(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106872702 A
(43)申请公布日 2017.06.20

(21)申请号 201611095752.6

(22)申请日 2012.10.25

(30)优先权数据
61/551,195 2011.10.25 US

(62)分案原申请数据
201280063852.4 2012.10.25

(71)申请人 斯隆-凯特林纪念癌症中心
地址 美国纽约州

(72)发明人 C·索耶斯 D·乌尔默特
J·刘易斯 M·伊万斯 H·丽扎

(74)专利代理机构 北京市君合律师事务所 11517
代理人 顾云峰 吴龙瑛

(51)Int.Cl.
G01N 33/574(2006.01)

权利要求书1页 说明书51页
序列表1页 附图12页

(54)发明名称

用于前列腺癌的诊断、预测和治疗的游离PSA抗体

(57)摘要

本发明提供了监测和检测与肿瘤结合的游离PSA(“fPSA”)的方法,所述方法使用抗体多肽作为雄激素受体信号指示。在特定实施方式中,所述方法可以用于评估抗雄激素和/或一般抗癌治疗的有效性。本发明还提供了多种涉及与肿瘤结合的或瘤内fPSA特异性抗体的方法和组合物。例如,本发明提供了组合物,包括药物组合物,其包括抗-fPSA抗体或者其片段或特征性部分。本发明进一步提供了多种使用抗-fPSA抗体和/或组合物的治疗和/或诊断方法。

CN 106872702 A

1.一种原位监测对前列腺癌治疗或疗法的应答的方法,所述方法包括:

给予与fPSA的表位结合的抗体多肽;

确定治疗前在主体的肿瘤或组织中fPSA的表达或活性水平;

给予主体前列腺癌治疗或疗法;

再次给予与fPSA的表位结合的抗体多肽;

确定治疗后在主体的肿瘤或组织中fPSA的表达或活性水平;

将治疗后在肿瘤或组织中fPSA的表达或活性水平与治疗前的水平进行比较;以及

基于所述比较,根据所展示出的原位fPSA活性或表达的降低情况,确定疗法或治疗是否有效。

用于前列腺癌的诊断、预测和治疗的游离PSA抗体

[0001] 本申请是申请号为201280063852.4、申请日为2012年10月25日、发明名称为“用于前列腺癌的诊断、预测和治疗的游离PSA抗体”的中国发明专利申请的分案申请，原申请为国际申请号为PCT/US2012/061982的国家阶段申请，该国际申请要求申请日为2011年10月25日，申请号为61/551,195的美国临时申请的优先权，其整体通过引用并入本申请。

背景技术

[0002] 前列腺癌是男性中最常诊断出的癌症之一，并且是仅次于肺癌的最常见的导致癌症相关死亡的原因。罹患前列腺癌的风险随着年龄的增大显著增加，特别是在50岁以上的男性中。随着过去的三十年中标志性的人口老龄化和预期寿命的增加，前列腺癌在美国的发生率可能接近六分之一的男性。

[0003] 尽管有大量的研究探讨了前列腺癌的分子原因，但是其仍难以治疗。目前治疗的金标准是手术，通常是将前列腺摘除，再进行放疗或化疗。然而，这些方法并不完全有效并且影响个体恢复性功能的可能性。此外，前列腺癌细胞和转移性前列腺癌细胞能够通过过表达雄激素受体或模拟活化雄激素受体信号的其他适应性突变补偿通过治疗减少的雄激素水平。而且，目前的方法不足以识别和治疗已浸润其他组织(例如淋巴结和骨)的转移性前列腺癌细胞。与作为其来源的前列腺肿瘤一样，转移性前列腺癌细胞保留了雄激素敏感性，并且雄激素的存在驱动了转移性肿瘤生长。

[0004] 发明概述

[0005] 本发明的实施方式基于一个惊人的发现，即对游离PSA(“fPSA”)具有特异性的单克隆抗体和抗体多肽能够与瘤内的fPSA或与前列腺肿瘤密切结合的其他fPSA结合。与肿瘤结合的fPSA水平能够为肿瘤本身的雄激素受体信号提供高特异性和可定量的检测。因此，根据本发明，单克隆抗体或抗体多肽结合到与肿瘤结合的fPSA上有助于在原位监测和/或将雄激素受体信号可视化并且其为抗癌治疗的有效性提供了一种优越的检测措施。

[0006] 与常规的血清PSA检测相比，通过fPSA对雄激素受体信号原位监测提供了明显更好的结果。例如，原位fPSA水平是前列腺癌特异性的，并且如本申请所证实的其与雄激素的应答性和治疗效果直接相关。因此，本申请公开的本发明的实施方式提供了检测与肿瘤结合的fPSA的表达的非侵入性方法，其更加清楚地反映了在PSA表达中雄激素受体驱动的改变。而且，在患有弥散性疾病的患者中单克隆抗体和抗体多肽能够检测转移灶并且能够区分恶性和非恶性疾病。此外，单克隆抗体和抗体多肽针对与肿瘤结合的fPSA的结合特异性能够用在直接针对前列腺肿瘤或转移位点的靶向疗法中(例如化疗、放射性同位素的递送或基因疗法)。

[0007] 本发明的实施方式提供了用于原位监测对前列腺癌的治疗或疗法的应答的方法。在特定实施方式中，所述方法包括给予与游离PSA(“fPSA”)的表位结合的抗体多肽；确定治疗前在主体的肿瘤或组织中fPSA的表达或活性水平；给予主体前列腺癌治疗或疗法；再次给予与fPSA的表位结合的抗体多肽；确定治疗后在主体的肿瘤或组织中fPSA的表达或活性水平；将治疗后在肿瘤或组织中fPSA的表达或活性水平与治疗前的水平进行比较；以及基

于所述比较，根据所展示出的原位fPSA活性或表达的降低情况，确定疗法或治疗是否有效。在一个特定实施方式中，所述fPSA的表位在催化裂隙中或与之邻近。在另一个特定实施方式中，所述前列腺癌的治疗或疗法是抗雄激素疗法。

[0008] 在某些实施方式中，所述抗体多肽是单克隆抗体。一些实施方式进一步包括，在给药步骤前，将所述抗体多肽与检测实体组合。在特定实施方式中，所述检测实体选自由锆-89(^{89}Zr)、碘-124(^{124}I)、碘-131(^{131}I)、碘-125(^{125}I)、铋-212(^{212}Bi)、铋-213(^{213}Bi)、砹-221(^{211}At)、铜-67(^{67}Cu)、铜-64(^{64}Cu)、铼-186(^{186}Re)、铼-186(^{188}Re)、磷-32(^{32}P)、钐-153(^{153}Sm)、镥-177(^{117}Lu)、锝-99m(^{99m}Tc)、镓-67(^{67}Ga)、铟-I 1 1(^{111}In)和铊-201(^{201}Tl)组成的组。

[0009] 在一些实施方式中，所述检测步骤包括通过单光子发射计算机断层成像技术(SPECT)、正电子发射断层成像技术(PET)或磁共振成像(MRI)检测。

[0010] 在特定实施方式中，所述前列腺癌治疗或疗法选自包括去势、RU58642、LG120907、LG105、RD162、MDV3100、BMS-641988、CH5137291、阿彻瑞克酸(ataric acid)、N-丁基苯磺酰胺、醋酸环丙孕酮、羟基氟他胺、比卡鲁胺、尼鲁米特、肽拮抗剂、TAK700、ARN-509(醋酸阿比特龙)、卡博替尼(cabozantimib)、伊匹单抗(ipilimumab)、库司替森、BPX-101、阿尔法莱丁(alpharadin)、德尼单抗(denosumab)和Protsvac-VF的组。用于本发明实施方式的其他前列腺癌的治疗包括氯化镭-223、卡博替尼(cabozantinib)和比卡鲁胺(康士德)。在某些实施方式中，通过治疗后fPSA的表达或活性水平与治疗前fPSA的表达或活性水平相比降低指示有效的治疗。

[0011] 在所述方法的其他实施方式中，提供了一种在主体中原位监测雄激素受体信号的方法。在特定实施方式中，所述方法包括给予主体与位于或邻近PSA的催化裂隙的至少一个表位结合的抗体多肽，其中所述抗体多肽与检测实体复合；通过成像方案，检测在前列腺肿瘤或其转移细胞中检测实体的存在情况；其中所述检测实体的存在情况与雄激素受体信号相关。在一个特定实施方式中，雄激素受体信号在体外成像。在另一个实施方式中，雄激素受体信号在体内成像。其他实施方式进一步包括对所述检测实体的存在情况进行定量以确定fPSA的表达或活性的检测，其中所述fPSA表达的检测与雄激素受体信号定量地相关。在特定实施方式中，所述成像方案选自包括单光子发射计算机断层成像技术(SPECT)、正电子发射断层成像技术(PET)或磁共振成像(MRI)的组。

[0012] 本发明的一些实施方式提供了在主体中治疗前列腺癌或其转移性疾病的方法。在某些实施方式中，所述方法包括向主体给予对与抗癌剂组合或偶联的fPSA具有特异性的包括抗体多肽的靶向实体。如本申请中所讨论的，所述fPSA实质上在瘤内或与前列腺癌细胞结合。在一些实施方式中，对fPSA具有特异性的抗体或其抗原结合片段用于生产针对前列腺癌的药物治疗或药物。在一些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段是人源或小鼠单克隆抗体。在某些实施方式中，所述抗体是5A10。示例性的抗癌剂可以选自包括光敏剂、核酸、放射敏化剂、放射性同位素、超抗原、前药、前药活化酶、抗血管生成剂和抗雄激素疗法的组。在一些实施方式中，所述抗癌剂可以是MDV3100、ARN-509和阿霉素。在一些实施方式中，所述抗-fPSA抗体多肽对位于或邻近fPSA的催化裂隙的表位具有特异性。

[0013] 本发明的其他实施方式提供了包括对fPSA具有特异性的单克隆抗体或其片段的药物组合物。

[0014] 在本发明的另一个实施方式中，提供了一种用于监测原位雄激素受体信号的试剂盒，所述试剂盒包括对fPSA具有特异性的抗体多肽；能够检测fPSA的表达或活性水平的试剂；对照；以及用于对由该试剂盒实施的检测和根据该检测确定雄激素受体信号提供指导的说明书。

附图说明

[0015] 下文所述的图，在一起组成附图，其仅供说明之用，不用于限制。

[0016] 图1显示了典型的粗制(灰色)和纯化(黑色)^{89}Zr-5A10的放射性-ITLC色谱图。洗脱液为50mM DTPA，pH7。^{89}Zr-5A10保持在基线(Rf＝0.0)，杂质与溶剂前沿一起移动(Rf＝1.0)。

[0017] 图2显示了确定^{89}Zr-5A10对fPSA的相对亲和性的竞争性结合检测。通过在使用固化的fPSA包被的孔中将^{89}Zr-5A10与可变浓度的未标记的5A10孵育确定^{89}Zr-5A10对fPSA的相对亲和性。将孵育后孔中仍保留的活性解释为^{89}Zr-5A10对fPSA的特异性结合。将实验值对理想(理论)值作图，其基于DFO和^{89}Zr与5A10的偶联不会改变mAb对fPSA亲和性的假设计算。使用线性回归确定线性(y＝x)偏差，并且显示了一个^{89}Zr-5A10制备物的代表性数据。检测重复进行两次，使用两个独立浓度范围的5A10(共n＝4)。

[0018] 图3显示了^{89}Zr-5A10特别地位于多个AR-和fPSA-阳性前列腺癌的临床前模型中。图3a显示了在多个时间点携带LNCaP-AR异种移植瘤的完好雄性小鼠所选定组织的生物分布数据，图中显示在24h时所观察到的^{89}Zr-5A10的瘤内摄取达峰。随着时间的推移，以血液和心脏为代表的血池的活性耗竭，并且像很多单克隆抗体一样，在肝脏中观察到了持续的高摄取。图3b显示了携带LNCaP-AR异种移植瘤的完好雄性小鼠的代表性横断面(Trans.)和冠状PET切片，图中显示了^{89}Zr-5A10定位于肿瘤(T)和在小鼠肝脏(L)中的摄取。图3c显示了与肿瘤结合的^{89}Zr-5A10在多个s.c.前列腺癌模型和若干处置条件下的完好雄性小鼠中的生物分布数据。通过同时注射过量的未标记5A10(1mg未标记的mAb)，^{89}Zr-5A10对LNCaP-AR的定位被完全竞争掉。非特异性放射性示踪剂^{89}Zr-IgG未定位于LNCaP-AR，并且^{89}Zr-5A10未定位于PC3，PC3为不表达AR-和PSA-的前列腺癌模型。观察到^{89}Zr-5A10居间地定位于CWR22Rv1异种移植瘤，同LNCaP-AR相比，该中间定位在该模型中与较低的PSA基线表达一致。*表示与所有条件下比较P<0.01。"表示与PC3比较P<0.01。图3d显示了在携带LNCaP-AR肿瘤的去势小鼠中手术植入s.c.睾酮颗粒后导致与肿瘤结合的^{89}Zr-5A10增加，但在其他器官的摄取未发生改变。生物分布数据在注射后24h采集。*表示与未经处置(No Tx)的比较P<0.01。误差线表示平均值的标准偏差。

[0019] 图4显示了注射^{89}Zr-5A10的携带LNCaP-AR异种移植瘤的完好雄性小鼠的生物分布曲线。给予携带肿瘤的小鼠^{89}Zr-5A10，并在注射后的指定时间将其处死并且收集用于生物分布研究的血液和组织。数据以平均％ID/g±一个标准偏差表示。

[0020] 图5显示了注射^{89}Zr-5A10和过量未标记的5A10的携带LNCaP-AR异种移植瘤的完好雄性小鼠的生物分布曲线。共同给予携带肿瘤的小鼠^{89}Zr-5A10和过量5A10(1mg/小鼠)，并在注射后24h将其处死并且收集用于生物分布研究的血液和组织。数据以平均％ID/g±一个标准偏差报告。*表示与单独的示踪剂比较在给予未标记5A10的动物中^{89}Zr-5A10的瘤内摄取P<0.01。

[0021] 图6显示了注射^{89}Zr-IgG的携带LNCaP-AR异种移植瘤的完好雄性小鼠的生物分布曲线。给予携带肿瘤的小鼠^{89}Zr-IgG，并在注射后的指定时间将其处死并且收集用于生物分布研究的血液和组织。数据以平均％ID/g±一个标准偏差表示。

[0022] 图7显示了注射^{89}Zr-5A10的携带LNCaP-AR、PC3或CWR22Rv1异种移植瘤的完好雄性小鼠的生物分布曲线。给予携带肿瘤的小鼠^{89}Zr-5A10，并在注射后24h将其处死并且收集用于生物分布研究的血液和组织。数据以平均％ID/g±一个标准偏差报告。

[0023] 图8显示了注射^{89}Zr-5A10的具有或不具有皮下睾酮颗粒的携带LNCaP-AR异种移植瘤的去势雄性小鼠的生物分布曲线。手术植入睾酮颗粒或无操作(No Tx)六天后，给予携带肿瘤的小鼠^{89}Zr-5A10，并在注射后24h将其处死并且收集用于生物分布研究的血液和组织。数据以平均％ID/g±一个标准偏差报告。*表示与No Tx比较在给予睾酮的动物中^{89}Zr-5A10的瘤内摄取$P<0.01$。

[0024] 图9显示了注射^{89}Zr-5A10的具有或不具有皮下睾酮颗粒的携带CWR22Rv1异种移植瘤的去势雄性小鼠的生物分布曲线。手术植入睾酮颗粒或无操作(No Tx)六天后，给予携带肿瘤的小鼠^{89}Zr-5A10，并在注射后24h将其处死并且收集用于生物分布研究的血液和组织。数据以平均cpm/g±一个标准偏差报告。*表示与No Tx比较在给予睾酮的动物中^{89}Zr-5A10的瘤内摄取$P<0.05$。

[0025] 图10显示了89Zr-5A10在体内对雄激素受体(“AR”)药理学抑制的检测。图10a显示了携带LNCaP-AR异种移植瘤的去势雄性小鼠的生物分布数据，图中显示MDV3100抑制^{89}Zr-5A10对肿瘤的定位。连续7d给予动物赋形剂或指定剂量的MDV3100，并在第7天时注射^{89}Zr-5A10，p.i.24h后收集用于生物分布研究的动物。*表示与赋形剂或10mg/kg MDV3100比较40mg/kg和80mg/kg剂量的MDV3100的$P<0.01$。图10b显示了携带LNCaP-AR异种移植瘤的完好雄性小鼠右侧面的代表性横断面(Trans.)和冠状PET切片，经过s.c.睾酮颗粒，或者连续7天每日灌胃给予赋形剂或MDV3100(80mg/kg)处理，再p.i.^{89}Zr-5A10 24h后成像。组间可见与肿瘤结合的^{89}Zr-5A10存在明显的肉眼可见差异。箭头表示肿瘤(T)和小鼠肝脏(L)的位置。在图10c中，对PET研究中肿瘤目的区域进行分析的结果显示，与肿瘤结合的^{89}Zr-5A10出现了统计学上的显著变化。*表示与赋形剂比较$P<0.01$。误差线表示平均值的标准偏差。

[0026] 图11显示了给予赋形剂或MDV3100，并且注射^{89}Zr-5A10的携带LNCaP-AR异种移植瘤的去势雄性小鼠的生物分布曲线。给予携带肿瘤的去势雄性小鼠赋形剂，或指定剂量的MDV3100(每日灌胃给药)。在第6天时，注射给予小鼠^{89}Zr-5A10，并在注射24h后，将其处死并收集用于生物分布研究的血液和组织。数据以平均值％ID/g±一个标准偏差的形式报告。*表示与赋形剂比较MDV3100 40mg/kg和80mg/kg的$P<0.01$。40and 80mg/kg剂量的MDV3100与10mg/kg剂量的MDV3100比较$P<0.05$。

[0027] 图12显示了小鼠在左侧胫骨接种LNCaP-AR的典型生物发光图像。将完好的雄性小鼠在左侧胫骨接种LNCaP-AR，利用生物发光监测进展，并且通过MRI和血清PSA分析(见正文)对肿瘤的进展进行确证。显示了在接种5周后一群携带肿瘤小鼠的典型图像。这些动物患有经确证的疾病。

[0028] 图13显示了表示肿瘤侵入骨的典型MRI。将完好的雄性小鼠在左侧胫骨接种LNCaP-AR，并且使用MRI目测检查和血清PSA分析对肿瘤的进展进行确证。左后肢的对比区域(面向MRI切片的右侧)表示肿瘤块局限在红色区域。

[0029] 图14显示了^{89}Zr-5A10特异性靶向体内骨微环境中的前列腺癌。在图14a中，配准的三维、容积重建PET/CT图像显示^{89}Zr-5A10定位于完好雄性小鼠左侧胫骨中的骨LNCaP-AR移植物中。PET数据，以蓝绿色比例尺表示，显示了与右侧(正常)胫骨相比，在动物的左侧(携带肿瘤)的胫骨具有更高的放射性。在图14b中，配准PET/MRI图像显示了通过MRI检测的与肿瘤结合的^{89}Zr-5A10正电子发射共定位的对比度。在图14c中，对完好雄性小鼠胫骨进行骨折处理，并在手术后10天使用18F-NaF评估骨重塑情况。利用PET鉴定骨折的胫骨中对比度清晰的区域。首次成像2天后，同时注射给予动物^{99m}Tc-MDP和^{89}Zr-5A10。SPECT成像显示^{99m}Tc-MDP也定位于骨折愈合区域，这与预期一致。而相反的是，PET成像显示在损伤部位无可检测的^{89}Zr-5A10，这表明与目前在临床上使用的放射性示踪剂相比该试剂对前列腺癌具有更高的特异性。

[0030] 图15显示了表明^{89}Zr-5A10与肿瘤在胫骨中调准的配准PET/MRI切片。将完好的雄性小鼠的左侧胫骨接种LNCaP-AR，并且使用MRI目测检查和血清PSA分析对肿瘤的进展进行确证。在注射^{89}Zr-5A10 24h后采集配准的PET/MRI图像。给出右侧(正常)后肢的图像用于比较。

[0031] 图16显示了给予携带骨LNCaP-AR异种移植瘤的小鼠^{89}Zr-5A10(左图)和^{89}ZrCl(右图)后的组织学和重叠放射自显影，图中显示了^{89}Zr-5A10定位于肿瘤组织，而^{89}ZrCl定位于正常骨。通过组织学(定义为H&E染色)目测检查区分肿瘤组织，在4×下用蓝框标出，在10×下用箭头突出。选定的更高放大倍数的组织区域用黄框标出。

[0032] 图17显示了给予赋形剂或MDV3100，并且注射^{89}Zr-J591的携带LNCaP-AR异种移植瘤的去势雄性小鼠的生物分布曲线。给予携带肿瘤的去势小鼠赋形剂，或者指定剂量的MDV3100(每日灌胃)。在第6天时，注射给予小鼠^{89}Zr-J591，并在注射24h后，将其处死并收集用于生物分布研究的血液和组织。数据以平均%ID/g±一个标准偏差的形式报告。

[0033] 定义

[0034] 动物：如本申请所使用的，术语“动物”指动物界的任意成员。在一些实施方式中，“动物”指任意性别和任意发育阶段的人。在一些实施方式中，“动物”指任意发育阶段的非人动物。在某些实施方式中，所述非人动物是哺乳动物(例如啮齿动物、小鼠、大鼠、家兔、猴、犬、猫、绵羊、牛、灵长类和/或猪)。在一些实施方式中，动物包括，但不限于哺乳动物、鸟类、爬虫类、两栖类、鱼、昆虫和/或蠕虫。在某些实施方式中，所述动物易被HCV感染。在一些实施方式中，动物可以是转基因动物、基因工程动物和/或克隆。

[0035] 拮抗剂：如本申请所使用的，术语“拮抗剂”指试剂i)抑制、减少或降低另一种试剂的作用，例如使受体失活；和/或ii)抑制、减少、降低或推迟一种或多种生物事件，例如活化一种或多种受体或刺激一个或多个生物通路。在特定实施方式中，拮抗剂抑制一种或多种雄激素受体的活化和/或活性。拮抗剂可以是或包括任意化学分类的试剂，包括例如小分子、多肽、核酸、碳水化合物、脂质、金属和/或任意其他显示出相关抑制活性的实体。拮抗剂可以是直接的(在这种情况下其直接影响受体)或间接的(在这种情况下其通过与受体结合以外的方式影响受体，例如改变受体的表达或翻译；改变直接由受体活化的信号转导通路，改变受体激动剂的表达、翻译或活性)。在特定实施方式中，雄激素受体拮抗剂可以选自由小分子拮抗剂(例如RU58642、LG120907、LG105、RD162、MDV3100、BMS-641988、CH5137291、阿彻瑞克酸(ataric acid)、N-丁基苯磺酰胺)、甾体化合物(例如醋酸环丙孕酮)、非甾体化合

物(例如羟基氟他胺、比卡鲁胺、尼鲁米特)、肽拮抗剂及其组合组成的组。或者或此外,在本发明的实施方式中使用的抗雄激素疗法包括但不限于TAK700、ARN-509、卡博替尼(cabozantimib)、伊匹单抗(ipilimumab)、库司替森、BPX-101、阿尔法莱丁(alpharadin)、德尼单抗(denosumab)、Protsvac-VF及其组合。

[0036] 抗体多肽:如本申请所使用的,术语"抗体多肽"或"抗体",或者"其抗原结合片段",其可以互换使用,指能够与表位结合的多肽。在一些实施方式中,抗体多肽是全长抗体,并且在一些实施方式中,其长度小于全长但包括至少一个结合位点(包括至少一个,以及优选地至少两个具有抗体"可变区"结构的序列)。在一些实施方式中,术语"抗体多肽"包括具有与免疫球蛋白结合结构域同源或基本上同源的结合结构域的任意蛋白。在特定实施方式中,"抗体多肽"包括具有结合结构域的多肽,所述结合结构域显示出与免疫球蛋白结合结构域至少99%的一致性。在一些实施方式中,"抗体多肽"是具有结合结构域的任意蛋白,所述结合结构域显示出与免疫球蛋白结合结构域(例如对照免疫球蛋白结合结构域)具有至少70%、80%、85%、90%或95%的一致性。所包括的"抗体多肽"可以具有与天然来源的抗体相同的氨基酸序列。根据本发明的抗体多肽可以采用任意可用的方法制备,包括例如从天然来源或抗体文库中分离、在其中或使用宿主细胞的重组生产、化学合成等或其组合。抗体多肽可以是单克隆的或多克隆的。抗体多肽可以是任意免疫球蛋白类型的成员,包括任意的人源类型:IgG、IgM、IgA、IgD和IgE。在某些实施方式中,抗体可以是IgG免疫球蛋白类型的成员。如本申请所使用的,术语"抗体多肽"或"抗体的特征部分"可以互换使用,指具有与目的表位结合的能力的任意抗体衍生物。在某些实施方式中,"抗体多肽"是保留了全长抗体的特异性结合能力的至少一个显著部分的抗体片段。抗体片段的例子包括但不限于Fab、Fab'、F(ab')2、scFv、Fv、dsFv、双功能抗体和Fd片段。或者或此外,抗体片段可以包括多条连接在一起的链,例如通过二硫键。在一些实施方式中,抗体多肽可以是人源抗体。在一些实施方式中,抗体多肽可以是人源化的。人源化的抗体多肽包括可以是嵌合的免疫球蛋白、免疫球蛋白链或抗体多肽(如Fv、Fab、Fab'、F(ab')2或抗体的其他抗原结合序列),其含有最低限度的来源于非人源免疫球蛋白的序列。在通常情况下,人源化的抗体是接受体的互补性决定区(CDR)残基被非人物种(供体抗体)如具有所需特异性、亲和性和容量的小鼠、大鼠或家兔CDR的残基取代的人源免疫球蛋白(接受体抗体)。在特定实施方式中,根据本发明使用的抗体多肽与fPSA或PSA的特定表位(例如在催化裂隙中)结合;在一些实施方式中,根据本发明使用的抗体多肽对fPSA或PSA的特定表位(例如位于或与催化裂隙邻近)具有特异性。特定的示例性抗体参见Stenman UH等,"Summary report of the TD-3workshop:characterization of 83antibodies against prostate-specific antigen",Tumour Biol.,1999,20:1-12,其通过引用并入本申请。在一些实施方式中,抗体多肽是5A10或4G10单克隆抗体或其抗原结合片段。

[0037] 大约:如本申请所使用的,术语"大约"或"约",应用于一个或多个目的值,指与规定的参考值近似的值。在某些实施方式中,术语"大约"或"约"指任意方向上(高于或低于)落入规定的参考值25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更低范围内的值的范围,除非另有说明或上下文另有明示(除非这样的数值将超出可能值的100%)。

[0038] 生物活性:如本申请所使用的,短语"生物活性"指在生物系统中(例如细胞培养

物，生物体等）具有活性的任意物质的特征。例如，当将某物质给予生物体时对该生物体具有的生物学作用被认为是生物活性。在特定实施方式中，当蛋白或多肽是具有生物活性时，通常将蛋白或多肽中具有至少一种生物活性的蛋白或多肽的一部分称为“生物活性”部分。

[0039] 特征部分：如本申请所使用的，术语物质的“特征部分”在广义上是指在某种程度上与整个物质的序列或结构保持一致性。在某些实施方式中，特征部分具有完好物质的至少一个功能性特征。例如，蛋白或多肽的“特征部分”指含有氨基酸的连续延伸或者氨基酸的连续延伸的集合，其在一起组成了蛋白或多肽的特征。在一些实施方式中，每个这种连续的延伸通常含有至少2、5、10、15、20、50或更多个氨基酸。在通常情况下，除了上文所述的序列和/或结构的一致性以外，物质的特征部分（例如蛋白、抗体等的）指具有相关完好物质至少一个功能性特征；表位结合特异性就是一个例子。在一些实施方式中，特征部分可以是生物活性。

[0040] 联合疗法：术语“联合疗法”，如本申请所使用的，指在重叠的方案中给予用于治疗疾病的两种或多种不同药剂以使得主体同时暴露于至少两种药剂的那些情况。在一些实施方式中，不同的药剂同时给予。在一些实施方式中，一种药剂与至少一种其他药剂重叠给予。在一些实施方式中，不同的药剂按顺序给予以使得所述药剂在主体体内同时发挥生物活性。

[0041] 检测实体：术语“检测实体”如本申请所使用的指有利于检测与之连接的试剂（例如抗体）的任意元素、分子、官能团、化合物、其片段或部分。检测实体的例子包括但不限于：不同的配体、放射性核素（例如^{3}H、^{14}C、^{18}F、^{19}F、^{32}P、^{35}S、^{135}I、^{125}I、^{123}I、^{64}Cu、^{187}Re、^{111}In、^{90}Y、^{99m}Tc、^{177}Lu、^{89}Zr等）、荧光染料（具体的示例性荧光染料，见下文）、化学发光剂（例如吖啶酯、稳定的二氧杂环丁烷等）、生物发光剂、光谱可分辨的无机荧光半导体纳米晶体（即量子点）、金属纳米粒子（例如金、银、铜、铂等）、纳米簇、顺磁性金属离子、酶（酶的特定例子，见下文）、比色分析标记（例如染料、胶体金等）、生物素、地高辛、半抗原和针对其抗血清或单克隆抗体是可用的蛋白。

[0042] 诊断信息：如本申请所使用的，诊断信息或用于诊断的信息是指在确定是否患者患有疾病或状况和/或在将疾病或状况分类至表型类别或对预测疾病或状况或者对所述疾病或状况的可能疗效（一般性治疗或任意特殊的治疗）具有意义的任意类别有用的任意信息。类似地，诊断指提供任意类型的诊断信息，包括但不限于，是否主体可能患有疾病或状况（如前列腺癌）、状态、主体表现出的疾病或状况的阶段或特征、与肿瘤的性质或分类有关的信息、与预后有关的信息和/或用于选择适宜治疗的信息。治疗选择可以包括对特定治疗（例如化疗）剂或其他治疗形式的选择，如手术、放疗等，对是否停止或提供治疗的选择、与给药方案相关的选择（例如一种或多种剂量的特定治疗剂或治疗剂组合的频率或水平）等。

[0043] 剂型：如本申请所使用的，术语“剂型”和“单位剂型”指给予主体的治疗组合物的物理上分离的单位。各单位均含有预计量的活性材料（例如治疗剂如抗-fPSA抗体）。在一些实施方式中，所述预计量在给药方案中作为剂量给予时与理想的疗效相关。本领域的普通技术人员将理解给予特定主体的治疗组合物或药剂的总量由一名或多名主治医师确定，并且可以涉及多个剂型的给药。

[0044] 给药方案：“给药方案”（或“治疗方案”），作为本申请中使用的术语，是指单独给予主体的一组单位剂量（通常多于一个），其通常间隔一段时间。在一些实施方式中，给定的治

疗剂具有推荐的给药方案，其可以涉及一个或多个剂量。在一些实施方式中，给药方案包括多个剂量，其均由相同长度的时间间隔彼此分隔；在一些实施方式中，给药方案包括多个剂量并且至少由两个不同的时间间隔分隔各剂量。在一些实施方式中，当给予患者群体时，给药方案是或者已经与理想的治疗效果具有相关性。

[0045] 表达：如本申请所使用的，核酸序列的“表达”指一个或多个下述事件：(1)来自DNA序列的RNA模板的产生(例如通过转录)；(2)RNA转录本的加工(例如通过剪接、编辑、5’帽形成和/或3’末端形成)；(3)将RNA翻译成多肽或蛋白；和/或(4)多肽或蛋白的翻译后修饰。

[0046] 游离PSA：术语“游离PSA”或“fPSA”，如本申请所使用的，指任意形式的PSA或PSA前体，其不与蛋白酶抑制剂结合，如α1-抗凝乳蛋白酶，并且其紧邻或与前列腺癌细胞或其转移性疾病结合(即不是血清标记物)。

[0047] 功能性：如本申请所使用的，“功能性”生物分子是指以表现出其性质和/或活性的形式的生物分子，该生物分子以该性质和/或活性为特征。生物分子可以具有两种功能(即双功能的)或多种功能(即多功能的)。

[0048] 基因：如本申请所使用的，术语“基因”具有如本领域所公知的含义。在一些实施方式中，术语“基因”可以包括基因调控序列(例如启动子、增强子等)和/或内含子序列。在一些实施方式中，所述术语指不编码蛋白但是编码功能性RNA分子如tRNA、RNAi-诱导剂等的核酸。或者或此外，在多个实施方式中，术语“基因”，如本申请所使用的，指编码蛋白的核酸部分。本领域的普通技术人员根据上下文将清楚是否所述术语包括其他序列(例如非编码序列、调控序列等)。

[0049] 基因产物或表达产物：如本申请所使用的，术语“基因产物”或“表达产物”通常指由基因转录的RNA(前-和/或后-加工)或者由基因转录的RNA编码的多肽(前-和/或后-修饰)。

[0050] 同源性：如本申请所使用的，术语“同源性”指聚合分子之间的总体相关性，例如在多肽分子之间。在一些实施方式中，如果其序列具有至少80％、85％、90％、95％或99％的一致性，则认为聚合分子如抗体彼此之间是“同源的”。在一些实施方式中，如果其序列具有至少80％、85％、90％、95％或99％的相似性，则认为聚合分子彼此之间是“同源的”。

