR2，含有SEQ ID NO:11或27中所示的序列的FR3，以及含有SEQ ID NO:12或28中所示的序列的FR4；以及VL，该VL包含含有SEQ ID NO:41中所示的序列的FR1，含有SEQ ID NO:42中所示的序列的FR2，含有SEQ ID NO:43中所示的序列的FR3，以及含有SEQ ID NO:44中所示的序列的FR4。

[0169] 在任何实施例中，抗原结合位点包含含有如SEQ ID NO:49至51中任一项所示的氨基酸序列的重链恒定区，优选地其中该重链恒定区包含如SEQ ID NO:50中所示的序列。

[0170] 在仍另一个实施例中，抗原结合位点包含SEQ ID NO:53至56(优选53)中任一项中所示的序列。

[0171] 在任何实施例中，抗原结合位点包含含有SEQ ID NO:52的序列的轻链恒定区。在一个实施例中，抗原结合位点的轻链包含SEQ ID NO:57的序列。

[0172] 在特别优选的实施例中，抗原结合位点包含SEQ ID NO:53和57中所示的序列。

[0173] 前述抗原结合位点也可称为抗体的抗原结合结构域。

[0174] 优选地，如本文所述的抗原结合位点是抗体或其抗原结合片段。通常，抗原结合位点是抗体，例如单克隆抗体。

[0175] 如本文所述，抗原结合位点可以是以下形式：

[0176] (i)单链Fv片段(scFv)；

[0177] (ii)二聚scFv(双-scFv)；

[0178] (iii)与抗体的恒定区、Fc或重链恒定结构域(CH)2和/或CH3连接的(i)或(ii)中之一；或

[0179] (iv)与结合免疫效应细胞的蛋白质连接的(i)或(ii)中之一。

[0180] 进一步地，如本文所述，抗原结合位点可以是以下形式：

[0181] (i)双体抗体；

[0182] (ii)三体抗体；

[0183] (iii)四体抗体；

[0184] (iv)Fab；

[0185] (v)F(ab')2；

[0186] (vi)Fv；

[0187] (vii)与抗体的恒定区、Fc或重链恒定结构域(CH)2和/或CH3连接的(i)至(vi)之一；或

[0188] (viii)与结合免疫效应细胞的蛋白质连接的(i)至(vi)之一。

[0189] 在任何方面或实施例中，抗体为裸抗体。具体而言，抗体为非缀合形式且不适于形成缀合物。

[0190] 本发明还提供了包含如本文所述的抗原结合位点、免疫球蛋白可变结构域、抗体、dab(单结构域抗体)、双-scFv、scFv、Fab、Fab'、F(ab')2、Fv片段、双体抗体、三体抗体、四体抗体、线性抗体、单链抗体分子或多特异性抗体的融合蛋白。

[0191] 本发明还提供了本文所述的处于与标记或细胞毒性剂缀合的抗原结合位点、免疫球蛋白可变结构域、抗体、dab、双-scFv、scFv、Fab、Fab'、F(ab')2、Fv片段、双体抗体、三体抗体、四体抗体、线性抗体、单链抗体分子或多特异性抗体或融合蛋白的形式的缀合物。

[0192] 本发明还提供了一种抗体，用于结合本文所述的抗原结合位点、免疫球蛋白可变

结构域、抗体、dab、双-scFv、scFv、Fab、Fab'、F(ab')2、Fv片段、双抗体、三体抗体、四体抗体、线性抗体、单链抗体分子或多特异性抗体、融合蛋白或缀合物。

[0193] 在优选实施例中，抗原结合位点是包含抗体恒定结构域CH2-CH3区中的一个或多个氨基酸取代的IgG免疫球蛋白，其相对于野生型抗体Fc区修饰了抗体对新生儿Fc受体(FcRn)的结合。该一个或多个氨基酸修饰改变抗体恒定结构域、Fc区或其FcRn结合片段对FcRn的亲和力，从而改变抗原结合位点的血清半衰期。

[0194] 优选地，相对于未修饰野生型抗体，该取代改变所述修饰抗体对FcRn的结合亲和力和/或所述修饰抗体的血清半衰期。本发明进一步提供了一种修饰抗体，该修饰抗体与未修饰抗体相比具有减少的FcRn结合亲和力和/或减少的血清半衰期，其中来自CH2结构域的位置Ile253或His310处的任一个或多个氨基酸残基和/或来自CH3结构域的His435残基被与未修饰抗体或未修饰IgG中的不同的另一个氨基酸取代。

[0195] 在一个实例中，该一个或多个氨基酸修饰选自在等同于H310和H435的残基处的氨基酸取代。在另一个实例中，抗体包含His310和His435残基两者处的氨基酸取代。

[0196] 氨基酸取代可包括从组氨酸残基取代为：丙氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸或天冬氨酸。优选地，His310处的氨基酸取代为丙氨酸。优选地，His435处的氨基酸取代为谷氨酰胺。优选地，Ile253处的氨基酸取代为丙氨酸。

[0197] 在另一个实施例中，抗原结合位点是包含一个或多个氨基酸取代的抗体，这些氨基酸取代修饰抗体与激活Fcγ受体的结合。该一个或多个氨基酸修饰改变抗体恒定结构域、Fc区或Fcγ受体结合片段对任一个或多个Fcγ受体的亲和力。优选地，该氨基酸修饰在等同于Leu235的残基处。更优选地，氨基酸修饰是从Leu235修饰为谷氨酸。

[0198] 在一个实施例中，氨基酸修饰是Ser228处的铰链稳定突变。优选地，Ser228处的氨基酸修饰为脯氨酸。

[0199] 在本发明的一个实施例中，抗体包含Ser228、Leu235、His310和His435处的突变。优选地，氨基酸修饰为Ser228Pro、Leu235Glu、His310Ala和His435Gln。

[0200] 氨基酸修饰优选在具有IgG1同种型的抗体或在IgG4同种型上进行。

[0201] 在优选实施例中，抗体包含如SEQ ID NO:235至238中任一项所示的重链恒定区。

[0202] 本发明还提供了编码如本文所述的抗原结合位点、免疫球蛋白可变结构域、抗体、dab、双-scFv、scFv、Fab、Fab'、F(ab')2、Fv片段、双抗体、三体抗体、四体抗体、线性抗体、单链抗体分子或多特异性抗体、融合蛋白或缀合物的核酸。

[0203] 在一个实例中，这种核酸包含在其中该核酸与启动子可操作地连接的表达构建体中。这种表达构建体可以在载体中，例如在质粒中。

[0204] 在涉及单多肽链抗原结合位点的本发明实例中，表达构建体可包含与编码该多肽链的核酸连接的启动子。

[0205] 在涉及形成抗原结合位点的多条多肽链的实例中，表达构建体包含编码含有例如与启动子可操作地连接的VH的多肽的核酸和编码含有例如与启动子可操作地连接的VL的多肽的核酸。

[0206] 在另一个实例中，表达构建体是双顺反子表达构建体，例如，包含按5'到3'顺序的以下可操作连接的组分：

[0207] (i)启动子

[0208] (ii)编码第一多肽的核酸；

[0209] (iii)内部核糖体进入位点；以及

[0210] (iv)编码第二多肽的核酸，

[0211] 其中该第一多肽包含VH，并且第二多肽包含VL，反之亦然。

[0212] 本发明还设想了单独的表达构建体，其中一个编码包含VH的第一多肽，且另一个编码包含VL的第二多肽。例如，本发明还提供一种组合物，该组合物包含：

[0213] (i)第一表达构建体，其包含编码含有与启动子可操作连接的VH的多肽的核酸；和

[0214] (ii)第二表达构建体，其包含编码含有与启动子可操作连接的VL的多肽的核酸。

[0215] 本发明提供了包含本文所述载体或核酸的细胞。优选地，该细胞是分离的、基本纯化的或重组的。在一个实例中，该细胞包含本发明的表达构建体或：

[0216] (i)第一表达构建体，其包含编码含有与启动子可操作连接的VH的多肽的核酸；和

[0217] (ii)第二表达构建体，其包含编码含有与启动子可操作连接的VL的多肽的核酸，

[0218] 其中第一和第二多肽缔合以形成本发明的抗原结合位点。

[0219] 本发明的细胞的实例包括细菌细胞、酵母细胞、昆虫细胞或哺乳动物细胞。

[0220] 本发明还提供了一种药物组合物，其包含抗原结合位点或包含如本文所述的CDR和/或FR序列或如本文所述的免疫球蛋白可变结构域、抗体、dab(单结构域抗体)、双-scFv、scFv、Fab、Fab'、F(ab')2、Fv片段、双抗体、三体抗体、四体抗体、线性抗体、单链抗体分子或多特异性抗体、融合蛋白或缀合物以及药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

[0221] 本发明还提供了一种诊断组合物，其包含抗原结合位点或包含如本文所述的CDR和/或FR序列或如本文所述的抗原结合位点、免疫球蛋白可变结构域、抗体、dab、双-scFv、scFv、Fab、Fab'、F(ab')2、Fv片段、双抗体、三体抗体、四体抗体、线性抗体、单链抗体分子或多特异性抗体、融合蛋白或缀合物、稀释剂以及任选地标记。优选地，该抗原结合位点是与放射性同位素缀合的单克隆抗体。

[0222] 本发明还提供了一种试剂盒或制品，其包含抗原结合位点或包含如本文所述的CDR和/或FR序列或如本文所述的免疫球蛋白可变结构域、抗体、dab、双-scFv、scFv、Fab、Fab'、F(ab')2、Fv片段、双抗体、三体抗体、四体抗体、线性抗体、单链抗体分子或多特异性抗体、融合蛋白或缀合物。

[0223] 优选地，该抗原结合位点是与放射性同位素缀合的单克隆抗体。

[0224] 如本文所述的抗原结合位点、蛋白质或抗体可包含人恒定区，例如IgG恒定区，如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4恒定区或其混合物。在包含VH和VL的抗体或蛋白质的情况下，VH可连接到重链恒定区，且VL可连接到轻链恒定区。

[0225] 在一个实例中，如本文所述的蛋白质或抗体或如本文所述的蛋白质或抗体的组合物包含重链恒定区(包括稳定的重链恒定区)，其包含完全或部分具有或不具有C末端赖氨酸残基的序列的混合物。

[0226] 在一个实例中，本发明的抗体包含本文披露的连接到或融合到IgG4恒定区或稳定的IgG4恒定区(例如，如上所述)的VH以及连接到或融合到κ轻链恒定区的VL。

[0227] 本发明的抗原结合位点的功能特征将被视为经必要的修改后应用于本发明的抗体。

[0228] 如本文所述的抗原结合位点可以是纯化的、基本纯化的、分离的和/或重组的。

[0229] 本发明还提供了一种用于治疗或预防受试者的癌症的方法，该方法包括向受试者施用本发明的抗原结合位点。在这方面，该抗原结合位点可用于预防病症的复发，并且这被认为是预防该病症。

[0230] 示例性癌症包括前列腺癌。应理解，具有PSMA亲和力的抗体将可用于此目的。

[0231] 本发明还提供了一种诊断、监测或预断受试者的疾病、障碍或感染的体内方法，该方法包括：

[0232] (a)向受试者施用有效量的本文所述的抗体，所述抗体特异性结合与疾病、障碍或感染相关的抗原；

[0233] (b)使抗体集中在所述受试者中发现所述抗原的部位处；以及

[0234] (c)检测所述抗体；

[0235] 由此检测到高于背景或标准水平的所述抗体指示受试者患有所述疾病、障碍或感染。

[0236] 如本文所用，除非上下文另有要求，否则术语“包含”及该术语的变型诸如“包括”和“含有”并不旨在排除进一步的添加剂、组分、整体或步骤。

[0237] 前述段落中所述的本发明的进一步方面和这些方面的进一步实施例将从以举例方式给出并参考附图的以下描述中变得清楚。

附图说明

[0238] 图1：本发明抗体的平均半衰期和Tukey半衰期多重比较。误差条表示平均值的标准差。J591 IgG＝用于结合PSMA的对照HuJ591抗体。ANT4044-K-DOTA＝与DOTA缀合的抗体ANT4044赖氨酸。ANT4044-A2-K-DOTA-与DOTA缀合的抗体ANT4044-A2赖氨酸。ANT4044-FcRn-K-DOTA＝与DOTA缀合的具有在FcRn结合区中的氨基酸取代的抗体ANT4044赖氨酸。ANT4044-FcRg-K-DOTA＝与DOTA缀合的具有在FcRn和Fcγ受体结合区中的氨基酸取代的抗体ANT4044赖氨酸。

[0239] 图2：所选择的本发明抗体的平均曲线下面积(AUC)和清除率(CL)。J591 IgG＝用于结合PSMA的对照HuJ591抗体。ANT4044-K-DOTA＝与DOTA缀合的抗体ANT4044赖氨酸。ANT4044-A2-K-DOTA-与DOTA缀合的抗体ANT4044-A2赖氨酸。ANT4044-FcRn-K-DOTA＝与DOTA缀合的具有在FcRn结合区中的氨基酸取代的抗体ANT4044赖氨酸。ANT4044-FcRg-K-DOTA＝与DOTA缀合的具有在FcRn和Fcγ受体结合区中的氨基酸取代的抗体ANT4044赖氨酸。

[0240] 图3：由PET图像的ROI分析确定的在8小时处的抗体的生物分布。

[0241] 图4：由PET图像的ROI分析确定的在24小时处的抗体的生物分布。

[0242] 图5：通过离体γ计数确定的在48小时时所有抗体的生物分布。

[0243] 图6：由PET图像的ROI分析确定的在48小时处的抗体的生物分布。

[0244] 图7：注射后5天内的抗体血药浓度。

[0245] 图8：通过成像(8小时、24小时、48小时)确定的肿瘤抗体积聚

[0246] 图9：抗体的肿瘤与血液比率。在8小时、24小时和48小时的时间点测定每种抗体的肿瘤:血液比率(体内肿瘤:尾血)。与抗体JN005和hJ591相比，JN006和JN007在所有时间点的该比率都显著更高。

[0247] 图10:抗体的肿瘤与血液比率。在48小时和120小时的时间点测定每种抗体的肿瘤:血液比率(离体:离体)。与抗体JN005和hJ591相比,JN006和JN007在所有时间点的该比率都显著更高。

[0248] 图11:本发明的示例性抗体的体内成像和体内分布。接受本发明的抗PSMA的FcRn-K-DOTA-Lu修饰抗体的LNCap异种移植小鼠的SPECT成像。

[0249] 图12:本发明的示例性抗体的血液药代动力学。在施用本发明的抗PSMA的FcRn-K-DOTA-Lu修饰抗体后,在小鼠血液中测量的放射性水平。

[0250] 图13:在用本发明的示例性抗体治疗的LNCap荷瘤异种移植小鼠中的功效研究。使用本发明的抗PSMA的K-DOTA-Lu FcRn修饰抗体治疗显著抑制肿瘤生长,如第14天与第0天相比肿瘤体积无变化所证明的。在对照组(PBS)组中,肿瘤体积总体增加,其中与FcRn-K-DOTA-Lu治疗组的相应时间相比,肿瘤在第9、12和14天显著更大。

[0251] 图14:在施用本发明的示例性抗体后,LNCap荷瘤异种移植小鼠的肿瘤:血液比率。显示了接受本发明的抗PSMA的K-DOTA-Lu抗体治疗的小鼠的肿瘤:血液比率,该抗体经修饰以减少FcRn结合(HuX592R-DOTA-Lu177)。向对照小鼠施用抗PSMA的K-DOTA-Lu抗体(HuJ591-DOTA-Lu177)。与接受未修饰抗体的小鼠相比,接受FcRn修饰抗体的小鼠的该比率更高,特别是在24小时和48小时的时间点。

[0252] 图15:通过离体γ计数测量的在健康雄性Balb/c裸鼠中^{177}Lu标记的HuX592R和HuJ591的生物分布。A显示施用后24、48和72小时评估的HuX592R生物分布,而B比较了施用后72小时HuX592R和HuJ591的生物分布。

[0253] 图16:施用HuX592R(FcRn-K-DOTA-Lu)或无治疗对照后,每个治疗队列中LNCaP异种移植肿瘤的消退。

[0254] 图17:在施用TLX592(FcRn-K-DOTA-Lu)、TLX591(K-DOTA-Lu抗体,在本文中也称为HuJ591-DOTA-Lu177)或无治疗对照后,研究日时间段内的队列存活率绘图。

具体实施方式

[0255] 应当理解的是,在本说明书中披露和限定的本发明可扩展至所提及的或者从文本部分和附图部分显而易见的单个特征的两个或更多个的所有替代性组合。所有这些不同组合构成本发明的多个替代性方面。

[0256] 前述段落中所述的本发明的进一步方面和这些方面的进一步实施例将从以举例方式给出并参考附图的以下描述中变得清楚。

[0257] 现在将详细地参照本发明的某些实施例。虽然本发明将结合实施例来进行描述,但是应当理解的是,不意图将本发明限于那些实施例。相反,本发明旨在涵盖可以包括在如权利要求所限定的本发明范围内的所有替代性方案、修改方案以及等同方案。

[0258] 本发明部分涉及鉴定减少放射免疫疗法中使用的放射免疫缀合物的毒性的新方法。具体而言,本发明的方法在不显著影响放射免疫缀合物的治疗潜力的情况下减少毒性。

[0259] 如上所述,对健康组织和细胞的辐射损伤是放射免疫疗法的主要问题。毒性严重限制了RAIT的辐射剂量,并降低了肿瘤治疗的有效性。

[0260] 然而,诸位发明人已开发出用于放射免疫疗法的抗体,这些抗体与野生型抗体相比由于对抗体的恒定重链的修饰而具有减少的血清半衰期,从而减少抗体对新生儿Fc受体

(FcRn)的亲和力。因此,诸位发明人开发的抗体在各种免疫疗法中使用具有显著的益处。

[0261] 虽然治疗性抗体的FcRn结合结构域的修饰以前已有报道,但已开发此类修饰的目的是增加FcRn亲和力,例如增加治疗性抗体的血清半衰期和延长治疗性抗体在循环中的保留时间。与现有技术的方法相比,本发明旨在减少治疗剂的血清半衰期。

[0262] 令人惊讶的是,诸位发明人发现,尽管减少了血清半衰期(并增加了施用后从体循环中清除的速率),但本发明的抗体具有与未修饰抗体相似的被递送到肿瘤部位并在肿瘤部位积聚的能力。这些结果令人惊讶,因为它们显示修饰抗体和未修饰抗体的肿瘤负载在统计学上没有差异,这指示诸位发明人采用的方法在显著减少血清半衰期且从而减少毒性的同时,不会对抗体与其靶标表位结合的能力产生负面影响,也不会对抗体递送至靶标位点的能力产生负面影响。

[0263] 更重要的是,诸位发明人已经证明,尽管清除率增加,但本发明的修饰抗体仍然保留在肿瘤部位。因此,诸位发明人的工作表明,对放射性标记抗体的FcRn或FcRn和Fcγ受体结合结构域的修饰在减少循环中放射性同位素的量方面具有显著的效用,而不影响抗体在肿瘤中积聚的能力方面的治疗潜力。这有许多益处,包括减少放射性同位素在循环中长期保留会另外导致的多种毒性作用(包括血液学毒性,作为骨髓辐照和吸收入骨的结果)。此外,考虑到迄今为止许多RAIT疗法的剂量限制毒性是血液学毒性(作为这种血液循环延长和骨髓辐照的直接结果的血液学毒性),本发明提供了更高水平的可接受剂量的可能性;从而导致更有效的疗法。吸收入骨和骨髓辐照)。

[0264] 出乎意料的是,诸位发明人还发现,在消除和FcRn结合的同时,对恒定重链的氨基酸修饰不影响抗体与蛋白G和某些蛋白A纯化树脂结合的能力。因此,与其他免疫疗法相比,本发明的具有减少的血清半衰期的抗体可使用为常规抗体开发的相同现有/标准化生产平台产生。与许多其他工程化抗体形式中的几种(例如微型抗体、双体抗体等,它们生产起来很麻烦,并且比IgG分子更不稳定)相比,这是一个关键优势。此外,作为对身体而言“天然”的分子形式,全长抗体也倾向于相比工程化抗体或抗体片段具有减少的免疫原性反应的可能性。

[0265] 本发明抗体的另一个优点是其特别适合于治疗诊断领域的应用。更具体地说,如上所述,当抗体与放射性同位素偶联时,减少的血清半衰期使得抗体对于疗法特别有用,因为抗体能够向肿瘤递送适当量的放射性药剂,同时从循环中快速清除。另外,抗体的血清半衰期减少使其特别适合用于诊断方法,在诊断方法中希望快速清除偶联到抗体并选择用于成像的放射性同位素。首先将抗体用作诊断剂从而会通知使用治疗剂形式的抗体和给药(即,当将抗体与适合于疗法的放射性同位素偶联时)。因此,发现了本发明的抗体在与不同的放射性同位素偶联并随后用作“治疗诊断对”时的效用。

[0266] 概况

[0267] 贯穿本说明书,除非另外具体说明或上下文另有要求,否则提及单个步骤、物质成分、步骤组或物质成分组时,应视为涵盖这些步骤、物质成分、步骤组或物质成分组中的一项和多项(即一项或多项)。因此,如本文所用,单数形式“一种/一个(a/an)”和“该”包括复数方面,反之亦然,除非上下文另有清楚规定。例如,对“一种”的提及包括单种以及两种或更多种;对“一个”的提及包括单个以及两个或更多个;对“该”的提及包括单一以及两或更多;等等。

[0268] 本领域的普通技术人员将理解,本发明易受不同于具体所述的变化和修改的那些变化和修改的影响。应当理解,本发明包括所有这样的变化和修改。本发明还包括在本说明书中单独地或共同地提及的或指出的所有的步骤、特征和化合物,以及所述步骤或特征中的任何两个或更多个的任何及所有组合。

[0269] 本领域技术人员应认识到类似于或等同于本文所述的那些的可以在本发明的实践中使用的许多方法和材料。本发明绝不限于所述的方法和材料。

[0270] 本文提及的所有专利和公开物均通过引用以其全文并入。

[0271] 本发明的范围不受本文所述的具体实例的限制,这些实例仅旨在用于举例说明的目的。功能上等同的产品、组合物和方法显然在本发明的范围内。

[0272] 除非另外具体说明,否则本文中的本发明的任何实例或实施例应视为经必要修改后适用于本发明的任何其他实例或实施例。

[0273] 除非确切地另外定义,本文使用的所有技术和科学术语应视为具有与本领域(例如,细胞培养、分子遗传学、免疫学、免疫组织化学、蛋白质化学、以及生物化学)普通技术人员通常理解的相同的含义。

[0274] 除非另外指示,否则本披露中使用的重组蛋白、细胞培养和免疫学技术是本领域技术人员熟知的标准程序。这样的技术在诸如以下来源的文献中被描述和解释:J.Perbal,APractical Guide to Molecular Cloning[分子克隆实用指南],约翰威利父子公司(John Wiley and Sons)(1984),J.Sambrook等人Molecular Cloning:ALaboratory Manual[分子克隆:实验室手册],冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbour Laboratory Press)(1989),T.A.Brown(编),Essential Molecular Biology:APractical Approach[基本分子生物学:实用方法],第1和2卷,IRL出版社(1991),D.M.Glover和B.D.Hames(编),DNACloning:APractical Approach[DNA克隆:实用方法],第1-4卷,IRL出版社(1995和1996),以及F.M.Ausubel等人(编),Current Protocols in Molecular Biology[分子生物学的当前方案],格林出版联营公司和威利国际科学公司(Greene Pub.Associates and Wiley-Interscience)(1988,包括直至现在的所有更新),Ed Harlow和David Lane(编)Antibodies:A Laboratory Manual[抗体:实验室手册],冷泉港实验室(Cold Spring Harbour Laboratory),(1988),以及J.E.Coligan等人(编)Current Protocols in Immunology[当代免疫学实验技术],约翰威利父子公司(包括直至现在的所有更新)。

[0275] 本文中可变区及其部分、免疫球蛋白、抗体及其片段的描述和定义可通过在Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest[具有免疫学意义的蛋白质的Kabat序列],美国国立卫生研究院(National Institutes of Health),贝塞斯达,马里兰州,1987和1991,Bork等人,J Mol.Biol.[分子生物学杂志]242,309-320,1994,Chothia和Lesk J.Mol Biol.[分子生物学杂志]196:901-917,1987,Chothia等人Nature[自然]342,877-883,1989和/或Al-Lazikani等人,J Mol Biol[分子生物学杂志]273,927-948,1997中的讨论进一步澄清。

[0276] 术语“和/或”(例如“X和/或Y”)应理解为“X和Y”或“X或Y”,并应被视为对两种含义或任何一种含义提供明确支持。

[0277] 如本文所用,术语“衍生自”应表示指定整体可从特定来源获得,尽管不一定直接从该来源获得。

[0278] 选择的定义

[0279] 如本文所用,肿瘤:血液比指抗体(或放射性标记抗体)的量与个体的血液中相同抗体的量的比率。技术人员将熟悉计算肿瘤:血液比率的标准技术。例如,放射性同位素(或标记抗体)的离体活性浓度被测量并表示为每克组织(或血液)经衰减校正的注射活性的百分比,并近似为注射剂量百分比/g(%ID/g)。然后将肿瘤与血液比率计算为肿瘤中检测到的活性相对于血液中检测到的活性。

