(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 1764478 B
(45)授权公告日 2015.10.21

(21)申请号 200480007880.X
(22)申请日 2004.01.20
(30)优先权数据
60/442,125 2003.01.24 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2005.09.23
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2004/001367 2004.01.20
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2004/067038 EN 2004.08.12
(73)专利权人 免疫医疗公司
地址 美国新泽西州
(72)发明人 G·L·格里菲思斯
(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
代理人 李波 刘玥
(51)Int.Cl.
A61K 47/48(2006.01)

(56)对比文件
BarbaraA. 等..Preparation and functional evaluation of new doxorubicinimmunoconjugates containing an acid-sensitive linker onsmall-cell lung cancer cells..Cancer Immunol Immunother42.1996,4255-63.

审查员 黄轶洁

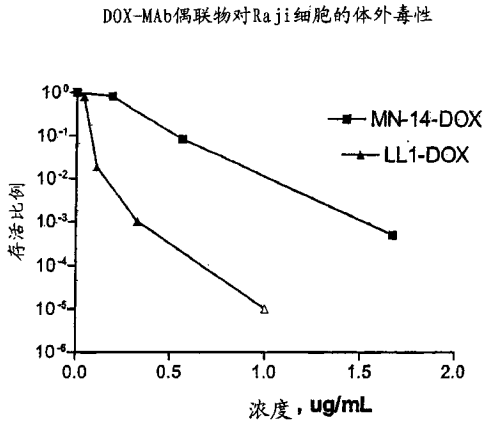
权利要求书2页 说明书18页 附图3页

(54)发明名称

蒽环霉素-抗体偶联物

(57)摘要

蒽环霉素-抗体偶联物。本发明涉及具有导向于各种抗原能力的治疗性偶联物。偶联物含有导向抗体或其抗原结合片段和蒽环霉素化疗药物。靶向抗体和蒽环霉素化疗药物通过包括酰肼部分的接头连接。



CN 1764478 B

1. 蒽环霉素药物和抗体的偶联物，其中所述蒽环霉素药物和所述抗体通过包含酰肼和马来酰亚胺的接头连接，并且所述抗体是针对 CD74 的内化抗体，并且其中所述抗体 - 蒽环霉素偶联物内化到靶细胞中，并且其中所述蒽环霉素药物选自柔红霉素，阿霉素，表柔比星，2- 吡咯啉阿霉素，吗啉代 - 阿霉素，和氰基吗啉代 - 阿霉素。

2. 权利要求 1 的偶联物，其中所述偶联物导向于乳腺癌、黑素瘤、B 细胞淋巴瘤、结肠癌或前列腺癌。

3. 权利要求 2 的偶联物，其中所述偶联物导向于 B 细胞淋巴瘤。

4. 权利要求 2 的偶联物，其中所述偶联物导向于黑素瘤。

5. 权利要求 1 的偶联物，其中所述抗体是 LL1。

6. 权利要求 1 的偶联物，其中所述接头连接抗体上的还原的二硫键。

7. 权利要求 1 的偶联物，其中所述蒽环霉素药物通过 13- 酮基部分与抗体连接。

8. 权利要求 6 的偶联物，其中所述还原的二硫键是抗体上的链间二硫键。

9. 权利要求 1 的偶联物，其中所述抗体是鼠抗体，嵌合抗体，灵长动物化抗体，人源化抗体，或人抗体。

10. 权利要求 9 的偶联物，其中所述抗体是 I gG 的片段。

11. 权利要求 1 的偶联物，其中每分子抗体有 6-10 个蒽环霉素药物分子。

12. 权利要求 1 的偶联物，其中抗体 - 蒽环霉素偶联物内化到靶细胞中，并且随后在细胞表面上表达抗原。

13. 权利要求 1 的偶联物，其中抗体总的电荷没有改变。

14. 权利要求 1 的偶联物，其中蒽环霉素药物带有烷基化部分。

15. 权利要求 14 的偶联物，其中烷基化部分是烯胺。

16. 权利要求 15 的偶联物，其中蒽环霉素药物是 2- 吡咯啉基 - 阿霉素。

17. 制备权利要求 1 的偶联物的方法，其中接头首先与蒽环霉素药物偶联，从而产生蒽环霉素药物 - 接头偶联物，并且其中所述蒽环霉素药物 - 接头偶联物接着偶联硫醇 - 还原的单克隆抗体或抗体片段。

18. 权利要求 17 的方法，其中在与硫醇 - 还原的单克隆抗体或抗体片段偶联之前不纯化蒽环霉素药物 - 接头偶联物。

19. 权利要求 17 的方法，其中蒽环霉素药物上第二个反应性官能不受破坏。

20. 权利要求 17 的方法，其中蒽环霉素药物上的烷基化基团不受破坏。

21. 权利要求 17 的方法，其中所述蒽环霉素药物是 2- 吡咯啉基 - 阿霉素，吗啉代 - 阿霉素，或氰基吗啉代 - 阿霉素。

22. 权利要求 1 的抗体和蒽环霉素药物的偶联物在制备用于治疗哺乳动物中的乳腺癌、黑素瘤、B 细胞淋巴瘤、结肠癌或前列腺癌的药物中的用途。

23. 权利要求 22 的用途，其中所述药物用于治疗 B 细胞淋巴瘤。

24. 权利要求 22 的用途，其中所述哺乳动物是人。

25. 权利要求 22 的用途，其中所述药物是静脉内，腹膜内，动脉内，鞘内，膀胱内或肿瘤内制剂。

26. 权利要求 22 的用途，其中所述药物是药团或输液制剂。

27. 权利要求 22 的用途，其中药物是用于反复和 / 或周期为基础的给药的制剂。

28. 权利要求 22 的用途，其中哺乳动物患有黑素瘤。

29. 权利要求 22-28 任一项的用途，其中所述药物与其他标准治疗法联合。

30. 权利要求 29 的用途，其中所述标准治疗法选自放射疗法，手术和化学疗法。

31. 权利要求 1 的偶联物，其中所述抗体是单克隆抗体。

32. 权利要求 1 的偶联物，其中所述抗体是抗体片段。

33. 权利要求 1 的偶联物，其中所述抗体是抗体融合蛋白。

34. 权利要求 33 的偶联物，其中所述抗体融合蛋白是多价的。

35. 一种在合适的容器中含有权利要求 1 的单克隆抗体和蒽环霉素药物的偶联物的试剂盒。

36. 权利要求 35 的试剂盒，其中在无菌容器中提供液体，冷冻或冻干形式的单克隆抗体 - 蒽环霉素药物偶联物。

37. 权利要求 36 的试剂盒，其中单克隆抗体 - 蒽环霉素药物偶联物被稀释或重新配制。

蒽环霉素 - 抗体偶联物

发明领域

[0001] 本发明涉及具有导向于各种抗原能力的治疗性偶联物 (conjugate)。所述偶联物包含导向部分和化学治疗药物。导向部分和化学治疗药物通过含有细胞内可裂解部分的接头连接。

[0002] 发明背景

[0003] 很多年来,能用于向人类癌症特异性送递化疗药物的抗体一直是特异性导向的药物治疗领域的科学家们的一个目标。这个目标的实现最终可以给癌症化学疗法带来魔力弹这个概念。朝着这个目标的显著进展随着 1975 年 Kohler 和 Milstein 的杂交瘤技术的出现,以及接之而来的制备单克隆抗体 (mAbs) 的能力而发展。在过去 25 年间,已经制备出抗癌细胞上过量表达的很多抗原靶的 mAbs。针对药物、毒素、放射性核素或其他治疗剂本身,或者它们的偶联物,已经临床前,并且随后临床上试验了很多 mAbs。一般情况下,mAbs 本身,经常称作“裸 mAbs”,对于患有实体肿瘤的患者以长期存活标准看还没有成功,虽然最近用抗乳腺和结肠癌的 mAb 治疗已经看到存活优势 (分别抗 HER2-neu 和 17-1A 的 mAbs)。对于血液恶性肿瘤,使用裸 mAbs,特别是抗 B- 细胞淋巴瘤 (抗 B- 细胞表面上 CD20 和 CD22 的 mAbs) 实现更大程度成功。

[0004] 然而,显然,使用肿瘤 - 相关 mAbs 和合适的毒性剂的偶联物比抗大多数临床癌症病例的裸 mAbs 更有效。这里,mAb 还载有对于病变组织是特异性的毒性剂,除了毒性之外,其本身固有 mAb 的 Fc 部分提供的天然或重组工程效应物功能,例如补体固定和 ADCC(抗体依赖细胞毒性),其设置作用机理导致细胞溶解作用。然而,有可能 Fc 部分对于治疗功能不是必需的,在 mAb 片段情况下,其他机理,例如细胞凋亡,抑制血管生成,抑制转移活性,和 / 或影响肿瘤细胞粘附,可能起作用。毒性剂最常是化疗药物,发射粒子的放射性核素,或者细菌或植物毒素。各种偶联物类型有着它自己特定优点。穿透性放射性核素和细菌和植物毒素是十分有毒的,其毒性通常比标准化疗药物高 几个数量级。这使得前两者可以与 mAbs 一起使用,因为在临床情形中,摄入到疾病组织中的 mAbs 量非常低。临床实践中低的 mAb 肿瘤摄入和癌症化疗药物相对低毒性谱的联合,是为什么 mAb- 药物偶联物迄今为止不能做到承诺的主要原因。

[0005] 在为研究人癌症而建立的临床前动物异种移植模型中,描述过能竞争性消退甚至治愈动物肿瘤的很多 mAb 偶联物。然而,在很多这样的动物异种移植模型中,肿瘤摄入 mAb 偶联物经常是每克组织 10-50％注射剂量,而在临床情形下,每克组织肿瘤摄入 0.1-0.0001％注射剂量更正常。意料之中的是用更具有毒性的放射性核素和毒素制备的 mAb 偶联物临床上一般比用标准化疗药物制备的相应的 mAb- 药物偶联物远远要好。然而,放射性核素 mAb 偶联物由于与肿瘤定位活性相比大大过量的循环的衰变的放射性的存在经常能产生大的毒性。毒素 -mAb 偶联物有着双重缺点 :大的非靶组织损伤和大的对一般使用的植物或细菌蛋白质的免疫反应性。而现在能制备人或人源化形式的 (互补决定区移植的)mAbs,任何偶联物的毒性部分的去免疫作用可能显著阻碍进步。

[0006] 虽然目前可看到临床研究中没有必然的效力,但是 mAb- 药物偶联物仍然具有令

人感兴趣的理论优点。药物本身结构是完全确定的，不以异构体存在，并且通常在远离mAbs的抗原结合区的特定位点的非常确定的偶联化学，可以与mAb蛋白连接。与涉及Abs和毒素的化学偶联物相比，MAb-药物偶联物制备更具有可重复性，因此更有商业发展前途并且容易获得管理批准。因为这样的原因，尽管碰到挫折，但是对mAb药物偶联物的兴趣持续不断。但是，在最近的一些情况下，临床前结果已经相当有希望。在偶联化学中继续精益求精，最新考虑了去除或减少mAb的免疫原性质的能力，考虑到有用的mAb-药物偶联物对于临床癌症治疗的难以捉摸的前景。

