



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105085681 A

(43) 申请公布日 2015. 11. 25

(21) 申请号 201510333807. 1

(22) 申请日 2010. 12. 02

(30) 优先权数据

61/266, 134 2009. 12. 02 US

(62) 分案原申请数据

201080062988. 4 2010. 12. 02

(71) 申请人 伊麦吉纳博公司

地址 美国加利福尼亚

(72) 发明人 D·何 T·奥拉夫森 A·李普曼

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司
11245

代理人 赵蓉民

(51) Int. Cl.

C07K 16/30(2006. 01)

C12N 15/13(2006. 01)

权利要求书1页 说明书23页

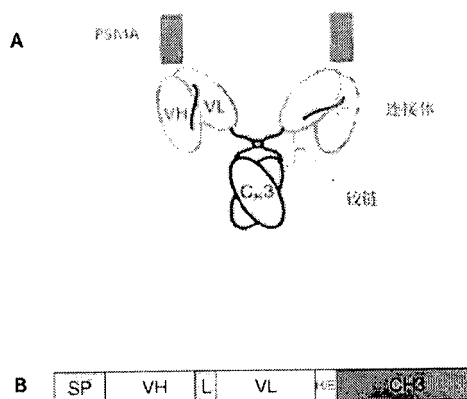
序列表14页 附图25页

(54) 发明名称

靶向人前列腺特异性膜抗原的 J591 微抗体和双抗体

(57) 摘要

在一个实施方式中, 提供了结合 PSMA 的微抗体单体。微抗体单体由核苷酸序列编码, 该核苷酸序列自 N 端至 C 端包含可结合 PSMA 的 scFv 序列、人 T 铰链序列和人 IgG CH3 序列。在另一实施方式中, 提供了结合 PSMA 的 CysDB 单体。CysDB 单体可由核苷酸序列编码, 该核苷酸序列自 N 端至 C 端包含可结合 PSMA 的 scFv 序列和半胱氨酸尾部。在其他实施方式中, 提供了诊断或治疗个体中与 PSMA 表达有关的癌症的方法。



1. 微抗体, 由核苷酸序列编码, 所述核苷酸序列自 N 端至 C 端包含 :
scFv 序列, 所述 scFv 序列能够结合前列腺特异性膜抗原 (PSMA), 所述 scFv 包含通过连接序列连接到轻链可变区 (VL) 的重链可变区 (VH) ;
人工铰链序列 ; 和
人 IgG CH3 序列。
2. 权利要求 1 所述的微抗体, 进一步包含 N 端信号序列, 从而在细胞中表达时能分泌所述微抗体。
3. 权利要求 1 所述的微抗体, 其中所述 scFv 为 VHVL 方向, 以使所述 VH 在所述 VL 的上游。
4. 权利要求 3 所述的微抗体, 其中所述核苷酸序列包含 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2。
5. 权利要求 1 所述的微抗体, 其中所述 scFv 为 VLVH 方向, 以使所述 VL 在所述 VH 的上游。
6. 权利要求 1 所述的微抗体, 其中所述核苷酸序列在由细胞表达时生成氨基酸序列, 并且其中所述氨基酸序列包含 SEQIDNO:10 或 SEQIDNO:11。
7. cys- 双抗体 (CysDB), 由核苷酸序列编码, 所述核苷酸序列自 N 端至 C 端包含 :
scFv 序列, 所述 scFv 序列能够结合 PSMA, 所述 scFv 包含通过连接序列连接到轻链可变区 (VL) 的重链可变区 (VH) ; 和
半胱氨酸尾部。
8. 权利要求 7 所述的 CysDB, 进一步包含 N 端信号序列, 从而在细胞中表达时能分泌 CysDB。
9. 权利要求 7 所述的 CysDB, 其中所述 scFv 为 VHVL 方向, 以使所述 VH 在所述 VL 的上游。
10. 权利要求 9 所述的 CysDB, 其中所述核苷酸序列包含 SEQIDNO:6 或 SEQIDNO:7。

靶向人前列腺特异性膜抗原的 J591 微抗体和双抗体

[0001] 本申请是申请日为 2010 年 12 月 2 日、申请号为 201080062988.4、题为“靶向人前列腺特异性膜抗原的 J591 微抗体和双抗体”的专利申请的分案申请。

[0002] 关于联邦政府资助的研究的声明

[0003] 本发明是以政府资助在由国家癌症研究所 (NCI) 给予的合约编号 HHSN261200900051C 下进行的。政府拥有本发明的一定权利。

[0004] 优先权要求

[0005] 本申请要求享有 2009 年 12 月 2 日提交的美国临时申请号 61/266,134 的权益,在此将其主题引入作为参考,如其在本文中被完整描述。

[0006] 背景

[0007] 抗体工程的进展已能开发具有不同药物动力学和结合性质的特征的多种抗体片段 (Wu et al 2005、Wu et al 2008、Wu et al 2009)。微抗体是特征在于分子量 (~80kD) 比全长抗体小同时保持对抗原的二价结合特性的抗体形式 (Hu et al 1996)。由于其较小的尺寸,微抗体的特征在于从系统的更快清除和靶向肿瘤组织时的增强渗透。在强靶向结合迅速清除的能力下,微抗体是可用于诊断成像的优化抗体形式 (Wu et al 2005)。自从发现了抗肿瘤相关靶标 (tumor associated target) CEA 的第一个微抗体,已开发了许多用于临床前诊断成像的抗不同癌靶标的微抗体,包括乳腺癌中的人表皮生长因子受体-2 (HER2)、非何杰金氏淋巴瘤中的 B-淋巴细胞抗原 CD20 和前列腺癌中的前列腺干细胞抗原 (PSMA) (Hu et al 1996、Leyton et al 2008、Olafsen et al 2004、Olafsen et al 2009)。例如,已在临床中评价 ^{123}I 标记的 CEA 微抗体以用于通过 SPECT 使结直肠癌患者成像,并且已用 ^{111}In -DOTA 标记的微抗体进行了类似的研究 (Wong et al 2004)。新成像剂的开发对于用现有技术成像不佳的特定癌症如前列腺癌的诊断、控制和治疗是尤为至关重要的。

[0008] 需要开发全部癌症类型的成像剂从而能够靶向、分期和监测疾病。现有的前列腺癌诊断成像的方法仍相对不准确。对于 2006 年评估的 234,460 例新病例和 27,350 例死亡,需要能够准确诊断、分期和监测前列腺癌的成像剂 (Olson et al 2007)。

[0009] 前列腺特异性膜抗原 (PSMA)——与前列腺癌有关的细胞表面生物标记 (Slovin 2005),是具有谷氨酸羧肽酶活性的单通道 II 型跨膜蛋白,虽然对 PSMA 的功能性作用并不十分了解 (Olson et al 2007)。PSMA 的表达在前列腺之外的正常组织,包括脑、小肠、肝、近端肾小管和唾液腺中相对有限 (Olson et al 2007)。

[0010] 前列腺癌中的 PSMA 表达随肿瘤的侵占性而增加,并在高级肿瘤、转移性损伤和不依赖于雄激素的疾病中最高 (Olson et al 2007)。因此,PSMA 是癌症生物标记——成像剂靶向的良好候选物。PSMA 表达也在多种非前列腺实体肿瘤的新血管系统中上调,该非前列腺实体肿瘤包括肺癌、结肠癌、乳腺癌、肾癌、肝癌和胰腺癌以及肉瘤和黑素瘤 (Olson et al 2007)。

[0011] 已开发了靶向 PSMA 的全长抗体,其中一些处于临床前和临床发展的不同阶段 (Olson et al 2007)。PSMA 最初由鼠抗体 (mAb) 7E11 限定,该鼠抗体 (mAb) 7E11 识别 PSMA 的胞内表位 (Olson et al 2007)。后来 7E11mAb 发展为 FDA 批准的 SPECT 成像剂,称为

Prostascint,用于在软组织中检测和成像前列腺癌 (Olson et al 2007)。但是,由于 7E11 识别胞内表位, Prostascint 是相对弱的成像剂,其被限于检测坏死的肿瘤组织 (Olson et al 2007)。Prostascint 具有全长抗体的药物动力学性质,在注射与成像之间也需要长的时间 (Olson et al 2007)。此外,Prostascint 是引起强免疫应答的鼠抗体,阻挠多次给药 (Olson et al 2007)。

[0012] 另一种靶向 PSMA 的全长抗体——J591,被发现,并随后去免疫 (deimmunize),去免疫的形式称为 huJ591 (Liu et al 1997, Bander et al 2003)。去免疫的 huJ591 是抗人 PSMA 抗体,其识别和结合 PSMA 的胞外表位 (Bander et al 2003)。huJ591 抗体正被开发为针对前列腺癌的潜在放射免疫治疗剂。在 I 期试验中,用发射 γ 的同位素铟 111 和镱 177 标记的 DOTA 结合的 huJ591 抗体证实了优良地靶向转移部位、无免疫原性,并且良好地耐受多次给药 (Bander et al 2003, Milowsky et al 2004, Bander et al 2005, Olson et al 2007)。除前列腺癌外,¹¹¹In-DOTA huJ591 的 I 期研究证实了特异性靶向晚期实体肿瘤的肿瘤新血管系统 (Milowsky et al 2007)。

[0013] 概述

[0014] 在一个实施方式中,提供了结合 PSMA 的微抗体 (minibody)。根据该实施方式,微抗体由核苷酸序列编码,该核苷酸序列自 N 端至 C 端包含能够结合前列腺特异性膜抗原 (PSMA) 的 scFv 序列、人工铰合 (铰链) 序列和人 IgG1 CH3 序列。微抗体单体还可包含 N 端信号序列,从而在细胞中表达时能分泌微抗体。

[0015] 本文所述微抗体 scFv 包含通过连接序列连接至轻链可变区 (VL) 的重链可变区 (VH)。一方面,scFv 为 VHVL 方向,以使 VH 在 VL 的上游。具有这种 scFv 的微抗体单体可具有包含 SEQIDNO:1 或 SEQIDNO:2 的核苷酸序列。另一方面,scFv 为 VLVH 方向,以使 VL 在 VH 的上游。

[0016] 微抗体单体可由细胞表达。在这种实施方式中,由细胞表达的 CysDB 单体可包含氨基酸序列 SEQIDNO:10 或 SEQIDNO:11。

[0017] 在另一实施方式中,提供了结合 PSMA 的 cys- 双抗体 (diabody) (CysDB)。根据该实施方式,CysDB 单体由核苷酸序列编码,该核苷酸序列自 N 端至 C 端包含能够结合 PSMA 的 scFv 序列和半胱氨酸尾。CysDB 还可包括 N 端信号序列,从而在细胞中表达时能分泌微抗体。

[0018] 本文所述的 CysDB scFv 包含通过连接序列连接至轻链可变区 (VL) 的重链可变区 (VH)。一方面,scFv 为 VHVL 方向,以使 VH 在 VL 的上游。具有这种 scFv 的 CysDB 单体可具有包含 SEQIDNO:6 或 SEQIDNO:7 的核苷酸序列。另一方面,scFv 为 VLVH 方向,以使 VL 在 VH 的上游。具有这种 scFv 的 CysDB 单体可具有包含 SEQIDNO:8 或 SEQIDNO:9 的核苷酸序列。

[0019] CysDB 可由细胞表达。在一些实施方式中,由细胞表达的 CysDB 可包含氨基酸序列 SEQIDNO:12、SEQIDNO:13、SEQIDNO:14 或 SEQIDNO:15。

[0020] 在另一实施方式中,提供了诊断个体中与 PSMA 表达有关的癌症的方法。该方法包括向患有或疑患有 PSMA 表达有关的癌症的个体给予结合于 (缀合于) 诊断剂的抗 PSMA 微抗体或 cys- 双抗体;使个体暴露于成像方法以在体内显现被标记的微抗体或 cys- 双抗体;和当标记的微抗体或 cys- 双抗体定位于肿瘤部位时,确定个体患有与 PSMA 表达有关的癌

症。

[0021] 在另一实施方式中,提供了治疗个体中与 PSMA 表达有关的癌症的方法。该方法包括向个体给予治疗有效量的药物组合物,该组合物包含抗 PSMA 微抗体或抗 PSMA cys- 双抗体。一方面,抗 PSMA 微抗体或抗 PSMA cys- 双抗体结合至治疗剂。

[0022] 个体中与 PSMA 表达有关的癌症可以是肺癌、结直肠癌、乳腺癌、肾癌、肝癌、膀胱癌、胰腺癌或黑素瘤。

[0023] 可用于上述方法的微抗体可以是本文所述任何适当的微抗体,或可包含 SEQIDNO:10 或 SEQIDNO:11。可用于上述方法的 cys- 双抗体可以是本文所述任何适当的微抗体,或可包含 SEQIDNO:12、SEQIDNO:13、SEQIDNO:14 或 SEQIDNO:15。

[0024] 附图简述

[0025] 图 1A 是 J591 微抗体的示意图。该图显示了以 VHVL 方向结合目标 PSMA 的微抗体。

[0026] 图 1B 是 VHVL 方向 J591 微抗体的表达构建物的示意图。SP = 信号肽, VH - 重链可变区, VL - 轻链可变区, L - 18 氨基酸连接体, H / E - 人工铰链 / 延伸, CH3 来自人 IgG1。

[0027] 图 2 是去免疫 (第 3 行;SEQ ID NO:5;SEQ ID NO:19)、鼠 (第 2 行;SEQ ID NO:4;SEQ ID NO:18) 和人复合 (第 1 行;SEQ ID NO:3;SEQ ID NO:17) J591V 区氨基酸序列之间的比较。沿 HC 行 (第 1 行) 突出的残基表示 HC 与鼠 V 区之间的差异。沿去免疫行 (第 3 行) 突出的残基表示最初去免疫过程导致的去免疫 V 区与鼠 V 区之间的差异。两个星表示通过去免疫被引入的两个脯氨酸。

[0028] 图 3 是 J591 人复合 VHVL 微抗体核苷酸序列 (SEQ ID NO:1) 和经翻译的相应氨基酸序列 (SEQ ID NO:10)。

[0029] 图 4 是 J591 2P VHVL 微抗体核苷酸序列 (SEQ ID NO:2) 和经翻译的相应氨基酸序列 (SEQ ID NO:11)。

[0030] 图 5 是 cys- 双抗体 (CysDB) 的示意图 (A)、VLVH 方向 CysDB 的表达构建物的示意图 (B) 和 VHVL 方向 CysDB 的表达构建物的示意图 (C)。SS = 信号序列, VH = 重链可变区, VL = 轻链可变区, L 连接体 (可以是 5 或 8 个氨基酸), GGS = 半胱氨酸尾部 (Gly-Gly-Cys)。

[0031] 图 6 是 J591 cys- 双抗体 (CysDB) VH-5-VL 核苷酸序列 (SEQ ID NO:6) 和经翻译的相应氨基酸序列 (SEQ ID NO:12)。

[0032] 图 7 是 J591 cys- 双抗体 (CysDB) VH-8-VL 核苷酸序列 (SEQ ID NO:7) 和经翻译的相应氨基酸序列 (SEQ ID NO:13)。

[0033] 图 8 是 J591 cys- 双抗体 (CysDB) VL-5-VH 核苷酸序列 (SEQ ID NO:8) 和经翻译的相应氨基酸序列 (SEQ ID NO:14)。

[0034] 图 9 是 J591 cys- 双抗体 (CysDB) VL-8-VH 核苷酸序列 (SEQ ID NO:9) 和经翻译的相应氨基酸序列 (SEQ ID NO:15)。

[0035] 图 10 是 A、B、C 形式的 pcDNA 3.1/myc-His(-) 的载体图谱。来自 Invitrogen Corp. 的这种表达载体的特征在于用于哺乳动物表达的 CMV 启动子和用于选择的新霉素抗性。

[0036] 图 11 是确定 CHO-K1 细胞表达 J591 微抗体的代表性免疫印迹分析。第 1 泳道相应于分子量标记样本,第 2 泳道相应于空白载体样本,第 3 泳道相应于阳性对照微抗体样本,第 4 泳道相应于 J591 HC VLVH 样本,第 5 泳道相应于 J591 HC VHVL 样本,第 6 泳道相应于

J591 2P VLVH 样本,第 7 泳道相应于 J591 2P VHVL 样本。

[0037] 图 12A-D 是表示 J591 微抗体的流式细胞计量分析的图。柱状图将细胞计数相对于 PE 信号 (FL2-H) 作图。图 12A 显示了表示 J591 HC VLVH 微抗体的流式细胞计量分析的图,图 12B 显示了表示 J591 HC VHVL 微抗体的流式细胞计量分析的图,图 12C 显示了表示 J591 2P VLVH 微抗体的流式细胞计量分析的图,图 12D 显示了表示 J591 2P VHVL 微抗体的流式细胞计量分析的图。

[0038] 图 13 是纯化的 J591 微抗体的 SDS-PAGE 分析。纯化的 J591 微抗体蛋白在非还原条件 (第 1 列) 和还原条件 (第 2 列) 下被装载于 SDS-PAGE 凝胶上。凝胶用 GelCode Blue (Pierce, Thermo Scientific) 染色。微抗体以 1/5 稀释,以装载于凝胶上。

[0039] 图 14 是纯化的 J591 微抗体的尺寸排阻层析 (SEC) 分析。该图将 220nm UV 吸光度 (mAU) 相对于时间 (min) 作图。4 μ g J591 微抗体被装载于 TSK-GEL Super SW3000 柱上。使蛋白质分子量标准品也在柱上单独运行以提供参照。聚集体相对于微抗体蛋白 (在此被标记为单体) 的百分比通过计算曲线下的面积确定。

[0040] 图 15 通过 ELISA 示例了 J591 微抗体蛋白结合 PSMA。以 1 μ g/ml 的纯化重组 PSMA 蛋白包被 96 孔 ELISA 板。将纯化的 J591 微抗体蛋白 (1, ●) 以 2 μ g/ml 的初始浓度引入,并由第三稀释液连续稀释 10 倍。对阴性对照微抗体 (2, ■) 进行同样的稀释。样本各稀释重复三次进行,误差条表示标准偏差。最初温育后,用结合碱性磷酸酶的山羊抗人 IgG (Fc 特异的) 抗体检测结合的微抗体,并将其用 pNPP 溶液显像。在 405nm 下检测吸光度。

[0041] 图 16A-D 是表示流式细胞计量分析的图,示例了 J591 微抗体结合 PSMA+ 细胞系。所有柱状图将细胞计数相对于 PE 信号 (FL2-H) 作图。对 J591 微抗体蛋白和阴性对照微抗体 (1) 均以 20 μ g/ml 测试其结合 PSMA+ 细胞系 LNCaP (A 和 B) 和 CWR22rv1 (C 和 D)。细胞随后用二级抗人 IgG (Fc 特异的) -PE 结合的抗体染色。1 $\times 10^5$ 个细胞 / 点和以 5,000 事件 / 点进行分析。(A) J591 微抗体 (2) 结合 LNCaP 细胞 (B) J591-DOTA 微抗体 (2) 结合 LNCaP 细胞 (C) J591 微抗体 (2) 结合 CWR 细胞 (D) J591-DOTA 微抗体 (2) 结合 CWR 细胞。

[0042] 图 17 是显示 J591 微抗体在 LNCaP 细胞中内化的代表性图像。将 LNCaP 细胞在 12 孔板中聚 -d- 赖氨酸包被的盖玻片上铺平。生长 2 天后,将细胞在 4℃ 下预冷 30 分钟,然后用一级抗体或微抗体在 4℃ 下温育 30 分钟。在最初温育后的所示时间点,将细胞固定,透化,并用二级抗人 IgG-Alexa 488 染色。同时将盖玻片置于载玻片上,并在封固介质中用 DAPI 复染。用 63 $\times$ 油浸没透镜在 Leica SP2-1P-FCS 共焦显微镜上观察载玻片。

[0043] 图 18 是显示 J591 微抗体在 CWR22rv1 细胞中内化的代表性图像。将 CWR22rv1 细胞在 12 孔板中聚 -d- 赖氨酸包被的盖玻片上铺平。生长 2 天后,将细胞在 4℃ 下预冷 30 分钟,然后用一级抗体或微抗体在 4℃ 下温育 30 分钟。在最初温育后的所示时间点,将细胞固定,透化,并用二级抗人 IgG-Alexa 488 染色。同时将盖玻片置于载玻片上,并在封固介质中用 DAPI 复染。用 63 $\times$ 油浸没透镜在 Leica SP2-1P-FCS 共焦显微镜上观察载玻片。

[0044] 图 19 是示例 131 I 标记的 J591 微抗体和 111 In-DOTA 标记的 J591 微抗体的细胞相关放射活性的获取和保留的图。细胞相关放射活性在结合 CWR22rv1 细胞时随时间的获取和保留。细胞膜、细胞溶胞产物 (内化) 和所有 (膜 + 内化) 部分的放射活性表示为每分钟的计数 (cpm)。在实验前一天将 CWR22rv1 细胞接种于 24 孔板中,5 $\times 10^5$ 个细胞 / 孔。将细胞在 4℃ 下预冷,然后用过量 (A) 131 I 标记的 J591 微抗体或 (B) 111 In-DOTA 标记的 J591 微

抗体温育。在每个时间点,去除含有放射标记微抗体的上清液,用酸性甘氨酸缓冲液清除细胞以得到膜部分,并溶解细胞。各时间点进行三次。Y-条表示标准偏差。

[0045] 图 20 是比较 ^{131}I 标记的 J591 微抗体与 ^{111}In -DOTA 标记的 J591 微抗体的细胞相关放射活性的图。总细胞相关放射活性(膜+内化)表示为初始细胞相关放射活性在结合 CWR22rv1 细胞时随时间的百分比。该图显示了 ^{131}I 标记的 J591 微抗体(下线)和 ^{111}In -DOTA 标记的 J591 微抗体(上线)。

[0046] 图 21 示例了具有 CWR22rv1 和 PC3 异种移植体、注射 ^{64}Cu -DOTA-J591 微抗体的小鼠的代表性连续微 PET/CT 图像。在注射后连续多次扫描代表性小鼠。CWR22rv1 肿瘤表示为 (+) 肿瘤, PC3 肿瘤表示为 (-) 肿瘤。(A) 注射后 4 小时的 CT 扫描。显示了冠状平面和横断面。(B) 注射后 4 小时的 PET/CT 覆盖图像。显示了冠状平面和横断面。(C) 注射后 4 小时的代表性小鼠冠状 PET/CT 覆盖 3D 投影 (D) 注射后 43 小时代表性小鼠冠状 PET/CT 覆盖 3D 投影。

