



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104327179 A

(43) 申请公布日 2015.02.04

(21) 申请号 201410529294.7

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2008.12.22

C07K 14/485(2006.01)

(30) 优先权数据

A61K 51/08(2006.01)

07150395.7 2007.12.21 EP

A61P 35/00(2006.01)

C12N 15/12(2006.01)

(62) 分案原申请数据

200880126835.4 2008.12.22

(71) 申请人 阿菲博迪公司

地址 瑞典布鲁玛

(72) 发明人 L·亚伯拉罕森 N·赫内

J·费尔德维施 C·伦德尔

V·托尔马切夫

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理

有限公司 11262

代理人 高瑜 郑霞

权利要求书3页 说明书28页

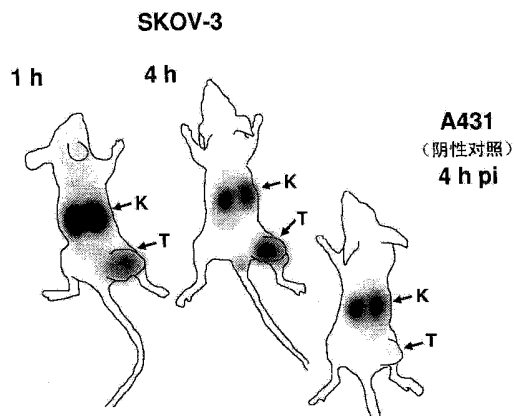
序列表6页 附图18页

(54) 发明名称

具有 HER2 亲和性的新多肽

(57) 摘要

本发明揭示了 HER2 结合多肽,其包含氨基酸序列 $EX_1RNAYWEIA\ LLPNLTNQQK\ RAFIRKLYDD\ PSQSSELLX_2E\ AKKLNDSQ$,其中位置 2 的 X_1 是 M、I 或者 L;位置 39 的 X_2 是 S 或者 C (SEQ ID NO:1)。此外,本发明揭示了包含螯合环境的这种肽。本发明还揭示了包含螯合环境和放射性核素的肽形成的放射性标记的多肽。本发明还揭示了患有或者怀疑患有特征在于 HER2 过表达的癌症的哺乳动物对象身体的体内成像方法,所述方法包括给予这种放射性标记的多肽,随后使用医学成像设备获得身体图像;本发明还揭示了治疗这种癌症的方法。此外,本发明还揭示了这种放射性标记的多肽在诊断和治疗特征在于 HER2 过表达的癌症中的应用。本发明还揭示了编码所述多肽的核酸、包含所述核酸的表达载体以及包含所述表达载体的宿主细胞。



1. HER2 结合多肽,其包含氨基酸序列
EX₁RNAYWEIA LLPNLTNQQK RAFIRKLYDD PSQSSELLX₂E AKKLNSQ,
其中位置 2 的 X₁ 是 M、I 或者 L,位置 39 的 X₂ 是 S 或者 C(SEQ ID NO:1)。
2. 权利要求 1 的 HER2 结合多肽,其包含氨基酸序列
YAKEX₁RNAYW EIALLPNLTN QQKRAFIRKL YDDPSQSSEL LX₂EAKKLNS Q
其中位置 5 的 X₁ 是 M、I 或者 L,位置 42 的 X₂ 是 S 或者 C(SEQ ID NO:2)。
3. 权利要求 1 或 2 的 HER2 结合多肽,其包含氨基酸序列
AEAKYAKEX₁R NAYWEIALLP NLTNQQKRAF IRKLYDDPSQSSELLX₂EAKK LNSQ
其中位置 9 的 X₁ 是 M、I 或者 L,位置 46 的 X₂ 是 S 或者 C(SEQ ID NO:3)。
4. 权利要求 1 或 2 的 HER2 结合多肽,其包含氨基酸序列
ESEKYAKEX₁R NAYWEIALLP NLTNQQKRAF IRKLYDDPSQ SSELLX₂EAKK LNSQ
其中位置 9 的 X₁ 是 M、I 或者 L,位置 46 的 X₂ 是 S 或者 C(SEQ ID NO:4)。
5. 权利要求 3 的 HER2 结合多肽,包含氨基酸序列
AEAKYAKEMR NAYWEIALLP NLTNQQKRAF IRKLYDDPSQ SSELLSEAKK LNSQAPKVD C(SEQ ID NO:5)。
6. 权利要求 4 的 HER2 结合多肽,其包含氨基酸序列
ESEKYAKEMR NAYWEIALLP NLTNQQKRAF IRKLYDDPSQSSELLSEAKK LNSQAPK(SEQ ID NO:6)。
7. 权利要求 1-6 任一项的 HER2 结合多肽,其进一步包含与其 N 末端偶联的巯基乙酰基,其中通过 N 末端的前三个连续肽键的氮原子以及巯基乙酰基的 SH 基团一起提供了由 N₃S 螯合剂基序组成的螯合环境。
8. 权利要求 7 的 HER2 结合多肽,其中 N 末端的前三个连续肽键由残基 ESE 的氨基基团提供。
9. 权利要求 6-8 任一项的 HER2 结合多肽,其具有序列:
maESEKYAKEMR NAYWEIALLP NLTNQQKRAF IRKLYDDPSQSSELLSEAKK LNSQAPK
其中 ma 是巯基乙酰基 (SEQ ID NO:7)。
10. 权利要求 1-6 任一项的 HER2 结合多肽,其包含半胱氨酸残基,所述半胱氨酸残基已经存在于序列中或者作为额外的氨基酸残基或者通过置换不参与 HER2 结合的表面暴露的氨基酸残基。
11. 权利要求 10 的 HER2 结合多肽,其中所述半胱氨酸残基位于 SEQ ID NO:5 的 C 末端,或者所述额外的半胱氨酸位于 SEQ ID NO:1-4 或者 6-7 任一序列的 C 末端,其中所述半胱氨酸残基任选随后是一或多个其它氨基酸残基,且其中螯合环境由 N₃S 螯合剂基序组成,所述基序由半胱氨酸和两个前面的氨基酸残基组成的一段氨基酸残基序列的三个连续肽键的氮原子以及半胱氨酸残基的 SH 基团一起提供。
12. 权利要求 10 的 HER2 结合多肽,其包含由通过硫醇基团与所述多肽偶联的聚氨基聚羧酸酯螯合剂提供的螯合环境。
13. 权利要求 12 的 HER2 结合多肽,其中所述聚氨基聚羧酸酯螯合剂是 1, 4, 7, 10- 四氮杂环十二烷 -1, 4, 7, 10- 四乙酸或者其衍生物。
14. 权利要求 13 的 HER2 结合多肽,其中所述 1, 4, 7, 10- 四氮杂环十二烷 -1, 4, 7, 10- 四

乙酸衍生物是 1, 4, 7, 10- 四氮杂环十二烷 -1, 4, 7- 三 - 乙酸 -10- 马来酰亚胺乙基乙酰胺。

15. HER2 结合多肽, 其由与 1, 4, 7, 10- 四氮杂环十二烷 -1, 4, 7- 三 - 乙酸 -10- 马来酰亚胺乙基乙酰胺偶联的 SEQ ID NO:5 组成。

16. 权利要求 12 的 HER2 结合多肽, 其中所述聚氨基聚羧酸酯螯合剂是二乙烯三胺五乙酸或者其衍生物。

17. 由权利要求 7-9 和 11 任一项的 HER2 结合多肽的放射螯合物 (radiochelate) 和放射性核素组成的放射标记的多肽, 其中所述放射性核素适于医学成像、是 ^{99m}Tc , 或者所述放射性核素适于治疗、选自 ^{186}Re 或者 ^{188}Re 。

18. 由权利要求 9 的 HER2 结合多肽的放射螯合物与 ^{99m}Tc 组成的放射标记的多肽。

19. 由权利要求 12-16 任一项的 HER2 结合多肽的放射螯合物与放射性核素组成的放射标记的多肽, 其中所述放射性核素适于医学成像, 选自 ^{61}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{66}Ga 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{110m}In 、 ^{111}In 、 ^{44}Sc 和 ^{86}Y , 或者所述放射性核素适于治疗, 选自 ^{225}Ac 、 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 、 ^{67}Cu 、 ^{166}Ho 、 ^{177}Lu 、 ^{212}Pb 、 ^{149}Pm 、 ^{153}Sm 、 ^{227}Th 和 ^{90}Y , 其中所述放射性核素通过螯合环境与 HER2 结合多肽复合。

20. 由权利要求 15 的 HER2 结合多肽的放射螯合物与 ^{111}In 组成的放射标记的多肽。

21. 由通过接头分子与放射性核素连接的权利要求 10 的 HER2 结合多肽组成的放射标记的多肽, 所述放射性核素适于医学成像和 / 或治疗, 选自 ^{211}At 、 ^{76}Br 、 ^{18}F 和碘同位素组成的组。

22. 患有或者怀疑患有特征在于 HER2 过表达的癌症的哺乳动物包括人对象的身体的体内成像方法, 包括如下步骤:

- 将权利要求 17-21 任一项的放射性标记的多肽给予哺乳动物对象身体内, 其中所述放射性核素适于成像;

- 在给予所述放射性标记的多肽 1-72 小时内, 使用医学成像设备获得对象身体至少一部分的一或多个图像, 所述图像示出身体内所述放射性核素的存在。

23. 权利要求 22 的方法, 包括在给予步骤之前制备权利要求 17-21 任一项的放射性标记的多肽的步骤, 其中所述放射性核素适于成像, 所述步骤包括混合权利要求 10-16 任一项的多肽与合适的放射性核素。

24. 权利要求 22 的方法, 包括在给予步骤之前制备权利要求 18 的放射性标记的多肽的步骤, 所述步骤包括混合权利要求 9 的多肽与 ^{99m}Tc 。

25. 权利要求 22 的方法, 包括在给予步骤之前制备权利要求 20 的放射性标记的多肽的步骤, 所述步骤包括混合权利要求 15 的多肽与 ^{111}In 。

26. 权利要求 22-25 任一项的方法, 其中所述癌症选自乳腺癌、卵巢癌、胃癌、膀胱癌、唾液腺癌、肺癌和食管癌 (cancer in the esophagus)。

27. 权利要求 17-21 任一项的放射性标记的多肽, 其中所述放射性核素适于成像, 所述放射性标记的多肽用于诊断。

28. 权利要求 17-21 任一项的放射性标记的多肽, 其中所述放射性核素适于成像, 所述放射性标记的多肽用于诊断属于特征在于 HER2 过表达频繁出现的癌症的组的癌症。

29. 权利要求 17-21 任一项的放射性标记的多肽, 其中所述放射性核素适于成像, 用于癌症的诊断和 / 或分子学鉴定, 所述癌症选自乳腺癌、卵巢癌、胃癌、膀胱癌、唾液腺癌、肺癌和食管癌。

30. 权利要求 17-21 任一项的放射性标记的多肽用于制备对哺乳动物包括人对象的身体进行体内成像的诊断剂的应用,其中所述放射性核素适于成像。

31. 治疗患有特征在于 HER2 过表达的癌症的哺乳动物对象包括人的方法,所述方法包括将治疗有效量的权利要求 17、19 或者 21 的放射性标记的多肽给予对象身体内,其中所述放射性核素适于治疗。

32. 权利要求 31 的方法,包括在给予步骤之前制备权利要求 17、19 或者 21 的放射性标记的多肽的步骤,其中所述放射性核素适于治疗,包括混合权利要求 10-16 任一项的多肽与合适的放射性核素。

33. 权利要求 31 或者 32 的方法,其中所述癌症选自乳腺癌、卵巢癌、胃癌、膀胱癌、唾液腺癌、肺癌和食管癌。

34. 权利要求 17、19 或者 21 的放射性标记的多肽,其中所述放射性核素适于治疗,所述放射性标记的多肽用于治疗中。

35. 权利要求 17、19 或者 21 的放射性标记的多肽,其中所述放射性核素适于治疗,所述放射性标记的多肽用于治疗特征在于 HER2 过表达的癌症。

36. 权利要求 17、19 或者 21 的放射性标记的多肽,其中所述放射性核素适于治疗,所述放射性标记的多肽用于治疗选自乳腺癌、卵巢癌、胃癌、膀胱癌、唾液腺癌、肺癌以及食管癌的癌症。

37. 权利要求 17、19 或者 21 的放射性标记的多肽在制备治疗特征在于 HER2 过表达的癌症的药物中的应用,其中所述放射性核素适于治疗。

38. 权利要求 17、19 或者 21 的放射性标记的多肽在制备治疗癌症的药物中的应用,其中所述放射性核素适于治疗,所述癌症选自乳腺癌、卵巢癌、胃癌、膀胱癌、唾液腺癌、肺癌以及食管癌。

39. 编码权利要求 1-6 或者 10 任一项的多肽的核酸。

40. 包含权利要求 39 的核酸的表达载体。

41. 包含权利要求 39 的表达载体的宿主细胞。

具有 HER2 亲和性的新多肽

[0001] 本申请是申请日为 2008 年 12 月 22 日,申请号为 200880126835.4,发明名称为“具有 HER2 亲和性的新多肽”的申请的分案申请。

发明领域

[0002] 本发明涉及结合人表皮生长因子受体 2(在后文称作 HER2)的新多肽。本发明还涉及这种 HER2 结合多肽作为诊断剂和 / 或药物的应用,特别是其作为诊断和 / 或治疗特征在于 HER2 过表达的癌症的诊断剂和 / 或药物的应用。

[0003] 背景

[0004] HER2 及其在癌症疾病中的作用

[0005] HER2 原癌基因编码已知产生称作 HER2 蛋白或者受体的 185kDa 细胞表面受体蛋白 (Hynes NE et al(1994)Biochim Biophys Acta 1198:165-184)。这个基因有时也称作 neu、HER2/neu 或者 c-erbB-2。Neu 首先在已经用乙基亚硝基脲治疗的大鼠中发现,并表现为这个基因突变 (Shih C et al(1981)Nature 290:261-264)。突变形式的 neu 导致组成型活性形式的受体产生,且组成可在低拷贝数转化细胞的强力致癌基因 (Hynes NE et al, supra)。

[0006] 正常细胞以组织特异性方式在其浆膜上表达少量 HER2 蛋白。目前没有已知的 HER2 配体;然而,HER2 已经示出与 HER1(表皮生长因子受体,EGFR)、HER3 和 HER4 形成异源二聚体,与这些受体的配体复合。这种异源二聚体形成使得激活的 HER2 受体从细胞外部向细胞核传递生长信号,因此控制正常细胞生长和分化 (Sundaresan S et al(1999)Curr Oncol Rep1:16-22)。

[0007] 在肿瘤细胞中,DNA 复制系统中的错误可导致一个染色体上存在多个基因拷贝,这是已知称作基因扩增的现象。HER2 基因的扩增导致这个基因的转录增加。这样提高了 HER2mRNA 水平及增加伴随的 HER2 蛋白合成增加,由此导致 HER2 蛋白在这些肿瘤细胞表面上过表达。这种过表达可导致 HER2 蛋白水平与在相邻的正常细胞中的发现的那些表达水平高 10-100 倍。由此导致细胞分化增加及伴随的较高的细胞生长速度。HER2 基因的扩增参与正常细胞转化为癌症表型 (Hynes NE et al, supra;Sundaresan S et al, supra)。

[0008] 据认为 HER2 蛋白的过表达导致 HER2 的同源二聚体形成,这导致组成型活性受体形成 (Sliwkowski MX et al(1999)Semin Oncol 26(4Suppl12):60-70)。在这些条件下,生长促进信号在不存在配体的情况下可以持续地传递进细胞中。因此,多个细胞内信号转导途径被激活,导致不受控制的细胞生长,以及在一些情况中出现致癌转化 (Hynes NE et al, supra)。因此,由生长因子受体介导的信号转导机制是抑制细胞复制和肿瘤生长的重要靶位。

[0009] 乳腺癌在美国是女性最常见的恶性肿瘤,在 2001 年新增病例已经是 192200 例 (Greenlee R et al(2001)CA Cancer J Clin 51:15-36)。在大约 25% 的所有乳腺癌患者中,均存在 HER2 基因由于其扩增而过表达 (Slamon DJ et al(1989)Science 244:707-712)。HER2 蛋白的这种过表达与一些阴性预后变量相关,包括雌激素受体阴性

状态、高 S- 期细胞比值 (high S-phase fraction)、阳性淋巴结转移 (positive nodal status)、突变的 p53 以及高核级别 (high nuclear grade) (Sjogren S et al(1998) J Clin Oncol 16(2):462-469)。根据 Slamon 等 (如前) 所述,发现 HER2 基因的扩增与淋巴结阳性转移患者的缩短的无疾病存活期和缩短的整体存活期明显相关。

[0010] 为此,重要的目标是继续进一步研究 HER2 在乳腺癌的发病机制和治疗中的作用。与 HER2 相互作用的分子的鉴别是这项研究的一部分。

[0011] 临床前体外研究检验了 HER2 活性抑制是否能影响肿瘤细胞生长。用 4D5,一些鼠抗 HER2 单克隆抗体之一,治疗过表达 HER2 蛋白的 SK-BR-3 乳腺癌细胞,与用对照的单克隆抗体治疗相比,确实抑制肿瘤细胞增殖。给予具有过表达 HER2 的人乳腺癌和卵巢癌 (异种移植) 的小鼠 4D5 延长其无肿瘤存活时间。相似的研究证实小鼠中胃癌异种移植物的生长被抗-HER2 单克隆抗体抑制 (Pietras RJ et al(1994) Oncogene 9:1829-1838)。

[0012] 在抑制肿瘤细胞表面大量存在的 HER2 蛋白的方法中,一种治疗方法在近年来已经可商购。因此,单克隆抗体 4D5 的人源化变体或者 trastuzumab 为此由 F Hoffman-La Roche 和 Genentech 以 **Herceptin®** 商标销售。

[0013] 因此已经针对乳腺癌描述了 HER2 的过表达。其与卵巢癌、胃癌、膀胱癌、唾液腺癌、肺癌 (Holbro et al., Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2004. 44:195-217) 以及食管癌 (Ekman et al., Oncologist 2007 ;12 ;1165-1177, 具体参见第 1170-1171 页) 也相关。

[0014] 尽管抗体在治疗特征在于 HER2 蛋白过表达的癌症中显示了明显优势,但是仍存在各种因素具有降低抗体效力的可能性的事实 (见例如 Reilly RM et al(1995) Clin Pharmacokinet 28:126-142)。这些因素包括:(1) 所述抗体穿透大的实体肿瘤或者穿透重要区域如脑的通透性有限;(2) 所述抗体由于血管通透性降低而外渗进靶位点的能力降低;(3) 抗体与正常组织的交叉反应性和非特异性结合降低靶效应;(4) 异质肿瘤吸收导致未得治疗带;(5) 注射的抗体代谢增加降低治疗效力;以及 (6) HAMA 与人抗人抗体的快速形成使治疗性抗体失活。

[0015] 此外,毒性作用在癌症的治疗性抗体的开发中具有很大障碍 (Carter P(2001) Nat Rev Cancer 1:118-129;Goldenberg DM(2002) J Nucl Med 43:693-713;Reichert JM(2002) Curr Opin Mol Ther 4:110-118)。与健康组织的交叉反应性可导致未缀合的 (裸) 抗体的副作用,这种副作用在抗体与毒素或者放射性同位素缀合时可额外增强。免疫介导的并发症包括肺毒性反应的呼吸困难,偶尔的中枢和周围神经系统并发症,以及肝功和肾功衰退。有时可以见到预料之外的毒性并发症,如 HER2 靶向抗体 trastuzumab 相关的心脏毒性反应 (Schneider JW et al(2002) Semin Oncol 29(3suppl11):22-28)。使用同位素缀合的抗体进行的放射性免疫治疗也可以导致骨髓抑制。

[0016] 尽管近年来目前使用的抗癌抗体取得了临床和商业上的成功,但是关于抗体使用前景仍存在许多重要问题。因此,继续提供具有相当 HER2 亲和性的制剂以及提供这种分子在诊断和治疗疾病中的应用仍是本领域的一个重要议题。

[0017] HER2 结合 Z 变体分子

[0018] 使用不同的相互作用靶位,从这种分子的随机化文库中选择衍生自金黄色葡萄球菌 A 蛋白 (SPA) 的 B 结构域的蛋白质 Z 相关的分子 (Nilsson B et al(1987) Protein Engineering 1,107-133) (见例如 W095/19374;Nord K et al(1997)

Nature Biotechnology 15, 772-777 ;W02005/000883 ;W02005/075507 ;W02006/092338 ;W02007/065635)。

[0019] 在 W02005/003156 中,揭示了具有与 HER2 相互作用的能力的大量 Z 变体。

[0020] 发明揭示

[0021] 本发明的一个目的是通过提供特征在于与 HER2 特异性结合的多肽满足持续提供具有 HER2 亲和性的物质的需求。

[0022] 本发明的一个相关目的是 HER2 结合多肽,其显示较少或者无非特异性结合。

[0023] 本发明的另一目的是提供 HER2 结合多肽,其可易于用作融合多肽中的一部分。

[0024] 本发明的另一目的是提供 HER2 结合多肽,其解决了与现有抗体试剂相关的一或多个已知问题。

[0025] 本发明的另一目的是提供 HER2 结合多肽,其适用于治疗性应用中。

[0026] 本发明的另一目的是提供 HER2 结合多肽,其适用于诊断性应用中。

[0027] 本发明的一个相关目的是在特征在于 HER2 蛋白过表达的癌症疾病的临床背景中发现治疗、抑制和 / 或靶向的新形式。

[0028] 本发明的另一方面是提供 HER2 结合多肽,其易于由化学肽合成方法合成。

[0029] 本发明的一个相关目的是发现 HER2 结合多肽,其与已知的 HER2 结合剂相比呈现出改良的稳定性。

[0030] 本发明的再一目的是获得 HER2 结合多肽,其在体内用于哺乳动物时呈现出低抗原性。

[0031] 本发明的另一目的是提供 HER2 结合多肽,其在给予哺乳动物时具有改良的生物分布性。

[0032] 本发明的这些及其它目的由所附权利要求所要求的本发明的不同方面符合。因此,第一方面,本发明提供了多肽,其具有包含如下序列的氨基酸序列:

[0033] EX₁RNAYWEIA LLPNLTNQQK RAFIRKLYDD PSQSSELLX₂E AKKL NDSQ

[0034] 其中位置 2 的 X₁ 是 M、I 或者 L,位置 39 的 X₂ 是 S 或者 C(SEQ ID NO:1),

[0035] 或者在一些情况中,更优选

[0036] YAKEX₁RNAYW EIALLPNLTN QQKRAFIRKL YDDPSQSSEL LX₂EA KKLNDS Q

[0037] 其中位置 5 的 X₁ 是 M、I 或者 L,位置 42 的 X₂ 是 S 或者 C(SEQ ID NO:2),

[0038] 或者在一些情况中,更优选

[0039] AEAKEYAKEX₁R NAYWEIALLP NLTNQQKRAF IRKLYDDPSQ SSEL LX₂EAKK LND SQ

[0040] 其中位置 9 的 X₁ 是 M、I 或者 L,位置 46 的 X₂ 是 S 或者 C(SEQ ID NO:3),

[0041] 或者在一些情况中,更优选

[0042] ESEKYAKEX₁R NAYWEIALLP NLTNQQKRAF IRKLYDDPSQ SSELL X₂EAKK LND SQ

[0043] 其中位置 9 的 X₁ 是 M、I 或者 L,位置 46 的 X₂ 是 S 或者 C(SEQ ID NO:4)。

[0044] 据此,本发明人发现例如与在 W02005/003156 中揭示的 HER2 结合多肽相比,包含 SEQ ID NO:1-4 任一序列的多肽呈现出令人惊奇的优势,同时保留这些前述描述的多肽的结合靶 HER2 的能力。由本发明的多肽的一或多个实施方案呈现出的这些优势的非限制性实例如下所述:

