



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104837508 A

(43) 申请公布日 2015.08.12

(21) 申请号 201380065210.2

代理人 初明明 黄希贵

(22) 申请日 2013.07.23

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

61/736684 2012.12.13 US

61/749548 2013.01.07 US

A61K 51/00(2006.01)

A61M 36/14(2006.01)

A61K 39/00(2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015.06.12

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/051667 2013.07.23

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/092804 EN 2014.06.19

(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 D. M. 戈登伯格

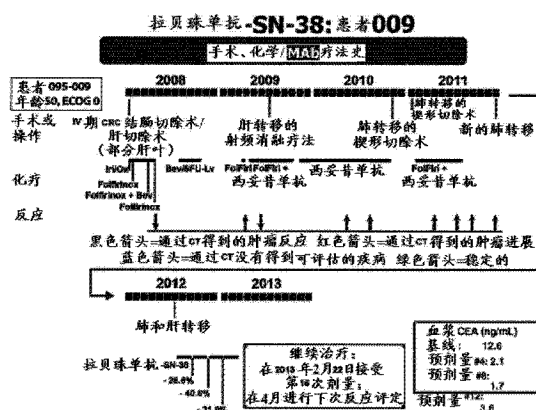
(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001权利要求书5页 说明书97页
序列表73页 附图8页

(54) 发明名称

功效改进且毒性降低的抗体与 SN-38 的免疫
缀合物的剂量

(57) 摘要

本发明涉及包含附接于抗体或抗原结合抗体片段的 SN-38 的治疗性免疫缀合物。所述抗体可以结合至 EGP-1 (TROP-2)、CEACAM5、CEACAM6、CD74、CD19、CD20、CD22、CSAp、HLA-DR、AFP 或 MUC5ac 并且所述免疫缀合物可以在 4mg/kg 与 24mg/kg 之间,优选以 4、6、8、9、10、12、16 或 18mg/kg 的剂量施用。当在指定剂量及方案下施用时,所述免疫缀合物可以缩小实体肿瘤的尺寸、减少或消除转移并且有效治疗耐受标准疗法如放射疗法、化学疗法或免疫疗法的癌症。



1. 一种治疗癌症的方法,其包括向具有癌症的人受试者施用包含缀合至抗体或其抗原结合片段的 SN-38 的免疫缀合物;其中所述抗体或其片段结合至选自以下组成的组的抗原:EGP-1 (TROP-2)、CEACAM5、CEACAM6、CD74、CD19、CD20、CD22、CSAp、HLA-DR、MUC5ac 以及 AFP (甲胎蛋白);并且其中所述免疫缀合物是以在 4 mg/kg 与 18 mg/kg 之间的剂量施用。

2. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述剂量选自以下组成的组:4 mg/kg、6 mg/kg、8 mg/kg、9 mg/kg、10 mg/kg、12 mg/kg、16 mg/kg 和 18 mg/kg。

3. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述抗体选自以下组成的组:hLL1 (抗 CD74)、hLL2 (抗 CD22)、hRFB4 (抗 CD22)、hRS7 (抗 TROP-2)、hPAM4 (抗 MUC5ac)、hMN-3 (抗 CEACAM6)、hMN-14 (抗 CEACAM5)、hMN-15 (抗 CEACAM6)、hA19 (抗 CD19)、hA20 (抗 CD22)、hMu-9 (抗 CSAp)、hL243 (抗 HLA-DR) 以及 hIMMU31 (抗 AFP)。

4. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述癌症是实体肿瘤并且所述治疗造成至少 15%、至少 20%、至少 30% 或至少 40% 的肿瘤尺寸的减小。

5. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述癌症选自以下组成的组:B 细胞淋巴瘤、B 细胞白血病、结肠癌、胃癌、食道癌、甲状腺髓样癌、肾癌、乳腺癌、肺癌、胰腺癌、膀胱癌、卵巢癌、子宫癌、子宫颈癌、睾丸癌、前列腺癌、肝癌、皮肤癌、骨癌、脑癌、直肠癌以及黑素瘤。

6. 如权利要求 5 所述的方法,其中所述 B 细胞白血病或 B 细胞淋巴瘤选自以下组成的组:无痛形式的 B 细胞淋巴瘤、侵袭形式的 B 细胞淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病、急性淋巴细胞性白血病、毛细胞白血病、非何杰金氏淋巴瘤、何杰金氏淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、弥漫性 B 细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤以及多发性骨髓瘤。

7. 如权利要求 5 所述的方法,其中所述癌症是转移性的。

8. 如权利要求 7 所述的方法,进一步包括缩小尺寸或消除转移。

9. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述癌症难以用其它疗法医治但对所述免疫缀合物有反应。

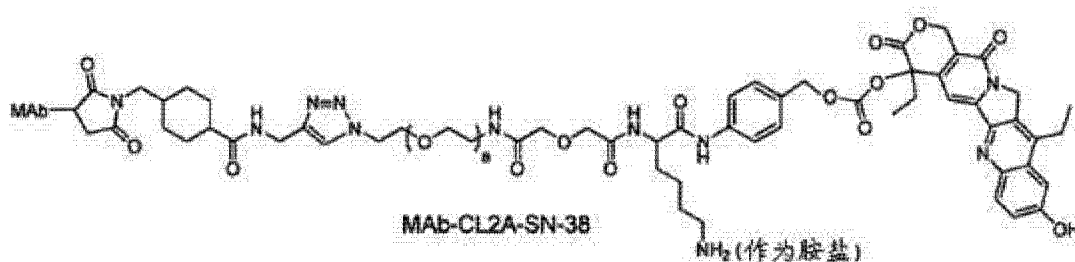
10. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述患者在用所述免疫缀合物治疗之前未能对至少一种其它疗法有反应。

11. 如权利要求 10 所述的方法,其中所述患者在用所述免疫缀合物治疗之前未能对依立替康的疗法有反应。

12. 如权利要求 10 所述的方法,其中所述癌症是实体肿瘤并且所述治疗造成至少 15%、至少 20%、至少 30% 或至少 40% 的肿瘤尺寸的减小。

13. 如权利要求 1 所述的方法,其中在 SN-38 与所述抗体之间存在接头。

14. 如权利要求 13 所述的方法,其中所述接头是 CL2A 并且所述免疫缀合物的结构是 MAb-CL2A-SN-38



MAb-CL2A-SN-38。

15. 如权利要求 14 所述的方法,其中在 MAb-CL2A-SN-38 中 SN-38 的 10-羟基位置是使用“COR”部分的 10-*O*-酯或 10-*O*-碳酸酯衍生物;其中“CO”是羰基且“R”是选自以下的基团:(i) N,N-二取代的氨基烷基“N(CH₃)₂-(CH₂)_n”,其中 n 是 1-10 并且其中末端氨基任选地呈季盐形式;(ii) 烷基残基“CH₃-(CH₂)_n”,其中 n 是 0-10;(iii) 烷氧基部分“CH₃-(CH₂)_n-O”,其中 n 是 0-10;(iv) “N(CH₃)₂-(CH₂)_n-O”,其中 n 是 2-10;或(v) “R₁O-(CH₂-CH₂-O)_n-CH₂-CH₂-O”,其中 R₁是乙基或甲基并且 n 是值为 0-10 的整数。

16. 如权利要求 1 所述的方法,其中存在 6 个或更多个附接于每个抗体分子的 SN-38 分子。

17. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述抗体是 IgG1 或 IgG4 抗体。

18. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述抗体具有选自由以下组成的组的同种异型: G1m3、G1m3, 1、G1m3, 2、G1m3, 1, 2、nG1m1、nG1m1, 2 及 Km3 同种异型。

19. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述免疫缀合物剂量是以具有选自由以下组成的组的周期的方案每周向人受试者施用一次或两次:(i) 每周;(ii) 每隔一周;(iii) 一周疗法,然后是二、三或四周停药;(iv) 两周疗法,然后是一、二、三或四周停药;(v) 三周疗法,然后是一、二、三、四或五周停药;(vi) 四周疗法,然后是一、二、三、四或五周停药;(vii) 五周疗法,然后是一、二、三、四或五周停药;以及(viii) 每月。

20. 如权利要求 19 所述的方法,其中所述周期重复 4、6、8、10、12、16 或 20 次。

21. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述免疫缀合物是与一种或多种选自由以下组成的组的治疗方式组合施用:非缀合抗体、放射性标记的抗体、药物-缀合的抗体、毒素-缀合的抗体、基因疗法、化学疗法、治疗性肽、细胞因子疗法、寡核苷酸、局部放射疗法、手术以及干扰 RNA 疗法。

22. 如权利要求 21 所述的方法,其中所述药物、毒素或化疗剂选自由以下组成的组:5-氟尿嘧啶、阿法替尼、阿普立定、阿扎立平、阿那曲唑、蒽环类、阿西替尼、AVL-101、AVL-291、苯达莫司汀、博来霉素、硼替佐米、博舒替尼、苔藓抑素-1、白消安、卡奇霉素、喜树碱、卡铂、10-羟基喜树碱、卡莫司汀、塞来昔布、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、喜树碱类、环磷酰胺、克唑替尼、阿糖胞苷、达卡巴嗪、达沙替尼、dinaciclib、多西紫杉醇、放线菌素 D、柔红霉素、阿霉素、2-吡咯啉阿霉素(2P-DOX)、氟基-吗啉代阿霉素、葡萄糖苷酸阿霉素、葡萄糖苷酸表柔比星、埃罗替尼、雌莫司汀、表鬼臼毒素、埃罗替尼、恩替诺特、雌激素受体结合剂、依托泊苷(VP16)、葡萄糖苷酸依托泊苷、磷酸依托泊苷、依西美坦、芬戈莫德、黄酮吡啶酚、氟尿苷(FuR)、3', 5'-O-二油酰基-FuR (FuR-dO)、氟达拉滨、氟他胺、法呢基-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、idelalisib、异环磷酰胺、伊马替尼、L-天冬酰胺酶、拉帕替尼、来那度胺、亚叶酸、LFM-A13、洛莫司汀、氮芥、美法仑、巯嘌呤、6-巯嘌呤、甲氨蝶呤、米托蒽醌、光神霉素、丝裂霉素、米托坦、诺维本、来那替尼、尼洛替尼、亚硝基脲、奥拉帕尼、普卡霉素、丙卡巴肼、紫杉醇、PCI-3276、喷司他丁、PSI-341、雷洛昔芬、司莫司汀、索拉非尼、链佐星、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、长春花生物碱以及 ZD1839。

23. 一种治疗胰腺癌、结肠直肠癌、肺癌、胃癌、膀胱癌、肾癌、乳腺癌、卵巢癌、子宫癌或前列腺癌的方法,其包括向具有胰腺癌、结肠直肠癌、肺癌、胃癌、膀胱癌、肾癌、乳腺癌、卵巢癌、子宫癌或前列腺癌的人受试者施用包含缀合至 hRS7 (抗 TROP-2) 抗体或其抗原结合片段的 SN-38 的免疫缀合物;其中所述免疫缀合物是以在 4 mg/kg 与 24 mg/kg 之间的剂量施用。

24. 如权利要求 23 所述的方法,其中所述剂量选自由以下组成的组:4 mg/kg、6 mg/kg、8 mg/kg、9 mg/kg、10 mg/kg、12 mg/kg、16 mg/kg 和 18 mg/kg。

25. 如权利要求 23 所述的方法,其中所述治疗造成至少 15%、至少 20%、至少 30% 或至少 40% 的肿瘤尺寸的减小。

26. 如权利要求 23 所述的方法,其中所述癌症是转移性结肠癌并且所述患者在施用所述免疫缀合物之前 FOLFIRI 或 FOLFOX 化学疗法对其无效。

27. 如权利要求 23 所述的方法,其中所述癌症是三阴性转移性乳腺癌并且所述患者在施用所述免疫缀合物之前 CMF、卡铂或紫杉醇疗法对其无效。

28. 如权利要求 23 所述的方法,其中所述癌症是转移性肺癌并且所述患者在施用所述免疫缀合物之前卡铂、贝伐单抗、依托泊苷、拓扑替康、多西他赛或吉西他滨疗法对其无效。

29. 一种治疗乳腺癌、肺癌、胰腺癌、食道癌、甲状腺髓样癌、卵巢癌、子宫癌、前列腺癌、睾丸癌、结肠癌、直肠癌或胃癌的方法,其包括向具有乳腺癌、肺癌、胰腺癌、食道癌、甲状腺髓样癌、卵巢癌、子宫癌、前列腺癌、睾丸癌、结肠癌、直肠癌或胃癌的人受试者施用包含缀合至 hMN-14 (抗 CEACAM5) 抗体或其抗原结合片段的 SN-38 的免疫缀合物;其中所述免疫缀合物是以在 4 mg/kg 与 24 mg/kg 之间的剂量施用。

30. 如权利要求 29 所述的方法,进一步包括向所述受试者施用抗 CEACAM6-SN-38 免疫缀合物。

31. 如权利要求 29 所述的方法,其中所述剂量选自由以下组成的组:4 mg/kg、6 mg/kg、8 mg/kg、9 mg/kg、10 mg/kg、12 mg/kg、16 mg/kg 和 18 mg/kg。

32. 如权利要求 29 所述的方法,其中所述治疗造成至少 15%、至少 20%、至少 30% 或至少 40% 的肿瘤尺寸的减小。

33. 如权利要求 29 所述的方法,其中所述癌症是转移性结肠癌并且所述患者在施用所述免疫缀合物之前依立替康、奥沙利铂、FOLFIRINOX、FOLFIRI、FOLFOX、贝伐单抗、西妥昔单抗、雷莫芦单抗、5-氟尿嘧啶或甲酰四氢叶酸疗法对其无效。

34. 一种治疗乳腺癌、肺癌、胰腺癌、食道癌、甲状腺髓样癌、卵巢癌、子宫癌、前列腺癌、睾丸癌、结肠癌、直肠癌或胃癌的方法,其包括向具有乳腺癌、肺癌、胰腺癌、食道癌、甲

状腺髓样癌、卵巢癌、子宫癌、前列腺癌、睾丸癌、结肠癌、直肠癌或胃癌的人受试者施用包含缀合至 hMN-15 (抗 CEACAM6) 抗体或其抗原结合片段的 SN-38 的免疫缀合物 ;其中所述免疫缀合物是以在 4 mg/kg 与 24 mg/kg 之间的剂量施用。

35. 如权利要求 34 所述的方法,进一步包括向所述受试者施用抗 CEACAM5-SN-38 免疫缀合物。

36. 如权利要求 34 所述的方法,其中所述剂量选自由以下组成的组 :4 mg/kg、6 mg/kg、8 mg/kg、9 mg/kg、10 mg/kg、12 mg/kg、16 mg/kg 和 18 mg/kg。

37. 如权利要求 34 所述的方法,其中所述治疗造成至少 15%、至少 20%、至少 30% 或至少 40% 的肿瘤尺寸的减小。

38. 一种治疗胰腺癌的方法,其包括向具有胰腺癌的人受试者施用包含缀合至 hPAM4 (抗 MUC5ac) 抗体或其抗原结合片段的 SN-38 的免疫缀合物 ;其中所述免疫缀合物是以在 4 mg/kg 与 24 mg/kg 之间的剂量施用。

39. 如权利要求 38 所述的方法,其中所述剂量选自由以下组成的组 :4 mg/kg、6 mg/kg、8 mg/kg、9 mg/kg、10 mg/kg、12 mg/kg、16 mg/kg 和 18 mg/kg。

40. 如权利要求 38 所述的方法,其中所述治疗造成至少 15%、至少 20%、至少 30% 或至少 40% 的肿瘤尺寸的减小。

41. 一种治疗 B 细胞淋巴瘤、B 细胞白血病、黑素瘤、肾癌、肺癌、肠癌、胃癌、乳腺癌、前列腺癌或卵巢癌的方法,其包括向具有 B 细胞淋巴瘤、B 细胞白血病、黑素瘤、肾癌、肺癌、肠癌、胃癌、乳腺癌、前列腺癌或卵巢癌的人受试者施用包含缀合至 hLL1 (抗 CD74) 抗体或其抗原结合片段的 SN-38 的免疫缀合物 ;其中所述免疫缀合物是以在 4 mg/kg 与 24 mg/kg 之间的剂量施用。

42. 如权利要求 41 所述的方法,其中所述剂量选自由以下组成的组 :4 mg/kg、6 mg/kg、8 mg/kg、9 mg/kg、10 mg/kg、12 mg/kg、16 mg/kg 和 18 mg/kg。

43. 如权利要求 41 所述的方法,其中所述癌症是实体肿瘤并且所述治疗造成至少 15%、至少 20%、至少 30% 或至少 40% 的肿瘤尺寸的减小。

44. 一种治疗 B 细胞淋巴瘤或 B 细胞白血病的方法,其包括向具有 B 细胞淋巴瘤或 B 细胞白血病的人受试者施用包含缀合至 hLL2 (抗 CD22) 抗体或其抗原结合片段的 SN-38 的免疫缀合物 ;其中所述免疫缀合物是以在 4 mg/kg 与 24 mg/kg 之间的剂量施用。

45. 如权利要求 44 所述的方法,其中所述剂量选自由以下组成的组 :4 mg/kg、6 mg/kg、8 mg/kg、9 mg/kg、10 mg/kg、12 mg/kg、16 mg/kg 和 18 mg/kg。

46. 如权利要求 44 所述的方法,其中所述癌症是实体肿瘤并且所述治疗造成至少 15%、至少 20%、至少 30% 或至少 40% 的肿瘤尺寸的减小。

47. 一种治疗 B 细胞淋巴瘤、B 细胞白血病、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、黑素瘤、肾癌或肝癌的方法,其包括向具有 B 细胞淋巴瘤、B 细胞白血病、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、肾癌或肝癌的人受试者施用包含缀合至 hL243 (抗 HLA-DR) 抗体或其抗原结合片段的 SN-38 的免疫缀合物 ;其中所述免疫缀合物是以在 4 mg/kg 与 24 mg/kg 之间的剂量施用。

48. 如权利要求 47 所述的方法,其中所述剂量选自由以下组成的组 :4 mg/kg、6 mg/kg

kg、8 mg/kg、9 mg/kg、10 mg/kg、12 mg/kg、16 mg/kg 和 18 mg/kg。

49. 如权利要求 47 所述的方法,其中所述癌症是实体肿瘤并且所述治疗造成至少 15%、至少 20%、至少 30% 或至少 40% 的肿瘤尺寸的减小。

50. 一种治疗 B 细胞淋巴瘤或 B 细胞白血病的方法,其包括向具有 B 细胞淋巴瘤或 B 细胞白血病的人受试者施用包含缀合至 hA20 (抗 CD20) 抗体或其抗原结合片段的 SN-38 的免疫缀合物;其中所述免疫缀合物是以在 4 mg/kg 与 24 mg/kg 之间的剂量施用。

51. 如权利要求 50 所述的方法,其中所述剂量选自由以下组成的组:4 mg/kg、6 mg/kg、8 mg/kg、9 mg/kg、10 mg/kg、12 mg/kg、16 mg/kg 和 18 mg/kg。

52. 如权利要求 50 所述的方法,其中所述癌症是实体肿瘤并且所述治疗造成至少 15%、至少 20%、至少 30% 或至少 40% 的肿瘤尺寸的减小。

53. 一种治疗癌瘤、生殖细胞肿瘤及其它产生 AFP 的肿瘤的方法,其包括向具有肝细胞癌、生殖细胞肿瘤或产生 AFP 的肿瘤的人受试者施用包含缀合至 hIMMU31 (抗 AFP) 抗体或其抗原结合片段的 SN-38 的免疫缀合物;其中所述免疫缀合物是以在 4 mg/kg 与 24 mg/kg 之间的剂量施用。

54. 如权利要求 53 所述的方法,其中所述剂量选自由以下组成的组:4 mg/kg、6 mg/kg、8 mg/kg、9 mg/kg、10 mg/kg、12 mg/kg、16 mg/kg 和 18 mg/kg。

55. 如权利要求 53 所述的方法,其中所述治疗造成至少 15%、至少 20%、至少 30% 或至少 40% 的肿瘤尺寸的减小。

56. 一种治疗 B 细胞淋巴瘤、B 细胞白血病、自体免疫疾病、非何杰金氏淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病、急性淋巴细胞性白血病、多发性骨髓瘤、特发性血小板减少性紫癜、全身性红斑狼疮或类风湿性关节炎的方法,其包括向具有 B 细胞淋巴瘤、B 细胞白血病、自体免疫疾病、非何杰金氏淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病、急性淋巴细胞性白血病、多发性骨髓瘤、特发性血小板减少性紫癜、全身性红斑狼疮或类风湿性关节炎的人受试者施用包含缀合至 hA19 (抗 CD19) 抗体或其抗原结合片段的 SN-38 的免疫缀合物;其中所述免疫缀合物是以在 4 mg/kg 与 24 mg/kg 之间的剂量施用。

57. 如权利要求 56 所述的方法,其中所述剂量选自由以下组成的组:4 mg/kg、6 mg/kg、8 mg/kg、9 mg/kg、10 mg/kg、12 mg/kg、16 mg/kg 和 18 mg/kg。

58. 如权利要求 56 所述的方法,其中所述疾病是淋巴瘤并且所述治疗造成至少 15%、至少 20%、至少 30% 或至少 40% 的总肿瘤指示病灶的减小。

59. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述免疫缀合物在包含选自由以下组成的组的缓冲液的药物组合物中在 pH 6 至 7 下贮存:N-(2-乙酰胺基)-2-氨基乙磺酸 (ACES); N-(2-乙酰胺基)亚氨基二乙酸 (ADA);N,N-双(2-羟基乙基)-2-氨基乙磺酸 (BES); 4-(2-羟基乙基)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);以及哌嗪-N,N'-双(2-乙磺酸) [Pipes]。

60. 如权利要求 59 所述的方法,其中所述组合物进一步包含 25 mM 海藻糖和 0.01% v/v 聚山梨醇酯 80。

功效改进且毒性降低的抗体与 SN-38 的免疫缀合物的剂量

[0001] 相关申请

[0002] 本申请根据 35 U.S.C. 119(e) 要求 12/13/12 提交的美国临时专利申请 61/736,684 及 1/7/13 提交的 61/749,548 的权益。

[0003] 序列表

[0004] 本申请含有经由 EFS-Web 以 ASCII 格式提交的序列表并且在此以引用的方式整体并入。在 2013 年 7 月 17 日创建的所述 ASCII 副本的名称是 IMM340W01_SL.txt 并且大小是 60,405 个字节。

发明领域

[0005] 本发明涉及抗体或抗原结合抗体片段与喜树碱如 SN-38 的免疫缀合物的治疗用途,所述免疫缀合物靶向人受试者中的各种癌细胞的能力得以改进。在优选实施方案中,抗体及治疗性部分经由提高治疗功效的细胞内可裂解的键连接。在更优选的实施方案中,免疫缀合物是以使治疗效果达到最佳的特定剂量和 / 或特定施用方案来施用的。用于本文所公开的人治疗用途的 SN-38 缀合抗体的最佳剂量和施用方案显示从动物模型研究中不能预测到的出乎意料的优良功效,从而允许有效治疗耐受标准抗癌疗法(包括母体化合物,依立替康(CPT-11))的癌症。

[0006] 发明背景

[0007] 多年来在特异性地靶向药物疗法的领域中科学家的一个目标是使用单克隆抗体(MAb)来特定递送毒性试剂到人癌症。已经开发了肿瘤相关 MAb 与合适的毒性试剂的缀合物,但是在人的癌症疗法中已经取得了各式各样的成功,并且实际上没有应用在如感染性及自体免疫疾病的其它疾病中。毒性试剂最通常是化学治疗性药物,虽然发射颗粒的放射性核素或细菌或植物毒素也已与 MAb 缀合,尤其用于癌症疗法(Sharkey 和 Goldenberg, CA Cancer J Clin. 2006 年 7 月 -8 月 ;56(4):226-243)并且更近来,将放射性免疫缀合物用于某些感染性疾病的临床前疗法中(Dadachova 和 Casadevall, Q J Nucl Med Mol Imaging 2006 ;50(3):193-204)。

[0008] 使用 MAb- 化学治疗性药物缀合物的优点在于:(a) 化学治疗性药物本身在结构上被明确定义;(b) 使用充分定义的缀合化学过程将化学治疗性药物连接至 MAb 蛋白,经常在远离 MAb 抗原结合区的特异性位点处;(c) 与涉及 MAb 及细菌或植物毒素的化学缀合物相比,MAb- 化学治疗性药物缀合物更具有可重复性且通常具有更小的免疫原性,且因此更有商业发展前途并且容易获得管理批准;以及(d) MAb- 化学治疗性药物缀合物与放射性核素 MAb 缀合物相比全身毒性要小几个数量级,尤其是针对辐射敏感的骨髓。

[0009] 喜树碱(CPT)及其衍生物是一类有效的抗肿瘤剂。依立替康(又称为 CPT-11)及拓扑替康是 CPT 类似物,其是被批准的癌症治疗剂(Iyer 和 Ratain, Cancer Chemother. Pharmacol. 42:S31-S43(1998))。CPT 通过经由使拓扑异构酶 I-DNA 复合物稳定来抑制拓扑异构酶 I 酶,从而发挥作用(Liu, 等人 The Camptothecins: Unfolding Their Anticancer Potential, Liehr J. G., Giovanella, B. C. 和 Verschraegen(编著), NY Acad Sci., NY

922:1-10(2000))。CPT 在缀合物的制备中带来了特殊问题。一个问题是大多数 CPT 衍生物在含水缓冲液中的不溶性。其次, CPT 提供对于缀合至大分子的结构修饰的特别挑战。例如, CPT 本身仅在环 E 中含有叔羟基。在 CPT 的情况下羟基官能团必须偶联至适用于随后的蛋白缀合的接头;并且在有效的 CPT 衍生物如 SN-38、化学治疗性 CPT-11 的活性代谢物及其它含有 C-10-羟基的衍生物如拓扑替康和 10-羟基-CPT 中, 酚羟基在 C-10 位置处的存在使得必需的 C-20-羟基衍生作用复杂化。第三, 喜树碱的 E 环的 δ -内酯部分在生理条件下的不稳定性导致抗肿瘤效力大大降低。因此, 进行缀合方案以便在 7 或更低的 pH 下进行其以避免内酯环打开。然而, 具有胺反应性基团如活性酯的双官能 CPT 的缀合通常需要 8 或更大的 pH。第四, 细胞内可裂解部分优选地并入连接 CPT 与抗体或其它结合部分的接头/间隔物中。

[0010] 存在制备及施用抗体-CPT 缀合物如抗体-SN-38 缀合物的更有效方法的需要。优选地, 所述方法包括使得用于人患者的治疗用途的抗体-CPT 缀合物的功效最大化且使得毒性最小化的最佳给药及施用方案。

[0011] 发明概述

[0012] 除非另外明确地说明, 如本文所用的缩写“CPT”可以是指喜树碱或其任何衍生物, 如 SN-38。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及组合物来解决在本领域中未实现的需要。优选地, 所述喜树碱是 SN-38。所公开的方法及组合物适用于治疗耐受其它形式的疗法或对其反应较小的多种疾病及病状, 并且可以包括针对其用于选择性靶向的合适的抗体或抗原结合抗体片段可产生、或可获得或已知的疾病。可用本发明的免疫缀合物治疗的优选疾病或病状包括例如癌症或由感染性有机体所引起的疾病。

[0013] 优选地, 靶向部分是抗体、抗体片段、双特异性或其它多价抗体、或其它基于抗体的分子或化合物。所述抗体可以具有各种同种型, 优选地人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4, 更优选地包括人 IgG1 铰链及恒定区序列。抗体或其片段可以是嵌合的人-小鼠、嵌合的人-灵长类动物、人源化(人构架及鼠科高变(CDR)区)、或完全人抗体以及其变型, 如一半 IgG4 抗体(称为“单抗体(unibody)”), 如由 van der Neut Kolfschoten 等人(Science 2007; 317:1554-1557)所描述。更优选地, 抗体或其片段可被设计或选择以包含属于特定同种异型的人恒定区序列, 这可以造成在向人受试者施用免疫缀合物时降低的免疫原性。供施用的优选同种异型包括非 G1m1 同种异型(nG1m1), 如 G1m3、G1m3, 1、G1m3, 2 或 G1m3, 1, 2。更优选地, 同种异型选自由以下组成的组:nG1m1、G1m3、nG1m1, 2 及 Km3 同种异型。

[0014] 使用的抗体可以结合至本领域中已知的任何疾病相关抗原。举例来说, 当疾病病况是癌症时, 由肿瘤细胞表达或另外与肿瘤细胞有关的许多抗原在本领域中是已知的, 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 A33 抗体有特异性的抗原、ART-4、B7、Ba 733、BAGE、BrE3- 抗原、CA125、CAMEL、CAP-1、CASP-8/m、CCCL19、CCCL21、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)、CEA(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 、HLA-DR、HM1.24 人绒毛膜促性腺激素 (HCG) 及其亚基、HER2/neu、HMGB-1、低氧诱导因子 (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、巨噬细胞迁移抑制因子 (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 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、血管生成标记物、bcl-2、bcl-6、Kras、致癌基因标记物以及致癌基因产物 (参见, 例如 Sensi 等人, Clin Cancer Res 2006, 12:5023-32; Parmiani 等人, JImmunol 2007, 178:1975-79; Novellino 等人 Cancer Immunol Immunother 2005, 54:187-207)。优选地, 抗体结合至 CEACAM5、CEACAM6、EGP-1 (TROP-2)、MUC-16、AFP、MUC5a, c、PAM4 抗原、CD74、CD19、CD20、CD22 或 HLA-DR。

[0015] 可以利用的示例性抗体包括但不限于: hR1 (抗 IGF-1R, 3/12/10 申请的美国专利申请序列号 12/722, 645)、hPAM4 (抗粘蛋白, 美国专利号 7, 282, 567)、hA20 (抗 CD20, 美国专利号 7, 251, 164)、hA19 (抗 CD19, 美国专利号 7, 109, 304)、hIMMU31 (抗 AFP, 美国专利号 7, 300, 655)、hLL1 (抗 CD74, 美国专利号 7, 312, 318)、hLL2 (抗 CD22, 美国专利号 7, 074, 403)、hMu-9 (抗 CSAp, 美国专利号 7, 387, 773)、hL243 (抗 HLA-DR, 美国专利号 7, 612, 180)、hMN-14 (抗 CEACAM5, 美国专利号 6, 676, 924)、hMN-15 (抗 CEACAM6, 美国专利号 7, 541, 440)、hRS7 (抗 EGP-1, 美国专利号 7, 238, 785)、hMN-3 (抗 CEACAM6, 美国专利号 7, 541, 440)、Ab124 和 Ab125 (抗 CXCR4, 美国专利号 7, 138, 496), 每个引用专利或申请的实施例部分以引用的方式并入本文。更优选地, 所述抗体是 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, 术语依帕珠单抗与 hLL2 是可互换的, 术语维妥珠单抗与 hA20、hL243g4P、hL243 γ 4P 与 IMMU-114 也是一样。

[0016] 使用的替代抗体包括但不限于阿昔单抗 (抗糖蛋白 IIb/IIIa)、阿来组单抗 (抗 CD52)、贝伐单抗 (抗 VEGF)、西妥昔单抗 (抗 EGFR)、吉妥单抗 (抗 CD33)、替伊莫单抗 (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)、易普利单抗 (抗 CTLA-4)、阿巴伏单抗 (抗 CA-125)、阿德木单抗 (抗 EpCAM)、阿特利珠单抗 (抗 IL-6 受体)、贝纳利珠单抗 (benralizumab) (抗 CD125)、obinutuzumab (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 抗体如 CDP571 (Ofei 等人, 2011, Diabetes 45:881-85)、MTNFAI、M2TNFAI、M3TNFAI、M3TNFABI、M302B、M303 (Thermo Scientific, Rockford, IL)、英夫利昔单抗 (Centocor, Malvern, PA)、塞妥珠单抗 (UCB, Brussels, Belgium)、抗 CD40L (UCB, Brussels, Belgium)、阿达木单抗 (Abbott, Abbott Park, IL)、Benlysta (Human Genome Sciences); 用于治疗阿尔茨海默氏病的抗体如 Alz 50 (Ksiezak-Reding 等人, 1987, J Biol Chem 263:7943-47)、罗氏单抗 (gantenerumab)、苏兰珠单抗 (solanezumab) 及英夫利昔单抗; 抗纤维蛋白抗体, 像 59D8、T2G1、MH1; 抗 CD38 抗体如 MOR03087 (MorphoSys AG)、MOR202 (Celgene)、HuMax-CD38 (Genmab) 或达拉莫单抗 (daratumumab) (Johnson & Johnson); (抗 HIV 抗体如 P4/D10 (美国专利 8,333,971)、Ab75、Ab 76、Ab 77 (Paulik 等人, 1999, Biochem Pharmacol 58:1781-90), 以及由 Polymun (Vienna, Austria) 描述及出售的抗 HIV 抗体, 还在美国专利 5,831,034、美国专利 5,911,989 以及 Vcelar 等人, AIDS 2007;21(16):2161-2170 及 Joos 等人, Antimicrob. Agents Chemother. 2006;50(5):1773-9 中描述, 所有文献都以引用的方式并入本文; 以及针对病原体的抗体如 CR6261 (抗流感)、艾韦单抗 (抗乙型肝炎)、非维珠单抗 (felvizumab) (抗呼吸道合胞病毒)、夫瑞韦如 (抗狂犬病病毒)、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 (panobacumab) (抗假单胞菌属)、瑞非韦鲁 (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 (抗乙型肝炎) 以及 urtoxazumab (抗大肠杆菌)。

[0017] 在一个优选实施方案中, 化学治疗性部分是选自喜树碱 (CPT) 及其类似物和衍生物且更优选地是 SN-38。然而, 可以利用的其它化学治疗性部分包括紫杉烷类 (例如浆果赤霉素 III, 紫杉酚)、埃坡霉素、蒽环类 (例如阿霉素 (DOX)、表柔比星、吗啉代阿霉素 (吗啉代-DOX)、氰基吗啉代-阿霉素 (氰基吗啉代-DOX)、2-吡咯啉基阿霉素 (2-PDOX) 或 2-PDOX 的前药形式 (前 2-PDOX); 参见例如 Priebe W (编著), ACS symposium series 574, 由 American Chemical Society, Washington D.C. 出版, 1995 (332pp) 及 Nagy 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. US A 93:2464-2469, 1996)、由格尔德霉素例示的苯醌样霉素 (DeBoer 等人, Journal of Antibiotics 23:442-447, 1970; Neckers 等人, Invest. New Drugs 17:361-373, 1999) 及其类似物。优选地, 抗体或其片段连接至至少一个化学治疗性部分; 优选地 1 至约 5 个化学治疗性部分; 更优选地 6 个或更多个化学治疗性部分, 最优选地约 6 至约 12 个化学治疗性部分。

[0018] 水溶性 CPT 衍生物的一个实例是 CPT-11。可获得关于 CPT-11 的药理学及其在体内向活性 SN-38 的转化的广泛临床数据 (Iyer 和 Ratain, Cancer Chemother Pharmacol 42:S31-43 (1998); Mathijssen 等人, Clin Cancer Res. 7:2182-2194 (2002); Rivory, Ann NY Acad Sci. 922:205-215, 2000)。活性形式的 SN-38 比 CPT-11 的有效性高约 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、IMMU-31-SN-38、hRS7-SN-38、hA20-SN-38、hL243-SN-38、hLL1-SN-38 或 hLL2-SN-38 缀合物。

[0019] 各种实施方案可涉及本发明方法及组合物治疗包括但不限于以下的癌症的用途: 非何杰金氏淋巴瘤、B 细胞急性及慢性淋巴细胞性白血病、伯基特淋巴瘤、何杰金氏淋巴瘤、急性大 B 细胞淋巴瘤、毛细胞白血病、急性骨髓性白血病、慢性粒细胞性白血病、急性淋巴

细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、T 细胞淋巴瘤及白血病、多发性骨髓瘤、瓦尔登斯特伦 (Waldenstrom) 巨球蛋白血症、癌瘤、黑素瘤、肉瘤、神经胶质瘤、骨癌以及皮肤癌。癌瘤可以包括以下的癌瘤：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、子宫颈、膀胱、胰腺、骨、脑、结缔组织、肝、胆囊、膀胱、肾、皮肤、中枢神经系统以及睾丸。

[0020] 另外,本发明方法及组合物可用于治疗感染性疾病,例如涉及由以下病原体感染的疾病: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。实例包括引起 AIDS 的人免疫缺陷病毒 (HIV)、结核分支杆菌、无乳链球菌、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、嗜肺性军团病菌、酿脓链球菌、大肠杆菌、淋病奈瑟氏菌、脑膜炎奈瑟氏菌、肺炎球菌属、新型隐球菌、荚膜组织胞浆菌、B 型流感嗜血杆菌、苍白密螺旋体、莱姆病螺旋体、西尼罗病毒、绿脓假单胞菌、麻风分枝杆菌、流产杆菌、狂犬病病毒、流感病毒、巨细胞病毒、I 型单纯疱疹病毒、II 型单纯疱疹病毒、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、埃-巴二氏病毒、鼠白血病病毒、腮腺炎病毒、水泡性口膜炎病毒、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、间日疟原虫、鼠弓形体、让氏锥虫、克氏锥虫、罗德西亚锥虫、布氏锥虫、曼氏血吸虫、日本血吸虫、牛巴贝虫、柔嫩艾美球虫、盘尾丝虫、热带利什曼原虫、旋毛线虫、小泰累尔梨浆虫、水泡绦虫、羊绦虫、牛肉绦虫、细粒棘球绦虫、科特氏中殖孔绦虫、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、唾液支原体及肺炎支原体。针对感染性有机体(抗毒素和抗病毒抗体)以及其它靶标的综述抗体清单包含于 Casadevall, Clin Immunol 1999 ;93(1):5-15 中,所述文献以引用的方式并入本文。

[0021] 在涉及治疗癌症的某些实施方案中,药物缀合物可以与手术、放射疗法、化学疗法、用裸抗体的免疫疗法、放射免疫疗法、免疫调节剂、疫苗及其类似物组合使用。这些组合疗法可以允许减小有待以这类组合给予的每种治疗剂的剂量,由此减少某些严重副作用并且潜在地缩短所需的治疗疗程。当不存在或存在最小重叠毒性时,也可给予全剂量的每种治疗剂。

[0022] 在感染性疾病中,药物免疫缀合物可以与其它治疗性药物、免疫调节剂、裸 MAb 或疫苗(例如,针对肝炎、HIV 或乳头状瘤病毒的 MAb,或基于这些病毒的免疫原的疫苗,或激酶抑制剂,如在乙型肝炎中)组合。针对这些及其它病毒病原体的抗体及基于抗原的疫苗在本领域中是已知的并且在一些情况下已在商业中使用。最近已由 Reichert 和 Dewitz (Nat Rev Drug Discovery 2006 ;5:191-195) 对抗感染性单克隆抗体的发展进行了综述,所述文献以引用的方式并入本文,其概述了优先级病原体,已针对所述病原体采取了裸抗体疗法,仅产生两种病原体,针对这两种病原体的抗体正在 III 期临床试验或正在销售(呼吸道合胞病毒及耐甲氧西林金黄色葡萄球菌),25 种其它的在临床研究中且 20 种中止了临床研究。对于组合疗法,用于治疗感染性有机体的放射免疫疗法的用途公开于例如美国专利号 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 中;以及美国专利申请公布号 20020136690 和 20030103982 中,每个专利的实施例部分以引用的方式并入本文。

[0023] 免疫缀合物的优选最佳给药可以包括在 3mg/kg 与 20mg/kg 之间的剂量, 优选每周一次、每周两次或每隔一周一次给予。最佳给药方案可以包括以下治疗周期: 连续两周的疗法, 接着停药一周、两周、三周或四周; 或者交替周的疗法与停药; 或者一周疗法, 接着停药两周、三周或四周; 或者三周疗法, 接着停药一周、两周、三周或四周; 或者四周疗法, 接着停药一周、两周、三周或四周; 或者五周疗法, 接着停药一周、两周、三周、四周或五周; 或者每两周施用一次、每三周施用一次或每月施用一次。治疗可以延续任何周期数, 优选至少 2、至少 4、至少 6、至少 8、至少 10、至少 12、至少 14 或至少 16 个周期。剂量可以高达 24mg/kg。示例性的使用剂量可以包括 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 以及 24mg/kg。优选剂量是 4、6、8、9、10、12、14、16 或 18mg/kg。普通技术人员将认识到, 多种因素如年龄、一般健康状况、具体器官功能或重量以及先前疗法对于具体器官系统(例如骨髓)的效果可以在选择免疫缀合物的最佳剂量时加以考虑, 并且施用的剂量和 / 或频率可以在治疗过程中增加或减少。剂量可以视需要重复, 在少至 4 至 8 个剂量之后观察到肿瘤缩小的证据。本文所公开的最佳剂量和施用方案在人受试者中显示出人意料的优良功效和降低的毒性, 这不能从动物模型研究中预测到。令人惊讶地, 优良的功效允许治疗先前被认为耐受一种或多种标准抗癌疗法的肿瘤, 所述标准抗癌疗法包括母体化合物 CPT-11, 在体内由其衍生出 SN-38。

[0024] 本发明方法可以包括使用 CT 和 / 或 PET/CT 或 MRI 以按规定的时间间隔测量肿瘤反应。还可监测肿瘤标记物如 CEA(癌胚抗原)、CA19-9、AFP、CA 15.3 或 PSA 的血液水平。剂量和 / 或施用方案可以根据成像和 / 或标记物血液水平的结果视需要进行调整。

[0025] 本发明要求保护的组合物及方法的惊人结果是对高剂量抗体-药物缀合物的出人意料的耐受性, 甚至在重复输注时也如此, 仅观察到相对低级的恶心与呕吐毒性, 或可应付的嗜中性白细胞减少症。进一步惊人的结果是缺乏抗体-药物缀合物的积聚, 不同于具有缀合至白蛋白、PEG 或其他载体的 SN-38 的其它产物。积聚缺乏与改善的耐受性以及即使在重复或增加给药之后的严重毒性缺乏有关。这些惊人结果允许剂量及递送方案的最佳化, 具有出乎意料高的功效及低毒性。要求保护的方法在具有先前耐药性癌症的个体中提供 15%或以上、优选 20%或以上、优选 30%或以上、更优选 40%或以上的实体肿瘤尺寸的缩小(如通过最长直径来测量)。普通技术人员将认识到, 肿瘤尺寸可以通过以下多种不同技术来测量, 如总肿瘤体积、在任何维度上的最大肿瘤尺寸或在若干维度上的尺寸测量组合。这可以使用标准放射性操作如计算机断层摄影术、超声波检查法和 / 或正电子发射断层摄影术来完成。测量尺寸的手段与观察用免疫缀合物治疗减小肿瘤尺寸(优选地造成肿瘤的消除)的趋势相比是次要的。

[0026] 虽然免疫缀合物可以周期性弹丸注射施用, 但在替代实施方案中, 免疫缀合物可以通过连续输注抗体-药物缀合物来施用。为了提高免疫缀合物在血液中的 C_{max} 并延长 PK, 连续输注可以例如通过留置导管来施用。这类装置在本领域中是已知的, 如 HICKMAN®、BROVIAC® 或 PORT-A-CATH® 导管(参见, 例如 Skolnik 等人, Ther Drug Monit 32:741-48, 2010) 并且可以使用任何这类已知的留置导管。多种连续输注泵也是本领域中已知的并且可以使用任何这类已知的输注泵。连续输注的剂量范围可以在每日 0.1 与 3.0mg/kg 之间。更优选地, 这些免疫缀合物可以在 2 至 5 小时、更优选

地 2-3 小时的相对较短时间内通过静脉内输注施用。

[0027] 在特别优选的实施方案中,免疫缀合物及给药方案在耐受标准疗法的患者中是有效的。例如,hMN-14-SN-38 免疫缀合物可以向对依立替康(SN-38 的母体试剂)的先前疗法无反应的患者施用。令人惊讶的是,耐依立替康的患者可以对 hMN-14-SN-38 显示部分或甚至是完全反应。免疫缀合物特异性地靶向肿瘤组织的能力可以通过改进治疗剂的靶向和增强其递送来克服肿瘤抗性。或者,抗 CEACAM5 免疫缀合物如 hMN-14 可以与抗 CEACAM6 免疫缀合物如 hMN-3 或 hMN-15 共同施用。其它抗体-SN-38 免疫缀合物与替代的标准治疗性处理相比可以显示类似的改进功效和 / 或降低的毒性,并且不同 SN-38 免疫缀合物的组合或 SN-38- 抗体缀合物与缀合至放射性核素、毒素或其它药物的抗体的组合可以提供甚至更改进的功效和 / 或降低的毒性。具体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。

附图说明

[0028] 图 1. 用 MAb-CL2A-SN-38 缀合物的带有 Capan 1 人胰腺癌的无胸腺裸小鼠的体内疗法。

[0029] 图 2. 用 MAb-CL2A-SN-38 缀合物的带有 BxPC3 人胰腺癌的无胸腺裸小鼠的体内疗法。

[0030] 图 3. 用 hMN-14-CL2A-SN-38 缀合物的带有 LS174T 人结肠癌的无胸腺裸小鼠的体内疗法。

[0031] 图 4. 带有 GW-39 肺转移性疾病的 hMN14-CL-SN-38 治疗小鼠的存活曲线。

[0032] 图 5. hRS7-SN-38 ADC 在若干实体肿瘤-异种移植物疾病模型中的治疗功效。hRS7-CL2-SN-38 和 hRS7-CL2A-SN-38 ADC 治疗的功效在带有人非小细胞肺、结肠直肠、胰腺以及鳞状细胞肺肿瘤异种移植物的鼠中加以研究。所有的 ADC 及对照都以所指示的量(表示为每剂量 SN-38 的量;长箭头=缀合物注射,短箭头=依立替康注射)来施用。(A) 带有 Calu-3 肿瘤的小鼠 ($N = 5-7$) 是用 hRS7-CL2-SN-38 每 4 天注射一次,总共注射 4 次 ($q4d \times 4$)。(B) 带有 COLO 205 肿瘤的小鼠 ($N = 5$) 是用 ADC 注射 8 次 ($q4d \times 8$) 或者用依立替康的 MTD 每两天注射一次,总共注射 5 次 ($q2d \times 5$)。(C) Capan-1 ($N = 10$) 或 (D) 带有 BxPC-3 肿瘤的小鼠 ($N = 10$) 是用所指示的试剂治疗,每周两次,持续 4 周。(E) 除每周两次给予 ADC 持续 4 周之外,带有 SK-MES-1 肿瘤 ($N = 8$) 的小鼠接受 CPT-11 的 MTD ($q2d \times 5$)。

[0033] 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。向肿瘤平均值大约是 0.35cm^3 ($0.20-0.55\text{cm}^3$) 的裸小鼠 ($N = 10$ 只/组) 施用 0.25 或 0.5mg 每种缀合物,每周两次,持续 4 周。

[0034] 图 7. 在带有皮下 Ramos 肿瘤的裸小鼠中 Emab 抗 CD22-SN-38 缀合物 (实线) 对比不相关的拉贝珠单抗 (Lmab)-SN-38 缀合物 (虚线) 的特异性。向动物腹膜内给予缀合物的剂量,每周两次,持续 4 周。给予 A、B 及 C 每剂量 75、125 及 $250\mu\text{g}$ 的每种缀合物 (基于 22g 的平均重量分别是 54.5、91 及 182g/kg 的 SN-38)。基于进展时间 (TTP) 的存活至 3.0cm^3 ,肿瘤起始于 0.4cm^3 的平均尺寸。比较 Emab-SN-38 与 Lmab-SN-38 缀合物的中值存

活（示出）的 P 值显示于每个图中。C. 另一组动物的存活曲线（灰色实线），向所述动物每周一次腹膜内注射依立替康（6.5g/剂量；SN-38 等效物大致与 250-g 剂量的 Emab-SN-38 缀合物相同）。

[0035] 图 8. 在施用 IMMU-130（拉贝珠单抗 -NS-38）之前患者的先前治疗史。先前治疗包括 IV 期 CRC 结肠切除术 / 肝切除术（部分肝叶）、肝转移的射频消融疗法、肺转移的楔形切除术以及用依立替康 / 奥沙利铂、Folfirinox、Folfirinox+ 贝伐单抗、贝伐单抗 +5-FU/ 甲酰四氢叶酸、FolFiri、FolFiri+ 西妥昔单抗及西妥昔单抗单独进行的化学疗法。患者通过每隔一周缓慢 IV 输注总共 17 个治疗剂量来接受 16mg/kg IMMU-132 的剂量。

[0036] 发明详述

[0037] 定义

[0038] 在随后的描述中，使用许多术语并且提供以下定义以便了解要求保护的主体。在本文中未明确定义的术语是根据其一般及普通含义来使用。

[0039] 除非另作说明，一个或一种是指“一个（种）或更多个（种）”。

[0040] 本文所用的术语约意指一个值加或减十个百分比（10%）。举例来说，“约 100”是指在 90 与 110 之间的任何数值。

[0041] 如本文所用的抗体是指全长（即天然存在的或由正常免疫球蛋白基因片段重组工艺形成的）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，如抗体片段。抗体或抗体片段可以在要求保护的主体范围内被缀合或另外被衍生化。这类抗体包括但不限于 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4（及 IgG4 亚型）以及 IgA 同种型。如以下所用，缩写“MAb”可以可交换地用于指示抗体、抗体片段、单克隆抗体或多特异性抗体。

[0042] 抗体片段是抗体如 F(ab')₂、F(ab)₂、Fab'、Fab、Fv、scFv（单链 Fv）、单结构域抗体（DAB 或 VHH）及其类似物的一部分，包括以上所引用的 IgG4 的一半分子（van der Neut Kolfshoten 等人（Science 2007 ;317(14Sept):1554-1557）。不考虑结构，使用的抗体片段与由完整抗体识别的相同抗原结合。术语“抗体片段”还包括合成的或基因工程化蛋白，其通过结合至特定抗原以形成复合物来发挥抗体作用。例如，抗体片段包括由可变区组成的分离的片段，如由重链和轻链的可变区组成的“Fv”片段及其中轻链与重链可变区通过肽接头（“scFv 蛋白”）连接的重组单链多肽分子。片段可以不同的方式构建以产生多价和 / 或多特异性结合形式。

[0043] 裸抗体通常是不缀合至治疗剂的整个抗体。裸抗体可以由例如 Fc 依赖性功能如补体结合（CDC）及 ADCC（抗体依赖性细胞毒性）展现治疗性和 / 或细胞毒性作用。然而，其它机制如细胞凋亡、抗血管生成、抗转移性活性、抗粘附活性、抑制异型或同型粘附以及干扰信号传导途径也可提供治疗性作用。裸抗体包括多克隆及单克隆抗体、天然存在的或重组抗体，如嵌合的、人源化或人抗体及其片段。在一些情况下，“裸抗体”也可能是指“裸”抗体片段。如本文所定义，“裸”与“非缀合”同义并且是指不连接或缀合至治疗剂。

[0044] 嵌合抗体是重组蛋白，其含有抗体重链和轻链两者的可变结构域，包括来源于一个物种的抗体、优选啮齿动物抗体、更优选鼠科抗体的互补决定区（CDR），但抗体分子的恒定结构域来源于人类抗体。对于兽医应用来说，嵌合抗体的恒定结构域可以来源于其它物种，如灵长类动物、猫或狗。

[0045] 人源化抗体是其中来自一个物种的抗体的 CDR（例如鼠科抗体）从鼠科抗体的可

变重链和轻链转移到人可变重链和轻链结构域（构架区）中的重组蛋白。抗体分子的恒定结构域来源于人抗体的那些恒定结构域。在一些情况下，人源化抗体的构架区的特定残基（特别是接触或接近于 CDR 序列的那些）可以被修饰，例如被置换为来自原始鼠科、啮齿动物、低于人的灵长类动物或其它抗体的相应残基。

[0046] 人抗体例如从转基因小鼠中获得的抗体，所述转基因小鼠已被“工程化”以响应于抗原挑战而产生人抗体。在此技术中，将人重链基因座和轻链基因座的元件引入到来源于胚胎干细胞系的小鼠品系中，所述胚胎干细胞系含有内源性重链基因座和轻链基因座的靶向破坏。转基因小鼠可合成对各种抗原具有特异性的人抗体，并且小鼠可用来产生分泌人抗体的杂交瘤。用于从转基因小鼠中获得人抗体的方法由 Green 等人，Nature Genet. 7:13(1994)、Lonberg 等人，Nature 368:856(1994) 以及 Taylor 等人，Int. Immun. 6:579(1994) 描述。完全地人抗体还可通过基因转染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均为本领域中已知的。参见，例如 McCafferty 等人，Nature 348:552-553(1990) 用于从来自未免疫供体的免疫球蛋白可变结构域基因库 (gene repertoire) 中体外产生人抗体及其片段。在此技术中，将人抗体可变结构域基因同框克隆到丝状噬菌体的主要或次要外壳蛋白基因中，并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，所以基于抗体功能性质的选择也导致选择编码展现那些性质的抗体的基因。以此方式，噬菌体模拟 B 细胞的一些性质。可以多种形式进行噬菌体展示，对于它们的综述，参见例如 Johnson 和 Chiswell, Current Opinion in Structural Biology 3:5564-571(1993)。还可由体外激活的 B 细胞来生成抗体。参见美国专利号 5,567,610 和 5,229,275，每个专利的实施例部分以引用的方式并入本文。

