



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110075295 A

(43)申请公布日 2019.08.02

(21)申请号 201910347750.9

A61K 47/68(2017.01)

(22)申请日 2014.04.17

A61P 35/00(2006.01)

(30)优先权数据

A61P 37/02(2006.01)

13/948732 2013.07.23 US

A61P 31/00(2006.01)

A61K 31/4745(2006.01)

(62)分案原申请数据

201480041766.2 2014.04.17

(71)申请人 免疫医疗公司

地址 美国新泽西州

(72)发明人 S.V.戈文丹 J.B.盖尔

N.J.霍尔曼 D.M.戈登伯格

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 权陆军 万雪松

(51)Int.Cl.

A61K 39/395(2006.01)

权利要求书3页 说明书92页

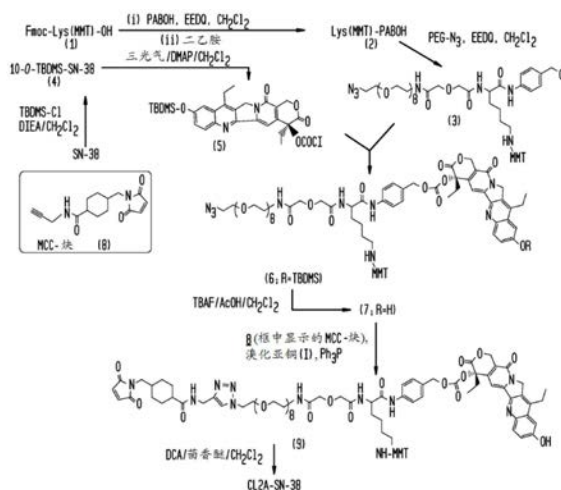
序列表50页 附图8页

(54)发明名称

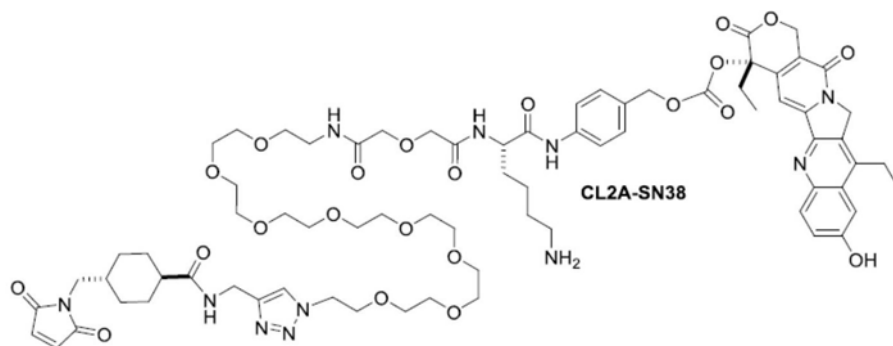
具有CL2A接头的抗体-SN-38免疫缀合物

(57)摘要

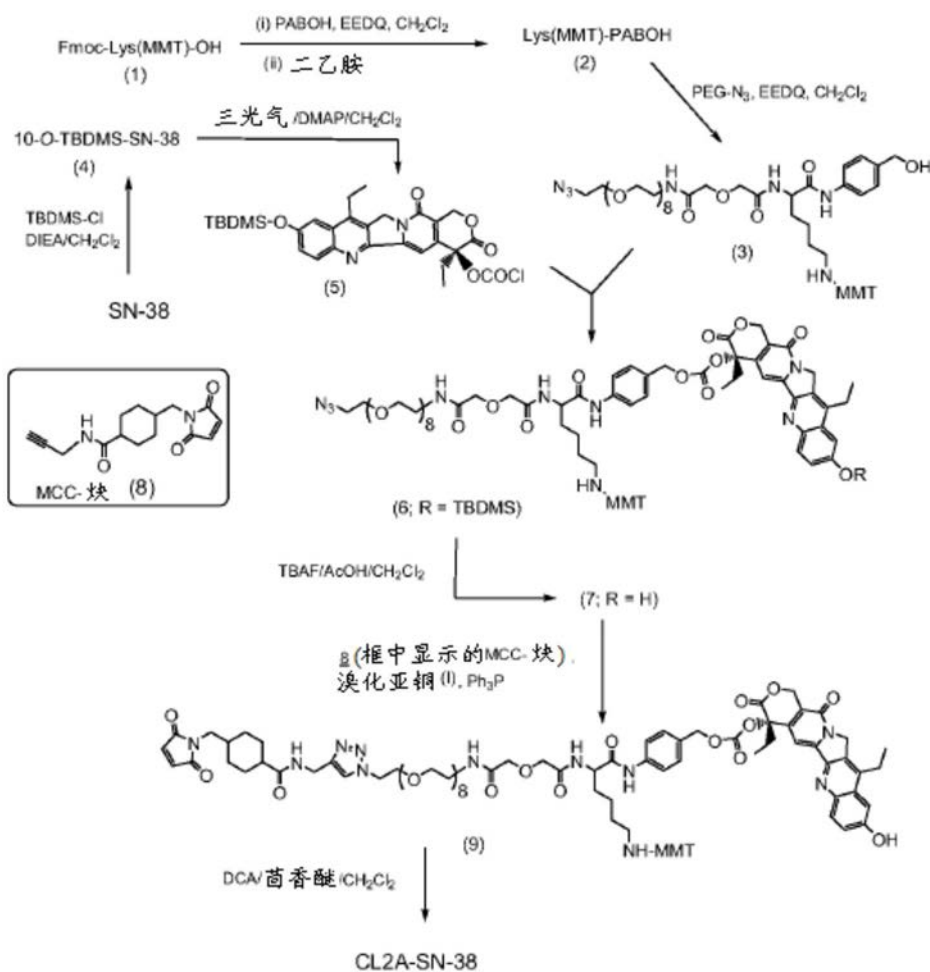
本发明涉及具有CL2A接头的抗体-SN-38免疫缀合物。本发明涉及用于制备蛋白质或肽的SN-38缀合物,优选地抗体或抗原结合抗体片段的免疫缀合物的方法和组合物。更优选,使用CL2A接头,以每抗体或抗体片段1-12个,更优选6个或更少,最优选1-5个SN-38部分将SN-38附接于抗体或抗体片段。最优选,以大规模批次制备所述免疫缀合物,对反应方案进行各种修改以优化大规模的收率和回收率。其它实施方案涉及使疾病治疗的功效最大化和使施用的副作用最小化的免疫缀合物的施用的最优化的剂量和/或方案。



1. 一种产生具有如下结构的化合物CL2A-SN-38的方法，



所述方法包括进行如所显示的反应方案：



所述方法还包括将SN-38与叔-丁基二甲基氯硅烷 (TBDMS-Cl) 反应以产生10-O-TBDMS-SN-38 (中间体4)，其中在二氯甲烷溶剂中进行所述反应。

2. 根据权利要求1所述的方法，所述方法还包括将10-O-TBDMS-SN-38 (中间体4) 与三光气和DMAP反应以产生10-O-TBDMS-SN-38-20-O-氯甲酸酯 (反应性中间体5)，其中通过将三光气添加至含有中间体4的二氯甲烷反应混合物中进行所述反应，并且分批添加所述三光气以在大规模生产中减少放热反应并维持高反应收率。

3. 根据权利要求1所述的方法，所述方法还包括用庚烷沉淀Lys (MMT) -PABOH (中间体2)。

4. 根据权利要求3所述的方法,所述方法还包括测定所述沉淀的中间体2中的残留二乙胺,并且如果检测到二乙胺的存在,通过层析纯化所述沉淀。

5. 根据权利要求1所述的方法,所述方法还包括通过铜催化的环化加成反应将叠氮基-PEG-Lys (MMT)-PABO-CO-20-O-SN-38 (中间体7) 与MCC-炔 (中间体8) 反应以产生MCC-PEG-Lys (MMT)-PABO-CO-20-O-SN-38 (中间体9),其中进行所述反应14小时以提高产物收率。

6. 根据权利要求5所述的方法,其中首先通过硅胶层析纯化中间体9,随后用EDTA提取以除去铜。

7. 根据权利要求1所述的方法,所述方法还包括将CL2A-SN38的马来酰亚胺部分与蛋白质或肽反应以产生缀合有SN38的蛋白质或肽。

8. 根据权利要求7所述的方法,其中所述马来酰亚胺部分与蛋白质或肽上的还原的巯基反应。

9. 根据权利要求7所述的方法,其中所述蛋白质或肽为抗体或抗原结合抗体片段并且所述缀合有SN-38的抗体或抗体片段为免疫缀合物。

10. 根据权利要求9所述的方法,所述方法还包括通过正切流动过滤 (TFF) 纯化所述免疫缀合物。

11. 根据权利要求9所述的方法,其中使用25至30个透析过滤体积的缓冲液,利用50,000道尔顿分子量截断值的膜进行所述TFF。

12. 根据权利要求11所述的方法,所述方法还包括在pH为6.0至7.0的Good氏生物缓冲液中配制所述免疫缀合物以及冷冻干燥所述免疫缀合物以进行贮存。

13. 根据权利要求12所述的方法,其中所述Good氏生物缓冲液选自由以下组成的组:2-(N-吗啉代) 乙磺酸 (MES)、3-(N-吗啉代) 丙磺酸 (MOPS)、4-(2-羟乙基) 哌嗪-1-乙磺酸 (HEPES) 和1,4-哌嗪二乙磺酸 (PIPES),pH在6-7的范围内,并且缓冲液浓度为10-100mM。

14. 根据权利要求13所述的方法,其中所述缓冲液的pH在6.5至7的范围内。

15. 根据权利要求13所述的方法,其中所述缓冲液浓度为25mM。

16. 根据权利要求13所述的方法,其中所述缓冲液为25mM MES缓冲液,pH6.5。

17. 根据权利要求9所述的方法,其中所述抗体为双特异性抗体或单克隆抗体。

18. 根据权利要求9所述的方法,其中所述抗体片段选自由以下组成的组: $F(ab')_2$ 、 $F(ab)_2$ 、 Fab' 、 Fab 、 Fv 、 $scFv$ 、单结构域抗体和IgG4抗体的半分子。

19. 根据权利要求9所述的方法,其中将所述抗体或抗体片段附接于1至12个拷贝的CL2A-SN38。

20. 根据权利要求9所述的方法,其中将所述抗体或抗体片段附接于6个拷贝的CL2A-SN38。

21. 根据权利要求9所述的方法,其中将所述抗体或抗体片段附接于1至5个拷贝的CL2A-SN38。

22. 根据权利要求9所述的方法,其中所述抗体为抗-癌抗体、抗-感染性疾病抗体或抗-自身免疫性疾病抗体。

23. 根据权利要求9所述的方法,其中所述抗体选自由以下组成的组:LL1 (抗-CD74)、LL2 (抗-CD22)、RFB4 (抗-CD22)、RS7 (抗-EGP-1)、PAM4 (抗-MUC5AC)、KC4 (抗-粘蛋白)、A19 (抗-CD19)、A20 (抗-CD20)、MN-14 (抗-CEACAM5)、MN-15 (抗-CEACAM6)、MN-3 (抗-CEACAM6)、

R1 (抗-IGF-1R)、Mu-9 (抗-CSAp)、Immu31 (抗-AFP)、CC49 (抗-TAG-72)、J591 (抗-PSMA)、HuJ591 (抗-PSMA)、AB-PG1-XG1-026 (抗-PSMA二聚体)、D2/B (抗-PSMA)、G250 (抗-碳酸酐酶IX) 和hL243 (抗-HLA-DR)。

24. 根据权利要求9所述的方法, 其中所述抗体或抗体片段结合于选自由以下组成的组的抗原: 碳酸酐酶IX、 α -甲胎蛋白 (AFP)、 α -辅肌动蛋白-4、ART-4、B7、Ba 733、BAGE、BrE3-抗原、CA125、CAMEL、CAP-1、CASP-8/m、CCL19、CCL21、CD1、CD1a、CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD11A、CD14、CD15、CD16、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD29、CD30、CD32b、CD33、CD37、CD38、CD40、CD40L、CD44、CD45、CD46、CD52、CD54、CD55、CD59、CD64、CD66a-e、CD67、CD70、CD70L、CD74、CD79a、CD80、CD83、CD95、CD126、CD132、CD133、CD138、CD147、CD154、CDC27、CDK-4/m、CDKN2A、CTLA-4、CXCR4、CXCR7、CXCL12、HIF-1 α 、结肠特异性抗原-p (CSAp)、CEACAM5、CEACAM6、c-Met、DAM、EGFR、EGFRvIII、EGP-1 (TROP-2)、EGP-2、ELF2-M、Ep-CAM、成纤维细胞生长因子 (FGF)、F1t-1、F1t-3、叶酸受体、G250抗原、GAGE、gp100、GRO- β 、H2B、H3、H4、HLA-DR、HM1.24、人绒毛膜促性腺素 (HCG)、HER2/neu、HMGB-1、缺氧诱导因子 (HIF-1)、HSP70-2M、HST-2、Ia、IGF-1R、IFN- γ 、IFN- α 、IFN- β 、IFN- λ 、IL-4R、IL-6R、IL-13R、IL-15R、IL-17R、IL-18R、IL-2、IL-6、IL-8、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-23、IL-25、胰岛素样生长因子-1 (IGF-1)、KS1-4、Le-Y、LDR/FUT、巨噬细胞游走抑制因子 (MIF)、MAGE、MAGE-3、MART-1、MART-2、NY-ESO-1、TRAG-3、mCRP、MCP-1、MIP-1A、MIP-1B、MIF、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC5ac、MUC13、MUC16、MUM-1/2、MUM-3、NCA66、NCA95、NCA90、PD-1、PD-L1、PD-1受体、胎盘生长因子、p53、PLAGL2、前列腺酸性磷酸酶、PSA、PRAME、PSMA、PlGF、ILGF、ILGF-1R、IL-6、IL-25、RS5、RANTES、T101、SAGE、S100、存活素、存活素-2B、TAC、TAG-72、腱生蛋白、TRAIL受体、TNF- α 、Tn抗原、Thomson-Friedenreich抗原、肿瘤坏死抗原、VEGFR、ED-B纤连蛋白、WT-1、17-1A-抗原、补体因子C3、C3a、C3b、C5a、C5、bcl-2、bcl-6、Kras和癌基因产物。

具有CL2A接头的抗体-SN-38免疫缀合物

[0001] 相关申请

[0002] 本申请是国际申请日为2014年4月17日的国际申请PCT/US2014/034518、申请号为201480041766.2的题为“具有CL2A接头的抗体-SN-38免疫缀合物”的发明专利申请的分案申请。

[0003] 本申请要求2013年7月23日提交的美国专利申请系列第13/948,732号的优先权。

[0004] 序列表

[0005] 本申请含有已以ASCII格式电子方式提交的并且在此通过引用整体并入本文的序列表。2014年4月4日创建的所述ASCII拷贝称为IMM340W02_SL.txt并且大小为60,597字节。

技术领域

[0006] 本发明涉及具有提高的靶向各种癌细胞、感染性疾病生物体的能力和/或用于治疗自身免疫性疾病的治疗性免疫缀合物,所述缀合物含有抗体部分和选自药物的喜树碱基团的药物部分。抗体与药物部分经由可增强治疗功效的细胞内可裂解的键联连接。最优选地,喜树碱是SN-38并且联接抗体与药物部分的接头是CL2A,如下文中所描述的。在具体的实施方案中,可以提供最佳效率和最小毒性的特定施用剂量和/或方案施用免疫缀合物。本文中公开的用于人治疗用途的缀合有SN-38的抗体的施用的最佳剂量和方案显示一直不能从动物模型研究预测的意想不到的优越效能,从而允许有效治疗抗标准抗癌治疗(包括亲本化合物伊立替康(CPT-11))的癌症。

背景技术

[0007] 多年来,使用单克隆抗体(MAb)以将毒性药剂特异性递送至人癌症一直是特异性靶向药物治疗的领域的目标。肿瘤相关MAb与合适的毒性药剂的缀合物已被开发,但在癌症的治疗中喜忧参半,并且实际上几乎未应用于其它疾病,诸如感染性和自身免疫性疾病。毒性药剂最常见地是化疗药物,尽管也已将粒子辐射放射性核素或细菌或植物毒素缀合于MAb,特别地用于癌症的治疗(Sharkey和Goldenberg,CA Cancer J Clin.2006年7-8月;56(4):226-243)以及,更近以来,将放射性免疫缀合物用于某些感染性疾病的临床前治疗(Dadachova和Casadevall,Q J Nucl Med Mol Imaging 2006;50(3):193-204)。

[0008] 使用的MAb-化疗药物缀合物的有利方面是:(a)化疗药物本身在结构上已被明确确定;(b)使用已非常明确的缀合化学物质,通常在远离MAb抗原结合区的特定位点将化疗药物连接于MAb蛋白;(c)可比包括MAb和细胞或植物毒素的化学缀合物更加可重现地产生MAb-化疗药物缀合物,因此更容易进行商业开发且被监管机构批准;和(d)MAb-化疗药物缀合物的全身性毒性比放射性核素MAb缀合物低几个数量级。

[0009] 关于蛋白质-药物缀合物的早期工作表明,对于作为有用的治疗剂的蛋白质-药物缀合物,药物优选地在其已被内化至靶细胞时,以其最初形式被释放。Trouet等Proc.Natl.Acad.Sci.USA79:626-629(1982)显示在药物与抗体部分之间使用被溶酶体切割以释放完整药物的特定肽接头的有利方面。值得注意的是,已基于肿瘤内部的pH通常低

于正常生理pH的观察(Willner等,美国专利5,708,146;Trail等(Science261:212-215(1993)),开发了使用温和的酸可裂解接头诸如含有脲的那些接头制备的MAb-化疗药物缀合物。第一个被批准的MAb-药物缀合物,吉姆单抗奥佐米星,在抗-CD33抗体(人源化P67.6)与高效的加利车霉素衍生物之间掺入了酸不稳定性脲键。Sievers等,J Clin Oncol.19:3244-3254(2001);Hamann等,Bioconjugate Chem.13:47-58(2002)。在一些情况下,产生在化学治疗性药物与MAb之间具有还原不稳定性位阻二硫键的MAb-化疗药物缀合物(Liu等,Proc Natl Acad Sci USA 93:8618-8623(1996))。

[0010] 然而,另一种可裂解的接头包括组织蛋白酶B不稳定性二肽间隔子,诸如Phe-Lys或Val-Cit,与Trouet等人的含有1至4个氨基酸的溶酶体不稳定性肽间隔子类似,其在药物与二肽之间额外掺入可折叠间隔子(Dubowchik等,Bioconjugate Chem.13:855-869(2002);Firestone等,美国专利6,214,345 B1;Doronina等,Nat Biotechnol.21:778-784(2003))。后一方法也用于制备喜树碱的免疫缀合物(Walker等,Bioorg Med Chem Lett.12:217-219(2002))。已被利用的另一种可裂解部分是掺入抗体与化疗药物之间的接头的酯键联。Gillimard和Saragovi已经发现,当将紫杉醇的酯缀合于抗-大鼠p75 MAb,MC192或抗-人TrkA MAb,5C3时,发现缀合物显示出靶特异性毒性。Gillimard和Saragovi,Cancer Res.61:694-699(2001)。

[0011] 抗体-药物缀合物设计的当前概念强调衔接(使用只有在细胞内才被裂解的稳定键)于抗体的超毒性药物的用途。该方法已被用于设计超毒性药物诸如加利车霉素、单甲基澳瑞他汀-E(MMAE)和类美登素类的缀合物。虽然非常稳定的对MAb的键合导致在循环中的稳定性,但缀合物在肝、脾和肾中也被加工,从而在这些器官中释放毒性药物,并且在疾病治疗应用中潜在地减少治疗窗。虽然最近监管机构批准ADCETRIS®(brentuximab vedotin)用于霍奇金淋巴瘤以及批准KADCYLA®(ado-曲妥单抗艾坦辛(ado-trastuzumab emtansine))用于难治性乳腺癌是令人鼓舞,但最大可施用剂量的加利车霉素缀合物在非霍奇金淋巴瘤中的治疗功效的不存在及其随后的不连续,以及用于AML的吉妥珠单抗奥佐米星的市场撤回指向在ADC中使用超毒性剂(ultratoxics)的局限性。

[0012] 本发明的缀合物具有比未缀合的或“裸露的”抗体或抗体片段更大的功效,虽然此类未缀合的抗体部分已在特定情况下被使用。在癌症中,例如,裸抗体已在淋巴瘤(CAMPATH®和 RITUXAN®)、结直肠癌和其它癌症(ERBITUX®和 AVASTIN®)、乳腺癌(HERECEPTIN®)的治疗中,以及目前大量在临床开发(例如,依帕珠单抗、维妥珠单抗、米拉珠单抗)中发挥作用。在大多数这些情况下,临床使用已牵涉将这些裸露的或未缀合的抗体与其它治疗诸如化学治疗或放射治疗组合。

[0013] CL2A接头用于将治疗药物诸如SN-38附接于抗体部分的用途已被公开(例如,美国专利第7,999,083和8,080,250号,实施例部分通过引用并入本文)。然而,存在对用于制备和使用CL2A和MAb-CL2A-SN-38缀合物的更加高效的方法(包括导致最大功效和最低毒性的最优化剂量方案)以及CL2A-SN-38和抗体-CL2A-SN-38缀合物的高效大规模生产的需要。

发明内容

[0014] 本发明利用喜树碱诸如SN-38的抗体缀合物,相较于超毒性化学治疗剂如加利车

霉素、美登素类或MMAE的亚纳摩尔至皮摩尔毒性,所述抗体缀合物在体外具有纳摩尔毒性。非超毒性的药物的使用允许使用不需要细胞内化来释放游离药物,而是允许药物的一定细胞外释放的抗体-药物接头。对于下文中描述的CL2A接头,50%的所缀合的药物在24小时内被释放,从而通过细胞外和细胞内释放其来增加药物的生物利用度。另外,相对无毒的药物的使用允许较高剂量的ADC的施用,从而获得更好的治疗功效。

[0015] 本发明通过提供用于制备和施用CPT-抗体免疫缀合物的改进的方法和组合物,解决了本领域中未实现的需要。优选地,喜树碱是SN-38。所公开的方法和组合物用于治疗多种对于其它形式的治疗是难治疗性的或对所述治疗不太起反应的疾病和病况,其可包括针对其的合适抗体或抗原结合抗体片段(用于选择性靶向)可被开发或是可获得的或是已知的疾病。可用主题免疫缀合物治疗的优选疾病或病况可包括,例如,癌症、自身免疫性疾病、免疫功能障碍疾病或由感染性生物引发的疾病。

[0016] 抗体可具有各种同种型,优选地人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4,更优选含有人IgG1铰链和恒定区序列。抗体或其片段可以是嵌合、人源化或完全人抗体或其抗原结合片段,诸如半IgG4抗体,如由van der Neut Kolfischoten等(Science 2007;317:1554-1557)描述的,或如商购可得的(例如, **ABLYNX®**, Ghent, Belgium) 单结构域抗体(例如, 纳米抗体)。更优选地, 抗体或其片段可被设计或选择来包含属于特定同种异型的人恒定区序列, 这可导致当向人受试者施用所述免疫缀合物时, 免疫原性降低。用于施用的优选同种异型包括非-G1m1同种异型(nG1m1), 诸如G1m3、G1m3,1、G1m3,2或G1m3,1,2。更优选地, 所述同种异型选自自由以下组成的组:nG1m1、G1m3、nG1m1,2和Km3同种异型。

[0017] 所使用的抗体可结合于本领域中已知的任何疾病相关抗原。当疾病状态为癌症时, 例如, 由肿瘤细胞表达的或否则与肿瘤细胞相关的许多抗原是本领域中是已知的, 包括但不限于碳酸酐酶IX、 α -甲胎蛋白(AFP)、 α -辅肌动蛋白-4、A3、对于A33抗体是特异的抗原、ART-4、B7、Ba 733、BAGE、BrE3-抗原、CA125、CAMEL、CAP-1、CASP-8/m、CCL19、CCL21、CD1、CD1a、CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD11A、CD14、CD15、CD16、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD29、CD30、CD32b、CD33、CD37、CD38、CD40、CD40L、CD44、CD45、CD46、CD52、CD54、CD55、CD59、CD64、CD66a-e、CD67、CD70、CD70L、CD74、CD79a、CD80、CD83、CD95、CD126、CD132、CD133、CD138、CD147、CD154、CDC27、CDK-4/m、CDKN2A、CTLA-4、CXCR4、CXCR7、CXCL12、HIF-1 α 、结肠特异性抗原-p(CSAp)、CEACAM5、CEACAM6、c-Met、DAM、EGFR、EGFRvIII、EGP-1(TROP-2)、EGP-2、ELF2-M、Ep-CAM、成纤维细胞生长因子(FGF)、F1t-1、F1t-3、叶酸受体、G250抗原、GAGE、gp100、GR0- β 、HLA-DR、HM1.24、人绒毛膜促性腺素(HCG)及其亚单位、HER2/neu、组蛋白H2B、组蛋白H3、组蛋白H4、HMGB-1、缺氧诱导因子(HIF-1)、HSP70-2M、HST-2、Ia、IGF-1R、IFN- γ 、IFN- α 、IFN- β 、IFN- λ 、IL-4R、IL-6R、IL-13R、IL-15R、IL-17R、IL-18R、IL-2、IL-6、IL-8、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-23、IL-25、胰岛素样生长因子-1(IGF-1)、KC4-抗原、KS-1-抗原、KS1-4、Le-Y、LDR/FUT、巨噬细胞游走抑制因子(MIF)、MAGE、MAGE-3、MART-1、MART-2、NY-ESO-1、TRAG-3、mCRP、MCP-1、MIP-1A、MIP-1B、MIF、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC5ac、MUC13、MUC16、MUM-1/2、MUM-3、NCA66、NCA95、NCA90、PAM4抗原、胰腺癌粘蛋白、PD-1、PD-L1、PD-1受体、胎盘生长因子、p53、PLAGL2、前列腺酸性磷酸酶、PSA、PRAME、PSMA、PlGF、ILGF、ILGF-1R、IL-6、IL-25、RS5、RANTES、T101、SAGE、S100、存活素、存活素-2B、TAC、TAG-72、腱生蛋白、TRAIL受体、TNF- α 、Tn抗原、Thomson-Friedenreich抗原、肿瘤坏死抗原、

VEGFR、ED-B纤连蛋白、WT-1、17-1A-抗原、补体因子C3、C3a、C3b、C5a、C5、血管生成标志物、bcl-2、bcl-6、Kras、癌基因标志物和癌基因产物(参见,例如,Sensi等,Clin Cancer Res 2006,12:5023-32;Parmiani等,J Immunol 2007,178:1975-79;Novellino等Cancer Immunol Immunother 2005,54:187-207)。优选地,所述抗体结合于AFP、CEACAM5、CEACAM6、CSAp、EGP-1 (TROP-2)、AFP、MUC5ac、PAM4抗原、CD74、CD19、CD20、CD22或HLA-DR。

[0018] 可利用的示例性抗体包括,但不限于,hR1 (抗-IGF-1R,美国专利申请系列第12/722,645号,2010年3月12日提交的)、hPAM4 (抗-MUC5ac,美国专利第7,282,567号)、hA20 (抗-CD20,美国专利第7,251,164号)、hA19 (抗-CD19,美国专利第7,109,304号)、hIMMU31 (抗-AFP,美国专利第7,300,655号)、hLL1 (抗-CD74,美国专利第7,312,318号)、hLL2 (抗-CD22,美国专利第7,074,403号)、hRFB4 (抗-CD22,美国临时专利申请系列第61/944,295号,2014年2月25日提交的)、hMu-9 (抗-CSAp,美国专利第7,387,773号)、hL243 (抗-HLA-DR,美国专利第7,612,180号)、hMN-14 (抗-CEACAM5,美国专利第6,676,924号)、hMN-15 (抗-CEACAM6,美国专利第7,541,440号)、hRS7 (抗-EGP-1,美国专利第7,238,785号)、hMN-3 (抗-CEACAM6,美国专利第7,541,440号)、Ab124和Ab125 (抗-CXCR4,美国专利第7,138,496号),每一个引述的专利或申请的实施例部分通过引用并入本文。更优选地,所述抗体为IMMU-31 (抗-AFP)、hRS7 (抗-TROP-2)、hMN-14 (抗-CEACAM5)、hMN-3 (抗-CEACAM6)、hMN-15 (抗-CEACAM6)、hLL1 (抗-CD74)、hLL2 (抗-CD22)、hL243或IMMU-114 (抗-HLA-DR)、hA19 (抗-CD19) 或hA20 (抗-CD20)。如本文所用的,术语依帕珠单抗和hLL2可互换使用,术语维妥珠单抗与hA20、hL243g4P、hL243 γ 4P和IMMU-114亦可互换使用。

[0019] 所使用的替代抗体包括,但不限于,阿昔单抗 (抗-糖蛋白IIb/IIIa受体)、阿仑单抗 (抗-CD52)、贝伐单抗 (抗-VEGF)、西妥昔单抗 (抗-EGFR)、吉妥珠单抗 (抗-CD33)、替伊莫 (抗-CD20)、帕尼单抗 (抗-EGFR)、利妥昔单抗 (抗-CD20)、托西莫单抗 (抗-CD20)、曲妥单抗 (抗-ErbB2)、lambrolizumab (抗-PD-1受体)、nivolumab (抗-PD-1受体)、易普利姆玛 (抗-CTLA-4)、阿巴伏单抗 (抗-CA-125)、阿德木单抗 (抗-EpCAM)、atlizumab (抗-IL-6受体)、贝那利珠单抗 (抗-CD125)、阿托珠单抗 (GA101,抗-CD20)、CC49 (抗-TAG-72)、AB-PG1-XG1-026 (抗-PSMA,美国专利申请11/983,372,保藏为ATCC PTA-4405和PTA-4406)、D2/B (抗-PSMA, WO 2009/130575)、托珠单抗 (抗-IL-6受体)、巴利昔单抗 (抗-CD25)、达珠单抗 (抗-CD25)、依法利珠单抗 (抗-CD11a)、GA101 (抗-CD20; Glycart Roche)、莫罗单抗-CD3 (抗-CD3受体)、那他珠单抗 (抗- α 4整联蛋白)、奥马珠单抗 (抗-IgE); 抗-TNF- α 抗体诸如CDP571 (Ofei等, 2011, Diabetes 45:881-85)、MTNFAI、M2TNFAI、M3TNFAI、M3TNFABI、M302B、M303 (Thermo Scientific, Rockford, IL)、英夫利昔单抗 (Centocor, Malvern, PA)、赛妥珠单抗 (certolizumab pegol) (UCB, Brussels, Belgium)、抗-CD40L (UCB, Brussels, Belgium)、阿达木单抗 (Abbott, Abbott Park, IL)、Benlysta (Human Genome Sciences); 治疗阿尔茨海默病的抗体诸如Alz50 (Ksiezak-Reding等, 1987, J Biol Chem 263:7943-47)、甘替鲁单抗、苏兰珠单抗和英夫利昔单抗; 抗-纤维蛋白抗体诸如59D8、T2G1s、MH1; 抗-CD38抗体诸如MOR03087 (MorphoSys AG)、MOR202 (Celgene)、HuMax-CD38 (Genmab) 或达雷木单抗 (Johnson&Johnson); (抗-HIV抗体诸如P4/D10 (美国专利8,333,971)、Ab 75、Ab 76、Ab 77 (Paulik等, 1999, Biochem Pharmacol 58:1781-90) 以及由Polymun (Vienna, Austria) 所描述和销售的, 还有美国专利5,831,034、美国专利5,911,989以及Vcelar等, AIDS 2007;21

(16):2161-2170和Joos等,Antimicrob.Agents Chemother.2006;50(5):1773-9(所述专利和文献均通过引用并入本文)所描述的抗-HIV抗体;以及抗-病原体抗体诸如CR6261(抗-流感病毒)、艾韦单抗(抗-乙型肝炎病毒)、非维珠单抗(抗-呼吸道合胞病毒)、福拉韦单抗(抗-狂犬病毒)、莫维珠单抗(抗-呼吸道合胞病毒)、帕利珠单抗(抗-呼吸道合胞病毒)、帕诺库单抗(抗-假单胞菌属)、雷韦单抗(抗-狂犬病病毒)、瑞加韦单抗(抗-巨细胞病毒)、司韦单抗(抗-巨细胞病毒)、tivirumab(抗-乙肝)和乌珠单抗(抗-大肠杆菌)。

[0020] 优选地,抗体部分连接于至少一个药物部分,更优选1至约5个药物部分,可选地约7至12个药物部分。在各种实施方案中,可将抗体部分可附接于4或6个药物部分,或5个或更少的药物部分。每抗体部分的药物部分的数目可以是1、2、3、4、5、6个或更多个。

[0021] 水溶性CPT衍生物的实例是CPT-11。关于CPT-11的药理学及其在体内转化为活性SN-38的大量临床数据是可获得的(Iyer和Ratain,Cancer Chemother Pharmacol.42:S31-43(1998);Mathijssen等,Clin Cancer Res.7:2182-2194(2002);Rivory,Ann NY Acad Sci.922:205-215,2000)。活性形式的SN-38的效力约为CPT-11的2至3个数量级。在具体的优选实施方案中,免疫缀合物可以是hMN-14-SN-38、hMN-3-SN-38、hMN-15-SN-38、hIMMU-31-SN-38、hRS7-SN-38、hR1-SN-38、hA20-SN-38、hPAM4-SN-38、hL243-SN-38、hLL1-SN-38、hRFB4-SN-38、hMu-9-SN-38或hLL2-SN-38缀合物。更优选地,CL2A接头用于将SN-38缀合于抗体部分。

[0022] 各种实施方案可涉及使用主题方法和组合物来治疗癌症,包括但不限于非霍奇金淋巴瘤、B细胞急性和慢性淋巴白血病、伯基特淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、急性大B细胞淋巴瘤、毛细胞白血病、急性骨髓性白血病、慢性骨髓性白血病、急性淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞白血病、T细胞淋巴瘤和白血病、多发性骨髓瘤、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、癌、黑色素瘤、肉瘤、神经胶质瘤、骨癌和皮肤癌。癌可以包括口腔、食道、胃肠道、肺道、肺、胃、结肠、乳腺、卵巢、前列腺、子宫、子宫内膜、宫颈、膀胱、胰腺、骨、脑、结缔组织、肝、胆、膀胱、肾、皮肤、中枢神经系统和睾丸的癌。

[0023] 可潜在地用主题免疫缀合物治疗的自身免疫性或免疫功能障碍疾病包括急性免疫血小板减少症、慢性免疫血小板减少症、皮炎、西德纳姆舞蹈症、重症肌无力、系统性红斑狼疮、狼疮性肾炎、风湿热、多腺体综合征、大疱性类天疱疮、寻常天疱疮、糖尿病(例如,青少年糖尿病)、亨诺-许兰氏紫癜、链球菌感染后肾炎、结节性红斑、高安动脉炎、ANCA相关性血管炎、阿狄森氏病、类风湿关节炎、多发性硬化症、结节病、溃疡性结肠炎、多形性红斑、IgA肾病、结节性多动脉炎、强直性脊柱炎、古德帕斯彻氏综合征、血栓闭塞性脉管炎、Sjögren综合征、原发性胆汁性肝硬化、桥本甲状腺炎、甲状腺毒症、硬皮病、慢性活动型肝炎、多肌炎/皮炎、多软骨炎、寻常天疱疮、韦格纳肉芽肿、膜性肾病、肌萎缩侧索硬化、脊髓痨、巨细胞动脉炎/多肌痛、恶性贫血、急进性肾小球肾炎、银屑病、纤维化肺泡炎、移植排斥(GVHD)、器官移植排斥、脓毒病、败血症和炎症。

[0024] 另外,主题方法和组合物可用于治疗感染性疾病,例如涉及病毒体诸如细菌、立克次氏体、支原体、原生动物、真菌、病毒、寄生虫或其它微生物剂引起的感染的疾病。实例包括引发AIDS的人免疫缺陷病毒(HIV)、结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)、无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*)、嗜肺军团菌(*Legionella pneumophila*)、化脓性链

球菌 (*Streptococcus pyogenes*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、淋病奈瑟球菌 (*Neisseria gonorrhoeae*)、脑膜炎奈瑟球菌 (*Neisseria meningitidis*)、肺炎球菌 (*Pneumococcus*)、新型隐球菌 (*Cryptococcus neoformans*)、荚膜组织胞浆菌 (*Histoplasma capsulatum*)、乙型流感嗜血杆菌 (*Hemophilis influenzae B*)、梅毒螺旋体 (*Treponema pallidum*)、莱姆病螺旋体 (*Lyme disease spirochetes*)、西尼罗河病毒、绿脓假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、麻风分枝杆菌 (*Mycobacterium leprae*)、流产布鲁氏菌 (*Brucella abortus*)、狂犬病毒、流感病毒、巨细胞病毒、单纯疱疹病毒I、单纯疱疹病毒II、人血清细小样病毒、呼吸道合胞病毒、水痘带状疱疹病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、麻疹病毒、腺病毒、人T细胞白血病病毒、EB病毒、鼠白血病病毒、腮腺炎病毒、水疱性口炎病毒、辛德毕斯病毒、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒、疣病毒、蓝舌病毒、仙台病毒、猫白血病病毒、呼肠孤病毒、脊髓灰质炎病毒、猿猴病毒40、小鼠乳腺肿瘤病毒、登革热病毒、风疹病毒、恶性疟原虫 (*Plasmodium falciparum*)、间日疟原虫 (*Plasmodium vivax*)、刚地弓形虫 (*Toxoplasma gondii*)、让氏锥虫 (*Trypanosoma rangeli*)、克氏锥虫 (*Trypanosoma cruzi*)、罗德西亚锥虫 (*Trypanosoma rhodesiense*)、布氏锥虫 (*Trypanosoma brucei*)、曼森氏血吸虫 (*Schistosoma mansoni*)、日本血吸虫 (*Schistosoma japonicum*)、牛巴贝斯虫 (*Babesia bovis*)、柔嫩艾美球虫 (*Elmeria tenella*)、盘尾丝虫 (*Onchocerca volvulus*)、热带利什曼原虫 (*Leishmania tropica*)、旋毛形线虫 (*Trichinella spiralis*)、小泰勒虫 (*Theileria parva*)、水泡绦虫 (*Taenia hydatigena*)、羊绦虫 (*Taenia ovis*)、牛肉绦虫 (*Taenia saginata*)、细粒棘球绦虫 (*Echinococcus granulosus*)、科氏中殖孔绦虫 (*Mesocostoides corti*)、关节炎支原体 (*Mycoplasma arthritidis*)、猪鼻支原体 (*M.hyorhinis*)、口腔支原体 (*M. orale*)、精氨酸支原体 (*M.arginini*)、莱氏无胆甾原体 (*Acholeplasma laidlawii*)、唾液支原体 (*M.salivarium*) 和肺炎支原体 (*M.pneumoniae*)。将列出针对感染性生物体 (抗毒素和抗病毒抗体) 以及其它靶的抗体的综述包含在 Casadevall, Clin Immunol 1999;93 (1):5-15 (通过引用并入本文) 中。

[0025] 在涉及癌症治疗的某些实施方案中, 可将药物缀合物与外科手术、放射治疗、化学治疗、利用裸抗体的免疫治疗、放射免疫治疗、免疫调节剂、疫苗等组合使用。类似组合在顺从于抗体部分的其它疾病诸如自身免疫性疾病的治疗中是优选的。例如, 可将喜树碱缀合物可与TNF抑制剂、B-细胞抗体、干扰素、白细胞介素和其它有效药剂组合以用于治疗自身免疫性疾病, 诸如类风湿关节炎、全身性红斑狼疮、**Sjögren**综合征、多发性硬化症、血管炎以及I型糖尿病 (幼年型糖尿病), 这些组合治疗可允许在此类组合中提供较低剂量的每一种治疗剂, 从而降低某些严重的副作用, 并且潜在地减少所需治疗过程。

[0026] 在感染性疾病中, 可将药物免疫缀合物与其它治疗药物、免疫调节剂、裸MAb或疫苗 (例如, 针对肝炎、HIV或乳头状瘤病毒、或基于这些病毒的免疫原的疫苗、或激酶抑制剂的MAb, 诸如在乙型肝炎中) 组合。针对这些和其它病毒病原体的抗体和基于抗原的疫苗在本领域是已知的, 并且在一些情况下, 已经在商业使用中。抗-感染性单克隆抗体的开发最近已由Reichert和Dewitz (Nat Rev Drug Discovery 2006;5:191-195) (通过引用并入本文) 综述, 25种其它单克隆抗体正在临床研究中并且20种单克隆抗体在临床研究过程中被中断, 所述文献概述了针对其的裸抗体治疗已被实现的优先病原体, 从而导致只有两个针对其的抗体正处于III期临床试验中或将要上市的病原体 (呼吸道合胞病毒和抗甲氧西

林金黄色葡萄球菌)。对于联合治疗,在例如美国专利第4,925,648、5,332,567、5,439,665、5,601,825、5,609,846、5,612,016、6,120,768、6,319,500、6,458,933、6,548,275号以及在美国专利申请公开第20020136690和20030103982号(所述专利和专利申请公开的每一篇的实施例部分通过引用并入本文)中公开了放射免疫治疗用于治疗感染性生物体的用途。

[0027] 免疫缀合物的优选最佳给药可包括优选每周1次、每周2次、每隔一周1次或每隔三周1次施予的3mg/kg至18mg/kg的剂量。最佳给药方案可以包括如下的治疗周期:连续2周的治疗,随后1、2、3或4周的休息,或治疗周与休息周交替进行,或1周的治疗,随后2、3或4周的休息,或3周的治疗,随后1、2、3或4周的休息,或4周的治疗,随后1、2、3或4周的休息,或5周的治疗,随后1、2、3、4或5周的休息,或每两周一次的施用,每三周一次的施用或每月一次的施用。可将治疗延长,以进行许多周期,优选至少2个、至少4个、至少6个、至少8个、至少10个、至少12个、至少14或至少16个周期。剂量可高达24mg/kg。使用的示例性剂量可包括1mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、4mg/kg、5mg/kg、6mg/kg、7mg/kg、8mg/kg、9mg/kg、10mg/kg、11mg/kg、12mg/kg、13mg/kg、14mg/kg、15mg/kg、16mg/kg、17mg/kg、18mg/kg、19mg/kg、20mg/kg、22mg/kg和24mg/kg。优选的剂量是4,6,8,9,10,12,14,16或18mg/kg。本领域普通技术人员将了解,在选择免疫缀合物的最佳剂量中可能要考虑许多因素,诸如年龄、一般健康状况、特定器官的功能或重量,以及对特定器官系统(例如,骨髓)的之前的治疗作用,以及可在治疗过程中增加或减少施用的剂量和/或频率。可根据需要重复剂量,在少至4至8个剂量后观察到肿瘤缩小的证据。本文中公开的施用的最优化剂量和方案显示在人受试者中的未预料到的优良功效和减小的毒性,这可不可能从动物模型研究中预测到。令人惊讶地,所述优良的功效允许治疗先前被发现抵抗一种或多种标准抗癌治疗(包括在体内从其衍生SN-38的亲代化合物CPT-11)的肿瘤。

[0028] 关于本发明所要求保护的组合物和方法的令人惊奇的结果是高剂量的抗体-药物缀合物的预料不到的耐受性,即使重复输注,也只观察到相对低等级的恶性、呕吐和腹泻的毒性,以及皮肤皮疹,或可控制的嗜中性粒细胞减少。进一步令人惊奇的结果是抗体-药物缀合物的积累的缺乏,与已将SN-38缀合于白蛋白、PEG或其它载体的其它产品不同。积累的缺乏与提高的耐受性和严重毒性(即使在重复或增加剂量后亦如此)的不存在相关。这些令人惊讶的结果允许剂量和递送方法的最优化,具有预料不到的高功效和低毒性。所要求保护的方法在具有先前具有抗性的癌症的个体提供了肿瘤的缩小,肿瘤的尺寸缩小15%或更多,优选20%或更多,优选30%或更多,更优选为40%或更多(如按最长的直径测量的)。本领域普通技术人员将了解,肿瘤尺寸可通过多种不同的技术,诸如肿瘤的总体积、任意维度上的最大肿瘤尺寸或在几个维度上的尺寸测量的组合来测量。这可利用标准放射学方法,例如计算机体层摄影术、超声检查和/或正电子发射断层摄影术。测量尺寸的装置不如观察利用免疫缀合物减小肿瘤体积,优选地导致肿瘤的消除的趋势重要。

[0029] 虽然可将免疫缀合物以周期性推注来进行施周,但在替代实施方案中,可通过抗体-药物缀合物的连续输注来施用免疫缀合物。为了增加免疫缀合物在血液中的C_{max}和延长其PK,可以例如通过留置导管来进行连续输注。此类装置在本领域中是公知的,诸如HICKMAN®、BROVIAC®或PORT-A-CATH®导管(参见,例如,Skolnik等,Ther Drug Monit 32:741-48,2010),并且可使用任何此类已知的留置导管。多种连续输液泵在本领域中也是已知的,并且可以使用任何此类已知的输液泵。用于连续输注的剂量范围可

为0.1和2.0mg/kg/日。更优选地,可在2至5小时,更优选2-3小时的相对短的时间内施用这些免疫缀合物。

[0030] 在特别优选的实施方案中,免疫缀合物和给药方案在耐标准治疗的患者中可以是有效的。例如,可向对利用伊立替康(SN-38的母体剂)的先前治疗无反应的患者施用hMN-14-SN-38免疫缀合物。令人惊讶地,耐伊立替康患者可显示对hMN-14-SN-38的部分反应。免疫缀合物特异性靶向肿瘤组织的能力可通过治疗剂的改善的靶向和增强的递送克服肿瘤抗性。或者,可将抗-CEACAM5免疫缀合物,诸如hMN-14与抗-CEACAM6免疫缀合物,诸如hMN-3或hMN-15共施用。其它抗体-SN-38的免疫缀合物可显示相较于其它标准治疗性治疗的类似的提高的效力和/或降低的毒性,并且不同SN-38免疫缀合物的组合,或SN-38抗体缀合物与缀合于放射性核素、毒素或其它药物的抗体的组合,可提供甚至更加提高的功效和/或降低的毒性。特别优选的受试者可以是转移性结肠癌患者、三阴性乳腺癌患者、HER+、ER+、黄体酮+乳腺癌患者、转移性非小细胞肺癌(NSCLC)患者、转移性胰腺癌患者、转移性肾细胞癌患者、转移性胃癌患者、转移性前列腺癌患者或转移性小细胞肺癌患者。

[0031] 某些实施方案涉及用于大规模制备CL2A-SN38缀合物和抗体-CL2A-SN-38免疫缀合物,具有提高的收率和/或效率的改进的方法。特别优选的实施方案示于图1中。优选地,CL2A接头的末端上的马来酰亚胺基团与抗体部分或其它靶向肽或蛋白质上的还原的半胱氨酸残基上的巯基侧链反应,虽然将CL2A部分附接于抗体部分的其它方法是已知的并且可以使用。在其它优选实施方案中,从CL2A-SN-38部分制备的免疫缀合物通过切向过滤来纯化,从而避免在尺寸排阻和疏水相互作用柱层析上进行的繁琐层析,并且使得能够在纯化后获得高蛋白质回收。

[0032] 在图1中举例说明的优选实施方案中,将在赖氨酸侧链上具有MMT保护基团的Fmoc-赖氨酸(MMT)-OH(中间体1,图1)与PABOH和EEDQ在二氯甲烷中反应以产生Fmoc-Lys(MMT)-PABOH,其与二乙胺反应以形成Lys(MMT)-PABOH(中间体2,图1)。将Lys(MMT)-PABOH与PEG-叠氮化物和EEDQ试剂在二氯甲烷中反应以生成叠氮基-PEG-Lys(MMT)-PABOH(中间体3,图1)。PEG部分含有确定数目的单体,与含有不同数目的单体的混合物的标准PEG相反,从而提供具有更均匀的溶解性和药物代谢动力学特征的终产品。在单独的反应中,SN-38与TBDMS-C1反应以生成10-O-TBDMS-SN-38(中间体4,图1)。10-O-TBDMS-SN-38通过与三氯甲基碳酸酯和DMAP反应以产生反应性中间体10-O-TBDMS-SN-38-20-O-氯甲酸酯而被活化(中间体5,图1),所述10-O-TBDMS-SN-38-20-O-氯甲酸酯与叠氮基-PEG-Lys(MMT)-PABOH原位反应,以产生叠氮基-PEG-Lys(MMT)-PABO-CO-20-O-SN-38-TBDMS中间体(中间体6,图1)。用TBAF/AcOH/二氯甲烷处理中间体6,以从SN-38部分除去TBDMS保护基团。将所得的叠氮基-PEG-Lys(MMT)-PABO-CO-20-O-SN-38(中间体7,图1)与MCC-炔(中间体8,图1)反应,以产生含有用于与抗体缀合的马来酰亚胺反应基团的MCC-PEG-Lys(MMT)-PAB-O-SN-38(中间体9,图1)。反应通过PEG部分上的叠氮化物与MCC-炔中间体上的炔之间的铜介导的环加成反应来发生。最后,从赖氨酸侧链除去MMT保护基以产生CL2A-SN-38产物,其具有可用于缀合于抗体、抗体片段或含有还原的巯基的任何其它蛋白质或肽的反应性马来酰亚胺部分。普通技术人员将了解,如果期望对除半胱氨酸外的氨基酸侧链的缀合,则可引入除马来酰亚胺外的反应性基团。

[0033] 在优选实施方案中,接头-SN-38缀合物包含可细胞内裂解的部分,所述部分为包

含药物部分的活化的羟基基团和4-氨基苄醇或在苄基位置上用C₁-C₁₀烷基取代的取代的4-氨基苄醇,而后者,通过其氨基附接于L-氨基酸或包含多达4个L-氨基酸部分的多肽;其中N-末端附接于以抗体部分-结合基团终止的交联剂。

附图说明

[0034] 图1.用于CL2A-SN-38的改进的大规模生产的新型方案。

[0035] 图2.利用MAb-CL2A-SN-38缀合物对患有Capan1人胰腺癌的无胸腺裸小鼠的体内治疗。

[0036] 图3.利用MAb-CL2A-SN-38缀合物对患有BxPC3人胰腺癌的无胸腺裸小鼠的体内治疗。

[0037] 图4.利用hMN-14-CL2A-SN-38缀合物对患有LS174T人结肠癌的无胸腺裸小鼠的体内治疗。

[0038] 图5A.hRS7-SN-38 ADC在具有人非小细胞肺癌肿瘤异种移植物的老鼠中的治疗功效。每4天一次用hRS7-CL2-SN-38注射具有Calu-3肿瘤的老鼠(N=5-7),进行总共4次注射(q4dx4)。以指定的量(表示为每剂量SN-38的量;长箭头=缀合物注射,短箭头=伊立替康注射)施用所有ADC和对照。

[0039] 图5B.hRS7-SN-38 ADC在具有人结直肠肿瘤异种移植物的老鼠中的治疗功效。利用ADC注射具有COLO 205肿瘤的老鼠(N=5) 8次(q4dx8),或每2天一次用MTD的伊立替康注射所述老鼠,进行总共5次注射(q2dx5)。以指定的量(表示为每剂量SN-38的量;长箭头=缀合物注射,短箭头=伊立替康注射)施用所有ADC和对照。

[0040] 图5C.hRS7-SN-38 ADC在具有人胰腺癌异种移植物的老鼠中的治疗功效。每周2次用指定的药剂治疗具有Capan-1(N=10)肿瘤的老鼠(N=10),进行4周。以指定的量(表达为每剂量SN-38的量;长箭头=缀合物注射,短箭头=伊立替康注射)施用所有ADC和对照。

[0041] 图5D.hRS7-SN-38 ADC在具有人胰腺癌异种移植物的老鼠中的治疗功效。每周2次用指定的药剂治疗具有BxPC-3肿瘤的老鼠(N=10),共进行4周。以指定的量(表达为每剂量SN-38的量;长箭头=缀合物注射,短箭头=伊立替康注射)施用所有ADC和对照。

[0042] 图5E.hRS7-SN-38 ADC在具有人肺鳞癌异种移植物的老鼠中的治疗功效。除了每周2次施用ADC,进行4周以外,具有SK-MES-1肿瘤的老鼠(N=8)还接受MTD的CPT-11(q2dx5)。以指定的量(表达为每剂量SN-38的量;长箭头=缀合物注射,短箭头=伊立替康注射)施用所有ADC和对照。

[0043] 图6.依帕珠单抗(Emab)-SN-38与维妥珠单抗(Vmab)-SN-38缀合物在皮下Ramos模型中的比较功效。每周2次向具有平均约0.35cm³(0.20-0.55cm³)的肿瘤的老鼠(N=10每组)施用0.25或0.5mg的每一种缀合物,总共进行4周。

[0044] 图7A.Emab抗-CD22-SN-38缀合物(实线)对比不相关拉贝珠单抗(Lmab)-SN-38缀合物(虚线)在具有皮下Ramos肿瘤的裸小鼠中的特异性。每周2次以每剂量75μg的每一种缀合物的剂量(54.5μg/kg的SN-38,基于22g的平均重量)向动物腹膜内施予所述缀合物,进行4周。存活基于至3.0cm³的进展时间(TTP),肿瘤始于平均0.4cm³的尺寸。用于比较Emab-SN-38对Lmab-SN-38缀合物的中位存活时间(所示)的P值示于每一个图中。

[0045] 图7B.Emab抗-CD22-SN-38(实线)对比不相关拉贝珠单抗(Lmab)-SN-38缀合物(虚

线)在具有皮下Ramos肿瘤的裸小鼠中的特异性。每周2次以每剂量125 μ g的每一种缀合物的剂量(91 μ g/kg的SN-38,,基于22g的平均重量)向动物腹膜内施予所述缀合物,进行4周。存活基于至3.0cm³的进展时间(TTP),肿瘤始于0.4cm³的平均尺寸。用于比较Emab-SN-38对Lmab-SN-38缀合物的中位存活时间(所示)的P值示于每一个图中。

[0046] 图7C.Emab抗-CD22-SN-38缀合物(实线)对比不相关拉贝珠单抗(Lmab)-SN-38缀合物(虚线)在具有皮下Ramos肿瘤的裸小鼠中的特异性。每周2次以每剂量250 μ g的每一种缀合物的剂量(182 μ g/kg的SN-38,基于22g的平均重量)向动物腹膜内施予所述缀合物,进行4周。存活基于至3.0cm³的进展时间(TTP),肿瘤始于平均0.4cm³的尺寸。用于比较Emab-SN-38对Lmab-SN-38缀合物的中位存活时间(所示)的P值示于每一个图中。还显示了每周1次通过腹膜内注射施予伊立替康(6.5 μ g/剂量;与250- μ g剂量的Emab-SN-38缀合物大致相同的SN-38当量)的另一组动物的存活曲线(灰色实线)。

[0047] 图8.在施用IMMU-130(拉贝珠单抗-NS-38)之前患者的先前治疗史。先前治疗饮用IV期CRC结肠切除术/肝切除术(部分叶)、肝转移的射频消融治疗、肺转移的楔形切除和利用伊立替康/奥沙利铂,Folfirinox、Folfirinox+贝伐单抗、贝伐单抗+5-FU/亚叶酸、FolFiri、FolFiri+西妥昔单抗以及单独的西妥昔单抗的化学治疗。患者通过每隔1周的缓慢IV输注接受16mg/kg的剂量的IMMU-132,进行总共17个治疗剂量。

具体实施方式

[0048] 定义

[0049] 在以下的描述中,使用许多术语,并且以下定义被提供来帮助理解所述主题。本文中未明确定义的术语根据它们的平常和通常的含义来使用。

[0050] 除非另有规定,否则一个/种(a)或一个/种(an)意指“一个/种或多个/种”。

[0051] 如本文所用的,术语约表示值加或减百分之十(10%)。例如,“约100”是指90与110之间的任何数值。

[0052] 如本文所用的,抗体是指全长(即,天然存在的或通过正常免疫球蛋白基因片段重组过程形成的)免疫球蛋白分子(例如,IgG抗体)或免疫球蛋白分子的抗原结合部分,诸如抗体片段。可在所要求保护的主题的范围内缀合或另外地衍生抗体或抗体片段。此类抗体包括但不限于IgG1、IgG2、IgG3的、IgG4(和IgG4亚形式),以及IgA同种型。

[0053] 抗体片段是抗体的部分,诸如F(ab')₂、F(ab)₂、Fab'、Fab、Fv、scFv(单链Fv)、单结构域抗体(DAB或VHH)等,包括上面引用的IgG4的半分子(van der Neut Kolfshoten等(Science 2007;317(9月14日):1554-1557)。单结构域抗体的商购可得形式,被称为纳米抗体(ABLYNX®,Ghent,Belgium),将在下文进一步详细讨论。无论结构如何,所使用的抗体片段与被完整抗体识别的同一抗原结合。术语“抗体片段”还包括合成的或基因工程改造的蛋白质,所述蛋白质通过结合至特定抗原以形成复合物来象抗体一样起作用。例如,抗体片段包括由可变区组成的分离的片段,诸如由重链和轻链的可变区组成的“Fv”片段,其中轻链和重链可变区通过肽接头连接的重组单链多肽分子(“scFv蛋白”),和模拟高变区诸如CDR的由氨基酸残基组成的最小识别单位。Fv片段可以以不同的方式被构建来产生多价和/或多特异性结合形式。在多价的情况下,它们具有不止一个针对特定表位的结合位点,然而对于多特异性形式,不止一个表位(相同抗原的或针对一种抗原和不同抗原的)被结合。