[0280] 如本文所用,术语‘治疗诊断(theranostic)’是指化合物/材料用于诊断以及疗法的能力。术语“治疗诊断试剂”涉及适合于检测、诊断和/或治疗患者的疾病或病症的任何试剂。治疗诊断化合物/材料的目的是克服不同诊断剂和治疗剂之间可能存在的在生物分布和选择性方面的不理想差异。对于治疗诊断对,首先向患者施用含有成像放射性核素的治疗诊断化合物,以便鉴定疾病或定位身体中的受影响区域。一旦鉴定/定位,由于成像和疗法放射性核素的生物分布相同,可通过以靶标特异性方式施用含有治疗性放射性核素的治疗诊断化合物来治疗疾病。

[0281] 在本发明的上下文中,本发明的抗体特别可用于包含在治疗诊断对中,例如,其中抗体与用于成像或诊断目的的放射性同位素缀合,并且相同抗体与适合于疗法的不同放射性同位素或细胞毒性剂缀合。抗体的抗原结合位点将诊断性放射性同位素导向或靶向肿瘤部位,以促进诊断(包括肿瘤分布、肿瘤大小、肿瘤密度),而抗体的相同抗原结合位点将放射性同位素导向肿瘤以进行疗法。

[0282] 如本文所用,术语“Fc区”(有时称为“Fc”或“Fc结构域”)是指IgG分子的与通过IgG分子的木瓜蛋白酶消化获得的可结晶片段相关的部分。Fc区由IgG分子的两条重链的C末端半部分组成,这两条重链通过二硫键连接。它没有抗原结合活性,但含有碳水化合物部分以及补体和Fc受体(包括FcRn受体)的结合位点。Fc区包含整个第二恒定结构域CH2(根据EU索引编号系统,人IgG1的残基231-340,在Kabat系统中也定义为残基244至360)和第三恒定结构域CH3(残基341-447EU索引/361-478Kabat)(例如,参见WO 2015175874的SEQ ID NO:1,或图1C的CH2序列和SEQ ID NO:2;图1D的CH3的序列,其通过引用并入本文;另外参见http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu_IGHGnber.html#refs的关于针对免疫球蛋白Fc区中各个残基的编号惯例的比较)。

[0283] 如本文所用,“EU索引”或“EU编号方案”是指EU抗体的编号(Edelman等人,1969,Proc Natl Acad Sci USA[美国国家科学院院刊]63:78-85,特此通过引用全文并入)。如本文所用,“Kabat系统”是指Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest[具有免疫学意义的蛋白质的Kabat序列],美国国立卫生研究院,贝塞斯达,马里兰州,1987和1991。本领域技术人员将能够容易地确定给定氨基酸序列是否根据EU或Kabat系统进行编号。

[0284] 术语“分离的蛋白质”或“分离的多肽”是如下的蛋白质或多肽,该蛋白质或多肽由于其起源或衍生来源而未与在其天然状态下伴随它的天然缔合组分缔合;基本上不含来自相同来源的其他蛋白质。可使用本领域已知的蛋白质纯化技术使蛋白质基本上不含天然缔合组分或通过分离进行基本纯化。“基本纯化”意指蛋白质基本上不含污染物,例如至少约70%或75%或80%或85%或90%或95%或96%或97%或98%或99%不含污染物。

[0285] 术语“重组”应理解为意指人工基因重组的产物。因此,在包含抗体抗原结合结构

域的重组蛋白的上下文中，该术语不涵盖在受试者体内天然发生的作为B细胞成熟期间发生的天然重组产物的抗体。然而，如果分离出此类抗体，则其应被认为是包含抗体抗原结合结构域的分离的蛋白质。类似地，如果使用重组手段分离和表达编码该蛋白质的核酸，则所得蛋白质为包含抗体抗原结合结构域的重组蛋白质。重组蛋白还涵盖通过人工重组手段表达的蛋白质，在此情况下该蛋白质在细胞、组织或受试者中(例如，该蛋白在其中表达)。

[0286] 术语“蛋白质”应被视为包含单个多肽链，即一系列通过肽键连接的连续氨基酸或一系列彼此共价或非共价连接的多肽链(即多肽复合物)。例如，可以使用合适的化学物质或二硫键共价连接该系列多肽链。非共价键的实例包括氢键、离子键、范德华力和疏水相互作用。

[0287] 术语“多肽”或“多肽链”将从前述段落理解为意指一系列通过肽键连接的连续氨基酸。

[0288] 如本文所用，术语“抗原结合位点”可与“抗原结合结构域”互换使用，并且应被视为是意指能够特异性结合抗原的抗体区域，即VH或VL或者包含VH和VL两者的Fv。抗原结合结构域不需要在整个抗体的背景下，例如，它可以是分离的(例如，结构域抗体)或另一形式(例如，如本文所述，如scFv)。

[0289] 为了本披露的目的，术语“抗体”包括由于Fv内包含的抗原结合结构域而能够特异性结合一种或几种密切相关抗原的蛋白质。该术语包括四链抗体(例如，两条轻链和两条重链)、重组或修饰抗体(例如，嵌合抗体、人源化抗体、人抗体、CDR移植抗体、灵长类化抗体、去免疫抗体、同人源化(synhumanized)抗体、半抗体、双特异性抗体)。抗体通常包含恒定结构域，其可排列成恒定区或恒定片段或可结晶片段(Fc)。抗体的示例性形式包括作为其基本单元的四链结构。全长抗体包括两条共价连接的重链(约50至70kD)和两条轻链(约23kDa)。轻链通常包含可变区(如果存在)和恒定结构域，并且在哺乳动物中为κ轻链或λ轻链。重链通常包含可变区和由铰链区连接到另外一个或多个恒定结构域的一个或两个恒定结构域。哺乳动物的重链属于以下类型之一：α、δ、ε、γ或μ。每条轻链也与其中一条重链共价连接。例如，这两条重链以及这些重链和轻链通过链间二硫键和非共价相互作用保持在一起。链间二硫键的数量在不同类型的抗体中可能有所不同。每条链都有N末端可变区(VH或VL，其中每个的长度为约110个氨基酸)和一个或多个C末端恒定结构域。轻链的恒定结构域(长度为约110个氨基酸的CL)与重链的第一恒定结构域(长度为330至440个氨基酸的CH1)对齐并二硫键合。轻链可变区与重链可变区对齐。抗体重链可包含2个或更多个另外的CH结构域(如CH2、CH3等)，并可包含CH1和CH2恒定结构域之间的铰链区。抗体可以是任何类型(例如，IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、类别(例如，IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或亚类。在一个实例中，抗体是鼠(小鼠或大鼠)抗体或灵长类(例如，人)抗体。在一个实例中，抗体重链缺失C末端赖氨酸残基。在一个实例中，抗体为人源化的、同人源化的、嵌合的、CDR移植的或去免疫化的。

[0290] 术语“全长抗体”、“完整抗体”或“整个抗体”可互换使用，以指处于其基本完整形式的抗体，与抗体的抗原结合片段相反。具体而言，整个抗体包括具有重链和轻链(包括Fc区)的抗体。恒定结构域可以是野生型序列恒定结构域(例如，人野生型序列恒定结构域)或其氨基酸序列变体。

[0291] 如本文所用，“可变区”指如本文所定义的抗体的轻链和/或重链中能够特异性结

合抗原的部分，并包含互补决定区(CDR;即CDR1、CDR2和CDR3)以及框架区(FR)的氨基酸序列。例如，可变区包含三个或四个FR(例如，FR1、FR2、FR3和任选地FR4)以及三个CDR。VH指重链的可变区。VL指轻链的可变区。

[0292] 如本文所用，术语“互补决定区”(同义词CDR;即CDR1、CDR2和CDR3)是指抗体可变区的氨基酸残基，其存在是特异性抗原结合的主要促成因素。每个可变区结构域(VH或VL)典型地有三个CDR，分别鉴定为CDR1、CDR2和CDR3。VH的CDR在本文中也分别称为CDR H1、CDR H2和CDR H3，其中CDR H1对应于VH的CDR 1，CDR H2对应于VH的CDR 2，并且CDR H3对应于VH的CDR 3。同样，VL的CDR在本文中分别称为CDR L1、CDR L2和CDR L3，其中CDR L1对应于VL的CDR 1，CDR L2对应于VL的CDR 2，并且CDR L3对应于VL的CDR 3。在一个实例中，分配给CDR和FR的氨基酸位置根据以下定义:Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest[具有免疫学意义的蛋白质的Kabat序列]，美国国立卫生研究院，贝塞斯达，马里兰州，1987和1991(本文中也称为“Kabat编号系统”)。在另一个实例中，根据增强的Chothia编号方案(Enhanced Chothia Numbering Scheme)(http://www.bioinfo.org.uk/mdex.html)定义分配给CDR和FR的氨基酸位置。本发明不限于由Kabat编号系统定义的FR和CDR，而是包括所有编号系统，包括规范编号系统或Chothia和Lesk J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]196:901-917,1987;Chothia等人，Nature[自然]342:877-883,1989;和/或Al-Lazikani等人，J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]273:927-948,1997的编号系统;Honnegher和Plükthun J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]309:657-670,2001的编号系统;或Giudicelli等人，Nucleic Acids Res.[核酸研究]25:206-211 1997中讨论的IMGT系统。在一个实例中，根据Kabat编号系统定义CDR。任选地，根据Kabat编号系统的重链CDR2不包含本文所列的五种C末端氨基酸，或者那些氨基酸中的任一种或多种被另一种天然发生的氨基酸取代。在这方面，Padlan等人，FASEB J.[FASEB杂志]，9:133-139,1995确定重链CDR2的五个C末端氨基酸通常不参与抗原结合。

[0293] “框架区”(FR)是指除CDR残基以外的可变区残基。VH的FR在本文中也分别称为FR H1、FR H2、FR H3和FR H4，其中FR H1对应于VH的FR 1，FR H2对应于VH的FR 2，FR H3对应于VH的FR 3，并且FR H4对应于VH的FR 4。同样，VL的FR在本文中分别称为FR L1、FR L2、FR L3和FR L4，其中FR L1对应于VL的FR 1，FR L2对应于VL的FR 2，FR L3对应于VL的FR 3，并且FR L4对应于VL的FR 4。

[0294] 如本文所用，术语“Fv”应被视为意指任何蛋白质，无论其由多个多肽还是单个多肽构成，其中VL和VH缔合并形成具有抗原结合结构域的复合物，即能够特异性结合抗原。形成抗原结合结构域的VH和VL可以位于单个多肽链中或位于不同的多肽链中。进一步地，本发明的Fv(以及本发明的任何蛋白质)可具有可结合或可不结合相同抗原的多个抗原结合结构域。该术语应理解为涵盖直接衍生自抗体的片段以及对应于使用重组手段产生的此类片段的蛋白质。在一些实例中，VH未连接到重链恒定结构域(CH)1和/或VL未连接到轻链恒定结构域(CL)。示例性含有Fv的多肽或蛋白质包含Fab片段、Fab’片段、F(ab’)片段、scFv、双体抗体、三体抗体、四体抗体或更高阶复合物、或者连接到其恒定区或结构域的前述任一项(例如，CH2或CH3结构域，例如微型抗体)。“Fab片段”由免疫球蛋白的单价抗原结合片段组成，并且可通过木瓜蛋白酶消化整个抗体以生成由完整轻链和部分重链组成的片段来产生，或可使用重组方式产生。抗体的“Fab”片段可通过用胃蛋白酶处理整个抗体，然后还原，

以产生由完整轻链以及包含VH和单个恒定结构域的部分重链组成的分子来获得。以这种方式处理的每个抗体获得两个Fab'片段。Fab'片段也可以通过重组手段产生。抗体的"F(ab')2片段"由通过两个二硫键连接在一起的两个Fab'片段的二聚体组成,并且通过用胃蛋白酶处理整个抗体分子(无需随后还原)来获得。"Fab2"片段是包含使用例如亮氨酸拉链或CH3结构域连接的两个Fab片段的重组片段。"单链Fv"或"scFv"是包含抗体可变区片段(Fv)的重组分子,其中轻链可变区和重链可变区通过合适的柔性多肽接头共价连接。

[0295] 如本文所用,术语"结合"在提及抗原结合位点或其抗原结合结构域与抗原的相互作用时意指该相互作用取决于抗原上特定结构(例如,抗原决定簇或表位)的存在。例如,抗体识别并结合特定的蛋白质结构,而不是一般情况的蛋白质。如果抗体与表位"A"结合,则含有表位"A"的分子(或游离的、未标记的"A")在含有经标记的"A"和该蛋白质的反应中的存在将减少与抗体结合的经标记的"A"的量。

[0296] 如本文所用,术语"特异性结合(specifically binds或binds specifically)"应被视为意指本发明的抗原结合位点与特定抗原或表达相同抗原的细胞以与替代性抗原或细胞相比更频繁、更快速地、更大的持续时间和/或更大的亲和力反应或缔合。例如,抗原结合位点与PSMA结合的亲和力比与其他抗原结合的亲和力实质性更大(例如,1.5倍或2倍或5倍或10倍或20倍或40倍或60倍或80倍至100倍或150倍或200倍)。

[0297] 如本文所用,术语"表位"(同义词"抗原决定簇")应理解为意指包含抗体的抗原结合结构域的抗原结合位点结合的细胞表面蛋白(如PSMA)区域。

[0298] 如本文所用,术语"病症"指正常功能的中断或干扰,并且不限于任何特定病症,并将包括疾病或障碍。

[0299] 如本文所用,术语"预防(preventing、prevent或prevention)"包括施用本发明的抗原结合位点以从而停止或阻碍病症的至少一种症状的发展。该术语还涵盖对缓解期受试者进行的用以预防或阻碍复发的治疗。

[0300] 如本文所用,术语"治疗(treating、treat或treatment)"包括施用本文所述的抗原结合位点以从而减少或消除特定疾病或病症的至少一种症状。

[0301] 如本文所用,术语"受试者"应指包括人在内的任何动物,例如哺乳动物。示例性受试者包括但不限于人和非人灵长类动物。例如,受试者是人。

[0302] 修饰抗体

[0303] 本发明部分涉及对IgG抗体的修饰,包括对抗体的区域的一个或多个氨基酸取代,这些取代减少或消除抗体对FcRn的亲和力,从而减少抗体的血清半衰期。

[0304] 应理解,根据本发明,可根据本文所述方法修饰希望减少血清半衰期的任何抗体。此外,应理解,在优选实施例中,经修饰以减少血清半衰期的抗体是可用于诊断或治疗应用并且更具体地说可用于治疗诊断应用的抗体。

[0305] 根据本发明的方法使用的合适抗体的实例包括曲妥珠单抗(Herceptin®)、利妥昔单抗(Rituxan®)、贝伐珠单抗(Avastin®)、狄诺塞单抗(Unituxin®)、帕尼单抗(Vectibix®)、派姆单抗(Keytruda®)、纳武单抗(Opdivo®)、托西莫单抗(Bexxar®)和替伊莫单抗(ibritumomab)(Zevalin®)。然而,还应理解,本发明不旨在限于特定抗体,前提是该抗体在其他情况下易受FcRn结合的影响。

[0306] 本发明还设想了用于靶向肿瘤抗原的抗体药物缀合物的用途，其中这些缀合物包含细胞毒性有效负载。此类抗体的实例包括吉妥珠单抗(Mylotarg®)、本妥昔单抗(Adcetris®)、英妥珠单抗(Besponsa®)、格巴妥木单抗(CDX-011)、阿奈妥单抗(BAY94-9343)、米妥昔单抗(IMGN853)迪妥昔珠单抗(ABT-414)、洛伐妥珠单抗(Rova-T)和他伐达妥昔单抗(SGN-CD33A)。通过引用并入本文的Lambert等人，2017，Adv Ther[疗法进展](2017)34:1015-1035中描述了进一步的实例。

[0307] 在某些实施例中，适于根据本发明进行修饰以减少对FcRn的亲和力的抗体是具有表1中所示的一个或多个序列的抗体。

[0308] 本发明还提供了抗原结合位点或编码该位点的核酸，该核酸与本文披露的序列具有至少80％的同一性。在一个实例中，本发明的抗原结合位点或核酸包含与本文披露的序列至少约85％或90％或95％或97％或98％或99％相同的序列。

[0309] 可替代地或另外，抗原结合位点包含与本文根据任何实例所述的V_H或V_L的一个或多个CDR至少约80％或85％或90％或95％或97％或98％或99％相同的CDR(例如，三个CDR)。

[0310] 在另一实例中，本发明的核酸包含与编码具有本文根据任何实例所述的功能的抗原结合位点的序列至少约80％或85％或90％或95％或97％或98％或99％相同的序列。本发明还涵盖编码本发明的抗原结合位点的核酸，由于遗传密码的简并性，其不同于本文举例说明的序列。

[0311] 核酸或多肽的％同一性通过GAP(Needleman和Wunsch.Mol.Biol.[分子生物学杂志],48,443-453,1970)分析(GCG计划)确定，缺口建立罚分＝5，缺口扩展罚分＝0.3。查询序列的长度为至少50个残基，GAP分析将两个序列在至少50个残基的区域上对齐。例如，查询序列的长度为至少100个残基，GAP分析将两个序列在至少为100个残基的区域上对齐。例如，将两个序列在其整个长度上对齐。

[0312] 本发明还设想了在严格杂交条件下与编码本文所述抗原结合位点的核酸杂交的核酸。“中等严格”在本文中定义为在2 x SSC缓冲液、0.1％(w/v)SDS中在45℃至65℃范围内的温度或等同条件下进行的杂交和/或洗涤。“高严格”在本文中定义为在0.1 x SSC缓冲液、0.1％(w/v)SDS或较低盐浓度中，在至少65℃的温度或等同条件下进行的杂交和/或洗涤。本文提及的特定严格水平涵盖使用本领域技术人员已知的SSC以外的洗涤/杂交溶液的等同条件。例如，本领域已知用于计算双链核酸的链将解离的温度(也称为解链温度或Tm)的方法。类似于(例如，在5℃或10℃内)或等于核酸Tm的温度被认为是高严格。中等严格应被认为在计算的核酸Tm的10℃至20℃或10℃至15℃内。

[0313] 本发明还设想了本发明的抗原结合位点的突变形式，该抗原结合位点的突变形式与本文所示序列相比包含一个或多个保守氨基酸取代。在一些实例中，抗原结合位点包含10个或更少，例如9或8或7或6或5或4或3或2或1个保守氨基酸取代。“保守氨基酸取代”是指其中氨基酸残基被具有类似侧链和/或亲水性和/或亲合性的氨基酸残基替换的取代。

[0314] 具有类似侧链的氨基酸残基的家族已在现有技术中定义，所述侧链包括碱性侧链(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、非极性侧链(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、β-分支侧链(例

如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)及芳族侧链(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。亲合性指数描述于例如Kyte和Doolittle J.Mol.Biol.[分子生物学杂志],157:105-132,1982中,并且亲水性指数描述于US 4554101中。

[0315] 本发明还设想了非保守氨基酸变化。例如,特别感兴趣的是用另一种带电荷的氨基酸和用中性或带正电的氨基酸取代带电荷的氨基酸。在一些实例中,抗原结合位点包含10个或更少,例如,9或8或7或6或5或4或3或2或1个非保守氨基酸取代。

[0316] 在一个实例中,一个或多个突变发生在本发明的抗原结合位点的抗原结合结构域的FR内。在另一实例中,一个或多个突变发生在本发明的抗原结合位点的CDR内。

[0317] 用于产生抗原结合位点突变形式的示例性方法包括:

[0318] • DNA突变(Thie等人,Methods Mol.Biol.[分子生物学方法]525:309-322,2009)或RNA(Kopsidas等人,Immunol.Lett.[免疫学快报]107:163-168,2006;Kopsidas等人BMC Biotechnology[BMC生物技术],7:18,2007;和WO 1999/058661);

[0319] • 将编码该多肽的核酸引入突变细胞(例如XL-1Red、XL-mutS和XL-mutS-Kanr细菌细胞(斯特拉塔根公司(Stratagene)))中;

[0320] • DNA改组,例如在Stemmer,Nature[自然]370:389-91,1994中所披露的;以及

[0321] • 定点突变,例如Dieffenbach(编)和Dveksler(编)(于:PCR Primer:ALaboratory Manual[PCR引物:实验室手册],冷泉港实验室,纽约,1995)所述。

[0322] 用于确定本发明的突变型抗原结合位点的生物活性的示例性方法对于本领域技术人员将而言是显而易见的和/或在本文中进行了描述,例如抗原结合。例如,本文描述了用于确定抗原结合、结合的竞争抑制、亲和力、缔合、解离和治疗功效的方法。

[0323] 恒定区

[0324] 本发明涵盖本文所述的抗原结合位点和/或包含抗体恒定区的抗体。这包括融合到Fc的抗体的抗原结合片段。

[0325] 可用于产生本发明的蛋白质的恒定区序列可从许多不同来源获得。在一些实例中,蛋白质的恒定区或其部分衍生自人抗体。其恒定区或部分可衍生自任何抗体类别,包括IgM、IgG、IgD、IgA和IgE;以及任何抗体同种型,包括IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。在一个实例中,恒定区为人同种型IgG4或稳定的IgG4恒定区。

[0326] 优选修饰

[0327] 本发明具体设想了对包含Fc区或恒定区的抗体或抗原结合位点的修饰。

[0328] 新生儿Fc受体(FcRn)对体内IgG类抗体的代谢归宿是重要的。FcRn的功能是从溶酶体降解途径中挽救IgG,导致清除率减少和半衰期增加。它是一种异二聚体蛋白质,由以下两种多肽组成:50kDa的I类主要组织相容性复合物样蛋白(a-FcRn)和15kDa的p2-微球蛋白(β2ηι)。FcRn与IgG类抗体的Fc区的CH2-CH3部分以高亲和力结合。IgG类抗体和FcRn之间的相互作用依赖于pH,并以1:2化学计量学发生,即一个IgG抗体分子可通过其两个重链Fc区多肽与两个FcRn分子相互作用(参见例如Huber,A.H.等人,J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]230(1993)1077-1083)。

[0329] 因此,IgG的体外FcRn结合特性/特征指示其在血液循环中的体内药代动力学特性。重链CH2-结构域和CH3-结构域的不同氨基酸残基参与FcRn和IgG类抗体的Fc区之间的相互作用。

[0330] 影响FcRn结合从而影响血液循环中的半衰期的不同突变是已知的。对小鼠Fc区-小鼠FcRn相互作用至关重要的Fc区残基已通过定点突变进行鉴定(参见例如Dall'Acqua,W.F.,等人J.Immunol[免疫学杂志]169(2002)5171-5180)。残基Ile253、His310、His433、Asn434和His435(根据EU索引编号系统编号)参与了相互作用(Medesan,C等人,Eur.J.Immunol.[欧洲免疫学杂志]26(1996)2533-2536;Firan,M.等人,Int.Immunol.[国际免疫学杂志]13(2001)993-1002;Kim,J.K.等人,Eur.J.Immunol.[欧洲免疫学杂志]24(1994)542-548)。(使用Kabat系统,相关残基为Ile266、His329、His464、Asn465和His466)。发现残基Ile253、His310和His435对人Fc区与鼠FcRn的相互作用至关重要(Kim,J.K.等人,Eur.J.Immunol.[欧洲免疫学杂志]29(1999)2819-2885)。

[0331] 更具体地说,抗体可包含降低蛋白质的半衰期的一个或多个氨基酸取代。例如,抗体包含含有降低Fc区对新生儿Fc区(FcRn)的亲和力的一个或多个氨基酸取代的Fc区。

[0332] 本发明还提供了一种抗体,该抗体具有与天然发生的IgG类抗体恒定区基本上相同的恒定区,其中选自由残基His310、His435和Ile253组成的组的至少一个氨基酸残基与天然发生的IgG类抗体中存在的不同,从而相对于该天然发生的抗体改变所述抗体的FcRn结合亲和力和/或血清半衰期。在优选实施例中,天然发生的IgG类抗体包含人IgG1、IgG2、IgG2M3、IgG3或IgG4分子的重链恒定区。

[0333] 同样在优选实施例中,来自具有与天然发生的IgG类抗体基本上相同的恒定区的抗体的重链恒定区的氨基酸残基310或残基435是非组氨酸且减少恒定区的FcRn亲和力的任何氨基酸。例如,残基310或435处的氨基酸可以是丙氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、精氨酸、脯氨酸、谷氨酰胺、甲硫氨酸、丝氨酸、苏氨酸、赖氨酸、天冬酰胺、苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸、半胱氨酸、缬氨酸或甘氨酸。