[0045] • 本发明的多肽包含更少的在多肽序列的化学合成中可导致如低产量和成功率等

问题的氨基酸,如天冬酰胺、精氨酸、天冬氨酸和甲硫氨酸。

[0046] • 本发明的多肽包含更少的赋予表面疏水性的氨基酸残基,因此与先前描述的相关的 HER2 结合多肽相比具有更亲水性谱。这意味着具有更少的低溶解性和聚集的问题。不受理论的限制,目前也认为更亲水性特性作用于在给予宿主时改变多肽的生物分布性,从肝胆途径(通过肝脏排泄)转向更希望的肾排泄途径(通过肾排泄)。

[0047] • 本发明的多肽包含更少的与多肽稳定性问题相关的氨基酸残基,如甲硫氨酸、天冬酰胺和二肽天冬酰胺-脯氨酸。甲硫氨酸易于氧化,天冬酰胺易于去酰胺化,天冬酰胺-脯氨酸键易于裂解,因此其导致终产物的非均质性。

[0048] • 本发明的多肽缺少在相似的序列中已发现增加与含有 VH3 重链可变结构域的免疫球蛋白相互作用的氨基酸残基(Silverman G. J., Int. Rev. Immunol. 1992 ;9(1):57-78)。不受理论的限制,目前认为本发明的多肽中这些氨基酸残基的置换在将该多肽给予宿主时降低了多肽的抗原性。

[0049] 本发明的多肽具有替代 HER2 抗体的不同的应用。作为非限制性的例子,它们可用于治疗特征在于 HER2 过表达的癌症、通过结合细胞表面上的 HER2 而用于抑制细胞发信号、用于在体内和体外诊断特征在于 HER2 过表达的癌症、用于将药剂靶向过表达 HER2 的细胞、用于检测 HER2 的组织化学方法中,以及用于分离及其它应用方法中。本发明的多肽可用于依赖于试剂的 HER2 亲和性的任何方法中。因此,所述多肽在这种方法中可用作检测试剂、捕获试剂或者分离试剂,用作诊断剂以在体内或者在体外进行诊断,或者自身用作治疗剂或者用作靶向 HER2 蛋白的其它治疗剂或者诊断剂的工具。在体外应用本发明的多肽的方法可以不同形式进行,如在微滴定平板中、在蛋白质阵列中、在生物传感器表面上、在组织切片上等。

[0050] 在不偏离本发明范围的条件下,可以对本发明的多肽进行不同的修饰和/或添加,以使所述多肽适于特定用途。这种修饰和添加在下文更详细描述,包括在相同多肽链中包含的额外氨基酸,或者与本发明的多肽化学缀合的或者另外方式结合的标记和/或治疗剂。

[0051] 短语“HER2 结合亲和性”、“HER2 结合”等是指多肽的通过例如使用表面等离子共振技术如 **Biacore®** 设备(GE Healthcare)可以检测的性质。HER2 结合亲和性可以在实验中检测,其中 HER2 或者其片段如胞外结构域或者其融合蛋白固定在该设备的传感器芯片上,使含有待检测的多肽的样品经过该芯片。或者,将待检测的多肽固定在该设备的传感器芯片上,使含有 HER2 或者其片段如胞外结构域的样品经过该芯片。然后技术人员解释获得的传感图,以确定该多肽的 HER2 结合亲和性的至少定性测量。如果尝试定量测量,例如为了确定相互作用的某 KD 值,也可以使用表面等离子共振技术。结合值可例如在 **Biacore®** 2000 设备(GE Healthcare)中限定。HER2 或者其片段如胞外结构域固定在设备的传感器芯片上,通过系列稀释制备待确定其亲和性的多肽样品并以随机顺序注射。然后从结果中计算 KD 值,使用例如由设备生产商提供的 BIAevaluation 3.2 软件的 1:1Langmuir 结合模式进行。

[0052] 本发明还涵盖了这样的多肽,其中上述 HER2 结合多肽以 HER2 结合结构域形式存在,在其每一末端已经添加额外的氨基酸残基。这些额外的氨基酸残基在该多肽与 HER2 的结合中可起作用,但是在一些其它目的中可以相同地起作用,例如多肽的生产、纯化、稳定

化、偶联或者检测等一或多个目的中。这些额外的氨基酸残基可包含为了进行化学偶联而添加的一或多个氨基酸残基。一个实例是在多肽链的第一位或者最后一位即在 N 末端或者 C 末端添加半胱氨酸残基。用于化学偶联的半胱氨酸残基也可通过置换该蛋白质结构域表面上的另一氨基酸而导入,优选在不参与靶向结合的表面部分。这种额外的氨基酸残基也可包含“标记”以纯化或者检测所述多肽,如六组氨酸 (His6) 标记,或者“myc”标记或者“FLAG”标记以与特异于该标记的抗体相互作用。本领域技术人员知道其它选择。

[0053] 在具有额外的氨基酸残基的多肽的一个具体实施方案中,本发明提供了包含如下氨基酸序列的 HER2 结合多肽:

[0054] AEAKYAKEMR NAYWEIALLP NLTNQQKRAF IRKLYDDPSQ SSEL LSEAKK LNSQAPKVD C (SEQ ID NO:5)。

[0055] 在具有额外的氨基酸残基的多肽的另一个具体实施方案中,本发明提供了包含如下氨基酸序列的 HER2 结合多肽:

[0056] ESEKYAKEMR NAYWEIALLP NLTNQQKRAF IRKLYDDPSQ SSELLSEAKK LNSQAPK (SEQ ID NO:6)。

[0057] 上述“额外的氨基酸残基”也组成具有任何希望功能的一或多个多肽结构域,如与第一个 HER2 结合结构域相同的结合功能,或者另一种结合功能,或者酶功能,或者荧光功能,或者其混合物。

[0058] 因此,本发明涵盖了包含 SEQ ID NO:1-6 所示任何序列的多肽的多聚体。令人感兴趣地是例如当使用本发明的多肽诊断或者治疗癌症或者用于纯化 HER2 的方法中时,获得更强于本发明的一种多肽与 HER2 的结合。在这种情况下,所述多肽的多聚体如二聚体、三聚体或者四聚体可提供必要的亲和性作用。所述多聚体可由适当数目的本发明的多肽组成。在本发明的多聚体中连接的多肽“单位”可以通过使用已知的有机化学方法共价结合连接,或者在多肽重组表达系统中表达为一或多个融合蛋白,或者以任何其它方式直接或者通过接头如氨基酸接头结合。

[0059] 此外,本发明还涉及“异种”融合多肽,其包含在本发明范围内,其中包含 SEQ ID NO:1-6 所示任意序列的多肽组成第一个结构域或者第一部分,第二部分以及其它部分具有除了结合 HER2 之外的其它功能。所述融合多肽的第二部分及其它部分可包含具有除了 HER2 之外另一靶分子亲和性的结合结构域。结果是融合多肽具有至少一个 HER2 结合结构域以及具有所述其它靶分子亲和性的至少一个结构域。这使得可以产生可用于不同生物技术应用中的多特异性的试剂,如用作治疗剂或者用作捕获、检测或者分离试剂。其中至少一个多肽结构域包含 SEQ ID NO:1-6 所示任意序列的这种多特异性多肽多聚体的制备,可以如上文针对一些 HER2 结合“单位”的多聚体所述实现。所述第二部分或者其它部分可以是衍生自金黄色葡萄球菌蛋白质 A 的结构域的变体,如“Z 结构域”或者“蛋白质 Z”的变体 (Nilsson B et al (1987), supra), 或者包含具有靶亲和性的不相关的天然发生的或者重组的蛋白质 (或者其保留天然发生的或者重组蛋白质的结合能力的片段)。具有人血清白蛋白亲和性及可用作本发明多肽的融合配体这种结合蛋白的实例是链球菌菌株 G148 (Nygren P-Å et al (1988) Mol Recogn 1:69-74) 的蛋白质 G 的白蛋白结合结构域之一,如 GA1、GA2 或者 GA3 结构域。蛋白质 G 的 GA3 结构域也称作 ABD,即白蛋白结合结构域。包含 SEQ ID NO:1-6 所示任意序列的 HER2 结合多肽与链球菌蛋白质 G 的白蛋白结合结构域之间的融合

多肽因此包含在本发明范围内。当将本发明的多肽作为诊断剂、治疗剂或者靶向剂给予人时,其与结合血清白蛋白的部分的融合蛋白在体内半衰期方面可提供益处,这种融合蛋白与分离的 HER2 结合部分相比其半衰期延长(这个原理已经在例如 W091/01743 中描述)。同样,根据在 W02005/097202 中阐释的原理,所述融合多肽可以呈现出比分离的 HER2 结合部分低的免疫原性。

[0060] 本发明也涵盖了产生融合多肽的其它可能性。因此,根据本发明第一方面的多肽可以与第二部分或者其它部分共价结合,其除了靶向结合之外还呈现出其它功能,或者代替靶向结合而呈现出其它功能。一个实例是包含 SEQ ID NO:1-6 所示任意序列的一或多个多肽与作为报道或者效应部分的酶活性多肽之间的融合蛋白。可以与包含 SEQ ID NO:1-6 所示任一序列的多肽偶联形成融合蛋白的报道酶的实例为本领域技术人员已知,包括如 β -半乳糖苷酶、碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、羧肽酶。本发明的融合多肽的第二部分及其它部分的其它选项包括荧光多肽,如绿色荧光蛋白、红色荧光蛋白、荧光素酶及其变体。

[0061] 本发明的融合多肽的第二部分及其它部分的其它选项包括治疗性应用部分。在治疗性应用中,其它分子也可以通过其它方式与本发明多肽共价或者非共价偶联。非限制性实例包括酶的 ADEPT(抗体定向的酶前药治疗)应用,使用本发明的多肽定向效应酶(例如羧肽酶);蛋白质,用于补充免疫系统的效应细胞及其它成分;细胞因子,如 IL-2、IL-12、TNF α 、IP-10;促凝因子,如组织因子、von Willebrand 因子;毒素,如蓖麻毒素 A、假单胞菌外毒素、calceamicin、maytansinoid;毒性小分子,如 auristatin 类似物、阿霉素。

[0062] 关于上文对于掺入本发明的 HER2 结合多肽的融合蛋白的描述,应注意第一部分、第二部分及其它部分的名称是为了清晰起见而命名,用以一方面在 HER2 结合部分之间加以区分,以及另一方面区分呈现其它功能的部分。这些名称不是指融合蛋白的多肽链中不同结构域的实际顺序。因此,例如所述第一部分不限于在融合蛋白的 N 末端、中间或者在 C 末端。

[0063] 本发明涵盖了这样的多肽,其中为上述 HER2 结合多肽提供标记基团,如至少一个荧光团、生物素或者放射性同位素,例如用以检测所述多肽。特别地,本发明涵盖了放射性标记的多肽,其由上述 HER2 结合多肽与放射性核素如放射性金属的放射性螯合物组成。

[0064] 大多数放射性核素具有金属性质,且金属与蛋白质和肽中存在的元素典型不能形成稳定共价键。为此,使用螯合剂、多配位基配体(multidentate ligand),用放射性金属标记靶向蛋白质,与该金属形成称作螯合物的非共价化合物。在本发明多肽的一个实施方案中,掺入放射性核素可以通过提供螯合环境使得该放射性核素可以与所述多肽配位、螯合或者复合。

[0065] 本发明多肽的一个具体的实施方案中,其包含特征为 N_3S 螯合剂的四配位基螯合环境。术语 N_3S 是指这个螯合剂的四个附着的基团由三个氮原子和一个硫原子形成。在 N_3S 螯合剂中, N 和 S 原子在空间上排列为提供合适的“口袋”,用于放射性金属的复合或者附着。

[0066] 在一些实施方案中,根据本发明的 HER2 结合多肽可进一步包含与其 N 末端偶联的巯基乙酰基,其中通过 N 末端的前三个连续肽键的氮原子以及巯基乙酰基的 SH 基团一起提供了由 N_3S 螯合剂基序组成的螯合环境。

[0067] 在一些实施方案中,根据本发明的 HER2 结合多肽的 N 末端的前三个连续肽键可由

残基 ESE 的氨基基团提供。

[0068] N_3S 螯合剂可以通过适当选择多肽的氨基酸序列中的氨基酸残基而提供。

[0069] 例如, N_3S 螯合环境可以通过巯基乙酰基与本发明多肽的 N 末端偶联而提供。在这个实施方案中, 巯基乙酰基提供了必需的 S 原子, 而肽主链中前三个 N 原子组成四配位基螯合剂的三个 N 原子。优选地, 巯基乙酰基与包含 SEQ ID NO:4 所示氨基酸序列为大多数 N-末端氨基酸序列的多肽偶联, 产生包含如下氨基酸序列的多肽:

[0070] maESEKYAKEX₁R NAYWEIALLP NLTNQQKRAF IRKLYDDPSQ SSE LLX₂EAKK LND SQ

[0071] 其中 ma 是巯基乙酰基, 位置 9 的 X₁ 是 M、I 或者 L, 位置 46 的 X₂ 是 S 或者 C。在特别优选的实施方案中, 所述多肽具有如下序列:

[0072] maESEKYAKEMR NAYWEIALLP NLTNQQKRAF IRKLYDDPSQSSELLSEAKK LND SQAPK

[0073] 其中 ma 是巯基乙酰基 (SEQ ID NO:7)。

[0074] 在一些实施方案中, 根据本发明的 HER2 结合多肽可包含半胱氨酸残基, 所述半胱氨酸残基已经存在于序列中或者作为额外的氨基酸残基或者通过置换不参与 HER2 结合的表面暴露的氨基酸残基。优选地, 所述半胱氨酸残基可位于 SEQ ID NO:5 的 C 末端, 或者所述额外的半胱氨酸可位于 SEQ ID NO:1-4 或者 6-7 任一序列的 C 末端, 其中所述半胱氨酸残基任选随后是一或多个其它氨基酸残基, 且由半胱氨酸和两个前面的氨基酸残基组成的一段氨基酸残基序列的三个连续肽键的氮原子以及半胱氨酸残基的 SH 基团一起提供了由 N_3S 螯合剂基序组成的螯合环境。优选地, 根据本发明的 HER2 结合多肽可包含由通过硫醇基团与所述多肽偶联的聚氨基聚羧酸酯螯合剂提供的螯合环境。更优选地, 所述聚氨基聚羧酸酯螯合剂可以是 1, 4, 7, 10-四氮杂环十二烷-1, 4, 7, 10-四乙酸或者其衍生物。更优选地, 所述聚氨基聚羧酸酯螯合剂可以是二乙烯三胺五乙酸或者其衍生物。

[0075] 在另一个实施方案中, 三个 N 基团可以由多肽链中三个连续肽键的 N 原子提供, 最后一个半胱氨酸残基, 其包含在其侧链上的 SH 基团。半胱氨酸侧链的 S 原子组成 N_3S 螯合剂中的 S 原子。换句话说, N_3S 螯合剂是三肽序列 XXC 形式, 其中 X 是任何氨基酸残基。这种三肽序列可最初包含于本发明的多肽中或者作为一或多个额外的氨基酸添加而包含于本发明的多肽中。优选半胱氨酸残基位于 SEQ ID NO:5 的 C 末端或者一额外的半胱氨酸直接位于 SEQ ID NO:1-4 或者 6-7 任一序列的 C 末端。所述半胱氨酸残基也可以后接一或多个其它氨基酸残基。

[0076] 本发明的多肽包含特征为 N_3S 螯合剂的四配位基螯合环境, 由与 N 末端偶联的巯基乙酰基和三个连续肽键的氮原子提供, 或者由三个连续肽键的氮原子与在多肽 C 末端的半胱氨酸残基提供, 所述多肽可用于提供由 HER2 结合多肽与放射性核素的放射性螯合物组成的放射性标记的多肽, 所述放射性核素适于医学成像, 例如是 ^{99m}Tc (Engfeldt et al (2007) Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging 34(5):722-22; Engfeldt et al (2007) Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging 34(11):1843-53), 或者所述放射性核素适于治疗, 选自 ^{186}Re 和 ^{188}Re 。在一些实施方案中, 放射性核素通过螯合环境与 HER2 结合多肽复合。

[0077] 当本发明的多肽包含两个、三个或者更多个 XXC 三肽时, 优选末端那个用于与放射性核素复合。当所述多肽以此方式放射性标记时, 其它 XXC 三肽优选被保护。

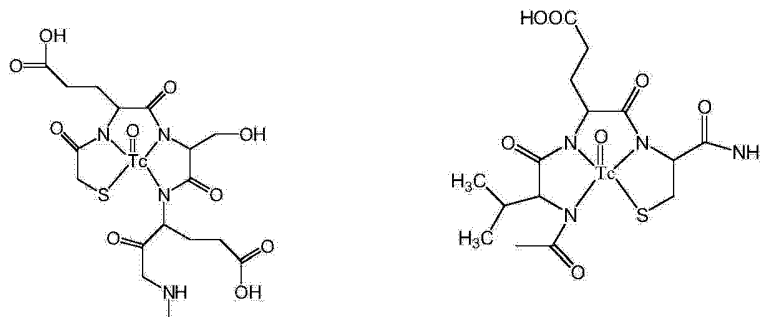
[0078] 本发明的放射性标记的多肽的一个特别优选的实施方案是具有如下氨基酸序列的 HER2 结合多肽与 ^{99m}Tc 的放射性螯合物:

[0079] maESEKYAKEMR NAYWEIALLP NLTNQQKRAF IRKLYDDPSQ SSELLSEAKK LNDSQAPK

[0080] 其中 ma 是巯基乙酰基 (SEQ ID NO:7)。

[0081] 使用多肽在 N 末端的 maESE- 或者在 C 末端的 -VDC 整合的 ^{99m}Tc 的假定结构分别是：

[0082]



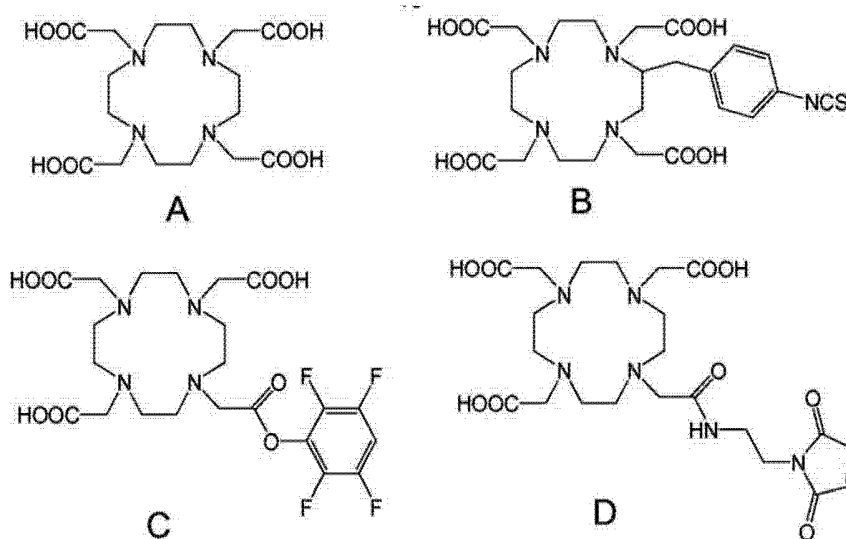
[0083] 在本发明多肽的另一个实施方案中,聚氨基聚羧酸酯螯合剂用于掺入放射性核素。优选所述多肽然后包含至少一个半胱氨酸,最优选其包含仅一个半胱氨酸。所述半胱氨酸可以最初或者在后期作为一或多个额外的氨基酸加入而存在于本发明的多肽中。

[0084] 技术人员也可以预知许多其它螯合剂,能螯合如“裸”Me、 $\text{Me} = \text{O}$ 、 $\text{O} = \text{Me} = \text{O}$ 、 $\text{Me} \equiv \text{N}$ 、 $\text{Me}(\text{CO})_3$ 或者 HYNIC-Me- 共配体核心 (其中 Me 是 Tc 或者 Re 的放射性同位素) 等这种核心,其在肽合成期间可以位点特异性附着于多肽,或者使用已知的放射标记缀合化学方法与重组产生的多肽缀合。优选地,这种螯合剂具有亲水性特性。关于这种螯合剂的综述在 Liu S and Edwards DS(1999)Chem Rev. 99(9):2235-68 中提供。

[0085] 技术人员可以区分两类聚氨基聚羧酸酯螯合剂:大环型和无环型。

[0086] 对于铟、镓、钇、铋、放射性锕 (radioactinides) 和放射性镧 (radiolanthanides) 等放射性同位素最常用的大环型螯合剂是 DOTA (1, 4, 7, 10- 四氮杂环十二烷-1, 4, 7, 10- 四乙酸) 的不同衍生物 (见下文)。与本发明的多肽适用作螯合剂的一些不同的基于 DOTA 的化合物可商购,例如购自 Macrocyclics Inc., USA, 实例见下文所示。

[0087]



[0088] 在这个化学式中, A 是 DOTA, B 是氨基反应性 4- 异硫氰基 - 苯甲基 -DOTA, C 是

DOTA-TFP 酯, D 是巯基反应性马来酰亚胺单酰胺 DOTA。

[0089] 金属从 DOTA 中较高的动力学惰性, 即较慢的解离速度, 有利地稳定放射性核素的附着。然而, 由于较慢的结合速度而需要提高温度进行标记。为此, DOTA 衍生物广泛用于标记短肽, 其在加热至 60-90°C 相对无反应。

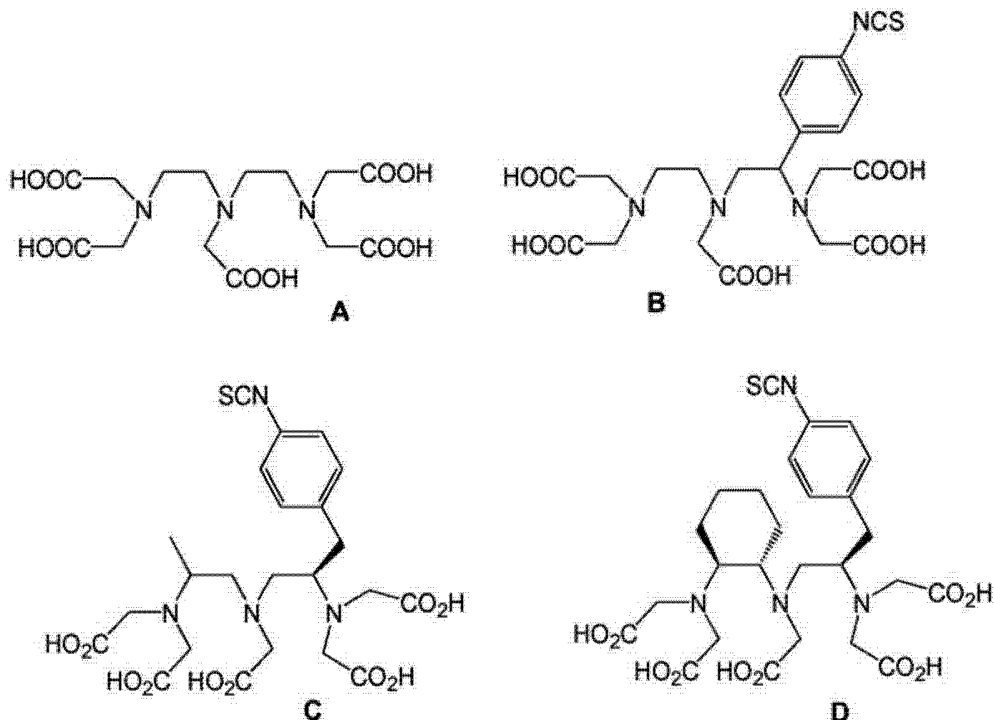
[0090] 在本发明中用作螯合剂的一个优选的衍生物是 1, 4, 7, 10- 四氮杂环十二烷-1, 4, 7- 三- 乙酸-10- 马来酰亚胺乙基乙酰胺。