[0007] 对mAb-药物偶联物的相关早期工作发现，在使用化学键的体外和体内临床前试验期间经常导致药物效力的损失。因此，很多年以前就认识到，理想地，一旦通过mAb成分被靶细胞内化，为了成为有用的治疗，药物需要以它原来的形式释放。然后上世纪八十年代和九十年代早期焦点大都集中在药物和mAb之间化学接头的性质上。尤其是，根据肿瘤中的pH经常低于正常生理pH的发现，开发了使用温和的 酸可裂解的接头制备的偶联物（美国专利Nos.4,542,225；4,569,789；4,618,492；和4,952,394）。这项研究在Trail等的划时代文章中达到顶峰（Science 261：212-215(1993)），这篇文章证明，临床前研究中，用合适的接头制备的mAb-阿霉素（DOX）偶联体能用来治愈携带各种人肿瘤异种移植物的小鼠。使用在被导向的肿瘤细胞上有非常大量的受体的抗体（称作BR96）实现这个有希望的结果，mAb-药物偶联物被高度取代（每个mAb单位6-8个DOX残基），以反复为基础，以大剂量施用偶联物。

[0008] 在临床情形中，肿瘤对mAbs的摄入非常低，因为这个变量在某种程度上是寻址的更有毒性的药物，需要实现期望的治疗效果。在几种不同的mAb-药物偶联物的开发中使用更有毒性的药物（美国专利Nos.5,208,020；5,416,064；5,877,296；和6,015,562）。这些努力使用药物，例如maytansinoids和calicheamicin的衍生物，它们本质上太有毒性不能在标准化疗中使用。与mAb的偶联使得相对于单独化疗可见到的经常是非特异性的细胞和蛋白质结合，相对更多的药物被导向于肿瘤。由于肿瘤靶上通常可见的低水平抗原结合位点，象这些的药物的敏锐毒性可能会克服临床上见到的肿瘤－定向的mAb的低水平。在临床前研究中，在比先前用标准药物例如DOX，用mAb-药物偶联物见到的相比低得多的mAb-药物偶联物剂量，见到携带人肿瘤异种移植物的小鼠的治愈（Liu等，Proc.Natl.Acad.Sci.USA93：8616-8623(1996)和Hinman等，Cancer Res.53：3336-3342(1993)）。在maytansinoid-mAb偶联物情况下（Liu），治疗所需要的偶联物的量比以前用DOX偶联物（Trail，上文）需要的少50倍以上。

[0009] 在这些偶联物的开发中，认为药物和mAb之间的接头对于体外和体内保留好的抗肿瘤活性是决定性的。用分子内可裂解部分（腙）和药物和mAb之间的易发生还原的键（二硫键）制备所述偶联物。体内血清条件下腙键显然是稳定的，发现二硫键对于实际使用通常不足够稳定。在calicheamicins情况下，以位阻大的（成对二甲基）二硫键置换标准二硫键而制备偶联物，或者在maytansinoids情况下用甲基二硫键置换标准二硫键而制备偶联物。进行这项工作时，对较新的蒽环霉素－取代的mAb偶联物继续分离工作。在较新的DOX偶联mAbs情况下，发现通过仅插入腙作为可裂解单元，并且通过硫醚键而不是 二硫键连接DOX和mAb，获得卓越结果（美国专利No.5,708,146）。当以相同的方式连接时，还使用能使每个Mab取代位点DOX单元数目加倍的支化接头，获得新的DOX-Mab偶联物效力

增加近一个数量级 (King 等，Bioconjugate Chem. 10 :279-288，(1999))。

[0010] 发明概述

[0011] 本发明涉及蒽环霉素药物的新的内化抗体偶联物。具体实施方案举例来说是阿霉素 (DOX)，表柔比星，吗啉代阿霉素（吗啉代 -DOX)，氰基吗啉代 - 阿霉素（氰基吗啉代 -DOX)，和 2- 吡咯啉基 (pyrrolino)- 阿霉素 (2-PDOX) 的偶联物。2-PDOX 是特别有毒的，其结构中插入烯胺，其不仅作为嵌入剂和拓扑异构酶起作用，而且还作为具有增加的毒性的烷化剂。和 DOX 一样，2-PDOX 具有相对好的水溶性，这意味着其能以多取代量偶联 mAbs 而不沉淀 mAb。下面详细描述的药物始终以每 mAb 分子 8 个药物部分的平均水平（典型地测得 7-9) 被取代。但是药物的数目也可以是每 mAb 分子 6-10 个分子之间的范围。

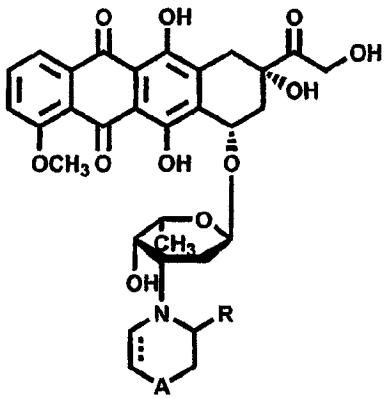
[0012] 一方面，本发明涉及一种免疫偶联物，包括导向部分，蒽环霉素药物，和通过巯基结合导向部分并且通过分子内可裂解部分结合蒽环霉素化疗药物的接头。

[0013] 在本发明优选的实施方案中，导向部分是 mAb，蒽环霉素化疗药物是 DOX，2-PDOX，吗啉代 -DOX 和吗啉代氰基 -DOX，并且分子内可裂解部分是腙。

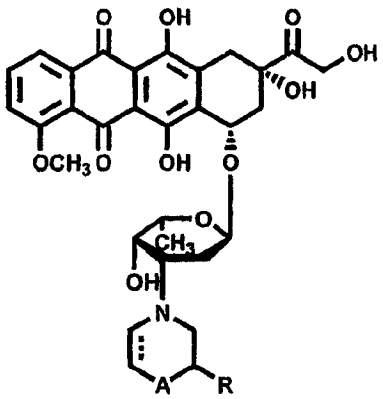
[0014] 另一方面，本发明涉及一种免疫偶联物，包括导向于疾病的抗体和蒽环霉素化疗药物。近 30-40 年左右已经合成几百种蒽环霉素药物例子，在别处对它们进行了详细讨论（参见 :AnthracyclineAntibiotics ;New Analogs, methods of Delivery, and Mechanismsof Action, Waldemar Priebe, Editor, ACS Symposium Series 574, American Chemical Society, Washington DC, 1994)。认为这样的类似物在本发明的范围内。

[0015] 在优选的实施方案中，本发明涉及一种免疫偶联物，包括导向于疾病的抗体和式 I 和 II 的蒽环霉素化疗药物 :

[0016]



(I)



(II)

[0017] 其中，A 不存在或者其可以选自 NH，N- 烷基，N- 环烷基，O，S，和 CH_2 ;虚线表示单键或双键 ;并且 R 是 H 或 CN ;接头通过硫化物基团结合导向部分，而通过分子内可裂解部分结合蒽环霉素化疗药物。当 A “不存在”时，通过单键连接每一侧与 A 邻接的碳原子，这样得到五元环。

[0018] 如这里使用的，“烷基”指饱和脂肪烃基，包括 1-20 碳原子的直链和支链基团当本文中提到数字范围，如“1-20”，意思是在这种情况下烷基可以含有 1 个碳原子，2 个碳原子，3 个碳原子，等，至多包括 20 个碳原子）。含有 1-4 个碳原子的烷基称作低级烷基。更优选地，烷基是具有 1-10 个碳原子的中等大小烷基，例如，甲基，乙基，丙基，2- 丙基，正丁基，异丁基，叔丁基，戊基等等。最优选地，它是具有 1-4 个碳原子的低级烷基，例如甲基，乙基，丙

基，2- 丙基，正丁基，异丁基，或叔丁基，等等。

[0019] 如这里使用的，“环烷基”指 3-8 元全碳单环，全碳 5- 元 /6- 元或 6- 元 /6- 元稠合双环或多环稠合环（“稠合”环体系意思是体系中的每一个环与体系中另外一个环共有相邻的碳原子对）基团，其中环中的一个或多个可以含有一个或几个双键，但是所有环都没有完全偶联的 pi- 电子体系。环烷基的例子不限于环丙烷，环丁烷，环戊烷，环戊烯，环己烷，环己二烯，金刚烷，环庚烷，环庚三烯等等。环烷基可以被取代或不被取代。

[0020] 在另一个优选实施方案中，分子内可裂解部分是腙。

[0021] 在优选实施方案中，mAb 是导向于肿瘤 - 相关抗原的 mAb。肿瘤 - 相关抗原定义为以比正常细胞中更高的量由肿瘤细胞或者它们的脉管 系统表达的抗原，其中正常细胞对于患者生存所必需的细胞功能是重要的。肿瘤 - 相关抗原也可以是与不同正常细胞相关的抗原，例如造血细胞，B- 细胞，T- 细胞或骨髓细胞中的谱系抗原，从而患者能生存，伴有所述正常细胞暂时的选择性减少，而表达相同抗原的恶性细胞被足够破坏，以减轻患者症状并且还改善患者状况。mAb 还可以与血液恶性肿瘤相关的抗原反应。

[0022] 在另一个实施方案中，mAb 选自 B- 细胞，T- 细胞，骨髓 - 细胞，和其他造血细胞 - 相关抗原，例如 B- 细胞中的 CD19，CD20，CD21，CD22，CD23 ；骨髓细胞中的 CD33，CD45，和 CD66 ；T- 细胞中的 IL-2(TAC 或 CD25) ；不同造血肿瘤类型中的 MUC1，肌腱蛋白，CD74，HLA-DR，CD80 ；各种癌中的 CEA，CSAp，MUC1，MUC2，MUC 3，MUC4，PAM4，EGP-1，EGP-2，AFP，HCG，HER2/neu，EGFR，VEGF，P1GF，Le(y)，碳酸酐酶 IX，PAP，PSMA，MAGE，S100，肌腱蛋白，和 TAG-72，神经胶质瘤中的肌腱蛋白，和脉管系统和内皮细胞，以及一些肿瘤的支持性基质表达的抗原。

[0023] 在另一个优选的实施方案中，mAb 选自 LL1（抗 -CD74），LL2（抗 -CD22），hA20 和利妥希玛（抗 -CD20），M195（抗 -CD33），RS7（抗 - 上皮糖蛋白 -1(EGP-1)），17-1A（抗 -EGP-2），PAM-4，BrE3，和 KC4（都是抗 -MUC1），MN-14（抗 - 癌胚抗原 (CEA)），Mu-9（抗 - 结肠 - 特异性抗原 -p），Immu 31（抗甲胎蛋白），抗 -TAG-72（例如，CC49），抗 -Tn，J591（抗 -PSMA），BC-2（抗 - 肌腱蛋白抗体）和 G250（抗 - 碳酸酐酶 IXmAb）。使用这些偶联物可以定向的其他有用的抗原包括 HER-2/neu，CD19，CD20（例如，C2B8，hA20，cA20，1F5Mabs）CD21，CD23，CD33，CD40，CD80，甲胎蛋白 (AFP)，VEGF，EGF 受体，P1GF（胎盘生长因子），ILGF-1（胰岛素样生长因子 -1），MUC1，MUC2，MUC3，MUC4，PSMA，神经节苷脂，HCG，EGP-2（例如，17-1A），CD37，HLA-DR，CD30，Ia，Ii，A3，A33，Ep-CAM，KS-1，Le(y)，S100，PSA，肌腱蛋白，叶酸受体，Thomas-Friedenreich 抗原，肿瘤坏死抗原，肿瘤血管生成抗原，Ga 733，IL-2(CD25)，T101，MAGE，CD66，CEA，NCA95，NCA90 或其组合。

