

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

A61K 51/10 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200480026048.4

[45] 授权公告日 2009 年 4 月 29 日

[11] 授权公告号 CN 100482285C

[22] 申请日 2004.9.1

[21] 申请号 200480026048.4

[30] 优先权

[32] 2003.9.10 [33] EP [31] 03255633.4

[32] 2003.9.10 [33] US [31] 60/501,881

[86] 国际申请 PCT/EP2004/009733 2004.9.1

[87] 国际公布 WO2005/023318 英 2005.3.17

[85] 进入国家阶段日期 2006.3.10

[73] 专利权人 菲洛根股份公司

地址 意大利锡耶纳

共同专利权人 舍林股份公司

[72] 发明人 劳拉·博尔西 芭芭拉·卡尔内莫拉

恩里卡·巴尔扎

帕特里齐亚·卡斯泰拉尼

卢恰诺·扎尔迪 马蒂亚斯·弗里贝

克里斯托夫·斯特凡·希尔格

[56] 参考文献

WO03055917A2 2003.7.10

WO0196599A2 2001.12.20

WO0162800A1 2001.8.30

审查员 刘桂英

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 林晓红

权利要求书 3 页 说明书 58 页 附图 6 页

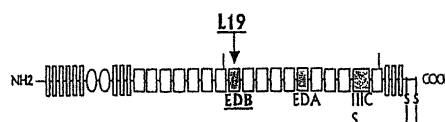
[54] 发明名称

放射性标记的抗纤连蛋白 ED-B 的抗体 L19
靶向肿瘤血管的制药用途

[57] 摘要

一种结合人 ED-B 的特异性结合构件，其中所述特异性结合构件用选自自由 76Br、77Br、123I、124I、131I 和 211At 组成的一组同位素标记，并且包含一种抗原结合位点，所述抗原结合位点包含抗体 VH 结构域和抗体 VL 结构域，其中所述抗体 VH 结构域选自自由 L19VH 结构域和包含 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3 的 VH 结构域组成的一组，其中所述 VH CDR3 是 SEQ ID NO: 3 所示的 L19 VHCDR3，所述 VH CDR1 任选地是 SEQ ID NO: 1 所示的 L19 VH CDR1，所述 VH CDR2 任选地是 SEQ ID NO: 2 所示的 L19 VH CDR2；其中所述抗体 VL 结构域任选地选自自由 L19 VL 结构域及包含 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3 的 VL 结构域组成的一组，其中所述 VL CDR3 是 SEQ ID NO: 6 所示的

L19 VL CDR3，所述 VL CDR1 任选地是 SEQ ID NO: 4 所示的 L19 VL CDR1，所述 VL CDR2 任选地是 SEQ ID NO: 5 所示的 L19 VL CDR2；所述 L19 VH 结构域和所述 L19 VL 结构域序列在 Pini et al. (1998) J. Biol. Chem. 273: 21769-21776 中公开；其中所述特异性结合构件包含一种小免疫球蛋白 (mini-immunoglobulin)，所述小免疫球蛋白包含与 eS2-CH4 融合并二聚体化的所述抗体 VH 结构域和抗体 VL 结构域，或者所述特异性结合构件包含一种完整的 IgG1 抗体分子；本发明还提供了应用这种特异性结合构件的方法和用途。



1. 一种结合人 ED-B 的特异性结合构件,其中所述特异性结合构件用 ^{131}I 同位素标记,并且包含一种抗原结合位点,所述抗原结合位点包含抗体 VH 结构域和抗体 VL 结构域,其中所述抗体 VH 结构域选自由 L19 VH 结构域和包含 VH CDR1、VH CDR2 和 VH CDR3 的 VH 结构域组成的一组,其中所述 VH CDR3 是 SEQ ID NO:3 所示的 L19 VH CDR3,所述 VH CDR1 是 SEQ ID NO:1 所示的 L19 VH CDR1,所述 VH CDR2 是 SEQ ID NO:2 所示的 L19 VH CDR2;其中所述抗体 VL 结构域选自由 L19 VL 结构域及包含 VL CDR1、VL CDR2 和 VL CDR3 的 VL 结构域组成的一组,其中所述 VL CDR3 是 SEQ ID NO:6 所示的 L19 VL CDR3,所述 VL CDR1 是 SEQ ID NO:4 所示的 L19 VL CDR1,所述 VL CDR2 是 SEQ ID NO:5 所示的 L19 VL CDR2;其中所述特异性结合构件包含一种小免疫球蛋白,所述小免疫球蛋白包含与 $\epsilon_{\text{S}2}$ -CH4 融合并二聚体化的所述抗体 VH 结构域和抗体 VL 结构域。

2. 权利要求 1 的特异性结合构件,其包含一种抗体 VH 结构域,所述抗体 VH 结构域包含具有 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:3 所示氨基酸序列的 VH CDR,所述特异性结合构件与一种包含 L19 VH 结构域和 L19 VL 结构域的抗体的 ED-B 结合结构域竞争结合 ED-B。

3. 权利要求 1 或 2 的特异性结合构件,其包含 L19 VH 结构域。

4. 权利要求 3 的特异性结合构件,其包含 L19 VL 结构域。

5. 权利要求 1 或 2 的特异性结合构件,其中所述抗体 VH 结构域和抗体 VL 结构域处于与 $\epsilon_{\text{S}2}$ -CH4 融合的 scFv 抗体分子内。

6. 权利要求 5 的特异性结合构件,其中所述 scFv 抗体分子通过接头肽与 $\epsilon_{\text{S}2}$ -CH4 融合,其中所述接头肽具有氨基酸序列 GGSG。

7. 一种产生权利要求 1—6 任一项的特异性结合构件的方法，所述方法包括用 ^{131}I 同位素标记所述特异性结合构件。

8. 权利要求 7 的方法，其中所述标记包括在所述特异性结合构件存在下氧化 $^{131}\text{I}^-$ 的卤化物。

9. 权利要求 7 的方法，其中所述标记包括将含有 ^{131}I 放射性同位素的激活的双功能卤素载体与所述特异性结合构件的赖氨酸或半胱氨酸残基缀合或者与其 N 末端缀合。

10. 权利要求 7—9 任一项的方法，其中所述方法包括在标记之前表达编码所述特异性结合构件的核酸。

11. 权利要求 10 的方法，包括在产生所述特异性结合构件的条件下培养宿主细胞。

12. 权利要求 7—9 任一项的方法，进一步包括分离和/或纯化所述特异性结合构件。

13. 权利要求 7—9 任一项的方法，进一步包括将所述特异性结合构件与 ED-B 或 ED-B 的片段在体外结合。

14. 一种包含权利要求 1—6 任一项的特异性结合构件的组合物，其用于治疗人体或动物体的治疗方法中。

15. 权利要求 14 的组合物，其用于治疗病理性血管发生的损害的方法中。

16. 权利要求 14 的组合物，其用于治疗肿瘤的方法中。

17. 一种包含权利要求 1—6 任一项的特异性结合构件的组合物，其用于诊断方法中。

18. 权利要求 1—6 任一项的特异性结合构件在生产治疗病理性

血管发生的损害的药物中的应用。

19. 权利要求 1—6 任一项的特异性结合构件在生产治疗肿瘤的药物中的应用。

20. 权利要求 1—6 任一项的特异性结合构件在生产诊断试剂中的应用。

放射性标记的抗纤连蛋白 ED-B 的抗体 L19 靶向 肿瘤血管的制药用途

本发明涉及使用放射性标记的抗体分子靶向肿瘤血管。特别地，本发明涉及与纤连蛋白的 ED-B 结合的抗体分子的应用，所述抗体分子在肿瘤靶向中具有被论证的有效性。在本发明的不同实施方案中，抗体分子以不同分子形式应用。在某些实施方案中，所述抗体分子包括人 IgG1。在其它实施方案中，所述抗体分子是小免疫球蛋白(mini-immunoglobulin)，例如通过将 scFv 抗体分子与分泌性 IgE 同种型的 CH4 恒定区融合而产生，所述分泌性 IgE 同种型在其 COOH 末端天然含有一个用于形成共价连接的二聚体的半胱氨酸。血液清除率、体内稳定性及其它有利性质被用于本发明的不同方面和实施方案中，例如用于肿瘤靶向中。根据临床需要和疾病情况，不同抗体分子形式的不同体内行为可用于不同的诊断和/或治疗目的。

尽管非人源的单克隆抗体(mAb)具有作为治疗剂的巨大潜力，但由于其免疫原性(1 Shawlert et al., 1985; 2 Miller et al., 1983)、不良的药代动力学性质(3 Hakimi et al., 1991; 4 Stephens et al., 1995)及在恢复效应器功能中的无效性(5 Riechmann et al., 1988; 6 Junghens et al., 1990)而很少进行临床实验。近来从噬菌体展示文库中分离人抗体片段的展望(7 McCafferty et al., 1990; 8 Lowman et al., 1991; 综述见 9 Nilsson et al., 2000 和 10 Winter et al., 1994)解决了这些问题，复兴了用这些试剂治疗主要疾病的研究并重新点燃了使用这些试剂治疗主要疾病的希望。确实，这些分子应作为新的诊断和治疗工具的理想构架(building block) (11 Reichert, 2001; 12 Huls et al., 1999)。另外，这些抗体可以“成熟”以达到在皮摩尔(picomolar)范围内的亲和性(13 Pini et al., 1998)，这对于其临床应用即使不是必需的，至少也是所希望的。

但是对用于诊断或治疗剂的选择性送递, 人抗体片段的临床应用需要高度特异性靶位。在肿瘤的情况中, 最常用的靶位是细胞表面抗原, 其通常既不丰富也不稳定。然而, 在肿瘤进展期间, 肿瘤细胞周围的微环境进行广泛的修饰而产生“肿瘤环境”, 这个肿瘤环境是基于抗体的肿瘤治疗方法的一种靶位(14 Neri and Zardi, 1998)。事实上, 改变的肿瘤微环境本身是可以靶向的致癌原这一观点愈加获得共识。能将治疗剂有效送递至肿瘤微环境的分子因此代表癌症治疗的有希望的及重要的新工具(15 Bissel, 2001; 14 Neri and Zardi, 1998)。

纤连蛋白(FN)是一种胞外基质(ECM)成分, 其在各种正常组织和体液中广泛表达。不同的 FN 同种型可以通过 FN 前 mRNA 的可变剪接而产生, 这是由细胞因子和胞外 pH 调节的一个过程(16 Balza et al., 1988; 17 Carnemolla et al., 1989; 18 Borsi et al., 1990; 19 Borsi et al., 1995)。也称作外型(extratypic)III 型重复 B (EIIIB)的完整 III 型重复 ED-B 可以完全包括或者不包括在 FN 分子中(20 Zardi et al., 1987)。ED-B 在不同物种中是高度保守的, 在迄今研究的所有哺乳动物(人、大鼠、小鼠、狗)中具有 100%同源性, 与鸡的相似结构域具有 96%同源性。含有 ED-B 的 FN 同种型(B-FN)在正常成体组织中不能用免疫组织化学检测到, 除了在进行生理学重塑(physiological remodelling)的组织中(例如子宫内膜和卵巢)及在伤口愈合期间的组织中(17 Carnemolla et al., 1989; 21 French-Constant, et al., 1989)。相反, 其在肿瘤和胚胎组织中高度表达(17 Carnemolla et al., 1989)。另外, 已经证实 B-FN 是血管发生的标记物(22 Castellani et al., 1994), 并且侵入肿瘤组织的内皮细胞沿着含有 B-FN 的 ECM 纤维迁移(23 Tarli et al. 1999)。

已经描述了使用特异于 B-FN 同种型(24 Carnemolla et al., 1996; 23 Tarli et al., 99; 25 Viti et al., 99; 26 Neri et al., 97; 27 Demartis et al., 2001)的人重组抗体 scFv(L19) (13 Pini et al., 98)进行的肿瘤血管的选择性靶向。所述抗体可用于将治疗性放射性核素或毒性物质选择性送递至肿

瘤血管的体内诊断(免疫闪烁扫描术(immunoscintigraphy))及治疗方法中。另外, Birchler et al. (28 1999)示出与光敏剂化学偶联的 scFv(L19)选择性积聚在血管生成性兔角膜模型的新形成的血管中, 并且在经近红外线光照射后介导眼部新血管的完全和选择性阻塞。

更最近的, Nilsson et al. (29 2001)报道了在不同类型鼠肿瘤模型中 scFV(L19)与组织因子的胞外结构域的免疫缀合物介导选择性梗塞。此外, scFv(L19)与 IL-2 或 IL-12 的融合蛋白已经示出增强这两种细胞因子的治疗效力(30 Halin et al., submitted; 31 Carnemolla et al., 2002)。对于融合物在治疗病理性血管发生损害(包括肿瘤)中的应用的描述也见于 WO01/62298。最后, 由于 L19 与小鼠和人 ED-B 同等好地反应, 因此其可用于前临床研究和临床研究中。

也参见 PCT/GB97/01412、PCT/EP99/03210、PCT/EP01/02062 和 PCT/IB01/00382 所述。

不同抗体形式示出在体内稳定性、清除率和肿瘤靶向性能方面的不同表现(32 Wu et al., 2000)。小免疫球蛋白或小免疫蛋白(small immunoprotein, SIP)在(33 Li et al., 1997)中描述。

本发明基于不同形式的 L19 人抗体分子(即 scFv、小免疫球蛋白和完整 IgG1)的制备、鉴定和体内生物分布的研究, 及用放射性同位素标记。

附图简述

图 1 示出了例证不同蛋白质结构的模型。A: FN 亚基的结构域结构模型。进行可变剪接的蛋白质序列以灰色表示。如图所示, 重组抗体 L19 的表位位于重复 ED-B 中。B-D: 分别用于表达 L19 (scFv) (B)、L19-SIP (C) 和 L19-IgG1/K 的构建体示意图。

图 2 示出了在裸鼠中 SK-MEL-28 肿瘤的生长曲线(三角形所示)及在 129 小鼠品系中 F9 肿瘤的生长曲线(圆形所示)。体积(mm³)与时间(天)的关系作图。每个数据点是六只小鼠的平均值±SD。

图3示出对不同L19形式的大小排阻层析结果。在A、B和C组中分别示出在放射性碘标记后scFv、小免疫球蛋白和IgG1形式的L19的大小排阻层析(Superdex 200)图示。D、E和F组分别示出在静脉内注射放射性碘标记的scFv、小免疫球蛋白和IgG1形式的L19后,在所示时间血浆的大小排阻层析(Superdex 200)图示。当注射后在不同时间对血浆进行上样时,未检测到L19-SIP或L19-IgG1曲线图的改变,而在注射L19(scFv)2后3小时,观测到具有更高分子量的第二个峰。

图4示出使用不同放射性碘标记的L19抗体分子形式在携带SK-MEL-28肿瘤的小鼠中的生物分布实验结果。报道了静脉内注射后在所示时间在肿瘤(图4A)和血液(图4B)中%ID/g的变化。在图4C中,对%ID/g的肿瘤-血液比作图。L19(scFv)的曲线以菱形表示,L19小免疫球蛋白以正方形表示,L19 IgG1以三角形表示。

图5示出使用放射性碘标记的L19(scFv)(正方形)和L19小免疫球蛋白(菱形),在携带F9肿瘤的小鼠中的生物分布实验结果。报道了在静脉内注射后在所示的不同时间肿瘤(A)和血液(B)中%ID/g的变化。

图6示出分别注射生理盐水和I-131-L19-SIP后,随着时间(天)推移U251肿瘤面积(平方毫米)的变化。

本发明涉及结合人纤连蛋白的ED-B的特异性结合构件(specific binding member),其中所述特异性结合构件用选自自由 ^{76}Br 、 ^{77}Br 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{131}I 和 ^{211}At 组成的一组的一或多种同位素放射性标记。本发明还提供了产生这种特异性结合构件的方法,及其在诊断和治疗中的应用。

本发明的特异性结合构件在动物实验中示出有益的性质,如相对于红骨髓以较高剂量送递至肿瘤,及高度肿瘤积聚性质。

一方面,本发明提供了一种特异性结合构件,其与人纤连蛋白的ED-B结合并包含L19 VH结构域和VL结构域,任选地L19 VL结构域,其中所述特异性结合构件包含一种包括与 ϵ_{S2} -CH4融合的所述抗体VH结

构域和抗体 VL 结构域并二聚体化的免疫球蛋白,或者所述构件包含完整的 IgG1 抗体分子,并且其中所述特异性结合构件用选自 ^{76}Br 、 ^{77}Br 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{131}I 和 ^{211}At 组成的一组的同位素放射性标记。优选所述放射性同位素是 ^{123}I 或 ^{131}I , 最优选是 ^{131}I 。

放射性标记物或放射性标记的分子可以与所述特异性结合构件附着,可以在例如酪氨酸、赖氨酸或半胱氨酸残基进行标记。

L19 VH 结构域和 L19 VL 结构域序列在 Pini et al. (1998) J. Biol. Chem. 273: 21769-21776 中列出, 其中 VH 结构域序列为: EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SFSMSWVRQA PGKGLEWVSS ISGSSGTTY Y ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKPF PYFDYWGQGT LTVVSS, VL 结构域序列为: EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SSFLAWYQQK PGQAPRLLIY YASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QTGRIPPTFG QGTKVEIK, 通过引用 Pini 等的论文而完全引入本文的那些序列视为在此被列出。

