

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03816898.7

A61K 47/48

C07K 7/06

A61K 51/08

A61P 35/00

[43] 公开日 2005 年 9 月 14 日

[11] 公开号 CN 1668335A

[22] 申请日 2003.5.16 [21] 申请号 03816898.7

[30] 优先权

[32] 2002.5.17 [33] US [31] 10/150,654

[86] 国际申请 PCT/GB2003/002110 2003.5.16

[87] 国际公布 WO2003/097105 英 2003.11.27

[85] 进入国家阶段日期 2005.1.17

[71] 申请人 免疫医疗公司

地址 美国新泽西州

[72] 发明人 D·M·戈登伯格 H·汉森

S·-O·梁 W·J·麦克布里德

Z·屈

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 郭广迅 王景朝

权利要求书 12 页 说明书 99 页 附图 7 页

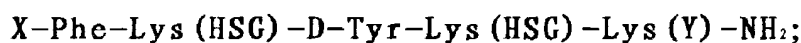
[54] 发明名称 通过包含载体肽和活性剂的双特异性抗体和半抗原构建体的方式进行药物前靶向定位

[57] 摘要

本发明涉及可以被双特异性抗体或抗体片段结合的靶向构建体,所述抗体或抗体片段有至少一个特异性结合靶组织的臂,和至少另外一个特异性结合靶向构建体的臂。靶向构建体含有载体部分,所述载体部分包含或携带至少一个可被所述双特异性抗体或抗体片段的至少一个臂识别的表位。该靶向构建体进一步包含一个或多个治疗或诊断剂或酶。本发明提供了构建体和制备靶向构建体、双特异性抗体或抗体片段的方法,以及使用它们的方法。

ISSN 1008-4274

1. 下式化合物:



其中化合物包括在 X 或 Y 位上的硬酸阳离子螯合剂, 和在剩下的 X
5 或 Y 位上的软酸阳离子螯合剂。

2. 权利要求 1 的化合物, 其中硬酸阳离子螯合剂包括羧基或胺基
基团。

3. 权利要求 1 的化合物, 其中硬酸阳离子螯合剂选自 NOTA、
DOTA、DTPA、和 TETA。

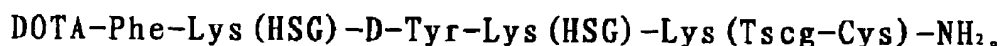
10 4. 权利要求 1 的化合物, 其中软酸阳离子螯合剂包括硫醇基团。

5. 权利要求 1 的化合物, 其中软酸阳离子螯合剂选自 Tscg-Cys
和 Tsca-Cys。

6. 权利要求 1 的化合物, 其进一步包含至少一种放射性核素、治
疗剂或诊断剂。

15 7. 权利要求 6 的化合物, 其中放射性核素选自 ^{225}Ac 、 ^{111}Ag 、 ^{72}As 、
 ^{77}As 、 ^{211}At 、 ^{198}Au 、 ^{199}Au 、 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 、 ^{75}Br 、 ^{76}Br 、 ^{11}C 、 ^{55}Co 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、
 ^{67}Cu 、 ^{166}Dy 、 ^{169}Er 、 ^{18}F 、 ^{52}Fe 、 ^{59}Fe 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{154}Gd 、 ^{155}Gd 、 ^{156}Gd 、 ^{157}Gd 、
 ^{158}Gd 、 ^{166}Ho 、 ^{120}I 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{110}In 、 ^{111}In 、 ^{194}Ir 、 ^{177}Lu 、 ^{51}Mn 、
 $^{52\text{m}}\text{Mn}$ 、 ^{99}Mo 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{211}Pb 、 ^{212}Pb 、 ^{109}Pd 、 ^{149}Pm 、 ^{142}Pr 、 ^{143}Pr 、
20 ^{223}Ra 、 $^{82\text{m}}\text{Rb}$ 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{189}Re 、 ^{105}Rh 、 ^{47}Sc 、 ^{153}Sm 、 ^{75}Se 、 ^{83}Sr 、 ^{89}Sr 、
 ^{161}Tb 、 $^{94\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{94}Tc 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{86}Y 、 ^{90}Y 和 ^{89}Zr , 并且当靶向构建体包括一种
以上放射性核素时, 放射性核素可以是不同的放射性核素。

8. 权利要求 1 的化合物, 其包括:



25 9. 权利要求 1 的化合物, 其包括:



10. 权利要求 1 的化合物, 其中硬酸阳离子螯合剂包括选自 IIa
族和 IIIa 族金属阳离子的阳离子。

11. 权利要求 1 的化合物, 其中软酸阳离子螯合剂包括选自过渡
30 金属、Bi、镧系元素和铜系元素的阳离子。

12. 权利要求 1 的化合物, 其中软酸阳离子螯合剂包括选自 Tc、
Re 和 Bi 的阳离子。

13. 一种靶向构建体，其包含：
X-Phe-Lys (HSG)-D-Tyr-Lys (HSG)-Lys (Y)-NH-R；
其中靶向构建体包括在 X 或 Y 位的硬酸阳离子螯合剂；和在剩下的 X 或 Y 位的软酸阳离子螯合剂；以及 R 位的治疗剂、诊断剂或酶。
- 5 14. 权利要求 13 的靶向构建体，其中 R 与靶向构建体共价连接。
15. 权利要求 13 的靶向构建体，其中 R 通过接头部分与靶向构建体连接。
16. 权利要求 15 的靶向构建体，其中接头部分包括至少一个氨基酸。
- 10 17. 权利要求 13 的化合物，其进一步包含至少一个结合于至少一个硬酸螯合剂和软酸螯合剂的放射性核素。
18. 权利要求 17 的化合物，其中放射性核素选自 ^{225}Ac 、 ^{111}Ag 、 ^{72}As 、 ^{77}As 、 ^{211}At 、 ^{198}Au 、 ^{199}Au 、 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 、 ^{75}Br 、 ^{76}Br 、 ^{11}C 、 ^{55}Co 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{166}Dy 、 ^{169}Er 、 ^{18}F 、 ^{52}Fe 、 ^{59}Fe 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{154}Gd 、 ^{155}Gd 、 ^{156}Gd 、
15 ^{157}Gd 、 ^{158}Gd 、 ^{166}Ho 、 ^{120}I 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{110}In 、 ^{111}In 、 ^{194}Ir 、 ^{177}Lu 、 ^{51}Mn 、 $^{52\text{m}}\text{Mn}$ 、 ^{99}Mo 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{211}Pb 、 ^{212}Pb 、 ^{109}Pd 、 ^{149}Pm 、 ^{142}Pr 、 ^{143}Pr 、 ^{223}Ra 、 $^{82\text{m}}\text{Rb}$ 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{189}Re 、 ^{105}Rh 、 ^{47}Sc 、 ^{153}Sm 、 ^{75}Se 、 ^{83}Sr 、 ^{89}Sr 、 ^{161}Tb 、 $^{94\text{a}}\text{Tc}$ 、 ^{94}Tc 、 $^{99\text{a}}\text{Tc}$ 、 ^{86}Y 、 ^{90}Y 和 ^{89}Zr ，并且，当靶向构建体包括一种以上放射性核素时，放射性核素可以是不同的放射性核素。
- 20 19. 权利要求 13 的靶向构建体，其中所述的治疗剂包括放射性核素、药物、药物前体或毒素。
20. 权利要求 19 的靶向构建体，其中所述的药物前体选自表柔比星葡萄糖苷酸、CPT-11、依托泊甙葡萄糖苷酸、柔红霉素葡萄糖苷酸和阿霉素葡萄糖苷酸。
- 25 21. 权利要求 19 的靶向构建体，其中所述毒素选自蓖麻毒素、相思豆毒蛋白、核糖核酸酶 (RNase)、DNase I、葡萄球菌肠毒素-A、美洲商陆抗病毒蛋白、gelonin、白喉毒素、假单胞杆菌属外毒素、和假单胞菌属内毒素。
22. 权利要求 13 的靶向构建体，其中所述治疗剂包含阿霉素、
30 SN-38、依托泊甙、氮甲喋呤、6-巯基嘌呤或依托泊甙磷酸盐。
23. 权利要求 13 的靶向构建体，其中诊断剂包括一种或多种用于光动力治疗的试剂。

24. 权利要求 23 的靶向构建体, 其中所述用于光动力治疗的试剂是光敏剂。

25. 权利要求 24 的靶向构建体, 其中所述光敏剂选自苯叶啉一元酸环 A (BPD-MA)、本红紫素锡 (SnET2)、磺化酞菁铝 (AlSPc) 和德叶啉镱 (Lutex)。

26. 权利要求 13 的靶向构建体, 其中所述诊断剂包含一种或多种用于磁共振成像 (MRI) 的影像增强剂。

27. 权利要求 26 的靶向构建体, 其中所述增强剂包括 Mn、Fe、La 和 Gd。

28. 权利要求 13 的靶向构建体, 其中所述诊断剂包含一种或多种用于 X-射线或计算机体层摄影的不透射线的试剂或对照试剂。

29. 权利要求 28 的靶向构建体, 其中所述不透射线的试剂或对照试剂包括钡、泛影酸盐、乙碘油、柠檬酸镱、碘卡酸、碘西他酸、碘达胺、胆影酸、碘氧胺酸、iogulamide、碘海醇、碘异酞醇、碘番酸、碘普西酸、碘西法酸、碘丝酸、碘碘葡胺、iosemetic acid、碘肽硫、碘替酸、碘酞酸、碘曲西酸、碘克酸、羟泛影酸、胺碘苯丙酸、葡甲胺、甲泛葡胺、甲泛影酸钠、丙碘酮或氯化亚铊。

30. 权利要求 13 的靶向构建体, 其中所述诊断剂包含一种或多种超声对照试剂。

31. 权利要求 30 的靶向构建体, 其中所述超声对照试剂包括脂质体或葡聚糖。

32. 权利要求 31 的靶向构建体, 其中脂质体是气体填充的。

33. 权利要求 13 的靶向构建体, 其中所述的酶包括能够在靶位点将药物中间体转化为毒性形式, 以提高所述药物的毒性的酶。

34. 治疗或诊断、或治疗和诊断疾病或导致疾病的病症的方法, 其包括:

(A) 给所述受试者施用双特异性抗体或抗体片段, 其中所述抗体或抗体片段具有至少一个特异性结合靶组织的臂, 和至少另外一个特异性结合靶向构建体的臂;

(B) 可选择地, 给所述受试者施用清除组合物, 并使所述组合物将没有定位的抗体或抗体片段从循环中清除出去; 和

(C) 给所述受试者施用包含权利要求 1 化合物的靶向构建

体，其进一步包含至少一种诊断或治疗阳离子，和/或一种或多种螯合的或化学结合的治疗剂、诊断剂或酶。

35. 权利要求 34 的方法，其中双特异性抗体或抗体片段和靶向构建体基本上是在同一时间施用，其中抗体或抗体片段具有至少一个
5 特异性结合靶组织的臂，和至少另外一个特异性结合靶向构建体的臂。

36. 权利要求 34 的方法，其中治疗阳离子发射 20-10, 000keV 的粒子和/或正电子。

37. 权利要求 34 的方法，其中所述治疗阳离子选自 ^{111}In 、 ^{177}Lu 、
10 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 、 ^{211}At 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{90}Y 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{47}Sc 、
 ^{111}Ag 、 ^{67}Ga 、 ^{142}Pr 、 ^{153}Sm 、 ^{161}Tb 、 ^{166}Dy 、 ^{166}Ho 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{189}Re 、 ^{212}Pb 、
 ^{223}Ra 、 ^{225}Ac 、 ^{59}Fe 、 ^{75}Se 、 ^{77}As 、 ^{89}Sr 、 ^{99}Mo 、 ^{105}Rh 、 ^{109}Pd 、 ^{143}Pr 、 ^{149}Pm 、
 ^{169}Er 、 ^{194}Ir 、 ^{198}Au 、 ^{199}Au 和 ^{211}Pb 。

38. 权利要求 34 的方法，其中诊断阳离子发射 25-10, 000keV
15 的粒子和/或正电子。

39. 权利要求 34 的方法，其中所述诊断阳离子选自 ^{110}In 、 ^{111}In 、
 ^{177}Lu 、 ^{18}F 、 ^{52}Fe 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{86}Y 、 ^{90}Y 、 ^{89}Zr 、 $^{94\text{m}}\text{Tc}$ 、
 ^{94}Tc 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{120}I 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 $^{154-158}\text{Gd}$ 、 ^{32}P 、 ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{186}Re 、
 ^{188}Re 、 ^{51}Mn 、 $^{52\text{m}}\text{Mn}$ 、 ^{55}Co 、 ^{72}As 、 ^{75}Br 、 ^{76}Br 、 $^{82\text{m}}\text{Rb}$ 和 ^{83}Sr 。

40. 权利要求 34 的方法，其中所述诊断剂用于进行正电子发射
20 体层摄影 (PET)。

41. 权利要求 34 的方法，其中所述诊断剂用于进行 SPECT 成像。

42. 权利要求 34 的方法，其中所述诊断阳离子或试剂包括一种
或多种用于磁共振成像的影像增强剂。

43. 权利要求 42 的方法，其中所述增强剂选自 Mn、Fe、La 和 Gd。
25

44. 权利要求 34 的方法，其中所述诊断剂包含一种或多种用于
X-射线或计算机体层摄影的不透射线的试剂或对照试剂。

45. 权利要求 44 的方法，其中所述不透射线的试剂或对照试剂
包括钡、泛影酸盐、乙碘油、柠檬酸铈、碘卡酸、碘西他酸、碘达胺、
30 胆影酸、碘氧胺酸、iogulamide、碘海醇、碘异酞醇、碘番酸、碘普
西酸、碘西法酸、碘丝酸、碘砒葡胺、iosemetic acid、碘肽硫、碘
替酸、碘酞酸、碘曲西酸、碘克酸、羟泛影酸、胺碘苯丙酸、葡甲胺、

甲泛葡胺、甲泛影酸钠、丙碘酮或氯化亚铂。

46. 权利要求 34 的方法，其中所述诊断剂包含一种或多种超声对照试剂。

47. 权利要求 46 的方法，其中所述超声对照试剂包括脂质体或葡聚糖。

48. 权利要求 47 的方法，其中所述脂质体是气体填充的。

49. 权利要求 34 的方法，其中所述诊断剂选自荧光化合物、化学发光化合物和生物发光化合物。

50. 权利要求 49 的方法，其中所述荧光化合物选自荧光素异硫氰酸盐、若丹明、藻红蛋白、藻青蛋白、别藻青蛋白、o-phthaldehyde 和荧光胺。

51. 权利要求 49 的方法，其中所述化学发光化合物选自鲁米诺、异鲁米诺、芳烃吡啶酯、咪唑、吡啶盐和草酸酯。

52. 权利要求 49 的方法，其中所述生物发光化合物选自荧光素、荧光素酶和水母发光蛋白。

53. 权利要求 34 的方法，其中所述靶组织是肿瘤。

54. 权利要求 53 的方法，其中所述肿瘤产生或与选自以下的抗原相关：结肠-特异性抗原-P (CSAp)、癌胚抗原 (CEA)、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD30、CD74、CD80、HLA-DR、Ia、MUC 1、MUC 2、MUC 3、MUC 4、EGFR、HER 2/neu、PAM-4、TAG-72、EGP-1、EGP-2、A3、KS-1、Le(y)、S100、PSMA、PSA、粘蛋白、叶酸受体、VEGFR、坏死抗原、IL-2、T101、MAGE。

55. 权利要求 34 的方法，其中所述至少一个特异性结合靶组织的臂是单克隆抗体或单克隆抗体的片段。

56. 权利要求 34 的方法，其中所述至少另外一个特异性结合靶向构建体的臂是单克隆抗体或单克隆抗体的片段。

57. 权利要求 34 的方法，其中所述至少一个特异性结合靶组织的臂是人的、嵌合的或人源化的抗体或人的、嵌合的或人源化抗体的片段。

58. 权利要求 34 的方法，其中所述至少另外一个特异性结合靶向构建体的臂是人的、嵌合的或人源化的抗体或人的、嵌合的或人源化的抗体的片段。

59. 权利要求 34 的方法, 其中所述双特异性抗体或抗体片段进一步包含治疗核素。

60. 权利要求 59 的方法, 其中所述治疗核素选自 ^{111}In 、 ^{177}Lu 、 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 、 ^{211}At 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{90}Y 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{47}Sc 、
5 ^{111}Ag 、 ^{67}Ga 、 ^{142}Pr 、 ^{153}Sm 、 ^{161}Tb 、 ^{166}Dy 、 ^{166}Ho 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{189}Re 、 ^{212}Pb 、 ^{223}Ra 、 ^{225}Ac 、 ^{59}Fe 、 ^{75}Se 、 ^{77}As 、 ^{89}Sr 、 ^{99}Mo 、 ^{105}Rh 、 ^{109}Pd 、 ^{143}Pr 、 ^{149}Pm 、 ^{169}Er 、 ^{194}Ir 、 ^{198}Au 、 ^{199}Au 和 ^{211}Pb 。

61. 权利要求 34 的方法, 其中双特异性抗体包含 MAb Mu-9 的 Fv 和 MAb 679 的 Fv。

10 62. 权利要求 61 的方法, 其中 Mu-9 和/或 679 是嵌合的或人源化的。

63. 权利要求 61 的方法, 其中 Mu-9 和/或 679 是人 Mu-9 和 679。

64. 权利要求 61 的方法, 其中双特异性抗体包含 Mu-9 的一个或多个 CDRs。

15 65. 权利要求 61 的方法, 其中双特异性抗体包含 679 的一个或多个 CDRs。

66. 权利要求 61 的方法, 其中双特异性抗体是融合蛋白。

67. 权利要求 34 的方法, 其中双特异性抗体包含 MAb MN-14 的 Fv 和 MAb 679 的 Fv。

20 68. 权利要求 67 的方法, 其中 MN-14 和/或 679 是嵌合的或人源化的。

69. 权利要求 67 的方法, 其中 MN-14 和/或 679 是人 MN-14 和 679。

25 70. 权利要求 67 的方法, 其中双特异性抗体包含 MN-14 的一个或多个 CDRs。

71. 权利要求 67 的方法, 其中双特异性抗体包含 679 的一个或多个 CDRs。

72. 权利要求 67 的方法, 其中双特异性抗体是融合蛋白。

30 73. 权利要求 34 的方法, 其中融合蛋白是三价体, 并且整合了能与 CSAp 反应的抗体的 Fv。

74. 权利要求 34 的方法, 其中双特异性抗体整合了 III 类抗-CEA 抗体和 679 的 Fv。

75. 权利要求 34 的方法，其中所述靶向构建体包含一种或多种用于消除病灶组织的放射性同位素。
76. 权利要求 34 的方法，其中所述靶向构建体包含 ^{10}B 原子，并且所述方法进一步包含照射定位于所述病灶组织的所述硼原子的步骤，从而影响所述病灶组织的 BNCT。
77. 权利要求 34 的方法，当所述靶向构建体包含酶时，给所述受试者进一步施用药物，该药物能够被所述的酶转化为毒性形式，并由此提高所述药物在靶位点的毒性。
78. 检测或治疗哺乳动物靶细胞、组织或病原体的方法，其包括：
施用有效量的双特异性抗体或抗体片段，其中所述抗体或抗体片段包含至少一个特异性结合靶的臂，和至少另外一个特异性结合靶向构建体的臂；和
施用包含权利要求 1 化合物的靶向构建体；
其中所述靶包括靶细胞、组织、病原体或由其产生的或与其相关的分子，并且特异性结合所述靶的至少一个臂能够结合到靶的互补结合部分。
79. 权利要求 78 的方法，其中所述病原体是真菌、病毒、寄生虫、细菌、原生动植物或支原体。
80. 权利要求 79 的方法，其中所述真菌选自小孢子菌属、发癣菌属、表皮癣菌属、*Sporothrix schenckii*、新型隐球菌、粗球孢菌、荚膜组织胞浆菌、皮炎牙生菌、白色假丝酵母。
81. 权利要求 79 的方法，其中所述病毒选自人免疫缺陷病毒 (HIV)、疱疹病毒、巨细胞病毒、狂犬病病毒、流行性感感冒病毒、B 型肝炎病毒、仙台病毒、猫白血病毒、Reo 病毒、脊髓灰质炎病毒、人血清细小样病毒、猿病毒 40、呼吸道合胞病毒、小鼠乳腺肿瘤病毒、水痘-带状疱疹病毒、登革热病毒、风疹病毒、麻疹病毒、腺病毒、人 T-细胞白血病毒、EB 病毒、鼠白血病毒、流行性腮腺炎病毒、疱疹性口炎病毒、辛德毕斯病毒、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒、疣病毒和蓝舌病毒。
82. 权利要求 79 的方法，其中所述细菌选自炭疽杆菌、无乳链球菌、嗜肺军团菌、化脓链球菌、埃希氏大肠杆菌、淋病奈瑟氏球菌、脑膜炎奈瑟氏球菌、肺炎球菌、嗜血 B-型流感、梅毒螺旋体、莱姆病

螺旋体、铜绿假单胞菌、麻风分枝杆菌、流产布鲁菌、结核分枝杆菌、和破伤风毒素。

83. 权利要求 79 的方法，其中所述寄生虫是蠕虫或疟原虫。

84. 权利要求 79 的方法，其中所述原生动植物选自镰状疟原虫、间日疟原虫、鼠弓形虫、让氏锥虫、克氏锥虫、罗德西亚锥虫、布氏锥虫、曼森血吸虫、日本血吸虫、牛巴贝虫、Elmeria tenella、旋盘尾丝虫、旋毛线虫、旋盘尾丝虫、小泰勒尔梨浆虫、水泡绦虫、羊绦虫、牛肉绦虫、细粒棘球蚴、和科尔蒂中殖孔绦虫。

85. 权利要求 79 的方法，其中所述支原体选自关节炎支原体、猪鼻支原体、口腔支原体、精氨酸支原体、拉氏无胆甾原体、唾液支原体、和肺炎支原体。

86. 权利要求 78 的方法，其中所述靶向构建体进一步包含至少一种放射性核素、治疗剂、诊断剂或酶。

87. 权利要求 86 的方法，其中放射性核素选自 ^{225}Ac 、 ^{111}Ag 、 ^{72}As 、 ^{77}As 、 ^{211}At 、 ^{198}Au 、 ^{199}Au 、 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 、 ^{75}Br 、 ^{76}Br 、 ^{11}C 、 ^{55}Co 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{166}Dy 、 ^{169}Er 、 ^{18}F 、 ^{52}Fe 、 ^{59}Fe 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{154}Gd 、 ^{155}Gd 、 ^{156}Gd 、 ^{157}Gd 、 ^{158}Gd 、 ^{166}Ho 、 ^{120}I 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{110}In 、 ^{111}In 、 ^{194}Ir 、 ^{177}Lu 、 ^{51}Mn 、 $^{52\text{m}}\text{Mn}$ 、 ^{99}Mo 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{211}Pb 、 ^{212}Pb 、 ^{109}Pd 、 ^{149}Pm 、 ^{142}Pr 、 ^{143}Pr 、 ^{223}Ra 、 $^{82\text{m}}\text{Rb}$ 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{189}Re 、 ^{105}Rh 、 ^{47}Sc 、 ^{153}Sm 、 ^{75}Se 、 ^{83}Sr 、 ^{89}Sr 、 ^{161}Tb 、 $^{94\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{94}Tc 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{86}Y 、 ^{90}Y 和 ^{89}Zr ；并且当靶向构建体包含一种以上核素时，放射性核素可以是不同的放射性核素。

88. 权利要求 86 的方法，其中诊断剂包括成像剂。

89. 一种治疗或鉴定受试者病灶组织的方法，其包括：

给所述受试者施用双特异性抗体或抗体片段，其中抗体或抗体片段具有至少一个特异性结合靶组织的臂，和至少另外一个特异性结合靶向构建体的臂；

可选择地，给所述受试者施用清除组合物，并使所述组合物将没有定位的抗体或抗体片段从循环中清除出去；和

给所述受试者施用包含权利要求 1 化合物的靶向构建体。

90. 权利要求 89 的方法，其中所述受试者是哺乳动物。

91. 权利要求 90 的方法，其中所述哺乳动物受试者选自人类、灵长目、马科动物、犬科动物和猫科动物。

92. 权利要求 89 的方法, 其中所述靶向构建体进一步包含至少一种放射性核素、治疗剂、诊断剂或酶。

93. 权利要求 92 的方法, 其中放射性核素选自 ^{225}Ac 、 ^{111}Ag 、 ^{72}As 、 ^{77}As 、 ^{211}At 、 ^{198}Au 、 ^{199}Au 、 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 、 ^{75}Br 、 ^{76}Br 、 ^{11}C 、 ^{55}Co 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{166}Dy 、 ^{169}Er 、 ^{18}F 、 ^{52}Fe 、 ^{59}Fe 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{154}Gd 、 ^{155}Gd 、 ^{156}Gd 、 ^{157}Gd 、 ^{158}Gd 、 ^{166}Ho 、 ^{120}I 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{110}In 、 ^{111}In 、 ^{194}Ir 、 ^{177}Lu 、 ^{51}Mn 、 $^{52\text{m}}\text{Mn}$ 、 ^{99}Mo 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{211}Pb 、 ^{212}Pb 、 ^{109}Pd 、 ^{149}Pm 、 ^{142}Pr 、 ^{143}Pr 、 ^{223}Ra 、 $^{82\text{m}}\text{Rb}$ 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{189}Re 、 ^{105}Rh 、 ^{47}Sc 、 ^{153}Sm 、 ^{75}Se 、 ^{83}Sr 、 ^{89}Sr 、 ^{161}Tb 、 $^{94\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{94}Tc 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{86}Y 、 ^{90}Y 和 ^{89}Zr ; 并且当靶向构建体包含一种以上放射性核素时, 放射性核素可以是不同的放射性核素。

94. 权利要求 92 的方法, 其中诊断剂包括成像剂。

95. 权利要求 92 的方法, 其中治疗剂包括药物、毒素、细胞因子、激素或生长因子。

96. 一种用于治疗或鉴定受试者病灶组织的试剂盒, 其包括:

- (A) 包含权利要求 1 化合物的靶向构建体;
- (B) 双特异性抗体或抗体片段, 其中抗体或抗体片段具有至少一个特异性结合靶组织的臂, 和至少另外一个特异性结合靶向构建体的臂;

其中靶向构建体包括载体部分和一种或多种缀合的治疗剂或诊断剂或酶, 其中所述载体部分包含或携带至少一个可被所述双特异性抗体或抗体片段的所述至少另外一个臂识别的表位; 和

(C) 可选择地, 一种清除组合物, 用于清除没有定位的抗体或抗体片段。

97. 权利要求 96 的试剂盒, 其中所述诊断剂选自 ^{110}In 、 ^{111}In 、 ^{177}Lu 、 ^{18}F 、 ^{52}Fe 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{86}Y 、 ^{90}Y 、 ^{89}Zr 、 $^{94\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{94}Tc 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{120}I 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 $^{154-158}\text{Gd}$ 、 ^{32}P 、 ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{51}Mn 、 $^{52\text{m}}\text{Mn}$ 、 ^{55}Co 、 ^{72}As 、 ^{75}Br 、 ^{76}Br 、 $^{82\text{m}}\text{Rb}$ 和 ^{83}Sr 。

98. 权利要求 96 的试剂盒, 其中所述治疗剂选自 ^{111}In 、 ^{177}Lu 、 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 、 ^{211}At 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{90}Y 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{47}Sc 、 ^{111}Ag 、 ^{67}Ga 、 ^{142}Pr 、 ^{153}Sm 、 ^{161}Tb 、 ^{166}Dy 、 ^{166}Ho 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{189}Re 、 ^{212}Pb 、 ^{223}Ra 、 ^{225}Ac 、 ^{59}Fe 、 ^{75}Se 、 ^{77}As 、 ^{89}Sr 、 ^{99}Mo 、 ^{105}Rh 、 ^{109}Pd 、 ^{143}Pr 、 ^{149}Pm 、 ^{169}Er 、 ^{194}Ir 、 ^{198}Au 、 ^{199}Au 和 ^{211}Pb 。

99. 权利要求 96 的方法, 当所述靶向构建体包含酶时, 可选择地, 该试剂盒进一步包含药物, 其中所述药物能够被酶转化为毒性形式, 以提高所述药物在靶位点的毒性。

100. 包含权利要求 1 化合物的靶向构建体。

5 101. 一种哺乳动物正常组织成像的方法, 其包括:

施用有效量的双特异性抗体或抗体片段; 和

施用包含权利要求 1 化合物的靶向构建体;

10 其中所述双特异性抗体或抗体片段包含至少一个特异性结合靶组织的臂, 和至少另外一个特异性结合靶向构建体的臂; 并且其中所述至少一个臂能够与正常组织或靶细胞上或由其产生或与之相关的互补结合部分结合。

102. 权利要求 101 的方法, 其中所述正常组织是卵巢组织、胸腺组织、甲状旁腺组织、子宫内膜组织、骨髓组织或脾组织。

15 103. 权利要求 101 的方法, 其中所述靶向构建体进一步包含至少一种放射性核素、治疗剂、诊断剂或酶。

20 104. 权利要求 103 的方法, 其中放射性核素选自 ^{225}Ac 、 ^{111}Ag 、 ^{72}As 、 ^{77}As 、 ^{211}At 、 ^{198}Au 、 ^{199}Au 、 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 、 ^{75}Br 、 ^{76}Br 、 ^{11}C 、 ^{55}Co 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{166}Dy 、 ^{169}Er 、 ^{18}F 、 ^{52}Fe 、 ^{59}Fe 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{154}Gd 、 ^{155}Gd 、 ^{156}Gd 、 ^{157}Gd 、 ^{158}Gd 、 ^{166}Ho 、 ^{120}I 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{110}In 、 ^{111}In 、 ^{194}Ir 、 ^{177}Lu 、 ^{51}Mn 、 $^{52\text{m}}\text{Mn}$ 、 ^{99}Mo 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{211}Pb 、 ^{212}Pb 、 ^{109}Pd 、 ^{149}Pm 、 ^{142}Pr 、 ^{143}Pr 、 ^{223}Ra 、 $^{82\text{m}}\text{Rb}$ 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{189}Re 、 ^{105}Rh 、 ^{47}Sc 、 ^{153}Sm 、 ^{75}Se 、 ^{83}Sr 、 ^{89}Sr 、 ^{161}Tb 、 $^{94\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{94}Tc 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{86}Y 、 ^{90}Y 和 ^{89}Zr ; 并且当靶向构建体包含一种以上放射性核素时, 放射性核素可以是不同的放射性核素。

105. 权利要求 103 的方法, 其中诊断剂包括对照试剂。

25 106. 权利要求 103 的方法, 其中诊断剂包括成像剂。

107. 权利要求 106 的方法, 其中所述成像剂是用于 PET 的试剂。

108. 权利要求 106 的方法, 其中成像剂是用于 SPECT 的试剂。

109. 权利要求 103 的方法, 其中治疗剂包括药物、毒素、细胞因子、激素或生长因子。

30 110. 一种手术中鉴定受试者病灶组织的方法, 其包括:

施用有效量的双特异性抗体或抗体片段; 和

施用包含权利要求 1 化合物的靶向构建体;

其中双特异性抗体或抗体片段包含至少一个特异性结合靶组织的臂,和至少另外一个特异性结合靶向构建体的臂;并且其中所述至少一个臂能够结合到靶细胞、组织或病原体或由其产生的或与其相关的分子上的互补结合部分。

5 111. 权利要求 110 的方法,其中所述靶向构建体进一步包含至少一种放射性核素、治疗剂、诊断剂或酶。

112. 权利要求 111 的方法,其中放射性核素选自 ^{225}Ac 、 ^{111}Ag 、 ^{72}As 、 ^{77}As 、 ^{211}At 、 ^{198}Au 、 ^{199}Au 、 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 、 ^{75}Br 、 ^{76}Br 、 ^{11}C 、 ^{55}Co 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{166}Dy 、 ^{169}Er 、 ^{18}F 、 ^{52}Fe 、 ^{59}Fe 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{154}Gd 、 ^{155}Gd 、 ^{156}Gd 、
10 ^{157}Gd 、 ^{158}Gd 、 ^{166}Ho 、 ^{120}I 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{110}In 、 ^{111}In 、 ^{194}Ir 、 ^{177}Lu 、 ^{51}Mn 、 $^{52\text{m}}\text{Mn}$ 、 ^{99}Mo 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{211}Pb 、 ^{212}Pb 、 ^{109}Pd 、 ^{149}Pm 、 ^{142}Pr 、 ^{143}Pr 、 ^{223}Ra 、 $^{82\text{m}}\text{Rb}$ 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{189}Re 、 ^{105}Rh 、 ^{47}Sc 、 ^{153}Sm 、 ^{75}Se 、 ^{83}Sr 、 ^{89}Sr 、 ^{161}Tb 、 $^{94\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{94}Tc 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{86}Y 、 ^{90}Y 和 ^{89}Zr ;并且,当靶向构建体包含一种以上放射性核素时,放射性核素可以是不同的放射性核素。

15 113. 权利要求 111 的方法,其中诊断剂包括对照试剂。

114. 权利要求 111 的方法,其中诊断剂包括成像剂。

115. 权利要求 111 的方法,其中治疗剂包括药物、毒素、细胞因子、激素或生长因子。

116. 一种内窥镜鉴定受试者病灶组织的方法,其包括:

20 施用有效量的双特异性抗体或抗体片段;和

施用包含权利要求 1 化合物的靶向构建体;

其中双特异性抗体或抗体片段包含至少一个特异性结合靶组织的臂,和至少另外一个特异性结合靶向构建体的臂;并且其中所述至少一个臂能够结合到靶细胞、组织或病原体或由其产生的或与其相关的
25 分子上的互补结合部分。

117. 权利要求 116 的方法,其中所述靶向构建体进一步包含至少一种放射性核素、治疗剂、诊断剂或酶。

118. 权利要求 117 的方法,其中放射性核素选自 ^{225}Ac 、 ^{111}Ag 、 ^{72}As 、 ^{77}As 、 ^{211}At 、 ^{198}Au 、 ^{199}Au 、 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 、 ^{75}Br 、 ^{76}Br 、 ^{11}C 、 ^{55}Co 、 ^{62}Cu 、
30 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{166}Dy 、 ^{169}Er 、 ^{18}F 、 ^{52}Fe 、 ^{59}Fe 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{154}Gd 、 ^{155}Gd 、 ^{156}Gd 、 ^{157}Gd 、 ^{158}Gd 、 ^{166}Ho 、 ^{120}I 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{110}In 、 ^{111}In 、 ^{194}Ir 、 ^{177}Lu 、 ^{51}Mn 、 $^{52\text{m}}\text{Mn}$ 、 ^{99}Mo 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{211}Pb 、 ^{212}Pb 、 ^{109}Pd 、 ^{149}Pm 、 ^{142}Pr 、

^{143}Pr 、 ^{223}Ra 、 $^{82\text{m}}\text{Rb}$ 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{189}Re 、 ^{105}Rh 、 ^{47}Sc 、 ^{153}Sm 、 ^{75}Se 、 ^{83}Sr 、 ^{89}Sr 、 ^{161}Tb 、 $^{94\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{94}Tc 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{86}Y 、 ^{90}Y 和 ^{89}Zr ；并且，当靶向构建体包含一种以上放射性核素时，放射性核素可以是不同的放射性核素。

119. 权利要求 117 的方法，其中诊断剂包括对照试剂。

5 120. 权利要求 117 的方法，其中诊断剂包括成像剂。

121. 权利要求 117 的方法，其中治疗剂包括药物、毒素、细胞因子、激素或生长因子。

122. 一种血管内鉴定受试者病灶组织的方法，其包括：

10 施用有效量的双特异性抗体或抗体片段，其中双特异性抗体或抗体片段包含至少一个特异性结合靶组织的臂，和至少另外一个特异性结合靶向构建体的臂；

其中所述至少一个臂能够结合到靶细胞、组织或病原体或由其产生的或与其相关的分子上的互补结合部分；和

施用包含权利要求 1 化合物的靶向构建体。

15 123. 权利要求 122 的方法，其中所述靶向构建体进一步包含至少一种放射性核素、治疗剂、诊断剂或酶。

124. 权利要求 123 的方法，其中放射性核素选自 ^{225}Ac 、 ^{111}Ag 、 ^{72}As 、 ^{77}As 、 ^{211}At 、 ^{198}Au 、 ^{199}Au 、 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 、 ^{75}Br 、 ^{76}Br 、 ^{11}C 、 ^{55}Co 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{166}Dy 、 ^{169}Er 、 ^{18}F 、 ^{52}Fe 、 ^{59}Fe 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{154}Gd 、 ^{155}Gd 、 ^{156}Gd 、
20 ^{157}Gd 、 ^{158}Gd 、 ^{166}Ho 、 ^{120}I 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{110}In 、 ^{111}In 、 ^{194}Ir 、 ^{177}Lu 、 ^{51}Mn 、 $^{52\text{m}}\text{Mn}$ 、 ^{99}Mo 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{211}Pb 、 ^{212}Pb 、 ^{109}Pd 、 ^{149}Pm 、 ^{142}Pr 、 ^{143}Pr 、 ^{223}Ra 、 $^{82\text{m}}\text{Rb}$ 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{189}Re 、 ^{105}Rh 、 ^{47}Sc 、 ^{153}Sm 、 ^{75}Se 、 ^{83}Sr 、 ^{89}Sr 、 ^{161}Tb 、 $^{94\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{94}Tc 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{86}Y 、 ^{90}Y 和 ^{89}Zr ；并且，当靶向构建体包含一种以上放射性核素时，放射性核素可以是不同的放射性核素。

25 125. 权利要求 123 的方法，其中诊断剂包括对照试剂。

126. 权利要求 123 的方法，其中诊断剂包括成像剂。

127. 权利要求 123 的方法，其中治疗剂包括药物、毒素、细胞因子、激素或生长因子。

通过包含载体肽和活性剂的双特异性抗体和
半抗原构建体的方式进行药物前靶向定位

5 本申请是1999年8月23日申请的美国专利 No. 09/382,186 和
2001年4月3日申请的美国专利 No. 09/823,746 的后续申请, 所述
两个申请是1999年6月22日申请的美国专利 No. 09/337,756 的后续
申请, 所述文献在此全文引作参考。

发明背景

10 发明领域。本发明涉及治疗用途的免疫试剂, 例如, 放射免疫治
疗 (RAIT), 和诊断用途, 例如, 放射免疫检测 (RAIT) 和磁共振成像
(MRI)。更具体地, 本发明涉及双特异性抗体 (bsAb) 和双特异性抗
体片段 (bsFab), 其中所述抗体或抗体片段有至少一个特异性结合靶
组织的臂, 和至少另外一个特异性结合靶向构建体的臂。另外, 本发
15 明涉及针对特异免疫原的单克隆抗体、人源化和嵌合的单克隆双特异
性抗体和抗体片段, 其中所述抗体或抗体片段有至少一个特异性结合
靶组织的臂, 和至少另外一个特异性结合靶向构建体的臂, 还涉及编
码所述抗体和抗体片段的 DNAs、和表达所述 DNAs 的载体。先前的临
时申请 U. S. S. N. 60/090,142 和 U. S. S. N. 60/104,156 公开了本发明的一
20 部分, 在此全文引作参考。

相关技术

癌症治疗和诊断方面的进展包括将抗体或抗体片段直接用于疾病
组织, 其中抗体或抗体片段能够将诊断剂或治疗剂靶向定位于疾病位
点。正在研究的该方法的一个进展, 包括 bsAbs 的应用, 该 bsAbs 有
25 至少一个特异性结合疾病靶组织的臂和至少另外一个特异性结合低分
子量半抗原的臂。在该方法中, 给予一种 bsAb, 使之定位于靶组织,
并清除正常组织。一段时间之后, 给予放射标记的低分子量半抗原,
其可以被 bsAb 的第二个特异性识别, 同样也使其定位于原来的靶组
织。