[0047] 治疗剂是适用于治疗疾病的原子、分子或化合物。治疗剂的实例包括但不限于抗体、抗体片段、免疫缀合物、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、光活化剂或染料、放射性核素、寡核苷酸、干扰 RNA、siRNA、RNAi、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。

[0048] 免疫缀合物是缀合至治疗剂的抗体、抗原结合抗体片段、抗体复合物或抗体融合蛋白。缀合可以是共价或非共价的。缀合优选是共价的。

[0049] 如本文所用，术语抗体融合蛋白是重组产生的抗原结合分子，其中一种或多种天然抗体、单链抗体或抗体片段连接至另一部分，如蛋白质或肽、毒素、细胞因子、激素等。在某些优选实施方案中，融合蛋白可以包含融合在一起的两种或更多种相同或不同抗体、抗体片段或单链抗体，其可以结合至相同抗原或不同抗原上的相同表位、不同表位。

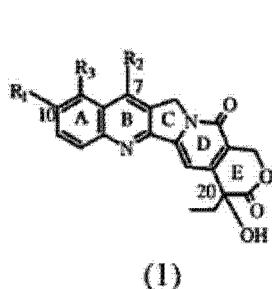
[0050] 免疫调节剂是当存在时改变、抑制或刺激身体免疫系统的治疗剂。通常，使用的免疫调节剂刺激免疫细胞增殖或在免疫应答级联中变得活化，如巨噬细胞、树状细胞、B 细胞和 / 或 T 细胞。然而，在一些情况下，免疫调节剂可以抑制免疫细胞的增殖或活化。如本文所述的免疫调节剂的一个实例是细胞因子，其是大约 5-20kDa 的可溶性小蛋白，其一旦与特定抗原接触便由一个细胞群（例如激发的 T- 淋巴细胞）释放并且用作细胞之间的细胞间介质。如熟练技术人员将了解，细胞因子的实例包括淋巴因子、单核因子、白介素以及若干相关信号传导分子，如肿瘤坏死因子 (TNF) 和干扰素。趋化因子是细胞因子的子集。某

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。示例性干扰素包括干扰素- α 、干扰素- β 、干扰素- γ 以及干扰素- λ 。

[0051] CPT 是喜树碱的缩写,并且当用于本发明的应用 CPT 中时,代表喜树碱本身或喜树碱的类似物或衍生物,如 SN-38。喜树碱及其一些类似物的结构在下文的图 1 中以式 1 给出,其中指明编号并且环用字母 A-E 来标记。

[0052] 图 1

[0053]



CPT: $R_1 = R_2 = R_3 = H$

10-羟基-CPT: $R_1 = OH; R_2 = R_3 = H$

CPT-11: $R_1 = \text{O}-\text{N}(\text{C}_4\text{H}_8)_2$; $R_2 = \text{乙基}; R_3 = H$

SN-38: $R_1 = OH; R_2 = \text{乙基}; R_3 = H$

拓扑替康: $R_1 = OH; R_2 = H; R_3 = \text{CH}_2\text{-N}(\text{CH}_3)_2$

[0054] 喜树碱缀合物

[0055] 用于制备包含附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及组合物描述如下。在优选实施方案中,药物的溶解性通过将所定义的聚乙二醇 (PEG) 部分 (即含有限定数量的单体单元的 PEG) 置于药物与抗体之间来增强,其中所定义的 PEG 是低分子量 PEG,优选含有 1-30 个单体单元,更优选含有 1-12 个单体单元。

[0056] 优选地,第一接头在一端连接药物并且可以在另一端以乙炔或叠氮化物基团终止。这第一接头可以包含在一端具有叠氮化物或乙炔基团并且在另一端具有不同反应性基团如羧酸或羟基的所定义的 PEG 部分。所述双官能的所定义的 PEG 可以附接于氨基醇的胺基,并且后者的羟基可以碳酸酯的形式附接于药物上的羟基。或者,所述定义的双官能 PEG 的非叠氮化物 (或乙炔) 部分任选地附接于 L-氨基酸或多肽的 N 末端,其中 C 末端附接于氨基醇的氨基,并且后者的羟基分别以碳酸酯或氨基甲酸酯形式附接于药物的羟基。

[0057] 包含抗体偶联基团及与第一接头的叠氮化物 (或乙炔) 基团 (即乙炔 (或叠氮化物)) 互补的反应性基团的第二接头可以经由乙炔-叠氮化物环加成反应与药物-(第一接头) 缀合物反应,以得到对缀合至疾病靶向抗体有用的最终双官能药物产物。抗体偶联基团优选是硫醇或硫醇反应性基团。

[0058] 以下提供用于在涉及 CPT 类似物如 SN-38 的药物-接头前体的制备中在 C-20 碳酸酯存在下选择性再生 10-羟基的方法。也可使用用于在药物中的反应性羟基如 SN-38 中的酚羟基的其它保护基,例如叔丁基二甲基甲硅烷基或叔丁基二苯基甲硅烷基,并且这些是在衍生的药物连接至抗体-偶联部分之前由氟化四丁基铵去保护。CPT 类似物的 10-羟基可选地作为酯或碳酸酯 (除了 'BOC' 外) 来保护,以使得双官能的 CPT 缀合至抗体,而先前没有对此保护基去保护。保护基在施用生物缀合物之后在生理 pH 条件下容易去保护。

[0059] 在乙炔-叠氮化物偶联 (称为 '点击化学') 中叠氮化物部分可以在 L2 上,而乙炔部分在 L3 上。或者, L2 可含有乙炔,而 L3 含有叠氮化物。'点击化学' 是指在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),但是替代形式的点击化学是已知的并且可以使用。点击化学在接近中性的 pH 条件下在水溶液中进行,并且因此易于药物缀合。点击化学的优点在于它是化

学选择性的,并且补充其它众所周知的缀合化学,如硫醇-马来酰亚胺反应。

[0060] 虽然本应用集中在抗体或抗体片段作为靶标部分的用途,但熟练技术人员将认识到,当缀合物包含抗体或抗体片段时,另一种类型的靶标部分如适体、avimer、亲和体或肽配位体可以被置换。

[0061] 示例性优选实施方案涉及药物衍生物与通式 2 的抗体的缀合物,

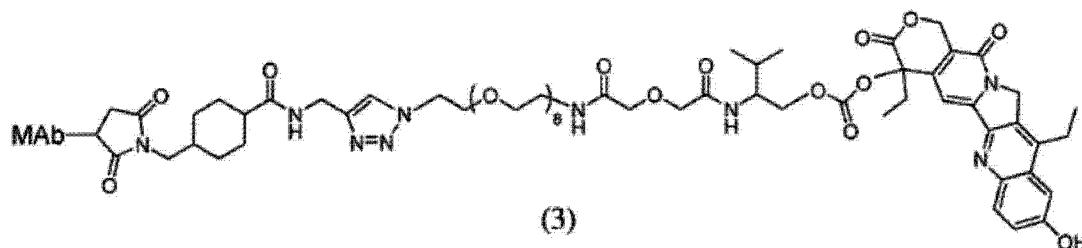
[0062] $\text{MAb}-[\text{L2}]-[\text{L1}]-[\text{AA}]_m-[\text{A}']-\text{药物} (2)$

[0063] 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)基团的交链接头的组分;L1 包含在一端具有与 L2 中的乙炔(或叠氮化物)部分互补的叠氮化物(或乙炔)并且在另一端具有反应性基团如羧酸或羟基的所定义的 PEG;AA 是 L-氨基酸;m 是 0、1、2、3 或 4 的整数;并且 A' 是选自以下的组的另外的间隔物:乙醇胺、4-羟基苄醇、4-氨基苄醇或取代或未被取代的乙二醇。‘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、酪氨酸以及缬氨酸。如果 A' 基团含有羟基,那么其分别以碳酸酯或氨基甲酸酯形式连接到药物的羟基或氨基。

[0064] 在式 2 的一个优选实施方案中,A' 是衍生自 L-氨基酸的取代的乙醇胺,其中氨基酸的羧基被羟甲基部分置换。A' 可以衍生自以下 L-氨基酸中的任何一个: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、酪氨酸以及缬氨酸。

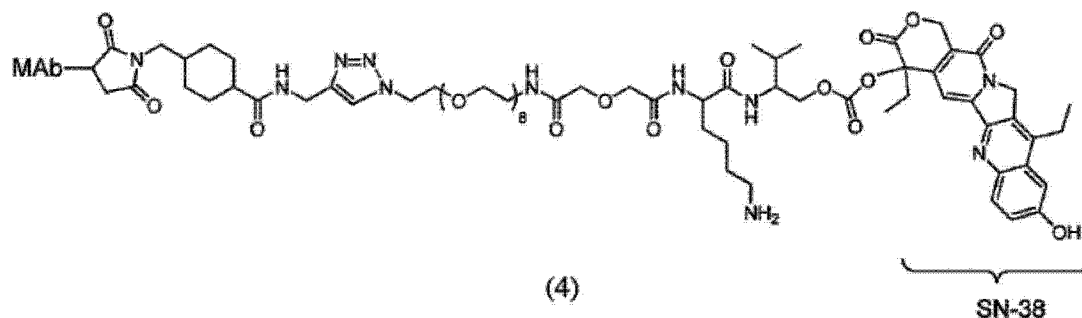
[0065] 在式 2 的优选实施方案的缀合物的一个实例中,m 是 0,A' 是 L-缬氨醇,并且药物是由 SN-38 例示。所得结构以式 3 示出。

[0066]



[0067] 在式 2 的优选实施方案的缀合物的另一实例中,m 是 1 且由衍生的 L-赖氨酸表示,A' 是 L-缬氨醇,并且药物是由 SN-38 例示。结构以式 4 示出。

[0068]



[0069] 在这个实施方案中,首先使用用于赖氨酸氨基的正交保护基在氨基酸如赖氨酸的羧酸与缬氨醇的氨基之间形成酰胺键。除去赖氨酸 N 末端上的保护基,保持赖氨酸侧链上的保护基完整,并且 N 末端偶联到在另一端具有叠氮化物(或乙炔)的所定义的 PEG 上的

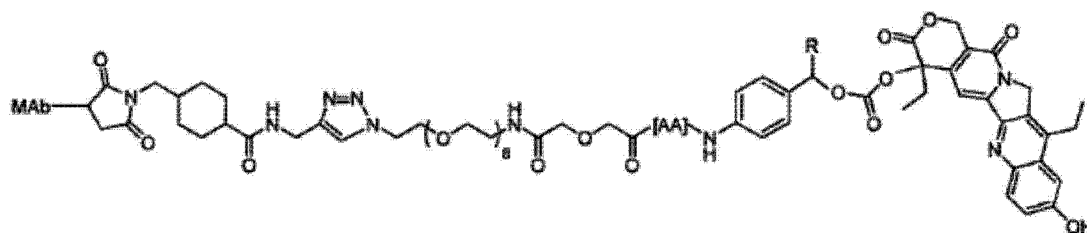
羧基。缬氨酸的羟基然后附接于 10-羟基保护的 SN-38 的 20-氯甲酸酯衍生物,并且此中间物偶联到携带抗体结合部分以及点击环加成化学中所涉及的互补乙炔(或叠氮化物)基团的 L2 组分。最终,在赖氨酸侧链和 SN-38 两者处除去保护基得到式 3 所示的此实例的产物。

[0070] 虽然不希望受理论约束,但在细胞内蛋白水解之后生成的小的 MW SN-38 产物(即缬氨酸-SN-38 碳酸酯)具有经由涉及缬氨酸的氨基和碳酸酯的羰基的分子内环化作用放出完整 SN-38 的另外途径。

[0071] 在另一优选实施方案中,通式 2 的 A' 是 A-OH,其中 A-OH 是可折叠部分如 4-氨基苄醇或取代的 4-氨基苄醇,其在苄基位置处被 C₁-C₁₀烷基取代,并且后者经由其氨基附接于 L-氨基酸或包含高达 4 个 L-氨基酸部分的多肽;其中 N 末端附接于以抗体结合基团封端的交联接头。

[0072] 优选实施方案的一个实例如下给出,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' 在通式 (2) 中由单个 L-氨基酸组成,其中 m = 1,并且药物用 SN-38 来例示。所述结构表示如下(式 5,称为 MAb-CLX-SN-38)。AA 的单个氨基酸选自以下 L-氨基酸中的任何一个: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、酪氨酸以及缬氨酸。4-氨基苄醇部分(A' 的 A-OH 实施方案)上的取代基 R 是氢或选自 C₁-C₁₀烷基的烷基。

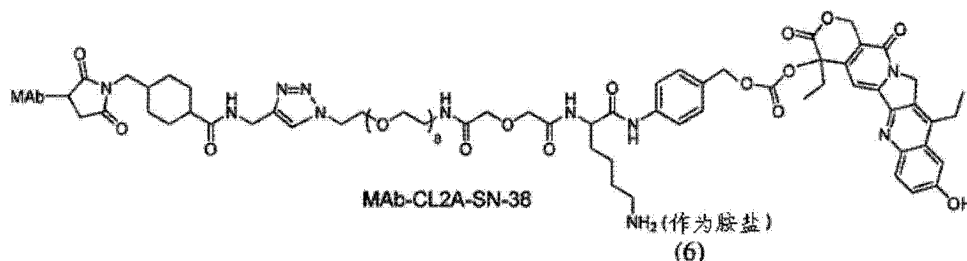
[0073]



MAb-CLX-SN-38 (5)

[0074] 式 5 的 MAb-CLX-SN-38 的一个实施方案,其中单个氨基酸 AA 是 L-赖氨酸并且 R = H,并且药物是由 SN-38(式 6;称为 MAb-CL2A-SN-38)例示。

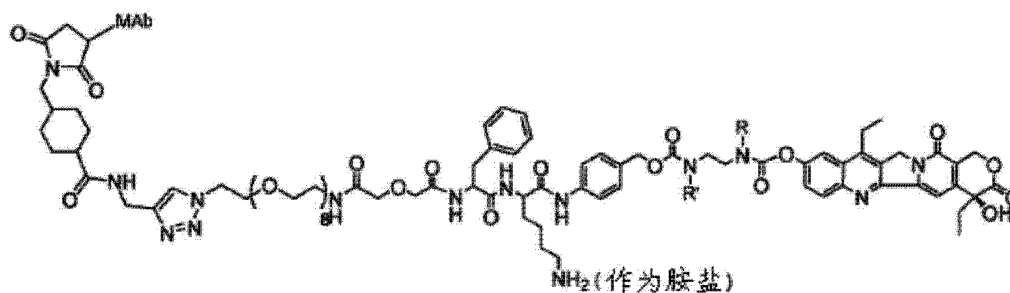
[0075]



[0076] 其它实施方案在含有 10-羟基的喜树碱如 SN-38 的背景内是可能的。在 SN-38 作为药物的实例中,药物的更高反应性的 10-羟基被衍生化,而 20-羟基未受影响。在通式 2 内, A' 是取代的乙二胺。此实施方案的一个实例由以下式 '7' 表示,其中 SN-38 的酚羟基被衍生化为具有取代的乙二胺的氨基甲酸酯,其中二胺的另一个胺被衍生化为具有 4-氨

基苄醇的氨基甲酸酯,并且后者的氨基附接于 Phe-Lys 二肽。在此结构(式 7)中,R 和 R' 独立地是氢或甲基。当 R = R' = 甲基时,其被称为 MAb-CL17-SN-38 或 MAb-CL2E-SN-38。

[0077]

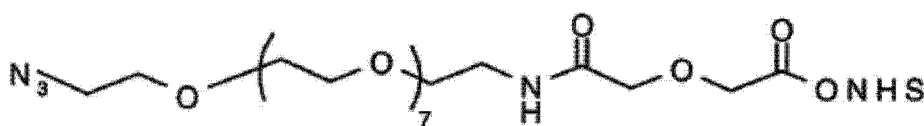


(7)

[0078] 在一个优选实施方案中,AA 包含多肽部分,优选二肽、三肽或四肽,其可由细胞内肽酶裂解。实例是:Ala-Leu、Leu-Ala-Leu 以及 Ala-Leu-Ala-Leu (Trouet 等人,1982)。

[0079] 在另一优选实施方案中,缀合物的 L1 组分含有所定义的聚乙二醇 (PEG) 间隔物,其具有 1-30 个重复单体单元。在进一步优选实施方案中,PEG 是具有 1-12 个重复单体单元的所定义的 PEG。PEG 的引入可以涉及使用可商购获得的异双官能化的 PEG 衍生物。异双官能 PEG 可含有叠氮化物或乙炔基团。含有 8 个重复单体单元的异双官能的所定义的 PEG (其中 'NHS' 是琥珀酰亚胺基) 的一个实例在以下式 8 中给出:

[0080]

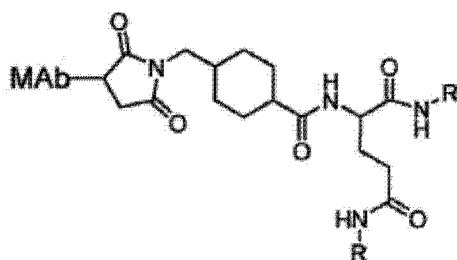


(8)

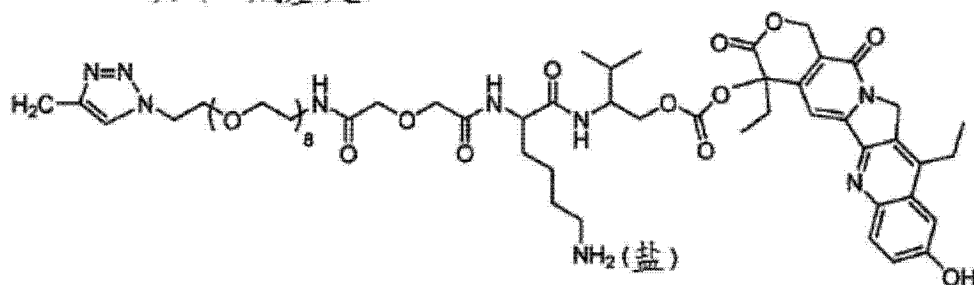
[0081] 在一个优选实施方案中,L2 具有多个乙炔(或叠氮化物)基团,范围是 2-40,但优选是 2-20,且更优选是 2-5;以及单个抗体结合部分。

[0082] 含有多个药物分子及单个抗体结合部分的代表性 SN-38 缀合物显示如下。此结构的 'L2' 组分附加到 2 个乙炔基团,导致两个叠氮化物附加的 SN-38 分子的附接。至 MAb 的键合表示为琥珀酰亚胺。

[0083]



其中R残基是:



(9)

[0084] 在优选实施方案中,当双官能药物含有硫醇反应性部分作为抗体结合基团时,使用硫醇化试剂在抗体的赖氨酸基团上生成抗体上的硫醇。用于通过修饰 MAb 的赖氨酸基团将硫醇基引入抗体上的方法在本领域中是众所周知的 (Wong, Chemistry of protein conjugation and cross-linking, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL(1991), 第 20-22 页)。或者,使用还原剂如二硫苏糖醇 (DTT) 轻度还原抗体上的链间二硫键 (Willner 等人, Bioconjugate Chem. 4:521-527 (1993)) 可以在抗体上生成 7 至 10 个硫醇;这具有将多个药物部分并入 MAb 远离抗原结合区的链间区中的优点。在一个更优选实施方案中,SN-38 附接于还原的二硫化物巯基,导致形成抗体-SN-38 免疫缀合物,其中每个抗体分子共价附接 6 个 SN-38 部分。提供半胱氨酸残基用于附接药物或其它治疗剂的其它方法是已知的,如使用半胱氨酸工程化的抗体 (参见美国专利号 7,521,541,其实施例部分以引用的方式并入本文)。

[0085] 在替代优选实施方案中,化学治疗性部分选自由以下组成的组:阿霉素 (DOX)、表柔比星、吗啉代阿霉素 (吗啉代-DOX)、氰基吗啉代-阿霉素 (氰基吗啉代-DOX)、2-吡咯啉并-阿霉素 (2-PDOX)、Pro-2PDOX、CPT、10-羟基喜树碱、SN-38、拓扑替康、勒托替康、9-氨基喜树碱、9-硝基喜树碱、紫杉烷类、格尔德霉素、平阳霉素以及埃坡霉素。在一个更优选实施方案中,化学治疗性部分是 SN-38。优选地,在缀合物的优选实施方案中,抗体连接至至少一个化学治疗性部分;优选地 1 至约 12 个化学治疗性部分;最优选地约 6 至约 12 个化学治疗性部分。

[0086] 此外,在一个优选实施方案中,接头组分 'L2' 包含与在所述抗体的一个或多个赖氨酸侧链氨基处引入的硫醇反应性残基反应的硫醇基。在此情况下,抗体通过本领域中充分描述的工序被硫醇反应性基团如马来酰亚胺、乙烯砜、溴乙酰胺或碘乙酰胺预衍生化。

[0087] 在此工作的背景下,意外地发现一种方法,通过该方法可以制备 CPT 药物接头,其中 CPT 另外具有 10-羟基。此方法涉及但不限于保护 10-羟基作为叔丁氧羰基 (BOC) 衍生物,然后制备药物接头缀合物的倒数第二个中间物。通常,除去 BOC 基团需要用强酸如三氟

乙酸 (TFA) 进行处理。在这些条件下,含有有待被除去的保护基的 CPT20-O- 接头碳酸酯也对裂解敏感,从而产生未被修饰的 CPT。实际上,如本领域中所述的使用适度可除去的甲氧基三苯甲基 (MMT) 保护基用于接头分子的赖氨酸侧链的基本原理就是要避免这种可能性 (Walker 等人, 2002)。发现选择性除去酚 BOC 保护基通过进行反应持续较短时间、最佳 3 至 5 分钟是可能的。在这些条件下,主要产物是其中在 10- 羟基位置处的 ‘BOC’ 被除去,而在 ‘20’ 位置处的碳酸酯是完整的。

[0088] 替代方法涉及用除了 ‘BOC’ 以外的基团保护 CPT 类似物的 10- 羟基位置,以使得最终产物准备好缀合至抗体,而无需将 10-OH 保护基去保护。将 10-OH 转化为酚碳酸酯或酚酯的 10- 羟基保护基容易通过生理 pH 条件或在体内施用缀合物之后由酯酶去保护。在生理条件下在 10 位置处酚碳酸酯相比在 10- 羟基喜树碱的 20 位置处叔碳酸酯的更快去除已经由 He 等人 (He 等人, *Bioorganic&Medicinal Chemistry* 12:4003-4008 (2004)) 描述。SN-38 上的 10- 羟基保护基可以是 ‘COR’, 其中 R 可以是取代的烷基如 “ $N(CH_3)_2-(CH_2)_n-$ ”, 其中 n 是 1-10 并且其中末端氨基任选地呈季盐形式以便提高水溶性,或简单的烷基,如 “ $CH_3-(CH_2)_n-$ ”, 其中 n 是 0-10,或其可以是烷氧基部分如 “ $CH_3-(CH_2)_n-O-$ ”, 其中 n 是 0-10,或 “ $N(CH_3)_2-(CH_2)_n-O-$ ”, 其中 n 是 2-10,或 “ $R_1O-(CH_2-CH_2-O)_n-CH_2-CH_2-O-$ ”, 其中 R_1 是乙基或甲基并且 n 是值为 0-10 的整数。这些 10- 羟基衍生物容易通过用选出的试剂的氯甲酸酯处理来制备,如果最终衍生物将是碳酸酯的话。通常,含有 10- 羟基的喜树碱如 SN-38 是使用三乙胺作为碱用摩尔当量的二甲基甲酰胺中的氯甲酸酯来处理。在这些条件下,20-OH 位置是不受影响的。对于形成 10-O- 酯,使用选出试剂的酰基氯。

[0089] 在制备药物衍生物与通式 2 的抗体的缀合物优选工艺中,其中描述符 L2、L1、AA 及 A-X 如在先前部分中所描述,首先制备双官能药物部分 $[L2]-[L1]-[AA]_m-[A-X]$ -药物,接着将双官能药物部分缀合至抗体上 (本文如 “MAb” 所示)。

[0090] 在制备药物衍生物与通式 2 的抗体的缀合物的一个优选方法中,其中描述符 L2、L1、AA 及 A-OH 如先前部分中所述,双官能药物部分是通过首先经由酰胺键将 A-OH 连接到 AA 的 C 末端,然后将 AA 的胺末端偶联到 L1 的羧基上来制备。如果 AA 不存在 (即 $m = 0$), 那么 A-OH 经由酰胺键直接附接于 L1。交联接头 $[L1]-[AA]_m-[A-OH]$ 附接于药物的羟基或氨基,并且在此之后通过借助于经由点击化学在 L1 和 L2 中在叠氮化物 (或乙炔) 与乙炔 (或叠氮化物) 基团之间的反应附接到 L1 部分。

[0091] 在一个实施方案中,抗体是单克隆抗体 (MAb)。在其它实施方案中,抗体可以是多价和 / 或多特异性 MAb。抗体可以是鼠科的、嵌合的、人源化或人单克隆抗体,并且所述抗体可以是完整的、片段 (Fab、Fab’、 $F(ab)_2$ 、 $F(ab’)_2$) 或亚片段 (单链构建体) 形式,或具有 IgG1、IgG2a、IgG3、IgG4、IgA 同种型或由此之亚分子。

[0092] 在一个优选实施方案中,抗体结合至在癌症或恶性细胞上表达的抗原或抗原的表位。癌细胞优选是来自造血系统肿瘤、癌瘤、肉瘤、黑素瘤或神经胶质肿瘤的细胞。有待根据本发明治疗的优选恶性肿瘤是恶性实体肿瘤或造血系统肿瘤。

[0093] 在一个优选实施方案中,细胞内可裂解的部分可以在其一旦通过 MAb- 药物缀合物结合至其受体上便内化至细胞中之后被裂解,并且尤其被酯酶和肽酶裂解。

[0094] 一般抗体技术

[0095] 用于制备对抗几乎任何靶抗原的单克隆抗体的技术在本领域中是众所周知的。参

见,例如 **Köhler** 和 **Milstein**, *Nature* 256:495(1975) 以及 **Coligan** 等人(编著), *CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY*, 第1卷,第2.5.1-2.6.7页(*John Wiley&Sons* 1991)。简言之,可通过用包含抗原的组合物注射小鼠、去除脾脏以获得 B- 淋巴细胞、使 B- 淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合以产生杂交瘤、克隆杂交瘤、选择产生针对抗原的抗体的阳性克隆、培养产生针对抗原的抗体的克隆以及从杂交瘤培养物中分离抗体来获得单克隆抗体。

[0096] MAb 可通过多种已确立的技术从杂交瘤培养物分离和纯化。这类分离技术包括使用蛋白 A 或蛋白 G 琼脂糖凝胶的亲和色谱法、尺寸排阻色谱法和离子交换色谱法。参见,例如 **Coligan** 的第 2.7.1-2.7.12 页和第 2.9.1-2.9.3 页。还参见 **Baines** 等人,在 *METHODS IN MOLECULARBIOLOGY*, 第10卷,第79-104页中的“Purification of Immunoglobulin G(IgG),” (*The HumanaPress, Inc.* 1992)。

[0097] 在初始生成针对免疫原的抗体之后,可对抗体测序并且随后通过重组技术来制备。鼠抗体和抗体片段的人源化和嵌合为本领域技术人员所熟知,如下所论述。

[0098] 熟练技术人员将认识到,要求保护的方法和组合物可以利用本领域中已知的广泛多种抗体中的任一种。使用的抗体可以从多种已知来源商购获得。例如,分泌杂交瘤系的多种抗体是从美国典型培养物保藏中心(ATCC, Manassas, VA) 获得。针对包括但不限于肿瘤相关抗原的各种疾病靶标的大量抗体已经在 ATCC 处保藏和 / 或已经公开可变区序列并且可以获得以供在要求保护的方法和组合物中使用。参见,例如美国专利号 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,每个专利的实施例部分以引用的方式并入本文。这些仅仅是示例性的并且广泛多种其它抗体及其杂交瘤在本领域中是已知的。熟练技术人员将认识到,针对几乎任何疾病相关抗原的分泌抗体序列或抗体的杂交瘤可以通过简单搜索 ATCC、NCBI 和 / 或 USPTO 数据库的针对所关注的所选疾病相关靶标的抗体而获得。克隆抗体的抗原结合结构域可以使用本领域中熟知的标准技术进行扩增、切除、连接到表达载体中、转染到适应的宿主细胞中并且被用于蛋白质生产。分离的抗体可以使用本文所公开的技术缀合至治疗剂如喜树碱。

[0099] 嵌合及人源化抗体

[0100] 嵌合抗体是重组蛋白,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))置换。嵌合抗体当向受试者施用时展现降低的免疫原性及提高的稳定性。用于构建嵌合抗体的方法在本领域中是众所周知的(例如 Leung 等人,1994,Hybridoma 13:469)。

[0101] 嵌合的单克隆抗体可以通过将来自小鼠免疫球蛋白的可变重链和轻链转移到人抗体的相应可变结构域中而被人源化。嵌合单克隆抗体中的小鼠构架区(FR)也被人 FR 序列置换。为了保护人源化单克隆的稳定性和抗原特异性,一个或多个人 FR 残基可被小鼠对应残基置换。人源化单克隆抗体可以被用来治疗性处理受试者。用于产生人源化单克隆抗体的技术在本领域中是众所周知的。(参见,例如 Jones 等人,1986,Nature,321:522; Riechmann 等人,1988,332:323;Verhoeyen 等人,1988,Science,239:1534; Carter 等人,1992,Proc. Nat'l Acad. Sci. USA,89:4285;Sandhu, Crit. Rev. Biotech.,1992,12:437;Tempest 等人,1991,Biotechnology 9:266;Singer 等人,J. Immun.,1993,150:2844。)

[0102] 其它实施方案可以涉及非人灵长类动物抗体。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 等人,WO 91/11465(1991)和 Losman 等人,Int. J. Cancer 46:310(1990)中。在另一实施方案中,抗体可以是人单克隆抗体。这类抗体可以从已被工程化以响应于抗原挑战产生特异性人抗体的转基因小鼠中获得,如下所论述。

[0103] 人抗体

[0104] 用于使用组合方法或用人免疫球蛋白基因座转化的转基因动物来产生完全人抗体的方法为本领域中已知的(例如, Mancini 等人,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;每篇文献以引用的方式并入本文)。预期此类完全人抗体展现出比嵌合抗体或人源化抗体甚至更少的副作用并且在体内起基本上内源性人抗体的作用。在某些实施方案中,要求保护的方法和工序可利用通过此类技术产生的人抗体。

[0105] 在一个替代方案中,可使用噬菌体展示技术来产生人抗体(例如,Dantas-Barbosa 等人,2005,Genet. Mol. Res. 4:126-40,以引用的方式并入本文)。人抗体可从正常人或从表现出具体疾病病况(如癌症)的人中产生(Dantas-Barbosa 等人,2005)。从患病个体构建人抗体的优点在于循环抗体库可偏向针对疾病相关抗原的抗体。

[0106] 在此方法的一个非限制性实例中,Dantas-Barbosa 等人(2005)从骨肉瘤患者中构建了人 Fab 抗体片段的噬菌体展示文库。一般来说,总 RNA 是从循环血液淋巴细胞中获

得(同上)。重组 Fab 是从 μ 、 γ 及 κ 链抗体库中克隆并且被插入噬菌体展示文库中(同上)。RNA 被转变为 cDNA 并且用于使用针对重链及轻链免疫球蛋白序列的特异性引物来制备 Fab cDNA 文库(Marks 等人, 1991, J. Mol. Biol. 222:581-97, 以引用的方式并入本文)。文库构建是根据 Andris-Widhopf 等人(2000, Phage Display Laboratory Manual, Barbas 等人(编著), 第 1 版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY 第 9.1 至 9.22 页, 以引用的方式并入本文)进行。最终 Fab 片段用限制性核酸内切酶消化并且被插入噬菌体基因组中以制得噬菌体展示文库。这类文库可通过标准噬菌体展示方法来筛选。熟练技术人员将认识到, 这项技术仅仅是示例性的并且可以利用用于通过噬菌体展示来制造和筛选人抗体或抗体片段的任何已知方法。

[0107] 在另一替代方案中, 已经被基因工程化以产生人抗体的转基因动物可用于使用如以上所论述的标准免疫方案生成针对基本上任何免疫原性靶标的抗体。用于从转基因小鼠获得人抗体的方法是由 Green 等人, Nature Genet. 7:13(1994)、Lonberg 等人, Nature 368:856(1994) 以及 Taylor 等人, Int. Immun. 6:579(1994) 描述。这类系统的一个非限制性实例是来自 Abgenix(Fremont, CA) 的 **XENOMOUSE®** (例如 Green 等人, 1999, J. Immunol. Methods 231:11-23, 以引用的方式并入本文)。在 **XENOMOUSE®** 和类似动物中, 小鼠抗体基因已经失活并且被置换为功能性人抗体基因, 而小鼠免疫系统的其余部分保持完整。

[0108] 将 **XENOMOUSE®** 用含有人 IgH 和 Ig κ 基因座的部分, 包括大部分可变区序列连同辅助基因和调控序列的种系构型 YAC(酵母人工染色体)转化。人可变区库可用于来生成产生抗体的 B 细胞, 所述 B 细胞可通过已知技术加工成杂交瘤。用靶抗原免疫的 **XENOMOUSE®** 将通过正常免疫应答产生人抗体, 其可通过以上所讨论的标准技术收获和/或产生。可获得 **XENOMOUSE®** 的多种品系, 其各自均能够产生不同类别的抗体。已示出转基因产生的人抗体具有治疗潜能, 同时保留正常人抗体的药物代谢动力学性质(Green 等人, 1999)。熟练技术人员将认识到, 要求保护的组合物和方法不限于使用 **XENOMOUSE®** 系统, 但可利用已被基因工程化以产生人抗体的任何转基因动物。

[0109] 抗体片段的产生

[0110] 要求保护的方法和/或组合物的一些实施方案可涉及抗体片段。这类抗体片段可例如通过借助于常规方法进行全抗体的胃蛋白酶或木瓜蛋白酶消化而获得。例如, 抗体片段可以通过用胃蛋白酶酶促裂解抗体以提供表示为 $F(ab')_2$ 的 5S 片段而产生。此片段可进一步使用硫醇还原剂和任选地用于由裂解二硫键产生的巯基的封端基团来裂解, 以产生 3.5S Fab' 单价片段。或者, 使用胃蛋白酶进行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公开于美国专利号 4,036,945; 美国专利号 4,331,647; Nisonoff 等人, 1960, Arch. Biochem. Biophys., 89:230; Porter, 1959, Biochem. J., 73:119; Edelman 等人, 1967, METHODS IN ENZYMOLOGY, 第 422 页 (Academic Press) 以及 Coligan 等人(编著), 1991, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, (John Wiley&Sons) 中。

[0111] 也可以使用裂解抗体的其它方法, 如分离重链以形成单价轻-重链片段, 进一步裂解片段; 或其它酶促、化学或遗传技术, 只要所述片段结合至由完整抗体所识别的抗

原即可。例如, Fv 片段包含 V_H 与 V_L 链的缔合。这种缔合可以是非共价的, 如 Inbar 等人, 1972, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 69:2659 中所述。或者, 可变链可通过分子间二硫键连接或通过化学物质如戊二醛交联。参见 Sandhu, 1992, Crit. Rev. Biotech., 12:437。

[0112] 优选地, Fv 片段包含通过肽接头连接的 V_H 及 V_L 链。这些单链抗原结合蛋白 (scFv) 通过构建包含编码由寡核苷酸接头序列连接的 V_H 和 V_L 结构域的 DNA 序列的结构基因来制备。结构基因被插入表达载体中, 其随后被引入宿主细胞如大肠杆菌中。重组宿主细胞合成具有桥接两个 V 结构域的接头肽的单条多肽链。用于产生 scFv 的方法在本领域中是熟知的。参见 Whitlow 等人, 1991, Methods: A Companion to Methods in Enzymology 2:97; Bird 等人, 1988, Science, 242:423; 美国专利号 4, 946, 778; Pack 等人, 1993, Bio/Technology, 11:1271 以及 Sandhu, 1992, Crit. Rev. Biotech., 12:437。

[0113] 另一种形式的抗体片段是单结构域抗体 (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众所周知的 (参见, 例如 Cossins 等人, Protein Expression and Purification, 2007, 51:253-59; Shuntao 等人, Molec Immunol 2006, 43:1912-19; Tanha 等人, 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”) 可以通过构建编码所关注抗体的 CDR 的基因而获得。这类基因例如通过使用聚合酶链反应以从产生抗体的细胞的 RNA 合成可变区来制备。参见 Larrick 等人, 1991, Methods: A Companion to Methods in Enzymology 2:106; Ritter 等人 (编著), 1995, MONOCLONAL ANTIBODIES: PRODUCTION, ENGINEERING AND CLINICAL APPLICATION, 第 166-179 页 (Cambridge University Press); Birch 等人, (编著), 1995, MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND APPLICATIONS, 第 137-185 页 (Wiley-Liss, Inc.)。

[0114] 抗体变型

[0115] 在某些实施方案中, 抗体序列如抗体的 Fc 部分可以变化以使缀合物的生理特征最佳化, 如血清中的半衰期。置换蛋白质中的氨基酸序列的方法在本领域中是广为人知的, 如通过定点诱变 (例如 Sambrook 等人, Molecular Cloning, A laboratory manual, 第 2 版, 1989)。在优选实施方案中, 变型可涉及在 Fc 序列中添加或删除一个或多个糖基化位点 (例如美国专利号 6, 254, 868, 其中的实施例部分以引用的方式并入本文)。在其它优选实施方案中, 可以在 Fc 序列中进行特定氨基酸置换 (例如 Hornick 等人, 2000, J Nucl Med 41:355-62; Hinton 等人, 2006, J Immunol 176:346-56; Petkova 等人 2006, Int Immunol 18:1759-69; 美国专利号 7, 217, 797; 每篇文献以引用的方式并入本文)。

[0116] 靶抗原和示例性抗体

[0117] 在一个优选实施方案中, 使用识别和 / 或结合至在靶细胞上以高水平表达并且相对于正常组织在患病细胞上突出或排他地表达的抗原。更优选地, 抗体在结合之后快速体内化。一个示例性快速内化抗体是 LL1 (抗 CD74) 抗体, 其中内化速率是每天每个细胞大约 8×10^6 个抗体分子 (例如 Hansen 等人, 1996, Biochem J. 320:293-300)。因此, “快速内化” 抗体可以是内化速率为每天每个细胞约 1×10^6 至约 1×10^7 个抗体分子的抗体。在要求保护的组合物和方法中使用的抗体可以包括具有如上所述性质的 MAbs。在例如癌症的疗法中使用的示例性抗体包括但不限于 LL1 (抗 CD74)、LL2 或 RFB4 (抗 CD22)、维妥珠单抗 (hA20, 抗 CD20)、利妥昔单抗 (抗 CD20)、obinituzumab (GA101, 抗 CD20)、lambrolizumab (抗 PD-1 受

体)、nivolumab(抗 PD-1 受体)、易普利单抗(抗 CTLA-4)、RS7(抗上皮糖蛋白-1(EGP-1, 又名 TROP-2))、PAM4 或 KC4(两者都是抗粘蛋白)、MN-14(抗癌胚抗原(CEA, 又名 CD66e 或 CEACAM5)、MN-15 或 MN-3(抗 CEACAM6)、Mu-9(抗结肠特异性抗原-p)、Immu 31(抗 α 甲胎蛋白)、R1(抗 IGF-1R)、A19(抗 CD19)、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 二聚物)、D2/B(抗 PSMA)、G250(抗碳酸酐酶 IX MAb)、L243(抗 HLA-DR)、阿来组单抗(抗 CD52)、贝伐单抗(抗 VEGF)、西妥昔单抗(抗 EGFR)、吉妥单抗(抗 CD33)、替伊莫单抗(抗 CD20);帕尼单抗(抗 EGFR);托西莫单抗(抗 CD20);PAM4(又名 clivatuzumab, 抗粘蛋白)以及曲妥单抗(抗 ErbB2)。这类抗体在本领域中是已知的(例如, 美国专利号 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 ;以及美国专利申请公布号 20050271671 ;20060193865 ;20060210475 ;20070087001 ;每个专利的实施例部分以引用的方式并入本文)。使用的具体已知抗体包括 hPAM4(美国专利号 7,282,567)、hA20(美国专利号 7,251,164)、hA19(美国专利号 7,109,304)、hIMMU-31(美国专利号 7,300,655)、hLL1(美国专利号 7,312,318、)、hLL2(美国专利号 7,074,403)、hMu-9(美国专利号 7,387,773)、hL243(美国专利号 7,612,180)、hMN-14(美国专利号 6,676,924)、hMN-15(美国专利号 7,541,440)、hR1(美国专利申请 12/772,645)、hRS7(美国专利号 7,238,785)、hMN-3(美国专利号 7,541,440)、AB-PG1-XG1-026(美国专利申请 11/983,372, 保藏为 ATCC PTA-4405 和 PTA-4406)以及 D2/B(WO 2009/130575), 每个列举的专利或申请的关于附图和实施例部分的文本以引用的方式并入本文。

[0118] 可以使用所述缀合物靶向的其它有用的抗原包括碳酸酐酶 IX、B7、CCCL19、CCCL21、CSAp、HER-2/neu、BrE3、CD1、CD1a、CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD11A、CD14、CD15、CD16、CD18、CD19、CD20(例如 C2B8、hA20、1F5MAb)、CD21、CD22、CD23、CD25、CD29、CD30、CD32b、CD33、CD37、CD38、CD40、CD40L、CD44、CD45、CD46、CD52、CD54、CD55、CD59、CD64、CD67、CD70、CD74、CD79a、CD80、CD83、CD95、CD126、CD133、CD138、CD147、CD154、CEACAM5、CEACAM6、CTLA-4、 α 甲胎蛋白(AFP)、VEGF(例如 **AVASTIN®**, 纤连蛋白剪接变体)、ED-B 纤连蛋白(例如 L19)、EGP-1(TROP-2)、EGP-2(例如 17-1A)、EGF 受体(ErbB1)(例如 **Erbbitux®**)、ErbB2、ErbB3、因子 H、FHL-1、Flt-3、叶酸受体、Ga 733、GRO- β 、HMGB-1、低氧诱导因子(HIF)、HM1.24、HER-2/neu、胰岛素样生长因子(ILGF)、IFN- γ 、IFN- α 、IFN- β 、IFN- λ 、IL-2R、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-25、IP-10、IGF-1R、Ia、HM1.24、神经节苷脂、HCG、L243 所结合的 HLA-DR 抗原、CD66 抗原(即 CD66a-d 或其组合)、MAGE、mCRP、MCP-1、MIP-1A、MIP-1B、巨噬细胞迁移抑制因子、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC5ac、胎盘生长因子(P1GF)、PSA(前列腺特异性抗原)、PSMA、PAM4 抗原、PD-1 受体、NCA-95、NCA-90、A3、A33、Ep-CAM、KS-1、Le(y)、间皮素、S100、腱生蛋白、TAC、Tn 抗原、Thomas-Friedenreich 抗原、肿瘤坏死抗原、肿瘤血管生成抗原、TNF- α 、TRAIL 变体(R1 和 R2)、TROP-2、VEGFR、RANTES、T101、以及癌症干细胞抗原、补体因子 C3、C3a、C3b、C5a、C5 和致癌基因产物。

[0119] 对合适的抗原的综合分析(集群分配, Cluster Designation 或 CD) 关注造

血恶性细胞,如流式细胞术所示,且其可以是选择适用于药物-缀合免疫疗法的抗体的指导,参见 Craig 和 Foon, Blood 于 2008 年 1 月 15 日在线预公布;DOI 10.1182/blood-2007-11-120535。

[0120] CD66 抗原由具有类似结构 CD66a-e 的五种不同糖蛋白组成,分别由癌胚抗原 (CEA) 基因家族成员 BCG、CGM6、NCA、CGM1 及 CEA 编码。这些 CD66 抗原(例如 CEACAM6)主要在粒细胞、消化道正常上皮细胞及各种组织的肿瘤细胞中表达。还包括作为癌症的适合靶标的睾丸癌抗原,如 NY-ESO-1(Theurillat 等人, Int. J. Cancer 2007; 120(11):2411-7)、以及在骨髓性白血病 (Kozlov 等人, Cancer Genet. Cytogenet. 2005; 163(1):62-7) 和 B 细胞疾病中的 CD79a、和用于非何杰金氏淋巴瘤的 CD79b(Poison 等人, 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”的美国临时申请序列号 60/426,379 中。属于更耐受治疗的前体恶性细胞群的癌症干细胞 (Hill 和 Perris, J. Natl. Cancer Inst. 2007; 99:1435-40),具有可在某些癌症类型中被靶向的抗原,如前列腺癌 (Maitland 等人, Ernst Schering Found. Sympos. Proc. 2006; 5:155-79)、非小细胞肺癌 (Donnenberg 等人, J. Control Release 2007; 122(3):385-91)、和成胶质细胞瘤 (Beier 等人, Cancer Res. 2007; 67(9):4010-5) 中的 CD133、以及结肠直肠癌 (Dalerba 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2007; 104(24):10158-63)、胰腺癌 (Li 等人, Cancer Res. 2007; 67(3):1030-7) 和头颈鳞状细胞癌 (Prince 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2007; 104(3):973-8) 中的 CD44。

[0121] 在多发性骨髓瘤疗法中,已经描述了针对以下的合适的靶向抗体:例如 CD38 和 CD138 (Stevenson, Mol Med 2006; 12(11-12):345-346; Tassone 等人, Blood 2004; 104(12):3688-96)、CD74 (Stein 等人, 同上)、CS1 (Tai 等人, Blood 2008; 112(4):1329-37)、以及 CD40 (Tai 等人, 2005; Cancer Res. 65(13):5898-5906)。

[0122] 巨噬细胞迁移抑制因子 (MIF) 为先天性和获得性免疫和凋亡的重要调节剂。已报道了 CD74 为 MIF 的内源性受体 (Leng 等人, 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作用可用于治疗广泛范围的疾病病况,如膀胱癌、前列腺癌、乳癌、肺癌、结肠癌以及慢性淋巴细胞性白血病(例如, Meyer-Siegler 等人, 2004, BMC Cancer 12:34; Shachar&Haran, 2011, Leuk Lymphoma 52:1446-54);自身免疫疾病如类风湿性关节炎和全身性红斑狼疮 (Morand&Leech, 2005, Front Biosci 10:12-22; Shachar&Haran, 2011, Leuk Lymphoma 52:1446-54);肾疾病如肾脏同种异体移植排斥 (Lan, 2008, Nephron Exp Nephrol. 109:e79-83) 以及众多炎症性疾病 (Meyer-Siegler 等人, 2009, Mediators Inflamm epub, 2009 年 3 月 22 日; Takahashi 等人, 2009, Respir Res 10:33; 米拉珠单抗 (hLL1) 为治疗性用于治疗 MIF 介导的疾病的示例性抗 CD74 抗体。

[0123] 抗 TNF- α 抗体为本领域中已知的,并且可用于治疗免疫疾病如自身免疫疾病、免疫功能障碍(例如,移植物抗宿主疾病、器官移植排斥)或糖尿病。已知的对抗 TNF- α 的抗体包括人抗体 CDP571 (Ofei 等人, 2011, Diabetes 45:881-85);鼠抗体 MTNFAI、M2TNFAI、M3TNFAI、M3TNFABI、M302B 以及 M303 (Thermo Scientific, Rockford, IL);英利昔单抗 (Centocor, Malvern, PA);赛妥珠单抗 (UCB, Brussels, Belgium);以及阿达木单抗

(Abbott, Abbott Park, IL)。这些和许多其它已知的抗 TNF- α 抗体可用于要求保护的方法和组合物中。用于治疗免疫失调或自身免疫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); 达利珠单抗 (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) 以及奥马珠单抗 (抗 IgE)。

[0124] 1 型和 2 型糖尿病可以使用针对以下 B 细胞抗原的已知抗体来治疗: 如 CD22 (依帕珠单抗和 hRFB4)、CD74 (米拉珠单抗)、CD19 (hA19)、CD20 (维妥珠单抗) 或 HLA-DR (hL243) (参见, 例如 Winer 等人, 2011, *Nature Med* 17:610-18)。还提出将抗 CD3 抗体用于 1 型糖尿病的疗法中 (Cernea 等人, 2010, *Diabetes Metab Rev* 26:602-05)。

[0125] 本发明的药物组合物可用来治疗具有代谢性疾病 (如淀粉样变性) 或神经退行性疾病 (如阿尔茨海默氏疾病) 的受试者。巴匹珠单抗 (Bapineuzumab) 正处于阿尔茨海默氏疾病疗法的临床试验中。其它提出用于治疗阿尔茨海默氏疾病的抗体包括 Alz 50 (Ksiezak-Reding 等人, 1987, *J Biol Chem* 263:7943-47)、罗氏单抗和芬兰单抗。已报道了抗 TNF- α 抗体英利昔单抗减少淀粉样蛋白斑并且改进认知。

[0126] 在一个优选实施方案中, 可使用要求保护的组合物和方法治疗的疾病包括心血管疾病, 如纤维蛋白凝块、动脉粥样硬化、心肌缺血和梗塞。纤维蛋白抗体 (例如 scFv (59D8); T2G1; MH1) 为已知的并且正作为显露所述凝块和肺栓塞的成像剂处于临床试验中, 而抗粒细胞抗体 (如 MN-3、MN-15、抗 NCA95 和抗 CD15 抗体) 可靶向心肌梗塞和心肌缺血。(参见, 例如美国专利号 5, 487, 892; 5, 632, 968; 6, 294, 173; 7, 541, 440, 所述专利各自的实施例部分均以引用的方式并入本文)。可使用抗巨噬细胞、抗低密度脂蛋白 (LDL)、抗 MIF 和抗 CD74 (例如, hLL1) 抗体来靶向动脉粥样硬化斑块。阿昔单抗 (抗糖蛋白 IIb/IIIa) 已批准在经皮冠状动脉介入治疗和不稳定心绞痛的治疗中辅助用于预防再狭窄 (Waldmann 等人, 2000, *Hematol* 1:394-408)。已报道了抗 CD3 抗体降低动脉粥样硬化的发展和进展 (Steffens 等人, 2006, *Circulation* 114:1977-84)。对抗氧化的 LDL 的抗体在小鼠模型中诱导已建立的动脉粥样硬化的消退 (Ginsberg, 2007, *J Am Coll Cardiol* 52:2319-21)。示出抗 ICAM-1 抗体在大鼠中减少脑动脉闭塞后的缺血性细胞损伤 (Zhang 等人, 1994, *Neurology* 44:1747-51)。针对白细胞抗原的商业上可获得的单克隆抗体由以下代表: OKT 抗 T 细胞单克隆抗体 (可获自 Ortho Pharmaceutical Company), 其结合正常 T 淋巴细胞; 由具有 ATCC 保藏号 HB44、HB55、HB12、HB78 和 HB2 的杂交瘤产生的单克隆抗体; G7E11、W8E7、NKP15 和 G022 (Becton Dickinson); NEN9.4 (New England Nuclear); 以及 FMC11 (Sera Labs)。对抗纤维蛋白和血小板抗原的抗体的描述包含于 Knight, *Semin. Nucl. Med.*, 20:52-67 (1990) 中。

[0127] 在另一优选实施方案中, 使用快速内化的抗体且然后再表达、加工并且呈递在细胞表面上, 使得能够通过细胞连续摄取和分泌循环缀合物。最优选的抗体/抗原对的一个实例是 LL1, 即抗 CD74MAb (恒定链, II 类特异性分子伴侣, Ii) (参见, 例如美国专利号 6, 653, 104; 7, 312, 318; 每个专利的实施例部分以引用的方式并入本文)。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 等人, *Immunology*

98:296-302(1999))。CD74 抗体在癌症中使用的综述包括于以下文献中:Stein 等人, Clin Cancer Res. 2007 年 9 月 15 日;13(18Pt 2):5556s-5563s, 其以引用的方式并入本文。

[0128] 优选抗 CD74 抗体治疗的疾病包括但不限于非何杰金氏淋巴瘤、何杰金氏病、黑色素瘤、肺癌、肾癌、结肠癌、多形性成胶质细胞瘤、组织细胞瘤、骨髓性白血病及多发性骨髓瘤。在靶细胞表面上短期连续表达 CD74 抗原,接着是抗原的内化以及抗原的再表达使得能够靶向有待内化的 LL1 抗体以及其携带的任何化学治疗性部分。这允许高的以及治疗性浓度的 LL1 化学治疗性药物缀合物积聚在这类细胞内部。内化的 LL1 化学治疗性药物缀合物经由溶酶体和核内体循环,并且化学治疗性部分在靶细胞内以活性形式释放。

[0129] 在另一优选实施方案中,治疗性缀合物可以针对病原体使用,因为针对病原体的抗体是已知的。例如,特异性地结合通过感染性病灶(包括病毒、细菌、真菌及寄生虫感染(例如由病原体如细菌、立克次氏体、支原体、原生动物、真菌以及病毒所引起))产生或与其有关的标记物的抗体及抗体片段以及与此类微生物有关的抗原和产物已经被公开,尤其在 Hansen 等人,美国专利号 3,927,193 和 Goldenberg 美国专利号 4,331,647、4,348,376、4,361,544、4,468,457、4,444,744、4,818,709 及 4,624,846 中,每个专利的实施例部分以引用的方式并入本文,并且在以上所引用的 Reichert 和 Dewitz 中。针对感染性有机体(抗毒素和抗病毒抗体)以及其它靶标的综述抗体清单包含于 Casadevall, Clin Immunol 1999;93(1):5-15 中,所述文献以引用的方式并入本文。