通常地, VH 结构域与 VL 结构域配对以提供抗体抗原结合位点。在一个优选实施方案中, L19 VH 结构域与 L19 VL 结构域配对, 由此形成包括 L19 VH 和 VL 结构域的抗体抗原结合位点。在其它的实施方案中, L19 VH 与除 L19 VL 之外的其他 VL 结构域配对。本领域充分确定了轻链的杂乱性(promiscuity)。

可以从 L19 VH 或 VL 结构域中取一或多个 CDR 并掺入至合适的框架中。这种操作在下文进一步讨论。L19 VH CDR 1、2 和 3 分别示于 SEQ ID NO:1、2 和 3。L19VL CDR1、2 和 3 分别示于 SEQ ID NO:1、2 和 3。

在一个优选的实施方案中, 所述特异性结合构件是 L19-SIP, 最优选的是 ^{123}I -标记的 L19-SIP (本文称作 I-123-L19-SIP)或者 ^{131}I -标记的 L19-SIP (本文称作 I-131-L19-SIP)。

序列在本文列出并可用于针对 ED-B 的特异性结合构件的 VH 和 VL 结构域及其 CDR 的变体可以通过序列变更或突变及筛选的方法获得。

根据本发明所论述, 可以应用序列在本文特别公开的任何 VH 和 VL 结构域的可变结构域氨基酸序列变体。特定变体可包括一或多个氨基酸

序列改变(添加、缺失、取代和/或插入氨基酸残基),可以少于大约20个改变、少于大约15个改变、少于大约10个改变或者少于大约5个改变、4、3、2或1个改变。可以在一或多个框架区域和/或一或多个CDR中进行改变。

本发明的特异性结合构件可以是与既结合ED-B又包含由L19 VH结构域和L19 VL结构域形成的抗原结合位点的特异性结合构件竞争与抗原的结合的构件。结合构件之间的竞争可以容易地在体外分析,例如使用ELISA和/或通过将结合构件用特异性报道分子标记,所述结合构件在存在其它未标记的结合构件的情况下可以检测到,从而使得可以鉴别结合相同表位或重叠表位的特异性结合构件。

因此,本发明的进一步的方面是应用包含人抗体的抗原结合位点的特异性结合构件,其与L19竞争结合ED-B。

本发明的特异性结合构件可以以至少L19的结合亲和性结合ED-B,不同特异性结合构件的结合亲和性在适当条件下对比。

除了抗体序列之外,本发明的特异性结合构件可以包含其它氨基酸,例如形成肽或多肽(如折叠的结构域),或者赋予分子除了结合抗原的能力之外的其他功能特性。本发明的特异性结合构件可以携带一个可检测的标记,或者可以与毒素或酶缀合(例如通过肽键或接头缀合)。

在病理性血管发生所致疾病或损害的治疗中,本发明的特异性结合构件可以与一种毒性分子缀合,例如与选自白细胞介素-2(IL-2)、阿霉素、白细胞介素-12(IL-12)、干扰素- γ (IFN- γ)、肿瘤坏死因子 α (TNF α)和组织因子(优选截短的组织因子,例如截短至残基1-219)的生物杀灭性或胞毒性分子缀合。见例如WO01/62298所述。

本发明的特异性结合构件可用于人体或动物体的治疗或诊断方法,如人患者的疾病或病症的治疗(可包括预防性治疗)方法,所述方法包括将有效量的本发明特异性结合构件给予所述患者。优选地,本发明的特异性结合构件通过非肠道给予途径给予患者。根据本发明可治疗的病症包括肿瘤(特别是实体瘤)及其它病理性血管发生所致损害,包括风湿性关节炎、糖尿病视网膜病变、年龄相关的黄斑变性、及血管瘤。

特异性结合构件非常适于用选自 ^{76}Br 、 ^{77}Br 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{131}I 和 ^{211}At

组成的一组同位素标记，并随后用于放射诊断和放射治疗中。

本发明再一方面提供了一种产生本发明的特异性结合构件的方法，包括用选自自由 ^{76}Br 、 ^{77}Br 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{131}I 和 ^{211}At 组成的一组的放射性同位素标记特异性结合构件。

为直接放射性标记特异性结合构件，可以靶向分子中的酪氨酸组分。在这个特殊程序中，将卤化物例如 Br^- 、 I^- 、 At^- 在存在活性药物成分(API) 的情况下用合适的氧化剂氧化，例如 iodogen®(包被的管)、iodo-Beads、氯胺-T(Chloramine-T) (N-氯-p-甲基苯磺酰胺的钠盐)等。

可以通过预先标记一种双功能卤素载体而用例如溴、碘或砷进行间接标记，所述卤素载体优选衍生自例如安息香酸衍生物、Bolton-Hunter 衍生物、苯衍生物等等。可以将所述载体转化进激活的物种中与赖氨酸残基的 ϵ -氨基基团或者与 API 的 N 末端缀合。这种间接方法还提供了一种合成途径以在半胱氨酸组分的巯基基团化学选择性地放射性标记肽化合物。半胱氨酸桥连的分子首先可以由合适的还原剂例如氯化锡(二价)、Tris (2-羧乙基)膦(TCEP)还原而产生可与所述卤素载体反应的游离的半胱氨酸 SH 基团。作为结合的功能基团，可以应用马来酰亚胺和 α -溴乙酰胺衍生物。

产生本发明的特异性结合构件的方法可包括在标记所述特异性结合构件之前表达编码该特异性结合构件的核酸。因此，作为早期步骤，产生所述特异性结合构件的方法可任选地包括引起或使得编码核酸(即包含编码所述特异性结合构件的序列的核酸)表达。这种方法可包括在产生所述特异性结合构件的条件下培养宿主细胞。

产生方法可包括产物的分离和/或纯化步骤。所述特异性结合构件可以在从核酸中表达后分离和/或纯化，和/或从宿主细胞中回收。所述分离和纯化可以在标记之前进行。或者或另外，所述特异性结合构件可以在标记后分离和/或纯化。

产生方法可包括将所述产物配制成为包括至少一种额外成分如药物

可接受的赋形剂的组合物。因此，所述(标记的)特异性结合构件可以配制成为包括至少一种额外成分如药物可接受的赋形剂的组合物。

本发明的这些及其它方面在下文进一步详细描述。

术语

特异性结合构件(specific binding member)

这个术语描述了彼此具有结合特异性的一对分子的构件(member)。特异性结合对的构件可以是天然产生的或者是完全或部分合成产生的。一对分子的一个构件具有在其表面上的区域或者空穴，所述区域或空穴与该分子对的另一个构件特异性结合并因此与该另一个构件特殊的空间和极性构成互补。因此成对的构件具有彼此特异性结合的性质。特异性结合对的类型例如是抗原—抗体、生物素—抗生物素蛋白、激素—激素受体、受体—配体、酶—底物。本申请与抗原—抗体类型的反应相关。

抗体分子

这个术语描述了天然产生的或者部分或全部合成产生的免疫球蛋白。该术语还涵盖了包含抗体结合结构域的任何多肽或蛋白质。包含抗原结合结构域的抗体片段是例如 Fab、scFv、Fv、dAb、Fd；及微型双功能抗体(diabody)。本发明涉及完整的 IgG1 抗体分子及如所述的包含 ϵ_{S2} -CH4 的小免疫球蛋白。

重组 DNA 技术可用于从初始抗体分子中产生保留原始抗体分子特异性的其他抗体分子。这些技术可包括将编码抗体的免疫球蛋白可变区或者互补决定区(CDR)的 DNA 导入不同免疫球蛋白的恒定区，或者恒定区加上框架区。见例如 EP-A-184187、GB 2188638A 或 EP-A-239400 所述。

由于抗体可以许多方式修饰，因此术语“抗体分子”应该被理解为涵盖具有需要的特异性的抗体抗原结合结构域的任何特异性结合构件或者物质。因此，这个术语涵盖了抗体片段和衍生物，包括包含免疫球蛋

白抗原结合结构域的任何多肽，无论是天然的还是完全或部分合成的多肽。因此该术语包括包含与另一种多肽融合的免疫球蛋白结合结构域或等价物的嵌合分子。嵌合抗体的克隆和表达在 EP-A-0120694 和 EP-A-0125023 中描述。

抗原结合结构域

这个术语描述了抗体分子的特定部分，其包含特异性结合并互补于一种抗原的部分或全部的区域。在抗原较大的情况中，抗体可以仅结合抗原的特定部分，该部分称作表位。抗原结合结构域可以由一或多个抗体可变结构域(例如所谓的由 VH 结构域组成的 Fd 抗体片段)提供。优选地，抗原结合结构域包括抗体轻链可变区(VL)和抗体重链可变区(VH)。

特异性

这个术语可用于描述特异性结合对的一个构件与除了其特异结合配体之外的分子无任何显著的结合的状态。该术语还可用于例如抗原结合结构域特异于多种抗原携带的特定表位的状态，在这种情况下携带抗原结合结构域的特异性结合构件能结合携带该表位的各种抗原。

包含

这个术语通常的含义是包括，即允许存在一或多种特征或成分。

分离的

这个术语是指本发明的特异性结合构件或者编码这些结合构件的核酸通常处于本发明指定的状态。所述构件及核酸没有或基本没有其天然伴随物质，如在其天然环境或者当这种制品是通过重组 DNA 技术在体外或体内制备时在其制备环境(例如细胞培养物)中发现的材料。所述构件及核酸可以用稀释剂或佐剂配制并因为实践目的仍认为是分离的，例如所述构件如果用于包被微量滴定平板以用于免疫分析时，通常与明胶或其它载体混合，或者当用于诊断或治疗时，与药物可接受的载体或稀释剂混合。特异性结合构件可以是天然或通过异源真核细胞系统(例如 CHO 或 NSO (ECACC 85110503)细胞)糖基化的，或它们可以是非糖基化的(例

如如果通过在原核细胞中表达而产生)。

“基本如所列出的”是指本发明的相关 CDR 或 VH 或 VL 结构域与序列在本文列出的特定区域相同或高度相似。“高度相似”涵盖了在 CDR 和/或 VH 或 VL 结构域中可以产生 1—5 个，优选 1—4 个如 1—3 个或 1 或 2 或 3 或 4 个取代。

携带本发明的 CDR 的结构通常是抗体重链或轻链序列或者其基本部分，其中 CDR 位于相应于重排的免疫球蛋白基因编码的天然发生的 VH 和 VL 抗体可变结构域的 CDR 的位置。免疫球蛋白可变结构域的结构和位置可以参考(Kabat, E. A. et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest. 5th Edition. US Department of Health and Human Services. 1991, 及其 Internet (<http://immuno.bme.nwu.edu> 或使用任何搜索工具查找"Kabat") 上可获得的更新资料所述确定。

优选地，基本如本文所列出的 CDR 氨基酸序列作为人可变结构域或其基本部分中的 CDR 而被携带。基本如本文所列出的 L19 VH CDR3 和/或 L19 VL CDR3 序列可用于本发明的优选实施方案中，优选每个序列在人重链或轻链可变结构域(根据可能的情况)或者其基本部分中作为 CDR3 被携带。

免疫球蛋白可变结构域的基本部分包含至少 3 个 CDR 区域，以及它们之间的框架区。优选地，该部分还包括第一个和第四个框架区的任一个或两者的至少大约 50%，该 50%是第一个框架区的 C-末端 50%及第四个框架区的 N 末端 50%。可变结构域的基本部分的 N 末端或 C 末端的其它残基可以是与天然发生的可变结构域区域通常不相关的那些残基。例如，通过重组 DNA 技术产生的本发明的特异性结合构件的构建可以导致引入由为了便于克隆或其它操纵步骤而导入的接头编码的 N 或 C 末端残基。其它操纵步骤包括导入接头以将本发明的可变结构域与另外的蛋白质序列包括免疫球蛋白重链、其它可变结构域或者蛋白质标记物连接在一起，如下文更详细的论述。

在本发明的 IgG1 抗体分子中, VL 结构域可以以 C 末端附着到包括人 C κ 或 C λ 链, 优选 C κ 链的抗体轻链恒定区。

除了用 ^{76}Br 、 ^{77}Br 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{131}I 和/或 ^{211}At 标记之外, 本发明的特异性结合构件可以用另一种可检测的或功能性标记物进行标记。可检测的标记物如下所述, 包括放射性标记物如放射性同位素锝、铟、钷、铜、镱或铼, 特别是 $^{94\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{111}In 、 ^{86}Y 、 ^{88}Y 、 ^{177}Lu 、 ^{64}Cu 和 ^{67}Cu , 其可以使用如本文所述的抗体成像领域的常规化学方法附着于本发明的抗体。可以使用的其它放射性同位素包括 ^{203}Pb 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{43}Sc 、 ^{47}Sc 、 ^{110}mIn 、 ^{97}Ru 、 ^{62}Cu 、 ^{68}Cu 、 ^{86}Y 、 ^{88}Y 、 ^{90}Y 、 ^{121}Sn 、 ^{161}Tb 、 ^{153}Sm 、 ^{166}Ho 、 ^{105}Rh 、 ^{177}Lu 、 ^{72}Lu 和 ^{18}F 。

标记物也包括酶标记物如辣根过氧化物酶。标记物还包括化学成分如生物素, 其可以通过结合特异性关连的可检测成分例如标记的抗生物素蛋白而检测。

一个标记方案实例如下:

为直接放射性标记特异性结合构件, 首先通过合适的还原剂例如氯化锡(二价)、Tris (2-羧乙基)膦(TCEP)还原半胱氨酸桥连的分子, 产生可与同位素例如 Tc 或 Re 反应的游离半胱氨酸 SH 基团。在这个特定程序中, 得自即时发生器系统的 permetalate 由还原剂例如氯化锡(二价)在存在辅助配体例如酒石酸钠和 API 的情况下还原(详见下文实验章节所述)。

用例如铟、钷、镧系元素或锝和铼进行的间接标记可以通过将一种螯合配体与所述特异性结合构件的胺或硫醇基团预先结合而进行, 所述螯合配体优选地衍生自乙二胺四乙酸(EDTA)、二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)、环己基 1,2-二胺四乙酸(CDTA)、乙二醇-O,O'-二(2-氨基乙基)-N,N,N',N'-二乙酸(HBED)、三乙烯四胺六乙酸(TTHA)、1,4,7,10-四氮杂环十二烷-N,N',N''-四乙酸(1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N',N''-tetraacetic acid, DOTA)、1,4,7-三氮杂环壬烷-N,N',N''-三乙酸(1,4,7-triazacyclononane-N,N',N''-triacetic acid,

NOTA)、1,4,8,11-四氮杂环十四烷-N,N',N'',N'''-四乙酸(1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid, TETA)、巯基乙酰二甘氨酸(mercaptoacetyl diglycine, MAG2)、巯基乙酰三甘氨酸(mercaptoacetyl triglycine, MAG3)、巯基乙酰甘氨酸半胱氨酸(meicaptoacetyl glycyl cysteine, MAGC)、半胱氨酸甘氨酸半胱氨酸(cysteiny glycyl cysteine, CGC)。螯合配体具有合适的偶联基团,例如活性酯、马来酰亚胺、硫代氨基甲酸盐或者 α -卤化的乙酰胺成分。为了将螯合配体与胺基团例如赖氨酸残基的 ϵ -NH₂-基团结合,不需要预先还原L-19-SIP化合物。

标记特异性结合构件的方法可包括将含有选自⁷⁶Br、⁷⁷Br、¹²³I、¹²⁴I、¹³¹I和²¹¹At组成的一组的一种放射性同位素的激活的双功能卤素载体与所述特异性结合构件的赖氨酸残基或N末端,以及半胱氨酸残基缀合。所述方法可包含将所述卤素载体与所述特异性结合构件的赖氨酸或半胱氨酸残基缀合,或与所述特异性结合构件的N末端缀合。(i)半胱氨酸残基和(ii)赖氨酸残基或N末端其中之一或二者可以根据本发明用相同或不同的放射性同位素标记。

本发明的特异性结合构件设计为用于人或动物对象优选人的诊断或治疗方法中。所述特异性结合构件特别适用于放射治疗和放射诊断方法中。

因此,本发明进一步提供了包括给予本发明提供的特异性结合构件的治疗方法、包含这种特异性结合构件的药物组合物、以及这种特异性结合构件在生产用于给予的药物中的应用,例如在生产药物或药物组合物的方法中的应用,包括用所述特异性结合构件与药学可接受的赋形剂一起配制。

本发明的特异性结合构件可用于提供治疗益处的临床适应证包括肿瘤如任何实体瘤,以及病理性血管发生所致其他损害,包括风湿性关节炎、糖尿病视网膜病变、年龄相关的黄斑变性及血管瘤。

本发明的特异性结合构件可用于人体或动物的治疗方法中，如治疗(包括预防性治疗)人患者的疾病或病症的方法，所述方法包括将有效量的本发明的特异性结合构件给予所述患者。优选地，所述治疗是放射治疗。根据本发明可治疗的病症在本文别处论述。

本发明的特异性结合构件可用于 SPECT 成像、PET 成像和治疗中。用于 SPECT 成像优选的同位素包括 ^{123}I 和 ^{131}I 。用于 PET 的优选同位素是 ^{124}I 。 ^{131}I 是用于治疗的优选同位素。