30 虽然低分子量半抗原与 bsAbs 联合使用具有多种特征成像和治疗
用途, 但对于潜在的应用的来说, 制备单个的 bsAbs 几乎是不可能的。
而且, 应用 bsAb/低分子量半抗原系统还必须克服另外几个问题。第一

- 个是, bsAb 的臂与低分子量半抗原的结合必须具有很高的结合亲和力, 因为预先设计的低分子量半抗原如果没有被 bsAb 结合的话, 会快速从活组织中清除出去。第二个是, 非-bsAb 结合的低分子量半抗原事实上需要快速从活组织中清除出去, 以避免被非靶组织吸收并滞留。
- 5 第三个是, 在使用 bsAb 的方案中, 检测和/或治疗剂在 bsAb 方案应用中必须与低分子量半抗原保持相关。

关于 bsAbs 的一个令人感兴趣的进展是, 使用具有合适双特异性的 Abs 直接将螯合剂和金属螯合络合物介导到肿瘤。所使用的螯合剂和金属螯合络合物一般具有放射性, 使用放射性核素, 如钴-57

10 (Goodwin 等, 美国专利 No. 4, 863, 713), 铟-111 (Barbet 等, 美国专利 No. 5, 256, 395 和 No. 5, 274, 076, Goodwin 等, J. Nucl. Med., 33:1366-1372(1992) 和 Kranenborg 等, Cancer Res (suppl.), 55:5864s-5867s(1995) 和 Cancer (suppl.) 80:2390-2397(1997)), 和镓-68 (Boden 等, Bioconjugate Chem., 6:373-

15 379, (1995) 和 Schuhmacher 等, Cancer Res., 55:115-123(1995)) 进行放射免疫成像。因为 Abs 抗体是针对螯合剂和金属螯合络合物的, 因而抗体对其所针对的络合物具有非常显著的特异性。事实上, Boden 等的 bsAbs 对于螯合剂和金属-螯合络合物对映混合物的单个对映体具有特异性。高特异性经证实在一个方面是不利的, 也就是, 其中所

20 使用的核素不能轻易替换为其它核素, 如用其它可获得的试剂替换进行放射免疫治疗 (RAIT) 的钷-90 和铷-213 和进行 MRI 的钆。因此在第二步靶向定位过程中采用了碘-131, 一种非金属, 来进行 RAIT, 其中使用了 I-131 标记的铟-金属-螯合络合物。该方法的第二个缺点是, 需要为每种用于诊断和治疗的试剂生产抗体。

25 在癌成像和治疗方面, 前靶向定位 (Pretargeting) 方法受到了相当多的注意。不同于直接靶向定位的将一种效应分子 (如一种放射性核素或一种与小的载体连接的药物) 直接连接到靶向试剂, 在前靶向定位系统中, 效应分子是在靶向试剂之后一段时间才施用。这段时间可以使靶向试剂定位于肿瘤病灶, 和更重要的是, 易于从身体内清除。

30 因为大多靶向试剂是抗体蛋白, 因此与较小的效应分子 (通常几分钟) 相比, 一般从身体中清除的更慢 (通常几天)。在包括治疗性核素的直接靶向系统中, 身体, 特别是极易受损害的红骨髓, 在靶向试

剂在肿瘤中慢慢到达最大水平并从身体清除期间，全部暴露在射线之下。在前靶向定位系统中，放射性核素通常结合到一种小的“效应”分子如螯合剂或肽上，这些小的效应分子可以非常快地从身体清除出去，因此将正常组织的暴露时间减至最小程度。而且，因为小分子能够快速穿越肿瘤血管并结合到初级靶向试剂，因此肿瘤能够快速到达核素吸收最大量。此外，较小的尺寸有助于在肿瘤中更加均匀的分布。

前靶向定位方法有多种不同的实施方案，但大多包括亲合素/链霉抗生物素蛋白-生物素识别系统或可被肿瘤抗原和效应分子共同识别的双特异性抗体。亲合素/链霉抗生物素蛋白系统是高度可变的，并已经以不同方式被应用。抗体能够与链霉抗生物素蛋白或生物素相偶联，用作初级靶向试剂。一段时间以后，施用效应分子，其分别与生物素或亲合素/链霉抗生物素蛋白结合。另外一种方式有3个步骤，首先靶向定位生物素-结合抗体，然后桥接链霉抗生物素蛋白/亲合素，最后给予生物素-结合效应物。根据所使用的效应物，这些系统可以很容易地进行改变，只要效应物和靶向试剂能够与所使用的生物素或链霉抗生物素蛋白/亲合素结构相偶联。因为具有可变性适用于多种靶向位置，并在亲合素/链霉抗生物素蛋白和生物素之间具有高度结合亲和力，因此该类前靶向定位系统比其它系统具有更大的优点。然而，生物素和链霉抗生物素是外源蛋白，因而是免疫原性的，在临床应用中这限制了它们的施用次数。从这个角度来说，bsAbs 具有能够作为相对非-免疫原性的人源化的蛋白来使用的优点。虽然 bsAb 的结合亲和力（通常为 10^{-9} 到 10^{-10} M）比不上链霉抗生物素蛋白/亲合素-生物素亲和的非常高的亲和力（ $\sim 10^{-15}$ M），这两种前靶向定位系统都依赖于初级靶向试剂的结合亲和力，因此具有较高亲和力的链霉抗生物素蛋白/亲合素-生物素系统并不比 bsAb 前靶向定位系统更具有实际上的优点。然而，多数 bsAbs 仅有一个用于结合初级靶的臂，而链霉抗生物素蛋白/亲合素-生物素前靶向定位系统一般使用具有两个臂的完整 IgG，两个臂均用于结合靶，这加强了与靶的结合。通过使用一种二价肽，加强了其亲和力，与单价肽相比，能够大大提高肽结合到靶位点的能力。因此，这两种系统均能够提供较高的具有合适滞留的靶向定位比率。

使用 bsAb 的前靶向定位还需要抗体有一个识别效应分子的臂。迄

今报道的多数放射性核素靶向定位依赖抗体对金属螯合络合物的识别，如抗体对装载了铟的 DTPA 的识别或抗体对其它螯合剂的识别。因为抗体对特定金属螯合络合物通常是高度选择性的，因此需要构建与特定效应抗体相适应的新的 bsAbs。如果抗体对效应物不是特异性的，而是与其它成分反应，则不需要所述过程。这样的话，可以制造多个效应物，只要它们包含抗体识别成分。我们发展了以前 Janevik-Ivanovska 等公开的前靶向定位系统，在所述文献中将一种直接识别组胺衍生物、组胺-琥珀酰-甘氨酸(HSG)的抗体作为识别系统，其中可以制备多个效应物成分。已经报道了使用放射性碘和铱标记的包含 HSG 的二价肽，所获得的卓越的前靶向定位效果。在本申请中，我们扩展了该系统，使之包括适用于放射标记 ^{90}Y 、 ^{111}In 、 ^{177}Lu 的肽，和可选择的 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -结合肽。

因此，需要一种这样的免疫试剂，其能够被直接用于病灶组织并能够与随后施用的靶向诊断或治疗结合物结合，同时需要一种灵活的系统，不需要对双特异性或多重特异性抗体进行改变，即可容纳不同的诊断和治疗剂。

发明目的

本发明的一个目的是，提供一种多重特异性的抗体或抗体片段，其有至少一个特异性结合靶组织的臂和至少另外一个特异性结合靶向构建体的臂，其中靶向构建体能够根据多种不同的诊断和治疗应用而被加以修饰。

本发明的另外一个目的是，提供联合使用多重特异性抗体和靶向构建体的前靶向定位诊断和治疗方案，提供制造多重特异性的方法，和该方法中所使用的试剂盒。

在完成所述目的过程中，本发明人发现针对靶向构建体的多重特异性 Abs 是有优势的，其能够携带一个或多个诊断和治疗剂。通过使用该项技术，可以改变螯合剂、金属螯合络合物、治疗剂或诊断剂的特性，以适应不同的用途，而不必为每个新用途准备新的多重特异性 Abs。而且，在该过程中，两种或多种不同的螯合剂、金属螯合络合物、诊断或治疗剂可以与本发明多重特异性 Ab 一起使用。

发明概述

本发明涉及多重特异性或双特异性抗体或抗体片段，其至少有一

个特异性结合靶组织的臂和至少另外一个特异性结合靶向构建体的臂。

提供了一种具有通式 X-Phe-Lys (HSG)-D-Tyr-Lys (HSG)-Lys (Y)-NH₂ (SEQ ID NO:1) 的化合物, 其中该化合物包括位于 X 或 Y 位置上的硬酸阳离子螯合剂, 和位于剩下的 X 或 Y 位置上的软酸阳离子螯合剂。硬酸阳离子螯合剂可包括羧基或胺基基团, 还可包括如 5 NOTA、DOTA、DTPA、和 TETA 的螯合剂。软酸阳离子螯合剂可包括硫醇基团, 还包括如 Tscg-Cys 和 Tsca-Cys 的螯合剂。该化合物的一个优选实施方案是 DOTA-Phe-Lys (HSG)-D-Tyr-Lys (HSG)-Lys (Tscg-10 Cys)-NH₂ (SEQ ID NO:1), 也被称作 IMP245。所述化合物中, 将硬酸阳离子螯合剂和软酸阳离子螯合剂的位置进行交换就构成了另外一个实施方案, 即 (Tscg-Cys)-Phe-Lys (HSG)-D-Tyr-Lys (HSG)-Lys (DOTA)-NH₂ (SEQ ID NO:1)。

化合物还可以包括结合到不同螯合部分上的阳离子。例如, 硬酸 15 阳离子可以包括 IIa 和 IIIa 族的金属阳离子, 其通常结合到硬酸螯合剂中。结合到软酸螯合剂上的软酸阳离子包括过渡金属、镧系元素、铜系元素、和/或 Bi。这样的软酸阳离子非穷尽的例子包括 Tc、Re、和 Bi。

本发明还提供了一种靶向构建体, 其包括 X-Phe-Lys (HSG)-D- 20 Tyr-Lys (HSG)-Lys (Y)-NH-R (SEQ ID NO:1)。在此, 硬酸阳离子螯合剂即可位于 X, 也可位于 Y, 同时软酸阳离子螯合剂位于剩下的 X 或 Y。靶向构建体还包括将化合物与治疗或诊断剂或酶“R”连接到一起的接头。该接头至少有一个氨基酸, 用于 R 基团与化合物的连接。治疗剂的例子包括药物、药物前体 (如表柔比星葡萄糖苷酸, CPT-11, 依托泊甙 25 葡萄糖苷酸, 柔红霉素葡萄糖苷酸和阿霉素葡萄糖苷酸) 或毒素 (如蓖麻毒素, 相思豆毒蛋白, 核糖核酸酶, DNase I, 葡萄球菌 (*Staphylococcal*) 肠毒素-A, 美洲商陆抗病毒蛋白, gelonin, 白喉毒素, 假单胞杆菌属 (*Pseudomonas*) 外毒素, 和假单胞菌属内毒素)。

另外, 治疗剂的例子包括阿霉素、SN-38、氨甲碟呤、6-巯基嘌呤 30 和/或依托泊甙磷酸盐。诊断剂包括核素、一种或多种用于光促治疗的试剂 (如光敏剂, 如苯卟啉一元酸环 A (BPD-MA)、本红紫素锡 (SnET2)、磺化酞菁铝 (AlSPc) 和德卟啉 (texaphyrin) 镱 (Lutex)、对照试剂和

用于磁共振成像 (MRI) 和计算机化体层摄影 (CT) 的影像增强试剂。R 基团可以是酶, 其能够将靶位点上的药物前体转化为药物; 或能够将去除毒性的药物中间体复原为毒性形式, 提高所述药物在靶位点的毒性。

5 在一个实施方案中, 本发明提供了治疗、诊断和/或鉴定患者病灶组织的方法, 包含:

(A) 给患者施用双特异性抗体或抗体片段, 其中所述抗体或抗体片段具有至少一个特异性结合靶组织的臂, 和至少另外一个特异性结合靶向构建体的臂;

10 (B) 可选择地, 给患者施用清除组合物, 并使组合物将没有定位的抗体或抗体片段从循环中清除出去。

(C) 给患者施用包含载体部分的第一靶向构建体, 其中载体部分包含或携带至少一个可被双特异性抗体或抗体片段的至少另外一个臂识别的表位, 和一个或多个已缓合的治疗或诊断剂、或酶; 和

15 (D) 当靶向构建体包含酶时, 给患者进一步施用

1) 药物前体, 当酶能够在靶位点将药物前体转化为药物的情况下; 或

2) 在患者体内能够被解毒, 形成低毒性中间体的药物, 当酶能够将解毒的中间体复原为毒性形式, 并从而提高药物在靶位点的毒性的情况下, 或

3) 药物前体, 其在患者体内经过自然过程被活化, 并通过转化为一种低毒性中间体的方式被解毒, 当酶能够将解毒的中间体重新转换为毒性形式, 并从而提高药物在靶位点的毒性的情况下, 或

25 4) 包含载体部分的第二靶向构建体, 其中载体部分包含或携带至少一个可被双特异性抗体或抗体片段的至少另外一个臂识别的表位, 当酶能够在靶位点将药物前体转化为药物的情况下。

在另一个实施方案中, 本发明提供了用于治疗或鉴定患者病灶组织的试剂盒, 其包括:

30 (A) 双特异性抗体或抗体片段, 其具有至少一个特异性结合靶组织的臂和至少另外一个特异性结合靶向构建体的臂;

(B) 包含载体部分的第一靶向构建体, 其中载体部分包含或携带至少一个可被双特异性抗体或抗体片段的至少另外一个臂识别的表

位, 和一个或多个缀合的治疗或诊断剂、或酶; 和

(C) 可选择地, 一种清除组合物, 用于清除没有定位的抗体和抗体片段; 和

(D) 可选择地, 当第一靶向构建体包含一种酶时,

5 1) 药物前体, 当酶能够在靶位点将药物前体转化为药物的情况下; 或

 2) 在患者体内能够被解毒, 形成低毒性中间体的药物, 当酶能够将解毒的中间体复原为毒性形式, 并从而提高药物在靶位点的毒性的情况下, 或

10 3) 药物前体, 其在患者体内经过自然过程被活化, 并通过转化为一种低毒性中间体的方式被解毒, 当酶能够将解毒的中间体重新转换为毒性形式, 并从而提高药物在靶位点的毒性的情况下, 或

 4) 包含载体部分的第二靶向构建体, 其中载体部分包含或携带至少一个可被双特异性抗体或抗体片段的至少另外一个臂识别的表位,
15 当酶能够在靶位点将药物前体转化为药物的情况下。

 本发明的另一个实施方案是, 提供编码所述抗体或抗体片段的 DNA 构建体。尤其是能够产生可变区域的 DNA 构建体, 所述可变区域能够提供与靶向构建体和病灶组织反应的有利特性。同时本发明在该方面还提供了一种重组 DNA 构建体, 其包含能够在宿主细胞中产生双特异性
20 抗体或抗体片段的表达组件, 所述抗体或抗体片段有至少一个特异性结合靶组织的臂和至少另外一个特异性结合靶向构建体的臂, 其中该重组 DNA 构建体包含, 在宿主细胞中起作用的从 5' 到 3' 方向转录的转录起始调控区、在宿主细胞中起作用的翻译起始调控区、编码双特异性抗体或抗体片段的 DNA 序列、和在宿主细胞中起作用的转录、
25 翻译终止调控区, 其中双特异性抗体或抗体片段受调控区的控制。

 本发明另外一个实施方案提供了通过重组技术制备抗体或抗体片段的方法。同时本发明在该方面还提供了制备具有至少一个特异性结合靶组织的臂和至少另外一个特异性结合靶向构建体的臂的双特异性抗体或抗体片段的方法, 其包括:

30 (A) 将前面所述的重组 DNA 构建体转导到宿主细胞;

 (B) 培养细胞并分离抗体或抗体片段。

 在本发明的另外一个实施方案中, 提供了制备双特异性融合蛋白

的方法，所述融合蛋白具有至少一个特异性结合靶组织的臂和至少另外一个特异性结合靶向构建体的臂，所述方法包括：

5 (1) (A) 将重组 DNA 构建体转导到宿主细胞，该重组 DNA 构建体包含能够在宿主细胞中产生双特异性融合蛋白片段的表达组件，其中构建体还包含，在宿主细胞中起作用的从 5' 到 3' 方向转录的转录起始调控区、在宿主细胞中起作用的翻译起始调控区、编码与免疫球蛋白轻链抗体片段连接的 scFv 的 DNA 序列、和在宿主细胞中起作用的转录、翻译终止调控区，其中双特异性融合蛋白片段受调控区的控制；

10 (B) 将重组 DNA 构建体共转导到宿主细胞，该重组 DNA 构建体包含能够在宿主细胞中产生 Fd 片段的表达组件，其中 Fd 片段与 (A) 中的免疫球蛋白轻链抗体片段互补，并且当与轻链抗体片段连接时形成 Fab 片段，该 Fab 片段上的结合位点对于靶组织来说是特异性的，其中构建体还包含，在宿主细胞中起作用的从 5' 到 3' 方向转录的转录起始调控区、在宿主细胞中起作用的翻译起始调控区、编码 Fd 片段的 DNA
15 序列、和在宿主细胞中起作用的转录、翻译终止调控区，其中 Fd 片段受调控区的控制；

(C) 培养细胞并分离双特异性融合蛋白，或

20 (2) (A) 将重组 DNA 构建体转导到第一宿主细胞，该重组 DNA 构建体包含能够在第一宿主细胞中产生双特异性融合蛋白片段的表达组件，其中构建体还包含，在第一宿主细胞中起作用的从 5' 到 3' 方向转录的转录起始调控区、在第一宿主细胞中起作用的翻译起始调控区、编码与轻链抗体片段连接的 scFv 的 DNA 序列、和在第一宿主细胞中起作用的转录、翻译终止调控区，其中双特异性融合蛋白片段受调控区的控制；

25 (B) 将重组 DNA 构建体转导到第二宿主细胞，该重组 DNA 构建体包含能够在第二宿主细胞中产生 Fd 片段的表达组件，其中 Fd 片段与 (2) (A) 中的轻链抗体片段互补，并且当与轻链抗体片段连接时形成 Fab 片段，该 Fab 片段上的结合位点对于靶组织来说是特异性的，其中构建体还包含，在第二宿主细胞中起作用的从 5' 到 3' 方向转录的转录起始调控区、在第二宿主细胞中起作用的翻译起始调控区、编码 Fd
30 片段的 DNA 序列、和在第二宿主细胞中起作用的转录、翻译终止调控区，其中 Fd 片段受调控区的控制；

(C) 培养第一和第二宿主细胞;

(D) 选择性分离双特异性融合蛋白片段和 Fd 片段; 和

(E) 将片段进行连接, 产生双特异性融合蛋白, 并分离双特异性融合蛋白。

- 5 可使用多种宿主细胞来制备双特异性抗体或抗体片段, 包括但不限于哺乳动物细胞、昆虫细胞、植物细胞和细菌细胞。在一个实施方案中, 使用了哺乳动物受精卵, 经重组 DNA 构建体的转导, 产生了能够生产双特异性抗体或抗体片段的转基因动物。

10 本发明还尝试提供的双特异性抗体或抗体片段, 其中所述抗体和抗体片段具有至少一个特异性结合靶组织的臂, 和至少另外一个特异性结合靶向构建体的臂, 所述靶向构建体可以根据不同的诊断和治疗用途而加以修饰。

本发明进一步的实施方案涉及将本发明抗体或抗体片段用于光动力学治疗。

- 15 本发明进一步的实施方案涉及将本发明抗体或抗体片段用于放射免疫成像中的正电子发射体层摄影 (PET)。

本发明的进一步实施方案涉及将本发明抗体或抗体片段用于放射免疫成像中的单光子发射。

- 20 本发明进一步的实施方案涉及将本发明抗体或抗体片段用于磁共振成像 (MRI)。

本发明进一步实施方案涉及将本发明抗体或抗体片段用于 X-射线、计算机化体层摄影 (CT) 或超声波成像。

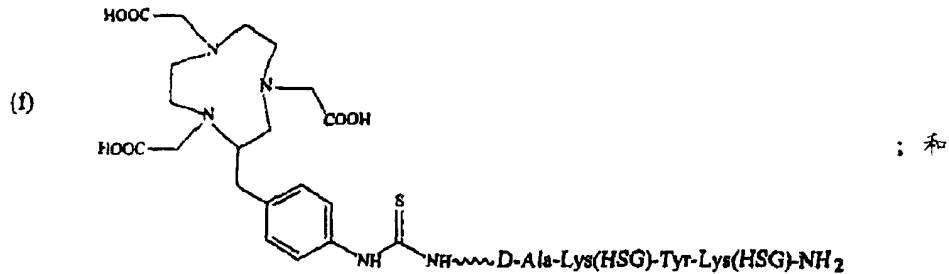
本发明进一步实施方案涉及将本发明抗体或抗体片段用于手术中的、内窥镜的、或血管内检测和/或治疗。

- 25 本发明进一步的实施方案涉及将本发明的抗体或抗体片段用于硼中子捕获治疗 (BNCT)。

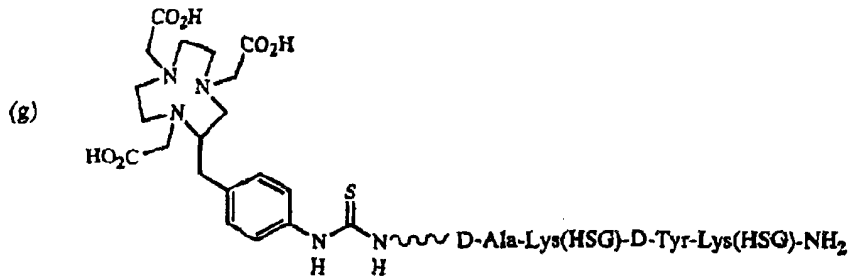
30 本发明进一步实施方案涉及将本发明抗体或抗体片段用于诊断或治疗病灶组织 (例如癌症、感染、炎症、血块、动脉粥样硬化、梗死)、正常组织 (如脾、甲状旁腺、胸腺、骨髓)、异位组织 (如子宫内膜异位症)、和病原体。

此外, 本发明提供了前靶向定位诊断和治疗方法, 其中联合使用双特异性抗体和以下靶向构建体:

- (a) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH₂ (SEQ ID NO: 3);
 (b) DOTA-Phe-Lys(HSG)-Tyr-Lys(HSG)-NH₂ (SEQ ID NO: 2);
 (c) Ac-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH₂ (SEQ ID NO: 4);
 (d) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH₂ (SEQ ID NO: 1);
 (e) (Tscg-Cys)-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(DOTA)-NH₂ (SEQ ID NO: 1);



(SEQ ID NO: 5)



(SEQ ID NO: 6)

以及制备双特异性的方法，和用于该方法试剂盒。

5 本发明人发现针对靶向构建体的 bsAbs 是有优势的，其能够携带一个或多个诊断或治疗剂。通过使用该技术，可以改变螯合剂、金属螯合络合物、治疗剂或诊断剂的特性，以适应不同的用途，而不必为每个用途准备新的 bsAbs。而且，通过该方法两种或多种不同的螯合剂、金属螯合络合物或治疗剂可以与本发明的 bsAb 一起使用。

本发明涉及治疗或鉴定受试者病灶组织的方法，其包括：

10 (A) 给所述受试者施用双特异性抗体或抗体片段，其中所述抗体或抗体片段具有至少一个特异性结合靶组织的臂，和至少另外一个特异性结合包含至少两个 HSG 半抗原的靶向构建体的臂；

(B) 可选择地，给所述受试者施用清除组合物，并使所述组合物将没有定位的抗体或抗体片段从循环中清除出去。

15 (C) 给所述受试者施用包含载体部分的靶向构建体，其中载体部分包含或携带至少两个 HSG 半抗原，和至少一个螯合剂，并可以包含至少一个诊断和/或治疗的阳离子，和/或一个或多个螯合的或化学结

合的治疗或诊断剂，或酶；和

(D) 当所述靶向构建体包含酶时，给受试者进一步施用

1) 药物前体，当所述酶能够在靶位点将药物前体转化为药物的情况下；或

5 2) 在所述受试者体内能够被解毒，形成低毒性中间体的药物，当所述酶能够将解毒的中间体复原为毒性形式，并从而提高药物在靶位点的毒性的情况下，或

3) 药物前体，其在受试者体内经过自然过程被活化，并通过转化为一种低毒性中间体的方式被解毒，当酶能够将解毒的中间体重新转换为毒性形式，并从而提高药物在靶位点的毒性的情况下。

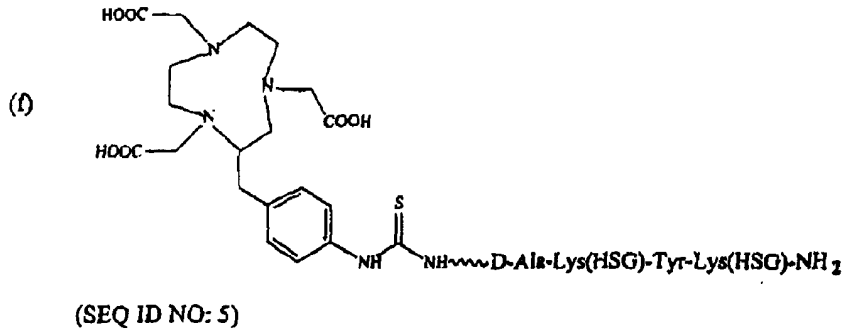
10 本发明还涉及检测或治疗哺乳动物靶细胞、组织或病原体的方法，其包括：

施用有效量的双特异性抗体或抗体片段，其中所述抗体或抗体片段具有至少一个特异性结合靶组织的臂，和至少另外一个特异性结合
15 靶向构建体的臂；

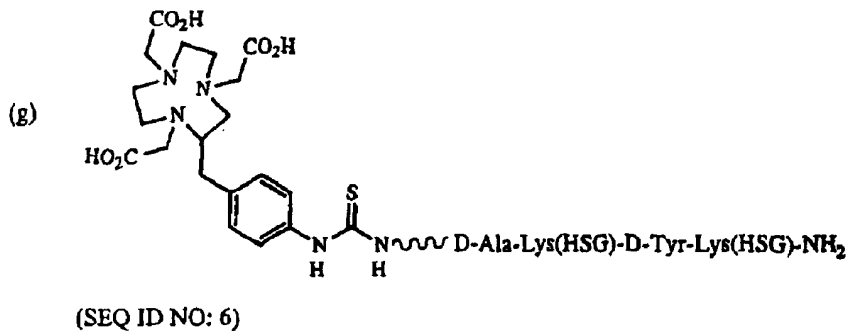
其中所述至少一个臂能够结合到靶细胞、组织、或病原体或由其产生的或与其相关的分子上的互补结合部分；和

施用选自下列的靶向构建体：

- (a) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH₂ (SEQ ID NO: 3);
- (b) DOTA-Phe-Lys(HSG)-Tyr-Lys(HSG)-NH₂ (SEQ ID NO: 2);
- (c) Ac-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH₂ (SEQ ID NO: 4);
- (d) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH₂ (SEQ ID NO: 1);
- (e) (Tscg-Cys)-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(DOTA)-NH₂ (SEQ ID NO: 1);



; 和



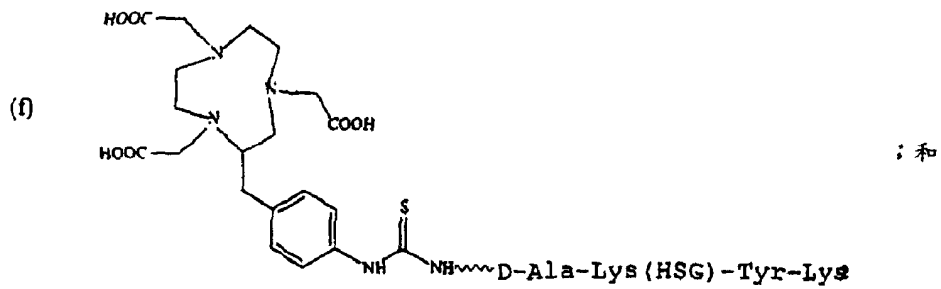
本发明还涉及治疗或鉴定受试者病灶组织的方法，包含：

- 给所述受试者施用双特异性抗体或抗体片段，其中所述抗体或抗体片段具有至少一个特异性结合靶组织的臂，和至少另外一个特异性结合靶向构建体的臂；

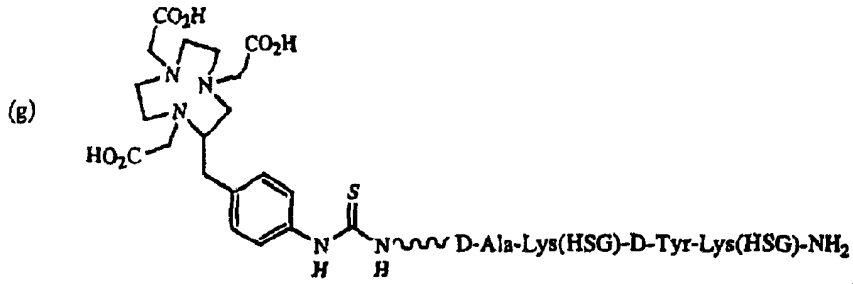
可选择地，给所述受试者施用清除组合物，并使所述组合物将没有定位的抗体或抗体片段从循环中清除出去；和

给所述受试者施用选自下列的靶向构建体：

- (a) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH₂ (SEQ ID NO: 3);
- (b) DOTA-Phe-Lys(HSG)-Tyr-Lys(HSG)-NH₂ (SEQ ID NO: 2);
- (c) Ac-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH₂ (SEQ ID NO: 4);
- (d) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH₂ (SEQ ID NO: 1);
- (e) (Tscg-Cys)-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(DOTA)-NH₂ (SEQ ID NO: 1);



(SEQ ID NO: 5)



(SEQ ID NO: 6)

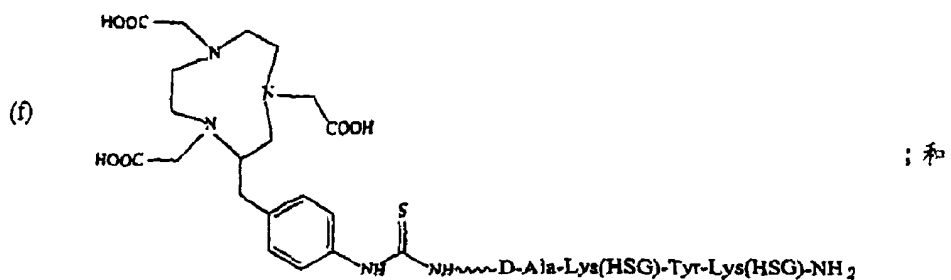
本发明还涉及用于治疗或鉴定受试者病灶组织的试剂盒，包含：

(A) 一种双特异性抗体或抗体片段，其中所述抗体或抗体片段具有至少一个特异性结合靶组织的臂，和至少另外一个特异性结合靶向

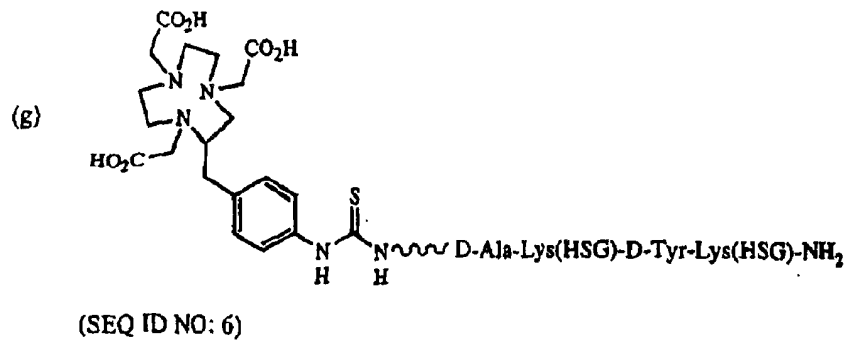
5 构建体的臂，其中所述构建体选自：

- (a) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH₂ (SEQ ID NO: 3);
- (b) DOTA-Phe-Lys(HSG)-Tyr-Lys(HSG)-NH₂ (SEQ ID NO: 2);
- (c) Ac-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH₂ (SEQ ID NO: 4);
- (d) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH₂ (SEQ ID NO: 1);
- (e) (Tscg-Cys)-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(DOTA)-NH₂ (SEQ ID NO:

1):



(SEQ ID NO: 5)



(B) 包含载体部分的靶向构建体，其中载体部分包含或携带至少一个能够被所述双特异性抗体或抗体片段的所述至少另外一个臂识别的表位，和一个或多个缓合的治疗或诊断剂、或酶；和

5 (C) 可选择地，清除组合物，用于清除没有定位的抗体和抗体片段；和

(D) 可选择地，当所述第一靶向构建体包含一种酶时

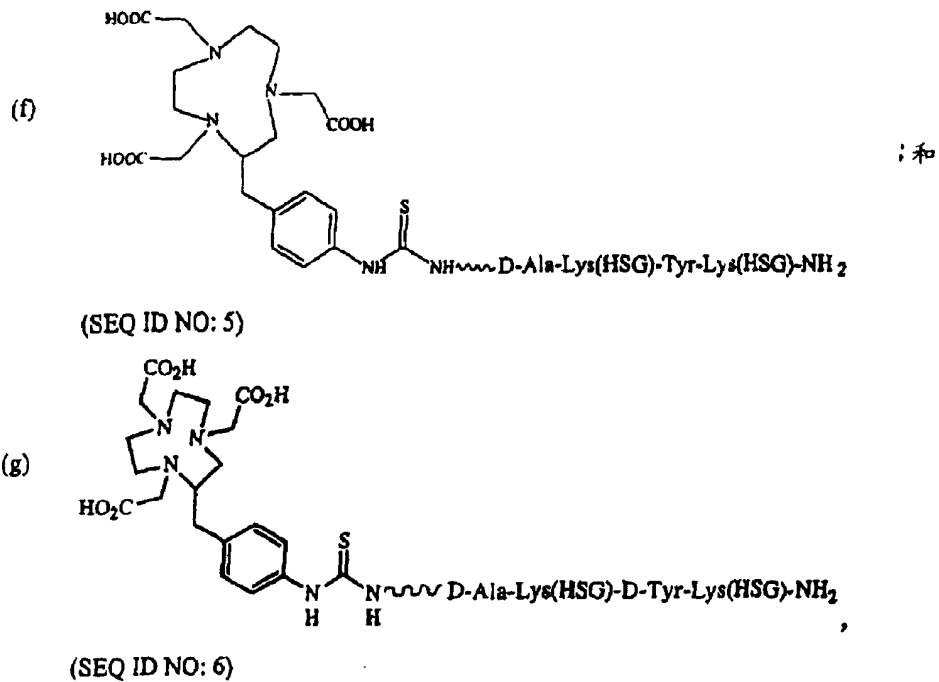
1) 药物前体，当所述酶能够在靶位点将所述药物前体转化为药物的情况下；或

10 2) 在所述受试者体内能够被解毒，形成低毒性中间体的药物，当所述酶能够将所述解毒的中间体复原为毒性形式，并从而提高所述药物在靶位点的毒性的情况下，或

15 3) 药物前体，其在所述受试者体内经过自然过程被活化，并通过转化为一种低毒性中间体的方式被解毒，在所述酶能够将所述解毒的中间体重新转换为毒性形式，并从而提高所述药物在靶位点的毒性的情况下。

本发明还涉及选自下列的靶向构建体：

- (a) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH₂ (SEQ ID NO: 3);
- (b) DOTA-Phe-Lys(HSG)-Tyr-Lys(HSG)-NH₂ (SEQ ID NO: 2);
- (c) Ac-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH₂ (SEQ ID NO: 4);
- (d) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH₂ (SEQ ID NO: 1);
- (e) (Tscg-Cys)-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(DOTA)-NH₂ (SEQ ID NO: 1);



本发明还涉及筛选靶向构建体的方法，其包括：

- 将所述靶向构建体与双特异性抗体或抗体片段接触，形成混合物，其中所述抗体或抗体片段具有至少一个特异性结合靶组织的臂，
5 和至少另外一个特异性结合所述靶向构建体的臂；

其中所述至少一个臂能够结合到靶细胞、组织、或病原体或由其产生的或与其相关的分子上的互补结合部分；和

可选择地，孵育所述混合物；和
分析所述混合物。

- 10 本发明还涉及哺乳动物正常组织成像的方法，包含：

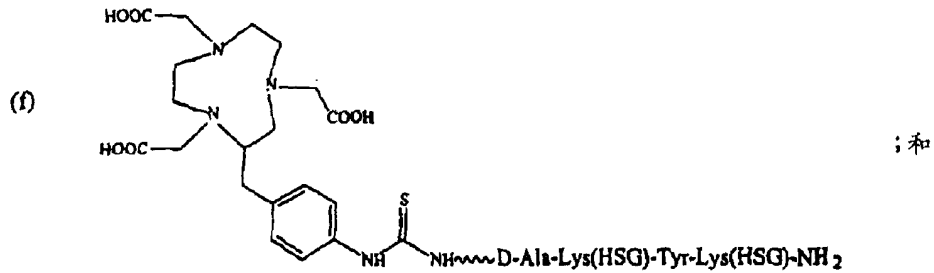
施用有效量的双特异性抗体或抗体片段，其中所述抗体或抗体片段具有至少一个特异性结合靶组织的臂，和至少另外一个特异性结合
靶向构建体的臂；

- 其中所述至少一个臂能够结合到靶细胞、组织或由其产生的或与其相关的分子上的互补结合部分；和
15

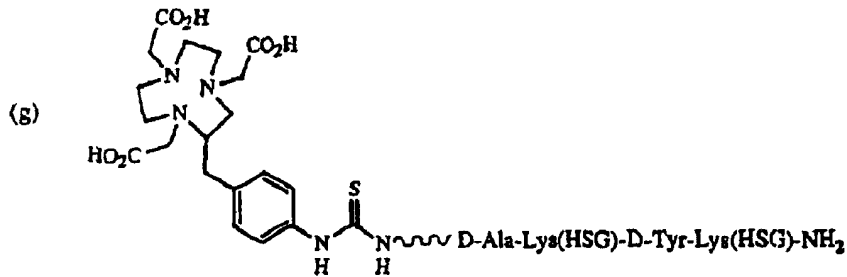
施用选自下列的靶向构建体：

- (a) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH₂ (SEQ ID NO: 3);
- (b) DOTA-Phe-Lys(HSG)-Tyr-Lys(HSG)-NH₂ (SEQ ID NO: 2);
- (c) Ac-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH₂ (SEQ ID NO: 4);
- (d) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH₂ (SEQ ID NO: 1);

(e) (Tscg-Cys)-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(DOTA)-NH₂ (SEQ ID NO: 1);



(SEQ ID NO: 5)



(SEQ ID NO: 6)

