



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I524897 B

(45)公告日：中華民國 105 (2016) 年 03 月 11 日

(21)申請案號：097150429

(22)申請日：中華民國 97 (2008) 年 12 月 24 日

(51)Int. Cl. : A61K39/385 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

C07K16/28 (2006.01)

(30)優先權：2007/12/26 美國

61/016,613

2007/12/26 美國

61/016,630

(71)申請人：生物監測股份公司 (德國) BIOTEST AG (DE)

德國

免疫原股份有限公司 (美國) IMMUNOGEN, INC. (US)

美國

(72)發明人：休茲 葛利格 SCHULZ, GREGOR (DE)；歐斯特羅斯 法蘭克 OSTERROTH, FRANK (DE)；愛格涅爾 希爾克 AIGNER, SILKE (DE)；尤瑞克 克里斯多夫 UHEREK, CHRISTOPH (DE)；布尤洽 克里斯多夫 BRUECHER, CHRISTOPH (DE)；利能 史蒂芬 ZENG, STEFFEN (DE)；達拉肯 班傑明 DAELKEN, BENJAMIN (DE)；路希爾 馬庫斯 RUEHLE, MARKUS (DE)；卡路斯 艾爾瑪 KRAUS, ELMAR (DE)；海德 湯瑪士 HAEDER, THOMAS (DE)

(74)代理人：憚軼群；陳文郎

(56)參考文獻：

CN 1350454A

US 5034223A

WO 2006099875A1

WO 2007144046A2

Cortesini R. et al. "Pancreas cancer and the role of soluble immunoglobulin-like transcript 3 (ILT3)." JOP. 2007 Nov, 8(6): 697-703 第 701 頁左欄第 4 段、右欄第 1 段

審查人員：顏逸瑜

申請專利範圍項數：23 項 圖式數：5 共 74 頁

(54)名稱

降低細胞毒殺性副作用及改良免疫綴合物功效的方法

METHOD OF DECREASING CYTOTOXIC SIDE-EFFECTS AND IMPROVING EFFICACY OF IMMUNOCONJUGATES

(57)摘要

在此揭示的是用於改良免疫綴合物之靶定性，特別是腫瘤靶定性之方法、組成物以及套組。該方法以及組成物依靠隔離亦表現該免疫綴合物會靶定之抗原之非靶細胞。在此揭露各種隔離該等非靶細胞之方法。該方法、組成物以及套組使得能適當的隔離非靶細胞，同時使該免疫綴合物對抗靶細胞之程度維持高效力。

Disclosed are methods, compositions and kits for improving targeting, in particular tumor targeting, of immunoconjugates. The method and composition relies on the sequestration of non-target cells that also express the antigen the immunoconjugate targets. Sequestration of those non-target cells in a variety of ways

is disclosed. The methods, compositions and kits allow appropriate sequestration of non-target cells while maintaining a high degree of effectiveness of the immunoconjugates against target cells.

公告本發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：97150429

※申請日：97.12.24

※IPC 分類：

A61k 39/385 (2006.01)

A61k 39/395 (2006.01)

C07k 16/28 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

降低細胞毒殺性副作用及改良免疫綴合物功效的方法

METHOD OF DECREASING CYTOTOXIC SIDE-EFFECTS AND
IMPROVING EFFICACY OF IMMUNOCONJUGATES

二、中文發明摘要：

在此揭示的是用於改良免疫綴合物之靶定性，特別是腫瘤靶定性之方法、組成物以及套組。該方法以及組成物依靠隔離亦表現該免疫綴合物會靶定之抗原之非靶細胞。在此揭露各種隔離該等非靶細胞之方法。該方法、組成物以及套組使得能適當的隔離非靶細胞，同時使該免疫綴合物對抗靶細胞之程度維持高效力。

三、英文發明摘要：

Disclosed are methods, compositions and kits for improving targeting, in particular tumor targeting, of immunoconjugates. The method and composition relies on the sequestration of non-target cells that also express the antigen the immunoconjugate targets. Sequestration of those non-target cells in a variety of ways is disclosed. The methods, compositions and kits allow appropriate sequestration of non-target cells while maintaining a high degree of effectiveness of the immunoconjugates against target cells.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 () 圖。(無)

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

相關申請案之交叉引用

此申請案請求於2007年12月26日所提申之美國臨時申請案第61/016,613號、於2007年12月26日所提申之美國臨時申請案第61/016,630號之優先權，其等之全部內容在此併入本案以為參考。

發明領域

本發明有關改良免疫綴合物，特別是針對表現在靶以及非靶細胞上之抗原之免疫綴合物，之靶定性之方法以及組成物。

【先前技術】

發明背景

免疫綴合物係有希望用於治療不同的醫療狀況，特別是用於治療廣泛的癌症之候選者。例如，Tassone et al. (2004)報導類美登素 (maytansinoid) 免疫綴合物 B-B4-DM1 對 CD138陽性多發性骨髓瘤細胞，具有極佳的細胞毒殺活性 (亦可參見美國專利公開案第20070183971號)。

在此用於說明本發明，特別是提供有關實施之額外詳細的說明之公開文獻以及包括專利之其它資料，均併入本案以為參考。方便起見，該等公開文獻於下文中按作者以及日期提出和/或以所附之目錄中之作者按字母列出。

研究之實質部分已集中在其中效應劑可選擇性地傳送至所欲的位置或細胞群之系統的建立，即，更靶定的治療

疾病，但具有更少的毒性副作用之系統的建立。僅管在用於治療各種疾病之傳送系統方面已有大量的進展，但許多該等傳送系統，例如，治療癌症之系統，仍效果不彰和/或使病人處於相當大的風險之中。

5 免疫綴合物包含至少一種依附至至少一種效應分子之靶定劑。此免疫綴合物可依據其等之效應分子而被分類成，例如，藥物免疫綴合物、免疫毒素綴合物以及放射免疫綴合物(Payne, 2003)。

10 滅殺靶細胞之效力係免疫綴合物是否有用之一關鍵因素。效力可受效應分子之強度的影響(Blättler and Chari, 2001)、可受該效應物保持其強度之能力的影響(Chari et al., 1995; Liu et al., 1996; Ojima et al., 2002; Senter et al., 2002 and Sievers and Linenberger, 2001)、可受腫瘤易受影響之程度的影響(Charter, 2001)、可受靶抗原在靶細胞上之表現位
15 準的影響、可受靶定劑親和力的影響以及可受靶細胞內化該免疫綴合物之能力的影響(Wargalla, 1989)。

20 一種有助於提高效率之方法涉及放射免疫綴合物澤娃靈(Zevalin)。釷-90澤娃靈(釷-90標記的替伊莫單抗(Ibritumomab-Tiuxetan))以及銥-111澤娃靈(銥-111標記的替伊莫單抗)，係以異貝莫單抗(Ibritumomab) (利妥昔單抗(Rituximab)之鼠類配對物)為主，與螯合物替坦(Tiuxetan) (其對銥-111與釷Y-90具親和力)綴合之放射免疫綴合物(Biogen-IDEC)。異貝莫單抗(鼠類)以及利妥昔單抗(人類)二者，均會結合廣泛表現在B細胞上之CD20。CD20不會內

化、調節或脫落，最可能的是參與 Ca^{2+} 流入與流出細胞中。利妥昔單抗當本身投與時(在無澤娃靈之情況下)係高細胞毒性的，會導致消滅B細胞(包括癌性B細胞)，因此為侵襲性淋巴瘤之標準治療之部分。該被消滅的B細胞由淋巴幹細胞而來之健康B細胞取代。

澤娃靈治療療法涉及未綴合的抗體利妥昔單抗以及免疫綴合的澤娃靈二者。概略而言，在IV推注10分鐘投與固定劑量的銥-111澤娃靈之前，單次輸注利妥昔單抗。7至9天後，此步驟後接著第二步驟，其涉及在IV推注10分鐘投與Y-90澤娃靈前，第二次輸注利妥昔單抗。利妥昔單抗之預處理會消滅大多數的B細胞，而剩餘的細胞(其可包括對利妥昔單抗之處理產生抗性之腫瘤細胞)之後由澤娃靈靶定。由於B細胞介導干擾放射活性遍及病人身體所產生之副作用，銥-111/Y-90澤娃靈一般不以其本身之形式使用。

此澤娃靈之治療(其被指示用於患有復發或難治療性低分化、濾泡型或轉化型B細胞非何杰金氏淋巴瘤之病人，包括患有利妥昔單抗難治療性濾泡型非何杰金氏淋巴瘤之病人)在臨床試驗中，顯示出比僅以利妥昔單抗治療高的反應速率。其亦對不再對利妥昔單抗有反應之病人顯示出有希望的結果。

理想之情況係免疫綴合物會專一性地結合至靶細胞群，諸如特別種類之腫瘤細胞，而很難或根本不會結合至任何其它的細胞，特別是在宿主有機體中進行重要功能之細胞。雖然不少抗原與某些疾病特徵非常相關，但在大部

分之情況下，該等抗原亦會表現在與該疾病不相關之細胞上，即非靶細胞上。取決於此等健康細胞對該有機體之重要性，免疫綴合物之成功很大程度是視此等細胞受治療之影響有多深遠而定。

- 5 因此，仍存在一種用於降低一免疫綴合物之可能的副作用之需求，其中該副作用係因該免疫綴合物與會表現靶細胞上之相關抗原之非標靶間之交互反應而產生。此等包括，特別是，由於與已從該靶細胞上分離之靶分子結合，該免疫綴合物對非靶細胞之細胞毒性以及整體效力降低。
- 10 對非靶細胞之細胞毒性的降低，在當該非靶細胞在宿主有機體中扮演非常重要的角色時特別地重要。

【發明內容】

發明概要

- 本發明針對一種用於改良一靶定表現在靶細胞上之細胞結合型抗原之免疫綴合物之靶定性之方法，其包含：
- 15 胞結合型抗原之免疫綴合物之靶定性之方法，其包含：

(a)提供一包含該抗原之介質，其中該抗原係靶細胞、非靶細胞上之細胞結合型和/或呈可溶性之形式；

(b)隔離細胞結合型抗原、可溶性抗原和/或表現抗原之細胞，

- 20 (c)投與一靶定表現在靶細胞上之細胞結合型抗原之免疫綴合物，其包含一功能性地依附至一效應分子之抗該抗原之靶定劑，其中該(b)中之隔離改良該免疫綴合物之靶細胞靶定性。較佳地，該抗原內化進入其結合之細胞中和/或遭受脫落。該非靶細胞可包含諸如上皮細胞、肝細胞或任

何其它不容易再生之細胞。

特別地，本發明針對一種用於改良一靶定CD138之免疫綴合物之腫瘤靶定性之方法，其包含：

5 (a)提供一包含細胞結合型CD138和/或可溶性CD138之介質；

(b)隔離細胞結合型CD138、可溶性CD138和/或表現CD138之細胞，

10 (c)投與一靶定細胞結合型CD138之免疫綴合物，其包含一功能性地依附至一效應分子之抗CD138之靶定劑，其中該(b)中之隔離改良該免疫綴合物之腫瘤靶定性。

本發明亦針對藥學組成物以及套組，其包含一靶定表現在靶細胞(如腫瘤細胞)上之細胞結合型抗原(如CD138)之免疫綴合物，該免疫綴合物包含一功能性地依附至一效應分子之抗該抗原之靶定劑；以及一未綴合的靶定劑。

15 本發明提供一種一靶定細胞結合型CD138之免疫綴合物於製造用於治療腫瘤之藥劑之用途，該免疫綴合物包含一功能性地依附至一效應分子之抗CD138之靶定劑，其中該藥劑係要用來投與至一病人，其中細胞結合型CD138、可溶性CD138和/或表現CD138之細胞已經隔離。

20 本發明進一步提供一種一靶定細胞結合型CD138之免疫綴合物於製造用於治療腫瘤之藥劑之用途，該免疫綴合物包含一功能性地依附至一效應分子之抗CD138之靶定劑，其中該藥劑係要用來當為治療療程之部分之形式投與，包含下列步驟：

(a)提供一包含細胞結合型CD138和/或可溶性CD138之介質；

(b)隔離細胞結合型CD138、可溶性CD138和/或表現CD138之細胞，以及

5 (c)投與該免疫綴合物。

此外，本發明提供一種用於治療腫瘤之靶定細胞結合型CD138之免疫綴合物，其包含一功能性地依附至一效應分子之抗CD138之靶定劑，其中該免疫綴合物係要用來投與至一病人，其中細胞結合型CD138、可溶性CD138和/或表現CD138之細胞已經隔離。

另外，本發明提供一種一靶定細胞結合型CD138之免疫綴合物以及一未綴合的CD138靶定劑於製造供同時、分開或依序用於治療腫瘤之結合配方之用途，其中該免疫綴合物包含一功能性地依附至一效應分子之抗CD138之靶定劑，以及其中該未綴合的CD138靶定劑能夠隔離細胞結合型CD138、可溶性CD138和/或表現CD138之細胞。

此外，本發明亦提供一種藥劑，其包含一靶定細胞結合型CD138之免疫綴合物以及一未綴合的CD138靶定劑，其等呈結合配方之形式供同時、分開或依序用於治療腫瘤，其中該免疫綴合物包含一功能性地依附至一效應分子之抗CD138之靶定劑，以及其中該未綴合的CD138靶定劑能夠隔離細胞結合型CD138、可溶性CD138和/或表現CD138之細胞。

特別地，在以上用途中，該細胞結合型CD138、可溶性CD138和/或表現CD138之細胞之隔離會改良該免疫綴合

物之腫瘤靶定性。

本發明亦提供一種一靶定表現在靶細胞上之細胞結合型抗原之免疫綴合物於製造用於治療病人之藥劑之用途，該免疫綴合物包含一功能性地依附至一效應分子之抗該抗原之靶定劑，其中該藥劑係要用來投與至一病人，其中細胞結合型抗原、可溶性抗原和/或表現抗原之細胞已經隔離。

本發明進一步提供一種一靶定表現在靶細胞上之細胞結合型抗原之免疫綴合物於製造用於治療個體之藥劑之用途，該免疫綴合物包含一功能性地依附至一效應分子之抗該抗原之靶定劑，其中該藥劑係要用來當作治療療程之部分之形式投與，包含下列步驟：

(a)提供一包含該抗原之介質，其中該抗原係靶細胞、非靶細胞上之細胞結合型和/或呈可溶性之形式；

(b)隔離細胞結合型抗原、可溶性抗原和/或表現抗原之細胞；以及

(c)投與該免疫綴合物。

本發明亦提供一種用於治療個體之靶定表現在靶細胞上之細胞結合型抗原之免疫綴合物，其包含一功能性地依附至一效應分子之抗該抗原之靶定劑，其中該免疫綴合物係要用來投與至一病人，其中細胞結合型抗原、可溶性抗原和/或表現抗原之細胞已經隔離。

另外，本發明提供一種一靶定表現在靶細胞上之細胞結合型抗原之免疫綴合物以及一未綴合的靶定劑於製造結合配方供同時、分開或依序用於治療個體之藥劑之用途，

其中該免疫綴合物包含一功能性地依附至一效應分子之抗該抗原之靶定劑，以及其中該未綴合的靶定劑能夠隔離細胞結合型抗原、可溶性抗原和/或表現抗原之細胞。

且，本發明提供一種藥劑，其包含一靶定表現在靶細胞上之細胞結合型抗原之免疫綴合物以及一未綴合的靶定劑，其等呈結合配方之形式供同時、分開或依序用於治療個體，其中該免疫綴合物包含一功能性地依附至一效應分子之抗該抗原之靶定劑，以及其中該未綴合的靶定劑能夠隔離細胞結合型抗原、可溶性抗原和/或表現抗原之細胞。

於本發明之一具體例中，在以上用途中，細胞結合型抗原、可溶性抗原和/或表現抗原之細胞之隔離會改良該免疫綴合物之靶細胞靶定性。

特別地，本發明可用於治療或預防一個體中之疾病，其中該疾病係一種其中表現在該靶細胞上之靶抗原，亦呈可溶性之形式和/或亦會表現在非靶健康細胞和/或組織上之疾病。於本發明之一具體例中，該靶細胞係前癌或癌細胞。

圖式簡單說明

第1A圖顯示由FACS分析法測得之NCI-H929以及MOLP-2(右)表面上之CD138表現。使用FITC綴合的二抗偵測到之結合型nBT062抗體以黑色表示。在代表性直條圖中，將細胞總數對在FITC波段(FL1-H)中測得之螢光強度作圖。僅以該二抗處理之細胞作為對照組(白色)。第1B圖顯示在細胞存活率分析中，NCI-H929以及MOLP-2細胞對nBT062-SPDB-DM4(綴合物)以及缺少該抗體部分之游離

毒素之敏感度。提供相應的 IC_{50} 值。以FACS分析法測定在該細胞表面上之相對的CD138表現，然後提供相對螢光強度。此外，絕對受體數目/細胞係以使用QIFIKIT量化之值顯示。第1C圖顯示MOLP-2以及NCI-H929細胞對nBT062之敏感度。

第2A圖以及第2B圖描述在漸增濃度之nBT062存在下，nBT062-SPDB-DM4對NCI-H929細胞之細胞毒性。各圖亦顯示在無nBT062之存在下所獲得之劑量/反應曲線。NCI-H929細胞對游離毒素之敏感度示於第2A圖(第二圖)中。

第3A圖以及第3B圖描述在漸增濃度之nBT062下，nBT062-SPDB-DM4對MOLP-2細胞之細胞毒性。各圖亦顯示在無nBT062之存在下所獲得之劑量/反應曲線。MOLP-2細胞對游離毒素之敏感度示於第3A圖(第二圖)中。