由于使用对于成像和治疗的一个元件的不同同位素，因此各自的免疫缀合物的生物分布是相同的。这与使用 ^{111}In 标记的衍生物进行成像以预测各自的 ^{90}Y 标记的治疗衍生物的生物分布的其它方案相比是有利的，因为相应的 ^{111}In 和 ^{90}Y 标记的衍生物的生物分布可以不同。见 Carrasquillo J. A. et al. (1999) J Nucl Med 40: 268-276。

因此，本发明进一步提供了包括给予本发明提供的特异性结合构件的治疗方法、包含这种特异性结合构件的药物组合物、以及这种特异性结合构件在生产用于给予的药物中的应用，例如在生产药物或药物组合物的方法中的应用，包括用所述特异性结合构件与药物学可接受的赋形剂一起配制。

根据本发明，所提供的组合物可以给予个体。给予优选是以“治疗有效量”给予，这是足以示出对患者有益处的量。这种益处可以是至少改善至少一种症状。实际给予量及给予速度和时程依赖于治疗的疾病的性质和严重程度而定。治疗处方，例如剂量等的确定，在普通医生和其它医生的职责范围内。抗体的合适剂量为本领域所熟知；见 Ledermann J. A. et al. (1991) Int J. Cancer 47: 659-664；Bagshawe K. D. et al. (1991) Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals 4: 915- 922 所述。

根据需治疗的病症，组合物可以单独或者与其它治疗进行组合同时或相继给予。

本发明的特异性结合构件，包括包含抗体抗原结合结构域的那些构

件，可以通过任何合适途径给予需要治疗的患者，通常通过注射进血流中和/或直接注入治疗部位例如肿瘤中。优选地，所述特异性结合构件是通过非肠道给予的。精确剂量依赖于许多因素而定，如治疗途径、治疗区域(例如肿瘤)的大小和位置、抗体的精确性质(例如完整的 IgG1 抗体分子、小免疫球蛋白分子)，及与抗体分子附着的任何可检测的标记物或其它分子的性质。典型的的抗体剂量是 10—50 mg。

这是单次治疗成人患者的剂量，对于儿童和婴幼儿可以适当调整，也可以根据分子量按比例调整其它抗体形式的剂量。根据医生的判断可以每天一次、每周两次、间隔一周或一个月重复治疗。

本发明的特异性结合构件通常以药物组合物的形式给予，其除了特异性结合构件之外可包含至少一种成分。

因此本发明的药物组合物根据本发明的应用除了活性成分之外，还可包含一种药物学可接受的赋形剂、载体、缓冲剂、稳定剂及本领域技术人员熟知的其它材料。这些材料应是无毒的并且不应干扰所述活性成分的效力。载体或其它材料的精确性质依赖于给药途径而定，可以是口服的或者注射例如静脉内注射途径。

对于静脉内注射或者在病变部位注射，活性成分是肠道外给予可接受的水溶液形式，其无热原并且具有合适的 pH、等渗性和稳定性。本领域技术人员可以使用例如等渗介质如氯化钠注射液、Ringer's 注射液、乳酸盐 Ringer's 注射液制备合适的溶液。根据需要可包括防腐剂、稳定剂、缓冲剂、抗氧化剂和/或其它添加剂。

根据需治疗的病症，组合物可以单独或者与其它治疗进行组合而同时或相继给予。其它治疗可包括给予合适剂量的止痛药物如非甾体抗炎药物(例如阿司匹林、扑热息痛、布洛芬或酮洛芬)或者鸦片制剂如吗啡，或者止吐剂。

本发明提供了一种包括促使或使得本发明提供的特异性结合构件与 ED-B 结合的方法。正如所述，这种结合可以在体内发生，例如在给予特

异性结合构件或者编码特异性结合构件的核酸之后发生，或者这种结合可以在体外发生，例如在 ELISA、Western 印迹、免疫细胞化学、免疫沉淀或亲和层析中发生。

可以确定特异性结合构件与 ED-B 的结合的量。定量可以是关于测试样品中抗原的量，这对于诊断有意义。

抗体对样品的反应性可以通过任何方式确定。可以通过放射免疫测定法(RIA)确定。将放射性标记的抗原与未标记的抗原(测试样品)混合并使其与抗体结合。将结合的抗原通过物理方法从未结合的抗原中分离，确定与抗体结合的放射性抗原的量。测试样品中抗原越多则结合抗体的放射性抗原越少。也可以使用与报道分子连接的抗原或类似物进行非放射性抗原的竞争结合分析。所述报道分子可以是具有光谱分离吸光和发光特性的荧光染料、磷或激光染料。合适的荧光染料包括荧光素、罗丹明、藻红蛋白和得克萨斯红。合适的生色染料包括二氨基联苯胺。

其它报道分子包括大分子胶状颗粒或者微粒子如有色的、磁性或顺磁性的乳胶珠，及可以直接或间接引起可目测的、可电子检测的或可另外记录的检测信号的生物或化学活性剂。这些分子可以是例如催化产生或改变颜色或引起电子性质改变的反应的酶。它们可以是分子可激发的，由此能量状态之间的电子跃迁导致特征性光谱吸收或发射。它们可包括与生物传感器结合使用的化学实体。可以应用生物素/抗生物素蛋白或者生物素/链霉抗生物素及碱性磷酸酶检测系统。

由单个抗体-报道分子缀合物产生的信号可用于得到样品(正常和测试样品)中相关抗体结合的可量化的绝对或相对数据。

本发明进一步涉及一种特异性结合构件，其与既结合抗原又包含包括具有基本如本文所列出的氨基酸的 CDR 的 V 结构域，优选包含 SEQ ID NO:3 所示 VH CDR3 的 VH 结构域的任何特异性结合构件竞争结合 ED-B。结合构件之间的竞争可以简便地在体外分析，例如通过将一个结合构件用一个特异性报道分子标记，所述结合构件在存在其它未标记的

结合构件的情况下可以检测到，从而使得可以鉴别结合相同表位或重叠表位的特异性结合构件。竞争可以例如使用如 Carnemolla et al. (24 1996) 所述 ELISA 确定。

如上所述，产生本发明的特异性结合构件的方法可包括表达编码核酸，及可以任选地包括在产生所述特异性结合构件的条件下培养宿主细胞。根据本发明的或者本发明使用的特异性结合构件及编码核酸分子及载体可以基本纯或均一形式分离自和/或纯化自例如其天然环境，在核酸的情况中，没有或基本没有源自编码具有所需功能的多肽的序列之外的核酸或基因。

本发明使用的核酸可包括 DNA 或 RNA，并且可以是全部或部分合成的。本文列出的核苷酸序列涵盖了具有特定序列的 DNA 分子，及具有特定序列的 RNA 分子，除非特别说明，否则其中 U 取代 T。

本领域熟知在各种不同的宿主细胞中克隆和表达多肽的系统。合适的宿主细胞包括细菌、哺乳动物细胞、酵母和杆状病毒系统。本领域中可利用的表达异源多肽的哺乳动物细胞系包括中国仓鼠卵巢细胞、HeLa 细胞、幼仓鼠肾细胞、NSO 小鼠黑素瘤细胞及许多其它细胞。通常优选的细菌宿主是大肠杆菌。

本领域充分确定了抗体及抗体片段在原核细胞如大肠杆菌中的表达。综述参见例如 Pluckthun, A. *Bio/Technology* 9: 545-551 (1991)。本领域技术人员也可利用在培养的真核细胞中的表达以产生特异性结合构件，见最近的综述例如 Ref, M. E. (1993) *Curr. Opinion Biotech.* 4: 573-576; Trill J. J. et al. (1995) *Curr. Opinion Biotech* 6: 553-560。

可以选择或构建含有适当调节序列的合适载体，所述调节序列包括启动子序列、终止子序列、聚腺苷酸化序列、增强子序列、标记基因及其它合适序列。载体可以是质粒、病毒例如噬菌体或噬菌粒。进一步详述参见例如 *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*: 3rd edition, Sambrook et al., 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press。关于核酸操纵

例如制备核酸构建体、诱变、测序、将 DNA 导入细胞中和基因表达、及蛋白质分析的许多已知技术和方案详见于 *Current Protocols in Molecular Biology*, Second Edition, Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons, 1992。Sambrook 等及 Ausubel 等所论述并入本文作参考。

产生本发明的特异性结合构件的方法可进一步包括将编码核酸导入宿主细胞中。所述导入可利用任何可利用的技术进行。对于真核细胞,合适的技术可包括磷酸钙转染、DEAE-Dextran、电穿孔、脂质体介导的转染及使用逆转录病毒或其它病毒例如痘苗病毒的转导,或者对于昆虫细胞使用杆状病毒的转导。对于细菌细胞,合适的技术可包括氯化钙转化、电穿孔及使用噬菌体转染。

在导入后可以引起或使得所述核酸表达,例如通过在使得所述基因表达的条件下培养宿主细胞进行。

在一个实施方案中,本发明的核酸整合进宿主细胞的基因组(例如染色体)中。整合可以根据标准技术通过将促进重组的序列包含于基因组中而促进。

本领域技术人员根据包括如下实施例的本发明公开可显而易见本发明的其它方面和实施方案。本发明的特异性结合构件的合成和标记方法在如下实施例中充分例证。这些实施例仅是例证本发明而无限限制之意。本说明书中所提及的所有文献均并入参考。

本发明各方面和实施方案的实施例

1. 本发明的特异性结合构件的制备和鉴定

如下实施例使用放射性标记的肽化合物 L19-SIP。

1.1: I-131-L19-SIP 的合成(氯胺-T 方法(Chloramine-T method))

将含有 200 μ g L19-SIP 的 230 μ l PBS (0.2 M PBS, pH 7.4)置于反应瓶中,与 185 MBq [131 I] NaI 混合,并与 30 μ L 新鲜制备的在 0.2 M PBS (pH 7.4)中的氯胺-T 溶液(2 mg/mL)反应。1 分钟后,加入 50 μ L 的 Na₂S₂O₅ 溶

液(10 mg/mL 于 PBS 0.2 M, pH 7.4 中)。 ^{131}I 标记的 L19-SIP 通过凝胶层析纯化, 使用预先用 5 ml 在 PBS 中的 0.5 %牛血清白蛋白封闭的 NAP-5 层析柱(Amersham, 洗脱液: PBS)进行。

放射性化学制品产率: 45.7 %。

放射性化学制品纯度: 88.3% (SDS-PAGE)。

比活性: 31.7 MBq/nmol。

免疫反应性: 76 %。

1.2: I-131-L19-SIP 的合成(iodogen 方法)

将溶于 800 μl PBS(0.2 M PBS, pH 7.4)中的 800 μg L19-SIP 与 500 MBq [^{131}I] NaI 混合并置于反应瓶(iodogen 管, Pierce Inc.)中。将混合物在室温轻轻摇动 30 分钟。 ^{131}I 标记的 L19-SIP 通过凝胶层析纯化, 使用预先用 5 ml 在 PBS 中的 0.5%牛血清白蛋白封闭的 NAP-5 层析柱(Amersham, 洗脱液: PBS)进行。

放射性化学制品产率: 93.2%。

放射性化学制品纯度: 91.1% (SDS-PAGE)。

比活性: 46.6 MBq/nmol。

免疫反应性: 78%。

1.3: I-123-L19-SIP 的合成(iodogen 方法)

将含有 200 μg L19-SIP 的 230 μl PBS(0.2 M PBS, pH 7.4)与 200 MBq [^{123}I] NaI 混合并置于反应瓶(iodogen 管, Pierce Inc.)中。将混合物在室温轻轻摇动 30 分钟。 ^{123}I 标记的 L19-SIP 通过凝胶层析纯化, 使用预先用于 PBS 中的 5 ml 0.5%牛血清白蛋白封闭的 NAP-5 层析柱(Amersham, 洗脱液: PBS)进行。

放射性化学制品产率: 81.6%。

放射性化学制品纯度: 89.6% (SDS-PAGE)。

比活性：61.2 MBq/nmol。

免疫反应性：84%。

1.4: I-124-L19-SIP 的合成(iodogen 方法)

将含有 200 μ g L19-SIP 的 230 μ l PBS(0.2 M PBS, pH 7.4)与 50MBq [123 I] NaI 混合并置于反应瓶(iodogen 管, Pierce Inc.)中。将混合物在室温轻轻摇动 30 分钟。 124 I 标记的 L19-SIP 通过凝胶层析纯化, 使用预先用于 PBS 中的 5 ml 0.5%牛血清白蛋白封闭的 NAP-5 层析柱(Amersham, 洗脱液: PBS)进行。

放射性化学制品产率：84.5%。

放射性化学制品纯度：89.6% (SDS-PAGE)。

比活性：22.8 MBq/nmol。

免疫反应性：86%。

1.5: (3-(4-羟基-3- 131 I)碘-苯基)-丙酸酯)-L19-SIP 的合成

将 500 μ g(3-(4-羟基-苯基)-N-(sulfonato-琥珀酰亚氨基)丙酸酯)溶解于 1 mL 的 DMSO 中。将 10 μ l 氯胺-T (5 mg/ml 于 PBS 中)与 74 MBq [131 I] NaI 混合, 用 15 μ L PBS (0.2 M, pH 7.4)中和。将 1 μ l 的(3-(4-羟基-苯基)-N-(sulfonato-琥珀酰亚氨基)丙酸酯)溶液加入氯胺-T/[131 I] NaI 溶液中并使该混合物反应 1 分钟。加入 40 μ L 的 Na₂S₂O₅(10 mg/mL 于 PBS 0.2 M, pH 7.4 中), 随后立即加入含有 200 μ g L19-SIP 的 230 μ l 硼酸盐缓冲液(0.2 M PBS, pH 8.5)而结束反应。

(3-(4-羟基-3- 131 I)碘-苯基)-丙酸酯)-L19-SIP 通过凝胶层析纯化, 使用预先用 5 ml 含有 0.5 %牛血清白蛋白的 PBS 封闭的 NAP-5 层析柱(Amersham, 洗脱液: PBS)进行。

放射性化学制品产率：37.2%。

放射性化学制品纯度：94.6 % (SDS-PAGE)。

比活性：10.3 MBq/nmol。

免疫反应性：69%。

1.6: I-131-L19-SIP 的 MIRD 计算

基于在携带肿瘤的小鼠中的生物分布数据，I-131 标记的 L19-SIP 的吸收剂量可以通过 MIRD 公式(MIRD formalism)计算。生物动力学建模使用携带人成胶质细胞瘤(U251)的小鼠中 I-131-L19-SIP 的%ID 数据进行。停留时间通过对双指数和单指数函数曲线下从零至无限大求积分所得的面积计算，包括所述化合物的生物学和物理学半衰期。

考虑到小鼠器官既作为放射源又作为放射靶位，因此可以使用 MIRDOSE 3.1 软件的 S 值估计 I-131- L19-SIP 的作为自身对自身的器官吸收剂量(无放射性交叉发射)。

小鼠器官剂量 (mGy/MBq):

肝	50
肾	160
脾	50
肺	220
卵巢	180—410 (依赖于排卵周期状况和 ED-B 表达)
子宫	600 (依赖于排卵周期状况和 ED-B 表达)
睾丸	55
血液	130
红骨髓	50 (基于血液剂量计算)
肿瘤	940 (对于 100mg 肿瘤计算)

使用 MIRDOSE 3.1 程序中计算的停留时间，可以估计 I-131-L19-SIP 的人体吸收剂量。

人体器官剂量(mGy/MBq):

肾上腺	9.46E-02
-----	----------

脑	1.64E-02
乳腺	7.33E-02
胆囊	1.00E-01
LLI 壁	4.47E-01
小肠	1.10E-01
胃	9.45E-02
ULI 壁	2.11E-01
心脏壁	6.22E-02
肾	1.86E-01
肝	7.46E-02
肺	7.04E-02
肌肉	8.71E-02
卵巢	8.07E-01
胰腺	1.15E-01
红骨髓	9.11E-02
骨表面	9.74E-02
皮肤	7.20E-02
脾	7.11E-02
睾丸	2.38E-01
胸腺	8.55E-02
甲状腺	8.54E-02
膀胱壁	7.19E-01
子宫	4.72E-01
全身	8.78E-02
EFF DOSE EQUIV	3.60E-01
EFF DOSE	3.21E-01

推断红骨髓和生殖器官(卵巢/子宫和睾丸)是剂量限制器官。然而,

基于剂量测定计算的治疗窗看起来有利及有希望。发现肿瘤剂量与红骨髓剂量比值为 18。因此, I-131-L19-SIP 显示递送至肿瘤的剂量是递送至红骨髓的剂量的 18 倍, 这是很显著的。

1.7: 在将 I-131-L19-SIP 单次静脉内注射进携带肿瘤的裸鼠后的肿瘤治疗研究

将 I-131-L19-SI 单次静脉内注射进携带 U251(成胶质细胞瘤)的裸鼠(体重为大约 27 g)中。研究剂量分别为 37 MBq 和 74 MBq。另外, 研究一组对照动物(单次注射生理盐水)。在注射后的时间内, 使用测径器测定肿瘤大小(mm²)。

在分别单次静脉内注射生理盐水和 I-131-L19-SIP 后监测的裸鼠中肿瘤的生长情况示于图 6。

每只动物单次注射 74MBq I-131-L19-SIP 的动物示出对 U251 肿瘤生长的显著作用, 使其停滞 18 天。对于低剂量组(37 MBq)也如此, 除了低剂量组在最后 5 天开始轻微的肿瘤生长。相反, 对照组的肿瘤在整个观测期间持续生长。