[0047] 图 22 是示例 ^{64}Cu -DOTA-J591 微抗体在注射后 19 小时和 43 小时的生物分布的条形图。图中绘制了 ^{64}Cu -DOTA-J591 微抗体在异种移植肿瘤和所选目标正常组织中的生物分布。生物分布被图示为注射剂量除以重量(克数)的 % (% ID/g)。各数据点表示一组小鼠在注射后 19hrs (n = 8) 和 43hrs (n = 4) 的平均 % ID/g。误差条表示标准偏差。

[0048] 图 23 示例了具有 CWR22rv1 和 PC3 异种移植体、注射 ^{124}I -J591 微抗体的小鼠的代表性连续微 PET 图像。在注射后连续多次扫描代表性小鼠。CWR22rv1 肿瘤表示为 (+) 肿瘤, PC3 肿瘤表示为 (-) 肿瘤。(A) 注射后 4 小时的 CT 扫描。显示了冠状平面和横断面。(B) 注射后 4 小时的 PET/CT 覆盖图像。显示了冠状平面和横断面。(C) 注射后 4、20 和 44 小时的冠状 PET/CT 覆盖图像。

[0049] 图 24 是示例 ^{124}I -J591 微抗体在注射后 19 小时和 44 小时的生物分布的条形图。图中绘制了 ^{124}I -J591 微抗体在异种移植肿瘤和所选目标正常组织中的生物分布。生物分布表示为注射剂量除以重量(克数)的 % (% ID/g)。各数据点表示一组小鼠(在第 19 小时 n = 4, 在第 44 小时 n = 2) 在注射后 19hrs 和 44hrs 的平均 % ID/g。误差条表示标准偏差。

[0050] 图 25 是示例下列微抗体变体在瞬时转染的 CHO-K1 细胞中的表达水平的条形图: (1) J591 HC VLVH 微抗体 (J591 VLVH Mb)、(2) J591 HC VHVL 微抗体 (J591 VHVL Mb)、(3) J591 2P VLVH 微抗体 (J591 VLVH**Mb) 和 (4) J591 2P VHVL 微抗体 (J591 VHVL**Mb)。huJ591 HC VHVL 呈现瞬时转染的最高表达 (6.7 $\mu\text{g/mL}$)。

[0051] 图 26 是显示在注射 ^{64}Cu -DOTA-J591 微抗体后 4 小时、20 小时和 43 小时的生物分布比(即,阳性肿瘤与组织的比)的条形图。生物分布比包括阳性肿瘤 (Pos) 相对于肝 (Liv)、肾 (Kid) 和软组织 (Soft) 的比。误差条表示平均标准误差 (SEM)。

[0052] 图 27 是显示在注射 ^{124}I -J591 微抗体后 4 小时、20 小时和 43 小时的生物分布比(即,阳性肿瘤与组织的比)的条形图。生物分布比包括阳性肿瘤 (Pos) 相对于肝 (Liv)、肾 (Kid) 和软组织 (Soft) 的比。误差条表示平均标准误差 (SEM)。

[0053] 详细描述

[0054] 本公开涉及靶向前列腺特异性膜抗原 (PSMA) 的抗体或功能性抗体片段。PSMA 抗体或其功能性抗体片段可结合至物质如诊断剂、治疗剂或纳米颗粒,形成抗 PSMA 结合体。

还公开了包括 PSMA 抗体、功能性 PSMA 抗体片段或抗 PSMA 偶联物用于诊断、显现、监测或治疗与 PSMA 过表达有关的癌症或其他状况的方法。

[0055] PSMA 抗体及其功能性片段

[0056] 根据本文所述实施方式,本文提供了 PSMA 抗体或功能性 PSMA 抗体片段。PSMA 抗体或功能性抗体片段是包含免疫球蛋白或免疫球蛋白相关分子的一个或多个部分的分子,其特异性结合 PSMA 或与 PSMA 具有免疫反应性。术语修饰抗体包括但不限于遗传改造形式或其他修饰形式的免疫球蛋白,如胞内抗体 (intrabody)、嵌合抗体、全人抗体、人源化抗体和杂合抗体 (例如,双特异性抗体、双抗体、三抗体和四抗体)。术语功能性抗体片段包含抗体的一个或多个单独或与其他分子组合的抗原结合片段,包括但不限于 Fab'、F(ab')₂、Fab、Fv、rIgG、scFv 片段、单区 (single domain) 片段、肽抗体 (peptibodies)、微抗体和 cys- 双抗体。术语 scFv 指单链 Fv 抗体,其中传统二链抗体的重链和轻链的可变区已结合形成一条链。

[0057] 在一个实施方式中,修饰抗体或功能性抗体片段是抗 PSMA 微抗体。在一个实施方式中,抗 PSMA 抗体是 J591 微抗体。抗 PSMA 微抗体具有抗 PSMA 抗体片段,该抗 PSMA 抗体片段具有优化的如下文所述体内成像和生物分布药效学性质。“微抗体”是同型二聚体,其中各单体是单链可变片段 (scFv),其通过连接体如 ana 铰链序列连接于人 IgG1 CH3 结构域。在一个实施方式中,铰链序列是人 IgG1 铰链序列 (EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGPP;SEQ ID NO:16)。在另一实施方式中,铰链序列是人工铰链序列。人工铰链序列可包含人 IgG1 铰链部分和 GlySer 连接序列。在一个实施方式中,人工铰链序列包含人 IgG1 铰链的大约前 14 或 15 个残基,然后是长度为 8、9 或 10 个氨基酸的 GlySer 连接序列。在另一实施方式中,人工铰链序列包含 IgG1 铰链的大约前 15 个残基,然后是长度为 10 个氨基酸的 GlySer 连接序列。

[0058] scFv 可具有 VHVL 或 VLVH 方向,其中 VHVL 方向意为 scFv 的重链可变区 (VH) 在轻链可变区 (VL) 的上游,VLVH 方向意为 scFv 的 VL 在 VH 的上游。如本文所用,“上游”意为朝向氨基酸的 N 端或核苷酸序列的 5' 端。VH 和 VL 通过氨基酸连接序列彼此连接。氨基酸连接体可以是任意适当的长度。在一个实施方式中,连接体富含 Gly-Ser,且长度为大约 15-20 个氨基酸。在另一实施方式中,连接体富含 Cys-Ser,且长度为 18 个氨基酸。

[0059] 根据本文所述实施方式,抗 PSMA 微抗体各单体可由自 N 端至 C 端包含下列组分的核苷酸序列编码:(a) 能够结合 PSMA 的 scFv 序列,(b) 人工铰链序列,和 (c) 人 IgG CH3 序列。微抗体可由本文所述细胞、细胞系或其他适当的表达系统表达。因此,信号序列可被融合至 scFv 的 N 端,从而能够在细胞或细胞系中表达时分泌微抗体。在一些实施方式中,核苷酸序列是 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2。当由细胞或细胞系表达时,核苷酸被转录和翻译为氨基酸序列。在一些实施方式中,表达的氨基酸序列是 SEQ ID NO:10 或 SEQ ID NO:11。

[0060] 在另一实施方式中,提供的修饰抗体或功能性抗体片段是抗 PSMA cys- 双抗体 (CysDB)。“双抗体”包含第一多肽链和与第二多肽链,所述第一多肽链包含重链可变区 (VH),该重链可变区通过肽连接体连接而连接于第一多肽链上的轻链可变区 (VL) (VH-VL),该肽连接体太短而不能使第一多肽链上的两个结构域之间配对;所述第二多肽链包含轻链可变区 (VL),该轻链可变区通过肽连接体连接而连接于第二多肽链上的重链可变区 VH (VL-VH),该肽连接体太短而不能使第二多肽链的两个结构域之间配对。短连接体促使第

一与第二多肽链的互补结构域之间进行链配对,并促进具有两个功能性抗原结合位点的二聚分子组装。因此,肽连接体可以是促进这种组装的任意适合长度,例如,长度为5至10个氨基酸。如下进一步描述,一些cys-双抗体可包含长度为5或8个氨基酸的肽连接体。抗PSMA CysDB是同型二聚体抗体形式,其由两个相同的单体形成,该单体包含分子量大约为55kDa的单链Fv(scFv)片段。在一个实施方式中,抗PSMA是J591 CysDB。如上述抗PSMA微抗体,本文所述抗PSMA CysDBs具有药效学性质优化的抗PSMA抗体片段,其可用于体内成像和生物分布。

[0061] 根据本文所述实施方式,CysDB各单体可由自N端至C端包含下列组分的核苷酸序列编码:(a)能够结合PSMA的scFv序列和(b)半胱氨酸尾部。CysDBs可由本文所述细胞或细胞系表达。因此,信号序列可被融合至scFv的N端,从而在细胞或细胞系中表达时能分泌微抗体。在一些实施方式中,核苷酸序列是SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:9。当由细胞或细胞系表达时,核苷酸被转录和翻译为氨基酸序列。在一些实施方式中,表达的氨基酸序列是SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:15。

[0062] 根据一些实施方式,CysDB scFv序列类似于微抗体scFv序列,上述scFv。因此,scFv可具有VHVL或VLVH方向,其中VHVL方向意为scFv的重链可变区(VH)在轻链可变区(VL)的上游,VLVH方向意为scFv的VL在VH的上游。抗体可变区如上所述通过GlySer连接体被连接在一起。半胱氨酸尾部(Gly-Gly-Cys)被添加在C端。该半胱氨酸尾部使双抗体复合形成共价半胱氨酸键,并为功能性部分如放射标记的位点特异性结合的可用硫残基提供选择。

[0063] 多种CysDBs已被成功地从抗不同目标的不同亲本抗体改造,包括CEA、Her2(曲妥珠单抗(trastuzumab)/赫赛汀(Herceptin®)、PSCA和CD20(利妥昔单抗(rituximab)/美罗华(Rituxan®))。CysDB形式的不同变化已经用四种特定形式评价,证明关于结合和表达水平的最大前景。对于各个单独的抗体,重链可变区和轻链可变区以不同方式结合。因此,不同连接体长度的应用允许确保二硫键形成的构象灵活性和运动范围。在一些实施方式中,两种连接体长度变体具有5氨基酸连接体或8氨基酸连接体。可利用两个方向(VL-连接体-VH-Cys尾部和VH-连接体-VL-Cys尾部)开发各连接体长度的变体,以确保实现适当的折叠和稳定性。根据一些实施方式,可用于本文所述方法的四种CysDB变体已被构建:VH5VL、VH8VL、VL5VH和VL8VH(参见图6-9)。虽然各CysDB变体已被成功表达,但结果可能取决于所用亲本抗体而变化。生成全部四种变体和测试全部四种变体的表达和结合确保鉴定到各新型CysDB蛋白质生成的最佳形式。评价变体组对于确保生成二硫桥可用的高品质稳定蛋白质是重要的。因此,改造CysDB试剂实际上涉及利用两种不同的连接体长度,而非一种——如在微抗体中;和两种可变区方向,VH/VL和VL/VH。

[0064] 在一些实施方式中,哺乳动物细胞系(例如,CHO-K1细胞系)可被用作表达系统以生成本文所述微抗体、cys-双抗体或其他抗体片段。但是,由于本文所述微抗体、cys-双抗体和其他抗体片段是非糖基化的,不需要细胞系或表达——哺乳动物表达系统,因此无需翻译后修饰。因此,多种哺乳动物和非哺乳动物表达系统可根据本公开实施方式用于生成PSMA抗体片段(例如,抗PSMA微抗体和cys-双抗体),包括但不限于哺乳动物表达系统(例如,CHO-K1细胞)、细菌表达系统(例如,大肠杆菌(E. Coli)、枯草芽孢杆菌

(*B. subtilis*)) 酵母菌表达系统 (例如, 毕赤酵母 (*Pichia*), 酿酒酵母 (*S. cerevisiae*)) 或任何其他已知表达系统。

[0065] 如下文实施例详细描述, 在 CHO-K1 细胞中制成和表达了区别在于 svFv 区的四种微抗体变体。通过 ELISA 和流式细胞术证明了特异性结合 PSMA。其中一种高表达和 PSMA 结合的变体 (J591 HC VHVL) 被选择用于蛋白质生成、纯化和进一步评价。J591 HC VHVL 微抗体的蛋白质生成成功按比例增加, 以生成足以用于下文所述内化和微 PET 成像实验的量。

[0066] J591 微抗体的共焦显微镜研究显示在 CWR22rv1 和 LNCaP 细胞中的胞内染色随时间增加, 类似于完整 huJ591mAb, 这表明 J591 微抗体进行了迅速内化。为进一步评价 J591 微抗体的内化, 利用两种放射标记策略: 用 I-131 放射性碘标记和 DOTA 结合以用于 In-111 放射性金属标记。¹¹¹In-DOTA J591 微抗体显示细胞相关放射活性经过 3 小时时间增加 260%。相反, ¹³¹I-J591 微抗体的初始细胞结合随后为达到初始活性 80% 的显著丧失。

[0067] J591 微抗体在结合 PSMA+ 细胞系 CWR22rv1 和 LNCaP 后迅速内化。对于 ¹³¹I 标记的 J591 微抗体, 总细胞相关放射活性随时间减少, 表明标记的损失有可能归因于 ¹³¹I-J591 微抗体的脱卤和 / 或迅速代谢和从细胞释放。相反, ¹¹¹In-DOTA-J591 微抗体的总细胞相关放射活性随时间显著增加 (~ 2.5 倍), 这与俘获在溶酶体中的残留标记一致。基于总细胞相关放射活性随时间的维持, 残留 ¹¹¹In-DOTA 放射标记策略呈现为内化 PSMA 抗原的适当体内成像方法。

[0068] 抗 PSMA 衍生物和偶联物

[0069] 在一些实施方式中, PSMA 抗体或功能性抗体片段可包括经修饰的抗体衍生物。例如, 抗体衍生物包括但不限于, 通过糖基化、乙酰化、聚乙二醇化、磷酸化、酰胺化、已知保护 / 封闭基团衍生化、蛋白质水解切割和连接细胞配体或其他蛋白质修饰的抗体。多种化学修饰中任一种可通过已知技术进行, 包括但不限于, 特异性化学切割、乙酰化、甲酰化和衣霉素代谢合成。此外, 衍生物可含有一个或多个非天然氨基酸。

[0070] 在其他实施方式中, PSMA 抗体或功能性抗体片段可结合 (偶联) 至另一种物质, 形式抗 PSMA 偶联物。本文所述抗 PSMA 偶联物可通过已知的连接抗体与脂质、碳水化合物、蛋白质或其他原子和分子的方法制备。一方面, 抗 PSMA 偶联物利用适当的连接体或键通过位点特异性结合形成。位点特异性结合更可能保持抗体或功能性抗体片段的结合活性。物质可通过二硫键形成结合或连接在还原性抗体组分或抗体片段的铰链区。例如, 在 scFv 片段 C 端引入半胱氨酸残基, 如在上述双抗体中引入的半胱氨酸残基, 允许与多种试剂在远离抗原结合位点的位点进行位点特异性巯基反应性偶联。或者, 用于形成抗 PSMA 偶联物的其他连接体或键可包括但不限于, 共价键、非共价键、硫连接体、胺连接体、胍连接体、酯连接体、酰胺基连接体和氨基连接体、亚氨基连接体、缩氨硫脲连接体、缩氨基脲连接体、脲连接体以及碳-碳连接体。

[0071] 在一个实施方式中, 抗 PSMA 偶联物可包含结合于诊断剂的 PSMA 抗体或功能性 PSMA 抗体片段。“诊断剂”是可用于诊断、检测或显现疾病的原子、分子或化合物。根据本文所述实施方式, 诊断剂可包括但不限于, 放射性物质 (例如, 放射性同位素、放射性核素、放射标记或放射性示踪剂)、染料、造影剂、荧光化合物或分子、生物发光化合物或分子、酶和增强剂 (例如, 顺磁离子)。此外, 应当注意的是, 一些纳米颗粒, 例如量子点和金属纳米

颗粒（下文所述）也可适用作检测剂。

[0072] 根据本公开的实施方式，可被用作诊断剂的放射性物质包括但不限于 ^{18}F 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{45}Ti 、 ^{47}Sc 、 ^{52}Fe 、 ^{59}Fe 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{75}Sc 、 ^{77}As 、 ^{86}Y 、 ^{90}Y 、 ^{89}Sr 、 ^{89}Zr 、 ^{94}Tc 、 ^{94}Tc 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{99}Mo 、 ^{105}Pd 、 ^{105}Rh 、 ^{111}Ag 、 ^{111}In 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{142}Pr 、 ^{143}Pr 、 ^{149}Pm 、 ^{153}Sm 、 $^{154-158}\text{Gd}$ 、 ^{161}Tb 、 ^{166}Dy 、 ^{166}Ho 、 ^{169}Er 、 ^{175}Lu 、 ^{177}Lu 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{189}Re 、 ^{194}Ir 、 ^{198}Au 、 ^{199}Au 、 ^{211}At 、 ^{211}Pb 、 ^{212}Bi 、 ^{212}Pb 、 ^{213}Bi 、 ^{223}Ra 和 ^{225}Ac 。根据本公开的实施方式可被用作诊断剂的顺磁离子包括但不限于，过渡金属离子和镧系金属离子（例如具有原子数6至9、21-29、42、43、44或57-71的金属）。这些金属包括Cr、V、Mn、Fe、Co、Ni、Cu、La、Ce、Pr、Nd、Pm、Sm、Eu、Gd、Tb、Dy、Ho、Er、Tm、Yb和Lu离子。

[0073] 当诊断剂是放射性金属或顺磁离子时，该剂可与具有长尾部的试剂发生反应，该试剂的一个或多个螯合基团连接于长尾部以结合这些离子。长尾部可以是聚合物，如聚赖氨酸、多糖或具有可结合螯合基团以结合离子的侧基的其他衍生链或可衍生链。可根据本公开应用的螯合基团的实例包括但不限于乙二胺四乙酸（EDTA）、二乙烯三胺五乙酸（DTPA）、DOTA、NOTA、NETA、卟啉、多胺、冠醚、二硫缩氨基脲、多肟及类似基团。通常使螯合物通过能与分子形成键并且免疫反应性损失最小和聚集和/或内部交联最少的基团连接于PSMA抗体或功能性抗体片段。同样的螯合物当与非放射性金属如锰、铁和钆络合时，在与本文所述抗体和载体一起使用时可用于MRI。大环螯合物如NOTA、DOTA和TETA可分别与多种金属和放射性金属一起应用，该放射性金属包括但不限于镱、钷和铜的放射性核素。可应用其他环形螯合物如大环聚醚，其令人感兴趣的在于稳定结合核素如用于RAIT的 ^{223}Ra 。在某些实施方式中，螯合部分可用于使PET成像剂如 $\text{Al-}^{18}\text{F}$ 复合物连接到目标分子以用于PET分析。

[0074] 根据本公开的实施方式可被用作诊断剂的造影剂包括但不限于泛影酸钡、乙碘油、柠檬酸镱、碘卡酸、碘西他酸、碘达胺、胆影酸、碘沙酸、碘古酰胺（iogulamide）、异己基、碘帕醇、碘番酸、碘普西酸（ioprocemic acid）、碘西法酸、碘丝酸、碘矾葡胺、碘琥酸（iosemetetic acid）、碘酞硫（iotasul）、碘得酸、碘拉酸、碘出酸、碘克沙酸（ioxaglic acid）、羟泛影酸（ioxotrizoic acid）、胺碘苯丙酸、甲基葡胺、甲泛葡胺、甲泛影盐（metrizoate）、丙碘酮、氯化铯或其组合。

[0075] 根据本公开的实施方式可被用作诊断剂的生物发光和荧光化合物或分子和染料包括但不限于荧光素、异硫氰酸荧光素（FITC）、Oregon Green. TM、若丹明、德克萨斯红、异硫氰酸四若丹明（TRITC）、Cy3、Cy5等）、荧光标记物（例如，绿色荧光蛋白（GFP）、藻红蛋白等）、由肿瘤相关蛋白酶激活的自动猝灭的荧光化合物、酶（例如，荧光素酶、辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶等）、纳米颗粒、生物素、地高辛或其组合。

[0076] 根据本公开的实施方式可被用作诊断剂的酶包括但不限于辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、酸性磷酸酶、葡萄糖氧化酶、 β -半乳糖苷酶、 β -葡萄糖醛酸酶或 β -内酰胺酶。这种酶可与色原、荧光化合物或发光化合物联合用于生成可检测信号。

[0077] 在另一实施方式中，抗PSMA偶联物可包含结合（偶联）于治疗剂的PSMA抗体或功能性PSMA抗体片段。本文所用“治疗剂”是可用于治疗与PSMA相关的癌症或其他状况的原子、分子或化合物。治疗剂的实例包括但不限于药物、化疗剂、治疗性抗体和抗体片段、毒素、放射性同位素、酶（例如，在肿瘤部位将前体药物分解为细胞毒性剂的酶）、核酸酶、

