



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107847584 B

(45) 授权公告日 2022. 01. 25

(21) 申请号 201680020661.8

(22) 申请日 2016.02.09

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 107847584 A

(43) 申请公布日 2018.03.27

(30) 优先权数据  
62/113,988 2015.02.09 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2017.10.01

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2016/017141 2016.02.09

(87) PCT国际申请的公布数据  
WO2016/130539 EN 2016.08.18

(73) 专利权人 纪念斯隆凯特琳癌症中心  
地址 美国纽约州纽约市  
专利权人 麻省理工学院

(72) 发明人 莎拉·M·奇尔 许红  
史蒂文·M·拉森 张乃刚  
K·D·维特鲁普 A·曾

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494  
代理人 封新琴

(51) Int.Cl.  
A61K 39/395 (2006.01)  
C07K 16/00 (2006.01)

(56) 对比文件  
WO 2010099536 A2, 2010.09.02  
WO 2005004809 A2, 2005.01.20  
US 2010008858 A1, 2010.01.14  
US 2003026764 A1, 2003.02.06  
Kelly Davis Orcutt. Engineering an antibody with picomolar affinity to DOTA chelates of multiple radionuclides for pretargeted radioimmunotherapy and imaging.《Nuclear Medicine and Biology》.2011,第38卷(第2期),第223-233页.  
Kelly Davis Orcutt. A modular IgG-scFv bispecific antibody topology.《Protein Engineering, Design & Selection》.2009,第23卷(第4期),第221-228页.

审查员 滕瑞芳

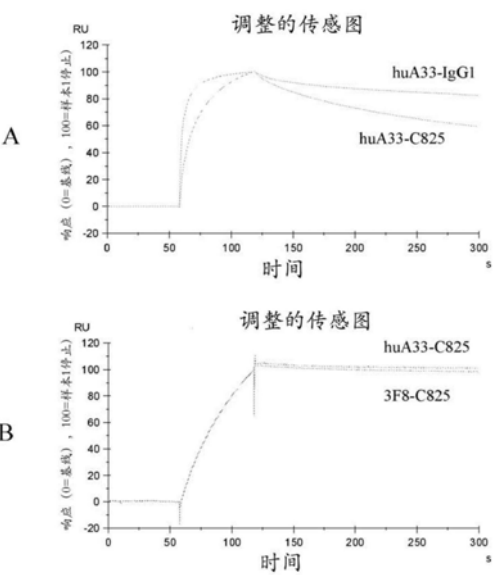
权利要求书2页 说明书50页 附图10页

(54) 发明名称

具有人A33抗原和DOTA金属复合物亲和力的多特异性抗体及其用途

(57) 摘要

本文描述了结合A33和1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸的多特异性结合剂。本文还提供了使用多特异性结合剂或其组合物用于检测,预防和/或治疗性治疗特征在于表达A33糖蛋白抗原的疾病,特别是结肠直肠癌的方法。



1. 一种双特异性抗体,其包含第一抗原结合位点和第二抗原结合位点,其中所述第一抗原结合位点包含

DIQMTQSPSSLSVSVGDRVTITCKASQNVRTVVAWYQQKPGKGLAPKTLIYLASNRHTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLPEDIATYFCQQHWSYPLTFGQGTKVEVKR的V<sub>L</sub>结构域序列,和

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSTYDMSWVRQAPGKGLEWVATISSGGSYTYLDSVKGRFTISRDSKNTLYLQMNSLQAEDSAIYYCAPTTVPFAYWGQGLTVTVSS的V<sub>H</sub>结构域序列;并且

所述第二抗原结合位点包含

HVKLQESGPGLVQPSQSLTCTVSGFSLTDYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGGTAYNTALISRLNIYRDN SKNQVFLEMSLQAEDTAMYYCARRGSYPYNYFDAWGCGTTTVTVSS的V<sub>H</sub>结构域序列,以及

QAVVIQESALTPPGETVTLTCGSSTGAVTASNANWVQEKPDHCFTGLIGGHNNRPPGVPARFSGSLIGDKAALTIAGTQTEDEAIYFCALWYSDHWVIGGGTRLTVLG的V<sub>L</sub>结构域序列;

或

HVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLT DYGVHWVRQAPGKGLEWLGVIWSGGGTAYNTALISRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGSYPYNYFDAWGCGTLTVTVSS的V<sub>H</sub>结构域序列,以及

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTASNANWVQKPGQCPRLIGGHNNRPPGVPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSDHWVIGGGTKLTVLG的V<sub>L</sub>结构域序列。

2. 权利要求1的双特异性抗体,其中所述第一抗原结合位点和/或第二抗原结合位点包含单链可变片段(scFv)或是单链可变片段(scFv)。

3. 权利要求1的双特异性抗体,其中所述第一抗原结合位点是免疫球蛋白分子,以及所述第二抗原结合位点是scFv, scFab, Fab或Fv。

4. 权利要求3的双特异性抗体,其中所述第二抗原结合位点为鼠C825 scFv或人源化C825 scFv。

5. 权利要求4的双特异性抗体,其中所述鼠C825 scFv或人源化C825scFv与所述免疫球蛋白分子的重链的C末端连接,或与所述免疫球蛋白分子的轻链的C末端连接。

6. 一种双特异性抗体,其包含MGWSCIILFLVATATGDIQMTQSPSSLSVSVGDRVTITCKASQNVRTVVAWYQQKPGKGLAPKTLIYLASNRHTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLPEDIATYFCQQHWSYPLTFGQGTKVEVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSGGGGSASHVKLQESGPGLVQPSQSLTCTVSGFSLTDYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGGTAYNTALISRLNIYRDN SKNQVFLEMSLQAEDTAMYYCARRGSYPYNYFDAWGCGTTTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQAVVIQESALTPPGETVTLTCGSSTGAVTASNANWVQEKPDHCFTGLIGGHNNRPPGVPARFSGSLIGDKAALTIAGTQTEDEAIYFCALWYSDHWVIGGGTRLTVLG (SEQ ID NO:2)、MGWSCIILFLVATATGDIQMTQSPSSLSVSVGDRVTITCKASQNVRTVVAWYQQKPGKGLAPKTLIYLASNRHTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLPEDIATYFCQQHWSYPLTFGQGTKVEVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECTSGGGSGGGSGGGSGSHVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLT DYGVHWVRQAPGKGLEWLGVIWSGGGTAYNTALISRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGSYPYNYFDAWGCGTLTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQA VVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTASNANWVQKPGQCPRLIGGHNNRPPGVPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSDHWVIGGGTKLTVLG (SEQ ID NO:3)或MGWSCIILFLVATATGDIQMTQSPSSLSVSVGDRVTITCKASQNVRTVVAWYQQKPGKGLAPKTLIYLASNRHTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLPEDIATYFCQ

QHWSYPLTFGQGTKVEVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECTSGGGGSGGGGSGGGGSHVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFLTDYGVHWVRQAPGKGLEWLGVIWSSGGGTAYNTALISRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCARRGSYPYNYFDAWGCGTLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTASNANWVQKPGQCPRGLIGGHNNRPPGVPARFSGSLLGGKAALTLLGAQPEDEAEYYCALWYSDHWVIGGGTKLTVLG (SEQ ID NO:4) 的轻链氨基酸序列,并且还包含MGWSCIIILFLVATATGEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSTYDMSWVRQAPGKGLEWVATISSGGSYTYLYDSVKGRFTISRDS SKNTLYLQMNSLQAEDSAIYYCAPTTVVPFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT C PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:6) 或MGWSCIIILFLVATATGEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSTYDMSWVRQAPGKGLEWVATISSGGSYTYLYDSVKGRFTISRDS SKNTLYLQMNSLQAEDSAIYYCAPTTVVPFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:7) 的重链氨基酸序列。

7. 一种分离的核酸分子,其包含权利要求1-6中任一项所述的双特异性抗体的多肽链的全部的编码序列。

8. 包含权利要求7所述的核酸序列的表达载体。

9. 一种宿主细胞,其包含权利要求8的表达载体。

10. 一种生产根据权利要求1-6中任一项的双特异性抗体的方法,所述方法包括以下步骤

在允许所述双特异性抗体表达的条件下在培养基中培养根据权利要求9的宿主细胞,以及

从培养基中分离所述双特异性抗体。

11. 一种药物组合物,其包含权利要求1-6中任一项的双特异性抗体。

12. 权利要求1-6中任一项的双特异性抗体在制备用于治疗或诊断A33-阳性癌症的药物中的用途,其中所述A33-阳性癌症是结肠直肠癌。

13. 一种双特异性抗体在制备用于治疗或诊断受试者中A33阳性癌症的药物中的用途,其中所述A33-阳性癌症是结肠直肠癌,且其中所述治疗或诊断包括以下步骤

在足以使所述双特异性抗体定位于表达A33抗原的一种或多种肿瘤的条件和时间下将权利要求5的双特异性抗体给予受试者,随后

向所述受试者施用清除剂,其中所述清除剂除去未结合的双特异性抗体,随后

向受试者施用放射性标记的DOTA-Bn。

## 具有人A33抗原和DOTA金属复合物亲和力的多特异性抗体及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2015年2月9日提交的美国临时申请序列号62/113,988的权益,其全部内容通过引用并入本文。

[0003] 背景

[0004] 基于抗体的治疗提供了显着的前景,特别是在治疗癌症方面。正在开发各种形式,包括单克隆,鼠,嵌合,人源化,人类,全长,Fab,聚乙二醇化,放射性标记,药物共轭,多特异性等。在美国或欧洲已经获得市场批准的30多种治疗性抗体药物中(见例如Reichert,mAbs 4:3,413,5月/6月,2012年在此引入作为参考),采用不同技术指标的两种双特异性抗体(Catumaxomab和Blinatumomab)已被批准用于人类。然而,特定的有效抗体试剂的开发仍然是一个挑战。

### 发明内容

[0005] 本发明尤其提供包括与特定靶标相互作用的结合部分的多特异性结合剂。在许多实施方案中,这样的结合部分是或包含抗体组分。在一些实施方案中,本发明的多特异性结合剂包含人源化抗体A33(本文中称为huA33)的结合元件。在一些实施方案中,本发明的多特异性结合剂包含基于huA33的第一结合部分和与有机或无机化合物相互作用的第二结合部分。与缺乏本文所述的这些组分的亲本结合剂相比,这样提供的试剂具有改善的功能特征。

[0006] 特别地,本发明提供了结合A33糖蛋白和苄基-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸(DOTA)的改进的多特异性(例如双特异性)抗体试剂-Bn),其中所述多特异性结合剂含有人源化抗体A33的一个或多个结构特征(例如,一个或多个CDR)和单克隆抗体2D12.5的一个或多个结构特征(例如,一个或多个CDR)。在一些实施方案中,与亲本抗体A33和2D12.5相比,所提供的多特异性结合剂对正常组织(例如骨髓和肾)具有高的肿瘤摄取和低毒性。在一些实施方案中,当用于改善A33阳性肿瘤的预靶向放射免疫治疗方法时,提供的多特异性结合剂克服次优的肿瘤剂量和治疗指数缺陷。

[0007] 在一些实施方案中,本发明提供了包含基于人源化抗体A33(huA33)的第一抗原结合位点和基于单克隆抗体2D12.5的第二抗原结合位点的双特异性抗体。在一些实施方案中,2D12.5抗体是人源化的。

[0008] 在一些实施方案中,第一抗原结合位点和/或第二抗原结合位点是或包含多肽链或链。

[0009] 在一些实施方案中,多肽链或链包括在表8中出现的序列中发现的重链CDR。在一些某些实施方案中,所述重链CDR在人源化A33抗体(huA33)中发现。在一些实施方案中,多肽链或链包括在表8中出现的序列中发现的轻链CDR。在一些某些实施方案中,所述轻链CDR在人源化A33抗体(huA33)中发现。在一些实施方案中,多肽链或链包括在表8中出现的一个或多个序列中发现的重链和轻链CDR。在一些某些实施方案中,所述重链和轻链CDR在人源

化A33抗体(huA33)中发现。

[0010] 在一些实施方案中,第一和/或第二抗原结合位点是或包含单链可变片段(scFv)。在一些实施方案中,第一抗原结合位点由免疫球蛋白分子组成,第二抗原结合位点由scFv, scFab, Fab或Fv构成。在一些实施方案中,第二抗原结合位点是scFv。在某些实施方案中,第二抗原结合位点为C825scFv。在一些实施方案中,C825scFv是人源化的。在一些实施方案中,scFv连接到免疫球蛋白分子的重链的C末端。在一些实施方案中,scFv连接到免疫球蛋白分子的轻链的C末端。

[0011] 在一些实施方案中,本发明提供了由基于人源化抗体A33(huA33)的免疫球蛋白分子和与苜蓿基-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸(DOTA-Bn)结合的scFv组成的双特异性抗体,其中scFv基于C825并连接到huA33的轻链的C末端,所述双特异性抗体的特征在于当施用于生物体时的受限的免疫学影响。

[0012] 在一些实施方案中,免疫球蛋白分子是IgG。在一些实施方案中,免疫球蛋白分子是无糖基化(aglycosylated)的IgG。在一些实施方案中,免疫球蛋白分子是具有K322A取代的IgG。在一些实施方案中,免疫球蛋白分子是具有K322取代基的无糖基化IgG。

[0013] 在各种实施方案中,本发明的双特异性抗体包含SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4。在各种实施方案中,本发明的双特异性抗体包含SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7。在各种实施方案中,本发明的双特异性抗体包含SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4,并且还包含SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7。

[0014] 在各种实施方案中,本发明的双特异性抗体包含SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:6,SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:6,SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:6,或SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:7。

[0015] 在一些实施方案中,本发明提供分离的核酸分子,其包含本文所述的双特异性抗体的部分或全部多肽链的编码序列。在某些实施方案中,编码序列是密码子优化的。

[0016] 在一些实施方案中,本发明提供了包含如本文所述的核酸分子的表达载体。

[0017] 在一些实施方案中,本发明提供了包含如本文所述的宿主细胞的宿主细胞。

[0018] 在一些实施方案中,本发明提供了生产如本文所述双特异性抗体的方法,所述方法包括以下步骤:在允许双特异性抗体表达的条件下,在培养基中培养如本文所述的宿主细胞;以及从培养基中分离双特异性抗体。

[0019] 在一些实施方案中,本发明提供包含如本文所述的双特异性抗体的组合物。

[0020] 在一些实施方案中,本发明提供了包含本文所述的组合物或如本文所述的双特异性抗体的药物组合物。

[0021] 在一些实施方案中,本发明提供本文所述的药物组合物或本文所述的组合物的用于治疗或诊断癌症的用途。

[0022] 在一些实施方案中,本发明提供了本文所述的双特异性抗体,组合物或药物组合物用于治疗或检测与A33表达相关的病症的用途。

[0023] 在一些实施方案中,本发明提供了包含本文所述的双特异性抗体的试剂盒。

[0024] 在一些实施方案中,本发明提供本文所述的双特异性抗体在制备用于药的药物中的用途。

[0025] 在一些实施方案中,本发明提供本文所述的双特异性抗体在制备用于诊断测试或

测定中的药物中的用途。

[0026] 在一些实施方案中,本发明提供本文所述的双特异性抗体在制备用于诊断癌症的药物中的用途。

[0027] 在一些实施方案中,本发明提供本文所述的双特异性抗体在制备用于治疗癌症的药物中的用途。

[0028] 在一些实施方案中,本发明提供本文所述的双特异性抗体在制备用于治疗结肠直肠癌,胃癌或胰腺癌的药物中的用途。

[0029] 在一些实施方案中,本发明提供了治疗受试者中的医学病症的方法,其中所述医学病症的特征在于A33表达,包括向所述受试者施用治疗有效量的本文所述的双特异性抗体。在一些实施方案中,医学病症包括A33阳性肿瘤。在一些某些实施方案中,医学病症是结肠直肠癌,胃癌或胰腺癌。

[0030] 在一些实施方案中,本发明提供了杀死肿瘤细胞的方法,所述方法包括使肿瘤细胞与双特异性抗体接触的步骤,所述双特异性抗体由基于人源化抗体A33的第一抗原结合位点(huA33)和结合苕基-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸(DOTA-Bn)的第二抗原结合位点,在足以观察到肿瘤细胞杀伤的条件和时间下进行所述接触。

[0031] 在一些实施方案中,本发明提供抑制肿瘤生长的方法,所述方法包括以下步骤:使肿瘤细胞与双特异性抗体接触,所述双特异性抗体由基于人源化抗体A33的第一抗原结合位点和结合苕基-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸(DOTA)的第二抗原结合位点,在足以使没有结合的双特异性抗体从血液清除的条件下进行所述接触,以允许与毒物缀合的DOTA-Bn的最后一步杀死肿瘤细胞。

[0032] 在一些实施方案中,接触步骤包括向生物体施用如本文所述的双特异性抗体,并且所述施用使得未结合的双特异性抗体从血液中清除。在一些实施方案中,施用步骤包括将本文所述的双特异性抗体与包含与有效载荷结合的DOTA-Bn的缀合物组合施用,所述施用使得所述有效载荷递送至肿瘤细胞。在一些实施方案中,所述施用使得肿瘤细胞基本上被本文所述的双特异性抗体饱和。在一些实施方案中,所述施用使得肿瘤细胞在给予缀合物之前被如本文所述的双特异性抗体基本饱和。在一些实施方案中,根据组合方案进行施用,所述组合方案的特征在于缀合物的治疗指数比对于其中缀合物作为单步骤单一疗法施用的参考方案观察到的至少更好10倍。

[0033] 在一些实施方案中,通过包括一个或多个循环的方案来施用。在一些实施方案中,通过包括例如1,2,3,4,5,6,7,8,9,10或更多个周期的方案施用。

[0034] 在一些实施方案中,通过包括一个或多个以下循环的方案来施用,所述循环具有施用双特异性抗体的第一给药步骤,施用缀合物的第二给药步骤和至少一个施用与有效载荷缀合的相同DOTA-Bn缀合物或不同DOTA-Bn缀合物的第三给药步骤。在一些实施方案中,进行第一施用步骤,使得肿瘤细胞基本上被双特异性抗体饱和。在一些实施方案中,第一施用步骤在第二施用步骤和任何第三施用步骤之前进行,并且在该循环内不进行双特异性抗体的进一步施用。在一些某些实施方案中,在第一循环之后没有循环包括双特异性抗体的任何施用。在一些实施方案中,施用在几小时至数天的时间内进行。

[0035] 在一些实施方案中,缀合物在几分钟内施用。

[0036] 在一些实施方案中,第二抗原结合位点是基于单克隆抗体2D12.5。在一些实施方

案中,第二抗原结合位点是基于人源化2D12.5。

[0037] 在一些实施方案中,本发明提供了治疗或诊断受试者中A33阳性癌症的方法,所述方法包括向受试者施用本文所述的双特异性抗体,所述给药在足够的条件和时间用双特异性抗体定位于表达A33抗原的一种或多种肿瘤下进行,随后向受试者施用清除剂,其中清除剂除去未结合的双特异性抗体,然后向受试者施用放射性标记的DOTA-Bn。在一些某些实施方案中,所述方法还包括将所述双特异性抗体第二次施用于所述受试者。

[0038] 在一些实施方案中,在给予清除剂之后进行第二次给予受试者的双特异性抗体。在一些实施方案中,第二次向受试者施用双特异性抗体之后向受试者第二次施用清除剂。

[0039] 在一些实施方案中,如本文所述的治疗方法基本上对正常组织没有辐射毒性。在一些实施方案中,如本文所述的治疗方法导致治疗指数增加大于10倍。在一些实施方案中,如本文所述的治疗方法是治愈的。

[0040] 在许多实施方案中,清除剂是基于葡聚糖的清除剂。在许多实施方案中,放射性标记的DOTA为 $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Bn, $^{90}\text{Y}$ -DOTA-Bn或 $^{86}\text{Y}$ -DOTA-Bn。

[0041] 在一些实施例,有效载荷是有毒载荷。在一些实施例中,有效载荷是生物反应调节剂。在一些实施方案中,有效载荷选自可检测部分和活性部分。在一些实施方案中,有效载荷是或包含选自放射性同位素,肽,核酸,小分子,纳米颗粒,病毒及其组合的组。

## 附图说明

[0042] 由以下附图构成的本文包括的附图仅用于说明的目的,而不是为了限制。

[0043] 图1显示通过SE-HPLC色谱(UV 280nm)体外评估huA33-C825生化纯度。7.853分钟的主峰是近似分子量为210KDa的完全配对的双特异性抗体。

[0044] 图2显示与(A)人A33抗原和(B)BSA-(Y)-DOTA-Bn结合的抗体的示例性Biacore感测图。

[0045] 图3显示了示例性(A)在不同剂量的清除剂(CA)和对照(盐水)中的镱-177对于肿瘤和各种正常组织的活性,(B)在不同浓度的CA下的镱-177的活性,(C)各种CA浓度下的肿瘤-器官比,(D)注射后数小时的镱-177的活性。活性表示为每克组织注射剂量的百分比(% ID/g)。肿瘤内多个小时长时间滞留,其他组织迅速清除。

[0046] 图4显示注射后24小时 $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Bn的示例性肿瘤摄取作为处理携带人结肠癌移植瘤的小鼠(SW1222)的放射性的函数;(A)各种组织中 $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Bn的摄取量。(B)SW1222肿瘤中摄取 $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Bn的量;(C)在SW1222肿瘤和肾脏中的 $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Bn的活性,在注射后24小时每注射 $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Bn;(D)在肿瘤中结合的 $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Bn的pmoles,注射后24小时内每注射 $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Bn。在约40MBq的注射活性后达到饱和。

[0047] 图5显示了接受单周期PRIT的小鼠组的示例性肿瘤生长测量( $\text{mm}^3$ ) (A)对照(无治疗, $n=8$ ), (B) 0.9mCi (33.3MBq; 1mCi = 37MBq)  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Bn ( $n=6$ ); (C) huA33-C825+ 0.3mCi  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Bn ( $n=8$ ), (D) huA33-C825+0.9mCi  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Bn ( $n=8$ )。对照和治疗(huA33-C825)SW1222肿瘤表明,SW1222肿瘤的生长模式受单剂量放射性的很小影响,甚至剂量递增也这样。最高剂量(0.9mCi)表现出一些效果。箭头表示 $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Bn的施用日。在 $t=-24$ 小时,给予huA33-C825剂量,随后在 $t=-4$ 小时加入葡聚糖清除剂,在 $t=0$ 小时给予 $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Bn。

[0048] 图6显示了接受双周期PRIT的小鼠的示例性肿瘤生长测量( $\text{mm}^3$ ) (A)  $2 \times \text{huA33-C825PRIT}+11.1\text{MBq}$  (总计: $22.2\text{MBq}$ ) , (B)  $2 \times \text{huA33-C825PRIT}+33.3\text{MBq}$  (总计: $66.6\text{MBq}$ ) , (C)  $2 \times \text{huA33-C825PRIT}+55.5\text{MBq}$  (总计: $111\text{MBq}$ ) , (D)  $1 \times \text{huA33-C825PRIT}+111\text{MBq}$  (总计: $111\text{MBq}$ )。对于在肿瘤接种后10和17天给出的双周期PRIT,在所有剂量水平下都有明显的反应,以剂量依赖性方式观察到完整的反应。在图6C ( $2 \times \text{huA33-C825PRIT}+55.5\text{MBq}$  (总共为 $111\text{MBq}$ ))中,所有的肿瘤都对治疗作出反应。通过比较病理学MSKCC实验室,通过每周至少监测三次重量和总体外观以及肝,肾,脾和骨髓的组织病理学评估来确定毒性。在小鼠中没有可检测的毒性。

[0049] 图7显示了总结带有SW1222结肠癌肿瘤裸鼠的DOTA-PRIT多周期治疗研究结果的示例性肿瘤反应曲线。描述了三种治疗手段:无治疗(三角形),仅 $^{177}\text{Lu-DOTA-Bn}$ (正方形)和3个循环的DOTA-PRIT治疗,其具有 $55\text{MBq}$ 的 $^{177}\text{Lu-DOTA-Bn}$ /周期( $165\text{MBq}$ 总施用活性;圆和每个处理由x轴下方的箭头表示)。

[0050] 图8示出了肿瘤随时间的示例性最大强度nanoSPECT/CT图像和活性浓度。从携带单周期抗GPA33PRIT+ $55\text{MBq}$   $^{177}\text{Lu-DOTA-Bn}$ 处理的SW1222-肿瘤裸鼠中收集图像,并在注射后1,24和160小时通过纳米SPECT/CT成像 $^{177}\text{Lu-DOTA-BN}$ 。显示肿瘤位于下腹区的最大强度nanoSPECT/CT图像。通过校准图像的兴趣区分析来确定肿瘤中的活性浓度。

[0051] 定义

[0052] 本发明的范围由所附权利要求限定,并且不受本文所述的特定实施例的限制;阅读本公开的本领域技术人员将知道可以等同于所描述的实施例的各种修改,或者在权利要求的范围内。

[0053] 一般来说,除非另有明确说明,本文使用的术语符合本领域其理解的含义。以下提供某些术语的明确定义;在本说明书的特定情况下,这些和其它术语的含义对于本领域技术人员来说将是清楚的。

[0054] 本说明书中引用的参考文献或其相关部分通过引用并入本文。

[0055] 为了更容易理解本发明,下面首先定义某些术语。在整个说明书中阐述了以下术语和其它术语的附加定义。

[0056] “亲和力”:如本领域已知的,“亲和性”是特定配体结合其配偶体的紧密度的度量。亲和力可以用不同的方法来衡量。在一些实施方案中,通过定量测定法测量亲和力。在一些这样的实施方案中,可以将结合配偶体浓度固定为超过配体浓度,以模拟生理条件。或者或另外,在一些实施方案中,可以改变结合配偶体浓度和/或配体浓度。在一些这样的实施方案中,可以将亲和力与可比较条件(例如浓度)下的参考相比较。

[0057] 如本文所用,“亲和力成熟(Affinity matured)”(或“亲和力成熟抗体(affinity matured antibody)”)是指在其一个或多个CDR中具有一个或多个改变的抗体,与没有这些改变的母抗体比较,其抗体对抗原的亲和力增强。在一些实施方案中,亲和力成熟抗体对靶抗原具有纳摩尔或甚至皮摩尔亲和力。亲和力成熟抗体可以通过本领域已知的多种方法中的任一种产生。Marks等人,1992,BioTechnology 10:779-783描述了通过 $V_H$ 和 $V_L$ 结构域改组(domain shuffling)的亲和力成熟。CDR和/或框架残基的随机诱变描述于:Barbas等人,1994,Proc.Nat.Acad.Sci美国91:3809-3813;Schier等,1995,Gene 169:147-155;Yelton等,1995,J.Immunol.155:1994-2004;Jackson等,1995,J.Immunol.154(7):3310-9;和



Hawkins等人,1992,J.Mol.Biol.226:889-896。

[0058] 本文所用的“改善”是指预防,减轻或缓解状态或改善受试者的状态。改善包括但不限于完全恢复或完全预防疾病,病症或病症(例如放射性损伤)。

[0059] 本文所用的“动物”是指动物界的任何成员。在一些实施方案中,“动物”是指任何性别和发育阶段的人类。在一些实施方案中,在任何发育阶段,“动物”是指非人类动物。在某些实施方案中,非人动物是哺乳动物(例如,啮齿动物,小鼠,大鼠,兔,猴,狗,猫,绵羊,牛,灵长类动物和/或猪)。在一些实施方案中,动物包括但不限于哺乳动物,鸟类,爬行动物,两栖动物,鱼,昆虫和/或蠕虫。在某些实施方案中,动物易感染DV。在一些实施方案中,动物可以是转基因动物,遗传工程化的动物和/或克隆。

