



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109422810 A

(43)申请公布日 2019.03.05

(21)申请号 201710736516.6

A61P 37/02(2006.01)

(22)申请日 2017.08.24

A61P 29/00(2006.01)

(71)申请人 孙立春

A61P 3/00(2006.01)

地址 415000 湖南省常德市武陵区三岔路  
人民西路578号1栋2单元附11号

A61P 3/10(2006.01)

申请人 蔡车国

A61P 3/04(2006.01)

A61P 19/06(2006.01)

A61P 9/12(2006.01)

(72)发明人 孙立春 蔡车国 朱波

(51)Int.Cl.

C07K 16/28(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

A61P 31/00(2006.01)

A61P 1/16(2006.01)

A61P 33/06(2006.01)

A61P 37/06(2006.01)

权利要求书3页 说明书15页 附图7页

(54)发明名称

全人源或人源化bombesin受体GRPR单克隆  
抗体药物或诊断试剂的开发及应用

(57)摘要

全人源或人源化GRPR(胃泌素释放肽受体)

单克隆抗体的开发及其相关药物或诊断试剂的  
应用。GRPR在一些特定组织或病变组织中异常表  
达,表明GRPR受体可以作为药物靶点。以GRPR单  
克隆抗体来开发相应药物的抗体药物或临床诊  
断试剂将具有重要的临床应用和市场开发价值。  
然而,目前还没有针对GRPR的人源化或全人源单  
克隆抗体的开发。本发明首次公布全人源或人源  
化GRPR单克隆抗体的开发,并以此抗体为载体与  
各种生物活性分子(如化疗药物,放射性药物,诊  
断标记)偶联,构建各种抗体靶向药物或抗体诊  
断标记,用于相关疾病的治疗与诊断。这对于相  
关疾病的预防与治疗有非常重要的临床应用价  
值。

1. 全人源 (fully human) 或人源化 (humanized) GRPR (gastrin-releasing peptide receptor, 胃泌素释放肽受体) 单克隆抗体 (monoclonal antibody)。利用全人源或人源化 GRPR 单克隆抗体, 开发全人源或人源化 GRPR 单克隆抗体药物或诊断试剂。

2. 根据权利要求1所述,其特征在于(但不限于):GRPR为GPCR家族成员,其蛋白序列(人GRPR含384个氨基酸,可以有转录变异(transcript variants))有七个过膜结构域(transmembrane domain,TM),三个膜外环和一个膜外N端,三个膜内环和一个膜内N端。作为免疫原的GRPR特定序列片段可以是GRPR受体序列中任何部位的一段片段。例如,免疫原序列片段可以是,但不限于,MALNDCAFLLNLEVDHFHMCNISSHSADLPV,LIKIFCTVKSMRNVPNLFISSL,ITCAPVDASRYLADRWLFGRIGCKL,LHPFHEESTNQTFISCAPYPHSNELHPKIH,TGRSTTCMTSLKSTNPSVATFSLINGNICHERYV,SMASFVLFYVIPLSIISVYYYFI,HVIYLYRSYHYSEVDTMLH,HVKKQIESRKRLAKTVLVFVGLFAFCWLPN等等。用于构建全人源或人源化GRPR单克隆抗体的GRPR免疫原可以是,但不限于,一个或多个序列,序列长度可以变化,不限于所列片段之序列长度,个别氨基酸也可以不同。可以(但不限于)通过计算机模拟,预测,软件分析和实验,筛选最佳GRPR特定序列片段作为免疫原(immunogen),通过(但不限于),噬菌体展示(phage display),细胞展示技术,转基因(transgenic)老鼠等技术获得所要求的全人源或人源化GRPR单克隆抗体。并进一步开发全人源(fully human)或人源化(humanized)GRPR单克隆抗体药物和单克隆抗体诊断试剂。

3. 根据权利要求1,2,所述,其特征在于:全人源或人源化GRPR单克隆抗体药物可以是,但不限于,GRPR单克隆抗体本身和GRPR单克隆抗体复合物(如,但不限于,GRPR单克隆抗体纳米材料复合物(nanoparticle complex))。

4. 根据权利要求1,2所述,其特征在于:全人源或人源化GRPR单克隆抗体药物或诊断试剂可以是,但不限于,生物活性分子与GRPR单克隆抗体的复合物,其形式(formula)为A—B—mAb。

在A—B—mAb复合物中,mAb代表全人源或人源化SSTR2单克隆抗体。

B为药物(A)与抗体(mAb)之间的连接链(linkers),可以是(但不限于)肽(peptide),单个氨基酸,葡萄糖醛酸(glucuronides),腙(hydrazone),二硫桥(disulfide bridge),硫醚(thioether),螯合基团(chelating groups)或其他等。也可以是可裂解的连接链(cleavable linkers)如Val-Ala,或非裂解的连接链(Non-cleavable linkers),或两个或多个联合应用(如多肽与硫醚一起作为连接链,多肽连接链一端接螯合基团,另一端接硫醚,构成完整的连接链),将药物与GRPR单克隆抗体连接在一起。连接链(linkers)的应用与策略主要基于不同抗体,不同药物等多方面的考量。肽可以是(但不限于)含两个或多个氨基酸(自然态氨基酸或修饰后的氨基酸),如D-Tyr,DTyr-DSer,DSer-Lys-D-Tyr,Val-Ala等。

连接链B一端连接药物(A),另一端连接抗体(mAb)。在药物(A)一侧,连接链B的连接方式可以是,但不限于,葡萄糖醛酸(glucuronides),腙(hydrazone),二硫桥(disulfide bridge),硫醚(thioether),螯合基团(chelating groups)。可以更偏向于,但不限于,增加抗体复合物的亲水性。如,B可以带有一聚合物(polymer)或亲水聚合物(如polyethylene glycol,polyvinyl alcohol,polyvinyl acetate),或其他连接链。在mAb一侧,连接链B的连接方式也可以是,但并不限于,葡萄糖醛酸(glucuronides),腙(hydrazone),二硫桥

(disulfide bridge), 硫醚(thioether), 骯合基团(chelating groups)等。

A为生物活性分子,可以通过(但不限于)连接链(linkers)(B),如,但不限于,二硫桥(disulfide bridge),腙(hydrazine),多肽,或者硫醚(thioether)等与GRPR单克隆抗体相连。A可以是(但不限于),治疗药物(therapeutic agents),细胞毒性药物(cytotoxic agents),检测标记(detectable labels),核酸(nucleic acid)(如核酸,核酸片段(nucleic acid fragment)或oligoDNA,oligoRNA等),活性多肽(biologically active peptide),以及鳌合基团chelating groups等等。

5.根据权利要求4所述,其特征在于:与全人源或人源化GRPR单克隆抗体连接的生物活性分子A可以是,但不限于,任何用于治疗,诊断人类疾病或其他处理的治疗药物,细胞毒性药物,抗代谢药物,抗细胞增殖药物。这些药物可以是(但不限于)促进或抑制生物活性的,抗肿瘤的,抑制免疫的,细胞毒性的,或抗病毒的。可以是(但不限于)烷化剂,抗生素,抗代谢药,免疫调节剂,拓扑酶抑制剂,微管蛋白抑制剂,激素激动剂或拮抗剂。这些药物可以通过直接或间接作用或补充剂(supplementary agents)起作用。例如,但不限于,methotrexate, paclitaxel, combretastatin, Benzodepa; Bicalutamide; Sirolimus (rapamycin, FK506), galocitabine; ganirelix; gemcitabine; glutathione抑制剂, telomerase抑制剂(inhibitors); cladribine, cytarabine, dacarbazine, fludarabine phosphate, fluorouracil, camptothecin, colchicine,。

6.根据权利要求4所述,其特征在于:与全人源或人源化GRPR单克隆抗体连接的生物活性分子A可以是,但不限于,任何自然存在的,修饰的,合成的多肽(蛋白与抗体为长链大分子多肽)。这些多肽可以是(但不限于)激素(hormones),生长因子(growth factors),细胞因子(cytokines),神经传递因子(neurotransmitters),抗原(antigens),抗体(antibodies)和其它蛋白(proteins)等。细胞因子(cytokines)可以是(但不限于),趋化因子chemokines,干扰素interferons,肿瘤坏死因子(TNF),淋巴因子lymphokines,白细胞介素interleukines。活性多肽(biologically active peptide)(各种多肽,细胞因子(cytokines),激素(hormone),等等)。

多肽可以是,但不限于,单链多肽(linear peptide),聚合多肽(polypeptide),环状多肽(cyclic peptide),分支多肽(branched peptide)。多肽包括短链肽(尤指寡聚肽oligopeptide,或低聚物oligomer)以及长链肽(氨基酸序列长至100氨基酸残基)。多肽包括自然修饰的或化学修饰的氨基酸或多肽序列。

例如,但不限于,angiotensin II,gonadotropin-releasing hormone,bombesin,somatostatin,Pituitary AdenylateCyclaseActivating Peptide (PACAP),Urotensin II, vasoactive peptide (VIP),Growth Hormone Releasing Hormone (GHRH),glucagon,Secretin, substance P,neuropeptide Y (NPY),cell penetrating peptide (CPP),白细胞介素IL1,IL2,IL3,趋化因子CCL1,CCL2,CCL3,CCL4.Parathyroid hormone,gonadal hormones,adrenocortical hormones,thyroid hormones,胰岛素(insulin)。

7.根据权利要求4所述,其特征在于:与全人源或人源化GRPR单克隆抗体连接的生物活性分子A可以是,但不限于,任何用于诊断的检测标记(detectable labels)。可以是,但不限于,包含一个或多个如下特性:荧光,颜色,细胞毒性(toxicity),放射性(radioactivity),辐射敏感(radiosensitivity),光敏感(photosensitivity),非放射性。

检测标记可以是,但不限于,细胞毒性和非细胞毒性,直接连接到抗体上某氨基酸部位,也可以通过螯合基团,肽或其它分子或连接链与抗体连接。检测标记可以是重金属离子,或稀土离子。放射性检测标记可以是各种放射性同位素标记(如,但不限于,I<sup>125</sup>,I<sup>131</sup>,I<sup>123</sup>,Se<sup>75</sup>,Fibrinogen 1-125;)。或者这些放射性物标记在某氨基酸或其它基团上,如DTyr,DPhen等。非放射性检测标记可以是各种已知的荧光(fluorescence)(如荧光分子fluorescein,rhodamine,Texas red,pyridyloxazole,merocyanine,oxazine170,acridine yellow,或荧光蛋白,如,荧光蛋白GFP,YFP,RFP,或其他荧光分子标记物)或染料(dye)。毒性(toxic)检测标记可以是蓖麻毒素(ricin),或如上所述的放射性物,化学治疗药物,辐射敏感剂等。

8.根据权利要求4所述,其特征在于:与全人源或人源化GRPR单克隆抗体连接的生物活性分子A可以是,但不限于,任何螯合基团,可以用于连接多肽与放射性标记,连接多肽与荧光标记,连接荧光标记与抗体等等的螯合基团。可以是与肽类药物(peptide agent)偶联的基团,也可以是与检测标记(如荧光,染料,放射性同位素等)形成复合物(complex),如金属(metal),光敏感剂。螯合基团可以是一个双功能稳定螯合剂(bifunctional stable chelator)。例如,但不限于,DTPA(N,N-Bis[2-[bis(carboxymethyl)amino]ethyl]glycine),DOPA(1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid)。