这个研究结果示出 I-131-L19-SIP 对于治疗实体瘤的极佳潜力。

1.8: I-123-L19-SIP 单次静脉内注射进携带肿瘤的裸鼠后的成像

将本发明的物质以大约 9.25 MBq 的剂量静脉内注射进携带 F9(畸胎癌)的裸鼠(体重大约 25 g)中。在给予该物质后的不同时间进行 γ 照相机成像。

通过在注射后 4 小时和 24 小时对携带 F9(畸胎癌)的裸鼠中 I-123-L19-SIP 进行平面闪烁扫描(planar scintigraphy), 可以明确描述肿瘤。在注射后 4 小时, 除了肿瘤强烈吸收之外, 在机体其它部位仅可检测到微弱的背景(未与特定器官结合, 而是得自血液)。尽管肿瘤中信号保持, 但随着时间推移, 机体其它部位的背景信号消失。因此, 在注射后 24 小

时, 仅可检测到肿瘤。

这个研究结果示出 I-123-L19-SIP 对于实体瘤成像的极佳潜力。

2.进一步的实施例和实验

材料和方法

scFv、小免疫球蛋白(SIP)和 IgG1 构建体 scFv 的制备和表达

scFv(L19) (图 1A)是特别针对纤连蛋白 ED-B 结构域的亲和性成熟的 ($K_d=5.4 \times 10^{-11} M$) 抗体片段(13 Pini et al., 1998)。将 scFv(D1.3) (7 McCafferty et al.; 26 Neri et al., 1997)用作对照, 这是一种小鼠抗鸡卵清溶菌酶 scFv。根据 Pini et al. (34 1997)所述, 将这些 scFv 在大肠杆菌菌株 HB2151 (Maxim Biotech, San Francisco CA)中表达。

小免疫球蛋白

为构建 L19 小免疫球蛋白(L19-SIP)基因(图 1C), 将编码 scFv(L19) 的 DNA 序列通过聚合酶链反应(PCR)使用 Pwo DNA 聚合酶(Roche)根据厂商指导进行扩增, 引物是分别含有 ApaLI 和 BspE I 限制位点的引物 BC-618 (gtgtgcactcggaggtgcagctgttgagctctggg-SEQ ID NO:8) 和引物 BC-619 (gcctccggatttgattccaccttggtcccttggcc-SEQ ID NO:9)。扩增产物插入 pUT- ϵ SIP 载体 ApaLI/BspEI 中, 这样提供了具有在胞外介质中分泌蛋白质所需的分泌信号的 scFv 基因。pUT- ϵ SIP 载体得自先前所述的 pUT-SIP-long (33 Li et al., 1997), 是用人 IgE 分泌同种型 IgE-S2 的 CH4 结构域(ϵ_{S2} -CH4; 35 Batista et al., 1996)取代人恒定的 $\gamma 1$ -CH3 结构域产生的。CH4 是使得 IgE 分子二聚体化的结构域, ϵ_{S2} 同种型在羧基末端含有一个半胱氨酸, 其通过链间二硫键稳定 IgE 二聚体。在最终的 SIP 分子中, ScFv(L19)与 ϵ_{S2} -CH4 结构域通过一个短 GGSG 接头连接。然后用 HindIII 和 EcoR 限制酶将 SIP 基因从质粒 pUT- ϵ SIP-L19 中切离并克隆进含有巨细胞病毒(CMV)启动子的哺乳动物表达载体 pcDNA3 (Invitrogen, Groningen, The Netherlands)中, 以获得构建体 pcDNA3-L19-SIP。

编码 scFv(D1.3) 的 DNA 序列使用引物 BC-721 (ctcgtgcactcgcaggtgcagctgcaggagtca-SEQ ID NO:10) 和 BC-732 (ctctccggaccgtttgatctcgcgcttggt-SEQ ID NO:11) 扩增并插入 pUT-εSIP 载体 ApaLI/BspEI 中。然后将 D1.3-SIP 基因用 HindIII 和 EcoRI 限制酶从 pUT-εSIP-D1.3 中切离并克隆进 pcDNA3 中, 获得构建体 pcDNA3-D1.3-SIP。

这些构建体用于使用 FuGENE 6 转染试剂(Roche)转染 SP2/0 鼠骨髓瘤细胞(ATCC, American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA), 根据厂商优化的针对粘着细胞的方案进行。将转染瘤在补加了 10% FCS 的 DMEM 中生长, 并使用 750μg/ml Geneticin (G418, Calbiochem, San Diego, CA) 选择。

IgG1

为制备完整的 IgG1, 将 L19 重链的可变区(L19-VH)与其分泌肽序列一起用 HindIII 和 XhoI 从先前所述的 L19-pUTεSIP 中切离并插入进含有完整人 γ1 恒定重链基因的 pUC-IgG1 载体中。然后将重组的 IgG1 基因用 HindIII 和 EcoRI 从 pUC-IgG1-L19-VH 中切离并克隆进 pcDNA3 中, 获得构建体 pcDNA3-L19-IgG1。

为制备完整的 L19 轻链, 将 L19-VL 通过 PCR 从 L19-pUT-εSIP (如上述) 中扩增, 使用分别含有 ApaLI 和 BsiWI 限制性位点的引物 BC-696 (tggtgtgcactcggaaattgtgttgacgcagtc-SEQ ID NO:12) 和 BC-697 (ctctcgtacgtttgattccaccttggtcc-SEQ ID NO:13) 进行。在用 ApaLI 和 BsiWI 消化后, 将扩增产物插入含有分泌信号序列和人恒定区 κ 轻链序列的载体 pUT-SEC-hCκ 中。然后将重组轻链基因用 HindIII 和 XhoI 从 pUT-SEC-hCκ-L19-VL 中切离并插入 pCMV2Δ 哺乳动物表达载体(通过除去抗 G418 的抗性基因而得自 pcDNA3 载体)中, 获得构建体 pCMV2Δ-L19-κ。

这些构建体的等摩尔量用于如上述共转染 SP2/0 鼠骨髓瘤细胞。将

经 Geneticin 选择的克隆在 ELISA 中筛选分泌完整的重链和轻链嵌合免疫球蛋白的能力。

所有 DNA 构建体均使用 Qiagen (Hilden, Germany) 的 Maxiprep 系统纯化, 构建体的两条链的 DNA 序列使用 ABI PRISM dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer, Foster City, CA) 证实。除了 BsiWI (New England Biolabs, Beverly, MA) 之外, 所有限制酶(RE)均得自 Roche Diagnostics (Milan, Italy)。在 RE 消化后, 插入体和载体使用 Qiaquick 方法(Qiagen)从琼脂糖凝胶中回收。

抗体的纯化和质量控制

如 Carnemolla et al. (24 1996)所述方法进行免疫亲和性层析以纯化不同的抗体。

将根据厂商指导(24 Carnemolla et al., 96)与 Sepharose 4B (Amersham Pharmacia Biotech., Uppsala, Sweden)缀合的 ED-B 用于免疫纯化所有不同的 L19 抗体形式, 与 Sepharose 4B (Amersham Pharmacia)缀合的鸡卵清溶菌酶(Sigma, St. Louis, USA)层析柱用于纯化 D1.3 抗体。

免疫纯化的抗体形式 L19-SIP 和 L19-IgG1 不需要进一步纯化, 在+4 °C 用 PBS, pH 7.4 透析。由于得自免疫亲和层析的 scFv 由单体和二聚体两种形式组成, 因此需要如 Demartis et al. (27 2001)所述另一个纯化步骤以分离后者。制备成批的不同抗体形式并在还原和非还原条件下使用 SDS-PAGE、免疫组织化学、大小排阻层析(Superdex 200, Amersham Pharmacia Biotech) 和 ELISA 实验分析。

十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)、酶联免疫吸附测定(ELISA)、大小排阻层析和免疫组织化学

根据 Carnemolla et al. (24 1996)所述在条件培养基上进行筛选 ELISA 实验。为公开不同 L19 抗体形式的表达, 将含有 FN 的 ED-B 结构域的重组片段 7B89 (24 Carnemolla et al., 1996), 包括 L19 识别的表位, 固定在 Maxisorp 免疫平板(Nunc, Roskilde, Denmark)上。为了在 ELISA 实验中

检测 D1.3 抗体, 将鸡卵清鸡溶菌酶(Sigma)固定在 EIA 平板 NH₂ 表面 (Costar, Cambridge, MA)。根据厂商指导稀释的过氧化物酶缀合的兔抗人 IgE (Pierce, Rockford, IL)用作二级抗体以检测 SIP。在 IgG1 情况中使用过氧化物酶缀合的兔抗人 IgG (Pierce)。对于含有标记序列 FLAG 的 scFv 而言, 小鼠抗人 FLAG 单克隆抗体(M2, Kodak)和过氧化物酶缀合的山羊抗小鼠抗体(Pierce)分别用作二级和三级抗体。在所有情况中, 固定的抗原的免疫反应性使用过氧化物酶的底物 ABTS(Roche)检测并测定在 405nm 的吸光度。

Superdex 200 (Amersham Pharmacia)层析柱用于分析纯化的抗体在天然条件下的凝胶过滤模式, 使用快速蛋白质液相层析(FPLC; Amersham Pharmacia)进行。

如 Castellani et al. (22 1994)所述对不同组织恒冷箱切片进行免疫组织化学测定, 并根据 Carnemolla et al. (17 1989)所述在还原和非还原条件下进行 4—18%梯度 SDS-PAGE。

动物和细胞系

无胸腺裸鼠(8 周龄 nude/nude CD1 雌性)得自 Harlan Italy (Correzzana, Milano, Italy), 129(SyHsd 克隆)品系小鼠(8—10 周龄, 雌性)得自 Harlan UK (Oxon, England)。小鼠胚胎畸胎瘤细胞(F9), 人黑素瘤衍生的细胞(SK-MEL-28)和小鼠骨髓瘤细胞(SP2/0)购自 American Type Culture Collection (Rockville, MD)。为诱导肿瘤, 将裸鼠皮下注射 16×10^6 SK-MEL-28 细胞, 129 品系小鼠注射 3×10^6 F9 细胞。肿瘤体积使用如下公式计算: $(d)^2 \times D \times 0.52$, 其中 d 和 D 分别是用测径器测定的肿瘤的短径和长径(cm)。根据国家关于用于科学研究目的的动物保护法(意大利法律 no. 116, 27 January, 1992)饲养、处理和处死动物。*重组抗体的放射性碘标记*

蛋白质的放射性碘标记根据 Chizzonite 间接方法(36 Riske et al., 1991), 使用 IODO-GEN 预包被的碘标记管(Pierce)根据厂商指导结合

Na¹²⁵I (NEN Life Science Products, Boston, MA)。在报道的实验中, 0.5mg 蛋白质使用 1.0mCi 的 Na¹²⁵I。放射性标记的分子使用 0.25% BSA 预处理及于 PBS 中平衡的 PD10 (Amersham Pharmacia)柱从游离 ¹²⁵I 中分离。样品的放射性使用 Crystal γ -计数器(Packard Instruments, Milano, Italy)测定。放射性标记的蛋白质的免疫反应性在用含有 0.25% BSA 的 PBS 饱和的 200 μ l ED-B Sepharose 柱上进行。已知量的放射性碘标记的抗体(200 μ l 含有 0.25% BSA 的 PBS)用于顶部并使其进入柱中。然后将该柱用 1.5 ml 含有 0.25% BSA 的 PBS 漂洗以除去非特异性结合的抗体。最后, 免疫反应性结合物使用 1.5 ml 的 0.1M TEA, pH11 洗脱。计数未结合物和结合物的放射性, 计算免疫反应性抗体的百分比。免疫反应性总是高于 90%。

为进一步分析放射性碘标记的抗体, 将已知量的 200 μ l 放射性标记的蛋白质装入 Superdex 200 柱。不同蛋白质的保留体积在放射性碘标记后不改变。对于三种放射性碘标记的 L19 抗体形式及其阴性对照, 从 Superdex 200 柱回收的放射性为 100% (图 3A, 3B 和 3C)。

生物分布实验

为阻止 ¹²⁵I 在胃中的非特异性积聚及在甲状腺中的浓缩, 在注射放射性标记的抗体之前 30 分钟为小鼠口服溶于水中的 20 mg 高氯酸钠(Carlo Erba, Italy)。在生物分布实验期间间隔 24 小时重复一次该程序。携带肿瘤的小鼠在尾静脉注射含有 0.1 nmole 的不同放射性标记的抗体(对于 scFv 相应于 6 μ g, 对于 SIP 相应于 8 μ g, 对于 IgG 相应于 18 μ g)的 100 μ l 盐水。在每个时间点处死三只动物, 切离包括肿瘤的不同器官, 称重, 在 γ 计数器中计数, 然后用 PBS, pH 7.4 中 5% 甲醛固定, 根据 Tarli et al. (23 1999)所述进行微量放射自显影。

取血样制备血浆以确定放射性标记的分子在血流中的稳定性, 使用已经描述的免疫反应性测试和凝胶过滤分析进行。在这两种情况中均使用 200 μ l 血浆。不同器官的放射性含量以注射的剂量/克的百分比(%ID/g)

表示。放射性碘标记的抗体的血液清除参数使用最小二乘法拟合，这一拟合使用的是 MacIntosh Program Kaleidagraph (Synergy Software, Reading PA, USA)和等式：

$$X(t) = A \exp(-(\alpha t)) + B \exp(-(\beta t)),$$

其中 $X(t)$ 是在时间 t 放射性标记的抗体的 % ID/g。这个等式描述了双指数血液清除模式，其中 α 期的幅度定义为 $A \times 100 / (A + B)$ ， β 消除期的幅度定义为 $B \times 100 / (A + B)$ 。 α 和 β 是关于相应的血液清除期的半衰期的速度参数。 $T_{1/2}(\alpha \text{ 期}) = \ln 2 / \alpha = 0.692... / \alpha$ ， $T_{1/2}(\beta \text{ 期}) = \ln 2 / \beta = 0.692... / \beta$ 。 $X(0)$ 假定等于 40%，相应于每只小鼠中 2.5ml 血液体积。

结果

抗体制备

利用 L19 不同抗体形式(scFv、小免疫球蛋白和完整的人 IgG1)的可变区(13 Pini et al., 1998)及其在体内靶向肿瘤血管的性质。

图 1 示出用于表达不同的 L19 抗体形式的构建体。使用特异于非相关抗原的 scFv 的可变区制备相似的构建体(D1.3; 7 McCafferty; 26 Neri et al., 1997)。

为获得 SIP 和 IgG1，将 SP2/0 鼠骨髓瘤细胞用图 1 所示构建体转染，使用 G418 选择稳定的转染瘤。最佳生产者通过 ELISA 确定，扩展这些克隆以进行抗体纯化。所有这三种 L19 抗体形式的纯化基于免疫亲和层析，使用与 Sepharose 缀合的重组 ED-B 进行。产量对于 scFv(L19)为大约 8mg/l，对于 L19-SIP 为 10mg/l，对于 L19-IgG1 为 3mg/l。对于对照蛋白，使用特异于鸡卵溶菌酶的 scFv(D1.3)，并且使用 scFv D1.3 的可变区构建 D1.3-SIP。这两种抗体在与 Sepharose 缀合的鸡卵溶菌酶上纯化。产量分别为 8 和 5mg/l。作为 L19-IgG1 的对照，使用可商购的人 IgG1/ κ (Sigma)。

在还原和非还原条件下对三种纯化的 L19 形式进行 SDS-PAGE 分析。对于 scFv(L19)，表观分子量正如所期望的在还原和非还原条件下均为大

约 28kDa(未示出)。L19-SIP 示出在非还原条件下分子量接近 80kDa, 在还原条件下分子量为大约 40kDa。结果表明 95%以上的天然分子以共价连接的二聚体形式存在。L19-IgG1 示出正如所期望的在非还原条件下主带为大约 180kDa, 而在还原条件下示出相应于大约 55kDa 的重链和大约 28kDa 的轻链的两条条带。通过大小排阻层析(Superdex 200)分析获得三种 L19 抗体形式的洗脱模式。在所有三种情况中, 均检测到具有正常分布的代表 98%以上的单峰。使用标准校准曲线, 表观分子量对于 scFv(L19)₂ 为 60kDa, 对于 L19-SIP 为 80kDa, 对于 L19-IgG1 为 180kDa。另外, 通常存在于重组蛋白制品中并可以使在体内研究中获得的结果无效的分子聚集物经证明不存在。对纯化的对照蛋白质进行 SDS-PAGE 和大小排阻层析(Superdex 200)提供相似的结果。

使用这三种不同的 L19 抗体形式, 对在裸鼠中诱导的 SK-MEL-28 人黑素瘤及在 129 品系小鼠中诱导的 F9 鼠畸胎瘤的恒冷箱切片进行免疫组织化学分析。在低如 0.25—0.5 nM 的浓度获得最佳结果。所有三种纯化的 L19 抗体识别相同的结构。