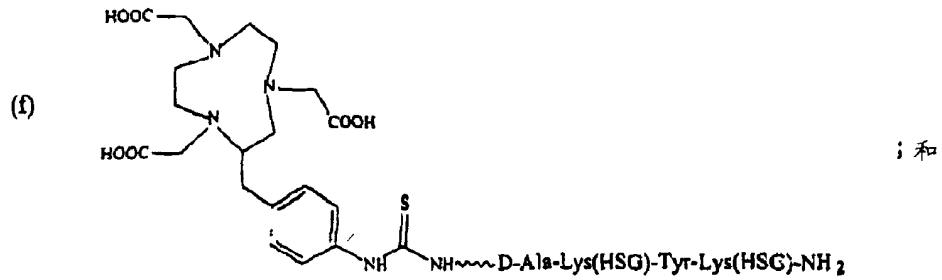
本发明还涉及受试者病灶组织的手术中鉴定或治疗的方法，包含：

5 施用有效量的双特异性抗体或抗体片段，其中所述抗体和抗体片段具有至少一个特异性结合靶组织的臂，和至少另外一个特异性结合靶向构建体的臂；

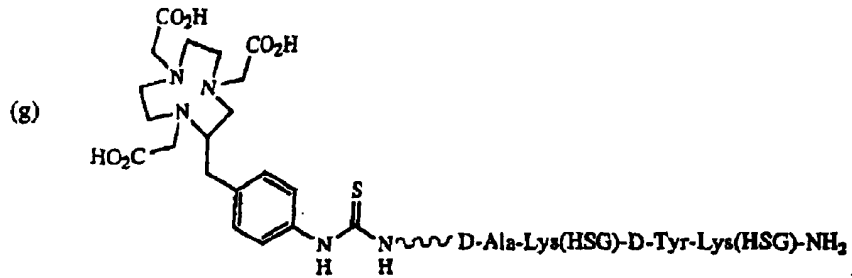
其中所述至少一个臂能够结合到靶细胞、组织或病原体或由其产生的或与其相关的分子上的互补结合部分；和

施用选自下列的靶向构建体：

- (a) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH₂ (SEQ ID NO: 3);
- (b) DOTA-Phe-Lys(HSG)-Tyr-Lys(HSG)-NH₂ (SEQ ID NO: 2);
- (c) Ac-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH₂ (SEQ ID NO: 4);
- (d) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH₂ (SEQ ID NO: 1);
- 10 (e) (Tscg-Cys)-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(DOTA)-NH₂ (SEQ ID NO: 1);



(SEQ ID NO: 5)



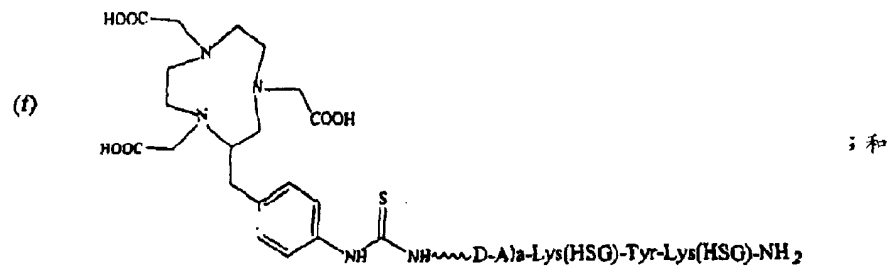
(SEQ ID NO: 6)

- 本发明还涉及受试者病灶组织的内镜鉴定或治疗的方法，包含：
施用有效量的双特异性抗体或抗体片段，其中所述抗体和抗体片段具有至少一个特异性结合靶组织的臂，和至少另外一个特异性结合
5 靶向构建体的臂；

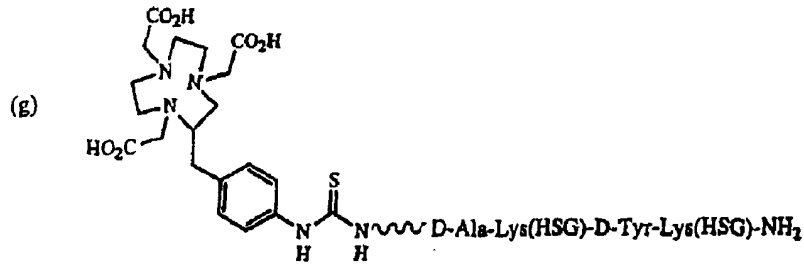
其中所述至少一个臂能够结合到靶细胞、组织或病原体或由其产生的或与其相关的分子上的互补结合部分；和

施用选自下列的靶向构建体：

- (a) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH₂ (SEQ ID NO: 3);
- (b) DOTA-Phe-Lys(HSG)-Tyr-Lys(HSG)-NH₂ (SEQ ID NO: 2);
- (c) Ac-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH₂ (SEQ ID NO: 4);
- (d) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH₂ (SEQ ID NO: 1);
- (e) (Tscg-Cys)-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(DOTA)-NH₂ (SEQ ID NO: 1);



(SEQ ID NO: 5)



(SEQ ID NO: 6)

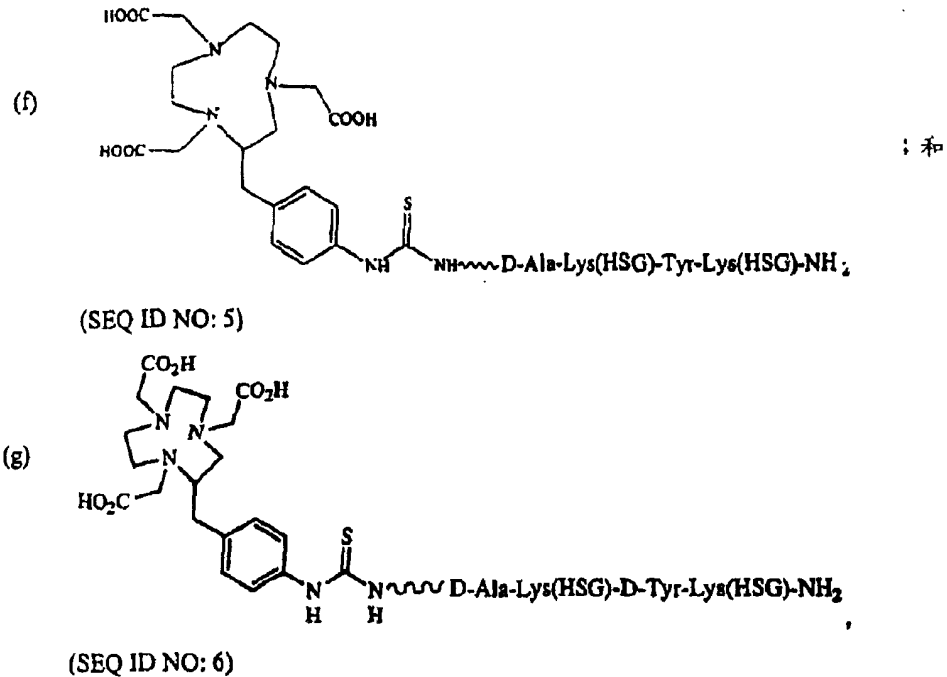
本发明还涉及受试者病灶组织的血管内鉴定或治疗的方法，包含：

5 施用有效量的双特异性抗体或抗体片段，其中所述抗体和抗体片段具有至少一个特异性结合靶组织的臂，和至少另外一个特异性结合靶向构建体的臂；

其中所述至少一个臂能够结合到靶细胞、组织或病原体或由其产生的或与其相关的分子上的互补结合部分；和

施用选自下列的靶向构建体：

- (a) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH₂ (SEQ ID NO: 3);
- (b) DOTA-Phe-Lys(HSG)-Tyr-Lys(HSG)-NH₂ (SEQ ID NO: 2);
- (c) Ac-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH₂ (SEQ ID NO: 4);
- (d) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH₂ (SEQ ID NO: 1);
- (e) (Tscg-Cys)-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(DOTA)-NH₂ (SEQ ID NO: 1);



本发明的其它方面、特征和优点将在下面的说明书中加以描述，在一定程度上来说所述内容在说明书中是显而易见的，或在实施本发明过程中可以体会到。本发明的实施方式和优点可以通过本发明的手段和组合，尤其是权利要求书中提到的，来实现并获得。

附图简述

附图 1 图解说明不同的 Abs 和 bsAbs。

附图 2 提供了纯化的 hMN-14Fab-734scFv 的 SDS-PAGE 分析结果。聚丙烯酰胺凝胶的浓度为 4-20%，在非还原条件（泳道 1 和 2）和还原条件下（泳道 3 和 4）进行，bsAb（泳道 2 和 4）和 hMN-14 IgG（泳道 1 和 3）的用量为 3 μg。

附图 3 图解说明两种双特异性融合蛋白。

附图 4 图示用于制备 hMN-14Fab-734scFv 双特异性融合蛋白的 DNA 构建体。

附图 5 图示用于制备 hMN-14Fab-734scFv 双特异性融合蛋白的 DNA 构建体。

附图 6 显示 hMN-14 x m679 bsMAb 与 ¹¹¹In-标记的 IMP-241 二价 HSG-DOTA 肽之间的结合特性。方格 A: 只有 ¹¹¹In-IMP-241 的 SE-HPLC 结果；方格 B: ¹¹¹In-IMP-241 与 hMN-14 x m679 bsMAb 混合后的 SE-HPLC 结果；方格 C: 将 ¹¹¹In-IMP-241 加入含有 hMN-14 x 679 bsMAb

和过量 CEA 的混合物后的结果。色谱结果表明 ^{111}In -IMP-241 与 bsMAb (B) 与 bsMAb/CEA 复合体 (C) 相关。

附图 7 显示 ^{125}I -mMu-9 x m679F(ab')₂ bsMAb 和 ^{111}In -IMP-241 在 GW-39 肿瘤模型裸小鼠中的清除率。小鼠静脉注射放射标记的 bsMAb, 48 小时之后静脉给予放射标记的肽。数值表示每克注射剂量的平均和标准偏差的百分数 (每次时间间隔 n=5)。

优选实施方案的详细说明

I. 概述

本发明提供了一种双特异性抗体 (bsAb) 或抗体片段 (bsFab), 其具有至少一个可与靶组织反应的臂, 和至少另外一个可与靶向构建体反应的臂。靶向构建体包括肽, 所述肽具有至少两个可识别半抗原单元。可识别半抗原的例子包括但不限于, 组胺琥珀酰甘氨酸 (HSG) 和荧光素异硫氰酸盐。靶向构建体可以与多种用于治疗或鉴定病灶组织的试剂缀合。能够缀合的试剂包括但不限于, 螯合剂、金属螯合络合物、药物、毒素 (如蓖麻毒素、相思豆毒蛋白, 核糖核酸酶 (如 RNase), DNase I, 葡萄球菌 (*Staphylococcal*) 肠毒素-A, 美洲商陆抗病毒蛋白, gelonin, 白喉毒素, 假单胞杆菌属 (*Pseudomonas*) 外毒素, 和假单胞菌属内毒素) 和其它效应分子。另外, 活化药物前体或提高药物靶特异性毒性的酶也可以缀合到靶向构建体上。因此, 使用可与靶向构建体反应的 bsAb 可以进行多种治疗和诊断应用, 而不必为每个应用准备新的 bsAb。

双特异性抗体 (bsAb) 前靶向定位系统提供了一种诊断和治疗用途的潜在的非免疫原性、高度选择性的替代方法。另外, 在此描述的 bsAb 前靶向定位系统比其它前靶向定位系统具有一个非常重要的优点, 就是它可以与多种不同的成像或治疗剂一起应用。本系统所具有的灵活性归因于使用了直接抗组胺-琥珀酰-甘氨酸 (HSG) 的抗体和开发了含有 HSG 残基的肽。含有 HSG 的肽既可以用 DOTA 螯合 ^{111}In 、 ^{90}Y 、 ^{177}Lu 进行合成, 也可以用镓/铈螯合剂进行合成。在前靶向定位中, 联合使用这些肽和双特异性抗体, 使用被抗-癌胚抗原 (CEA) 或抗-结肠-特异性抗原-P (CSAp) 抗体的 Fab' 化学稳定的抗-HSG Fab', 来提供对表达这些抗原的肿瘤的靶向能力。但是, 其它的抗原靶还可以包括现有技术中已知的多种与肿瘤相关的抗原, 如 CD19, CD20, CD21, CD22,

CD23, CD30, CD74, CD80, HLA-DR, Ia, MUC 1, MUC 2, MUC 3, MUC 4, EGFR, HER 2/neu, PAM-4, BrE3, TAG-72 (B72.3, CC49), EGP-1 (如 RS7), EGP-2 (如 17-1A 和其它 Ep-CAM 靶), Le(y) (如 B3), A3, KS-1, S100, IL-2, T101, 坏死抗原, 叶酸受体, 血管生成标记 (如 VEGF), 肌腱蛋白, PSMA, PSA, 肿瘤相关细胞因子, MAGE, 和/活其片段。组织特异性抗体 (如抗骨髓细胞的, 如 CD34, CD74 等, 甲状旁腺球蛋白抗体等) 和抗非恶性病灶组织的抗体, 如血凝纤维蛋白, 粥样斑块巨噬细胞抗原 (如 CD74 抗体), 和特异性病原体抗体 (如抗细菌的、抗病毒的、和抗寄生虫的), 在现有技术中是已知的。

可以在温和条件下对肽进行标记以获得较高特异性活性, 这样可以避免纯化的需要。肿瘤模型裸鼠的体内研究表明, 放射标记的肽在体内被快速清除, 在肿瘤组织或正常组织中仅有极少量的滞留。在施用前靶向剂量的 bsAbs 之后 1 到 2 天时, 肿瘤所摄取的放射标记肽的量升高了 28-175 倍, 在注射肽 3 小时内, 肿瘤/非肿瘤比率超过 2: 1 到 8: 1, 这表明比同时施用的 ^{99m}Tc -抗-CEA Fab' 具有显著的提高。抗-CSAp x 抗-HSG F(ab'): bsAb 在肿瘤中具有最高和最持久的滞留, 并且当与 ^{111}In 标记的肽联合使用时, 以治疗放射核素如 ^{90}Y 和 ^{177}Lu 来估计照射剂量, 结果显示可以给肿瘤施用相当 12, 000cGy 的照射剂量, 其中肾脏接受了 1500 cGy, 而其它所有组织接受了 500 cGy。因此, 该靶向定位系统具有高度灵活性, 能够使用多种诊断成像和治疗所需的化合物, 并因为获得了非常高的肿瘤吸收和靶向比率, 而非常适用于所述用途。

另外, 本发明还包含一种检测和/或治疗哺乳动物靶细胞、组织或病原体的方法, 其包括施用有效量的双特异性抗体或抗体片段, 其中所述抗体和抗体片段包含至少一个特异性结合靶组织的臂和至少另外一个特异性结合靶向构建体的臂。在此所使用的“病原体”包括但不限于, 真菌 (如小孢子菌属、发癣菌属、表皮癣菌属、*Sporothrix schenckii*、新型隐球菌、粗球孢菌、荚膜组织胞浆菌、皮炎牙生菌、白色假丝酵母)、病毒 (如人免疫缺陷病毒 (HIV)、疱疹病毒、巨细胞病毒、狂犬病病毒、流行性感感冒病毒、B 型肝炎病毒、仙台病毒、猫白血病毒、Reo 病毒、脊髓灰质炎病毒、人血清细小样病毒、猿病毒 40、呼吸道合胞病毒、乳腺肿瘤病毒、水痘-带状疱疹病毒、登革热病

毒、风疹病毒、麻疹病毒、腺病毒、人 T-细胞白血病病毒、爱-巴病毒、鼠白血病病毒、流行性腮腺炎病毒、疱疹性口炎病毒、辛德毕斯病毒、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒、疣病毒和蓝舌病病毒)、寄生虫、细菌(如炭疽杆菌、无乳链球菌、嗜肺军团菌、化脓链球菌、埃希氏大肠杆菌、淋病奈瑟氏球菌、脑膜炎奈瑟氏球菌、肺炎球菌、嗜血 B-型流感、梅毒螺旋体、莱姆病螺旋体、铜绿假单胞菌、麻风分枝杆菌、流产布鲁杆菌、结核分枝杆菌、和破伤风毒素)、支原体(关节炎支原体、猪鼻支原体、口腔支原体、精氨酸支原体、拉氏无胆甾原体、唾液支原体、和肺炎支原体)和原生动物(如镰状疟原虫、间日疟原虫、鼠弓形虫、让氏锥虫、克氏锥虫、罗德西亚锥虫、布氏锥虫、曼森血吸虫、日本血吸虫、牛巴贝虫、*Elmeria tenella*、旋盘尾丝虫、旋毛线虫、旋盘尾丝虫、小泰勒尔梨浆虫、水泡绦虫、羊绦虫、牛肉绦虫、细粒棘球蚴、和科尔蒂中殖孔绦虫)。参见美国专利 No. 5, 332, 567。

15 本文还提供了抗体和抗体片段。抗体片段是抗体中的抗原结合部分, 如 $F(ab')_2$ 、 $F(ab)_2$ 、 Fab' 、 Fab 等。抗体片段所结合的抗原与完整抗体所识别的抗原相同。例如, 抗-CD22 单克隆抗体片段结合到 CD22 的表位。

20 术语“抗体片段”还包括任一合成的蛋白或基因工程蛋白, 其与抗体相同, 均是结合到特异性抗原形成复合物。例如, 抗体片段包括分离的片段、由免疫球蛋白重链可变区和轻链可变区组成的“Fv”片段、免疫球蛋白轻链和重链可变区通过肽接头连接在一起而形成的重组单链多肽分子(“sFv 蛋白”)、和由模拟“高变区”的氨基酸残基组成的最小识别单元。在免疫球蛋白轻链区或重链区的每个可变区中发现了三个被称作“高变区”或“互补决定区”(CDR)的区域。每个 CDR 的两侧均连接有相对保守构架区(FR)。认为是 FR 维持着可变区的结构完整性。免疫球蛋白轻链的 CDRs 和相应重链的 CDRs 构成了抗原结合位点。CDRs 的高度可变性与抗体特异性的变化多端相一致。

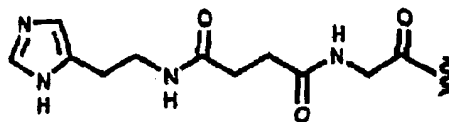
30 在此所使用的术语“受试者”指的是任何动物(如脊椎动物和无脊椎动物)包括但不限于, 人类和其它灵长类动物、啮齿类动物(如小鼠、大鼠、和豚鼠)、lagamorphs(如兔)、牛科动物(如牛)、绵羊科动物(如绵羊)、山羊科动物(如山羊)、猪科动物(如猪)、马科动物(如

马)、犬科动物(如狗)、猫科动物(如猫)、家禽(如鸡、火鸡、鸭子、鹅、其它家禽等),还有未驯化的或野生的动物,包括但不限于,如有蹄动物类(如鹿)、熊类、鱼类、lagamorphs、啮齿类动物、鸟类等。该术语对年龄和性别没有限制。因此成年的和新出生的受试者,还有
5 胎儿,不管是雄性还是雌性,都包括在该术语范围内。

II. 抗体的靶向构建体

有多种不同结构的靶向构建体,但在 bsAb 靶向定位方法中要选择那些不仅能减少诱发免疫反应而且在体内能够快速清除的靶向构建体。疏水试剂是诱发强烈免疫反应的最好的试剂,而亲水试剂则是在
10 体内清除速率最快的试剂,因此需要在亲水和疏水之间建立一个平衡。本发明是通过如下方法实现所述目的的,一方面依靠使用亲水螯合试剂来抵消一些有机部分所固有的疏水性。还有,通过选择,使靶向构建体的亚基具有相反的溶解特性,例如,当亚基是含有氨基酸的肽时,可以一部分选择疏水性的,一部分选择亲水性的。除肽外,还
15 可使用碳水化合物作为亚基。

靶向构建体可以包括具有两个氨基酸残基的肽骨架,优选两个到
10 个氨基酸残基,其可以与其它部分如螯合试剂相偶联。靶向构建体应当是一种低分子量构建体,优选分子量小于 50,000 道尔顿,并优选小于约 20,000 道尔顿、10,000 道尔顿、或 5,000 道尔顿,包括
20 任一能够与螯合试剂结合的金属离子。例如,肽 DTPA-Tyr-Lys(DTPA)-OH(其中 DTPA 是二亚乙基三胺五乙酸)已经被用于产生抗分子中铟-DTPA 部分的抗体。不过,通过使用不含铟的分子,并通过合适的筛选,能够产生抗酪氨酰-赖氨酸二肽的新的 Abs。通常情况下,靶向构建体的抗原肽具有四个或更多个残基,如肽 DOTA-Phe-
25 Lys(HSG)-Tyr-Lys(HSG)-NH₂(SEQ ID NO:2),其中 DOTA 是 1,4,7,10-四氮杂环十二烷基四乙酸,HSG 是具有如下分子式的组胺琥珀酰甘氨酸基团:



可以使用不包含金属的肽作为免疫原,筛选与 Phe-Lys-Tyr-

Lys (SEQ ID NO: 2) 骨架反应的 Abs。

靶向构建体的半抗原也能提供免疫原性识别部分，例如一种化学半抗原。使用化学半抗原，优选 HSG 半抗原，能够使抗体和构建体之间具有高度特异性。这是因为抗 HSG 半抗原的抗体是已知的，能够很容易地组合成合适的 bsAb。因此半抗原与肽骨架的结合能够产生特异性结合 bsAb 或 bsFab 的靶向构建体。

本发明还提出将非天然的氨基酸，如 D-氨基酸，掺入肽骨架结构中，这样当与最终的 bsAb/构建体系统一起使用时，能够确保 bsAb 的识别靶向构建体的臂对靶向构建体是完全特异性的。本发明还提出其它类型的骨架结构，如由非天然氨基酸和 peptoids 构成的结构。

作为免疫原的肽在肽自动合成仪上可以很方便地合成，其中使用了固相支持物和标准的重复正交脱保护和偶联技术。使用如乙酰基的标准保护基团将肽中的游离胺基保护起来，肽中的游离胺基在后面用于螯合连接。这样的保护性基团对本领域技术人员来说是公知的。参见 Greene 和 Wuts 的 “Protective Groups in Organic Synthesis, 1999 (John Wiley and Sons, N. Y.)”。当制备的肽用于 bsAb 系统时，将肽从树脂上切割下来，最好使其产生相应的 C-末端酰胺基，目的是抑制体内羧肽酶的活性。

III. 螯合部分

靶向构建体中的亲水螯合部位能够确保靶向构建体在体内快速清除。除了亲水性外，在选择螯合剂时，应当选择具有金属结合特性的，并且能够随着后面的情况而变化，这至少对于那些 bsAb 表位是肽的一部分或是一种非螯合化学半抗原的靶向构建体来说应当是这样，金属-螯合络合物的识别不再是个问题。

可以使用的金属-螯合组合包括 2-苄基-DTPA 和它的单甲基、环己基类似物，其中使用 ^{47}Sc 、 ^{52}Fe 、 ^{55}Co 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{111}In 、 ^{89}Zr 、 ^{90}Y 、 ^{161}Tb 、 ^{177}Lu 、 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 、和 ^{225}Ac 用于放射成像和 RAIT。在本申请中与 bsAbs 共同使用的是与非放射性金属如 Mn、Fe、和 Gd 络合并用于 MRI 的螯合剂相同的螯合剂。大环的螯合剂如 NOTA (1, 4, 7-三氮-环壬烷-N, N', N''-三乙酸)、DOTA、和 TETA (p-溴乙酰胺-苄基-四乙胺四乙酸) 能够与多种金属和放射性金属，特别是放射性核素 Ga、Y、Cu 进行螯合。

DTPA 和 DOTA 类螯合剂，因为配体包括硬碱螯合功能基团如羧化物和胺，因而能够有效螯合硬酸阳离子，尤其是 IIa 和 IIIa 族的金属阳离子。通过将环定做为与金属离子相适应的大小，而使所制备的金属-螯合络合物更加稳定。也可以选择其它类型的环状螯合剂，如大环聚醚能够与用于 RAIT 的 ^{223}Ra 核素稳定结合。卟啉螯合剂能够与多种放射性金属螯合，并且还能够在特定的非放射性的金属络合物用于 bsAb 介导的免疫光疗。此外，还可在靶向构建体上缀合多种类型的螯合剂，以结合多种金属离子，如非放射性的金属、诊断用放射核素和/或治疗用放射性核素。

10 能够结合到靶向构建体的螯合试剂上的诊断用放射性核素包括，但不限于， ^{110}In 、 ^{111}In 、 ^{177}Lu 、 ^{18}F 、 ^{52}Fe 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{86}Y 、 ^{90}Y 、 ^{89}Zr 、 $^{94\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{94}Tc 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{120}I 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 $^{154-158}\text{Gd}$ 、 ^{32}P 、 ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{51}Mn 、 $^{52\text{m}}\text{Mn}$ 、 ^{55}Co 、 ^{72}As 、 ^{75}Br 、 ^{76}Br 、 $^{82\text{m}}\text{Rb}$ 、 ^{83}Sr 、或其它 δ^- 、 β^- 或正电子-发射物。优选地，诊断用放射性核素的衰变能在 25-10,000keV 之间，更优选在 25-4,000keV 之间，更加优选在 20-1,000keV 之间，更加优选在 70-700keV 之间。激发正电子发射放射性核素的总衰变能量优选 <2,000 keV，更优选低于 1,000 keV，最优选 <700 keV。使用 γ -射线检测的用作诊断剂的放射性核素包括，但不限于：Cr-51、Co-57、Co-58、Fe-59、Cu-67、
15 Ga-67、Se-75、Ru-97、Tc-99m、In-111、In-114m、I-123、I-125、I-131、Yb-169、Hg-197 和 Tl201。 γ -射线激发的放射性核素的衰变能优选为 20-2000 keV，更优选为 60-600 keV，更加优选为 100-300 keV。

25 能够与靶向结构的螯合试剂结合的治疗用放射性核素包括，但不限于： ^{111}In 、 ^{177}Lu 、 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 、 ^{211}At 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{90}Y 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{47}Sc 、 ^{111}Ag 、 ^{67}Ga 、 ^{142}Pr 、 ^{153}Sm 、 ^{161}Tb 、 ^{166}Dy 、 ^{166}Ho 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{189}Re 、 ^{212}Pb 、 ^{223}Ra 、 ^{225}Ac 、 ^{59}Fe 、 ^{75}Se 、 ^{77}As 、 ^{89}Sr 、 ^{99}Mo 、 ^{105}Rh 、 ^{109}Pd 、 ^{143}Pr 、 ^{149}Pm 、 ^{169}Er 、 ^{194}Ir 、 ^{198}Au 、 ^{199}Au 、和 ^{211}Pb 。治疗用放射性核素的衰变能优选在 25-10,000 keV 之间。 β^- 粒子激发核素的衰变能优选为 25-5,000 keV 之间，更优选为 100-4,000 keV，最优选为 500-2,500 keV。还优选以俄歇激发粒子衰变的放射性核素，如 Co-58、Ga-67、Br-80m、Tc-99m、Rh-103m、Pt-109、In-111、Sb-119、I-

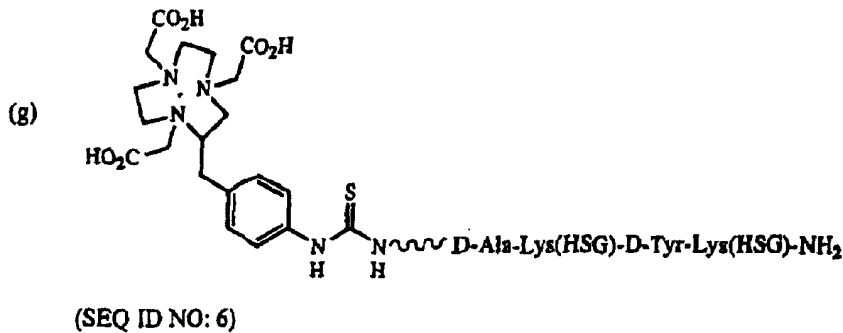
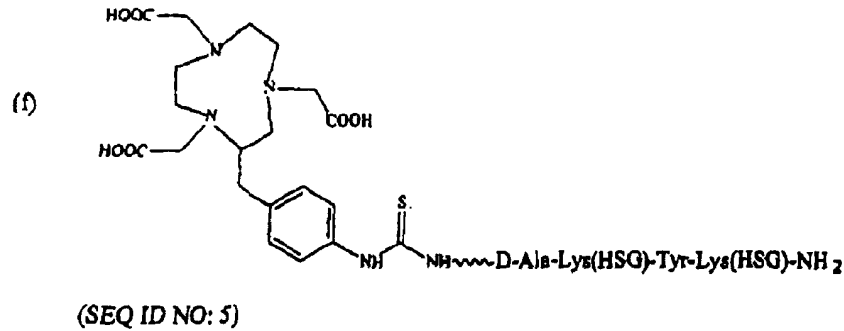
125、Ho-161、Os-189m、和 Ir-192。β-粒子激发核素的衰变能优选 <1,000 keV, 更优选 <100 keV, 最优选 <70 keV。还优选衰变时产生 α-粒子的放射性核素。这样的放射性核素包括, 但不限于: Dy-152、At-211、Bi-212、Ra-223、Rn-219、Po-215、Bi-211、Ac-225、Fr-221、
5 At-217、Bi-213、和 Fm-255。α-粒子激发放射性核素的衰变能优选为 2,000-9,000 keV, 更优选为 3,000-8,000 keV, 最优选为 4,000-7,000 keV。

在美国专利 No: 5,753,206 中公开的螯合剂, 尤其是缩氨基硫脲乙醛酰半胱氨酸 (Tscg-Cys) 和氨基硫脲-乙酰半胱氨酸 (Tsca-Cys)
10 螯合剂有利于结合软酸阳离子, 如 Tc、Re、Bi 和其它过渡金属、镧系元素和铜系元素, 所述元素能够紧密结合于弱碱性配体, 尤其是含硫的或含磷的配体。可以在肽上连接一种以上的螯合剂, 如结合 In(III) 阳离子的类似于 DTPA 的硬酸螯合剂, 和结合 Tc 阳离子的软酸螯合剂 (如含硫醇基团的螯合剂, 如 Tscg-Cys)。因为抗 di-DTPA 半抗原的
15 抗体是已知的 (Barbet' 395, supra), 而且能够很容易地偶联到一种靶抗体形成 bsAb, 因此在靶向定位方案中, 可以使用带有非放射性的 di-DTPA 螯合剂和另外一种螯合剂的肽半抗原来结合放射性同位素, 即用于靶向放射性同位素。这种肽的一个实例是 Ac-Lys(DTPA)-Tyr-Lys(DTPA)-Lys(Tscg-Cys)-NH₂ (SEQ ID NO: 7)。肽可以预先加载
20 In(III), 然后用 ^{99m}Tc 阳离子标记, DTPA 优先螯合 In(III) 离子, 含硫醇基团的 Tscg-Cys 优先螯合 Tc 阳离子。其它硬酸螯合剂, 如 NOTA、DOTA、TETA 等可以代替 DTPA 基团, 可以使用模拟技术生产对它们特异性的 Mabs, 从而产生出抗 di-DTPA Mab。

应当意识到, 可以合并两种不同的硬酸或软酸螯合剂组成接头,
25 例如, 因为阳离子的尺寸、螯合环的几何性状和阳离子优选的复合离子结构是存在差别的, 因此不同尺寸的螯合环可以在两种不同的硬酸阳离子或两种软酸阳离子中间进行选择结合。这样可以使两种不同的金属合并成为一个可被前靶向定位的 bsAb 捕获的接头, 金属中的一种或两种可以是放射性的或是用于增强 MRI 的。

30 优选的螯合剂包括 NOTA、DOTA 和 Tscg 及其组合。这些螯合剂掺入后形成具有如下结构的螯合剂-肽复合基序:

- (a) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH₂ (SEQ ID NO: 3);
 (b) DOTA-Phe-Lys(HSG)-Tyr-Lys(HSG)-NH₂ (SEQ ID NO: 2);
 (c) Ac-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH₂ (SEQ ID NO: 4);
 (d) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH₂ (SEQ ID NO: 1);
 (e) (Tscg-Cys)-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(DOTA)-NH₂ (SEQ ID NO: 1);



已经表明所述的螯合剂-肽缀合物 (f) 和 (g) 能够结合 ⁶⁸Ga, 因此可以用于正电子发射体层摄影 (PET)。

使用常用的化学方法使螯合剂与靶向构建体中的肽相偶联, 其中
 5 的一些将在下面的实施例中加以详细描述。简要地说, 在合成肽 Ac-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH₂ (SEQ ID NO: 4) 过程中, 首先将 Aloc-Lys(Fmoc)-OH 连接到肽合成仪 Rink 酰胺树脂上。在此所使用的保护性基团缩写 “Aloc” 和 “Fmoc”, 指的是烯丙氧基羰基和苄基甲氧基羰基。然后使用标准 Fmoc 自动合成方案将 Fmoc-
 10 Cys(Trt)-OH 和 TscG 加到赖氨酸的侧链, 形成如下的肽: Aloc-Lys(Tscg-Cys(Trt))-rink 树脂。然后除去 Aloc 基团。然后在合成仪上合成如下的肽 “Lys(Aloc)-D-Tyr-Lys(Aloc)-Lys(Tscg-Cys(Trt))-rink 树脂 (SEQ ID NO: 4)。然后进行 N-末端酰化作用, 并除去侧链 Aloc 保护基团。然后用活化的 N-三苯甲基-HSG-OH 处理所
 15 得到的肽, 直到用 Kaiser 在树脂中检测不到胺类为止。参见 Karacay

等 Bioconjugate Chem. 11: 842-845 (2000). Ac-Lys (HSG)-D-Tyr-Lys (HSG)-Lys (Tscg-Cys)-NH₂ (SEQ ID NO: 4) 和 DOTA-Phe-Lys (HSG)-D-Tyr-Lys (HSG)-NH₂ (SEQ ID NO: 3) 和 DOTA-Phe-Lys (HSG)-Tyr-Lys (HSG)-NH₂ (SEQ ID NO: 2) 和 DOTA-Phe-Lys (HSG)-D-Tyr-Lys (HSG)-Lys (Tscg-Cys)-NH₂ (SEQ ID NO: 1) 的合成将在以下作出详细描述。

IV. 制备金属螯合物的方法

螯合剂-肽缀合物在固态时能够保存很长时间。可以把它们分成单位剂量用于与金属的结合反应，也可以以单位剂量的固态、液态、或半液态溶液、冷冻溶液或冻干制品的形式进行保存。可以通过公知的方法对它们进行标记。

通常情况下，在进行螯合时，所采用的硬酸阳离子是以合适的盐溶液形式存在，它能够被硬酸螯合剂螯合，也能被软螯合剂螯合。但是，随后添加容易与软酸螯合剂螯合的软酸阳离子，其能够置换与软酸螯合剂已经螯合了的任何硬酸阳离子。例如，即使存在过量的不带放射性 ¹¹¹InCl₃，^{99m}Tc(V) 葡庚糖酸盐或 Tc 阳离子（由氯化锡和 Na^{99m}TcO₄ 原位产生的）和 Na^{99m}TcO₄ 对软酸螯合剂的标记，仍然是定量进行的。

其它软酸阳离子如 ¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、²¹³Bi 和二价或三价的阳离子 Mn、CO、Ni、Pb、Cu、Cd、Au、Fe、Ag（单价）、Zn、和 Hg 等，尤其是 ⁶⁴Cu、和 ⁶⁷Cu，其中的一些阳离子用于放射免疫检测或放射免疫治疗，所述阳离子通过类似的方法被装载到接头肽上。Re 阳离子也能够由高价铼的盐和二价锡离子产生，或使用一种预还原铼葡庚糖酸盐或其它过渡螯合剂来生成 Re。因为与还原 Tc 相比，还原高价铼需要更多的二价锡离子（最终浓度一般超过 200 μg/mL），因此需要注意确保高浓度的二价锡不要还原二硫键环化肽中的敏感的二硫键。在铼放射性标记中，使用了与 Tc-^{99m} 相似的过程进行标记。制备 Tscg-Cys-配体的 ReO 金属络合物的方法之一是将肽与 ReOCl₃(P(Ph)₃)₂ 进行反应，也可以使用其它还原性成分如 ReO(乙二胺)₂ 与肽进行反应。

V. 施用方法

应当注意的是，以下讨论主要集中在使用本发明双特异性抗体和靶向构建体治疗病灶组织。本发明实现了将本发明双特异性抗体和靶

向构建体用于治疗 and/或正常组织或器官的成像，其中使用了美国专利号 6126916、6077499、6010680、5776095、5776094、5776093、5772981、5753206、5746996、5697902、5328679、5128119、5101827 和 4735210 中的方法，在此全文引入所述文献。在此所使用的术语“组织”指的是，但不限于：卵巢组织、胸腺组织、甲状旁腺组织、骨髓组织或脾组织。在靶向正常组织时，一个重要的用途是鉴定和治疗组织的异位（即其位置发生了转移），如子宫内膜异位症。

施用 bsAb 和靶向构建体可以通过如下方式，在施用与接头部分连接的治疗剂之前一段时间，施用 bsAb。本领域技术人员根据所使用试剂的特定性质，能够很容易地对试剂施用的剂量和时间间隔进行设计。如果首先给予的是 bsAb-F(ab')₂ 衍生物，则在施用靶向构建体之前，应当等待 1-6 天。如果作为初级靶向载体的是 IgG-Fab' bsAb 缀合物，则在施用接头部分之前，需要等待较长一段时间，一般在 3-15 天。可选择地，bsAb 和靶向构建体可以以一种鸡尾酒的形式同时施用，也可以依次施用。

有多种诊断和治疗剂均能缀合到靶向构建体上。一般来说，诊断和治疗剂包括同位素、药物、毒素、细胞因子、细胞因子缀合物、激素、生长因子、缀合物、放射性核素、对照试剂、金属、细胞毒性药物、和免疫调节剂。例如，使用钆进行磁共振成像，缀合荧光素后用于光动力学治疗。另外，对照试剂可以是 MRI 对照试剂，如钆离子、镧离子、锰离子、铁离子、铬离子、铜离子、钴离子、镍离子、镉离子、铈离子、铊离子、铊离子、铊离子、铊离子、铊离子、或其它可对照标记，也可以是 CT 对照试剂，和超声对照试剂。另外的诊断剂包括荧光标记化合物如荧光素异硫氰酸盐、若丹明、藻红素、藻青素、别藻蓝蛋白、荧光胺、化学发光化合物（包括鲁米诺、异鲁米诺、芳炔吡啶酯、咪唑、吡啶盐和草酸酯）、和生物发光化合物（包括荧光素、荧光素酶和水母素。放射性核素也能被用作治疗和/诊断剂，包括如 ⁹⁰Y、¹¹¹In、¹³¹I、^{99m}Tc、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、¹⁷⁷Lu、⁶⁷Cu、²¹²Bi、²¹³Bi、²¹¹At。

治疗剂还包括，如化学治疗药物如长春花生物碱、萹环类药、epidophyllotoxinw、紫杉烷、抗代谢药、烷基化试剂、抗体、Cox-2 抑制剂、抗有丝分裂试剂、抗心绞痛试剂和凋亡试剂，尤其是多索鲁比辛、甲氨蝶呤、泰素、CPT-11、喜树碱、及它们的衍生物和其它种

类的抗癌试剂。其它可用于制备免疫缀合物和抗体融合蛋白的治疗剂包括氮芥、烷基磺酸盐、亚硝基脲、三氮烯、叶酸类似物、COX-2 抑制剂、嘧啶类似物、嘌呤类似物、铂配位络合物、激素等。REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 19th Ed. (Mack Publishing Co. 1995) 5 和 GOODMAN AND GILMAN'S THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS, 7th Ed. (MacMillan Publishing Co. 1985), 还有所述出版物的修订版记载了可用的治疗剂。其它可用的治疗剂, 如试验药物, 是本领域技术人员公知的。治疗剂还可以包括, 但不限于, 其它药物、药物前体和/或毒素。术语“药物”、“药物前体”和“毒素”在 10 说明书详述部分加以区分。术语“诊断剂”或“诊断”包括但不限于检测试剂、检测、或定位。

