



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102989000 B

(45) 授权公告日 2016. 04. 20

(21) 申请号 201210308200. 4

US 6441163 B1, 2002. 08. 27,

(22) 申请日 2006. 08. 14

US 2004241174 A1, 2004. 12. 02,

(30) 优先权数据

审查员 梁峥

60/710, 858 2005. 08. 24 US

60/797, 713 2006. 05. 04 US

(62) 分案原申请数据

200680034242. 6 2006. 08. 14

(73) 专利权人 伊缪诺金公司

地址 美国马萨诸塞

(72) 发明人 戴勇 王勇 晋圣瑾

D·H·梅舒拉姆 G·W·阿姆弗莱特

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 袁志明

(51) Int. Cl.

A61K 47/48(2006. 01)

A61P 35/00(2006. 01)

(56) 对比文件

WO 03057163 A2, 2003. 07. 17,

WO 03057163 A2, 2003. 07. 17,

权利要求书2页 说明书23页

(54) 发明名称

制备美登木素生物碱抗体缀合物的方法

(57) 摘要

本发明涉及一种制备美登木素生物碱抗体缀合物的方法。本发明提供的制备与细胞毒性剂化学偶联的抗体的方法包括使连接体与抗体共价连接、纯化步骤、使细胞毒性剂与抗体缀合和随后的纯化步骤。

1. 制备抗体-美登木素生物碱缀合物的方法,该方法包括下列步骤:

(a) 用双功能交联试剂接触抗体,以使连接体与抗体共价连接,从而制备第一混合物,该混合物包含其上结合了连接体的抗体,

(b) 通过在 pH 为 4 至 9 的溶液中使其上结合了连接体的抗体与美登木素生物碱起反应,使美登木素生物碱与第一混合物中其上结合了连接体的抗体缀合,以制备第二混合物,该混合物包含 (i) 通过连接体与美登木素生物碱化学偶联的抗体, (ii) 游离的美登木素生物碱和 (iii) 步骤 (b) 期间产生的反应副产物,以及

(c) 使第二混合物经受切向流过滤、选择性沉淀、吸附过滤、吸附色谱法或其组合,以从第二混合物的其它成分中纯化通过连接体与美登木素生物碱化学偶联的抗体,从而制备纯化的通过连接体与美登木素生物碱化学偶联的抗体的第二混合物;

其中所述第一混合物没有进行进一步的纯化而被立即缀合。

2. 权利要求 1 的方法,其中所述的吸附色谱法选自羟磷灰石色谱法、疏水电荷诱导色谱法、疏水作用色谱法、离子交换色谱法、染料配体色谱法、亲和色谱法、反相色谱法及其组合。

3. 权利要求 2 的方法,其中所述的离子交换色谱法是混合式离子交换色谱法,并且所述的亲和色谱法是固定化金属离子亲和色谱法。

4. 权利要求 1 的方法,其中步骤 (b) 中的溶液的 pH 为 4 至 6.0。

5. 权利要求 1 的方法,其中步骤 (b) 中的溶液的 pH 为 6.5 至 9。

6. 权利要求 1 的方法,其中步骤 (b) 中的溶液包含蔗糖。

7. 权利要求 1 的方法,其中步骤 (b) 中的溶液包含缓冲剂,其选自柠檬酸盐缓冲剂、乙酸盐缓冲剂、琥珀酸盐缓冲剂和磷酸盐缓冲剂。

8. 制备抗体-美登木素生物碱缀合物的方法,该方法包括下列步骤:

(a) 用双功能交联试剂接触抗体,以使连接体与抗体共价连接,从而制备第一混合物,该混合物包含其上结合了连接体的抗体,

(b) 使第一混合物经受吸附色谱法,从而制备纯化的其上结合了连接体的抗体的第一混合物,

(c) 通过在 pH 为 4 至 9 的溶液中使其上结合了连接体的抗体与美登木素生物碱起反应,使美登木素生物碱与纯化的第一混合物中其上结合了连接体的抗体缀合,以制备第二混合物,该混合物包含 (i) 通过连接体与美登木素生物碱化学偶联的抗体、(ii) 游离的美登木素生物碱和 (iii) 反应副产物,以及

(d) 使第二混合物经受吸附色谱法,以从第二混合物的其它成分中纯化通过连接体与美登木素生物碱化学偶联的抗体,从而制备纯化的通过连接体与美登木素生物碱化学偶联的抗体的第二混合物。

9. 权利要求 8 的方法,其中所述的吸附色谱法选自羟磷灰石色谱法、疏水电荷诱导色谱法、疏水作用色谱法、离子交换色谱法、染料配体色谱法、亲和色谱法、反相色谱法及其组合。