放射性标记的 L19 抗体形式的体内稳定性

为进行体内生物分布研究, 使用 SK-MEL-28 人黑素瘤和 F9 鼠畸胎瘤。SK-MEL-28 肿瘤具有相对缓慢的生长速度, 而 F9 肿瘤生长迅速(图 2)。因此, 使用 SK-MEL-28 肿瘤使得能够进行长期实验(直至 144 小时), 而诱导 F9 肿瘤用于短期生物分布研究(直至 48 小时)。当肿瘤为大约 0.1—0.3cm³ 时, 进行所有生物学分布实验。为对比各种抗体形式, 注射于 100μl 无菌盐水中的等摩尔量(0.1 nmol)抗体。在注射之前, 将放射性碘标记的化合物经 0.22μm 过滤, 检测免疫反应性和凝胶过滤模式(见“材料和方法”)。放射性标记的蛋白质的免疫反应性总是超过 90%。

图 3 A—C 报道了放射性碘标记的 L19 抗体形式的凝胶过滤分析(Superdex 200)图示。

注射后在不同时间点从处理的动物取血样，针对免疫反应性并通过凝胶过滤层析分析血浆中存在的放射性。凝胶过滤图示出所有三种 L19 抗体形式均具有注射的蛋白质的分子量的单一主峰。只有 scFv 的图示显示具有更高分子量的另一个峰，提示聚集物形成(图 3D—F)。此外，对于 scFv(L19) 2 观测到非洗脱自 Superdex200 柱的大分子量聚集物的形成。事实上，当 L19-SIP 和 L19-IgG 从 Superdex 200 柱中回收均为所用得放射性的 90—100 % 时，scFv(L19) 2 的被上样的放射性产率为大约 55%。滞留的放射性仅在用 0.5M NaOH 洗涤层析柱后回收，表明大聚集物封闭在层析滤柱上(表 1)。

表 1 还报道了对血浆进行的免疫反应性测试结果(见“材料和方法”)。在实验期间，L19-SIP 和 L19-IgG1 在血浆中保持与起始试剂相同的免疫反应性。相反，在注射后 3 小时，血浆中 scFv(L19) 2 的免疫反应性降低至少于 40%。

对比生物分布实验

表 2a、b、c 和图 4 报道了在携带 SK-MEL-28 肿瘤的小鼠中使用放射性标记的 L19 抗体的生物分布实验中获得的结果。

表 2a、b、c 示出在静脉内注射放射性标记的抗体后不同时间，组织和器官包括肿瘤的 % ID/g 平均值($\pm$ SD)。

图 4 示出了在实验的不同时间肿瘤(A)和血液(B)中不同抗体形式的 %ID/g 变化，以及肿瘤和血液中 % ID/g 之间的比值(C)。所有三种 L19 抗体形式均选择性积聚在肿瘤中，肿瘤与其它器官的 %ID/g 的比值在表 3 中报道。

如显微放射自显影术所表明，抗体仅积聚在肿瘤血管中，而不特异性积聚在正常器官的血管上。相反，在肿瘤或正常组织中未发现放射性碘标记的对照分子特异性积聚(表 2a、b、c)。

所有这三种 L19 抗体形式均示出主要由肾脏介导的清除，通过计数

尿液样品确定。正如所期望的，scFv(L19)2 清除速度较快，完整的 L19-IgG1 较慢。双指数函数曲线拟合产生如表 4 报道的半衰期数值。

图 5 示出使用 F9 畸胎癌肿瘤模型用放射性碘标记的 scFv(L19)2 和 L19-SIP 获得的肿瘤和血液的%ID/g ($\pm$ SD)的变化。由于 F9 畸胎癌的高度血管生成活性，因此在静脉内注射后 3 小时和 6 小时放射性分子在这个肿瘤中的积聚与在 SK-MEL-28 肿瘤中积聚相比高出 3—4 倍，并且在实验持续的 48 小时内持续较高。对于 SK-MEL-28 肿瘤，在肿瘤血管中的特异性积聚通过显微放射自显影术证实，在注射对照分子后未观测到特异性肿瘤积聚。表 5 报道了在 F9 肿瘤和其它器官中在注射后不同时间 L19 (scFv)和 L19SIP 的%ID/g。

还原的 L19-SIP 的合成

向含有 375 μ g(5nmol)L19-SIP 的 422 μ l PBS 溶液中加入 50 μ l TCEP-溶液(14.34mg TCEP $\times$ HCl/5ml Na₂HPO₄ 水溶液, 0.1M, pH = 7.4)。将反应混合物在 37 $^{\circ}$ C 轻轻摇动 1 小时。还原的 L19-SIP 使用 NAP-5 柱(Amersham, Eluant: PBS)通过凝胶层析纯化。分离的产物的 SDS-PAGE 分析证实了 L19-SIP 定量转化为还原的 L19-SIP。

产率: 100.3 μ g/200 μ l PBS (26.7%)。

Tc-99m-L19-SIP 的合成

将 3.0 mg L-酒石酸-二钠置于瓶中，随后加入含有 100.3 μ g 还原的 L19-SIP 的 200 μ l PBS, 将溶液用 100 μ l Na₂HPO₄-缓冲水溶液(1M, pH=10.5) 稀释。加入 85 μ l Tc-99m 发生器(generator)洗脱液(24 小时)和 10 μ l SnCl₂-溶液(5mg SnCl₂/1ml 0.1M HCl)。将反应混合物在 37 $^{\circ}$ C 摇动 0.5 小时。Tc-99m 标记的 L19-SIP 通过凝胶层析纯化，使用 NAP-5 层析柱 (Amersham, 洗脱剂: PBS)进行。

放射性化学制品产率: 35.6%。

放射性化学制品纯度：90.2% (SDS-PAGE)。

比活性：26.4MBq/nmol。

免疫反应性：91.4%。

Tc-99m-MAG₂-L19-SIP 羧甲基-t-丁基二硫化物的合成

将含有 21.75ml (0.312mol) 1-巯基乙酸、43.5ml (0.312mol)三乙胺和 100g (0.312mol) N-(叔丁基巯基)-N,N'-二-BOC-胍的 1L EtOH (abs.)溶液回流(N₂-气)加热 60 小时。EtOH 在减压下蒸发至终体积为大约 200ml。将剩余物倒入 1.8L H₂O 中并将所得悬浮液的 pH 使用 5 摩尔 NaOH 调节为 7.14。滤除二-BOC-胍并将所得溶液的 pH 使用半浓缩的 HCl 调节为 2.2。用 600ml CH₂Cl₂ 从水中提取三次粗提物。组合的有机层经过 MgSO₄ 干燥，溶剂在减压下蒸发，产生 41.1g(80%)黄色油状物。该原料对于进一步合成是足够纯的。

N-(苄氧基羰基-Gly) Gly t-丁酯(Z-(N-Gly) Gly t-丁酯

将含有 35.02g (114mmol) Z-Gly-O 琥珀酰亚胺和 15g (114mmol) Gly-O-^tBu 的 1.4L CH₂Cl₂ 溶液在 N₂-气下在室温搅动 20 小时。将有机层用 250ml 1%柠檬酸水溶液洗涤 3 次，用 200ml 半饱和的 NaHCO₃ 水溶液洗涤 2 次，及用 200ml 水洗涤 1 次。将有机层经过无水 MgSO₄ 干燥。在减压下蒸发 CH₂Cl₂ 产生 36.5g (99%) Z-Gly-Gly-O-^tBu 黄色油状物。该粗提物对于进一步合成是足够纯的。

Gly-Gly t-丁酯

将 36.5 g (113 mmol) Z-Gly-Gly-O^tBu 溶解于 1L THF 中，随后加入 3.65 g 活性炭上的钯(10%)。将该混合物在 H₂ 气(1atm)下在室温搅动 3 小时。将悬浮液用 N₂ 净化、过滤(PTFE 滤膜：0.45μm)并将滤液在减压下浓缩产生 20.3g (95%) Gly- Gly-O-^tBu 黄色油状物。该粗提物对于进一步合

成是足够纯的。

羧甲基-t-丁基二硫化甘氨酸甘氨酸 t-丁酯

将含有 23.85g (115.6mmol) DCC 的 430ml CH_2Cl_2 溶液滴加至含有 21.76 g (115.6 mmol) Gly-Gly-O-^tBu、20.84 g (115.6 mmol)羧甲基-t-丁基二硫化物和 13.3 g (115.6 mmol) NHS 的 1L CH_2Cl_2 溶液中。所得悬浮液在 N_2 气下在室温搅动过夜。在过滤后，将所得溶液用 400ml 半饱和的 NaHCO_3 水溶液洗涤 3 次，用 400ml 水洗涤 1 次。将干燥的有机层(MgSO_4) 在减压下蒸发。粗提物通过在硅胶上层析纯化，使用的溶剂梯度范围是 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 99:1 至 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 98.5:1.5。分离 26.1g (64%) 黄色油状物。

巯基乙酰基甘氨酸甘氨酸

将 26.32g (75.09mmol)羧甲基-t-丁基二硫化甘氨酸甘氨酸 t-丁酯在 N_2 气下溶解于 233ml TFA 中。所得溶液在室温下搅动 20 分钟。在减压下($5-10 \times 10^{-2}\text{mbar}$)蒸发 TFA，所得油状物另外搅动 2 小时干燥($5-10 \times 10^{-2}\text{mbar}$)。加入 250ml Et_2O 后沉淀出白色粉末，将该悬浮液搅动 3 小时。滤出该产物并再悬浮于 100ml Et_2O 中。所得悬浮液搅动过夜，滤出产物并将该物质在室温下减压干燥，产生 20.46g (92.5%) 白色粉末物。

巯基乙酰基甘氨酸甘氨酸 NHS 酯

将巯基乙酰基甘氨酸甘氨酸(1g, 3.4 mmol)和 N-羟基琥珀酰亚胺(391 mg, 3.4 mmol)混和在干燥的圆底瓶中，并溶解于无水 DMF (4 ml)中。加入含有 DCC (700 mg, 3.4 mmol)的无水二氧六环(2 ml)中，同时搅动该混合物。在 15 分钟内开始形成沉淀物(DCU)。1 小时后，通过真空过滤移除沉淀物。将该沉淀物用冷却的二氧六环洗涤。从滤物中除去二氧六环。通过加入二乙醚将产物从剩余的 DMF 溶液中沉淀。过滤分离产物，用冷

却的二乙醚洗涤并在真空干燥器中干燥。产率：1.33 (99 %)。

Tc-99m-MAG₂-ε-HN (Lys)-L19-SIP 的合成

将含有 200μg (2.66 nmol)非还原的 L19-SIP 的 111μl PBS 用 300 μl 硼酸钠缓冲液(0.1M, pH 8.5)稀释并用 200ml 磷酸盐缓冲液(0.1M, pH 8.5)透析两次, 每次 1 小时, 应用 Slide-A-Lyzer 10,000 MWCO (Pierce Inc., Rockford, IL, U.S.A.)进行。加入 50μl 巯基乙酰基甘氨酸 NHS 酯溶液(0.50mg 溶解于 500μl 磷酸盐缓冲液中, 0.1M, pH 8.5), 将反应混合物在 37℃加热 3 小时。将反应混合物用 200ml 磷酸盐缓冲液(0.1M, pH 8.5)透析 2 次, 每次 1 小时, 及透析 1 次 17 小时(过夜), 应用 Slide-A-Lyzer 10,000 MWCO (Pierce Inc., Rockford, IL, U. S.A.)进行。向瓶中加入 3.0 mg L-酒石酸-二钠, 随后加入 90μl Tc-99m 发生器洗脱液(每日洗脱的)和 25μl SnCl₂ 溶液(5mg SnCl₂/1ml 0.1M HCl)。将反应混合物在 37℃摇动 0.5 小时。Tc-99m-标记的 L19-SIP 使用 NAP-5 柱(Amersham, 洗脱液: PBS)通过凝胶层析纯化。

放射性化学制品产率: 55.1%。

放射性化学制品纯度: 94.5 % (SDS-PAGE)。

比活性: 15.2 MBq/nmol。

免疫反应性: 81.1%。

Re-188-L19-SIP 的合成

将 3.0 mg L-酒石酸-二钠置于瓶中, 随后加入含有 150μg 还原的 L19-SIP-SH 的 310μl PBS, 将溶液用 100μl Na₂HPO₄ 缓冲水溶液(1M, pH=10.5)稀释。加入 100μl Re-188 发生器洗脱液和 50μl SnCl₂ 溶液(5mg SnCl₂/1ml 0.1M HCl)。将反应混合物在 37℃摇动 1.5 小时。Re-188 标记的 L19-SIP 通过凝胶层析纯化, 使用 NAP-5 柱(Amersham, 洗脱液: PBS)进行。

放射性化学制品产率：34.8 %

放射性化学制品纯度：97.2% (SDS-PAGE)

比活性：13.5 MBq/nmol

免疫活性：91.7%

用于 EDTA、CDTA、TETA、DTPA、TTHA、HBED、DOTA、NOTA、DO3A、及相似类型螯合剂与半胱氨酸 SH 基团特异性结合的还原的 L19-SIP 的合成

将 50 μ l TCEP 溶液(14.34mg TCEP $\times$ HCl/5ml Na₂HPO₄ 水溶液, 0.1M, pH=7.4)加入到含有 375 μ g (5 nmol) L19-SIP 的 422 μ l PBS 溶液中。将反应混合物在 37 $^{\circ}$ C 轻轻摇动 1 小时。还原的 L19-SIP 通过凝胶层析纯化, 使用 NAP-5 柱(Amersham, 洗脱液: 乙酸钠缓冲液, 0.1M, pH 5.0)进行。分离的产物的 SDS-PAGE 分析证实了 L19-SIP 定量转化为还原的 L19-SIP。

产率: 105.7 μ g/200 μ l (28.2%)。

In-111-MX-DTPA-马来酰亚胺-S (Cys)-L19-SIP-R 的合成(R=还原的)

将含有 105 μ g (2.8 nmol)还原的 L19-SIP 的 200 μ l 乙酸钠缓冲液(0.1M, pH 5)与 50 μ l 溶解的 1,4,7-三氮-2-(N-马来酰亚胺乙烯基 p-氨基)苯甲基-1,7-双(羧甲基)-4-羧甲基 6-甲基庚烷(0.25mg DTPA-马来酰亚胺于 500 μ l 0.1M pH 5 乙酸钠缓冲液中)在 37 $^{\circ}$ C 反应 3 小时。将反应混合物用 200ml 乙酸钠缓冲液(0.1M, pH6)透析 2 次, 每次 1 小时, 应用 SlideA-Lyzer 10,000 MWCO (Pierce Inc., Rockford, IL, U. S. A.)进行。

加入 80 μ l [In-111] InCl₃ 溶液(HCl, 1N, 40 MBq, Amersham Inc.)并将反应混合物在 37 $^{\circ}$ C 加热 30 分钟。

In-111 标记的 DTPA-马来酰亚胺-S(Cys)-L19-SIP 通过凝胶层析纯化, 使用 NAP-5 柱(Amersham, 洗脱液: PBS)进行。

放射性化学制品产率：51.6 %

放射性化学制品纯度：97.2% (SDS-PAGE)

比活性：7.9 MBq/nmol

免疫反应性：88.5%

MX-DTPA-马来酰亚胺 (1,4,7-三氮-2-(N-马来酰亚胺乙烯基 p-氨基)苯甲基-1,7-二(羧甲基)-4-羧甲基-6-甲基庚烷)的合成

将 512mg (1mmol) 的 {[3-(4-氨基-苯基)-2-(双-羧甲基-氨基)-丙基]-[2-(双-羧甲基-氨基)-丙基]-氨基}-乙酸(Macrocylics Inc. Dallas, TX, U. S. A.)和 707 mg (7 mmol)三乙胺溶解于 3 ml 无水 DMF 中。滴加入含有 400 mg (1.5 mmol)的 3-(2, 5-二氧-2, 5-二氢-吡咯-1-基)-丙酸 2,5-二氧-吡咯烷-1-基酯(Aldrich)的 1ml 无水 DMF。将溶液在 50℃搅动 5 小时。缓慢加入 30 ml 二乙醚。将反应混合物进一步搅动 30 分钟。通过过滤收集沉淀。粗提物通过 RP-HPLC(乙腈-:水-:三氟乙酸/3:96.9:0.1 至 99.9:0:0.1)纯化。产率：61% (405 mg, 0.61mmol)。MS-ESI: 664 = $M^+ + 1$ 。

In-111-MX-DTPA-ε-HN (Lys)-L19-SIP 的合成

将含有 200μg (2.66 nmol)非还原的 L19-SIP 的 111μl PBS 用 300μl 硼酸钠缓冲液(0.1M, pH 8.5)稀释, 并用 200ml 硼酸钠缓冲液(0.1M, pH 8.5)透析 2 次, 每次 1 小时, 应用 Slide-A-Lyzer 10,000 MWCO (Pierce Inc., Rockford, IL, U. S. A.)进行。加入 50μl 的 1,4,7-三氮-2-(p-异硫氰酸)苯甲基-1,7-双(羧甲基)-4-羧甲基-6-甲基庚烷(MX-DTPA)溶液(0.33 mg MX-DTPA 溶解于 500μl 硼酸钠缓冲液 0.1M, pH 8.5), 并将反应混合物在 37℃加热 3 小时。将反应混合物用 200ml 乙酸钠缓冲液(0.1M, pH 6.0)透析 2 次 1 小时及 1 次 17 小时(过夜), 应用 Slide-A-Lyzer 10,000 MWCO (Pierce Inc., Rockford, IL, U. S. A.)进行。