[0130] 在一个优选实施方案中,病原体选自由以下组成的组:HIV 病毒、结核分支杆菌、无乳链球菌、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、嗜肺性军团病菌、酿脓链球菌、大肠杆菌、淋病奈瑟氏菌、脑膜炎奈瑟氏菌、肺炎球菌属、新型隐球菌、荚膜组织胞浆菌、B 型流感嗜血杆菌、苍白密螺旋体、莱姆病螺旋体、绿脓假单胞菌、麻风分枝杆菌、流产杆菌、狂犬病病毒、流感病毒、巨细胞病毒、I 型单纯疱疹病毒、II 型单纯疱疹病毒、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、埃-巴二氏病毒、鼠白血病病毒、腮腺炎病毒、水泡性口膜炎病毒、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、西尼罗病毒、恶性疟原虫、间日疟原虫、鼠弓形体、让氏锥虫、克氏锥虫、罗德西亚锥虫、布氏锥虫、曼氏血吸虫、日本血吸虫、牛巴贝虫、柔嫩艾美球虫、盘尾丝虫、热带利什曼原虫、旋毛线虫、小泰累尔梨浆虫、水泡绦虫、羊绦虫、牛肉绦虫、细粒棘球绦虫、科特氏中殖孔绦虫、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、唾液支原体及肺炎支原体,如美国专利号 6,440,416 中所公开,其中的实施例部分以引用的方式并入本文。

[0131] 在一个更优选的实施方案中,包含抗 gp120 和其它这种抗 HIV 抗体的本发明药物缀合物可用作 AIDS 患者的 HIV 的治疗剂;并且针对结核分支杆菌的抗体的药物缀合物适用作药物难治性结核的治疗剂。已经检查了抗 gp120MAb(抗 HIV MAb)与毒素诸如假单胞菌外毒素的融合蛋白的抗病毒特性(Van Oigen 等人, J Drug Target, 5:75-91, 1998)。治疗 AIDS 患者的 HIV 感染的尝试失败了,可能是因为效力不足或不可接受的宿主毒性。本发明的 CPT 药物缀合物有利地缺少蛋白毒素的这种毒性副作用,并且因此有利地用于治疗 AIDS 患者的 HIV 感染。这些药物缀合物可单独给予,或与当单独提供时在这种患者中有效的其它抗生素或治疗剂组合给予。候选抗 HIV 抗体包括 Johansson 等人(AIDS. 2006 年 10 月

3 日 ;20(15):1911-5) 所述的 P4/D10 抗包被蛋白抗体、以及 Polymun (Vienna, Austria) 描述和销售的抗 HIV 抗体,还描述在美国专利 5,831,034、美国专利 5,911,989、以及 Vcelar 等人, AIDS 2007 ;21(16):2161-2170 和 Joos 等人, Antimicrob. Agents Chemother. 2006 ;50(5):1773-9 中,所有文献都以引用的方式并入本文。为了克服耐药性,用于 HIV 的优选靶向剂是这些抗体的各种组合。

[0132] 用于治疗自体免疫疾病或免疫系统功能障碍(例如移植物抗宿主疾病、器官移植排斥)的抗体在本领域中是已知的并且可以使用所公开的方法和组合物缀合至 SN-38。用于治疗自体免疫/免疫功能障碍疾病的抗体可以结合至包括但不限于以下的示例性抗原: 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 、干扰素以及 HLA-DR。以上论述的结合至这些及其它靶抗原的抗体可用于治疗自体免疫或免疫功能障碍疾病。可用免疫缀合物治疗的自体免疫疾病可以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、西登哈姆氏舞蹈病、重症肌无力、全身性红斑狼疮、狼疮肾炎、风湿热、多内分泌腺综合征、大疱性类天疱疮、糖尿病、亨-舍二氏紫癜、链球菌感染后肾炎、结节性红斑、高安氏动脉炎、ANCA 相关的脉管炎、阿狄森氏病、类风湿性关节炎、多发性硬化、结节病、溃疡性结肠炎、多形性红斑、IgA 肾病、多发性结节性动脉炎、强直性脊柱炎、古德帕斯彻氏综合征、血管闭塞性脉管炎、干燥综合征、原发性胆汁性肝硬化、桥本氏甲状腺炎、甲状腺毒症、硬皮病、慢性活动性肝炎、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、肌萎缩性侧索硬化、脊髓痨、巨细胞性动脉炎/多肌痛、恶性贫血、快速进行性肾小球性肾炎、牛皮癣或纤维性肺炎。

[0133] 以上论述的抗体及针对疾病相关抗原的其它已知抗体可以在要求保护的方法和组合物的实践中用作 CPT- 缀合物,更优选地 SN-38- 缀合物。

[0134] 双特异性及多特异性抗体

[0135] 双特异性抗体适用于许多生物医学应用中。例如,具有肿瘤细胞表面抗原及 T 细胞表面受体的结合位点的双特异性抗体可以通过 T 细胞指导特异性肿瘤细胞的溶解。识别神经胶质瘤和 T 细胞上的 CD3 表位的双特异性抗体已经成功地用于治疗人患者的脑肿瘤 (Nitta, 等人 Lancet. 1990 ;355:368-371)。优选的双特异性抗体是抗 CD3X 抗 CD19 抗体。在替代实施方案中,抗 CD3 抗体或其片段可以附接于针对另一 B 细胞相关抗原的抗体或片段,如抗 CD3X 抗 CD20、抗 CD3X 抗 CD22、抗 CD3X 抗 HLA-DR 或抗 CD3X 抗 CD74。在某些实施方案中,用于本文所公开的治疗剂缀合的技术和组合物可以双特异性或多特异性抗体作为靶向部分来使用。

[0136] 产生双特异性或多特异性抗体的许多方法是已知的,如例如美国专利号 7,405,320 中所公开,所述专利的实施部分以引用的方式并入本文。双特异性抗体可以通过四体瘤方法产生,所述四体瘤方法涉及融合两种不同的杂交瘤,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)。

[0137] 用于产生双特异性抗体的另一种方法使用异双官能交联接头来在化学上连接两种不同的单克隆抗体 (Staerz, 等人 Nature, 1985 ;314:628-631 ;Perez, 等人 Nature, 1985 ;316:354-356)。双特异性抗体还可通过将两个亲本单克隆抗体的每个还

原成对应的半个分子,然后使所述半个分子混合并且允许再氧化以获得杂交结构来产生 (Staerz 和 Bevan, Proc Natl Acad Sci USA, 1986 ;83:1453-1457)。另一种替代方法涉及使用适当的接头化学上交联两个或三个单独纯化的 Fab' 片段。(参见,例如欧洲专利申请 0453082)。

[0138] 其它方法包括通过经由逆转录病毒衍生的穿梭载体将相异可选择标记物基因转移到随后融合的各自亲本杂交瘤中 (DeMonte 等人, Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87:2941-2945);或用含有不同抗体的重链基因和轻链基因的表达质粒转染杂交瘤细胞系来改进产生杂交的杂交瘤的效率。

[0139] 同源 V_H 和 V_L 结构域可用具有适当组成和长度的肽接头 (通常由超过 12 个氨基酸残基组成) 连接以形成具有结合活性的单链 Fv (scFv)。制造 scFv 的方法公开于美国专利号 4,946,778 和美国专利号 5,132,405 中,每个专利的实施例部分以引用的方式并入本文。将所述肽接头的长度减至小于 12 个氨基酸残基而阻止位于同一条链的 V_H 和 V_L 结构域配对,而迫使在不同链上的具有互补结构域的 V_H 和 V_L 结构域进行配对,从而形成功能性多聚体。用 3 至 12 个氨基酸残基的接头连接的 V_H 和 V_L 结构域的多肽链主要形成二聚体 (称为二链抗体)。使用 0 至 2 个氨基酸残基的接头有利于形成三聚体 (称为三链抗体) 和四聚体 (称为四链抗体),但是除接头长度之外,寡聚化的准确模式似乎还依赖于 V-结构域的组成以及方向 (V_H -接头- V_L 或 V_L -接头- V_H)。

[0140] 用于生产多特异性或双特异性抗体的这些技术在低产率、纯化的必要性、技术的低稳定性或劳动密集程度方面展现各种困难。更近来,已经利用被称为“对接和锁定”(DNL)的技术来生产实际上任何所需抗体、抗体片段及其它效应分子的组合 (参见,例如美国专利号 7,521,056 ;7,527,787 ;7,534,866 ;7,550,143 ;7,666,400 ;7,858,070 ;7,871,622 ;7,906,121 ;7,906,118 ;8,163,291 ;7,901,680 ;7,981,398 ;8,003,111 及 8,034,352,每个专利的实施例部分以引用的方式并入本文)。该技术利用互补的蛋白结合结构域,称为锚定结构域 (AD) 以及二聚化和对接结构域 (DDD),它们互相结合,并且允许组装从二聚体、三聚体、四聚体、五聚体到六聚体的复杂结构。这些以高产率形成稳定复合物,而不要求深入的纯化。DNL 技术允许组装单特异性、双特异性或多特异性抗体。本领域已知的用于制备双特异性或多特异性抗体的任何技术可用来实践本发明要求保护的方法。

[0141] 在各种实施方案中,如本文所公开的缀合物可以是复合物多特异性抗体的一部分。这类抗体可以含有具有不同特异性的两个或更多个不同的抗原结合位点。多特异性复合物可以结合至同一抗原的不同表位,或者替代地可以结合至两个不同抗原。一些更优选的靶标组合包括表 1 中所列的那些。这是优选组合的一个实例清单,而不意图是穷举的。

[0142] 表 1. 多特异性抗体的一些实例

[0143]

第一靶标	第二靶标
MIF	第二促炎性效应细胞因子, 尤其是 HMGB-1、TNF- α 、IL-1 或 IL-6
MIF	促炎性效应趋化因子, 尤其是 MCP-1、RANTES、MIP-1A 或 MIP-1B
MIF	促炎性效应受体, 尤其是 IL-6R、IL-13R 和 IL-15R
MIF	凝血因子, 尤其是 TF 或凝血酶
MIF	补体因子, 尤其是 C3、C5、C3a 或 C5a
MIF	补体调节蛋白, 尤其是 CD46、CD55、CD59 和 mCRP
MIF	癌症相关抗原或受体
HMGB-1	第二种促炎性效应细胞因子, 尤其是 MIF、TNF- α 、IL-1 或 IL-6

[0144]

HMGB-1	促炎性效应趋化因子, 尤其是 MCP-1、RANTES、MIP-1A 或 MIP-1B
HMGB-1	促炎性效应受体, 尤其是 MCP-1、RANTES、MIP-1A 或 MIP-1B
HMGB-1	凝血因子, 尤其是 TF 或凝血酶
HMGB-1	补体因子, 尤其是 C3、C5、C3a 或 C5a
HMGB-1	补体调节蛋白, 尤其是 CD46、CD55、CD59 和 mCRP
HMGB-1	癌症相关抗原或受体
TNF- α	第二种促炎性效应细胞因子, 尤其是 MIF、HMGB-1、TNF- α 、IL-1 或 IL-6
TNF- α	促炎性效应趋化因子, 尤其是 MCP-1、RANTES、MIP-1A 或 MIP-1B
TNF- α	促炎性效应受体, 尤其是 IL-6R、IL-13R 和 IL-15R
TNF- α	凝血因子, 尤其是 TF 或凝血酶
TNF- α	补体因子, 尤其是 C3、C5、C3a 或 C5a
TNF- α	补体调节蛋白, 尤其是 CD46、CD55、CD59 和 mCRP
TNF- α	癌症相关抗原或受体
LPS	促炎性效应细胞因子, 尤其是 MIF、HMGB-1、TNF- α 、IL-1 或 IL-6
LPS	促炎性效应趋化因子, 尤其是 MCP-1、RANTES、MIP-1A 或 MIP-1B
LPS	促炎性效应受体, 尤其是 IL-6R、IL-13R 和 IL-15R
LPS	凝血因子, 尤其是 TF 或凝血酶
LPS	补体因子, 尤其是 C3、C5、C3a 或 C5a
LPS	补体调节蛋白, 尤其是 CD46、CD55、CD59 和 mCRP
TF 或凝血酶	促炎性效应细胞因子, 尤其是 MIF、HMGB-1、TNF- α 、IL-1 或 IL-6
TF 或凝血酶	促炎性效应趋化因子, 尤其是 MCP-1、RANTES、MIP-1A 或 MIP-1B
TF 或凝血酶	促炎性效应受体, 尤其是 IL-6R、IL-13R 和 IL-15R
TF 或凝血酶	补体因子, 尤其是 C3、C5、C3a 或 C5a
TF 或凝血酶	补体调节蛋白, 尤其是 CD46、CD55、CD59 和 mCRP
TF 或凝血酶	癌症相关抗原或受体

[0145] 如以下的另外其它组合优选用于癌症疗法: 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、IL6+CEACAM6 抗体。这类抗体不必仅以组合使用, 但可以组合为各种形式的融合蛋白, 如 IgG、Fab、scFv 及其类似物, 如美国专利号 6,083,477 ; 6,183,744 及 6,962,702 以及美国专利申请公布号 20030124058 ; 20030219433 ; 20040001825 ; 20040202666 ; 20040219156 ; 20040219203 ; 20040235065 ; 20050002945 ; 20050014207 ; 20050025709 ; 20050079184 ; 20050169926 ; 20050175582 ;

20050249738 ;20060014245 及 20060034759 中所述,每个专利的实施例部分以引用的方式并入本文。

[0146] DOCK-AND-LOCK™(DNL™)

[0147] 在优选实施方案中,二价或多价抗体是作为 DOCK-AND-LOCK™(DNL™) 复合物形成(参见,例如美国专利号 7,521,056 ;7,527,787 ;7,534,866 ;7,550,143 ;7,666,400 ;7,858,070 ;7,871,622 ;7,906,121 ;7,906,118 ;8,163,291 ;7,901,680 ;7,981,398 ;8,003,111 及 8,034,352,每个专利的实施例部分以引用的方式并入本文)。通常,技术利用了 cAMP- 依赖型蛋白激酶(PKA) 的调节(R) 亚基的二聚化和对接结构域(DDD) 序列与来源于任何多种 AKAP 蛋白的锚定结构域(AD) 序列之间发生的特异性和高亲和性结合相互作用(Baillie 等人,FEBS Lett ers. 2005 ;579:3264。Wong 和 Scott,Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2004 ;5:959)。DDD 肽和 AD 肽可附接至任何蛋白质、肽或其它分子。因为 DDD 序列自发地二聚化并且结合 AD 序列,所以技术允许在可附接至 DDD 序列或 AD 序列的任何选择的分子之间形成复合物。

[0148] 虽然标准 DNL™复合物包含具有附接至一个 AD 连接的分子的两个 DDD 连接的分子的三聚体,但是复合物结构的变化允许形成二聚体、三聚体、四聚体、五聚体、六聚体以及其它多聚体。在一些实施方案中,DNL™复合物可包含结合相同抗原决定簇或两种或更多种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,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、核糖核酸酶如抗肿瘤核糖核酸酶、抑制性寡核苷酸如 siRNA、抗原或异种抗原、聚合物如 PEG、酶、治疗剂、激素、细胞毒性剂、抗血管生成剂、促凋亡剂或任何其它分子或聚集物。

[0149] 1968 年,首次从兔骨骼肌中分离出 PKA,其在由第二信使 cAMP 结合 R 亚基而触发的最彻底研究的信号转导途径之一中起关键作用(Walsh 等人,J. Biol. Chem. 1968 ;243:3763)。全酶的结构由通过 R 亚基保持为失活形式的两个催化亚基组成(Taylor, J. Biol. Chem. 1989 ;264:8443)。发现 PKA 的同工酶具有两种类型的 R 亚基(RI 和 RII),并且每种类型均具有 α 同工型和 β 同工型(Scott, Pharmacol. Ther. 1991 ;50:123)。因此,PKA 调节亚基的四种同工型为 RI α 、RI β 、RII α 和 RII β 。R 亚基仅分离为稳定二聚体并且示出二聚化结构域由 RII α 的前 44 个氨基末端残基组成(Newlon 等人,Nat. Struct. Biol. 1999 ;6:222)。如下所讨论,其它调节亚基的氨基酸序列的类似部分涉及在二聚化和对接中,每个部分均位于调节亚基的 N- 末端附近。cAMP 结合 R 亚基引起用于广谱丝氨酸/苏氨酸激酶活性的活性催化亚基释放,所述活性催化亚基通过 PKA 的区室化经过其与 AKAP 对接而朝向选择的底物(Scott 等人,J. Biol. Chem. 1990 ;265 ;21561)。

[0150] 自从 1984 年表征了第一种 AKAP(微管相关蛋白-2)(Lohmann 等人,Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1984 ;81:6723),已在酵母至人范围内的物种中鉴定出多于 50 种 AKAP 具有多种多样的结构,所述 AKAP 定位至各种亚细胞位点,包括质膜、肌动蛋白细胞骨架、细胞核、线粒体以及内质网(Wong 和 Scott,Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2004 ;5:959)。用于 PKA 的 AKAP 的 AD 为具有 14-18 个残基的两亲性螺旋(Carr 等人,J. Biol. Chem. 1991 ;266:14188)。AD 的氨基酸序列在各个 AKAP 之间十分不同,其中针对 RII 二聚体所报道的结合亲和性在 2nM 至 90nM 范围内(Alto 等人,Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003 ;100:4445)。AKAP 将仅结

合二聚 R 亚基。对于人 RII α , AD 结合由 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 结合结构域均位于相同 N- 末端的 44 氨基酸序列内 (Newlon 等人, Nat. Struct. Biol. 1999 ;6:222 ; Newlon 等人, EMBO J. 2001 ;20:1651), 所述 44 氨基酸序列在本文中称为 DDD。

[0151] 我们已开发了一种平台技术, 其利用人 PKA 调节亚基的 DDD 和 AKAP 的 AD 作为一对优良的接头模块用于将任何两个实体 (在下文称为 A 和 B) 对接成非共价复合物, 所述复合物可通过在 DDD 和 AD 的至关重要的位置中引入半胱氨酸残基以促进形成二硫键而进一步锁定为 DNLTM复合物。所述途径的一般方法如下。通过将 DDD 序列连接至 A 的前体来构建实体 A, 从而产生下文称为 a 的第一组分。因为 DDD 序列将实现二聚体的自发形成, 因此 A 将主要由 a_2 组成。通过将 AD 序列连接至 B 的前体来构建实体 B, 从而产生下文称为 b 的第二组分。 a_2 中含有的 DDD 的二聚基序将产生用于结合 b 中含有的 AD 序列的对接位点, 因此促进 a_2 与 b 容易地缔合以形成主要由 a_2b 组成的二元三聚复合物。此结合事件通过随后的反应以经过二硫桥键共价固定两个实体而不可逆, 这基于有效局部浓度的原则非常有效地发生, 因为初始结合相互作用会使置于 DDD 和 AD 上的反应性巯基靠近 (Chmura 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001 ;98:8480) 以位点特异性地连接。使用接头、适配子模块和前体的各种组合, 可产生和使用广泛多种具有不同化学计量的 DNLTM构建体 (参见, 例如美国专利号 7, 550, 143 ; 7, 521, 056 ; 7, 534, 866 ; 7, 527, 787 和 7, 666, 400)。

[0152] 通过远离两个前体的官能团衔接 DDD 和 AD, 还预期此类位点特异性连接保留两个前体的原始活性。此方法在本质上为模块化的并且可潜在应用于位点特异性和共价连接广泛范围的物质, 包括肽、蛋白质、抗体、抗体片段以及具有广泛范围活性的其它效应子部分。利用描述于以下实施例中的构建 AD 和 DDD 缀合的效应子的融合蛋白方法, 可将几乎任何蛋白质或肽并入到 DNLTM构建体中。然而, 所述技术并非限制性的并且可利用其它缀合方法。

[0153] 已知用于制得融合蛋白的多种方法, 包括核酸合成、杂交和 / 或扩增以产生编码感兴趣的融合蛋白的合成双链核酸。可通过标准分子生物学技术将此类双链核酸插入到用于融合蛋白产生的表达载体中 (参见, 例如 Sambrook 等人, Molecular Cloning, A laboratory manual, 第 2 版, 1989)。在此类优选的实施方案中, AD 和 / 或 DDD 部分可衔接至效应子蛋白或肽的 N- 末端或 C- 末端。然而, 熟练的技术人员将认识到, AD 或 DDD 部分衔接至效应部分的位点可取决于效应子部分的化学性质和效应子部分中涉及其生理活性的部分而改变。可使用本领域中已知的技术进行各种效应子部分的位点特异性衔接, 如使用二价交联试剂和 / 或其它化学缀合技术。

[0154] 在各种实施方案中, 抗体或抗体片段可通过例如将 DDD 或 AD 部分衔接于抗体重链的 C 末端而并入 DNLTM复合物中, 如下所详细描述。在更优选的实施方案中, DDD 或 AD 部分、更优选地 AD 部分可衔接于抗体轻链的 C 末端 (参见, 例如 5/24/13 申请的美国专利申请序列号 13/901, 737, 其中的实施例部分以引用的方式并入本文)。

[0155] AD 和 DDD 部分中的结构 - 功能关系

[0156] 对于不同类型的 DNLTM构建体, 可利用不同的 AD 序列或 DDD 序列。示例性 DDD 和 AD 序列提供于下文中。

[0157] DDD1

[0158] SHIQIPPLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO :1)

[0159] DDD2

[0160] CGHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO :2)

[0161] AD1

[0162] QIEYLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO :3)

[0163] AD2

[0164] CGQIEYLAKQIVDNAIQQAGC (SEQ ID NO :4)

[0165] 熟练的技术人员将认识到,DDD1 和 DDD2 基于蛋白激酶 A 的人 RII α 同工型的 DDD 序列。然而,在替代实施方案中,DDD 部分和 AD 部分可基于蛋白激酶 A 的人 RI α 形式的 DDD 序列和相应的 AKAP 序列,如下以 DDD3、DDD3C 和 AD3 所例示。

[0166] DDD3

[0167] SLRECELYVQKHNIQALLKDSIVQLCTARPERPMAFLREYFERLEKEEAK (SEQ ID NO :5)

[0168] DDD3C

[0169] MSCGGSRECELYVQKHNIQALLKDSIVQLCTARPERPMAFLREYFERLEKEEAK (SEQ ID NO :6)

[0170] AD3

[0171] CGFEELAWKIAKMIWSDVFQQGC (SEQ ID NO :7)

[0172] 在其它的替代实施方案中,可在 DNLTM复合物的构建中利用 AD 部分和 / 或 DDD 部分的其它序列变体。例如,仅存在对应于 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 序列为以上公开的 DDD1 和 DDD2 的基础。以下示出四种人 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。(应注意,DDD1 的序列与人 PKA RII α DDD 部分相比稍有改变。)

[0173] PKA RI α

[0174] SLRECELYVQKHNIQALLKDVSIQVQLCTARPERPMAFLREYFEKLEKEEAK (SEQ ID NO :8)

[0175] PKA RI β

[0176] SLKGCELYVQLHGIQQVLKDCIVHLCSKPERPMKFLREHFEEKLEKEENRQILA (SEQ ID NO :9)

[0177] PKA RII α

[0178] SHIQIPPGLTELLQGYTVEVGQQPPDLVDFAVEYFTRLREARRQ (SEQ ID NO :10)

[0179] PKA RII β

[0180] SIEIPAGLTELLQGFTVEVLRHQPADLLEFALQHFTRLQQENER (SEQ ID NO :11)

[0181] 已对 AD 结构域和 DDD 结构域的结构 - 功能关系进行了调查研究。(参见,例如 Burns-Hamuro 等人,2005, Protein Sci 14:2982-92;Carr 等人,2001, J Biol Chem 276:17332-38;Alto 等人,2003, Proc Natl Acad Sci USA 100:4445-50;Hundsrucker 等人,2006, Biochem J396:297-306;Stokka 等人,2006, Biochem J 400:493-99;Gold 等人,2006, Mol Cell124:383-95;Kinderman 等人,2006, Mol Cell124:397-408,所述参考文献各自的整个正文以引用的方式并入本文。)

[0182] 例如,Kinderman 等人 (2006, Mol Cell124:397-408) 检测了 AD-DDD 结合相互作用的晶体结构,并且得出结论人 DDD 序列含有以下在 SEQ ID NO :1 中加下划线的在二聚体形成或 AKAP 结合中重要的许多保守氨基酸残基。(参见 Kinderman 等人,2006 的图 1,其以引用的方式并入本文。)熟练的技术人员将认识到,在设计 DDD 序列的序列变体时,将希望避免改变任何加下划线的残基,而对于二聚化和 AKAP 结合不太关键的残基可进行保守氨基

酸取代。

[0183] SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO :1)

[0184] 如下所更详细地讨论,已表征保守氨基酸取代的二十种常见 L-氨基酸中的每一种。因此,基于 Kinderman (2006) 和保守氨基酸取代的数据,基于 SEQ ID NO :1 的潜在替代 DDD 序列在表 2 中示出。在设计表 2 中,仅考虑高度保守的氨基酸取代。例如,带电荷的残基仅取代具有相同电荷的残基,具有小侧链的残基取代类似大小的残基,羟基侧链仅取代其它羟基等。因为脯氨酸对氨基酸二级结构的独特作用,所以没有其它残基取代脯氨酸。有限数量的此类潜在替代 DDD 部分序列在以下 SEQ ID NO :12 至 SEQ ID NO :31 中示出。熟练的技术人员将认识到,DDD 部分的属种内数目几乎不受限制的替代种类可通过标准技术,例如使用商业肽合成器或熟知的定点诱变技术来构建。氨基酸取代对 AD 部分结合的作用还可容易地通过例如在 Alto 等人 (2003, Proc Natl Acad Sci USA 100 :4445-50) 中所公开的标准结合测定来确定。

[0185] 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。

[0186]

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

[0187]

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

[0188] THIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO :12)

[0189] SKIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO :13)

[0190] SRIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO :14)

[0191] SHINIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO :15)

[0192] SHIQIPPALTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO :16)

[0193] SHIQIPPGLSELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO :17)

[0194] SHIQIPPGLTDLLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO :18)

[0195] SHIQIPPGLTELLNGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO :19)

[0196] SHIQIPPGLTELLQAYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO :20)

[0197] SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO :21)

[0198] SHIQIPPGLTELLQGYTVDVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO :22)

[0199] SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLKQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO :23)

[0200] SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRNQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO :24)

[0201] SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQNPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO :25)

[0202] SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO :26)

[0203] SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVDFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO :27)

[0204] SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFLVEYFTRLREARA (SEQ ID NO :28)

[0205] SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFIVEYFTRLREARA (SEQ ID NO :29)

[0206] SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFVVEYFTRLREARA (SEQ ID NO :30)

[0207] SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVDYFTRLREARA (SEQ ID NO :31)

[0208] Alto 等人 (2003, Proc Natl Acad Sci USA 100 :4445-50) 对各种 AKAP 蛋白的 AD 序列进行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), 其对 DDD 的结合常数为 0.4nM。AKAP-IS 序列设计成 AKAP 与 PKA 结合的肽拮抗剂。AKAP-IS 序列中取代倾向于使与 DDD 的结合减弱的残基在以下 SEQ ID NO :3 中已加下划线。熟练的技术人员将认识到, 在设计 AD 序列的序列变体时, 将希望避免改变任何加下划线的残基, 而对于 DDD 结合不太关键的残基可进行保守氨基酸取代。表 3 示出 AKAP-IS 的序列 (AD1, SEQ ID NO :3) 中的潜在保守氨基酸取代, 类似于在以上表 2 中对于 DDD1 (SEQ ID NO :1) 所示出的保守氨基酸取代。

[0209] 有限数量的此类潜在替代 AD 部分序列在以下 SEQ ID NO :32 至 SEQ ID NO :49 中示出。此外, 可能的 AD 部分序列的属种内的很多种类可通过熟练技术人员基于 Alto 等人 (2003) 的数据来制得、测试并且使用。应注意, Alto (2003) 的图 2 示出基于真实结合实验制得并同时保持对 DDD 部分的结合活性的许多潜在氨基酸取代。

[0210] AKAP-IS

[0211] QIEYLAKQIVD**NAIQQA** (SEQ ID NO :3)

[0212] 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。

[0213]

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

[0214] NIEYLAKQIVD**NAIQQA** (SEQ ID NO :32)

[0215] QLEYLAKQIVD**NAIQQA** (SEQ ID NO :33)

[0216] QVEYLAKQIVD**NAIQQA** (SEQ ID NO :34)

[0217] QIDYLAKQIVD**NAIQQA** (SEQ ID NO :35)

[0218] QIEFLAKQIVD**NAIQQA** (SEQ ID NO :36)

[0219] QIETLAKQIVD**NAIQQA** (SEQ ID NO :37)

[0220] QIESLAKQIVD**NAIQQA** (SEQ ID NO :38)

[0221] QIEYIAKQIVD**NAIQQA** (SEQ ID NO :39)

[0222] QIEYVAKQIVD**NAIQQA** (SEQ ID NO :40)

[0223] QIEYLARQIVD**NAIQQA** (SEQ ID NO :41)

[0224] QIEYLAKNIVD**NAIQQA** (SEQ ID NO :42)

[0225] QIEYLAKQIVEN**NAIQQA** (SEQ ID NO :43)

[0226] QIEYLAKQIVD**QAIQQA** (SEQ ID NO :44)

[0227] QIEYLAKQIVD**NAINQA** (SEQ ID NO :45)

[0228] QIEYLAKQIVD**NAIQNA** (SEQ ID NO :46)

[0229] QIEYLAKQIVD**NAIQQL** (SEQ ID NO :47)

[0230] QIEYLAKQIVDNAIQQI (SEQ ID NO :48)
[0231] QIEYLAKQIVDNAIQQV (SEQ ID NO :49)
[0232] Gold 等人 (2006, Mol Cell 24 :383-95) 利用结晶学和肽筛选开发出 SuperAKAP-IS 序列 (SEQ ID NO :50), 其对 PKA 的 RII 同工型展现出与 RI 同工型相比高 5 个数量级的选择性。加下划线的残基指示相对于 AKAP-IS 序列的氨基酸取代的位置, 所述氨基酸取代增加对 RII α 的 DDD 部分的结合。在此序列中, 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。可进行取代以影响对 RII α 的亲亲和性的残基为残基 8、11、15、16、18、19 和 20 (Gold 等人, 2006)。预期在某些替代实施方案中, 可用 SuperAKAP-IS 序列取代 AKAP-IS AD 部分序列来制备 DNLTM 构建体。可用来取代 AKAP-IS AD 序列的其它替代序列于 SEQ ID NO :51-53 中示出。相对于 AKAP-IS 序列的取代已加下划线。预期如同 SEQ ID NO :4 中示出的 AD2 序列, AD 部分还可包括额外的 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。

[0233] SuperAKAP-IS

[0234] QIEYVAKQIVDYAIHQA (SEQ ID NO :50)

[0235] 替代 AKAP 序列

[0236] QIEYKAKQIVDHAIHQA (SEQ ID NO :51)

[0237] QIEYHAKQIVDHAIHQA (SEQ ID NO :52)

[0238] QIEYVAKQIVDHAIHQA (SEQ ID NO :53)

[0239] Gold 等人的图 2 公开了来自多种 AKAP 蛋白的另外 DDD 结合序列, 如下所示。

[0240] RII- 特异性 AKAP

[0241] AKAP-KL

[0242] PLEYQAGLLVQNAIQQAI (SEQ ID NO :54)

[0243] AKAP79

[0244] LLIIETASSLVKNAIQLSI (SEQ ID NO :55)

[0245] AKAP-Lbc

[0246] LIEEAASRIVDAVIEQVK (SEQ ID NO :56)

[0247] RI- 特异性 AKAP

[0248] AKAPce

[0249] ALYQFADRFSELVISEAL (SEQ ID NO :57)

[0250] RIAD

[0251] LEQVANQLADQIIKEAT (SEQ ID NO :58)

[0252] PV38

[0253] FEELAWKIAKMIWSDVF (SEQ ID NO :59)

[0254] 双特异性 AKAP

[0255] AKAP7

[0256] ELVRLSKRLVENAVLKAV (SEQ ID NO :60)

[0257] MAP2D

[0258] TAEVSARIVQVVTAEAV (SEQ ID NO :61)

[0259] DAKAP1

[0260] QIKQAAFQLISQVILEAT (SEQ ID NO :62)

[0261] DAKAP2

[0262] LAWKIAKMIVSDVMQQ (SEQ ID NO :63)

[0263] Stokka 等人 (2006, Biochem J 400 :493-99) 还开发出 AKAP 与 PKA 结合的肽竞争剂, 如在 SEQ ID NO :64-66 中示出。肽拮抗剂命名为 Ht31 (SEQ ID NO :64)、RIAD (SEQ ID NO :65) 和 PV-38 (SEQ ID NO :66)。Ht-31 肽对于 PKA 的 RII 同工型展现出较高的亲和性, 而 RIAD 和 PV-38 对于 RI 示出较高的亲和性。

[0264] Ht31

[0265] DLIEEAASRIVDAVIEQVKAAGAY (SEQ ID NO :64)

[0266] RIAD

[0267] LEQYANQLADQIIKEATE (SEQ ID NO :65)

[0268] PV-38

[0269] FEELAWKIAKMIWSDVFQQC (SEQ ID NO :66)

[0270] Hundsrucker 等人 (2006, Biochem J 396 :297-306) 开发出 AKAP 与 PKA 的结合的其它肽竞争剂, 与 PKA 的 RII 形式的 DDD 的结合常数低至 0.4nM。各种 AKAP 拮抗性肽的序列提供于 Hundsrucker 等人的表 1 中, 再现于以下表 4 中。AKAPIS 代表一种合成 RII 亚基结合肽。所有其它肽均来源于所指示的 AKAP 的 RII 结合结构域。

[0271] 表 4. AKAP 肽序列

[0272]

肽序列

AKAPIS	QIEYLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:3)
AKAPIS-P	QIEYLAKQIPDNAIQQA (SEQ ID NO:67)
Ht31	KGADLIEEAASRIVDAVIEQVKAAG (SEQ ID NO:68)
Ht31-P	KGADLIEEAASRIPDAVIEQVKAAG (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)

[0273]

AKAP7 δ -P-pep	PEDAELVRLSKRLPENAVLKAVQQY (SEQ ID NO:73)
AKAP7 δ -PP-pep	PEDAELVRLSKRLPENAPLKAVQQY (SEQ ID NO:74)
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	VNLDDKAVLAEKIVAEAIEKAEREL (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)

[0274] 在不同 AKAP 蛋白的 AD 结构域中高度保守的残基在以下通过参考 AKAP-1S 序列 (SEQ ID NO:3) 加下划线指示。残基与 Alto 等人 (2003) 所观察到的相同, 其中添加了 C-末端丙氨酸残基。(参见 Hundsrucker 等人 (2006) 的图 4, 其以引用的方式并入本文。) 对于 RII DDD 序列具有特别高的亲和性的肽拮抗剂的序列为 AKAP-1S、AKAP7 δ -wt-pep、AKAP7 δ -L304T-pep 和 AKAP7 δ -L308D-pep 的序列。

[0275] AKAP-1S

[0276] QIEYLAKQIVDNIQQA (SEQ ID NO:3)

[0277] Carr 等人 (2001, J Biol Chem 276:17332-38) 检测了来自人和非人蛋白的不同 AKAP-结合 DDD 序列之间的序列同源性程度并且鉴定在不同 DDD 部分中看起来似乎为最高度保守的 DDD 序列中的残基。其在以下通过参考 SEQ ID NO:1 的人 PKA RII α DDD 序列加下划线指示。特别保守的残基进一步以斜体指示。残基与 Kinderman 等人 (2006) 所表明 的对结合 AKAP 蛋白重要的那些残基重叠, 但不与其相同。熟练的技术人员将认识到, 在设计 DDD 的序列变体时, 最优选的是避免改变最保守的残基 (斜体), 并且优选还避免改变保守残基 (加下划线), 而既未加下划线也不是斜体的残基可考虑进行保守氨基酸取代。

[0278] SHIQIPGLTELLOGYTVEVLRQOPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:1)

[0279] 基于 Carr 等人 (2001) 的数据, 针对 DDD1 (SEQ ID NO:1) 序列的一组修饰的保守氨基酸取代在表 5 中示出。甚至对于这个缩减组的取代序列, 存在多个可通过熟练技术人员在无需过多实验的情况下产生、测试和使用的可能替代 DDD 部分序列。熟练的技术人员可容易地得到此类替代 DDD 氨基酸序列, 如上表 2 和表 3 所公开。

[0280] 表 5. DDD1 (SEQ ID NO:1) 中的保守氨基酸取代。共有序列公开为 SEQ ID NO:89。

[0281]

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

[0282]

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

[0283] 熟练的技术人员将认识到,DDD 或 AD 氨基酸序列中的这些和其它氨基酸取代可用来使用本领域中标准的技术和仅通过常规实验来产生 AD 或 DDD 部分的属种内的替代种类。

[0284] 抗体同种异型

[0285] 治疗性抗体的免疫原性与输注反应风险增加和治疗性反应的持续时间减少相关 (Baert 等人,2003, N Engl J Med 348 :602-08)。治疗性抗体在宿主中诱导免疫应答的程度可部分地通过抗体的同种异型来确定 (Stickler 等人,2011, Genes and Immunity 12 :213-21)。抗体同种异型与抗体的恒定区序列中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 抗体的同种异型命名为 Gm 同种异型 (1976, J Immunol 117 :1056-59)。

[0286] 对于常见的 IgG1 人抗体而言,最普遍的同种异型为 G1m1 (Stickler 等人,2011, Genes and Immunity 12 :213-21)。然而,G1m3 同种异型也频繁出现于白种人中 (同上)。已报道了当向非 G1m1 (nG1m1) 接受者 (如 G1m3 患者) 施用 G1m1 抗体含有倾向于诱导免疫应答的同种异型序列 (同上)。当向 G1m1 患者施用 G1m1 同种异型抗体不作为免疫原性的 (同上)。

[0287] 人 G1m1 同种异型包含重链 IgG1 的 CH3 序列中的 Kabat 位置 356 上的氨基酸天冬氨酸和 Kabat 位置 358 上的亮氨酸。nG1m1 同种异型包含 Kabat 位置 356 上的氨基酸谷氨酸和 Kabat 位置 358 上的甲硫氨酸。G1m1 和 nG1m1 同种异型均包含 Kabat 位置 357 上的谷氨酸残基,并且同种异型有时称为 DEL 同种异型和 EEM 同种异型。针对示例性抗体利妥昔单抗 (SEQ ID NO :85) 和维妥珠单抗 (SEQ ID NO :86) 示出 G1m1 和 nG1m1 同种异型抗体的重链恒定区序列的非限制性实例。

[0288] 利妥昔单抗重链可变区序列 (SEQ ID NO :85)

[0289] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKAEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0290] 维妥珠单抗重链可变区 (SEQ ID NO :86)

[0291] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0292] Jefferis 和 Lefranc (2009, mAbs 1 :1-7) 综述了 IgG 同种异型的特征的序列变化及其对免疫原性的影响。他们报道了与 G1m17 同种异型中的 Kabat 214 上的赖氨酸残基相比, G1m3 同种异型的特征在于 Kabat 位置 214 上的精氨酸残基。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之外, Jefferis 和 Lefranc(2009) 报道了 κ 轻链恒定区中的同种异型变体, 其中 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, 并且 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。

[0293] 关于治疗性抗体, 维妥珠单抗和利妥昔单抗分别为用于治疗广泛多种血液恶性肿瘤的对抗 CD20 的人源化抗体和嵌合 IgG1 抗体。表 6 比较了利妥昔单抗与维妥珠单抗的同种异型序列。如在表 6 中所示, 利妥昔单抗 (G1m17, 1) 为 DEL 同种异型 IgG1, 在利妥昔单抗中的赖氨酸与维妥珠单抗中的精氨酸的 Kabat 位置 214 (重链 CH1) 上具有额外序列变化。已报道了在受试者中维妥珠单抗比利妥昔单抗的免疫原性小 (参见, 例如 Morchhauser 等人, 2009, J Clin Oncol 27:3346-53; Goldenberg 等人, 2009, Blood 113:1062-70; Robak&Robak, 2011, BioDrugs 25:13-25), 这种作用已归因于人源化抗体与嵌合抗体之间的差异。然而, EEM 同种异型与 DEL 同种异型之间的同种异型差异也可能解释维妥珠单抗的更低免疫原性。

[0294] 表 6. 利妥昔单抗与维妥珠单抗的同种异型

[0295]

	完整的同种异型	重链位置和相关的同种异型					
		214 (同种异型)		356/358 (同种异型)		431 (同种异型)	
利妥昔单抗	G1m17,1	K	17	D/L	I	A	-
维妥珠单抗	G1m3	R	3	E/M	-	A	-

[0296] 为了减小治疗性抗体在 nG1m1 基因型个体中的免疫原性, 希望选择对应于 G1m3 同种异型的抗体同种异型, 其特征在于 Kabat 214 上的精氨酸; 和 nG1m1,2 无效同种异型, 其特征在于 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。出人意料地, 发现重复皮下施用 G1m3 抗体经过很长一段时间并不会引起显著的免疫应答。在替代实施方案中, 与 G1m3 同种异型一样的人 IgG4 重链具有 Kabat 214 上的精氨酸、Kabat 356 上的谷氨酸、Kabat 359 上的甲硫氨酸以及 Kabat 431 上的丙氨酸。因为免疫原性看起来似乎至少部分地与那些位置上的残基相关, 所以对于治疗性抗体的人 IgG4 重链恒定区序列的使用也是一个优选的实施方案。G1m3 IgG1 抗体与 IgG4 抗体的组合也可用于治疗性施用。

[0297] 氨基酸取代

[0298] 在替代实施方案中, 公开的方法和组合物可涉及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, 用来制得 DNLTM构建体的 DDD 和 / 或 AD 序列可如上所讨论进行修饰。

[0299] 熟练技术人员将意识到一般来说, 氨基酸取代通常涉及一种氨基酸用具有相对类似性质的另一种氨基酸替代 (即, 保守氨基酸取代)。各种氨基酸的性质和氨基酸取代对蛋白质结构和功能的作用为广泛研究的主题和本领域中的知识。

[0300] 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有助于所得到的蛋白质的二级结构,其反过来定义了蛋白质与其它分子的相互作用。每种氨基酸在其疏水性和电荷特征的基础上确定亲水指数 (Kyte&Doolittle, 1982), 这些为: 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); 以及精氨酸 (-4.5)。在进行保守取代中, 使用其亲水指数在 ± 2 内的氨基酸为优选的, 亲水指数在 ± 1 内的氨基酸为更优选的, 并且亲水指数在 ± 0.5 内的氨基酸为甚至更优选的。

[0301] 氨基酸取代还可考虑氨基酸残基的亲水性 (例如, 美国专利号 4, 554, 101)。已给氨基酸残基确定以下亲水性值: 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, ± 1); 丙氨酸 (-0.5); 组氨酸 (-0.5); 半胱氨酸 (-1.0); 蛋氨酸 (-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) 以及色氨酸 (-3.4)。用具有类似亲水性的其它氨基酸替代氨基酸为优选的。

[0302] 其它考虑包括氨基酸侧链的大小。例如, 用具有松散侧链的氨基酸如色氨酸或酪氨酸替代具有紧凑侧链如甘氨酸或丝氨酸的氨基酸通常不是优选的。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, 已确定不同氨基酸残基对蛋白质结构域采用 α -螺旋、 β -折叠或回转二级结构趋势的作用并且为本领域中已知的 (参见, 例如 Chou&Fasman, 1974, Biochemistry, 13:222-245; 1978, Ann. Rev. Biochem., 47:251-276; 1979, Biophys. J., 26:367-384)。

[0303] 基于此类考虑和广泛实证研究, 已构建保守氨基酸取代的表格并且为本领域中已知的。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; 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。

[0304] 氨基酸取代的其它考虑包括残基是否位于蛋白质的内部或为暴露于溶剂。对于内部残基, 保守取代将包括: 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) 对于溶剂暴露的残基, 保守取代将包括: 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) 已构建各种矩阵来辅助选择氨基酸取代, 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)。

[0305] 在确定氨基酸取代中,还可考虑分子间或分子内键的存在,如在带正电荷残基(例如,His、Arg、Lys)与带负电荷残基(例如,Asp、Glu)之间形成离子键(盐桥)或在半胱氨酸残基附近之间形成二硫键。

[0306] 在编码的蛋白质序列中用任何氨基酸取代任何其它氨基酸的方法为熟知的,并且为熟练技术人员例如通过定点诱变技术或通过合成和组装编码氨基酸取代和剪接成表达载体构建体的寡核苷酸进行常规实验的事情。

[0307] Avimer

[0308] 在某些实施方案中,本文所述的结合部分可包含一个或多个 avimer 序列。Avimer 是针对各种靶分子的亲和性和特异性有些类似于抗体的一类结合蛋白。它们是通过体外外显子改组和噬菌体展示从人胞外受体结构域生成的。(Silverman 等人,2005,Nat. Biotechnol. 23:1493-94;Silverman 等人,2006,Nat. Biotechnol. 24:220。)得到的多结构域蛋白可包含多个独立的结合结构域,与单表位结合蛋白相比,此蛋白可表现出改善的亲合性(一些情况下为亚纳摩尔)和特异性(同上)。在各种实施方案中,avimer 可附接于例如 DDD 和 / 或 AD 序列以用于要求保护的方法和组合物中。有关构建和使用 avimer 的其他详情公开于例如美国专利申请公布号 20040175756、20050048512、20050053973、20050089932 和 20050221384 中,每个专利的实施例部分以引用的方式并入本文。

[0309] 噬菌体展示

[0310] 要求保护的组合物和 / 或方法的某些实施方案可涉及各种靶分子、细胞或组织的结合肽和 / 或肽模拟物。结合肽可由本领域已知的任何方法鉴定,包括但不限于噬菌体展示技术。用于产生不同肽群体的各种噬菌体展示方法和技术是本领域公知的。例如,美国专利号 5,223,409;5,622,699 和 6,068,829 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,从而在其表面上表达小的肽(Smith 和 Scott,1985,Science 228:1315-1317;Smith 和 Scott,1993,Meth. Enzymol. 21:228-257)。除了肽以外,较大的蛋白结构域诸如单链抗体也可在噬菌体颗粒表面上展示(Arap 等人,1998,Science 279:377-380)。

[0311] 对指定器官、组织、细胞类型或靶分子选择性的靶向氨基酸序列可通过淘选分离(Pasqualini 和 Ruoslahti,1996,Nature 380:364-366;Pasqualini,1999,The Quart. J. Nucl. Med. 43:159-162)。简言之,将包含推测靶向肽的噬菌体文库施用于完整的生物体或分离的器官、组织、细胞类型或靶分子,并且收集包含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与靶标结合的噬菌体,然后将其通过在宿主细菌中生长而扩增。

[0312] 在某些实施方案中,可在淘选的轮次之间在宿主细菌中繁殖噬菌体。不同于被噬菌体裂解,相反细菌可分泌展示特定插入物的噬菌体的多个拷贝。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,并且收集用于另一轮淘选。可进行多轮淘选,直到获得选择性或特定结合物(binder)的群体。肽的氨基酸序列可通过对对应于噬菌体基因组中靶向肽插入物的 DNA 进行测序来确定。然后可通过标准蛋白化学技术产生所鉴定的靶向肽为合成的肽(Arap 等人,1998,Smith 等人,1985)。

[0313] 在一些实施方案中,消减方案可用于进一步减少背景噬菌体结合。消减的目的是从结合至除了所关注的靶标外的靶标的文库中去除噬菌体。在替代实施方案中,噬菌体文

库可针对对照细胞、组织或器官进行预筛选。例如,肿瘤结合肽可在针对对照正常细胞系预筛选文库之后加以鉴定。在消减之后,可针对所关注的分子、细胞、组织或器官筛选文库。消减方案的其它方法是已知的并且可在要求保护的方法的实践中使用,如例如美国专利号 5,840,841、5,705,610、5,670,312 及 5,492,807 中所公开。

[0314] 适体

[0315] 在某些实施方案中,使用的靶向部分可以是适体。构建及确定适体的结合特征的方法在本领域中是众所周知的。例如,这类技术描述在美国专利号 5,582,981、5,595,877 及 5,637,459 中,每个专利的实例以引用的方式并入本文。用于制备及筛选结合至所关注的具体靶标的适体的方法是众所周知的,例如美国专利号 5,475,096 及美国专利号 5,270,163,每个专利的实施例部分以引用的方式并入本文。

[0316] 适体可以通过任何已知方法来制备,包括合成、重组及纯化方法,并且可以单独或与对相同靶标有特异性的其它配位体组合使用。一般说来,最少大约 3 个核苷酸、优选至少 5 个核苷酸为实现特定结合所必需的。序列短于 10 个碱基的适体是可行的,但是 10、20、30 或 40 个核苷酸的适体可以是优选的。

[0317] 适体可如同传统的 DNA 或 RNA 分子一样被分离,测序和 / 或扩增或合成。或者,所关注的适体可包含修饰的低聚物。通常存在于适体中的任何羟基都可被磷酸酯基团、磷酸酯基团置换,被标准保护基保护,或被活化以制备与其它核苷酸的另外的键,或可缀合至固体支持物。一个或多个磷酸二酯键可被替代的连接基团置换,如 $P(O)O$ 被 $P(O)S$ 、 $P(O)NR_2$ 、 $P(O)R$ 、 $P(O)OR'$ 、 CO 或 CNR_2 置换,其中 R 是 H 或烷基 (1-20C) 且 R' 是烷基 (1-20C); 另外,此基团可以经由 O 或 S 附接于邻近的核苷酸。低聚物中的所有键不必完全相同。

[0318] 亲和体和 Fynomer

[0319] 某些替代实施方案可以利用亲和体来代替抗体。亲和体可从 Affibody AB (Solna, Sweden) 商购获得。亲和体是用作抗体模拟物的小的蛋白质并且在结合靶分子中是有用的。亲和体通过在 α 螺旋蛋白支架上组合工程化而产生 (Nord 等人, 1995, Protein Eng 8:601-8; Nord 等人, 1997, Nat Biotechnol 15:772-77)。亲和体设计是基于包含蛋白 A 的 IgG 结合结构域的三螺旋束结构 (Nord 等人, 1995; 1997)。具有广泛范围的结合亲合力的亲和体可通过随机化细菌蛋白 A 的 Fc 结合活性中所涉及的十三个氨基酸而产生 (Nord 等人, 1995; 1997)。随机化之后, PCR 扩增的文库被克隆到噬菌粒载体中以便通过突变蛋白的噬菌体展示来筛选。噬菌体展示文库可针对任何已知的抗原使用标准噬菌体展示筛选技术进行筛选 (例如 Pasqualini 和 Ruoslahti, 1996, Nature 380:364-366; Pasqualini, 1999, Quart. J. Nucl. Med. 43:159-162), 以便鉴定针对靶抗原的一个或多个亲和体。

[0320] 对 HER2/neu 有特异性的 ^{177}Lu 标记的亲和体已显示在体内靶向表达 HER2 的异种移植瘤 (Tolmachev 等人, 2007, Cancer Res 67:2773-82)。虽然由于低分子量放射性标记的化合物的积聚所致的肾毒性开始是个问题,但可逆性的结合至白蛋白减少肾脏积聚,使得用标记的亲和体的基于放射性核素的疗法能实现 (同上)。

[0321] 使用放射性标记的亲和体用于体内肿瘤成像的可行性最近已得到论证 (Tolmachev 等人, 2011, Bioconjugate Chem 22:894-902)。马来酰亚胺 - 衍生的 NOTA 缀合至抗 HER2 亲和体并且用 ^{111}In 进行放射性标记 (同上)。向带有表达 HER2 的 DU-145 异

种移植物的老鼠施用,然后进行 γ 照相机成像,允许异种移植物的可视化(同上)。

[0322] Fynomer 也可以对抗体类似的亲和力和特异性结合至靶抗原。Fynomer 是基于作为用于装配结合分子的支架的人 Fyn SH3 结构域。Fyn SH3 结构域是完全地人的 63 个氨基酸蛋白,其可在细菌中以高产率产生。Fynomer 可连接在一起以产生对两种或更多种不同抗原靶标具有亲和力的多特异性结合蛋白。Fynomer 可从 COVAGEN AG (Zurich, Switzerland) 商购获得。

[0323] 熟练的技术人员将认识到,亲和体或 fynomer 可在要求保护的方法和组合物的实践中用作靶向分子。

[0324] 缀合方案

[0325] 优选缀合方案是基于在中性或酸性 pH 下较为容易的硫醇-马来酰亚胺、硫醇-乙烯砜、硫醇-溴乙酰胺或硫醇-碘乙酰胺反应。这避免了缀合对于较高 pH 条件的需要,如例如当使用活性酯时这将成为必要的。示例性缀合方案的更多细节在以下实施例部分中描述。