9.根据权利要求4所述,其特征在于:与全人源或人源化GRPR单克隆抗体连接的生物活性分子A可以是,但不限于,核酸或核酸片段(包括DNA和RNA)。如,但不限于,作用于各种基因的相关的oligoDNA,oligoRNA,oligoPNA,sirRNA,microRNA或类似物等。

10.根据权利要求1,2,3,4所述,其特征在于:(1)以全人源或人源化GRPR单克隆抗体开发的药物可以用于,但不限于,治疗人类疾病如肿瘤(如,胰腺癌,内分泌瘤,前列腺癌等)及血管发生,感染疾病(如肝炎,疟疾),器官移植(如肾脏移植等)的免疫抑制和免疫病(如红斑狼疮,类风湿性关节炎等),代谢(Metabolic)疾病(如痛风,II型糖尿病,肥胖,高尿酸血症,高血压等)等。(2)以全人源或人源化GRPR单克隆抗体开发的诊断试剂可以是,但不限于,各种诊断试剂和诊断手段,如,酶联免疫试剂,荧光标记诊断试剂,胶体金试纸条,纳米金颗粒,肿瘤成像(imaging),人体显像(scintigraphy)等。

## 全人源或人源化bombesin受体GRPR单克隆抗体药物或诊断试剂的开发及应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及到药物和诊断试剂,属于医药和临床检验领域。

### 背景技术

[0002] 随着新科技新技术的出现,单克隆抗体(monoclonal antibody,mAb)成为现代药物开发的一个新的热点方向(1-4)。单克隆抗体是大分子蛋白,特异性很强,亲和力很高,稳定性很好。这些抗体可以用于疾病治疗,疾病诊断或者健康检查(5-7)。目前,全球已有几十个临床用mAb药物如adalimumab,这些药物被用于抗肿瘤治疗,器官移植的免疫排斥,自身免疫病,感染性疾病等人类疾病(1,4,5)。在全球生物药物市场,单克隆抗体药物市场快速增长(1,2),抗体药物在未来全球药物市场上大有可为(2,4)。本发明将开发全人源或人源化GRPR受体单克隆抗体,以此为基础进一步开发抗体药物或抗体诊断试剂。

[0003] 人源化(humanized)和全人源(fully human)单克隆抗体发展起来(8),主要是小鼠(murine)和嵌合(chimeric)类单克隆抗体具有很强的免疫原性(immunogen),相关药物应用会诱导机体对外来抗体的免疫应答,产生严重副作用,药物效果也很有限(4,9)。人源化和全人源单克隆抗体具有高度的人源特异性,大大降低机体识别对这些抗体的识别和免疫排斥,因而安全性大大提高(2,9)。目前,开发人源化和全人源单克隆抗体主要利用噬菌体展示技术(phage display),转基因小鼠技术(transgenic mice),细胞展示技术,新克隆生物技术(neoclone biotechnology)等(3,8,9)。

[0004] 人源化和全人源单克隆抗体可以直接作为抗体药物用于人类疾病治疗,同时,甚至更多的是被用作药物载体与其它非特异性,非选择性药物(如传统的肿瘤化疗药物)联合应用,形成抗体药物复合物(antibody-drug conjugates,ADCs)(6,10)。这些抗体药物复合物ADCs变成了抗原靶向的特异性药物,进一步提高药物靶向性,增强药物效果,减少对人体的副作用。这些人源化和全人源单克隆抗体也可用于与其它生物活性分子(如放射性同位素,核酸片段oligoDNA,oligoPNA,多肽片段,sirRNA,microRNA,荧光分子,抗肿瘤药物,免疫抑制剂,代谢调控因子等等)(5,11,12)相连,构成相应的靶向复合物,广泛应用于疾病治疗,疾病诊断和健康检测等等。

[0005] 目前,人源化和全人源单克隆抗体主要是针对一些特定靶点如CD25,CD33,TNF- $\alpha$ ,VEGF,VEGFR,EGFR(1,5,6,11,13-15)。这些分子在特定组织表达或具有特定功能,因而可用于靶向治疗或临床检测。例如,VEGF(vascular endothelial growth factor)为血管内皮细胞生长因子。Bevacizumab是人源化(humanized)抗VEGF单克隆抗体,用于治疗转移性直肠结肠癌(1,15)。TNFalpha(tumor necrosis factor alpha)为肿瘤坏死因子。Adalimumab是全人源(fully human)抗TNF- $\alpha$ 单克隆抗体,用于治疗类风湿关节炎(1)。此外,还有更多人源化和全人源单克隆抗体正在临床试验中。单克隆抗体药物代表着全新的现代药物发展方向之一(1)。GRPR受体已经被确认为特定的分子靶点,也被应用于靶向药物的研究开发,我们也长期开发以GRPR为靶点的多肽药物或多肽载体靶向抗肿瘤药物。然而,还没有针对

GRPR的人源化或全人源单克隆抗体的开发。本发明首次公布全人源或人源化GRPR单克隆抗体的开发，并以此单克隆抗体为载体与各种生物活性分子(如化疗药物，放射性药物)偶联，构建各种抗体靶向药物复合物或用于疾病诊断的抗体复合物。

[0006] 以GRPR (gastrin-releasing peptide receptor, 胃泌素释放肽受体) (人GRPR有384个氨基酸) 为靶点开发全人源或人源化单克隆抗体，是基于已知的GRPR受体特性和其本身特异性表达(16-18)。GRPR是GPCR家族成员，为含有七个过膜结构域的细胞表面受体。蛙皮素(bombesin, BN)受体GRPR(胃泌素释放肽受体)与NMB受体(NMBR)和蛙皮素受体III亚型(bombesin receptor subtype 3, BRS-3)一起构成蛙皮素受体亚家族(subfamily)(19, 20)。GRPR是三者中最重要的受体。GRPR受体家族的天然配体为蛙皮素(bombesin, BN)，胃泌素释放肽(gastrin release peptide, GRP)和神经介素B(neuromedin B, NMB)。胃泌素释放肽GRP通过GRPR受体调控下游信号机相关功能，对人体正常生理或异常病理的调控发挥非常重要的作用(17, 19, 20)。胃泌素释放肽GRP调节细胞生长、胃肠运动，调节激素分泌，调节昼夜节律，调节记忆，也与肿瘤，类风湿性关节炎，退行性病变等疾病相关(17, 18, 20)。而且新的发现表明，GRPR为瘙觉受体，尤其是，胃泌素释放肽在背神经节神经元中特异性表达，而GRPR受体仅在脊髓背侧特异性表达，胃泌素释放肽GRP通过与GRPR受体相互作用，可能用于止痒的临床治疗(21)。而且，我们发现，GRPR受体在肿瘤，干细胞等等组织细胞中异常高的表达。GRPR也作为受体靶点用于imaging抗肿瘤药物的传递(19, 22)。这使GRPR受体可能在肿瘤，干细胞治疗方面作为药物靶点。

[0007] 尤其是，GRPR在很多恶性肿瘤中异常表达，且表达量比在正常的人体组织更高(19, 23)。我们的研究发现，GRPR在许多癌症细胞如肺癌，前列腺癌，乳腺癌，胰腺癌，类癌卵巢癌等异常表达，而其它两受体BRS3和NMBR的表达相对要低很多，甚至不表达(23, 24)。其他报道也证实GRPR在各种肿瘤中的异常表达，如在肺癌，乳腺癌，卵巢癌，胰腺癌，直肠结肠癌，前列腺癌，头颈鳞状细胞癌、神经母细胞瘤中，GRPR异常表达(17, 18, 22-24)。而且，BN和GRPR被证实在肿瘤相关的分子机制，肿瘤发生和肿瘤转移等方面都发挥重要作用。因而，GRPR成为一个临床治疗和临床检验的分子靶标。GRPR被作为靶点用于与放射性同位素，抗肿瘤化疗药物，oligoDNA, siRNA等偶联的靶向药物的靶点受体(18, 19, 24-27)。我们将抗肿瘤药物喜树碱(camptothecin, CPT)与BN构建GRPR靶向的复合物CPT-BN(24)。复合物CPT-BN能通过GRPR将抗肿瘤药物CPT快速带入受体靶向肿瘤细胞。在抗类癌和肺癌肿瘤生长的实验中，复合物CPT-BN(GRPR高亲和力)增强CPT的抗肿瘤效果，而复合物CPT-BNi(与GRPR无亲和力)中的CPT对肺癌肿瘤生长没有影响。证明GRPR是非常特异性的药物靶点(18, 22, 24)。

[0008] 目前，全人源或人源化单克隆抗体是现代药物开发的新的重要方向之一。而针对GRPR受体的全人源或人源化单克隆抗体的开发尚未见报道。本发明主要针对GRPR受体，开发全人源(fully human)或人源化(humanized)GRPR单克隆抗体，并将之应用于人类疾病治疗药物或诊断试剂的开发。

## 发明内容

[0009] 本发明是确认全人源(fully human)或人源化(humanized)bombesin受体GRPR(gastrin-releasing peptide receptor, 胃泌素释放肽受体)单克隆抗体(monoclonal antibody)及其相关药物或诊断试剂的开发与应用。

[0010] 1,全人源(fully human)或人源化(humanized)GRPR单克隆抗体。本发明是基于GRPR的表达特异性和功能特异性来开发全人源或人源化GRPR单克隆抗体(可以是,但不限于,IgG1,IgG2,IgG3,IgG4,IgA,IgD,IgE,IgM等,更倾向于IgG1.)。可以通过计算机模拟,预测,软件分析和实验,筛选GRPR特定序列片段作为免疫原(immunogen)。

[0011] GRPR特定序列片段如,但不限于:

- [0012] MALNDGFLLNLEVDHFMHCNISSHSADLPV,
- [0013] LIKIFCTVKSMRNVPNLFISSL,
- [0014] ITCAPVDASRYLADRWFGRIGCKL,
- [0015] LHPFHEESTNQTFISCAPYPHSNELHPKIH,
- [0016] TGRSTTCMTSLKSTNPSVATFSLINGNICHERRYV,
- [0017] SMASFLVFYVIPLSIIISVYYYFI,
- [0018] HVIYLYRSYHYSEVDTSM LH,
- [0019] HVKKQIESRKRLAKTVLFVGLFAFCWL PN等等。

[0020] 利用噬菌体展示(phage display),细胞展示技术,转基因(transgenic)老鼠等技术获得所要求的全人源或人源化GRPR单克隆抗体。

[0021] 2,以全人源或人源化GRPR单克隆抗体开发抗体药物或抗体诊断试剂。

[0022] 2.1直接利用所开发的全人源或人源化GRPR单克隆抗体(GRPR mAb)作为疾病治疗药物。已经有一些全人源和人源化单克隆抗体药物已被成功开发和临床应用。GRPR单克隆抗体(GRPR mAb)也可以直接应用于一些GRPR特异性的人类疾病的治疗。

[0023] 2.2利用所开发的全人源或人源化GRPR单克隆抗体作为载体,将相关生物活性分子与抗体相连,构建抗体-活性分子复合物,开发GRPR靶向药物或临床诊断试剂。