[0060] 本文所用的“抗体”具有本领域的理解含义,是指特异性结合特定抗原的免疫球蛋白(Ig)。如本领域普通技术人员已知的,天然产生的抗体通常由四条多肽链,两条重(H)链和两条轻链(L)链组成。每个重链和轻链由可变区(分别在本文中缩写为HCVR或 $V_H$ 和LCVR或 $V_L$ )和恒定区组成。重链的恒定区包含 $C_H1$ , $C_H2$ 和, $C_H3$ 结构域(在IgM和IgE的情况下,任选地是 $C_H4$ 结构域)。轻链的恒定区由一个结构域 $C_L$ 组成。 $V_H$ 和 $V_L$ 区域还包含称为互补决定区(CDR)的高变区,其间隔着更保守的区域,称为框架区(FR)。每个 $V_H$ 和 $V_L$ 由以下顺序从氨基末端到羧基末端排列的三个CDR和四个FR组成:FR1,CDR1,FR2,CDR2,FR3,CDR3,FR4。免疫球蛋白分子可以是任何类型(例如IgM,IgD,IgG,IgA和IgE),类(例如IgG1,IgG2,IgG3,IgG4,IgA1和IgA2)或亚类。

[0061] 抗体试剂:本文所用的术语“抗体试剂”是指特异性结合特定抗原的试剂。在一些实施方案中,该术语包括具有足以赋予特异性结合的免疫球蛋白结构元件的任何多肽。在各种实施方案中,合适的抗体试剂可包括但不限于单克隆抗体,多克隆抗体,人源化抗体,灵长类抗体,嵌合抗体,人抗体,双特异性或多特异性抗体,单结构域抗体(例如鲨鱼式单结构域抗体(shark single domain antibody)(例如,IgNAR或其片段)),缀合抗体(即,与其它蛋白质缀合或融合的抗体,放射性标记物,细胞毒素),小型模块化免疫药物(Small Modular ImmunoPharmaceuticals,“SMIPs™”),单链抗体,在一些实施方案中,该术语可以指订肽(stapled peptide)。在一些实施方案中,该术语可以指抗体样结合肽模拟物。在一些实施方案中,该术语可以指抗体样结合支架蛋白。在一些实施方案中,该术语可以指单体或连接蛋白。在许多实施方案中,抗体试剂是或包含其氨基酸序列包括本领域技术人员识别为互补决定区(CDR)的一个或多个结构元件的多肽;在一些实施方案中,抗体试剂是或包含其氨基酸序列包括与参考抗体中发现的CDR基本相同的至少一个CDR(例如,至少一个重链CDR和/或至少一个轻链CDR)的多肽。在一些实施方案中,包含的CDR基本上与参考CDR相同,因为与参考CDR相比,其与序列相同或含有1-5个氨基酸取代。在一些实施方案中,包含的CDR基本上与参考CDR相同,因为其显示至少85%,86%,87%,88%,89%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%或100%的序列同一性。在一些实施方案中,包含的CDR基本上与参考CDR相同,因为其与参考CDR显示至少96%,96%,97%,98%,99%或100%的序列同一性。在一些实施方案中,包含的CDR与参考CDR基本相同,因为与参考CDR相比,所包含的CDR中的至少一个氨基酸被缺失,添加或取代,但是所包括的CDR具有否则的氨基酸序列与参考CDR的相同。在一些实施方案中,所包括的CDR基本上与参考CDR相同,因为与参考CDR相比,所包括的CDR中的1-5个氨基酸被缺失,添加或取代,但是所包括的CDR具有

否则的氨基酸序列与参考CDR相同。在一些实施方案中,所包括的CDR基本上与参考CDR相同,因为与参考CDR相比,所包含的CDR中的至少一个氨基酸被取代,但是所包括的CDR具有与其相同的氨基酸序列参考CDR。在一些实施方案中,所包括的CDR基本上与参考CDR相同,因为与参考CDR相比,所包含的CDR中的1-5个氨基酸被缺失,添加或取代,但是所包括的CDR具有否则的氨基酸序列与参考CDR相同。在一些实施方案中,抗体剂是或包含其氨基酸序列包括本领域技术人员识别为免疫球蛋白可变结构域的结构元件的多肽。在一些实施方案中,抗体剂是具有结合结构域的多肽蛋白质,其与免疫球蛋白结合结构域同源或大部分同源。在一些实施方案中,抗体试剂是或包含多肽,其包括在特定参考抗体链或链(例如重链和/或轻链)中发现的所有CDR。

[0062] 本文所用的“抗体组分”是指特异性结合表位或抗原的多肽元件(其可以是完整多肽,或更大多肽的一部分,例如本文所述的融合多肽),以及包括一个或多个免疫球蛋白结构特征。通常,抗体组分是其氨基酸序列包括抗体结合区特征的元件(例如,抗体轻链或可变区或其一个或多个互补决定区(“CDR”)或抗体重链的多肽链或可变区或其多个CDR,任选在一个或多个框架区的存在下)。在一些实施方案中,抗体组分是或包含全长抗体。在一些实施方案中,抗体组分小于全长,但包括至少一个结合位点(包含至少一个,优选至少两个具有已知抗体“可变区”结构的序列)。在一些实施方案中,术语“抗体组分”包括具有结合结构域的任何蛋白质,其与免疫球蛋白结合结构域同源或大部分同源。在具体实施方案中,所包含的“抗体组分”包括具有与免疫球蛋白结合结构域具有至少99%同一性的结合结构域的多肽。在一些实施方案中,所包含的“抗体组分”是具有与免疫球蛋白结合结构域显示至少70%,75%,80%,85%,90%,95%或98%同一性的结合结构域的任何多肽,例如参考免疫球蛋白结合域。包含的“抗体成分”可以具有与在天然来源中发现的抗体(或其部分,例如其抗原结合部分)相同的氨基酸序列。抗体组分可以是单特异性的,双特异性的或多特异性的。抗体组分可以包括任何免疫球蛋白类特征的结构元件,包括任何人类:IgG,IgM,IgA,IgD和IgE。已经显示抗体的抗原结合功能可以通过全长抗体的片段进行。这样的抗体实施方案也可以是特异性结合两种或更多种不同抗原的双特异性,双特异性或多特异性形式。包含在抗体的“抗原结合部分”的结合片段的实例包括(i) Fab片段,由 $V_H$ , $V_L$ , $C_H1$ 和 $C_L$ 结构域组成的单价片段;(ii)  $F(ab')_2$ 片段,包含在铰链区通过二硫桥连接的两个Fab片段的二价片段;(iii) 由 $V_H$ 和 $C_H1$ 结构域组成的Fd片段;(iv) 由抗体单臂的 $V_H$ 和 $V_L$ 结构域组成的Fv片段,(v) dAb片段(Ward等人,(1989) *Nature* 341:544-546),其包含单个可变结构域;和(vi) 分离的互补决定区(CDR)。此外,尽管Fv片段的两个结构域 $V_H$ 和 $V_L$ 由独立的基因编码,但是它们可以通过合成接头使用重组方法连接,合成接头使得它们能够被制成单个蛋白质链,其中 $V_H$ 和 $V_L$ 区对形成单价分子(称为单链Fv(scFv));参见例如Bird等人,1988,*Science* 242:423-426;和Huston等人,1988,*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883)。在一些实施方案中,如本文所述的“抗体组分”是或包含这样的单链抗体。在一些实施方案中,“抗体组分”是或包含双抗体(diabody)。双抗体是二价、双特异性抗体,其中 $V_H$ 和 $V_L$ 结构域在单个多肽链上表达,但使用太短的接头不允许同一链上的两个结构域之间的配对,从而迫使结构域与互补结构域配对(参见例如Holliger,P等人,1993,*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448;Poljak,R.J.,1994,*Structure* 2(12):1121-1123)。这种抗体结合部分是本领域已知的(Kontermann和Dubel eds.,*Antibody Engineering* (2001) Springer-Verlag. New

York.790pp。(ISBN3-540-41354-5)。在一些实施方案中,抗体组分是或包含包含一对串联Fv区段( $V_H-C_H1-V_H-C_H1$ )的单链“线性抗体”,其与互补轻链多肽一起形成一对抗原结合区(Zapata等人,1995年,Protein Eng.8(10):1057-1062;和美国专利号5,641,870)在一些实施方案中,抗体组分可具有嵌合或人源化抗体特征的结构元件,一般来说,人源化抗体是人免疫球蛋白抗体),其中来自受体的互补决定区(CDR)的残基被来自具有所需特异性,亲和力和能力的非人物种(供体抗体)如小鼠,大鼠或兔的CDR的残基所替代在一些实施方案中,抗体组分可以具有人抗体特征的结构元件。

[0063] 本文所用的“生物活性”是指由感兴趣的试剂或实体实现的可观察的生物效应或结果。例如,在一些实施方案中,特异性结合相互作用是生物活性。在一些实施方案中,生物学途径或事件的调节(例如,诱导,增强或抑制)是生物活性。在一些实施方案中,通过检测由生物学途径或感兴趣事件产生的直接或间接产物来评估生物活性的存在或程度。

[0064] 本文所用的“双特异性抗体”是指双特异性结合剂,其中至少一个,通常两个结合部分是或包含抗体组分。各种不同的双特异性抗体结构在本领域中是已知的。在一些实施方案中,双特异性抗体中或包含抗体组分的每个结合部分包括 $V_H$ 和/或 $V_L$ 区;在一些这样的实施方案中, $V_H$ 和/或 $V_L$ 区是在特定单克隆抗体中发现的那些。在一些实施方案中,当双特异性抗体含有两个抗体组分结合部分时,每个包括来自不同单克隆抗体的 $V_H$ 和/或 $V_L$ 区。在一些实施方案中,其中双特异性抗体含有两个抗体组分结合部分,其中两个抗体组分结合部分之一包含具有包含来自第一单克隆抗体的CDR的 $V_H$ 和/或 $V_L$ 区域的免疫球蛋白分子,以及两种抗体之一组分结合部分包括具有包含来自第二单克隆抗体的CDR的 $V_H$ 和/或 $V_L$ 区的抗体片段(例如,Fab,F(ab'),F(ab')<sub>2</sub>,Fd,Fv,dAB,scFv等)抗体。

[0065] 如本文所用,“双特异性结合剂”是指具有两个离散结合部分的多肽试剂,其各自与不同的靶标结合。在一些实施方案中,双特异性结合剂是或包含单一多肽;在一些实施方案中,双特异性结合剂是或包含多个肽,其在一些这样的实施方案中可以彼此共价连接,例如通过交联。在一些实施方案中,双特异性结合剂的两个结合部分识别相同靶标(例如抗原)的不同位点(例如表位)。在一些实施例中,它们识别不同的目标。在一些实施方案中,双特异性结合剂能够同时结合具有不同结构的两个靶。

[0066] 如本文所用,“载体”是指施用组合物的稀释剂,佐剂,赋形剂或载体。在一些示例性实施方案中,载体可以包括无菌液体,例如水和油,包括石油,动物,植物或合成来源的油,例如花生油,大豆油,矿物油,芝麻油等等。在一些实施方案中,载体是或包括一种或多种固体组分。

[0067] 本文所用的“CDR”是指抗体可变区内的互补决定区。对于每个可变区,在重链和轻链的每个可变区中有三个CDR,其被指定为CDR1,CDR2和CDR3。“一组CDR”或“CDR组”是指发生在能够结合抗原的同源重链和轻链可变区的抗原或CDR的单个可变区中的三个或六个CDR的组。本领域已经建立了用于限定CDR边界的某些系统(例如,Kabat,Chothia等);本领域技术人员了解这些系统之间和之间的差异,并且能够理解对于要求保护的发明的理解和实践所需的CDR边界。

[0068] 本文所用的“CDR-移植的抗体”是指其氨基酸序列包含来自一个物种的重链和轻链可变区序列的抗体,其中一个或多个 $V_H$ 区和/或 $V_L$ 被另一物种的CDR序列替代,例如具有其中一个或多个鼠CDR(例如,CDR3)已被人CDR序列替代的鼠 $V_H$ 和 $V_L$ 区的抗体。同样地,“CDR移

植抗体”也可以指具有人V<sub>H</sub>区和V<sub>L</sub>区的抗体,其中一个或多个人CDR(例如CDR3)已被小鼠CDR序列替代。

[0069] 本文所用的“嵌合抗体”是指其氨基酸序列包括在第一种中发现的V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>区序列的抗体,以及在第二种中发现的不同于第一种的可变区序列。在许多实施方案中,嵌合抗体具有与人恒定区连接的鼠V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>区。在一些实施方案中,将与非人恒定区(例如小鼠恒定区)连接的人V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>区的抗体称为“反向嵌合抗体”。

[0070] “组合治疗”:如本文所用,术语“联合治疗”是指受试者同时暴露于两种或更多种治疗方案(例如两种或更多种治疗剂)的那些情况。在一些实施方案中,两种或更多种试剂或可同时施用;在一些实施方案中,可以依次施用这样的试剂;在一些实施方案中,这些试剂以重叠给药方案施用。

[0071] “可比较”:如本文所使用的,是指彼此可能不相同但是足够相似以允许在其之间进行比较的两个或更多个试剂,实体,情况,状况集合等,使得结论可以根据观察到的差异或相似性合理地绘制。本领域普通技术人员将理解,在任何特定情况下,对于两个或更多个这样的试剂,实体,情况,状况集合等等被认为是可比较的,需要什么样近似度。

[0072] “对应”,如本文所用,表示目的多肽中的氨基酸残基的位置/相同。普通技术人员将理解,为了简单起见,多肽中的残基通常使用基于参考相关多肽的规范编号系统来指定,使得与“对应”于第190位的残基的氨基酸例如,实际上不必是特定氨基酸链中的第190个氨基酸,而是对应于参考多肽在190处发现的残基;本领域普通技术人员容易理解如何鉴定“对应”氨基酸。

[0073] “检测剂”:如本文所述,是指例如由于其特定的结构和/或化学特性和/或其功能性而适于检测的部分或试剂。这些试剂的非限制性实例包括酶,放射性标记物,半抗原,荧光标记,磷光分子,化学发光分子,发色团,发光分子,光亲和分子,着色颗粒或配体如生物素。许多检测剂是本领域已知的,以及它们与抗体相连的系统(参见例如美国专利号5,021,236;4,938,948;和4,472,509,各自通过引用并入本文)。具体实例可包括顺磁离子,放射性同位素,荧光染料,可核物检测物质,X射线成像剂等。在本发明的一些实施方案中,缀合的检测剂是诊断或成像剂。

[0074] “剂型”和“单位剂型”:如本文使用的,术语“剂型”是指待治疗的受试者(例如,人类患者)的治疗剂的物理上离散的单位。每个单位含有预定量的活性物质,根据适当的给药方案,当被给予相关群体时,计算或证明产生所需治疗效果。例如,在一些实施方案中,这样的量是适于根据给药方案施用的单位剂量(或其全部分数),所述给药方案在被给予相关群体时被确定为与所需或有益结果相关(即,用治疗剂量方案)。然而,应当理解,给予任何特定患者的总剂量将由健康医学判断范围内的医疗专业人员(例如医生)来选择。

[0075] “给药方案”(或“治疗方案”):如本文所用的,是单独给予受试者的一组单位剂量(通常多于一种),通常由时间段分离。在一些实施方案中,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。在一些实施方案中,给药方案包括多个剂量,每个剂量彼此分开相同长度的时间段;在一些实施方案中,给药方案包括多个剂量和分开单个剂量的至少两个不同时间段。在一些实施方案中,治疗剂在预定时期内连续(例如通过输注)施用。在一些实施方案中,治疗剂每天施用一次(QD)或每天两次(BID)。在一些实施方案中,给药方案包括多个剂量,每个剂量彼此分开相同长度的时间段;在一些实施方案中,给药方案包

括多个剂量和分开单个剂量的至少两个不同时间段。在一些实施方案中,给药方案内的所有剂量具有相同的单位剂量。在一些实施方案中,给药方案内的不同剂量具有不同的量。在一些实施方案中,给药方案包含第一剂量的第一剂量,随后是与第一剂量量不同的第二剂量的一个或多个另外的剂量。在一些实施方案中,给药方案包括第一剂量的第一剂量,随后是与第一剂量相同的第二剂量的一个或多个另外的剂量。在一些实施方案中,当跨相关群体施用(即,是治疗性给药方案)时,给药方案与期望或有益结果相关。

[0076] 本文所用的“效应子功能”指由抗体Fc区与Fc受体或配体的相互作用产生的生物化学事件。效应功能包括但不限于抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC),抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP)和补体介导的细胞毒性(CMC)。在一些实施方案中,效应子功能是在抗原结合后起作用的功能,一种与抗原结合无关的功能,或二者结合。

[0077] 本文所用的“效应细胞”是指免疫系统的细胞,其表达一种或多种Fc受体并介导一种或多种效应子功能。在一些实施方案中,效应细胞可以包括但不限于单核细胞,巨噬细胞,嗜中性粒细胞,树突状细胞,嗜酸性粒细胞,肥大细胞,血小板,大颗粒淋巴细胞,朗格汉斯细胞,天然杀伤(NK)细胞中的一种或多种,T淋巴细胞,B淋巴细胞,并且可以来自任何生物体,包括但不限于人,小鼠,大鼠,兔和猴。

[0078] 本文所用的“工程”一般来说是指由人工操纵的方面。例如,在一些实施方案中,当两个或更多个序列在自然界中没有以该顺序连接在一起时,由人工操纵,以便彼此直接相连得到该多核苷酸,该多核苷酸可以被认为是“工程化的”。在一些特定的这样的实施方案中,工程改造的多核苷酸可以包含在自然界中与第一编码序列有效相关但不与第二编码序列有效结合的调节序列,由人工连接,使得其可操作地与第二编码序列相关联。或者或另外,在一些实施方案中,每个编码多肽元件或结构域的第一和第二核酸序列在自然界中不彼此连接可以在单一工程化多核苷酸中彼此连接。可比较地,在一些实施方案中,如果细胞或生物体被操纵以使得其遗传信息被改变(例如,已经引入了先前不存在的新遗传物质,或之前存在的遗传物质已经被改变或删除)。通常的做法是本领域技术人员所理解的,即使实际操作是在先前的实体上进行的,经工程化的多核苷酸或细胞的后代通常仍被称为“工程化的”。此外,如本领域技术人员将理解的,可以获得各种方法,通过其可以实现如本文所述的“工程”。例如,在一些实施例中,“工程”可以涉及通过使用被编程为执行分析或比较的计算机系统来选择或设计(例如,核酸序列,多肽序列,细胞,组织和/或生物体),或以其他方式分析,推荐和/或选择序列,变更等)。或者或另外,在一些实施方案中,“工程”可以涉及使用体外化学合成方法和/或重组核酸技术,例如核酸扩增[例如通过聚合酶链式反应],杂交,突变,转化,转染等,和/或各种受控交配方法中的任何一种)。如本领域技术人员将理解的,各种建立的这样的技术(例如,对于重组DNA,寡核苷酸合成和组织培养和转化[例如电穿孔,脂质转染等]在本领域中是公知的,并且描述参见例如Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual(2d ed.,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NY[1989]),其通过引用并入本文用于任何目的。

[0079] 如本文所用,“表位”包括由免疫球蛋白(例如抗体或受体)结合组分特异性识别的任何部分。在一些实施方案中,表位由抗原上的多个化学原子或基团组成。在一些实施方案中,当抗原采用相关的三维构象时,这些化学原子或基团被表面暴露。在一些实施方案中,当抗原采用这种构象时,这样的化学原子或基团在空间中物理上彼此接近。在一些实施方

案中,当抗原采用替代构象(例如线性化)时,至少一些此类化学原子是基团彼此物理分离。

[0080] 如本文所用,“赋形剂”是指可以包括在药物组合物中的非治疗剂,例如提供或有助于所需的一致性 or 稳定作用。合适的药物赋形剂包括例如淀粉,葡萄糖,乳糖,蔗糖,明胶,麦芽,米,面粉,白垩,硅胶,硬脂酸钠,单硬脂酸甘油酯,滑石,氯化钠,干脱脂乳,甘油,丙烯,水,乙醇等。

[0081] 本文所用的“Fc配体”是指来自任何生物结合抗体以形成Fc-配体复合物的分子,优选多肽。Fc配体包括但不限于Fc $\gamma$ RIIA(CD32A),Fc $\gamma$ RIIB(CD32B),Fc $\gamma$ RIIIA(CD16A),Fc $\gamma$ RIIIB(CD16B),Fc $\gamma$ RI(CD64),Fc $\gamma$ RII(CD23),Fc $\gamma$ Rn,C1q,C3,葡萄球菌蛋白A,链球菌蛋白G和病毒Fc $\gamma$ R。Fc配体可以包括结合Fc的未发现的分子。

[0082] 如本领域所理解的,“荧光标记”是具有荧光特征的部分或实体,并且在一些实施方案中可基于这种荧光检测。在一些实施方案中,荧光标记可以是或可以包含Alexa 350,Alexa 430,AMCA,BODIPY 630/650,BODIPY 650/665,BODIPY-FL,BODIPY-R6G,BODIPY-TMR,BODIPY-TRX,Cascade Blue,Cy3,Cy5,6-FAM,荧光素异硫氰酸酯,HEX,6-JOE,俄勒冈州绿488,俄勒冈州绿500,俄勒冈州绿514,太平洋蓝,REG,若丹明绿,罗丹明红,雷诺沙星,ROX,TAMRA,四甲基罗丹明,和/或德克萨斯红等。

[0083] 如本文所用的“框架”或“框架区”是指可变区减去CDR的序列。因为CDR序列可以由不同的系统确定,所以框架序列同样受到相应的不同的解释。六个CDR将重链和轻链上的构架区分成每个链上的CDR1位于FR1和FR2之间的CDR1,FR2和FR3之间的CDR2,CDR2在FR2和FR3之间的CDR3和CDR3之间的CDR3FR3和FR4。没有将特定子区域指定为FR1,FR2,FR3或FR4,其他框架区域表示单个天然存在的免疫球蛋白链的可变区内的组合FR。如本文所用,FR表示四个子区域中的一个,FR1例如表示最靠近可变区域的氨基末端的第一框架区域,相对于CDR1为5',FRs表示两个或更多个构成框架区域的子区域。

[0084] 本文所用的“宿主细胞”是指已经引入了外源DNA(重组或其他)的细胞。阅读本公开的技术人员将明白,这些术语不仅指特定主题细胞,而且还涉及这种细胞的后代。由于突变或环境影响,后代可能发生某些修饰,所以这种后代实际上可能不与亲本细胞相同,但仍包括在本文所用的术语“宿主细胞”的范围内。在一些实施方案中,宿主细胞包括选自适于表达外源DNA(例如,重组核酸序列)的任何生命王国的原核和真核细胞。示例性细胞包括原核生物和真核生物(单细胞或多细胞),细菌细胞(例如大肠杆菌,芽孢杆菌属,链霉菌属菌株等),分枝杆菌细胞,真菌细胞,酵母细胞(植物细胞,昆虫细胞(例如,SF-9,SF-21,杆状病毒感染的昆虫细胞,粉纹夜蛾等),非人类动物细胞,人类细胞或细胞融合物,例如杂交瘤或quadromas。在一些实施方案中,细胞是人,猴,猿,仓鼠,大鼠或小鼠细胞。在一些实施方案中,细胞是真核细胞,选自以下细胞:CHO(例如CHO K1,DXB-11CHO,素食CHO),COS(例如COS-7),视网膜细胞,Vero,CV1,肾脏(例如,HEK293,293EBNA,MSR293,MDCK,HaK,BHK),HeLa,HepG2,WI38,MRC5,Colo205,HB8065,HL-60(例如BHK21),Jurkat,Daudi,A431),CV-1,U937,3T3,L细胞,C127细胞,SP2/0,NS-0,MMT 060562,Sertoli细胞,BRL3A细胞,HT1080细胞,骨髓瘤细胞,肿瘤细胞和源自上述细胞在一些实施方案中,细胞包含一个或多个病毒基因,例如表达病毒基因的视网膜细胞(例如PER.C6TM细胞)。

[0085] 本文所用的“人抗体”旨在包括具有从人免疫球蛋白序列产生(或组装)的可变和恒定区的抗体。在一些实施方案中,尽管抗体(或抗体组分)的氨基酸序列包括未被人种系

免疫球蛋白序列编码的残基或元件(例如包括序列变异,例如可以(最初)具有通过体外的随机或位点特异性诱变或体内体细胞突变引入),例如在一个或多个CDR中,特别是CDR3中。

[0086] “人源化”,如本领域已知的,术语“人源化”通常用于指抗体(或抗体组分),其氨基酸序列包括来自产自非人类物种(例如,小鼠)的参考抗体的 $V_H$ 和 $V_L$ 区序列,而且还包括相对于参考抗体的那些序列的修饰,旨在使它们更“人类”,即更类似于人种系的各种序列。在一些实施方案中,“人源化”抗体(或抗体组分)是免疫特异性结合目的抗原的抗体(或抗体组分),其具有基本上具有与人抗体相似的氨基酸序列的框架(FR)区域,区域(CDR)具有基本上与非人抗体相似的氨基酸序列。人源化抗体基本上包含至少一个,通常为两个可变结构域(Fab,Fab',F(ab')<sub>2</sub>,FabC,Fv),其中全部或基本上所有的CDR区域对应于非人免疫球蛋白(即供体免疫球蛋白)和所有或基本上所有的框架区都是人免疫球蛋白共有序列的那些。在一些实施方案中,人源化抗体还包含至少一部分免疫球蛋白恒定区(Fc),通常为人免疫球蛋白恒定区的一部分。在一些实施方案中,人源化抗体含有轻链以及重链的至少可变结构域。抗体还可以包括 $C_H1$ ,铰链, $C_H2$ , $C_H3$ 和任选的重链恒定区的 $C_H4$ 区。在一些实施方案中,人源化抗体仅含有人源化 $V_L$ 区。在一些实施方案中,人源化抗体仅含有人源化 $V_H$ 区。在一些某些实施方案中,人源化抗体含有人源化 $V_H$ 和 $V_L$ 区。

[0087] 表示本文使用的“改进”,“增加”或“减少”或其语法等同物,其指示相对于基线测量的值,例如在本文所述的治疗开始之前相同个体中的测量,或在不存在本文所述的治疗的情况下在对照个体(或多个对照个体)中的测量。“对照个体”是受到与受治疗者相同形式的疾病或伤害的个体。

[0088] 本文所用的“体外”是指在人造环境中发生的事件,例如在试管或反应容器中,在细胞培养等中,而不是在多细胞生物体内。

[0089] 本文所用的“体内”是指在多细胞生物体内发生的事件,例如人类和非人动物。在基于细胞的系统的上下文中,该术语可以用于指活细胞内发生的事件(与例如体外系统相反)。

[0090] 如本文所用,“分离的”是指已经(1)在最初生产时与其相关的至少一些组分分开的物质和/或实体(无论是在本质上和/或在实验设置),和/或(2)由人工设计,生产,制备和/或制造。分离的物质和/或实体可以从约10%,约20%,约30%,约40%,约50%,约60%,约70%,约80%,约90%,约91%约92%,约93%,约94%,约95%,约96%,约97%,约98%,约99%或大于约99%。在一些实施方案中,分离的试剂为约80%,约85%,约90%,约91%,约92%,约93%,约94%,约95%,约96%,约97%,约98%,约99%,或大于约99%纯度。如本文所用,如果物质基本上不含其它组分,则物质是“纯的”。在一些实施方案中,如本领域技术人员将理解的,在与某些其它组分例如一种或多种载体或赋形剂组合后,物质仍然可以被认为“分离的”或甚至是“纯的”(例如缓冲液,溶剂,水等);在这样的实施方案中,计算物质的百分比分离或纯度,而不包括这些载体或赋形剂。为了给出一个例子,在一些实施方案中,当a)由于其来源或衍生来源与某些或全部不相关时,认为在自然界中出现的生物聚合物如多肽或多核苷酸是“分离的”在其天然状态伴随的组件;b)它本质上不含与其产生的物种相同物种的其它多肽或核酸;c)由来自细胞或其他表达系统的组分表达或不相关,其不属于在本质上产生它的物种。因此,例如,在一些实施方案中,在与本质上产生它的细胞系统不同的细胞系统中化学合成或合成的多肽被认为是“分离的”多肽。或者或另外,在一



些实施方案中,已经进行一种或多种纯化技术的多肽可以被认为是“分离的”多肽,其程度与与其相关的其它组分a)分离;和/或b)最初生产时与之相关联。

[0091] 本文所用的“ $K_D$ ”是指来自与其配偶体(例如抗体或其结合成分所结合的表位)的复合物的结合剂(例如,其抗体或其结合组分)的解离常数。

[0092] 本文所用的“ $k_{off}$ ”是指结合剂(例如,其抗体或其结合组分)与其配偶体(例如抗体或其结合成分所结合的表位)的复合物解离的离去速率常数。