[0334] 优选地,位置310处的残基选自丙氨酸、或谷氨酸或谷氨酰胺;或来自重链恒定区的氨基酸残基435选自精氨酸、谷氨酰胺或丙氨酸。在其他优选实施例中,具有与天然发生的IgG类抗体基本上相同的恒定区的抗体在位置310处具有丙氨酸残基且在位置435处具有谷氨酰胺残基。

[0335] 在本发明的优选实施例中,修饰抗体对FcRn的结合亲和力和/或该修饰抗体的血清半衰期降低至少约30%、50%、80%、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、15倍、20倍、25倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍或100倍。在本发明的优选实施例中,所述修饰抗体对FcRn的结合亲和力和/或所述修饰抗体的血清半衰期减少至少约20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%。

[0336] 另外,本发明的抗体可包含修饰抗体对任一个或多个Fcγ受体的亲和力的一个或多个突变。

[0337] 在本发明的优选实施例中,恒定区的Fc区保留了诱导效应子功能的能力。在一个实例中,恒定区的Fc区包含调节效应子功能(包括与野生型IgG相比增加效应子功能)的一个或多个氨基酸取代。

[0338] 在一个实例中,恒定区的Fc区具有减少的诱导效应子功能的能力,例如,与天然或野生型人IgG1或IgG3 Fc区相比。在一个实例中,效应子功能为抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)和/或抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP)和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)。用于评估含有Fc区的蛋白质的效应子功能水平的方法在本领域中是已知的和/或在

本文中进行了描述。

[0339] 在一个实例中,修饰该抗体诱导效应子功能的能力的氨基酸取代是在来自重链恒定区的残基Ile253处的氨基酸取代。在一个实例中,取代是对选自以下的任何氨基酸的取代:丙氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、精氨酸、脯氨酸、谷氨酰胺、甲硫氨酸、丝氨酸、苏氨酸、赖氨酸、天冬酰胺、苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸、半胱氨酸、缬氨酸或甘氨酸,其中该取代减少该抗体诱导效应子功能的能力。在优选实施例中,来自Ile的在残基253处的取代是取代为精氨酸、脯氨酸或天冬氨酸,更优选丙氨酸。

[0340] 在一个实例中,Fc区是IgG4 Fc区(即,来自IgG4恒定区),例如人IgG4 Fc区。合适的IgG4 Fc区的序列对于技术人员来说是显而易见的,和/或可以在公开可用的数据库中获得(例如,可以从国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)获得)。

[0341] 在一个实例中,恒定区是稳定的IgG4恒定区。术语“稳定的IgG4恒定区”将被理解为意指如下的IgG4恒定区,该IgG4恒定区已被修饰以减少Fab臂交换或者经历Fab臂交换的倾向或者半抗体的形成或者形成半抗体的倾向。“Fab臂交换”是指对人IgG4进行的一种类型的蛋白质修饰,其中IgG4重链和附接的轻链(半分子)被转换为来自另一个IgG4分子的重-轻链对。因此,IgG4分子可能获得两个不同的Fab臂,识别两种不同的抗原(产生双特异性分子)。Fab臂交换在体内天然发生,并可通过纯化的血细胞或还原剂(如还原型谷胱甘肽)在体外诱导。当IgG4抗体解离形成两个分子,每个分子包含单一重链和单一轻链时,就会形成“半抗体”。

[0342] 在一个实例中,稳定的IgG4恒定区包含根据Kabat系统的铰链区位置241处的脯氨酸(Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest[具有免疫学意义的蛋白质的序列]华盛顿特区美国卫生和公共服务部(Washington DC United States Department of Health and Human Services),1987和/或1991)。根据EU编号系统,该位置对应于铰链区的位置228。在人IgG4中,这种残基通常是丝氨酸。在丝氨酸取代脯氨酸之后,IgG4铰链区包含序列CPPC。在这方面,本领域技术人员将知道,“铰链区”是抗体重链恒定区中富含脯氨酸的部分,其连接向抗体的两个Fab臂赋予移动性的Fc和Fab区。铰链区包含参与重链间二硫键的半胱氨酸残基。根据Kabat的编号系统,它通常被定义为从人IgG1的Glu226延伸至Pro243(或使用EU指数从Glu216至Pro230)。通过将形成重链间二硫键(S-S)的第一个和最后一个半胱氨酸残基放置在相同位置,其他IgG同种型的铰链区可与IgG1序列对齐(例如,参见WO2010/080538)。

[0343] 稳定的IgG4抗体的其他实例是其中人IgG4重链恒定区中位置409(根据EU编号系统)处的精氨酸被赖氨酸、苏氨酸、甲硫氨酸或亮氨酸取代的抗体(例如,如WO 2006/033386所述)。恒定区的Fc区可另外或可替代地包含选自由以下组成的组的残基:对应于405的位置处的丙氨酸、缬氨酸、甘氨酸、异亮氨酸和亮氨酸(根据EU编号系统)。任选地,铰链区包含位置241处的脯氨酸(即,CPPC序列)(如上所述)。

[0344] 在另一实例中,Fc区是经修饰以具有减少的效应子功能的区域,即“非免疫刺激Fc区”。例如,Fc区是包含在选自由268、309、330和331组成的组的一个或多个位置处的取代的IgG1 Fc区。在另一个实例中,Fc区是包含一个或多个以下变化E233P、L234V、L235A以及G236的缺失和/或一个或多个以下变化A327G、A330S和P331S的IgG1 Fc区(Armour等人,Eur

J Immunol.[欧洲免疫学杂志]29:2613-2624,1999;Shields等人,J Biol Chem.[生物化学杂志]276(9):6591-604,2001)。非免疫刺激性Fc区的其他实例在例如Dall'Acqua等人,J Immunol.[免疫学杂志]177:1129-11382006;和/或Hezareh J Virol[病毒学杂志];75:12161-12168,2001中进行了描述。

[0345] 在另一实例中,Fc区是嵌合Fc区,例如,包含来自IgG4抗体的至少一个C_H2结构域和来自IgG1抗体的至少一个C_H3结构域,其中该Fc区包含在选自由240、262、264、266、297、299、307、309、323、399、409和427(EU编号)组成的组的一个或多个氨基酸位置处的取代(如WO 2010/085682所述)。示例性取代包括240F、262L、264T、266F、297Q、299A、299K、307P、309K、309M、309P、323F、399S和427F。

[0346] 抗体产生

[0347] 优选地,本文根据任何实例所述的抗原结合位点都是重组的。

[0348] 在重组蛋白的情况下,编码该重组蛋白的核酸可被克隆到表达构建体或载体中,然后将这些表达构建体或载体转染到不以其他方式产生该蛋白质的宿主细胞中,例如大肠杆菌细胞、酵母细胞、昆虫细胞或哺乳动物细胞如猿猴COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、人胚肾(HEK)细胞、或骨髓瘤细胞。用于表达蛋白质的示例性细胞为CHO细胞、骨髓瘤细胞或HEK细胞。实现这些结局的分子克隆技术在本领域中是已知的,并在例如Ausubel等人(编),Current Protocols in Molecular Biology[分子生物学的当前方案],格林出版联营公司和威利国际科学公司(1988,包括直至现在的所有更新)或Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual[分子克隆:实验室手册],冷泉港实验室出版社(1989)中进行了描述。很多克隆和体外扩增方法适合于构建重组核酸。生产重组抗体的方法在本领域中也是已知的,参见例如US 4816567或US 5530101。

[0349] 分离后,将核酸可操作地连接到表达构建体或表达载体中的启动子,以进一步在无细胞系统或细胞中克隆(扩增DNA)或表达。

[0350] 如本文所用,术语"启动子"要在其最广泛的背景下看待并包含基因组基因的转录调控序列,包括准确转录起始所需的TATA盒或起始元件,具有或不具有改变核酸的表达(例如,响应于发育和/或外部刺激,或以组织特异性方式)的另外的调控元件(例如,上游激活序列、转录因子结合位点、增强子和沉默子)。在本上下文中,术语"启动子"还用于描述重组、合成或融合核酸,或者赋予、激活或增强与其可操作连接的核酸的表达的衍生物。示例性启动子可包含一个或多个特定调控元件的另外的拷贝,以进一步增强所述核酸的表达和/或改变其空间表达和/或时间表达。

[0351] 如本文所用,术语"可操作地连接到"意指相对于核酸定位启动子,使得核酸的表达由启动子控制。

[0352] 许多用于在细胞中表达的载体是可用的。载体组分通常包括但不限于以下一项或多项:信号序列、编码蛋白质的序列(例如,衍生自本文提供的信息)、增强子元件、启动子和转录终止序列。本领域技术人员将知道用于表达蛋白质的合适序列。示例性信号序列包括原核分泌信号(例如pelB、碱性磷酸酶、青霉素酶、Ipp或热稳定肠毒素II)、酵母分泌信号(例如转化酶前导物、α因子前导物或酸性磷酸酶前导物)或哺乳动物分泌信号(例如单纯疱疹病毒gD信号)。

[0353] 哺乳动物细胞中有活性的示例性启动子包括巨细胞病毒立即早期启动子(CMV-

IE)、人延伸因子1-α启动子(EF1)、小核RNA启动子(U1a和U1b)、α-肌球蛋白重链启动子、猿猴病毒40启动子(SV40)、罗斯肉瘤病毒启动子(RSV)、腺病毒主要晚期启动子、β-肌动蛋白启动子;包含CMV增强子/β-肌动蛋白启动子或免疫球蛋白启动子的混合调节元件或其活性片段。有用的哺乳动物宿主细胞系的实例为SV40转化的猴肾CV1系(COS-7,ATCC CRL 1651);人胚肾系(293或293细胞亚克隆,用于悬浮培养生长;幼仓鼠肾细胞(BHK,ATCC CCL 10);或中国仓鼠卵巢细胞(CHO)。

[0354] 适于在酵母细胞(诸如像选自包括毕赤酵母、酿酒酵母和波姆酵母的组的酵母细胞)中表达的典型启动子包括但不限于ADH1启动子、GAL1启动子、GAL4启动子、CUP1启动子、PHO5启动子、nmt启动子、RPR1启动子或TEF1启动子。

[0355] 本领域技术人员已知用于将分离的核酸或包含其的表达构建体引入细胞中以进行表达的方法。用于给定细胞的技术取决于已知的成功技术。将重组DNA引入细胞中的方法包括微注射、由DEAE-葡聚糖介导的转染、由脂质体介导的转染如通过使用脂质转染胺(吉博科公司(Gibco),马里兰州,美国)和/或cellfectin(吉博科公司,马里兰州,美国)、PEG介导的DNA摄取、电穿孔和微粒轰击如通过使用DNA涂覆的钨或金颗粒(Agracetus公司,威斯康星州,美国)等。

[0356] 用于产生该蛋白质的宿主细胞可在多种培养基中培养,取决于所用的细胞类型。可商购的培养基如Ham的F10(西格玛公司(Sigma))、最低必需培养基((MEM)(西格玛公司)、RPMI-1640(西格玛公司)和杜尔贝科氏改良伊格培养基((DMEM),西格玛公司)适合于培养哺乳动物细胞。用于培养本文讨论的其他细胞类型的培养基在本领域中是已知的。

[0357] 蛋白质的分离

[0358] 用于分离蛋白质的方法在本领域中是已知的和/或在本文中进行了描述。

[0359] 当抗原结合位点被分泌到培养基中时,可首先使用可商购蛋白质浓缩过滤器(例如,艾美康恩公司(Amicon)或密理博皮里康恩公司(Millipore Pellicon)超滤装置)浓缩来自此类表达系统的上清液。可在前述任何步骤中包含诸如PMSF等的蛋白酶抑制剂以抑制蛋白质水解,且可包含抗生素以防止外来污染物的生长。可替代地或另外,可以从表达该蛋白质的细胞中过滤和/或分离上清液,例如,使用连续离心。

[0360] 从细胞制备的抗原结合位点可使用例如离子交换、羟基磷灰石色谱、疏水相互作用色谱、凝胶电泳、透析、亲和色谱(例如,蛋白质A亲和色谱或蛋白质G色谱)或前述的任何组合来纯化。这些方法在本领域中是已知的,并描述于例如WO99/57134或Ed Harlow和David Lane(编)Antibodies:A Laboratory Manual[抗体:实验室手册],冷泉港实验室(1988)中。

[0361] 本领域技术人员还将知道,该蛋白质可被修饰以包含便于纯化或检测的标签,例如聚组氨酸标签(例如六组氨酸标签)、或流感病毒血凝素(HA)标签、或猿猴病毒5(V5)标签、或FLAG标签、或谷胱甘肽S-转移酶(GST)标签。然后使用本领域中已知的方法纯化(如亲和纯化)所得蛋白质。例如,通过使包含该蛋白质的样品与特异性结合固定在固体或半固体支持物上的六组氨酸标签的镍-次氮基三乙酸(Ni-NTA)接触,洗涤样品以去除未结合的蛋白质,随后洗脱结合的蛋白质,来纯化包含六组氨酸标签的蛋白质。可替代地或另外,在亲和纯化方法中使用结合标签的配体或抗体。

[0362] 放射性同位素与抗体的连接

[0363] 在本发明的任何实施例中，本文所述抗体可直接或间接连接到诊断或治疗剂，优选地，诊断或治疗剂为放射性同位素。

[0364] 合适的同位素的实例包括：锕-225（^{225}Ac），砹-211（^{211}At），铋-212和铋-213（^{212}Bi、^{213}Bi），铜-64和铜-67（^{64}Cu、^{67}Cu），镓-67和镓-68（^{67}Ga和^{68}Ga），铟-111（^{111}In），碘-123、碘-124、碘-125或碘-131（^{123}I、^{124}I、^{125}I、^{131}I）（^{123}I），铅-212（^{212}Pb），镥-177（^{177}Lu），镭-223（^{223}Ra），钐-153（^{153}Sm），钪-44和钪-47（^{44}Sc、^{47}Sc），锶-90（^{90}Sr），锝-99（^{99m}Tc），钇-86和钇-90（^{86}Y、^{90}Y），锆-89（^{89}Zr）。本领域技术人员将熟悉哪些放射性同位素优选用作诊断剂，哪些优选用作治疗剂。

[0365] 应理解，放射性同位素可直接（通过螯合剂或辅基或接头）或通过结合抗体中的单个或多个氨基酸残基（例如酪氨酸残基的卤化）间接地缀合至本发明的抗体。

[0366] 在替代性实施例中，可使用螯合剂或接头以使放射性同位素与抗体缀合。在一个实例中，抗体可缀合至螯合部分，该螯合部分选自由以下组成的组：TMT（6,6″-乙酰胺[N,N″,N″′-四（羧甲基）氨甲基）-4’-（3-氨基-4-甲氧基苯基）-2,2’:6’,2″-三联吡啶）、DOTA（1,4,7,10-四氮杂环十二烷-NN’,N″（N″′-四乙酸，也称为四昔坦）、TCMC（DOTA的四伯酰胺）、DO3A（1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7-三（乙酸）-10-（2-硫乙基）乙酰胺）、CB-DO2A（4,10-双（羧甲基）-1,4,7,10-四氮杂双环[5.5.2]十四烷）、NOTA（1,4,7-三氮杂环壬烷-三乙酸）Diamsar（3,6,10,13,16,19-六氮杂双环[6.6.6]二十烷-1,8-二胺）、DTPA（戊酸或二乙烯三胺五乙酸）、CHX-A″-DTPA（[（R）-2-氨基-3-（4-异氰硫基苯基）丙基]-反式-（S,S）-环己烷-1,2-二胺-五乙酸）、TETA（1,4,8,11-四氮杂环十四烷-1,4,8）、11-四乙酸、Te2A（4,11-双（羧甲基）-1,4,8,11-四氮杂双环[6.6.2]十六烷）、HBED、DFO（去铁胺）、DFOsq（DFO-方酰胺）和HOPO（3,4,3-（LI-1,2-HOPO）或本文所述的其他螯合剂。

[0367] 带有射电金属（radiometal）和其他卤化放射性同位素的螯合剂可通过抗体中的一个或多个氨基酸残基或反应性部分（包括但不限于一个或多个赖氨酸残基、酪氨酸残基或硫醇部分）与本发明的抗体结合。

[0368] 在另一个实例中，修饰抗体缀合至双功能接头，例如溴乙酰基、硫醇、琥珀酰亚胺酯、TFP酯、马来酰亚胺或使用本领域已知的任何胺或硫醇修饰化学。

[0369] 本领域技术人员将熟悉将螯合剂与抗体及其衍生物或片段缀合的标准方法。另外，本领域技术人员将熟悉选择相关螯合剂以与射电金属配对的方法，例如通过引用并入本文的Chem.Soc.Rev.[化学会志综述]，2014,43,260中所述。

[0370] 抗原结合位点的活性测定

[0371] 结合PSMA

[0372] 本领域技术人员从本文的披露内容中将清楚地看到，本发明的优选抗原结合位点结合PSMA。用于评估与蛋白质的结合的方法在本领域中是已知的，例如描述于Scopes（于：Protein purification:principles and practice[蛋白质纯化：原理与实践]，第三版，施普林格维拉格（Springer Verlag），1994）中。这种方法通常涉及固定抗原结合位点并使其与标记抗原接触。在洗涤以去除非特异性结合蛋白后，检测标记的量以及因此结合的抗原的量。当然，可以标记抗原结合位点并固定抗原。也可以使用平移式测定。可替代地或另外，可以使用表面等离子体共振测定。

[0373] 治疗、诊断和治疗诊断方法

[0374] 本发明的抗体可用于治疗需要通过放射免疫疗法治疗的许多病症。通常，这类病症包括癌症。

[0375] 示例性癌症包括囊性和实体肿瘤、骨和软组织肿瘤，包括肛门组织、胆管、膀胱、血细胞、肠、脑、乳腺、类癌、宫颈、眼、食管、头颈、肾、喉、白血病、肝、肺、淋巴结、淋巴瘤、黑色素瘤、间皮瘤、骨髓瘤、卵巢、胰腺、阴茎、前列腺、皮肤(例如鳞状细胞癌)、肉瘤、胃、睾丸、甲状腺、阴道、外阴肿瘤。软组织肿瘤包括良性单体性施旺氏细胞瘤、硬纤维瘤、脂母细胞瘤、脂肪瘤、子宫平滑肌瘤、透明细胞肉瘤、皮肤纤维肉瘤、尤因肉瘤、骨外粘液样软骨肉瘤、粘液样脂肪肉瘤、腺泡横纹肌肉瘤和滑膜肉瘤。特定骨肿瘤包括非骨化性纤维瘤、单房性骨囊肿、内生软骨瘤、动脉瘤性骨囊肿、成骨细胞瘤、软骨母细胞瘤、软骨粘液纤维瘤、骨化性纤维瘤和釉质瘤、骨巨细胞瘤、纤维发育不良、尤文肉瘤嗜酸性肉芽肿、成骨肉瘤、软骨瘤、软骨肉瘤、恶性纤维组织细胞瘤和转移癌。白血病包括急性淋巴母细胞性白血病、急性成髓细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病和慢性髓细胞性白血病。

[0376] 其他实例包括乳腺肿瘤、结直肠肿瘤、腺癌、间皮瘤、膀胱肿瘤、前列腺肿瘤、生殖细胞肿瘤、肝细胞瘤/胆管细胞癌、神经内分泌肿瘤、垂体肿瘤、小圆细胞肿瘤、鳞状细胞癌、黑色素瘤、非典型纤维黄色瘤、精原细胞瘤、非精原细胞瘤、间质莱迪希细胞瘤、塞尔托立细胞瘤(Sertoli cell tumor)、皮肤肿瘤、肾肿瘤、睾丸肿瘤、脑肿瘤、卵巢肿瘤、胃肿瘤、口腔肿瘤、膀胱肿瘤、骨肿瘤、宫颈肿瘤、食管肿瘤、喉肿瘤、肝肿瘤、肺肿瘤、阴道肿瘤和威尔姆氏肿瘤。

[0377] 优选地，本发明的抗原结合位点可用于治疗以存在PSMA为特征的癌症。例如，结合PSMA的抗体可用于治疗以PSMA表达增加为特征的癌症，包括前列腺癌。

[0378] 本领域技术人员将熟悉用于选择与本发明抗体一起使用的合适诊断剂的方法，包括用于诊断本文所述病症的放射成像的放射性同位素。进一步地，本领域技术人员将熟悉与本文所述的诊断试剂结合使用的成像技术。

[0379] 如本文所用，治疗诊断方法是用于肿瘤细胞和/或转移的体外和/或体内可视化、鉴定和/或检测的方法以及治疗癌症的方法。

[0380] 在一个实施例中，本发明包括一种治疗诊断方法，其包括：

[0381] (1)向患者或受试者施用诊断有效量的本发明抗体，

[0382] 其中该抗体包含至少一种在诊断上有用的标记，以及

[0383] (2)向有需要的患者或受试者施用治疗有效量的本发明抗体，

[0384] 其中该抗体包含一种或多种肿瘤治疗剂(例如，放射性同位素、毒素、药物)。

[0385] 优选地，按顺序进行步骤1和步骤2，并且步骤1和步骤2中的抗体相同。

[0386] 含抗体结合结构域的蛋白质

[0387] 单结构域抗体

[0388] 在一些实例中，本发明的抗原结合位点或蛋白质是或包含单结构域抗体(其可与术语“结构域抗体”或“dAb”互换使用)。单结构域抗体是包含抗体的全部或部分重链可变区的单一多肽链。在某些实例中，单结构域抗体是人单结构域抗体(多曼提斯公司(Domantis, Inc.)，沃尔瑟姆，马萨诸塞州;参见例如US 6248516)。

[0389] 双体抗体、三体抗体、四体抗体

[0390] 在一些实例中，本发明的蛋白质是或包含诸如WO 98/044001和/或WO 94/007921

中所述的那些的双体抗体、三体抗体、四体抗体或更高阶蛋白质复合物。

[0391] 例如，双体抗体是包含两条缔合的多肽链的蛋白质，每条多肽链包含结构V_L-X-V_H或V_H-X-V_L，其中V_L是抗体轻链可变区，V_H是抗体重链可变区，X是包含不足以使单个多肽链中的V_H和V_L缔合(或形成Fv)的残基的接头或者不存在，其中一条多肽链的V_H与另一条多肽链的V_L结合以形成抗原结合结构域，即，形成能够特异性结合一种或多种抗原的Fv分子。V_L和V_H在每条多肽链中可以相同，或者V_L和V_H在每条多肽链中可以不同，以形成双特异性双体抗体(即，包含两种具有不同特异性的Fv)。

[0392] 单链Fv(scFv)

[0393] 本领域技术人员将知道，scFv包含单个多肽链中的V_H和V_L区以及V_H和V_L之间的多肽接头，该接头使scFv能够形成抗原结合所希望的结构(即，使单个多肽链的V_H和V_L彼此缔合以形成Fv)。例如，该接头包含超过12个氨基酸残基，其中$(Gly_4Ser)_3$是scFv的更有利接头之一。

[0394] 本发明还设想了二硫键稳定的Fv(或diFv或dsFv)，其中将单个半胱氨酸残基引入V_H的FR和V_L的FR中，并且半胱氨酸残基通过二硫键连接以产生稳定的Fv。

[0395] 可替代地或另外，本发明涵盖二聚scFv，即包含两个通过非共价或共价键连接的scFv分子的蛋白质，例如，通过亮氨酸拉链结构域(例如，衍生自Fos或Jun)连接。可替代地，两个scFv通过具有足够长度的肽接头连接，以使两个scFv形成并结合抗原，例如，如US 20060263367所述。

[0396] 重链抗体

[0397] 重链抗体在结构上不同于许多其他形式的抗体，只要它们包含重链但不包含轻链。因此，这些抗体也被称为“仅重链抗体”。例如，在骆驼和软骨鱼中发现了重链抗体(也称为IgNAR)。

[0398] 为了将其与常规4链抗体中存在的重链可变区(称为“VH结构域”)和常规4链抗体中存在的轻链可变区(称为“VL结构域”)区分开，天然发生的重链抗体中存在的可变区在骆驼抗体中通常称为“V_{HH}结构域”，并且在IgNAR中称为V-NAR。

[0399] 对骆驼重链抗体及其可变区以及生产和/或分离和/或使用它们的方法的一般描述可在以下参考文献WO 94/04678、WO 97/49805和WO 97/49805中找到。

[0400] 关于软骨鱼重链抗体及其可变区以及生产和/或分离和/或使用它们的方法的一般描述尤其可在WO 2005/118629中找到。

[0401] 包含其抗原结合结构域的其他抗体和蛋白质

[0402] 本发明还设想了其他抗体和包含其抗原结合结构域的蛋白质，诸如：

[0403] (i)如US 5731168所述的“匙孔”双特异性蛋白质；

[0404] (ii)异源缀合物蛋白质，例如，如US 4676980所述；

[0405] (iii)使用化学交联剂产生的异源缀合物蛋白质，例如，如US 4676980所述；以及

[0406] (iv)Fab_3(例如，如EP19930302894所述)。

[0407] 组合物

[0408] 在一些实例中，如本文所述的抗原结合位点可经口、肠胃外施用，通过吸入喷雾、吸附、吸收施用，局部、直肠、鼻、颊、阴道、脑室内施用，以含有常规无毒的药学上可接受的载体的剂量配制品经由植入贮存器施用，或通过任何其他方便的剂型施用。如本文所用，术