[0326] 治疗性治疗

[0327] 另一方面,本发明涉及一种治疗受试者的方法,包括向受试者施用治疗有效量的如本文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(例如非何杰金氏淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、多发性骨髓瘤、何杰金氏淋巴瘤、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、毛细胞白血病),使用例如针对另一 CD22 表位(hRFB4)的抗 CD22 抗体如 hLL2MAb(依帕珠单抗,参见美国专利号 6,183,744)或针对其它 B 细胞抗原如 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起源的消化系统上皮腺癌、癌症如乳腺癌及非小细胞肺癌、及其它癌瘤、肉瘤、神经胶质肿瘤、骨髓性白血病等。具体说来,有利地使用由以下恶性实体肿瘤或造血系统肿瘤产生的或与其有关的针对抗原例如癌胚抗原的抗体:例如胃肠道、胃、结肠、食道、肝、肺、乳腺、胰腺、肝、前列腺、卵巢、睾丸、脑、骨或淋巴瘤、肉瘤或黑素瘤。取决于疾病病况和缀合物的耐受性,这种治疗剂可给予一次或重复给予,并且还可任选地组合其它治疗方式使用,所述其它治疗方式如手术、外部辐射、放射免疫疗法、免疫疗法、化疗、反义疗法、干扰 RNA 疗法、基因疗法等等。每种组合将适合于肿瘤类型、阶段、患者情况及先前疗法,以及主治医师考虑的其它因素。

[0328] 如本文所用,术语“受试者”是指任何动物(即脊椎动物和无脊椎动物),包括但不限于哺乳动物,包括人。不意图将该术语限于特别的年龄或性别。因此,成人及新生儿受试者以及胎儿不管是雄性或雌性都包括在该术语内。本文给出的剂量是用于人,但可以针对其它哺乳动物的尺寸以及针对儿童根据体重或平方米尺寸进行调整。

[0329] 在一个优选实施方案中,包含抗 EGP-1(抗 TROP-2)抗体如 hRS7MAb 的治疗性缀合物可用于治疗癌瘤,如以下的癌瘤:食道、胰腺、肺、胃、结肠和直肠、膀胱、乳腺、卵巢、子宫、肾及前列腺,如美国专利号 7,238,785;7,517,964 及 8,084,583 中所公开,其中的实施例部分以引用的方式并入本文。hRS7 抗体是包含以下的人源化抗体:轻链互补决定区(CDR)序列 CDR1(KASQDVSIAVA, SEQ ID NO:90)、CDR2(SASYRYT, SEQ ID NO:91)及 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) 及 CDR3(GGFGSSYWYFDV, SEQ ID NO:95)。

[0330] 在另一优选实施方案中,包含抗 CEACAM5 抗体(例如 hMN-14, labretuzumab)和/或抗 CEACAM6 抗体(例如 hMN-3 或 hMN-15)的治疗性缀合物可用于治疗表达 CEACAM5 和/或 CEACAM6 的多种癌症中的任一种,如美国专利号 7,541,440;7,951,369;5,874,540;6,676,924 以及 8,267,865 中所公开,每个专利的实施例部分以引用的方式并入本文。可使用抗 CEACAM5、抗 CEACAM6 或这两者的组合的治疗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、口腔癌以及胃癌。大多数癌瘤,包括胃肠道癌、呼吸道癌、泌尿生殖癌及乳腺癌,表达 CEACAM5 并且可用本发明免疫缀合物治疗。hMN-14 抗体是包含以下的人源化抗体:轻链可变区 CDR 序列 CDR1(KASQDVGTSVA; SEQ ID NO:96)、CDR2(WTSTRHT; SEQ ID NO:97) 及 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) 及 CDR3(LYFGFPWFAY; SEQ ID NO:101)。hMN-3 抗体是包含以下的人源化抗体:轻链可变区 CDR 序列 CDR1(RSSQSIVHSNGNTYLE, SEQ ID NO:102)、CDR2(KVSNRFS, SEQ ID NO:103) 及 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) 及 CDR3(KGWMDFNSSLDY, SEQ ID NO:107)。hMN-15 抗体是包含以下的人源化抗体:轻链可变区 CDR 序列 SASSRVSYIH(SEQ ID NO:108)、GTSTLAS(SEQ ID NO:109) 及 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) 及 DMGIRWNFDV(SEQ ID NO:113)。

[0331] 在另一优选实施方案中,包含抗 CD74 抗体的治疗性缀合物(例如在美国专利号 7,074,403;7,312,318;7,772,373;7,919,087 及 7,931,903 中公开的 hLL1, 米拉珠单抗,每个专利的实施例部分以引用的方式并入本文)可用于治疗表达 CD74 的多种癌症中的任一种,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,以及若干血液系统癌症,如多发性骨髓瘤、慢性淋巴细胞性白血病、急性淋巴母细胞性白血病、非何杰金氏淋巴瘤及何杰金氏淋巴瘤。hLL1 抗体是包含以下的人源化抗体:轻链 CDR 序列 CDR1(RSSQSLVHRNGNTYLH; SEQ ID NO:114)、CDR2(TVSNRFS; SEQ ID NO:115) 及 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) 及 CDR3(SRGKNEAWFAY; SEQ ID NO:119)。

[0332] 在另一优选实施方案中,包含抗 CD22 抗体的治疗性缀合物(例如 hLL2, 依帕珠单抗,公开于美国专利号 5,789,554;6,183,744;6,187,287;6,306,393;7,074,403 和 7,641,901 中,每个专利的实施例部分以引用的方式并入本文,或嵌合的或人源化 RFB4 抗体)可用于治疗包括但不限于以下的表达 CD22 的多种癌症中的任一种:无痛形式的 B 细胞淋巴瘤、侵袭形式的 B 细胞淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病、急性淋巴细胞性白血病、非何杰金氏淋巴瘤、何杰金氏淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤或弥漫性 B 细胞淋巴瘤。hLL2 抗体是包含以下的人源化抗体:轻链 CDR 序列 CDR1(KSSQSVLYSANHK YLA, SEQ ID NO:120)、CDR2(WASTRES, SEQ ID NO:121) 及 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) 及 CDR3(RDITTFY, SEQ ID NO:125)。

[0333] 在一个优选实施方案中,包含抗 CSAp 抗体如 hMu-9MAb 的治疗性缀合物可用于

治疗结肠直肠癌以及胰腺癌和卵巢癌,如美国专利号 6,962,702 ;7,387,772 ;7,414,121 ;7,553,953 ;7,641,891 和 7,670,804 中所公开,每个专利的实施例部分以引用的方式并入本文。另外,包含 hPAM4MAb 的治疗性缀合物可用于治疗胰腺癌或其它实体肿瘤,如美国专利号 7,238,786 和 7,282,567 中所公开,每个专利的实施例部分以引用的方式并入本文。hMu-9 抗体是包含以下的人源化抗体:轻链 CDR 序列 CDR1(RSSQSIVHSNGNTYLE, SEQ ID NO:126)、CDR2(KVSNRFS, SEQ ID NO:127) 及 CDR3(FQGSRVPT, SEQ ID NO:128) 以及重链可变区 CDR 序列 CDR1(EYVIT, SEQ ID NO:129)、CDR2(EIYPGSGSTSYNEKFK, SEQ ID NO:130) 及 CDR3(EDL, SEQ ID NO:131)。hPAM4 抗体是包含以下的人源化抗体:轻链可变区 CDR 序列 CDR1(SASSSVSSSYLY, SEQ ID NO:132)、CDR2(STSNLAS, SEQ ID NO:133) 及 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) 及 CDR3(GFGGSYGFAY, SEQ ID NO:137)。

[0334] 在另一优选实施方案中,包含抗 AFP MAb 如 IMMU31 的治疗性缀合物可用于使用人源化、嵌合的以及人抗体形式来治疗肝细胞癌、生殖细胞肿瘤及其它产生 AFP 的肿瘤,如美国专利号 7,300,655 中所公开,其中的实施例部分以引用的方式并入本文。IMMU31 抗体是包含以下的人源化抗体:重链 CDR 序列 CDR1(SYVIH, SEQ ID NO:138)、CDR2(YIHPYNGGTKYNEKFKG, SEQ ID NO:139) 及 CDR3(SGGGDPFAY, SEQ ID NO:140) 以及轻链 CDR1(KASQDINKYIG, SEQ ID NO:141)、CDR2(YTSALLP, SEQ ID NO:142) 及 CDR3(LQYDDLWT, SEQ ID NO:143)。

[0335] 在另一优选实施方案中,包含抗 HLA-DR MAb 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、黑素瘤或其它产生 HLA-DR 的肿瘤,如美国专利号 7,612,180 中所公开,其中的实施例部分以引用的方式并入本文。hL243 抗体是包含以下的人源化抗体:重链 CDR 序列 CDR1(NYGMN, SEQ ID NO:144)、CDR2(WINTYTREPTYADDFKG, SEQ ID NO:145) 及 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) 及 CDR3(QHFWTTPWA, SEQ ID NO:149)。

[0336] 在另一优选实施方案中,包含抗 CD20MAb 如维妥珠单抗(hA20)、1F5、obinutuzumab(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、免疫性血小板减少性紫癜、全身性红斑狼疮、干燥综合征、埃文斯综合征、关节炎、动脉炎、寻常天疱疮、肾脏移植排斥、心脏移植排斥、类风湿性关节炎、伯基特淋巴瘤、非何杰金氏淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、小淋巴细胞性淋巴瘤、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,如美国专利号 7,435,803 或 8,287,864 中所公开,每个专利的实施例部分以引用的方式并入本文。hA20(维妥珠单抗)抗体是包含以下的人源化抗体:轻链 CDR 序列 CDRL1(RASSSVSYIH, SEQ ID NO:150)、CDRL2(ATSNLAS, SEQ ID NO:151) 及 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) 及 CDRH3(STYYGGDWYFDV, SEQ ID NO:155)。

[0337] 在另一优选实施方案中,包含抗 CD19MAb 如 hA19 的治疗性缀合物可用于治疗 B 细胞相关的淋巴瘤及白血病,如非何杰金氏淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病或急性淋巴母细

胞性白血病。可治疗的其它疾病病况包括自体免疫疾病,如急性或慢性免疫血小板减少症、皮炎、西登哈姆氏舞蹈病、重症肌无力、全身性红斑狼疮、狼疮肾炎、风湿热、多内分泌腺综合征、大疱性类天疱疮、糖尿病、亨-舍二氏紫癜、链球菌感染后肾炎、结节性红斑、高安氏动脉炎、阿狄森氏病、类风湿性关节炎、多发性硬化、结节病、溃疡性结肠炎、多形性红斑、IgA 肾病、多发性结节性动脉炎、强直性脊柱炎、古德帕斯彻氏综合征、血管闭塞性脉管炎、干燥综合征、原发性胆汁性肝硬化、桥本氏甲状腺炎、甲状腺毒症、硬皮病、慢性活动性肝炎、多肌炎 / 皮炎、多软骨炎、寻常天疱疮、韦格纳肉芽肿、膜性肾病、肌萎缩性侧索硬化、脊髓痨、巨细胞性动脉炎 / 多肌痛、恶性贫血、快速进行性肾小球性肾炎、牛皮癣以及纤维性肺泡炎,如美国专利号 7,109,304、7,462,352、7,902,338、8,147,831 以及 8,337,840 中所公开,每个专利的实施例部分以引用的方式并入本文。hA19 抗体是包含以下的人源化抗体:轻链 CDR 序列 CDR1KASQSVDDYDGSYLN(SEQ ID NO:156)、CDR2DASNLVS(SEQ ID NO:157) 及 CDR3QQSTEDPWT(SEQ ID NO:158) 以及重链 CDR 序列 CDR1SYWMN(SEQ ID NO:159)、CDR2QIWPBGDGTNYNGKFKG(SEQ ID NO:160) 及 CDR3RETTTVGRYYYAMDY(SEQ ID NO:161)。

[0338] 在另一优选实施方案中,包含抗腱生蛋白抗体的治疗性缀合物可用于治疗造血和实体肿瘤,并且包含针对腱生蛋白的抗体的缀合物可用于治疗实体肿瘤,优选脑癌,如成胶质细胞瘤。

[0339] 在一个优选实施方案中,用于治疗人疾病的抗体是人或人源化(CDR 移植的)形式的抗体;但也可以使用鼠科及嵌合形式的抗体。相同物种 IgG 分子作为递送剂是最优选的,以使得免疫应答最小。当考虑重复治疗时这是尤其重要的。对于人,人或人源化 IgG 抗体从患者生成抗-IgG 免疫应答的可能性较小。抗体如 hLL1 和 hLL2 在结合靶细胞上的内化抗原后快速内化,这意味着被携带的化疗药物也快速内化到细胞中。然而,具有较慢内化速率的抗体也可用于实现选择性疗法。

[0340] 在另一优选实施方案中,治疗性缀合物可以针对病原体使用,因为针对病原体的抗体是已知的。例如,特异性地结合通过感染性病灶(包括病毒、细菌、真菌及寄生虫感染(例如由病原体如细菌、立克次氏体、支原体、原生动物、真菌以及病毒所引起))产生或与其有关的标记物的抗体及抗体片段以及与这类微生物有关的抗原和产物已经被公开,尤其在 Hansen 等人,美国专利号 3,927,193 和 Goldenberg 美国专利号 4,331,647、4,348,376、4,361,544、4,468,457、4,444,744、4,818,709 及 4,624,846 中,每个专利的实施例部分以引用的方式并入本文,并且在以上所引用的 Reichert 和 Dewitz 中。在一个优选实施方案中,病原体选自由以下组成的组:HIV 病毒、结核分支杆菌、无乳链球菌、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、嗜肺性军团病菌、酿脓链球菌、大肠杆菌、淋病奈瑟氏菌、脑膜炎奈瑟氏菌、肺炎球菌属、新型隐球菌、荚膜组织胞浆菌、B 型流感嗜血杆菌、苍白密螺旋体、莱姆病螺旋体、绿脓假单胞菌、麻风分枝杆菌、流产杆菌、狂犬病病毒、流感病毒、巨细胞病毒、I 型单纯疱疹病毒、II 型单纯疱疹病毒、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、埃-巴二氏病毒、鼠白血病病毒、腮腺炎病毒、水泡性口膜炎病毒、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、西尼罗病毒、恶性疟原虫、间日疟原虫、鼠弓形体、让氏锥虫、克氏锥虫、罗德西亚锥虫、布氏锥虫、曼氏血吸虫、日本血吸虫、牛巴贝虫、柔嫩艾

美球虫、盘尾丝虫、热带利什曼原虫、旋毛线虫、小泰累尔梨浆虫、水泡绦虫、羊绦虫、牛肉绦虫、细粒棘球绦虫、科特氏中殖孔绦虫、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、唾液支原体及肺炎支原体,如美国专利号 6,440,416 中所公开,其中的实施例部分以引用的方式并入本文。

[0341] 在一个更优选的实施方案中,包含抗 gp120 和其它这种抗 HIV 抗体的本发明药物缀合物可用作 AIDS 患者的 HIV 的治疗剂;并且针对结核分支杆菌的抗体的药物缀合物适用作药物难治性结核的治疗剂。已经检查了抗 gp120MAb(抗 HIV MAb)与毒素诸如假单胞菌外毒素的融合蛋白的抗病毒特性(Van Oigen 等人, *J Drug Target*, 5:75-91, 1998)。治疗 AIDS 患者的 HIV 感染的尝试失败了,可能是因为效力不足或不可接受的宿主毒性。本发明的药物缀合物有利地缺少蛋白毒素的这种毒性副作用,并且因此有利地用于治疗 AIDS 患者的 HIV 感染。这些药物缀合物可单独给予,或与当单独提供时在这种患者中有效的其它抗生素或治疗剂组合给予。候选抗 HIV 抗体包括 Johansson 等人(AIDS. 2006Oct 3; 20(15):1911-5)所述的 P4/D10 抗包被蛋白抗体、以及 Polymun(Vienna, Austria)描述和销售的抗 HIV 抗体,还描述在美国专利 5,831,034、美国专利 5,911,989、以及 Vcelar 等人, AIDS2007;21(16):2161-2170 和 Joos 等人, *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006; 50(5):1773-9 中,所有文献都以引用的方式并入本文。为了克服耐药性,用于 HIV 的优选靶向剂是这些抗体的各种组合。

[0342] 在一个优选实施方案中,向细胞和病原体中的更有效的并入可通过使用多价、多特异性或多价、单特异性抗体来实现。这类二价和双特异性抗体的实例见于美国专利号 7,387,772;7,300,655;7,238,785;及 7,282,567 中,每个专利的实施例部分以引用的方式并入本文。这些多价或多特异性抗体对于表达多种抗原靶标和甚至同一抗原靶标的多个表位的癌症和感染性生物体(病原体)的靶向尤其优选,但所述癌症和感染性生物体(病原体)通常逃避用于免疫疗法的抗体靶向和充分结合,因为细胞或病原体上单个抗原靶标的表达或可获得性不足。通过靶向多种抗原或表位,所述抗体显示对靶标更高的结合和停留时间,从而提供与本发明中被靶向的药物更高的饱和。

[0343] 在另一优选实施方案中,治疗性缀合物可用于治疗自体免疫疾病或免疫系统功能障碍(例如,移植物抗宿主疾病、器官移植排斥)。适用于治疗自体免疫/免疫功能障碍疾病的抗体可以结合至包括但不限于以下的示例性抗原: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 以及 HLA-DR。以上论述的结合至这些及其它靶抗原的抗体可用于治疗自体免疫或免疫功能障碍疾病。可用免疫缀合物治疗的自体免疫疾病可以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、西登哈姆氏舞蹈病、重症肌无力、全身性红斑狼疮、狼疮肾炎、风湿热、多内分泌腺综合征、大疱性类天疱疮、糖尿病、亨-舍二氏紫癜、链球菌感染后肾炎、结节性红斑、高安氏动脉炎、ANCA 相关的脉管炎、阿狄森氏病、类风湿性关节炎、多发性硬化、结节病、溃疡性结肠炎、多形性红斑、IgA 肾病、多发性结节性动脉炎、强直性脊柱炎、古德帕斯彻氏综合征、血管闭塞性脉管炎、干燥综合征、原发性胆汁性肝硬化、桥本氏甲状腺炎、甲状腺毒症、硬皮病、慢性活动性肝炎、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、肌萎缩性侧索硬化、脊髓痨、巨细胞性动脉炎 / 多肌痛、恶性贫血、快速进行性肾小球性肾炎、牛皮癣或纤维性肺泡炎。

[0344] 在另一优选实施方案中,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。适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 以及 ^{211}Pb 。治疗性放射性核素优选地具有范围为 20 至 6,000keV 的衰变能量,优选地对于俄歇粒子 (Auger) 发射体范围为 60 至 200keV,对于 β 粒子发射体范围为 100-2,500keV,并且对于 α 粒子发射体范围为 4,000-6,000keV。有用的发射 β 粒子的核素的最大衰变能量优选地是 20-5,000keV,更优选地是 100-4,000keV,并且最优选地是 500-2,500keV。实质上随着发射俄歇粒子而衰变的放射性核素也是优选的。例如,Co-58、Ga-67、Br-80m、Tc-99m、Rh-103m、Pt-109、In-111、Sb-119、I-125、Ho-161、Os-189m 以及 Ir-192。有用的发射 β 粒子的核素的衰变能量优选地为 <1,000keV,更优选地为 <100keV,并且最优选地为 <70keV。实质上随着 α 粒子的产生而衰变的放射性核素也是优选的。这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 以及 Fm-255。有用的发射 α 粒子的放射性核素的衰变能量优选地为 2,000-10,000keV,更优选地为 3,000-8,000keV,并且最优选地为 4,000-7,000keV。其它可能有用的放射性同位素包括: ^{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 及其类似物。

[0345] 放射性核素及其它金属可以例如使用附接于抗体或缀合物的螯合基团来递送。大环螯合物如 NOTA、DOTA 和 TETA 可与多种金属和放射性金属一起使用,最尤其是可分别与镓、钷和铜的放射性核素一起使用。通过根据感兴趣的金属定制环大小,可使得这种金属-螯合物复合物非常稳定。可使用其它环型螯合物,如用于络合 ^{223}Ra 的大环聚醚。

[0346] 与本文所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,如长春花生物碱类、蒽环类抗生素、表鬼臼毒素、紫杉醇类、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、抗血管生成剂和促细胞调亡剂,特别是阿霉素、甲氨蝶呤、紫杉酚、其他喜树碱类、以及其它形式的这些和其它类别的抗癌剂等。其它癌症化疗药物包括氮芥类、烷基磺酸酯类、亚硝基脲类、三氮烯类、叶酸类似物、嘧啶类似物、嘌呤类似物、钼配位复合物、激素等。合适的化疗剂描述在 REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 第 19 版 (MackPublishing 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。其它合适的化疗剂如实验性药物是本领域技术人员已知的。

[0347] 可使用的示例性药物包括但不限于,5-氟尿嘧啶、阿法替尼、阿普立定、阿扎立平、阿那曲唑、蒽环类、阿西替尼、AVL-101、AVL-291、苯达莫司汀、博来霉素、硼替佐米、博舒替尼、苔藓抑素-1、白消安、卡奇霉素、喜树碱、卡铂、10-羟基喜树碱、卡莫司汀、塞来昔布、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、喜树碱类、克唑替尼、环磷酰胺、阿糖胞苷、达卡巴嗪、达沙替尼、dinaciclib、多西紫杉醇、放线菌

素 D、柔红霉素、阿霉素、2-吡咯啉阿霉素 (2P-DOX)、氰基-吗啉代阿霉素、葡糖苷酸阿霉素、葡糖苷酸表柔比星、埃罗替尼、雌莫司汀、表鬼臼毒素、埃罗替尼、恩替诺特、雌激素受体结合剂、依托泊苷 (VP16)、葡糖苷酸依托泊苷、磷酸依托泊苷、依西美坦、芬戈莫德、氟尿苷 (FudR)、3', 5'-O-二油酰基-FudR (FudR-d0)、氟达拉滨、氟他胺、法呢基-蛋白转移酶抑制剂、黄酮吡啶酚 (flavopiridol)、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、idelalisib、异环磷酰胺、伊马替尼、L-天冬酰胺酶、拉帕替尼、来那度胺、亚叶酸、LFM-A13、洛莫司汀、氮芥、美法仑、巯嘌呤、6-巯嘌呤、甲氨蝶呤、米托蒽醌、光神霉素、丝裂霉素、米托坦、诺维本、来那替尼、尼洛替尼、亚硝基脲、奥拉帕尼、普卡霉素、丙卡巴肼、紫杉醇、PCI-32765、喷司他丁、PSI-341、雷洛昔芬、司莫司汀、索拉非尼、链佐星、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 (vatalanib)、长春瑞滨、长春碱、长春新碱、长春花生物碱以及 ZD1839。这种试剂可以是本文所述的缀合物的一部分,或可选地可在缀合物之前、同时或之后与所述缀合物组合施用。或者,一种或多种本领域已知的治疗性裸抗体可与所述缀合物组合使用。示例性治疗性裸抗体如上所述。

[0348] 可与喜树碱缀合物配合使用的治疗剂还可包括与靶向部分缀合的毒素。可用于此用途的毒素包括蓖麻毒素、相思豆毒素、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、白树毒蛋白、白喉毒素、绿脓杆菌外毒素以及绿脓杆菌内毒素。(参见,例如 Pastan. 等人, Cell (1986), 47:641 以及 Sharkey 和 Goldenberg, CA Cancer J Clin. 2006 年 7 月-8 月;56(4):226-43)。适合用于本文中的额外毒素为本领域技术人员已知,并公开于 U. S. 6,077,499 中。

[0349] 另一类治疗剂可包括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如肿瘤坏死因子 (TNF)、造血因子,如白介素 (IL)、集落刺激因子,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,如干扰素- α 、- β 、- γ 或 - λ 、以及干细胞生长因子,如命名为“S1 因子”的。细胞因子中包括生长激素如人生长激素、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;糖蛋白激素如滤泡刺激激素 (FSH)、促甲状腺激素 (TSH) 和促黄体激素 (LH);肝生长因子;前列腺素、成纤维细胞生长因子;促乳素;胎盘催乳素、OB 蛋白;肿瘤坏死因子- α 和 - β ;苗勒氏抑制物质;小鼠促性腺素相关肽;抑制素;活化素;血管内皮生长因子;整联蛋白;血小板生成素 (TPO);神经生长因子如 NGF- β ;血小板生长因子;转化生长因子 (TGF) 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;干扰素如干扰素- α 、- β 和 - γ ;集落刺激因子 (CSF) 如巨噬细胞-CSF (M-CSF);白介素 (IL) 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、血管他丁、血小板反应蛋白、内皮他丁、肿瘤坏死因子以及淋巴毒素 (LT)。本文所用的术语细胞因子包括来自天然来源或来自重组细胞培养物的蛋白质,和天然序列细胞因子的生物活性等效物。

[0350] 使用的趋化因子包括 RANTES、MCAF、MIP1- α 、MIP1- β 以及 IP-10。

[0351] 本领域技术人员将认识到,包含缀合至抗体或抗体片段的喜树碱的本发明免疫缀

合物可单独或与以下一种或多种其它治疗剂组合使用,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、放射疗法、趋化因子、细胞因子、免疫调节剂、酶、激素、寡核苷酸、RNAi 或 siRNA。这类另外的治疗剂可单独地、与本发明抗体-药物免疫缀合物组合或附接于其上使用。

[0352] 制剂和施用

[0353] 缀合物的适合的施用途包括但不限于口服、胃肠外、经皮、直肠、经粘膜、肠施用、肌内、髓内、鞘内、直接心室内、静脉内、玻璃体内、腹膜内、鼻内或眼内注射。优选施用途是肠胃外。或者,可以局部而非全身方式来施用化合物,例如经由将化合物直接注射到实体肿瘤中。

[0354] 免疫缀合物可根据制备药学上有用的组合物的已知方法配制,由此所述免疫缀合物在混合物中与药学上合适的赋形剂合并。无菌磷酸盐缓冲盐水是药学上合适的赋形剂的一个实例。其它合适的赋形剂为本领域技术人员所熟知。参见,例如 Ansel 等人,PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS,第5版(Lea&Febiger 1990)和 Gennaro(编著),REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES,第18版(Mack Publishing Company 1990),以及它们的修订版。

[0355] 在一个优选实施方案中,免疫缀合物是在古德氏生物学缓冲液(pH 6-7)中使用选自以下组成的组的缓冲液来配制:N-(2-乙酰胺基)-2-氨基乙磺酸(ACES);N-(2-乙酰胺基)亚氨基二乙酸(ADA);N,N-双(2-羟基乙基)-2-氨基乙磺酸(BES);4-(2-羟基乙基)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);以及哌嗪-N,N'-双(2-乙磺酸)[Pipe]。更优选的缓冲液是MES或MOPS,优选地在20至100mM的浓度范围内,更优选地约25mM。最优选的是25mM MES,pH 6.5。所述制剂可以进一步包含25mM海藻糖和0.01% v/v 聚山梨醇酯80作为赋形剂,其中最终的缓冲液浓度被更改为22.25mM作为附加赋形剂的结果。优选的保存方法是作为冻干的缀合物制剂保存在-20℃至2℃的温度范围下,其中最优选保存在2℃至8℃下。

[0356] 免疫缀合物可以被配制以供经由例如弹丸注射、缓慢输注或连续输注来静脉内施用。优选地,本发明的抗体在小于约4小时的时间内、且更优选在小于约3小时的时间内输注。例如,首个25-50mg可以在30分钟之内、优选地甚至在15分钟内输注,并且其余的在接来的2-3小时内输注。用于注射的制剂可以单位剂型,例如在安瓿中或在多剂量容器中存在,其中添加有防腐剂。组合物可以采取如在油性或水性媒介物中的混悬液、溶液或乳液的形式,并且可以含有如混悬剂、稳定剂和/或分散剂的配制剂。或者,活性成分可以呈粉末形式以供在使用之前用适合的媒介物例如无菌无热原水复原。

[0357] 可采用另外的药学方法控制治疗性缀合物的作用持续时间。控制释放制剂可以通过使用聚合物复合或吸附免疫缀合物来制备。例如,生物相容性聚合物包括聚(乙烯-共-乙酸乙烯酯)基质和硬脂酸二聚体与癸二酸的聚酞共聚物基质。Sherwood 等人,Bio/Technology 10:1446(1992)。从这样的基质释放免疫缀合物的速率取决于免疫缀合物的分子量、基质内的免疫缀合物的量以及被分散的颗粒的大小。Saltzman 等人,Biophys. J. 55:163(1989);Sherwood 等人,同上。其它固体剂型描述在Ansel 等人,PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS,第5版(Lea&Febiger

1990) 和 Gennaro(编 著), REMINGTON' S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 第 18 版 (Mack Publishing Company 1990), 以及它们的修订版中。

[0358] 一般来说, 对于人施用的免疫缀合物的剂量将取决于如患者年龄、体重、身高、性别、一般医学状况和以往病史等因素而变化。期望为接受者提供在约 1mg/kg 至 24mg/kg 范围内的作为单次静脉内输注的免疫缀合物的剂量, 虽然如情况需要也可施用较低或较高的剂量。对于 70kg 患者 1-20mg/kg 的剂量例如为 70-1, 400mg, 或对于 1.7-m 患者为 41-824mg/m²。需要时可重复剂量, 例如每周一次持续 4-10 周, 每周一次持续 8 周, 或每周一次持续 4 周。在维持疗法中需要时, 其还可以较低频率给予, 如每隔一周一次持续若干个月, 或每月或每季度一次持续许多个月。优选的剂量可以包括但不限于 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 以及 24mg/kg。可使用在 1 至 24mg/kg 范围内的任何量。剂量优选地施用多次, 每周一次或两次。可使用 4 周、更优选地 8 周、更优选地 16 周或更久的最小剂量方案。施用方案可以包括在选自以下组成的组的周期上每周施用一次或两次: (i) 每周; (ii) 每隔一周; (iii) 一周疗法, 然后是二、三或四周停药; (iv) 两周疗法, 然后是一、二、三或四周停药; (v) 三周疗法, 然后是一、二、三、四或五周停药; (vi) 四周疗法, 然后是一、二、三、四或五周停药; (vii) 五周疗法, 然后是一、二、三、四或五周停药; 以及 (viii) 每月。周期可重复 4、6、8、10、12、16 或 20 次或更多次。

[0359] 或者, 免疫缀合物可以每 2 或 3 周一个剂量施用, 总共重复至少 3 个剂量。或者, 每周两次, 持续 4-6 周。如果使剂量降至约 200-300mg/m² (对于 1.7m 患者为每剂 340mg, 或者对于 70kg 患者为 4.9mg/kg), 那么其可每周施用一次或甚至两次持续 4 至 10 周。或者, 剂量方案可减少, 即每 2 或 3 周一次持续 2-3 个月。然而, 已确定可通过缓慢静脉内输注施用甚至更高的剂量, 如每周一次或每 2-3 周一次 12mg/kg, 持续重复的给药周期。给药方案可任选地以其它时间间隔重复, 并且剂量可在对剂量和方案适当调整下通过各种肠胃外途径给予。

[0360] 在优选实施方案中, 免疫缀合物用于治疗癌症。癌症的实例包括但不限于癌瘤、淋巴瘤、成胶质细胞瘤、黑素瘤、肉瘤以及白血病、骨髓瘤或淋巴恶性肿瘤。此类癌症的更具体的实例如下所述并且包括: 鳞状细胞癌 (例如, 上皮鳞状细胞癌)、尤因氏肉瘤 (Ewing sarcoma)、韦尔姆斯氏瘤 (Wilms tumor)、星形细胞瘤、肺癌 (包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌和肺鳞状癌)、腹膜癌、胃部癌或胃癌 (包括胃肠癌)、胰腺癌、多形性成胶质细胞瘤、子宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝细胞瘤、肝细胞癌、神经内分泌肿瘤、甲状腺髓样癌、甲状腺分化癌、乳腺癌、卵巢癌、结肠癌、直肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、唾液腺癌、肾脏癌或肾癌、前列腺癌、外阴癌、肛门癌、阴茎癌以及头颈部癌。术语“癌症”包括原发性恶性细胞或肿瘤 (例如, 其细胞未迁移至受试者体内原始恶性疾病或肿瘤部位以外的部位的肿瘤) 和继发性恶性细胞或肿瘤 (例如, 由转移产生的肿瘤, 恶性细胞或肿瘤细胞迁移至与原始肿瘤部位不同的次级部位)。

[0361] 癌症或恶性肿瘤的其它实例包括但不限于: 急性儿童成淋巴细胞性白血病、急性成淋巴细胞性白血病、急性淋巴细胞性白血病、急性骨髓性白血病、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、成人急性骨髓性

白血病、成人何杰金氏淋巴瘤、成人淋巴细胞性淋巴瘤、成人非何杰金氏淋巴瘤、成人原发性肝癌、成人软组织肉瘤、AIDS 相关的淋巴瘤、AIDS 相关的恶性肿瘤、肛门癌、星形细胞瘤、胆管癌、膀胱癌、骨癌、脑干神经胶质瘤、脑瘤、乳癌、肾盂和输尿管癌、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、大脑星形细胞瘤、子宫颈癌、儿童（原发性）肝细胞癌、儿童（原发性）肝癌、儿童急性成淋巴细胞性白血病、儿童急性骨髓性白血病、儿童脑干神经胶质瘤、儿童小脑星形细胞瘤、儿童大脑星形细胞瘤、儿童颅外胚细胞瘤、儿童何杰金氏病、儿童何杰金氏淋巴瘤、儿童下丘脑和视通路神经胶质瘤、儿童成淋巴细胞性白血病、儿童成神经管细胞瘤、儿童非何杰金氏淋巴瘤、儿童松果体和幕上原始神经外胚层瘤、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、慢性淋巴细胞性白血病、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、食道癌、尤因氏肉瘤和相关肿瘤、外分泌腺癌、颅外胚细胞瘤、性腺外胚细胞瘤、肝外胆管癌、眼癌、女性乳癌、戈谢氏病 (Gaucher's Disease)、胆囊癌、胃部癌、胃肠良性肿瘤、胃肠肿瘤、胚细胞瘤、妊娠性滋养层细胞瘤、毛细胞白血病、头颈癌、肝细胞癌、何杰金氏淋巴瘤、高丙种球蛋白血症、下咽癌、肠癌、眼内黑色素瘤、胰岛细胞癌、胰岛细胞胰腺癌、卡波济氏肉瘤 (Kaposi's Sarcoma)、肾癌、喉癌、唇口腔癌、肝癌、肺癌、淋巴增生性疾病、巨球蛋白血症、男性乳癌、恶性间皮瘤、恶性胸腺瘤、成神经管细胞瘤、黑色素瘤、间皮瘤、原发灶隐匿的转移性鳞状颈癌、转移性原发性鳞状颈癌、转移性鳞状颈癌、多发性骨髓瘤、多发性骨髓瘤 / 浆细胞赘瘤、骨髓发育不良综合症、髓细胞性白血病、骨髓性白血病、骨髓增生性疾病、鼻腔和副鼻窦癌、鼻咽癌、成神经细胞瘤、非何杰金氏淋巴瘤、非黑色素瘤皮肤癌、非小细胞肺癌、原发灶隐匿性转移性鳞状颈癌、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 / 骨骼的恶性纤维组织细胞瘤、卵巢上皮癌、卵巢胚细胞瘤、卵巢低恶性潜能肿瘤、胰腺癌、病变蛋白血症、真性红细胞增多症、副甲状腺癌、阴茎癌、嗜铬细胞瘤、垂体肿瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、原发性肝癌、前列腺癌、直肠癌、肾细胞癌、肾盂和输尿管癌、成视网膜细胞瘤、横纹肌肉瘤、唾液腺癌、肉状瘤病肉瘤、塞扎里综合症 (Sezary Syndrome)、皮肤癌、小细胞肺癌、小肠癌、软组织肉瘤、鳞状颈癌、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、肾盂和输尿管的移行细胞癌、移行肾盂和输尿管癌、滋养层细胞瘤、输尿管和肾盂细胞癌、输尿管癌、子宫癌、子宫肉瘤、阴道癌、视通路和下丘脑神经胶质瘤、阴门癌、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、韦尔姆斯氏瘤，和除赘瘤以外位于上列器官系统中的任何其它过度增生性疾病。

[0362] 本文描述和要求保护的方法和组合物可用来治疗恶性或恶变前病状并且用来预防发展成赘生性或恶性病况，包括但不限于以上所述的那些病症。此类用途表明在已知的或怀疑先前进展至瘤形成或癌症的病状中，具体来说，其中非赘生性细胞生长由过度增生、化生组成，或最具体地，出现发育异常（针对此类异常生长病状的综述，参见 Robbins 和 Angell, Basic Pathology, 第2版, W. B. Saunders Co., Philadelphia, 第68-79页 (1976)）。

[0363] 发育异常常为癌症的前兆，并且主要见于上皮中。其为非赘生性细胞生长的最无序形式，涉及个别细胞一致性和细胞结构定向的失去。在存在慢性刺激或炎症的情况下，发育异常特征性地发生。可治疗的发育异常病症包括但不限于无汗性外胚层发育不良、前面部发育不良、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、大脑发育

不良、子宫颈非典型增生、软骨外胚层发育不良、锁骨颅骨发育不良、先天性外胚层发育不良、颅骨干发育不良、颅腕跗发育不良、颅骨干骺端发育不良、牙本质发育异常、骨干结构不良、外胚层发育不良、牙釉质发育不良、脑性眼球发育不全、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、上皮异常增生、面指生殖器发育异常、家族性颌骨纤维性发育异常、家族性白色皱褶性发育异常、纤维肌肉发育异常、骨纤维性结构不良、旺盛骨性发育不良、遗传性肾视网膜发育不良、有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、乳腺发育不良、下颌骨颜面发育不良、干骺端发育不良、蒙蒂尼氏发育异常 (Mondini dysplasia)、单骨纤维性骨发育不良、粘液上皮发育异常、多发性骨骺发育不良、眼耳脊椎发育不良、眼齿指发育不良、眼椎骨发育不全、牙源性发育不良、眼下颌骨发育不良、根尖周牙骨质异常增生、多骨纤维性结构不良、假性软骨发育不全性脊椎骨骺发育不良、视网膜发育不良、中隔 - 眼发育不良、脊椎骨骺发育不良以及脑室径向发育不良。

[0364] 可治疗的另外赘生前病症包括但不限于良性异常增生性病症 (例如良性肿瘤、纤维囊性病状、组织肥大、肠息肉或腺瘤以及食道发育异常)、粘膜白斑病、角化病、博文氏病 (Bowen's disease)、农夫皮肤 (Farmer's Skin)、日光性唇炎以及日光性角化病。

[0365] 在优选的实施方案中,使用本发明的方法来抑制癌症,具体为上文所列的那些癌症的生长、进展和 / 或转移。

[0366] 另外的过度增生性疾病、病症和 / 或病状包括但不限于恶性疾病和相关病症的进展和 / 或转移,如白血病 (包括急性白血病 (例如急性淋巴细胞性白血病、急性骨髓细胞性白血病 (包括成骨髓细胞性、早幼粒细胞性、骨髓单核细胞性、单核细胞性和红白血病)) 和慢性白血病 (例如慢性骨髓细胞性 (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 (例如何杰金氏病和非何杰金氏病)、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瘤,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、胚胎癌、韦尔姆斯氏瘤、子宫颈癌、睾丸癌、肺癌、小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神经胶质瘤、星形细胞瘤、成神经管细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、成血管细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质瘤、脑脊膜瘤、黑素瘤、成神经细胞瘤以及成视网膜细胞瘤。

[0367] 可用免疫缀合物治疗的自体免疫疾病可以包括急性和慢性免疫性血小板减少症、皮炎、西登哈姆氏舞蹈病、重症肌无力、全身性红斑狼疮、狼疮肾炎、风湿热、多内分泌腺综合征、大疱性类天疱疮、糖尿病、亨 - 舍二氏紫癜、链球菌感染后肾炎、结节性红斑、高安氏动脉炎、ANCA 相关的脉管炎、阿狄森氏病、类风湿性关节炎、多发性硬化、结节病、溃疡性结肠炎、多形性红斑、IgA 肾病、多发性结节性动脉炎、强直性脊柱炎、古德帕斯彻氏综合征、血管闭塞性脉管炎、干燥综合征、原发性胆汁性肝硬化、桥本氏甲状腺炎、甲状腺毒症、硬皮病、慢性活动性肝炎、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、肌萎缩性侧索硬化、脊髓痨、巨细胞性动脉炎 / 多肌痛、恶性贫血、快速进行性肾小球性肾炎、牛皮癣或纤维性肺泡炎。

[0368] 试剂盒

[0369] 各种实施方案可涉及含有适用于治疗患者体内的患病组织的组分的试剂盒。示例性试剂盒可含有至少一种如本文所述的缀合抗体或其它靶向部分。如果含有用于施用的组分的组合物未配制用于通过消化道递送,如通过口服递送,那么可包括能够通过一些其它途径递送试剂盒组分的装置。用于如肠胃外递送等应用的一种类型装置为注射器,其用来将组合物注射到受试者体内。还可使用吸入装置。

[0370] 试剂盒组分可包装在一起或分开到两个或更多个容器中。在一些实施方案中,容器可为含有适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用于重构和/或稀释其它试剂的缓冲液。可使用的其它容器包括但不限于袋、盘、盒、管等。试剂盒组分可无菌包装和保持在容器内。可包括的另一个组件为提供给试剂盒使用者的说明书。

实施例

[0371] 本发明的各种实施方案通过以下实施例来说明,而不限制其范围。

[0372] 总论

[0373] 以下使用的缩写有: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-乙氧基羰基-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,4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-甲酸琥珀酰亚胺基酯;TBAF,四丁基氟化铵;TBDMS,叔丁基二甲基氯硅烷。

[0374] 以下实施例中的羟基化合物的氯甲酸酯利用三光气和 DMAP,按照 Moon 等人(J. Medicinal Chem. 51:6916-6926, 2008)中所述的工序制备。萃取处理是指用氯仿、二氯甲烷或乙酸乙酯萃取,并任选地用饱和碳酸氢盐、水和饱和氯化钠洗涤。除非另外指明,否则快速色谱利用 230-400 目硅胶和甲醇-氯甲烷梯度,利用多达 15% v/v 甲醇-二氯甲烷进行。反相 HPLC 以方法 A 或方法 B 进行,方法 A 利用装有柱前过滤器的 7.8×300mm C18HPLC 柱,并利用溶剂梯度为 100% 溶剂 A 至 100% 溶剂 B,以流速 3mL/分钟持续 10 分钟,和以流速 4.5mL/分钟保持在 100% 溶剂 B,持续 5 或 10 分钟;方法 B 利用装有柱前过滤器的 4.6×30mm Xbridge C18, 2.5 μm 柱,利用的溶剂梯度为 100% 溶剂 A 至 100% 溶剂 B,流速 1.5mL/分钟,持续 4 分钟,和 100% 溶剂 B,流速 2mL/分钟,持续 1 分钟。溶剂 A 是 0.3% 乙酸铵水溶液、pH 4.46,而溶剂 B 是 9:1 乙腈-乙酸铵水溶液(0.3%)、pH 4.46。HPLC 由设置在 360nm 和 254nm 下的二重管线内吸光度检测器监测。

[0375] 实施例 1. 制备 CL6-SN-38

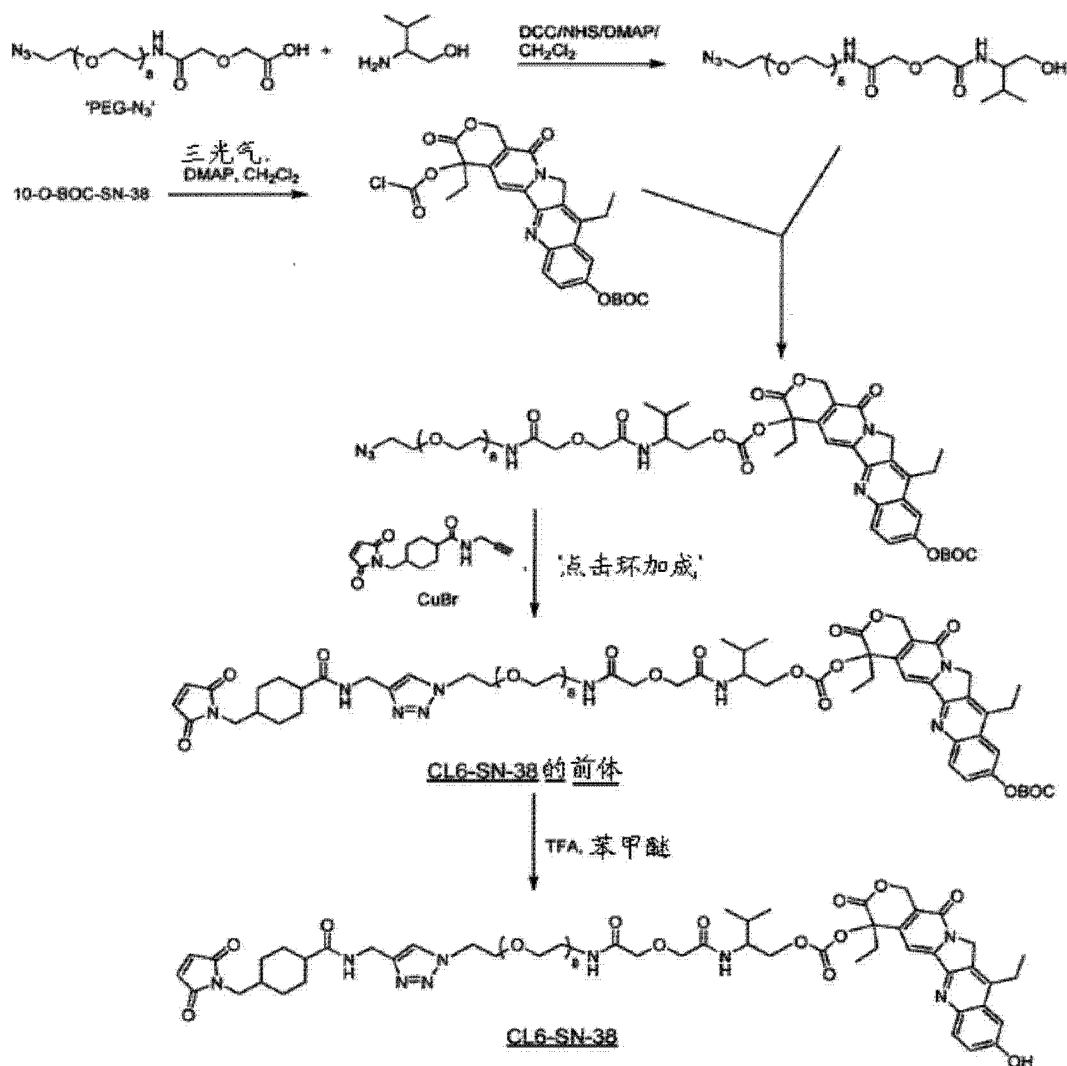
[0376] CL6-SN-38 在路线 -1 中表示。将可商购获得的 O-(2-叠氨基乙基)-O'-(N-二乙醇酰基-2-氨基基)庚乙二醇(‘PEG-N₃’;227mg)以 DCC(100mg)、NHS(56mg)和催化量的 DMAP 在 10mL 二氯甲烷中活化 10min。向此混合物中加入 L-缬氨酸(46.3mg),并且在环境温度下搅拌反应混合物 1h。过滤,随后去除溶剂,并且快速色谱产生 214mg 透明油状物。将此中间物(160mg)与 10-O-BOC-SN-38-20-O-氯甲酸酯反应,后者是利用三光气和 DMAP 从 10-O-BOC-SN-38(123mg)产生的。在 4mL 二氯甲烷中进行偶联反应 10min,并通过快速色谱纯化反应混合物,获得呈泡沫物质状的 130mg(45%产率)产物。HPLC: t_R11.80min;电喷射质谱: M+Na: m/z 1181。

[0377] 点击环加成所需的含马来酰亚胺的炔属试剂, 即 4-(N-马来酰亚胺甲基)-N-(2-丙炔基)环己烷-1-甲酰胺, 通过利用 1.1 当量二异丙基乙胺将 0.107g SMCC 与 0.021mL 炔丙胺 (0.018g; 1.01 当量) 在二氯甲烷中反应而制备。1h 后去除溶剂, 并通过快速色谱纯化产物获得 83mg 产物 (无色粉末)。电喷射质谱以正离子模式显示在 m/e 275(M+H) 处的多个峰和在 m/e 192 处的基峰, 与对 $C_{15}H_{18}N_2O_3$ 计算的结构一致: 275.1390(M+H), 测量值: 275.1394 (准确质量)。

[0378] 将叠氮基中间物 (126mg) 溶解在 DMSO (1.5mL) 和水 (0.4mL) 中, 并与 60mg 4-(N-马来酰亚胺甲基)-N-(2-丙炔基)环己烷-1-甲酰胺和 15mg 溴化亚铜反应, 并在环境温度下搅拌 30min。在对反应混合物处理之后, 快速色谱法得到 116mg (75% 产率) 环加成产物。HPLC: t_R 11.20min; 电喷射质谱: M+H 和 M+Na 分别为 m/z 1433 和 1456。最后, 用 TFA (5mL)、二氯甲烷 (1mL)、苯甲醚 (0.1mL) 和水 (0.05mL) 的混合物进行去保护, 随后用乙醚沉淀, 之后快速色谱法产生为胶状物质的产物 CL6-SN-38。HPLC: t_R 9.98min; 电喷射质谱: M+H 和 M-H (负离子模式) 分别在 m/z 1333 和 1356。

[0379] 路线-1

[0380]



[0381] 实施例 2. 制备 CL7-SN-38

[0382] 该合成在路线-2 中示意性地显示。在氩气下, 将 L-缬氨酸 (40mg) 与可商购获

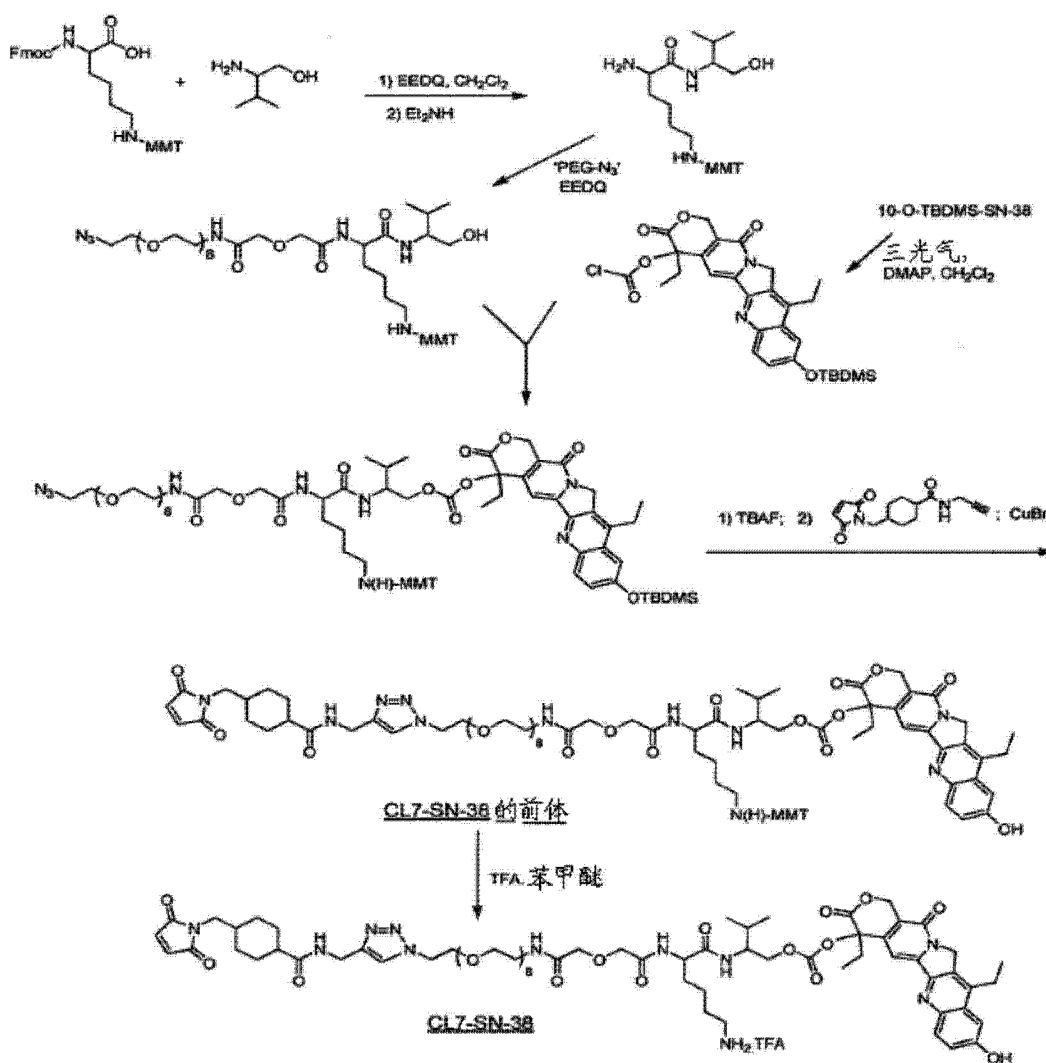
得的 Fmoc-Lys(MMT)-OH(253mg) 和 EEDQ(107mg) 在 10mL 无水二氯甲烷中在环境温度下反应 3h。萃取处理,随后快速色谱法得到呈淡黄色液体状的产物 Fmoc-Lys(MMT)-缬氨酸(200mg; ~ 70%产率)。HPLC: t_R 14.38min;电喷射质谱: M+H: m/z 727。将此中间物(200mg)用二乙胺(10mL)去保护,并快速色谱后获得纯度~ 90%的产物(135mg)。HPLC: t_R 10.91min;电喷射质谱: M+Na 为 m/z 527。在 EEDQ(72mg, 1.1 当量)存在下,将此产物(135mg)与可商购获得的 O-(2-叠氮基乙基)-O'-(N-二乙醇酰基-2-氨基)庚乙二醇(‘PEG-N₃’;150mg, 1.1 当量)在 10mL 二氯甲烷中偶联,并在环境温度下搅拌过夜。由快速色谱法纯化粗制物,获得呈淡黄色油状的 240mg 纯化产物(~ 87%产率)。HPLC: t_R 11.55min;电喷射质谱: M+H 和 M+Na 分别在 m/z 1041 和 1063。