[0093] 如本文所用,“ $k_{on}$ ”是指结合剂(例如,其抗体或其结合成分)与其配偶体(例如,抗体或其结合组分结合的表位)的关联速率常数。

[0094] 本文所用的“接头”通常是指连接两个或多个不同感兴趣区域(例如,感兴趣的特定结构和/或功能结构域或部分)的分子或实体的一部分。在一些实施方案中,接头不显著参与相关的感兴趣功能(例如,使得连接体的存在或不存在与相关结构域或感兴趣部分相关联不会实质上改变结构域或部分的相关功能)。在一些实施方案中,连接物的特征在于缺乏限定或刚性结构。在一些实施方案中,特别是当感兴趣的一个或多个结构域或多个部分由多肽构成时,连接体是或包含多肽。在一些具体实施方案中,如本文所述的多肽(例如,工程改造的多肽)可以具有通用结构S1-L-S2,其中S1和S2是感兴趣的部分或结构域。在一些实施方案中,S1和S2中的一个或两个可以是或包含如本文所述的结合元件(例如,抗体组分)。在一些实施方案中,多肽接头可以是2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,35,40,45,50,55,60,65,70,75,80,85,90,95,100或更多个氨基酸长。在一些实施方案中,多肽接头可以具有氨基酸序列,其是或包含如Holliger,P.等人,1993,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,国家科.科学院.科学.USA 90:6444-6448或Poljak,R.J.等人,1994,Structure 2:1121-1123。在一些实施方案中,多肽接头可以具有是或包含GGGGSGGGSGGGGS(即 $[G_4S]_3$ )或GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS(即 $[G_4S]_6$ )的氨基酸序列。

[0095] 本文所用的“多价结合剂”是指能够结合两个或更多个抗原的结合剂,其可以在相同的分子上或在不同的分子上。在一些实施方案中,如本文所述的多价结合剂被改造为具有三个或更多个抗原结合位点,并且通常不是天然存在的蛋白质。本文所述的多价结合剂是指能够结合两个或多个相关或不相关靶标的结合剂。多价结合剂可以由单个抗体组分的多个拷贝或不同抗体组分的多个拷贝组成。这种结合剂能够结合两种或更多种抗原,并且是四价或多价结合剂。多价结合剂可另外包含治疗剂,例如免疫调节剂,毒素或RNA酶。在一些实施方案中,多价结合剂在一些实施方案中能够同时结合至少两个不同结构的靶,例如两个不同的抗原,相同抗原上的两个不同表位,或半抗原和/或抗原或表位。在许多实施方案中,本发明的多价结合剂是工程改造成具有如本文所述的多价结合剂特征的蛋白质。本发明的多价结合剂可以是单特异性的(能够结合一种抗原)或多特异性(能够结合两种或更多种抗原),并且可以由两种重链多肽和两种轻链多肽组成。在一些实施方案中,每个结合位点由重链可变结构域和轻链可变结构域组成,每个抗原结合位点共有6个CDR参与抗原结合。

[0096] 如本文所用的最广义的“核酸”是指为或可并入寡核苷酸链的任何化合物和/或物质。在一些实施方案中,核酸是通过磷酸二酯键连接或可以并入寡核苷酸链中的化合物和/或物质。从背景来看,在一些实施方案中,“核酸”是指个体核酸残基(例如核苷酸和/或核



昔); 在一些实施方案中, “核酸”是指包含单个核酸残基的寡核苷酸链。在一些实施方案中, “核酸”是或包含RNA; 在一些实施方案中, “核酸”是或包含DNA。在一些实施方案中, 核酸是, 包含或由一个或多个天然核酸残基组成。在一些实施方案中, 核酸是, 包含或由一种或多种核酸类似物组成。在一些实施方案中, 核酸类似物不同于核酸, 因为它不利用磷酸二酯骨架。例如, 在一些实施方案中, 在本发明核酸被认为是, 包含或由一个或多个本领域已知的“肽核酸”组成, 并且在骨架中具有肽键而不是磷酸二酯键。或者或另外, 在一些实施方案中, 核酸具有一个或多个硫代磷酸酯和/或5'-N-亚磷酰胺键而不是磷酸二酯键。在一些实施方案中, 核酸是由一种或多种天然核苷(例如腺苷, 胸苷, 鸟苷, 胞苷, 尿苷, 脱氧腺苷, 脱氧胸苷, 脱氧鸟苷和脱氧胞苷)组成或由其组成。在一些实施方案中, 核酸是一个或多个核苷类似物(例如2-氨基腺苷, 2-硫代胸苷, 肌苷, 吡咯并-嘧啶, 3-甲基腺苷, 5-甲基胞苷, C-5丙炔基-胞苷, C-5丙炔基-尿苷, 2-氨基腺苷, C5-溴嘌呤, C5-氟尿苷, C5-碘尿苷, C5-丙炔基-尿苷, C5-丙炔基-胞苷, C5-甲基胞苷, 2-氨基腺苷, 7-脱氮腺苷, 7-8-脱氧腺苷, 8-氧基鸟嘌呤, 0(6)-甲基鸟嘌呤, 2-硫代胞苷, 甲基化碱基, 插入碱基及其组合)。在一些实施方案中, 与天然核酸相比, 核酸包含一种或多种修饰的糖(例如2'-氟核糖, 核糖, 2'-脱氧核糖, 阿拉伯糖和己糖)。在一些实施方案中, 核酸具有编码功能性基因产物例如RNA或蛋白质的核苷酸序列。在一些实施方案中, 核酸包括一个或多个内含子。在一些实施方案中, 通过一种或多种从天然来源的分离制备核酸, 通过基于互补模板的聚合(体内或体外), 重组细胞或系统中的繁殖和化学合成的酶合成。在一些实施方案中, 核酸是至少3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 450, 475, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000或更多残留物。在一些实施方案中, 核酸是单链的; 在一些实施方案中, 核酸是双链的。在一些实施方案中, 核酸具有包含至少一个编码多肽的序列或是编码多肽的序列的补体的元件的核苷酸序列。在一些实施方案中, 核酸具有酶活性。

[0097] 如本文所使用的,“可操作地连接”是指并置,其中所描述的组件处于允许它们以其预期方式发挥作用的关系。以可操作地连接到编码序列的控制序列以这样的方式连接,使得编码序列的表达在与控制序列相容的条件下实现。“可操作地连接”序列包括与感兴趣的基因连续的表达控制序列和以反式或一定距离作用以控制感兴趣的基因的表达控制序列。本文所用的术语“表达控制序列”是指实现其连接的编码序列的表达和加工所必需的多核苷酸序列。表达控制序列包括适当的转录起始,终止,启动子和增强子序列;高效的RNA处理信号如拼接和聚腺苷酸化信号;稳定细胞质mRNA的序列;提高翻译效率的序列(例如Kozak共有序列);增强蛋白质稳定性的序列;并且当需要时,增强蛋白质分泌的序列。这种控制序列的性质根据宿主生物体而不同。例如,在原核生物中,这样的控制序列通常包括启动子,核糖体结合位点和转录终止序列,而在真核生物中,通常这些控制序列包括启动子和转录终止序列。术语“控制序列”旨在包括其存在对于表达和处理是必需的组分,并且还可以包括其存在是有利的其它组分,例如前导序列和融合伴侣序列。

[0098] 如本领域所了解的，“顺磁离子”是指具有顺磁性的离子。在一些实施方案中，顺磁离子是铬(III)，锰(II)，铁(III)，铁(II)，钴(II)，镍(II)，铜(II)，钼(III)，钆(III)，镱(III)，钪(III)，钒(II)，铀(III)，镨(III)，镧(III)，钽(III)，铈(III)，铟(III)，镉(III)，铅(II)和/或铋

(III)。

[0099] 本文使用的“有效载荷”是指通过与另一个实体的关联而被递送到感兴趣的位点(例如,到细胞,组织,肿瘤或生物体)的部分或实体。在一些实施例中,有效载荷是或包括检测试剂。在一些实施例中,有效载荷实体是或包括治疗剂。在一些实施方案中,有效载荷实体是或包含催化剂。本领域普通技术人员将理解,有效载荷实体可以是任何化学类别。例如,在一些实施方案中,有效载体实体可以是或包含碳水化合物,同位素,脂质,核酸,金属,纳米颗粒(例如陶瓷或聚合物纳米颗粒),多肽,小分子,病毒。为了给出一些实例,在一些实施方案中,治疗剂有效载荷可以是或包含毒素(例如毒性肽,小分子或同位素[例如放射性同位素]);在一些实施方案中,检测剂有效载荷可以是或包含荧光实体或试剂,放射性实体或试剂,可通过结合检测的试剂或实体(例如标签,半抗原,配体等),催化剂,等等。

[0100] 如本文所使用的,“生理条件”具有本领域的理解意义,参考细胞或生物体生存和/或繁殖的条件。在一些实施方案中,该术语是指可能发生的外部或内部环境的条件在一些实施方案中,生理条件是存在于人或非人动物体内的那些条件,特别是存在于和/或在手术部位内的那些条件。生理条件通常包括,例如,温度范围为20~40℃,大气压为1,pH为6~8,葡萄糖浓度为1~20mM,大气压下的氧浓度,以及地球上遇到的重力,在一些实施方案中,在生理条件下操纵和/或维持实验室。在一些实施方案中,在生物体中涉及生理条件。

[0101] 本文所用的“多肽”是指氨基酸的任何聚合链。在一些实施方案中,多肽具有自然界中出现的氨基酸序列。在一些实施方案中,多肽具有在自然界中不发生的氨基酸序列。在一些实施方案中,多肽具有工程改造的氨基酸序列,因为其通过人工作用而被设计和/或产生。在一些实施方案中,多肽可以包含天然氨基酸,非天然氨基酸或两者。在一些实施方案中,多肽可以包含仅由天然氨基酸组成或仅由非天然氨基酸组成。在一些实施方案中,多肽可以包含D-氨基酸,L-氨基酸或两者。在一些实施方案中,多肽可以仅包含D-氨基酸。在一些实施方案中,多肽可以仅包含L-氨基酸。在一些实施方案中,多肽可以包括一个或多个侧基或其它修饰,例如在多肽的N末端,多肽的C末端或其任何组合修饰或连接至一个或多个氨基酸侧链。在一些实施方案中,这种侧基或修饰可以选自乙酰化,酰胺化,脂化,甲基化,聚乙二醇化等,包括其组合。在一些实施方案中,多肽可以是环状的,和/或可以包含环状部分。在一些实施方案中,多肽不是环状的和/或不包含任何环状部分。在一些实施方案中,多肽是线性的。在一些实施方案中,多肽可以是或包含缝合多肽。在一些实施方案中,术语“多肽”可以附加到参考多肽,活性或结构的名称;在这种情况下,本文中使用的是指具有相关活性或结构的多肽,因此可被认为是多肽相同类别或家族的成员。对于每个这样的类,本说明书提供和/或本领域技术人员将知道该类内其氨基酸序列和/或功能已知的示例性多肽;在一些实施方案中,这样的示例性多肽是用于多肽类的参考多肽。在一些实施方案中,多肽类或家族的成员与共享序列基序(例如,特征序列元件)共有共同活性(在一些实施方案中具有相似水平)显示出显着的序列同源性或同一性或在指定范围内)与该类的参考多肽;在一些实施方案中具有该类别内的所有多肽)。例如,在一些实施方案中,成员多肽显示与参考多肽的总体程度的同源性或同一性,所述参考多肽至少约30至40%,并且通常大于约50%,60%,70%,80%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%以上和/或包括至少一个区域显示非常高的序列同一性,通常大于90%或甚至95%,96%,97%,98%或99%的特征序列元件)。这样的保守区域通常包含至少三到四个,通常多达20个或更

多个氨基酸;在一些实施方案中,保守区域包含至少2个,3个,4个,5个,6个,7个,9个,10个,11个,13个,14个,15个或更多个连续氨基酸的至少一个片段。在一些实施方案中,有用的多肽可以包含或由母体多肽的片段组成。在一些实施方案中,可以包含或由多个片段组成的有用多肽,其各自在相同亲本多肽中以相对于彼此的不同空间排列发现,比在感兴趣的多肽中发现(例如,在亲本中直接连接可以在感兴趣的多肽中空间分离,反之亦然,和/或片段可以在感兴趣的多肽中以与母体中不同的顺序存在),使得感兴趣的多肽是其母体多肽的衍生物。

[0102] 当与疾病,病症和/或病症的发生相关地使用时,本文所用的“预防”或“预防”是指降低发展疾病,病症和/或病症的风险和/或延迟发生疾病,病症或病症的一种或多种特征或症状。疾病,病症或病症的发作已经延迟预定时间段时,预防可能被认为是完整的。

[0103] “放射性同位素”:本文所用的术语“放射性同位素”其技术上的理解含义是指经历放射性衰变的同位素。在一些实施方案中,放射性同位素可以是或包含一种或多种铀-225,ast ine-211,铋-212,碳-14,铬-51,氯-36,钴-57,钴-58,铜-67,钋-152,镓-67,氢-3,碘-123,碘-124,碘-125,碘-131,铟-111,铁-59,铅-212,镭-177,磷-32,镭-223,镭-224,铯-186,铯-188,硒-75,硫-35,钨-99m,钍-227,钇-90和锆-89。

[0104] 本文所用的“重组体”旨在表示通过重组方法设计,设计,制备,表达,产生或分离的多肽(例如本文所述的抗体或抗体组分或多特异性结合剂)例如使用转染宿主细胞的重组表达载体表达的多肽,从重组的组合人多肽库中分离的多肽(Hoogenboom HR,1997,TIB Tech.15:62-70;Azzazy H.和Highsmith WE,2002,Clin.Biochem.35:425-445;Gavilondo, JV和Larrick,JW,2002,BioTechniques 29:128-145;Hoogenboom H.和Chames,P.2000, Immunology Today 21:371-378),分离的抗体来自对于人免疫球蛋白基因是转基因的动物(例如,小鼠)(参见例如Taylor,LD等人,1992,Nucl.Acids Res.20:6287-6295;Little M.等人,2000,Immunology今天21:364-370;Kellermann SA.和Green LL,2002,Current Opinion in Biotechnology 13:593-597;墨菲等,2014,国家科.科学院.科学.美国专利 111(14):5153-5158)或通过涉及将所选序列元件彼此拼接的任何其它方式制备,表达,产生或分离的多肽。在一些实施方案中,在自然界中发现了一种或多种这样选择的序列元件。在一些实施方案中,这些选择的序列元件中的一个或多个被设计成电子计算机。在一些实施方案中,一个或多个这样选择的序列元件来自已知序列元件例如天然或合成来源的诱变(例如,体内或体外)。例如,在一些实施方案中,重组抗体多肽由在感兴趣的源生物的种系(例如人,小鼠等)中发现的序列组成。在一些实施方案中,重组抗体具有由诱变产生的氨基酸序列(例如在体外或体内,例如转基因动物中),使得重组抗体的 $V_H$ 和 $V_L$ 区的氨基酸序列为虽然源自和与种系 $V_H$ 和 $V_L$ 序列相关的序列在体内不能天然存在于种系抗体库内。

[0105] 如本文所用,“回收”是指使得试剂或实体基本上不含其它先前与其相关组分的方法,例如通过分离,例如使用本领域已知的纯化技术。在一些实施方案中,从天然来源和/或包含细胞的来源回收试剂或实体。

[0106] 如本文所使用的“参考”描述了如本文所述进行比较的标准,对照或其他适当参考。例如,在一些实施方案中,参考文献是标准或控制剂,动物,个体,群体,样品,序列,一系列步骤,一组条件或价值,其对于药剂,动物,个体,群体,样品,序列,一系列步骤,一组条件或利益的价值进行比较。在一些实施方案中,在测试或确定感兴趣的基础上同时测试和/或

确定参考。在一些实施例中,参考是历史参考,任选地在有形介质中实施。通常,如本领域技术人员将理解的,在与感兴趣的评估中使用的条件相当的条件下确定或表征参考。

[0107] 如上下文将理解的,“风险”,疾病,障碍和/或病症的“风险”包括特定个体将发展疾病,病症和/或病症(例如,放射性损伤)。在一些实施例中,风险表示为百分比。在一些实施方案中,风险为0,1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,20,30,40,50,60,70,80,90和高达100%。在一些实施方案中,风险表示为与参考样品或参考样品组相关的风险。在一些实施方案中,参考样品或一组参考样品具有疾病,病症,病况和/或事件(例如,放射线损伤)的已知风险。在一些实施方案中,参考样品或参考样品组是来自与特定个体相当的个体。在一些实施方案中,相对风险为0,1,2,3,4,5,6,7,8,9,10或更多。

[0108] 如本文所使用的“特异性结合”是指结合剂鉴别在其中发生结合的环境中可能的配偶体之间的能力。据称其他潜在目标存在时与一个特定目标相互作用的结合剂被“特异性地”结合到与其相互作用的靶标上。在一些实施方案中,通过检测或确定结合剂与其配偶体之间的缔合程度来评估特异性结合;在一些实施方案中,通过检测或确定结合剂-配偶体复合物的解离程度来评估特异性结合;在一些实施方案中,通过检测或确定结合剂竞争其伴侣和另一实体之间的替代交互的能力来评估特异性结合。在一些实施方案中,通过在一定范围的浓度下进行这种检测或测定来评估特异性结合。

[0109] 本文所用的“受试者”是指任何哺乳动物,包括人。在本发明的某些实施方案中,受试者是成年人,青少年或婴儿。在一些实施例中,使用术语“个体”或“患者”,并且旨在与“受试者”互换。本发明还考虑到药物组合物的施用和/或在子宫内治疗方法的表现。

[0110] “基本上”:如本文所用,术语“基本上”是指表现出感兴趣的特征或性质的总体或接近完全程度或程度的定性条件。生物艺术的普通技术人员将明白,生物和化学现象很少(如果有的话)将要完成和/或接近完成或已经完成或避免绝对的结果。因此,术语“基本上”用于捕获在许多生物和化学现象中固有的潜在缺乏完整性。

[0111] 本文所用的“实质序列同源性”是指氨基酸或核酸序列之间的比较。如本领域普通技术人员将理解的,如果两个序列在相应位置含有同源残基,通常被认为是“基本上同源的”。同源残基可以是相同的残基。或者,同源残基可以是不相同的残基将具有相似的结构和/或功能特征。例如,如本领域普通技术人员所熟知的,某些氨基酸通常分类为“疏水性”或“亲水”氨基酸,和/或具有“极性”或“非极性”侧链。将一个氨基酸替换为相同类型的另一个可能通常被认为是“同源”取代。典型的氨基酸分类总结在表1和表2中。

[0112] 表1

[0113]	丙氨酸	Ala	A	无极	中性	1.8
	精氨酸	Arg	R	极性	正	-4.5
	天冬酰胺	Asn	N	极性	中性	-3.5
	天冬氨酸	Asp	D	极性	负	-3.5
	半胱氨酸	Cys	C	无极	中性	2.5
	谷氨酸	Glu	E	极性	负	-3.5
	谷氨酰胺	Gln	Q	极性	中性	-3.5
	甘氨酸	Gly	G	无极	中性	-0.4
	组氨酸	His	H	极性	正	-3.2
	异亮氨酸	Ile	I	无极	中性	4.5
	亮氨酸	Leu	L	无极	中性	3.8
	赖氨酸	Lys	K	极性	正	-3.9
	蛋氨酸	Met	M	无极	中性	1.9
	苯丙氨酸	Phe	F	无极	中性	2.8
[0114]	脯氨酸	Pro	P	无极	中性	-1.6
	丝氨酸	Ser	S	极性	中性	-0.8
	苏氨酸	Thr	T	极性	中性	-0.7
	色氨酸	Trp	W	无极	中性	-0.9
	酪氨酸	Tyr	Y	极性	中性	-1.3
[0115]	缬氨酸	Val	V	无极	中性	4.2
	表2					

[0116]	不明确的氨基酸	3-字母	1-字母
	天冬酰胺或天冬氨酸	Asx	B
	谷氨酰胺或谷氨酸	Glx	Z
	亮氨酸或异亮氨酸	Xle	J
	未指定或未知的氨基酸	Xaa	X

[0117] 如本领域众所周知的,氨基酸或核酸序列可以使用各种算法中的任一种进行比较,包括在商业计算机程序中可用的那些,例如用于核苷酸序列的BLASTN和BLASTP,带隙BLAST和PSI-BLAST用于氨基酸序列。示例性的这样的程序在Altschul等人,1990, J.Mol.Biol.,215(3):403-410;Altschul等人,1996,Methods in Enzymology 266:460-80;Altschul等人,1997,Nucleic Acids Res.25:3389-3402;Baxevanis等人,1998, Bioinformatics:A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins,Wiley; 以及Misener等人(编辑),Bioinformatics Methods and Protocols(Methods in

Molecular Biology,第132卷),Humana Press,1999;所有前述内容通过引用并入本文。除了鉴定同源序列之外,上述程序通常提供了同源性的指示。在一些实施方案中,如果至少50%,至少55%,至少60%,至少65%,至少70%,至少75%,至少80%,至少85%,至少90%,至少91%,至少92%,至少93%,至少94%,至少95%,至少96%,至少97%,至少98%,99%以上的相应残基在相关的残基上同源。在一些实施方案中,相关的拉伸是完整的序列。在一些实施方案中,相关的拉伸是至少10,至少15,至少20,至少25,至少30,至少35,至少40,至少45,至少50,至少55,至少60,至少65,至少70,至少75,至少80,至少85,至少90,至少95,至少100,至少125,至少150,至少175,至少225,至少250,至少275,至少300,至少325,至少350,至少375,至少400,至少425,至少450,至少475,至少500或更多的残基。

[0118] 本文所用的“基本相同”是指氨基酸或核酸序列之间的比较。如本领域普通技术人员将理解的,如果两个序列在相应位置含有相同的残基,通常被认为是“基本上相同的”。如本领域众所周知的,可以使用各种算法中的任何一种算法来比较氨基酸或核酸序列,包括在商业计算机程序中可用的那些算法,例如用于核苷酸序列的BLASTN和BLASTP,带隙BLAST和用于氨基酸的PSI-BLAST酸序列。示例性的这样的程序在Altschul等人,1990,J.Mol. Biol.,215(3):403-410;Altschul等人,1996,Methods in Enzymology 266:460-80;Altschul等人,1997,Nucleic Acids Res.25:3389-3402;Baxevanis等人,1998,Bioinformatics:A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins,Wiley;和Misener等人(编辑),Bioinformatics Methods and Protocols(Methods in Molecular Biology,第132卷),Humana Press,1999。除了识别相同的序列之外,上述程序通常提供了近似度。在一些实施方案中,如果至少50%,55%,60%,65%,70%,75%,80%,85%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%或更多的相应残基在相关的残基上是相同的。在一些实施方案中,相关的拉伸是完整的序列。在一些实施方案中,相关的拉伸是至少10,15,20,25,30,35,40,45,50,55,60,65,70,75,80,85,90,95,100,125,150,175,200,225,250,275,300,325,350,375,400,425,450,475,500或更多的残基。在CDR的上下文中,提及“基本相同”通常是指具有氨基酸序列至少80%,优选至少85%,至少90%,至少95%,至少98%或在与参考CDR的至少99%相同。

[0119] 本文使用的“表面等离子体共振”是指允许实时分析特异性结合相互作用的光学现象,例如通过检测生物传感器基质内蛋白质浓度的变化,例如通过使用BIAcore系统(Pharmacia Biosensor AB,Uppsala,Sweden和Piscataway,NJ)。有关进一步描述,请参见Jonsson,U.等人,1993,Ann.生物学.临床.51:19-26;Jonsson,U.,et al.,1991,Biotechniques 11:620-627;Johnsson,B.等人,1995,J.Mol.Biol.Recognit.8:125-131;和Johnsson,B.等人,1991,Anal.生物化学.198:268-277。

[0120] 本文所用的“治疗有效量”是指产生其所施用的期望效果的量。在一些实施方案中,该术语是指当根据治疗性给药方案施用于患有或易患疾病,病症和/或病症的群体时,足以治疗疾病,病症和/或条件。在一些实施方案中,治疗有效量是降低疾病,病症和/或病症的一种或多种症状的发生率和/或严重性和/或延迟发作的量。本领域普通技术人员将理解,术语“治疗有效量”实际上不需要在特定个体中实现成功的治疗。相反,治疗有效量可以是当向需要这种治疗的患者施用时在大量受试者中提供特定期望的药理学应答的量。在一些实施方案中,提及治疗有效量可以是对在一个或多个特定组织(例如,受疾病,病症或病

症影响的组织)或流体(例如血液,唾液,血清,汗水,眼泪,尿液等)。本领域普通技术人员将理解,在一些实施方案中,可以以单一剂量配制和/或施用治疗有效量的特定药剂或治疗剂。在一些实施方案中,可以以多种剂量配制和/或施用治疗有效的药剂,例如作为给药方案的一部分。

[0121] 本文所用的“转化”是指将外源DNA引入宿主细胞的任何方法。使用本领域熟知的各种方法,可以在天然或人造条件下进行转化。转化可以依赖于将外源核酸序列插入原核或真核宿主细胞的任何已知方法。在一些实施方案中,基于正在转化的宿主细胞选择特定的转化方法,并且可以包括但不限于病毒感染,电穿孔,交配,脂质转染。在一些实施方案中,稳定转化“转化”细胞,因为所插入的DNA能够作为自主复制的质粒或宿主染色体的一部分复制。在一些实施方案中,转化的细胞在有限的时间段内瞬时表达引入的核酸。

[0122] 如本文所用,“载体”是指能够转运与其连接的另一核酸的核酸分子。一种载体是“质粒”,其是指可以连接另外的DNA片段的环状双链DNA环。另一种类型的载体是病毒载体,其中额外的DNA区段可以连接到病毒基因组中。某些载体能够在其被引入其中的宿主细胞中自主复制(例如,具有细菌复制起点和附加型哺乳动物载体的细菌载体)。其它载体(例如,非附加型哺乳动物载体)可以在引入宿主细胞后整合到宿主细胞的基因组中,从而与宿主基因组一起复制。此外,某些载体能够指导它们可操作连接的基因的表达。这些载体在本文中称为“表达载体”。

## 具体实施方式

[0123] 本发明证实了结合人结肠直肠癌上建立的抗原的多特异性结合剂(例如,双特异性抗体)的成功构建。特别地,本发明具体地说明了使用结合人A33糖蛋白抗原和苜蓿基-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸的双特异性抗体在结直肠癌中成功靶向放射免疫治疗(DOTA-Bn),提供特异性的这种双特异性抗体,并显示其令人惊奇的有用性和/或有效性。

[0124] 本发明尤其提供了靶向人A33抗原的双特异性抗体的第一次成功的治疗用途,并且还提供了用于治疗表达A33的肿瘤的预靶向放射免疫治疗方案的改进的治疗方法。本发明还提供用于A33阳性癌症的同时闪烁照相成像和放射免疫治疗的“治疗诊断”(即治疗和诊断)药剂,并且具体表现出令人惊奇的有用性和/或有效性。

[0125] A33是具有有限的正常组织表达的人结肠直肠癌的糖蛋白抗原,在抗体结合较长时间后保留在肿瘤细胞表面上,与正常肠上皮的快速生理周转相反-基于治疗指数对肠道抗原特有的组织保留。使用直接缀合的抗体(例如<sup>131</sup>I-huA33)的晚期结直肠癌(“CRC”)的放射免疫显像和放射免疫治疗(RIT)已经产生次最佳肿瘤剂量和治疗指数(Welt等,1994, J.Clin.Oncol.12:1561-1571)。本发明包括以下认识:使用多步预靶向RIT(PRIT)方法可以克服这两个缺陷,其中对苜蓿基-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-N,N',N'',N'''-四乙酸(DOTA-Bn)-放射性金属配合物具有高亲和力的双特异性四价huA33-C825双特异性抗体首先靶向肿瘤。本公开具体地说明,在从循环中清除未结合的huA33-C825双特异性抗体后,注射<sup>177</sup>Lu放射性标记的DOTA-Bn半抗原以向A33阳性肿瘤递送肿瘤杀伤剂量的PRIT。为了给出一个具体实例,本公开表明,在人结肠直肠肿瘤模型SW1222中,具有确立的皮下肿瘤的小鼠可以在对包括骨髓和肾脏在内的正常组织具有最小的毒性情况下被治愈。