[0024] 在特别优选的实施方案中，导向性 mAb 针对随后被抗体快速内化的表面抗原。

[0025] 在特别优选的实施方案中，导向性 mAb 针对 CD74 的表面抗原。

[0026] 在另一个优选的实施方案中，接头是 4-[N- 马来酰亚胺基甲基] 环庚烷 -1- 羧酰肼基。

[0027] 本发明还描述了制备本发明的组合物的方法，以及所述组合物的使用方法。

[0028] 附图的简要描述

[0029] 图 1 是利用描述的方法制备的蒽环霉素 - 抗体偶联物的代表性大小排阻 HPLC 谱图。

[0030] 图 2 详细描述 1 微克 / 毫升药物 -mAb 偶联物浓度的抗 Burkitt 淋巴瘤 Raji 细胞

的 DOX-LL1 偶联物与非导向性 MN-14 抗体的 DOX 偶联物相比的体外效力。DOX-LL1 偶联物与 DOX-MN-14 偶联物相比，表现出存活细胞级分中三个数量级的差异。

[0031] 图 3 详细说明裸鼠 DU145 前列腺异种移植物模型中单一 100 微克剂量的 2-PDOX-RS7 偶联物的效力。

[0032] 图 4 详细说明侵袭性 RAJI/SCID 小鼠全身肿瘤模型中单一剂量的 LL1 抗体的 2-PDOX- 和 DOX- 偶联物的效力。对动物 i.v. 注射 Raji B- 细胞淋巴瘤细胞，并且五天后用图中指定的偶联物治疗。

[0033] 图 5 详细说明侵袭性 RAJI/SCID 小鼠全身肿瘤模型中单一剂量的 2-PDOX-LL1 抗体与不施用偶联物的未处理对照或者给与非导向性对照偶联物 2-PDOX-MN-14 的动物组相比的效力。

[0034] 优选实施方案的详细描述

[0035] 除非另有说明，如这里使用的，“一个”意思是“一个或多个”。

[0036] 导论

[0037] 化疗药物，例如上面讨论的那些，能通过几种方法与抗体偶联，形成 mAb- 药物偶联物。例如，化疗药物可以在还原 mAb 链间二硫键之后与 mAb，或其片段连接。这种方法产生每个抗体分子平均 8-10 个（取决于 IgG 类型）游离巯基，并且以在还原反应中使用的硫醇的有限水平以可重复方式这样做。这种化疗药物的连接方法是有利的，由于下面的原因：首先，在亲水性赖氨酸残基上没有暴露的 mAb 或其片段上内部或半内部位点中放置连接的化疗药物。由于 mAb 的放置了化疗药物的更多的疏水性区域而使它们保持更稳定。第二，这样的位点不改变 mAb 或其片段的总电荷。第三，当使用 mAb 裸形式时，内部硫醇的放置较不可能干扰特别重要的 ADCC 和补体作用。因此，选择不 干扰的连接位点，使得 ADCC 和补体固定，能与 mAbs，或 mAb 片段互补，起药物送递载体作用。第四，与暴露的赖氨酸基团上放置多个化疗药物分子相比，内部硫醇位置的放置较不可能导致对化疗药物的免疫反应。在一些实施方案中，与偶联前抗体电荷相比，Ab- 药物偶联物中抗体的总电荷不改变。这是因为在偶联反应中没有利用赖氨酸残基，因此，没有游离的带正电荷的氨基被修饰形成例如中性酰胺键。

[0038] 抗体

[0039] 如这里描述的，抗体指全长（即，天然存在的或者正常免疫球蛋白基因片段重组方法形成的）免疫球蛋白分子（例如，IgG 抗体）或免疫球蛋白分子的免疫活性（即，特异性结合）部分，象抗体片段。

[0040] 抗体片段是抗体的一部分，例如 $F(ab')_2$，$F(ab)_2$，Fab′，Fab，Fv，scFv（单链 Fv）等。不考虑结构，抗体片段结合完整抗体识别的相同的抗原，因此，它是抗体的一部分的抗原结合片段。

[0041] 术语“抗体片段”还包括通过与特异抗原结合形成复合体的象抗体一样作用的任何合成的或基因工程蛋白质。例如，抗体片段包括可变区构成的分离的片段，例如由重链和轻链可变区构成的“Fy”片段，其中重链和轻链可变区通过肽接头连接的重组单链多肽分子（“scFv 蛋白质”），和由模拟超变区的氨基酸残基构成的最小识别单位。可以以不同方法构建 Fv 片段，得到多价和 / 或多特异性结合形式。多价结合形式与抗特异性表位的一个以上结合位点反应，而多特异形式与一个以上表位（抗原的或甚至抗特异性抗原和不同抗

原）结合。

[0042] 根据这里讨论的，术语抗体融合蛋白是重组产生的抗原－结合分子，其中具有相同或不同特异性的相同或不同天然抗体，单链抗体或抗体片段中的两个或多个被连接。融合蛋白至少包括一个特异性结合位点。

[0043] 融合蛋白的价指融合蛋白具有抗原或表位结合臂或位点的总数；即单价，二价，三价或多价。抗体融合蛋白的多价意思是它利用了与抗原结合中多个相互作用的优点，从而提高了与抗原结合或与不同抗原结合的亲合力。特异性指抗体融合蛋白能结合多少不同类型的抗原或表位；即单特异性，二特异性，三特异性或多特异性。使用这些定义，天然抗体，例如 IgG，是二价的，因为它具有两个结合臂，但是是单特异性的，因为它结合一种类型的抗原或表位。单特异性多价融 合蛋白对于相同的抗原或表位有一个以上结合位点。例如，单特异性二价抗体是具有与相同抗原反应的两个结合位点的融合蛋白。融合蛋白可以包括不同抗体成分或相同抗体成分的多个拷贝的多价或多特异性组合。

[0044] 在本发明优选的实施方案中，使用抗体，例如单克隆抗体 (mAbs)，和快速内化抗体，以识别或结合在靶细胞是高水平表达的并且相对于正常组织优先或只在病变细胞上表达的标记物或肿瘤相关抗原。本发明范围内有用的抗体包括抗肿瘤相关抗原的抗体，例如具有如上所述性质的抗体（并且表现出内化进入细胞和微生物的水平的不同性质），对癌症包括但不限于使用下面的 mAb：LL1（抗 -CD74），LL2（抗 -CD22），M195（抗 -CD33），MN3（抗 -NCA90），RS7（抗－上皮糖蛋白 -1(EGP-1)），PAM-4，BrE3 和 KC4（都是抗 -MUC1），MN-14（抗－癌胚胎抗原 (CEA)），Mu-9（抗－结肠－特异性抗原 -p），Immu 31（抗甲胎蛋白），抗 -TAG-72（例如，CC49），抗 -Tn，J591（抗 -PSMA），M195（抗 -CD33）和 G250（抗－碳酸酐酶 IX mAb）。使用这些偶联物可以导向的其他有用抗原和这样的抗原的不同表位包括 HER-2/neu，，CD19，CD20（例如，C2B8，hA20，1F5Mabs）CD21，CD23，CD25，CD30，CD33，CD37，CD40，CD74，CD80，甲胎蛋白 (AFP)，VEGF，EGF 受体，P1GF，MUC1，MUC2，MUC3，MUC4，PSMA，PAP，碳酸酐酶 IX，TAG-72，GD2，GD3，，HCG，EGP-2（例如，17-1A），HLA-DR，CD30，Ia，A3，A33，Ep-CAM，KS-1，Le(y)，S100，PSA，肌腱蛋白，叶酸受体，Tn 或 Thomas-Friedenreich 抗原，肿瘤坏死抗原，肿瘤血管生成抗原，Ga733，，T101，MAGE，或者它们的组合。2002 年 11 月 15 日申请的发明名称是“定向送递治疗药物的多特异性多价复合体的应用”的美国临时申请登记号 No.60/426379 中公开了多种上述抗原。

[0045] 在本发明另一个优选的实施方案中，使用快速内化的抗体，然后在细胞表面上再表达，使得细胞持续吸收和增加循环抗体－化疗药物偶联物。在优选实施方案中，所述药物是蒽环霉素，并且抗体－蒽环霉素偶联物内化于靶细胞中，然后在细胞表面上再表达。最优选的抗体 / 抗原对的例子是 LL1 和 CD74（不变链，II 类特异性陪伴分子，Ii）。CD74 抗原在 B 细胞淋巴瘤，某些 T 细胞淋巴瘤，黑素瘤和一些其他癌上高度表达 (Ong 等，Immunology 98：296-302(1999))。

[0046] 在优选实施方案中，在人疾病的治疗中使用的抗体是人或人源化 (CDR- 移植到人构架中）抗体形式；但是能使用鼠，嵌合和灵长动物化抗体形式。对于兽医应用，相同物种 IgG 可能是最有效的载体，但是交叉物种 IgGs 也是有用的，例如对狗使用鼠抗体（例如，L243 抗 -HLA-DR mAb 用于治疗犬淋巴瘤）。最优选使用相同物种免疫球蛋白 (IgG) 分子作为送递试剂，使免疫反应最小化。当考虑反复治疗时，这是特别重要的。对于人，人 IgG 抗

体或人源化 IgG 抗体较不可能产生患者的抗 -IgG 免疫应答。导向于内化抗原，在与靶细胞结合之后，象 hLL1 和 hLL2 这样的抗体快速内化，这意味着偶联的化疗药物快速内化于细胞中。

[0047] 免疫调节剂，例如细胞因子，也能偶联于单克隆抗体 - 蒽环霉素药物，或者能施用与本发明的优选实施方案的嵌合，人源化或人单克隆抗体 - 蒽环霉素药物偶联物不偶联的免疫调节剂。可以在施用本发明的优选实施方案的单克隆抗体 - 蒽环霉素药物偶联物之前，同时或之后施用免疫调节剂。免疫调节剂还可以和由与不同抗原结合的一个或多个抗体构成的杂合抗体偶联。这样的抗原也可以是免疫调节剂。例如，在施用抗体组合的同时，之前或之后，CD40 或其他免疫调节剂可以和抗 -CSAp 或抗 -CSAp/ 非 -CSAp 抗体联合给药。单克隆抗体 - 蒽环霉素偶联物可以与抗 CD40 联合，或者与抗 CD40 偶联成融合蛋白来使用。

[0048] 如这里使用的，术语“免疫调节剂”包括细胞因子，干细胞生长因子，淋巴毒素，例如肿瘤坏死因子 (TNF)，和造血因子，例如白介素 (例如，白介素 -1(IL-1)，IL-2，IL-3，IL-6，IL-10，IL-12，IL-18，和 IL-21)，集落刺激因子 (例如，巨噬细胞集落刺激因子 (G-CSF) 和粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF))，干扰素 (例如，干扰素 - α，β 和 γ)，指定为“S1 因子”的干细胞生长因子，红细胞生成素和血小板生成素。合适的免疫调节剂部分的例子包括 IL-2，IL-6，IL-10，IL-12，IL-18，IL-21，干扰素 - γ，TNF- α，等。