语“肠胃外”包括皮下、静脉内、肌肉内、腹腔内、鞘内、脑室内、胸骨内和颅内注射或输注技术。

[0409] 将抗原结合位点制备成适合于向受试者施用的形式(例如药物组合物)的方法在本领域中是已知的,并且包括例如以下中所述的方法:Remington's Pharmaceutical Sciences[雷明顿药物科学](第18版,马克出版公司(Mack Publishing Co.),伊斯顿,宾夕法尼亚州,1990)以及U.S.Pharmacopeia:National Formulary[美国药典:国家处方集](麦克出版公司(Mack Publishing Company),伊斯顿,宾夕法尼亚州,1984)。

[0410] 本发明的药物组合物特别可用于肠胃外施用,如静脉内施用或向器官或关节的体腔或内腔施用。用于施用的组合物通常包含抗原结合位点溶解在药学上可接受的载体(例如水性载体)中的溶液。可使用多种水性载体,例如缓冲盐水等。组合物可以含有如接近生理条件所需要的药学上可接受的辅助物质,如pH调节剂和缓冲剂、毒性调节剂等,例如乙酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、乳酸钠等。本发明的抗原结合位点在这些配制品中的浓度可以广泛变化,并且将主要根据所选择的特定施用方式和患者的需要,基于流体体积、粘度、体重等来选择。示例性载体包括水、生理盐水、林格氏溶液、右旋糖溶液和5%人血清白蛋白。也可使用非水性媒介物,如混合油和油酸乙酯。脂质体也可用作载体。这些媒介物可含有少量的增强等渗性和化学稳定性的添加剂,例如缓冲剂和防腐剂。

[0411] 施用剂量和施用时间

[0412] 本发明的抗原结合位点的合适剂量将根据抗原结合位点的特异性、待治疗的病症和/或正在治疗的受试者而变化。熟练的医师有能力确定合适的剂量,例如,从次优剂量开始,逐步修改剂量以确定最佳或可用剂量。可替代地,为了确定治疗/预防的适当剂量,使用来自细胞培养测定或动物研究的数据,其中适合的剂量在循环浓度的范围内,包括毒性很小或没有毒性的活性化合物的ED_{50}。该剂量可以取决于所采用的剂型以及使用的施用途径而在该范围内变化。治疗/预防有效剂量可从细胞培养测定来进行初始估计。在动物模型中可配制剂量以达到循环血浆浓度范围,包括在细胞培养中测定的IC_{50}(即达到症状的半最大抑制的化合物浓度或量)。这类信息可以用来更精确地确定用于人中的剂量。可以测量血浆中的水平,例如通过高效液相色谱法。

[0413] 在一些实例中,本发明的方法包括施用预防或治疗有效量的本文所述蛋白质。

[0414] 术语“治疗有效量”是指当向需要治疗的受试者施用时,改善受试者的预后和/或状态和/或将本文所述临床病症的一个或多个症状减少或抑制至低于作为该病症的临床诊断或临床特征观察到并接受的水平的量。给受试者的施用量取决于待治疗病症的特定特征、正治疗的病症的类型和阶段、施用方式、以及受试者的特征(如一般健康状况、其他疾病、年龄、性别、基因型和体重)。本领域技术人员将能够根据这些和其他因素确定适当的剂量。因此,该术语不应解释为将本发明限于特定量(例如一种或多种蛋白质的重量或量),而是本发明涵盖足以在受试者中实现所述结果的任何量的一个或多个抗原结合位点。

[0415] 如本文所用,术语“预防有效量”应被视为意指足以预防或抑制或延迟临床病症的一种或多种可检测的症状的出现的量的蛋白质。本领域技术人员将知道,这个量将根据例如施用的一种或多种特定抗原结合位点和/或特定受试者和/或病症的类型或严重程度或水平和/或病症的易感性(遗传或其他)而变化。因此,该术语不应解释为将本发明限于特定量(例如一个或多个抗原结合位点的重量或量),而是本发明涵盖足以在受试者中实现所述

结果的任何量的一个或多个抗原结合位点。

[0416] 试剂盒

[0417] 本发明另外包括包含以下一项或多项的试剂盒：

[0418] (i)本发明的抗体或一种或多种编码该抗体的表达构建体；

[0419] (ii)本发明的分子；

[0420] (iii)本发明的复合物;或

[0421] (iii)本发明的药物组合物。

[0422] 在用于检测癌症的试剂盒的情况下,该试剂盒还可以包括检测装置,例如,连接到本发明的抗原结合位点。

[0423] 在用于治疗/预防用途的试剂盒的情况下,该试剂盒可另外包含药学上可接受的载体。

[0424] 任选地,本发明的试剂盒与关于在本文根据任何实例所述的方法中使用的说明书一起包装。

[0425] 表1:本发明的PSMA结合抗体的氨基酸和核苷酸序列概述

[0426]

抗体 ID	区域	SEQ ID NO:	氨基酸或核苷酸序列
ANT4044 可变重链	HCDR1（蛋白质）	1	EYTIH
	HCDR2（蛋白质）	2	NINPNNGGTTYNQKFED
	HCDR3（蛋白质）	3	GWNFDY
	VH（蛋白质）	4	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYTIHWVRQA PGKGLEWIGNINPNNGGTTYNQKFEDRVTITVDKSTSTAYM ELSSLRSEDTAVYYCAAGWNFDYWGQGTTVTVSS
	HCDR1（DNA）	5	GAATACACCATCCAC
	HCDR2（DNA）	6	AACATTAATCCTAACAATGGTGGTACTACCTACAACCAGA AGTTCGAGGAC
	HCDR3（DNA）	7	GGTTGGAACTTTGACTAC
	VH（DNA）	8	GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAA GCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTG GATACACATTCACTGAATACACCATCCACTGGGTGAGGC AGGCCCCTGGAAAGGGCCTTGAGTGGATTGGAAACATTA ATCCTAACAATGGTGGTACTACCTACAACCAGAAGTTCG AGGACAGAGTCACAATCACTGTAGACAAGTCCACCAGCA CAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGAGATCTGAGGATA CTGCAGTCTATTACTGTGCAGCTGGTTGGAACTTTGACT ACTGGGGCCAAGGCACCACGGTCACCGTCTCCTCA
	HFR1（蛋白质）	9	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT
	HFR2（蛋白质）	10	WVRQAPGKGLEWIG
	HFR3（蛋白质）	11	RVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAA
	HFR4（蛋白质）	12	WGQGTTVTVSS
	HFR1（DNA）	12	GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAA GCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTG GATACACATTCACT
	HFR2（DNA）	14	TGGGTGAGGCAGGCCCCTGGAAAGGGCCTTGAGTGGAT TGGA
	HFR3（DNA）	15	AGAGTCACAATCACTGTAGACAAGTCCACCAGCACAGCC TACATGGAGCTCAGCAGCCTGAGATCTGAGGATACTGCA GTCTATTACTGTGCAGCT
	HFR4（DNA）	16	TGGGGCCAAGGCACCACGGTCACCGTCTCCTCA

[0427]

抗体 ID	区域	SEQ ID NO:	氨基酸或核苷酸序列
ANT4044-A2 可变重链	HCDR1（蛋白质）	17	EYTIH
	HCDR2（蛋白质）	18	NINPNNGGTTYNQKFED
	HCDR3（蛋白质）	19	YWLFDY
	VH（蛋白质）	20	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYTIHWVRQA PGKGLEWIGNINPNNGGTTYNQKFEDRVTITVDKSTSTAYM ELSSLRSEDTAVYYCAAYWLFDYWGQGTTVTVSS
	HCDR1（DNA）	21	GAATACACCATCCAC
	HCDR2（DNA）	22	AACATTAATCCTAACAATGGTGGTACTACCTACAACCAGA AGTTCGAGGAC
	HCDR3（DNA）	23	TACTGGCTGTTCGACTAC
	VH（DNA）	24	GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAA GCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTG GATACACATTCACTGAATACACCATCCACTGGGTGAGGC AGGCCCCTGGAAAGGGCCTTGAGTGGATTGGAAACATTA ATCCTAACAATGGTGGTACTACCTACAACCAGAAGTTCG AGGACAGAGTCACAATCACTGTAGACAAGTCCACCAGCA CAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGAGATCTGAGGATA CTGCAGTCTATTACTGTGCAGCTTACTGGCTGTTCGACT ACTGGGGCCAAGGCACCACGGTCACCGTCTCCTCA
	HFR1（蛋白质）	25	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT
	HFR2（蛋白质）	26	WVRQAPGKGLEWIG
	HFR3（蛋白质）	27	RVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAA
	HFR4（蛋白质）	28	WGQGTTVTVSS
	HFR1（DNA）	29	GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAA GCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTG GATACACATTCACT
	HFR2（DNA）	30	TGGGTGAGGCAGGCCCCTGGAAAGGGCCTTGAGTGGAT TGGA
	HFR3（DNA）	31	AGAGTCACAATCACTGTAGACAAGTCCACCAGCACAGCC TACATGGAGCTCAGCAGCCTGAGATCTGAGGATACTGCA GTCTATTACTGTGCAGCT
	HFR4（DNA）	32	TGGGGCCAAGGCACCACGGTCACCGTCTCCTCA
ANT4044/ANT4044-A2 可变轻链	LCDR1（蛋白质）	33	KASQDVGTAVD
	LCDR2（蛋白质）	34	WASTRHT
	LCDR3（蛋白质）	35	QQYNSYPLT
	VL（蛋白质）	36	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCKASQDVGTAVDWYQQKP

[0428]

抗体 ID	区域	SEQ ID NO:	氨基酸或核苷酸序列
			GQAPKLLIYWASTRHTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISRLQPE DFAVYYCQQYNSYPLTFGQGTKVDIK
	LCDR1（DNA）	37	AAGGCCAGTCAGGATGTGGGTACTGCTGTAGAC
	LCDR2（DNA）	38	TGGGCATCCACCCGGCACACT
	LCDR3（DNA）	39	CAGCAATATAACAGCTATCCTCTCACG
	VL（DNA）	40	GACATTCAGATGACCCAGTCTCCCAGCACCCTGTCCGCA TCAGTAGGAGACAGGGTCACCATCACTTGCAAGGCCAGT CAGGATGTGGGTACTGCTGTAGACTGGTATCAACAGAAA CCAGGGCAAGCTCCTAAACTACTGATTTACTGGGCATCC ACCCGGCACACTGGAGTCCCTGATCGCTTCAGCGGCAG TGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGACT GCAGCCTGAAGACTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAATAT AACAGCTATCCTCTCACGTTCGGCCAGGGGACCAAGGT GGATATCAAA
	LFR1（蛋白质）	41	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC
	LFR2（蛋白质）	42	WYQQKPGQAPKLLIY
	LFR3（蛋白质）	43	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISRLQPEDFAVYYC
	LFR4（蛋白质）	44	FGQGTKVDIK
	LFR1 (DNA)	45	GACATTCAGATGACCCAGTCTCCCAGCACCCTGTCCGCA TCAGTAGGAGACAGGGTCACCATCACTTGC
	LFR2（DNA）	46	TGGTATCAACAGAAACCAGGGCAAGCTCCTAAACTACTG ATTTAC
	LFR3（DNA）	47	GGAGTCCCTGATCGCTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGAC AGATTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGCAGCCTGAAGA CTTTGCAGTTTATTACTGT
	LFR4 (DNA)	48	TTCGGCCAGGGGACCAAGGTGGATATCAAA
ANT4044/ANT4044-A2 未修饰人 IgG1 重链恒定区	IgG1 HC（蛋白质）	49	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
ANT4044/ANT404	IgG1 H310A	50	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS

[0429]

抗体 ID	区域	SEQ ID NO:	氨基酸或核苷酸序列
4-A2 修饰人 IgG1 重链恒定区	H435Q HC（蛋白质）		WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL**A**QDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN**Q**YTQ KSLSLSPGK
ANT4044/ANT4044-A2 修饰人 IgG4 恒链区	IgG4 S228P L235E H310A H435Q HC（蛋白质）	51	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYT CNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLAQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNQYTQKSLSL SLGK
ANT4044/ANT4044-A2 κ 轻链恒定区	人 κ LC 恒定区	52	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
ANT4044 RADmAb IgG1 重链（HuX592r）	FcRn-空，IgG1 同种异型 G1m（3）H310A H435Q	53	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYTIHWVRQA PGKGLEWIGNINPNNGGTTYNQKFEDRVTITVDKSTSTAYM ELSSLRSEDTAVYYCAAGWNFDYWGQGTTVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL**A**QDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN**Q**YTQKSLSLSP GK
ANT4044 RADmAb IgG4 重链	FcRn +FcRγ-空，IgG4 S228P L235E H310A H435Q	54	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYTIHWVRQA PGKGLEWIGNINPNNGGTTYNQKFEDRVTITVDKSTSTAYM ELSSLRSEDTAVYYCAAGWNFDYWGQGTTVTVSSASTKG PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDH KPSNTKVDKRVESKYGPPCP**P**CPAPEF**E**GGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA

[0430]

抗体 ID	区域	SEQ ID NO:	氨基酸或核苷酸序列
			KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL**A**QDWLNGKEYKCKVSNKG LPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS RLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN**Q**YTQKSLSLSLGK
ANT4044-A2 RADmAb IgG1 重链	FcRn-空，IgG1 H310A H435Q	55	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYTIHWVRQA PGKGLEWIGNINPNNGGTTYNQKFEDRVTITVDKSTSTAYM ELSSLRSEDTAVYYCAAYWLFDYWGQGTTVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL**A**QDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN**Q**YTQKSLSLSP GK
ANT4044-A2 RADmAb IgG4 重链	FcRn+FcRγ-空 IgG4 S228P L235E H310A H435Q	56	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYTIHWVRQA PGKGLEWIGNINPNNGGTTYNQKFEDRVTITVDKSTSTAYM ELSSLRSEDTAVYYCAAYWLFDYWGQGTTVTVSSASTKGP SVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHK PSNTKVDKRVESKYGPPCP**P**CPAPEF**E**GGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVL**A**QDWLNGKEYKCKVSNKGL PSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSR LTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN**Q**YTQKSLSLSLGK
ANT4044-ANT4044-A2 Vk 轻链	Vk 轻链	57	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCKASQDVGTAVDWYQQKP GQAPKLLIYWASTRHTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISRLQPE DFAVYYCQQYNSYPLTFGQGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC

[0431] 实例

[0432] 实例1:用于与PSMA结合的抗体

[0433] 概述

[0434] 将两种抗体(ANT4044和ANT4044-A2)的抗体VH基因序列克隆到三种不同的人IgG双表达载体中,这些载体编码未修饰IgG1、含有突变H310A和H435Q(消除FcRn结合和蛋白A结合(Andersen等人,2012))的IgG1(称为IgG1(H310A,H435Q))、以及具有上述相同FcRn消除突变以及铰链稳定S228P突变(Angal等人,1993)和Fc沉默L235E突变(Reddy等人,2000)的修饰IgG4(称为IgG4(S228P,L235E,H310A,H435Q))。每个双表达载体还包含ANT4044和ANT4044-A2两者共同的抗体Vκ基因序列。

[0435] 共有五种抗体在CHO细胞中瞬时转染和表达,并使用蛋白A(ANT4044-A2 IgG1)或蛋白G进行纯化(ANT4044和ANT4044-A2两者均表达为IgG1(H310A,H435Q)和IgG4(S228P,

L235E,H310A,H435Q)两者)。亲和色谱之后是制备型尺寸排阻色谱(SEC)。

[0436] 通过SDS-PAGE、分析型SEC、热稳定性和通过Biacore得到的与PSMA的抗原结合来评估抗体完整性。使用Biacore单周期分析,对一组人Fcγ受体(FcγRlllA176F、FcγRlllA176V、FcγRlllB、FcγRlIA167R、FcγRllA167H、FcγRllB、FcgRl)以及新生儿受体FcRn进行另外的测试。

[0437] 方法和结果

[0438] 抗体表达质粒的构建

[0439] 使用人源化抗体ANT4044以及亲和力成熟的人源化抗体ANT4044-A2的VH和Vκ序列生成具有侧翼限制性内切酶位点的DNA片段,以克隆到IgG1(pANT18)、IgG1(H310A,H435Q)(pANT71)和IgG4(S228P,L235E,H310A,H435Q)(pANT73)的pANT双表达载体中。在每个同种型载体中,在Mlu I和Hind III限制性位点之间克隆VH区域,并在Pte I和BamH I限制性位点之间克隆Vκ区。所有五种构建体均经DNA测序证实。

[0440] 抗体的瞬时表达

[0441] 制备对应于五种抗体构建体的无内毒素DNA,并使用MaxCyte STX®电穿孔系统(MaxCyte公司,盖瑟斯堡,美国)将其瞬时转染至CHO-S细胞(赛默飞世尔公司,盖瑟斯堡,英国)中。在回收后,将细胞在含有8mM L-谷氨酰胺(赛默飞世尔公司,拉夫伯勒,英国)和1x次黄嘌呤-胸苷(赛默飞世尔公司,拉夫伯勒,英国)的CD OptiCHO培养基(赛默飞世尔公司,拉夫伯勒,英国)中稀释至$3x10^6$个细胞/ml。在转染后24小时,将培养温度降至32℃,并添加1mM丁酸钠(西格玛公司,多塞特,英国)。

[0442] 通过添加3.6%(的起始体积)的饲料(2.5%CHO-CD高效饲料A(赛默飞世尔公司,拉夫伯勒,英国)、0.5%酵母酯(BD科学公司,牛津,英国)、0.25mM谷氨酰胺(赛默飞世尔公司,拉夫伯勒,英国)和2g/L葡萄糖(西格玛公司,多塞特,英国))向培养物每天进料。通过IgG ELISA监测IgG上清液滴度,并在收获上清液之前培养转染细胞长达14天。

[0443] 抗体纯化

[0444] 使细胞培养上清液通过蛋白A(ANT4044-A2 IgG1)或蛋白G(ANT4044和ANT4044-A2两者均为IgG1(H310A,H435Q)和IgG4(S228P,L235E,H310A,H435Q)两者)琼脂糖柱(通用电气医疗集团,小查尔方特,英国)。所有抗体被缓冲液交换到1x PBS(pH 7.2)中。将蛋白A或蛋白G纯化材料在HiLoad™ 26/600Superdex™ 200pg制备型SEC柱(通用电气医疗集团,小查尔方特,英国)上运行,使用1x PBS作为流动相,在此期间收集、汇集和过滤灭菌单体级分。SEC图谱揭示,当表达为IgG4(S228P,L235E,H310A,H435Q)时,抗体(特别是ANT4044-A2)与表达为其他IgG同种型的抗体相比,显示出更高的聚集水平(高达22%)。

[0445] 根据预测的氨基酸序列,通过测量OD280 nm并使用消光系数(Ec(0.1%)对抗体进行定量。

[0446] 分析型SEC和SDS-PAGE

[0447] 使用Superdex™ 200 Increase 10/300GL分析柱(通用电气医疗集团,小查尔方特,英国)和作为流动相的1x PBS通过分析型SEC来分析原料ANT4044 IgG1和蛋白A或蛋白G以及制备型SEC纯化材料。对于正确折叠的IgG单体物质,洗脱图谱是典型的。还通过非还原型和还原型SDS-PAGE对抗体进行分析。观察到与预测的VH和Vκ链大小相对应的条带

[0448] 热稳定性分析

[0449] 为了评估五种纯化抗体以及来自原料的ANT4044 IgG1的热稳定性，使用基于荧光的热移位测定来确定解链温度(50％蛋白质结构域解折叠的温度)。将所有抗体在含有SYPRO®Orange(赛默飞世尔公司，拉夫伯勒，英国)的1x PBS中稀释至100μg/ml的工作浓度，并在StepOnePlus实时PCR系统(赛默飞世尔公司，拉夫伯勒，英国)上在56分钟的时间段内经受25℃至99℃的温度梯度。使用蛋白质热稳定性软件(1.2版)分析解链曲线，并根据一阶导数数据计算Tm。

[0450] 对于ANT4044和ANT4044-A2，IgG1骨干显现的热稳定性最高，最低解链温度均为69.3℃。当比较不同的IgG骨干时，与ANT4044-A2相比，ANT4044表现出更大的热稳定性。

[0451] 对与PSMA的结合的评估

[0452] 对每种纯化抗体进行多周期动力学分析，以评估与前列腺特异性膜抗原(PSMA)的结合。使用运行Biacore T200评估软件V3.0.1(乌普萨拉，瑞典)的Biacore T200(序列号1909913)仪器进行分析。为了进行直接比较，所有抗体均被捕获在蛋白G芯片(通用电气医疗集团，乌普萨拉，瑞典)上。

[0453] 将纯化抗体在HBS-EP+中稀释至1μg/ml的浓度。在每个周期开始时，各抗体被捕获在蛋白G表面上，得到约50RU的RL。在捕获后，使表面稳定化。使用35μl/min的流速获得动力学数据，以最小化任何潜在的传质效应。对于动力学分析，采用PSMA(R&D系统公司(R&D Systems)，明尼阿波利斯，美国)。将空白(PSMA)的多个重复和单一浓度的分析物的重复编程到动力学运行中，以检查表面和分析物在动力学周期上的稳定性。对于动力学分析，两倍稀释范围选自25nM至1.5625nM PSMA。监测PSMA的缔合期600秒，监测解离期2400秒。在每个周期结束时，使用含有0.5％P20的10mM甘氨酸-HCL pH 1.5的两次注射进行蛋白G表面的再生。

[0454] 从Fc2、Fc3和Fc4的信号中减去来自参考通道Fc1的信号，以校正与参考表面的非特异性结合方面的差异，并且在1对1结合模型中使用全局Rmax参数。通过将每种抗体的KD除以同一芯片上ANT4044 IgG1的KD，计算相对KD。

[0455] 对与人FcRn结合的评估

[0456] 使用运行Biacore T200评估软件V3.0.1(乌普萨拉，瑞典)的Biacore T200(序列号1909913)仪器，通过稳态亲和力分析评估纯化抗体与FcRn的结合。将FcRn(义翘神州生物公司(Sino Biological)，中国北京)在pH 5.5的乙酸钠中以10μg/mL涂覆于CM5芯片上，使用标准胺偶联至300RU。

[0457] 将纯化抗体在含有0.05％P20的PBS(pH 6.0或pH 7.4)中以5点稀释法从37nM至3000nM滴定。使抗体以30μl/min的流速和25℃的温度以渐增的浓度通过芯片。注射时间为30s，解离时间为100s。在单解离后，用0.1M Tris pH 8.0再生芯片。

[0458] 正如预期的那样，H310A H435Q突变显著减少了pH为6.0时与FcRn结合的抗体。作为未修饰的IgG1测试的ANT4044和ANT4044-A2抗体两者在pH为6.0时对FcRn显示出相似的亲和力。对pH为7.4的任何抗体都几乎没有观察到结合。

[0459] 对与人Fcγ受体结合的评估

[0460] 使用运行Biacore T200评估软件V3.0.1(乌普萨拉，瑞典)的Biacore T200(序列号1909913)仪器，通过单周期分析评估纯化抗体与高亲和力和低亲和力Fcγ受体的结合，以30μl/min的流速运行。人Fc受体、FcγRI、FcγRIIa(167R和167H多态性两者)、FcγRIIb、

FcγRIIIa(176F和176V多态性两者)和FcγRIIIb均获自义翘神州生物公司(中国北京)。FcγR捕获在CM5传感器芯片上,该芯片使用标准胺化学,使用Hiscapture试剂盒(通用电气医疗集团,小查尔方特,英国)预偶联。

[0461] 在每个周期开始时,在HBS-P+中稀释的His标签化的Fcγ受体被负载到特定的RU水平。每个受体使用五点三倍稀释范围的抗体,每个浓度之间无再生。在所有情况下,解离后,通过两次注射pH为1.5的甘氨酸来再生芯片。从负载受体的Fc的信号中减去来自参考通道Fc1(空白)的信号,以校正与参考表面的非特异性结合方面的差异。

[0462] 分析高亲和力Fcγ受体FcγRI的1:1动力学和低亲和力Fcγ受体的稳态结合的传感图。代表性传感图

[0463] ANT4044和ANT4044-A2表达为与所有高亲和力和低亲和力人激活Fcγ受体结合的未修饰IgG1。在IgG1中引入H310A和H435Q突变并不影响这种结合,尽管观察到与低亲和力人Fcγ受体的结合有轻微降低的小趋势。正如预期的那样,IgG4(S228P,L235E,H310A,H435Q)抗体与所有激活Fcγ受体的结合显著减少。所有测试的抗体均显示与抑制性受体FcγRIIB的低亲和力结合。因此,IgG1和IgG1(H310A,H435Q)都潜在地可能刺激效应子功能,而IgG4(S228P,L235E,H310A,H435Q)不太可能刺激效应子功能。