[0024] 生物活性分子与GRPR单克隆抗体的复合物,其形式(formula)为:A-B-mAb。

[0025] 在A-B-mAb中,mAb代表全人源或人源化GRPR单克隆抗体。

[0026] B为药物(A)与抗体(mAb)之间的连接链(linkers),可以是(但不限于)肽(peptide),单个氨基酸,葡萄糖醛酸(glucuronides),腙(hydrazone),二硫桥(disulfide bridge),硫醚(thioether),螯合基团(chelating groups)或其他等(10)。也可以是可裂解的连接链(cleavable linkers)如Val-Ala,或非裂解的连接链(Non-cleavable linkers),或两个或多个联合应用(如多肽与硫醚一起作为连接链,多肽连接链一端接螯合基团,另一端接硫醚,构成完整的连接链),将药物与GRPR单克隆抗体连接在一起。连接链(linkers)的应用与策略主要基于不同抗体,不同药物等多方面的考量。肽可以是(但不限于)可以是含两个或多个氨基酸(自然态氨基酸或修饰后的氨基酸),如D-Tyr,DTyr-DSer,DSer-Lys-D-Tyr,Val-Ala等)。

[0027] 连接链B一端连接药物(A),另一端连接mAb。在药物(A)一测,连接链B的连接方式可以更偏向于,但不限于,增加抗体复合物的亲水性。B可以带有一聚合物(polymer)或亲水聚合物(如polyethylene glycol,polyvinyl alcohol,polyvinyl acetate),或其他连接链。在mAb一测,连接链B的连接方式可以是葡萄糖醛酸(glucuronides),腙(hydrazone),二硫桥(disulfide bridge),硫醚(thioether),螯合基团(chelating groups)等。

[0028] A为生物活性分子,通过连接链(linkers)如,但不限于,二硫桥(disulfide

bridge), 脲(hydrazine), 氨基酸, 多肽或者硫醚(thioether)等与GRPR单克隆抗体相连。A可以是(但不限于)治疗药物(therapeutic agents), 细胞毒性药物(cytotoxic agents), 检测标记(detectable labels), 核酸(nucleic acid), 活性多肽(biologically active peptide), 以及螯合基团(chelating groups)等等。

[0029] 例如, GRPR单克隆抗体与各种小分子化学药物(A)连接, 构成抗体-化学药物复合物。GRPR单克隆抗体与各种放射性同位素或其偶联基团(A)连接, 构成放射性抗体复合物。GRPR单克隆抗体与各种诊断用的放射性同位素, 荧光基团或其偶联基团(A)等连接, 构成放射性抗体或荧光抗体等。GRPR单克隆抗体与活性多肽(A)等连接, 构成抗体-多肽复合物。SSTR2单克隆抗体与核酸如oligoDNA, oligoPNA, oligoRNA, siRNA, microRNA或类似物等(A)连接, 构成抗体-核酸复合物。这些复合物用于, 但不限于, 诊断或治疗疾病肿瘤, 自身免疫病, AIDS病等。

[0030] 用于获得全人源或人源SSTR2单克隆抗体的技术与方法为已知的或新的技术方法。可以是, 但不限于, 噬菌体展示(phage display), 细胞展示技术, 或转基因(transgenic)老鼠等这些技术方法。

[0031] 本发明中, 治疗药物(therapeutic agents)(A)指任何用于治疗, 诊断人类疾病或其他处理的化合物或药物, 这些化合物或药物可以是自然存在的, 修饰的, 合成的等。这些化合物或药物可以是促进或抑制生物活性, 可以用于(但不限于)治疗肿瘤, 细胞异常增值, 类癌综合征, 血管发生, 类风湿关节炎, 炎症性疾病, 自身免疫病等。治疗药物可以是抗肿瘤的, 包括细胞毒性的。治疗药物可以是(但不限于)烷化剂(alkylating agents), 抗生素, 抗代谢药, 免疫调节剂, 拓扑酶(topoisomerases)抑制剂, 微管蛋白抑制剂, 激素激动剂(agonists)或拮抗剂(antagonists)。这些药物可以通过直接或间接方式起作用或补充剂(supplementary agents)起作用。

[0032] 细胞毒性药物(cytotoxic agents)(A)指任何自然存在的, 修饰的, 合成的对肿瘤细胞或其它目的细胞产生细胞毒性的化合物。这些药物可以用于(但不限于)治疗肿瘤, 炎症, 自身免疫病, 或其他与细胞异常增殖相关的疾病或症状。细胞毒性药物可以是(但不限于)烷化剂(alkylating agents), 抗生素, 抗代谢药, 免疫调节剂, 拓扑酶(topoisomerases)抑制剂, 微管蛋白抑制剂, 激素激动剂(agonists)或拮抗剂(antagonists)等。

[0033] 检测标记(detectable labels)(A)指任何用于诊断的检测标记, 可以是, 但不限于, 细胞毒性和非细胞毒性。可以是, 但不限于, 包含一个或多个如下特性: 荧光, 颜色, 细胞毒性(toxicity), 放射性(radioactivity), 辐射敏感(radiosensitivity), 光敏感(photosensitivity), 非放射性。检测标记可以是直接连接到抗体上某氨基酸部位, 也可以通过螯合基团, 肽或其它分子或其他连接链与抗体连接。检测标记可以是重金属离子, 或稀土离子, 如Gd<sup>3+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Mn<sup>3+</sup>等。放射性检测标记可以是放射性碘标记, 如<sup>122</sup>I, <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I, <sup>111</sup>In, <sup>201</sup>Ti, <sup>111</sup>Ag等。或者这些放射性物标记在某氨基酸, 某肽或其它基团上, 如DTyr, DPhe等。非放射性检测标记可以是各种已知的荧光(fluorescence)或染料(dye)。毒性(toxic)检测标记可以是蓖麻毒素(ricin), 或如上所述的放射性物, 化学治疗药物, 辐射敏感剂等。

[0034] 融合基团(chelating groups)(A)指任何相关基团, 可以是合成的, 自然的或改造的。可以是与肽类药物(peptide agent)偶联的基团, 也可以是与如上所述的检测标记(如

荧光,染料,放射性同位素等)形成复合物(complex),如金属(metal),光敏感剂。螯合基团可以与如上所述的一种或多种治疗药物,细胞毒性药物或检测标记等形成单一药物靶点复合物或多个药物靶点复合物。

[0035] 活性多肽(biologically active peptides)(A)指任何自然存在的,修饰的,合成的多肽(包括蛋白与抗体,蛋白与抗体为长链大分子多肽),这些多肽具有生理功能或参与生物过程(biological process)。如,这些多肽可以是(但不限于)激素(hormones),生长因子(growth factors),细胞因子(cytokines),神经传递因子(neurotransmitters),抗原(antigens),抗体(antibodies)和其它蛋白(proteins)等。细胞因子(cytokines)可以是(但不限于),趋化因子(chemokines),干扰素(interferons),肿瘤坏死因子(TNF),淋巴因子(lymphokines),白细胞介素(interleukines)等。

[0036] 多肽(peptides)(A)指任何多肽,如,但不限于,单链多肽(linear peptide),聚合多肽(polypeptide),环状多肽(cyclic peptide),分支多肽(branched peptide)等。多肽指含有两个或更多氨基酸并由肽键或修饰后的肽键或其他方式连在一起的多肽或蛋白。多肽包括短链肽(尤指寡聚肽oligopeptide,或低聚物oligomer)以及长链肽(氨基酸序列长至100氨基酸残基)。多肽包括自然修饰的或化学修饰的氨基酸或多肽序列。修饰(modification)可发生在多肽的任何位置,包括多肽骨架(backbone),氨基酸侧链,氨基端,羧基端等。

[0037] 核酸或类似物(A)指任何自然存在的,修饰的,合成的或其它方式获得的核酸或核酸片段。可以是(但不限于),oligoDNA,oligoPNA,oligoRNA,sirRNA,microRNA或类似物。

[0038] 聚合物(polymer)指自然发生的或合成的聚合物,尤其是亲水性聚合物(hydrophilic polymer),这有助于改变整个抗体复合物的水溶性或生物分布。聚合物可以是(但不限于),poly(ethylene glycol)(PEG),dextran,poly(vinyl alcohol)(PVA),hydroxyethyl starch,PVP,PHPMA,gelatin,polysuccinamide(PSI)等。这些聚合物可以被修饰,如succinylation(带负电荷),PSI部分水解,或与其他化合物反应来添加含有羧基或氨基的基团。这类修饰可以增加或改变聚合物的亲水性或使抗体与治疗药物或细胞毒性药物或螯合基团更容易偶联。

[0039] 我们的实验结果及其他公开资料支持上述结论:

[0040] 图1抗体结构示意图。包括小鼠抗体,嵌合抗体,人源化抗体和全人源抗体。

[0041] 图2抗体-药物复合物(antibody-drug conjugate)结构示意图。

[0042] 图3GRPR氨基酸序列示意图,GRPR含有384个氨基酸,有七个过膜结构域,一个膜外N端,一个膜内C端,三个膜外环,三个膜内环。

[0043] 图4下面列表中为PCR检测结果,GRPR与其他各种GPCR受体在各种肿瘤细胞中的不同表达。GRPR在一些肿瘤细胞(如前列腺癌,乳腺癌,胰腺癌,类癌,卵巢癌等)中高表达。证明GRPR在这些肿瘤中可能是一个特定的分子靶标。

[0044] 图5GRPR受体亲和力实验显示,GRPR在不同肿瘤细胞表达不一,蛙皮素Bombesin与GRPR受体的的亲和力也不一。在类癌BON( $IC_{50}:1.8nM$ ),胰腺癌CFPAC-1( $IC_{50}:3.6nM$ ),和前列腺癌DU-145( $IC_{50}:5.7nM$ )细胞中,GRPR具有高亲和力,在白血病MOLT-4( $IC_{50}:\geq 1000nM$ )中,亲和力低。

[0045] 图6GRPR受体靶向特异性抗肿瘤药物CPT-BN示意图。

[0046] 图7受体靶向特异性药物(antibody-drug conjugate, peptide-drug conjugate, radio-labeled peptide, radio-labeled antibody等)通过受体进入靶向肿瘤细胞示意图。A,人体内生长的肿瘤;B,肿瘤细胞表面存在各种受体,特定受体靶向药物识别细胞表面特定受体,与之相互作用,激活受体;C,药物-受体复合物诱导细胞内吞(endocytosis),受体靶向特异性药物进入受体特异性肿瘤细胞;D,细胞内酶降解药物载体,释放抗肿瘤药物,药物杀死受体靶向肿瘤细胞。

[0047] 图8GRPR受体亲和力实验。有活性的CPT-BN复合物(与GRPR有高亲和力),非活性的CPT-BNi复合物(BNi为非活性BN肽,即与GRPR受体没有亲和力,或亲和力很低)。实验显示,蛙皮素bombesin及CPT-BN与GRPR有高亲和力,而CPT-BNi亲和力很多。证明GRPR受体具有靶向特异性,可以用作靶向药物的分子靶点。

[0048] 图9药物经与GRPR受体结合的细胞吸收实验(drug internalization)。类癌BON细胞中GRPR受体异常高的表达,BON细胞被用于GRPR配体(ligand)BN和放射性同位素标记的BN竞争性亲和力实验(competitive binding assay)。同时,总的最大计数(total counts)代表在细胞表面和细胞内的总的放射性同位素标记的BN,然后对结合在细胞表面的放射性标记的BN用酸(低PH值)洗涤,离心,去除上清液,沉淀细胞再记数,该数值代表药物的细胞吸收,总记数减去此值,则为细胞表面上的放射性标记的BN。实验结果显示,在室温下一小时,有近60%的BN(图13上)或BN复合物(CPT-BN)(图13下)经GRPR受体快速进入靶向细胞内。证明GRPR是一个特定受体靶点,可以用于相关抗体药物的开发。