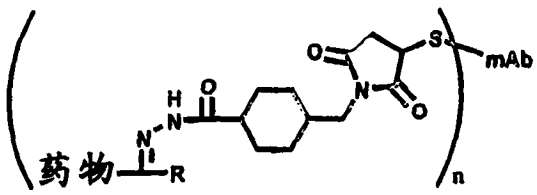
[0049] 免疫调节剂是根据本发明定义的治疗剂，当存在时，它改变，抑制或刺激身体的免疫系统。典型地，本发明中有用的免疫调节剂刺激免疫细胞增殖或者在免疫应答级联中激活，例如巨噬细胞，B- 细胞，和 / 或 T- 细胞。这里描述的免疫调节剂的例子是细胞因子，其是与特 异性抗原接触时一个细胞群 (例如激发的 T- 淋巴细胞) 释放的大约 5-20kD 的可溶性小蛋白，它作为细胞之间细胞间介质起作用。本领域技术人员理解，细胞因子的例子包括淋巴因子，单核因子，白介素，和几种相关的信号传递分子，例如肿瘤坏死因子 (TNF) 和干扰素。趋化因子是一组细胞因子。一些白介素和干扰素是刺激 T 细胞或其他免疫细胞增殖的细胞因子的例子。

[0050] 在本发明优选的实施方案中，免疫调节剂提高蒽环霉素药物 - 抗体偶联物的效力，并且在某些情况下是通过宿主的刺激物效应细胞。

[0051] 抗体 -化疗药物偶联物

[0052] 本发明涉及蒽环霉素药物和抗体的偶联物，其中蒽环霉素药物和抗体通过包括酰肼和马来酰亚胺的接头连接。接头优选是 4-(N- 马来酰亚胺基甲基) 环己烷 -1- 羧酰肼。偶联物优选具有下式 :

[0053]



[0054] 其中 n 是 6 至 10。

[0055] 此外，抗体针对或识别肿瘤相关抗原。抗体可以是单克隆抗体，其抗原 - 结合片段或者抗体融合蛋白。抗体融合蛋白可以是多价和 / 或多特异性的。偶联物中的抗体融合蛋白可以包括两个或多个相同或不同的天然的或合成的抗体，单链抗体或具有相同或不同特

异性的抗体片段。融合蛋白的抗体或抗体片段选自 LL1,LL2,M195,MN-3,RS7,17-1A,RS11,PAM-4,KC4,BrE3,MN-14,Mu-9,Immu31,CC49,Tn 抗体,J591,Le(y) 抗体和 G250。

[0056] 通过抗体内化可以导向于这种肿瘤相关抗原。偶联物用于导向于癌,肉瘤,淋巴瘤,白血病,神经胶质瘤或皮肤癌,例如黑素瘤。肿瘤相关抗原优选选自 CD74,CD22,EGP-1,CEA,结肠 - 特异性抗原 -p 粘蛋白 (CSAp),碳酸酐酶 IX,HER-21neu,,CD19,CD20,CD21,CD23,CD25,CD30,CD33,CD40,CD45,CD66,NCA90,NCA95,CD80,甲胎蛋白 (AFP),VEGF,EGF 受体,P1GF,MUC1,MUC2,MUC3,MUC4,PSMA, GD2,GD3 神经节苷脂,HCG,EGP-2,CD37,HLA-D-DR,CD30,Ia,Ii,A3,A33,Ep-CAM,KS-1,Le(y),S100,PSA,肌腱蛋白,叶酸受体,Tn 和 Thomas-Friedenreich 抗原,肿瘤坏死抗原,肿瘤血管生成抗原,Ga 733,IL-2,MAGE,和它们的组合。更优选地,肿瘤相关抗原选自 CD74,CD19,CD20,CD22,CD33,EGP-1,MUC1,CEA 和 AFP。这些肿瘤相关抗原可以是 B- 细胞,T- 细胞,骨髓细胞的谱系抗原 (CDs),或与血液恶性肿瘤相关的抗原。

[0057] 偶联物的抗体部分可以是鼠,嵌合,灵长动物化的,人源化,或人抗体部分。抗体可以是完整免疫球蛋白或者其抗原 - 结合片段,例如 IgG 或者其片段。优选地,抗体针对 B- 细胞,例如选自 CD19,CD20,CD21,CD22,CD23,CD30,CD37,CD40,CD52,CD74,CD80,和 HLA-DR 的抗原。抗体,其抗原 - 结合片段或融合蛋白优选选自 LL1,LL2,L243,C2B8,A20,MN-3,M195,MN-14,抗 -AFP,Mu-9,PAM-4,RS7,RS11 和 17-1A。更优选地,抗体是 LL1,LL2,L243,C2B8,或 hA20。另外,抗体通过与抗体上还原的二硫键连接的接头与药物连接,其可以是抗体上的链间二硫键。

[0058] 偶联物的蒽环霉素药物部分选自柔红霉素,阿霉素,表柔比星,2- 吡咯啉基阿霉素,吗啉代 - 阿霉素,和氰基吗啉代 - 阿霉素。此外,蒽环霉素药物可通过 13- 酮基部分与抗体连接。优选地,每分子抗体有 6-10 个分子的蒽环霉素药物。另外,抗体 - 蒽环霉素偶联物内化到靶细胞中,然后抗原在细胞表面上再表达。

[0059] 本发明涉及这里描述的偶联物的制备方法,其中接头首先与蒽环霉素药物偶联,从而产生蒽环霉素药物 - 接头偶联物,并且其中蒽环霉素药物 - 接头偶联物接着偶联硫醇还原的单克隆抗体或抗体片段。与硫醇还原的单克隆抗体或抗体片段偶联之前可以将蒽环霉素药物 - 接头偶联物纯化,但是不必须这样做。因此,优选地,在与硫醇还原的单克隆抗体或抗体片段偶联之前不需要纯化蒽环霉素药物 - 接头偶联物。偶联物的制备方法应该如此,使得蒽环霉素药物上第二反应官能团不被破坏。另外,偶联物的制备方法不应该破坏蒽环霉素药物上的烷基化基团。偶联物中的蒽环霉素药物优选是 2- 吡咯啉基 - 阿霉素,吗啉代 - 阿霉素或氰基吗啉代 - 阿霉素。

[0060] 为了与抗体偶联,分别将化疗药物分子活化,使得它们包含在中 性 pH 下对硫醇反应特异性的游离马来酰亚胺基团。当化疗药物带有反应性酮时,利用可商购的接头 4-(N- 马来酰亚胺基甲基) 环己烷 -1- 羧酰肼 (M2C2H ;Pierce Chemical Co.,Rockford,IL)[MolecularBiosciences,Inc.,Boulder,CO 也提供其三氟乙酸盐] 能将酮转化为腙,如下文方案 I 所示。

[0061] 在方案 I 中,药物是化疗药物,优选蒽环霉素药物,并且 R 基团是氢原子或任选地被羟基 (-OH) 取代的 C_1-C_6烷基。

[0062]

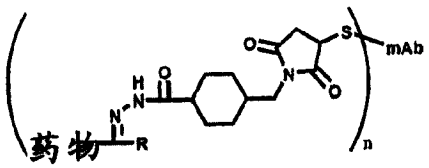


[0063] 方案 1

[0064] 不受理论约束，认为接头 M_2C_2H 在本发明优选实施方案中是特别有用的基团，有两个原因。第一，认为接头中的环己基稳定腙官能团。重要的是使用的腙键对于血清条件基本上是稳定的，并且环己基邻近形成的腙，导致与更标准的直链烷基相比更稳定的腙。第二，一旦化疗药物 -mAb 偶联物内化到细胞中，则酮与这种羧酰肼反应产生的腙被裂解。

[0065] 对于还原的 mAb 上可获得的巯基稍微过量（1-5 倍摩尔）的马来酰亚胺 - 取代的化疗药物在水溶液中与还原的 mAb 混合。在中性，接近中性或低于中性 pH 下进行反应，优选大约 pH4 至大约 pH7。让成分进行大约 5 至大约 30 分钟短时间的反应。然而，本领域技术人员明白，就反应时间和 pH 来说可以优化反应条件。下面方案所示的化疗药物 -mAb 偶联物（其中 n 是 1-10 的整数，优选 1-8），然后通过大小排阻色谱法和疏水性相互作用色谱柱从化疗药物和其他缓冲成分分离。在优选的实施方案中，药物是蒽环霉素并且 n 是 6-10 的整数。

[0066]

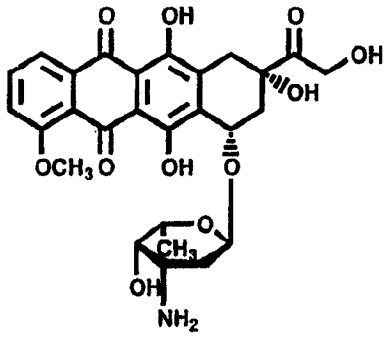


[0067] 化疗药物 -mAb 偶联物

[0068] 上面的条件对于 2-PDOX 是最优的。反应条件要最优，因为这保证只有 mAb 的自由产生的硫醇基团与马来酰亚胺活化的药物反应，而反应条件对 2-PDOX 的烯胺不起作用。令人惊奇的是硫醇 - 马来酰亚胺偶联能在可烷基化的基团的存在下进行，例如烯胺基团。

[0069] 在本发明优选的实施方案中，使用的化疗药物是蒽环霉素药物。这些药物包括原来这组成员之一，阿霉素 (DOX，如下所示），及其异构体，表柔比星代表的一大类衍生物。

[0070]



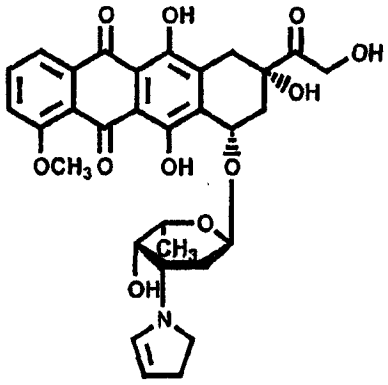
[0071] DOX

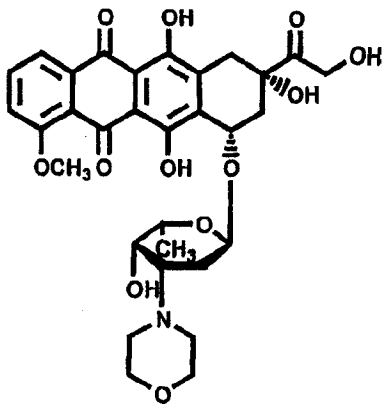
[0072] 阿霉素和表柔比星都在癌症治疗中广泛使用。在本发明另一个优选的实施方案中，化疗药物包括高毒性 2-PDOX 的类似物，即，吗啉代 - 和氰基吗啉代 - 阿霉素（分别是吗啉代 -DOX 和氰基吗啉代 DOX）。在另一个优选的实施方案中，化疗药物包括柔红霉素。

[0073] 本领域技术人员认识到本发明优选实施方案的蒽环霉素药物包含多个反应性基

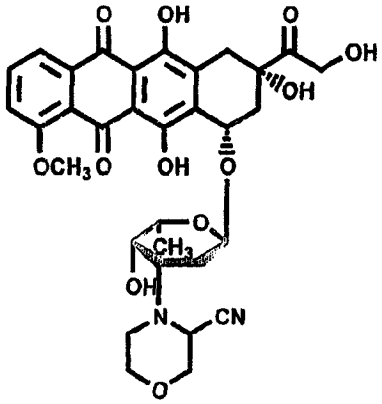
团，可以称作第二反应官能团，在药物与接头偶联之前和 / 或药物 - 接头偶联物与 mAb 偶联之前，要求用现有技术中公知的保护基团将其保护；保护作用是必须的，这样不会破坏反应基团的完整性。参见 Greene 和 Wuts，Protective Groups in Organic Synthesis(John Wiley & Sons 第二版 1991。反应基团包括蒽环霉素药物中的蒽醌核心中的羰基；某些条件下可以与亲核试剂反应的基团。其他反应基团包括位于蒽环霉素药物分子中的各种醇基；某些条件下可以与亲电试剂反应的基团。最后，其他反应基团包括 DOX 中存在的胺基和 2-PDOX 中存在的烯胺；这两种都与亲电试剂反应。在带有烷基化基团（例如，2-PDOX 的烯胺）的蒽环霉素药物情况下，需要控制反应条件，使得烷基化基团的完整性不被破坏。