[0464] 结论

[0465] 将对应于人源化抗PSMA抗体ANT4044及其亲和力成熟变体ANT4044-A2的可变重链和轻链序列克隆到编码未修饰的人IgG1、具有突变H310A和H435Q(其消除FcRn结合)的人IgG1、或人IgG4(S228P,L235E,H310A,H435Q)的双表达载体中。瞬时转染CHO细胞,并通过蛋白A或蛋白G亲和色谱和制备型SEC纯化五种抗体。分析SEC揭示与单体IgG一致(几乎没有聚集证据)的图谱。包括ANT4044IgG1(来自原料)在内的所有抗体的热稳定性以及与PSMA、人FcRn和人Fcγ受体的结合均得到了表征。

[0466] 对于ANT4044和ANT4044-A2两者,IgG1骨干显现出最高热稳定性,而与ANT4044-A2抗体相比,ANT4044抗体表现出更大的热稳定性。IgG1(H310A,H435Q)和IgG4(S228P,L235E,H310A,H435Q)两种形式的所有抗体都显示出与PSMA类似的结合,其对应物表达为未修饰的IgG1。亲和力成熟的ANT4044-A2抗体对PSMA的亲和力是ANT4044的2-3倍。

[0467] H310A、H435Q突变的引入显著减少了在pH为6.0时与FcRn的结合,而在pH为7.4时观察到任何抗体与FcRn的结合极少。

[0468] 对抗体与人Fcγ受体结合的分析证实,表达为IgG4(S228P,L235E,H310A,H435Q)的抗体中L235E突变消除了结合。突变H310A和H435Q对抗体与人Fcγ受体的结合没有显著影响,因此,预计IgG1和IgG1(H310A,H435Q)两者都显示出类似的效应子功能特性。

[0469] 实例2:抗体缀合

[0470] 抗体ANT4044-IgG1、ANT4044-A2-IgG1、ANT4044-IgG1 H310A H435Q(又称ANT4044-IgG1-2M)和ANT4044-IgG4 S228P L235E H310A H435Q(又称ANT4044-IgG4-4M)与ThioBridge™-PEG(6u)-DOTA试剂或NHS-DOTA试剂缀合。

[0471] ThioBridge™是PolyTherics专有的二硫键缀合接头,并描述于

[0472] DOTA是螯合剂有效负载,即1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸单酰胺。

[0473] ThioBridge™ DOTA缀合评估:将ANT4044-IgG1制备为在反应缓冲液(20mM磷酸钠,pH 7.5,150mM NaCl,20mM乙二胺四乙酸(EDTA))中的6-10mg/mL的溶液。向反应缓冲液(6-

10mg/mL,40℃)中的ANT4044-IgG1中按每抗体添加6-10当量的三(2-羧乙基)膦(TCEP)或DTT 10mM。通过用反应缓冲液稀释,将抗体浓度调整为5mg/mL。将还原混合物在37℃-40℃下孵育1小时。在添加试剂之前,将还原混合物冷却至22℃。向混合物中添加5.6-8当量的在乙腈中的ThioBridge™-PEG(6u)-DOTA,用反应缓冲液将该混合物进一步稀释至4mg/mL。混合物中乙腈的百分比为5%。将反应混合物在22℃下孵育长达22小时。使用Vivaspin20过滤器(30kDa MWCO,PES膜,健能隆公司(Granon))在14000rcf下通过超速离心进行缓冲液交换和多余试剂去除。用Vivaspin 20过滤器(30kDa MWCO,PES膜,健能隆公司)将样品7-9x缓冲液交换到杜尔贝科氏PBS pH 7.2-7.5中。通过UV-vis测量抗体-ThioBridge™ DOTA缀合物浓度,用杜尔贝科氏-PBS pH 7.2-7.5校正至4.0mg/mL,无菌过滤(0.22μm醋酸纤维素过滤器),并在-80℃下储存。

[0474] 赖氨酸DOTA缀合评估:将ANT4044-IgG1制备为在0.1M $NaHCO_3$和20mM乙二胺四乙酸(EDTA)pH 8-9(反应缓冲液)中的6mg/mL溶液。接下来,在杜尔贝科氏PBS pH 7.2-7.5中以5.0mg/mL制备1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸单N-羟基琥珀酰亚胺酯六氟磷酸三氟乙酸盐(NHS-DOTA试剂)。添加10-25当量的NHS-DOTA试剂溶液,并通过添加反应缓冲液将抗体浓度校正至4.0mg/mL。在22℃下孵育2-3小时。然后,通过添加0.2M醋酸钠pH 5.5(4:1v/v)进行淬火,并在14000rcf下使用Vivaspin 20过滤器(30kDa MWCO,PES膜,健能隆公司)进行超速离心。重复稀释和超速离心2倍以上。然后,用Vivaspin 20过滤器(30kDa MWCO,PES膜,健能隆公司)4x缓冲液交换到杜尔贝科氏PBS pH 7.2-7.5中。通过UV-vis测量抗体-DOTA缀合物浓度,用杜尔贝科氏-PBS pH 7.2-7.5校正至4.0mg/mL,无菌过滤(0.22μm醋酸纤维素过滤器),并在-80℃下储存。首先进行小规模反应和纯化,以鉴定合适的缀合条件。开发了分析型SEC和分析型LC-MS方法,以证实缀合程度、纯度和存在的残留试剂。发现两种试剂的缀合都是有效的。两种试剂均未在缀合期间或之后导致聚集。赖氨酸缀合物展示了更广泛的不同DOTA负载物质,并且比ThioBridge™缀合物需要更高的LC-MS分析量。显示通过LC-MS得到的所有测试样品的均在4.0和4.2之间(ThioBridge™)的平均DAR以及在3.8和4.9之间(赖氨酸缀合物)的平均DAR。

[0475] 实例3:用于结合PSMA的抗体的药代动力学分析

[0476] 使用与实例1中所述类似的方法评估以下抗体的血清半衰期:J591 IgG赖氨酸DOTA缀合物(用于结合PSMA的对照抗体)、ANT4044赖氨酸DOTA缀合物(ANT4044-K-DOTA)、ANT4044-A2赖氨酸DOTA缀合物(ANT4044-A2-K-DOTA)、在FcRn结合区具有氨基酸取代的ANT4044、赖氨酸DOTA缀合物(ANT4044-FcRn-K-DOTA)和在FcRn和Fcγ受体结合区具有氨基酸取代的ANT4044、赖氨酸DOTA缀合物(ANT4044-FcRg-K-DOTA)。结果示于图1中。

[0477] 图2显示了每种测试抗体的平均曲线下面积(AUC,顶部)和清除率(CL,底部)。误差条表示平均值的标准差。

[0478] 实例4:生物分布与肿瘤积聚研究

[0479] 评估了本发明不同抗体对小鼠模型中LNCaP细胞的比较靶向性的定量分析。

[0480] 抗体的放射性标记和TLC分析。

[0481] 测试抗体为:

[0482] 1.ANT4044-IgG1+DOTA(“JN005”)

[0483] 2.ANT4044-A2-IgG1+DOTA(“JN008”)

[0484] 3.ANT4044-IgG1(FcRn)+DOTA(“JN007”)

[0485] 4.ANT4044-IgG4(FcRn/FcRγ)+DOTA(“JN006”)

[0486] 5.HuJ591 IgG1+DOTA(“J591”-与PSMA结合的对照)

[0487] 将所有抗体在室温下与^{64}Cu一起在0.1M pH 5.5乙酸铵缓冲液中在200倍过量的生物分子下孵育45分钟。取每种溶液的样品,并与50mM EDTA按1:1混合。将5μL的每种溶液点样在TLC纸(用硅胶浸渍的安捷伦iTLC-SG玻璃微纤维色谱纸)上,并按50:50H_2O:乙醇运行。然后使用放射性同位素荧光屏在Carestream MSFX成像系统上对板进行成像。如有必要,根据制造商的方案,通过使用7K MWCO Zeba离心柱(赛默科技公司(Thermo Scientific))纯化去除未结合的铜。所有样品均显示>95%标记。

[0488] 进行对照实验以监测游离Cu-64和结合EDTA的Cu-64的洗脱表现,以进行质量控制。

[0489] 肿瘤的起始和生长

[0490] 对8周龄雄性Balb/c裸鼠(27G针)向每只小鼠的右肋皮下注射于100μL磷酸盐缓冲盐水中的5x10^6个LNCaP细胞。

[0491] 通过尾静脉(29G)注射抗体溶液,然后使用Siemens Inveon PET-CT仪器对小鼠成像,或通过尾剪采集血液并通过γ计数器测量活性,以在指定时间点进行血液浓度分析。

[0492] 成像方案

[0493] 在封闭的麻醉剂诱导室中,用2%剂量的异氟烷(IsoFlo,雅培实验室(Abbott Laboratories))麻醉小鼠。施用眼反射和足反射对小鼠进行监测,以确保深度麻醉。一旦老鼠被深度麻醉,它被放置在合适的动物床上,其中将麻醉剂空气混合物(1%)通过鼻锥递送到鼻子和嘴巴。使用动物监测系统(BioVetTM系统,m2m成像,澳大利亚)在所有实验中实现生理学监测(使用传感器探头进行呼吸)。在尾静脉注射抗体后,使用西门子公司(Siemens)Inveon PET-CT扫描仪获取图像。

[0494] 将注射器用放射性同位素溶液(大约150μL)填充,并使用校准系数为35的剂量校准物(Capintec CRC-25)测量注射器中的活性。使用相同剂量校准物测量尾静脉注射后留在注射器中的活性,并计算在每只小鼠中注射的总体积。

[0495] PET/CT扫描仪的校准使用内部制造的体模进行,该体模含有一定剂量的Cu-64溶液作为辐射源。

[0496] 将小鼠放置在扫描床上(使用内部开发的扫描床,每次扫描n=4),获取显微CT扫描,以进行解剖学联合配准。小鼠的CT图像通过X射线源获取,电压设置为80kV,电流设置为500μA。扫描如下进行:采用360°旋转,120个旋转步骤,低倍放大,像素组合为四。曝光时间为230ms,有效像素尺寸为106μm。使用Feldkamp重建软件(西门子公司)重建CT图像。在CT成像后,在注射放射性示踪剂后8小时、24小时和48小时进行PET扫描,采用30-60分钟静态获取。使用有序子集期望最大化(OSEM2D)算法重建PET图像,并使用Inveon Research Workplace软件(IRW4.1)(西门子公司)进行分析,该软件允许融合CT和PET图像以及定义感兴趣的区域(ROI)。使用IRW软件(西门子公司)对每只个体动物的CT和PET数据集进行校准,以确保感兴趣的器官的良好重叠。三维ROI被放置在全身以及所有感兴趣的器官内,如心脏、肾脏、肺、膀胱、肝脏、脾、肠和肿瘤,使用形态学CT信息描绘器官。将每体素的活性通过扫描填充了已知活性Cu-64的圆柱形体模获得的转换因子转换为nci/cc,以解释PET扫描仪

的效率。然后将活性浓度表示为每cm^3组织的衰减校正的注射活性的百分比，其可近似为注射剂量百分比/g(%ID/g)。

[0497] 然后将肿瘤与血液比计算为肿瘤中检测到的活性相对于血液中检测到的活性。

[0498] 结果

[0499] 在注射后8、24和48小时对小鼠进行成像。在48小时的时间点之后，收获器官进行γ计数和器官分布定量。

[0500] 在肿瘤边缘(如CT扫描所描绘)周围绘制感兴趣的区域，并在成像研究中计算每只小鼠的抗体浓度(基于注射剂量百分比)。图3至图6和图8显示了体内和离体测量的器官积聚(通过γ计数器)。体内和离体之间的定量变异性是由于体内绘图的ROI和背景信号引起的。ns P>0.05,*P≤0.05,**P≤0.01,***P≤0.001,****P≤0.0001

[0501] 图7显示了注射后5天内抗体的血液浓度。

[0502] 体内成像显示所有抗体的肿瘤积聚和长期定位(超过2天)。不同抗体之间没有统计学差异，并且肿瘤中的量在48小时内为大约5%ID/g。

[0503] 离体分析显示，所有抗体在48小时处都有生物分布。在此时间点，肿瘤积聚的抗体浓度最高，其次是肝脏、脾和肺。

[0504] JN005显示肝脏和脾的积聚低于其他变体(J591除外)。这在长得多的循环时间中也很明显-在120小时处仍有约10%ID/g的JN005循环。

[0505] 通过在120小时内抽取血液样品进行药代动力学评估。最值得注意的观察是，与其他抗体相比，JN007的清除速度更快。

[0506] 还使用血液样品来计算抗体的肿瘤:血液比率。在8小时、24小时和48小时的时间点测定每种抗体的肿瘤:血液比率(体内:尾血)，并且结果在图9中示出。图10显示了在48小时和120小时处的肿瘤:血液比率(离体:离体)。

[0507] 与抗体JN005(ANT4044-IgG1+DOTA)和J591相比，抗体JN006(ANT4044-IgG4(FcRn/FcRγ)+DOTA)和JN007(ANT4044-IgG1(FcRn)+DOTA)在所有时间点的肿瘤:血液比率都显著更高。在120小时处的比率尤其惊人，FcRn结合修饰抗体和FcRn/Rfγ受体结合修饰抗体的肿瘤:血液比率是未修饰抗体的肿瘤:血液比率的约200倍。

[0508] 讨论

[0509] 尽管一些测试抗体具有显著减少的血清半衰期(和增加的清除率)，但肿瘤中积聚的所有抗体的量在统计学上没有差异。这些结果令人惊讶，因为它们显示每种抗体的肿瘤负载是相同的，指示所有抗体对其靶标表位具有相似的结合亲和力，并且所有抗体具有相似的递送到靶标位点的能力，尽管FcRn和Fcγ受体修饰显著增加JN007和JN006抗体的清除率并减少这些抗体的血清半衰期。

[0510] 结果指示，放射性标记抗体的FcRn或FcRn和Fcγ受体结合结构域的修饰在减少循环中放射性同位素的量方面具有显著的效用，而不影响抗体在肿瘤中积聚的能力方面的治疗潜力。这有许多益处，包括减少放射性同位素在循环中长期保留会另外导致的多种毒性作用(包括血液学毒性、吸收入骨毒性和骨髓辐照毒性)。

[0511] 实例5:本发明的示例性抗体的^{177}Lu成像和放射疗法功效研究

[0512] 测试品

[0513] 1.TXP02-JN007(ANT4044-FcRn-K-DOTA)

[0514] 2.TXP02-JN005(ANT4044-K-DOTA)

[0515] 3.PSMA-617(PSMA结合肽)

[0516] 1期化学:成像研究

[0517] 标记概要:JN007,JN005。

[0518] ANT4044是如本文所述的抗PSMA抗体。ANT4044-FcRN是抗体的修饰形式,其中重恒定链的FcRn结合区已被修饰以减少血清半衰期。ANT4044-FcRn-K-DOTA是ANT4044-FcRN,其通过赖氨酸残基与螯合剂DOTA缀合。

[0519] 将150μg ANT4044-FcRn用500MBq的Lu-177标记,其中在37℃下孵育2小时。标记效率为81%。将反应混合物在NAP-5柱上向PBS中纯化,随后的标记效率为98%。收集含有标记抗体的级分。通过添加适当量的未标记ANT4044-FcRn抗体和PBS来制备含有10μg、100μg和370μg(各自标记有20MBq的Lu-177)的剂量。

[0520] 将500μg ANT4044抗体用100MBq的Lu-177标记,其中在37℃下孵育2小时。标记效率为98.2%。将制剂在PBS中稀释并在不进一步纯化的情况下使用。

[0521] 2期化学:功效研究

[0522] 标记概要:PSMA-617,ANT4044-FcRn。

[0523] 将6μg(4nmol)的PSMA-617(6μl的在水中的1mg/ml溶液)在0.1M乙酸铵缓冲液(pH 5.5)中用200MBq Lu-177标记,并加热至95℃持续10分钟。标记效率为97.6%。将制剂在PBS中稀释并在不进一步纯化的情况下使用。

[0524] 将300μg ANT4044-FcRn用120MBq Lu-177标记。在37℃下孵育2小时后的标记效率为96.5%。将制剂通过添加5μl 0.1M EDTA淬灭,在PBS中稀释并在不进一步纯化的情况下使用。

[0525] 1期-成像研究设计

[0526] 1.对于1期研究,将具有适当肿瘤大小(150-300mm^3)的动物分为4组进行研究(n=3),剂量如下

[0527] a.第1组:10μg[^{177}Lu]TXP02-ANT4044-FcRn,200μL,向侧尾静脉中静脉(IV)注射。

[0528] b.第2组:100μg[^{177}Lu]TXP02-ANT4044-FcRn,200μL,向侧尾静脉IV注射。

[0529] c.第3组:370μg[^{177}Lu]TXP02-ANT4044-FcRn,200μL,向侧尾静脉中IV注射。

[0530] d.第4组:100μg[^{177}Lu]TXP02-ANT4044,200μL,向侧尾静脉中IV注射。

[0531] 2.在抗体注射后4、24和48小时,通过SPECT/CT成像评估抗体的生物分布:

[0532] a.获取全身静态SPECT图像,然后进行全身CT,以供解剖学参考。

[0533] b.SPECT扫描持续时间为40分钟,CT扫描持续时间为每次扫描12分钟。

[0534] c.在多小鼠室内,一次对三只动物进行成像

[0535] 3.通过卡尺测量评估肿瘤体积,每周3次。检查动物是否有任何不良反应,并定期称重。

[0536] 4.对于选择动物,收集组织以进行另外的离体分析。

[0537] 5.剩下的动物被宰杀,屠体丢弃。

[0538] 2期-功效研究设计

[0539] 1.对于主要功效研究,将具有适当肿瘤大小(150-300mm^3)的动物分为3组进行研究(n=6),剂量如下

[0540] a.第1组:50μg[^{177}Lu]TXP02-ANT4044-FcRn,200μL,IV

[0541] b.第2组:600ng[^{177}Lu]PSMA-617,200μL,IV

[0542] c.第3组:200μL PBS,IV

[0543] 2.在注射测试剂后的3周内,通过卡尺测量评估肿瘤大小,每周3次。

[0544] 3.检查动物是否有任何不良反应,并定期称重。

[0545] 4.在0.5、4、8、24、48、72、96、120小时,通过尾刺法从第1组和第2组动物中采集血液样品,并通过γ计数进行评估。

[0546] 5.称取全血样品,然后与参考标准品一起在γ计数器中计数。

[0547] 6.最初的研究目的是监测治疗后5周内的肿瘤生长。由于在一些[^{177}Lu]TXP02-ANT4044-FcRn小鼠中观察到辐射病,该时间范围缩短。

[0548] 7.对于选择动物,收集组织以进行另外的离体分析。

[0549] 8.剩下的动物被宰杀,屠体丢弃。

[0550] 结果和讨论

[0551] 图11是异种移植小鼠中[^{177}Lu]TXP02-ANT4044-FcRn分布的示例性图像。

[0552] 图12是在小鼠血液中测得的[^{177}Lu]TXP02-ANT4044-FcRn放射性水平的绘图。

[0553] 图13是如本研究中确定的肿瘤生长曲线图。ANT4044-FcRn-DOTA-Lu治疗显著抑制肿瘤生长,如与第0天相比第14天的肿瘤体积没有变化所证明的。在对照(PBS)组中,肿瘤体积总体增加,其中与ANT4044-FcRn-DOTA-Lu治疗组的相应时间相比,肿瘤在第9、12和14天显著更大。

[0554] 测试抗体(JN007)和比较抗体(JN005)两者的放射性标记均成功(>96%的标记效率),实现的最大比活性为2MBq/μg。

[0555] 成像研究显示LNCaP肿瘤异种移植物中测试抗体和比较抗体两者的摄取(参见表2)。

[0556] 与JN005抗体的同一时间点相比,在注射后48小时,所有组的JN007抗体的血液清除率(如由心脏左心室中绘制的小ROI推断的)更快(参见表3)。

[0557] 表2:在4、24和48小时处的[^{177}Lu]TXP02-JN007和[^{177}Lu]TXP02-JN005肿瘤摄取

[0558]

组	质量剂量(μg/动物)	成像示踪剂	剂量放射性(Mbq/动物,平均值±SD)	4小时:肿瘤%ID/g(平均值±SD)	24小时:肿瘤%ID/g(平均值±SD)	48小时:肿瘤%ID/g(平均值±SD)
1	100	[^{177}Lu] TXP02-JN007	19.4±0.6	3.2±0.4	6.9±1.2	8.3±1.7
2	100	[^{177}Lu] TXP02-JN005	19.7±0.7	4.5±0.2	16.8±1.2	23.7±0.8

[0559] 表3:在4、24和48小时处的[^{177}Lu]TXP02-JN007和[^{177}Lu]TXP02-JN005心脏(血液)摄取

[0560]

组	质量剂量(μg/动物)	成像示踪剂	剂量放射性(Mbq/动物,平均值±SD)	4小时:血液%ID/g(平均值±SD)	24小时:血液%ID/g(平均值±SD)	48小时:血液%ID/g(平均值±SD)
1	100	[^{177}Lu] TXP02-JN007	19.4±0.6	11.7±1.7	3.0±0.2	1.7±0.1
2	100	[^{177}Lu] TXP02-JN005	19.7±0.7	16.5±1.1	10.0±0.6	7.8±0.9

[0561] 图14是在施用JN007抗体(本发明的抗PSMA的K-DOTA-Lu抗体,其经修饰以减少FcRn结合,也称为HuX592R-DOTA-Lu177)后小鼠的肿瘤:血液比率的绘图。

[0562] 与对照小鼠(接受JN005,即抗PSMA的K-DOTA-Lu抗体HuJ591-DOTA-Lu177,该抗体在FcRn结合区没有修饰)相比,接受FcRn修饰抗体的小鼠的肿瘤中的抗体比率高于血液。

[0563] 实例6

[0564] 测试抗体

[0565] 1.HuX592R(ANT4044-FcRN)

[0566] 2.HuJ591(ANT4044)

[0567] 抗体的放射性标记和TLC分析

[0568] 分别地对于HuX592R和HuJ591,在室温下将所有抗体与^{177}Lu在50倍或100倍过量的生物分子下在0.1M pH 5.5乙酸铵缓冲液中孵育45分钟。取每种溶液的样品,并与50mM DTPA按1:1混合。将5uL的每个DTPA孵育样品或纯溶液点样在TLC纸(用硅胶浸渍的安捷伦iTLC-SG玻璃微纤维色谱纸)上,并按50:50H_2O:乙醇运行。然后使用Eckert和Ziegler Mini-Scan和Flow-Count系统实现检测到放射性标记物质迁移。所有样品均显示≥90%标记。进行对照实验以监测游离^{177}Lu和结合DTPA的^{177}Lu的洗脱表现,以进行质量控制。

[0569] 细胞结合

[0570] 评估Lu标记的构建体HuX592R和HuJ591的细胞结合。

[0571] 总之,将含有在0.100mL PBS中的1.25x10^{5}个PC-3肿瘤细胞(阴性对照)或1.25x10^{5}个LNCaP肿瘤细胞的Eppendorf试管在37℃下与5μL(0.030MBq)标记抗体一起孵育。在以下时间点停止孵育进行分析:1小时、2小时、4小时和24小时。

[0572] 未结合级分确定。

[0573] 在每个孵育期结束时,将Eppendorf试管以500g离心5分钟。将含有游离Lu-177抗体的上清液在单独的试管中回收,并使用γ分析进行计数。用0.200mL PBS溶液洗涤含有与Lu-177标记抗体缔合的细胞的沉淀,并以500g离心5分钟,重复3次。收集每次洗涤的上清液并进行计数,将值与回收的孵育上清液组合以得出总游离未结合抗体。

[0574] 表面结合级分确定。

[0575] 在冰冷温度下,将沉淀重悬浮于pH为4.0的0.1mL PBS中20分钟。然后在4℃下将Eppendorf试管以500g离心5分钟,并收集上清液进行计数。在用冰冷PBS pH4.0再洗涤三次后,收集上清液进行γ计数。

[0576] 内化级分确定。

[0577] 在洗涤和离心后,将细胞沉淀作为内化级分计数。

[0578] 蛋白质浓度

[0579] 用1M NaOH溶解细胞,测定蛋白质浓度。

[0580] 计算

[0581] 计算Lu-177抗体与肿瘤细胞(表面结合的和内化的级分)的结合以及未结合抗体,并报告为每mg蛋白质孵育的总放射性的百分比。

[0582] 动物

[0583] 从ARC(西澳大利亚)获得6周大的健康雄性Balb/C裸鼠(约20g),用于本研究。在研究之前对小鼠进行1周的监测,以便在注射细胞之前适应环境。在实验前和实验期间,所有

动物都自由获得食物和水。

[0584] 给药

[0585] 将注射器用放射性标记抗体溶液(大约100μL)填充,并使用校准系数为35的剂量校准物(Capintec CRC-25)测量注射器中的活性。使用相同剂量校准物测量尾静脉注射后留在注射器中的活性,并计算在每只小鼠中注射的总体积。