加入 80μl [In-111] InCl₃ 溶液(HCl, 1N, 40 MBq, Amersham Inc.)并

将反应混合物在 37℃ 加热 30 分钟。In-111 标记的 MX-DTPA-ε-HN (Lys)-L19-SIP 通过凝胶层析纯化, 使用 NAP-5 柱(Amersham, 洗脱液: PBS)进行。

放射性化学制品产率: 72.4%

放射性化学制品纯度: 80.3% (SDS-PAGE)

比活性: 8.8 MBq/nmol

免疫反应性: 77.5%

In-111-DOTA-C-苯甲基-p-NCS-ε-HN (Lys)-L19-SIP 的合成

将含有 200μg (2.66 nmol)非还原的 L19-SIP 的 108μl PBS 用 300μl 硼酸钠缓冲液(0.1M, pH 8.5)稀释, 并用 200ml 硼酸钠缓冲液(0.1M, pH 8.5)透析 2 次, 每次 1 小时, 应用 Slide-A-Lyzer 10,000 MWCO (Pierce Inc., Rockford, IL, U. S. A.)进行。向溶液中加入 50μl 1,4,7,10-四氮-2-(p-异硫氰酸)苯甲基环十二烷-1,4,7,10-四乙酸(苯甲基-p-SCN-DOTA, Macrocylics Inc., Dallas TX, U. S. A.)溶液(1.5 mg 苯甲基-p-SCN-DOTA 溶解于 5 ml 硼酸钠缓冲液, 0.1M, pH 8.5 中), 并将反应混合物在 37℃ 加热 3 小时。将反应混合物用 200ml 乙酸钠缓冲液(0.1M, pH 6.0)透析 2 次, 每次 1 小时, 及透析 1 次 17 小时(过夜), 应用 Slide-A-Lyzer 10,000 MWCO (Pierce Inc., Rockford, IL, U. S. A.)进行。

加入 80μl [In-111] InCl₃ 溶液(HCl, IN, 40 MBq, Amersham Inc.), 将反应混合物在 37℃ 加热 30 分钟。In-111 标记的 DOTA-C-苯甲基-p-NCS-ε-HN(Lys)-L19-SIP 通过凝胶层析纯化, 使用 NAP-5 柱(Amersham, 洗脱液: PBS)进行。

放射性化学制品产率: 70.8%

放射性化学制品纯度: 92.1% (SDS-PAGE)

比活性: 10.1 MBq/nmol

免疫反应性: 75.1%

Y-88-MX-DTPA- ϵ -HN (Lys)-L19-SIP 的合成

将含有 200 μ g (2.66 nmol)非还原的 L19-SIP 的 110 μ l PBS 用 300 μ l 硼酸钠缓冲液(0.1M, pH 8.5)稀释,并用 200ml 硼酸钠缓冲液(0.1M, pH 8.5)透析 2 次,每次 1 小时,应用 Slide-A-Lyzer 10,000 MWCO (Pierce Inc., Rockford, IL, U. S. A.)进行。加入 50 μ l 的 MX-DTPA 溶液(0.33mg MX-DTPA 溶解于 500 μ l 硼酸钠缓冲液, 0.1M, pH 8.5),将反应混合物在 37 $^{\circ}$ C 加热 3 小时。将反应混合物用 200ml 乙酸钠(0.1M, pH 6.0)缓冲液透析 2 次,每次 1 小时,及透析 1 次 17 小时(过夜),应用 Slide-A-Lyzer 10,000 MWCO (Pierce Inc., Rockford, IL, U. S. A.)进行。

加入 100 μ l [Y-88]YCl₃ 溶液(HCl, 1N, 75 MBq, Oak Ridge National Lab.)并将反应混合物在 37 $^{\circ}$ C 加热 30 分钟。Y-88 标记的 MX-DTPA- ϵ -HN(Lys)-L19-SIP 通过凝胶层析纯化,使用 NAP-5 柱 (Amersham, 洗脱液: PBS)进行。

放射性化学制品产率: 68.1%

放射性化学制品纯度: 91.5% (SDS-PAGE)

比活性: 11.4 MBq/nmol

免疫反应性: 70.5%

Lu-177-DOTA-C-苯甲基-p-NCS- ϵ -HN (Lys)-L19-SIP 的合成

将含有 200 μ g (2.66 nmol)非还原的 L19-SIP 的 120 μ l PBS 用 300 μ l 硼酸钠缓冲液(0.1M, pH 8.5)溶解,并用 200ml 硼酸钠缓冲液(0.1M, pH 8.5)透析 2 次,每次 1 小时,应用 Slide-A-Lyzer 10,000 MWCO (Pierce Inc., Rockford, IL, U. S. A.)进行。加入 50 μ l 苯甲基-p-SCN-DOTA 溶液(1.5 mg 溶解于 5 ml 硼酸钠缓冲液 0.1M, pH 8.5 中),将反应混合物在 37 $^{\circ}$ C 加热 3 小时。将反应混合物用 200ml 乙酸钠缓冲液(0.1M, pH 6.0)透析 2 次,每次 1 小时,及透析 1 次 17 小时(过夜),应用 Slide-A-Lyzer 10,000 MWCO

(Pierce Inc., Rockford, IL, U. S. A.)进行。

加入 200 μ l [Lu-177] LuCl₃ 溶液(HCl, 1N, 80 MBq, NRH-Petten, Netherlands), 将反应混合物在 37°C 加热 30 分钟。Lu-177 标记的 DOTA-C-苯甲基-p-NCS-E-HN (Lys) L19-SIP 通过凝胶层析纯化, 使用 NAP-5 柱 (Amersham, 洗脱液: PBS)进行。

放射性化学制品产率: 72.2%

放射性化学制品纯度: 94.9 % (SDS-PAGE)

比活性: 18.3 MBq/nmol

免疫反应性: 73.4 %

In-111-MX-DTPA-L19-SIP 在单次静脉内注射进携带肿瘤的裸鼠后的器官分布和排泄

将本发明的标记的肽以大约 37 kBq 剂量静脉内注射进携带 F9(畸胎瘤)的动物中(体重大约 25g)。在给予所述物质后在各个时间各个器官中的放射性及在排泄物中的放射性使用 γ 计数器测定。

In-111-MX-DTPA-L19-SIP 在携带 F9(畸胎瘤)的裸鼠中的生物分布(平均值 $\pm$ SD, 3 只动物)示于表 6。

Tc-99m-L19-SIP 在单次注射进携带肿瘤的裸鼠后的器官分布和排泄

将标记的肽以大约 56 kBq 的剂量静脉内注射进携带 F9 (畸胎瘤)的动物(体重为大约 25 g)。给予所述物质后在不同时间各个器官中的放射性浓度及排泄物中的放射性使用 γ 计数器测定。另外, 基于肿瘤和血液中肽的浓度, 在不同时间建立肿瘤血液比。

Tc-99m-L19-SIP 在携带 F9 (畸胎瘤)的裸鼠中的生物分布(平均值 $\pm$ SD, 3 只动物)示于表 7。

在携带 F9 (畸胎瘤)的裸鼠中 Tc-99m-L19-SIP 的肿瘤血液比(平均值 $\pm$ SD, 3 只动物)示于表 8。

放射性标记的肽在动物实验中被证实具有有利的性质。例如，Tc-99m-L19-SIP 和 In-111-MX-DTPA- ϵ -HN(Lys)-L19-SIP 在注射(p. i.)后 1 小时显示 17.2 (Tc-99m)或 12.9(In-111) %注射剂量/g (ID/g)的高肿瘤积聚力。在 p. i.注射后 24 小时观测到 9.4(Tc-99m)或 13.0(In-111)%ID/g 的显著肿瘤滞留。因此，肿瘤摄取显著高于其它已知 In-111 或 Tc-99m 标记的抗体片段(例如 Kobayashi et al., J. Nuc. Med., Vol. 41 (4), pp. 755-762, 2000; Verhaar et al., J. Nuc. Med., Vol. 37 (5), pp. 868-872, 1996)。在注射后 24 小时，化合物的血液清除分别产生 13:1 和 6:1 的肿瘤/血液比。

最显著地，在 p. i.注射后 24 小时，与例如 Kobayashi 等所述的其他高滞留的 (120% ID/g) In-111 标记的重组抗体片段相比，In-111-MX-DTPA- ϵ -HN(Lys)-L19-SIP 显示明显较低的肾摄取和滞留 (22.5% ID/g)。肾滞留是非常普遍的问题，通常妨碍镧系元素标记的化合物在放疗中的应用。

实验结果表明本发明描述的放射免疫缀合物用于诊断和治疗应用的极佳潜力，优选通过非肠道给予应用于患者。

讨论

观测到胞毒性抗癌药物更有效地定位于正常组织而非肿瘤(37 Bosslet et al., 1998)，这促使人们开始进行药物选择性递送至肿瘤的可能性研究。然而，肿瘤的有效靶向具有两个主要要求：1)肿瘤内对来自血液的配体分子的特异性、丰富的、稳定的及易于获得的靶位，及 2) 具有合适的药代动力学性质的配体分子，其可易于从血流中扩散至肿瘤，并且具有与靶位的高度亲和性以保证其有效及选择性积聚在肿瘤中。

由于其与众不同的特点，肿瘤微环境是一个可能的泛肿瘤(pan-tumoral)靶位。事实上，肿瘤进展诱导(及随后需要)肿瘤微环境成分的显著更改，特别是胞外基质(ECM)的那些成分。构成实体瘤的 ECM 的分子在数量上和质量上均不同于正常 ECM 的那些分子。另外，许多这些

肿瘤 ECM 成分是所有实体瘤共有的,是导致一般性质和功能如细胞浸润(正常细胞浸润进肿瘤组织及癌细胞浸润进正常组织)和血管发生的原因。在组成修饰的肿瘤 ECM 的众多分子中,本发明人注意力集中在含有 ED-B 结构域的 FN 同种型(B-FN 上)。

B-FN 在迄今为止测试的所有实体瘤的 ECM 中广泛表达,并且与血管发生过程持续相关(22 Castellani et al., 1994),但在正常成体组织中不可检测(17 Carnemolla et al., 1989)。治疗剂定向递送至内皮下 ECM 克服了与实体瘤的间隙高压相关的问题(38 Jain et al. 1988; 39 Jain, 1997; 40 Jain RK, 1999)。

L19 (13 Pini et al. 1998; 25 Viti, Canc. Res., 23 Tarli, et al., 1999),一种与 FN 的 ED-B 结构域具有高亲和性($K_d=5.4 \times 10^{-11}M$)的 scFv,其在体内选择性并有效地积聚在肿瘤新血管周围,并且能将其缀合的任何治疗分子选择性转运至肿瘤并在其中聚集(28 Birchler et al., 1999; 29 Nilsson, et al., 2001; 30 Halin et al. 2002; 31 Carnemolla et al., 2002)。L19 选择性靶向肿瘤的能力使用闪烁扫描技术已经在患者中证实。

本说明书报道了用放射性同位素对小免疫蛋白(SIP)的标记、放射性标记的 SIP 的应用、及三种不同的 L19 人抗体形式的肿瘤血管靶向效力及药物动力学性质,所述三种不同 L19 人抗体形式是 scFv、小免疫球蛋白/小免疫蛋白和完整的人 IgG1。

SIP 分子通过融合 scFv(L19)与人 IgE 的分泌同种型 S_2 的 ϵ CH4 结构域而获得。所述 ϵ CH4 是使得 IgE 分子二聚体化的结构域,所述 S_2 同种型在 COOH 末端含有半胱氨酸,其通过链间二硫键共价地稳定所述二聚体(35 Batista et al., 1996)。Fc ϵ RI 的 IgE 结合位点位于 CH3 结构域中(41 Turner and Kinet, 1999; 42 Vangelista et al., 1999; 43 Garman et al., 2000),因此根据本发明的实施方案,与 ϵ CH4 结构域融合的 scFv 不激活导致超敏反应的任何信号产生。

这三种形式在小鼠的两种不同肿瘤模型(鼠 F9 畸胎瘤和人

SK-MEL-28 黑素瘤)中的表现已经进行了研究。F9 畸胎瘤是一种快速生长的肿瘤，一旦植入则在大约 2 周的时间内杀死动物。另一方面，SK-MEL-28 肿瘤呈现双相生长曲线，早期快速生长相，随后是第二个较慢生长相。先前已经示出 F9 畸胎瘤中 ED-B 的量在肿瘤生长期间保持稳定(23 Tarli, et al., 1999); 相反，ED-B 积聚在 SK-MEL-28 黑素瘤中，与肿瘤生长能力成正比(23 Tarli et al., 1999)，在第一相中发现丰富的 ED-B，而在第二相中量较少。SK-MEL-28 黑素瘤的应用使得可以长期研究生物分布情况，而没有可引起错误判断结果的肿瘤块明显改变(图 2)。

三种 L19 抗体形式在体内的稳定性的对比研究示出 L19-SIP 和 L19-IgG1 在实验期间(144 小时)在血浆中保持与注射前相同的免疫反应性和分子量。相反，scFv(L19)在血浆中迅速丧失其免疫反应性，并产生太大以至于不能进入凝胶过滤层析柱的聚集体。scFv 的这种聚集很可能与肿瘤与肺的%ID/g 比相关，因为聚集体可积聚在肺的微血管中(表 3)。对于所有三种形式，血液清除主要通过肾脏介导，显示出表 4 报道的具有 α 和 β 相的双相曲线，其与分子大小成反比。

不同抗体形式在所研究的肿瘤中的积聚是分子的清除率和体内稳定性的结果。使用 scFv，在注射放射性标记的抗体后 3 小时观测到注射剂量/g 百分比(%ID/g)的最大值，然后迅速降低。使用 SIP，肿瘤中%ID/g 比 scFv 的%ID/g 高 2—5 倍，在注射后 4—6 小时达到最大值。这种模式在 F9 和 SK-MEL-28 肿瘤中均观测到。相反，IgG1 在肿瘤中的积聚在实验期间持续增加。然而，由于其缓慢清除，在 144 小时后% ID/g 的肿瘤血液比仅为大约 3，对比之下在相同时间后 scFv 的比值为 10，SIP 的比值为 70 (图 4)。

本发明研究的三种抗体形式示出的体内稳定性、清除和肿瘤靶向性能的同时独特性质可用于不同的诊断和/或治疗目的，根据临床需要和疾病情况而定。例如，在注射后瞬即示出良好的肿瘤-器官和肿瘤-血液比的放射性标记的抗体是体内诊断性免疫闪烁扫描术所必需的，主要是因为

这种分析中使用的同位素半衰期短。

使用抗体作为治疗剂的载体可以有不同的方法：递送物质，在达到其靶位(例如仅在靶位上激活的光敏剂)后展示其治疗作用，为此与递送至肿瘤的绝对量相关；递送物质，在达到其靶位(例如 β 发射体 Yttrium- 90)之前发挥其治疗和毒性作用，为此必须特别注意作为时间的函数的肿瘤与血液积聚曲线下的面积比，以使得全身毒性最小化及抗肿瘤治疗作用最大化。

例如，L19-SIP 似乎提供分子稳定性、清除率和肿瘤积聚的最佳协调。已经描述了由与一个二聚体化结构域结合的 scFv 抗体片段组成的相似的融合蛋白(44 Hu et al, 1996; 33 Li et al., 1997)，但在两种情况中均使用人 $\gamma 1CH3$ 作为二聚体化结构域。人 $\epsilon_{S2}CH4$ 结构域的使用提供了一种获得二聚体共价稳定的简易方式。另外，由 C 末端半胱氨酸残基形成的二硫键可易于在足够温和的条件下还原以保护分子的整体结构，因此提供了易于接触的放射性标记或化学缀合的反应基团。这个特征似乎特别具有临床应用潜力。

L19-IgG1 在肿瘤中大量积聚，尽管这种积聚被缓慢的血液清除率抵消，但是所述除去循环抗体的三个步骤的程序不仅可用于治疗目的，也可以用于诊断性免疫闪烁扫描术(45 Magnani et al. 2000)。

参考文献

1. Shawler et al. J. Immunol., 135 : 1530-1535, 1985。
2. Miller et al. Blood, 62: 988-995, 1983。
3. Hakimi et al. J. Immunol., 147: 1352-1359, 1991。
4. Stephens et al. Immunology, 85 : 668-674, 1995。
5. Riechmann et al. Nature, 332: 323-327, 1988。
6. Junghans et al. CancerRes., 50: 1495-1502, 1990。
7. McCafferty et al. Nature, 348 : 552-554, 1990。
8. Lowman et al. Biochemistry, 30: 10832-10838, 1991。
9. Nilsson et al. Advanced Drug Delivery Reviews, 43: 165-196, 2000。
10. Winter et al. Annu. Rev. Immunol., 12: 433-455, 1994。
11. Reichert. Nature Biotech., 19 : 819-822, 2001。
12. Huls et al. Nature Biotech., 17: 276-281, 1999。
13. Pini et al. J Biol Chem, 273: 21769-21776, 1998。
14. Neri and Zardi. Advanced Drug Delivery Reviews, 31: 43-52, 1998。
15. Bissel and Radisky. Nature Reviews-Cancer., 1 : 46-54, 2001。
16. Balza et al. FEBS Lett., 228 :42-44, 1988。
17. Carnemolla et al. J. Cell. Biol., 108 : 1139-1148, 1989。
18. Borsi et al. FEBS Lett., 261 : 175-178, 1990。
19. Borsi et al. J. Biol. Chem., 270: 6243-6245, 1995。
20. Zardi et al. EMBO J., 6: 2337-2342, 1987。
21. French-Constant et al. J. Cell Biol., 109 : 903-914, 1989。
22. Castellani et al. Int J Cancer, 59 : 612-618, 1994。
23. Tarli et al. Blood, 94 : 192-198, 1999。
24. Carnemolla et al. Int J Cancer, 68 : 397-405, 1996。
25. Viti et al. Cancer Res, 59 : 347-353, 1999。