当靶向构建体包括诊断剂时, 优选在施用带有诊断剂的靶向构建体之前施用 bsAb。在施用诊断剂之前, 要为 bsAb 留出足够的时间, 使之靶向定位于病灶组织, 诊断剂是以靶向构建体的方式施用, 最后 15 进行成像。体腔中肿瘤检测可以通过如下方式进行, 对不同的身体结构发射适当波长的光并随后接收, 然后直接或间接进行观察, 或者通过特殊的检测器, 如放射性探测器或荧光检测器等。身体任何部位的伤病都可以观测到, 只要非离子射线能够递送, 并能够重新捕获从身体结构反射回来的射线。例如, PET, 一种高分辨率、非侵入性的成像 20 技术, 与本发明抗体和靶向构建体一起用于人病灶的造影。在 PET 过程中, 检测到由正电子衰变产生的 511keV 的 γ -光子。与诊断剂可以一起使用的还有 X-射线、计算机化体层摄影 (CT)、MRI 和 γ -成像 (如单光子发射计算机化体层摄影 (SPECT))。

正如前面所描述的, 靶向构建体可以包括放射性诊断剂, 其放射 25 出 25 - 10, 000 keV 的 γ -、 β -、 α -和俄歇-粒子和/或正电子。这样的试剂的例子包括但不限于, ^{18}F 、 ^{52}Fe 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{86}Y 、 ^{89}Zr 、 $^{94\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{94}Tc 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{111}In 、 ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{124}I 、 ^{131}I 、 $^{154-158}\text{Gd}$ 、和 ^{175}Lu 。

本发明的 bsAbs 或 bsFabs 能够被用于光动力学治疗 (PDT), 这在 30 美国专利 6096289、4331647、4818709、4348376、4361544、4444744、5851527 中有所记载。在 PDT 过程中, 给受试者施用一种感光物, 如血卟啉衍生物如二血卟啉醚。使用光, 如 630nm, 来激活抗肿瘤活性。

可用作替代感光物的包括那些可以在较长波长下使用的感光物，这样皮肤可以接受较少的光。感光物的例子包括但不限于，苯叶啉一元酸环 A (BPD-MA)、本红紫素锡 (SnET2)、磺化酞菁铝 (AlSPc) 和德叶啉镱 (Lutex)。

- 5 另外，在进行 PDT 过程中，诊断剂可以注射，例如，系统地，内窥镜采用激光诱导荧光来检测已与光激活试剂连接的癌症的位点，其中内窥镜包括无线的胶囊大小的内窥镜或摄像头。例如，该项技术已经被用于早期肺部肿瘤的荧光支气管镜检。Doiron 等 Chest 76: 32 (1979)。在另外一个实例中，抗体和抗体片段用于单光子发射。
- 10 例如，在施用本发明抗体或抗体片段之后，给受试者施用一种 Tc-99m-标记的诊断剂。然后用一种能够产生单光子射线的 γ -摄像头扫描受试者，进行计算机化体层摄影，分辨病灶或肿瘤位点。

- 可以将光活化试剂或染料缀合到抗体复合物，获得治疗用免疫缀合物。已经将荧光素和其它发色基团或染料，如对可见光敏感的叶啉，
- 15 用于检测和治疗病灶，其中给病灶照射合适波长的光。在治疗方面，这被称作光照射、光治疗、或光动力学治疗 (Jori 等 (eds.), Photodynamic therapy of Tumors and Other Diseases (Libreria Progetto 1985) ; van den Bergh, Chem. Britain 22: 430 (1986))。另外，将单克隆抗体偶联到光
- 20 活化染料用于进行光治疗。Mew 等，J. Immunol. 130: 1473 (1983); idem., Cancer Res. 45: 4380 (1985); Oseroff 等，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 8744 (1986); idem., Photochem. Photobiol. 46: 83 (1987); Hasan 等，Prog. Clin. Biol. Res. 288: 471 (1989); Tatsuta 等，Lasers Surg. Med. 9: 422 (1989);
- 25 Pelegrin 等，Cancer 67: 2529 (1991)。然而，这些早期的研究没有包括用于内窥镜治疗的用途，尤其是使用抗体片段或亚片段。因此本发明完善了包含光活性试剂或染料的免疫缀合物在治疗上的应用。

- 可以使用不透射线的和作为对照的材料来加强 X-射线检测和计算机化体层摄影的效果，这样的材料包括碘化合物、钡化合物、镓化合物、铊化合物等。特定的化合物包括钡、泛影酸盐、乙碘油、柠檬酸镓、碘卡酸、碘西他酸、碘达胺、胆影酸、碘氧胺酸、iogulamide、
- 30 碘海醇、碘异酞醇、碘番酸、碘普西酸、碘西法酸、碘丝酸、碘矾葡

胺、iosemetic acid、碘肽硫、碘替酸、碘酞酸、碘曲西酸、碘克酸、羟泛影酸、胺碘苯丙酸、葡甲胺、甲泛葡胺、甲泛影酸钠、丙碘酮或氯化亚铂。可以使用的超声对照材料包括葡聚糖和脂质体，尤其是气体填充的脂质体。在一个实施方式中，一种免疫调节剂，如细胞因子，也可以通过接头或其它本领域已知的方法缀合到靶向构建体上。在此所使用的术语“免疫调节剂”包括细胞因子、干细胞生长因子、淋巴毒素，如肿瘤坏死因子（TNF）、和造血因子，如白介素（如白介素-1（IL-1）、IL-2、IL-3、IL-6、IL-10、IL-12、和IL-18），集落刺激因子（如粒细胞集落刺激因子（G-CSF）和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子（GM-CSF）），干扰素（如干扰素- α 、- β 、- γ ），干细胞生长因子命名为“S1因子”、红细胞生成素和血小板生成素。合适的免疫调节剂的实例包括IL-2、IL-6、IL-10、IL-12、IL-18、干扰素- γ 、TNF- α 等。

靶向构建体也可以与酶缀合，其中的酶能够在靶位点活化药物/药物前体或能够通过控制身体的解毒途径来提高治疗效果。在施用bsAb之后，施用缀合了酶的含有低分子量半抗原的靶向构建体。通过bsAb与靶向构建体的结合，使酶前靶向定位于靶位点，之后注射一种已知能够在靶位点起作用的细胞毒性药物。药物可以是一种能够在体内被哺乳动物一般的解毒过程解毒的，并形成低毒性中间体的药物。例如，能够被肝脏转化为低毒性葡糖苷酸化合物的药物。解毒中间体能够随后在靶位点被前靶向定位的酶重新转换为原来的具有较高毒性的形式，从而提高药物在靶位点的细胞毒性。

可选择的，可以施用一种能够被前靶向定位的酶转化为活性药物的药物前体。前靶向定位的酶通过回收再利用解毒的药物，提高了治疗效果。该过程需要使用酶-药物组合。可选择的，将含有酶的靶向构建体与靶bsAb混合，之后给患者施用。在施用药物前体之前，需要等待足够长的时间，以使bsAb:靶向构建体-缀合物定位于靶位点，并使未结合的靶向构建体从循环中清除出去。正如前面所讨论的，药物前体在施用后被前靶向定位的酶转化为药物。

用于抗癌治疗的某些细胞毒性药物在血清中的溶解性相对较低。另外，一些药物在未缀合时具有相当的毒性，将它们转化为药物前体能够显著降低其毒性。将溶解性很低的药物转化为具有较高溶解性的

复合物，如葡糖苷酸、亲水酸的酯或亲水胺的酰胺，都能提高它们在血浆水相中的溶解度，并能提高它们通过静脉、动脉或毛细血管细胞壁，到达肿瘤周围组织液的能力。药物前体分解后在靶位点沉积了低溶解性的药物。在美国专利号 5851527 中，Hansen 描述了多个这样的

5 药物前体-到-药物转化的例子。

身体对某些毒性物质的解毒方法是，在肝脏中将某些毒性物质如芳香族或脂环族醇、硫醇、酚和胺转化为葡糖苷酸，从而使它们的毒性降低并使它们更容易排泄到尿中。能够转化为所述底物的一个典型的抗肿瘤药物是表阿霉素，它是多索鲁比辛（阿霉素）的 4-差向异构体，它是一种蒽环类糖苷，已经证明它是人 β -D-葡糖苷酸酶的一个底物，参见 Arcamone *Cancer Res.* 45:5995(1985)。其它类似物具有较少的极性基团，预期它们更具有亲脂性，并更能够进行所述过程。其它具有芳香族或脂环族醇、硫醇、酚和胺基团的药物或毒素也可以形成所述复合物形式。这些药物、或其药物前体均适用于本发明的提高

10 15 位点特异性的方法。

药物前体 CPT-11（伊立替康）在体内被羧酸酯酶转化为活性代谢物 SN-38。因此本发明的一个用途是，施用一种靶向肿瘤的 bsAb 和一种半抗原（如 di-DTPA），然后注射 di-DTPA-羧酸酯酶复合物。在获得合适的肿瘤/背景定位比率后，给予 CPT-11，定位于肿瘤的羧酸酯酶

20 在肿瘤处将 CPT-11 转化为 SN-38。活性 SN-38 的溶解度很低，因此它会沉积在肿瘤附近，并随后对邻近的表现为靶向抗原阴性的肿瘤细胞发挥作用。这是本发明方法的一个优点。本发明公开了一种修饰形式的羧酸酯酶，其包含在本发明范围内。参见如 Potter 等，*Cancer Res.* 58:2646-2651(1998) 和 Potter 等，*Cancer Res.* 58:3627-

25 3632(1998)。

依托泊苷是一种被广泛应用的抗癌药物，通过形成葡糖苷酸而使它的毒性大大降低，这包括在本发明范围内。参见如 Hande 等，*Cancer Res.* 48:1829-1834(1988)。可以由细胞毒性药物制备葡糖苷酸复合物，并作为肿瘤治疗剂注射到已被 mAb-葡糖苷酸酶复合物前靶向定位

30 的肿瘤。参见如 Wang 等，*Cancer Res.* 52:4484-4491(1992)。当然，该复合物还可以用于在此描述的前靶向定位方法。类似的，现有技术中已经描述了来自于柔红霉素和多索鲁比辛衍生物的药物前体与羧酸

酯酶和葡糖苷酸酶一起使用的实例。参见如 Bakina 等, J. Med Chem. 40: 4013-4018 (1997)。本发明可以使用的其它药物前体/酶组合的实例包括, 但不限于, 酚芥的羟基衍生物的葡糖苷酸药物前体和 β -葡糖苷酸酶; 酚芥或 CPT-11 和羧肽酶; 氮甲喋呤取代的 α -氨基酸和羧肽酶 A; 药物 (如 6-巯嘌呤、多索鲁比辛) 的青霉素或头孢菌素复合物和 β -内酰胺酶; 依托泊苷磷酸盐和碱性磷酸酶。

5 可选择, 在半抗原上可以缀合能够在靶位点活化药物前体或能够通过控制身体的解毒途径而提高治疗效果的酶。在施用前靶向定位的 bsAb 之后, 给受试者施用所述酶-半抗原缀合物, 使之直达靶位点。在酶定位于靶位点以后, 注射一种已知能够在靶位点起作用的细胞毒性药物, 或其药物前体, 其中药物前体在原位被已靶向定位的酶转化为所述药物。正如上面所述的, 药物是一种能够被哺乳动物正常解毒进程解毒的并形成低毒性中间体的药物, 低毒性中间体通常是葡糖苷酸。解毒的中间体, 如葡糖苷酸, 在靶位点被前靶向定位的酶重新转化

10 化为毒性更强的形式, 并由此增强了药物在靶位点的细胞毒性。这可以使药物再利用。同样的, 所施用的药物前体也能够通过正常的生物过程转化为活性药物。前靶向定位的酶通过使解毒药物再利用, 而提高了药物的治疗效果。该方法适用于所有的酶-药物组合。

在另外的实施方案中, 酶-半抗原缀合物可以在施用前与 bsAb 混合。在经过足够的时间以使酶-半抗原-bsAb 缀合物定位到靶位点并使未结合的缀合物从循环中清除后, 再施用药物前体。如上所述, 药物前体在原位被前靶向酶转化为药物。

本发明进一步计划应用本发明的 bsAb 和诊断剂进行硼中子捕获治疗 (BNCT) 方案。BNCT 是一种二元系统, 其中定位于肿瘤的 ^{10}B 原子通过中子照射使肿瘤细胞接受离子照射。BNCT 基于核反应理论, 当一种稳定的同位素, 同位素富集 ^{10}B (有 19.8% 的天然丰度) 在热中子的辐照下, 发生了核反应, 产生出 α -粒子和 ^7Li 原子。这些粒子的路径约为一个细胞的直径, 因此具有很高的线性能量传递。核反应产生的粒子中, 仅有几个短范围的 1.7MeV α -粒子能够靶向细胞核并摧毁它。

25 30 如用 BNCT 成功治疗癌症, 需要一种能够将高浓度的 ^{10}B 定位于肿瘤位点, 同时使非靶向组织基本上没有硼的方法。美国专利 6228362 描述了使用前靶向定位 bsAb 进行 BNCT 治疗受试者肿瘤的组合物和方法,

并且在实施本发明时可以将所述组合物和方法很容易地进行修改。

在本发明的另外一个实施方式中，靶向构建体的肽骨架上缀合了一种药物前体。给患者施用前靶向定位的 bsAb，并使之定位于靶并使之基本上不存在于循环中。一段时间以后，施用包含药物前体（如聚-谷氨酸（SN-38-酯）₁₀）的靶向构建体，由此将药物前体定位于特定的靶肿瘤。已知，因为肿瘤内或肿瘤周围细胞的高裂解率，从细胞内释放了大量的酶，因此肿瘤中酶的含量很高。技术人员可以选择合适的能够被这些酶活化的药物前体，来充分利用所述条件。例如，羧酸酯酶能够活化聚-谷氨酸（SN-38-酯）₁₀ 药物前体，它切割聚-谷氨酸（SN-38-酯）₁₀ 的酯键，在肿瘤部位释放出高浓度的游离 SN-38。可选择地，也可选择其它合适的酶定位于肿瘤位点。

药物从靶向构建体上切割下来后，被肿瘤细胞内在化。可选择的，通过在靶部位的交联作用，使药物作为完整复合物的一部分被内在化。靶向构建体能够诱导肿瘤结合 bsAb 的内在化，并由此因为提高了内在化的药物水平，而提高药物治疗效果。

有多种肽载体适合缀合药物前体，包括聚氨基酸，如聚赖氨酸、聚谷氨酸（E）、聚天冬氨酸（D），包括其 D-氨基酸类似物共聚物，如聚（Lys-Glu）即 poly[KE]，两种氨基酸的比例从 1: 10-10:1。也可以使用含有多多种氨基酸的共聚物，如聚（Lys-Ala-Glu-Tyr（SEQ ID NO: 8）（KA EY; 5: 6: 2: 1）。较少的多聚载体可以通过固相肽合成技术来合成，固相肽合成技术可以很容易合成链长为 2-50 个氨基酸残基的多肽。除了能得到具有准确结构的多肽外，此项技术的第二个优点是可以在链上特定的位点连接上一个或任意数目的化学接头。这些接头在后面可以用于连接预定数目的识别和治疗半抗原。

聚乙二醇 [PEG] 在体内具有合适的特性，能够用于双特异性抗体药物前体方法。在 SN-38 和 PEG 羟基之间插入二价酸如琥珀酸，从而在 SN-38 的羟基和标准的双羟基 PEG 的两个末端之间导入酯接头，从而生成了 SN-38-O-CO(CH₂)₂CO-O-PEG-O-CO(CH₂)₂CO-OSN-38。所产生的二-SN-38-PEG 是 SN-38-聚合物类药物前体中聚合数目最少的一个。PEG 衍生物具有理想的体内特性，但由于其二聚性能而具有有限的负载能力，所以制备了具有更大的携带半抗原能力的 PEG 共聚物，如 Poiani 等所描述的。参见如 Poiani 等，Bioconjugate Chem., 5: 621-

630, 1994。当 PEG 发生双(琥珀酰亚胺)碳酸盐衍生和与多功能二元胺如赖氨酸共聚合时, PEG 衍生物的两端均被活化。所述共聚合的产物中, 包含(-Lys(COOH)-PEG-Lys(COOH)-PEG-)。重复单元, 其中赖氨酸酰基不参与共聚过程, 所述共聚物可用于连接 SN-38 残基。SN-38 残基与游离的羧基反应, 生成具有(-Lys-(COOH)-PEG-Lys(COOH)-PEG-)。链的 SN-38 酯。

其它的合成聚合物也可用于携带识别半抗原和药物前体, 包括 N-(2-羟丙基)甲丙烯酰胺(HMPA)共聚物、聚(苯乙烯-共顺丁烯二酸酐(SMA))、聚(丁二烯醚顺丁烯二酸酐)(DIVEMA)、聚乙烯亚胺、乙氧基化聚乙烯亚胺、starburst dendrimers、和聚(N-乙烯吡咯烷酮)(PVP)。例如, 包含多个酐单元的 DIVEMA 聚合物与限量的 SN-38 反应, 在聚合物骨架上生成具有预期取代比率的药物。剩余的酐基团在有水的条件下打开生成游离羧酸酯。使用标准的水溶性肽偶联试剂如 1-乙基-3-(3-双甲基氨基丙基)碳二亚胺氢氯化物(EDC)活化有限的游离羧酸酯, 并使之偶联到具有游离氨基的识别部分。后者一个例子是组胺, 在过去已有其抗体。

多种药物前体都能缀合到靶向构建体上。所述聚合物的实例涉及 SN-38, 其是药物前体 CPT-11(伊里诺坎)的活性代谢产物。SN-38 具有芳香族羟基, 这在上面的描述中其用于生成芳香基酯, 芳香酯对酯酶类的酶非常敏感。类似的, 一种广泛用于化疗的, 喜树碱类似物拓普替康, 也具有可利用的芳香族羟基, 能够以 SN-38 所描述的类似的方式来生产对酯酶敏感的聚合物药物前体。

阿霉素也含有芳香族羟基, 使用与所述喜树碱类相似的酸催化反应, 能够使其偶联到含有羧酸酯的聚合载体上。类似的, 阿霉素类似物如柔红霉素、表阿霉素、柔红霉素也能以类似的方式偶联。具有氨基“化学接头”活性, 足以化学偶联到聚合载体上的阿霉素和其它药物能够通过其游离氨基通过多种途径有效偶联到载体分子上。提供游离羧酸酯基团的聚合物能够被活化(如被 EDC 活化), 活化的聚合物与阿霉素混合, 通过酰胺键直接将药物连接到聚合物的侧链上。通过混合适合的能够被切割的交联试剂, 如乙烯 glycobis(琥珀酰亚胺基琥珀酸盐((EGS, Pierce Chemical Co., Rockford, IL)或双-[2-(琥珀酰亚胺基氧羰基氧)乙基]砒(BSOCOES, Molecular

Bioscineces, Huntsville, AL), 在与双琥珀酰亚胺酯基团反应后, 使两个胺交联为两个酰胺, 通过所述方式, 含有氨基的药物也能够被偶联到带有氨基链的聚合物上。这是非常有利的, 因为这些基团保持了对酶切割的敏感性。例如, (阿霉素-EGS)_n-聚-赖氨酸在 EGS 交联链上保留了对酶切割敏感的二酯基团, 可以通过酶如酯酶进行切割。使用已知的过程, 还能将阿霉素缀合到多种肽上, 例如, HyBnK (DTPA) YK (DTPA)-NH₂, (HyBn= p-H₂NNHC₆H₄CO₂H)。参见 Kaneko 等., J Biocoyugate Chem., 2: 133-141, 1991..

5 在一个优选实例中, 治疗复合物包含偶联到载体上的阿霉素, 其中载体包含胺残基, 和一种螯合试剂, 如 DTPA, 形成了 DTPA-肽-阿霉素复合物, 其中 DTPA 形成前靶向定位 bsAb 的识别部分。优选的, 所述载体包含酪氨酸-赖氨酸二肽, 如 Tyr-Lys (DTPA)-NH₂, 更优选地, 载体包含 Lys (DTPA)-Tyr-Lys (DTPA)-NH₂。阿霉素苯基脒缀合到含双 DPTA 的肽上, 这从治疗角度来说尤为理想。

15 氮甲碟呤也有可利用的氨基, 能够偶联到含有活化的羧酸酯的聚合物上, 偶联方式与阿霉素类似。另外, 它还有两个谷氨酰胺基 (α 和 β), 其也能够被活化, 并偶联到含氨基的聚合物上。氮甲碟呤的游离羧酸酯基团也能在原位 (EDC) 被活化, 活化的药物与含氨基的聚合物混合时, 能够通过酰胺键直接将药物连接到聚合物的侧链上。使用体积排阻层析或离子交换层析, 可以很容易地将过量的未反应的或非交联反应的药物从聚合物-药物复合物中分离出去。

20 Maytansinoids 和 calicheamicins (如 esperamycin) 含有双-和三硫醚键, 能够被切割为具有单个硫醇基团的成分, 以便能够用于下面的化学操作。Thiomaytensinoid 或 thioespera-mycin 首先与交联试剂如顺丁烯二酰亚胺-肽反应, 其中的肽对肽酶的切割敏感。随后肽的 C-末端被活化, 并偶联到含氨基的聚合物上, 如聚赖氨酸。

在另外的实施方式中, 双特异性抗体将治疗或药物前体聚合物和放射性核素一起介导到体内的靶上, 由此将化疗和放射性免疫治疗结合在一起。其中所述每种治疗剂可以缀合到同一靶向构建体上, 同时施用, 或者将核素缀合到第一靶向构建体上, 药物缀合到第二靶向构建体上, 分别施用。在其中一个简单的实例中, 构建了包含一个药物前体和一个核素的肽。例如, 三肽 Ac-Glu-Gly-Lys-NH₂ 可以用作靶向

构建体的载体部分，SN-38 连接到该部分的 γ -谷氨酰羧基上形成芳基酯，螯合物 DOTA 连接到第五个氨基上形成酰胺，从而生成了复合物 Ac-Glu(SN-38)-Gly-Lys(DOTA)-NH₂。随后根据成像或治疗的需要，应用不同的金属对 DOTA 螯合物进行放射性标记，放射性金属包括 In-111、Y-90、Sm-153、Lu-177、和 Zr-89。当金属-DOTA 复合物在靶向构建体中作为可识别半抗原时，对于金属 DOTA 复合物来说，需要所使用的次级识别抗体对该金属 DOTA 复合物具有非常高的亲和力。一般来说，亲和力 ($\log K_a$) 应在 6-11 之间。聚合肽，如聚[Glu(SN-38)₁₀-Lys(Y-90-DOTA)₂]，与所述低分子量肽一样容易制备，本发明优选聚合肽。另外，可以使用三重取代的聚合物，如聚[Glu(SN-38)₁₀-Lys(Y-90-DOTA)_n(组胺-琥珀酸酯)_m，其中 n 和 m 是整数，从而使识别试剂独立于放射免疫治疗剂。存在于肿瘤位点的羧酸酯酶将药物前体活化，或通过第二靶向构建体而靶向定位于肿瘤位点的羧酸酯酶将药物前体活化。

15 可选择的，在不同的步骤中，分别施用化疗和放射免疫治疗剂，进行联合治疗。例如，首先给表达 CEA-肿瘤患者施用一种 bsAb，其中的 bsAb 具有至少一个特异性结合 CEA 的臂和至少另外一个特异性结合靶向构建体的臂，其中所述靶向构建体的半抗原是一种钆-DOTA 缀合物。然后，使用包含钆-DOTA- β -葡糖苷酸酶缀合物的靶向构建体对患者进行治疗。在足够使 bsAb 和酶实现定位并从正常组织中清除的一段时间以后，给予患者第二靶向构建体，该第二靶向构建体包含 Ac-Glu(SN-38)-Gly-Lys(Y-90-DOTA)-NH₂。该第二靶向构建体依靠在肿瘤部位上还没有与第一靶向构建体结合的 bsAb 的介导，定位于肿瘤。定位于靶位点的第一靶向构建体作用于 Ac-Glu(SN-38)-Gly-Lys(Y-90-DOTA)-NH₂，释放出游离的 SN-38 药物。通过使用没有底物限制的酶，将药物前体和它们各自的酶一起定位于靶位点，大大提高了活性药物的产量。该实例与现有的药物前体方案相比，具有显著的进步。

25 在随后的步骤中，也就是在施用了作为所给予的靶向构建体一部分的核素之后，再施用药物前体-聚合物的另外一个优点是，使放射治疗和药物治疗协同作用，从而使疗效最大化。猜测经过 RAIT 的放射性治疗后，由于照射损伤，肿瘤变得更加容易“渗漏”。这可使聚合物-药物前体更完全并更深入进入肿瘤。

5 可选择的, RAIT 治疗剂可以连接到 bsAb 上, 而不是连接到靶向构建体上。例如, 首先给 CEA 表达肿瘤患者施用一种抗-CEA x 抗-DTPA 的 bsAb, 其中 bsAb 上缀合了 Y-90-DOTA。在该例子中, 优点是可以选择特定的抗-螯合物 mAbs, 其中的抗-铟-DTPA 抗体不会结合到钷-DOTA 螯合物上。在 Y-90-DOTA-抗-CEA x 抗-铟-DTPA 在肿瘤中达到最大浓度, 并充分地非靶组织清除之后, 注射铟-DTPA-葡萄糖苷酸酶缀合物, 使之特异性定位于 CEA 肿瘤位点。然后给患者注射聚合物-药物前体, 如聚(Glu)(SN-38)₁₀。后者在肿瘤位点被选择性切割为活性单体 SN-38, 从而成功联合了化疗和先前施用的 RAIT 疗法。

10 还应当注意到, 在本发明方法中可以使用如下的双特异性抗体或抗体片段, 其具有至少一个特异性结合靶位点抗原的结合位点, 和至少另外一个特异性结合抗体-酶复合物中酶部分的结合位点。可以在注射前使所述抗体与酶结合, 该过程不需要将酶共价缀合到抗体上, 或者首先注射所述抗体, 并使之定位于靶位点, 并在没有靶向定位的抗体基本上从哺乳动物的循环系统中清除出去之后, 再注射酶, 注射量
15 和注射途径应当能够使足够量的酶到达已定位的抗体或抗体片段, 并在原位与之结合形成抗体-酶复合物。

还应当注意到, 本发明还成功使用了多价靶结合蛋白, 其具有至少三个不同的靶结合位点, 如同专利申请系列号 60220782 中描述的一
20 样。通过化学接头将几个 Fab 样片段交联在一起, 即可获得多价靶结合蛋白。参见美国专利号 5262524、5091542 和 Landsdorp 等, Euro. J. Immunol. 16: 679-83 (1986)。多价靶结合蛋白还可以通过如下方法制备, 将几个单链 Fv 分子(scFv)共价连接, 从而形成一条多肽。参见美国专利号 5892021。美国专利号 6025165 和 5837242 中描述了一
25 种由 scFv 分子聚合形成的多价靶结合蛋白。Krott 等, Protein Engineering. 10(4): 423-433 (1997) 描述了一种包含三个 scFv 分子的三价靶结合蛋白。

在使用 bsAb 和靶向构建体之间, 可以使用一种清除试剂。本发明发现, 本发明可以使用一种具有独特作用机制的清除试剂, 即糖基化的抗-独特型 Fab' 片段, 其靶向抗 bsAb 的病灶靶向臂。给予抗-
30 CEA(MN-14Ab) x 抗-肽 bsAb, 使之最大程度地定位于病灶靶位。给予一种命名为 WI2 的 MN-14 的抗独特型 Ab, 来清除残留的 bsAb, 优选使

用糖基化形式的 Fab' 片段。清除试剂以单价形式与 bsAb 结合，所附加的糖基将整个复合物介导到肝脏，在这里进行快速的新陈代谢。然后给受试者施用与靶向构建体连在一起的治疗或诊断剂。所述 WI2 Ab 与 bsAb 的 MN-14 臂具有非常高的亲和力，并且清除机制与其它已经公开的机制不同（参见 Goodwin 等，ibid），该机制不涉及交联，因为 WI2-Fab' 是单价的。

根据本发明的另一个方面，本发明提供了一种适用于治疗或鉴定患者病灶组织的试剂盒，其包含一种双特异性抗体或抗体片段，其中所述抗体或抗体片段具有至少一个特异性结合靶组织的臂，和至少另外一个特异性结合靶向构建体的臂，以及一种包含载体部分的第一靶向构建体，其中载体部分包含或携带至少一个可被双特异性抗体或抗体片段的至少一个臂识别的表位、和一个或多个缀合的治疗或诊断剂、或酶，试剂盒还可选择地包含一种清除组合物，其用于清除没有定位的抗体和抗体片段。该试剂盒还可选择性地包含一种药物前体，当第一靶向构建体包含能够在靶位点将药物前体转化为药物的酶、或包含能够将解毒的药物中间体重新转化为毒性形式并因此提高药物在靶位点的毒性的酶、或包含能够在患者体内由自然过程活化并通过转化为低毒性中间体而解毒的药物前体从解毒的中间体重新转化为毒性形式，并由此提高药物在靶位点的毒性的酶。还可使用一种包含载体部分的第二靶向构建体，其中载体部分包含或携带至少一个可被双特异性抗体或抗体片段的至少另外一个臂识别的表位，和一种药物前体，当酶能够在靶位点将药物前体转化为药物的情况下，试剂盒还可包括能够促进鉴定或治疗病灶组织的仪器，例如可包括，但不限于应用装置，如注射器。试剂盒还可包括使用本发明进行鉴定或治疗病灶组织时所需的溶液。

靶向构建体可以静脉内、动脉内、手术过程中、内窥镜、腹膜内、肌肉、皮下、胸膜内、鞘内施用，经过导管灌注、或病灶内直接注射，可以连续灌输、或通过单或多造影剂团施用，或经过其它本领域技术人员已知的用于诊断（检测）和治疗病灶组织的方法。此外，所述靶向构建体可以包括在其它检测和治理病灶组织的方法中所使用的试剂，包括但不限于，将右旋糖苷或脂质体缀合到靶向构建体上用于超声，或将其它对照试剂缀合到靶向构建体上用于其它的成像形式，如

上面已经描述过的 X-射线、CT、PET、SPECT 和超声。

VI. 生成抗体的方法

可以使用公知的生产抗体的方法来生产肽骨架和/或半抗原的抗体 (Abs)。例如, 给免疫活性动物注射悬浮在弗氏完全佐剂中的免疫原, 如 (肽)_n-KLH, 其中 KLH 是匙孔血蓝蛋白, n = 1 - 30, 然后再连续两次注射悬浮在不完全弗氏佐剂中的同样的免疫原静脉抗原加强后三天收集脾细胞。然后将收集的脾细胞与 Sp2/0-Ag14 骨髓瘤细胞融合, 培养所得克隆的上清液, 其中克隆已经进行了直接-结合 ELISA 法抗-肽反应分析。使用最初的免疫原的肽片段分析所产生的 Abs 的特异性。这些肽片段可以使用肽自动合成仪来制备。对于制备 Ab, 分离酶-缺陷型杂交瘤, 以便能够进行融合细胞系的选择。这项技术还可被用于制备抗一种或多种螯合物的抗体, 如 In(III)-DTPA 螯合物。抗 In(III)-di-DTPA 的单克隆小鼠抗体是已知的 (Barbet '395 supra)。

本发明所使用的抗体对多种细胞表面或细胞内肿瘤相关抗原具有特异性, 所述抗原可以用作标记物。这些标记可以是肿瘤产生的物质, 或可以是在肿瘤位点富集的物质, 其存在于肿瘤细胞的表面或存在于肿瘤细胞内, 可能存在于细胞质内、细胞核内、或各种细胞器或亚细胞结构内。所述肿瘤相关标记公开在下列文献中, Herberman, "Immunodiagnosis of Cancer", in Fleisher ed., "The Clinical Biochemistry of Cancer" 347 页 (American Association of Clinical Chemists, 1979) 和美国专利号 4,150,149、4,361,544、和 4,444,744。还可参见如下的美国专利, Thorpe 等的 5,965,132、Thorpe 等的 6,004,554、Epstein 等的 6,071,491、Epstein 等的 6,017,514、Epstein 等的 5,882,626、Epstein 等的 5,019,368、和 Thorpe 等的 6,342,221, 所有所述文献在此引作参考。

在以前的文献中, Herberman 将肿瘤相关标记分成几类, 包括癌胚抗原类、胎盘抗原类、致癌或肿瘤病毒相关抗原、组织相关抗原、器官相关抗原、异常激素和正常抗原或其变种。偶尔情况下, 使用肿瘤相关标记的亚基生产的抗体具有更高的肿瘤特异性, 如绒毛膜促性腺激素 (HCG) 的 β -亚基或癌胚抗原 (CEA) 的 γ 区, 由其产生的抗体大大降低了与非肿瘤物质的交叉反应, 参见美国专利号 4,361,644 和 4,444,744。肿瘤脉管标记 (如 VEGF)、肿瘤坏死 (Epstein 的专利)

标记、膜受体标记(如二氢叶酸受体, EGFR)、跨膜抗原标记(如 PSMA)和致癌基因产物标记都可用作抗体或抗体片段的肿瘤相关的合适的靶位。正常细胞的标记, 如果其在肿瘤细胞中表达很丰富, 如 B-细胞复合体抗原(如 CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、和恶性 B-细胞上的 HLA-DR)、还有特定肿瘤细胞表达的细胞因子(如恶性 T-细胞上的 IL-2 受体), 也适合作本发明抗体和抗体片段的靶位。其它公知的可用作本发明抗体和抗体片段靶位的肿瘤相关抗原包括, 但不限于, CEA、CSAp、TAG-72、MUC-1、MUC-2、MUC-3、MUC-4、EGP-1、EGP-2、BrE3、PAM-4、KC-4、A3、KS-1、PSMA、PSA、粘多糖、T101、S100、MAGE、HLA-DR、CD19、CD20、CD22、CD30、和 CD74。

另外的令人感兴趣的标记是跨膜激活剂和 CAML-相互作用剂(TACI)。参见 Yu 等, Nat. Immunol. 1: 252-256 (2000)。简单的说, TACI 是一种恶性 B-细胞的标记(如淋巴瘤)。此外, 已知 TACI 和 B-细胞成熟抗原(BCMA)通过类似于一种增殖-诱导配体(APRIL)的肿瘤坏死因子而结合在一起。APRIL 在体外能够刺激初级 B 细胞和 T 细胞的增殖, 并能够在体内导致 B-细胞的积累, 从而使脾的重量增加。APRIL 还与 TALL-I (还称作 BlyS 或 BAFF) 竞争受体结合位点。尤其是可溶的 BCMA 和 TACI 特异防止 APRIL 的结合, 并能够阻断初级 B-细胞的 APRIL-刺激的增殖。在小鼠中, BCMA-Fc 也能够抑制抗匙孔血蓝蛋白和抗肺炎泛克的抗体的产生, 这表明 APRIL 和/或 TALL-I 由经 BCMA 和/或 TACI 发出信号对于产生体液免疫是必须的。因此, APRIL-TALL-I 和 BCMA-TACI 共同形成了一种两配体-两受体、涉及激发 B、T 细胞功能的途径。

在生成对免疫原的初级抗体后, 可以对抗体进行测序, 并随后应用重组技术来制备。小鼠抗体和抗体片段的人源化和嵌合化, 对本领域技术人员来说是公知的。例如, 人源化单克隆抗体可以由如下过程来制备, 将小鼠免疫球蛋白的轻链和重链可变区的互补决定区转导到人的可变区域, 然后, 用人的残基替换小鼠对应物的框架区。使用来自人源化单克隆抗体的抗体可以避免潜在的问题, 该问题涉及鼠恒定区的免疫原性。现有技术已经记载了克隆小鼠免疫球蛋白可变区的常用技术, 例如 Orlandi 等, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86: 3833 (1989), 在此全文引作参考。现有技术中也记载了生产人源化

Mabs 的技术, 例如, Jones 等 *Nature* 321: 522 (1986), Riechmann 等, *Nature* 332: 321 (1988), Verhoeyen 等, *Science* 239: 1534 (1988), Verhoeyen 等 *Science* 239: 1534 (1988), Carter 等, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 89: 4285 (1992), Sandhu, *Crit. Rev. Biotech.* 12: 437 (1992), 和 Singer 等, *J. Immun.* 150: 2844 (1993), 所述所有文献在此引作参考。

可选择地, 可从转基因非人动物中获得完整的人抗体。参见如 Mendez 等, *Nature Genetics*, 15: 146-156 (1997)、美国专利号 5633425。例如, 从含有人免疫球蛋白转座子的转基因小鼠中回收人抗体。通过抑制小鼠内源免疫球蛋白基因, 并将人免疫球蛋白转座子转导到小鼠, 从而使小鼠的体液免疫系统人源化。人免疫球蛋白转座子非常复杂, 含有大量的离散片段, 其总量几乎占到人类基因组总量的 0.2%。为了确保转基因小鼠能够生产出完整功能的抗体, 必须将人类重链和轻链转座子的绝大部分区域转导到小鼠基因组中。所述目的是通过如下的方法逐步完成的, 首先形成酵母人工染色体 (YACs), 其在种系构造中既包含人类重链免疫球蛋白转座子, 还包含人类轻链免疫球蛋白转座子。因为每个插入片段大小都在 1Mb 左右, 因此构建 YAC 时需要免疫球蛋白转座子的重叠片段进行同源重组。获得两个 YACs, 其中一个包含重链转座子, 另一个包含轻链转座子, 通过将包含酵母球芽的 YAC 与小鼠胚胎干细胞融合的方法, 将两个 YACs 分别转导到小鼠。然后将胚胎干细胞克隆显微注射到小鼠的胚泡。根据胚系传递 YAC 的能力, 筛选得到嵌合雄性鼠, 然后将嵌合雄性小鼠与小鼠抗体缺陷型的鼠进行杂交。将两个转基因胚系进行杂交, 其中之一包含人类重链转座子, 另一个包含人类轻链转座子, 经过杂交产生了能够在免疫诱导下产生人类抗体的后代。

通过微细胞介导染色体传递 (MMCT) 的方法, 也能将未重排的人类免疫球蛋白基因转导到小鼠胚胎干细胞。参见如 Tomizuka 等, *Nature Genetics*, 16: 133 (1997)。在该方法中, 将包含人类染色体的微型细胞与小鼠胚胎干细胞融合。在后代中稳定保留了所传递的染色体, 并且成年嵌合体表现出了适当的组织特异性表达。

可选择的, 本发明的抗体或抗体片段可以衍生自从免疫球蛋白组合文库中分离的人类抗体片段。参见如 Barbas 等, *METHODS: A*

Companion to Methods in Enzymology 2:119 (1991), 和 Winter 等, Rev. Immunol. 12: 433 (1994), 所述文献在此引作参考。在通过 B-细胞永生生化生产单克隆抗体方面, 所存在的一些难题可以通过使用噬菌体展示在 *E. coli* 中构建和表达抗体片段的方法来加以克服。为了确保能够回收到亲和力高的单克隆抗体, 所使用的组合免疫球蛋白文库必须有较大的库容量。所使用的一个典型的策略是, 从免疫小鼠的淋巴细胞或脾细胞获得 mRNA, 然后使用反转录酶合成 cDNA。通过 PCR 分别扩增重链基因和轻链基因, 并连接到噬菌体克隆载体。从而构建了两个不同的基因文库, 其中之一包含重链基因, 另一个包含轻链基因。从每个文库中分离噬菌体 DNA, 将重链基因和轻链基因连接在一起, 并经包装形成一个组合基因文库。其中的每个噬菌体均包含重链和轻链 cDNAs 的随机组合对, 并在转染 *E. coli* 后, 使转染细胞表达抗体链。为了鉴定识别预定抗原的抗体, 将噬菌体文库进行涂板处理, 从而将空斑中的抗体分子转移到滤膜。将滤膜与放射性标记的抗原一起温育, 然后洗去过量的未结合的配体。经放射自显影, 出现放射斑点的空斑即包含了与抗原结合的抗体。可以获得用于生产人类免疫球蛋白质粒文库的克隆和表达载体, 例如, 可从 STRATAGENE 克隆系统中获得所述克隆和表达载体 (La Jolla, CA)。