[0051] 标记物：标记物，如本申请所使用的，指其存在或水平表征特定肿瘤或其转移性疾病的试剂。例如，在一些实施方式中，所述术语指表征特定肿瘤、肿瘤亚类、肿瘤阶段等的基因表达产物。或者或此外，在一些实施方式中，特定标记物的存在或水平与特定信号通路的活性(或活性水平)相关，例如其可以表征特定类型的肿瘤。标记物存在或不存在的统计学显著性可以随着特定标记物的不同而改变。在一些实施方式中，标记物的检测具有高度的特异性，其反映了肿瘤是某种特定的亚类的较高概率。这种特异性可能是以灵敏度为代价的(即，即使所述肿瘤是预计表达该标记物的肿瘤，但也可能出现阴性结果)。相反的是，具有较高灵敏度的标记物其特异性可能低于具有较低灵敏度的那些。根据本发明有用的标记物不需要以100％的准确度区分特定亚类的肿瘤。

[0052] 患者：如本申请所使用的，术语“患者”或“主体”指给予或可以给予所提供的组合物的任意生物体，例如用于实验、诊断、预防、美容和/或治疗目的。典型的患者包括动物(例如哺乳动物如小鼠、大鼠、家兔、非人灵长类和/或人)。在一些实施方式中，患者是人。在一些实施方式中，患者罹患或对一种或多种病症或状况易感。在一些实施方式中，患者显示出

病症或状况的一种或多种症状。在一些实施方式中，患者已确诊患有一种或多种病症或状况。在一些实施方式中，所述病症或状况是或包括癌症，或存在一种或多种肿瘤。在一些实施方式中，这种癌症或肿瘤是或包括前列腺癌，或者前列腺肿瘤。在一些实施方式中，所述病症或状况是转移性前列腺癌。

[0053] 肽：术语“肽”指两个或多个氨基酸通过肽键或经修饰的肽键彼此连接。在特定实施方式中，“肽”指具有长度小于约100个氨基酸、小于约50个氨基酸、小于20个氨基酸或者小于10个氨基酸的多肽。

[0054] 药学上可接受的：术语“药学上可接受的”如本申请所使用的指物质在合理的医学判断范围内适宜用于与人类和动物的组织接触，不具有过度的毒性、刺激性、变态反应或者其他问题或并发症，同时具有合理的收益/风险比。

[0055] 多肽：如本申请所使用的，“多肽”一般来说是至少两个氨基酸通过肽键彼此连接的串。在一些实施方式中，多肽可以包括至少3-5个氨基酸，其均通过至少一个肽键的方式与其他氨基酸连接。本领域的普通技术人员将理解多肽有时包括“非天然”的氨基酸或能够任选地整合至多肽链的其他实体。

[0056] 预后和预测性信息：如本申请所使用的，术语预后和预测性信息可以互换使用指在不存在或存在治疗的条件下可以用于指示疾病或状况过程的任意方面的任意信息。这种信息可以包括但不限于患者的平均预期寿命，患者在给定的时间量内存活(例如6个月、1年、5年等)的可能性，患者将被治愈疾病的可能性，患者的疾病将对特定疗法产生应答的可能性(其中可以以任意不同的方式对应答进行定义)。预后和预测性信息包括在诊断信息的大类中。

[0057] 蛋白：如本申请所使用的，术语“蛋白”指多肽(即，至少3-5个氨基酸通过肽键彼此连接的串)。蛋白可以包括氨基酸以外的部分(例如可以是糖蛋白、蛋白聚糖等)和/或可以被另外加工或修饰。在一些实施方式中，“蛋白”可以是在细胞中生产和/或活化的完整多肽(具有或不具有信号序列)；在一些实施方式中，“蛋白”是或包括特征部分如在细胞中生产和/或活化的多肽。在一些实施方式中，蛋白包括一个以上的多肽链。例如，多肽链可以由一个或多个二硫键连接或者通过其他方式连接。在一些实施方式中，如本申请所述的蛋白或多肽可以包含L-氨基酸、D-氨基酸、或其二者，和/或可以包含本领域公知的多种氨基酸修饰或类似物中的任意一种。有用的修饰包括例如末端乙酰化、酰胺化、甲基化等。在一些实施方式中，蛋白或多肽可以包括天然的氨基酸、非天然的氨基酸、合成氨基酸和/或其组合。在一些实施方式中，蛋白是或包括抗体、抗体多肽、抗体片段、其具有生物活性的部分和/或其特征部分。

[0058] 应答：如本申请所使用的，对治疗的应答可以指在主体的状况中发生的任何有益的改变，这种改变是治疗的结果或与治疗相关。这种改变可以包括使状况稳定(例如在没有治疗的情况下阻止可能会发生的恶化)、改善状况的症状和/或改善状况的治疗前景等。其可以指主体的应答或肿瘤的应答。可以根据各种各样的标准测量肿瘤或主体的应答，包括临床标准和客观标准。用于评估应答的技术包括但不限于临床检查、正电子发射断层扫描、胸部X-射线扫描、MRI、超声、内窥镜、腹腔镜、在来自主体的样品中肿瘤标记物的存在情况或水平、细胞学和/或组织学。这些技术中的许多是用来尝试确定肿瘤的大小，或者以其他方式确定总肿瘤负荷。用于评估对治疗产生应答的方法和指导原则在Therasse等，“New

guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors",European Organization for Research and Treatment of Cancer,National Cancer Institute of the United States,National Cancer Institute of Canada,J.Natl.Cancer Inst.,2000,92(3):205-216中进行了讨论。可以以任意适宜的方式选择准确的应答标准,只要当对肿瘤和/或患者的组进行比较时,待比较的组是基于相同或相当的标准来评估以确定应答率的。本领域的普通技术人员将能够选择适宜的标准。

[0059] 样品:如本申请所使用的,来自主体的样品可以包括但不限于以下任一一项或全部:一个或多个细胞,组织、血液、血清、腹水、尿液、唾液以及其他体液、分泌物或排泄物的一部分。术语"样品"还包括来源于通过处理这种样品得到的任意材料。所得到的样品可以包括由样品提取或通过技术如将mRNA扩增或逆转录等对样品进行处理得到的核苷酸分子或多肽。

[0060] 特异性结合:如本申请所使用的,术语"特异性结合"或"针对……具体特异性"或"对……具有特异性"指靶实体(例如靶蛋白或多肽)与结合剂(例如抗体如所提供的抗体)之间的相互作用(通常是非共价的)。如本领域的普通技术人员应理解的,如果在存在其他相互作用的情况下对其具有偏好,则认为相互作用是"特异性的"。在多个实施方式中,相互作用通常依赖于靶分子存在特定结构特征如被结合分子识别的抗原决定簇或表位。例如,如果抗体对表位A具有特异性,在含有游离的标记的A及其抗体的反应中存在含有表位A的多肽或存在游离的未标记A,则将减少与其抗体结合的标记的A的量。应理解特异性不需要是绝对的。例如,本领域技术人员公知,除了存在于靶分子上的那些表位,很多抗体还与其他表位发生交叉反应。这种交叉反应或许是可以接受的,这要视所述待用抗体的应用而定。在特定实施方式中,对fPSA具有特异性的抗体与同蛋白酶抑制剂(例如ACT)结合的PSA具有低于10%的交叉反应性。本领域的普通技术人员将能够选择具有足够高特异性的抗体以在任意给定的应用中适宜的实施该抗体(例如用于检测靶分子、用于治疗目的等)。可以在附加因素的背景下对特异性进行评估如针对所述靶分子结合分子的亲和性对比针对其他靶点(例如竞争物)结合分子的亲和性。如果结合分子显示出针对所需检测的靶分子具有较高的亲和性和针对非靶分子具有较低的亲和性,则认为所述抗体对于免疫诊断将可能是可接受的试剂。一旦在一个或多个背景下建立了结合分子的特异性,它可以用于其他的背景中(优选相似的背景)而无需重新评估其特异性。

[0061] 癌症分期:如本申请所使用的,术语"癌症分期"指对癌症进展水平的定性或定量评估。用于确定癌症分期的标准包括但不限于肿瘤的大小和转移程度(例如局部或远距离)。

[0062] 基本上:如本申请所使用的,术语"基本上"指目的特征或性质显示出全部或接近全部的范围或程度的定性条件。生物领域的普通技术人员将理解生物或化学现象很少,如果有的话,进行完全和/或进行完整或者达到或避免绝对的结果。因此在本申请中使用的术语"基本上"表示多种生物和化学现象中固有的潜在的完整性缺乏。

[0063] 罹患:"罹患"疾病、病症或状况(前列腺癌)的个体指已确诊和/或显示出疾病、病症或状况的一种或多种症状。前列腺肿瘤通常没有症状。在一些实施方式中,个体罹患前列腺癌前列腺肿瘤,但是未显示出前列腺癌的任何症状和/或未被确诊为前列腺癌。在一些实施方式中,罹患前列腺癌的个体指与未患前列腺癌的个体相比与肿瘤结合的或瘤内fPSA或

PSA增加的个体。

[0064] 症状减轻:根据本发明,当一种或多种特定疾病、病症或状况的症状在程度(例如强度、严重程度等)和/或频率上降低时,表示“症状减轻”。出于澄清的目的,特定的发病的推迟被认为是该症状频率降低的一种形式。很多具有较小肿瘤的前列腺癌患者没有症状。本发明并不仅限定于症状消除的情况。本发明具体地涉及使得一种或多种症状减轻的治疗(和主体的状况因此被“改善”),尽管没有将其完全消除。

[0065] 治疗剂:如本申请所使用的,短语“治疗剂”指当给予主体时,具有治疗作用和/或引起所需的生物学和/或药理学作用的任意药剂。

[0066] 治疗有效量:如本申请所使用的,术语“治疗有效量”指赋予所治疗主体治疗作用的治疗性蛋白(例如fPSA抗体)的量,其处于适用于任何药物治疗的合理的收益/风险比。所述治疗作用可以是客观的(即,可以通过某些测试或标记物检测)或主观的(即,由主体给出描述或对作用的感觉)。特别地,“治疗有效量”指治疗性蛋白或组合物有效地治疗、改善或阻止预期的疾病或状况,或显示出可检测的治疗或预防作用的量,如改善与疾病相关的症状、阻止或推迟发病和/或降低疾病症状的严重程度或频率。通常采用可以包含多个剂量单位的给药方案给予治疗有效量。对于任意的特定治疗性蛋白而言,治疗有效量(和/或在有效的给药方案中适宜的单位剂量)是可以改变的,例如其取决于给药途径以及与其他药剂的组合。而且,对于任意特定患者的具体治疗有效量(和/或单位剂量)可能取决于多种因素,包括所治疗的病症和病症的严重程度;所使用的具体药剂的活性;所使用的具体组合;患者的年龄、体重、大致健康状况、性别和饮食;所使用的具体融合蛋白的给药时间、给药途径和/或排泄或代谢速率;治疗持续时间;以及药物领域公知的其他因素。

[0067] 治疗:如本申请所使用的,术语“治疗”(也称为“treat”或“treating”)指使特定疾病、病症和/或状况(例如前列腺癌)的一种或多种症状、特征和/或病因部分或完全减轻、改善、再生、抑制、推迟发病、减轻严重程度和/或降低发生率的任意物质的给予(例如抗-fPSA抗体或AR拮抗剂)。这种治疗可以针对未显示出相关疾病、病症和/或状况的主体和/或针对仅显示出疾病、病症和/或状况的早期征兆的主体。或者或此外,这种治疗可以针对显示出相关疾病、病症和/或状况一种或多种已确定征兆的主体。在一些实施方式中,治疗可以针对已确诊罹患相关疾病、病症和/或状况的主体。在一些实施方式中,治疗可以针对已知具有一种或多种易感因素的主体,所述因素在统计学上与相关疾病、病症和/或状况发展风险的增加具有相关性。

[0068] 某些实施方式的详述

[0069] 临床标记物被频繁地用于诊断前列腺癌以及评估疗效。前列腺癌最普遍的临床标记物是前列腺特异性抗原(“PSA”)。PSA是丝氨酸蛋白酶和蛋白酶的组织激肽释放酶家族的成员。其主要由前列腺导管和腺泡上皮产生并分泌至腔内,其功能为裂解精液凝结物中的精液凝结蛋白I和II。然而,癌症和多种更加良性的状况都改变了前列腺的结构,使得PSA渗漏进入血管周围的空隙并且进入血液中。

[0070] PSA,尽管在前列腺组织中大量表达,但是其在前列腺健康的男性血清中几乎检测不到。出现PSA水平升高通常提示前列腺损伤或疾病。血清PSA以两种形式存在:游离的、催化活性形式和与其他蛋白复合或结合的形式。标准PSA检测测定这两种形式的相对或定量的量,其有助于区分是否导致PSA升高的原因是前列腺癌或某些其他状况。血清PSA检测确

定血液中游离或未复合PSA(“fPSA”)与总PSA(游离加结合PSA)之比。fPSA与总PSA之比较低表明个体事实上患前列腺癌的可能性升高。总血清PSA水平高于10ng/ml也表明根据临床实践指导原则患前列腺癌的几率超过50％。血清PSA水平在4-10ng/ml之间是需要进行前列腺组织活检以确证实际上是否存在癌症的临床指征。

[0071] 尽管如此,即使是更精确水平的血清检测也显示出了显著的局限性,特别是在评估治疗的疗效方面。越是从治疗焦点(即肿瘤)上除去生物标记物或抗原,越是难以评估生物标记物或抗原水平的波动是否是真实的治疗结果或者是表示由干预现象导致的假象。简言之,原因与结果之间的相关性更难以确定。而且,由于所有的血清标记物均与疾病来源是分离的,因此定量水平与疾病的严重程度或进展之间的相关性必然是不完善的。而且,涉及分期、肿瘤特征、痊愈的可能性和治疗评估的信息通常需要更高级的成像或侵入性组织活检。尚无基于血清的标记物能够真实地提供具体的、实时的信息,包括潜在的形态学,其能够来源于瘤内诊断。

[0072] PSA在前列腺的管腔上皮细胞中具有高水平的表达,但在其他组织中不存在或表达水平极低。雄激素通过若干雄激素应答基因调控元件导致PSA的表达增加,并且前列腺癌的发展特别地由雄激素特别是睾酮驱动。因此,对抗雄激素作用的疗法(即抗-雄激素疗法),包括除去产生雄激素的组织,代表了治疗前列腺癌具有吸引力的靶点。传统的抗-雄激素疗法直接作用于雄激素受体以阻止其被雄激素活化而发挥作用。

[0073] PSA远非前列腺癌理想的血清标记物。事实上多种更加良性的状况均能够导致其存在于血清中,这使得出现假阳性结果的风险显著升高。前列腺炎、感染和良性前列腺增生(“BPH”)均能够使血清PSA的水平增加。换言之,实际上尚无特异性针对前列腺癌的血清PSA形式。而且,血清PSA水平不完全与疾病和治疗的疗效相关。例如,事实上在经过一个治疗过程后PSA水平下降一半无关于且并不代表体内癌细胞数量下降一半。检测血清中PSA的能力不仅仅要求PSA的表达,还要求PSA分泌和渗漏至循环中的,而这是两个知之甚少的过程。其他的困难来自仅有极少百分比的肿瘤产生的PSA分泌至血管周围空隙以及进入血清循环的限速步骤尚不明确。

[0074] 标准血清总PSA检测还对检测大部分早期肿瘤缺乏敏感性和特异性并且完全不足以检测来源于前列腺癌的转移性肿瘤。例如,骨是前列腺癌转移扩散最常见的位点,但是对其进行鉴定特别具有挑战性,因为大部分检测技术(例如核医学技术如^{99m}Tc-MDP、^{18}F-NaF)均不能对转移性疾病进行直接成像,但却会靶向附近的正常骨修复。因此,现有的技术不能区分恶性和非恶性疾病。而且,由于对肿瘤导致的骨修复的分辨可能落后于临床应答数月或数年,因此无法对抗-雄激素疗法的应答进行有效的评估。

[0075] 本发明的实施方式涉及基于抗体对通过与肿瘤结合的或瘤内的fPSA对雄激素受体(“AR”)信号进行监测和定量以及基于抗体靶向瘤内fPSA的治疗应用。一个惊人的发现部分地促进了本申请公开的发明,即特异性针对催化裂隙PSA的抗体和抗体多肽选择性地与fPSA结合,其包括和优选地为本申请首次披露的与肿瘤结合的和瘤内的fPSA。催化裂隙特异性抗体与fPSA在肿瘤原位结合的能力能够用于多种诊断和治疗应用。例如,定量地与同肿瘤结合的fPSA结合的标记抗体能够直接在原位监测对抗-雄激素疗法的应答而非间接地通过血清PSA水平监测。成功治疗的结果是AR信号减少(例如通过阻断受体活性的药物化合物),其可以反映在可检测的标记抗体信号的减少。本领域技术人员将理解,本发明的实施

方式适用于阻断雄激素受体或导致凋亡(例如化疗)的任意疗法,以及直接或间接降低AR水平(即,siRNA)的任意治疗。

[0076] 此外,本申请公开的方法具有诊断和治疗扩散性前列腺疾病的能力;即来源于前列腺的癌细胞转移至身体其他器官或组织的转移性疾病。如上文所讨论的,已证实检测、监测和治疗转移性前列腺癌特别困难。例如,手术切除转移的淋巴结,常常无法除去可能存在的全部癌细胞,这极大增加了复发的可能性。而且,目前监测骨转移的方法是完全不适宜的,因为其在正常骨修复附近成像而非直接在肿瘤部位成像,这意味着大部分的扫描无法区分恶性和非恶性疾病(即导致骨重塑的其他疾病)。

[0077] 血清中的PSA主要与血清蛋白酶抑制剂α1-抗凝乳蛋白酶(ACT)共价结合并且将其称为复合的PSA(“cPSA”)。相对较少的部分以非复合的fPSA形式存在。然而,已发现更大比例的fPSA结合在靠近前列腺肿瘤的地方或者甚至结合在肿瘤内部。fPSA包含不同的分子形式,分别为活化的和未活化的PSA。fPSA的亚形式,如本申请所定义的,包括BPSA和原-PSA(“pPSA”)。BPSA与天然的成熟PSA相同,但是在Lys182和Lys145具有两个内部肽键裂隙。其与在内部部分或前列腺“过渡区”的结节增生结合,而癌症通常在外部部分或“外周区”发展。BPSA在前列腺的过渡区升高并且与病理性BPH结合。pPSA与前列腺肿瘤本身结合。这些形式一起代表具有高度疾病特异性的fPSA的个体形式。

[0078] 当与分子成像结合使用时,fPSA在对前列腺癌和扩散性疾病的评估和治疗方面的能力尤为显著。在肿瘤学中的分子成像是对作为人类肿瘤学基础的关键分子和基于分子的事件的非侵入性成像。其能够提供此前无法获得的关于检测,鉴别诊断、指示适合的治疗过程的肿瘤生物学、分期、复发和对治疗的应答的信息。特别是核医学技术其本身就是分子成像。通过放射性检测器,生物分子的放射性示踪剂可以用于检测肿瘤、癌细胞和分化的正常组织的实时生物化学,由此提供关于人肿瘤和组织的定性或定量的生物化学或功能性信息。

[0079] 单克隆抗体技术的发展和改进为分子成像的进步提供了便利。除了其已确立的用于癌症靶向药物的潜在用途以外,单克隆抗体可以用作诊断成像用的疾病特异性造影剂。例如,通过将高灵敏度和分辨率的正电子发射断层成像(“PET”)相机与单克隆抗体组合得到免疫-PET,即PET和单克隆抗体的组合,其是一个有吸引力的、新的选择以改善诊断性肿瘤表征。然而,将理解本申请中披露的概念并非基于任何单一的成像技术。事实上,这是一项变化多端的技术,其适于使用几乎任何的成像参数以推断人肿瘤和组织的定性或定量的生物化学或功能性信息。本公开涵盖的分子成像方法包括γ相机成像、单光子发射计算机断层扫描、正电子发射断层扫描、磁共振波谱、磁共振成像、光学成像(宏观光谱成像)和超声波。

[0080] 免疫-PET相当于全面的体内免疫组化染色,出于此目的必需使用正电子发射体对单克隆抗体进行标记,以使其能够使用PET相机可视化。然而,除了现有的PET示踪剂以外,仍需要开发新一代的基于单克隆抗体的成像探针或新型的放射性示踪剂,目前非肿瘤特异性代谢示踪剂18-氟-2-脱氧-D葡萄糖(^{18}FDG)的使用占全部PET成像程序的>90%。

[0081] 已证实特别地将放射性示踪剂工程化改造使其成功地检测肿瘤是具有挑战性的,结果导致新型放射性示踪剂在临床上具有较高的消耗率。放射性示踪剂的靶点必需以其潜在的使用背景(即,检测、应答指示剂)作为框架,并且候选物的选择通常是基于指示在癌症

中上调的临床前证据。在这一点上，在未透彻理解靶点上调的病理生物学机制的情况下在患者中对新型放射性示踪剂进行适宜地评估可能是具有挑战性的。

[0082] 本发明的特定实施方式在这一点上已经获得了成功，这是通过使用来源于对与肿瘤结合的fPSA具有特异性的适宜标记的抗体的新型放射性示踪剂非侵入性的对前列腺特异的、雄激素受体调节的基因表达和所得到的翻译产物的变化情况进行检测而证实的。本申请公开的放射性示踪剂是雄激素受体依赖性的对前列腺癌细胞具有高度特异性并且能够检测雄激素调节的fPSA表达的增加，这表明其能够反映瘤内的雄激素受体信号。与本领域技术人员公知的成像技术偶联后，本申请公开的新型放射性示踪剂通过对雄激素受体药理学抑制的响应而导致的fPSA合成的改变能够在原位对雄激素受体信号进行定量。而且，所述放射性示踪剂对骨中的转移性前列腺癌肿瘤具有独特的特异性并且其能够清楚地区分真正的骨前列腺癌病灶和骨重塑。

[0083] 本发明的实施方式对雄激素受体信号进行监测和成像的能力适用于广泛的诊断方法。本发明的实施方式能够提供涉及前列腺癌和转移的前列腺癌细胞的诊断信息以及预后和预测性信息。如前所述，监测肿瘤相关雄激素受体信号的能力有助于极其准确地对治疗的疗效进行检测，特别是当使用抗-雄激素治疗时。在这方面的能力，当癌细胞已经出现适应性突变使所述细胞不响应雄激素受体信号时本发明的实施方式能够做出提示。而且，本发明的实施方式能够用于评估癌症的分期和/或对治疗的可能后果提供信息。本发明的实施方式还能够预测是否给定的治疗过程将取得成功。例如，与基线的参考值相比雄激素受体信号水平的升高可能提示抗-雄激素治疗特别积极的过程。

[0084] 还应理解的是，本申请公开的抗-fPSA抗体和抗体多肽与肿瘤结合的特异性和瘤内特异性使得可以将抗-雄激素和抗-癌治疗靶向至表达和/或展示fPSA的细胞。肿瘤相关的fPSA抗体可以与放射性元素、细胞毒性核酸类似物、凋亡诱导剂和目前已知或将被开发的能够对准确递送至特定细胞群有益的潜在的任意疗法偶联。通过仅结合至PSA的催化裂隙，其在血清中被ACT所阻断，本申请公开的fPSA抗体和抗体多肽具有直接将疗法靶向至前列腺特异性肿瘤和前列腺癌细胞(例如前列腺癌来源的转移性骨病)的能力。不被任何特定理论所束缚，据信fPSA以具有蛋白水解活性的整合膜蛋白的形式瞬时存在，然后在细胞外周空隙中瞬时存在，随后其被细胞外结核蛋白(例如ACT)所隔离，该蛋白阻止fPSA被催化裂隙特异性抗体所识别。

[0085] 本发明的实施方式和本申请公开的方法可以包括目前已知的或将被发现的能够特异性与fPSA特别是与肿瘤结合的fPSA结合的任意抗体。如上文所描述的，本发明还涵盖能够与fPSA特异性结合的抗体片段和抗体的特征部分(例如5A10)。选定的抗体和抗体片段可以单独或组合使用。当组合使用时，选定的抗体和抗体片段可以同时或序贯使用。本发明的抗体和抗体片段在给予后约12-48小时与肿瘤的结合达峰，并且在特定的实施方式中为给予后20-30小时内。在特定实施方式中，在给予后约24小时观察到与肿瘤的结合活性达峰。

[0086] 本发明的一些实施方式利用了仅当PSA未被复合时(即未与ACT或其他蛋白结合)能够特异性与PSA表位结合的单克隆或多克隆抗体(或其特征片段)。在本发明的实施方式中使用的抗体可以来自任意种属如人、小鼠、家兔等。如上文所描述的，对在催化裂隙内或其附近(例如邻近)的表位的可达性是fPSA(特别是瘤内或与细胞结合的fPSA)与血清PSA之

间的重要区别特征。在本发明的一些实施方式中，所述表位在催化裂隙内。在本发明的一些实施方式中，所述表位与催化裂隙邻近。在本发明的实施方式中使用的一个这种抗体是5A10，其是特异性识别与fPSA的催化裂隙邻近的表位的小鼠单克隆抗体。

[0087] 5A10是针对精液中的PSA而获得的，并且其表位几乎无法接近与ACT复合的PSA。参见例如Lilja,H.等,Clin.Chem.,1991,37:1618-1625。在本发明的一些实施方式中，所述抗体是4G10。

[0088] 在一些实施方式中，本发明使用的抗体可以与包括fPSA中的氨基酸80-91的线性表位结合，其形成称为激肽释放酶环的一部分。在一些实施方式中，所述抗体与fPSA序列SWGSEPC(在PSA中的氨基酸204-210)结合。该SWG位点形成对fPSA具有特异性的MAb表位的一部分。氨基酸204-207(SWGS)形成凹槽的边缘，其含有与凹槽另一侧的区域80-91对面的PSA活性位点残基。在一些实施方式中，抗体结合fPSA序列HPQKV(在PSA中的氨基酸164-168)，其位于与氨基酸204-207邻近的位置并且可以形成对fPSA具有特异性的单克隆抗体表位的一部分。在一些实施方式中，所述抗体在fPSA的氨基酸164-168的区域结合。在一个特定实施方式中，所述抗体与5A10的氨基酸164-168的区域结合。在一些实施方式中，抗体特异性地与PSA三个不同构象的环中至少一个的残基结合，即氨基酸80-91、164-168和204-207。参见Leinonen,J.等,Clin.Chem.,2002,48(12):2208-2216。

[0089] 基于已公开的PSA表位特征/结构分析对其他fPSA-特异性抗体的开发在本领域普通技术人员能力的范围内并且下面将立即对所述方法进行讨论。示例性的PSA表位的表征参见:Lilja,H.等,Clin.Chem.,1991,37:1618-1625;Pettersson,K.等,Clin.Chem.,1995,41:1480-1488;Piironen,T.,Protein Sci.,1998,7:259-269;和Menez,R.,J.Mol.Biol.,2008,376(4):1021-1033;Leinonen,J.等,Clin.Chem.,2002,48(12):2208-2216,以及Villoutreix B.O.等,Protein Sci.,1994,3:2033-2044,其均通过引用整体并入本申请。

[0090] 人源化的和表面修饰的抗体

[0091] 可以采用本领域技术人员公知的常规方法开发本发明的实施方式中使用的单克隆抗体;杂交瘤技术只是一个例子。参见例如G.Kohler和C.Milstein,Nature,1975,256:495-497。单克隆抗体的生产方案和生产其的细胞系是本领域公知的。参见例如Gerhard等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,1978,75:1510;Monoclonal Antibodies(R.Kennett,T.McKearn,&K.Bechtol eds.1980);Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas(G.Hammerling,U.Hammerling,&J.Kearney eds.1981);Kozbor等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,1982,79:6651;Jonak等,Hybridoma,1983,2:124;Monoclonal Antibodies and Functional Cell Lines(R.Kennett,K.Bechtol,&T.McKearn eds.1983);以及Shulman等,Nature,1982,276:269-270。

[0092] 在某些实施方式中，特别地当使用抗-fPSA抗体用于治疗目的时，人源化的或表面修饰的抗体可以用于降低任意可能的免疫原反应。在通常情况下，人源化的或表面修饰的抗体将限制非人抗体在人受体中治疗应用的持续时间和有效性的不需要的免疫应答降至最低。

[0093] 现有技术中已经描述了多种用于制备包括来源于非人抗体的抗原结合部分的人源化抗体的方法。特别地，具有与人源恒定结构域融合的啮齿动物可变区及其结合的互补性决定区(CDR)的抗体已被描述(参见例如Winter等,Nature,1991,349:293;Lobuglio等,

Proc.Nat.Acad.Sci.USA,1989,86:4220;Shaw等,J.Immunol.,1987,138:4534;以及Brown等,Cancer Res.,1987,47:3577)。在与适宜的人源抗体恒定结构域融合前将啮齿动物CDR移入人源支持性框架区(FR)(例如参见Riechmann等,Nature,1988,332:323;Verhoeyen等,Science,1988,239:1534;以及Jones等,Nature,1986,321:522)以及通过重组的表面修饰的啮齿动物FR支持的啮齿动物CDR也已被描述(参见例如EPO专利公开号519,596)。

[0094] 完全人源的抗体是人患者的治疗特别需要的。可以使用转基因小鼠生产这种抗体,所述转基因小鼠不能表达内源性免疫球蛋白重链和轻链基因,但是其能够表达人源重链和轻链基因(例如,参见Lonberg和Huszar,Int.Rev.Immunol.,1995,13:65-93以及美国专利申请号5,545,806;5,569,825;5,625,126;5,633,425;和5,661,016)。

[0095] 还能够从人源抗体文库中鉴定和分离完全人源的抗体或其抗原结合片段。例如,还能够使用催化裂隙的全部和/或其抗原部分筛选包含理论上多样性的人源抗体(10^{12}种不同的抗体)或其物理上可实施的亚部分的多核苷酸文库的表达产物以鉴定新型的相互作用抗体或片段。示例性的文库包括来自免疫个体的噬菌体展示文库(参见例如Barbas等,J.Mol.Biol.,1993,230:812-823)、生殖细胞序列文库(Griffiths等,EMBO J.,1994,13:3245-3260)以及天然的B-细胞库(Vaughan等,Nature Biotech.,1996,14:309-314)。在特定实施方式中,可以使用来源于罹患前列腺癌的供体的文库。在这种文库中,PSA抗原刺激使得B细胞中mRNA的产生增加,其有助于分离倾向于与PSA结合的重链和轻链可变基因。

[0096] 还可以使用合成文库,在其中生殖细胞抗体基因片段(VH、DH、和JH或Vκ/λ和Jκ/λ)在体外被组合地克隆和排布,以产生编码完整的VH和VL链的重构基因(参见例如Winter,FEBS Letters,1998,430:92-94)。参见例如de Kruif等,J.Mol.Biol.,1995,248:97-105;Griffiths等,EMBO J.,1994,13:3245-3260;Hoogenboom和Winter,J.Mol.Biol.,1992,227:381-388;以及Nissim等,EMBO J.,1994,13:692-698。还可以使用半合成文库,其通过选择一个或多个抗体框架作为支架以及将CDR环中的序列随机化产生。特定文库可以具有重链和/或轻链完全或部分随机化的CDR3高变区(参见例如Huls等,Nat.Biotech.,1999,17:276-281;Knappik等,J.Mol.Biol.,2000,296:57-86)。通常参见Fuh,G.Expert.Opin.Biol.Ther.,2007,7(1):73-87;Kim等,Mol.Cells,2005,20(1):17-29。可以使用噬菌体、酵母、大肠杆菌和核糖体展示技术用于文库筛选。

[0097] 在本发明的方法中还可以使用表面修饰版本的抗-fPSA抗体。表面修饰的过程涉及选择性的使用人源FR残基取代来源于例如鼠源重链或轻链可变区的FR残基以提供包括仍基本上保留了所有天然FR蛋白折叠结构的抗原结合部分的抗体。表面修饰技术基于对抗原结合特性的理解,其主要由对抗原结合表面中的重链和轻链CDR集合的结构和相对配置情况所决定(例如参见Davies等,Ann.Rev.Biochem.,1990,59:439)。因此,仅在人源化抗体中能够保留抗原结合的特异性,其中CDR结构、其彼此间的相互作用以及其与其余可变区结构域的相互作用被仔细的保留。通过使用表面修饰技术,选择性地用人源残基取代免疫系统易于遇到的外部(例如溶剂-易接近的)FR残基以提供含有弱免疫原性或者基本上无免疫原性表面修饰的杂交分子。

[0098] 诊断应用

[0099] 在一些实施方式中,所提供的抗体用于诊断应用。借助本申请公开的抗体对与肿瘤结合的fPSA的特异性,可以将其引入诊断检测以原位监测相对于通过血清PSA的间接方

法不同的多种基于在肿瘤实际位置中的雄激素受体信号的疗法的作用。例如，PSA基因产物的产生受到雄激素受体（“AR”）的正向调节。AR是通过与胞质中的雄激素结合活化的核受体。活化的AR转位至核中，在其中其能够与靶基因调控区的雄激素应答元件结合。这样，阻断或降低雄激素水平或AR活性的前列腺癌治疗反映在雄激素调控基因产物如fPSA的相应减少上。发明人的一些实施方式在原位对这种作用进行了监测。

[0100] 诊断应用还能够检测转移性前列腺癌疾病的存在与否，例如在肝脏、淋巴结或骨中。在通常情况下，本申请提供的fPSA特异性抗体可以在任意前列腺癌相关治疗（例如抗-雄激素治疗）之前、期间或之后给予，以评估与主体特异性基线或来源于患者群体的基线相比治疗对雄激素受体信号的作用。在特定实施方式中，来源于群体的基线值可以包括患者或未罹患前列腺癌的主体群体中fPSA表达或活性的平均或中位雄激素受体信号水平。