激素、免疫调节剂、反义寡核苷酸、螯合剂、硼化合物、光活性剂和染料。

[0078] 化疗剂本质上通常具有细胞毒性或细胞抑制性,并可包括烷化剂、抗代谢物、抗肿瘤抗生素、拓扑异构酶抑制剂、有丝分裂抑制剂激素治疗、靶向治疗剂和免疫治疗剂。在一些实施方式中,根据本公开的实施方式可被用作诊断剂的化疗剂包括但不限于 13- 顺式 - 维甲酸、2- 氯脱氧腺苷、5- 阿扎胞苷、5- 氟尿嘧啶、6- 巯基嘌呤、6- 硫鸟嘌呤、放线菌素 -D、阿霉素、阿德斯白细胞、阿仑珠单抗 (alemtuzumab)、阿利维甲酸 (alitretinoin)、全反式维甲酸、 α 干扰素、六甲蜜胺、氨甲蝶呤 (amethopterin)、阿米福汀 (amifostine)、阿那格雷 (anagrelide)、阿那曲唑 (anastrozole)、阿糖胞苷 (arabinosylcytosine)、三氧化二砷、苯胺吡啶、氨基喜树碱、氨基格鲁米特、天冬酰胺酶、氮杂胞苷、卡介苗 (BCG)、苯达莫司汀 (bendamustine)、贝伐单抗 (bevacizumab)、蓓萨罗丁 (bexarotene)、比卡鲁胺 (bicalutamide)、硼替佐米 (bortezomib)、博来霉素、白消安、四氢叶酸钙、嗜橙菌因子、卡培他滨 (capecitabine)、卡奈替尼 (canertinib)、卡波铂 (carboplatin)、卡莫司汀 (carmustine)、西妥昔单抗 (cetuximab)、苯丁酸氮芥 (chlorambucil)、顺铂、克拉屈滨 (cladribine)、可的松、环磷酰胺、阿糖胞苷、达贝泊汀 α (darbepoetin alfa)、达沙替尼 (dasatinib)、道诺霉素、地西他滨 (decitabine)、地尼白介素 (denileukin diftitox)、地塞米松、dexasone、右雷佐生 (dexrazoxane)、放线菌素 D、柔红霉素 (daunorubicin)、氨烯咪胺、多西他奇 (docetaxel)、亚德里亚霉素、脱氧氟尿苷、恩尿嘧啶 (eniluracil)、表柔比星 (epirubicin)、依泊汀 α (epoetin alfa)、厄洛替尼 (erlotinib)、依维莫司 (everolimus)、依西美坦 (exemestane)、雌氮芥、依托泊甙、非格司亭 (filgrastim)、氟甲睾酮 (fluoxymesterone)、氟维司群 (fulvestrant)、黄酮吡醇 (flavopiridol)、氟尿苷 (floxuridine)、氟达拉滨 (fludarabine)、氟尿嘧啶、氟他胺 (flutamide)、吉非替尼 (gefitinib)、吉西他滨 (gemcitabine)、奥吉妥珠单抗 (gemtuzumab ozogamicin)、戈舍瑞林 (goserelin)、粒细胞集落刺激因子、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子、六甲基三聚氰胺、氯化可的松羟基脲、替伊莫单抗 (ibritumomab)、干扰素 α 、白细胞介素 - 2、白细胞介素 -11、异维甲酸、伊沙匹隆 (ixabepilone)、伊达比星 (idarubicin)、甲磺酸伊马替尼 (imatinib mesylate)、异环磷酰胺 (ifosfamide)、依立替康 (irinotecan)、拉帕替尼 (lapatinib)、来那度胺 (lenalidomide)、来曲唑 (letrozole)、亚叶酸、亮脯利特 (leuprolide)、脂质体 Ara-C、洛莫司汀 (lomustine)、氮芥、甲地孕酮 (megestrol)、美法仑 (melphalan)、巯基嘌呤、美司钠 (mesna)、氨甲蝶呤 (methotrexate)、甲基泼尼松龙 (methylprednisolone)、丝裂霉素 C、米托坦 (mitotane)、米托蒽醌 (mitoxantrone)、奈拉滨 (nelarabine)、尼鲁米特、奥曲肽 (octreotide)、奥普瑞白介素 (oprelvekin)、奥沙利铂 (oxaliplatin)、紫杉醇、帕米膦酸钠 (pamidronate)、培美曲塞 (pemetrexed)、帕尼单抗 (panitumumab)、PEG 干扰素、培加帕酶 (pegaspargase)、聚乙二醇非格司亭 (pegfilgrastim)、PEG-L- 天冬酰胺酶、喷司他丁 (pentostatin)、光辉霉素、泼尼松龙、泼尼松、甲基苄肼 (procarbazine)、雷洛昔芬 (raloxifene)、利妥昔单抗、罗米司亭 (romiplostim)、雷替曲塞 (ralitrexed)、沙帕他滨 (sapacitabine)、沙莫司亭 (sargramostim)、沙铂 (satraplatin)、索拉非尼 (sorafenib)、舒尼替尼 (sunitinib)、司莫司汀 (semustine)、链脲霉素 (streptozocin)、它莫西芬 (tamoxifen)、替加氟 (tegafur)、替加氟 - 尿嘧啶、坦西莫司 (temsirolimus)、替莫唑胺 (temozolamide)、替尼泊甙 (teniposide)、萨立多胺 (thalidomide)、硫鸟嘌呤、噻替派

(thiotepa)、托泊替康 (topotecan)、托瑞米芬 (toremifene)、托西莫单抗 (tositumomab)、曲妥珠单抗、维甲酸 (tretinoin)、三甲曲沙 (trimitrexate)、alrubicin、长春新碱、长春碱、长春碱酰胺、长春瑞滨、伏立诺他 (vorinostat) 或唑来膦酸 (zoledronic acid)。

[0079] 根据本公开的实施方式可被用作诊断剂的治疗性抗体及其功能性片段包括但不限于, 阿仑珠单抗、贝伐单抗、西妥昔单抗、依决可单抗 (edrecolomab)、吉姆珠单抗 (gemtuzumab)、替伊莫单抗 (ibritumomab tiuxetan)、帕尼单抗、利妥昔单抗、托西莫单抗和曲妥珠单抗。

[0080] 根据本公开的实施方式可被用作诊断剂的毒素包括但不限于蓖麻毒素、相思子毒素、核糖核酸酶 (RNase)、脱氧核糖核酸酶 (DNase) I、葡萄球菌肠毒素-A (Staphylococcal enterotoxin-A)、美洲商陆抗病毒蛋白、白树毒素、白喉毒素、假单胞菌外毒素 (Pseudomonas exotoxin) 和假单胞菌内毒素 (Pseudomonas endotoxin)。

[0081] 根据本公开的实施方式可被用作诊断剂的放射性同位素包括但不限于 ^{32}P 、 ^{89}Sr 、 ^{90}Y 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{99}Mo 、 ^{131}I 、 ^{153}Sm 、 ^{177}Lu 、 ^{186}Re 、 ^{213}Bi 、 ^{223}Ra 和 ^{225}Ac 。

[0082] 在另一实施方式中, 抗 PSMA 偶联物可包含结合于纳米颗粒的 PSMA 抗体或功能性 PSMA 抗体片段。术语“纳米颗粒”指尺寸以纳米测量的微观粒子, 例如, 至少一个维度小于约 100nm 的粒子。纳米颗粒尤其可用作可检测物质, 因为其小到足以散射可见光, 而非吸收可见光。例如, 金纳米颗粒具有显著的可见光消光性质, 并在溶液中呈现深红色至黑色。由此, 包含结合于纳米颗粒的 PSMA- 特异性抗体或片段的组合物可用于个体肿瘤或癌细胞的体内成像。在尺寸范围的小值端, 纳米颗粒通常被称为团簇 (cluster)。已形成金属、电介质和半导体纳米颗粒以及混合结构 (例如核壳型纳米颗粒)。纳米球、纳米棒和纳米杯 (nanocups) 只是其中几种已生成的形状。半导体量子点和纳米晶体是另外的纳米颗粒类型的实例。这种纳米级粒子在结合于 PSMA 抗体或功能性抗体片段时可被用作上述肿瘤细胞体内检测的成像剂。或者, 纳米颗粒可在治疗应用中用作药物载体, 其在结合于本发明的 PSMA- 特异性抗体或片段时, 向在细胞表面过表达 PSMA 的癌细胞输送化疗剂、激素治疗剂、放射治疗剂、毒素或本领域已知的任何其他细胞毒性剂或抗癌剂。

[0083] 上述任何抗 PSMA 偶联物可进一步结合一个或多个另外的治疗剂、诊断剂、纳米颗粒、载体或其组合。例如, PSMA 抗体或功能性 PSMA 抗体片段可用 ^{131}I 放射标记并结合于脂质载体, 以使抗 PSMA- 脂质偶联物形成微团。该微团可掺入一种或多种治疗剂或诊断剂。或者, 除载体外, PSMA 抗体或功能性 PSMA 抗体片段可结合于 ^{131}I (例如, 在酪氨酸残基处) 和药物 (例如, 在赖氨酸残基的 ϵ - 氨基处), 并且载体可掺入另外的治疗剂或诊断剂。

[0084] 诊断、分期和监测癌症的方法

[0085] PSMA 抗体、功能性 PSMA 抗体片段或抗 PSMA 偶联物可用于靶向 PSMA 阳性细胞, 如过表达 PSMA 的癌细胞。因此, 诊断、检测、显现、监测或治疗与 PSMA 表达有关的癌症或其他状况的方法可包括向患有或疑患与 PSMA 表达有关的癌症或其他状况的个体给予 PSMA 抗体、功能性 PSMA 抗体片段或抗 PSMA 偶联物。如本文所用, 术语“个体”指任何动物 (例如, 哺乳动物), 包括但不限于人、非人灵长类、啮齿类、狗、猪及类似动物。

[0086] 与 PSMA 表达有关的癌症可包括具有过表达 PSMA 的癌症肿瘤组织的癌症 (例如, 前列腺癌) 或具有过表达 PSMA 的实体肿瘤新血管系统的癌症 (例如, 前列腺癌、肺癌、结肠 (或结直肠) 癌、乳腺癌、肾癌、肝癌、膀胱癌和胰腺癌以及肉瘤和黑素瘤)。多数实体

肿瘤新血管系统表达 PSMA, 使 PSMA 成为新血管系统生物标记。因此, 除表达 PSMA 的癌细胞外, 与 PSMA 表达有关的癌症可包括任何具有新血管系统的癌组织, 包括但不限于, 癌如前列腺癌、肺癌、结肠 (或结直肠) 癌、乳腺癌、肾癌、肝癌、膀胱癌和胰腺癌以及肉瘤和黑色素瘤。

[0087] 在一个实施方式中, 诊断、检测、显现或监测与 PSMA 表达有关的癌症的方法包括向患有或疑患癌症的个体给予诊断性抗 PSMA 偶联物。诊断性抗 PSMA 偶联物包含结合至一种或多种上述诊断剂的 PSMA 抗体或功能性 PSMA 抗体片段。在一个实施方式中, PSMA 抗体或功能性 PSMA 抗体片段是微抗体或 CysDB, 衍生自 J591 抗体, 如本文所述的那些 J591 微抗体和 J591CysDBs。诊断性抗 PSMA 偶联物可结合或连接于一种或多种本文所述的其他物质, 如治疗性抗 PSMA 偶联物 (如下文所述)、未结合的治疗剂、造影液、载体脂质或纳米颗粒。

[0088] 用于上述方法的诊断性抗 PSMA 偶联物适于体内或体外检测或显现方法。在一个实施方式中, 将进行体外诊断或预后分析, 以确定 PSMA 在从患有或疑患与 PSMA 有关的癌症的个体提取的组织样本中相对于正常 (即, 非癌症) 或对照组织样本 (即, 已知癌性或良性组织样本) 的表达水平。考虑多种确定这种表达水平的分析, 包括免疫组织化学、荧光原位杂交 (FISH) 和脱落抗原 (shed antigen) 分析、DNA 印迹或 PCR 技术。

[0089] 在另一实施方式中, 诊断性抗 PSMA 偶联物可用于体内成像模式以显现个体体内 X 射线断层术 (tomography) 中的目标细胞。根据本文所述方法, 确定个体患有与 PSMA 表达有关的癌症是通过显现被标记的微抗体或 CysDB 实现的, 其中显现的标记微抗体或 CysDB 定位于肿瘤部位。除诊断与 PSMA 表达有关的癌症外, PSMA 微抗体还可根据上述类似方法用于分期和监测癌症进程。

[0090] 根据本文所述方法可应用的适当的体内成像方法包括但不限于, 磁共振成像 (MRI)、正电子发射断层扫描 (PET) 或微 PET、电脑断层扫描 (CT)、PET/CT 联合成像仪、冷却充电偶联设备 (CCD)、相机光学成像、光学成像 (例如, 生物发光光学成像、荧光光学成像或反射吸收) 和单光子发射电脑断层扫描 (SPECT)。

[0091] 如下文实施例所述, 用适当的放射性同位素 (例如, 残留 ^{124}I 、 ^{64}Cu -DOTA 或 ^{89}Zr -DOTA) 标记的本文所述的微抗体或 CysDB 可被用作临床成像剂, 从而根据本文所述方法体内靶向 PSMA。根据本文所述实施方式, 这些 J591 微抗体和 CysDBs 还可被开发为潜在的单光子发射电脑断层扫描 (SPECT) 成像剂。通过改变放射标记, 例如 ^{111}In -DOTA-J591, J591 微抗体可被用作 SPECT 成像剂。

[0092] 通过如下评价本文所述 J591 微抗体的肿瘤靶向: 用正电子发射体 I-124 ($t_{1/2} = 4.2\text{d}$) 和 Cu-64 ($t_{1/2} = 12.7\text{h}$) 进行放射性标记, 然后进行小动物 PET (微 PET) 和生物分布实验, 以比较体内细胞相关放射活性的保留。

[0093] ^{124}I 和 ^{64}Cu -DOTA 标记的 J591 微抗体均以高摄取和高特异性迅速靶向 CWR22rv1 肿瘤。携带 PSMA 阳性 CWR22rv1 和阴性 PC-3 异种移植体的小鼠的连续成像生成高对比度图像和两种标记很好的肿瘤摄取。在注射后 19 小时, 分别以 ^{64}Cu -DOTA- 和 ^{124}I -J591 微抗体实现 $8.2(\pm 1.2)\% \text{ ID/g}$ 和 $8.8(\pm 2.0)\% \text{ ID/g}$ 。在注射后 43 小时 (p. i.), ^{64}Cu -DOTA-J591 微抗体的肿瘤摄取增加至 $13.3(\pm 8.3)\% \text{ ID/g}$, 而 ^{124}I -J591 微抗体的肿瘤摄取减少至 $3.25(\pm 0.9)\% \text{ ID/g}$ 。 ^{64}Cu -DOTA- 和 ^{124}I -J591 微抗体的阳性与阴性肿瘤比在第 19 小时分别为 3.1 和 4.9, 在第 43 小时分别为 5.4 和 7.3。 ^{64}Cu -DOTA-J591 微抗体可见持续的高肝摄

取 [在第 19hr 为 $21.4(\pm 3.1)\%$ ID/g, 且在第 43hr 为 $14.4(\pm 2.1)\%$ ID/g], 但 ^{124}I -J591 微抗体呈现迅速的背景清除, 导致较高的对比度图像。两种放射性标记的微抗体在第 19 小时类似的肿瘤摄取是预料之外的, 并且暗示了较慢的体内内化。因此, I-124 放射性标记的 J591 微抗体是有效检测 PSMA 阳性细胞的示踪剂。

[0094] 治疗癌症的方法

[0095] 在一些实施方式中, 提供了治疗与 PSMA 过表达有关的癌症或其他病症的方法。这种方法包括向个体给予治疗有效量的包含上述 PSMA 抗体或功能性 PSMA 抗体片段的药物组合物。在一个实施方式中, PSMA 抗体或功能性 PSMA 抗体片段是微抗体或 CysDB, 衍生自 J591 抗体, 如本文所述那些 J591 微抗体和 J591CysDBs。

[0096] 病症的“治疗”或“医疗”可指预防病症, 减缓发病或病症发展速度, 减少发生病症的危险, 预防或延缓与癌症有关的症状发生, 减少或终止与癌症有关的症状, 产生病症的完全或部分消退或其一些组合。

[0097] “治疗有效量”或“治疗性有效剂量”是化合物在个体中产生期望治疗效果如预防或治疗目标病症或减轻与病症有关的症状的量。精确的治疗有效量是组合物在给定个体中在治疗效力方面产生最大有效效果的量。该量将取决于多种因素而改变, 包括但不限于治疗性化合物的特性 (包括活性、药物动力学、药效学和生物利用度)、个体生理条件 (包括年龄、性别、疾病类型和阶段、总体身体状况、对给定剂量的应答和药物类型)、制剂中药学可接受的载体或多种载体的性质和给药途径。临床和药理学领域的技术人员将能够通过常规实验法——即通过监测个体对化合物给予的应答和由此调整剂量——确定治疗有效量。对于另外的指导, 参见 Remington: The Science and Practice of Pharmacy 第 21 版, Univ. of Sciences in Philadelphia (USIP), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, 2005。

[0098] 在一个实施方式中, 药物组合物可包含治疗性抗 PSMA 偶联物, 其中该偶联物包含结合至一种或多种上述治疗剂的 PSMA 抗体或功能性 PSMA 抗体片段。在一个实施方式中, PSMA 抗体或功能性 PSMA 抗体片段是微抗体或 CysDB, 衍生自 J591 抗体, 如本文所述那些 J591 微抗体和 J591CysDBs。例如, 本文所述 J591 微抗体或 cys- 双抗体可用于放射免疫治疗法, 其中一个或多个 3B J591 微抗体用适当的 β 发射放射标记如钇-90 进行放射标记。放射标记的 3B J591 微抗体或多个微抗体可用于向表达 PSMA 的局部癌组织输送细胞损伤和死亡。进一步, 对放射标记的 J591 微抗体和双抗体的应用有可能呈现相对于放射标记的全长亲本 huJ591 抗体改善的肿瘤渗透。

[0099] 治疗性抗 PSMA 偶联物可与本文所述一种或多种另外的物质结合或缔合, 如诊断性抗 PSMA 偶联物 (上文所述)、未结合的诊断剂、造影液、载体脂质或纳米颗粒。

[0100] 在一些实施方式中, 药物组合物还可包含药学可接受的载体。药学可接受的载体可以是涉及从一个组织、器官或身体部分向另一个组织、器官或身体部分携带或运输目标化合物的药学可接受的物质、组合物或介质。例如, 载体可以是液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂、溶剂或封装材料或其一些组合。载体各组分必须是“药学可接受的”, 因为其必须与制剂中的其他成分相容。其还必须适于接触其可能碰到的任何组织、器官或身体部分, 意思是其必须不携带过度超过其治疗效益的毒性、刺激、过敏反应、免疫原性或任何其他并发症的危险。

[0101] 本文所述药物组合物可通过任何适当的给药途径给予。给药途径可指本领域中已知的任何给药途径,包括但不限于气溶胶、肠内、鼻腔、眼部、口腔、胃肠外、直肠、经皮(例如、局部霜剂或膏剂、贴剂)或阴道。“经皮”给予可用局部霜剂或膏剂或借助于经皮贴剂实现。“胃肠外”指一般与注射相关的给药途径,包括眶下、输注、动脉内、囊内、心脏内、皮内、肌内、腹膜内、肺内、脊柱内、胸骨内、鞘内、子宫内、静脉内、蛛网膜下、囊下、皮下、经粘膜或经气管途径。

[0102] 下列实施例意欲为示例本发明的多个实施方式。因此,所述具体实施方式不被解释为限制本发明的范围。对于本领域技术人员显而易见的是,可进行多种等同形式、改变和修正而没有脱离本发明的范围,并且要理解的是,这种等同实施方式将在此被包含在内。进一步,在本公开引用的所有参考文献的全部内容并入本文作为参考,如同本文对其进行了完整叙述。

[0103] 实施例 1:生成 J591 微抗体

[0104] J591 微抗体构建物。第三代 J591 微抗体是整合全长亲本 huJ591 抗体的修饰可变区的改造抗体片段。该微抗体形式是同型二聚体,其中各单体是连接人 IgG1CH3 区的单链可变片段(scFv)(图 1A)。scFv 可具有 VHVL 或 VLVH 方向。如图 1B 所示,具有 VHVL 方向的 scFv 的 J591 微抗体表达构建物具有重链可变(VH)区,其通过 18 氨基酸连接体(L)序列连接轻链可变(VL)区。在 VLVH 方向,在图 1B 中 VL 和 VH 将转换,以使 VL 区在 VH 区的上游。

[0105] 合成四种 J591 微抗体序列,用于下文所述表达研究:如下构建的微抗体序列:

[0106] 1) VHVL 方向的 J591 人复合体(HC)(J591 HC VHVL;SEQ ID NO:1);

[0107] 2) VLVH 方向的 J591 人复合体(HC)(J591 HC VLVH);

[0108] 3) VHLV 方向、2 个脯氨酸置换(2P)的 J591(J591 2P VHVL;SEQ ID NO:2);和

[0109] 4) VLVH 方向、2 个脯氨酸置换(2P)的 J591(J591 2P VLVH)。

[0110] 图 3 显示 J591 HC VHVL 微抗体的序列(SEQ ID NO:1),图 4 显示 J591 2P VHVL 微抗体的序列(SEQ ID NO:2)。18 个氨基酸的连接体(L)具有特定的序列——富含 GlySer 残基(参见图 1,序列参见图 3 和 4)。scFv 通过人工铰链序列连接于人 IgG1 CH3 区,该人工铰链序列其中前 15 个残基是人 IgG1 铰链部的残基,然后是 10 个氨基酸 GlySer 连接序列(参见图 1,序列参见图 3 和 4)。该特定铰链序列也已被成功整合到之前的微抗体中。微抗体(VH-VL-CH3 或 VL-VH-CH3 方向)由于 CH3 区之间的缔合和铰合区中二硫键的形成而以稳定的二聚体存在。为能分泌微抗体, κ 轻链信号序列引导表达构建体,并使其融合在重链可变区 N 端(参见图 1B,序列参见图 3 和 4)。

[0111] 通过在亲本 huJ591 重链可变区和轻链可变区中进行氨基酸置换改造 J591 微抗体组。全长亲本 huJ591 可变区的序列分析确定了异常多的构象限制性脯氨酸残基,其被确认为减少蛋白质结构的灵活性。去免疫 J591(SEQ ID NO:5;SEQ ID NO:19)与原鼠 J591(SEQ ID NO:4;SEQ ID NO:18)之间的序列对比比较表明,去免疫过程引入另外的脯氨酸残基(参见图 2)。经序列和蛋白建模分析后,对蛋白质进行两种改变,以提高灵活性和折叠能力。第一,将轻链可变区的两个脯氨酸残基(P42Q 和 P100A)变为鼠序列中发现的残基(参见图 2,下文被称为 2P)。第二,利用人复合(HC)抗体技术(Antitope)计算两可变区的置换,该人复合(HC)抗体技术通过避免潜在表位而非破坏表位使序列去免疫(参见图 2,下文被称为

HC)。

[0112] J591 微抗体的表达。生成上述四种微抗体序列中每一种的表达载体。将四种微抗体序列的每一种克隆到用于哺乳动物表达的 pcDNA3.1/myc-His(-)A 版载体 (Invitrogen, Inc.) 中相应的 XbaI/HindIII 位点。pcDNA3.1 表达载体的特征在于哺乳动物表达的 CMV 启动子和哺乳动物 (新霉素) 和细菌 (氨苄青霉素) 的选择标记物 (参见图 10)。

