

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710185161.2

[51] Int. Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 9 月 17 日

[11] 公开号 CN 101264325A

[22] 申请日 2003.3.3

[21] 申请号 200710185161.2

分案原申请号 03809918.7

[30] 优先权

[32] 2002. 3. 1 [33] US [31] 60/360229

[71] 申请人 免疫医疗公司

地址 美国新泽西州

[72] 发明人 S·戈文丹 Z·屈 H·J·汉森
D·M·戈登伯格

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 刘 健 刘 玥

权利要求书 3 页 说明书 70 页 附图 17 页

[54] 发明名称

RS7 抗体

[57] 摘要

本发明涉及单价和多价的, 单特异性结合蛋白和涉及多价的, 多特异性结合蛋白。这些结合蛋白的一个实施方案含有一个或多个结合位点, 其中每个结合位点与靶抗原或靶抗原上的表位结合。这些结合蛋白的另一实施方案含有两个或多个结合位点, 其中每个结合位点具有对靶抗原上不同表位的亲和性或具有对靶抗原或半抗原的亲和性。本发明还涉及用于在宿主中表达这些功能性结合蛋白的重组载体。更具体地, 本发明涉及名为 RS7 的肿瘤相关抗原结合蛋白和其它 EGP-1 结合蛋白。本发明还涉及人源化, 人和嵌合 RS7 抗原结合蛋白, 以及该结合蛋白在诊断和治疗中的用途。

1. 嵌合、人源化或人抗-EGP-1 抗体或其片段在制备用于治疗其中患病细胞表达 EGP-1 抗原的疾病的药物中的应用，其中所述抗体或片段是裸抗体或其片段或者与除 Rnase 之外的治疗剂缀合。

2. 权利要求 1 的应用，其中所述抗-EGP-1 抗体或其片段是裸抗体或其片段。

3. 权利要求 1 的应用，其中所述抗-EGP-1 抗体或其片段与除 Rnase 之外的治疗剂缀合。

4. 权利要求 3 的应用，其中所述治疗剂选自药物、毒素、放射性核素、免疫调节剂、激素、酶、生长因子和反义寡核苷酸。

5. 权利要求 4 的应用，其中所述毒素是假单胞菌内毒素、蓖麻毒蛋白、相思豆毒素、DNase I、葡萄球菌肠毒素-A、美洲商陆抗病毒蛋白、白树毒素、白喉毒素或假单胞菌外毒素。

6. 权利要求 4 的应用，其中所述免疫调节剂是细胞因子、干细胞生长因子、淋巴毒素、肿瘤坏死因子 (TNF)、造血因子、白细胞介素-1 (IL-1)、IL-2、IL-3、IL-6、IL-10、IL-12、IL-18、IL-21、集落刺激因子、粒细胞-集落刺激因子 (G-CSF)、粒细胞巨噬细胞-集落刺激因子 (GM-CSF)、干扰素- α 、干扰素- β 、干扰素- γ 、称为“S1 因子”的干细胞生长因子、促红细胞生成素、血小板生成素或其组合。

7. 权利要求 3 的应用，其中所述治疗剂具有选自抗有丝分裂、烷化、抗代谢物、抗血管生成、细胞凋亡、生物碱、抗生素剂及其组合的药理特性。

8. 权利要求 3 的应用，其中所述治疗剂选自氮芥类、氮丙啶衍生物、烷基磺酸酯类、亚硝基脲类、三氮烯类、叶酸类似物、蒽环类抗生素、紫杉烷类药、COX-2 抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂、嘧啶类似物、嘌呤类似物、抗生素、酶、表鬼白毒素类、铂配位络合物、长春花生物碱、取代的脲类、甲胍衍生物、肾上腺皮质激素抑制剂、拮抗剂、内皮生长抑素、紫杉醇、喜树碱、阿霉素、阿霉素类似物及其组合。

9. 权利要求 4 的应用，其中所述放射性核素选自 ^{131}I 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{86}Y 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{94\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{90}Y 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{189}Re 、 ^{177}Lu 、 ^{67}Cu 、 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 、 ^{211}At 、 ^{198}Au 、 ^{224}Ac 、 ^{126}I 、 ^{133}I 、 ^{77}Br 、 $^{113\text{m}}\text{In}$ 、 ^{95}Ru 、 ^{97}Ru 、 ^{103}Ru 、 ^{105}Ru 、 ^{107}Hg 、 ^{203}Hg 、 $^{121\text{m}}\text{Te}$ 、 $^{125\text{m}}\text{Te}$ 、

¹⁶⁵Tm、¹⁶⁷Tm、¹⁶⁸Ag、¹¹¹Ag、¹⁹⁷Pt、¹⁰⁹Pd、³²P、³³P、⁴⁷Sc、¹⁵³Sm、¹⁰⁵Rh、¹⁴²Pr、¹⁴³Pr、¹⁶¹Tb、¹⁶⁶Ho、¹⁹⁹Au、⁵⁷Co、⁵⁸Co、⁵¹Cr、⁵⁹Fe、¹⁸F、⁷⁵Se、²⁰¹Tl、²²⁵Ac、⁷⁶Br、⁸⁶Y、¹⁶⁹Yb、¹⁶⁶Dy、²¹²Pb 和 ²²³Ra。

10. 权利要求 1 的应用，其中所述抗-EGP-1 抗体或其片段是融合蛋白的一部分。

11. 权利要求 10 的应用，其中所述融合蛋白包括第二抗体或其片段或治疗性蛋白或肽。

12. 权利要求 10 的应用，其中所述第二抗体或其片段与包含一个或多个半抗原的靶向构建体结合。

13. 权利要求 11 的应用，其中所述第二抗体或其片段与除 EGP-1 之外的肿瘤相关抗原结合。

14. 权利要求 11 的应用，其中所述肿瘤相关抗原是 CD20、CD22、CEA、CSAp、AFP 或 MUC-1，或者其中所述第二抗体或其片段是 hMN-14、Mu-9、Immu31 或 PAM4。

15. 权利要求 1 的应用，其中所述抗-EGP-1 抗体或其片段与第二抗体或其片段共价相连。

16. 权利要求 1 的应用，其中所述抗-EGP-1 抗体或其片段是嵌合、人源化或人 RS7 抗体或其片段。

17. 权利要求 16 的应用，其中所述嵌合、人源化或人 RS7 抗体或其片段包括 RS7 抗体轻链可变区 CDR1 (KASQDVSIAVA, SEQ ID NO:28); CDR2 (SASYRYT, SEQ ID NO:29); 和 CDR3 (QQHYITPLT, SEQ ID NO:30) 和 RS7 重链可变区 CDR1 (NYGMN, SEQ ID NO:31); CDR2 (WINTYTGEPTYTDDFKG, SEQ ID NO:32) 和 CDR3 (GGFGSSYWYFDV, SEQ ID NO:33) 的互补决定区 (CDR)。

18. 权利要求 1 的应用，其中所述抗-EGP-1 抗体或其片段包括人 IgG1 恒定区序列。

19. 权利要求 1 的应用，其中所述疾病是癌症。

20. 权利要求 1 的应用，其中所述癌症是肺、乳腺、膀胱、卵巢、子宫、胃或前列腺的肿瘤。

21. 权利要求 1 的应用，其中所述肺肿瘤是鳞状细胞癌或腺癌。

22. 与治疗剂缀合的嵌合、人源化或人抗-EGP-1 抗体或其片段在制备用于治疗其中患病细胞表达 EGP-1 抗原的疾病的药物中的应用，

其中所述抗-EGP-1 抗体或其片段包括人 IgG1 恒定区。

23. 权利要求 22 的应用, 其中所述治疗剂选自同位素、药物、毒素、免疫调节剂、激素、酶、Rnase、抗体、抗体片段、生长因子、放射性核素和反义寡核苷酸。

24. 权利要求 23 的应用, 其中所述放射性核素选自 ^{131}I 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{86}Y 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{94\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{90}Y 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{189}Re 、 ^{177}Lu 、 ^{67}Cu 、 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 、 ^{211}At 、 ^{198}Au 、 ^{224}Ac 、 ^{126}I 、 ^{133}I 、 ^{77}Br 、 $^{113\text{m}}\text{In}$ 、 ^{95}Ru 、 ^{97}Ru 、 ^{103}Ru 、 ^{105}Ru 、 ^{107}Hg 、 ^{203}Hg 、 $^{121\text{m}}\text{Te}$ 、 $^{125\text{m}}\text{Te}$ 、 ^{165}Tm 、 ^{167}Tm 、 ^{168}Ag 、 ^{111}Ag 、 ^{197}Pt 、 ^{109}Pd 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{47}Sc 、 ^{153}Sm 、 ^{105}Rh 、 ^{142}Pr 、 ^{143}Pr 、 ^{161}Tb 、 ^{166}Ho 、 ^{199}Au 、 ^{57}Co 、 ^{58}Co 、 ^{51}Cr 、 ^{59}Fe 、 ^{18}F 、 ^{75}Se 、 ^{201}Tl 、 ^{225}Ac 、 ^{76}Br 、 ^{86}Y 、 ^{169}Yb 、 ^{166}Dy 、 ^{212}Pb 和 ^{223}Ra 。

25. 权利要求 23 的应用, 其中所述 Rnase 是 onconase。

RS7 抗体

本申请是申请号为 03809918.7、发明名称为“RS7 抗体”的专利申请的分案申请。

1. 发明领域

本发明涉及单价和多价的，单特异性结合蛋白和涉及多价的，多特异性结合蛋白。这些结合蛋白的一个实施方案含有一个或多个结合位点，其中每个结合位点与靶抗原或靶抗原上的表位结合。这些结合蛋白的另一实施方案含有两个或多个结合位点，其中每个结合位点具有对靶抗原上不同表位的亲和性或具有对靶抗原或半抗原的亲和性。本发明还涉及用于在宿主中表达这些功能性结合蛋白的重组载体。更具体地，本发明涉及名为 RS7 的肿瘤相关抗原结合蛋白。本发明还涉及人源化 RS7 抗原结合蛋白，以及该结合蛋白在诊断和治疗中的用途。

2. 发明背景

人造结合蛋白，尤其是单克隆抗体和工程化处理抗体或抗体片段已经得到广泛测试并显示出在多种人类疾病，包括癌症、自身免疫病、感染性疾病、炎症疾病和心血管疾病的检测和治疗中的价值 (Filpula 和 McGuire, Exp. Opin. Ther. Patents (1999) 9:231-245)。例如放射性同位素标记的抗体已经检测可用于在使用本领域可用的检测剂注射患者后使肿瘤可视化。抗体或抗体来源的试剂的临床应用主要依赖于其与特异性靶抗原的结合能力。选择能力对于在人疾病的检测和治疗期间将诊断剂或治疗剂，如同位素、药物、毒素、细胞因子、激素、生长因子、酶、缀合物、放射性核素或金属递送至靶位，特别是如果诊断剂或治疗剂对体内的正常组织有毒性的情况下是有用的。

Goldenberg, The American Journal of Medicine (1993) 94:298-299 中公开了抗体系统的潜在局限性。检测和治疗技术中的重要参数是注射剂量特别是靶细胞存在位点的剂量的量和摄取率，即特异性结合的抗体的浓度与周围正常组织中存在的放射性的比率。当将抗体注射至血流中时，其要通过多个区室而被代谢和排泄。抗体在通

过身体的其它部分时，必须能够定位和结合靶细胞抗原。控制抗原靶向的因素包括位置，大小，抗原密度，抗原可达性，病理组织的细胞组成和靶向抗体的药代动力学。其它能特别影响抗体对肿瘤靶向的因素包括靶抗原在肿瘤和其它组织中的表达和由放射性标记的抗体的缓慢血液清除率所导致的骨髓毒性。附着于被靶定的肿瘤细胞的靶向抗体的量收到血管化和肿瘤抗体透过屏障，以及瘤内压力的影响。非靶器官如肝、肾或骨髓的非特异性的摄取是该技术，特别是用于发射免疫治疗时的另一个潜在的局限性，其中骨髓的照射通常会导致剂量限制性毒性。

一个建议的方法，指直接靶向，是为用携带诊断性或治疗性放射性同位素的抗体靶向抗原而设计的技术。在肿瘤领域中，直接靶向方法使用通过其抗原识别肿瘤的发射性标记的抗-肿瘤单特异性抗体。该技术包括将标记的单特异性抗体注射给患者然后使得抗体定位于靶肿瘤从而获得诊断性或治疗性效果。未结合的抗体被身体清除。该方法可用于诊断或治疗另外的哺乳动物疾病。

另一种建议的溶液，指特别为克服携带诊断性或治疗性放射性同位素的抗体靶向肿瘤的缺陷而设计的“亲和力增强系统”（AES），（US-5,256,395（1993），Barbet 等，Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals（1999）14:153-166）。AES采用放射性标记的半抗原和识别靶肿瘤和放射性半抗原的抗-肿瘤/抗-半抗原双特异性结合蛋白。具有较高效价的半抗原和具有较高特异性的结合蛋白也可用于该方法。该方法包括将结合蛋白注射给患者然后使其定位于靶肿瘤。在经过足够长的未结合的结合蛋白被从血流中清除的时间后，给予放射性标记的半抗原。半抗原于位于靶细胞位点的抗体-抗原复合物结合从而获得诊断性或治疗性效果。未结合的半抗原被身体清除。Barbet描述了二价半抗原可与双特异性抗体在后者结合在肿瘤表面上时发生交联的可能性，。结果，放射性标记的复合物更稳定且在肿瘤中保持更长的时间。该系统可用于诊断或治疗哺乳动物疾病。

本领域中仍需要制备可用于直接靶向系统中的多价，单特异性结合蛋白和制备可用于亲和力增强系统中的多价，多特异性结合蛋白。特别是，仍需要表现出定向抗原处的增强的摄取，血浓度降低，和能最佳保护正常组织和细胞免受毒性药物损害的结合蛋白。

发明概述

因此,本发明的一个目的是提供识别肿瘤相关抗原,由抗人非小细胞肺癌的鼠 MA b RS7-3G11 所限定的上皮糖蛋白-1 (EGP-1) 的单特异性单克隆抗体及其片段。根据第三届国际肺癌研究协会 (IASLC) 研讨会对肿瘤和分化抗原的建议,已将 RS7 抗原命名为 EGP-1 (上皮糖蛋白-1)。至少一种与 EGP-1 相关的表位在文献中也称为 TROP2。在一个优选的实施方案中,本发明的抗体或抗体片段结合的表位与 Stein (如下) 和其它在先研究所披露的鼠 RS7 抗体结合的表位相同。或者,抗体或片段结合的表位可与 Stein 所披露的鼠 RS7 抗体结合的表位不同。在一个优选的实施方案中,抗-EGP-1 或抗-TROP2 抗体或其片段是嵌合、人源化或完整人 RS7 抗体或其片段。

例如本发明中涉及了人源化抗体或其片段,其中人源化 RS7 MA b 的轻链可变区的互补决定区 (CDR) 包括含有 KASQDVSI A V A 氨基酸序列的 CDR1; 含有 SASYRYT 氨基酸序列的 CDR2; 和含有 QQHYITPLT 氨基酸序列的 CDR3。本发明的另一实施方案是人源化抗体或其片段,其中人源化 RS7 MA b 的重链可变区的 CDR 包括含有 NYGMN 氨基酸序列的 CDR1; 含有 WINTYTGEPTYTDDFKG 氨基酸序列的 CDR2 和含有 GGFGSSYWYFDV 氨基酸序列的 CDR3。而且优选,人源化抗体或其片段包括鼠 RS7 MA b 的 CDR 和人抗体的轻链和重链可变区的构架区 (FR), 其中人源化 RS7 MA b 的轻链可变区的 CDR 包括含有 KASQDVSI A V A 氨基酸序列的 CDR1; 含有 SASYRYT 氨基酸序列的 CDR2; 和含有 QQHYITPLT 氨基酸序列的 CDR3; 和人源化 RS7 MA b 的重链可变区的 CDR 包括含有 NYGMN 氨基酸序列的 CDR1; 含有 WINTYTGEPTYTDDFKG 氨基酸序列的 CDR2 和含有 GGFGSSYWYFDV 氨基酸序列的 CDR3。还优选,人源化抗体或其片段还包括人抗体的轻链和重链恒定区的 FR。

在一个优选的实施方案中,人源化 RS7 抗体或片段包括含有至少一个被在鼠 RS7 抗体中相应位置上发现的氨基酸残基所替换的氨基酸的轻链和/或重链的 FR。例如其中至少一个被替换的氨基酸残基优选位于选自图. 3B 的鼠重链可变区的氨基酸残基 38、46、68 和 91 的位置和/或至少一个被替换的氨基酸残基优选位于选自图. 3A 的鼠轻链可变区的氨基酸残基 20, 85 和 100 的位置。

本发明还描述了一种包括至少两种抗-EGP-1 MAbs 或其片段的抗体融合蛋白或其片段，其中 MAbs 或其片段选自本发明的抗-EGP-1 MAbs 或其片段。在相关静脉中，抗体融合蛋白或其片段包括至少一种任何本发明的抗-EGP-1 抗体的第一抗-EGP-1 MAbs 或其片段和至少一种本发明的抗-EGP 抗体以外的第二 MAbs 或其片段。例如第二抗体或其片段可以是癌-相关抗体或其片段。另一优选的实施方案是包括两个不同表位结合性抗-EGP-1 抗体或其片段的融合蛋白或其片段。

本发明的一个目的是提供识别多于一个 RS7 抗原上的表位的或具有对 RS7 抗原和对半抗原分子亲和力的多特异性抗体及其片段。后一结合蛋白适于预靶定靶抗原。因此，还描述了一种将诊断剂、治疗剂或其组合递送至靶位的方法，包含：(i) 对个体给予多价，多特异性 MAbs 或其片段；(ii) 等待足够长的时间以便使非结合蛋白的量从个体血流中清除；和 (iii) 对所述个体给予可与所述个体的结合位点结合的诊断剂、治疗剂或其组合。

本发明的另一个目的是提供将诊断剂或治疗剂递送至表达 EGP-1 抗原的定向疾病的方法。例如描述了一种将诊断剂或治疗剂或其组合递送至靶位的方法，包括 (i) 提供一种包含与至少一种治疗剂和/或诊断剂结合的抗-EGP-1 抗体或其片段的组合物和 (ii) 对此需要的所述个体给予所述组合物。优选地，诊断剂或治疗剂选自同位素、药物、毒素、免疫调节剂，激素、酶、生长因子、放射性核素、金属、造影剂和检测剂。

在本发明的另一实施方案中，将诊断剂、治疗剂或其组合递送至靶位的方法包括 (i) 对个体给予包含一个或多个具有对 EGP-1 靶抗原亲和力的抗原-结合位点和一个或多个具有对半抗原分子亲和力的半抗原结合位点的多价，多特异性抗体或片段；(ii) 等待足够长的时间以便使非结合蛋白的量从个体血流中清除；和 (iii) 对所述个体给予包含诊断剂、治疗剂或其组合。

本发明的另一目的是提供癌细胞靶向的包括抗-EGP-1 MAbs 或其片段或本发明任一种抗体的抗体融合蛋白或其片段的诊断缀合物或治疗缀合物而其中抗-EGP-1 抗体或其片段与至少一种诊断剂或治疗剂结合。适用的治疗剂是具有选自抗有丝分裂，烷化，抗代谢物，抗血管生成，细胞凋亡，生物碱和抗生素药剂及其组合的药理特性的药物。

同样优选的治疗剂选自氮芥类，氮丙啶衍生物，烷基磺酸酯类，亚硝基脲类，三氮烯类，叶酸类似物，蒽环类抗生素，紫杉烷类药，COX-2 抑制剂，酪氨酸激酶抑制剂，嘧啶类似物，嘌呤类似物，抗生素，酶，表鬼白毒素类，铂配位络合物，长春花生物碱，取代的脲类，甲胍衍生物，肾上腺皮质激素抑制剂，拮抗剂，内皮生长抑素，紫杉醇，喜树碱，阿霉素，阿霉素类似物，及其组合。优选地，诊断剂选自光活化性放射性核素，优选 25 ~ 4000 keV，和造影剂。

在一个优选的实施方案中，DNA 序列包含一种核酸，所述核酸编码包含本发明的抗-EGP-1Mab 或其片段的 Mab 或片段；包含至少两种所述 Mab 或其片段的抗体融合蛋白或其片段；包含至少一种含有本发明的抗-EGP-1 抗体和片段的 Mab 或其片段的第一抗-EGP-1 Mab 或其片段和至少一种本文所描述的抗-EGP-1 Mab 或其片段以外的第二 Mab 或其片段的抗体融合蛋白或其片段；或包含至少一种包含本文描述的任何抗体的所述 Mab 或其片段的第一 Mab 或其片段和至少一种本文描述的任何抗体的所述 Mab 或其片段以外的第二 Mab 或其片段的抗体融合蛋白或其片段，其中第二 Mab 可与选自 EGP-2、MUC1-4、A33、CSAp、CEA、Le(y)、Tn、Tag-72、PSMA、PSA、EGFR、HER2/neu、AFP、HCG、HCG- β 、铁蛋白、PAP、PLAP、EGP-2、组蛋白、细胞角蛋白、腱生蛋白、CanAg、肾癌 G 250、VGFR1、VGFR2、PAM4-抗原、致癌基因产物，及其组合的抗原反应。第二 Mab 可替代性地与肿瘤相关性血管内皮抗原，如 VEGF（血管内皮生长因子）和 PlGF（胎盘生长因子）反应。第二抗体的选择依赖于肿瘤细胞类型。例如抗-PSMA 或抗-PSA 抗体可用于治疗或诊断前列腺癌，抗-CEA 或抗-MUCL，MUC2，MUC3 和 MUC4 抗体用于乳癌、卵巢癌、肺癌和结肠癌，EGFR 用于结肠癌和头颈癌，抗-CSAp 抗体用于结肠癌和卵巢癌，而抗-HER/neu 用于乳癌、卵巢癌和其它癌症。这些仅用以示例性说明，而并非意在限制。含有该 DNA 序列的表达载体和宿主细胞也是本发明优选的实施方案。

本文还提供了诊断和治疗恶性肿瘤的方法。例如诊断和治疗癌症的方法，包括 (i) 对此需要的个体给予包含一个或多个具有对 EGP-1 靶抗原亲和力的抗原-结合位点和一个或多个具有对半抗原分子亲和力的半抗原结合位点的多价，多特异性抗体或片段；(ii) 等待足够长的时间以便使非结合蛋白的量从个体血流中清除；和 (iii) 对所述

个体给予包含诊断剂、治疗剂或其组合，可与所述抗体的结合位点结合的半抗原。

同样地，诊断和治疗恶性肿瘤的方法可包括施用治疗有效量的抗-EGP-1 融合蛋白或其片段或包含 EGP-1 MAbs 或其片段的治疗缀合物，其中 EGP-1 MAbs 或其片段或抗体融合蛋白或其片段在药学上适用的赋形剂中与至少一种治疗剂结合。在相关静脉中，裸抗-EGP-1 抗体及其片段，包括裸抗-EGP-1 融合蛋白及其片段，也可用于治疗恶性肿瘤。裸抗-EGP-1 抗体可用于体外诊断恶性肿瘤，例如采用免疫测试法或免疫组织化学法，但不能用于体内诊断，除非其包括预靶向技术，如 AES。但是，标记的 EGP-1 抗体可用于体内诊断和治疗恶性肿瘤。例如本文描述了治疗个体中癌细胞的方法，包括 (i) 对所述个体给予治疗有效量的包含抗-EGP-1 MAbs 或其片段或抗体融合蛋白或其片段的组合物，(ii) 将所述 EGP-1 MAbs 或其片段或抗体融合蛋白或其片段在药学上适用的赋形剂中配制。相似地，本发明还包括用于诊断和治疗的裸 MAbs 及其片段和缀合的 MAbs 或其片段或融合蛋白或其片段的组合。

附图简述

图 1 显示了 mRS7，cAb-V κ #23 (cRS7)，和 CAB-V κ #1 在竞争性结合检测法中的比较。将不同浓度的竞争性 Ab 用于与生物素化 mRS7 抗体常量的结合竞争。结果显示 V κ #1 轻链不结合 RS7 抗原。

图 2 显示了编码 (A) 由 5' RACE 克隆的 RS7 V κ 和 (B) 由 RT-PCR 克隆的 RS7 V H 的 DNA 和氨基酸序列。推定的 CDR 区用下划线显示。核苷酸残基连续编号。将 Kabat's Ig 分子编号法用于氨基酸残基。在 (B) 中，用字母 (顶部) 对残基的编号是用在前残基的数字加字母，例如 N52 后的 T 的编号是 52A；182 后的 N，N 和 L 的编号分别是 82A，82B 和 82C。