第4圖描述漸增濃度之nBT062對NCI-H929以及MOLP-2細胞之 IC_{50} 值的影響。該 IC_{50} 值係根據於第2圖以及第3圖中所示之劑量反應曲線計算得，然後對用於預培育之nBT062的濃度作圖。

第5圖顯示該免疫綴合物BT062中效應物功能性依附至抗體。

20 【實施方式】

本發明之各種較佳具體例之詳細說明

本發明有關一種改良免疫綴合物(特別是以亦表現在非靶細胞上之細胞結合型抗原作為標靶之免疫綴合物)之靶定性，特別是腫瘤靶定性，之方法。該方法包含透過未

綴合的靶定劑隔離可為細胞結合型或可溶性之抗原(如，CD138)。於某些具體例中，該方法亦包含隔離表現細胞結合型抗原之細胞。該隔離較佳地“遮蔽”非靶細胞免於該免疫綴合物之破壞和/或降低免疫綴合物結合可溶性抗原和/或表現在非靶細胞上之抗原。因此，因免疫綴合物治療所產生之副作用得以降低和/或結合效力得以改良，以容許投與分別具有相對低的副作用發生之較低劑量的免疫綴合物和/或較高劑量的免疫綴合物。

在一具體例中，如本發明之未綴合的靶定劑係投與至一需要治療處理之對象之細胞。該未綴合的靶定劑會結合可為或可能不是細胞結合型之抗原(如，CD138)。免疫綴合物以依序或共同(如，呈單一劑量或套組之部分)之方式投與。選擇性地或額外地，如，先處理該病人之血液(預處理)，以便隔離可溶性、細胞結合型抗原和/或表現抗原之細胞。相較於直接投與該免疫綴合物(即，在沒有以未綴合的靶定劑預處理之情況下)，在以該免疫綴合物處理的時候，受易影響之非靶腫瘤細胞之存活率改良了約5%、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%或甚至更多。

於一範例中，該未綴合的靶定劑係nBT062 (DSM ACC287)，其係以單一劑量之形式投與至具癌症之病人。於此範例中，靜脈投與有效量之nBT062，以便該未綴合的靶定劑正好能到達可溶性CD138 (CD138)以及易受影響之細胞結合型CD138。四個小時內，靜脈投與有效量之免疫綴合物BT062 (其在此更詳細的說明)至相同的病人。該免疫

綴合物產生內化以及效應分子經天然方式從靶定抗體上釋出。5至10天後，可在相同病人身上重複該投與程序。所使用之nBT062：BT062之有效比率分別為10：1以及3：1。

於第二範例中，對需要腫瘤治療之病人同時投與呈藥學組成物之部分之nBT062以及BT062。該靶細胞係表現CD138之腫瘤細胞。各投與nBT062以及BT062二者之有效量。在投與之前，於細胞培養中決定該組成物之個別組份之劑量以及nBT062對BT062之有效比率，以便能改良該免疫綴合物之腫瘤靶定性。特別地，與直接投與該免疫綴合物相比，腫瘤靶細胞之存活率僅稍微降低1%，然而亦與直接投與該免疫綴合物相比，該易受影響之非靶細胞之存活率從40%加倍至80%。當有效量之免疫綴合物結合至該靶細胞時，該免疫綴合物產生內化且效應分子經天然方式從靶定抗體上釋出。

於第三範例中，在與nBT062共同投與之前，口服投與 α 阻斷劑哌唑嗪(proazosin)至需要腫瘤治療之病人。哌唑嗪會刺激該病人的周邊循環，因此使得nBT062能更有效地到達其目標，就未綴合靶定劑而言，該目標係非靶細胞，如表皮細胞。隔天，對該病人投與一有效量之BT062。該免疫綴合物之腫瘤靶定性獲得改良。使用1：1 nBT062/BT062之有效比率。當有效量之免疫綴合物結合該靶細胞時，該免疫綴合物產生內化且效應分子經天然方式從該靶定抗體中釋出。

於第四範例中，使病人之血液通過一管柱，其中nBT062

已固定在裝填進該管柱中之瓊脂糖株上。sCD138 (“可溶性”/“遮蔽的”CD138)會結合至該固定的nBT062。此處理連續進行2個小時。將如此過濾的血液再回輸至該病人中，用食鹽水溶液將sCD138從該管柱中洗出，以便準備該管柱供
5 下個程序。24小時內，以有效量之BT062處理該病人。

在第五範例中，以如第三範例中之方式預處理該病人之血液，但係以抗凝血-3以及BT062之組合處理該病人，其等各分別以有效量以及有效比率投與。

於第六範例中，使該病人之血液經血漿分離2個小時。
10 將所獲得之血液細胞重新懸浮於捐贈的補充血漿或添加蛋白質之食鹽水中，然後回輸至該病人。之後，如範例3或4之方式，將該免疫綴合物投與至該病人。

CD138 或粘結蛋白聚糖-1 (syndecan-1) (亦稱作 SYND1; SYNDECAN; SDC; SCD1; CD138抗原, SwissProt
15 登錄號: P18827人類)係一種整合膜糖蛋白，起初之描述係其出現在上皮來源之細胞上，之後發現在造血細胞上 (Sanderson, 1989)。在惡性造血方面，CD138高度表現在大多數的MM細胞、卵巢癌、腎癌、膀胱癌、乳癌、前列腺癌、肺癌、結腸癌細胞上，以及何杰金氏(Hodgkin's)與非何杰
20 金氏淋巴瘤、慢性淋巴性白血病 (CLL) (Horvathova, 1995)、急性淋巴性白血病 (ALL)、急性骨髓性白血病 (AML) (Seftalioglu, 2003 (a); Seftalioglu, 2003 (b))、gallbladder (GB) carcinoma (Roh et al, 2008)、實體組織癌、結腸癌之細胞上以及其它表現CD138之細胞之惡性血液疾病與實體腫

瘤上(Carbone et al., 1999 ; Sebestyen et al.,1999 ; Han et al., 2004 ; Charnaux et al., 2004 ; O'Connell et al.,2004 ; Orosz and Kopper, 2001)。

其它已顯示出為CD138表現陽性之癌症，係卵巢腺
5 癌、膀胱移行細胞癌、腎透明細胞癌、肺鱗狀細胞癌；乳
癌與子宮癌(見，例如，Davies et al., 2004 ; Barbareschi et
al., 2003 ; Mennerich et al., 2004 ; Anttonen et al., 2001 ;
Wijdenes, 2002)。

在正當的人類造血腔中，CD138之表現侷限在血漿細
10 胞(Wijdenes, 1996 ; Chilosi, 1999)，而不會在周邊血液淋巴
細胞、單細胞、顆粒細胞以及紅血球上表現。特別是，CD34⁺
幹細胞以及前體細胞不會表現CD138，且抗CD138 mAb不
會影響造血幹細胞培養中群落形成單位之數目(Wijdenes,
1996)。在非造血腔中，CD138主要表現在肺、肝、皮膚、
15 腎與腸子內之單層與複層上皮上。在內皮細胞上僅觀察到
微弱的染色(Bernfield, 1992 ; Vooijs, 1996)。據報導，CD138
在人類淋巴瘤細胞中存在多型態之形式(Gattei, 1999)。

單株抗體B-B4、BC/B-B4、B-B2、DL-101、1 D4、MI15、
1.BB.210、2Q1484, 5F7、104-9, 281-2，特別是B-B4，已被
20 報導對CD138具專一性。其中B-B4、1D4與MI15會辨識
CD138之完整分子以及中心蛋白二者，且顯示出會辨識相
同或幾乎相關的抗原決定位(Gattei, 1999)。之前的研究報
導，B-B4不會辨識可溶性CD138，而僅能辨識呈膜結合形
式之CD138 (Wijdenes, 2002)。

B-B4，一種鼠類IgG1 mAb，會結合人類粘結蛋白聚糖-1 (CD138)上中心蛋白之殘基90-95間之線性抗原決定位 (Wijdenes, 1996; Dore, 1998)。與CD138之表現模式一致，B-B4與血漿細胞株RPMI8226顯示出強力的反應，但不會與內皮細胞反應。亦與CD138之表現模式一致的是，B-B4亦會與上皮細胞株A431 (角質化細胞衍生來的)以及HepG2 (由肝細胞衍生來的)反應。免疫毒素B-B4-肥皂草毒素(saporin)對血漿細胞株RPMI8226亦有高度的毒性，事實上比游離肥皂草毒素毒性更強。然而，從該二種上皮細胞株之測試結果，B-B4-肥皂草毒素顯示僅對細胞株A431具毒性，而在群落生成分析中，B-B4-肥皂草毒素顯示出在A431細胞之生長上沒有抑制作用(Vooijs, 1996)。其它的研究人員報導，MM關聯的抗原對腫瘤缺少專一性(Couturier, 1999)。

nBT062係一種以B-B4為基礎之CD138專一性嵌合人類/鼠類抗體，其具有與其母抗體B-B4相同的CD138結合專一性(B-B4嵌合抗體在此通常稱作c-B-B4)。表現nBT062之中國倉鼠卵細胞已在2007年12月11日寄存於DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig。識別號為DSM ACC2875。BT062係一種包含該CD138專一性嵌合抗體nBT062之免疫綴合物，其透過連接子與細胞生長抑制性類美登素衍生物綴合。包含nBT062以及類美登素效應分子之免疫綴合物，時常係依照

其連接子以及類美登素效應物來描述特徵，如
 nBT062-SMCC-DM1係一種包含nBT062、SMCC (含硫酯鍵
 之“非可剪切的“連接子)以及DM1作為效應物之免疫綴合
 物。更一般而言，含有nBT062以及效應分子之免疫綴合物，
 5 亦可描述為nBT062-連接子-效應物或僅稱nBT062-效應物
 (nBT062N，其中N係任一種在此所述之效應物)。

本發明之“靶定劑”能夠與由靶細胞表現之分子連結，
 包括胜肽與非胜肽。特別是，本發明之靶定劑包括靶定抗
 體以及非免疫球蛋白靶定分子，其可以非免疫球蛋白之蛋
 10 白為基礎，包括，但不限於，AFFILIN®分子、ANTICALINS®
 以及AFFIBODIES®。非免疫球蛋白靶定分子亦包括非胜肽
 靶定分子，諸如靶定DNA以及RNA寡核苷酸(適體)，但亦
 包括生理配位子，特別是正在討論之抗原，諸如CD138，
 之配位子。

15 本發明之“靶定抗體”是或不是以天然抗體為主，或由
 人工合成或基因工程所產生，會結合至有興趣之細胞(靶細
 胞)上之抗原。本發明之靶定抗體包括單株抗體、多株抗
 體、多專一性抗體(如，雙專一性抗體)或抗體片段。該靶定
 抗體可以基因工程設計成，例如，改良其對靶細胞之親和
 20 力(Ross, 2003)或減少其免疫原性。該靶定抗體可依附至包
 括效應分子之微脂粒配方(Carter, 2003)。抗體片段包含完
 整抗體之部分，較佳地該完整抗體之抗原結合或可變區。
 本發明之抗體片段之例子包括Fab、Fab'、F(ab')₂以及Fv片
 段，但亦包括微型雙功能抗體(diabodies)；結構區抗體

(domain antibodies) (dAb) (Ward, 1989 ; 美國專利第 6,005,079號) ; 線性抗體 ; 單鏈抗體分子 ; 以及由抗體片段形成之多專一性抗體。在單鏈可變片段抗體(scFv)方面，重鏈與輕鏈(VH與VL)可由具有，如，序列(甘胺酸₄絲胺酸)_n之短的胺基酸連接子連接，其具有足夠的靈活性，以容許該二個結構區組成一個功能抗原結合袋。加各種訊號序列可使得該靶定抗體能更精準的靶定。加輕鏈恆定區(CL)可容許透過雙硫鍵而二聚化，提供更高的安定性以及親和力。假如抗有興趣之靶之mAb係可得的，則用於建構scFv之可變區可利用RT-PCR獲得，其從由母融合瘤取出之mRNA選殖出可變區。選擇性地，該scFv可經由噬菌體呈現技術而重新產生(Smith, 2001)。本發明之雙專一性抗體可具有，例如，至少一個反應性抗靶組織之臂，以及一個反應性抗連接子部分之臂(美國專利公開案第20020006379號)。

本發明之雙專一性抗體亦可結合超過一個靶細胞上之抗原(Carter, 2003)。本發明之抗體可經由，例如，引入半胱胺酸殘基而引入硫醇基團來進行修飾(Olafsen, 2004)。

根據本發明，該靶定抗體可由任何來源而來，可為，但不限於，駱駝抗體、鼠類抗體、嵌合人類/小鼠抗體，諸如nBT062，或嵌合人類/猴子抗體，特別是，猴子部分源自於食蟹猴之嵌合人類/猴子抗體。

人化抗體係一種抗體，其含有由人類抗體而來以及由非人類抗體而來之序列，且亦落在本發明之範疇內。適合用於人化抗體之方法包括CDR-移植(互補決定區移植) (EP

0 239 400 ; WO 91/09967 ; 美國專利案第5,530,101號 ; 以及第5,585,089號)、外飾或表面重塑(EP 0 592 106 ; EP 0 519 596 ; Padlan, 199 ; Studnicka et al., 1994 ; Roguska et al., 1994)、鏈改組(chain shuffling) (美國專利案第5,565,332號) 5 以及DeImmunosationTM (Biovation, LTD)。在CDR移植方面，從如mAb B-B4而來之小鼠互補決定區(CDR)係被移植至人類可變框架，之後被接至人類恆定區，以製成人類B-B4抗體(hB-B4)。許多利用CDR移植之抗體現已在臨床上應用，包括MYLOTARG (Sievers et al., 2001)以及HECEPTIN 10 (Pegram et al, 1998)。

表面重塑技術使用分子模型、統計分析以及突變之組合，來改變抗體可變區之非CDR表面，以便像目標宿主之已知抗體的表面。用以表面重塑抗體之策略與方法，以及用於減低抗體在不同宿主內之免疫原性，揭露於，例如， 15 美國專利案第5,639,641號中。人類抗體可經由在此技藝中已知之各種方法製得，包括噬菌體呈現方法。亦可見美國專利案第4,444,887、第4,716,111號、第5,545,806號以及第5,814,318號；以及國際專利申請公開案WO 98/46645、WO 98/50433、WO 98/24893、WO 98/16654、WO 96/34096、 20 WO 96/33735與WO 91/10741。

亦可使用完整的人類抗體。此等抗體可利用噬菌體呈現方法選定，此時使用CD138或其抗原決定簇來選擇性地結合表現，例如，B-B4可變區之噬菌體(見，Krebs, 2001)。此方法有利地結合親和力成熟技術，以便改良該抗體之親

和力。

於一具體例中，該呈未綴合形式之靶定抗體係中度或不良內化的。在37°C下，3個小時之培育後，中度內化構成約30%至約75%之抗體內化，不良內化構成約0.01%至高達約30%之內化。於另一較佳具體例中，該靶定抗體會結合至CD138，例如抗體B-B4、BC/B-B4、B-B2、DL-101、1 D4、MI15、1.BB.210、2Q1484、5F7、104-9、281-2，特別是B-B4或nBT062。nBT062係一種嵌合的B-B4抗體。融合瘤細胞，其係由將SP02/0骨髓瘤細胞與Balb/c小鼠之脾細胞雜交而產生，已在2007年12月11日寄存在DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig。識別號為DSM ACC2874。在本發明之情況下，當專一性抗體之名稱結合術語“靶定抗體”時，諸如“nBT062靶定抗體”，此意指此靶定抗體具有抗體nBT062之結合專一性。假如說明一靶定抗體係由專一性抗體“衍生而來的”，此意指此靶定抗體具有此抗體之結合專一性，但可採取任何與以上靶定抗體之說明一致之形式。

本發明之“非免疫球蛋白靶定分子”包括由非免疫球蛋白而來之靶定分子以及非胜肽靶定分子。涵括於此定義中之小型非免疫球蛋白，係被設計成對，特別是表面表現的CD138，具有專一性親和力。此等小型非免疫球蛋白包括支架為主的基因工程分子，諸如Affilin®分子，其具有相對低的分子量，諸如介於10 kDa與20 kDa之間。適當的支架

包括，例如， γ 結晶體。此等分子在天然狀態下對該靶分子不具有專利結合活性。經由基因工程該蛋白表面，透過局部定義的隨機化溶劑曝露的胺基酸，製得完全新的結合位置。前面的非結合蛋白因此被轉換成專一性結合蛋白。此等分子可被設計去專一性地結合標靶，諸如CD138，且使其能專一性的傳送一或多種效應分子(見，scil Proteins GmbH at www.scilproteins.com, 2004)。另一種類型之非免疫球蛋白靶定分子係由脂質運載蛋白(lipocalins)而來，且包括，例如，ANTICALINS®，其結構有點像免疫球蛋白。然而，脂質運載蛋白係由具有160至180個胺基酸殘基之單一多肽鏈構成。脂質運載蛋白之結合袋可被重塑成可高親和力以及專一性地辨識有興趣之分子(見，例如，Beste et al., 1999)。人工合成的細菌受體，諸如市售商品名Affibody® (Affibody AB)者，亦在本發明之範疇內。此等人工合成細菌受體分子係小型、簡單的蛋白質，可由以蛋白質A(金黃色葡萄球菌)之IgG結合結構區之一之支架為主的三螺旋束構成。此等分子具有與許多免疫球蛋白相似之結合特性，但實質上更小，具有分子量通常不超過10kDa，且亦比較安定。適合的人工合成細菌受體分子係，例如，於美國專利案第5,831,012號；第6,534,628號以及第6,740,734號中所述者。