[0586] 耐受性

[0587] 对健康雄性Balb/C裸鼠(每个剂量队列n=3)用^{177}Lu标记的HuX592R(以大约100μg/小鼠的质量剂量给出6、9或12MBq注射剂量)注射(29G,在约100μL生理盐水中的尾静脉注射剂)共3次,间隔7天。然后在注射后监测小鼠健康,在首次注射后28天,将所有小鼠宰杀,并将其器官固定在PFA中,转移到30%蔗糖中,并允许其衰减,然后冷冻保存,以备将来可能需要时进行分析。

[0588] 生物分布

[0589] 对健康雄性Balb/C裸鼠(每个队列n=3)用^{177}Lu标记的构建体(以100(HuX592R)或140(HuJ591)μg/小鼠的质量剂量给出6MBq注射剂量)注射(29G,尾静脉注射生理盐水)。然后在注射后24、48和72小时(HuX592R)和72小时(HuJ591)处死动物。采集血液样品,收集组织并清除多余的血液且称重,以进行离体分析。施用Perkin PerkinElmer 2480自动γ计数器测量组织中的放射性。使用已知的^{177}Lu样品校准γ计数器,并基于注射的活性,测量表示为%ID/g组织重量的活性。

[0590] 肿瘤的起始和生长

[0591] 为了进行放射自显影和治疗研究,对8-12周龄雄性Balb/c裸鼠(27G针)向每只小鼠的右肋皮下注射在50μL 50:50磷酸盐缓冲生理盐水:基质胶中的$4x10^6$个LNCaP细胞。细胞注射时没有证据表明有溃疡;对动物进行密切监测,并用卡尺测量肿瘤,除实体肿瘤生长外,动物状态良好。肿瘤生长是散发性的,这在LNCaP肿瘤中经常观察到,当肿瘤达到100-200mm^3时,将小鼠招募入适当的研究组中。

[0592] 放射自显影

[0593] 对荷瘤雄性Balb/C裸鼠(每个队列n=2)用^{177}Lu标记的构建体进行注射(29G,在约100μL生理盐水中的尾静脉注射剂),以100(HuX592R)或140(HuJ591)μg/小鼠的质量剂量给出6MBq注射剂量。然后在注射后7天处死动物,将肿瘤样品在异戊烷-干冰浆中快速冷冻,然后嵌入OCT化合物中进行切片。将20μm切片收集到载玻片上并风干,然后在封闭盒中的荧光屏上暴露大约3.5小时。然后如针对^{177}Lu优化的,使用Amersham Typhoon Phosphorimager使用50μm的像素大小(扫描时间20-30分钟)获得图像,灵敏度设置为1000。使用ImageQuant TL软件分析图像。

[0594] 治疗研究

[0595] 每周对荷瘤雄性Balb/C裸鼠(每个队列n=6)用^{177}Lu标记的构建体进行注射(29G,在约100μL生理盐水中的尾静脉注射剂),持续3周,以100(针对HuX592R)或140(针对HuJ591)μg/小鼠的质量剂量给出6或8MBq(针对HuX592R)或6MBq(针对HuJ591)注射剂量。与仅媒介物的对照相比,在90天内对响应于疗法的肿瘤生长进行监测。

[0596] 结果

[0597] HuX592R和HuJ591均显示成功的^{177}Lu标记。将这些^{177}Lu标记的构建体直接用于细

胞结合、耐受性、生物分布和治疗功效研究。

[0598] 细胞结合

[0599] 针对LNCaP(PSMA+)和PC3(PSMA-)细胞系评估^{177}Lu标记的HuX592R和HuJ591的结合。在将构建体添加到细胞中后1、2和4小时，评估未结合的、表面结合的和细胞沉淀缔合的级分。细胞测定显示，HuJ591和HuX592R在表达PSMA的细胞系中均显示出增强的积聚，在细胞沉淀中观察到的最高浓度指示在测定期间(在所有时间点)成功内化。在PSMA阴性细胞系(PC3)中通常观察到最小缔合/内化，这指示结合是受体依赖性的，并且标记不会显著干扰抗体与受体的结合。

[0600] 耐受性

[0601] 在3个剂量水平(12、9和6MBq)下评估^{177}Lu标记的HuX592R在健康雄性Balb/c裸鼠(每个队列n＝3)中的耐受性，进行3次，间隔一周。通过动物体重和动物记分表评估动物健康4周，包括3周的治疗施用。在这项研究中，发现12MBq的剂量太高，因此则使用6MBq和8MBq的剂量进行全部研究。

[0602] 生物分布

[0603] 在HuX592R施用后24、48和72小时(图15A)和HuJ591施用后仅72小时(图15B)，评估^{177}Lu标记的构建体在健康雄性Balb/c裸鼠(每个队列n＝3)中的生物分布。结果显示，与HuX592R相比，HuJ591的循环时间显著更长，而在清除率方面在器官(如肝脏和脾)中的积聚水平相应降低，表明系统清除更快。

[0604] 放射自显影

[0605] 将^{177}Lu标记的构建体施用于荷瘤雄性Balb/c裸鼠体内。在注射后1周处死动物，在OCT中冷冻肿瘤，切片并获取放射自显影图像。总体结果与两种构建体的肿瘤积聚和穿透一致，而在此时间点HuJ591的积聚相比HuX592R增强。此外，这两种抗体的放射治疗剂在肿瘤中的分布显现出分散性良好。

[0606] 治疗研究

[0607] 将荷有肋部LNCaP异种移植瘤的雄性Balb/c裸鼠分配到治疗队列中，并施用3个剂量，各自间隔1周；

[0608] 1.媒介物对照

[0609] 2．6MBq[^{177}Lu]-HuX592R

[0610] 3．8MBq[^{177}Lu]-HuX592R

[0611] 4．6MBq[^{177}Lu]-HuJ591

[0612] 对肿瘤消退(图17)和通过动物体重评估的动物健康进行100天的监测。结果显示，HuX592R具有显著的肿瘤生长抑制作用(图16)，HuX592R 8MBq队列中有2只小鼠且HuJ591队列中有4只小鼠(未显示)显示肿瘤完全消退，其中肿瘤负荷无法通过卡尺测量。在开始疗法后37天(所有队列n＝6的最后一个数据点，允许进行统计比较)，与对照队列相比，所有3种治疗均产生了显著的肿瘤生长减少，如通过双因素ANOVA确定的，其中HuX592R为6MBq(p 0.0105)，HuX592R为8MBq(p 0.0086)，且HuJ591为6MBq(p 0.0056)。

[0613] 如根据体重变化评估的，没有剂量组显示出显著的健康不良。

[0614] 与对照队列(中位存活期83.5天)相比，所有3个治疗队列(中位存活期>研究期)的小鼠存活期(图17)在统计学上更长(通过Mantel-Cox检验$p<0.05$)。向上勾号表示动物因非

肿瘤/健康相关问题而被安乐死。

[0615] 显示两种配制品即HuJ591(6MBq)和HuX592R(6MBq和8MBq两者)对表达PSMA的肿瘤均有功效。在研究的100天内,HuJ591(6MBq)和HuX592R(8MBq)均没有治疗/肿瘤相关死亡,并且HuX592R 8MBq组的2只小鼠和HuJ591组的4只小鼠显示肿瘤绝对消退(无法通过卡尺测量)。在存活率绘图方面,所有抗体治疗组在统计学上均优于对照组。

[0616] 应当理解的是,在本说明书中披露和限定的本发明可扩展至所提及的或者从文本部分和附图部分显而易见的单个特征的两个或更多个的所有替代性组合。所有这些不同组合构成本发明的多个替代性方面。

序列表
<110> 泰利克斯国际有限公司(Telix International Pty Ltd)
<120> 抗体
<130> 53082459SCH
<150> AU 2019902344
<151> 2019-07-02
<160> 57
<170> PatentIn 3.5版
<210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> ANT4044可变重链 - HCDR1 (蛋白质)
<400> 1
Glu Tyr Thr Ile His
1 5
<210> 2
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> ANT4044可变重链 - HCDR2 (蛋白质)
<400> 2
Asn Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Glu
1 5 10 15
Asp
<210> 3
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> ANT4044可变重链 - HCDR3 (蛋白质)
<400> 3
Gly Trp Asn Phe Asp Tyr
1 5
<210> 4
<211> 115

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> ANT4044可变重链 - VH (蛋白质)
<400> 4

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1				5				10						15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Glu	Tyr
			20					25					30		
Thr	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
		35					40					45			
Gly	Asn	Ile	Asn	Pro	Asn	Asn	Gly	Gly	Thr	Thr	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe
	50					55					60				
Glu	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70					75					80
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Ala	Gly	Trp	Asn	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr
			100					105					110		
Val	Ser	Ser													
		115													

<210> 5
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> ANT4044可变重链 - HCDR1 (DNA)
<400> 5
gaatacacca tccac 15
<210> 6
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> ANT4044可变重链 - HCDR2 (DNA)
<400> 6
aacattaatc ctaacaatgg tggtactacc tacaaccaga agttcgagga c 51
<210> 7
<211> 18

<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> ANT4044可变重链 - HCDR3 (DNA)
<400> 7
ggttggaact ttgactac 18
<210> 8
<211> 345
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> ANT4044可变重链 - VH (DNA)
<400> 8
gaggtccagc tggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggata cacattcact gaatacacca tccactgggt gaggcaggcc 120
cctggaaagg gccttgagtg gattggaaac attaatccta acaatggtgg tactacctac 180
aaccagaagt tcgaggacag agtcacaatc actgtagaca agtccaccag cacagcctac 240
atggagctca gcagcctgag atctgaggat actgcagtct attactgtgc agctggttgg 300
aactttgact actggggcca aggcaccacg gtcaccgtct cctca 345
<210> 9
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> ANT4044可变重链 - HFR1 (蛋白质)
<400> 9
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30
<210> 10
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> ANT4044可变重链 - HFR2 (蛋白质)
<400> 10
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10

<210> 11
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> ANT4044可变重链 - HFR3 (蛋白质)
<400> 11
Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15
Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
20 25 30
<210> 12
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> ANT4044可变重链 - HFR4 (蛋白质)
<400> 12
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
1 5 10
<210> 13
<211> 90
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> ANT4044可变重链 - HFR1 (DNA)
<400> 13
gaggtccagc tggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggata cacattcact 90
<210> 14
<211> 42
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> ANT4044可变重链 - HFR2 (DNA)
<400> 14
tgggtgaggc aggcccctgg aaagggcctt gagtggattg ga 42
<210> 15
<211> 96

<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> ANT4044可变重链 - HFR3 (DNA)
<400> 15
agagtcacaa tcactgtaga caagtccacc agcacagcct acatggagct cagcagcctg 60
agatctgagg atactgcagt ctattactgt gcagct 96
<210> 16
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> ANT4044可变重链 - HFR4 (DNA)
<400> 16
tggggccaag gcaccacggt caccgtctcc tca 33
<210> 17
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> ANT4044-A2可变重链 - HCDR1 (蛋白质)
<400> 17
Glu Tyr Thr Ile His
1 5
<210> 18
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> ANT4044-A2可变重链 - HCDR2 (蛋白质)
<400> 18
Asn Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Glu
1 5 10 15
Asp
<210> 19
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> ANT4044-A2可变重链 - HCDR3 (蛋白质)
<400> 19
Tyr Trp Leu Phe Asp Tyr
1 5
<210> 20
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> ANT4044-A2可变重链 - VH (蛋白质)
<400> 20
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
20 25 30
Thr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Asn Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Glu Asp Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ala Tyr Trp Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser
115
<210> 21
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> ANT4044-A2可变重链 - HCDR1 (DNA)
<400> 21
gaatacacca tccac 15
<210> 22
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> ANT4044-A2可变重链 - HCDR2 (DNA)
<400> 22
aacattaatc ctaacaatgg tggtactacc tacaaccaga agttcgagga c 51
<210> 23
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> ANT4044-A2可变重链 - HCDR3 (DNA)
<400> 23
tactggctgt tcgactac 18
<210> 24
<211> 345
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> ANT4044-A2可变重链 - VH (DNA)
<400> 24
gaggtccagc tggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggata cacattcact gaatacacca tccactgggt gaggcaggcc 120
cctggaaagg gccttgagtg gattggaaac attaatccta acaatggtgg tactacctac 180
aaccagaagt tcgaggacag agtcacaatc actgtagaca agtccaccag cacagcctac 240
atggagctca gcagcctgag atctgaggat actgcagtct attactgtgc agcttactgg 300
ctgttcgact actggggcca aggcaccacg gtcaccgtct cctca 345
<210> 25
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> ANT4044-A2可变重链 - HFR1 (蛋白质)
<400> 25
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30
<210> 26
<211> 14
<212> PRT

<213> 人工序列
<220>
<223> ANT4044-A2可变重链 - HFR2 (蛋白质)
<400> 26
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10
<210> 27
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> ANT4044-A2可变重链 - HFR3 (蛋白质)
<400> 27
Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15
Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
20 25 30
<210> 28
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> ANT4044-A2可变重链 - HFR4 (蛋白质)
<400> 28
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
1 5 10
<210> 29
<211> 90
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> ANT4044-A2可变重链 - HFR1 (DNA)
<400> 29
gaggtccagc tggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggata cacattcact 90
<210> 30
<211> 42
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> ANT4044-A2可变重链 - HFR2 (DNA)
<400> 30
tgggtgaggc aggcccctgg aaagggcctt gagtggattg ga 42
<210> 31
<211> 96
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> ANT4044-A2可变重链 - HFR3 (DNA)
<400> 31
agagtcacaa tcactgtaga caagtccacc agcacagcct acatggagct cagcagcctg 60
agatctgagg atactgcagt ctattactgt gcagct 96
<210> 32
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> ANT4044-A2可变重链 - HFR4 (DNA)
<400> 32
tggggccaag gcaccacggt caccgtctcc tca 33
<210> 33
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> ANT4044/ ANT4044-A2可变轻链 - LCDR1 (蛋白质)
<400> 33
Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala Val Asp
1 5 10
<210> 34
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> ANT4044/ ANT4044-A2可变轻链 - LCDR2(蛋白质)
<400> 34
Trp Ala Ser Thr Arg His Thr
1 5

<210> 35
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> ANT4044/ ANT4044-A2可变轻链 - QQYNSYPLT
<400> 35
Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5
<210> 36
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> ANT4044/ ANT4044-A2可变轻链 - VL (蛋白质)
<400> 36
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala
20 25 30
Val Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105
<210> 37
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> ANT4044/ ANT4044-A2可变轻链 - LCDR1 (DNA)
<400> 37
aaggccagtc aggatgtggg tactgctgta gac 33
<210> 38

<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> ANT4044/ ANT4044-A2可变轻链 - LCDR2 (DNA)
<400> 38
tgggcatcca cccggcacac t 21
<210> 39
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> ANT4044/ ANT4044-A2可变轻链 - LCDR3 (DNA)
<400> 39
cagcaatata acagctatcc tctcacg 27
<210> 40
<211> 321
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> ANT4044/ ANT4044-A2可变轻链 - VL (DNA)
<400> 40
gacattcaga tgacccagtc tcccagcacc ctgtccgcat cagtaggaga cagggtcacc 60
atcacttgca aggccagtca ggatgtgggt actgctgtag actggtatca acagaaacca 120
gggcaagctc ctaaactact gatttactgg gcatccaccc ggcacactgg agtccctgat 180
cgcttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag actgcagcct 240
gaagactttg cagtttatta ctgtcagcaa tataacagct atcctctcac gttcggccag 300
gggaccaagg tggatatcaa a 321
<210> 41
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> ANT4044/ ANT4044-A2可变轻链 - LFR1(蛋白质)
<400> 41
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 42
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> ANT4044/ ANT4044-A2可变轻链 - LFR2 (蛋白质)
<400> 42
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15
<210> 43
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> ANT4044/ ANT4044-A2可变轻链 - LFR3 (蛋白质)
<400> 43
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15
Leu Thr Ile Ser Arg Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30
<210> 44
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> ANT4044/ ANT4044-A2可变轻链 - LFR4(蛋白质)
<400> 44
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
1 5 10
<210> 45
<211> 69
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> ANT4044/ ANT4044-A2可变轻链 - LFR1(DNA)
<400> 45
gacattcaga tgacccagtc tcccagcacc ctgtccgcat cagtaggaga cagggtcacc 60
atcacttgc 69
<210> 46

<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> ANT4044/ ANT4044-A2可变轻链 - LFR2(DNA)
<400> 46
tggtatcaac agaaaccagg gcaagctcct aaactactga tttac 45
<210> 47
<211> 96
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> ANT4044/ ANT4044-A2可变轻链 - LFR3 (DNA)
<400> 47
ggagtccctg atcgcttcag cggcagtgga tctgggacag atttcactct caccatcagc 60
agactgcagc ctgaagactt tgcagtttat tactgt 96
<210> 48
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> ANT4044/ ANT4044-A2可变轻链 - LFR4(DNA)
<400> 48
ttcggccagg ggaccaaggt ggatatcaaa 30
<210> 49
<211> 330
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> ANT4044/ANT4044-A2未修饰人IgG1重链恒定
区 - IgG1 HC (蛋白质)
<400> 49
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 50

<211> 330

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> ANT4044/ANT4044-A2修饰人IgG1重链恒定区 - IgG1 H310A H435Q HC (蛋白质)

<400> 50

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95
Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190
Ala Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Gln Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 51

<211> 327

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> ANT4044/ANT4044-A2修饰人IgG4恒定链区 -
IgG4 S228P L235E H310A H435Q HC (蛋白质)

<400> 51

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu Ala Gln Asp
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205
Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285
Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Gln Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320
Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 52
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> ANT4044/ANT4044-A2 κ轻链恒定区 - 人
κ LC恒定区 (蛋白质)
<400> 52
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

100 105

<210> 53

<211> 445

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> ANT4044 RADmAb IgG1重链 (HuX592r) - FcRn-空, IgG1同种异型G1m(3) H310A H435Q (蛋白质)

<400> 53

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
20 25 30
Thr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Asn Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Glu Asp Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ala Gly Trp Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
115 120 125
Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
130 135 140
Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
145 150 155 160
Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
165 170 175
Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
180 185 190
Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
195 200 205
Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
210 215 220
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
245 250 255
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
260 265 270
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
275 280 285
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
290 295 300
Thr Val Leu Ala Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305 310 315 320
Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
340 345 350
Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430
Gln Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 54
<211> 442
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> ANT4044 RADmAb IgG4重链 - FcRn+FcRγ-空, IgG4 S228P L235E H310A H435Q (蛋白质)
<400> 54

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
20 25 30
Thr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Asn Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Glu Asp Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Gly Trp Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
115 120 125

Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
145 150 155 160

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
165 170 175

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
180 185 190

Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
195 200 205

Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys
210 215 220

Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
225 230 235 240

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
245 250 255

Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp
260 265 270

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
275 280 285

Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
290 295 300

Ala Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
305 310 315 320

Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
325 330 335

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu
340 345 350

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
355 360 365
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
370 375 380
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
385 390 395 400
Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn
405 410 415
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Gln Tyr Thr
420 425 430
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440

<210> 55
<211> 445
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> ANT4044-A2 RADmAb IgG1重链 - FcRn-空, IgG1 H310A H435Q (蛋白质)
<400> 55
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
20 25 30
Thr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Asn Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Glu Asp Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ala Tyr Trp Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
115 120 125
Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
130 135 140
Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
145 150 155 160

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
165 170 175
Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
180 185 190
Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
195 200 205
Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
210 215 220
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
225 230 235 240
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
245 250 255
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
260 265 270
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
275 280 285
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
290 295 300
Thr Val Leu Ala Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305 310 315 320
Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
340 345 350
Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430
Gln Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 56
<211> 442
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> ANT4044-A2 RADmAb IgG4重链 - FcRn+FcRγ-空 IgG4 S228P L235E H310A H435Q (蛋白质)

<400> 56

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
20 25 30
Thr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Asn Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Glu Asp Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ala Tyr Trp Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
115 120 125
Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
130 135 140
Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
145 150 155 160
Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
165 170 175
Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
180 185 190
Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
195 200 205
Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys
210 215 220
Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
225 230 235 240
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
245 250 255
Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp
260 265 270

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
275 280 285
Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
290 295 300
Ala Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
305 310 315 320
Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
325 330 335
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu
340 345 350
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
355 360 365
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
370 375 380
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
385 390 395 400
Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn
405 410 415
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Gln Tyr Thr
420 425 430
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440

<210> 57
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> ANT4044-ANT4044-A2 Vk轻链 - Vk轻链 (蛋白质)
<400> 57

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala
20 25 30
Val Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

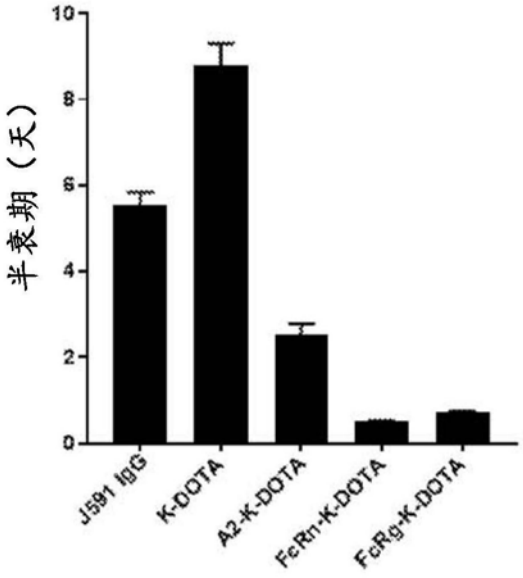

半衰期（天）
10
8
6
4
2
0
J591 IgG
K-DOTA
A2-K-DOTA
FcRn-K-DOTA
FcRg-K-DOTA

图1

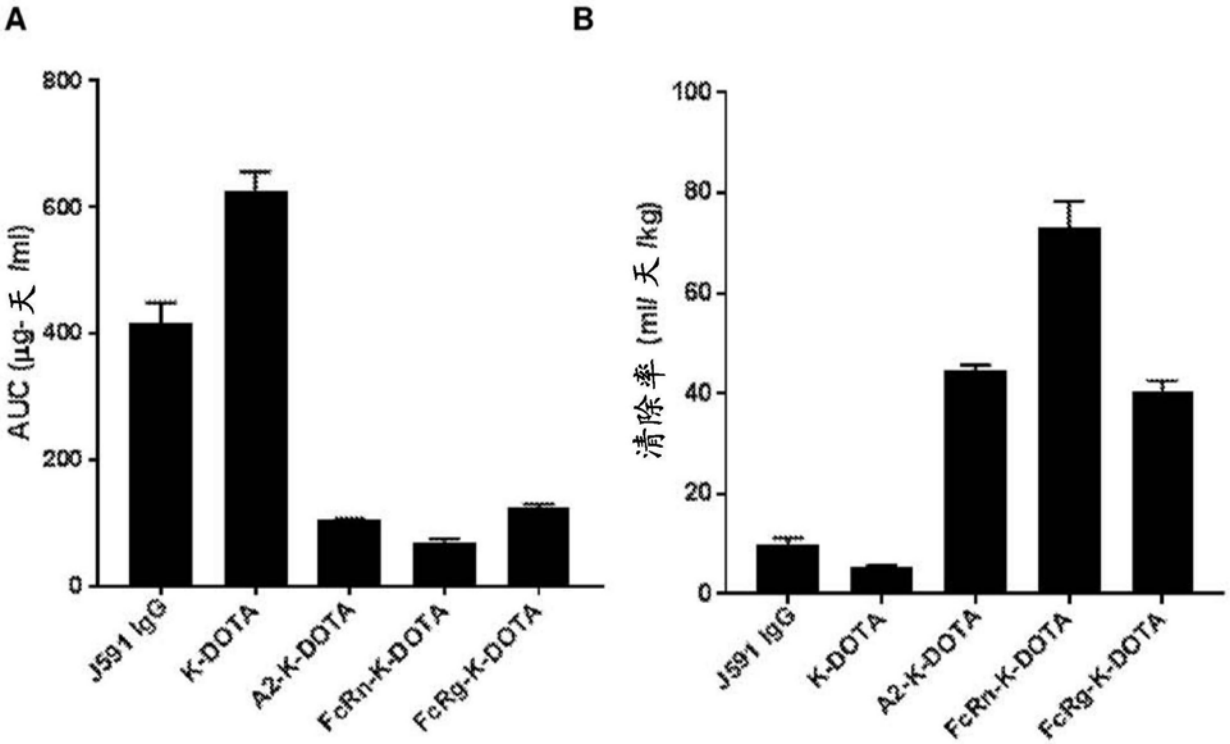

A
AUC (μg·天 /ml)
800
600
400
200
0
B
清除率 (ml/ 天 /kg)
100
80
60
40
20
0
J591 IgG
K-DOTA
A2-K-DOTA
FcRn-K-DOTA
FcRg-K-DOTA