[0054] 裸抗体通常是未缀合于治疗剂的完整抗体。这是因为抗体分子的Fc部分提供效应子或免疫功能,诸如补体结合和ADCC(抗体依赖性细胞的细胞毒性),其将机制设置成可导致细胞裂解的作用。然而,Fc部分可能不是抗体的治疗功能所需的,而是其它机制,诸如细胞凋亡、抗-血管生成、抗-转移活性、抗-粘附活性,诸如异质性或同质性粘附的抑制和信号转导途径中的干扰,可能起作用,并干扰疾病的进展。裸抗体包括多克隆和单克隆抗体及其片段,其包括鼠抗体以及某些重组抗体,诸如嵌合、人源化或人抗体及其片段。如本文所用的,“裸露的”与“未缀合的”同义,并且意指未连接或缀合于治疗剂。

[0055] 嵌合抗体是重组蛋白,其含有重和轻抗体链的可变结构域,包括源自一个物种的抗体,优选地啮齿动物抗体,更优选为鼠抗体的互补决定区(CDR),而所述抗体分子的恒定结构域来源于人抗体的恒定结构域。对于兽医应用,嵌合抗体的恒定结构域可来源于其它物种诸如灵长类动物、猫或狗的抗体。

[0056] 人源化抗体是其中将来自一个物种的抗体例如鼠抗体的CDR从鼠抗体的重和轻可变链转移至人重和轻可变结构域(框架区)的重组蛋白。抗体分子的恒定结构域来源于人抗体的恒定结构域。在某些情况下,人源化抗体的框架区的特定残基,特别是触及或靠近CDR序列的那些残基可被修饰,例如用来自原始鼠、啮齿类动物、类人猿或其它抗体的对应残基替代。

[0057] 人抗体是例如从已被“工程化”来响应抗原攻击而产生人抗体的转基因小鼠获得的抗体。在该技术中,人重和轻链基因座的元件引入从胚胎干细胞系衍生的小鼠的品系,所述胚胎干细胞系包含内源重链和轻链基因座的靶向破坏。转基因小鼠可合成对于各种抗原是特异的人抗体,并且小鼠可用于产生分泌人抗体的杂交瘤。用于从转基因小鼠获得人抗体的方法由Green等,Nature Genet.7:13(1994),Lonberg等,Nature 368:856(1994)和Taylor等,Int.Immun.6:579(1994)。完全人抗体还可通过基因或染色体转染方法,以及噬菌体展示技术来构建,所有所述方法和技术在本领域中是已知的。关于从来自未免疫的供体的免疫球蛋白可变结构域基因库体外产生人抗体和其片段,参见例如,例如,McCafferty等,Nature 348:552-553(1990)。在该技术中,将抗体可变结构域基因框内克隆入丝状噬菌体的主要或次要衣壳蛋白基因,并且在噬菌体颗粒的表面上展示为功能性抗体片段。因为丝状颗粒含有噬菌体基因组的单链DNA拷贝,所以基于抗体的功能性质的选择也导致编码显示那些特性的抗体的基因的选择。这样,噬菌体模拟B细胞的某些性质。噬菌体展示可以以多种形式进行,有关它们的综述,参见例如Johnson和Chiswell,Current Opinion in Structural Biology 3:5564-571(1993)。人抗体还可通过体外活化的B细胞产生。参见美国专利第5,567,610和5,229,275号,所述专利的每一个的实施例部分通过引用并入本文。

[0058] 如本文所用的感染性疾病是牵涉病原体诸如细菌、立克次氏体、支原体、原生动物、真菌、病毒、寄生虫或其它微生物剂的感染的疾病。实例包括引起AIDS的人免疫缺陷病毒(HIV)、结核分枝杆菌、无乳链球菌、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、嗜肺军团菌、化脓性链球菌、大肠杆菌、淋病奈瑟球菌、脑膜炎奈瑟球菌、肺炎球菌、新型隐球菌、荚膜组织胞浆菌、乙型流感嗜血杆菌、梅毒螺旋体、莱姆病螺旋体、西尼罗病毒、绿脓假单胞菌、麻风分枝杆菌、流产布鲁氏菌、狂犬病毒、流感病毒、巨细胞病毒、单纯疱疹病毒I、单纯疱疹病毒II、人血清细小样病毒、呼吸道合胞病毒、水痘带状疱疹病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、麻疹病毒、腺病毒、人T细胞白血病毒、EB病毒、鼠白血病毒、腮腺炎病毒、水疱性口炎病毒、

辛德毕斯病毒、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒、疣病毒、蓝舌病毒、仙台病毒、猫白血病毒、呼肠孤病毒、脊髓灰质炎病毒、猿猴病毒40、小鼠乳腺肿瘤病毒、登革热病毒、风疹病毒、恶性疟原虫、间日疟原虫、刚地弓形虫、让氏锥虫、克氏锥虫、罗德西亚锥虫、布氏锥虫、曼森氏血吸虫、日本血吸虫、牛巴贝斯虫、柔嫩艾美球虫、盘尾丝虫、热带利什曼原虫、旋毛形线虫、小泰勒虫、水泡绦虫、羊绦虫、牛肉绦虫、细粒棘球绦虫、科氏中殖孔绦虫、关节炎支原体、猪鼻支原体、口腔支原体、精氨酸支原体、莱氏无胆甾原体、唾液支原体和肺炎支原体。列出针对感染性生物体以及其它靶的的抗体(抗毒素和抗病毒抗体)的综述包含在 Casadevall, Clin Immunol 1999;93(1):5-15(通过引用并入本文中)。

[0059] 治疗剂是与结合部分例如抗体或抗体片段分开地、同时地或相继地施用的并且在疾病的治疗中是有用的分子或原子。治疗剂的实例包括,但不限于,抗体、抗体片段、缀合物、药物、细胞毒性剂、促细胞凋亡剂、毒素、核酸酶(包括DNA酶和RNA酶)、激素、免疫调节剂、螯合剂、硼化合物、光敏剂或染料、放射性同位素或放射性核素、寡核苷酸、干扰RNA、肽、抗-血管生成剂、化疗剂、细胞因子、趋化因子、前药、酶、结合蛋白或肽或其组合。

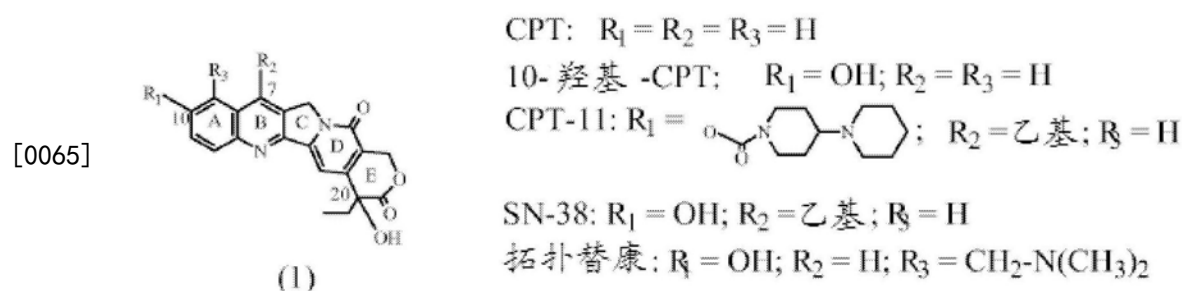
[0060] 免疫缀合物是缀合于治疗剂的抗体、抗体片段或其它抗体部分。如本文所用的,术语“缀合物”和“免疫缀合物”可互换使用。

[0061] 如本文所用的,术语抗体融合蛋白是其中一个或多个天然抗体、单链抗体或抗体片段连接于另一个部分,诸如蛋白质或肽、毒素、细胞因子、激素等的重组产生的抗原结合分子。在某些优选实施方案中,融合蛋白可包含融合在一起的两个或更多个相同或不同的抗体、抗体片段或单链抗体,其可以结合相同表位、相同抗原上的不同表位、或不同抗原。

[0062] 免疫调节剂是当存在时,改变、抑制或刺激身体的免疫系统的治疗剂。通常地,使用的免疫调节剂刺激免疫细胞增殖或在免疫应答级联(诸如巨噬细胞、树突细胞、B细胞和/或T细胞)中被激活。然而,在某些情况下,免疫调节剂可以抑制免疫细胞的增殖或活化,如在自身免疫性疾病的治疗中。如本文所述的免疫调节剂的实例是细胞因子,其为由一个细胞群体(例如,已接触抗原的T-淋巴细胞)与特定接触后释放的,并且用作细胞间的细胞间调节剂的约5-20kDa的可溶性小蛋白质。如本领域技术人员将理解的,细胞因子的实例包括淋巴因子、单核因子、白细胞介素和几种相关信号转导分子,诸如肿瘤坏死因子(TNF)和干扰素。趋化因子是一个亚组的细胞因子。某些白介素和干扰素是刺激T细胞或其它免疫细胞增殖的细胞因子的实例。

[0063] CPT是喜树碱的缩写。如本申请中所用,CPT表示喜树碱本身或喜树碱的类似物或衍生物。在下图1中的式1中给出喜树碱及其某些类似物的结构(具有所指示的编号和标有字母A-E的环)。

[0064] 图1



[0066] 化学缩写:

[0067] DCA-二氯乙酸

[0068] Fmoc-苄氧羰酰氯

[0069] EEDQ-2-乙氧基-1-乙氧羰基-1,2-二氢喹啉

[0070] MCC-炔-4-(N-马来酰亚胺甲基)-N-(2-丙炔基)环己烷-1-甲酰胺

[0071] MMT-单甲氧基三苯甲基

[0072] PABOH-对-氨基苄醇

[0073] PEG-聚乙二醇

[0074] TBAF-叔-正-丁基氟化铵

[0075] TBDMS-叔-丁基二甲硅烷基

[0076] 喜树碱缀合物

[0077] 在下文中描述了用于制备包含衔接于抗体或抗原结合抗体片段的喜树碱治疗剂的免疫缀合物的非限制性方法和组合物。在优选实施方案中,通过将确定的聚乙二醇(PEG)部分(即,含有确定数目的单体单位的PEG)置于药物与抗体之间来增加药物的溶解度,其中所述确定的PEG是低分子量PEG,优选含有1至30个单体单位,更优选含有1-12个单体单位。

[0078] 优选地,第一接头在一个末端连接药物并且可在另一个末端以乙炔或叠氮基终止。该第一接头可包含在一个末端具有叠氮化物或乙炔基并且在另一末端具有不同反应基团诸如羧酸或羟基基团的确定的PEG部分。可将所述双功能确定的PEG连接于氨基醇的胺基,并且可将后者的羟基以碳酸酯的形式衔接于药物上的羟基。或者,可将所述确定的双功能PEG的非叠氮化物(或乙炔)部分衔接于L-氨基酸或多肽的N末端,C-末端衔接于氨基醇的氨基,以及可将后者的羟基分别以碳酸酯或氨基甲酸酯的形式衔接于药物的羟基。

[0079] 第二接头(包含抗体偶联基团和与第一个接头的叠氮化物(或乙炔)基团互补的反应基团,即乙炔(或叠氮化物))可通过乙炔-叠氮环加成反应与药物-(第一接头)缀合物反应,以提供用于与疾病靶向抗体缀合的最终的双功能药品。抗体-偶联基团优选为硫醇基或硫醇反应性基团。

[0080] 下文中提供了用于在牵涉CPT类似物诸如SN-38的药物-接头前体的制备中在C-20碳酸酯存在的情况下选择性再生10-羟基的方法。还可使用药物中的反应性羟基诸如SN-38中的酚羟基的其它保护基团,例如,叔-丁基二甲基甲硅烷基或叔-丁基二苯基甲硅烷基,并且可在将衍生的药物连接于抗体-偶联部分之前利用四丁基氟化铵对这些保护基团去保护。可选择地将CPT类似物的10-羟基作为酯或碳酸酯而非“BOC”来进行保护,以便将双功能CPT缀合于抗体而无需该保护基团的先前的去保护。在施用生物缀合物后,保护基团在生理pH条件下可被容易地去保护。

[0081] 在乙炔-叠氮化物偶联(称为“点击化学”)中,叠氮化物部分可在L2上,乙炔部分可在L3上。或者,L2可含有乙炔,L3含有叠氮化物。“点击化学”是指乙炔部分与叠氮化物部分之间的铜(+1)催化的环加成反应(Kolb HC和Sharpless KB,Drug Discov Today 2003;8:1128-37),但点击化学的替代形式是已知的,并且可被使用。所述反应使用溴化亚铜和三苯膦的混合物,以使得能够在非极性有机溶剂,诸如二氯甲烷中高效偶联。点击化学的有利方面在于,其具有化学选择性,并互补其它公知的缀合化学,诸如硫醇-马来酰亚胺反应。在下面的讨论中,当缀合物含有抗体或抗体片段时,可取代另一种类型的结合部分,诸如靶向肽。

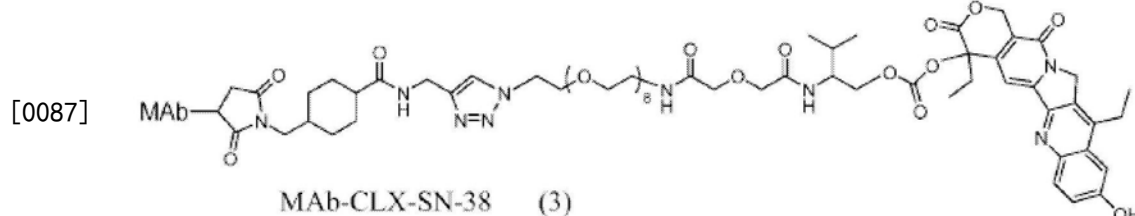
[0082] 示例性优选的实施方案涉及通式2的药物衍生物与抗体的缀合物，

[0083] $\text{MAb}-[\text{L2}]-[\text{L1}]-[\text{AA}]_m-[\text{A}']-\text{药物}$ (2)

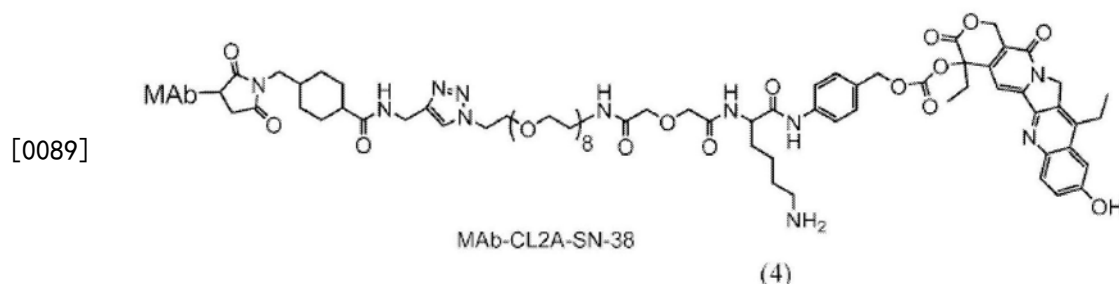
[0084] 其中，MAb是疾病靶向抗体；L2是包含抗体-偶联部分和一个或多个乙炔(或叠氮化物)基团的交联剂的组分；L1包含在一个末端具有叠氮化物(或乙炔)(与L2中的乙炔(或叠氮化物)互补)，和在另一个末端具有反应基团诸如羧酸或羟基的确定的PEG；AA是L-氨基酸；m是具有为0、1、2、3或4的值的整数；且A'是另外的间隔子，选自乙醇胺、4-羟基苄醇、4-氨基苄醇或取代的或未取代的乙二胺。“AA”的L氨基酸选自丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸。如果A'组含有羟基，则将其分别以碳酸酯或氨基甲酸酯的方式连接于药物的羟基或氨基。

[0085] 在式2的优选实施方案中，通式2的'A'为A-OH，其中A-OH为可折叠的部分诸如4-氨基苄醇或在苄基位置上用C₁-C₁₀烷基取代的取代的4-氨基苄醇，并且后者，通过其氨基附接于L-氨基酸或包含多达4个L-氨基酸部分的多肽；其中将N末端附接于以抗体部分-结合基团终止的交联剂。

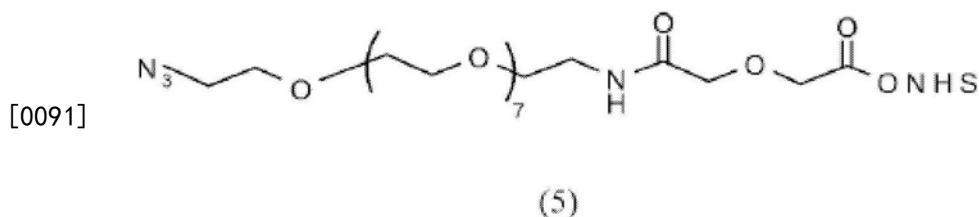
[0086] 下文中给出优选实施方案的实例，其中通式(2)的A'的A-OH实施方案来源于取代的4-氨基苄醇，并且'AA'由通式(2)中m=1的单个L-氨基酸组成，且药物以SN-38为例。结构示于在下文中(式3，称为MAb-CLX-SN-38)。AA的单个氨基酸选自以下L-氨基酸的任何一个：丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸。4-氨基苄醇部分(A'的A-OH实施方案)上的取代基R为氢或选自C₁-C₁₀烷基的烷基。



[0088] 式3的MAb-CLX-SN-38的实施方案，其中所述单个氨基酸AA为L-赖氨酸并且R=H，并且药物以SN-38为例(式4；称为MAb-CL2A-SN-38)。



[0090] 在另一个优选实施方案中，缀合物的L1组分含有具有1-30个重复单体单位的确定的聚乙二醇(PEG)间隔子。在其它优选实施方案中，PEG是具有1-12个重复单体单位的确定的PEG。PEG的引入可牵涉使用为商购可得的异双功能化的PEG衍生物。异双功能性PEG可含有叠氮化物或乙炔基团。在下文的式5中给出了含有8个重复单体单位的确定的异双功能性PEG的实例，其中'NHS'为琥珀酰亚胺基：



[0092] 在优选实施方案中,产生CL2A-SN-38的方法示于图1中。在本实施方案中,已在用于产生免疫缀合物MAb-CL2A-SN-38的CL2A-SN-38的制备中产生了某些显著的工艺变化。对于本领域普通技术人员来说不明显的对例如美国专利第7,999,083号中公开的方法的这些变化包括以下变化。

[0093] 1) 尽管先前使用己烷来沉淀Lys (MMT) -PABOH(图1中的中间体2),但用庚烷代替己烷来作为更安全的替代。残留未除去的二乙胺通过NMR光谱学来测定。如果检测到二乙胺的存在,则进一步纯化该材料以除去二乙胺,这避免了因二乙胺在中间体2中的存在而引起的收率下降。

[0094] 2) 在从SN-38进行的10-O-TBDMS-SN-38(图1中的中间体4)的制备中,用二氯甲烷(DCM)替代先前用于反应的溶剂的二甲基甲酰胺(DMF),由此使得在反应后更容易除去溶剂。进行从DMF至DCM的转换以易于按比例放大,以及对于在DMF中的还原偶尔观察到的一些减少的产物收率。通常使用DMF作为溶剂来利用叔-丁基二甲基氯硅烷保护羟基,虽然已使用其它溶剂(Greene TW和Wuts PGM,Protecting Groups in Organic Synthesis,John Wiley&Sons,Inc.,1999;第127-132页)。在SN-38的情况下,DMF的使用是优选的,因为材料仅微溶于DCM。DCM介质中产物形成的高收率是预料之外的,并且不可能被预测。

[0095] 3) 在图1中10-O-TBDMS-SN-38至其氯甲酸酯反应性中间体5的转化中,将三光气分批(而非一批)添加至二氯甲烷溶液中。这保持了收率,同时避免大规模制造中反应温度的潜在危险升高。

[0096] 4) 在导致倒数第二中间体MCC-PEG-Lys (MMT) -PABOCO-20-O-SN-38(图1中的中间体9)的叠氮基-PEG-Lys (MMT) -PABO-CO-20-O-SN-38(图1中的中间体7)与MCC-炔(图1中的中间体8)之间的环化加成反应中,发现如果首先用EDTA提取处理反应混合物以除去铜盐,则该产物是不稳定的,从而导致收率的降低。令人惊奇地,还发现,如果首先进行反应混合物的层析,接着用EDTA提取以除去未被完全捕获在硅胶柱中的残留的铜盐,则产物是稳定的。该方法的变化还通过避免不想要的副产物的形成而导致收率的提高。通过简单地反转操作顺序(即在首先进行层析,随后利用EDTA提取)来在纯化之前提高中间体9的稳定性,是未预料到的。

[0097] 5) 在与上述第4项中所述的相同的反应中,当反应时间缩短至14小时(而非18-24小时)时,获得提高的收率。

[0098] 在某些实施方案中,当双功能性药物含有硫醇反应部分作为抗体-结合基团时,通过使用硫醇化试剂可在抗体的赖氨酸基团(而非还原的半胱氨酸残基)的侧链上生成待标记的抗体上的硫醇。用于通过MAb的赖氨酸基团的修饰将巯基引入至抗体上的方法在本领域中是公知的(Wong in Chemistry of protein conjugation and cross-linking,CRC Press,Inc.,Boca Raton,FL(1991),第20-22页)。或者,使用还原剂三-(2-羧乙基)膦(TCEP)对抗体上的链间二硫键的适度还原可在抗体上生成7至10个硫醇;这具有将多个药

物部分掺入MAb的远离抗原结合区的链间区域的有利方面。此外,在用TCEP还原后,还原的抗体的预纯化不是必需的,并且二硫键还原的抗体被原位缀合于硫醇反应性CL2A-SN-38。

[0099] 在另一个优选实施方案中,使用25至30个渗透体积的缀合物配制缓冲液(用于纯化数百克缀合物),使用50,000Da分子量截断值的膜,通过切向流过滤(TFF)法纯化抗体与CL2A-SN-38的缀合物。该方法避免了对在尺寸排阻和疏水层析柱上使用昂贵且笨重的层析纯化的需要。

[0100] 在另一个实施方案中,在pH为6至7.0的Good氏生物缓冲液中配制缀合物,并将其冻干贮存。优选地,Good氏缓冲液选自由以下组成的组:2-(N-吗啉代)乙磺酸(MES)、3-(N-吗啉代)丙磺酸(MOPS)、4-(2-羟乙基)哌嗪-1-乙磺酸(HEPES)和1,4-哌嗪二乙磺酸(PIPES),pH在6-7的范围内,优选pH在6.5至7的范围内,并且缓冲液浓度为10-100mM,优选25mM。最优的配制缓冲液为25mM MES, pH 6.5。

[0101] 在其它实施方案中,将纯化的缀合物与赋形剂诸如海藻糖和聚山梨酸酯80组合,冷冻干燥,并将其作为冻干制品于-20℃至8℃的温度范围内贮存。

[0102] 一般抗体技术

[0103] 用于制备针对实际上任何靶抗原的单克隆抗体的技术在本领域中是公知的。参见,例如,Kohler和Milstein, *Nature* 256:495 (1975), 和Coligan等(编辑), *CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY*, 第1卷,第2.5.1-2.6.7页(John Wiley&Sons 1991)。简言之,单克隆抗体可通过如下步骤来获得:用包含抗原的组合物注射小鼠,取出脾脏以获得B淋巴细胞,将B淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合以产生杂交瘤,克隆杂交瘤,选择产生针对所述抗原的抗体的阳性克隆,培养产生针对所述抗原的抗体的克隆,以及从杂交瘤培养物分离所述抗体。

[0104] 各种技术,诸如嵌合或人源化抗体的产生,可涉及抗体克隆和构建的步骤。目标抗体的抗原结合V_K(可变轻链)和V_H(可变重链)序列可通过多种分子克隆方法,诸如,RT-PCR、5'-RACE和cDNA文库筛选来获得。来自表达鼠抗体的细胞的抗体的V基因可通过PCR扩增获得,并且可对其进行测序。为了确认其真实性,可将克隆的V_L和V_H基因在细胞培养物中表达为嵌合Ab,如由Orlandi等(*Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 86:3833 (1989))所描述的。基于V基因序列,可随后设计和构建人源化抗体,如由Leung等(*Mol. Immunol.*, 32:1413 (1995))描述的。

[0105] cDNA可利用一般分子克隆技术(Sambrook等, *Molecular Cloning, A laboratory manual*, 第2版(1989))从产生鼠抗体的任何已知的杂交瘤细胞系或转染的细胞系产生。抗体的V_K序列可使用引物VK1BACK和VK1FOR(Orlandi等, 1989)或由Leung等(*BioTechniques*, 15:286 (1993))描述的扩展引物组来扩增。V_H序列可使用引物对VH1BACK/VH1FOR(Orlandi等, 1989)或由Leung等(*Hybridoma*, 13:469 (1994))描述的与鼠IgG的恒定区退火的引物来扩增。人源化V基因可通过组合长寡核苷酸模板合成与如由Leung等(*Mol. Immunol.*, 32:1413 (1995))描述的PCR扩增来构建。

[0106] 可将V_K的PCR产物亚克隆入分期载体,诸如基于pBR327的分期载体VKpBR,其含有Ig启动子、信号肽序列和方便的限制性位点。可将V_H的PCR产物亚克隆至类似的分期载体,诸如基于pBluescript的VHpBS。可从VKpBR和VHpBS切取含有V_K和V_H序列与启动子和信号肽序列的表达盒,并将其分别连接入适当的表达载体诸如pKh和pGlg中(Leung等, *Hybridoma*,

13:469 (1994))。可将所述表达载体共转染入适当的细胞,并监测上清液的嵌合、人源化或人抗体的产生。或者,可切取 V_K 和 V_H 表达盒,将其亚克隆入单个表达载体诸如pdHL2中,如由Gillies等(J.Immunol.Methods 125:191 (1989),并且也示于Losman等,Cancer,80:2660 (1997)中)所描述的。

[0107] 在替代实施方案中,可将表达载体转染入已被预先改造以适于转染、在无血清培养基中生长和表达的宿主细胞。可以使用的示例性细胞系包括在Sp/EEE、Sp/ESF和Sp/ESF-X的细胞系(参见,例如美国专利第7,531,327;7,537,930和7,608,425号;其各自的实施例部分通过引用并入本文)。这些示例性细胞系基于Sp2/0骨髓瘤细胞系,其用Bcl-EEE基因转染,将其暴露于氨甲喋呤以扩增转染的基因序列并将其预适应于无血清细胞系以用于蛋白质表达。

[0108] 嵌合和人源化抗体

[0109] 嵌合抗体是其中人抗体的可变区已被例如小鼠抗体的可变区(包括小鼠抗体的互补决定区(CDR))取代的重组蛋白。当向受试者施用,嵌合抗体表现出降低的免疫原性和增强的稳定性。用于构建嵌合抗体的方法在本领域中是公知的(例如,Leung等,1994,Hybridoma 13:469)。

[0110] 嵌合单克隆抗体可通过将来自小鼠免疫球蛋白的重和轻可变链的小鼠CDR转移至人抗体的对应可变结构域中来人源化。嵌合单克隆抗体的鼠框架区(FR)也被人FR序列替代。为了保持人源化单克隆抗体的稳定性和抗原特异性,用小鼠的对应残基替代一个或多个FR残基。人源化单克隆抗体可用于治疗性治疗受试者。用于生产人源化单克隆抗体的技术在本领域中是公知的。(参见,例如,Jones等,1986,Nature,321:522;Riechmann等,Nature,1988,332:323;Verhoeyen等,1988,Science,239:1534;Carter等,1992,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA,89:4285;Sandhu,Crit.Rev.Biotech.,1992,12:437;Tempest等,1991,Biotechnology 9:266;Singer等,J.Immun.,1993,150:2844)。

[0111] 其它实施方案可涉及非人类灵长类抗体。用于在狒狒中产生治疗上有用的抗体的一般技术可见于,例如,Goldenberg等,WO 91/11465 (1991)和Losman等,Int.J.Cancer46:310 (1990)中。在另一个实施方案中,抗体可以是人单克隆抗体。此类抗体可从已被工程化以响应抗原攻击而产生特异性人抗体的转基因小鼠获得,如以下文所论述的。

[0112] 人抗体

[0113] 用于使用组合方法或利用人免疫球蛋白基因座转化的转基因小鼠制备完全人抗体的方法在本领域中是已知的(例如,Mancini等,2004,New Microbiol.27:315-28;Conrad和Scheller,2005,Comb.Chem.High Throughput Screen.8:117-26;Brekke和Loset,2003,Curr.Opin.Pharmacol.3:544-50;各自通过引用并入本文)。预期此类完全人抗体表现出甚至比嵌合或人源化抗体更少的副作用,并且在体内基本上如内源人抗体一样发挥作用。在某些实施方案中,所要求保护的方法和程序可利用由此类技术产生的人抗体。

[0114] 在一个替代方案中,噬菌体展示技术可用于产生人抗体(例如,Dantas-Barbosa等,2005,Genet.Mol.Res.4:126-40,通过引用并入本文)。人抗体可从正常人或表现出特定疾病状态诸如癌症的人产生(Dantas-Barbosa等,2005)。从患病个体构建人抗体的有利方面在于循环抗体库可偏向针对疾病相关抗原的抗体。

[0115] 在该方法的一个非限制性实例中,Dantas-Barbosa等(2005)构建了来自骨肉瘤

患者的人Fab抗体片段的噬菌体展示文库。通常地,从循环血淋巴细胞获得总RNA(同上)。从 μ 、 γ 和 κ 链抗体库克隆重组Fab,并将其插入噬菌体展示文库(同上)。将RNA转变成cDNA,并使用针对重和轻链免疫球蛋白序列的特异性引物来产生Fab cDNA文库(Marks等,1991, J.Mol.Biol.222:581-97,通过引用并入本文)。按照Andris-Widhopf等(2000,于:Phage Display Laboratory Manual,Barbas等(编辑),第1版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NY第9.1至9.22页,通过引用并入本文)进行文库构建。用限制性内切核酸酶消化最终的Fab片段,将其插入噬菌体基因组以产生噬菌体展示文库。可通过标准噬菌体展示法筛选此类文库。本领域技术人员将了解,该技术仅是示例性的,并且可使用用于通过噬菌体展示制备和筛选人抗体或抗体片段的任何已知方法。

[0116] 在另一个替代方案中,已被基因工程化以产生人抗体的转基因动物可用于使用上述标准免疫方案来生成针对基本上任何免疫原性靶的抗体。用于从转基因小鼠获得人抗体的方法由Green等,Nature Genet.7:13(1994),Lonberg等,Nature 368:856(1994)和Taylor等,Int.Immun.6:579(1994)描述。此类系统的非限定性实例为来自Abgenix(Fremont,CA)的XenoMouse®(例如,Green等,1999,J.Immunol.Methods 231:11-23,通过引用并入)。在XenoMouse®和类似动物中,小鼠抗体基因已被灭活,并被功能性人抗体基因替代,同时所述小鼠免疫系统的其余部分仍然保持完整。

[0117] 用种系配置的YAC(酵母人工染色体)转化XenoMouse®,所述YAC包含人类IgH和Ig κ 基因座的部分,包括大多数可变区序列,连同辅助基因和调控序列。人可变区库可以用于生成抗体生成B细胞,可利用已知技术将所述B细胞加工成杂交瘤。利用靶抗原免疫的XenoMouse®将通过正常的免疫应答产生人抗体,通过上述标准技术收获和/或产生所述人抗体。XenoMouse®的多个株系是可用的,其每一个能够产生不同种类的抗体。已显示转基因产生的人抗体具有治疗潜力,同时保留正常人抗体的药代动力学性质(Green等,1999)。本领域技术人员将了解,所述组合物和方法不限于XenoMouse®系统的使用,而且还可利用已被基因工程化以产生人抗体的任何转基因动物。

[0118] 抗体片段的产生

[0119] 可以例如,通过利用常规方法对完整抗体进行胃蛋白酶或木瓜蛋白酶消化来获得抗体片段。例如,可通过利用胃蛋白酶酶促裂解抗体以提供5S片段标示的F(ab')₂来产生抗体片段。可使用硫醇还原剂和任选地用于因二硫键的裂解而产生的巯基的封闭基团进一步裂解该片段来产生3.5S Fab'单价片段。或者,使用胃蛋白酶的酶促裂解产生两个单价Fab片段和Fc片段。用于产生抗体片段的示例性方法描述于美国专利第4,036,945号;美国专利第4,331,647号;Nisonoff等,1960,Arch Biochem Biophys,89:230;Porter,1959, Biochem.J.,73:119;Edelman等,1967,METHODS IN ENZYMOLOGY,第422页(Academic Press)和Coligan等(编辑),1991,CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY,(John Wiley& Sons)中。

[0120] 还可使用切割抗体的其它方法,诸如分离重链以形成单价轻-重链片段,片段的进一步裂解或其它酶促、化学或遗传技术,只要该片段结合被完整抗体识别的抗原。例如,Fv片段包含V_H与V_L链的缔合。该缔合可以是非共价的,如Inbar等,1972,Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA,69:2659中描述的。或者,可变链可通过分子间二硫键连接,或通过化学物

质诸如戊二醛交联。参见Sandhu,1992,Crit.Rev.Biotech.,12:437。

[0121] 优选地,Fv片段包含通过肽接头连接的V_H和V_L链。这些单链抗原结合蛋白(scFv)通过构建包含编码V_H和V_L结构域(通过寡核苷酸接头序列连接)的DNA序列的结构基因来制备。将所述结构基因插入表达载体,随后将所述表达载体引入宿主细胞,诸如大肠杆菌(E.coli)。所述重组宿主细胞合成通过接头肽桥连两个V结构域的单个多肽链。用于产生scFv的方法在本领域中是公知的。参见Whitlow等,1991,Methods:A Companion to Methods in Enzymology 2:97;Bird等,1988,Science,242:423;美国专利第4,946,778号;Pack等,1993,Bio/Technology,11:1271和Sandhu,1992,Crit.Rev.Biotech.,12:437。

[0122] 抗体片段的另一种形式为单结构域抗体(dAb),有时称为单链抗体。用于产生单结构域抗体的技术在本领域中是公知的(参见,例如,Cossins等,Protein Expression and Purification,2007,51:253-59;Shuntao等,Molec Immunol 06,43:1912-19;Tanha等,J.Biol.Chem.2001,276:24774-780)。其它类型的抗体片段可包含一个或多个互补决定区(CDR)。CDR肽("最小识别单位")可通过构建编码目标抗体的CDR的基因来获得。此类基因例如通过使用聚合酶链式反应合成来自抗体生成细胞的RNA的可变区来制备。参见Larrick等,1991,Methods:A Companion to Methods in Enzymology 2:106;Ritter等(编辑),1995,MONOCLONAL ANTIBODIES:PRODUCTION,ENGINEERING AND CLINICAL APPLICATION,第166-179页(Cambridge University Press);Birch等,(编辑),1995,MONOCLONAL ANTIBODIES:PRINCIPLES AND APPLICATIONS,第137-185页(Wiley-Liss,Inc.)。

[0123] 抗体变异

[0124] 在某些实施方案中,可改变抗体,诸如抗体的Fc部分的序列以优化缀合物的生理特征,诸如血清中的半衰期。取代蛋白质中的氨基酸序列的方法在本领域中是公知的,诸如通过定点诱变(例如,Sambrook等,Molecular Cloning,A laboratory manual,第2版,1989)。在优选实施方案中,变异可包括一个或多个糖基化位点在Fc序列中的添加或去除(例如,美国专利第6,254,868号,其实例部分通过引用并入本文)。在其它优选实施方案中,可进行Fc序列中的特定氨基酸取代(例如,Hornick等,2000,J Nucl Med 41:355-62;Hinton等,2006,J Immunol 176:346-56;Petkova等2006,Int Immunol 18:1759-69;美国专利第7,217,797号;各自通过引用并入本文)。

[0125] 抗体的同种型

[0126] 治疗性抗体的免疫原性与增加的输注反应的风险和减少的治疗反应持续时间相关(Baert等,2003,N Engl J Med 348:602-08)。治疗性抗体在宿主中诱导免疫应答所达到的程度可部分地通过所述抗体的同种异型来测定(Stickler等,2011,Genes and Immunity 12:213-21)。抗体同种异型与抗体的恒定区序列中的特定位置上的氨基酸序列变化相关。含有重链 γ -型恒定区的IgG抗体的同种异型被指定为Gm同种异型(1976,J Immunol 117:1056-59)。

[0127] 对于共同的IgG1人抗体,最普遍的同种异型为G1m1(Stickler等,2011,Genes and Immunity 12:213-21)。然而,G1m3同种异型也频繁出现在高加索人中(Stickler等,2011)。已报导,G1m1抗体含有当向非-G1m1(nG1m1)患者诸如G1m3患者施用时常倾向于诱导免疫应答的同种异型序列(Stickler等,2011)。当向G1m1患者施用,非-G1m1同种异型抗体不具有免疫原性(Stickler等,2011)。

[0128] 人G1m1同种异型在重链IgG1的CH3序列中的Kabat位置356上包含氨基酸天冬氨酸以及在Kabat位置358上包含亮氨酸。nG1m1同种异型在Kabat位置356上包含氨基酸谷氨酸和在Kabat位置358上包含甲硫氨酸。G1m1和nG1m1同种异型均在Kabat位置357上含有谷氨酸残基,并且所述同种异型有时称为DEL和EEM同种异型。下文中以示例性抗体利妥昔单抗(SEQ ID NO:85)和维妥珠单抗(SEQ ID NO:86)来显示G1m1和nG1m1同种异型抗体的重链恒定区序列的非限制性实例。

[0129] 利妥昔单抗的重链可变区序列(SEQ ID NO:85)

```
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP  
AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKAEPKSCDKTH  
TCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY
```

[0130] VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**DEL**TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH
YTQKSLSLSPGK

[0131] 维妥珠单抗的重链可变区序列(SEQ ID NO:86)

```
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP  
AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH  
TCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY
```

[0132] VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**EEM**TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH
YTQKSLSLSPGK

[0133] Jefferis和Lefranc (2009, mAb 1:1-7) 综述了IgG同种异型的序列变异特征以及它们对免疫原性的影响。他们报告, G1m3同种异型的特征在于Kabat位置214上的精氨酸残基(相较于G1m17同种异型中的Kabat 214上的赖氨酸残基)。nG1m1,2同种异型的特征在于Kabat位置356上的谷氨酸、Kabat位置358上的甲硫氨酸以及Kabat位置431上的丙氨酸。G1m1,2同种异型的特征在于Kabat位置356上的天冬氨酸, Kabat位置358上的亮氨酸以及Kabat位置431上的甘氨酸。除了重链恒定区序列变体以外, Jefferis和Lefranc (2009) 还报导了κ轻链恒定区中的异型变体, Km1同种异型的特征在于Kabat位置153上的缬氨酸和Kabat位置191上的亮氨酸, Km1,2同种异型的特征在于Kabat位置153上的丙氨酸和Kabat位置191上的亮氨酸, 且Km3同种异型的特征在于Kabat位置153上的丙氨酸和Kabat位置191上的缬氨酸。

[0134] 关于治疗性抗体, 维妥珠单抗和利妥昔单抗分别为针对CD20的人源化和嵌合IgG1抗体, 其用于多种恶性血液病和/或自身免疫性疾病的治疗。表1比较了利妥昔单抗对比维妥珠单抗的同种异型的序列。如表1中显示的, 利妥昔单抗(G1m17, 1) 为DEL同种异型IgG1, 利妥昔单抗中的Kabat位置214(重链CH1) 上的为赖氨酸的额外序列变异对比维妥珠单抗中的精氨酸。据报导, 维妥珠单抗在受试者中的免疫原性弱于利妥昔单抗(参见, 例如, Morchhauser等, 2009, J Clin Oncol 27:3346-53; Goldenberg等, 2009, Blood 113:1062-

70;Robak&Robak,2011,BioDrugs25:13-25),这是已被归因于人源化抗体与嵌合抗体之间的差异的效果。然而,在EEM与DEL之间的同种异型的差异也可能解释维妥珠单抗的较低的免疫原性。

[0135] 表1.利妥昔单抗对比维妥珠单抗的同种异型

		重链位置和相关同种异型					
		完全同种异型	214(同种异型)		356/358(同种异型)		431 (同种异型)
[0136]	利妥昔单抗	<i>G1m17,1</i>	<i>K</i>	<i>17</i>	<i>D/L</i>	<i>1</i>	<i>A</i>
	维妥珠单抗	<i>G1m3</i>	<i>R</i>	<i>3</i>	<i>E/M</i>	-	<i>A</i>

[0137] 为了减小治疗性抗体在nG1m1基因型个体中的免疫原性,希望选择对G1m3同种异型(特征在于Kabat 214上的精氨酸)和nG1m1,2空-同种异型(特征在于Kabat位置356上的谷氨酸,Kabat位置358上的甲硫氨酸和Kabat位置431上的丙氨酸)响应的抗体的同种异型。令人惊讶地,发现长时间内G1m3抗体的重复皮下施用不会导致显著的免疫应答。在替代实施方案中,与G1m3同种异型共同的人IgG4重链在Kabat 214上具有精氨酸、在Kabat 356上具有谷氨酸、在Kabat 359上具有甲硫氨酸和在Kabat 431上具有丙氨酸。由于免疫原性似乎至少部分地与这些位置上的残基相关,因此将人IgG4重链恒定区序列用于治疗性抗体的用途也是优选的实施方案。G1m3 IgG1抗体与IgG4同抗体的组合也可以是用于治疗性施用。

[0138] 已知的抗体

[0139] 在各种实施方案中,所述方法和组合物可利用本领域中已知的多种抗体中的任何抗体。所使用的抗体可从许多已知来源商购获得。例如,多种分泌抗体的杂交瘤细胞系可获自美国典型培养保藏中心(ATCC,Manassas,VA)。大量针对不同疾病靶(包括但不限于肿瘤相关抗原)的抗体已被保藏在ATCC和/或具有公布的可变区序列,并且可用于所要求保护的方法和组合物。参见,例如,美国专利第7,312,318;7,282,567;7,151,164;7,074,403;7,060,802;7,056,509;7,049,060;7,045,132;7,041,803;7,041,802;7,041,293;7,038,018;7,037,498;7,012,133;7,001,598;6,998,468;6,994,976;6,994,852;6,989,241;6,974,863;6,965,018;6,964,854;6,962,981;6,962,813;6,956,107;6,951,924;6,949,244;6,946,129;6,943,020;6,939,547;6,921,645;6,921,645;6,921,533;6,919,433;6,919,078;6,916,475;6,905,681;6,899,879;6,893,625;6,887,468;6,887,466;6,884,594;6,881,405;6,878,812;6,875,580;6,872,568;6,867,006;6,864,062;6,861,511;6,861,227;6,861,226;6,838,282;6,835,549;6,835,370;6,824,780;6,824,778;6,812,206;6,793,924;6,783,758;6,770,450;6,767,711;6,764,688;6,764,681;6,764,679;6,743,898;6,733,981;6,730,307;6,720,155;6,716,966;6,709,653;6,693,176;6,692,908;6,689,607;6,689,362;6,689,355;6,682,737;6,682,736;6,682,734;6,673,344;6,653,104;6,652,852;6,635,482;6,630,144;6,610,833;6,610,294;6,605,441;6,605,279;6,596,852;6,592,868;6,576,745;6,572,856;6,566,076;6,562,618;6,545,130;6,544,749;6,534,058;6,528,625;6,528,269;6,521,227;6,518,404;6,511,665;6,491,915;6,488,930;6,482,598;6,482,408;6,479,247;6,468,531;6,468,529;6,465,173;6,461,823;6,458,356;6,455,044;6,455,040;6,451,310;6,444,206;6,441,143;6,432,404;6,432,402;6,419,928;6,413,726;6,406,694;6,403,770;6,403,091;6,395,276;6,395,274;6,387,350;6,383,759;6,383,484;6,376,654;6,372,215;6,359,126;6,355,

481;6,355,444;6,355,245;6,355,244;6,346,246;6,344,198;6,340,571;6,340,459;6,331,175;6,306,393;6,254,868;6,187,287;6,183,744;6,129,914;6,120,767;6,096,289;6,077,499;5,922,302;5,874,540;5,814,440;5,798,229;5,789,554;5,776,456;5,736,119;5,716,595;5,677,136;5,587,459;5,443,953;5,525,338号,所述专利的每一个的实施例部分通过引用并入本文。这些仅是示例性的并且许多种其它抗体和它们的杂交瘤在本领域是已知的。本领域技术人员将会了解,针对几乎任何疾病相关抗原的抗体序列或分泌抗体的杂交瘤可通过就针对所选择的疾病相关目标靶的抗体简单地搜索ATCC、NCBI和/或USPTO数据库来获得。可使用本领域熟知的标准技术(参见,例如,美国专利第7,531,327;7,537,930;7,608,425和7,785,880号,其每一个的实施例部分通过引用并入本文)扩增经克隆的抗体的抗原结合结构域,将其切除,然后连接入表达载体,转染入适当的宿主细胞,并且用于蛋白质生产。

[0140] 可在所述方法和组合物的范围内使用的具体抗体包括,但不限于,LL1(抗-CD74)、LL2或RFB4(抗-CD22)、维妥珠单抗(hA20,抗-CD20)、利妥昔单抗(抗-CD20)、阿托珠单抗(GA101,抗-CD20)、lambrolizumab(抗-PD-1受体)、nivolumab(抗-PD-1受体)、伊匹木单抗(抗-CTLA-4)、RS7(抗-上皮糖蛋白-1(EGP-1、也被称为TROP-2))、PAM4或KC4(均为抗-粘蛋白)、MN-14(抗-癌胚抗原(CEA、也被称为CD66e或CEACAM5)、MN-15或MN-3(抗-CEACAM6)、Mu-9(抗-结肠特异性抗原-p)、Immu31(抗- α 甲胎蛋白)、R1(抗-IGF-1R)、A19(抗-CD19)、IMMU-H2B(抗-H2B)、IMMU-H3(抗-H3)、IMMU-H4(抗-H4)、TAG-72(例如,CC49)、Tn、J591或HuJ591(抗-PSMA(前列腺特异性膜抗原))、AB-PG1-XG1-026(抗-PSMA二聚体)、D2/B(抗-PSMA)、G250(抗-碳酸酐酶IX MAb)、L243(抗-HLA-DR)、阿仑单抗(抗-CD52)、贝伐单抗(抗-VEGF)、西妥昔单抗(抗-EGFR)、吉妥珠单抗(抗-CD33)、替伊莫单抗tiuxetan(抗-CD20)、帕尼单抗(抗-EGFR);托西莫单抗(抗-CD20);PAM4(又名克伐珠单抗(clivatuzumab)、抗-粘蛋白)和曲妥珠单抗(抗-ErbB2)。此类蛋白在本领域中是已知的(例如,美国专利第5,686,072;5,874,540;6,107,090;6,183,744;6,306,393;6,653,104;6,730,300;6,899,864;6,926,893;6,962,702;7,074,403;7,230,084;7,238,785;7,238,786;7,256,004;7,282,567;7,300,655;7,312,318;7,585,491;7,612,180;7,642,239号;和美国专利申请公布第20050271671;20060193865;20060210475;20070087001号;美国专利申请系列第14/180,646号;每一个的实施例部分通过引用并入本文)。所使用的具体的已知抗体包括hPAM4(美国专利第7,282,567号)、hA20(美国专利第7,251,164号)、hA19(美国专利第7,109,304号)、hIMMU-31(美国专利第7,300,655号)、hLL1(美国专利第7,312,318号)、hLL2(美国专利第7,074,403号)、hMu-9(美国专利第7,387,773号)、hL243(美国专利第7,612,180号)、hMN-14(美国专利第6,676,924号)、hMN-15(美国专利第7,541,440号)、hR1(美国专利申请12/772,645)、hRS7(美国专利第7,238,785号)、hMN-3(美国专利第7,541,440号)、AB-PG1-XG1-026(美国专利申请11/983,372,以ATCC PTA-4405和PTA-4406保藏)和D2/B(WO 2009/130575),每一个引用的专利或申请的正文通过对附图和实施例部分的引用并入本文。

[0141] 可使用所述缀合物靶向的其它有用抗原包括碳酸酐酶IX、 α -甲胎蛋白(AFP)、 α -辅肌动蛋白-4、A3、对于A33抗体是特异的抗原、ART-4、B7、Ba 733、BAGE、BrE3-抗原、CA125、CAMEL、CAP-1、CASP-8/m、CCL19、CCL21、CD1、CD1a、CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD11A、CD14、CD15、CD16、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD29、CD30、CD32b、CD33、CD37、CD38、

CD40、CD40L、CD44、CD45、CD46、CD52、CD54、CD55、CD59、CD64、CD66a-e、CD67、CD70、CD70L、CD74、CD79a、CD80、CD83、CD95、CD126、CD132、CD133、CD138、CD147、CD154、CDC27、CDK-4/m、CDKN2A、CTLA-4、CXCR4、CXCR7、CXCL12、HIF-1 α 、结肠特异性抗原-p (CSAp)、CEACAM5、CEACAM6、c-Met、DAM、EGFR、EGFRvIII、EGP-1 (TROP-2)、EGP-2、ELF2-M、Ep-CAM、成纤维细胞生长因子 (FGF)、Flt-1、Flt-3、叶酸受体、G250抗原、GAGE、gP100、GRO- β 、组蛋白H2B、组蛋白H3、组蛋白H4、HLA-DR、HM1.24、人绒毛膜促性腺素 (HCG) 及其亚单位、HER2/neu、HMGB-1、缺氧诱导因子 (HIF-1)、HSP70-2M、HST-2、Ia、IGF-1R、IFN- γ 、IFN- α 、IFN- β 、IFN- λ 、IL-4R、IL-6R、IL-13R、IL-15R、IL-17R、IL-18R、IL-2、IL-6、IL-8、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-23、IL-25、胰岛素样生长因子-1 (IGF-1)、KC4-抗原、KS-1-抗原、KS1-4、Le-Y、LDR/FUT、巨噬细胞游走抑制因子 (MIF)、MAGE、MAGE-3、MART-1、MART-2、NY-ESO-1、TRAG-3、mCRP、MCP-1、MIP-1A、MIP-1B、MIF、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC5ac、MUC13、MUC16、MUM-1/2、MUM-3、NCA66、NCA95、NCA90、PAM4抗原、胰腺癌粘蛋白、PD-1、PD-L1、PD-1受体、胎盘生长因子、p53、PLAGL2、前列腺酸性磷酸酶、PSA、PRAME、PSMA、PlGF、ILGF、ILGF-1R、IL-6、IL-25、RS5、RANTES、T101、SAGE、S100、存活素、存活素-2B、TAC、TAG-72、腱生蛋白、TRAIL受体、TNF- α 、Tn抗原、Thomson-Friedenreich抗原、肿瘤坏死抗原、VEGFR、ED-B纤连蛋白、WT-1、17-1A-抗原、补体因子C3、C3a、C3b、C5a、C5、血管生成标志物、bcl-2、bcl-6、Kras、癌基因标志物和癌基因产物 (参见, 例如, Sensi等, Clin Cancer Res 2006, 12:5023-32; Parmiani等, J Immunol 2007, 178:1975-79; Novellino等 Cancer Immunol Immunother 2005, 54:187-207)。

[0142] 造血恶性细胞上的合适的抗原 (集群名称, 或CD) 靶的综合分析 (如通过流式细胞仪显示的并且可以是选择用于药物缀合免疫治疗的合适的抗体的指导) 是Craig和Foon, Blood (2008年1月15日在线出版的); DOI 10.1182/blood-2007-11-120535。

[0143] CD66抗原由五个不同的具有相似结构的糖蛋白CD66a-e (分别由癌胚抗原 (CEA) 基因家族成员BCG、CGM6、NCA、CGM1和CEA编码) 组成。这些CD66抗原 (例如, CEACAM6) 主要在粒细胞、消化道的正常上皮细胞和各种组织的肿瘤细胞中表达。还包括为用于癌症的适当的靶的是癌症睾丸抗原, 诸如NY-ESO-1 (Theurillat等, Int. J. Cancer 2007; 120 (11): 2411-7), 和髓细胞性白血病 (Kozlov等, Cancer Genet. Cytogenet. 2005; 163 (1): 62-7) 以及还有B细胞疾病中的CD79a, 以及CD79b (用于非霍奇金淋巴瘤) (Poison等, Blood 110 (2): 616-623)。许多上述抗原公开于2002年11月15日提交的标题为“Use of Multi-specific, Non-covalent Complexes for Targeted Delivery of Therapeutics”的美国临时申请系列第60/426,379号中。癌症干细胞, 可归于更具治疗抗性的前体恶性肿瘤细胞群 (Hill和Perris, J. Natl. Cancer Inst. 2007; 99:1435-40) 的癌症干细胞具有可在某些癌症类型中被靶向的抗原, 诸如前列腺癌 (Maitland等, Ernst Schering Found. Sympos. Proc. 2006; 5: 155-79)、非小细胞肺癌 (Donnenberg等, J. Control Release 2007; 122 (3): 385-91) 和成胶质细胞瘤 (Beier等, Cancer Res. 2007; 67 (9): 4010-5) 中的CD133, 以及结直肠癌 (Dalerba等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2007; 104 (24): 10158-63)、胰腺癌 (Li等, Cancer Res. 2007; 67 (3): 1030-7) 和头颈部鳞状细胞癌 (Prince等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2007; 104 (3): 973-8) 中的CD44。用于乳腺癌治疗的另外一个有用的靶是由Taylor等 (Biochem. J. 2003; 375:51-9) 所描述的可LIV-1抗原。

[0144] 对于多发性骨髓瘤治疗,已描述了针对例如CD38和CD138(Stevenson,Mol Med 2006;12(11-12):345-346;Tassone等,Blood 2004;104(12):3688-96)、CD74(Stein等,同上)、CS1(Tai等,Blood 2008;112(4):1329-37)和CD40(Tai等,2005;Cancer Res.65(13):5898-5906)的合适的靶向抗体。

[0145] 巨噬细胞游走抑制因子(MIF)是先天性和适应性免疫以及细胞凋亡的重要调节剂。据报道,CD74是MIF的内源性受体(Leng等,2003,J Exp Med 197:1467-76)。拮抗性抗-CD74抗体对MIF介导的细胞内途径的治疗功效可用于治疗广泛的疾病状态,诸如膀胱、前列腺、乳腺、肺、结肠的癌症和慢性淋巴细胞白血病(例如,Meyer-Siegler等,2004,BMC Cancer 12:34;Shachar&Haran,2011,Leuk Lymphoma 52:1446-54);自体免疫性疾病诸如类风湿性关节炎和系统性红斑狼疮(Morand&Leech,2005,Front Biosci 10:12-22;Shachar&Haran,2011,Leuk Lymphoma 52:1446-54);肾脏疾病诸如肾移植排斥(Lan,2008,Nephron Exp Nephrol.109:e79-83);和许多炎性疾病(Meyer-Siegler等,2009,Mediators Inflamm,2009年3月22日电子版;Takahashi等,2009,Respir Res 10:33)。米拉珠单抗(hLL1)是具有用于治疗MIF-介导的疾病的用途的示例性抗-CD74抗体。

[0146] 抗-TNF- α 的抗体在本领域中是已知的并且可用于治疗免疫性疾病,诸如自身免疫性疾病、免疫功能障碍(例如,移植物抗宿主病、器官移植排斥)或糖尿病。针对TNF- α 的已知抗体包括人抗体CDP571(Ofei等,2011,Diabetes 45:881-85);鼠抗体MTNFAI、M2TNFAI、M3TNFAI、M3TNFABI、M302B和M303(Thermo Scientific,Rockford,IL);英夫利昔单抗(Centocor,Malvern,PA);赛妥珠单抗pegol(UCB,Brussels,Belgium);和(Abbott,Abbott Park,IL)。这些和许多其它已知的抗-TNF- α 的抗体可用于所要求保护的方法和组合物。用于治疗免疫失调或自身免疫性疾病的其它抗体包括,但不限于,抗-B细胞抗体如维妥珠单抗、依帕珠单抗、米拉珠单抗或hL243;托珠单抗(抗-IL-6受体);巴利昔单抗(抗-CD25);达克珠单抗(抗-CD25);依法利珠单抗(抗-CD11a);莫罗单抗-CD3(抗-CD3受体);抗-CD40L(UCB,Brussels,Belgium);那他珠单抗(抗- α 4整联蛋白)和奥马珠单抗(抗-IgE)。