[0383] 将此中间物(240mg)与 10-O-TBDMS-SN-38-20-O-氯甲酸酯反应,后者利用三光气和 DMAP 从 10-O-TBDMS-SN-38(122mg)产生。偶联反应在 5mL 二氯甲烷中进行 10min,并由快速色谱法纯化反应混合物,获得呈淡黄色泡沫状的 327mg 产物。电喷射质谱: M+H 为 m/z 1574。将全部产物与 10mL 二氯甲烷中的 0.25mmol TBAF 反应 5min,并且将反应混合物稀释到 100mL,并用盐水洗涤。

[0384] 将粗产物(250mg)溶解在 DMSO(2mL)和水(0.4mL)中,并与 114mg 4-(N-马来酰亚胺甲基)-N-(2-丙炔基)环己烷-1-甲酰胺(如实施例 1 所述地制备)和 30mg 溴化亚铜反应,在环境温度下搅拌 1h。快速色谱法得到 150mg 倒数第二个中间物。最后,用 TFA(0.5mL)和苯甲醚(0.05mL)在二氯甲烷(5mL)中的混合物将 MMT 基团去保护 3min,随后由快速色谱法纯化,产生呈胶状物质的 69mg CL7-SN-38。HPLC: t_R 9.60min;电喷射质谱: M+H 和 M-H(负离子模式)分别为 m/z 1461 和 1459。

[0385] 路线-2

[0386]



[0387] 实施例 3. 制备 CL6-SN-38-10-O-CO₂Et

[0388] 将实施例 1 的 CL6-SN-38 (55.4mg) 溶于二氯甲烷 (5mL) 中, 并且与氯甲酸乙酯 (13.1mg ; 11.5 μL) 和二异丙基乙胺 (52.5mg ; 71 μL) 反应, 且在氩气下搅拌 20min。用 100mL 二氯甲烷稀释反应混合物, 并用各 100mL 的 0.1M HCl、半饱和碳酸氢钠和盐水洗涤, 且干燥。去除溶剂后, 快速色谱法得到 59mg 标题产物。HPLC : t_R 10.74min ; 准确质量 : 计算值 1404.6457 (M+H) 和 1426.6276 (M+Na) ; 测量值 : 1404.6464 (M+H) 和 1426.6288 (M+Na)。

[0389] 实施例 4. 制备 CL7-SN-38-10-O-CO₂Et

[0390] 利用实施例 3 所述的工序和纯化, 将实施例 2 的 CL7-SN-38 的前体 (80mg) 转化为 10-O-氯甲酸酯。产率 : 60mg。HPLC : t_R 12.32min ; 电喷射质谱 : M+H 和 M-H (负离子模式) 分别为 m/z 1806 和 1804。利用二氯乙酸和苯甲醚在二氯甲烷中将此物质去保护, 获得标题产物。HPLC : t_R 10.37min ; 电喷射质谱 : M+H 在 m/z 1534。

[0391] 实施例 5. 制备 CL6-SN-38-10-O-COR 和 CL7-SN-38-10-O-COR

[0392] 本实施例显示, SN-38 的 10-OH 基团被保护为碳酸酯或酯而不是 'BOC', 从而最终产物容易与抗体缀合而不需要为 10-OH 保护基去保护。体内施用蛋白缀合物后, 此基团容易在生理 pH 条件下去保护。在这些缀合物中, 'R' 可以是取代的烷基如 (CH₂)_n-N(CH₃)₂, 其中 n 是 2-10, 或简单烷基如 (CH₂)_n-CH₃, 其中 n 是 0-10, 或其可以是烷氧基部分如 "CH₃-(CH₂)

n-O-”，其中n是0-10，或取代的烷氧基部分如O-(CH₂)_n-N(CH₃)₂，其中n是2-10，且其中末端氨基任选地呈用于增强水溶性的季盐形式，或“R₁O-(CH₂-CH₂-O)_n-CH₂-CH₂-O-”，其中R₁是乙基或甲基且n是数值为0-10的整数。在后面的目录的最简单形式中，R = “-O-(CH₂)₂-OCH₃”。如果最终衍生物将是碳酸酯，那么这些10-羟基衍生物容易通过用氯甲酸酯处理所选试剂来制备。通常，将含10-羟基的喜树碱（如SN-38）利用三乙胺作为碱、用摩尔当量的氯甲酸酯在二甲基甲酰胺中处理。在这些条件下，20-OH位置不受影响。对于形成10-O-酯，使用所选试剂的酰基氯。利用高级中间物，方便地实现这种衍生化，如对实施例3和4的简单碳酸乙酯所说明的。

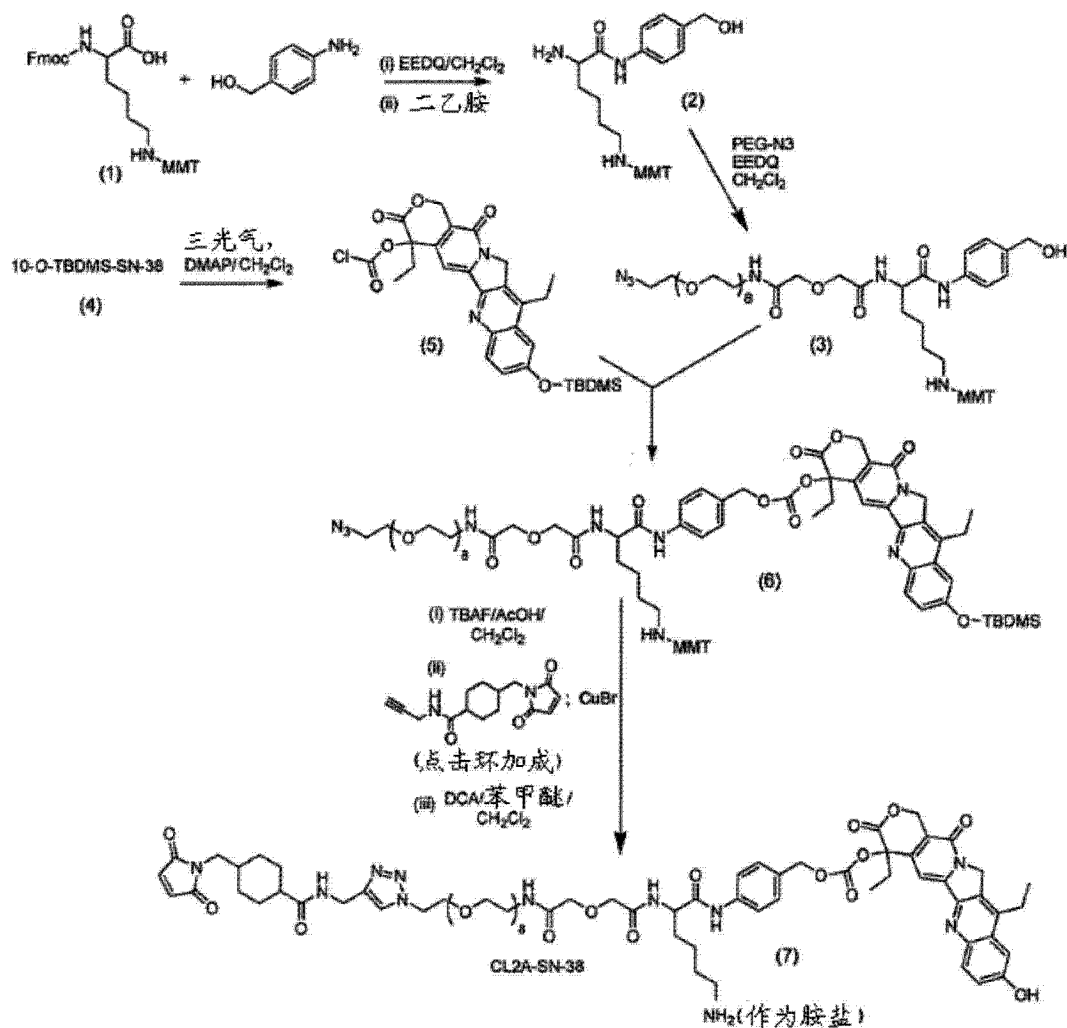
[0393] 实施例6. 制备CL2A-SN-38

[0394] 在室温下向可商购获得的Fmoc-Lys(MMT)-OH(0.943g)、对氨基苄醇(0.190g)在二氯甲烷(10mL)中的混合物中加入EEDQ(0.382g)并搅拌4h。萃取处理，随后快速色谱法产生1.051g白色泡沫状物质。所有HPLC分析都通过第0148段‘总论’中阐明的方法B进行。HPLC保留时间:3.53min.，电喷射质谱在m/e 745.8(M+H)和m/e780.3(M+Cl⁻)处显示峰，与结构一致。将此中间物(0.93g)溶解在二乙胺(10mL)中并搅拌2h。去除溶剂后，在己烷中洗涤残余物，获得呈无色沉淀物的0.6g中间物（路线-3中的(2)）(HPLC测得为91.6%纯的)。HPLC保留时间:2.06min。电喷射质谱在m/e 523.8(M+H)、m/e 546.2(M+Na)和m/e 522.5(M-H)处显示峰。

[0395] 利用EEDQ，将此粗制中间物(0.565g)与可商购获得的O-(2-叠氮基乙基)-O’-(N-二乙醇酰基-2-氨基乙基)庚乙二醇（‘PEG-N3’，0.627g）在二氯甲烷(10mL)中偶联。去除溶剂和快速色谱法产生0.99g产物（路线-3中的(3)；淡黄色油；87%产率）。HPLC保留时间:2.45min。电喷射质谱在m/e 1061.3(M+H)、m/e 1082.7(M+Na)和m/e 1058.8(M-H)处显示峰，与结构一致。在氩气下将此中间物(0.92g)与10-O-TBDMS-SN-38-20-O-氯甲酸酯（路线-3中的(5)）在二氯甲烷(10mL)中反应10min。由快速色谱法纯化混合物，获得呈淡黄色油状的0.944g（路线-3中的(6)；产率=68%）。HPLC保留时间:4.18min。向二氯甲烷(10mL)中的此中间物(0.94g)中加入TBAF(THF中1M, 0.885mL)和乙酸(0.085mL)在二氯甲烷(3mL)中的混合物，然后搅拌10min。用二氯甲烷(100mL)稀释混合物，以0.25M柠檬酸钠和盐水洗涤。去除溶剂产生0.835g黄色油状产物。HPLC保留时间:2.80min.，(99%纯度)。电喷射质谱在m/e 1478(M+H)、m/e 1500.6(M+Na)、m/e 1476.5(M-H)、m/e 1590.5(M+TFA)处显示峰，与结构一致。

[0396] 路线-3:制备CL2A-SN-38

[0397]



[0398] 在 CuBr (0.0083g)、 DIEA (0.01mL) 和三苯基膦 (0.015g) 存在下, 将此叠氮基 - 衍生的 SN-38 中间物 (0.803g) 与 4-(N-马来酰亚胺甲基)-N-(2-丙炔基) 环己烷-1-甲酰胺 (0.233g) 在二氯甲烷 (10mL) 中反应 18h。萃取处理包括用 0.1MEDTA (10mL) 洗涤, 并快速色谱法, 产生呈黄色泡沫状的 0.891g (产率 = 93%), HPLC 保留时间: 2.60min。电喷射质谱在 m/e 1753.3 (M+H)、 m/e 1751.6 (M-H)、1864.5 (M+TFA) 处显示峰, 与结构一致。最后, 用二氯乙酸 (0.3mL) 和苯甲醚 (0.03mL) 在二氯甲烷 (3mL) 中的混合物将倒数第二中间物 (0.22g) 去保护, 随后用乙醚沉淀, 产生呈浅黄色粉末状的 0.18g (97% 产率) CL2A-SN-38 (路线-3 中的 (7))。HPLC 保留时间: 1.88min。电喷射质谱在 m/e 1480.7 (M+H)、1478.5 (M-H) 处显示峰, 与结构一致。

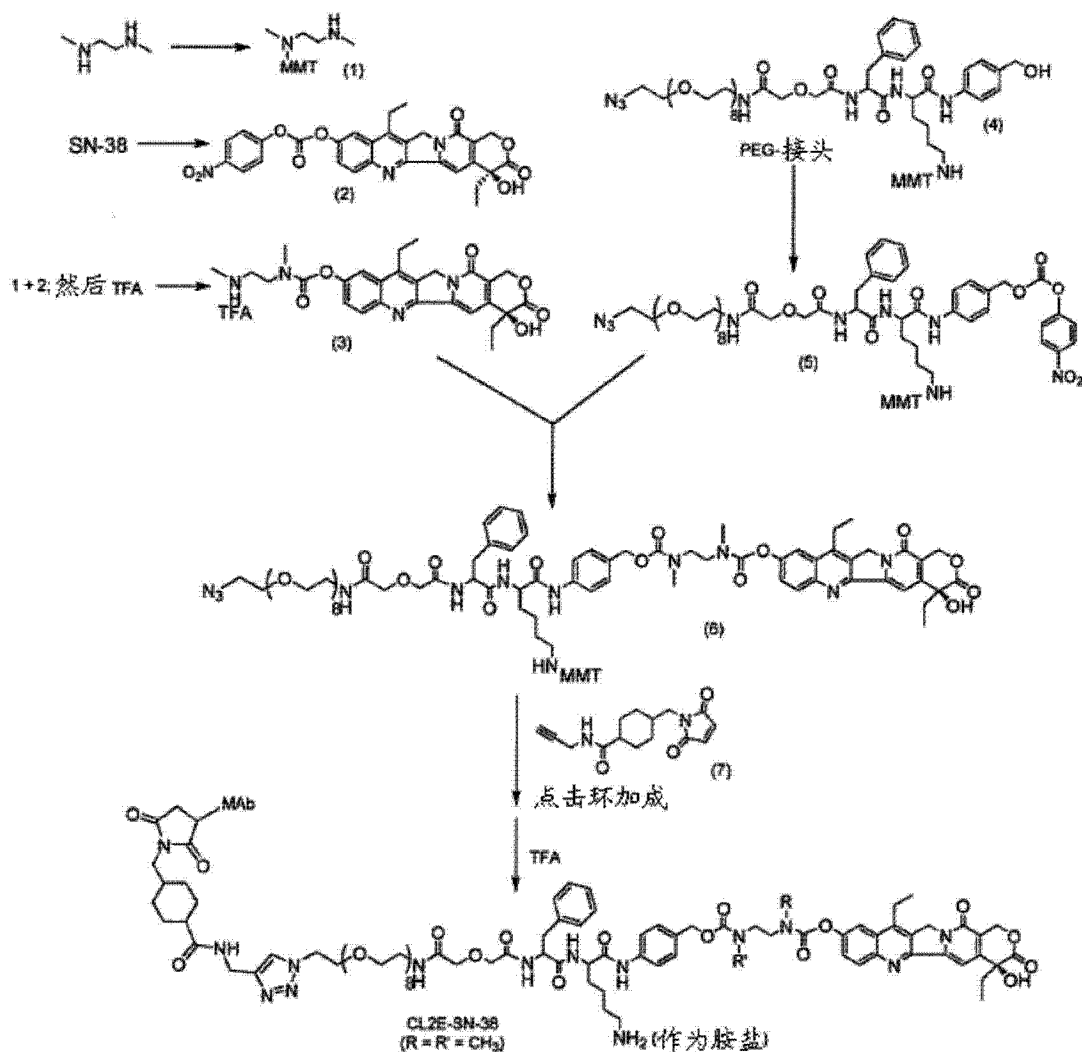
[0399] 实施例 7. 制备 CL2E-SN-38

[0400] 将二氯甲烷 (50mL) 中的 $\text{N,N}'$ -二甲基乙二胺 (3mL) 与单甲氧基三苯甲基氯 (1.7g) 反应。搅拌 1h 后, 减压下去除溶剂, 并且通过萃取处理回收粗产物 (黄色油; 2.13g)。所有 HPLC 分析都通过第 0148 段 '总论' 中阐明的方法 B 进行。HPLC 保留时间: 2.28min。将此中间物 (路线-4 中的 (1); 0.93g) 原位加入活化的 SN-38 中, 并且后者 (路线-4 中的 (2)) 通过在 DMF 中将 SN-38 (0.3g) 与氯甲酸对硝基苯酯 (0.185g) 和 DIEA (0.293mL) 反应 1h 而制备。去除溶剂后, 在失活的硅胶上纯化残余物, 获得呈白色固体的 0.442g。

[0401] 用三氟乙酸 (1mL) 和苯甲醚 (0.1mL) 在二氯甲烷 (5mL) 中的混合物将此中间物 (0.442g) 去保护, 随后用乙醚沉淀, 获得呈白色固体状的 0.197g 产物 (路线-4 中的 (3))。将此中间物 ((3); 0.197g) 与掺入活化的含叠氮化物二肽的 PEG- 接头 (路线-4 中的 (5)) 偶联, 该活化是通过 PEG- 接头 (路线-4 中的 (4); 0.203g) 与双 (4- 硝基苯基) 碳酸酯 (0.153g) 和 DIEA (0.044mL) 在二氯甲烷 (8mL) 中反应而进行的。快速色谱产生 0.2g 呈玻璃固体状的叠氮化物- 衍生的 SN-38 中间物 (路线-4 中的 (6))。HPLC 保留时间: 2.8min。电喷射质谱在 m/e 1740.5 (M+H)、 m/e 1762.9 (M+Na)、 m/e 1774.9 (M+Cl⁻) 处显示峰, 与结构一致。在 CuBr (0.007g)、DIEA (0.008mL) 和三苯基膦 (0.012g) 存在下, 将此中间物 (路线-4 中的 (6); 0.2g) 在二氯甲烷中以 4-(N- 马来酰亚胺甲基)-N-(2- 丙炔基) 环己烷-1- 甲酰胺 (0.067g) 进行点击环加成 18h。处理包括用 0.1M EDTA 处理的反应混合物, 随后快速色谱法产生 0.08g 呈浅黄色泡沫状的倒数第二中间物。HPLC: t_R = 2.63min。电喷射质谱在 m/e 2035.9 (M+Na⁺)、 m/e 2047.9 (M+Cl⁻) 处显示峰, 与结构一致。最后, 用三氟乙酸 (0.2mL)、苯甲醚 (0.12mL) 和水 (0.06mL) 在二氯甲烷 (2mL) 中的混合物将此中间物 (0.08g) 去保护, 随后用乙醚沉淀产生 0.051g 呈浅黄色粉末状的产物 CL17-SN-38 (也称为 CL2E-SN-38) (产率 = 69%)。HPLC 保留时间: 1.95min., ~ 99% 纯度。电喷射质谱在 m/e 1741.1 (M+H)、1775.5 (M+Cl⁻) 处显示峰, 与结构一致。

[0402] 路线-4: 制备 CL2E-SN-38

[0403]



[0404] 实施例 8. 双官能 SN-38 产物与轻度还原的抗体的缀合

[0405] 这些研究中使用抗 CEACAM5 人化 MAb hMN-14 (又名拉贝珠单抗)、抗 CD22 人化 MAb hLL2 (又名依帕珠单抗)、抗 CD20 人化 MAb hA20 (又名维妥珠单抗)、抗 EGP-1 人化 MAb hRS7 以及抗粘蛋白人化 MAb hPAM4 (又名 clivatuzumab)。在含 5.4mM EDTA 的 40mM PBS, pH 7.4 中, 在 37°C (浴) 下将每种抗体用 50 至 70 倍摩尔过量的二硫苏糖醇 (DTT) 还原 45min。由尺寸排阻色谱和 / 或渗滤纯化还原产物, 并且缓冲液更换为 pH 6.5 的适当缓冲液。由 Ellman 检验测定硫醇含量, 并且在 6.5 至 8.5SH/IgG 范围中。或者, 将抗体用三 (2-羧乙基) 膦 (TCEP) 在 pH 5-7 范围内的磷酸盐缓冲液中还原, 随后进行原位缀合。利用 7-15% v/v 的 DMSO 作为共溶剂, 将还原的 MAb 与以下物质反应: ~10 至 15 倍摩尔过量的实施例 1 的 'CL6-SN-38'、或实施例 2 的 'CL7-SN-38'、或实施例 3 的 'CL6-SN-38-10-0-CO₂Et'、或实施例 4 的 'CL7-SN-38-10-0-CO₂Et'、实施例 6 的 CL2A-SN-38、或实施例 7 的 CL2E-SN-38, 并在环境温度下孵育 20min。将缀合物通过离心 SEC, 穿过疏水柱, 最后通过超滤-渗滤纯化。通过在 366nm 下的吸光度测定产物的 SN-38, 并且将其与标准值关联, 而蛋白浓度从 280nm 处的吸光度推断, 对 SN-38 在此波长下的吸光度的溢出校正。以这种方式确定 SN-38/Mb 取代比。将纯化的缀合物作为冻干制剂储存在玻璃小瓶中, 在真空下加帽, 并储存在 -20°C 冰箱中。对这些缀合物中的一些获得 SN-38 摩尔取代比 (MSR), 其通常在 5 至 7 的范围内, 如表 7 所示。

[0406] 表 7 : 在一些缀合物中 SN-38/MAb 摩尔取代比 (MSR)

[0407]

MAb	缀合物	MSR
hMN-14	hMN-14-[CL2A-SN-38], 使用实施例 10 的药物-接头	6.1
	hMN-14-[CL6-SN-38], 使用实施例 1 的药物-接头	6.8
	hMN-14-[CL7-SN-38], 使用实施例 2 的药物-接头	5.9
	hMN-14-[CL7-SN-38-10-O-CO ₂ Et], 使用实施例 4 的药物-接头	5.8
	hMN-14-[CL2E-SN-38], 使用实施例 11 的药物-接头	5.9
hRS7	hRS7-CL2A-SN-38, 使用实施例 10 的药物-接头	5.8
	hRS7-CL7-SN-38, 使用实施例 2 的药物-接头	5.9
	hRS7-CL7-SN-38 (Et), 使用实施例 4 的药物-接头	6.1
hA20	hA20-CL2A-SN-38, 使用实施例 10 的药物-接头	5.8
hLL2	hLL2-CL2A-SN-38, 使用实施例 10 的药物-接头	5.7
hPAM4	hPAM4-CL2A-SN-38, 使用实施例 10 的药物-接头	5.9

[0408] 实施例 9. 在人胰腺癌或结肠癌的临床前模型中的体内治疗功效

[0409] 对带有皮下人胰腺或结肠肿瘤异种移植物的对免疫缺乏免疫力的无胸腺裸小鼠 (雌性) 用特异性 CL2A-SN-38 缀合物或对照缀合物治疗, 或不治疗。观察特异性缀合物的治疗功效。图 1 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) 和未治疗对照更好的功效。类似地, 在人胰腺癌的 BXP3 模型中, 特异性 hRS7-CL2A-SN-38 显示比对照治疗更好的治疗功效 (图 2)。同样, 在人结肠癌的侵袭性 LS174T 模型中, 用特异性 hMN-14-CL2A-SN-38 治疗比无治疗更有效 (图 3)。

[0410] 实施例 10. 在裸小鼠中使用 hMN-14-[CL1-SN-38] 和 hMN-14-[CL2-SN-38] 体内治疗 GW-39 人结肠肿瘤的肺转移

[0411] 通过静脉内注射 GW-39 人结肠肿瘤混悬液在裸小鼠中建立结肠癌瘤的肺转移模型, 并且在 14 天之后开始治疗。特异性抗 CEACA M5 抗体缀合物、hMN14-CL1-SN-38 和 hMN14-CL2-SN-38、以及非靶向的抗 CD22MAb 对照缀合物、hLL2-CL1-SN-38 和 hLL2-CL2-SN-38 以及 hMN14 与 SN-38 的等剂量混合物是在 q4d×8 的剂量方案下使用不同的剂量来注射。图 4 (MSR = SN-38/ 抗体摩尔取代比) 显示由于 hMN-14 缀合物所造成的选择性治疗效果。在 250 μg 的相等剂量下, 用 hMN14-CL1-SN-38 或 hMN14-CL2-SN-38 治疗的小鼠显示大于 107 天的中值存活期。用对照缀合抗体 hLL2-CL1-SN-38 和 hLL2-CL2-SN-38 (其不特异性地靶向肺癌细胞) 治疗的小鼠显示 56 和 77 天的中值存活期, 而用非缀合的 hMN14IgG 和游离的 SN-38 治疗的小鼠显示 45 天的中值存活期, 与 43.5 天的未处理的盐水对照相当。清楚地看见缀合的癌细胞靶向的抗体-SN-38 缀合物的有效性的显著和惊人提高, 其与非缀合抗体和游离的化疗剂单独相比基本上更有效。还观察到缀合抗体的治疗性效果的剂量-反应性。这些结果表明 SN-38- 抗体缀合物与非缀合抗体和游离 SN-38 的组合效果相比在同一体内人肺癌系统中的明显优越性。

[0412] 实施例 11. 使用人源化抗 TROP-2IgG-SN-38 缀合物有效治疗各种各样的上皮癌

[0413] 摘要

[0414] 此项研究的目的是评价 SN-38 抗 TROP-2 抗体-药物缀合物 (ADC) 针对若干人实体肿瘤类型的功效,并且评定其在小鼠和猴子中的耐受性,后者具有类似于人的针对 hRS7 的组织交叉反应性。两种 SN-38 衍生物,CL2-SN-38 和 CL2A-SN-38,缀合至抗 TROP-2- 人源化抗体 hRS7。体外表征所述免疫缀合物的稳定性、结合以及细胞毒性。在五种不同的表达 TROP-2 抗原的人实体肿瘤-异种移植模型中测试功效。毒性是在小鼠和食蟹猴中评定。

[0415] 两种 SN-38 衍生物的 hRS7 缀合物在药物取代 (~ 6)、细胞结合 ($K_d \sim 1.2 \text{ nmol/L}$)、细胞毒性 ($IC_{50} \sim 2.2 \text{ nmol/L}$) 以及体外血清稳定性 ($t_{1/2} \sim 20$ 小时) 方面是等效的。细胞暴露于 ADC 表明信号传导途径导致 PARP 裂解,但是注意到在 p53 和 p21 上调中针对游离 SN-38 的差异。当与非靶向的对照 ADC 相比时,在带有 Calu-3 ($P \leq 0.05$)、Capan-1 ($P < 0.018$)、BxPC-3 ($P < 0.005$) 以及 COLO 205 肿瘤 ($P < 0.033$) 的小鼠中由 hRS7-SN-38 在无毒剂量下产生显著的抗肿瘤效果。小鼠耐受 $2 \times 12 \text{ mg/kg}$ (SN-38 等效物) 的剂量,仅在 ALT 和 AST 肝酶水平上有短暂的升高。以 $2 \times 0.96 \text{ mg/kg}$ 输注的食蟹猴仅在血液计数上展现暂时的降低,不过重要的是,所述值并没有降到正常范围之下。

[0416] 得出以下结论,抗 TROP-2hRS7-CL2A-SN-38ADC 提供针对一定范围的人实体肿瘤类型的显著且特定的抗肿瘤效果。其在猴子中耐受良好,其中组织 TROP-2 表达类似于人 (Cardillo 等人,2011,Clin Cancer Res 17:3157-69)。

[0417] 转化关联性

[0418] 具有实体肿瘤的患者成功的依立替康治疗有局限性,很大程度上是因为 CPT-11 前药向活性 SN-38 代谢物的低转化率。其他人检验了非靶向形式的 SN-38,作为避开对于此转化的需要和 SN-38 被动地递送到肿瘤中的手段。我们将 SN-38 共价地缀合至人源化抗 TROP-2 抗体 hRS7。此抗体-药物缀合物在包括非小细胞肺癌、胰腺癌、结肠直肠癌以及鳞状细胞肺癌范围内的 s.c. 人癌症异种移植模型中具有特异性抗肿瘤效果,所有都是在无毒剂量下 (例如, $\leq 3.2 \text{ mg/kg}$ 累积的 SN-38 等效剂量)。

[0419] TROP-2 广泛地在许多上皮癌中表达,但是也在一些正常组织中表达,并且因此在食蟹猴中进行剂量递增研究以评定此缀合物的临床安全。猴子耐受 $24 \text{ mg SN-38 等效物/kg}$,仅有小的可逆性毒性。鉴于其肿瘤靶向和安全概况,hRS7-SN-38 可提供对于防治对依立替康有反应的实体肿瘤的改善。

[0420] 引言

[0421] 人滋养层细胞表面抗原 (TROP-2),又名 GA733-1 (胃抗原 733-1)、EGP-1 (上皮糖蛋白-1) 以及 TACSTD2 (肿瘤相关钙信号转导蛋白) 在多种人癌瘤中表达并且在一些与侵袭性更大的疾病有关的癌瘤中具有预后意义 (参见,例如 Alberti 等人,1992,Hybridoma 11:539-45;Stein 等人,1993,Int J Cancer 55:938-46;Stein 等人,1994,Int J Cancer 增刊 8:98-102)。TROP-2 在以鼠科 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强增殖、迁移和体外无贴壁依赖性生长、以及提高的生长率,且存在以下证据:增加的体内 Ki-67 表达和更高的转移可能性 (Cubas 等人,2010,Mol Cancer 9:253)。

[0422] TROP-2 抗原在许多上皮癌中的分布使其成为一个有吸引力的治疗性靶标。Stein 和同事 (1993,Int J Cancer 55:938-46) 表征了一种称为 RS7-3G11 (RS7) 的抗体,其结合至 EGP-1,其存在于许多实体肿瘤中,但是所述抗原也在一些正常组织中表达,通常以降低

的强度或在限制的区域中。使用放射性标记的 RS7 的靶向和治疗性功效在许多人肿瘤异种移植物中有记载 (Shih 等人, 1995, Cancer Res 55:5857s-63s; Stein 等人, 1997, Cancer 80:2636-41; Govindan 等人, 2004, Breast Cancer Res Treat 84:173-82), 但是这种内化抗体在非缀合形式下不显示治疗活性 (Shih 等人, 1995, Cancer Res 55:5857s-63s)。然而, 在体外其显示针对 TROP-2 阳性肿瘤的抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 活性。

[0423] 我们报道了使用偶联到 SN-38 的若干衍生物的抗 CEACAM5 (CD66e) IgG 来制备抗体-药物缀合物 (ADC), SN-38 是一种拓扑异构酶 -I 抑制剂, 它是依立替康或 CPT-11 的活性组分 (Moon 等人, 2008, J Med Chem 51:6916-26; Govindan 等人, 2009, Clin Cancer Res 15:6052-61)。衍生物在它们的体外血清稳定性特性方面不同, 并且体内研究发现一种形式 (称为 CL2) 在预防或阻止人结肠和胰腺癌异种移植物的生长中比具有或多或少稳定性的其它连接物更有效。

[0424] 重要的是, 这些效果出现在无毒剂量下, 初始测试未能确定剂量限制性毒性 (Govindan 等人, 2009, Clin Cancer Res 15:6052-61)。这些结果是令人鼓舞的, 也是惊人的, 因为 CEACAM5 抗体不内化, 这是一种被认为对 ADC 的成功至关重要的特性。我们推测抗 CEACAM5-SN-38 缀合物的治疗活性可能与抗体局部化之后 SN-38 在肿瘤内的缓慢释放有关。因为依立替康在当细胞在其生长周期的 S 期期间暴露时表现良好, 所以预期持续释放改善反应。实际上, 偶联到非靶向的血浆增量剂如聚乙二醇 (PEG) 或胶束的 SN-38 已显示在依立替康或 SN-38 单独的情况下改善功效 (例如 Koizumi 等人, 2006, Cancer Res 66:10048-56), 对此机制提供额外支持。

[0425] 考虑到 RS7 抗体对上皮癌的宽反应性及其内化能力, 我们假设 RS7-SN-38 缀合物不仅可获益于药物的持续释放, 而且获益于直接细胞内递送。因此, 我们使用人源化形式的鼠科 RS7 抗体 (hRS7) 制备并测试 SN-38 缀合物的功效。对 SN-38 衍生物稍作修改 (Govindan 等人, 2009, Clin Cancer Res 15:6052-61), 这改善了缀合物的品质而不会改变其体外稳定性或其体内功效。这种新的衍生物 (称为 CL2A) 是目前偶联到抗体的 SN-38 的优选试剂。在本文中, 我们示出了缀合物在以无毒剂量植入裸小鼠中的若干上皮癌细胞系中的功效, 其它研究显示可以耐受实质更高的剂量。更重要的是, 也表达在与人类类似的组织中的 TROP-2 的猴子中的毒性研究显示 hRS7-SN-38 在比小鼠中的治疗有效剂量略微更高量下是被耐受的, 提供证据表明这种缀合物是用于治疗具有大范围上皮癌的患者有前景的试剂。

[0426] 材料和方法

[0427] 细胞系、抗体及化疗剂。用于此研究中的所有癌细胞系都是购自美国典型培养物保藏中心。这些包括 Calu-3 (非小细胞肺癌)、SK-MES-1 (鳞状细胞肺癌)、COLO 205 (结肠腺癌)、Capan-1 和 BxPC-3 (胰腺癌) 以及 PC-3 (前列腺癌)。人源化 RS7IgG 以及对照人源化抗 CD20 (hA20IgG, 维妥珠单抗) 和抗 CD22 (hLL2IgG, 依帕珠单抗) 抗体是在 Immunomedics, Inc. Irinotecan 处制备。依立替康 (20mg/mL) 是从 Hospira, Inc. 处获得。

[0428] SN-38 免疫缀合物和体外方面。CL2-SN-38 的合成先前已经描述 (Moon 等人, 2008, J Med Chem 51:6916-26)。其与 hRS7IgG 的缀合和血清稳定性如所描述地进行 (Moon 等人, 2008, J Med Chem 51:6916-26; Govindan 等人, 2009, Clin Cancer Res 15:6052-61)。CL2A-SN-38 (M.W. 1480) 的制备及其 hRS7 缀合物、以及稳定性、结合及细胞毒

性研究如先前所描述地进行 (Moon 等人, 2008, J Med Chem 51:6916-26)。制备细胞溶解产物并且针对 p21^{Waf1/Cip}、p53 及 PARP (聚 ADP 核糖聚合酶) 进行免疫印迹。

[0429] 体内治疗性研究。对于所有动物研究, SN-38 免疫缀合物和依立替康的剂量是以 SN-38 等效物示出。基于 6 的平均 SN-38/IgG 取代比, 施用于 20-g 小鼠 (25mg/kg) 的一个 500 μ g 剂量的 ADC 含有 0.4mg/kg 的 SN-38。依立替康剂量同样显示为 SN-38 等效物 (即 40mg 依立替康/kg 等效于 24mg/kg SN-38)。Ncr 雌性无胸腺裸 (nu/nu) 小鼠, 4 至 8 周龄; 以及雄性 Swiss-Webster 小鼠, 10 周龄, 均购自 Taconic Farms。耐受性研究是由 SNBL USA, Ltd 在食蟹猴 (*Macaca fascicularis*; 2.5 - 4kg 雄性和雌性) 中进行。动物被皮下植入不同的人癌细胞系。使用卡尺测量 2 个尺寸来测定肿瘤体积 (TV), 体积被定义为: $L \times w^2/2$, 其中 L 是肿瘤的最长尺寸且 w 是最短尺寸。当疗法开始时肿瘤尺寸范围在 0.10 与 0.47cm³之间。在每个实验中的治疗方案、剂量及动物数量在结果中描述。冻干的 hRS7-CL2A-SN-38 和对照 ADC 被重构并且根据需要在无菌盐水中稀释。所有试剂都是腹腔内施用 (0.1mL), 依立替康除外, 它是静脉内施用。所述给药方案受我们在先调查研究的影响, 其中 ADC 每 4 天给予一次或每周给予两次, 持续变化的时间长度 (Moon 等人, 2008, J Med Chem 51:6916-26; Govindan 等人, 2009, Clin Cancer Res 15:6052-61)。此给药频率反映了对缀合物的体外血清半衰期的考虑, 以便允许对 ADC 的更连续的暴露。

[0430] 统计学。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是基于曲线下面积 (AUC)。个体肿瘤生长的概况是经由线性 - 曲线建模获得。f- 检验用于在生长曲线的统计分析之前确定组间的方差齐性。2 尾 t- 测验被用于评定各个治疗组和对照组之间的统计显著性, 盐水对照组除外, 其使用 1 尾 t- 测验 (显著性在 $P \leq 0.05$ 下)。AUC 的统计比较仅在组内的首个动物因为进展而被施以安乐死之时进行。

[0431] 药物动力学和生物分布。将 ¹¹¹In 放射性标记的 hRS7-CL2A-SN-38 和 hRS7IgG 注射到带有 s. c. SK-MES-1 肿瘤 ($\sim 0.3\text{cm}^3$) 的裸小鼠中。一组静脉内注射 20 μ Ci (250- μ g 蛋白) 的 ¹¹¹In-hRS7-CL2A-SN-38, 而另一组接受 20 μ Ci (250- μ g 蛋白) 的 ¹¹¹In-hRS7IgG。在各个时点, 使小鼠 (每时点 5 只) 麻醉, 经由心内穿刺术放血, 然后施以安乐死。将肿瘤和各个组织移除, 称重, 并且通过 γ 闪烁计数以确定每克组织的百分比注射剂量 (% ID/g)。第三组在施用 ¹¹¹In-hRS7-CL2A-SN-38 之前 3 天注射 250 μ g 未作标记的 hRS7-CL2A-SN-38, 并且同样进行尸检。在使用 f- 检验确定方差齐性之后, 2 尾 t- 测验被用于比较 hRS7-CL2A-SN-38 与 hRS7IgG 摄取。使用 WinNonLin 软件 (Parsight Corp.) 对血液清除率进行药物动力学分析。

[0432] 在 Swiss-Webster 小鼠和食蟹猴中的耐受性。简言之, 小鼠被分为 4 个组, 每个组在第 0 天和第 3 天接受 2mL 乙酸钠缓冲液对照 i. p. 注射液或 3 个不同剂量的 hRS7-CL2A-SN-38 (4、8 或 12mg/kg 的 SN-38) 并且血清收集, 如结果中所述。食蟹猴 (3 只雄性和 3 只雌性; 2.5-4.0kg) 被施用 2 个不同剂量的 hRS7-CL2A-SN-38。剂量、时间以及被放血以便评价可能的血液学毒性和血清化学特性的猴子的数量在结果中描述。

[0433] 结果

[0434] hRS7-CL2A-SN-38 的稳定性和效力。两种不同的连接物被用于将 SN-38 缀合至 hRS7IgG。第一个被称为 CL2-SN-38 并且先前已有描述 (Moon 等人, 2008, J Med Chem 51:6916-26; Govindan 等人, 2009, Clin Cancer Res 15:6052-61)。对 CL2 接头的合成做出

的小改变是除去苯丙氨酸部分。此变化使合成简化,但不影响缀合结果(例如,CL2-SN-38和CL2A-SN-38每IgG分子并入~6SN-38)。并排比较发现在血清稳定性、抗原结合或体外细胞毒性方面没有显著差异(未示出)。

[0435] 为了证实SN-38接头从CL2到CL2A的变化不会影响体内效能,将在带有COLO 205或Capan-1肿瘤(未示出)的小鼠中比较hRS7-CL2A与hRS7-CL2-SN-38,分别使用0.4mg或0.2mg/kg SN-38,每周两次×4周,并且在两个研究中的初始肿瘤尺寸是0.25cm³。hRS7-CL2A和CL2-SN-38缀合物两者与未处理的(AUC_{第14天} P<0.002 比对盐水,在COLO 205模型中;AUC_{第21天} P<0.001 比对盐水,在Capan-1模型中)且非靶向的抗CD20对照ADC, hA20-CL2A-SN-38(AUC_{第14天} P<0.003,在COLO-205模型中;AUC_{第35天} P<0.002,在Capan-1模型中)相比显著地抑制肿瘤生长。在Capan-1模型中的研究结束时(第140天),50%用hRS7-CL2A-SN-38治疗的小鼠和40%的hRS7-CL2-SN-38小鼠不含肿瘤,而仅20%的hA20-ADC治疗动物没有明显病征。重要的是,在两个肿瘤模型中在2种特异性缀合物之间的功效方面不存在差异。

[0436] 作用机制。体外细胞毒性研究表明hRS7-CL2A-SN-38具有针对若干不同实体肿瘤系的在nmol/L范围的IC₅₀值(表8)。游离SN-38的IC₅₀在所有细胞系中比缀合物更低。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,但是ADC比对游离SN-38的IC₅₀比率在更高的TROP-2表达细胞中是降低的,很可能反映了当存在更多抗原时增强的内化药物的能力。

[0437] 表8. 在若干实体肿瘤系中TROP-2的表达以及SN-38和hRS7-SN-38的体外细胞毒性

[0438]

细胞系	经由FACS的TROP-2表达		细胞毒性结果				
	中值荧光 (背景)	阳性 百分比	SN-38	95% CI	hRS7- SN-38 ^a	95% CI	ADC/游离 SN-38比率
			IC ₅₀ (nmol/L)	IC ₅₀ (nmol/L)	IC ₅₀ (nmol/L)	IC ₅₀ (nmol/L)	
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-1	44.0 (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

[0439] ^aIC₅₀值显示为hRS7-SN-38的SN-38等效物

[0440] 已知SN-38在细胞中激活若干信号传导途径,从而导致细胞凋亡。初始研究体外检验早期信号传导事件中所涉及的2种蛋白质(p21^{Waf1/Cip1}和p53)的表达以及1个晚期细胞凋亡事件[聚ADP核糖聚合酶(PARP)的裂解](未示出)。在BxPC-3中,SN-38导致p21^{Waf1/Cip1}表达增加20倍,而hRS7-CL2A-SN-38仅导致10倍增加,此发现与游离SN-38在此细胞系中的更高活性一致(表8)。然而,hRS7-CL2A-SN-38在Calu-3中增加p21^{Waf1/Cip1}表达超过游离SN-38的2倍(未示出)。

[0441] 在 p53 表达中观察到 hRS7-CL2A-SN-38- 与游离的 SN-38- 介导的信号传导事件之间的较大不一致。在 BxPC-3 和 Calu-3 两者中,用游离 SN-38 的 p53 的上调直到 48 小时才明显,而 hRS7-CL2A-SN-38 在 24 小时之内上调 p53(未示出)。另外,在暴露于 ADC 的细胞中的 p53 表达与 SN-38 相比在两个细胞系中更高(未示出)。有趣的是,虽然 hRS7IgG 对 p21^{Waf1/Cip1} 表达没有可感知的作用,但其诱发 p53 在 BxPC-3 和 Calu-3 两者中的上调,但是仅在 48 小时暴露之后。依据后面的细胞凋亡事件,PARP 的裂解当用 SN-38 或缀合物孵育时在两个细胞系中是明显的(未示出)。裂解的 PARP 的存在在 BxPC-3 中在 24 小时时更高,这与 p21 的高表达及其下降的 IC₅₀ 有关。在 ADC 中用游离 SN-38 的更高裂解程度与细胞毒性发现一致。

[0442] hRS7-SN-38 的功效。因为 TROP-2 广泛地在若干人癌瘤中表达,所以在若干不同的人癌症模型中进行研究,从评价 hRS7-CL2-SN-38 连接物开始,但稍后使用 CL2A 连接物的缀合物。每 4 天 × 4 给予 0.04mg SN-38/kg 的 hRS7-CL2-SN-38 的带有 Calu-3 的裸小鼠与施用相等量的 hLL2-CL2-SN-38(分别地, TV = 0.14 ± 0.22cm³ 比 0.80 ± 0.91cm³; AUC_{第 42 天} P < 0.026; 图 5A) 相比具有显著改善的反应。当剂量增加到 0.4mg/kg SN-38 时观察到剂量-反应。在此更高的剂量水平下,所有给予特异性 hRS7 缀合物的小鼠在 28 天内“治愈”,且其余的直到第 147 天研究结束时才不含肿瘤,而肿瘤在用不相关的 ADC 治疗的动物中重新生长(特异性比不相关的 AUC_{第 98 天}: P = 0.05)。在接受 hRS7IgG 与 SN-38 的混合物的小鼠中,肿瘤到第 56 天进展 > 4.5 倍 (TV = 1.10 ± 0.88cm³; AUC_{第 56 天} P < 0.006 比 hRS7-CL2-SN-38)。

[0443] 还在人结肠 (COLO 205) 和胰腺 (Capan-1) 肿瘤异种移植物中检验了功效。在带有 COLO 205 肿瘤的动物中(图 5B), hRS7-CL2-SN-38 (0.4mg/kg, q4d × 8) 在 28 天治疗期内预防肿瘤生长,与对照抗 CD20ADC (hA20-CL2-SN-38) 或 hRS7IgG 相比显著减小肿瘤(分别地, TV = 0.16 ± 0.09cm³, 1.19 ± 0.59cm³, 及 1.77 ± 0.93cm³; AUC_{第 28 天} P < 0.016)。依立替康 (24mg SN-38/kg, q2d × 5) 的 MTD 与 hRS7-CL2-SN-38 一样有效,因为小鼠血清可比人血清更高效地将依立替康转化为 SN-38,但是在依立替康中的 SN-38 剂量 (2,400 μg 累积的) 比缀合物 (总共 64 μg) 大 37.5 倍。

[0444] 带有 Capan-1 的动物当以与 hRS7-CL2-SN-38 缀合物相等的 SN-38 剂量给予时对单独依立替康没有显著反应(例如,在第 35 天,平均肿瘤尺寸在给予 0.4mg SN-38/kg hRS7-SN-38 的动物中是 0.04 ± 0.05cm³, 对比在给予 0.4mg/kg SN-38 的依立替康治疗动物中是 1.78 ± 0.62cm³; AUC_{第 35 天} P < 0.001; 图 5C)。当依立替康剂量比 4mg/kg SN-38 增加 10 倍时,反应得到改善,但是仍然不如在 0.4mg/kg SN-38 剂量水平下的缀合物显著 (TV = 0.17 ± 0.18cm³ 比 1.69 ± 0.47cm³, AUC_{第 49 天} P < 0.001)。相等剂量的非靶向 hA20-CL2-SN-38 与依立替康治疗动物相比也具有显著的抗肿瘤效果,但是特异性 hRS7 缀合物比不相关的 ADC 显著更佳 (TV = 0.17 ± 0.18cm³ 比 0.80 ± 0.68cm³, AUC_{第 49 天} P < 0.018)。

[0445] 然后将用 hRS7-CL2A-SN-38 ADC 的研究扩展到人上皮癌的 2 种其它模型。在带有 BxPC-3 人胰腺肿瘤的小鼠(图 5D)中,与用盐水或相等量的非靶向 hA20-CL2A-SN-38(分别地, TV = 0.24 ± 0.11cm³ 比 1.17 ± 0.45cm³ 和 1.05 ± 0.73cm³; AUC_{第 21 天} P < 0.001)、或比 SN-38 等效剂量高 10 倍给予的依立替康(分别地, TV = 0.27 ± 0.18cm³ 比 0.90 ± 0.62cm³; AUC_{第 25 天} P < 0.004) 治疗的对照小鼠相比, hA20-CL2A-SN-38 再次显著地抑制肿瘤生长。有

趣的是,在用 0.4mg/kg ADC 治疗的带有 SK-MES-1 人鳞状细胞肺肿瘤的小鼠(图 5E)中,肿瘤生长抑制优于盐水或非缀合 hRS7IgG(分别地,TV = $0.36 \pm 0.25\text{cm}^3$ 比对 $1.02 \pm 0.70\text{cm}^3$ 和 $1.30 \pm 1.08\text{cm}^3$;AUC_{第28天}, $P < 0.043$),但是非靶向 hA20-CL2A-SN-38 或依立替康的 MTD 提供与特异性 hRS7-SN-38 缀合物相同的抗肿瘤效果。在所有鼠科研究中,hRS7-SN-38ADC 依据体重减轻耐受良好(未示出)。

[0446] hRS7-CL2A-SN-38 的生物分布。使用各自的 ^{111}In 标记底物在具有 SK-MES-1 人鳞状细胞肺癌异种移植物的老鼠(未示出)中比较 hRS7-CL2A-SN-38 或非缀合 hRS7IgG 的生物分布。进行药物动力学分析以确定 hRS7-CL2A-SN-38 相对于非缀合 hRS7 的清除率(未示出)。ADC 比相同量的非缀合 hRS7 清除的更快,ADC 展现~40%较短的半衰期和平均滞留时间。尽管如此,此对肿瘤摄取仍具有最小影响(未示出)。虽然在 24 小时和 48 小时时点处存在显著差异,但到 72 小时(峰值摄取)两种试剂在肿瘤中的量是相似的。在正常组织中,肝和脾的差异是最惊人的(未示出)。在注射后 24 小时,在肝脏中 hRS7-CL2A-SN-38 比 hRS7IgG 多 >2 倍。相反,在脾脏中,在峰值摄取(48 小时时点)下存在的亲本 hRS7IgG 比 hRS7-CL2A-SN-38 多 3 倍。在其余组织中的摄取和清除率通常反映在血液浓度方面的差异。

[0447] 因为对于疗法给予每周两次的剂量,所以检验在注射 ^{111}In 标记的抗体之前 3 天首先接受 0.2mg/kg (250 μg 蛋白)的 hRS7ADC 的预剂量的动物组中的肿瘤摄取。在预剂量小鼠中的肿瘤摄取在每个时点与不接受预剂量的动物相比实质上是减少的(例如,在不给予预剂量的动物中在 72 小时时预剂量肿瘤摄取是 $12.5\% \pm 3.8\% \text{ID/g}$ 比对 $25.4\% \pm 8.1\% \text{ID/g}$; $P = 0.0123$)。预剂量对血液清除率或组织摄取没有可感知的影响(未示出)。这些研究表明在一些肿瘤模型中,特异性抗体的肿瘤增殖物(accretion)可减少了一个或多个在前剂量,这或许解释了为何治疗反应的特异性可随着 ADC 剂量的增加而降低以及为何不指明进一步的剂量增加。

[0448] hRS7-CL2A-SN-38 在 Swiss-Webster 小鼠和食蟹猴中的耐受性。Swiss-Webster 小鼠耐受 3 天内的 2 个剂量,各自是 4、8 及 12mg SN-38/kg 的 hRS7-CL2A-SN-38,具有最小的暂时失重(未示出)。没有出现造血毒性并且血清化学特性仅表现出升高的天冬氨酸转氨酶(AST)和丙氨酸转氨酶(未示出)。治疗之后第七天,AST 在所有 3 个治疗组中升到正常水平之上(>298U/L)(未示出),最大比例的小鼠在 $2 \times 8\text{mg/kg}$ 组中。然而,到治疗后第 15 天,大部分动物在正常范围内。在治疗 7 天之内以及根据第 15 天标准化的证据,ALT 水平也在正常范围以上(>77U/L)(未示出)。来自所有这些小鼠的肝脏不显示组织损伤的组织学证据(未示出)。就肾脏功能而言,在治疗组中仅葡萄糖和氯化物水平稍微升高。在 $2 \times 8\text{mg/kg}$ 下,7 只小鼠中有 5 只具有稍微升高的葡萄糖水平(范围是 273 - 320mg/dL,正常值的上端是 263mg/dL),到注射后第 15 天才恢复到正常水平。类似地,氯化物水平在 2 个最高剂量组(57%在 $2 \times 8\text{mg/kg}$ 组中并且 100%小鼠在 $2 \times 12\text{mg/kg}$ 组中)中稍微升高,范围从 116 到 127mmol/L(正常范围的上端是 115mmol/L),并且在注射后第 15 天保持升高。这也可以表现出胃肠道毒性,因为大部分氯化物是经由肠吸收而获得;然而,在结束时,在所检验的任何器官系统中不存在组织损伤的组织学证据(未示出)。

[0449] 因为小鼠不表达由 hRS7 结合的 TROP-2,所以需要更合适的模型来确定 hRS7 缀合物对于临床使用的潜力。免疫组织学研究揭示在人和食蟹猴两者中在多个组织(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、膀胱以及子宫；未示出）中的结合。基于此交叉反应性，在猴子中进行耐受性研究。

[0450] 接受 $2 \times 0.96\text{mg SN-38/kg}$ 的 hRS7-CL2A-SN-38 的组在输注之后和研究结束过程中没有重大临床事件。重量减轻没有超过 7.3% 并且到第 15 天回到适应重量。暂时的减少在大多数血细胞计数数据中观察到（未示出），但是值没有降到正常范围以下。在血清化学特性中未发现异常值。在第 11 天（末次注射之后第 8 天）尸检的动物的组织病理学显示在造血器官（胸腺、下颌和肠系膜淋巴结、脾脏、及骨髓）、胃肠道器官（胃、十二指肠、空肠、回肠、盲肠、结肠以及直肠）、雌性生殖器官（卵巢、子宫及阴道）并且在注射部位处的微观变化。这些变化从最小变动到中等并且在恢复期结束时（第 32 天）完全逆转，在所有组织中，胸腺和胃肠道除外，它们倾向于在此更迟的时点完全恢复。