[0113] 将四种 J591 微抗体表达载体暂时转染到 CHO-K1 细胞中, 以确认 J591 微抗体的表达。转染利用 Lipofectamine 试剂以 6 孔板形式进行。72 小时转染后, 收集和过滤上清液, 以去除任何细胞。

[0114] 为确定 J591 微抗体由 CHO-K1 细胞表达, 用取自瞬时转染的上清液样本进行蛋白质印迹分析。空载体转染的上清液被包含作为阴性对照, 不同微抗体转染的上清液被用作阳性对照。将转染上清液进行 SDS-PAGE, 并转移至 PVDF 膜。用结合碱性磷酸酶 (AP) 的抗人 IgG (Fc- 特异性) 抗体探测该膜, 并通过用 AP 底物 BCIP/NBT 温育而使其显影。图 11 是确定 J591 微抗体表达的多个实验的代表性印迹。在非还原条件下, J591 微抗体以大约 90kD 的预期分子量运行 (图 11)。表示单体形式的较小带也在大约 40kD 被检测到。

[0115] 进行定量 ELISA 以分析瞬时转染的 J591 微抗体表达。ELISA 是夹心分析, 其将山羊抗人 IgG (Fc 特异性) 用作捕捉抗体和将 AP 结合的山羊抗人 IgG (Fc 特异性) 用作检测抗体。之前生成的微抗体的纯化蛋白质被用作标准品。连续稀释 J591 微抗体上清液, 找到适于标准曲线线性范围的稀释点。利用程序 SoftMax Pro 插入根据标准曲线未知的浓度。

[0116] 分析多个转染的上清液, 并且平均值展示在图 25 中。J591 HC VHVL 微抗体呈现第三代微抗体中的最高表达 (6.7ug/ml)。

[0117] J591 微抗体的结合能力。为确定 J591 微抗体结合细胞 PSMA 的能力, 通过流式细胞计量术分析上述瞬时转染的上清液。如图 12A-12D 所示, 测试各 J591 微抗体瞬时转染的上清液的结合 PSMA 阳性 (PSMA+) 的 LNCaP 细胞 (2), 并与 PSMA 阴性的阴性对照细胞进行比较。所有上清液被标准化至 2.1ug/ml 的 J591 微抗体浓度。随后细胞用二级抗人 IgG (Fc 特异性)-PE 结合的抗体染色。阴性对照细胞仅用二级抗人 IgG (Fc 特异性) 抗体染色 (1)。1×10⁵ 个细胞 / 点, 且以 10,000 事件 / 点进行分析。

[0118] 用 J591 微抗体染色的各细胞群证实了信号相对于阴性对照细胞显著增加 (参见图 12)。J591 微抗体上清液没有显著染色阴性对照 PC3 细胞 (PSMA 阴性) (数据未显示)。全部四种微抗体显示对 LNCaP 细胞的相当结合亲和力 (参见图 12)。

[0119] 实施例 2: 稳定的细胞系群

[0120] 基于上述表达和结合数据, 将 J591 人复合 VHVL (HC VHVL) 微抗体选作主要候选以推进至较大规模 (~低毫克量) 蛋白质生产, 用于下文所述的后续体内成像研究。虽然下文所述实施例对 J591 HC VHVL 微抗体特异, 但要注意的是, 本文所述任何 J591 微抗体或 cys- 双抗体均可被纯化和用于类似研究。

[0121] 用新霉素作为选择标记物将 J591 HC VHVL 微抗体稳定转染到 CHO-K1 细胞中。选择高表达克隆后, 以大约 36mg/L (经过 4 天培养) 选择表达 J591 微抗体的克隆用于大规模生产。

[0122] 蛋白质生产运行。为生成至少 10mg 最终纯化的蛋白质, 将稳定的细胞系扩大至 400ml 生产运行 (在 2% FBS 介质)。将细胞接种到 8 个 T175 烧瓶中, 并持续生产运行 7

天。

[0123] 蛋白质纯化。在生产运行结束时,收集上清液,将其旋转以去除任何细胞,并用 0.2 μ m 过滤装置过滤。用蛋白 L 亲和层析从上清液纯化 J591 微抗体。装载后,将柱用 PBS (pH = 7.2) 洗涤,并用 IgG 洗脱缓冲液 (Pierce, Thermo Scientific) 将微抗体从柱洗脱。立即用 1M Tris 缓冲液 (pH = 8) 中和洗脱部分。将最终的洗过部分浓缩,并缓冲交换到最终的 PBS 制剂 (pH = 7.2) 中。

[0124] 纯化的蛋白质分析。纯化后,利用 280A 下的 UV 吸光度计算 J591 微抗体蛋白的最终浓度。吸光系数为 1.76 (吸光单位为 A280 下每 mg/ml)。最终的蛋白质浓度为 1.06mg/ml。

[0125] 为分析 J591 微抗体的纯度,蛋白质通过 SDS-PAGE 在非还原和还原条件下运行。在非还原的条件下,微抗体被检测到在大约 85kDa (图 13)。相对小的拖尾 (smear) 存在于 85kDa 带,其可表示少量降解。大约 40kDa 小带表示微抗体单体。在还原条件下,微抗体被检测到为约 40kDa 的单体形式 (图 13)。

[0126] 为检测装配微抗体复合物的纯度,通过尺寸排阻层析分析蛋白质。通过 SEC 分析 4 微克纯化蛋白 (图 14)。主峰相应于微抗体同型二聚体。在早期时间点洗脱的两个小峰表示较大的聚集蛋白。峰下面积的分析显示 85% 的蛋白质产物相对于 15% 的聚集体以适当的微抗体同型二聚体存在。

[0127] 实施例 3: J591 微抗体结合 PSMA+ 细胞并被 PSMA+ 细胞内化

[0128] 通过 Catalent 专有 GPEX 技术利用无血清 CHO-S 细胞的慢病毒转导生成高表达稳定细胞库。利用离子交换层析,以足够高纯度从细胞上清液纯化 J591 微抗体,用于下游实验。通过 SDS-PAGE 和 SEC 分析确定产物高纯度 (>85% 纯度)。纯化的蛋白质不具有任何显著的生物负载 (0cfu/ml),和具有相对低的内毒素水平 (8 至 16EU/mg)。此生产运行批次的总产量为 65mg J591 微抗体蛋白。

[0129] 功能性 ELISA。为确定 J591 微抗体蛋白结合纯化的 PSMA 的能力,利用纯化的重组 PSMA 进行间接 ELISA。实验中包括阴性对照微抗体。在 2 μ g/ml 的初始浓度下, J591 微抗体以饱和状态结合重组 PSMA (参见图 15)。随后连续稀释 J591 微抗体显示出浓度依赖性结合 (参见图 15)。如预期,阴性对照微抗体不结合 PSMA (参见图 15)。

[0130] 流式细胞计量术。在 ELISA 中成功结合重组 PSMA 后,通过流式细胞计量术测试 J591 微抗体蛋白结合 PSMA+ 细胞的能力。全长 hJ591 抗体被包含在实验中作为阳性对照 (数据未显示),并且阴性对照微抗体也被包含在内。在本实验中, PSMA+ 细胞是 LNCaP 和 CWR22rv1 细胞, PSMA- 细胞系是 PC3。J591 微抗体相比起同等浓度的阴性对照微抗体明显结合 LNCaP (参见图 16A) 和 CWR22rv1 (参见图 16C)。已知 LNCaP 细胞具有高于 CWRs 的 PSMA 表达,其可解释细胞群的较高 PE 信号 (参见图 16, 上排相对于下排)。如预期, J591 微抗体不显著结合 PC3 细胞 (数据未显示)。

[0131] 在此流式细胞计量分析前,使 J591 微抗体蛋白结合双功能性螯合剂 1, 4, 7, 10- 四氮杂环十二烷 -N, N', N'', N''' - 四乙酸 (DOTA), 准备用于下游放射性金属标记。利用水溶性 N- 羟基琥珀酰亚胺方法 (Lewis et al 2001) 实施结合。DOTA 结合后,透析蛋白质偶联物以改变缓冲液和去除过量的 DOTA。

[0132] 为在结合后检验结合能力,通过流式细胞计量术测试 J591-DOTA 微抗体与 PSMA 的

结合。相比起未结合的 J591 微抗体, J591-DOTA 微抗体呈现免疫反应性略微降低, 如细胞群的 PE 信号的略微改变所示 (参见图 16B 和 16D)。已知双功能螯合剂与抗体的过度结合是免疫反应性降低的原因 (Kukis et al 1995)。结合条件可被优化以防止过度结合和造成的结合损失。但是, J591-DOTA 微抗体结合的略微改变被认为是可接受的, 并且蛋白推进至放射标记。

[0133] 未标记微抗体的内化。利用免疫荧光共焦显微镜来检测 J591 微抗体至 PSMA+ 细胞的内化。用于本实验的两种 PSMA+ 细胞系, LNCaP 和 CWR22rv1 细胞系, 之前已被用于细胞结合研究, 并且还用于随后的放射标记内化研究。PC3 细胞被用作 PSMA- 阴性对照细胞系。全长亲本 J591 抗体被包含在实验中作为阳性对照。阴性对照微抗体也被包含在内以进一步证明 PSMA+ 细胞中摄取 J591 微抗体的特异性。

[0134] 由于原始全长 J591 抗体在 LNCaP 细胞上的之前的内化研究显示到 180 分钟时的强内化 (Liu et al 1998), 在一级抗体温育后 $t = 0$ 和 $t = 180$ 分钟将细胞染色以测定内化。通过结合 Alexa 488 荧光团的二级抗人 IgG 抗体检测抗体和微抗体的定位。细胞用 DAPI 复染, 以使核染色。

[0135] J591 全长抗体显示在 $t = 0$ 时对质膜非常鲜明和清楚的染色 (参见图 17)。在 37°C 下温育 180 分钟后, J591 全长抗体内化到 LNCaP 细胞中, 如 Alexa 488 染色在整个细胞的分散所示。J591 微抗体还显示 $t = 0$ 时清楚的质膜染色和到 $t = 180$ 分钟时的强内化 (图 17)。J591 微抗体在 $t = 0$ 时的染色明显不如 J591 全长清楚, 可能表明较小尺寸的微抗体在 LNCaP 细胞中更迅速的内化。阴性对照微抗体在 $t = 0$ 时不能结合 LNCaP 细胞。J591 全长抗体和微抗体不能结合 PSMA-PC3 细胞 (数据未显示)。

[0136] 全长 J591 抗体至 CWR22rv1 细胞的内化显示与 LNCaP 细胞所见非常类似的染色图谱。染色在 $t = 0$ 时对质膜非常鲜明和清楚, 并且到 $t = 180$ 分钟时变得非常分散 (参见图 18)。J591 微抗体也被内化到 CWR22rv1 中。染色在 $t = 0$ 时在质膜中清楚, 到 $t = 180$ 分钟时变得更加分散 (图 18)。如预期, 阴性对照微抗体不结合 CWR22rv1 细胞 (图 18)。

[0137] 实施例 4: 放射标记的 PSMA 特异性微抗体

[0138] 用碘-131 放射标记 J591 微抗体。利用 Pierce Thermo Scientific 的 Iodogen 法 (如 Olafsen et al 2006 所述) 用大约 $50\ \mu\text{Ci}$ 的 ^{131}I 放射性标记纯化的 J591 微抗体蛋白 ($50\ \mu\text{g}$)。该试剂能发生化学氧化反应, 以使 ^{131}I 连接于 J591 微抗体的可用的酪氨酸残基。表 2 是 J591 微抗体放射标记结果的概括, 包括放射标记效力、纯化后结合放射活性百分比和比活性。利用瞬时薄层色谱法 (ITLC) 测定结合蛋白质的放射活性相对于未结合的百分比, 确定放射标记效力为约 51%。(参见下表 2)。通过利用剂量校准器测量放射标记蛋白质的总活性和基于标记效力计算比活性, 确定比活性为 $0.46\ \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ (表 2)。为去除多余的未结合 ^{131}I , 利用旋转柱 (spin column) 进一步纯化放射标记的蛋白质。纯化后结合 J591 微抗体的放射活性百分比在纯化后显著增加至大约 96% (表 2)。

[0139] DOTA 结合和用铟-111 放射性金属标记 J591。用 ^{111}In 放射标记之前结合有双功能性金属螯合剂 DOTA 的 J591 微抗体。将 $100\ \mu\text{g}$ DOTA-J591 微抗体用 $200\ \mu\text{Ci}$ ^{111}In -氯化物在 0.1M 无金属乙酸铵 ($\text{pH } 6.0$) 中于 43°C 下温育 50 分钟。通过添加 10mM DTPA 至 1mM 的最终浓度来终止反应。测定放射标记效力为大约 60%, 比活性为 $1.1\ \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ (参见表 2)。利用旋转柱进一步纯化放射标记的蛋白质以去除过量的未结合 ^{111}In 。类似于 ^{131}I -J591 微

抗体,纯化后结合 J591 微抗体的放射活性百分比显著增加至大约 94% (表 2)。

[0140] 表 2. 用 ^{131}I 和 ^{111}In 放射标记 J591 微抗体。

[0141]

	放射标记 效力(%)	纯化后的结合 放射活性(%)	比活性 (uCi/ug)
^{131}I	51%	96.2%	0.46
$^{111}\text{In-DOTA}$	60%	94.2%	1.1

[0142] 经放射标记的 J591 微抗体的内化和保留。测试 ^{131}I 标记和 $^{111}\text{In-DOTA}$ 标记的 J591 微抗体在 PSMA+CWR22rv1 细胞中细胞相关放射活性的摄取和保留。将 CWR22rv1 细胞选作这些体外实验的唯一 PSMA+ 细胞系,因为其将被用于微 PET 成像实验。鉴于文献和同事的实验知识, CWR22rv1 异种移植模型具有比 LNCaP 模型高的肿瘤发生率 (take rate) 和比 LNCaP 模型快的体外和肿瘤生长速率。

[0143] 对于 ^{131}I 标记的 J591 微抗体的摄取和保留,与膜有关的放射活性量在前 30 分钟内迅速减少,而内化放射活性在此时间框内迅速增加 (参见图 19A)。这些数据一起表明 ^{131}I -J591 微抗体的内化。虽然内化 ^{131}I J591 的量随时间增加,但总细胞相关放射活性到 180 分钟时相对于 ~ 2900cpm 的最初起始点显著降低 (参见图 19A)。

[0144] 与之形成鲜明对比的是, $^{111}\text{In-DOTA}$ 标记的 J591 微抗体的摄取和保留显示总细胞相关放射活性随时间相对大的增加 (参见图 19B)。类似于 ^{131}I 标记的 J591 微抗体,膜相关的放射活性随内化放射活性增加而显著减少,表明具有活性的内化 (参见图 19B)。很大程度上归功于内化放射活性随时间的增加,总细胞相关放射活性到 180 分钟时从 ~ 7,500cpm 的起始点增至大约 20,000cpm (图 19B)。

[0145] 为比较两种放射标记 J591 微抗体,通过以各个放射标记分别在 $t = 0$ 时的初始细胞相关放射活性的百分比的形式表示数据而标准化总细胞相关放射活性 (参见图 20)。到 $t = 180$ 分钟时, $^{111}\text{In-DOTA}$ 标记的 J591 微抗体增至初始细胞相关放射活性的 ~ 250%,而 ^{131}I 标记的 J591 微抗体降至初始的 ~ 80% (图 20)。如文献 (Vaidyanathan et al 2009) 中的其他组所示,非残留 ^{131}I 标记策略导致细胞相关放射活性随时间总体减少。这些数据明确表明,残留 $^{111}\text{In-DOTA}$ 放射标记的细胞相关放射活性随时间保留和积累。

[0146] 纯化的 J591 HC VHVL 微抗体 (或上述任何微抗体) 可用于在微 PET 成像和生物分布研究中证明在体内靶向人 PSMA 的能力。在一个实施方式中,纯化的 J591 HC VHVL 微抗体蛋白可首先在成像研究的准备中被再次检验以确定其体外结合 PSMA 的能力。在确定结合后,然后可将 J591 HC VHVL 微抗体结合于双功能性螯合剂 DOTA,并用适于微 PET 的发射正电子的放射性金属如铜 64 进行放射标记。在进行微 PET 成像前,可分析放射标记的微抗体以确保高放射标记效力和免疫反应性。

[0147] 在一些实施方式中,放射标记的微抗体可静脉内注入移植有 PSMA 阳性或 PSMA 阴性肿瘤的异种移植小鼠。在注射后的特定时间点,可通过 PET 连续扫描各动物。在最后一次扫描后,可通过 CT 扫描动物,用于解剖参考。然后可分析各动物的 PET 和 CT 图像,从而评价肿瘤靶向和特异性。

[0148] 实施例 5: ^{125}I -J591 和 $^{64}\text{Cu-DOTA}$ 结合的 J591 微抗体的体内结合和生物分布

[0149] 用碘-124 放射标记 J591 微抗体。利用 Pierce Thermo Scientific 的 Iodogen 法 (如 Olafsen et al 2006 所述) 用大约 1.3mCi ¹²⁴I 放射标记纯化的 J591 微抗体蛋白 (总量为 300 μg)。该方法涉及化学氧化反应以将 ¹²⁴I 放射性同位素连接于 J591 微抗体可用的酪氨酸残基。下文表 3 是 J591 微抗体放射标记结果的概括, 包括放射标记效力、纯化后结合的放射活性百分比、比活性和免疫反应性。标记反应后, 利用瞬时薄层色谱 (ITLC) 确定放射标记效力为大约 62% (结合蛋白质的放射活性相对于未结合的百分比) (参见表 3)。利用 Sephadex G-25 旋转柱部分地纯化放射标记的 J591 微抗体, 并通过 ITLC 对其进行重新评价, 从而确定结合放射活性的百分比。放射标记蛋白质的比活性为 2.6 μCi/μg (表 3), 如通过用剂量校准器测量蛋白质总放射活性所确定。为从反应去除多余的未结合 ¹²⁴I, 用旋转柱进一步纯化放射标记的蛋白质。纯化后结合 J591 微抗体的放射活性百分比显著增加至大约 98% (表 3)。通过测试与 CWR22rv1 相对于 PC3 细胞的结合来确定 ¹²⁴I-J591 微抗体的免疫反应性为 48% (表 3)。虽然该免疫反应性低于预期, 但基于之前的微抗体结合性能, 做出推进 ¹²⁴I J591 微抗体至成像和生物分布实验的决定。进一步的放射标记条件 (pH、时间、温度等) 的优化和得到较高蛋白质纯度可潜在地提高免疫反应性。

[0150] 表 3. 用 ¹²⁴I 和 ⁶⁴Cu 对 J591 微抗体进行放射标记。

[0151]

	标记条件	放射标记效力(%)	纯化后的结合放射活性(%)	比活性 (uCi/ug)	免疫反应性 (%)
¹²⁴ I	PBS 中的蛋白质	62%	98.0%	2.6	48%
⁶⁴ Cu-DOTA	PBS 中的蛋白质	40%	85% *	1 *	29% *
⁶⁴ Cu-DOTA	AmmOAc, 增加 AmmCiTr 缓冲液	92%	85% *	1 *	29% *
* -含两种标记条件的组分					

[0152] 铜-64 放射性金属标记 DOTA-J591 微抗体。用 ⁶⁴Cu 放射标记 J591 微抗体, 其之前结合双功能性金属螯合剂 DOTA。对于初始放射标记条件, 在 43°C 下于 25mM 无金属柠檬酸铵 [pH 5.2] 中将 PBS 中的 400 μg DOTA-J591 微抗体与大约 745 μCi ⁶⁴CuCl₂ 温育 60 分钟。通过添加 10mM EDTA 至最终浓度 1mM 而终止反应。利用这些标记条件, 确定放射标记效力低于预期约 40% (参见表 3)。

[0153] 在提高标记效力的努力中, 在开始放射标记反应前首先将 DOTA-J591 微抗体透析到 0.25 乙酸铵缓冲液 [pH 7.2] 中。用大约 730uCi ⁶⁴CuCl₂ 标记乙酸铵缓冲液中的另外的 560 μg DOTA-J591 微抗体。改善放射标记的另一种调整涉及增加反应所用的柠檬酸铵缓冲液百分比。随着这些调整, 放射标记效力显著增加至大约 92% (表 3)。

[0154] 将两种标记条件的所有 ⁶⁴Cu-DOTA J591 微抗体组分混合在一起, 并用旋转柱进一步纯化以去除过量的未结合 ⁶⁴Cu。纯化后结合 J591 微抗体的放射活性的百分比为大约 85%, 并且比活性为 1 μCi/μg (表 3)。利用之前关于 ¹²⁴I J591 微抗体所述的基于细胞的方法确定放射标记的微抗体免疫反应性为大约 29% (表 3)。虽然免疫反应性低于预期, 但做出推进至微 PET 和生物分布实验的决定。除蛋白质纯度和标记条件外, 未来优化免疫反应性的努力可包括优化 DOTA 结合反应 (即, DOTA- 分子比等)。

[0155] 实施例 6:放射标记的 J591 微抗体的连续微 PET 成像和生物分布

[0156] ^{64}Cu -DOTA J591 微抗体。为了评价 ^{64}Cu -DOTA-J591 微抗体的肿瘤靶向和结合特异性,利用植入 CWR22rv1 (PSMA+) 和 PC3 (PSMA-) 异种移植体的小鼠进行微 PET 成像和生物分布分析。在开始成像实验前,使两种异种移植肿瘤均生长至 39-223mg 的尺寸。在注射后 4 小时 CT 和 PET/CT 图像显示, CWR22rv1 肿瘤相比起 PC3 肿瘤迅速肿瘤定位 (图 21A 和 21B 显示代表性小鼠)。如对放射性金属标记的微抗体的预期,在胸部中检测到显著活性,并具体定位于肝脏。放射性金属如 ^{64}Cu 的定位已在文献 (Yazaki et al 2001) 中得到充分研究。除肝脏外,背景活性甚至在注射后 4 小时仍相对较低,这允许具有显著对比的 PET/CT 图像 (图 21B 和 21C)。强肿瘤定位在注射后 19 小时甚至 43 小时仍持续 (图 21D)。总背景活性随时间略微减少,但肝脏仍保持强活性源 (图 21D)。