其它“非免疫球蛋白靶定分子”係討論中之抗原的生理配位子。CD138之生理配位子包括，例如，但不限於，ADAMTS4 (聚蛋白多醣酶-1)、抗凝血酶-3、bFGF、組織蛋白酶G (cathepsin G)、CCL5 (RANTES)、CCL7、CCL11、

CCL17、CD44、膠原蛋白(第1型膠原蛋白、第2型膠原蛋白、第3型膠原蛋白、第4型膠原蛋白、第5型膠原蛋白、第6型膠原蛋白)、CXCL1、彈性蛋白酶、gp120、HGF [肝細胞成長因子]、層粘連蛋白-1、層粘連蛋白-2、層粘連蛋白-5、
5 中間因子(midkine)、MMP-7、嗜中性彈性蛋白酶以及多效生長因子(pleiotrophin) (HBNF, HBGF-8)。

非胜肽靶定分子包括，但不限於，結合至CD138之DNA以及RNA寡核苷酸(適體)。

在此使用之“未綴合的靶定劑”，在本發明之某些具體
10 例中係一靶定劑，其不是在此定義之免疫綴合物之部分，即沒有依附至效應分子之靶定劑。然而，於其它具體例中，將詳細說明如下，該“未綴合的靶定劑”依附至對非效應分子，例如基質。於又其它具體例中，該未綴合的靶定劑可依附至染料分子以供監控。如本發明之未綴合的靶定劑較
15 佳地對其等結合之細胞不會產生系統毒性，即隨著時間推移，該未綴合的靶定劑不會誘發該等細胞群之細胞死亡。

本發明之靶定劑會結合表現在靶細胞上，特別是腫瘤細胞上之抗原，但亦表現在非靶細胞上之抗原，然而通常結合程度不同。如本發明之非靶細胞包括表現該靶定專一
20 性抗原之細胞，即，由該免疫綴合物靶定之抗原，諸如CD138，但通常在相當低的濃度下進行(諸如在該腫瘤細胞上之表現的三分之一、四分之一、五分之一或六分之一)且不具有腫瘤細胞/疾病特性。此非靶細胞隨著抗原之不同而改變，但可包括上皮細胞、肝細胞或任何其它不易再生之

細胞。

本發明之“效應分子”係一種依附至靶定劑之分子或衍生物或其類似物，且會發揮所欲的作用，例如，靶細胞之細胞凋亡或另一類型之細胞死亡，或連續細胞週期終止。

- 5 本發明之效應分子包括可在靶細胞上發揮所欲作用之分子，包括，但不限於，毒素、藥物，特別是低分子量細胞毒性劑、放射性核素、生物反應改質物、造孔劑、核糖核酸酶、具有誘導細胞凋亡活性之細胞凋亡梯瀑訊號之蛋白質、細胞毒性酵素、前趨藥物活化酵素、反訊息寡核苷酸、
- 10 抗體或細胞激素以及其等之功能衍生物或類似物/片段。毒素可包括細菌毒素，諸如，但不限於，白喉毒素或外毒素A；植物毒素，諸如，但不限於，蓖麻毒素。具有誘導細胞凋亡活性之細胞凋亡梯瀑訊號之蛋白質包括，但不限於，顆粒酶B、顆粒酶A、半胱天冬酶-3、半胱天冬酶-7、半胱天冬酶-8、半胱天冬酶-9、截短型Bid (tBid)、Bax以及Bak。
- 15

- 於一較佳具體例中，該效應物當呈其天然形式時(“未綴合的效應物”)，具有高非選擇性毒性，包括系統毒性，即對一或多種靶細胞或靶細胞種類，特別是疾病標的無選擇性。本發明之效應分子之“天然形式”係依附至靶定劑以
- 20 形成免疫綴合物前之效應分子，即其呈沒有依附至該靶劑之形式存在。亦可僅稱其為效應分子或未綴合的效應分子。於另一較佳具體例中，該效應分子之非選擇性毒性在與該靶定劑綴合後實質上被消除，即消除至任何殘餘的非選擇性毒性係臨床上可接受之程度。於另一較佳具體例

中，該效應分子在到達靶細胞時，會導致該靶細胞死亡或連續細胞週期終止。本發明之藥物-效應分子包括，但不限於，藥物，包括，例如，作用為微管蛋白聚合之抑制劑之小型高度細胞毒性劑，諸如類美登素、海兔毒素 (dolastatins)、Auristatin以及自念珠藻環肽(cryptophycin)；DNA烷基化劑，像是CC-1065類似物或衍生物(美國專利案第5,475,092號；第5,585,499號；第6,716,821號)以及迪歐卡黴素(duocarmycin)；烯二炔類抗生素，諸如卡奇黴素(Calicheamicin)以及埃斯培拉黴素(esperamicin)；以及高效紫杉烷類(紫杉烷)藥物(Payne, 2003)。類美登素以及卡奇黴素係特佳的。效應物類美登素包括任何來源之類美登素，包括，但不限於，合成的美登醇以及美登醇類似物以及衍生物。阿黴素、道諾黴素(daunomycin)、氮甲喋呤(methotrexate)、長春鹼(vinblastine)、新制癌菌素(neocarzinostatin)、巨毛黴素(macromycin)、三亞胺醌(trenimon)以及 α -鵝膏蕈鹼(α -amanitin)係一些其它落在本發明之範疇內之效應分子。亦落在本發明之範疇內的是作為效應分子之反訊息DNA分子。當專一性藥物或藥物種類之名字與在此之術語“效應物”或效應分子”結合時，意指如本發明之免疫綴合物之效應物，係以該專一性藥物或藥物種類為基礎。

美登素係一種從衣索比亞灌木齒葉美登木(Maytenus serrata)取得之天然產物(Remillard, 1975；美國專利案第3,896,111號)。此藥物會抑制微管蛋白聚合，導致有絲分裂

阻抑以及細胞死亡(Remillard, 1975; Bhattacharyya, 1977; Kupchan, 1978)。美登素之細胞毒性高於臨床上用於影響微管蛋白聚合之抗癌藥物(諸如長春花生物鹼或紫杉醇) 200-1000倍。然而美登素之臨床試驗指出，由於它的高度系統毒性，所以其缺少治療窗(therapeutic window)。美登素以及類美登素雖係高度細胞毒性的，但其等於癌症治療之臨床用途，因其等對腫瘤之選擇性差導致之嚴重的系統性副作用，而大大地受限制。美登素之臨床試驗顯示出對中樞神經系統以及胃腸系統有嚴重有害的作用。

類美登素亦可從其它植物中分離出來，包括滑桃樹(*Trewia nudiflora*)之種子組織(美國專利案第4,418,064號)。

某些微生物亦會產生類美登素，諸如美登醇以及C-3美登醇酯(美國專利案第4,151,042號)。

本發明針對任何來源之類美登素，包括合成的美登醇以及美登醇類似物，其等揭示於，例如，美國專利案第4,137,230號；第4,248,870號；第4,256,746號；第4,260,608號；第4,265,814號；第4,294,757號；第4,307,016號；第4,308,268號；第4,308,269號；第4,309,428號；第4,313,946號；第4,315,929號；第4,317,821號；第4,322,348號；第4,331,598號；第4,361,650號；第4,362,663號；第4,364,866號；第4,371,533號；第4,424,219號以及第4,151,042號中。

於一較佳具體例中，類美登素係含硫醇之類美登素，更佳地係根據在頒給Chari等人之美國專利案第6,333,410號或Chari等人之文獻(Chari, 1992)中所揭示之方法產生者。

在本發明之情況下，DM-1 (N^2 -去乙醯- N^2 -(3-巰基-1-氧代丙基)-美登素)係較佳的效應分子。DM1之細胞毒性為美登素之3至10倍，且已透過雙硫鍵將其連接至針對與腫瘤相關之抗原之抗體，而被轉換成前趨藥物。某些此等綴合
5 物(有時稱“腫瘤活化的前趨藥物”(TAPs))在血液腔中無細胞毒性，因為其等會在與靶細胞結合時被活化以及內化，藉此釋出該藥物(Blättler, 2001)。已發展出許多抗體-DM1綴合物(Payne, 2003)，且已在臨床試驗中評估。例如，huC242-DM1在結腸直腸癌病人中之治療具良好耐受性，不
10 會誘發任何可測得之免疫反應，且具有長的循環時間(Tolcher, 2003)。

其它特佳的類美登素包含含有立體障礙性的硫醇鍵之側鏈，諸如，但不限於，類美登素 $N^{2'}$ -去乙醯- $N^{2'}$ -(4-巰基-1-氧代戊基)美登素，亦稱作“DM3”以及 $N^{2'}$ -去乙醯- $N^{2'}$ -(4-甲
15 基-4-巰基-1-氧代戊基)-美登素，亦稱為“DM4”。

DNA烷化劑亦特佳之效應分子，包括，但不限於，CC-1065類似物或衍生物。CC-1065係一種從鏈絲菌(*Streptomyces zelensis*)之培養物分離而出之強效抗腫瘤抗
生素，在試管中已顯示出特殊的細胞毒性(美國專利案第
20 4,169,888號)。在美國專利案第5,475,092號、第5,585,499號以及第5,739,350號中所述之CC-1065類似物或衍生物，落在本發明之範疇內。如熟悉此技藝之人士所能認知到的，在美國專利案第5,846,545號中所述之改質的CC-1065類似物或衍生物以及在，例如，美國專利案第6,756,397號中所述

之CC-1065類似物或衍生物之前趨藥物，亦落在本發明之範疇內。於本發明之某些具體例中，CC-1065類似物或衍生物可，例如，以在美國專利案第6,534,660號中所述之方法合成得。

5 另一群可製造較佳效應分子之化合物為紫杉烷類，特別是高強度者以及含有硫醇基或雙硫基團者。紫杉烷類係會抑制微管蛋白之解聚作用，導致微小管聚合以及細胞死亡之速率增加之有絲分裂的紡錘體毒劑。例如，於美國專利案第6,436,931號；第6,340,701號；第6,706,708號以及美國
10 國專利公開案第20040087649號；第20040024049號以及第20030004210號中揭露之紫杉烷類，落在本發明之範疇內。其它之紫杉烷類揭露於，例如美國專利案第6,002,023號、美國專利案第5,998,656號、美國專利案第5,892,063號、美國專利案第5,763,477號、美國專利案第5,705,508號、美國
15 專利案第5,703,247號以及美國專利案第5,367,086號中。熟悉此技藝之人士當能領會，聚乙二醇化紫杉烷類，諸如一種在美國專利案第6,596,757號中所述者，亦落在本發明之範疇內。

 本發明之卡奇黴素(Calicheamicin)效應分子包括 γ II、
20 N-乙醯基卡奇黴素以及卡奇黴素之其它衍生物。卡奇黴素會以序列專一性之方式結合至DNA之小溝，經受重整以及曝露自由基，引起雙鏈DNA破損，導致細胞凋亡以及死亡。可於本發明之情況下使用之卡奇黴素效應分子之一例子，述於美國專利案第5,053,394號中。

本發明之免疫綴合物包含至少一種靶定劑，特別是靶定抗體，以及一或多種效應分子。該免疫綴合物可包含另外的分子，例如，用於安定化之分子。關於免疫綴合物，術語“綴合物”通常用於定義該靶定劑與一或多種效應分子之有效結合(即功能性依附)，而不意圖完全意指任一類之有效結合，特別是不限於化學“綴合”。只要該靶定劑能夠結合該靶位置以及所依附的效應物功能如預期充分，特別是當傳送至該靶位置時，任何模式之依附均合適。本發明之綴合方法包括，但不限於，在該效應分子和/或該靶定抗體有或無事先改質之情況下，使該效應分子與該靶定抗體直接依附，或透過連接子依附。連接子可依功能而分類成，例如，酸不穩定性、光不穩定性連接子、酵素可剪切的連接子等等。其它適合的連接子可包括雙硫鍵以及非可剪切的鍵，諸如，但不限於，磺酸丁二醯亞胺基馬來醯亞胺甲基環己烷羧酸酯(SMCC)，其為能夠連接化合物與含SH之化合物之異雙官能性連接子。雙官能性以及異雙官能性連接子分子，諸如碳水化合物引導的異雙官能性連接子分子，諸如S-(2-硫代吡啶基)-L-半胱胺酸醯肼(TPCH)亦落在本發明之範疇內(Vogel, 2004)。該效應分子，諸如類美登素，可經由二個反應步驟綴合至靶定抗體，包括用交聯劑(諸如N-丁二醯亞胺基吡啶二硫代丙酸酯(SPDP))修飾該靶定抗體，以便將二硫代吡啶基基團引入該靶定抗體之第一步驟。第二步驟方面，可將具有硫醇基團之反應性類美登素，諸如DM1或DM4，加入該經修飾的抗體中，導致取代該經

修飾之抗體中之硫代吡啶基基團，而產生雙硫連接的細胞
毒性類美登素/抗體綴合物(美國專利案第5,208,020號)。然
而，一步驟的綴合方法，諸如一種在頒給Chari等人之美國
專利公開案第20030055226號中所揭示之方法，亦落在本發
5 明之範疇內。於本發明之一具體例中，將具有相同或不同
類型之多重效應分子依附至靶定抗體。第5圖顯示存在於免
疫綴合物BT062 (nBT062-SPDP-DM4)中之例示性功能依
附。圖中指示，平均3.5個DM4分子依附至該抗體。

CC-1065類似物或衍生物可透過如美國專利案第
10 6,716,821號中所述之PEG連接基團，綴合至該靶定劑。

卡奇黴素可透過連接子(美國專利案第5,877,296號以
及美國專利案第5,773,001號)或根據美國專利案第
5,712,374號以及美國專利案第5,714,586號所揭示之綴合方
法，綴合至該靶定抗體。另一用於製備卡奇黴素綴合物之
15 較佳方法揭示於美國專利公開案第20040082764號中。本發
明之免疫綴合物可採用重組融合蛋白之形式。

本發明之未綴合的靶定劑和/或免疫綴合物可在活體
內以及活體外提供。在許多具體例中，治療療程包括活體
內以及活體外部分。例如，首先可先將病人的血液接受血
漿分離法之處理，在回輸至少該血液細胞(即血漿擴張劑)
20 至該病人後，使該病人接受該免疫綴合物之治療。其它活
體外方法包括細胞處理上清液。取決於特殊的治療療程，可
將不同的介質與該未綴合的靶定劑和/或免疫綴合物接觸。此
等介質包括，但不限於，血液、血漿、組織以及骨髓。

該未綴合的靶定劑較佳地會結合具有不同構型之抗原，包括以可溶性形式存在之抗原，諸如可溶性(脫落的)CD138 (sCD138)。此sCD138係在如脫落之過程之期間產生。脫落可在自然情況下發生，但亦可因某些投與至如MM
5 病人之藥物所引起。

該未綴合的靶定劑亦可結合至細胞結合型抗原，諸如CD138。此細胞結合型抗原可表現在非靶細胞之表面上，當靶細胞為腫瘤細胞時，其在此亦稱作非腫瘤細胞。該未綴合的靶定劑可結合至表現在非腫瘤細胞/非靶細胞上之
10 抗原，至其防護該非腫瘤/非靶細胞免受該免疫綴合物不同程度之破壞之程度，該免疫綴合物係共同或之後投與，或在某些具體例中，在投與該未綴合的靶定劑之前投與。

未綴合的靶定劑之“預處理”與投與該免疫綴合物間之時間間隔可不同，可短如約20分鐘、約30分鐘，但亦可約1
15 小時、約2小時、約3小時、約4小時、約5小時，但通常不超過24小時。

當該未綴合的靶定劑被描述成去隔離表現CD138之細胞時，意指隔離整個表現CD138之細胞。例如，依附至基質之未綴合的靶定劑，可隔離此從血液而來之細胞與此基
20 質接觸。

在此使用之血管舒張劑係任一種具有血管舒張活性之劑。包括的有，特別是 $\alpha 1$ 受體拮抗劑，即 α 阻斷劑，諸如，但不限於，哌唑嗪(proazosin)、特拉唑嗪(terazosin)或多沙唑嗪(doxazosin)。然而任何其它具有血管舒張活性之劑均包

括在此定義之內，諸如，但不限於，硝普鈉(sodium nitroprussid)、鈣離子拮抗劑、硝酸鹽或ACE抑制劑(血管收縮素轉換酵素(ACE)之抑制劑)。

5 此等劑可使用不同的投與途徑。然而口服投與係較佳的。在本發明之情況下，此血管舒張劑可，較佳地，在該未綴合的靶定劑之前或一起投與。此投與後通常接著投與適合的免疫綴合物。於較佳具體例中，投與該免疫綴合物之時間點在投與該血管舒張劑之後至少10至12個小時。然而，最適當的時間點取決於所使用之個別的血管舒張劑，且
10 為熟悉此技藝之人士所熟悉之範疇內。較佳投與該免疫綴合物之時間點是在該劑之血管舒張作用已實質上消退時。

當依照本發明之方法使用之免疫綴合物，結合(較佳地破壞)腫瘤細胞之百分位數高於當免疫綴合物在相同情況下(投與之途徑、濃度等等)用作為唯一有效成份時產生之百分位數時，該方法稱之為“改良免疫綴合物之腫瘤靶定性”。如本發明之腫瘤細胞包括癌細胞以及可能會或可能不會形成實體腫瘤之癌前期細胞。因此，任何不正常成長的細胞係此定義之一部分。
15