[0101] 在某些实施方式中，如下述章节中讨论的，可以通过将检测实体加入所提供的抗体中检测结合情况。在某些实施方式中，本发明的检测技术包括阴性对照，其可以包括将所述检测用于对照样品（例如来自正常的非癌组织），这样可以将来自其的信号与来自待测样品的信号进行比较。

[0102] 在本发明的实施方式中使用的特定诊断技术包括但不限于酶联免疫吸附检测（“ELISA”）、正电子发射断层扫描、Western印迹、免疫组化和磁共振成像。

[0103] 检测实体

[0104] 在一些实施方式中，抗-fPSA特异性抗体用于检测应用。可以使用本申请所述的多功能剂，除了如本申请所描述的所提供的抗体以外，其还包括至少一个检测实体。

[0105] 检测实体可以是在目标组织例如前列腺癌细胞或骨中的fPSA结合后能够检测fPSA抗体或抗体多肽的任意实体。可以使用多种检测剂中的任意一种作为所提供抗体的多功能抗体剂中的检测实体（例如标记部分）。检测实体可以直接检测或间接检测。检测实体的例子包括但不限于：各种配体、放射性核素（例如^{3}H、^{14}C、^{18}F、^{19}F、^{32}P、^{35}S、^{135}I、^{125}I、^{123}I、^{64}Cu、^{187}Re、^{111}In、^{90}Y、^{99m}Tc、^{177}Lu、^{89}Zr等）、荧光染料（具体的示例性荧光染料，见下文）、化学发光剂（例如吖啶酯、稳定的二氧杂环丁烷等）、生物发光剂、光谱可分辨的无机荧光半导体纳米晶体（即量子点）、金属纳米粒子（例如金、银、铜、铂等）纳米簇、顺磁性金属离子、酶（酶的特定例子，见下文）、比色分析标记（例如染料、胶体金等）、生物素、地高辛、半抗原和针对其抗血清或单克隆抗体是可用的蛋白。

[0106] 在某些实施方式中，检测实体包括荧光标记。具有多种化学结构和物理特性的多种已知荧光标记部分均适用于本发明。适宜的荧光染料包括但不限于荧光素和荧光染料（例如荧光素异硫氰酸酯或FITC、萘荧光素、4',5'-二氯-2',7'-二甲氧基荧光素、β羧基荧光素或FAM等）、羰花青、部花青、苯乙烯基染料、氧杂菁染料、藻红素、赤藓红、曙红、罗丹明染料（例如羧基四甲基-罗丹明或TAMRA、羧基罗丹明6G、羧基-X-罗丹明（ROX）、丽丝胺罗丹明B、罗丹明6G、罗丹明绿、罗丹明红、四甲基罗丹明（TMR）等）、香豆素和香豆素染料（例如甲氧基香豆素、二烷基氨基香豆素、羟基香豆素、氨基甲基香豆素（AMCA）等）、俄勒冈绿染料（例如俄勒冈绿488、俄勒冈绿500、俄勒冈绿514等）、德克萨斯红、德克萨斯红-X、光谱红™、光谱绿™、花青染料（例如Cy-3™、Cy-5™、Cy-3.5™、Cy-5.5™等）、Alexa Fluor染料（例如Alexa Fluor 350、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 532、Alexa Fluor 546、Alexa Fluor 568、Alexa Fluor 594、Alexa Fluor 633、Alexa Fluor 660、Alexa Fluor 680等）、BODIPY

染料(例如BODIPY FL、BODIPY R6G、BODIPY TMR、BODIPY TR、BODIPY 530/550、BODIPY 558/568、BODIPY 564/570、BODIPY 576/589、BODIPY 581/591、BODIPY 630/650、BODIPY 650/665等)、IRDyes(例如IRD40、IRD 700、IRD 800等)等等。适宜的荧光染料以及将荧光染料与其他化学实体如蛋白和肽偶联的方法的更多例子参见例如"The Handbook of Fluorescent Probes and Research Products",9111Ed.,Molecular Probes,Inc.,Eugene,OR。

[0107] 荧光标记剂试剂有利的性质包括具有较高的摩尔吸光系数、较高的荧光量子产率和光稳定性。在某些实施方式中,标记荧光团在可见光(即在400和750nm之间)范围内显示出所需的吸收和发射波长而非在光谱的紫外范围内(即低于400nm)。

[0108] 在某些实施方式中,检测实体包括酶。适宜的酶的例子包括但不限于那些在ELISA中使用的,例如辣根过氧化物酶、β-半乳糖苷酶、荧光素酶、碱性磷酸酶等。其他例子包括β-葡萄糖醛酸苷酶、β-D-葡萄糖苷酶、脲酶、葡萄糖氧化酶等。可以使用接头基团如碳二亚胺、二异氰酸酯、戊二醛等将酶与靶实体(例如氯毒素部分)偶联。对适宜接头更详细的描述参见本申请的其他部分。

[0109] 在某些实施方式中,检测实体包括放射性同位素,其可以被单光子发射计算机断层成像(SPECT)或位置发射断层成像(PET)所检测。PET的高分辨率和定量成像特别适用于本发明的某些实施方式。这种放射性核素的例子包括但不限于锆-89(^{89}Zr)、碘-124(^{124}I)、碘-131(^{131}I)、碘-125(^{125}I)、铋-212(^{212}Bi)、铋-213(^{213}Bi)、砹-221(^{211}At)、铜-67(^{67}Cu)、铜-64(^{64}Cu)、铼-186(^{186}Re)、铼-186(^{188}Re)、磷-32(^{32}P)、钐-153(^{153}Sm)、镥-177(^{117}Lu)、锝-99m(^{99m}Tc)、镓-67(^{67}Ga)、铟-I 1 1(^{111}In)和铊-201(^{201}Tl)。用于生产和使用^{89}Zr-标记的单克隆抗体的特定程序参见Verel,I.等,"^{89}Zr-Immuno-PET:Comprehensive Procedures for the Production of ^{89}Zr-Labeled Monoclonal Antibodies",J.Nucl.Med.2003;44:1271-1281,其通过引用并入本申请。

[0110] 在某些实施方式中,标记部分包括可以被γ照相机检测的放射性同位素。这种放射性同位素的例子包括但不限于碘-131(^{131}I)和锝-99m(^{99m}Tc)。

[0111] 在某些实施方式中,检测实体包括顺磁性金属离子,其是磁共振成像(MRI)良好的对比度增强剂。这种顺磁性金属离子的例子包括但不限于钆III(Gd3+)、铬III(Cr3+)、镝III(Dy3+)、铁III(Fe3+)、锰II(Mn2+)和镱III(Yb3+)。在某些实施方式中,检测实体包括钆III(Gd3+)。钆是经FDA认证的用于MRI的造影剂,其累积在异常组织中使得这些异常区域在磁共振成像中变得非常明亮(增强)。已知钆在机体不同区域的正常和异常组织之间提供了极大的对比,特别是在脑中。

[0112] 在某些实施方式中,标记部分包括可以被核磁共振光谱(MRS)检测的稳定的顺磁性同位素。适宜的稳定的顺磁性同位素的例子包括但不限于碳-13(^{13}C)和氟-19(^{19}F)。

[0113] 药物组合物

[0114] 本发明还提供了一种包括一种或多种所提供的抗体或其片段或特征部分的组合物。在一些实施方式中,本发明提供了至少一种抗体和至少一种药学上可接受的赋形剂。这种药物组合物可以任选地包括和/或与一种或多种其他治疗性或生物活性物质组合给予。在一些实施方式中,所提供的药物组合物用于药物或药物的生产。在一些实施方式中,所提供的药物组合物用于在前列腺癌及其转移的治疗或预防中的预防剂(即疫苗)。在一些实施方式中,所提供的药物组合物用于治疗应用,例如在罹患前列腺癌的个体中;例如作为能够

特异性靶向细胞毒剂或阻断雄激素受体信号的化合物的递送载体。在一些实施方式中，所述药物组合物同时用于诊断应用和治疗应用。在一些实施方式中，将药物组合物制剂用于给予人类。在一些实施方式中，所述药物组合物包括与本申请所定义的抗癌剂组合或偶联的抗-fPSA抗体。

[0115] 例如，可以以无菌可注射形式提供药物组合物(例如适于皮下注射或静脉输注的形式)。在一些实施方式中，以适于注射的液体剂型提供药物组合物。在一些实施方式中，以粉剂提供药物组合物(例如冻干和/或灭菌)，任选地在真空条件下，在注射前使用水性稀释剂(例如水、缓冲剂、盐溶液等)将其复溶。在一些实施方式中，在水、氯化钠溶液、醋酸钠溶液、苯甲醇溶液、磷酸盐缓冲液等溶液中将药物组合物稀释和/或复溶。在一些实施方式中，应将粉剂轻柔地与水性稀释剂混合(例如不能振摇)。

[0116] 在一些实施方式中，所提供的药物组合物包括一种或多种药学上可接受的赋形剂(例如防腐剂、惰性稀释剂、分散剂、表面活性剂和/或乳化剂、缓冲剂等)。在一些实施方式中，药物组合物包括一种或多种防腐剂。在一些实施方式中，药物组合物不包括防腐剂。

[0117] 在一些实施方式中，药物组合物以可以冷藏和/或冷冻的形式提供。在一些实施方式中，药物组合物以不能冷藏和/或冷冻的形式提供。在一些实施方式中，复溶的溶液和/或液体剂型可以在复溶后贮存一段时间(例如2小时、12小时、24小时、2天、5天、7天、10天、2周、1个月、2个月或更长时间)。在一些实施方式中，抗体组合物的贮存时间长于指定时间导致了抗体降解。

[0118] 液体剂型和/或复溶溶液可以包括颗粒物质和/或给药前变色。在一些实施方式中，如果出现变色或混浊和/或如果过滤后仍存在颗粒物质，则不应使用溶液。

[0119] 本申请所述的药物组合物可以采用药理学领域已知的或此后开发的任意方法制备。在一些实施方式中，这种制备方法包括将活性成分加入一种或多种赋形剂和/或一种或多种其他辅助成分使之结合的步骤，然后如有必要和/或需要，将产品成型和/或包装成所需的单一或多剂量单位。

[0120] 可以将根据本发明的药物组合物以单一单位剂量和/或多个单一单位剂量的形式制备、包装和/或总包销售，。如本申请所使用的，“单位剂量”指不连续量的包括预计量活性成分的药物组合物；例如抗-fPSA抗体和抗-雄激素疗法。活性成分的量通常等于将给予主体的剂量和/或等于这种剂量便于计算拆分的一部分，例如这种剂量的二分之一或三分之一。

[0121] 可以改变根据本发明的药物组合物中活性成分、药学上可接受的赋形剂和/或任意其他成分的相对量，依据所治疗主体的鉴别、体型和/或状况和/或待给予组合物的给药途径。例如，所述组合物可以包括0.1％至100％(w/w)之间的活性成分。

[0122] 本发明的药物组合物还可以包括药学上可接受的赋形剂，其如本申请所使用的可以是或包括溶剂、分散介质、稀释剂或其他液体溶剂、分散或混悬助剂、表面活性剂、等张剂、增稠或乳化剂、防腐剂、固体粘合剂、润滑剂等，以适于所需的特定剂型。Remington's The Science and Practice of Pharmacy第21版，A.R.Gennaro(Lippincott,Williams& Wilkins,Baltimore,MD,2006)中公开了用于将药物组合物制剂的多种赋形剂以及用于制备其的公知技术。除了与原料药或其衍生物不相容的任意常规赋形剂以外，如产生任意不良的生物效应或以有害方式与药物组合物的任意其他成分相互作用，可以将任意常规赋形

剂包含在本发明的范围内。

[0123] 一般的偶联物

[0124] 本申请所述的多功能剂包括多种实体，其均具有至少一种功能(例如与化疗剂偶联的对在fPSA的催化裂隙中或其附近的表位具有特异性的单克隆抗体)。所涉及的多功能剂的某些实施方式包括靶向实体和至少一种下述实体：检测实体、治疗实体和诊断实体。在一些实施方式中，多功能剂包括抗-fPSA抗体，其包含靶向实体和治疗实体但不包含检测实体。在一些实施方式中，多功能剂包括抗-fPSA抗体，其包含靶向实体和检测实体但不包含治疗实体。在一些实施方式中，本发明的多功能剂包括靶向实体、治疗实体和检测实体。在一些实施方式中，药剂的实体可以彼此间偶联。不同实体偶联以形成多功能剂不限于特定的偶联方式。例如，两种实体可以直接彼此间共价偶联。或者，两种实体可以间接彼此间共价偶联，如通过接头实体。在一些实施方式中，多功能剂可以包括在所述试剂中不同类型的偶联，以使得所述试剂的一些实体直接偶联而所述试剂的其他实体通过一个或多个接头间接偶联。在一些实施方式中，本发明的多功能剂包括单一类型的接头实体。在其他实施方式中，本发明的多功能剂包括一种以上类型的接头实体。在一些实施方式中，多功能剂包括不同长度单一类型的接头实体。

[0125] 在一些实施方式中，在多功能剂中包括实体之间的共价连接。本领域技术人员将理解，所述部分彼此之间可以直接或间接地连接(例如通过接头，如下文所述)。

[0126] 在一些实施方式中，其中多功能剂的一个实体(如靶向实体)和另一个实体彼此间直接共价连接，如可以通过键直接共价偶联(例如接头或接头实体)，如酰胺、酯、碳-碳、二硫、氨基甲酸酯、醚、硫醚、脲、胺或碳酸盐键。可以通过利用多功能剂的第一个实体和/或第二个实体上存在的官能团完成共价偶联。或者，可以使用另一个氨基酸取代非关键氨基酸以引入用于偶联目的的有用基团(如氨基、羧基或巯基)。或者，可以在多功能剂的至少一个实体上添加氨基以引入用于偶联目的的有用基团(如氨基、羧基或巯基)。能够用于将部分连接在一起的适宜官能团包括但不限于胺、酸酐、羟基、羧基、巯基等。可以使用活化剂如碳二亚胺以形成直接的键。多种活化剂是本领域公知的并且适于将一个实体与另一个实体偶联。

[0127] 在其他实施方式中，本发明涵盖的多功能剂实体通过接头基团间接地共价连接。还可以将这种接头基团称为接头或连接实体。可以使用本领域公知的任意数量稳定的双功能剂实现这一目的，包括同功能和异功能剂(这种试剂的例子，参见例如Pierce Catalog and Handbook)。双功能接头与活化剂的作用不同，前者使得在所得到的偶联物(剂)中含有连接部分，而后者通过反应将两部分直接偶联。双功能接头的作用为可以使两个其他的惰性部分之间反应。或者或此外，可以对成为反应产物一部分的双功能接头进行选择以使其对抗-fPSA抗体具有某种程度的构象柔性(例如包括含有若干原子的直链烷基的双功能接头，例如含有2和10个之间碳原子的直连烷基)。或者或此外，可以对双功能接头进行选择以使得在所提供的抗体与治疗剂之间形成的键是可裂解的，例如可水解的(这种接头的例子，参见例如美国专利号5,773,001；5,739,116和5,877,296，其均通过引用整体并入本申请)。例如，当在偶联物水解后观察到更高活性的某些实体如靶向剂(例如所提供的fPSA特异性抗体)和/或治疗实体时，可以使用这种接头。实体可以从多功能剂中裂解出来的示例性机制包括溶酶体在酸性pH下水解(腙、缩醛和顺式乌头酸样酰胺)、肽通过溶酶体酶的裂解(组

织蛋白酶(capthepins)和其他溶酶体酶)和二硫键的还原。使这种实体从多功能剂中裂解出来的另一种机制包括在生理pH下的细胞外或细胞内水解。当将一种实体与另一种实体偶联使用的交联剂是生物可降解的/生物蚀解的组分如葡聚糖等时适用这种机制。

[0128] 例如,可以通过引入羰基基团制备含腙的多功能剂,羰基基团提供所需的释放性质。还可以制备具有接头的多功能剂,所述接头包括在一端具有二硫基和在另一端具有肼衍生物的烷基链。含有腙以外官能团的接头也具有在溶酶体的酸性环境中被裂解的可能。例如,可以由巯基反应性接头制备多功能剂,其包括腙以外的在胞内裂解的基团,如酯、酰胺和缩醛/缩酮。

[0129] pH敏感性接头分类的另一个例子是顺式乌头酸,其具有与酰胺基紧邻的羧酸基团。羧酸在酸性溶酶体中加速酰胺水解。还能够使用若干其他结构类型的达到相似类型水解速率加速的接头。

[0130] 抗-fPSA抗体偶联物的另一种可能的释放方法是通过溶酶体酶使肽酶解。在一个例子中,所提供的抗体通过酰胺键与对-氨基苯甲醇连接,然后在苯甲醇与治疗剂之间形成氨基甲酸酯或碳酸酯。肽的裂解使得氨基苯甲基氨基甲酸酯或氨基苯甲基碳酸酯脱落,并释放治疗剂。在另一个例子中,可以通过从接头上裂解脱落酚代替氨基甲酸酯。在另一个变化中,使用还原二硫键使得对-巯基氨基甲酸苯甲酯或对-巯基苯甲基碳酸酯脱落。

[0131] 本申请中提供的可以作为多功能剂的连接实体的有用的接头包括但不限于:聚乙二醇、乙二醇的共聚物、聚丙二醇、丙二醇的共聚物、羧甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、聚-1,3-二氧戊环、聚-1,3,6-三聚甲醛、乙烯/马来酸酐共聚物、聚氨基酸、葡聚糖n-乙烯基吡咯烷酮、聚n-乙烯基吡咯烷酮、丙二醇均聚物、环氧丙烷聚合物、环氧乙烷聚合物、聚氧乙烯多元醇、聚乙烯醇、直链或支链的糖基化的链、聚缩醛、长链脂肪酸、长链疏水性脂肪基。

[0132] 本发明的一些实施方式利用包括至少一种非共价结合的实体的多功能剂。非共价相互作用的例子包括但不限于疏水性相互作用、静电相互作用、偶极相互作用、范德华相互作用和氢键键合。不考虑结合、相互作用或偶联的性质,第一实体和第二实体的结合,在一些实施方式中,具有足够的选择性、特异性和强度,以使得在所述试剂中含有的第二实体在转运/递送至和进入靶点之前或之中不会与第一实体分离。因此,可以采用本领域技术人员公知的任意化学、生化、酶学或遗传偶联实现多功能剂中的多功能实体之间的结合。

[0133] 治疗性偶联物

[0134] 如本申请所述的,抗-fPSA抗体可以包括具有与前列腺癌相关的治疗用途的多功能剂部分。在本公开的背景下治疗用途的例子包括但不限于与靶向相关的用途(例如fPSA特异性单克隆抗体)、与治疗作用相关的用途(例如细胞毒性和/或细胞生长抑制作用、抗-增殖作用、抗血管生成作用、减轻症状等)和与诊断、检测或标记相关的用途等。

[0135] 靶向实体是能够包括在试剂中的分子结构,其通过与目的靶点特异性的相互作用或对其具有亲和性影响或控制作用位点。作为一个例子,靶点可以是存在于细胞表面的分子或分子复合物,例如某些细胞类型、组织等。在本发明的一些实施方式中,所述靶点是与肿瘤结合的或瘤内的fPSA并且所述靶向实体是抗-fPSA抗体。本申请公开的抗-fPSA靶向实体可以凭借其与仅在未复合的PSA中的表位的亲和性特别地或优选地与fPSA相互作用。针对试剂如治疗剂靶向部分的使用是本领域公知的。在本申请的背景下,原发性或转移性前列腺癌细胞是所述靶点。也就是说,在分子水平,靶点是存在(例如优选地表达)于前列腺癌

细胞上的分子或细胞成分，以使得其能够在接触后特异性地或优选地与抗-fPSA抗体结合。本发明的抗-fPSA抗体对其靶点(例如前列腺癌细胞的fPSA)显示出特异性并且能够定位于并与靶点结合。在一些实施方式中，抗-fPSA抗体靶向实体定位于前列腺癌细胞并且保持在一段时间内与之结合。在一些实施方式中，所述fPSA靶点在瘤内和/或是整合的膜蛋白。

[0136] 在一些实施方式中，所述抗-fPSA抗体是包括fPSA靶向实体的多功能剂，其基本上由与一种或多种抗癌剂偶联的fPSA特异性抗体或其抗原结合片段组成。在这种实施方式中，因此，所述多功能剂是抗体偶联物。下文中还提供了可以用于诊断或评估前列腺癌、治疗前列腺癌和生产前列腺癌药物的有用的抗-fPSA抗体偶联物的非限制性实施方式。

[0137] 在一些实施方式中，将抗-fPSA抗体与用作治疗(例如抗癌)剂的核酸分子偶联。多种化学类型和结构形式的核酸能够适用于这样的策略。这些包括，通过非限制性的例子，DNA包括单链(ssDNA)和双链(dsDNA)；RNA包括但不限于ssRNA、dsRNA、tRNA、mRNA、rRNA、酶促RNA；RNA:DNA杂交体、三链DNA(例如与短的寡核苷酸结合的dsDNA)等。

[0138] 在一些实施方式中，所述核酸剂在约5至2000个核苷酸长度之间。在一些实施方式中，所述核酸剂是至少约6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50或更长的核苷酸长度。在一些实施方式中，所述核酸剂是少于约2000、1900、1800、1700、1600、1500、1400、1300、1200、1100、1000、900、800、700、600、500、450、400、350、300、250、200、150、100、50、45、40、35、30、25、20或更短的核苷酸长度。

[0139] 在一些实施方式中，所述核酸剂包括调控转录的启动子和/或其他序列。这样的实施方式可以包括例如与雄激素应答元件对应的核苷酸序列(例如PSA雄激素应答元件AGCACT TGC TGTTCT(SEQ ID NO:1))，因此其可以充当诱饵与活化的AR结合。在一些实施方式中，所述核酸剂包括复制起点和/或调控复制的其他序列。在一些实施方式中，所述核酸剂不包括启动子和/或复制起点。

[0140] 用于本发明实践的核酸抗癌剂包括靶向与肿瘤发生和细胞生长或细胞转化相关的基因(例如原癌基因，其编码刺激细胞分化的蛋白)、血管生成/抗-血管生成基因、肿瘤抑制基因(其编码抑制细胞分化的蛋白)、编码与肿瘤生长和/或肿瘤迁移相关蛋白的基因和自杀基因(其诱导凋亡或其他形式的细胞死亡)，特别是在快速分化的细胞中最活跃的自杀基因的那些药剂。

[0141] 与肿瘤发生和/或细胞转化相关的基因的例子包括雄激素受体基因、MLL融合基因、BCR-ABL、TEL-AML1、EWS-FLI1、TLS-FUS、PAX3-FKHR、Bcl-2、AML1-ETO、AML1-MTG8、Ras、Fos PDGF、RET、APC、NF-1、Rb、p53、MDM2等；过表达的基因如多药耐药性基因；细胞周期蛋白；β-连环蛋白；端粒酶基因；c-myc、n-myc、Bcl-2、Erb-B1和Erb-B2；以及突变的基因如Ras、Mos、Raf和Met。肿瘤抑制基因的例子包括但不限于p53、p21、RB1、WT1、NF1、VHL、APC、DAP激酶、p16、ARF、神经纤维瘤蛋白和PTEN。能够被在抗癌疗法中使用的核酸剂靶向的基因的例子包括编码与肿瘤迁移相关蛋白的基因如整合素、选择素和金属蛋白酶；编码促进新血管生成的蛋白的抗血管生成基因如血管内皮生长因子(VEGF)或VEGFr；编码抑制新生血管生成的蛋白的抗血管生成基因如内皮抑素、血管抑素和VEGF-R2；以及编码蛋白如白介素、干扰素、成纤维细胞生长因子(α-FGF和β-FGF)、胰岛素样生长因子(例如IGF-1和IGF-2)、血小板衍生生长因子(PDGF)、肿瘤坏死因子(TNF)、转化生长因子(例如TGF-α和TGF-β)、

表皮生长因子(EGF)、角化细胞生长因子(KGF)、干细胞因子及其受体c-Kit(SCF/c-Kit)配体、CD40L/CD40、VLA-4VCAM-1、ICAM-1/LFA-1、透明质酸酶hyalurin/CD44等的基因。

[0142] 适于与抗-fPSA抗体偶联的核酸剂可以具有任意多种用途包括例如用作抗癌或其他治疗剂、探针、引物等。核酸剂可以具有酶活性(例如核酶活性)、基因表达抑制活性(例如作为反义或siRNA剂等)和/或其他活性。核酸剂可以是本身具有活性或可以是递送活性核酸剂的载体(例如通过所递送核酸的复制和/或转录)。对于本说明书的目的来说,如果其编码或以其他方式递送治疗活性剂,即使其本身不具有治疗活性,则认为这种载体核酸是"治疗剂"。

[0143] 在某些实施方式中,抗-fPSA抗体的偶联物包括包含或编码反义化合物的核酸治疗剂。术语"反义化合物或药剂"、"反义寡聚体"、"反义寡核苷酸"和"反义寡核苷酸类似物"在本申请中互换使用,并且指核苷酸碱基的序列以及亚单位与亚单位骨架,其允许反义化合物与RNA中的靶序列通过Watson-Crick碱基配对方式杂交以在靶序列中形成RNA寡聚物异源双链。所述寡聚物可以在靶序列中具有精确的序列互补性或近似互补性。这种反义寡聚物可以阻止或抑制含有靶序列的mRNA的翻译,或抑制基因转录。反义寡聚物可以与双链或单链序列结合。

[0144] 适于在本发明的实践中使用的反义寡核苷酸的例子包括例如在下述综述中提到的那些:R.A Stahel等,Lung Cancer,2003,41:S81-S88;K.F.Pirollo等,Pharmacol.Ther.,2003,99:55-77;A.C.Stephens和R.P.Rivers,Curr.Opin.Mol.Ther.,2003,5:118-122;N.M.Dean和C.F.Bennett,Oncogene,2003,22:9087-9096;N.Schiavone等,Curr.Pharm.Des.,2004,10:769-784;L.Vidal等,Eur.J.Cancer,2005,41:2812-2818;T.Aboul-Fadl,Curr.Med.Chem.,2005,12:2193-2214;M.E.Gleave和B.P.Monia,Nat.Rev.Cancer,2005,5:468-479;Y.S.Cho-Chung,Curr.Pharm.Des.,2005,11:2811-2823;E.Rayburn等,Lett.Drug Design&Discov.,2005,2:1-18;E.R.Rayburn等,Expert Opin.Emerg.Drugs,2006,11:337-352;I.Tamm和M.Wagner,Mol.Biotechnol.,2006,33:221-238(其均通过引用整体并入本申请)。

[0145] 适宜的反义寡核苷酸的例子包括EZN-4176,其是基于核酸的下调AR mRNA的反义寡核苷酸(Zhang,Y.等,Mol.Cancer Therapeutics,2011,10:2309);AR寡聚脱氧核苷酸,其抑制LNCaP前列腺肿瘤细胞的细胞生长(Eder,I.E.等,Nature,2000,7(7):997-1008);以及奥利默森钠(也称为G31239,由Genta,Inc.,Berkeley Heights,NJ研发),其是靶向bcl-2mRNA起始编码区的磷硫酰寡聚物。Bc1-2是凋亡的有效抑制剂并且在多种癌症中过表达,包括滤泡性淋巴瘤、乳腺癌、结肠癌、前列腺癌和中/高分级淋巴瘤(C.A.Stein等,Semin.Oncol.,2005,32:563-573;S.R.Frankel,Semin.Oncol.,2003,30:300-304)。其他适宜的反义寡核苷酸包括GEM-231(HYB0165,Hybridon,Inc.,Cambridge,MA),其是直接针对cAMP依赖性蛋白激酶A(PKA)的混合骨架寡核苷酸(S.Goel等,Clin.Cancer Res.,2003,9:4069-4076);Affinitak(ISIS 3521或阿普卡生,ISIS pharmaceuticals,Inc.,Carlsbad,CA),其是PKC-α的反义抑制剂;OGX-011(Isis 112989,Isis Pharmaceuticals,Inc.),其是针对凝聚素的2'-甲氧乙基修饰的反义寡核苷酸,凝聚素是一种参与调节细胞周期、组织重塑、脂质运输和细胞死亡的糖蛋白,其在乳腺、前列腺和结肠癌症中过表达;ISIS 5132(Isis112989,Isis Pharmaceuticals,Inc.),其是与c-raf-1mRNA的3'-非翻译区序列互补

的磷硫酰寡核苷酸(S.P.Henry等,Anticancer Drug Des.,1997,12:409-420;B.P.Monia等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,1996,93:15481-15484;C.M.Rudin等,Clin.Cancer Res.,2001,7:1214-1220);ISIS 2503(Isis Pharmaceuticals,Inc.),其是人H-ras mRNA表达的磷硫酰寡核苷酸反义抑制剂(J.Kurreck,Eur.J.Biochem.,2003,270:1628-1644);靶向X-连的锁凋亡蛋白抑制剂(XIAP)的寡核苷酸,其阻断凋亡通路中的主要部分,如GEM 640(AEG 35156,Aegera Therapeutics Inc.and Hybridon,Inc.)或靶向存活素,其为凋亡蛋白的抑制剂(IAP),如ISIS 23722(Isis Pharmaceuticals,Inc.),其是2'-O-甲氧乙基嵌合寡核苷酸;MG98,其靶向DNA甲基转移酶;和GTI-2040(Lorus Therapeutics,Inc.Toronto,Canada),其是20-mer的寡核苷酸,与人核糖核苷酸还原酶R2小亚基部分mRNA中的编码区互补。

[0146] 其他适宜的反义寡核苷酸包括针对Her-2/neu、c-Myb、c-Myc和c-Raf研发的反义寡核苷酸(参见例如A.Biroccio等,Oncogene,2003,22:6579-6588;Y.Lee等,Cancer Res.,2003,63:2802-2811;B.Lu等,Cancer Res.,2004,64:2840-2845;K.F.Pirollo等,Pharmacol.Ther.,2003,99:55-77;和A.Rait等,Ann.N.Y.Acad.Sci.,2003,1002:78-89)。

[0147] 在某些实施方式中,抗-fPSA抗体的偶联物包括核酸抗癌剂,其包括或编码干扰RNA分子。术语"干扰RNA"和"干扰RNA分子"在本申请中互换使用,并且指能够以序列特异性方式抑制或下调基因表达或沉默基因的RNA分子,例如通过介导RNA干扰(RNAi)。RNA干扰(RNAi)是一种由双链RNA(dsRNA)触发的进化保守的、具有序列特异性的机制,其诱导互补的靶向单链mRNA的降解以及"沉默"相应的翻译序列(McManus和Sharp,2002,Nature Rev.Genet.,2002,3:737)。通过酶裂解使较长的dsRNA链形成具有生物活性的长度约为21-23个核苷酸的"短-干扰RNA"(siRNA)序列以发挥RNAi的功能(Elbashir等,Genes Dev.,2001,15:188)。RNA干扰已经成为一种有希望的治疗癌症的方法。

[0148] 可以以若干形式中的任意一种提供适于在本发明的实践中使用的干扰RNA。例如,可以以分离的短干扰RNA(siRNA)、双链RNA(dsRNA)、微-RNA(miRNA)或短发夹RNA(shRNA)中的一种或多种形式提供干扰RNA。

[0149] 适于在本发明中使用的干扰RNA分子的例子包括例如在下述综述中举出的iRNA:O.Milhavet等,Pharmacol.Rev.,2003,55:629-648;F.Bi等,Curr.Gene.Ther.,2003,3:411-417;P.Y.Lu等,Curr.Opin.Mol.Ther.,2003,5:225-234;I.Friedrich等,Semin.Cancer Biol.,2004,14:223-230;M.Izquierdo,Cancer Gene Ther.,2005,12:217-227;P.Y.Lu等,Adv.Genet.,2005,54:117-142;G.R.Devi,Cancer Gene Ther.,2006,13:819-829;M.A.Behlke,Mol.Ther.,2006,13:644-670;和L.N.Putral等,Drug News Perspect.,2006,19:317-324(其内容均通过引用整体并入本申请)。

[0150] 其他适宜的干扰RNA分子的例子包括但不限于p53干扰RNA(例如T.R.Brummelkamp等,Science,2002,296:550-553;M.T.Hemman等,Nat.Genet.,2003,33:396-400);靶向癌基因的干扰RNA,如Raf-1(T.F.Lou等,Oligonucleotides,2003,13:313-324)、K-Ras(T.R.Brummelkamp等,Cancer Cell,2002,2:243-247)和erbB-2(G.Yang等,J.Biol.Chem.,2004,279:4339-4345)。

[0151] 在某些实施方式中,抗-fPSA抗体的偶联物包括核酸治疗剂,其是核酶。如本申请所使用的,术语"核酶"指能够以靶向特异性方式裂解其他RNA分子的催化性RNA分子。核酶

能够用于下调任何不需要的目的基因产物的表达。能够在本发明的实践中使用的核酶的例子包括但不限于对雄激素受体mRNA具有特异性的那些核酶。

[0152] 在某些实施方式中，在抗-fPSA抗体的偶联物中的实体或部分包括在光动力疗法(PDT)中使用的光敏剂。在PDT中，局部或全身给予患者光敏剂，随后使用光照射，其被待治疗的组织或器官中的光敏剂所吸收。光敏剂的光吸收产生对细胞有害的反应性物质(例如自由基)。为了达到最大效能，光敏剂通常是适于给药的形式，并且还是能够在靶位点易于细胞内化的形式，其相对于正常组织常常具有一定程度的选择性。

[0153] 可以将与光敏剂结合的抗-fPSA抗体偶联物作为PDT中的新递送系统。除了减少光敏剂的聚集以外，根据本发明的光敏剂的递送还显示出其他优势如光敏剂针对靶组织/器官的特异性和细胞内化作用增加。