[0126] 不希望受理论的约束,我们注意到本文提供的的数据表明,在一些实施方案中,与使用单周期剂量的相同的PRIT方案相比,使用双周期剂量的huA33-C825双特异性抗体的PRIT方案导致对肿瘤体积的巨大影响。此外,本公开内容尤其表明,如本文所述的这种双周期给药的huA33-C825双特异性抗体在大约80%的测试受试者中产生完全反应。本文还演示了具有额外循环的治疗,其显示出高度有效的反应,例如对于在靶器官(骨髓脾和肾)中没有可检测到的毒性的10/10小鼠,治疗3周期给药方案。因此,在至少一些实施方案中,本公开包括使用双特异性抗体形式改进的PRIT方案的开发,所述双特异性抗体形式有效地靶向人A33糖蛋白抗原以实现增强的肿瘤靶向和/或肿瘤消融,具有最少至无临床或组织学辐射毒性。

[0127] 人结肠直肠癌

[0128] 人A33抗原是分子量为43kD (213个氨基酸多肽) 的跨膜糖蛋白,并且在超过95%的具有限制性正常表达的人结肠癌(结肠和肠上皮) 和最少脱落中表达流通。最初,开发了一种鼠单克隆抗体(A33) 和以后的人源化版本(huA33) (King等人,1995,British J.Cancer 72:1364-1372),发现具有理想的特异性,亲和力和抗体抗原摄取和内化性质,用作放射性同位素用于诊断和治疗的靶向剂。在结肠直肠癌患者中<sup>124</sup>I-huA33成像的临床研究中,抗原阳性肿瘤和肠之间的差异清除导致作者得出结论:替代性多步法包括初始给予非放射性双特异性A33抗体形式(或“预先靶向”),随后放射性标记的半抗原可能是优选的(O'Donoghue et al.,2011,J.Nucl.Med.52:1878-1885)。A33的放射性碘形式(例如,<sup>125</sup>I-A33)的高肿瘤持续性促使广泛研究A33抗体-抗原复合物的内在性质,表明抗A33抗体长时间存在于表面上,使得抗体,在一些实施方案中特别适用于预靶向方法(Ackerman等人,2008,Mol.Cancer Ther.7(7):2233-2240),特别是当肠中的正常表达被允许转换在最后一个配体步骤之前。如果目标抗原在这些正常细胞上表达,肠壁上皮携带抗原和结合抗体脱落一到三天的独特生理学特征是至关重要的(Scott等,2005,Clin.Cancer Res.11:4810-4817)。如本文所述,在PRIT中,在最后一次细胞毒性配体步骤之前,使用清除剂(CA)从血液中清除未结合的抗体。正常肠细胞的自然脱落的功能上等同于肠道中的清除步骤。已经研究了针对各种其他肿瘤相关抗原的靶向放射免疫治疗(PRIT),包括CEA(hMN-14-抗-DTPA-铟+<sup>131</sup>I-di-DTPA-铟半抗原)和最近的抗CEACAM5-抗组胺琥珀酰甘氨酸“TF2”与<sup>177</sup>Lu-IMP288半抗原),TAG-72(CC49scFv-链亲和素+<sup>90</sup>Y-DOTA-生物素),Ep-CAM(具有<sup>90</sup>Y-DOTA-生物素的NR-LU-10-SA)。

[0129] 迄今为止,通过部分由于次优的肿瘤剂量和治疗指数(TI),使用将毒药靶向肿瘤的抗体(例如具有直接缀合的抗体的放射免疫疗法(RIT))迄今得到了有限的成功。此外,由于正常的组织旁观者毒性(bystander toxicity),剂量升高是不可行的,因此这种治疗导致有限的抗肿瘤效果。因此,本发明基于这样的认识,因为人类A33糖蛋白抗原存在于结肠直肠癌中并且具有独特的保留性质,达到较高的TI的对数倍和建立的异种移植物的完全缓解,而对任何主要器官没有毒性的PRIT方法可以通过以下手段开发和有效靶向肿瘤细胞上的人A33,即即使用具有与人A33结合的第一抗原结合位点和对DOTA-Bn(金属)复合物(例如,通过称为C825的单链Fv(scFv)的特异性)具有高亲和力的第二抗原结合位点的双特异性抗体(本文称为huA33-C825)。如本文所述,使用皮下结肠直肠癌移植瘤模型SW1222,通过滴定huA33-C825,基于葡聚糖的清除剂(葡聚糖-CA)和<sup>177</sup>Lu放射性标记的DOTA-Bn半抗原(<sup>177</sup>Lu-DOTA-Bn)的剂量,改进了一种PRIT技术。



[0130] 如本文所述,本发明的双特异性结合剂在诊断成像/剂量测定和治疗应用中提供双重功能。只要TI有利,靶向放射治疗(称为放射免疫治疗,RIT)可以提供足够的辐射来克服任何肿瘤抵抗。目前的放射性标记的IgG药物(例如<sup>90</sup>Y-Zevalin)具有3:1的次优TI,其中血液毒性为剂量限制的治疗疗法的边界。本发明包括以下认识:在预靶向RIT(PRIT)中,抗体靶向步骤与有效载荷步骤分离。本公开内容赞赏PRIT相对于常规RIT的一个潜在附加优点在于,在一些实施例中,PRIT可以促进患者护理。可以在医生的办公室(例如,在管理医师的办公室)中进行,在一些实施方案中,冷抗体的初始输注,并且在一些实施方案中,进行清除剂的施用。在一些实施方案中,只有放射性标记的DOTA-Bn(通常在一个或多个,并且在一些实施方案中,在全部其它步骤之后进行)的步骤将需要由核医学训练的医师进行,然后患者可以是一旦放射性从身体清除(<24小时),就返回医生的护理。因此,通过利用大和小配体的独特药代动力学,本发明人在此证明了PRIT可以高度有效。本发明具体说明使用完全人源化的PRIT系统,其利用DOTA-Bn(Bn=苄基)在小鼠异种移植模型中具有显着的治疗潜力。随着TI提高10倍以上,没有观察到临床或组织学毒性。作为治疗诊断学,使用PET或SPECT的PRIT剂量测定法产生了高度可重复的剂量估计。虽然放射性同位素提供了原理的初步证据,但PRIT可能适用于与DOTA-Bn相关的任何有效载荷,包括纳米颗粒,肽,毒素,药物和病毒。本发明人已经应用其PRIT方法来靶向人A33抗原,因为其在美国的死亡率高。例如,A33阳性肿瘤涉及结肠直肠癌(49700名年度死亡),胃癌(10720名年度死亡)和胰腺癌(39590名年度死亡)的高死亡率。目前,对于这些转移性癌症中的任何一种,没有治愈性疗法可用。

[0131] 如本文所述,本发明人使用人源化抗体A33(King等人,1995,Brit.J.Cancer 72:1364-1372)和C825(对于苄基-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-N,N',N'',N'''-四乙酸(DOTA-Bn)-放射性金属配合物具有高亲和力的鼠scFv抗体(Orcutt et al.2011,Nucl.Med.Biol.38:223-233))的可变区序列开发了称为huA33-C825的双特异性抗体,在具有建立的s.c.人结肠癌移植瘤(SW1222)的小鼠中证明改进的PRIT方法。我们注意到,本文提供的数据具体表明,使用如本文所述的这种改进的PRIT在注射后(p.i.)24小时(h)提供105:1(血液)和18:1(肾脏)的肿瘤对正常组织比例。此外,如本文所述,对于PRIT,p.i.2-120小时的<sup>177</sup>Lu-DOTA-Bn的生物分布,估计吸收剂量(cGy/MBq)到肿瘤,血液,肝脏,脾脏和肾脏分别为65.8,0.9(治疗指数(TI):73),6.3(TI:10),6.6(TI:10)和5.3(TI:12)。因此,在一些实施方案中,使用本文所述的huA33-C825双特异性抗体的PRIT方案提供了治疗人结肠直肠异种移植物的改善的治疗指数和最佳肿瘤剂量。我们还注意到,本文提供的数据具体表明,建立的肿瘤的双周期PRIT治疗(66.6或111MBq <sup>177</sup>Lu-DOTA-Bn,见表7)产生了9/9个完整的反应,并且2/9活着而无复发超过140天。此外,另外7个时候,达到肿瘤大小为500mm<sup>3</sup>的时间为66.6MBq的27±26d,111MBq的时间为40±6d,未处理的小鼠的时间为13±2d。没有辐射诱导的毒性的临床或组织学证据。因此,本文提供的数据证实,本文所述的双特异性抗体代表以改善的疗效和安全性特征为特征的癌症治疗剂,并且如本文所述的多步骤PRIT方法可以使用β-发射同位素<sup>177</sup>Lu来释放安全有效的辐射以消融建立结肠直肠肿瘤。

[0132] 人源化抗体

[0133] 在一些实施方案中,根据本发明使用的抗体是单克隆抗体,和/或在一些实施方案中可以在其它物种中制备的同源抗A33抗体的人源化形式。在一些实施方案中,人源化抗

体是将抗原结合所不需要的人免疫球蛋白轻链或重链的某些或全部氨基酸(例如,可变结构域的恒定区和框架区)用于替代来自同源非人抗体的轻链或重链的相应氨基酸。例如,给定抗原的鼠抗体的人源化版本在其重链和轻链两者上具有(1)人抗体的恒定区;(2)来自人抗体可变结构域的构架区;和(3)来自鼠抗体的CDR。在一些实施方案中,人框架区中的一个或多个残基可以改变为鼠抗体相应位置的残基,以保持人源化抗体与抗原的结合亲和力。这种变化有时被称为“反向突变”。类似地,为了所需的原因,例如,对抗原的稳定性或亲和力,可以进行正向突变以恢复到鼠序列。与嵌合人抗体相比,人源化抗体通常不太可能引起人类的免疫应答,因为前者含有非常少的非人成分。

[0134] 在一些实施方案中,通过重组DNA技术产生人源化抗体。或者或另外,用于制备本发明的人源化抗体的合适方法描述于例如EP0239400;Jones等人,1986,Nature 321:522-525;Riechmann等人,1988,Nature 332:323-327;Verhoeyen等人,1988,Science 239:1534-1536;Queen等,1989,纳特.科学院.科学.美国86:10029;美国专利号6,180,370;和Orlandi等,1989,国家科.科学院.科学.美国:86:3833;所有这些的公开内容通过引用整体并入本文。通常,鼠(或其他非人)CDR移植到人抗体上的实现如下。从杂交瘤中分离编码重链和轻链可变结构域的cDNA。通过测序确定可变结构域(包括CDR)的DNA序列。将编码CDR的DNA插入连接到所需同种型的人恒定区基因片段的人抗体重链或轻链可变区编码序列的相应区域(例如,用于CH和 $\kappa$ 的C<sub>L</sub>1的 $\gamma$ 1)为基因合成。人源化重链和轻链基因在哺乳动物宿主细胞(例如CHO或NS0细胞)中共表达以产生可溶性人源化抗体。为了促进大规模生产抗体,通常希望在生产线上选择使用DHFR基因或GS基因的高表达。这些生产细胞系在生物反应器或中空纤维培养系统或WAVE技术中培养以产生可溶性抗体的大量培养物,或产生在牛奶中表达抗体的转基因哺乳动物(例如,山羊,牛或绵羊)(参见,例如美国专利号5,827,690)。

[0135] 如本文所述,使用在King等人,1995(同上))中描述的人源化抗体A33中发现的序列和/或成分来工程化多特异性结合剂(例如双特异性抗体)。其他鼠抗A33抗体可以是人源化的(例如,如本文所述),并且可以用于如本文所述的多特异性结合剂的工程化。例如,使用编码一种或多种(通常只有一种)候选鼠抗A33抗体的轻链和/或重链的可变区的cDNA构建用于表达鼠-人嵌合体的载体,其中鼠抗-如前所述,A33抗体可变区与人IgG1(重链)和人 $\kappa$ (轻链)恒定区连接。或者或另外,在一些实施方案中,可以产生具有变体糖基化的新型形式的人源化抗-A33抗体,例如为了增强与Fc受体的结合并增强抗原亲和力,如果需要的话。

[0136] 在一些实施方案中,为了产生人源化抗A33抗体,可以通过与人种系序列的同源性匹配来选择人受体框架结构域。使用这样选择的人受体框架,轻链和重链可变结构域被设计并且可以生成和表达每种变体/版本的数量。

[0137] 对于人类患者的治疗性治疗,完全人抗体是特别需要的。人抗体可以通过本领域已知的多种方法制备,包括使用源自人免疫球蛋白序列的抗体库所述的噬菌体展示方法。另见美国专利号4,444,887和4,716,111;和国际专利申请公开WO 98/46645,WO 98/60433,WO 98/24893,WO 98/16664,WO 96/34096,WO 96/33735和WO 91/10741;其各自的全部内容通过引用并入本文。Cole等人的技术(1985,Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy,ed.R.A.Reisfeld&S.Sell,pp.77-96,New York,Alan R.Liss)和Boerder等人(1991)J.Immunol,147(1):86-95)也可用于制备人单克隆抗体。

[0138] 本文包括使用其它技术产生但保留本发明的抗A33抗体的可变区的人抗体。或者

或另外,也可以使用不能表达功能性内源性小鼠免疫球蛋白但可以表达人免疫球蛋白基因的转基因小鼠来产生人抗体(例如,参见Lonberg和Huszar,1995,Int.Rev.Immunol.13:93;Taylor,LD等人,1992,Nucl.Acids Res.20:6287-6295;Kellermann SA.和Green LL,2002,Current Opinion in Biotechnology 13:593-597;Little M.等人,2000,Immunol.Today 21:364-370;Murphy,AJ等人,2014,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 111(14):5153-5158)。关于用于产生人抗体和人单克隆抗体的该技术的详细讨论以及用于产生此类抗体的方案,参见例如国际专利申请公开WO 98/24893;WO 92/01047;WO 96/34096;WO 96/33735;欧洲专利号0 598 877;美国专利号5,413,923;5,625,126;5,633,425;5,569,825;5,661,016;5,545,806;5,814,318;5886793;5,916,771;5,939,598;和8,502,018,其全部内容通过引用并入本文。

[0139] 此外,人单克隆抗体可以通过免疫移植有人外周血白细胞,脾细胞或骨髓的小鼠(例如,XTL的Trioma技术)来制备。可以使用称为“引导选择”的技术来产生识别所选表位的完全人抗体。在该方法中,选择的非人单克隆抗体(例如小鼠抗体)用于指导识别相同表位的完全人抗体的选择(Jespersen等,1988,Biotechnol.12:899-903)。

[0140] 如本文所用,在一些实施方案中,“抗A33抗体”,“抗A33抗体部分”或“抗A33抗体片段”和/或“抗A33抗体变体”指包含与A33结合的免疫球蛋白的至少一部分的多肽实体,特别是指与A33结合的包含重链或轻链或配体的至少一个互补决定区(CDR)的多肽的实体(通常包含在相关链或其部分中发现的所有CDR),在本文所述的任何特定单克隆抗体中发现。在一些实施方案中,该术语是指包括这样的多肽的实体,其不仅包括此类CDR,而且包括在重链或轻链可变区,重链或轻链恒定区,框架区,或其任何部分,其可以并入本发明的抗体中,其来自非鼠源,优选来自人源。在一些具体实施方案中,术语“抗A33抗体”从上下文中可以清楚地用于指共同或单独地指huA33,hA33,A33,人源化抗体A33,人源化A33及其组合,和/或相关片段或组分,结构域或其区域,例如单链可变片段(例如huA33scFv,hA33scFv,A33scFv及其组合)。

[0141] 在一些实施方案中,人源化抗体能够在体外,原位和/或体内调节,减少,拮抗,减轻,缓解,阻断,抑制,消除和/或干扰至少一种细胞功能,其中所述细胞表达人A33。作为非限制性实例,合适的抗A33抗体,特定部分或变体以高亲和力结合人A33的表位,特别是肽表位。

[0142] 如本领域已知的和/或如本文所述,抗体片段可通过酶切割,合成或重组技术产生。还可以使用其中一个或多个终止密码子已经在天然停止位点上游引入的抗体基因以多种截短形式产生抗体。例如,编码F(ab')<sub>2</sub>重链部分的组合基因可以被设计为包括编码重链的C<sub>H</sub>1结构域和/或铰链区的DNA序列。抗体的各个部分可以通过常规技术化学连接在一起,或者可以使用基因工程技术作为连续蛋白质来制备。

[0143] 在一些实施方案中,根据本发明使用的嵌合或人源化抗体包括其中CDR存在于本文所述的一种或多种抗A33抗体中的至少一部分或其余抗体存在于或源自一种或多种人抗体。因此,例如,在一些实施方案中,抗体的人部分可以包括在人体中基本上非免疫原性的构架,C<sub>L</sub>,C<sub>H</sub>结构域(例如,C<sub>H</sub>1,C<sub>H</sub>2,C<sub>H</sub>3),铰链,V<sub>L</sub>,V<sub>H</sub>区。阅读本公开内容的本领域技术人员将理解,在一些实施方案中,如本文所述使用的抗体的“人部分”在一些实施方案中可能与相关序列中发现的相应序列不显示100%同一性源人抗体。在一些实施方案中,保留源性

人抗体中可能发现的尽可能多的人氨基酸残基以使免疫原性可忽略,然而,在各种实施方案中,可以根据需要或以其他方式将人残基修饰以支持由CDR形成的抗原结合位点同时使抗体的人源化最大化。在一些实施方案中,这样的变化或变化相对于未修饰的抗体保留或降低人或其他物种中的免疫原性。

[0144] 本领域普通技术人员阅读本公开将理解本发明提供的包括人源化抗体的抗体和/或利用本文所述的人源化抗体序列元件的抗体可以由能够表达功能重排的人免疫球蛋白(例如重链和/或轻链)基因的非人动物或原核或真核细胞产生。此外,当抗体剂是单链抗体时,其可以包含在天然人抗体中未发现的接头肽。例如,Fv可以包含连接肽,例如2至约20个甘氨酸或其它氨基酸残基,优选8-15个甘氨酸或其它氨基酸残基,其连接重链的可变区和轻链。这种接头肽被认为是人源的。

[0145] 抗体人源化可以通过例如通过合成包含框架融合到个体人框架池的非人目标单克隆抗体的六个CDR的组合库进行。可以使用含有代表所有已知重链和轻链人种系基因的基因的人类框架库。可以筛选所得的组合库以与感兴趣的抗原结合。这种方法可以允许筛选和/或选择特别有利的(例如,就维持对亲本抗体的结合活性而言)完全人类骨架的组合。然后通过多种技术进一步优化人源化抗体。

[0146] 抗体人源化可用于将小鼠或其他非人抗体发育成“完全人”抗体。所得抗体可以仅含有人序列,不含小鼠或非人抗体序列,同时保持与起始抗体相似的结合亲和性和特异性。

[0147] 在一些实施方案中,根据本发明使用的抗-A33人源化抗体包含变体Fc区,其中所述变体Fc区相对于野生型Fc区(或亲本Fc区)包含至少一个氨基酸修饰,使得所述分子对Fc受体(例如,Fc $\gamma$ R)具有改变的亲和力,条件是所述变体Fc区在基于对Fc-Fc受体相互作用的结晶学和结构分析的与Fc受体直接接触的位置处不具有取代,例如由Sondermann等人公开的(2000,Nature,406:267-273,其全部内容通过引用并入本文)。与Fc受体如Fc $\gamma$ R直接接触的Fc区内的位置的实例是氨基酸234-239(铰链区),氨基酸265-269(B/C环),氨基酸297-299(C'/E环)和氨基酸327-332(F/G)环。在一些实施方案中,包含变体Fc区的本发明的抗A33抗体包括至少一个残基的修饰,其基于结构和结晶学分析与Fc $\gamma$ R直接接触。

[0148] 在一些实施方案中,根据本发明使用的抗A33抗体是对活化和/或抑制性受体具有改变的亲和力的人源化A33抗体,具有一个或多个氨基酸修饰的变体Fc区,其中所述一个或多个氨基酸修饰是在297位用丙氨酸取代;在一些实施方案中,在239D,330L,332E处的取代以增强FcR亲和力;在一些实施方案中,在322K处的取代以减少或消除FcR结合。在一些实施方案中,与亲本Fc区相比,用于根据本发明的抗A33抗体具有变异糖基化的Fc区;在一些实施方案中,变体糖基化包括不含岩藻糖;在一些实施方案中,变体糖基化来自GnT1缺陷型CHO细胞中的表达。在一些实施方案中,本发明提供具有人源化A33抗体组分的双特异性结合剂,其包含以K322A取代为特征的变体Fc区。在一些实施方案中,提供的双特异性结合剂包括与可衍生该组分的亲本抗体相比显示变异的糖基化(例如,无糖基化)的抗体组分;在一些这样的实施方案中,这样的变体可以是或包含以K322A取代为特征的变体Fc区。在一些实施方案中,这样的变体组分(例如,变体Fc区)导致补体活化和FcR结合的完全消除,否则可能在本文所述的预靶向放射免疫治疗中加入清除剂之前损害肿瘤细胞膜。

[0149] 在一些实施方案中,本发明提供和/或利用包含变体Fc区(即,Fc区包括相对于适当参考Fc的一个或多个添加,缺失和/或取代)的抗体或抗体试剂,其中其特征在于其改变

的效应子功能改变和/或其对FcR的亲合力相对于参考Fc增强或减少。这些变化在本领域技术人员的技能范围内。

[0150] 因此,与其他事项一起,本发明提供了多特异性结合剂(例如,抗体试剂),其包含以一种或多种Fc $\gamma$ R的更大亲和力结合的变体Fc区。这样的试剂优选如下文所述更有效地介导效应子功能。在一些实施方案中,本发明提供多特异性结合剂(例如,抗体试剂),其包含以较弱亲和力结合一种或多种Fc $\gamma$ R的变体Fc区。在某些情况下,例如在其作用机制涉及阻断或拮抗但不杀死携带靶抗原的细胞的抗体的情况下,需要还原或消除效应子功能。此外,在一些实施方案中,当制备如下文所述的双特异性抗体时,期望消除效应子功能。在自身免疫性疾病的情况下,减少或消除效应子功能是有利的,其中会阻断效应细胞中的Fc $\gamma$ R激活受体(这种功能将存在于宿主细胞中)。通常,增加的效应子功能可能针对肿瘤和外来细胞;在一些实施方案中,效应子功能可以远离肿瘤细胞。

[0151] 用于本发明的Fc变体可以与其它Fc修饰组合,包括但不限于改变效应子功能的修饰。本发明包括将本文所述的Fc变体与其它Fc修饰组合以在抗体或Fc融合体中提供额外的,协同的或新的特性。在一些这样的实施方案中,Fc变体可以增强其组合的修饰的表型。例如,如果Fc变体与已知结合具有比包含野生型Fc区的可比分子更高的亲和力的Fc $\gamma$ R111A的突变体组合,则与突变体的组合导致Fc $\gamma$ R111A亲和力的更大倍数增强。

[0152] 在一些实施方案中,根据本发明,如本文所述的Fc变体插入抗体或Fc融合体中以产生包含一个或多个Fc糖形式(即,一个或多个碳水化合物共价连接的一个或多个Fc多肽)的工程化试剂到包含Fc区的分子,其中糖形式的碳水化合物组成与包含Fc区的亲本分子的碳水化合物组成不同。

[0153] 在一些实施方案中,如本文所述的多特异性结合剂(例如,抗体试剂)可以包括显示变体糖基化和/或可以在糖基化缺陷型细胞系中表达的Fc变体(例如,GnT1-与适当的参考Fc区(例如,野生型)或在不糖基化缺陷的细胞系中表达的Fc区相比,该试剂的Fc区的Fc区缺乏糖基化。

[0154] 在一些实施方案中,根据本发明使用的抗体可以相对于与感兴趣的抗原(例如A33)结合的适当的参考抗体具有修饰的糖基化位点,优选不改变抗体的功能,例如,与抗原的结合活性。如本文所用,“糖基化位点”包括寡糖(即,含有两个或更多个简单糖连接在一起的碳水化合物)将特异性并共价连接的抗体中的任何特定氨基酸序列。寡糖侧链通常通过N-或O-键与抗体的主链连接。N-连接的糖基化是指寡糖部分与天冬酰胺残基的侧链的连接。O-连接的糖基化是指寡糖部分与羟基氨基酸(例如丝氨酸,苏氨酸)的连接。例如,可以在特殊的CHO细胞中产生缺乏某些寡糖的包含岩藻糖和末端N-乙酰葡萄糖胺的Fc-糖型(huA33-IgG1n),并表现出增强的ADCC效应子功能。

[0155] 在一些实施方案中,本发明包括通过添加或缺失糖基化位点来修饰本发明的抗体的碳水化合物含量的方法。用于修饰抗体的碳水化合物含量的方法是本领域公知的,并且包括在本发明内,参见例如美国专利号6,218,149;EP0359096B1;美国专利公开号US 2002/0028486;国际专利申请公开WO 03/035835;美国专利公开号2003/0115614;美国专利号6,218,149;美国专利号6,472,511;所有这些全部内容通过引用并入本文。在一些实施方案中,本发明包括通过缺失抗体的一个或多个内源性碳水化合物部分来修饰抗体(或其相关部分或其组分)的碳水化合物含量的方法。在一些某些实施方案中,本发明包括通过将位置

297从天冬酰胺修饰为丙氨酸来删除抗体Fc区的糖基化位点。

[0156] 工程化糖形式可用于各种目的,包括但不限于增强或减少效应子功能。可以通过本领域技术人员已知的任何方法,例如通过使用工程改造或变体表达菌株,通过与一种或多种酶(例如DI N-乙酰葡萄糖胺基转移酶III (GnTIII))共表达,通过表达一种或多种分子包含来自各种生物体的Fc区域或来自各种生物体的细胞系,或者通过在包含Fc区域的分子表达后修饰碳水化合物。用于产生工程化糖型的方法是本领域已知的,并且包括但不限于在Umana等人,1999,Nat.生物技术.17:176-180;Davies等人,2001,Biotechnol.生物工程.74:288-294;Shields等人,2002,J.Biol.Chem.化学.277:26733-26740;Shinkawa等人,2003,J.Biol.Chem.化学.278:3466-3473;美国专利号6,602,684;美国专利申请序列号10/277,370;美国专利申请序列号10/113,929;国际专利申请公开W000/61739A1;W001/292246A1;W002/311140A1;W002/30954A1;POTILLEGENT™技术(Biowa,Inc.Princeton,N.J.);GLYCOMAB™糖基化工程技术(GLYCART biotechnology AG,Zurich,Switzerland);其各自的全部内容通过引用并入本文。参见例如国际专利申请公开W0 00/061739;EA01229125;美国专利申请公开号2003/0115614;Okazaki等人,2004,JMB,336:1239-49,其各自的全部内容通过引用并入本文。

[0157] 多重结合剂

[0158] 如本领域技术人员所知,多价结合剂是分子实体或复合物,其包括特异性结合两个或多个靶标(例如表位)的结合成分。这种多价结合剂在本领域中发现了多种用途,包括治疗用途。为了给出一个例子,如本领域技术人员所知道的,已将多价结合剂工程化以通过将细胞毒性T细胞引导(或召集)到肿瘤部位来促进杀死肿瘤细胞。肿瘤抗原的实例包括但不限于甲胎蛋白(AFP),CA15-3,CA27-29,CA19-9,CA-125,钙视素调蛋白,癌胚抗原,CD34,CD99,CD117,嗜铬粒蛋白,细胞角蛋白,结蛋白,上皮膜蛋白(EMA),因子VIII,CD31FL1,胶质纤维酸性蛋白(GFAP),大囊性疾病流体蛋白(GCDFP-15),HMB-45,人绒毛膜促性腺激素(hCG),抑制素,角蛋白,淋巴细胞标志物MART-1(Melan-A),Myo D1,肌肉特异性肌动蛋白(MSA),神经丝,神经元特异性烯醇化酶(NSE),胎盘碱性磷酸酶(PLAP),前列腺特异性抗原,S100蛋白,肌肉肌动蛋白(SMA),突触素,甲状腺球蛋白,甲状腺转录因子-1,肿瘤M2-PK和波形蛋白。