[0074]





[0075] 2-PDOX 吗啉代 -DOX



[0076] 氰基吗啉代 -DOX

[0077] 蒽环霉素类这类药物中，为了制备更大或更小毒性的免疫偶联物，以它们不同的毒性为基础，可以互换毒性 1-10,000 倍范围不同 (3-4 个数量级) 的各个药物。蒽环霉素类能通过几种机理对靶细胞施加毒性作用，包括抑制 DNA 拓扑异构酶 2(top 2)，插入到 DNA 中，氧化还原反应和结合某些细胞内或膜蛋白。另外，可以设计具有另外的细胞杀伤机理的类似物，例如被烷基化的可能性。举例的类似物是带有烷基化部分的蒽环霉素类，如 2-PDOX 类似物的情况。在这个例子中，烷基化部分是烯胺基团。在 2-PDOX 类似物中，吡咯啉环中的烯胺在生理条件下对于亲核试剂是高反应性的。

[0078] 药物组合物和给药方法

[0079] 本发明的一些实施方案涉及含有本发明的 mAb- 药物偶联物和药学可接受载体或赋形剂的药物组合物。所谓“药学可接受载体”意指但 不限于无毒固体，半固体或液体填料，稀释剂，胶囊化材料或者本领域技术人员公知的配制辅助剂。稀释剂，例如多元醇，聚乙

二醇和葡聚糖，可以用来提高偶联物的生物半寿期。

[0080] 本发明还涉及治疗哺乳动物疾病的方法，包括施用这里描述的抗体和蒽环霉素药物的偶联物。本发明方法还包括在其他标准治疗法之前、同时或之后施用这里描述的抗体－蒽环霉素偶联物，其中所述标准治疗法选自放射疗法，手术和化学疗法。

[0081] 本发明意在包括治疗哺乳动物疾病的方法，包括施用导向于相同病细胞上不同抗原或相同抗原的不同表位的抗体和蒽环霉素药物偶联物中的两种或多种。另外，本发明意在包括治疗哺乳动物疾病的方法，包括在以第二种抗体为基础的治疗之前、同时或之后施用抗体和蒽环霉素药物的偶联物，使得与偶联物中的抗体相比，第二抗体为基础的治疗中第二抗体导向于病变细胞上的不同抗原或相同抗原的不同表位。

[0082] 在一些实施方案中，单独的 mAb- 药物偶联物或者含有本发明的 mAb- 药物偶联物和药学可接受载体或赋形剂的药物组合物可以在对受试者治疗的方法中使用，包括对受试者施用治疗有效量的本发明的 mAb- 药物偶联物。

[0083] 在优选的实施方案中，受试者是哺乳动物。例举的哺乳动物包括人，猪，绵羊，山羊，马，小鼠，狗，猫，牛等。可以用本发明的 mAb- 药物偶联物治疗的疾病包括癌症，例如皮肤癌，头颈癌，肺癌，乳腺癌，前列腺癌，卵巢癌，子宫内膜癌，宫颈癌，结肠癌，直肠癌，膀胱癌，脑癌，胃癌，胰腺癌，淋巴系统癌。通过施用治疗有效量的本发明的 mAb- 药物偶联物可以治疗患有 B- 或 T- 细胞癌，非何杰金氏淋巴瘤，何杰金氏病，淋巴细胞或髓细胞白血病，多发性骨髓瘤，肉瘤和黑素瘤的患者。

[0084] 本发明的 mAb- 药物偶联物可以静脉内，腹膜内，动脉内，鞘内，膀胱内或肿瘤内给药。偶联物可以以反复和 / 或周期为基础，以药团剂或输注给与。根据药物的剂量和就副作用而言的偶联物的耐受性，输注可以重复一次或多次，由负责的主治医师决定。本领域技术人员明白能凭经验确定本发明的 mAb- 药物偶联物的有效量。对需要治疗癌症的受试者施用和一种或几种药学可接受赋形剂组合的药物组合物药 物。要理解，当对人患者给药时，在合理医学判定范围内由负责的主治医师决定本发明的药剂或组合物的总的日用量。对于特定患者的特定治疗有效剂量水平取决于多个因素 ：要实现的细胞反应的类型和程度 ；使用的特异性 mAb- 药物偶联物或组合物的活性 ；使用的特异性 mAb- 药物偶联物或组合物 ；患者的年龄，体重，一般健康状况，性别和饮食 ；给药时间，给药途径，和药剂排泄速度 ；治疗持续时间 ；与特定药剂联合或同时使用的药物等医药领域公知的因素。例如，本领域公知药物起始剂量是比实现期望的治疗效果所需要的剂量更低的水平，并且逐渐增加剂量，直到实现期望的效果。

[0085] 在本发明的优选的实施方案中，在其他标准治疗法包括放疗、手术或化疗之前、同时或之后施用抗体－蒽环霉素偶联物。

[0086] 在另一个优选的实施方案中，施用抗体和蒽环霉素药物的一种或多种偶联物，偶联物导向于病变细胞上相同抗原或相同抗原上的不同表位。在另一个优选的实施方案中，在另一种以抗体为基础的治疗之前、同时或之后给与抗体和蒽环霉素药物的偶联物。这种附加的以抗体为基础的治疗可以包括施用两种或多种以抗体为基础的治疗，包括裸治疗，其中单独给与抗体或者与另一种治疗药剂联合施用，该药剂是与抗体偶联的或没有偶联的。偶联可以使用本文公开的接头或其他类型的接头。当给与两种以抗体为基础的治疗时，这些治疗无论施用哪一种抗体，第二种抗体导向于相同病变细胞上不同的抗原或相同抗原

上的不同表位。第二种抗体也与另一种（不同）药物或者与治疗性同位素偶联，这样提供以抗体为基础的治疗。也理解这种治疗能联合，在施用增强抗肿瘤效果或预防或减轻治疗偶联物的脊髓抑制效果的细胞因子之前，同时或之后施用。

[0087] 上面确定的每一种治疗方法另外可以包括施用一种或多种免疫调节剂。这些免疫调节剂可以选自干扰素，细胞因子，干细胞生长因子，集落－刺激因子，淋巴毒素和其他造血因子。干扰素优选 α－干扰素，β－干扰素或 γ－干扰素，造血因子可以选自红细胞生成素，血小板生成素，白介素 (ILs)，集落刺激因子 (CSF)，粒细胞巨噬细胞－集落刺激因子 (GM-CSF)。白介素可以选自 IL-1，IL-2，IL-3，IL-6，IL-10，IL-12，IL-18，和 IL-21。免疫调节剂或造血因子可以在免疫偶联物治疗之前，期间或之后施用。施用免疫调节剂来增强施用的本发明偶 联物的效力。

[0088] 试剂盒

[0089] 本发明的优选实施方案还涉及在合适的容器中含有单克隆抗体和蒽环霉素药物的偶联物的试剂盒。偶联物优选包括含有酰肼和马来酰亚胺的接头。在无菌容器中提供液体，冷冻或冻干形式的单克隆抗体－蒽环霉素药物偶联物。在对需要治疗的患者施用之前能将单克隆抗体－蒽环霉素药物偶联物稀释或重新配制。

[0090] 在另一个实施方案中，其中通过接头连接蒽环霉素药物和抗体的蒽环霉素药物和抗体偶联物含有酰肼和马来酰亚胺，并且其中至少一种免疫调节剂进一步与抗体偶联。然后根据这里描述的，对需要治疗的患者施用单独的偶联物或者与其它治疗联合施用。

[0091] 不限制本发明的范围，通过下面的实施例详细描述本发明。

[0092] 实施例

[0093] 概述

[0094] 根据最初 Nagy 等的描述 (Proc. Natl. Acad. Sci, U. S. A. 93 :2464-2469(1996)) 为基础，利用改进的方法制备 2－吡咯啉基－阿霉素。利用公开的方法 (Acton 等, J. Med. Chem. 27 :638-645(1984)) 从阿霉素合成吗啉代 -DOX 和氰基吗啉代 -DOX。

[0095] 实施例 1 :2-PDOX 的合成

[0096] 2－吡咯啉基－阿霉素 (2-PDOX) 的合成 :4－碘代丁醛 :2-(3－氯丙基)-1,3－二－氧戊环 (1.3mL ;10mM) 溶解于含有 30 克碘化钠 (200 毫摩尔 ;20－倍过量）的 200 毫升丙酮中。将溶液回流 24 小时后蒸发至干。在下面的反应中使用粗混合物。阿霉素盐酸盐 (550 毫克，946 微摩尔）溶解于 6.5 毫升的 DMF 中，并且加入 3.86 克 (19.48 毫摩尔，20－倍过量）的 4－碘代丁醛，接着加入 500 微升 N,N－二异丙基乙胺 (DIPEA)。五分钟之后，通过在 Waters NovaPakC-18 柱子上用梯度洗脱通过反相 HPLC 将材料纯化。梯度是 :90 ： 10 洗脱剂 A 至 70 ： 30 洗脱剂 B，每分钟 75 毫升，经 40 分钟，其中洗脱剂 A 是 0.1％三氟乙酸 (TFA) 并且洗脱剂 B 是含有 0.1％ TFA 的 90％乙腈。电子喷射质 谱证实产物的身份，$M+H^+$ ＝ 596。

[0097] 实施例 2 :2-PDOX 与抗 -CD22 抗体人源化 LL2(hLL2) 的偶联

[0098] a)2-PDOX 的活化 :2-PDOX(5.95 毫克 ;1×10^{-5}摩尔）与一摩尔当量的商业上可购得的接头 4-(N－马来酰亚胺基甲基）环已烷 -1－羧酰肼 (M_2C_2H ;Pierce Chemical Co., Rockford, IL)(2.88 毫克 ;1×10^{-5}摩尔）在 0.5 毫升二甲亚砜 (DMSO) 中混合。反应混合物在 50-60℃下在减压下被加热 30 分钟。通过制备 RP-HPLC 纯化期望的产物，使用下面成分构成的梯度 :0.3％乙酸铵和 90％乙腈，pH 4.4 中 0.3％乙酸铵，从大多数没有反应的

2-PDOX(洗脱,早大约 0.5 分钟)和从没有反应的 M2C2H(更早洗脱)分离期望的产物。通过参考相对于乙腈/乙酸铵缓冲液中 2-PDOX 的标准溶液的样品(496nm)的 UV 吸收水平估计回收的量。如果不是立即使用,将马来酰亚胺活化的 2-PDOX 冷冻并且冻干。当需要与抗体进一步反应时,采用最小量的 DMSO。

[0099] b)hLL2 IgG 的还原:4℃下用 100 微升 1.8M Tris HCl 缓冲液处理 1-毫升 LL2 抗体样品(8-12mg/mL),接着用 3 微升 2-巯基乙醇处理。让还原反应进行 10 分钟,并且通过在含有 1mM EDTA 作为抗氧化剂的 0.1M 乙酸钠,pH 5.5 中平衡过的两个连续 G-50-80 Sephadex 旋转柱纯化还原的抗体。通过 280nm UV 吸光度分析产物,通过 Ellman 反应,在 410nm 检测,测定每摩尔抗体硫醇基的数目。这些还原条件导致每个抗体产生大约 8-12 个硫醇基,相应于抗体链间二硫键的完全还原。