图 3 显示了 (A) 人 SA-1A'c1，鼠 RS7，和 hRS7 V κ 链和 (B) 人 RF-TS3，鼠 RS7，和 hRS7 V H 链的氨基酸序列比对。在 (A) 中，圆点表示 RS7 中与 SA-1A'c1 中相应残基相同的残基。短横线表示引入以帮助比对的缺口。框表示 CDR 区。hRS7 的 N-和 C-末端残基 (下划线标出) 均由所使用的 staging 载体固定。因此，RS7 的相应的末端残基

不能与人序列中的比较。使用 Kabat's 编号方案。在 (B) 中, 圆点显示 RS7 中与 RF-TS3 中的相应残基相同的残基。短横线表示引入以帮助比对的缺口。框表示 CDR 区。hRS7 的 N-和 C-末端残基(下划线标出)均由所使用的 staging 载体固定。因此, RS7 的相应的末端残基不能与人 VH 序列中的比较。

图 4 显示了 (A) 人源化 RS7 V_K 和 (B) 人源化 RS7 V_H 的 DNA 和氨基酸序列。氨基酸序列的粗体和下划线部分表示用 Kabat's 编号方案所确定的 CDR。

图 5 显示 (A) 人源化 RS7 V_K 的轻链 cDNA 和氨基酸序列和人源化 RS7 V_H 的重链 cDNA 和氨基酸序列。氨基酸序列的下划线部分表示用于分泌的前导肽序列。“*”表示终止密码子。

图 6 显示了 mRS7, cRS7 和 hRS7 在竞争性结合检测法中的比较。不同浓度的竞争性 Ab 用于与生物素化 RS7 抗体常量对 Ag 包被的 96-孔 ELISA 板的结合竞争。hRS7 显示出与 RS7 和 cRS7 相当的阻滞活性。

图 7 显示了人源化 RS7 V_K 的轻链 cDNA 和氨基酸序列。氨基酸序列的下划线标出的部分表示用于分泌的前导肽序列。“*”表示终止密码子。赖氨酸残基也用下划线标出。

图 8 显示了人源化 RS7 V_K 的重链 cDNA 和氨基酸序列。氨基酸序列的下划线标出的部分表示用于分泌的前导肽序列。“*”表示终止密码子。赖氨酸残基也用下划线标出。

图 9 显示剩余部分 IMP-R4, IMP-R5 和 IMP-R8 的结构。

图 10 是由于放射性碘化的 hRS7 在 MDA-MB-468 肿瘤模型中的剂量确定法的棒形图。

图 11 提供了表明放射性免疫治疗对乳癌异种移植物在裸鼠中的肿瘤生长的影响的组图。

图 12 是放射性免疫治疗裸鼠中乳癌异种移植物后, 评价毒性的组图。

图 13 是表明相对平均肿瘤体积 (MTV) 的图。

优选实施方案详述

除非另有特指, 术语 “a” 或 “an” 是指 “一个或多个”。

RS7 抗体 (以前被称为 RS7-3G11) 是抗人原发肺鳞状细胞癌的粗

制膜制备物而产生的鼠 IgG₁。参见 Stein 等, *Cancer Res.* 50:1330 (1990), 其全文引入作为参考。RS7 抗体识别肿瘤相关抗原, 其由抗人非细胞肺癌而产生的鼠 MAbs RS7-3G11 所确定。Stein 等披露了识别 46-48 kDa 糖蛋白的 RS7 抗体, 特征为聚簇 13。Stein 等, *Int. J. Cancer Supp.* 8:98-102 (1994)。同样参见, Basu 等, *Int. J. Cancer* 52:472-479 (1995)。根据 3rd 国际肺癌研究协会 (IASLC) 研讨会对肿瘤和分化抗原的建议, 已将该抗原命名为 EGP-1 (上皮糖蛋白-1)。参见, 例如 DeLeij 等, *Int. J. Cancer Supp.*, 8:60-63 (1994)。因此, 如本文所述, RS7 和 EGP-1 抗原具有相同含义。EGP-1 抗原还指现有技术中的 TROP2, 但可能是 EGP-1 和 TROP2 二者的多表位。

流式细胞仪和免疫组织化学染色研究已经显示出 RS7 Mab 可检测多种肿瘤类型上的抗原, 而其仅有限地与正常人组织结合。(Stein 等, (1990), 如上)。RS7 抗体与可被快速内在化的 EGP-1 糖蛋白反应。EGP-1 主要由癌如肺癌, 胃癌, 膀胱癌, 乳癌, 卵巢癌, 子宫癌和前列腺癌表达。使用放射性标记的鼠 RS7 Mab 在动物模型中的定位和治疗研究已经证明了肿瘤靶向和治疗的效能 (Stein 等, (1990), 如上。Stein 等, (1991), 如上)。

更为近来的研究已证明在来自肺, 乳, 膀胱, 卵巢, 子宫, 胃和前列腺的肿瘤中存在 RS7 强染色。参见 Stein 等, *Int. J. Cancer* 55:938 (1993), 将其全文引入作为参考。而且, 该研究中的肺癌病例鳞状细胞癌和腺癌。同前。两种细胞类型均强染色, 显示 RS7 抗体不能从非小细胞肺癌地组织学分类上区分。

如上所述, RS7 Mab 被快速内在化至靶细胞 (Stein 等 (1993), 如上)。RS7 MAbs 的内在化速度常数介于其它两种快速内在化 MAbs 的内在化速度常数之间, 所述其它两种快速内在化已经被证明可用于免疫毒素制备。同前。已有大量报道指出免疫毒素缀合物的内在化是抗肿瘤活性绝对必须的。(PASTAN 等, *Cell* 47: 641 (1986))。药物免疫缀合物的内在化也已经被描述为抗肿瘤效能中的主要因素。

(Yang 等, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:1189 (1988))。因此, RS7 抗原可能是这些需要治疗剂内在化的免疫治疗类型的重要的靶位。

因此, 用 RS7 Mab 的研究显示了抗体表现出某些重要的特性, 其

使其可作为临床诊断和治疗应用的候选。因为 RS7 抗原提供了诊断和治疗的有用的靶位，就需要获得识别 RS7 抗原的表位的 Mab。而且，嵌合，人源化和人 RS7 抗体的有效性是双决定子酶联免疫吸附测定（ELISA）发展的根本，所述测定需要在俩那创样品中检测 RS7 抗原，且是人类体内应用的根本。

为此目的，本发明描述了可结合 RS7 抗原并可用于诊断和治疗方法的嵌合，人源化和人抗体及其片段。人源化抗体和抗体片段已被描述于名为“抗-CD20 抗体和其融合蛋白及使用方法”的，代理人卷号 18733/1073 的美国临时申请，美国临时申请号 60/356,132，美国临时申请 60/416,232 和代理人卷号 18733/1155 中；hMN-14 抗体，如美国申请号 5,874,540 中公开的那些抗体，其是 III 类抗-癌胚抗原抗体（抗-CEA 抗体）；Mu-9 抗体，如美国申请号.10/116,116 公开的那些抗体；AFP 抗体，如美国临时申请 60/399,707 公开的那些抗体；PAM4 抗体，如名为“单克隆抗体 cPAM4”的美国临时申请，代理人卷号 18733/1102 公开的那些抗体；RS7 抗体，如美国临时申请 60/360,229 公开的那些抗体；和 CD22 抗体，如美国专利 5,789,554 和 6,187,287 和美国申请 09/741,843 和 09/988,013 公开的那些抗体，上述全部文件均全文引入此处作为参考。本文所描述的嵌合抗体是一种重组蛋白，其包含含有来源于一种物种的抗体优选是啮齿动物抗体的互补决定区（CDR）的可变区，而抗体分子的恒定区则来源于人抗体。为了兽医学上的应用，嵌合抗体的恒定区可来源于其它物种。人源化抗体是一种重组蛋白，其中将来自一种物种的抗体例如啮齿动物抗体的 CDR 从啮齿动物抗体的重链和可变轻链转移至人重链和轻链可变区。

在一个优选的实施方案中，RS7 抗体是人源化的。因为非-人类单克隆抗体可由人宿主作为外源蛋白而识别，而且重复注射会导致有害的过敏性反应，故鼠 RS7 序列的人源化能降低患者经受的不利免疫应答。对于基于鼠的单克隆抗体，其通常是指人抗-小鼠抗体（HAMA）应答。本发明的另一实施方案是抗-EGF-1 抗体或其片段，其是低于人的灵长类抗-EGP-1 抗体，鼠单克隆抗-EGP-1 抗体（限于兽医应用），嵌合抗-EGP-1 抗体，人抗-EGP-1 抗体，和人源化抗-EGP-1 抗体。优选地，人源化 RS7 抗体或其片段的构架区中的某些人残基被鼠的相似物置换。还优选地，联合来自两个不同人抗体的框架序列而用于 V_H。

抗体分子的恒定区源自人抗体的那些。

本发明另一优选的实施方案是人 RS7 抗体。人抗体是获自已经被“工程化处理”以响应抗原性激发而制备特异性人抗体的转基因鼠的抗体。在该方法中，将人重和轻链基因座的元件导入源自包含内源重链和轻链基因座的靶向断裂的胚胎干细胞系的小鼠品系中。该转基因鼠能合成特异性针对人抗原的人抗体，该小鼠可用于制备分泌人抗体的杂交瘤。Green 等 *Nature Genet.* 7:13 (1994)，Lonberg 等 *Nature* 368:856 (1994) 和 Taylor 等 *Int. Immun.* 6:579 (1994) 描述了从转基因鼠中获得人抗体的方法。完全人抗体还可以用基因或染色体转染法，以及噬菌体显示技术 (phage display technology) 进行构建，所有这些方法均为本领域已知的。例如参见 McCafferty 等, *Nature* 348:552-553 (1990) 从来自未免疫的供者的免疫球蛋白可变区基因库中于体外制备人抗体及其片段。在该方法中，将抗体可变区基因框架内克隆至丝状噬菌体的主要或次要外膜蛋白质基因，并被显示为噬菌体微粒表面上的功能性抗体片段。因为丝状微粒包含噬菌体基因组的单股 DNA 拷贝，基于抗体功能特性的选择还会导致选择选择编码表现出这些特性的抗体的基因。在该方法中，噬菌体模拟了 B 细胞的某些特性。可用多种形式实施噬菌体展现，对其的综述可参见例如 Johnson 和 Chiswell, *Current Opinion in Structural Biology* 3:5564-571 (1993)。

本发明的抗体及其片段优选抵抗来自人原发鳞状细胞肺癌的粗制膜制备物而产生。还优选，RS7 抗体及其片段抵抗来自人卵巢癌细胞系的活细胞的膜制备物而产生。还优选，RS7 抗原由活 Colo 316 细胞提供。在相关静脉中，RS7 抗体可使用 RS7 抗原基本上纯的制剂而获得。基本上纯的蛋白是基本上不含在天然状态下与所述蛋白相伴随的污染性细胞成分的蛋白。如此处所述，术语“RS7 抗体”还包括嵌合、人和人源化 RS7 抗体。

嵌合，人源化和人 RS7 抗体的制备

可采用本领域技术人员已知的方法获得针对特异性抗原的单克隆抗体。例如参见 Kohler 和 Milstein, *Nature* 256:495 (1975)，和 Coligan 等 (eds.)，*CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY*, Vol.1,

2.5.1-2.6.7 页 (John Wiley & Sons 1991) (在下文中 "Coligan")。简言之, RS7 抗原 MAb, 如 RS7 的制备可以通过用包含 RS7 抗原的组合物注射小鼠, 通过取血清样品鉴定抗体制备的存在, 取脾获得 B-淋巴细胞, 融合 B-淋巴细胞和骨髓瘤细胞来制备杂交瘤, 克隆杂交瘤, 选择产生针对 RS7 抗原的抗体的阳性克隆, 培养该产生针对 RS7 抗原的抗体的克隆, 和从杂交瘤培养物中分离 RS7 抗体。

在针对抗原的抗体初始生成后, 可对抗体进行测序并随后用重组技术进行制备。鼠抗体和抗体片段的人源化和嵌合化是本领域技术人员所熟知的。例如将小鼠互补决定区通过从小鼠免疫球蛋白的重和轻可变链将转移至人可变区中, 然后用鼠相似物置换构架区中的人类残基从而制备人源化单克隆抗体。源自人源化单克隆抗体的抗体成分的应用避免了与鼠恒定区免疫原性相关的潜在问题。

本发明的用于和人源化、嵌合或人 RS7 抗体联合治疗的人抗体, 即, 人 EGP-1 MAb 或其它人抗体, 如抗-EGP-2, MUC1-4, CEA, CC49, CSAP, PSMA, PSA, EGFR, A33 和 HER2/neu MAb, 可获自转基因的非人类动物。例如参见 Mendez 等, Nature Genetics, 15:146-156 (1997); 美国专利 5,633,425, 其全文引入此处作为参考。本发明的可用于联合治疗的人抗体还可与选自 Le(y)、Tn、Tag-72、AFP、HCG、HCG- β 、铁蛋白、PAP、EGP-2、组蛋白、细胞角蛋白、腱生蛋白、CanAg、肾癌 G 250、VGFR1、VGFR2 或其组合的抗原反应。例如人抗体可从含有人免疫球蛋白基因座的转基因小鼠中回收。通过灭活内源免疫球蛋白基因和导入人免疫球蛋白基因座将该小鼠体液免疫系统人源化。人免疫球蛋白基因座非常复杂且包含大量的不连续区段, 其总共几乎占人基因组的 0.2%。为确保转基因小鼠能够产生足够抗体库, 必须将大部分人重链和轻链基因座导入小鼠基因组。这要用分步法来完成, 开始要构建含有以种系构型的或者人重链或者轻链的免疫球蛋白基因座酵母人工染色体(YAC)。因为没插入的大小大约是 1 Mb, 故构建 YAC 需要免疫球蛋白基因座重复片段的同源重组。将两种 YAC, 一种含有重链基因座而一种含有轻链基因座, 经由含有 YAC-酵母球芽与小鼠胚胎干细胞的融合而分别导入小鼠。然后将胚胎干细胞克隆显微注射至小鼠囊胚。根据经由其生殖腺传输 YAC 的能力筛选结果得到的嵌合雄性然后将其与鼠抗体制备缺陷的小鼠进行繁殖。培养这两个

转基因品系，一个含有人重链基因座而另一个含有人轻链基因座，产生响应免疫而生成抗体的子代。

克隆鼠免疫球蛋白可变区的一般方法描述于，例如 Orlandi 等 *Proc. Nat'l Acad. Sci USA* 86:3833 (1989) 的公开内容中，其全文引入作为参考。制备人源化 MAbs 的方法描述于，例如 Carter 等，*Proc. Nat'l Acad. Sci USA* 89:4285 (1992)，和 Singer 等 *J. Immunol.* 150:2844 (1992)，Mountain 等 *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 10:1 (1992)，和 Coligan 10.19.1-10.19.11 页，由此将上述每一文件均引入作为参考。

通常，RS7 抗体的 V_K (可变轻链) 和 V_H (可变重链) 序列可通过多种分子克隆方法，如 RT-PCR，5'-RACE 和 cDNA 文库筛选获得。具体地，MAb RS7 的 V_H 和 V_K 基因通过来自杂交瘤细胞的 PCR 扩增分别通过 RT-PCR 和 5'-RACE 而进行克隆，并用 DNA 测序确定其序列。为证实其可靠性，将克隆的 V_L 和 V_H 基因在细胞培养物中作为嵌合 Ab 表达，如 Orlandi 等，(*Proc. Nat'l Acad. Sci USA*, 86:3833 (1989)) 所述，其引入作为参考。根据 V 基因序列，然后设计和构建人源化 RS7 抗体，如 Leung 等 (*Mol. Immunol.*, 32:1413 (1995)) 所述，其引入作为参考。可从任何已知通过一般的分子克隆技术 (Sambrook 等，*Molecular Cloning, A laboratory manual*, 2 DED (1989)) 制备鼠或嵌合 RS7 抗体的杂交瘤系或转染细胞系中制备 cDNA。在一个优选的实施方案中，使用 RS7 杂交瘤系。用于 mAb 的 V_K 序列可使用引物 VK1BACK 和 VK1FOR (Orlandi 等，1989) 或如 Leung 等 (*BioTechniques*, 15:286 (1993)，其引入作为参考) 所描述的扩展引物组进行扩增，而 V_H 序列可使用引物对 VH1BACK/VH1FOR (Orlandi 等，1989 above)，或与 Leung 等 (*Hybridoma*, 13:469 (1994)，将其引入作为参考) 所描述的与鼠 IgG 恒定区退火的引物进行扩增。将包含 10 μ l 第一链 cDNA 产物，10 μ l 10 $\times$ PCR 缓冲液 [500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl (pH 8.3), 15 mM MgCl₂ 和 0.01% (W/V) 明胶] (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT)，250 μ M 各 dNTP，200nM 引物，和 5 单位 Taq DNA 聚合酶 (Perkin Elmer Cetus) 的 PCR 反应混合物实施 30 个 PCR 循环。每个 PCR 循环优选包括 94 $^{\circ}$ C 变性 1 分钟，50 $^{\circ}$ C 退火 1.5 分钟，和 72 $^{\circ}$ C 聚合 1.5 分钟。扩增的 V_K 和 V_H 片段可在 2% 琼脂糖

上纯化 (BioRad, Richmond, CA)。相似地, 可通过长寡核苷酸模板合成和 PCR 扩增联合 (如 Leung 等 (Mol. Immunol, 32:1413 (1995) 所述) 构建人源化 V 基因。

可将 V κ 的 PCR 产物亚克隆至 staging 载体, 如基于 pBR327 的 staging 载体 V κ pBR, 其包含 Ig 启动子, 信号肽序列和便于 V κ PCR 产物的框架内连接方便的限制性位点。可将 V H 的 PCR 产物亚克隆至相似 staging 载体, 如基于 pBluescript 的 V H pBS。包含各 PCR 产物的各克隆可用, 被引入作为参考的 Sanger 等 Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 74:5463 (1977) 的方法进行测序。

本文所述 DNA 序列应被理解为包括所有其等位基因, 突变体和变体, 无论是天然存在的还是诱导的。

含有 V κ 和 V H , 和启动子和信号肽序列的表达盒分别从 V κ pBR 和 V H pBS 剪切, 经双限制性酶切为 HindIII-BamHI 片段。然后将 V κ 和 V H 表达盒分别连接至适宜的表达载体, 如 pKh 和 pGlg 中 (Leung 等, Hybridoma, 13:469 (1994))。可将表达载体共转染至适宜的细胞中, 例如骨髓瘤 Sp2/0-Ag14 (ATCC, VA), 选择潮霉素抗性的集落, 和采用例如 ELISA 检测法, 如下述检测上清液中嵌合抗体或人源化 RS7 MAb 的制备。或者, 可将 V κ 和 V H 表达盒组装至改良的 staging 载体, V κ pBR2 和 V H pBS2 中, 分别剪切为 XbaI/BamHI 和 XhoI/BamHI 片段, 然后亚克隆至单个表达载体, 如 p dHL2 , 如 Gilles 等 (J Immunol.Methods 125:191 (1989) 所述和还可参加 Losman 等, 癌症, 80:2660 (1997)) 而在 SP2/0-AGL4 细胞中表达。适用于本发明的另一载体是 GS 载体, 如 Barnes 等, Cytotechnology 32:109-123 (2000)中所述, 所述载体优选在 NS0 细胞系和 CHO 细胞中表达。Werner 等, Arzneim.-Forsch./Drug Res. 48 (11), Nr. 8, 870-880 (1998) 中描述了其它适宜的哺乳动物表达系统。

然后按下述实施共转染和用 ELISA 检测分泌抗体的克隆。根据被引入作为参考的 Co 等 J Immunol., 148:1149 (1992) 的描述, 可将约 10 μg V κ pKh (轻链表达载体) 和 20 μg V H pGIG (重链表达载体) 通过电穿孔而用于转染 5 $\times 10^6$ SP2/0 骨髓瘤细胞 (BioRad, Richmond, CA)。转染后, 可在 96-孔微量滴定板上于完全 HSFM 培养基 (Life Technologies, Inc., Grand Island, NY) 中以 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO $_2$ 培养

细胞。可在加入终浓度 500 单位/ml 潮霉素的潮霉素选择培养基 (Calbiochem, San Diego, CA) 2 日后开始选择步骤。克隆通常在电穿孔后 2~3 周出现。然后将培养物扩展以用于进一步的分析。

适用的宿主细胞包括微生物的或哺乳动物的宿主细胞。优选的宿主是人细胞系, PER.C6, 其为制备 Mab 而构建, 和其它融合蛋白。因此, 本发明一个优选的实施方案是包含编码抗-EGP-1 MAbs、缀合物、融合蛋白或其片段的 DNA 序列的宿主细胞。PER.C6 细胞 (WO 97/00326) 是通过使用含有在人磷酸甘油酸酯激酶 (PGK) 启动子的控制下 Adserotype 5 (Ad5) E1A 和 E1B 编码序列 (Ad5 nucleotides 459-3510) 的质粒转染原代人胚胎视网膜细胞而产生。E1A 和 E1B 分别是腺病毒早期基因活化蛋白 1A 和 1B。该方法和组合物特别适用于生成发生翻译前修饰的, 例如通过糖基化修饰的所需人重组蛋白的稳定表达。某些特性使得 PER.C6 特别适用于作为重组蛋白制备的宿主, 如 PER.C6 是被完全定性的人细胞系且其已经发展了非常好的实验室操作。而且, PER.C6 可在无血清缺乏任何人或动物来源的蛋白的培养基中以悬浮培养物生长且其生长适合滚瓶, 摇瓶、旋转瓶和生物反应器, 其倍增时间为约 35 小时。最后, E1A 的存在导致上调 CMV 增强子/启动子调控下的基因表达而 E1B 的存在防止了可能由于重组转基因的过表达而增强的 p53-依赖的凋亡。在一个实施方案中, 细胞能够产生比常规哺乳动物细胞系高 2~200 倍的重组蛋白和/或蛋白性物质。

用 ELISA 测试法鉴别分泌嵌合或人源化重链的阳性转染瘤克隆。简言之, 将来自转染瘤培养物的上清样品 (100 μ l) 以三份加入用山羊抗-人 (GAH)-IgG, F(ab')₂ 片段-特异性抗体 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) 预包被的 ELISA 微量滴定板上。滴定板室温下孵育 1 小时。用洗涤缓冲液 (含 0.05% 聚山梨醇酯-20 的 PBS) 洗板三次以除去未结合的蛋白质。将辣根过氧化物酶 (HRP) 缀合的 GAH-IgG, Fc 片段-特异性抗体 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) 加入孔内, (100 μ l 抗体稀释储存液 $\times 10^4$, 用未结合的抗体补充至终浓度 1.0g/ml)。孵育 1 小时后, 通常洗板三次。每孔加入反应液 [100 μ l 含有 167 μ g 邻苯二胺 (OPD) (Sigma, St. Louis, MO), 0.025% 过氧化氢的 PBS]。在黑暗中显色 30 分钟。在每孔中加入 50 μ l 4M HCl 溶液终止反应, 然后用自动化 ELISA 读数仪 (Bio-Tek

instruments, Winooski, VT) 测定 490 nm 处吸光度。然后相对于无关联嵌合抗体标准 (可获自 Scotgen, Ltd., Edinburg, Scotland) 测定结合的嵌合抗体。

抗体可按下述方法从细胞培养基中分离。转染瘤培养物适于无血清培养基。为制备嵌合抗体, 利用 HSF1 在滚瓶中将细胞生长为 500 ml 培养物。将培养物离心使细胞成团, 上清液经 0.2 μ m 膜过滤。使过滤的培养基以 1ml/分的速度通过 A 蛋白柱 (1 $\times$ 3 cm)。然后用约 10 个柱体积的 PBS 洗柱, 用含 10mM EDTA 的 0.1M 甘氨酸的缓冲液 (pH 3.5) 从柱上洗脱蛋白 A 结合的抗体。在 10 μ l 3M Tris (pH 8.6) 的存在下, 搜集 1ml 洗脱级分, 测定 280/260 nm 处吸光度确定蛋白质浓度。将峰值洗脱级分集中, 对 PBS 透析, 用例如 Centricon 30 (Amicon, Beverly, MA) 浓缩蛋白质。用 ELISA 测定抗体浓度, 如前, 用 PBS 将其浓度调整至约 1 mg/ml。在样品中益于加入 0.01% (w/v) 的叠氮化钠作为保存剂。