26. Neri et al. *Nature Biotechnol*, 15: 1271-1275, 1997。
27. Demartis et al. *Eur J Nucl Med*, 28 : 4534-4539, 2001。
28. Birchler et al. *Nat Biotechnol*, 17: 984-988, 1999。
29. Nilsson et al. *Cancer Res.*, 61: 711-716, 2001。
30. Halin et al. *Nature Biotechnol*. In the press, 2002。
31. Carnemolla et al. *Blood*, 99 :, 2002。
32. Wu et al. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 97 : 8495-8500, 2000。
33. Li et al. *Protein Engineering*, 10 : 731-736, 1997 34. Pini et al. *J. Immunol. Methods*, 206: 171-183, 1997。
35. Batista et al. *J. Exp. Med.*, 184 : 2197-205, 1996。
36. Riske et al. *J. Biol. Chem.*, 266: 11245-11251, 1991。
37. Bosslet et al. *CancerRes.*, 58: 1195-1201, 1998。
38. Jain and Baxter. *Cancer Res.*, 48 : 7022-7032, 1988。
39. Jain. Vascular and interstitial physiology of tumors. Role in cancer detection and treatment. In: R. Bicknell, C. E. Lewis and N. Ferrara (eds). *Tumour Angiogenesis*, pp. 45-59. New York: Oxford University Press, 1997。
40. Jain. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 1 :241-263, 1999。
41. Turner and Kinet. *Nature*, 402 Suppl., B24-B30, 1999。
42. Vangelista et al. *Jour. Clin. Invest.*, 103 : 1571-1578, 1999。
43. Garman et al. *Nature*, 406 : 259-266, 2000。
44. Hu et al. *Cancer Res.*, 56: 3055-3061, 1996。
45. Magnani et al. *Br. J. Cancer*, 82: 616-620, 2000。

表 1. 在静脉内注射后不同时间点放射性标记的抗体的免疫反应性(I*)和从 superdex200 的放射性回收率(R)

时间 (h)	3		6		24		48		72		144	
	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R
L19 (scFv)	36	54	32	58	27	Nd	14	Nd	9	Nd	4	Nd
L19 SIP	100	100	100	96	100	94	95	96	100	Nd	95	Nd
L19 IgG1	100	100	100	100	95	100	100	100	100	100	95	100

如“材料和方法”所述的测定了血浆中的免疫反应性(%)和从 Superdex200 的放射性回收率(%)。

*: 为标准化, 免疫反应性测定结果指的是静脉内注射前的免疫反应性的百分比数值。

Nd: 未测定

表 2a. 在携带 SK-MEL-28 肿瘤的小鼠中放射性标记的 L19 和 D1.3 抗体片段的生物分布实验

L19 (scFv)

	3h	6h	24h	48h	72h	144h
肿瘤	2.47±0.65	2.01±0.72	1.62±0.43	0.95±0.14	0.68±0.04	0.32±0.14
血液	1.45±0.58	0.54±0.12	0.10±0.03	0.04±0.01	0.03±0.02	0.03±0.01
肝脏	0.48±0.20	0.18±0.05	0.04±0.01	0.02±0.00	0.02±0.01	0.02±0.00
脾脏	0.67±0.28	0.27±0.04	0.07±0.02	0.03±0.00	0.02±0.01	0.02±0.00
肾脏	4.36±0.32	1.67±0.08	0.16±0.01	0.06±0.01	0.04±0.02	0.03±0.00
小肠	0.77±0.21	0.57±0.05	0.24±0.06	0.17±0.04	0.12±0.05	0.09±0.01
心脏	0.77±0.20	0.31±0.07	0.07±0.02	0.02±0.00	0.02±0.01	0.02±0.00
肺	2.86±0.34	1.50±0.67	1.07±0.42	0.73±0.39	0.55±0.11	0.51±0.22

D1.3 (scFv)

	3h	6h	24h	48h	72h	144h
肿瘤	1.03±0.74	0.87±0.42	0.15±0.10	0.07±0.02	Nd	Nd
血液	1.52±0.86	0.81±0.13	0.02±0.00	0.01±0.00	Nd	Nd
肝脏	1.19±0.65	0.66±0.26	0.14±0.04	0.03±0.08	Nd	Nd
脾脏	1.05±0.88	0.42±0.33	0.07±0.02	0.05±0.01	Nd	Nd
肾脏	3.01±2.48	1.83±0.76	0.48±0.01	0.18±0.05	Nd	Nd
小肠	0.56±0.54	0.56±0.13	0.17±0.03	0.02±0.01	Nd	Nd
心脏	0.86±0.54	0.55±0.84	0.02±0.01	0.01±0.00	Nd	Nd
肺	1.28±0.65	1.06±0.88	0.04±0.01	0.03±0.01	Nd	Nd

结果表示为每克组织抗体注射剂量的百分比(%ID/g) ±SD

nd: 未测定

表 2b. 在携带 SK-MEL-28 肿瘤的小鼠中放射性标记的 L19-SIP 和 D1.3-SIP 的生物分布试验

L19 SIP

	3h	6h	24h	48h	72h	144h
肿瘤	5.23±0.65	6.14±2.23	4.20±2.47	2.57±0.31	2.33±0.90	1.49±0.65
血液	9.82±0.68	5.03±0.52	1.39±0.06	0.29±0.04	0.08±0.02	0.02±0.01
肝脏	2.65±0.14	1.74±0.31	0.50±0.06	0.19±0.01	0.10±0.02	0.05±0.01
脾脏	3.76±0.36	2.43±0.24	0.71±0.05	0.26±0.04	0.13±0.01	0.17±0.18
肾脏	7.33±0.91	3.87±0.21	1.09±0.05	0.30±0.04	0.14±0.02	0.06±0.01
小肠	1.45±0.24	1.44±0.29	1.06±0.43	0.56±0.08	0.40±0.08	0.18±0.00
心脏	4.16±0.24	2.15±0.08	0.52±0.05	0.13±0.03	0.06±0.01	0.02±0.01
肺	7.72±0.60	5.41±0.55	1.81±0.40	0.59±0.29	0.19±0.03	0.05±0.01

D1.3 SIP

	3h	6h	24h	48h	72h	144h
肿瘤	3.80±0.30	1.65±0.12	0.70±0.00	0.26±0.01	0.07±0.01	0.04±0.03
血液	10.40±0.81	4.45±0.14	1.21±0.01	0.32±0.00	0.08±0.01	0.06±0.02
肝脏	4.05±0.98	2.73±0.33	1.43±0.07	0.51±0.21	0.15±0.08	0.02±0.01
脾脏	3.31±0.66	1.76±0.50	0.82±0.12	0.46±0.20	0.15±0.05	0.04±0.02
肾脏	8.41±0.49	4.64±0.06	1.47±0.05	0.36±0.20	0.16±0.03	0.06±0.01
小肠	2.03±0.55	1.06±0.20	1.02±0.06	0.14±0.03	0.08±0.02	0.12±0.04
心脏	3.28±0.20	1.81±0.02	0.29±0.01	0.06±0.00	0.05±0.01	0.04±0.01
肺	6.16±0.28	4.52±0.07	1.16±0.05	0.09±0.00	0.06±0.01	0.05±0.01

结果表示为每克组织抗体注射剂量的百分比(%ID/g) ±SD

nd: 未测定

表 2c. 在携带 SK-MEL-28 肿瘤的小鼠中放射性标记的 L19-IgG1 和 hIgG1κ的生物分布试验

L19 IgG1

	3h	6h	24h	48h	72h	144h
肿瘤	4.46±0.08	5.39±1.01	6.70±2.10	7.80±2.51	8.90±2.52	11.22±3.19
血液	16.04±0.81	12.02±1.65	8.31±1.77	5.12±1.42	5.02±3.81	4.87±0.26
肝脏	6.03±0.37	6.77±0.53	2.41±0.35	1.45±0.41	1.26±0.71	1.09±0.16
脾脏	6.63±1.34	6.37±1.37	2.51±0.47	2.01±0.32	1.80±1.02	1.51±0.29
肾脏	6.47±0.39	5.12±0.47	3.07±0.35	1.73±0.63	1.54±1.14	1.12±0.44
小肠	1.60±0.39	1.35±0.65	1.43±0.19	1.13±0.32	1.13±0.98	0.97±0.47
心脏	5.63±0.67	4.77±0.52	2.87±0.45	1.48±0.51	1.32±1.09	0.92±0.37
肺	6.55±0.65	5.15±0.62	4.16±0.66	2.28±0.80	1.98±1.60	1.42±0.45

hIgG1κ

	3h	6h	24h	48h	72h	144h
肿瘤	Nd	3.28±0.38	4.00±0.22	2.78±0.20	Nd	2.32±0.26
血液	Nd	10.12±0.35	7.87±0.25	6.24±0.34	Nd	5.41±0.51
肝脏	Nd	4.02±0.09	2.06±0.10	1.90±0.24	Nd	1.28±0.03
脾脏	Nd	4.47±0.28	1.82±0.01	1.42±0.19	Nd	1.24±0.03
肾脏	Nd	5.40±0.19	2.56±0.06	2.08±0.22	Nd	1.30±0.15
小肠	Nd	0.72±0.07	0.46±0.05	0.36±0.03	Nd	0.31±0.01
心脏	Nd	3.80±0.15	2.52±0.21	0.99±0.18	Nd	1.48±0.13
肺	Nd	4.82±0.92	3.64±0.08	1.75±0.32	Nd	1.09±0.13

结果表示为每克组织抗体注射剂量的百分比(%ID/g) ±SD
 nd: 未测定

表 3. 在携带 SK-MEL-28 肿瘤的小鼠中放射性标记的 L19 抗体形式的 %ID/g 的肿瘤-器官比

	L19 (scFv)						L19SIP						L19IgG1					
	3	6	24	48	72	144	3	6	24	48	72	144	3	6	24	48	72	144
时间 (h)	3	6	24	48	72	144	3	6	24	48	72	144	3	6	24	48	72	144
肿瘤	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
血液	1.7	3.7	16.2	23.7	22.7	10.7	0.5	1.2	3.0	8.9	29.1	74.5	0.3	0.4	0.8	1.5	1.8	2.3
肝脏	5.1	11.1	40.5	47.5	34.0	16.0	2.0	3.5	8.4	13.5	23.3	29.8	0.7	0.8	2.8	5.4	7.1	6.3
脾脏	3.7	7.4	23.1	31.6	34.0	16.0	1.4	2.5	5.9	10.0	17.9	8.8	0.7	0.6	2.7	3.9	4.9	7.4
肾脏	0.6	1.2	10.1	15.8	17.0	10.7	0.7	1.6	3.8	8.6	16.6	29.8	0.7	1.0	2.2	4.5	5.8	5.3
小肠	3.2	3.5	6.7	5.6	5.7	3.6	3.6	4.3	4.0	46	5.8	8.3	2.8	4.0	4.7	6.9	7.9	7.1
心脏	3.2	6.5	23.1	47.5	34.0	16.0	1.3	2.9	8.1	20.0	38.8	74.5	0.8	1.1	2.3	5.3	6.7	5.8
肺	0.9	1.3	1.5	1.3	1.2	0.6	0.7	1.1	2.3	4.3	12.3	29.8	0.7	1.0	1.6	3.4	4.5	3.7

表 4. 三种 L19 抗体形式的血液清除的动力学参数

	α		β	
	(%) ^{a)}	t _{1/2} (h)	(%) ^{a)}	t _{1/2} (h)
L19 (scFv)	96.7	0.53	3.3	8.00
L19-SIP	83.7	1.06	16.3	10.66
L19-IgG1	76.9	1.48	23.1	106.7

^{a)} : 两个半衰期部分的相对数量

表 5. 在携带 F9 肿瘤的小鼠中放射性标记的 L19(scFv)和 L19SIP 的生物分布试验

L19 (scFv)

	3h	6h	24h	48h
肿瘤	10.46±1.75	8.15±2.63	3.18±0.83	2.83±0.71
血液	2.05±0.38	1.88±1.14	0.17±0.01	0.06±0.02
肝脏	1.62±1.67	0.73±0.51	0.07±0.01	0.04±0.02
脾脏	1.53±0.36	0.90±0.54	0.11±0.01	0.05±0.01
肾脏	12.70±0.73	4.37±0.98	0.24±0.03	0.18±0.08
小肠	0.68±0.15	0.95±0.23	0.24±0.01	0.17±0.06
心脏	1.35±0.21	0.81±0.38	0.08±0.02	0.04±0.01
肺	2.88±0.29	2.06±0.69	0.38±0.60	0.33±0.05

L19 SIP

	3h	6h	24h	48h
肿瘤	17.46±1.93	16.65±2.59	15.32±2.17	12.00±1.91
血液	13.51±0.57	9.62±1.18	1.73±0.02	1.14±0.20
肝脏	2.81±0.37	2.39±0.13	0.54±0.14	0.32±0.00
脾脏	3.42±0.26	2.66±0.27	0.61±0.09	0.37±0.01
肾脏	9.18±0.76	5.85±0.50	1.16±0.05	0.76±0.06
小肠	0.95±0.03	1.36±0.21	0.83±0.11	1.04±0.14
心脏	4.64±0.24	3.67±0.46	0.67±0.06	0.46±0.14
肺	5.61±0.01	5.93±0.57	1.66±0.19	0.91±0.08

结果表示为每克组织抗体注射剂量的百分比(%ID/g) ±SD

nd: 未测定

表 6

	%剂量/g 组织		
	1h p.i.	3h p.i.	24h p.i.
脾脏	5.05±1.04	4.27±0.27	4.86±1.77
肝脏	10.80±1.52	10.57±1.44	10.68±1.51
肾脏	14.30±1.45	16.71±2.42	22.48±6.79
肺	9.94±1.72	6.15±0.80	3.03±0.95
无内容物胃	1.10±0.13	1.62±0.19	1.66±0.24
有内容物小肠	1.67±0.14	2.65±0.30	2.64±1.40
肿瘤	12.93±2.76	10.18±2.28	12.96±3.13
血液	17.10±1.9	9.08±0.96	1.98±0.47

表 7

	%剂量/g 组织		
	1h p.i.	3h p.i.	24h p.i.
脾脏	6.92±1.3	5.37±0.23	2.06±0.48
肝脏	14.65±0.81	12.43±0.37	4.62±0.52
肾脏	22.07±1.87	15.99±1.10	5.92±1.18
肺	10.06±1.67	5.33±0.49	1.32±0.25
无内容物胃	2.18±0.39	2.12±0.09	1.15±0.08
有内容物小肠	3.03±0.25	3.62±0.58	1.20±0.12
肿瘤	17.20±7.49	18.79±5.35	9.42±3.84
血液	16.53±2.04	7.42±0.21	0.73±0.14

表 8

	1h p.i.	3h p.i.	24h p.i.
肿瘤血液比	1.01±0.33	2.54±0.74	12.81±4.03

序列表

- <110> 菲洛根股份公司
舍林股份公司
- <120> 使用放射性标记的抗纤连蛋白ED-B的抗体L19靶向肿瘤血管
- <130> SMWFP6177075
- <140> EP 03255633.4
<141> 2003-09-10
- <140> US 60/501,881
<141> 2003-09-10
- <150>
<151>
- <160> 13
- <170> PatentIn version 3.1
- <210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens
- <400> 1
Ser Phe Ser Met Ser
1 5
- <210> 2
<211> 17
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ser Ile Ser Gly Ser Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr
1 5

<210> 4

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Phe Leu Ala
1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Tyr Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Cys Gln Gln Thr Gly Arg Ile Pro Pro Thr
1 5 10

<210> 7

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Linker peptide

<400> 7

Gly Gly Ser Gly
1

<210> 8

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer

<400> 8

gtgtgcactc ggaggtgcag ctgttggagt ctggg

35

<210> 9

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer

<400> 9

gcctccgat ttgatttcca ccttggtccc ttggcc

36

<210> 10

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer

<400> 10

ctcgtgcact cgcaggtgca gctgcaggag tca

33

<210> 11

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer

<400> 11

ctctccggac cgtttgatct cgcgcttggt

30

<210> 12

<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<220>		
<223>	Primer	
<400>	12	
	tggtgtgcac tcggaaattg tgttgacgca gtc	33
<210>	13	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<220>		
<223>	Primer	
<400>	13	
	ctctcgtacg ttgatttcc accttggtcc	30