[0147] 检查点抑制剂抗体已主要用于癌症治疗。免疫检查点是指免疫系统中负责维持自身耐受性和调制免疫系统反应的程度以使外围组织损伤最小化的抑制性途径。然而,肿瘤细胞也可激活免疫系统的检查点,以减小免疫反应抗肿瘤组织的效力。可将针对细胞毒性T淋巴细胞抗原4(CTLA4,也称为CD152)、程序化细胞死亡蛋白1(PD1,也称为CD279)和程序化细胞死亡1配体1(PD-L1,也称为CD274)的示例性检查点抑制剂抗体可与一种或多种其它药剂组合使用,以增强抗疾病细胞、组织或病原体的免疫反应的效力。示例性抗-PD1抗体包括 lambrolizumab(MK-3475,MERCK)、nivolumab(BMS-936558,BRI STOL-MYERS SQUIBB)、AMP-224(MERCK)和pidilizumab(CT-011,CURETECH LTD.)。抗-PD1抗体是商购可得的,例如来自 **ABCAM®**(AB137132)、**BIOLEGEND®**(EH12.2H7,RMP1-14)和AFFYMETRI X EBIOSCIENCE(J105,J116,MIH4)。示例性抗-PD-L1抗体包括MDX-1105(MEDAREX)、MEDI4736(MEDIMMUNE)、MPDL3280A(GENENTECH)和BMS-936559(BRISTOL-MYERS SQUIBB)。抗-PD-L1抗体也是商购可得的,例如来自AFFYMETRIX EBIOSCIENCE(MIH1)。示例性抗-CTLA4抗体包括伊匹木单抗(Bristol-Myers Squibb)和曲美木单抗(PFIZER)。抗-PD1抗体是商购可得的,例如来自 **ABC AM®**(AB134090)、SINO BIOLOGICAL INC.(11159-H03H,11159-H08H)和 THERMO SCIENTIFIC PIERCE(PA5-29572,PA5-23967,PA5-26465,MA1-12205,MA1-35914)。

伊匹木单抗最近获得FDA批准用于治疗转移性黑素瘤(Wada等,2013,J Transl Med 11:89)。

[0148] 在另一个优选实施方案中,使用被迅速内化,随后被重新表达、加工和呈递在细胞表面上,使得细胞能够连续摄入和积累循环缀合物的抗体。最优选的抗体/抗原对的实例为LL1、抗-CD74单克隆抗体(不变链,II类特异性伴侣,Ii)(参见,例如,美国专利第6,653,104、7,312,318号;每一个专利的实施例部分通过引用并入本文)。CD74抗原在B细胞淋巴瘤(包括多发性骨髓瘤)和白血病、某些T细胞淋巴瘤、黑素瘤、结肠癌、肺癌和肾癌、成胶质细胞瘤以及某些其它癌症上高度表达(Ong等,Immunology 98:296-302(1999))。CD74抗体在癌症中的用途的综述包含在Stein等,Clin Cancer Res.2007年9月15日;13(18 Pt 2):5556s-5563s(通过引用并入本文)中。

[0149] 优选地利用抗-CD74抗体治疗的疾病包括,但不限于,非霍奇金淋巴瘤、霍奇金病、黑素瘤、肺癌、肾癌、结肠癌、多形性成胶质细胞瘤、组织细胞瘤、骨髓性白血病和多发性骨髓瘤。所述CD74抗原在靶细胞表面上连续表达一段短暂的时间,随后抗原内化,以及抗原再表达,使得靶向LL1抗体连同其携带的任何化疗部分一起被内化。这允许高且治疗性的浓度的LL1-化疗药物缀合物积累在此类细胞的内部。内化LL1-化疗药物缀合物通过溶酶体和内涵体进行循环,并且化学治疗部分以活性形式在靶细胞内释放。

[0150] 在另一个优选实施方案中,可使用治疗性缀合物来对抗病原体,因为针对病原体的抗体是已知的。例如,特异性结合由感染性病变(包括病毒、细菌、真菌和寄生虫感染,例如由病原体诸如细菌、立克次氏体、支原体、原生动物,真菌和病毒以及与此类微生物相关的抗原和产物引起)产生的或与其相关的标志物的抗体和抗体片段已被公开于,除其它以外,Hansen等,美国专利第3,927,193号和Goldenberg美国专利第4,331,647、4,348,376、4,361,544、4,468,457、4,444,744、4,818,709和4,624,846号(每个专利的实施例部分通过引用并入本文)和Reichert和Dewitz(上文中引用的)中。列出针对感染性生物体以及其它靶的抗体(抗毒素和抗病毒抗体)的综述包含在Casadevall,Clin Immunol 1999;93(1):5-15(通过引用并入本文)中。

[0151] 在优选实施方案中,所述病原体选自由以下组成的组:HIV病毒、结核分枝杆菌、无乳链球菌、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、嗜肺军团菌、化脓性链球菌、大肠杆菌、淋病奈瑟球菌、脑膜炎奈瑟球菌、肺炎球菌、新型隐球菌、荚膜组织胞浆菌、乙型流感嗜血杆菌、梅毒螺旋体、莱姆病螺旋体、绿脓假单胞菌、麻风分枝杆菌、流产布鲁氏菌、狂犬病毒、流感病毒、巨细胞病毒、单纯疱疹病毒I、单纯疱疹病毒II、人血清细小样病毒、呼吸道合胞病毒、水痘带状疱疹病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、麻疹病毒、腺病毒、人T细胞白血病病毒、EB病毒、鼠白血病病毒、腮腺炎病毒、水疱性口炎病毒、辛德毕斯病毒、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒、疣病毒、蓝舌病毒、仙台病毒、猫白血病病毒、呼肠孤病毒、脊髓灰质炎病毒、猿猴病毒40、小鼠乳腺肿瘤病毒、登革热病毒、风疹病毒、西尼罗河病毒、恶性疟原虫、间日疟原虫、刚地弓形虫、让氏锥虫、克氏锥虫、罗德西亚锥虫、布氏锥虫、曼森氏血吸虫、日本血吸虫、牛巴贝斯虫、柔嫩艾美球虫、盘尾丝虫、热带利什曼原虫、旋毛形线虫、小泰勒虫、水泡绦虫、羊绦虫、牛肉绦虫、细粒棘球绦虫、科氏中殖孔绦虫、关节炎支原体、猪鼻支原体、口腔支原体、精氨酸支原体、莱氏无胆甾原体、唾液支原体和肺炎支原体,如美国专利第6,440,416号(其实施例部分通过引用并入本文)中公开的。

[0152] 在更优选实施方案中,包含抗-gp120和其它此类抗-HIV抗体的本发明的药物缀合物可在AIDS患者中用作HIV的治疗剂;以及针对结核分枝杆菌的抗体的药物缀合物适合用作药物难治疗性(drug-refractive)结核病的治疗剂。已检查了抗-gp120单克隆抗体(抗HIV MAb)与毒素诸如假单胞菌外毒素的融合蛋白的抗病毒性质(Van Oigen等,J Drug Target,5:75-91,1998)。治疗AIDS患者中HIV感染的尝试可能因药效不足或不可接受的宿主毒性而失败。本发明的CPT药物缀合物有利地不存在蛋白质毒素的此类毒副作用,从而有利地用于治疗AIDS患者的HIV感染。可单独地施予或与当单独施予时在此类患者中是有效的其它抗体或治疗剂组合地施予这些药物缀合物。可单独施予这些药物缀合物,或与当单独施予时在此类患者中是有效的其它抗生素或治疗剂组合地施用所述药物组合物。候选抗-HIV抗体包括由Johansson等(AIDS.2006年10月3日;20(15):1911-5)描述的P4/D10抗包膜抗体以及由Polymun(Vienna,Austria)描述和销售的抗-HIV抗体(也描述于美国专利第5,831,034号、美国专利第5,911,989号,以及Vcelar等,AIDS 2007;21(16):2161-2170和Joos等,Antimicrob.Agents Chemother.2006;50(5):1773-9(全部通过引用并入)中)。用于HIV的优选靶向剂为这些抗体的各种组合,以克服抗性。

[0153] 用于治疗自身免疫性疾病或免疫系统功能障碍(例如,移植物抗宿主病、器官移植排斥)的抗体在本领域中是已知的,并且可使用公开的方法和组合物将其缀合于CL2A-SN-38。用于治疗自身免疫性疾病/免疫功能障碍病症的抗体可以结合于示例性抗原,包括,但不限于,BCL-1、BCL-2、BCL-6、CD1a、CD2、CD3、CD4、CD5、CD7、CD8、CD10、CD11b、CD11c、CD13、CD14、CD15、CD16、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD33、CD34、CD38、CD40、CD40L、CD41a、CD43、CD45、CD55、TNF- α 、干扰素、IL-6和HLA-DR。上文中所论述的结合于这些和其它靶抗原的抗体可用于治疗自身免疫性疾病或免疫功能障碍疾病。可用免疫缀合物治疗的自身免疫性疾病可包括急性特发性血小板减少性紫癜、慢性特发性血小板减少性紫癜、皮炎、西德纳姆舞蹈症、重症肌无力、系统性红斑狼疮、狼疮性肾炎、风湿热、多腺体综合症、大疱性类天疱疮、糖尿病、亨诺-许兰氏紫癜、链球菌感染后肾炎、结节性红斑、高安动脉炎、ANCA相关性血管炎、阿狄森氏病、类风湿关节炎、多发性硬化症、结节病、溃疡性结肠炎、多形性红斑、IgA肾病、结节性多动脉炎、强直性脊柱炎、古德帕斯彻氏综合征、血栓闭塞性脉管炎、Sjogren综合征、原发性胆汁性肝硬化、桥本甲状腺炎、甲状腺毒症、硬皮病、慢性活动型肝炎、多肌炎/皮炎、多软骨炎、大疱性类天疱疮、寻常天疱疮、韦格纳肉芽肿、膜性肾病、肌萎缩侧索硬化、脊髓痨、巨细胞动脉炎/多肌痛、恶性贫血、急进性肾小球肾炎、银屑病或纤维化肺炎。

[0154] 上述抗体和针对疾病相关抗原的其它已知抗体可在所要求保护的方法和组合物的实践中用作CL2A-SN-38-免疫缀合物。

[0155] 双特异性和多特异性抗体

[0156] 双特异性抗体在许多生物医学应用中是有用的。例如,具有针对肿瘤细胞表面抗原和针对T细胞表面受体的结合位点的双特异性抗体可指导T细胞对特定肿瘤细胞的裂解。识别神经胶质瘤和T细胞上的CD3表位的双特异性抗体已被成功地用于在人患者中治疗脑肿瘤(Nitta等Lancet.1990;355:368-371)。在某些实施方案中,可将用于本文中公开的治疗剂缀合的技术和组合物与双特异性或多特异性抗体一起用作抗体部分。

[0157] 许多产生双特异性或多特异性抗体的方法是已知的,如例如在美国专利第7,405,

320号(其实实施例部分通过引用并入本文)中公开的。双特异性抗体可通过细胞杂交瘤方法来产生,所述方法包括融合两个不同的杂交瘤,每个杂交瘤产生识别不同抗原位点的单克隆抗体(Milstein和Cuello,Nature,1983;305:537-540)。

[0158] 用于产生双特异性抗体的另一种方法使用使用异双功能交联试剂以化学上栓系两个不同的单克隆抗体(Staerz,等Nature.1985;314:628-631;Perez,等Nature.1985;316:354-356)。双特异性抗体的产生还可通过将两个亲代单克隆抗体中的每一个还原成各自的半分子,然后将所述半分子混合并且使其再氧化以获得杂种结构(Staerz和Bevan.Proc Natl Acad Sci USA.1986;83:1453-1457)。另一个替代方案包括使用适当接头将两个或三个分别纯化的Fab'片段进行化学交联(参见,例如欧洲专利申请0453082)。

[0159] 其它方法包括通过将不同选标记经由逆转录病毒性穿梭载体基因转移至各自亲代杂交瘤(其随后融合)中(DeMonte,等Proc Natl Acad Sci USA.1990,87:2941-2945);或用包含不同抗体的重链和轻链基因的表达质粒转染杂交瘤细胞系来提高产生杂种杂交瘤的效率。

[0160] 可将同源V_H和V_L结构域与具有适当组成和长度的肽接头(通常由12个以上的氨基酸残基组成)联接以形成具有结合活性的单链Fv(scFv)。制备scFv的方法公开于美国专利第4,946,778号和美国专利第5,132,405号(每篇专利的实施例部分通过引用并入本文)中。肽接头长度减少至12个以下的氨基酸残基,防止V_H和V_L结构域在同一链上配对并且促进具有互补结构域的V_H和V_L结构域在其它链上配对,导致功能性多聚体的形成。与3至12个氨基酸残基的接头联接的V_H和V_L结构域的多肽链主要形成二聚体(称为双抗体)。使用0至2个氨基酸残基的接头,有利于形成三聚体(称为三抗体)和四聚体(称为四抗体),但是寡聚化的确切模式除了取决于接头长度以外,似乎还取决于V-结构域的组成和取向(V_H-接头-V_L或V_L-接头-V_H)。

[0161] 这些用于产生多特异性或双特异性抗体的技术表现出在低收率、纯化必需性、低稳定性或技术的劳动密集程度的方面的各种困难。最近,称为“停靠-和-锁定™”(DNL™)的技术已用于产生实质上任何所需抗体、抗体片段和其它效应分子的组合(参见,例如美国专利第7,550,143、7,521,056、7,534,866、7,527,787号和USSN 11/925,408,每篇专利和专利申请的实施例部分通过引用并入本文)。该技术利用互补蛋白结合结构域(称为锚定结构域(AD)和二聚化和停靠结构域(DDD)),其彼此结合并且允许装配复合物结构,范围包括二聚体、三聚体、四聚体、五聚体和六聚体。这些以高收率形成稳定的复合物而不需广泛的纯化。所述技术允许单特异性、双特异性或多特异性抗体的装配。本领域中已知的用于产生双特异性或多特异性抗体的任何技术可用于实施本文所要求保护的方法。

[0162] 使用的组合(诸如对于癌症治疗是优选的)包括CD20+CD22抗体、CD74+CD20抗体、CD74+CD22抗体、CEACAM5(CEA)+CEACAM6(NCA)抗体、胰岛素样生长因子(ILGF)+CEACAM5抗体、EGP-1(例如,RS-7)+ILGF抗体、CEACAM5+EGFR抗体。此类抗体不仅需要被组合使用,而且还可被组合为各种形式诸如IgG、Fab、scFv等的融合蛋白,如美国专利第6,083,477、6,183,744和6,962,702号和美国专利申请公开第20030124058、20030219433、20040001825、20040202666、20040219156、20040219203、20040235065、20050002945、20050014207、20050025709、20050079184、20050169926、20050175582、20050249738、20060014245和20060034759号(所述专利和专利申请的每一篇的实施例部分通过引用并入本文)中描述

的。

[0163] 预靶向

[0164] 双特异性或多特异性抗体可以用于预靶向技术。预靶向是多步骤过程,最初被发展来解决直接靶向抗体的缓慢血液清除,这种缓慢血液清除促成对正常组织(诸如骨髓)的不期望的毒性。通过使用预靶向,可将放射性核素或其它治疗剂与在数分钟内从血液中清除的小递送分子(可靶向构建体)衔接。首先施用具有可靶向构建体以及靶抗原的结合位点的预靶向双特异性或多特异性抗体,使得游离抗体从循环中清除,然后施用可靶向构建体。

[0165] 预靶向方法公开于,例如,Goodwin等,美国专利第4,863,713号;Goodwin等, J.Nucl.Med.29:226,1988;Hnatowich等, J.Nucl.Med.28:1294,1987;Oehr等, J.Nucl.Med.29:728,1988;Klibanov等, J.Nucl.Med.29:1951,1988;Sinitzyn等, J.Nucl.Med.30:66,1989;Kalofonos等, J.Nucl.Med.31:1791,1990;Schechter等, Int.J.Cancer48:167,1991;Paganelli等, Cancer Res.51:5960,1991;Paganelli等, Nucl.Med.Comm.12:211,1991;美国专利第5,256,395号;Stickney等, Cancer Res.51:6650,1991;Yuan等, Cancer Res.51:3119,1991;美国专利第6,077,499、7,011,812、7,300, 644、7,074,405、6,962,702、7,387,772、7,052,872、7,138,103、6,090,381、6,472,511、6, 962,702和6,962,702(所述每一篇专利和文献通过引用并入)中。

[0166] 治疗或诊断受试者的疾病或病症的预靶向方法可以通过以下步骤提供:(1)向受试者施用双特异性抗体或抗体片段;(2)任选地向受试者施用清除组合物,并使得组合物从循环中清除抗体;和(3)向受试者施用可靶向构建体,所述可靶向构建体含有一种或多种螯合的或化学结合的治疗剂或诊断剂诸如SN-38。

[0167] 可靶向构建体

[0168] 在某些实施方案中,用于预靶向的标记有一种或多种治疗或诊断剂的可靶向构建体肽可被选择来结合双特异性抗体,所述双特异性抗体具有用于可靶向构建体肽的一个或多个结合位点和用于与疾病或病况相关的靶抗原的一个或多个结合位点。双特异性抗体可用于其中首先向受试者施用所述抗体的预靶向技术。可允许足够的时间来使双特异性抗体结合靶抗原和使未结合的抗体从循环清除。随后可向受试者施用可靶向构建体诸如标记的肽,并使其结合于双特异性抗体和定位在患病细胞或组织。

[0169] 此类可靶向构建体可具有不同的结构,并且被选择来不仅用于以高亲和力结合于可靶向构建体的抗体或片段的可用性,而且还用于快速体内清除(当在预靶向方法中使用)和双特异性抗体(bsAb)或多特异性抗体。疏水剂是在引发强免疫反应上是最好的,而亲水剂对快速体内清除是优选的。因此,建立疏水特征与亲水特征之间的平衡。这可部分地通过使用亲水螯合剂以抵消许多有机部分的固有疏水性来实现。另外,可选择具有相反溶液性质的可靶向构建体的亚单位,例如,含有其中一些是疏水性的并且其中一些是亲水性的氨基酸的肽。

[0170] 具有少至2个氨基酸残基,优选2至10个残基的肽,也可被使用,并且还可被偶联于其它部分,诸如螯合剂。接头应该是低分子量的缀合物,优选具有小于50,000道尔顿且有利地小于约20,000道尔顿、10,000道尔顿或5,000道尔顿的分子量。更通常地,所述靶向构建体肽将具有四个或更多个残基和一种或多种用于结合例如双特异性抗体的半抗原。示例性半抗原可包括In-DTPA(铟-二乙烯三胺五乙酸)或HSG(组胺琥珀酰甘氨酸)。靶向构建体还

可以包括一个或多个螯合部分,诸如DOTA(1,4,7,10-四氮杂环十二烷1,4,7,10-四乙酸),NOTA(1,4,7-三氮杂-环壬烷-1,4,7-三乙酸),TETA(对-溴乙酰-苄基-四乙胺四乙酸)、NETA([2-(4-,7-二羧基甲基[1,4,7]三氮杂环壬烷-1-基-乙基)-2-羧基甲基-氨基]乙酸)或其它已知的螯合部分。螯合部分可以例如用于结合治疗和/或诊断放射性核素、顺磁性离子或造影剂。

[0171] 可靶向构建体还可在骨架结构中包含非天然氨基酸,例如,D-氨基酸,以增强肽在体内的稳定性。在替代实施方案中,可使用其它骨架结构,诸如从非天然氨基酸或拟肽构建的那些骨架。

[0172] 使用固相载体和重复正交脱保护和偶联的标准技术在自动肽合成仪上方便地合成用作可靶向构建体的肽。有利地用标准保护基团诸如Boc基团封闭以后将被用于螯合部分或其它试剂的缀合的肽中的游离氨基,而N-末端残基可被乙酰化来增强血清稳定性。此类保护基对于本领域技术人员来说是公知的。参见Greene和Wuts *Protective Groups in Organic Synthesis*,1999(John Wiley和Sons,N.Y.)。当肽被制备用于随后在双特异性抗体系统内使用时,有利地将它们从树脂裂解来产生对应的C-末端酰胺以抑制体内羧肽酶活性。

[0173] 当使用利用双特异性抗体的预靶向时,所述抗体将含有针对由靶组织产生的或与靶组织相关的抗原的第一结合位点和针对可靶向构建体上的半抗原的第二结合位点。示例性半抗原包括,但不限于,HSG和In-DTPA。针对HSG半抗原产生的抗体是已知的(例如,679抗体),并且可容易地被掺入适当的双特异性抗体(参见,例如,美国专利第6,962,702、7,138,103和7,300,644号,关于实施例部分通过引用并入本文)。然而,其它半抗原和结合它们的抗体在本领域中是已知的,并且可被使用,诸如In-DTPA和734抗体(例如,美国专利第7,534,431号,实施例部分通过引用并入本文)。

[0174] 停靠-锁定™(DNL™)

[0175] 在优选实施方案中,双价或多价抗体形成为停靠-和-锁定™(DNL™)复合物(参见,例如,美国专利第7,521,056、7,527,787、7,534,866、7,550,143和7,666,400号,每一篇专利的实施例部分通过引用并入本文)。通常地,所述技术利用了cAMP依赖性蛋白激酶(PKA)的调节(R)亚基的二聚化和停靠结构域(DDD)与来源于多种AKAP蛋白的任何蛋白的锚定结构域(AD)序列之间发生的特异性和高亲和力结合相互作用(Baillie等,FEBS Letters.2005;579:3264.Wong和Scott,Nat.Rev.Mol.Cell Biol.2004;5:959)。可将DDD和AD肽附接于任何蛋白质、肽或其它分子。因为DDD序列自发地二聚化并结合至AD序列,因此所述技术允许可附接于DDD或AD序列的任何选择的分子之间的复合物的形成。

[0176] 尽管标准的DNL™复合物包含附接于一个AD连接的分子的两个DDD连接的分子的三聚体,但复合结构中的变化允许二聚体、三聚体、四聚体、五聚体、六聚体和其它多聚体的形成。在一些实施方案中,DNL™复合物可以包含结合于相同抗原决定簇或两个或更多不同抗原的两种或更多种抗体、抗体片段或融合蛋白。DNL™复合物还可包含一种或多种其它效应子,诸如蛋白质、肽、免疫调节剂、细胞因子、白细胞介素、干扰素、结合蛋白、肽配体、载体蛋白、毒素、核糖核酸酶诸如豹蛙酶、抑制性寡核苷酸诸如siRNA、抗原或异种抗原诸如PEG、酶、治疗剂、激素、细胞毒性剂、抗-血管生成剂、促细胞凋亡剂或任何其它分子或聚集体。

[0177] 在1968年首先从兔骨骼肌分离了在由第二信使cAMP与R亚基的结合引发的研究最

充分的信号转导途径中起着中心作用的PKA (Walsh等, J. Biol. Chem. 1968; 243: 3763)。全酶的结构由通过R亚基以无活性形式保持的两个催化亚基组成 (Taylor, J. Biol. Chem. 1989; 264: 8443)。PKA的同工酶经发现具有两个类型的R亚基 (RI和RII), 每一个类型都有 α 和 β 亚型 (Scott, Pharmacol. Ther. 1991; 50: 123)。因此, PKA调节亚基的4个同种型为RI α 、RI β 、RII α 和RII β 。R亚基已经仅作为稳定的二聚体被分离, 并且已显示二聚化结构域由RII α 的前44个氨基末端残基组成 (Newlon等, Nat. Struct. Biol. 1999; 6: 222)。如下文中所论述的, 其它调节亚基的氨基酸序列的相似部分都参与二聚和停靠, 每一个位于所述调节亚基的N末端附近。cAMP对R亚基的结合导致广谱的丝氨酸/苏氨酸激酶活性的活性催化亚基的释放, 所述亚基经其与其AKAP停靠通过PKA区室化而定向于选定的底物 (Scott等, J. Biol. Chem. 1990; 265: 21561)。

[0178] 自从1984年表征了首个AKAP (微管相关蛋白-2) 以后 (Lohmann等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1984; 81: 6723), 已经在范围从酵母到人的物种中鉴定了具有多样结构的超过50种AKAP, 其定位于各种亚细胞位点, 包括质膜、肌动蛋白细胞骨架、细胞核、线粒体和内质网 (Wong和Scott, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2004; 5: 959)。AKAP针对PKA的AD是14-18个残基的两亲性螺旋 (Carr等人, J. Biol. Chem. 1991; 266: 14188)。个体AKAP中AD的氨基酸序列有很大不同, 其中对RII二聚体报道的结合亲和力范围为2至90nM (Alto等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003; 100: 4445)。AKAP将仅结合二聚体R亚基。对于人RII α , AD结合到由23个氨基末端残基形成的疏水表面 (Colledge和Scott, Trends Cell Biol. 1999; 6: 216)。因此, 人RII α 的二聚化结构域和AKAP结合结构域都定位于相同N末端44个氨基酸序列内 (Newlon等, Nat. Struct. Biol. 1999; 6: 222; Newlon等, EMBO J. 2001; 20: 1651), 其在本文称为DDD。

[0179] 我们已经开发了利用人PKA调控亚基的DDD和AKAP的AD作为优良的接头模块对用于将在下文称为A和B的任何两个实体停靠成非共价复合物的平台技术, 所述非共价复合物可以通过将半胱氨酸残基在策略位置引入DDD和AD以促进二硫键形成而被进一步锁定成DNLTM复合物。所述方法的一般方法如下。实体A通过将DDD序列与A的前体连接来构建, 产生在下文称为a的第一组分。因为DDD序列将影响二聚体的自发形成, 因此A由a₂构成。实体B通过将AD序列与B的前体连接来构建, 产生在下文称为b的第二组分。a₂中含有的DDD的二聚体基序将产生用于结合b中含有的AD序列的停靠位点, 从而促进a₂和b的易于缔合以形成由a₂b构成的二组分三聚体复合物。该结合事件通过随后反应以经由二硫桥共价束缚两个实体而成为不可逆的, 这基于有效局部浓度的原理而非常有效地发生, 因为最初的结合相互作用将使置于DDD和AD上的反应性硫醇基靠近 (Chmura等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001; 98: 8480) 以位点特异性地连接。通过使用接头、衔接子模块和前体的各种组合, 可产生和使用具有不同化学计量的多种DNLTM构建体 (参见, 例如, 美国专利第7, 550, 143、7, 521, 056、7, 534, 866、7, 527, 787和7, 666, 400号)。

[0180] 通过连接远离两个前体的官能团的DDD和AD, 这种位点特异性连接也预期保留两个前体的原始活性。该方法在性质上是模块化的, 并且可潜在地应用于位点特异性且共价地连接多种物质, 包括肽、蛋白质、抗体、抗体片段和具有广泛活性的其它效应物部分。利用下文实施例中描述的构建AD和DDD缀合的效应物的融合蛋白方法, 可以将实际上任何蛋白或肽并入DNLTM构建体。然而, 所述技术不是限制性的并且可以利用其它缀合方法。

[0181] 已知多种方法用于制备融合蛋白,包括核酸合成、杂交和/或扩增以产生编码目标融合蛋白的合成双链核酸。此类双链核酸可以通过标准分子生物学技术插入用于产生融合蛋白的表达载体(参见例如Sambrook等人,Molecular Cloning,A laboratory manual,第2版,1989)。在此类优选实施方案中,AD和/或DDD部分可以附接于效应蛋白或肽的N末端或C末端。然而,本领域技术人员将了解,AD或DDD部分与效应物部分的附接位点可以改变,取决于效应物部分的化学性质以及效应物部分中参与其生理活性的部分。多种效应物部分的位点特异性连接可以使用本领域已知的技术来进行,例如使用二价交联试剂和/或其它化学缀合技术。

[0182] AD和DDD部分中的结构-功能关系

[0183] 对于不同类型的DNLTM结构,可使用不同的AD或DDD序列。在下文中提供示例性DDD和AD序列。

DDD1

SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:1)

DDD2

[0184] CGHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:2)

AD1

QIEYLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:3)

AD2

CGQIEYLAKQIVDNAIQQAGC (SEQ ID NO:4)

[0185] 本领域技术人员将了解,DDD1和DDD2基于蛋白激酶A的人RII α 同种型的DDD序列。然而,在替代实施方案中,DDD和AD部分可基于蛋白激酶A的人RI α 形式的DDD序列和对应的AKAP序列,如下文中的DDD3、DDD3C和AD3所举例的。

DDD3

SLRECELYVQKHNIQALLKDSIVQLCTARPERPMAFLREYFERLEKEEAK (SEQ ID NO:5)

DDD3C

[0186] MSCGGSLRECELYVQKHNIQALLKDSIVQLCTARPERPMAFLREYFERLEKEEAK (SEQ ID NO:6)

AD3

CGFEELAWKIAKMIWSDVFQQGC (SEQ ID NO:7)

[0187] 在其它替代实施方案中,可在DNLTM复合物的构建中使用AD和/或DDD部分的其它序列变体。例如,只存在对应于PKA RI α 、RII α 、RI β 和RII β 的DDD部分的人PKA DDD序列的4个变体。RII α DDD序列是上文中公开的DDD1和DDD2的基础。下文中显示了4个人PKADDD序列。DDD

序列代表RII α 的残基1-44、RII β 的残基1-44、RI α 的残基12-61和RI β 的残基13-66。(注意，DDD1的序列与人PKA RII α DDD部分具有微小改变。)

PKA RII α

SLRECELYVQKHNIQALLKDVSIQQLCTARPERPMAFLREYFEKLEKEEAK

(SEQ ID NO:8)

PKA RII β

SLKGCELYVQLHGIQQLKDCIVHLCISKPERPMKFLREHFEKLEKEENRQILA

(SEQ ID NO:9)

[0188]

PKA RII α

SHIQIPPLTELLQGYTVEVGQPPDLVDFAVEYFTRLREARRQ (SEQ ID

NO:10)

PKA RII β

SIEIPAGLTELLQGFTEVLRHQPADLLEFALQHFTRLQQENER (SEQ ID

NO:11)

[0189] AD与DDD结构域的结构-功能关系已成为研究的主题。(参见,例如,Bums-Hamuro等,2005,Protein Sci 14:2982-92;Carr等,2001,J Biol Chem 276:17332-38;Alto等,2003,Proc Natl Acad Sci USA 100:4445-50;Hundsruker等,2006,Biochem J 396:297-306;Stokka等,2006,Biochem J 400:493-99;Gold等,2006,Mol Cell 24:383-95;Kinderman等,2006,Mol Cell 24:397-408,所述参考文献的每一篇的完整文本通过引用并入本文)。

[0190] 例如,Kinderman等(2006,Mol Cell 24:397-408)检查了AD-DDD结合相互作用的晶体结构,并得出人DDD序列含有许多在二聚体形成或AKAP结合中是重要的保守氨基酸残基,下文中SEQ ID NO:1中加以下划线的。(参见Kinderman等,2006(通过引用并入本文)的图1)。本领域技术人员将了解,在设计DDD序列的序列变体中,可期望地避免改变任何加以下划线的残基,同时可对对于二聚化和AKAP结合不太重要的残基进行保守氨基酸取代。

[0191] SHIQIPPLTELLQGYTVEVLRQPPDLVEFAVEYFTRLREARRQ (SEQ ID NO:1)

[0192] 如下文中更详细论述的,已表征了20个共同L氨基酸的每一个的保守氨基酸取代。因此,基于Kinderman(2006)的数据和保守氨基酸取代,基于SEQ ID NO:1的潜在可替代DDD序列示于表2中。在设计表2中,只有高度保守的氨基酸取代才被考虑。例如,带电荷的残基只被具有相同电荷的残基取代,具有小的侧链的残基只被具有相似尺寸的残基取代,羟基侧链只被其它羟基取代等。由于脯氨酸对二级结构的独特作用,因此没有其它残基可用于取代脯氨酸。有限数目的此类潜在的替代DDD部分的序列示于下文的SEQ ID NO:12至SEQ ID NO:31中。本领域技术人员将了解,DDD部分内的属内的大量替代种类可通过标准技术,例如使用商购可得的肽合成仪或公知的定点诱变技术来构建。氨基酸取代对AD部分结合的作用也可通过标准结合测定来容易地测定,如Alto等(2003,Proc Natl Acad Sci USA 100:4445-50)中公开的。

[0193] 表2.DDD1 (SEQ ID NO:1) 中的保守氨基酸取代。共有序列公开为SEQ ID NO:87。

[0194]

<u>S</u>	<u>H</u>	<u>I</u>	<u>Q</u>	<u>I</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>G</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	<u>E</u>	<u>L</u>	<u>L</u>	<u>Q</u>	<u>G</u>	<u>Y</u>	<u>T</u>	<u>V</u>	<u>E</u>	<u>V</u>	<u>L</u>	<u>R</u>
T	K		N				A		S	D			N	A		S		D			K
R																					

[0195]

<u>Q</u>	<u>Q</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>D</u>	<u>L</u>	<u>V</u>	<u>E</u>	<u>F</u>	<u>A</u>	<u>V</u>	<u>E</u>	<u>Y</u>	<u>F</u>	<u>T</u>	<u>R</u>	<u>L</u>	<u>R</u>	<u>E</u>	<u>A</u>	<u>R</u>	<u>A</u>
N	N			E			D		L		D			S	K		K	D	L	K	L
									I									I	V		V

THIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:12)

SKIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:13)

SRIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:14)

SHINIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:15)

SHIQIPPALTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:16)

SHIQIPPGLSELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:17)

SHIQIPPGLTDLLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:18)

SHIQIPPGLTELLNGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:19)

SHIQIPPGLTELLQAYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:20)

SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:21)

[0196]

SHIQIPPGLTELLQGYTVDVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:22)

SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLKQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:23)

SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRNQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:24)

SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQNPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:25)

SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:26)

SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVDFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:27)

SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFLVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:28)

SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFIVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:29)

SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFVVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:30)

SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVDYFTRLREARA (SEQ ID NO:31)

[0197] Alto等(2003,Proc Natl Acad Sci USA 100:4445-50)进行了各种AKAP蛋白的AD序列的生物信息学分析以设计称为AKAP-IS的RII选择性AD序列(SEQ ID NO:3),其具有0.4nM的对于DDD的结合常数。AKAP-IS序列被设计为AKAP对PKA的结合的肽拮抗剂。其中取代倾向于减少对DDD的结合的AKAP-IS序列中的残基在下面的SEQ ID NO:3加以下划线。本领域技术人员将了解,在设计AD序列的序列变体中,可期望地避免改变任何加以下划线的残基,同时可以对对于DDD结合不太重要的残基进行保守氨基酸取代。表3显示AKAP-IS的序列(AD1,SEQ ID NO:3)中的潜在保守氨基酸取代,与上文表2中对于DDD1(SEQ ID NO:1)显

示的相似。

[0198] 有限数量的此类潜在替代AD部分序列示于下文中的SEQ ID NO:32至SEQ ID NO:49中。再次地,可由本领域技术人员基于Alto等(2003)的数据产生、测试和使用可能的AD部分序列的属内的非常大量的种类。值得注意的是,Alto(2003)的图2显示了甚至更大量的可产生的潜在氨基酸取代,同时保持对DDD部分的结合活性(基于实际的结合实验)。

AKAP-IS

[0199]

QIEYLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:3)

[0200]

表3.AD1 (SEQ ID NO:3) 中的保守氨基酸取代。共有序列公开为SEQ ID NO:88。

[0201]

Q	I	E	Y	L	A	K	Q	I	V	D	N	A	I	Q	Q	A
N	L V	D	F T S	I V		R	N			E	Q			N	N	L I V

NIEYLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:32)

QLEYLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:33)

QVEYLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:34)

QIDYLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:35)

QIEFLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:36)

QIETLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:37)

[0202]

QIESLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:38)

QIEYIAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:39)

QIEYVAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:40)

QIEYLARQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:41)

QIEYLAKNIVDNAIQQA (SEQ ID NO:42)

QIEYLAKQIVENAIQQA (SEQ ID NO:43)

QIEYLAKQIVDQAIQQA (SEQ ID NO:44)

QIEYLAKQIVDNAINQA (SEQ ID NO:45)

QIEYLAKQIVDNAIQNA (SEQ ID NO:46)

[0203]

QIEYLAKQIVDNAIQQL (SEQ ID NO:47)

QIEYLAKQIVDNAIQQI (SEQ ID NO:48)

QIEYLAKQIVDNAIQQV (SEQ ID NO:49)

[0204] Gold等(2006,Mol Cell 24:383-95)利用结晶学和肽筛选开发SuperAKAP-IS序列 (SEQ ID NO:50),该序列显示对于PKA的RII同型的选择性比对于RI同种型的选择性高5个数量级。加以下划线的残基表示相对于AKAP-IS序列的氨基酸取代的位置,其增强对RII α 的DDD部分的结合。在该序列中,N末端Q残基编号为残基编号4并且C末端A残基为残基编号20。其中可进行取代以影响对于RII α 的亲力的残基为8、11、15、16、18、19和20(Gold等,2006)在某些替代实施方案中,预期可用SuperAKAP-IS序列取代AKAP-IS AD部分序列以制备DNLTM构建体。可以取代AKAP-IS AD序列的其它替代序列显示于SEQ ID NO:51-53中。相对于AKAP-IS序列的取代被加以下划线。与SEQ ID NO:4中显示的AD2一样,预期AD部分还可以包

括其它N末端残基半胱氨酸和甘氨酸以及C末端残基甘氨酸和半胱氨酸。

SuperAKAP-IS

QIEYVAKQIVDYAIHQQA (SEQ ID NO:50)

可替代 *AKAP* 序列

[0205]

QIEYKAKQIVDHAIHQQA (SEQ ID NO:51)

QIEYHAKQIVDHAIHQQA (SEQ ID NO:52)

QIEYVAKQIVDHAIHQQA (SEQ ID NO:53)

[0206] Gold等的图2公开了下文中显示的来自多种AKAP蛋白的另个的DDD结合序列。

[0207] RII-特异性AKAP

AKAP-KL

PLEYQAGLLVQNAIQQAI (SEQ ID NO:54)

AKAP79

[0208] LLIETASSLVKNAIQLSI (SEQ ID NO:55)

AKAP-Lbc

LIEEAASRIVDAVIEQVK (SEQ ID NO:56)

[0209] RI-特异性AKAP

AKAPce

ALYQFADRFSELVISEAL (SEQ ID NO:57)

RIAD

[0210] LEQVANQLADQIIKEAT (SEQ ID NO:58)

PV38

FEELAWKIAKMIWSDVF (SEQ ID NO:59)

[0211] 双重特异性AKAP

AKAP7

ELVRLSKRLVENAVLKAV (SEQ ID NO:60)

MAP2D

TAEVVSARIVQVVTAEEAV (SEQ ID NO:61)

[0212]

DAKAP1

QIKQAAFQLISQVILEAT (SEQ ID NO:62)

DAKAP2

LAWKIAKMIVSDVMQQ (SEQ ID NO:63)

[0213] Stokka等(2006,Biochem J 400:493-99)还开发了示于SEQ ID NO:64-66中的AKAP对PKA的结合的肽部分剂。肽拮抗剂被命名为Ht31 (SEQ ID NO:64)、RIAD (SEQ ID NO:65) 和PV-38 (SEQ ID NO:66)。Ht-31肽展示更大的对于PKA的RII同种型的亲和力,而RIAD和PV-38显示更高的对于RI的亲和力。

Ht31

DLIEEAASRIVDAVIEQVKAAGAY (SEQ ID NO:64)

RIAD

[0214]

LEQYANQLADQIIKEATE (SEQ ID NO:65)

PV-38

FEELAWKIAKMIWSDVFQQC (SEQ ID NO:66)

[0215] Hundsrucker等(2006,Biochem J 396:297-306)开发了其它的AKAP对PKA的结合的肽竞争剂,其具有低至0.4nM的对PKA的RII形式的DDD的结合常数。各种AKAP拮抗性肽的序列提供于Hundsrucker等中的表1中,再现于下文的表4中。AKAPIS代表合成RII亚基结合肽。所有其它肽来源于指定的AKAP的RII结合结构域。

[0216] 表4.AKAP肽序列

[0217] 肽序列

AKAPIS	QIEYLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:3)
AKAPIS-P	QIEYLAKQIPDNAIQQA (SEQ ID NO:67)
Ht31	KGADLIEEAASRIVDAVIEQVKAAG (SEQ ID NO:68)
Ht31-P	KGADLIEEAASRIPDAPIEQVKAAG (SEQ ID NO:69)
AKAP7 δ -wt-pep	PEDAELVRLSKRLVENAVLKAVQQY (SEQ ID NO:70)
AKAP7 δ -L304T-pep	PEDAELVRTSKRLVENAVLKAVQQY (SEQ ID NO:71)
AKAP7 δ -L308D-pep	PEDAELVRLSKRDVENAVLKAVQQY (SEQ ID NO:72)
AKAP7 δ -P-pep	PEDAELVRLSKRLPENAVLKAVQQY (SEQ ID NO:73)
AKAP7 δ -PP-pep	PEDAELVRLSKRLPENAPLKAVQQY (SEQ ID NO:74)
[0218] AKAP7 δ -L314E-pep	PEDAELVRLSKRLVENAVEKAVQQY (SEQ ID NO:75)
AKAP1-pep	EEGLDRNEEIKRAAFQIISQVISEA (SEQ ID NO:76)
AKAP2-pep	LVDDPLEYQAGLLVQNAIQQAIAEQ (SEQ ID NO:77)
AKAP5-pep	QYETLLIETASSLVKNAIQLSIEQL (SEQ ID NO:78)
AKAP9-pep	LEKQYQEQLSEEVAKVIVSMSIAFA (SEQ ID NO:79)
AKAP10-pep	NTDEAQEELAWKIAKMIVSDIMQQA (SEQ ID NO:80)
AKAP11-pep	VNLDKKAVLAEKIVAEAEIKAEREL (SEQ ID NO:81)
AKAP12-pep	NGILELETKSSKLVQNIQTAVDQF (SEQ ID NO:82)
AKAP14-pep	TQDKNYEDEL TQVALALVEDVINYA (SEQ ID NO:83)
Rab32-pep	ETSAKDNINIEEAARFLVEKILVNH (SEQ ID NO:84)

[0219] 参照AKAP IS序列(SEQ ID NO:3)通过加下划线在下文中指示在不同AKAP蛋白的AD结构域之间高度保守的残基。所述残基与由Alto等(2003)观察到的相同,添加C末端丙氨酸残基。(参见Hundsruker等(2006)的图4,通过引用并入本文)。具有特别高的对于RII DDD序列的亲力的肽拮抗剂的序列为AKAP-IS、AKAP7 δ -wt-pep、AKAP7 δ -L304T-pep和AKAP7 δ -L308D-pep的序列。

AKAP-IS

[0220] QIEYLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:3)

[0221] Carr等(2001, J Biol Chem 276:17332-38)研究来自人与非人蛋白质的不同AKAP结合DDD序列之间的序列同源性的程度,并鉴定在不同DDD部分之间似乎是最高度保守的DDD序列中的残基。这些残基在下文中通过参考SEQ ID NO:1的人PKA RII α DDD加以下划线来指示。特别保守的残基进一步用斜体来指示。与这些残基重叠但不与其相同的残基被Kinderman等(2006)认为对于对AKAP蛋白的结合是非常重要的。本领域技术人员将了解,在设计DDD序列的变体中,最优选的是避免改变最保守的残基(斜体),并且优选的是避免改变保守的残基(加以下划线的),同时可考虑针对既未加以下划线也没有斜体的残基的保守氨基酸取代。

[0222] SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:1)

[0223] 基于Carr等(2001)的数据的对DDD1(SEQ ID NO:1)序列的一组经修饰的保守氨基酸取代示于表5中。本领域技术人员可容易地导出替代DDD氨基酸序列,如上文中针对表1和

表2所公开的。

[0224] 表5.DDD1 (SEQ ID NO:1) 中的保持氨基酸取代。共有序列公开为SEQ ID NO:89。

[0225]

<u>S</u>	<u>H</u>	<u>I</u>	<u>Q</u>	<u>I</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>G</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	<u>E</u>	<u>L</u>	<u>L</u>	<u>Q</u>	<u>G</u>	<u>Y</u>	<u>T</u>	<u>V</u>	<u>E</u>	<u>V</u>	<u>L</u>	<u>R</u>
T			N						S								I L A				

[0226]

<u>Q</u>	<u>Q</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>D</u>	<u>L</u>	<u>V</u>	<u>E</u>	<u>F</u>	<u>A</u>	<u>V</u>	<u>E</u>	<u>Y</u>	<u>F</u>	<u>T</u>	<u>R</u>	<u>L</u>	<u>R</u>	<u>E</u>	<u>A</u>	<u>R</u>	<u>A</u>
N										I L A	D			S	K		K		L I V		L I V

[0227] 本领域技术人员将了解,通过使用本领域中的标准技术和仅常规实验,可利用DDD或AD氨基酸序列中的这些和其它氨基酸取代来在AD或DDD部分的属内产生替代种类。

[0228] 替代DNLTM结构

[0229] 在某些替代实施方案中,DNLTM构建体可使用替代地构建的抗体或抗体片段来形成,其中可将AD部分附接于在κ轻链(C_k)的C末端而非重链上的Fc的C末端。可如2012年6月1日提交的临时美国专利申请系列第61/654,310号、2012年6月20日提交的第61/662,086号、2012年7月19日提交的第61/673,553号和2012年8月13日提交的第61/682,531号(所述每一个临时美国专利申请系列的完整正文通过引用并入本文)中所公开的,制备替代地形成的DNLTM构建体。缀合有轻链的DNLTM构建体体外显示出增强的体外Fc效应功能活性,和改善的药物动力学,体内稳定性和抗-淋巴瘤活性(Rossi等,2013,Bioconjug Chem 24:63-71)。

[0230] 可如临时美国专利申请序列第61/654,310、61/662,086、61/673,553和61/682,531号中所公开的,制备缀合有C_k的DNLTM构建体。简言之,通过重组工程化产生C_k-AD2-IgG,其中将AD2肽融合于κ轻链的C末端。因为C_k的天然C末端是半胱氨酸残基,其形成与C_H1的二硫桥,所以将16-氨基酸残基“铰链”接头用于间隔AD2与C_k-V_H1二硫桥。使用pdHL2载体构建C_k-AD2-IgG-维妥珠单抗和C_k-AD2-IgG-依帕珠单抗的哺乳动物表达载体,所述pdHL2载体先前被用于同源C_H3-AD2-IgG模块的表达。合成2208-bp的核苷酸序列,其包含范围从V_k/C_k内含子内的Bam HI限制性位点至C_k内含子的Xho I限制性位点3',在C_k的编码序列的3'末端框内插入铰链接头(EFPKPSTPPGSSGGAP,SEQ ID NO:162)和AD2的编码序列的pdHL2载体序列。将该合成序列经由Bam HI和Xho I限制性位点插入维妥珠单抗和依帕珠单抗的IgG-pdHL2表达载体。如对于C_H3-AD2-IgG模块所述,利用SpESFX-10产生生产性克隆。通过在分批转瓶培养中培养稳定地转染的生产性克隆产生C_k-AD2-IgG-维妥珠单抗和C_k-AD2-IgG-依帕珠单抗,并使用MabSelect (GE Healthcare) 蛋白A亲和层析在单一步骤中从上清液纯化所述单抗。

[0231] 按照先前针对22-(20)-(20)所描述的相同的DNLTM法(Rossi等,2009,Blood 113:6161-71),利用C_H1-DDD2-Fab-维妥珠单抗(来源于维妥珠单抗的基于Fab的模块)缀合C_k-AD2-IgG-依帕珠单抗以产生bsHexAb22*-(20)-(20),其中22*表示依帕珠单抗的C_k-AD2模块并且每一个(20)表示维妥珠单抗Fab的稳定的二聚体。将22*-(20)-(20)的性质与22-(20)-(20)(包含C_H3-AD2-IgG-依帕珠单抗的同源Fc-bsHexAb,其具有相似的组成和分子尺寸,但具有不同的体系结构)的性质相比较。

[0232] 按照先前针对20-2b所描述的相同的DNLTM法(Rossi等,2009,Blood 114:3864-71),用IFN α 2b-DDD2(具有在其C末端上融合的DDD2肽的IFN α 2b的模块)缀合C_k-AD2-IgG-维妥珠单抗以产生20*-2b(其包含具有融合于每一条轻链的二聚体IFN α 2b的维妥珠单抗)。将20*-2b的性质与作为同源Fc-IgG-IFN α 的20-2b的性质相比较。

[0233] 通过MabSelect亲和层析从DNLTM反应混合物分离bsHexAbs和IgG-IFN α 的每一种。两个C_k衍生的原型,抗-CD22/CD20双特异性六价抗体(包含依帕珠单抗(抗-CD22)和维妥珠单抗(抗-CD20)的4个Fab)和CD20-靶向免疫细胞因子(包含维妥珠单抗和4个分子的干扰素- α 2b)显示相较于它们的Fc衍生的对应物增强的体外Fc效应子功能,以及改善的药代动力学、体内稳定性和抗-淋巴瘤活性。

[0234] 氨基酸取代

[0235] 在替代实施方案中,所公开的方法和组合物可包括具有一个或多个取代的氨基酸残基的蛋白质或肽的产生和使用。例如,可如上所述修饰用于产生DNLTM构建体的DDD和/或AD序列。

[0236] 本领域技术人员将意识到,一般地,氨基酸取代通常包括用另一个具有相对相似性质的氨基酸对氨基酸的替换(即,保守氨基酸取代)。各种氨基酸的性质以及氨基酸取代对蛋白质结构和功能的作用已为本领域中的广泛研究和知识的主题。

[0237] 例如,可考虑氨基酸的亲水指数(Kyte&Doolittle,1982,J.Mol.Biol.,157:105-132)。氨基酸的相对亲水特征促成所得蛋白质的二级结构,这反过来确定蛋白质与其它分子的相互作用。每一个氨基酸已被分配了基于其疏水性和电荷特征的亲水指数(Kyte&Doolittle,1982),这些指数是:异亮氨酸(+4.5);缬氨酸(+4.2);亮氨酸(+3.8);苯丙氨酸(+2.8);半胱氨酸/胱氨酸(+2.5);甲硫氨酸(+1.9);丙氨酸(+1.8);甘氨酸(-0.4);苏氨酸(-0.7);丝氨酸(-0.8);色氨酸(-0.9);酪氨酸(-1.3);脯氨酸(-1.6);组氨酸(-3.2);谷氨酸(-3.5);谷氨酰胺(-3.5);天冬氨酸(-3.5);天冬酰胺(-3.5);赖氨酸(-3.9)和精氨酸(-4.5)。在产生保守取代中,其亲水指数在 ± 2 内的氨基酸的使用是优选的,在 ± 1 内的是更优选的,在 ± 0.5 内的是甚至更优选的。

[0238] 氨基酸取代还可考虑氨基酸残基的亲水性(例如,美国专利第4,554,101号)。亲水性值已被赋予氨基酸残基:精氨酸(+3.0);赖氨酸(+3.0);天冬氨酸(+3.0);谷氨酸(+3.0);丝氨酸(+0.3);天冬酰胺(+0.2);谷氨酰胺(+0.2);甘氨酸(0);苏氨酸(-0.4);脯氨酸(-0.5+/-0.1);丙氨酸(-0.5);组氨酸(-0.5);半胱氨酸(-1.0);甲硫氨酸(-1.3);缬氨酸(-1.5);亮氨酸(-1.8);异亮氨酸(-1.8);酪氨酸(-2.3);苯丙氨酸(-2.5);色氨酸(-3.4)。用具有相似亲水性的其它氨基酸对氨基酸的取代是优选的。

[0239] 其它考虑包括氨基酸侧链的尺寸。例如,用具有大的侧链的氨基酸例如色氨酸或酪氨酸替换具有紧凑侧链的氨基酸诸如甘氨酸或丝氨酸通常不是优选的。各种氨基酸残基对蛋白质二级结构的作用也是考虑因素。通过实证研究,不同氨基酸残基对蛋白质结构域采用 α 螺旋、 β -折叠或反转二级结构的倾向性的作用已被确定,并且本领域中是已知的(参见,例如,Chou&Fasman,1974,Biochemistry,13:222-245;1978,Ann.Rev.Biochem.,47:251-276;1979,Biophys.J.,26:367-384)。

[0240] 基于此类考虑和广泛的实验研究,保守氨基酸取代的表已被构建并且在本领域中是已知的。例如:精氨酸和赖氨酸;谷氨酸和天冬氨酸;丝氨酸和苏氨酸;谷氨酰胺和天冬酰胺。

胺;以及缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸。或者:Ala (A) leu、ile、val;Arg (R) gln、asn、lys;Asn (N) his、asp、lys、arg、gln;Asp (D) asn、glu;Cys (C) ala、ser;Gln (Q) glu、asn;Glu (E) gln、asp;Gly (G) ala;His (H) asn、gln、lys、arg;Ile (I) val、met、ala、phe、leu;Leu (L) val、met、ala、phe、ile;Lys (K) gln、asn、arg;Met (M) phe、ile、leu;Phe (F) leu、val、ile、ala、tyr;Pro (P) ala;Ser (S) thr;Thr (T) ser;Trp (W) phe、tyr;Tyr (Y) trp、phe、thr、ser;Val (V) ile、leu、met、phe、ala。

[0241] 氨基酸取代的其它考虑因素包括残基是否位于蛋白质的内部或是否暴露于溶剂。对于内部残基,保守取代可包括:Asp和Asn;Ser和Thr;Ser和Ala;Thr和Ala;Ala和Gly;Ile和Val;Val和Leu;Leu和Ile;Leu和Met;Phe和Tyr;Tyr和Trp。(参见,例如,rockefeller.edu上的PROWL网站)。对于暴露于溶剂的残基,保守取代包括:Asp和Asn;Asp和Glu;Glu和Gln;Glu和Ala;Gly和Asn;Ala和Pro;Ala和Gly;Ala和Ser;Ala和Lys;Ser和Thr;Lys和Arg;Val和Leu;Leu和Ile;Ile和Val;Phe和Tyr。(同上)。各种矩阵已被构建来帮助选择氨基酸取代,诸如PAM250评分矩阵、Dayhoff矩阵、Grantham矩阵、McLachlan矩阵、Doolittle矩阵、Henikoff矩阵、Miyata矩阵、Fitch矩阵、Jones矩阵、Rao矩阵、Levin矩阵和Risler矩阵(同上)。

[0242] 在测定氨基酸取代中,还可考虑分子间或分子内键,诸如带正电荷残基(例如,His、Arg、Lys)与带负电荷的残基(例如,Asp、Glu)之间的离子键(盐桥)或附近半胱氨酸残基之间的二硫键的存在。

[0243] 用任何氨基酸取代编码的蛋白质序列中的任何其它氨基酸的方法对于本领域技术人员来说是公知的并且是常规实验的问题,例如通过定点诱变的技术或通过编码氨基酸取代的寡核苷酸的合成和装配以及拼接至表达载体构建体中。

[0244] 噬菌体展示

[0245] 所要求保护的组合物和/或方法的某些实施例可涉及各种靶分子、细胞或组织的结合肽和/或肽模拟物。结合肽可通过本领域中已知的任何方法来确定,包括但不限于噬菌体展示技术。噬菌体展示的各种方法和用于产生不同肽群体的技术在本领域中是公知的。例如,例如,美国专利第5,223,409、5,622,699和6,068,829号中公开了用于制备噬菌体文库的方法。噬菌体展示技术包括遗传操纵噬菌体以便小肽可在它们的表面上表达(Smith和Scott,1985,Science 228:1315-1317;Smith和Scott,1993,Meth.Enzymol.21:228-257)。除了肽以外,还可在噬菌体颗粒的表面上展示较大的蛋白质结构域诸如单链抗体(Arap等,1998,Science 279:377-380)。

[0246] 可通过淘选(Pasqualini和Ruoslahti,1996,Nature 380:364-366;Pasqualini,1999,The Quart.J.Nucl.Med.43:159-162)分离对于给定的器官、组织、细胞类型或靶分子具有选择性的靶向氨基酸序列。简言之,向整个生物体或向分离的器官、组织、细胞类型或靶分子施用包含假定的靶向肽的噬菌体文库,并收集含有结合的噬菌体的样品。可从靶器官、组织、细胞类型或靶分子洗脱结合靶的噬菌体,随后通过将它们在宿主细菌中生长来扩增它们。

[0247] 在某些实施方案中,可在淘选的轮次之间于宿主细菌中繁殖噬菌体。与通过噬菌体裂解不同,细菌可以相反地分泌多个拷贝的展示特定插入物的噬菌体。如果需要,可将扩增的噬菌体再次暴露于靶器官、组织、细胞类型或靶分子,收集所述噬菌体以进行另外轮的

淘选。可进行多轮淘选,直至获得一群选择性或特异性结合剂。可通过对对应于噬菌体基因组中的靶向插入物的DNA进行测序来测定肽的氨基酸序列。随后可通过标准蛋白质化学技术(Arap等,1998,Smith等,1985)将所鉴定的靶向肽产生为合成肽。

[0248] 在一些实施方案中,削减方案可用于进一步减少背景噬菌体结合。削减的目的是为了从结合于靶而不是目标靶的文库中去除噬菌体。在替代实施方案中,可针对对照细胞、组织或器官预筛选噬菌体文库。例如,可在针对对照正常细胞系的文库预筛选后鉴定肿瘤-结合肽。削减后,可针对目标分子、细胞、组织或器官筛选文库。削减方案的其它方法是已知的并且可用于实施所要求保护的方法,例如如公开于美国专利第5,840,841、5,705,610、5,670,312和5,492,807号中的方法。

[0249] 纳米抗体

[0250] 纳米抗体是尺寸约12-15kDa(长度约110个氨基酸)的单结构域抗体。纳米抗体可选择性结合靶抗原,与全尺寸抗体一样,并且具有相似的对于抗原的亲合力。然而,由于它们的小得多的尺寸,它们可以能够更好地渗透进实体瘤。该较小的尺寸也促成纳米抗体的稳定性,所述纳米抗体比全尺寸抗体更加抗pH和极端温度(Van Der Linden等,1999, *Biochim Biophys Acta* 1431:37-46)。最初在发现骆驼科动物(骆驼、羊驼、美洲驼羊)具有完全功能的无轻链的抗体后开发了单结构域抗体(例如,Hamsen等,2007, *Appl Microbiol Biotechnol* 77:13-22)。重链抗体由单个可变结构域(V_H)和两个恒定结构域(C_H2 和 C_H3)组成。与抗体一样,可开发纳米抗体,并将其用作多价和/或双特异性构建体。被靶向多种靶抗原诸如IL-6R、vWF、TNF、RSV、RANKL、IL-17A&F和IgE(例如,ABLYNX®, Ghent, Belgium),在癌症、炎症、感染性疾病、阿尔茨海默病、急性冠状动脉综合征和其它病症中具有潜在临床用途的纳米抗体的人源化形式正处于商业开发中(例如,Saerens等,2008, *Curr Opin Pharmacol* 8:600-8; Muylldermans, 2013, *Ann Rev Biochem* 82:775-97; Ibanez等, 2011, *J Infect Dis* 203:1063-72)。