[0157] 最后一次扫描后,安乐死所有动物 (在注射后 19 小时 $n=8$, 在注射后 43 小时 $n=4$), 并将选定的目标组织 (包括阳性和阴性肿瘤、血液、肝、脾、肺和肾) 切除、称重和通过 γ 计数器测量放射活性。图 22 中在注射后 19 小时的生物分布表明, CWR22rv1 肿瘤 (肿瘤+) 达到 8.23% ID/g 的平均摄取,与之相比 PC3 肿瘤 (肿瘤-) 为 2.69% ID/g。在 CWR22rv1 的定位明显高于 PC3 肿瘤 ($p<0.05$)。如微 PET/CT 成像所示,注射后 19 小时肝脏的摄取相对较高 (21.43% ID/g),而其他目标组织的定位非常较不显著 (参见图 22)。

[0158] 在注射后 43 小时,生物分布表明 CWR22rv1 肿瘤的平均摄取 (肿瘤+; 13.25% ID/g) 相比注射后 19 小时增加 (图 22)。背景活性相比注射后 19 小时减少,特别是肝活性显著减少至 14.37% ID/g (图 22)。

[0159] 随着背景活性总体减少结合 CWR22rv1 肿瘤的积累增加,肿瘤与背景的比在注射后 19 小时至注射后 43 小时之间显著增加 (图 26)。

[0160] ^{124}I J591 微抗体。如同 ^{64}Cu -DOTA J591 微抗体,对 ^{124}I J591 微抗体进行微 PET 和生物分布实验,以评价肿瘤靶向。在开始成像实验前使两种异种移植肿瘤均生长至 36-192mg 的尺寸范围。注射后 (p. i.) 4 小时的微 PET 图像显示在 CWR22rv1 肿瘤迅速定位,但在胸部、腹部和膀胱中具有高循环活性 (图 23A 和 23B)。到注射后 20 小时,背景活性从系统明显清除,并且到 44 小时几乎完全消失,而在阳性肿瘤处活性保持 (图 23C)。

[0161] 对于生物分布分析,在最后一次扫描后安乐死组中的所有动物 (注射后 20 小时 $n=6$, 注射后 44 小时 $n=2$), 并将选定的目标组织切除、称重和通过 γ 计数器测量放射活性。图 24 中小鼠注射后 20 小时的生物分布显示, CWR22rv1 肿瘤 (肿瘤+) 摄取达到 8.75% ID/g,与之相比 PC3 肿瘤 (肿瘤-) 为 1.8% ID/g。在 CWR22rv1 的定位明显高于 PC3 肿瘤 ($p<0.05$)。背景活性到注射后 20 小时相对较低 (图 24)。

[0162] 到注射后 44 小时, CWR22rv1 肿瘤 (肿瘤+) 摄取显著减少至 3.25% ID/g (图 24)。细胞相关放射活性由于 ^{124}I -J591 微抗体脱卤和 / 或代谢随时间减少,支持之前上述体外内化和保留实验的结果。到注射后 44 小时,背景活性几乎完全从系统清除 (图 24)。

[0163] 虽然 CWR22rv1 肿瘤活性摄取随时间减少 (图 24),但背景活性迅速减少造成图像的强烈对比。生物分布比反映出肿瘤比背景随时间的巨大增加 (图 27)。

[0164] 在通过 J591 微抗体使 PSMA 阳性肿瘤成功成像后,根据本公开的实施方式可考察微抗体的生物分布。这些生物分布研究可考察注射后微抗体在肿瘤位点相对于其他选定组织随时间的定位。这些研究可用于证明高肿瘤 / 背景比。J591 微抗体的应用将可能在使过

量表达 PSMA 的肿瘤——如前列腺癌中——成像时,产生高肿瘤 / 背景比。这些成像和生物分布实验的阳性结果可引起毒理学实验,为临床研究做准备。

[0165] 进一步,通过 PET 成像研究,J591 微抗体体内靶向人 PSMA 的能力可通过癌症患者的临床试验得到证明。在一个实施方式中,临床试验可在前列腺癌患者中进行。癌症患者的这些临床试验可利用上述类似方法进行。简而言之,放射标记的微抗体可被静脉内注入患有已知过量表达 PSMA 的癌症形式的癌症患者。在注射后特定时间点,可通过 PET 连续扫描各患者。在最后一次扫描后,可通过 CT 扫描患者用于解剖学参考。然后可分析各患者的 PET 和 CT 图像,从而评价肿瘤靶向和特异性。

[0166] 参考文献

[0167] 以下所列的参考文献、专利和公开的专利申请以及说明书上文引用的所有参考文献在此以其全部内容通过参考并入本文,如同本文对其进行了完整叙述。

[0168] Bander NH, Trabulsi EJ, Kostakoglu L, Yao D, Vallabhajosula S, Smith-Jones P, Joyce MA, Milowsky M, Nanus DM, Goldsmith SJ. Targeting metastatic prostate cancer with radiolabeled monoclonal antibody J591 to the extracellular domain of prostate specific membrane antigen. *J Urol*, 2003. 170(5):1717-1721.

[0169] Bander NH, Milowsky MI, Nanus DM, Kostakoglu L, Vallabhajosula S, Goldsmith SJ. Phase I trial of ¹⁷⁷ Lutetium-labeled J591, a monoclonal antibody to prostate-specific membrane antigen, in patients with androgen-independent prostate cancer. *J Clin Oncol*, 2005. 23(21):4591-601.

[0170] Hu S, Shively L, Wu AM. Minibody: A novel engineered anti-carcinoembryonic antigen antibody fragment (single-chain Fv-CH3) which exhibits rapid, high-level targeting of xenografts. *Cancer Res*, 1996. 56(13):3055-61.

[0171] Kukis DL, Denardo GL, Denardo SJ, Mirick GR, Miers LA, Greiner DP, Meares CF. Effect of the Extent of Chelate Substitution on the Immunoreactivity and Biodistribution of ²¹²Pb-BAT-Lym-1 Immunoconjugates, 1995. 55, 878-884.

[0172] Lewis MR, Kao JY, Anderson AL, Shively JE, Raubitschek A. An improved method for conjugating monoclonal antibodies with N-hydroxysulfosuccinimidyl DOTA. *Bioconjug Chem*, 2001. 12:320-324.

[0173] Leyton JV, Wu AM. Humanized radioiodinated minibody for imaging of prostate stem cell antigen-expressing tumors. *Clin Cancer Res*, 2008. 14(22):7488-96.

[0174] Liu H, Rajasekaran AK, Moy P, Xia Y, Kim S, Navarro V, Rahmati R, Bander NH. Constitutive and Antibody-induced Internalization of Prostate-specific Membrane Antigen. *Cancer Res*, 1998. 58:4055-4060.

[0175] Liu H, Moy P, Kim S, Xia Y, Rajasekaran A, Navarro V, Knudsen B, Bander NH. Monoclonal antibodies to the extracellular domain of prostate specific membrane antigen also react with tumor vasculature endothelium. *Cancer Res*, 1997. 57(17):3629-34.

[0176] Milowsky MI, Nanus DM, Kostakoglu L, Vallabhajosula S, Goldsmith SJ, Bander

NH. Phase I trial of Yttrium-90-labeled anti-prostate specific membrane antigen monoclonal antibody J591 for androgen-independent prostate cancer. *J Clin Oncol*, 2004. 22(13):2522-2531.

[0177] Milowsky MI, Nanus DM, Kostakoglu L, Sheehan CE, Vallabhajosula S, Goldsmith SJ, Ross JS, Bander NH. Vascular targeted therapy with anti-prostate-specific membrane antigen monoclonal antibody J591 in advanced solid tumors. *J Clin Oncol*, 2007. 25(5):540-547.

[0178] Morris MJ, Divgi CR, Pandit-Taskar N, et al. Pilot trial of unlabeled and indium-111-labeled anti-prostate-specific membrane antigen antibody J591 for castrate metastatic prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 2005. 11(20):7454-7461.

[0179] Olafsen T, Tan GJ, Cheung CW, Yazaki PJ, Park JM, Shively JE, Williams LE, Raubitschek AA, Press MF, Wu AM. Characterization of engineered anti-p185HER-2(scFv-CH3)₂ antibody fragments(minibodies)for tumor targeting. *Protein Eng Des Sel*, 2004. 17(4):315-23.

[0180] Olafsen T, Kenanova VE, Wu AM. Tunable pharmacokinetics:modifying the in vivo half-life of antibodies by directed mutagenesis of the Fc fragment. *Nat Protoc*, 2006. 1:2048-60.

[0181] Olafsen T, Betting D, Kenanova VE, Salazar FB, Clarke P, Said J, Raubitschek AA, Timmerman JM, Wu AM. Recombinant Anti-CD20 Antibody Fragments for Small-Animal PET Imaging of B-Cell Lymphomas. *J Nuc Med*, 2009. 50(9):1500-1508.

[0182] Olson WC, Heston WDW, Rajasekaran AK. Clinical Trials of Cancer Therapies Targeting Prostate Specific Membrane Antigen. *Reviews on Recent Clinical Trials*, 2007. 2:182-190.

[0183] Slovin SF. Targeting novel antigens for prostate cancer treatment:focus on prostate-specific membrane antigen. *Expert Opin Ther Targets*, 2005. 9(3):561-570.

[0184] Vaidynathan G, Jestin E, Olafsen T, Wu AM, Zalutsky MR. Evaluation of an anti-p185(HER2)(scFv-C(H)₂-C(H)₃)₂ fragment following radioiodination using two different residualizing labels:SGMIB and IB-Mal-D-GEECK. *Nucl Med Biol*, 2009. 36(6):671-80.

[0185] Wong JY, Chu DZ, Williams LE, Yamauchi DM, Ikle DN, Kwok CS, Liu A, Wilczynski S, Colcher D, Yazaki PJ, Shively JE, Wu AM, Raubitschek AA. Pilot trial evaluating an I¹²³I-labeled 80-kilodalton engineered anticarcinoembryonic antigen antibody fragment(cT84.66minibody)in patients with colorectal cancer. *Clin Cancer Res*, 2004. 10(15):5014-21.

[0186] Wu AM and Senter PD. Arming antibodies:prospects and challenges for immunoconjugates. *Nat Biotechnol*, 2005. 23(9):1137-46.

[0187] Wu AM and Olafsen T. Antibodies for molecular imaging of cancer. *Cancer J*, 2008. 14(3):191-7.

- [0188] Wu AM. Antibodies and Antimatter: The resurgence of ImmunoPET. J Nucl Med, 2009. 50(1):2-5.
- [0189] Yazaki PJ, Wu AM, Tsai SW, Williams LE, Ikle DN, Wong JYC, Shively JE, and Raubitschek AA. Tumor targeting of radiometal labeled anti-CEA recombinant T84.66 diabody and T84.66 minibody: Comparison to radioiodinated fragments. Bioconj Chem, 2001. 12, 220-228.
- [0190] 专利和公开的专利申请:
- [0191] Wu, Anna. Antibody Construct. 美国专利 5837821, 提交于 06/24/94, 授予专利权于 11/17/98。
- [0192] Bander, Neil. Treatment and diagnosis of cancer. 美国专利 6649163, 提交于 7/20/99, 授予专利权于 11/18/03。
- [0193] Bander, Neil. Treatment and diagnosis of cancer. 美国专利 6770450, 提交于 7/20/99, 授予专利权于 8/3/04。
- [0194] Bander, Neil. Carr, Francis. Hamilton, Anita. Modified antibodies to prostate-specific membrane antigen and uses thereof. 美国专利 7045605, 提交于 5/30/02, 授予专利权于 5/16/06。
- [0195] Bander, Neil. Treatment and diagnosis of prostate cancer. 美国专利 7112412, 提交于 7/20/99, 授予专利权于 9/26/06。
- [0196] Bander, Neil. Treatment and diagnosis of cancer. 美国专利 7163680, 提交于 8/13/2001, 授予专利权于 1/16/07。
- [0197] Bander, Neil. Treatment and diagnosis of cancer. 美国专利 6136311, 提交于 7/17/97, 授予专利权于 10/24/00。
- [0198] Bander, Neil. Treatment and diagnosis of prostate cancer with antibodies to extracellular PSMA. 美国专利 6107090, 提交于 4/9/97, 授予专利权于 8/22/00。
- [0199] Bander, Neil. Carr, Francis. Hamilton, Anita. Methods of treating prostate cancer with anti-prostate specific membrane antigen antibodies. 美国专利 7514078, 提交于 05/30/03, 授予专利权于 4/7/09。

[0001]

序列表

<110> D. 何
 T. 奥拉夫森
 L. 李普曼
 <120> 靶向人前列腺特异性膜抗原 (PSMA) 的 J591 微抗体和双抗体及其应用方法
 <130> 72050.8002.W000
 <150> US 61/266,134
 <151> 2009-12-02
 <160> 19
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 1176
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> J591 人复合 VHVL 微抗体核苷酸序列
 <400> 1
 atggaaaccg acaccctgcl gctgtgggtg ctgctgcicl gggtcccagg ctccaccgtt 60
 gaagtgcagc tggteagtc tgggcggaa gtgaagaaac ctggcgctc cgtgaagatc 120
 tcttcaaa ecctccgcta cacttccac gactacaca tccactgggt gaacaggec 180
 tccggcaagg gcttggatg gactggcaac atcaacccta acaacggcgg caccacctac 240
 aaccagaagt tcgaggaccg ggcacacctg accgtggaca agtccacctc caccgcctac 300
 atggaaactgt cctccctgcg gtctgaggac accgcctgt actactgcgc cgttgctgg 360
 aacttcgact actggggcca gggcaccaca gtgacagtct cgagcggctc tacctctggc 420
 ggaggtctg ggggaggaag cggcggagge ggtctctctg acatcgtgat gaccagtec 480
 cctctctccc tgtctgecte cgtggggcag agagtacaa tccatgcaa ggcctccag 540
 gatgtggca cggcctgga ctggtatcag cagaagcctg gcaaggcccc taagctgctg 600
 atctactggg cctccaccag acacaccgge gtgcctgaca gattcaecgg ctccggtctt 660
 ggcaccgact taccctgac cactccage ctgcagcctg aggaattcgc cgaactctc 720
 tgcagcagc acactccta cctctgacc ttcggcgag gacccagct ggaattcnaa 780
 gagcccaagt cctgcgaca gaccacacc tgcctccctt gtggcggcgg atctaglggc 840
 ggaggatccg gtggccagcc tggggagcct caggtgtaca cctgcctcc ctccggggac 900
 gagctgaca agaaccaggt gtcctgacc tgtctggica agggcttcta ccttccgat 960
 atgcctgtgg agtgggagtc caacggccag cctgagaaca actacangac caccctcct 1020
 gtgtctgact ccagcggctc ctcttctctg tactccaagc tgacagtgga taagtcctgg 1080
 tggcagcagg gcaacgigt ctctgttcc gtgatgcaag aggccttgc aaccactat 1140
 acccagaagt cctgtctct gtctctggc aagtga 1176
 <210> 2
 <211> 1176
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> J591 2P VHVL 微抗体核苷酸序列
 <400> 2

[0002]

```

atggaacccg acaccctgct gctgagggtg ctgctgctct gggteccagg ctccaccggt      60
gaagtcagc tgggtcagtc cggccctgaa gtaagaagc ctggcgccac cgtcaagatc      120
tcctgcaaga cctccggcta caccctcacc gactacacca tccactgggt gaaacaggcc      180
ccctggcaagg gctcgaatg gatcggcaac atcaacctt acaacggcgg caccacctat      240
aacagaagt tcaggacaa ggccacctg accgtggacn agtcnccga caccgcttac      300
atggaactgt cctccctccg gtccaggac accgcagtgt attactgcgc cgctggctgg      360
aacttcgact actggggcca ggccacctg ctgacagtct cgagcgctc cnaagtggc      420
ggaggtctg gcgtggatc tggcggaggc ggctcctcg acatccagat gaccagttc      480
cctctctccc tgtccactc cgtggcgac agagtgaacc tgacatcaa ggctctccag      540
gacgtgggca ccgcgggga ctggtatcag cagaagccag gccagtcccc taagctgctg      600
atctactggg cctccnccg gcncccgcc atccctccc ggctctccg cagtggctct      660
ggcaccgact tcacctgac catctccagc ctgcagctg aggaattcgc cgaactactac      720
tgccagcagt acaactccta cctctgacc ttggcgccg gcacaaaggt ggacatcaaa      780
gagcttaagt cctcgacaa gaccacaca tgtccctct ggcgggagg agcagcgga      840
ggcggtccg gtcgctacc tgggagccct caggtgtaca cctgcctcc ctccgggac      900
gagctgacca agaaccaggt gtccctgacc tgtctggta agggtctta cctctccgt      960
atgcgcggg agtgggagtc caacggccag cctgagaaca actacaagc cccccctct      1020
gtgtggact ccgacggctc cttctctctg tactccaagc tgacagtgga taagtcctgg      1080
tgccagcagg gcaacgtgt ctcctgttc gtgatgcac aggccttga caaccacta      1140
accagaagt cctgtcct gtctctggc aagtga      1176

```

<210> 3
 <211> 115
 <212> PR1
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人复合 J591 V-区域 (VH)的氨基酸序列

<400> 3

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
20 25 30

Thr Ile His Trp Val Lys Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

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

Ala Ala Gly Trp Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr

[0003]

	100	105	110
Val Ser Ser			
115			
<210> 4			
<211> 115			
<212> PRT			
<213> 小白鼠 (Mus musculus)			
<400> 4			
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Thr			
1 5 10 15			
Ser Val Arg Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr			
20 25 30			
Thr Ile His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile			
35 40 45			
Gly Asn Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe			
50 55 60			
Glu Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr			
65 70 75 80			
Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Trp Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys			
85 90 95			
Ala Ala Gly Trp Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr			
100 105 110			
Val Ser Ser			
115			
<210> 5			
<211> 115			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 去免疫的 J591 V-区域 (VH)的氨基酸序列			
<400> 5			
Glu Val Gly Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala			
1 5 10 15			
Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr			
20 25 30			
Thr Ile His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile			
35 40 45			
Gly Asn Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe			
50 55 60			
Glu Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Asp Thr Ala Tyr			
65 70 75 80			

[0004]

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

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

Val Ser Ser
115

<210> 6
<211> 750
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> J591 cys-双抗体 (CysDB) VH-5-VL 核苷酸序列

<400> 6
atggaaccg acacccctgt gctgtgggtg ctgctcctgt gggigcccgg atctaccgtt 60
gaagtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggcgccctc cgtgaagatc 120
tcttgcaga cctccggcta cacccttcac gagtacacca tccactgggt gaaacaggcc 180
tccggcaagg gcctggaatg gctggcaac atcaacctt acaacggcgg caccacctac 240
aaccagaagt tcgaggaccg ggccacctg accgtggaca agtcacctc caccgcctac 300
atggaactgt cctcccigcg gtctgaggac accgcctgt actactgcgc cgtggctgg 360
aacttcgact actggggcca gggcaccacc gtgacagct cgaactcgg tggggcgcc 420
gatatcgtga tgaaccagtc ccttctctc ctgtctgctt ccgtggcgca cagagtacc 480
atcacatgca aggcctccca ggaatgggg accgcctgg actggtatca gcagaagcct 540
ggcaaggccc ctangctgt gatctactgg gccctccaca gacacaccg cgtgcctgac 600
agattcaccg gctccggctc tggcaccgac ttaccctga ccatctccag cctgcagcct 660
gaggacttcg ccactactt ctgccagcag taacactct accctctgac ctteggcgga 720
ggcaccagc tggaaatcaa gggcgggtgc 750

<210> 7
<211> 759
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> J591 cys-双抗体 (CysDB) VH-8-VL 核苷酸序列

<400> 7
atggaaccg acacccctgt gctgtgggtg ctgctcctgt gggigcccgg atctaccgtt 60
gaagtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggcgccctc cgtgaagatc 120
tcttgcaga cctccggcta cacccttcac gagtacacca tccactgggt gaaacaggcc 180
tccggcaagg gcctggaatg gctggcaac atcaacctt acaacggcgg caccacctac 240
aaccagaagt tcgaggaccg ggccacctg accgtggaca agtcacctc caccgcctac 300
atggaactgt cctcccigcg gtctgaggac accgcctgt actactgcgc cgtggctgg 360
aacttcgact actggggcca gggcaccacc gtgacagct cgaactcgg agggagtggc 420
ggaggcgccg atatcgtgat gaccagtc ccttctctc tgtctgctc cgtggcgac 480
agagtacca tcacatgcaa ggctcccag gatgtggca ccgccggga ctggtatcac 540
cagaagcctg gcangcccc taagctgctg atctactgg cctccaccag acacaccg 600

[0005]

gtgccctgaca gartcaccgg ctcgggtctt ggcaccgact tcacctgac cattercage 660
ctgcagcctg aggaattcgc cgactattc tgcagcagt acaattccta cctctgacc 720
ttcggcggag gcaccaagct ggaatcaag ggcggttg 759

<210> 8
<211> 750
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> J59I cys-双抗体 (CysDB) VI-5-VII 核苷酸序列

<400> 8
atggaacgg acacctgct gctgtgggtg ctgctctgt ggttgcggg atctaccgt 60
gatatcgtga tgaccagtc ccttctctc ctgtctgct cgttgggga cagagtgacc 120
atcacatgca aggcctccca ggaatgggc accgcctgg actggtatca gcagaagcct 180
ggcaaggccc cttaagctgt gatctactgg gctctcacc gacacacgg cgtgctgac 240
agattacgg gctcgggtc tggaccgac ttacacctga ccatctcag cctgcagcct 300
gaggacttcg ccgactact ctgccagcag tacaactct accctctgac cttcggcgga 360
ggcaccagc tggaaatcaa gtccgggtgg ggcggcgaag tgcagctgt gcagctggc 420
gccgaagiga agaaacctgg cgtctcgtg aagatctct gcaagacct cggtacacc 480
ttacccgagt acaccatca ctgggtgaaa caggctctc gcaaggcct ggaatggatc 540
ggcaacatca accctaaan cggcgggacc acctacaac agaagtcca ggaccgggcc 600
acctgacgg tggacaagtc caectccac gcttacctg aactgtctc cctgcggctt 660
gaggacacgg cgtgtacta ctgcgcgtt ggttggact tgcactact gggtcagggc 720
accaccgiga cagtctcag cggcggttg 759