用于制备 RS7 抗体的引物的核苷酸序列如下述实施例 2 所列。在一个优选的实施方案中, 人源化 RS7 抗体或抗体片段包括鼠 RS7 Mab 的互补决定区 (CDRS) 和人抗体轻链和重链可变区的框架区 (FR) 和人抗体的轻链和重链恒定区, 其中人源化 RS7 的轻链可变区的 CDR 包括含有氨基酸序列 KASQDVSIIVA 的 CDR1; 含有氨基酸序列 SASRYT 的 CDR2; 和含有氨基酸序列 QQHYITPLT 的 CDR3; 而人源化 RS7 Mab 的重链可变区的 CDR 包括含有氨基酸序列 NYGMN 的 CDR1; 含有氨基酸序列 WINTYTGEPTYTDDFKG 的 CDR2 和含有氨基酸序列 GGFGSSYWYFDV 的 CDR3。同样优选的, 人源化抗体轻链和重链可变区的 FR 包括至少一种被鼠 RS7 Mab 的所述相应 FR 置换的氨基酸。

可采用多种已良好建立的方法从杂交瘤培养物中分离和纯化 Mab。所述分离方法包括使用 A 蛋白琼脂糖凝胶的亲和层析, 大小排阻层析和离子交换层析。例如参见 Coligan 2. 7. 1-2. 7. 12 页和 2. 9. 1-2. 9. 3 页。还可参见, METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, VOL. 10, 79-104 页 (The Humana Press, Inc.1992) 中的 Baines 等 "Purification of Immunoglobulin G (IgG)"。

RS7 Mab 可采用本领域技术人员众所周知的多种方法进行特征描述。例如可使用非直接免疫荧光检测, 流式细胞计数分析或 Western

分析鉴别 RS7 MAbs 结合 RS7 抗原的能力。

RS7 抗体片段的制备

本发明涉及 RS7 和 hRS7 抗体片段的用途。识别特异性表位的抗体片段可用已知方法制备。抗体片段是抗体的抗原结合部，如 $F(ab')_2$ ， Fab' ， Fab ， Fv ， sFv 等。其它抗体片段包括，但不限于：通过抗体分子的胃蛋白酶消化制备的 $F(ab)'$ 片段，和可通将 $F(ab)'$ 片段的二硫键还原而制备的 Fab' 片段。这些方法描述于，例如 Goldenberg，美国专利 4,036,945 和 4,331,647 和本文所包含的参考文献中，将所述专利全文引入此处作为参考。同样，参见 Nisonoff 等，*Arch Biochem. Biophys.* 89:230 (1960)；Porter，*Biochem. J* 73:119 (1959)，Edelman 等，*METHODS IN ENZYMOLOGY* Vol. 1, 422 页 (Academic Press 1967)，和 Coligan 2.8.1-2.8.10 和 2.10.-2.10.4 页。或者，可构建 Fab' 表达文库 (Huse 等，1989，*Science*，246:1274-1281) 从而可以快速且简便地鉴别具有所需特异性的单克隆 Fab' 片段。本发明包括抗体和抗体片段。

单链 Fv 分子 ($scFv$) 包括 VL 区和 VH 区。VL 和 VH 区联合形成靶位结合位点。这两个区还可通过肽连接子 (L) 而共价相连。 $scFv$ 分子可被表示为或者 VL-L-VH 若 VL 区是 $scFv$ 分子的 N-末端部分，或者 VH-L-VL 若 VH 区是 $scFv$ 分子的 N-末端部分。制备 $scFv$ 分子和设计适用的肽连接子的方法描述于美国专利 4,704,692，美国专利号 4,946,778，R. Raag 和 M. Whitlow，"Single Chain Fvs." *FASEB Vol* 9:73-80 (1995) 和 R. E. Bird 和 B. W. Walker，"Single Chain Antibody Variable Regions," *TIBTECH*, Vol 9:132-137 (1991) 中。这些参考文件全文引入此处作为参考。

可通过全长抗体的蛋白水解作用或编码片段的 DNA 在大肠杆菌 (*E. coli*) 中或另一宿主中的表达来制备抗体片段。可采用常规方法用胃蛋白酶或木瓜蛋白酶消化全长抗体而获得抗体片段。例如抗体片段可通过用胃蛋白酶酶法裂解抗体而提供表示为 $F(ab')_2$ 的 5S 片段而制备。该片段还可利用巯基还原剂，和可任选地由二硫键的裂解而产生的巯基的阻断剂进一步裂解，以产生 3.5S Fab' 单价片段。或者，使用木瓜蛋白酶的酶性裂解可直接产生两个单价 Fab 片段和 Fc 片

段。这些方法描述于, 例如 Goldenberg, 美国专利 4, 036, 945 和 4, 331, 647, 和本文包括的参考文件, 所述专利全文引入此处作为参考。并且, 参见 Nisonoff 等, Arch Biochem. Biophys. 89: 230(1960); Porter, Biochem. J. 73: 119 (1959), EDELMAN 等, METHODS IN ENZYMOLOGY Vol. 1, 422 页 (Academic Press 1967), 和 Coligan 2.8.1-2.8.10 和 2.10.-2.10.4 页。

抗体片段的另一形式是编码单个互补决定区 (CDR) 的肽。CDR 是抗体的可变区的片段, 其与抗体结合的表位在结构上互补且比可变区的其它部分更具可变性。因此, CDR 有时是指高可变区。可变区包括三个 CDR。可通过构建编码所需要抗体的 CDR 的基因而获得 CDR 肽。例如可通过采用多聚酶链反应从产生抗体的细胞的 RNA 合成可变区制备所述基因。例如参见 Larrick 等, Methods: A Companion to Methods in Enzymology 2: 106 (1991); Courtenay-Luck, "Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies", MONOCLONAL ANTIBODIES: PRODUCTION ENGINEERING AND CLINICAL APPLICATION 中, Ritter 等 (eds.), 166-179 页 (Cambridge University Press 1995); 和 Ward 等, "Genetic Manipulation and Expression of Antibodies", MONOCLONAL ANTIBODIES: PRODUCTION, ENGINEERING AND CLINICAL APPLICATIONS 中, Birch 等, (eds.), 137-185 页 (Wiley-Liss, Inc. 1995)。

其它裂解抗体的方法, 如分离重链以便形成单价轻链-重链片段, 片段的进一步裂解, 或其它酶, 化学或遗传技术也是可以使用的, 只要片段能与被完整抗体识别的抗原结合。

嵌合、人源化和人 RS7 抗体融合蛋白的制备

抗体融合蛋白及其片段可通过多种常规方法制备, 所述方法包括两个官能团间的戊二醛连接直至更特别的连接。抗体和/或抗体片段优选彼此直接或经由连接部分, 经由抗体或片段上的一个或多个官能团例如胺基、羧基、苯基、巯基或羟基而共价结合。可以使用戊二醛以外的多种常规连接剂, 例如二异氰酸酯, 二异硫氰酸酯, 二(羟基琥珀酰亚胺)酯, 碳二亚胺, 马来酰亚胺羟基琥珀酰亚胺酯等。

制备嵌合, 人源化和人 RS7 抗体融合蛋白的简单方法是将抗体或

片段在存在戊二醛的条件下混合以形成抗体融合蛋白。初始希夫碱连接基团可通过例如硼氢化物还原成仲胺而被稳定。二异氰酸酯或碳二亚胺可用于代替戊二醛而作为非位点特异性连接子。抗体融合蛋白被预期含有高于 Mab 的结合特异性，因为融合蛋白包括结合 RS7 抗原的至少两种表位的部分。因此，抗体融合蛋白是 RS7 抗原结合蛋白用于治疗的优选形式。

在本文中，抗体融合蛋白包括至少两种嵌合、人源化或人 RS7 Mab，或其片段，其中至少两种 Mab 或片段与 RS7 抗原的不同表位结合或抗 RS7 表位和完全不同的抗原的表位。例如双特异性 RS7 抗体融合蛋白可包括 CEA 抗体或其片段和 RS7 Mab 或其片段。所述双特异性 RS7 抗体融合蛋白可以，例如通过从 CEA 获得 $F(ab')_2$ 片段如上述而得以制备。抗体 $F(ab')_2$ 片段的链间二硫键被半胱氨酸轻微还原，谨慎地以便避免轻-重链连接，从而形成 $Fab'-SH$ 片段。巯基被过量二马来酰亚胺连接剂活化（1,1'-（亚甲基二-4,1-亚苯基）双马来酰亚胺）。将 RS7 Mab 转变为 $Fab'-SH$ 然后与活化的 CEA $Fab'-SH$ 片段反应从而获得双特异性 RS7 抗体融合蛋白。

多特异性 RS7 抗体融合蛋白可通过将 RS7 抗原结合部分加至双特异性嵌合、人源化或人 RS7 抗体融合蛋白获得。例如双特异性抗体融合蛋白可与 2-亚氨基硫杂环戊烷反应而导入一个或多个用于将双特异性融合蛋白偶连至第三个 RS7 抗原 Mab 或片段的巯基，其中使用上述双马来酰亚胺活化方法。这些用于制备抗体复合物的技术是本领域技术人员熟知的。例如参见美国专利 4,925,648，其全文引入作为参考。

双特异性抗体可通过多种常规方法制备，例如二硫化物裂解和完整 IgG 混合物的重建或，优选 $F(ab')_2$ 片段，融合多于一个杂交瘤从而形成能产生具有多于一种特异性的抗体的多瘤，和通过遗传工程。已经通过对来自不同抗体还原裂解的 Fab' 片段的氧化裂解而制备双特异性抗体融合蛋白。其可方便的通过如下方法实施，通过混合两种不同的用胃蛋白酶消化两种不同抗体而制备的 $F(ab')_2$ 片段，还原裂解从而形成 Fab' 片段的混合物，然后氧化重建二硫键从而制备包括含有特异性针对每个原始表位的 Fab' 部分的双特异性抗体融合蛋白的 $F(ab')_2$ 片段的混合物。制备抗体融合蛋白的一般方法可见于，例如 Nisonoff 等，Arch Biochem. Biophys. 93:470 (1961)，Hammering

等, J. Exp. Med. 128: 1461 (1968), 和美国专利 4, 331, 647 中。本发明涉及包含至少一种第一抗-EGP-1 MAbs 或其片段和至少一种除外本发明的抗-EGP-1 MAbs 或其片段的第二 MAbs 或其片段的抗体融合蛋白或其片段。

通过使用异双功能连接剂如马来酰亚胺羟基琥珀酸亚胺酯可实现高选择性连接。酯和抗体或片段的反应将在抗体或片段衍生胺基, 然后将该衍生物与, 例如抗体 Fab 片段具有游离巯基(或, 采用例如添加了巯基的较大片段或完整抗体的 Traut 氏试剂)反应。所述连接剂不太可能在相同抗体内交联基团并提供了连接的选择性。

将抗体或片段在远离抗原结合位点的位点连接是有益的。其可通过, 例如连接至裂解的链内巯基而实施, 如上述。另一方法包括将具有氧化糖部分的抗体与具有至少一个游离胺官能团的另一抗体反应。这形成了希夫碱(亚胺)键, 其优选通过还原成仲胺, 例如通过硼氢化物还原, 形成最终的缀合物而稳定。对于小分子, 所述位点特异性连接描述于美国专利 4, 671, 958 中, 而对大附加物则见美国专利 4, 699, 784-引入作为参考。

具有长度多于 12 个氨基酸残基的连接子(例如 15-或 18-残基连接子)的 ScFv 能产生同链上 VH 和 VL 区间的相互作用而通常形成单体、二聚体(称为双抗体)和少量高分子量多聚物的混合物(Kortt 等, Eur. J. Biochem. (1994) 221:151-157)。然而, 具有长度多于 5 个或少于 5 个氨基酸残基的连接子的 ScFv, 阻止了同链上 VH 和 VL 区的分子内配对, 强制不同链上 VH 和 VL 区的配对。3~12 个残基的连接子主要形成二聚体(Atwell 等, Protein Engineering (1999) 12:597-604)。用 0~2 个残基的连接子, 会形成 scFv 的三聚体(称为三抗体), 四聚体(称为四抗体)或更高的低聚体; 然而, 低聚反应的精确模式显示出除了连接子长度以外还依赖组成和 V-区的方向。例如用 0 个残基的连接子, 抗-神经氨酸酶抗体 NC10 的 scFv 主要形成三聚体(VH 至 VL 方向)或四聚体(VL 至 VH 方向)(Dolezal 等, Protein Engineering (2000) 13:565-574)。对于用 1-和 2-残基连接子从 NC10 构建 scFv, VH 至 VL 方向主要形成二聚体(Atwell 等, Protein Engineering (1999) 12:597-604); 相反地, VL 至 VH 方向形成四聚体, 三聚体, 二聚体和更高分子量多聚体的混合物(Dolezal

等, Protein Engineering (2000) 13:565-574)。对于抗-CD19 抗体 HD37 以 VH~VL 方向构建 scFv, 0-残基连接子只形成三聚体而 1-残基连接子只形成四聚体 (Le Gall 等, FEBS Letters (1999) 453:164-168)。

本发明的 RS7 抗体及其片段还可用于制备抗原-特异性双抗体, 三抗体和四抗体, 其是多价的但具有单特异性。两个或多个 scFv 分子的非共价联合可形成功能性双抗体, 三抗体和四抗体。单特异性双抗体相同 scFv 的同型二聚体, 其中每个 scFv 包括来自选择的抗体的 VH 区, 所述选择的抗体通过短连接子而与相同抗体相连。二体是通过非共价联合两个 scFv 形成的二价二聚体, 产生两个 Fv 结合位点。三体来自三个 scFv 的三价三聚体的形成, 产生三个结合位点, 而四体来自四个 scFvs 的四价四聚体, 产生四个结合位点。某些单特异性二体是通过使用包含重组基因构建体的表达载体而制备的, 所述重组基因构建体包含 V_{H1} -连接子- V_{L1} 。参见 Holliger 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993); Atwell 等, Molecular Immunology 33:1301-1302 (1996); Holliger 等, Nature Biotechnology 15:632-631 (1997); Helfrich 等, Int. J. Cancer 76:232-239 (1998); Kipriyanov 等, Int. J. Cancer 77:763-772 (1998); Holliger 等, Cancer Research 59:2909-2916 (1999)。构建 scFVs 的方法公开于 US-4,946,778 (1990) 和 US-5,132,405 (1992) 中。根据 scFv 而制备多价, 单特异性结合蛋白的方法公开于 US-5,837,242 (1998), US-5,844,094 (1998) 和 WO-98/44001 (1998) 中。本发明的优选实施方案是包含一个或多个具有对 EGP-1 靶抗原亲和力的抗原结合位点和一个或多个具有对半抗原分子亲和力的半抗原结合位点的多价, 多特异性抗体或其片段。

测定抗体结合亲和力

由此分离的 mRS7, cRS7 和 hRS7 抗体的相对结合亲和力可通过直接放射免疫法测定。RS7 可用 ^{131}I 或 ^{125}I 以氯胺-T 法进行标记 (例如参见 Greenwood 等, Biochem. J., 89:123 (1963), 其引入作为参考)。通常将碘化抗体的比活调整至约 $10\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ 。未标记的和标记的抗体用反应培养基 (添加了 1% 马血清和 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 庆大霉素的 HSFM)

稀释至适宜浓度。将适宜浓度的标记的和未标记的抗体一起加入反应管，总体积为 100 μ l。取样 ME180 细胞（人颈癌细胞系）并测定细胞浓度。离心培养物然后收集于反应培养基中洗涤一次的细胞，然后在反应培养基中混旋至终浓度约 10^7 细胞/ml。所有步骤均在 4℃ 冷条件下实施。将 100 μ l 细胞悬液加入反应管。4℃ 冷条件下实施反应 2 小时，期间定期轻微震荡反应管以便使细胞重悬。反应期后，每管加入 5 ml 洗涤缓冲液（含有 1% BSA 的 PBS）。离心悬液然后用 5ml 洗涤缓冲液第二次洗涤细胞片状沉淀物。离心后，在 γ 计数器（Minaxi, Packard Instruments, Sterling, Va.）中计数残留在细胞片状沉淀物中的残留放射性的量。

表达载体

表达载体是包含在宿主细胞中表达的基因的 DNA 分子。通常，将基因表达置于包括组成型或可诱导启动子，组织-特异性调节元件和增强子的特定调节元件的调控之下。所述基因被称为“操作性连接于”调节元件。启动子是引导结果基因转录的 DNA 序列。结构基因是转录成信使 RNA（mRNA），后者然后翻译成特定多肽的特征性氨基酸序列的 DNA 序列。典型地，启动子位于基因的 5' 区，近似于结构基因的转录起始位点。如果启动子是一个可诱导启动子，那么响应诱导剂转录速率增加。相反，如果启动子是一个组成型启动子，则转录速率不受诱导剂的调控。增强子是一种 DNA 调节元件，其可提高转录效率，而不论增强子相对于转录起始位点的距离或方向如何。

分离的 DNA 分子是未整合至生物体的基因组 DNA 中的 DNA 片段。例如克隆的 RS7 抗原基因是从哺乳动物细胞基因组 DNA 中分离的 DNA 片段。分离的 DNA 分子的另一实例是未整合至生物体的基因组 DNA 中的化学合成 DNA 分子。互补 DNA（cDNA）是通过酶逆转录酶从 mRNA 模板形成的单链 DNA 分子。通常，与 mRNA 的部分互补的引物用于启动反转录。本领域技术人员还使用术语“cDNA”来指由所述单链 DNA 分子和其互补 DNA 链组成的双链 DNA 分子。

克隆化载体载体是一种 DNA 分子，如质粒、粘性质粒或噬菌体，其具有在宿主细胞中自主复制的能力。克隆化载体典型地包含一个或少数限制性内切酶识别位点，在该识别位点，外源性 DNA 序列可以可

确定的方式插入而不失去载体的基本生物功能，还包含一个标记基因，其适用于鉴别和选择用克隆化载体转化的细胞。标记基因典型地包括提供四环素抗性或氯苄西林抗性的基因。重组宿主可以是含有克隆化载体或表达载体地任何原核或真核细胞。该术语的意义还包括经基因工程而使宿主细胞的染色体或基因组中包含克隆化基因的原核或真核细胞。术语表达是指基因产物的生物合成。例如在结构基因的情况下，表达涉及结构基因转录为 mRNA 和 mRNA 翻译为一个或多个多肽。

人源化、人和嵌合 RS7 抗体在治疗和诊断中的用途

本发明涉及一种诊断或治疗个体中恶性肿瘤的方法，包括对个体给予治疗有效量的包含 EGP-1 MAb 或其片段或抗体融合蛋白或其片段的治疗缀合物，其中 EGP-1 MAb 或其片段或抗体融合蛋白或其片段与至少一种治疗剂结合并随后在药学上适用的赋形剂中配制。其还预期了未缀合的（裸）EGP-1 MAb 或其它抗原-结合部分的融合构建体还可用于治疗表达 EGP-1 的癌细胞。这些未结合的抗体可方便地与其它治疗模式，如化疗，放疗和/或免疫治疗，或一起或与多种次序和程序联合。还优选的是一种诊断或治疗癌症的方法，包含：对此需要的个体给予包含一个或多个针对 EGP-1 抗原的抗原结合位点和一个或多个半抗原结合位点的多价，多特异性抗体或其片段，等待足够长的时间以便使非结合蛋白的量从个体血流中清除；然后对所述个体给予包含诊断剂、治疗剂或其组合，与所述抗体的结合位点结合的载体分子。在一个优选的实施方案中，癌症是肺癌、乳癌、头颈癌、卵巢癌、前列腺癌、膀胱癌或结肠癌。

用于制备单克隆抗体（MAb）的杂交瘤技术已经通过了一种用于制备能定位或杀死癌细胞的分子探针的方法。使用放射性标记的 MAb 的肿瘤显像技术已经被用于描述多种恶性肿瘤中的癌浸润。在实验动物和人类中，抗体和其它靶向抗体已被用于在多种表达癌胚的肿瘤中癌胚抗原的放射免疫测定，以及肿瘤如黑素瘤，结肠癌和乳癌。Goldenberg 等，Cancer Res. 40:2984 (1980)；Hwang 等，Cancer Res. 45:4150 (1985)；Zalcberg 等，J. Nat'l. Cancer Inst. 71:801 (1983)；Colcher 等，Cancer Res. 43:736 (1983)；(Larson 等，J. Nucl. Med. 24:123 (1983)；DeLand 等，Cancer Res. 40:3046 (1980)；Epenetos 等，Lancet 2:999 (1982)。

MAb 在体外诊断中的用途是众所周知的。例如参见 Carlsson 等, Bio/Technology 7 (6):567 (1989)。例如 MAb 可用于检测生物样品组织中肿瘤相关抗原的存在。MAb 还可采用如放射性免疫测试法, 酶联免疫吸附测试法和荧光免疫测试法的技术而用于检测临床液体样品中肿瘤相关抗原的量。

肿瘤-靶向 MAb 和毒素的缀合物可用于选择性在体内杀死癌细胞 (Spalding, Bio/Technology 9 (8):701 (1991); Goldenberg, Scientific American Science & Medicine 1 (1):64 (1994))。例如实验动物模型中的治疗研究已经证实了携带细胞毒性放射性核素的抗体的抗-肿瘤活性。(Goldenberg 等, Cancer Res. 41:4354 (1981), Cheung 等, J. Nat'l Cancer Inst. 77:739 (1986), 和 Senekowitsch 等, J. Nucl. Med. 30:531 (1989))。还参见 Stein 等, Antibody Immunoconj. Radiopharm. 4:703 (1991), 其全文引入作为参考。而且, 已经开始关于治疗淋巴瘤, 黑素瘤, 和其它恶性肿瘤的使用某些该 Mabs 的 I 期治疗试验。例如参见 DeNardo 等, Int. J. Cancer Suppl. 3:96 (1988), 和 Goldenberg 等, J. Clin. Oncol. 9:548 (1991)。

人源化, 嵌合和完整人抗体及其片段适用于诊断方法和治疗方法中。因此, 本发明包括将诊断剂或治疗剂, 或其组合递送至靶位的方法, 包括 (i) 提供包括抗-EGP-1 抗体的组合物和 (ii) 对此需要的个体给予诊断性或治疗性抗体缀合物。优选地, 将本发明的嵌合, 人源化和完整人类 RS7 抗体及其片段用于治疗恶性肿瘤的方法中。

本文还描述了靶向癌细胞的诊断缀合物或治疗缀合物, 其包含含有可与癌细胞结合的抗-EGP-1 MAb 或其片段或抗体融合蛋白或其片段的抗体成分, 其中抗体成分与至少一种诊断剂或至少一种治疗剂结合。优选地, 诊断缀合物至少包括光活化性诊断剂或 MRI 造影剂。更优选地, 诊断剂是能量为 60~4,000 keV 的放射性标记物。

用于治疗组合物包含至少一种单独裸或结合的人源化、嵌合或人 RS7 抗体, 或与本发明的其它裸或结合的人源化, 嵌合, 人类或其它抗体联合, 或与本文未公开的其它裸或结合的人源化、嵌合或人抗体联合。本发明还包括将结合的或裸抗体与不与抗-EGP-1 抗体结合的治疗剂如免疫调节剂, 或诊断剂一起给药。针对相同或不同的表位或

抗原的裸或结合的抗体还可与一种或多种本发明的抗体联合。

因此，本发明涉及单独施用抗-EGP-1 抗体及其片段，作为裸抗体或抗体片段，或作为多元治疗的施用。优选地，抗体是人源化、嵌合或完整人 RS7 抗体或其片段。部分的多元治疗还包括增加了以裸抗体，融合蛋白，或免疫缀合物的形式施用其它抗体的使用裸抗-EGP-1 抗体的免疫治疗。例如人源化，嵌合或完整人 RS7 抗体 可与另一裸人源化，嵌合 RS7 或其它抗体，或与同位素、一个或多个化疗剂、细胞因子、毒素或其组合结合的人源化，嵌合 RS7 或其它抗体位素联合。例如本发明预期了裸或结合的 EGP-1 或 RS7 抗体或其片段在其它实体肿瘤/癌相关的抗体如抗-EGP-2, CEA, CSAp, MUC1-4, EGFR, HER2/neu, PSA, CC49 (抗-Tag72 抗体) 和 PSMA 抗体的施用之前，与之联合或之后的治疗。这些实体癌抗体可以是裸或与尤其，药物、酶、激素、毒素，同位素或免疫调节剂缀合的。人源化，嵌合或完整人 RS7 抗体和毒素的融合蛋白或也可用于本发明。可构建多种不同的抗体组合，或作为裸抗体或作为部分裸和部分与治疗剂或免疫调节剂结合的。或者，不同的裸抗体组合可用于与其它治疗剂，如细胞毒类药物或与放射联合施用。所述抗体的组合还可用，有利地，如本领域已知的反义寡核苷酸制备。照这样，治疗缀合物还包括优选可用于对 B-细胞恶性肿瘤的抗癌基因和致癌基因产物的寡核苷酸，尤其是反义寡核苷酸。例如抑制 bcl-2 表达的反义分子，其被描述于美国 5,734,033(Reed)，将其全文引入作为参考，其也缀合于或形成抗体融合蛋白的治疗剂部分或与本发明的人源化 RS7 抗体一起施用。