[0159] 在一些实施方案中,根据本发明使用的多价结合剂是双特异性结合剂。在许多实施方案中,这种双特异性结合剂能够结合肿瘤细胞。在许多实施方案中,这种双特异性结合剂能够经由在肿瘤细胞表面中表达的A33抗原结合到人结肠直肠癌细胞。

[0160] 在一些实施方案中,由本发明提供的多价结合剂(例如双特异性结合剂)是抗体组分或包含抗体组分。本领域已知各种技术用于设计,构建和/或生产包含抗体组分的多特异性结合剂。

[0161] 例如,构建了使用完整免疫球蛋白框架(例如IgG),单链可变片段(scFv)或其组合的多价结合剂。串联的两个scFv单元组成的双特异性结合剂已被证明是临床上成功的双特异性抗体形式。在抗肿瘤免疫治疗的情况下,已经设计了包含串联的两个单链可变片段(scFv)的双特异性结合剂,使得结合肿瘤抗原的scFv与通过结合CD3与T细胞接合的scFv连接。以这种方式,T细胞被召集到肿瘤部位,希望它们可以通过某些T细胞具有的细胞毒性来介导构成肿瘤的肿瘤细胞的杀伤。已经制备了靶向CD19和CD3用于淋巴瘤的这种双特异性

结合剂的实例(称为Bispecific T cell Engaging,或BiTE;例如参见Dreier等,2003,J.Immunol.170:4397-4402;Bargou et al.等人,2008,Science 321:974-977),其在动物异种移植研究中已经成功地预防肿瘤生长。在人类研究中,这种双特异性结合剂显示客观的肿瘤反应,包括5个部分和2个完全缓解。

[0162] 示例性双特异性结合剂包括具有针对肿瘤抗原特异性的第一抗体组分和对小分子半抗原特异性的第二抗体组分(例如,DTPA,IMP288,DOTA,DOTA-Bn,DOTA-desferrioxamine,生物素,荧光素,或在Goodwin,DA等人,1994,Cancer Res.54(22):5937-5946中公开的那些,其通过引用并入本文)。双特异性结合剂可以例如通过组合识别相同或不同抗原的不同表位的重链和/或轻链来制备。在一些实施方案中,通过分子作用,双特异性结合剂在其两个结合臂(一个 $V_H/V_L$ 对)之一上结合一个抗原(或表位),并在其第二臂( $V_H/V_L$ 对)上结合不同抗原(或表位)。根据该定义,双特异性结合剂具有两个不同的抗原结合臂(在特异性和CDR序列中),并且对于其结合的每个抗原是单价的。

[0163] 在一些实施方案中,本发明的双特异性结合剂的特征在于能够同时结合具有不同结构的两个靶。在一些实施方案中,本发明的双特异性结合剂具有至少一种与例如B细胞,T细胞,骨髓细胞,血浆或肥大细胞抗原或表位特异性结合的组分和至少一种其它成分其特异性结合到具有治疗或诊断剂的可靶向缀合物。

[0164] 本发明的双特异性结合剂(例如,双特异性抗体)基于特定的认识,即当用于靶向人类A33抗原的多步预靶向放射免疫治疗(PRIT)时某些形式可能对某些靶标(例如,肿瘤抗原)更有利)。例如,本文提供的双特异性抗体利用完整IgG和scFv的组合。这种双特异性抗体通过IgG组分(例如抗A33)和通过scFv组分(例如抗DOTA-Bn)显示二价结合。如本文所述,具有这种格式的双特异性抗体首先通过IgG组分(例如,抗A33)与A33阳性肿瘤细胞结合,并且通过清除剂(CA;例如,基于葡聚糖的清除剂)。之后是包括使用放射性标记的小分子半抗原(例如 $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Bn)的步骤。示例性的放射性标记的小分子包括放射性镧系元素,例如钷和镱(例如 $^{86}\text{Y}$ , $^{90}\text{Y}$ 和 $^{177}\text{Lu}$ )以及 $^{124}\text{I}$ 和 $^{131}\text{I}$ 。此外,本发明的双特异性抗体提供诊断和治疗性肿瘤靶向特征。

[0165] 在各种实施方案中,根据本发明的双特异性结合剂(例如双特异性抗体)由第一结合成分和第二结合成分组成。在许多实施方案中,如本文所述的双特异性结合剂的第一和第二结合组分各自由以不同特异性为特征的抗体组分组成。在许多实施方案中,抗体组分选自表8。

[0166] 在各种实施方案中,根据本发明的双特异性结合剂包含第一结合成分,第二结合成分。在各种实施方案中,根据本发明的双特异性结合剂包含连接到第一和第二结合组分(例如,位于第一和第二结合组分之间)的第一结合组分,第二结合组分和接头。

[0167] 在各种实施方案中,如本文所述的第一和/或第二结合组分包含或是抗体组分。在各种实施方案中,本文所述的第一和/或第二结合组分包含接头序列。

[0168] 在一些实施方案中,接头是至少2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,35,40,45,50,55,60,65,70,75,80,85,90,95,100或更多的氨基酸长度。在一些实施方案中,接头的特征在于其倾向于不采用刚性三维结构,而是为多肽(例如第一和/或第二结合成分)提供灵活性。在一些实施方案中,基于赋予双特异性结合剂的特异性,例如聚集的减少和/或稳定性的增加,在本文所述的双特



异性结合剂中使用接头。在一些实施方案中,本发明的双特异性结合剂包含 $G_4S$ 接头。在一些某些实施方案中,本发明的双特异性结合剂包含 $(G_4S)_n$ 接头,其中n为1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15或更多。

[0169] 在各种实施方案中,如本文所述的第一和/或第二结合组分包含或是免疫球蛋白(例如IgG)。在各种实施方案中,如本文所述的结合成分的第一和/或第二结合成分包含或者是抗体片段(例如scFv)。在各种实施方案中,如本文所述的第一结合组分包含或者是免疫球蛋白,第二结合组分包含或是抗体片段。在某些实施方案中,第一结合成分是免疫球蛋白,第二结合成分是抗体片段。在某些实施方案中,第一结合成分是IgG,第二结合成分是scFv。

[0170] 在一些某些实施方案中,根据本发明的双特异性结合剂包含免疫球蛋白,其免疫球蛋白包含重链和轻链,以及scFv。在一些某些实施方案中,scFv与免疫球蛋白的重链的C末端连接。在一些某些实施方案中,scFv与免疫球蛋白轻链的C末端连接。在各种实施方案中,scFv通过接头序列与重链或轻链连接。

[0171] 在一些实施方案中,本发明的双特异性结合剂包含一个或多个至少约50%(例如,至少约55%,60%,65%,70%,75%,80%,85%,90%,95%,96%,97%,98%或99%)与表8中出现的一个或多个序列相同的序列。

[0172] 在一些实施方案中,本发明的双特异性结合剂包含与表8中出现的一个或多个序列基本相同的一个或多个序列。

[0173] 在一些实施方案中,本发明的双特异性结合剂包含与表8中出现的一个或多个序列相同的一个或多个序列。

[0174] 在一些实施方案中,本发明的双特异性结合剂选自表8中出现的一个或多个序列。在一些某些实施方案中,本发明的双特异性结合剂选自出现在表8中的两个序列,例如,重链和轻链序列。

[0175] 在各种实施方案中,如本文所述的双特异性结合剂的第一结合成分包含具有与出现在表8中的抗体组分至少50%(例如,50%,55%,60%,65%,70%,75%,80%,85%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%以上)相同的序列的抗体组分。

[0176] 在各种实施方案中,如本文所述的双特异性结合剂的第一结合组分包含具有与表8中出现的抗体组分基本相同的序列的抗体组分。

[0177] 在各种实施方案中,如本文所述的双特异性结合剂的第一结合组分包含具有与表8中出现的抗体组分相同的序列的抗体组分。

[0178] 在各种实施方案中,如本文所述的双特异性结合剂的第二结合组分包含具有与出现在表8中的抗体组分至少50%(例如,50%,55%,60%,65%,70%,75%,80%,85%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%以上)相同的序列的抗体组分。

[0179] 在各种实施方案中,如本文所述的双特异性结合剂的第二结合组分包含具有与表8中出现的抗体组分基本相同的序列的抗体组分。

[0180] 在各种实施方案中,如本文所述的双特异性结合剂的第二结合组分包含具有与表8中出现的抗体组分相同的序列的抗体组分。

[0181] 如本文所述,本发明人提供了在具有s.c.A33阳性人结肠直肠肿瘤(SW1222)的免疫受损小鼠中使用称为huA33-C825的双特异性抗体的改进的多步PRIT方法。这种方法包括



i.v.注射各种剂量的huA33-C825和基于葡聚糖的CA,然后注射 $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Bn诊断治疗性(即诊断和治疗)半抗原用于同时闪烁照相成像和放射免疫治疗。本发明具体描述了提供最佳huA33-C825和CA剂量的生物分布研究,随后进行一系列额外的生物分布研究以确定作为 $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Bn剂量( $\sim 2.0$ - $111.0\text{MBq}$ )的函数的肿瘤摄取,用作PRIT研究的实用和剂量学指南。此外,如本文所述,在注射 $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Bn后,在三种不同剂量水平( $11.1$ ,  $55.0$ 和  $111.0\text{MBq}$ )注射后24小时切除肿瘤和肾,以通过放射自显影检查体外 $^{177}\text{Lu}$ 活性微分布,以及通过苏木精和伊红染色将 $^{177}\text{Lu}$ 活性与异种移植物和组织形态相关联。此外,基于 $^{131}\text{I}$ -huA33-C825的放射性示踪剂研究估计绝对SW1222肿瘤摄取huA33-C825 24h p.i.,  $0.25\text{mg/}$ 小鼠为 $\sim 90\text{pmol/g}$ 肿瘤。因此,本发明表明,如果单个huA33-C825分子具有结合 $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Bn(因此最大 $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Bn结合能力为 $180\text{pmol/g}$ 肿瘤)的两个分子的能力,估计的最大占有率为( $11\text{pmol } ^{177}\text{Lu-DOTA-Bn}/180\text{pmol}=0.061$ 或 $\sim 6\%$ )。因此,本发明具体说明改进的PRIT方法是有效的,没有任何相关的不利辐射响应。此外,本发明具体表明,至少在一些实施方案中,对具有确定的s.c.人结肠直肠肿瘤的免疫受损小鼠,可以使用改进的多步骤PRIT方法(其中使用称为huA33-C825的抗A33/抗DOTA-Bn(金属)双特异性抗体,葡聚糖-基于CA和 $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Bn)进行治愈,并且对包括骨髓和肾的正常组织只有最小的毒性。

[0182] 通常研究的人结肠直肠癌(例如LS174T)中,SW1222作为相对较好分化和血管化的肿瘤而脱颖而出。虽然允许靶向抗体的均匀分布(Emir等人,2007,Cancer Res.15;67(24):11896-11905),但是这些肿瘤也是相对放射抗性的。如本文所述,A33抗原在超过95%的具有限制性正常表达和最小脱落进循环的人结肠癌中高度表达。人结肠直肠癌中A33抗原的临床治疗靶点尚未成功。对本文所述的双特异性抗体显示出对A33和DOTA-Bn(金属)的亲合力,其有助于放射性标记的镧(例如 $^{177}\text{Lu}$ )的肿瘤摄取,并且成功地将靶向放射免疫治疗递送到A33阳性肿瘤。此外,使用如本文所述的人源化A33抗体的双特异性结合蛋白能够二价结合A33和二价结合DOTA-Bn,其导致增强的杀死A33+肿瘤的效力和由于缺乏灾难性辐射反应而增加的安全性。因此,使用本文所述的双特异性结合蛋白的形式的PRIT策略代表增强肿瘤杀伤,减少的不良反应并且表现出治疗多种A33阳性癌症的有效治疗剂的独特方法。

#### [0183] 目标

[0184] 除此之外,本发明包括多特异性结合剂,特别是双特异性结合剂如双特异性抗体对于促进细胞杀伤特别有用和/或有效的认识。特别地,本发明表明特异性结合靶细胞相关表位(例如,肿瘤抗原)和小分子半抗原(例如,DOTA-Bn[金属])的多价结合剂的活性可以是结肠癌的有效免疫治疗。

[0185] 例如,在本发明的一些实施方案中,多价结合剂特异性结合肿瘤细胞相关表位和小分子半抗原。根据这样的实施方案,多价结合剂可以促进试剂与其靶标表位中的一个或两个结合,和/或可以通过经由小分子半抗原的放射免疫疗法介导的靶细胞杀死细胞。

[0186] 在一些实施方案中,待杀死的靶细胞包括例如表达肿瘤抗原(例如A33阳性肿瘤)的细胞。本领域普通技术人员将知道在这样的细胞上适当的靶表位,其中如本文所述的多价结合剂期望结合。

#### [0187] 核酸构建与表达

[0188] 如本文所述的人源化抗体和多特异性结合剂(例如,双特异性抗体)可以使用本领域已知的分子生物学方法由核酸分子产生。将核酸分子插入能够在引入合适的宿主细胞时

能够表达融合蛋白的载体。合适的宿主细胞包括但不限于细菌,酵母,昆虫和哺乳动物细胞。用于将DNA片段插入载体的本领域技术人员已知的任何方法可用于在转录/翻译控制信号的控制下构建编码本发明融合蛋白的表达载体。这些方法可以包括体外重组DNA和合成技术和体内重组(参见Sambrook等人,Molecular Cloning,A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory;Current Protocols in Molecular Biology,Eds.Ausubel等人,Greene Publ.Assoc,Wiley-Interscience,NY)。

[0189] 根据本发明的核酸分子的表达可以通过第二核酸序列调节,使得分子在用重组DNA分子转化的宿主中表达。例如,本发明的核酸分子的表达可以由本领域已知的启动子和/或增强子元件来控制。

[0190] 核酸构建体包括编码由抗体和/或抗体组分产生的多特异性结合蛋白的区域。通常,这种多特异性结合蛋白将从 $V_H$ 和/或 $V_L$ 区产生。在鉴定和选择显示所需结合和/或功能特性的抗体后,分离每个抗体的可变区,扩增,克隆和测序。可以对 $V_H$ 和 $V_L$ 核苷酸序列进行修饰,包括添加编码氨基酸和/或携带限制性位点的核苷酸序列,编码氨基酸的核苷酸序列的缺失或编码氨基酸的核苷酸序列的取代。抗体和/或抗体组分可以由人,人源化或嵌合抗体产生。

[0191] 本发明的核酸构建体通过本领域已知的方法插入到表达载体或病毒载体中,并且核酸分子可操作地连接到表达控制序列。

[0192] 在适当的情况下,可以修饰编码本文所述的人源化抗体和多特异性结合剂的核酸序列,以包括针对在特定细胞类型或生物中表达而优化的密码子(例如参见美国专利号5,670,356和美国专利号5,874,304)。密码子优化的序列是合成序列,并且优选编码由非密码子优化的亲本多核苷酸编码的相同多肽(或全长多肽的具有与全长多肽基本相同的活性的生物活性片段)。在一些实施方案中,编码抗体组分的遗传物质的编码区全部或部分可包括改变的序列以优化特定细胞类型(例如真核或原核细胞)的密码子使用。例如,本文所述的人源化重链(或轻链)可变区的编码序列可以优化用于在细菌细胞中表达。或者,编码序列可以优化用于在哺乳动物细胞(例如CHO)中表达。这样的序列可以被描述为密码子优化的序列。

[0193] 将含有核酸分子的表达载体转化到合适的宿主细胞中以允许产生由核酸构建体编码的蛋白质。示例性宿主细胞包括原核生物(例如大肠杆菌)和真核生物(例如,COS或CHO细胞)。用表达载体转化的宿主细胞在允许产生本发明的人源化抗体或多特异性结合剂的条件下生长,然后回收人源化抗体或多特异性结合剂。

[0194] 本发明的人源化抗体和/或多特异性结合剂可以通过允许随后形成稳定的抗体或结合剂分子的任何技术来纯化。例如,不希望受理论束缚,抗体和/或多特异性结合剂可以作为可溶性多肽或作为包涵体从细胞中回收,从而可以通过8M盐酸胍和透析定量地提取抗体和/或多特异性结合剂。为了进一步纯化本发明的抗体和/或多特异性结合剂,可以使用常规的离子交换层析,疏水相互作用层析,反相层析或凝胶过滤。本发明的人源化抗体和/或多特异性结合剂也可以在从真核细胞或原核细胞分泌后从条件培养基中回收。

[0195] 筛选和检测方法

[0196] 本发明的人源化抗体和/或多特异性结合剂也可用于体外或体内筛选方法,其中期望检测和/或测量细胞或细胞的一种或多种活性(例如细胞凋亡或细胞生长)。筛选方法

是本领域公知的,并且包括无细胞,基于细胞和动物测定。体外测定可以是固态或可溶性靶分子检测可以以本领域已知的多种方式实现,包括使用能够鉴定人源化抗体或多特异性结合剂的标记物或可检测基团,其结合到靶分子(例如,细胞表面抗原)。可检测的标记可以与使用本发明的人源化抗体或多特异性结合剂的测定结合使用。治疗剂

[0197] 本发明的人源化抗体和/或多价结合剂可用作治疗剂。在一些实施例中,如在本领域中理解的,它们被利用而无需进一步修改。在一些实施方案中,它们可以并入如本文所述的组合物或制剂中。在一些实施方案中,它们可以化学地与一种或多种其它试剂或实体(例如,有效载荷)相关联或连接(例如,共轭)。

[0198] 用于将抗体试剂或其组分与其它部分或实体缀合的各种技术是本领域公知的,并且可以根据本发明的实践来使用。为了给出一个实例,可以根据本领域公知的技术制备放射性标记的抗体试剂。

[0199] 例如,单克隆抗体可以通过与钠和/或碘化钾和化学氧化剂如次氯酸钠或酶氧化剂如乳过氧化物酶接触而碘化。抗体可以通过配体交换方法用镓-99m标记,例如通过用亚锡溶液还原高效液相,将还原的镓螯合到Sephadex柱上并将该抗体应用于该柱。在一些实施方案中,所提供的抗体试剂使用直接标记技术进行标记,例如通过培养高镓酸盐,还原剂如SNC12,缓冲溶液如邻苯二甲酸钠溶液和抗体。通常用于结合作为金属离子存在于抗体的放射性同位素的中间官能团是二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)或乙二胺四乙酸(EDTA)或1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸(DOTA)或对氨基苄基-D DOTA(DOTA-Bn)。放射性同位素可以通过例如剂量测定来检测。

[0200] 治疗方法

[0201] 本发明的人源化抗体和/或多特异性结合剂对靶抗原之一表现出高亲和力结合的能力使得它们对于有效靶向表达靶抗原的细胞具有治疗上的用途。因此,在一些实施方案中,可能需要增加人源化抗体或多特异性结合剂对于一种靶抗原而不是另一种也被多特异性结合剂(或Fc受体)结合的靶抗原的亲和力在人源化抗体的情况下)。例如,在肿瘤杀伤的上下文中,某些条件可以受益于对肿瘤抗原的亲力的增加或降低,但不受第二抗原的影响。因此,如本文描述的,通过使用人源化抗体或多特异性结合剂来增加具有表达肿瘤抗原的肿瘤的患者中的人源化抗体或多特异性结合剂对肿瘤抗原的结合亲和力可能是有益的。

[0202] 本发明提供本文所述的人源化抗体和/或多特异性结合剂作为用于治疗具有表达能够被这种多特异性结合剂结合的抗原的肿瘤的患者治疗剂。这样的人源化抗体和/或多特异性结合剂可以用于人或动物体的治疗方法或诊断方法中。

[0203] 施用

[0204] 本发明提供了将有效量的本文所述的治疗活性物质(例如,人源化抗体或多特异性结合剂)施用给予需要治疗的受试者的方法。

[0205] 如本文所述的人源化抗体或多特异性结合剂可以通过本领域已知的用于治疗性递送药剂的各种方法来施用,例如蛋白质或核酸可用于治疗性递送人源化抗体或多特异性结合剂或编码本发明的人源化抗体或多特异性结合剂的核酸,其用于杀死或抑制受试者中靶细胞的生长,例如细胞转染,基因治疗,用递送载体或药理学上直接给药通过提供包含编码本发明的多特异性结合剂的核酸的重组细胞的间接递送。

[0206] 各种递送系统是已知的并且可以用于施用本发明的人源化抗体或多特异性结合

剂,例如包封在脂质体,微粒,微胶囊,能够表达化合物的重组细胞,受体介导的内吞作用(参见例如Wu和Wu,1987,J.Biol.Chem.262:4429-4432),构建作为逆转录病毒或其它载体的一部分的核酸等。给药途径可以是肠内或肠胃外,包括,但不限于静脉内,皮下,肌内,肠胃外,经皮或经粘膜(例如口服或鼻腔)。在一些实施方案中,静脉内施用本发明的多特异性结合剂。在一些实施方案中,皮下施用本发明的多特异性结合剂。在一些实施方案中,多特异性结合剂与其它生物活性剂一起施用。

[0207] 阅读本公开的本领域普通技术人员将容易理解,如本文所述,用本文所述的治疗活性物质(例如,使用人源化抗体或多特异性结合剂)进行治疗可在某些实施方案中与其他疗法组合,特别是包括其他抗肿瘤治疗。在一些实施方案中,这样的其它抗肿瘤治疗可以是或包括,例如给予一种或多种化学治疗剂,免疫调节剂,放射治疗,高频超声治疗,手术等。

[0208] 在一些实施方案中,可以选择施用本文所述的治疗活性物质(例如,人源化抗体或多特异性结合剂)和与其组合的另一疗法的相对时间以优化效果。

[0209] 为了给出一些实施例,在一些实施方案中,本文所述的治疗活性物质在足以使肿瘤细胞饱和的条件下和一段时间下(例如,根据给药方案)给药。在一些实施方案中,未施用的治疗活性物质在给药后从血流中除去;在一些这样的实施方案中,在施用另一种试剂之前发生(例如,允许发生)这种除去。

[0210] 在一些具体实施方案中,如本文所述的治疗活性物质与靶向DOTA-Bn的另一种药物组合施用。在一些这样的实施例中,另一试剂携带有效载荷。在一些实施例中,有效载荷可以是或包括治疗剂有效载荷(例如,有毒载荷)。在一些实施例中,有效载荷可以是或包括检测试剂有效载荷。

[0211] 在一些具体实施方案中,施用本文所述的治疗活性物质(例如,人源化抗体或多特异性结合剂),以使肿瘤细胞饱和,随后施用靶向DOTA-Bn的第二药物(并可能携带有效载荷)。任选地,施用靶向DOTA-Bn(例如,并且可携带不同有效载荷)的至少一种第三试剂。

[0212] 在一些实施方案中,在施用本文所述的治疗活性物质后一段时间内施用第二和第三试剂,该时间段可足以允许未结合的治疗剂清除。在一些实施方案中,第二和任选的第三试剂在不进一步施用治疗剂的情况下施用。例如,在一些实施方案中,根据包括至少一个循环的方案来施用如本文所述的治疗活性物质:(i)施用治疗剂(任选使得相关肿瘤细胞饱和);(ii)施用第二和任选的至少一种第三试剂(例如,靶向DOTA-Bn,并且可任选地携带有效载荷);(iii)任选地额外施用第二和/或第三种试剂,而无需另外施用治疗剂。在一些实施方案中,治疗方案可以包括多个这样的循环;在一些实施方案中,方案可以包括1,2,3,4,5,6,7,8,9,10或更多个循环。

[0213] 在一些实施方案中,治疗方案仅包括单次循环,其包括施用治疗剂;在一些实施方案中,这样的治疗方案可以包括一个或多个循环,其包括步骤(ii)和(iii),但不包括治疗剂的额外施用。

[0214] 在一些实施方案中,先前施用本文所述的治疗剂允许联合治疗,其中治疗剂与其组合的药剂显示比单独施用更广泛的治疗指数(即,先前不给予治疗剂,如本文所述)。在一些实施方案中,这样更广泛的治疗指数至少改善了对数倍。

[0215] 药物组合物

[0216] 本发明还提供包含本发明的人源化抗体或多特异性结合剂和药学上可接受的载

体或赋形剂的药物组合物。如果需要,组合物还可以含有一种或多种另外的治疗活性物质。

[0217] 虽然本文提供的药物组合物的描述主要针对适合于对人类进行伦理施用的药物组合物,但是本领域技术人员将会理解,这些组合物通常适用于各种动物的施用。为了使组合物适合于各种动物的施用,适于给予人的药物组合物的改性是很好理解的,普通技术的兽医药理学家可以仅用普通的(如果有的话)实验来设计和/或进行这种修饰。

[0218] 本文所述的药物组合物的制剂可以通过药理学领域已知或以后开发的任何方法制备。通常,这种制备方法包括将活性成分与稀释剂或其它赋形剂和/或一种或多种其它辅助成分结合的步骤,然后如果需要和/或需要,将产品成型和/或包装成所需的单剂量或多剂量单位。

[0219] 根据本发明的药物组合物可以作为单一单位剂量和/或多个单一单位剂量来批量制备,包装和/或出售。如本文所用,“单位剂量”是包含预定量的活性成分的药物组合物的离散量。活性成分的量通常等于将给予受试者的活性成分的剂量和/或这样的剂量的方便部分,例如这样的剂量的一半或三分之一。

[0220] 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/或任何另外的成分的相对量可以根据受治疗和进一步的受试者的身份,大小和/或状况而变化取决于给药组合物的途径。作为实例,组合物可以包含0.1%至100% (w/w)的活性成分。

[0221] 药物制剂可以另外包含药学上可接受的赋形剂,如本文所用,赋形剂包括任何和所有溶剂,分散介质,稀释剂或其它液体载体,分散体或悬浮助剂,表面活性剂,等渗剂,增稠或乳化试剂,防腐剂,固体粘合剂,润滑剂等,适合于所需的具体剂型。Remington的“药科学与实践”第21版,A.R.Gennaro (Lippincott, Williams&Wilkins, Baltimore, MD, 2006; 通过引用并入本文) 公开了用于配制药物流合物和用于制备其的已知技术的各种赋形剂。除了任何常规的赋形剂介质与物质或其衍生物不相容,例如通过产生任何不期望的生物效应或以有害方式与药物组合物的任何其它成分相互作用,其用途被认为在本发明的范围。

[0222] 在一些实施方案中,药学上可接受的赋形剂为至少95%,至少96%,至少97%,至少98%,至少99%或100%纯度。在一些实施方案中,赋形剂被批准用于人类和用于兽医用途。在一些实施方案中,赋形剂由美国食品和药物管理局批准。在一些实施方案中,赋形剂是药物级。在一些实施方案中,赋形剂符合美国药典 (USP), 欧洲药典 (EP), 英国药典和/或国际药典的标准。

[0223] 用于制备药物组合物的药学上可接受的赋形剂包括但不限于惰性稀释剂,分散剂和/或造粒剂,表面活性剂和/或乳化剂,崩解剂,粘合剂,防腐剂,缓冲剂,润滑剂和/或油。这样的赋形剂可任选地包括在药物制剂中。根据配方师的判断,可以在组合物中存在诸如可可脂和栓剂蜡,着色剂,包衣剂,甜味剂,调味剂和/或芳香剂的赋形剂。

[0224] 在制剂和/或制造药剂中的一般考虑可以在例如Remington: The Science and Practice of Pharmacy 21st ed., Lippincott Williams&Wilkins, 2005 (通过引用并入本文) 中找到。

[0225] 试剂盒

[0226] 本发明进一步提供药物包装或试剂盒,其包含一个或多个装有至少一种如本文所述的人源化抗体或多特异性结合剂(例如,双特异性抗体)的容器。试剂盒可以以任何适用的方法使用,包括例如治疗或诊断。可选择地与这种容器相关联可以是由管理制造,使用或

销售药物或生物制品的政府机构规定的形式的通知,该通知反映 (a) 制造,使用或销售的机构的人类施用的批准, (b) 使用指南或两者兼而有之。

[0227] 在以下对示例性实施例的描述的过程中,本发明的其它特征将变得显而易见,这些示例性实施例是为了说明本发明而给出的,并不旨在限制本发明。

[0228] 例子

[0229] 提供以下实施例以便向本领域普通技术人员描述如何制备和使用本发明的方法和组合物,并不意图限制发明人认为是其发明的范围。除非另有说明,温度以摄氏度表示,压力处于或接近大气压。