还有一个方法也可以用于获得高亲和力的 scFv。参见如 Vaughn 等, Nat. Biotechnol., 14: 309-314 (1996)。使用对应于所有已知 V_H 、 V_L 和 V_λ 基因家族的 PCR 引物, 从非免疫的人类供体中分离 V-基因, 从而构建具有较大容量的 scFv 基因文库。在扩增后, 将 V_L 和 V_λ 库合并在一起组成一个库。将这些片段连接到噬菌粒载体上。然后将 scFv 接头连接到噬菌粒 V_L 片段的上游。将 V_H 和接头- V_L 片段扩增, 并装配到 J_H 区域。将得到的 V_H -接头- V_L 片段连接到噬菌粒载体。如同上面所描述的, 可以使用滤膜、或免疫管 (Nunc; Maxisorp) 对噬菌粒文库进行淘选。从而得到类似于上面的结果, 即从免疫兔的淋巴细胞或脾细胞构建组合免疫球蛋白文库, 并在毕赤酵母中表达。参见如 Ridder 等, Biotechnology, 13: 155-260 (1995)。另外, 在分离得到合适的 scFv 以后, 可以通过亲和力成熟过程, 如 CDR3 变异, 和链改组过程使抗体片段具有更高的结合亲和力和更低的解离速度。参见如 Jackson 等, Br. J. Cancer, 78: 181-188 (1998); Osbourn 等,

Immunotechnology, 2: 181-196 (1996)。

另外一种形式的抗体片段是编码单个 CDR 的肽。通过构建编码预期抗体的 CDR 的基因来获得 CDR 肽 (“最小识别单元”)。例如, 该基因可以通过如下方法制备, 即使用聚合酶链式反应从抗体-生产细胞的 RNA 合成可变区。参见如 Larrick 等, Methods: A Companion to Methods in Enzymology 2: 106 (1991); Courtenay-Luck, "Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies, "in MONOCLONAL ANTIBODIES: PRODUCTION, ENGINEERING AND CLINICAL APPLICATION, Ritter 等 (eds.), 166-179 页 (Cambridge University Press 1995); 和 Ward 等, "Genetic Manipulation and Expression of Antibodies, "in MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND APPLICATIONS, Birch 等, (eds.), 137-185 页 (Wiley-Liss, Inc. 1995)。

可以通过已知的技术制备 bsAbs, 例如, 分别用胃蛋白酶消化抗-CEA 肿瘤 Ab 和抗-肽 Ab, 形成它们各自的 $F(ab')_2$ 。用半胱氨酸还原抗-CEA- $Ab-F(ab')_2$, 生成 Fab' 单体单元, 进一步将其与交联剂双(顺丁烯二酰亚胺基)正丁烷反应, 生成 Fab'-顺丁烯二酰亚胺部分。用半胱氨酸还原抗肽 $Ab-F(ab')_2$, 经纯化回收的抗肽-Fab'-SH 与抗-CEA-Fab'-顺丁烯二酰亚胺反应, 生成 Fab' x Fab' 双特异性的 Ab。可选择的, 抗肽 Fab'-SH 片段可以与抗-CEA $F(ab')_2$ 偶联, 生成一种 $F(ab')_2$ x Fab' 构建体、或与抗-CEA IgG 偶联生成一种 IgG x Fab' 双特异性构建体。在其中一个实例中, 所述 IgG x Fab' 构建体通过如下的位点-特异性方法来制备, 即将抗肽 Fab' 的硫醇基团与抗-CEA IgG 重链上的碳水化合物相连接, 其中的碳水化合物已经用高碘酸盐氧化, 之后通过与商业可获得的胍-顺丁烯二酰亚胺交联剂反应而使之活化。其中所使用的 Ab 可以通过公知的技术进行嵌合化或人源化。嵌合抗体是这样一种重组蛋白, 其包含来自啮齿类动物抗体的可变区和互补决定区, 同时抗体分子的其它部分来自人类抗体。人源化抗体是这样一种重组蛋白, 其中鼠单克隆抗体的互补决定区已经进行了从鼠免疫球蛋白重链和轻链可变区到人类可变区的转变。

生产双特异性抗体和抗体片段可以使用多种重组方法。例如, 可以转基因家畜的奶中生产双特异性抗体和抗体片段。参见如 Colman, A., Biochem. Soc. Symp., 63: 141-147, 1998; 和美国专利

5827690。构建两种 DNA，其中分别含有编码免疫球蛋白重链和轻链对的 DNA 片段。将片段克隆到表达载体，其中表达载体包含一种优选在乳房上皮细胞中表达的启动子序列。这样的例子包括，但不限于，兔、牛、和绵羊酪蛋白基因的启动子，牛 α -乳球蛋白基因的启动子，绵羊 β -乳球蛋白基因的启动子，和鼠乳酸蛋白基因的启动子。优选的，插入片段的 3' 端连接有乳房特异性基因同源基因组序列。从而提供了聚腺苷酸化位点和转录稳定序列。将所述表达组件共同注射到受精原核，即哺乳动物的受精卵，然后将其植入雌性受体的子宫，使之发育。出生之后，用 Southern 分析方法筛选含有两种转基因的后代。为了形成本发明的抗体，在同一细胞中必须同时表达重链和轻链两种基因。使用本领域公知的标准免疫分析方法分析雌性转基因动物的奶，鉴定其是否含有预期的功能性抗体和抗体片段。可以使用本领域已知的标准方法纯化奶中的抗体。

将编码小鼠轻链和重链可变区的 cDNA 片段与编码人类抗体 C 区的片段相连接，从而构建了一种嵌合的 Ab。因为 C 区不能结合抗原，所以所述嵌合抗体不仅保留了与原来的小鼠 Ab 相同的抗原特异性，而且在序列上更加接近人类抗体。嵌合 Ab 仍然含有一部分小鼠的序列，它仍然具有免疫原性。人源化的 Ab 包含那些抗原识别必需的小鼠氨基酸。通过将来自鼠互补决定区的氨基酸构建到人类抗体框架中，来构建所述产物。

其它的生产 bsAbs 的方法中包括工程化重组 Abs，其含有附加的半胱氨酸残基，从而比一般的免疫球蛋白型交联得更加牢固。参见如 FitzGerald 等，Protein Eng. 10(10):1221-1225, 1997。另外一个进展是将两个或多个不同的具有所需双特异性的单链抗体或抗体片段连在一起形成工程化重组融合蛋白。参见如 Coloma 等，Nature Biotech. 15:159-163, 1997。使用分子工程技术可以得到多种双特异性融合蛋白。其中的一种形式，双特异性融合蛋白是单价体，其组成例如，由 scFv 和 Fab 组成，其中 scFv 有第一抗原结合位点，Fab 片段有第二抗原结合位点。双特异性融合蛋白的另外一种形式是二价体，其组成如，带有两个第一抗原结合位点的 IgG，和带有两个第二抗原结合位点的两个 scFv。

应用重组技术也能在哺乳动物细胞中生产功能性双特异性单链抗

体 (bscAb), 也被称作双抗体 (diabodies)。参见如 Mack 等, Proc. Acad. Sci., 92: 7021-7025, 1995。例如, 应用重组方法将两条单链 Fv 片段通过甘氨酸-丝氨酸接头连接到一起, 应用标准 PCR 方法分离所需的两个抗体的 V_L 轻链 (V_L) 和 V_H 重链 (V_H) 区。分别从 V_L、V_H 各自的杂交瘤中获取 V_L 和 V_H 的 cDNA, 然后将其结合在一起形成单链片段, 该过程使用了两步法融合 PCR 技术。第一步的 PCR 是导入 (Gly₄-Ser₁)₃ 接头 (SEQ ID NO: 9), 第二步 PCR 是连接 VL 和 VH 扩增子。然后, 将每个单链分子克隆到细菌表达载体。在扩增之后, 切除其中一条单链分子, 将其亚克隆到另外一个载体, 该载体包含第二

5 条单链分子。所得到的 bscAb 片段亚克隆到真核表达载体。将该载体转导到中国仓鼠卵巢细胞, 使其表达所述功能性蛋白。双特异性融合蛋白也可以以类似的方法进行制备。双特异性单链抗体和双特异性融合蛋白均包括在本发明范围内。

10 连接了两个或多个不同单链抗体或抗体片段的双特异性融合蛋白也可以类似的方法来生产。

可以应用重组技术来生产多种融合蛋白。例如, 利用重组技术能够生产包含来自人源化单克隆抗-CEA 抗体的 Fab 片段和来自鼠抗-diDTPA 的 scFv 片段的融合蛋白。一种可变接头, 如 GGGS (SEQ ID NO: 10), 将 scFv 连接到抗-CEA 抗体的重链恒定区。可选择的, scFv 也可以连接到 hMN-14 的轻链恒定区。通过 PCR 反应将适合连接 Fd 重链和 scFv 的接头序列导入 V_L 和 V_H 区。然后, 将编码 scFv 的 DNA 片段连接到包含编码 C_H1 区 DNA 序列的阶段性的 (Staging) 载体上。切除 scFv-C_H1 构建体, 并将其连接到包含编码抗-CEA 抗体 V_H 区 DNA 序列的载体上。使用所得到的载体转染哺乳动物细胞, 使其表达双特异性融合蛋白。

20 25

使用埃希氏大肠杆菌表达系统能够大量生产 bscAb 和融合蛋白。参见如 Zhenping 等, Biotechnology, 14: 192-196, 1996。两个“交叉-重叠” scFv 片段在 E. coli 中共表达, 可以生成功能性 bscAb, 所谓交叉重叠是指, 两个片段的 V_L 和 V_H 区分别位于不同的多肽链上。应用标准 PCR 技术可以分离两个抗体的 V_L 轻链 (V_L) 区和 V_H 重链 (V_H) 区。然后将其 cDNA 连接到细菌表达载体上, 其中第一抗体 V_L 区的 C-末端通过接头连接到第二抗体 V_H 区的 N-末端。相对应的, 第二抗体 V_L 区的

30

C-末端通过接头连接到第一抗体 V_H 区的 N-末端。使用一种强启动子对所得到的双顺反子操纵子进行转录调控，可以使用的强启动子如埃希氏大肠杆菌碱性磷酸酯酶启动子，该启动子可以使用磷酸盐饥饿法进行诱导。可选择的，使用 lac 启动子和一种由 2% 甘氨酸和 1% Triton X-100 组成的培养基，也能在 *E. coli* 中有效表达单链融合构建体。参见如 Yang 等, *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 2869-2874, 1998。使用一种大肠杆菌热稳定性肠毒素 II 信号序列将所述肽介导到周质腔。在完成分泌后，将两种肽连接形成非共价异源二聚体，其具有两种抗原结合特异性。应用本领域已知的标准方法对 bscAb 进行纯化，如葡萄球菌蛋白 A 层析。

还可以在转基因家畜的奶中生产功能性 bscAb 和融合蛋白。参见如 Colman, A., *Biochem. Soc. Symp.*, 63: 141-147, 1998; 美国专利号 5827690。使用所述方法获得 bscAb 片段，将其克隆到表达载体，该表达载体含有优选在乳房上皮细胞中表达的启动子序列。这样的例子包括，但不限于，兔、牛、和绵羊酪蛋白基因的启动子，牛 α -乳球蛋白基因的启动子，绵羊 β -乳球蛋白基因的启动子，和鼠乳酸蛋白基因的启动子。优选的，所插入的 bscAb 的 3' 端侧接有乳房特异性基因同源基因组序列。从而提供了聚腺苷酸化位点和转录稳定序列。将所述表达组件共同注射到受精原核，即哺乳动物的受精卵，然后将其植入雌性受体的子宫，使之发育。出生之后，用 Southern 分析方法筛选含有转导 DNA 的后代。使用本领域公知的标准免疫分析方法分析雌性转基因动物的奶，鉴定其是否含有预期的功能性 bscAb。可以使用本领域已知的标准方法纯化奶中的 bscAb。在奶中生产转基因产品 bscAb 是一种有效的方法，能够获得大量的 bscAb。

还可以在转基因植物中生产本发明功能性的 bscAb 和融合蛋白。参见如 Fiedler 等, *Biotech.*, 13: 1090-1093, 1995; Fiedler 等, *Immunotechnology*, 3: 205-216, 1997。所述形式的产品有几个优点，包括低成本、大规模生产和能够稳定、长期的储存。使用所述方法获得 bscAb 片段，将其克隆到表达载体，该载体包含启动子序列和编码能够将蛋白介导到内质网的信号肽的序列。有多种启动子可供使用，只要它能使信号肽将表达产物介导到植物的特定部位。例如，使用花椰菜花叶病毒强启动子 35S，可以使蛋白在烟草植株的各个部位表达，

使用种子特异性豆球蛋白 B4 启动子可以使蛋白在特定的组织中表达。根据本领域已知的标准方法转化表达组件。使用 Southern 分析方法鉴定转化子。使用本领域已知的标准免疫分析方法分析转基因植株中是否含有具有功能的 bscAb。可以使用本领域已知的标准方法从植物组织中纯化 bscAb。

另外，转基因植物能够长期储存 bscAb 和融合蛋白。已经从室温条件下储存一周的烟草叶子中，提取出了功能活性的 scFv 蛋白。类似的，室温储存一年的转基因烟草种子同样没有丧失 scFv 蛋白或其抗原结合活性。

还可以在昆虫细胞中生产本发明功能性 bscAb 和融合蛋白。参见如 Mahiouz 等, *J. Immunol. Methods*, 212; 149 - 160 (1998)。基于昆虫的表达系统能够大量生产均质和折叠正确的 bscAb。杆状病毒广泛用作昆虫细胞的表达载体，并且已经成功用其重组了抗体分子。参见如 Miller, L. K, *Ann. Rev. Microbiol.*, 42:177 (1998); Bei 等, *J. Immunol. Methods*, 186: 245 (1995)。可选择的，可以使用一种诱导表达体系，其中所生成的稳定昆虫细胞系中包含 bscAb 构建体，该构建体受诱导启动子的转录调控。参见如 Mahiouz 等, *J. Immunol. Methods*, 212; 149 - 160 (1998)。根据所述方法获得 bscAb 片段，将其克隆到含有果蝇金属硫蛋白启动子和人类 HLA-A2 前导序列的表达载体中。然后将构建体转染到 *D. melanogaster* SC-2 细胞。通过提高细胞周围的铜、锌或镉的含量来诱导表达。使用本领域已知的标准免疫方法来检测是否含有具有功能的 bscAb。同样使用本领域已知的标准技术纯化 bscAb。

本发明所优选的双特异性抗体是整合了 Mab Mu-9 的 Fv 与 Mab 679 的 Fv 的抗体、和整合了 MAB MN-14 的 Fv 与 Mab 679 的 Fv 的抗体、以及它们的人类的、嵌合的或人源化的对应物。美国专利 5874540 公开了所述 MN-14 以及它的嵌合的和人源化的对应物。还优选整合一个或多个 Mu-9 或 679 的 CDRs 的抗体。抗体可以是一种整合了 III-类抗-CEA 抗体和 679 的 Fv 的融合蛋白或双特异性抗体。美国专利 4818709 详细记载了包括 III-类抗-CEA 抗体在内的 III-类抗体。

VII. 其它用途

本发明囊括了 bsAb 和与所述靶向构建体连接在一起的治疗或诊断

剂在手术中、血管内和内窥镜肿瘤和损伤检测、活检和治疗方面的用途，所述内容在美国专利 6096289 中也有所记载。

5 本发明的抗体和抗体片段不仅能够用于治疗或成像目的，而且能够在体外进行辅助研究。例如，可以在体外使用本发明的 bsAbs 来探知一种靶向构建体是否能够与一种或多种 bsAbs 形成稳定的复合物。这样的分析能够帮助本领域技术人员确定能够与 bsAbs 形成稳定复合物的靶向构建体。反过来讲，这也有助于本领域技术人员确定有可能用作治疗和/或成像剂的靶向构建体。

10 所述分析通过如下方法进行，将未确知的靶向构建体与至少两摩尔当量的 bsAb 混合。温育后，使用体积排阻 HPLC 分析混合物，来检测靶向构建体是否与 bsAb 发生了结合。可选择的，也可以使用标准组合方法进行分析，其中将含有多种 bsAbs 的溶液点在标准 96 孔板上。在每个孔中加入靶向构建体溶液。温育后进行分析，可以很容易地确定那个构建体与所述 bsAb(s) 结合得最好。

15 应当理解在所述分析中，bsAb 和靶向构建体的加入顺序不是至关重要的；即，可以将 bsAb 加入构建体中，反之亦然。同样的，bsAb 和靶向构建体也不用必须是溶液形式；即，它们在加入时可以是溶液形式，也可以不是溶液形式，无论那种形式只要是最方便的形式即可。最后，用于分析是否结合的方法也是无关紧要的，只要该方法能够确定是否发生了结合。因此，人们可以使用如下的标准分析方法，包括但不限于 FABMS、高-区域 NMR 或其它合适的方法，对是否结合进行分析，所述方法可以与排阻 HPLC 联合使用，也可以替代排阻 HPLC 方法使用。

25 下面通过如下的实施例对本发明进行详细说明，本发明不受如下实施例任何形式的限制。

实施例

实施例 1) 合成 Ac-Lys (HSG)-D-Tyr-Lys (HSG)-Lys (Tscg-Cys-)-NH₂ (IMP243)

30 使用 Karacay 等 Bioconjugate Chem. 11: 842-854 (2000) 所描述的方法合成所述肽，与文献不同之处在于用 D-酪氨酸代替了 L-酪氨酸，用 N-三苯甲基-HSG-OH 代替了 DTPA。在进行 N-三苯甲基-HSG-OH 的最终偶联时，所使用的 N-三苯甲基-HSG-OH 的量十倍于树脂上肽的

量。使用一个当量的(相对于 HSG) N-羟基苯并三唑、一个当量的苯并三唑-1-基-氧基-三-(二甲氨基)磷六氟磷酸盐(BOP)和两个当量的二异丙基乙胺对 N-三苯甲基-HSG-OH(NMP 中为 0.28M)进行活化。将活化底物与树脂混合,室温下持续 15 小时。

5 实施例 2) 包含 IMP 243 的 Tc-99m 试剂盒

制备一种配方缓冲液,其含有 22.093g 的羟基丙基-β-环糊精、0.45g 的 2,4-二羟基苯甲酸、0.257g 的醋酸钠盐、和 10.889g 的 α-D-葡庚糖酸钠盐,所述成分溶解在 170mL 脱氨水中。用几滴 1M 的氢氧化钠将溶液的 pH 值调到 5.3,然后稀释到总量 220mL。0.2mL
10 SnCl₂(200mg/mL)用 3.8mL 配方缓冲液进行稀释,制得含二价锡的缓冲溶液。将肽 Ac-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH₂(SEQ ID NO: 4)(0.0026g)溶解于 78mL 的缓冲溶液中,并与 0.52mL 二价锡缓冲液混合。然后将肽溶液过滤,使用的是 0.22μm 的 Millex GV 滤器,取 1.5mL 等分滤液倒入 3mL 冻干瓶。然后立即将冻干瓶冷冻、
15 冻干并在真空下卷曲密封。

在试剂盒中加入 1.5mL 盐水中的高锝酸盐溶液(27mCi)。在室温下温育该试剂盒 10 分钟,并在沸水浴中加热 25 分钟。在使用前将试剂盒冷却到室温。

20 实施例 3) 通过双特异性抗体肿瘤前靶向定位,将治疗/成像放射性同位素携带到肿瘤的肽

合成了 DOTA-Phe-Lys(HSG)-Tyr-Lys(HSG)-NH₂(SEQ ID NO: 2)(IMP 237),其通过双特异性抗体肿瘤前靶向定位,将治疗放射性同位素如 ⁹⁰Y 或 ¹⁷⁷Lu 递送到肿瘤。双特异性抗体由两部分组成,其中一部分与肿瘤上的抗原相结合,另一部分与 HSG 肽相结合。与 HSG 肽相
25 结合的抗体是 679。该系统也可用于递送成像同位素,如 ¹¹¹In-111。

IMP 237 的合成

在 Sieber 酰胺树脂上(Nova-Biochem),使用标准 Fmoc 固相肽合成技术将如下受保护的氨基酸装配成肽骨架,依次是: Fmoc-Lys(Aloc)-OH, Fmoc-Tyr(But)-OH, Fmoc-Lys(Aloc)-OH,
30 Fmoc-Phe-OH(试剂购自 Advanced Chemtech),三-t-丁基 DOTA(大环的)。然后使用 Dangles 等 J. Org. Chem. 52: 4984-4993 (1987) 的方法,用 Pd[P(ph)₃]₄将侧赖氨酸侧链进行去保护。然后加入三苯甲

基 HSG (其合成将在下面加以描述) 形式的 HSG 配体, 使用 BOP/HBTU 双偶联过程使之连接到氨基酸上。用 TFA 进行处理, 从而从树脂上将肽切割下来, 并脱去肽上的保护性基团。利用 HPLC 纯化肽, 从 1.823g Fmoc-Lys (Aloc) -Tyr (But) -Lys (Aloc)-NH-Sieber 酰胺树脂中
5 纯化了 0.6079g 的肽。

N-三苯甲基-HSG-OH 的合成

将甘氨酸-t-丁基盐酸酯 (15.263g, 9.1×10^{-2} mol) 和 19.760g Na_2CO_3 混合, 然后悬浮在 50mL H_2O 中, 并冰浴冷却。然后在反应溶液中加入琥珀酸酐 (9.142g, 9.14×10^{-2} mol), 并使其温度
10 慢慢升至室温, 并搅拌 18 小时。将柠檬酸 (39.911g) 溶解在 50mL H_2O 中, 将其缓缓加入到反应溶液中, 然后用 2 x 150mL EtOAc 进行萃取。将有机萃取物用 Na_2SO_4 干燥、过滤并浓缩, 得到 25.709g 白色固体。

将粗产物 (25.709g) 溶解在 125mL 二氧杂环乙烷中, 在室温水浴中冷却, 然后与 11.244g N-羟基琥珀酰亚胺混合。向反应溶液中加入
15 15.0mL 二异丙基碳二亚胺, 并搅拌一个小时。将二盐酸组胺 (18.402g, 1.00×10^{-1} mol) 溶解在 100 mL DMF 和 35mL 二异丙基乙胺中。将组胺混合物加入反应溶液中, 在室温下搅拌 21 小时。用 100mL 水使反应淬灭, 然后过滤除去沉淀。在高真空的旋转蒸发器中除去溶剂。粗提产物溶解在 300mL 二氯甲烷中, 并用 100mL 饱和 NaHCO_3 萃取。
20 有机层用 Na_2SO_4 干燥、并浓缩, 得到 34.19g 的黄色油状粗提产物。

将粗提产物 (34.19g) 溶解在 50mL 氯仿中, 并与 31mL 二异丙基乙胺混合。将氯化三苯甲基 (25.415g) 溶解在 50mL 氯仿中, 并逐滴加入搅拌着的并在冰浴中冷却着的反应溶液中。搅拌反应 45 分钟, 然后用 100mL 水使反应淬灭。分离有机溶液层, 并经过 Na_2SO_4 干燥、和
25 浓缩, 得到绿色的胶状物。用 100mL Et_2O 捣碎胶状物, 形成黄色的沉淀, 用 3 x 50mL 的 Et_2O 洗涤沉淀物。将固相进行真空干燥, 得到 30.641g (总产量的 59.5%) 的 N-三苯甲基-HSG-t-丁基酯。

将 N-三苯甲基-HSG-t-丁基酯 (20.620g, 3.64×10^{-2} mol) 溶解在由 30mL 氯仿和 35mL 冰醋酸组成的溶液中。在冰浴下进行反应, 并将 15 mL $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ 缓缓加入反应溶液中。使反应液缓慢升至室温, 并混合 5 小时。用 200mL 1M 的 NaOH 灭反应, 并用 200mL 氯仿萃取
30 所得产物。经过 Na_2SO_4 使有机层干燥, 并浓缩, 得到粗提胶状物, 其

中该胶状物用 100mL Et₂O 研制，形成沉淀。将粗提沉淀倒入 400mL 0.5 M pH 7.5 的磷酸盐缓冲液中，并用 2 x 200mL EtOAc 进行萃取。用 1 M HCl 将水层酸化至 pH 3.5，并用 2 x 200mL 氯仿萃取。形成沉淀，并经过过滤收集沉淀(8.58g)。通过与先前样品 HPLC 对照显示，所述
5 沉淀即为所预期的产品 (ESMS MH+511)。

放射标记

制备 ⁹⁰Y 试剂盒

将 DOTA-Phe-Lys (HSG)-Tyr-Lys (HSG)-NH₂ (SEQ ID NO: 2) 溶解在 0.25M NH₄OAc/10% HPCD 缓冲液中，浓度分别为 9、18、35、70 和
10 140μg/mL。将溶液在 0.22μm Millex GV 过滤器上进行无菌过滤，取 1mL 加到酸冲洗过的冻干瓶中。将冻干瓶迅速冷冻干燥。冻干后将瓶在真空下密封，并从冻干器拿出时要卷曲密闭。

将 ⁹⁰Y (~400μ Ci/试剂盒) 稀释到 1mL 去离子水中，然后加入到冻干试剂盒中。将试剂盒在沸水浴中加热 15 分钟，然后将瓶冷却到室
15 温，并使用反相 HPLC 评价被标记的肽 (HPLC 条件: Waters Noca-Pak C-18, 8 x 100 mm RCM 柱, 洗脱液流速为 3mL/min, 洗脱液的线性梯度为从 100% (0.1% TFA 水溶液) 到 100% (90% CH₃CN, 0.1%TFA, 10%H₂O))。HPLC 分析结果显示在本试剂盒中，完全标记所需要的肽的最小浓度是 35μg/mL。反相 HPLC 示踪结果显示出了
20 明显的 ⁹⁰Y 标记肽的峰。排阻 HPLC 结果显示，当将所述被标记的肽与过量 679IgG 混合时，所述标记肽完全结合到了 679IgG 上。

用 ¹¹¹In 标记

将 ¹¹¹In (~300μ Ci/试剂盒) 稀释到 0.5mL 去离子水中，然后加入到冻干试剂盒中。将试剂盒在沸水浴中加热 15 分钟，然后将瓶冷却，
25 然后加入 0.5 mL 2.56 x 10⁻⁵M 的溶解在 0.5M 醋酸盐缓冲液中的 In，然后将试剂盒再次在沸水浴中加热 15 分钟。将进行肽标记的瓶冷却到室温，并使用反相 HPLC 进行评价 (HPLC 条件: Waters Noca-Pak C-18, 8 x 100 mm RCM 柱, 洗脱液流速为 3mL/min, 洗脱液的线性梯度为从 100% (0.1% TFA 水溶液) 到 100% (90% CH₃CN, 0.1%TFA, 10%H₂O))。
30 HPLC 分析结果显示在进行标记时需要的肽的最小浓度 (4.7% 的游离 ¹¹¹In)，在本试剂盒中，是 35μg/mL。反相 HPLC 示踪结果显示出了明显的 ¹¹¹In 标记肽的峰。排阻 HPLC 结果显示，当将所述被标记的肽与

过量 679IgG 混合时, 所述标记肽完全结合到了 679IgG 上。

体内研究

给带有 GW-39 人类结肠异种移植肿瘤的裸鼠注射双特异性抗体 hMN-14 x m679 (1.5×10^{-10} mol)。在注射 ^{111}In 标记的肽 ($8.8 \mu\text{Ci}$, 1.5×10^{-11} mol) 之前, 使抗体在体内经过 24 小时的清除。在分别注射 3、24、48 小时后, 杀死动物。

用 hMN-14 x m679 进行了前靶向定位后, 肽在小鼠体内的生理分布结果显示在表 1 中。表 2 显示了在前靶向定位研究中, 肽在肿瘤中与非肿瘤中的比率。

表1

在注射 hMN-14 x m679 后 24 小时, 使用 ^{111}In 标记的肽进行的前靶向定位结果
% 注射量/g 组织

组织	^{111}In IMP 237 注射后 3 小时	^{111}In IMP 237 注射后 24 小时	^{111}In IMP 237 注射后 48 小时
GW-39	7.25 ± 2.79	8.38 ± 1.70	5.39 ± 1.46
肝脏	0.58 ± 0.13	0.62 ± 0.09	0.61 ± 0.16
脾	0.50 ± 0.14	0.71 ± 0.16	0.57 ± 0.15
肾	3.59 ± 0.75	2.24 ± 0.40	1.27 ± 0.33
肺	1.19 ± 0.26	0.44 ± 0.10	0.22 ± 0.06
血液	2.42 ± 0.61	0.73 ± 0.17	0.17 ± 0.06
胃	0.18 ± 0.03	0.09 ± 0.02	0.07 ± 0.02
小肠	0.65 ± 0.74	0.18 ± 0.03	0.11 ± 0.02
大肠	0.30 ± 0.07	0.17 ± 0.03	0.13 ± 0.03

表2

在注射 hMN-14 x m679 后 24 小时, 使用 ^{111}In 标记的肽进行前靶向定位
肿瘤/非肿瘤组织的比率

组织	^{111}In IMP 237 注射后 3 小时	^{111}In IMP 237 注射后 24 小时	^{111}In IMP 237 注射后 48 小时
肝脏	12.6 ± 4.44	13.6 ± 2.83	8.88 ± 1.78
脾	15.1 ± 6.32	12.1 ± 2.86	9.50 ± 1.62
肾	2.04 ± 0.74	3.84 ± 1.04	4.25 ± 0.19
肺	6.11 ± 1.96	19.6 ± 5.91	25.4 ± 6.00
血液	3.04 ± 1.13	11.9 ± 3.20	31.9 ± 4.79
胃	40.5 ± 16.5	104. ± 39.6	83.3 ± 16.5
小肠	18.9 ± 12.6	47.5 ± 10.3	49.5 ± 7.83
大肠	25.2 ± 10.6	50.1 ± 16.7	43.7 ± 9.35

DOTA-Phe-Lys (HSG)-Tyr-Lys (HSG)-NH₂ (SEQ ID NO: 2) (IMP 237) 和 DOTA-Phe-Lys (HSG)-D-Tyr-Lys (HSG)-NH₂ (SEQ ID NO: 3) (IMP 241) 的血清稳定性

5 肽标记和 HPLC 分析

根据 Karacay 等, Bioconjugate Chem. 11: 842-854 (2000) 记载的方法标记肽 IMP 237 和 IMP 241。将 IMP 241 肽 (0.0019g) 溶解在 587 μl 0.5 M pH 5.5 的 NH₄Cl 溶液中。取 1.7 μl 肽溶液稀释到 165 μl 0.5 M pH 5.5 的 NH₄Cl 溶液中。将 10 μl 的 ^{111}In (1.8 mCi) 加入
10 到肽溶液中, 并将混合液在沸水浴中加热 30 分钟。

用 HPLC 法分析标记的肽, 所使用的柱子是 Waters 8x100mm radial-pak, nova-pak C-18 RCM 筒状柱。柱子的洗脱条件如下, 流速 3 mL/min, 线性梯度从 100% 的 0.1% TFA 水溶液到 100% 的 0.1% TFA 溶解在 90% 乙腈和 10% 水中形成的溶液, 洗脱时间为 10 分钟。
15 在柱子的无效空间中大约有 6% 的游离 ^{111}In (1.6 分钟)。在 5 分钟和 6.6-8 分钟之间还有一些 ^{111}In 标记的峰。 ^{111}In 标记的肽洗脱时间为 8.8 分钟, 是一个独立的峰。 ^{111}In IMP237 的 HPLC 轮廓与 ^{111}In IMP 241 的轮廓非常接近。

血清稳定性

20 将 30 μl 的 ^{111}In Imp 241 置于 300 μl 新鲜的小鼠血清中, 并置

于 37℃ 温育箱中。通过所述 HPLC 法对肽进行监测。

将 24 μl 的 ¹¹¹In Imp 237 置于 230 μl 新鲜的小鼠血清中，并置于 37℃ 温育箱中。通过所述 HPLC 法对肽进行监测。

分析结果显示，与小鼠血清 37℃ 温育 22 小时后，检测到 ¹¹¹In IMP 241 已经发生了缓慢的分解，分解率大约为 5%。在 37℃ 温育 22 小时后，检测到大约有 70% 的 ¹¹¹In IMP 237 转化为保留时间较短的成分。

结论

在与 IMP 237 对比之下，IMP241 肽中的 D 型酪氨酸使 IMP 241 肽在小鼠血清中的分解速度变缓。

10 IMP 237 和 IMP 241 在体内的稳定性比较

通过检测 (HPLC 法) 30 分钟和 60 分钟时小鼠的尿样品，来进行 ¹¹¹In IMP 237 和 ¹¹¹In IMP 241 体内稳定性比较。其中的 IMP 237 肽和 IMP 241 肽使用所述方法进行 ¹¹¹In-111 标记。

将标记的肽注射到 Balb/c 小鼠中，分别在注射肽 30 分钟和 60 分钟后杀死动物，每一个时间点使用一只小鼠。随后的 HPLC 示踪结果表明，在排泄物中存在完整的 ¹¹¹In Imp 241，而 ¹¹¹In Imp 237 几乎全部代谢为一种新的 ¹¹¹In 标记的肽。

结论

用 D-Tyr 取代肽骨架中的 Tyr 能使肽在体内的代谢速率降至最低。

其它的体内研究

给带有 GW-39 人类结肠异种移植肿瘤的裸鼠注射双特异性抗体 mMU-9 x m679 (1.5×10^{-10} mol)。在注射 ¹¹¹In 标记的肽 (8.8 μCi, 1.5×10^{-11} mol) 之前，使抗体在体内经过 24 小时的清除。在分别注射 3、24、48 小时后，杀死动物。

用 mMU-14 x m679 进行了前靶向定位后，肽在小鼠体内的生理分布结果显示在表 3 中。表 4 显示了在前靶向定位研究中，肽在肿瘤中与非肿瘤中的比率。表 5 显示在没有使用双特异性抗体前靶向定位的情况下，肽在小鼠中的生理分布。

表 3

在注射 mMU-9 x m 679 后 48 小时, 使用 ^{111}In 标记的肽进行的前靶向定位结果 %注射量/g 组织

组织	^{111}In 标记肽注射后 3 小时		^{111}In 标记肽注射后 24 小时		^{111}In 标记肽注射后 48 小时	
	IMP 237	IMP 241	IMP 237	IMP 241	IMP 237	IMP 241
GW-39	18.3 ± 7.17	26.7 ± 14.1	16.7 ± 8.22	14.8 ± 4.56	12.9 ± 1.10	12.3 ± 2.11
肝脏	0.41 ± 0.10	0.66 ± 0.34	0.32 ± 0.08	0.32 ± 0.09	0.28 ± 0.09	0.32 ± 0.21
脾	0.34 ± 0.12	0.63 ± 0.38	0.34 ± 0.12	0.25 ± 0.07	0.28 ± 0.07	0.31 ± 0.22
肾	3.62 ± 0.71	4.28 ± 0.77	2.51 ± 0.54	2.34 ± 0.70	1.78 ± 0.38	1.17 ± 0.43
肺	0.61 ± 0.15	1.03 ± 0.65	0.22 ± 0.07	0.21 ± 0.07	0.12 ± 0.04	0.14 ± 0.08
血液	1.16 ± 0.48	1.78 ± 1.49	0.21 ± 0.13	0.15 ± 0.05	0.08 ± 0.03	0.10 ± 0.09
胃	0.12 ± 0.04	0.21 ± 0.09	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.02	0.04 ± 0.01	0.03 ± 0.02
小肠	0.23 ± 0.04	0.50 ± 0.27	0.12 ± 0.02	0.09 ± 0.06	0.11 ± 0.08	0.07 ± 0.06
大肠	0.34 ± 0.16	0.38 ± 0.15	0.15 ± 0.07	0.10 ± 0.02	0.12 ± 0.07	0.09 ± 0.05

表 4

在注射 mMU-9 x m 679 后 48 小时, 使用 ^{111}In 标记的肽进行前靶向定位肿瘤/非肿瘤组织的比率

组织	^{111}In 标记肽注射后 3 小时		^{111}In 标记肽注射后 24 小时		^{111}In 标记肽注射后 48 小时	
	IMP 237	IMP 241	IMP 237	IMP 241	IMP 237	IMP 241
肝脏	45.6 ± 17.8	41.8 ± 19.6	49.8 ± 16.6	47.1 ± 8.68	49.1 ± 13.6	45.1 ± 13.9
脾	56.8 ± 23.8	43.5 ± 9.77	47.4 ± 14.7	59.6 ± 13.0	47.5 ± 10.6	50.2 ± 19.0
肾	5.13 ± 2.18	6.05 ± 2.41	6.43 ± 2.24	6.58 ± 2.42	7.43 ± 1.02	11.2 ± 2.61
肺	30.5 ± 10.6	28.4 ± 12.8	76.4 ± 34.1	72.7 ± 21.9	115. ± 36.6	102. ± 37.1
血液	18.6 ± 12.0	19.0 ± 11.8	86.9 ± 36.2	108. ± 41.0	187. ± 76.3	181. ± 86.6
胃	156. ± 86.1	126. ± 49.6	303. ± 95.9	328. ± 96.7	344. ± 101.	456. ± 193.
小肠	80.7 ± 29.0	59.0 ± 31.0	143. ± 60.7	193. ± 83.7	153. ± 67.7	217. ± 73.5
大肠	56.3 ± 19.7	78.6 ± 54.4	116. ± 36.9	155. ± 42.4	133. ± 47.6	153. ± 43.1

表 5

单独的 ^{111}In 标记肽在体内的生理分布

组织	^{111}In 标记肽注射后 30 分钟		^{111}In 标记肽注射后 3 小时		^{111}In 标记肽注射后 24 小时	
	IMP 237	IMP 241	IMP 237	IMP 241	IMP 237	IMP 241
GW-39	2.99 ± 1.11	2.73 ± 0.37	0.17 ± 0.05	0.31 ± 0.12	0.11 ± 0.02	0.11 ± 0.08
肝脏	0.48 ± 0.06	0.50 ± 0.09	0.15 ± 0.02	1.07 ± 1.61	0.15 ± 0.01	0.09 ± 0.04
脾	0.42 ± 0.08	0.43 ± 0.22	0.09 ± 0.04	0.13 ± 0.05	0.13 ± 0.02	0.08 ± 0.03
肾	5.85 ± 0.37	7.31 ± 0.53	3.55 ± 0.44	3.21 ± 0.45	2.18 ± 0.24	2.61 ± 0.51
肺	1.26 ± 0.24	1.12 ± 0.26	0.13 ± 0.02	0.15 ± 0.06	0.06 ± 0.00	0.07 ± 0.06
血液	1.62 ± 0.34	1.59 ± 0.29	0.12 ± 0.02	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.00 ± 0.00
胃	0.59 ± 0.32	0.52 ± 0.16	0.04 ± 0.01	0.07 ± 0.03	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.04
小肠	0.55 ± 0.13	2.52 ± 3.73	0.09 ± 0.01	0.17 ± 0.08	0.08 ± 0.01	0.04 ± 0.01
大肠	0.33 ± 0.05	0.30 ± 0.07	0.33 ± 0.15	0.32 ± 0.14	0.05 ± 0.01	0.07 ± 0.03

实施例 4) 合成肽抗原

应用树脂固相合成技术装配肽 Ac-Phe-Lys (Ac)-Tyr-Lys (Ac)-OH (SEQ ID NO: 2), 将第一位的残基 (赖氨酸) 以受保护的衍生物 α -Fmoc-Lys (Aloc)-OH 的形式连接到树脂上。选择性去掉 α -Fmoc 保护基团, 然后在后面的循环中依次偶联上 Fmoc-Tyr (OBut)、 α -Fmoc-Lys (Aloc)-OH、和 Fmoc-Phe-OH, 并进行 α -氨基脱保护。与 TFA 反应可以去掉 Aloc-和 OBut-侧链保护基团, 与乙酸酐反应可以为游离 α -和 ϵ -氨基基团带上 Ac, 从而形成 Ac-Phe-Lys (Ac)-Tyr-Lys (Ac)-OH (SEQ ID NO: 2)。

实施例 5) 将 Ac-Phe-Lys (Ac)-Tyr-Lys (Ac)-OH (SEQ ID NO: 2) 偶联到 KLH

将 Ac-Phe-Lys (Ac)-Tyr-Lys (Ac)-OH (SEQ ID NO: 2) 肽溶解在水中, 用 1N 的 HCl 将 pH 值调至 4.0, 然后用 1 摩尔当量的 1-乙基-3(3-二甲基氨基丙基) 碳二亚胺进行处理, 在 4°C 反应 1 小时。PH 为 8.5 的匙孔血蓝蛋白 (KLH) 与过量的 100 倍摩尔浓度的活化肽进行缓合反应, 在 4°C 反应 1 小时。使用排阻层析从未反应肽中纯化肽-KLH 缓合物, 用于生产抗体。

实施例6) 生成抗-肽 Ab

将肽抗原和完全弗氏佐剂混合物注射到免疫活性小鼠中。在随后的几周中，给小鼠施用两次与不完全弗氏佐剂混合的肽进行加强。从免疫动物中收集脾细胞，并使之与 Sp2/0-Ag14 骨髓瘤细胞融合。所得克隆的培养物上清液用于 ELISA 法进行抗-肽反应分析，反应板预先涂布肽免疫原。分离酶缺陷型杂交瘤，用于选择融合细胞系，选择在培养基上生长的克隆，使之产生抗肽 Ab。

实施例7) 抗肽 Ab 的纯化

使用层析技术纯化抗-肽 Ab，首先使用蛋白 A 柱分离 IgG 组分，然后使用离子交换柱去掉产物中的杂质。最后使用亲和柱纯化所需的 Ab，其中亲和柱的固相载体上结合了抗原肽，它是通过将所述肽化学偶联到活性珠或活性树脂上形成的。

实施例8) 将抗-肽 Ab 消化为 F(ab')₂

将抗-肽 Ab 与 200 μg/μl pH 为 4 的的胃蛋白酶一起温育 1 小时，然后使用串联的蛋白 A 柱进行纯化，以去除未被消化的 IgG，然后使用 G-50-Sephadex 柱进行纯化，以去除低分子量杂质。

实施例9) 将抗肽 Ab 还原为 Fab'-SH

将抗肽 F(ab')₂ 与新制备的半胱氨酸溶液一起反应，使之还原为 Fab' 片段，其中半胱氨酸溶解在包含 10mM EDTA 的 0.1 M PBS 缓冲液中。使用 HPLC 监控反应过程，在反应完成后（大约 1 小时的时间），使用旋转-柱层析纯化 Fab'-SH，并贮存在 pH 小于 5 的含有 10mM EDTA 的脱氧缓冲液中。

实施例10) 将抗-CEA-IgG 氧化偶联到顺丁烯二酰亚胺

将抗-CEA Ab IgG 与 10mM 过氧化钠在 4℃ 黑暗中反应 90 分钟，使之氧化。使用旋转柱层析纯化氧化的 Ab，并将其与过量的交联接头 4-(4-顺丁烯二酰亚胺苯基)丁酸肼 (MPBH) 混合。使反应进行 2 小时，然后使用旋转柱层析纯化 IgG-脘-顺丁烯二酰亚胺。与 10mM 氰氢硼化钠进行反应，还原脘键，然后再次进行纯化。

实施例11) 制备抗-CEA-IgG x 抗-肽-Fab' 双特异性 Ab

用等摩尔当量实施例 6 中制备的抗-肽 Fab'-SH 处理实施例 10 中制备的 IgG-肼-顺丁烯二酰亚胺，pH 值为 6.0，室温下反应 30 分钟。与碘乙酰胺反应 30 分钟，来阻遏剩余的游离的硫醇基团。使用排阻层

析纯化双特异性 Ab 抗-CEA-IgG x 抗-肽-Fab', 去除未反应的 Fab', 然后进行亲和层析用固相结合肽从未反应的 IgG 中分离 IgG x Fab'.