本文所描述的连于诊断剂或治疗剂的单特异性结合蛋白的直接靶向 RS7 阳性肿瘤。单特异性分子选择性结合靶定抗原并且随着分子上结合位点数目的增加，对靶细胞亲和力就增加并在所需位置观察到更长的停留时间。而且，非-抗原结合的分子可快速从体内清除而将正常组织暴露量最小化。多特异性结合蛋白的使用为随后的诊断剂或治疗剂的特异性递送预靶定了 RS7 阳性肿瘤。药剂由含有肽的琥珀酰甘氨酸组胺 (HSG) 携带。名为 679 (IgG1, K) 鼠单克隆抗体以高亲和力与含有三肽部分 HSG 结合 (Morel 等, Molecular immunology, 27, 995-1000, 1990)。679 MAbs 可以和可结合 HSG 和靶抗原的 hRS7 结合而形成双特异性结合蛋白。也可使用选择性半抗原。这些结合蛋白选

择性地与靶定抗原结合以便产生增高的亲和力和在所需位置上较长的停留时间。而且，非-抗原结合的二抗体可从体内快速地清除而将正常组织暴露量最小化。

RS7 抗体及其片段可用于治疗哺乳动物病症如癌症。癌症包括，但不限于肺癌、乳癌、膀胱癌、卵巢癌、前列腺癌和结肠癌症。

根据本发明将诊断剂或治疗剂递送至靶位用于诊断或治疗包括提供含有诊断剂或治疗剂的抗-EGP-1 抗体或其片段并将结合蛋白给予有此需要的个体。诊断还需要采用已知技术检测结合蛋白的步骤。

本发明的抗体及其片段和诊断剂或治疗剂施用可采用静脉内、动脉内、腹膜内、肌内、皮下、胸膜内、鞘内、经区域性导管的输注或直接伤口内注射施用于哺乳动物。当注射施用结合蛋白时，可以连续输注或单次或多次快速浓注。用于治疗， $20 \sim 800 \text{ mg/m}^2$ 的剂量是适宜的，优选 $100 \sim 500 \text{ mg/m}^2$ ，而同量低剂量为诊断成像推荐的，如 $0.5 \text{ mg} \sim 100 \text{ mg/患者}$ 。所述剂量可按不同的频率重复，这依赖于临床情况和患者的耐受程度。

抗体和诊断剂或治疗剂可作为试剂盒在药学可用的载体中，优选磷酸盐缓冲生理盐水（PBS）以生理 pH 和浓度而提供给人类或哺乳动物治疗和诊断用途。制剂优选是无菌的，特别是如果其意在用于人类时。所述试剂盒的可选的组分包括稳定剂，缓冲液，标记剂，放射性同位素，顺磁性化合物，用于增强清除率的第二抗体和常规的注射器，柱，瓶等。

裸抗体治疗

治疗有效量的裸嵌合，人源化和完整人 RS7 抗体，或其片段，可在药学可用的赋形剂中配制。裸嵌合，人源化和完整人 RS7 抗体的效能可通过对这些裸抗体补充一种或多种其它裸抗体，一种或多种嵌合，人源化和完整人 RS7 抗体与如药物，毒素，免疫调节剂、激素、生长因子、酶、寡核苷酸或治疗性放射性核素的治疗剂缀合的免疫缀合物，或一种或多种包含药物、毒素、免疫调节剂、激素、生长因子、酶、寡核苷酸或治疗性放射性核素的治疗剂，与 RS7 抗体或其片段同时或次序或根据处方剂量方案施用，而得以增强。

在一个优选的实施方案中，本发明的裸或结合的 RS7 抗体与至少

一种癌症药物联合。所述联合治疗能提高药物或需要的较低药物剂量的效能。例如测定 Dox-RS7 和 2P-Dox-RS7 分别对肺癌细胞系, Ca1u3, 和两种乳癌细胞系, MDA468 和 T47D 的 IC_{50} 值。Ca1u3 和 T47D 细胞具有 EGP-1 抗原阳性而具有 CEA 抗原阴性, 而 MDA468 对 EGP-1 和 CEA 抗原均是阳性的。结果显示 Dox-RS7 的 IC_{50} 值是 $0.04\mu\text{g/ml}$ 而 2P-Dox-RS7 的 IC_{50} 值是 $0.023\mu\text{g/ml}$ 。因此, 将本发明的裸、人类、人源化或嵌合抗-EGP-1 抗体或片段与特定药物, 如 2P-Dox 缀合可帮助克服多药物抗性。但抗体与特定药物联合时, 如上述, 其也是可能的。

RS7 免疫缀合物

本发明还涉及人源化, 嵌合和人 RS7 抗体及其片段用于治疗的用途。免疫治疗的目的是对靶细胞递送细胞毒性剂量的放射、毒素、细胞因子、酶、或激素或药物, 同时要将非靶位组织的暴露量最小化。本发明的 RS7 抗原结合蛋白可用于治疗多种肿瘤, 如肺, 乳腺, 膀胱, 卵巢, 子宫, 胃和前列腺的肿瘤。

本发明的任何抗体或抗体融合蛋白及其片段都可以和一种或多种治疗剂或诊断剂缀合。通常, 一种治疗剂或诊断剂与每种抗体或抗体片段结合而超过一种治疗剂或诊断剂可与相同的抗体或抗体片段缀合。如果 Fc 区不存在(例如当用作免疫缀合物抗体成分的抗体是抗体片段时), 可能会将糖部分引入全长抗体或抗体片段的轻链可变区中。例如参见 Leung 等, R Immunol. 154:5919 (1995); Hansen 等, 美国专利 5, 443, 953 (1995), Leung 等, 美国专利 6, 254, 868, 其均全文引入此处作为参考。

工程化处理的糖部分可用于缀合治疗剂或诊断剂。将肽经由抗体糖部分而与抗体成分缀合的方法是本领域技术人员熟知的。例如参见 Shih 等, Int. J. Cancer 41:832 (1988); Shih 等, Int. J. Cancer 46:1101 (1990); 和 Shih 等, 美国专利 5, 057, 313, 其均全文引入此处作为参考。一般方法包括将含有氧化糖部分的抗体成分与含有至少一种游离胺官能团的载体聚合物反应然后加载多种肽。该反应形成了希夫碱(亚胺)键, 其可通过还原成仲胺形成最终的缀合物而稳定。且, 可将抗体与螯合剂如 DTPA(如 Mx-DTPA)、DOTA、TETA 或 NOTA 缀合。

本发明的抗体融合蛋白包括两种或多种抗体或其片段且构成该融

合蛋白的每种抗体或片段可包含治疗剂或诊断剂。此外，一种或多种抗体融合蛋白的抗体或片段可含有多于一种的缀合的治疗剂或诊断剂。此外，治疗剂无须相同而可以是不同的治疗剂，例如可将药物和放射性同位素与相同的融合蛋白结合。特别地，IgG 可以用 ^{131}I 放射性标记的并结合至药物。 ^{131}I 可被掺至 IgG 的酪氨酸和与 IgG 赖氨酸的 ϵ 氨基连接的药物。治疗剂和诊断剂均还可与还原的巯基结合和与糖侧链结合。

多种诊断和治疗试剂可方便地与本发明的抗体结合。此处引用的治疗剂是也可用于与上述裸抗体分开施用的那些试剂。治疗剂包括，例如化学治疗药物如长春花生物碱，蒽环类抗生素，表鬼白毒素，紫杉烷类，抗代谢物，烷化剂，抗生素，Cox-2 抑制剂，抗有丝分裂物，抗血管生成剂和调亡剂，特别是阿霉素，甲氨蝶呤，紫杉醇，CPT-11，喜树碱和来自这些及其它类抗癌药等的其它药物，甲胍衍生物，肾上腺皮质抑制剂，拮抗物，内皮生长抑素，紫杉醇等。

其它适用于制备免疫缀合物和抗体融合蛋白癌症化学治疗药物包括氮芥类，氮丙啶衍生物，烷基磺酸酯类，亚硝基脲类，三氮烯类，叶酸类似物，蒽环类抗生素，紫杉烷类药，COX-2 抑制剂，嘧啶类似物，嘌呤类似物，铂配位络合物，激素，酪氨酸激酶抑制剂如抑制 EGF-受体酪氨酸激酶，BCR ABL 酪氨酸激酶或 VEGF-体酪氨酸激酶等的那些。适用的化学治疗剂描述于 REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 19TH Ed. (Mack Publishing Co. 1995)，在 GOODMAN 和 GILMAN'S THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS, 7th Ed. 中 (MacMillan Publishing Co. 1985) 中以及这些出版物的修订版。其它适宜的化学治疗剂，如实验药物，是本领域技术人员已知的。

还可将毒素，如假单胞菌外毒素复合于或形成本发明的 RS7 和 hRS7 抗体的免疫缀合物的治疗剂部分。其它适用于制备所述缀合物或其它融合蛋白的毒素包括蓖麻毒蛋白、相思豆毒素、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、白树毒素、白喉毒素、假单胞菌外毒素和假单胞菌内毒素。例如参见 Pastan 等 CELL 47: 641(1986), 和 Goldenberg, CA-A Cancer Journal For Clinicians 44: 43 (1994)。

适用于本发明的其它毒素是本领域技术人员已知的并被描述于美

国专利 6,077,499 中,所述美国专利全文引入作为参考。

还可将免疫调节剂,如细胞因子结合于或形成 EGP-1, RS7 和 hRS7 免疫缀合物的治疗剂部分,或不与本发明的嵌合、人源化或人 RS7 抗体或其片段结合而施用。如本文所使用的,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,如白细胞介素(例如白细胞介素-1(IL-1)、IL-2、IL-3、IL-6、IL-10、IL-12、IL-18 和 IL-21),集落刺激因子(例如粒细胞-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(例如干扰素- α 、- β 和- γ),促红细胞生成素、促血小板生成素或其组合。适宜的免疫调节剂部分的实例包括 IL-2、IL-3、IL-6、IL-10、IL-12、IL-18、IL-21,及其组合,和干扰素- γ , TNF- α 等。或者,个体可接受裸 EGP-1 或 RS7 抗体和单独施用的细胞因子,其可在施用裸 RS7 抗体之前、同时或之后进行施用。如上所述,RS7 抗体还可与免疫调节剂结合。免疫调节剂还可以与含有可与不同抗原结合的一个或多个抗体的杂合抗体结合。

治疗剂或诊断剂可通过二硫键的形成在还原抗体成分的铰链区连接。作为一种选择,还可利用异双官能交联剂,如 N-琥珀酰 3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯(SPDP)将所述肽合抗体连接。Yu 等, Int. J. Cancer., 56:244 (1994)。用于所述结合的一般方法是本领域众所周知的。例如参见 Wong, CHEMISTRY OF PROTEIN CONJUGATION AND CROSS-LINKING (CRC Press 1991); Upeslakis 等, "Modification of Antibodies by Chemical Methods", 在 MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND APPLICATIONS, Birch 等 (eds.) 中, 187-230 页 (Wiley-Liss, Inc. 1995); Price, "Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies, MONOCLONAL ANTIBODIES: PRODUCTION, ENGINEERING AND CLINICAL APPLICATION 中, Ritter 等 (eds.) 中, 60-84 页 (Cambridge University Press 1995)。或者,治疗剂或诊断剂可经由抗体 Fc 区中的糖部分进行结合。糖基团可用于增加肽与巯基结合的相同肽的加载,或糖基团可用于结合不同的肽。

此外,放射性标记的抗体,免疫缀合物,或其片段可包括用于诊断性影像学的 γ 放射性同位素或正电子发射体。适用的放射性同位素,

特别是能量为 25~4,000 keV, 包括 ^{131}I , ^{123}I , ^{124}I , ^{86}Y , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, $^{94\text{m}}\text{Tc}$, ^{18}F , ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{76}Br 等。例如参见名为 "Labeling Targeting Agents with Gallium-68" 发明人为 G. L. Griffiths 和 W. J. McBride 的美国专利申请 (美国临时申请号 60/342, 104), 其公开了为了成像目的的正电子发射体, 如 ^{18}F , ^{68}Ga , $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 等, 所述申请全文引入作为参考。优选地, 诊断性和治疗性放射性核素的能量为 25-4,000 keV。其它适用的放射性核素包括 ^{90}Y , ^{111}In , ^{125}I , ^3H , ^{35}S , ^{14}C , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{189}Re , ^{177}Lu , ^{67}Cu , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{211}At , ^{198}Au , ^{224}Ac , ^{126}I , ^{133}I , ^{77}Br , $^{113\text{m}}\text{In}$, ^{95}Ru , ^{97}Ru , ^{103}Ru , ^{105}Ru , ^{107}Hg , ^{203}Hg , $^{94\text{m}}\text{Tc}$, $^{121\text{m}}\text{Te}$, $^{122\text{m}}\text{Te}$, $^{125\text{m}}\text{Te}$, ^{165}Tm , ^{167}Tm , ^{168}Tm , ^{111}Ag , ^{197}Pt , ^{109}Pd , ^{32}P , ^{33}P , ^{47}Sc , ^{153}Sm , ^{177}Lu , ^{105}Rh , ^{142}Pr , ^{143}Pr , ^{161}Tb , ^{166}Ho , ^{199}Au , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{51}Cr , ^{59}Fe , ^{58}F , ^{75}Se , ^{201}Tl , ^{225}Ac , ^{76}Br , ^{86}Y , ^{169}Yb , ^{166}Dy , ^{212}Pb 和 ^{223}Ra 。

例如 ^{67}Cu , 由于 61.5 小时半衰期和丰富的 β 粒子和 γ 射线的供应而被认为是一个更佳的用于免疫治疗的放射性同位素, 可用螯合剂对溴乙酰氨基-苄基-四乙基胺四乙酸 (TETA) 而与 RS7 抗原结合蛋白结合。Chase, 如上。或者, 发射高能 β 粒子的 ^{90}Y 可用二亚乙基三胺五乙酸 (DTPA) 与 RS7 抗原结合蛋白偶联。而且, 用于直接用 ^{131}I 放射性标记 RS7 Mab 的方法描述于 Stein 等 (1991), 如上, 和 Govindan 等, WO 9911294A1 名为 "Stable Radioiodine Conjugates and Methods for Their Synthesis," 的专利, 其全文引入此处作为参考。

含有用于热中子活化治疗的硼附加物-加载的载体的本发明的 RS7 抗体或其片段将以相似的方式受到正常的作用。然而, 在实施中子辐照前等待直至为靶定的免疫缀合物清除将是有益的。使用与 RS7 抗体结合的抗体能够加速清除。参见美国专利 4,624,846 对该一般原理的描述。例如硼附加物如碳硼烷可与 RS7 抗体连接。碳硼烷可利用侧链上的羧基官能团而制备, 如本领域所熟知的。碳硼烷与载体, 如氨基葡聚糖的连接可通过活化碳硼烷的羧基并与载体上的胺缩聚产生中间体缀合物而获得。然后该中间体缀合物与 RS7 抗体结合。在给予 RS7 抗体缀合物之后, 硼附加物被热中子辐照活化而转化放射性原子, 其通过 α 发射而衰变从而产生高毒性, 短程的作用。

此外, 本发明包括在个体中诊断癌症的方法。可通过施用诊断上

有效量的在药学上适用的赋形剂配制的诊断缀合物，然后检测所述标记物实施诊断。例如放射性和非放射性试剂可用作诊断剂。适用的非放射性诊断剂是适用于磁共振成像，计算机控制断层扫描术或超声的造影剂。磁成像剂包括，例如非放射性金属，如锰，铁和钆，当与本发明的抗体一起使用时，其与包括 2-苄基-DTPA 及其一甲基和环己基类似物的金属-螯合剂组合物复合。参见与 2001 年 10 月 10 日提交的美国序号 09/921,290，其全文引入作为参考。

因此，描述了在个体中诊断恶性肿瘤的方法，包括 (i) 用包含裸抗-EGP-1 MAb 或其片段或裸抗体融合蛋白或其片段的组合物对来自个体的样品实施体外诊断。例如 RT-PCR 和免疫检测体外诊断方法可作为有用的诊断/检测方法用于检测组织，血液和其它体液中 EGP-1 瞬间量的存在。免疫组织化学可用于检测细胞或组织中 EGP-1 的存在。优选地，进行诊断的恶性肿瘤是癌症。最优选地，癌症选自肺癌、前列腺癌、卵巢癌、乳癌、结肠癌和膀胱癌。

此外，可检测的标记，如荧光分子、或细胞毒害剂，如重金属或放射性核素可结合于螯合剂如 DTPA、DOTA、TETA 或 NOTA 或适用的肽。例如治疗有效的免疫缀合物可通过使光活化剂或染料与抗体融合蛋白结合而得到。荧光组合物，如荧光染料，和其它色原，或染料，如对可见光敏感的卟啉已经通过将适宜的光对准损害处而用于检测和治疗损害。在治疗中，其被称为光辐射，光照疗法或光动力疗法 (Jori 等 (eds.), *PHOTODYNAMIC THERAPY OF TUMORS AND OTHER DISEASES* (Libreria Progetto 1985); van den Bergh, *Chem. Britain* 22:430 (1986))。此外，单克隆抗体还可与光活化的染料偶联以实施光治疗。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. Biolres.* 288:471 (1989); Tatsuta 等, *Lasers Surg. Med.* 9:422 (1989); Pelegriin 等, *Cancer* 67:2529 (1991)。然而，这些早期的研究未包括内窥镜疗法的使用，特别是抗体片段或亚片段的使用。因此，本发明涉及含光活化剂或染料的免疫缀合物的治疗用途。

本发明还预期了造影剂如 MRI 造影剂，顺磁来自和超声增强剂。

例如钆离子、镧离子、锰离子或其它可比的标记物，CT造影剂，和超声造影剂适用于本发明。在一个优选的实施方案中，超声增强剂是包括人源化 RS7 IgG 或其片段的脂质体。同样优选地，脂质体被气体填充。

为了治疗的目的，将本发明的 RS7 抗体及其片段以治疗有效量施用于病人。如果所施用的量具有生理学上的显著意义，则抗体被称为以“治疗有效量”进行施用。如果一种药剂的存在导致受体哺乳动物生理学上可检测的变化，则该药剂具有生理学上的显著意义。

体外诊断

本发明涉及 RS7 抗体，包括 RS7 和 hRS7 抗体及其片段，用于体外检测生物样品的 RS7 抗原存在的用途。在所述免疫测定中，RS7 抗体可用在液相中或与固相载体结合，如下述。同样，参见 Stein 等(1993)，如上，和 Stein 等，Cancer Res. 49: 32 (1989)，期全文引入作为参考。

测定生物样品释放包含 RS7 抗原的检测方法的一个实例是放射免疫测定(RIA)。例如在 RIA 的一个形式中，将测试物在存在放射性标记的 RS7 抗原的情况下与 RS7 抗原混合。在该方法中，测试物浓度将与结合 Mab 的标记的 RS7 抗原的量成反比并直接相关于游离标记的 RS7 抗原的量。其它适用的检测方法对本领域技术人员是显而易见的。

或者，可实施包含与固相载体结合的 RS7 抗原结合蛋白的体外测定。例如可将 Mab 连接于聚合物，如氨基葡聚糖，以便将 Mab 连至不溶性支持物如多聚物包被的珠、平板或管。

其它适用的体外测定法对本领域技术人员是显而易见的。可检测地标记的 RS7 抗原结合蛋白和 RS7 抗原的具体浓度，孵育温度和时间，已经其它测定条件可根据包含样品中的 RS7 抗原浓度，样品的性质等的多种因素而改变。RS7 抗原结合蛋白样品的结合活性可根据熟知的方法进行测定。本领域技术人员通过使用常规实验将能确定用于每一测定的操作性和最佳的条件。

根据习惯或特定环境需要，可将其它如洗涤，搅拌，震荡，过滤等的步骤加入测定法。

可使用酶联免疫吸附测定法(ELISA)测定生物样品中 RS7 抗原的

存在。在直接竞争性 ELISA 中，将纯的或半纯的抗原制剂结合于在液体或欲检测的细胞提取物中不溶解的固体支持物然后加入一定量的可检测地标记的可溶性抗体以便检测和/或定量固相抗原和标记的抗体间形成的二元复合物。

相反地，“双决定子” ELISA，还已知为“两位点 ELISA”或“三明治测定法”，需要少量抗原且该测定法不需要抗原的大量纯化。因此，用于检测临床样品中抗原的直接竞争性 ELISA 优选双决定子 ELISA。例如参见“the use of the double-determinant ELISA for quantitation of the C-MYC oncoprotein in biopsy specimens”，Field 等，Oncogene 4. -1463 (1989)；Spandidos 等，AntiCancer Res. 9. 821 (1989)。

在双决定子 ELISA 中，将一定量的未标记的 MAb 或抗体片段（“俘获抗体”）结合于固体支持物，将测试样品与俘获抗体接触，然后加入一定量的可检测地标记的可溶性抗体（抗体片段）以便检测和/或定量抗体，抗原，和标记的抗体之间形成的三元复合物。抗体片段是抗体的部分如 $F(ab')_2$ ， $F(ab)_2$ ， Fab' ， Fab 等。在本文中，抗体片段是与 RS7 抗原的表位结合的 RS7 Mab 的部分。术语“抗体片段”还包括任何合成的或遗传工程化处理的通过与特定抗原结合形成复合物而以类似抗体的方式发挥作用的蛋白。例如抗体片段包括包含轻链可变区，含有重或轻链的可变区的“Fv”片段，和重组单链多肽分子，其中轻链和重链可变区经由肽连接子相连，的分离的片段。抗体融合蛋白是包含至少两种基本上单特异性抗体或抗体片段的多特异性抗体组合物，其中至少两种抗体或抗体片段与 RS7 抗原不同的表位结合。RS7 融合蛋白还包括抗体融合蛋白与诊断剂或治疗剂的缀合物。术语 RS7 抗体包括人源化，嵌合，人和鼠抗体，其抗体片段，免疫缀合物及其片段和抗体融合蛋白及其片段。

实施双决定子 ELISA 的方法是熟知的。例如参见 Field 等，如上，Spandidos 等，如上，和 Moore 等，“Twin-Site ELISAs for fos and myc Oncoproteins Using the AMPAK System”，METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Vol.10, 273-281 页 (The Humana Press, Inc.1992)。例如在一种使用双决定子 ELISA 检测 RS7 抗原的方法中，就来自活组织样品的细组织糜冻干然后在含有 1% nonidet-p40(NP40), 0.6 μ l/ml

抑酞酶, 0.2 mM 苯基甲基磺酰氟, 0.1 μ g/ml 亮肽酶素和 1 mM EDTA 的裂解缓冲液 (100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4) 中以 10~20 mg 组织 (湿干)/500 μ l 溶液的浓度重悬。悬液于冰上孵育 60 分钟, 然后对其进行约 6 次 10-秒间隔的声波处理。通过离心除去不溶性物质。

就可溶性提取物加入微量滴定板的含有吸收的 RS7 抗原 Mab 作为俘获抗体的孔中。然后通过已经与碱性磷酸酶偶联的第二 RS7 抗原 Mab 识别俘获的 RS7 抗原。结合的碱性磷酸酶的量, 与提取物中 RS7 抗原的比例, 可采用显色底物如对硝基苯基磷酸酯以颜色计量的方法进行检测。

或者, 可采用辣根过氧化物酶实施用于 RS7 抗原的双决定子 ELISA。样品制备和双决定子 ELISA 的其它变化可由本领域技术人员根据例行实验进行设计。

在双决定子 ELISA 中, 可溶性抗体或抗体片段必须与和被俘获抗体识别的表位不同的 RS7 表位结合。例如可溶性抗体可以是 RS7 Mab, 而俘获抗体可以是 MR23。或者, 可溶性抗体可以是 MR23, 而俘获抗体可以是 RS7 Mab。

可实施双决定子 ELISA 以便确定 RS7 抗原是否存在于活组织样品中。或者, 可实施该分析以便定量存在于体液的临床样品中的 RS7 抗原的量。可通过包括稀释纯化的 RS7 抗原而实施定量分析。下面描述了纯化 RS7 抗原的方法。

本发明的 RS7 Mab 及其片段还适用于检测试剂盒的制剂。所述试剂盒可包含被区分为紧密接受的一个或多个容器工具如瓶, 管等的载体, 每个所述容器工具包含免疫测定的各元件。