[0230] 实施例1.huA33-C825的体外表征

[0231] 除此之外,本发明包括人源化抗体A33 (huA33) 对于构建多特异性结合剂(例如双特异性抗体)特别有意义的见解。本发明人不希望受任何特定理论的约束,提出通过以多特异性形式使用huA33可以克服对放射性标记的单特异性huA33(例如<sup>131</sup>I-huA33)观察到的次最佳肿瘤剂量和治疗指数。

[0232] 本实施例描述了由基于人源化抗体A33的第一抗原结合位点和结合小分子半抗原(例如苄基-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸[DOTA-Bn])的第二抗原结合位点组成的双特异性抗体的产生。本文提供的描述描述了靶向结肠直肠癌细胞的双特异性抗体(称为huA33-C825)的成功生产。如本文所述,基于亲和力成熟的2D12.5抗体的抗DOTA-Bn单链Fv片段(ScFv)连接到人源化A33轻链的羧基末端。用于预靶向放射免疫治疗(PRIT)的抗体药物发展的主要缺点是在正常组织中的辐射过度暴露,免疫原性,次最佳肿瘤剂量和低治疗指数。如下所述,本发明的双特异性抗体克服了这种缺陷并为表达人A33抗原如结肠直肠癌的癌症提供了有效的PRIT可能性。

[0233] 通过SE-HPLC对huA33-C825的示例性生物化学纯度分析如图1所示。SEC-HPLC显示出具有210KDa近似MW的主峰(90%,通过UV分析),以及一些次要峰,假定是通过凝胶过滤可去除的聚集体。双重特异性抗体在多次冷冻和融化循环后通过SE-HPLC和Biacore仍保持稳定。通过Biacore T100测量结合亲和力。示例性结果列于表3中。示例性传感图在图2中阐述。

[0234] 表3

	抗原	Agent	$k_{on}$ (1/Ms)	$k_{off}$ (1/s)	$K_D$ (M)
[0235]	人类 A33	huA33-IgG1	6.14E+05	1.05E-03	1.71E-09
		huA33-C825	9.15E+04	5.81E-03	6.35E-08
	BSA-DOTA-BN (Y)				
	抗原	hu3F8-C825	1.60E+04	3.37E-04	2.12E-08
		huA33-C825	1.90E+04	2.20E-04	1.16E-08

[0236] 如本实施例所示,与单特异性huA33抗体相比,huA33-C825表现出对人A33抗原的较低亲和力( $K_D$ 为63.5nM v.171nM,图2A)。与具有不结合A33抗原的第一抗原结合位点和结合DOTA-Bn(金属)的第二抗原的位点的对照双特异性抗体相比,HuA33-C825对BSA-(Y)-DOTA-Bn( $K_D$ 为11.6nM)保持对DOTA-Bn(金属)的高结合亲和力( $K_D$ 为21.2nM,图2B)。总而言之,本实施例证明了结合人A33抗原和小分子半抗原(例如,DOTA-Bn)并对两个靶具有高亲和力

的双特异性抗体的构建。此外,与亲本huA33-IgG1抗体相比,在huA33-C825中观察到的对人A33抗原的亲合性降低提供了更快的清除。

[0237] 实施例2.使用huA33-C825,葡聚糖清除剂(葡聚糖-CA)和 $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Bn优化PRIT

[0238] 本实施例证明多特异性结合剂(例如双特异性抗体)对于A33阳性肿瘤的预靶向放射免疫治疗(PRIT)的功效。特别地,该实施例描述了对携带SW1222的啮齿动物的预靶向放射免疫治疗(PRIT)方案中使用实施例1中描述的双特异性抗体作为清除剂(CA)的量的肿瘤靶向的优化。如下所示,随着剂量的增加,观察到治疗指数逐渐增加,而且绝对肿瘤摄取也减少。

[0239] 选择0.25mg/小鼠剂量的huA33-C825,基于在携带SW1222-肿瘤的小鼠在 $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Bn 24小时p.i.的先导生物分布研究,使用0.1-0.6mg huA33-C825(0.48-2.86nmol),固定比例的CA和 $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Bn(5.6MBq),对于0.25-0.6mg huA33-C825的肿瘤中的 $^{177}\text{Lu}$ 活性浓度,显示出~15-18% ID/g的平台。接下来,进行进一步的生物分布实验以优化PRIT期间的CA剂量,其中0.25mg(1.19nmol)作为huA33-C825剂量。24小时后分别给予荷瘤小鼠组(n=3~4组),随后24h后,以盐水(即载体),2.4%(w/w,相对于0.25mg huA33-C825剂量),5%(w/w),10%(w/w)或25%(w/w) CA剂量(0-62.5 $\mu\text{g}$ /小鼠)。另外4小时后,向小鼠注射5.6MBq的 $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Bn,并在24小时后处死用于生物分布分析。清除剂的示例性优化在图3A-3D中示出。在图4A-4D中示出了给予25%(w/w)剂量的CA的SW1222肿瘤和给予小鼠组的各种正常组织中的示例性 $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Bn活性。

[0240] 如预期的那样,CA剂量对循环(即血液) $^{177}\text{Lu}$ 活性(分别为从~8至0.1% ID/g盐水(无CA)至25%(w/w))具有显著影响。此外,CA剂量看起来降低了在肿瘤的后续的 $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Bn摄取。所测试的最高CA剂量(25%(w/w))被认为是最佳的,因为与较低CA剂量相比,具有最高放射敏感性(血液和肾脏)的组织肿瘤对正常器官比率最高与生理盐水(PRIT)相比, $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Bn肿瘤摄取减少(吸收减少约50%)。具体来说, $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Bn的肿瘤摄取(% ID/g,平均值 $\pm$ 标准误差)分别为盐水 $17.51 \pm 0.90$  (n=3)和CA在65 $\mu\text{g}$ 剂量水平(25%(w/w)) $8.46 \pm 3.74$  (n=4)。对于盐水,血液,肾脏和肌肉的肿瘤与器官比例分别为 $2.2 \pm 0.4$ , $4.9 \pm 0.6$ 和 $23.2 \pm 3.8$ 。在CA的65 $\mu\text{g}$ CA剂量水平(25%(w/w))下,血液,肾脏和肌肉的肿瘤与器官比分别为 $105.8 \pm 52.3$ , $18.4 \pm 13.4$ 和 $282.1 \pm 208.7$ 。接下来,使用优化的用于huA33-C825和CA的PRIT剂量进行 $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Bn剂量滴定研究。对于 $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Bn剂量滴定研究,将 $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Bn剂量组的 $^{177}\text{Lu}$ 活性生物分布数据作为% ID/g和绝对值进行比较,其中肿瘤和临界选择组织(血液,肝脏,脾脏和肾脏)摄取量(kBq/g;参见图4A,4B)。最后,在24h p.i.的单次点生物分布实验。在携带SW1222的肿瘤小鼠中进行 $^{131}\text{I}$ -痕量标记的huA33-C825(0.39-0.40MBq,冷huA33-C825加入1.19nmol),以估计在PRIT过程中肿瘤的huA33-C825的绝对抗体摄取(以pmol/g计)。表4中列出了示例性的表格数据(数据以平均值 $\pm$ SD表示)。示例性的肿瘤摄取计算如图4D所示。

[0241] 如本实施例所示, $^{131}\text{I}$ -huA33-C825肿瘤摄取(平均 $\pm$ 标准偏差)为 $3.71 \pm 0.97\%$  ID/g。这对应于绝对huA33-C825吸收为44pmol/g(考虑到~50%免疫反应级分,然后考虑88pmol/g)。

[0242] 表4

在将  $^{131}\text{I}$ -A33-C825 (0.39-0.40MBq, 0.25mg / 1.19nmol) i.v. 注射入 SW1222 荷瘤小鼠 (n = 5) 24 小时后生物分布研究。

[0243]	组织	24 hr
	血液	$5.05 \pm 0.97$
	心	$2.10 \pm 0.31$
	肺	$2.35 \pm 0.52$
	肝	$2.04 \pm 0.53$
	脾	$1.36 \pm 0.30$
	胃	$6.92 \pm 3.06$
	小肠	$0.98 \pm 0.35$
	大肠	$0.83 \pm 0.40$
	肾脏	$1.77 \pm 0.31$
	肌肉	$0.49 \pm 0.06$
	骨	$0.71 \pm 0.20$
	瘤	$3.71 \pm 0.97$
	肿瘤大小 (g)	$0.86 \pm 0.34$

[0244] 实施例3. 生物分布和吸收剂量计算

[0245] 测试前述实施例中描述的HuA33-C825的体内功效。测定放射性标记的DOTA-Bn的生物分布和植入SW1222肿瘤细胞的小鼠吸收剂量的估计。

[0246] 在本实施例中, 在具有最佳剂量的huA33-C825和CA的A33-阳性SW1222荷瘤小鼠组中进行PRIT, 随后是2.0MBq ( $\sim 10\text{pmol}$ ) 的 $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Bn和生物分布研究从2-120h p.i.  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Bn进行, 以确定在肿瘤和各种正常组织中的 $^{177}\text{Lu}$ 活性停留时间。

[0247] 简言之, 使用最佳A33-C825 (0.25mg/小鼠) 和葡聚糖清除剂剂量 (25% (w/w), 62.5  $\mu\text{g}$ ) 和2.0MBq ( $\sim 10\text{pmol}$ ) 的 $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Bn的PRIT后, 使用生物分布测定确定肿瘤和各种正常组织中的 $^{177}\text{Lu}$ 活性。给予SW1222荷瘤小鼠组 (n=4~5) 250 $\mu\text{g}$  huA33-C825, 24小时后用25% (w/w) (62.5 $\mu\text{g}$ ) 葡聚糖清除剂, 另外4h后, 2.0MBq ( $\sim 10\text{pmol}$ ) 的 $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Bn。在2, 24和120h p.i.  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Bn处死一组动物, 进行生物分布分析。使用材料和方法中所述使用这些数据来估计 $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Bn的放射免疫治疗的吸收剂量 (表5)。

[0248] 对于肿瘤,  $^{177}\text{Lu}$ 摄取在给药后非常快速地发生, 平均在2小时p.i. 时为7.0% ID/g。24小时p.i. 时最大肿瘤摄取量为8.5% ID/g, 并在120小时p.i. 后的96小时内减少约一半至4.0%的ID/g。在2小时p.i. 观察到肾脏, 肝脏, 脾脏和血液摄取峰值 (0.87, 0.70, 0.92和0.75% ID/g, 平均值), 和分别降低 (也是平均值) 至0.27 (与峰吸收相比减少3.2倍), 0.30 (2.3倍减少), 0.32 (2.9倍减少) 和0.02 (减少37.5倍) % ID/g (也是平均值)。

[0249] 在用于PRIT的携带s.c. A33阳性-结肠直肠癌肿瘤的雌性无胸腺小鼠中肿瘤和选择正常组织的吸收剂量的示例性估计。包括最佳huA33-C825和葡聚糖清除剂剂量列于表6。



对于每个靶区域,吸收剂量被计算为非穿透辐射的 $^{177}\text{Lu}$ 平衡剂量常数的乘积(即 $\beta$ 射线)和目标区域 $^{177}\text{Lu}$ 累积的活性,假定 $^{177}\text{Lu}$  $\beta$ 射线完全局部吸收并忽略 $\gamma$ 射线和非自身剂量的贡献。

[0250] 表5

组织	2 hr ( $n = 5$ )	24 hr ( $n = 4$ )	120 hr ( $n = 5$ )
血液	$0.75 \pm 0.16$	$0.08 \pm 0.02$	$0.02 \pm 0.01$
心	$0.30 \pm 0.05$	$0.11 \pm 0.03$	$0.05 \pm 0.01$
肺	$0.59 \pm 0.10$	$0.21 \pm 0.07$	$0.06 \pm 0.02$
肝	$0.70 \pm 0.14$	$0.43 \pm 0.09$	$0.30 \pm 0.03$
脾	$0.92 \pm 0.15$	$0.47 \pm 0.14$	$0.32 \pm 0.12$
胃	$0.15 \pm 0.03$	$0.04 \pm 0.01$	$0.02 \pm 0.01$
小肠	$0.14 \pm 0.02$	$0.05 \pm 0.01$	$0.02 \pm 0.00$
大肠	$0.17 \pm 0.03$	$0.05 \pm 0.01$	$0.04 \pm 0.02$
肾脏	$0.87 \pm 0.09$	$0.46 \pm 0.27$	$0.27 \pm 0.09$
肌肉	$0.12 \pm 0.01$	$0.03 \pm 0.02$	$0.02 \pm 0.00$
骨	$0.09 \pm 0.02$	$0.03 \pm 0.02$	$0.03 \pm 0.00$
瘤	$6.99 \pm 1.24$	$8.46 \pm 3.74$	$3.99 \pm 0.44$
肿瘤大小 (g)	$1.31 \pm 0.50$	$1.08 \pm 0.45$	$0.98 \pm 0.32$

[0251]

[0252]

[0253]

肿瘤与组织之比	2 hr ( $n = 5$ )	24 hr ( $n = 4$ )	120 hr ( $n = 5$ )
血液	$9.3 \pm 2.6$	$107.2 \pm 54.0$	$181.0 \pm 62.1$
心	$23.7 \pm 6.1$	$78.1 \pm 41.3$	$78.6 \pm 22.3$
肺	$11.8 \pm 3.0$	$40.2 \pm 22.4$	$64.4 \pm 25.0$
肝	$10.0 \pm 2.7$	$19.5 \pm 9.5$	$13.5 \pm 2.2$
脾	$7.6 \pm 1.8$	$18.0 \pm 9.7$	$12.5 \pm 4.8$
胃	$46.6 \pm 13.5$	$225.0 \pm 113.5$	$166.2 \pm 50.5$
小肠	$49.7 \pm 11.6$	$182.0 \pm 91.8$	$210.5 \pm 43.9$
大肠	$41.5 \pm 11.2$	$177.8 \pm 89.8$	$104.3 \pm 49.2$
肾脏	$8.1 \pm 1.7$	$18.3 \pm 13.4$	$14.8 \pm 4.9$
肌肉	$58.6 \pm 12.4$	$285.3 \pm 212.8$	$249.4 \pm 58.6$
骨	$78.0 \pm 22.4$	$293.8 \pm 211.5$	$149.5 \pm 31.0$

表6

	组织	cGy/MBq	Therapeutic Index
[0254]	血液	0.9	73
	瘤	65.8	
	心	1.4	47
	肺	1.8	37
	肝	6.3	10
	脾	6.6	10
	胃	0.6	110
	小肠	0.5	132
	大肠	0.8	82
	肾脏	5.3	12
	肌肉	0.3	219
	骨	0.6	110

[0255] 如表6所示,血液,肿瘤,肝脏,脾脏和肾脏的 $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Bn (作为cGy/MBq)的估计吸收剂量分别为0.9,65.8,6.3,6.6和5.3。此外,对于单周期治疗,肿瘤对血液的治疗指数为73,肾脏为12,表示肿瘤靶向的治疗范围,预期无主要毒性。实际上,到远至140天,具有持久反应的受试者也没有观察到毒性。

[0256] 通过PET成像评估PRIT后的肿瘤摄取显示出与 $^{86}\text{Y}$ -DOTA-Bn和 $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Bn同种型两者的生物分布测定相似的结果(数据未显示)。

[0257] 实施例4. 体内治疗研究

[0258] 该实施例说明huA33-C825双特异性抗体在预靶向放射免疫疗法中的体内功效,介导携带A33阳性癌细胞的小鼠中肿瘤负荷的降低。特别地,本实施例描述了单周期和双周期治疗对SW1222-肿瘤携带小鼠的肿瘤负荷的影响。

[0259] 在第一次治疗研究期间,使用以下五组肿瘤携带小鼠( $n=6-8$ 每组),其分别进行以下处理:载体(即未处理, $n=8$ , $\text{TV}_7:76\pm15\text{mm}^3$ ),仅 $33.3\text{MBq }^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Bn(每组6只)(在双特异性抗体和CA注射期间给予载体, $n=6$ , $\text{TV}_7:116\pm23\text{mm}^3$ ),单周期IgG-C825PRIT+ $33.3\text{MBq }^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Bn( $n.s.$  IgG-C825huA33-C825, $n=8$ , $\text{TV}_7:100\pm10\text{mm}^3$ ),或单周期huA33-C825PRIT+ $11.1\text{MBq}$ 或 $33.3\text{MBq }^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Bn( $n=8$ , $\text{TV}_7:103\pm17\text{mm}^3$ 和 $\text{TV}_7:93\pm15\text{mm}^3$ )。单周期huA33-C825PRIT+( $11.1\text{MBq}$ 或 $33.3\text{MBq }^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Bn)的肿瘤吸收剂量分别为730和2190cGy(根据表6的吸收剂量估计)。本发明人观察到,在治疗期间, $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Bn剂量增加,相对肿瘤摄取减少,这可能表明接近肿瘤可能的饱和。这可能会影响估计的吸收肿瘤剂量。如果使用估计的7% ID/g为PRIT+ $33.3\text{MBq }^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Bn剂量后峰值肿瘤摄取(即,考虑到具有较高的 $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Bn剂量的相对肿瘤摄取减少),则估计肿瘤吸收剂量 $\sim 1800\text{cGy}$ 可能更准确,总体建议有效剂量范围为1800-2200cGy。来自每个 $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Bn治疗组的小鼠中的示例性肿瘤反应(以肿瘤体积 $[\text{mm}^3]$ 表示)如图5所示。接受无治疗的肿瘤组的组,由单独的 $33.3\text{MBq }^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Bn或单周期IgG-C825PRIT+ $33.3\text{MBq }^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Bn显示没有肿瘤

反应。给予 $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Bn的后两组的扫描显示肿瘤区域的活性最小。相比之下,使用单周期huA33-C825PRIT+或11.1MBq或33.3MBq $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Bn处理的组在治疗后至少15天内显示出轻微的生长延迟,但不产生CR。为了比较,肿瘤接种后第23天( $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Bn注射后16天),肿瘤体积(平均值 $\pm$ SEM)分别为 $1398\pm 206$  ( $n=8$ ),  $1051\pm 167$  ( $n=5$ )  $877\pm 109$  ( $n=7$ ),  $694\pm 138$  ( $n=8$ ), 无治疗 $495\pm 76$  ( $n=8$ ), 单独33.3MBq  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Bn, 单周期IgG-C825PRIT+33.3MBq $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Bn, 或单周期huA33-C825PRIT+分别为11.1MBq或33.3MBq $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Bn。在肿瘤接种后30天内,所有组的平均肿瘤大小 $\geq 1250\text{mm}^3$ ,研究终止。用更高剂量的单周期huA33-C825PRIT+ $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Bn, 111.1MBq  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Bn处理观察到类似的结果(数据未显示)。

[0260] 在第二次治疗研究中,研究了双周期huA33-C825PRIT治疗。接受双周期治疗的小鼠中的示例性肿瘤反应(以肿瘤体积[mm<sup>3</sup>]表示)列在图6A-6D中。

[0261] 给予小鼠无治疗 ( $n=5/\text{TV}_{10}:314\pm 77\text{mm}^3$ ), 所有小鼠由于肿瘤负荷过大而需要在30天内进行处死, 达到 $500\text{mm}^3$ 的时间为 $13\pm 2\text{d}$ 。PRIT+11.1MBq  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Bn (总共 $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Bn剂量22.2MBq; 估计肿瘤剂量1460cGy) ( $n=5/\text{TV}_{10}:462\pm 179\text{mm}^3$ ), 2/5动物显示CR (图6A)。在复发性肿瘤中, 达到 $500\text{mm}^3$ 的时间为9d ( $\text{TV}_{10}:391\text{mm}^3$ ) 或36d ( $\text{TV}_{10}:712\text{mm}^3$ )。用2周期的PRIT+33.3MBq  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Bn (总共 $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Bn剂量66.6MBq; 估计肿瘤剂量3600-4400cGy) ( $n=5/344\pm 105\text{mm}^3$ ) 产生CR (图6B), 5/5动物。在这些复发性肿瘤中, 达到 $500\text{mm}^3$ 的时间为12d ( $\text{TV}_{10}:325\text{mm}^3$ ), 65d ( $\text{TV}_{10}:502\text{mm}^3$ ), 7d ( $\text{TV}_{10}:341\text{mm}^3$ ) 和23d ( $\text{TV}_{10}:345\text{mm}^3$ ), 一个单只小鼠在处死时的肿瘤大小 $<10\text{mm}^3$ 。两循环PRIT+55.5mCi  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Bn (总共 $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Bn剂量111.0MBq; 估计肿瘤剂量:2580cGy, 基于峰值肿瘤摄取3% ID/g) ( $n=4/236\pm 54\text{mm}^3$ ) 产生CR, 4/4动物 (图6C)。在这些复发性肿瘤中, 达到 $500\text{mm}^3$ 的时间为34d ( $\text{TV}_{10}:295\text{mm}^3$ ), 45d ( $\text{TV}_{10}:263\text{mm}^3$ ) 和42d ( $\text{TV}_{10}:175\text{mm}^3$ ), 一个单只小鼠在处死时的肿瘤大小为 $44\text{mm}^3$ 。在PRIT+33.3mCi  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Bn (总共 $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Bn剂量:66.6MBq) 的两个循环的治疗后, 平均复发时间为 $500\text{mm}^3$ 为 $27\pm 26\text{d}$ 。对于PRIT+55.5MBq  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Bn (总共 $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Bn剂量:111MBq) 的两个周期的治疗, 平均复发时间为 $500\text{mm}^3$ 为 $40\pm 6\text{d}$ 。每种治疗方案的吸收辐射剂量(以Gy单位表示)的示例性估计列于表7。

[0262] 表7

治疗组	肿 瘤	血 液	肾	完 的 应	整 回	治疗后 40 天治愈
控制						
非预先指定的 11.1 MBq				0/5		0/5
非预先定位的 33.3 MBq				0/6		0/6
IgG-C825 + 11.1 MBq				0/5		0/5
IgG-C825 + 33.3 MBq				0/7		0/7

[0263]

<i>单周期</i>						
huA33-C825 + 11.1 MBq	7.3	0.1	0.6	0/8		0/8
huA33-C825 + 33.3 MBq	21.9	0.3	1.8	0/8		0/8
<i>双周期</i>						
huA33-C825 + 11.1 MBq (x2); 22.2 MBq	14.6	0.2	1.2	2/5		1/5
huA33-C825 + 33.3 MBq (x2); 66.6 MBq	43.8	0.6	3.5	5/5		2/5
huA33-C825 + 55.5 MBq (x2); 111.0 MBq	73.0	1.0	5.9	4/4		2/4

[0264]

<i>三周期</i>						
huA33-C825 + 55.5 MBq (x3); 165.0 MBq	140	1.5	8.8	10/10		10/10

[0265] 动物在治疗后140天观察到类似生存趋势(数据未显示)。

[0266] 实施例5. 毒性

[0267] 本实施例说明了先前实施例中描述的人源化A33双特异性抗体的体内毒性。

[0268] 简言之,用PRIT+11.1MBq的<sup>177</sup>Lu-DOTA-Bn (n=3) 两个循环或PRIT+1.5mCi的<sup>177</sup>Lu-DOTA-Bn (n=3) 的两个循环的两个周期处理的总共六只小鼠,提交治疗后9周的肾脏,骨髓,肝脏和脾脏的解剖病理学评估。给予在两个循环的PRIT+0.3mCi的<sup>177</sup>Lu-DOTA-Bn治疗后没有CR的3/5小鼠,在注射第二次<sup>177</sup>Lu-DOTA-Bn剂量后5天(即处理后)提交。这些小鼠在治疗后没有显示肿瘤大小的任何减少,并且由于肿瘤负荷过大而需要牺牲。在3/3小鼠中,肾和骨髓正常,表明没有辐射诱导的毒性。对于1/3小鼠,肝脏显示髓外造血,与组内其它两例比较,肝脏正常。对于1/3小鼠,脾脏(白髓)显示滤泡性淋巴增生,脾脏与组内其它两例比较,在正常范围内。对于用两个周期的PRIT+55.5MBq处理的小鼠,治疗后七周,提交单独一只小鼠,而另外两只小鼠在治疗后九周提交。所有这三只小鼠均出现CR,随后肿瘤再次发生,由于肿瘤负担过重而需要牺牲。对于3/3小鼠,肾,骨髓和肝脏均正常。对于1/3小鼠,脾脏(白髓)显示滤泡性淋巴增生,脾脏与组内其它两例比较,在正常范围内。

[0269] 包括其它方面,本实施例证实huA33-C825在体内有效降低肿瘤负荷(即减少肿瘤

生长)并提供有效的PRIT。

#### [0270] 实施例6.治愈性治疗诊断PRIT

[0271] 本实施例记录了先前实施例中描述的人源化A33双特异性抗体的使用,并且除其他外,证明使用这些抗体的治疗可以是治疗性的。具体来说,它显示了治疗诊断性治愈性疗法的治疗方案,其中包括额外的治疗周期,总施用量增加。

[0272] 对携带SW1222s.c.移植瘤的裸鼠( $n=20$ ;肿瘤体积 $=102\pm 40\text{mm}^3$ ;平均值 $\pm$ 标准偏差(SD))进行以下治疗( $n=5-10$ /组):无处理( $n=5$ ),仅 $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Bn( $n=5$ )或由抗GPA33 PRIT+55MBq的 $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Bn( $n=10$ ;总计:165MBq)组成的三循环PRIT方案。在注射了 $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Bn的第一个循环后,经过DPRIT的五个随机选择的小鼠进行多至160hr的系列nanoSPECT/CT成像,用于剂量测定计算。

[0273] DPRIT在10/10只小鼠(对照:在肿瘤接种后21天死亡10/10)中诱导完全的肿瘤反应,所有处理的动物在100天无肿瘤存活并且没有明显的毒性。在100天的5/10只小鼠的尸体解剖验证了治愈,并且没有显示肾,肝,脾和骨/骨髓的评估的显著的组织病理学发现(数据未显示)。第1循环后 $^{177}\text{Lu}$ 辐射暴露量的剂量学估计为 $4556\pm 637\text{rads}$ ( $n=5$ ,平均值 $\pm$ SD)。基于这些数据,治愈性DPRIT(即3个循环)后总共 $^{177}\text{Lu}$ 辐射肿瘤的一级近似值分别为14000rad(对于150rad的血液和肾脏的辐射剂量(治疗指数(TI):93))和875rads(TI:16))。

[0274] 三循环PRIT方案治疗的动物的镱-177纳米SPECT/CT成像显示出与肿瘤中可见摄取和最小组织背景的高对比度(数据未显示)。TI $\sim 70:1$ 。观察到基于活体小鼠的非侵入性体内横截面成像的10毫克或更少的肿瘤的检测。本实施例正好证实了huA33-C825有效地降低了体内的肿瘤负荷,并且基于PRIT的诊断治疗可能具有治愈性作用和/或用于检测小肿瘤。

#### [0275] 实施例7.诊断治疗性“实时”同时治疗和图像引导剂量测定

[0276] 本实施例使用前述实施例中描述的人源化A33双特异性抗体来记录体内对体内DOTA-PRIT方案的体内反应,并通过同时治疗和图像引导剂量测定法证明治疗功效。具体来说,nanoSPECT/CT用于“实时”剂量测定进行 $^{177}\text{Lu}$ -DPRIT治疗的小鼠的高分辨率定量成像。

[0277] 用单次循环的抗GPA33 PRIT+55MBq的 $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Bn处理的携带SW1222-肿瘤(体积: $100\text{mm}^3$ ,根据游标卡尺测量)的裸鼠,并在 $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Bn注射后1,2,4和160小时通过纳米SPECT/CT三次成像:图8所示是肿瘤位于下腹部区域的最大强度nanoSPECT/CT图像。图像被衰减校正到注射时间,并使用已知的活性标准进行校准。使用校正图像的兴趣区分析来确定肿瘤中的活性浓度。该实例正好确认了huA33-C825有效地降低体内肿瘤负荷,而高分辨率定量成像是可用于测量功效的一种方法。