[0100] c)活化的 2-PDOX 与还原的 hLL2 的偶联:用马来酰亚胺基活化的 2-PDOX 处理来自上面 b)的硫醇还原的抗体,不用使含水/DMSO 混合物中 DMSO 的最终浓度达到高于 25%。4℃下反应 15 分钟之后,通过用 0.2M 乙酸铵,pH 4.4 中平衡过的 G-50-80 旋转柱洗脱,接着通过在相同缓冲液中平衡过的 SM-2 Bio-Beads 的柱子渗滤,获得没有未反应马来酰亚胺基-DOX 的期望的产物。通过在 280 和 496nm 下通过 UV 扫描分析产物,从而估计 2-PDOX 与 mAb 的摩尔比。通过 MALDI-TOF 质谱分析测得 2-PDOX 与 Mab 之绝对比。UV 和 MS 分析都证明在这组反应条件下获得每摩尔 hLL2 抗体 7-8 单位的 2-PDOX 的取代比例。通过大小排阻 HPLC(GF-250 柱,Bio-Rad,Hercules CA),流速 1 毫 升/分钟,0.2M 乙酸盐缓冲液,pH 5.0,使用设置在 496nm 的 UV 检测器,基本上所有的检测峰在 LL2 抗体的滞留时间附近洗脱出来。这表明产物中存在极少游离药物。2-PDOX-hLL2 偶联物样品等份分为单级分,典型是 0.1-1.0mg,冷冻备用,或者将它们冻干。根据需要,将它们解冻并且重新配制用于进一步实验。

[0101] 实施例 3:2-PDOX 与抗-CD74 抗体人源化 LL1(hLL1)的偶联

[0102] a)2-PDOX 的活化:2-PDOX(5.95 毫克;1×10^{-5}摩尔)与一摩尔当量的商业上可购得的接头 4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酰肼(M2C2H;Pierce Chemical Co.,Rockford,IL)(2.88 毫克;1×10^{-5}摩尔)在 0.5 毫升 DMSO 中混合。反应混合物在 50-60℃下在减压下被加热 30 分钟。通过制备 RP-HPLC 纯化期望的产物,使用下面成分构成的梯度:0.3%乙酸铵和 90%乙腈,pH 4.4 中 0.3%乙酸铵,从大多数没有反应的 2-PDOX(洗脱,早大约 0.5 分钟)和从没有反应的 M2C2H(更早洗脱)分离期望的产物。通过参考相对于乙腈/乙酸铵缓冲液中 2-PDOX 的标准溶液的样品(496nm)的 UV 吸收水平估计回收的量。如果不是立即使用,将马来酰亚胺活化的 2-PDOX 冷冻并且冻干。当需要与抗体进一步反应时,采用最小量的二甲基甲酰胺(DMF)或 DMSO。

[0103] b)hLL1 IgG 的还原:4℃下用 100 微升 1.8M Tris HCl 缓冲液处理 1-毫升 hLL1 抗体样品(8-12mg/mL),接着用 3 微升 2-巯基乙醇处理。让还原反应进行 10 分钟,并且通过在含有 1mM EDTA 作为抗氧化剂的 0.1M 乙酸钠,pH 5.5 中平衡过的两个连续 G-50-80Sephadex 旋转柱纯化还原的抗体。通过 280nm UV 吸光度分析产物,通过 Ellman 反应,在 410nm 检测,测定每摩尔抗体硫醇基的数目。这些还原条件导致每个抗体产生大约 8-10 个硫醇基,相应于抗体链间二硫键的完全还原。

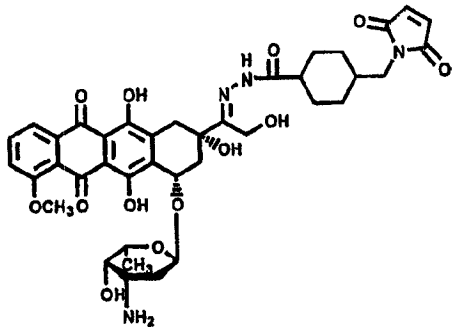
[0104] c)活化的 2-PDOX 与还原的 hLL1 的偶联:用来自 a)的马来酰亚基胺活化的 2-PDOX

处理来自上面 b) 的硫醇还原的抗体，含水 /DMSO 混合物中 DMSO 的最终浓度是 15％。4℃下反应 15 分钟之后，通过用 0.2M 乙酸铵，pH 4.4 中平衡过的 G-50-80 旋转柱洗脱，接着通过在相同缓冲液中平衡过的 SM-2 Bio-Beads 的柱子渗滤，获得没有未反 应马来酰亚胺硫醇 -DOX 的期望的产物。通过在 280 和 496nm 下通过 UV 扫描分析产物，从而估计 2-PDOX 与 mAb 的摩尔比。通过 MALDI-TOF 质谱分析测得 2-PDOX 与 Mab 之绝对比。UV 和 MS 分析证明在这组反应条件下获得每摩尔 hLL1 抗体 7-8 单位的 2-PDOX 的取代比例。通过大小排阻 HPLC 分析 (GF-250 柱，Bio-Rad，Hercules CA)，流速 1 毫升 / 分钟，0.2M 乙酸盐缓冲液，pH 5.0，使用设置在 496nm 的 UV 检测器，基本上一个检测峰在 hLL1 抗体的滞留时间附近洗脱出来。这表明产物中存在极少或没有游离药物。2-PDOX-hLL1 偶联物样品等份分为单一级分，典型是 0.1-1.0mg，冷冻备用，或者将它们冻干。根据需要，将它们解冻并且重新配制用于进一步实验。

[0105] 实施例 4 :DOX 与抗 -CD74 抗体 hLL1 的偶联

[0106] a)DOX 的活化 :DOX(1×10^{-5}摩尔) 与一摩尔当量的商业上可购得的接头 4-(N- 马来酰亚胺基甲基) 环己烷 -1- 羧酰肼 (M_2C_2H ;PierceChemical Co.，Rockford，IL)(2.88 毫克 ;1×10^{-5}摩尔) 在 0.5 毫升 DMSO 中混合。反应混合物在 50-60℃下被加热 30 分钟。通过制备 RP-HPLC 纯化下面所示期望的中间体，使用下面成分构成的梯度 :0.3％乙酸铵和 90％乙腈，pH 4.4 中 0.3％乙酸铵，从没有反应的 DOX(洗脱，早大约 0.5 分钟) 和从没有反应的 M_2C_2H(更早洗脱) 分离期望的产物。

[0107]



[0108] 通过参考相对于乙腈 / 乙酸铵缓冲液中 DOX 的标准溶液的样品 (496nm) 的 UV 吸收水平估计没有反应的 DOX 的量。如果不是立即使用，将马来酰亚胺活化的 DOX 冷冻并且冻干。当需要与抗体进一步 反应时，采用最小量的 DMF 或 DMSO。

[0109] b)hLL1 IgG 的还原 :4℃下用 100 微升 1.8M Tris HCl 缓冲液处理 1- 毫升 hLL1 抗体样品 (10mg/mL)，接着用 3 微升 2- 巯基乙醇处理。让还原反应进行 10 分钟，并且通过在含有 1mM EDTA 作为抗氧化剂的 0.1M 乙酸钠，pH 5.5 中平衡过的两个连续 G-50-80 Sephadex 旋转柱纯化还原的抗体。通过 280nm UV 吸光度分析产物，通过 Ellman 反应，在 410nm 检测，测定每摩尔抗体硫醇基的数目。这些还原条件导致每个抗体产生大约 8-10 个硫醇基，相应于抗体链间二硫键的完全还原。

[0110] c) 活化的 DOX 与还原的 hLL1 的偶联 :用来自上面 a) 的马来酰亚胺基活化的 DOX 处理来自上面 b) 的硫醇还原的抗体，含水 /DMSO 混合物中 DMSO 的最终浓度是 15％。4℃下反应 15 分钟之后，通过用 0.2M 乙酸铵，pH 4.4 中平衡过的 G-50-80 旋转柱洗脱，接着通过在相同缓冲液中平衡过的 SM-2 Bio-Beads 的柱子渗滤，获得没有未反应马来酰亚胺

基 -DOX 的期望的产物。通过在 280 和 496nm 下通过 UV 扫描分析产物，从而估计 DOX 与 mAb 的摩尔比。通过 MALDI-TOF 质谱分析测得 DOX 与 Mab 之绝对比。UV 和 MS 分析都证明在这组反应条件下获得每摩尔 hLL1 抗体 7-8 单位的 DOX 的取代比例。通过大小排阻 HPLC(GF-250 柱，Bio-Rad，Hercules CA)，流速 1 毫升 / 分钟，0.2M 乙酸盐缓冲液，pH 5.0，使用设置在 496nm 的 UV 检测器，基本上一个检测峰在 hLL1 抗体的滞留时间附近洗脱出来。痕迹（见图 1 ；496nm 下的 UV 检测器，设置检测 DOX）表明阿霉素 -LL1 偶联物基本上是 9 分钟左右滞留时间的单一峰，没有聚集的蛋白质物质或游离 DOX（滞留时间 14 分钟左右）。这表明产物中存在极少或没有游离药物。DOX-hLL1 偶联物样品等份分为单级分，典型是 0.1-1.0mg，冷冻备用，或者将它们冻干。根据需要，将它们解冻并且重新配制用于进一步实验。

[0111] 实施例 5 ：阿霉素与 hLL1 的偶联和 dox-hLL1 偶联物的配制

[0112] a) 阿霉素与 SMCC 酰肼反应

[0113] 在 13 毫升 1 ： 2 甲醇：乙醇（无水）中混合 90mg 的阿霉素 (1.56×10^{-4}mol) 和 60.23mg 的 SMCC 酰肼，并且加入 10.4 微升三氟乙酸。 室温下避光将混合物搅拌 4 小时。然后将反应溶液通过 0.22 微米注射器过滤器过滤到 100mL 圆底烧瓶中。加入 75 微升二异丙基乙胺并且在 300℃下在旋转蒸发器上蒸发溶剂。残余物用 4×40mL 乙腈接着用 1×40mL 二乙醚研制，并且在高真空下在旋转蒸发器上干燥成粉末。将粉末再溶解于 5mL 无水甲醇，再如上所述蒸发至干，然后在 -200℃下贮存直到需要。

[0114] b) 用二硫苏糖醇还原 hLL1-IgG

[0115] 在 20mL 圆底烧瓶中混合 8.4mL 的 hLL1-IgG(10.3mg/mL，5.78×10^{-7}mol)，160 微升 0.1M 磷酸钠缓冲液，pH 7.5，500 微升的 0.2M EDTA，pH 7.0，和 290 微升的去离子水。通过在真空和氩气氛之间将溶液循环六次而将混合物去氧。通过通入氩气 10 分钟而将新制备的 40mM 二硫苏糖醇 (DTT) 水溶液 (0.015g 于 2.4mL 水中，2.3×10^{-5} 摩尔 ；对于 IgG 40- 倍摩尔过量）去氧，并且向去氧 hLL1 抗体溶液加入 640 微升的这种 DTT 水溶液。得到的混合物在 37℃下温育 1 小时。通过用去氧 10mM PBS/100mM L- 组氨酸，pH 7.4 缓冲液渗滤（一个 30K 过滤器，氩气下，4℃下），纯化还原的抗体。持续加入缓冲液，直到总的滤液体积是 300mL。还原的 hLL1 溶液 (hLL1-SH) 的体积减小到 10mL。