10. 权利要求 9 的方法,其中所述的离子交换色谱法是混合式离子交换色谱法,并且所述的亲和色谱法是固定化金属离子亲和色谱法。

11. 权利要求 8 的方法,其中步骤 (c) 中的溶液的 pH 为 4 至 6.0。

12. 权利要求 8 的方法,其中步骤(c)中的溶液的 pH 为 6.5 至 9。
13. 权利要求 8 的方法,其中步骤(c)中的溶液包含蔗糖。
14. 权利要求 8 的方法,其中步骤(c)中的溶液包含缓冲剂,其选自柠檬酸盐缓冲剂、乙酸盐缓冲剂、琥珀酸盐缓冲剂和磷酸盐缓冲剂。
15. 权利要求 1 ~ 14 任何一项的方法,其中所述的抗体为单克隆抗体。
16. 权利要求 15 的方法,其中所述的抗体为人源化单克隆抗体。
17. 权利要求 1 ~ 14 任何一项的方法,其中所述的抗体为嵌合抗体。
18. 权利要求 1 ~ 14 任何一项的方法,其中所述的抗体为与 CD19 抗原结合的鼠抗体 B4 的人源化或表面重建的抗体;与 CD56 抗原结合的鼠抗体 N901 的人源化或表面重建的抗体;或与 CD33 抗原结合的鼠抗体 MY9 的人源化或表面重建的抗体。
19. 权利要求 1 ~ 14 任何一项的方法,其中所述的抗体选自 huN901、huMy9-6、huB4、huC242、曲妥单抗、比伐单抗、西罗珠单抗、CNT095、huDS6 和利妥昔单抗。
20. 权利要求 1 ~ 14 任何一项的方法,其中所述的美登木素生物碱包含硫醇基。
21. 权利要求 20 的方法,其中所述的美登木素生物碱为 $N^{2'}$ -脱乙酰- $N^{2'}$ -(3-巯基-1-氧代丙基)-美登素。
22. 权利要求 20 的方法,其中所述的美登木素生物碱为 $N^{2'}$ -脱乙酰- $N^{2'}$ -(4-甲基-4-巯基-1-氧代戊基)-美登素。
23. 权利要求 1 ~ 14 任何一项的方法,其中所述的抗体经化学键与所述的美登木素生物碱化学偶联,所述的化学键选自二硫键、对酸不稳定的键、对光不稳定的键、对肽酶不稳定的键、硫醚键和对酯酶不稳定的键。
24. 权利要求 1 ~ 14 任何一项的方法,其中所述的双功能交联试剂选自 3-(2-吡啶二硫基)丙酸 N-琥珀酰亚氨基酯、4-(2-吡啶二硫基)丁酸 N-琥珀酰亚氨基酯、4-(2-吡啶二硫基)戊酸 N-琥珀酰亚氨基酯、4-(马来酰亚氨基甲基)环己烷羧酸 N-琥珀酰亚氨基酯、N-琥珀酰亚氨基-4-(N-马来酰亚氨基甲基)-环己烷-1-羧基-(6-酰氨基己酸酯)、 κ -马来酰亚氨基十一酸 N-琥珀酰亚氨基酯、 γ -马来酰亚氨基丁酸 N-琥珀酰亚氨基酯、 ϵ -马来酰亚氨基己酸 N-羟基琥珀酰亚胺酯、间-马来酰亚氨基苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯、N-(α -马来酰亚氨基乙酰氧基)-琥珀酰亚胺酯、琥珀酰亚氨基-6-(β -马来酰亚氨基丙酰氨基)己酸酯、4-(对-马来酰亚氨基苯基)-丁酸 N-琥珀酰亚氨基酯、N-(对-马来酰亚氨基苯基)-异氰酸酯、N-琥珀酰亚氨基-4-(碘代乙酰基)-氨基苯甲酸酯、碘醋酸 N-琥珀酰亚氨基酯、溴乙酸 N-琥珀酰亚氨基酯和 3-(溴乙酰氨基)丙酸 N-琥珀酰亚氨基酯。
25. 权利要求 24 的方法,其中所述的双功能交联试剂是 4-(2-吡啶二硫基)丁酸 N-琥珀酰亚氨基酯。
26. 权利要求 24 的方法,其中所述的双功能交联试剂是 4-(2-吡啶二硫基)戊酸 N-琥珀酰亚氨基酯。
27. 权利要求 24 的方法,其中所述的双功能交联试剂是 4-(马来酰亚氨基甲基)环己烷羧酸 N-琥珀酰亚氨基酯。