例如可有一个含有固定在固相支持物上的俘获抗体的容器工具, 和另一个含有溶液中可检测地标记的抗体的容器工具。另一个容器工具可包括含有系列稀释 RS7 抗原的标准溶液。RS7 抗原的标准溶液可用于产生标准曲线, 其中 RS7 抗原的浓度标绘于横坐标而和检测信号位于纵坐标。从含有 RS7 抗原的样品获得的结果可以从所述曲线中以内插值替换从而给出生物样品中 RS7 抗原的浓度。

本发明的 RS7 抗体及其片段还可用于检测从免疫组织化学样品制备的切片中 RS7 抗原的存在。所述原位检测可用于确定 RS7 抗原的存

在和用于确定 RS7 抗原在受试组织中的分布。原位检测可通过将可检测地-标记的 RS7 抗原结合蛋白用于对冷冻样品切片的而实施。研究显示 RS7 抗原不能在石蜡包埋的切片中保存。Stein 等 (1993), 如上。原位检测的一般技术是本领域技术人员熟知的。例如参见 Ponder, "Cell Marking Techniques and Their Application", MAMMALIAN DEVELOPMENT: A PRACTICAL APPROACH 中 113-38 Monk (ed.) (IRL Press 1987), 和 Coligan 5.8.1-5.8.8 页。还可参见 Stein 等 (1989), 如上, 和 Stein 等 (1993), 如上。

RS7 抗体及其片段可用任何适宜的检测剂例如放射性同位素, 酶, 荧光标记, 化学发光标记, 生物发光标记和顺磁标记进行可检测地标记。制备和检测所述可检测地-标记的 RS7 抗原结合蛋白的方法是本领域技术人员熟知的, 并在下面给出更详细的描述。

标记物部分可以是通过使用 γ 计数器或闪烁计数器或放射自显影的方式而检测的放射性同位素。在一个优选的实施方案中, 诊断缀合物是 γ 放射性、 β 放射性或正电子放射性同位素。本说明书中的标记物部分涉及在预先确定的条件下将产生信号的分子。标记物部分的实例包括放射性同位素, 酶, 荧光标记, 化学发光标记, 生物发光标记和顺磁标记。如本说明书所使用的, 诊断剂或治疗剂与抗体结合从而产生能用于诊断和治疗的缀合物的分子和原子。诊断剂或治疗剂的实例包括药物, 毒素, 螯合剂, 染料, 发色团, 硼化合物和标记物部分。特别适用于本发明目的的同位素是 ^3H , ^{131}I , ^{31}S , ^{14}C , 和优选的 ^{125}I 。其它放射性核素的实例是, 例如 ^{90}Y , ^{111}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{186}Re , ^{188}Re , ^{177}Lu , ^{67}Cu , ^{212}Bi , ^{213}Bi , 和 ^{211}At 。其它放射性核素也可用作诊断剂和治疗剂。适用的诊断性成像的同位素通常为 25~4,000 keV, 而适用的治疗性放射性核素通常为 60~700 keV。

本发明的 RS7 抗体及其片段还可用荧光化合物进行标记。通过将 RS7 抗原结合蛋白暴露于适宜波长的光下和检测生产的荧光来确定荧光标记的 Mab 的存在。荧光标记化合物包括异硫氰酸荧光素, 罗丹明, 藻红蛋白, 藻蓝蛋白, 别藻蓝蛋白, 邻苯二甲醛和荧胺。荧光标记的 RS7 抗原结合蛋白特别适用于流式细胞术。

或者, 将 RS7 抗原结合蛋白与化学发光化合物偶联而就 RS7 抗体及其片段进行可检测的标记。通过检测在化学反应中产生的发光来确

定化学发光标记的 Mab 的存在。化学发光标记化合物的实例包括鲁米诺，异氨基苯二酰肼，芳香族吡啶酯，咪唑，吡啶酯盐和草酸酯。

相似地，生物发光化合物可用于标记本发明的 RS7 抗体及其片段。生物发光是一类在生物系统中发现的生物发光物，其中催化蛋白增加化学发光反应的效能。通过检测发光来确定生物发光蛋白的存在。用于标记的生物发光化合物包括萤光素，萤光素酶和水母素。

或者，RS7 抗体及其片段通过将 RS7 抗体与酶连接而被可检测的标记。当 RS7 抗体-酶缀合物在存在适宜底物的情况下孵育时，酶部分与底物反应从而产生可被检测的化学部分，例如被光谱光度测量、荧光计或视觉工具检测。可用于可检测地标记 RS7 抗体的酶的实例包括苹果酸脱氢酶，葡萄球菌核酸酶， δ -V-类固醇异构酶，酵母乙醇脱氢酶， α -磷酸甘油脱氢酶，磷酸丙糖异构酶，辣根过氧化物酶，碱性磷酸酶，门冬酰胺酶，葡萄糖氧化酶， β -半乳糖苷酶，核糖核酸酶，脲酶，过氧化氢酶，6-磷酸葡萄糖脱氢酶，葡萄糖淀粉酶和乙酰胆碱酯酶。

RS7 抗体，融合蛋白，及其片段还可用于顺磁性离子标记为了体内诊断的目的。特别适用于磁共振成像的造影剂包括 Gd、Mn、Dy 或 Fe 离子。RS7 抗体及其片段还可与超声造影剂/增强剂结合。例如超声造影剂是包含人源化 RS7 IgG 或其片段的脂质体。更优选地，超声造影剂是被气体填充的脂质体。

在相关静脉中，双特异性抗体可与造影剂缀合。例如双特异性抗体可包括多于一种用于超声成像的影像-增强剂。在一个优选的实施方案中，造影剂是脂质体。优选地，脂质体包括与脂质体外层面共价结合的二价 DTPA-肽。更优选地，脂质体被气体填充。

本领域技术人员将可知晓其它可根据本发明应用的适用的标记。标记物部分与 RS7 抗体的结合可采用本领域已知的标准方法实施。与其有关的典型方法描述于 Kennedy 等，Clin. Chim. Acta 70:1 (1976)，Schurs 等，Clin. Chim. Acta 81:1 (1977)，Shih 等，Int'l J. Cancer 46:1101 (1990)，Stein 等 (1990)，如上，和 Stein 等 (1993)，如上。同样，一般参见，Coligan。

上述体外和原位检测方法可用于辅助病理状态的诊断和分期。例如所述方法可用于检测表达 RS7 抗原的肿瘤，包括肺，乳腺，膀胱，卵巢，子宫，胃和前列腺的肿瘤。

体内诊断

本发明还预期了 RS7 抗体在体内诊断中的用途。使用放射性标记的 Mab 的诊断性成像的方法是众所周知的。在免疫闪烁成像术中, 例如用 γ 放射性同位素标记抗体并导入患者。使用 γ 照相机检测 γ 放射性同位素的定位和分布。例如参见 Srivastava (ed.), *RADIOLABELED MONOCLONAL ANTIBODIES FOR IMAGING AND THERAPY* (Plenum Press 1988), Chase, "Medical Applications of Radioisotopes", 在 *REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES*, 18TH Edition, Gennaro 等 (eds.) 中, 624-652 页 (Mack Publishing Co., 1990), 和 Brown, "Clinical Use of Monoclonal Antibodies", *BIOTECHNOLOGY AND PHARMACY* 227-49, Pezzuto 等 (eds.) (Chapman & Hall 1993)。

为了诊断性成像, 放射性同位素可与 RS7 抗体或直接地, 或使用媒介官能团间接地结合。适用的媒介官能团包括螯合剂如乙二胺四醋酸和二亚乙基三胺五乙酸。例如参见 Shih 等, 如上, 和美国专利 5, 057, 313。

经由选择最小半衰期, 体内的最少保留和能允许检测和准确测定的同位素的最低量最佳组合的同位素而将递送给患者的辐射剂量保持尽可能低的水平。放射性同位素可与 RS7 抗体结合并适宜于诊断成像的实例包括 ^{99m}Tc 和 ^{111}In 。

药理学上适用的赋形剂

可使用额外的药理学方法控制 RS7 抗体在治疗应用中的作用时间。通过使用聚合物来复合或吸收 RS7 抗体可制成控释剂。例如生物相容性聚合物包括聚(乙烯-共聚-乙酸乙烯酯)基质和硬脂酸二聚物和癸二酸的聚酐共聚物基质。Sherwood 等, *Bio/Technology* 10: 1446 (1992)。Sherwood 等, *BioTechnology* 10:1446 (1992)。RS7 抗体从所述基质中释放的速率取决于 RS7 抗体的分子量、基质内 RS7 抗体的量和分散的颗粒的大小。Saltzman 等, *Biophys. J.* 55:163 (1989); Sherwood 等, 如上。其它固体剂型描述于 *REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES*, 18TH ed. (1990) 中。

将被递送给个体的人源化, 嵌合和人 RS7 抗体可仅包含 mAb, 免疫

缀合物，抗体融合蛋白或可包含一种或多种药学上适用的赋形剂，一种或多种附加成分，或这些的某些组合。

本发明的免疫缀合物、裸抗体、融合蛋白及其片段可按已知方法配方制成药学上有用的组合物，由此免疫缀合物或裸抗体和药学上适用的赋形剂在混合物中组合。磷酸盐缓冲无菌盐水是药学上适用的赋形剂的一个实例。其它适用的赋形剂是本领域技术人员众所周知的。例如参见 Ansel 等 PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS 和药物 DELIVERY SYSTEMS, 5TH Edition (Lea & Febiger 1990), 和 GENNARO (ed.), REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18TH Edition (Mack Publishing Company 1990) 和其修订版。

本发明的免疫缀合物或裸抗体可被配制成借助，例如弹丸注射或连续输注的静脉内给药。用于注射的配方可以是单位剂型，例如安瓿中或多剂量容器中，和附加的保存剂。组合物可采用所述剂型如在油性或水性在中的悬液，溶液或乳液，并可包含配方剂如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。或者，使用前，活性成分可以是在用于与适宜的载体，例如无热原灭菌水组成的粉剂形式。

可使用额外的药学方法控制治疗性或诊断性缀合物或裸抗体的作用时间。通过使用聚合物来复合或吸收免疫缀合物或裸抗体可制成控释剂。例如生物相容性聚合物包括聚(乙烯-共聚-乙酸乙烯酯)基质和硬脂酸二聚物和癸二酸的聚酐共聚物基质。Sherwood 等, Bio/Technology 10: 1446 (1992)。免疫缀合物或抗体从所述基质中释放的速率取决于免疫缀合物或抗体的分子量、基质内免疫缀合物，抗体的量和分散的颗粒的大小。Saltzman 等, Biophys. J. 55:163 (1989); Sherwood 等, 如上。其它固体剂型描述于 Ansel 等, PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS AND 药物 DELIVERY SYSTEMS, 5TH Edition (Lea & Febiger 1990) 和 Gennaro (ed.), REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18TH Edition (Mack Publishing Company 1990) 和其修订版中。

免疫缀合物，抗体融合蛋白，裸抗体及其片段还可采取皮下或甚至是其它胃肠外途径而施用于哺乳动物。在一个优选的实施方案中，将抗-EGP-1 抗体或其片段以 10~2000 毫克蛋白/每剂的剂量进行施用。而且，可采取连续输注，或单次或多次快速浓注进行施用。通常，

免疫缀合物，融合蛋白或裸抗体对人的施用剂量根据诸如患者年龄、体重、身高、性别、一般医学状况和既往医学史等因素而改变。典型地，合乎需要的是将免疫缀合物，抗体融合蛋白或裸抗体以剂量约 1 mg/kg ~ 20 mg/kg，单次静脉内输注提供给受者，但也可以根据环境需要施用较低或较高的剂量。该剂量可按需重复施用，例如一周一次持续 4 ~ 10 周，优选一周一次持续 8 周，更优选地，一周一次持续 4 周。其还可以以较低频率给予，如隔周一次持续数月。剂量可用多种胃肠外途径给予，可对剂量和方案进行适宜的调整。

本发明的 RS7 抗体可按已知方法配制成药学上有用的组合物，由此 RS7 抗体和药学上适用的赋形剂在混合物中组合。如果组合物的施用可被接受治疗的患者耐受，则这种组合就被称为“药学上可用的载体”。无菌磷酸盐-缓冲盐水是药学上适用的赋形剂的一个实例。其它适用的赋形剂是本领域技术人员众所周知的。例如参见 REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18TH Ed. (1990)。

为了治疗的目的，将免疫缀合物、融合蛋白或裸抗体以治疗有效量施用于哺乳动物。本发明所针对的适宜个体一般是人类，但非人类的动物个体也是可预期的。如果所施用的量是生理学上显著的，则抗体制剂被称为以“治疗有效量”进行施用。如果一种药剂的存在导致受体哺乳动物生理学上可检测的变化，则该药剂就是生理学上的显著的。

对本领域技术人员来说，可对本发明的组合物和方法作出多种修饰和改变是显而易见的。因此，应当理解本发明涵盖了所述修饰和改变，只要其落在所附权利要求和其等效形式的范围之内。

上面所引用的所有出版物，专利和专利申请均以其全部引入此处作为参考，其全文引入的程度与若将其单独引入作为参考时的程度相同。

下述实施例是对本发明实施方案的说明，而并非在任何形式上用于限制权利要求的范围。

实施例 1. 构建嵌合 RS7 抗体

RS7V_K和 V_H 基因的分子克隆

从产生 RS7 的杂交瘤细胞中制备总细胞质 RNA 和 mRNA。采用 RT-

PCR 和 5' RACE 克隆编码 V κ 和 V H 序列的基因然后用 DNA 测序法确定序列。对多个克隆测序以消除由 PCR 反应导致的可能误差。序列分析显示存在两个 V κ (#1 和 #23) 和一个 V H (RS7V H) 转录物。联合各潜在鼠 V κ 与 V H , 生成两个含有人恒定区的嵌合 Ab (cAb), 然后通过转染将其在 Sp2/0 细胞中表达。通过用 ELISA 筛选转染的细胞克隆的细胞培养物上清液从而鉴定产生 cAb 的克隆。扩大阳性克隆然后从细胞培养物上清中纯化 cAb。Ag-结合测定显示 cAb 由 V κ #23 和 V H 组成, cAb-V κ #23 结合在用 ME 180, 人颈癌细胞 (ATCC, Rockville, MD) 的粗制膜部分包被的微孔上 (图 1)。cAb 联合 V κ #1 和 V H , cAb-V κ #1 未显示出与 Ag-包被的孔结合。

因此, 将免疫反应的 cAb (含有 V κ 23) 命名为 cRS7。将作为 PCR 产物的克隆的鼠 V H 和功能性 V κ (#23) 序列产物分别命名为 RS7V κ (图 2A) 和 RS7V H (图 2B)。

RS7 Ab 结合活性检测

将竞争性 ELISA 结合测定用于评价工程化处理的 cRS7 的结合亲和力。简言之, 将恒量的生物素化鼠 RS7 与变化浓度 (0.01 ~ 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 的检测 Ab (RS7 或 cRS7) 混合, 然后加至 Ag-包被的微孔, 然后在室温下孵育 1 小时。洗涤后, 加入 HRP 缀合的链霉抗生物素蛋白然后在室温下孵育 1 小时。在加入含有 4 mM 邻苯二胺二盐酸盐和 0.04% H_2O_2 的底物溶液后通过读取 OD₄₉₀ 而显示出 HRP-缀合的链霉抗生物素蛋白与 Ag-结合的生物素化 RS7 结合的量。通过该类竞争性 Ag-结合检测, 显示出 cRS7 和鼠 RS7 对生物素化鼠 RS7 与抗原包被孔的结合的竞争完全相同, 因此证实了所获得的 V κ 和 V H 序列的可靠性 (图.1)。

实施例 2. hRS7 抗体的构建方法

hRS7 V 基因的序列设计

通过研究 Kabat 数据库中人 V κ 和 V H 序列, 发现 RS7 V κ 和 V H 的 FRs 分别表现出与人 SA-1A' c1 V κ 和 RF-TS3 V H 高度的序列同一性。一个例外是 RS7V H 的 FR4, 其显示出与 NEWM V H 最高的同一性。因此将人 SA-1A' c1 框架序列用作移植 RS7V κ 的 CDR 的支架 (图 3A), 并将 RF-TS3 和 NEWM 框架序列联合用于 RS7V H (图 4)。当与起始人抗体框架比较

时, 在每个链 CDR 区外都存在大量的氨基酸改变。鼠 FR 中侧接潜在 CDR 的某些氨基酸残基保留在基于由 Qu, Z., Losman, M.J., Eliassen, K.C., Hansen, H.J., Goldenberg, D.M., 和 Leung, S.O. (1999) Humanization of mmu31, alpha-fetoprotein-specific antibody. Clin. Cancer Res. 5, 3095s-3100s 在先建立的指导而重建的 hRS7 Fv 中。这些残基是 S20, D60, V85, 和 RS7V κ 和 K38 的 A100, RS7VH 的 K46, A78 和 F91 (图 3A 和 3B)。

hRS7 V 序列的构建

Leung 等 Leung, S. O., Shevitz, J., Pellegrini, M. C., Dion, A. S., Shih, L. B., Goldenberg, D.M., 和 Hansen, H.J. (1994) Chimerization of LL2 a rapidly internalizing antibody specific for Bcell lymphoma. Hybridoma, 13:469-476) 公开了一种修饰策略, 采用如图 4 所示的长寡核苷酸合成和 PCR, 将该策略用于构建为 hRS7 所设计的 VL 和 VH 基因。为了构建 hRS7 VH 区, 两个长寡核苷酸, hRS7VHA (176-MER) 和 hRS7VHB (168-MER) 在自动化 DNA 合成仪 (Applied Biosystem) 上合成。

hRS7VHA 代表 hRS7VH 区的 23 ~ 198 nt

```
5'-GGTCTGAGTT GAAGAAGCCT GGGGCCTCAG TGAAGGTTTC
CTGCAAGGCT TCTGGATACA CCTTCACAAA CTATGGAATG AACTGGGTGA
AGCAGGCCCC TGGACAAGGG CTAAATGGA TGGGCTGGAT AAACACCTAC
ACTGGAGAGC CAACATATAC TGATGACTTC AAGGGA-3'
```

hRS7VHB 代表与 174 ~ 340 nt 互补的 hRS7VH 区的负链。

```
5'-ACCCTTGGCC CCAGACATCG AAGTACCAGT AGCTACTACC
GAACCCCCCT CTTGCACAGA AATACACGGC AGTGTCGTCA GCCTTTAGGC
TGCTGATCTG GAGATATGCC GTGCTGACAG AGGTGTCCAA GGAGAAGGCA
AACCGTCCCT TGAAGTCATC AGTATATG-3'
```

hRS7VHA 和 B 的 3' 末端序列 (23 nt 残基) 彼此互补。在所述 PCR 条件下, hRS7VHA 和 B 3' - 末端退火而形成由长寡核苷酸的剩余部分所侧接的短双链 DNA。每个退火的末端均作为单链 DNA 转录的引物, 结果得到包含 hRS7VH 的 23 ~ 340 nt 的双链 DNA。该 DNA 在存在两个短寡核苷酸, hRS7VHBACK 和 hRS7VHFOR 下进一步扩增以形成全长

hRS7VH。

hRS7VHBACK 5'-GTGGTGCTGC AGCAATCTGG GTCTGAGTTG
AAGAAGCC-3'

hRS7VHFOR 5'-TGAGGAGACG GTGACCAGGG ACCCTTGGCC
CCAGACAT-3'

以 10 μ l 10 $\times$ PCR 缓冲液 (500 mM KCl, 100 mM Tris.HCL 缓冲液, pH 8.3, 15 mM MgCl₂), 2 μ mol hLL1 VHBACK 和 hLL1VHFOR, 和 2.5 单位 Taq DNA 聚合酶 (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, Ct) 扩增 hRS7VHA 和 B 的最小量 (经验确定的)。将该反应混合物进行 3 个循环的 PCR 反应: 94 $^{\circ}$ C 变性 1 分钟, 45 $^{\circ}$ C 退火 1 分钟, 和 72 $^{\circ}$ C 聚合 1.5 分钟, 然后进行 27 个循环的 PCR 反应: 94 $^{\circ}$ C 变性 1 分钟, 55 $^{\circ}$ C 退火 1 分钟, 和 72 $^{\circ}$ C 聚合 1 分钟。凝胶纯化 hRS7VH 的双链 PCR-扩增的产物, 用 PstI 和 BstEII 限制性酶切然后克隆至重链 staging 载体, VHpBS2 的互补 PstI/BstEII 位点。

为构建人源化 V κ 序列的全长 DNA, 如上述合成 hRS7VKA (156-mer) 和 hRS7VKB (155-mer)。通过上述短寡核苷酸 hRS7VKBACK 和 hRS7VKFOR 扩增 hRS7VKA 和 B。

hRS7VKA 代表 hRS7V κ 区的 20~175 nt。

5'-CTCCATCCTC CCTGTCTGCA TCTGTAGGAG ACAGAGTCAG CATCACCTGC
AAGGCCAGTC AGGATGTGAG TATTGCTGTA GCCTGGTATC AGCAGAAACC
AGGGAAAGCC CCTAAGCTCC TGATCTACTC GGCATCCTAC CGGTACACTG
GAGTCC-3'

hRS7VKB 代表与 155~320 nt 互补的 hRS7V κ 区的负链。

5'-CCTTGGTCCC AGCACCGAAC GTGAGCGGAG TAATATAATG
TTGCTGACAG TAATAAACTG CAAAATCTTC AGGTTGCAGA CTGCTGATGG
TGAGAGTGAA ATCTGTCCCA GATCCACTGC CACTGAACCT ATCAGGGACT
CCAGTGTACC GGTAG-3'

hRS7VKBACK 5'-GACATTCAGC TGACCCAGTC TCCATCCTCC
CTGTCTG-3'

hRS7VKFOR 5'-ACGTTAGATC TCCACCTTGG TCCCAGCACC G-3'

凝胶纯化 hRS7VK 的双链 PCR-扩增的产物, 用 PvuII 和 BglIII 限制性酶切然后克隆至轻链 staging 载体, VKpBR2 的 PvuI/BclI 的互补位点。通过将 HRS7VK 和 VH 的 XBAI-BAMHI 和 XhoI/BamHI 片段分别次序亚克隆至 pdHL2 如上述而构建最终的表达载体。

hRS7 抗体的转染和表达

将约 30 μ g 的用于 hRS7 的表达载体通过 SalI 酶切消化而线性化然后用电穿孔 (450V 和 25 PF) 转染至 SP2/0-AGL4 细胞。将转染的细胞铺于 96-孔板 2 日然后通过加入 MTX 至终浓度为 0.025 μ M 而选择药物抗性。

MTX-抗性集落在 2-3 周内出现于孔中。用 ELISA 测试法检测来自存活于用于筛选人 Ab 分泌的选择的克隆的上清。简言之, 将 100 μ l 上清样品加入用 GAH-IgG, F(ab')₂ 片段-特异性 Ab 预包被的 ELISA 微量滴定板上, 然后孵育 1 小时。用洗涤缓冲液 (含 0.05% 聚山梨醇酯 20 的 PBS) 洗板三次以除去未结合的蛋白质。将 HRP-结合的 GAH-IgG, Fc 片段-特异性 Ab 加入孔。

在孵育 1 h 后, 洗涤平板。在加入含有 4 mM OPD 和 0.04% H₂O₂ 的底物溶液后通过读取 A₄₉₀ 而显示结合 HRP-结合。扩展阳性细胞克隆然后通过 A 蛋白柱亲和层析从细胞培养物上清中纯化 hRS7 IgG。

人源化 RS7 抗体的结合活性

使用 ME180 细胞膜提取物包被平板将 ELISA 竞争性结合测定用于评价 hRS7 的免疫反应性如所述 (Stein 等, Int. J. Cancer 55: 938-946 (1993))。ME180 细胞膜部分通过声裂法和离心制备。通过离心用粗制膜提取物包被 96 孔平底 PVC 板然后用 0.1% 戊二醛固定。将恒量的生物素化鼠 RS7 与变化浓度的 mRS7, cRS7 或 hRS7 混合, 然后加至包被的微孔, 然后在室温下孵育 1 小时。洗涤后, 加入 HRP-缀合的链霉抗生物素蛋白, 然后在室温下孵育 1 小时。在加入含有 4 mM 邻苯二胺二盐酸盐和 0.04% H₂O₂ 的底物溶液后通过读取 A₄₉₀ 而显示与膜结合的生物素化 mRS7 结合的 HRP-缀合的链霉抗生物素蛋白的量。如图 6 中的竞争性分析所示, hRS7 IgG 表现出与 mRS7 和 cRS7 相当的结合活性, 证实了 RS7 的结合亲和力在人源化中得以保存。