[0154] 适于在本发明中使用的光敏剂包括多种合成的和天然存在的具有在PDT中使用的光敏性质的分子中的任意一种。在某些实施方式中，所述光敏剂的吸收光谱在可见光范围内，通常在350nm至1200nm之间，优选地在400nm至900nm之间，例如在600nm至900nm之间。根据本发明的能够与毒素偶联的适宜的光敏剂包括但不限于卟啉和卟啉衍生物(例如二氢卟酚、菌绿素、异菌绿素、酞菁和萘酞菁)；金属卟啉、金属酞菁、当归根素、硫属元素的吡喃盐(chalcogenopyrylium,chalcogenapyrrillium)染料、叶绿素、香豆素、黄素及其相关化合物如咯嗪和核黄素、富勒烯、脱镁叶绿酸、焦脱镁叶绿酸、青色素(例如部花青素540)、脱镁叶绿素、噻吠啉(sapphyrin)、特沙弗林(texaphyrin)、红紫素、叶琳烯(porphycene)、吩噻嗪盐(phenothiazinium)、亚甲基蓝衍生物、萘酰亚胺、尼罗蓝衍生物、醌、二萘嵌苯醌(例如金丝桃素、竹红菌素和尾孢菌素)、补骨脂素、醌、类视黄醇、罗丹明、噻吩、喔地斯(verdins)、呫吨染料(例如曙红、赤藓红、玫瑰红)、卟啉的二聚体和低聚物形式以及前药如5-氨基乙酰丙酸(R.W.Redmond和J.N.Gamlin,Photochem.Photobiol.,1999,70:391-475)。

[0155] 适于在本发明中使用的示例性光敏剂包括在美国专利号5,171,741;5,171,749;5,173,504;5,308,608;5,405,957;5,512,675;5,726,304;5,831,088;5,929,105;和5,880,145中描述的那些(其全部内容均通过引用整体并入本申请)。

[0156] 在某些实施方式中，抗-fPSA特异性抗体偶联物包括放射增敏剂。如本申请所使用的，术语“放射增敏剂”指使肿瘤细胞对放疗更加敏感的分子、化合物或试剂。给予接受放疗的患者放射增敏剂通常会增强放疗的作用。将放射增敏剂与靶实体(例如能够靶向瘤内fPSA的抗-fPSA抗体)偶联的优势为仅在靶细胞具有放射增敏作用。为了便于使用，即使是将其全身给予，放射增敏剂也应该能够发现靶细胞。然而，目前可用的放射增敏剂通常不是对肿瘤具有选择性的，并且其通过扩散在哺乳动物机体中分布。可以将本发明的fPSA抗体偶联物作为新型的放射增敏剂递送系统使用。

[0157] 多种放射增敏剂是本领域公知的。适于在本发明中使用的放射增敏剂的例子包括但不限于紫杉醇(TAXOL®)、卡铂、顺铂和奥沙利铂(Amorino等，Radiat.Oncol.Investig.,1999,7:343-352;Choy,Oncology,1999,13:22-38;Safran等，Cancer Invest.,2001,19:1-7;Dionet等,Anticancer Res.,2002,22:721-725;Cividalli等,Radiat.Oncol.Biol.Phys.,2002,52:1092-1098)；吉西他滨(Gemzar®)(Choy,Oncology,2000,14:7-14;Mornex和Girard,Annals of Oncology,2006,17:1743-1747)；依他硝唑(Nitrolmidazole®)(Inanami等,Int.J.Radiat.Biol.,2002,78:267-274)；米索硝唑

(Tamulevicius等,Br.J.Radiology,1981,54:318-324;Palcic等,Radiat.Res.,1984,100:340-347)、替拉扎明(Masunaga等,Br.J.Radiol.,2006,79:991-998;Rischin等,J.Clin.Oncol.,2001,19:535-542;Shulman等,Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.,1999,44:349-353);以及核酸碱基衍生物,例如卤代嘌呤或嘧啶如5-氟脱氧尿嘧啶(Buchholz等,Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.,1995,32:1053-1058)。

[0158] 在某些实施方式中,抗-fPSA抗体偶联物包括放射性同位素。适宜的放射性同位素的例子包括任意的α-、β-或γ-发射体,当将其定位于肿瘤部位时,其导致细胞破坏(S.E.Order,"Analysis,Results,and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy",Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy,R.W.Baldwin等(Eds.),Academic Press,1985)。这种放射性同位素的例子包括但不限于碘-131(^{131}I)、碘-125(^{125}I)、铋-212(^{212}Bi)、铋-213(^{213}Bi)、砹-211(^{211}At)、铼-186(^{186}Re)、铼-188(^{188}Re)、磷-32(^{32}P)、钇-90(^{90}Y)、钐-153(^{153}Sm)和镥-177(^{177}Lu)。

[0159] 在某些实施方式中,抗-fPSA抗体偶联物包括超级抗原或其生物活性部分。超级抗原的构成为一群细菌和病毒蛋白,其在活化大部分T细胞群方面具有极强的作用。超级抗原直接与主要组织相容性复合物(MHC)结合而不需要加工。事实上,超级抗原结合MHC II类分子上未经加工的外部抗原-结合槽,以避免常规肽结合位点大部分的多态性。

[0160] 已将基于超级抗原的肿瘤治疗方法开发为用于治疗实体肿瘤。在这种方法中,将靶向部分(例如抗-fPSA抗体或其抗原结合片段)与超级抗原偶联,提供靶向的超级抗原。如果所述抗体或抗体片段识别与肿瘤结合的抗原,则与肿瘤细胞结合的靶向超级抗原能够触发超级抗原活化的细胞毒性T细胞通过超级抗原依赖性细胞介导的细胞毒性直接杀死肿瘤细胞。(参见例如Søgaard等,(1996)"Antibody-targeted superantigens in cancer immunotherapy,"Immunotechnology,2(3):151-162,其全部内容通过引用并入本申请)。

[0161] 在本发明的实施方式中使用的超级抗原的例子包括具有野生型葡萄球菌肠毒素A(SEA)的融合蛋白(Giantonio等,J.Clin.Oncol.,1997,15:1994-2007;Alpaugh等,Clin.Cancer Res.,1998,4:1903-1914;Cheng等,J.Clin.Oncol.,2004,22:602-609;其全部内容均通过引用并入本申请);肠毒素基因簇(egc)葡萄球菌超级抗原(Terman等,Clin.Chest Med.,2006,27:321-324,其全部内容通过引用并入本申请),以及葡萄球菌肠毒素B(SEB)(Perabo等,Int.J.Cancer,2005,115:591-598,其全部内容通过引用并入本申请)。超级抗原或其生物活性部分能够与抗-fPSA抗体结合以形成包括抗体和超级抗原的偶联物。适于在本发明中使用的超级抗原的其他例子包括但不限于葡萄球菌肠毒素E(SEE)、脓性链球菌外毒素(SPE)、葡萄球菌中毒性休克综合征毒素(TSST-1)、链球菌有丝分裂外毒素(SME)和链球菌超级抗原(SSA)。

[0162] 在某些实施方式中,抗-fPSA抗体偶联物可以用于定向酶前药疗法。在定向酶前药疗法方法中,将定向/靶向酶和前药给予主体,其中所述靶向酶特别地定位于在主体机体中将前药转化成活性药物的部分。可以在一步(通过靶向酶)或多于一步中将前药转化为活性药物。例如,可以通过靶向酶将前药转化为活性药物的前体。然后通过例如一种或多种其他靶向酶、给予主体的一种或多种非靶向酶、在主体中或主体中的靶位点天然存在的一种或多种酶(例如蛋白酶、磷酸酶、激酶或聚合酶)的催化活性,通过给予主体药剂和/或通过不

具有酶催化作用的化学过程(例如氧化、水解、同分异构化、差向异构化等)将前体转化为活性药物。

[0163] 在本发明的一些实施方式使用抗体导向酶前药疗法(ADEPT),其中将抗-fPSA抗体与酶连接并注射给予主体,以使得所述酶与同肿瘤结合的或转移性fPSA选择性结合。如上文所讨论的,本申请公开的抗-fPSA抗体(例如5A10)能够充分地区分瘤内fPSA和血清PSA。随后,给予主体前药。仅通过在前列腺癌细胞中或附近的酶,将前药转化成其活性形式。选择性是通过抗-fPSA抗体的特异性以及通过推迟前药给予直至在前列腺癌和正常组织的酶水平之间形成较大差异得以实现。还可以使用编码前药活化酶的基因靶向前列腺癌细胞。这种方法被称为病毒导向酶前药疗法(VDEPT)或更通常地称为GDEPT(基因导向酶前药疗法),并且其在实验室系统中已得到了较好的结果。导向酶前药疗法的其他版本包括PDEPT(聚合物-导向酶前药疗法)、LEAPT(凝集素-导向酶活化前药疗法)和CDEPT(梭菌-导向酶前药疗法)。

[0164] 适于在本发明中使用的酶/前药/活性药物组合的非限制性例子参见例如Bagshawe等,Current Opinions in Immunology,1999,11:579-583;Wilman,"Prodrugs in Cancer Therapy",Biochemical Society Transactions,14:375-382,615th Meeting,Belfast,1986;Stella等,"Prodrugs:A Chemical Approach To Targeted Drug Delivery",in"Directed Drug Delivery",Borchardt et al.,(Eds),pp.247-267(Humana Press,1985)。酶/前药/活性抗癌药物组合的非限制性例子参见例如Rooseboom等,Pharmacol.Reviews,2004,56:53-102。

[0165] 前药活化酶的例子包括但不限于硝基还原酶、细胞色素P450、嘌呤-核苷磷酸化酶、胸腺嘧啶激酶、碱性磷酸酶、β-葡糖醛酸酶、羧肽酶、青霉素酰化酶、β-内酰胺酶、胞嘧啶脱氨酶和甲硫氨酸γ-裂解酶。

[0166] 能够通过由前药活化酶将前药在体内活化形成抗癌药的例子包括但不限于5-(氮丙啶-1-基)-4-羟基-氨基-2-硝基-苯甲酰胺、异磷酰胺氮芥、磷酰胺氮芥、2-氟腺嘌呤、6-甲基嘌呤、更昔洛韦-三磷酸核苷酸、依托泊苷、丝裂霉素C、对-[N,N-双(2-氯乙基)氨基]苯酚(POM)、多柔比星、恶唑烷酮、9-氨基喜树碱、芥子、甲氨蝶呤、苯甲酸芥子、阿霉素、柔红霉素、洋红霉素、博来霉素、埃斯培拉霉素、美法仑、岩沙海葵毒素、4-去乙酰长春碱-3-羧酸酰肼、苯二胺芥子、4'-羧基邻苯二甲酸基(1,2-环己烷-二胺)铂、紫杉醇、5-氟尿嘧啶、甲基硒醇和硫代碳酰二氟化物(carbonothionic difluoride)。

[0167] 在某些实施方式中,治疗(例如抗癌)剂包括一种或多种抗-fPSA抗体和抗血管生成剂的偶联物。适于在本发明中使用的抗血管生成剂包括阻断、抑制、减缓或降低血管生成过程,或者由先前存在的血管发展成新血管形式的过程的任意分子、化合物或因子。这种分子、化合物或因子能够通过阻断、抑制、减缓或降低血管生成中涉及的任意步骤来阻止血管生成,包括(但不限于)步骤(1)起源血管膜的溶解,(2)内皮细胞的迁移和增殖和(3)由迁移细胞形成新的血管。

[0168] 抗血管生成剂的例子包括但不限于贝伐单抗(AVASTIN®)、塞来昔布(西乐葆®)、内皮抑素、沙利度胺、EMD121974(西仑吉肽)、TNP-470、角鲨胺、考布他汀A4、干扰素-α、抗-VEGF抗体、SU5416、SU6668、PTK787/2K 22584、Marimistal、AG3340、COL-3、新伐司他和BMS-275291。

[0169] 在一些实施方式中，治疗剂包括一种或多种抗-fPSA抗体和抗-雄激素疗法的偶联物，如雄激素受体(“AR”)拮抗剂。在本发明的这些和其他实施方式中使用的AR拮抗剂包括小分子拮抗剂(例如RU58642、LG120907、LG105、RD162、MDV3100、BMS-641988、CH5137291、阿彻瑞克酸(ataricacid)、N-丁基苯磺酰胺)、甾体化合物(例如醋酸环丙孕酮)、非甾体化合物(例如羟基氟他胺、比卡鲁胺、尼鲁米特)和肽拮抗剂。在本申请的实施方式中使用的其他抗雄激素疗法包括TAK700、ARN-509、卡博替尼、伊匹单抗、库司替森、BPX-101、阿尔法莱丁(alpharadin)、德尼单抗和Protsvac-VF。

[0170] 在本发明的特定实施方式中使用的其他前列腺癌治疗剂包括镭-223氯化物、卡博替尼、抗-OX40抗体和比卡鲁胺(康士德)。

[0171] 给药

[0172] 可以根据任意适宜的途径和方案给予根据本发明的fPSA单克隆抗体和/或抗体多肽以及本发明的药物组合物。在一些实施方式中，途径或方案是与积极的治疗益处相关的。

[0173] 在一些实施方式中，精确的给药量在不同主体之间可以不同，这取决于在医疗领域公知的一个或多个因素。这些因素可以包括例如主体的人种、年龄、一般状况，所给予的特定组合、其给药方式，其活化方式，前列腺癌的严重程度；所使用的具体的fPSA抗体的活性；所给予的具体的药物组合物；给药后组合物的半衰期；主体的年龄、体重、一般健康状况、性别和饮食；给药时间、给药途径和所使用的具体化合物的排泄速率；治疗持续时间；与所使用的具体化合物组合或同时使用的药物等等中的一个或多个。可以将药物组合物制成剂量单位形式以便于给药和使剂量的统一。然而，应当理解，本发明组合物的每日总使用量将由主治医师在合理的医学评判标准范围内确定。

[0174] 可以采用本领域技术人员公知的任意途径给予本发明的化合物。在一些实施方式中，可以通过口服(PO)、静脉(IV)、肌肉内(IM)、动脉内、髓内、鞘内、皮下(SQ)、心室内、透皮、皮间、皮内、直肠(PR)、阴道、腹腔(IP)、胃内(IG)、局部(例如使用粉剂、软膏、乳膏、凝胶、洗剂和/或滴剂)、粘膜、鼻内、口腔、肠内、玻璃体内、舌下；通过气管内滴入、支气管内滴入和/或吸入；以口腔喷雾、鼻内喷雾和/或气雾剂、和/或通过门静脉导管给予本发明的组合物。

[0175] 在具体实施方式中，根据本发明的fPSA抗体和/或其药物组合物可以静脉给予，例如通过静脉输注。在具体实施方式中，根据本发明的fPSA抗体和/或其药物组合物可以通过肌肉注射给予。在具体实施方式中，根据本发明的fPSA抗体和/或其药物组合物可以通过前列腺内注射给予。在具体实施方式中，根据本发明的fPSA抗体和/或其药物组合物可以通过皮下注射给予。在具体实施方式中，根据本发明的fPSA抗体和/或其药物组合物可以通过门静脉导管给予。然而，本发明通过考虑药物递送科学中可能益处的任意适宜途径涵盖根据本发明的fPSA抗体和/或其药物组合物的递送。

[0176] 在某些实施方式中，根据本发明的fPSA抗体和/或其药物组合物可以以足以递送约0.001mg/kg至约100mg/kg、约0.01mg/kg至约50mg/kg、约0.1mg/kg至约40mg/kg、约0.5mg/kg至约30mg/kg、约0.01mg/kg至约10mg/kg、约0.1mg/kg至约10mg/kg、约1mg/kg至约25mg/kg的主体体重每天的剂量水平给予以获得所需的治疗效果。可以以每日三次以上、每日三次、每日两次、每日益处、隔日一次、每三日一次、每周一次、每两周一次、每三周一次、每四周一次、每两个月一次、每六个月一次或者每十二个月一次递送所需的剂量。在某些实

施方式中，可以使用多次给药递送所需的剂量(例如两次、三次、四次、五次、六次、七次、八次、九次、十次、十一次、十二次、十三次、十四次或更多次给药)。

[0177] 预防性应用

[0178] 在一些实施方式中，根据本发明的fPSA抗体可以用于预防性应用。在一些实施方式中，预防性应用涉及在易感和/或已显示出前列腺癌症状的个体中预防、抑制其进展和/或推迟前列腺癌和/或其他与fPSA相关的症状发病的系统和方法。

[0179] 联用疗法

[0180] 应理解，可以将根据本发明的fPSA抗体及其治疗活性偶联物和/或其药物组合物引入联合疗法中以辅助诊断和/或治疗。“联合”并不旨在暗示所述药剂必需同时给予和/或制成共同递送的药剂，尽管这些递送方法在本发明的范围内。组合物可以同时、先于或后于一种或多种所需的疗法或医疗程序给予。应理解，可以将组合使用的治疗活性剂在单一组合物中共同给予或者在不同组合物中分别给予。在通常情况下，各药剂将以针对该药剂确定的剂量和/或时间方案给予。

[0181] 在特定实施方式中，本申请公开的抗fPSA特异性抗体在抗癌剂或抗-雄激素疗法之前、之后或同时给予。抗-雄激素疗法包括手术(例如去势)、化疗、放疗和雄激素受体(“AR”)拮抗剂。在本发明的这些和其他实施方式中使用的AR拮抗剂包括小分子拮抗剂(例如RU58642、LG120907、LG105、RD162、MDV3100、BMS-641988、CH5137291、阿彻瑞克酸(ataric acid)、N-丁基苯磺酰胺)、甾体化合物(例如醋酸环丙孕酮)、非甾体化合物(例如羟基氟他胺、比卡鲁胺、尼鲁米特)、肽拮抗剂及其组合组成的组。在本发明的实施方式中使用的其他抗雄激素疗法包括但不限于TAK700、ARN-509(阿比特龙)、卡博替尼、伊匹单抗、库司替森、BPX-101、阿尔法莱丁(alpharadin)、德尼单抗、Protsvac-VF。在本发明的特定实施方式中使用的其他前列腺癌治疗剂包括镭-223氯化物、卡博替尼、抗-OX40抗体和比卡鲁胺(康士德)。

[0182] 在联用方案中使用的特定疗法的组合(例如疗法或程序)将考虑所需疗法和/或程序的相容性以及将达到的所需的治疗效果。还应理解，可以在联用疗法(例如联用化疗疗法)中使用的本申请公开的抗-fPSA抗体的药物组合物是可以同时、先于或后于一种或多种其他所需的疗法和/或化疗程序给予的药物组合物。

[0183] 可以将抗-fPSA抗体或其药学上可接受的组合物与化疗剂联合给予以治疗原发性或转移性前列腺癌。在一些实施方式中，活性成分是化疗剂例如但不限于阿霉素、地塞米松、长春新碱、环磷酰胺、氟尿嘧啶、托泊替康、紫杉醇、干扰素、铂衍生物、紫杉烷(例如紫杉醇)、长春花生物碱(例如长春碱)、蒽环类抗生素(例如多柔比星)、表鬼臼毒素(例如依托泊苷)、顺铂、甲氨蝶呤、放线菌素D、放线菌素D、多拉司他汀10、秋水仙碱、依米丁、三甲曲沙、氯苯氨啶、环孢菌素、柔红霉素、替尼泊苷、两性霉素、烷化剂(例如苯丁酸氮芥)、5-氟尿嘧啶、喜树碱、顺铂、甲硝唑、伊马替尼、格列卫™、舒尼替尼和索坦®及其组合。

[0184] 在某些实施方式中，将抗-fPSA抗体、及其偶联物或其药学上可接受的组合物与选自下述一种或多种的抗增殖或化疗剂联合给予：阿巴瑞克、阿地白介素、阿地白介素、阿仑单抗、阿利维A酸、别嘌呤醇、六甲蜜胺、氨磷汀、阿那曲唑、三氧化二砷、天冬酰胺酶、阿扎胞苷、活卡介苗、贝伐单抗(Bevacuzimab)、阿瓦斯丁、氟尿嘧啶、贝沙罗汀、博来霉素、硼替佐米、白消安、卡普睾酮、卡培他滨、喜树碱、卡铂、卡莫司汀、塞来昔布、西妥昔单抗、苯丁酸氮

芥、顺铂、克拉屈滨、氯苯拉滨、环磷酰胺、阿糖胞苷、更生霉素、阿法达贝泊汀、柔红霉素、地尼白介素、右雷佐生、多西他赛、多柔比星(中性)、盐酸多柔比星、屈他雄酮丙酸酯、表柔比星、促红细胞生成素α、埃罗替尼、雌莫司汀、磷酸依托泊苷、依托泊苷、依西美坦、非格司亭、氟尿苷氟达拉滨、氟维司群、吉非替尼、吉西他滨、吉姆单抗、醋酸戈舍瑞林、醋酸组氨瑞林、羟基脲、替伊莫单抗、伊达比星、异环磷酰胺、甲磺酸伊马替尼、干扰素α-2a、干扰素α-2b、伊立替康、来那度胺、来曲唑、亚叶酸钙、醋酸亮丙瑞林、左旋咪唑、洛莫司汀、醋酸甲地孕酮、美法仑、巯基嘌呤、6-MP、美司钠、甲氨蝶呤、甲氧沙林、丝裂霉素C、米托坦、米托蒽醌、诺龙、奈拉滨、诺非单抗、奥普瑞白介素、奥沙利铂、紫杉醇、帕利夫明、帕米膦酸、培加酶、培门冬酶、培非格司亭、培美曲塞二钠、喷司他丁、哌泊溴烷、普卡霉素、卟吩姆钠、甲基苄肼、奎纳克林、拉布立酶、利妥昔单抗、沙格司亭、索拉非尼、链脲佐菌素、马来酸舒尼替尼、滑石、他莫昔芬、替莫唑胺、替尼泊苷、VM-26、睾内酯、硫鸟嘌呤、6-TG、塞替派、托泊替康、托瑞米芬、托西莫单抗、曲妥珠单抗、维甲酸、ATRA、尿嘧啶氮芥、戊柔比星、长春碱、长春新碱、长春瑞滨、唑来膦酸或唑来膦酸。

[0185] 在联用方案中使用的特定疗法(例如多柔比星、ARN-509和针对fPSA的治疗性抗体等)的组合通常考虑所需治疗和/或程序的相容性和将达到的所需的治疗效应。还将理解，所使用的疗法和/或化疗针对相同病症可以达到所需效果(例如，可以将本发明的抗原与另一种化疗剂同时给予)，或者其可以达到不同效果。将理解，所使用的疗法针对相同目的可以达到所需效果(例如，可以将用于治疗、预防和/或推迟前列腺癌发病的fPSA特异性抗体与用于治疗、预防和/或推迟前列腺癌发病的另一种药剂同时给予)，或者其可以达到不同效果(例如对任何不良反应进行控制)。本发明包括将药物组合物与可以在体内改善其生物利用度、降低和/或改善其代谢、抑制其排泄和/或改善其体内分布的药剂联合递送。

[0186] 在特定实施方式中，抗-fPSA抗体与ARN-509(阿比特龙)和/或多柔比星联合或偶联给予。用于本发明这种实施方式的其他前列腺癌治疗剂包括镭-223氯化物、卡博替尼、抗-OX40抗体和比卡鲁胺(康士德)。

[0187] 在一些实施方式中，药剂在联用时的使用水平不超过其单用时的水平。在一些实施方式中，联用时的水平将低于其在单用时的水平。

[0188] 在一些实施方式中，联用疗法可能涉及给予多种导向单一表位(例如单一构象的表位)的抗体。在一些实施方式中，联用疗法可能包括识别不同表位的多种抗体。

[0189] 试剂盒

[0190] 本发明提供了多种试剂盒以方便地和/或有效地实施根据本发明的方法。试剂盒通常包括根据本发明的一种或多种fPSA特异性抗体或抗体多肽(例如5A10)。在一些实施方式中，试剂盒包括用于不同目的的(例如诊断、治疗和/或预防)不同fPSA特异性抗体的集合。通常地，试剂盒将包括足量的fPSA特异性抗体，以允许用户进行向主体多次给予和/或进行多次实验。在一些实施方式中，试剂盒提供或包括一种或多种已由买方指定的fPSA特异性抗体。

[0191] 在某些实施方式中，在根据本发明中使用的试剂盒可以包括一种或多种对照样品；说明书(例如用于处理样品、用于进行检测、用于解读结果、用于溶解fPSA特异性抗体、用于储存fPSA特异性抗体等等)；缓冲液；和/或进行检测所必需的其他试剂。在某些实施方式中，试剂盒可以包括抗体盘。试剂盒的其他组分可以包括细胞、细胞培养基、组织和/或组

织培养基。

[0192] 在一些实施方式中，试剂盒包括多个包含fPSA特异性抗体的单位剂量的药物组合物。可以提供记忆辅助工具，例如以数字、字母和/或其他标记和/或带有日历插入物的形式，在治疗方案中标明可以施用剂量的天/时间。可以在试剂盒中包括与药物组合物形式类似或剂量不同的安慰剂剂量和/或钙膳食补充剂，其剂量为每日一次。

[0193] 试剂盒可以包括一个或多个器皿或容器，以使得某些单独的组分或试剂可以单独放置。试剂盒可以包括一种用于将各容器相对密闭的密封以供商业销售的方式，例如塑料盒，说明书、包装材料如发泡胶等均可以被密封在其中。

[0194] 在一些实施方式中，试剂盒用于治疗、诊断和/或预防罹患和/或对前列腺癌易感的主体。在一些实施方式中，这种试剂盒包括(i)至少一种fPSA特异性抗体；(ii)注射器、针头、涂抹器等，用于将至少一种fPSA特异性抗体给予主体；和(iii)使用说明书。

[0195] 本发明还包括以下实施方式：

[0196] 1.一种原位监测对前列腺癌治疗或疗法的应答的方法，所述方法包括：

[0197] 给予与fPSA的表位结合的抗体多肽；

[0198] 确定治疗前在主体的肿瘤或组织中fPSA的表达或活性水平；

[0199] 给予主体前列腺癌治疗或疗法；

[0200] 再次给予与fPSA的表位结合的抗体多肽；

[0201] 确定治疗后在主体的肿瘤或组织中fPSA的表达或活性水平；

[0202] 将治疗后在肿瘤或组织中fPSA的表达或活性水平与治疗前的水平进行比较；以及

[0203] 基于所述比较，根据所展示出的原位fPSA活性或表达的降低情况，确定疗法或治疗是否有效。

[0204] 2.根据实施方式1所述的方法，其中所述fPSA的表位位于或邻近催化裂隙。

[0205] 3.根据实施方式1所述的方法，其中所述前列腺癌治疗或疗法是抗雄激素疗法。

[0206] 4.根据实施方式1所述的方法，其中所述抗体多肽是多克隆抗体。

[0207] 5.根据实施方式1所述的方法，其进一步包括在给药步骤前，将抗体多肽与检测实体组合。

[0208] 6.根据实施方式5所述的方法，其中所述检测实体选自由锆-89(89Zr)、碘-124(124I)、碘-131(131I)、碘-125(125I)、铋-212(212Bi)、铋-213(213Bi)、砹-221(211At)、铜-67(67Cu)、铜-64(64Cu)、铼-186(186Re)、铼-186(188Re)、磷-32(32P)、钐-153(153Sm)、镥-177(117Lu)、锝-99m(99mTc)、镓-67(67Ga)、铟-I 1 1(111In)和铊-201(201Tl)组成的组。

[0209] 7.根据实施方式1所述的方法，其中所述确定步骤包括通过单光子发射计算机断层成像技术(SPECT)、正电子发射断层成像技术(PET)或磁共振成像(MRI)检测。

[0210] 8.根据实施方式1所述的方法，其中所述前列腺癌治疗或疗法选自包含去势、RU58642、LG120907、LG105、RD162、MDV3100、BMS-641988、CH5137291、阿彻瑞克酸(ataric acid)、N-丁基苯磺酰胺、醋酸环丙孕酮、羟基氟他胺、比卡鲁胺、尼鲁米特、肽拮抗剂、TAK700、ARN-509、卡博替尼(cabozantimib)、伊匹单抗(ipilimumab)、库司替森、BPX-101、阿尔法莱丁(alpharadin)、德尼单抗(denosumab)和Protsvac-VF的组。

[0211] 9.根据实施方式1所述的方法，其中通过治疗后fPSA的表达或活性水平与治疗前

fPSA的表达或活性水平相比降低指示有效的治疗。

[0212] 10.一种原位监测主体中的雄激素受体信号的方法，所述方法包括：

[0213] 给予主体与位于或邻近PSA的催化裂隙的至少一个表位结合的抗体多肽，其中所述抗体多肽与检测实体复合；

[0214] 通过成像方案，检测在前列腺肿瘤或其转移细胞中检测实体的存在情况；

[0215] 其中所述检测实体的存在情况与雄激素受体信号相关。

[0216] 11.根据实施方式10所述的方法，其中雄激素受体信号在体外成像。

[0217] 12.根据实施方式10所述的方法，其中雄激素受体信号在体内成像。

[0218] 13.根据实施方式10所述的方法，其进一步包括对所述检测实体的存在情况进行定量以确定fPSA的表达或活性的检测，其中所述fPSA表达的检测与雄激素受体信号定量地相关。

[0219] 14.根据实施方式10所述的方法，其中所述成像方案选自包括单光子发射计算机断层成像技术(SPECT)、正电子发射断层成像技术(PET)或磁共振成像(MRI)的组。

[0220] 15.一种在主体中治疗前列腺癌或其转移性疾病的方法，所述方法包括向主体给予fPSA特异性抗体多肽，所述fPSA与抗雄激素疗法偶联。

[0221] 16.一种包含fPSA特异性单克隆抗体或其片段的药物组合物。

[0222] 17.一种用于监测原位雄激素受体信号的试剂盒，所述试剂盒包括：

[0223] (a)fPSA特异性抗体多肽；

[0224] (b)能够检测fPSA的表达或活性水平的试剂；

[0225] (c)对照；以及

[0226] (d)用于对由该试剂盒实施的检测和根据该检测确定雄激素受体信号提供指导的说明书。

[0227] 18.fPSA特异性抗体或其抗原结合片段在制备治疗前列腺癌的药物中的用途，其中所述抗体或其抗原结合片段与抗癌剂组合或偶联。

[0228] 19.根据实施方式18所述的用途，其中所述抗体或其抗原结合片段是单克隆抗体。

[0229] 20.根据实施方式18所述的用途，其中所述抗体或其抗原结合片段是人源单克隆抗体。

[0230] 21.根据实施方式18所述的用途，其中所述抗体或其抗原结合片段是小鼠单克隆抗体。

[0231] 22.根据实施方式21所述的用途，其中所述抗体是5A10。

[0232] 23.根据实施方式18所述的用途，其中所述抗癌剂选自包括光敏剂、核酸、放射敏化剂、放射性同位素、超抗原、前药、前药活化酶、抗血管生成剂和抗雄激素疗法的组。

[0233] 24.根据实施方式23所述的用途，其中所述抗癌剂选自由MDV3100、ARN-509和阿霉素组成的组。

[0234] 25.根据实施方式18所述的用途，其中所述抗体或其抗原结合片段对位于或邻近fPSA的催化裂隙的表位具有特异性。

[0235] 26.根据实施方式18所述的用途，其中所述fPSA实质上在瘤内或与前列腺癌细胞结合。

[0236] 将通过对下述实施例的考虑进一步理解本发明的这些和其他方面，其旨在解释本

发明某些特定的实施方式，而非旨在限制由权利要求所定义的其范围。

实施例

[0237] 一般的细节信息

[0238] 所有化学药品，除非另有说明，否则均购自Sigma Aldrich(St.Louis,MO)并且无需进一步纯化即可使用。fPSA-特异性5A10单克隆抗体购自芬兰的土尔库大学并且无需进一步纯化即可使用。水以流速<1.0mL/min通过10cm chelex树脂柱(Bio-Rad Laboratories,Hercules,CA)进行纯化(在25℃时>18.2MΩ·cm,Milli-Q,Millipore,Billerica,MA)。根据此前发布的常规质量控制程序对所有仪器进行校正和维护。使用以^{89}Zr作为校正因子的Capintec CRC-15R剂量校准器(Capintec,Ramsey,NJ)对放射性物质进行检测。对于放射性的准确定量，使用针对^{89}Zr的动态能量窗800-1000keV(909keV发射)的经校正的Perkin Elmer(Waltham,MA)自动Wizard^{2}γ计数器对实验样品计数1min。通过使用硅胶浸渍的玻璃纤维瞬时薄层色谱(ITLC-SG)纸(Pall Corp.,East Hills,NY)对^{89}Zr-放射性标记反应进行监测并且在放射-TLC板阅读器(与Bioscan Autochanger 1000(Bioscan Inc.,Washington,DC,使用Win-Scan Radio-TLC软件，2.2版)偶联的Bioscan System 200成像扫描仪)上进行分析。溶剂系统包括在水中的二乙烯三胺五乙酸(DTPA,50mM,pH7)和磷酸盐缓冲液(PBS)。MDV3100由在MSKCC的有机合成核心实验室制备，并且在DMSO中复溶无需进一步纯化。睾酮颗粒购自美国的Innovative Res.。