假如靶細胞與疾病或疾病狀態相關，但不必然是腫瘤細胞時，本發明之方法稱之為改良免疫綴合物對該靶細胞之靶定性。
20

靶定性(特別是腫瘤靶定性)之改良程度，可以百分位數表示。例如，改良約20%腫瘤靶定性，意指指定數量之免疫綴合物投與至病人時，結合之腫瘤細胞多出作為唯一有

效劑時結合之腫瘤細胞20%。

當防護非靶細胞，如表現CD138之非腫瘤細胞，免於免疫綴合物之結合，較佳地至預防或減少破壞該非腫瘤(非靶)細胞之程度，較佳地至臨床上可接受之程度(此取決於討論中之非腫瘤細胞以及所投與之位置以及途徑)時，如本發明之方法亦稱之為“改良免疫綴合物靶定靶細胞之靶定性”或“改良免疫綴合物之腫瘤靶定性”。破壞非靶/非腫瘤細胞之可接受的位準變化很大，於某些具體例中可低如約病人身體中某類型之易受影響之非腫瘤細胞或於特定器官中之非腫瘤細胞之總數之1%，或高達約2、3、4、5、6、7、8、9、10、15或20%。於某些情況下，特別是當投與可局限在如特定器官中時，此百分位數甚至更高。於此情況下，有效量之免疫綴合物意指，導致該免疫綴合物結合之腫瘤細胞被破壞(較佳地凋亡)之數量。有效量之未綴合的靶定劑，意指“防護”或“遮蔽”如表現CD138之非腫瘤細胞之數量，即未綴合的靶定劑之數量足以妨礙或阻擋有效量之免疫綴合物接近非腫瘤細胞，以致預防了該等細胞受到破壞。藉由遮蔽非腫瘤細胞，將該免疫綴合物對全部易受影響之非腫瘤細胞/非靶細胞之毒性限制至一可接受之程度，如至臨床上可接受之程度。某些濃度之未綴合靶定劑可導致全部易受影響之非腫瘤細胞/非靶細胞對免疫綴合物之敏感度減少。此全部易受影響之非腫瘤細胞/非靶細胞之敏感度之減少，可受IC₅₀增加之影響，且可藉由隔離值予以量化：

$$\text{隔離}[\%] = 100 \times (\text{IC}_{50}\text{處理}/\text{IC}_{50}\text{直接}) - 100$$

IC₅₀處理[nM] . . . 細胞經未綴合的靶定劑處理(預或共同)時，
免疫綴合物的IC₅₀值

5 IC₅₀直接[nM]. . . 細胞直接經未綴合的靶定劑處理時，免疫綴
合物的IC₅₀值

該IC₅₀處理值可能高於該IC₅₀直接值2、3、4、5、6、7、
8、9、10倍，導致隔離值高於100%、200、300%、400%、
500%、600%、700%、800%、900%以及1000%。然而，於
10 某些具體例中，比較需要的係較低的隔離值，諸如高於20%
或高於50%。

可計算對易受影響之非靶細胞(如，CD138^{hi})以及易受
影響之靶細胞(如，CD138^{lo})之IC₅₀值以及隔離值，然後加
以比較，且可計算相對的隔離值：

15 相對隔離=隔離(易受影響之非靶細胞)/隔離(易受影響之靶細胞)

值大於1指出一指定濃度之未綴合的靶定劑，如
nBT062，遮蔽如CD138^{hi}的細胞大於如CD138^{lo}的細胞。

在本發明之情況下，相對隔離值等於或大於10、等於
或大於20、等於或大於30、等於或大於40或等於或大於50
20 係較佳的。

當投與未綴合的靶定劑來遮蔽該易受影響之非靶細
胞，特別是非腫瘤細胞，時，如在此所述，其亦會遮蔽靶
細胞。於一較佳具體例中，該有效量之未綴合的靶定劑不
會或僅稍微減少腫瘤靶細胞之敏感性，導致存活之腫瘤細
25 胞沒有或相對稍微增加。有效量之免疫綴合物之投與，較
佳地仍容許達到所希望破壞腫瘤細胞之程度。

於較佳具體例中，選定一未綴合的靶定劑對免疫綴合

物之比率，以便於全部易受影響之非靶細胞之敏感度減少至臨床上可接受之位準，且與沒有經未綴合的靶定劑處理之相同細胞相比，可存活之易受影響的非靶細胞之百分位數增加，如增加10%、20%、30%、40%、50%、60%、高達100%，而該靶，如腫瘤細胞之敏感度僅較佳地減少些微的百分位數點，諸如1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%或10%、15%、20%，較佳地0至10%，甚至更佳地0至5%。因此未綴合的靶定劑對免疫綴合物之有效比率，係會減少易受影響之總非腫瘤/非靶細胞之敏感度(因此增加可存活之非腫瘤細胞之%)至臨床上可接受之位準，然而仍保持腫瘤細胞之敏感度(因此維持或僅些微增加可存活之腫瘤細胞之%)在臨床上所欲之位準。

雖然非靶細胞破壞和/或靶細胞存活率之可接受度以及未綴合的靶定劑對免疫綴合物之比率，可能會隨著病人的不同而不同(取決於，如，病人之整體狀況或疾病狀態)以及隨著投與之形式以及位置的不同而不同(靜脈注射對控制注射進入，如，特定的器官)，但下列未綴合的靶定劑對免疫綴合物之比率在本發明之一具體例中較佳的約1：2至約10：1，更佳的約1：1至約8：1，甚至更佳地約1：1至約5：1，特別的約2：1、約3：1、約4：1。於本發明之一具體例中，一開始投與高比率之未綴合的靶定劑/免疫綴合物，之後依序降低。例如，第一次治療時使用約20：1之比率，以容許完全的保護非靶細胞，之後降低至約10：1。假如無觀察到嚴重的副作用，則將比率降低至約9：1、約8：

1、約7：1、約6：1、約5：1、約4：1、約3：1、約2：1和/或約1：1，在某些具體例中，約1：2。在本發明之某些具體例中，以如血管舒張劑之預處理，容許該比率降低至約1：1、約1：2、約1：3、約1：4或約1：5。然而，熟悉此技藝之人士應得能夠輕易地依照特定狀況與病人之所需調整該比率。

免疫綴合物之腫瘤靶定性之改良，可選擇性地或額外由物理分離如sCD138或表現CD138之整個細胞之隔離而產生。此等方法之後者在末期癌症，諸如多發性骨髓瘤，之治療上特別引人興趣。結果，投與相同數量之免疫綴合物將結合更多的腫瘤細胞，因為sCD138或表現CD138之整個細胞已從如血液中被移除。此可容許投與較低劑量之免疫綴合物，即可達到所欲之靶細胞破壞作用，因此降低該免疫綴合物之潛在或實際的副作用。

即使不是唯一之方法，血漿分離法係達到物理分離，如sCD138，之方法之一。其涉及將血漿(血漿組份)從血液循環中移出、處理以及回輸。利用細胞分離法，透過不連續或連續流動離心或血漿過濾，將血漿從血液中移出。如將於下詳細說明的，該方法可以或可不與未綴合的靶劑結合使用。較佳地，在血漿分離期間，從病人之血液中移除至少約5%、至少約10%、至少約20%、至少約30%、至少約40%、至少約50%或更多百分比數之可溶性抗原。

可將靶定劑依附至基質。假如CD138專一性靶定劑被依附至基質，則此靶定劑在此稱作“CD138專一性吸附劑”。

例如，為減少生物液體中之sCD138，可將靶定劑，諸如nBT062，固定在一基質上。此一固定可以共價鍵為基礎，諸如偶合至乙醛活化的微珠或其它利用初級胺透過“還原性胺化”之表面，但亦可以非共價鍵為基礎，諸如將nBT062
5 結合至蛋白質A或蛋白質G或將生物素化抗體結合至鏈黴素或親和素包覆之基質。熟悉此技藝之人士當能認知的，典型的基質包括，但不限於，瓊脂或瓊脂糖微珠、聚酯或活化的聚酯表面。

本發明之方法之改良的靶定性，特別是腫瘤靶定性，
10 在某些具體例中可部分歸因於在靶細胞(特別是腫瘤細胞)上，諸如CD138之抗原的表現高於非靶/非腫瘤細胞，和/或腫瘤細胞處理/內化，如，CD138之能力比非靶/非腫瘤細胞快。Tassone et al. (2004)報導，在主要陽性多發性骨髓瘤(MM)細胞上，CD138表現之mRNA位準比在漿細胞上高出
15 50至200倍。FACS分析顯露出，在MM細胞表面上CD138數量高於漿細胞約6倍。然而，如熟悉此技藝之人士能認知到的，可使用許多方法來測定相對於非腫瘤細胞，在腫瘤細胞上相對的抗原(諸如CD 138)表現，其包括以上所述之方法，亦包括進一步述於下之直接比較蛋白質位準或QIFIKIT
20 方法。熟悉此技藝人士應能夠了解，任何可構成在腫瘤與非腫瘤細胞中作區別之基礎之表現位準的增加(如FACS或QIFIKIT方法測量時，增加2、3、4、5、6、7、8或9倍)，均落在本發明之範疇內。因此，特定劑量之如未綴合的靶定劑，可結合表現在非腫瘤細胞上之CD138之百分比數，

相對高於表現在腫瘤細胞上之CD138之百分比數。藉由提供某一劑量之未綴合的靶定劑，使例如，平均約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%或甚至更多表現在非腫瘤細胞上之CD138能被該未綴合的靶定劑結合，而較低百分比數，諸如約5%、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%或更多表現在腫瘤細胞上之CD138被結合。如熟悉此技藝之人士所能認知到的，不同的百分比數組合落在本發明之範疇內。例如，在某一劑量之未綴合的靶定劑下，平均約50%表現在非腫瘤細胞上之CD138被該未綴合的靶定劑結合，而由於較高的表現位準和/或降低的易受影響性(見下面之討論)，平均僅約30%表現在腫瘤細胞上之CD138被該未綴合的靶定劑結合。該相對較高的結合位準將有效地遮蔽大量的非腫瘤細胞(如，約80%、約70%、約60%、約50%、約40%、約30%、約20%、約10%或約5%)免於免疫綴合物之破壞，同時實質上部分，但較佳地實質上全部的腫瘤細胞仍會經歷該免疫綴合物所引起之細胞凋亡。

第 1B 圖 顯示 在 NCI-H929 (CD138^高) 以及 MOLP-2 (CD138^低) 模型細胞上之 CD138 表現。從圖上可以看出，依據 QIFIKIT 之測量結果，表現在 NCI-H929 細胞上之 CD138 受體之數量相對於表現在 MOLP-2 細胞上之數量，與在多發性骨髓瘤細胞上所發現之數量相對於漿細胞之數量普遍相關，即，腫瘤細胞表現 CD138 之位準比未轉形的(非腫瘤)細胞高出非常多。

第1B圖亦詳述在實驗部分所述之細胞存活率分析之結果。CD138^高細胞對該CD138專一性免疫綴合物nBT062-SPDP-DM4之敏感度(根據IC₅₀ (nM)之表現)高於CD138^低細胞對此免疫綴合物之敏感度。另一方面，CD138^低 (MOLP-2)細胞對游離DM4之敏感度高於CD138^高 (NCI-H929)細胞之敏感度，而CD138^高細胞對游離DM4毒素之敏感度(亦根據IC₅₀ (nM)之表現)幾乎與其等對該免疫綴合物之敏感度相等。

此迫使得出一結論，即CD138^高與CD138^低細胞對該免疫綴合物之敏感度之差異係該免疫綴合物之專一特性，而不僅係反映出MOLP-2細胞對該免疫綴合物之效應分子(在此為DM4)之敏感度減少。在第1B圖中所提供之CD138^高與CD138^低細胞株二者之IC₅₀值，係根據第2A圖與第3A圖中所示之劑量反應曲線計算得。

以未綴合的靶定劑(在此為nBT062)預培育CD138^高與CD138^低細胞之影響，以在實驗部分所述之細胞存活率分析顯示。相對於未經處理的細胞(設定為100%存活細胞)計算存活細胞之分率。第1C圖顯示未綴合的靶定劑本身之培育在MOLP-2 (CD138^低)與NCI-H929 (CD138^高)細胞上的影響。此圖清楚地顯示出，使用的未綴合的靶定劑對該二種細胞均不具細胞毒性作用。

第2A+B圖(NCI-H929細胞)以及第3A+B圖(MOLP-2細胞)顯示不同分析的結果。以濃度漸增之nBT062培育該等細胞，在此為預培育30分鐘，顯露出對二種細胞株具保護作

用。此顯示出該未綴合的靶定劑，在此為nBT062，會掩蓋細胞結合型CD138，導致二種細胞株對BT062之處理之敏感度減少。因此，nBT062之濃度增加，會導致之後投與之綴合物nBT062-SPDB-DM4對二種細胞株之 IC_{50} 值增加，即，
5 對此免疫綴合物之敏感度減少。然而重要地，在相同濃度之nBT062下，CD138^低細胞對之後指定濃度之nBT062-SPDB-DM4處理之敏感度，比該CD138^高細胞之敏感度顯著降低。在第4圖中，將二種細胞株對BT062之 IC_{50} 值，對預投與之nBT062濃度作圖。可見，對MOLP-2 (CD138^低)細胞
10 預投與某一濃度範圍內之nBT062，該nBT062提供有效的防護對抗BT062的處理，即 IC_{50} 大幅增加，然而在相同濃度範圍內之nBT062，NCI-H929 (CD138^高)維持對BT062高度敏感。在本發明之情況下，此濃度範圍之未綴合的靶定劑令人感到興趣，因為其代表在此濃度下，非靶細胞可受良好
15 保護，同時仍能有效地減少靶細胞。

如上所述，為量化該nBT062介導對免疫綴合物之敏感度的減低，可以上述之方法計算在指定濃度下之nBT062防護(更一般地“隔離”)二種細胞株之程度。

針對二種細胞株之 IC_{50} 值以及隔離值提供於表1中。以
20 如上所述之方法計算相對隔離值。值大於1表示，在指定濃度之nBT062下，對CD138^低細胞之防護高於對CD138^高細胞之防護(表1)。

表1：MOLP-2與NCI-H929在無或不同濃度之nBT062下之IC₅₀值。以下式計算之敏感度的降低(IC₅₀值之增加)以隔離%表示。相對隔離值係根據個別細胞株對各nBT062濃度所獲得之保護值計算得(方程式提供於下)

nBT062 濃度(nM)	敏感度				相對 隔離值 ⁽²⁾
	MOLP-2; CD138 ^低		NCI-H929; CD138 ^高		
	IC50 (nM)	隔離值 ⁽¹⁾	IC50 (nM)	隔離值 ⁽¹⁾	
--	0.398	--	0.146	--	--
0.39	0.739	86%	0.158	8%	10.8
0.78	2.522	534%	0.166	14%	38.1
1.56	2.879	623%	0.232	59%	10.6
3.125	3.283	725%	0.325	123%	5.9

5 (1)隔離率=100*(有nBT062之IC₅₀值/無nBT062之IC₅₀值)-100
(2)相對隔離率=隔離率CD138^低/隔離率CD138^高

結果顯示出，在某些濃度之未綴合的靶定劑下，相對
隔離值事實上顯著地大於1。在本發明之情況下，相對隔離
10 值等於或大於10、等於或大於20、等於或大於30、等於或
大於40或等於或大於50係較佳的。

在表2中，CD138^低與CD138^高細胞在以未綴合的靶定劑
預處理後之存活率，係以相對於在相同濃度之未綴合的靶
定劑下成長之對照組細胞表示。二種細胞株均以0.4或0.8
15 nM之nBT062-SPDB-DM4處理，以及沒有預處理(第一列)
或以漸增濃度之nBT062預處理。例如，在0.4 nM免疫綴合
物濃度下，以0.78nM未綴合的靶定劑預處理，使作為模型
之非靶細胞之存活率從41提高至99%，而作為模型之靶細
胞之存活率僅稍微從6提高至10%。因此，在未綴合的靶定
20 劑對免疫綴合物2：1之比率下，找到了能達到高存活率百
分比數之CD138^低(非靶細胞)以及低存活率之CD138^高細胞
(靶細胞)之最佳程度之未綴合的靶定劑對免疫綴合物之比
率。因此，表2之數據顯示以某些濃度之未綴合的靶定劑培

(S)

育該等細胞，CD138^低(非靶細胞)可幾乎完全地被遮蔽免於該免疫綴合物之任何作用，即，變得接近或完全對之後的免疫綴合物之處理無敏感性，而BT062對靶細胞之功效僅些微降低。

5 表2：個別細胞株之存活細胞之百分比(未經處理之對照組之%)，以作為範例之指定濃度的BT062與nBT062提供。

BT062 濃度(nM)	nBT062 濃度(nM)	MOLP-2	NCI-H929	nBT062/BT062 比率
		存活細胞 (對照組之%)	存活細胞 (對照組之%)	
0.4	--	41	6	--
0.4	3.125	90	23	7.8
0.4	1.56	71	9	3.9
0.4	0.78	99	10	2.0
0.4	0.39	71	7	1.0
0.8	--	37	5	--
0.8	6.25	100	27	7.8
0.8	3.125	87	9	3.9
0.8	1.56	76	8	2.0
0.8	0.78	64	7	1.0
0.8	0.39	46	6	0.5

非靶細胞破壞和/或靶細胞存活之可接受度以及未綴合的靶定劑對免疫綴合物之比率，可能隨著病況之不同而不同、病人的不同而不同(取決於，如，病人之整體病況或疾病狀態)以及投與之形式與位置而不同(靜脈注射對控制注射進入，如，特定的器官)。

細胞之易受影響性因位置(投與位置)以及時間(靶細胞處理之狀態)而不同。因此，表現CD138之非腫瘤細胞以及表現CD138之腫瘤細胞之不同的易受影響性，在某些具體例中，亦歸因於本發明之方法與組成物所達到之結果。例