[0049] 图10各种受体特异性药物复合物对类癌BON细胞增殖的抑制作用。CPT-BN为GRPR受体靶向复合物,而MTX-SST,CA-SST与CPT-SST为SSTR2受体靶向复合物。实验显示这些受体特异性复合物具有不同活性。

[0050] 图11各种受体特异性药物复合物对表达GRPR和SSTR2的类癌BON肿瘤生长的抑制作用。CPT-BN为GRPR受体靶向复合物,而CA-SST与CPT-SST为SSTR2受体靶向复合物。三个受体靶向药物均有效抑制类癌BON肿瘤生长。

[0051] 图12GRPR受体靶向药物的抗肺癌肿瘤生长实验。CPT-L2-BA3为与GRPR有高亲和力的CPT-BN复合物,DPhe-CPT-L2-BA3为非活性的CPT-BNi复合物(即与GRPR受体没有亲和力,或亲和力很低)。实验结果显示,与GRPR亲和力高的复合物CPT-L2-BA3有效抑制肺癌NCI-H1299肿瘤生长,而与GRPR的亲和力低的复合物DPhe-CPT-L2-BA3对肺癌NCI-H1299肿瘤生长没有抑制作用。我们的实验证明复合物CPT-L2-BA3具有GRPR受体靶向特异性。GRPR受体在一些肿瘤细胞中可以作为抗肿瘤的药物靶点。因此开发以GRPR受体为药物靶点的抗体药物具有临床应用价值。

[0052] 图13GRPR靶向药物抑制血管发生(angiogenesis)的动物实验。Matrigel在低温下为液态,在室温或体温时为固态。将血管内皮细胞(endothelial cells)与血管生成因子(bFGF),GRPR靶向药物DC-51-43(CPT-BN复合物)与液态Matrigel混合,注射到小鼠皮下,液态Matrigel在小鼠体内形成固体,bFGF刺激小鼠皮下内皮细胞向matrigel迁移,内皮细胞在matrigel中形成血管样结构。实验完成后,将固体matrigel取出,固定,包埋,切片,染色。红色显示为血管样结构。实验结果显示,(A),阴性对照(没bFGF,没给药),没有血管样结构;(B),阳性对照(有bFGF,没给药),有血管样结构;(C),有bFGF,小鼠有给药,GRPR靶向药物DC-51-43(CPT-BN复合物)非常有效的抑制血管样结构的形成;(D),数据分析进一步显示,

DC-51-43 (CPT-BN复合物) 有效抑制血管样结构的形成。

[0053] 这些实验结果或事实都预示着, GRPR在特定组织和许多疾病相关组织中异常表达, 为我们开发相关药物和诊断试剂提供了新的分子靶点。因此, 开发全人源或人源化GRPR单克隆抗体, 并以此开发相关抗体药物或诊断试剂具有重要的临床应用价值。

## 附图说明

[0054] 无

## 具体实施方式

[0055] 1, 开发全人源(fully human) 或人源化(humanized) bombesin受体GRPR(gastrin-releasing peptide receptor, 胃泌素释放肽受体) 单克隆抗体(monoclonal antibody)。

[0056] Bombesin受体GRPR(gastrin-releasing peptide receptor, 胃泌素释放肽受体)蛋白序列含384个氨基酸。由于GRPR基因变异, 以及转录, 翻译的差异或操作手段差异而使基因表达有所不同, 或少许氨基酸突变, 或少许序列或长度有变。GRPR象其他GPCR成员, 有七个过膜结构域, 一个膜外N端, 一个膜内C端, 三个膜外环, 三个膜内环。

[0057] 作为免疫原的GRPR特定序列片段可以是GRPR受体序列中任何部位的一段片段。可以通过计算机模拟, 预测, 软件分析和实验, 筛选最佳GRPR特定序列片段作为免疫原(immunogen)。例如免疫原序列片段可以是, 但不限于, MALNDLFLLNEVDHFMHCNISSHSADLPV, L I K I F C T V K S M R N V P N L F I S S L , I T C A P V D A S R Y L A D R W L F G R I G C K L , LHPFHEESTNQTFIISCAPYPHSNELHPKIH, TGRSTTCMTSLKSTNPSVATFSLINGNICHERYV等。用于构建全人源或人源化GRPR单克隆抗体的GRPR免疫原可以是一个或多个序列, 序列长度也可以变化。,

[0058] 通过, 但不限于, 现代技术如噬菌体展示(phage display), 细胞展示技术, 或转基因(transgenic)老鼠等技术, 构建抗体表达载体, 表达筛选, 细胞培养, 转基因动物等系列步骤, 最终获得全人源或人源化GRPR单克隆抗体。或者通过其他方法获得全人源或人源化SSTR2单克隆抗体。

[0059] 2, 全人源或人源化GRPR单克隆抗体药物或诊断试剂的开发与应用。

[0060] GRPR在一些特定组织或病变组织中异常表达。例如, 在许多肿瘤细胞中异常表达(19, 23)。GRPR受体只在脊髓背侧特异性表达(21)。这使GRPR受体可能在疾病治疗方面作为药物靶点。事实上, GRPR已作为受体靶点用于肿瘤imaging和抗肿瘤药物的传递等(19, 22)。我们的BN化疗药物复合物(BN-drug conjugate)也展示了GRPR受体靶向特异性的抗肿瘤效果。然而, 与单克隆抗体相比, 多肽半寿期短, 特异性和选择性相对低一些。以GRPR单克隆抗体来开发相应药物的抗体药物或临床诊断试剂将具有非常重要的临床应用和市场开发价值。

[0061] 2.1直接利用所开发的全人源或人源化GRPR单克隆抗体作为疾病治疗药物。

[0062] 许多这类全人源或人源化单克隆抗体药物已被成功开发和临床应用。全人源或人源化GRPR单克隆抗体本身可以直接应用于一些GRPR特异性的人类疾病治疗。如, GRP通过GRPR促进细胞增殖, GRPR单克隆抗体可以用于抗细胞异常增殖等。

[0063] 2.2利用所开发的全人源或人源化GRPR单克隆抗体作为载体, 将相关生物活性分

子与抗体相连,构建抗体-活性分子复合物,开发受体靶向药物或临床诊断试剂,用于治疗各种疾病如(但不限于)肿瘤等。或开发各种诊断试剂和诊断手段如酶联免疫试剂,荧光标记诊断试剂,胶体金试纸条,纳米金颗粒,肿瘤成像(imaging),人体显像(scintigraphy)。

[0064] 如,GRPR单克隆抗体与各种小分子化学药物(A)连接,构成抗体-化学药物复合物。如,GRPR单克隆抗体与各种放射性同位素或偶联基团(A)连接,构成放射性抗体复合物,作为受体靶向药物。如GRPR单克隆抗体与多肽(包括多肽,蛋白,抗体等)(A)等连接,构成抗体多肽复合物。如,GRPR单克隆抗体与核酸如oligoDNA,oligoPNA,oligoRNA,siRNA,microRNA或类似物等(A)连接,构成抗体核酸复合物。如,GRPR单克隆抗体与各种诊断用的放射性同位素,荧光基团或其偶联基团(A)等连接,构成放射性抗体或荧光抗体等。这些复合物用于诊断或治疗人类疾病如肿瘤等。

[0065] 以下为,但不限于,部分SSTR2单克隆抗体复合物(A-B-C-mAb)具体实例:

[0066] Camptothecin-carbonyl-Pro-DSer-Nle-DTyr-DSer-mAb

[0067] Camptothecin-carbonyl-Hydroxyproline-mAb

[0068] Camptothecin-thioether-Lys-DSer-DSer-DSer-DSer-Pro-DSer-Nle-DTyr-DSer-mAb

[0069] Methotrexate-CH<sub>2</sub>CO-DLys-DTyr-Lys-mAb

[0070] Methotrexate-thioether-mAb

[0071] Thiocolchicine-Thioether-DSer-Nle-DTyr-DSer-mAb

[0072] Thiocolchicine-Carbonyl-Sar-DSer-Nle-DTyr-DSer-mAb

[0073] Oligo(DNA)-S-S-mAb

[0074] 更多的GRPR单克隆抗体(mAb)通过连接链(linkers)(B)与各种生物活性分子(A)相连构成更多的抗体复合物,例如(见下):

[0075] 与全人源或人源化GRPR单克隆抗体连接的生物活性分子A(A-B-mAb)可以是,但不限于,任何已知的治疗药物(therapeutic agents)或细胞毒性药物(cytotoxic agents)。例如抗肿瘤药物(Antineoplastic agents)如:Acivicin;Aclarubicin;Acodazole Hydrochloride;Acronine;Adozelesin;Adriamycin;Aldesleukin;Anthramycin;Asparaginase;Asperlin;Azacitidine;Azetepa;Azotomycin;Batimastat;Camptothecin;Caracemide;Carbetimer;Carboplatin;Carmustine;Carubicin Hydrochloride;Carzelesin;Cedefingol;Chlorambucil;Cirolemycin;Cisplatin;Cladribine;Combretestatin A-4;Eflornithine Hydrochloride;Ellipticine;Elsamitrucin;Etoposide;Etoposide Phosphate;Etoprine;Fadrozole Hydrochloride;Fazarabine;Fenretinide;Floxuridine;Fludarabine Phosphate;Fluorouracil;5-FdUMP;Flurocitabine;Homocamptothecin;Hydroxyurea;Idarubicin Hydrochloride;Ifosfamide;Ilmofosine;Maytansine;Mechlorethamine Hydrochloride;Megestrol Acetate;Spirogermanium Hydrochloride;Spiromustine;Spiroplatin;Streptonigrin;Streptozocin;Strontium Chloride Sr 89;Sulofenur;Talisomycin;Taxane;Taxoid;Tecogalan Sodium;Tegafur;Teloxantrone Hydrochloride;Temoporfin;Teniposide;Teroxirone;Testolactone;Thiamiprime;Thioguanine;Thiotepa;Thymitaq;Tiazofurin;Tirapazamine;Tomudex;TOP53;Topotecan Hydrochloride;Toremifene Citrate;

Trestolone Acetate; Triciribine Phosphate; Trimetrexate; Trimetrexate Glucuronate; Triptorelin; 2-Chlorodeoxyadenosine; 2'-Deoxyformycin; 9-aminocamptothezin; losoxantrone; Dactinomycin (Actinomycin D); amsacrine; pyrazoloacridine; all-trans retinol; 14-hydroxy-retro-retinol; all-trans retinoic acid; N-(4-Hydroxyphenyl) retinamide; 13-cis retinoic acid; 3-Methyl TTNEB; 9-cis retinoic acid; fludarabine (2-F-ara-AMP); or 2-chlorodeoxyadenosine (2-Cda).