[0239] 实施例1：^{89}Zr-标记的单克隆fPSA抗体的生产

[0240] 蛋白偶联

[0241] 将单克隆抗体5A10和鼠源性IgG$_1$与去铁胺B(DFO;Calbiochem,Spring Valley,CA)偶联并且使用^{89}Zr-草酸盐进行放射性标记以获得^{89}Zr-5A10，其使用来自于此前对用于免疫-PET的放射性标记的单克隆抗体进行研究的程序；例如Holland,J.P.等，^{89}Zr-DFO-J591for immunoPET of prostate-specific membrane antigen expression in vivo,J Nucl,Med.,2010,51(8),1293-1300，其通过引用并入本申请。通过放射-ITLC对标记抗体的纯度进行评估。图1显示了粗品(红色)和纯化的(蓝色)^{89}Zr-5A10的典型放射-ITLC层析图。洗脱液为50mM DTPA,pH7。^{89}Zr-5A10仍保留在基线(R_f=0.0)，杂质与溶剂前沿一起移动(R_f=1.0)。

[0242] DFO与蛋白的偶联

[0243] 按照如下所示将DFO与蛋白偶联：将5A10加入离心管(3mg/mL,1mL)并使用1.0M和0.1M的Na_2CO_3(aq.)的分装物将pH调整至9.5-10.0。然后使用自动移液管加入4当量的[Fe(N-succDFO-TFP)]并轻柔地混合溶液。不加以搅拌在室温下使反应进行1h，随后通过缓慢加入<10μL 0.25M H_2SO_4(aq.)分装物将pH调整至3.9-4.2。然后加入相对于[Fe(N-succDFO-TFP)]过量>10-倍的乙二胺四乙酸二钠盐($EDTA^{2-}.2Na^{+}$(aq.)，0.0674mol dm^{-3}在经过去离子水处理的chelex 100树脂中)。将反应物在38℃的水浴中孵育1h，在这段时间中溶液由澄清的黄色变为无色。通过分子排阻色谱(葡聚糖凝胶G-25M,PD-10柱，>30kDa,GE Healthcare；死体积=2.5mL，使用200μL无菌盐水洗脱以获得总体积为1.8mL的分离蛋白)对DFO偶联的5A10进行纯化。使用相同的程序制备DFO-鼠源性IgG。

[0244] 放射性标记

[0245] 根据此前报道的方法，在EBCO TR19/9可变电子束能量回旋加速器(Ebco Industries Inc.,Richmond,British Columbia,Canada)上通过^{89}Y(p,n)^{89}Zr嬗变反应生产锆-89(Zr-89)。在高放射性核素中分离^{89}Zr-草酸盐并且其放射化学纯度(RCP)>99.9％，其有效的比活度为195-497MBq/μg(5.27-13.31mCi/μg)。

[0246] 分别通过^{89}Zr-草酸盐与DFO偶联的5A10和IgG的络合反应制备^{89}Zr-5A10和^{89}Zr-IgG。根据此前报道的使用^{89}Zr标记单克隆抗体的方法进行常规的放射性标记反应。用于生产^{89}Zr-5A10的常规条件作为例子给出。使用相同的方法生产^{89}Zr-IgG。简言之，使用1.0M Na_2CO_3(aq.)将在1.0M草酸(250μL)中的^{89}Zr-草酸盐(429MBq,[11.6mCi])调整至pH7.1-7.7。注意：酸中和释放CO_2(g)，应注意以确保无放射性物质从微量离心管中溢逸出。待CO_2释放停止后，加入DFO-偶联的5A10(500μL,2.0mg/mL[1.0mg蛋白]，在无菌盐水中)并且使用移液管吹打轻柔地将反应物混合。在室温下孵育反应物1-2h并且通过ITLC(DTPA,50mM,pH7)监测随着时间推移的络合进程。2h后，得到放射性标记的粗品并且RCP通常>80-90％。通过使用旋转-柱离心(总体积4mL，颗粒截留>30kDa，Amicon Ultra-4,Millipore,Billerica,MA；使用4×3mL无菌盐水洗涤)对^{89}Zr-5A10进行纯化。通过ITLC和分子排阻色谱对最终的^{89}Zr-5A10(形式：pH5.5-6.0；<500μL；无菌盐水)的放射化学纯度(RCP)进行检测。在ITLC实验中，^{89}Zr-5A10、^{89}Zr-IgG和^{89}Zr-DFO仍保留在基线(R_f＝0.0)，而$^{89}Zr^{4+}$(aq.)离子和复合的^{89}Zr-DTPA洗脱至溶剂前沿(R_f＝1.0)。经纯化的^{89}Zr-5A10最终的放射化学收率通常>70％并且产物在无菌盐水中配制，其RCP>99％(n＝5)，并且蛋白比活度为195.0±8.0MBq/mg(5.27±0.2mCi/mg)。图1显示了粗品和经纯化(配制的)^{89}Zr-5A10的典型放射-ITLC层析图。

[0247] 螯合物的数量

[0248] 根据本领域技术人员公知的方法通过放射性同位素稀释检测测定与5A10或IgG偶联的可接近的DFO螯合物的数量(例如Holland,J.P.等,Measuring the pharmacokinetic effects of a novel Hsp90inhibitor on HER2/neu expression in mice using ^{89}Zr-DFO-trastuzumab,PLoS ONE,2010,5(1),e8859；Anderson,C.J.等,Preparation,biodistribution and dosimetry of copper-64-labeled anti-colorectal carcinoma monoclonal antibody fragments 1A3-F(ab')2,J.Nucl.Med.,1995,36(5),850-858)。将来自母液的^{89}Zr-氯化物分装物(5μL,370kBq[10μCi],pH7.7-8.1，使用1.0M Na_2CO_3调节pH)加入12份含有不具有放射活性的$ZrCl_4$(aq.)的1:2系列稀释的溶液中(分装量50μL；1000-0.5pmol,pH7.7-8.1)。将混合物涡旋30s，随后加入5μL 5A10的分装物(1.36mg/mL,6.8μg mAb,0.045nmol；无菌盐水)。将反应物在室温下孵育2h，随后使用DTPA(20μL,50mM,pH7)淬灭。通过对照实验确证^{89}Zr与DFO偶联的蛋白在<2h内完全络合。通过使ITLC试纸(DTPA,50mM)显色以及计数基线和溶剂前沿的活度评估络合的程度。将^{89}Zr-放射性标记蛋白的分数(A_b)对不具有放射活性的$ZrCl_4$的加入量作图。通过测定仅50％的蛋白被标记时$ZrCl_4$的浓度，乘以系数2，再除以反应中存在蛋白的摩尔数计算螯合物的数量。同位素稀释检测的结果显示，分别对于5A10和IgG_1而言，每个蛋白分子平均有2-3个可接近的螯合物。

[0249] ^{89}Zr-标记的5A10的亲和性检测

[0250] 为确定^{89}Zr-5A10对fPSA的亲和性，进行了竞争性结合检测。通过在使用固化的fPSA包被的孔中将^{89}Zr-5A10与可变浓度的未经标记的5A10孵育测定了^{89}Zr-5A10针对fPSA的相对亲和性。使用低荧光Maxisorp板条(Nunc,Roskilde,Denmark)将捕获mAb通过物理吸

附固化于酶标板上。在100L含0.2mol/L NaH_2PO_4缓冲剂的缓冲液中使用1μg mAb H117将孔在35℃下包被过夜。使用DELFIA洗涤溶液洗涤已包被的孔两次，然后使用300μL含二乙烯三胺五乙酸(DTPA)处理的BSA(1g/L)、山梨醇(60g/L)、Germall II(1g/L)和50mmol NaH_2PO_4的溶液将其在室温(RT)下饱和3h。饱和后，将孔抽吸、干燥并于4℃下在含干燥剂的密封塑料袋中保存直至使用。

[0251] 使用新制的^{89}Zr-5A10样品，通过将fPSA(25μL，47.7ng/mL)在100μL DELFIA检测缓冲液中的溶液加入预先制备的板的各孔中进行亲和性检测。在室温下孵育1h后，将溶液吸出，并使用检测缓冲液洗涤孔两次。通过加入200μL含20μg ^{89}Zr-5A10以及0.0、0.002、0.02、0.2、0.5、1、2、4、6、8或10μg未经标记的5A10的检测缓冲液分装物启动结合检测。所有反应物均设置双复管。缓慢振摇下将反应物孵育2h，到时间后将孔抽吸并使用DELFIA洗涤溶液洗涤4次。在NaI(Tl)-孔计数器(Perkin Elmer 2480自动γ计数器)中测定结合活性。

[0252] 将孵育后孔中保留的活性作为^{89}Zr-5A10与fPSA的特异性结合。将实验值对理想(理论)值作图，基于DFO和^{89}Zr对5A10的偶联不会改变mAb对fPSA亲和性的假设计算。使用线性回归确定线性(y＝x)的偏离，并且显示了来自一个^{89}Zr-5A10制备物的代表性数据。检测重复进行两次，使用两个独立浓度范围的5A10(总计n＝4)。图2中的结果表明^{89}Zr-DFO与5A10的生物偶联不会导致其对纯化的fPSA的亲和性丧失，并且^{89}Zr-5A10保持了对fPSA的特异性。

[0253] 实施例2：^{89}Zr-5A10在体内的结合

[0254] 通过将^{89}Zr-5A10给予皮下(s.c.)接种了LNCaP-AR异种移植瘤的完好雄性小鼠进行体内研究，根据所描述的LNCaP-AR是来源于过表达野生型雄激素受体的亲代前列腺癌细胞的PSA-阳性的人前列腺癌模型(Chen,C.D.等,Molecular Determinants of Resistance to Androgen Therapy,Nat.Med.,2004,10:33-39)。所有的动物实验均依据实验动物管理和使用委员会(IACUC)的指导原则和《实验动物的管理和使用指南》进行。雄性CB-17SCID小鼠(6-8周龄)来自Taconic Farms Inc.(Hudson,NY)，通过皮下(s.c.)注射含1.0×10^6个细胞的200μL细胞悬液将LNCaP-AR、22Rv1和PC3肿瘤接种至右侧翼，所述细胞悬液为培养基与复溶的基底膜(BD Matrigel™,Collaborative Biomedical Products Inc.,Bedford,MA)1:1v/v的混合物。经过3-7周后发展成可触及的肿瘤(50-250mm^3)。在异氟烷麻醉条件下采样公知的方案进行手术去势和颗粒植入。根据此前已报道的方法通过外部游标卡尺测量估计肿瘤的体积(V/mm^3)(Holland,J.P.等,Measuring the pharmacokinetic effects of a novel Hsp90inhibitor on HER2/neu expression in mice using ^{89}Zr-DFO-trastuzumab,PLoS ONE,2010,5(1),e8859)。

[0255] 在注射后(p.i.)的多个时间点收集组织以确定放射性示踪剂生物分布的动力学(图3a)。进行生物分布研究以评估在人前列腺癌异种移植瘤模型中^{89}Zr-5A10的摄取情况。使用热灯将小鼠逐渐温暖5min，随后通过尾静脉注射(t＝0h)静脉(i.v.)给予^{89}Zr-5A10(1.11-1.85MBq,[30-50μCi],5.7-9.5μg蛋白，在200μL无菌注射用盐水中)。在注射后1、4、12、24、48、72、96和120h通过CO_2(g)室息将动物(n＝4-5，每组)安乐死并且取出16个组织(包括肿瘤)，在水中冲洗，空气干燥5min，称重并且在γ计数器上计数，以测定^{89}Zr-放射活性的累积情况。测定注射至各只动物的^{89}Zr-5A10制剂的质量并且通过与已知放射活性和质量的标准注射器比较用于确定计数的总数(每分钟的计数，[c.p.m.])。对计数数据进行背

景-和衰变-校正并且各样品测定的组织摄取以每克注射剂量的百分率作为单位(%ID/g)通过归一化至注射的放射活性的总量计算。

[0256] 在注射后约24小时观察到肿瘤结合活性的峰值(19.59±4.9%ID/g),并且除了少数例外,在宿主组织中几乎没有观察到^{89}Zr-5A10的累积(图3a;图4)。如图4所示,给予携带肿瘤的小鼠^{89}Zr-5A10,并且在注射后的所示时间点,处死动物以及收集用于生物分布研究的血液和组织。数据以平均值%ID/g±一个标准偏差报告。表1显示了在右肩部携带皮下LNCaP-AR肿瘤的完好雄性SCID小鼠中i.v.给药后多个时间点^{89}Zr-5A10(n=4)的离体生物分布数据。数据以平均%ID/g±一个标准偏差(S.D.)表示。肿瘤与组织比值和组织与肌肉比值的误差根据标准偏差的几何平均数计算。

[0257] 表1

[0258]

器官	**4 h (n=4)**	**12 h (n=4)**	**24 h (n=4)**	**48 h (n=4)**	**72 h (n=4)**	**96 h (n=4)**	**120 h (n=4)**
血液	13.49 ± 1.74	12.28 ± 5.93	6.67 ± 3.08	5.44 ± 2.85	3.16 ± 0.14	4.44 ± 2.55	3.39 ± 2.09
前列腺	1.56 ± 0.48	1.40 ± 0.74	3.95 ± 2.82	0.73 ± 0.49	0.57	0.86 ± 0.50	5.23 ± 8.82
膀胱	3.88 ± 2.55	0.63 ± 0.37	1.59 ± 1.87	1.75 ± 2.07	0.38 ± 0.25	1.87 ± 1.86	1.19 ± 1.35
心脏	4.93 ± 1.58	4.06 ± 1.54	2.74 ± 2.83	1.69 ± 0.95	1.24 ± 0.49	1.37 ± 0.66	2.36 ± 2.19
肺	5.94 ± 1.63	5.00 ± 1.61	3.79 ± 2.05	3.19 ± 1.52	1.46 ± 0.23	1.52 ± 0.66	1.71 ± 0.95
肝	23.20 ± 3.55	19.61 ± 4.00	24.56 ± 4.91	21.30 ± 4.58	15.40 ± 1.47	14.16 ± 3.79	13.28 ± 5.96
脾	13.42 ± 2.71	6.80 ± 1.46	8.90 ± 4.19	7.28 ± 3.00	6.15 ± 3.37	9.19 ± 10.99	4.01 ± 2.46
胃	1.49 ± 1.49	0.83 ± 0.30	0.75 ± 0.11	0.64 ± 0.30	0.51 ± 0.04	0.70 ± 0.41	0.54 ± 0.33
小肠	0.97 ± 0.27	0.83 ± 0.21	1.07 ± 0.22	0.53 ± 0.08	0.90 ± 0.57	0.56 ± 0.19	0.49 ± 0.05
大肠	1.07 ± 0.30	2.01 ± 1.77	1.14 ± 1.04	3.93 ± 6.85	0.59 ± 0.35	0.62 ± 0.19	0.45 ± 0.16
肾	3.98 ± 1.08	2.57 ± 0.51	3.74 ± 3.43	3.81 ± 2.72	1.90 ± 0.66	1.71 ± 0.41	2.33 ± 1.87
肌肉	0.59 ± 0.15	0.59 ± 0.14	0.86 ± 0.66	0.80 ± 0.79	0.28 ± 0.02	0.41 ± 0.09	0.45 ± 0.24
骨	3.06 ± 1.82	2.58 ± 2.07	2.63 ± 2.28	1.94 ± 0.40	1.76 ± 1.30	2.94 ± 3.23	3.39 ± 2.33
肿瘤	2.34 ± 0.84	5.13 ± 3.95	19.59 ± 4.99	12.38 ± 5.63	5.99 ± 1.57	6.10 ± 3.99	6.74 ± 7.36
肿瘤与组织的比值							
血液	0.2 ± 0.1	0.4 ± 0.4	2.9 ± 1.5	2.3 ± 1.6	1.9 ± 0.5	1.4 ± 1.2	2.0 ± 2.5
前列腺	1.5 ± 0.7	3.7 ± 3.4	4.9 ± 3.8	17.0 ± 13.8	10.5	7.1 ± 6.2	1.3 ± 2.6
膀胱	0.6 ± 0.3	8.2 ± 8.9	12.3 ± 4.5	7.1 ± 4.5	15.9 ± 5.9	3.3 ± 3.0	5.7 ± 8.8
心脏	0.5 ± 0.4	1.3 ± 1.2	7.1 ± 8.6	7.3 ± 9.3	4.8 ± 3.5	4.5 ± 5.3	2.9 ± 4.5
肺	0.4 ± 0.2	1.0 ± 0.9	5.2 ± 5.5	3.9 ± 2.8	4.1 ± 1.9	4.0 ± 3.3	3.9 ± 5.7
肝	0.1 ± 0.0	0.3 ± 0.2	0.8 ± 0.5	0.6 ± 0.4	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.3	0.5 ± 0.6
脾	0.2 ± 0.1	0.8 ± 0.6	2.2 ± 0.7	1.7 ± 0.9	1.0 ± 0.3	0.7 ± 0.5	1.7 ± 2.0
胃	1.6 ± 0.7	6.2 ± 5.0	25.9 ± 13.9	19.3 ± 11.8	11.7 ± 7.1	8.7 ± 11.9	12.6 ± 15.8
小肠	2.4 ± 2.6	6.2 ± 5.3	18.2 ± 5.4	23.5 ± 15.5	6.7 ± 1.8	10.9 ± 9.6	13.7 ± 17.2
大肠	2.2 ± 1.0	2.6 ± 2.1	17.1 ± 5.6	3.1 ± 1.5	10.2 ± 7.1	9.9 ± 7.3	15.0 ± 16.5
肾	0.6 ± 0.3	2.0 ± 2.3	5.2 ± 4.9	3.2 ± 5.8	3.2 ± 2.0	3.6 ± 2.6	2.9 ± 3.3
肌肉	4.0 ± 1.8	8.8 ± 7.0	22.8 ± 21.7	15.5 ± 13.1	21.5 ± 9.3	15.0 ± 10.5	15.0 ± 20.3
骨	0.8 ± 0.3	2.0 ± 1.6	7.4 ± 6.1	6.4 ± 7.0	3.4 ± 0.9	2.1 ± 1.4	2.0 ± 2.4
组织与肌肉的比值							
前列腺	2.6 ± 1.1	2.4 ± 1.4	4.6 ± 4.9	0.9 ± 1.1	2.1	2.1 ± 1.3	11.6 ± 20.6
膀胱	6.6 ± 4.6	1.1 ± 0.7	1.9 ± 2.6	2.2 ± 3.4	1.4 ± 0.9	4.6 ± 4.7	2.6 ± 3.3
心脏	8.3 ± 3.4	6.9 ± 3.1	3.2 ± 4.1	2.1 ± 2.4	4.4 ± 1.8	3.4 ± 1.8	5.3 ± 5.6

[0259]

肺	10.0 ± 3.8	8.5 ± 3.4	4.4 ± 4.2	4.0 ± 4.4	5.2 ± 0.9	3.8 ± 1.9	3.8 ± 2.9
肝	39.2 ± 11.8	33.5 ± 10.6	28.7 ± 22.9	26.9 ± 27.1	55.3 ± 7.1	34.9 ± 12.3	29.5 ± 20.7
脾	22.7 ± 7.5	11.6 ± 3.7	10.4 ± 9.4	9.1 ± 9.8	22.1 ± 12.3	22.6 ± 27.6	8.9 ± 7.3
胃	2.5 ± 2.6	1.4 ± 0.6	0.9 ± 0.7	0.8 ± 0.9	1.8 ± 0.2	1.7 ± 1.1	1.2 ± 1.0
小肠	1.6 ± 0.6	1.4 ± 0.5	1.3 ± 1.0	0.7 ± 0.7	3.2 ± 2.1	1.4 ± 0.6	1.1 ± 0.6
大肠	1.8 ± 0.7	3.4 ± 3.1	1.3 ± 1.6	4.9 ± 9.9	2.1 ± 1.3	1.5 ± 0.6	1.0 ± 0.6
肾	6.7 ± 2.5	4.4 ± 1.4	4.9 ± 5.2	4.8 ± 5.8	6.8 ± 2.4	4.2 ± 1.4	5.2 ± 5.0
骨	5.2 ± 3.4	4.4 ± 3.7	3.1 ± 3.6	2.4 ± 2.5	6.3 ± 4.7	7.2 ± 8.1	7.5 ± 6.6
肿瘤	4.0 ± 1.7	8.8 ± 7.1	22.8 ± 18.6	15.5 ± 16.9	21.5 ± 5.9	15.0 ± 10.4	15.0 ± 18.2

[0260] 表2显示了在注射^{89}Zr-5A10的携带LNCaP-AR肿瘤的完好雄性小鼠中通过ELISA对肿瘤组织中PSA的表达水平的分析。使用^{89}Zr-5A10对小鼠进行注射，并且在注射后的规定时间点将其处死用于PSA分析。手术切取肿瘤组织。使用PSA-导向的ELISA确定fPSA和总PSA(“tPSA”)，并且将所述值归一化至总蛋白浓度。fPSA的浓度以平均ng/ml(a)报告、总PSA(“tPSA”)浓度以ng/mL(b)报告和总蛋白浓度以ng/mg(c)报告。按照如下所示对血清和肿瘤组织中的PSA进行ELISA检测。根据生产厂商的推荐使用双标记免疫荧光检测(DELFIA Prostatus™PSA游离/总PSA;Perkin-Elmer Life Sciences)对fPSA和tPSA进行检测。该检测以等摩尔形式测定fPSA和复合的PSA(cPSA)[8]，以及PSA-ACT针对fPSA的交叉反应性<0.2%[9]。针对tPSA的检测下限为0.05μg/L(CV=5.0%，在2.32μg/L时)和针对fPSA为0.04μg/L(CV=5.9%，在0.25μg/L时)。使用Perkin-Elmer Life Sciences的1235自动免疫检测系统进行检测。通过从tPSA中扣除fPSA计算cPSA的浓度。

[0261] 表2

[0262]

小鼠#	注释	平均 fPSA[a]	平均 tPSA[b]	f/t PSA 比值	总蛋白[c]	fPSA/t 蛋白	tPSA/t 蛋白
1.00	**4 h**	171.81	239.75	0.72	6.20	27.72	38.68
2.00		134.54	175.90	0.76	5.35	25.14	32.88
3.00		355.69	537.93	0.66	6.65	53.48	80.88
5.00	**12 h**	282.14	420.15	0.67	6.30	44.75	66.64
6.00		28.22	37.33	0.76	5.03	5.61	7.42
7.00		114.51	147.79	0.77	4.92	23.29	30.06
8.00		87.30	113.79	0.77	6.24	13.98	18.23
9.00	**24 h**	158.19	212.62	0.74	6.15	25.74	34.60
10.00		96.50	125.22	0.77	5.43	17.78	23.07
11.00		106.40	146.10	0.73	6.21	17.13	23.52
12.00		264.55	355.14	0.74	6.10	43.38	58.23
13.00	**48 h**	252.67	339.09	0.75	5.54	45.64	61.25
14.00		337.09	494.87	0.68	6.25	53.94	79.19

[0263]

15.00		80.[89]	99.39	0.81	5.80	13.94	17.13
16.00		237.97	365.96	0.65	5.83	40.83	62.78
17.00	**72 h**	178.[89]	253.99	0.70	5.96	30.03	42.64
18.00		324.82	477.48	0.68	6.71	48.43	71.19
19.00		140.96	229.85	0.61	6.57	21.44	34.96
20.00		248.42	326.42	0.76	5.20	47.80	62.81
21.00	**96 h**	228.56	329.97	0.69	5.61	40.76	58.85
22.00		171.25	225.05	0.76	5.31	32.27	42.41
23.00		55.37	71.39	0.78	5.01	11.05	14.25
24.00		115.80	159.40	0.73	5.90	19.62	27.01
27.00		56.49	68.26	0.83	3.59	15.75	19.03
28.00		71.14	94.26	0.75	6.04	11.78	15.61

[0264] PET研究中显示的在肿瘤中的对比区域支持生物分布数据(图3b)。图3b提供了携带LNCaP-AR异种移植瘤的完好雄性小鼠的代表性的横截(Trans.)和冠状PET切片,其显示了^{89}Zr-5A10在肿瘤(T)的定位和小鼠肝脏(L)的摄取情况。PET成像实验在微PET焦点120扫描仪(Concorde Microsystems)上进行。在重复研究中(n=4),通过i.v.尾静脉注射给予小鼠^{89}Zr-5A10的制剂(10.4-12.6MBq,[280-340μCi],53.1-64.5μg蛋白,在200μL无菌注射用盐水中)。在记录PET图像前约5min,通过吸入1-2%异氟烷(Baxter Healthcare,Deerfield,IL)/氧气的混合物将小鼠麻醉并将其置于扫描仪的床上。在注射后1-120h之间的不同时间点记录PET图像。在10至30min之间使用350-750keV的γ-射线能量窗以及6ns的符合时间窗(coincidence timing window)采集列表模式数据。对于所有的静态图像而言,调整扫描时间以确保最少记录2000万个符合事件。通过傅里叶重新分级将数据分选成2-维直方图,并且通过滤波反投影法(FBP)将横截的图像重建成128×128×63(0.72×0.72×1.3mm)的矩阵。针对^{89}Zr重建的空间分辨率为在视场(FOV)中心的1.9mm半高全宽(FWHM)。对图像数据进行归一化以针对PET应答的非均一性、死时间的计数损失、正电子分支比和注射时间的物理衰变进行校正,但不使用衰变、散射或部分体积平均校正。使用针对小鼠的经验确定系统校正系数(单位为[mCi/mL]/[cps/立体像素])将立体像素计数率转化为活性浓度。然后将所得到的图像数据归一化到所给予的活性以将图像参数化,并用%ID/g表示。使用手工绘制的2-维目的区域(ROI)或3-维目的体积(VOI)以确定在不同组织中的最大和平均%ID/g(以注射时间校正衰变)。使用ASIPro VM™软件(Concorde Microsystems)对图像进行分析。

[0265] 使用100倍过量的未经标记的5A10竞争^{89}Zr-5A10的摄取,确证了^{89}Zr-5A10和LNCaP-AR之间生物相互作用的特异性(图3c、图5、表3和表4)。同时给予携带肿瘤的小鼠^{89}Zr-5A10和过量的5A10(1mg/小鼠),并且在注射后24h,将其处死并收集用于生物分布研究的血液和组织。图3c中提供的生物分布数据显示了在完好雄性小鼠中的多个s.c.PCa模型和若干处理条件下的肿瘤结合的^{89}Zr-5A10。通过共同注射过量的未经标记的5A10(1mg未经标记的mAb)完全竞争了^{89}Zr-5A10向LNCaP-AR的定位。非特异性放射性示踪剂^{89}Zr-IgG未定位于LNCaP-AR,并且^{89}Zr-5A10未定位于PC3,其为不表达AR-和PSA-的前列腺癌模型。观察到^{89}Zr-5A10居间地定位于CWR22Rv1异种移植瘤,这与同LNCaP-AR相比在该模型中PSA具有较低的基线表达一致。*表示与所有条件下比较P<0.01。"表示与PC3比较P<0.01。表3显示了

在携带LNCaP-AR肿瘤的完整小鼠中，共同注射过量的未经标记的5A10后，^{89}Zr-5A10摄取的生物分布数据。其为在右肩部携带皮下LNCaP-AR肿瘤的完好雄性SCID小鼠中，共同注射1mg 5A10后，在i.v.给药后多个时间点针对^{89}Zr-5A10(n＝4)的离体生物分布数据。数据以平均%ID/g±一个标准偏差(S.D.)表示。针对所述比值的误差以标准偏差的几何平均数计算。

[0266] 表3

[0267]

	生物分布		肿瘤与组织的比值		组织与肌肉的比值	
	假手术	阻断	假手术	阻断	假手术	阻断
器官	24 h (n=4)	24 h (n=4)	24 h (n=4)	24 h (n=4)	24 h (n=4)	24 h (n=4)
血液	6.67 ± 3.0	17.0 ± 13.4	2.9 ± 1.5	0.2 ± 0.2		
膀胱	1.59 ± 1.8	0.93 ± 0.3	12.3 ± 14.9	4.4 ± 2	1.9 ± 2.6	0.6 ± 0.7
心脏	2.74 ± 2.8	2.03 ± 0.7	7.1 ± 7.6	2.0 ± 0.9	3.2 ± 4.1	1.3 ± 1.5
肺	3.79 ± 2.0	3.47 ± 1.7	5.2 ± 3.1	1.2 ± 0.6	4.4 ± 4.2	2.2 ± 2.7
肝	24.56 ± 4.9	24.0 ± 2.3	0.8 ± 0.3	0.2 ± 0	28.7 ± 22.9	15.4 ± 16.7
脾	8.90 ± 4.1	11.43 ± 4.51	2.2 ± 1.2	0.4 ± 0.2	10.4 ± 9.4	7.3 ± 8.4
胃	0.75 ± 0.11	0.86 ± 0.2	25.9 ± 7.7	4.8 ± 1	0.9 ± 0.7	0.6 ± 0.6
小肠	1.07 ± 0.2	1.04 ± 0.2	18.2 ± 6.0	4.0 ± 1	1.3 ± 1.0	0.7 ± 0.7
大肠	1.14 ± 1.04	1.00 ± 0.2	17.1 ± 16.2	1.3 ± 0.4	1.3 ± 1.6	0.6 ± 0.7
肾	3.74 ± 3.4	3.26 ± 0.7	5.2 ± 5.0	2.7 ± 3	4.4 ± 5.2	2.1 ± 2.3
肌肉	0.86 ± 0.6	1.56 ± 1.6	22.8 ± 18	3.2 ± 1		
骨	2.63 ± 2.2	1.27 ± 0.3	7.4 ± 6	1.0 ± 0.3	3.1 ± 3.4	1.0 ± 1.5
肿瘤	19.54 ± 4.9	4.12 ± 0.9			22.8 ± 26.5	0.8 ± 0.9

[0268] 表4中包括在携带LNCaP-AR异种移植瘤的完好雄性小鼠中，共同注射给予^{89}Zr-5A10和过量的未经标记的5A10，对肿瘤中PSA的检测结果。注射给予小鼠^{89}Zr-5A10和过量的未经标记的5A10(1mg)，并且在注射后的规定时间点将其处死用于PSA分析。手术切取肿瘤组织。使用PSA导向的ELISA(如上文所示)确定fPSA和tPSA，并将所述值归一化至总蛋白浓度。[a]fPSA的浓度以ng/ml报告，[b]总PSA浓度以ng/mL报告，[c]总蛋白浓度以ng/mg报告。缩写：fPSA，fPSA；tPSA，总PSA。

[0269] 表4

[0270]

小鼠#	样品	fPSA[a]	tPSA[b]	f/t PSA比值	t蛋白[c]	fPSA/t蛋白	tPSA/t蛋白
1.0	肿瘤	10.1	250.4	0.0	5.2	1.9	47.8
2.0	肿瘤	9.7	220.6	0.0	6.1	1.6	36.2
3.0	肿瘤	15.7	613.0	0.0	6.2	2.5	98.1
4.0	肿瘤	11.5	483.4	0.0	6.1	1.9	78.9

[0271] 而且，在24h p.i.后，几乎没有非特异性放射性示踪剂^{89}Zr-标记的小鼠IgG掺入LNCaP-AR中(图3c、图6、表5和表6)。图6显示了注射^{89}Zr-5A10的携带LNCaP-AR、PC3或CWR22Rv1异种移植瘤的完好雄性小鼠的生物分布图。给予携带肿瘤的小鼠^{89}Zr-5A10，并且在注射24h后，将其处死收集用于生物分布研究的血液和组织。数据以平均%ID/g±一个标准偏差报告。表5显示了在携带LNCaP-AR肿瘤的完好小鼠中针对^{89}Zr-IgG摄取的生物分布数

据。在右肩部携带皮下LNCaP-AR肿瘤的完好雄性SCID小鼠中在i.v.给药后多个时间点^{89}Zr-IgG(n=4)的离体生物分布数据。数据以平均%ID/g±一个标准偏差(S.D.)表示。所述比值的误差以标准偏差的几何平均数计算。

[0272] 表5

[0273]