[0251] 纳米抗体的血浆半衰期比全尺寸抗体的短,消除主要通过肾脏途径。因为它们不存在Fc区,因此,它们未显示补体依赖性细胞毒性。

[0252] 纳米抗体可通过用靶抗原免疫骆驼、美洲驼羊、羊驼或鲨鱼,随后mRNA,将其克隆至文库中,随后筛选抗原结合来产生。可通过标准技术来人源化纳米抗体序列(例如, Jones等, 1986, *Nature* 321:522, Riechmann等, 1988, *Nature* 332:323, Verhoeyen等, 1988, *Science* 239:1534, Carter等, 1992, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 89:4285, Sandhu, 1992, *Crit. Rev. Biotech.* 12:437, Singer等, 1993, *J. Immunol.* 150:2844)。人源化因骆驼科动物与人FR序列之间的高度同源性而为相对直接的。

[0253] 在各种实施方案中,主题CL2A-SN-38缀合物可包含用于缀合的药物至细胞、组织、器官或病原体的靶向递送的纳米抗体。所使用的纳米抗体公开于,例如,在美国专利第7,807,162、7,939,277、8,188,223、8,217,140、8,372,398、8,557,965、8,623,361和8,629,244号(所述每一篇专利的实施例部分通过引用并本文)中。

[0254] 缀合方案

[0255] 优选的缀合方案基于在中性或酸性pH下容易进行的硫醇-马来酰亚胺、硫醇-乙烯基砜、硫醇-溴代乙酰胺或硫醇-碘乙酰胺反应。这避免了对如,例如当使用活性酯时所必需的用于缀合物的较高的pH条件的需要。示例性缀合方案的更详细内容在下文中的实施例部

分进行了说明。

[0256] 治疗性治疗

[0257] 在另一个方面,本发明涉及治疗受试者的方法,所述方法包括向受试者施用治疗有效量的如本文中所述的治疗性缀合物。可用本文所述的治疗性缀合物治疗的疾病包括,但不限于B-细胞恶性肿瘤(例如,非霍奇金淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、多发性骨髓瘤、霍奇金淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、急性淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、毛细胞性白血病)(使用,例如抗-CD22抗体诸如针对另一种CD22表位(hRFB4)的hLL2 MAbs(依帕珠单抗,参见美国专利第6,183,744号),或针对其它B细胞抗原诸如CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD37、CD40、CD40L、CD52、CD74、CD80或HLA-DR的抗体)。其它疾病包括但不限于,内胚层衍生的消化系统上皮的腺癌,癌症诸如乳腺癌和非小细胞肺癌,以及其它癌、肉瘤、神经胶质瘤、髓细胞性白血病等。具体地,有利地使用由恶性实体瘤或造血组织肿瘤(例如,胃肠道、胃、结肠、食管、肝、肺、乳腺、胰腺、肝、前列腺、卵巢、睾丸、脑、骨或淋巴肿瘤、肉瘤或黑素瘤)产生的或与其相关的针对抗原例如癌胚抗原的抗体。此类治疗剂可进行一次或反复进行,这取决于疾病状态和对缀合物的耐受性,并且还可将其任选地与其它治疗方式,诸如手术、外部辐射、放射免疫治疗、免疫治疗、化学治疗、反义治疗、干扰RNA治疗、基因治疗等组合使用。每一个组合将适于肿瘤类型、分期、患者状况和以前的治疗和由管理医师考虑的其它因素。

[0258] 如本文所用的,术语“受试者”是指任何动物(例如,脊椎动物和无脊椎动物),包括但不限于哺乳动物(包括人)。所述术语无意限于特定的年龄或性别。因此,成年和新生儿受试者以及胎儿(无论男性或女性)都被所述术语涵盖。本文中所给出的剂量是用于人的,但可根据体重或平方米大小将所述剂量调整至适合其它哺乳动物以及儿童的大小。

[0259] 在优选实施方案中,包含抗-EGP-1(抗-TROP-2)抗体诸如hRS7MAbs的治疗性缀合物可用于治疗癌,诸如食道癌、胰腺癌、肺癌、胃癌、结肠和直肠癌、膀胱癌、乳腺癌、卵巢癌、子宫癌、肾癌和前列腺癌,如美国专利第7,238,785、7,517,964和8,084,583号(所述每一个专利的实施例部分通过引入并入本文)中公开的。hRS7抗体是人源化抗体,其包含轻链互补决定区(CDR)序列CDR1(KASQDVSIAVA,SEQ ID NO:90);CDR2(SASYRYT,SEQ ID NO:91);和CDR3(QQHYITPLT,SEQ ID NO:92)以及重链CDR序列CDR1(NYGMN,SEQ ID NO:93);CDR2(WINTYTGEPTYTDDFKG,SEQ ID NO:94)和CDR3(GGFGSSYWYFDV,SEQ ID NO:95)

[0260] 在另一个优选实施方案中,包含抗-CEACAM5抗体(例如,hMN-14,拉贝珠单抗)和/或抗-CEACAM6抗体(例如,hMN-3或hMN-15)的治疗性缀合物可被用于治疗表达CEACAM5和/或CEACAM6的多种癌症的任一种,如美国专利第7,541,440、7,951,369、5,874,540、6,676,924和8,267,865号(所述每一篇专利的实施例部分通过引用并入)中公开的。可使用抗-CEACAM5、抗-CEACAM6或这两者的组合治疗的实体肿瘤包括但不限于乳腺癌、肺癌、胰腺癌、食道癌、甲状腺髓样癌、卵巢癌、结肠癌、直肠癌、膀胱癌、口腔癌和胃癌。大多数癌(包括胃肠道癌、呼吸道癌、泌尿生殖系统癌症和乳腺癌)表达CEACAM5,并且可用所述主题免疫缀合物治疗。hMN-14抗体是人源化抗体,其包含轻链可变区CDR序列CDR1(KASQDVGTSA;SEQ ID NO:96)、CDR2(WTSTRHT;SEQ ID NO:97)和CDR3(QQYSLYRS;SEQ ID NO:98),以及重链可变区CDR序列CDR1(TYWMS;SEQ ID NO:99)、CDR2(EIHPDSSTINYAPSLKD;SEQ ID NO:100)和CDR3(LYFGFPWFAY;SEQ ID NO:101)。

[0261] hMN-3抗体是人源化抗体,其包含轻链可变区CDR序列CDR1 (RSSQSIVHSNGNTYLE, SEQ ID NO:102)、CDR2 (KVSNRFS, SEQ ID NO:103) 和CDR3 (FQGSHVPPT, SEQ ID NO:104) 以及重链CDR序列CDR1 (NYGMN, SEQ ID NO:105)、CDR2 (WINTYTGEPTYADDFKG, SEQ ID NO:106) 和CDR3 (KGWMDFNSSLDY, SEQ ID NO:107)。

[0262] hMN-15抗体是人源化抗体,其包含轻链可变区CDR序列SASSRVSYIH (SEQ ID NO:108)、GTSTLAS (SEQ ID NO:109) 和QQWSYNPPT (SEQ ID NO:110);以及重链可变区CDR序列DYYMS (SEQ ID NO:111)、FIANKANGHTTDYSPSVKG (SEQ ID NO:112) 和DMGIRWNFDV (SEQ ID NO:113)。

[0263] 在另一个优选实施方案中,包含抗-CD74抗体(例如,hLL1,米拉珠单抗,如美国专利第7,074,403、7,312,318、7,772,373、7,919,087和7,931,903号(所述每一篇专利的实施例部分通过引用并入)中公开)的治疗性缀合物可用于治疗表达CD74的多种癌症的任一种,包括但不限于肾癌、肺癌、肠癌、胃癌、乳腺癌、前列腺癌或卵巢癌以及几种血液肿瘤,诸如多发性骨髓瘤、慢性淋巴细胞性白血病、急性淋巴细胞性白血病、非霍奇金淋巴瘤和霍奇金淋巴瘤。hLL1抗体是人源化抗体,其包含轻链可变区CDR序列CDR1 (RSSQSLVHRNGNTYLH; SEQ ID NO:114)、CDR2 (TVSNRFS; SEQ ID NO:115) 和CDR3 (SQSSHVPPT; SEQ ID NO:116) 以及重链可变区CDR序列CDR1 (NYGVN; SEQ ID NO:117)、CDR2 (WINPNTGEPTFDDDFKG; SEQ ID NO:118) 和CDR3 (SRGKNEAWFAY; SEQ ID NO:119)。

[0264] 在另一个优选实施方案中,包含抗-CD22抗体(例如,hLL2,依帕珠单抗,于美国专利第5,789,554、6,183,744、6,187,287、6,306,393、7,074,403和7,641,901号(所述每一篇专利的实施例部分通过引用并入)中公开的,或嵌合或人源化RFB4抗体)的治疗性缀合物可用于治疗表达CD22的多种癌症的任一种,包括但不限于B细胞淋巴瘤的无痛形式、B细胞淋巴瘤的侵袭形式、慢性淋巴性白血病、急性淋巴性白血病、非霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤或弥漫性B细胞淋巴瘤。抗-CD22缀合物也用于治疗自体免疫性疾病诸如急性免疫性血小板减少症、慢性免疫血小板减少症、皮炎、西德纳姆舞蹈症、重症肌无力、系统性红斑狼疮、狼疮性肾炎、风湿热、多腺体综合症、大疱性类天疱疮、天疱疮寻常、糖尿病(例如,青少年糖尿病)、亨诺-许兰氏紫癜、链球菌感染后肾炎、结节性红斑、高安动脉炎、ANCA相关性血管炎、阿狄森氏病、类风湿关节炎、多发性硬化症、结节病、溃疡性结肠炎、多形性红斑、IgA肾病、结节性多动脉炎、强直性脊柱炎、古德帕斯彻氏综合征、血栓闭塞性脉管炎、**Sjögren** 综合征、原发性胆汁性肝硬化、桥本甲状腺炎、甲状腺毒症、硬皮病、慢性活动型肝炎、多肌炎/皮炎、多软骨炎、寻常天疱疮、韦格纳肉芽肿、膜性肾病、肌萎缩侧索硬化、脊髓痨、巨细胞动脉炎/多肌痛、恶性贫血、急进性肾小球肾炎、银屑病、纤维化肺泡炎、移植物抗宿主病(GVHD)、器官移植排斥、脓毒病、败血症和炎症。hLL2抗体是人源化抗体,其包含轻链CDR序列CDR1 (KSSQSVLYSANHKYLA, SEQ ID NO:120)、CDR2 (WASTRES, SEQ ID NO:121) 和CDR3 (HQYLSSWTF, SEQ ID NO:122) 以及重链CDR序列CDR1 (SYWLH, SEQ ID NO:123)、CDR2 (YINPRNDYTEYNQNFKD, SEQ ID NO:124) 和CDR3 (RDITTFY, SEQ ID NO:125)。

[0265] 在优选实施方案中,包含抗-CSAp抗体诸如hMu-9MAb的治疗性缀合物可用于治疗结直肠癌,以及胰腺癌和卵巢癌,如美国专利第6,962,702、7,387,772、7,414,121、7,553,953、7,641,891和7,670,804号(所述每一篇专利的实施例部分通过引用并入)中公开的。hMu-9抗体是人源化抗体,其包含轻链CDR序列CDR1 (RSSQSIVHSNGNTYLE, SEQ ID NO:126)、

CDR2 (KVSNRFS, SEQ ID NO:127) 和CDR3 (FQGSRVPYT, SEQ ID NO:128) 以及重链可变CDR序列 CDR1 (EYVIT, SEQ ID NO:129)、CDR2 (EIYPGSGSTSYNEKFK, SEQ ID NO:130) 和CDR3 (EDL, SEQ ID NO:131)。

[0266] 包含hPAM4 MAb的治疗性缀合物可用于治疗胰腺癌或其它实体瘤,如美国专利第7,238,786和7,282,567号(所述每一篇专利的实施例部分通过引用并入)中公开的。hPAM4抗体是人源化抗体,其包含轻链可变区CDR序列CDR1 (SASSSVSSSYLY, SEQ ID NO:132)、CDR2 (STSNLAS, SEQ ID NO:133) 和CDR3 (HQWNRYPYT, SEQ ID NO:134);以及重链CDR序列CDR1 (SYVLH, SEQ ID NO:135)、CDR2 (YINPYNDGTQYNEKFKG, SEQ ID NO:136) 和CDR3 (GFGGSYGFAY, SEQ ID NO:137)。

[0267] 在另一个优选实施方案中,包含抗-AFP MAb诸如IMMU31的治疗性缀合物可用于治疗肝细胞癌、生殖细胞肿瘤以及其它AFP产生性肿瘤(使用人源化、嵌合和人抗体形式),如美国专利第7,300,655号(其实施例部分通过引用并入)中公开的。IMMU31抗体是人源化抗体,其包含重链CDR序列CDR1 (SYVIH, SEQ ID NO:138)、CDR2 (YIHPYNGGTKYNEKFKG, SEQ ID NO:139) 和CDR3 (SGGGDPFAY, SEQ ID NO:140) 以及轻链CDR1 (KASQDINKYIG, SEQ ID NO:141)、CDR2 (YTSALLP, SEQ ID NO:142) 和CDR3 (LQYDDLWT, SEQ ID NO:143)。

[0268] 在另一个优选实施方案中,包含抗-HLA-DR MAb诸如hL243的治疗性缀合物可用于治疗淋巴瘤、白血病、皮肤癌、食道癌、胃癌、结肠癌、直肠癌、胰腺癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、膀胱癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、睾丸癌、肾癌、肝癌、黑素瘤或其它HLA-DR产生性肿瘤,如美国专利第7,612,180号(其实施例部分通过引用并入)中公开的。hL243抗体是人源化抗体,其包含重链CDR序列CDR1 (NYGMN, SEQ ID NO:144)、CDR2 (WINTYTREPTYADDFKG, SEQ ID NO:145) 和CDR3 (DITAVVPTGFDY, SEQ ID NO:146) 以及轻链CDR序列CDR1 (RASENIYSNLA, SEQ ID NO:147)、CDR2 (AASNLA, SEQ ID NO:148) 和CDR3 (QHFWTTPWA, SEQ ID NO:149)。

[0269] 在另一个优选实施方案中,包含抗-CD20 MAb诸如维妥珠单抗(hA20)、1F5、阿托珠单抗(GA101)或利妥昔单抗的治疗性缀合物可用于治疗淋巴瘤、白血病、免疫血小板减少性紫癜、系统性红斑狼疮、**Sjögren** 综合征、伊文思综合征、关节炎、动脉炎、寻常天疱疮、肾移植排斥、心脏移植排斥、类风湿关节炎、伯基特淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、小淋巴细胞淋巴瘤、弥漫性B细胞淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病、急性淋巴细胞性白血病、I型糖尿病、GVHD、多发性硬化或多发性骨髓瘤,如美国专利第7,435,803或8,287,864号(所述每一篇专利的实施例部分通过引用并入)中公开的。hA20(维妥珠单抗)抗体是人源化抗体,其包含轻链CDR序列CDRL1 (RASSSVSYIH, SEQ ID NO:150)、CDRL2 (ATSNLAS, SEQ ID NO:151) 和CDRL3 (QQWTSNPPT, SEQ ID NO:152) 以及重链CDR序列CDRH1 (SYNMH, SEQ ID NO:153)、CDRH2 (AIYPGNGDTSYNQKFKG, SEQ ID NO:154) 和CDRH3 (STYYGGDWYFDV, SEQ ID NO:155)。

[0270] 在另一个优选实施方案中,包含抗-CD19 MAb诸如hA19的治疗性缀合物可用于治疗B细胞相关淋巴瘤和白血病诸如非霍奇金淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病或急性淋巴细胞性白血病。可以治疗的其它疾病状态包括自身免疫性疾病,诸如急性或慢性免疫性血小板减少症、皮炎、西德纳姆舞蹈症、重症肌无力、系统性红斑狼疮、狼疮性肾炎、风湿热、多腺体综合症、大疱性类天疱疮、糖尿病、亨诺-许兰氏紫癜、链球菌感染后肾炎、结节性红斑、高安动脉炎、阿狄森氏病、类风湿关节炎、多发性硬化症、结节病、溃疡性结肠炎、多形性红

斑、IgA肾病、结节性多动脉炎、强直性脊柱炎、古德帕斯彻氏综合征、血栓闭塞性脉管炎、Sjögren综合征、原发性胆汁性肝硬化、桥本甲状腺炎、甲状腺毒症、硬皮病、慢性活动型肝炎、多肌炎/皮肌炎、多软骨炎、寻常天疱疮、韦格纳肉芽肿、膜性肾病、肌萎缩侧索硬化、脊髓痨、巨细胞动脉炎/多肌痛、恶性贫血、急进性肾小球肾炎、银屑病、纤维化肺泡炎，如美国专利第7,109,304、7,462,352、7,902,338、8,147,831和8,337,840号(所述每一篇专利的实施例部分通过引用并入)中公开的。hA19抗体是人源化抗体，其包含轻链CDR序列CDR1 KASQSVDDYDGDSYLN (SEQ ID NO:156)、CDR2 DASNLVS (SEQ ID NO:157) 和CDR3 QQSTEDPWT (SEQ ID NO:158) 以及重链CDR序列CDR1 SYWMN (SEQ ID NO:159)、CDR2 QIWPGDGDTNYNGKFKG (SEQ ID NO:160) 和CDR3 RETTTVGRYYYAMDY (SEQ ID NO:161)。

[0271] 包含抗-腱生蛋白抗体的治疗性缀合物可用于治疗造血组织肿瘤和实体瘤，包含针对腱生蛋白的抗体的缀合物可用于治疗实体瘤，优选地脑瘤如成胶质细胞瘤。

[0272] 优选地，用于治疗人疾病的抗体为抗体的人或人源化(CDR-移植)形式；尽管可使用抗体的鼠和嵌合形式。与递送剂相同种类的IgG分子最优选地使免疫应答降至最低。当考虑重复治疗时，这是特别重要的。对于人，人或人源化IgG抗体不太可能从患者产生抗-IgG免疫反应。抗体诸如hLL1和hLL2在结合于靶细胞上的内化抗原时迅速内化，这意味着被运载的化疗药物也被迅速地内化至细胞内。然而，具有较慢的内化速率抗体也可用于实现选择性治疗。

[0273] 治疗性缀合物可用于对抗病原体，因为针对病原体的抗体是已知的。例如，已在除其它以外，Hansen等，美国专利第3,927,193号Goldenberg美国专利第4,331,647、4,348,376、4,361,544、4,468,457、4,444,744、4,818,709和4,624,846号(所述每一篇专利的实施例部分通过引用并入本文)以及Reichert和Dewitz(上文中引用的)中公开了特异性结合由感染性病变产生的或与其相关的标志物的抗体和抗体片段，所述感染性病变包括病毒、细菌、真菌和寄生虫感染(例如由病原体诸如细菌、立克次氏体、支原体、原生动物、真菌和病毒以及与此类微生物相关的抗原和产物引起的)。在优选实施方案中，所述病原体选自由以下组成的组的HIV病毒、结核分枝杆菌、无乳链球菌、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、嗜肺军团菌、化脓性链球菌、大肠杆菌、淋病奈瑟球菌、脑膜炎奈瑟球菌、肺炎球菌、新型隐球菌、荚膜组织胞浆菌、乙型流感嗜血杆菌、梅毒螺旋体、莱姆病螺旋体、绿脓假单胞菌、麻风分枝杆菌、流产布鲁氏菌、狂犬病毒、流感病毒、巨细胞病毒、单纯疱疹病毒I、单纯疱疹病毒II、人血清细小样病毒、呼吸道合胞病毒、水痘带状疱疹病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、麻疹病毒、腺病毒、人T细胞白血病病毒、EB病毒、鼠白血病病毒、腮腺炎病毒、水疱性口炎病毒、辛德毕斯病毒、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒、疣病毒、蓝舌病毒、仙台病毒、猫白血病病毒、呼肠孤病毒、脊髓灰质炎病毒、猿猴病毒40、小鼠乳腺肿瘤病毒、登革热病毒、风疹病毒、西尼罗河病毒、恶性疟原虫、间日疟原虫、刚地弓形虫、让氏锥虫、克氏锥虫、罗德西亚锥虫、布氏锥虫、曼森氏血吸虫、日本血吸虫、牛巴贝斯虫、柔嫩艾美球虫、盘尾丝虫、热带利什曼原虫、旋毛形线虫、小泰勒虫、水泡绦虫、羊绦虫、牛肉绦虫、细粒棘球绦虫、科氏中殖孔绦虫、关节炎支原体、猪鼻支原体、口腔支原体、精氨酸支原体、莱氏无胆甾原体、唾液支原体和肺炎支原体，如美国专利第6,440,416号(其实施例部分通过引用并入本文)中公开的。

[0274] 包含抗-gp120和其它此类抗-HIV抗体的本发明的药物缀合物可在AIDS患者中用作HIV的治疗剂；并且针对结核分枝杆菌的抗体的药物缀合物适合用作治疗药物难治性结

核病的治疗剂。已检查了抗-gp120 MAbs (抗HIV MAbs) 与毒素 (诸如假单胞菌外毒素) 的融合蛋白的抗病毒性质 (Van Oigen等, J Drug Target, 5:75-91, 1998)。在治疗AIDS患者的HIV感染上的尝试失败, 可能归因于药效不足或不可接受的宿主毒性。本发明的药物缀合物有利地不存在蛋白质毒素的毒性副作用, 从而有利地用于治疗AIDS患者的HIV感染。可单独施予这些药物缀合物, 或可将其与当单独施予时在此类患者中是有效的其它抗生素或治疗剂组合施予。候选抗-HIV抗体包括由Johansson等 (AIDS. 2006年10月3日; 20 (15) :1911-5) 描述的P4/D10抗-包膜抗体, 以及由Polymun (Vienna, Austria) 描述和销售的, 也在美国专利5,831,034、美国专利5,911,989以及Vcelar等, AIDS 2007; 21 (16) :2161-2170和Joos等, Antimicrob. Agents Chemother. 2006; 50 (5) :1773-9 (所述专利和文献全部通过引用并入本文) 中描述的抗-HIV抗体。用于HIV的优选靶向剂为这些抗体的各种组合以克服抗性。

[0275] 可通过使用多价多特异性或多价单特异性抗体来实现至细胞和病原体内的更有效掺入。此类双价和双特异性抗体见于美国专利第7,387,772、7,300,655、7,238,785和7,282,567 (所述专利的每一篇的实施例部分通过引用并入本文) 中。这些多价或多特异性抗体在癌症和感染性生物体 (病原体) 的靶向中是特别优选的, 所述癌症和感染性生物体表达多种抗原靶和甚至同一抗原靶的多个表位, 但其往往因细胞或病原体上的单一抗原靶的不充足的表达或可用性而逃避免疫治疗所需的抗体靶向和充分结合。通过靶向多种抗原或表位, 所述抗体显示在靶上的较高结合和停留时间, 从而为在本发明中被靶向的药物提供较高的饱和度。

[0276] 所述治疗性缀合物也可用于治疗自身免疫性疾病或免疫系统功能障碍 (例如, 移植抗宿主病、器官移植排斥)。用于治疗自身免疫/免疫功能障碍的抗体结合示例性抗原, 所述抗原包括, 但不限于, BCL-1、BCL-2、BCL-6、CD1a、CD2、CD3、CD4、CD5、CD7、CD8、CD10、CD11b、CD11c、CD13、CD14、CD15、CD16、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD33、CD34、CD38、CD40、CD40L、CD41a、CD43、CD45、CD55、CD56、CD57、CD59、CD64、CD71、CD74、CD79a、CD79b、CD117、CD138、FMC-7、H2B、H3、H4、HLA-DR和MIF。如上所述的结合这些和其它靶抗原的抗原可用于治疗自身免疫性疾病或免疫系统功能障碍疾病。可用免疫缀合物治疗的自身免疫性疾病可包括急性免疫性血小板减少症、慢性免疫血小板减少症、皮炎、西德纳姆舞蹈症、重症肌无力、系统性红斑狼疮、狼疮性肾炎、风湿热、多腺体综合症、大疱性类天疱疮、糖尿病、亨诺-许兰氏紫癜、链球菌感染后肾炎、结节性红斑、高安动脉炎、ANCA相关血管炎、阿狄森氏病、类风湿关节炎、多发性硬化症、结节病、溃疡性结肠炎、多形性红斑、IgA肾病、结节性多动脉炎、强直性脊柱炎、古德帕斯彻氏综合征、血栓闭塞性脉管炎、Sjogren综合征、原发性胆汁性肝硬化、桥本甲状腺炎、甲状腺毒症、硬皮病、慢性活动型肝炎、多肌炎/皮炎、多软骨炎、大疱性类天疱疮、韦格纳肉芽肿、膜性肾病、肌萎缩侧索硬化、脊髓痨、巨细胞动脉炎/多肌痛、恶性贫血、急进性肾小球肾炎、银屑病或纤维化肺泡炎。

[0277] 本领域普通技术人员将了解, 可单独使用包含缀合于抗体或抗体片段的喜树碱的主题免疫缀合物, 或将其与一种或多种其它治疗剂诸如第二抗体、第二抗体片段、第二免疫缀合物、放射性核素、毒素、药物、化疗剂、放射治疗、趋化因子、细胞因子、免疫调节剂、酶、激素、寡核苷酸、RNAi或siRNA组合使用。可单独施用此类附加的治疗剂, 将其与其它主题抗体-药物免疫缀合物组合施用, 或将其附接于所述其它主题抗体-药物免疫缀合物。

[0278] 在某些实施方案中, 与本发明的喜树碱缀合物组合使用的治疗剂可包含一种或多

种同位素。用于治疗患病组织的放射性同位素包括,但不限于 ^{111}In 、 ^{177}Lu 、 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 、 ^{211}At 、 ^{62}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{90}Y 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{47}Sc 、 ^{111}Ag 、 ^{67}Ga 、 ^{142}Pr 、 ^{153}Sm 、 ^{161}Tb 、 ^{166}Dy 、 ^{166}Ho 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{189}Re 、 ^{212}Pb 、 ^{223}Ra 、 ^{225}Ac 、 ^{59}Fe 、 ^{75}Se 、 ^{77}As 、 ^{89}Sr 、 ^{99}Mo 、 ^{105}Rh 、 ^{109}Pd 、 ^{143}Pr 、 ^{149}Pm 、 ^{169}Er 、 ^{194}Ir 、 ^{198}Au 、 ^{199}Au 、 ^{227}Th 和 ^{211}Pb 。治疗性放射性核素优选具有在20至6,000keV的范围内,优选在60至200keV的范围内(对于俄歇发射体)、在100-2,500keV的的范围内(对于 β 发射体)和在4,000-6,000keV的范围内(对于 α 发射体)的衰变能量。有用的 β -粒子-发射核素的最大衰变能优选为20-5,000keV,更优选100-4,000keV,和最优选500-2,500keV。还优选的是基本上通过辐射俄歇发射粒子进行衰变的放射性核素。例如,Co-58、Ga-67、Br-80m、Tc-99m、Rh-103m、Pt-109、In-111、Sb-119、I-125、Ho-161、Os-189m和Ir-192。有用的 β -粒子-发射核素的衰变能优选 $<1,000\text{keV}$,更优选 $<100\text{keV}$,最优选 $<70\text{keV}$ 。还优选的是基本上通过 α -粒子的产生进行衰变的放射性核素。此类放射性核素包括,但不限于:Dy-152、At-211、Bi-212、Ra-223、Rn-219、Po-215、Bi-211、Ac-225、Fr-221、At-217、Bi-213、Th-227和Fm-255。有用的 α 粒子发射放射性核素的衰变能优选为2,000-10,000keV,更优选3,000-8,000keV,和最优选4,000-7,000keV。所用的另外的潜在放射性同位素包括 ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{75}Br 、 ^{198}Au 、 ^{224}Ac 、 ^{126}I 、 ^{133}I 、 ^{77}Br 、 $^{113\text{m}}\text{In}$ 、 ^{95}Ru 、 ^{97}Ru 、 ^{103}Ru 、 ^{105}Ru 、 ^{107}Hg 、 ^{203}Hg 、 $^{121\text{m}}\text{Te}$ 、 $^{122\text{m}}\text{Te}$ 、 $^{125\text{m}}\text{Te}$ 、 ^{165}Tm 、 ^{167}Tm 、 ^{168}Tm 、 ^{197}Pt 、 ^{109}Pd 、 ^{105}Rh 、 ^{142}Pr 、 ^{143}Pr 、 ^{161}Tb 、 ^{166}Ho 、 ^{199}Au 、 ^{57}Co 、 ^{58}Co 、 ^{51}Cr 、 ^{59}Fe 、 ^{75}Se 、 ^{201}Tl 、 ^{225}Ac 、 ^{76}Br 、 ^{169}Yb 等。

[0279] 可以例如使用附接于抗体或缀合物的螯合基团递送放射性核素和其它金属。大环螯合剂诸如NOTA、DOTA和TETA,可用于多种金属和射电金属,特别是分别用于镓、钷和铜放射性核素。通过根据目标金属调节环的大小,可使此类金属-螯合剂复合物非常稳定。可使用其它环类型的螯合剂,诸如用于络合 ^{223}Ra 的大环聚酯。

[0280] 与本文中描述的喜树碱缀合物组合使用的治疗剂还包括,例如,化疗药物诸如长春花生物碱、蒽环类,鬼臼毒素类、紫杉烷类、抗代谢物、酪氨酸激酶抑制剂、烷化剂、抗生素、Cox-2抑制剂、抗有丝分裂剂、抗血管生成剂和促凋亡剂,特别是多柔比星、甲氨蝶呤、紫杉酚、其它喜树碱以及来自这些和其它种类的抗癌剂的其它抗癌剂等。其它癌症化疗药物包括氮芥、烷基磺酸盐、亚硝基脲、三氮烯、叶酸类似物、嘧啶类似物、嘌呤类似物、铂配位络合物、激素等。在REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES,第19版(Mack Publishing Co.1995)和GOODMAN AND GILMAN'S THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS,第7版(MacMillan Publishing Co.1985)以及这些出版物的修订版中描述了合适的化学治疗剂。其它合适的化疗剂,诸如实验性药物,对于本领域技术人员来说是已知的。

[0281] 示例性的使用的药物包括,但不限于,5-氟尿嘧啶、阿法替尼、aplidin、阿扎立平、阿那曲唑、蒽环霉素、阿西替尼、AVL-101、AVL-291、苯达莫司汀、博来霉素、硼替佐米、波舒替尼、苔藓抑素-1、白消安、刺孢霉素、喜树碱、卡铂、10-羟基喜树碱、卡莫司汀、西乐葆、苯丁酸氮芥、顺铂(CDDP)、Cox-2抑制剂、伊立替康(CPT-11)、SN-38、卡铂、克拉屈滨、喜树碱、环磷酰胺、克唑替尼、阿糖胞苷、达卡巴嗪、达沙替尼、dinaciclib、多西他赛、放线菌素D、柔红霉素、多柔比星、2-吡咯啉并多柔比星(2P-DOX)、氰基吗啉代多柔比星、多柔比星葡萄糖苷酸、表柔比星葡萄糖醛酸苷、埃罗替尼、雌莫司汀、替尼泊苷、厄洛替尼、恩替司他、雌激素受体结合剂、依托泊苷(VP16)、依托泊苷葡萄糖苷酸、磷酸依托泊苷、依西美坦、芬戈莫德、黄酮类抗肿瘤药、氟尿苷(FuR)、3',5'-O-二油酰-氟尿苷(FuR-dO)、氟达拉滨、氟他胺、法尼基

蛋白转移酶抑制剂、福他替尼、ganetespib、GDC-0834、GS-1101、吉非替尼、吉西他滨、羟基脲、依鲁替尼、伊达比星、艾德利布、异环磷酰胺、伊马替尼、L-门冬酰胺酶、拉帕替尼、来那度胺、甲酰四氢叶酸、LFM-A13、洛莫司汀、氮芥、美法仑、巯嘌呤、6-巯基嘌呤、甲氨蝶呤、米托蒽醌、光辉霉素、丝裂霉素、米托坦、诺维本、来那替尼、尼洛替尼、亚硝基脲、奥拉帕利、普卡霉素、甲基苄肼、紫杉醇、PCI-32765、喷司他丁、PSI-341、雷洛昔芬、司莫司汀、索拉非尼、链脲菌素、SU11248、舒尼替尼、他莫昔芬、替莫唑胺(DTIC的含水形式)、反铂、沙利度胺、硫鸟嘌呤、塞替派、替尼泊苷、托泊替康、尿嘧啶氮芥、瓦他拉尼、长春瑞滨、长春碱、长春新碱、长春花生物碱和ZD1839。此类试剂可以为本文所述的缀合物的部分或可选择地可将其与所述缀合物组合,在所述缀合物之前,与所述缀合物同时或在所述缀合物之后施用。或者,可将一种或多种如本领域中已知的治疗性裸抗体与所需缀合物组合使用。示例性治疗性裸抗体是如上所述的。

[0282] 可与喜树碱缀合物协同使用的治疗剂还可包含缀合于靶向部分的毒素。可用于这方面的毒素包括蓖麻毒蛋白、相思豆毒蛋白、核糖核酸酶(RNA酶)、DNA酶I、葡萄球菌肠毒素-A、美洲商陆抗病毒蛋白、白树毒素、白喉毒素、假单胞菌外毒素和假单胞菌内毒素。(参见,例如,Pastan.等,Cell(1986),47:641,以及Sharkey和Goldenberg,CA Cancer J Clin.2006年7月-8月;56(4):226-43)。本文中使用的其它毒性对于本领域技术人员来说是已知的并且公开于U.S.6,077,499中。

[0283] 另一类治疗剂可包含一种或多种免疫调节剂。使用的免疫调节剂可选自细胞因子、干细胞生长因子、淋巴毒素、造血因子、集落刺激因子(CSF)、干扰素(IFN)、红细胞生成素、血小板生成素及其组合。特别有用的是淋巴毒素例如肿瘤坏死因子(TNF)、造血因子例如白细胞介素(IL)、集落刺激因子例如粒细胞-集落刺激因子(G-CSF)或粒细胞巨噬细胞-集落刺激因子(GM-CSF)、干扰素例如干扰素- α 、 β 、 γ 或 λ 以及干细胞生长因子例如命名为“S1因子”的干细胞生长因子。细胞因子中包括生长激素,例如人生长激素、N-甲硫氨酰人生长激素和牛生长激素;甲状旁腺激素;甲状腺素;胰岛素;胰岛素原;松弛素;松弛素原;糖蛋白激素例如卵泡刺激素(FSH)、甲状腺刺激素(TSH)和黄体生成素(LH);肝细胞生长因子;前列腺素、成纤维生长因子;催乳素;胎盘催乳素、OB蛋白;肿瘤坏死因子- α 和- β ;苗勒抑制物质(mullerian-inhibiting substance);鼠促性腺激素相关肽;抑制素;激活素;血管内皮生长因子;整联蛋白;血小板生成素(TPO);神经生长因子例如NGF- β ;血小板生长因子;转化生长因子(TGF)例如TGF- α 和TGF- β ;胰岛素样生长因子-I和-II;红细胞生成素(EPO);骨诱导因子;干扰素例如干扰素- α 、 β 、 γ 和 λ ;集落刺激因子(CSF)例如巨噬细胞-CSF(M-CSF);白细胞介素(IL)例如IL-1、IL-1 α 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-21、IL-25、LIF、kit-配体或FLT-3、血管生长抑素、血小板反应蛋白、内皮抑制素、肿瘤坏死因子和淋巴毒素(LT)。如本文所用的,术语细胞因子包括来自天然来源或重组细胞培养物的蛋白质和具有天然序列细胞因子的生物活性等效形式。

[0284] 使用的趋化因子包括RANTES、MCAF、MIP1- α 、MIP1- β 和IP-10。

[0285] 制剂和施用

[0286] 所述缀合物的合适的施用途径包括,但不限于,口服、肠胃外、直肠、经粘膜、肠施用、髓内、鞘内、直接心室内、静脉内或腹腔内注射。优选施用途径是肠胃外。或者,可以以局

部而非全身性方式,例如通过将化合物直接注射进入实体瘤来施用所述化合物。

[0287] 可按照已知的方法配制免疫缀合物以制备药学上有用的组合物,其中将免疫缀合物与药学上合适的赋形剂在混合物中组合。无菌磷酸盐缓冲盐水是药学上合适的赋形剂的一个实例。其它合适的赋形剂对于本领域技术人员来说是公知的。参见,例如,Ansel等, PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS,第5版(Lea&Febiger 1990)和Gennaro (编辑), REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES,第18版(Mack Publishing Company 1990)及其修订版本。

[0288] 在优选实施方案中,使用选自以下组成的组的缓冲液在Good氏生物缓冲液(pH 6-7)中配制免疫缀合物:N-(2-乙酰氨基)-2-氨基乙磺酸(ACES);N-(2-乙酰胺基)亚氨基二乙酸(ADA);N,N-双(2-羟乙基)-2-氨基乙磺酸(BES);4-(2-羟乙基)哌嗪-1-乙磺酸(HEPES);2-(N-吗啉代)乙磺酸(MES);3-(N-吗啉代)丙磺酸(MOPS);3-(N-吗啉基)-2-羟基丙磺酸(MOPSO)和哌嗪-N,N'-双(2-乙磺酸)[Pipes]。更优选的缓冲液为MES或MOPS,优选在20至100mM的浓度范围内,更优选约25mM。最优选的是25mM MES,pH 6.5。所述制剂还可包含25mM海藻糖和0.01%v/v的聚山梨醇酯80作为赋形剂,作为添加赋形剂的结果,最终的缓冲液浓度被修改至22.25mM。优选的贮存方法是如在-20℃至2℃的温度范围内贮存(最优选在2℃至8℃贮存)的缀合物的冻干制剂。

[0289] 可将所述免疫缀合物配制用于静脉内施用,通过例如推注注射、缓慢输注或连续输注。优选在短于约4小时的时期内,更优选短于约3小时的时期内输注本发明的抗体。例如,可在30分钟内,优选甚至15分钟内输注前25-50mg,在随后的2-3小时内输注剩余部分。注射用制剂可以单位剂量形式,例如在安瓿中或者在多剂量容器中提供并且添加防腐剂。组合物可采用例如在油性或水性媒介物中的悬浮液、溶液或乳液的形式,并且可含有配制剂例如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。或者,活性成分可呈粉剂形式,用于在使用前用适当的媒介物(例如无菌无热原水)复原。

[0290] 可将其它制药方法用于控制治疗性缀合物的作用持续时间。控释制剂可通过使用聚合物复合或者吸附免疫缀合物来制备。例如,生物相容性聚合物包括乙烯-醋酸乙烯酯共聚物基质和硬脂酸二聚体和癸二酸的聚酸酐共聚物基质。例如,Sherwood等,Bio/Technology 10:1446(1992)。免疫缀合物从此基质上释放的速率取决于该免疫缀合物的分子量、基质内的免疫缀合物的量和分散粒子的尺寸。Saltzman等,Biophys.J.55:163(1989);Sherwood等,同上。其它固体剂型描述于Ansel等,PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS,第5版(Lea&Febiger 1990)和Gennaro (编辑), REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES,第18版(Mack Publishing Company 1990)及其修订版本中。

[0291] 通常,用于人的免疫缀合物的施用剂量取决于诸如患者年龄、体重、身高、性别、一般医疗条件和既往医疗史等因素而变化。可能需要向接受者提供约1mg/kg至24mg/kg范围内的免疫缀合物的剂量作为单次静脉内输注,但是也可根据情况需要施用更低或更高的剂量。对于70kg患者按1-20mg/kg施用的剂量例如为70-1,400mg,或对于1.7-m的患者,剂量为41-824mg/m²。根据需要可重复剂量,例如,每周1次,进行4-10周,每周1次进行8周,或每周1次,进行4周。其还可以以较少频率,诸如每隔一周一次(进行数月),或每月一次或每季一次(进行许多个月)提供,如在维持治疗中所需要的。优选剂量可包括,但不限于1mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、4mg/kg、5mg/kg、6mg/kg、7mg/kg、8mg/kg、9mg/kg、10mg/kg、11mg/kg、12mg/kg、

13mg/kg、14mg/kg、15mg/kg、16mg/kg、17mg/kg、18mg/kg、19mg/kg、20mg/kg、22mg/kg和24mg/kg。可使用在1至24mg/kg的范围内的任意量。优选每周多次、一次或二次施用剂量。可使用4周,更优选8周,更优选16周或更长时间的最小剂量方案。施用的方案可包括按选自由以下组成的组的周期每周一次或两次的施用:(i)每周;(ii)每隔一周;(iii)一周的治疗,随后休息2、3或4周;(iv)2周的治疗,随后休息1、2、3或4周;(v)3周的治疗,随后休息1、2、3、4或5周;(vi)4周的治疗,随后休息1、2、3、4或5周;(vii)5周的治疗,随后休息1、2、3、4或5周;和(viii)每月。重复所述周期4、6、8、10、12、16或20次或更多次。

[0292] 或者,可以每2或3周作为一个剂量施用免疫缀合物,重复总共至少3个剂量。或者,每周两次,进行4-6周。如果将剂量减少至约200-300mg/m²(每个剂量340mg(对于1.7-m的患者)或4.9mg/kg(对于70kg的患者)),可每周施用一次或甚至二次,进行4至10周。或者,可减少疗程剂量,即每2或3周一次,进行2-3个月。然而,已确定可以通过缓慢的静脉内每周一次或每2-3周一次输注施用甚至更高的剂量(诸如12mg/kg),进行重复的给药循环。可以任选地以其它间隔重复给药方案,并且可通过不同胃肠外途径(对剂量和治疗方案进行适当的调整)提供剂量。

[0293] 在优选实施方案中,免疫缀合物用于癌症的治疗。癌症的实例包括但不限于癌、淋巴瘤、成胶质细胞瘤、黑素瘤、肉瘤以及白血病、骨髓瘤或淋巴样恶性肿瘤。下文中指出此类癌症的更具体的实例,包括:鳞状细胞癌(例如,上皮鳞状细胞癌)、尤因肉瘤、维尔姆斯瘤、星形细胞瘤、肺癌(包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺的腺癌和肺的鳞状癌)、腹膜癌、胃肠癌或胃癌(包括胃肠道癌)、胰腺癌、多形性成胶质细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝细胞瘤、肝细胞癌、神经内分泌瘤、甲状腺髓样癌(medullary thyroid cancer)、分化的甲状腺癌、乳腺癌、卵巢癌、结肠癌、直肠癌、子宫内膜癌症或子宫癌、唾液腺癌、肾癌或肾癌(renal cancer)、前列腺癌、外阴癌、肛门癌、阴茎癌以及头颈癌。术语“癌症”包括原发性恶性细胞或肿瘤(例如,其细胞还未迁移至除了原始恶性肿瘤或肿瘤的位置外的受试者的身体的位置的恶性细胞或肿瘤)和继发性恶性细胞或肿瘤(例如,通过恶性细胞或肿瘤细胞至与原始肿瘤的位置不同的继发性位置的转移、迁移产生的恶性细胞或肿瘤)。

[0294] 癌症或恶性肿瘤的其它实例包括但不限于:儿童急性淋巴细胞白血病、急性淋巴细胞性白血病、急性淋巴细胞性白血病(Acute Lymphocytic Leukemia)、急性髓样白血病、肾上腺皮质癌、成人(原发性)肝细胞癌、成人(原发性)肝癌、成人急性淋巴细胞性白血病、成人急性髓样白血病、成人非霍奇金淋巴瘤、成人淋巴细胞白血病、成人非霍奇金淋巴瘤、成人原发性肝癌、成人软组织肉瘤、AIDS-相关淋巴瘤、AIDS-相关恶性肿瘤、直肠癌、星形细胞瘤、胆管癌、膀胱癌、骨癌、脑干神经胶质瘤、脑瘤、乳腺癌、肾盂和输尿管的癌症、中枢神经系统(原发性)淋巴瘤、中枢神经系统淋巴瘤、小脑星形细胞瘤(Cerebellar Astrocytoma)、脑星形细胞瘤(Cerebral Astrocytoma)、宫颈癌、儿童(原发性)肝细胞癌、儿童(原发性)肝癌、儿童急性淋巴母细胞白血病(Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia)、儿童急性髓样白血病、儿童脑干神经胶质瘤、儿童小脑星形细胞瘤(Childhood Cerebellar Astrocytoma)、儿童小脑星形细胞瘤、儿童颅外生殖细胞肿瘤(Childhood Extracranial Germ Cell Tumors)、儿童非霍奇金病(Childhood Hodgkin's Disease)、儿童非霍奇金淋巴瘤、儿童下丘脑和视通路神经胶质瘤、儿童淋巴细胞白血病(Childhood Lymphoblastic Leukemia)、儿童髓母细胞瘤(Childhood Medulloblastoma)、儿童非霍奇

金淋巴瘤、儿童松果体和幕上原始神经外胚瘤、儿童原发性肝癌、儿童横纹肌肉瘤、儿童软组织肉瘤、儿童视通路和下丘脑神经胶质瘤、慢性淋巴细胞白血病、慢性髓细胞性白血病、结肠癌、皮肤T细胞淋巴瘤、内分泌胰岛细胞癌、子宫内膜癌、室管膜瘤、上皮癌、食管癌、尤因肉瘤和相关肿瘤、外分泌胰腺癌、颅外胚细胞瘤 (Extracranial Germ Cell Tumor)、性腺外生殖细胞瘤 (Extragenital Germ Cell Tumor)、肝外胆管癌、眼癌、雌性乳腺癌、高歇氏病 (Gaucher's Disease)、胆囊癌、胃癌、胃肠道类癌 (Gastrointestinal Carcinoid Tumor)、胃肠瘤 (Gastrointestinal Tumors)、生殖细胞瘤、妊娠滋养细胞肿瘤、多毛细胞白血病、头颈癌、肝细胞癌、非霍奇金淋巴瘤、高丙种球蛋白血症 (Hypergammaglobulinemia)、下咽癌、肠癌、眼内黑素瘤、胰岛细胞癌、胰岛细胞胰腺癌、卡波西氏肉瘤、肾癌、喉癌、唇和口腔癌、肝癌、肺癌、淋巴组织增殖性疾病 (Lymphoproliferative Disorders)、巨球蛋白血症、雄性乳腺癌、恶性间皮瘤 (Malignant Mesothelioma)、恶性胸腺瘤、髓母细胞瘤、黑素瘤、间皮瘤、转移性原发性鳞状颈癌 (Metastatic Occult Primary Squamous Neck Cancer)、转移性原发性鳞状颈癌 (Metastatic Primary Squamous Neck Cancer)、转移性鳞状颈癌 (Metastatic Squamous Neck Cancer)、多发性骨髓瘤、多发性骨髓瘤/浆细胞肿瘤、骨髓增生异常综合征、髓细胞性白血病 (Myelogenous Leukemia)、髓样白血病 (Myeloid Leukemia)、骨髓增生性疾病、鼻腔和鼻窦癌 (Nasal Cavity and Paranasal Sinus Cancer)、鼻咽癌、神经母细胞瘤、非霍奇金淋巴瘤、非黑素瘤皮肤癌、非小细胞肺癌、隐匿性原发性转移性鳞状颈癌 (Occult Primary Metastatic Squamous Neck Cancer)、口咽癌、骨肉瘤/恶性纤维肉瘤、骨肉瘤/恶性纤维组织细胞瘤、骨肉瘤/骨恶性纤维组织细胞瘤、卵巢上皮性癌、卵巢生殖细胞肿瘤、卵巢低度恶性潜能肿瘤 (Ovarian Low Malignant Potential Tumor)、胰腺癌、副蛋白血症 (Paraproteinemias)、真性红细胞增多症、甲状旁腺癌、阴茎癌、嗜铬细胞瘤、垂体瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤 (Primary Central Nervous System Lymphoma)、原发性肝癌、前列腺癌、直肠癌、肾细胞癌、肾盂和输尿管癌 (Renal Pelvis and Ureter Cancer)、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、涎腺癌、肉状瘤病肉瘤、赛扎里氏综合征 (Sezary Syndrome)、皮肤癌、小细胞肺癌、小肠癌、软组织肉瘤、鳞状颈癌 (Squamous Neck Cancer)、胃癌、幕上原始神经外胚层和松果体瘤、T细胞淋巴瘤、睾丸癌、胸腺瘤、甲状腺癌、肾盂和输尿管移行细胞癌 (Transitional Cell Cancer of the Renal Pelvis and Ureter)、肾盂和输尿管移行细胞癌 (Transitional Renal Pelvis and Ureter Cancer)、滋养细胞肿瘤 (Trophoblastic Tumors)、输尿管和肾盂细胞癌 (Ureter and Renal Pelvis Cell Cancer)、尿道癌、子宫癌、子宫肉瘤、阴道癌、视通路和下丘脑神经胶质瘤、外阴癌、沃尔登斯特伦巨球蛋白血症、肾母细胞瘤和任何其它过度增殖性疾病，除瘤形成外，都位于上面所列的器官系统中。

[0295] 本文中描述的和要求保护的方法和组合物可用于治疗恶性或恶变前状态以及用于阻止至瘤形成状态 (neoplastic state) 或恶性状态 (包括但不限于上述的那些病症) 的进展。此类用途适用于已知或疑似进展至瘤形成或癌症，特别是其中由超常增生、化生 (metaplasia) 或最特别地发育不良组成的非瘤形成细胞生长已发生的疾病 (关于此类异常生长条件的综述，参见Robbins和Angell, Basic Pathology, 第2版, WB.Saunders Co., Philadelphia, 第68-79页 (1976))。

[0296] 发育不良通常是癌症的先兆，并且主要见于上皮中。其为非瘤形成细胞生长的最

紊乱形式,包括个体细胞一致性和细胞的构造取向 (architectural orientation) 的丧失。当存在慢性刺激或炎症时,发育不良特征性地发生。可治疗的发育不良病症包括但不限于:无汗性外胚层发育不良、异侧发育异常、窒息性胸廓发育不良、心房-手指发育不良、支气管肺发育不良、脑发育不良、宫颈发育不良、软骨外胚层发育异常、锁骨颅骨发育异常、先天性外胚叶发育不良、颅骨骨干发育异常、颅腕跖骨发育不良、颅骨干骺端发育不良、牙质发育不良、骨干发育异常、外胚层发育不良、釉质发育不良、脑性眼球发育不良、偏侧骨骺发育不良、多发性骨骺发育不良、点状骨骺发育不良、上皮发育不良、面-指(趾)-生殖器发育不良、家族性颌骨纤维性发育异常、家族性白色皱襞发育异常、肌纤维发育不良、骨纤维异常增殖症、旺盛骨性发育不良、遗传性肾脏-视网膜发育不良、出汗性外胚层发育不良、少汗性外胚层发育不良、淋巴细胞减少性胸腺发育不良、乳房发育不良、下颌面发育不良、干骨后端发育不良、蒙底尼发育异常、单骨纤维性发育不良、粘膜上皮发育不良、多发性骨骺发育不良、眼-耳-脊椎综合征、眼-牙-指(趾)发育不良、眼椎骨发育不良、牙体发育异常、眼-下颚发育异常 (ophthalmomandibulomelic dysplasia)、根尖周牙骨质结构不良、多骨纤维发育不良、假性软骨发育不良性脊椎骨骺发育不良、视网膜发育不良、隔-视神经发育不良、脊椎骨骺发育不良和室径向发育异常 (ventriculoradial dysplasia)。

[0297] 可治疗的其它肿瘤前病症包括但不限于,良性过度增生性病症(例如,良性肿瘤、纤维囊性状态、组织肥大、肠息肉或腺瘤以及食道发育不良)、白斑、角化病、鲍温病、慢性光化性皮炎 (Farmer's Skin)、日光性唇炎和日光性角化病。

[0298] 在优选的实施方案中,本发明的方法用于抑制癌症,特别是上文列出的那些癌症的生长、进展和/或转移。

[0299] 其它过度增生性疾病、病症和/或病况包括,但不限于,如下恶性肿瘤相关病症的进展和/或转移:诸如白血病(包括急性白血病;例如,急性淋巴细胞性白血病、急性髓细胞性白血病[包括成髓细胞性白血病、前髓细胞性白血病、骨髓单核细胞性白血病、单核细胞性白血病和红白血病)和慢性白血病(例如,慢性髓细胞性[粒细胞性]白血病和慢性淋巴细胞性白血病)、真性红细胞增多症、淋巴瘤(例如,霍奇金病和非霍奇金病)、多发性骨髓瘤、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、重链病,和实体肿瘤,包括但不限于肉瘤和癌,诸如纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、骨源性肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤因氏瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝细胞癌、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎性癌、肾母细胞瘤、宫颈癌、睾丸肿瘤、肺癌、小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神经胶质瘤、星形细胞瘤、髓母细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、血管母细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质瘤、脑膜瘤、恶性黑素瘤、神经母细胞瘤和视网膜母细胞瘤。

[0300] 可用免疫缀合物治疗的自身免疫性疾病可包括急性或慢性免疫性血小板减少症、皮炎、西德纳姆舞蹈症、重症肌无力、系统性红斑狼疮、狼疮性肾炎、风湿热、多腺体综合征、大疱性类天疱疮、糖尿病、亨诺-许兰氏紫癜、链球菌感染后肾炎、结节性红斑、高安动脉炎、ANCA相关性血管炎、阿狄森氏病、类风湿关节炎、多发性硬化症、结节病、溃疡性结肠炎、多形性红斑、IgA肾病、结节性多动脉炎、强直性脊柱炎、古德帕斯彻氏综合征、血栓闭塞性脉管炎、Sjögren综合征、原发性胆汁性肝硬化、桥本甲状腺炎、甲状腺毒症、硬皮病、慢性

活动型肝炎、多肌炎/皮肌炎、多软骨炎、大疱性类天疱疮、寻常天疱疮、韦格纳肉芽肿、膜性肾病、肌萎缩侧索硬化、脊髓痨、巨细胞动脉炎/多肌痛、恶性贫血、急进性肾小球肾炎、银屑病或纤维化肺泡炎。

[0301] 试剂盒

[0302] 各种实施方案可涉及包含适合于在患者中治疗患病组织的组分的试剂盒。示例性试剂盒可含有至少一种缀合抗体或如本文所述的其它靶向部分。如果未配制用于经由消化道递送,诸如通过口服递送的用于施用的含有组分的组合物,则可包括能够通过一些其它途径递送试剂盒组分的装置。用于施用诸如肠胃外递送的一种类型的设备是用于将组合物注射入受试者的身体的注射器。还可使用吸入装置。

[0303] 可将试剂盒组分包装在一起或分离成两个或更多个容器。在一些实施方案中,容器可以是装有适合用于重构的组合物的无菌冻干制剂的小瓶。试剂盒还可含有一种或多种适于其他试剂的重构和/或稀释的缓冲液。可使用的其它容器包括,但不限于,小袋、托盘、盒、管等。可包装试剂盒组分并将其在容器内无菌维持。可包括的另一种组分是给使用试剂盒的人用于其用途的说明书。

[0304] 实施例

[0305] 通过下列实施例举例说明本发明的各种实施方案,而不限制其范围。

[0306] 概况

[0307] 下文所使用的缩写为:DCC,二环己基碳二亚胺;NHS,N-羟基琥珀酰亚胺,DMAP,4-二甲氨基吡啶;EEDQ,2-乙氧基-1-乙氧羰基-1,2-二氢喹啉;MMT,单甲氧基三苯甲基;PABOH,对-氨基苄醇;PEG,聚乙二醇;SMCC,琥珀酰亚胺基4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯;TBAF,氟化四丁基铵;TBDMS,叔-丁基二甲基氯硅烷。

[0308] 按照Moon等(J.Medicinal Chem.51:6916-6926,2008)(其通过引用并入本文)中描述的方法,使用三光气和DMAP制备以下实施例中的羟基化合物的氯甲酸酯。萃取处理是指用氯仿、二氯甲烷或乙酸乙酯萃取,和任选地用饱和碳酸氢盐、水,和用饱和氯化钠洗涤。除非另有说明,否则急骤层析使用230-400目硅胶和甲醇-二氯甲烷梯度(使用高达15%v/v甲醇-二氯甲烷)来进行。通过方法A或通过方法B进行反相HPLC,方法A:使用配有柱前过滤器的7.8×300mm C18 HPLC柱,以每分钟3mL的流速在10分钟内使用100%溶液A至100%溶剂B的溶剂梯度和以每分钟4.5mL的流速维持100%溶液B(进行5或10分钟);方法B:使用配有柱前过滤器的4.6×30mm Xbridge C18,2.5μm柱,以每分钟1.5mL的流速使用100%溶液A至100%溶剂B的溶剂梯度(进行4分钟)和以每分钟2mL的流速使用100%的溶液B(进行1分钟)。溶剂A为0.3%含水乙酸铵,pH 4.46,而溶剂B为9:1 乙腈-含水乙酸铵(0.3%),pH 4.46。通过设置在360nm和254nm的双列直插式吸收检测器监控HPLC。