实施例 3. 使用残留性标记物的人源化 RS7 的放射性碘标记

残留性部分 (IMP-R4, IMP-R5 或 IMP-R8) 进行放射性碘标记, 并与二硫化物还原的 hRS7 按别处所述方法偶联 (Govindan SV, 等. Bioconjugate Chem. 1999; 10: 231-240)。参见图 9。在残留性放射性碘标记中, 使用 ^{125}I , 制备 ^{125}I -IMP-Rx-hRS7 其中 x= 4, 5 或 8), 分别使用 IMP-R4, IMP-R5 和 IMP-R8 获得总产率和比活性 (括弧内) 的 87.1 % (3.38 mCi/mg), 34.3 % (0.97 mCi/mg), 和 76.6 % (2.93 mCi/mg)。在大规模 ^{131}I 标记中, 使用 ^{131}I -IMP-R4 体, 获得下述结果。使用 20.4 mCi ^{131}I , 35.7 nmol IMP-R4 和 3.22 mg DTT-还原的 RS7, 获得 60%总产率 (3.80 mCi/mg)。使用 30.3 mCi ^{131}I , IMP-R4 和还原的 hRS7 另一操作得到 69.7%产率 (3.88 mCi/mg)。

13.97 mCi ^{131}I 的第三次操作得到 71.8 %掺合度 (4.42 mCi/mg)。用 13.6 mCi ^{131}I 和非特异性人源化抗体, hLL2 标记的 ^{131}I -IMP-R4 得到 64.4 %产率 (3.67 mCi/mg)。

实施例 4. 乳癌动物模型中的临床前实验

为了肿瘤靶向实验, 通过皮下注射约 2.3×10^7 个培养的 MDA-MB-468 细胞在 5~8 周龄雌性裸鼠中繁殖肿瘤, 在 1 个月后, 当肿瘤大小达到 ~0.1 至 ~0.2 cm³ 时使用动物。对小鼠静脉注射 ~10 μCi ^{125}I -[IMP-Rx]-hRS7 其中 x= 4、5 或 8, 和 20-25 μCi ^{131}I -Mab (CT 法)。因此, 每个实验都是用 ^{125}I / ^{131}I 配对标记的实验。在所示时间, 测定多种器官和血液中的生物分布, 然后表示为 % 注射剂量/g。在确定 ^{125}I 生物分布时, 校正 ^{131}I 反散射入 ^{125}I 窗的量。

为治疗研究, 研究多种形式下的肿瘤生长模式以便确定用于肿瘤稳定生长的最佳方法。总结出肿瘤生长约 8-周后用于靶向实验的方法是最佳的, 并 30-50 %的动物可根据肿瘤生长模式而使用。为治疗研究, 对带有肿瘤的动物静脉注射是检测药剂的 ^{131}I -IMPR4-hRS7, 并与直接放射性碘化的物质 ^{131}I -hRS7 进行比较。

将基线体重与每周检测的体重和肿瘤体积比较。当肿瘤达到 3 cm³ 时处死动物。根据 IACUC-批准的方法实施所有动物实验。

动物体内生物分布

在 NIH Swiss 裸鼠的生长的肿瘤中使用双-标记的 hRS7 制剂(^{125}I -IMP-Rx-hRS7 其中 $x=4, 5$ 或 8 , 每个试剂与直接标记 ^{131}I -hRS7 混合) 实施这些实验。表 1A, 1B 和 1C 描述了具体的生物分布显示出使用残留性标记具有非常好的表现。例如 ^{125}I -IMP-IMP-R4-RS7, ^{125}I -IMP-R5-hRS7 和 ^{125}I -IMP-R8-hRS7 在第 7 日的%注射剂量/每克肿瘤分别是 $41.6\pm3.0\%$, $32.2\pm11.6\%$ 和 $24.7\pm8.5\%$, 而对于直接标记的 ^{131}I -HRS7 在各双-标记的实验中相同时间点为 $5.9\pm0.9\%$, $6.2\pm2.1\%$ 和 $6.7\pm2.3\%$ 。在相同时间点, 肿瘤-比-非肿瘤的比率是 ^{125}I -IMP-R4-hRS7 $1.7\sim7.6$ 倍, ^{125}I -IMP-R5-hRS7 $1.7\sim6.0$ 倍和 ^{125}I -IMP-R8-hRS7 $2.0\sim4.8$ 倍高于 ^{131}I -hRS7 (数据未显示)。

表 1. 用 ^{125}I -IMP-R (R4 或 R5 或 R8) 和 ^{131}I -hRST (CT 法) 双-标记的人源化 RS7 在载有 MDA-MB-468 肿瘤异种移植物的 NIH Swiss 裸鼠中的生物分布

表 1A: ^{125}I -IMP-R4-hRS7 对 ^{131}I -hRS7 (CT)

组织	标记物	% ID/g $\pm$ SD ¹ , n=5			
		24 小时	72 小时	168 小时, n=4	336 小时
MDA-MB-468	^{125}I -IMP-R4	32.8 $\pm$ 6.3	46.8 $\pm$ 11.0	41.6 $\pm$ 3.0	25.1 $\pm$ 3.8
	^{131}I (CT)	8.6 $\pm$ 1.5	8.6 $\pm$ 2.3	5.9 $\pm$ 0.9	4.4 $\pm$ 0.8
	肿瘤 wt.	(0.19 $\pm$ 0.06)	(0.19 $\pm$ 0.08)	(0.13 $\pm$ 0.07)	(0.18 $\pm$ 0.04)
肝	^{125}I -IMP-R4	5.7 $\pm$ 0.7	4.7 $\pm$ 1.5	2.8 $\pm$ 0.4	1.3 $\pm$ 0.2
	^{131}I (CT)	4.1 $\pm$ 0.3	2.0 $\pm$ 0.1	1.5 $\pm$ 0.2	0.7 $\pm$ 0.1
脾	^{125}I -IMP-R4	3.6 $\pm$ 0.6	3.3 $\pm$ 0.6	2.6 $\pm$ 0.8	1.9 $\pm$ 0.2
	^{131}I (CT)	2.6 $\pm$ 0.5	1.7 $\pm$ 0.4	1.1 $\pm$ 0.4	0.6 $\pm$ 0.1
肾	^{125}I -IMP-R4	7.8 $\pm$ 0.7	6.8 $\pm$ 0.4	5.6 $\pm$ 0.8	3.0 $\pm$ 0.5
	^{131}I (CT)	3.5 $\pm$ 0.3	2.1 $\pm$ 0.3	1.4 $\pm$ 0.3	0.7 $\pm$ 0.1
肺	^{125}I -IMP-R4	4.5 $\pm$ 1.0	3.2 $\pm$ 0.6	2.2 $\pm$ 0.7	0.8 $\pm$ 0.2
	^{131}I (CT)	3.1 $\pm$ 0.8	2.2 $\pm$ 0.4	1.6 $\pm$ 0.6	0.6 $\pm$ 0.2
血液	^{125}I -IMP-R4	15.1 $\pm$ 1.4	9.5 $\pm$ 0.7	6.0 $\pm$ 1.5	1.9 $\pm$ 0.6
	^{131}I (CT)	10.8 $\pm$ 1.0	7.3 $\pm$ 0.6	5.3 $\pm$ 1.2	2.2 $\pm$ 0.6
胃	^{125}I -IMP-R4	1.3 $\pm$ 0.2	0.6 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.1
	^{131}I (CT)	1.6 $\pm$ 0.5	0.7 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.1
Sm. Int.	^{125}I -IMP-R4	1.5 $\pm$ 0.2	0.9 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.2	0.2 $\pm$ 0.1
	^{131}I (CT)	1.0 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.04
Lg. Int.	^{125}I -IMP-R4	1.3 $\pm$ 0.3	1.0 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.1
	^{131}I (CT)	0.8 $\pm$ 0.2	0.5 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.03
肌	^{125}I -IMP-R4	1.2 $\pm$ 0.2	0.7 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.2
	^{131}I (CT)	0.9 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.05	0.3 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.1
骨	^{125}I -IMP-R4	2.3 $\pm$ 0.3	2.1 $\pm$ 0.3	2.4 $\pm$ 0.6	2.3 $\pm$ 1.2
	^{131}I (CT)	1.4 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.1

表 1B: ^{125}I -IMP-R5-hRS7 对 ^{131}I -hRS7 (CT 法)

组织	标记物	% ID/g $\pm$ SD ¹ , n=5			
		24 小时	72 小时	168 小时	336 小时, n=4
MDA-MB-468	^{125}I -IMP-R5	29.1 $\pm$ 4.6	39.6 $\pm$ 2.7	32.2 $\pm$ 11.6	17.8 $\pm$ 7.0
	^{125}I (CT)	9.2 $\pm$ 1.0	9.1 $\pm$ 0.6	6.2 $\pm$ 2.1	4.9 $\pm$ 2.0
	肿瘤 wt.	(0.14 $\pm$ 0.02)	(0.20 $\pm$ 0.05)	(0.11 $\pm$ 0.03)	(0.13 $\pm$ 0.06)
肝	^{125}I -IMP-R5	4.8 $\pm$ 1.4	2.5 $\pm$ 0.1	1.8 $\pm$ 0.3	0.8 $\pm$ 0.3
	^{125}I (CT)	5.1 $\pm$ 1.5	2.4 $\pm$ 0.2	1.7 $\pm$ 0.2	0.8 $\pm$ 0.3
脾	^{125}I -IMP-R5	4.1 $\pm$ 1.0	2.0 $\pm$ 0.4	1.9 $\pm$ 0.4	0.8 $\pm$ 0.4
	^{125}I (CT)	3.8 $\pm$ 1.2	1.7 $\pm$ 0.5	1.3 $\pm$ 0.3	0.7 $\pm$ 0.4
肾	^{125}I -IMP-R5	10.0 $\pm$ 1.4	6.3 $\pm$ 0.5	5.0 $\pm$ 0.5	1.1 $\pm$ 0.3
	^{125}I (CT)	3.7 $\pm$ 0.5	1.9 $\pm$ 0.3	1.7 $\pm$ 0.3	0.8 $\pm$ 0.2
肺	^{125}I -IMP-R5	5.4 $\pm$ 1.8	3.2 $\pm$ 0.8	2.3 $\pm$ 0.2	0.9 $\pm$ 0.4
	^{125}I (CT)	3.9 $\pm$ 1.2	2.5 $\pm$ 0.7	2.0 $\pm$ 0.3	0.9 $\pm$ 0.5
血液	^{125}I -IMP-R5	16.5 $\pm$ 4.0	8.8 $\pm$ 0.6	6.5 $\pm$ 1.0	2.7 $\pm$ 1.4
	^{125}I (CT)	12.2 $\pm$ 3.0	7.8 $\pm$ 0.5	6.3 $\pm$ 0.8	3.1 $\pm$ 1.4
胃	^{125}I -IMP-R5	0.9 $\pm$ 0.2	0.5 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.1
	^{125}I (CT)	1.1 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.1
Sm. Int.	^{125}I -IMP-R5	1.5 $\pm$ 0.3	0.8 $\pm$ 0.04	0.6 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.1
	^{125}I (CT)	1.1 $\pm$ 0.2	0.6 $\pm$ 0.02	0.5 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.1
Lg. Int.	^{125}I -IMP-R5	1.4 $\pm$ 0.2	0.9 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.04
	^{125}I (CT)	0.7 $\pm$ 0.1	1.4 $\pm$ 0.03	0.4 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.04
肌	^{125}I -IMP-R5	1.3 $\pm$ 0.3	0.7 $\pm$ 0.2	0.5 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.1
	^{125}I (CT)	0.9 $\pm$ 0.2	0.6 $\pm$ 0.2	0.4 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.1
骨	^{125}I -IMP-R5	2.2 $\pm$ 0.6	1.3 $\pm$ 0.2	1.2 $\pm$ 0.5	1.0 $\pm$ 0.6
	^{125}I (CT)	1.9 $\pm$ 0.7	0.9 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.2	0.3 $\pm$ 0.2

表 1C: ^{125}I -IMP-R8-hRS7 对 ^{131}I -hRS7 (CT 法)

组织	标记物	% ID/g $\pm$ SD ¹ , n=5			
		24 小时	72 小时	168 小时	336 小时
MDA-MB-468	^{125}I -IMP-R8	24.1 $\pm$ 5.4	26.9 $\pm$ 3.9	24.7 $\pm$ 8.5	11.0 $\pm$ 6.4
	^{131}I (CT)	8.8 $\pm$ 1.6	8.8 $\pm$ 1.0	6.7 $\pm$ 2.3	2.4 $\pm$ 1.3
	肿瘤 wt.	(0.17 $\pm$ 0.04)	(0.12 $\pm$ 0.05)	(0.10 $\pm$ 0.04)	(0.15 $\pm$ 0.05)
肝	^{125}I -IMP-R8	4.6 $\pm$ 0.7	3.3 $\pm$ 0.4	1.8 $\pm$ 0.2	0.7 $\pm$ 0.2
	^{131}I (CT)	4.1 $\pm$ 0.6	3.3 $\pm$ 0.4	1.8 $\pm$ 0.2	0.8 $\pm$ 0.2
脾	^{125}I -IMP-R8	2.6 $\pm$ 0.7	2.3 $\pm$ 0.2	1.9 $\pm$ 0.2	1.0 $\pm$ 0.1
	^{131}I (CT)	2.4 $\pm$ 0.8	2.2 $\pm$ 0.3	2.0 $\pm$ 0.3	0.7 $\pm$ 0.1
肾	^{125}I -IMP-R8	7.2 $\pm$ 0.8	4.6 $\pm$ 0.8	2.6 $\pm$ 1.0	1.8 $\pm$ 0.1
	^{131}I (CT)	2.5 $\pm$ 0.3	3.0 $\pm$ 0.7	1.8 $\pm$ 0.5	0.8 $\pm$ 0.3
肺	^{125}I -IMP-R8	3.0 $\pm$ 0.7	4.7 $\pm$ 0.5	2.3 $\pm$ 0.6	1.0 $\pm$ 0.4
	^{131}I (CT)	2.4 $\pm$ 0.4	4.4 $\pm$ 0.5	2.1 $\pm$ 0.5	1.0 $\pm$ 0.4
血液	^{125}I -IMP-R8	10.8 $\pm$ 1.2	9.6 $\pm$ 0.9	6.3 $\pm$ 1.4	2.2 $\pm$ 0.6
	^{131}I (CT)	9.2 $\pm$ 1.6	9.5 $\pm$ 0.8	6.4 $\pm$ 1.4	2.6 $\pm$ 0.6
胃	^{125}I -IMP-R8	0.9 $\pm$ 0.2	0.7 $\pm$ 0.2	0.3 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.1
	^{131}I (CT)	1.1 $\pm$ 0.2	0.9 $\pm$ 0.3	0.4 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.1
Sm. Int.	^{125}I -IMP-R8	1.0 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.2	0.5 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.1
	^{131}I (CT)	0.8 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.1
Lg. Int.	^{125}I -IMP-R8	1.0 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.1
	^{131}I (CT)	0.6 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.1
肌	^{125}I -IMP-R8	0.8 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.1
	^{131}I (CT)	0.6 $\pm$ 0.04	0.6 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.1
骨	^{125}I -IMP-R8	1.4 $\pm$ 0.2	1.2 $\pm$ 0.3	1.4 $\pm$ 0.2	0.8 $\pm$ 0.2
	^{131}I (CT)	1.1 $\pm$ 0.2	0.9 $\pm$ 0.2	0.7 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.1

放射量测定计算, 根据生物分布使用 ^{125}I 替换 ^{131}I , 使用 Siegel, JA 和 Stabin, MG (Journal of Nuclear Medicine 1994; 35:152-156) 的方法实施。表-2 比较了残留性和常规放射性碘标记, 而图 10 用图形描述了数据。发现所有残留性药剂以递送给肿瘤剂量和肿瘤-比-非肿瘤比例的方式表现最佳; 考虑到有益放射化学产生和相同药剂可

获得的比活性而选择 ^{131}I -IMP-R4-HRS7 用于治疗实验。

表 2: 在 MDA-MB-468 肿瘤模型中由于
变化放射性碘化的 hRS7 而计算的辐射剂量

器官	模型	对血液标准化为 1500 cGy 的 cGy					
		I 组		II 组		III 组	
		IMP-R4	CT	IMP-R5	CT	IMP-R8	CT
肿瘤	(Trap 0 点 0)	6995	1613	5187	1506	4000	1206
肝	Exp	674	456	398	449	497	505
脾	Exp	535	315	336	313	384	356
肾	Exp	1063	402	867	361	761	394
肺	Exp	450	392	450	422	506	473
血液 (org)	Exp	1500	1500	1500	1500	1500	1500
胃	Exp	104	144	84	118	101	128
Sm. Int.	Exp	148	124	131	119	130	121
Lg. Int.	Exp	163	108	136	86	140	97
肌	Exp	112	99	105	100	97	93
骨	Exp	486	151	244	149	245	151
对血液 1500 cGy 的 mCi		0.231	0.285	0.213	0.239	0.248	0.255

裸鼠中 MDA-MB-468 人乳癌异种移植物的治疗

最大耐受剂量 (MTD): 从剂量确定数据 (表-2, 1 组) 中, ^{131}I -IMP-R4-hRS7 和 ^{131}I -hRS7 的 mCi 量, 对血液产生辐射剂量 1500 cGy (估计的 MTD) 分别计算为 0.231 mCi 和 0.285 mCi。在 Swiss 裸鼠中采用增加的每个药剂的剂量实施 MTD 的实验确定。对于 ^{131}I -IMP-R4-HRS7, 给予动物组 200, 225, 250, 275, 300 和 325 μCi ; 250 μCi 的剂量组的 5 只动物中的 1 只在 4 个月后死亡, 而 300 μCi 的剂量组的 4 只动物中的 3 只在 2 周~4 周间死亡。虽然 275 和 325 μCi 的剂量组中的动物在第 5 周均存活是未料到的, 我们仍总结了 231 μCi (从剂量

确定数据中计算的)和 250 μ Ci 给药剂量组间的 MTD。对于 ^{131}I -HRS7 (基于“CT”的放射性碘标记),用 250, 280, 310, 340, 370 和 400 μ Ci 注射动物组;2 周~3 周间,340 μ Ci 剂量组的 6 只动物中的 6 只,370 μ Ci 剂量组的 6 只动物中的 3 只,和 400 μ Ci 剂量组的 4 只动物中的 4 只死亡。根据这些,将 MTD 设为 280~310 μ Ci。

治疗研究-1

对于该用于将 ^{131}I -IMP-R4-hRS7 的效能与 ^{131}I -hRS7 (CT 法)的效能相比较的第一治疗实验,每种试剂使用其最大耐受剂量的~70%。单剂 175 μ Ci 残留性试剂显示出效能显著高于 200 μ Ci 的常规放射性碘剂。在该包括未治疗对照的实验中,每组使用 10 或 11 只动物,全部三组为随机分组以便使其起始肿瘤大小非常相似。在治疗前(第 2 日)三个组的平均肿瘤体积为 0.312 ± 0.181 , 0.308 ± 0.203 和 0.303 ± 0.212 。

在该实验中,第 49 日的过渡数据显示于图-11 下方。图-11 中上方的图显示了每组中各动物的肿瘤体积(CM^3),而下方的图显示了两种格式的平均肿瘤体积。未治疗组中死亡三只动物。残留性标记组的肿瘤生长控制要显著好于传统标记和未治疗组,如对平均肿瘤体积(MTV)直至 49 日的曲线下面积(AUC)的 student-t 检验所测定的。在 49 日,由于用 ^{131}I -IMP-R4-hRS7 治疗,MTV 的 AUC 出现的显著性差异(p 值),括弧内给出治疗前(第 2 日)各肿瘤体积差异 p 值,如下。对于未治疗:0.05 (0.78);对于 ^{131}I -hRS7 (CT):0.03 (0.98);对于 ^{131}I -hRS7 (CT)对未治疗:0.14 (0.81)。在 49 日,平均肿瘤体积在常规的和残留性放射性碘组间出现持续的离散,后一组导致持续的降低。在治疗后 8-周,在用 ^{131}I -IMP-R4-hRS7 治疗的组中 11 只小鼠中 5 只完全缓解,MTV 为起始值的 20%。未治疗的和 ^{131}I -hRS7-治疗的小鼠在 8 周的 MTV 分别为各起始值的 280%和 163%, ^{131}I -hRS7 组中 11 只小鼠中 1 只完全缓解。

治疗被良好耐受。IMP-R4 组在第 2 日时的平均体重为 21.93 ± 2.03 和而在第 49 日时为 23.68 ± 1.81 ;对于“CT”组,平均体重在第 2 日和 49 日分别为 21.77 ± 2.21 和 23.90 ± 2.64 。治疗组的骨髓中毒性,如通过血细胞计数所确定的,显示于图-12 中。简言之:对于使用

^{131}I -IMP-R4-HRS7, 在施用药剂 1 周后对于 WBC, 淋巴细胞和中性白细胞计数, 达到分别为对照水平的 34%, 7%和 61%的最低值。在第 5 周, 这些分别恢复到对照水平的 74%, 58%和 92%, 并在第 49 日保持在对照水平的 45%, 36%和 51%; 而对于 ^{131}I -hRS7 (CT): 在施用药剂 1 周后对于 WBC, 淋巴细胞和中性白细胞计数, 达到分别为对照水平的 41%, 13%和 67%的最低值。在第 5 周, 这些分别恢复到对照水平的 85%, 67%和 103%, 并在第 49 日保持在对照水平的 42%, 32%和 49%。

治疗研究-2

在 MDA-MB-468 肿瘤模型中使用 ^{131}I -IMP-R4-hRS7 的 RAIT 的特异性将 ^{131}I -IMP-R4-hRS7 的效能与非特异性用 ^{131}I -IMP-R4 标记的对照人源化抗体, hLL2 (抗-CD-22 MAb) 的效能进行比较。在该实验中, 施用 175 μCi 的各试剂。这代表 ^{131}I -IMP-R4-hRS7 最大耐受剂量的 ~70%。在该包括未治疗的对照的实验中, 每组使用 7~8 只动物, 如治疗实验 1 参照起始肿瘤体积分布而随机分组。图 13, 显示了三个组的相对平均肿瘤体积 (MTV) (治疗前 MTV:100), 显示出特异性的生长调节。

实施例 5. 用 Y-90 人源化 RS7 mAb 和裸人源化 RS7 mAb 治疗乳癌患者:

某女, 56 岁, 有乳腺癌复发史, 表现为颈部淋巴结和左侧肺转移的。该患者在化疗和激素治疗后复发两次。该患者随后接受了两次治疗性注射 (间隔 2 周) Y-90-缀合的人源化 RS7 mAb i. v., 每次的剂量为抗体蛋白剂量 100 mg 中 20 mCi Y-90。治疗后四周, 该患者白血细胞和血小板计数降低了约 50%, 但在治疗后 9 周恢复。在治疗后 12 周的再肿瘤分类, 计算机断层摄影检测到肺和淋巴结转移降低 30%。此后, 该患者接受了 4 次一周一次的输注 (每次超过 3 小时) 被良好耐受的裸人源化 RS7, 除了某些短暂的僵直和寒战, 没有对其血液计数或血液化学产生任何不良作用。每次输注的裸抗体为 400 mg/m²。大约 8 周后, 经由计算机断层摄影的再肿瘤分类显示出在可检测的损害中的额外降低了约 20%。在随访检测 3 个月后, 该患者的疾病表现稳定 (即, 没有表现出附加的或进展性的生长)。

序列表

<110> IMMUNOMEDICS, INC.

<120> RS7 抗体

<130> 018733/1164

<140> PCT/GB02/00885

<141> 2003-03-03

<150> 60/360,229

<151> 2002-03-01

<160> 28

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 324

<212> DNA

<213> Mus sp.

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(324)

<400> 1

gac att cag ctg acc cag tct cac aaa ttc atg tcc aca tca gta gga	48
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly	
1 5 10 15	
gac agg gtc agc atc acc tgc aag gcc agt cag gat gtg agt att gct	96
Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Ala	
20 25 30	
gta gcc tgg tat caa cag aaa cca gga caa tct cct aaa cta ctg att	144
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile	
35 40 45	
tac tcg gca tcc tac cgg tac act gga gtc cct gat cgc ttc act ggc	192
Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly	
50 55 60	
agt gga tct ggg acg gat ttc act ttc acc atc agc agt gtg cag gct	240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala	
65 70 75 80	
gaa gac ctg gca gtt tat tac tgt cag caa cat tat att act ccg ctc	288

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ile Thr Pro Leu
 85 90 95

acg ttc ggt gct ggg acc aag ctg gag ctg aaa cgg 324
 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
 100 105

<210> 2
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 2
 Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15

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

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

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

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

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ile Thr Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
 100 105

<210> 3
 <211> 360
 <212> DNA
 <213> Mus sp.