组织	4 h (n=4)	12 h (n=4)	24 h (n=4)	48 h (n=4)	72 h (n=4)	96 h (n=4)	120 h (n=4)
血液	37.55 ± 16.43	36.17 ± 5.68	24.96 ± 8.14	23.71 ± 3.79	21.54 ± 2.64	17.39 ± 4.42	16.04 ± 4.89
前列腺	3.25 ± 0.57	2.76 ± 0.25	1.66 ± 0.86	1.49 ± 0.72	1.31 ± 1.24	1.01 ± 0.69	2.51
膀胱	10.16 ± 2.45	12.53 ± 2.73	7.73 ± 3.12	5.95 ± 0.67	5.69 ± 0.35	5.68 ± 1.51	3.52 ± 1.40
心脏	12.35 ± 3.43	17.64 ± 3.76	8.51 ± 3.46	9.98 ± 2.73	9.88 ± 3.32	7.23 ± 3.39	4.60 ± 1.77
肺	23.73 ± 6.35	23.12 ± 5.80	17.88 ± 3.77	21.73 ± 6.01	25.09 ± 5.59	15.91 ± 4.64	18.10 ± 7.46
肝	12.86 ± 2.86	13.26 ± 2.36	10.15 ± 2.75	11.07 ± 2.04	13.16 ± 4.74	8.21 ± 2.04	8.87 ± 2.29
脾	1.76 ± 0.21	1.92 ± 1.18	1.30 ± 0.41	0.99 ± 0.18	0.89 ± 0.32	0.73 ± 0.30	0.66 ± 0.24
胃	3.83 ± 0.71	1.64 ± 0.13	1.57 ± 0.26	1.13 ± 0.16	1.10 ± 0.21	0.74 ± 0.32	0.77 ± 0.22
小肠	3.77 ± 0.98	2.00 ± 0.69	2.04 ± 0.76	1.31 ± 0.31	1.21 ± 0.40	0.98 ± 0.31	0.94 ± 0.37
大肠	10.44 ± 1.20	11.76 ± 0.84	9.79 ± 2.07	9.43 ± 1.79	9.18 ± 1.63	7.41 ± 2.30	6.70 ± 3.16
肾	1.66 ± 0.42	1.37 ± 0.18	1.26 ± 0.28	1.08 ± 0.09	0.97 ± 0.10	0.65 ± 0.18	0.50 ± 0.35
肌肉	3.55 ± 1.40	3.94 ± 0.85	2.74 ± 1.25	2.53 ± 0.41	2.94 ± 0.39	2.06 ± 1.75	1.89 ± 0.56
骨	5.74 ± 1.43	7.04 ± 2.45	4.80 ± 1.31	3.52 ± 1.13	3.45 ± 1.37	3.56 ± 1.44	3.65 ± 1.16
肿瘤	3.05 ± 1.68	2.55 ± 0.24	2.49 ± 1.14	2.52 ± 0.61	1.89 ± 1.12	0.59 ± 0.36	0.09 ± 0.08
肿瘤与组织的比值							
血液	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1
前列腺	1.8 ± 0.4	2.5 ± 0.3	2.9 ± 1.6	2.4 ± 1.2	2.6 ± 2.6	3.5 ± 2.5	1.5
膀胱	1.9 ± 1.1	2.8 ± 0.3	1.9 ± 1.0	1.4 ± 0.4	1.8 ± 1.3	6.1 ± 3.9	42.5 ± 19.1
心脏	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.3	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.2	0.6 ± 0.2	1.0 ± 1.0
肺	0.5 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.6 ± 0.3	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.2	0.5 ± 0.3	0.8 ± 0.4
肝	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1
脾	0.4 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.2	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.2
胃	3.3 ± 0.5	3. ± 2.3	3.7 ± 1.4	3.6 ± 1.0	3.9 ± 2.0	4.9 ± 2.2	5.6 ± 2.3
小肠	1.5 ± 0.3	4.3 ± 0.4	3.1 ± 0.7	3.1 ± 0.8	3.1 ± 1.3	4.8 ± 2.3	5.0 ± 2.4
大肠	1.5 ± 0.4	3.5 ± 1.2	2.4 ± 1.0	2.7 ± 0.8	2.8 ± 1.4	3.6 ± 1.3	3.9 ± 1.7
肾	3.5 ± 0.9	0.6 ± 0.0	0.5 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.2	0.5 ± 0.2	0.5 ± 0.3
肌肉	1.6 ± 0.7	5.2 ± 0.7	3.8 ± 1.1	3.3 ± 0.7	3.6 ± 1.3	5.5 ± 1.9	7.3 ± 4.2
骨	1.66 ± 0.42	1.8 ± 0.4	1.8 ± 0.9	1.4 ± 0.4	1.2 ± 0.4	1.7 ± 1.5	1.9 ± 1.5
组织与肌肉的比值							
前列腺	2.0 ± 0.6	2.0 ± 0.3	1.3 ± 0.7	1.4 ± 0.7	1.4 ± 1.3	1.6 ± 1.2	5
膀胱	3.5 ± 1.2	5.2 ± 1.9	3.8 ± 1.3	3.3 ± 1.1	3.6 ± 1.5	5.5 ± 2.7	7.3 ± 5.6
心脏	1.8 ± 1.1	1.9 ± 0.3	2.0 ± 1.0	2.3 ± 0.6	2.0 ± 1.2	0.9 ± 0.6	0.2 ± 0.2
肺	6.1 ± 2.1	9.2 ± 2.3	6.2 ± 2.8	5.5 ± 0.8	5.9 ± 0.7	8.7 ± 3.4	7.1 ± 5.7
肝	7.4 ± 2.8	12.9 ± 3.2	6.8 ± 3.1	9.2 ± 2.6	10.2 ± 3.6	11.1 ± 6.1	9.2 ± 7.3
脾	14.3 ± 5.2	16.9 ± 4.8	14.2 ± 4.4	20.1 ± 5.8	25.9 ± 6.4	24.5 ± 9.9	36.2 ± 29.4
胃	7.7 ± 2.6	9.7 ± 2.2	8.1 ± 2.8	10.3 ± 2.1	13.6 ± 5.1	12.7 ± 4.7	17.7 ± 13.2
小肠	1.1 ± 0.3	1.4 ± 0.9	1.0 ± 0.4	0.9 ± 0.2	0.9 ± 0.4	1.1 ± 0.6	1.3 ± 1.0
大肠	2.3 ± 0.7	1.2 ± 0.2	1.3 ± 0.3	1.0 ± 0.2	1.1 ± 0.3	1.1 ± 0.6	1.5 ± 1.1
肾	2.3 ± 0.8	1.5 ± 0.5	1.6 ± 0.7	1.2 ± 0.3	1.3 ± 0.4	1.5 ± 0.6	1.9 ± 1.5
骨	6.3 ± 1.7	8.6 ± 1.3	7.8 ± 2.4	8.7 ± 1.8	9.5 ± 2.0	11.4 ± 4.8	13.4 ± 11.3
肿瘤	2.1 ± 1.0	2.9 ± 0.7	2.2 ± 1.1	2.3 ± 0.4	3.0 ± 0.5	3.2 ± 2.8	3.8 ± 2.9

[0274] 表6显示了在携带LNCaP-AR肿瘤的完好雄性小鼠中,注射^{89}Zr-IgG后,通过ELISA对肿瘤PSA表达水平的分析。注射给予小鼠^{89}Zr-IgG,并且在注射后的规定时间点,将其处死用于PSA分析。手术切取肿瘤组织。使用PSA导向的ELISA(如上文所示)确定fPSA和tPSA,并且

在瘤内PSA的情况下，将所述值归一化至总蛋白浓度。[a]fPSA的浓度以ng/ml报告，[b]总PSA浓度以ng/mL报告，[c]总蛋白浓度以ng/mg报告。缩写：fPSA，fPSA；tPSA，总PSA。

[0275] 表6

[0276]

小鼠	注释	fPSA[a]	tPSA[b]	f/t PSA比值	总蛋白[c]	fPSA/t蛋白	tPSA/t蛋白
1	4h	132.6	180.2	74%	5.6	23.7	32.2
2		71.2	94.0	76%	4.8	14.7	19.4
3		114.6	155.5	74%	6.7	17.1	23.2
4		61.4	78.5	78%	5.4	11.3	14.5
5	12h	174.2	250.4	70%	6.9	25.1	36.1
6		59.3	79.1	75%	4.7	12.6	16.8
7		161.7	232.2	70%	6.3	25.6	36.8
8		259.8	369.5	70%	7.1	36.6	52.1
9	24h	105.2	140.0	75%	6.2	16.9	22.5
10		147.4	214.9	69%	6.9	21.4	31.3
11		141.3	199.3	71%	6.1	23.2	32.7
12		115.9	155.2	75%	5.5	21.2	28.4
13	48h	55.5	75.8	73%	5.9	9.4	12.8
14		73.1	87.0	84%	6.3	11.5	13.7
15		39.4	47.4	83%	3.7	10.7	12.8
16		40.9	53.1	77%	4.5	9.1	11.8
17	72h	110.9	152.9	73%	6.2	17.9	24.6
18		114.5	145.2	79%	6.7	17.2	21.8
19		203.3	277.8	73%	7.2	28.1	38.4
20		93.5	124.8	75%	7.2	13.0	17.3
21	96h	22.6	30.7	74%	3.1	7.4	10.0
22		116.4	147.7	79%	7.4	15.8	20.0
23		95.8	123.4	78%	6.6	14.5	18.7
24		189.4	251.8	75%	6.8	28.0	37.2
25	120h	101.9	135.3	75%	6.6	15.3	20.4
26		87.0	112.5	77%	5.9	14.8	19.1
27		214.4	304.4	70%	7.5	28.7	40.7
28		132.0	179.4	74%	6.2	21.2	28.7
29	未注射	217.9	303.8	72%	7.7	28.2	39.3
30	未注射	157.2	215.3	73%	7.1	22.0	30.1
31	未注射	183.0	239.7	76%	6.0	30.5	39.9
32	未注射	49.7	63.0	79%	4.3	11.6	14.7

[0277] 与预期结果一致，PC3异种移植瘤，其为AR-和PSA-阴性的人PCa模型，在24h p.i.后，几乎未显示出对^{89}Zr-5A10的亲和力(图3c、图7和表7)。在图7中，给予携带肿瘤的小鼠

^{89}Zr-5A10，并且在注射后24h将其处死并收集用于生物分布研究的血液和组织。数据以平均%ID/g+一个标准偏差的形式报告。

[0278] 表7显示了在携带PC3肿瘤的完好雄性小鼠中^{89}Zr-5A10摄取的生物分布数据。其为在具有皮下肿瘤的完好雄性小鼠中(n＝4)^{89}Zr-5A10摄取的离体生物分布数据。在i.v.给药后24h采集数据。数据以平均%ID/g±一个标准偏差(S.D.)表示。所述比值的误差以标准偏差的几何平均数计算。

[0279] 表7

[0280]

生物分布		肿瘤与组织的比值		组织与肌肉的比值	
器官	24 h (n=4)	器官	24 h (n=4)	器官	24 h (n=4)
血液	25.86 ± 5.5	血液	0.1 ± 0.1	前列腺	0.8 ± 0.5
前列腺	1.71 ± 0.8	前列腺	1.7 ± 1.3	膀胱	1.5 ± 0.9
膀胱	2.99 ± 1.5	膀胱	0.8 ± 0.6	心脏	1.8 ± 0.7
心脏	3.68 ± 0.2	心脏	0.4 ± 0.2	肺	3.4 ± 1.4
肺	7.00 ± 0.9	肺	0.3 ± 0.1	肝	5.1 ± 2.8
肝	10.43 ± 4.2	肝	0.3 ± 0.2	脾	5.3 ± 2.4
脾	10.90 ± 2.7	脾	0.4 ± 0.2	胃	3.3 ± 1.3
胃	6.83 ± 0.9	胃	1.8 ± 1.0	小肠	0.8 ± 0.4
小肠	1.64 ± 0.3	小肠	2.0 ± 1.1	大肠	0.7 ± 0.4
大肠	1.50 ± 0.5	大肠	1.3 ± 0.8	肾	1.1 ± 0.5
肾	2.28 ± 0.6	肾	0.5 ± 0.3	骨	3.0 ± 1.3
肌肉	6.18 ± 1.3	肌肉	1.5 ± 0.8	肿瘤	1.3 ± 0.6
骨	2.04 ± 0.7	骨	1.1 ± 0.7		
肿瘤	2.68 ± 0.5				

[0281] 最后，测定了s.c.CWR22Rv1异种移植瘤对^{89}Zr-5A10的亲和力，其为另一种AR-和PSA-阳性的PCa模型(图3c、图7和表8)。表8提供了在携带CWR22Rv1肿瘤的完好雄性小鼠中^{89}Zr-5A10摄取的生物分布数据。其为在携带皮下CWR22Rv1肿瘤的完好雄性小鼠中(n＝4)^{89}Zr-5A10摄取的离体生物分布数据。在i.v.给药后24h采集数据。数据以平均%ID/g±一个标准偏差(S.D.)表示。所述比值的误差以标准偏差的几何平均数计算。

[0282] 表8

[0283]

生物分布		肿瘤与组织的比值		组织与肌肉的比值	
器官	24 h (n=4)	器官	24 h (n=4)	器官	24 h (n=4)
血液	2.53 ± 0.9	血液	3.4 ± 1.5	膀胱	4.6 ± 4.0
膀胱	2.94 ± 2.1	膀胱	2.9 ± 2.2	心脏	3.2 ± 1.5
心脏	2.05 ± 0.1	心脏	4.2 ± 1.0	肺	4.8 ± 2.6
肺	3.06 ± 0.8	肺	2.8 ± 1.0	肝	41.2 ± 21.2
肝	26.11 ± 5.7	肝	0.3 ± 0.1	脾	50.2 ± 24.1
脾	31.84 ± 3.6	脾	0.3 ± 0.1	胃	1.0 ± 0.9
胃	0.64 ± 0.5	胃	13.3 ± 10.7	小肠	1.1 ± 0.8
小肠	0.67 ± 0.4	小肠	12.7 ± 8.4	大肠	1.1 ± 1.1
大肠	0.72 ± 0.6	大肠	11.9 ± 11	肾	22.8 ± 10.8
肾	14.44 ± 1.3	肾	0.6 ± 0.2	骨	9.5 ± 0.7
肌肉	0.63 ± 0.3	肌肉	13.5 ± 7.1	肿瘤	13.5 ± 7.1
骨	6.01 ± 0.3	骨	1.4 ± 0.4		
肿瘤	8.59 ± 2.0				

[0284] 实施例3：^{89}Zr-5A10对雄激素调节fPSA表达升高的检测

[0285] 下述实施例表明^{89}Zr-5A10能够检测雄激素调节的fPSA表达的升高。将去势雄性小鼠接种LNCaP-AR，并且在肿瘤形成后，将动物不进行处理或手术s.c.植入睾酮颗粒。处置7d

后给予^{89}Zr-5A10，并在24h p.i.后进行生物分布研究。与对照相比在给予睾酮的LNCaP-AR异种移植瘤中^{89}Zr-5A10的定位显著增加(图3d、图8和表9)。图8显示了携带LNCaP-AR异种移植瘤的去势雄性小鼠中，具有或不具有皮下睾酮颗粒，注射^{89}Zr-5A10的生物分布曲线。手术植入睾酮颗粒或不进行处理(No Tx)6天后，给予携带肿瘤的小鼠^{89}Zr-5A10，并且在注射后24h将其处死并收集用于生物分布研究的血液和组织。数据以平均%ID/g+一个标准偏差的形式报告。*表示与No Tx相比在给予睾酮的动物中^{89}Zr-5A10的瘤内摄取P<0.01。如表9所示，给予雄激素治疗后，^{89}Zr-5A10在携带LNCaP-AR肿瘤的去势雄性小鼠中的生物分布摄取显著升高。其为显示在携带LNCaP-AR异种移植瘤的去势雄性小鼠中^{89}Zr-5A10摄取的离体生物分布数据。动物(n=4)未进行处理(No Tx)或给予皮下睾酮颗粒(Test.)。7d后，注射给予动物^{89}Zr-5A10，并且在放射性示踪剂i.v.24h后采集生物分布数据。数据以平均%ID/g±一个标准偏差(S.D.)表示。所述比值的误差以标准偏差的几何平均数计算。

[0286] 表9

[0287]

	生物分布		肿瘤与组织的比值		组织与肌肉的比值	
	No Tx	Test.	No Tx	Test.	No Tx	Test.
器官	24 h (n=4)	24 h (n=4)	24 h (n=4)	24 h (n=4)	24 h (n=4)	24 h (n=4)
血液	9.85 ± 7.36	4.57 ± 1.78	2.3 ± 1.9	7.7 ± 4.2		
膀胱	1.22 ± 0.87	1.75 ± 0.78	18.7 ± 9.6	20.2 ± 10.7	1.5 ± 1.2	2.2 ± 1.3
心脏	4.41 ± 1.59	3.57 ± 1.03	5.2 ± 4.1	9.9 ± 5.7	5.5 ± 2.9	4.5 ± 2.2
肺	8.83 ± 2.13	6.63 ± 2.07	2.6 ± 1.3	5.3 ± 2.5	11.0 ± 5.1	8.3 ± 4.2
肝	59.08 ± 27.03	40.79 ± 14.15	0.4 ± 0.2	0.9 ± 0.4	73.7 ± 44.3	51.3 ± 27.3
脾	19.36 ± 2.12	12.19 ± 4.09	1.2 ± 0.7	2.9 ± 1.5	24.2 ± 9.8	15.3 ± 8.0
胃	1.14 ± 0.27	0.68 ± 0.85	20.0 ± 7.6	52.2 ± 26.2	1.4 ± 0.6	0.9 ± 1.1
小肠	1.31 ± 0.44	0.83 ± 0.18	17.4 ± 7.5	42.5 ± 55.6	1.6 ± 0.8	1.0 ± 0.5
大肠	2.49 ± 0.97	1.00 ± 0.17	9.2 ± 4.6	35.5 ± 15.4	3.1 ± 1.7	1.3 ± 0.5
肾	8.32 ± 1.90	4.79 ± 0.96	2.7 ± 1.5	7.4 ± 3.0	10.4 ± 4.7	6.0 ± 2.7
肌肉	0.80 ± 0.31	0.79 ± 0.32	28.4 ± 12.2	44.5 ± 18.8		
骨	3.16 ± 1.42	2.65 ± 0.76	7.2 ± 3.8	13.3 ± 7.3	3.9 ± 2.3	2.2 ± 1.3
肿瘤	22.75 ± 8.28	35.33 ± 13.15			28.4 ± 15.1	44.5 ± 24.4

[0288] 与预期结果一致，瘤内PSA水平也升高(表10)。表10提供了在携带LNCaP-AR异种移植瘤的去势雄性小鼠中，未进行处理或皮下给予睾酮颗粒后的瘤内PSA浓度。对携带LNCaP-AR异种移植瘤的去势雄性小鼠未进行处理(VEH#)或皮下给予睾酮颗粒(TEST#)，处理6天后，注射给予^{89}Zr-5A10。注射后24小时，处死小鼠用于PSA分析。手术切取肿瘤组织。使用PSA导向的ELISA(如上文所示)确定fPSA和tPSA，并且在瘤内PSA的情况下，将所述值归一化至总蛋白浓度。[a]fPSA的浓度以ng/ml报告，[b]总PSA浓度以ng/mL报告，[c]总蛋白浓度以ng/mg报告。缩写：fPSA，fPSA；tPSA，总PSA。

[0289] 表10

[0290]

小鼠	fPSA	tPSA	f/t PSA 比值	总蛋白	fPSA/t 蛋白	tPSA/t 蛋白
VEH1	91.37	139.75	0.65	8.31	10.99	16.81
VEH2	96.19	125.86	0.76	6.86	14.03	18.36
VEH3	285.18	419.60	0.68	7.68	37.15	54.66
VEH4	159.43	198.58	0.80	8.38	19.02	23.69
TEST2	566.42	2765.37	0.20	8.51	66.60	325.14
TEST3	147.77	183.28	0.81	6.51	22.69	28.14
TEST4	424.31	707.52	0.60	8.23	51.56	85.98
TEST5	384.89	551.47	0.70	5.88	65.44	93.77

[0291] 在CWR22Rv1异种移植瘤中观察到了类似结果(图8、表11和表12)。在图8中,手术植入睾酮颗粒或不进行处理(No Tx)6天后,给予携带肿瘤的小鼠^{89}Zr-5A10,并且在注射后24h将其处死并且收集用于生物分布研究的血液和组织。数据以平均cpm/g+一个标准偏差的形式报告。*表示与No Tx相比在给予睾酮的动物中^{89}Zr-5A10的瘤内摄取P<0.05。表11提供了显示在携带CWR22Rv1异种移植瘤的去势雄性小鼠中^{89}Zr-5A10摄取的离体生物分布数据。在给予^{89}Zr-5A10 7天前,对动物(n=4)不进行处理(No Tx)或皮下给予其睾酮颗粒(Test.)。在放射性示踪剂i.v.后24h采集生物分布数据。数据以平均%ID/g±一个标准偏差(S.D.)表示。所述比值的误差以标准偏差的几何平均数计算。

[0292] 表11

[0293]

	生物分布		*肿瘤与组织的比值*		*组织与肌肉的比值*	
	No Tx	*Test.*	*No Tx*	*Test.*	*No Tx*	*Test.*
器官	**24 h (n=4)**	**24 h (n=4)**	**24 h (n=4)**	**24 h (n=4)**	**24 h (n=4)**	**24 h (n=4)**
血液	7.35 ± 0.35	6.04 ± 0.59	0.3 ± 0.1	0.6 ± 0.1	15.4 ± 1.8	18.3 ± 3.8
前列腺	7.18 ± 0.42	8.97 ± 1.29	0.3 ± 0.1	0.4 ± 0.1	4.5 ± 1.8	7.0 ± 1.0
膀胱	1.62 ± 0.55	5.84 ± 3.3	1.3 ± 0.7	0.6 ± 0.0	3.5 ± 1.2	11.9 ± 7.0
心脏	2.19 ± 0.38	1.86 ± 0.42	1.0 ± 0.5	1.9 ± 1.0	4.7 ± 0.9	3.8 ± 1.0
肺	2.09 ± 0.16	1.83 ± 0.15	1.0 ± 0.4	1.9 ± 0.4	4.5 ± 0.6	3.7 ± 0.6
肝	5.28 ± 1.21	5.70 ± 1.17	0.4 ± 0.2	0.6 ± 0.1	11.3 ± 2.8	11.6 ± 2.9
脾	4.12 ± 0.77	4.34 ± 1.49	0.5 ± 0.2	0.8 ± 0.2	8.8 ± 1.9	8.9 ± 3.3
胃	0.48 ± 0.06	0.35 ± 0.11	4.4 ± 1.8	9.6 ± 3.3	1.0 ± 0.2	0.7 ± 0.2
小肠	0.63 ± 0.03	0.35 ± 0.09	3.4 ± 1.3	9.8 ± 3.0	1.3 ± 0.2	0.7 ± 0.2
大肠	0.54 ± 0.05	0.45 ± 0.09	3.9 ± 1.5	7.5 ± 2.1	1.2 ± 0.2	0.9 ± 0.2
肾	2.16 ± 0.23	1.40 ± 0.08	1.0 ± 0.4	2.5 ± 0.5	4.6 ± 0.7	2.9 ± 0.4
肌肉	0.46 ± 0.04	0.49 ± 0.07	4.5 ± 1.8	7.0 ± 0.5	2.8 ± 1.0	2.9 ± 1.5
骨	1.31 ± 0.46	1.39 ± 0.69	1.6 ± 0.6	2.5 ± 0.4		
肿瘤	2.10 ± 0.78	3.44 ± 0.09				

[0294]

[0295] 表12提供了在携带22Rv1肿瘤的去势雄性小鼠中,注射给予^{89}Zr-5A10后,通过

ELISA对肿瘤中PSA的表达水平的分析。携带22Rv1异种移植瘤的去势雄性小鼠未进行处理(VEH#)或皮下给予睾酮颗粒(TEST#)，并且在处理6天后，注射给予^{89}Zr-5A10。注射24小时后，处死小鼠用于PSA分析。手术切取肿瘤组织。使用PSA导向的ELISA(如上文所示)确定fPSA和tPSA，并且将所述值归一化至总蛋白浓度。[a]fPSA的浓度以ng/ml报告，[b]总PSA浓度以ng/mL报告，[c]总蛋白浓度以ng/mg报告。缩写：fPSA，fPSA；tPSA，总PSA。

[0296] 表12

[0297]

小鼠	fPSA[a]	tPSA[b]	总蛋白[c]	fPSA/t蛋白	tPSA/t蛋白
VEH 1	4.83	13.93	5.88	0.82	2.44
VEH 2	7.37	22.91	8.47	0.87	2.62
VEH 3	10.87	20.84	7.74	1.40	2.62
VEH 4	4.32	16.12	8.38	0.52	1.93
VEH 5	10.0	27.42	7.94	1.27	3.41
TEST 1	32.9	67.20	7.86	4.19	8.37
TEST 2	31.0	69.52	8.62	3.60	8.12
TEST 4	26.8	71.43	9.47	2.84	7.50
TEST 5	29.8	61.42	8.67	3.44	6.78

[0298] 总之，这些结果表明^{89}Zr-5A10能够真实地反映瘤内AR信号。

[0299] 实施例4：使用^{89}Zr-5A10对体内雄激素受体信号的体内定量

[0300] 下述实施例显示了fPSA特异性单克隆抗体在体内对雄激素受体信号进行定量的能力。在这一特定实施方式中，使用抗雄激素MDV3100通过^{89}Zr-5A10PET在体内对AR的药理学抑制情况进行定量，MDV3100的临床活性与在LNCaP-AR模型中的应答具有相关性。

[0301] 将MDV3100溶解在DMSO中，以使得当给予动物时DMSO的终浓度为5％。赋形剂的配方为1％羧甲基纤维素、0.1％吐温-80和5％DMSO。MDV3100或赋形剂通过灌胃每日给予。根据此前已报道的方法通过外部游标卡尺测量估计肿瘤的体积(V/mm3)(Holland,J.P.等，Measuring the pharmacokinetic effects of a novel Hsp90inhibitor on HER2/neu expression in mice using ^{89}Zr-DFO-trastuzumab,PLoS ONE,2010,5(1),e8859)。

[0302] s.c.给予去势雄性小鼠LNCaP-AR异种移植瘤，并且将携带肿瘤的小鼠随机分成每日一次灌胃给予赋形剂或者10、40或80mg/kg MDV3100的组。开始给药7天后，给予^{89}Zr-5A10，并且在24h p.i后进行生物分布研究(图10a、图11和表13)。在图10a中，携带LNCaP-AR异种移植瘤的去势雄性小鼠的生物分布数据显示MDV3100抑制^{89}Zr-5A10向肿瘤的定位。连续7d给予动物赋形剂或者规定剂量的MDV3100，第7天时注射^{89}Zr-5A10，并且在24p.i.后收集用于生物分布研究的动物。*表示与赋形剂或10mg/kgMDV3100相比40mg/kg和80mg/kg剂量的MDV3100P<0.01。图11是携带LNCaP-AR异种移植瘤的去势雄性小鼠，给予赋形剂或MDV3100，并且注射^{89}Zr-5A10的生物分布曲线，其同样显示了MDV3100以剂量依赖性的方式抑制^{89}Zr-5A10定位于前列腺癌。给予携带肿瘤的去势小鼠赋形剂或规定剂量的MDV3100(每日灌胃给药)。在第6天时，注射给予小鼠^{89}Zr-5A10，并且在注射24h后，将其处死并收集用于生物分布研究的血液和组织。数据以平均％ID/g±一个标准偏差的形式报告。*表示与赋形剂相比MDV3100 40mg/kg和80mg/kg的P<0.01。与10mg/kg剂量的MDV3100相比40和80mg/kg

剂量的P<0.05。表13显示了表示在携带LNCaP-AR异种移植瘤的去势雄性小鼠中^{89}Zr-5A10摄取的离体生物分布数据。通过每日灌胃给予动物(n＝4)溶剂或规定剂量的MDV3100(MDV)。在第6天时,i.v.给予^{89}Zr-5A10。在i.v.给予放射性示踪剂24h后采集生物分布数据。

[0303] 表13

[0304]

	溶剂	*MDV (10 mg/kg)*	*MDV (40 mg/kg)*	*MDV (80 mg/kg)*
组织	**24 h (n=4)**	**24 h (n=4)**	**24 h (n=4)**	**24 h (n=4)**
血液	9.85 ± 7.36	5.70 ± 1.17	4.08 ± 2.25	4.13 ± 2.49
膀胱	1.22 ± 0.87	1.14 ± 0.53	0.50 ± 0.22	0.94 ± 0.17
心脏	4.41 ± 1.59	6.21 ± 1.87	3.52 ± 0.64	3.32 ± 1.14
肺	8.83 ± 2.13	9.80 ± 3.28	6.37 ± 2.41	7.31 ± 1.60
肝	59.08 ± 27.03	46.95 ± 12.13	37.21 ± 0.67	28.66 ± 7.94
脾	19.36 ± 2.12	18.08 ± 4.45	14.18 ± 4.03	13.05 ± 5.66
胃	1.14 ± 0.27	0.31 ± 0.03	0.53 ± 0.33	0.69 ± 0.31
小肠	1.31 ± 0.44	0.99 ± 0.29	0.98 ± 0.41	0.99 ± 0.15
大肠	2.49 ± 0.97	0.89 ± 0.17	0.67 ± 0.18	0.99 ± 0.39
肾	8.32 ± 1.90	9.44 ± 2.17	9.32 ± 1.17	7.95 ± 0.96
肌肉	0.80 ± 0.31	0.65 ± 0.31	0.47 ± 0.29	0.58 ± 0.35
骨	3.16 ± 1.42	1.91 ± 0.42	3.13 ± 0.69	2.31 ± 1.39
肿瘤	22.75 ± 8.28	14.12 ± 8.0	4.57 ± 1.78	3.19 ± 1.4
肿瘤与组织的比值				
血液	2.3 ± 1.9	2.5 ± 1.5	1.1 ± 0.8	0.8 ± 0.6
膀胱	18.7 ± 9.6	12.4 ± 9.9	9.1 ± 5.0	3.4 ± 2.1
心脏	5.2 ± 4.1	2.3 ± 1.7	1.3 ± 0.8	1.0 ± 0.5
肺	2.6 ± 1.3	1.4 ± 0.9	0.7 ± 0.3	0.4 ± 0.2
肝	0.4 ± 0.2	0.3 ± 0.2	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1
脾	1.2 ± 0.7	0.8 ± 0.5	0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.1
胃	20.0 ± 7.6	45.7 ± 28.2	8.6 ± 4.2	4.6 ± 2.9
小肠	17.4 ± 7.5	14.3 ± 8.2	4.7 ± 3.4	3.2 ± 2.0
大肠	9.2 ± 4.6	15.9 ± 10.2	6.8 ± 3.9	3.2 ± 1.5
肾	2.7 ± 1.5	1.5 ± 0.9	0.5 ± 0.2	0.4 ± 0.2
肌肉	28.4 ± 12.2	21.8 ± 13.4	9.7 ± 4.0	5.5 ± 2.5
骨	7.2 ± 3.8	7.4 ± 5.5	1.5 ± 1.1	1.4 ± 1.0
组织与肌肉的比值				
膀胱	1.5 ± 1.2	21.8 ± 16.1	9.7 ± 7.0	5.5 ± 4.1
心脏	5.5 ± 2.9	1.8 ± 1.2	1.1 ± 0.8	1.6 ± 1.0
肺	11.0 ± 5.1	9.6 ± 5.4	7.5 ± 4.8	5.7 ± 4.0
肝	73.7 ± 44.3	15.2 ± 8.8	13.6 ± 9.7	12.6 ± 8.0
脾	24.2 ± 9.8	72.6 ± 39.1	79.2 ± 48.3	49.4 ± 32.6
胃	1.4 ± 0.6	28.0 ± 14.9	30.2 ± 20.3	22.5 ± 16.6
小肠	1.6 ± 0.8	0.5 ± 0.2	1.1 ± 1.0	1.2 ± 0.9
大肠	3.1 ± 1.7	1.5 ± 0.9	2.1 ± 1.5	1.7 ± 1.0
肾	10.4 ± 4.7	1.4 ± 0.7	1.4 ± 1.0	1.7 ± 1.2
骨	3.9 ± 2.3	14.6 ± 7.7	19.8 ± 12.4	13.4 ± 8.4
肿瘤	28.4 ± 15.1	3.0 ± 1.5	6.7 ± 4.3	4.0 ± 3.4

[0305]

[0306] 与预期结果一致,各剂量的MDV3100均抑制AR信号和fPSA合成(表14)。表14提供了在给予抗雄激素的携带LNCaP-AR肿瘤的去势雄性小鼠中通过ELISA确定的肿瘤PSA表达水平分析的数据。每日灌胃给予携带LNCaP-AR异种移植瘤的去势雄性小鼠溶剂(VEH#)、10mg/kg(MDV10#)、40mg/kg(MDV40#)或80mg/kg(MDV80#)。处理后6天,注射给予小鼠^{89}Zr-5A10。注射后24小时,处死小鼠用于PSA分析。手术切取肿瘤组织。使用PSA导向的ELISA(如上文所

示)确定fPSA和tPSA,并且在瘤内PSA的情况下,将所述值归一化至总蛋白浓度。[a]fPSA的浓度以ng/ml报告,[b]总PSA浓度以ng/mL报告,[c]总蛋白浓度以ng/mg报告。缩写:fPSA,fPSA;tPSA,总PSA。

[0307] 表14

[0308]

小鼠	fPSA[a]	tPSA[b]	f/t PSA比值	总蛋白[c]	fPSA/t蛋白	tPSA/t蛋白
VEH1	91.37	139.75	0.65	8.31	10.99	16.81
VEH2	96.19	125.86	0.76	6.86	14.03	18.36
VEH3	285.18	419.60	0.68	7.68	37.15	54.66
VEH4	159.43	198.58	0.80	8.38	19.02	23.69
MDV10 1	474.40	690.48	0.69	9.20	51.57	75.06
MDV10 2	19.12	26.21	0.73	5.82	3.29	4.50
MDV10 4	48.98	86.72	0.56	6.92	7.07	12.52
MDV10 5	3.96	6.64	0.60	4.50	0.88	1.48
MDV40 1	71.24	79.60	0.89	6.13	11.61	12.98
MDV40 3	43.25	51.09	0.85	7.04	6.14	7.25
MDV40 4	98.26	122.15	0.80	6.50	15.13	18.81
MDV80 3	5.97	10.55	0.57	5.05	1.18	2.09
MDV80 4	77.83	112.53	0.69	7.52	10.34	14.96
MDV80 5	57.31	97.80	0.59	5.74	9.99	17.05

[0309] 相应地,给予40和80mg/kg剂量的MDV3100使得与肿瘤结合的^{89}Zr-5A10显著降低(图10a)。

[0310] 显著地,通过PET我们还观察到在每日灌胃给予动物赋形剂或80mg/kg的MDV3100的组之间与肿瘤结合的^{89}Zr-5A10出现具有统计学意义的改变(图10b和10c,表16)。图10b显示了在右侧翼携带LNCaP-AR异种移植瘤的完好雄性小鼠的代表性横截(Trans.)和冠状PET切片,在使用s.c.睾酮颗粒处理或者连续7d每日灌胃给予赋形剂或MDV3100(80mg/kg)后,^{89}Zr-5A10 24h p.i.成像。在这两组之间可见与肿瘤结合的^{89}Zr-5A10具有清楚的目测可见的差异。箭头指示肿瘤(T)和小鼠肝脏(L)的位置。在图10c中,对PET研究中肿瘤目的区域进行分析后发现与肿瘤结合的^{89}Zr-5A10出现具有统计学意义的显著改变。*表示与赋形剂相比$P<0.01$。"表示与赋形剂相比$P<0.05$。误差线表示平均值的标准偏差。表16提供了对皮下LNCaP-AR肿瘤目的区域进行分析确定的$SUV_{平均}$值列表。