[0076] 还有其他抗肿瘤药物如20-pi-1,25dihydroxyvitamin D3; 5-ethynyluracil; abiraterone; aclarubicin; acylfulvene; adecytenol; adozelesin; aldesleukin; ALL-TK antagonists; altretamine; ambamustine; amidox; amifostine; aminolevulinic acid; amrubicin; amsacrine; anagrelide; anastrozole; andrographolide; 血管发生抑制剂 (inhibitors); 拮抗剂D (antagonist D); 拮抗剂G (antagonist G); antarelix; anti-dorsalizing morphogenetic protein-1; antiestrogen; antineoplaston; 反义寡聚核酸 (antisense oligonucleotides); carboxyamidotriazole; CaRest M3; CARN 700; cartilage derived 抑制剂 (inhibitors); carzelesin; casein kinase 抑制剂 (inhibitors) (ICOS); castanospermine; cecropin B; cetrorelix; chlorins; chloroquinoxaline sulfonamide; cicaprost; cis-porphyrin; cladribine; clomifene类似物 (analogs); clotrimazole; collismycin A; collismycin B; combretastatin A4; combretastatin analogue; conagenin; crambescidin 816; crisnatol; cryptophycin 8; cryptophycin A衍生物 (derivatives); curacin A; cyclopentanthraquinones; cycloplatam; cypemycin; cytarabine ocfosfate; 溶细胞因子 (cytolytic factor); cytostatin; daclizimab; decitabine; dehydrodidegnin B; 2'-deoxycoformycin (DCF); deslorelin; dexifosfamide; dexrazoxane; dexverapamil; diaziquone; didemnin B; didox; diethylnorspermine; dihydro-5-azacytidine; hypericin; ibandronic acid; idarubicin; idoxifene; idramantone; ilmofosine; ilomastat; imidazoacridones; imiquimod; 免疫调控肽 (immunostimulant peptides); IGF-1 (insulin-like growth factor-1) 受体抑制剂; interferon激动剂 (agonists); 干扰素 (interferons); 白细胞介素 (interleukins); iobenguane; iododoxorubicin; ipomeanol, 4-; irinotecan; iroplact; irsogladine; isobengazole; isohomohalicondrin B; itasetron; jasplakinolide; kahalalide F; lamellarin-N triacetate; lanreotide; leinamycin; lenograstim; lentinan sulfate; leptolstatin; letrozole; 白血病抑制因子 (leukemia inhibiting factor); leukocyte干扰素 (alpha interferon); leuprorelin; lysofylline; lytic peptides; maytansine; mannostatin A; marimastat; masoprolol; maspin; matrilysin抑制剂 (inhibitors); matrix metalloproteinase抑制剂 (inhibitors); menogaril; rnerbarone; meterelin; methioninase; metoclopramide; MIF抑制剂 (inhibitor); ifepristone; miltefosine; mirimostim; mithracin; mitoguazone; mitoxantrone; mofarotene; molgramostim; 单克隆抗体 (monoclonal antibody), human chorionic gonadotrophin; molidamol; 耐药基因抑制剂 (multiple drug resistance gene inhibitor); multiple tumor suppressor 1-based therapy; mustard抗癌药物

(anticancer agents) ;mycaperoxide B;myriaporone;N-acetyl dinaline;N-substituted benzamides;nafarelin;nagrestip;naloxone;napavin;naphterpin;nartograstim;nedaplatin;nemorubicin;neridronic acid;neutral endopeptidase;nilutamide;nisamycin;nitric oxide调节因子(modulators) ;氮氧自由基抗氧化剂(nitroxide antioxidant) ;nitrullyn;6-benzylguanine;octreotide;okicenone;寡聚核酸(oligonucleotides);onapristone;ondansetron;ondansetron;oracin;ormaplatin;osaterone;oxaliplatin;oxaunomycin;paclitaxel类似物(analogs);paclitaxel衍生物(derivatives);prostaglandin J2;proteasome抑制剂;protein A-based免疫调控因子(immune modulator);蛋白激酶C(protein kinase C) 抑制剂raf拮抗剂(antagonists);raltitrexed;ramosetron;ras farnesyl protein transferase抑制剂;ras抑制剂;ras-GAP抑制剂(inhibitor);retelliptine demethylated;rhenium Re 186etidronate;rhizoxin;ribozymes;RII retinamide;rogletimide;rohitukine;romurtide;roquinimex;rubiginone B 1;ruboxyl;safingol;saintopin;SarCNU;sarcophytol A;sargramostim;Sdi 1mimetics;semustine;寡核苷酸(oligonucleotides);信号转导(signal transduction) 抑制剂(inhibitors);signal transduction调控因子(modulators);sizofiran;sobuzoxane;sodium borocaptate;sodium phenylacetate;solverol;sonermin;sparfasic acid;spicamycin D;spiromustine;splenopentin;spongistatin 1;squalamine;stem cell抑制剂(inhibitor);stem-cell division抑制剂(inhibitors);stipiamide;stromelysin抑制剂(inhibitors);sulfinosine;血管活性肠肽拮抗剂(superactive vasoactive intestinal peptide antagonist);thymotrinan;thyroid stimulating hormone;tin ethyl etiopurpurin;tirapazamine;titanocene dichloride;topotecan;topsentin;toremifene;totipotent stem cell factor;转录抑制剂(transcription inhibitors);tretinoi;triacetyluridine;triciribine;trimetrexate;triptorelin;tropisetron;turosteride;酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitors);tyrphostins;UBC抑制剂(inhibitors);ubenimex;urogenital sinus-derived生长抑制因子(growth inhibitory factor);urokinase受体拮抗剂(receptor antagonists);vapreotide;variolin B;velaresol;veramine;verdins;verteporfin;vinorelbine;vinxaltine;vitaxin;vorozole;zanoterone;zeniplatin;zilascorb;and zinostatin stimalamer.

[0077] 复合物A-B-mAb中,生物活性分子A也可以是抗细胞增殖药物(antiproliferative agents),如,piritrexim isothionate。也可以是前列腺肥大抑制剂(antiprostatic hypertrophy agents)如,sitogluside,治疗前列腺增生(prostatic hyperplasia)药物,如tamsulosin hydrochloride,或前列腺生长抑制剂(prostate growth inhibitors)如pentomone。

[0078] 生物活性分子A(A-B-mAb)也可以是抗代谢药物(antimetabolic agents),如methotrexate(MTX)。抗代谢药物(Antimetabolites)可以是,但不限于,这些化合物和其衍生物:azathioprine,cladribine,cytarabine,dacarbazine,fludarabine phosphate,fluorouracil,gencitabine chlorhydrate,mercaptopurine,methotrexate,mitobronitol,mitotane,proguanil chlorohydrate,pyrimethamine,raltitrexed,

trimetrexate glucuronate,urethane,vinblastine sulfate,vincristine sulfate等。可以是一种叶酸类抗代谢药物(folic acid-type antimetabolite),如methotrexate, proguanil chlorhydrate,pyrimethamine,trimethoprine,or trimetrexate glucuronate,及这些药物的衍生物。

[0079] 生物活性分子(A)也可以是蒽环类药物(anthracycline)类抗肿瘤药物,包括,但不限于aclarubicine chlorhydrate,daunorubicine chlorhydrate,doxorubicine chlorhydrate,epirubicine chlorhydrate,idarubicine chlorhydrate,pirarubicine, or zorubicine chlorhydrate。生物活性分子(A)可以是camptothecin或其衍生物或相关化合物如10,11methylenedioxycamptothecin,可以是maytansinoid或结构类似的化合物如ansamitocin P3, maytansine, 2'-N-demethylmaytanbutine或maytanbicyclinol。

[0080] 治疗药物(therapeutic agents)或细胞毒性药物(cytotoxic agents)(A)可以是抗肿瘤补充增强剂(supplementary potentiating agents),如,但不限于,三环类抗抑郁药(tricyclic anti-depressant drugs)(例如,imipramine,desipramine, amitryptyline,clomipramine,trimipramine,doxepin,nortriptyline,protriptyline, amoxapine and maprotiline);非三环类抗抑郁药(non-tricyclic anti-depressant drugs)(例如,sertraline,trazodone and citalopram);Ca<sup>++</sup>拮抗剂(antagonists)(例如,verapamil,nifedipine,nitrendipine和caroverine);Calmodulin抑制剂(inhibitors)(例如,prenylamine,trifluoroperazine and clomipramine);Amphotericin B;Triparanol类似物(analogs)(例如,tamoxifen);抗心律失常药物(antiarrhythmic drugs)(例如,quinidine);降压药(antihypertensive drugs)(例如,reserpine);Thiol depleters(例如,buthionine和sulfoximine)和抗耐药基因药物(multiple drug resistance (MDR) reducing agents)如Cremaphor EL。

[0081] 与全人源或人源化GRPR单克隆抗体连接的生物活性分子A(A-B-mAb)可以是,但不限于,多肽,细胞因子(cytokines),激素(hormone),其他蛋白分子或蛋白片段,其他抗体或抗体片段等等。例如angiotensin II,gonadotropin-releasing hormone,bombesin,生长抑素(somatostatin),Pituitary AdenylateCyclaseActivatingPeptide (PACAP), Urotensin II,vasoactive peptide (VIP),Growth Hormone Releasing Hormone (GHRH), glucagon,glucagon-like peptide 1 (GLP-1) Secretin, substance P,neuropeptide Y (NPY),cell penetrating peptide (CPP)(如TAT peptide),干扰素interferons,白细胞介素interleukines (IL1,I L2,IL3),淋巴因子Lymphokine,肿瘤坏死因子tumor necrosis factor,趋化因子(Chemokines)(如CCL1,CCL2,CCL3,CCL4).Parathyroid hormone, gonadal hormones,adrenocortical hormones,thyroid hormones,胰岛素(insulin)。

[0082] 与全人源或人源化GRPR单克隆抗体连接的生物活性分子A(A-B-mAb)可以是,但不限于,放射性同位素或放射性同位素标记物如Rhenium188,Fibrinogen I 125; Fludeoxyglucose F 18;Fluorodopa F 18;Insulin I 125;Insulin I 131;lobenguane I 123;Iodipamide Sodium I 131;Iodoantipyrine I 131;Iodocholesterol I 131; Iodohippurate Sodium I123;Iodohippurate Sodium I 125;Iodohippurate Sodium I 131;Iodopyracet I 125;Iodopyracet I 131;lofetamine Hydrochloride I 123; Iomethin I 125;Iomethin I 131;Iothalamate Sodium I 125;Iothalamate Sodium I

131;tyrosine 1 131;Liothyronine I125;Liothyronine I 131;Merisoprol Acetate Hg 197;Merisoprol Acetate Hg 203;Merisoprol Hg 197;Selenomethionine Se 75;Technetium Tc 99m Antimony Trisulfide Colloid;Technetium Tc 99m Bicisate;Technetium Tc 99m Disofenin;Technetium Tc 99m Etidronate;Technetium Tc 99m Exametazime;Technetium Tc 99m Furifosmin;Technetium Tc 99m Gluceptate;Technetium Tc 99m Lidofenin;Technetium Tc 99m Mebrofenin;Technetium Tc 99m Medronate;Technetium Tc 99m Medronate Disodium;Technetium Tc99m Mertiatide;Technetium Tc 99m Oxidronate;Technetium Tc 99m Pentetate;Technetium Tc 99m Pentetate Calcium Trisodium;Technetium Tc 99m Sestamibi;Technetium Tc 99m Siboroxime;Technetium Tc 99m Succimer;Technetium Tc 99m Sulfur Colloid;Technetium Tc 99m Teboroxime;Technetium Tc 99m Tetrofosmin;Technetium Tc 99m Tiatide;Thyroxine1 125;Thyroxine 1 131;Tolpovidone 1 131;Triolein 1 125;or Triolein 1 131,Gd<sup>3+</sup>,Fe<sup>3+</sup>,Mn<sup>3+</sup>。或者放射性标记物如多肽,蛋白,抗体,螯合基团,核酸,DNA, RNA等。可以用放射性同位素(radioisotopes)如<sup>75</sup>Br,<sup>77</sup>Br,<sup>76</sup>Br,<sup>122</sup>I,<sup>123</sup>I,<sup>124</sup>I,<sup>125</sup>I,<sup>129</sup>I,<sup>131</sup>I,<sup>90</sup>Y或<sup>211</sup>At等等标记这些待标记物如多肽,螯合基团,核酸,DNA等。如,将<sup>90</sup>Y经一个螯合基团(a chelating group)标记到多肽链的氨基上,再与抗体相连。