<210> 9
<211> 759
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> J59I cys-双抗体 (CysDB) VI-8-VII 核苷酸序列

<400> 9
atggaacgg acacctgct gctgtgggtg ctgctctgt ggttgcggg atctaccgt 60
gatatcgtga tgaccagtc ccttctctc ctgtctgct cgttgggga cagagtgacc 120
atcacatgca aggcctccca ggaatgggc accgcctgg actggtatca gcagaagcct 180
ggcaaggccc cttaagctgt gatctactgg gctctcacc gacacacgg cgtgctgac 240
agattacgg gctcgggtc tggaccgac ttacacctga ccatctcag cctgcagcct 300
gaggacttcg ccgactact ctgccagcag tacaactct accctctgac cttcggcgga 360
ggcaccagc tggaaatcaa ggcgggagg agtgcggag gcggcgaat gcagctggtg 420
cagcttggcg ccgaagtga gaaacctgga gcttccgta agatctctg cnagacctc 480
ggctacacct tcaccagta caaccatca tgggtgaaac aggcctccg caaggccctg 540
gaatggatcg gcaacatca ccttacaac ggcggcaca cctacaacca gaagttcag 600
gaccgggcca cctgacctg ggaacgtcc acctccacc cctacatga actgtctcc 660
ctgcggctg aggaacacg cgtgtacta tgcgcctg gcttggactt cgactactg 720

[0006]

ggccagggca ccaccgtgac agtctcgagc ggcggttgc

759

<210> 10

<211> 391

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> J591 人复合 VHVL 微抗体氨基酸序列

<400> 10

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

[0007]

Leu Glu Ile Lys Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
260 265 270

Pro Cys Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gln Pro Arg
275 280 285

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
290 295 300

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
305 310 315 320

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
325 330 335

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
340 345 350

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
355 360 365

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
370 375 380

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
385 390

<210> 11
<211> 391
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> J591 2P VHVL 微抗体氨基酸序列

<400> 11

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Val Lys
20 25 30

Lys Pro Gly Ala Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr
35 40 45

Phe Thr Glu Tyr Thr Ile His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly
50 55 60

Leu Glu Trp Ile Gly Asn Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr Tyr
65 70 75 80

Asn Gln Lys Phe Glu Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr
85 90 95

Asp Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala
100 105 110

[0008]

Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Gly Trp Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 115 120 125
 Thr Leu Leu Thr Val Ser Ser Gly Ser Thr Ser Gly Gly Gly Ser Gly
 130 135 140
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser
 145 150 155 160
 Pro Ser Ser Leu Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Leu Thr Cys
 165 170 175
 Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala Val Asp Trp Tyr Gln Gln Lys
 180 185 190
 Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His
 195 200 205
 Thr Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 210 215 220
 Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr
 225 230 235 240
 Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys
 245 250 255
 Val Asp Ile Lys Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
 260 265 270
 Pro Cys Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gln Pro Arg
 275 280 285
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
 290 295 300
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 305 310 315 320
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 325 330 335
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 340 345 350
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 355 360 365
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 370 375 380
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 385 390
 <210> 12
 <211> 250
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0009]

<220>
 <223> J591 cys-双抗体 (CysDB) VH-5-VL 氨基酸序列
 <400> 12
 Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15
 Gly Ser Thr Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys
 20 25 30
 Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr
 35 40 45
 Phe Thr Glu Tyr Thr Ile His Trp Val Lys Gln Ala Ser Gly Lys Gly
 50 55 60
 Leu Glu Trp Ile Gly Asn Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr Tyr
 65 70 75 80
 Asn Gln Lys Phe Glu Asp Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr
 85 90 95
 Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala
 100 105 110
 Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Gly Trp Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 115 120 125
 Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ser Gly Gly Gly Gly Asp Ile Val Met
 130 135 140
 Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr
 145 150 155 160
 Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala Val Asp Trp Tyr
 165 170 175
 Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser
 180 185 190
 Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly
 195 200 205
 Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
 210 215 220
 Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly
 225 230 235 240
 Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Cys
 245 250
 <210> 13
 <211> 253
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>

[0010]

<223> J591 cys-双抗体 (CysDB) VH-8-VL 氨基酸序列

<400> 13

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys
20 25 30

Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr
35 40 45

Phe Thr Glu Tyr Thr Ile His Trp Val Lys Gln Ala Ser Gly Lys Gly
50 55 60

Leu Glu Trp Ile Gly Asn Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr Tyr
65 70 75 80

Asn Gln Lys Phe Glu Asp Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr
85 90 95

Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala
100 105 110

Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Gly Trp Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
115 120 125

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Asp
130 135 140

Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp
145 150 155 160

Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala Val
165 170 175

Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
180 185 190

Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser
195 200 205

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
210 215 220

Asp Phe Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
225 230 235 240

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Cys
245 250

<210> 14

<211> 250

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> J591 cys 双抗体 (CysDB) VL 5 VH 氨基酸序列

[0011]

<400> 14

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp
35 40 45

Val Gly Thr Ala Val Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp
65 70 75 80

Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn
100 105 110

Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ser
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys
130 135 140

Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr
145 150 155 160

Phe Thr Glu Tyr Thr Ile His Trp Val Lys Gln Ala Ser Gly Lys Gly
165 170 175

Leu Glu Trp Ile Gly Asn Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr Tyr
180 185 190

Asn Gln Lys Phe Glu Asp Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr
195 200 205

Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala
210 215 220

Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Gly Trp Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
225 230 235 240

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys
245 250

<210> 15

<211> 253

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> J591 cys-双抗体 (CysDB) VL-8-VH 氨基酸序列

<400> 15

[0012]

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15
 Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
 20 25 30
 Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp
 35 40 45
 Val Gly Thr Ala Val Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 50 55 60
 Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp
 65 70 75 80
 Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn
 100 105 110
 Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly
 115 120 125
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala
 130 135 140
 Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser
 145 150 155 160
 Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Thr Ile His Trp Val Lys Gln Ala Ser
 165 170 175
 Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Asn Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly
 180 185 190
 Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Glu Asp Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp
 195 200 205
 Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu
 210 215 220
 Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Gly Trp Asn Phe Asp Tyr Trp
 225 230 235 240
 Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys
 245 250
 <210> 16
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)
 <400> 16
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro

[0013]

20

<210> 17
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人复合 J591 V-区域 (VL)的氨基酸序列

<400> 17

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala
 20 25 30

Val Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 18
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 小白鼠

<400> 18

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Ile Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala
 20 25 30

Val Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Asn Val Gln Ser
 65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Met Leu Asp Leu Lys
 100 105

[0014]

<210> 19
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 去免疫的 J591 V-区域 (VL)的氨基酸序列

<400> 19

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala
 20 25 30

Val Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Pro Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105

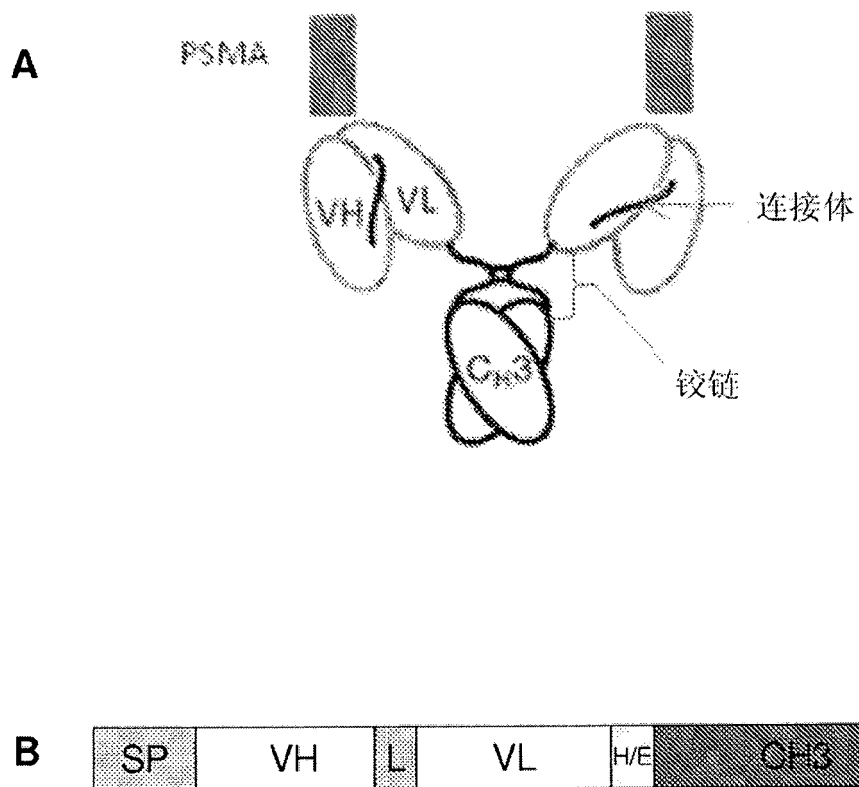


图 1

VH	
(SEQ ID NO:3)	第14行 EVQLDSGQEEKHPGQSVISCKTSGYTFTEYTIHWVKQGHLEWIGNINPNNGGTT
(SEQ ID NO:4)	第22行 EVQLQDSGGEIKNPGTSVRIISCKTSGYTFTEYTIHWVQSHGKSLIEWIGNINPNNGGTT
(SEQ ID NO:5)	第33行 EVQLDSGPEKHPGQSVISCKTSGYTFTEYTIHWVKQGHLEWIGNINPNNGGTT
(SEQ ID NO:3)	第14行 YNQKFEIATLTVEKSSSTAYMELSLSEI AVYVCAGWNEDYWGQGTITVSS
(SEQ ID NO:4)	第22行 YNQKFEDKATLTVDKSSSTAYMELSLTSED SAVYVCAGWNEDYWGQGTITVSS
(SEQ ID NO:5)	第33行 YNQKFEDKATLTVEKSSSTAYMELSLSEI AVYVCAGWNEDYWGQGTITVSS
VL	
(SEQ ID NO:17)	第14行 DIVMTQSSTSSVGRVNIICASQDVGTAVDWYQKNECPRKLLIYWASTRHG
(SEQ ID NO:18)	第22行 DIVMTQSHKENSTSVGRVSIICASQDVGTAVDWYQKNEGSEKLLIYWASTRHG
(SEQ ID NO:19)	第33行 DIIMIQSSTSSVGRVNIICASQDVGTAVDWYQKNECSEKLLIYWASTRHG
(SEQ ID NO:17)	第14行 VPDREFTGSGSSTDFLTITIPEDADYFCQQYNSYFLTFGGSTIK
(SEQ ID NO:18)	第22行 VPDREFTGSGSSTDFLTITITNVQSEDLADYFCQQYNSYFLTFGAGTMDLX
(SEQ ID NO:19)	第33行 FPRFASGSSTDFLTITIPEDADYFCQQYNSYFLTFGGSTIK

图 2

J591 HC VHVL微抗体翻译序列(SEQ ID NOs:1和10)

tctagagccgccacc

XbaI Kozak

1 M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G
1 ATGGAAACCGACACCCTGCTGCTGTGGGTGCTGCTGCTCTGGGTCCCAGGCTCCACCGGT
信号肽
21 E V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K I
61 GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGATC
VH
41 S C K T S G Y T F T E Y T I H W V K Q A
121 TCCTGCAAGACCTCCGGCTACACCTTCACCGAGTACACCAICCACTGGGTGAAACAGGCC

61 S G K G L E W I G N I N P N N G G T T Y
181 TCCGGCAAGGGCCTGGAATGGATCGGCAACATCAACCCTAACACGGCGGCACCACTAC

81 N Q K F E D R A T L T V D K S T S T A Y
241 AACCAGAAGTTCGAGGACCGGGCCACCCTGACCGTGGACAAGTCCACCTCCACCGCCTAC

101 M E L S S L R S E D T A V Y Y C A A G W
301 ATGGAAGTGTCTCCCTGCGGTCTGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCGCTGGCTGG

121 N F D Y W G Q G T T V T V S S G S T S G
361 AACTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCACAGTGACAGTCTCGAGCGGCTCTACCTCTGGC
连接体
141 G G S G G G S G G G G S S D I V M T Q S
421 GGAGGCTCTGGGGGAGGAAGCGGCGGAGGCGGCTCCTCTGACATCGTGATGACCCAGTCC
VL
161 P S S L S A S V G D R V T I T C K A S Q
481 CCTCTCTCCCTGTCTGCCTCCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACATGCAAGGCCTCCCAG

181 D V G T A V D W Y Q Q K P G K A P K L L
541 GATGTGGGCACCGCCGTGGACTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCAAGGCCCTTAAGCTGCTG

201 I Y W A S T R H T G V P D R F T G S G S
601 ATCTACTGGGCCTCCACCAGACACACCGGCGTGCCTGACAGATTCACCGGCTCCGGCTCT

221 G T D F T L T I S S L Q P E D F A D Y F
661 GGCACCGACTTCACCCTGACCATCTCCAGCCTGCAGCCTGAGGACTTCGCCGACTACTTC

241 C Q Q Y N S Y P L T F G G G T K L E I K
721 TGCCAGCAGTACAACTCCTACCCTCTGACCTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA

261 E P K S C D K T H T C P P C G G G S S G
781 GAGCCCAAGTCCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCCCCTTGTGGCGGCGGATCTAGTGGC
铰链
281 G G S G G Q P R E P Q V Y T L P P S R D
841 GGAGGATCCGGTGGCCAGCCTCGGGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCTCCCTCCCGGGAC
CH3
301 E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D
901 GAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTCAAGGGCTTCTACCCTTCCGAT

321 I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P
961 ATCGCCGTGGAGTGGGAGTCCAACGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACCACCCCTCTCT

341 V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R

图 3

1021 GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTGIACTCCAAGCTGACAGTGGATAAGTCCCGG
361 W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y
1081 TGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGTTCCTGTATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTAT
381 T Q K S L S L S P G K -
1141 ACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGTCTCCTGGCAAGTGA
终止子

aagctt
HindIII

图 3(续)

J591 2P VHVL微抗体翻译序列(SEQ ID NOs:2和11)

TCTAGAGCCGCCACC

XbaI

1 M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G
1 ATGGAACACCGACACCCTGCTGCTGIGGGTGTCTGCTCTGGGTCCCAGGCTCCACCGGT
信号肽
21 E V Q L V Q S G P E V K K P G A T V K I
61 GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGCCCTGAAGTGAAGAAGCCTGGCGCCACCGTCAAGATC
VH
41 S C K T S G Y T F T E Y T I H W V K Q A
121 TCTTGCAAGACCTCCGGCTACACCTTACCAGTACACCATCCACTGGGTGAAACAGGCC
61 P G K G L E W I G N I N P N N G G T T Y
181 CCTGGCAAGGGTCTGGAATGGATCGGCAACATCAACCCTAACAACGGCGGCACCACCTAT
81 N Q K F E D K A T L T V D K S T D T A Y
241 AACCAGAAGTTCGAGGACAAGGCCACCCTGACCGTGGACAAGTCCACCGACACCGCCTAC
101 M E L S S L R S E D T A V Y Y C A A G W
301 ATGGAAGTGTCTCTCCCTCCGGTCCGAGGACACCGCAGTGTATTACTGCGCCGCTGGCTGG
121 N F D Y W G Q G T L L T V S S G S T S G
361 AACTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGCTGACAGTCTCGAGCGGTCCACAAGTGGC
连接体
141 G G S G G G S G G G G S S D I Q M T Q S
421 GGAGGCTCTGGCGGTGGATCTGGCGGAGGCGGCTCATCCGACATCCAGATGACCCAGTCC
VL
161 P S S L S T S V G D R V T L T C K A S Q
481 CCCTCCTCCCTGTCCACCTCCGTGGGCGACAGAGTGACCCTGACATGCAAGGCCTCCCAG
181 D V G T A V D W Y Q Q K P G Q S P K L L
541 GACGTGGGCACCGCCGTGGAAGTATCAGCAGAAGCCAGGCCAGTCCCCTAAGCTGCTG
201 I Y W A S T R H T G I P S R F S G S G S
601 ATCTACTGGGCCTCCACCCGGCACACCGGCATCCCTTCCCGGTTCTCCGGCAGTGGCTCT
221 G T D F T L T I S S L Q P E D F A D Y Y
661 GGCACCGACTTCACCCCTGACCATCTCCAGCCTGCAGCCTGAGGACTTCGCCGACTACTAC
241 C Q Q Y N S Y P L T F G A G T K V D I K
721 TGCCAGCAGTACAACCTCCTACCCTCTGACCTTCGGCGCCGGCACAAAGGTGGACATCAAA
261 E P K S C D K T H T C P P C G G G S S G
781 GAGCCTAAGTCCCTGCGACAAGACCCACACATGTCCCCCTTGCGGCGGAGGAAGCAGCGGA
铰链 延伸
281 G G S G G Q P R E P Q V Y T L P P S R D
841 GGCGGATCCCGGTGGCCAGCCCTCGGGAGCCTCAGGTGTACACCCGTGCTCCCTCCCGGGAC
CH3
301 E L T K N Q V S L T C L V K G G F Y P S D
901 GAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTCAAGGGCTTCTACCCCTCCGAT
321 I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P
961 ATCGCCGTGGAGTGGGAGTCCAACGGCCAGCCTGAGAACAACCTACAAGACCACCCCTCTCT

图 4

```

341  V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R
1021 GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCCTTCTGTAAGCTGACAGTGGATAAGTCCCGG

361  W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y
1081 TGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGTTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTAT

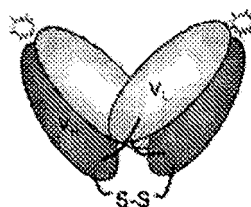
381  T Q K S L S L S P G K -
1141 ACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGTCTCCTGGCAAGTGA
      终止子

```

AAGCTT
HindIII

图 4(续)

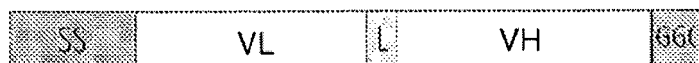
A



Cys 双抗体 (Sirk S. et al, Bioconjugate Chem, 2008)

B

5 或 8 aa



C

5 或 8 aa



图 5

(SEQ ID NOs:6和12)

J591 CysDB Vh-5-V1

```
1  M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G
1  ATGGAAACCGACACCCCTGCTGCTGTGGGTGCTGCTCCTGTGGGTGCCCGGATCTACCGGT
   信号
21  E V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K I
61  GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGATC
   Vh
41  S C K T S G Y T F T E Y T I H W V K Q A
121 TCCTGCAAGACCTCCGGCTACACCTTCACCGAGTACACCATCCACTGGGTGAAACAGGCC

61  S G K G L E W I G N I N P N N G G T T Y
181 TCCGGCAAGGGCCTGGAATGGATCGGCAACATCAACCCTAACACGGCGGCACCACTAC

81  N Q K F E D R A T L T V D K S T S T A Y
241 AACCAGAAGTTCGAGGACCGGGCCACCCTGACCGIGGACAAGTCCACCTCCACCGCCTAC

101 M E L S S L R S E D T A V Y Y C A A G W
301 ATGGAACCTGCTCCCTGCGGTCTGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCGCTGGCTGG

121 N F D Y W G Q G T T V T V S S S G G G G
361 AACTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACAGTCTCGAGCTCCGGTGGGGGCGGC
   连接体
141 D I V M T Q S P S S L S A S V G D R V T
421 GATAICGTGATGACCCAGTCCCCTTCCTCCCTGTCTGCCCTCCGTGGGCGACAGAGTGACC
   V1
161 I T C K A S Q D V G T A V D W Y Q Q K P
481 ATCACAIGCAAGGCCTCCCAGGATGTGGGCACCGCCGTGGACTGGTATCAGCAGAAGCCT

181 G K A P K L L I Y W A S T R H T G V P D
541 GGCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTACTGGGCCTCCACCAGACACACCGGCGTGCTGAC

201 R F T G S G S G T D F T L T I S S L Q P
601 AGATTACCGGCTCCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACCATCTCCAGCCTGCAGCCT

221 E D F A D Y F C Q Q Y N S Y P L T F G G
661 GAGGACTTCGCCGACTACTTCTGCCAGCAGTACAACCTCCTACCCTCTGACCTTCGGCGGA

241 G T K L E I K G G C
721 GGCACCAAGCTGGAAATCAAGGGCGGTTGC
   Cys
```

图 6

(SEQ ID NOs:7和13)

J591 CysDB Vh-8-V1

```
1  M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G
1  ATGGAAACCGACACCCCTGCTGCTGTGGGTGCTGCTCCTGIGGGTGCCCGGATCTACCGGT
   信号
21  E V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K I
61  GAAGTGCAGCTGGIGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGATC
   Vh
41  S C K T S G Y T F T E Y T I H W V K Q A
121 TCCTGCAAGACCTCCGGCTACACCTTCACCGAGTACACCATCCACTGGGTGAAACAGGCC

61  S G K G L E W I G N I N P N N G G T T Y
181 TCCGGCAAGGGCCTGGAATGGATCGGCAACATCAACCCTAACACGGCGGCACCACCTAC

81  N Q K F E E D R A T L T V D K S T S T A Y
241 AACCAGAAGITCGAGGACCGGGCCACCCTGACCGTGGACAAGTCCACCTCCACCGCCTAC

101 M E L S S L R S E D T A V Y Y C A A G W
301 ATGGAACGTGCTCCCTGCGGTCTGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCGCTGGCTGG

121 N F D Y W G Q G T T V T V S S G G G S G
361 AACTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACAGTCTCGAGCGCGGAGGGAGTGGC
   连接体
141 G G G D I V M T Q S P S S L S A S V G D
421 GGAGGCGGCGATATCGTGATGACCCAGTCCCCTTCCTCCCTGCTGCTCCTCCGTGGGCGAC
   v1
161 R V T I T C K A S Q D V G T A V D W Y Q
481 AGAGTGACCATCACATGCAAGGCCTCCCAGGATGTGGGCACCGCCGTGGACTGGTATCAG

181 Q K P G K A P K L L I Y W A S T R H T G
541 CAGAAGCCTGGCAAGGCCCTTAAGCTGCTGATCTACTGGGCCTCCACCAGACACACCGGC

201 V P D R F T G S G S G I D F I L I I S S
601 GTGCCTGACAGATTCACCGGCTCCGGCTCTGGCACCGACTTCACCTGACCATCTCCAGC

221 L Q P E D F A D Y F C Q Q Y N S Y P L T
661 CTGCAGCCTGAGGACTTCGCCGACTACTTCTGCCAGCAGTACAACCTCCTACCCTCTGACC

241 F G G G T K L E I K G G C
721 TTCGGCGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAGGGCGGTTGC
   cys
```