[0116] c) 阿霉素 -SMCC 与 hLL1-SH 的偶联和偶联物的纯化

[0117] 活化的阿霉素 (1.9mL，2.09×10^{-5}摩尔，对于 IgG 36- 倍过量）溶解于二甲亚砜 (DMSO) 溶液，并且室温下氩气下缓慢加入 hLL1-SH 抗体溶液 (40mL)。DMSO 的最终浓度是 5％。温和搅拌下让反应在 4℃下进行 40 分钟。将反应混合物加载于 BioBeadTM(Bio-Rad，RichmondCA) 柱 (1.5cm 直径 ×34cm 高，用 10mM PBS/100mM L- 组氨酸，pH 7.4 缓冲液平衡过），并且以 2mL/min 洗脱。在 Amicon 过滤装置中浓缩产物偶联物并且在冻干之前配制用于通过 0.22 微米注射过滤器过滤。

[0118] d) 偶联物配制和冻干

[0119] 向 40mL 的上面的 hLL1-dox 溶液加入 8mL 的 0.5M 甘露糖醇水溶液和 0.48mL 的 1％吐温 20，得到最终浓度 1.64mg/mL hLL1-dox，82.5mM 甘露糖醇，和 0.01％吐温 20。以 1mg 和 10mg dox-hLL1 数量（分别 3 和 10mL 小瓶）冻干样品，在干冰上冷冻，并且在真空下 冻干 48 小时。真空封闭小瓶，在 -20℃避光密闭贮存备用。

[0120] 实施例 6 ：抗体的吗啉代 -DOX 和氰基吗啉代 -DOX 偶联物的制备

[0121] 利用 Acton 等的方法 (J.Med.Chem.27 :-638-645(1984)),通过用 2,2′ -氧-双[乙醛]对阿霉素还原性烷基化来制备吗啉代 -DOX 和氰基吗啉代 -DOX。

[0122] 这些 DOX 类似物以对于 DOX 和 2-PDOX 类似物如上所述相同的方式与 M_2C_2H 偶联。氰基吗啉代 -DOX 在室温下在无水甲醇(代替 DMSO)中用 10%摩尔过量的酰肼偶联过夜。去除溶剂,接着通过急骤层析法提供腙。电喷射质谱分析 :M+H m/e 872,M+Na 894 ;M-H 870。以类似方式,使用 1.5 当量试剂,采用 SMCC-酰肼在无水甲醇中反应 4 小时将吗啉代 -DOX 衍生化为它的腙,并且通过急骤层析纯化产物。电喷射质谱分析 :M+H m/e 847,M-H m/e 845,M+Cl m/e 881。

[0123] 如上面实施例 2-4 中所述,将抗体的链间二硫键还原为游离硫醇,产生二硫化物-还原的 mAbs,利用实施例 2,3,和 4 的 c) 部分中描述的相同的方法制备偶联物。制备下面的吗啉代 -DOX 和氰基吗啉代 -DOX 的 mAb 偶联物 :

[0124] 吗啉代 -DOX-抗体偶联物 :

[0125] mRS7 偶联物 :药物与 mAb 取代之比 :6.4 : 1。

[0126] mMN-14 偶联物 :药物与 mAb 取代之比 :8.9 : 1。

[0127] 氰基吗啉代 -DOX-抗体偶联物 :

[0128] mRS7 偶联物 :药物与 mAb 取代之比 :5.3 : 1。

[0129] mMN-14 偶联物 :药物与 mAb 取代之比 :7.0 : 1。

[0130] 实施例 7 :蒽环霉素-抗体偶联物的体外效力

[0131] 从美国典型培养物保藏中心 (ATCC,Rockville,MD) 获得 RajiB-淋巴瘤细胞,并且在加有谷氨酰胺,丙酮酸盐,青霉素和链霉素 (LifeTechnologies,Grand Island,NY) 的含有 12.5%胎牛血清 (Hyclone,Logan,UT) 的 RPMI 1640 培养基中培养。简要地说,在 24-孔板的孔中,3.75×10^5个细胞与指定浓度的药物 -mAb 偶联物在 1.5mL 组织培养基中温育 2 天。然后将细胞转移到含有 20 毫升培养基的 T25 烧瓶中,并且温育最多 21 天,或者直到细胞扩增 16-倍。在第 0 天,第 2 天,然后每 3-5 天使用台盼蓝进行活细胞计数。从没有处理的细胞的生长速度计算加倍时间,从处理的细胞扩增 16-倍需要的时间计算存活比例,假定处理不影响加倍时间。能容易检测单个的保留的活细胞。在 1 微克 / 毫升药物 -mAb 偶联物浓度下,DOX-LL1 偶联物表现出与 DOX-MN-14 偶联物相比存活细胞比例的三个数量级的差异。见图 2。

[0132] 实施例 8 :用蒽环霉素-抗体偶联物治疗带肿瘤动物

[0133] a)对实体肿瘤异种移植模型的治疗

[0134] 用 DU145 人前列腺癌细胞对无胸腺裸鼠组皮下注射。大约两周之后,当动物体内长出可触摸的前列腺肿瘤异种移植物时,用单剂量的药物-抗体偶联物 2-PDOX-RS7 治疗一半动物,另一半保持未处理(对照)。图 3 说明未处理小鼠中肿瘤异种移植物生长与用 2-PDOX-RS7 治疗的小鼠异种移植物生长。证明用药物-抗体偶联物治疗动物,在延迟异种移植物生长方面的治疗性效果。

[0135] b)动物模型中全身癌的治疗

[0136] NCr-SCID 小鼠,每组 10 个动物,通过尾静脉注射对每个动物静脉内注射 2.5×10^6 人 Burkitt′ s B-细胞淋巴瘤细胞系 Raji 的悬浮液。五天之后,动物未接受处理或者用单剂量的 350 微克 DOX-LL1 或 150 微克 2-PDOX-LL1 治疗。图 4 给出试验结果。没有接受

处理的动物由于全身癌症而瘫痪并且在注射 Raji 细胞之后 23 天左右死亡。用 LL1 抗体的 DOX- 和 2-PDOX- 偶联物治疗的动物存活延长的时间，相当于对于 2-PDOX-LL1- 治疗的动物寿命延长四倍左右，相对于 DOX-LL1 治疗的动物寿命延长甚至更多。

[0137] c)动物模型中全身癌的治疗

[0138] NCr-SCID 小鼠，每组 10 个动物，通过尾静脉注射对每个动物静脉内注射 2.5×10^6 人 Burkitt′ s B- 细胞淋巴瘤细胞系 Raji 的悬浮液。五天之后，动物未接受处理或者用单剂量的 150 微克 2-PDOX-LL1 或 150 微克 2-PDOX-MN-14（非特异性对照抗体偶联物）治疗。图 5 给出试验结果。没有接受处理的动物由于全身癌症而瘫痪并且在注射 Raji 细胞之后 23 天左右死亡。用 2-PDOX-MN-14 偶联物处理的动物也是如此。用 2-PDOX-LL1 抗体偶联物治疗的动物存活延长的时间。

[0139] 从上面的描述，本领域技术人员容易确认本发明的基本特征，不 脱离本发明的精神和范围，能对本发明进行各种改变和修饰，使它适合各种应用和条件而不用过度的试验。这里引用的所有的专利，专利申请和公开物在此全文引作参考。

[0140] 参考文献

[0141] 美国专利文献：

[0142] Arcamone 等，美国专利 No.4,125,607

[0143] Greenfield 等，美国专利 No.5,122,368

[0144] Janaky 等，美国专利 No.6,214,969

[0145] Kaneko 等，美国专利 No.5,349,066

[0146] Kaneko 等，美国专利 No.5,137,877

[0147] McKenzie 等，美国专利 No.5,798,097

[0148] King 等，美国专利 No.6,307,026

[0149] King 等，美国专利 No.5,824,805

[0150] King 等，美国专利 No.5,162,512

[0151] Moreland 等，美国专利 No.5,241,078

[0152] Schally 等，美国专利 No.6,184,374

[0153] Schally 等，美国专利 No.5,843,903

[0154] Willner 等，美国专利 No.5,708,146

[0155] Willner 等，美国专利 No.5,622,929

[0156] Willner 等，美国专利 No.5,606,017

[0157] 其他参考文献：

[0158] Anthracycline Antibiotics:New Analogs, Methods of Delivery, and Mechanisms of Action.ACS Symposium Series 574, W.Priebe, editor, Publ.American Chemical Society,1995.Acton et al., J.Med.Chem.,27:638-645,1984.

[0159] Arencibia et al., Anticancer Drugs,12:71-78,2001.

[0160] Benali et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,97:9180-9185,2000.

[0161] Chastzistamou et al., Clin.Cancer Res.,6:4158-4165,2000.

[0162] Denmeade et al., Cancer Res.,58:2537-40,1998.

[0163] Dubowchik et al., Bioconjug Chem.,13:855-869,2002.

[0164] Halmos et al.,Cancer Lett.,136 :129-136,1999.

[0165] Hansen et al.,Biochem J.,320 :393-300,1996.

[0166] Kahan et al.,Breast Cancer Res.Treat.,59 :255-262,2000.

[0167] Kahan et al.,Int.J. Cancer,82 :592-598,1999.

[0168] Kahan et al.,Cancer 85 :2608-2615,1999.

[0169] Kiaris et al.,Eur.J.Cancer,37 :620-628,2001.

[0170] Kiaris et al.,Br.J.Cancer,81 :966-971,1999.

[0171] Koppan et al.,Cancer Res.,58 :4132-4137,1998.

[0172] Krebs et al.,Cancer Res.,60 :4194-4199,2000.

[0173] Michel et al.,Clin.Cancer Res.,8 :2632-2639,2002.

[0174] Miyazaki et al.,Am.J.Obstet.Gynecol.180 :1095-103,1999.

[0175] Miyazaki et al.,J. Naal.Cancer Inst.,89 :1803-1809,1997.

[0176] Mosure et al.,Cancer Chemother.Pharmacol.,40 :251-258,1997.

[0177] Nagy et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,97 :829-834,2000.

[0178] Nagy et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,95 :1794-1799,1998.

[0179] Nagy et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,94 :652-656,1997.

[0180] Nagy et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,93 :7269-7273,1996.

[0181] Nagy et al.,Proc.Natl.Acad.Sci,U.S.A.,93 :2464-2469,1996.

[0182] Ong et al.Immunology,98 :296-302,1999.

[0183] Pawlyk-Byczkowska et al.,Cancer Res.,49 :4568-4577,1989.

[0184] Plonowski et al.,Int.J.Cancer,88 :652-657,2000.

[0185] Plonowski et al.,Cancer Res.,60 :2996-3001,2000.

[0186] Plonowski et al.,Cancer Res.,59 :1947-1953,1999.

[0187] Roche et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,90 :8581-8585,1993.

[0188] Schally et al.,Clin.Cancer Res.,7 :2854-2861,2001.

[0189] Schally et al.,Prosate,45 :158-166,2000.

[0190] Schally et al.,Eur.J.Endocrinol.,141 :1-14,1999.

[0191] Shih et al.Cancer Immunol.Immtunother.,49 :208-216,2000.