[0311] 表16

[0312] ***赋形剂*** ***MDV (80*** ***睾酮***

[0313]

		mg/kg)
24 h (n=4)	24 h (n=4)	24 h (n=3)
2.54 ± 0.8	8.62 ± 1.2	19.28 ± 8.0
2.89 ± 0.6	5.25 ± 1.2	19.75 ± 7.5
2.09 ± 0.93	7.16 ± 0.8	12.07 ± 5.0
3.23 ± 1.4	8.54 ± 1.6	

[0314] 此外，在接受s.c.睾酮颗粒给予的小鼠的单独处理的臂中观察到了与肿瘤结合的^{89}Zr-5A10的显著增加。

[0315] 总之，这些结果突出了^{89}Zr-5A10具有测定在瘤内AR信号中药理学触发的改变的能力。

[0316] 实施例5：^{89}Zr-5A10能够分辨骨骼中的前列腺癌病灶

[0317] 如上文所讨论的，已发现常规前列腺癌诊断显著的局限性为不能分辨真正的骨骼转移性疾病和附近的骨重塑，其与转移性疾病无关或者与治疗的时间分隔开，进而阻碍了分析。在本实施例中，已证实了fPSA单克隆抗体具有分辨真正的骨骼前列腺癌病灶的能力。

[0318] 如下所示，通过在完好雄性小鼠左侧后肢的胫骨上注射LNCaP-AR建立骨肿瘤。手术前，使用氯胺酮麻醉去势雄性SCID小鼠，并且在左后肢上开一个切口。使用骨钻在胫骨上钻孔，并将1x 10^5个细胞(22Rv1或LNCaP-AR)注射至骨髓中。使用骨蜡将穿刺封闭，缝合切口，并在手术后连续3天每日一次给予动物姑息剂量的卡洛芬(5mg/kg)。使用生物发光成像追踪肿瘤的发展，并使用MRI对其进行确证。制备与骨肿瘤模型类似的骨折模型，除了不注射细胞和使用骨蜡以外。

[0319] 在7周后，通过MRI确证肿瘤的发展情况(图12和图13)。图12显示了在左侧胫骨接种LNCaP-AR的小鼠的典型生物发光图像。完好的雄性小鼠在胫骨上接种LNCaP-AR，通过生物发光监测进展，通过MRI和血清PSA分析对肿瘤的发展进行确证。显示了在接种5周后一组携带肿瘤小鼠的典型图像。这些动物已确证患有疾病和生物发光为阳性。

[0320] 在200MHz下运转以及配有400mT/m ID 12cm梯度线圈的Bruker 4.7T Biospec扫描仪(Bruker Biospin MRI GmbH,Ettlingen,Germany)上采集小鼠的磁共振图像。使用ID为32mm的定制正交鸟笼式谐振器用于RF激发和采集(Stark Contrast MRI Coils Research Inc.,Erlangen,Germany)。使用氧和1％异氟烷气体麻醉小鼠。使用小动物生理监测系统(SA Instruments,Inc.,Stony Brook,New York)监测动物的呼吸。首先采集三个正交方向上的T2加权侦查图像用于确定动物的位置。使用T2-加权的快速自旋回波RARE序列(弛豫增强的快速采集)采集轴向小鼠骨盆图像，切片厚度为0.8mm、FOV 30mm×34mm和空间分辨率117×133μm。使用下述采集参数TR＝4.5s、TE＝40ms、RARE因子8和采集时间20分钟。

[0321] 图13显示的为典型的受肿瘤累及的骨的MRI切片。在完好雄性小鼠的胫骨上接种LNCaP-AR，使用MRI目测检查和血清PSA分析对肿瘤的进展进行确证。左后肢的对比区域(面向MRI切片的右侧)表示用红色圈出的肿瘤块。

[0322] 与对侧后肢相比，携带肿瘤的后肢在PET/CT研究中显示了较高的对比度(图14a)。对于PET/CT研究而言，使用轴向8.5cm和横断5.0cm的FOV在小动物Siemens/CTI microCAT

II(Siemens Medical Solutions,Malvern,PA)扫描仪上采集计算机断层(CT)图像。根据此前已报道的方法将配准的PET/CT图像记录并映射至矩阵。在图14a中,配准的三维、容积重建PET/CT图像显示^{89}Zr5A10定位于完好雄性小鼠左侧胫骨的骨LNCaP-AR移植瘤上。PET数据,以蓝绿色比例尺表示,显示了与右侧(正常)胫骨相比,在动物的左侧(携带肿瘤)的胫骨具有更高的放射性。

[0323] 与这一观察结果一致,配准的PET/MRI图像显示了对胫骨中PET和MRI对比度的调准(图14b和图15)。在图14b中,配准的PET/MRI图像像显示了通过MRI检测的与肿瘤结合的^{89}Zr-5A10正电子发射共定位的对比度。图15显示了表明^{89}Zr-5A10与胫骨中肿瘤调准的配准的PET/MRI切片。将完好的雄性小鼠在左侧胫骨接种LNCaP-AR,并且使用MRI目测检查和血清PSA分析对肿瘤的进展进行确证。在注射^{89}Zr-5A10 24h后采集配准的PET/MRI图像。给出右侧(正常)后肢的图像用于比较。

[0324] 对手术切除的胫骨进行死后放射自显影显示^{89}Zr-5A10的正电子发射与由组织学定义的LNCaP-AR损伤的剖析图对齐(图16)。进行如下所示的程序:在将小鼠处死后,手术切取包括肿瘤的胫骨并将其包埋于OCT中(Miles Inc.,Elkhart,IN)并且在低温模具中使用干冰速冻。使用Microm HM500冰冻切片机(Microm International,Walldorf,Germany)切取若干组每组为10个连续的5μm厚的组织切片,并将其帖附在聚-L-赖氨酸包被的玻璃显微镜玻片上。使用10%磷酸盐缓冲的福尔马林固定组织切片5min,洗涤两次,空气干燥并使用苏木素和伊红(H&E)染色。将染色后的组织切片置于与Fuji胶片BAS-MS2325成像板(Fuji Photo Film Co,Tokyo,Japan)配合的胶片暗盒中以采集数字放射自显影照片(DAR)。在注射^{89}ZrCl或^{89}Zr-5A10～168h后,将切片曝光48h。使用Fujifilm BAS-1800II生物图像分析仪(Fuji Photo Film Co,Tokyo,Japan)读取已曝光的磷板以产生具有50μm像素维数的数字图像。使用配有电控平台(Prior Scientific Inc,Rockland,MA)的Olympus BX60系统显微镜(Olympus America Inc,Melville,NY)获取数字图像。随后,以相同的分辨率采集H&E图像,作为DAR数据。使用刚性平面变换盒,将DAR图像与H&E图像手工对齐。

[0325] 图16显示了给予携带骨LNCaP-AR移植瘤的小鼠^{89}Zr-5A10(左图)和^{89}ZrCl(右图)后的组织学和重叠放射自显影,图中显示了^{89}Zr-5A10定位于肿瘤组织,而^{89}ZrCl定位于正常骨。通过组织学(通过H&E染色定义)目测检查区分肿瘤组织,在4×下用蓝框标出,在10×下用箭头突出。选定的更高放大倍数的组织区域用黄框标出。

[0326] 为进一步确证^{89}Zr-5A10不与骨重塑存在交叉反应,在一个单独的小鼠组中通过穿刺右后肢的胫骨手术诱导骨折。18F-NaF和99mTc-MDP均容易地定位于修复部位,而^{89}Zr-5A10则没有(图14c)。在图14c中,使得完好的雄性小鼠胫骨骨折,并在10天后手术,使用^{18}F-NaF对骨重塑进行评估。通过PET在骨折的胫骨中鉴定得到的清楚的对比区域。首次成像2天后,共同注射给予动物99mTc-MDP和^{89}Zr-5A10。与预期结果一致,SPECT成像显示99mTc-MDP也定位于愈合的骨的区域。而相反的是,PET成像显示在创伤部位未检测到^{89}Zr-5A10,这表面与目前在临床上使用的放射性示踪剂相比该试剂对PCa显示出高度的特异性。

[0327] 总之,这些结果突出了^{89}Zr-5A10对骨中前列腺癌来源的肿瘤具有独特的特异性。

[0328] 实施例6:总结和比较数据

[0329] 已证实使用与对fPSA具有特异性的单克隆抗体连接的新型放射性示踪剂能够非侵入性的测定雄激素受体调节的、前列腺特异性基因产物PSA表达的改变。^{89}Zr-5A10容易地

定位于多种雄激素受体-和PSA-阳性前列腺癌模型，并且在临床验证有效的前列腺癌异种移植瘤模型中定量检测到了其使得抗雄激素疗法诱导的fPSA合成下降，这均支持其适于对雄激素受体信号进行定量检测。由于^{89}Zr-5A10特异性的靶向于前列腺癌细胞而非非恶性骨病变，其在骨扫描中表型模拟癌症导致的改变，因此本发明的放射性示踪剂为更准确地分期和更好的对治疗进行选择提供了机会。在这一点上，本发明的实施方式为研究异质性疾病的个体损伤以增强我们对肿瘤生物学的理解提供了前所未有的机会。

[0330] 此前已报道了表达受雄激素受体信号抑制的细胞表面蛋白前列腺特异性膜抗原(PSMA)的改变也能够作为用于雄激素受体信号成像的非侵入性标记物。然而，PSMA的表达并不是前列腺特异性的，尚不知晓雄激素受体导向疗法对PSMA表达的临床影响。而且，在LNCaP-AR异种移植瘤中的正式比较显示与相同标记的针对PSMA的单克隆抗体(^{89}Zr-J591)相比在肿瘤定位后疗法中^{89}Zr-5A10PET产生更引人注目的变化(图17)。图17显示了给予赋形剂或MDV3100，并且注射^{89}Zr-J591的携带LNCaP-AR异种移植瘤的去势雄性小鼠的生物分布曲线。给予携带肿瘤的去势小鼠赋形剂，或者指定剂量的MDV3100(每日灌胃)。在第6天时，注射给予小鼠^{89}Zr-J591，并在注射24h后，将其处死并收集用于生物分布研究的血液和组织。数据以平均%ID/g±一个标准偏差的形式报告。在图17中能够清楚的看出，在肿瘤定位后疗法中针对PMSA的单克隆抗体不能显示出任何具有统计学显著性的差异，从而证明了本发明实施方式的优效性和预料不到的效果。

[0331] 等效物和范围

[0332] 仅使用常规实验，所属领域的技术人员将识别或能够确定本申请所述的本发明特定实施方式的多个等效物。本发明的范围并不旨在限于以上描述。同样地，本领域的普通技术人员将理解前述仅代表本发明的某些优选实施方式。在不脱离如下述权利要求所示的本发明的精神或范围的前提下，可以对上文所述的程序和组分进行多种改变和修饰。

[0333] 在权利要求书中，除非有相反指示或从上下文其他方面显而易见，否则例如“一种(a、an)”和“所述”可以指一种或一种以上。因此，举例来说，对“一个抗体”的提及包括多个所述抗体，且对“所述细胞”的提及包括对所属领域的技术人员公知的一种或一种以上细胞的提及等等。除非相反指示或从上下文其他方面显而易见，否则如果一个、一个以上或全部的群组成员存在于、用于所给出的产物或过程中或以其他方式与所给出的产物或过程有关，那么认为符合一个或多个群组成员之间包括“或”的权利要求或描述。本发明包括正好一个群组成员存在于、用于所给出的产物或过程中或以其他方式与所给出的产物或过程有关的实施例。本发明包括一个以上或全部的群组成员存在于、用于所给出的产物或过程中或以其他方式与所给出的产物或过程有关的实施例。此外，应了解本发明涵盖一个或更多限制、要素、从句、描述性术语等从一项或一项以上所列权利要求引入另一项权利要求中的所有变化、组合和排列。举例来说，任何从属于另一项权利要求的权利要求都可进行修改，以包括一个或更多在任何其他从属于同一基础权利要求的权利要求中发现的限制。此外，在权利要求叙述一种组合物的情况下，除非另外指示或除非所属领域的技术人员清楚会产生矛盾或不一致，否则应了解包括使用该组合物的方法以达成本申请所揭示的任何目的，且包括根据本申请所揭示的任何制造方法或所述领域中已知的其他方法制造所述组合物的方法。

[0334] 在例如以马库什群组格式(Markush group format)将要素呈现为清单的情况下，

应了解也公开了所述要素的每个子群，且任何要素都可从所述群组中去除。应了解，一般说来，在提及本发明或本发明的方面包含特定要素、特征等的情况下，某些本发明实施例或本发明方面由这些要素、特征等组成，或基本上由这些要素、特征等组成。为简单起见，本申请中未以这些词语(in haec verba)明确阐述这些实施例。应注意，术语“包含”意欲为开放性的且允许包括其他要素或步骤。

[0335] 在给出范围的情况下，包括端点。此外，应了解，除非另外指示或从上下文和所属领域的技术人员所理解的其他方面显而易见，否则表示为范围的值在不同的本发明实施例中可采用所述范围内的任何具体值或子范围，除非上下文另外清楚规定，否则达到此范围下限的个位数的十分之一的程度。

[0336] 另外，应了解，现有技术内的任何特定的本发明实施例都可明确地排除在任一项或一项以上权利要求之外。因为认为这些实施例为所属领域的技术人员已知，所以即使本申请中未明确阐述排除在外，也可将其排除在外。本发明组合物的任何特定实施例都可因任一原因而排除在任一项或一项以上权利要求之外，而不管是否与现有技术的存在相关。

[0337] 以上所讨论且贯穿正文的出版物只在本申请案的申请日期之前提供其揭示内容。本申请中不应认为承认本发明人根据之前的公开内容无权提前公开所述内容。

序列表

<110> 斯隆-凯特林纪念癌症中心

<120> 用于前列腺癌的诊断、预测和治疗的游离PSA抗体

<130> 2003080-0488

<160> 1

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 15

<212> DNA

<213> 智人

<400> 1

agcacttgct gttct 15

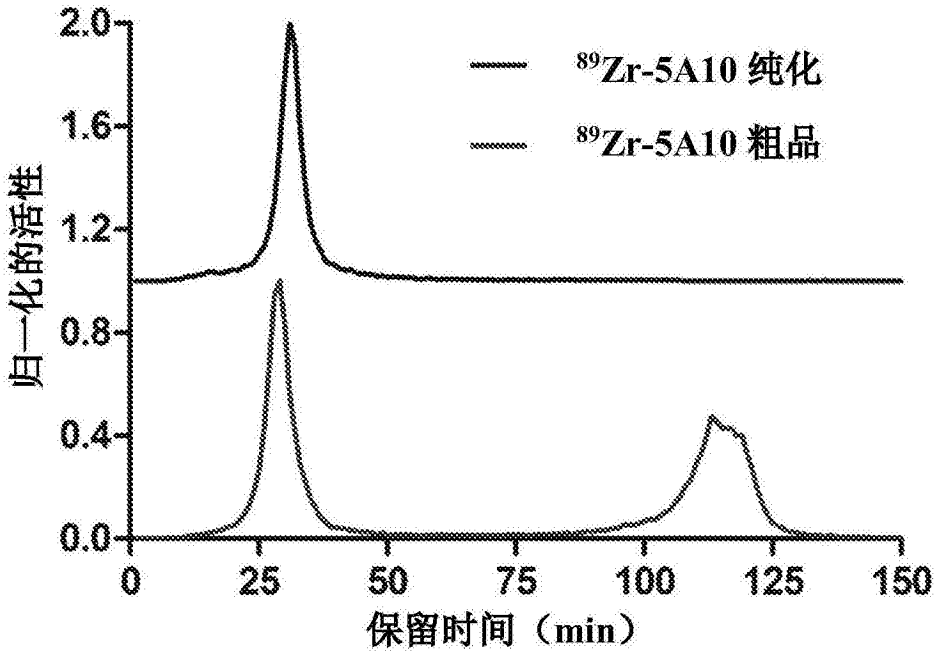

2.0
1.6
1.2
0.8
0.4
0.0
归一化的活性
0
25
50
75
100
125
150
保留时间（min）
89Zr-5A10 纯化
89Zr-5A10 粗品

图1

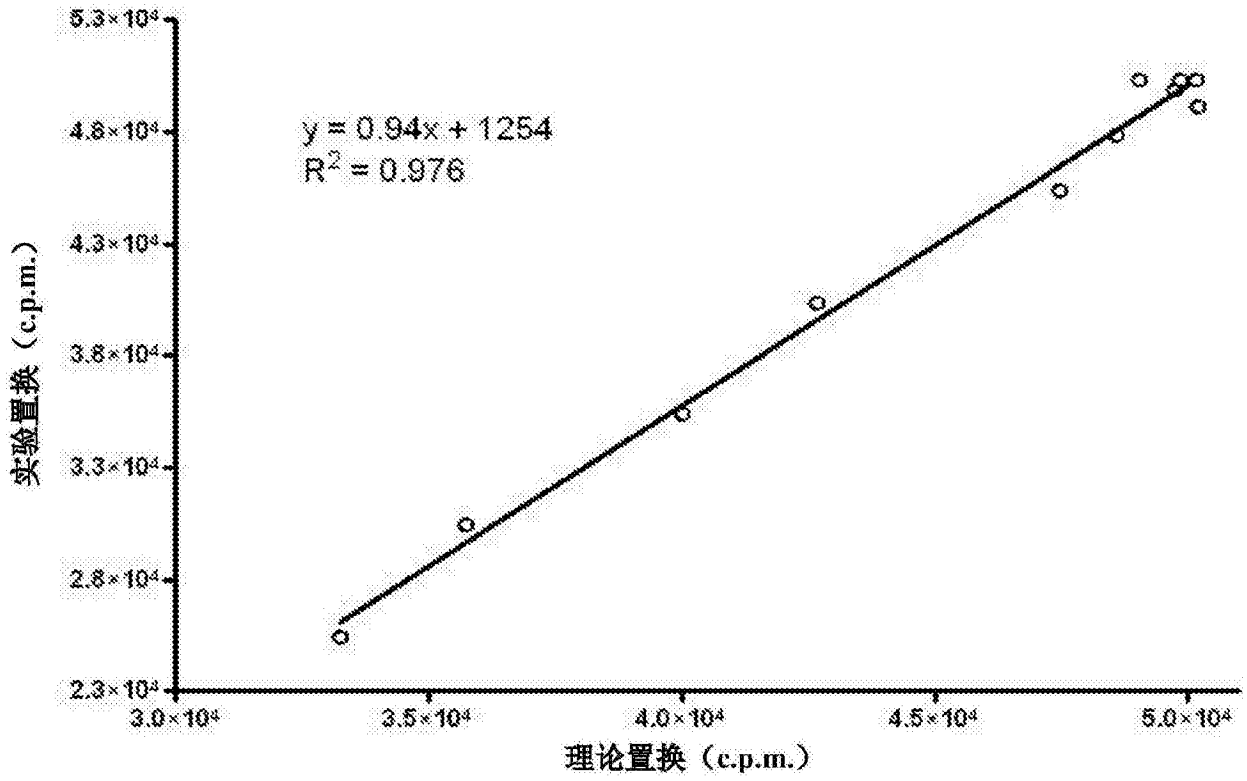

5.3×10⁴
4.8×10⁴
4.3×10⁴
3.8×10⁴
3.3×10⁴
2.8×10⁴
2.3×10⁴
3.0×10⁴
3.5×10⁴
4.0×10⁴
4.5×10⁴
5.0×10⁴
实验置换（c.p.m.）
理论置换（c.p.m.）
y = 0.94x + 1254
R2 = 0.976

图2

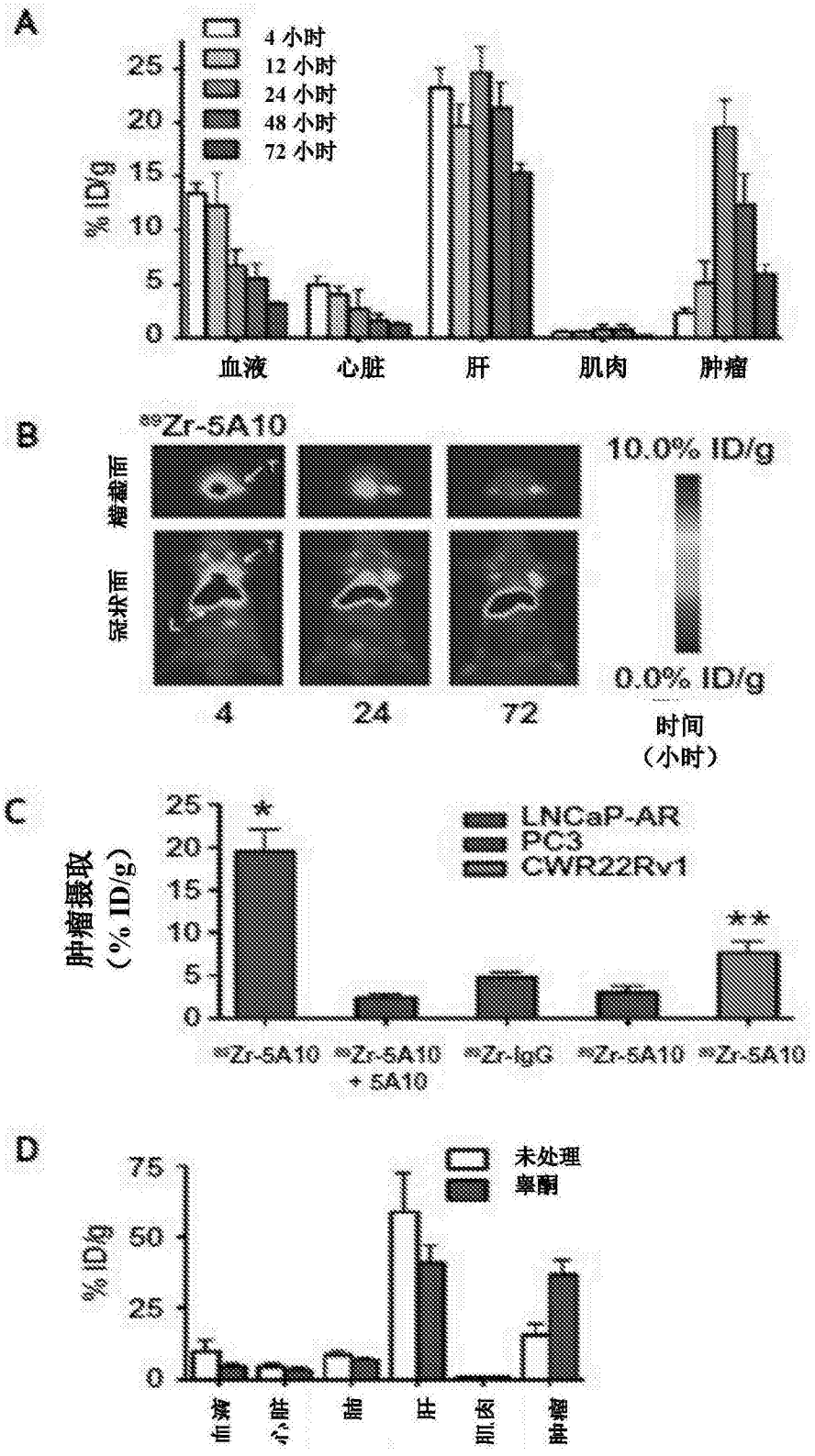

A
4 小时
12 小时
24 小时
48 小时
72 小时
% ID/g
血液
心脏
肝
肌肉
肿瘤
B
89Zr-5A10
横截面
冠状面
10.0% ID/g
0.0% ID/g
4
24
72
时间
（小时）
C
肿瘤摄取
（% ID/g）
LNCaP-AR
PC3
CWR22Rv1
89Zr-5A10
89Zr-5A10 + 5A10
89Zr-IgG
89Zr-5A10
89Zr-5A10
D
未处理
睾酮

图3

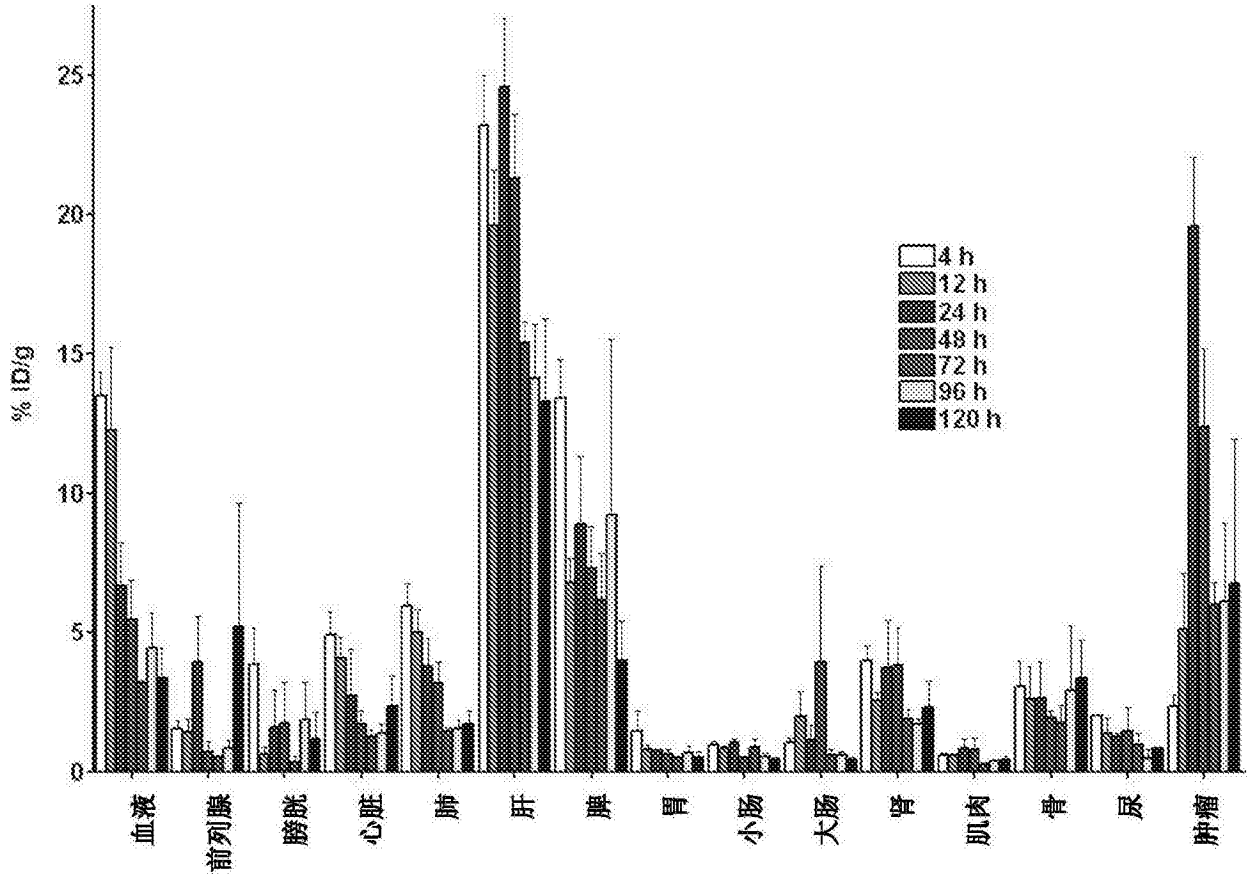

% ID/g
25
20
15
10
5
0
4 h
12 h
24 h
48 h
72 h
96 h
120 h
血液
前列腺
膀胱
心脏
肺
肝
脾
胃
小肠
大肠
肾
肌肉
骨
尿
肿瘤

图4

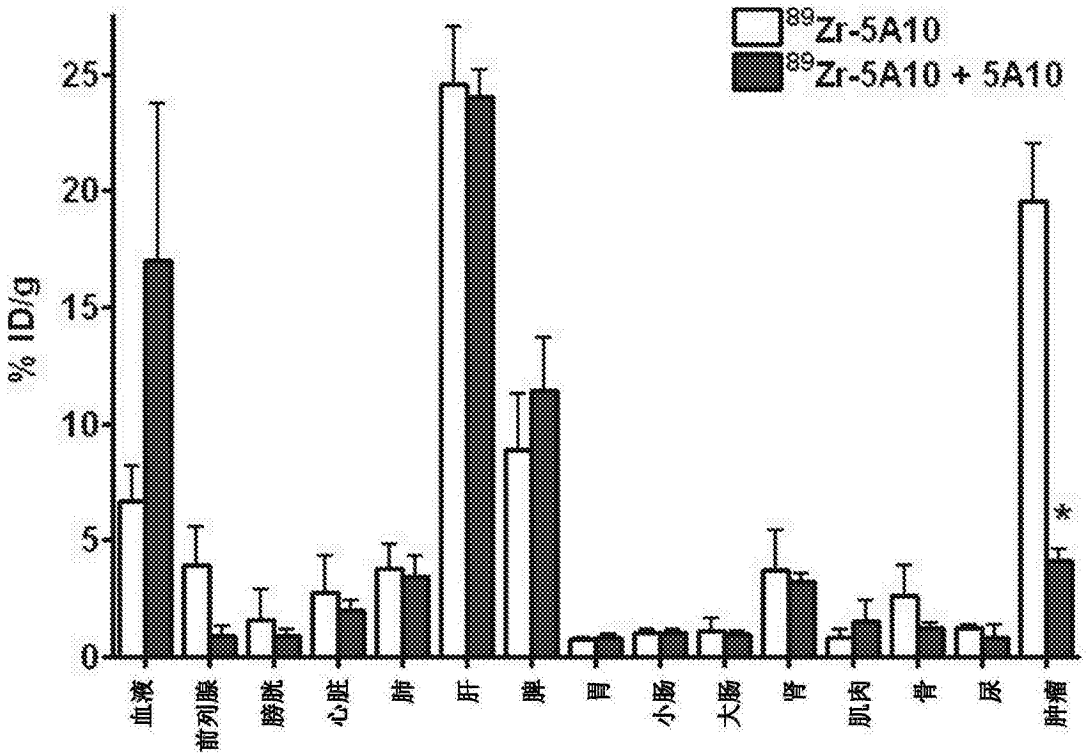

89Zr-5A10
89Zr-5A10 + 5A10
% ID/g
25
20
15
10
5
0
血液
前列腺
膀胱
心脏
肺
肝
脾
胃
小肠
大肠
肾
肌肉
骨
尿
肿瘤
*