图 7

(SEQ ID NOs:8和14)

J591 CysDB V1-5-Vh

```
1  M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G
1  ATGGAAACCGACACCCCTGCTGCTGTGGGTGCTGCTCCTGTGGGTGCCCGGATCTACCGGT
   信号
21  D I V M T Q S P S S L S A S V G D R V T
61  GATATCGTGATGACCCAGTCCCTTCCCTGCTGCTGCTCCGTGGGCGACAGAGTGACC
   V1
41  I T C K A S Q D V G T A V D W Y Q Q K P
121 ATCACATGCAAGGCCTCCAGGATGTGGGCACCGCCGTGGACTGGTATCAGCAGAAGCCT

61  G K A P K L L I Y W A S T R H T G V P D
181 GGCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTACTGGGCCCTCCACCAGACACACCGGCGTGCTGAC

81  R F T G S G S G T D F T L T I S S L Q P
241 AGATTACCGGCTCCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACCATCTCCAGCCTGCAGCCT

101 E D F A D Y F C Q Q Y N S Y P L T F G G
301 GAGGACTTCGCCGACTACTTCTGCCAGCAGTACAACCTCCTACCCTCTGACCTTCGGCGGA

121 G T K L E I K S G G G G E V Q L V Q S G
361 GGCACCAAGCTGGAAATCAAGTCCGGTGGGGCGGCGAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGC
   连接体          Vh
141 A E V K K P G A S V K I S C K T S G Y T
421 GCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGATCTCCTGCAAGACCTCCGGCTACACC

161 F T E Y T I H W V K Q A S G K G L E W I
481 TTCACCGAGTACACCATCCACTGGGTGAAACAGGCCTCCGGCAAGGGCTTGAATGGATC

181 G N I N P N N G G T T Y N Q K F E D R A
541 GGCAACATCAACCCTAACACGGCGGCACACCTACAACCAGAAGTTCGAGGACCGGGCC

201 T L T V D K S T S T A Y M E L S S L R S
601 ACCCTGACCGTGGAACAAGTCCACCTCCACCGCCTACATGGAAGTGTCTCCTCCCTGCGGTCT

221 E D T A V Y Y C A A G W N F D Y W G Q G
661 GAGGACACCGCGTGTACTACTGCGCCGCTGGCTGGAAGTTCGACTACTGGGGCCAGGGC

241 T T V T V S S G G C
721 ACCACCGTGACAGTCTCGAGCGGCGGTTC
   Cys
```

图 8

(SEQ ID NOs:9和15)

J591 CysDB V1-8-Vh

```
1  M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G
1  ATGGAAACCGACACCCTGCTGCTGTGGGTGCTGCTCCTGTGGGTGCCCCGGATCTACCGGT
   信号
21  D I V M T Q S P S S L S A S V G D R V I
61  GATATCGTGATGACCCAGTCCCCCTTCTCCCTGTCTGCCTCCGTGGGCGACAGAGTGACC
   V1
41  I T C K A S Q D V G T A V D W Y Q Q K P
121 ATCACATGCAAGGCCTCCCAGGATGTGGGCACCGCCGTGGACTGGTATCAGCAGAAGCCT

61  G K A P K L L I Y W A S T R H T G V P D
181 GGCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTACTGGGCCTCCACCAGACACACCGGCGTGCTGAC

81  R F T G S G S G T D F T L T I S S L Q P
241 AGATTACCGGCTCCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACCATCTCCAGCCTGCAGCCT

101 E D F A D Y F C Q Q Y N S Y P L T F G G
301 GAGGACTTCGCCGACTACTTCTGCCAGCAGTACAACCTCCTACCCTCTGACCTTCGGCGGA

121 G T K L E I K G G G S G G G G E V Q L V
361 GGCACCAAGCTGGAAATCAAGGCGGAGGGAGTGGCGGAGGCGGCGAAGTGCAGCTGGTG
   连接体                               Vh
141 Q S G A E V K K P G A S V K I S C K T S
421 CAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGATCTCCTGCAAGACCTCC

161 G Y T F T E Y T I H W V K Q A S G K G L
481 GGCTACACCTTCACCGAGTACACCATCCACTGGGTGAAACAGGCCTCCGGCAAGGGCCTG

181 E W I G N I N P N N G G T T Y N Q K F E
541 GAATGGATCGGCAACATCAACCCTAACAACGGCGGCACCACCTACAACCAGAAGTTCGAG

201 D R A T L T V D K S T S T A Y M E L S S
601 GACCGGGCCACCCTGACCGTGGACAAGTCCACCTCCACCGCCTACATGGAACCTGTCTCTCC

221 L R S E D T A V Y Y C A A G W N F D Y W
661 CTGCGGTCTGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCGCTGGCTGGAACCTCGACTACTGG

241 G Q G I T V T V S S G G C
721 GGCCAGGGCACCACCGTGACAGTCTCGAGCGGCGGTTC
   Cys
```

图 9

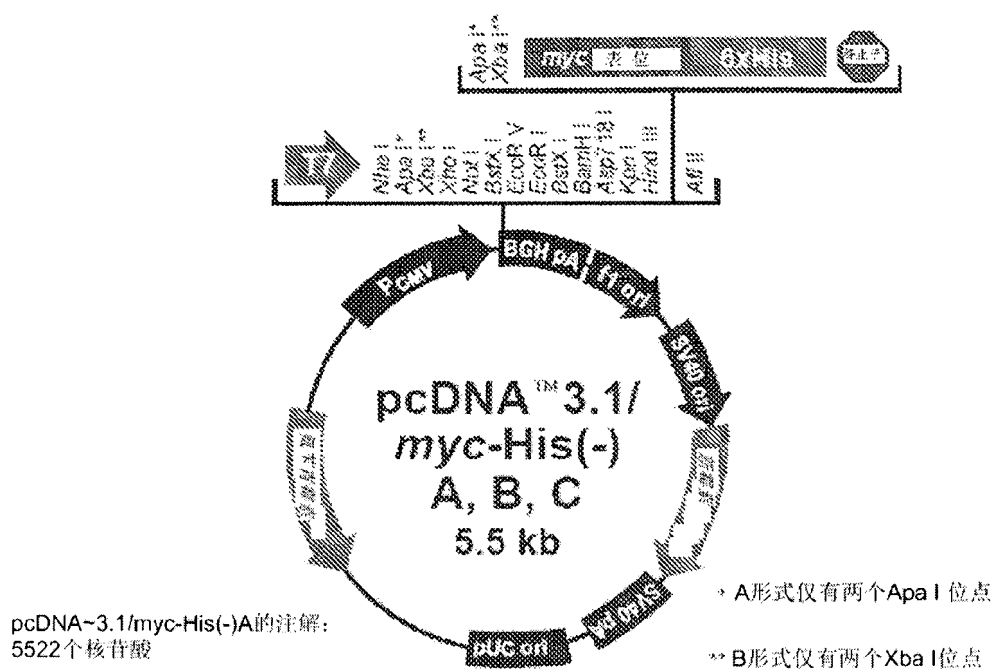


图 10

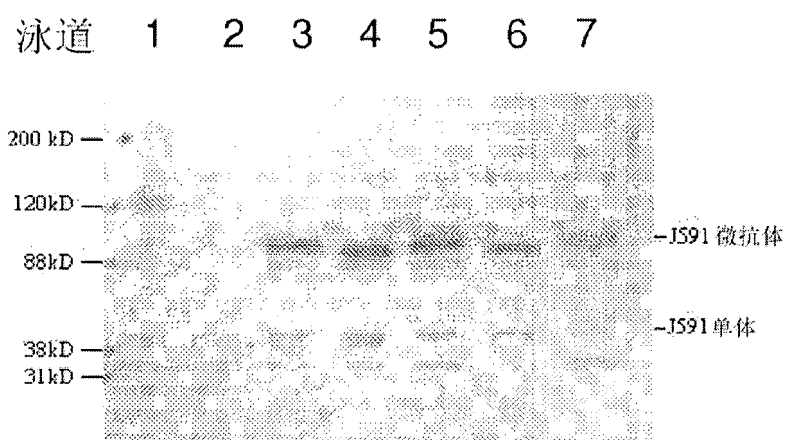
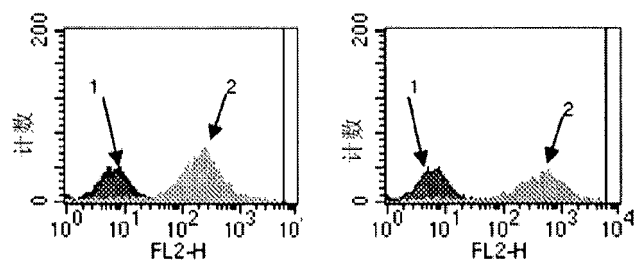


图 11

A- J59I HC VL VH 微抗体 B- J59I HC VH VL 微抗体



C- J59I 2P VL VH 微抗体 D- J59I 2P VH VL 微抗体

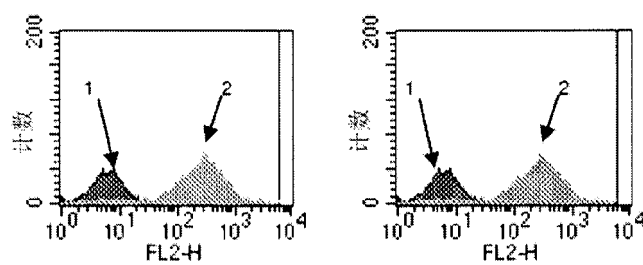
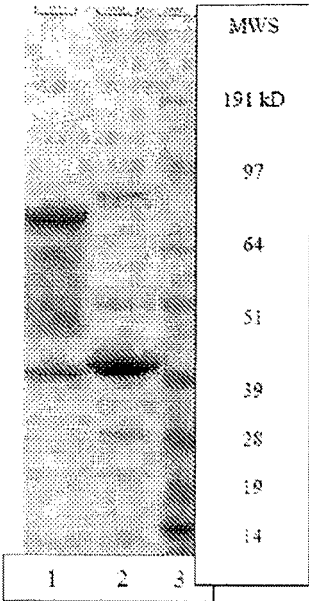


图 12



泳道	样本描述	还原剂 (μ l)	样本 (μ l)	4X LDS	加载到凝胶 上的量(μ l)
1	终产物, 1:5稀释	0	22.5	7.5	25
2	终产物, 1:5稀释	3	22.5	7.5	25
3	蛋白质标准品	0	10	0	10