[0309] 实施例1:CL2A-SN-38的制备

[0310] 用于合成CL2A-SN-38的优选反应方案示于图1中,包括用于进行大规模生产的改进方法的以下步骤。

[0311] 0-(2-叠氮乙基)-O'-[(N-二羟乙酰基-2-氨乙基)-Lys(MMT)-PABOH]七甘醇(中间体3,图1)的制备:在500-mL单颈烧瓶中,添加商购可得的Fmoc-Lys(MMT)-OH(16g)、对-氨基苄醇(3.26g)和EEDQ(6.52g),随后添加无水二氯甲烷(80mL)。搅拌过夜后,添加二乙胺(25mL),再过6小时后,将反应混合物浓缩至一50ml的体积。将其用庚烷稀释,并将溶液浓

缩回至50mL。具有庚烷(各50mL)的两个另外的情况(chases)提供在底部含有胶状材料的两相混合物。将胶状物质溶于二氯甲烷(24mL)中,搅拌,并处理,以缓慢添加庚烷(80mL)中。搅拌1小时后,将浆状物过滤,获得13.02g(99.6%收率)的Lys(MMT)-PABOH(中间体2,图1)。如果发现二乙胺存在,则任选地通过层析进一步纯化该物质。将Lys(MMT)-PABOH(11.51g)与0-(2-叠氮乙基)-O'-[(N-二羟乙酰基-2-氨基)-Lys(MMT)-PABOC0-20-0-SN-38]七甘醇(中间体7,图1)在无水二氯甲烷(90mL)中的溶液混合。向该搅拌的溶液中添加EEDQ(5.54g)。在~18小时后,浓缩反应混合物,随后使用乙酸乙酯-甲醇梯度洗脱通过在硅胶上进行层析将其纯化,以获得纯的标题化合物(中间体3,图1)。

[0312] TBDMS-SN-38(中间体4,图1)的制备:通过使用二氯甲烷而非二甲基甲酰胺作为溶剂来改进制备,这使得处理更容易。将无水二氯甲烷(160mL)中的二异丙基乙胺(36.6g)溶液添加至SN-38(33g)。将悬浮液在冰/水浴中冷却,并搅拌。向该搅拌的悬浮液中添加二氯甲烷(125mL)中的叔-丁基二甲基氯硅烷(31.72g)溶液。将冷却浴除去,并且将反应混合物搅拌4小时。用380mL的10%氯化钠溶液中的0.2M HCl和300mL10%的氯化钠溶液洗涤澄清的反应混合物。在干燥和除去溶剂后,从乙酸乙酯-庚烷沉淀产物,以获得38.75g(91%收率)的TBDMS-SN-38。

[0313] 10-0-TBDMS-SN-38-20-0-氯甲酸酯(反应中间体5,图1)的生成和0-(2-叠氮乙基)-O'-[(N-二羟乙酰基-2-氨基)-Lys(MMT)-PABOC0-20-0-SN-38]七甘醇(中间体7,图1)的制备:为了避免来自所需量的三光气的团注添加(bolus addition)的大量放热,通过在30分钟内将无水二氯甲烷(4mL)中的三光气(0.24g)溶液添加至0.94g的TBDMS-SN-38与DMAP(0.76g)在二氯甲烷(17mL)中的混合物来发明改进的方法。这导致向反应中间体(图1中的5)的转化率为98.5%,如通过利用无水甲醇猝灭的猝灭的等分的反应混合物的HPLC分析测定的。从而确保所需产物的洁净形成,因未反应的SN-38对初始形成的氯甲酸酯的猝灭而无二聚体材料形成的证据。然而团注添加导致5.8℃至17.6℃的大量放热,缓慢添加使内部温度在整个过程中维持在<10℃,同时不损害反应的质量。使用250mL无水二氯甲烷中的11.25g(22.2mmol) TBDMS-SN-38,以及如上文中针对小规模反应所描述的按比例使用其它试剂来重复相同方法。15分钟后,在8分钟内添加25.01g的0-(2-叠氮乙基)-O'-[(N-二羟乙酰基-2-氨基)-Lys(MMT)-PABOH]七甘醇(中间体3,图1)在二氯甲烷(125mL)中的溶液。75分钟后,用50mM醋酸钠缓冲液,pH 5.3、水和盐水相继洗涤反应混合物,随后经无水硫酸钠干燥。随后用四氢呋喃(31mL)中的1M氟化四丁铵、无水二氯甲烷(34mL)和乙酸(3mL)的混合物搅拌产物的溶液。2小时后,用0.25M柠檬酸盐缓冲液,pH 6、水和盐水洗涤反应混合物,随后经无水硫酸钠干燥。利用使用甲醇-二氯甲烷混合物的梯度洗脱的硅胶上进行的层析提供17.3g(52%收率)的标题产物(中间体7,图1)。

[0314] CL2A-SN-38(图1)的制备:将无水二氯甲烷(130mL)中的0-(2-叠氮乙基)-O'-[(N-二羟乙酰基-2-氨基)-Lys(MMT)-PABOC0-20-0-SN-38]七甘醇(中间体7,图1;10.2g)与4-(N-马来酰亚胺甲基)-N-(2-丙炔基)环己烷-1-甲酰胺(中间体8[‘MCC-炔’]图1;3.78g)混合。向其中添加三苯基膦(0.38g)、溴化亚酮(0.24g)和二异丙基乙胺(0.25mL)在二氯甲烷(100mL)中的混合物。在环境室温下搅拌反应混合物14小时。将材料浓缩,通过层析纯化;用EDTA、水和盐水洗涤纯产物溶液。以10.8g(89%收率)的量获得产物,0-{2-[(1,2,3-三唑基)-4-[4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酰胺基甲基]]乙基}-O'-[(N-二羟乙酰基-2-

氨乙基)-Lys (MMT)-PABOC0-20-0-SN-38] 七甘醇 (中间体9, 图1), 其好于先前获得的67%的最大收率。该改进的方法因减少的反应时间 (14小时对比18-41小时) 而提高了收率, 并且还通过首先进行层析随后进行EGTA提取避免了先前遭遇的关于中间体9的稳定性问题。将二氯甲烷中的产物溶液与茴香醚 (2.8g) 混合, 冷却至 $<5^{\circ}\text{C}$, 随后与二氯乙酸 (5.8g) 反应2小时。以81%的总收率 (在2个步骤中) 从叔-丁基甲醚沉淀终产物CL2A-SN-38。

[0315] 实施例2. CL2A-SN-38至抗体的缀合

[0316] 将抗-CEACAM5人源化MAb, hMN-14、抗-CD22人源化MAb, hLL2、抗-CD20人源化MAb, hA20、抗-EGP-1人源化MAb, hRS7和抗-粘蛋白人源化MAb, hPAM4用于这些研究。用pH在7-7.4的范围内的磷酸盐缓冲液中的三 (2-羧乙基) 膦 (TCEP) 温和地还原每一种抗体, 将pH调整至6.5, 并使用5-10% v/v的DMSO作为共溶剂将其与~10倍摩尔过量的CL2A-SN-38反应, 在环境温度下孵育20分钟。将相对于抗体10倍摩尔过量的N-乙基马来酰亚胺用作含水溶液来封闭任何过量的硫醇。

[0317] 使用20-30个透析过滤体积的终配制缓冲液25mM MES, pH 6.5通过正切流动过滤 (TFF) 纯化缀合物。该方法避免了在尺寸排阻和疏水柱上的繁琐连续纯化, 从而使得能够以简便的方式纯化数百克缀合物。通过366nm处的吸光度测定产物的SN-38, 将其与标准值相关联。从280nm处的吸光度推断蛋白质浓度, 将其针对该波长上的SN-38吸光度的溢出效应进行校正。根据这些, 测定SN-38/MAb取代比率 (DAR)。将纯化的缀合物作为冻干制剂贮存在玻璃小瓶中, 在真空下封盖并贮存在 -20°C 冰箱中。对于某些此类缀合物获得的DAR (其通常在5至7的范围内) 示于表6中。

[0318] 表6: 某些缀合物中的SN-38/MAb药物/MAb比率 (DAR)

[0319]

MAb	缀合物	DAR
hMN-14	hMN-14-[CL2A-SN-38]	6.1
hRS7	hRS7-CL2A-SN-38	5.8
hA20	hA20-CL2A-SN-38	5.8
hLL2	hLL2-CL2A-SN-38	5.7
hPAM4	hPAM4-CL2A-SN-38	5.9

[0320] 实施例3. 人胰腺癌或结肠癌的临床前模型中的体内治疗功效

[0321] 利用特异性CL2A-SN-38缀合物或对照缀合物处理具有皮下人胰腺或结肠肿瘤异种移植物的免疫受损的无胸腺雌性裸小鼠或不处理所述小鼠。观察特异性缀合物的治疗功效。图2显示Capan 1胰腺肿瘤模型, 其中hRS7 (抗-EGP-1)、hPAM4 (抗-粘蛋白) 和hMN-14 (抗-CEACAM5) 抗体的特异性CL2A-SN-38缀合物显示比对照hA20-CL2A-SN-38缀合物 (抗-CD20) 和未处理对照更好的功效。类似地, 人胰腺癌的BXP3模型中, 特异性hRS7-CL2A-SN-38显示比对照处理更好的治疗功效 (图3)。同样地, 在人结肠癌的侵袭性LS174T模型中, 利用特异性hMN-14-CL2A-SN-38的处理比非处理更有效 (图4)。

[0322] 实施例4. 人源化抗-TR0P-2 IgG-SN-38缀合物用于不同上皮癌的有效治疗的用途

[0323] 本研究的目的是评估SN-38-抗-TR0P-2抗体-药物缀合物 (ADC) 抗几种人类实体瘤类型的功效, 并评估其小鼠和猴中的耐受性, 后者具有与人类似的与hRS7的组织交叉反应性。将两个SN-38衍生物CL2-SN-38 (参见美国专利第7,591,994号) 和CL2A-SN-38缀合于

抗-TROP-2-人源化抗体hRS7。体外表征免疫缀合物的稳定性、结合和细胞毒性。在表达TROP-2抗原的5个不同的人实体肿瘤异种移植模型中测试功效。在小鼠和食蟹猴中评估毒性。

[0324] 两个SN-38衍生物的hRS7缀合物在药物分布(~ 6)、细胞结合($K_d \sim 1.2 \text{ nmol/L}$)、细胞毒性($IC_{50} \sim 2.2 \text{ nmol/L}$)和体外血清稳定性($t_{1/2} \sim 20$ 小时)上是等同的。细胞对ADC的暴露显示导致PARP裂解的信号转导途径,但注意到相对于游离SN-38在p53和p21上调方面的差异。当与非靶向对照ADC相比较时,无毒性剂量的hRS7-SN-38在具有Calu-3 ($P \leq 0.05$)、Capan-1 ($P < 0.018$)、BxPC-3 ($P < 0.005$)和COL0205肿瘤 ($P < 0.033$)的小鼠中产生了显著抗肿瘤作用。小鼠耐受 $2 \times 12 \text{ mg/kg}$ (SN-38当量)的剂量,只具有ALT和AST肝酶水平的短暂升高。利用 $2 \times 0.96 \text{ mg/kg}$ 输注的食蟹猴只显示血细胞计数的短暂减少,然而,重要地,所述值未降至低于正常范围。

[0325] 我们得出抗-TROP-2 hRS7-CL2A-SN-38 ADC提供抗一系列人实体瘤类型的显著和特异性的抗肿瘤作用。其在猴中被良好地耐受,组织TROP-2表达与人相似。(Cardillo等, 2011, Clin Cancer Res 17:3157-69)。

[0326] 具有实体瘤的患者的成功伊立替康治疗很大程度上因CPT-11前药至活性SN-38代谢产物的低转化率而已受到限制。其它研究人员已检查了作为避开对该转化的需要和将SN-38被动地递送至肿瘤的方法的SN-38的非靶向形式。我们将SN-38共价缀合于人源化抗-TROP-2抗体hRS7。该抗体-药物缀合物在所有无毒性剂量(例如, $\leq 3.2 \text{ mg/kg}$ 累积的SN-38当量剂量)上在一系列皮下人癌症异种移植模型(包括非小细胞肺癌、胰腺癌、结直肠癌和肺鳞状细胞癌)中具有特定的抗肿瘤作用。

[0327] TROP-2在许多上皮癌中,但也在一些正常组织中广泛表达,从而在食蟹猴中进行剂量递增研究以评估该缀合物的临床安全性。猴耐受 24 mg SN-38当量/kg,只具有轻微的、可逆的毒性。鉴于其肿瘤靶向和安全性特征,hRS7-CL2A-SN-38可在响应伊立替康的实体瘤的治疗中提供改善。

[0328] 人滋养层细胞表面抗原(TROP-2)(也称为GA733-1(胃抗原733-1)、EGP-1(上皮糖蛋白-1)和TACSTD2(肿瘤相关钙信号转导蛋白)在多种人癌症中表达,并且已在一些癌症中患有与更具侵袭性的疾病相关的预后显著性(参见,例如,Alberti等,1992,Hybridoma 11:539-45;Stein等,1993,Int J Cancer 55:938-46;Stein等,1994,Int J Cancer Suppl. 8:98-102)。TROP-2在利用鼠TROP-2转染的小鼠胰腺癌细胞系中的功能作用的研究显示在低血清条件下的增加的增殖、迁移和体外不依赖于锚定的生长,以及增加的生长速度(具有增加的Ki-67体内表达的证据)和更高的转移的可能性(Cubas等,2010,Mol Cancer 9:253)。

[0329] TROP-2抗原在许多上皮癌中的分布使其成为有吸引力的治疗靶标。Stein及其同事(1993,Int J Cancer 55:938-46)表征了结合EGP-1的称为RS7-3G11(RS7)的抗体,其存在于许多实体瘤中,但抗原也在一些正常组织中表达(通常以较低的强度,或在有限的区域内)。已使用放射性标记的RS7在许多肿瘤异种移植模型中记录了靶向和治疗功效(Shih等,1995,Cancer Res 55:5857s-63s;Stein等,1997,Cancer 80:2636-41;Govindan等,2004,Breast Cancer Res Treat 84:173-82),但该内化抗体在未缀合形式中未显示治疗活性(Shih等,1995,Cancer Res 55:5857s-63s)。然而,在体外其已显示抗TROP-2阳性癌的抗体依赖性细胞毒性(ADCC)活性。

[0330] 我们报导了使用偶联于SN-38 (作为伊立替康或CPT-11的活性成分的拓扑异构酶-I抑制剂) 的几种衍生物的抗-CEACAM5 (CD66e) 制备抗体-CEACAM5药物缀合物 (ADC) (Moon等,2008,J Med Chem 51:6916-26;Govindan等,2009,Clin Cancer Res 15:6052-61)。所述衍生物在它们的体内血清稳定性性质上可变化,并且体内研究发现在防止或阻止人结肠癌和胰腺癌异种移植物的生长方面比具有更大或更小稳定性的其它键联更有效的一种形式 (称为CL2)。

[0331] 重要地,这些作用在无毒性剂量发生,初始测试不能确定剂量限制性毒性 (Govindan等,2009,Clin Cancer Res 15:6052-61)。这些结果令人鼓舞,但也令人惊讶,因为CEACAM5抗体不内化 (被认为对于ADC的成熟是至关重要的性质)。我们推测抗-CEACAM5-SN-38缀合物的治疗活性可能与在抗体定位后SN-38在肿瘤内的缓慢释放相关。因为当在它们的生长周期的S期暴露细胞时,伊立替康表现最佳,所有预期持续释放提高反应。事实上,偶联于非靶向血浆延长剂诸如聚乙二醇 (PEG) 或胶束的SN-38已显示超过单独的伊立替康或SN-38的提高的功效 (例如,Koizumi等,2006,Cancer Res 66:10048-56),从而为该机制提供了另外的支持。

[0332] 鉴于RS7抗体与上皮癌的广泛反应性和其内化能力,我们假设RS7-SN-38缀合物可以不仅从药物的持续释放受益,而且还从直接细胞内递送受益。因此,我们使用鼠RS7抗体的人源化形式 (hRS7) 制备SN-38缀合物并测试其功效。对SN-38衍生物 (Govindan等,2009,Clin Cancer Res 15:6052-61) 进行修饰,这改善了缀合物的质量但不改变其体外稳定性或其体内功效。该新的衍生物 (称为CL2A) 是目前用于将SN-38偶联于抗体的优选试剂。在本文中,我们显示了hRS7-SN-38缀合物在无毒性剂量上在植入裸小鼠的几种上皮癌细胞系中的功效,其它研究显示显著更高的剂量可被耐受。更重要的是,在也在与人相似的组织中表达TROP-2的猴毒性进行的毒性研究显示,hRS7-CL2A-SN-38在小鼠中以比治疗有效剂量明显更高的量被耐受,从而提供证据表明该缀合物是用于治疗患有广泛的上皮癌的患者的前景药剂。

[0333] 材料和方法

[0334] 细胞系、抗体和化学治疗剂。本研究中使用的所有人类肿瘤细胞系购自美国典型培养物保藏中心。这些细胞系包括Calu-3 (非小细胞肺癌)、SK-MES-1 (肺鳞状细胞癌)、COLO 205 (结肠腺癌)、Capan-1和BxPC-3 (胰腺癌)、和PC-3 (前列腺腺癌)。人源化RS7 IgG和对照人源化抗-CD20 (hA20 IgG, 维妥珠单抗) 和抗-CD22 (hLL2 IgG, 依帕珠单抗) 抗体于Immunomedics, Inc中制备。伊立替康 (20mg/mL) 获自Hospira, Inc。

[0335] SN-38免疫缀合物和体外方面。先前已描述了CL2-SN-38的合成 (Moon等,2008,J Med Chem 51:6916-26,也参见美国专利第7,591,994号)。如所描述的 (Moon等,2008,J Med Chem 51:6916-26;Govindan等,2009,Clin Cancer Res 15:6052-61), 进行其至hRS7 IgG的缀合和其血清稳定性。如先前所描述的 (Moon等,2008,J Med Chem 51:6916-26), 进行CL2A-SN-38 (分子量1480) 及其hRS7缀合物的制备,以及稳定性、结合和胞毒性研究。制备细胞裂解物,并对p21^{Waf1/Cip}、p53和PARP (聚-ADP-核糖聚合酶) 进行免疫印迹。

[0336] 体内治疗研究。对于所有动物研究,SN-38免疫缀合物和伊立替康的剂量以SN-38当量显示。基于为6的平均SN-38/IgG取代比率,用于20-g小鼠 (25mg/kg) 的500μg ADC的剂量含有0.4mg/kg的SN-38。伊立替康的剂量也同样显示为SN-38当量 (即,40mg伊立替康/kg

相当于24mg/kg的SN-38)。4至8周龄的NCr雌性无胸腺裸(nu/nu)小鼠和10周龄的雄性Swiss-Webster小鼠购自Taconic农场。由SNBL USA, Ltd在食蟹猴(食蟹猕猴;2.5-4kg的雄性和雌性)中进行耐受性研究。用不同人癌症细胞系皮下植入动物。通过使用卡尺进行2维测量来测定肿瘤体积(TV), 体积被定义为: $L \times w^2/2$, 其中L为肿瘤的最长尺寸, w为最短尺寸。当治疗开始时, 肿瘤在0.10至0.47cm³的尺寸范围内。在结果中描述了每个实验中的治疗方案、剂量和动物数目。重构冻干的hRS7-CL2A-SN-38和对照ADC, 并根据需要在无菌盐水中进行稀释。除伊立替康(其静脉内施用)外, 所有试剂均腹腔内施用(0.1mL)。所述给药方案受我们先前研究影响, 其中每4天一次或每周2次施予ADC, 持续不同的时间长度(Moon等, 2008, J Med Chem 51:6916-26; Govindan等, 2009, Clin Cancer Res 15:6052-61)。该给药频率反映了对所述缀合物的体外血清半衰期的考虑, 以允许更多的对ADC的连续暴露。

[0337] 统计。将生长曲线确定为初始TV随时间的百分比变化。肿瘤生长的统计分析基于曲线下面积(AUC)。个体肿瘤生长的特征谱通过线性曲线建模来获得。在生长曲线的统计分析之前, 将f-试验用于测定组间变化的等同性。将双尾t检验用于评估各种治疗组与对照之间的统计显著性, 盐水对照(其中使用1尾t检验(在 $P \leq 0.05$ 时具有显著性))除外。AUC的统计比较均仅进行至组内的第一只动物因进展而被无痛处死的时间。

[0338] 药代动力学和生物分布。将¹¹¹In-放射标记的hRS7-CL2A-SN-38和hRS7 IgG注射入具有皮下SK-MES-1肿瘤(~0.3cm³)的裸小鼠中。用20μCi (250-μg蛋白质)的¹¹¹In-hRS7-CL2A-SN-38静脉内注射一个组, 然而另一个组接受20μCi (250-μg蛋白质)的¹¹¹In-hRS7 IgG。在不同的时间点上, 麻醉小鼠(每时间点5只), 通过心内穿刺放血, 随后无痛致死。取出肿瘤和各种组织, 称重, 随后通过γ闪烁计数, 以测定每克组织的百分比注射剂量(% ID/g)。在施用¹¹¹In-hRS7-CL2A-SN-38前3天, 用250μg的未标记的hRS7-CL2A-SN-38注射第3组, 同样地进行尸检。将双尾t检验用于在使用f-检验测定变化的等同性后比较hRS7-CL2A-SN-38与hRS7 IgG的摄取。使用WinNonLin软件(Parsight Corp.)进行血液清除的药代动力学分析。

[0339] Swiss-Webster小鼠和食蟹猴中的耐受性。简言之, 将小鼠分选至4个组, 各自在第0天和第3天接受2-mL的乙酸钠缓冲液对照或3个不同剂量的hRS7-CL2A-SN-38(4、8或12mg/kg的SN-38)的i.p.注射, 随后进行血液和血清收集, 如结果中所描述的。向食蟹猴(3个雄性和3个雌性;2.5-4.0kg)施用2个不同剂量的hRS7-CL2A-SN-38。在结果中描述了剂量、时间和被放血以用于评估可能的血液学毒性和血清化学的猴的数目。

[0340] 结果

[0341] hRS7-CL2A-SN-38的稳定性和效力。将2种不同的键联用于将SN-38缀合于hRS7 IgG。第1种称为CL2-SN-38并且先前已进行了描述(Moon等, 2008, J Med Chem 51:6916-26; Govindan等, 2009, Clin Cancer Res 15:6052-61)。对CL2接头的合成进行改变, 以使苯丙氨酸被除去。该改变简化了合成, 但不影响缀合结果(例如, CL2-SN-38和CL2A-SN-38均掺入每IgG分子~6个SN-38)。并排比较未发现血清稳定性、抗原结合或在体外细胞毒性的显著变化(未显示)。

[0342] 为了确认SN-38接头从CL2至CL2A的变化不影响体内效力, 分别地使用0.4mg或0.2mg/kg SN-38(每周2次, 进行4周)在具有COLO 205或Capan-1肿瘤的小鼠中比较hRS7-CL2A和hRS7-CL2-SN-38(未显示), 两个研究中的起始肿瘤尺寸均为0.25cm³。hRS7-CL2A和

CL2-SN-38缀合物相较于未处理的 ($AUC_{14天}P < 0.002$ 对比盐水, 在COLO 205模型中; $AUC_{21天}P < 0.001$ 对比盐水, 在Capan-1模型中) 和非靶向抗-CD20对照ADC, hA20-CL2A-SN-38 ($AUC_{14天}P < 0.003$, 在COLO-205模型中; $AUC_{35天}P < 0.002$, 在Capan-1模型中), 均显著抑制肿瘤生长。在Capan-1中在研究结束时 (第140天), 50% 用hRS7-CL2A-SN-38处理的小鼠和40%的hRS7-CL2-SN-38小鼠无肿瘤, 然而仅20%的hA20-ADC处理的动物不具有可见的疾病体征。重要的是, 在两种肿瘤模型中在2种特异性缀合物之间不存在功效的差异。

[0343] 作用机制。体外细胞毒性研究表明, hRS7-CL2A-SN-38对几种不同的实体瘤细胞系具有在nmol/L范围内的 IC_{50} 值 (表8); 在所有细胞系中, 对于游离的SN-38的 IC_{50} 低于缀合物。虽然在TROP-2表达与对hRS7-CL2A-SN-38的敏感性之间不存在相关性, 但ADC对比游离SN-38的 IC_{50} 比率低于较高TROP-2表达的细胞, 最可能反映当更多抗原存在时增强的内化药物的能力。

[0344]

表 8. TROP-2 的表达以及 SN-38 和 hRS7-SN-38 在几种实体瘤细胞系中的体外细胞毒性

细胞系	通过 FACS 测定的 TROP-2 表达		细胞毒性结果				ADC/游离 SN-38 比率
	中位百分比 荧光(本底)	百分比 阳性	SN-38 IC_{50} (nmol/L)	95% CI	hRS7-SN-38 ^a IC_{50} (nmol/L)	95% CI	
Calu-3	282.2(4.7)	99.6%	7.19	5.77-8.95	9.97	8.12-12.25	1.39
COLO 205	141.5(4.5)	99.5%	1.02	0.66-1.57	1.95	1.26-3.01	1.91
Capan-1	100.0(5.0)	94.2%	3.50	2.17-5.65	6.99	5.02-9.72	2.00
PC-3	46.2(5.5)	73.6%	1.86	1.16-2.99	4.24	2.99-6.01	2.28
SK-MES-144	4.0(3.5)	91.2%	8.61	6.30-11.76	23.14	17.98-29.78	2.69
BxPC-3	26.4(3.1)	98.3%	1.44	1.04-2.00	4.03	3.25-4.98	2.80

[0345] ^a IC_{50} -值显示为hRS7-SN-38的SN-38当量。

[0346] 已知SN-38激活细胞中的几个信号转导途径, 从而导致细胞凋亡。我们的初步研究在体外检查了参与早期信号转导事件 ($p21^{Waf1/Cip1}$ 和 $p53$) 和1个晚期凋亡事件 [聚-ADP-核糖聚合酶 (PARP) 的裂解] 的2种蛋白的表达 (未显示)。在BxPC-3中, SN-38导致 $p21^{Waf1/Cip1}$ 表达增加至20倍, 然而hRS7-CL2A-SN-38导致仅10倍的增加, 与对于游离的SN-38在该细胞系中的较高活性一致的发现 (表8)。然而, hRS7-CL2A-SN-38使 $p21^{Waf1/Cip1}$ 在Calu-3中的表达为游离SN-38的2倍以上 (未显示)。

[0347] 在 $p53$ 的表达上观察到hRS7-CL2A-SN-38-与游离SN-38介导的信号转导事件之间的较大差异。在BxPC-3和Calu-3中, 游离SN-38对 $p53$ 蛋白的上调直至48个小时才明显, 然而hRS7-CL2A-SN-38在24小时内上调 $p53$ (未显示)。另外, 暴露于ADC的细胞中的 $p53$ 表达相较于SN-38在两个细胞系中均较高 (未显示)。有趣的是, 尽管hRS7 IgG对 $p21^{Waf1/Cip1}$ 表达没有显著作用, 但其在BxPC-3和Calu-3中确实诱导 $p53$ 的上调, 但只在48小时的暴露后。就晚期凋亡事件而言, 当与SN-38或缀合物一起孵育时, PARP的裂解在两种细胞系中是明显的 (未显示)。BxPC-3中所述裂解的PARP的存在在24小时时较高, 这与 $p21$ 的高表达和其较低的 IC_{50} 相关。对于游离SN-38超过ADC的更高的裂解程度与细胞毒性发现一致。

[0348] hRS7-SN-38的功效。因为TROP-2在几种人癌症中广泛表达, 因此在几个不同的人

癌症模型中进行研究,所述研究始于hRS7-CL2-SN-38键联的评估,但后来,使用利用CL2A-键联的缀合物。每4天(进行4次)被施予0.04mg SN-38/kg的hRS7-CL2-SN-38的具有Calu-3的裸小鼠相较于施以等量的hLL2-CL2-SN-38的动物具有显著改善的反应(分别为 $TV=0.14\pm0.22\text{cm}^3$ 对比 $0.80\pm0.91\text{cm}^3$; $AUC_{42\text{天}}P<0.026$;图5A)。当剂量增加至0.4mg/kg SN-38时,观察到了剂量反应。在该较高的剂量水平上,所有被施予特异性hRS7缀合物的小鼠均在28天内被“治愈”,并且保持无肿瘤直至第147天研究结束,然而在用不相关ADC治疗的动物中肿瘤继续生长(特异性对比不相关 $AUC_{98\text{天}}P=0.05$)。在接受hRS7 IgG和SN-38的混合物的小鼠中,肿瘤到第56天进展至 >4.5 倍($TV=1.10\pm0.88\text{cm}^3$; $AUC_{56\text{天}}P<0.006$ 对比hRS7-CL2-SN-38)。

[0349] 也在人结肠(COLO 205)和胰腺(Capan-1)肿瘤异种移植中检查了功效。在具有COLO 205的动物(图5B)中,hRS7-CL2-SN-38(0.4mg/kg,q4dx8)在28天的治疗期中阻止肿瘤生长,相较于对照抗-CD20 ADC(hA20-CL2-SN-38)或hRS7 IgG具有显著更小的肿瘤(分别为 $TV=0.16\pm0.09\text{cm}^3$ 、 $1.19\pm0.59\text{cm}^3$,和 $1.77\pm0.93\text{cm}^3$; $AUC_{28\text{天}}P<0.016$)。最大耐受剂量的伊立替康(24mg SN-38/kg,q2dx5)与hRS7-CL2-SN-38的功效相同,因为相较于人血清,小鼠血清可更高效地将伊立替康转化成SN-38,但伊立替康中的SN-38的剂量(累积2,400 μg)为对于该缀合物(总共64 μg)的37.5倍。

[0350] 当以相当于hRS7-CL2-SN-38缀合物的SN-38-剂量施予时,具有Capan-1的动物未显示的对单独的伊立替康的显著反应(例如,在第35天,在被施予0.4mg SN-38/kg hRS7-SN-38的动物中的平均肿瘤尺寸为 $0.04\pm0.05\text{cm}^3$,对比被施予0.4mg/kg SN-38的伊立替康-处理的动物中的 $1.78\pm0.62\text{cm}^3$; $AUC_{35\text{天}}P<0.001$;图5C)。当将伊立替康剂量增加10倍至4mg/kg SN-38时,反应得以提高,但仍然不如0.4mg/kg SN-38剂量水平的缀合物显著($TV=0.17\pm0.18\text{cm}^3$ 对比 $1.69\pm0.47\text{cm}^3$, $AUC_{49\text{天}}P<0.001$)。相较于伊立替康-处理的动物,等剂量的非靶向hA20-CL2-SN-38也具有显著的抗肿瘤作用,但特异性hRS7缀合物显著好于不相关ADC($TV=0.17\pm0.18\text{cm}^3$ 对比 $0.80\pm0.68\text{cm}^3$, $AUC_{49\text{天}}P<0.018$)。

[0351] 随后将利用hRS7-CL2A-SN-38 ADC的研究推广至人上皮癌的其它2个模型。在具有BxPC-3人胰腺肿瘤的小鼠中(图5D),相较于利用盐水和等量的非靶向hA20-CL2A-SN-38(分别为 $TV=0.24\pm0.11\text{cm}^3$ 对比 $1.17\pm0.45\text{cm}^3$ 和 $1.05\pm0.73\text{cm}^3$; $AUC_{21\text{天}}P<0.001$)或以为10倍的SN-38等效剂量施予的伊立替康(分别为 $TV=0.27\pm0.18\text{cm}^3$ 对比 $0.90\pm0.62\text{cm}^3$; $AUC_{25\text{天}}P<0.004$)处理的对照小鼠,hRS7-CL2A-SN-38再次显著抑制肿瘤生长。有趣的是,在利用0.4mg/kg的ADC处理的具有SK-MES-1人鳞状细胞肺肿瘤的小鼠中(图5E),肿瘤生长抑制优于盐水或未缀合的hRS7 IgG(分别地, $TV=0.36\pm0.25\text{cm}^3$ 对比 $1.02\pm0.70\text{cm}^3$ 和 $1.30\pm1.08\text{cm}^3$; $AUC_{28\text{天}}P<0.043$),但非靶向hA20-CL2A-SN-38或MTD的伊立替康提供与特异性hRS7-SN-38缀合物相同的抗肿瘤作用。在所有的鼠研究中,hRS7-SN-38 ADC在体重减轻方面被良好地耐受(未显示)。

[0352] hRS7-CL2A-SN-38的生物分布。使用各自的 ^{111}In -标记的底物在具有SK-MES-1人肺鳞癌异种移植(未显示)的小鼠中比较hRS7-CL2A-SN-38或未缀合的hRS7 IgG的生物分布。进行药代动力学分析以确定hRS7-CL2A-SN-38相对于未缀合的hRS7的清除(未显示)。ADC比等量的未缀合的hRS7更快地被清除,ADC显示短~40%的半衰期和平均滞留时间。然而,这对肿瘤摄取(未显示)的影响最小。虽然在第24和48小时的时间点上存在显著差异,但

到72小时(峰值摄取)时,肿瘤中的两种药剂的量相似。在正常组织当中,肝和脾的差异是最显著的(未显示)。在注射后24小时,肝中的hRS7-CL2A-SN-38超过hRS7 IgG的2倍。相反地,在脾中,在峰值摄取(48小时的时间点)时存在的亲代hRS7 IgG为hRS7-CL2A-SN-38的3倍。其余组织中的摄取和清除通常反映血药浓度的差异。

[0353] 因为对治疗施予每周两次的剂量,因此检查首先接受0.2mg/kg (250μg蛋白质)的预剂量的hRS7 ADC,3天后注射¹¹¹In-标记的抗体的动物的组中的肿瘤摄取。预给药的小鼠中的¹¹¹In-hRS7-CL2A-SN-38的肿瘤摄取相较于未接受预剂量的动物在每一个时间点上显著减少(例如,在72小时时,预给药的肿瘤摄取为12.5%±3.8% ID/g对比未施予预剂量的动物中的25.4%±8.1% ID/g;P=0.0123)。预给药对血液清除或组织摄取没有明显影响(未显示)。这些研究表明,在某些肿瘤模型中,可通过在先给药(多次在先给药)来减少特定抗体的肿瘤累积,这可能解释了为什么治疗反应的特异性可随着ADC的剂量增加而降低以及为什么未指示进一步的剂量增加。

[0354] hRS7-CL2A-SN-38在Swiss-Webster小鼠和食蟹猴中的耐受性。Swiss-Webster小鼠在3天内以最小短暂体重减轻(未显示)耐受2个剂量的各自4、8和12mg SN-38/kg的hRS7-CL2A-SN-38。无造血毒性发生,并且血清化学只揭示升高的天冬氨酸转氨酶(AST)和丙氨酸转氨酶(未显示)。治疗后7天,AST在所有3个处理组(未显示)中升至高于正常水平(>298U/L),最大比例的小鼠在2×8mg/kg组中。然而,至治疗后15天,大多数动物均在正常范围内。在7天的治疗(未显示)内ALT水平也高于正常范围(>77U/L),并且到第15天具有正常化的证据。来自所有这些小鼠的肝脏没有显示组织损伤的组织学证据(未显示)。就肾功能而言,在处理组中只有葡萄糖和氯化物水平稍微升高。在2×8mg/kg上,7只小鼠中有5只具有稍微升高的血糖水平(273-320mg/dL的范围,高于正常的上端263mg/dL),所述血糖水平至注射后15天恢复正常。类似地,氯化物水平略微升高,在2个最高剂量组(2×8mg/kg组中的57%和2×12mg/kg组中的100%的小鼠)中范围从116至127mmol/L(正常范围的的上端115mmol/L),并且在注射后15天仍保持高水平。这也可指示胃肠道毒性,因为大多数氯化物是通过肠摄取获得的;然而,在结束时,在检查的任何器官系统中未出现组织损伤的证据(未显示)。

[0355] 因为小鼠不表达被hRS7结合的TROP-2,因此需要更合适的模型以测定hRS7缀合物用于临床用途的潜力。免疫组织学研究显示在人和食蟹猴的多个组织(乳腺、眼、胃肠道、肾、肺、卵巢、输卵管、胰腺、甲状旁腺、前列腺、唾液腺、皮肤、胸腺、甲状腺、扁桃体、输尿管、膀胱和子宫;未显示)中的结合。基于该交叉反应性,在猴中进行耐受性研究。

[0356] 接受2×0.96mg SN-38/kg的hRS7-CL2A-SN-38的组在输注后和直至研究结束没有显著的临床事件。体重减轻不超过7.3%并且至第15天回复至适应重量。在大多数血细胞计数数据中注意到短暂下跌(未显示),但值未降至低于正常范围。在血清化学上未发现异常值。第11天(最后一次注射后8天)尸检的动物的组织病理学显示造血器官(胸腺、下颌骨和肠系膜淋巴结、脾和骨髓)、胃肠器官(胃、十二指肠、空肠、回肠、盲肠、结肠和直肠)、女性生殖器官(卵巢、子宫和阴道)以及注射部位上的微观变化。这些变化的范围为最小至中等,并且除在胸腺和胃肠道(其倾向于在该更后的时间点朝向完全恢复)中之外,在所有组织中在恢复期结束时(第32天)被完全逆转。

[0357] 在2×1.92mg SN-38/kg的缀合物的剂量水平上,存在1例因胃肠道并发症和骨髓抑制引起的死亡,并且该组内的其它动物显示相似的,但比2×0.96mg/kg组更严重的不利

事件。这些数据表明,剂量限制性毒性与伊立替康的限制性毒性完全相同;即,肠道和血液学。因此,hRS7-CL2A-SN-38的MTD在 2×0.96 与 1.92mg SN-38/kg 之间,这代表了 2×0.3 至 0.6mg/kg SN-38 的人等效剂量。

[0358] 讨论

[0359] TROP-2是在许多上皮性肿瘤(包括肺癌、乳腺癌、结直肠癌、胰腺癌、前列腺癌和卵巢癌)上表示的蛋白质,从而使其成为用于递送细胞毒性剂的潜在重要的靶。当结合于TROP-2时,RS7抗体内化(Shih等,1995,Cancer Res 55:5857s-63s),这使得能够直接细胞内递送细胞毒素。

[0360] 化疗药物至抗体的缀合已探索了30多年。因为ADC的相当大的部分不被肿瘤加工,但被正常组织加工,因此存在这样的风险,即这些试剂在于肿瘤中达到治疗水平之前对正常器官系统毒性太大。与任何治疗剂一样,治疗窗是确定ADC的潜力的关键因素,从而我们不是检查“超毒性”药物,而是选择SN-38作为靶向TROP-2的ADC的药物成分。

[0361] SN-38是强效拓扑异构酶-I抑制剂,在几种细胞系中具有在纳摩尔范围的 IC_{50} 值。其为前药伊立替康的活性形式,用于治疗结直肠癌,并且在肺癌、乳腺癌和脑癌中也具有活性。我们推断,以ADC的形式存在的直接靶向SN-38,可以是优于CPT-11的显著改进的治疗剂(通过克服后者的至活性SN-38的低的患者变化的生物转化率)。

[0362] 插入原始CL2衍生物中的Phe-Lys肽允许用于经由组织蛋白酶B的可能裂解。为了试图简化合成过程,在CL2A中,苯丙氨酸被消除,从而组织蛋白酶B裂解位点被除去。有趣的是,该产物具有比利用CL2获得的广泛特征谱更加明确的层析特征谱(未显示),但更重要的是,该变化在并排测试中对缀合物的结合、稳定性或潜力没有影响。这些数据表明,CL2中的SN-38主要通过在与SN-38的内酯环形成的pH-敏感性苄基碳酸酯键上的裂解而非组织蛋白酶B裂解位点上的裂解从缀合物释放。

[0363] hRS7 ADC针对一系列实体瘤细胞系的体外细胞毒性始终具有在 nmol/L 的范围内的 IC_{50} 值。然而,暴露于游离SN-38的细胞显示比ADC低的 IC_{50} 值。对于ENZ-2208(Sapra等,2008,Clin Cancer Res 14:1888-96)和NK012(Koizumi等,2006,Cancer Res 66:10048-56)也报道了游离与缀合的SN-38之间的该差异。ENZ-2208采用支链PEG来连结每PEG约3.5至4个分子的SN-38,然而NK012是含有按重量计20%的SN-38的胶束纳米颗粒。对于我们的ADC,该差异(即,游离SN-38对比缀合的SN-38的效力比)随着TROP-2在肿瘤细胞中的表达水平升高而减小,从而表明所述药物的靶向递送的有利方面。就体外血清稳定性而言,hRS7-SN-38的CL2-和CL2A-SN-38形式均产生约20小时的 $t_{1/2}$,这与对于ENZ-2208(Zhao等,2008,Bioconjug Chem 19:849-59)所报导的12.3分钟的短 $t_{1/2}$ 相反,但与在生理条件下在24小时后57%的SN-38从NK012的释放相似(Koizumi等,2006,Cancer Res 66:10048-56)。

[0364] 利用hRS7-SN-38(利用CL2-SN-38或CL2A-SN-38)处理荷瘤小鼠在5种不同的肿瘤模型中显著抑制肿瘤生长。在其中的4种中,观察到肿瘤消退,并且在Calu-3的情况下,所有接受最高剂量的hRS7-SN-38的小鼠在研究结束时不含肿瘤。与在人中不同,伊立替康在小鼠中被血浆酯酶非常高效地转化成SN-38,具有大于50%的转化率,并且在小鼠中产生比在人中更高的功效。当以为10倍或等量的SN-38水平施用伊立替康时,hRS7-SN-38在控制肿瘤生长中显著更好。只有当以其 24mg/kg q2dx5 (为SN-38的37.5倍)的MTD施用伊立替康时,其

才等同于hRS7-SN-38的效力。在患者中,我们预期该有利方面甚至更加有利于hRS7-CL2A-SN-38,因为伊立替康的生物转化将大大降低。

[0365] 我们还在一些抗原表达细胞系诸如SK-MES-1中显示,使用抗原-结合ADC不保证比非结合的不相关缀合物更好的治疗反应。这不是不寻常或意外的发现。事实上,当与伊立替康相比较时,早先提及的非结合的SN-38缀合物增强治疗活性,因此预期无关IgG-SN-38缀合物具有一定的活性。这与肿瘤具有不成熟的渗漏的血管的事实相关,相较于正常组织,所述不成熟的渗漏的血管允许大分子更好地通过。对于我们的缀合物,当pH降低至模拟溶酶体水平的水平时(例如,pH 5.3,于37℃;数据未显示),50%的SN-38将在约13小时内被释放,然而在中性pH的血清中,释放速率降低至近1/2。如果不相关缀合物进入酸性肿瘤微环境,则预期其局部释放一些SN-38。其它因素,诸如肿瘤生理学和对药物的先天敏感性,也可在确定该“基准”活动中起作用。然而,具有较长的滞留时间的特异性缀合物应当具有高于该基线反应的增强的效力,只要存在充足的抗原来捕获特异性抗体。SK-MES-1模型中的生物分布研究还显示,如果肿瘤抗原因连续给药而变得饱和,则特异性缀合物的肿瘤摄取减少,这产生与利用不相关缀合物发现的治疗结果相似的治疗结果。

[0366] 虽然在我们的ADC与其它SN-38递送剂的公开报告之间进行直接比较是个挑战,但可进行一些一般观察。在我们的治疗研究中,最高个体剂量为0.4mg/kg的SN-38。在Calu-3模型中,在20g小鼠中对于1.6mg/kg SN-38或32μg SN-38的总累积剂量,只施予4次注射。使用其10mg/kg的MTD(5次)进行采用ENZ-2208的多个研究,并且采用NK012的临床前研究涉及其30mg/kg的MTD(3次)。因此,以分别为在ENZ-2208和NK012中报导的剂量的30倍和1/55的SN-38当量,利用hRS7-SN-38获得显著的抗肿瘤作用。即使利用1/10的hRS7 ADC(0.04mg/kg),也观察到显著的抗肿瘤作用,然而未提供较低剂量的ENZ-2208,并且当将NK012的剂量降至1/4至7.5mg/kg时,功效丧失(Koizumi等,2006,Cancer Res 66:10048-56)。正常小鼠对于24mg/kg SN-38(1,500mg/kg的缀合物)的1周累积剂量未显示急性毒性,这表明MTD较高。因此,利用低至10/75至1/15的量的SN-38当量可有效地治疗荷瘤动物。

[0367] 作为拓扑异构酶-I抑制剂,SN-38诱导显著的对细胞的DNA的损伤,p53和p21^{WAF1/Cip1}的上调导致半胱天冬酶激活和PARP的裂解。当我们将BxPC-3和Calu-3细胞暴露于我们的ADC时,p53和p21^{WAF1/Cip1}均被上调至高于基线水平。另外,PARP裂解在两种细胞系中也是明显的,从而确认这些细胞中的细胞凋亡事件。令人感兴趣的是p21^{WAF1/Cip1}在BxPC-3和Calu-3中相对于p53被游离SN-38和我们的hRS7-SN-38更高地上调。这可表明p53在这2种细胞系中的突变状态和p53依赖性途径用于p21^{WAF1/Cip1}-介导的细胞凋亡的用途。

[0368] 有趣的观察是由hRS7-ADC相对于SN-38在24小时时介导的p53在BxPC-3和Calu-3中的早期上调。甚至裸hRS7 IgG可在这些细胞系中上调p53,虽然只在48小时的暴露后。已将TROP-2的过表达和通过抗体的交联与几个MAPK相关信号转导事件以及细胞内钙释放发生联系。虽然hRS7的结合不足以诱导BxPC-3和Calu-3的细胞凋亡,如通过PARP裂解的不存在证明的,但这可足以引发细胞,使得缀合于hRS7的SN-38的包含可导致更大的对肿瘤生长抑制的作用。目前正在进行研究以了解哪些途径参与SN-38的hRS7-递送,以及它们可如何与游离SN-38不同,以及p53可在该信号转导中起何作用。

[0369] 生物分布研究显示,hRS7-CL2A-SN-38具有与亲代hRS7 IgG相似的肿瘤摄取,但通过2倍速度的肝摄取被显著更快地清除,这可归因于SN-38的疏水性。由于ADC通过肝来清

除,因此预期肝脏和胃肠道毒性是剂量限制性的。尽管小鼠具有增加的肝转氨酶的证据,但胃肠毒性充其量是轻微的,仅具有有短暂的体重减轻,并且在组织病理学检查后未发现异常。有趣的是,未显示血液学毒性。然而,猴显示如对于伊立替康所预期的相同的毒性,胃肠道和血液学毒性是剂量限制性的。

[0370] 因为被hRS7识别的TROP-2在小鼠中不表达,因此在具有与人相似的TROP-2的组织表达的猴中进行毒性研究是极为重要的。猴耐受具有轻度和可逆毒性的0.96mg/kg/剂量($\sim 12\text{mg}/\text{m}^2$),这外推出 $\sim 0.3\text{mg}/\text{kg}/\text{剂量}$ ($\sim 11\text{mg}/\text{m}^2$)的人剂量。在NK012的I期临床试验中,具有实体瘤的患者耐受每3周一次的 $28\text{mg}/\text{m}^2$ 的SN-38,以4级嗜中性白细胞减少症作为剂量限制性毒性(Hamaguchi等,2010,Clin Cancer Res 16:5058-66)。类似地,利用ENZ-2208的I期临床试验显示剂量限制性发热性嗜中性粒细胞减少症,并建议每3周一次施用 $10\text{mg}/\text{m}^2$,或者如果向患者施用G-CSF,施用 $16\text{mg}/\text{m}^2$ 。因为猴耐受 $22\text{mg}/\text{m}^2$ 的累积人等效剂量,因此有可能的是,即使hRS7结合至许多正常组织,对于hRS7 ADC的单次治疗的MTD可与其它非靶向SN-38剂的MTD类似。实际上,抗-TROP-2抗体的特异性似乎在确定DLT中也不起作用,因为毒性特征谱与伊立替康的相似。更重要的是,如果可如在响应于正好在 0.03mg SN-38当量/kg/剂量的人等效剂量的小鼠一样在人中实现抗肿瘤活性,则可在临床上实现显著的抗肿瘤反应。

[0371] 总之,猴中的毒理学研究,与小鼠中的体内人癌症异种移植模型组合,已表明该ADC靶向TROP-2在几种不同上皮来源的肿瘤中是有效的治疗剂。

[0372] 实施例5.缀合有抗-CD22(依帕珠单抗)的SN-38用于恶性血液病的治疗

[0373] 我们先前发现,当用CL2A接头(其允许每24小时约50%的IgG-结合的SN-38游离至血清中)制备时,可成功地使用缀合有SN-38的缓慢内化抗体。在本研究中,检查分别用依帕珠单抗(快速内化)和维妥珠单抗(缓慢内化)、人源化抗-CD22和抗-CD20 IgG制备的SN-38缀合物治疗B-细胞恶性肿瘤的功效。两种抗体-药物缀合物具有相似的抗多种人淋巴瘤/白血病细胞系,但SN-38的缓慢释放但SN-38的缓慢释放削弱甚至针对不相关缀合物的体外效力鉴别。当SN-38被稳定地连接于抗-CD22缀合物时,其效力降低1/40至1/55。因此,只用不太稳定的缓慢解离的CL2A接头进行进一步的研究。在体内,在具有Ramos异种移植物的老鼠中,即使Ramos表达为CD22的15倍的CD20,在CD22与CD20抗体-药物缀合物之间亦发现相似的抗肿瘤活性,这表明依帕珠单抗-SN-38缀合物(Emab-SN-38)的内化增强其活性。Emab-SN-38在体内比非结合的不相关IgG-SN-38缀合物更有效,从而在无毒性剂量上消除了大部分良好建立的Ramos异种移植瘤。体外和体内研究表明,可将Emab-CL2A-SN-38与未缀合的维妥珠单抗组合以进行更有效的治疗。因此,Emab-SN-38在远低于毒性水平的剂量上在淋巴瘤和白血病中具有活性,从而代表了单独地或与抗-CD20抗体治疗组合地具有治疗潜力的新的有前景的药剂。(Sharkey等,2011,Mol Cancer Ther 11:224-34.)