[0091] 如上文揭示, 本发明的多肽可例如包含 SEQ ID NO:5 氨基酸序列。在更具体的实施方案中, 所述多肽包含 SEQ ID NO:5 序列, 且具有与氨基酸残基 C61 偶联的四氮杂环 (tetraazacyclo) 化合物。在特别优选的实施方案中, 所述四氮杂环化合物是 1, 4, 7, 10- 四氮杂环十二烷-1, 4, 7- 三- 乙酸-10- 马来酰亚胺乙基乙酰胺, 其通过残基 C61 的 SH 基团与四氮杂环化合物的马来酰亚胺部分反应而与所述多肽偶联。本发明的一个特别优选的实施方案因此是与 1, 4, 7, 10- 四氮杂环十二烷-1, 4, 7- 三- 乙酸-10- 马来酰亚胺乙基乙酰胺偶联的包含如下氨基酸序列的 HER2 结合多肽:

[0092] AEAKYAKEMR NAYWEIALLP NLTNQQKRAF IRKLYDDPSQ SSEL LSEAKK LNDSPAPKVD C (SEQ ID NO:5)。

[0093] 最常用的无环聚氨基聚羧酸酯螯合剂是 DTPA (二乙烯三胺-五乙酸) 的不同衍生物, 如下文化学式所示, 其中 A 是 DTPA, B 是氨基反应性衍生的异硫氰基苯甲基-DTPA, C 是氨基反应性衍生的半刚性 2-(对-异硫氰基苯甲基)-6- 甲基-DTPS (IB4M), D 是氨基反应性衍生的 CHX-A"-DTPA。

[0094]



[0095] 已经发现 DTPA 的主链修饰的半刚性变体提供足够的稳定性以用 ^{90}Y 标记, 例如 Zevalin[®]。尽管无环螯合剂惰性较低, 且因此与大环型螯合剂相比稳定性较差, 但是在室温其标记较迅速。为此, 其可优选用于标记不能耐热的单克隆抗体。聚氨基聚羧酸酯螯合

剂与靶向蛋白质的偶联的详细方案已经由 Cooper 及其同事 (Nat. Protoc. 1:314-7, 2006) 和 Sosabowski and Mather (Nat. Protoc. 1:972-6, 2006) 公开。

[0096] 与聚氨基聚羧酸酯螯合剂偶联的本发明的多肽可用于提供放射性标记的多肽, 所述放射性标记的多肽由与螯合剂偶联的 HER2 结合多肽与放射性核素的放射性螯合物组成, 所述放射性核素适于医学成像, 选自 ^{61}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{66}Ga 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 $^{110\text{m}}\text{In}$ 、 ^{111}In 、 ^{44}Sc 和 ^{86}Y , 或者所述放射性核素适于治疗性应用, 选自 ^{225}Ac 、 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 、 ^{67}Cu 、 ^{166}Ho 、 ^{177}Lu 、 ^{212}Pb 、 ^{149}Pm 、 ^{153}Sm 、 ^{227}Th 和 ^{90}Y , 其中所述放射性核素与 HER2 结合多肽通过螯合环境复合。

[0097] 本发明的放射性标记的多肽的一个优选的实施方案是与 1, 4, 7, 10- 四氮杂环十二烷 -1, 4, 7- 三 - 乙酸 -10- 马来酰亚胺乙基乙酰胺偶联的具有如下氨基酸序列的 HER2 结合多肽与 ^{111}In 的放射性螯合物:

[0098] AEAKEYAKEMR NAYWEIALLP NLTNQQKRAF IRKLYDDPSQ SSELLSEAKK LNSQAPKVD C (SEQ ID NO:5)。

[0099] 本发明的放射性标记的多肽的一个优选的实施方案是与 1, 4, 7, 10- 四氮杂环十二烷 -1, 4, 7- 三 - 乙酸 -10- 马来酰亚胺乙基乙酰胺偶联的具有如下氨基酸序列的 HER2 结合多肽与 ^{61}Cu 或者 ^{64}Cu 的放射性螯合物:

[0100] AEAKEYAKEMR NAYWEIALLP NLTNQQKRAF IRKLYDDPSQ SSELLSEAKK LNSQAPKVD C (SEQ ID NO:5)。

[0101] 本发明的放射性标记的多肽的一个特别优选的实施方案是与 1, 4, 7, 10- 四氮杂环十二烷 -1, 4, 7- 三 - 乙酸 -10- 马来酰亚胺乙基乙酰胺偶联的具有如下氨基酸序列的 HER2 结合多肽与 ^{66}Ga 、 ^{67}Ga 或者 ^{68}Ga 的放射性螯合物:

[0102] AEAKEYAKEMR NAYWEIALLP NLTNQQKRAF IRKLYDDPSQ SSELLSEAKK LNSQAPKVD C (SEQ ID NO:5)。

[0103] 本发明的放射性标记的多肽的一个特别优选的实施方案是与 1, 4, 7, 10- 四氮杂环十二烷 -1, 4, 7- 三 - 乙酸 -10- 马来酰亚胺乙基乙酰胺偶联的具有如下氨基酸序列的 HER2 结合多肽与 ^{86}Y 的放射性螯合物:

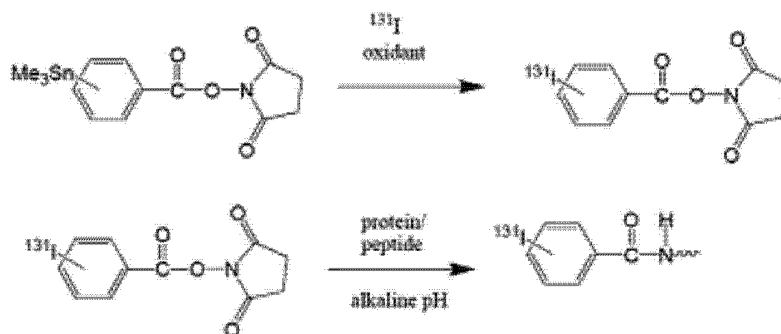
[0104] AEAKEYAKEMR NAYWEIALLP NLTNQQKRAF IRKLYDDPSQ SSELLSEAKK LNSQAPKVD C (SEQ ID NO:5)。

[0105] 本发明的放射性标记的多肽也可以通过如上述间接标记 HER2 结合多肽而获得。优选所述多肽包含至少一个半胱氨酸残基, 最优选其包含仅一个半胱氨酸。所述半胱氨酸可以最初或者在后期作为一或多个额外的氨基酸加入而存在于本发明的多肽中。对于用例如 ^{18}F 、 ^{76}Br 、不同的碘同位素以及 ^{211}At 进行间接标记, 中间体“接头分子”可用于标记。这种接头应含有两个功能部分, 一个部分提供快速且有效的放射性标记, 另一部分使得可以与蛋白质快速且有效地偶联, 例如与唯一的半胱氨酸的氨基基团或者优选与巯基基团偶联。例如, 马来酰亚胺基团与巯基基团反应形成稳定的硫醚键。想法是“接头分子”首先与放射性标记反应, 随后与蛋白质的巯基基团反应。

[0106] 针对放射性碘化对一些选项进行彻底研究, 其中对接头分子进行了放射性碘化, 例如在具有合适裂解基团的激活的酚环 (phenolic ring) 或者芳环上进行。关于制备非标记的接头和使用 N- 琥珀酰亚胺 3-[*I] 碘苯甲酸酯进行间接标记的详细方案由 Vaidyanathan et al. (Vaidyanathan G and Zalutsky MR (2006) Nat

Protoc. 1(2):707-13) 提供。使用 N-琥珀酰亚胺基三甲基锡烷基 (stannyl)- 苯甲酸酯间接标记的一个实例如下文化学式例证。

[0107]



[0108] 在这个化学式中,接头分子首先在酸性条件下放射性碘化,然后在碱性条件下与游离氨基偶联(赖氨酸的 ϵ -氨基基团的 N-末端)。苯甲酸酯的间位-和对位-碘衍生物在文献中均有描述。

[0109] 接头分子可包含连接放射性标记的芳基基团(例如在第 2-、3- 或者 4- 位置),条件是当放射性标记是 ^{76}Br 时,接头分子不包含酚 OH- 基团。接头分子的非限制性实例包括杂环亚胺,可用于连接本发明的多肽与放射性标记,包括 N-[2- 苯甲酰胺乙基] 马来酰亚胺、4- 马来酰亚胺二苯丙酮 (BPMa1)、琥珀酰亚胺 4-(p- 马来酰亚胺苯基) 丁酸酯 (SMPB)、4-(4-N- 马来酰亚胺苯基) 丁酸肼盐酸盐 (MPBH) 以及马来酰亚胺苯甲酰-N-羟基琥珀酰亚胺酯 (MBS)。

[0110] N-[2- 苯甲酰胺乙基] 马来酰亚胺可以与 ^{18}F 反应形成 N-[2-(4-(^{18}F - 氟苯甲酰胺)乙基) 马来酰亚胺。同样,其可以与 ^{76}Br 反应,如 Cai et al. (J. Nucl. Med. 47:1172-80, 2006) 所述。

[0111] 本发明还涉及使用上述 HER2 结合多肽的不同方面,以及各种治疗、诊断和检测方法,其中所述多肽由于其结合特性而可以用于其中。当在下文关于这些应用和方法的描述中,术语“HER2 结合多肽”是指包含单独的 HER2 结合多肽,但是也包含基于上述这种多肽的所有那些分子,例如掺入 HER2 多肽作为融合蛋白的一部分,和 / 或与标记、螯合剂、治疗剂和 / 或诊断剂缀合,和 / 或提供额外的氨基酸残基作为标记或者用于其它目的。如上所述,这种融合蛋白、衍生物等组成本发明的一部分。

[0112] 因此,一方面,本发明提供了患有或者怀疑患有特征在于 HER2 过表达的癌症的哺乳动物包括人对象的体内成像方法,所述方法包括如下步骤:

[0113] - 将如上述放射性标记的多肽给予所述哺乳动物对象身体内,该多肽包含适于医学成像的放射性核素;

[0114] - 使用医学成像设备获得该对象身体至少一部分的图像,所述图像示出所述身体内放射性核素的存在。优选地,该图像在给予身体该放射性标记的多肽 1-72 小时内获得,或者在一些情况中优选在 1-24 小时内获得。给予多肽和获得图像之间的时间依赖于所用放射性核素的半衰期。可以重复两次、三次或者多次获得图像的步骤,从而获得一系列图像。这可用于试图跟踪靶向剂随着时间的生物分布状况以及进行药动力学研究。技术人员意识到可以获得任何数目的图像,以实现在这项研究中必要程度的时间分辨率。

[0115] 在本发明的成像方法的一个实施方案中,所述方法包括在给予步骤之前的制备本

发明的放射性标记的多肽的预备步骤,该步骤包括混合第一方面的多肽与适于医学成像的放射性核素。

[0116] 在本发明的成像方法的一个更具体的实施方案中,所述方法包括在给予步骤之前的制备放射性标记的多肽的预备步骤,所述放射性多肽由 i) 其氨基酸序列由 SEQ ID NO:7 组成的多肽与 ii) ^{99m}Tc 组成,所述预备步骤包括将所述多肽在存在在适当缓冲液中的合适还原剂的条件下与 ^{99m}Tc - 高锝酸盐混合,所述还原剂例如是氯化亚锡或者氟化亚锡。也可以在存在中间体的弱螯合剂的条件下进行,例如酒石酸盐或者柠檬酸盐或者葡糖酸盐。

[0117] 在本发明的成像方法的另一具体的实施方案中,所述方法包括在给予步骤之前的制备放射性标记的多肽的预备步骤,所述放射性标记的多肽由 i) 与 1,4,7,10- 四氮杂环十二烷-1,4,7- 三- 乙酸-10- 马来酰亚胺乙基乙酰胺缀合的其氨基酸序列由 SEQ ID NO:5 组成的多肽与 ii) ^{111}In 组成,这个步骤包括将该缀合物与 ^{111}In 在防止不溶的胶体形成的合适缓冲液中混合,所述缓冲液例如(但不限于)乙酸盐或者柠檬酸盐缓冲液。

[0118] 在本发明的成像方法的另一具体的实施方案中,所述方法包括在给予步骤之前的制备放射性标记的多肽的预备步骤,所述放射性标记的多肽由 i) 与 1,4,7,10- 四氮杂环十二烷-1,4,7- 三- 乙酸-10- 马来酰亚胺乙基乙酰胺缀合的其氨基酸序列由 SEQ ID NO:5 组成的多肽与 ii) ^{61}Cu 或者 ^{64}Cu 组成,这个步骤包括将该缀合物与 ^{61}Cu 或者 ^{64}Cu 在防止不溶的胶体形成的合适缓冲液中混合,所述缓冲液例如(但不限于)乙酸盐或者柠檬酸盐缓冲液。

[0119] 在本发明的成像方法的另一具体的实施方案中,所述方法包括在给予步骤之前的制备放射性标记的多肽的预备步骤,所述放射性标记的多肽由 i) 与 1,4,7,10- 四氮杂环十二烷-1,4,7- 三- 乙酸-10- 马来酰亚胺乙基乙酰胺偶联的其氨基酸序列由 SEQ ID NO:5 组成的多肽与 ii) ^{66}Ga 、 ^{67}Ga 或者 ^{68}Ga 组成,这个步骤包括将该缀合物与 ^{66}Ga 、 ^{67}Ga 或者 ^{68}Ga 在防止不溶的胶体形成的合适缓冲液中混合,所述缓冲液例如(但不限于)乙酸盐或者柠檬酸盐缓冲液。

[0120] 在本发明这个方面的一些实施方案中,所述癌症选自乳腺癌、卵巢癌、胃癌、膀胱癌、唾液腺癌、肺癌和食管癌。

[0121] 另一方面,本发明提供了用于诊断中的上述放射性标记的多肽。如本文所用,术语“诊断”用于描述通过评估患者病史、检验和综合实验室资料而鉴别或者确定疾病性质和原因的行为或过程。

[0122] 所述放射性标记的多肽可用于诊断特征在于频繁发生 HER2 过表达的癌症。如本文所用,“频繁发生”是指 HER2 的过表达在至少 10% 的患有特定癌症的所有患者中存在。所述放射性标记的多肽因此可用于决定患者是否具有这种癌症的方法中。其也可用于决定患者的适当治疗方法。特别地,检测 HER2 过表达可用于对患者进行分层次 HER2 靶向治疗,例如使用 trastuzumab (Herceptin[®]) 治疗。

[0123] 所述放射性标记的多肽也可用于对癌症进行诊断和 / 或分子学鉴定,所述癌症选自乳腺癌、卵巢癌、胃癌、膀胱癌、唾液腺癌、肺癌和食管癌。在涉及鉴定 HER2 表达的分子鉴定中,即例如在治疗之前和之后确定是否存在 HER2 的任何表达、确定 HER2 表达的量,这可以通过获得在治疗之前和之后的图像而实现,以及为了外科手术的目的而确定 HER2 表达的程度或者解剖学含量。

[0124] 再一方面,本发明提供了上述放射性标记的多肽在制备用以对哺乳动物包括人对象的身体进行体内成像的诊断剂中的应用。

[0125] 另一方面,本发明提供了治疗患有特征在于 HER2 过表达的癌症的哺乳动物包括人对象的方法,所述方法包括将治疗有效量的适于治疗的放射性核素给予所述哺乳动物对象体内。

[0126] 在这个方面的一个实施方案中,所述方法包括在给予步骤之前的制备本发明的放射性标记的多肽的预备步骤,这个步骤包括:

[0127] - 将第一方面的多肽与适于治疗的金属放射性核素在合适的缓冲液中混合;或者

[0128] - 将第一方面的多肽与高铈酸盐在合适的缓冲液中在存在合适的还原剂的条件下混合;这也可以在存在中间体弱螯合剂如酒石酸盐或者柠檬酸盐或者葡糖酸盐的条件下进行;或者

[0129] - 将第一方面的多肽与铈反应性中间体如三羰基复合物混合;或者

[0130] - 将第一方面的多肽与具有附着的卤素原子的反应性中间体在合适的缓冲液中混合。这个混合步骤可以在存在用于抑制多肽放射裂解作用的物质如抗坏血酸或者龙胆酸的条件下进行。

[0131] 在本发明这个方面的一些实施方案中,所述癌症选自乳腺癌、卵巢癌、胃癌、膀胱癌、唾液腺癌、肺癌以及食管癌。

[0132] 另一方面,本发明提供了用于治疗中的上述放射性标记的多肽,如用于治疗特征在于 HER2 过表达的癌症,例如用于治疗选自乳腺癌、卵巢癌、胃癌、膀胱癌、唾液腺癌、肺癌以及食管癌的癌症。

[0133] 再一方面,本发明提供了上述放射性标记的多肽在制备治疗特征在于 HER2 过表达的癌症的药物中的应用,所述癌症如选自乳腺癌、卵巢癌、胃癌、膀胱癌、唾液腺癌、肺癌以及食管癌的癌症。

[0134] 本发明另一方面涉及包含编码上述多肽的序列的核酸分子。

[0135] 本发明另一方面涉及表达载体,其包含前一方面的核酸分子以及使得可以通过表达该核酸分子产生本发明多肽的其它核酸元件。

[0136] 本发明再一方面涉及包含前述的表达载体的宿主细胞。

[0137] 本发明的后三方面是产生本发明多肽的工具,鉴于本文关于待表达的多肽的信息以及本领域技术人员目前重组表达蛋白质的水平,技术人员无需过度劳动即可获得其并付诸于实践。

[0138] 然而,本发明的多肽也可以通过其它已知方式产生,包括化学合成方法或者在不同的原核或者真核宿主中表达,所述宿主包括植物和转基因动物。

[0139] 通过对进行的实验加以描述举例说明本发明。如下实施例无限制本发明之意。在实施例中参考附图。

[0140] 附图简述

[0141] **Affibody[®]** 分子的序列在下表 1 中提供。

[0142] 图 1 示出在固定有 HER2/Fc 嵌合的融合蛋白的传感器芯片上,在注射 A:7.8nM; B:1.9nM 和 C:0.49nM 的 **Affibody[®]** 分子 II 之后获得的 Biacore 传感图。C 末端半胱氨酸

的 SH- 基团用 N- 乙基马来酰亚胺 (NEM) 封闭。

[0143] 图 2 示出在固定有 HER2/Fc 嵌合的融合蛋白的传感器芯片上注射 A:6nM ;B:1.5nM 和 C:0.38nM 的 **Affibody**[®] 分子 II (SEQ ID NO:5) 与 C 末端半胱氨酸偶联的 DOTA 之后获得的 Biacore 传感图。

[0144] 图 3 示出在固定有 HER2/Fc 嵌合的融合蛋白的传感器芯片上注射 A:6nM ;B:1.5nM 和 C:0.38nM 的 **Affibody**[®] 分子 X (SEQ ID NO:7) 之后获得的 Biacore 传感图。

[0145] 图 4 示出在 BALB/c nu/nu 小鼠 SKOV-3 肿瘤异种移植中,具有 DOTA 的 ¹¹¹In- 标记的 **Affibody**[®] 分子 II 的生物分布。所有小鼠均注射 1 μg (100kBq) 的 ¹¹¹In- 标记的 **Affibody**[®] 分子 II。在注射后 0.5、1、4 和 24 小时切下器官,称重,在 γ 计数器中测量其放射性含量。放射性吸收以每克组织注射的活性的百分比计算 (% IA/g)。

[0146] 图 5 示出在图 4 中描述的生物分布研究中测量的放射性吸收的肿瘤 - 器官比率。

[0147] 图 6 示出在 SKOV-3 肿瘤异种移植中,具有 DOTA 的 ¹¹¹In- 标记的 **Affibody**[®] 分子 II 的肿瘤靶向特异性。所有小鼠均注射具有 DOTA 的 1 μg (100kBq) ¹¹¹In- 标记的 **Affibody**[®] 分子 II。一组动物预先用过量的未标记的 **Affibody**[®] 分子 (封闭组) 处理 50 分钟,之后注射 ¹¹¹In- 标记的 **Affibody**[®] 分子。在注射后 4 小时切下器官,称重,在 γ 计数器中测量其放射性含量。放射性吸收以每克组织注射的活性的百分比计算 (% IA/g)。

[0148] 图 7 示出在 BALB/c nu/nu 小鼠中表达 HER2 的 SKOV-3 异种移植肿瘤 (左侧部分,注射后 30 分钟和 4 小时) 以及 HER2 阴性 A431 异种移植 (右侧部分,注射后 4 小时) 的 γ 相机图像。所有小鼠均注射具有 DOTA 的 3 μg (4.5MBq) 的 ¹¹¹In- 标记的 **Affibody**[®] 分子 II。K = 肾, T = 肿瘤。

[0149] 图 8 示出在 BALB/c nu/nu 小鼠 SKOV-3 肿瘤异种移植中,注射后 4 小时 ^{99m}Tc- 标记的 **Affibody**[®] 分子 X 的生物分布情况。所有小鼠均注射 1 μg (65kBq) 的 ^{99m}Tc- 标记的 **Affibody**[®] 分子 X。一组动物预先用过量的未标记的 **Affibody**[®] 分子 (封闭组) 处理 50 分钟,之后注射 ^{99m}Tc- 标记的 **Affibody**[®] 分子。在注射后 4 小时切下器官,称重,在 γ 计数器中测量其放射性含量。放射性吸收以每克组织注射的活性的百分比计算 (% IA/g)。

[0150] 图 9 示出在图 8 中描述的生物分布性研究中测量的放射性吸收的肿瘤 - 器官比率。

[0151] 图 10 示出 BALB/c nu/nu 小鼠中表达 HER2 的 SKOV-3 异种移植肿瘤 (左侧部分,注射后 1 小时和 4 小时) 以及 HER2 阴性 A431 异种移植 (右侧部分,注射后 4 小时) 的 γ 相机图像。所有小鼠均注射 3 μg (15MBq) 的 ^{99m}Tc- 标记的 **Affibody**[®] 分子 X。K = 肾, T = 肿瘤。

[0152] 图 11 示出在氨基酸 18-58 的合成阶段 **Affibody**[®] 分子 X 的分析性 HPLC 洗脱图。

Affibody[®] 分子在 VydacTP218TP54 柱上分离。流速:1ml/ 分钟;温度:35℃;检测:220nm;溶剂 A:0.1% TFA、在 H₂O 中的 1% 乙腈;溶剂 B: 在乙腈中的 0.1% TFA。

[0153] A) 在聚苯乙烯树脂上使用假脯氨酸在位置 22-23、41-42、45-46 和 53-54 进行的合成。

[0154] B) 在聚苯乙烯树脂上没有假脯氨酸进行的标准肽合成。

[0155] 图 12 示出在氨基酸 1-58 (A) 和 10-58 (B) 的合成阶段 **Affibody**[®] 分子 X 的分析性 HPLC 洗脱图。**Affibody**[®] 分子在 VydacTP218TP54 柱上分离。流速:1ml/ 分钟;温度:35℃;检测:220nm;溶剂 A:0.1% TFA、在 H₂O 中的 1% 乙腈;溶剂 B: 在乙腈中的 0.1% TFA。