图 13

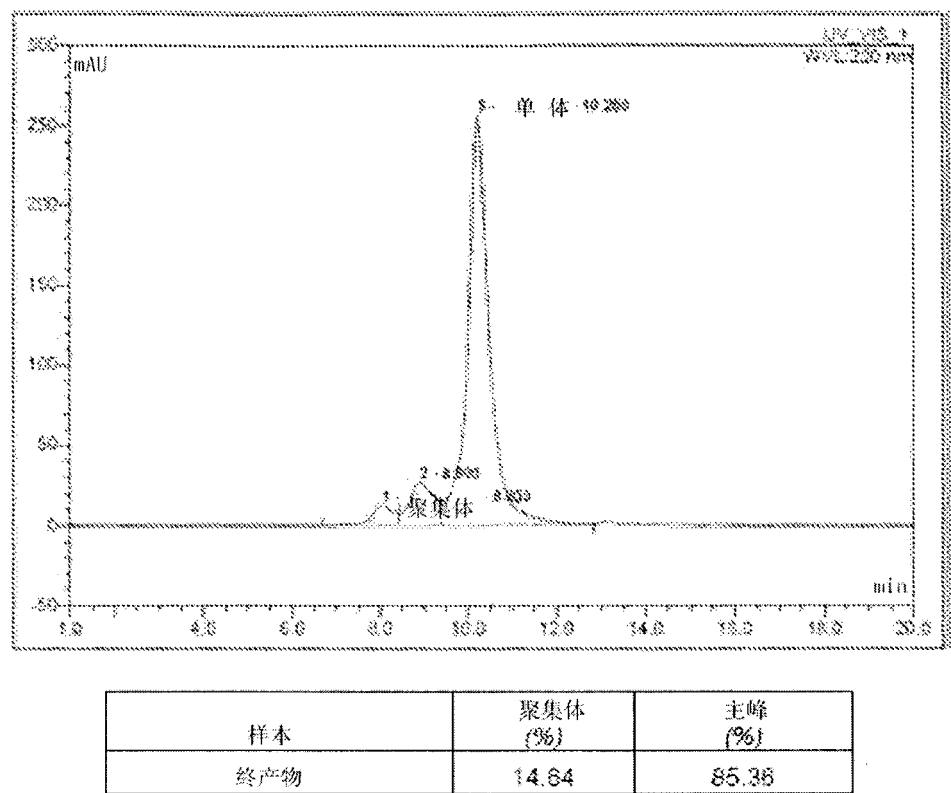


图 14

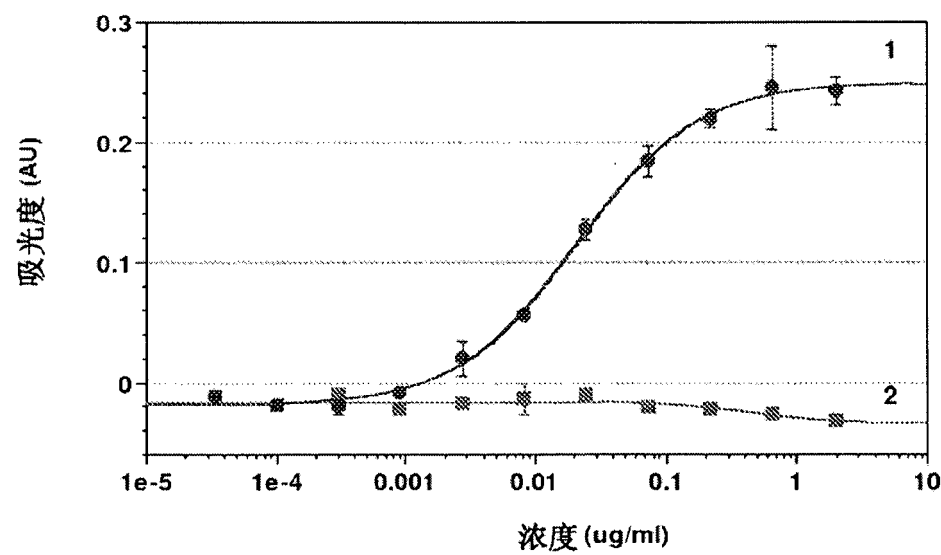


图 15

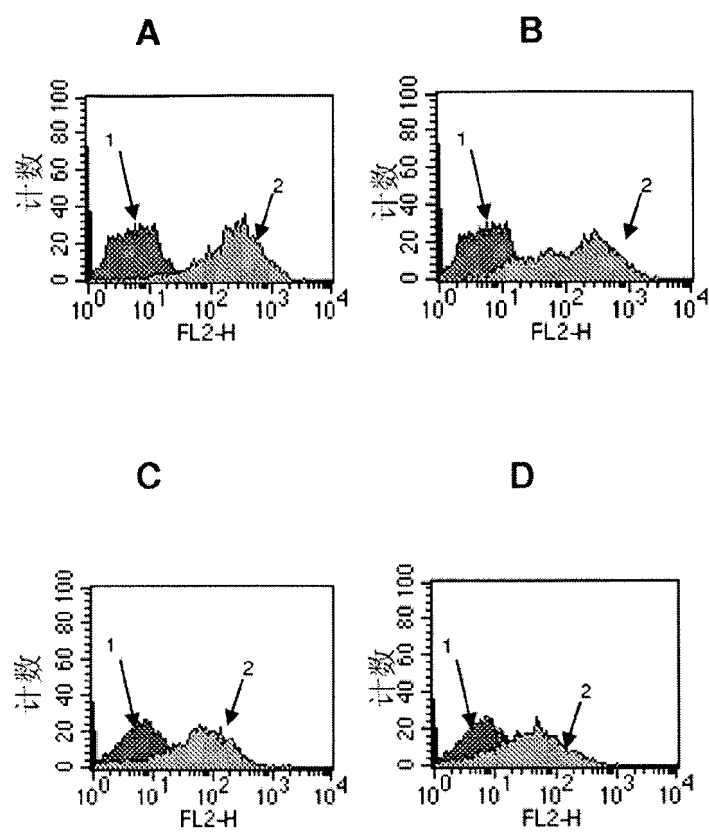


图 16

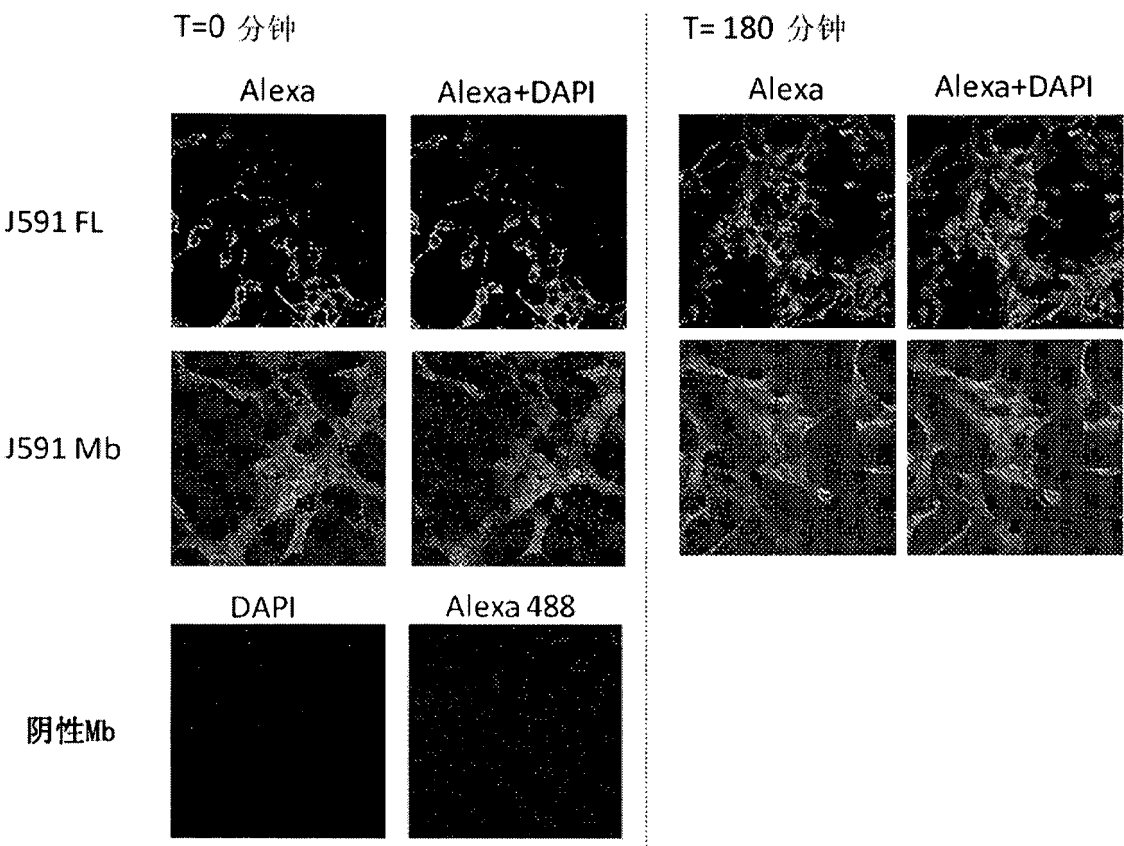


图 17

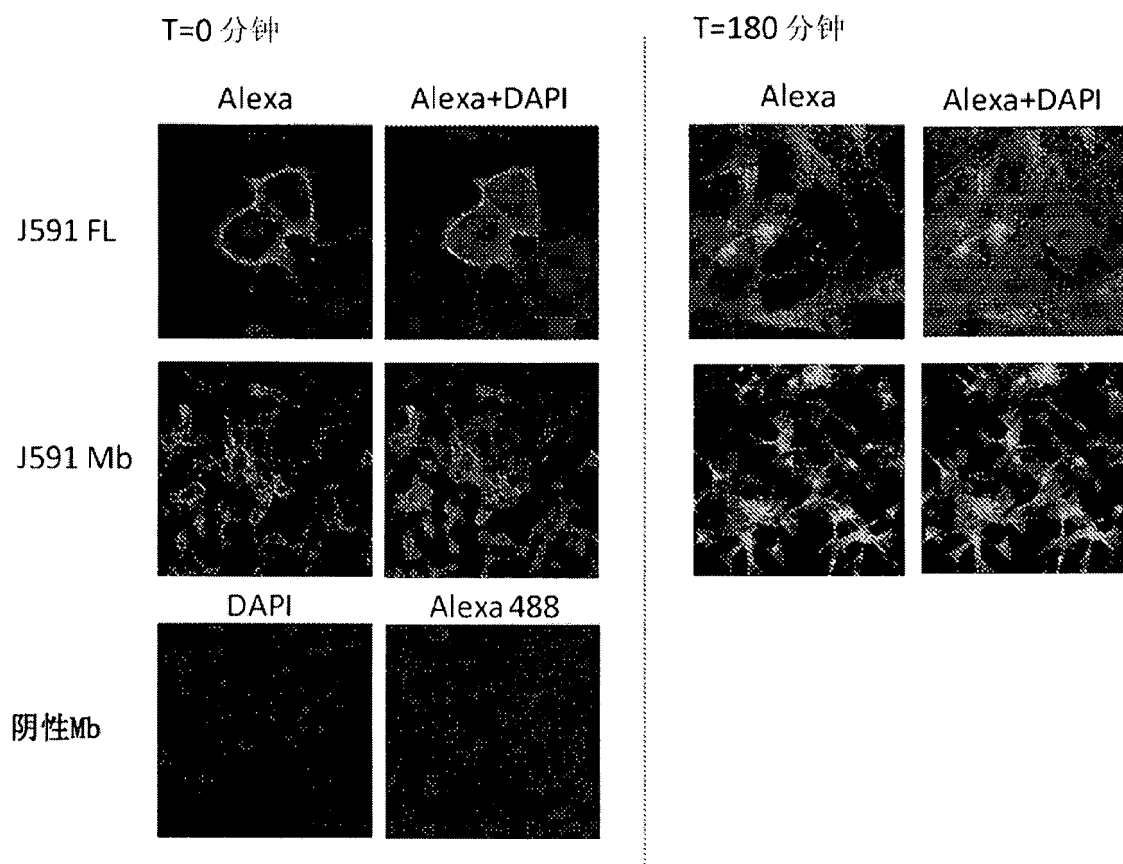


图 18

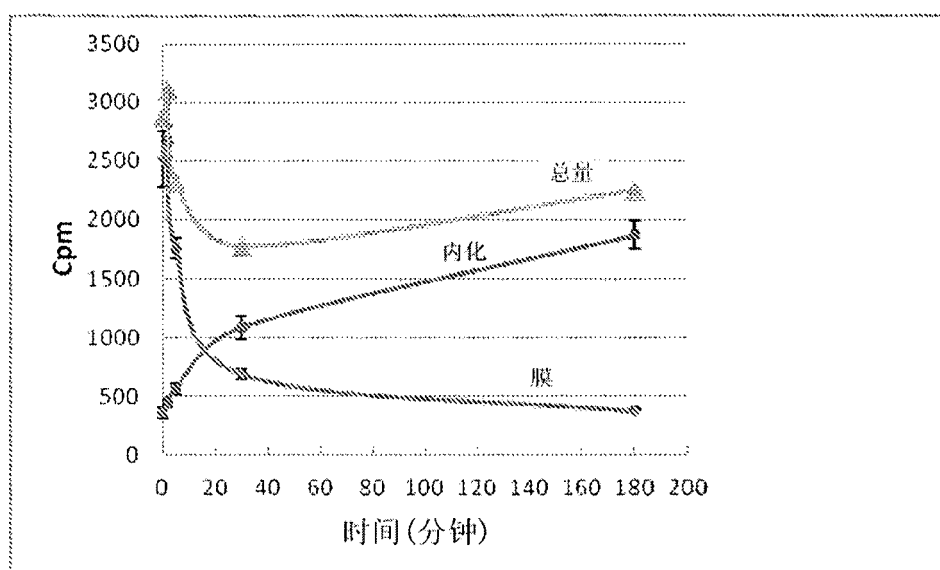
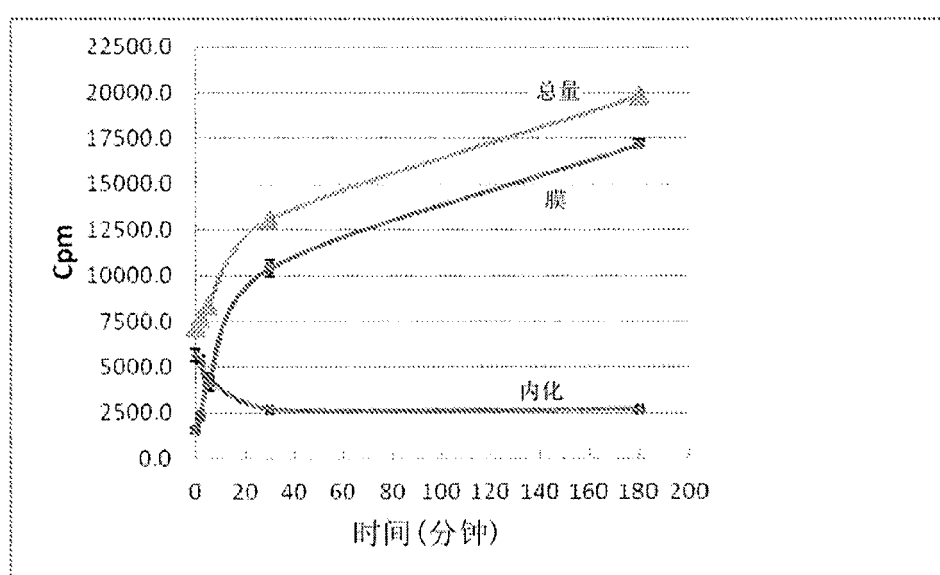
A**B**

图 19

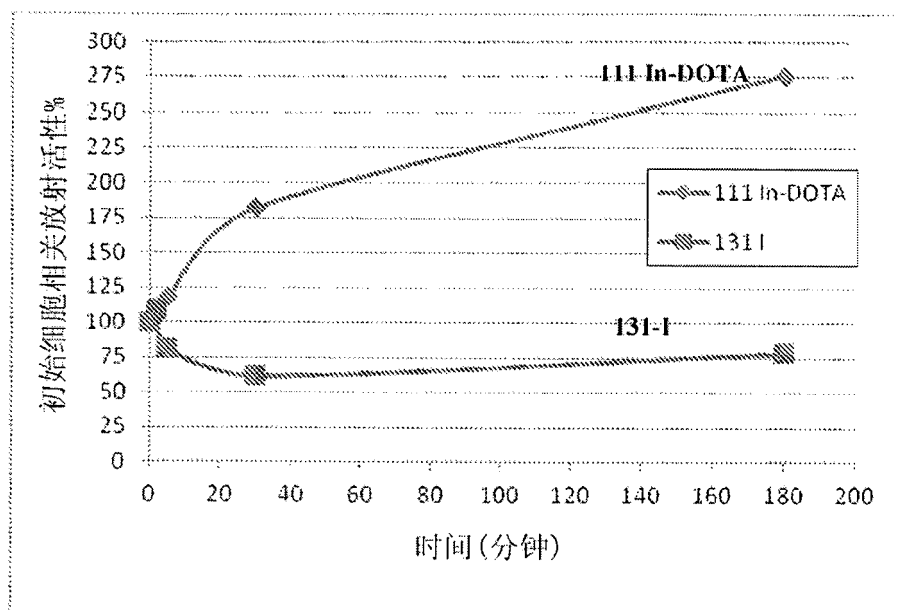


图 20

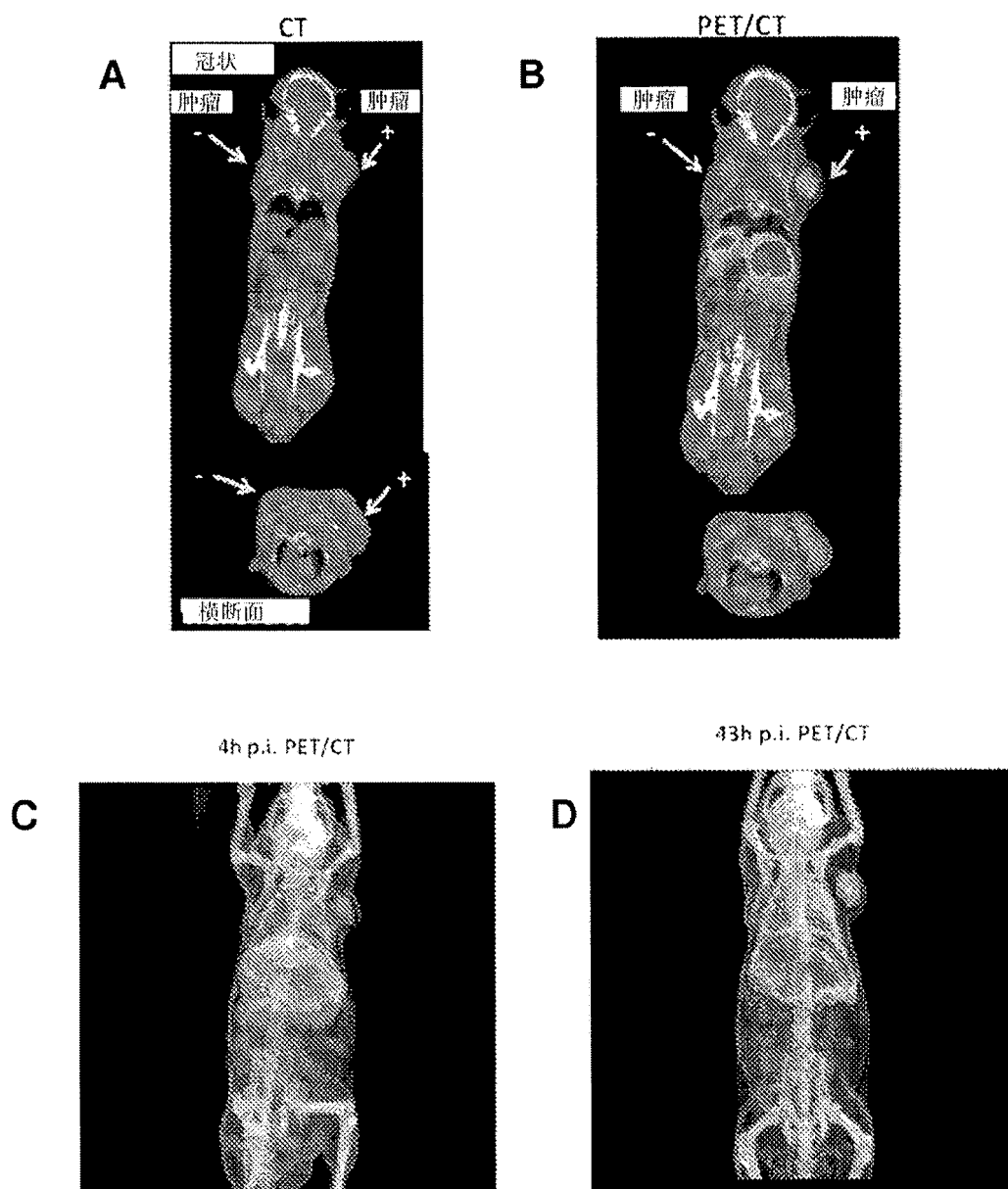


图 21

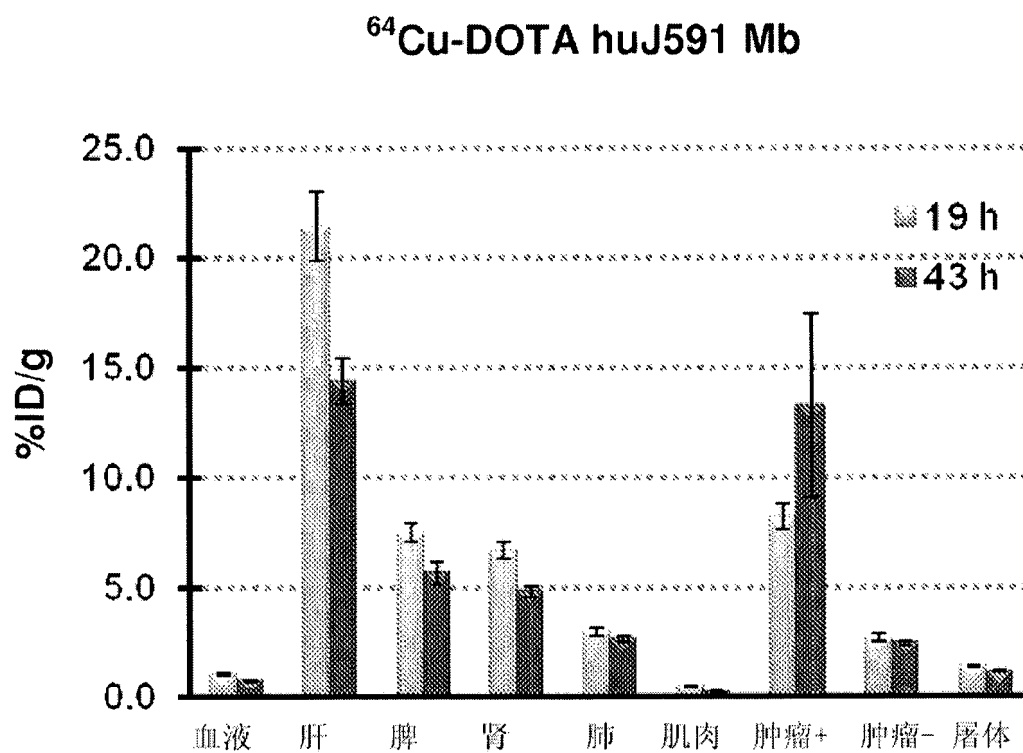


图 22

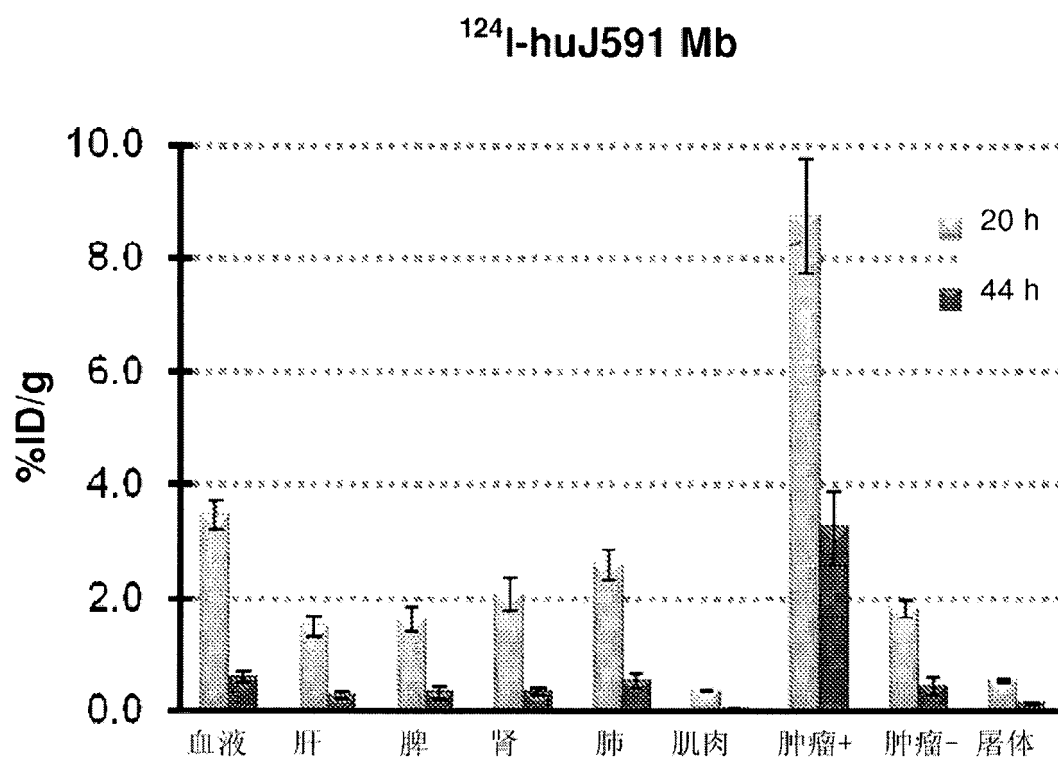


图 24

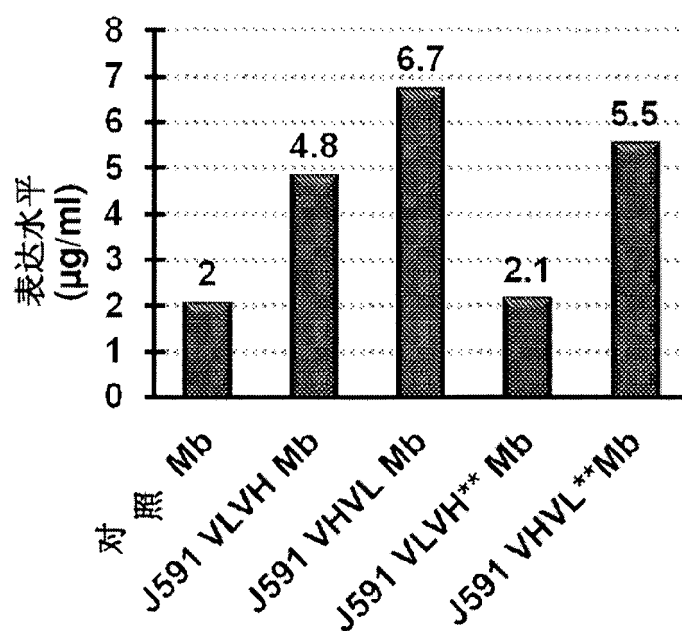


图 25

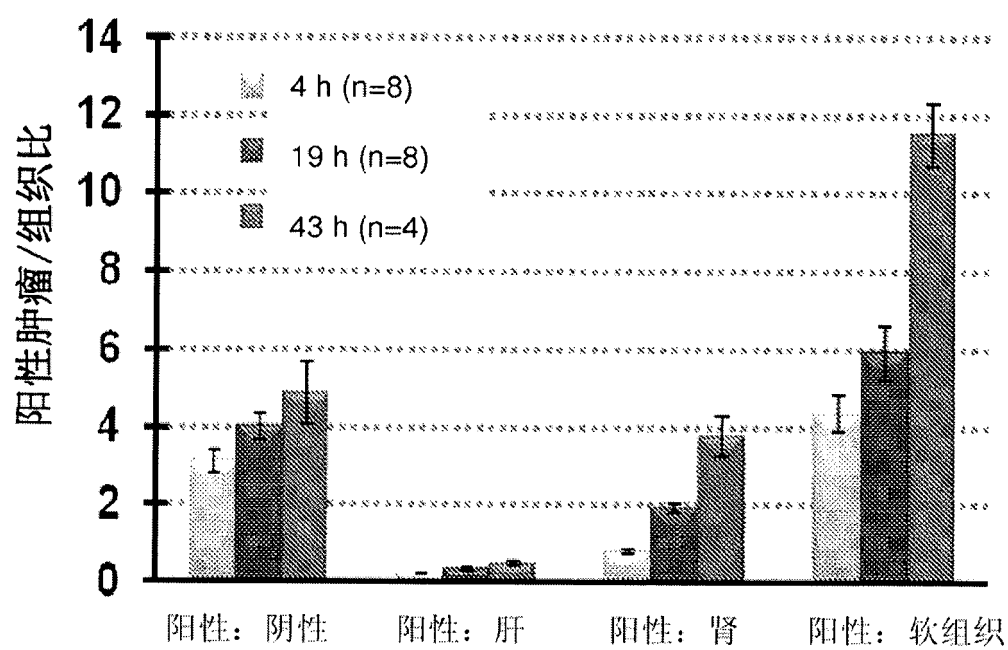
^{64}Cu -DOTA huJ591 Mb

图 26

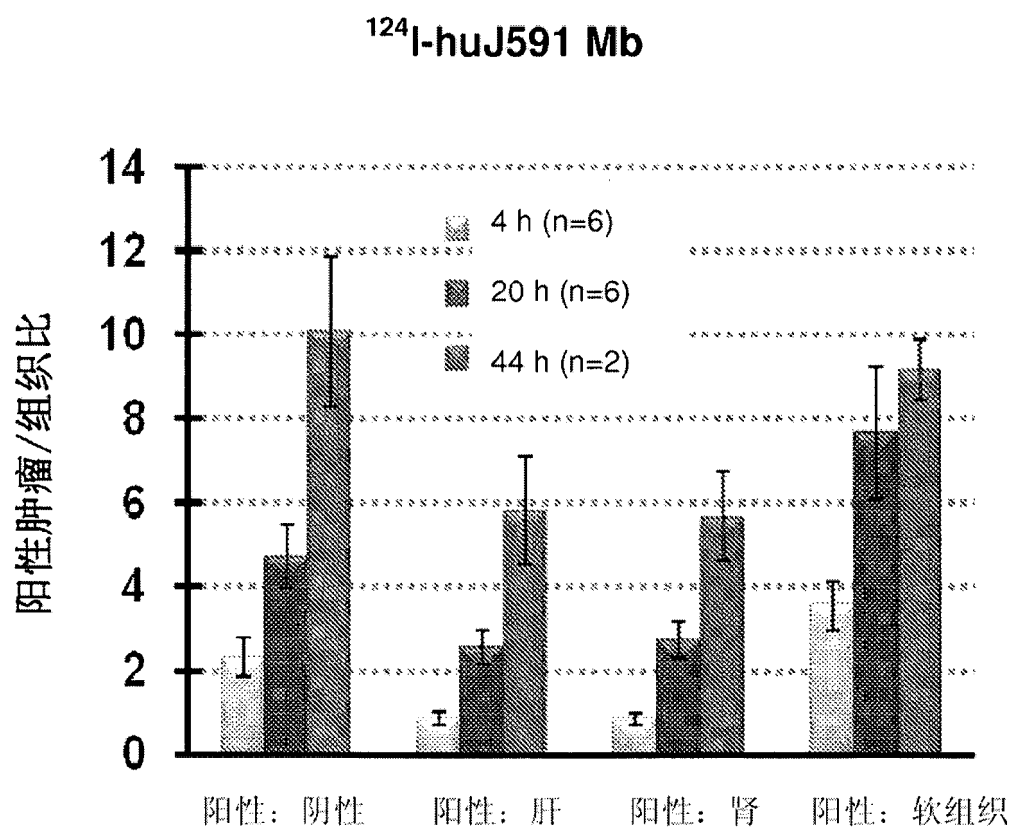


图 27

J591 Minibodies and Cys-Diabodies for Targeting Human Prostate Specific Membrane Antigen

ABSTRACT

In one embodiment, a minibody monomer that binds PSMA is provided. The minibody monomer is encoded by a nucleotide sequence comprising, from N-terminus to C-terminus, an scFv sequence that can bind PSMA, an artificial hinge sequence, and a human IgG CH3 sequence. In another embodiment, a CysDB monomer that binds PSMA is provided. The CysDB monomer may be encoded by a nucleotide sequence comprising, from N-terminus to C-terminus, an scFv sequence that can bind PSMA and a cysteine tail. In other embodiments, methods for diagnosing or treating a cancer associated with PSMA expression in a subject are provided.

靶向人前列腺特异性膜抗原的 J591 微抗体和双抗体

摘要

在一个实施方式中，提供了结合 PSMA 的微抗体单体。微抗体单体由核苷酸序列编码，该核苷酸序列自 N 端至 C 端包含可结合 PSMA 的 scFv 序列、人工铰链序列和人 IgG CH3 序列。在另一实施方式中，提供了结合 PSMA 的 CysDB 单体。CysDB 单体可由核苷酸序列编码，该核苷酸序列自 N 端至 C 端包含可结合 PSMA 的 scFv 序列和半胱氨酸尾部。在其他实施方式中，提供了诊断或治疗个体中与 PSMA 表达有关的癌症的方法。