<220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (360)

<400> 3
 gtg aag ctg cag gag tca gga cct gag ctg aag aag cct gga gag aca 48
 Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr
 1 5 10 15

```

gtc aag atc tcc tgc aag gct tct gga tat acc ttc aca aac tat gga 96
Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly
                20                25                30

atg aac tgg gtg aag cag gct cca gga aag ggt tta aag tgg atg ggc 144
Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met Gly
                35                40                45

tgg ata aac acc tac act gga gag cca aca tat act gat gac ttc aag 192
Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Thr Asp Asp Phe Lys
                50                55                60

gga cgg ttt gcc ttc tct ttg gaa acc tct gcc acc act gcc tat ttg 240
Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Thr Thr Ala Tyr Leu
        65                70                75                80

cag atc aac aac ctc aaa agt gag gac atg gct aca tat ttc tgt gca 288
Gln Ile Asn Asn Leu Lys Ser Glu Asp Met Ala Thr Tyr Phe Cys Ala
                85                90                95

aga ggg ggg ttc ggt agt agc tac tgg tac ttc gat gtc tgg ggc caa 336
Arg Gly Gly Phe Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln
                100                105                110

ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca 360
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
        115                120

```

<210> 4
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

```

<400> 4
Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr
  1                5                10                15

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

Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met Gly
                35                40                45

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Thr Asp Asp Phe Lys
        50                55                60

Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Thr Thr Ala Tyr Leu

```

65		70		75		80
Gln Ile Asn Asn Leu Lys Ser Glu Asp Met Ala Thr Tyr Phe Cys Ala						
		85		90		95
Arg Gly Gly Phe Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln						
		100		105		110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser						
		115		120		

<210> 5
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 人类

<400> 5
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105

<210> 6
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人类

<400> 6
Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala Ser
1 5 10 15

Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Ala
20 25 30

Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
35 40 45

Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Asn Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe Thr
50 55 60

Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Glu Asp Ser Asn Gly Tyr Lys Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Ser Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 7
<211> 324
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：人源化hRS7Vk序列

<220>
<221> CDS
<222> (1).. (324)

<400> 7
gac atc cag ctg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga 48
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
gac aga gtc agc atc acc tgc aag gcc agt cag gat gtg agt att gct 96
Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Ala
20 25 30
gta gcc tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc 144
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
tac tcg gca tcc tac cgg tac act gga gtc cct gat agg ttc agt ggc 192
Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly

50	55	60	
agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agt ctg caa cct			240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro			
65	70	75	80
gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt cag caa cat tat att act ccg ctc			288
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ile Thr Pro Leu			
	85	90	95
acg ttc ggt gct ggg acc aag gtg gag atc aaa cgt			324
Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg			
	100	105	

<210> 8

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：人源化hRS7Vk氨基酸序列

<400> 8

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ile Thr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 9

<211> 363

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：人源化hRS7VH序列

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (363)

<400> 9

cag gtc caa ctg cag caa tct ggg tct gag ttg aag aag cct ggg gcc	48
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala	
1 5 10 15	

tca gtg aag gtt tcc tgc aag gct tct gga tac acc ttc aca aac tat	96
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr	
20 25 30	

gga atg aac tgg gtg aag cag gcc cct gga caa ggg ctt aaa tgg atg	144
Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met	
35 40 45	

ggc tgg ata aac acc tac act gga gag cca aca tat act gat gac ttc	192
Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Thr Asp Asp Phe	
50 55 60	

aag gga cgg ttt gcc ttc tcc ttg gac acc tct gtc agc acg gca tat	240
Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr	
65 70 75 80	

ctc cag atc agc agc cta aag gct gac gac act gcc gtg tat ttc tgt	288
Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys	
85 90 95	

gca aga ggg ggg ttc ggt agt agc tac tgg tac ttc gat gtc tgg ggc	336
Ala Arg Gly Gly Phe Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly	
100 105 110	

caa ggg tcc ctg gtc acc gtc tcc tca	363
Gln Gly Ser Leu Val Thr Val Ser Ser	
115 120	

<210> 10

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：人源化hRS7VH氨基酸序列

<400> 10

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Thr Asp Asp Phe
50 55 60

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

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Phe Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Ser Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 11

<211> 702

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：人源化hRS7k序列

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (699)

<400> 11

atg gga tgg agc tgt atc atc ctc ttc ttg gta gca aca gct aca ggt 48
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

gtc cac tcc gac atc cag ctg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca 96
Val His Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
20 25 30

tct gta gga gac aga gtc agc atc acc tgc aag gcc agt cag gat gtg	144
Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val	
35 40 45	
agt att gct gta gcc tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag	192
Ser Ile Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys	
50 55 60	
ctc ctg atc tac tcg gca tcc tac cgg tac act gga gtc cct gat agg	240
Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg	
65 70 75 80	
ttc agt ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agt	288
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser	
85 90 95	
ctg caa cct gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt cag caa cat tat att	336
Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ile	
100 105 110	
act ccg ctc acg ttc ggt gct ggg acc aag gtg gag atc aaa cgt act	384
Thr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr	
115 120 125	
gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag cag ttg	432
Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu	
130 135 140	
aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat ccc	480
Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro	
145 150 155 160	
aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa tcg ggt	528
Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly	
165 170 175	
aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc acc tac	576
Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr	
180 185 190	
agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag aaa cac	624
Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His	
195 200 205	
aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg ccc gtc	672
Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val	
210 215 220	
aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt tag	702

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 12
<211> 233
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：人源化hRS7k氨基酸序列

<400> 12
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
20 25 30

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

Ser Ile Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
50 55 60

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

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

Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ile
100 105 110

Thr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
115 120 125

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
130 135 140

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
145 150 155 160

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
165 170 175

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
180 185 190

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
195 200 205

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
210 215 220

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 13

<211> 1410

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：人源化hRS7H序列

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (1407)

<400> 13

atg gga tgg agc tgt atc atc ctc ttc ttg gta gca aca gct aca ggt 48
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

gtc cac tcc gtc caa ctg cag caa tct ggg tct gag ttg aag aag cct 96
Val His Ser Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro
20 25 30

ggg gcc tca gtg aag gtt tcc tgc aag gct tct gga tac acc ttc aca 144
Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
35 40 45

aac tat gga atg aac tgg gtg aag cag gcc cct gga caa ggg ctt aaa 192
Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys
50 55 60

tgg atg ggc tgg ata aac acc tac act gga gag cca aca tat act gat 240
Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Thr Asp
65 70 75 80

gac ttc aag gga cgg ttt gcc ttc tcc ttg gac acc tct gtc agc acg 288
Asp Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr
85 90 95

gca tat ctc cag atc agc agc cta aag gct gac gac act gcc gtg tat 336
Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr

100	105	110	
ttc tgt gca aga ggg ggg ttc ggt agt agc tac tgg tac ttc gat gtc Phe Cys Ala Arg Gly Gly Phe Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val 115 120 125			384
tgg ggc caa ggg tcc ctg gtc acc gtc tcc tca gcc tcc acc aag ggc Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly 130 135 140			432
cca tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct ggg ggc Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly 145 150 155 160			480
aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val 165 170 175			528
acg gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe 180 185 190			576
ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg gtg Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val 195 200 205			624
acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val 210 215 220			672
aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aga gtt gag ccc aaa Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys 225 230 235 240			720
tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu 245 250 255			768
ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr 260 265 270			816
ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val 275 280 285			864
agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val 290 295 300			912

```

gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc 960
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
305                      310                      315                      320

acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg 1008
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
                      325                      330                      335

aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc 1056
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
                      340                      345                      350

ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca 1104
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
                      355                      360                      365

cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag aac cag 1152
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
                      370                      375                      380

gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc 1200
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
385                      390                      395                      400

gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg 1248
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
                      405                      410                      415

cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tat agc aag ctc 1296
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
                      420                      425                      430

acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc 1344
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
                      435                      440                      445

gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc 1392
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
                      450                      455                      460

ctg tct ccg ggt aaa tga 1410
Leu Ser Pro Gly Lys
465

```

<210> 14

<211> 469

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：人源化hRS7H氨基酸序列

<400> 14

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

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

Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
35 40 45

Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys
50 55 60

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

Asp Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr
85 90 95

Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr
100 105 110

Phe Cys Ala Arg Gly Gly Phe Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
115 120 125

Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
130 135 140

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
145 150 155 160

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
165 170 175

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
180 185 190

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
195 200 205

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
210 215 220

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys

225		230		235		240
Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu						
		245		250		255
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr						
		260		265		270
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val						
		275		280		285
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val						
		290		295		300
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser						
305		310		315		320
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu						
		325		330		335
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala						
		340		345		350
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro						
		355		360		365
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln						
		370		375		380
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala						
385		390		395		400
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr						
		405		410		415
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu						
		420		425		430
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser						
		435		440		445
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser						
		450		455		460
Leu Ser Pro Gly Lys						
465						

<210> 15

<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 15
Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Ala Val Ala
1 5 10

<210> 16
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 16
Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr
1 5

<210> 17
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 17
Gln Gln His Tyr Ile Thr Pro Leu Thr
1 5

<210> 18
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 18
Asn Tyr Gly Met Asn
1 5

<210> 19
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 19
Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Thr Asp Asp Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 20
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 20
Gly Gly Phe Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 21
<211> 176
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 21
ggctctgagtt gaagaagcct ggggcctcag tgaaggtttc ctgcaaggct tctggataca 60
ccttcacaaa ctatggaatg aactgggtga agcaggcccc tggacaaggg cttaaattgga 120
tgggctggat aaacacctac actggagagc caacatatat tgatgacttc aaggga 176

<210> 22
<211> 168
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 22

```
acccttg gcc ccagacatcg aagtaccagt agctactacc gaacccccct cttgcacaga 60
aatacacggc agtgtcgtca gcctttaggc tgctgatctg gagatatgcc gtgtgacag 120
aggtgtccaa ggagaaggca aaccgtccct tgaagtcac agtatatg 168
```

<210> 23

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 23

```
gtggtgctgc agcaatctgg gtctgagttg aagaagcc 38
```

<210> 24

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 24

```
tgaggagacg gtgaccagg acccttg gcc ccagacat 38
```

<210> 25

<211> 156

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 25

```
ctccatcctc cctgtctgca tetgtaggag acagagtcag catcacctgc aaggccagtc 60
aggatgtgag tattgctgta gcctgggtatc agcagaaacc agggaaagcc cctaagctcc 120
tgatctactc ggcacacctac cggtacactg gactcc 156
```

<210> 26

<211> 155

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 26

```
ccttggtccc agcaccgaac gtgagcggag taatataatg ttgctgacag taataaaactg 60
caaaatcttc aggttgcaga ctgctgatgg tgagagtga atctgtccca gatccactgc 120
cactgaacct atcagggact ccagtgtacc ggtag 155
```

<210> 27

<211> 37

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 27

```
gacattcagc tgaccagtc tccatcctcc ctgtctg 37
```

<210> 28

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 28

```
acgttagatc tccaccttgg tcccagcacc g 31
```

1

15

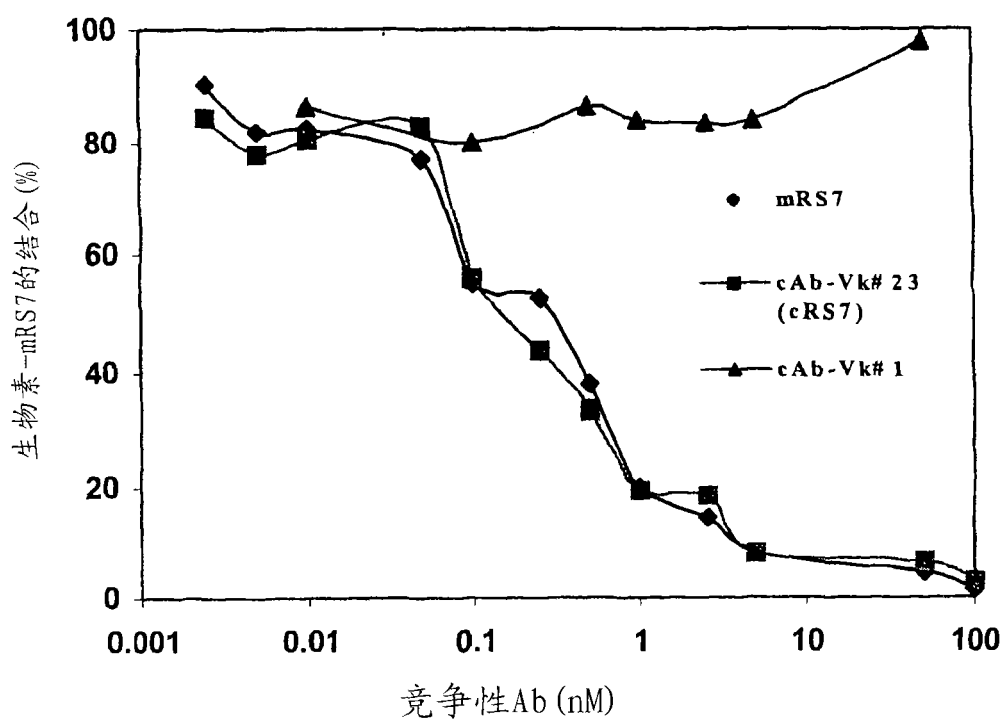


图 1

RS7Vk

GACATTGAGCTGACCCAGTCTCACAAATTTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCATCACCTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGAGT
1 10 20 30
D I Q L T Q S H K F M S T S V G D R V S I T C K A S Q D V S
L1

90

ATTGCTGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGACAAATCTCCTAAACTACTGATTACTCGGCATCCTACCGGTACACTGGAGTCCCTGAT
40 50 60
I A V A W Y Q Q K P G Q S P K L L I Y S A S Y R Y T G V P D
L2

180

CGCTTCACTGGCAGTGGATCTGGACGGATTTCACCTTTCACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAA
70 80 90
R F T G S G S G T D F T F T I S S V Q A E D L A V Y Y C Q Q
L3

270

CATTATATTACTCCGCTCACGTTTCGGTGTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGG
100 108
H Y I T P L T F G A G T K L E L K R
L3

324

图 2A

RS7VH

GTGAAGCTGCAGGAGTCAGGACCTGAGCTGAAGAAAGCCTGGAGAGACAGTCAAGATCTCCTGCAAGGCTTCTGGATATACCTTCACAAAC
2 10 20 30 90
V K L Q E S G P E L K K K P G E T V K I S C K A S G Y T F T N

TATGGAATGAACCTGGGTGAAGCAGGCTCCAGGAAAGGGTTTAAAGTGGATGGGCTGGATAAAACACCTACACTGGAGAGGCCAACATATACT
40 50 60 180
Y G M N W V K Q A P G K G L K K W M G W I N T Y T G E P T Y T

GATGACTTCAAGGACGGTTTGCCCTTCTCTTTGGAAACCTCTGCCACCACTGCCTATTGCGAGATCAACAACCTCAAAAAGTGAGGACATG
70 80 82 A B C 270
D D F K G R F A F S L E T S A T T A Y L Q I N N L K S E D M

GCTACATATTTCTGTGCAAGAGGGGGTTCGGTAGTAGTACTGGTACTTCGATGTCCTGGGGCCAAAGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
90 100 A B C D 110 113 360
A T Y F C A R G G F G S S Y W Y F D V W G Q G T T V T V S S

H1

H2

H3

图 2B

77

	1	10	20	30	40
SA-1A' c1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	CRASQSISSYLNWYQQK			
RS7	DIQL●●HKFM●T●●●●S●●●●	K●●DV●IAVA●●●●●●			
hRS7	<u>DIQL●●●●●●●●●●S●●●●</u>	<u>K●●DVSIAVA●●●●●●</u>			

	50	60	70	80
SA-1A' CL	GKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFS	SGSGTDFLTIS	SLQP	
RS7	●QS●●●●S●YRYT●●●●D●●	T●●●●●●●●F●●V●A		
hRS7	●●●●●●●S●YRYT●●●●D●●	●●●●●●●●●●●●●●●●		

	90	100	108
SA-1A' CL	EDFATYCCQQSYSTPLTFGGG	TKVEI--	
RS7	●L●V●●●●●H●I●●●●●A●●●●	L●LKR	
hRS7	●●●●V●●●●●H●I●●●●●A●●●●	<u>IKR</u>	

图 3A

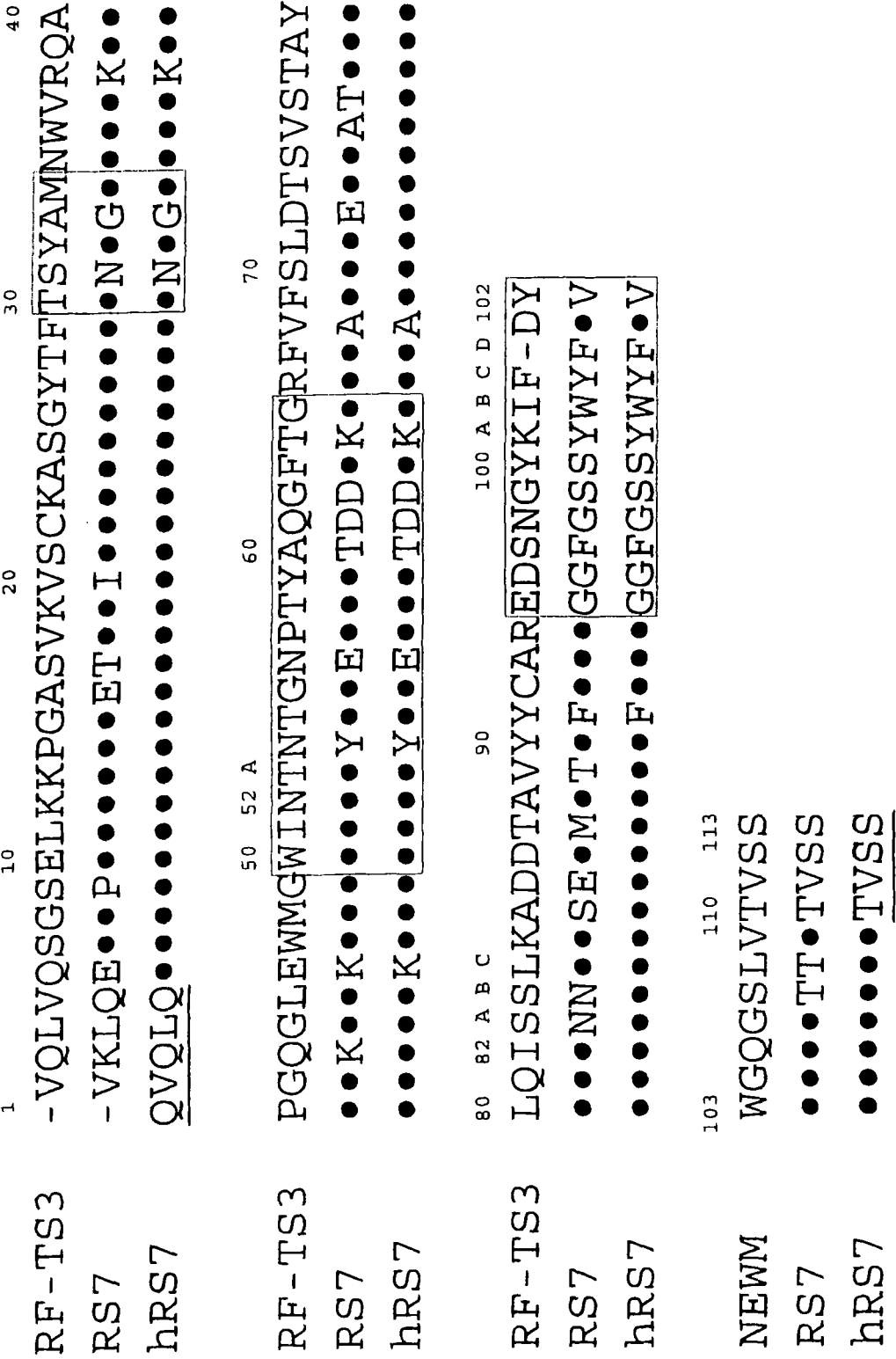


图 3B

hRS7Vk

GACATCCAGCTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGTCATCTGTAGGACAGAGTCAGCATCACCTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGAGT	90
D I Q L T Q S P S S L S A S V G D R V S I T C <u>K A S Q D V S</u>	30
	L1
ATTGCTGTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTACTCGGCATCCTACCGGTACACTGGAGTCCCCTGAT	180
<u>I A V A</u> W Y Q Q K P G K A P K L L I Y <u>S A S Y R Y T G V P D</u>	60
	L2
AGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTGAGCAA	270
R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A V Y Y C <u>Q Q</u>	90
CATTATATTACTCCGCTCACGTTTCGGTGCTGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGT	324
<u>H Y I T P L T F G A G T K V E I K R</u>	108
	L3

图 4A

hRS7VH

CAGGTCCAACTGCAGCAATCTGGGTCTGAGTTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCTCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACA	90
Q V Q L Q Q S G S E L K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T	30
AACTATGGAATGAACTGGGTGAAGCAGGCCCCCTGGACAAGGCTTAAATGGATGGCTGGATAAACACCTACACTGGAGAGCCCAACATAT	180
<u>N Y G M N W V K Q A P G Q G L K W M G W I N T Y T G E P T Y</u>	59
H1	H2
ACTGATGACTTCAAGGACGGTTTGCCCTTCTCCTTGGACACCTCTGTGTCAGCACGGCATATCTCCAGATCAGCAGCCCTAAAGGCTGACGAC	270
<u>T D D F K G R F A F S L D T S V S T A Y L Q I S S L K A D D</u>	86
ACTGCCGTGTATTCTGTGCAAGAGGGGGTTTCGGTAGTAGCTACTGTACTTCCGATGTCTGGGGCCCAAGGTCCTGGTCAACCGTCTCC	360
<u>T A V Y F C A R G G F G S S Y W Y F D V W G Q G S L V T V S</u>	112
H3	
TCA	363
S	113

图 4B

```

ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTCCACTCCGACATCCAGTGTCCATCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGACAGAGTCAGCATC 120
M G W S C I I L F L V A T A T G V H S D I Q L T Q S P S L S A S V G D R V S I 40
ACCTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGAGTATTGCTGTAGCTGGTATCAGCAGAAACCCAGGAAAGCCCTAAGCTCTGATCTACTCGGCATCCTACCGGTACACTGGAGTCCCTGATAGG 240
T C K A S Q D V S I A V A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y S A S Y R Y T G V P D R 80
TTCAGTGGCAGCTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCACTTTTATTACTGTCAAGCAACATTATATCTCCGCTCACCCTCGGTGCTGGG 360
F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A V Y Y C Q Q H Y I T P L T F G A G 120
ACCAAGGTGGAGATCAAAACGTACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAATCTGGAACTGCCCTGTGTGTGCCTGCTGAATPACTTCTATCCC 480
T K V E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P 160
AGAGAGGCCCAAGTACAGTGGAGTGGATAACGCCCTCCCAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAGCACCCTACAGCCCTCAGCAGCACCCTGACGCTG 600
R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L 200
AGCAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCCTGCGAAGTACCCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAACAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG 702
S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C * 233