[0374] 引言

[0375] 大量努力已集中在白血病和淋巴瘤的生物治疗上,其中未缀合的抗体(例如,利妥昔单抗、阿仑单抗、奥法木单抗)、放射免疫缀合物(^{90}Y -替伊莫单抗、 ^{131}I -托西莫)和药物缀合物(吉姆单抗奥佐米星)获得了美国食品和药物管理局(FDA)的批准。另一种抗体-药物缀合物(ADC)、brentuximab vedotin(SGN-35;抗-CD30-auristatin E)最近被FDA加速批准用于霍奇金淋巴瘤和间变性大细胞淋巴瘤。在临床前和临床开发中还存在靶向CD19、CD22、

CD37、CD74和CD79b的许多其它ADC。

[0376] 针对所有这些靶的抗体是用于药物的载体的逻辑选择,因为它们会内化。CD22的内化和特异性已使其成为用于白血病和淋巴瘤的特别重要的靶,至少3种不同的抗-CD22缀合物正处于临床研究中,包括CMC-544(酸不稳定性缀合的加利车霉素),一种抗-CD22-美坦辛缀合物(稳定连接的MCC-DM1),和CAT-3888(正式称为BL22;假单胞菌外毒素单链融合蛋白)。所有这些活性剂缀合物中的活性剂具有亚纳摩尔的效力(即,所谓的超毒性)。

[0377] 我们最近开发了用SN-38(来源于前药伊立替康的具有低纳摩尔效力的拓扑异构酶I抑制剂)缀合抗体的方法(Govindan等,2009,Clin Cancer Res 15:6052-62;Moon等,2008,J Med Chem 51:6916-26)。最初使用利用缓慢内化的抗-CEACAM5抗体制备的缀合物检查4种SN-38键联化学物质(Govindan等,2009,Clin Cancer Res 15:6052-62;Moon等,2008,J Med Chem 51:6916-26)。缀合物保留CEACAM5结合,但在人血清中在SN-38的解离速率上相异,半衰期从约10变化至67个小时(Govindan等,2009,Clin Cancer Res 15:6052-62)。最终,选择具有中等稳定性(~50%在24-35小时内解离)的称为CL2的接头被选择用于进一步开发。最近对CL2进行了修饰,从而消除组织蛋白酶B可裂解二肽中的苯丙氨酸,以简化生产和提高生产率。称为CL2A的新的衍生物保留连接于SN-38的pH敏感性碳酸酯键联,但其不再被组织蛋白酶B选择性裂解。然而,其具有与原始CL2接头相同的血清稳定性和体内活性(Cardillo等,2011,Clin Cancer Res 17:3157-69)。因为对于缓慢内化的抗-CEACAM5-SN-38,发现显著的功效而无毒性,我们推测,在其定位于肿瘤中后SN-38从抗体的缓慢释放有助于其活性。因此,本报告的主要目的是评估使用CL2A接头和对于B细胞癌是高度特异的但在它们的抗原表达和内化性质上不同的两种抗体制备的缀合物的治疗前景。

[0378] 依帕珠单抗(Emab)是已以未缀合的或缀合的形式在淋巴瘤和白血病中被广泛评估的快速内化(例如,在1小时内 $\geq 50\%$)人源化抗-CD22 IgG1。维妥珠单抗(Vmab)为也被临床研究但缓慢内化(例如,在1小时内~10%)的人源化抗-CD20抗体。CD20通常在非霍奇金淋巴瘤中以远高于CD22的水平表达,然而CD22优先在急性淋巴母细胞性白血病(ALL)但非多发性骨髓瘤中表达。两种抗体在患者中作为未缀合的试剂是有效的,但只有维妥珠单抗在鼠异种移植模型中具有活性(Stein等,2004,Clin Cancer Res 10:2868-76)。基于显示与未缀合的维妥珠单抗组合的 ^{90}Y -Emab在NHL模型中具有增强的功效的先前研究(Mattes等,2008,Clin Cancer Res 14:6154-60)中,我们还检查了Emab-SN-38+Vmab组合,因为这可提供额外的益处而无需竞争相同的靶抗原或具有另外的毒性。

[0379] 材料和方法

[0380] 细胞系。Ramos,Raji,Daudi(伯基特淋巴瘤)和JeKo-1(套细胞淋巴瘤)购自美国典型培养物保藏中心。REH,RS4;11,MN-60和697(ALL)购自Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen。WSU-FSCCL(滤泡性NHL)为Dr.Mitchell R.Smith(Fox Chase Cancer Center,Philadelphia,PA)的礼物。将所有细胞系在37℃、潮湿的CO₂培养箱(5%)中培养于推荐的含有10至20%胎牛血清的补加培养基中,并且周期性检查其支原体。

[0381] 抗体和缀合法。依帕珠单抗和维妥珠单抗分别为人源化抗-CD22和抗-CD20 IgG1单克隆抗体。拉贝珠单抗(Lmab),人源化抗-CEACAM5 IgG1和RS7,人源化抗-TROP-2抗体(两者均来自Immunomedics,Inc.)用作非结合的不相关对照。Herein、Emab-SN-38、Vmab-SN-38

和Lmab-SN-38是指使用上述CL2A接头制备的缀合物。人血清中的体外研究显示约50%的活性SN-38部分每天从IgG释放(Cardillo等,2011,Clin Cancer Res 17:3157-69)。称为CL2E的另一种接头(参见美国专利第7,999,083和8,080,250号)在14天内在人血清中是稳定的,但其含有有助于SN-38的释放(当在溶酶体中被加工时)的组织蛋白酶B裂解位点。在美国专利第7,999,083和8,080,250号中给出了制备CL2E的方法以及CL2A和CL2E接头的结构。缀合物含有约每IgG6个SN-38单位(例如,1.0mg的IgG-SN-38缀合物含有~16μg的SN-38)。

[0382] 体外细胞结合和细胞毒性。使用未缀合的特异性抗体和不相关抗体进行流式细胞术,在4℃孵育1小时,荧光素异硫氰酸酯(FITC)-Fcγ片段特异性山羊抗-人IgG(Jackson ImmunoResearch)显示结合,也在4℃孵育1小时。使用CellQuest软件包在FACSCALIBUR®流式细胞仪(Becton Dickinson)上测定中位荧光。

[0383] 使用MTS染料还原法(Promega)测定细胞毒性。从一式三份测定的平均值产生剂量-反应曲线[利用/不利用抗-人FcγF(ab')₂;Jackson ImmunoResearch],并且PRISM® GraphPad软件(v5)计算IC₅₀值,基于数据的最佳拟合曲线使用F检验进行统计比较。将显著性设置在P<0.05。

[0384] 免疫印迹。在对测试试剂暴露24或48小时后,通过免疫印迹显示早期(p21表达)和晚期(PARP裂解)细胞凋亡的标志物。

[0385] 体内研究。通过将来自培养的1×10⁷个细胞(0.2mL)(>95%的活力)植入4至6周龄雌性裸小鼠(Taconic)来创建皮下Ramos模型。植入后3周,将具有在0.4至0.8cm³(通过卡尺测量的,L×W×D)的范围内的肿瘤尺寸的动物分入动物的组,每组具有相同的肿瘤尺寸范围。至少每周一次测量肿瘤尺寸和体重,当肿瘤生长至3.0cm³或如果它们经历20%或更大的体重减轻,将动物从研究中移除。通过静脉内注射2.5×10⁶和1×10⁷个细胞来在雌性严重联合免疫缺陷(SCID)小鼠(Taconic)中分别创建静脉WSU-FSCCL和697模型。治疗在WSU-FSCCL细胞施用后5天以及697接种后7天开始。每日观察动物,使用后腿瘫痪或病态的其它体征作为替代存活终点。所有治疗方法是≤0.2mL的腹膜内注射。在结果部分中给出具体的剂量和频率。因为小鼠高效地将伊立替康转化成SN-38,因此基于SN-38当量调整伊立替康给药;SN-38的摩尔当量基于1.6%的ADC质量和60%的伊立替康质量。

[0386] 使用进展时间(TTP)作为如上指定的替代存活终点在卡普兰-迈耶曲线中表达功效。使用PRISM® GraphPad软件(显著性,P<0.05),利用对数秩检验进行统计分析。

[0387] 结果

[0388] 体外抗原表达和细胞毒性。所有细胞系对SN-38高度易感,EC₅₀的范围为0.13nmol/L(对于Daudi)至2.28nmol/L(对于RS4;11)(表9)。除697和RS4;11外,Emab-SN-38抗-CD22缀合物的功效为SN-38的1/7至1/2。对于我们的靶向SN-38缀合物以及其它非靶向SN-38缀合物,这是常见的发现。尽管存在抗原表达的差异,但Emab-CL2A-SN-38和Vmab-CL2A-SN-38具有与非结合的Lmab-CL2A-SN-38抗-CEACAM5缀合物相似的效力,这可能归因于在4天的MTS测定过程中约90%的SN-38的解离。使用较短的暴露时间的其它体外方法在鉴别缀合物的效力的差异中也是无效的。例如,1天的暴露后的膜联蛋白V染色未能发现未处理的与处理的细胞之间的差异(未显示)。也将p21和PARP裂解的上调分别作为细胞凋亡的早期和晚期标志物进行检查。Ramos不表达p21。然而,检测到(但仅在48小时暴露后)PARP裂解,其在SN-

38-处理的细胞中更强劲地表达(未显示)。WSU-FSCCL细胞系表达p21,但在Emab-CL2A-SN-38暴露后48小时之前,p21的上调和PARP的裂解均不明显。然而,在对于游离的SN-38的24小时暴露后观察到两者(未显示)。虽然对于游离的SN-38,细胞凋亡事件的增加的强度和早期激活与其相对于缀合有IgG的形式较低的EC₅₀一致,结果表明可能需要至少48小时的暴露期,但在该时间,约75%的SN-38可从缀合物释放。

[0389] 表9.通过FACScan测定的CD20和CD22的表达和针对几种造血肿瘤细胞系的SN-38和特异性Emab抗-CD22-SN-38、Vmab抗-CD20-SN-38和Lmab抗-CEACAM5-SN-38缀合物的通过MTS测定测量的体外细胞毒性

细胞系	CD20 表达 中位荧光 (本底)	CD22 表达 中位荧光 (本底)	SN-38,nmol/L	95% CI	EC ₅₀ 值 ^a						
					Emab-SN-38, nmol/L	95% CI	Vmab-SN-38, nmol/L	95% CI	Lmab-SN-38, nmol/L	95% CI	
NHL:Burkitt											
[0390]	Raji	422.2(0.8)	645.9(6.8)	1.42	0.8-2.4	2.10	1.2-3.8	ND	—	ND	—
					4.61		2.2-9.5	4.88	2.7-9.0	3.73	1.8-7.6
	Ramos	620.4(0.1)	440.8(4.1)	0.40	0.2-0.7	2.92	1.6-5.4	ND	—	ND	—
					9.84		4.5-21.6	13.56	4.9-37.2	8.08	2.9-22.2
	Daudi	815.1(0.9)	145.0(5.9)	0.13	0.1-0.2	0.52	0.4-0.7	ND	—	ND	—
NHL:滤泡											
	WSU-FS CCL	97.4(9)	7.7(4.9)	0.50	0.3-1.0	0.68	0.4-1.1	ND	—	ND	—
					1.05		0.8-1.4	0.83	0.6-1.1	1.17	0.8-1.7
NHL:套细胞											
	Jeko-1	604.6(0.5)	611.2(6.5)	ND	—	2.25	1.3-3.8	1.98	1.1-3.5	2.27	1.3-3.9
ALL:B 细胞											
[0391]	REH	12.3(1)	22.9(4.1)	0.47	0.3-0.9	1.22	0.8-1.9	ND	—	ND	—
	697	6.9(4.2)	16.0(4.2)	2.23	1.3-3.9	2.67	1.7-3.7	ND	—	ND	—
	RS4;11	3.7(4.1)	23.3(4.1)	2.28	1.1-4.9	1.68	1.0-3.0	ND	—	ND	—
	MN-60	21.5(5.8)	10.3(5.8)	1.23	0.6-2.1	3.65	2.2-6.2	ND	—	ND	—

[0392] 缩写:CI,置信区间;ND,未被测定的。^aEC₅₀表达为Emab-SN-38中的SN-38的摩尔当量。

[0393] 我们再次检测PARP的裂解和p21的表达,这一次是在用Emab-CL2A-SN-38+Vmab处理的细胞中。确认在Ramos中进行的早期研究,PARP的裂解最早在对缀合物暴露48小时后才发生,在交联抗体存在的情况下表达不变(未显示)。超过48小时的对维妥珠单抗的暴露对PARP的裂解没有影响,但当添加交联抗体时,裂解在24小时内非常强(未显示)。然而,当将单独的维妥珠单抗(无交联剂)与Emab-CL2A-SN-38组合时,PARP的裂解在24小时的暴露后

发生(未显示),这表明维妥珠单抗可即使在交联不存在的情况下诱导更快速的细胞凋亡发作。在WSU-FSCCL细胞系中唯一显着的差异是,所述组合大大提高了在48小时时的p21表达(未显示),再次表明当将维妥珠单抗与Emab-CL2A-SN-38缀合物组合时细胞凋亡诱导的加速。相较于Ramos的WSU-FSCCL的细胞凋亡诱导的延迟WSU-FSCCL延迟可能通过较低的CD22和CD20的表达来解释。

[0394] 超毒性试剂通常使用在血清中高度稳定的接头,因为它们过早释放会增加毒性,但这些缀合物必须被内化以最佳地递送药物。因为依帕珠单抗内化迅速,因此我们检查其是否可受益于更稳定连接的SN-38,比较CL2A连接的Emab-SN-38缀合物与血清稳定的CL2E-SN-38缀合物的体外细胞毒性。两种缀合物均具有相似的结合亲和力(未显示),但更稳定的Emab-CL2E-SN-38在3个细胞系中的效力约为CL2A缀合物的1/55至1/40(未显示)。虽然对于CL2A缀合物缺乏特异性,但Emab-CL2E-SN-38的效力始终为非结合的Lmab-抗-CEACAM5-CL2E-SN-38缀合物的约2倍(未显示)。我们得出,更稳定连接的缀合物将适合于缓慢内化的维妥珠单抗缀合物,因此仅用CL2A连接的SN-38缀合物继续我们的研究。

[0395] 由于体外测定的限制,在异种移植模型中评估功效。正如于表9中所示,所有淋巴瘤细胞系有比CD22高得多的CD20表达。Daudi有最高的CD22和CD20的表达,但其在体内对未缀合的维妥珠单抗非常敏感,并且体外试验显示了对SN-38的最高敏感度(表9)。这些性质很可能使其难以评估归功于SN-38缀合物对比未缀合的抗体的活性的差异,特别是当未结合的依帕珠单抗在动物中不是有效的治疗剂时。由于Ramos先前已被用于显示组合⁹⁰Y-Emab与维妥珠单抗的有利方面(Mattes等,2008,Clin Cancer Res 14:6154-60),因而我们决定先从在Ramos人Burkitt细胞系中比较Emab-CL2A-SN-38与Vmab-CL2A-SN-38缀合物开始。尽管流式细胞仪显示CD20的表达为CD22的15倍,但Ramos异种移植物的免疫组织学显示大量的CD22和CD20,CD22似乎比CD20更均匀地表达(未显示)。

[0396] 未治疗的动物中的Ramos异种移植进展迅速,在6天内从它们的0.4cm³的起始尺寸达到3.0-cm³的终止尺寸(未显示),并如先前报道的,维妥珠单抗和依帕珠单抗都未明显地影响良好建立的Ramos异种移植物的进展(Sharkey等,2009,J Nucl Med 50:444-53)。与先前使用其它SN-38缀合物的发现一致,没有一个接受每周2次0.5mg/剂量,进行4周的治疗方案的动物具有明显的体重减轻。两种缀合物在控制肿瘤生长中是非常有效的,到4周的治疗结束时80%或更多的动物没有肿瘤的证据(图6)。0.25-mg Vmab-CL2A-SN-38剂量在前4周在控制生长上更好,但在0.5mg上,对于两种缀合物均观察到相似的早期生长控制。因此,尽管CD20的表达为CD22的15倍,但Emab-CL2A-SN-38相较于Vmab-CL2A-SN-38更有利。因此,剩下的研究集中在单独的与未缀合的维妥珠单抗组合的Emab-SCL2A-N-38上。

[0397] Emab-CL2A-SN-38的剂量-反应和特异性。对于特异性Emab-CL2A-SN-38和不相关Lmab-CL2A-SN-38缀合物看到剂量-反应关系,但Emab-CL2A-SN-38在3个测试水平的2个水平上具有显著更好的生长控制,并且在中等剂量上具有有利于特异性缀合物的强烈趋势(图7)。再次地,0.25mg的Emab-CL2A-SN-38消除了大部分肿瘤;此处,10只动物中有7只在12周监控期结束时不含肿瘤,并且无体重变化。被施予单独的伊立替康(6.5μg/剂量;与0.25mg的缀合物大致相同的SN-38当量)的动物具有1.9周的中位存活时间,11只动物中有3只在研究结束时不含肿瘤,这与对于不相关Lmab-CL2A-SN-38缀合物的3.45周中位存活时间没有显著差异(P=0.452;图7C)。

[0398] 在697-弥漫性白血病模型中,盐水处理的动物的中位存活时间为从肿瘤接种开始仅有17天。被施予未缀合的依帕珠单抗加上伊立替康的动物具有相同的中位存活时间(与0.5mg缀合物相同的SN-38的摩尔当量),而始于肿瘤接种后7天,每周2次被施予0.5mg Emab-CL2A-SN-38的动物存活至24.5天,显著长于未处理的动物($P < 0.0001$)或与伊立替康一起施予的未缀合的依帕珠单抗($P = 0.016$)。然而,Emab-CL2A-SN-38未显著好于不相关缀合物(中位存活时间=22天; $P = 0.304$),最可能反映CD22在该细胞系中的低表达。

[0399] 与未缀合Vmab抗-CD20组合的Emab-CL2A-SN-38。我们先前报道了在皮下Ramos模型中当 ^{90}Y -Emab与未缀合的维妥珠单抗组合时改善的反应(Mattes等,2008,Clin Cancer Res 14:6154-60),因此利用Emab-CL2A-SN-38检查该可能性。在先导研究中,对5只具有平均约 0.3cm^3 的皮下Ramos肿瘤的动物施予维妥珠单抗(0.1mg)、0.1mg的Emab-CL2A-SN-38或Emab-CL2A-SN-38+Vmab(所有试剂,每周2次施予,进行4周)。达到 2.0cm^3 的中位TTP分别为22天、14天和超过77天(维妥珠单抗对比单独的Emab-CL2A-SN-38, $P = 0.59$;Emab-CL2A-SN-38+Vmab对比Emab-CL2A-SN-38, $P = 0.0145$),提供了维妥珠单抗与Emab-CL2A-SN-38的组合增强了总体治疗反应的初步证明。在也使用每周2次进行4周的治疗的随访研究中,11只被施予0.1mg的Emab-CL2A-SN-38加上0.1mg的维妥珠单抗的动物中有6个在处理开始后16周没有肿瘤的证据,然而接受单独的维妥珠单抗或利用0.1mg的对照Lmab-CL2A-SN-38的动物的中位存活时间分别为1.9和3.3周,在这些组的每一组中,11只动物中有3只在16周时是不含肿瘤的(未显示)。尽管具有更长的中位TTP和更多存活者,但在组间未发现显著的差异。因此,在具有丰富的CD20和中等水平的CD22的Ramos模型中,以无毒性剂量水平施予的Emab-CL2A-SN-38缀合物并未显著好于未缀合的抗-CD20治疗,但Emab-CL2A-SN-38至未缀合的抗-CD20治疗的添加似乎增强反应而无毒性。重要地要强调的是,以远低于它们的最大耐受剂量的水平施予SN-38缀合物,从而这些结果不应当被解释为未缀合的抗-CD20治疗等效于Emab-CL2A-SN-38缀合物的治疗。

[0400] 使用具有低CD20和CD22表达的WSU-FSCCL滤泡性NHL细胞系(未显示)在静脉内植入的模型中进行两个另外的研究。盐水处理的动物的中位存活时间为肿瘤植入后40至42天。以含有与0.3mg的ADC相同的SN-38当量的剂量施予的单独的伊立替康(未显示)增加中位存活时间(分别为,49天对比40天; $P = 0.042$),但15只动物中有4只第49天死于疾病进展,同一天,盐水组中15只动物中最终有4只被消除(未显示)。尽管存在其相对低的CD20表达,但单独的维妥珠单抗($35\mu\text{g}$,每周2次,进行4周)在该模型中是有效的。在第一研究中中位存活时间增加至91天,2只被治愈(第161天),在第二研究中中位存活时间增加至77天,在89天后无存活者(单独的维妥珠单抗对比盐水处理的,在两个研究中 $P < 0.001$)。与伊立替康和维妥珠单抗组合的未缀合的依帕珠单抗(0.3mg/剂量)具有与单独的维妥珠单抗相同的中位存活时间,表明依帕珠单抗和伊立替康均对净反应无贡献。

[0401] 如所预期的,由于WSU-FSCCL的低CD22表达,因此单独的Emab-CL2A-SN-38不如在Ramos中一样有效。在0.15-mg剂量上,未看到高于盐水组的显著益处,但在0.3mg上,中位存活时间增加至63天,提供了相较于盐水处理的动物显著的改善($P = 0.006$)。第二天,使用0.3mg的Emab-CL2A-SN-38,确认了相较于盐水组的增加的存活时间(75天对比40天; $P < 0.0001$)。该反应的特异性在第一研究中不明显,其中不相关Lmab-CL2A-SN-38缀合物和Emab-CL2A-SN-38的中位存活时间在0.15-或0.3-mg剂量水平无差异(对于Emab-CL2A-SN-

38对比抗-CEACAM5-CL2A-SN-38缀合物在2个剂量水平上,分别为42天对比49天和63对比63天)。然而,在第二研究中,0.3-mg剂量的Emab-CL2A-SN-38提供了高于不相关缀合物的显著增加的存活时间(75天对比49天; $P<0.0001$)。再次地,在该模型中显示特异性的困难最可能与低CD22表达相关。

[0402] 将特异性Emab-CL2A-SN-38与维妥珠单抗组合显著增加了存活时间,具有比对照Lmab-CL2A-SN-38强劲得多的反应的证据。例如,在第一研究中,利用维妥珠单抗加上0.15或0.3mg的对照缀合物处理的动物分别具有98和91天的中位存活时间,这与单独的维妥珠单抗的产生的存活时间(91天;未显示)相似。然而,维妥珠单抗加上0.15mg的特异性Emab-CL2A-SN-38缀合物使中位存活时间增加至140天。虽然该提高未显著高于单独的维妥珠单抗($P=0.257$),但当将Emab-CL2A-SN-38剂量增加至0.3mg的维妥珠单抗时,10只动物中有6只在研究结束时保持存活,从而提供了高于对照缀合物加上维妥珠单抗的显著的存活有利方面($P=0.0002$)。在第二研究中,单独的维妥珠单抗的中位存活时间比在第一研究中短(77天对比91天),然而对照缀合物和维妥珠单抗的中位存活时间再次为91天,这现在产生了高于单独的维妥珠单抗的显著的存活有利方面($P<0.0001$)。将特异性Emab-CL2A-SN-38缀合物与维妥珠单抗组合使中位存活时间延长至126天,这显著长于分别对于Emab-CL2A-SN-38和单独的维妥珠单抗的75天和77天的中位存活时间(对于每一组, $P<0.0001$)。然而,在本研究中,并没有完全满足对高于与对照抗-CEACAM5-CL2A-SN-38缀合物的组合的统计学上的提高的要求($P=0.078$)。

[0403] 讨论

[0404] 在过去10年中,ADC在癌症治疗中已取得实质性成果,但仍然存在一些挫折。成果主要是在研究者选择检查试剂时取得的,所述试剂毒性太大以至不能单独使用,但当与抗体偶联时,这些所谓的超毒物在临床前试验中产生显著改善的反应。brentuximab vedotin(一种奥利司他汀缀合物)最近被批准用于霍奇金淋巴瘤以及曲妥珠单抗-DM1抗-HER2-美坦辛缀合物作为单一试剂在对于未缀合的曲妥珠单抗是难治疗性的乳腺癌的临床成功表明,这些具有超毒性试剂的ADC正在成为可接受的治疗方式。然而,利用本身具有在皮摩尔范围内的效力的试剂制备的缀合物可具有增加的中毒风险,因为最近决定从市场撤除吉姆单抗奥佐米星(抗-CD33-加利车霉素缀合物)的决定表明了这一点(Ravandi,2011,J Clin Oncol 29:349-51)。因此,ADC的成功可取决于鉴定将药物的抗体结合在一起的适当化学物质,以及确定被充足地表达以允许所述细胞毒性剂的足够和选择性递送的合适的靶。

[0405] 我们开发了用于将SN-38偶联于IgG的CL2A接头,所述接头允许SN-38在血清中从缀合物缓慢释放(约第天50%)。对于该接头,被缓慢内化的抗体可以是有效的治疗剂,可能因为定位至肿瘤伯缀合物局部释放足够量的药物,甚至在未被内化的情况下。最近还将CL2A接头与抗体一起用于据报导被快速内化的TROP-2(Cardillo等,2011,Clin Cancer Res 17:3157-69.)。因此,缓慢释放机制似乎对于内化和非内化抗体是有益的。

[0406] 在该报导中,我们通过比较利用依帕珠单抗(快速内化的抗-CD22IgG)与利用维妥珠单抗(缓慢内化的抗-CD20 IgG)制备的SN-38缀合物,将我们的CL2A接头的评估扩展至B细胞恶性肿瘤的治疗。利用依帕珠单抗的鼠亲代的先前的研究已表明大多数抗体在1小时内内化,并且50%的CD22在5小时内在细胞表面重新表达(Shih等,1994,Int J Cancer 56:538-45)。该内化和再表达过程可允许可能补偿CD22的较低表面表达的细胞内递送。因为许

多B细胞恶性肿瘤表达比CD22多得多的CD20,因此靶向CD20的缀合物可通过在被定位于肿瘤后释放其毒性有效载荷递送更多摩尔的药物。

[0407] 体外细胞毒性研究由于SN-38从缀合物释放至培养基而不能区分特异性缀合物或甚至不相关缀合物的效力。事实上,单独的SN-38的效力比缀合物稍高,这可反映其进入细胞并衔接拓扑异构酶I的加速的能力。因为其它研究显示缀合物在可看到细胞凋亡的早期征兆之前需要48小时的暴露,因此我们得出体外测试不能区分这两种缀合物的效力,从而寻求体内研究。

[0408] 在异种移植模型中,两种缀合物均具有相似的抗Ramos肿瘤的抗肿瘤活性,所述流式细胞术已显示CD20的表达为CD22的近15倍。这为选择Emab抗-CD22-CL2A-SN-38缀合物提供了支持,尤其是因为可将其与未缀合的Vmab抗-CD20治疗组合而无需考虑任一种试剂可干扰另一种试剂的结合。事实上,如果使用抗-CD20-CL2A-SN-38缀合物,则施予的总IgG蛋白剂量可能低于有效的未缀合的抗-CD20抗体治疗所需的水平,因为剂量限制性毒性将由SN-38含量驱动。向抗-CD20-CL2A-SN-38缀合物添加更多未标记的抗-CD20可带来减少缀合物的摄取和潜在地降低其功效的风险。然而,如我们先前在使用放射性标记的依帕珠单抗与未缀合的维妥珠单抗的组合研究中所显示的,益处可来源于以它们的最大有效和安全剂量施予的两种试剂。体外研究显示维妥珠单抗,即使在用于增强信号转导的交联不存在的情况下,亦可加速利用Emab-CL2A-SN-38起始的细胞凋亡事件。因此,只要Emab-CL2A-SN-38缀合物与抗-CD20缀合物一样有效,选择Emab-CL2A-SN-38缀合物就是逻辑选择,因为其允许更有效的联合治疗,即使在其中抗原之一或两者的表达很低的肿瘤中。

[0409] 因为大多数使用超毒性药物的ADC被稳定地连接,因此我们还测试血清稳定的但在细胞内可被裂解的抗-CD22-CL2E-SN-38缀合物,但经测定其效力为CL2A接头的1/55至1/40。其它研究人员已检查了多种缀合于抗-CD20或抗-CD22抗体的超毒性药物,发现内化缀合物通常更具活性,而且还观察到甚至缓慢内化的抗体可以是有效的,如果释放的药物穿过细胞膜的话。虽然CL2A型接头可适合于SN-38,但对于更具毒性的试剂(其中血清中甚至小的持续释放可增强毒性和损害治疗窗)其可能不是最佳的。

[0410] Emab-CL2A-SN-38在具有Ramos的小鼠中在0.6mg的累积剂量(75 μ g,每周2次,进行4周)上是有活性的,这外推出正好2.5mg/kg的人剂量。因此,Emab-CL2A-SN-38应当在患者中具有充足的治疗窗。此外,将有效和安全剂量的抗-TROP-2-CL2A-SN-38缀合物与最大耐受剂量的⁹⁰Y-标记的抗体组合,而无毒性的显著增加,但具有提高的功效(Sharkey等,2011, Mol Cancer Ther 10:1072-81)。因此,这些SN-38抗体缀合物的安全性和功效特征谱对于其它联合治疗是非常有利的。

[0411] 即使伊立替康不被常规地用于治疗造血肿瘤,SN-38在淋巴瘤和白血病细胞系中也与在实体瘤中一样有效(Cardillo等,2011, Clin Cancer Res 17:3157-69.)。在WSU-FSCCL细胞系中,特异性和不相关IgG缀合物显著好于伊立替康,然而在Ramos中,利用不相关缀合物的中位TTP更长,但未显著好于伊立替康。这些结果与其它研究一致,所述其它研究已显示非特异性IgG对于药物是优良的载体并且在体内比游离药物或利用白蛋白或聚乙二醇(PEG)-Fc制备的缀合物更高效。虽然PEG-SN-38缀合物具有显著的抗肿瘤作用,但以其最大耐受剂量(范围在10至30mg/kg SN-38当量内)施予其(Sapra等,2009, Haematologica 94:1456-9)。相反地,在4周中被施予具有Ramos的动物的SN-38的最大累积剂量仅为1.6mg/

kg (即,每周2次0.25mg的Emab-SN-38的给药,进行4周)并且该剂量是无毒的。

[0412] Emab-CL2A-SN-38的特异性治疗活性在具有较高CD22表达的细胞系似乎提高。例如,在Ramos中,在所检查的3个不同的剂量水平的2个水平上记录了单独的Emab-CL2A-SN-38的特异性治疗作用,并且相当多数量的肿瘤被完全消除。相反地,在具有约10/25的CD22表达的WSU-FSCCL中,Emab-CL2A-SN-38在2个研究中的1个研究中相较于不相关抗-CEACAM5-CL2A-SN-38缀合物显著增加了存活时间。然而,重要地要强调的是,当与未缀合的抗-CD20治疗组合使用时,Emab-CL2A-SN-38扩大了治疗反应。因此,这两种治疗的组合可以甚至在其中CD22未被高度表达的情况下增强反应。

[0413] 总之,通过使用不太稳定的CL2A-SN-28接头,Emab抗-CD22-CL2A-SN-38缀合物在体内在无毒性剂量上与相似的抗-CD20-CL2A-SN-38缀合物具有等同的活性,尽管事实上CD20的表达为CD22的对数倍。甚至当CD22表达很低时,治疗反应仍受益于Emab-CL2A-SN-38与未缀合的Vmab抗-CD20治疗的组合,这表明当两种抗原均存在时,所述联合治疗可在许多B细胞恶性肿瘤中增强反应。当前的研究表明,该组合在多种淋巴瘤和白血病临床前模型中非常有效,而且似乎具有较低的宿主毒性。

[0414] 实施例6. 用于治疗CD74+人癌症的抗-CD74-CL2A-SN-38缀合物

[0415] CD74为抗体-药物缀合物(ADC)的有吸引力的靶,因为其在抗体结合后内化并且再循环。CD74主要与血液肿瘤相关,但也在实体瘤中表达。因此,检查利用人源化抗-CD74抗体米拉珠单抗制备的ADC用于治疗表达CD74的实体瘤的效用。利用可裂解的接头(CL2A和CL2E(差异在于它们在血清的稳定性以及它们如何在溶酶体中释放SN-38))制备米拉珠单抗-多柔比星和两种米拉珠单抗-SN-38缀合物。通过流式细胞术和免疫组织学测定CD74表达。在人癌细胞系A-375(黑素瘤)、HuH-7和Hep-G2(肝细胞瘤)、Capan-1(胰腺)和NCI-N87(胃)以及Raji伯基特淋巴瘤中进行体外毒性和体内治疗研究。在表达它们的靶抗原的异种移植物中比较米拉珠单抗-SN-38 ADC与利用抗-TROP-2和抗-CEACAM6抗体制备的SN-38 ADC。

[0416] 米拉珠单抗-多柔比星在淋巴瘤模型中最有效,然而在A-375和Capan-1中,只有米拉珠单抗-CL2A-SN-38显示治疗益处。尽管CD74的表面表达比TROP-2或CEACAM6低得多,但米拉珠单抗-CL2A-SN-38在Capan-1中具有与抗-TROP-2-CL2A-SN-38相似的功效,但在NCI-N87中,抗-CEACAM6和抗-TROP-2缀合物是更优的。在单一剂量水平上在2个肝细胞瘤细胞系中进行的研究显示优于盐水处理的动物的显著益处,但针对不相关IgG缀合物未显示所述益处。CD74在一些实体瘤异种移植物中为ADC的合适的靶,功效主要受CD74表达的均匀性影响,并且对于CL2A-连接的SN-38缀合物,提供了最佳治疗反应。

[0417] 引言

[0418] 称为不变链或Ii的CD74为II型跨膜糖蛋白,其与HLA-DR缔合并抑制抗原性肽与II类抗原呈递结构的结合。其用作伴侣分子,将不变链复合物导向内体和溶酶体,通过使用由NF-kB介导的途径在B细胞的成熟中,或通过与CD44相互作用在T细胞应答中用作辅助分子(Naujokas等,1993,Cell 74:257-68),并且其为促炎细胞因子、巨噬细胞游走抑制因子的受体(Leng等,2003,J Exp Med 197:1467-76),其参与激活细胞增殖和存活途径。

[0419] 在正常人组织中,CD74主要在B细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突细胞、朗格汉斯细胞、活化的T细胞的亚组和胸腺上皮(未显示)中表达,并且其在超过90%的B细胞肿瘤中表达(Burton等,2004,Clin Cancer Res 10:6606-11;Stein等,2004,Blood 104:3705-11)。

早期研究关于CD74是否存在于膜上具有矛盾的数据,部分因为针对不变链的抗体对于分子的细胞质部分是特异的,而且还因为在表达上存在相对少的拷贝,以及其在细胞表面上的半衰期非常短。细胞表面上约80%的CD74与MHC II抗原HLA-DR缔合(Roche等,1993,PNAS USA 90:8581-85)。通过使用鼠抗-CD74抗体LL1,估计Raji伯基特细胞系具有 4.8×10^4 个拷贝/细胞,但由于快速细胞内转运,每天 $\sim 8 \times 10^6$ 个抗体分子被内化和分解代谢(Hansen等,1996,Biochem J 320:293-300)。因此,CD74内化是高度动态的,抗体被从表面快速除去并且在细胞内卸载,随后CD74在表面上再表达。Fab'内化正好与IgG结合一样快地发生,这表明不需要双价结合。利用鼠LL1的CDR移植形式米拉珠单抗(hLL1)的后来研究发现,所述抗体可改变B细胞增殖、迁移和粘附分子的表达(Stein等,2004,Blood 104:3705-11;Qu等,2002,Proc Am Assoc Cancer Res 43:255;Frolich等,2012,Arthritis Res Ther 14:R54),但抗-CD74抗体的意外内化性质使得其成为用于癌症治疗剂的细胞内递送的高效载体(例如,Griffiths等,2003,Clin Cancer Res 9:6567-71)。基于临床前研究和毒理学结果,在多发性骨髓瘤(Kaufman等,2008,ASH Annual Meeting Abstracts,112:3697)以及非霍奇金淋巴瘤和慢性淋巴细胞性白血病中利用米拉珠单抗-多柔比星的I期临床试验已经开始。

[0420] 有趣的是,CD74也在非血液肿瘤癌,诸如胃癌、肾癌、膀胱癌、非小细胞肺癌、某些肉瘤和成胶质细胞瘤中表达(例如,Gold等,2010,Int J Clin Exp Pathol 4:1-12),从而使得其可成为用于表达该抗原的实体瘤的治疗靶。由于米拉珠单抗-多柔比星缀合物在血液肿瘤的模型中具有高度活性,其为用于该评估的逻辑选择。然而,我们最近开发了用于交高效拓扑异构酶I抑制剂SN-38偶联于抗体的方法。SN-38为伊立替康的活性形式,其药代动力学和代谢是公知的。这些缀合物在实体瘤细胞系中具有纳摩尔的效力,并且被发现活化未被活跃内化的抗体。先前的研究显示了对允许SN-38在血清中以 ~ 1 天的半衰期从缀合物解离的接头(CL2A)而非在血清中更稳定或更不稳定的其它接头的偏爱。然而,鉴定米拉珠单抗的意外内化能力,开发了在血清中高度稳定但当被摄入溶酶体后可释放SN-38的新的接头(CL2E)。

[0421] 目前的研究检查了将这3种米拉珠单抗抗-CD74缀合物(一种具有多柔比星,两种具有SN-38缀合物)用于主要针对实体瘤的有效治疗的前景。

[0422] 材料和方法

[0423] 人肿瘤细胞系。Raji伯基特淋巴瘤A-375(黑素瘤)、Capan-1(胰腺腺癌)、NCI-N87(胃癌)、Hep-G2肝细胞瘤和MC/CAR骨髓瘤细胞系购自美国典型培养物保藏中心(Manassas, VA)。HuH-7肝细胞瘤细胞系购自日本卫生科学研究资源库(Osaka, Japan)。将所有细胞系在37℃、潮湿的CO₂培养箱(5%)中培养于推荐的含有10%至20%的胎牛血清和补充剂的培养基中。将细胞传代 < 50 次,定期检查其霉菌菌。

[0424] 抗体和缀合方法。米拉珠单抗(抗-CD74 MAb)、依帕珠单抗(抗-CD22)、维妥珠单抗(抗-CD20)、拉贝珠单抗(抗-CEACAM5)、hMN15(抗-CEACAM6)和hRS7(抗-TROP-2)为人源化IgG1单克隆抗体。如上文中实施例所述,制备CL2A和CL2E接头和它们的SN-38衍生物并将其缀合物抗体。如先前所述(Griffiths等,2003,Clin Cancer Res 9:6567-71),制备米拉珠单抗-多柔比星缀合物。通过IgG的二硫化物还原,随后与这些接头的对应的马来酰亚胺衍生物反应来制备所有缀合物。分光光度分析估计的药物:IgG摩尔取代比为5-7(1.0mg的蛋

白质含有~16μg的SN-38或25μg的多柔比星当量)。

[0425] 体外细胞结合和细胞毒性。比较未缀合的和缀合的米拉珠单抗对抗原阳性细胞的结合的测定以及细胞毒性测试使用MTS染料还原法 (Promega, Madison, WI)。

[0426] 流式细胞术和免疫组织学。以提供仅膜结合的抗原或膜及细胞质抗原的评估的方式进行流式细胞术。使用10μg/mL的利用抗人IgG缀合物显现的抗体,利用无抗原修复的染色法,对皮下肿瘤异种移植物的福尔马林固定、石蜡包埋的切片进行免疫组织学。

[0427] 体内研究。雌性裸小鼠(4-8周龄)或雌性SCID小鼠(7周龄)购自Taconic (Germantown, NY) 并且在1周的隔离检疫后使用。每周2次腹膜内施用所有试剂,包括盐水对照,进行4周。结果中给出具体剂量。通过每周重量测量来评估毒性。对于Raji伯基特淋巴瘤模型,用0.1mL培养基中的 2.5×10^6 Raji细胞静脉内注射SCID小鼠。5天后,动物接受缀合物或盐水的单次静脉内注射(0.1mL) (N=10/组)。每天观察小鼠的痛苦和瘫痪的体征,当两个后肢瘫痪都发生, >15%的初始体重减轻,或如果另外地垂死(替代存活终点)时无痛致死小鼠。

[0428] 通过卡尺在两个维度上测量皮下肿瘤,肿瘤体积(TV) 计算为 $L \times w^2/2$,其中L为最长直径并且w为最短直径。至少每周进行一次测量,当肿瘤生长至 1.0cm^3 (即,替代存活终点)时结束动物。将A-375黑素瘤细胞系(6×10^6 个细胞,于0.2mL中)植入裸小鼠中,当肿瘤为平均 $0.23 \pm 0.06\text{cm}^3$ (N=8/组)时开始治疗。使用与来自组织培养的 8×10^6 个细胞组合的来自连续传代的肿瘤的肿瘤悬浮液(0.3mL的15%w/v肿瘤悬浮液)的组合将Capan-1皮下植入裸小鼠中。当TV平均为 $0.27 \pm 0.05\text{cm}^3$ (N=10/组)时开始治疗。通过皮下注射0.2mL的基质胶与来自最终培养的 1×10^7 个细胞的1:1 (v/v) 混合物来开始NCI-N87胃肿瘤异种移植。当TV平均为 $0.249 \pm 0.045\text{cm}^3$ (N=7/组)时开始治疗。将相同的方法用于在裸小鼠中发展Hep-G2和HuH-7肝细胞瘤异种移植。当Hep-G2平均为 $0.364 \pm 0.062\text{cm}^3$ (N=5/组) 以及HuH-7平均为 $0.298 \pm 0.055\text{cm}^3$ (N=5/组)时,开始治疗。

[0429] 使用上述替代终点测定平均存活时间来在卡普兰-迈耶曲线中表达功效。使用Prism GraphPad软件 (LaJolla, CA) 利用对数秩 (Mantel-Cox) 检验进行统计分析,显著性设置在 $P < 0.05$ 。

[0430] 结果

[0431] 人肿瘤细胞系和异种移植中的CD74表达。主要基于经透化的细胞的分析,将来源于4个不同实体瘤类型的6个细胞系鉴定为CD74阳性(表10),因为实体瘤细胞系中的仅膜结合的CD74的MFI通常不到本底MFI的2倍(除A-375黑素瘤细胞外)。Raji中的表面CD74表达为实体瘤细胞系的5倍以上,但经透化的Raji细胞中的总CD74与大多数实体瘤细胞系相似。

[0432] 表10. 通过流式细胞术测量的表达为米拉珠单抗-阳性门控细胞的平均荧光强度(MFI)的CD74表达

		表面		表面和细胞质		
细胞系		hLL1 (bkgd) ^a	MFI 比率 hLL1:bkg d	hLL1 (bkgd) ^b	MFI 比率 hLL1:bkgd	
[0433]	Panc CA ^c	Capan-1	22(12)	1.8	248(5)	49.6
	胃	Hs746T	17(8)	2.1	144(5)	28.8
		NCI-N87	5(4)	1.3	220(6)	36.7
	黑素瘤	A-375	16(3)	5.3	185(6)	30.8
	肝细胞瘤	Hep-G2	9(6)	1.5	156(5)	31.2
		HuH-7	8(5)	1.6	114(4)	28.5
	淋巴瘤	Raji	59(3)	19.6	143(5)	28.6

[0434] ND, 未进行

[0435] ^a仅用GAH-FITC孵育的细胞的本底MFI。

[0436] 免疫组织学显示Raji皮下异种移植物具有高度均匀和强烈的染色, 具有显著的细胞表面标记(未显示)。Hep-G2肝细胞瘤细胞系具有实体瘤的最均匀摄取, 适当强的但主要在细胞质中的染色(未显示), 接下来是具有稍微不太均匀但更强的染色, 仍然主要在细胞质中的表达(未显示)的A-375黑素瘤细胞系。Capan-1胰腺(未显示)和NCI-N87(未显示)胃癌细胞系具有适度(Capan-1)至强烈(NCI-N87)的CD74染色, 但其不均匀分布。HuH-7肝细胞瘤细胞系(未显示)具有最低的均匀性和最弱的染色。

[0437] 缀合物的免疫反应性。未缀合的米拉珠单抗、米拉珠单抗-CL2A-SN-38和米拉珠单抗-CL2E-SN-38缀合物的K_d值没有显著差异, 分别地平均为0.77nM、0.59nM和0.80nM。MC/CAR多发性骨髓瘤细胞系中测量的未缀合的和缀合有多柔比星的米拉珠单抗的K_d值分别为0.5±0.02nM和0.8±0.2nM(Sapra等, 2008, Clin Cancer Res 14:1888-96)。

[0438] 缀合物的体外药物释放和血清稳定性。在部分模拟溶酶体条件的环境(即, 低pH (pH 5.0))中, 和在组织蛋白酶B存在或不存在的条件下测定SN-38从巯基乙醇封端的CL2A和CL2E接头的释放机制。CL2E-SN-38底物在所述酶不存在的情况下(未显示)在pH5下是惰性的, 但在组织蛋白酶B存在的情况下, Phe-Lys位点上的裂解快速进行, 具有34分钟的半衰期(未显示)。活性SN-38的形成需要SN-38的第10个位置上的氨基甲酸酯键的分子内环化, 这更缓慢地发生, 具有10.7小时的半衰期(未显示的)。

[0439] 如所预期的, 组织蛋白酶B对CL2A接头中的活性SN-38的释放没有影响。然而, CL2A具有可裂解的苄基碳酸酯键, 在pH 5.0以与CL2E接头相似的速率释放活性SN-38, 半衰期为~10.2小时(未显示)。具有pH敏感性酰胺键的米拉珠单抗-多柔比星在pH 5.0下具有7至8小时的半衰期(未显示)。

[0440] 虽然所有这些接头在溶酶体相关条件下以相对相似的速率释放药物, 但它们在血清中具有极不相同的稳定性。米拉珠单抗-CL2A-SN-38在21.55±0.17h(未显示)内释放50%的游离SN-38, 与其它CL2A-SN-38缀合物一致。然而, CL2E-SN-38缀合物是高度惰性的, 半衰期经外推为~2100小时。米拉珠单抗-多柔比星缀合物在98小时释放50%的多柔比星, 这与2种其它抗体-多柔比星缀合物(未显示)相似。

[0441] 细胞毒性。涉及这些缀合物的评估的重要问题是游离多柔比星和SN-38在血液肿瘤和实体瘤细胞系中的相对效力。我们组先前报导SN-38在几种B细胞淋巴瘤和急性白血病细胞系中具有活性, 效力在0.13至2.28nM的范围内(Sharkey等, 2011, Mol Cancer Ther

11:224-34)。在随后用于体内治疗研究的4个实体瘤细胞系中的SN-38的效力在2.0至6nM的范围内(未显示)。多柔比星具有混合反应,在Raji淋巴瘤和A-375黑素瘤细胞系中具有3-4nM的效力,但针对Capan-1、NCI-N87和Hep G2细胞系的效力大致为1/10。比较SN-38与多柔比星的效力的其它研究发现:LS174T结肠癌,18对比18(分别地,SN-38对比多柔比星的nM效力);MDA-MB-231乳腺癌,2对比2nM;SK-OV-4卵巢癌,18对比90nM;Calu-3肺腺癌,32对比582nM;Capan-2胰腺癌,37对比221nM;和NCI-H466小细胞肺癌,0.1对比2nM。因此,在这6个细胞系中的4个细胞系中,SN-38的效力为多柔比星的5至20倍,在LS174T与MDA-MB-231中具有相似的效力。综上所述,这些数据表明多柔比星针对实体瘤不如SN-38有效,然而SN-38在实体瘤和造血组织肿瘤中似乎同样有效。

[0442] 如所预期的,所述3个缀合物形式的效力在体外通常比游离药物低数个数量级,因为预期两种药物均被容易地运输至细胞内,然而药物缀合物需要抗体结合来将药物运输至细胞内(未显示)。CL2A连接的SN-38缀合物例外,因为超过90%的SN-38在4天的测定期中从缀合物释放进介质中(Cardillo等,2011,Clin Cancer Res 17:3157-69;Sharkey等,2011,Mol Cancer Ther 11:224-34)。因此,甚至当缀合物被快速内化时,仍然难以辨别游离药物与CL2A-连接的药物之间的差异。

[0443] 相较于游离SN-38,稳定的CL2E-连接的SN-38在Raji细胞系中表现相当好,但其在4个实体瘤细胞系具有显著(7至16倍)更低的效力,表明CD74的相对低的表面表达可能在使药物在这些实体瘤中的运输降至最低中起作用。米拉珠单抗-多柔比星缀合物,当在所有细胞系中与游离多柔比星比较时,在其效力上具有显著差异,所述差异具有与CL2E-SN-38缀合物在实体瘤细胞系中相对游离SN-38的相似的量级。

[0444] 在上述6个另外的细胞系中,米拉珠单抗-CL2A-SN-38缀合物的效力为米拉珠单抗-多柔比星缀合物的9至60倍(未显示),但再次地,该结果很大程度上受如下事实影响,即CL2A-连接的缀合物在4天的孵育期中将大多数其SN-38释放至介质中,然而多柔比星缀合物在该相同的时间内至多释放50%的其药物。未在这些其它细胞系统中检查CL2E-连接的米拉珠单抗。

[0445] 人肿瘤异种移植物的体内治疗。利用用各种抗体制备的米拉珠单抗-多柔比星或SN-38缀合物的先前的体内研究已表明,它们在远低于它们的最大耐受剂量的剂量上是有效的(Griffiths等,2003,Clin Cancer Res 9:6567-71;Sapra等,2005,Clin Cancer Res 11:5257-64;Govindan等,2009,Clin Cancer Res 15:6052-61;Cardillo等,2011,Clin Cancer Res 17:3157-69;Sharkey等,2011,Mol Cancer Ther 11:224-34),从而体内测试集中在于被良好耐受的水平上比较相似但固定的量的每一种缀合物。

[0446] 初步研究首先在骨髓瘤的弥漫性Raji模型检查多柔比星和SN-38缀合物以估计米拉珠单抗-多柔比星缀合如何与2种SN-38缀合物相比较(未显示)。所有特异性缀合物显著好于非靶向拉贝珠单抗-SN-38缀合物或盐水处理的动物(其具有仅20天的中位存活时间)($P < 0.0001$)。尽管体外研究显示在Raji中对于SN-38缀合物的多达8倍的有利方面,但对于米拉珠单抗-多柔比星缀合物看到最长存活时间,其中所有被施予单一17.5mg/kg (350 μ g)剂量的动物和7/10的被施予2.0mg/kg (40 μ g)的动物在研究结束时(第112天)活着(例如,17.5mg/kg的剂量的米拉珠单抗-多柔比星对比米拉珠单抗-CL2A-SN-38, $P = 0.0012$)。对于更加稳定的CL2E-SN-38缀合物存活显著更低(对于CL2A对比CL2E,分别为17.5和2.0mg/kg

的剂量,分别 $P < 0.0001$ 和 $P = 0.0197$),即使体外研究表明两种缀合物,当被内化时以相似的速率释放活性SN-38。

[0447] 始于A-375黑素瘤细胞(因为其对多柔比星和SN-38均具有最佳体外反应),检查了5个实体瘤细胞系。A-375异种移植物快速生长,盐水处理的对照动物具有仅10.5天的中位存活时间(未显示)。12.5mg/kg (0.25mg/动物) (每周2个剂量)的米拉珠单抗-CL2A-SN-38缀合物使存活时间延长至28天($P = 0.0006$),所述存活时间显著好于具有17.5天的中位存活时间的对照依帕珠单抗-CL2A-SN-38缀合物($P = 0.0089$),后者与盐水处理的动物没有显著差异($P = 0.1967$)。米拉珠单抗-CL2A缀合物提供了比米拉珠单抗-CL2E-SN-38缀合物显著更长的存活时间($P = 0.0014$),所述米拉珠单抗-CL2E-SN-38缀合物具有与其对照依帕珠单抗-CL2E-SN-38缀合物相同的14天的中位存活时间。尽管施予为SN-38缀合物2倍的剂量的米拉珠单抗-多柔比星,但中位存活时间并未好于盐水处理的动物(10.5天)。

[0448] 与A-375黑素瘤模型一样,在Capan-1中,仅CL2A-连接的SN-38缀合物是有效的,具有35天的中位存活时间,与未处理的动物显著不同($P < 0.036$) (未显示),甚至在更低的剂量(5mg/kg; 100 μ g/动物) ($P < 0.02$) 上亦如此。米拉珠单抗-CL2E和非靶向依帕珠单抗-CL2A-SN-38缀合物,或高致2倍剂量的米拉珠单抗-多柔比星缀合物,提供任何存活有利方面($P = 0.44$ 对比盐)。值得指出的是,在采用被施予相同剂量的内化抗-TROP-2 CL2A-SN-38缀合物(hRS7-SN-38; IMMU-132)的动物的相同研究中,中位存活时间等于米拉珠单抗-CL2A-SN-38(未显示)。先前已将hRS7-CL2A-SN-38缀合物鉴定为用于治疗多种实体瘤的目标ADC(Cardillo等,2011,Clin Cancer Res 17:3157-69)。相较于对于米拉珠单抗的22(参见图10),Capan-1的表面结合hRS7的MFI为237(未显示)。因此,尽管具有显著较低的表面抗原表达,但米拉珠单抗-CL2A-SN-38缀合物在该模型中表现与hRS7-CL2A-SN-38缀合物一样好。

[0449] 由于米拉珠单抗-多柔比星缀合物在2个实体瘤异种移植物中具有较差的治疗结果,因此研究转向比较米拉珠单抗-SN-38缀合物与利用针对TROP-2(hRS7)或CEACAM6(hMN-15)的其它人源化抗体制备的SN-38缀合物,所述TROP-2或CEACAM6在许多实体瘤的表面上被更高度地表达(Blumenthal等,2007,BMC Cancer 7:2;Stein等,1993,Int J Cancer 55:938-46)。检查了3个另外的异种移植物模型。

[0450] 在胃肿瘤模型中NCI-N87中,被施予17.5mg/kg/剂(350 μ g)的米拉珠单抗-CL2A-SN-38的动物在存活时间上提供了一定的改善,但其不能满足相较于盐水处理的动物(31天对比14天; $P = 0.0760$)或相较于非结合维妥珠单抗抗-CD20-CL2A-SN39缀合物(21天; $P = 0.3128$) (未显示)的统计显著性。然而,hRS7-和hMN-15-CL2A缀合物分别显著地使中位存活时间延长至66天和63天($P = 0.0001$)。表面表达的TROP-2和CEACAM6的MFI分别为795和1123,远高于正好为5天的CD74(参见表10)。免疫组织学显示CD74在该细胞的异种移植物中的相对强的细胞质表达,但重要的是,其被分散,仅出现在肿瘤内的确定的口袋中(未显示)。CEACAM6和TROP-2比CD74更均匀地表达(未显示),CEACAM6更强地存在于细胞质中和膜上,并且发现TROP-2主要存在于膜上。因此,利用抗-CEACAM6和抗-TROP-2缀合物产生的延长的存活时间最可能反映NCI-N87中的较高的抗原密度和更均匀的表达。

[0451] 在Hep-G2肝细胞瘤细胞系(未显示)中,免疫组织学显示CD74的非常均匀的表达和适度的细胞质染色,并且流式细胞术显示相对低的表面表达(MFI=9)。对于hMN-15的MFI为

175并且免疫组织学显示CEACAM6的相当均匀的膜和细胞质表达,分离的口袋具有非常强的膜染色(未显示)。具有Hep-G2异种移植物的动物中的研究发现米拉珠单抗-CL2A-SN-38使存活时间延长至45天(相较于盐水处理组中的21天)($P=0.0048$),而hMN-15-CL2A-SN-38缀合物将存活时间延长至35天。存在优于hMN-15-CL2A-SN-38的有利于米拉珠单抗缀合物的趋势,但其未达到统计显著性(46天对比35天; $P=0.0802$)。然而,非结合的维妥珠单抗-CL2A-SN-38缀合物提供了与米拉珠单抗缀合物相似的存活有利方面。我们先前观察到利用非结合缀合物的治疗结果可与特异性CL2A-连接的缀合物相似,特别是在较高的蛋白质质量上,但特异性和对照缀合物的滴定通常选择性地显示。因此,特异性缀合物在这该细胞系中在这些剂量上都未提供选择性治疗有利方面。

[0452] 使用具有与Hep-G2(参见表10)相似的表面表达但略微更低的细胞质水平的HuH-7肝细胞瘤细胞系(未显示)的另一个研究,发现hMN-15-SN-38缀合物提供比米拉珠单抗-CL2A缀合物更长(35天对比18天)(虽然无显著差异)的存活有利方面($P=0.2944$)。虽然hMN-15和米拉珠单抗缀合物均显著好于盐水处理的动物(分别地, $P=0.008$ 和 0.009),但再次地,两种缀合物在该剂量水平上与非靶向维妥珠单抗-SN-38缀合物没有显著差异(分别地, $P=0.4602$ 和 0.9033)。CEACAM6表面表达在该细胞系相对低(MFI=81),并且免疫组织学显示CD74(未显示)和CEACAM6(未显示)非常弱并且高度分散。

[0453] 讨论

[0454] 用于肿瘤选择性化疗的抗体-药物缀合物(ADC)法是目前相当吸引人的领域(例如,Govindan等,2012,Expert Opin Biol Ther 12:873-90;Sapra等,2011,Expert Opin Biol Ther 20:1131-49。最近的临床成功(Pro等,2012,Expert Opin Biol Ther 12:1415-21;LoRusso等,2011,Clin Cancer Res 17:437-47)已在很大程度上通过采用超毒性药物替代先前已被使用的常规化学治疗剂而发生。然而,靶选择、抗体和药物接头是影响ADC的最佳性能的所有因素。例如,在曲妥珠单抗-DM1的情况下,HER2在表达该抗原的肿瘤上非常丰富,抗体被内化,并且抗体本身具有抗-肿瘤活性,所有这些可组合来增强治疗结果。形成鲜明对比的是,CD74以低得多的水平在细胞表面上表达,但其独特的内化和表面再表达性质已允许米拉珠单抗抗-CD74ADC在造血肿瘤异种移植模型中,甚至在利用适度毒性的药物诸如多柔比星的情况下,是有效的(Griffiths等,2003,ClinCancer Res 9:6567-71;Sapra等,2005,Clin Cancer Res 11:5257-64)。虽然多柔比星被更频繁地用于造血肿瘤中,但当向具有实体瘤的患者施用SN-38和其它喜树碱时,我们决定评估米拉珠单抗的多柔比星和SN-38缀合物在实体瘤中的功效。米拉珠单抗-多柔比星缀合物在各种血液肿瘤的异种移植模型中是有效的,从而导致其临床试验(NCT01101594和NCT01585688),而几种SN-38缀合物在实体瘤和血液肿瘤模型中是有效的,从而导致2种新的SN-38缀合物用于结直肠癌和多种上皮癌的I期临床试验(NCT01270698和NCT01631552)。

[0455] 在体外,未缀合的多柔比星和SN-38具有与多柔比星相似的抗Raji淋巴瘤细胞系的效力,但SN-38在许多不同的实体瘤细胞系中具有更强的效力。有趣的是,在体内,米拉珠单抗-多柔比星缀合物在Raji中相较于米拉珠单抗-SN-38缀合物提供最佳反应。然而,在Capan-1和A-375中,米拉珠单抗-多柔比星不如CL2A-连接的SN-38米拉珠单抗缀合物有效,即使体外测试已表明A-375与游离多柔比星对SN-38同样敏感。两个其它细胞系MDA-MB-231乳腺癌和LS174T结肠癌细胞系在体外对于游离的多柔比星与对于SN-38具有相似的效力,

但由于体外测试表明SN-38在实体瘤与血液肿瘤中同样有效,并且SN-38在大多数评估的实体瘤细胞系中的效力为多柔比星的5至20倍,因此我们决定集中在用于实体瘤治疗的2种米拉珠单抗-SN-38缀合物上。然而,为了更好地估计米拉珠单抗-SN-38缀合物的功效,我们包括对利用针对存在于多种实体瘤中的其它抗原的抗体制备的SN-38 ADC的比较评估。

[0456] 我们先前已在Capan-1细胞中研究了对于内化hRS7抗-TR0P-2CL2A-连接SN-38缀合物的治疗反应(Cardillo等,2011,Clin Cancer Res 17:3157-69),从而比较米拉珠单抗与hRS7 SN-38缀合物的功效。在本研究中,两种缀合物相较于对照抗体均显著延长了存活时间,每一种CL2A-连接的SN-38缀合物都优于CL2E-连接的缀合物。由于流式细胞术已显示在Capan-1中TR0P-2的表达高于CD74,因此该结果表明,已知为例外的CD74的转运能力比TR0P-2高效。然而,众所周知,肿瘤内的细胞间的抗原可及性(即,膜对比细胞质,生理学和“结合位点”屏障)和分布是影响靶向治疗(特别是取决于产品至个体细胞的充足的细胞内递送的那些治疗)的每一种形式的至关重要的因素(Thurber等,2008,Adv Drug Del Rev 60:1421-34)。在其中抗原在肿瘤内的所有细胞中不均匀表达的情况下,具有在定位于肿瘤中后缓慢释放其有效负载的靶向试剂诸如CL2A-连接的缀合物,可允许药物扩散至非靶向旁观者细胞,从而增强其功效范围。事实上,根据结合位点势垒效应,高抗原表达可潜在地阻碍肿瘤穿透,但细胞外释放机制可提供用于药物在肿瘤内扩散的机制。该机制也被认为有助于我们已使用很少内化的抗体诸如本文所用的抗-CEACAM5和抗-CEACAM6检查的其它缀合物的功效。基于米拉珠单抗的缀合物更严重地依赖于抗体与肿瘤细胞的直接相互作用,从而利用CD74'的快速内化和再表达(这可补偿其在细胞表面上的较低丰度)。然而,当CD74在肿瘤内高度分散时,该有利方面将被削弱,并且由于没有将缀合物保留在肿瘤内的机制,药物从缀合物缓慢释放的益处将丧失。由我们组对人胃肠肿瘤所作的先前综述提出,它们通常具有高水平的表达和良好的均匀性(Gold等,2010,Int J Clin Exp Pathol 4:1-12)。

[0457] 在我们的对用于SN-38的合适的接头的初步评估过程中,检查了许多不同的衍生物,包括被设计来被偶联至SN-38的20-羟基位置(与CL2A接头类似)的'CL2E'-接头。然而,该抗体缀合物缺乏充足的抗肿瘤活性,从而被放弃。鉴于米拉珠单抗的意外的内化性质,我们决定再回到SN-38-接头化学,假设CD74缀合物的快速内化可增强更稳定的缀合物的药物负载。我们推测如果离去基团是酚,则这可促进环化,从而CL2E-接头被设计来在SN-38的酚10-位置上联接。

[0458] 开始时,CL2E-连接的SN-38缀合物在Raii细胞系中具有与CL2A缀合物有前景地相似的IC₅₀,这与如果被快速内化,则两种缀合物均可以大致相同的速度释放SN-38的活性形式的观点一致。然而,如已提及的CL2A缀合物的体外活性很大程度上受到SN-38至培养基中的释放影响,并且不一定反映完整缀合物的摄入。当发现CL2E-连接的缀合物在实体瘤细胞系中的效力远低于CL2A缀合物时,这表明CD74的较低表面表达影响通过米拉珠单抗结合的SN-38的内化。然而,当Raji中的体内研究显示米拉珠单抗-CL2A-SN-38优于CL2E缀合物时,必需考虑可影响CL2E的功效的一些其它因素。一个可能的解释是CL2E-SN-38中的接头设计使药物20-位置未产生衍生,从而使内酯基团易于开环。事实上,利用伊立替康的研究已显示SN-38的效力可被许多因素降低,内酯环打开成羧化物形式仅具有10%的完整内酯形式的效力。相反地,CL2A-连接的SN-38在20-羟基位置被衍生,一个在生理条件下稳定喜树碱

中的内酯基团的过程。因此,SN-38的内酯环可能在CL2A中而非CL2E缀合物中得到保护而免于裂解。因此,内酯环的去稳定化可促成CL2E的体内功效降低。由于体外稳定性研究和血清稳定性的分析是在酸性条件下进行的,因此我们不具有这两种缀合物中的SN-38的羧化物形式的直接测量。