#### [0278] 材料与方法实例

##### [0279] 肿瘤细胞系和细胞培养试剂

[0280] 人类结肠直肠癌细胞系SW1222由路德维希癌症免疫治疗研究所(纽约州纽约州)获得,并通过连续传代维持。在含有5%CO<sub>2</sub>的37℃环境中,将细胞在补充有10%热灭活胎牛血清,2.0mM谷氨酰胺,100单位/mL青霉素和100单位/mL链霉素的Minimal Essential培养基中培养。在接收细胞系后,建立培养物并以小等分试样冷冻保存以限制传代至少于3个月,并使用商业试剂盒(Lonza)根据制造商的规格定期测试支原体。对于细胞通过和收获过程中的胰蛋白酶消化,使用不含钙和镁的Hanks缓冲盐溶液中的0.25%胰蛋白酶/0.53mM

EDTA溶液。

[0281] huA33-C825的克隆和表达

[0282] 使用先前在Cheal, S.M.等人(2014, Mol. Cancer Ther. 13 (7), 10页)描述的平台制备HuA33-C825,其使用人源化抗体A33(huA33; King, DJ等人, 1995, British J. Cancer 72: 1364-1372)的可变区( $V_H$ 和 $V_L$ )。在哺乳动物表达载体中的CHO细胞中产生HuA33-C825,并通过蛋白A亲和层析纯化(Cheal等, 同上)。

[0283] 表8(huA33-C825:人源化A33IgG1-鼠C825 scFv; huA33-huC825:人源化A33 IgG1-人源化C825scFv)表示本发明的示例性双特异性抗体。对于DNA序列,前导序列以下划线文本表示。对于氨基酸序列,前导序列表示为下划线文本,接头序列以粗体文本表示,可变区序列以斜体文本表示。

[0284] 表8

---

huA33-C825 轻链 DNA

[0285] ATGGGCTGGTCCTGCATCATCCTGTTTCTGGTGGCTACCGCCACC  
GCGACATCCAGATGACCCAGTCCCCCTCCTCCCTGTCCGTGTCT  
GTGGGCGACAGAGTGACCATCACATGCAAGGCCTCCCAGAACG  
TGCGGACCGTGGTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCCTGGCC  
CCCAAGACCCTGATCTACCTGGCCTCTAACCGGCACACCGGCGT  
GCCCTCCAGATTCTCCGGATCTGGCTCTGGCACCGACTTTACCTT  
CACCATCTCCAGCCTGCAGCCCGAGGATATCGCCACCTACTTTT  
GCCAGCAGCACTGGTCCTACCCCTGACCTTTGGCCAGGGCACC  
AAGGTGGAAGTGAAGAGAACCGTGGCCGCTCCCTCCGTGTTTCAT  
CTTCCCACCTTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCTTCTG  
TCGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCGCGAGGCCAAGGTG  
CAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAGG  
AATCCGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACAGCCT  
GTCCTCCACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACA  
AGGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTGTCTAGCCCC  
GTGACCAAGTCTTTCAACCGGGGCGAATGTGGCGGCGGAGGATC  
TGGCGGAGGCGGCTCTGCTTCTCACGTGAAGCTGCAGGAAAGCG  
GCCCTGGACTGGTGCAGCCTTCCCAGTCTCTGTCCCTGACCTGCA  
CCGTGTCCGGCTTCTCCCTGACCGATTACGGCGTGCACTGGGTG

CGACAGTCTCCAGGCAAGGGCCTGGAATGGCTGGGAGTGATTTG  
GAGCGGTGGCGGAACCGCCTACAACACCGCCCTGATCTCCCGGC  
TGAACATCTACCGGGACAACCTCCAAGAACCAGGTGTTCTGGA  
ATGAACTCCCTGCAGGCAGAGGACACCGCCATGTACTACTGCGC  
CAGACGGGGCTCCTACCCCTACAACCTACTTCGACGCTTGGGGCT  
GCGGCACCACCGTGACAGTGTCTAGCGGAGGTGGTGGATCTGGG  
GGCGGAGGTAGCGGAGGGGGAGGTTCTCAGGCTGTCTGTGATCC  
AGGAATCTGCCCTGACCACCCCCCTGGCGAGACAGTGACACTG  
ACCTGCGGATCTTCCACCGGCGCTGTGACCGCCTCCAACCTACGC  
CAACTGGGTGCAGGAAAAGCCCGACCACTGCTTCACCGGCCTGA  
TCGGCGGCCACAACAACAGACCTCCAGGCGTGCCAGCCCGGTTC  
TCCGGCTCTCTGATCGGAGATAAGGCCGCCCTGACAATCGCCGG  
CACCCAGACAGAGGACGAGGCTATCTACTTCTGCGCCCTGTGGT  
ACAGCGACCACTGGGTCATCGGCGGAGGCACCAGACTGACCGT  
GCTGGGATAG (SEQ ID NO:1)

huA33-C825 轻链氨基酸

[0286]

MGWSCIILFLVATATGDIQMTQSPSSLSVSVGDRVTITCKASQNVRTVV  
AWYQQKPGAPKTLIYLASNRHTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLPEDI  
ATYFCQQHWSYPLTFGQGTKVEVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS  
VVCLLNPFYPRKAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLS  
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC**GGGGSGG**  
**GG****SASHVKLQESGPGLVQPSQSLTCTVSGFSLTDYGVHWVRQSPGK**  
**GLEWLGVWSGGGTAYNTALISRLNIYRDN****SKNQVFLEMNSLQAEDTAM**  
**YYCARRGSYPNYFDAWGCGT****TVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQAVV**  
**IQESAL****TPPG****ETVTLTCGSSTGAVTASNYANWVQEKPDHCFTGLIGGH**  
**NNRPPGVPARFSGSLIGDKAAL****TIAGTQTEDEAIYFCALWYSDHWVIGG**  
**GTRLTVLG** (SEQ ID NO:2)

huA33-huC825 轻链氨基酸 (15aa 接头)

MGWSCIILFLVATATGDIQMTQSPSSLSVSVGDRVTITCKASQNVRTVV  
AWYQQKPGAPKTLIYLASNRHTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLPEDI  
ATYFCQQHWSYPLTFGQGTKVEVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS  
VVCLLNPFYPRKAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLS  
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC**TSGGGGS**  
**GGGGSGGGGSHVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFS****SLTDYGVHW**  
**VRQAPGKGLEWLGVWSGGGTAYNTALISRFTISRDNSKNTLYLQMNSL**  
**RAEDTAVYYCARRGSYPNYFDAWGCGT****LVTVSSGGGGSGGGGSGG**  
**GG****SQAVVTQEP****SLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTASNYANWVQQKPGQC**  
**PRGLIGGHNNRPPGVPARFSGSLLGGKAAL****TLLGAQPEDEAEYYCALW**  
**YSDHWVIGGGTKLTVLG** (SEQ ID NO:3)

huA33-huC825 轻链氨基酸 (30aa 接头)

MGWSCIIFLVATATGDIQMTQSPSSLSVSVGDRVTITCKASQNVRTVV  
AWYQQK**PGLAPK**TLIYLASN**RHTGVPSR**FSGSGSGTDFTFTISSLQ**PEDI**  
ATYFCQQHWSYPLTFGQGTKVEVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS  
VVCLLN**NFY**P**REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK**DSTYSLS  
STLTLSKADY**EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR**GE**CTSGGGGS**  
**GGGGSGGGGSHVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFS**LT**DYGVHW**  
**VRQAPGKGLEWLGV**W**SGGGTAYNTALISRFTISRDNSKNTLYLQMNSL**  
**RAEDTAVYYCARRGSYPYNYFDAWGCGTLVTVSSGGGGSGGGGSGG**  
**GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQAVVTQEP**SLTVSPGGTVTLTCGSSTGA  
VTASNYANWVQQKPGQCP**RGLIGGHNNRPPGVPAR**FSGSLLGGKAALT  
LLGAQPEDEAEYYCALWYSDHWVIGGGTKLTVLG (SEQ ID NO:4)

huA33-C825 重链 IgG1 DNA (无糖基化)

[0287]

ATGGGCTGGTCCTGCATCATCCTGTTTCTGGTGGCTACCGCCACC  
GGCGAGGTGCAGCTGCTGGAATCTGGCGGAGGACTGGTGCAGC  
CTGGCGGCTCTCTGAGACTGTCTTGTGCCGCCTCTGGCTTCGCCT  
TCTCCACCTACGACATGTCCTGGGTGCGACAGGCTCCTGGCAAG  
GGCCTGGAATGGGTGGCCACAATCTCTTCCGGCGGCTCCTACAC  
CTACTACCTGGACTCTGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGG  
ACTCCTCCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGA**ACTCCCTGCAG**  
GCCGAGGACTCCGCCATCTACTACTGTGCCCC**TACCACCGTGGT**  
GCCCTTCGCTTATTGGGGCCAGGGCACCCTCGTGACCGTGTCCTC  
TGCTTCTACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTC  
CAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCA  
AGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGA**ACTCAGGC**  
GCCCTGACCAGCGGCGTGACACACCTTCCCGGCCGTCCTACAGTC  
CTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTG**GGTGACCGTGCCCTCCA**  
GCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAG  
CCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTT  
GTGACAAA**ACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTC**  
CTGGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCC**CAAACCCAAGGA**  
CACCC**TCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTG**GTGG  
TGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCA**ACTGGTAC**  
GTGGACGGCGTGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGG  
AGGAGCAGTACGCCAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACC  
GTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCA  
AGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATC  
TCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCC  
TGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTG



ACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGA  
GTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACG  
CCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAG  
CTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTC  
ATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGA  
AGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA (SEQ ID NO:5)

huA33-C825 重链 IgG1 氨基酸 (无糖基化)

[0288] MGWSCIIILFLVATATGEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSTY  
DMSWVRQAPGKGLEWVATISSGGSYTYLLDSVKGRFTISRDSKNTLYL  
QMNSLQAEDSAIYYCAPTTVVPFAYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAP  
SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS  
SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK  
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE  
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDW  
LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK  
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL  
YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK  
(SEQ ID NO:6)

huA33-C825 重链 IgG1 氨基酸 (无糖基化, K322A)

MGWSCIIILFLVATATGEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSTY  
DMSWVRQAPGKGLEWVATISSGGSYTYLLDSVKGRFTISRDSKNTLYL  
QMNSLQAEDSAIYYCAPTTVVPFAYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAP  
SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS  
SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK  
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE  
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDW  
LNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK  
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL  
YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK  
(SEQ ID NO:7)

[0289] 表面等离子共振研究

[0290] Biocore T100 Biosensor, CM5传感器芯片及相关试剂均购自GE Healthcare。重组人A33蛋白购自Novoprotein。根据Cheal等人,同上,所述制备BSA-(Y)-DOTA-Bn缀合物。使用Amino Coupling试剂盒(GE Healthcare)固定A33和DOTA抗原。分析纯化的双特异性抗体和对照抗体,并使用如Cheal等人,同上,所述的Biacore T100评估软件将数据与二价分析物模型拟合。

[0291] PRIT试剂,方案和移植瘤研究

[0292] 所有动物实验均获得了斯洛伐克纪念癌症中心纪念机构动物保护和使用委员会的批准,并在研究中对动物进行适当和人道的使用的制度指导。无胸腺nu/nu雌性小鼠(6-8周龄;Harlan Sprague Dawley)在动物饲养室中适应至少一周。动物组在左侧经s.c.注射A33阳性SW1222,  $5 \times 10^6$  细胞,按1:1用Matrigel(BD Biosciences)配制,并在7-10天内观察

到建立的肿瘤(100-900mm<sup>2</sup>),使用椭圆体积 $V=4/3\pi$ (长度/2×宽度/2×高度/2)。所有试剂经静脉内(i.v.)通过侧尾静脉给药。PRIT方案包括注射:huA33-C825[t=-28h],随后24h后CA(CA是根据Orcutt等(2011)制备的500KDa葡聚糖-(Y)-DOTA-Bn缀合物),Nucl.Med.Biol.38:223-233)并配制在注射用盐水中;(Y)-DOTA-Bn/摩尔葡聚糖的摩尔数取代率为61(Y)-DOTA-Bn/葡聚糖[t=-4h]和<sup>177</sup>Lu-DOTA-Bn(如先前描述,通过温育来自Macrocyclics的氨基苄基-DOTA(p-NH<sub>2</sub>-Bn-DOTA)和<sup>177</sup>LuCl<sub>3</sub>(比活度~30Ci/mg;Perkin Elmer)制备的,并配制在注射盐水中)4小时后[t=0小时]。此外,huA33-C825用I-131进行痕量放射性标记,以估计PRIT期间的肿瘤摄取。使用IODOGEN方法(Cheal, S.等,2014, Mol.Cancer Ther.13(7):1-10)制备<sup>131</sup>I-huA33-C825(最终比活性为95.5MBq/mg,与冷huA33-C825加入以达到所需的mg剂量,使用大小排阻高压液相色谱的放射化学纯度>98%),并且使用基本上如Lindmo方法所述的SW1222细胞评价体外细胞结合免疫反应性。(Lindmo, T.等人,1990, J.Immunol.Meth.126(2):183-189)。对于具有非特异性IgG-C825的PRIT,使用等效的mg剂量的GD2靶向双特异性抗体(hu3F8-C825)代替huA33-C825。对于离体生物分布分析,将小鼠通过CO<sub>2</sub>(g)窒息进行安乐死,并收获肿瘤和选定的器官,用水冲洗,并通过γ闪烁计数(Perkin Elmer Wallac Wizard 3<sup>™</sup>)进行空气干燥,称重和放射分析。计数率是背景和衰减校正,转换为使用系统校准因子的活性,归一化为施用的活性,并表示为每克注射剂量(%ID/g)。通过学生不配对t检验分析肿瘤和各种组织中<sup>177</sup>Lu活性浓度的差异。

#### [0293] 吸收剂量的估计

[0294] 给予A33阳性SW1222荷瘤小鼠组(n=4-5)0.25mg huA33-C825,CA(62.5μg;25%(w/w))和1.85-2.0MBq(~10pmol)<sup>177</sup>Lu-DOTA-Bn,并在2,24和120小时下处死。对于每个组织,使用Excel将非衰变校正的时间-活度浓度数据合适地适合于1-组分,2-组分或更复杂的指数函数,并且分析地整合以产生每单位给药的累积活性浓度活性(MBq-h/g/MBq)。使用非穿透性辐射的<sup>177</sup>Lu平衡剂量常数(8.49g-cGy/MBq-h)来估计肿瘤对肿瘤并选择器官对器官的自身吸收剂量,假定<sup>177</sup>Lu beta的完全局部吸收并且忽略伽马射线和非自身剂量的贡献。为了确定<sup>177</sup>Lu-DOTA-Bn剂量对<sup>177</sup>Lu-DOTA-Bn在肿瘤中的相对摄取和选择具有最高吸收剂量(即血液,肝脏,脾脏和肾脏)的组合的影响,SW1222肿瘤-在t=-28小时时,给予雌性无胸腺裸鼠(n=5/组)0.25mg(1.19nmol)的huA33-C825,t=-4h给予62.5μg的CA,随后用11.1MBq(11.14-11.40),55.5MBq(54.61-55.06MBq)或111MBq(109.52-112.5MBq)处理。所有组均在24h p.i.<sup>177</sup>Lu-DOTA-Bn(即最大肿瘤摄取时间)处死,用于<sup>177</sup>Lu活性的生物分布分析。

#### [0295] PRIT+<sup>86</sup>Y-DOTA-Bn的PET成像

[0296] 在携带A33阳性SW1222肿瘤的单一小鼠组(n=5)的肩膀给予0.25mg huA33-C825,CA(62.5μg;25%(w/w))和8.6-8.8MBq(~50pmol)<sup>86</sup>Y-DOTA-Bn,并使用microPET Focus 120(CTI Molecular Imaging, Inc.Noxx, TN)在大约2和20h下非侵入成像。使用以下成像采集参数:能量窗口为350-750keV,符合定时窗口为6nsec,采集时间为20min。通过傅里叶重新分类和通过滤波反投影重建为128×128×95矩阵(重建的空间分辨率为2.6mm全宽半最大值(FWHM))的横向图像,将得到的列表模式数据分类为2D直方图。校正扫描仪响应不均匀,死时间计数损失,物理衰减(注射时间)和<sup>86</sup>Y正电子分支比的图像数据。没有应用衰减,散射

或部分体积平均校正。使用经验确定的小鼠系统校准因子(即 $\mu\text{Ci}/\text{mL}/\text{cps}/\text{体素}$ )将体素计数率转化为活性浓度。然后将所得图像数据归一化为施用的活性,以通过感兴趣区域分析来确定用于放射性衰变校正的组织的注射剂量/注射剂量( $\% \text{ID}/\text{g}$ )与注射时间的百分比。使用AsiPRO VM 5.0软件(Concorde Microsystems,Knoxville,TN)进行图像和感兴趣区域(ROI)分析(作为ROI最大值, $\% \text{ID}/\text{g}$ )。动物在24h p.i.处死。用于离体生物分布分析。

[0297] 放射自显影和免疫组织化学

[0298] 来自选择的经以下处理小鼠的冷冻和OCT嵌入的肿瘤和肾:给予huA33-C825 PRIT,然后用11.1 (11.14-11.40),55.5 (54.61-55.06)或111MBq (109.52-112.5MBq)  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Bn(杀死时间:24小时p.i.),使用低温恒温器(Avantik,Springfield,NJ)将其切成10  $\mu\text{m}$ 切片,并立即暴露于成像板(Fuji Photo Film,Kanagawa,Japan)72小时,随后用Typhoon FLA 7000扫描仪(GE,Pittsburg,PA)。相同的部分进行苏木精和伊红染色,并在装有受控移动台(Olympus,Central Valley,PA)的Olympus BX60显微镜下进行扫描。使用ImageJ (NIH)对放射自显影图像和显微镜图像进行处理和分析。

[0299] 治疗和闪烁扫描研究

[0300] 携带建立A33阳性SW1222移植瘤的小鼠的小组,注射huA33-C825或非特异性(n.s.) IgG-C825 PRIT(即单周期治疗,肿瘤接种后第7天的 $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Bn注射)或两个PRIT循环(即双周期治疗研究,肿瘤接种后第10天和第17天给予 $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Bn注射)。对于双周期治疗研究,描述了肿瘤接种后10天( $\text{TV}_{10}$ )的肿瘤体积(即,首次 $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Bn注射的日期),并且在适当时表达为平均值 $\pm$ SD。使用以下定义来描述治疗反应:完全缓解(CR)定义为肿瘤缩小至 $<100\text{mm}^3$ 。持续应答(DR)被定义为治疗后140天的存活。肿瘤负担过大定义为 $>2000\text{mm}^3$ 。对于闪烁扫描研究,将选择的经过治疗的A33阳性SW1222荷瘤小鼠组在气管吸入下置于麻醉下,然后在20分钟时间内在nanoSPECT(Bioscan,Washington D.C.)中扫描。使用低能量高分辨率准直器和设置为208keV的窗口30分钟(每图像约105个计数)。使用Bioscan HiSPECT软件将图像重建为 $256 \times 256$ 矩阵,并将其上传到ASIPro VM进行分析。

[0301] 等同

[0302] 在权利要求中使用诸如“第一”,“第二”,“第三”等的顺序术语来修改权利要求元素本身并不意味着一个权利要求要素相对于另一个的任何优先级,优先级或顺序或方法的动作的时间顺序,而仅仅被用作标签,以将具有某个名称的一个权利要求要素与具有相同名称的另一元素(而用于序数项)区分开来,以区分权利要求要素。

[0303] 在说明书和权利要求书中使用的“一个”和“一种”除非明确指出相反的含义,应理解为包括多个对象。如果在给定的产品或过程中存在一个、多于一个或所有组成员,受雇于或以其他方式相关,则认为在权利要求和说明书中在在组中的一个或多个成员之间包括“或”的关系,除非指定相反的情况或从上下文中显而易见。本发明包括其中该组的正好一个成员在给定的产品或过程中存在,应用于或以其他方式相关的实施例。本发明还包括其中多于一个或整个组成员存在于,用于或以其他方式与给定产品或过程相关的实施例。此外,应当理解,本发明包括所有变化,组合和排列,其中来自所列权利要求中的一个或多个的一个或多个限制,要素,条款,描述性条款等被引入另一权利要求中,这取决于除非另有说明,否则除非本领域普通技术人员显而易见,矛盾或不一致会导致相同的基础权利要求(或相关的任何其他权利要求)。在将元素表示为列表的情况下(例如,以马库什组或类似格

式),应当理解,还公开了每个子组的元素,并且可以从组中移除任何元素。应当理解,一般而言,在本发明或本发明的方面被称为包括特定元件,特征等的情况下,本发明的某些实施例或本发明的方面包括或基本上由,这样的元件,特征等。为了简单起见,这些实施例在每种情况下都没有以这么多话来具体阐述。还应当理解,本发明的任何实施方案或方面可以明确地从权利要求中排除,而不管该具体排除是否在说明书中列举。本文引用的用于描述本发明的背景和提供关于其实践的附加细节的出版物,网站和其它参考资料通过引用并入本文。

[0304] 已经描述了本发明的至少一个实施例的几个方面,应当理解,各种改变,修改和改进对于本领域技术人员将是显而易见的。这种改变,修改和改进旨在成为本公开的一部分,并且旨在在本发明的精神和范围内。因此,上述说明和附图仅作为示例,本发明由所附权利要求书详细描述。

[0305] 参考文献

[0306] Ackerman,M.E.et al.,2008,A33 antigen displays persistent surface expression,Cancer Immunol.Immunother.57 (7):1017-1027.

[0307] Ackerman,M.E.et al.,2008,Effect of antigen turnover rate and expression level on antibody penetration into tumor spheroids,Mol.Cancer Ther.7 (7):2233-2240.

[0308] Barendswaard,E.C.et al.,1998,Rapid and specific targeting of monoclonal antibody A33 to a colon cancer xenograft in nude mice,International J.Oncol.12:45-53.

[0309] Carrasquillo,J.A.et al.,2011,<sup>124</sup>I-huA33 Antibody PET of Colorectal Cancer,J.Nucl.Med.52:1173-1180.

[0310] Cheal,S.M.et al.,2014,Preclinical Evaluation of Multistep Targeting of Diasialoganglioside GD2 Using an IgG-scFv Bispecific Antibody with High Affinity for GD2 and DOTA Metal Complex,Mol.Cancer Ther.13 (7):1-10.

[0311] Cheal,S.M.et al.,2014,Evaluation of glycodendron and synthetically-modified dextran clearing agents for mult-step targeting of radioisotopes for molecular imaging and radioimmunotherapy,Mol.Pharm.11 (2):400-416.

[0312] El Emir,E.et al.,2007,Predicting Response to Radioimmunotherapy from the Tumor

[0313] Microenvironment of Colorectal Carcinomas,Cancer Res.67 (24):11896-11905.

[0314] Goodwin,D.A.et al.,1994,Pharmacokinetics of pretargeted monoclonal antibody 2D12.5 and <sup>88</sup>Y-Janus-2-(p-nitrobenzyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane tetraacetic acid (DOTA) in BALB/c mice with KHJJ mouse adenocarcinoma:a model for <sup>90</sup>Y radioimmunotherapy,Cancer Res.54 (22):5937-5946.

[0315] King,D.J.et al.,1995,Preparation and preclinical evaluation of humanised a33 immunoconjugates for radioimmunotherapy,British J.Cancer 72:1364-1372.

- [0316] Lindmo,T.et al.,1990,Immunometric assay by flow cytometry using mixtures of two particle types of different affinity,J.Immunol.Meth.126(2):183-189.
- [0317] Orcutt,K.D.et al.,2010,A modular IgG-scFv bispecific antibody topology,Protein Engineering Design&Selection 23(4):221-228.
- [0318] Orcutt,K.D.et al.,2011,Engineering an antibody with picomolar affinity to DOTA
- [0319] chelates of multiple radionuclides for pretargeted radioimmunotherapy and imaging,Nucl.Med.Biol.38(2):223-233.
- [0320] O'Donoghue,J.A.et al.,2011,<sup>124</sup>I-huA33 antibody uptake is driven by a33 antigen concentration in tissues from colorectal cancer patients imaged by immuno-pet.J.Nucl.Med.52:1878-1885.
- [0321] Scott,A.M.et al.,2005,A phase I trial of humanized monoclonal antibody A33 in patients with colorectal carcinoma:biodistribution, pharmacokinetics,and quantitative tumor uptake,Clin.Cancer Res.11(13):4810-4817.
- [0322] Welt,S.et al.,1994,Phase I/II study of iodine 131-labeled monoclonal antibody A33 in patients with advanced colon cancer,J.Clin.Oncol.12(8):1561-71.
- [0323] Welt,S.et al.,2003,Phase I study of anticolon cancer humanized antibody A33,Clin.Cancer Res.9:1338-1346.