[0083] 与全人源或人源化GRPR单克隆抗体连接的生物活性分子A(A-B-mAb)可以是,但不限于,诊断标记如荧光分子(如fluorescein, rhodamine, Texas red, pyridyloxazole, merocyanine, oxazine170, acridine yellow)或荧光蛋白(如荧光蛋白GFP, YFP, RFP)或荧光分子标记物(如多肽,蛋白,抗体,螯合基团,核酸,DNA, RNA等等),或其他已知的各种染料(dye),颜色(color),重金属,放射性同位素等,或其标记物(如多肽,蛋白,抗体,螯合基团,核酸,DNA, RNA等等)。这些诊断标记可以经不同方式方法连接到抗体上。可以是连接一个,两个或多个诊断标记。如在多肽链上双碘标记的同时,再将<sup>90</sup>Y经一个螯合基团标记到多肽链的氨基上构成有三个诊断标记的多肽标记物。

[0084] 与全人源或人源化GRPR单克隆抗体连接的生物活性分子A可以是,但不限于,核酸或核酸片段,如针对各种基因的oligoDNA,oligoRNA,sirRNA,microRNA等等。

[0085] 与全人源或人源化GRPR单克隆抗体连接的生物活性分子A可以是,但不限于,螯合基团(chelating groups)。螯合基团可以与肽,或诊断标记(如荧光,放射性同位素)或蛋白,或抗体相连。螯合基团可以是,但不限于,连接多肽与放射性标记,连接多肽与荧光标记,连接荧光标记与抗体。例如螯合基团可以是一个双功能稳定螯合剂(bifunctional stable chelator),该螯合剂可以连接到一个或多个氨基酸的活性基团(reactive groups)上,该氨基酸基团可以是末端或中间(terminal或internal)。可以连接到isothiocyanateβ-Ala或非α氨基酸连接链(nona-amino acid linker)上以防降解。如,ininocarboxylic和polyaminopolycarboxylic反应基团(reactive groups),DTPA(N,N-Bis[2-[bis(carboxymethyl)amino]ethyl]glycine),和DOPA(1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid)。

[0086] 以全人源或人源化GRPR单克隆抗体开发的药物(A-B-mAb)可以用于,但不限于,人类疾病如肿瘤,感染疾病,免疫病,代谢(Metabolic)疾病等。

[0087] 全人源或人源化GRPR单克隆抗体药物(A-B-mAb)可以作用于,但不限于,肿瘤(癌)

或肿瘤血管细胞表面的GRPR来治疗多种肿瘤(癌),如(但不限于),肺癌,胰腺癌,内分泌瘤,类癌(carcinoid),鼻咽癌,前列腺癌,神经瘤,宫颈癌,乳腺癌,卵巢癌,癌干细胞(cancer stem cell),血管发生(angiogenesis)。

[0088] 全人源或人源化GRPR单克隆抗体药物(A-B-mAb)可以用于,但不限于,治疗感染疾病如艾滋病(AIDS),肝炎,结核,疟疾。

[0089] 全人源或人源化GRPR单克隆抗体药物(A-B-mAb)可以用于,但不限于,器官(如肝脏,肾脏,)移植相关的免疫抑制,或者治疗自身免疫病如红斑狼疮,类风湿性关节炎,I型糖尿病,甲状腺疾病,溶血性贫血,银屑病,原发性胆汁性肝硬化。

[0090] 全人源或人源化GRPR单克隆抗体药物(A-B-mAb)可以用于,但不限于,治疗代谢疫病如痛风,II型糖尿病,肥胖,高尿酸血症,高血压。

[0091] 本发明并不局限于以上所述,凡在本发明基础上的关于全人源或人源化GRPR单克隆抗体,及其相关药物或诊断试剂的相关开发与应用都在本发明保护范围内。

#### [0092] 参考文献

[0093] 1.Buss NA,Henderson SJ,McFarlane M,Shenton JM,de Haan L.Monoclonal antibody therapeutics:history and future.Current opinion in pharmacology.2012;12(5):615-22.

[0094] 2.Pavlou AK,Reichert JM.Recombinant protein therapeutics--success rates,market trends and values to2010.Nature biotechnology.2004;22(12):1513-9.

[0095] 3.Lonberg N.Fully human antibodies from transgenic mouse and phage display platforms.Current opinion in immunology.2008;20(4):450-9.

[0096] 4.Nelson AL,Dhimolea E,Reichert JM.Development trends for human monoclonal antibody therapeutics.Nature reviews Drug discovery.2010;9(10):767-74.

[0097] 5.Sassoon I,Blanc V.Antibody-drug conjugate(ADC) clinical pipeline:a review.Methods in molecular biology.2013;1045:1-27.

[0098] 6.Scott AM,Wolchok JD,Old LJ.Antibody therapy of cancer.Nature reviews Cancer.2012;12(4):278-87.

[0099] 7.Weiner LM,Borghaei H.Targeted therapies in solid tumors:monoclonal antibodies and small molecules.Human antibodies.2006;15(3):103-11.

[0100] 8.Marasco WA,Sui J.The growth and potential of human antiviral monoclonal antibody therapeutics.Nature biotechnology.2007;25(12):1421-34.

[0101] 9.Weiner LM.Fully human therapeutic monoclonal antibodies.Journal of immunotherapy.2006;29(1):1-9.

[0102] 10.Nolting B.Linker technologies for antibody-drug conjugates.Methods in molecular biology.2013;1045:71-100.

[0103] 11.Anderl J,Faulstich H,Hechler T,Kulke M.Antibody-drug conjugate payloads.Methods in molecular biology.2013;1045:51-70.

[0104] 12.Tagawa ST,Milowsky MI,Morris M,Vallabhanujala S,Christos P,Akhtar

NH, et al. Phase II study of Lutetium-177-labeled anti-prostate-specific membrane antigen monoclonal antibody J591 for metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2013;19(18):5182-91.

[0105] 13. Bander NH. Antibody-drug conjugate target selection: critical factors. *Methods in molecular biology.* 2013;1045:29-40.

[0106] 14. Xu C, Sui J, Tao H, Zhu Q, Marasco WA. Human anti-CXCR4 antibodies undergo VH replacement, exhibit functional V-region sulfation, and define CXCR4 antigenic heterogeneity. *Journal of immunology.* 2007;179(4):2408-18.

[0107] 15. Adams GP, Weiner LM. Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nature biotechnology.* 2005;23(9):1147-57.

[0108] 16. Reubi JC. Peptide receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy. *Endocrine reviews.* 2003;24(4):389-427.

[0109] 17. Ischia J, Patel O, Shulkes A, Baldwin GS. Gastrin-releasing peptide: different forms, different functions. *BioFactors.* 2009;35(1):69-75.

[0110] 18. Weber HC. Regulation and signaling of human bombesin receptors and their biological effects. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity.* 2009;16(1):66-71.

[0111] 19. Sancho V, Di Florio A, Moody TW, Jensen RT. Bombesin receptor-mediated imaging and cytotoxicity: review and current status. *Current drug delivery.* 2011;8(1):79-134.

[0112] 20. Flores DG, Meurer L, Uberti AF, Macedo BR, Lenz G, Brunetto AL, et al. Gastrin-releasing peptide receptor content in human glioma and normal brain. *Brain research bulletin.* 2010;82(1-2):95-8.

[0113] 21. Sun YG, Chen ZF. A gastrin-releasing peptide receptor mediates the itch sensation in the spinal cord. *Nature.* 2007;448(7154):700-3.

[0114] 22. Sun LC, Mackey LV, Luo J, Fuselier JA, Coy DH. Targeted chemotherapy using a cytotoxic somatostatin conjugate to inhibit tumor growth and metastasis in nude mice. *Clinical medicine Oncology.* 2008;2:491-9.

[0115] 23. Sun L, Luo J, Mackey LV, Morris LM, Franko-Tobin LG, LePage KT, et al. Investigation of cancer cell lines for peptide receptor-targeted drug development. *Journal of drug targeting.* 2011;19(8):719-30.

[0116] 24. Moody TW, Fuselier J, Coy DH, Mantey S, Pradhan T, Nakagawa T, et al. Camptothecin-somatostatin conjugates inhibit the growth of small cell lung cancer cells. *Peptides.* 2005;26(9):1560-6.

[0117] 25. Parry JJ, Andrews R, Rogers BE. MicroPET imaging of breast cancer using radiolabeled bombesin analogs targeting the gastrin-releasing peptide receptor. *Breast cancer research and treatment.* 2007;101(2):175-83.

[0118] 26. Nakagawa O, Ming X, Carver K, Juliano R. Conjugation with receptor-

targeted histidine-rich peptides enhances the pharmacological effectiveness of antisense oligonucleotides. *Bioconjugate chemistry.* 2014; 25(1) :165–70.

[0119] 27. Zhang X, Cai W, Cao F, Schreibmann E, Wu Y, Wu JC, et al. 18F-labeled bombesin analogs for targeting GRP receptor-expressing prostate cancer. *Journal of nuclear medicine:official publication,Society of Nuclear Medicine.* 2006; 47 (3) :492–501.