如，nBT062可結合可溶性CD138和/或表現在至少某些類型之非腫瘤細胞上(如在浮在血液中之細胞上)之CD138，比結合表現在腫瘤細胞上之CD138容易。於本發明之某些具體例中，至少一部分之後者可相對不受如nBT062之影響。於
5 某些具體例中，此相對不受影響之CD138，在以導致細胞凋亡之免疫綴合物處理時，將變得更易受影響。在凋亡之後，死亡細胞會因如吞噬作用被移除，然後提供接近之前不易受影響或難以接近之腫瘤細胞。

“隔離”物質，諸如可溶性或細胞結合型CD138或本發明
10 之情況下之細胞，意指(i)結合物質或細胞，其會減少或預防進一步被，特別是免疫綴合物結合，或(ii)物理性分離該物質或細胞。如，以未綴合的靶定劑結合至個別的CD138抗原，可降低該免疫綴合物對該個別CD138抗原之親和力，且甚至使得該個別的CD138無法被靶定CD138之免疫綴
15 合物結合。親和力之降低可為，如，使用與免疫綴合物之靶定劑不同之未綴合的靶定劑之結果。例如，該未綴合的靶定劑可為生理性CD138配位子，諸如ADAMTS4，而該免疫綴合物之靶定劑可為nBT062。

因此，經如未綴合的靶定劑結合，可減少該免疫綴合
20 物結合非腫瘤細胞。此將因保護非腫瘤細胞免被有效量之免疫綴合物結合(在此意稱“防護”或“遮蔽”非腫瘤細胞)而改良腫瘤靶定性，因此減少與該免疫綴合物之投與相關之不欲的副作用。該改良的腫瘤靶定性可由下列反映出來：某一劑量之免疫綴合物之效力增加，或選擇性地，事實上

可使用較低劑量以便獲得相等的功效。

如上所述，隔離亦可僅僅以物理性分離為基礎。例如，在血漿分離期間，將血漿與血液細胞分開。可溶性抗原(如，sCD138)為該血漿之一部分。至少部分的血漿可以血漿擴張劑取代，因此降低了存在的可溶性CD138之總數量。此會降低非腫瘤結合型CD138抗原被該免疫綴合物結合之數量。結果，如，相同劑量之免疫綴合物將導致結合至細胞結合型CD138之程度(包括結合至腫瘤細胞結合型CD138之程度)高於在沒有物理性分離之隔離下所獲得之結果。

可以理解的，以結合為基礎之隔離以及物理性分離之組合亦係可能的。例如，可以，如，靶定劑(諸如CD138專一性吸附劑)結合在血漿分離中與血液細胞分開之血漿中所含之sCD138，然後將該血漿再回輸至該病人。如上之概略，本發明會區分功能性依附至效應分子之靶定劑(免疫綴合物之一部分)以及未綴合的靶定劑。至於CD138專一性吸附劑，該未綴合的靶定劑依附至或與諸如基質之非效應分子結合。

本發明之未綴合的靶定劑以及免疫綴合物可經由任何途徑投與，包括靜脈內、非口服的、口服、肌肉內、鞘內或氣霧。傳送模式視所欲之作用而定。熟悉此技藝之人士當能輕易地知道最佳的投與途徑，供依照本發明之特殊治療。適當的劑量視投與途徑以及所指示之治療而定，可由熟悉此技藝之人士根據目前的治療操作程序作決定。

含有本發明之未綴合的靶定劑以及免疫綴合物作為活

性成份之藥學組成物，可依照習用之藥化技藝製得。參見，
例如，Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th Ed. (1985,
Mack Publishing Co., Easton, Pa.)。典型地，將有效量之活
性成份與藥學上可接受之載劑混合。視供投與之配方形式
而定，例如靜脈內、口服、非口服、鞘內、經皮或氣霧，
該載劑可採用各種廣泛的形式。

在口服投與方面，可將該未綴合的靶定劑和/或免疫綴
合物配方成固體或液體製品，諸如膠囊、丸劑、錠劑、菱
形劑、融化劑(melts)、粉末、懸浮劑或乳劑。在製備呈口
服劑型之組成物方面，可使用任何一般的藥學媒介物，諸
如水、甘油、油、酒精、調味劑、防腐劑、著色劑、懸浮
劑以及與在口服液體製品(諸如懸浮液、酏劑以及溶液)例子
中之相似物；或載劑，諸如澱粉、糖、稀釋劑、粒化劑、
潤滑劑、黏結劑、崩散劑以及與在口服固體製品(諸如，粉
末、膠囊以及錠劑)例子中之相似物。因為其等易於投與，
錠劑以及膠囊為最好的口服劑型之代表，因此明顯地係使用
固體藥學載劑。若有需要，錠劑可依標準技術製成糖衣的或
腸衣的。活性劑必須安定的通過胃腸道。若需要的話，可使
用供安定的通過之適合的劑，可包括在文獻中所述之磷脂或
卵磷脂衍生物，以及微脂粒、微粒子(包括微球以及巨球)。

在非口服投與方面，可將該未綴合的靶定劑和/或免疫
綴合物溶於藥學載劑中，然後以溶液或懸浮液之形式投
與。適合的載劑之例子為水、食鹽水、磷酸鹽緩衝液(PBS)、
葡萄糖溶液、果糖溶液、乙醇或動物、植物或合成來源之

油。該載劑亦可含有其它成份，例如，防腐劑、懸浮劑、助溶劑、緩衝液等等。當未綴合之靶定劑和/或免疫綴合物需腦室內或鞘內投與時，其等亦可溶於腦脊髓液中。

根據本發明，以下列方式處理MM，使用nBT062以及BT062作為範例。此範例不意圖以任何方式限制本發明，且熟悉此技藝之人士當能輕易地決定落在本發明之範疇內之其它未綴合的靶定劑和/或免疫綴合物，以及其它可被用於治療諸如MM之疾病之治療療程。對需要治療之病人同時投與該二種組份，比率為3：1 (nBT062/BT062)。由於nBT062會結合至腫瘤以及非腫瘤細胞，因此BT062對非腫瘤細胞之毒性降低。特別是，該非腫瘤細胞之存活率，在使用特定數量之BT062時，增加40%，即從40%至80%。由於不同的因素，諸如在病人之MM細胞上高表現的CD138和/或在該等細胞上CD138之相對高的數量，BT062可以在會導致破壞該腫瘤細胞之有效數量下結合至腫瘤細胞(甚至在投與nBT062後)。特別地，該腫瘤細胞之存活率僅增加幾個百分點，即從6%至9%。因此，本發明具體例之未綴合的靶定劑以及免疫綴合物提供一手段，供用於有效投與效應分子至腫瘤位置，在此該效應分子可從免疫綴合物中釋出且具有臨床上可接受之副作用。此靶定的傳送以及釋出在多發性骨髓瘤之治療上提供顯著的進展。

本發明將進一步藉由參考下列以例示之方法且不意圖以任何方式限制本發明之範例來說明本發明。使用此技藝中已熟知之標準技術或於下文中明確說明之技術。

實驗部分：材料與方法

細胞株

MOLP-2係一種人類多發性骨髓瘤細胞株(DSMZ No.: ACC 607)，其表現相對低數量之CD138 (見以下以及第1b圖之詳細說明)。此細胞株亦對如毒素DM4高度敏感，指出其對抗藥物治療之內部機制，就算是有，還仍未建立。此等事實突顯出此細胞株係作為非靶細胞之極佳的模型，特別是非靶CD138^低細胞。

NCI-H929係一種人類多發性骨髓瘤細胞株(DSMZ No.: ACC 163)，相對於MOLP-2細胞，其表現相對高數量之CD138 (見以下以及第1b圖之詳細說明)。此細胞株對游離效應分子(如毒素DM4)亦具高程度的抗性，指出其對抗藥物治療之內部機制(如在其它的腫瘤細胞中)已建立完成。此等事實使得此細胞株係作為如在多發性骨髓瘤中找到之腫瘤細胞之極佳的模型，特別是靶CD138^高細胞。

用於相對測定CD138之表現之FACS分析法

分別地以nBT062培育 1×10^5 MOLP-2以及NCI-H929多發性骨髓瘤細胞，以便檢測在其等細胞表面上之CD138分子。添加於100 μ l PBS中稀釋之nBT062抗體，在室溫下30分鐘後，清洗該等細胞2次。於此分析法中所使用之抗體濃度為125-0.98 ng/ml。在接著以1/50於PBS中稀釋的FITC-綴合的山羊抗人類IgG (Immunotech, Inc.)培育該等細胞後，立即使用FACS Calibure流式細胞儀(Beckton Dickinson)檢測結合的抗體。測量FL-1波段下之FITC螢光。將所獲得之值

(對照組之平均值)減去未經處理的細胞、同型對照經處理的細胞以及僅以二抗處理之細胞之平均螢光值。全部的測定進行二份。利用FACS分析法，透過未綴合的抗體nBT062結合，用於決定表現在NCI-H929以及MOLP-2多發性骨髓瘤細胞株上之CD138之數據示於第1A圖之分佈圖中。

透過QIFIKIT測定絕對CD138受體數目

該 QIFIKIT 分析法 (DAKO USA) 容許利用流式細胞儀，使用間接免疫螢光分析量化細胞表面抗原。此方法用於測定在NCI-H929以及MOLP-2多發性骨髓瘤細胞株上之CD138的絕對受體數目。QIFIKIT由6種微珠群構成，微珠之直徑大約10 μm ，以不同，但數量已定義明確之小鼠單株抗體包覆。在6種微珠群上之單株抗體分子的數目範圍從0至400 000-800 000，由該套組提供。該等微珠模仿以專一性小鼠第一單株抗體標記的細胞。以飽和濃度下之小鼠第一Mab標記樣本細胞。在此情況下，預期此第Mab會一價地結合至各別的細胞表面抗原。因此，結合的抗體分子之數目相應於抗原位置之數目。以多株山羊抗小鼠免疫球蛋白/FITC，山羊F(ab')₂培育在飽和濃度下之該等細胞(與QIFIKIT微珠同時)。

利用個別微珠群之螢光強度對在該等微珠上單株抗體分子之數目作圖，建構校正曲線。之後利用內插法測定在樣本細胞上之抗原位置的數目。

在4°C下，以不同濃度之nBT062 (125-0.98 ng/mL)培育50 μl /井中之細胞(1×10^6 細胞/mL)，歷時45分鐘。依照製造

商之建議設定以及製備標準微珠。用100 μ l PBS清洗該等井。使用FITC-綴合的二抗(1:50稀釋於PBS中，培育時間45分鐘，4°C下，黑暗中)測定結合的nBT062。利用流式細胞儀，依照製造商之建議，分析樣品。使用Qifikit量化CD138

5 之絕對受體數目，示於第1B圖中。

細胞存活率分析

為估算以未綴合的靶定劑預培育CD138^高以及CD138^低細胞之影響，進行細胞存活率分析。將NCI-H929以及MOLP-2多發性骨髓瘤細胞株培養於微滴定培養皿中，密度

10 為約5000細胞/井。以不同濃度之未綴合的nBT062預培育該等細胞，歷時30分鐘。之後，以濃度漸增之BT062處理培養物。在加入10 μ l含WST-1試劑之四唑鹽(Roche)之前，培育該培養物5天，接著進一步培育1-3小時，以便測量細胞存活率。在微盤讀取器中，藉由測定在450 nm對690 nm (參考

15 波長)之吸光值，量化因甲臍(formazan)代謝物形成而產生之顏色。含培養基以及WST-1試劑之井作為空白對照組。從相對於在正常生長培養基中生長之細胞的數據(設定為100%)所獲得之數據，計算存活細胞之百分比。在對照實驗中，細胞係在相同條件下以等莫耳濃度的游離毒素或未綴

20 合的nBT062處理，然後如以上所述之方法測量細胞存活率。利用下列共同培養實驗確認以上之結果

共同培養中之細胞存活率

利用流式細胞儀測量BT062對表現CD138之細胞之細胞毒性。在室溫下，以螢光染料PKH67-GL (Sigma,

Deisenhofen, Germany), 依照製造商之說明書, 培育約 2×10^6 個表現低位準CD138之細胞(非靶細胞, CD138^低), 歷時5分鐘。藉由添加熱去活化FBS停止染料之併入。之後用15 ml 之PBS清洗細胞2次。

- 5 在96井微滴定盤中一起種入標記的細胞以及表現高位準CD138之未標記的細胞(“靶細胞”, CD138^高), 37°C 下培育一整夜。

- 為阻斷一小部分的結合位置, 以不同濃度之未綴合的nBT062預處理細胞。在對照組樣品中, 省略nBT062。之後,
10 以漸增濃度BT062處理該共同培養物。額外培育24-120小時後, 將該培養物轉移至聚丙烯管中。在500•g下離心細胞5分鐘, 移除上清液, 加入200 µl/管之碘化丙啶(PI)溶液(1 µg/ml, 配製於PBS中)。在室溫下培育5 - 10分鐘後, 利用FACS 分析法測定螢光。使用 CellQuestPro 軟體 (BD
15 Biosciences)計算相對於未經處理的細胞之活存細胞之分率。存活的CD138^低細胞測定為PKH67-GL陽性以及PI陰性。存活的CD138^高細胞(靶細胞)測定為PKH67-GL陰性以及PI陰性。加上一些在培養物中測得之自發性溶解的細胞(處理方式一致, 但無BT062)。選擇性地, 在實驗之另一組中,
20 以PKH67-GL標記CD138^高細胞, 且與未標記之CD138^低細胞共同培養。

透過nBT062預培育, 減少CD138^低非靶細胞對BT062之敏感度

在共同培養分析中, 分析以未綴合的nBT062預培育該等細胞, 在CD138^高以及CD138^低細胞之存活率上之影響。

為能夠在隨後之細胞存活率分析中區分靶與非靶細胞，在與未標記的CD138^高細胞共同培養之前，以螢光染料PKH67-GL標記CD138^低細胞。選擇性地，以相同染料標記CD138^高細胞。為部分地阻斷結合位置，以不同濃度之未綴合的nBT062處理共同培養物。之後，於該等細胞中加入BT062，然後利用PI染色以及隨後的FACS分析法分析細胞存活率。在以BT062處理後，在共同培養物中非靶細胞之存活率因以未綴合的抗體nBT062預培育而增加。重要地，BT062對靶細胞之效力僅稍微降低。此結果進一步證實，BT062對CD138^低非靶細胞之細胞毒性，可因nBT062預培育該等細胞而降低，藉以維持BT062對CD138^高靶細胞之細胞毒性。

可溶性CD138之隔離

細胞培養上清液中可溶性CD138之測量

使用固相三明治ELISA (Human CD138 ELISA kit, Diaclone, Besançon, France)，依照製造商之說明書，測量表現CD138之細胞的細胞培養上清液中可溶性CD138 (sCD138)之位準。

在補充sCD138之培養物中之細胞存活率分析

依照標準程序，利用抗體親和力色層分析法，使用載負與抗CD138抗體B-B4之管柱，從細胞培養上清液中純化出可溶性CD138。

為了獲得CD138陽性細胞之細胞培養物(於其培養上清液中具有已知濃度之sCD138)，於新鮮種下的細胞之培養基中補充不同濃度之純化sCD138。細胞培養在微滴定盤上進

行，密度為5000細胞/井(針對懸浮細胞)或900細胞/井(針對
 附著細胞)。為阻斷sCD138之結合位置，以未綴合的nBT062
 預培養該等細胞。之後，以漸增濃度之BT062處理培養物。
 在加入10 μ l含WST-1試劑之四唑鹽(Roche)之前，培育該等
 5 培養物1至5天，接著進一步培育1-3小時。在微盤讀取器
 中，藉由測定450 nm對690 nm (作為參考波長)下之吸光
 值，量化因甲臍代謝物形成而產生之顏色。含培養基以及
 WST 1試劑之井作為空白對照組。從相對於在正常生長培
 養基中生長之細胞的數據(設定為100%)所獲得之數據，計
 10 算存活細胞之百分比。

*藉由以nBT062遮蔽可溶性CD138，增加BT062對CD138⁺細
 胞之細胞毒性*

BT062對表現CD138之多發性骨髓瘤細胞之細胞毒殺
 活性，會因試管中細胞培養上清液中存在可溶性CD138而
 15 減低，因多發性骨髓瘤病人血液或組織中或實驗動物動體
 內存在sCD138而減低。為預防sCD138起競爭者之作用，於
 試管模型系統中使用nBT062來阻斷sCD138上之結合位
 置。因此，將表現CD138之細胞培養於含有sCD138之條件
 培養基之微滴定盤中或補充有已知濃度之純化sCD138之新
 鮮細胞培養基中。在添加BT062之同時或之前，於該培養物
 20 中加入未綴合的nBT062。於WST-1細胞存活率分析中測定
 細胞存活率。結果顯示，BT062之活性可因以nBT062預培
 育該等細胞而提高，因為該未綴合的抗體nBT062會遮蔽
 sCD138結合位置。