[0451] 在 $2 \times 1.92\text{mg SN-38/kg}$ 的缀合物剂量水平下，存在 1 例因胃肠道并发症和骨髓抑制所致的死亡，并且在此组中的其它动物显示与 $2 \times 0.96\text{mg/kg}$ 组类似但更严重的不良事件。这些数据指明剂量限制性毒性与依立替康相同；即肠和血液学的。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。

[0452] 讨论

[0453] TROP-2 是在包括肺癌、乳腺癌、结肠直肠癌、胰腺癌、前列腺癌以及卵巢癌的许多上皮肿瘤上表达的蛋白质，使其成为用于递送细胞毒性剂的潜在重要靶标。RS7 抗体当结合至 TROP-2 时进行内化 (Shih 等人, 1995, *Cancer Res* 55:5857s-63s)，这使得能够直接细胞内递送细胞毒素。

[0454] 已经探究了化学治疗性药物与抗体的缀合超过 30 年。因为相当大部分的 ADC 不是由肿瘤而是由正常组织加工，所以存在以下风险：这些试剂将在肿瘤中到达治疗性水平之前对正常器官系统的毒性过大。对于任何治疗剂，治疗窗是确定 ADC 的潜力的一个关键因素，且因此相比于检验“超毒性”药物，我们宁愿选择 SN-38 作为靶向 TROP-2 的 ADC 的药物组分。

[0455] SN-38 是有效的拓扑异构酶 -I 抑制剂，在若干细胞系中具有在纳摩尔范围的 IC_{50} 值。它是前药依立替康的活性形式，依立替康被用来治疗结肠直肠癌，并且还在肺癌、乳腺癌以及脑癌中具有活性。我们推论呈 ADC 形式的直接靶向的 SN-38 将是比 CPT-11 显著改善的治疗剂，其通过克服后者的向活性 SN-38 的低的及患者可变的生物转化率来实现。

[0456] 插入原始 CL2 衍生物中的 Phe-Lys 肽允许经由组织蛋白酶 B 的可能的裂解。在致力于简化 CL2A 中的合成过程期间，苯丙氨酸被排除，且因此除去组织蛋白酶 B 裂解位点。有趣的是，此产物与由 CL2 得到的宽分布曲线相比具有限定更好的色谱曲线（未示出），但更重要的是，此变化在并排测试中对缀合物的结合、稳定性或效能没有影响。这些数据表明在 CL2 中的 SN-38 主要通过键合到 SN-38 的内酯环的 pH 敏感性碳酸苯甲酯键而非组织蛋白酶 B 裂解位点处裂解而从缀合物中释放。

[0457] hRS7ADC 针对一定范围的实体肿瘤细胞系的体外细胞毒性一致地具有在 nmol/L 范围内的 IC_{50} 值。然而，暴露于游离的 SN-38 的细胞显示与 ADC 相比下降的 IC_{50} 值。游离的与缀合的 SN-38 之间的这种不一致也在 ENZ-2208 (Sapra 等人, 2008, *Clin Cancer Res* 14:1888-96) 和 NK012 (Koizumi 等人, 2006, *Cancer Res* 66:10048-56) 中有报道。

ENZ-2208 利用支链 PEG 来连接每 PEG 约 3.5 至 4 个 SN-38 分子,而 NK012 是含有 20 重量% SN-38 的胶束纳米颗粒。用我们的 ADC,这种不一致(即游离的比对缀合的 SN-38 的效能比)随着 TROP-2 表达水平在肿瘤细胞中的提高而减小,表明靶向递送药物的优势。就体外血清稳定性而言,CL2- 和 CL2A-SN-38 形式的 hRS7-SN-38 产生 ~ 20 小时的 $t_{1/2}$,这与对于 ENZ-2208 所报道的 12.3 分钟的短 $t_{1/2}$ 相反(Zhao 等人,2008,Bioconjug Chem 19:849-59),但类似于在 24 小时之后在生理条件下 57% SN-38 从 NK012 的释放(Koizumi 等人,2006,CancerRes 66:10048-56)。

[0458] 用 hRS7-SN-38(用 CL2-SN-38 或 CL2A-SN-38) 治疗带有肿瘤的小鼠在 5 种不同肿瘤模型中显著地抑制肿瘤生长。在其中的 4 个中,观察到肿瘤消退,并且在 Calu-3 的情况下,所有接受 hRS7-SN-38 的最高剂量的小鼠在研究结束时都不含肿瘤。不同于在人中,依立替康在小鼠中通过血浆酯酶以大于 50% 转化率很高效地转化为 SN-38,并且在小鼠中比在人中产生更高功效。当依立替康在 10 倍更高或等效 SN-38 水平下施用, hRS7-SN-38 在控制肿瘤生长方面显著更佳。只有当依立替康在其 24mg/kg q2d $\times$ 5(37.5 倍高于 SN-38) 的 MTD 下施用,它才与 hRS7-SN-38 的有效性相等。在患者中,我们预期此优势将对 hRS7-CL2A-SN-38 更加有利,因为依立替康的生物转化率将实质上下降。

[0459] 我们还展示在一些表达抗原的细胞系如 SK-MES-1 中,使用抗原结合 ADC 不保证比非结合的不相关的缀合物更佳的治疗反应。这不是不寻常或出乎意料的发现。实际上,早先所提及的非结合的 SN-38 缀合物当与依立替康相比时提高治疗活性,且因此预计不相关的 IgG-SN-38 缀合物具有一些活性。这与以下事实有关,肿瘤具有不成熟的渗漏血管,这允许与正常组织相比大分子的较好通过。用我们的缀合物,50% 的 SN-38 当 pH 下降至模拟溶酶体水平的水平(例如在 37 $^{\circ}$ C 下 pH 5.3;数据未示出)时将在 ~ 13 小时内释放,而在血清的中性 pH 下,释放率减少将近 2 倍。如果不相关的缀合物进入酸性肿瘤小环境中,那么预计将局部地释放一些 SN-38。其它因素如肿瘤生理学和对药物的先天敏感性也将在限定此“基线”活性中发挥作用。然而,具有较长停留时间的特异性缀合物将在此基线反应上具有提高的效能,只要存在足够的抗原来俘获特异性抗体。在 SK-MES-1 模型中的生物分布研究也显示,如果肿瘤抗原由于连续给药的缘故变得饱和,那么特异性缀合物的肿瘤摄取将减少,从而产生类似于在不相关的缀合物下所见的治疗结果。

[0460] 虽然在我们的 ADC 与其它 SN-38 递送试剂的公开报告之间进行直接比较是一项挑战,但可以做出一些一般观察。在我们的疗法研究中,最高个体剂量是 0.4mg/kg 的 SN-38。在 Calu-3 模型中,仅给予 4 次注射,总累积剂量是 1.6mg/kg SN-38 或在 20g 小鼠中 32 μ g SN-38。用 ENZ-2208 的多项研究是使用其 10mg/kg $\times$ 5 的 MTD 完成,并且用 NK012 的临床前研究涉及其 30mg/kg $\times$ 3 的 MTD。因此,显著的抗肿瘤效果是由 hRS7-SN-38 在分别比在 ENZ-2208 和 NK012 中所报道的剂量少 30 倍和 55 倍的 SN-38 等效物下得到。即使用少 10 倍的 hRS7ADC(0.04mg/kg),也能观察到显著的抗肿瘤效果,而不存在下降剂量的 ENZ-2208,并且当 NK012 剂量下降 4 倍至 7.5mg/kg 时,功效丧失(Koizumi 等人,2006,Cancer Res 66:10048-56)。正常小鼠在 24mg/kg SN-38 的累积剂量(1,500mg/kg 的缀合物)下在 1 周内不表现出急性毒性,表明 MTD 更高。因此,用减少 7.5 至 15 倍的量的 SN-38 等效物有效地治疗带有肿瘤的动物。

[0461] 作为拓扑异构酶-I 抑制剂,SN-38 诱发对细胞 DNA 的显著破坏,其中 p53 和 p21^{WAF1/}

Cip1 的上调导致胱天蛋白酶活化和 PARP 裂解。当将 BxPC-3 和 Calu-3 细胞暴露于我们的 ADC 时, p53 和 p21^{WAF1/Cip1} 两者都上调至基准水平以上。另外, PARP 裂解在两个细胞系中也是明显的, 证实了在这些细胞中的细胞凋亡事件。所关注的是通过游离的 SN-38 和我们的 hRS7-SN-38 两者 p21^{WAF1/Cip1} 在 BxPC-3 和 Calu-3 中相对于 p53 的更高上调。这可指示 p53 在这 2 个细胞系中的突变状态以及 p53 依赖性途径用于 p21^{WAF1/Cip1} 介导的细胞凋亡。

[0462] 一个有趣的观察结果是在 BxPC-3 和 Calu-3 两者中在 24 小时由 hRS7-ADC 相对于游离的 SN-38 介导的 p53 的早期上调。即使裸的 hRS7IgG 也可在这些细胞系中上调 p53, 虽然只是在 48 小时暴露之后。TROP-2 过表达和通过抗体的交联已与若干 MAPK 相关的信号传导事件以及细胞内钙释放有关联。虽然 hRS7 的结合不足以诱发 BxPC-3 和 Calu-3 中的细胞凋亡, 如 PARP 裂解的缺乏所证明, 但其可足以激发细胞, 以使得缀合至 hRS7 的 SN-38 的包含可产生对肿瘤生长抑制的更大作用。研究目前正在以理解哪个途径涉及 SN-38 的 hRS7 递送及其与游离的 SN-38 的区别可能是什么, 以及 p53 状态可在此信号传导中发挥什么作用。

[0463] 生物分布研究揭示 hRS7-CL2A-SN-38 具有与亲本 hRS7IgG 类似的肿瘤摄取, 但是明显实质上更快, 肝摄取率 2 倍更高, 这可能是由于 SN-38 的疏水性。在 ADC 经由肝脏清除的情况下, 肝脏和胃肠道毒性预计是剂量限制性的。虽然小鼠具有增加的肝脏转氨酶的证据, 但是胃肠道毒性最多是轻度的, 仅有暂时的重量减轻并且在病理组织学检查时没有观察到异常。有趣的是, 没有观察到血液学毒性。然而, 猴子显示与对依立替康所预料的相同毒性概况, 其中胃肠道和血液学毒性是剂量限制性的。

[0464] 因为由 hRS7 识别的 TROP-2 不在小鼠中表达, 所以在与人具有 TROP-2 的类似组织表达的猴子中进行毒性研究是非常重要的。猴子耐受 0.96mg/kg/ 剂量 ($\sim 12\text{mg}/\text{m}^2$), 有轻度和可逆性的毒性, 将其外推至 $\sim 0.3\text{mg}/\text{kg}/$ 剂量 ($\sim 11\text{mg}/\text{m}^2$) 的人剂量。在 NK012 的 I 期临床试验中, 具有实体肿瘤的患者耐受每 3 周 $28\text{mg}/\text{m}^2$ 的 SN-38, 其中有 4 级嗜中性白细胞减少作为剂量限制性毒性 (Hamaguchi 等人, 2010, Clin Cancer Res 16:5058-66)。类似地, 用 ENZ-2208 的 I 期临床试验揭示剂量限制性发热性嗜中性白细胞减少症, 其中推荐每 3 周施用 $10\text{mg}/\text{m}^2$ 或者如果患者是 G-CSF 施用那么施用 $16\text{mg}/\text{m}^2$ 。因为猴子耐受 $22\text{mg}/\text{m}^2$ 的累积人等效剂量, 所以有可能即使 hRS7 结合至许多正常组织, hRS7ADC 的单一治疗的 MTD 仍可类似于另一个非靶向 SN-38 试剂。实际上, 抗 TROP-2 抗体的特异性似乎在限定 DLT 中不发挥作用, 因为毒性概况类似于依立替康。更重要的是, 如果抗肿瘤活性可以在人中如同在对仅在 0.03mg SN-38 等效物 /kg/ 剂量下的人等效剂量有反应的小鼠中一样实现, 那么显著的抗肿瘤反应可以临床上实现。

[0465] 总之, 在组合有小鼠的体内人癌异种移植物模型的猴子中的毒理学研究表明, 此 ADC 靶向的 TROP-2 是在具有不同上皮起源的若干肿瘤中的有效治疗剂。

[0466] 实施例 12. 抗 CD22 (依帕珠单抗) 缀合的 -SN-38 用于治疗恶性血液病

[0467] 摘要

[0468] 先前已发现当用允许大约 50% 的 IgG 结合的 SN-38 每 24 小时解离于血清中的接头制备时与 SN-38 缀合的缓慢内化的抗体能被成功地使用。在此研究中, 检查用依帕珠单抗 (快速内化) 和维妥珠单抗 (缓慢内化) (分别是人源化抗 CD22 和抗 CD20IgG) 制备的 SN-38 缀合物治疗 B 细胞恶性肿瘤的功效。两种抗体-药物缀合物具有针对多种人淋巴瘤

/ 白血病细胞系的类似纳摩尔活性,但 SN-38 的缓慢释放损害了甚至针对不相关缀合物的体外效能鉴别 (potency discrimination)。当 SN-38 稳定地连接到抗 CD22 缀合物上时,其效能减小 40 至 55 倍。因此,进一步的研究仅用稳定性较低的缓慢离解的接头进行。在带有 Ramos 异种移植物的老鼠中在 CD22 与 CD20 抗体-药物缀合物之间发现体内类似的抗肿瘤活性,即使 Ramos 表达比 CD22 多 15 倍的 CD20,表明依帕珠单抗-SN-38 缀合物 (Emab-SN-38) 的内化提高其活性。Emab-SN-38 在体内比非结合的不相关的 IgG-SN-38 缀合物更有效,排除了在无毒剂量下的大部分构建良好的 Ramos 异种移植物。体外和体内研究显示 Emab-SN-38 可与非缀合的维妥珠单抗组合用于更有效的治疗。因此,Emab-SN-38 在淋巴瘤和白血病中在低于毒性水平的剂量下是有活性的且因此代表了一种新的有前景的试剂,其具有单独或与抗 CD20 抗体疗法组合的治疗潜力。(Sharkey 等人,2011,Mol Cancer Ther 11:224-34)。

[0469] 引言

[0470] 大量的努力都集中在白血病和淋巴瘤的生物疗法,其中非缀合抗体(例如利妥昔单抗、阿来组单抗、奥法木单抗)、放射性免疫缀合物(^{90}Y -替伊莫单抗、 ^{131}I -托西莫单抗)、以及药物缀合物(吉妥单抗)得到了美国食品与药物管理局(FDA)的批准。另一种抗体-药物缀合物(ADC),贝伦妥单抗-维多汀(brentuximab vedotin)(SGN-35;抗 CD30-奥瑞斯他汀 E)最近获得了 FDA 的加快批准用于何杰金氏淋巴瘤和间变性大细胞淋巴瘤。在靶向 CD19、CD22、CD37、CD74 及 CD79b 的临床前和临床开发中还存在许多其它 ADC。

[0471] 针对所有这些靶标的抗体是作为药物载体的符合逻辑的选择,因为它们是可内化的。CD22 的可内化和特异性使其成为白血病和淋巴瘤的特别重要的靶标,在临床研究中有至少 3 种不同的抗 CD22 缀合物,包括 CMC-544(酸不稳定的缀合的加利车霉素)、抗 CD22 美登素缀合物(稳定连接的 MCC-DM1)以及 CAT-3888(正式地称为 BL22;一种假单胞菌属外毒素单链融合蛋白)。在所有这些缀合物中的活性剂都具有亚纳摩尔效能(即所谓的超毒性)。

[0472] 我们最近开发出将抗体与 SN-38(一种拓扑异构酶 I 抑制剂)缀合的方法,所述拓扑异构酶 I 抑制剂具有来源于前药依立替康的低的纳摩尔效力(Govindan 等人,2009,Clin Cancer Res 15:6052-62;Moon 等人,2008,J Med Chem 51:6916-26)。最初使用以缓慢内化的抗 CEACAM5 抗体制备的缀合物检验四种 SN-38 连接化学物(Govindan 等人,2009,Clin Cancer Res 15:6052-62;Moon 等人,2008,J Med Chem 51:6916-26)。缀合物保持 CEACAM5 结合,但在 SN-38 于人血清中的离解率方面不同,其中半衰期在约 10 至 67 小时之间变化(Govindan 等人,2009,Clin Cancer Res 15:6052-62)。最终,具有中间物稳定性(在 24-35 小时内约 50%离解)的称为 CL2 的接头被选择用于进一步开发。CL2 最近被修饰,排除了组织蛋白酶 B-可裂解的二肽中的苯丙氨酸以简化和改善制造产量。被称为 CL2A 的这种新的衍生物将 pH 敏感性碳酸酯连接物保持在 SN-38 上,但其不再通过组织蛋白酶 B 选择性地裂解。尽管如此,它还是具有与原始 CL2 接头相同的血清稳定性和体内活性(Cardillo 等人,2011,Clin Cancer Res 17:3157-69)。因为用缓慢内化的抗 CEACAM5-SN-38 发现了显著功效而无毒性,所以推测其活性是通过 SN-38 于肿瘤中局部化之后其从抗体中的缓慢释放来辅助的。因此,这份报告中的主要目的是评价使用具有两种抗体的 CL2A 接头制备的缀合物的治疗前景,这两种抗体对 B 细胞癌有高度特异性但在其抗原表达和可内化特性方面不

同。

[0473] 依帕珠单抗 (Emab) 是快速内化的 (例如在 1 小时内 $\geq 50\%$) 人源化抗 CD22IgG1, 已在淋巴瘤和白血病中对呈非缀合或缀合形式的所述抗体进行了广泛的评价。维妥珠单抗 (Vmab) 是一种人源化抗 CD20 抗体, 也在临床上对其进行了研究, 但所述抗体内化缓慢 (例如在 1 小时内约 10%)。CD20 通常在非何杰金氏淋巴瘤中以比 CD22 高得多的水平表达, 而 CD22 优先在急性淋巴母细胞性白血病 (ALL) 而不是多发性骨髓瘤中表达。两种抗体在患者中作为非缀合试剂都有效, 但仅维妥珠单抗在鼠科异种移植物模型中有活性 (Stein 等人, 2004, Clin Cancer Res 10:2868-76)。以显示与非缀合的维妥珠单抗组合的 ^{90}Y -Emab 在 NHL 模型中具有提高的功效的早先研究为基础 (Mattes 等人, 2008, Clin Cancer Res 14:6154-60), 我们也检验了 Emab - SN-38+Vmab 组合, 因为这可以提供额外益处, 而不会竞争同一靶抗原或具有另外的毒性。

[0474] 材料和方法

[0475] 细胞系。Ramos、Raji、Daudi (伯基特淋巴瘤) 以及 JeKo-1 (套细胞淋巴瘤) 是购自美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection)。REH、RS4;11、MN-60 以及 697 (ALL) 是购自 Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen。WSU-FSCCL (滤泡型 NHL) 是由 Mitchell R. Smith 博士 (Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, PA) 馈赠。所有细胞系都在含有 10 至 20% 胎牛血清的推荐的补充培养基中在 37°C 下在湿润的 CO_2 孵育器 (5%) 中培养并且定期检查支原体。

[0476] 抗体及缀合方法。依帕珠单抗和维妥珠单抗分别是人源化抗 CD22 和抗 CD20IgG1 单克隆抗体。拉贝珠单抗 (Lmab), 即一种人源化抗 CEACAM5IgG1, 以及 RS7, 即一种人源化抗 TROP-2 抗体 (两者都来自 Immunomedics, Inc.) 被用作非结合的不相关对照。在本文中, Emab - SN-38、Vmab - SN-38 以及 Lmab - SN-38 是指使用如上所述的 CL2A 接头制备的缀合物。在人血清中的体外研究显示大约 50% 的活性 SN-38 部分每天从 IgG 释放 (Cardillo 等人, 2011, Clin Cancer Res 17:3157-69)。被称为 CL2E 的另一个接头在人血清中在 14 天内是稳定的, 但其含有组织蛋白酶 B 裂解位点以促进当在溶酶体中加工时 SN-38 的释放。制备 CL2E 的方法以及 CL2A 和 CL2E 接头的结构在以上实施例中给出。缀合物每 IgG 含有大约 6 个 SN-38 单位 (例如, 1.0mg IgG-SN-38 缀合物含有 $\sim 16\mu\text{g}$ 的 SN-38)。

[0477] 体外细胞结合和细胞毒性。流式细胞术使用在 4°C 下孵育 1 小时的非缀合特异性和不相关抗体进行, 其中使用异硫氰酸荧光素 (FITC)-Fc γ 片段 - 特异性山羊抗人 IgG (Jackson ImmunoResearch) 展现结合, 所述 IgG 也在 4°C 下孵育 1 小时。中值荧光在 FACSCALIBUR® 流式细胞计 (Becton Dickinson) 上使用 CellQuest 软件包测定。

[0478] 使用 MTS 染料还原测定 (Promega) 测定细胞毒性。剂量 - 反应曲线 [具有 / 不具有山羊抗人 Fc γ F(ab')₂; Jackson ImmunoResearch] 从三份测定的平均值中生成, 并且 IC_{50} 值使用 PRISM® GraphPad 软件 (v5) 计算, 针对数据的最佳拟合曲线使用 F 检验进行统计比较。显著性设定在 $P < 0.05$ 。

[0479] 免疫印迹。24 或 48 小时暴露于测试试剂之后, 通过蛋白质印迹展现早期 (p21 表达) 和晚期 (PARP 裂解) 细胞凋亡的标记物。

[0480] 体内研究。皮下 Ramos 模型通过将来自培养物 ($>95\%$ 活力) 的 1×10^7 个细胞 (0.2mL) 植入到 4 至 6 周龄的雌性裸小鼠 (Taconic) 中开始。植入后第三周, 将肿瘤范围

从 0.4 到 0.8cm³ (通过卡尺来测量, L×W×D) 的动物分成各个动物组, 其中每组具有相同范围的肿瘤尺寸。肿瘤尺寸和体重每周至少测量一次, 当肿瘤长到 3.0cm³ 时或如果它们经历 20% 或更大的体重减轻, 则将动物从研究中移除。静脉内 WSU-FSCCL 和 697 模型是通过在雌性严重联合免疫缺陷 (SCID) 小鼠 (Taconic) 中分别静脉内注射 2.5×10^6 和 1×10^7 个细胞开始的。治疗在施用 WSU-FSCCL 细胞之后第 5 天和在 697 接种之后第 7 天开始。每天观察动物, 使用后肢瘫痪或其它病态迹象作为替代存活终点。所有治疗都以 $\leq 0.2\text{mL}$ 腹膜内给予。具体的剂量和频率在结果部分中给出。因为小鼠将依立替康高效地转化为 SN-38, 所以依立替康给药是基于 SN-38 等效物来调整; SN-38 摩尔当量是基于 1.6% ADC 质量和 60% 依立替康质量。

[0481] 功效是以 Kaplan-Meier 曲线表示, 使用进展时间 (TTP) 作为如上所指出的替代存活终点。统计分析通过对数秩检验使用 **PRISM®** GraphPad 软件 (显著性, $P < 0.05$) 进行。

[0482] 结果

[0483] 抗原表达和体外细胞毒性。所有细胞系对 SN-38 都高度敏感, EC_{50} 值在 0.13nmol/L (对于 Daudi) 至 2.28nmol/L (对于 RS4 ;11) 范围内 (表 9)。除 697 和 RS4 ;11 之外, Emab - SN-38 抗 CD22 缀合物比 SN-38 的有效性低 2 至 7 倍。这对于我们的靶向以及其它非靶向 SN-38 缀合物是常见发现。尽管在抗原表达中有差异, 但 Emab - SN-38 和 Vmab - SN-38 具有与非结合的 Lmab - SN-38 抗 CEACAM5 缀合物类似的效能, 这可能是由于在 4 天 MTS 测定期间大约 90% 的 SN-38 离解的缘故。使用较短暴露时间的其它体外工序在区别缀合物效能方面的差异中也是无效的。例如, 在 1 天暴露之后的膜联蛋白 V 染色未能发现未处理的与处理的细胞之间的差异 (未示出)。p21 的上调和 PARP 裂解还分别作为细胞凋亡的早期和晚期标记物进行检验。Ramos 不表达 p21。然而, 检测 PARP 裂解, 但仅在 48 小时暴露之后, 其在 SN-38 处理的细胞中更强地表达 (未示出)。WSU-FSCCL 细胞系表达 p21, 但 p21 上调和 PARP 裂解仅在 Emab-SN-38 暴露之后 48 小时才明显。然而, 在暴露于游离的 SN-38 24 小时之后观察到这两者 (未示出)。虽然用游离的 SN-38 造成的细胞凋亡事件的强度提高和激活提前与其 EC_{50} 低于 IgG 缀合形式一致, 结果表明将需要至少 48 小时的暴露期, 但此时大约 75% 的 SN-38 将从缀合物中释放。

[0484] 表 9. 通过 FACSscan 得到的 CD20 和 CD22 表达以及通过 MTS 测定得到的针对若干造血系统肿瘤细胞系的 SN-38 和特异性 Emab 抗 CD22 - SN-38、Vmab 抗 CD20 - SN-38 以及 Lmab 抗 CEACAM5 - SN-38 缀合物的体外细胞毒性

[0485]

细胞系	CD20 表达 中值荧光 (背景)	CD22 表达 中值荧光 (背景)	SN- 38,nmol/L	EC ₅₀ 值 ^a									
				95% CI	Emab- SN-38, nmol/L	95% CI	Vmab- SN-38, nmol/L	95% CI	Lmab- SN-38, nmol/L	95% CI			
NHL:伯基特													
Raji	422.2 (6.8)	45.9 (6.8)	1.42	0.8- 2.4	2.10	1.2- 3.8	ND	—	ND	—	ND	—	
					4.61	2.2- 9.5	4.88	2.7- 9.0	3.73	1.8- 7.6			
Ramos	620.4 (4.1)	40.8 (4.1)	0.40	0.2- 0.7	2.92	1.6- 5.4	ND	—	ND	—	ND	—	
					9.84	4.5- 21.6	13.56	4.9- 37.2	8.08	2.9- 22.2			
Daudi	815.1 (5.9)	145.0 (5.9)	0.13	0.1- 0.2	0.52	0.4- 0.7	ND	—	ND	—	ND	—	
NHL:滤泡性													
WSU- FSCCL	97.4 (4.9)	7.7 (4.9)	0.50	0.3- 1.0	0.68	0.4- 1.1	ND	—	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 (6.5)	11.2 (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													
REH	12.3 (4.1)	22.9 (4.1)	0.47	0.3- 0.9	1.22	0.8- 1.9	ND	—	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	—	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	—	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	—	ND	—	

[0486] 缩写:CI,置信区间;ND,未测定。^aEC₅₀表示为 Emab-SN-38 中 SN-38 的摩尔当量。

[0487] 再次检验了 PARP 裂解和 p21 表达,这次在用 Emab-SN-38+Vmab 处理的细胞中进行。在 Ramos 中证实了早先的研究,PARP 裂解首先仅在暴露于缀合物的 48 小时之后发生,在交联抗体的存在下表达未改变(未示出)。暴露于维妥珠单抗超过 48 小时对 PARP 裂解没有影响,但裂解在当添加交联抗体时的 24 小时内是强的(未示出)。然而,当维妥珠单抗单独(没有交联接头)与 Emab-SN-38 组合时,在 24 小时暴露之后发生 PARP 裂解(未示出),表明维妥珠单抗可以诱发更快速开始的细胞凋亡,甚至在不存在交联下也是如此。WSU-FSCCL 细胞系中仅有的显著区别是所述组合在 48 小时大大地提高了 p21 表达(未示出),再次提示当维妥珠单抗与 Emab-SN-38 缀合物组合时细胞凋亡诱导的加速。与 Ramos 相比在 WSU-FSCCL 中细胞凋亡诱导的延迟可能是由 CD22 和 CD20 表达的下降来解释。

[0488] 超毒性试剂经常使用在血清中高度稳定的接头,因为其提前释放将增加毒性,但这些缀合物必须针对药物进行内化以便最佳递送。因为依帕珠单抗快速地内化,我们考查其是否可能受益于更稳定连接的 SN-38,将 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相比较。两种缀合物具有类似的结合亲和力(未示出),但更稳定的 Emab-CL2E-SN-38 在 3 个细胞系中的有效性比 CL2A 缀合物低约 40 至 55 倍(未示出)。虽然在使用 CL2A 缀合物时缺乏特异性,但 Emab-CL2E-SN-38 一致地比非结

合的 Lmab - 抗 CEACAM5 - CL2E - SN-38 缀合物有效大约两倍 (未示出)。得出结论,更稳定连接的缀合物未必适合于缓慢内化的维妥珠单抗缀合物且因此仅用 CL2A 连接的 SN-38 缀合物继续我们的研究。

[0489] 因为体外测定的限制,所以功效在异种移植物模型中评定。如表 9 中所示,所有淋巴瘤细胞系都具有比 CD22 高得多的 CD20 表达。Daudi 具有最高的 CD22 及 CD20 的表达,但是它在体内对非缀合的维妥珠单抗很敏感并且体外测试显示对 SN-38 的最高敏感性 (表 9)。这些特性可能使其难以评定 SN-38 缀合物的比对非缀合的抗体的活性差异,特别是当非缀合的依帕珠单抗不是动物中的有效治疗剂时。因为 Ramos 先前已显示将 ^{90}Y -Emab 与维妥珠单抗组合的优势 (Mattes 等人, 2008, Clin Cancer Res 14:6154-60),所以我们选择从 Emab-S N-38 与 Vmab-SN-38 缀合物在 Ramos 人伯基特细胞系中的比较开始。尽管流式细胞术显示 CD20 比 CD22 高 15 倍的表达,但 Ramos 异种移植物的免疫组织学显示丰富的 CD22 和 CD20,其中 CD22 似乎比 CD20 更均匀地表达 (未示出)。

[0490] 在未治疗的动物中的 Ramos 异种移植物快速进展,从其 0.4cm^3 的初始尺寸在 6 天内达到 3.0-cm^3 终止尺寸 (未示出),并且如先前所报道,维妥珠单抗和依帕珠单抗对构建良好的 Ramos 异种移植物的进展没有可感知的影响 (Sharkey 等人, 2009, J Nucl Med 50:444-53)。与使用其它 SN-38 缀合物的先前发现一致,用 4 周、每周两次、 0.5mg/ 剂量治疗方案治疗的动物都没有可感知的重量减轻。两种缀合物对控制肿瘤生长都高度有效,其中有 80% 或更多动物到 4 周治疗结束之时没有肿瘤的证据 (图 6)。 0.25-mg Vmab - SN-38 剂量在首个 4 周内控制生长较佳,但在 0.5mg 下,对两种缀合物都观察到类似的早期生长控制。因此,尽管有比 CD22 高 15 倍的 CD20 表达,但 Emab - SN-38 与 Vmab - SN-38 相比更有利。因此,剩余研究都集中在 Emab - SN-38 单独或与非缀合的维妥珠单抗的组合。

[0491] Emab - SN-38 剂量 - 反应及特异性。查看特异性 Emab - SN-38 和不相关的 Lmab - SN-38 缀合物的剂量 - 反应关系,但 Emab - SN-38 在所测试的 3 个水平的 2 个下具有显著更佳的生长控制,并且有特异性缀合物在中等剂量下有利的强劲趋势 (图 7)。同样, 0.25mg 的 Emab - SN-38 消除大多数肿瘤;在此处,10 个动物中有 7 个在 12 周监测期结束时不含肿瘤,在体重方面没有变化。单独给予依立替康 ($6.5\text{ }\mu\text{g/}$ 剂量;与 0.25mg 缀合物大致相同的 SN-38 等效物) 的动物具有 1.9 周的中值存活期,11 个动物中有 3 个在研究结束时不含肿瘤,这显著不同于不相关的 Lmab - SN-38 缀合物的 3.45 周中值存活期 ($P = 0.452$; 图 7C)。

[0492] 在 697- 播散性白血病模型中,盐水治疗的动物的中值存活期只是从肿瘤接种起 17 天。给予非缀合的依帕珠单抗加依立替康 (与 0.5mg 缀合物相同摩尔当量的 SN-38) 的动物具有相同的中值存活期,而从肿瘤接种起 7 天开始每周两次给予 0.5mg Emab - SN-38 的动物存活到 24.5 天,比未治疗的动物 ($P < 0.0001$) 或给予非缀合的依帕珠单抗和依立替康的动物 ($P = 0.016$) 显著更长。然而,Emab - SN-38 不比不相关的缀合物 (中值存活期 = 22 天; $P = 0.304$) 显著更佳,最可能反映了 CD22 在此细胞系中的低表达。

[0493] 与非缀合的 Vmab 抗 CD20 组合的 Emab-SN-38。先前报道了当 ^{90}Y -Emab 与非缀合的维妥珠单抗组合时在皮下 Ramos 模型中的改善反应 (Mattes 等人, 2008, Clin Cancer Res 14:6154-60) 并且因此用 Emab - SN-38 来检验此可能性。在试点研究中,向 5 个带有平均大约 0.3cm^3 的皮下 Ramos 肿瘤的动物给予维妥珠单抗 (0.1mg)、 0.1mg Emab-SN-38 或 Emab-SN-38+Vmab (所有试剂每周给予两次,持续 4 周)。达到 2.0cm^3 的中值 TTP 分别是 22

天、14 天、及大于 77 天（维妥珠单抗比对单独 Emab - SN-38, $P = 0.59$;Emab - SN-38+Vmab 比对 Emab - SN-38, $P = 0.0145$), 提供一个初始指示 : 维妥珠单抗与 Emab - SN-38 的组合改善总体治疗反应。在也使用每周两次的 4 周治疗方案的追踪研究中, 给予 0.1mg Emab - SN-38 加 0.1mg 维妥珠单抗的 11 个动物中有 6 个从治疗开始起的 16 周内没有肿瘤的证据, 而接受单独维妥珠单抗或 0.1mg 对照 Lmab - SN-38 的动物的中值存活期分别是 1.9 周和 3.3 周, 11 个动物中有 3 个在这些组的每个中在 16 周时不含肿瘤（未示出）。尽管有更长的中值 TTP 和更多的存活者, 但在组之间没有发现显著差异。因此, 在具有丰富的 CD20 和中等水平 CD22 的 Ramos 模型中, 在无毒剂量水平下给予的 Emab - SN-38 缀合物不比非缀合的抗 CD20 疗法显著更佳, 但添加 Emab - SN-38 至非缀合的抗 CD20 疗法中似乎改善反应而没有毒性。重要的是强调 SN-38 缀合物在比其最大耐受剂量小得多的水平下给予, 且因此这些结果将不会被解释成非缀合的抗 CD20 疗法等同于 Emab - SN-38 缀合物。

[0494] 两项另外的研究是使用具有 CD20 和 CD22 的低表达的 WSU-FSCCL 滤泡型 NHL 细胞系在静脉内植入模型中进行（未示出）。盐水治疗的动物的中值存活时间是从肿瘤植入起的 40 至 42 天。在含有与 0.3mgADC 相同的 SN-38 等效物的剂量下给予的单独依立替康（未示出）增加中值存活期（分别是 49 天比对 40 天 ; $P = 0.042$), 但 15 个动物中有 14 个在第 49 天死于疾病进展, 在同一天盐水组的 15 个动物中最终有 4 个被排除（未示出）。尽管其相对较低的 CD20 表达, 但维妥珠单抗单独 (35 μ g, 每周两次 $\times$ 4 周) 在此模型中是有效的。中值存活期在第一研究中增加到 91 天, 其中 2 个治愈（第 161 天）, 并且在第二研究中增加到 77 天, 但在 89 天之后没有存活者（单独维妥珠单抗比对盐水治疗, $P < 0.001$, 在两个研究中）。非缀合的依帕珠单抗 (0.3mg/ 剂量) 与依立替康和维妥珠单抗的组合与维妥珠单抗单独相比具有相同的中值存活期, 表明依帕珠单抗和依立替康都不有助于净反应。

[0495] 如所预期, 因为由 WSU-FSCCL 所致的 CD22 低表达, 所以单独 Emab - SN-38 不如在 Ramos 中有效。在 0.15mg 剂量下, 在盐水组中没有见到显著益处, 但在 0.3mg 下, 中值存活期增加到 63 天, 提供与盐水治疗的动物相比显著的改善 ($P = 0.006$)。使用 0.3mg Emab - SN-38 的第二研究证实了与盐水组相比增加的存活期 (75 天比对 40 天 ; $P < 0.0001$)。此反应的特异性在第一研究中不明显, 其中不相关的 Lmab - SN-38 缀合物和 Emab - SN-38 的中值存活期在 0.15mg 或 0.3mg 剂量水平下是不同的 (Emab - SN-38 比对抗 CEACAM5 - SN-38 缀合物, 在 2 个剂量水平下分别是 42 天比对 49 天和 63 天比对 63 天)。然而, 在第二研究中, 0.3mg 剂量的 Emab - SN-38 与不相关的缀合物相比提供显著改善的存活期 (75 天比对 49 天 ; $P < 0.0001$)。此外, 显示在此模型中的特异性的困难很可能与低的 CD22 表达有关。

[0496] 特异性 Emab - SN-38 与维妥珠单抗的组合实质上增加存活期, 证据是比对照 Lmab - SN-38 更强的反应。例如, 在第一研究中, 用维妥珠单抗加 0.15 或 0.3mg 对照缀合物治疗的动物分别具有 98 天和 91 天的中值存活期, 这类似于维妥珠单抗单独的中值存活期 (91 天 ; 未示出)。然而, 维妥珠单抗加 0.15mg 特异性 Emab-SN-38 缀合物增加中值存活期至 140 天。虽然这个改善不比维妥珠单抗单独显著更高 ($P = 0.257$), 但当 Emab-SN-38 剂量随着维妥珠单抗增加到 0.3mg 时, 10 个动物中有 6 个在研究结束时保持活着的, 提供与对照缀合物加维妥珠单抗相比显著的存活期优势 ($P = 0.0002$)。在第二研究中, 维妥珠单抗单独的中值存活期比第一研究中的短 (77 天比对 91 天), 而对照缀合物加维妥珠单抗的中值存活期还是 91 天, 这现在产生与单独维妥珠单抗相比显著的存活期优势 ($P < 0.0001$)。特异性

Emab-SN-38 缀合物与维妥珠单抗的组合将中值存活期延长至 126 天, 这比单独的 Emab-SN-38 和维妥珠单抗分别的 75 天和 77 天的中值存活期显著更长 (各自是 $P < 0.0001$)。然而, 在此研究中, 其不能满足优于与对照抗 CEACAM5-SN-38 缀合物的组合的统计学改善的要求 ($P = 0.078$)。

[0497] 讨论

[0498] 在过去的 10 年间, ADC 已在癌症疗法中取得了实质性的收益, 但还存在一些缺点。收益主要当研究者选择检查毒性过大以致不能单独使用的试剂时存在, 但是当偶联到抗体上时, 这些所谓的超毒素在临床前测试中产生实质上改善的反应。贝伦妥单抗-维多汀 (一种奥瑞斯他汀缀合物) 在何杰金氏淋巴瘤中的最近批准以及使用曲妥单抗-DM1 抗 HER2-美登素缀合物作为单个试剂在非缀合的曲妥单抗难治性乳腺癌中的临床成功表明这些载有超毒性试剂的 ADC 变成接受的治疗形式。然而, 用在皮摩尔范围内自身有效的试剂制备的缀合物可在毒性上具有增加的风险, 因为最近提出了从市场上收回吉妥珠单抗-奥佐米星 (抗 CD33-加利车霉素缀合物) 的决定。因此, ADC 的成功可取决于鉴定结合药物和抗体共同的适当化学特性以及定义充分地表达以允许细胞毒性剂的充分和选择性递送的合适靶标。

[0499] 我们开发了一种用于将 SN-38 偶联至 IgG 的接头, 这允许 SN-38 从缀合物上缓慢释放到血清中 (每天约 50%)。使用此接头, 缓慢内化的抗体可以是有效的治疗剂, 或许因为局部化至肿瘤中的缀合物局部地释放足够数量的药物, 即使没有被内化也一样。CL2A 接头最近还与针对 TROP-2 的抗体一起使用, 据报道 TROP-2 快速地内化 (Cardillo 等人, 2011, Clin Cancer Res 17:3157-69.)。因此, 似乎缓慢释放机制对内化和非内化抗体是有益的。

[0500] 在此报道中, 我们通过比较用依帕珠单抗 (一种快速内化的抗 CD22IgG) 和维妥珠单抗 (一种缓慢内化的抗 CD20IgG) 制备的 SN-38 缀合物对于 B 细胞恶性肿瘤的治疗扩展对 CL2A 接头的评定。用依帕珠单抗的鼠科亲本进行的先前研究已指示大多数抗体在 1 小时之内内化并且 50% 的 CD22 在 5 小时内在细胞表面上重新表达 (Shih 等人, 1994, Int J Cancer 56:538-45)。此内化和重新表达过程将许可细胞内递送, 这可能弥补 CD22 的较低表面表达。因为许多 B 细胞恶性肿瘤表达比 CD22 多得多的 CD20, 所以靶向 CD20 的缀合物可能通过在肿瘤中局部化之后释放其毒性载荷来递送更多摩尔数的药物。

[0501] 体外细胞毒性研究不能区分特异性缀合物的效能或甚至不相关的缀合物的效能, 因为 SN-38 从缀合物释放到培养基中。实际上, SN-38 单独比缀合物略为有效, 这可反映其加速进入细胞和啮合拓扑异构酶 I 的能力。因为其它研究展现缀合物在可以看见细胞凋亡的早期征兆之前需要 48 小时暴露, 我们得出结论体外测试不能区别这 2 种缀合物的效能且因此求助于体内研究。

[0502] 在异种移植模型中, 两种缀合物针对 Ramos 肿瘤具有类似的抗肿瘤活性, 流式细胞术指示其表达比 CD22 多将近 15 倍的 CD20。这支持选择 Emab 抗 CD22-SN-38 缀合物, 尤其是因为它可以与非缀合的 Vmab 抗 CD20 疗法组合, 而不用担心其中一种试剂会干扰另一个试剂的结合。实际上, 如果使用抗 CD20-SN-38 缀合物, 那么给予的总 IgG 蛋白剂量可能将低于有效的非缀合抗 CD20 抗体治疗通常所需的水平, 因为剂量限制性毒性将由 SN-38 含量驱动。添加更多的未标记的抗 CD20 到抗 CD20-SN-38 缀合物中将存在减少缀合物摄取

和潜在地减弱其功效的风险。然而,由于先前我们在使用放射性标记的依帕珠单抗和非缀合的维妥珠单抗的组合研究中显示,益处可来源于在其最大有效和安全剂量下给予的两种试剂。体外研究显示维妥珠单抗,甚至在不存在用于提高信号传导的交联下,也能促进以 Emab - SN-38 起始的细胞凋亡事件。因此,只要 Emab - SN-38 缀合物与抗 CD20 缀合物一样有效,那么选择 Emab - SN-38 缀合物是符合逻辑的选择。因为其允许更有效的组合疗法,甚至在一种或两种抗原的表达较低的肿瘤中也是如此。

[0503] 因为使用超毒性药物的大多数 ADC 是稳定连接的,所以我们还测试血清稳定的但细胞内可裂解的抗 CD22 - SN-38 缀合物,但确定其比 CL2A 接头的有效性低 40 至 55 倍。其他人检查了缀合至抗 CD20 或抗 CD22 抗体的多种超毒性药物,发现内化缀合物通常活性更大,而且还观察到甚至缓慢内化的抗体在释放的药物渗透细胞膜时也可以是有效的。虽然 CL2A 型接头可能适合于 SN-38,但其对于毒性更大的试剂可能不是最佳的,其中在血清中的即使小的持续释放也将增加毒性并且损害治疗窗。

[0504] Emab - SN-38 在带有 Ramos 的小鼠中在 0.6mg 的累积剂量下是有活性的 (75 μ g, 每周两次,持续 4 周),将其外推至仅 2.5mg/kg 的人剂量。因此,Emab - SN-38 将在患者中具有充分的治疗窗。此外,将有效和安全剂量的抗 TROP-2 - SN-38 缀合物与最大耐受剂量的 ^{90}Y -标记抗体组合,而没有毒性可感知的提高,但具有改善的功效 (Sharkey 等人, 2011, Mol Cancer Ther 10:1072-81)。因此,这些 SN-38 抗体缀合物的安全和功效概况对于其它组合疗法是有利的。

[0505] 尽管依立替康没有常规地用于治疗造血系统癌症,但 SN-38 在淋巴瘤和白血病细胞系中与在实体肿瘤中一样有效 (Cardillo 等人, 2011, Clin Cancer Res 17:3157-69)。在 WSU-FSCCL 细胞系中,特异性和不相关的 IgG 缀合物比依立替康显著更佳,而在 Ramos 中,不相关的缀合物的中值 TTP 与依立替康相比更长但不是显著更佳。这些结果与其它研究是一致的,所述研究显示非特异性的 IgG 是药物的优异载体并且比游离药物或用白蛋白或聚乙二醇 (PEG)-Fc 制备的缀合物在体内更有效。虽然 PEG - SN-38 缀合物具有显著的抗肿瘤效果,但它是在其最大耐受量下给予,范围从 10 到 30mg/kg SN-38 等效物 (Sapra 等人, 2009, Haematologica 94:1456-9)。相比之下,在 4 周内向带有 Ramos 的动物给予的 SN-38 的最大累积剂量仅为 1.6mg/kg (即每周两次给予 0.25mg 剂量的 Emab - SN-38,持续 4 周) 并且这是无毒的。

[0506] Emab - SN-38 的特定治疗活性在具有更高 CD22 表达的细胞系中似乎有改善。例如,在 Ramos 中,单独 Emab - SN-38 的特定治疗效果在所检查的 3 个不同剂量水平的 2 个下记录,并且相当大部分的肿瘤被完全切除。相比之下,在 CD22 表达下降约 2.5 倍的 WSU-FSCCL 中,Emab - SN-38 与不相关的抗 CEACAM5-SN-38 缀合物相比在 2 个研究的 1 个中显著地改善存活期。然而,重要的是要强调当 Emab-SN-38 与非缀合的抗 CD20 疗法组合使用时,其增强治疗反应。因此,这两种治疗的组合可以加强反应,甚至在 CD22 没有高度表达的情况下也是如此。

[0507] 总之,使用稳定性较低的 CL2A - SN-28 接头,Emab 抗 CD22 - SN-38 缀合物在无毒剂量下在体内与类似的抗 CD20 - SN-38 缀合物具有相同的活性,尽管 CD20 表达比 CD22 高对数倍。治疗反应即使当 CD22 表达较低的情况下也受益于 Emab - SN-38 与非缀合的 Vmab 抗 CD20 疗法的组合,这表明所述组合疗法当两种抗原存在时可以改善许多 B 细胞恶性肿瘤

中的反应。目前的研究表明此组合在各种各样的淋巴瘤和白血病临床前模型中都很有效，还似乎具有较低的宿主毒性。

[0508] 实施例 13. 用于治疗 CD74+ 人癌症的抗 CD74 (米拉珠单抗) SN-38 缀合物

[0509] 摘要

[0510] CD74 是抗体 - 药物缀合物 (ADC) 有吸引力的靶标,因为它在抗体结合之后内化并再循环。CD74 主要与血液学癌症有关,但也在实体癌症中表达。因此,检验了用人源化抗 CD74 抗体米拉珠单抗制备的 ADC 用于治疗表达 CD74 的实体肿瘤的效用。米拉珠单抗 - 阿霉素和两种米拉珠单抗 - SN-38 缀合物用可裂解的接头 (CL2A 和 CL2E) 制备,在其血清稳定性及其如何在溶酶体中释放 SN-38 方面是不同的。通过流式细胞术和免疫组织学测定 CD74 表达。体外细胞毒性和体内治疗性研究在人癌细胞系 A-375 (黑素瘤)、HuH-7 和 Hep-G2 (肝细胞瘤)、Capan-1 (胰腺癌)、及 NCI-N87 (胃癌) 以及 Raji 伯基特淋巴瘤中进行。将米拉珠单抗 - SN-38ADC 与用抗 TROP-2 和抗 CEACAM6 抗体制备的 SN-38ADC 在表达它们的靶抗原的异种移植植物进行比较。

[0511] 米拉珠单抗 - 阿霉素在淋巴瘤模型中最有效,但在 A-375 和 Capan-1 中,仅米拉珠单抗 - 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,米拉珠单抗 - CL2A-SN-38 在 Capan-1 中具有与抗 TROP-2CL2A-SN-38 类似的功效,但在 NCI-N87 中,抗 CEACAM6 和抗 TROP-2 缀合物是优良的。在 2 个肝细胞瘤细胞系中的研究在单次剂量水平下在盐水治疗的动物中展示显著益处,而不是针对不相关的 IgG 缀合物。CD74 是一些实体肿瘤异种移植植物中的合适的 ADC 靶标,其功效在很大程度上受 CD74 表达的均匀性的影响,并且 CL2A 连接的 SN-38 缀合物提供最佳的治疗反应。

[0512] 引言

[0513] 被称为恒定链或 Ii 的 CD74 是 II 型跨膜糖蛋白,其与 HLA-DR 缔合并抑制抗原性肽结合至 II 类抗原呈递结构。它充当伴侣分子,使用由 NF- κ B 介导的途径并且在 T 细胞反应中经由与 CD44 相互作用将恒定链复合物引导至核内体和溶酶体 (一种在 B 细胞成熟中的辅助分子) (Naujokas 等人, 1993, Cell 74:257-68), 并且它是一种用于促炎细胞因子、巨噬细胞迁移抑制因子的受体 (Leng 等人, 2003, J Exp Med 197:1467-76), 其涉及于激活细胞增殖和存活途径中。

[0514] 在正常人组织中, CD74 主要在 B 细胞、单核细胞、巨噬细胞、树状细胞、朗格罕氏细胞、活化的 T 细胞子集及胸腺上皮中表达 (未示出), 并且其在超过 90% 的 B 细胞肿瘤中表达 (Burton 等人, 2004, Clin Cancer Res 10:6606-11; Stein 等人, 2004, Blood 104:3705-11)。早期研究在关于 CD74 是否存在于膜上具有矛盾的数据, 部分是因为恒定链的抗体对于分子的细胞质部分有特异性, 而且还因为在表面上存在相对较少的拷贝, 并且其在细胞表面上的半衰期非常短。细胞表面上大约 80% 的 CD74 与 MHC II 抗原 HLA-DR 有关 (Roche 等人, 1993, PNAS USA 90:8581-85)。使用鼠科抗 CD74 抗体 LL1, 估算 Raji 伯基特淋巴瘤细胞系具有 4.8×10^4 个拷贝 / 细胞, 但是因为快速的细胞内转运, 约 8×10^6 个抗体分子每天被内化和异化 (Hansen 等人, 1996, Biochem J 320:293-300)。因此, CD74 内化是高度动态的, 其中抗体迅速地从表面移动并且在细胞内被卸载, 然后在表面上进行 CD74 再表达。Fab' 的内化与 IgG 结合同样快速的发生, 表明不需要二价结合。用 CDR 移植植物移植形式的鼠科 LL1 米拉珠单抗 (hLL1) 的稍后研究发现, 抗体可改变 B 细胞增殖、迁移及粘

附分子表达 (Stein 等人, 2004, Blood 104:3705-11 ;Qu 等人, 2002, Proc Am Assoc Cancer Res 43:255 ;Frolich 等人, 2012, Arthritis Res Ther 14:R54), 但抗 CD74 抗体的优越内化特性使其成为用于细胞内递送癌症治疗剂的有效载体 (例如 Griffiths 等人, 2003, Clin Cancer Res 9:6567-71)。基于临床前功效和毒理学结果, 已经在多发性骨髓瘤 (Kaufman 等人, 2008, ASH Annual Meeting Abstracts, 112:3697) 以及非何杰金氏淋巴瘤和慢性淋巴细胞性白血病中开始用米拉珠单抗 - 阿霉素的 I 期临床试验。

[0515] 有趣的是, CD74 还在非造血系统癌症中表达, 如胃癌、肾癌、膀胱癌、非小细胞肺癌、某些肉瘤以及成胶质细胞瘤 (例如 Gold 等人, 2010, Int J Clin Exp Pathol 4:1-12), 且因此其可能是用于表达此抗原的实体肿瘤的治疗性靶标。因为米拉珠单抗 - 阿霉素缀合物在血液癌症模型中有高度活性, 所以其是用于此评定的符合逻辑的选择。然而, 我们最近开发了用于将高度有效的拓扑异构酶 I 抑制剂 SN-38 偶联到抗体上的工序。SN-38 是依立替康的活性形式, 其药理学及代谢是众所周知的。这些缀合物在实体肿瘤细胞系中具有纳摩尔效能, 并且发现用不主动内化的抗体是有活性的。先前研究指出优选允许 SN-38 以约 1 天的半衰期从缀合物离解到血清中的接头 (CL2A) 胜于在血清中或多或少稳定的其它接头。然而, 鉴于米拉珠单抗优越的内化能力, 开发出一种在血清中高度稳定但可以在进入溶酶体中时释放 SN-38 的新型接头。

[0516] 目前的研究考查使用这三种米拉珠单抗抗 CD74 缀合物用于主要针对实体肿瘤的有效疗法的前景, 一种具有阿霉素, 且两种为 SN-38 缀合物。

[0517] 材料和方法

[0518] 人肿瘤细胞系。Raji 伯基特淋巴瘤、A-375 (黑素瘤)、Capan-1 (胰腺癌)、NCI-N87 (胃癌)、Hep-G2 肝癌及 MC/CAR 骨髓瘤细胞系是购自美国组织培养物保藏中心 (Manassas, VA)。HuH-7 肝细胞瘤细胞系是购自 Japan Health Science Research Resources Bank (Osaka, Japan)。所有细胞系都在湿润的 CO₂ 孵育器 (5%) 在 37°C 下在含有 10% 至 20% 胎牛血清和补充剂的推荐培养基中培养。细胞传代 <50 次并且定期检查支原体。