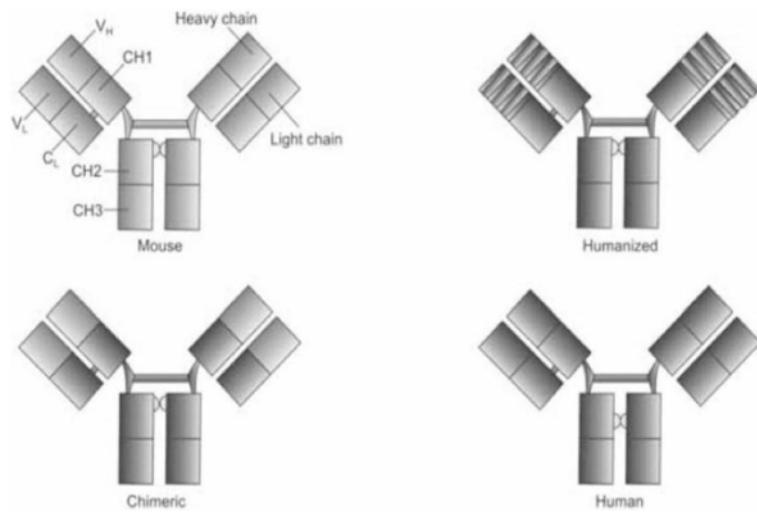


图1

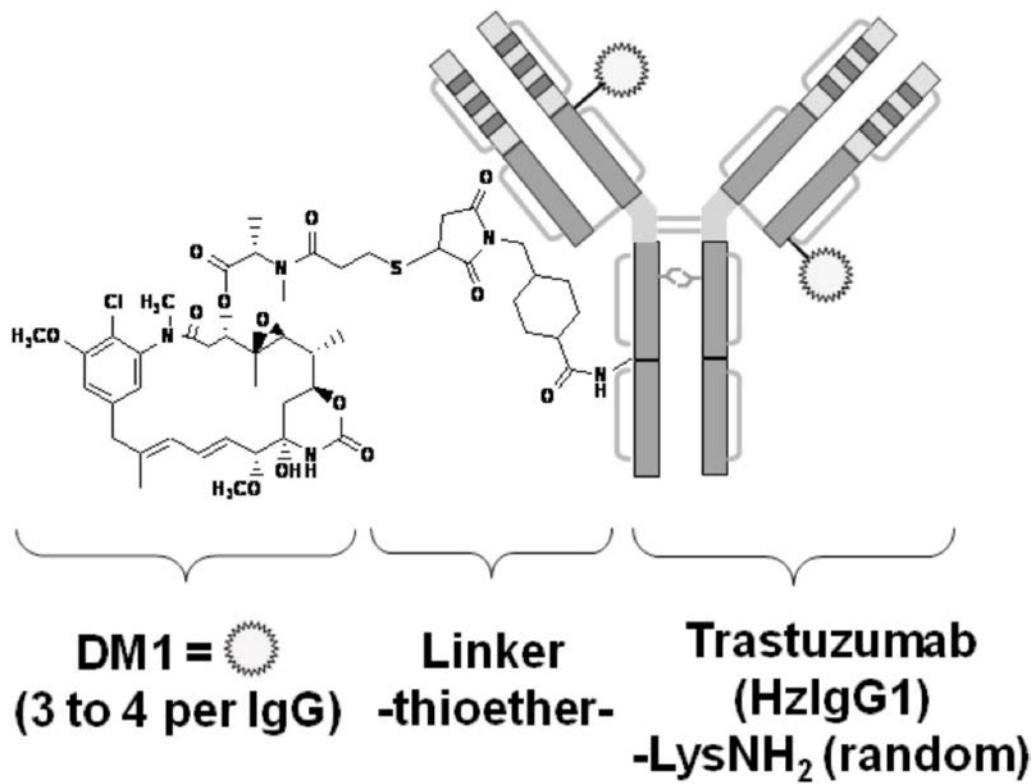


图2

10	20	30	40	50
MALND <b>C</b> FLLN	LEVDHFMHCN	ISSHSADLPV	NDDWSHPGIL	YVIPAVYGVI
60	70	80	90	100
ILIGLIGNIT	LIKIFCTVK <b>S</b>	MRNVPNL <b>F</b> IS	SLALGD <b>L</b> LLL	ITCAPVDASR
110	120	130	140	150
YLADRWFGR	IGCKLIPFIQ	LTSVG <b>V</b> SVFT	LTALSADRYK	AIVRPMDIQA
160	170	180	190	200
SHALMKICLK	AAFIWIISML	LA <b>I</b> PEAVFSD	LHPFH <b>E</b> ESTN	QTFISCAPYP
210	220	230	240	250
HSNELHPKI <b>H</b>	SMASFLVFY <b>V</b>	IPLSIISVYY	YFIAKNLIQS	AYNLPVEGNI
260	270	280	290	300
HVKKQIESRK	RLAKTVLVF <b>V</b>	GLFAFCWLPN	HVIYLYRSYH	YSEVDTSM <b>L</b> H
310	320	330	340	350
FVTSICARLL	AFTNSCVNPF <b>F</b>	ALYLLSKSFR	KQFNTQLLCC	QPGLIIRSHS
360	370	380		
TGRSTTCMTS	L <b>K</b> STNPSVAT	FSLINGNICH	ERYV	

图3

Table 2 Expression of certain GPCRs at mRNA level by RT-PCR.

Cells	Tumors	SST receptors					BN receptors			VIP receptors		
		1	2	3	4	5	GRPR	BRS	NMBR	PAC1	VPAC1	VPAC2
PC-3	Prostate cancer	++	++++	+	+	++++	++++	+	-	-	++++	-
DU-145	Prostate cancer	-	++++	+	+	++++	++++	++	++	-	++++	+
IMR32	Neuroblastoma	-	++++	-	-	++++	-	+	++	++++	++++	-
MCF-7	Breast cancer	+	++++	+	+	++++	+++	+	-	-	++++	++
MDA-MB-231	Breast cancer	+	++++	+	+	++++	-	-	+	-	++	++
CFPAC-1	Pancreatic cancer	++	++++	+	+	++++	++++	+	++	-	++++	-
BON	Pancreatic carcinoid	++++	++++	+	+	++++	++++	++++	+	-	++++	-
NCI-H69	Lung cancer	+	++++	+	+	++++	-	+	+	++	++++	-
NCI-H460	Large cell lung cancer	-	+++	+	+++	+	-	+	++	-	++++	+++
A549	Lung cancer	++++	++++	++	+++	+++	+	+	+	++	++++	+
MOLT-4	Leukemia	-	++++	-	-	-	++	++	++	-	++	++
HeLa	Cervical cancer	++	++++	+	+	++++	-	-	+++	-	+++	+++
U87MG	Glioblastoma	-	++	+	+++	-	-	+	-	++	++++	-
DLD-1	Colonrectal cancer	-	++	+	+++	++	+	-	+	-	+++	-
OVCAR-8	Ovarian cancer	-	+++	+	+++	+	+++	+	+	++	++++	+
NCI/ADR-RES	Ovarian cancer	-	+++	-	+++	-	+++	+	+	++	++++	+

Note: +++, High or over; ++, medium; +, low; +, trace; -, negative; N/A, Non-available.