```

图 5A

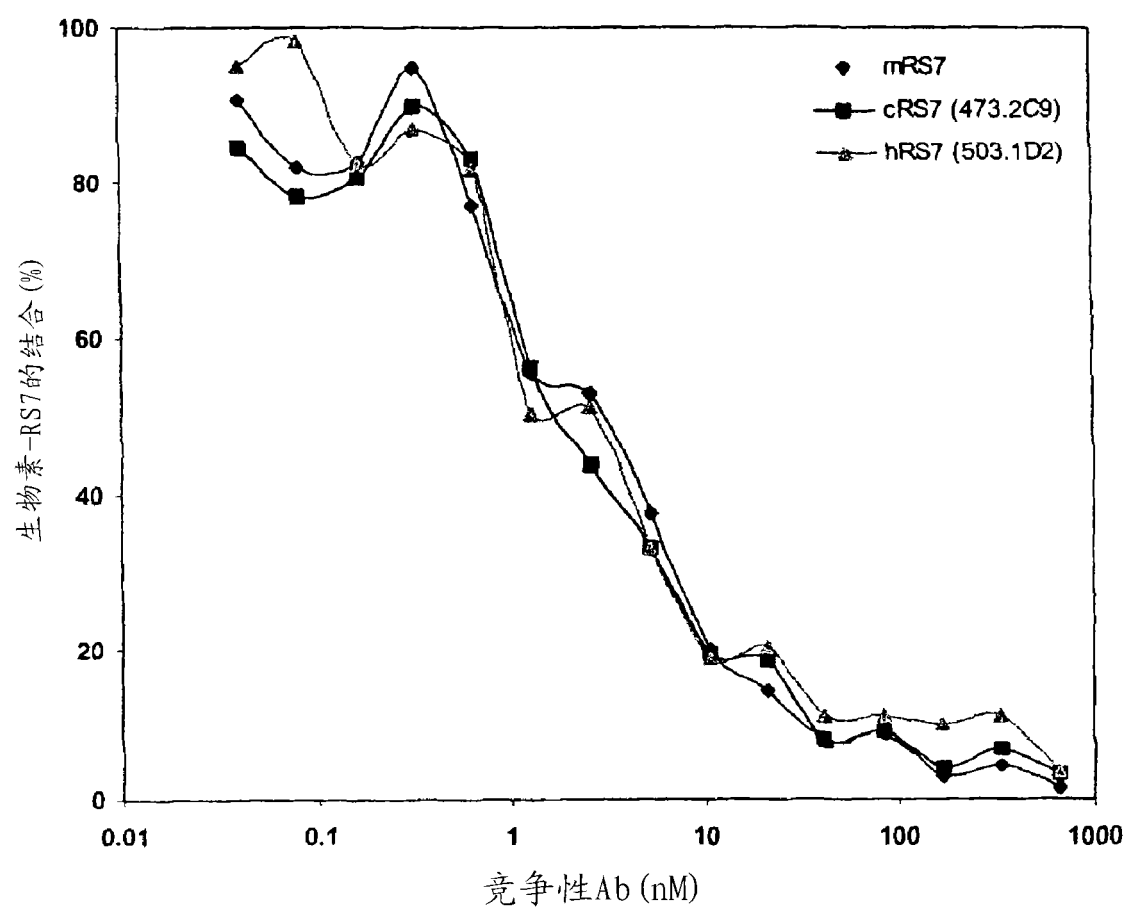


图 6

```

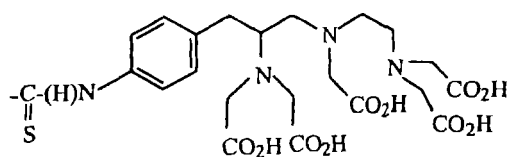
ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTCCACTCGACATCCAGCTGACCCAGTCTCCATCCTCCTGTCTGTCATCTGTAGGAGACAGAGTCAGCATC 120
M G W S C I I L F L V A T A T G V H S D I Q L T Q S P S L S A S V G D R V S I 40
ACCTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGAGTATTGCTGTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAAGGGAAGCCCTTAAGCTCCTGATCTACTCGGCATCCTACCGGTACACTGGAGTCCCTGATAGG 240
T C K A S Q D V S I A V A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y S A S Y R Y T G V P D R 80
TTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACCTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTGCAAGTTTACTGTACAGCAACATTATATTACTCCGCTCACGTTCCGTTGCTGGG 360
F S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A V Y Y C Q Q H Y I T P L T F G A G 120
ACCAAGGTGGAGATCAACCGTACTGTGGTGCACCATCTGTCTTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCC 480
T K V E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N F Y P 160
AGAGAGGCCCAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCCAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTG 600
R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L 200
AGCAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCCTGCGGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCCGTACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAG 702
S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C * 233

```

图 7

图表-1. IMP-4、IMP-5和IMP-R8的结构

在这些结构中, IMP-R1至IMP-R6中的 ‘MCC’ 是4-(N-马来酰亚氨基甲基)-环己烷-1-羧基残基; IMP-R8中的 ‘MMC’ 是马来酰亚氨基甲基羧基残基; 1-((p-CSNH) 苄基) DTPA是:



- IMP-R4:** MCC-Lys(MCC)-Lys(1-((p-CSNH) 苄基) DTPA)-D-Tyr-D-Lys(1-((p-CSNH) 苄基) DTPA)-OH
- IMP-R5:** MCC-Asp-D-Tyr-D-Lys(1-((p-CSNH) 苄基) DTPA)-OH
- IMP-R8:** MMC-Lys(MMC)-Asp-D-Tyr-D-Lys(1-((p-CSNH) 苄基) DTPA)-OH

图 9

MDA-MB-468肿瘤模型中由于放射性碘化的bRS7的剂量确定

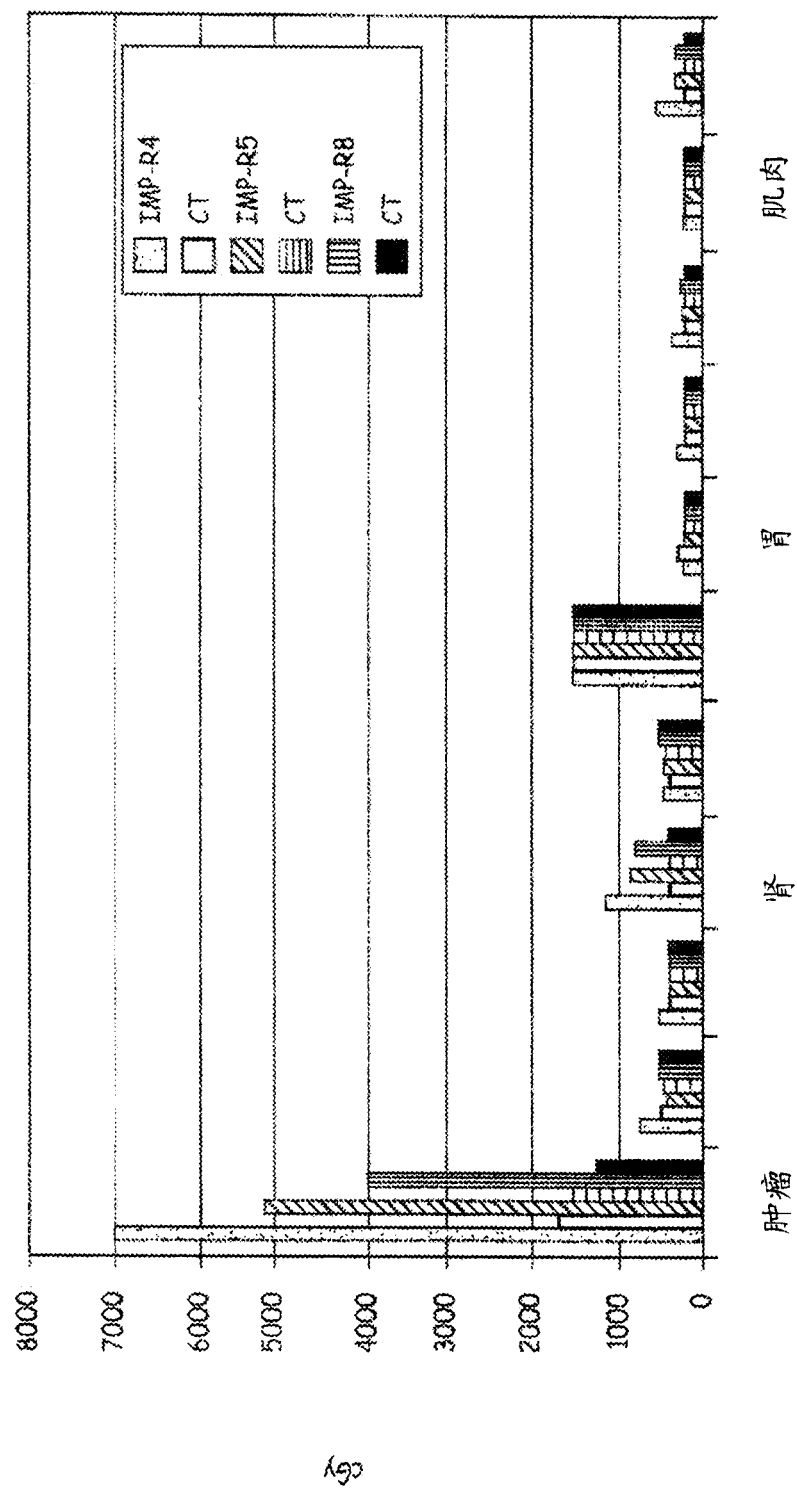


图 10

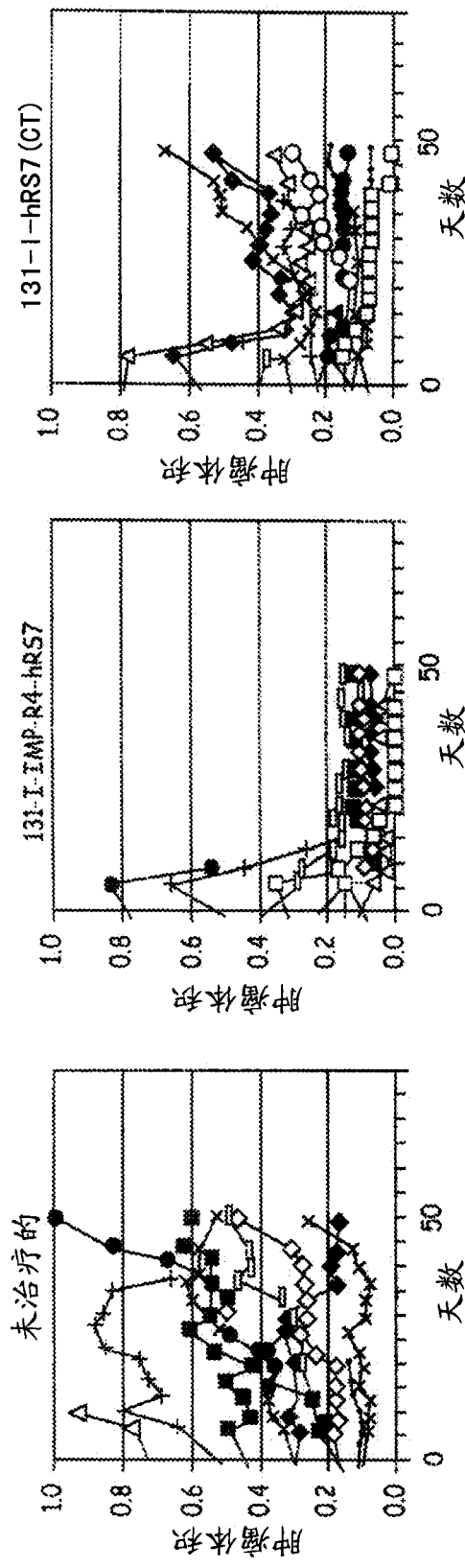


图 11A

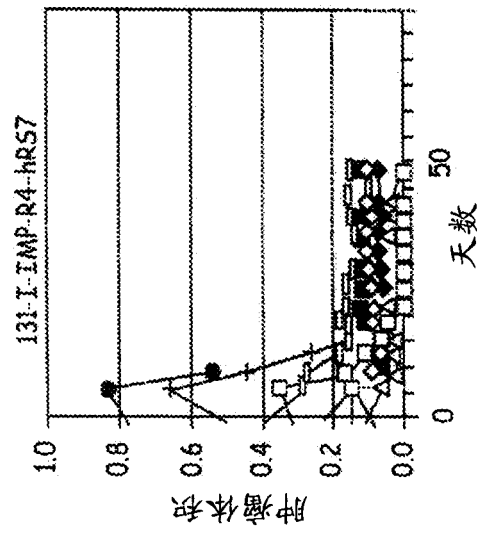


图 11B

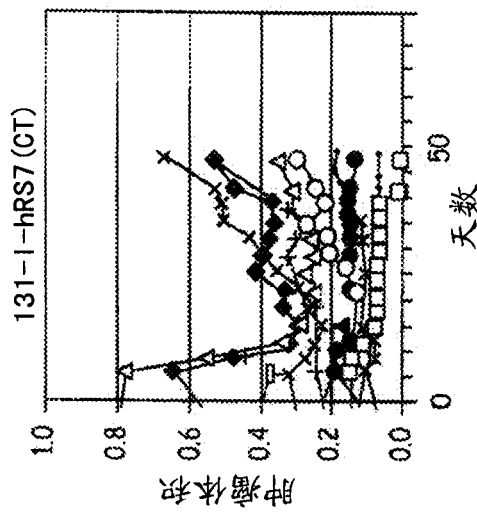


图 11C

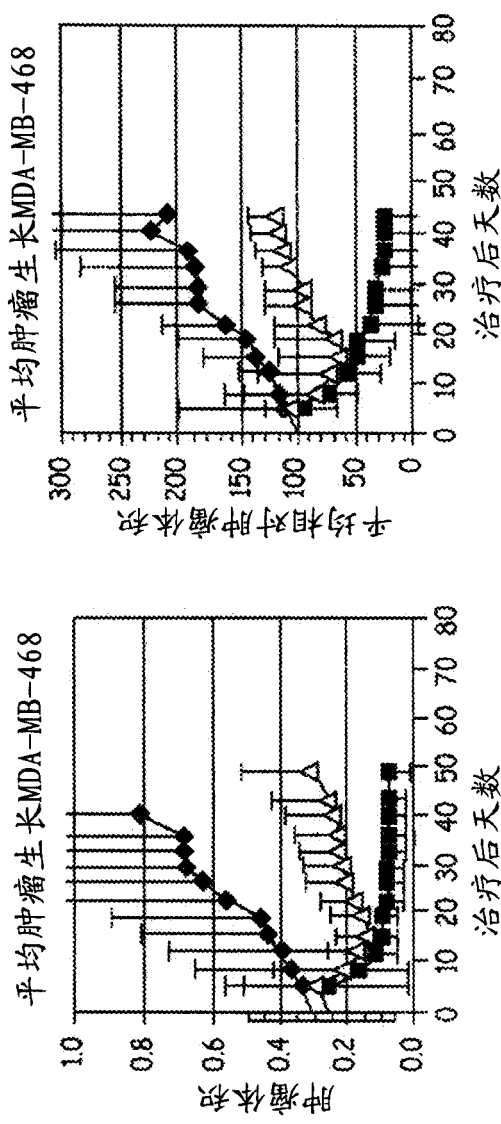


图 11D

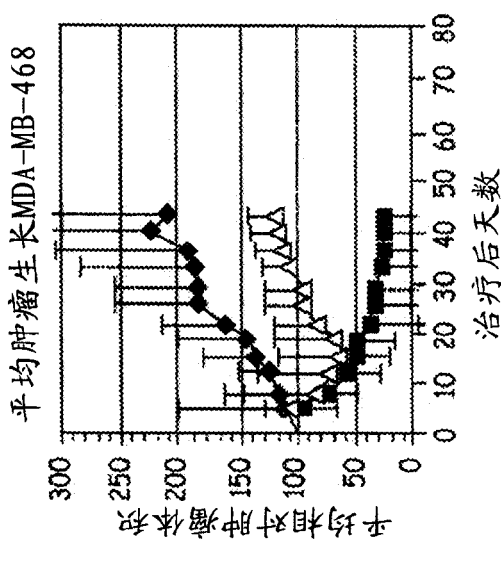


图 11E

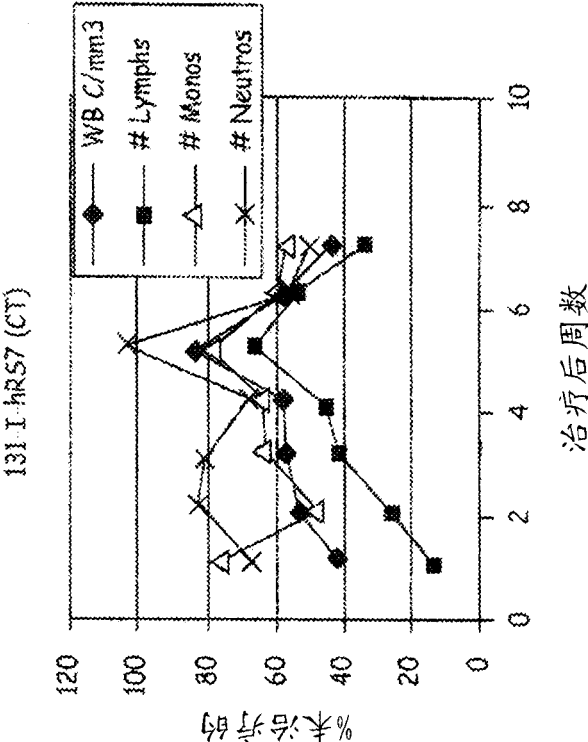


图 12B

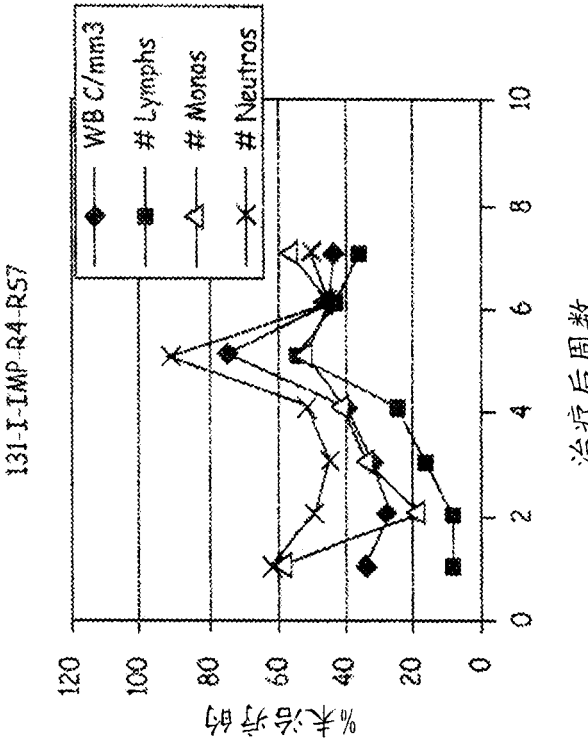


图 12A

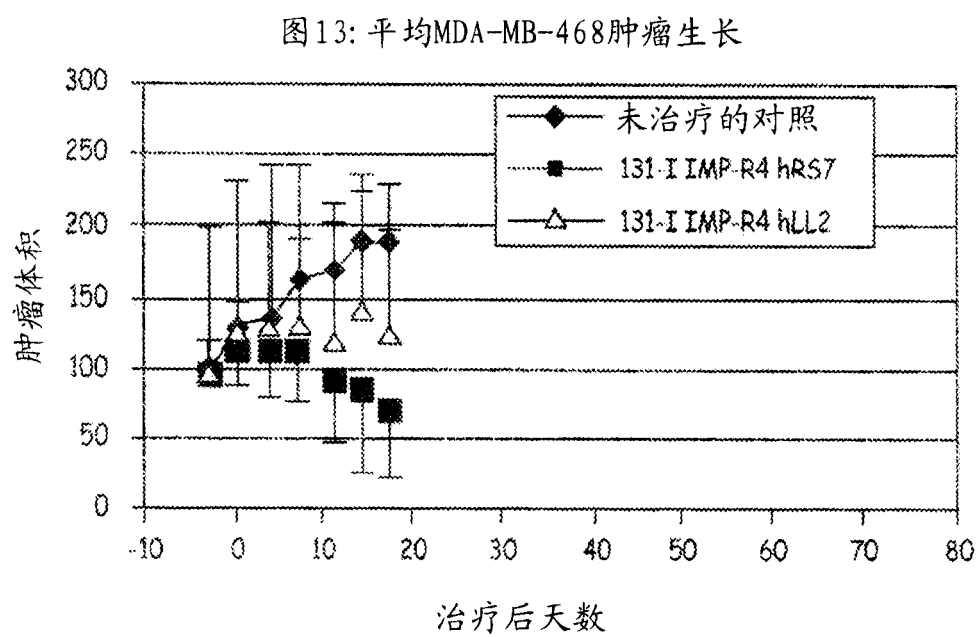


图 13

专利名称(译)	RS7抗体		
公开(公告)号	CN101264325A	公开(公告)日	2008-09-17
申请号	CN200710185161.2	申请日	2003-03-03
[标]申请(专利权)人(译)	免疫医疗公司		
申请(专利权)人(译)	免疫医疗公司		
当前申请(专利权)人(译)	免疫医疗公司		
[标]发明人	S戈文丹 Z屈 HJ汉森 DM戈登伯格		
发明人	S·戈文丹 Z·屈 H·J·汉森 D·M·戈登伯格		
IPC分类号	A61K39/395 A61P35/00 C07K16/30 G01N33/53 G01N33/532 A61K51/10		
CPC分类号	C07K2317/24 A61K39/39558 A61K51/1051 C07K16/3015 C07K16/30 C07K2317/21 A61K2039/505 A61K51/1045 A61K45/06		
代理人(译)	刘健 刘玥		
优先权	60/360229 2002-03-01 US		
其他公开文献	CN101264325B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及单价和多价的，单特异性结合蛋白和涉及多价的，多特异性结合蛋白。这些结合蛋白的一个实施方案含有一个或多个结合位点，其中每个结合位点与靶抗原或靶抗原上的表位结合。这些结合蛋白的另一实施方案含有两个或多个结合位点，其中每个结合位点具有对靶抗原上不同表位的亲和性或具有对靶抗原或半抗原的亲和性。本发明还涉及用于在宿主中表达这些功能性结合蛋白的重组载体。更具体地，本发明涉及名为RS7的肿瘤相关抗原结合蛋白和其它EGP - 1结合蛋白。本发明还涉及人源化，人和嵌合RS7抗原结合蛋白，以及该结合蛋白在诊断和治疗中的用途。

组织	标记物	% ID/g $\pm$ SD ¹ , n=5			
		24 小时	72 小时	168 小时, n=4	336 小时
MDA-MB-468	¹²⁵ I-IMP-R4	32.8 $\pm$ 6.3	46.8 $\pm$ 11.0	41.6 $\pm$ 3.0	25.1 $\pm$ 3.8
	¹²⁵ I (CT)	8.6 $\pm$ 1.5	8.6 $\pm$ 2.3	5.9 $\pm$ 0.9	4.4 $\pm$ 0.8
	肿瘤 wt.	(0.19 $\pm$ 0.06)	(0.19 $\pm$ 0.08)	(0.13 $\pm$ 0.07)	(0.18 $\pm$ 0.04)
肝	¹²⁵ I-IMP-R4	5.7 $\pm$ 0.7	4.7 $\pm$ 1.5	2.8 $\pm$ 0.4	1.3 $\pm$ 0.2
	¹²⁵ I (CT)	4.1 $\pm$ 0.3	2.0 $\pm$ 0.1	1.5 $\pm$ 0.2	0.7 $\pm$ 0.1
脾	¹²⁵ I-IMP-R4	3.6 $\pm$ 0.6	3.3 $\pm$ 0.6	2.6 $\pm$ 0.8	1.9 $\pm$ 0.2
	¹²⁵ I (CT)	2.6 $\pm$ 0.5	1.7 $\pm$ 0.4	1.1 $\pm$ 0.4	0.6 $\pm$ 0.1
肾	¹²⁵ I-IMP-R4	7.8 $\pm$ 0.7	6.8 $\pm$ 0.4	5.6 $\pm$ 0.8	3.0 $\pm$ 0.5
	¹²⁵ I (CT)	3.5 $\pm$ 0.3	2.1 $\pm$ 0.3	1.4 $\pm$ 0.3	0.7 $\pm$ 0.1
肺	¹²⁵ I-IMP-R4	4.5 $\pm$ 1.0	3.2 $\pm$ 0.6	2.2 $\pm$ 0.7	0.8 $\pm$ 0.2
	¹²⁵ I (CT)	3.1 $\pm$ 0.8	2.2 $\pm$ 0.4	1.6 $\pm$ 0.6	0.6 $\pm$ 0.2
血液	¹²⁵ I-IMP-R4	15.1 $\pm$ 1.4	9.5 $\pm$ 0.7	6.0 $\pm$ 1.5	1.9 $\pm$ 0.6
	¹²⁵ I (CT)	10.8 $\pm$ 1.0	7.3 $\pm$ 0.6	5.3 $\pm$ 1.2	2.2 $\pm$ 0.6
胃	¹²⁵ I-IMP-R4	1.3 $\pm$ 0.2	0.6 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.1
	¹²⁵ I (CT)	1.6 $\pm$ 0.5	0.7 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.1
Sm. Int.	¹²⁵ I-IMP-R4	1.5 $\pm$ 0.2	0.9 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.2	0.2 $\pm$ 0.1
	¹²⁵ I (CT)	1.0 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.04
Lg. Int.	¹²⁵ I-IMP-R4	1.3 $\pm$ 0.3	1.0 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.1
	¹²⁵ I (CT)	0.8 $\pm$ 0.2	0.5 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.03
肌	¹²⁵ I-IMP-R4	1.2 $\pm$ 0.2	0.7 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.2
	¹²⁵ I (CT)	0.9 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.05	0.3 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.1
骨	¹²⁵ I-IMP-R4	2.3 $\pm$ 0.3	2.1 $\pm$ 0.3	2.4 $\pm$ 0.6	2.3 $\pm$ 1.2
	¹²⁵ I (CT)	1.4 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.1