[0519] 抗体与缀合方法。米拉珠单抗 (抗 CD74MAb)、依帕珠单抗 (抗 CD22)、维妥珠单抗 (抗 CD20)、拉贝珠单抗 (抗 CEACAM5)、hMN15 (抗 CEACAM6) 以及 hRS7 (抗 TROP-2) 是人源化 IgG₁ 单克隆抗体。CL2A 和 CL2E 接头及其 SN-38 衍生物如以上实施例中所述来制备并缀合至抗体上。如先前所述制备米拉珠单抗 - 阿霉素缀合物 (Griffiths 等人, 2003, Clin Cancer Res 9:6567-71)。所有缀合物都通过 IgG 的二硫化物还原, 然后与这些接头的相应马来酰亚胺衍生物反应来制备。分光光度分析估算药物 : IgG 摩尔取代比是 5-7 (1.0mg 蛋白质含有约 16 μg 的 SN-38 或 25 μg 阿霉素等效物)。

[0520] 体外细胞结合和细胞毒性。比较非缀合和缀合的米拉珠单抗与抗原阳性细胞的细胞结合的测定及细胞毒性测试使用 MTS 染料还原法 (Promega, Madison, WI)。

[0521] 流式细胞术和免疫组织学。流式细胞术以提供仅膜结合或膜及细胞质抗原的评定的方式进行。对皮下肿瘤异种移植物的福尔马林固定且石蜡包埋的切片进行免疫组织学, 使用在 10 μg/mL 下以抗人 IgG 缀合物显现的抗体, 不用抗原修复方法染色。

[0522] 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 周检疫之后使用。所有试剂 (包括盐水对照) 都腹膜内

施用,每周两次,持续4周。具体的剂量在结果中给出。毒性通过每周重量测量来评定。对于Raji 伯基特淋巴瘤模型,用在0.1mL培养基中的 2.5×10^6 个Raji 细胞静脉内注射SCID小鼠。五天后,动物接受缀合物或盐水的单次静脉内注射(0.1mL)(N=10只/组)。每天观察小鼠的痛苦和麻痹迹象,并且当后肢瘫痪发生、>15%初始重量减轻或否则垂死(替代存活终点)时施以安乐死。

[0523] 皮下肿瘤通过卡尺在2个尺寸上测量,并且肿瘤体积(TV)被计算为: $L \times w^2/2$,其中L是最长直径且w是最短直径。每周至少测量一次,当肿瘤长到1.0cm³时(即替代存活终点)终止动物。将A-375 黑素瘤细胞系(6×10^6 个细胞,在0.2mL中)植入裸小鼠中并且当肿瘤平均为 $0.23 \pm 0.06 \text{ cm}^3$ (N=8只/组)时开始疗法。使用来自连续传代肿瘤的肿瘤混悬液(0.3mL的15% w/v 肿瘤混悬液)与来自组织培养物的 8×10^6 个细胞的组合将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只/组)时开始治疗。通过皮下注射0.2mL 1:1(v/v) 基质胶与来自末端培养的 1×10^7 个细胞的混合物开始NCI-N87 胃肿瘤异种移植植物。当TV平均为 $0.249 \pm 0.045 \text{ cm}^3$ (N=7只/组)时开始治疗。遵循相同的工序来在裸小鼠中发展Hep-G2 和HuH-7 肝细胞瘤异种移植植物。当Hep-G2 平均为 $0.364 \pm 0.062 \text{ cm}^3$ (N=5只/组)且HuH-7 平均为 $0.298 \pm 0.055 \text{ cm}^3$ (N=5只/组)时开始治疗。

[0524] 功效用Kaplan-Meier 存活曲线表示,使用如上所述的替代终点用于确定中值存活时间。通过对数秩(Mantel-Cox) 检验使用Prism GraphPad 软件(LaJolla, CA) 进行分析,其中显著性在P<0.05 下。

[0525] 结果

[0526] 在人肿瘤细胞系和异种移植植物中的CD74 表达。来源于4 种不同实体肿瘤类型的六个细胞系主要基于对透化细胞的分析被鉴别为CD74 阳性的(表10),因为在实体肿瘤细胞系中仅膜的CD74 的MFI 比背景MFI 高<2 倍(A-375 黑素瘤细胞系除外)。Raji 中的表面CD74 表达比实体肿瘤细胞系高>5 倍,但在透化的Raji 细胞中的总CD74 类似于大多数实体肿瘤细胞系。

[0527] 表10. 通过流式细胞术确定的表示为米拉珠单抗阳性门控细胞的平均荧光强度(MFI) 的CD74 表达。

[0528]

细胞系		表面		表面和细胞质	
		hLL1 (背景) ^a	MFI 比率 hLL1:背景	hLL1 背景 ^b	MFI 比率 hLL1:背景
Panc CA ^c	Capan-1	22 (12)	1.8	248 (5)	49.6
	Hs746T	17 (8)	2.1	144 (5)	28.8
胃癌	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

[0529] ND, 未进行

[0530] ^a仅用GAH-FITC 孵育的细胞的背景MFI。

[0531] 免疫组织学显示Raji 皮下异种移植植物具有大量均匀且强烈的染色,具有突出的

细胞表面标记（未示出）。Hep-G2 肝细胞瘤细胞系具有最均匀的实体肿瘤摄取，中等强度但是突出的细胞质染色（未示出），接着是 A-375 黑素瘤细胞系，其具有稍微较低均匀度的染色，更强烈但主要是细胞质的表达（未示出）。Capan-1 胰腺（未示出）和 NCI-N87（未示出）胃癌细胞系具有中等（Capan-1）至强烈的（NCI-N87）CD74 染色，但其分布不均匀。HuH-7 肝细胞瘤细胞系（未示出）具有最小均匀度和最弱的染色。

[0532] 缀合物的免疫反应性。非缀合的米拉珠单抗、米拉珠单抗-CL2A- 及 CL2E-SN-38 缀合物的 K_d 值显著不同，平均分别是 0.77nM、0.59nM 及 0.80nM。在 MC/CAR 多发性骨髓瘤细胞系中测量的非缀合的及阿霉素-缀合的米拉珠单抗的 K_d 值分别是 0.5 ± 0.02 nM 和 0.8 ± 0.2 nM (Sapra 等人, 2008, Clin Cancer Res 14:1888-96)。

[0533] 缀合物的体外药物释放和血清稳定性。SN-38 从巯基乙醇-加帽的 CL2A 和 CL2E 接头释放的机制是在部分地模拟溶酶体条件的环境中确定，即，低的 pH (pH 5.0)，且在组织蛋白酶 B 存在或不存在下。CL2E-SN-38 底物在酶不存在下在 pH 5 下是惰性的（未示出），但在组织蛋白酶 B 存在下，在 Phe-Lys 位点处的裂解迅速地进行，其中半衰期是 34min（未示出）。活性 SN-38 的形成需要在 SN-38 的第 10 位处氨基甲酸酯键的分子内环化，其发生更缓慢，且半衰期是 10.7h（未示出）。

[0534] 如所预期，组织蛋白酶 B 对在 CL2A 接头中的活性 SN-38 的释放没有影响。然而，CL2A 具有可裂解的碳酸苄酯键，在 pH 5.0 下以类似于 CL2E 接头的速率释放活性 SN-38，其中半衰期是约 10.2h（未示出）。具有 pH 敏感性酰胺键的米拉珠单抗-阿霉素缀合物在 pH 5.0 下具有 7 至 8 的半衰期（未示出）。

[0535] 虽然所有这些接头在溶酶体相关条件下以相对类似的速率释放药物，但它们具有非常不同的血清稳定性。米拉珠单抗-CL2A-SN-38 在 21.55 ± 0.17 h 内释放 50% 的游离 SN-38（未示出），与其它 CL2A-SN-38 缀合物一致。然而，CL2E-SN-38 缀合物具有高度惰性，其半衰期外推到约 2100h。米拉珠单抗-阿霉素缀合物在 98h 内释放 50% 的阿霉素，这类似于 2 种其它抗体-阿霉素缀合物（未示出）。

[0536] 细胞毒性。与评价这些缀合物有关的重要问题是游离的阿霉素和 SN-38 在造血和实体肿瘤细胞系中的相对效能。我们组先前已报道，SN-38 在若干 B 细胞淋巴瘤和急性白血病细胞系中有活性，其效能范围从 0.13 到 2.28nM (Sharkey 等人, 2011, Mol Cancer Ther 11:224-34)。在随后被用于体内治疗研究的 4 个实体肿瘤细胞系中的 SN-38 效能范围是从 2.0 到 6nM（未示出）。阿霉素在 Raji 淋巴瘤和 A-375 黑素瘤细胞系中具有混合反应，其效能是 3-4nM，但它针对 Capan-1、NCI-N87 及 Hep G2 细胞系的效力几乎小 10 倍。比较 SN-38 与阿霉素效能的其它研究发现：LS174T 结肠癌，18 比 18（分别是 SN-38 比阿霉素的 nM 效能）；MDA-MB-231 乳腺癌，2nM 比 2nM；SK-OV-4 卵巢癌，18nM 比 90nM；Calu-3 肺腺癌，32nM 比 582nM；Capan-2 胰腺癌，37nM 比 221nM；以及 NCI-H466 小细胞肺癌，0.1nM 比 2nM。因此，SN-38 在这 6 个细胞系的 4 个中比阿霉素更有效 5 至 20 倍，在 LS174T 和 MDA-MB-231 中具有类似效能。总的来说，这些数据指出阿霉素针对实体肿瘤与 SN-38 相比不够有效，而 SN-38 在实体和造血系统肿瘤中似乎同样有效。

[0537] 如所预期，3 种缀合物形式与游离的药物相比在体外不够有效几个数量级，因为预计两种药物容易转运到细胞中，而药物缀合物需要在细胞内抗体结合至转运药物（未示出）。CL2A 连接的 SN-38 缀合物是一个例外，因为超过 90% 的 SN-38 在 4 天测定期内从

缀合物释放到培养基中 (Cardillo 等人, 2011, Clin Cancer Res 17:3157-69; Sharkey 等人, 2011, Mol Cancer Ther 11:224-34)。因此, 即使缀合物被快速地内化, 还是难以辨别游离的药物与 CL2A 连接的药物之间的差异。

[0538] 稳定的 CL2E 连接的 SN-38 在 Raji 细胞系中与游离的 SN-38 相比比较良好地发挥作用, 但其在 4 个实体肿瘤细胞系中具有实质上 (7 至 16 倍) 下降的效能, 表明 CD74 的相对较低的表面表达可能在最少化这些实体肿瘤中的药物转运方面起作用。米拉珠单抗-阿霉素缀合物在所有的细胞系中当与游离的阿霉素相比时在其效能方面具有相当大的差异, 其在实体肿瘤细胞系中具有与 CL2E-SN-38 缀合物同游离的 SN-38 类似的量值。

[0539] 在以上提及的 6 个另外的细胞系中, 米拉珠单抗-CL2A-SN-38 缀合物比米拉珠单抗-阿霉素缀合物 9 至 60 倍更有效 (未示出), 但同样, 此结果很大程度上受以下事实的影响: CL2A 连接的缀合物在 4 天孵育期内将其大部分 SN-38 释放到培养基中, 而阿霉素缀合物在此相同时间内至多释放其 50% 的药物。未在这些其它的细胞系中考查 CL2E 连接的米拉珠单抗。

[0540] 人肿瘤异种移植物的体内疗法。用各种抗体制备的米拉珠单抗-阿霉素或 SN-38 缀合物的先前体内研究指出, 它们在比其最大耐受剂量低得多的剂量下是有效的 (Griffiths 等人, 2003, Clin Cancer Res 9:6567-71; Sapra 等人, 2005, Clin Cancer Res 11:5257-64; Govindan 等人, 2009, Clin Cancer Res 15:6052-61; Cardillo 等人, 2011, Clin Cancer Res 17:3157-69; Sharkey 等人, 2011, Mol Cancer Ther 11:224-34), 且因此体内测试集中在比较在耐受良好的水平下的类似但固定量的每种缀合物。

[0541] 初始研究首先考查播散性 Raji 淋巴瘤模型中的阿霉素和 SN-38 缀合物以便计量米拉珠单抗-阿霉素缀合物与 2 种 SN-38 缀合物相比结果如何 (未示出)。所有特异性缀合物比非靶向的拉贝珠单抗-SN-38 缀合物或盐水治疗的动物显著更佳, 其仅具有 20 天的中值存活期 ($P < 0.0001$)。尽管体外研究指出 SN-38 缀合物在 Raji 中差不多 8 倍的优势, 但最佳存活期见于米拉珠单抗-阿霉素缀合物中, 其中所有给予单次 17.5mg/kg (350 μ g) 剂量的动物以及给予 2.0mg/kg (40 μ g) 的 7/10 动物在研究结束时 (第 112 天) 是活着的 (例如 17.5mg/kg 剂量米拉珠单抗-阿霉素比对米拉珠单抗-CL2A-SN-38, $P = 0.0012$)。存活期对于更稳定的 CL2E-SN-38 缀合物是显著下降的 (CL2A 比对 CL2E 分别是 $P < 0.0001$ 和 $P = 0.0197$, 17.5 和 2.0mg/kg 剂量), 尽管体外研究表明两种缀合物在当内化时将以类似速率释放活性 SN-38。

[0542] 考查五个实体肿瘤细胞系, 从 A-375 黑素瘤细胞系开始, 因为它对阿霉素和 SN-38 两者具有最佳的体外反应。A-375 异种移植快速生长, 其中盐水治疗的对照动物仅具有 10.5 天的中值存活期 (未示出)。12.5mg/kg (0.25mg/ 每只动物) 每周两次剂量的米拉珠单抗-CL2A-SN-38 缀合物延长存活期至 28 天 ($P = 0.0006$), 其比具有 17.5 天中值存活期的对照依帕珠单抗-CL2A-SN-38 缀合物显著更佳 ($P = 0.0089$), 后者并没有显著地不同于盐水治疗的动物 ($P = 0.1967$)。米拉珠单抗-CL2A 缀合物提供比米拉珠单抗-CL2E-SN-38 缀合物显著更长的存活期 ($P = 0.0014$), 它具有与其对照依帕珠单抗-CL2E-SN-38 缀合物相同的 14 天中值存活期。尽管给予比 SN-38 缀合物高 2 倍剂量的米拉珠单抗-阿霉素, 但中值存活期与盐水治疗的动物差不多 (10.5 天)。

[0543] 如同 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,其中值存活期是 35 天,显著不同于未治疗的动物 ($P < 0.036$) (未示出),甚至在降低的剂量 (5mg/kg ; $100\text{ }\mu\text{g/只动物}$) ($P < 0.02$) 下也一样。米拉珠单抗-CL2E 和非靶向的依帕珠单抗-CL2A-SN-38 缀合物以及 2 倍更高剂量的米拉珠单抗-阿霉素缀合物都不提供任何存活期优势 ($P = 0.44$ 比对盐水)。值得注意的是,在用给予相同剂量的内化抗 TROP-2CL2A-SN-38 缀合物 (hRS7-SN-38;IMMU-132) 的动物的相同研究中,中值存活期等于米拉珠单抗-CL2A-SN-38 (未示出)。hRS7-CL2A-SN-38 缀合物先前已被鉴定为用于治疗多种实体肿瘤的所关注的 ADC (Cardillo 等人, 2011, Clin Cancer Res 17:3157-69)。在 Capan-1 上表面结合的 hRS7 的 MFI 是 237 (未示出),相比之下米拉珠单抗的是 22 (参见表 10)。因此,尽管具有实质上降低的表面抗原表达,但米拉珠单抗-CL2A-SN-38 缀合物在此模型中与 hRS7-CL2A-SN-38 缀合物的作用一样好。

[0544] 由于米拉珠单抗-阿霉素缀合物在 2 个实体肿瘤异种移植物中具有较差的治疗结果,故将焦点转移到比较米拉珠单抗-SN-38 缀合物与用针对 TROP-2 (hRS7) 或 CEACAM6 (hMN-15) 的其它人源化抗体制备的 SN-38 缀合物,其在许多实体肿瘤的表面更多地表达 (Blumenthal 等人, 2007, BMC Cancer 7:2; Stein 等人, 1993, Int J Cancer 55:938-46)。考查三种另外的异种移植物模型。

[0545] 在胃肿瘤模型 NCI-N87 中,给予 17.5mg/kg/剂量 ($350\text{ }\mu\text{g}$) 的米拉珠单抗-CL2A-SN-38 的动物在存活期方面提供一些改善,但其与盐水治疗的动物 (31 天比对 14 天; $P = 0.0760$) 或与非结合的维妥珠单抗抗 CD20-CL2A-SN39 缀合物 (21 天; $P = 0.3128$) (未示出) 相比未能满足统计显著性。然而, hRS7- 和 hMN-15-CL2A 缀合物分别显著地改善中值存活期至 66 天和 63 天 ($P = 0.0001$)。表面表达的 TROP-2 和 CEACAM6 的 MFI 分别是 795 和 1123,比 CD74 的仅 5 高得多 (参见表 10)。免疫组织学在此细胞系的异种移植物中显示相对强烈的 CD74 的细胞质表达,但重要地,它是分散的,仅在肿瘤内限定的囊袋中出现 (未示出)。CEACAM6 和 TROP-2 比 CD74 更均匀地表达 (未示出),其中 CEACAM6 更强地存在于细胞质和膜上,且 TROP-2 主要见于膜上。因此,抗 CEACAM6 和抗 TROP-2 缀合物的改善的存活期很可能反映了在 NCI-N87 中的更高抗原密度和更均匀的表达。

[0546] 在 Hep-G2 肝细胞瘤细胞系 (未示出) 中,免疫组织学显示非常均匀的 CD74 表达和中等的细胞质染色,并且流式细胞术指示相对较低的表面表达 ($\text{MFI} = 9$)。hMN-15 的 MFI 是 175 并且免疫组织学显示 CEACAM6 相当均匀的膜和细胞质表达,其中分离的囊袋 (pocket) 有很强的膜染色 (未示出)。在带有 Hep-G2 异种移植物的动物中的研究发现米拉珠单抗-CL2A-SN-38 与盐水治疗组中的 21 天相比延长存活期至 45 天 ($P = 0.0048$),而 hMN-15-CL2A-SN-38 缀合物改善存活期至 35 天。米拉珠单抗缀合物存在比 hMN-15-CL2A-SN-38 有利的趋势,但其未能达到统计显著性 (46 天比对 35 天; $P = 0.0802$)。然而,非结合的维妥珠单抗-CL2A-SN-38 缀合物提供与米拉珠单抗缀合物类似的存活期优势。我们先前观察到用非结合缀合物的治疗结果可类似于特异性 CL2A 连接的缀合物,特别是在更高的蛋白质剂量下,但特异性和对照缀合物的滴定通常选择性地展现。因此,特异性缀合物中没有一个是在此细胞系中在这些剂量下提供选择性的治疗优势。

[0547] 使用 HuH-7 肝细胞瘤细胞系的另一个研究 (未示出) 发现 hMN-15-SN-38 缀合物与米拉珠单抗-CL2A 缀合物相比 ($P = 0.2944$) 提供更久 (35 天比对 18 天) 但并非显著不同的存活期优势,所述 HuH-7 肝细胞瘤细胞系具有与 Hep-G2 相比类似的表面表达,但稍微下

降的细胞质水平（参见表 10）。虽然 hMN-15 和米拉珠单抗缀合物两者都比盐水治疗的动物显著更佳（分别地， $P = 0.008$ 和 0.009 ），但两种缀合物在此剂量水平下同样没有显著不同于非靶向的维妥珠单抗-SN-38 缀合物（分别地， $P = 0.4602$ 和 0.9033 ）。CEACAM6 表面表达在此细胞系中相对较低（MFI = 81），并且免疫组织学显示 CD74（未示出）和 CEACAM6（未示出）很模糊且高度分散。

[0548] 讨论

[0549] 用于肿瘤选择性化疗的抗体-药物缀合物（ADC）方法是现在相当关注的一个领域（例如，Govindan 等人，2012, *Expert Opin Biol Ther* 12:873-90；Sapra 等人，2011, *Expert Opin Biol Ther* 20:1131-49。近来取得的临床成功（Pro 等人，2012, *Expert Opin Biol Ther* 12:1415-21；LoRusso 等人，2011, *Clin Cancer Res* 17:437-47）很大程度上归功于采用超毒性药物代替先前已使用的传统化疗剂。然而，靶标选择、抗体以及药物接头是影响 ADC 的最佳性能的全部因素。例如，在曲妥单抗-DM1 的情况下，HER2 在表达此抗原的肿瘤上是丰富的，抗体被内化，且抗体本身具有抗肿瘤活性，所有的都可以组合以提高治疗成果。形成鲜明对比的是，CD74 在细胞表面上以低得多的水平表达，但其独特的内化和表面重新表达特性允许米拉珠单抗抗 CD74ADC 在造血系统癌症异种移植物模型中是有效的，即使是用中等毒性药物如阿霉素（Griffiths 等人，2003, *Clin Cancer Res* 9:6567-71；Sapra 等人，2005, *Clin Cancer Res* 11:5257-64）。虽然阿霉素在造血系统癌症中更经常地使用，而 SN-38 及其它喜树碱向具有实体肿瘤的患者施用，但我们决定评定阿霉素和米拉珠单抗的 SN-38 缀合物在实体肿瘤中的效用。米拉珠单抗-阿霉素缀合物在各种血液癌的异种移植物模型中是有效的，引出其临床测试（NCT01101594 和 NCT01585688），而若干 SN-38 缀合物在实体和血液肿瘤模型中是有效的，致使 2 种新的 SN-38 缀合物在结肠直肠癌和各种各样的上皮癌的 I 期临床试验中被研究（NCT01270698 和 NCT01631552）。

[0550] 在体外，非缀合的阿霉素及 SN-38 针对 Raji 淋巴瘤细胞系具有与阿霉素类似的效力，但是 SN-38 在许多不同的实体肿瘤细胞系中更有效。有趣的是，在体内，米拉珠单抗-阿霉素缀合物与米拉珠单抗-SN-38 缀合物相比在 Raji 中提供最佳反应。然而，在 Capan-1 和 A-375 中，米拉珠单抗-阿霉素不如 CL2A 连接的 SN-38 米拉珠单抗缀合物有效，尽管体外测试指出 A-375 对游离的阿霉素的敏感性与对游离的 SN-38 一样。两种其它细胞系，MDA-MB-231 乳腺癌和 LS174T 结肠癌，也在用游离的阿霉素时与 SN-38 具有类似的体外效能，但因为体外测试指出 SN-38 在实体和血液系统癌症中同样有效，并且用 SN-38 在所评价的大多数实体肿瘤细胞系中具有比阿霉素高 5 至 20 倍的效能，所以我们决定集中在将 2 种米拉珠单抗-SN-38 缀合物用于实体肿瘤治疗。然而，为了更好地计量米拉珠单抗-SN-38 缀合物的效用，我们纳入了用针对存在于多种实体肿瘤中的其它抗原的抗体制备的 SN-38ADC 的比较评定。

[0551] 我们先前已经考查了用内化的 hRS7 抗 TROP-2CL2A 连接的 SN-38 缀合物在 Capan-1 细胞系中的治疗反应（Cardillo 等人，2011, *Clin Cancer Res* 17:3157-69），且因此比较米拉珠单抗与 hRS7SN-38 缀合物的功效。在此研究中，两种缀合物与对照抗体相比显著地改善存活期，其中每个 CL2A 连接的 SN-38 缀合物优于 CL2E 连接的缀合物。因为流式细胞术已指出 TROP-2 表达在 Capan-1 中比 CD74 更多，所以此结果表明已知是个例外的 CD74 的转运能力比 TROP-2 更有效。然而，众所周知的是，抗原可达性（即膜比对细胞质，生

理和“位点结合”屏障)及在肿瘤内细胞间的分布是影响每种形式的靶向疗法的关键因素,特别是那些取决于产物向个别细胞的足够的细胞内递送的因素(Thurber 等人,2008,Adv Drug Del Rev 60:1421-34)。在抗原不均匀地在肿瘤内的所有细胞中表达的情况下,靶标试剂(如 CL2A 连接的缀合物)在肿瘤中局部化之后缓慢释放其有效负载,这将允许药物扩散到非靶向的旁观者细胞,从而扩大其功效范围。实际上,高的抗原表达根据位点结合屏障效应可潜在地阻止肿瘤渗透,但细胞外释放机制可提供药物在肿瘤内扩散的机制。还认为此机制促进其它缀合物的功效,我们已使用内化不良的抗体如本文所用的抗 CEACAM5 和抗 CEACAM6 对所述其它缀合物进行了考查。基于米拉珠单抗的缀合物更多地依赖于抗体与肿瘤细胞的直接相互作用,其利用 CD74 的快速内化和重新表达,这可以补偿其在细胞表面上的降低的丰度。然而,此优势当 CD74 高度地分散在肿瘤内时将减小,并且没有将缀合物保持在肿瘤内的机制,药物从缀合物中缓慢释放的益处将丧失。由我们组早先进行的对人胃肠道肿瘤的综述表明它们经常具有高表达水平和良好的均匀性(Gold 等人,2010,Int J Clin Exp Pathol 4:1-12)。

[0552] 在我们初始评定 SN-38 的合适接头期间,考查了许多不同的衍生物,包括‘CL2E’样接头,所述接头被设计偶联在 SN-38 的 20-羟基位置处,类似于 CL2A 接头。然而,那个抗体缀合物缺乏足够的抗肿瘤活性并且对其进行研究。鉴于米拉珠单抗的特殊内化特性,我们决定再次研究 SN-38 接头的化学特性,采取以下假设:CD74 缀合物的快速内化将提高更稳定的缀合物的药物负载。我们猜测如果离去基团是苯酚基团,那么这可促进环化,且因此 CL2E 接头被设计加入 SN-38 的苯酚 10-位处。

[0553] 开始时,CL2E 连接的 SN-38 缀合物在 Raji 细胞系中具有与 CL2A 缀合物充满希望类似的 IC_{50} ,这与以下观点一致:如果快速内化,那么两种缀合物将以大致相同的速率释放活性形式的 SN-38。然而,如已提到的,CL2A 缀合物的体外活性很大程度上受到 SN-38 向培养基中释放的影响,并且不一定是反映由完整缀合物的摄取。当发现 CL2E 连接的缀合物在实体肿瘤细胞系中比 CL2A 缀合物功效低得多时,这表明 CD74 的较低表面表达影响 SN-38 经由米拉珠单抗结合的内化。然而,当在 Raji 中的体内研究显示米拉珠单抗-CL2A-SN-38 优于 CL2E 缀合物时,一些其它因素毫无疑问被认为将影响 CL2E 的功效。一种可能的解释是在 CL2E-SN-38 中的接头设计在药物的 20-位置处未衍生化,致使内酯基团容易开环。实际上,依立替康的研究已显示 SN-38 的效能由许多因素而减弱,内酯环打开成羧酸酯形式,该形式仅具有完整内酯形式效能的 10%。相比之下,CL2A 连接的 SN-38 在 20-羟基位置处衍生化,这是一种在生理条件下稳定喜树碱中的内酯基团的方法。因此,SN-38 的内酯环可能受到保护以免在 CL2A 中裂解,而不是 CL2E 缀合物。因此,内酯环的去稳定可促使 CL2E 体内功效的减弱。因为在酸性条件下进行体外稳定性研究和血清稳定性分析,所以我们不直接测量在这些缀合物的任一种中羧酸酯形式的 SN-38。

[0554] 总之,体外和体内结果指出米拉珠单抗-阿霉素缀合物在 Raji 淋巴瘤细胞系中优于 CL2A-SN-38 缀合物,这可能反映了阿霉素缀合物与 CL2A 相比改善的稳定性。然而,CL2A-SN-38 缀合物比高度稳定的 CL2E-SN-38 缀合物更有效的研究结果表明潜在地与药物的激活或细胞系敏感性有关的其它问题可能起作用。

[0555] CD74 在细胞生物学中具有多重作用;在抗原呈递细胞中,它在加工抗原肽方面可具有更主导的作用,在实体肿瘤的情况下,其作用可能与存活期更相关。这些不同的作用可

能影响细胞内运输和加工。或者,CL2E 连接的 SN-38 的下降的功效可能反映了由 SN-38 中内酯环打开所致的药物失活,暗示特异性接头的重要性。最终,在实体肿瘤模型中,当针对用更可达(表面表达)和丰富的其它内化(hRS7)或内化不良的抗体(hMN15)制备的缀合物来测量时,抗原可达性似乎在限定米拉珠单抗-CL2A-SN-38 效能中具有主导作用。我们推测此发现用于靶向疗法是普遍的,但这些研究至少显示 CD74 靶向试剂的独特内化特性可提供显著的功效,即使当靶抗原的表面表达最小时也是如此。

[0556] 实施例 14. 使用 hRS7-SN-38(IMMU-132) 治疗疗法难治性转移性结肠癌(mCRC)

[0557] 患者是具有 mCRC 的 62 岁女性,其最初在 2012 年 1 月呈现转移性疾病。她在诊断之后的几个星期接受了腹腔镜回肠横结肠切除术作为第一疗法,然后在新辅助情形下接受 4 个周期的 FOLFOX(甲酰四氢叶酸、5-氟尿嘧啶、奥沙利铂)化疗,之后在 2012 年 3 月进行右肝切除术以便去除肝右叶中的转移性病灶。在此之后在 2012 年 6 月恢复辅助的 FOLFOX 方案,总共 12 个周期的 FOLFOX。8 月,由于神经毒性加重,将奥沙利铂从方案中除去。她的最后一个周期的 5-FU 是在 09/25/12。

[0558] 在 2013 年 1 月做的 CT 显示向肝脏转移。然后将她评定为入选 IMMU-132(hRS7-SN-38) 临床实验研究的良好候选人。在她病史中的并发症包括哮喘、糖尿病、高血压、高胆固醇血症、心脏杂音、食管裂孔疝、甲状腺机能减退、腕管综合征、青光眼、抑郁症、不宁腿综合征以及神经病。她的手术史包括输卵管结扎(1975)、甲状腺切除术(1983)、胆囊切除术(2001)、腕管解压术(2008)以及青光眼手术。

[0559] 在进入此项试验中之时,她的目标病灶是肝左叶中的一个 3.1cm 肿瘤。非目标病灶包括肝脏中的若干低密度肿块(hypo-attenuated mass)。她的基线 CEA 是 781ng/ml。

[0560] 在患者签署知情同意书之后,通过输注连续 2 周以每周一次的方案给予 IMMU-132,然后停药一周,这构成了一个治疗周期。耐受时重复这些周期。IMMU-132(8mg/kg)的首次输注在 2013 年 2 月 15 日开始,并且完成而无显著的事件。她在首个周期的过程中经历恶心(2 级)和疲劳(2 级)并且从那时起继续治疗而没有严重的不利事件。报道她在 2013 年 3 月有脱发和便秘。在 04/08/2013 通过计算机断层摄影术(CT)完成的首个反应评定(在 6 个剂量之后)显示目标病灶缩小 29%。她的 CEA 水平在 2013 年 3 月 25 日降到 230ng/ml。在 2013 年 5 月 23 日的第二反应评定(在 10 个剂量)中,目标病灶缩小 39%,由此构成了根据 RECIST 标准的部分反应。她已继续治疗到 06/14/13 时止,接受 6 个周期,由 12 个剂量的 8mg/kg 的 hRS7-SN-38(IMMU-132)组成。她的总体健康和临床症状自从开始此临床实验治疗以来改善相当大。

[0561] 实施例 15. 使用 hRS7-SN-38(IMMU-132) 治疗疗法难治性转移性乳腺癌

[0562] 患者是具有 IV 期三阴性乳腺癌(ER/PR 阴性,HER-neu 阴性)的 57 岁女性,她最初在 2005 年被诊断出。她在 2005 年经历了左乳肿块切除术,然后在 2005 年 9 月在辅助情形下接受剂量密集的 ACT。然后她接受放射疗法,在 11 月完成。当在 2012 年年初触诊患者发现对侧(右侧)乳房肿块时鉴定疾病的局部复发,并且然后用 CMF(环磷酰胺、氨甲蝶呤、5-氟尿嘧啶)化疗治疗。她的疾病在同年复发,在胸壁皮肤中有转移性病灶。然后她接受卡铂 + TAXOL®化疗方案,在此期间出现血小板减少。她的疾病进展并且开始每周给予阿霉素,继续 6 次剂量。皮肤疾病也进展。09/26/12 的 FDG-PET 扫描显示胸壁上的疾病进展并扩散,实体、腋窝淋巴结。给予患者羟考酮用于控制疼痛。

[0563] 当胸壁病灶打开并出血时,从2012年10月起向她给予IXEMPRA®直到2013年2月(每2周一次,持续4周)。然后给予她XELODA®,该药物由于在其手和脚中的神经病及便秘而耐受不佳。皮肤病灶是进行性的,然后她在给予知情同意书之后入选IMMU-132试验。该患者还具有甲状腺机能亢进和视力障碍病史,有CNS疾病的高风险(然而,脑MRI对于CNS疾病是阴性的)。在入选此试验之时,她在右乳的皮肤病灶(目标)经测量最大直径是4.4cm和2.0cm。她在右乳中还有另一个非目标病灶并且在右腋和左腋中各有一个肿大的淋巴结。

[0564] 首个IMMU-132输注(12mg/kg)于2013年3月12日开始,对该药物耐受良好。她的第二次输注由于在输注安排当天(一周以后)3级绝对嗜中性白细胞计数(ANC)减小(0.9)而被推迟。一周推迟之后并在接受NEULASTA®之后,在25%剂量减少下以9mg/kg施用她的第二次IMMU-132。此后,她已根据方案按时接受IMMU-132,每周一次,持续2周,然后停药一周。在3个治疗周期之后2013年5月17日她首次反应评定显示目标病灶的总长直径有43%减小,从而构成了根据RECIST标准的部分反应。她继续以9mg/kg剂量水平接受治疗。她的总体健康和临床症状自从开始用IMMU-132治疗以来改善相当大。

[0565] 实施例16. 使用hRS7-SN-38(IMMU-132)治疗难治性转移性非小细胞肺癌

[0566] 这是一位诊断有非小细胞肺癌的60岁男性。所述患者被给予卡铂、贝伐单抗的化疗方案6个月并且显示反应,然后在进展之后,在接下来的2年内接受卡铂、依托泊苷、TAXOTERE®、吉西他滨的进一步疗程,偶然的反应持续不超过2个月。患者然后表现出测量为6.5×4cm的左纵膈肿块和胸腔积液。

[0567] 在签署了知情同意书后,每隔一周以18mg/kg的剂量向患者给予IMMU-132。头两次注射期间,经历短期的嗜中性白细胞减少和腹泻,在4小时内有4次肠运动,但这些情况在2天内消退并且对症状性药疗法有反应。总共6次输注IMMU-132之后,指示病灶的CT评价显示22%减轻,仅在部分反应以下但有明确的肿瘤缩小。当指示病灶总直径的45%肿瘤缩小的部分反应由CT显示(由此构成了根据RECIST标准的部分反应)时,患者再进行此治疗两个月。

[0568] 实施例17. 使用hRS7-SN-38(IMMU-132)治疗难治性转移性小细胞肺癌

[0569] 这是一位被诊断为小细胞肺癌的65岁女性,所述肺癌涉及其左肺、纵隔淋巴结,并且MRI证据显示向左脑顶叶转移。先前化疗包括卡铂、依托泊苷及拓扑替康,但没有注意到反应。放射疗法也未能控制她的疾病。然后以18mg/kg的剂量给予她IMMU-132,每三周一次,总共5次输注。第二剂量之后,她经历低血压及2级嗜中性白细胞减少,这些症状在下次输注之前改善。第五次输注之后,CT研究结果显示她的目标左肺质量缩小13%。脑MRI也显示此转移的10%减少。继续她的IMMU-132给药再持续3个月,每三周一次,并且继续显示她的病状的客观和主观改善,左肺质量减小25%且脑转移减少21%。

[0570] 实施例18. 用hRS7-SN-38(IMMU-132)治疗具有IV期转移性疾病的胃癌患者

[0571] 此患者是一名60岁的男性,其具有40多年的吸烟史和过度饮酒史。他经历了重量减轻、饮食困难和抗酸剂不能减轻的疼痛、频繁腹痛、下背疼痛、以及最近在两腋可触摸到的淋巴结。他寻求医疗建议,并且在检查之后显示具有腺癌,包括一些鳞状特征,在胃-食道交界处,基于经由胃镜的活组织检查。放射性研究(CT和FDG-PET)还展现在右腋和左

腋、纵隔区、脊柱腰段以及肝脏（2 个肿瘤在右叶中且 1 个在左叶中，经测量直径全部在 2 与 4cm 之间）中的转移性疾病。切除他的胃肿瘤且然后对其实行表柔比星、顺铂及 5- 氟尿嘧啶的一系列化疗。4 个月及停药 6 周之后，他转为多西他赛化疗，基于通过 CT 测量转移性肿瘤及一些一般恶化所确认的进展，这还是未能控制他的疾病。

[0572] 然后以 10mg/kg 的剂量给予该患者 IMMU-132(hRS7-SN-38) 疗法，每隔一周输注一次，总共 6 次剂量，之后进行 CT 研究以评定他的疾病状况。对这些输注耐受良好，有一些轻度的恶心和腹泻，用症状性药疗法来控制。CT 研究展现他的指示转移性病灶总体减少 28%，因此他继续此疗法另外 5 个疗程。追踪 CT 研究显示通过 RECIST 标准，从 IMMU-132 疗法之前他的基线测量值来看，疾病保持约 35%减轻，并且他的一般状况也似乎有所改善，患者对于他的疾病受到控制恢复乐观的态度。

[0573] 实施例 19. 仅使用 IMMU-130（拉贝珠单抗-SN-38）治疗先前化学免疫疗法难治的晚期结肠癌患者

[0574] 患者是具有 IV 期转移性结肠癌病史的 50 岁男性，首先在 2008 被诊断出并且分别就原发性和转移性结肠癌给予结肠切除术和肝部分切除术。他然后接受化疗，如图 8 所示，该化疗包括依立替康、奥沙利铂、FOLFIRINOX（5- 氟尿嘧啶、甲酰四氢叶酸、依立替康、奥沙利铂）和贝伐单抗，以及与 5- 氟尿嘧啶 / 甲酰四氢叶酸组合的贝伐单抗，持续几乎 2 年。此后，在第二年或更长时间期间给予他单独或与 FOLFIRI（甲酰四氢叶酸、5- 氟尿嘧啶、依立替康）化疗组合的西妥昔单抗疗程。在 2009 年，他在化学免疫疗法下接受了针对肝转移的射频消融疗法，并且在 2010 年年底他进行了肺转移的楔形切除术，在几个月之后 2011 年年初重复该治疗。尽管在 2011 年采取了化学免疫疗法，但在 2011 年年底出现了新的肺转移，并且在 2012 年显现出肺和肝转移。就在进行 IMMU-130 抗体 - 药物疗法之前他的基线血浆癌胚抗原（CEA）滴度是 12.5ng/mL。由放射科医师通过计算机断层摄影术测量肿瘤尺寸变化而选出的指示病灶是右肺的中叶和肝转移，两者总计 91mm 作为在 IMMU-130（抗 CEACAM5-SN-38）疗法之前基线处它们的最长直径总和。

[0575] 此患者通过缓慢 IV 输注接受 16mg/kg 剂量的 IMMU-130，每隔一周一次，总共 17 次治疗剂量。患者对疗法耐受良好，在首个治疗之后仅有 1 级恶心、腹泻和疲劳，这些在治疗 4 和 5 之后出现，但此后没有出现，因为他就这些副作用接受了药疗法。治疗 3 之后，他显示脱发（2 级），这在随后的疗法期间存在。恶心、腹泻和偶尔的呕吐仅仅持续 2-3 天，并且他在首次输注之后出现疲劳，持续 2 周。不然，患者对该疗法耐受良好。因为长时间接受此缀合有 SN-38 的人源化（CDR 移植的）抗体，所以测量他血液中的抗拉贝珠单抗抗体，且没有检测到，甚至在 16 次剂量之后也一样。

[0576] 在 4 次治疗之后进行首个计算机断层摄影术（CT）测量，并且显示在该指示病灶中与在此疗法之前基线处得到的总测量值相比 28.6%变化。8 个治疗之后，此减小变成 40.6%，从而构成根据 RECIST 标准的部分缓解。当他的 CT 测量表明指示病灶小于基线测量值的 31.9%但比先前测量的 40.6%减小稍微更高时，此反应再维持 2 个月。因此，基于在先前化疗和免疫疗法（包括依立替康（SN-38 的母体分子））失败的患者的肺和肝中对指示病灶的细致的 CT 测量，显示对依立替康（或喜树碱）的活性代谢物 SN-38 当经由抗 CEACAM5 人源化抗体拉贝珠单抗（hMN-14）靶向时的客观反应。令人惊讶的是，虽然依立替康（CPT-11）通过体内释放 SN-38 起作用，但 SN-38 缀合的抗 CEACAM5 抗体通过在患者先

前未能对他的前一次含依立替康的疗法有反应之后诱发部分反应在结肠直肠癌患者中被证明是有效的。患者的血浆 CEA 滴度减小也证实了 CT 结果：它在第三次治疗剂量之后从 12.6ng/mL 的基线水平降至 2.1ng/mL，并且在 8 与 12 次剂量之间在 1.7 与 3.6ng/mL 之间。CEA 的正常血浆滴度通常被认为在 2.5 与 5.0ng/mL 之间，因此该疗法实现了他的 CEA 滴度在血液中的标准化。

[0577] 实施例 20. 用 IMMU-130 治疗具有晚期结肠癌的患者

[0578] 此患者是最初被诊断为转移性结肠癌（IV 期）的 75 岁女性。当她显示疾病进展时，其中疾病向后盲管、网膜扩散并且在她的骨盆中有腹水且在她的右侧胸腔中有胸腔积液，她进行了右半结肠切除术和小肠切除术，然后接受了 FOLFOX、FOLFOX+ 贝伐单抗、FOLFIRI+ 雷莫芦单抗、以及 FOLFIRI+ 西妥昔单抗疗法，持续一年半。就在此疗法之前她的基线 CEA 滴度是 15ng/mL。给予她 6mg/kg IMMU-130（抗 CEACAM5-SN-38），每周两次，持续连续 2 周，然后停药一周（3-周周期），超过 20 次剂量，她对此耐受非常好，没有任何严重的血液或非血液毒性。在 2 个月的疗法内，她的血浆 CEA 滴度适度地缩小至 1.3ng/mL，但在 8 周评价时，她显示指示肿瘤病灶的 21% 缩小，这在 13 周时提高至 27% 缩小。令人吃惊的是，在此时患者的腹水和胸腔积液都减少（后者消失），从而显著地改善患者的总体状况。患者继续她的临床实验疗法。

[0579] 实施例 21. 用 IMMU-130 治疗的具有 IV 期转移性疾病的胃癌患者

[0580] 患者是因胃不适和与饮食有关的疼痛持续约 6 年而寻求医疗护理的 52 岁男性，并且在过去的 12 个月期间有重量减轻。胃区触诊显示坚硬的包块，然后进行胃镜，显示在他的胃下部有溃疡性肿块。这是活组织检查并且被诊断为胃腺癌。实验室测试显示没有特定异常变化，除肝功能测试、LDH 和 CEA 升高以外，后者是 10.2ng/mL。然后患者经历全身 PET 扫描，揭示除胃肿瘤之外在左腋和肝右叶有转移性疾病（2 个小转移）。患者已进行了胃肿瘤切除，然后进行基线 CT 测量他的转移性肿瘤。手术之后四周，他接受了三个由顺铂和 5-氟尿嘧啶（CF）方案组成的组合化疗疗程，但耐受不是很好，因此转为多西他赛的治疗。基于 CT 扫描，疾病似乎稳定了约 4 个月，但接着患者陈诉有进一步重量减轻、腹痛、食欲不振和极度疲劳，促使重复的 CT 研究，该 CT 研究显示转移尺寸增大总计 20% 并且在原来胃切除的部位处有可疑病灶。

[0581] 然后以 8mg/kg 的每周方案给予患者使用 IMMU-130（抗 CEACAM5-SN-38）的实验疗法。他对此耐受良好，但在 3 周之后显示 2 级嗜中性白细胞减少和 1 级腹泻。他的第四次输注推迟一周，然后再开始每周输注，在接下来的 4 次注射中没有腹泻或嗜中性白细胞减少的证据。患者然后经历 CT 研究以测量他的转移性肿瘤尺寸并且察看胃切除的原始区域。根据 RECIST 标准，放射科医师测量出与 IMMU-130 疗法之前的基线相比转移性病灶总体减小 23%。在原来的胃切除术区域内看不到任何明显的病灶。此时患者的 CEA 滴度是 7.2ng/mL，这比 14.5ng/mL 的前 IMMU-130 基线值小得多。患者以 8.0mg/kg 的相同剂量继续每周的 IMMU-130 疗法，并且在总共 13 次输注之后，他的 CT 研究显示一个肝转移已消失且所有转移性病灶总体减少 41%，这构成了根据 RECIST 的部分反应。患者的一般状况改善并且他恢复了他的日常活动，同时继续接受每三周一次的 8mg/kg IMMU-130 维持疗法，持续另外 4 次注射。最后一次测量的血液 CEA 值是 4.8ng/mL，这在吸烟者的正常范围内，这就是此患者的情况。

[0582] 实施例 22. 用 hMN-15-SN-38 治疗复发性三阴性转移性乳腺癌

[0583] 先前用贝伐单抗加紫杉醇治疗但没有反应的具有三阴性转移性乳腺癌的 58 岁女性存在向若干肋骨、腰椎的转移,在她的左肺中有一个经测量直径为 3cm 的单发性病灶,有相当严重的骨骼疼痛和疲劳。给予她抗 CEACAM6 人源化单克隆抗体、hMN-15IgG(每 IgG 缀合 6 个分子的 SN-38) 的实验疗法。每三周给予她 12mg/kg 的输注,重复 4 次剂量,作为一个疗程。除暂时的 2 级嗜中性白细胞减少和一些初始腹泻之外,她耐受该疗法良好,然后在停药 2 个月之后重复该疗法,再持续一个疗程。放射学检查指出她具有根据 RECIST 标准的部分反应,因为指示病灶的总直径减小 39%。她的一般病状包括骨骼疼痛也得到改善,并且她回到了与她患病前几乎相同的活动水平。

[0584] 实施例 23. 用 hMN-15-SN-38 治疗复发性、通常难治性、转移性结肠癌

[0585] 一位 46 岁女性具有 IV 期转移性结肠癌,有原发性病灶切除的先前病史,其还具有同时向两个肝叶的肝转移以及蔓延到右肺的单一病灶;通过 CT 测量这些转移的直径在 2 与 5cm 之间。她在 3 年期间内经历了各种化疗的疗程,包括 5-氟尿嘧啶、甲酰四氢叶酸、依立替康、奥沙利铂、西妥昔单抗以及贝伐单抗。在两种情况下,存在疾病稳定或短期反应的证据,但测量得出她的 30% 或更多的病灶没有减少。她在 hMN-14-SN-38 疗法之前基线处的血浆 CEA 滴度是 46ng/mL,并且她的总指示病灶经测量是总计 92mm。

[0586] hMN-15-SN-38 疗法以每周 12mg/kg 开始,持续 2 周,之后是一周的停药期,在 21 天的周期内。此周期重复 3 次,仅有暂时的嗜中性白细胞减少和胃肠道副作用(恶心、呕吐、腹泻)。惊人地,尽管未能对 FOLFIRI 疗法(其包括依立替康或 CPT-11)做出反应,但该患者在完成她的疗法之后显示根据 RECIST 标准的部分反应。然后将她置于此疗法的维持计划中,以 16mg/kg 的剂量每月一次,持续接着的 6 个月。追踪扫描显示她的疾病保持受到控制作为部分反应(PR),并且患者通常状况良好,有 90% 卡尔诺夫斯基(Karnofsky)活动状况。

[0587] 实施例 24. 用抗 CSAp-SN-38 缀合物治疗的具有 IV 期转移性疾病的结肠癌患者

[0588] 在进行 9cm 乙状结肠腺癌切除术,然后是用 FOLFIRI 和西妥昔单抗的化学免疫疗法持续 6 个月,且接着是 FOLFOX 继之以贝伐单抗持续约 9 个月的延长期之后,此患者表现出向左肝叶和两肺的结肠癌转移。最初切除术然后是开始疗法之后 10 个月,认为呈现稳定的疾病,通过病灶增长和左侧肾上腺中出现新转移显示进展。此时她的血浆 CEA 是 52ng/mL,并且她的一般状况似乎已经恶化,具有腹痛、疲劳和临界贫血,提示可能有内出血。

[0589] 现在以每周 12mg/kg 的剂量给予她 hMu-9(抗 CSAp)抗体的 SN-38 缀合物,持续两周,停药一周,作为一个治疗周期,然后重复另外几个治疗周期,每周测量她的血细胞计数并接受针对胃肠道反应的阿托品药疗法。在首个治疗周期之后观察到 2 级脱发,但仅有 1 级嗜中性白细胞减少。3 个治疗周期之后,她的血浆 CEA 滴度降到 19ng/mL,并且此时她的 CT 测量显示在肝和肺中的指示病灶减小 24.1%。另外 3 个疗程之后,她的 CT 显示指示病灶减小 31.4%,并且肾上腺肿块的尺寸减小约 40%。此患者被认为对抗 CSAp-SN-38 抗体-药物疗法有反应,并且继续此疗法。她的一般状况似乎有所改善,具有较少的疲劳,没有腹痛或不适,并且通常更有活力。

[0590] 实施例 25. 用抗 CEACAM6-SN-38 免疫缀合物治疗乳腺癌

[0591] 此患者具有三阴性(不表达雌激素受体、孕激素受体或 Her2/neu)转移性乳腺癌,

在过去的 3 年间,在若干次不同的疗法之后复发。在她的两肺中表现出若干小肿瘤并且向她的 C4、C5、T2 和 T3 椎骨以及双侧若干肋骨转移。她在接受针对溶骨性病灶的标准疗法,并且现在开始 hMN-15-SN-38 的治疗,以 16mg/kg 的剂量每周一次,持续 3 周,停药一周,然后恢复此 3- 周周期疗法另外两次。治疗后 2 周,进行 CT 扫描以评价反应,并且注意到 2 个小的肺转移已消失,而 1 个较大的病灶看起来缩小约 40%。向椎骨的转移仍存在,但 C4 和 C5 病灶似乎缩小约 25%。在向肋骨的转移中,6 个小病灶中的 2 个看起来尺寸减小的非常多,并且不太确定是活的还是小区域的瘢痕或坏死。患者的肿瘤标记物以及她的 LDH 滴度似乎显示稳定或降低的水平,表明疾病进展已经停止并且还可能存在疾病减轻的一些证据。主观上,该患者感受好多了,疲劳和骨骼疼痛较少并且呼吸有改善。她在每次疗法之后经历了一些最小限度的恶心和呕吐,这些症状在一周之内消退。仅有的其它副作用是暂时的血小板减少,同样在 7 天之内消退。她正在接受观察并且将在 2 个月内恢复疗法周期。

[0592] 实施例 26. 用组合抗 CEACAM5 与抗 CEACAM6-SN-38 免疫缀合物治疗转移性结肠癌

[0593] 此患者具有转移性结肠癌,CT 证据显示在肝脏中的疾病(在右叶中的 5cm 病灶和在左叶中的 3cm 病灶)以及向右肺的 2 个转移(尺寸 2cm 和 3cm)。先前切除结肠的原发癌并且因为向肝和肺的异时转移,所以该患者接受术后疗法疗程。在疗法期间,肝转移生长并且一个肺转移变成两个,因此患者是实验性化学免疫疗法的候选者。他然后开始双抗体-药物缀合物的疗程,拉贝珠单抗(hMN-14)-SN-38 和 hMN-15-SN-38,各以 8mg/kg 的剂量隔天给予,每周一次,持续 2 周,然后每月重复,持续 4 个月。疗法之后的两周,通过 CT 和实验室测试评价患者的状况。CT 扫描显示在肝右叶中的大肿瘤减小了 50%,左叶中的肿瘤减小了约 33%,并且肺转移中两个肿瘤累积减小了约 20%。他的血液 CEA 滴度从疗法开始时的 22ng/mL 降至在此追踪时的 6ng/mL。主观上,他感觉更强壮并且还似乎在每天的活动中更有精力。副作用是暂时的血小板减少和白细胞减少,在疗法之后的 2 周内恢复至正常范围,并且出现了几次恶心和呕吐,通过止吐剂药疗法来控制。按计划,该患者将在约 2 个月内恢复这些疗法周期,之后是另一个病情检查以确定疾病状况。