[0459] 总之,体外和体内结果表明米拉珠单抗-多柔比星缀合物在Raii淋巴瘤细胞中优于CL2A-SN-38缀合物,这可反映多柔比星缀合物相较于CL2A缀合物的提高的稳定性。然而,CL2A-SN-38缀合物比高度稳定的CL2E-SN-38缀合物有效的发现表明潜在地与药物的激活或细胞系敏感性相关的其它问题可能在起作用。

[0460] CD74在细胞生物学中具有多个作用;在抗原呈递细胞中,其可在加工抗原性肽中具有更主导的作用,在为实体瘤的情况下,其作用可能与存活更加相关。这些不同的作用可影响细胞内运输和加工。或者,CL2E-连接的SN-38的较低的功效可反映因SN-38中的内酯环打开而导致的药物失活,暗示着特定接头的重要性。最后,在实体瘤模型中,当针对利用其它内化(hRS7)或为更加可及(表面表达的)和丰富的很少内化的抗体(hMN15)制备的缀合物测量时,抗原可及性似乎在确定米拉珠单抗-CL2A-SN-38的效力中具有主导作用。我们推测该发现对于靶向治疗是普遍的,但这些研究已至少表明CD74-靶向剂的独特内化性质可以甚至在靶抗原的表面表达最低时提供显著的功效。

[0461] 实施例7.hRS7-SN-38(IMMU-132)用于治疗难治性转移性结肠癌(mCRC)的用途

[0462] 患者为最初在2012年1月显示转移性疾病的具有mCRC的62岁妇女。她在诊断后数周具有腹腔镜下回肠横结肠切除术作为第一治疗,随后在新辅助设置中接受4个周期的FOLFOX(亚叶酸、5-氟尿嘧啶、奥沙利铂)化学治疗,随后在2012年3月进行右肝切除术以除去肝的右叶中的转移病灶。这之后,进行在2012年6月重新开始的辅助FOLFOX方案,进行总共12个周期的FOLFOX。在8月份,因不断加重的神经毒性而降低奥沙利铂。她的最后一个5-FU的周期是在2012年9月25日。

[0463] 2013年1月进行的CT显示至肝的转移灶。她随后被评估为加入IMMU-132(hRS7-CL2A-SN-38)调查研究的良好候选者。她的医疗史中的并存病包括哮喘、糖尿病、高血压、高胆固醇血症、心脏杂音、食管裂孔疝、甲状腺功能减退、腕隧道综合症、青光眼、抑郁症、多动腿综合征和神经病变。她的外科手术历史包括输卵管结扎(1975)、甲状腺切除术(1983)、胆囊切除术(2001)、腕隧道释放(2008)和青光眼手术。

[0464] 在进入该试验时,她的靶病变为肝的左叶中的3.1-cm的肿瘤。非靶病变包括肝中的几个低衰减肿块。她的基线CEA为781ng/m。

[0465] 在所述患者签署知情同意后,按照每周一次的方案,通过输注施予IMMU-132,进行连续2周,随后休息1周,这构成一个治疗周期。只要被耐受,重复这些周期。IMMU-132(8mg/kg)的第一输注始于2013年2月15日,并且在无重大事件的情况下完成。她在第一周期的过程中经历恶心(2级)和疲劳(2级),并且自那以后一直继续治疗而无重大不利事件。她在2013年3月报告脱发和便秘。2013年4月8日进行的第一反应评估(在6个剂量后),通过计算机断层摄影术(CT)显示29%的靶病变的缩小。她的CEA水平在2013年3月25日降至230ng/ml。在2013年5月23日的第二反应评估(在10个剂量后)中,靶病变缩小39%,从而按照RECIST标准,构成部分反应。自2013年6月14日起她一直继续进行治疗,接受6个周期,构成12个剂量(8mg/kg)的hRS7-CL2A-SN-38(IMMU-132)。她的总体健康和临床症状自开始该研

究治疗以来得到相到大的改善。

[0466] 实施例8.hRS7-SN-38 (IMMU-132) 用于治疗难治性转移性乳腺癌的用途

[0467] 患者为具有在2005年初诊的IV期三阴性乳腺癌 (ER/PR阴性、HER-neu阴性) 的57岁妇女。她在2005年经历了她的左乳腺的病灶切除术,随后在2005年9月在辅助设置中进行剂量-密集ACT。随后她接受放射治疗,这在11月中完成。当患者在2012年初在对侧(右)乳腺中触摸到肿块时,鉴定了疾病的局部复发,并且用CMF (环磷酰胺、甲氨蝶呤、5-氟尿嘧啶) 化学治疗进行治疗。她的疾病在同一年再发生,在胸壁的皮肤中具有转移性病变。她随后接受卡铂+TAXOL®化学治疗方案,在该过程中导致血小板减少。她的疾病进展并且她开始每周一次的多柔比星,该治疗持续6个剂量。皮肤疾病也在进展。2012年9月26日的FDG-PET扫描显示疾病在胸壁和肿大的坚硬的腋窝淋巴结上的时展。对所述患者施予羟考酮以控制疼痛。

[0468] 从2012年10月开始对她施予 IXEMPRA®直至2013年2月(每2周1次,进行4个月),此时胸壁病变打开并出血。随后对她进行 XELODA®,由于她的手和足中的神经病以及便秘,该治疗不能被很好耐受。皮肤病变是进行性的,随后在提供知情同意后被招入 IMMU-132试验。所述患者还具有甲状腺功能亢进和视觉障碍,具有高CNS疾病的风险(然而,脑MRI对于CNS疾病是阴性的)的医疗史。在加入该试验时,她在右乳腺中的皮下病变(靶)的最大直径测量为4.4cm和2.0cm。她在右乳腺中具有另一个非靶病变以及在右和左腋窝中各具有一个肿大的淋巴结。

[0469] 第一IMMU-132输注(12mg/kg)始于2013年3月12日,该治疗被良好耐受。她的第二输液因在安排的输注日具有3级绝对嗜中性粒细胞计数(ANC)降低(0.9)而被延迟一周。在一周延迟后并在接受 NEULASTA®后,以9mg/kg(剂量降低25%)施用她的第二IMMU-132。此后她按照方案(每周一次,进行2周,随后休息一周),一直如期接受IMMU-132。在3个治疗周期后,她在2013年5月17日的第一次反应评估显示靶病变的长的直径之和减小43%,按照RECIST标准构成部分反应。她以9mg/kg的剂量水平继续治疗。自她开始用IMMU-132治疗以来,她的总体健康和临床症状得到显著改善。

[0470] 实施例9.hRS7-SN-38 (IMMU-132) 用于治疗难治性、转移性非小细胞肺癌的作用

[0471] 这是被诊断为患有非小细胞肺癌的60岁男性。对所述患者施予卡铂、贝伐单抗的化学治疗方案,进行6个月,他显示反应,随后在进展后,在接下来的2年中接受利用卡铂、依托泊苷、TAXOTERE®、吉西他滨的化学治疗的其它疗程,偶尔具有持续不超过2个月的反应。所述患者随后显示测量为6.5x4cm的左纵膈肿块和胸腔积液。

[0472] 在签署知情同意后,以18mg/kg的剂量(每隔一周1次)对所述患者施予IMMU-132。在前两次注射过程中,经历短期的嗜中性粒细胞减少症和腹泻,在4小时内经历4次肠运动,但这些症状在2天内消退或对于对症用药起反应。在总共6次IMMU-132的输注后,指数病变的CT评估显示22%的减小,正好低于部分反应但具有明确的肿瘤缩小。所述患者继续该治疗,再进行2两个月,此时通过CT显示了指数病变的直径的总和的45%肿瘤缩小的部分反应,从而按照RECIST标准构成部分反应。

[0473] 实施例10.hRS7-CL2A-SN-38 (IMMU-132) 用于治疗难治性、转移性小细胞肺癌的用途

[0474] 这是被诊断为患有小细胞肺癌，累积她的左肺、纵膈淋巴结，以及具有至左顶叶脑叶的转移灶的MRI证据的65岁妇女。先前化学治疗包括卡铂、依托泊苷和托泊替康，但无明显反应。放射治疗也未能控制她的疾病。因此以18mg/kg的剂量（每隔三周一次）对她施予IMMU-132，进行总共5次输注。在第二个剂量后，她经历低血压和2级嗜中性粒细胞减少症，这在下一次输注前得以改善。在第五次输注后，CT研究显示13%的她的靶左肺肿块的缩小。脑的MRI也显示10%的该转移灶的减小。她继续她的IMMU-132（每3周一次给药），再进行3个月，并且继续显示她的状况的客观和主观改善，25%的左肺肿块的减小以及21%的脑转移灶的减小。

[0475] 实施例11. 利用hRS7-CL2A-SN-38 (IMMU-132) 对患有IV期转移性疾病的胃癌患者的治疗

[0476] 该患者为具有超过40年时间的吸烟和过量酒精摄入时期的历史的60岁男性。他经历体重减轻，饮食不适和未被抗酸药缓解的疼痛、频繁的腹痛、下腰痛和最近两个腋窝中的可触摸的结节。他寻求医疗指导，并且在基于通过胃镜的活组织检查的检查后显示在食管胃连接处具有腺癌，包括一些鳞状特征。放射学研究（CT和FDG-PET）还显示右和左腋、纵膈区域、腰椎和肝（右叶中的2个肿瘤和左叶中的1个肿瘤，所有测量为直径2至4cm）中的转移性疾病。他的胃肿瘤被切除，随后对其进行利用表柔比星、顺铂和5-氟尿嘧啶的化学治疗过程。在4个月和6周的休息期后，将其转换至多西他赛化学治疗，所述治疗也不能控制他的疾病，基于通过转移性肿瘤的CT测量确认的进展和一些总体恶化。

[0477] 随后每隔一周1次，通过输注以10mg/kg的剂量对所述患者施予利用IMMU-132（hRS7-CL2A-SN-38）的治疗，进行总共6个剂量，随后进行CT研究以评估他的疾病的状态。这些输注被良好地耐受，具有一些轻微的恶心和腹泻，可通过对症用药控制。CT研究显示他的指数转移性病变的总和已减小28%，因此他继续进行他的治疗，再进行5个疗程。随访CT研究显示，所述疾病根据RECIST标准与IMMU-132治疗前他的基线测量相比保持约35%的减少，并且他的总体状况也似乎已改善，所述患者对他的疾病得到控制恢复乐观的态度。

[0478] 实施例12. 仅使用IMMU-130（拉贝珠单抗-CL2A-SN-38）进行的对于先前的化学治疗是难治性的晚期结肠癌患者的治疗

[0479] 患者是一名具有IV期转移性结肠癌史的50岁男性，在2008年首诊，并且针对原发性和转移性结肠癌分别被施予了结肠切除术和部分肝切除术。他随后接受化学治疗，如图8中所指示的，所述化学治疗包括伊立替康、奥沙利铂、FOLFIRINOX（5-氟尿嘧啶、亚叶酸、伊立替康、奥沙利铂）和贝伐单抗，以及与5-氟尿嘧啶/亚叶酸组合的贝伐单抗，进行约2年。此后，在下一年或更长时间的过程中对他施予单独的或与FOLFIRI（亚叶酸钙、5-氟尿嘧啶、伊立替康）化学治疗组合的西妥昔单抗的疗程。在2009年，他接受射频消融治疗以治疗他的肝转移，同时在化学治疗免疫治疗下，和在2010年年底，他经历了他的肺转移的楔形切除术，数月后，在2011年初重复该手术。尽管在2011年已进行了化学免疫治疗，但新的肺转移在2011年年底出现，并且在2012年，肺和肝脏转移灶均可见。他的基线血浆癌胚抗原（CEA）滴度为12.5ng/mL，随后立即进行利用IMMU-130的抗体-药物治疗。由放射科医师选择用于通过计算机体层摄影术测量肿瘤尺寸变化的指数病变为右肺中叶和肝转移，两者总计91mm（为IMMU-130（抗-CEACAM5-CL2A-SN-38）治疗之前基线上的它们的最长直径之和）。

[0480] 该患者通过缓慢IV输注接受16mg/kg（每隔一周1次）的剂量的IMMU-130，进行总共

17个治疗剂量。所述患者很好地耐受该治疗,在第一治疗后仅具有1级恶心、腹泻和疲劳,这在治疗4和5后发生,但在之后不发生,因为他接受了用于这些副作用的药物治疗。在治疗3后,他确实表现脱发(2级),这在随后的治疗中存在。恶心、腹泻和偶尔的呕吐仅持续2-3天,并且第一输注后他的疲劳持续2周。另外,所述患者很好地耐受该治疗。由于接受缀合有SN-38的该人源化(CDR-移植的)抗体的长持续时间,测量他的血液的抗-拉贝珠单抗抗体,但未检测到该抗体,甚至在16个剂量后亦如此。

[0481] 在4次治疗后进行第一计算机体层摄影术(CT)测量,在指数病变上,所述测量显示与该治疗之前在基线上产生的测量之和的28.6%的变化。在8次治疗后,该减小变成40.6%,从而按照RECIST标准构成部分续部分缓解。该反应再维持2个月,此时他的CT测量显示指数病变比基线测量小31.9%,但比先前测量的40.6%的减小稍高。因此,基于肺和肝中指数病变的仔细CT测量,先前的化学治疗和免疫治疗,包括伊立替康(SN-38的亲代分子)已失败的该患者,当通过抗-CEACAM5人源化抗拉贝珠单抗(hMN-14)靶向时,显示了对伊立替康(或喜树碱)的活性代谢产物SN-38的客观反应。令人惊讶的是,尽管伊立替康(CPT-11)通过在体内释放SN-38发挥作用,但缀合有SN-38的抗-CEACAM5抗体通过在患者在早期未对他的最后一次含伊立替康的治疗作出反应后,诱导部分反应证明了在结直肠癌中是有效的。所述患者的血浆CEA滴度的减小也确证了CT发现:其从12.6ng/mL的基线水平降至第3治疗剂量后的2.1ng/mL,并且在第8剂量与第12剂量之间为1.7至3.6ng/mL。CEA的正常血浆滴度通常被认为在2.5与5.0ng/mL之间,因此该治疗实现了他的血液中的CEA滴度的正常化。

[0482] 实施例13.利用IMMU-130对具有晚期结肠癌的治疗

[0483] 本患者为初诊为患有转移性结肠癌(IV期)的75岁妇女。她经历了右部分结肠部分切除术和她的小肠的切除术,随后接受FOLFOX、FOLFOX+贝伐单抗、FOLFIRI+雷莫芦单抗和FOLFIRI+西妥昔单抗治疗,进行一年半,此时她表现出疾病的进展,疾病扩散至后部盲管、网膜,在她的骨盆中具有腹水并且在她的胸腔的右侧上具有胸腔积液。在即将进行该治疗前她的基线CEA滴度为15ng/mL。每周2次对她施予6mg/kg的IMMU-130(抗-CEACAM5-CL2A-SN-38),进行连续2周,随后休息1周(3周的周期),进行超过20个剂量,这被极好地耐受,无任何血液学或非血液学毒性。在2个月的治疗内,她的血浆CEA滴度适度地缩小至1.3ng/mL,但在8周的评估上,她显示21%的指数肿瘤病变的缩小,该缩减在13周时增加至27%的缩小。令人惊讶地,所述患者的腹水和胸腔积液在此时都减小(后者消失),从而显著地改善了所述患者的总体状况。所述患者继续她的研究性治疗。

[0484] 实施例14.利用IMMU-130对患有IV期转移性疾病的胃癌患者的治疗

[0485] 患者为52岁男性,其因与进食相关的胃不适和疼痛而寻求医疗照护约6年,并且在过去12个月中具有体重减轻。胃区的触诊显示坚硬的团块,随后对其进行胃镜检查,在他的胃的下部显示了溃疡性肿块。将该肿块进行活组织检查,其被诊断为胃腺癌。实验定检测显示无特殊异常变化,除肝功能检测,LDH和CEA升高外,后者为10.2ng/mL。所述患者随后经历全身PET扫描,这显示,除了胃肿瘤以外,还有左腋中和肝的右叶中的转移性疾病(2个小的转移灶)。所述患者将他的胃肿瘤切除,随后进行他的转移性肿瘤的基线CT测量。手术后4周,他接受了3个疗程的由顺铂和5-氟尿嘧啶(CF)的方案组成的联合化学治疗,但不能良好地耐受该治疗,因此转换成利用多西他赛的治疗。疾病似乎稳定了约4个月(基于CT扫描),但随后患者对进一步的体重减轻、腹痛、食欲缺乏和极端疲劳的抱怨引起重复的CT研究,这

显示转移灶的尺寸增加总共20%以及最初胃切除术的部位上有可疑病变。

[0486] 随后按照8mg/kg的周方案对所述患者施予利用IMMU-130 (抗-CEACAM5-CL2A-SN-38) 的实验性治疗。他很好地耐受该治疗,但3周后,显示2级嗜中性粒细胞减少症和1级腹泻。他的第4输注延缓1周,随后重新开始每周输注,在接下来的4次注射中无腹泻或嗜中性粒细胞减少症的证据。所述患者随后进行CT研究,以测量他的转移性肿瘤的尺寸和观察胃切除术的最初区域。放射科医师根据RECIST标准,相较于IMMU-130治疗之前的基线,测量了23%的转移性病变总和的减少。在最初的胃切除术区域似乎不存在任何明确的病变。此时所述患者的CEA滴度为7.2ng/mL,该滴度比14.5ng/mL的IMMU-130前基线值减少许多。所述患者继续以8.0mg/kg的相同剂量每周进行IMMU-130治疗,在总共13次输注后,他的CT研究显示一个肝转移灶已消失,并且所有转移性病变的总和减小41%,从而按照RECIST构成了部分反应。患者的一般状况改善并且他重新开始他的日常活动,同时继续接受8mg/kg (每3周一次) 的IMMU-130的维持治疗,再进行4次注射)。在血液CEA的最后一次测量时,值为4.8ng/mL,该值在吸烟者(该患者属于该情况)的正常范围内。

[0487] 实施例15. 利用hMN-15-CL2A-SN-38对复发的三阴性转移性乳腺癌的治疗

[0488] 先前利用贝伐单抗加上紫杉醇治疗的无反应的具有三阴性转移性乳腺癌的58岁妇女,显示至几个肋骨、椎骨的转移灶,在她的左肺中测得直径3cm的孤立性病变,具有相当程度的骨痛和疲劳。对她施予利用缀合有SN-38的抗-CEACAM6人源化单克隆抗体hMN-15 IgG (每IgG6个分子的SN-38) 的实验性治疗。每3周一次对她施予12mg/kg的输注,重复4个剂量(作为一个疗程)。除短暂的2级嗜中性粒细胞减少症和一些初始腹泻外,她很好地耐受该治疗,随后重复该治疗,休息2个月后,进行另一个疗程。放射检查显示她按照RECIST标准具有部分反应,因为指数病变的直径总和减小39%。她的一般状况,包括骨痛,也有改善,并且她返回至与她生病前几乎相同的活动水平。

[0489] 实施例16. 利用hMN-15-SN-38对复发的、通常难治性的转移性结肠癌的治疗

[0490] 46岁的妇女患有IV期转移性结肠癌,她具有原发病灶切除的先前历史,也具有至肝的两叶的同步肝转移,以及扩散至右肺的单个病灶;通过CT测量的这些转移灶的直径为2至5cm。她在3年的时间内经历多个化学治疗过程,包括5-氟尿嘧啶、亚叶酸、伊立替康、奥沙利铂、西妥昔单抗和贝伐单抗。在两个情况下,有证据疾病或短期反应的稳定,但她的测量的病变没有30%或更多的减小。hMN-15-CL2A-SN-38治疗前的基线上的CEA滴度为46ng/mL,并且她的总指数病变测量出92mm的总和。

[0491] 以在21天的周期内,每周12mg/kg,进行2周,此后休息1周的方案不定制利用hMN-15-CL2A-SN-38的治疗。重复该周期3次,只具有短暂的嗜中性粒细胞减少症和胃肠副作用(恶心、呕吐、腹泻)。令人惊讶地,尽管对FOLFIRI治疗(其包括伊立替康或CPT-11)无反应,但所述患者按照RECIST标准在完成她的治疗后显示部分反应。随后将她置于该治疗的维持方案,以16mg/kg的剂量,每月一次,再进行6个月。随访细查显示她的疾病继续被控制为部分反应(PR),并且所述患者通常处于良好状态,具有90%的Kaaarnofsky行为状态。

[0492] 实施例17. 利用抗-CSAp-SN-38缀合物对患有IV期转移性疾病的结肠癌患者的治疗

[0493] 该患者显示至肝的左叶和至两肺的结肠癌转移,在切除9-cm乙状结肠腺癌后,随后利用FOLFIRI和西妥昔单抗进行化学免疫治疗,持续6个月,随后利用FOLFOX,接着贝伐

单抗再进行约9月的时期的化学免疫治疗。在最初的切除术和随后治疗开始后10个月,被认为存在的稳定疾病显示通过病变生长和新的转移灶出现在左肾上腺中进展。此时她的血浆CEA为52ng/mL,并且她的一般状况似乎已恶化,具有腹痛、疲劳和临界性贫血,表明可能地存在内出血。

[0494] 她现每周1次,以12mg/kg的剂量对她施予hMu-9(抗-CSAp)抗体的CL2A-SN-38缀合物,进行2周,休息1周,从而作为一个治疗周期,随后重复以进行另外的治疗周期,每周测量她的血细胞计数,并接受阿托品药物治疗以治疗胃肠反应。在第一治疗周期后注意到2级脱发,但仅有1级嗜中性粒细胞减少症。在3个治疗周期后,她的血浆CEA滴度减小至19ng/ml,并且此时她的CT测量显示肝和肺中24.1%的指数病变的减小。在再进行3个疗程后,她显示31.4%的指数病变的CT减小,以及约40%的肾肿块的尺寸的减小。该患者被认为对抗-CSAp-CL2A-SN-38抗体-药物治疗起反应,并且继续该治疗。她的一般状况似乎得到改善,疲劳减轻,无腹痛或不适,并且总体上更加精神。

[0495] 实施例18. 利用抗-CEACAM6-CL2A-SN-38对免疫缀合物治疗乳腺癌的治疗

[0496] 该患者具有三阴性(不表达雌激素受体、孕酮受体或Her2/neu)转移性乳腺癌,该乳腺癌在过去3年的几次不同的治疗后复发。她显示两个肺中的几个小的肿瘤,以及至她的C4、C5、T2和T3椎骨以及两侧几个肋骨的转移灶。她因她的溶骨性病变而经历标准治疗,并且现在开始以16mg/kg的剂量(每周一次)利用hMN-15-CL2A-SN-38的治疗,进行3周,暂停1周,随后重新开始该3周的周期性治疗,再进行2次。在治疗后2周,进行CT扫描以评估反应,并注意到2个小的肺转移灶已消失,同时1个较大的病变似乎已减小约40%。至椎骨的转移灶仍然存在,但C4和C5病变似乎减小约25%。在至肋骨的转移灶中,6个小的病变中的2个似乎尺寸减小许多,并且不一定为可见的或小的疤痕或坏死的区域。所述患者的肿瘤标志物以及她的LDH滴度,似乎显示稳定或降低的水平,这表明疾病进展已被停止或降低水平,表明疾病进展已被停止或还存在一些疾病减轻的证据。主观上,所述患者感觉好多了,不太疲劳,不太骨痛并且呼吸得以改善。在每一次治疗后,她已经历了一些最低程度的恶心和呕吐,所述不适在1周内消退。唯一的其它副作用一直是短暂的血小板减少症,这也在7天内消退。她一直处理观察中,并且将在2个月内重新开始治疗周期。

[0497] 实施例19. 利用抗-CEACAM5和抗-CEACAM6-CL2A-SN-38免疫缀合物的组合对转移性结肠癌的治疗

[0498] 该患者具有转移性结肠癌,在肝中患有疾病的CT证据(右叶中5cm的病变和左叶中3cm的病变),以及于右肺的2个转移灶(2-和3-cm的尺寸)。先前已切除结肠的原发癌,并且所述患者由于至肝和肺的异时转移而具有术后治疗的过程。在治疗过程中,肝转移灶生长并且一个肺转移灶变成2个,因此患者为进行实验性化学免疫治疗的候选者。他随后开始双抗体-药物缀合物拉贝珠单抗(hMN-14)-CL2A-SN-38和hMN-15-CL2A-SN-38的疗程(各自在交替的天上以8mg/kg的剂量施用,每周1次,进行2周),随后每月重复一次,进行4个月。治疗后2周,所述患者的状态通过CT和实验室测试来评估。CT扫描显示,右肝叶中的大的肿瘤减小50%,左叶中的肿瘤减小约33%,并且肺转移灶对于两个肿瘤累计减小约20%。他的血液CEA滴度从治疗开始时的22ng/mL减小该随访时的6ng/mL。主观上,所述患者声称他感染更强壮并且在每日的活动似乎也具有更多的精力。副作用是短暂的血小板减少症和白细胞减少症,在治疗后2周内恢复至正常范围,以及几次恶心和呕吐的发作,通过抗-呕吐药物来

控制。按计划,所述患者将在约2个月内重新开始这些治疗周期,进行疾病状态的另一个治疗。

[0499] 实施例20. 抗体-药物缀合物的连续输注

[0500] 所述患者先前因直肠癌进行了切除术并且按照常规治疗接受术前和术后放射化疗治疗。她已无肿瘤4年,但现在显示至右肝叶的3个小的转移性病变,通过常规CT和随防血液CEA值发现的,所述CEA值从初始治疗后的3.0ng/mL升至6.3ng/mL。在17天中以2mg/kg的剂量对她施予留置导管和拉贝珠单抗-CL2A-SN-28的连续输注。5周后,她随后以1mg/kg接受重复的连续输注治疗,现进行3周。3周后,CT扫描和血液CEA监测显示肝转移灶之一已消失,并且另外两个相同或略微更小。血液CEA滴度现测量为2.4ng/mL。她无征候,并且仅经历2级恶心和呕吐(当治疗时),和2级嗜中性粒细胞减少症,两者随时间过去消退。

[0501] 实施例21. 利用抗-CEACAM5免疫缀合物对晚期转移性结肠癌的治疗

[0502] 患者为先前针对转移性结肠癌的治疗失败的50岁男性。一线治疗为FOLFIRINOX+AVASTIN®(以逐步方式建立的),在第一周期中始于IROX(伊立替康+奥沙利铂)。在开始该治疗后,所述患者具有显示肝转移灶的尺寸的减小的CT。这之后通过手术除去肿瘤组织。辅助化学治疗是一线方案(无IROX部分)的继续,其导致短暂的无复发期。在约1年的间隔后,CT显示肝转移灶的复发。这导致二线方案(FOLFIRI+西妥昔单抗)的开始。另一个CT显示肝转移灶中的反应。随后进行肝转移灶的RF消除,随后继续利用FOLFIRINOX+西妥昔单抗的辅助化学治疗,接着进行维持西妥昔单抗,持续约1年。另一个CT扫描显示无疾病的证据。进一步的扫描显示可能的肺结节,其已被确认。这导致肺结节的楔形切除术。随后重新开始和继续FOLFIRI+西妥昔单抗。更后的CT扫描显示肺和肝的转移灶。

[0503] 在施用hMN-14-CL2A-SN-38免疫缀合物时,所述患者患有晚期转移性结肠癌,肺和肝均具有转移灶,其对伊立替康(喜树碱)无反应。以12mg/kg的剂量施用hMN-14-CL2A-SN-38免疫缀合物,每隔1周重复该过程。所述患者按照RECIST标准显示具有转移性肿瘤的减小的部分反应。

[0504] 值得注意的是,在每隔一周1次施予该12mg/kg的组群中仅有一个患者显示2级血液学病症(嗜中性粒细胞减少症),并且大多数患者具有1或2级恶心、呕吐或脱发-这是抗体-药物缀合物的活性的体征,但被良好地耐受。抗体部分在喜树碱的改善的靶向中的作用解释了SN-38部分在先前一直抗未缀合的伊立替康的癌症中的功效。

[0505] 实施例22. 利用抗-MUC5ac-CL2A-SN-38免疫缀合物对转移性胰腺癌的治疗

[0506] 该44岁的患者具有转移性胰腺癌的历史,在胰头中具有不可手术的胰腺导管腺癌,并且显示至肝的左和右叶的转移灶,前者测量为3x4cm,后者测量为2x3cm。对所述患者施予吉西他滨疗程,但他无客观反应。4周后,每周2次,通过静脉内注射以8mg/kg的剂量对他施予hPAM4-CL2A-SN-38,进行2周,休息1周,随后再重复2个周期。1周后进行CT研究,所述CT研究显示32%(部分反应)的肿瘤块(所有部位)的总减小,同时伴随他的血液CA19-9滴度从基线时的220至放射学评估时的75的下降。在每一次利用抗体-药物缀合物治疗后,所述患者只显示1级恶心和呕吐,和在最后一个治疗周期结束时2级嗜中性粒细胞减少症,所述副作用在4周后消退。未施予预防输注反应的前驱给药法。

[0507] 实施例23. 使用hL243-CL2A-SN-38对治疗难治性转移性结肠癌(mCRC)的治疗

[0508] 患者为显示转移性结肠癌的67岁男性。在诊断后不久进行横结肠切除术后,所述

患者随后在进行部分肝切除术以除去肝的左叶中的转移性病变之前在新辅助设置中接受4个周期的FOLFOX化学疗灶。此后,进行辅助FOLFOX方案,进行总共10个周期的FOLFOX。

[0509] CT显示至肝的转移灶。他的靶病变是肝的左叶中的3.0-cm的肿瘤。非靶病变包括肝中的几个低衰减的肿块。基线CEA为685ng/mL。

[0510] 在所述患者签署知情同意后,每隔一周施予hL243-CL2A-SN-38 (10mg/kg),进行4个月。所述患者在第一治疗后经历恶心(2级)和疲劳(2级),并且继续治疗而无重大不利事件。进行的第一反应评估(8个剂量后)通过计算机体层摄影术(CT)显示26%的靶病变的缩小,并且他的CEA水平降至245ng/mL。在第二反应评估(12个剂量后),靶病变已缩小35%。他的总体健康和临床症状得到相当大的改善。

[0511] 实施例24. 利用IMMU-114-CL2A-SN-38 (抗-HLA-DR-SN-38)对复发性滤泡性淋巴瘤的治疗

[0512] 在接受R-CHOP化学治疗以治疗在滤泡性淋巴瘤(显示各种局部淋巴结(颈、腋窝、纵隔、腹股沟、腹部)中的广泛疾病和骨髓侵犯)后,每周一次,以10mg/kg的剂量对68岁的男性施予实验性试剂IMMU-114-CL2A-SN-38 (抗-HLA-DR-CL2A-SN-38),进行3周,休息3周,随后进行第二治疗,再进行3周。随后通过CT评估他的指数病变的变化,按照CHESON标准,他显示23%的减轻。重复所述治疗,再进行2个疗程,所述治疗随后通过CT显示55%的肿瘤减小,这是部分反应。

[0513] 实施例25. 利用IMMU-114-CL2A-SN-38对复发的慢性淋巴细胞性白血病的治疗

[0514] 具有如由International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia and World Health Organization classifications定义的CLL的历史的67岁的男性,显示在先前利用氟达拉滨、地塞米松和利妥昔单抗以及CVP的方案治疗之后复发的疾病。他现在具有与全身淋巴结肿大相关的发热和盗汗、减少的血红蛋白和血小板产生、以及快速升高的白细胞计数。他的LDH升高并且 β -2-微球蛋白几乎为正常的2倍。按照给药方案,每周一次,以8mg/kg对所述患者施予利用IMMU-114-CL2A-SN-38缀合物的治疗,进行4周,休息2周,随后再次重复所述周期。评估显示所述患者的组织学参数正在改善并且他的循环CLL细胞的数目似乎正在减少。随后重新开始所述治疗,再进行3个循环,此后他的血液学和实验室值表明他具有部分反应。

[0515] 实施例26. 使用hMN-15-CL2A-SN-38对难治性、转移性非小细胞肺癌的治疗

[0516] 患者为诊断为非小细胞肺癌的58岁男性。最初对他施予持续6个月的卡铂、贝伐单抗的化学治疗方案,并且他显示反应,随后在进展后,在接下来的2年中接受利用卡铂、依托泊苷、TAXOTERE®、吉西他滨的进一步化疗治疗过程,偶尔具有持续不超过2个月的反应。所述患者随后显示测量为5.5x3.5cm的左纵膈肿瘤左和胸腔积液。

[0517] 在签署知情同意后,每隔一周1次,以12mg/kg的剂量对所述患者施予hMN-15-CL2A-SN-38。在前两次注射过程中,经历短暂的嗜中性粒细胞减少症和腹泻,但这些症状在2天内消退或响应对症用药。在总共6次hMN-15-SN-38输注后,靶病变的CT评估显示22%的减小。所述患者继续该治疗,再进行两个月,此时通过CT显示了45%的部分反应。

[0518] 实施例27. 利用hA19-CL2A-SN-38对滤泡性淋巴瘤患者的治疗。

[0519] 60岁男性显示腹痛和可触摸肿块的存在。所述患者具有确认在纵膈、腋窝和颈部淋巴结中存在具有病理性腺病的肿块的CT和FDG-PET研究。实验室测试除升高的LDH和 β -2-

微球蛋白外显得很寻常。骨髓活组织检查显示几个副小梁 (paratrabecular) 和血管周围淋巴细胞聚集。这些是具有CD20、CD19和CD10的表达 (通过免疫染色) 的淋巴细胞。最终的诊断是2级滤泡性淋巴瘤 (IVA期), 具有为4的FLIPI评分。最大的受累淋巴结的最长直径为7cm。对所述患者施予通过CLA2接头缀合有SN-38的人源化抗-CD19单克隆抗体IgG (hA19) (每IgG6个药物分子)。给药为每周1次6mg/kg, 进行连续4周, 休息2周, 随后重复每6周中4个处理周的周期。5个周期后, 骨髓和成像 (CT) 评估显示部分反应, 其中可测量的病变减小约60%, 并且骨髓很少被浸润。同样地, LDH和 β -2-微球蛋白的滴度也减小。

[0520] 实施例28. 利用hA19-CL2A-SN-38对复发的前体B细胞ALL的治疗

[0521] 该51岁的妇女已在对前体费城染色体阴性B细胞ALL的治疗中, 所述疾病显示针对CD19、CD20、CD10、CD38和CD45的ALL细胞染色。超过20%的骨髓和血液淋巴母细胞表达CD19和CD20。所述患者已接受利用氯法拉滨和阿糖胞苷的治疗, 从而导致相当大的血液学毒性, 但无反应。也开始高剂量阿糖胞苷 (ara-C) 的疗程, 但不能被患者耐受。每周一次, 以6mg/kg的剂量对她施予 (通过输注施予) hA19-CL2A-SN-38治疗, 进行5周, 随后休息2周, 再重复该治疗2周。令人惊讶地, 她显示她的血细胞计数和骨髓计数的改善, 所述改善足够部分反应被测定。在因嗜中性粒细胞减少症 (3级) 而休息2个月后, 以8mg/kg (每隔一周1次) 重新开始治疗, 再进行4个疗程。此时, 她得以极大改善, 并且考虑进行维持治疗以试图将她带至其中她可以是进行干细胞移植的候选人的阶段。

[0522] 实施例29. 利用抗-CD22-CL2A-SN-38免疫缀合物对淋巴瘤的治疗

[0523] 患者为具有复发的弥漫性大B细胞淋巴瘤 (DLBCL) 的62岁男性。在6个疗程的R-CHOP化学免疫治疗后, 他现在显示纵隔、腋窝和腹股沟淋巴结中的广泛淋巴结扩散。每周一次, 以12mg/kg的剂量对他施予帕珠单抗-CL2A-SN-38 (抗-CD22), 进行3周, 休息1周, 随后再次重复, 再进行2个周期。1周后, 通过CT成像评估患者, 并且测量他的总肿瘤体积, 所述体积显示35% (部分反应) 的减小, 这似乎在接下来的3个月中得到维持。副作用仅为治疗后血小板减少症以及1级恶心和呕吐, 这在2周内消退。治疗前未施予减轻输注反应。

[0524] 实施例30. 在一线设置中利用维妥珠单抗和依帕珠单抗-CL2A-SN-38对滤泡性淋巴瘤的联合治疗。

[0525] 35岁的妇女被诊断为患有低级别和良好FLIPI评分的滤泡性淋巴瘤 (显示在她的颈部淋巴结、两个腋窝和纵隔中)。她的脾没有肿大, 并且骨髓活组织检查没有显示疾病参与。她在症状上没有受太大影响, 只有出现升高的温度、盗汗和比平常稍微更疲劳的时期。她的医生决定不进行观察和等待过程, 而是对该妇女施予组合皮下疗程的人源化抗-CD20单克隆抗体维妥珠单抗 (200mg/m², 每周一次, 进行4周) 与两个疗程 (每周一次, 每次输注为8mg/kg的剂量) 的抗-CD22依帕珠单抗-CL2A-SN-38的侵袭性较小的治疗。2个月后重复该联合治疗, 此之通过CT和FDG-PET成像研究以及骨髓活组织检查评估所述患者。令人惊讶地, 显示了约90%的所有疾病的减轻, 随后在4周的休息后对她施予另一个疗程的该联合治疗。4周后的评估显示放射学 (和骨髓活组织检查) 完全反应。她的医生决定8个月后重复该治疗过程, 并且放射学/病理学测试显示持续的完全缓解。

[0526] 实施例31. 使用维妥珠单抗-CL2A-SN-38对滤泡性淋巴瘤的一线治疗

[0527] 患者为显示低等级滤泡性淋巴瘤的41岁妇女, 具有可测量的双侧颈部和腋窝淋巴结 (各自2-3cm), 具有4cm直径的纵膈肿块, 和肿大的脾。对她施予3个疗程的维妥珠单抗-

CL2A-SN-38 (抗-CD20-CL2A-SN-38) 治疗, 每一个疗程由每3周一次10mg/kg的输注组成。在治疗完成后, 她的通过CT的肿瘤测量显示80%的减小。随后对她再施予2个疗程, 并且CT测量表明获得了完全反应。这得到FDG-PET成像确认。

[0528] 实施例32. 利用缀合有CL2A-SN-38的1F5人源化抗体对复发的DLBCL的治疗

[0529] 53岁的妇女在显示对施予的6个周期的R-CHOP化学治疗的部分反应后8个月, 显示在纵膈和腹主动脉旁部位的复发性弥漫性大B细胞淋巴瘤。她拒绝进行更具细胞毒性的化学治疗, 因此对她施予由10mg/kg通过CL2A接头缀合于SN-28的人源化1F5抗-CD20单克隆抗体(每抗体分子约6个分子的SN-28)(每周一次, 间隔一周, 进行5次输注)组成的温和治疗。CT和FDG-PET研究显示40%的她的淋巴瘤的进一步减小, 因此在休息4周的时间后, 以8mg/kg的剂量(每3周一次)重新开始治疗, 进行总共5次输注。她的疾病的评估显示约80%的减小。

[0530] 实施例33. 利用利妥昔单抗-CL2A-SN-38对复发的慢性淋巴细胞性白血病的治疗

[0531] 具有8年CLL的历史, 在过去对氟达拉滨、环磷酰胺和利妥昔单抗治疗起反应, 并且在复发后对依鲁替尼产生部分反应(持续9个月)的62岁妇女, 显示正在进展的疾病。以每周一次, 每次12mg/kg进行3个疗程, 随后降至8mg/kg, 每隔一周一次, 再进行4个疗程的方案对所述患者施予利妥昔单抗-CL2A-SN-38单一治疗。观察到血细胞减少的持续改善(通过超过50%或高于每分升11g的血红蛋白水平、高于1500个细胞/cmm的绝对嗜中性粒细胞计算或高于11k/cmm的血小板计数反映的), 该改善持续约9个月。

[0532] 实施例34. 利用与苯达莫司汀组合的维妥珠单抗-CL2A-SN-38对DLBCL的一线治疗

[0533] 59岁的男性显示多个部位的DLBCL, 包括胸、腹、腹股沟淋巴结和肿大的脾, 如由CT、FDG-PET和免疫组织学/病理学诊断确认的。在第1和第2天以90mg/m²的剂量施予苯达莫司汀, 并且在第7和14天以6mg/kg的剂量施予维妥珠单抗-CL2A-SN-38, 每4周施予该组合, 进行4个周期。放射学评估随后显示部分反应。在2个月的休息后, 重复所述治疗, 再进行2个周期, 并且放射学评估随后显示完全反应。血细胞减少, 最常见地嗜中性粒细胞减少症是可控的并且不会达到3级水平。

[0534] 实施例35. 利用与来那度胺组合的维妥珠单抗-CL2A-SN-38对套细胞淋巴瘤(MCL)的一线治疗

[0535] 患者为在显示GI抱怨和嗜睡后被诊断为患有MCL的68岁男性。结肠镜检查显示7-cm的盲肠肿块, 并且他的检查显示他患有IV期疾病。对他施予来那度胺的联合治疗, 在第1至21天每日口服25mg, 每28天1个周期。在2个周期后, 每隔一周1次以10mg/kg的剂量对他施予维妥珠单抗-CL2A-SN-38, 进行3次治疗, 休息2周。随后再次重复该治疗。完成该治疗后2周, 所述患者显示他的测量的指数病变的部分反应和看到的其它淋巴结的减小。4个月后, 重复来那度胺治疗, 进行21天, 随后进行2个疗程的维妥珠单抗-SN-38。他的疾病随后显示进一步被减小, 尽管还不是完全反应。

[0536] 实施例36. 对具有复发的/难治性弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)的患者的依帕珠单抗-SN-38治疗

[0537] 具有体重减轻的症状的65岁男性经历上腹部肿块的活组织检查, 该肿块被诊断为弥漫性大B细胞淋巴瘤。用6个周期的标准R-CHOP(利妥昔单抗、环磷酰胺、多柔比星、长春新碱和泼尼松)治疗他。他具有延长的和持久的嗜中性粒细胞减少症(700 ANC)和轻度血小板

减少症(50-70k/mL),但无真实的贫血。他的IPI很高。在该治疗后上腹部肿块未显示任何变化,且对他进行抗-CD22依帕珠单抗-CL2A-SN-38的温和治疗方案。这是每隔一周输注4mg/kg,进行4次输注,随后每隔3周一次,再进行3次输注的方案。1周后通过CT测量他的上腹部淋巴瘤,所述淋巴瘤显示52%的显著减小。所述患者继续该治疗,每隔3周一次,再进行3个月,并且继续显示他的淋巴瘤肿块的该减小,以及他的体重的稳定和他的精神和活力的改善。

[0538] 实施例37.具有复发的滤泡性淋巴瘤的患者的人源化RFB4治疗

[0539] 42岁的妇女显示辐射至她的背部的她的下腹部中的尖锐、恒定和严重的疼痛。实验室测试显得很寻常,但腹部超声显示在左下前方具有异质固体肿块,测量为7.5x6.2x7.0cm。CT扫描显示在左小肠系膜内具有大的肿块,牵涉相邻的淋巴结。肿块的CT导向穿刺活检显示其为3级滤泡性淋巴瘤。免疫组织化学显示对于CD19、CD20、CD22、Bcl-2和Bcl-6具有阳性结果的B细胞类型。PET研究显示在横膈膜以上、骨髓中或脾中没有疾病,但骨髓活组织检查确认了淋巴瘤的包含。所述患者经历6个周期的R-CHOP化学治疗,导致4个月后对该治疗的完全反应。然而,10个月后,她经历复发,她的腹部肿块和相邻的淋巴结的复发,以及肿大的脾和更多骨髓侵犯,如通过PET和活组织检查研究测定的。她现在开始利用使用CL2A接头缀合有SN-38分子的人源化抗-CD22单克隆抗体RFB4(每IgG6个SN-38分子)(以8mg/kg的剂量,每周一次,进行3周)的治疗过程,随后以8mg/kg(每隔一周1次)继续所述治疗,再进行4次治疗。2周后,她经历CT和FDG-PET研究,并且她的腹部病变和脾显示了40%的减小,以及骨髓侵犯的总体减小。在4周的休息后,每周一次,以4mg/kg施予治疗,进行4周,随后每隔一周1次以6mg/kg施予治疗,再进行5次治疗,所有可测量的病变的尺寸之和的进一步可测量的减小为总共60%。所述患者继续8mg/kg(每月)的hRFB4-CL2A-SN-38的维持治疗,进行接下来的5个月,并且维持她的治疗反应。

[0540] 实施例38.患有复发的/难治性急性淋巴母细胞白血病的患者的依帕珠单抗-CL2A-SN-38治疗。

[0541] 患有CD22+前体B细胞急性淋巴母细胞白血病(ALL)的29岁男性对利用PEG-天冬酰胺酶、环磷酰胺、柔红霉素、阿糖胞苷(ara-C)、长春新碱、亚叶酸、泼尼松、甲氨蝶呤和6-巯基嘌呤的治疗以及利用G-CSF(Neupogen)的支持治疗(在改进的Larson方案下作为诱导/维持治疗提供的)没有反应。所述患者的淋巴瘤为费城染色体阴性的。基于血细胞计算和骨髓白血病母细胞计数,所述患者只显示最小的反应,4个月后疾病进展。随后以6mg/kg的初始方案对他进行每周一次的依帕珠单抗-CL2A-SN-38给药,进行4周,随后降至6mg/kg(每隔一周1次),再进行6次输注。随后通过血细胞计数和骨髓白血病母细胞计数以及脾尺寸和骨髓侵犯的FDG研究评价所述患者,似乎实现了部分反应,伴随患者的一般体征和症状的改善。随后在接下来的8个月中继续进行该治疗,但以5mg/kg(每隔一周1次)进行,3周治疗和2周休息,并且实现完全缓解。所述患者现被评估为进行造血干细胞移植的候选者。

[0542] 实施例39.患有复发的/难治性急性淋巴母细胞性白血病的人源化RFB4-CL2A-SN-38治疗

[0543] 在对HIDAC(高剂量ara-C治疗)无反应后,以每周一次10mg/kg的给药方案对该患有前体B细胞急性淋巴母细胞性白血病的20岁男性施予具有缀合于SN-38的hRFB4 IgG的人源化抗-CD22(平均每IgG6个药物分子),进行2周,随后休息1周,接着进行10mg/kg的输注

(每隔一周1次),再进行5次治疗。随后评估所述患者的血液和骨髓白血病母细胞的存在,并且显示>90%的减少。在4周的休息后,重复该治疗过程,4周后评价显示无最小残留疾病的完全反应,如通过PCR测量的。

[0544] 实施例40.接受R-CHOP化学治疗的DLBCL患者的利用依帕珠单抗-CL2A-SN-38的巩固治疗

[0545] 具有测量为1.5至2.0cm的双侧颈腺病和颈淋巴结,以及3cm的右腋窝淋巴结,以及测量为2.5至3.0cm的腹膜后和双侧骨盆淋巴结的56岁妇女被诊断为具有对于CD20和CD22是阳性的3期弥漫性大B细胞淋巴瘤。对她进行每21天利用非格司亭和预防性抗生素的标准R-CHOP化学治疗方案。在接受6个周期的该治疗后,施予所述患者2个月的休息期,随后对其进行利用8mg/kg依帕珠单抗-CL2A-SN-38(每隔一周输注一次,进行3次治疗)的巩固治疗。然而R-CHOP化学治疗后的反应最小(小于30%的测量的病变的变化),利用依帕珠单抗-CL2A-SN-38的巩固治疗导致部分反应(>50%的所有指数病变的总和的减小)。在休息3个月后,重复利用依帕珠单抗-CL2A-SN-38的该治疗过程,再次对患者施予非格司亭和预防性抗生素,患者维持她的良好缓解。

[0546] 实施例41.利用IMMU-31-CL2A-SN-38对复发的转移性睾丸癌的治疗

[0547] 患者为具有切除他的右睾丸的睾丸癌,具有对联合化学治疗良好地反应的至两个肺的同期转移灶的历史的30岁男性。在诊断时,他 α -甲胎蛋白(AFP)的血液滴度升高处于1,110ng/mL,但在成功治疗后降至109ng/mL。他现在显示在3年的时期中逐渐升高的AFP滴度,因此进行他的CT和FDG-PET扫描,所述扫描显示至两个肺的肺转移的复发。他接受利用抗-AFP抗体IMMU-31 IgG(以每IgG 6个药物分子缀合SN-38的)的治疗。他接受12mg/kg的该抗体-药物缀合物的周剂量,进行4周的周期的3周,重复另一个循环,但治疗剂降至10mg/kg。随后重复该治疗,再进行2个周期。2周后,他的肺的放射学检查显示,转移灶已消失。他的血液AFP滴度现为18ng/mL。所述患者恢复至正常活性,已实现完全反应。

[0548] 实施例42.利用IMMU-31-CL2A-SN-38对复发的转移性肝细胞癌的治疗

[0549] 具有乙型肝炎感染、酒精过量和吸烟的历史的58岁男性首先导致肝硬化,随后被诊断为肝细胞癌。当时他显示在将他的肝的部分切除后,还存在受累的局部淋巴结。所述患者接受索拉非尼治疗的过程,显示一定的总体改善,但不具有他的局部淋巴结或2个肺(右肺)转移灶的任何减小。肝的CT还表明在余下的肝实质中可能存在复发。现在对所述患者施予3个疗程的利用IMMU-31-CL2A-SN-38的治疗,每一个疗程包含每周16mg/kg,进行4-周周期的2周的方案。在3个包含6个剂量的疗程后,重新评估所述患者,他显示他的循环AFP滴度从2,000ng/mL的基线值下降至170ng/mL,以及他的测量的指数病变的总和的20%的减小。在2个月的休息后,再制定3个周期的疗程,但剂量降至每输注1mg/kg。1个月后,所有测量的病变具有至35%的基线更大的减小,以及至100ng/mL的AFP血液滴度的轻微下降。所述患者继续每月一个剂量的维持治疗,长至不存在疾病进展或限制性毒性。

[0550] 实施例43.免疫缀合物贮存

[0551] 纯化实施例2中描述的缀合物,并用2-(N-吗啉代)乙磺酸(MES),pH 6.5交换缓冲液,随后用海藻糖(25mM的终浓度)和聚山梨醇酯80(0.01%v/v的终浓度)进一步配制,因赋形剂的添加,终缓冲液浓度变成22.25mM。将所配制的缀合物冷冻干燥并贮存于封闭的小瓶中,于2°C-8°C下储存。所述冻干的免疫缀合物在贮存条件下是稳定的并且维持它们的生理

活性。

[0552] ***

[0553] 从前面的描述中,本领域技术人员可容易地确定本发明的基本特征,并且在不背离本发明精神和范围的前提下,可对本发明做各种变化和修改以使其适应于各种用途和条件而无需过度实验。本文中引用的所有专利、专利申请和出版物通过引用并入。

序列表

<110> 免疫医疗公司
<120> 具有CL2A接头的抗体-SN-38免疫缀合物
<130> IMM340W02
<140>
<141>
<150> 13/948,732
<151> 2013-07-23
<160> 162
<170> PatentIn 3.5版
<210> 1
<211> 44
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述：合成
多肽

<400> 1
Ser His Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly Tyr
1 5 10 15
Thr Val Glu Val Leu Arg Gln Gln Pro Pro Asp Leu Val Glu Phe Ala
20 25 30
Val Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala
35 40

<210> 2
<211> 45
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 2
Cys Gly His Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly
1 5 10 15
Tyr Thr Val Glu Val Leu Arg Gln Gln Pro Pro Asp Leu Val Glu Phe
20 25 30
Ala Val Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala
35 40 45

<210> 3

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 3

Gln Ile Glu Tyr Leu Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile Gln Gln

1 5 10 15

Ala

<210> 4

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 4

Cys Gly Gln Ile Glu Tyr Leu Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile

1 5 10 15

Gln Gln Ala Gly Cys

20

<210> 5

<211> 50

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 5

Ser Leu Arg Glu Cys Glu Leu Tyr Val Gln Lys His Asn Ile Gln Ala

1 5 10 15

Leu Leu Lys Asp Ser Ile Val Gln Leu Cys Thr Ala Arg Pro Glu Arg

20 25 30

Pro Met Ala Phe Leu Arg Glu Tyr Phe Glu Arg Leu Glu Lys Glu Glu

35 40 45

Ala Lys

50

<210> 6

<211> 55

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 6

Met	Ser	Cys	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Glu	Cys	Glu	Leu	Tyr	Val	Gln	Lys
1				5					10					15	
His	Asn	Ile	Gln	Ala	Leu	Leu	Lys	Asp	Ser	Ile	Val	Gln	Leu	Cys	Thr
			20					25					30		
Ala	Arg	Pro	Glu	Arg	Pro	Met	Ala	Phe	Leu	Arg	Glu	Tyr	Phe	Glu	Arg
			35				40						45		
Leu	Glu	Lys	Glu	Glu	Ala	Lys									
			50				55								

<210> 7

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 7

Cys	Gly	Phe	Glu	Glu	Leu	Ala	Trp	Lys	Ile	Ala	Lys	Met	Ile	Trp	Ser
1				5					10					15	
Asp	Val	Phe	Gln	Gln	Gly	Cys									
			20												

<210> 8

<211> 51

<212> PRT

<213> 智人

<400> 8

Ser	Leu	Arg	Glu	Cys	Glu	Leu	Tyr	Val	Gln	Lys	His	Asn	Ile	Gln	Ala
1				5					10					15	
Leu	Leu	Lys	Asp	Val	Ser	Ile	Val	Gln	Leu	Cys	Thr	Ala	Arg	Pro	Glu
			20					25					30		
Arg	Pro	Met	Ala	Phe	Leu	Arg	Glu	Tyr	Phe	Glu	Lys	Leu	Glu	Lys	Glu
			35				40						45		
Glu	Ala	Lys													
			50												

<210> 9

<211> 54

<212> PRT

<213> 智人

<400> 9

Ser Leu Lys Gly Cys Glu Leu Tyr Val Gln Leu His Gly Ile Gln Gln
1 5 10 15
Val Leu Lys Asp Cys Ile Val His Leu Cys Ile Ser Lys Pro Glu Arg
 20 25 30
Pro Met Lys Phe Leu Arg Glu His Phe Glu Lys Leu Glu Lys Glu Glu
 35 40 45
Asn Arg Gln Ile Leu Ala
 50

<210> 10

<211> 44

<212> PRT

<213> 智人

<400> 10

Ser His Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly Tyr
1 5 10 15
Thr Val Glu Val Gly Gln Gln Pro Pro Asp Leu Val Asp Phe Ala Val
 20 25 30
Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Arg Gln
 35 40

<210> 11

<211> 44

<212> PRT

<213> 智人

<400> 11

Ser Ile Glu Ile Pro Ala Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly Phe Thr
1 5 10 15
Val Glu Val Leu Arg His Gln Pro Ala Asp Leu Leu Glu Phe Ala Leu
 20 25 30
Gln His Phe Thr Arg Leu Gln Gln Glu Asn Glu Arg
 35 40

<210> 12

<211> 44

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 12

Thr His Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly Tyr

1	5	10	15												
Thr	Val	Glu	Val	Leu	Arg	Gln	Gln	Pro	Pro	Asp	Leu	Val	Glu	Phe	Ala
		20						25					30		
Val	Glu	Tyr	Phe	Thr	Arg	Leu	Arg	Glu	Ala	Arg	Ala				
		35						40							

<210> 13

<211> 44

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 13

Ser	Lys	Ile	Gln	Ile	Pro	Pro	Gly	Leu	Thr	Glu	Leu	Leu	Gln	Gly	Tyr
1				5					10					15	
Thr	Val	Glu	Val	Leu	Arg	Gln	Gln	Pro	Pro	Asp	Leu	Val	Glu	Phe	Ala
				20				25					30		
Val	Glu	Tyr	Phe	Thr	Arg	Leu	Arg	Glu	Ala	Arg	Ala				
				35				40							

<210> 14

<211> 44

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 14

Ser	Arg	Ile	Gln	Ile	Pro	Pro	Gly	Leu	Thr	Glu	Leu	Leu	Gln	Gly	Tyr
1				5					10					15	
Thr	Val	Glu	Val	Leu	Arg	Gln	Gln	Pro	Pro	Asp	Leu	Val	Glu	Phe	Ala
				20				25					30		
Val	Glu	Tyr	Phe	Thr	Arg	Leu	Arg	Glu	Ala	Arg	Ala				
				35				40							

<210> 15

<211> 44

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 15

Ser	His	Ile	Asn	Ile	Pro	Pro	Gly	Leu	Thr	Glu	Leu	Leu	Gln	Gly	Tyr
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

1	5	10	15												
Thr	Val	Glu	Val	Leu	Arg	Gln	Gln	Pro	Pro	Asp	Leu	Val	Glu	Phe	Ala
	20							25					30		
Val	Glu	Tyr	Phe	Thr	Arg	Leu	Arg	Glu	Ala	Arg	Ala				
	35							40							

<210> 16

<211> 44

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 16

Ser	His	Ile	Gln	Ile	Pro	Pro	Ala	Leu	Thr	Glu	Leu	Leu	Gln	Gly	Tyr
1				5					10					15	
Thr	Val	Glu	Val	Leu	Arg	Gln	Gln	Pro	Pro	Asp	Leu	Val	Glu	Phe	Ala
			20					25					30		
Val	Glu	Tyr	Phe	Thr	Arg	Leu	Arg	Glu	Ala	Arg	Ala				
			35					40							