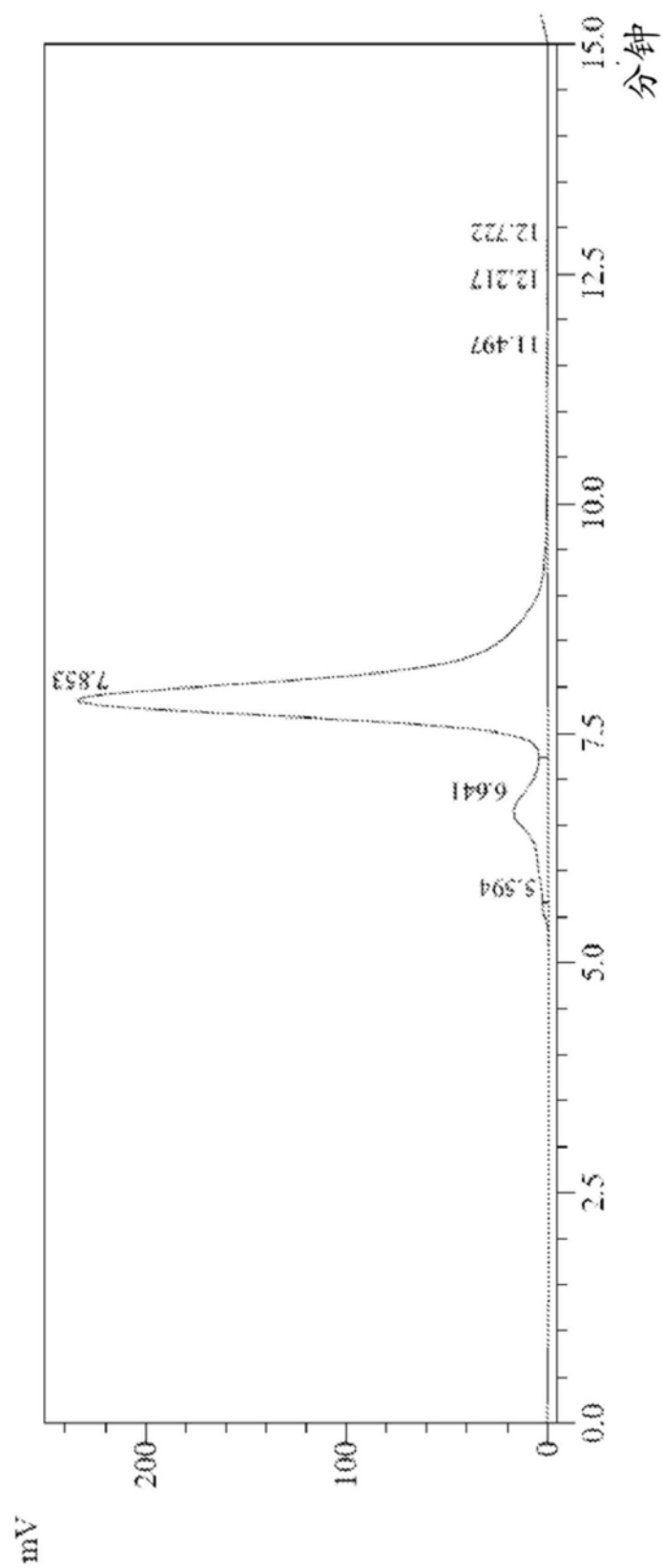


图1

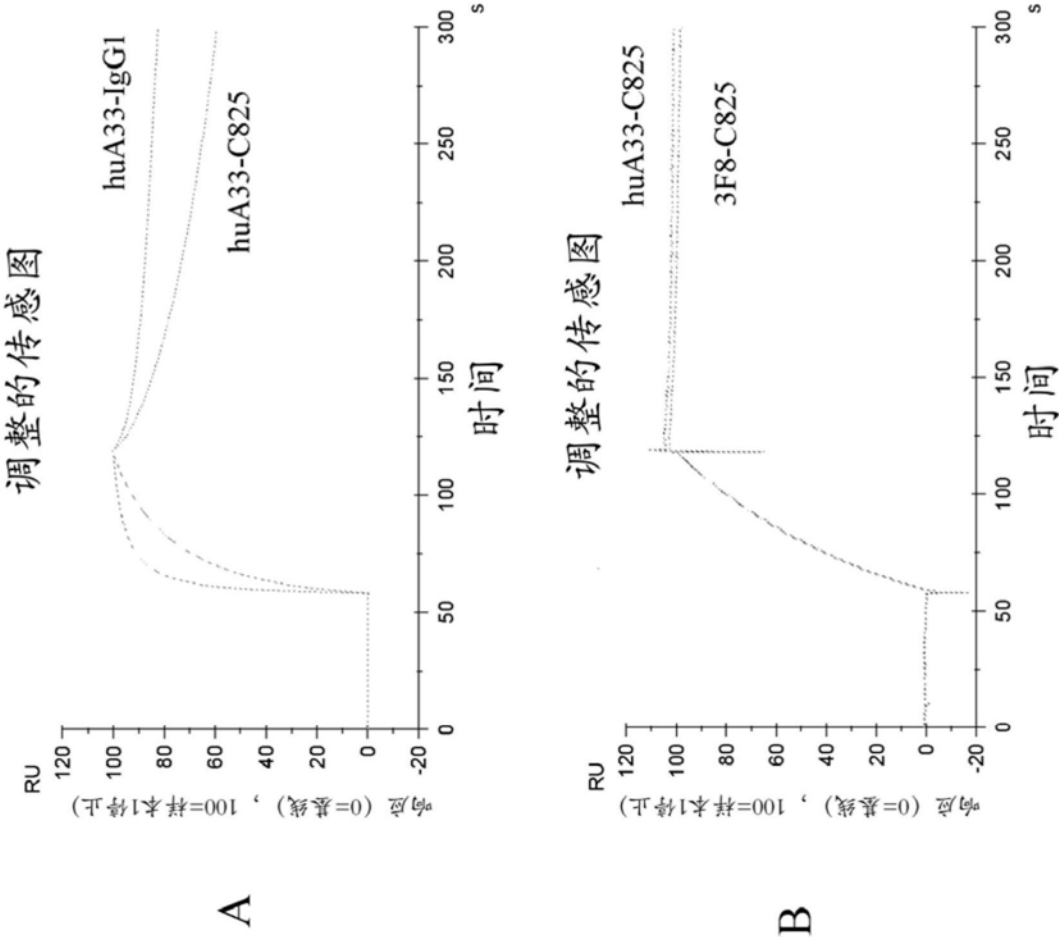


图2

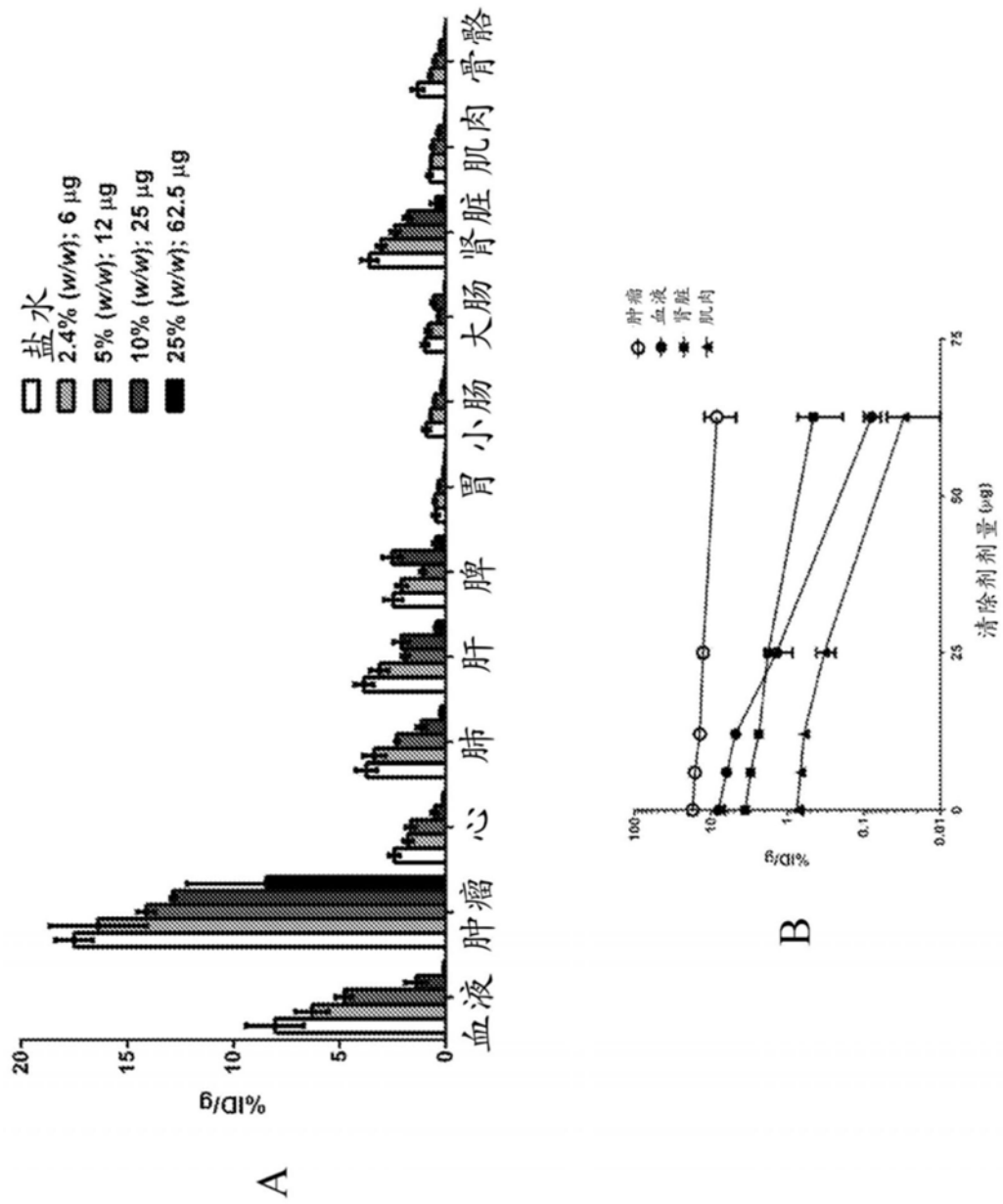


图3A和3B



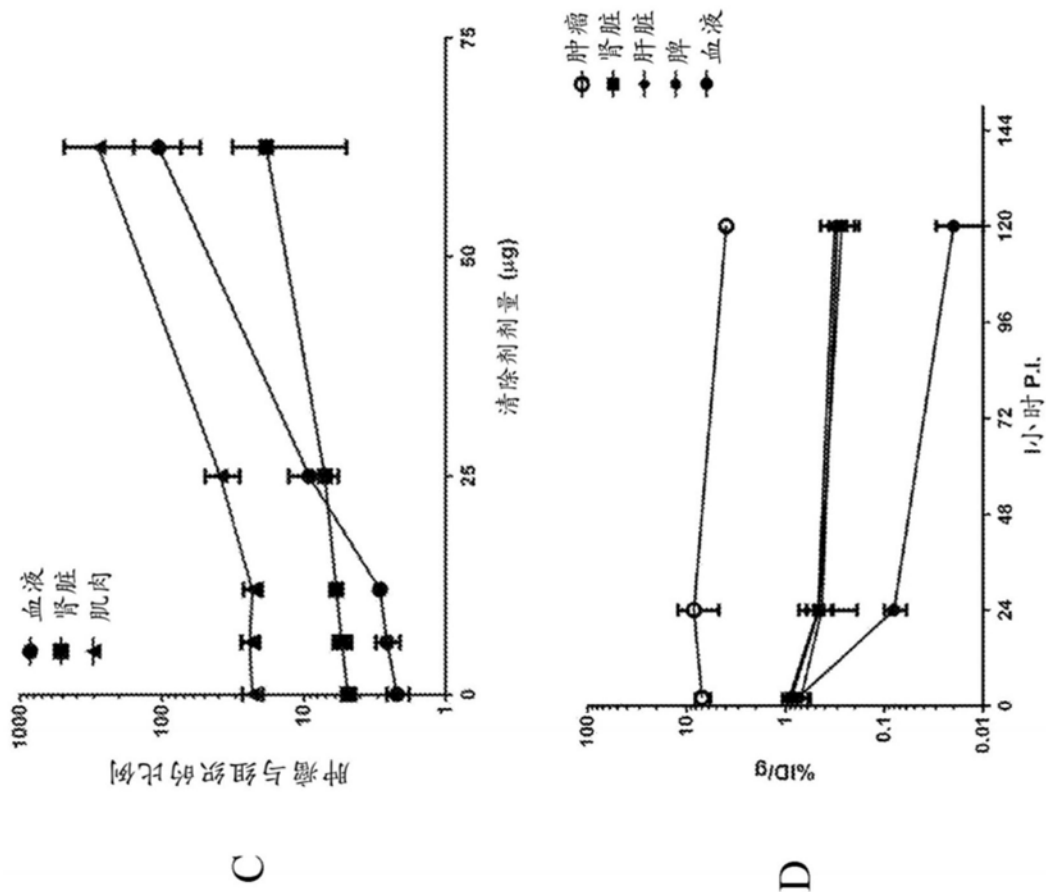


图3C和3D

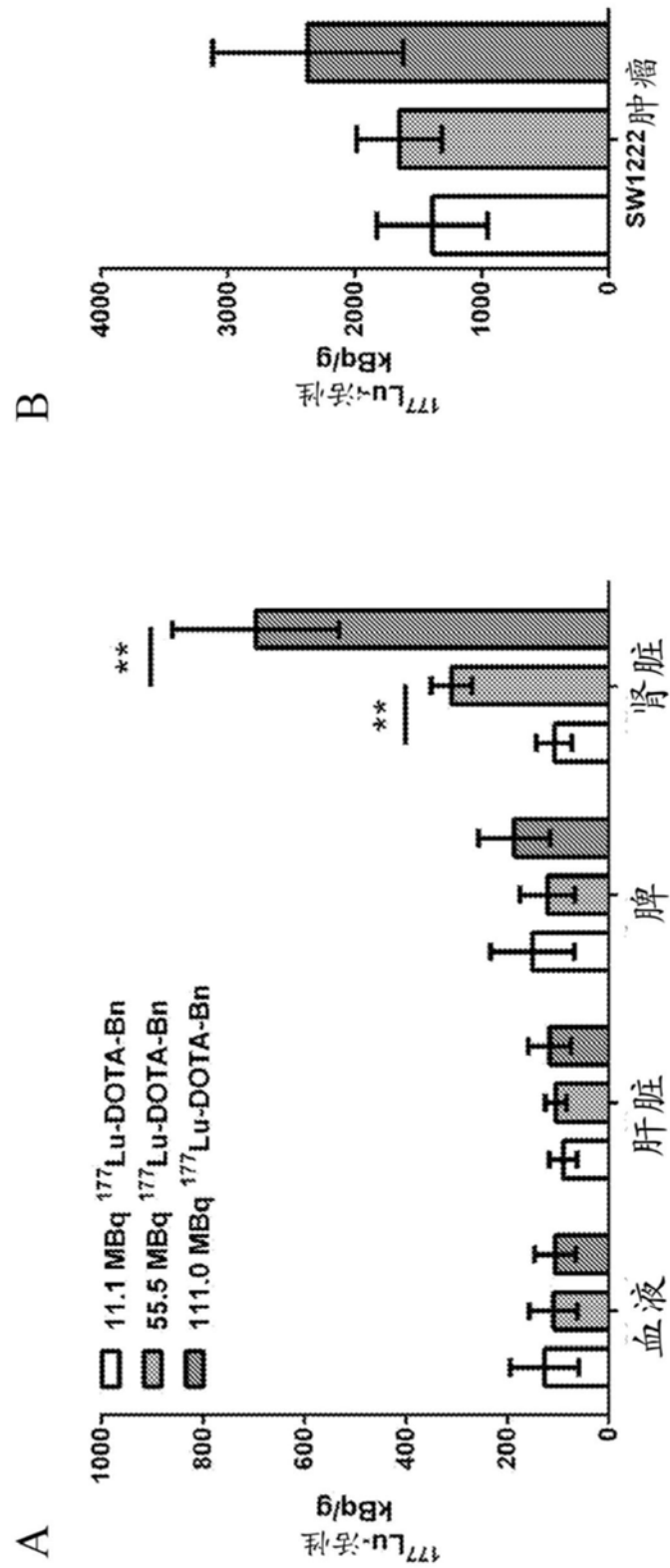


图4A和4B

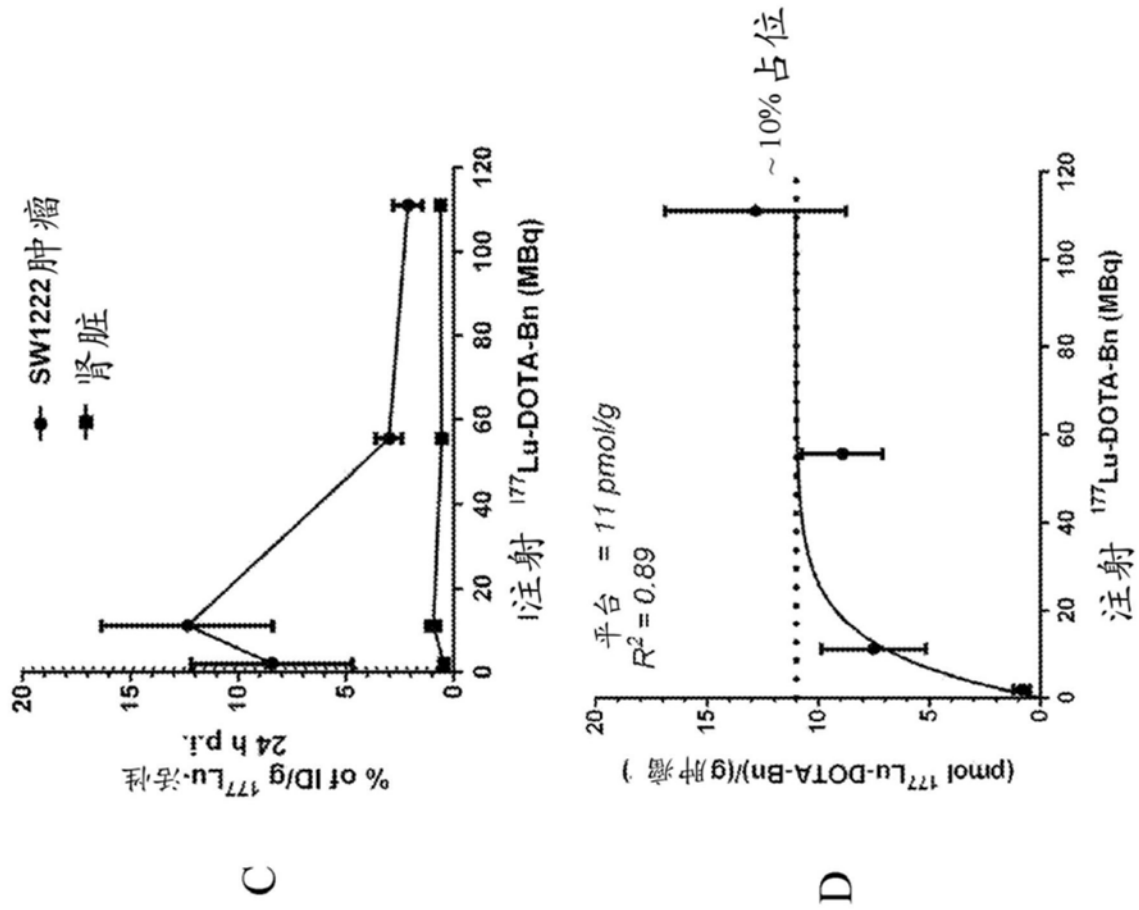


图4C和4D

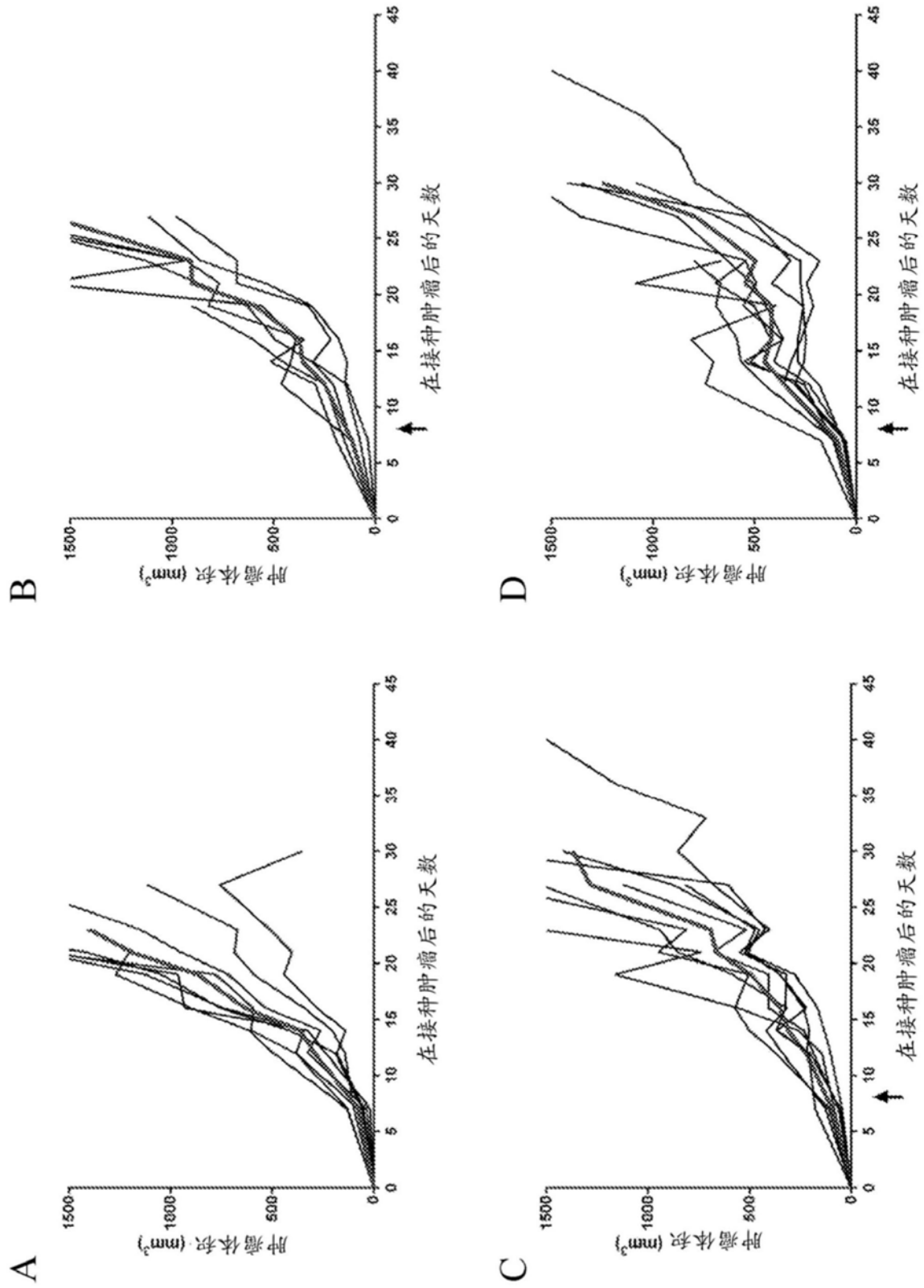


图5

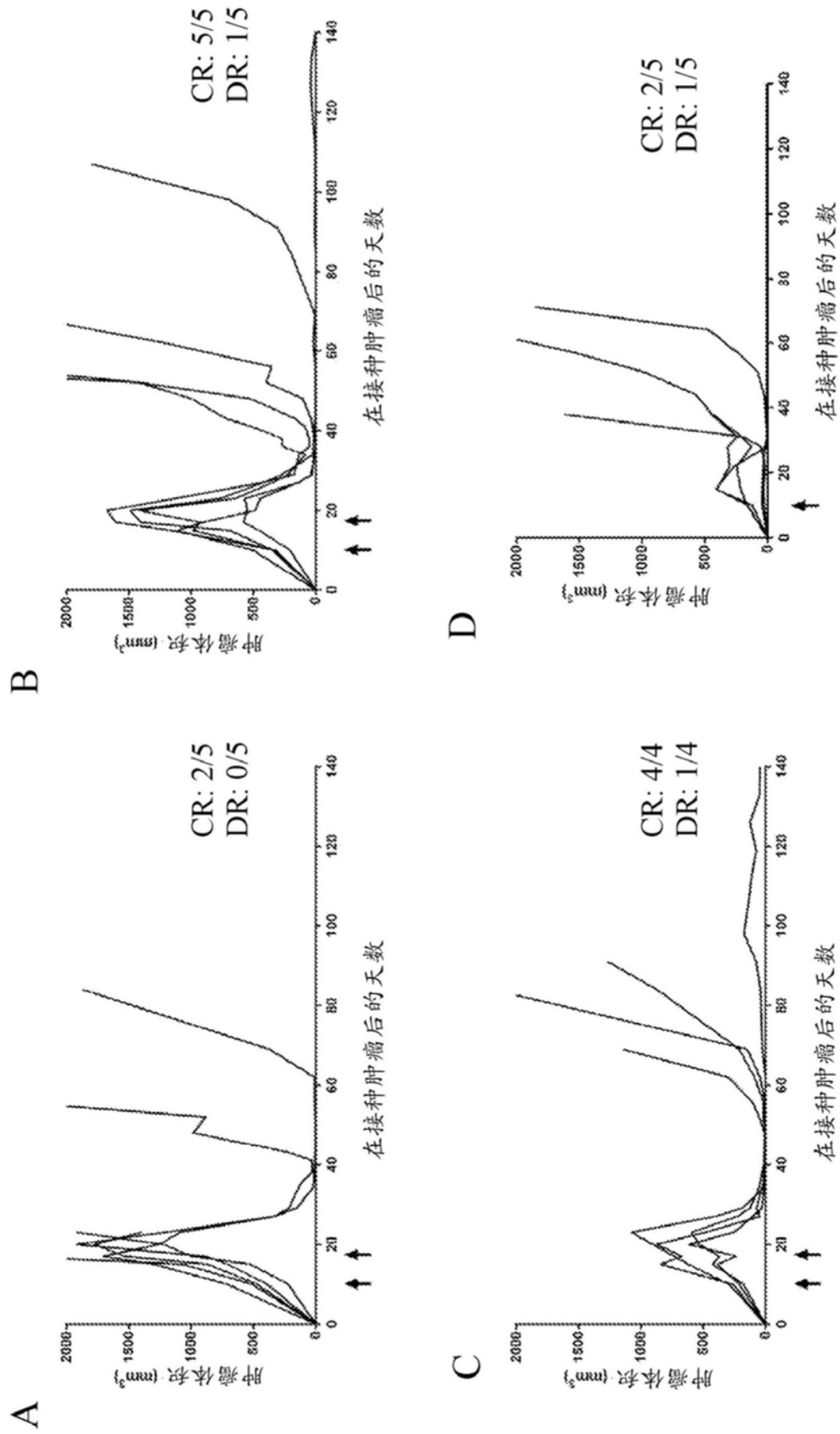


图6

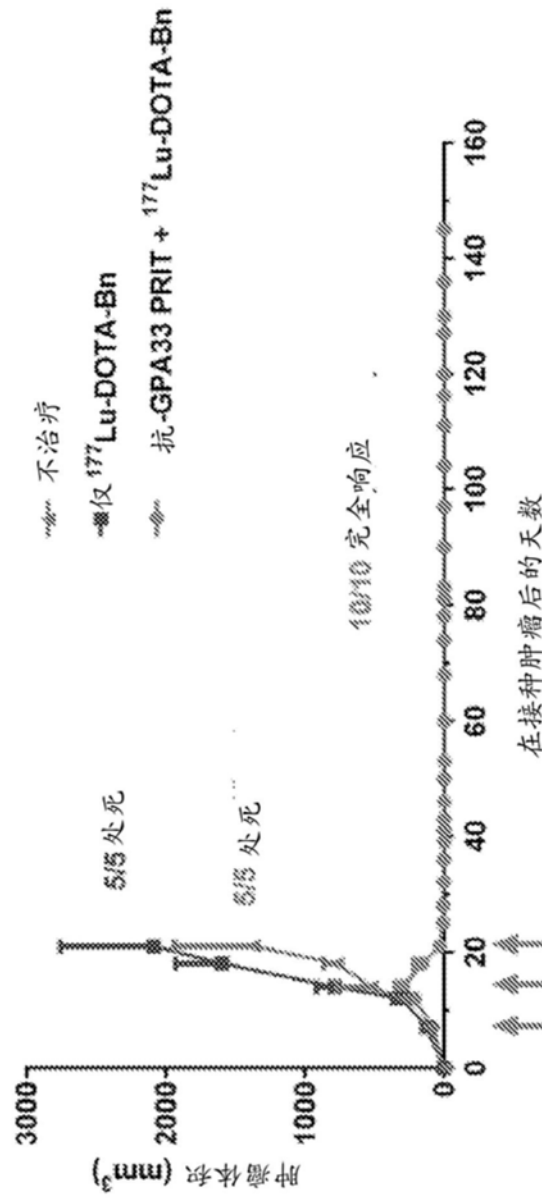


图7

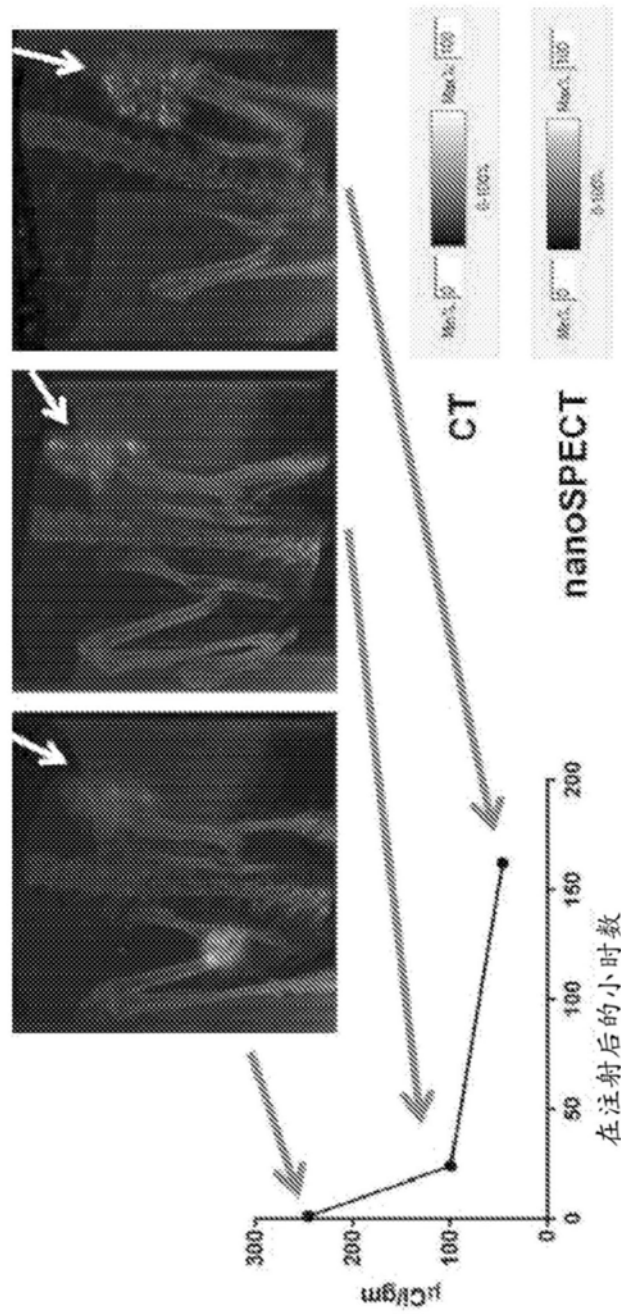


图8