参考書目

- 5 Akkina RK, Rosenblatt JD, Campbell AG, Chen IS, Zack JA. Modeling human lymphoid precursor cell gene therapy in the SCID-hu mouse. *Blood*. 1994;84:1393-1398.
- 10 Anttonen A, Heikkila P, Kajanti M, Jalkanen M, Joensuu H. High syndecan-1 expression is associated with favourable outcome in squamous cell lung carcinoma treated with radical surgery. *Lung Cancer*. 2001 Jun; 32(3):297-305.
- 15 Barbareschi M, Maisonneuve P, Aldovini D, Cangi MG, Pecciarini L, Angelo Mauri F, Veronese S, Caffo O, Lucenti A, Palma PD, Galligioni E, Doglioni C. High syndecan-1 expression in breast carcinoma is related to an aggressive phenotype and to poorer prognosis. *Cancer*. 2003 Aug 1;98(3):474-83.
- 20 Bernfield M, Kokenyesi R, Kato M, Hinkes MT, Spring J, Gallo RL, Lose EJ. Biology of the syndecans: a family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Cell Biol*. 1992;8:365-393.
- 25 Beste G, Schmidt FS, Stibora T, Skerra A. Small antibody-like proteins with prescribed ligand specificities derived from the lipocalin fold. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999; 96, 1898-1903.
- 30 Bhattacharyya B, Wolff J. Maytansine binding to the vinblastine sites of tubulin. *FEBS Lett*. 1977;75:159-162.
- 35 Blättler WA and Chari RVJ. Drugs to Enhance the Therapeutic Potency of Anticancer Antibodies: Antibody-Drug Conjugates as Tumor-Activated Prodrugs. In: Ojima, I., Vite, G.D. and Altmann, K.-H., Editors, 2001. *Anticancer Agents-Frontiers in Cancer Chemotherapy*, American Chemical Society, Washington, DC, pp. 317-338.
- 40 Bross PF, Beitz J, Chen G, Chen XH, Duffy E, Kieffer L, Roy S, Sridhara R, Rahman A, Williams G, Pazdur R. Approval summary: gemtuzumab ozogamicin in relapsed acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res*. 2001;7:1490-1496.
- 45 Carbone A, Gaidano G, Gloghini A, Ferlito A, Rinaldo A, Stein H. AIDS-related plasma- blastic lymphomas of the oral cavity and jaws: a diagnostic dilemma. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol*. 1999; 108: 95-99.
- 50 Carter P. Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nat Rev Cancer*. 2001;1:118-129.
- Chari RV, Martell BA, Gross JL, Cook SB, Shah SA, Blattler WA, McKenzie SJ, Goldmacher VS. Immunoconjugates containing novel maytansinoids: promising anticancer drugs. *Cancer Res*. 1992;52:127-131.
- Chari RV, Jackel KA, Bourret LA, Derr SM, Tadayoni BM, Mattocks

- 5 KM, Shah SA, Liu C, Blättler WA and Goldmacher VS. Enhancement of the selectivity and antitumor efficacy of a CC-1065 analogue through immunoconjugate formation. *Cancer Res.* 1995; 55: 4079-4084.
- 10 Charnaux N, Brule S, Chaigneau T, Saffar L, Sutton A, Hamon M, Prost C, Lievre N, Vita C, Gattegno L. RANTES (CCL5) induces a CCR5-dependent accelerated shedding of syndecan-1 (CD138) and syndecan-4 from HeLa cells and forms complexes with the shed ectodomains of these proteoglycans as well as with those of CD44. *Glycobiology*. 2004 Sep 8 [Epub ahead of print]
- 15 Chen BP, Galy A, Kyoizumi S, Namikawa R, Scarborough J, Webb S, Ford B, Cen DZ, Chen SC. Engraftment of human hematopoietic precursor cells with secondary transfer potential in SCID-hu mice. *Blood*. 1994;84:2497-2505.
- 20 Chilosì M, Adami F, Lestani M, Montagna L, Cimarosto L, Semenzato G, Pizzolo G, Menestrina F. CD138/syndecan-1: a useful immunohistochemical marker of normal and neoplastic plasma cells on routine trephine bone marrow biopsies. *Mod Pathol*. 1999;12:1101-1106.
- 25 Clement C, Vooijs, W.C., Klein, B., and Wijdenes, J. In: al. SFSe, ed. J. Leukocyte Typing V. Oxford: Oxford University Press; 1995:714-715.
- 30 Couturier O, Faivre-Chauvet A ; Filippovich IV; Thedr  z P, Sa  -Maurel C; Bardi  s M; Mishra AK; Gauvrit M; Blain G; Apostolidis C; Molinet R; Abbe JC; Bateille R; Wijdenes J; Chatal JF; Cherel M; Validation of 213Bi-alpha radioimmunotherapy for multiple myeloma. *Clinical Cancer Research* 5(10 Suppl.) (Oct 1999) 3165s-3170s.
- 35 Davies EJ et al. , Blackhall FH, Shanks JH, David G, McGown AT, Swindell R, Slade RJ, Martin-Hirsch P, Gallagher JT, Jayson GC. Distribution and Clinical Significance of Heparan Sulfate Proteoglycans in Ovarian Cancer *Clin Cancer Res.* 2004; 10(15):5178-86.
- 40 Dhodapkar MV, Abe E, Theus A, Lacy M, Langford JK, Barlogie B, Sanderson RD. Syndecan-1 is a multifunctional regulator of myeloma pathobiology: control of tumor cell survival, growth, and bone cell differentiation. *Blood*. 1998;91:2679-2688.
- 45 Dore JM, Morard F, Vita N, Wijdenes J. Identification and location on syndecan-1 core protein of the epitopes of B-B2 and B-B4 monoclonal antibodies. *FEBS Lett*. 1998;426:67-70.
- 50 Dowell JA, Korth-Bradley J, Liu H, King SP, Berger MS. Pharmacokinetics of gemtuzumab ozogamicin, an antibody-targeted chemotherapy agent for the treatment of patients with acute myeloid leukemia in first relapse. *J Clin Pharmacol*. 2001;41:1206-1214.
- Edinger M, Sweeney TJ, Tucker AA, Olomu AB, Negrin RS, Contag CH. Noninvasive assessment of tumor cell proliferation in animal

models. *Neoplasia*. 1999;1:303-310.

Gattei V, Godeas C, Degan M, Rossi FM, Aldinucci D, Pinto A. Characterization of Anti-CD138 monoclonal antibodies as tools for investigating the molecular polymorphism of syndecan-1 in human lymphoma cells. *Br J Haematol*. 1999;104:152-162.

Hamann PR, Hinman LM, Beyer CF, Lindh D, Upešlacijs J, Flowers DA, Bernstein I. An anti-CD33 antibody-calicheamicin conjugate for treatment of acute myeloid leukemia. Choice of linker. *Bioconjug Chem*. 2002;13:40-46.

Han I, Park H, Oh ES. New insights into syndecan-2 expression and tumorigenic activity in colon carcinoma cells. *J Mol Histol*. 2004;35(3):319-26.

Horvathova M, Gaillard, J.-P., Liutard, J., Duperray, C., Lavabre-Bertrand, T., Bourquard, P et al. In: al. SFSe, ed. *Leucocyte Typing V*. Oxford: Oxford University Press; 1995:713-714.

Krebs B, Rauchenberger R, Reiffert S, Rothe C, Tesar M, Thomassen E, Cao M, Dreier T, Fischer D, Hoss A et al. High-throughput generation and engineering of recombinant human antibodies. 2001. *J. Immunol. Methods* 254, pp. 67-84.

Juuti A, Nordling S, Lundin J, Louhimo J, Haglund C. Syndecan-1 expression - a novel prognostic marker in pancreatic cancer. *Oncology* 68(2-3): 2005: 97-106.

Kupchan SM, Sneden AT, Branfman AR, Howie GA, Rebhun LI, McIvor WE, Wang RW, Schnaitman TC. Structural requirements for antileukemic activity among the naturally occurring and semisynthetic maytansinoids. *J Med Chem*. 1978;21:31-37.

Kyoizumi S, Baum CM, Kaneshima H, McCune JM, Yee EJ, Namikawa R. Implantation and maintenance of functional human bone marrow in SCID-hu mice. *Blood*. 1992;79:1704-1711.

Kyoizumi S, Murray LJ, Namikawa R. Preclinical analysis of cytokine therapy in the SCID-hu mouse. *Blood*. 1993;81:1479-1488.

Liu C, Tadayoni BM, Bourret LA, Mattocks KM, Derr SM, Widdison WC, Kedersha NL, Ariniello PD, Goldmacher VS, Lambert JM, Blattler WA, Chari RV. Eradication of large colon tumor xenografts by targeted delivery of maytansinoids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:8618-8623.

McCune JM, Namikawa R, Kaneshima H, Shultz LD, Lieberman M, Weissman IL. The SCID-hu mouse: murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function. *Science*. 1988;241:1632-1639.

Mennerich D, Vogel A, Klamann I, Dahl E, Lichtner RB, Rosenthal A, Pohlenz HD, Thierauch KH, Sommer A. Shift of syndecan-1 expression

- from epithelial to stromal cells during progression of solid tumours. Eur J Cancer. 2004 Jun; 40(9):1373-82.
- 5 Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods. 1983;65:55-63.
- 10 Namikawa R, Ueda R, Kyoizumi S. Growth of human myeloid leukemias in the human marrow environment of SCID-hu mice. Blood. 1993;82:2526-2536.
- 15 O'Connell FP, Pinkus JL, Pinkus GS. CD138 (Syndecan-1), a Plasma Cell Marker Immunohistochemical Profile in Hematopoietic and Nonhematopoietic Neoplasms. Am J Clin Pathol 2004; 121:254-263.
- 20 Ojima I, Geng X, Wu X, Qu C, Borella CP, Xie H, Wilhelm SD, Leece BA, Bartle LM, Goldmacher VS and Chari RV. Tumor-specific novel taxoid-monoclonal antibody conjugates. 2002. J. Med. Chem. 45, pp. 5620-5623.
- 25 Olafsen, T, Cheung, CC, Yazaki, PJ, Li L, Sundaresan G, Gambhir SS, Sherman, MA, Williams, LE, Shively, JE, Raubitschek, AA, and Wu, AM. Covalent disulfide-linked anti-CEA diabody allows site-specific conjugation and radiolabeling for tumor targeting applications. 2004; Prot. Eng. Design & Selection 17:1: 21-27.
- Orosz Z, Kopper L. Syndecan-1 expression in different soft tissue tumours. Anticancer Res. 2001; 21(1B):733-7.
- 30 Padlan, EA. A possible procedure for reducing the immunogenicity of antibody variable domains while preserving their ligand-binding properties. Mol. Immunol. 1991; 28: 489-498.
- 35 Payne G. Progress in immunoconjugate cancer therapeutics. Cancer Cell. 2003;3:207-212.
- 40 Pegram MD, Lipton A, Hayes DF, Weber BL, Baselga JM, Tripathy D, Baly D, Baughman SA, Twaddell T, Glaspy JA and Slamon DJ. Phase II study of receptor-enhanced chemosensitivity using recombinant humanized anti-p185HER2/neu monoclonal antibody plus cisplatin in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer refractory to chemotherapy treatment. 1998. J. Clin. Oncol. 16, pp. 2659-2671.
- 45 Rawstron AC, Owen RG, Davies FE, Johnson RJ, Jones RA, Richards SJ, Evans PA, Child JA, Smith GM, Jack AS, Morgan GJ. Circulating plasma cells in multiple myeloma: characterization and correlation with disease stage. Br J Haematol. 1997;97:46-55.
- 50 Remillard S, Rebhun LI, Howie GA, Kupchan SM. Antimitotic activity of the potent tumor inhibitor maytansine. Science. 1975;189:1002-1005.
- Roh YH, Kim YH, Choi HJ, Lee KE, Roh MS. Syndecan-1 Expression

in Gallbladder Cancer and Its Prognostic Significance, *Eur Surg Res* 2008;41:245-250.

- 5 Roguska MA, Pedersen JT, Keddy CA, Henry AH, Searle SJ, Lambert JM, Goldmacher VS, Blattler WA, Rees AR, Guild BC. Humanization of murine monoclonal antibodies through variable domain resurfacing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:969-973.
- 10 Ross S, Spencer SD, Holcomb I, Tan C, Hongo J, Devaux B, Rangell L, Keller GA, Schow P, Steeves RM, Lutz RJ, Frantz G, Hillan K, Peale F, Tobin P, Eberhard D, Rubin MA, Lasky LA, Koeppen H. Prostate stem cell antigen as therapy target: tissue expression and in vivo efficacy of an immunoconjugate. *Cancer Res*. 2002 May 1;62(9):2546-53.
- 15 Ross JS, Gray K, Gray G, Worland PJ, Rolfe M. Anticancer Antibodies, *Am J Clin Path*. (4/17/2003).
- 20 Sanderson RD, Lalor P, Bernfield M. B lymphocytes express and lose syndecan at specific stages of differentiation. *Cell Regul*. 1989;1:27-35.
- 25 Sandhu JS, Clark BR, Boynton EL, Atkins H, Messner H, Keating A, Hozumi N. Human hematopoiesis in SCID mice implanted with human adult cancellous bone. *Blood*. 1996;88:1973-1982.
- 30 Sasaki A, Boyce BF, Story B, Wright KR, Chapman M, Boyce R, Mundy GR, Yoneda T. Bisphosphonate risedronate reduces metastatic human breast cancer burden in bone in nude mice. *Cancer Res*. 1995;55:3551-3557.
- 35 Schneider U, van Lessen A, Huhn D, Serke S. Two subsets of peripheral blood plasma cells defined by differential expression of CD45 antigen. *Br J Haematol*. 1997;97:56-64.
- 40 Sebestyen A, Berczi L, Mihalik R, Paku S, Matolcsy A, Kopper L. Syndecan-1 (CD138) expression in human non-Hodgkin lymphomas. *Br J Haematol*. 1999; 104(2):412-9.
- 45 Seftalioglu A, Karakus S. Syndecan-1/CD138 expression in normal myeloid, acute lymphoblastic and myeloblastic leukemia cells. *Acta Histochem*. 2003;105:213-221.
- 50 Seftalioglu A, Karakus S, Dundar S, Can B, Erdemli E, Irmak MK, Oztas E, Korkmaz C, Yazar F, Cavusoglu I. Syndecan-1 (CD138) expression in acute myeloblastic leukemia cells--an immuno electron microscopic study. *Acta Oncol*. 2003;42:71-74.
- Senter PD, Doronina S, Cervený C, Chace D, Francisco J, Klussman K, Mendelsohn B, Meyer D, Siegall CB, Thompson J et al. (2002). Cures and regressions of established tumors with monoclonal antibody auristatin conjugates. Abstract #2062, American Association for Cancer Res. (San Francisco, CA: American Association for Cancer Res.), 414.
- Sievers EL, Larson R.A., Stadtmauer, E.A., Estey, E., Lowenberg, B.,

- Dombret, H., Karanes, C., Theobald, M., Bennett, J.M., Sherman, M.L. et al. Efficacy and safety of gemtuzumab ozogamicin in patients with CD33-positive acute myeloid leukemia in first relapse. 2001. *J. Clin. Oncol.* 19, pp. 3244-3254.
- 5 Sievers EL and Linenberger M. Mylotarg: antibody-targeted chemotherapy comes of age. 2001. *Curr. Opin. Oncol.* 13, pp. 522-527.
- 10 Smith R., Single chain antibody variable region fragments; www.stanford.edu/~smithr/science/scfv.html (last updated on May, 2001).
- 15 Studnicka GM, Soares S, Better M, Williams RE, Nadell R, Horwitz AH. Human-engineered monoclonal antibodies retain full specific binding activity by preserving non-CDR complementarity-modulating residues. *Protein Eng.* 1994; 7(6): 805-814.
- 20 Tassone P, Goldmacher VS, Neri P, Gozzini A, Shammas MA, Whiteman KA, Hylander-Gans LL, Carrasco DR, Hideshima T, Shringarpure R, Shi J, Allam CK, Wijdenes J, Venuta S, Munshi NC, Anderson KC. Cytotoxic activity of the maytansinoid immunoconjugate B-B4-DM1 against CD138⁺ multiple myeloma cells, *Blood*, 2004, 104 (12), pp. 3688-3696.
- 25 Tolcher AW, Ochoa L, Hammond LA, Patnaik A, Edwards T, Takimoto C, Smith L, de Bono J, Schwartz G, Mays T, Jonak ZL, Johnson R, DeWitte M, Martino H, Audette C, Maes K, Chari RV, Lambert JM, Rowinsky EK. Cantuzumab mertansine, a maytansinoid immunoconjugate directed to the CanAg antigen: a phase I, pharmacokinetic, and biologic correlative study. *J Clin Oncol.* 30 2003;21:211-222.
- 35 Urashima M, Chen BP, Chen S, Pinkus GS, Bronson RT, Dedera DA, Hoshi Y, Teoh G, Ogata A, Treon SP, Chauhan D, Anderson KC. The development of a model for the homing of multiple myeloma cells to human bone marrow. *Blood*. 1997;90:754-765.
- 40 Vogel CW. Preparation of immunoconjugates using antibody oligosaccharide moieties. *Methods in Molecular Biology: Bioconjugation protocols strategies and methods.* 2004;283:087-108.
- 45 Vooijs WC, Post J, Wijdenes J, Schuurman HJ, Bolognesi A, Polito L, Stirpe F, Bast EJ, de Gast GC. Efficacy and toxicity of plasma-cell-reactive monoclonal antibodies B-B2 and B-B4 and their immunotoxins. *Cancer Immunol Immunother.* 1996;42:319-328.
- 50 Ward, E.S., D. Gussow, A.D. Griffiths, P.T. Jones, and G. Winter. Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli*. *Nature.* 1989. 341:544-546.
- Wargalla UC, Reisfeld RA. Rate of internalization of an immunotoxin correlates with cytotoxic activity against human tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989;86:5146-5150.
- Wijdenes J, Vooijs WC, Clement C, Post J, Morard F, Vita N, Laurent P,