图4

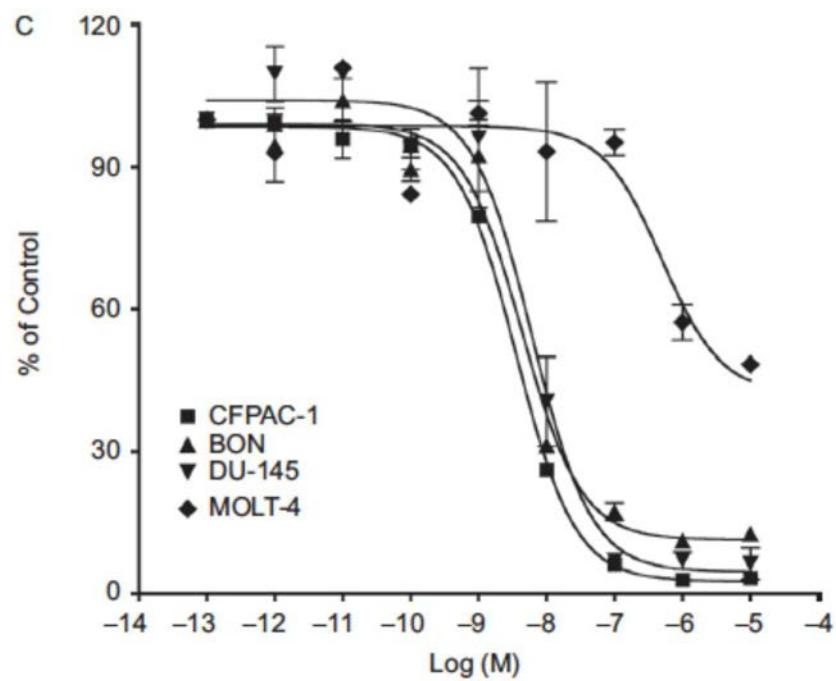


图5



图6

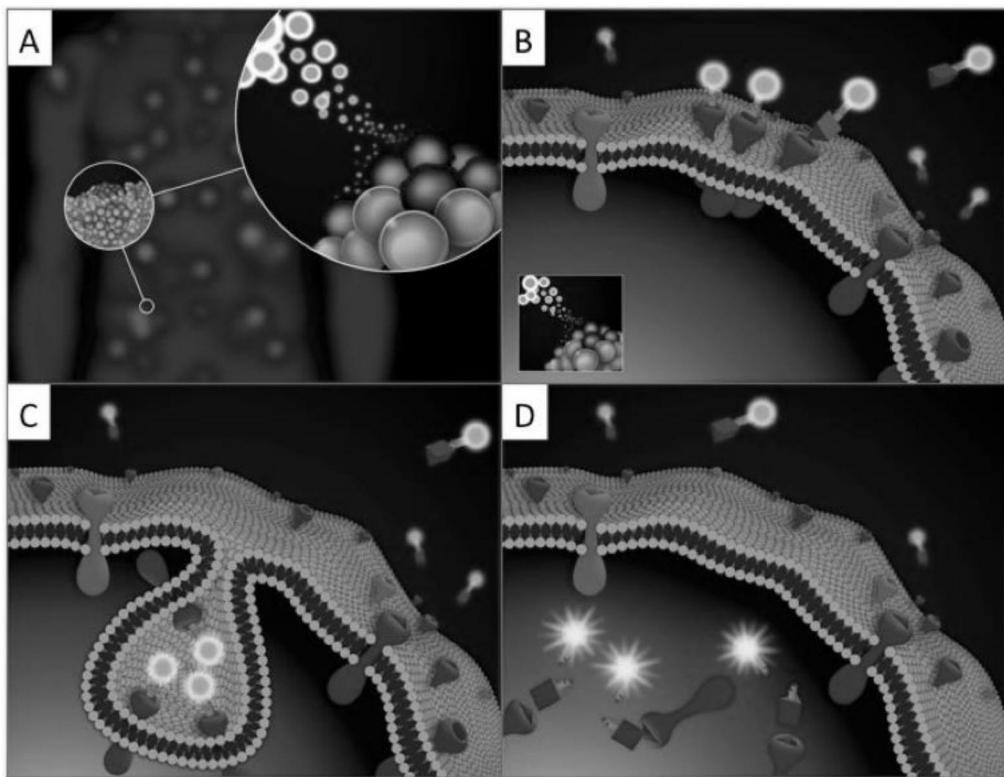


图7

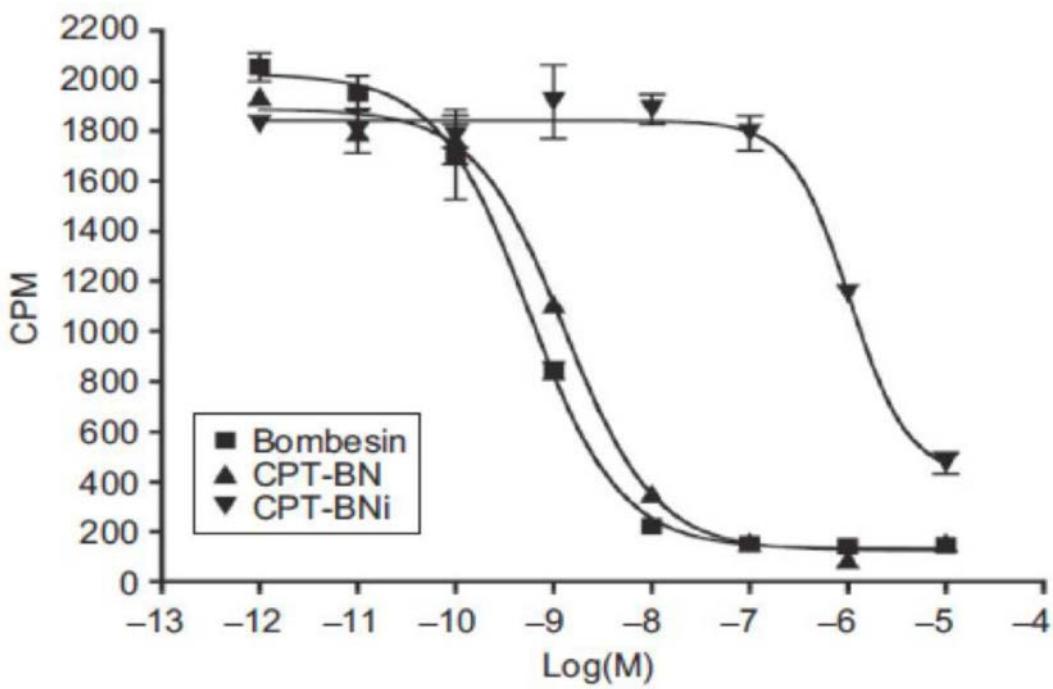


图8

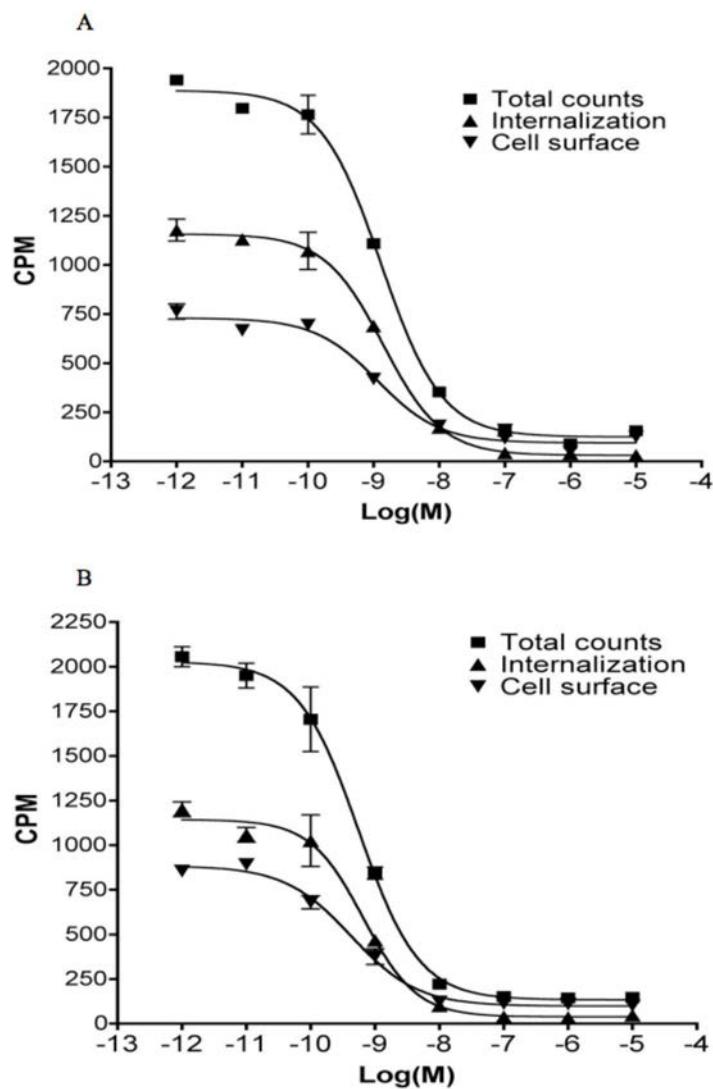


图9

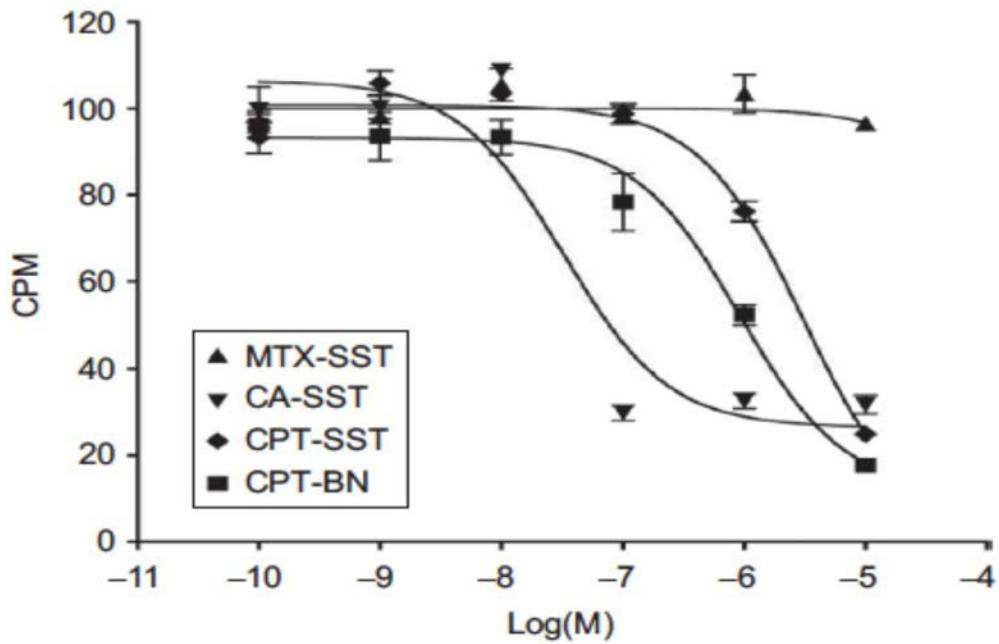


图10

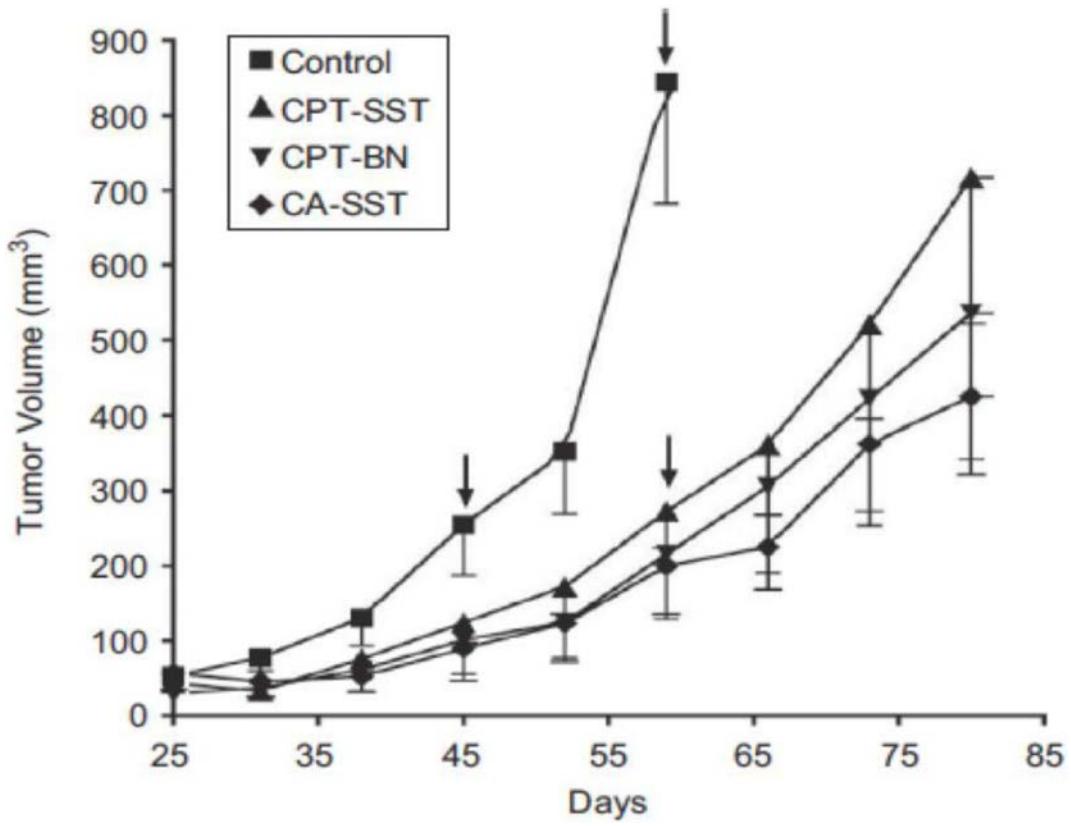


图11

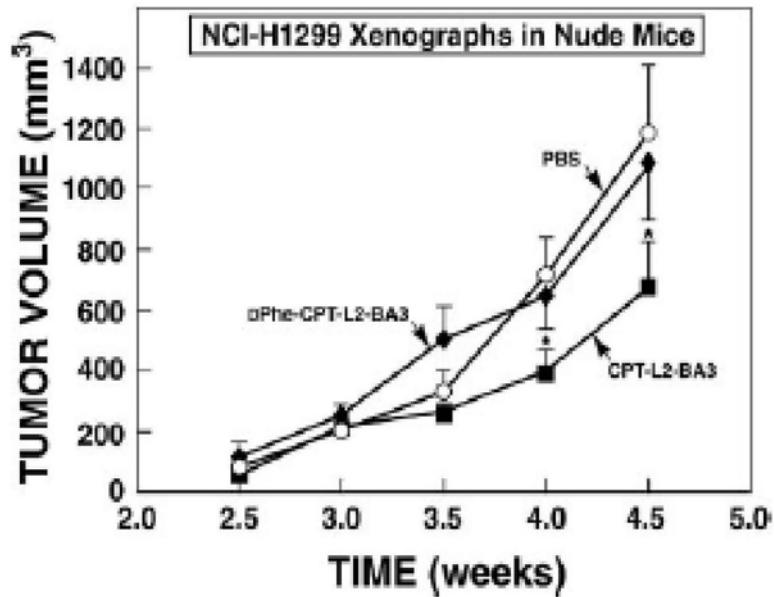


图12

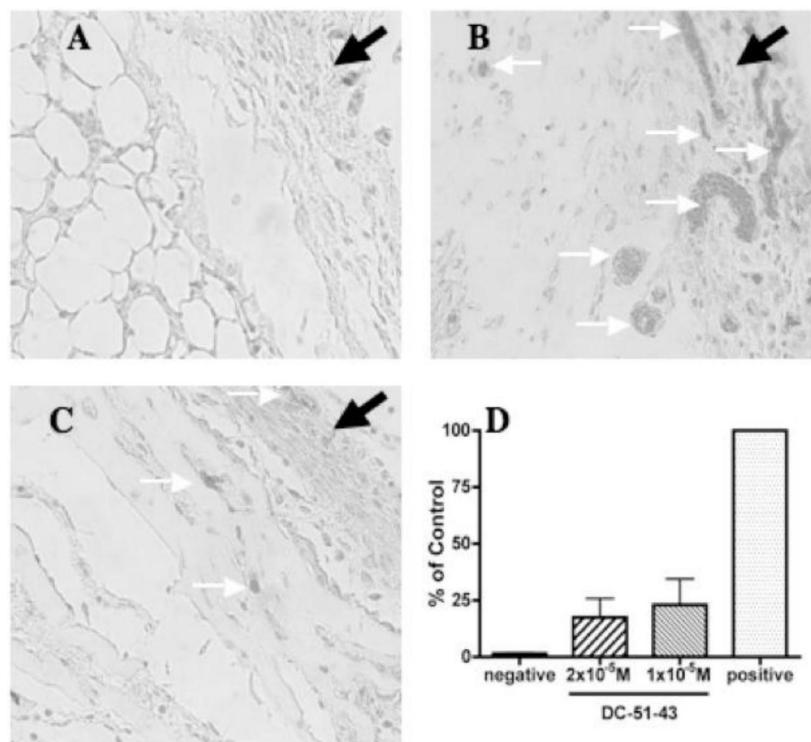


图13