实施例 12) Ac-Phe-Lys (Bz-DTPA)-Tyr-Lys (Bz-DTPA)-NH₂ (SEQ ID NO: 2) 的合成

- 5 应用树脂固相合成技术装配肽 Ac-Phe-Lys (Bz-DTPA)-Tyr-Lys (Bz-DTPA)-NH₂ (SEQ ID NO: 2), 将第一位的残基 (赖氨酸) 以受保护的衍生物 α -Fmoc-Lys (Aloc)-OH 的形式连接到树脂上。选择性去掉 α -Fmoc 保护基团, 然后在后面的循环中依次偶联上 Fmoc-Tyr (OBut)、 α -Fmoc-Lys (Aloc)-OH、和 Fmoc-Phe-OH, 并进行 α -
- 10 氨基脱保护。与钇 (0) 催化剂反应除去 Aloc 侧链。可选择地, 也可以使用 Boc-基团作为保护基团, 与 TFA 反应可以去掉 Boc-保护基团, 并使游离氨基与过量的 ITC-Bz-DTPA 反应。在去除过量 Bz-DTPA 后, 与乙酸酐反应可以为游离 α -氨基基团带上 Ac, 用 TFA 将完整的肽从树脂上切割下来 (期间伴随着酪氨酰残基的脱保护), 从而形成 Ac-
- 15 Phe-Lys (Bz-DTPA)-Tyr-Lys (Bz-DTPA)-NH₂.

实施例 13) 用 Y-90 放射性标记 Ac-Phe-Lys (Bz-DTPA)-Tyr-Lys (Bz-DTPA)-NH₂ (SEQ ID NO: 2)

将标题肽以 100 倍摩尔过量与钇-90 放射性核素混合在 pH5.5 的醋酸盐缓冲液中。在 30 分钟后定量放射性标记。

- 20 实施例 14) 羧酸酯酶与 di-DTPA-肽的连接

- 将羧酸酯酶 (5mg) 溶解在 pH8.0 的 0.2M 的磷酸盐缓冲液中, 然后用 5 倍摩尔过量的交联试剂硫代-琥珀酰亚胺基-[4-顺丁烯二酰亚胺甲基]-环己烷-1-羧酸盐 (sulfo-SMCC) 进行处理。室温搅拌两个小时后, 使用 G-25 Sephadex 旋转柱从低分子量成分中分离活化的酶,
- 25 并在含有 1mM EDTA pH 为 7 的 0.1 M 磷酸盐缓冲液中平衡。将四肽 N-乙酰基-Cys-Lys (DTPA)-Tyr-Lys (DTPA)-NH₂ (SEQ ID NO: 11) (10 倍摩尔过量) 加入到活化的酶中, 并溶解在与所述旋转柱所使用的相同的缓冲液中。室温搅拌 1 小时后, 使用 G-25 Sephadex 离心柱层析从未反应的肽中纯化 Cys-Lys (DTPA)-Tyr-Lys (DTPA)-NH₂ (SEQ ID NO: 11)
- 30 肽羧酸酯酶缀合物, 其中使用了 pH6.0 的 0.25M 醋酸盐缓冲液。用钼-111 对缀合物进行标记, 结果证明所述过程成功地实现了缀合, 然后使用排阻 HPLC 对缀合物进行分析。

实施例 15) 抗-CEA-IgGx 抗肽-Fab' 双特异性抗体用于 RAIT

给予 CEA 表达肿瘤患者抗-CEA-IgGx 抗肽-Fab' 双特异性 Ab。7 天后，给予患者 Y-90-di-Bz-DTPA-肽（来自实施例 13）。Y-90 标记的肽快速从非靶组织清除，而定位于用抗-CEA-IgGx 抗-肽-Fab' 双特异性 Ab 前靶向的位点，导致肿瘤的破坏。

实施例 16) 制备半乳糖-WI2-Fab' 清除试剂

使用实施例 8 中的方法，用胃蛋白酶将抗 MN-14 独特型 Ab 消化为 F(ab')₂ 片段，其中抗 MN-14 独特型 Ab 又被称作 WI2。使用实施例 9 中的方法，用低分子量硫醇基团将 F(ab')₂ 还原为 Fab' 片段。在还原完成以后，用离心柱层析纯化 Fab'-SH，并使之与过量碘乙酰胺反应来阻遏较链区硫醇，避免其再次连接。从过量碘乙酰胺再次纯化 Fab'，并使之与 400 倍摩尔过量的半乳糖苷化试剂，即氟甲基-2,3,4,6-四-O-乙酰基-1-巯基-β-D-吡喃半乳糖苷的巯基-imidate，进行反应（参见 Karacay 等）。使用两个旋转柱纯化半乳糖苷化蛋白，并使用 MALDI-MS 检测半乳糖和 Fab' 的比率。

实施例 17) 使用抗-CEA-IgG x 抗-肽 Fab' 双特异性 Ab 进行 RAIT，其中进行了 bsAb 清除步骤。

给 CEA 表达肿瘤患者施用抗-CEA-IgG (MN-14) x 抗-肽 Fab' 双特异性 Ab。三天以后，给患者施用清除剂量的半乳糖-WI2-Fab'。在施用清除剂量的半乳糖-WI2-Fab' 24 小时后，给患者施用 Y-90-di-Bz-DTPA-肽。Y-90 标记的肽在非靶组织中快速地被清除，但却很好地定位于使用了抗-CEA-IgG x 抗-肽-Fab' 双特异性 Ab 前靶向定位的位点上，从而有效地消灭肿瘤。

实施例 18) Ac-Lys (DTPA)-Tyr-Lys (DTPA)-Lys (Tscg-Cys)-NH₂ (SEQ ID NO: 7) (IMP192) 的合成

将第一个氨基酸 Aloc-Lys (Fmoc)-OH 连接到肽合成器上的 0.21 mmol 的 Rink 酰胺树脂上，然后使用标准的 Fmoc 自动合成方案，将与残基 Fmoc-Cys (Trt)-OH 和 TscG 结合的 Tc-99m 配体加入到赖氨酸侧链上，从而形成如下的肽：Aloc-Lys (TscG-Cys (Trt))-rink 树脂。然后使用 8mL Pd[P(Ph)₃]₄ 溶液进行处理，去除 Aloc 基团，其中所述 Pd[P(Ph)₃]₄ 溶液的配比如下，将 100mg Pd[P(Ph)₃]₄ 溶解在由 10 mL CH₂Cl₂、0.75mL 冰醋酸和 2.5 mL 二异丙基乙胺组成的混合溶剂中。

然后用 0.8ml 三丁基氢氧化物处理树脂混合物，旋转混合 60 分钟。然后继续在合成仪上进行肽合成，形成如下的肽：Lys(Aloc)-Tyr-Lys(Aloc)-Lys(Tscg-Cys)-rink 树脂 (SEQ ID NO: 7)。将 8mL 含有 10mL DMF、3mL 乙酸酐和 6mL 二异丙基乙胺的溶液加入到树脂中，并
5 旋转混合，使 N-末端进行乙酰化。使用前面所述的方法去除侧链 Aloc 保护基团，然后使用哌啶处理树脂，使用标准的 Fmoc 去保护方案去除所有的可能存在于树脂上的醋酸。

活化 DTPA 和 DTPA 的添加

将 5g DTPA 溶解在 40mL 1.0M 的四丁基铵氢氧化物甲醇溶液中。
10 在高真空下去除甲醇，得到一种粘性油。将油溶解在 50mL DMF 中，并在旋转蒸发器高真空下去除挥发性溶剂。用 DMF 处理两次以上。然后将粘性油溶解在 50mL DMF 中，并与 5g HBTU 混合。然后将 8mL 活化的 DTPA 溶液加入树脂中，旋转混合 14 小时。用 DTPA 重复处理，直至用 Kaiser 检测法检测时，树脂呈现胺检测阳性。可选择的，可以联合
15 使用 DTPA 四-t-丁基酯和常用的偶联试剂，如 DIC 和 HBTU。（参见 Arano Y, Uezono T, Akizawa H, Ono M, Wakisaka K, Nakayama M, Sakahara H, Konishi J, Yokoyama A., "Reassessment of diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) as a chelating agent for indium-111 labeling of polypeptides using a newly synthesized monoreactive DTPA derivative." , J Med Chem. 1996
20 Aug 30; 39(18): 3451-60) .

切割和纯化

然后使用 8 mL 由 30mL TFA、1 mL 三异丙基硅烷、和 1 mL 乙二
25 硫酚组成的溶液处理树脂 60 秒，从而将肽从树脂上切割下来。将粗切割产物倾倒入 30mL 醚中，并通过离心收集沉淀。然后使用反相 HPLC 用 4 x 30 cm Waters preparative C-18 Delta-Pak 柱子 (15 μ m, 100 埃) 纯化肽。收集 HPLC 组分，将其冻干获得包含所需产物的组分，其中产物鉴定使用 ESMS (MH \pm 1590) 法。

试剂盒配制

30 将肽装配到冻干试剂盒中，该试剂盒包含 78 μ g 肽、0.92mg 非放射性 InCl₃、100 μ g 二价氯化锡、3mg 龙胆酸和 HPCD (再生 10%)。

实施例 19) Tc-99m 标记及其稳定性

将 1.5 mL 含有 25 mCi $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ 的盐水加入到 IMP 192 试剂盒中，来标记 IMP 192。将试剂盒室温温育 10mm，然后在沸水浴中加热 15mm。然后将标记肽溶液冷却到室温。取其中一部分用于稳定性研究。取其中一部分以 1: 10 的比例稀释到盐水、1mM 半胱氨酸 0.05 M pH7.5 的磷酸盐溶液、和新鲜的人血清中。将最初的试剂盒溶液、盐水稀释液和半胱氨酸对比溶液在室温下温育，将血浆样品在 37℃ 下温育。使用 HPLC 和 ITLC 对样品进行监测。结果表明标记肽在体外试验中是稳定的。在血浆样品中的标记肽保留时间从 6.3mm 变为 7.3min。保留时间的变化可能是因为血浆中的一些成分与肽发生了离子成对现象。

表 6

样品	起始标记	第一时间点	第二时间点	ITLC 24 小时 饱和 NaCl
试剂盒 室温	1% 无效 体积, 99% 的肽 (6.4mm)	3 小时 1% 无效体积 99% 的肽	21 小时 5% 无效体积 95% 的肽	5% 溶剂前峰 94% 起始点
盐稀释液 室温		1.5 小时 1% 无效体积 99% 的肽	19 小时 4% 无效体积 96% 的肽	2.3% 溶剂前峰 97% 起始点
Cys 激发 1 mM 的 0.05 M pH7.5 的磷酸 盐溶液 室温		1 小时 2% 无效体积 98% 的肽	19.5 小时 11% 无效体积 89% 的肽	7.4% 溶剂前峰 91.3% 起始点
人血清 37℃		2 小时 1% 无效体积 7% 6 分钟 92% 7.2 分钟	20 小时 3% 无效体积 15% 6 分钟 82% 7.3 分钟	1.7% 溶剂前峰 96% 起始点

实施例 20) 制备 hMN-14 x 734 (Fab x Fab)

使 hMN-14 Fab'_{SH} (一种人源化的单克隆抗-CEA 抗体) 和 734Fab'_{SH} (一种鼠抗-diDTPA) 片段进行交联, 从而制备所述 bsAb, 所使用的方法类似于实施例 8 的方法。使用 10mM 2-巯基乙胺在存在 10mM pH 7.3 EDTA 的条件下还原 F(ab')₂ 片段, 从而形成 hMN-14 和 734 的 Fab'_{SH} 片段, 反应时间为 60 分钟, 反应温度为 37℃。经过旋转柱 (Penefsky) 纯化 (Sephadex G-50-80, 50 mM NaOAc, 0.5 mM EDTA, pH 5.3) 收集

Fab'SH 片段。使用 4mM N,N'-o-亚苯基双马来酰亚胺将 734 Fab'SH 片段导入顺丁烯二酰亚胺, 其中在 RT 下反应 60 分钟。使用旋转柱纯化技术分离 Fab'。734 Fab'和 hMN-14Fab'SH 的交联反应在 4℃ 进行 16 小时, 两者的摩尔比例是 1: 1。为了打开在所述过程中可能形成的二硫键, 将所述反应混合物用 10mM 2-巯基乙胺处理 1 小时, pH 为 5.3, 温度为 23℃。使用 pH6.4 的乙基顺丁烯二酰亚胺将 SH 基团阻遏。使用旋转柱去除反应混合物中的过量小分子量化合物。然后使用分析排阻 HPLC 柱 Bio-Sil SEC-250 分离纯化 bsAb。纯化的 bsAb 的 HPLC 保留时间为 10.23 分钟。

10 实施例 21) HPLC 结合研究

使用氯胺 T (Greenwood 和 Hunter) 进行 bsAb 的放射碘标记。将标记了放射碘的 bsAbs 结合到 CEA、WI2 (大鼠抗-MN-14 独特型抗体) 和放射性标记的肽基 DTPA 螯合物上, 然后用分析排阻 HPLC 对所述结合物进行检测。结果表明, 在用 10-20 倍摩尔过量的 CEA 处理时, 有大约 90% 的放射碘标记的 bsAb 结合到了 CEA 上。bsAb 与放射性钼标记的 DTPA 螯合物 (IMP-156 或 IMP-192) 形成了复合物。

IMP 156 Ac-Phe-Lys (DTPA)-TYR-Lys (DTPA)-NH₂ (SEQ ID NO: 2)

实施例 22) 血清稳定性

20 在温度为 37℃, 潮湿、并含有 5% 二氧化碳的条件下, 对放射性碘标记的 bsAb 在新鲜人血清中的稳定性进行检测。取一部分在 SE-HPLC 上检测。为了检测与血清蛋白结合的放射性碘, 取一部分与 WI2 混合, 结果使 bsAb 峰的保留时间减少。在血清中温育 48 小时后, bsAbs 对 WI2 的结合能力损失了 3-5%。在血清中温育 72 小时后, bsAbs 在血清中形成了少量的聚合物 (4-7%)。

实施例 23) 99m-Tc-IMP-192

肽基螯合物 Tc-99m 复合物在体外的稳定性试验通过如下方法进行, 将 Tc-99m 复合物分别在盐水、新鲜人血清和 10mM 半胱氨酸溶液中温育达 20 小时。从前靶向定位研究中注射了 99m-Tc-IMP-192 的小鼠中, 收集尿液, 用于分析所述复合物在体内的稳定性。在尿液中检测到放射活性表明尿液中存在完整的肽, 因为 SE-HPLC 结果显示放射活性是与抗体结合的。99m-Tc-IMP-192 在正常 BALB/c 小鼠中的生

理分布研究表明其在血液中被快速清除，记载在表 7 中。体内和体外研究结果均表明 $^{99m}\text{Tc-IMP-192}$ 具有稳定性。

表 7

$^{99m}\text{Tc-IMP-192}$ 在 BALB/c 小鼠中的清除

组织	%ID/g			
	1 小时	2 小时	4 小时	24 小时
肝脏	0.27 ± 0.18	0.22 ± 0.16	0.09 ± 0.02	0.04 ± 0.0
脾	0.08 ± 0.01	0.09 ± 0.3	0.05 ± 0.02	0.03 ± 0.01
肾	4.16 ± 0.75	4.05 ± 0.60	3.21 ± 0.99	1.21 ± 0.08
肺	0.50 ± 0.23	0.29 ± 0.08	0.19 ± 0.04	0.05 ± 0.00
血液	0.30 ± 0.09	0.21 ± 0.03	0.14 ± 0.04	0.05 ± 0.01
胃	0.39 ± 0.18	0.42 ± 0.18	0.27 ± 0.33	0.02 ± 0.01
小肠	1.37 ± 0.75	0.60 ± 0.06	0.21 ± 0.09	0.03 ± 0.01
大肠	0.41 ± 0.54	1.53 ± 0.45	1.58 ± 0.70	0.15 ± 0.14
肌肉	0.10 ± 0.06	0.05 ± 0.00	0.03 ± 0.01	0.00 ± 0.0
尿	169 ± 95	57 ± 15	6.30 ± 4.53	0.20 ± 0.02

实施例 24) 构建和表达 hMN-14 Fab-734scFv

- 5 使用重组的方法来生产单价双特异性融合蛋白，其中融合蛋白包含来自人源化单克隆抗-CEA 抗体的 Fab 片段和来自小鼠抗-diDTPA 的 scFv 片段。参见附图 3。单链 734 (734scFv) 的结构设计为 GGGG(S_{EQ} ID NO: 10)-V_L-(GGGGG)₃(S_{EQ} ID NO: 9)-V_H，其中近端的 GGGG(S_{EQ} ID NO: 10) 提供了一个弹性键，可以将 scFv 连接到 hMN-14 重链的恒定区上(附图 1)。可选择的，scFv 也可以连接到 hMN-14 轻链的恒定区上。
- 10 使用特异性引物组通过 PCR 反应，将适合框架内连接 hMN-14 重链 Fd 和 734scFv 的接头序列导入 734 的 V_L 和 V_H 区。

PCR 扩增 734 V_L 所使用的引物组是 734 V_LscFv5' (Cys) 和 734 V_LscFv3' (所述引物的多肽和多核苷酸序列记载在美国专利申请系列

15 号 09337756 中，申请日为 1999 年 6 月 22 日，所述专利全文引入本申请)。引物 734 V_LscFv5' (Cys) 是编码人类 IgG1 铰链区前四个残基 (PKSC) (S_{EQ} ID NO: 12) 的有义链序列，其中所述四个氨基酸残基通过一个短的弹性接头 GGGG(S_{EQ} ID NO: 10)，与 734V_L 的前六个氨基酸

残基 (QLVVTQ) (SEQ ID NO:13) 框架内连接。人类铰链区必须包括一个半胱氨酸, 因为半胱氨酸对于 hMN-14 重链 Fd-734scFv 融合和 hMN-14 轻链之间形成链间二硫键是必需的。在 C_H1 区和铰链区结合处的内含子序列中插入 Pst1 位点, 以便于后续过程中的连接。引物 734 V_LscFv3' 是编码 734V_L 区末端六个氨基酸残基 (TKLKIL) (SEQ ID NO:14) 和部分弹性接头序列 (GGGGSGGGG) (SEQ ID NO:15) 的反义序列, 其框架内融合在 V_L 区的下游。

PCR 扩增后, 首先用 T4 DNA 聚合酶处理扩增产物 (~400 bp), 除去末端额外 "A" 残基, "A" 残基是在 PCR 扩增中添加到末端的, 然后使用 Pst 1 进行消化。所得到的产物是一种双链 DNA 片段, 其具有 Pst1 突出端和钝端。734V_H PCR 扩增所使用的引物组是 734V_HscFv5' 和 734V_HscFv3' (Sac1)。引物 734V_HscFv5' (参见专利系列号 09337756) 是编码连接 V_L 和 V_H 序列的弹性接头 (SGGGGS) (SEQ ID NO:16) 的剩余部分和 734 V_H 区的前六个氨基酸残基 (EVKLQE) (SEQ ID NO:17) 的正义链序列。引物 734V_HscFv3' (Sac1) (参见专利系列号 09337756) 是编码 734 V_H 区末端六个氨基酸残基 (TVTSS) (SEQ ID NO:18) 的反义序列。另外还包括一个翻译终止密码子。在终止密码子的下游插入限制性内切酶位点 Eag 1 和 Sac 1, 以便于进行亚克隆。类似的, 首先用 T4 DNA 聚合酶处理 PCR 扩增 V_H 产物 (~400bp), 以除去 PCR 产物末端额外的 "A" 残基, 然后用 Sac 1 进行消化, 得到具有钝端-粘性末端的 V_H DNA 片段。

构建含有人类 IgG 1 基因组序列 SacII 酶切片段的 pBlueScript (Stratagene, La Jolla) 阶段性载体 (HC1kbpSK)。该基因组 SacII 酶切片段包含一部分 5' 内含子、人类 IgG 1 C_H1 区、将 C_H1 区与铰链区连接的内含子序列、铰链序列、将铰链区连接到 C_H2 区的内含子序列、和部分 C_H2 区。通过 Pst 1/Sac 1 消化, 去掉 HC1kbpSK 中包含铰链区和部分 C_H2 区的片段, 然后将所产生的克隆位点用于与所述过程中所制备的 V_L (Pst 1/钝端) 和 V_H (钝端/Sac 1) PCR 扩增产物的共连接。

通过内含子将所得构建体 (C_H1-734pSK) 中的 C_H1 区与 734scFv 基因序列相连接 (附图 4)。因为 IgG 1 的基因组 SacII 片段仅包括位于 C_H1 区旁侧的 5' 内含子序列的一部分, 因此需要将剩余的内含子

序列（其作为 BamH 1/SacII 酶切片段）插入到 C_H 1-734pSK 的相应部位，从而重建完整的内含子序列。然后分离 BamH 1/Eag 1 酶切片段，其包含完整 5' 内含子、C_H 1 区、用于连接的内含子、5 个铰链残基、短的 GGGs 接头（SEQ ID NO:10）、和 734scFv 序列，并将其用于取代 hMN-14pdHL2 载体内的包含人类基因组 IgG 1 恒定序列的 Hind III/Eag1 酶切片段。使用一端带有 BamH 1 突出端，另一端带有 Hind III 突出端的 HNB 接头，来将 Bam H1/Eag1 酶切片段更容易的连接到 hMN-14pdHL2 载体的 HindIII/Eag 1 位点。所得到的载体命名为 hMN-14-734pdHL2，可用其转染哺乳动物细胞，来表达双特异性蛋白。

所使用的 hMN-14pdHL2 载体来自载体 pdHL2，该载体在以前的文献中有所记载。参见 Losman 等，Cancer Supplement, 80:2660,1997。hMN-14pdHL2 载体是使用如下方法构建的，使用标准分子生物技术用 hMN-14 的 V_H 和 V_L 区取代 hLL2pdHL2 的 V_H 和 V_L 区（附图 5）。通过电穿孔技术将 hMN-14-734pdHL2 载体转染到 SP2/0 细胞，经过鉴定，所述细胞克隆分泌了 bsAb。利用蛋白 L 柱（Pierce, Rockford, IL）从细胞培养上清液中纯化得到的 bsAb 是 75kD 的蛋白（根据氨基酸序列进行估计），在非还原 SDS-PAGE 电泳中，它与 66kD 的标记物迁移率相同，这可能是由于它的二级结构导致的（附图 2，泳道 2）。在还原条件下，观察到对应于重链（50kD）和轻链（25kD）的条带（附图 2，泳道 4）。转染瘤分泌的 κ 链单体（25kD）和二聚体（50kD）也得到了共纯化（附图 2，泳道 2），因为蛋白 L 与人、小鼠和大鼠的 κ 轻链相结合。使用离子交换层析进一步从 κ 单体和二聚体中分离 bsAb。纯化的 hMN-14Fab-734scFv 表现出了剂量依赖方式特异性结合 CEA 和 In-DTPA-BSA 的特性。

25 实施例 25) 在奶中转基因生产 bscAb

将 bscAb 片段克隆到表达载体，该载体包含 5' 酪蛋白启动组序列和位于插入位点旁侧面 3' 不翻译基因组序列。然后使用现有技术中的标准过程，将表达组件注射到小鼠受精卵细胞原核中。然后将卵细胞植入雌性受体的子宫中，使之孕育。在出生后，通过 Southern 分析筛选存在转导 DNA 的后代。然后使用现有技术中已知的标准免疫方法，来分析转基因雌性鼠的奶中是否存在 bscAb，并分析所存在的 bscAb 是否具有功能。可以利用抗体对免疫抗原的互补结合特性，或利用柱

层析、或其它的现有技术中已知的方法，从奶中纯化 bscAb。

实施例 26) 在植物中转基因生产 bscAb

将 bscAb 片段克隆到表达载体，该载体包含截短的豆球蛋白 B4 启动子，加上 *Vicia faba* 的 LeB4 不翻译 RNA 前导序列的 54 个碱基对和编码 LeB4 信号肽、将蛋白介导到内质网上的序列。根据 Zambryski 等描述的方法，使用农杆菌介导的基因转染技术将表达组件转化到烟草叶片中。通过 Southern 分析鉴定转化子。使用现有技术中已知的标准免疫方法分析转基因植物中是否存在 bscAb，并分析所存在的 bscAb 是否具有功能。可以使用现有技术中已知的标准方法从植物组织中纯化 bscAb。

实施例 27) 前靶向定位试验

使用带有 GW39 异种移植肿瘤的雌性裸鼠 (Taconic NCRNU, 3-4 周龄) 用于前靶向定位试验。肿瘤重量为 0.3-0.8g。

表 8

125-I-hMN-14 x 734 bsAb 和 111-In-铟-IMP-156 肽在 GW-39 异种移植肿瘤裸鼠中的生理分布：在注射 111-In-铟-IMP-156 前，给 hMN-14 x 734 留出 48 小时进行定位的时间。在注射 111-In-铟-IMP-156 3 小时后进行生理分布检测。bsAb 与肽的施用比例为 1: 0.03。对于每个时间点取 5 只动物进行检测。

组织	125-I-hMN-14 x 734		111-In-铟-IMP-156	
	% ID/g	T/NT	% ID/g	T/NT
肿瘤	2.9 ± 1.1	1	5.2 ± 1.9	1
肝脏	0.1 ± 0.06	19 ± 6	0.5 ± 0.09	10.6 ± 3.5
脾	0.5 ± 0.03	6.3 ± 1.2	0.5 ± 0.1	12 ± 6
肾	0.3 ± 0.08	9.3 ± 1.8	1.9 ± 0.5	2.6 ± 0.5
肺	0.3 ± 0.1	12 ± 3	0.4 ± 0.1	12 ± 2
血液	0.3 ± 0.1	11 ± 2	0.7 ± 0.2	7.6 ± 1.5

表 9

在注射后 3 个小时, 对照组对 ^{111}In -铟-IMP-156 的清除。

	% ID/g	T/NT
肿瘤	0.14 ± 0.02	1
肝脏	0.42 ± 0.1	0.3 ± 0.1
脾	0.28 ± 0.09	0.5 ± 0.1
肾	0.93 ± 0.13	0.2 ± 0.03
肺	0.04 ± 0.01	3.5 ± 0.7
血液	0.05 ± 0.01	3.1 ± 0.7

表 10

给 GW 39 异种移植肿瘤裸鼠施用 $^{125}\text{-I}$ -标记的 bsAb ($5\ \mu\text{Ci}$, $15\ \mu\text{g}$, $1.5 \times 10^{-10}\ \text{mol}$)。在注射 $^{99\text{m-Tc-IMP-192}}$ ($10\ \mu\text{Ci}$, $1.6 \times 10^{-11}\ \text{mol}$ 的肽)之前, 为 hMN-14 x 734 留出 24 小时的定位和清除时间。
分别在注射 $^{99\text{m-Tc-IMP-192}}$ 后 30 分钟、1 小时、3 小时、和 24 小时进行生理分布研究, 每个时间点取 5 只动物。BsAb 与肽的比例是 1: 0.1。

$^{125}\text{-I-hMN-14 x 734}$		% ID/g			
组织	30 分钟	1 小时	3 小时	24 小时	
肿瘤	4.9 ± 1.1	6.0 ± 2.3	5.5 ± 1.1	3.3 ± 0.7	
肝脏	0.6 ± 0.1	0.5 ± 0.2	0.5 ± 0.1	0.1 ± 0.02	
脾	0.8 ± 0.3	0.7 ± 0.3	0.7 ± 0.2	0.2 ± 0.03	
肾	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.1 ± 0.02	
肺	0.9 ± 0.3	0.8 ± 0.2	0.8 ± 0.3	0.3 ± 0.1	
血液	0.9 ± 0.3	1.2 ± 0.4	1.1 ± 0.3	0.2 ± 0.07	

$^{99\text{m-Tc-IMP-192}}$		% ID/g			
组织	30 分钟	1 小时	3 小时	24 小时	
肿瘤	11.4 ± 4.8	14.3 ± 3.6	12.6 ± 5.2	8.7 ± 3.3	
肝脏	1.4 ± 0.3	0.9 ± 0.2	0.6 ± 0.1	0.4 ± 0.08	
脾	1.2 ± 0.4	0.8 ± 0.2	0.5 ± 0.1	0.4 ± 0.2	
肾	9.9 ± 6.1	4.6 ± 0.7	2.4 ± 0.5	1.2 ± 0.3	
肺	4.2 ± 3.4	3.6 ± 1.9	1.0 ± 0.3	0.3 ± 0.1	
血液	4.3 ± 1.2	3.5 ± 0.9	1.7 ± 0.4	0.6 ± 0.2	

表 11

给 GW 39 异种移植肿瘤裸鼠施用 ^{125}I -标记的 bsAb ($5\ \mu\text{Ci}$, $15\ \mu\text{g}$, $1.5 \times 10^{-10}\ \text{mol}$)。在注射 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -IMP-192 ($10\ \mu\text{Ci}$, $1.6 \times 10^{-11}\ \text{mol}$ 的肽)之前, 为 hMN-14 x 734 留出 24 小时的定位和清除时间。分别在注射 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -IMP-192 后 30 分钟、1 小时、3 小时、和 24 小时时进行生理分布研究, 每个时间点取 5 只动物。BsAb 与肽的比例是 1: 0.1。

^{125}I -hMN-14 x		肿瘤/非肿瘤的比率			
组织	30 分钟	1 小时	3 小时	24 小时	
肝脏	8.8 ± 1.5	12.1 ± 5.5	10.3 ± 2.5	23.8 ± 3.5	
脾	6.4 ± 1.6	9.3 ± 4.0	7.9 ± 1.7	18.2 ± 4.0	
肾	10.0 ± 2.6	12.5 ± 4.5	11.1 ± 3.0	27.3 ± 4.6	
肺	6.2 ± 2.3	8.4 ± 4.6	7.2 ± 2.3	12.4 ± 6.6	
血液	5.7 ± 2.1	4.9 ± 1.2	5.1 ± 1.3	14.5 ± 3.6	

$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -IMP-192		肿瘤/非肿瘤的比率			
组织	30 分钟	1 小时	3 小时	24 小时	
肝脏	7.9 ± 1.7	15.7 ± 5.4	20.7 ± 7.6	22.3 ± 7.4	
脾	9.4 ± 1.0	19.5 ± 8.6	22.9 ± 7.5	23.8 ± 3.5	
肾	1.2 ± 0.2	3.1 ± 0.6	5.2 ± 1.5	7.3 ± 1.9	
肺	3.7 ± 1.7	5.5 ± 3.6	13.5 ± 7.1	30.8 ± 14.4	
血液	2.7 ± 0.7	4.2 ± 1.3	7.3 ± 2.3	16.1 ± 6.4	

其中加入了 bsAb 清除步骤

一位 69 岁的患有结肠癌的男性患者，在进行完切除手术后一年，发现 CEA 在血浆中的浓度为 50ng/mL。给患者进行了 CT 扫描，发现在其肝脏的左半部有 5 个肿瘤，大小在 1cm-3cm 之间。给患者施用 100mg 的 hMN-14-Fab/734-scFv 融合蛋白。三天后，给患者施用清除剂量的半乳糖-WI2-Fab'。在施用清除剂量的半乳糖-WI2-Fab' 24 小时后，血液中融合蛋白的浓度比注射清除试剂前降低了 20 倍。然后给患者注射 IMP 245 Y-90-di-Bz-DTPA-肽，其中包含 50mCi 的 Y-90。三个月后进行 CT 扫描，结果表明 5 个肿瘤中消失了 3 个，剩余的两个肿瘤体积没有增大。同时，CEA 在血浆中的浓度降低为 10ng/mL。在随后的 6 个月中，CEA 在血浆中的水平没有增加，并且 CT 扫描结果表明所剩下的两个肿瘤没有增长。在第一次治疗后 1 年，在观测到患者 CEA 水平有所增高时，再次对患者进行了所述过程的治疗，在第二次治疗后 3 个月和 6 个月时，观测到两个肿瘤的体积发生了缩小。在 6 个月后，CEA 在血浆中的水平不超过 5ng/mL。

实施例 29) 羧酸酯酶-DTPA 缀合物的制备

将两瓶兔肝脏羧酸酯酶 (SIGMA; 蛋白含量 ~ 17mg) 溶解在 2.2mL 的 0.1 M pH7.7 的磷酸钠缓冲液中，并与 25 倍摩尔过量的 CA-DTPA 混合，其中 CA-DTPA 是新制备的 DMSO 中的储存溶液 (~ 25 mg/mL)。在缀合反应混合物中，DMSO 的最终浓度为 3% (v/v)。温育 1 小时后，使用两个 5mL 的旋转柱 (Sephadex G50/80, 流动相为 pH7.3 0.1M 的磷酸钠缓冲液) 对混合物进行预纯化，除去过量的试剂和 DMSO。使用 TSK 3000G Supelco 柱对所述洗脱液进行进一步的纯化，流动相为 0.2M pH6.8 的磷酸钠缓冲液，流速为 4ml/分钟。使用 Centricon-10™ 浓缩器将包含缀合物的组分浓缩，期间将缓冲液变为 0.1M pH6.5 的醋酸钠缓冲液。回收率：0.9ml, 4.11mg/ml (3.7mg)。联合使用分析型 HPLC 和线内 UV 检测对所述产物进行分析，结果表明有一个保留时间为 9.3 分钟的主峰和一个保留时间为 10.8 分钟的小峰，两者的比率为 95: 5。酶分析结果表明 115 酶单位/mg 蛋白，相当于没有经过修饰的羧酸酯酶。对没有经过修饰的羧酸酯酶和 DTPA-修饰的羧酸酯酶进行质谱分析 (MALDI 模式)，结果表明 DTPA 的平均取代率接近 1.5。使用已知的过量放射性铟示踪进行金属结合分析，在两次完全相同的试验中，得到

的结果分别为 DTPA: 酶为 1.24 和 DTPA: 酶为 1.41。使用活性为 12.0 mCi/mg 的 In-111 醋酸盐标记羧酸酯酶-DTPA, 然后使用过量的非放射性铟醋酸盐进行处理, 最后使用 10mM EDTA 进行处理, 清除其中过量的非放射性铟。HPLC 和 ITLC 分析结果显示放射性铟的掺入率为 97.7 %。用 20 倍摩尔量的过量双特异性抗体 hMN-14 Fab' x 734 Fab' 与经过 HPLC 分析的样品反应, 使样品与抗体完全络合, 然后将所得到的产物进一步与 WI2 (hMN-14 的抗-ID) 进行络合反应, 其中 WI2 是双特异性抗体的 80 倍。

实施例 30) IMP 224 的合成

10 将 0.0596g 包含肽 IMP 221 ($H_2N-NH-C_6H_4-CO-Lys(DTPA)-Tyr-Lys(DTPA)-NH_2$, MH⁺1322, 通过 Fmoc SPPS 制备的) 的苯肼与 0.0245g 溶解在 3mL DMF 中的盐酸多索鲁比辛混合。将反应溶液在室温下黑暗条件下进行反应。反应 4 个小时后, 加入 0.0263 g 的 IMP 221, 然后继续反应过夜。然后使用 HPLC 纯化所有的反应混合物, HPLC 条件为:

15 Waters Nova-Pak (3-40 X 100 mm segment, 6 μ m, 60 埃) 制备柱, 进行梯度洗脱, 洗脱液的梯度为缓冲液 A:B = 80: 20 到 A:B = 60: 40, 洗脱 40 分钟(缓冲液 A=0.3% NH_4OAc , B=0.3% NH_4OAc 在 90% CH_3CN 中)。合并包含产物的组分, 并使之冻干, 得到 0.0453 g 的预定产物, 然后使用 ESMA MH⁺ 1847 进行进一步的确定。

20 实施例 1) IMP 224 试剂盒的配制

将实施例 31 的肽装入到试剂盒中, 在后续过程中用 In-111 对其进行标记。制备 85 mL 包含 5.014 g 2-羟丙基- β -环糊精、和 0.598 g 柠檬酸的溶液。用 1 M 的 NaOH 将溶液的 pH 调至 4.20, 并用水稀释到 100mL。将 0.0010 g 的 IMP 224 肽溶解在 100mL 缓冲液中, 取其中

25 1mL 经过 0.22 μ m Millex GV 滤膜进行无菌过滤, 过滤到 2 mL 的冻干瓶中, 然后将其立即冷冻干燥。

实施例 32) In-111 对 IMP 224 试剂盒进行标记

将 In-111 溶解在 0.5 mL 水中, 并注射到冻干试剂盒中。将试剂盒溶液室温下温育 10 分钟, 然后加入 0.5 mL pH7.2 的缓冲液, 其中

30 所用的缓冲液包含 0.5 M 的 NaOAc 和 2.56×10^{-5} M 的非放射性的铟。

实施例 33) IMP 224 试剂盒的体外稳定性

用 2.52 mCi 的 In-111 使用所述方法对其中一个 IMP 224 试剂盒

进行标记。取其中一部分体积(0.15 mL, 370 μ Ci)与 0.9 mL 0.5 M pH4.0 的柠檬酸盐缓冲液、0.9 mL 0.5 M pH5.0 的柠檬酸盐缓冲液和 0.9 mL 0.5 M pH7.5 的磷酸盐缓冲液混合。然后使用反相 HPLC 对标记的肽进行稳定性研究。HPLC 的条件是: Waters Radial-Pak C-18 Nova-Pak 8x100mm, 流速为 3 mL/分钟, 梯度为: 100% A 到 100% B, 其中 A 为 0.3% NH₄Oac, B 为 90% CH₃CN、0.3% NH₄Oac, 洗脱时间为 10 分钟。

表 14

In/In-111 IMP 224 的体外稳定性结果

试剂盒		pH 4.0		pH 5.0		pH 7.5	
时间	完整肽	时间	完整肽	时间	完整肽	时间	完整肽
	00	4 分钟	00	0 分钟	00	0.5 小时	00
		1 小时	00*	1 小时	00*	0.5 小时	4
1 小时	9	9 小时	5	0 小时	1	0 小时	0

*表示已经分解没有计算在峰面积中的肽

实施例 34) IMP 221 在 BALB/c 小鼠中的体内生理分布

10 将 0.5 mL 含 400 μ Ci In-111 的水加入到试剂盒中。将该 In-111 试剂盒溶液室温下温育 10 分钟, 然后用含 1.5 mL 非放射性的铟的 pH7.2 0.5M 的醋酸盐缓冲液将其稀释。然后使用 ITLC 在饱和 NaCl 条件下分析标记的肽。游离 In-111 位于 ITLC 长条上部 20%。

15 给每只小鼠注射 100 μ L (20 μ Ci) 的 In-111 标记肽。分别在注射后 30 分钟、1 小时、2 小时、4 小时和 24 小时时将动物麻醉并杀死, 每个时间点取三只小鼠。分别取鼠的血液、肌肉、肝脏、肺、肾、脾、大肠、小肠、胃、尿和尾巴, 计算其分布量。所述生理分布研究结果列于下表中。

表 15

IMP 224 (Dox=N-NH-C₆H₄-CO-Lys (DTPA)-Tyr-Lys (DTPA)-NH₂ MH⁺

1847, 已经用 In-111 进行了标记, 并用非放射性的 In 进行了饱和)

在 BALB/c 小鼠中的生理分布结果, % ID/g.