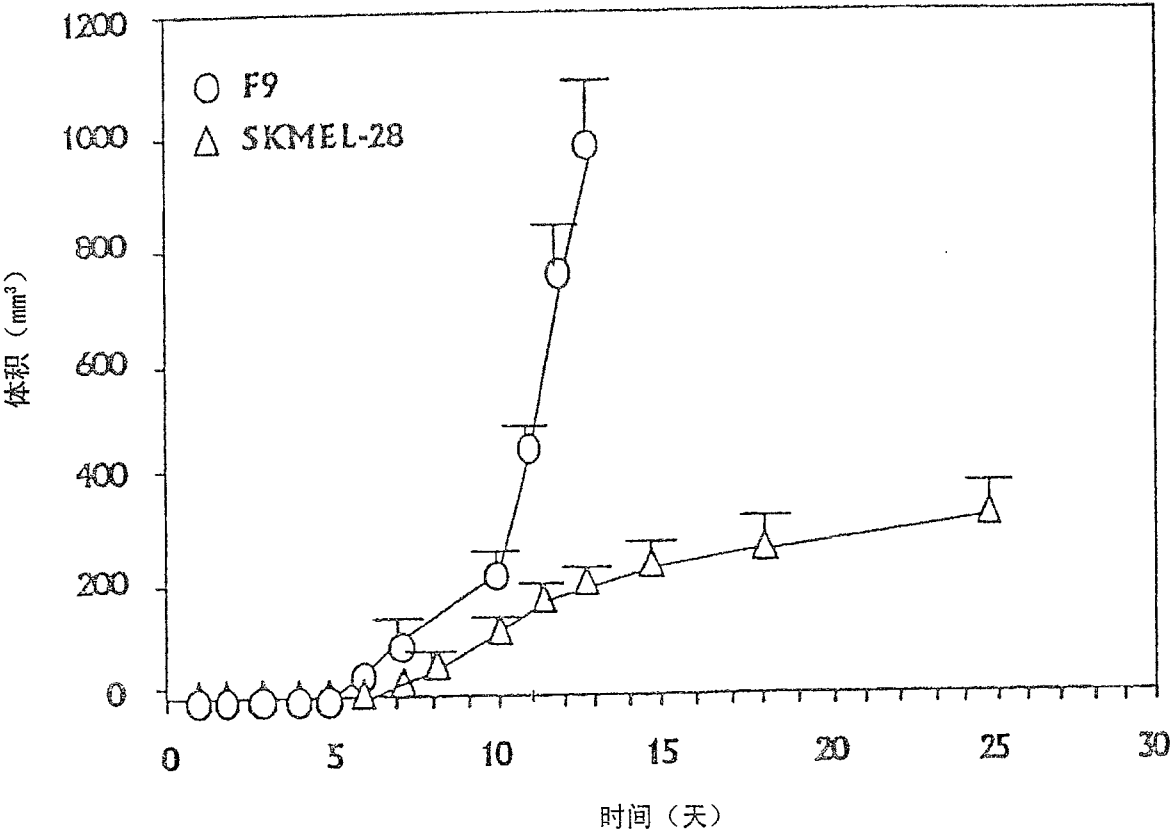


图2

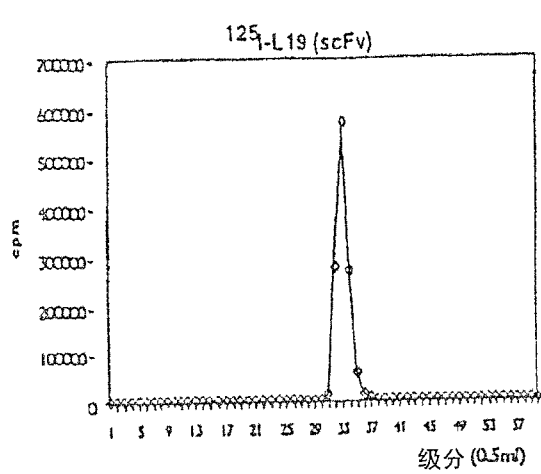


图3A

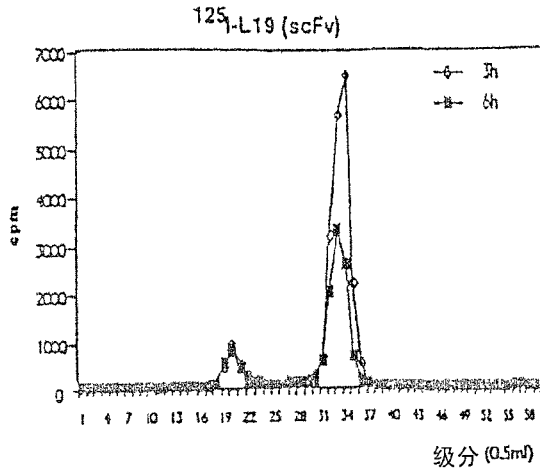


图3D

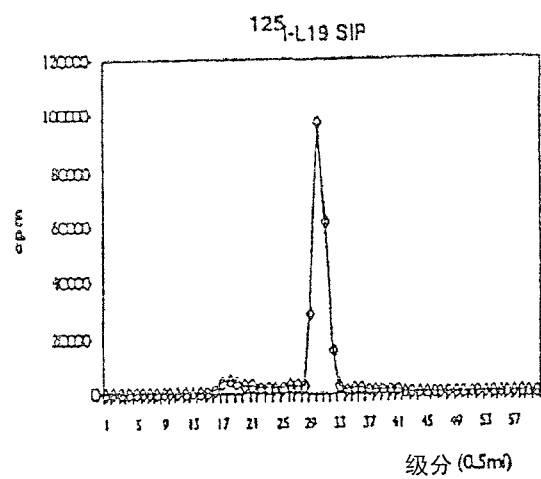


图3B

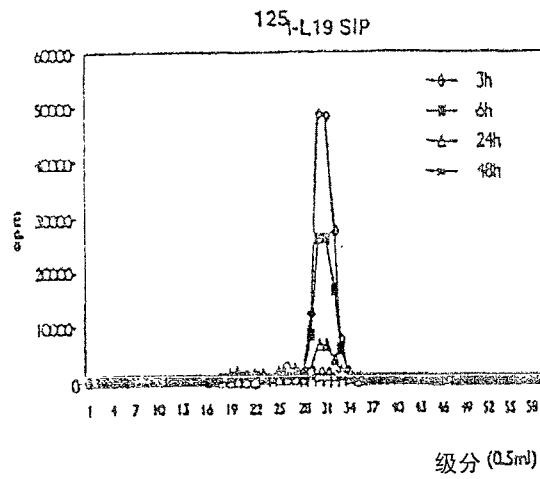


图3E

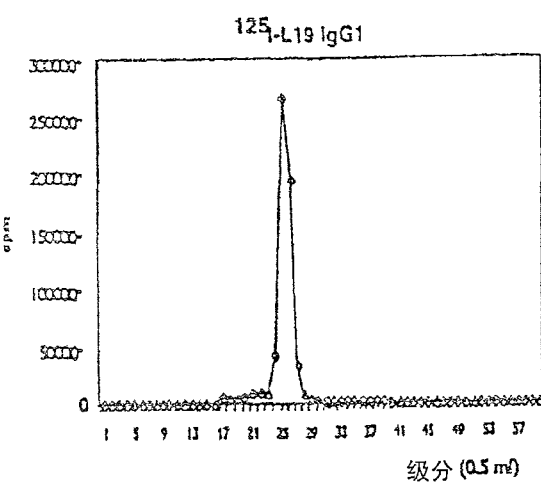


图3C

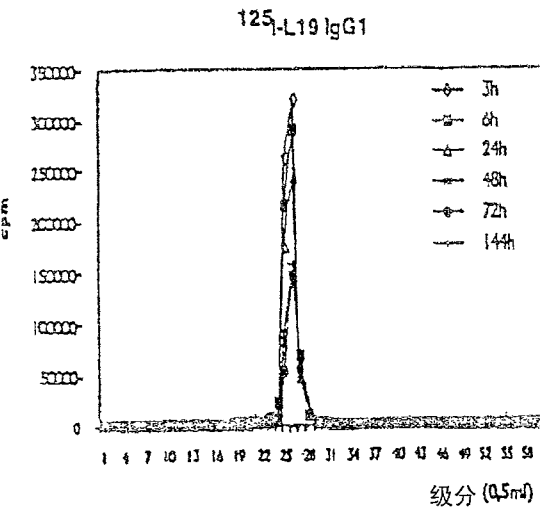


图3F

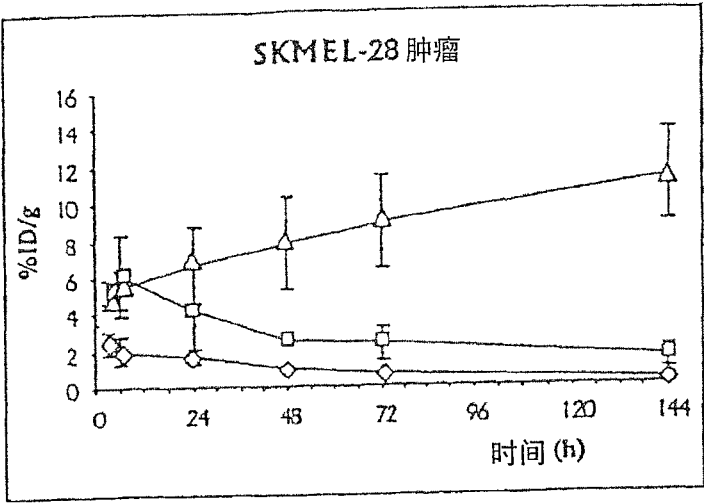


图4A

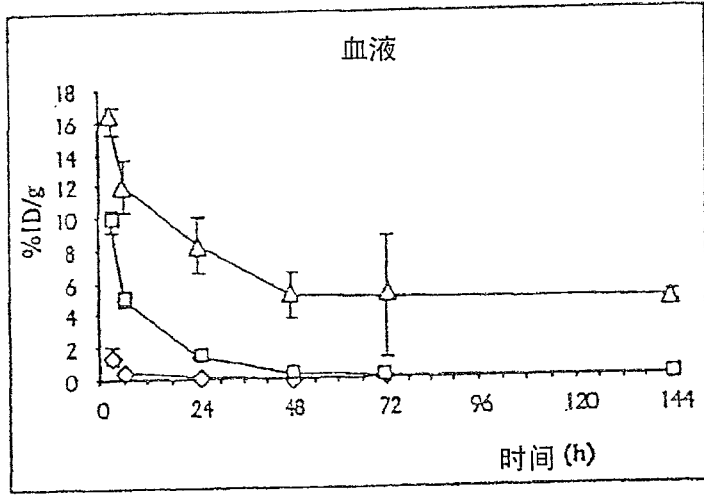


图4B

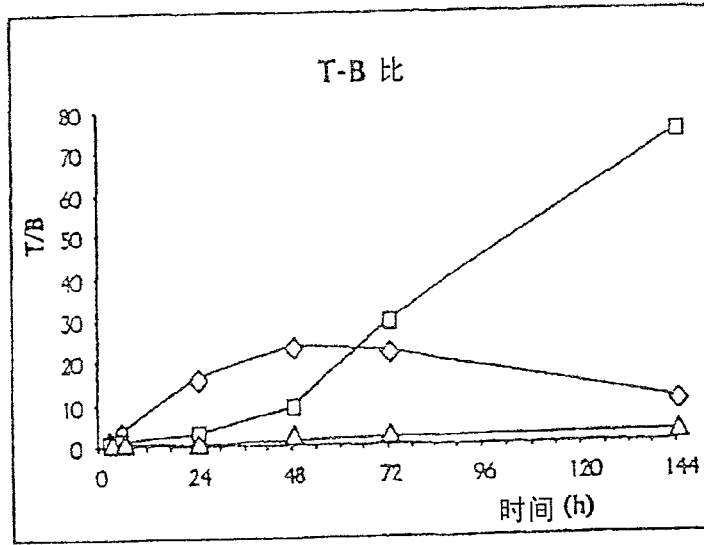


图4C

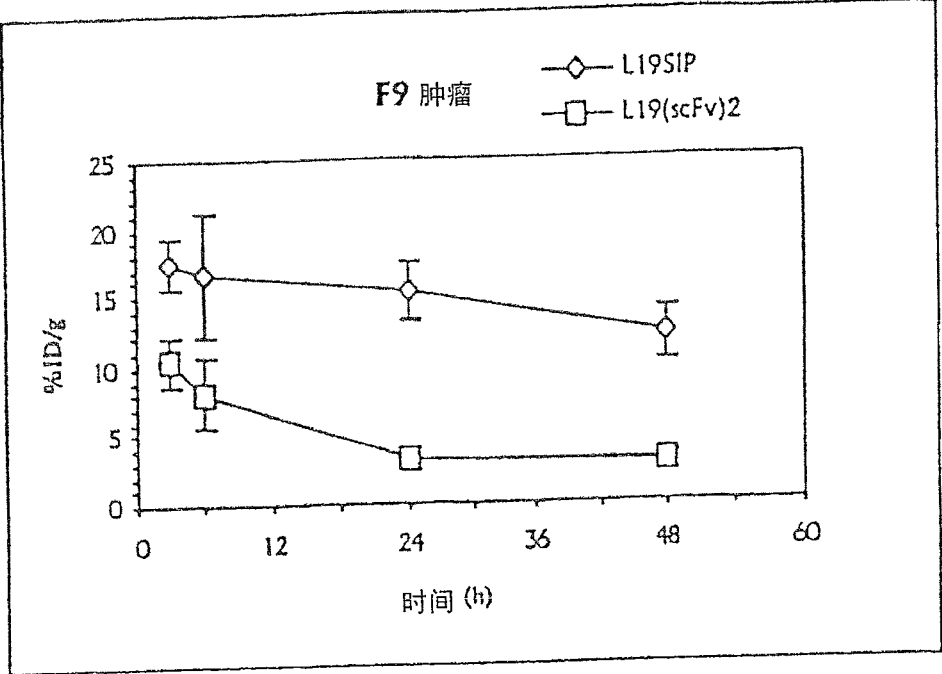


图5A

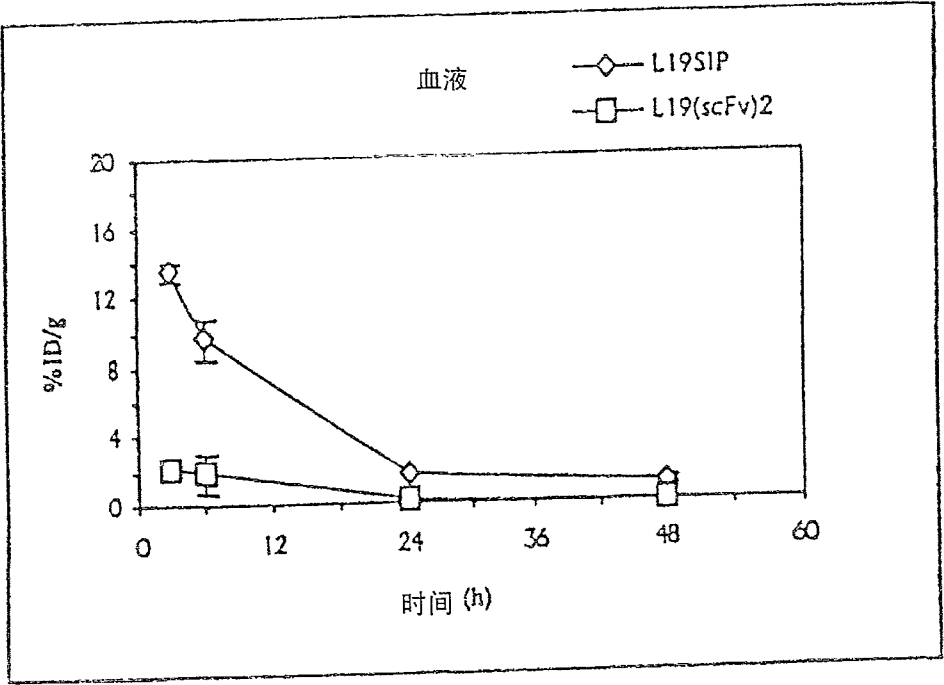


图5B

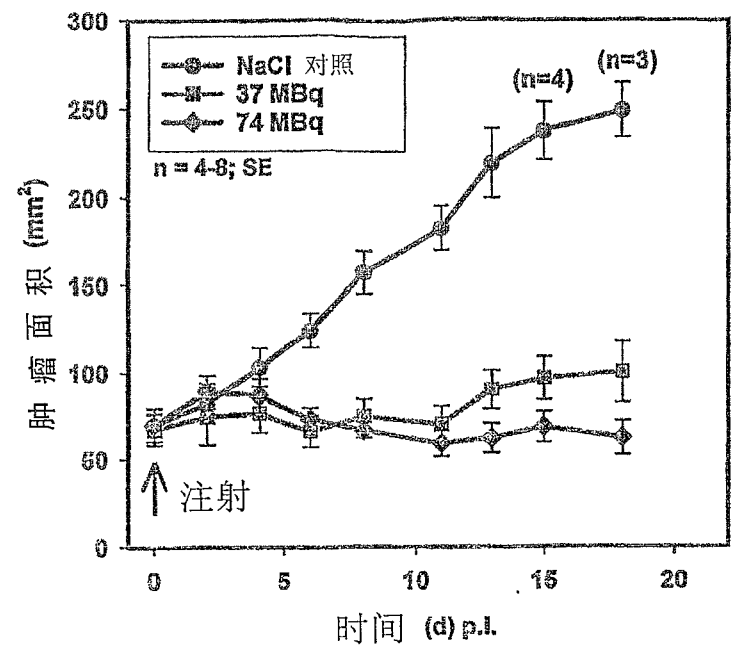


图6