[0156] A) 在聚苯乙烯树脂上使用假脯氨酸在位置 22-23、41-42、45-46 和 53-54 进行的合成。

[0157] B) 在聚苯乙烯树脂上没有假脯氨酸进行的标准肽合成。

[0158] 图 13 示出表 1 中列出的一些 **Affibody**[®] 分子的疏水性 / 亲水性图示。

A) **Affibody**[®] 分子 II (SEQ ID NO:5) 的图示, B) 具有 SEQ ID NO:X (SEQ ID NO:7) 序列的 **Affibody**[®] 分子的图示, C) **Affibody**[®] 分子 Z00342 的图示, 这个分子是作为对照的没有突变的亲代 **Affibody**[®] 分子。图的上半部分示出使用 Kyte-Doolittle scale 的图, 下半部分示出通过 HPLC 确定的在 pH 3.4 的疏水性指数。疏水性氨基酸是正值, 亲水性氨基酸是负值。7 个氨基酸的移动窗 (moving window) 用于这两个图。在 B) 中, 仅 **Affibody**[®] 分子 X (SEQ ID NO:7) 的氨基酸序列, 即没有 ma 的 **Affibody**[®] 分子 X 用于绘图。

[0159] 图 14 示出本发明的 **Affibody**[®] 分子 II (黑色线) 和 **Affibody**[®] 分子 Z00342 (灰色虚线) 的 HPLC 洗脱图。**Affibody**[®] 分子在 Zorbax 300SB C8150×2.1mm, 3.5 μm 柱上, 使用流速 0.5ml/ 分钟以及 TFA、水、乙腈溶剂系统分离。

实施例

[0160] 实施例 1 - 本发明多肽的制备

[0161] 概述

[0162] 在这个实施例中, 将选择的 HER2 特异性 **Affibody**[®] 分子亚克隆进 pET System 表达载体中, 在适当的细菌细胞中大量表达并根据如下方案纯化。相应的全长 HER2 特异性 **Affibody**[®] 分子的氨基酸序列作为 **Affibody**[®] 分子 I-XI 列于表 1 中。

[0163] **Affibody**[®] 分子的克隆

[0164] 将编码 **Affibody**[®] 分子 I-VIII 的基因通过使用两个寡核苷酸 (在一起包含

Affibody[®]序列)作为模板进行PCR扩增。对于每个构建体,使用具有28bp互补重叠的一对特定的模板寡核苷酸(每个长度为102b)。**Affibody**[®]基因的扩增使用包含NdeI位点和ATG起始密码子(对于**Affibody**[®]分子I,引物中还包含His₆-标记编码序列)的正向引物(有义)和具有C-末端氨基酸的密码子、终止密码子和NotI位点的反向引物(反义)。

[0165] 在**Affibody**[®]分子IX中通过重叠延伸PCR产生**Affibody**[®]-白蛋白结合结构域(ABD)基因融合物。如上文针对**Affibody**[®]分子I-VIII所述产生**Affibody**[®]分子编码片段,不同之处是反向引物包含接头序列(具有Cys密码子)和ABD基因的5'-末端。扩增ABD基因,使用包含**Affibody**[®]基因3'-末端和接头序列的正向引物以及具有终止密码子和NotI位点的反向引物扩增。随后,在最后的PCR扩增中将具有25bp重叠的两个PCR产物用作模板,使用**Affibody**[®]基因正向引物和ABD基因反向引物,产生**Affibody**[®]-ABD基因融合物。

[0166] 将PCR产物用限制酶NdeI和NotI消化,在预先用相同的酶消化的T7-表达载体中连接。

[0167] 表1:产生的**Affibody**[®]分子的氨基酸序列

[0168]

Affibody [®] 分子	成熟蛋白质的氨基酸序列
I	GSSHHHHHHL QVDAKYAKEM RNAYWEIALL PNLTNQQKRA FIRKLYDDPS QSSELLSEAK KLNSQAPK
II (SEQ ID NO:5)	AEAKYAKEMR NAYWEIALLP NLTNQQKRAF IRKLYDDPSQ SSELLSEAKK LNSQAPKVD C
III	AEAKYAKEMR NAYWEIALLP NLTNQQKRAF IRKLYDDPSQ SSELLSEAKK LNSQAPKC
IV	AEAKYAKEIR NAYWEIALLP NLTNQQKRAF IRKLYDDPSQ SSELLSEAKK LNSQAPKC
V	AEAKYAKELR NAYWEIALLP NLTNQQKRAF IRKLYDDPSQ SSELLSEAKK LNSQAPKC
VI	AEAKYAKEMR NAYWEIALLP NLTNQQKRAF IRKLYDDPSQ SSELLCEAKK LNSQAPK
VII	AEAKYAKEIR NAYWEIALLP NLTNQQKRAF IRKLYDDPSQ SSELLCEAKK LNSQAPK

[0169]

VIII	AEAKYAKELR NAYWEIALLP NLTNQQKRAF IRKLYDDPSQ SSELLCEAKK LNDSQAPK
IX	AEAKYAKEMR NAYWEIALLP NLTNQQKRAF IRKLYDDPSQ SSELLSEAKK LNDSQAPG-CGS-“ABD”
X (SEQ ID NO:7)	maESEKYAKEMR NAYWEIALLP NLTNQQKRAF IRKLYDDPSQ SSELLSEAKK LNDSQAPK
XI	YAKELRNAYW EIALLPNLTN QQKRAFIRKL YDDPSQSSEL LCEAKKLNDS QA

[0170] *Affibody*[®] 分子的表达与收获

[0171] 使用电穿孔将所得表达质粒转化进大肠杆菌 BL21 (DE3) 细胞中。从含有卡那霉素的选择性琼脂中挑取含有表达质粒的细菌,使用多发酵罐系统 (System Greta, Belach Bioteknik AB, Sweden) 在 37℃ 在补加 50mg/l 卡那霉素的 800ml 的 TSB+YE- 培养基 (30g/l Tryptic Soy Broth+5g/l Yeast Extract) 中生长。在光密度 (OD600nm) 为 ~1 条件下,通过加入 0.5mM 的 IPTG 自动诱导 *Affibody*[®] 分子表达。在加入诱导剂之后 5 小时,使培养物自动冷却至 <12℃。然后通过离心 (20 分钟, 15, 900×g) 收获培养物,收获 5-10g 细菌细胞沉淀并贮存在冷藏室 (-20℃) 中。

[0172] *Affibody*[®] 分子 I 的纯化

[0173] 将细胞沉淀 (3g) 重悬于含有 7M 尿素和 1000 单位 Benzonase (Merck) 的 30ml 的 pH 8 缓冲液中。在保温 30 分钟后,通过离心澄清裂解物,将含有 His6- 标记的 *Affibody*[®] 的上清应用于 1.5ml Superflow Ni-NTA 柱 (Qiagen) 上。将该柱用含有 7M 尿素的 20ml 的 pH 6.3 缓冲液的洗涤,及用含有 8M 尿素的 pH 4.5 缓冲液洗脱。最后,通过使用 PD-10 柱 (GE Healthcare) 将该缓冲液更换为 1×PBS (2.68mM KCl, 137mM NaCl, 1.47mM KH₂PO₄, 8.1mM Na₂HPO₄, pH 7.4)。

[0174] *Affibody*[®] 分子 II-VIII 的纯化

[0175] 将细胞沉淀 (10g) 重悬于补加 2000 单位 Benzonase (Merck) 的 100ml 的 20mM Tris-HCl pH 7.5 中,通过超声处理破坏并加热至 75℃ 维持 10 分钟。经加热处理的裂解物通过离心澄清,并应用于充满 25ml Q-Sepharose FF (GE Healthcare) 的 XK26 中,该柱预先用 20mM Tris-HCl pH 7.5 平衡。从该柱中收集流出级分 (flow through fraction),将具有 C 末端半胱氨酸的 *Affibody*[®] 分子与 20mM DTT 在室温保温 1 小时。加入 CAN 至 5% 浓度,应用于预先用 5% CAN、在水中 0.1% TFA 平衡的 3ml Resource 15RPC 柱 (GE Healthcare)。在将该柱用 5 个柱体积 (CV) 的 5% CAN、在水中 0.1% TFA 洗涤后,在 20CV 期间用线性梯度的 5-32% CAN、在水中的 0.1% TFA 洗脱结合的蛋白质。通过 SDS-PAGE 分析鉴别并集合含有 *Affibody*[®] 分子的级分。最后,通过使用 HiPrep 26/10 脱盐柱 (GE Healthcare) 将缓冲

液更换为 1×PBS。

[0176] **Affibody®**分子 IX 的纯化

[0177] 将细胞沉淀 (5g) 重悬于 50ml TST- 缓冲液 (25mM Tris-HCl, 200mM NaCl, 1mM EDTA, 0.05% Tween 20, pH 8.0) 中, 通过超声处理破坏。在通过离心澄清后, 将上清应用于充满 20ml HSA-Sepharose (人血清白蛋白固定在 CNBr- 激活的 Sepharose 4Fast Flow, GE Healthcare) 的 XK26 柱 (GE Healthcare) 中。将该柱用 10CV TST- 缓冲液及随后用 5CV 5mM NH₄Ac pH5.6 洗涤。结合的 ABD- 标记的 **Affibody®** 分子用 0.5M HAc pH 2.8 洗脱。最后, 使用 HiPrep 26/10 脱盐柱 (GE Healthcare) 将缓冲液更换为 1×PBS。

[0178] 实施例 2: 本发明多肽的体外 HER2 结合性质

[0179] 概述

[0180] 在这个实施例的实验中, 在 **Biacore®** 2000 系统中使用表面等离子共振技术 (SPR) 分析本发明多肽的结合情况。示出 **Affibody®** 分子 II (SEQ ID NO:5)、具有与 C 末端半胱氨酸和 X 偶联的 DOTA 的 II (SEQ ID NO:7) 的 HER2 靶向结合活性。

[0181] 生物传感器分析

[0182] 使用胺偶联化学方法, 将重组人 HER2/Fc (ErbB2/Fc) 嵌合蛋白固定 (1800 共振单位 (RU)) 在 CM5 传感器芯片表面上, 所述嵌合蛋白由 ErbB2 (HER2, Met¹-Thr⁶⁵²) 的胞外结构域融合人 IgG1 (Pro¹⁰⁰-Lys³³⁰) 的 Fc 区域与 C- 末端 His₆- 标记 (R&D Systems#1129-ER) 组成。激活及失活所述芯片上的一个表面用作参考细胞。在 HBS-EP 缓冲液 (10mM HEPES, 150mM NaCl, 3mM EDTA, 0.005% 表面活性剂 P-20, pH 7.4) 中稀释的 **Affibody®** 分子用作分析物。

[0183] 为了分析结合动力学, 将三个浓度的分析物一式两份注射在芯片上, 使用恒定流速 50 μl/ 分钟。结合相是 5 分钟, 考虑到 **Affibody®** 分子较慢的解离速度, 随后是较长时间的解离相 (30 分钟)。计算解离平衡常数 (KD)、结合速度常数 (ka) 以及解离速度常数 (kd), 使用 1:1Langmuir 结合模型及 BIAevaluation 4.1 软件 (GE Healthcare) 进行质量转移校准 (mass transfer correction)。

[0184] 半胱氨酸的 SH- 基团的封闭

[0185] 将具有一个 C 末端半胱氨酸的 **Affibody®** 分子用 N- 乙基马来酰亚胺 (NEM, Pierce No. 23030) 处理, 以封闭半胱氨酸的 SH- 基团, 从而防止该分子二聚体化。通过用 10 μl Tris-HCl pH 8.5 和 40 μl 0.5M 二硫苏糖醇 (DTT) 在室温处理 1ml (2.1mg) 所述肽 2 小时, 还原 **Affibody®** 分子 II (SEQ ID NO:5)。过量的 DTT 通过凝胶过滤除去, 在用偶联缓冲液 (100mM 磷酸钠, 150mM NaCl, pH 7.0) 平衡的 NAP5- 柱 (GE Healthcare) 上进行: 用 0.5ml 还原的蛋白质加样柱, 用 1ml 偶联缓冲液洗脱蛋白质。

[0186] 使用对于蛋白质 20 倍过量摩尔体积的 NEM 进行游离 SH 基团封闭: 向 0.5ml 还原蛋白质溶液 (1mg/ml) 中加入 15 μl NEM 水溶液 (200mM), 在室温在 head-over-head 混合仪中保温 1 小时。如上述在 NAP5- 柱上通过凝胶过滤除去过量的 NEM, 不同之处是 PBS 作为平

衡缓冲液。

[0187] 马来酰亚胺-DOTA 与 C 末端半胱氨酸的偶联

[0188] 将 3mg 的 Affibody[®] 分子 II (SEQ ID NO:5) 用 20mM DTT 在 40℃ 还原 30 分钟。通过将 PD-10 柱上缓冲液更换为 0.2M 乙酸铵 pH 5.5 除去过量的 DTT。使用 3 倍过量摩尔体积的螯合剂马来酰亚胺-单-酰胺-DOTA (Mal-DOTA, Macrocyclics No. B-272) 水溶液 (1mg/ml) 进行偶联。将混合物在 40℃ 持续摇动保温 1 小时。在半制备 RPC 柱 Zorbax 300SB C18, 9.4×250mm, 5 μm 上从未缀合的螯合剂中纯化。纯化的物质的偶联程度通过在 Zorbax 300SB C8150×2.1mm, 3.5 μm 分析柱上进行 HPLC-MS 分析。通过这种方法仅检测马来酰亚胺-DOTA 缀合的 Affibody[®] 分子。

[0189] 图 1 的传感图示出 Affibody[®] 分子 II 的 HER2- 结合相互作用, 图 2 示出具有 C 末端半胱氨酸偶联的 DOTA 的 Affibody[®] 分子 II 的 HER2- 结合相互作用, 图 3 示出 Affibody[®] 分子 X (SEQ ID NO:7) 的 HER2- 结合相互作用。

[0190] 进行动力学研究以确定 Affibody[®] 分子与 HER2 靶的相互作用的结合参数。将三个不同浓度的 Affibody[®] 分子注射至具有固定的 HER2/Fc 嵌合的融合蛋白的芯片表面上。解离平衡常数 ($K_D = k_d/k_a$)、结合速度常数 (k_a) 和解离速度常数 (k_d) 在表 2 中示出。偶联 C 末端半胱氨酸的 DOTA 与 NEM- 封闭的 Affibody[®] 分子 II 相比不明显改变 K_D 。

[0191] 表 2

[0192]

	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (pM)
具有 NEM 的 Affibody [®] 分子 II (SEQ ID NO:5)	1.23E+07	7.41E-04	60
具有 DOTA 的 Affibody [®] 分子 II (SEQ ID NO:5)	1.27E+07*	8.10E-04*	65*†
Affibody [®] 分子 X (SEQ ID NO:7)	6.72E+07	5.57E-04	83

[0193] *18 个测定的平均值

[0194] † ± 8.66 (STDEV)

[0195] 实施例 3a : 具有聚氨基聚羧酸酯螯合剂的本发明多肽的体内 HER2 结合性质

[0196] 概述

[0197] 在这个实施例的实验中, 在小鼠异种移植模型中在体内分析本发明的放射性标记的多肽的结合。具有偶联 C 末端半胱氨酸的 DOTA 的 Affibody[®] 分子 II 用 ¹¹¹In 进行放射性标记, 并注射进携带 HER2 过表达 SKOV-3 肿瘤异种移植物的老鼠以及作为对照的阴性 A431

肿瘤异种移植小鼠中。进行生物分布和 γ 相机成像研究,以分析所述放射性标记的 **Affibody**[®] 分子在不同器官中的分布以及在整个动物体内的定位。

[0198] ¹¹¹In 标记

[0199] 如实施例 2 所述,通过将单酰胺 DOTA (Ma1-DOTA) 与 C 末端半胱氨酸偶联修饰 **Affibody**[®] 分子 II。将所得分子命名为“具有 DOTA 的 **Affibody**[®] 分子 II”。

[0200] 为了进行 ¹¹¹In 标记,将具有 DOTA 的 30 μ g 的 **Affibody**[®] 分子 II (在 30 μ l 乙酸铵缓冲液 pH 5.5 中) 与 40.5 μ l 的 ¹¹¹InCl₃ 原种溶液 (在标记时为 15MBq)。反应混合物的 pH 为大约 5.0。将反应混合物在 60℃ 保温 60 分钟。

[0201] 在 Silica 凝胶灌注的玻璃纤维板 (ITLC SG 板, Gelman Sciences Inc.) 上,通过瞬时薄层色谱法 (ITLC) 分析标记效率,使用 0.02M 柠檬酸作为洗脱液。观测到沿着 ITLC 条带的放射性分布,使用 PhosphorImager (CycloneTM Storage Phosphor System, Packard) 量化。放射性标记的 **Affibody**[®] 分子保留在 ITLC 板的最初部位,而游离 ¹¹¹In 随着溶剂迁移。

[0202] 放射性化合物纯度为 99.8 - 99.9%,即所述放射性标记几乎是定量的。不需要进一步纯化放射性标记的 **Affibody**[®] 分子。将反应混合物用 PBS 稀释为 1.4ml,在实验之前保持冷冻 (1-2 天)。

[0203] 肿瘤模型

[0204] 为雌性远系繁殖的 BALB/c nu/nu 小鼠在右后肢移植 1×10^7 个 SKOV-3 (人卵巢腺癌腹水 (human ovary ascites adenocarcinoma)) 细胞或者 1×10^7 个 A431 (人鳞状细胞癌) 细胞。SKOV-3 细胞过表达 HER2, A431 细胞对于 HER2 是阴性的。

[0205] 携带肿瘤小鼠中的生物分布

[0206] 对于生物分布研究,将携带异种移植肿瘤小鼠 (在植入 1×10^7 个 SKOV-3 细胞之后 30-40 天) 随机分为四组。在小鼠尾静脉注射在 100 μ l PBS 中 1 μ g (100kBq) 的 ¹¹¹In 标记的 **Affibody**[®] 分子。所有注射均为小鼠耐受。一组动物 s. c. 注射 1.5ml (0.9mg) 未标记的 **Affibody**[®] 分子 II,其中 C 末端 Cys 已经如实施例 2 所述用 NEM 封闭,50 分钟后 i. v. 注射 1 μ g (100kBq) 的 ¹¹¹In- 标记的 **Affibody**[®] 分子 (封闭实验)。

[0207] 在注射致死剂量的 Ketalar 和 Rompun 溶液之后,在注射后 0.5、1、4 和 24 小时 (h p. i.) 通过心脏穿刺放血处死小鼠。在注射后 4 小时处死封闭组动物。切下器官,称重及在 γ 计数器中测量其放射性含量。以每克组织的注射的活性的百分比计算放射性吸收 (% IA/g)。

[0208] 成像

[0209] 对于 γ 相机成像,使用携带异种移植肿瘤小鼠 (在植入 1×10^7 个 SKOV-3 细胞之后 30-40 天,或者在植入 1×10^7 个 A431 细胞之后 10-15 天)。

[0210] 在小鼠尾静脉注射在 100 μ l PBS 中的 3 μ g (4.5MBq) 的 ¹¹¹In- 标记的 **Affibody**[®]。

分子 II。在注射后 0.5 或者 4 小时,使用致死剂量的 Ketalar 和 Rompun 溶液处死动物。使用装备 MEGP 准直仪的 Millenium GE γ 相机进行成像。使用 Hermes 软件 (Nuclear Diagnostics, Stockholm, Sweden) 目测评估闪烁成像结果。

[0211] 结果

[0212] 使用具有 DOTA 的 ^{111}In 标记的 **Affibody**[®] 分子 II 的生物分布研究结果示于图 4。除了肾之外,肿瘤中所有时间点的放射性吸收均高于所有其它器官。在注射后 0.5 小鼠肿瘤放射性吸收已经是 $13 \pm 2\%$ IA/g,在注射后 1 小时增加至 $17 \pm 2\%$ IA/g,在注射后 4 小时从 $15 \pm 3\%$ IA/g 缓慢降低至注射后 24 小时的 $11 \pm 4\%$ IA/g。正如所预期的,在肾中也发现较高吸收率,因为肾是如 **Affibody**[®] 分子等小蛋白质的主要排泄途径。在注射后 1 小时测量到最高的肾吸收率为 $186 \pm 24\%$ IA/g,在注射后 24 小时降低至 $144 \pm 13\%$ IA/g。因此,在肾中的吸收率明显低于针对具有在 N 末端偶联 DOTA 的 **Affibody**[®] 分子 Z00342 (在 WO 2005/003456 中作为 $Z_{\text{HER2}:107}$ 揭示,有时也称作 $Z_{\text{HER2}:342}$) 测量的肾吸收率,即在注射后 1 小时测量为 $243 \pm 22\%$ IA/g,在注射后 24 小时为 $232 \pm 34\%$ IA/g (Orlova, A. et al. (2006), Cancer Research 67:2178-2186)。此外,与 Orlova, et al. (2006) 所述 HER2- 特异性 **Affibody**[®] 分子相比, ^{111}In - 标记的具有 DOTA 的 **Affibody**[®] 分子 II 在所有器官中在所有测量时间均具有较低吸收率。在肿瘤中较高的吸收率以及在其它器官中降低的吸收率获得肿瘤 - 器官比率,其超过先前针对 **Affibody**[®] 分子公布的比率 (图 5)。例如,肿瘤 - 血液比率在注射后 1 小时为 16,在注射后 4 小时为 88,在注射后 24 小时为 275,对比之下由 Orlova, A. et al. (2006) 描述的 **Affibody**[®] 分子为 8 (注射后 1 小时)、12 (注射后 4 小时) 以及 47 (注射后 24 小时)。

[0213] 使用本发明 **Affibody**[®] 分子的肿瘤靶向特异性通过封闭实验证实,在该实验中用未标记的 **Affibody**[®] 分子预先注射携带肿瘤的小鼠使 ^{111}In 标记的具有 DOTA 的 **Affibody**[®] 分子的肿瘤吸收率降低 86%,但是在其它器官中的吸收率不变 (图 6)。在注射后 30 分钟和 4 小时获取 γ 相机图像,证实 ^{111}In 标记的具有 DOTA 的 **Affibody**[®] 分子 II 的高特异性肿瘤靶向 (图 7)。在注射后 0.5 小时观测 SKOV-3 肿瘤,在注射后 4 小时洗去背景放射性。处理除了肿瘤之外,在肾中也可见明显的吸收。携带 HER2- 阴性 A431 异种移植肿瘤的小鼠在注射后 4 小时肿瘤放射性活性的吸收不明显。

[0214] 实施例 3b:具有 N_3S 螯合剂的本发明多肽的体内 HER2 结合性质

[0215] 概述

[0216] 在这个实施例的实验中,在小鼠异种移植模型中在体内分析本发明的放射性标记的多肽的结合。将含有 N 末端巯基乙酰 (mercaptacetyl)- 谷氨酰 - 丝氨酰 (seryl)- 谷氨酰 (ma-ESE) 序列的 **Affibody**[®] 分子 X (SEQ ID NO:7) 用 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 放射性标记,并注射进携带 HER2 过表达 SKOV-3 肿瘤异种移植的小鼠中。进行生物分布和 γ 相机成像研究,分析放射性标记的 **Affibody**[®] 分子在不同器官中的分布以及在整个动物中的定位。