组织	30 分钟	1 小时	2 小时	4 小时	24 小时
肝脏	0.57 ± 0.04	0.31 ± 0.03	0.17 ± 0.03	0.17 ± 0.01	0.13 ± 0.02
脾	0.57 ± 0.18	0.27 ± 0.06	0.12 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.07 ± 0.00
肾	8.45 ± 1.79	5.36 ± 1.01	3.75 ± 0.52	4.03 ± 0.45	2.12 ± 0.17
肺	1.61 ± 0.34	0.99 ± 0.26	0.25 ± 0.02	0.17 ± 0.02	0.09 ± 0.02
血液	1.44 ± 0.28	0.54 ± 0.12	0.12 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.02 ± 0.00
胃	0.61 ± 0.07	0.15 ± 0.07	0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.02	0.04 ± 0.02
小肠	0.72 ± 0.08	0.37 ± 0.19	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.03	0.05 ± 0.01
大肠	0.59 ± 0.43	0.18 ± 0.04	0.38 ± 0.15	0.30 ± 0.06	0.08 ± 0.03
肌肉	0.51 ± 0.19	0.21 ± 0.08	0.03 ± 0.02	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00
尿	1553	1400 ± 421	19.1	1.72 ± 0.67	0.42 ± 0.18
尾巴	3.66 ± 0.43	1.90 ± 0.09	0.46 ± 0.09	0.24 ± 0.03	0.58 ± 0.22

实施例 35) IMP 224 的体内稳定性和清除

将 0.5 mL 含 400mCi In-111 的水加入到试剂盒中。将该 In-111 试剂盒室温下温育 10 分钟, 然后用含 0.5 mL 非放射性的铟的 pH7.2 0.5M 的醋酸盐缓冲液将其稀释。然后使用 ITLC 在饱和 NaCl 条件下分析标记的肽。游离 In-111 位于 ITLC 长条上部 20%。

给每只小鼠注射 100 μL (400 μCi) 的 In-111 标记肽。分别在注射后 30 分钟和 1 小时时将动物麻醉并杀死, 每个时间点取两只动物。收集血清和尿样品, 并将其储存在冰上, 并尽量快速地在冰上运送到 HPLC 处, 进行 HPLC 分析。尿样品的 HPLC (排阻层析) 分析结果显示, In-111 标记的肽仍能与抗体结合。反相 HPLC 分析结果显示, 在尿中的放射性标记肽是完整的。在血清中残留的活性量太低, 不能使用灵敏度较低的反相 HPLC 进行分析。多索鲁比辛在肝胆管中的清除率 ~ 95%。因此, 通过将可水解形式的双 DTPA 肽连接到药物上, 从而使药物在体内的生理分布转变为 100% 从肾中排泄。这可以使药物在体内的毒性大大降低, 因为所有的未靶向定位的药物都可以以完整形式被快速排泄。

表 16

在尿和血清中回收到的活性

组织	30 分钟		1 小时	
	动物 # 1	动物 # 2	动物 # 1	动物 # 2
尿	220 μ Ci	133 μ Ci	41.1 μ Ci	273 μ Ci
血清	1.92 μ Ci	3.64 μ Ci	1.21 μ Ci	1.27 μ Ci

实施例 36) 用 IMP 224 和 IMP 225 进行前靶向定位试验

使用一种包含 10 μ g 肽的 IMP 224 冻干试剂盒。向 2ml 的冻干试剂瓶中加入 1 mL 无菌水。取其中 0.5mL 与 1.0 mCi In-111 混合。将
5 所述 In-111 试剂盒溶液在室温下温育 10 分钟，然后取其中 0.1mL 用 1.9mL 非放射性的烟醋酸盐缓冲液 BM 8-12 稀释在无菌瓶中。然后使用 ITLC 在饱和 NaCl 条件下分析标记的肽。游离 In-111 位于 ITLC 长条上部 20%。

使用带有 GW-39 异种移植肿瘤的雌性裸小鼠 (Taconic NCRNU, 3-4
10 周龄) 进行前靶向定位试验。肿瘤在 0.3-0.8g 之间。给每只动物注射 100 微升 (5 μ Ci, 15 μ g, 1.5×10^{-10} mol) 的 I-125 标记的抗体 F6 x 734-(Fab')₂。

72 小时后，给每只小鼠注射 100 微升 (10 μ Ci) In-111 标记的肽。然后分别在注射后 1 小时、4 小时和 24 小时时将动物麻醉并杀死，每
15 个时间点取 5 只鼠。然后取小鼠的肿瘤、血液、肌肉、肝脏、肺、肾、脾、大肠、小肠、胃、尿和尾巴，并进行计算。

用包含 11 μ g 肽的 IMP 225 (Ac-Cys (Dox-COCH₂)-Lys (DTPA)-Tyr-Lys (DTPA)-NH₂ (SEQ ID NO: 11)MNa⁺1938) 冻干试剂盒重复所述的试验。

表 17

In-111-IMP-224 在 GW-39 肿瘤异种移植裸鼠中的生理分布, 在 72 小时前曾施用了 F6x734-F(ab')₂。单位为 % ID/g 组织。n=5。

组织	1 小时		4 小时		24 小时	
	I-125	In-111	I-125	In-111	I-125	In-111
GW-39	10.0±1.5	10.3±1.7	9.8±2.6	11.0±2.0	8.8±1.2	9.7±1.1
肝脏	0.1±0.0	0.4±0.1	0.1±0.0	0.3±0.0	0.1±0.0	0.3±0.0
脾	0.1±0.0	0.4±0.1	0.1±0.0	0.2±0.0	0.1±0.0	0.2±0.0
肾	0.3±0.1	3.5±0.6	0.2±0.0	2.8±0.3	0.2±0.0	1.9±0.2
肺	0.2±0.0	0.8±0.2	0.2±0.0	0.4±0.0	0.2±0.0	0.1±0.0
血液	0.4±0.1	1.8±0.6	0.4±0.1	0.9±0.2	0.4±0.0	0.2±0.0
胃	0.5±0.2	0.8±1.3	0.5±0.2	0.1±0.0	0.7±0.2	0.1±0.0
小肠	0.1±0.0	0.5±0.4	0.1±0.0	0.2±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0
大肠	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.3±0.1	0.1±0.1	0.1±0.1
肌肉	0.0±0.0	0.3±0.2	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
尿	1.1±2.0	168±106	1.8±0.6	31.8±31	0.9±0.2	1.2±0.2
尾巴	0.1±0.0	1.1±0.2	0.1±0.0	0.4±0.1	0.2±0.0	0.2±0.0

表 18

In-111-IMP-224 在 GW-39 肿瘤异种移植裸鼠中的生理分布, 在 72 小时前曾施用了 F6x734-F(ab')₂。数据是: 肿瘤与正常器官的比率。n=5。

组织	1 小时		4 小时		24 小时	
	I-125	In-111	I-125	In-111	I-125	In-111
GW-39	1	1	1	1	1	1
肝脏	85.4±25	24.0±5.9	81.8±25	35.4±6.9	61.1±8.5	31.6±5.8
脾	81.0±34	28.7±8.7	74.5±25	44.7±10	60.8±8.6	47.0±2.2
肾	39.7±9.4	3.0±0.5	57.1±14	3.9±0.5	39.6±4.8	5.0±0.5
肺	51.2±10	13.4±2.7	50.7±10	30.1±4.9	50.3±10	69.0±9.4
血液	25.2±8.3	6.1±2.5	22.9±7	12.8±2.0	21.8±4.2	41.8±6.3
胃	21.0±6.7	48.7±37	22.1±7	128±46	14.9±6.0	147±39
小肠	137±41	31.9±18	128±37	51.6±14	102±3.7	110±13
大肠	136±32	87.1±35	130±39	45.6±19	113±12	92.4±38
肌肉	209±86	38.6±13	139±	727±797	233±42	283±46
尿	11.0±23	0.3±0.5	6.3±4.2	0.71±0.6	9.8±1.9	8.3±1.3
尾巴	72.7±20	9.4±2.8	73.6±20	26.4±5.2	53.9±10	55.9±5.7

表 19

In-111-IMP-225 在 GW-39 肿瘤异种移植裸鼠中的生理分布, 在 72 小时前曾施用了 F6x734-F(ab')₂。单位为 % ID/g 组织。n=5

组织	1 小时		4 小时		24 小时	
	I-125	In-111	I-125	In-111	I-125	In-111
GW-39	6.2±5.9	14.6±14	10.5±3.8	16.5±4.8	8.3±3.0	10.1±2.3
肝脏	0.1±0.1	0.4±0.2	0.2±0.0	0.4±0.1	0.1±0.0	0.3±0.1
脾	0.5±0.7	1.6±2.4	0.2±0.1	0.4±0.1	0.1±0.0	0.4±0.1
肾	0.3±0.1	3.8±0.9	0.3±0.1	3.8±0.4	0.2±0.1	1.7±0.3
肺	0.3±0.1	0.8±0.4	0.3±0.0	0.6±0.1	0.2±0.1	0.2±0.1
血液	0.5±0.1	2.0±0.4	0.8±0.4	1.3±0.2	0.3±0.1	0.4±0.2
胃	0.1±0.2	1.1±0.9	0.8±0.4	0.4±0.2	0.3±0.0	0.1±0.0
小肠	0.1±0.0	0.4±0.1	0.1±0.0	0.3±0.2	0.1±0.0	0.1±0.0
大肠	0.1±0.0	0.2±0.0	0.1±0.0	0.3±0.1	0.1±0.0	0.1±0.0
肌肉	0.0±0.0	0.3±0.2	0.1±0.0	0.2±0.0	0.0±0.0	0.1±0.0
尿	2.8±3.4	110±40	2.0±1.0	13.5±6.4	0.3±0.3	0.7±0.4
尾巴	0.4±0.2	1.2±0.1	0.2±0.0	0.8±0.2	0.1±0.1	0.5±0.7

本发明所述的双特异性构建体或其它具有类似特性的物质均适合用于前靶向定位 RAIT, 其中 IMP-192 和它的类似物用治疗放射性同位素如 188-Re、213-Bi、67-Cu 等进行了标记。应当认为治疗螯合物能够缀合到肽上, 其中肽除了具有螯合物表位外, 还有可被 bsAbs 识别的表位, 这正如前面所描述的。

还应当意识到, 可以使用本发明的前靶向定位方法, 将可检测的放射性标记连接上不同的接头, 直接被介导到预定位点, 如肿瘤, 其中所述预定位点是将在手术中、内窥镜、血管内或其它类似过程中被切除的或是被检测的和/或是被治疗的。使用非放射性的 bsAbs 也可以实现前靶向定位, 而且在所述过程中, 最后所施用的低分子量放射性标记接头, 在体内定位的速度和未结合接头在体内的清除速度都比较快, 这与手术过程中应当避免不必要的拖延相一致, 并且所述过程中还可以使用半衰期较短的放射性同位素。另外, 所公开的治疗剂也可以用于手术后的放射性免疫治疗方案, 以确保彻底根除残余的肿瘤细胞。

实施例 37) DOTA-Phe-Lys (HSG)-D-Tyr-Lys (HSG)-Lys (Tscg-Cys)-NH₂ (SEQ ID NO:1) (IMP245) 的合成

使用在合成 IMP 192 时所描述的双偶联过程来合成所述肽。使用 5eq 受保护的 DOTA 将三-t-丁基 DOTA 加到带有单个苯并三唑-1-基-氧代-三-(二甲氨基)-磷鎓六氟磷酸盐 (BOP) 的肽的 C-末端, 偶联时间为 16 小时。然后用醋酸酐处理树脂。然后使用钨催化剂去掉侧链上的 Alloc 基团, 并根据合成 IMP 243 时所描述的方法, 加上 N-三苯甲基-HSG 基团。将产物从树脂上切割下来, 并用 HPLC 纯化, 收集其中的四种组分, 冻干后, 得到 0.2385g 的产物。ESMS MH⁺ 1832

10 实施例 38) Tc-99m 试剂盒组成

制备一种配方缓冲液, 其包含 22.093 g 的羟丙基-β-环糊精、0.45 g 的 2,4-二羟苯甲酸、0.257g 的醋酸钠、和 10.889g 的 α-D-葡庚糖酸钠, 将所述成分溶解在 170mL 的脱氨水中。用几滴 1M 的 NaOH 将所述溶液的 pH 调至 5.3, 然后稀释到总量 220mL。取 15 0.2mL SnCl₂ (200mg/mL) 溶液, 用 3.8mL 的配方缓冲液将其稀释, 制得二价锡缓冲液。将肽 IMP 245 (0.0029g) 溶解在 1mL 浓度为 1.6 x 10⁻³ M 的 InCl₃ 盐酸溶液中, 其中盐酸的浓度为 0.1M。将肽溶液与 2 mL 0.5 M 的 NH₄OAc 溶液混合, 并室温下温育 15 分钟。然后将 75mL 的配方缓冲液和 0.52mL 的二价锡缓冲液加入到肽溶液中。然后将 1.5mL 的肽溶液通过 0.22 μm Millex GV 过滤器过滤到 3mL 的冻干瓶中。然后将 20 瓶立即冷冻、并冻干, 并在真空下密封。

实施例 39) 用 Tc-99m 对 IMP 245 进行标记

高温 (沸水浴)

25 将溶解在 1.5mL 盐水中的高锝酸盐溶液 (29mCi) 加入到试剂盒中。然后将试剂盒在室温下温育 10 分钟, 并在沸水浴中加热 15 分钟。在使用前将试剂盒冷却到室温。

低温 (37℃)

30 将溶解在 1.5mL 盐水中的高锝酸盐溶液 (25mCi) 加入到试剂盒中。然后将试剂盒在室温孵育 14 分钟, 然后在 37℃ 水浴中加热 18 分钟, 试剂盒在使用前冷却至室温。因为使用了不同的注射器, 此次标记的 HPLC 保留时间略有不同。

实施例 40) IMP 245 的肽分析 (HPLC)

使用反相 HPLC 和排阻 HPLC 分析所述肽 (结果在下面列出)。排阻 HPLC 示踪结果表明肽结合了两个 mMU-9 x m679 和两个 hMN-14 x m679 双特异性抗体 (参见 "A Universal Pre-Targeting System for Cancer Detection and Therapy Using Bi-specific Antibody", Sharkey, R. M., McBride, W. J., Karacay, H., Chang, K., Griffiths, G. L., Hansen, H. J., 和 Goldenberg, D. M., 在此将该文献全文引入本发明)。反相 HPLC 结果表明在主峰之前有几个小峰出现, 而且加热好像不能显著改变小峰与大峰的比率。

SEC 回收率

- 10 单独的 Tc-99m Imp 245 为 54%,
Tc-99m IMP 245 + hMN-14 x m679 为 66%,
Tc-99m IMP 245 + mMU-9 x m679 为 66%。

实施例 41) IMP245 在血清中的稳定性

- 15 取 50 μ L 的 Tc-99m IMP 245, 用 470 μ L 新鲜小鼠血清稀释, 并在 37 $^{\circ}$ C 下温育。分别在温育 2.5 小时和 19 小时时, 取其中一部分体积使用反相 HPLC 进行分析。结果表明所述肽表现的相当稳定。

实施例 42) 非放射性的铼 IMP 245 酮基复合物的合成

- 20 将 0.0504 g 的 IMP 245 与 0.0045 g 的 $\text{ReOBr}_2 \cdot \text{N}(\text{bu})_2$ (根据 Cotton 等的方法合成) 和 50 μ L 溶在 1mL DMF 中的 DIEA 混合, 室温下混合 5 天, 来制备铼酮基复合物。使用 HPLC 来纯化所有的反应混合物, 最终得到 0.0118g 的预期产物。ESMSMH⁺2031

实施例 43) Tc-99m 试剂盒的组成 (龙胆酸配方)

- 25 将 (0.0029g, 1.58×10^{-6} mol) IMP 245 肽溶解于 2.0 mL 0.5M pH5.5 的 NH_4OAc 缓冲液中, 其中缓冲液中包含 0.0020 g 的 InCl_3 。将肽溶液在 50 $^{\circ}$ C 下加热 17 分钟。将 22.093g 的羟丙基- β -环糊精 (HPCD)、0.450g 的 2,4-二羟苯甲酸 (龙胆酸)、0.257g 的醋酸钠、10.889g 的 α -D-葡萄糖酸溶解在 170mL 的脱氮 DI 水中。用几滴 1M 的 NaOH 将所述溶液的 pH 调至 5.30, 然后用 DI 水稀释到总量 220mL。然后将配方缓冲液经过 0.22 μ m 的过滤器进行无菌过滤。取 0.2mL
30 (200mg/mL SnCl_2 溶解在 6M 的 HCl 中) 溶液, 用 3.8mL 的配方缓冲液将其稀释到无氮的无菌瓶中, 制得二价锡缓冲液。然后将肽溶液与 76mL 的配方缓冲液和 0.56mL 的二价锡缓冲液混合。然后将 1.5mL 的所述溶

液通过 Millex GV 0.22mm 过滤器过滤到 3mL 的冻干瓶中。然后将冻干瓶立即在干冰中冷冻直至冻干。在冻干完成后，将试剂盒在真空下密封。每个试剂盒包含 55 μg 的肽和 1.5mL 的 $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ 盐水溶液。

实施例 44) Tc-99m 试剂盒组成 (抗坏血酸配方)

- 5 用抗坏血酸配制的 Tc-99m 试剂盒的制备方法与龙胆酸试剂盒的制备方法相同，只是用 0.222g 的 L-抗坏血酸取代龙胆酸。

实施例 45) 对 Tc-99m 试剂盒进行标记

- 用 1.5mL 的 $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ 盐水溶液 (0.5-70 mCi) 溶解试剂盒中的肽，然后在室温下温育 10 分钟。然后将试剂盒在沸水浴中加热 15 分钟，并在使用前将其冷却到室温。
- 10

实施例 46) Tc-99m/In IMP 245 的标记和稳定性

- 前面的标记表明用非放射性的铟对 DOTA 进行饱和能够使 Tc-99m/In IMP 245 的产量提高。龙胆酸配方的试剂盒在用 1.5mL 30mCi Tc-99m In 对肽进行标记时，表现出更加清晰的初始标记，而抗坏血酸配方的试剂盒在标记后，标记肽在室温储存过夜时表现得更加稳定。前面所进行的 Tc-99m 标记的肽在 37 $^{\circ}\text{C}$ 新鲜血清中的稳定性研究表明，Tc-99m 标记的肽在血清中与在试剂盒中一样稳定。对所述标记肽进行扩展梯度 HPLC 分析，结果显示标记肽有两个峰。导致两个峰的原因可能是由于顺反 Tc 氧化物的形成。两个峰的比率随肽的序列、组成和标记条件的变化而变化。
- 15
- 20

实施例 47) Y-90 和 In-111 对 IMP 245 进行标记

- 将肽溶解在 0.5M pH3.08 的 NH_4OAc 溶液中，肽的浓度为 $2.2 \times 10^{-3}\text{M}$ 。取其中 3.5 μL 的肽溶液，将其与 165 μL 0.5M pH3.93 的 NH_4OAc 溶液和 6 μL 的 Y-90 溶液混合。然后将混合物加热到 85-95 $^{\circ}\text{C}$ ，持续 20 分钟。对所述混合物所进行的反相 HPLC 分析结果显示肽被很好地标记了。
- 25

- 在几个不同的条件下使用 In-111 进行了与所述过程类似的标记过程，但都没有得到清晰标记的产物。随后对没有标记的肽进行 HPLC 分析，结果显示生成了几个新的峰。该肽在贮存过程中可能生成了二硫化物。在随后的过程中加入了 Tc/Re 配体，与非放射性的铟一起进行预饱和，以使肽更加稳定，更加有利于进行 Y-90、Lu-177 和 In-111 标记。
- 30

实施例 48) 用 In-111 对 ReO IMP 245 进行标记

将 0.0025 g 的 ReO IMP 245 肽 (MH'2031) 溶解在 560 μ L 0.5M pH3.98 的 NH_4OAc 缓冲液中 (肽的浓度为 $2.2 \times 10^{-3}\text{M}$)。取 2.7 μ L 的 ReO IMP 245 溶液, 使之与 2 μ L 的 In-111 (573 μ Ci) 和 150 μ L 的 0.5 M pH3.98 的 NH_4OAc 缓冲液混合。然后将溶液在沸水浴中加热 20 分钟。HPLC 分析结果显示出现了一个清晰的标记肽的峰, 其保留时间类似于 Tc-99m/In IMP 245。

实施例 49) 生成适于用 ^{90}Y 、 ^{111}In 、和 ^{177}Lu 进行标记的肽 bsMAbs 的制备

10 双特异性抗体 $\text{F}(\text{ab}')_2$ 是由人源化 MN-14 抗-CEA 或鼠 Mu-9 抗-CSAp 的 Fab' 片段和鼠 679 组成的, 在制备所述双特异性抗体时使用了 PDM 作为交联接头。首先制备亲代抗体的 $\text{F}(\text{ab}')_2$ 。对于 hMN-14 或 Mu-9 来说, 用 1mM 的 DTT 将 $\text{F}(\text{ab}')_2$ 还原为 $\text{Fab}'\text{-SH}$, 并使之渗滤到含有 0.5 mM EDTA 的 pH5.3 的醋酸盐缓冲液中 (醋酸盐/EDTA 缓冲液), 以
15 除去 DTT, 并浓缩至 5-10mg/mL, 在使用前一直将其储存在 2-8 $^{\circ}$ C 条件下。对于 679, 使用 1mM 的 DTT 将 $\text{F}(\text{ab}')_2$ 还原为 $\text{Fab}'\text{-SH}$, 然后用 5 倍体积的醋酸盐/EDTA 缓冲液将其稀释, 然后快速加入 20mM 的 PDM (用 90% DMF 来制备), 使之最终浓度为 4mM。室温搅拌 30 分钟, 之后将所得到的溶液 (包含 679 $\text{Fab}'\text{-PDM}$) 渗滤到醋酸盐/EDTA 缓冲液中直至
20 使游离 PDM 的量到达最低限度, 并使所述溶液的浓度浓缩至 5-10mg/mL。然后将 hMN-14 $\text{Fab}'\text{-SH}$ 或 Mu-9 $\text{Fab}'\text{-SH}$ 与 679 $\text{Fab}'\text{-PDM}$ 以 1:1 的比例混合, 所述比例是根据 Fab' 的量来计算的。加入半胱氨酸至终浓度 2mM, 来淬灭缀合反应, 然后在 Superdex 200-填充柱 (Amersham, Pharmacia Bio, Piscataway, NJ) 上进行纯化, 得到预期
25 的双特异性缀合物 ($\sim 100\text{kDa}$)。然后使用 SE-HPLC, SDS-PAGE 和 IEF 对所述双特异性缀合物进行分析。对于 hMN-14 x m679 $\text{F}(\text{ab}')_2$, 其双特异性通过 BIAcore 和 SE-HPLC 来加以证明。另外, 使用 CM-5 芯片按照制造商 (Biacore, Inc., Piscataway, NJ08854) 推荐的方法进行 BIAcore 分析来检测 hMN-14 x 679 对 HSG 的亲合性, 其中 CM-5 芯片
30 来自一种包含单个 HSG 取代分子和硫醇的肽。

为了进行生理分布研究, 首先用 $^{125}\text{I}\text{Na}$ (Perkin Elmer Life Science, Inc. Boston, MA) 使用氯胺-T 方法 (20) 对 hMN-14 x

m679F(ab')₂进行放射性碘标记,然后使用离心排阻柱进行纯化。在质量检测试验中,使用ITLC分析发现未结合的放射性碘小于5%,SE-HPLC(Bio-Sil SE 250, Bio Rad, Hercules, CA)分析显示有大于90%的产物以相同的速率进行迁移,形成了一个单峰,在加入过量CEA
5 (Scripps Laboratories, San Diego, CA)的情况下,有大于90%的放射性标记产物转变为具有更高分子量的另一种成分。以类似的方法对¹²⁵I-mMu-9 x m679 bsMAB进行测试,使用GW-39人类结肠异种移植肿瘤的部分纯化提取物作为CSAp的来源,它能使mMu-9 x 679bsMAB的洗脱部分变为SE-HPLC柱的无效组分。

10 以所述类似的方法制备人源化MN-14(hMN-14)Fab'-SH。将^{99m}Tc-高锝酸盐(30mCi)直接加入到冻干的hMN-14-Fab'-SH(1.0mg)中,并在30分钟内注射到动物体内。通过ITLC分析显示,所述产品有3.0%未结合的^{99m}Tc,并有92%的免疫反应组分。

肽的放射性标记

15 用于进行⁹⁰Y、¹¹¹In、和¹⁷⁷Lu标记的二价HSG-肽,即IMP241,其包含DOTA配体,以使所述放射性金属更容易进行结合。将IMP241溶解在0.5M醋酸铵(pH4.0)中,浓度为 2.2×10^{-3} M。⁹⁰YCl₃来自于Perkin Elmer Life Sciences, Inc. (Boston, MA), ¹¹¹InCl₃来自于Iso Tex Diagnostics (Friendswood, TX), ¹⁷⁷Lu来自于Research Reactor
20 Facility, University of Missouri-Columbia, (Columbia, MO)。

在塑料锥形瓶中将3mCi的¹¹¹InCl₃与0.5M pH4.0的醋酸铵(3倍于¹¹¹InCl₃的体积)和2.3μL IMP 241(溶解在0.5M pH4.0的醋酸铵溶液中,浓度为 2.2×10^{-3} M)混合,来制备¹¹¹In-IMP 241。在离心
25 之后,将混合物在沸水浴中加热30分钟,并随后冷却。将混合物离心,并加入DTPA,使之最终浓度为3mM。在室温下15分钟后,用0.1M pH6.5的醋酸钠将其最终体积升至1.0mL。使用在饱和氯化钠溶液中平衡的反相HPLC和ITLC来检测未结合的同位素的量。反相HPLC分析所使用的柱子是Waters 8 x 100mm radial Pak cartridge,填充物是C-18 N-va-Pak 4μm(固相)。柱子的洗脱速度为1.5mL/分钟,线性梯度为
30 100%A到55%A和45%B,其中A为0.075%的TFA水溶液,B为0.075% TFA溶解在75%乙腈和25%的水组成的溶液中,洗脱时间为15分钟。在洗脱到15分钟时,溶剂已经转换为100%B,在再平衡到起始

条件之前,使柱子在该溶剂条件下保持5分钟。反相HPLC结果显示有一个保留时间为11.8分钟的单峰。将 ^{111}In -IMP 241与过量m679IgG混合,并在Bio-Sil SE 250 HPLC凝胶过滤柱上进行分析,结果显示出现了一个与抗体保留时间相同的峰,这表明两者已经发生了结合。

- 5 用 ^{90}Y 放射性标记IMP-241时,将15mCi的 $^{90}\text{YCl}_3$ 、3倍体积的0.5M pH4.0的醋酸铵、和83.2 μL 的IMP-241(溶解在0.5M pH4.0的醋酸铵中,浓度为 1.1×10^{-4} M)混合,并加入抗坏血酸,使抗坏血酸的最终浓度为6.75mg/mL。然后将混合物在沸水浴中加热30分钟,并冷却至室温,之后加入DTPA,使之最终浓度为5mM。15分钟之后,用
- 10 0.1M pH6.5的醋酸钠将最终体积升至1.0mL。用已经在饱和氯化钠溶液中平衡的ITLC条进行分析,结果显示有小于0.2%的未结合的同位素。将 ^{90}Y -IMP 241与过量m679 IgG混合,然后进行SE-HPLC分析,结果显示出现了一个与抗体保留时间相同的峰,这表明两者已经发生了结合。

- 15 用小鼠血清来测试放射性标记肽的稳定性,将放射性标记肽稀释在10倍体积的小鼠血清中,并在37 $^{\circ}\text{C}$ 下温育混合溶液。分别在1小时、3小时、和24小时时抽取样品,并用反相HPLC进行分析。

在体内的前靶向定位研究

- 20 GW-39,一种产自人类结肠肿瘤的CEA细胞系(参见 Goldenberg, D. M 和 Hansen, H. J, Carcinoembryonic antigen present in human colonic neoplasms serially propagated in hamsters, Science, 175:1117-18(1972))在裸鼠中进行连续的传代繁殖,方法是在无菌盐水中将1-2克的肿瘤切碎,将切碎的混合物通过金属丝网筛,并将盐水体积调至每10mL盐水中含有1克的肿瘤。给
- 25 6周龄左右的雌性NCR裸鼠(Charles River Laboratories, Inc., Fredrick MD或Taconic, Germantown, NY)连续灌输0.2ml的所述悬浮液。在肿瘤移植两到三周后,给动物注射单独的放射性标记肽,或为了进行前靶向定位,在注射放射性标记肽之前1到2天给动物施用bsMAb。在前靶向定位过程中,首先给动物静脉注射
- 30 1.5×10^{-10} 摩尔(15 μg ; 6 μCi ^{125}I)的bsMAb(0.1到0.2mL),然后给动物静脉注射(0.1-0.2mL) ^{111}In -IMP-241(1.5×10^{-11} 摩尔, 8-10 μCi)、 ^{177}Lu -IMP-241(1.5×10^{-11} 摩尔, 5 μCi)、或 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -IMP-

243 (1.5×10^{-11} 摩尔, 25-30 μCi)。在注射肽指定时间之后, 将动物麻醉, 心脏穿刺放血, 在尸体解剖之前将动物无痛致死。取动物组织、称重并使用合适的窗口通过 γ -闪烁计算每种组织的放射性核素的量和注射材料的标准放射量。GI 组织 (胃、小肠和大肠带着内容物一起称重和计算)。每克组织的注射剂量 (% ID/g) 和肽在肿瘤组织与正常组织中的百分比率 (T/NT) 列于下表中。表中和附图中所有的数值均是每次研究中所使用的动物的平均值和标准偏差。

结果

表 20

¹¹¹ In-IMP-241 的生理分布。给裸鼠静脉注射肽, 并在预定时间点解剖动物。数值是平均值 \pm SD (n=4)。			
组织	30 分钟	3 小时	24 小时
	%ID/g	%ID/g	%ID/g
肿瘤 (重量, g)	1.42 \pm 0.36 (0.242 \pm 0.245)	0.10 \pm 0.03 (0.179 \pm 0.053)	0.03 \pm 0.02 (0.239 \pm 0.046)
肝脏	0.20 \pm 0.03	0.07 \pm 0.01	0.06 \pm 0.01
脾	0.16 \pm 0.03	0.04 \pm 0.01	0.04 \pm 0.01
肾	4.07 \pm 0.89	2.13 \pm 0.21	1.72 \pm 0.69
肺	0.47 \pm 0.07	0.06 \pm 0.02	0.02 \pm 0.006
血液	0.39 \pm 0.10	< 0.01 ^a	< 0.01 ^a
胃	0.17 \pm 0.15	0.19 \pm 0.25	0.01 \pm 0.005
小肠	0.40 \pm 0.20	0.54 \pm 0.72	0.02 \pm 0.006
大肠	0.09 \pm 0.01	0.11 \pm 0.03	0.03 \pm 0.004

10 ^a表示放射性浓度在检测限以下。

表 21

¹¹¹ Lu-IMP-241 的生理分布。给裸鼠静脉注射肽, 并在预定时间点解剖动物。数值是平均值 \pm SD (n=5)。			
组织	1 小时	3 小时	24 小时
	% ID/g	% ID/g	% ID/g
肿瘤 (重量, g)	0.81 \pm 0.20 (0.517 \pm 0.069)	0.14 \pm 0.08 (0.665 \pm 0.261)	0.03 \pm 0.01 (0.538 \pm 0.302)
肝脏	0.11 \pm 0.01	0.08 \pm 0.01	0.08 \pm 0.01
脾	0.11 \pm 0.06	0.02 \pm 0.01	0.05 \pm 0.01
肾	3.68 \pm 0.57	2.52 \pm 0.42	1.76 \pm 0.53
肺	0.20 \pm 0.06	0.05 \pm 0.01	0.03 \pm 0.01
血液	0.15 \pm 0.04	< 0.01 ^a	< 0.01 ^a
胃	0.09 \pm 0.08	0.08 \pm 0.12	0.03 \pm 0.01
小肠	0.29 \pm 0.23	0.21 \pm 0.32	0.03 \pm 0.01
大肠	0.05 \pm 0.02	0.36 \pm 0.45	0.06 \pm 0.04

^a表示放射性浓度在检测限以下。

表 22

^{99m} Tc-IMP-243 和 ^{99m} Tc-IMP-245 的生理分布。给裸鼠静脉注射肽，并在预定时间点解剖动物。数值是平均值 ± SD (n=5)。					
组织	^{99m} Tc-IMP-243			^{99m} Tc-IMP-245	
	1 小时	3 小时	24 小时	30 分钟	3 小时
	% ID/g	% ID/g	% ID/g	% ID/g	% ID/g
肿瘤 (重量, g)	1.23 ± 0.38 (0.450 ± 0.179)	0.44 ± 0.13 (0.379 ± 0.168)	0.10 ± 0.02 (0.439 ± 0.230)	2.11 ± 0.36 (0.273 ± 0.032)	0.29 ± 0.11 (0.275 ± 0.085)
肝脏	3.29 ± 1.46	1.29 ± 0.95	0.15 ± 0.04	0.63 ± 0.10	0.24 ± 0.02
脾	0.45 ± 0.09	0.22 ± 0.03	0.10 ± 0.04	0.46 ± 0.10	0.10 ± 0.01
肾	6.57 ± 1.13	4.12 ± 0.86	1.82 ± 0.33	8.63 ± 2.42	2.38 ± 0.21
肺	1.09 ± 0.16	0.39 ± 0.04	0.10 ± 0.02	1.40 ± 0.32	0.17 ± 0.02
血液	0.99 ± 0.12	0.43 ± 0.11	0.07 ± 0.01	1.56 ± 0.43	0.19 ± 0.02
胃	1.84 ± 0.55	0.68 ± 0.31	0.14 ± 0.06	0.82 ± 0.82	0.35 ± 0.15
小肠	24.3 ± 4.75	2.53 ± 0.95	0.08 ± 0.02	1.19 ± 0.70	0.53 ± 0.33
大肠	0.63 ± 0.71	40.0 ± 10.4	0.17 ± 0.06	0.25 ± 0.05	1.13 ± 0.20

表 23

使用 hMN-14 x m679F(ab') ₂ bsMab 对 ^{99m} Tc-IMP-243 进行前靶向定位						
组织	肽注射后 3 小时 (n=5)			肽注射后 24 小时 (n=4)		
	¹²⁵ I-bsMab %ID/g	^{99m} Tc-IMP-243 %ID/g	T/TNT	¹²⁵ I-bsMab %ID/g	^{99m} Tc-IMP-243 %ID/g	T/TNT
肿瘤 (重量, g)	4.78 ± 1.11 (0.547 ± 0.265)	12.25 ± 3.32	---	2.24 ± 0.53 (0.390 ± 0.265)	7.36 ± 3.19	---
肝脏	1.17 ± 0.19	2.00 ± 0.35	6.2 ± 1.5	0.27 ± 0.08	0.51 ± 0.13	14.4 ± 4.4
脾	2.24 ± 0.57	1.55 ± 0.43	8.4 ± 2.9	0.60 ± 0.23	0.48 ± 0.15	15.9 ± 6.3
肾	0.81 ± 0.21	4.52 ± 0.79	2.7 ± 0.5	0.20 ± 0.05	2.08 ± 0.38	3.5 ± 1.3
肺	1.02 ± 0.29	2.41 ± 0.60	5.3 ± 1.7	0.24 ± 0.04	0.53 ± 0.12	14.1 ± 4.9
血液	1.48 ± 0.35	5.31 ± 1.32	2.4 ± 0.6	0.41 ± 0.08	1.08 ± 0.29	6.9 ± 2.3
胃	7.61 ± 3.33	1.51 ± 0.64	9.5 ± 4.6	0.57 ± 0.26	0.27 ± 0.14	27.8 ± 1.5
小肠	0.51 ± 0.15	5.44 ± 2.42	2.4 ± 0.7	0.10 ± 0.03	0.37 ± 0.21	22.2 ± 8.0
大肠	1.22 ± 0.10	24.79 ± 2.82	0.5 ± 0.2	0.09 ± 0.04	0.80 ± 0.48	10.4 ± 3.3