图2

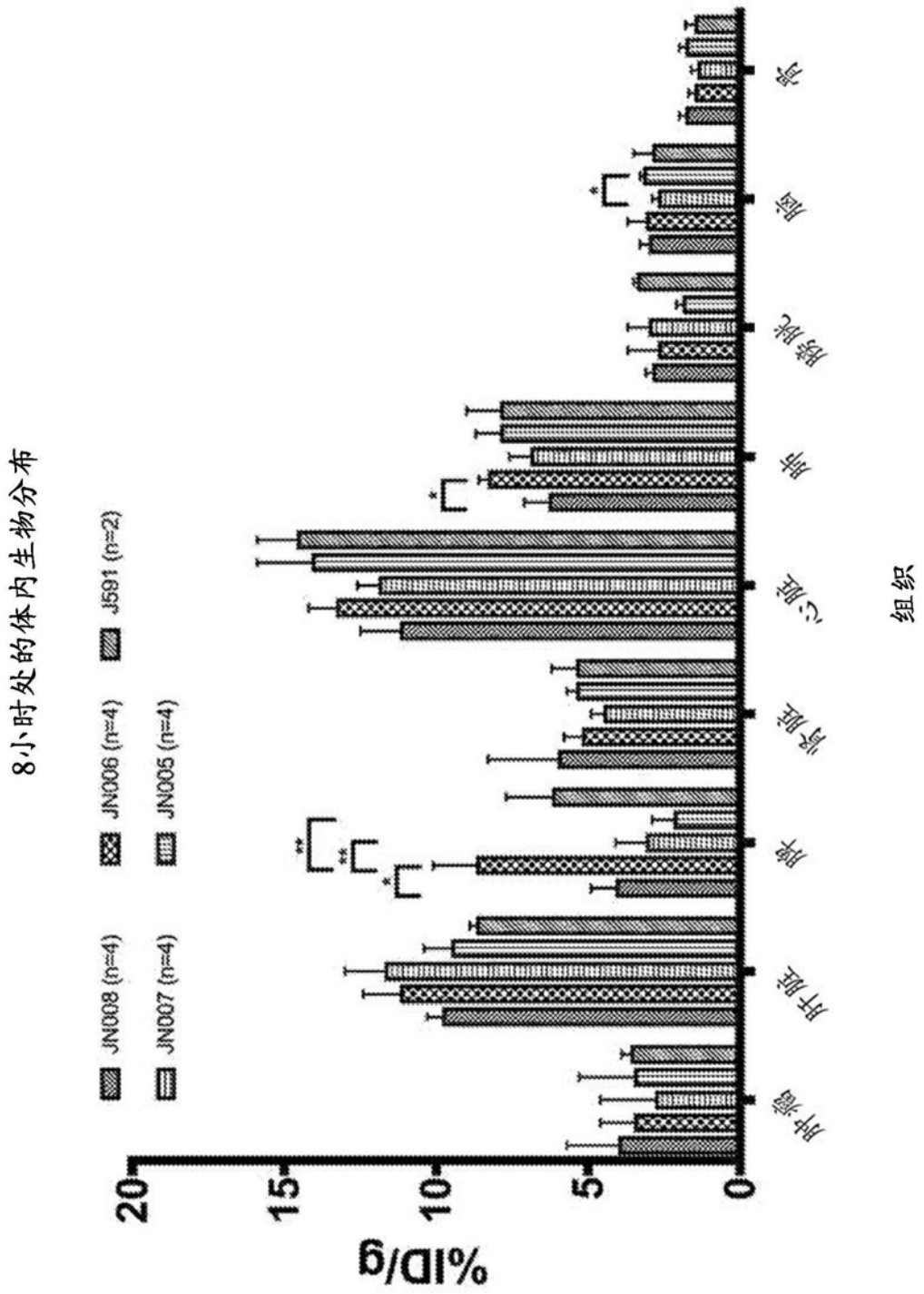

8小时处的体内生物分布
JN008 (n=4)
JN007 (n=4)
JN006 (n=4)
JN005 (n=4)
J591 (n=2)
%ID/g
20
15
10
5
0
肿瘤
肝脏
脾
肾脏
心脏
肺
胰腺
肠
组织

图3

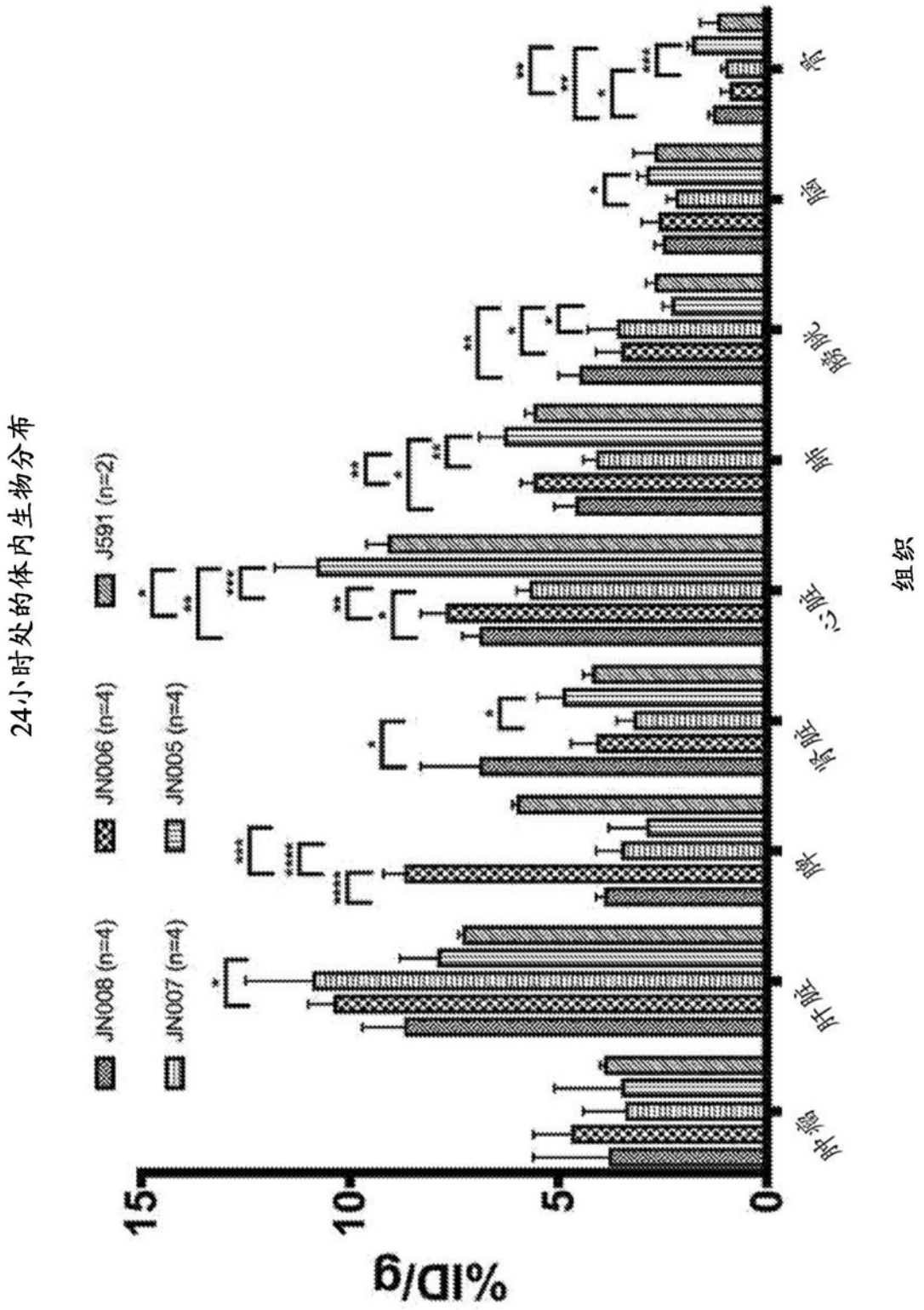

24小时处的体内生物分布
J591 (n=2)
JN006 (n=4)
JN005 (n=4)
JN008 (n=4)
JN007 (n=4)
%ID/g
15
10
5
0
肿瘤
肝脏
脾
肾脏
肾上腺
肺
脑
骨
心脏
肌肉
血
组织

图4

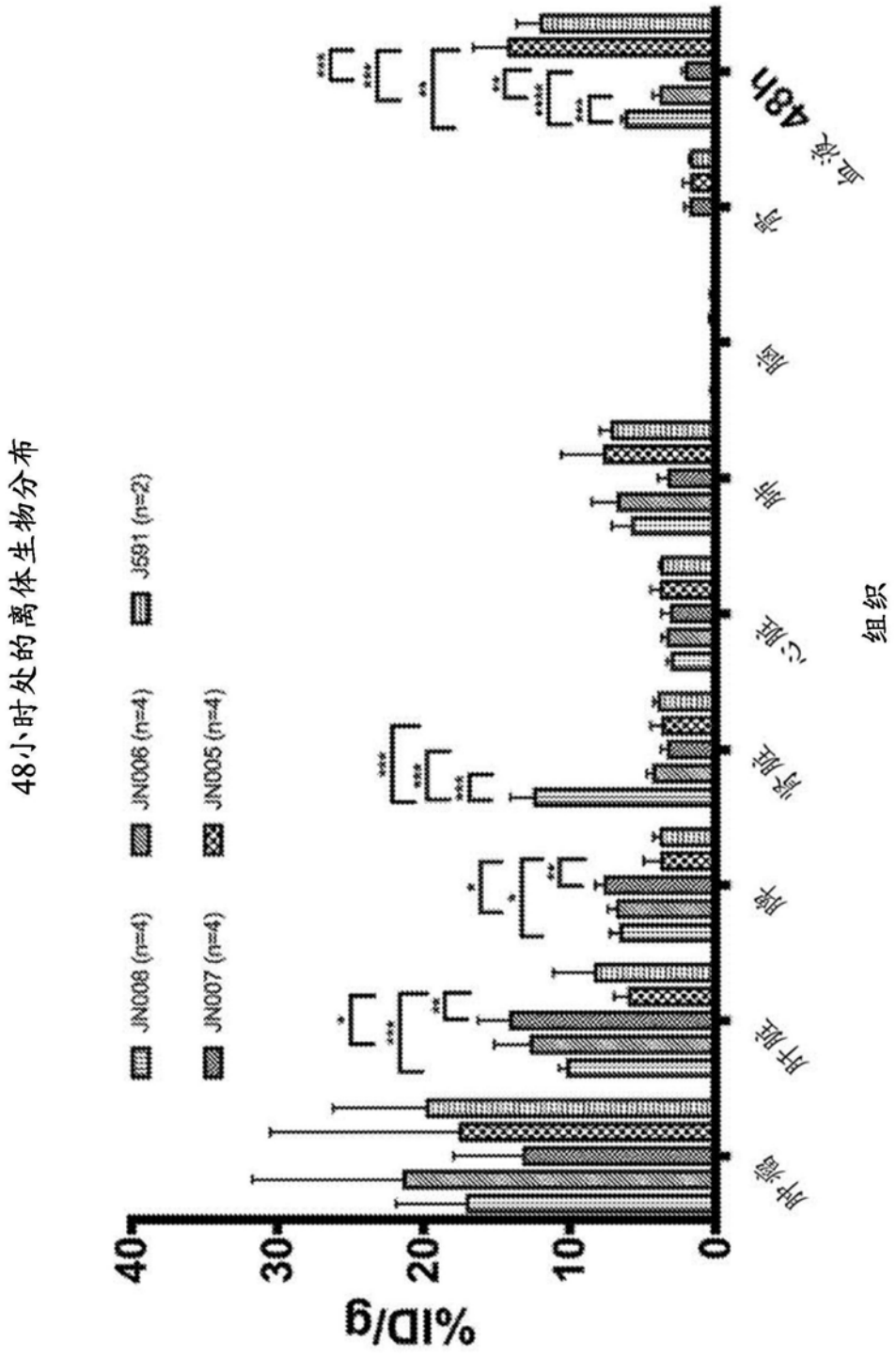

48小时处的离体生物分布
JN008 (n=4)
JN007 (n=4)
JN006 (n=4)
JN005 (n=4)
J591 (n=2)
%ID/g
40
30
20
10
0
肿瘤
肝脏
脾
肾脏
心脏
肺
肠
血液 48h
组织

图5

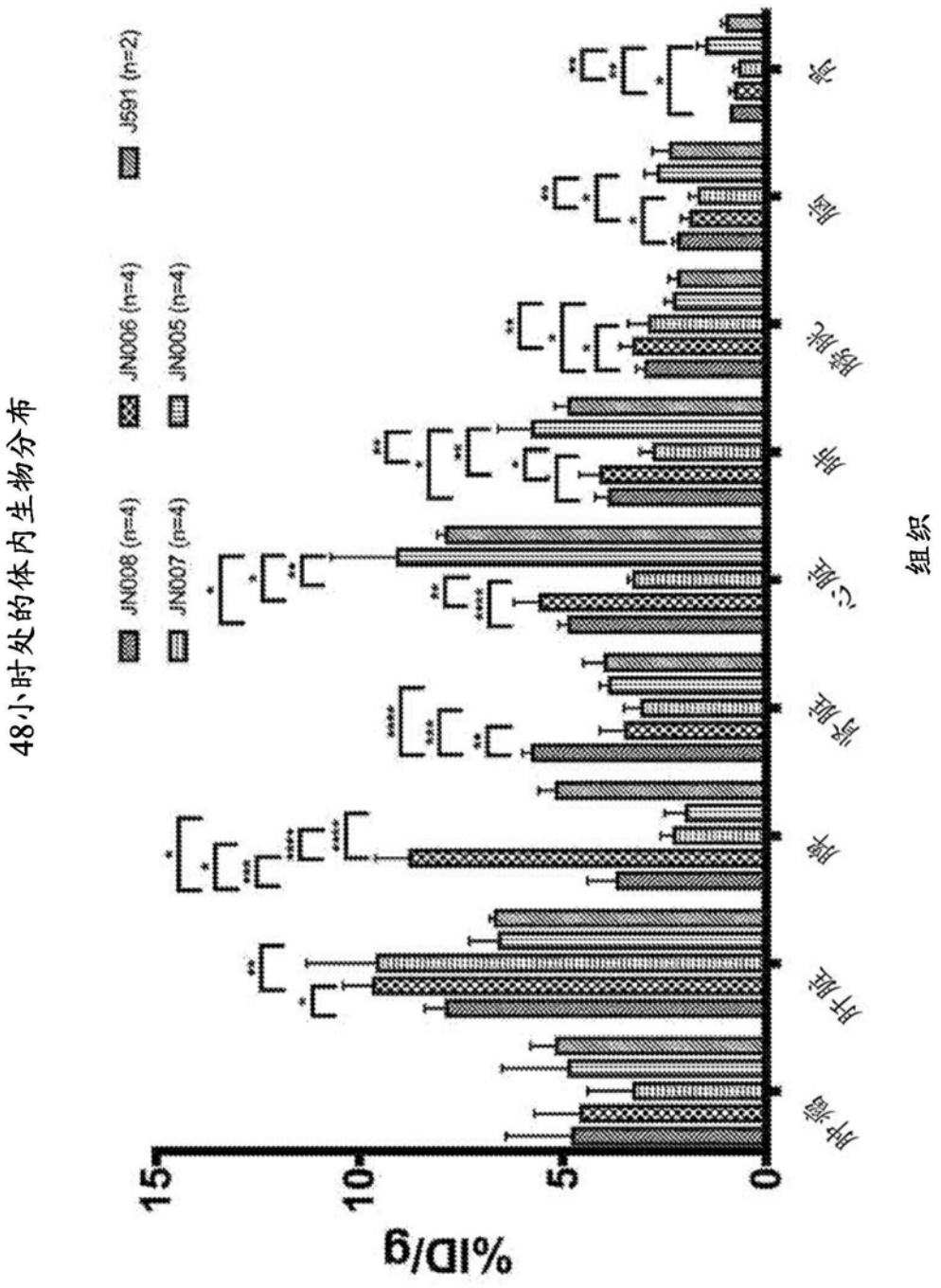

48小时处的体内生物分布
JN008 (n=4)
JN007 (n=4)
JN006 (n=4)
JN005 (n=4)
J591 (n=2)
%ID/g
15
10
5
0
肿瘤
肝脏
脾
肾脏
心脏
肺
胰腺
肌肉
骨
组织

图6

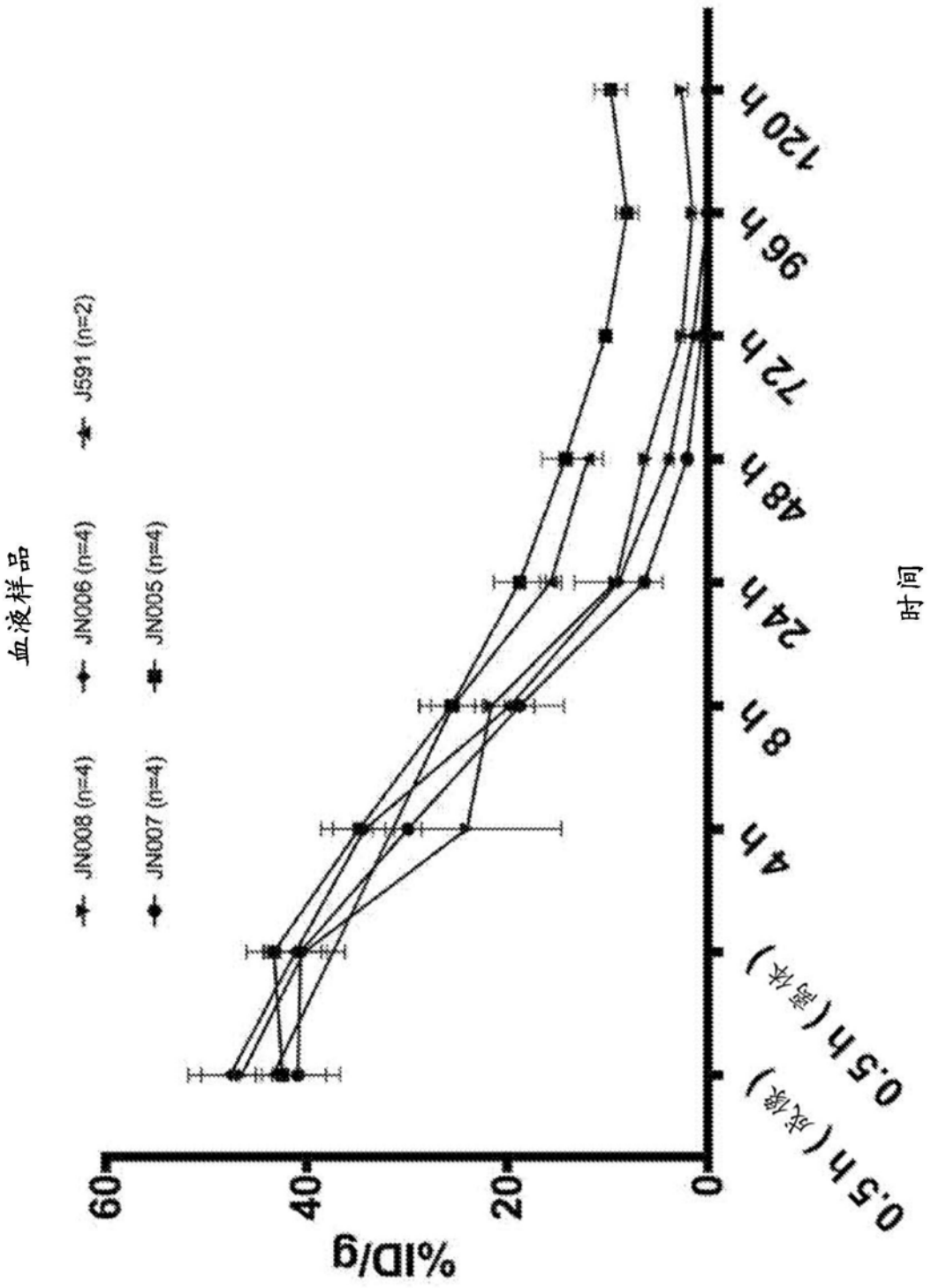

血液样品
J591 (n=2)
JN006 (n=4)
JN005 (n=4)
JN008 (n=4)
JN007 (n=4)
%ID/g
60
40
20
0
0.5h (皮保)
0.5h (静脉)
4h
8h
24h
48h
72h
96h
120h
时间

图7

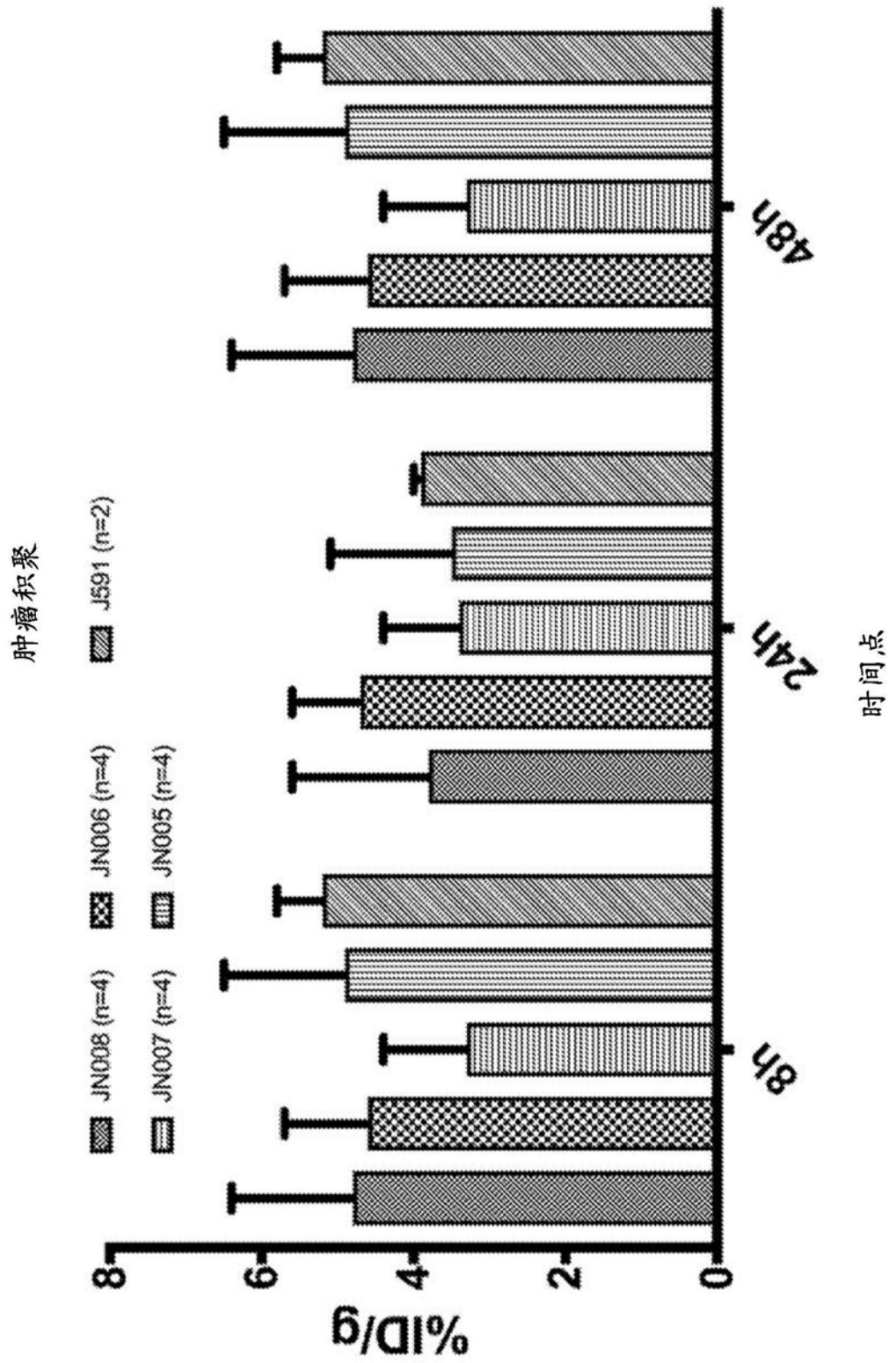

肿瘤积聚
JN008 (n=4)
JN007 (n=4)
JN006 (n=4)
JN005 (n=4)
J591 (n=2)
%ID/g
0
2
4
6
8
8h
24h
48h
时间点