[0192] Suzawa et al.,J.Contr.Release,79 :229-242,2002.

[0193] Westphalen et al.,Int.J.Oncol.17 :1063-1069,2000.

[0194] Wraight et al.,J.Biol.Chem.,265 :5787-5792,1990.

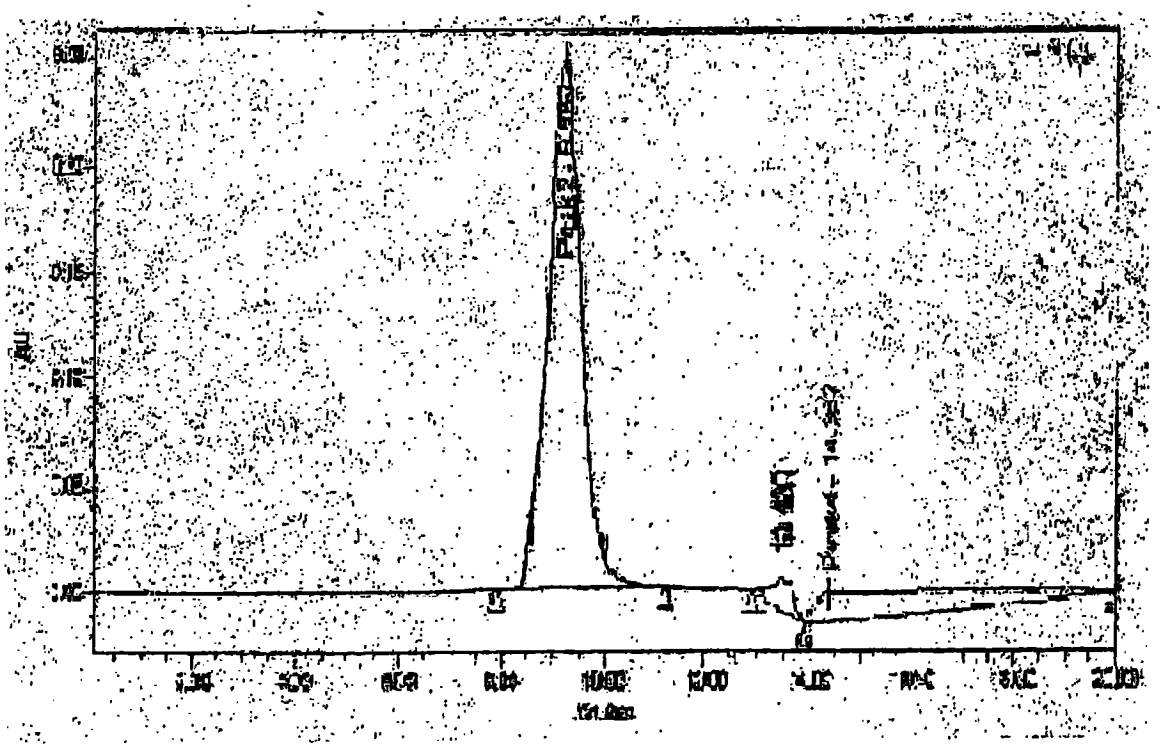


图 1

DOX-MAb 偶联物对 Raji 细胞的体外毒性

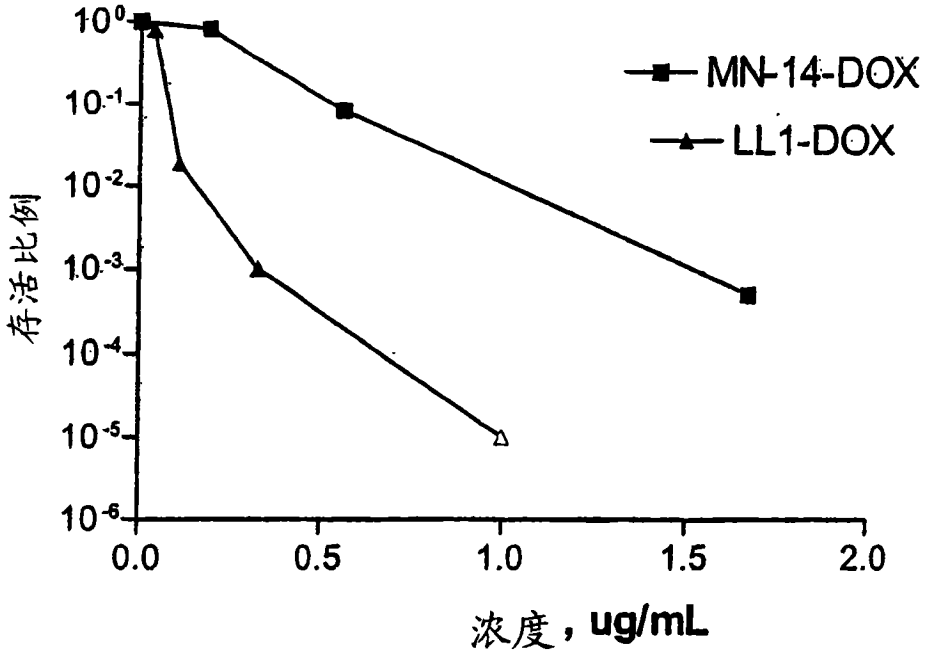


图 2

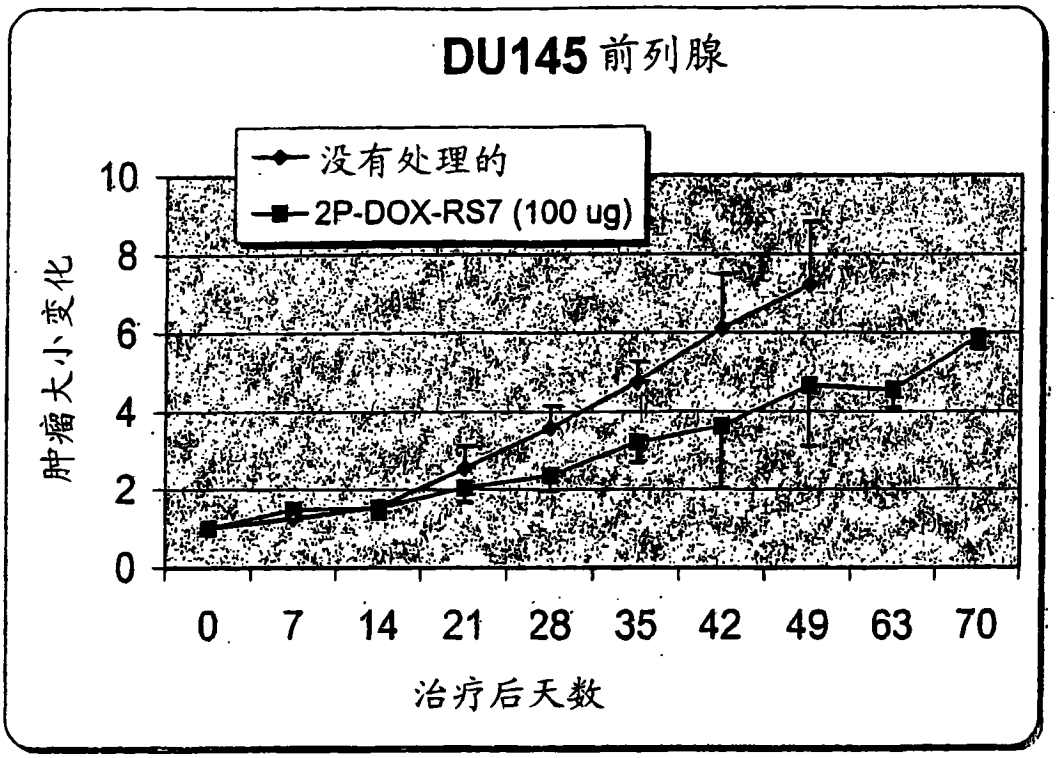


图 3

用致死剂量 Raji 细胞 i.v. 处理五天之后用单 -350 微克剂量的 LL1-DOX 或单一 150 微克剂量的 LL1-2-PDOX 治疗小鼠的存活

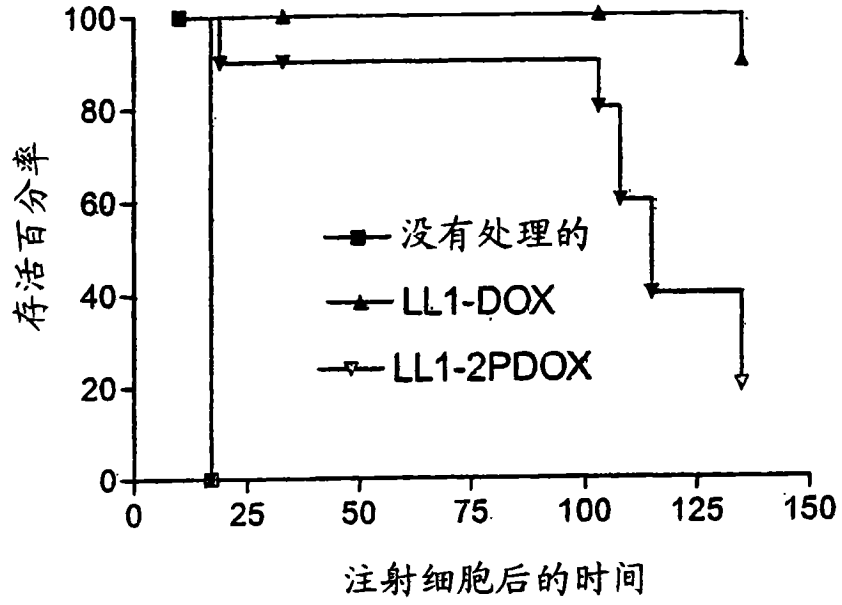


图 4

用致死剂量 Raji 细胞处理小鼠五天之后用单 -150 微克的 LL1-2-PDOX 偶联物或相同剂量的 MN-14-2-PDOX 对照偶联物处理小鼠的存活

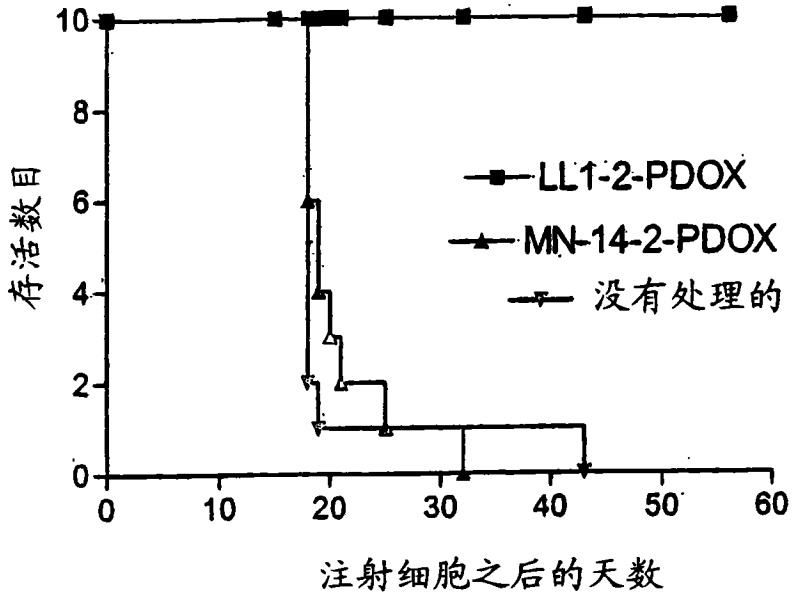


图 5