表 24

使用 hMN-14 x m679F(ab')₂bsMab 对 ^{99m}Tc-IMP-245 进行前靶向定位
(其中留出 24 小时使 bsMab 清除)

组织	肽注射后 1 小时 (n=5)		肽注射后 3 小时 (n=5)		肽注射后 24 小时 (n=5)	
	¹²⁵ I-bsMab %ID/g	^{99m} Tc-IMP-245 T/NT	¹²⁵ I-bsMab %ID/g	^{99m} Tc-IMP-245 %ID/g	¹²⁵ I-bsMab %ID/g	^{99m} Tc-IMP-245 %ID/g
肿瘤 (重量, g)	3.41 ± 1.19 0.304 ± 0.089		3.31 ± 0.81 (0.383 ± 0.052)	14.2 ± 5.27	1.5 ± 0.7 (0.335 ± 0.129)	5.0 ± 2.6
肝脏	0.35 ± 0.14	10.1 ± 0.5	0.44 ± 0.11	0.71 ± 0.13	0.12 ± 0.04	0.20 ± 0.03
脾	0.62 ± 0.15	16.4 ± 9.7	0.75 ± 0.17	0.41 ± 0.06	0.15 ± 0.03	0.13 ± 0.03
肾	0.33 ± 0.05	2.3 ± 1.4	0.28 ± 0.07	2.68 ± 0.50	0.08 ± 0.02	0.89 ± 0.13
肺	0.28 ± 0.06	7.3 ± 5.1	0.26 ± 0.05	0.88 ± 0.14	0.10 ± 0.01	0.14 ± 0.02
血液	0.47 ± 0.07	2.4 ± 0.6	0.44 ± 0.09	2.23 ± 0.39	0.14 ± 0.02	0.19 ± 0.02
胃	0.92 ± 0.35	23.5 ± 11.2	1.19 ± 0.83	0.41 ± 0.45	0.21 ± 0.05	0.06 ± 0.02
小肠	0.12 ± 0.03	10.5 ± 4.8	0.12 ± 0.05	0.76 ± 0.23	0.04 ± 0.01	0.10 ± 0.04
大肠	0.18 ± 0.06	47.8 ± 32.6	0.19 ± 0.08	0.97 ± 0.46	0.04 ± 0.01	0.17 ± 0.08

表 25

在注射后 3 小时, 在 GW-39 肿瘤裸鼠中 ^{99m}Tc -hMN-14Fab' 的肿瘤/非肿瘤的比率。(n=5)

组织	^{99m}Tc -hMN-14 Fab'
肝脏	0.2 ± 0.02
脾	0.9 ± 0.4
肾	0.02 ± 0.001
肺	0.7 ± 0.1
血液	1.0 ± 0.01

表 26

使用 hMN-14 x m679F(ab') ₂ bsMAb 对 ^{111}In -IMP-241 进行前靶向定位 (其中留出 24 小时清除 bsMAb)			
注射 ^{111}In -IMP-241 后 3 小时 (n=5)			
组织	^{125}I -bsMAb	^{111}In -241	
	%ID/g	%ID/g	T/NT
肿瘤 (0.254 ± 147 g)	2.92 ± 0.41	11.3 ± 2.2	—
肝脏	0.44 ± 0.24	0.53 ± 0.14	22.2 ± 6.3
脾	0.94 ± 0.41	0.42 ± 0.12	27.8 ± 5.9
肾	0.44 ± 0.17	4.61 ± 0.71	2.5 ± 0.5
肺	0.49 ± 0.24	0.83 ± 0.23	14.1 ± 2.8
血液	0.79 ± 0.24	1.44 ± 0.33	8.1 ± 2.1
胃	3.18 ± 2.27	0.11 ± 0.02	102.9 ± 15.2
小肠	0.27 ± 0.15	0.23 ± 0.08	53.4 ± 14.4
大肠	0.35 ± 0.18	0.31 ± 0.07	37.4 ± 9.2
注射 ^{111}In -IMP-241 后 24 小时 (n=4)			
组织	^{125}I -bsMAb	^{111}In -241	
	%ID/g	%ID/g	T/NT
肿瘤 (0.203 ± 0.09 g)	1.80 ± 0.34	6.87 ± 0.84	—
肝脏	0.10 ± 0.03	0.31 ± 0.05	22.3 ± 2.5
脾	0.35 ± 0.20	0.40 ± 0.13	18.5 ± 5.6
肾	0.11 ± 0.02	2.60 ± 0.43	2.7 ± 0.5
肺	0.13 ± 0.02	0.29 ± 0.05	24.0 ± 5.7
血液	0.23 ± 0.03	0.43 ± 0.10	16.4 ± 3.3
胃	0.21 ± 0.06	0.06 ± 0.01	116.9 ± 10.2
小肠	0.05 ± 0.01	0.10 ± 0.02	67.3 ± 9.6
大肠	0.04 ± 0.01	0.11 ± 0.03	66.0 ± 12.2
注射 ^{111}In -IMP-241 后 48 小时 (n=5)			

组织	^{125}I -bsMAB	^{111}In -241	
	%ID/g	%ID/g	T/NT
肿瘤 (0.206 ± 0.073 g)	1.32 ± 0.15	5.47 ± 1.03	—
肝脏	0.06 ± 0.01	0.27 ± 0.05	20.4 ± 4.1
脾	0.24 ± 0.14	0.40 ± 0.05	13.6 ± 2.0
肾	0.07 ± 0.01	1.17 ± 0.21	4.7 ± 0.46
肺	0.07 ± 0.02	0.19 ± 0.04	28.9 ± 6.5
血液	0.11 ± 0.02	0.17 ± 0.03	32.0 ± 7.2
胃	0.09 ± 0.03	0.04 ± 0.02	163.2 ± 53.9
小肠	0.03 ± 0.01	0.07 ± 0.02	76.8 ± 16.2
大肠	0.02 ± 0.01	0.07 ± 0.02	83.0 ± 16.8

表 27

使用 mMu-9 x m679F(ab')₂bsMAB 对 ^{111}In -IMP-241 进行前靶向定位(其中留出 48 小时清除 bsMAB)

注射 ^{111}In -IMP-241 后 3 小时			
组织	^{125}I -bsMAB	^{111}In -241	
	%ID/g	%ID/g	T/NT
肿瘤 (0.164 ± 0.064 g)	13.1 ± 4.36	17.8 ± 1.4	—
肝脏	0.19 ± 0.03	0.56 ± 0.08	32.0 ± 3.0
脾	0.28 ± 0.12	0.46 ± 0.13	41.2 ± 10.6
肾	0.32 ± 0.04	3.63 ± 0.34	4.9 ± 0.5
肺	0.31 ± 0.05	0.92 ± 0.21	20.0 ± 2.9
血液	0.55 ± 0.10	1.93 ± 0.63	9.7 ± 2.0
胃	0.75 ± 0.21	0.15 ± 0.07	130.2 ± 41.0
小肠	0.11 ± 0.02	0.28 ± 0.12	70.5 ± 20.4
大肠	0.10 ± 0.02	0.20 ± 0.07	98.1 ± 27.9
注射 ^{111}In -IMP-241 后 24 小时			
组织	^{125}I -bsMAB	^{111}In -241	
	%ID/g	%ID/g	T/NT
肿瘤 (0.214 ± 0.040 g)	12.4 ± 4.2	17.5 ± 4.1	—
肝脏	0.10 ± 0.02	0.44 ± 0.10	39.8 ± 6.5
脾	0.15 ± 0.05	0.35 ± 0.08	50.3 ± 7.1
肾	0.15 ± 0.03	2.28 ± 0.35	7.7 ± 1.9
肺	0.12 ± 0.02	0.31 ± 0.05	56.0 ± 6.0
血液	0.22 ± 0.05	0.38 ± 0.12	47.6 ± 11.2
胃	0.17 ± 0.04	0.05 ± 0.01	377.6 ± 101.8
小肠	0.05 ± 0.01	0.09 ± 0.02	195.7 ± 49.7

大肠	0.03 ± 0.01	0.08 ± 0.02	235.8 ± 58.4
注射 ^{111}In -IMP-241 后 48 小时			
组织	^{125}I -bsMAb	^{111}In -241	
	%ID/g	%ID/g	T/NT
肿瘤 (0.213 ± 0.064 g)	11.2 ± 5.5	12.7 ± 4.8	---
肝脏	0.06 ± 0.01	0.29 ± 0.06	44.6 ± 16.2
脾	0.06 ± 0.01	0.25 ± 0.05	50.6 ± 14.1
肾	0.06 ± 0.01	0.99 ± 0.35	12.9 ± 2.6
肺	0.05 ± 0.01	0.14 ± 0.01	90.8 ± 32.3
血液	0.07 ± 0.01	0.10 ± 0.02	127.8 ± 41.7
胃	0.10 ± 0.04	0.04 ± 0.01	338 ± 148.5
小肠	0.02 ± 0.00	0.07 ± 0.01	189.9 ± 71.1
大肠	0.02 ± 0.01	0.07 ± 0.02	168.0 ± 40.9

表 28

使用 hMN-14 x m679F(ab') ₂ bsMAb 分别对 ^{111}In -IMP-241 和 ^{177}Lu -IMP-241 进行 前靶向定位的结果对比。(其中留出 24 小时清除 bsMAb)			
注射放射性标记肽后 3 小时			
组织	% ID/g		
	^{177}Lu -IMP-241	^{111}In -IMP-241	
肿瘤 (重量, g)	9.71 ± 2.49 (0.747 ± 0.243)	8.76 ± 2.31 (0.536 ± 0.114)	
肝脏	0.46 ± 0.08	0.57 ± 0.24	
脾	0.36 ± 0.04	0.54 ± 0.30	
肾	3.61 ± 0.43	3.00 ± 0.87	
肺	0.64 ± 0.12	0.81 ± 0.33	
血液	1.48 ± 0.19	1.87 ± 0.97	
注射放射性标记肽后 24 小时			
组织	% ID/g		
	^{177}Lu -IMP-241	^{111}In -IMP-241	
肿瘤 (重量, g)	2.59 ± 0.30 (0.723 ± 0.138)	2.54 ± 1.04 (0.405 ± 0.105)	
肝脏	0.17 ± 0.04	0.19 ± 0.07	
脾	0.29 ± 0.07	0.28 ± 0.10	
肾	0.18 ± 0.03	0.25 ± 0.14	
肺	0.17 ± 0.02	0.24 ± 0.07	
血液	0.36 ± 0.05	0.54 ± 0.20	

表 29

使用 mMu-9 x m679 F(ab') ₂ bsMAb 时, ⁹⁰ Y-或 ¹⁷⁷ Lu-标记的 IMP-241 的放射量测定结果				
组织	⁹⁰ Y-IMP-241		¹⁷⁷ Lu-IMP-241	
	cGy/mCi	CGy (标准化的) ^a	cGy/mCi	CGy (标准化的) ^a
肿瘤	14,366	12,578	5580	13,721
血液	416	364	124	305
肝脏	551	482	161	394
肺	277	242	94	231
肾	1713	1500	610	1500

^a 表示射线吸收剂量以肾的 1500cGy 剂量进行标准化

肽的放射性标记和 BsMabs 的检测

- 5 IMP-241 DOTA 的整合基团可以使用 ¹¹¹In、⁹⁰Y 和其它放射性金属, 如 ¹⁷⁷Lu。用所述放射性核素所标记的肽的特异活性分别为 600、1650、和 300Ci/mmol。用 ¹⁷⁷Lu 标记的肽特异活性较低一方面是因为放射金属放置的时间比较长, 另一方面是同位素产品发生了融化, 不能使 ¹⁷⁷Lu 的活性得到最大值。^{99m}Tc-肽的特异活性在 1500 与 1600Ci/mmol 之间。
- 10 在每一次标记过程中, 调整标记的条件保证肽的放射活性掺入率大于 98%, 这样就不需要进行纯化了。反相 HPLC 表明所述标记的肽与新鲜小鼠血清在 37℃ 混合时, 所有的肽在 24 小时内是稳定的, 其洗脱峰的形状与刚开始制备出来时相同, 没有发生变化。扩展梯度 HPLC 对 IMP-243 和 245 的分析结果表明所述标记肽有两个峰, 这可能是因为
- 15 syn 的形成和抗锝酮基种类不同。

附图 6 显示的是 hMN-14 x m679 bsMAb 与 ¹¹¹In-IMP-241 结合的 SE-HPLC 结果。基本上所述的放射性标记的肽的洗脱时间都转变为 bsMAb 的洗脱时间, 并且当在加入放射性标记肽之前先将 CEA 加入到 bsMAb 时, 所有的放射性活性均出现在无效组分中。当用 CSAp 制备

20 mMu-9 x m679 bsMAb 也出现类似的结果 (未示出)。利用 BIAcore 计算 mMu-9 x m679 F(ab')₂ bsMAb 和所述有一个 HSG 的肽在芯片上的

结合动力学参数, 结果表明动力学参数为 $KD=1.5 \times 10^{-9}M$ 。

肽的生理分布

为了进行生理分布研究, IMP-241 用发射 γ 射线的放射性核素 ^{111}In 或 ^{177}Lu 对 IMP-241 进行了放射性标记, 以便于在组织中进行肽的检测, 另外 IMP-243 和 IMP-245 用 ^{99m}Tc 进行了标记。在带有肿瘤的裸鼠中, ^{177}Lu -和 ^{111}In -IMP-241 在裸鼠中具有相似的分布状况和清除特性 (表 20 和 21)。在所述两种情况下, 肽在注射 3 小时后就被快速地从血液中清除出去, 其在血液中的放射活性非常低, 不能进行精确的定量测定, 但所述肽在主要器官中具有足够的放射活性, 能够进行定量测定。放射活性经过肾脏的排泄作用而消除, 在监测期间只有少量的放射活性停留在肾脏中。在平均重量为 0.15g 的肾脏中, 在注射后 0.5-1.0 小时后, 肾脏中检测到的放射活性只占到总注射活性的大约 0.6%。给另外一组动物施用 ^{177}Lu -IMP-241, 在 48 小时进行解剖, 但因为在肾脏中的放射活性刚刚能够进行精确测定, 因此在表中没有列出所述数据。但是在注射后 48 小时, ^{177}Lu -IMP-241 在肾脏中的量降到 $0.94 \pm 0.2 \%ID/g$, 与在注射后 24 小时时所观测到的数值相比, 大约降低了 45%。放射活性物质绝大部分排泄到尿中, 但也有一小部分通过 GI 管进行清除。在注射后 1.0-3.0 小时之内, 在所有 GI 组织 (即胃、小肠和大肠) 中的放射活性占到注射活性总量的大约 0.6-0.7%。到 24 小时, 在所有 GI 组织中的放射活性仅占总量的 0.07%。

^{99m}Tc -IMP-243 与 IMP-241 在组织中的分布情况显著不同 (表 22)。 ^{99m}Tc -IMP-243 在血液中的清除速度较慢, 在肝脏中的摄取量较大, 并且相当多的部分在 GI 管道。例如, 在注射后 1 小时, 小肠包含 $24.3 \pm 4.75 \%ID/g$ 量的 ^{99m}Tc -IMP-243, 到 3 小时, 放射活性物质转移到大肠中。在注射 24 小时后, 放射活性物质完全从身体中清除。因此, 放射活性物质不与 GI 组织发生实质上的结合, 其仅存在于 GI 内容物中, 这与放射活性在小肠和大肠中前进的观测结果相一致。另一个肽 IMP-245, 在 GI 组织中放射活性的比例要小得多。在肝脏和肾脏中滞留的量也比 ^{99m}Tc -IMP-243 要低。

前靶向定位研究

使用 hMN-14 x m679F(ab')₂ bsMAb 进行前靶向定位 ^{99m}Tc -IMP-243 和 ^{99m}Tc -IMP-245 能力的试验。其中的 bsMAb 使用 ^{125}I 进行了放射性标

记, 这样能够与 ^{99m}Tc -IMP-243 或 IMP-245 同时进行记录。给动物静脉施用 bsMAb, 在 24 小时后, 给动物施用放射性标记肽, 并在施用后 3 小时和 24 小时时解剖动物。在前靶向定位过程中, 在注射后 3 小时和 24 小时时, 肿瘤吸收 ^{99m}Tc -IMP-243 的量比单独注射肽分别高出将近 28 和 70 倍 (表 23)。在 3 小时时肿瘤摄取量为 $12.25 \pm 3.32\% \text{ ID/g}$, 经过 24 小时降为 7.36 ± 3.19 。 ^{99m}Tc -IMP-243 的量在肿瘤中下降的速度没有 bsMAb 在肿瘤中下降的快, 在相同时间内, bsMAb 在肿瘤中的量由 $4.78 \pm 1.11\% \text{ ID/g}$ 下降到 $2.24 \pm 0.53\% \text{ ID/g}$ 。在施用 3 小时内, ^{99m}Tc -IMP-243 在肿瘤与非肿瘤中的量的比例除了大肠外在其它组织中均高于 2.0: 1, 这是因为在施用 3 小时时肽在大肠中还没有被清除, 在施用 24 小时后, 肿瘤/大肠的比例增加了近 20 倍。在肽注射后 3 小时时, 肿瘤/血液比例为 2.4 ± 0.6 。肿瘤对 ^{99m}Tc -IMP-245 的摄取情况与 ^{99m}Tc -IMP-243 类似 (表 6), 只是 ^{99m}Tc -IMP-245 肿瘤/非肿瘤的比例要高于 ^{99m}Tc -IMP-243, 这主要是因为施用 ^{99m}Tc -IMP-245 的动物中, bsMAb 经过清除后, 其含量要低于施用 ^{99m}Tc -IMP-243 的动物。不过, ^{99m}Tc -IMP-245 前靶向定位系统也具有较低的 GI 吸收率, 甚至是在施用后 1 小时时, 因此该肽比起 ^{99m}Tc -IMP-243 来有明显的优点。 ^{99m}Tc -IMP-245 肿瘤/肾的比例比 ^{99m}Tc -IMP-243 要高。所述生理分布状况数据表明, 在施用早期时, 比起使用直接进行放射性标记的 Fab' 片段, ^{99m}Tc -IMP-245 前靶向定位系统应当能够提供更好的成像对比度。还应当强调的是, 在注射 3 小时后, 使用 ^{99m}Tc -标记肽的肿瘤/肾比例要明显高于直接被 ^{99m}Tc -hMN-14Fab' 放射性标记的抗体片段 (表 25)。

在评价 IMP-241 肽前靶向定位时使用了两种不同的靶向系统, 一个系统使用了人源化抗-CEA 抗体 (hMN-14), 另一个系统使用了鼠抗-CSAp 的抗体 (mMu-9)。其中所使用的 bsMAb 均是将它们的 Fab' 与鼠 679MAb 的 Fab' 进行化学偶联来制备。在生理分布研究中, bsMAb 均使用 ^{125}I 进行了放射性标记, 这样 bsMAb 的分布可以同 IMP-241 一起进行评估, IMP-241 使用了 ^{111}In 进行了放射性标记。在所述两种前靶向定位系统中, 给带有肿瘤的裸鼠注射的 bsMAb 和肽的量均是相同的, 但因为 Mu-9 bsMAb 在血液中清除的时间要比 hMN-14 bsMAb 长, 因此在施用 Mu-9 bsMAb 48 小时后, 施用放射性标记肽, 而施用 hMN-14 bsMAb 时只需经过 24 小时就可施用放射性标记的肽。hMN-14 x 679 构建体

在施用后 24 小时，在血液中的含量与 mMu-9 x m679 构建体施用 48 小时后的含量很接近，分别为 $0.79 \pm 0.24\%$ ID/g 和 $0.55 \pm 0.10\%$ ID/g。发现 Mu-9 bsMAb 在肿瘤中的含量 ($13.1 \pm 4.36\%$ ID/g) 高于 MN-14 bsMAb (2.92 ± 0.41)，因为在以前对包含 Mu-9 和抗-CEA 抗体的 5 靶向研究中，已经发现 Mu-9 在 GW-39 异种移植肿瘤模型中比抗-CEA 抗体具有更高的吸收率和更长的滞留时间。因为 Mu-9 bsMAb 在肿瘤中的含量较高，因此肽的浓度相应也较高，在注射肽仅 3 小时后，浓度即达到 $17.8 \pm 1.4\%$ ID/g，而在使用 hMN-14 bsMAb 进行前靶向定位的动物中，肽的浓度仅为 $11.3 \pm 2.2\%$ ID/g。有趣的是，hMN-14 bsMAb 10 与肽结合的效率要高，因为在肿瘤中，在使用 hMN-14 bsMAb 时，施用肽 3 小时后，肽 % ID/g 与 bsMAb 的比例是 3.9，而在使用 Mu-9 bsMAb 时，在相同时间后，肽 % ID/g 与 bsMAb 的比例是 1.4。然而，在 Mu-9 前靶向定位系统中，肿瘤滞留 ^{111}In -IMP-241 的时间较长，这与 bsMAb 结合到肿瘤上所需的时间较长相对应。在每一系统中，在 3 小时时肽： 15 bsMAb 的比例能够持续到 48 小时时，这表明肽与 bsMAb 发生了特异性结合。使用 ^{111}In -IMP-241 前靶向定位系统比起单独使用肽，能够使肿瘤愈合的速度提供 100 倍（参考表 20）。在使用 ^{111}In -IMP-241 进行前 20 靶向定位时，不管是使用那种 bsMAb 前靶向定位系统，其在所有组织的肿瘤/非肿瘤比例也显著高于单独使用 ^{111}In 241 肽。总之，在 Mu-9 bsMAb 系统中， ^{111}In -IMP-241 具有显著较高的肿瘤/非肿瘤比例，尤其是在经过一段时间以后。

不管 IMP-241 是用 ^{177}Lu 放射性标记还是用 ^{111}In 进行放射性标记，所得到的前靶向定位结果是相同的。正如表 27 所列出的，使用 hMn-14 bsMAb 前靶向定位系统时， ^{177}Lu -IMP-241 的 % ID/g 与 ^{111}In -IMP-241 25 的基本相同。因为 ^{111}In -IMP-241 的生理分布与 ^{177}Lu -IMP-241 的相似，还因为现有技术中已经将 ^{111}In 作为代用物用于预测 ^{90}Y -的生理分布，因此使用 ^{111}In -IMP-241 和 mMu-9 x m679 F(ab')₂ bsMAb 能够进行扩展了的生理分布研究。正如附图 7 中所显示的，因为 Mu-9 抗体在肿瘤中滞留的时间较长，因此放射性标记肽在肿瘤中滞留的时间也较长。 30 使用这些数据，建立了 ^{90}Y 、和 ^{177}Lu 的放射剂量模型。 ^{90}Y ，因为它的 β -射线的能量较高 ($2.27\text{MeV}\dots$)，因此每 mCi 对肿瘤所释放的射线剂量比 ^{177}Lu ($495\text{keV}\dots$) 要高。但是，为了更好地进行比较，将射线剂量

用同种射线对同种剂量限制性组织进行了标准化。在该情况下，选择了对肾 1500cGy 作为标准剂量，在该剂量下组织是可以耐受的，而且产生的毒性也是相近的。在组织吸收剂量被标准化的情况下，数据显示 ^{177}Lu -IMP-241 与 ^{90}Y -IMP-241 对肿瘤释放的射线剂量是相同的。在肾耐受 1500cGy 剂量的情况下，肿瘤接受了将近 12,000cGy 的剂量，该射线剂量对大部分的实体肿瘤来说都是致命的。

对本领域技术人员来说，对本发明所公开的组合物和过程作出任何修饰和改变都是显而易见的。因此所述任何修饰和改变均包括在本发明的权利要求书之内。

10 在本发明说明书中所记载的所有出版物全文或部分引入本发明。另外的参考文献如下：

Arano Y, Uezono T, Akizawa H, Ono M, Wakisaka K, Nakayama M, Sakahara H, Konishi J, Yokoyama A., "Reassessment of diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) as a chelating agent for indium-111 labeling of polypeptides using a newly synthesized monoreactive DTPA derivative," *J Med Chem.* 1996 Aug 30; 39(18):3451-60.

Bamias, A., and Epenetos, A.A. Two-step strategies for the diagnosis and treatment of cancer with bioconjugates. *Antibody, Immunoconjugates, Radiopharm.* 1992; 5: 385-395.

Barbet, J., Peltier, P., Bardet, S., Vuillez, JP., Bachelot, I., Denet, S., Olivier, P., Lecia, F., Corouff, B., Huglo, D., Proye, C., Rouvier, E., Meyer, P., Chatal, J.F. Radioimmunodetection of medullary thyroid carcinoma using indium-111 bivalent hapten and anti-CEA x anti-DTPA-indium bispecific antibody. *J.Nucl.Med.* 1998; 39:1172-1178.

Bos, ES., Kuijpers, WHA., Meesters-Winters, M., Pham, DT., deHaan, AS., van Doormalen, Am., Kasperson, F.M., vanBocckel, CAA and Gougeon-Bertrand, F. In vitro evaluation of DNA-DNA hybridization as a two-step approach in radioimmunotherapy of cancer. *Cancer Res.* 1994; 54:3479-3486.

Carr *et al.*, WO00/34317.

Gautherot, E., Bouhou, J., LeDoussal, J.-M., Manetti, C., Martin, M., Rouvier, E., Barbet, J. Therapy for colon carcinoma xenografts with bi-specific antibody-targeted, iodine-131-labeled bivalent hapten. *Cancer suppl.* 1997; 80: 2618-2623.

Gautherot, E., Bouhou, J., Loucif, E., Manetti, C., Martin, M., LeDoussal, J.M., Rouvier, E., Barbet, J. Radioimmunotherapy of LS174T colon carcinoma in nude mice using an iodine-131-labeled bivalent hapten combined with an anti-CEA x anti-indium-DTPA bi-specific antibody. *J.Nucl. Med. Suppl.* 1997; 38: 7p.

Goodwin, D.A., Meares, C.F., McCall, M.J., McTigue, M., Chaovapong, W. Pre-targeted immunoscintigraphy of murine tumors with indium-111-labeled bifunctional haptens. *J.Nucl.Med.* 1988; 29:226-234.

Greenwood, F.C. and Hunter, W.M. The preparation of I-131 labeled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem.* 1963; 89:114-123.

Hawkins, G.A., McCabe, R.P., Kim, C.-H., Subramanian, R., Bredehorst, R., McCullers, G.A., Vogel, C.-W., Hanna, M.G.Jr., and Pomata, N. Delivery of radionuclides to pretargeted monoclonal antibodies using dihydrofolate reductase and methotrexate in an affinity system. *Cancer Res.* 1993; 53: 2368-2373.

Kranenborg, M.h., Boerman, O.C., Oosterwijk-Wakka, j., weijert, M., Corstens, F., Oosterwijk, E. Development and characterization of anti-renal cell carcinoma x antichelate bi-specific monoclonal antibodies for two-phase targeting of renal cell carcinoma. *Cancer Res.(suppl)* 1995; 55: 5864s-5867s
Losman M.J., Qu Z., Krishnan L.S., Wang J., Hansen H.J., Goldenberg D.M., Leung S.O. *Clin. Cancer Res.* 1999; 5(10 Suppl.):3101s-3105s.

Penefsky, H.S. A centrifuged column procedure for the measurement of ligand binding by beef heart F1. Part G. *Methods Enzymol.* 1979; 56:527-530.

Schuhmacher, J., Klivenyi, G., Matys, R., Stadler, M., Regiert, T., Hauser, H., Doll, J., Maier-Borst, W., Zoller, M. Multistep tumor targeting in nude mice using bi-specific antibodies and a gallium chelate suitable for immunoscintigraphy with positron emission tomography. *Cancer Res.* 1995; 55, 115-123.

Sharkey, R.M., Karacay, Griffiths, G.L., Behr, T.M., Blumenthal, R.D., Mattes, M.J., Hansen, H.J., Goldenberg. Development of a streptavidin-anti-carcinoembryonic antigen antibody, radiolabeled biotin pretargeting method for radioimmunotherapy of colorectal cancer. Studies in a human colon cancer xenograft model. *Bioconjugate Chem* 1997; 8:595-604.

Stickney, D.R., Anderson, L.D., Slater, J.B., Ahlem, C.N., Kirk, G.A., Schweighardt, S.A. and Frincke, J.M. Bifunctional antibody: a binary radiopharmaceutical delivery system for imaging colorectal carcinoma. *Cancer Res.* 1991; 51: 6650-6655.

所述所有参考文献全文引入本发明。

图 1 不同Abs和bsAbs的示意图

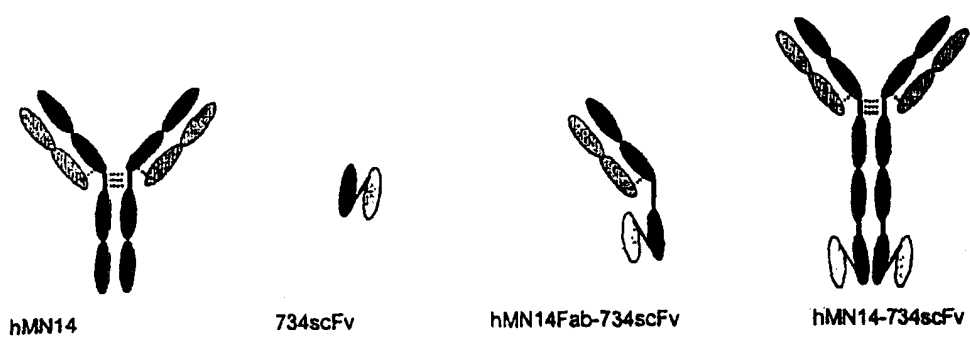


图 2 纯化的 hMN-14Fab-734scFv 的 SDS-PAGE 分析

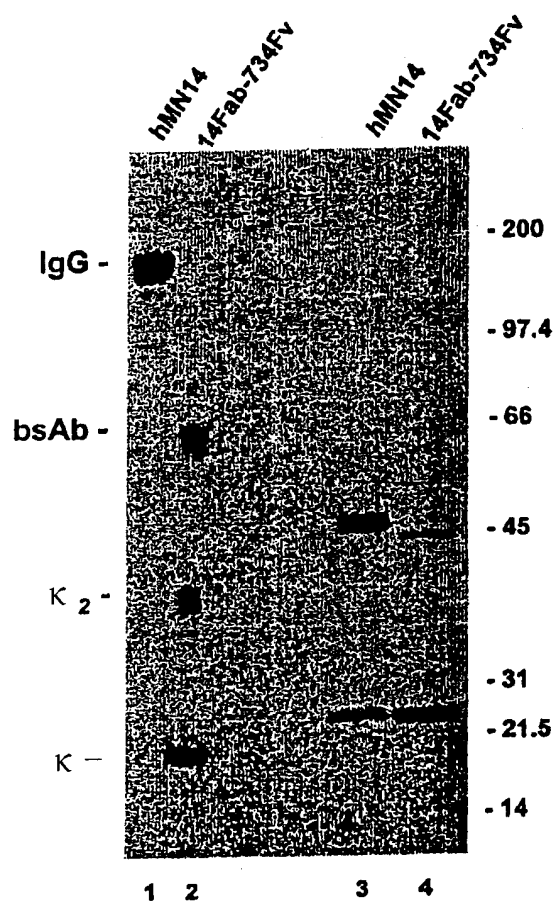


图 3 两种双特异性融合蛋白的示意图

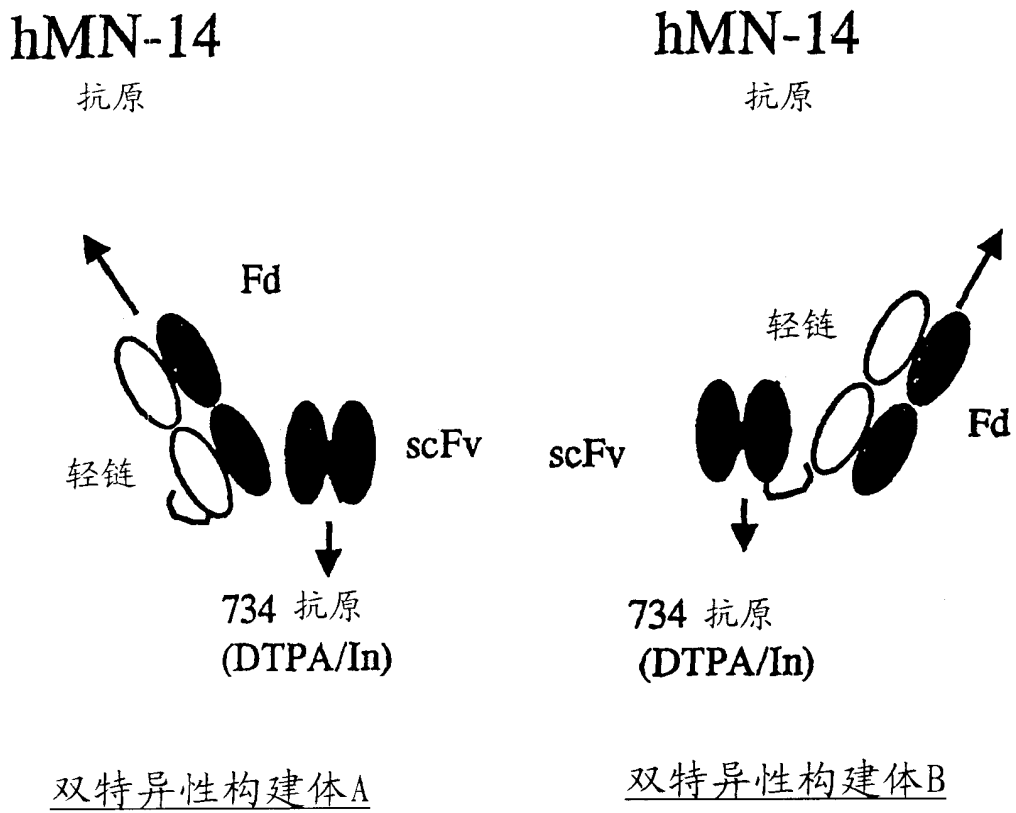


图 4 制备14Fab-734scFv DNA构建体的示意图

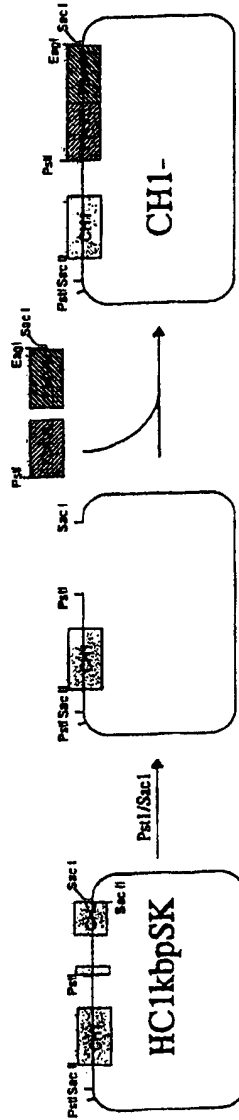
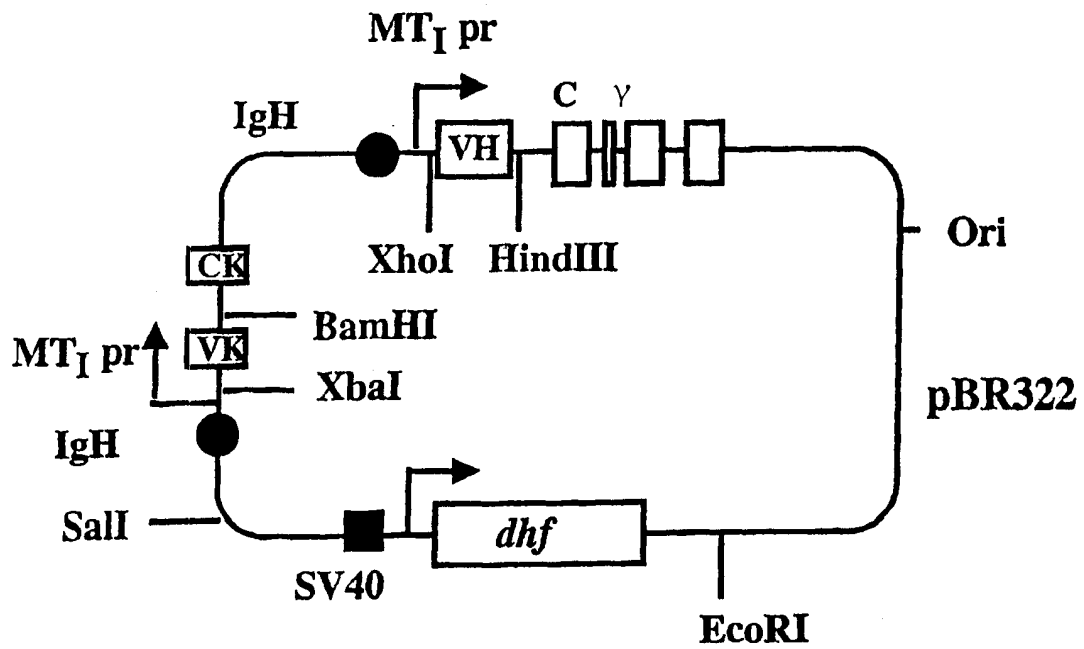


图 5 制备hMN-14Fab-734scFvDNA构建体的示意图



MN-14pdHL2 的质粒图谱

图 6 hMN-14 x m679 bsMAb 与 ^{111}In -标记的 IMP-241
二价HSC-DOTA肽的结合特性

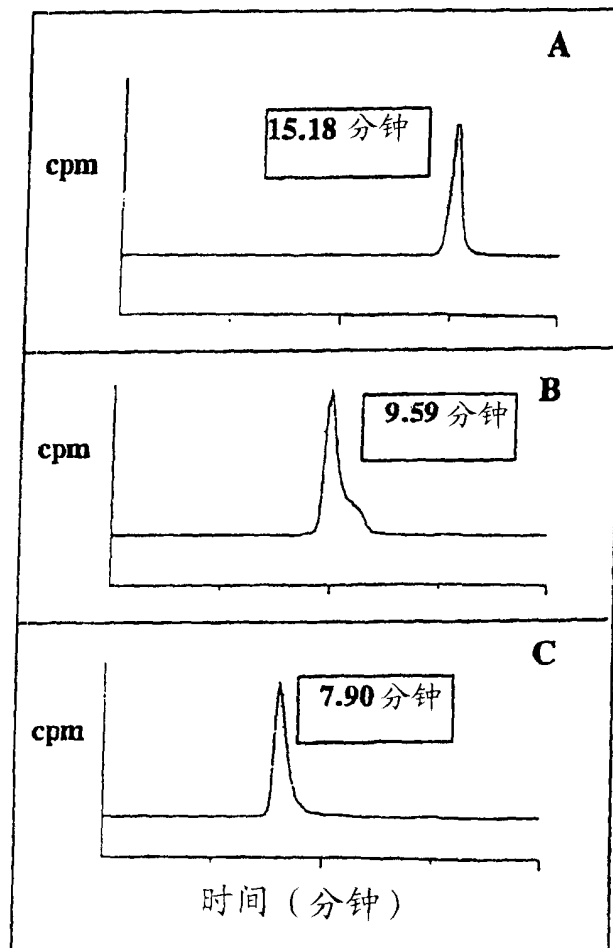


图 7 ^{125}I -mMu-9 x m679 $\text{F}(\text{ab}')_2$ bsMAb 和 ^{111}In -IMP-241
在GW-39肿瘤携带裸小鼠中的清除