<210> 17

<211> 44

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 17

Ser	His	Ile	Gln	Ile	Pro	Pro	Gly	Leu	Ser	Glu	Leu	Leu	Gln	Gly	Tyr
1				5					10					15	
Thr	Val	Glu	Val	Leu	Arg	Gln	Gln	Pro	Pro	Asp	Leu	Val	Glu	Phe	Ala
			20					25					30		
Val	Glu	Tyr	Phe	Thr	Arg	Leu	Arg	Glu	Ala	Arg	Ala				
			35					40							

<210> 18

<211> 44

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 18

Ser	His	Ile	Gln	Ile	Pro	Pro	Gly	Leu	Thr	Asp	Leu	Leu	Gln	Gly	Tyr
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

1	5	10	15												
Thr	Val	Glu	Val	Leu	Arg	Gln	Gln	Pro	Pro	Asp	Leu	Val	Glu	Phe	Ala
		20						25					30		
Val	Glu	Tyr	Phe	Thr	Arg	Leu	Arg	Glu	Ala	Arg	Ala				
		35						40							

<210> 19

<211> 44

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 19

Ser	His	Ile	Gln	Ile	Pro	Pro	Gly	Leu	Thr	Glu	Leu	Leu	Asn	Gly	Tyr
1				5					10					15	
Thr	Val	Glu	Val	Leu	Arg	Gln	Gln	Pro	Pro	Asp	Leu	Val	Glu	Phe	Ala
				20				25					30		
Val	Glu	Tyr	Phe	Thr	Arg	Leu	Arg	Glu	Ala	Arg	Ala				
				35				40							

<210> 20

<211> 44

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 20

Ser	His	Ile	Gln	Ile	Pro	Pro	Gly	Leu	Thr	Glu	Leu	Leu	Gln	Ala	Tyr
1				5					10					15	
Thr	Val	Glu	Val	Leu	Arg	Gln	Gln	Pro	Pro	Asp	Leu	Val	Glu	Phe	Ala
				20				25					30		
Val	Glu	Tyr	Phe	Thr	Arg	Leu	Arg	Glu	Ala	Arg	Ala				
				35				40							

<210> 21

<211> 44

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 21

Ser	His	Ile	Gln	Ile	Pro	Pro	Gly	Leu	Thr	Glu	Leu	Leu	Gln	Gly	Tyr
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

1	5	10	15												
Ser	Val	Glu	Val	Leu	Arg	Gln	Gln	Pro	Pro	Asp	Leu	Val	Glu	Phe	Ala
	20						25						30		
Val	Glu	Tyr	Phe	Thr	Arg	Leu	Arg	Glu	Ala	Arg	Ala				
	35						40								

<210> 22

<211> 44

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 22

Ser	His	Ile	Gln	Ile	Pro	Pro	Gly	Leu	Thr	Glu	Leu	Leu	Gln	Gly	Tyr
1				5					10					15	
Thr	Val	Asp	Val	Leu	Arg	Gln	Gln	Pro	Pro	Asp	Leu	Val	Glu	Phe	Ala
			20					25					30		
Val	Glu	Tyr	Phe	Thr	Arg	Leu	Arg	Glu	Ala	Arg	Ala				
			35				40								

<210> 23

<211> 44

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 23

Ser	His	Ile	Gln	Ile	Pro	Pro	Gly	Leu	Thr	Glu	Leu	Leu	Gln	Gly	Tyr
1				5					10					15	
Thr	Val	Glu	Val	Leu	Lys	Gln	Gln	Pro	Pro	Asp	Leu	Val	Glu	Phe	Ala
			20					25					30		
Val	Glu	Tyr	Phe	Thr	Arg	Leu	Arg	Glu	Ala	Arg	Ala				
			35				40								

<210> 24

<211> 44

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 24

Ser	His	Ile	Gln	Ile	Pro	Pro	Gly	Leu	Thr	Glu	Leu	Leu	Gln	Gly	Tyr
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

1	5	10	15												
Thr	Val	Glu	Val	Leu	Arg	Asn	Gln	Pro	Pro	Asp	Leu	Val	Glu	Phe	Ala
		20						25					30		
Val	Glu	Tyr	Phe	Thr	Arg	Leu	Arg	Glu	Ala	Arg	Ala				
		35						40							

<210> 25

<211> 44

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 25

Ser	His	Ile	Gln	Ile	Pro	Pro	Gly	Leu	Thr	Glu	Leu	Leu	Gln	Gly	Tyr
1				5					10					15	
Thr	Val	Glu	Val	Leu	Arg	Gln	Asn	Pro	Pro	Asp	Leu	Val	Glu	Phe	Ala
				20					25				30		
Val	Glu	Tyr	Phe	Thr	Arg	Leu	Arg	Glu	Ala	Arg	Ala				
				35				40							

<210> 26

<211> 44

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 26

Ser	His	Ile	Gln	Ile	Pro	Pro	Gly	Leu	Thr	Glu	Leu	Leu	Gln	Gly	Tyr
1				5					10					15	
Thr	Val	Glu	Val	Leu	Arg	Gln	Gln	Pro	Pro	Glu	Leu	Val	Glu	Phe	Ala
				20					25				30		
Val	Glu	Tyr	Phe	Thr	Arg	Leu	Arg	Glu	Ala	Arg	Ala				
				35				40							

<210> 27

<211> 44

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 27

Ser	His	Ile	Gln	Ile	Pro	Pro	Gly	Leu	Thr	Glu	Leu	Leu	Gln	Gly	Tyr
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

1	5	10	15												
Thr	Val	Glu	Val	Leu	Arg	Gln	Gln	Pro	Pro	Asp	Leu	Val	Asp	Phe	Ala
	20			25				30							
Val	Glu	Tyr	Phe	Thr	Arg	Leu	Arg	Glu	Ala	Arg	Ala				
	35							40							

<210> 28

<211> 44

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 28

Ser	His	Ile	Gln	Ile	Pro	Pro	Gly	Leu	Thr	Glu	Leu	Leu	Gln	Gly	Tyr
1				5				10					15		
Thr	Val	Glu	Val	Leu	Arg	Gln	Gln	Pro	Pro	Asp	Leu	Val	Glu	Phe	Leu
		20						25					30		
Val	Glu	Tyr	Phe	Thr	Arg	Leu	Arg	Glu	Ala	Arg	Ala				
		35						40							

<210> 29

<211> 44

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 29

Ser	His	Ile	Gln	Ile	Pro	Pro	Gly	Leu	Thr	Glu	Leu	Leu	Gln	Gly	Tyr
1				5				10					15		
Thr	Val	Glu	Val	Leu	Arg	Gln	Gln	Pro	Pro	Asp	Leu	Val	Glu	Phe	Ile
		20						25					30		
Val	Glu	Tyr	Phe	Thr	Arg	Leu	Arg	Glu	Ala	Arg	Ala				
		35						40							

<210> 30

<211> 44

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 30

Ser	His	Ile	Gln	Ile	Pro	Pro	Gly	Leu	Thr	Glu	Leu	Leu	Gln	Gly	Tyr
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

1	5	10	15												
Thr	Val	Glu	Val	Leu	Arg	Gln	Gln	Pro	Pro	Asp	Leu	Val	Glu	Phe	Val
		20						25					30		
Val	Glu	Tyr	Phe	Thr	Arg	Leu	Arg	Glu	Ala	Arg	Ala				
		35						40							

<210> 31

<211> 44

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 31

Ser	His	Ile	Gln	Ile	Pro	Pro	Gly	Leu	Thr	Glu	Leu	Leu	Gln	Gly	Tyr
1				5					10					15	
Thr	Val	Glu	Val	Leu	Arg	Gln	Gln	Pro	Pro	Asp	Leu	Val	Glu	Phe	Ala
				20					25				30		
Val	Asp	Tyr	Phe	Thr	Arg	Leu	Arg	Glu	Ala	Arg	Ala				
				35				40							

<210> 32

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 32

Asn	Ile	Glu	Tyr	Leu	Ala	Lys	Gln	Ile	Val	Asp	Asn	Ala	Ile	Gln	Gln
1					5				10					15	
Ala															

<210> 33

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 33

Gln	Leu	Glu	Tyr	Leu	Ala	Lys	Gln	Ile	Val	Asp	Asn	Ala	Ile	Gln	Gln
1					5				10					15	
Ala															

<210> 34

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 34

Gln Val Glu Tyr Leu Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile Gln Gln

1 5 10 15

Ala

<210> 35

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 35

Gln Ile Asp Tyr Leu Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile Gln Gln

1 5 10 15

Ala

<210> 36

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 36

Gln Ile Glu Phe Leu Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile Gln Gln

1 5 10 15

Ala

<210> 37

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 37

Gln Ile Glu Thr Leu Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile Gln Gln

1 5 10 15

Ala

<210> 38

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 38

Gln Ile Glu Ser Leu Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile Gln Gln

1 5 10 15

Ala

<210> 39

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 39

Gln Ile Glu Tyr Ile Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile Gln Gln

1 5 10 15

Ala

<210> 40

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 40

Gln Ile Glu Tyr Val Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile Gln Gln

1 5 10 15

Ala

<210> 41

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 41

Gln Ile Glu Tyr Leu Ala Arg Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile Gln Gln

1 5 10 15

Ala

<210> 42

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 42

Gln Ile Glu Tyr Leu Ala Lys Asn Ile Val Asp Asn Ala Ile Gln Gln

1 5 10 15

Ala

<210> 43

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 43

Gln Ile Glu Tyr Leu Ala Lys Gln Ile Val Glu Asn Ala Ile Gln Gln

1 5 10 15

Ala

<210> 44

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 44

Gln Ile Glu Tyr Leu Ala Lys Gln Ile Val Asp Gln Ala Ile Gln Gln

1 5 10 15

Ala

<210> 45

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 45

Gln Ile Glu Tyr Leu Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile Asn Gln

1	5	10	15
---	---	----	----

Ala

<210> 46

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 46

Gln Ile Glu Tyr Leu Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile Gln Asn

1	5	10	15
---	---	----	----

Ala

<210> 47

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 47

Gln Ile Glu Tyr Leu Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile Gln Gln

1	5	10	15
---	---	----	----

Leu

<210> 48

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 48

Gln Ile Glu Tyr Leu Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile Gln Gln

1	5	10	15
---	---	----	----

Ile

<210> 49

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 49

Gln Ile Glu Tyr Leu Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile Gln Gln

1 5 10 15

Val

<210> 50

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 50

Gln Ile Glu Tyr Val Ala Lys Gln Ile Val Asp Tyr Ala Ile His Gln

1 5 10 15

Ala

<210> 51

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 51

Gln Ile Glu Tyr Lys Ala Lys Gln Ile Val Asp His Ala Ile His Gln

1 5 10 15

Ala

<210> 52

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 52

Gln Ile Glu Tyr His Ala Lys Gln Ile Val Asp His Ala Ile His Gln

1 5 10 15

Ala

<210> 53

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 53

Gln Ile Glu Tyr Val Ala Lys Gln Ile Val Asp His Ala Ile His Gln

1 5 10 15

Ala

<210> 54

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 54

Pro Leu Glu Tyr Gln Ala Gly Leu Leu Val Gln Asn Ala Ile Gln Gln

1 5 10 15

Ala Ile

<210> 55

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 55

Leu Leu Ile Glu Thr Ala Ser Ser Leu Val Lys Asn Ala Ile Gln Leu

1 5 10 15

Ser Ile

<210> 56

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 56

Leu Ile Glu Glu Ala Ala Ser Arg Ile Val Asp Ala Val Ile Glu Gln

1 5 10 15

Val Lys

<210> 57

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 57

Ala Leu Tyr Gln Phe Ala Asp Arg Phe Ser Glu Leu Val Ile Ser Glu

1 5 10 15

Ala Leu

<210> 58

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 58

Leu Glu Gln Val Ala Asn Gln Leu Ala Asp Gln Ile Ile Lys Glu Ala

1 5 10 15

Thr

<210> 59

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 59

Phe Glu Glu Leu Ala Trp Lys Ile Ala Lys Met Ile Trp Ser Asp Val

1 5 10 15

Phe

<210> 60

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 60

Glu Leu Val Arg Leu Ser Lys Arg Leu Val Glu Asn Ala Val Leu Lys

1 5 10 15

Ala Val

<210> 61

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 61

Thr Ala Glu Glu Val Ser Ala Arg Ile Val Gln Val Val Thr Ala Glu

1 5 10 15

Ala Val

<210> 62

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 62

Gln Ile Lys Gln Ala Ala Phe Gln Leu Ile Ser Gln Val Ile Leu Glu

1 5 10 15

Ala Thr

<210> 63

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 63

Leu Ala Trp Lys Ile Ala Lys Met Ile Val Ser Asp Val Met Gln Gln

1 5 10 15

<210> 64

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 64

Asp Leu Ile Glu Glu Ala Ala Ser Arg Ile Val Asp Ala Val Ile Glu

1 5 10 15

Gln Val Lys Ala Ala Gly Ala Tyr

20

<210> 65

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 65

Leu Glu Gln Tyr Ala Asn Gln Leu Ala Asp Gln Ile Ile Lys Glu Ala

1 5 10 15

Thr Glu

<210> 66

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 66

Phe Glu Glu Leu Ala Trp Lys Ile Ala Lys Met Ile Trp Ser Asp Val

1 5 10 15

Phe Gln Gln Cys

20

<210> 67

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 67

Gln Ile Glu Tyr Leu Ala Lys Gln Ile Pro Asp Asn Ala Ile Gln Gln

1 5 10 15

Ala

<210> 68

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 68

Lys Gly Ala Asp Leu Ile Glu Glu Ala Ala Ser Arg Ile Val Asp Ala

1 5 10 15

Val Ile Glu Gln Val Lys Ala Ala Gly

20

25

<210> 69

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 69

Lys Gly Ala Asp Leu Ile Glu Glu Ala Ala Ser Arg Ile Pro Asp Ala

1 5 10 15

Pro Ile Glu Gln Val Lys Ala Ala Gly

20 25

<210> 70

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 70

Pro Glu Asp Ala Glu Leu Val Arg Leu Ser Lys Arg Leu Val Glu Asn

1 5 10 15

Ala Val Leu Lys Ala Val Gln Gln Tyr

20 25

<210> 71

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 71

Pro Glu Asp Ala Glu Leu Val Arg Thr Ser Lys Arg Leu Val Glu Asn

1 5 10 15

Ala Val Leu Lys Ala Val Gln Gln Tyr

20 25

<210> 72

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 72

Pro Glu Asp Ala Glu Leu Val Arg Leu Ser Lys Arg Asp Val Glu Asn
1 5 10 15
Ala Val Leu Lys Ala Val Gln Gln Tyr
 20 25

<210> 73

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 73

Pro Glu Asp Ala Glu Leu Val Arg Leu Ser Lys Arg Leu Pro Glu Asn
1 5 10 15
Ala Val Leu Lys Ala Val Gln Gln Tyr
 20 25

<210> 74

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 74

Pro Glu Asp Ala Glu Leu Val Arg Leu Ser Lys Arg Leu Pro Glu Asn
1 5 10 15
Ala Pro Leu Lys Ala Val Gln Gln Tyr
 20 25

<210> 75

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 75

Pro Glu Asp Ala Glu Leu Val Arg Leu Ser Lys Arg Leu Val Glu Asn
1 5 10 15
Ala Val Glu Lys Ala Val Gln Gln Tyr
 20 25

<210> 76

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 76

Glu Glu Gly Leu Asp Arg Asn Glu Glu Ile Lys Arg Ala Ala Phe Gln

1 5 10 15

Ile Ile Ser Gln Val Ile Ser Glu Ala

20 25

<210> 77

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 77

Leu Val Asp Asp Pro Leu Glu Tyr Gln Ala Gly Leu Leu Val Gln Asn

1 5 10 15

Ala Ile Gln Gln Ala Ile Ala Glu Gln

20 25

<210> 78

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 78

Gln Tyr Glu Thr Leu Leu Ile Glu Thr Ala Ser Ser Leu Val Lys Asn

1 5 10 15

Ala Ile Gln Leu Ser Ile Glu Gln Leu

20 25

<210> 79

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 79

Leu Glu Lys Gln Tyr Gln Glu Gln Leu Glu Glu Glu Val Ala Lys Val
1 5 10 15

Ile Val Ser Met Ser Ile Ala Phe Ala
20 25

<210> 80

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 80

Asn Thr Asp Glu Ala Gln Glu Glu Leu Ala Trp Lys Ile Ala Lys Met
1 5 10 15

Ile Val Ser Asp Ile Met Gln Gln Ala
20 25

<210> 81

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 81

Val Asn Leu Asp Lys Lys Ala Val Leu Ala Glu Lys Ile Val Ala Glu
1 5 10 15

Ala Ile Glu Lys Ala Glu Arg Glu Leu
20 25

<210> 82

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 82

Asn Gly Ile Leu Glu Leu Glu Thr Lys Ser Ser Lys Leu Val Gln Asn
1 5 10 15

Ile Ile Gln Thr Ala Val Asp Gln Phe
20 25

<210> 83

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 83

Thr	Gln	Asp	Lys	Asn	Tyr	Glu	Asp	Glu	Leu	Thr	Gln	Val	Ala	Leu	Ala
1				5					10					15	
Leu	Val	Glu	Asp	Val	Ile	Asn	Tyr	Ala							
				20					25						

<210> 84

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 84

Glu	Thr	Ser	Ala	Lys	Asp	Asn	Ile	Asn	Ile	Glu	Glu	Ala	Ala	Arg	Phe
1				5					10					15	
Leu	Val	Glu	Lys	Ile	Leu	Val	Asn	His							
				20					25						

<210> 85

<211> 330

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 85

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

Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
20				25				30							
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
35				40				45							
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
50				55				60							
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
65				70				75				80			
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
85				90				95							
Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
100				105				110							
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
115				120				125							
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
130				135				140							
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
145				150				155				160			
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
165				170				175							
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
180				185				190							
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
195				200				205							
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
210				215				220							
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu
225				230				235				240			
Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
245				250				255							
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
260				265				270							
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
275				280				285							
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
290				295				300							
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr
305				310				315				320			
Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys						

325

330

<210> 87
<211> 44
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (1) .. (1)
<223> Ser或Thr
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2) .. (2)
<223> His, Lys或Arg
<220>
<221> MOD_RES
<222> (4) .. (4)
<223> Gln或Asn
<220>
<221> MOD_RES
<222> (8) .. (8)
<223> Gly或Ala
<220>
<221> MOD_RES
<222> (10) .. (10)
<223> Thr或Ser
<220>
<221> MOD_RES
<222> (11) .. (11)
<223> Glu或Asp
<220>
<221> MOD_RES
<222> (14) .. (14)
<223> Gln或Asn
<220>
<221> MOD_RES
<222> (15) .. (15)
<223> Gly或Ala

<220>
<221> MOD_RES
<222> (17) .. (17)
<223> Thr或Ser
<220>
<221> MOD_RES
<222> (19) .. (19)
<223> Glu或Asp
<220>
<221> MOD_RES
<222> (22) .. (22)
<223> Arg或Lys
<220>
<221> MOD_RES
<222> (23) .. (24)
<223> Gln或Asn
<220>
<221> MOD_RES
<222> (27) .. (27)
<223> Asp或Glu
<220>
<221> MOD_RES
<222> (30) .. (30)
<223> Glu或Asp
<220>
<221> MOD_RES
<222> (32) .. (32)
<223> Ala, Leu, Ile或Val
<220>
<221> MOD_RES
<222> (34) .. (34)
<223> Glu或Asp
<220>
<221> MOD_RES
<222> (37) .. (37)
<223> Thr或Ser
<220>
<221> MOD_RES
<222> (38) .. (38)

<223> Arg或Lys
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (40) .. (40)
 <223> Arg或Lys
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (41) .. (41)
 <223> Glu或Asp
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (42) .. (42)
 <223> Ala, Leu, Ile或Val
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (43) .. (43)
 <223> Arg或Lys
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (44) .. (44)
 <223> Ala, Leu, Ile或Val
 <400> 87
 Xaa Xaa Ile Xaa Ile Pro Pro Xaa Leu Xaa Xaa Leu Leu Xaa Xaa Tyr
 1 5 10 15
 Xaa Val Xaa Val Leu Xaa Xaa Xaa Pro Pro Xaa Leu Val Xaa Phe Xaa
 20 25 30
 Val Xaa Tyr Phe Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 35 40
 <210> 88
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述：合成肽
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1) .. (1)
 <223> Gln或Asn
 <220>

<221> MOD_RES
<222> (2) .. (2)
<223> Ile, Leu或Val
<220>
<221> MOD_RES
<222> (3) .. (3)
<223> Glu或Asp
<220>
<221> MOD_RES
<222> (4) .. (4)
<223> Tyr, Phe, Thr或Ser
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5) .. (5)
<223> Leu, Ile或Val
<220>
<221> MOD_RES
<222> (7) .. (7)
<223> Lys或Arg
<220>
<221> MOD_RES
<222> (8) .. (8)
<223> Gln或Asn
<220>
<221> MOD_RES
<222> (11) .. (11)
<223> Asp或Glu
<220>
<221> MOD_RES
<222> (12) .. (12)
<223> Asn或Gln
<220>
<221> MOD_RES
<222> (15) .. (16)
<223> Gln或Asn
<220>
<221> MOD_RES
<222> (17) .. (17)
<223> Ala, Leu, Ile或Val

<400> 88

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ala Xaa Xaa Ile Val Xaa Xaa Ala Ile Xaa Xaa

1

5

10

15

Xaa

<210> 89

<211> 44

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1) .. (1)

<223> Ser或Thr

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4) .. (4)

<223> Gln或Asn

<220>

<221> MOD_RES

<222> (10) .. (10)

<223> Thr或Ser

<220>

<221> MOD_RES

<222> (18) .. (18)

<223> Val, Ile, Leu或Ala

<220>

<221> MOD_RES

<222> (23) .. (23)

<223> Gln或Asn

<220>

<221> MOD_RES

<222> (33) .. (33)

<223> Val, Ile, Leu或Ala

<220>

<221> MOD_RES

<222> (34) .. (34)

<223> Glu或Asp

<220>

<221> MOD_RES
 <222> (37) .. (37)
 <223> Thr或Ser
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (38) .. (38)
 <223> Arg或Lys
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (40) .. (40)
 <223> Arg或Lys
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (42) .. (42)
 <223> Ala, Leu, Ile或Val
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (44) .. (44)
 <223> Ala, Leu, Ile或Val
 <400> 89
 Xaa His Ile Xaa Ile Pro Pro Gly Leu Xaa Glu Leu Leu Gln Gly Tyr
 1 5 10 15
 Thr Xaa Glu Val Leu Arg Xaa Gln Pro Pro Asp Leu Val Glu Phe Ala
 20 25 30
 Xaa Xaa Tyr Phe Xaa Xaa Leu Xaa Glu Xaa Arg Xaa
 35 40
 <210> 90
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述：合成肽
 <400> 90
 Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Ala Val Ala
 1 5 10
 <210> 91
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 91

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr

1 5

<210> 92

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 92

Gln Gln His Tyr Ile Thr Pro Leu Thr

1 5

<210> 93

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 93

Asn Tyr Gly Met Asn

1 5

<210> 94

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 94

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Thr Asp Asp Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 95

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 95

Gly Gly Phe Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val

1 5 10

<210> 96

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 96

Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ser Val Ala

1 5 10

<210> 97

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 97

Trp Thr Ser Thr Arg His Thr

1 5

<210> 98

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 98

Gln Gln Tyr Ser Leu Tyr Arg Ser

1 5

<210> 99

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 99

Thr Tyr Trp Met Ser

1 5

<210> 100

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 100

Glu Ile His Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu Lys

1

5

10

15

Asp

<210> 101

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 101

Leu Tyr Phe Gly Phe Pro Trp Phe Ala Tyr

1

5

10

<210> 102

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 102

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu

1

5

10

15

<210> 103

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 103

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1

5

<210> 104

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 104

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Pro Thr

1 5

<210> 105

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 105

Asn Tyr Gly Met Asn

1 5

<210> 106

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 106

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 107

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 107

Lys Gly Trp Met Asp Phe Asn Ser Ser Leu Asp Tyr

1 5 10

<210> 108

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 108

Ser Ala Ser Ser Arg Val Ser Tyr Ile His

1 5 10

<210> 109

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 109

Gly Thr Ser Thr Leu Ala Ser

1 5

<210> 110

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 110

Gln Gln Trp Ser Tyr Asn Pro Pro Thr

1 5

<210> 111

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 111

Asp Tyr Tyr Met Ser

1 5

<210> 112

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 112

Phe Ile Ala Asn Lys Ala Asn Gly His Thr Thr Asp Tyr Ser Pro Ser

1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 113

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 113

Asp Met Gly Ile Arg Trp Asn Phe Asp Val

1 5 10

<210> 114

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 114

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Arg Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His

1 5 10 15

<210> 115

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 115

Thr Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 116

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 116

Ser Gln Ser Ser His Val Pro Pro Thr

1 5

<210> 117

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 117

Asn Tyr Gly Val Asn

1 5

<210> 118

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 118

Trp Ile Asn Pro Asn Thr Gly Glu Pro Thr Phe Asp Asp Asp Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 119

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 119

Ser Arg Gly Lys Asn Glu Ala Trp Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 120

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 120

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ala Asn His Lys Tyr Leu Ala

1 5 10 15

<210> 121

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 121

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 122

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 122

His Gln Tyr Leu Ser Ser Trp Thr Phe

1 5

<210> 123

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 123

Ser Tyr Trp Leu His

1 5

<210> 124

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 124

Tyr Ile Asn Pro Arg Asn Asp Tyr Thr Glu Tyr Asn Gln Asn Phe Lys

1 5 10 15

Asp

<210> 125

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 125

Arg Asp Ile Thr Thr Phe Tyr

1 5

<210> 126

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 126

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu

1 5 10 15

<210> 127

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 127

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 128

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 128

Phe Gln Gly Ser Arg Val Pro Tyr Thr

1 5

<210> 129

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 129

Glu Tyr Val Ile Thr

1 5

<210> 130

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 130

Glu Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

<210> 131

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 131

Glu Asp Leu

1

<210> 132

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 132

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Tyr

1 5 10

<210> 133

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 133

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser

1 5

<210> 134

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 134

His Gln Trp Asn Arg Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 135

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 135

Ser Tyr Val Leu His

1 5

<210> 136

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 136

Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Gln Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 137

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 137

Gly Phe Gly Gly Ser Tyr Gly Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 138

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 138

Ser Tyr Val Ile His

1 5

<210> 139

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 139

Tyr Ile His Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 140

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 140

Ser Gly Gly Gly Asp Pro Phe Ala Tyr

1 5

<210> 141

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 141

Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Tyr Ile Gly

1 5 10

<210> 142

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 142

Tyr Thr Ser Ala Leu Leu Pro

1 5

<210> 143

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 143

Leu Gln Tyr Asp Asp Leu Trp Thr

1 5

<210> 144

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 144

Asn Tyr Gly Met Asn

1 5

<210> 145

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 145

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Arg Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 146

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 146

Asp Ile Thr Ala Val Val Pro Thr Gly Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 147

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 147

Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala

1 5 10

<210> 148

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 148

Ala Ala Ser Asn Leu Ala Asp

1 5

<210> 149

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 149

Gln His Phe Trp Thr Thr Pro Trp Ala

1 5

<210> 150

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 150

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile His

1 5 10

<210> 151

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 151

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser

1 5

<210> 152

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 152

Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr

1 5

<210> 153

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 153

Ser Tyr Asn Met His

1 5

<210> 154

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 154

Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 155

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 155

Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asp Val

1 5 10

<210> 156

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 156

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Leu Asn

1 5 10 15

<210> 157

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 157

Asp Ala Ser Asn Leu Val Ser

1 5

<210> 158

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 158

Gln Gln Ser Thr Glu Asp Pro Trp Thr

1 5

<210> 159

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 159

Ser Tyr Trp Met Asn

1 5

<210> 160

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 160

Gln Ile Trp Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 161

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 161

Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5 10 15

<210> 162

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 162

Glu Phe Pro Lys Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser Ser Gly Gly Ala Pro

1 5 10 15

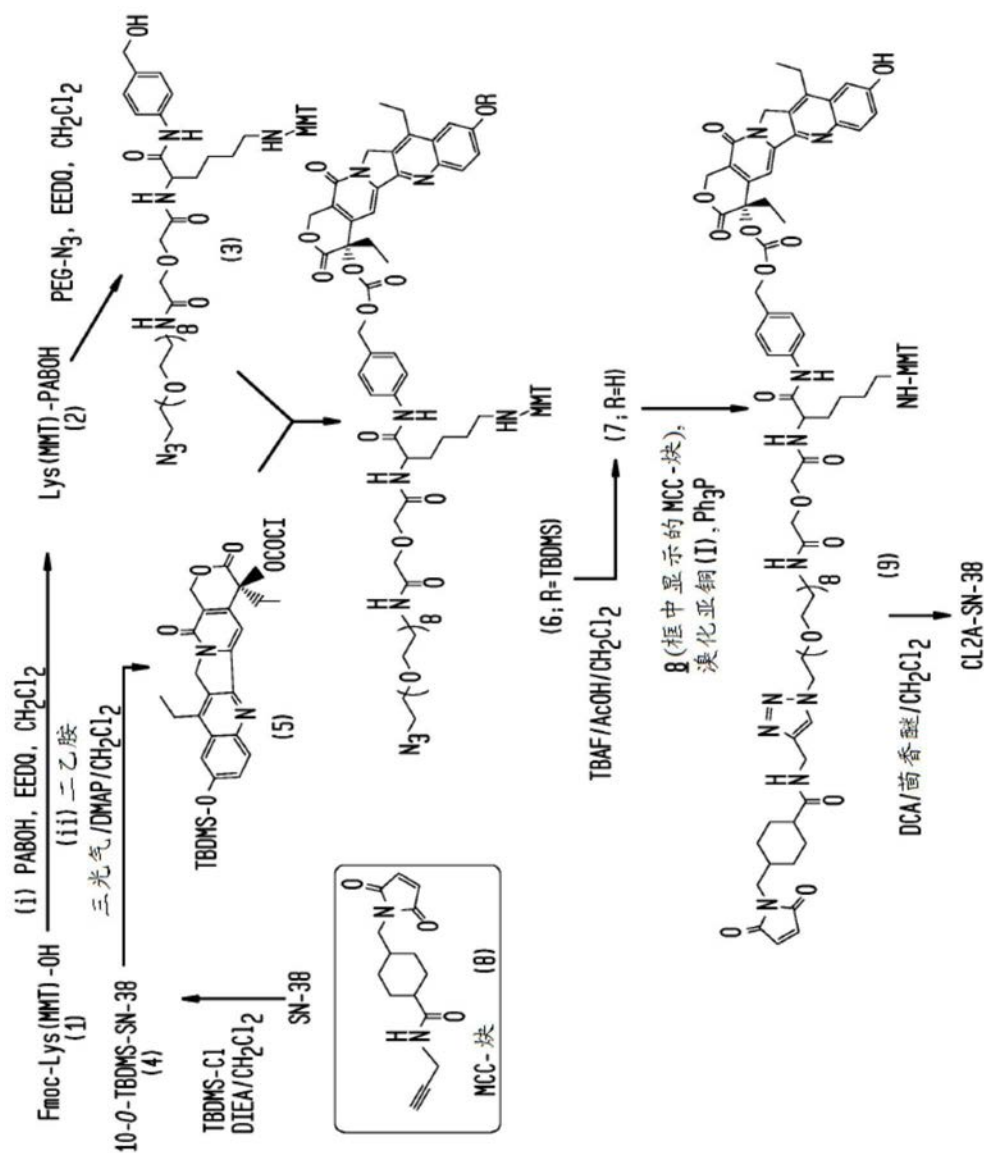


图1

MAb-CL2A-SN38免疫缀合物在具有Capan-1
肿瘤的小鼠中的治疗功效
(250 μ g, 每周二次, 进行4周), n = 9-10

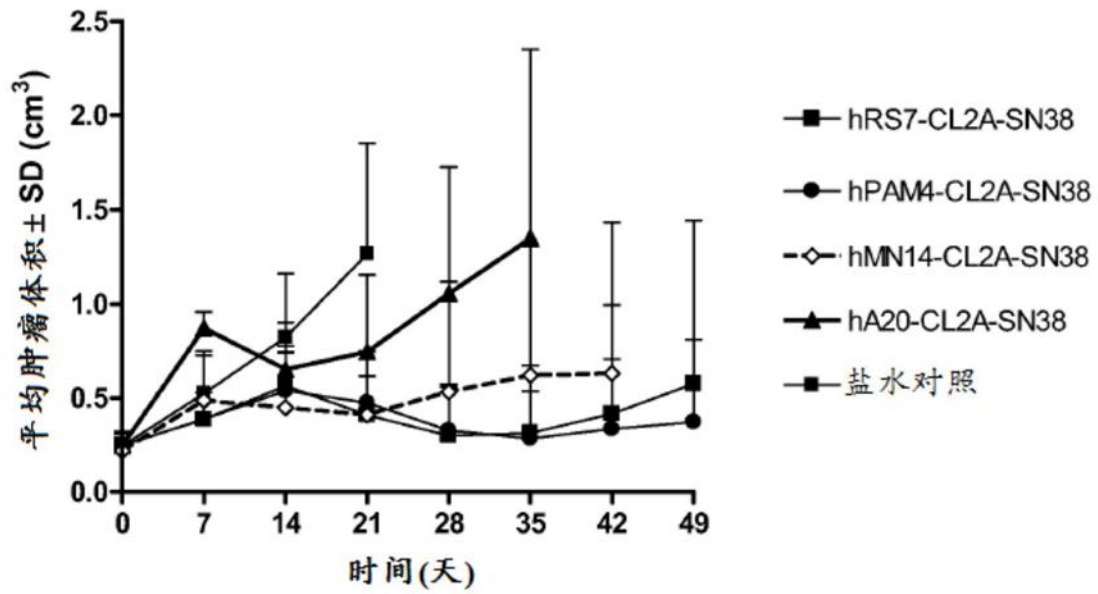


图2

MAb-CL2A-SN38免疫缀合物在具有人胰腺腺癌
异种移植物(BxPC-3)中的治疗功效
(500 μ g, 每周二次, 进行4周), n = 10

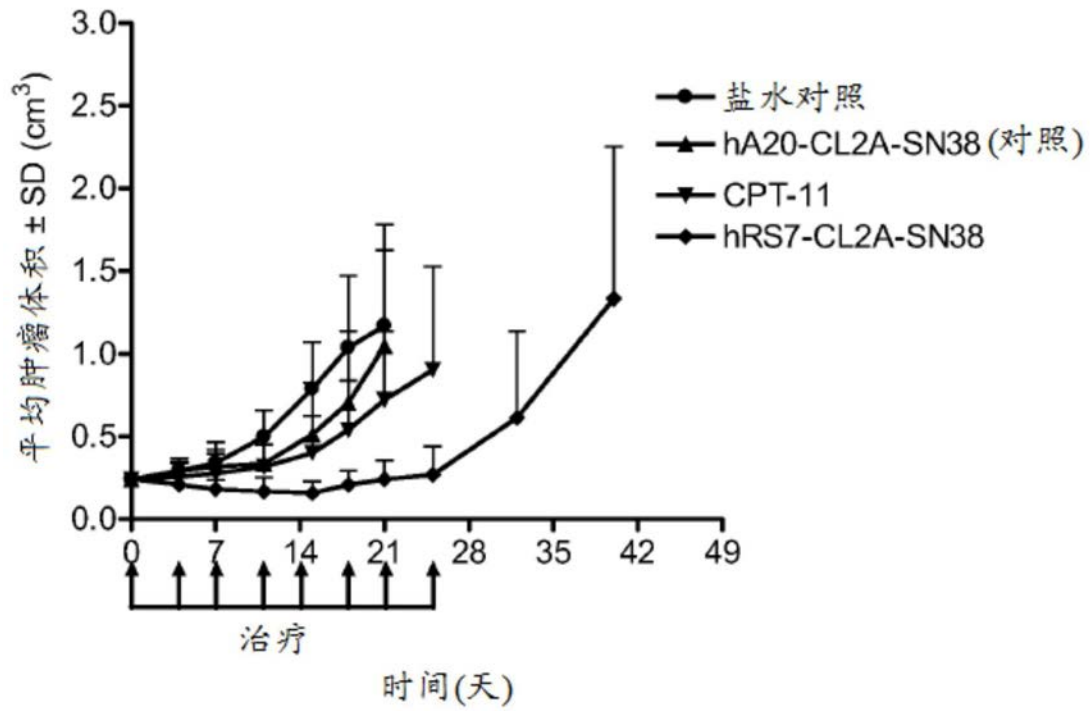


图3

hMN-14-CL2A-SN38在实验性人结肠癌(LS 174T)的治疗功效
(500 mg, 腹膜内注射, 每周2次, 进行2周), n = 10

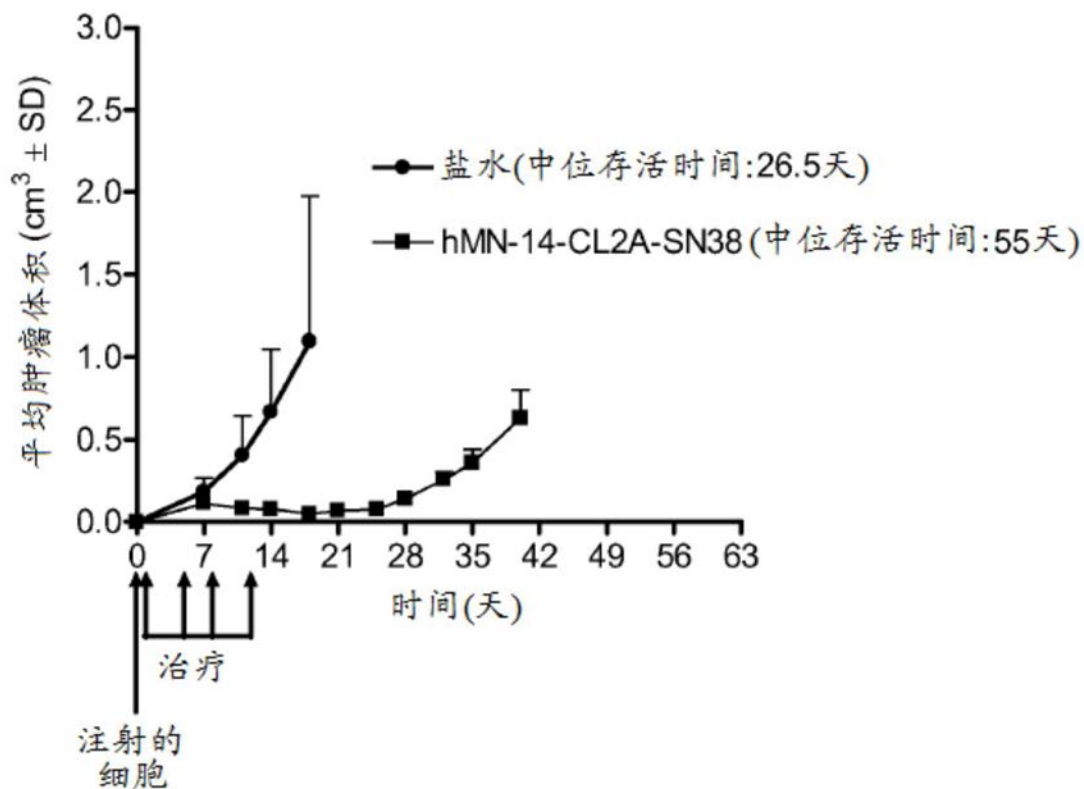


图4

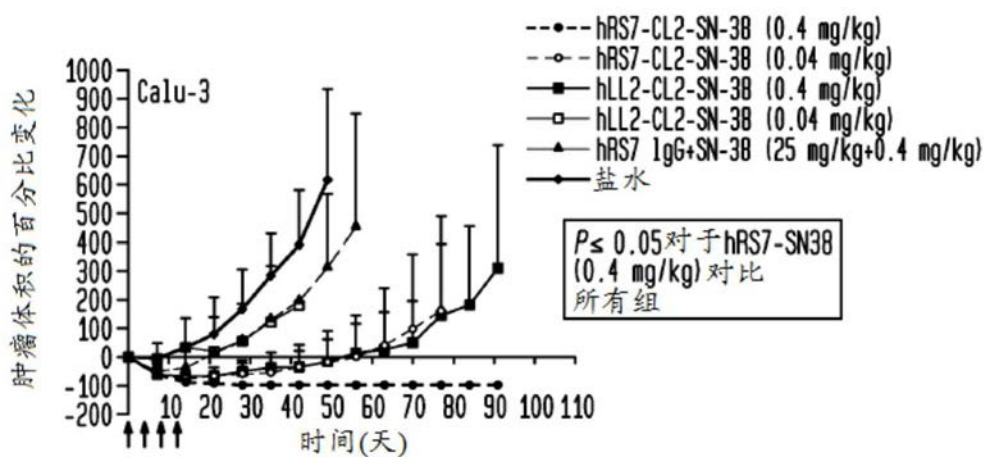


图5A

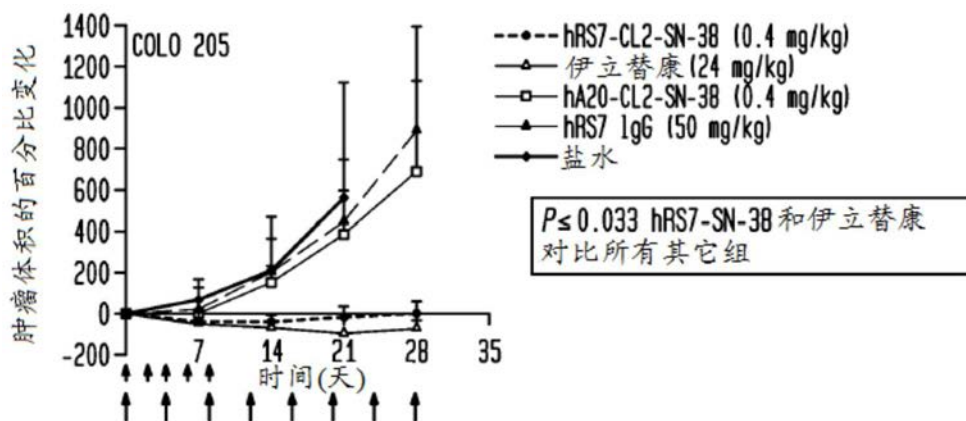


图5B

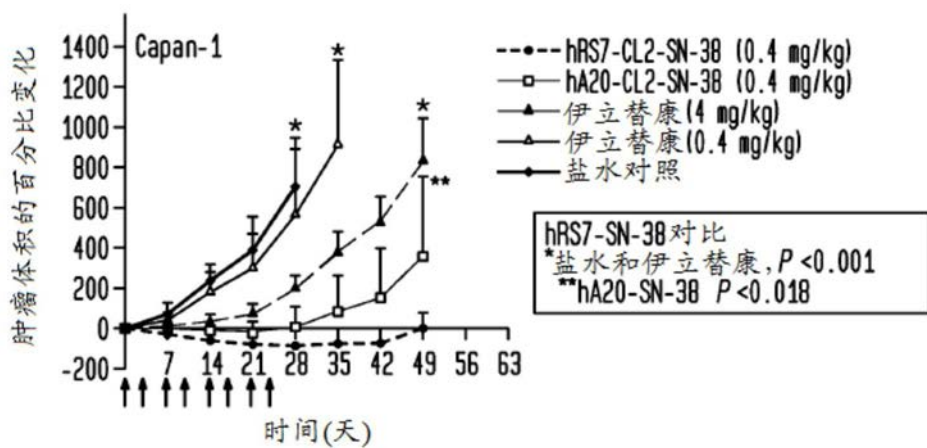


图5C

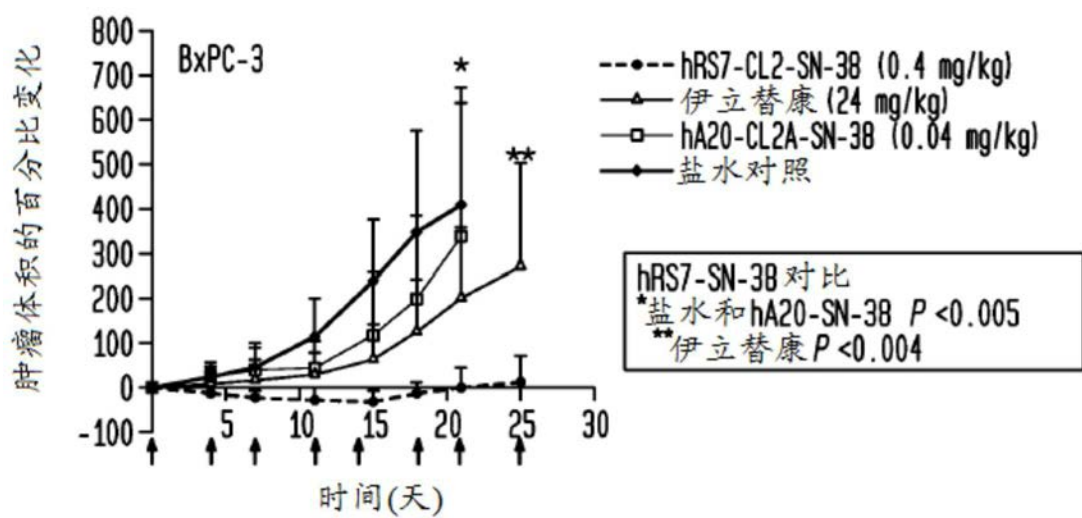


图5D

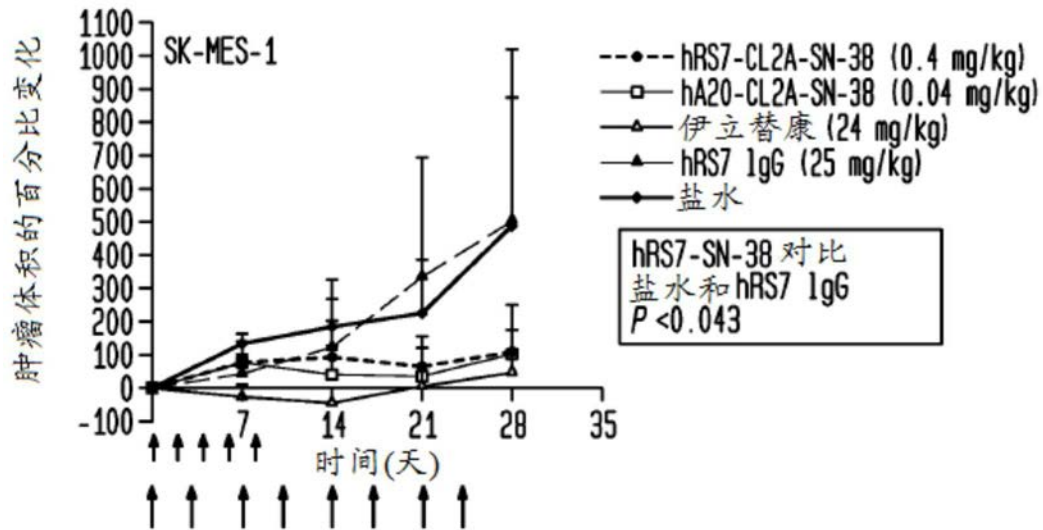


图5E

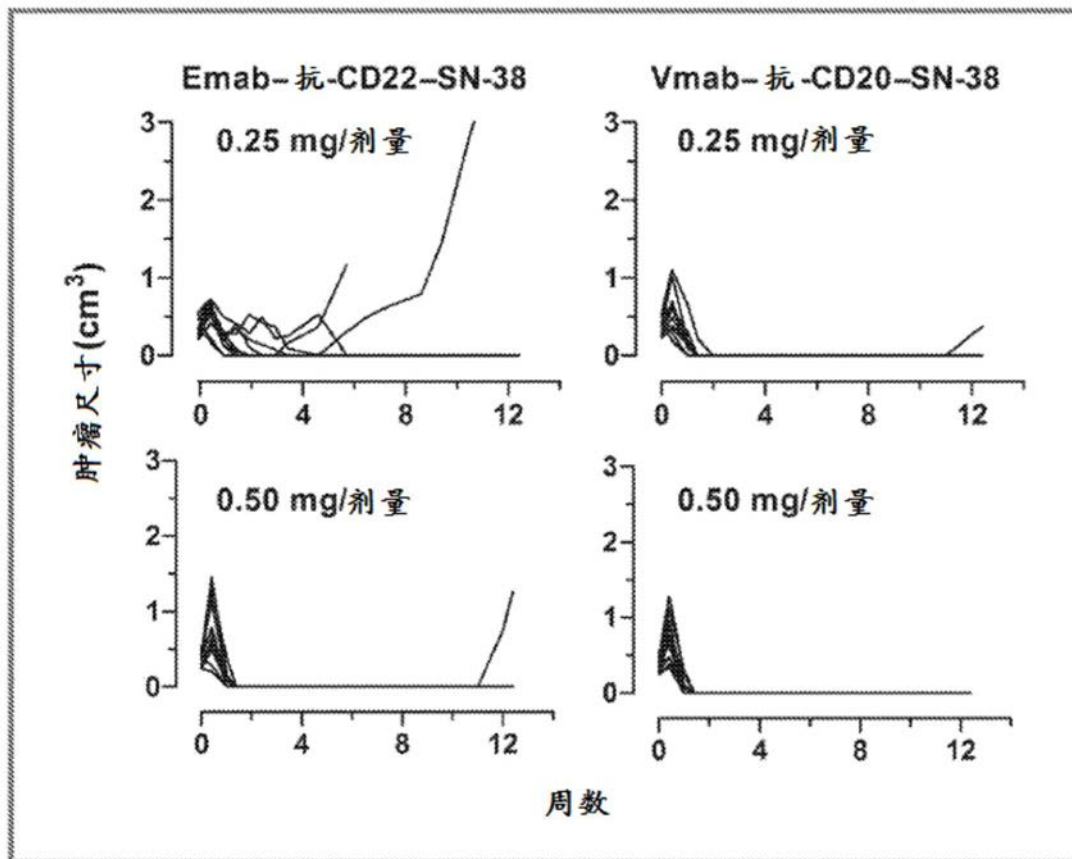


图6

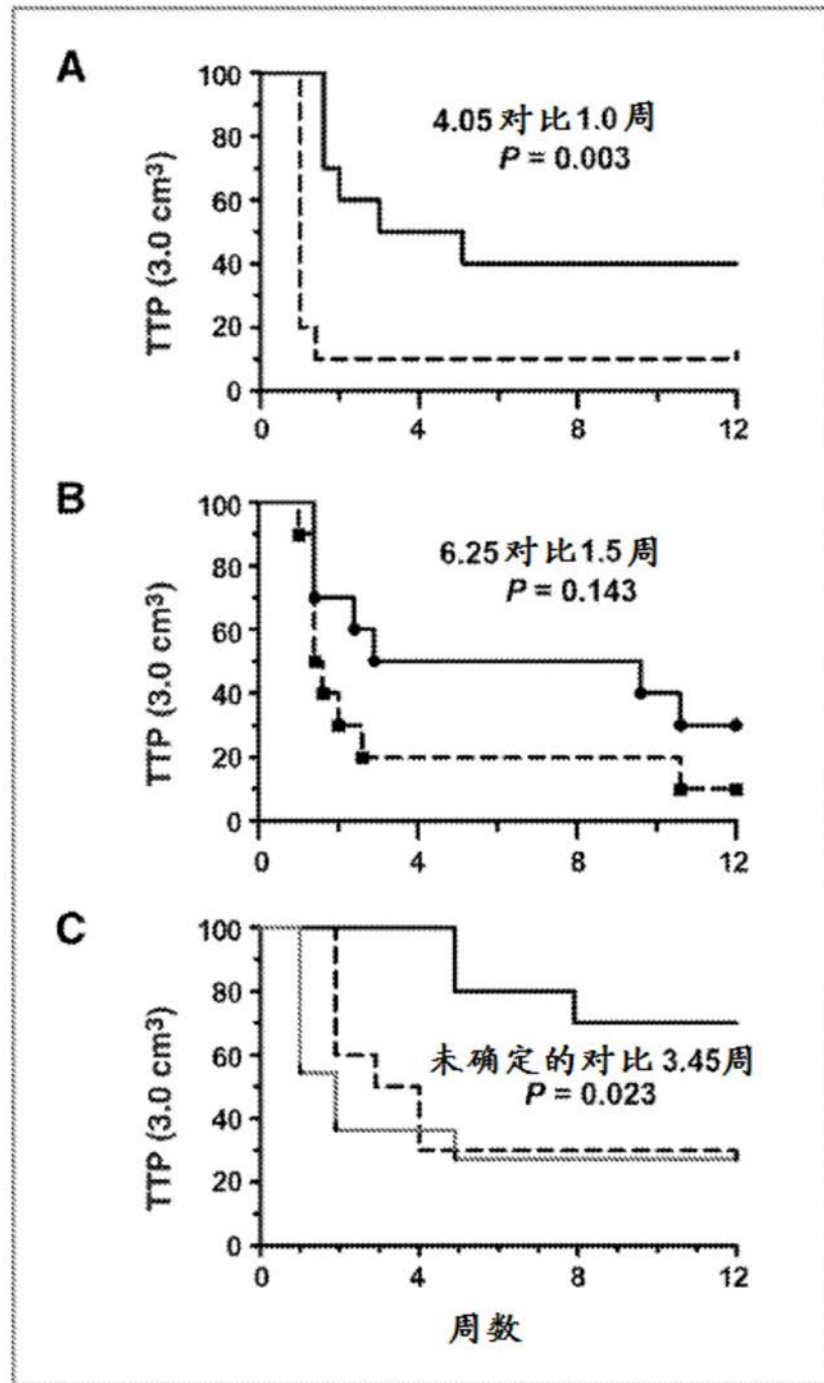


图7

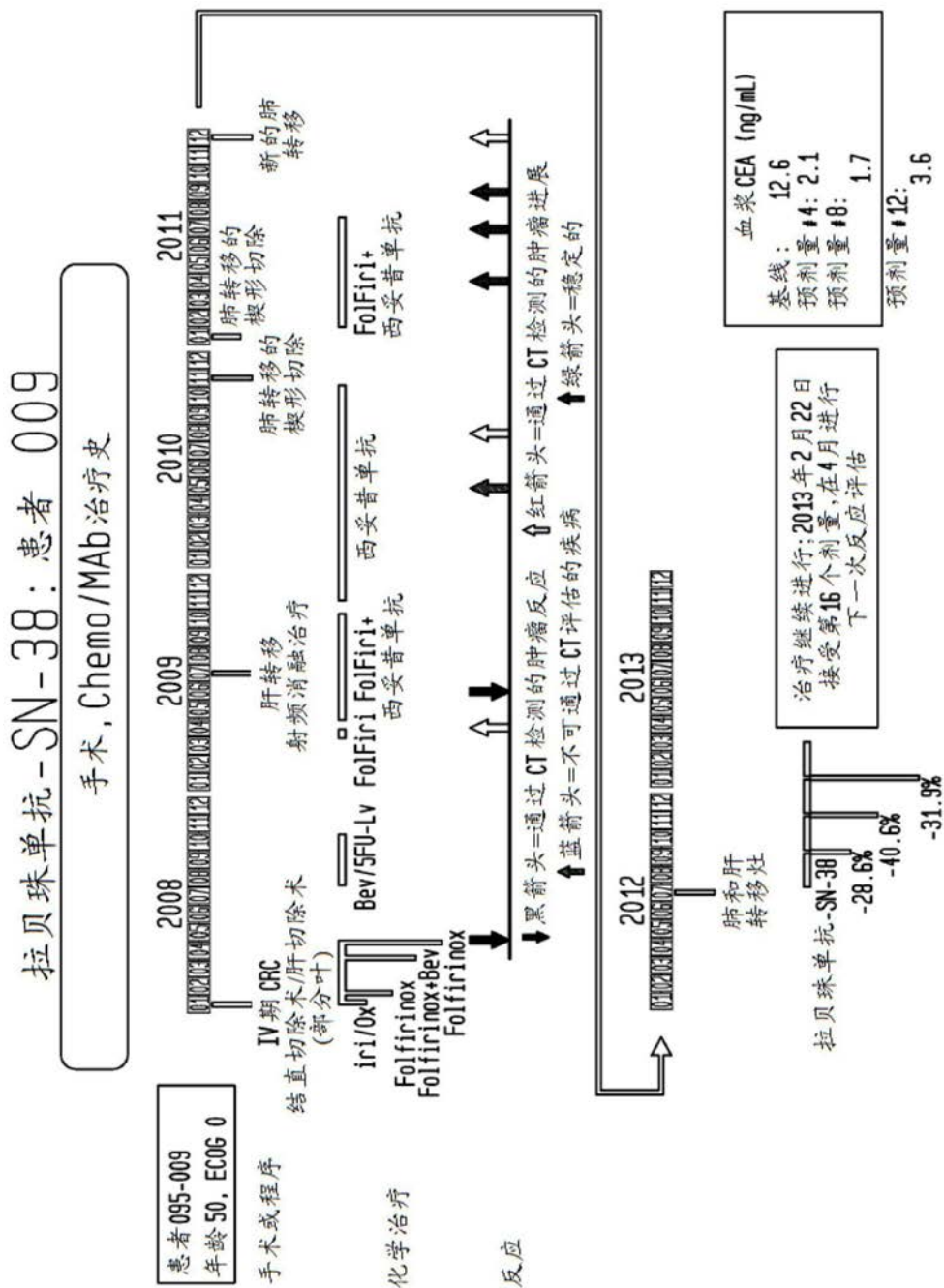


图8