[0594] 实施例 27. 连续输注抗体-药物缀合物

[0595] 患者先前切除了直肠癌并且根据常规治疗接受术前和术后放射化学疗法。她已经没有肿瘤 4 年了,但现在通过常规 CT 发现在肝右叶存在 3 个小的转移性病灶,并且追踪血液 CEA 值,它从初始疗法之后的 3.0ng/mL 升到了 6.3ng/mL。对她给予留置导管并且经 17 天以 2mg/kg 的剂量连续输注拉贝珠单抗-SN-28。然后在 5 周以后她以 1mg/kg 接受重复的连续输注疗法,持续 3 周。三周以后,CT 扫描和血液 CEA 监测展现其中一个肝转移已消失并且另外两个相同或稍微较小。血液 CEA 滴度现在经测量是 2.4ng/mL。她没有症状,且在疗法下仅经历 2 级恶心和呕吐,以及 2 级嗜中性白细胞减少,两者都随时间消退。

[0596] 实施例 28. 用抗 CEACAM5 免疫缀合物治疗晚期转移性结肠癌

[0597] 患者是转移性结肠癌的先前疗法失败的 50 岁男性。一线疗法是 FOLFIRINOX + AVASTIN®(以逐步的方式增加),在第一周期中从 IROX(依立替康+奥沙利铂)开始。开始此治疗之后,患者的 CT 显示肝转移尺寸的减小。在这之后是除去肿瘤组织的手术。辅助化疗被继续一线方案(没有 IROX 部分),这导致暂时的无复发期。约 1 年间隔期之后,CT 显示肝转移复发。这导致开始二线方案(FOLFIRI+西妥昔单抗)。另一次 CT 显示肝转移中的反应。然后进行肝转移的 RF 消融,接着继续 FOLFIRINOX+西妥

昔单抗的辅助化疗,然后维持西妥昔单抗持续大约一年。另一次 CT 扫描显示无疾病证据。进一步扫描显示可能的肺结节,并被证实。这引出肺结节的楔形切除术。随后重新开始并继续 FOLFIRI+ 西妥昔单抗。后来的 CT 扫描显示肺和肝两者的转移。

[0598] 在施用 hMN-14-SN-38 免疫缀合物之时,该患者具有晚期转移性结肠癌,肺和肝都有转移,他对依立替康(喜树碱)无反应。以 12mg/kg 的剂量施用 hMN-14-SN-38 免疫缀合物,每隔一周重复一次。患者显示根据 RECIST 标准的部分反应,转移性肿瘤减小。

[0599] 注意到在此 12mg/kg(每隔一周给予一次)群组中仅有一个患者显示 2 级血液症状(嗜中性白细胞减少)并且大多数患者具有 1 级或 2 级恶心、呕吐或脱发,这是抗体-药物缀合物的活性的征兆,但耐受良好。抗体部分在喜树碱改善的靶向中的作用说明 SN-38 部分在先前对非缀合的依立替康有抗性的癌症中的功效。

[0600] 实施例 29. 用抗 MUC5ac-SN-38 免疫缀合物治疗转移性胰腺癌

[0601] 这个 44 岁患者具有转移性胰腺癌病史,在胰头中具有不能手术的胰腺导管腺癌,并且显示向肝左叶和右叶的转移,前者经测量是 3×4cm 且后者经测量是 2×3cm。给予患者吉西他滨疗程,但没有显示客观反应。四周以后,以 8mg/kg 的剂量静脉内给予他 hPAM4-SN-38,每周两次,持续 2 周,停药 1 周,然后再重复 2 个周期。一周以后完成 CT 研究并且显示肿瘤肿块(所有部位)总体减小 32%(部分反应),并且他的血液 CA19-9 滴度从基线时的 220 降至放射性评价之时的 75。该患者在每次用抗体-药物缀合物治疗之后仅显示 1 级恶心和呕吐,并且在上次治疗周期结束时显示 2 级嗜中性白细胞减少,它们都在 4 周之后消退。没有给予用于预防输注反应的预先治疗。

[0602] 实施例 30. 使用 hL243-SN-38 治疗难治性转移性结肠癌(mCRC)

[0603] 患者是表现为转移性结肠癌的 67 岁男性。在诊断后不久的横结肠切除术之后,患者在新辅助情形下接受 4 个周期的 FOLFOX 化疗,随后进行部分肝切除术以便去除肝左叶中的转移性病灶。这之后是辅助的 FOLFOX 方案,持续总共 10 个周期的 FOLFOX。

[0604] CT 显示向肝脏的转移。他的目标病灶是在肝左叶中的 3.0cm 肿瘤。非目标病灶包括肝脏中的若干低密度肿块。基线 CEA 是 685ng/mL。

[0605] 在患者签署知情同意书之后,每隔一周给予 hL243-SN-38(10mg/kg),持续 4 个月。患者在首个治疗之后经历恶心(2 级)和疲劳(2 级)并且继续治疗而没有严重的不利事件。通过计算机断层摄影术(CT)完成的首个反应评定(在 8 次剂量之后)显示目标病灶缩小 26%并且他的 CEA 水平降至 245ng/mL。在第二个反应评定(在 12 次剂量之后)中,目标病灶缩小 35%。他的总体健康和临床症状得到了相当大的改善。

[0606] 实施例 31. 用 IMMU-114-SN-38(抗 HLA-DR-SN-38)治疗复发性滤泡性淋巴瘤

[0607] 在接受针对表现出在各种局部淋巴结(子宫颈、腋窝、纵隔、腹股沟、腹部)中的广泛疾病和骨髓受累的滤泡性淋巴瘤的 R-CHOP 化疗之后,给予这个 68 岁男性实验性试剂 IMMU-114-SN-38(抗 HLA-DR-SN-38),以 10mg/kg 的剂量每周一次,持续 3 周,停药 3 周,然后进行第二疗程,再持续 3 周。然后通过 CT 对他的指示肿瘤病灶的变化进行评价,并且显示根据 CHESON 标准有 23%减小。再重复该疗法 2 个疗程,然后通过 CT 显示肿瘤减小 55%,这是部分反应。

[0608] 实施例 32. 用 IMMU-114-SN-38 治疗复发性慢性淋巴细胞性白血病

[0609] 具有如国际研讨会对于慢性淋巴细胞性白血病和世界卫生组织分类所定义的 CLL

病史的 67 岁男性在用氟达拉滨、地塞米松和利妥昔单抗的先前疗法以及 CVP 方案之后表现出复发性疾病。他现在具有与广泛性淋巴结肿大有关的发热和盗汗、还原血红蛋白和血小板产生以及快速上升的白细胞计数。他的 LDH 升高并且 β -2-微球蛋白是正常值的将近两倍。以 8mg/kg 的给药方案给予该患者 IMMU-114-S N-38 缀合物的疗法,每周一次,持续 4 周,停药 2 周,然后再次重复该周期。评价显示患者的血液学参数得以改善并且他的循环 CLL 细胞数目似乎减少。然后恢复疗法另外 3 个周期,之后他的血液学和实验室值指出他具有部分反应。

[0610] 实施例 33. 使用 hMN-15-SN-38 治疗难治性转移性非小细胞肺癌

[0611] 患者是诊断有非小细胞肺癌的 58 岁男性。他最初被给予卡铂、贝伐单抗的化疗方案 6 个月并且显示反应,然后在进展之后,在接下来的 2 年内接受卡铂、依托泊苷、TAXOTERE®、吉西他滨的进一步疗程,偶然的反应持续不超过 2 个月。患者然后表现出测量为 5.5×3.5cm 的左纵膈肿块和胸腔积液。

[0612] 在签署了知情同意后,每隔一周以 12mg/kg 的剂量向患者给予 hMN-15-SN-38。头两次注射期间,经历了短期的嗜中性白细胞减少和腹泻,但这些情况在 2 天内消退并且对症状性药疗法有反应。总共 6 次输注 hMN-15-SN-38 之后,目标病灶的 CT 评价显示 22% 减小。当通过 CT 观察到 45% 的部分反应时,患者再继续此疗法 2 个月。

[0613] 实施例 34. 用 hA19-SN-38 治疗滤泡性淋巴瘤

[0614] 60 岁的男性呈现出腹痛并且存在可触摸到的肿块。患者的 CT 和 FDG-PET 研究证实纵膈、腋窝和颈部淋巴结中存在具有病理性腺病的肿块。实验室测试没有特别,除了升高的 LDH 和 β -2-微球蛋白之外。骨髓穿刺活组织检查揭示若干骨小梁旁和血管周围的淋巴聚集。这些是通过免疫染色展现的表达 CD20、CD19 和 CD10 的淋巴细胞。最后诊断是 IVA 期 2 级滤泡性淋巴瘤,FLIPI 评分是 4。最大受累及的淋巴结的最长直径是 7cm。给予患者与 SN-38 缀合(每 IgG 6 个药物分子)的人源化抗 CD19 单克隆抗体 IgG(hA19)。每周给药 6mg/kg,持续连续 4 周,停药 2 周,然后每 6 周重复 4 周治疗的周期。5 个周期之后,骨髓和成像(CT)评价显示部分反应,其中可测量的病灶减小约 60% 并且骨髓浸润少得多。同样,LDH 和 β -2-微球蛋白滴度也降低。

[0615] 实施例 35. 用 hA19-SN-38 治疗复发性前体 B 细胞 ALL

[0616] 这位 51 岁女性已经在前体的费城染色体阴性的 B 细胞 ALL 的疗法下,所述 ALL 显示对于 CD19、CD20、CD10、CD38 以及 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。患者已接受氟达拉滨和阿糖胞苷的先前疗法,导致相当大的血液毒性,但无反应。还开始高剂量的阿糖胞苷(ara-C)疗程,但不能被该患者耐受。通过输注 6mg/kg 持续 5 周以每周剂量给予该患者 hA19-SN-38 疗法,然后停药 2 周,再重复此疗法两次。惊人地,她显示血液和骨髓计数的改善,这足以确定部分反应。因为嗜中性白细胞减少(3 级)而停药 2 个月之后,恢复疗法,8mg/kg,每隔一周,再继续 4 个疗程。此时,她好转许多并且考虑进行维持疗法以将她转为可以是肝细胞移植候选者的时期。

[0617] 实施例 36. 用抗 CD22-SN-38 免疫缀合物治疗淋巴瘤

[0618] 患者是具有复发性弥漫性大 B 细胞淋巴瘤(DLBCL)的 62 岁男性。R-CHOP 化学免疫疗法 6 个疗程之后,他在纵膈、腋窝以及腹股沟淋巴结中出现广泛的淋巴结扩散。以 12mg/kg 的剂量给予他依帕珠单抗-SN-38(抗 CD22),每周一次×3,停药一周,然后再重复两个周

期。一周之后,通过 CT 成像评价患者,并且测量他的总肿瘤体积且显示 35%减小(部分反应),这似乎维持了接下来的 3 个月。副作用仅是治疗之后的血小板减少和 1 级恶心及呕吐,这在 2 周内消退。没有给予用于减轻输注反应的预先治疗。

[0619] 实施例 37. 用维妥珠单抗和依帕珠单抗-SN-38 在一线情形中的滤泡性淋巴瘤组合疗法

[0620] 35 岁女性被诊断患有低级且良好 FLIPI 评分的滤泡性淋巴瘤,出现于她的颈部淋巴结、两腋以及纵隔中。她的脾脏不肿大,且骨髓穿刺活组织检查不显示疾病受累。她在症状方面没有太大影响,仅有高温、盗汗并且比往常稍微更疲劳。她的内科医师决定不进行观望和等待过程,但给予这位妇女侵袭性较小的疗法,联合人源化抗 CD20 单克隆抗体维妥珠单抗的皮下疗程,每周一次 $\times 4$ 周 ($200\text{mg}/\text{m}^2$),与两个一周一次疗程的抗 CD22 依帕珠单抗-SN-38 组合,每次输注 $8\text{mg}/\text{kg}$ 的剂量。2 个月以后重复此组合疗法,并且之后通过 CT 和 FDG-PET 成像研究以及骨髓穿刺活组织检查评价该患者。惊人地,注意到所有疾病有约 90%减轻,并且然后在停药 4 周之后给予她另一个疗程的此组合疗法。4 周以后的评价显示放射性(和骨髓穿刺活组织检查)完全反应。她的内科医师决定 8 个月以后重复此疗法疗程,并且放射性/病理测试显示持续的完全缓解。

[0621] 实施例 38. 使用维妥珠单抗-SN-38 的滤泡性淋巴瘤的一线疗法

[0622] 患者是表现出低级滤泡性淋巴瘤的 41 岁女性,有可测量的双侧子宫颈和腋淋巴结(每个 2-3cm)、直径 4cm 的纵隔肿块和脾肿大。给予她 3 个疗程的维妥珠单抗-SN-38(抗 CD20-SN-38)疗法,其中每个疗程由以下组成:每 3 周一次输注 $10\text{mg}/\text{kg}$ 。完成疗法之后,通过 CT 得到的她的肿瘤测量显示减小 80%。然后再给予她 2 个疗程的疗法,并且 CT 测量指出实现完全反应。这通过 FDG-PET 成像得到证实。

[0623] 实施例 39. 用与 SN-38 缀合的 1F5 人源化抗体的复发性 DLBCL 的疗法

[0624] 53 岁的女性在显示对给予 6 个周期的 R-CHOP 化疗的部分反应之后 8 个月在纵隔和腹主动脉旁部位处表现出复发性弥漫性大 B 细胞淋巴瘤。她拒绝接受细胞毒性更大的化疗,因此给予由以下组成的温和疗法: $10\text{mg}/\text{kg}$ 人源化 1F5 抗 CD20 单克隆抗体,每个抗体分子缀合至约 6 个分子的 SN-28,每隔一周一次,总共 5 次输注。CT 和 FDG-PET 研究指示她的淋巴瘤进一步减小 40%,因此在 4 周的停药期之后,恢复疗法,每 3 周给予 $8\text{mg}/\text{kg}$ 的剂量,总共 5 次输注。她的疾病评价显示减小约 80%。

[0625] 实施例 40. 用利妥昔单抗-SN-38 的复发性慢性淋巴细胞性白血病的疗法

[0626] 具有 8 年 CLL 病史的 62 岁男性在过去对氟达拉滨、环磷酰胺和利妥昔单抗疗法有反应并且在复发之后对依鲁替尼有部分反应持续 9 个月,他现在表现出进展的疾病。以每 2 周 $12\text{mg}/\text{kg}$ 的方案给予该患者利妥昔单抗-SN-38 单一疗法,持续 3 个疗程,减为 $8\text{mg}/\text{kg}$,每隔一周一次,再持续 4 个疗程。观察到血细胞减少的持续改善,这是通过超过 50%或高于 11g 每分升的血红蛋白水平、高于 1500 个细胞每 cmm 的绝对嗜中性白细胞计数或高于 $11\text{k}/\text{cmm}$ 的血小板计数来反映的,所述改善持续约 9 个月。

[0627] 实施例 41. 用维妥珠单抗-SN-38 与苯达莫司汀组合的 DLBCL 的一线疗法

[0628] 59 岁男性表现出多个部位的 DLBCL,包括胸、腹、腹股沟淋巴结和脾肿大,如通过 CT、FDG-PET 和免疫组织学病理学诊断所证实。在第 1 天和第 2 天以 $90\text{mg}/\text{m}^2$ 的剂量给予苯达莫司汀,与维妥珠单抗-SN-38 组合,它在第 7 天和第 14 天以 $6\text{mg}/\text{kg}$ 的剂量给予,每 4 周

给予一次,持续4个周期。此后,放射性评价显示部分反应。停药2个月之后,再重复疗法2个周期,并且随后的放射性评定显示完全反应。血细胞减少,主要是嗜中性白细胞减少,是可控制的并且没有达到3级水平。

[0629] 实施例42. 用维妥珠单抗-SN-38与来那度胺组合的套细胞淋巴瘤(MCL)的一线疗法

[0630] 患者是在表现出GI陈诉和嗜睡之后被诊断为MCL的68岁男性。结肠镜检查显示7cm盲肠肿块,并且他的病情检查表明他具有IV期疾病。给予他来那度胺的组合疗法,每28天在第1天至第21天每天经口给予25mg。两个周期之后,每隔一周以10mg/kg的剂量给予他维妥珠单抗-SN-38,持续3个治疗,停药2周。然后再次重复。完成此疗法之后两周,患者显示他的所测量指示病灶的部分反应以及目测的其它淋巴结的减少。四个月以后,重复来那度胺疗法持续21天,接着是2个疗程的维妥珠单抗-SN-38。然后他的疾病显示甚至进一步的减轻,但还没达到完全反应。

[0631] 实施例43. 具有复发性/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疗法

[0632] 具有重量减轻症状的65岁男性经历了上腹部肿块的活组织检查,将其诊断为弥漫性大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、阿霉素、长春新碱和强的松)对其进行治疗。他具有延长和持续的嗜中性白细胞减少(700ANC),轻度血小板减少(50-70k/mL),但没有真正的贫血。他的IPI较高。上腹部肿块在此疗法之后不显示任何变化,并且对他实施抗CD22依帕珠单抗-SN-38的温和治疗方案。这是每隔一周输注4mg/kg持续4次输注,然后每三周一次再持续3次输注的方案。他的上腹部淋巴瘤在一周之后通过CT来测量并且显示明显减小52%。该患者继续此治疗,每三周一次,再持续3个月,并且继续显示他的淋巴瘤肿块减小,他的重量稳定且精力和活动有所改善。

[0633] 实施例44. 具有复发性滤泡性淋巴瘤的患者的人源化RFB4疗法

[0634] 42岁的女性在她的下腹部表现出急剧的、持续性的严重疼痛,放射至她的背部。实验室测试没有特别,但是腹部超声显示在左前下部中的异质实体肿块,测量为7.5×6.2×7.0cm。CT扫描显示在左小肠肠系膜内的大肿块,附近的淋巴结受累。肿块的CT导向穿刺活检显示它是3级滤泡性淋巴瘤。免疫组织化学显示是具有CD19、CD20、CD22、Bcl-2以及Bcl-6阳性结果的B细胞型。PET研究显示在膈肌以上、骨髓中或脾脏中没有疾病,但骨髓穿刺活组织检查证实淋巴瘤受累。患者经历6个周期的R-CHOP化疗,4个月之后对此疗法产生完全反应。然而,10个月以后,她经历了复发,她的腹部肿块和附近的淋巴结有复发,并且有脾肿大和更多的骨髓受累,如通过PET和活组织检查研究所确定。她现在开始以下疗法疗程:人源化抗CD22单克隆抗体RFB4,每IgG缀合有6个SN-38分子,以8mg/kg的剂量每周一次,持续3周,然后继续以8mg/kg每隔一周一次,再持续4次治疗。两周以后,她经历CT和FDG-PET研究,并且她的腹部病灶和脾脏显示减小40%,以及骨髓受累的普遍减少。停药4周之后,实施以下疗法:每周4mg/kg,持续4周,接着每隔一周6mg/kg,再持续5次治疗,所有可测量病灶的总体尺寸进一步可测量的减小总共60%。患者继续8mg/kg的hRFB4-SN-38的维持疗法,每月一次,再持续5个月,并且维持她的治疗反应。

[0635] 实施例45. 具有复发性/难治性急性淋巴母细胞性白血病的患者的依帕珠单抗-SN-38疗法

[0636] 具有 CD22+ 前体 B 细胞急性淋巴母细胞性白血病 (ALL) 的 29 岁男性对以下疗法没有反应: PEG- 天冬酰胺酶、环磷酰胺、柔红霉素、阿糖胞苷 (ara-C)、长春新碱、甲酰四氢叶酸、强的松、氨甲蝶呤及 6- 巯基嘌呤的疗法, 以及 G-CSF (Neupogen) 的支持疗法, 在修改的拉森 (Larson) 方案下作为诱导 / 维持疗法给予。患者的白血病是费城染色体阴性的。基于血液和骨髓白血病母细胞计数, 患者仅显示最小反应, 4 月以后疾病进展。然后以 6mg/kg 的初始方案每周给予他依帕珠单抗 -SN-38, 持续 4 周, 然后减为每隔一周 6mg/kg, 再进行 6 次输注。然后通过血液和骨髓白血病母细胞以及脾脏尺寸和骨髓累及的 FDG 研究对该患者进行评价, 似乎实现了部分反应, 伴随有患者的一般体征和症状的改善。随后在接下来的 8 个月继续此疗法, 但以每隔一周 5mg/kg, 治疗 3 周且停药 2 周, 并且实现完全缓解。现在该患者被评价作为造血干细胞移植的候选者。

[0637] 实施例 46. 具有复发性 / 难治性急性淋巴母细胞性白血病的患者的人源化 RFB4-SN-38 疗法

[0638] 在未能对 HIDAC (高剂量的 ara-C 疗法) 有反应之后, 给予此具有前体 B 细胞急性淋巴母细胞性白血病的 20 岁男性用缀合至 SN-38 的 hRFB4IgG 的人源化抗 CD22 疗法 (平均每 IgG 6 个药物分子), 以每周 10mg/kg 的给药方案, 持续两周, 然后停药 1 周, 接着每隔一周输注 10mg/kg, 再持续 5 次治疗。然后评价患者的血液和骨髓白血病母细胞的存在, 且显示 >90% 减少。停药 4 周之后, 重复此疗法疗程, 且 4 周以后的评价显示完全反应, 没有最小的残留疾病, 如通过 PCR 所测量。

[0639] 实施例 47. 在接受 R-CHOP 化学疗法的 DLBCL 患者中用依帕珠单抗 -SN-38 的巩固疗法

[0640] 此具有双侧子宫颈腺病和测量为 1.5 至 2.0cm 颈部淋巴结以及 3cm 的右腋淋巴结以及测量为 2.5 至 3.0cm 的腹膜后和双侧骨盆淋巴结的 56 岁女性被诊断为 3 期弥漫性大 B 细胞淋巴瘤, 所述淋巴瘤对 CD20 和 CD22 呈阳性。对她安排标准的 R-CHOP 化疗方案, 以非格司亭和预防性抗生素每 21 天给予一次。接受 6 个周期的此疗法之后, 给予患者 2 个月的停药期, 然后安排 8mg/kg 依帕珠单抗 -SN-38 的巩固疗法, 每隔一周输注一次, 持续 3 次治疗。R-CHOP 化疗之后的反应是最小的 (小于 30% 的所测量的病灶变化), 但用依帕珠单抗 -SN-38 的巩固疗法导致部分反应 (>50% 所有指示病灶的总体减少)。停药 3 个月之后, 重复用依帕珠单抗 -SN-38 的此疗法疗程, 再次给予该患者非格司亭和预防性抗生素, 并且维持她的良好缓解。

[0641] 实施例 48. 用 IMMU-31-SN-38 治疗复发性转移性睾丸癌

[0642] 患者是具有睾丸癌的右侧睾丸切除术的 30 岁男性, 有向两肺的同时性转移, 他对组合化疗反应良好。在诊断时, 他的甲胎蛋白 (AFP) 血液滴度是升高的, 为 1,110ng/mL, 但在成功的疗法之后降至 109ng/mL。他现在在 3 年期间内呈现出逐渐上升的 AFP 滴度, 所以对其身体进行 CT 和 FDG-PET 扫描, 显示向两肺的肺转移复发。他接受了抗 AFP 抗体 IMMU-31IgG 的疗法, 每 IgG 在 6 个药物分子处缀合有 SN-38。他接受每周剂量 12mg/kg 的此抗体 - 药物缀合物, 持续 4- 周周期的 3 周, 再重复一个周期, 但治疗剂减少至 10mg/kg。然后再重复此治疗 2 个周期。两周以后, 他的肺部放射学检查显示转移已经消失。他的血液 AFP 滴度现在是 18ng/mL。该患者恢复正常活动, 已经实现了完全反应。

[0643] 实施例 49. 用 IMMU-31-SN-38 治疗复发性转移性肝细胞癌

[0644] 具有乙型肝炎感染、饮酒过量和吸烟史的 58 岁男性首先导致肝硬化,然后被诊断为肝细胞癌。在他的肝脏已经切除一部分之后他提供之时,还存在局部淋巴结受累。患者接受一系列索拉非尼疗法,指示一些一般改善,但他的局部淋巴结或 2 个肺(右肺)转移没有任何减轻。肝脏 CT 还显示在剩余的肝实质中可能有复发。现在给予此患者 3 个疗程的 IMMU-31-SN-38 疗法,每个包括以下方案:每周一次 16mg/kg,持续一个 4 周周期的 2 周。在包括 6 次剂量的 3 个疗程之后,重新评价该患者且显示他的循环 AFP 滴度从 2,000ng/mL 的基线值降到 170ng/mL,并且测量出他的总体指示病灶有 20%减小。停药 2 个月之后,开始另一个疗程的 3 周期疗法,但每次输注的剂量减小至 1mg/kg。一个月以后,所有测量的病灶有更大的减小,至基线的 35%,而且 AFP 血液滴度稍微降至 100ng/mL。患者继续接受每月一个剂量的维持疗法,只要不存在疾病进展或限制性毒性。

[0645] 实施例 50. 免疫缀合物保存

[0646] 将实施例 8 中所述的缀合物纯化并用 2-(N-吗啉代)乙磺酸(MES)(pH 6.5)进行缓冲液更换,并且进一步用海藻糖(25mM 最终浓度)和聚山梨醇酯 80(0.01% v/v 最终浓度)配制,其中最终缓冲液浓度变为 22.25mM 作为赋形剂添加的结果。将配制的缀合物冻干并保存在密封小瓶中,保存在 2℃ -8℃ 下。冻干的免疫缀合物在保存条件下是稳定的并且维持其生理活性。

[0647] * * *

[0648] 本领域技术人员从以上描述可以容易地确定本发明的本质特征,并且不会背离其精神和范围,可以对本发明做出各种变化和修改以使其适应各种用途和条件而无需过多的实验。本文所引用的所有专利、专利申请和公布以引用的方式并入。

[0001]

序列表

<110> IMMUNOMEDICS, INC.

<120> 功效改进且毒性降低的抗体与 SN-38 的免疫缀合物的剂量

<130> IMM340W01

<140>

<141>

<150> 61/749,548

<151> 2013-01-07

<150> 61/736,684

<151> 2012-12-13

<160> 161

<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

[0002]

<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

[0003]

<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

[0004]

<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

[0005]

<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

[0006]

<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

[0007]

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

[0008]

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

[0009]

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

[0010]

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

[0011]

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

[0012]

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

[0013]

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

[0014]

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

[0015]

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

[0016]

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

[0017]

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

[0018]

<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

[0019]

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

[0020]

<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

[0021]

<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

[0022]

<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

[0023]

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

[0024]

<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

[0025]

<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

[0026]

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

[0027]

<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

[0028]

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

[0029]

<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

[0030]

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

[0031]

<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

[0032]

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

[0033]

<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

[0034]

<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

[0035]

<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

[0036]

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

[0037]

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 15Ile 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 15Leu Val Glu Asp Val Ile Asn Tyr Ala
20 25

<210> 84

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

[0038]

<220>

<223> 人工序列的描述：合成
肽

<400> 81

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
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

[0039]

	85	90	95
Lys Ala 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 Asp Glu			
	225	230	235
			240
Leu 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			

[0040]

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> 86		
<211> 330		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人工序列的描述：合成 多肽		
<400> 86		
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		

[0041]

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

[0042]

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

[0043]

<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)

[0044]

<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

[0045]

<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)

[0046]

<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

[0047]

<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

[0048]

<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

[0049]

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

[0050]

<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

[0051]

<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

[0052]

<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

[0053]

<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

[0054]

<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

[0055]

<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

[0056]

<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

[0057]

<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

[0058]

<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

[0059]

<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

[0060]

<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

[0061]

<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

[0062]

<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>

[0063]

<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 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

[0064]

<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>

[0065]

<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

[0066]

<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>

[0067]

<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

[0068]

<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>

[0069]

<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

[0070]

<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>

[0071]

<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

[0072]

<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>

[0073]

<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

MAb-CL2A-SN38 免疫缀合物在带有Capan-1肿瘤的

小鼠中的治疗功效

(250 μ g 每周两次 $\times$ 4周), n = 9-10

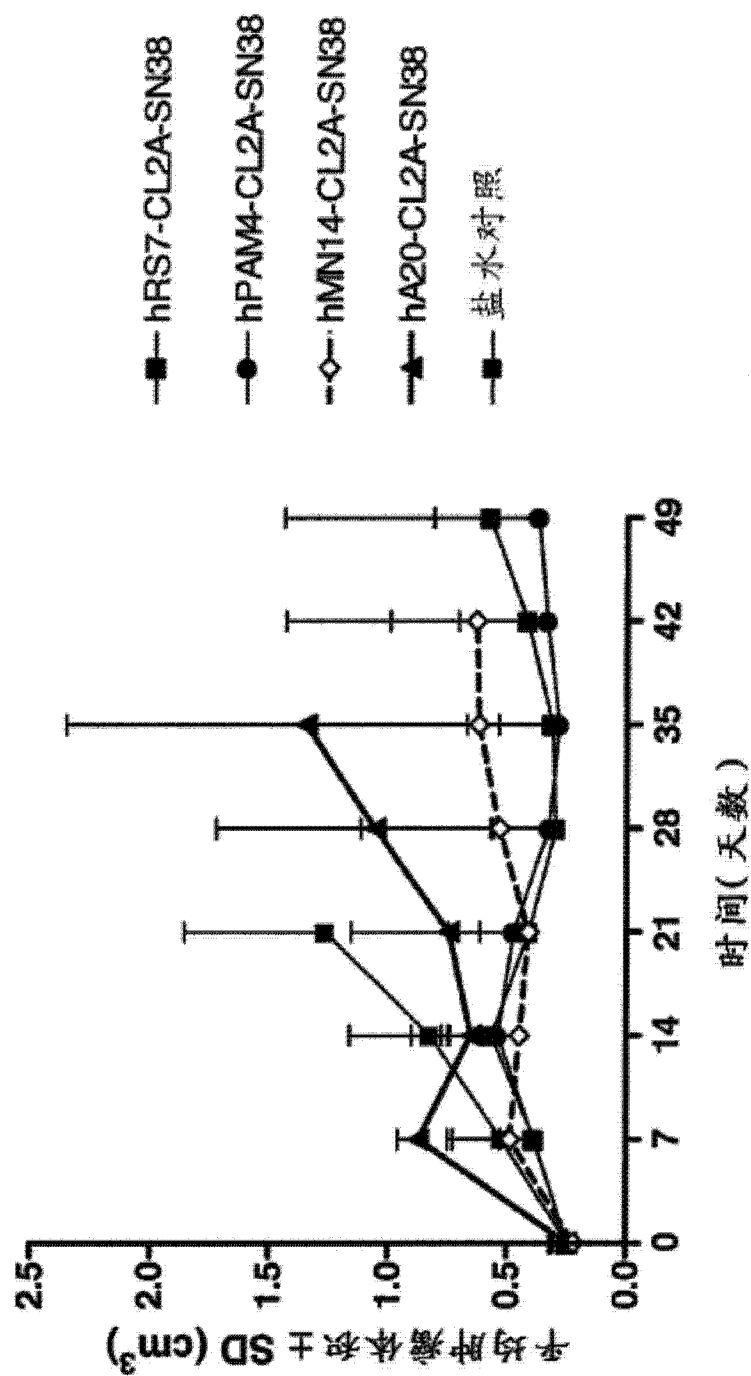


图 1

MAb-CL2A-SN38免疫缓释物在带有人胰腺癌异种移植物的
小鼠中的治疗功效 (BxPC-3)
(500 μ g 每周两次 x 4周), n = 10

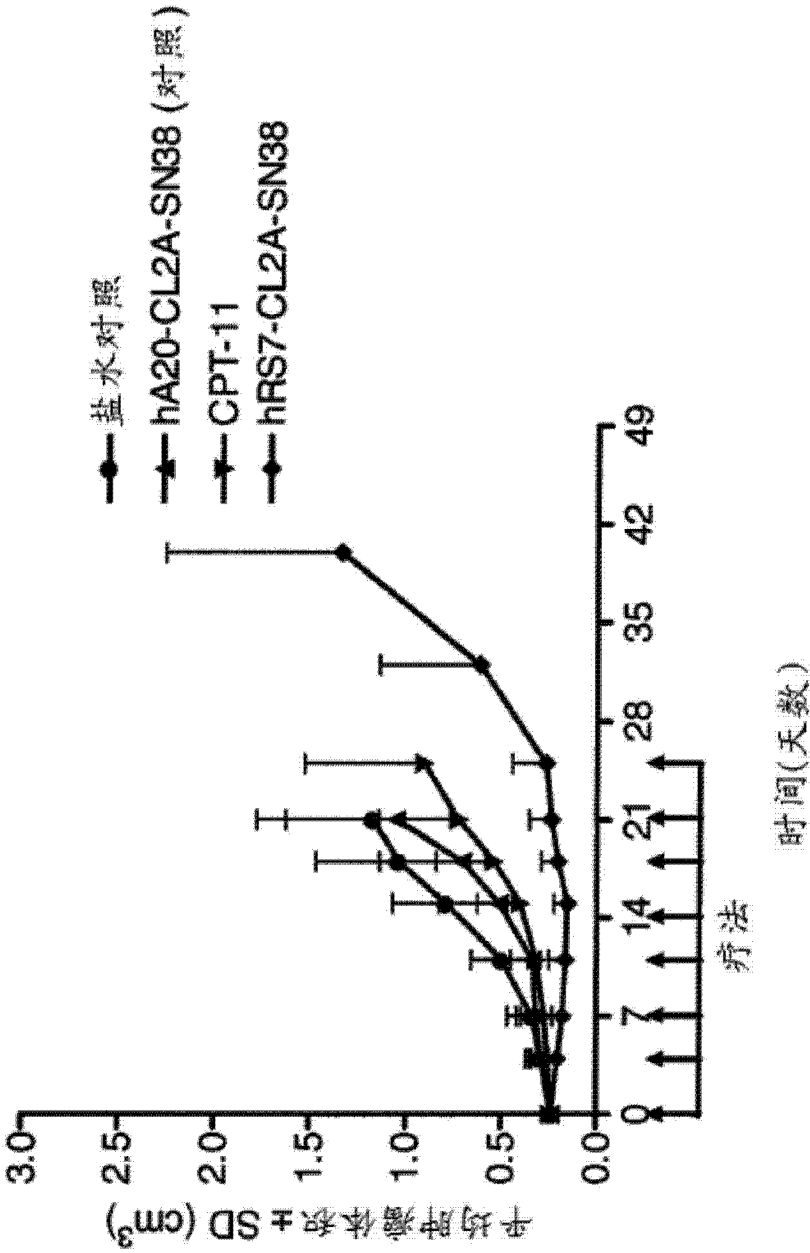


图 2

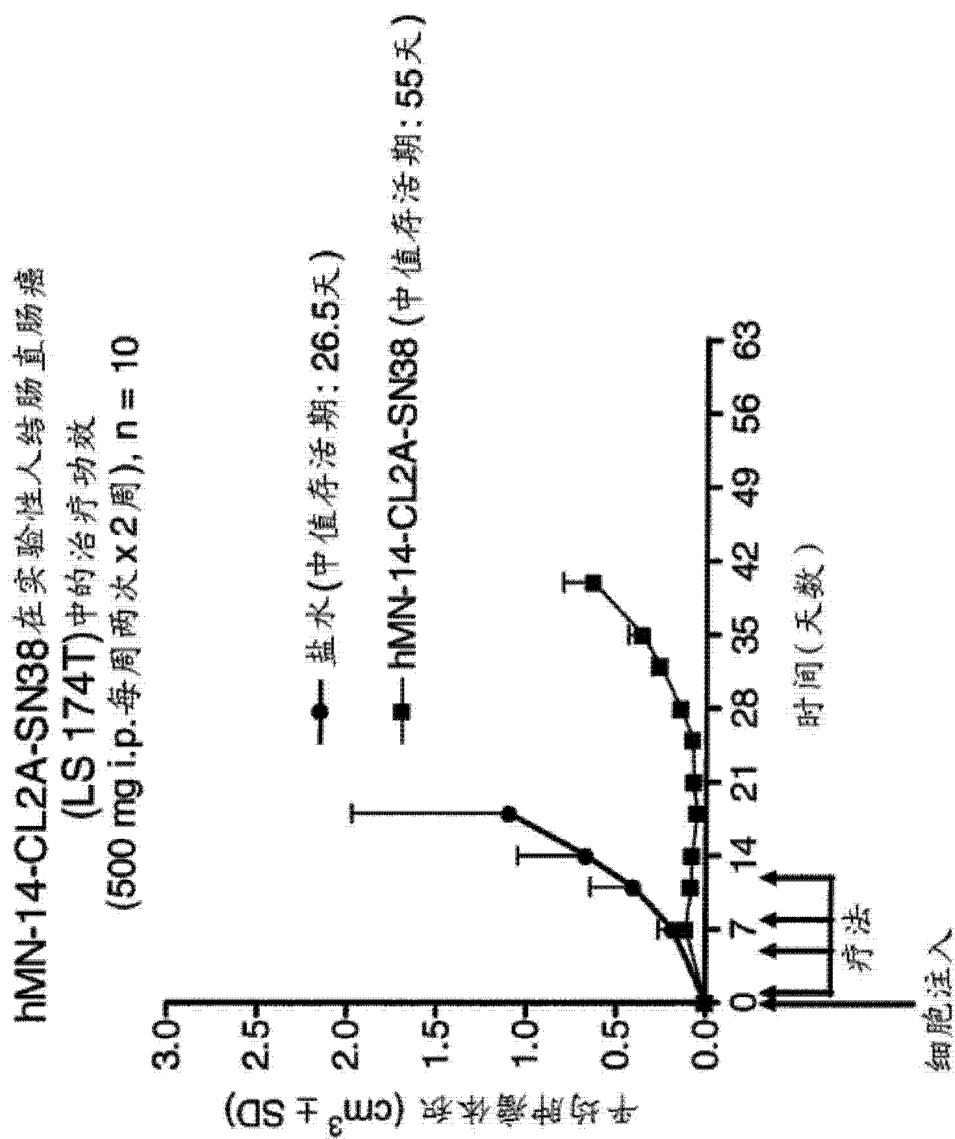


图 3

带有GW-39肺转移性疾病的hMN14-CL-SN38
治疗小鼠的存活曲线

(i.p. q4dx8)

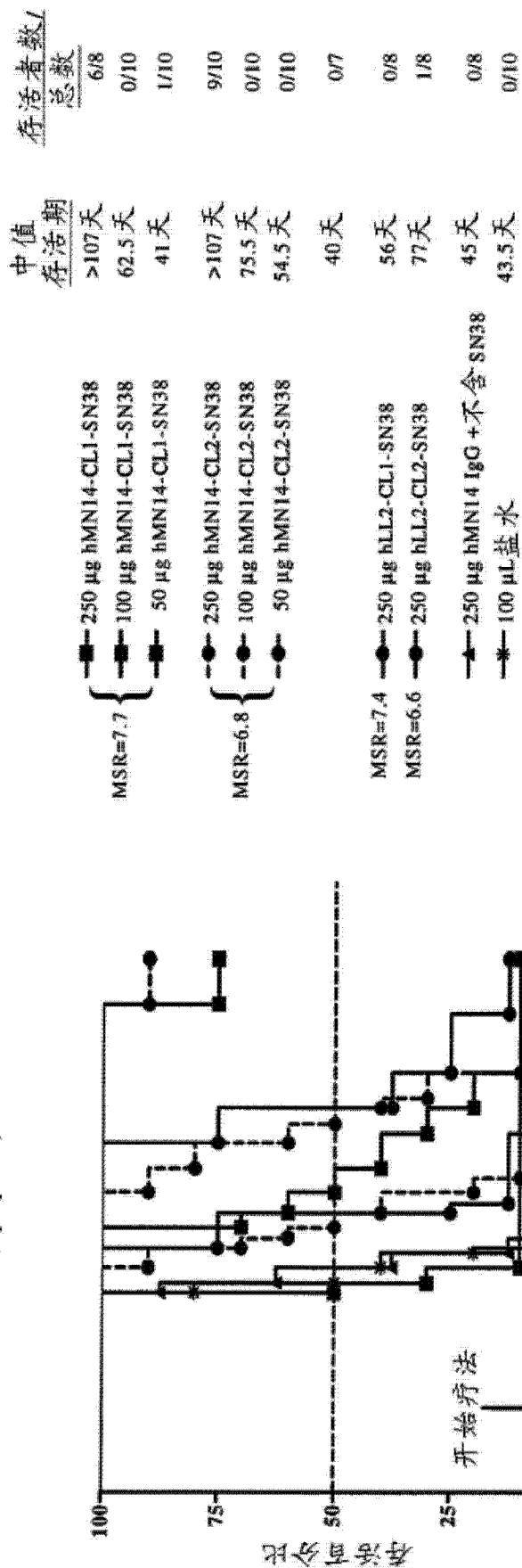


图 4

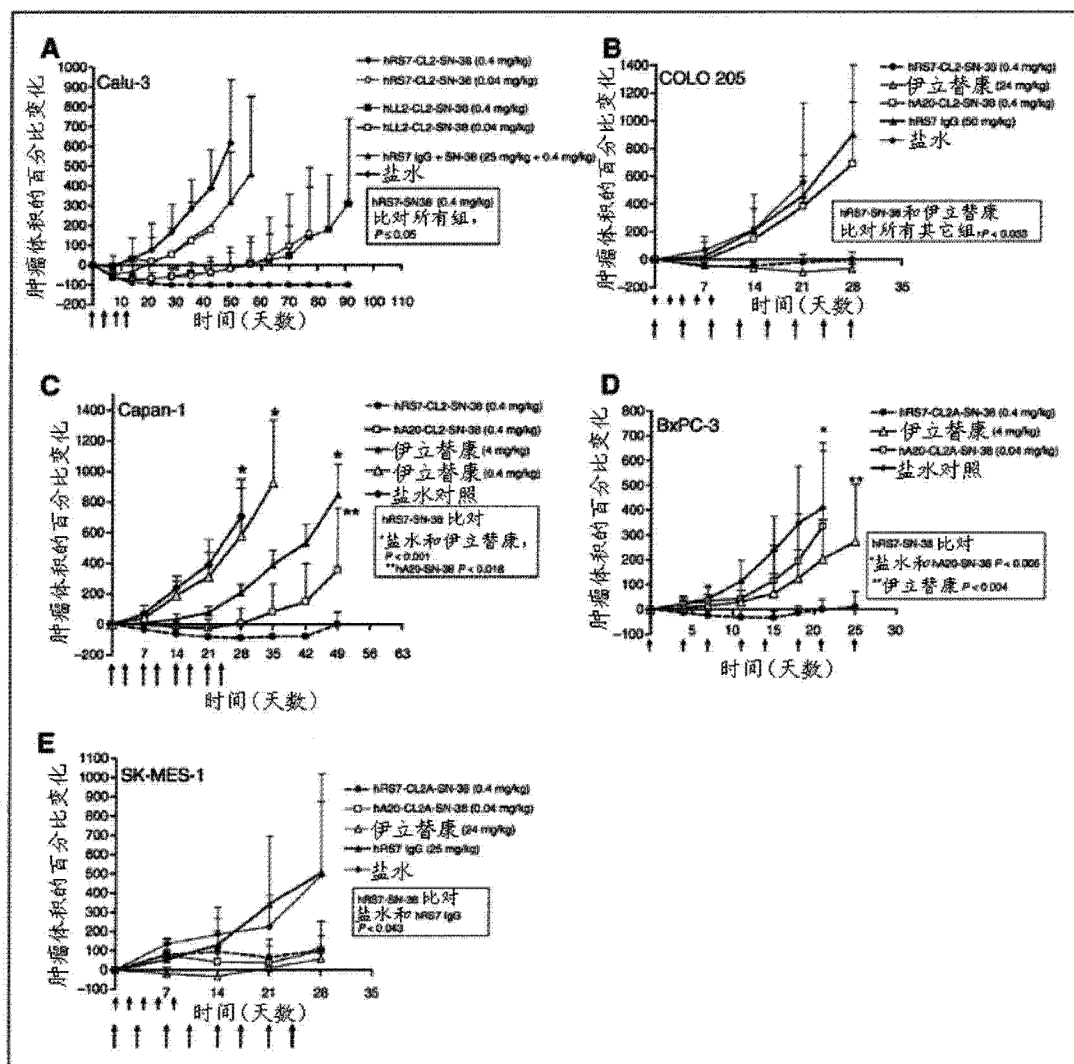


图 5

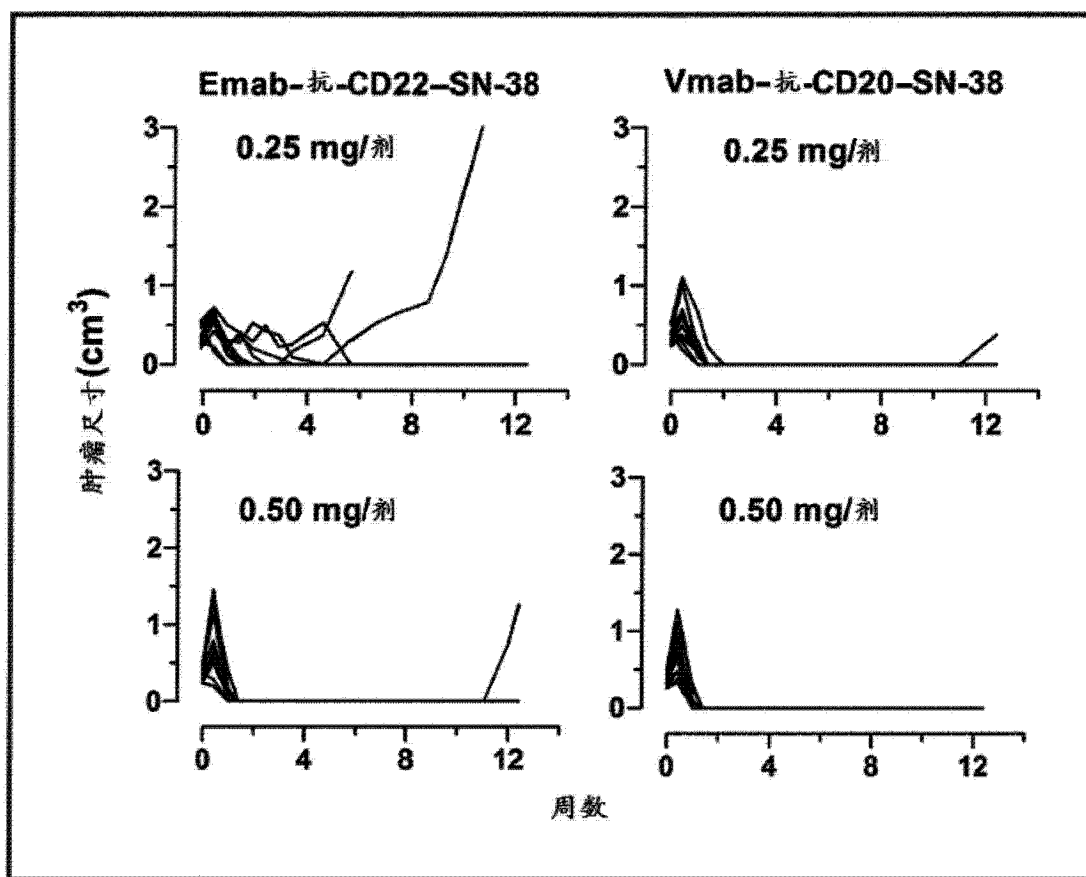


图 6

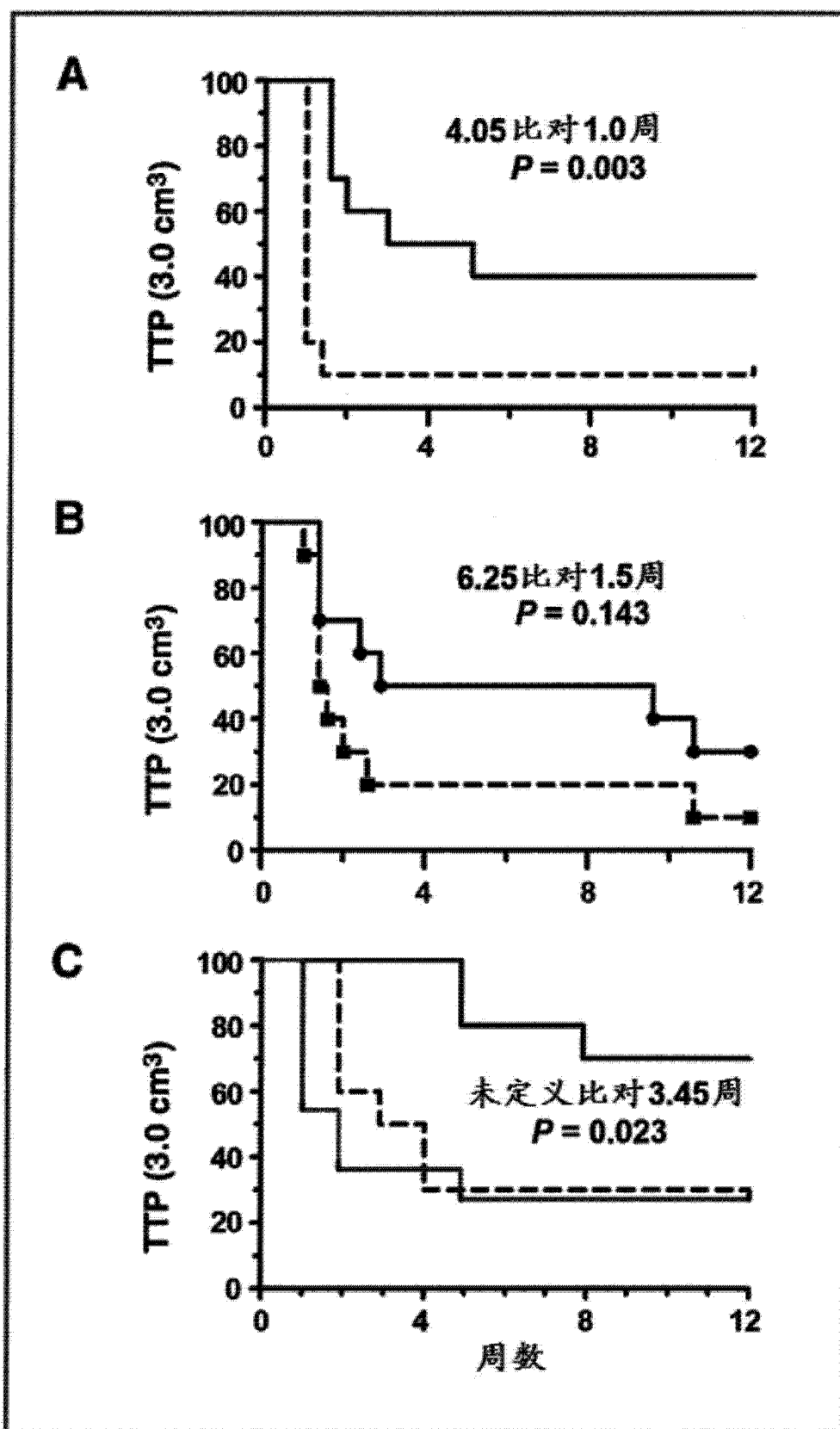


图 7

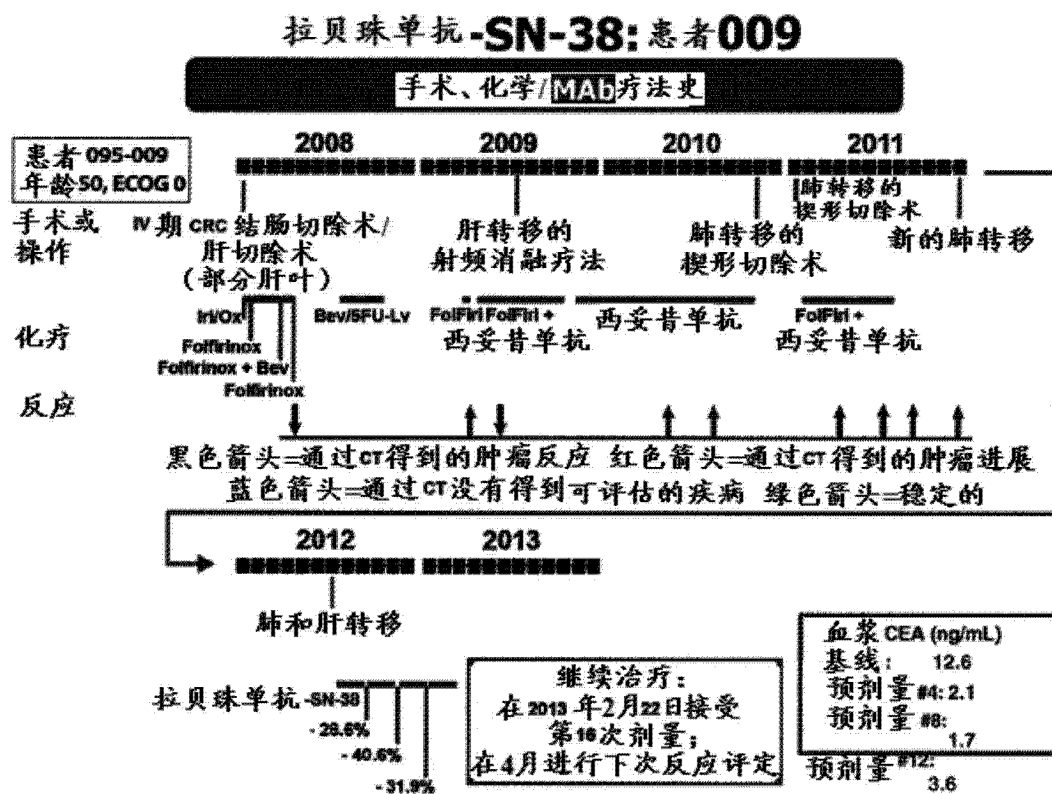


图 8