- Sun RX, Klein B, Dore JM. A plasmocyte selective monoclonal antibody (B-B4) recognizes syndecan-1. *Br J Haematol.* 1996;94:318-323.
- 5 Wijdenes J, Dore JM, Clement C, Vermot-Desroches C. CD138, *J Biol Regul Homeost Agents.* 2002 Apr-Jun;16(2):152-5.
- Witzig TE, Kimlinger TK, Ahmann GJ, Katzmann JA, Greipp PR. Detection of myeloma cells in the peripheral blood by flow cytometry. *Cytometry.* 1996;26:113-120.
- 10 Xie H, Audette C, Hoffee M, Lambert JM, Blättler W. Pharmacokinetics and biodistribution of the antitumor immunoconjugate, cantuzumab mertansine (huC242-DM1), and its two components in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004 Mar;308(3):1073-82.
- 15 Yang M, Jiang P, An Z, Baranov E, Li L, Hasegawa S, Al-Tuwaijri M, Chishima T, Shimada H, Moossa AR, Hoffman RM. Genetically fluorescent melanoma bone and organ metastasis models. *Clin Cancer Res.* 1999;5:3549-3559.
- 20 Yang M, Baranov E, Jiang P, Sun FX, Li XM, Li L, Hasegawa S, Bouvet M, Al-Tuwaijri M, Chishima T, Shimada H, Moossa AR, Penman S, Hoffman RM. Whole-body optical imaging of green fluorescent protein-expressing tumors and metastases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:1206-1211.
- 25

【圖式簡單說明】

第1A圖顯示由FACS分析法測得之NCI-H929以及

30 MOLP-2 (右)表面上之CD138表現。使用FITC綴合的二抗偵測到之結合型nBT062抗體以黑色表示。在代表性直條圖中，將細胞總數對在FITC波段(FL1-H)中測得之螢光強度作圖。僅以該二抗處理之細胞作為對照組(白色)。第1B圖顯示在細胞存活率分析中，NCI-H929以及MOLP-2細胞對

35 nBT062-SPDB-DM4 (綴合物)以及缺少該抗體部分之游離毒素之敏感度。提供相應的 IC_{50} 值。以FACS分析法測定在該細胞表面上之相對的CD138表現，然後提供相對螢光強度。此外，絕對受體數目/細胞係以使用QIFIKIT量化之值顯示。第1C圖顯示MOLP-2以及NCI-H929細胞對nBT062之

敏感度。

第2A圖以及第2B圖描述在漸增濃度之nBT062存在下，
nBT062-SPDB-DM4對NCI-H929細胞之細胞毒性。各圖亦顯
示在無nBT062之存在下所獲得之劑量/反應曲線。NCI-H929
5 細胞對游離毒素之敏感度示於第2A圖(第二圖)中。

第3A圖以及第3B圖描述在漸增濃度之nBT062下，
nBT062-SPDB-DM4對MOLP-2細胞之細胞毒性。各圖亦顯
示在無nBT062之存在下所獲得之劑量/反應曲線。MOLP-2
細胞對游離毒素之敏感度示於第3A圖(第二圖)中。

10 第4圖描述漸增濃度之nBT062對NCI-H929以及
MOLP-2細胞之 IC_{50} 值的影響。該 IC_{50} 值係根據於第2圖以及
第3圖中所示之劑量反應曲線計算得，然後對用於預培育之
nBT062的濃度作圖。

15 第5圖顯示該免疫綴合物BT062中效應物功能性依附至
抗體。

【主要元件符號說明】

(無)

七、申請專利範圍：**公告本**

1. 一種靶定細胞結合型CD138之免疫綴合物的用途，係用以製備一用於治療一個體中之表現CD138的腫瘤靶細胞之醫藥品，其中該個體已經以一種未經綴合的CD138靶定劑來治療，以將細胞結合型CD138隔離，

其中該未經綴合的CD138靶定劑係包含抗體B-B4之互補決定區的未經綴合的靶定抗體，

其中該免疫綴合物包含一針對該CD138之靶定劑，其被功能性地接附至一效應分子，

其中在該免疫綴合物中所包含的針對CD138之靶定劑係包含抗體B-B4之互補決定區的靶定抗體，

其中在該免疫綴合物中所包含的針對CD138之該靶定抗體及該未經綴合的靶定抗體結合人類粘結蛋白聚糖-1 (syndecan-1)之中心蛋白之殘基90-95間之線性抗原決定位，

且其中該腫瘤靶細胞係多發性骨髓瘤細胞。

2. 如申請專利範圍第1項之用途，其中該CD138內化進入其結合之細胞中和/或該CD138遭受脫落。
3. 如申請專利範圍第1項之用途，其中非靶表現CD138的細胞包含不容易再生之細胞。
4. 如申請專利範圍第3項之用途，其中該等不容易再生之細胞係上皮細胞、腦、心臟、腎以及肝細胞。
5. 如申請專利範圍第1項之用途，其中該效應分子係類美登素(maytansinoid)。

6. 如申請專利範圍第5項之用途，其中該類美登素(maytansinoid)係DM1、DM3或DM4。
7. 如申請專利範圍第1項之用途，其中所獲得之表現CD138之非靶細胞對表現CD138之靶細胞之相對隔離值大於5。
8. 如申請專利範圍第6項之用途，其中所獲得之表現CD138之非靶細胞對表現CD138之靶細胞之相對隔離值大於10。
9. 如申請專利範圍第1項之用途，其中未經綴合的CD138靶定劑對免疫綴合物之比率為約10：1至約1：2。
10. 如申請專利範圍第9項之用途，其中該比率為5：1至2：1。
11. 如申請專利範圍第1項之用途，其中該個體已經以一血管舒張劑來治療，該血管舒張劑之治療係在該未經綴合的CD138靶定劑之前或在一起。
12. 如申請專利範圍第11項之用途，其中該血管舒張劑係選自於哌唑嗪(prazosin)、特拉唑嗪(terazosin)或多沙唑嗪(doxazosin)。
13. 如申請專利範圍第1項或第8項之用途，其中該靶定細胞結合型CD138之免疫綴合物係要在該未經綴合的CD138靶定劑之後且於一時間間隔後投與。
14. 如申請專利範圍第13項之用途，其中該時間間隔至少20分鐘。
15. 如申請專利範圍第1項之用途，其中在該免疫綴合物中

所包含之該針對CD138之靶定抗體及該未經綴合的CD138靶定抗體係選自於：(a)嵌合人類/鼠類抗體，其中鼠類抗體為B-B4；及(b)包含鼠類抗體B-B4之互補決定區的人化抗體。

- 5 16. 如申請專利範圍第1項之用途，其中在該免疫綴合物中所包含之該針對CD138之靶定抗體及該未經綴合的CD138靶定抗體係抗體B-B4或衍生自抗體B-B4。

17. 一種套組，其包含：

10 於一容器中，(a)一靶定表現在靶細胞上之細胞結合型CD138之免疫綴合物，該免疫綴合物包含一功能性地接附至一效應分子之針對該CD138之靶定劑；

於一不同的容器中，(b)一未經綴合的CD138靶定劑，其中該未經綴合的CD138靶定劑係非系統性細胞毒性劑；

15 任擇地於一第三容器中，(c)一血管舒張劑，以及任擇地，於一第四容器中，(d)如何使用(a)與(b)以及任擇地(c)之說明書，

其中該未經綴合的CD138靶定劑係包含抗體B-B4之互補決定區的未經綴合的靶定抗體，

20 其中在該免疫綴合物中所包含的針對CD138之靶定劑係包含抗體B-B4之互補決定區的靶定抗體，

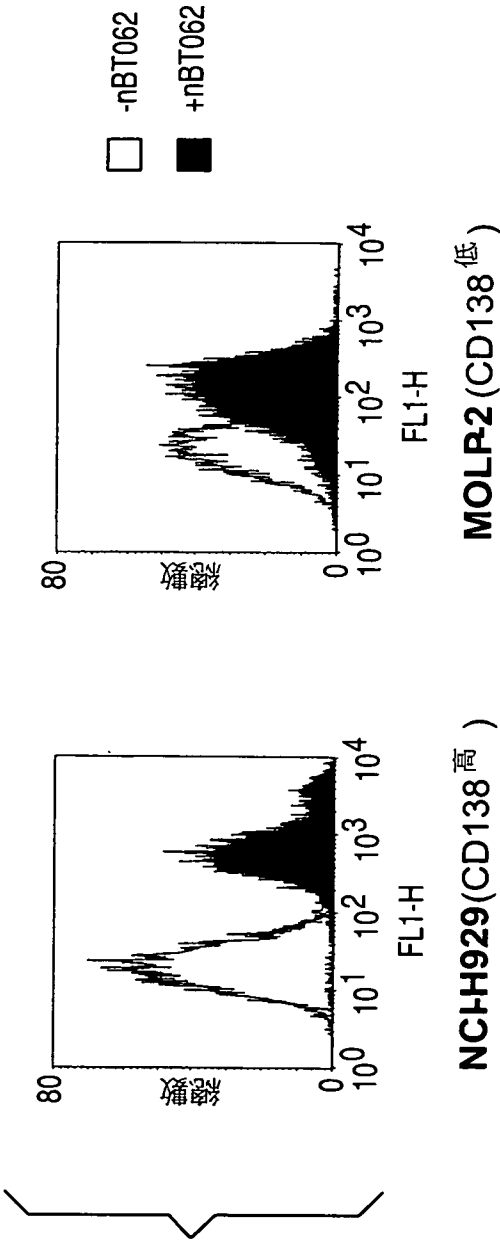
其中在該免疫綴合物中所包含的針對CD138之該靶定抗體及該未經綴合的靶定抗體結合人類粘結蛋白聚糖-1 (syndecan-1)之中心蛋白之殘基90-95間之線性抗原

決定位，

且其中該靶細胞係多發性骨髓瘤細胞。

18. 如申請專利範圍第17項之套組，其中該(d)中之說明書描述一治療療程，包含該未經綴合的CD138靶定劑對該免疫綴合物之比率為約10：1至約1：2。
19. 如申請專利範圍第18項之套組，其中該比率為約5：1至約2：1。
20. 如申請專利範圍第17項之套組，其中該效應分子係類美登素(maytansinoid)。
21. 如申請專利範圍第20項之套組，其中該類美登素(maytansinoid)係DM1、DM3或DM4。
22. 如申請專利範圍第17項之套組，其中在該免疫綴合物中所包含之該針對CD138之靶定抗體及該未經綴合的CD138靶定抗體係選自於：(a)嵌合人類/鼠類抗體，其中鼠類抗體為B-B4；及(b)包含鼠類抗體B-B4之互補決定區的人化抗體。
23. 如申請專利範圍第17項之套組，其中在該免疫綴合物中所包含之該針對CD138之靶定抗體及該未經綴合的CD138靶定抗體係抗體B-B4或衍生自抗體B-B4。

第1A圖

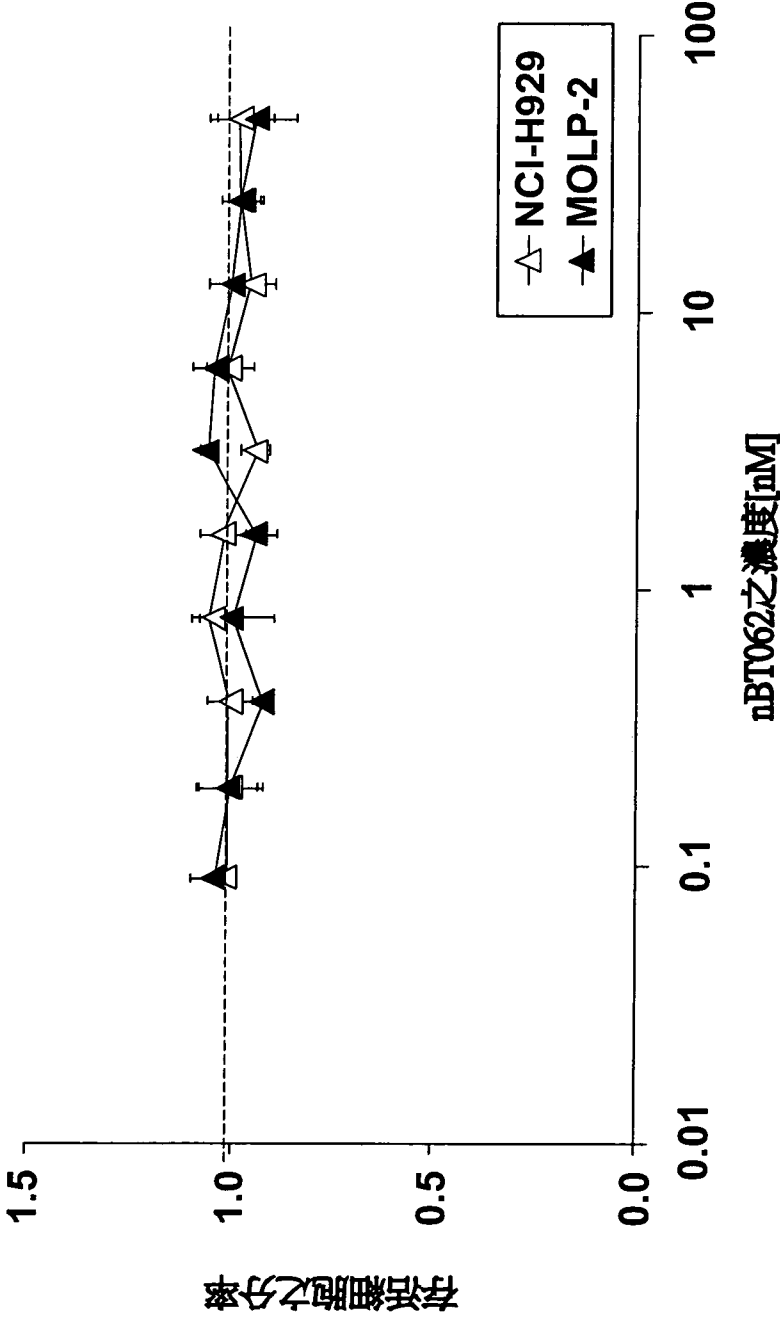


第1B圖

細胞株	來源	敏感度:IC50 (nM)			CD138 表現	
		綴合物	游離毒素	RFI*	受體/細胞	
NCHH929 (CD138 ^高)	多發性 骨髓瘤	0.146	0.152	502	788,752	
MOLP-2 (CD138 ^低)	多發性 骨髓瘤	0.398	0.049	425	161,064	