图8

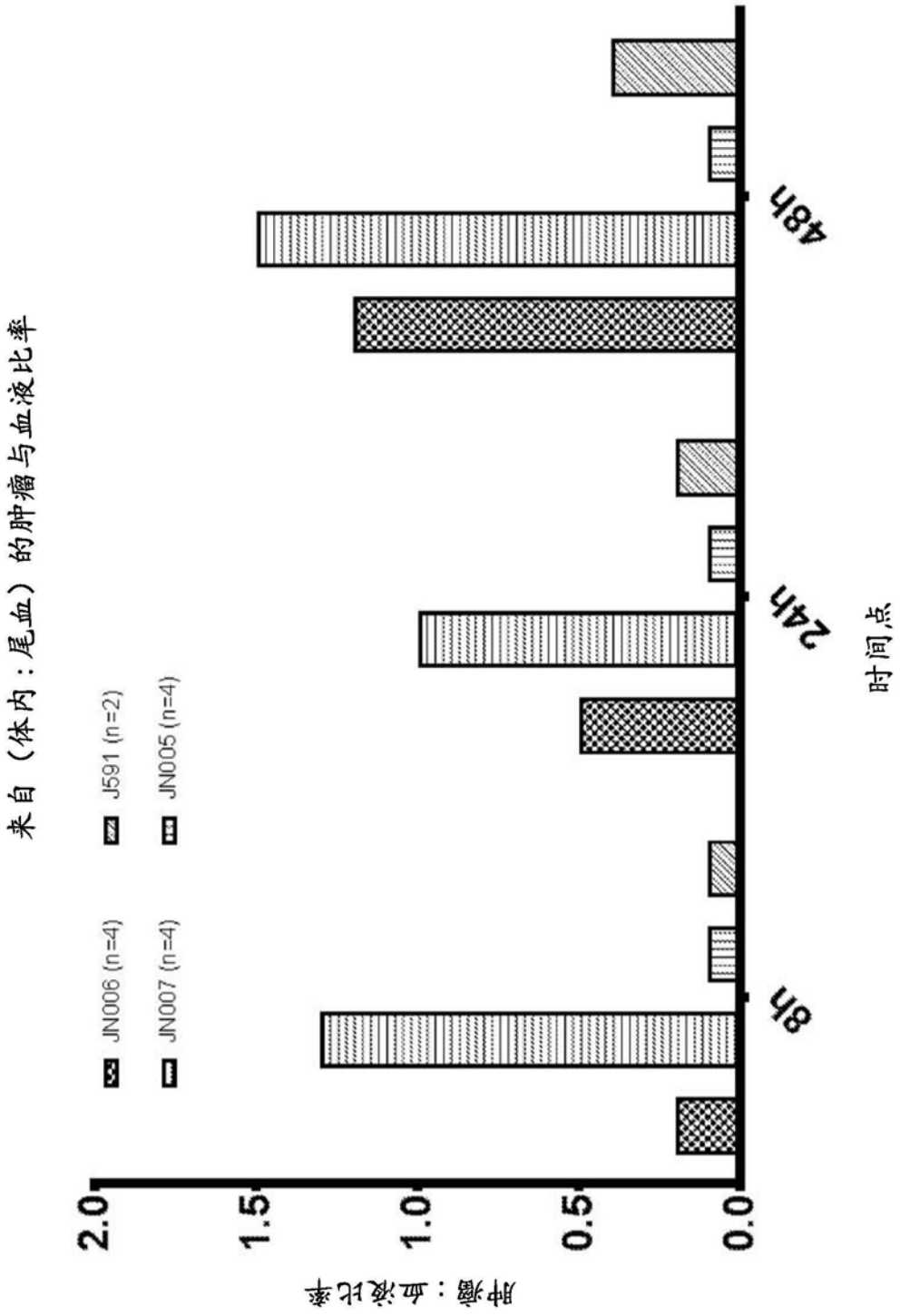

来自（体内：尾血）的肿瘤与血液比率
J591 (n=2)
JN005 (n=4)
JN006 (n=4)
JN007 (n=4)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
肿瘤：血液比率
8h
24h
48h
时间点

图9

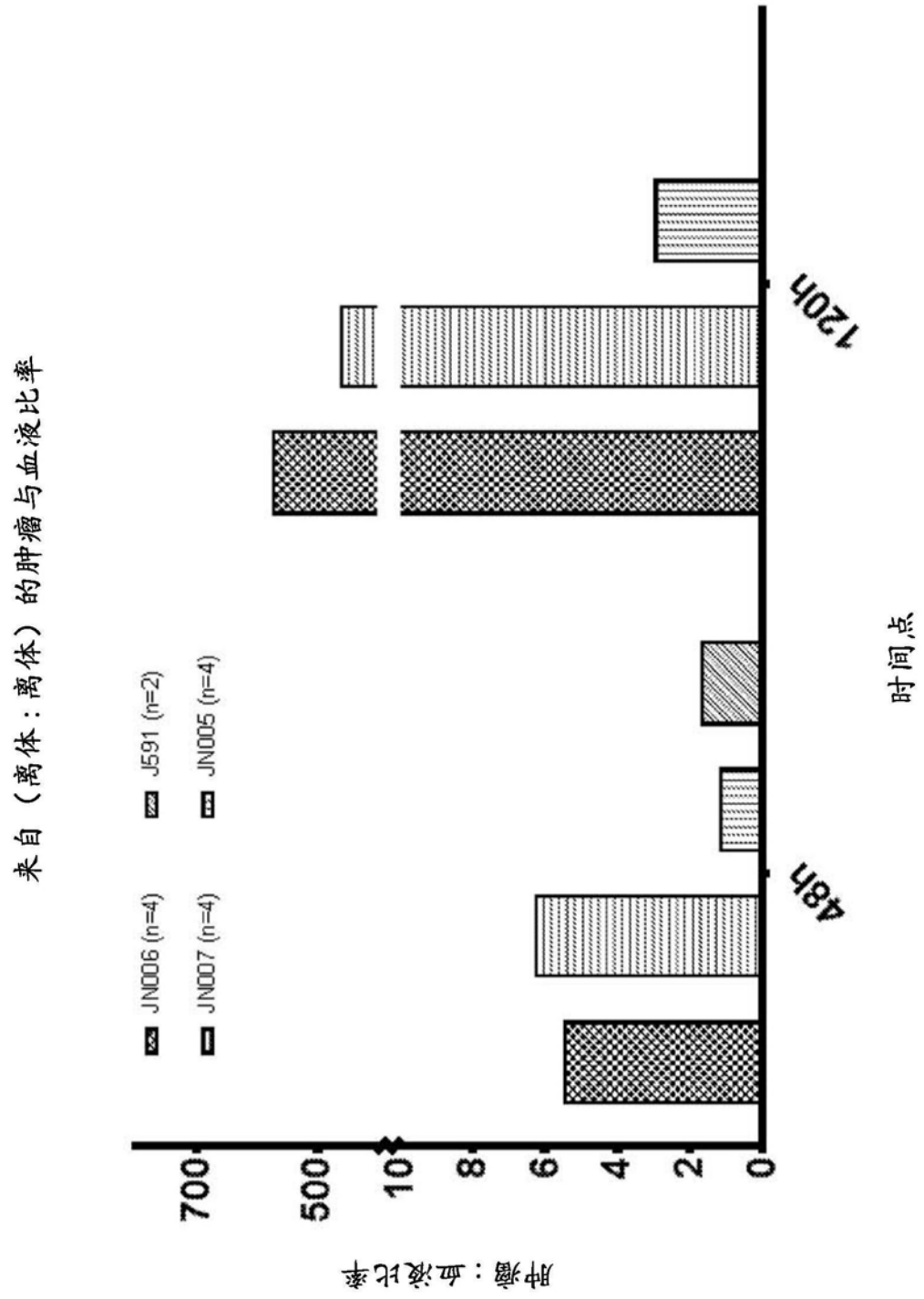

来自（离体：离体）的肿瘤与血液比率
J591 (n=2)
JN005 (n=4)
JN006 (n=4)
JN007 (n=4)
700
500
10
8
6
4
2
0
肿瘤：血液比率
48h
120h
时间点

图10



图11

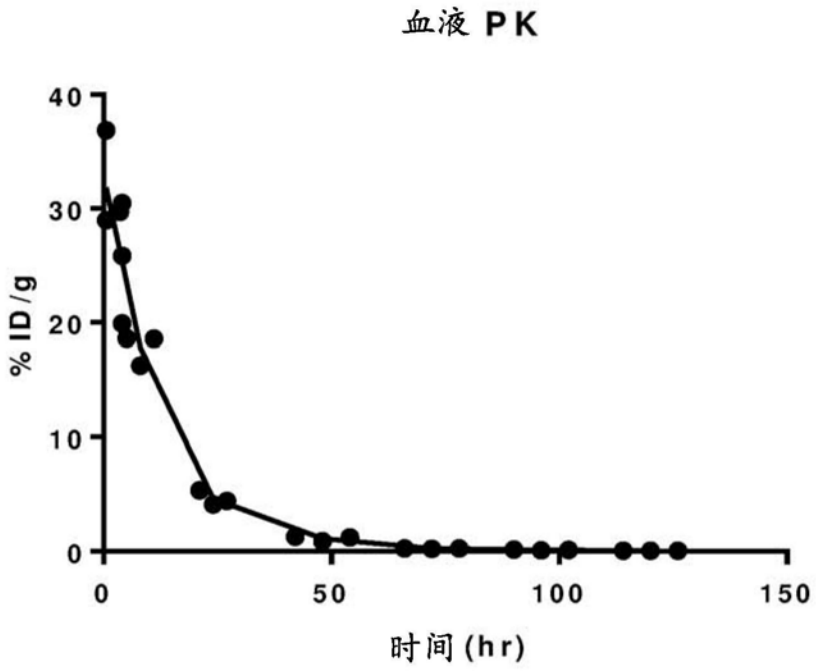


图12

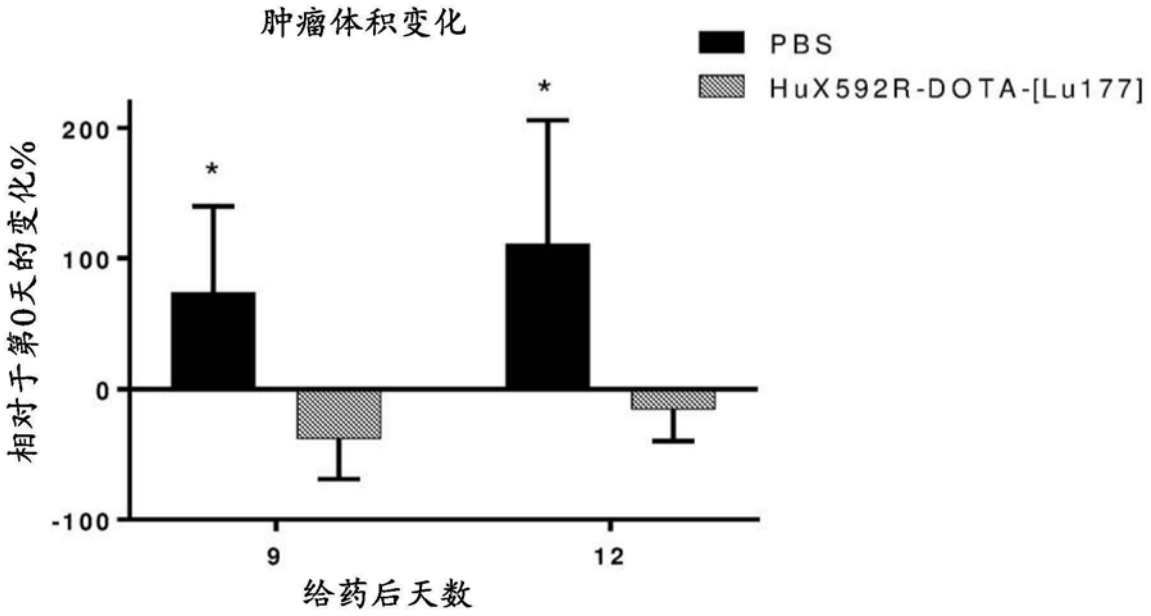

肿瘤体积变化
PBS
HuX592R-DOTA-[Lu177]
相对于第0天的变化%
200
100
0
-100
*
*
9
12
给药后天数

图13

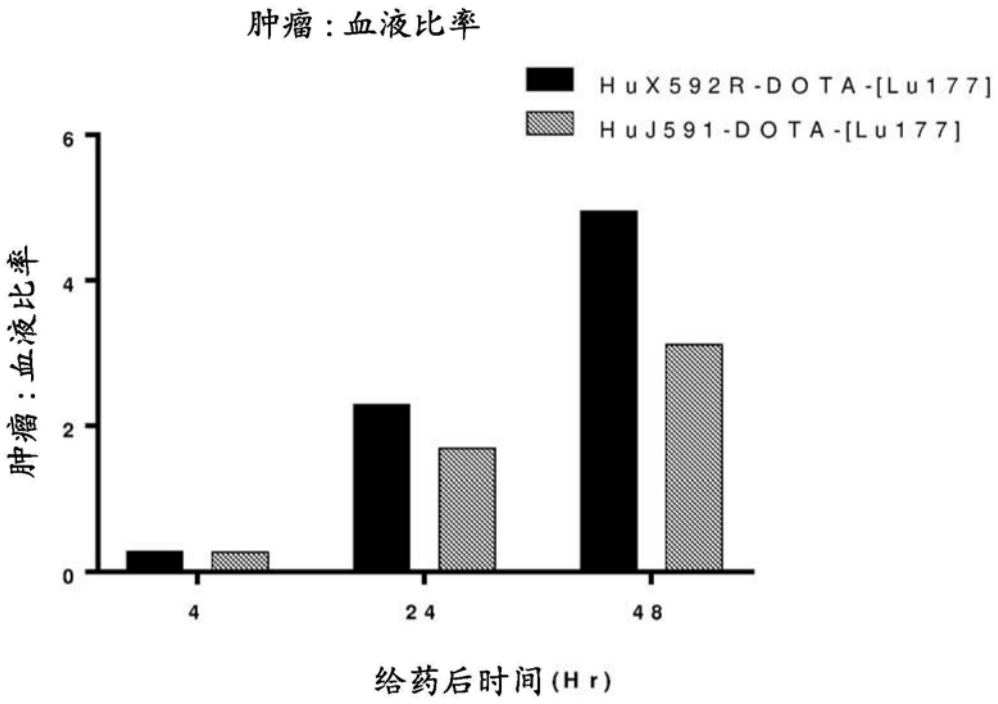

肿瘤：血液比率
HuX592R-DOTA-[Lu177]
HuJ591-DOTA-[Lu177]
肿瘤：血液比率
6
4
2
0
4
24
48
给药后时间(Hr)

图14

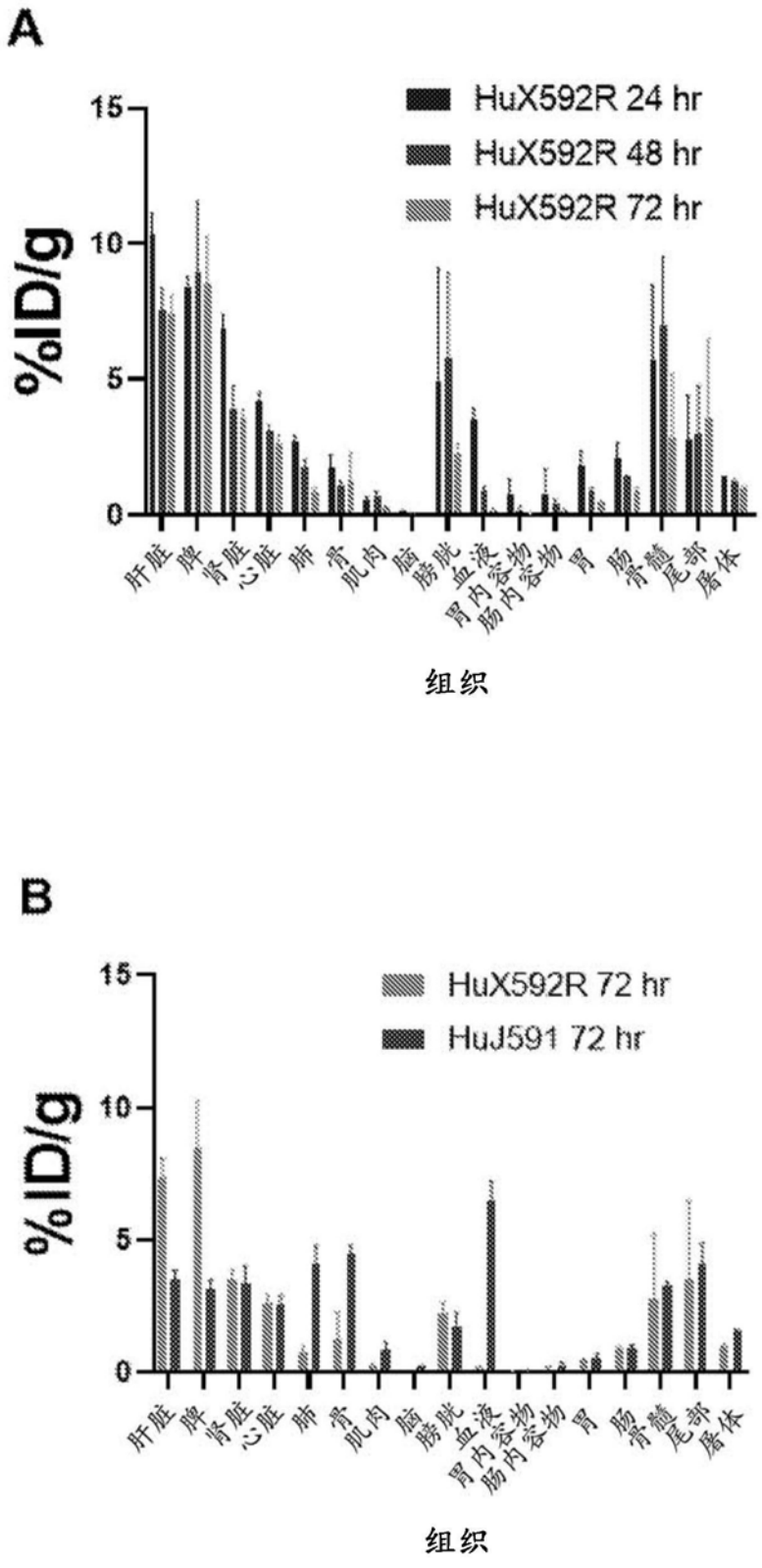
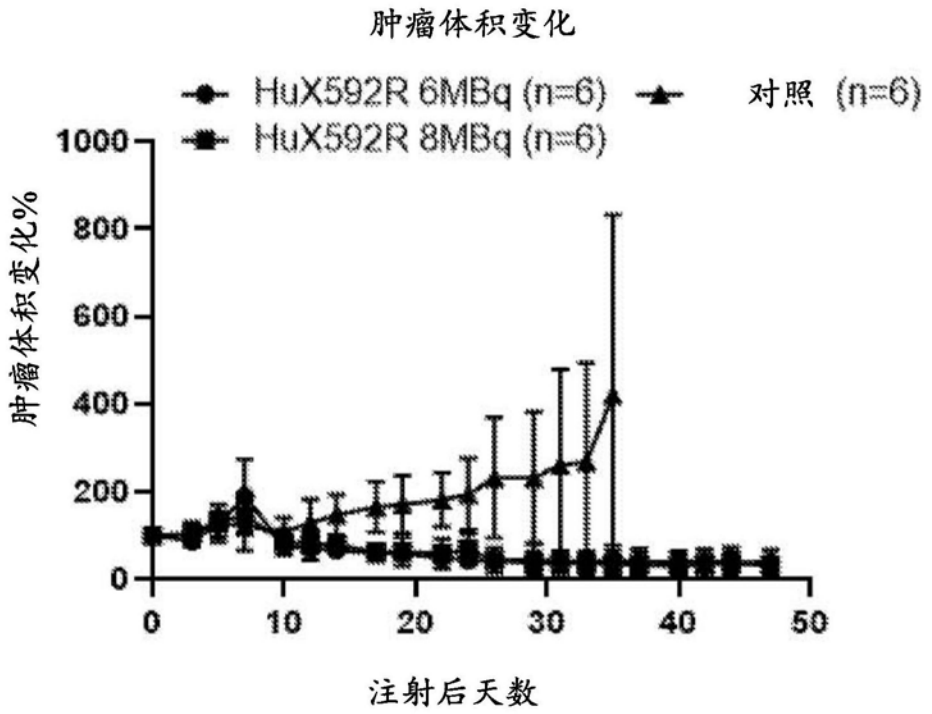

A
HuX592R 24 hr
HuX592R 48 hr
HuX592R 72 hr
%ID/g
15
10
5
0
肝脏
脾
肾脏
心脏
肺
骨
肌肉
脑
膀胱
血液
胃内容物
肠内容物
胃
肠
骨髓
尾部
屠体
组织
B
HuX592R 72 hr
HuJ591 72 hr
%ID/g
15
10
5
0
肝脏
脾
肾脏
心脏
肺
骨
肌肉
脑
膀胱
血液
胃内容物
肠内容物
胃
肠
骨髓
尾部
屠体
组织

图15

A


肿瘤体积变化
HuX592R 6MBq (n=6)
对照 (n=6)
HuX592R 8MBq (n=6)
肿瘤体积变化%
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
50
注射后天数

B

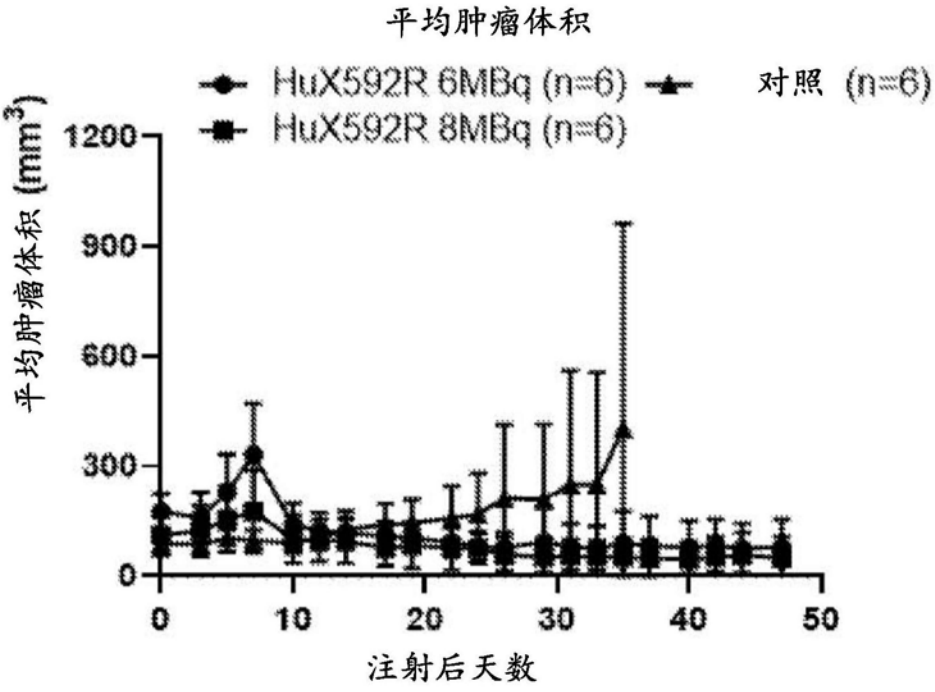

平均肿瘤体积
HuX592R 6MBq (n=6)
对照 (n=6)
HuX592R 8MBq (n=6)
平均肿瘤体积 (mm3)
1200
900
600
300
0
0
10
20
30
40
50
注射后天数

图16

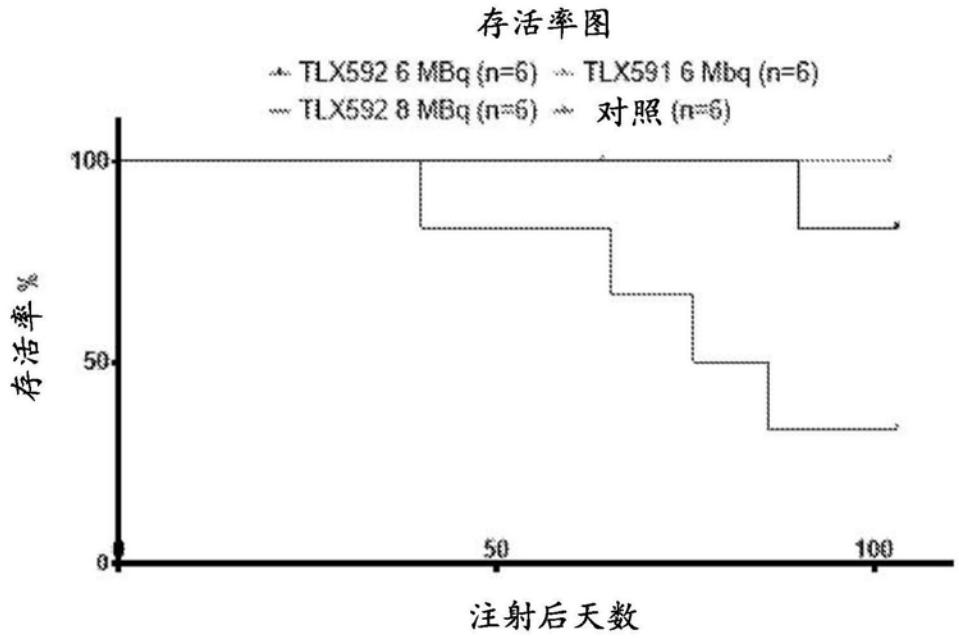

存活率图
TLX592 6 MBq (n=6)
TLX591 6 Mbq (n=6)
TLX592 8 MBq (n=6)
对照 (n=6)
100
50
0
存活率 %
0
50
100
注射后天数

图17