[0217] ^{99m}Tc 标记

[0218] 使用间接方法用 ^{99m}Tc 标记 **Affibody**[®] 分子 X。

[0219] 对于用 ^{99m}Tc 标记,产生含有如下成分的试剂盒:每 1ml 具有 50mg 葡糖酸盐二水合物、1mg EDTA 的二钠盐和 0.5mg 氯化锡(II) 二水合物。将该溶液分成 1ml 等份,将该等份冻干。冻干的标记试剂盒在使用之前在 -20°C 贮存。

[0220] 将 50 μl PBS (2.68mM KCl, 137mM NaCl, 1.47mM KH_2PO_4 , 8.1mM Na_2HPO_4 , pH 7.4) 加入 50 μg ABY-024 溶液 (在去离子化除气水中 2mg/ml) 中。在旋动之后,将该混合物与镓标记试剂盒混合,加入来自 ^{99m}Tc 发生器 (UltratechneKow FM generator, Tyco Healthcare Nordic AB, Mallinckrodt Sweden AB) 的 200 μl 含有 $^{99m}\text{TcO}_4^-$ 的洗脱物。将该混合物在 90°C 保温 60 分钟。

[0221] 将每种混合物的两个少量等份 (0.8 μl) 应用于两个 ITLC SG 条带,一个条带用 PBS 洗脱 (用以确定产量),另一条带用吡啶:乙酸:水 (5:3:1.5) 的混合物洗脱 (用以确定还原的水解的镓 (RHT) 的存在)。在这个洗脱液中,镓胶体保留在最初部位,而放射性标记的 **Affibody**[®] 分子、高镓酸盐及 ^{99m}Tc 的其它复合物随着溶剂迁移。使用 PhosphorImager (CycloneTM Storage Phosphor System, Packard) 观测和量化沿着 ITLC 条带的放射性的分布。标记几乎是定量的,不需要任何额外的纯化步骤。

[0222] 用 PBS 洗脱放射性标记的 **Affibody**[®] 分子,以保证放射性浓度为 65kBq/100 μl 。

将 **Affibody**[®] 分子的浓度调节为 1 μg /100 μl 。

[0223] 携带肿瘤的小鼠中的生物分布

[0224] 在雌性远系繁殖的 BALB/c nu/nu 小鼠的右后肢移植 1×10^7 个 SKOV-3 (人卵巢腺癌腹水) 细胞。

[0225] 对于生物分布研究,将携带异种移植肿瘤的小鼠 (在植入 1×10^7 个细胞之后 40-45 天) 随机分为四组。

[0226] 在小鼠尾静脉注射在 100 μl PBS 中的 1 μg (65kBq) ^{99m}Tc - 标记的 **Affibody**[®] 分子 X。所有注射均为小鼠耐受。一组动物 s.c. 注射 100 μl (0.5mg) 未标记的 His6-Z00342, 50 分钟后 i.v. 注射 1 μg (65kBq) ^{99m}Tc - 标记的 **Affibody**[®] 分子 X (封闭实验)。

[0227] 在注射致死剂量的 Ketalar 和 Rompun 溶液之后,在注射后 4 小时通过心脏穿刺放血处死小鼠。封闭组动物在注射后 4 小时处死。切下器官,称重及在 γ 计数器测量其放射性含量。放射性吸收以每克组织的注射的活性的百分比计算 (% IA/g)。

[0228] 成像

[0229] 对于 γ 相机成像,使用携带异种移植肿瘤的小鼠 (在植入 1×10^7 个 SKOV-3 细胞之后 40 天,或者在植入 1×10^7 个 A431 细胞之后 10-15 天)。

[0230] 在小鼠尾静脉注射在 100 μl PBS 中的 3 μg (15MBq) 的 ^{99m}Tc - 标记的 **Affibody**[®] 分子 X。在注射后 1 或者 4 小时,使用致死剂量的 Ketalar 和 Rompun 溶液处死动物。使用装备 LEHR 准直仪的 a.e. Cam Siemens γ - 相机进行成像。使用 Hermes 软件 (Nuclear Diagnostics, Stockholm, Sweden) 目测评估闪烁成像结果。

[0231] 结果

[0232] 使用 ^{99m}Tc - 标记的 **Affibody**[®] 分子 X 的生物分布研究结果示于图 8。除了肾之外,肿瘤中在注射后 4 小时的放射性吸收均高于所有其它器官。正如所预期的,在肾中也发现较高吸收率,因为肾是如 **Affibody**[®] 分子等小蛋白质的主要排泄途径。在注射后 4 小时测量的肾吸收率为 $58 \pm 10\% \text{ IA/g}$ 。因此,肾的吸收率明显低于在实施例 3a 中描述的 ^{111}In - 标记的 **Affibody**[®] 分子以及具有 N 末端偶联的 DOTA 的 Z00342 测量的肾吸收率 (Orlova, A. et al. (2006), Cancer Research 67:2178-2186)。此外,在肠道 ($3.52\% \text{ IA/g}$) 和肝脏 ($1.06\% \text{ IA/g}$) 中较低的吸收率以及在肾中较高的吸收率示出 ^{99m}Tc - 标记的 **Affibody**[®] 分子 X 主要通过肾而不是通过肝胆途径清除。EP 6 123 095 揭示了优选的 ma-Xaa1-Xaa2-Xaa3 螯合部分包含一或两个 Ser, 剩余两个或者一个氨基酸残基是 Glu, 导致从肝胆转移至肾清除途径。**Affibody**[®] 分子 X 含有 EP 6 123 095 中揭示的优选螯合剂部分之一, 即 ma-Glu-Ser-Glu 及本发明实施例 1 中描述的所有氨基酸置换 (表 1), 这样导致这些多肽的亲水性增加。因此, 本文描述的 ^{99m}Tc - 标记的 **Affibody**[®] 分子 X 代表了含有 ma-Xaa1-Xaa2-Xaa3 螯合部分的多肽的一个另外的实例, 其平衡较低的肝胆清除率与较高的肾清除率, 但是使得在肾中的重吸收最小化。

[0233] ^{99m}Tc - 标记的 **Affibody**[®] 分子 X 在所有器官中的吸收与在实施例 3a 中描述的 ^{111}In - 标记的 **Affibody**[®] 分子的吸收相似。

[0234] 上述生物分布实验的肿瘤-器官比率示于图 9。再次获得较高的肿瘤-器官比率。特别地, 在注射后 4 小时, ^{99m}Tc - 标记的 **Affibody**[®] 分子 X 的肿瘤-肝脏比率为 17, 相比之下实施例 3a 中描述的 ^{111}In - 标记的具有 DOTA 的 **Affibody**[®] 分子 II 的比率为 10。在注射后 4 小时, 肿瘤-血液比率为 42。

[0235] 使用 **Affibody**[®] 分子 X 的肿瘤靶向特异性通过封闭实验证实, 其中用过量的未标记的 **Affibody**[®] 分子预先注射携带肿瘤的小鼠使肿瘤吸收 ^{99m}Tc - 标记的 **Affibody**[®] 分子 X 降低 90%, 但是不影响在其它器官中吸收 (图 8)。

[0236] 在注射后 1 小时和 4 小时获取的 γ 相机图像证实本发明的 ^{99m}Tc - 标记的 **Affibody**[®] 分子的高特异性肿瘤靶向 (图 10)。在注射后 1 小时观测 SKOV-3 肿瘤, 在注射后 4 小时洗去背景放射性。除了肿瘤之外, 在肾中也观测到明显的吸收, 然而这种吸收明显低于在实施例 3a 中描述的具有 DOTA 的 ^{111}In - 标记的 **Affibody**[®] 分子 II 的肾吸收相比明显较低。携带 HER2- 阴性 A431 异种移植肿瘤的小鼠在注射后 4 小时肿瘤中的放射性吸收不明显。

[0237] 实施例 4: 本发明多肽与 Z00342 的化学合成对比研究**[0238] 概述**

[0239] 在这个实施例的实验中,描述了本发明的多肽的固相肽合成法。在四个位置导入突变,即 [N23T]、[A42S]、[A46S] 和 [A54S],使得可以使用简写为 Fmoc-Xxx-Yyy-OH 的假脯氨酸前体的另一种合成方法。在上述四个位置使用假脯氨酸,可以合成整个 Affibody[®] 分子 X (SEQ ID NO:7) (即氨基酸 1-58),而标准合成方法不能产生所述肽

[0240] 导入新的丝氨酸或者苏氨酸残基也使得可以使用异酰基二肽,这可以替代假脯氨酸,通过降低肽合成期间的聚集而提高合成效率 (Sohma et al., Tetrahedron Lett. 47:3013, 2006)。一些这样的构建模块可得自 Novabiochem of MerckBiosciences AG。

[0241] 原理

[0242] Affibody[®] 分子 Z00342 的肽合成 (在 WO 2005/003156 中作为 ZHER2:107 揭示,有时也称作 ZHER2:342) 以及 DOTA 与这个 Affibody[®] 分子 N 末端的偶联是可能的并且在文献中描述 (Orlova, A et al. (2006), Cancer Research 67:2178-2186)。然而,观测到在合成之后肽的产量有很大变化。难以可再现地合成所述肽的问题可与肽的长度以及原始的氨基酸序列相关。此外,具有仍被保护的氨基酸侧链的反应性基团的长肽可产生不利的二级结构,例如 β 折叠,其可破坏固相肽合成 (Quibell, M. & Johnson, T., in Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis-A Practical Approach, W. C. Chan, P. D. White Eds, Oxford University Press 2000, 115-135)。防止在肽合成期间形成二级结构的一种方式是使用假脯氨酸。如果氨基酸 Yyy 是丝氨酸、苏氨酸或者半胱氨酸,则可以使用简写为 Fmoc-Xxx-Yyy-OH 的假脯氨酸。这些假脯氨酸展示密闭的脯氨酸样结构,具有与主链连接的侧链,且其可以通过酸处理而转变为正常氨基酸结构 (Haack, T., & Mutter, M. Tetrahedron Letters (1992), 33 (12), 1589-92)。假脯氨酸可商购,在位置 Xxx 是 14 个氨基酸 (除了 Arg、Cys、His、Met、Pro、Thr 之外) 以及在位置 Yyy 是丝氨酸或者苏氨酸。

[0243] 亲代 Affibody[®] 分子 Z00342 在其原始序列中无苏氨酸和半胱氨酸。丝氨酸仅见于位置 33、39 和 41。假脯氨酸前体仅可为丝氨酸 41 (Q40-S41) 利用。对于其它两个丝氨酸,位置 Xxx 中氨基酸阻止假脯氨酸的使用,因为无前体可利用 (R32-S33 和 P38-S39)。

[0244] 在本发明的多肽中导入突变的目的是但不限于促进肽合成。特别是位置 23、42、46 和 54 中的突变,即 [N23T]、[A42S]、[A46S] 和 [A54S] 中的突变,可具有解决 SPPS 中鉴别的两个问题:其使得可以使用假脯氨酸以及在位置 23 通过用苏氨酸置换天冬酰胺改变在氨基酸 21-26 周围的关键区域。

[0245] 固相肽合成 (SPPS)

[0246] Affibody[®] 分子 X (SEQ ID NO:7) 的氨基酸序列在全自动肽合成仪中在 Fmoc-Lys (Boc)-Wang 聚苯乙烯树脂上装配。这个树脂特别适于使用 Fmoc 方法形成肽。将 57 个氨基酸 (具有适当的侧链保护) 偶联在该树脂上。在最后一步,人工进行 S-三苯甲基-保护的巯基乙酸的偶联。

[0247] 步骤 1:固相肽合成

[0248] 将 Fmoc-Lys (Boc)-Wang 聚苯乙烯树脂移至带有搅拌器的 SPPS-反应装置中。然后使用 Fmoc 去保护树脂开始合成,随后是根据下文描述的与 Fmoc-Pro-OH 偶联步骤。这个

步骤之后再次进行 Fmoc 去保护及随后的该序列的氨基酸衍生物的偶联。在最后用异丙醚 (IPE) 洗涤树脂之后,将该肽树脂在干燥器中减压干燥。

[0249] 进行标准 Fmoc 肽合成以及在四个位置使用假脯氨酸的合成法。对于标准肽合成法,仅使用 Fmoc-氨基酸。对于另一种肽合成法,除了 Fmoc-氨基酸之外使用如下假脯氨酸:在位置 22-23 使用 Fmoc-Leu-Thr-OH,在位置 41-42 使用 Fmoc-Ser-Ser-OH,在位置 45-46 使用 Fmoc-Leu-Ser-OH,以及在位置 53-54 使用 Fmoc-Asp-Ser-OH。

[0250] Fmoc 去保护步骤

[0251] 将所述树脂也用在 NMP 中 20%哌啶的处理,以实现 N- α -Fmoc 保护基团的裂解。然后用 NMP 洗涤该树脂。

[0252] 偶联步骤

[0253] 氨基酸衍生物 Pro57 与 Glu1 自动偶联。将至多 3eq 的 Fmoc-AA 衍生物溶解于 NMP 中。为了进行偶联,加入在二甲基甲酰胺 (DMF) 中的 2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲四氟硼酸盐 (TBTU) 和在 NMP 中的 sym.-collidine(2,4,6-三甲基吡啶)。所得溶液在室温混合,之后倒入树脂上。NMP 用作溶剂。在 60°C 至少 15 分钟偶联时间之后,用 NMP 洗涤该树脂。

[0254] 在每次偶联步骤之后,自动进行作为偶联剂的在 DMF 中的 2-(1H-7-偶氮苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲四氟硼酸盐 (TATU) 与作为溶剂的二氯乙烷的重复偶联,随后乙酸酐加帽。

[0255] 步骤 2:巯基乙酸的偶联

[0256] 使用 5 摩尔当量氨基酸、2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲六氟磷酸酯 (HBTU) 和 1-羟基苯并三唑 (HOBt) 以及 10 当量 N-二异丙基乙胺 (DIEA, 得自 Lancaster Synthesis, Morecambe, England) 进行酰化。S-三苯甲基-巯基乙酸得自 AnaSpec Inc (San Jose, CA, USA)。

[0257] 步骤 3:从树脂中裂解,包括剩余的保护基团的裂解

[0258] 将肽树脂用三氟乙酸 (TFA) 在存在纯化水、乙二硫醇 (EDT) 和三异丙基硅烷 (TIS) 的条件下处理。在室温裂解大约 2 小时后,将反应混合物冷却至大约 0°C,加入碘化铵和二甲基硫醚以还原氧化的甲硫氨酸。在大约 0°C 再裂解 60 分钟之后,形成的碘用抗坏血酸还原。在滤出产物之后,将其在冷却的 IPF 中沉淀,再次滤出,用 IPE 洗涤,及在减压下干燥。

[0259] 通过 HPLC 进行纯度分析

[0260] 长度为 58 个氨基酸的肽以及一些中间体的纯度通过反向 HPLC 确定,使用 Vydac 218TP54 (5 μ m, 250 $\times$ 4.6mm) 柱以及在 H₂O 中的 0.1% TFA、1% 乙腈和在乙腈中 0.1% TFA 分别作为溶剂 A 和 B。柱温度设定在 35°C。将该柱用 15-45%梯度的溶剂 B 在 30 分钟内洗脱,或者用 20-50%梯度的溶剂 B 在 30 分钟内洗脱。在 220nm 进行 UV 检测。通过面积归一化法计算纯度。

[0261] 结果

[0262] 通过分析性反向层析分析使用或者不使用假脯氨酸合成的 Affibody® 分子 X (SEQ ID NO:7) 的产量和纯度。为了跟随合成的行进,在一些偶联步骤之后取小部分合成树脂,分析预期的肽中间体的存在、纯度和产量。图 11 示出对长度为 41 个氨基酸 (氨基酸 18-58) 的肽中间体进行的分析。在肽合成的这个阶段,如果使用假脯氨酸进行合成,则可

鉴别一个清晰且显著的具有适当序列的峰 (RT = 15.33 分钟, 产量 49%) (图 11A)。然而, 标准 Fmoc- 合成法产生大量小肽峰以及相似大小的两个主峰, 但是产量较低。这两个主峰之一 (RT = 20.82 分钟) 被鉴别为是具有适当序列的肽中间体 (aa18-58) (图 11B)。只有使用假脯氨酸进行合成才能获得全长肽 (氨基酸 1-58)。图 12A 示出一个产物峰, 最终肽产量为 26%。然而, 标准 Fmoc- 合成法不能产生最终肽产物。对来自标准合成法的长度为 49 个氨基酸 (氨基酸 10-58) 的中间体进行分析表明不可检测到预期的中间体及该合成失败 (图 12B)。

[0263] 实施例 5: 本发明的多肽与 Z00342 的亲水性对比研究

[0264] 概述

[0265] 在这个实施例的实验中, 使用两种方法描述本发明的多肽的亲水性增加: 1) 蛋白质疏水性 / 亲水性图, 以及 2) 反向 HPLC 洗脱图。

[0266] 1) 蛋白质疏水性 / 亲水性图

[0267] 产生疏水性 / 亲水性图以显示极性和非极性残基沿着蛋白质序列的分布。这些图通常用于预测高疏水性区域, 例如跨膜部分, 或者亲水性序列, 即可能暴露在蛋白质表面上的区域。

[0268] 通过使用移动窗扫描蛋白质序列产生所述图, 所述移动窗可根据分析目的加以调整。例如, 建议 7 个氨基酸的移动窗是发现推定的表面暴露的区域的良好数值。在每个位置, 计算窗口内氨基酸的平均疏水性指数。这个数值绘制为该窗口的中点。对于组成这个实施例的疏水性 / 亲水性图, 使用两个疏水性级别: 1) Kyte-Doolittle 级别是达到正值的亲水性 (hydropathic) 区域 (Kyte J., Doolittle R. F. (1982) J. Mol. Biol. 157:105-132); 2) 通过 HPLC 确定的在 pH 3.4 的疏水性指数 (Cowan R., Whittaker R. G. (1990) Peptide Research 3:75-80)。使用 BioAnnotator 程序产生所述图, 该程序是 Vector NTI Suite 9.0.0. (Invitrogen) 的组成部分。

[0269] 当可能时将 Affibody[®] 分子的 10-12 个氨基酸, 即不参与该分子靶向结合活性的氨基酸 (除了一个氨基酸, 即 Met9) 改变为更亲水的氨基酸和 / 或改变为降低整体抗原性的氨基酸, 以优化序列在大肠杆菌中表达以及用放射性核素标记。

[0270] 本发明的多肽的疏水性 / 亲水性图的两个实例在图 13A 和 B 中示出。与亲代 Affibody[®] 分子 Z00342 的对比在图 13C 中示出。

[0271] 在 Affibody[®] 分子 II (SEQ ID NO:5) 的序列中, 进行如下氨基酸改变:

[0272] • 四个突变, 非极性疏水性氨基酸置换为极性氨基酸: [F5Y]、[A42S]、[A46S] 和 [A54S]。

[0273] • 两个突变, 极性氨基酸改变为非极性疏水性氨基酸: [N3A] 和 [N6A]。

[0274] • 一个改变, 无电荷的极性氨基酸改变为荷正电的极性氨基酸: [S33K]。

[0275] • 一个改变, 极性氨基酸改变为荷负电氨基酸: [N43E]。

[0276] • 一个改变, 极性氨基酸改变为极性较低的氨基酸: [N23T]。

[0277] • 一个改变, 非极性疏水性氨基酸改变为极性较低疏水性氨基酸 [V1A]。

[0278] • 一个改变, 荷负电的氨基酸改变为另一个荷负电的氨基酸: [D2E]。

[0279] 图 13A 中 **Affibody**[®] 分子 II 的图示出与亲代 **Affibody**[®] 分子 Z00342 (图 13C) 相比,由 α 螺旋 2 和 3 以及 C 末端 (氨基酸 24-58 之间) 组成的 **Affibody**[®] 分子的区域亲水性增加。

[0280] 在 **Affibody**[®] 分子 X (SEQ ID NO:7) 的序列中,对其进行如对于 **Affibody**[®] 分子 II 相同的氨基酸改变,但是前三个氨基酸改变为更亲水性的氨基酸。

[0281] • 一个突变,将非极性疏水性氨基酸置换为负电荷的氨基酸:[V1E]。

[0282] • 一个突变,将负电荷的氨基酸改变为极性氨基酸:[D2S]。

[0283] • 一个突变,将无电荷的极性氨基酸改变为负电荷极性氨基酸:[N3E]。

[0284] 图 13B 中 **Affibody**[®] 分子 X (SEQ ID NO:7) 的图示出与亲代 **Affibody**[®] 分子 Z00342 (图 13C) 相比,在 α 螺旋 2 和 3 (氨基酸 24-58 之间) 以及更亲水性的 N 末端的区域中亲水性同样增加。

[0285] 2) 反向 HPLC 洗脱图

[0286] 蛋白质可以通过反向 (RP) 层析有效地分离。蛋白质的亲水性 / 疏水性的差异可以在 RP 柱如 C8 或者 C18 柱上分析,其中更亲水性的蛋白质比更疏水性的蛋白质更早地洗脱,即由较低浓度乙腈洗脱液洗脱。使用如下条件对比 **Affibody**[®] 分子 II (SEQ ID NO:5) 与亲代 **Affibody**[®] 分子 Z00342 的洗脱:HPLC 设备:Agilent 1100 (Agilent);柱:Zorbax 300SB C8150×2.1mm,3.5 μ m (Agilent);温度:30℃;加样:20 μ l 蛋白质溶液,2.2mg/ml;流速:0.5ml/分钟;溶剂 A:在水中 0.5%三氟乙酸 (TFA);溶剂 B:在水中 90%乙腈、0.5% TFA;梯度:0-2 分钟 10% B,2-17 分钟 10-70% B,17-18 分钟 70-100% B,18-21 分钟 100% B,21-22 分钟 100-10% B,22-25 分钟 10% B。分析结果示于图 14。保留时间的改变例证了与亲代 **Affibody**[®] 分子 Z00342 相比,**Affibody**[®] 分子 II 的亲水性增加。与亲代 **Affibody**[®] 分子 Z00342 保留时间 9.860 分钟相比,这种具有上述所有突变的 **Affibody**[®] 分子洗脱保留时间为 9.614 分钟。

[0287] 实施例 6:本发明的多肽与 Z00342 的抗原性 (IgG 结合) 对比研究

[0288] 概述

[0289] 本发明中描述的 HER2 特异性多肽的一个希望的性质是具有较低的抗原性,是指与免疫球蛋白 (Ig) 具有较低的相互作用潜力。在这个实施例中,描述了一种在测量体外抗原性 (IgG 结合) 的方法,以及将具有与 C 末端半胱氨酸缀合的 DOTA 的 **Affibody**[®] 分子 I、II、II 以及具有与内半胱氨酸 (位置 42) 缀合的 DOTA 的分子 XI 与标准 HER2 特异性 **Affibody**[®] 分子 Z00342 对比,以评估所进行的氨基酸改变的影响。使用测定称作体外抗原性 (IVA) ELISA。