图5

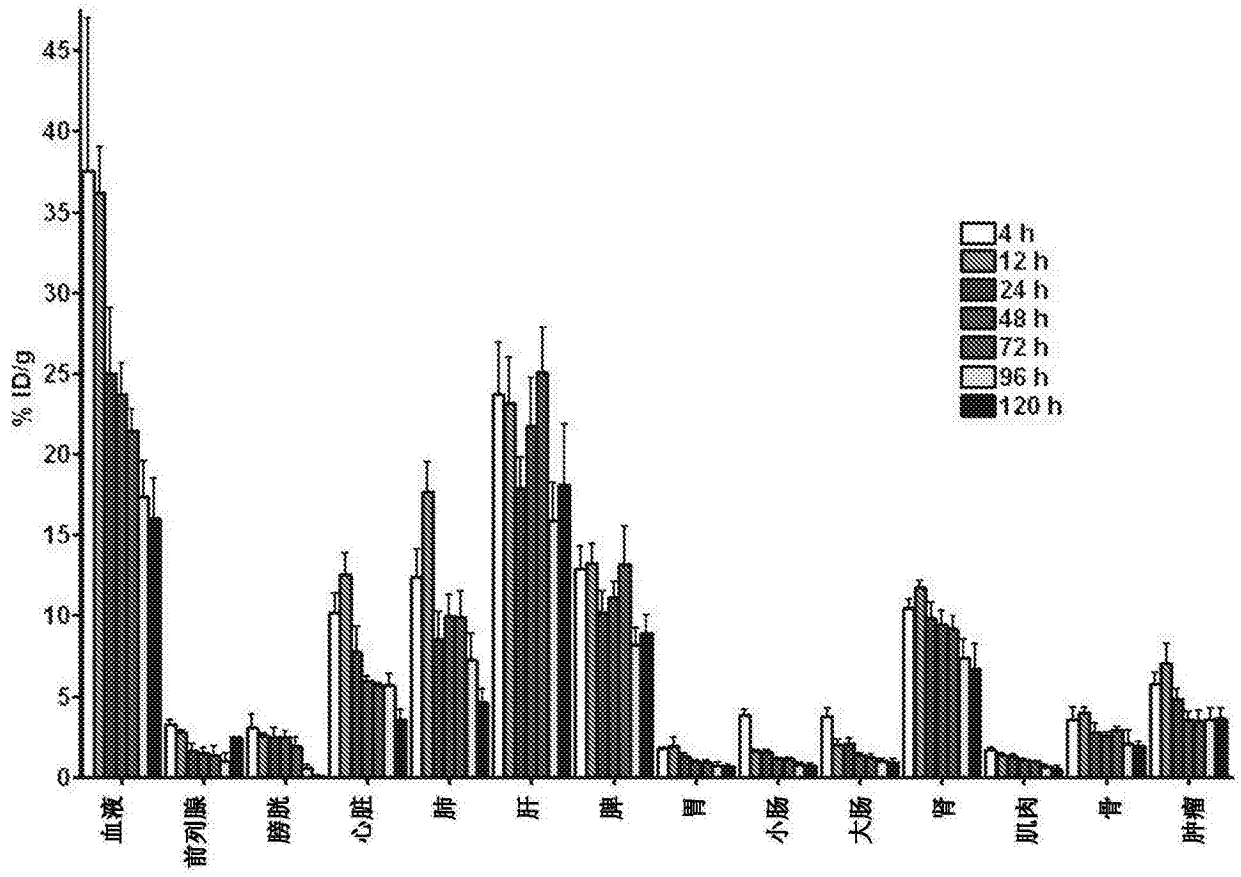

% ID/g
4 h
12 h
24 h
48 h
72 h
96 h
120 h
血液
前列腺
膀胱
心脏
脾
肝
脾
胃
小肠
大肠
肾
肌肉
骨
肿瘤

图6

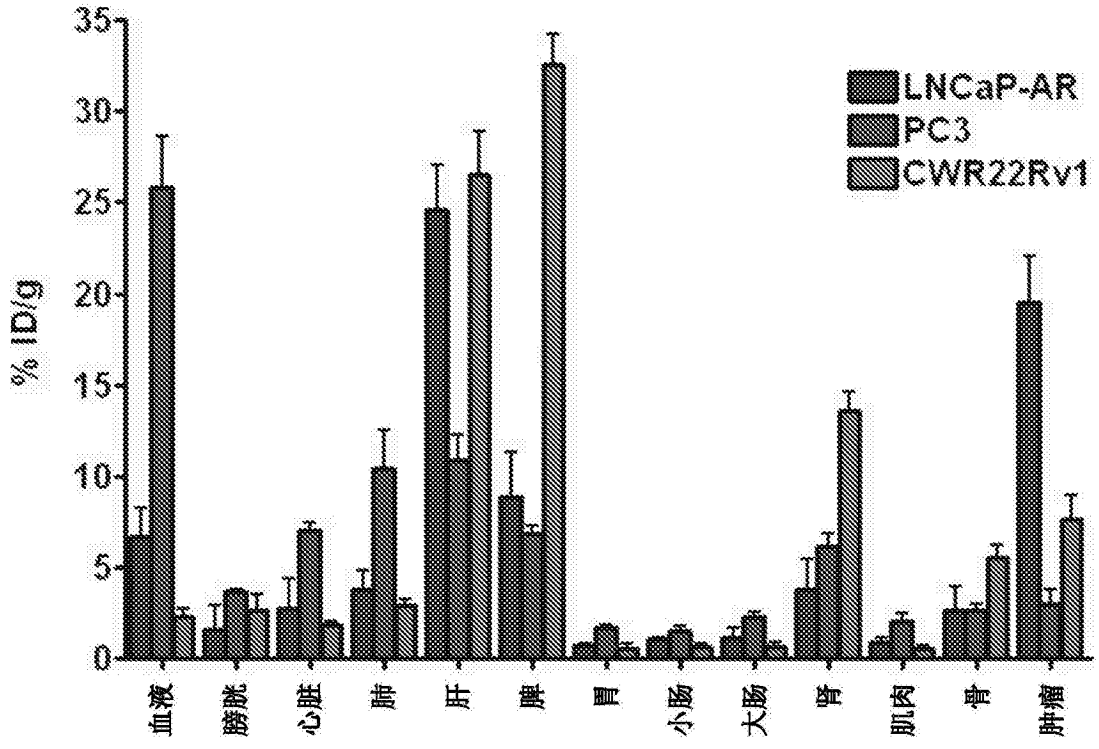

% ID/g
LNCaP-AR
PC3
CWR22Rv1
血液
膀胱
心脏
脾
肝
脾
胃
小肠
大肠
肾
肌肉
骨
肿瘤

图7

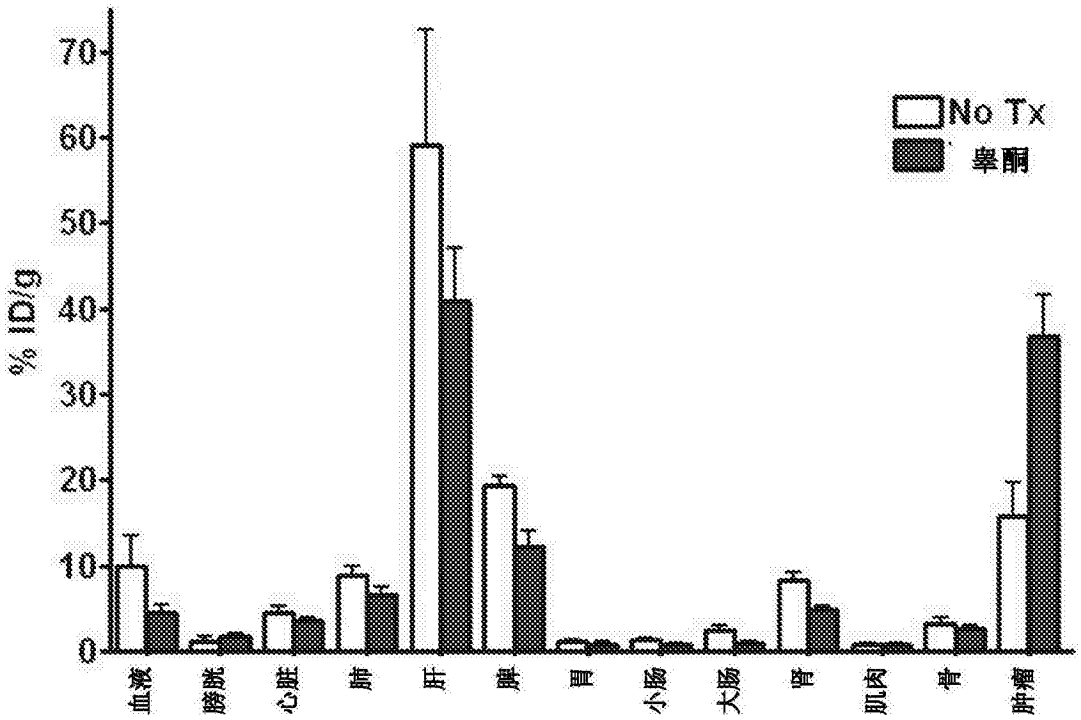

70
60
50
40
30
20
10
0
% ID/g
No Tx
睾酮
血液
膀胱
心脏
脂肪
肝
脾
肾
小肠
大肠
睾
肌肉
脊
肿瘤

图8

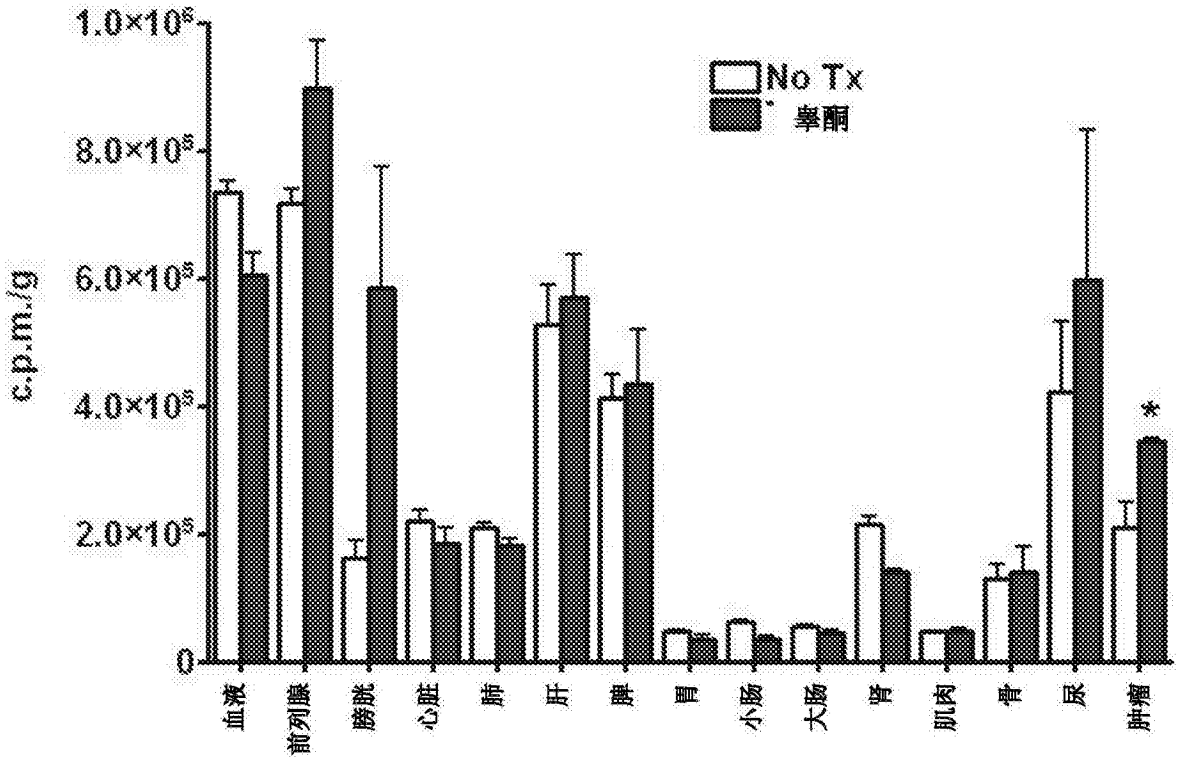

1.0×10^6
8.0×10^5
6.0×10^5
4.0×10^5
2.0×10^5
0
c.p.m./g
No Tx
睾酮
*
血液
前列腺
膀胱
心脏
脂肪
肝
脾
肾
小肠
大肠
睾
肌肉
脊
肾
肿瘤

图9

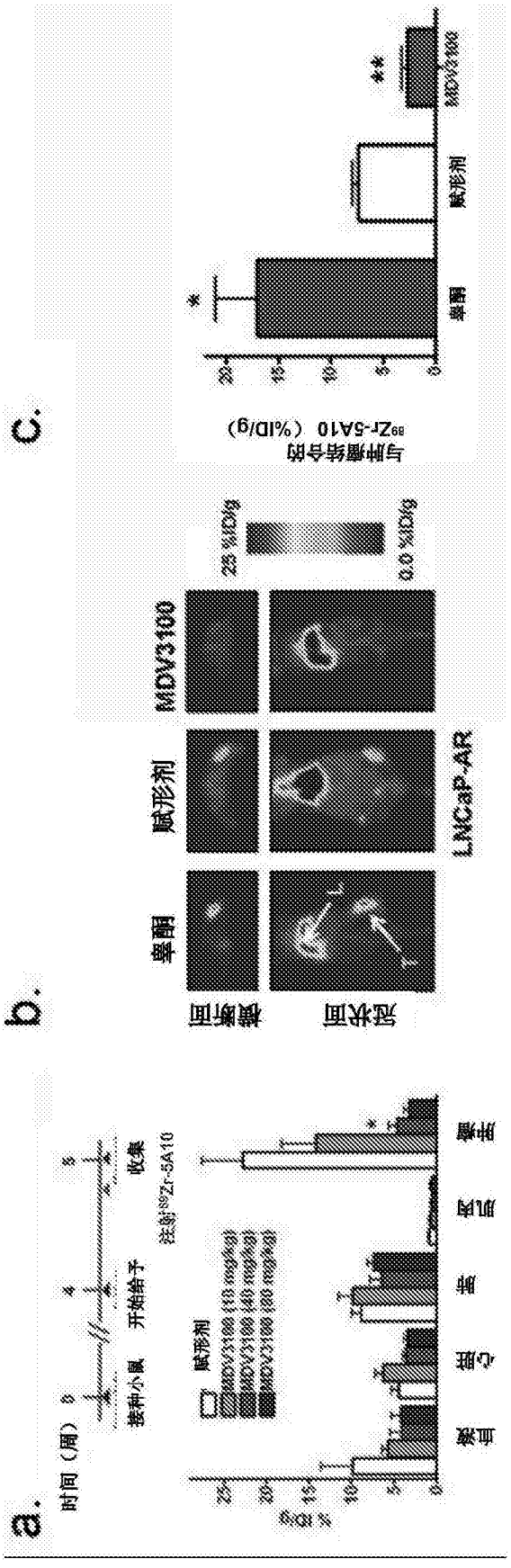

a.
时间（周）
接种小鼠
开始给予
注射89Zr-5A10
收集
赋形剂
MDV3100 (10 mg/kg)
MDV3100 (40 mg/kg)
MDV3100 (80 mg/kg)
%ID/g
血液
心脏
肺
肌肉
肿瘤
b.
冠状面
横断面
卓酮
赋形剂
MDV3100
LNCaP-AR
23 %ID/g
0.0 %ID/g
c.
与肿瘤结合的
89Zr-5A10 （%ID/g）
卓酮
赋形剂
MDV3100

图10

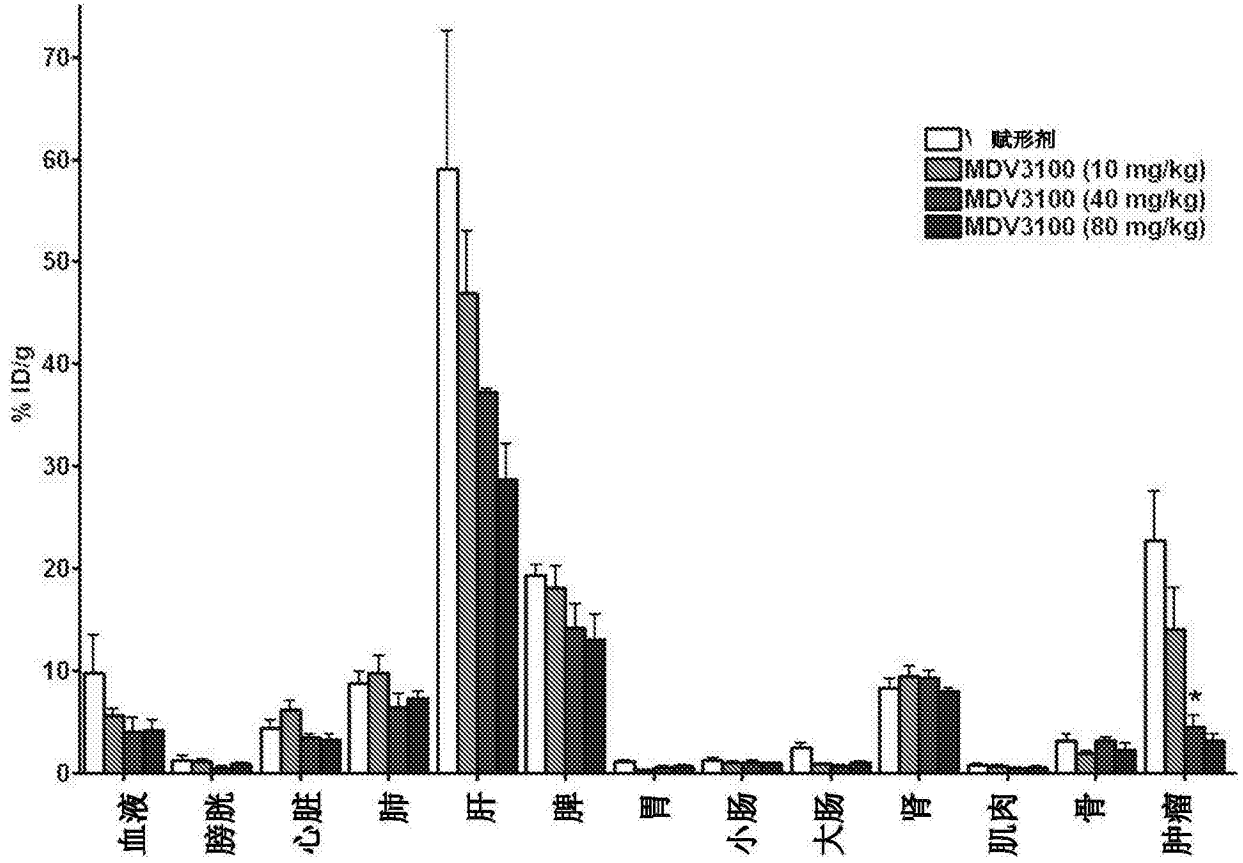

70
60
50
40
30
20
10
0
% ID/g
赋形剂
MDV3100 (10 mg/kg)
MDV3100 (40 mg/kg)
MDV3100 (80 mg/kg)
*
血液
膀胱
心脏
肺
肝
脾
胃
小肠
大肠
肾
肌肉
骨
肿瘤

图11

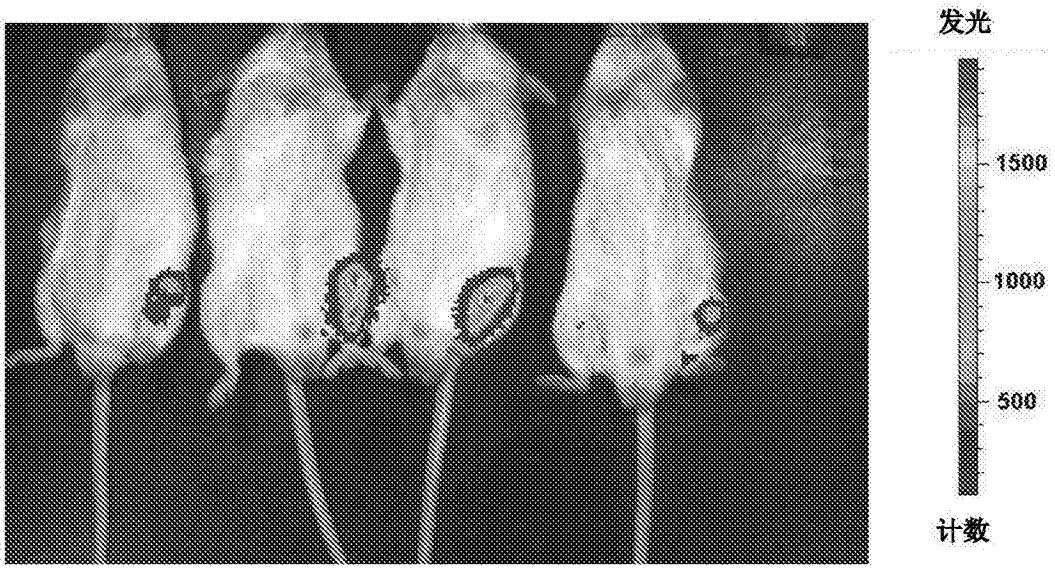

发光
1500
1000
500
计数

图12

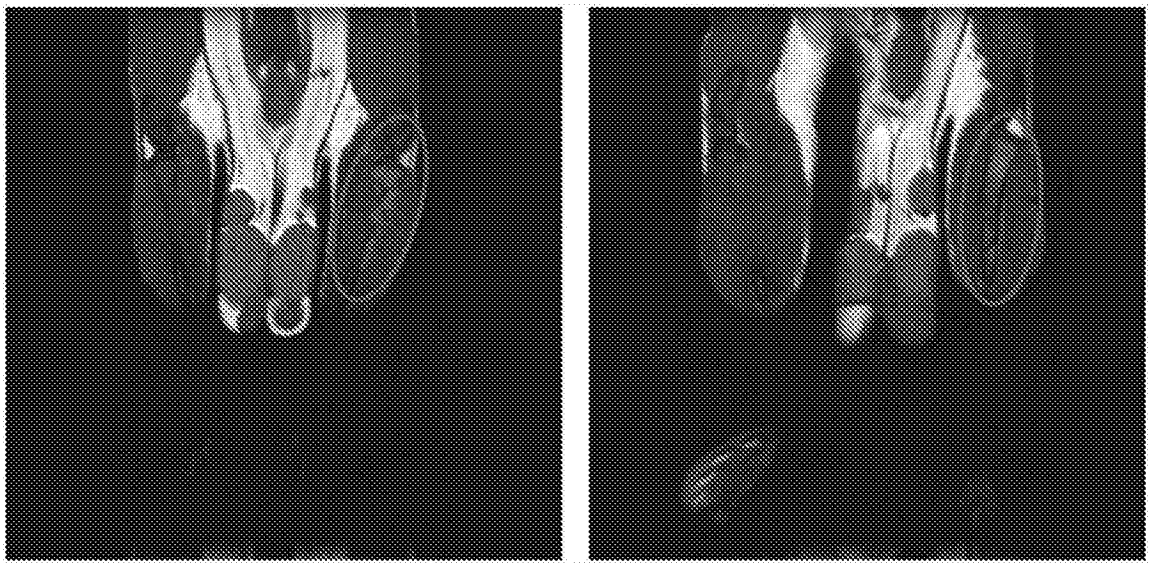


图13

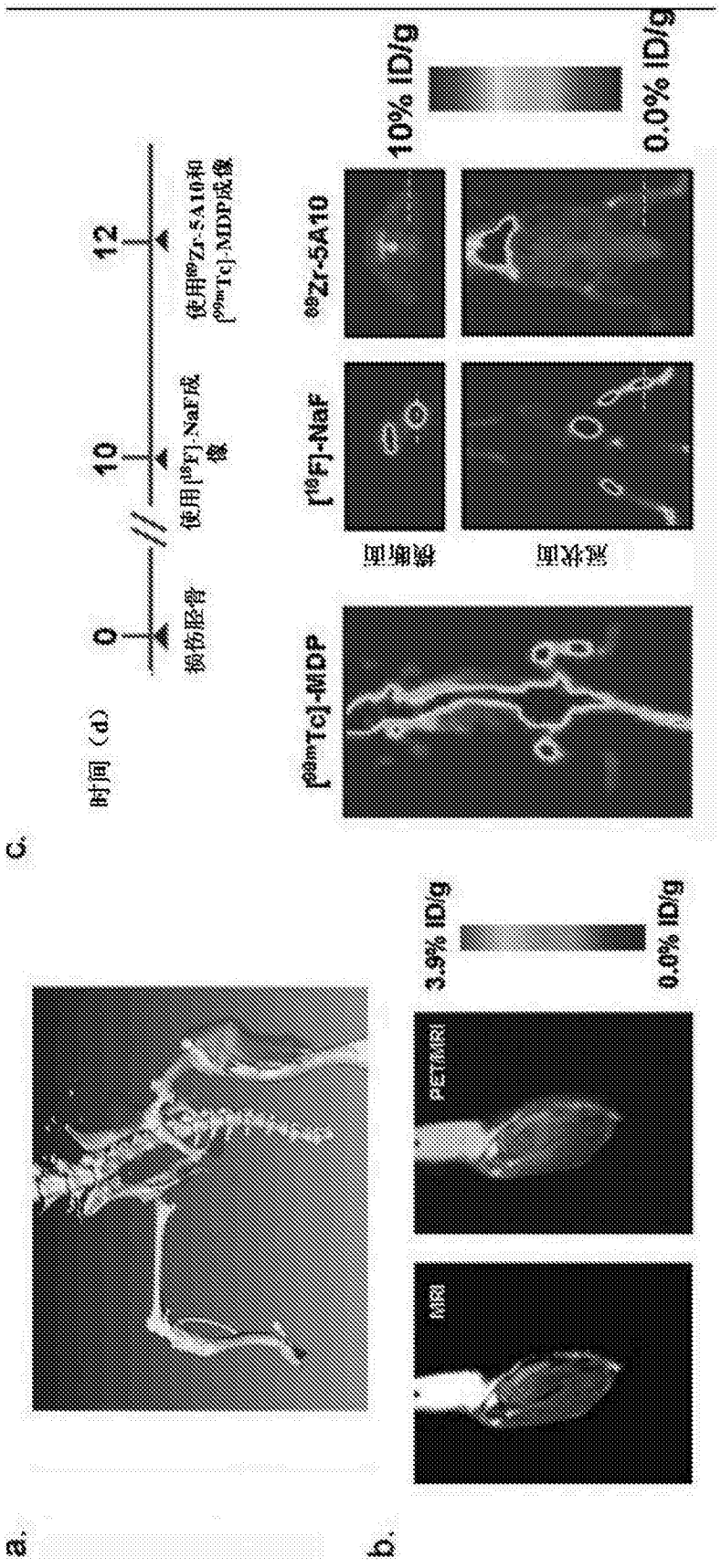

a.
b.
c.
3.9% ID/g
0.0% ID/g
PET/MRI
MRI
时间（d）
0
10
12
损伤胫骨
使用[18F]-NaF成像
使用89Zr-5A10和[99mTc]-MDP成像
[99mTc]-MDP
[18F]-NaF
89Zr-5A10
10% ID/g
0.0% ID/g
健康面
骨折面

图14

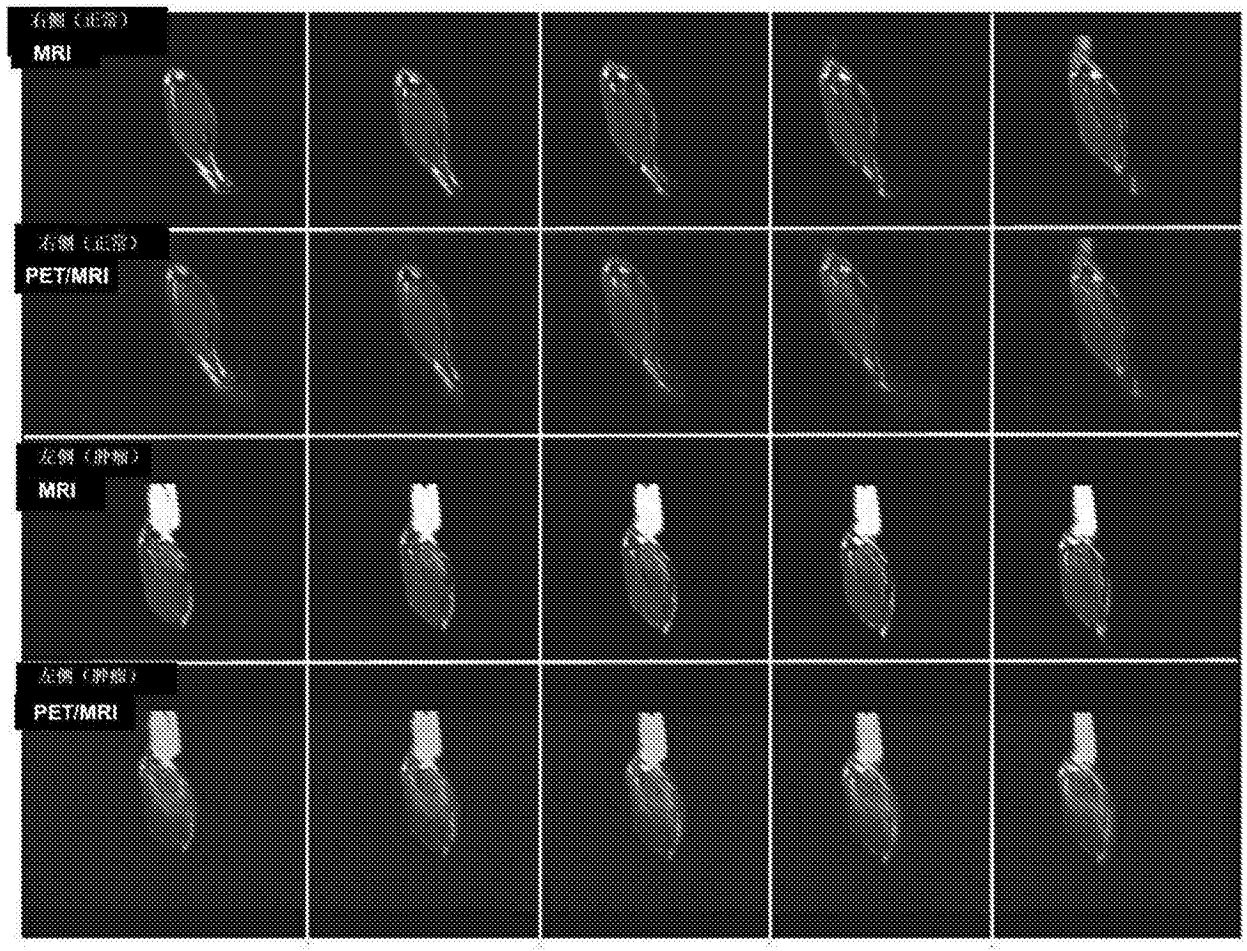

右侧（正常）
MRI
右侧（正常）
PET/MRI
左侧（肿瘤）
MRI
左侧（肿瘤）
PET/MRI

图15

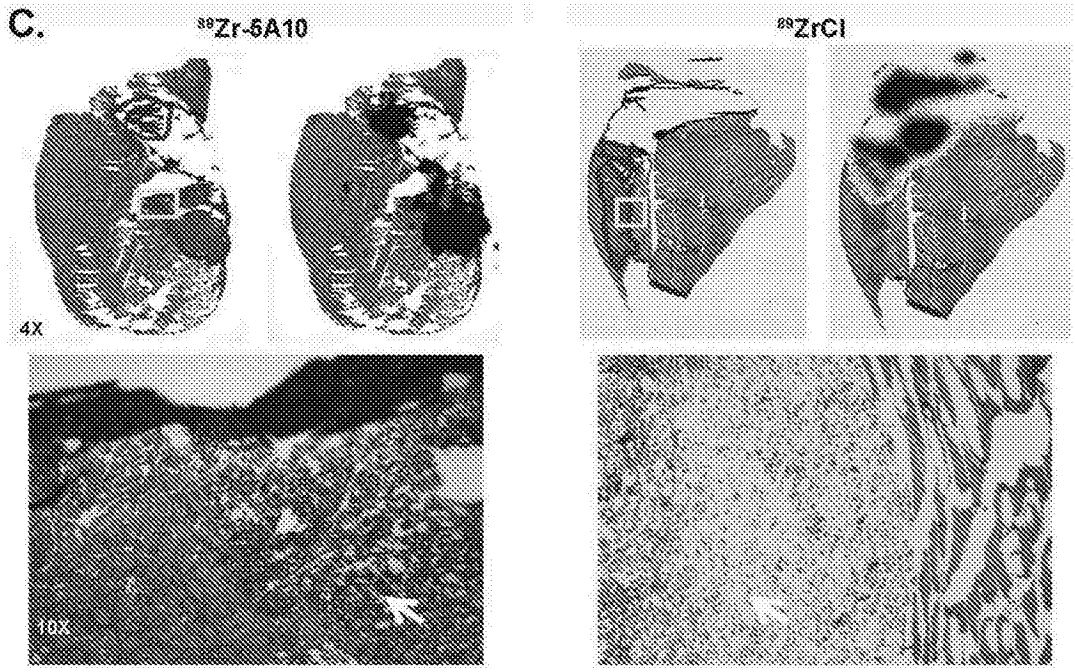

C.
89Zr-5A10
89ZrCl
4X
10X

图16

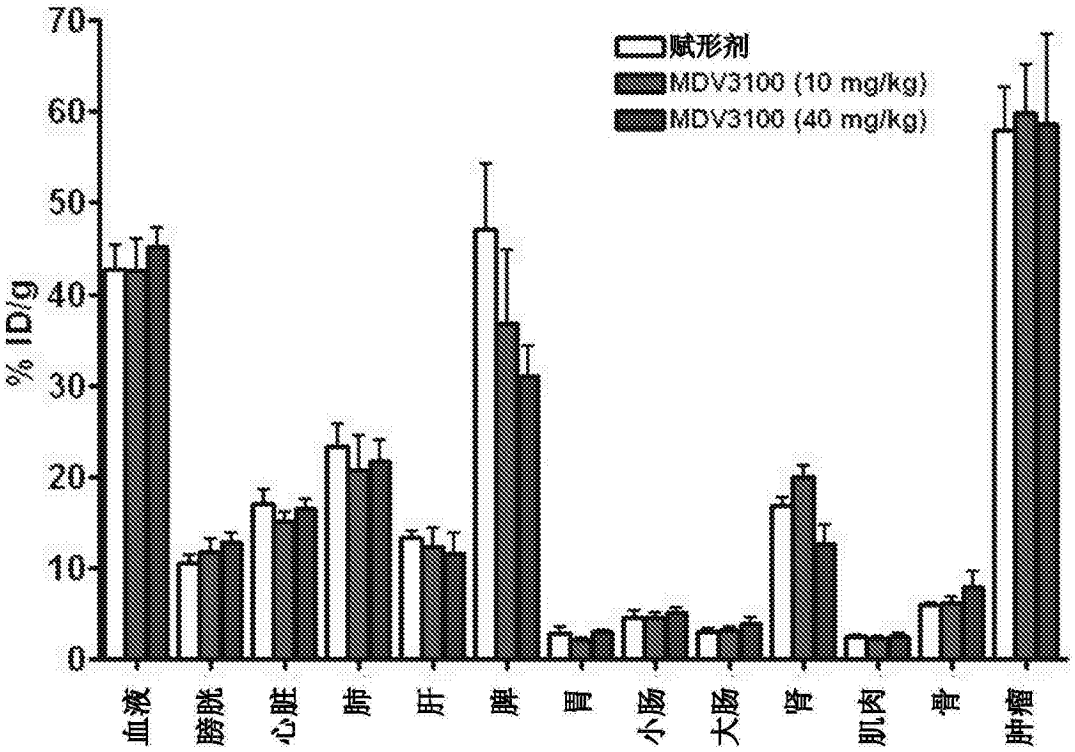

70
60
50
40
30
20
10
0
% ID/g
赋形剂
MDV3100 (10 mg/kg)
MDV3100 (40 mg/kg)
血液
膀胱
心脏
肺
肝
脾
胃
小肠
大肠
睾
肌肉
肾
肿瘤

图17