* RFI: 相對螢光強度

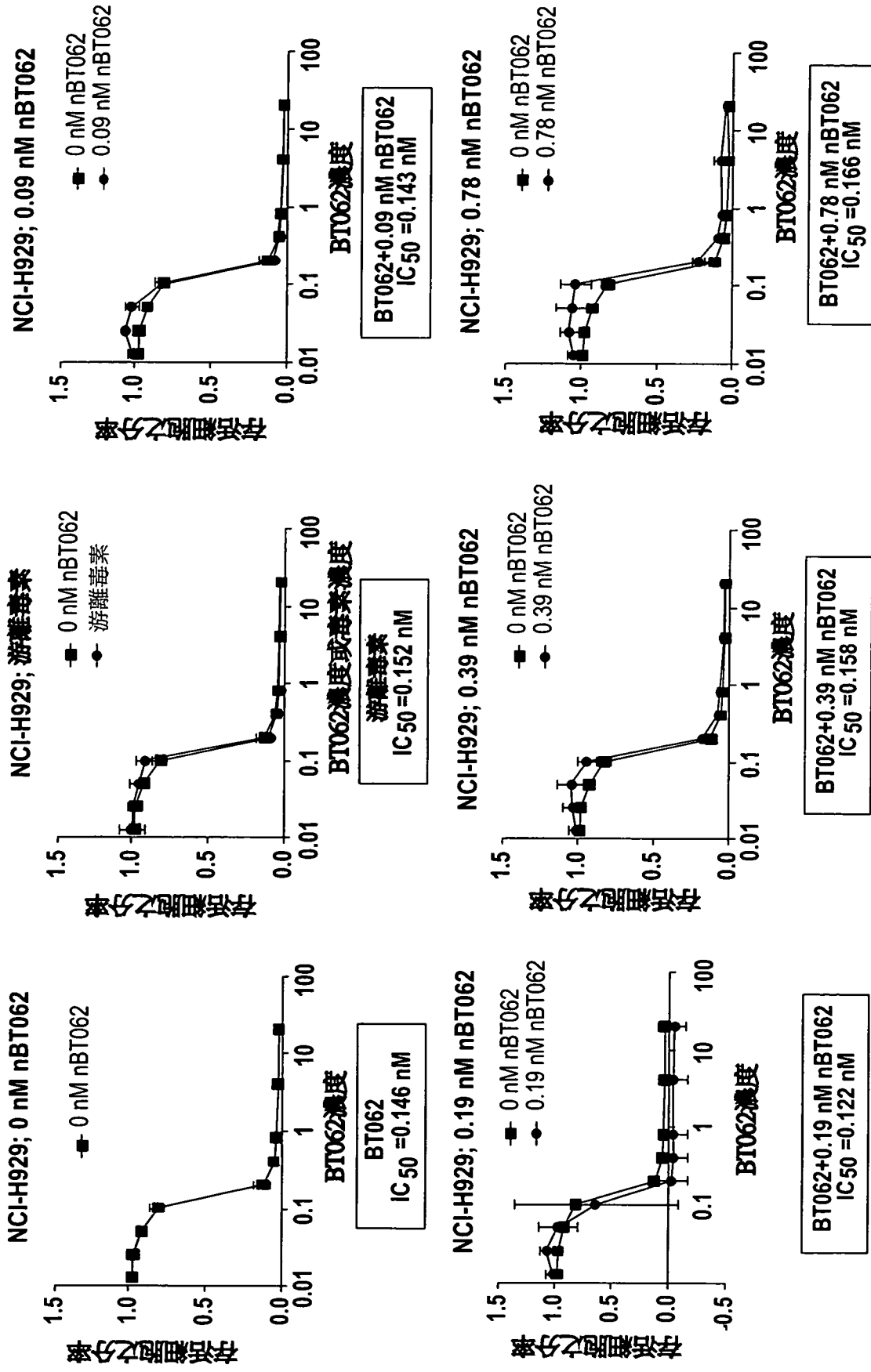
NCI-H929以及MOLP-2細胞對nBT062之敏感度



第1C圖

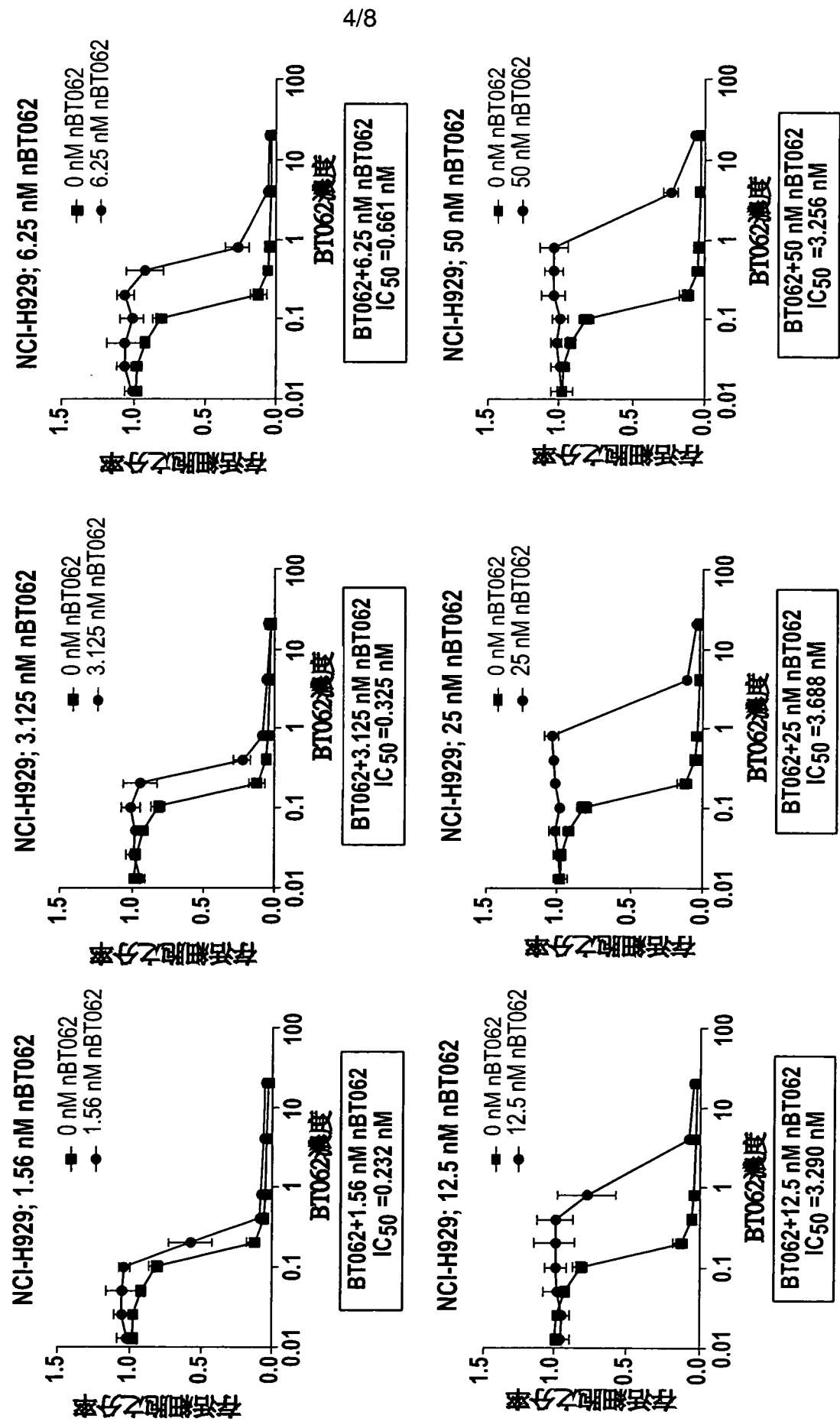
第2A圖

NCI-H929, CD138 高



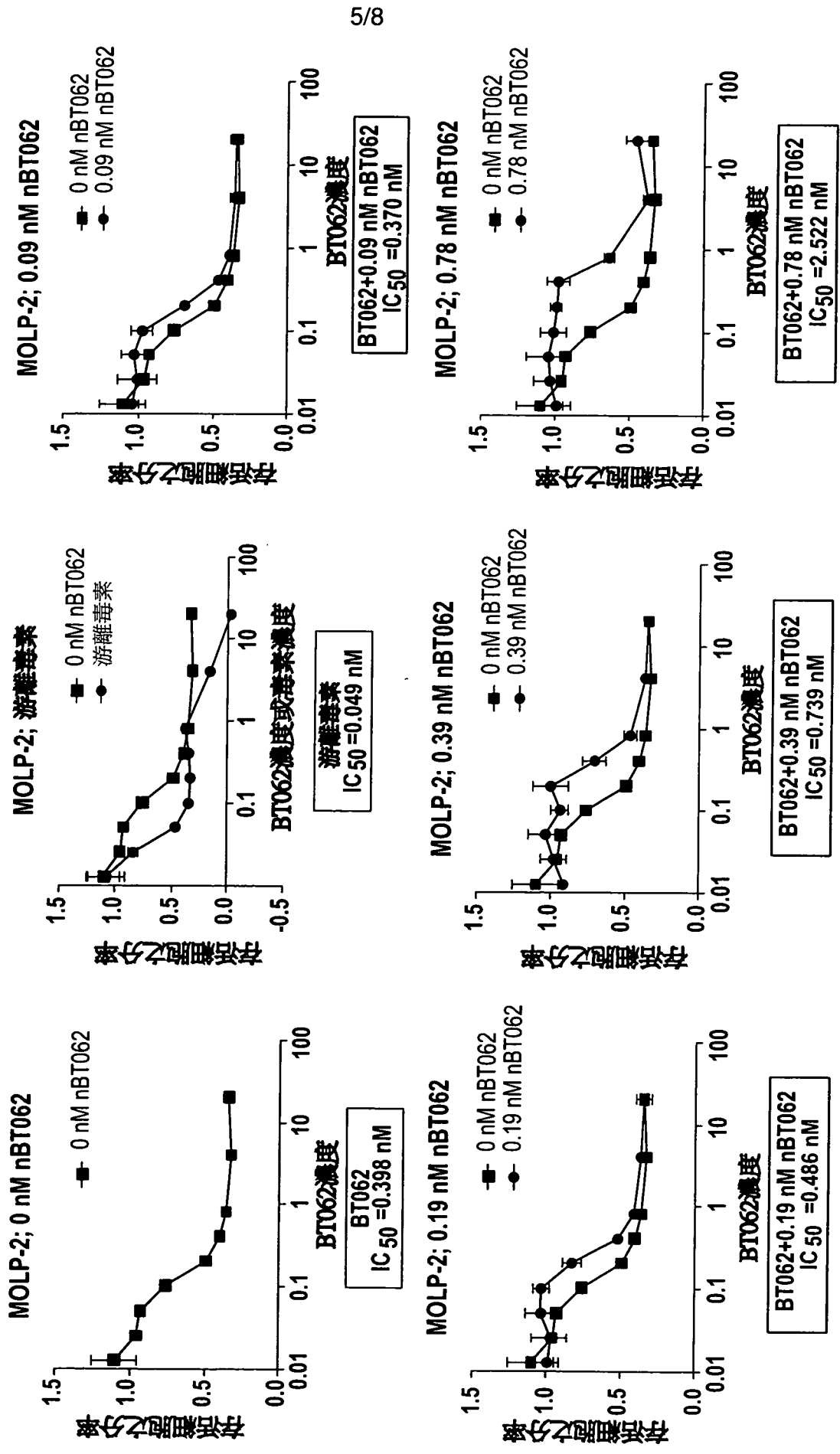
第2B圖

NCI-H929, CD138 高



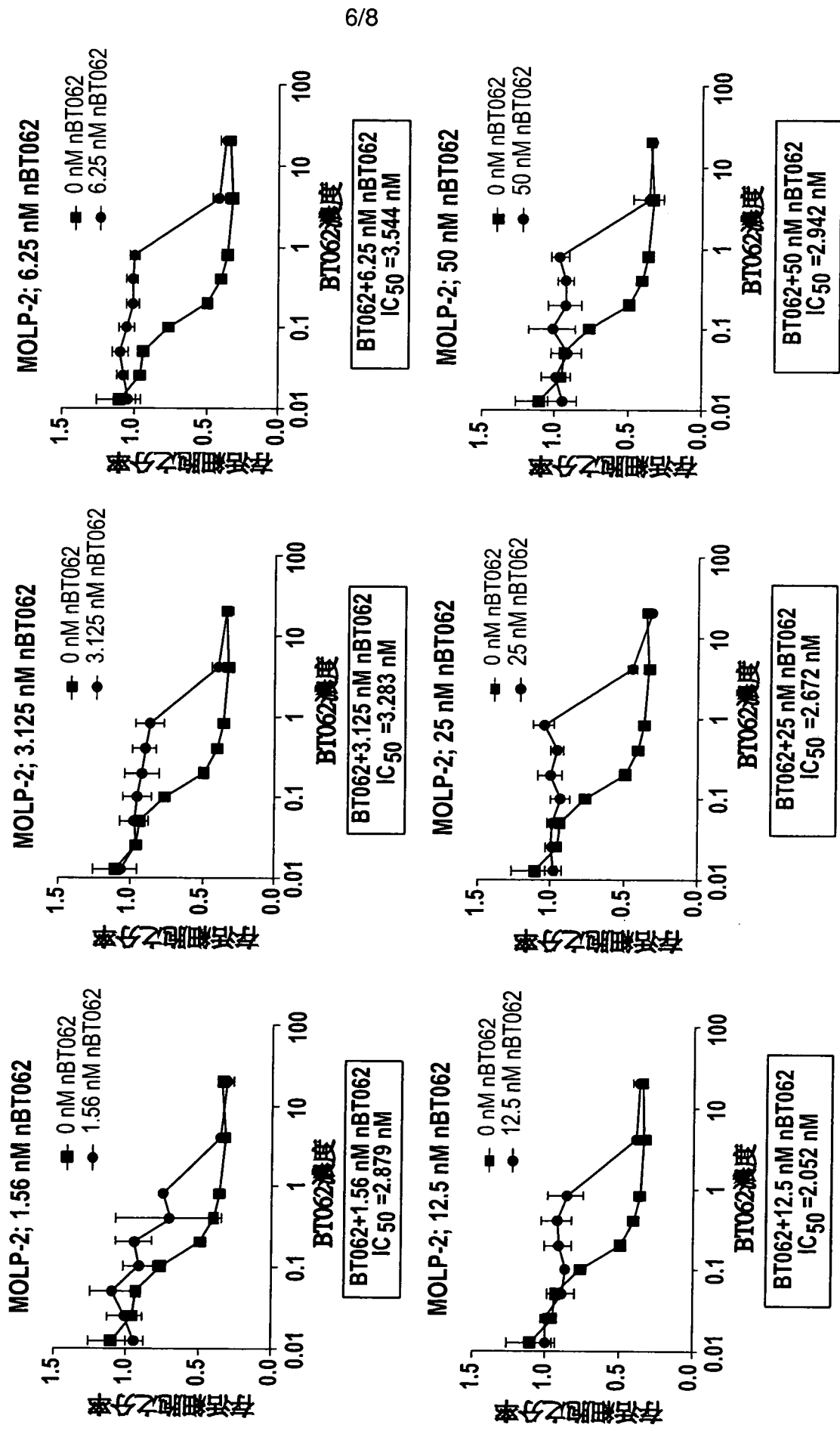
第3A圖

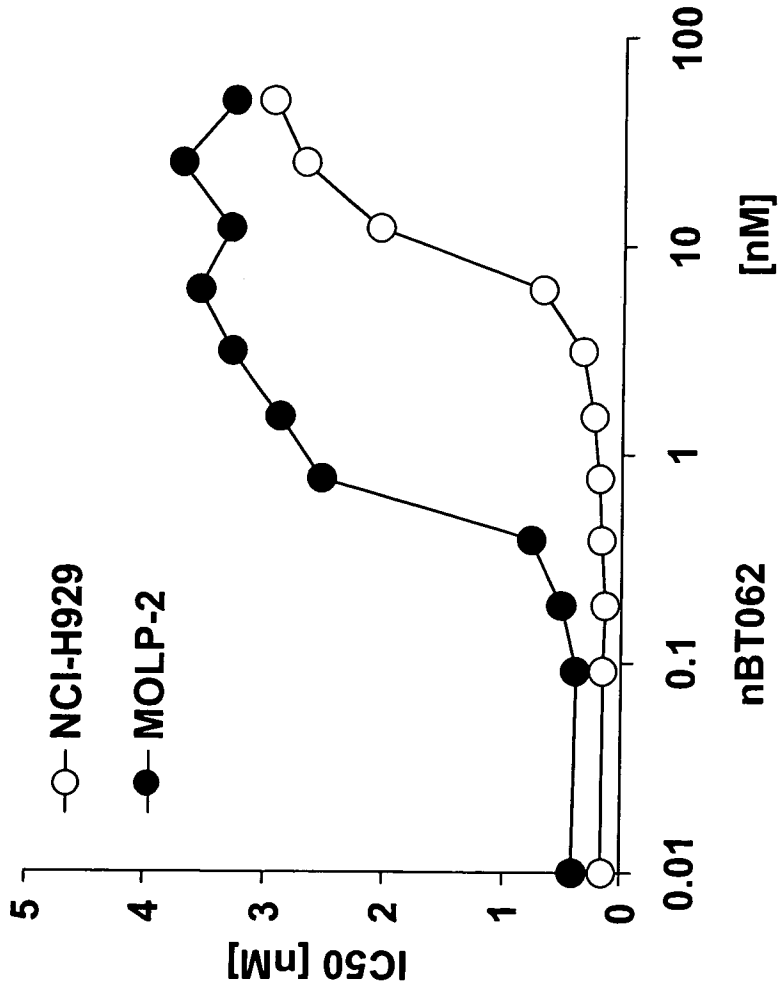
MOLP-2, CD138^低



第3B圖

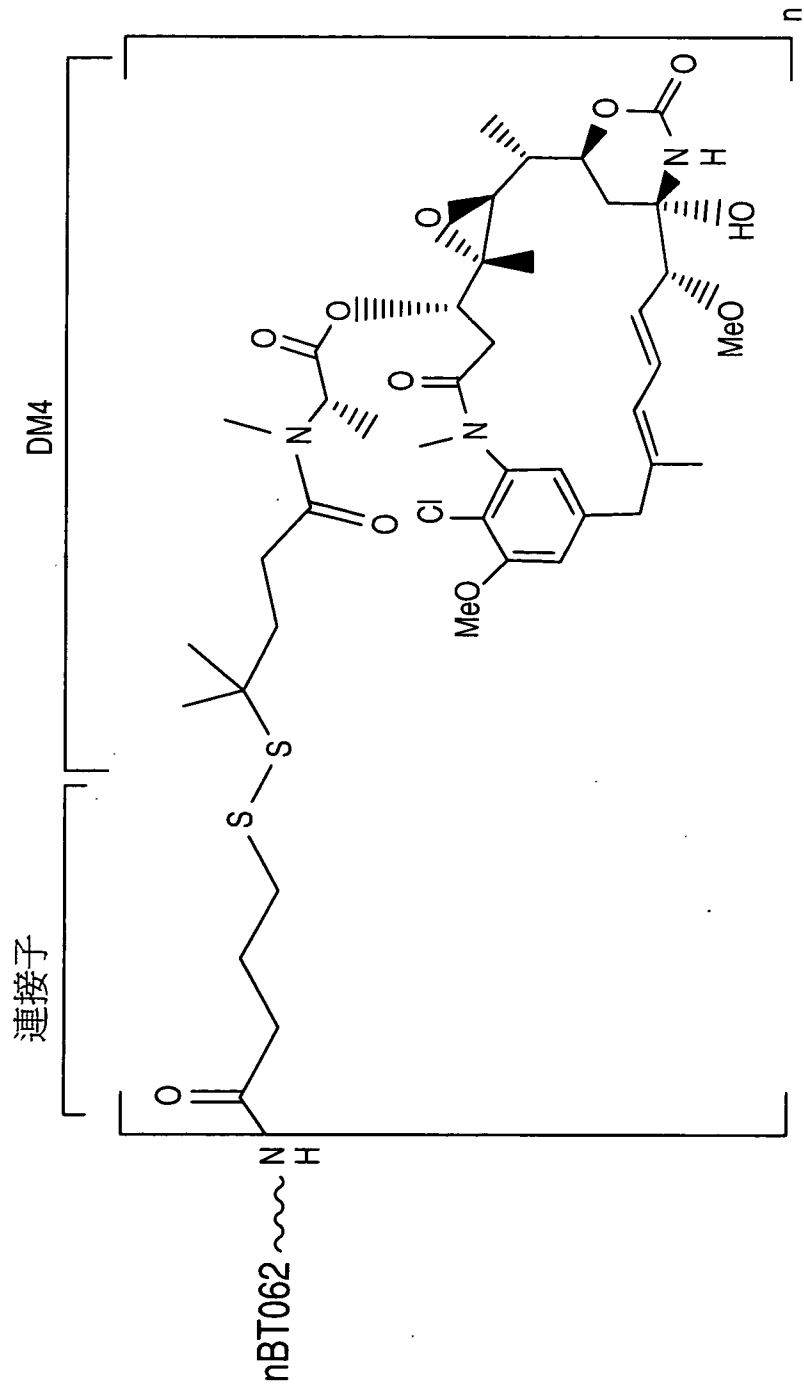
MOLP-2, CD138^低





nBT062預培育[μM]

第4圖



*n是每抗體分子連接約3.5個藥物

第5圖