[0290] 体外抗原性 (IVA) ELISA

[0291] 在 IVA ELISA 中,将 96 孔平板用 2 μ g/ml 的 HER2 特异性 **Affibody**[®] 分子 Z00342

包被,选择其作为标准包被试剂。此外,将平板用 2 μg/ml 的 HER2 特异性 Affibody[®] 分子 I、II、具有 DOTA 的 II 以及具有 DOTA 的 XI 包被。在每个孔中加入 50 μl 包被溶液,将半区平板在 +4℃ 保温过夜。将 ELISA 平板用自来水洗涤两次,在每个孔中加入 100 μl 的封闭溶液(磷酸盐缓冲盐水(PBS) pH 7.4 及 0.5% 酪蛋白)。随后将平板在室温(RT) 保温 1 小时,倒空,随后加入 50 μl/孔从 1 开始 2 倍系列稀释 100 次的灵长类动物血清集合。将平板在室温保温 1 小时,然后用 PBS+0.05% Tween(PBS-T) 洗涤 5 次。为了进行检测,使用 1/5000 稀释的山羊抗人 Ig-HRP 抗体(Southern Biotechnology)。将平板在室温保温 50 分钟,随后用 PBS-T 洗涤 5 次。为了显色,加入 50 μl 的 ImmunoPure TMB 底物(Pierce),将平板在黑暗中在室温保温 12 分钟。通过加入终止溶液(2M H₂SO₄) 结束显色反应,在 450nm 测量吸光度。

[0292] IVA-值的计算

[0293] 随后如上述进行 IVA ELISA。使用 XY-非线性回归公式绘制所得滴定曲线图,获得在 OD 0.3 的稀释值。在 OD 0.3 的标准稀释值设定为 100,通过联系标准值计算每个样品的 IVA-值。因此,IVA-值低于 100 表示与标准 Z00342 相比特定的 HER2 特异性多肽的较低程度的灵长类动物 Ig 结合力。评估四种不同的 HER2 特异性多肽的体外抗原性,即 Affibody[®] 分子 I、II、具有 DOTA 的 II 以及具有 DOTA 的 XI。这些多肽示出与标准蛋白质相比具有较低的体外抗原性。结论是所进行的氨基酸改变导致与免疫球蛋白的相互作用能力降低。

[0294] 表 3:不同的 HER2 特异性多肽相对于标准 Z00342 的 IVA 值

[0295]

Affibody [®] 分子	IVA-值
标准 Z00342	100
I	13
II	4
具有 DOTA 的 II	6
具有 DOTA 的 XI	1

[0001]

序列表

<110> 阿菲博迪公司

<120> 具有 HER2 亲和性的新多肽

<130> 21039125

<150> EP07150395

<151> 2007-12-21

<160> 7

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

<211> 48

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 新的 HER-2 结合多肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> 位置 2 处的 X 是 M、I 或 L

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (39)..(39)

<223> 位置 39 处的 X 是 S 或 C

<400> 1

Glu Xaa Arg Asn Ala Tyr Trp Glu Ile Ala Leu Leu Pro Asn Leu Thr
1 5 10 15

Asn Gln Gln Lys Arg Ala Phe Ile Arg Lys Leu Tyr Asp Asp Pro Ser
20 25 30

[0002]

Gln Ser Ser Glu Leu Leu Xaa Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ser Gln
 35 40 45

<210> 2

<211> 51

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 新的 HER-2 结合多肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5).. (5)

<223> 位置 5 处的 X 是 M、I 或 L

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (42).. (42)

<223> 位置 42 处的 X 是 S 或 C

<400> 2

Tyr Ala Lys Glu Xaa Arg Asn Ala Tyr Trp Glu Ile Ala Leu Leu Pro
 1 5 10 15

Asn Leu Thr Asn Gln Gln Lys Arg Ala Phe Ile Arg Lys Leu Tyr Asp
 20 25 30

Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Xaa Glu Ala Lys Lys Leu Asn
 35 40 45

Asp Ser Gln
 50

<210> 3

<211> 55

<212> PRT

[0003]

<213> 人工的

<220>

<223> 新的 HER-2 结合多肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (9).. (9)

<223> 位置 9 处的 X 是 M、I 或 L

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (46).. (46)

<223> 位置 46 处的 X 是 S 或 C

<400> 3

Ala	Glu	Ala	Lys	Tyr	Ala	Lys	Glu	Xaa	Arg	Asn	Ala	Tyr	Trp	Glu	Ile
1			5					10						15	

Ala	Leu	Leu	Pro	Asn	Leu	Thr	Asn	Gln	Gln	Lys	Arg	Ala	Phe	Ile	Arg
			20					25						30	

Lys	Leu	Tyr	Asp	Asp	Pro	Ser	Gln	Ser	Ser	Glu	Leu	Leu	Xaa	Glu	Ala
			35				40							45	

Lys	Lys	Leu	Asn	Asp	Ser	Gln	
		50				55	

<210> 4

<211> 55

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 新的 HER-2 结合多肽

<220>

[0004]

<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> 位置9处的X是M、I或L

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (46)..(46)
<223> 位置46处的X是S或C

<400> 4

Glu	Ser	Glu	Lys	Tyr	Ala	Lys	Glu	Xaa	Arg	Asn	Ala	Tyr	Trp	Glu	Ile
1				5					10					15	

Ala	Leu	Leu	Pro	Asn	Leu	Thr	Asn	Gln	Gln	Lys	Arg	Ala	Phe	Ile	Arg
			20					25					30		

Lys	Leu	Tyr	Asp	Asp	Pro	Ser	Gln	Ser	Ser	Glu	Leu	Leu	Xaa	Glu	Ala
			35				40						45		

Lys	Lys	Leu	Asn	Asp	Ser	Gln
		50				55

<210> 5
<211> 61
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 新的HER-2结合多肽

<400> 5

Ala	Glu	Ala	Lys	Tyr	Ala	Lys	Glu	Met	Arg	Asn	Ala	Tyr	Trp	Glu	Ile
1				5					10					15	

Ala	Leu	Leu	Pro	Asn	Leu	Thr	Asn	Gln	Gln	Lys	Arg	Ala	Phe	Ile	Arg
			20					25					30		

[0005]

Lys Leu Tyr Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ser Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys Val Asp Cys
50 55 60

<210> 6
<211> 58
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 新的 HER-2 结合多肽

<400> 6

Glu Ser Glu Lys Tyr Ala Lys Glu Met Arg Asn Ala Tyr Trp Glu Ile
1 5 10 15

Ala Leu Leu Pro Asn Leu Thr Asn Gln Gln Lys Arg Ala Phe Ile Arg
20 25 30

Lys Leu Tyr Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ser Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys
50 55

<210> 7
<211> 58
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 新的 HER-2 结合多肽

[0006]

<220>

<221> MISC FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> 序列包括与 N-末端偶联的巯基乙酰基基团(ma)

<400> 7

Glu Ser Glu Lys Tyr Ala Lys Glu Met Arg Asn Ala Tyr Trp Glu Ile
1 5 10 15

Ala Leu Leu Pro Asn Leu Thr Asn Gln Gln Lys Arg Ala Phe Ile Arg
20 25 30

Lys Leu Tyr Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ser Glu Ala
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys
50 55

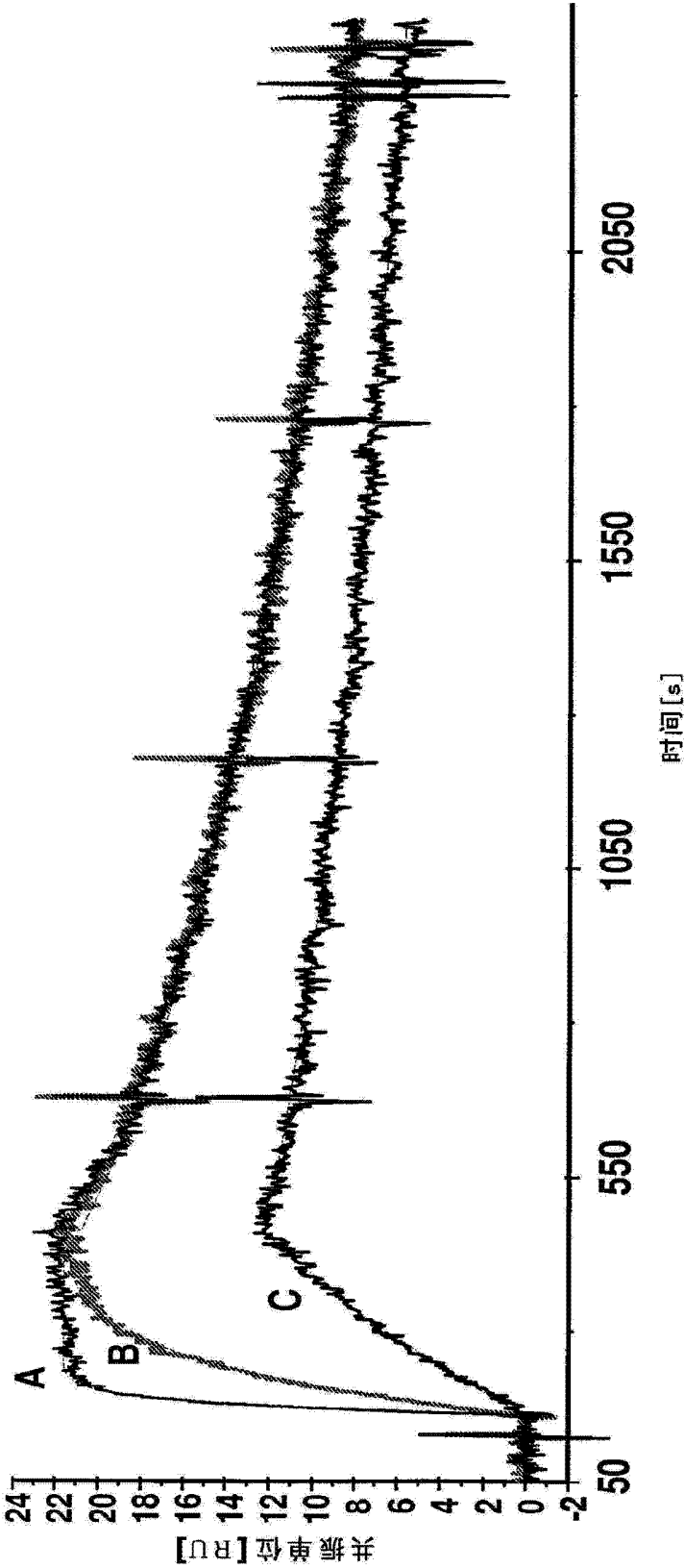


图 1

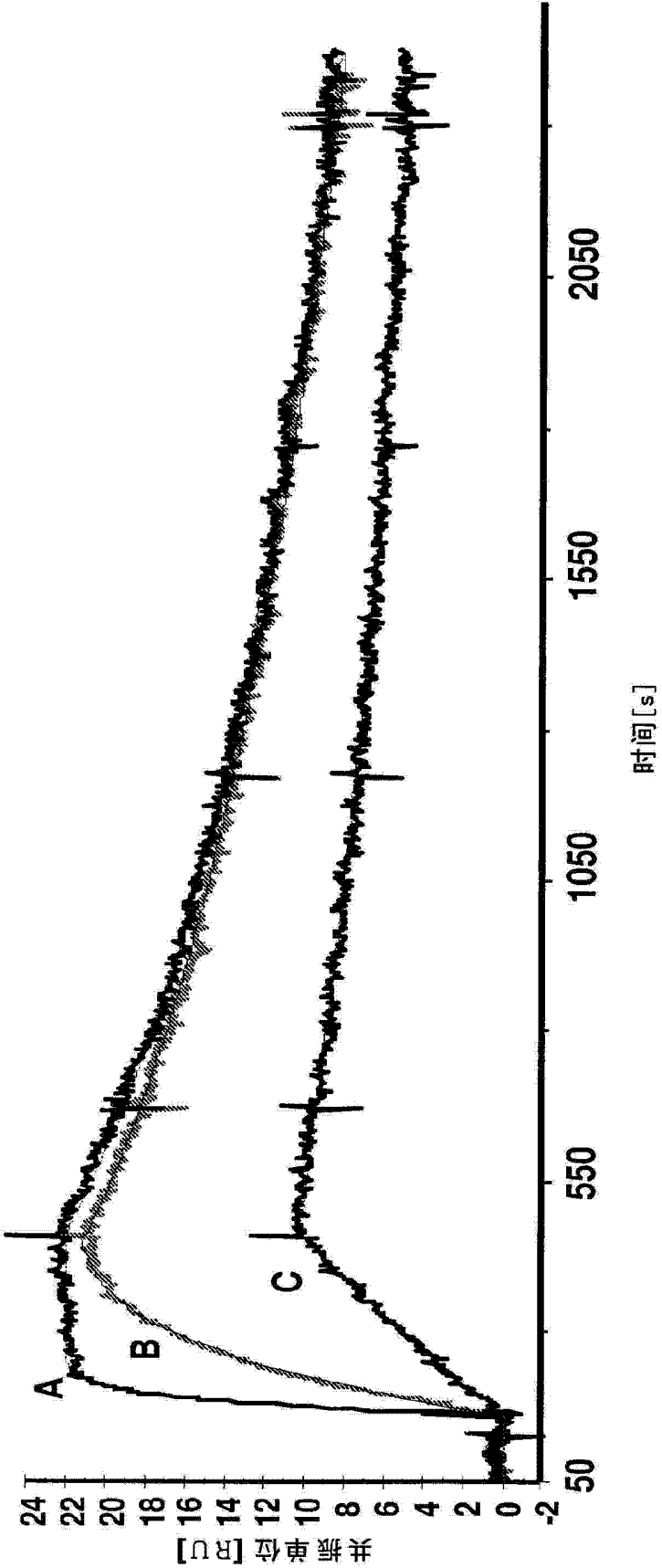


图 2

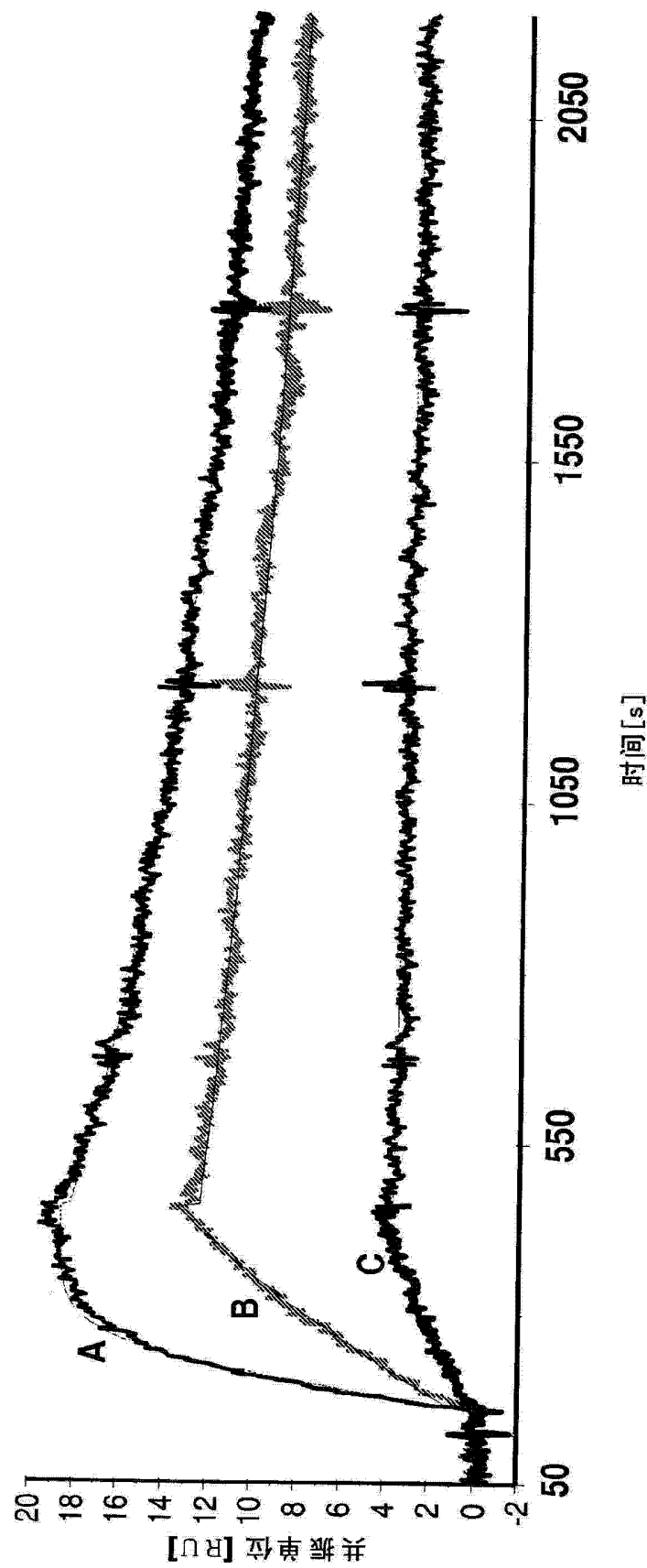


图 3

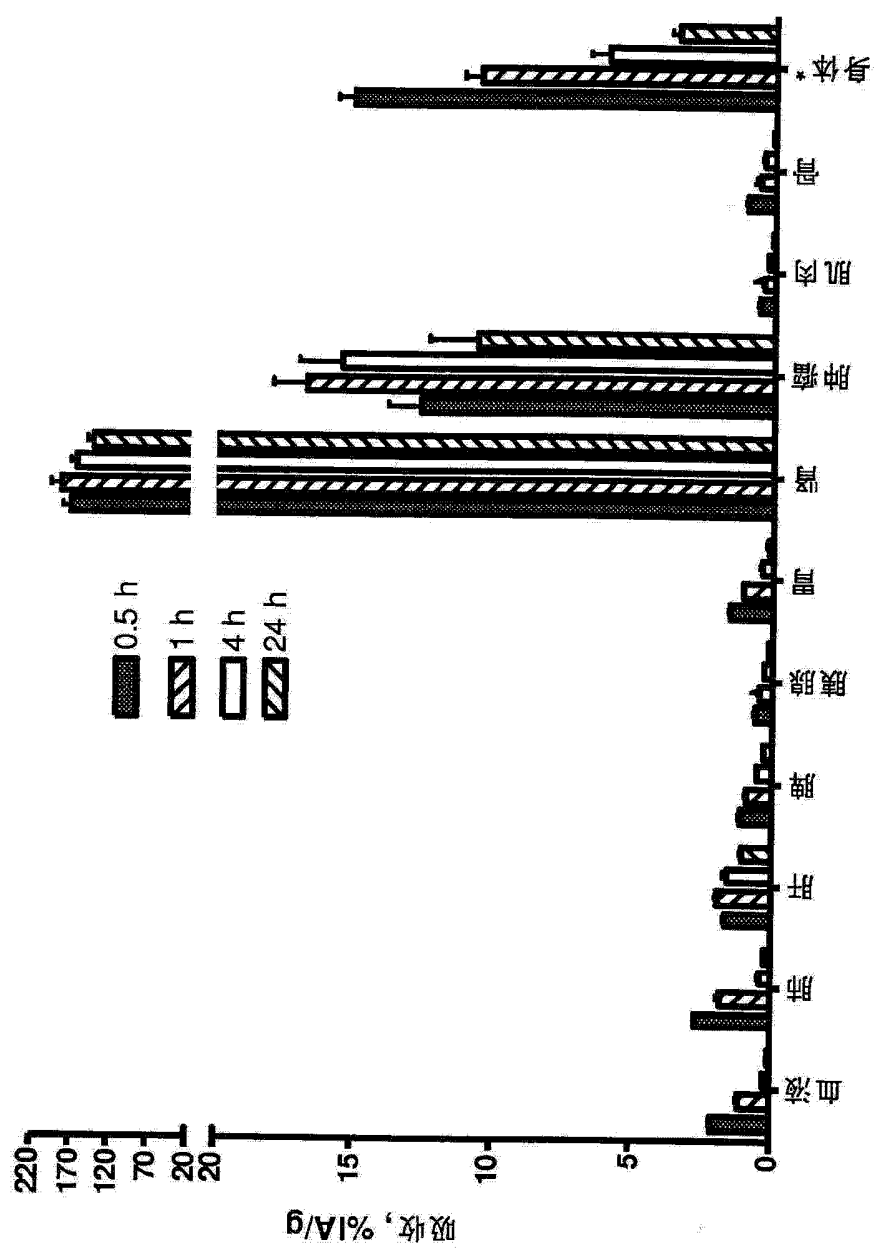


图 4

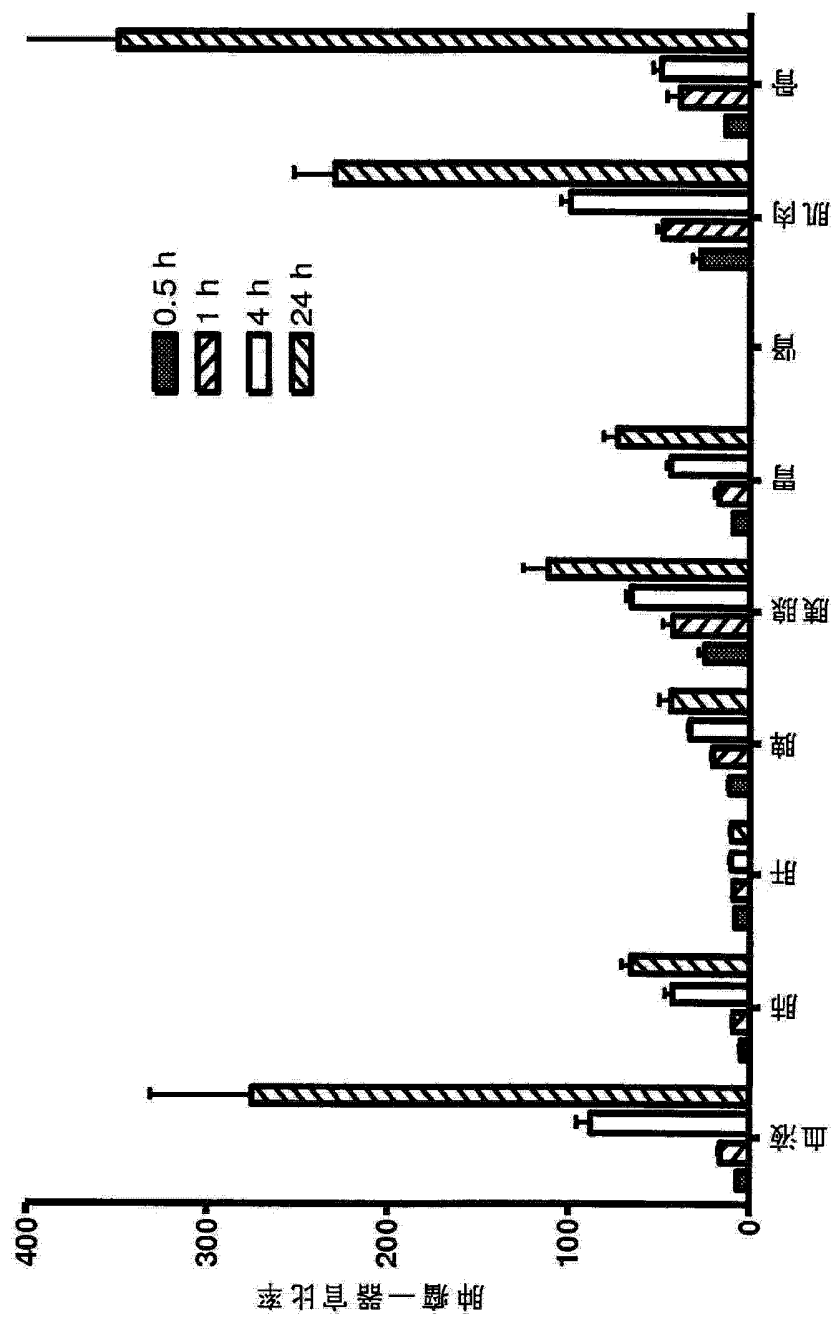


图 5

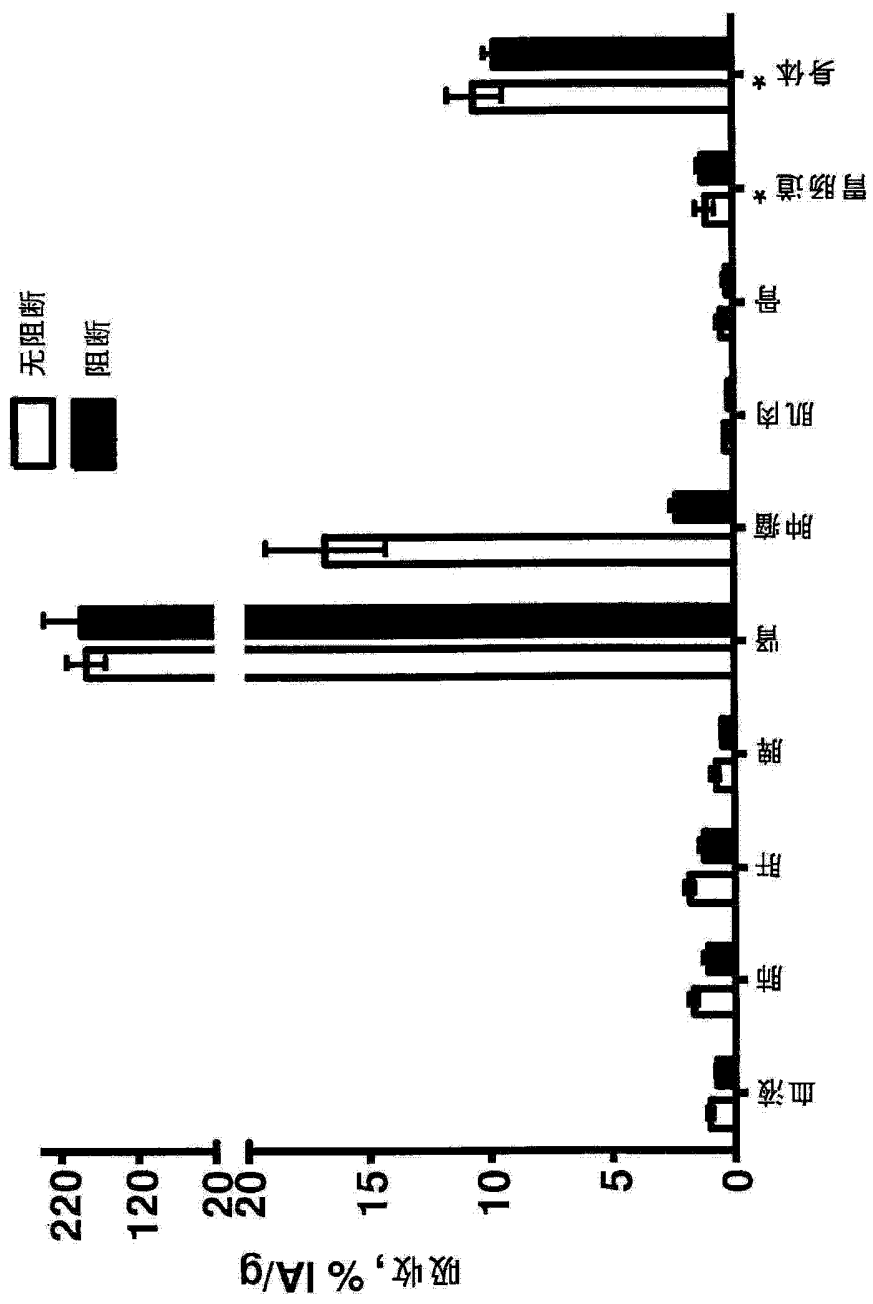


图 6

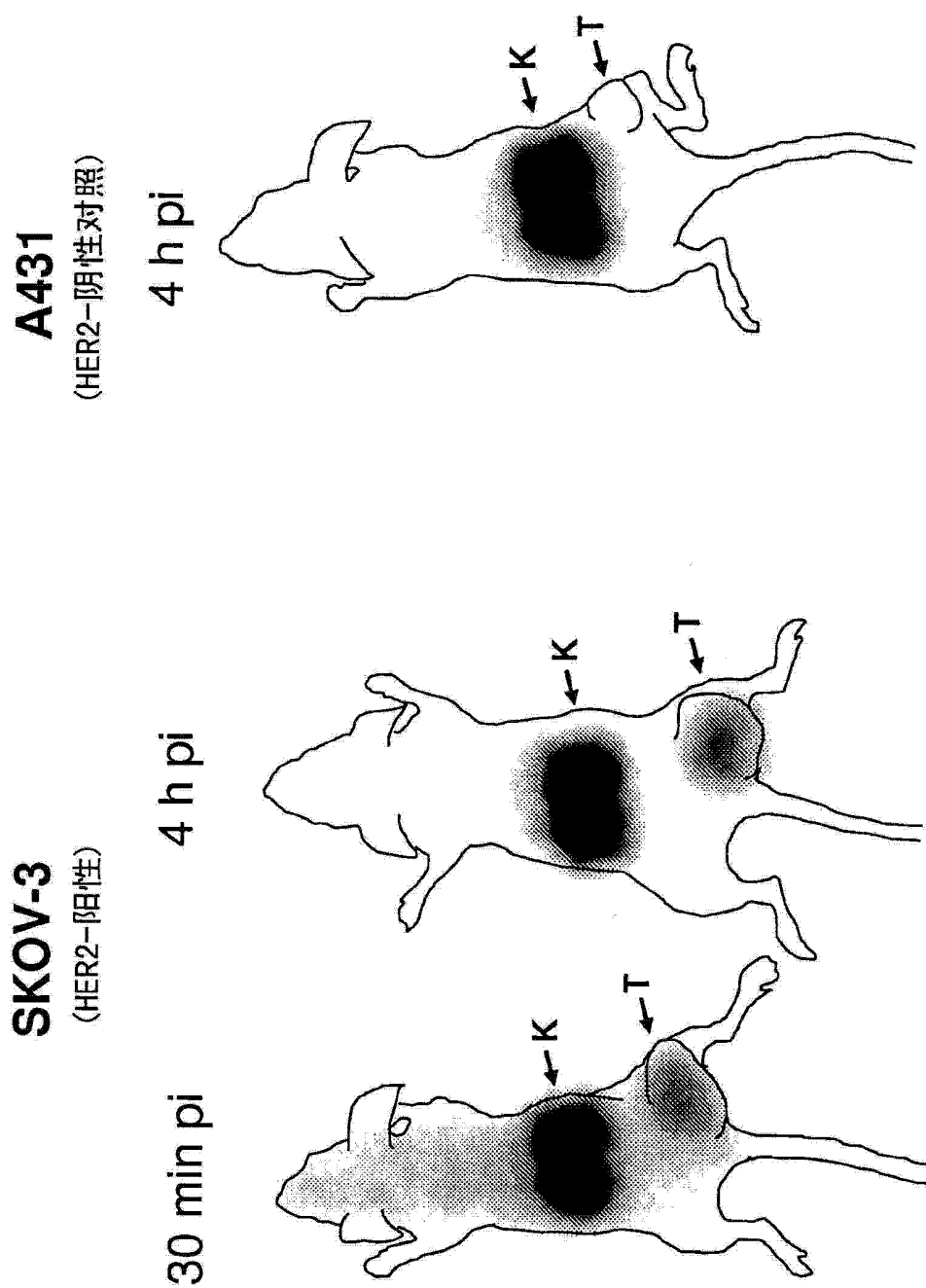


图 7

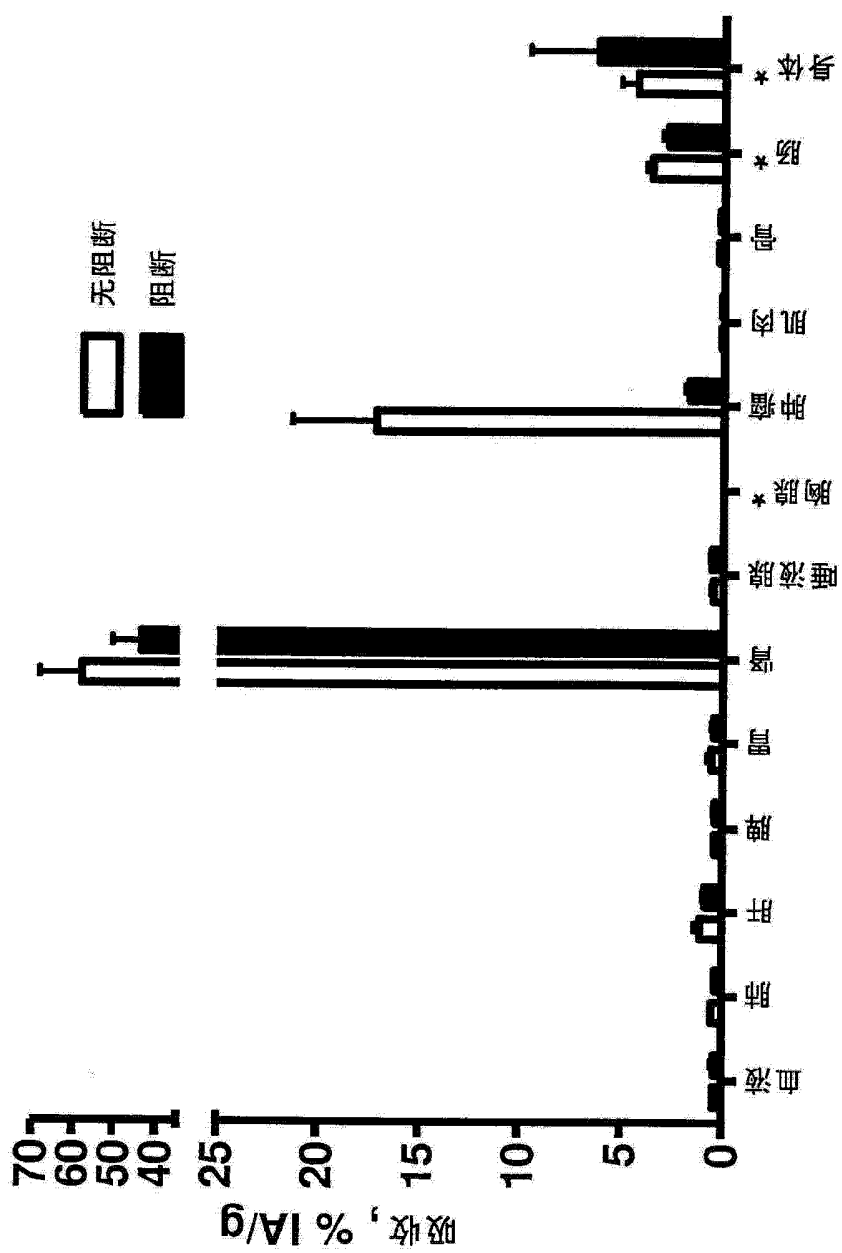


图 8

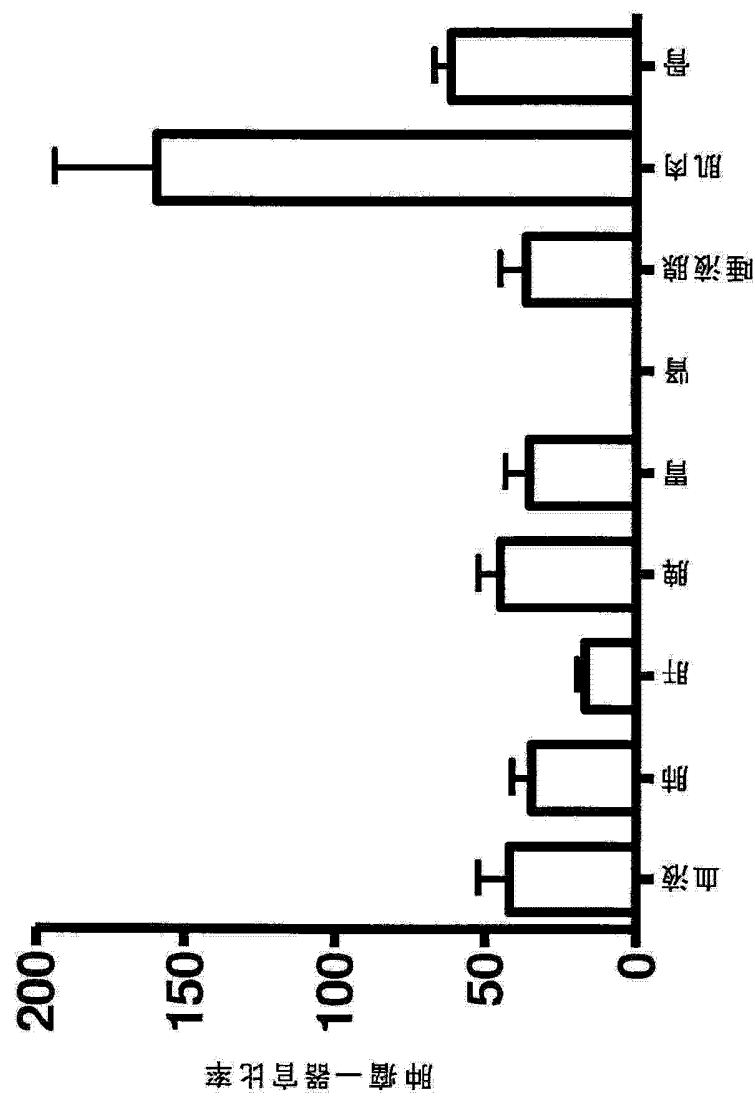


图 9

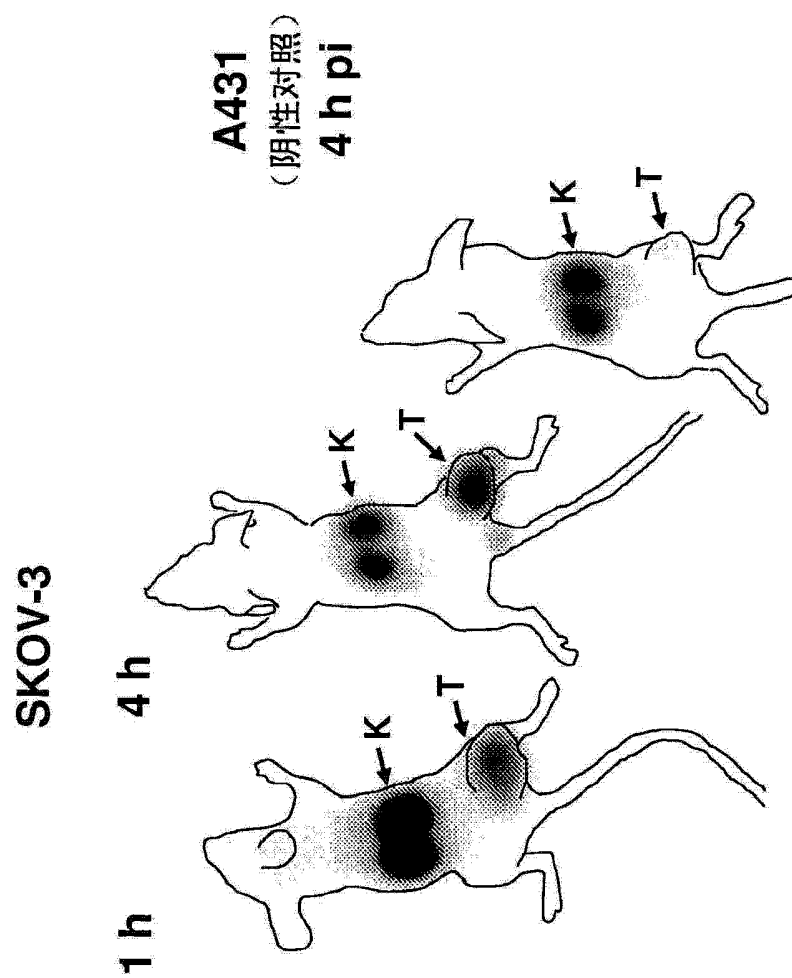


图 10

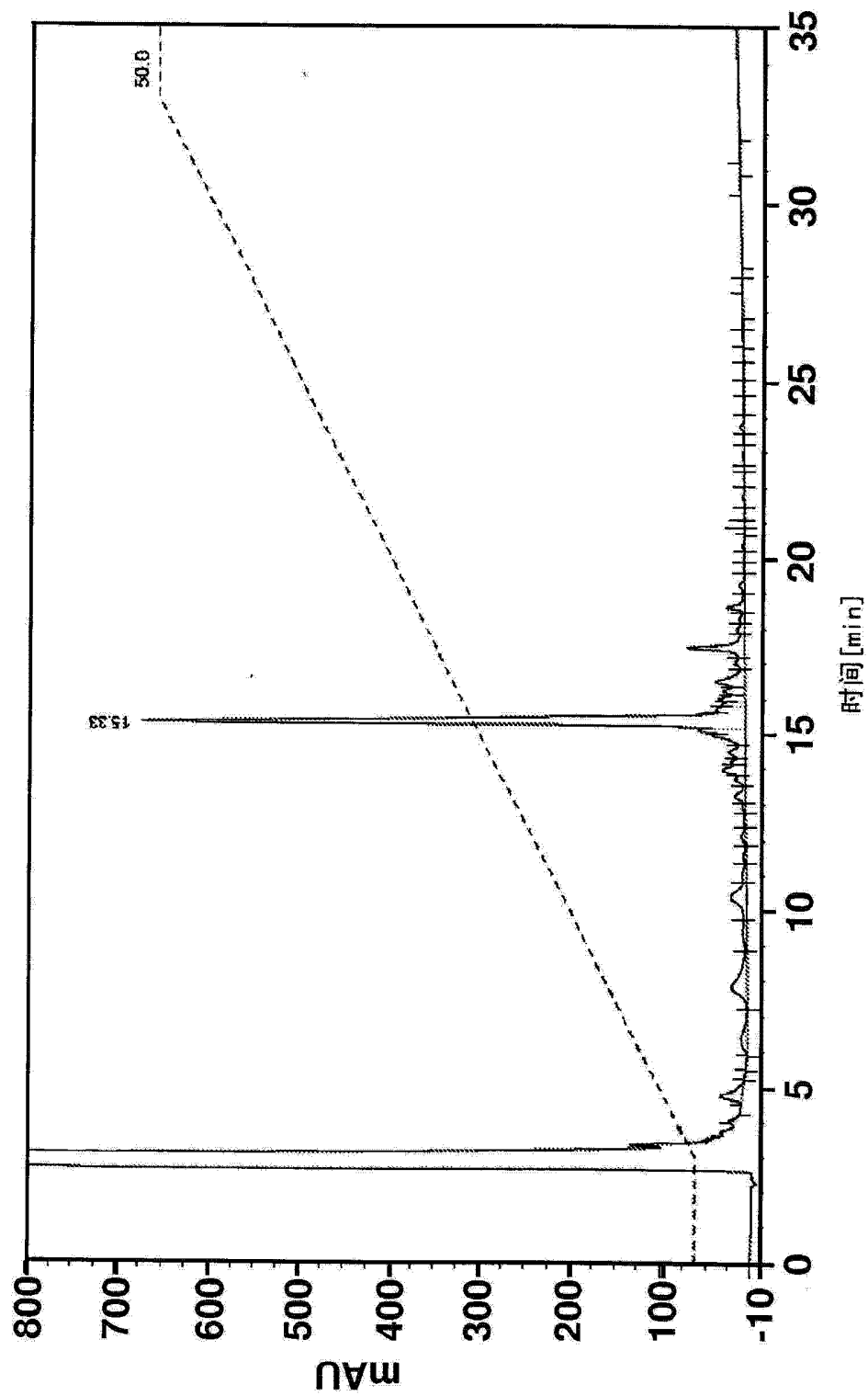


图 11A

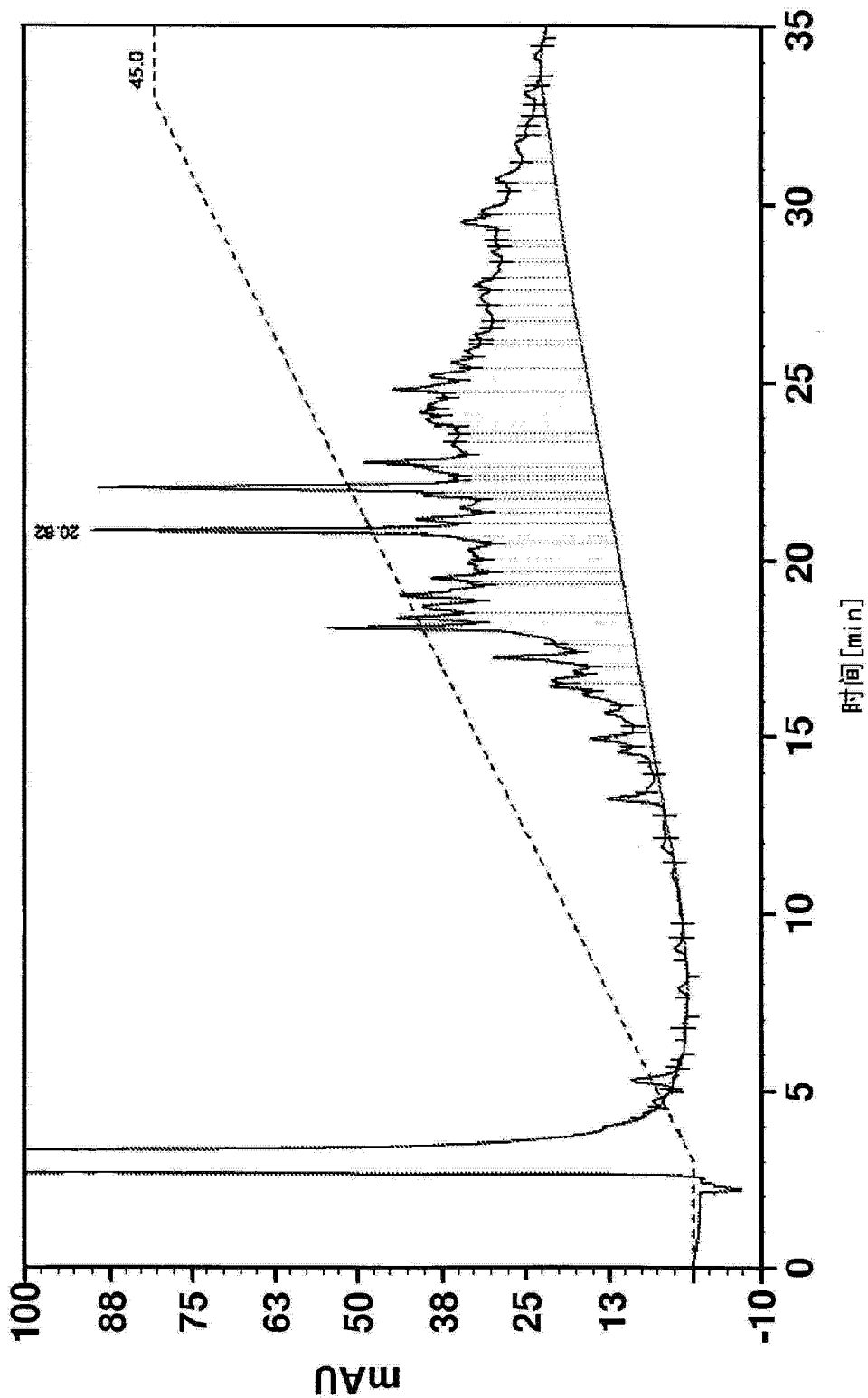


图 11B

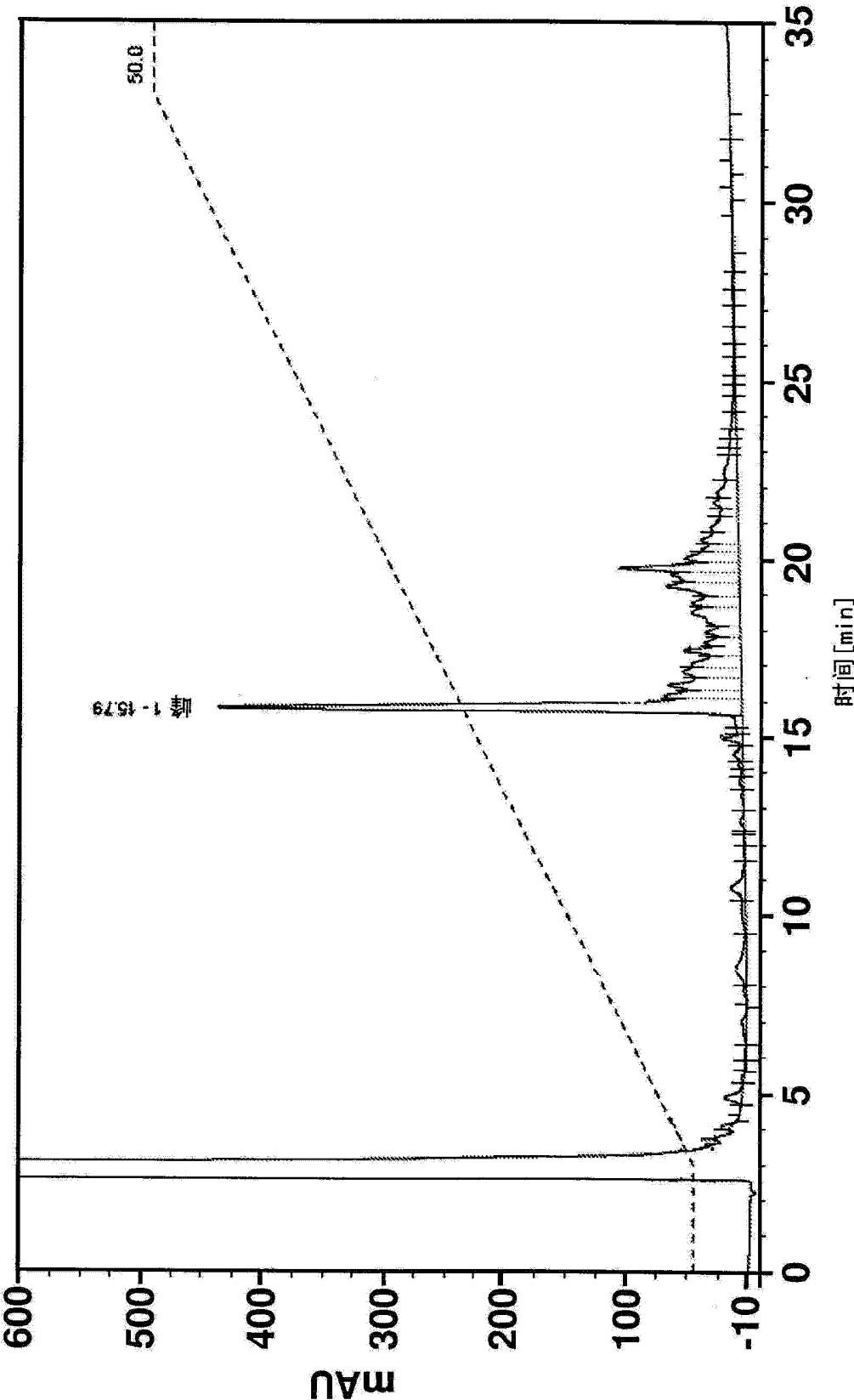


图 12A

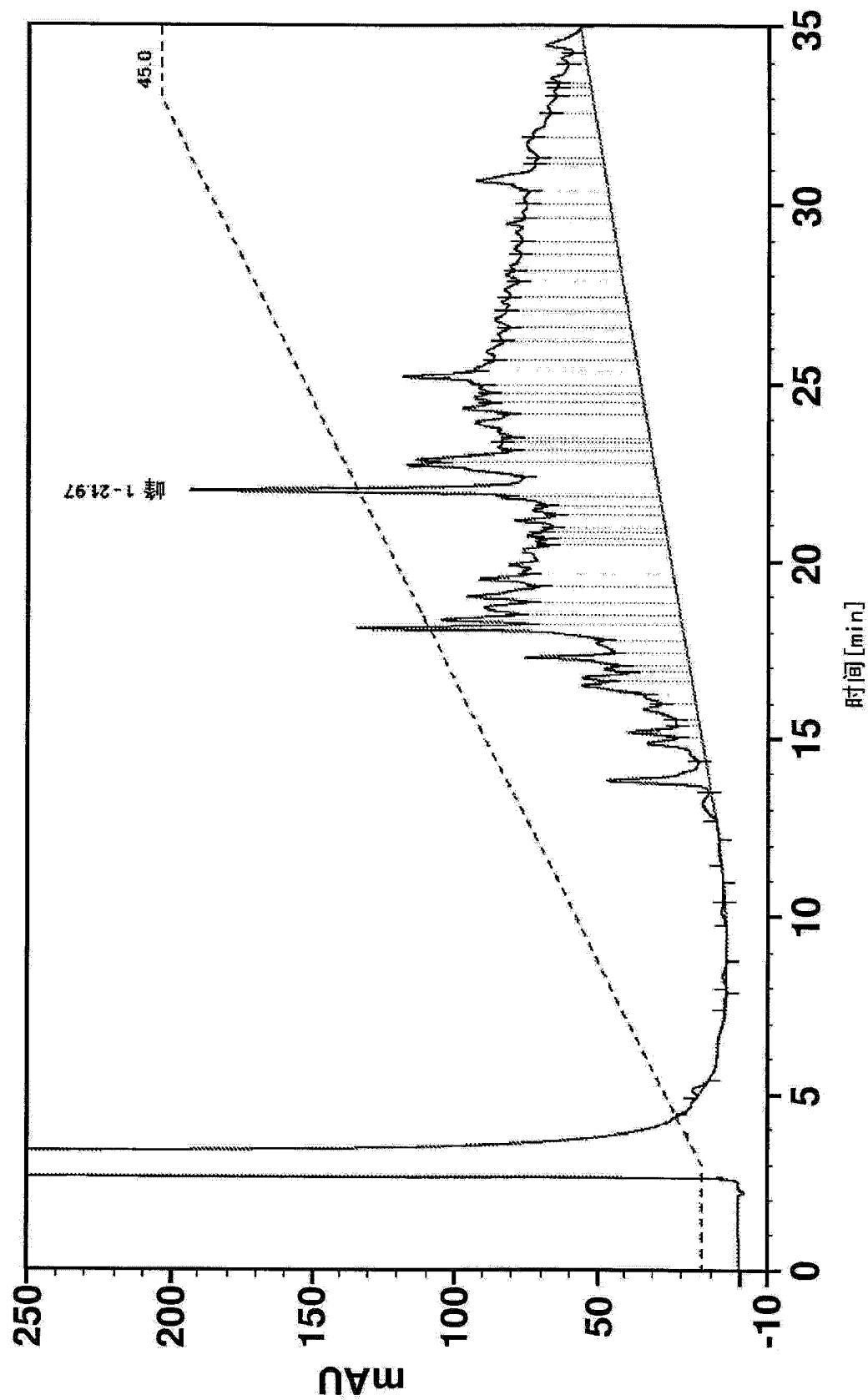


图 12B

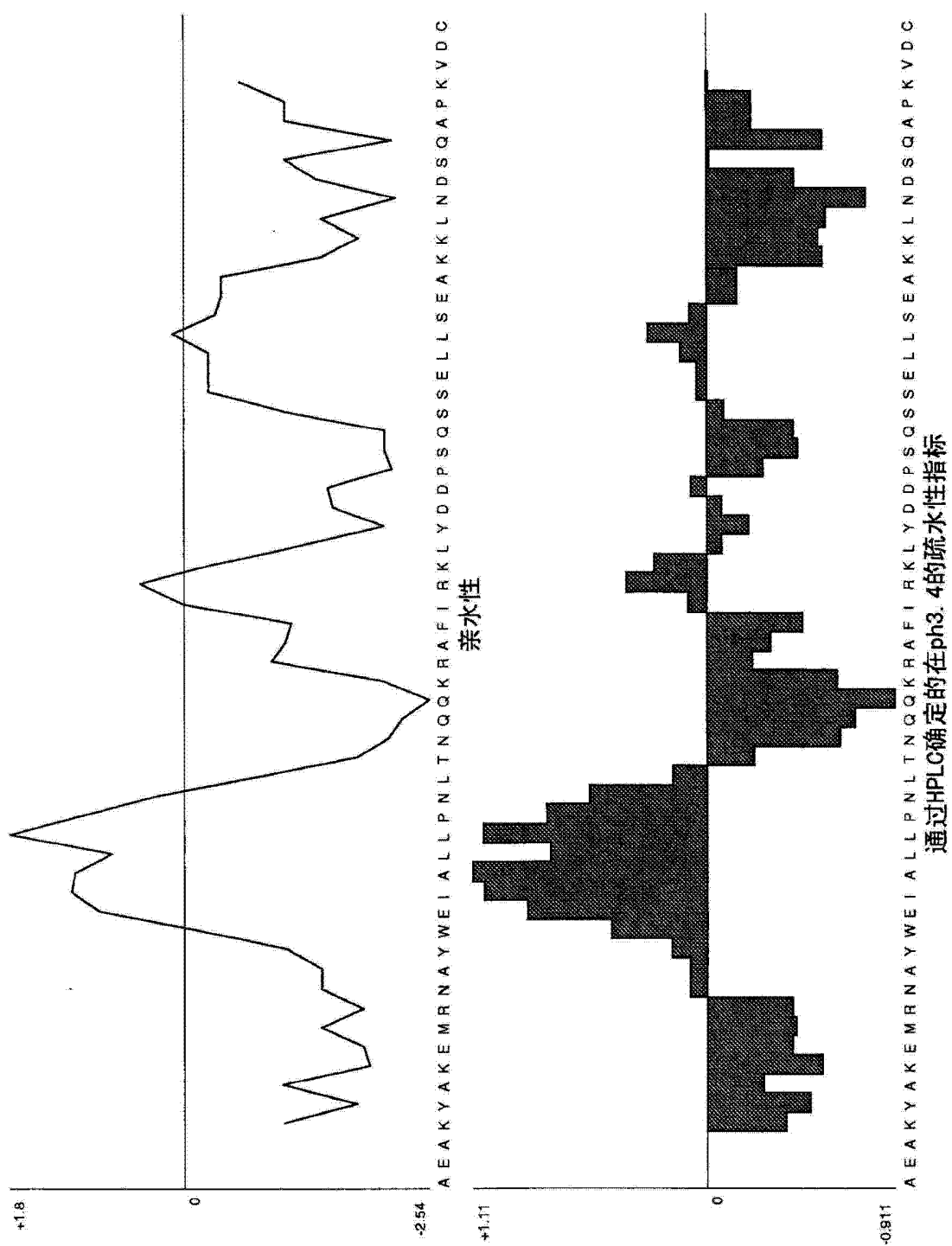


图 13A

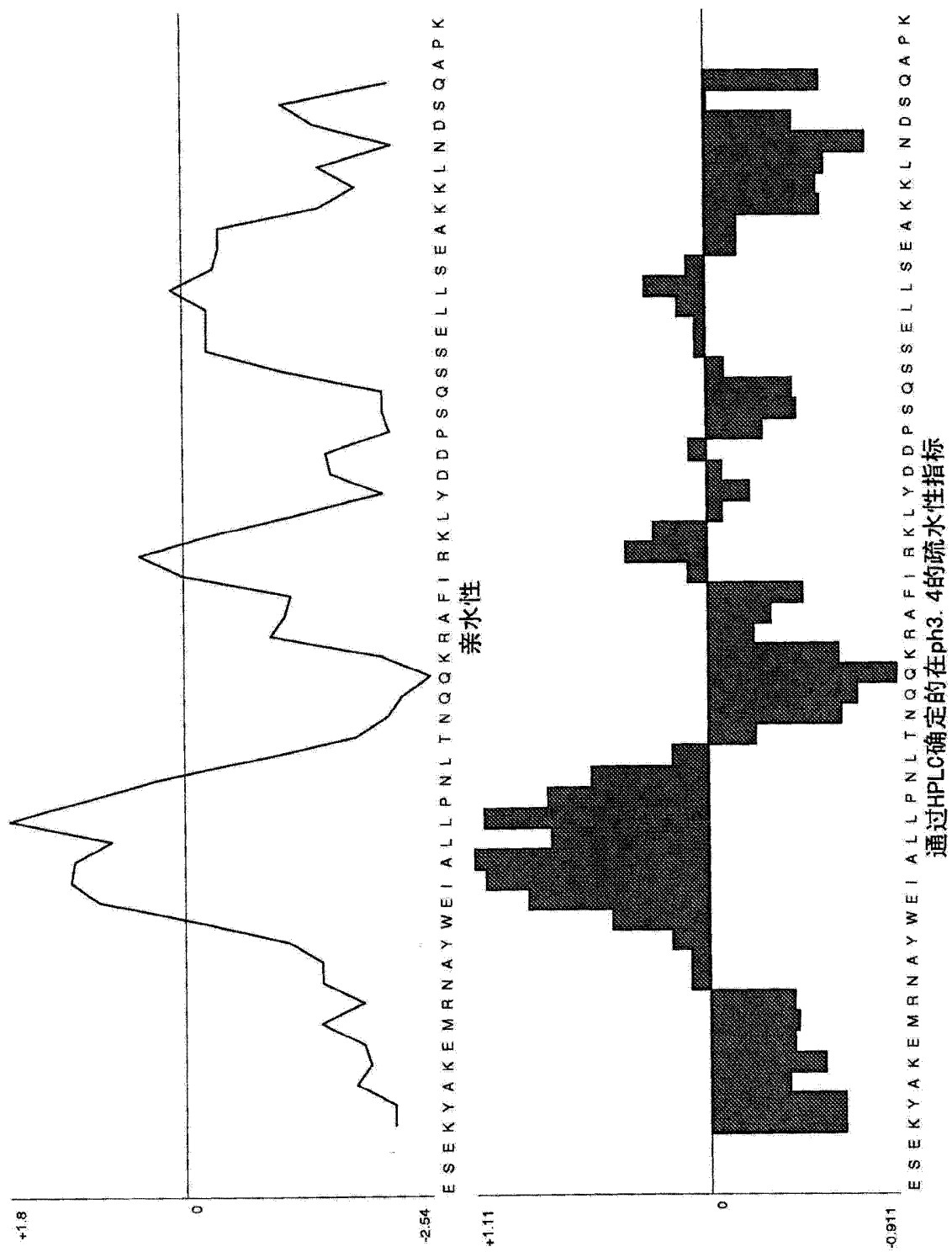


图 13B

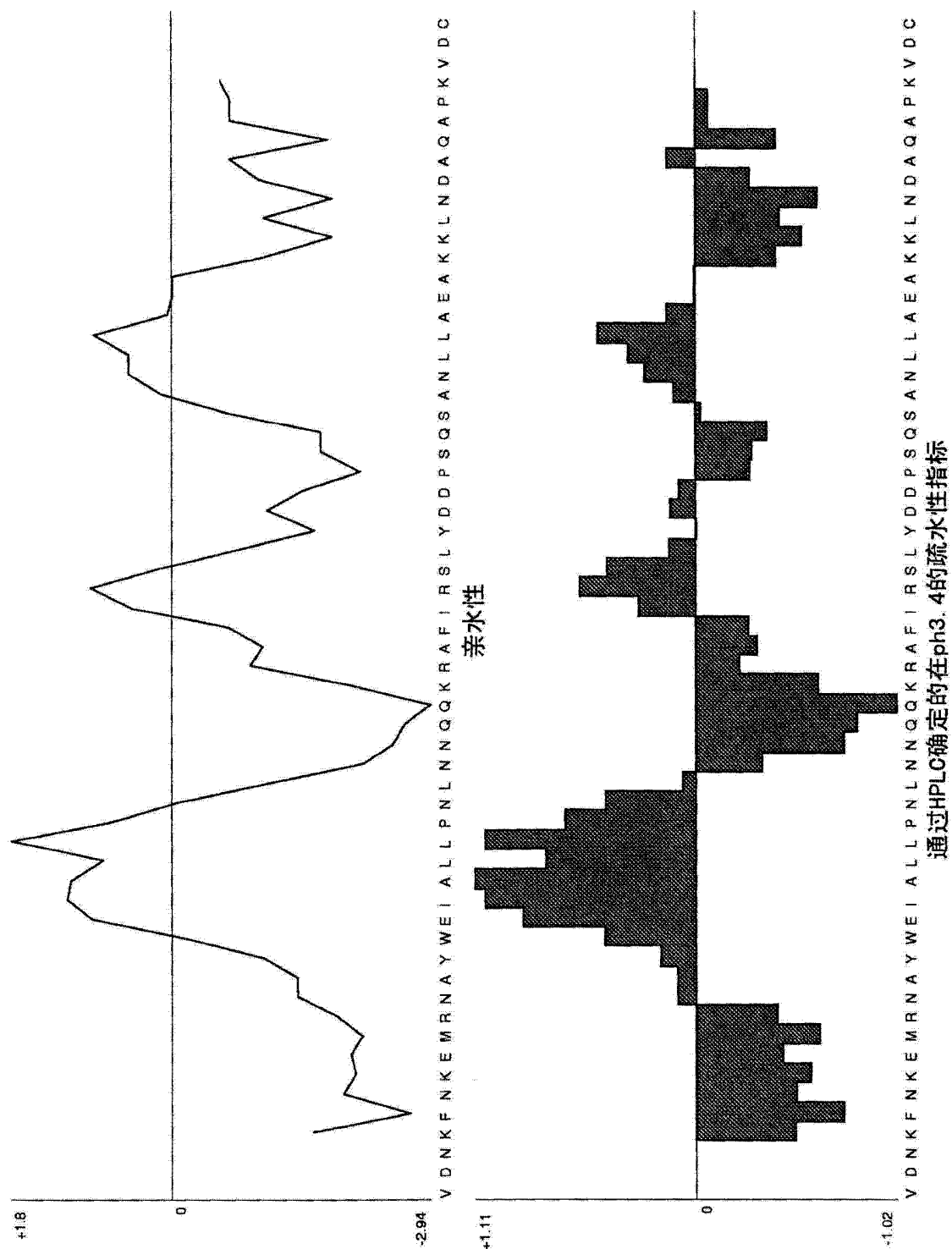


图 13C

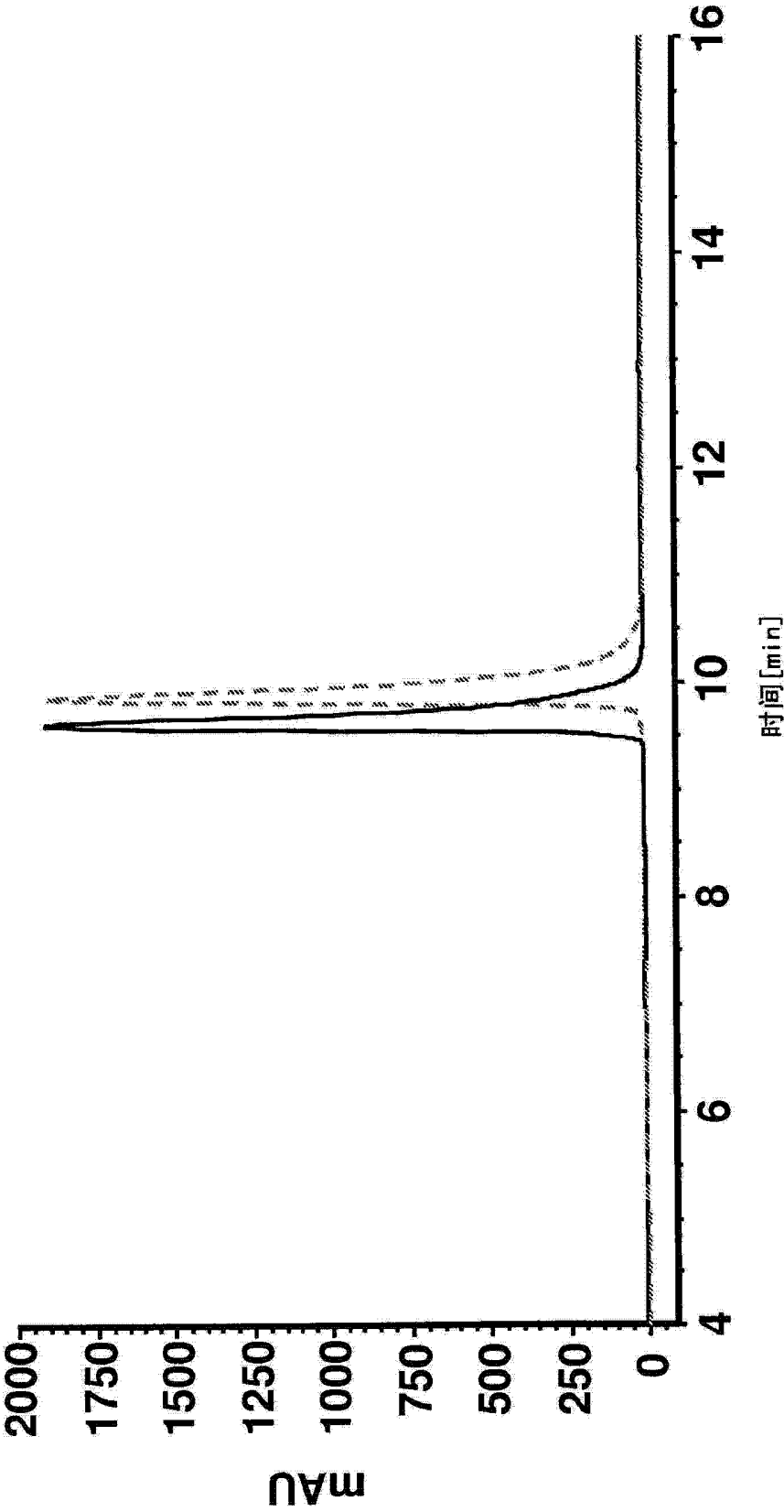


图 14

Abstract

HER2 binding polypeptides comprising the amino acid sequence EX₁ RNAYWEIA LLPNLTNQQK RAFIRKLYDD PSQSSELLX₂E AKKLNSQ wherein X₁ in position 2 is M, I or L, and X₂ in position 39 is S or C (SEQ ID NO: 1) are disclosed. Moreover, such peptides comprising a chelating environment are disclosed. Also radiolabeled polypeptides formed by the peptides comprising a chelating environment and radionuclides are disclosed. Furthermore, methods of *in vivo* imaging of the body of a mammalian subject having or suspected of having a cancer characterized by overexpression of HER2 comprising administration of such a radiolabeled polypeptide followed by obtainment of an image of the body using a medical imaging instrument and also methods of treating such cancer are disclosed. Furthermore, the use of such a radiolabeled polypeptide in diagnosis and treatment of cancer characterized by overexpression of HER2. Nucleic acids encoding the polypeptides, expression vectors comprising the nucleic acids and host cells comprising the expression vectors are also disclosed.