制备美登木素生物碱抗体缀合物的方法

[0001] 本申请是申请号为 200680034242.6、申请日为 2006 年 8 月 14 日、发明名称为“制备美登木素生物碱抗体缀合物的方法”的专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及制备相当高纯度和稳定性的缀合物的方法,其中所述缀合物包含与药物化学偶联的细胞结合剂。

背景技术

[0003] 随着更有效地靶向并杀灭癌细胞的药物开发,癌症治疗取得显著的进步。为了这个目的,研究人员利用癌细胞选择性表达的细胞表面受体和抗原,来开发基于抗体的药物,所述抗体与肿瘤特异性或肿瘤相关性抗原结合。在这点上,已将细胞毒性分子例如细菌和植物毒素、放射性核素和某些化学治疗药物与单克隆抗体化学连接,所述单克隆抗体与肿瘤特异性或肿瘤相关性抗原结合(参见,例如,国际专利申请 WO 00/02587、WO 02/060955 和 WO 02/092127,美国专利 5,475,092、6,340,701 和 6,171,586,美国专利申请公布号 2003/0004210A1,和 Ghetie 等, J. Immunol. Methods, 112:267-277(1988))。通常将这类化合物分别称为毒素、放射性核素和药物“缀合物”。常常也将它们称作免疫缀合物、放射免疫缀合物和免疫毒素。在药物缀合物与肿瘤细胞结合并释放药物或 / 和激活药物的细胞毒活性时,发生肿瘤细胞杀灭。药物缀合物所提供的选择性使对正常细胞的毒性降到最低,因此提高了药物在患者中的耐受性。

[0004] 先前已经描述了将抗体与含巯基的细胞毒性剂例如美登木素生物碱缀合的方法(参见,例如,美国专利 5,208,020、5,416,064 和 6,441,163)。例如,美国专利 5,208,020 和 5,416,064 公开了制备抗体-美登木素生物碱缀合物的方法,其中首先用异双功能试剂(例如美国专利 4,149,003、4,563,304 和美国专利申请公布号 2004/0241174A1 中所述的)修饰抗体。美国专利 5,208,020 和 5,416,064 进一步描述了经修饰的抗体与过量的含巯基的细胞毒性剂在 pH 7 的缀合,随后经 Sephadex™G25 色谱柱纯化。也描述了用尺寸排阻色谱法 (SEC) 纯化抗体-药物缀合物(参见,例如, Liu 等, Proc. Natl. Acad. Sci (USA), 93:8618-8623(1996) 和 Chari 等, Cancer Research, 52:127-131(1992))。

[0005] 先前描述用于制备抗体-药物缀合物的方法是复杂的,因为它们被用于执行或生产免疫缀合物的累赘步骤所阻碍,与最佳期望的相比,所述免疫缀合物纯度更低或更不稳定。例如,在 pH 为 6.0 ~ 6.5 之间的缀合对于生产纯净和稳定的缀合物来说不是最佳的。此外,在这些条件下的缀合反应通常是缓慢和无效率的,导致需要应用过度和材料。

[0006] 改变或消除一个或多个制备步骤,而不损害产物质量例如纯度和 / 或稳定性,将是理想的。进一步理想的是,具有除迄今为止所述的那些之外的另外的纯化选择,因为一些使用细胞结合剂、连接体和药物的某些组合的选择比使用其它的将更有效。

[0007] 鉴于前文所述,在本领域中存在如下需求:开发改进的制备具有相当高纯度和同时具有更大稳定性的细胞结合剂-药物缀合物组合物的方法。本发明提供这样的方法。根

据本文提供的本发明的说明,本发明的这些和其它优点以及另外的发明特征将是明显的。

发明内容

[0008] 发明简要概述

[0009] 本发明提供一种制备相当高纯度和稳定性的缀合物的方法,该缀合物包含与药物化学偶联的细胞结合剂。该方法包括 (a) 用双功能交联试剂与细胞结合剂接触,以使连接体与细胞结合剂共价连接,从而制备第一混合物,该混合物包含其上结合了连接体的细胞结合剂, (b) 使第一混合物经受切向流过滤、吸附色谱法、吸附过滤、选择性沉淀或它们的组合,从而制备纯化的其上结合了连接体的细胞结合剂的第一混合物, (c) 通过在 pH 为大约 4 至大约 9 的溶液中将其上结合了连接体的细胞结合剂与药物起反应,以制备第二混合物,该混合物包含 (i) 通过连接体与药物化学偶联的细胞结合剂、(ii) 游离药物和 (iii) 反应副产物,来使药物与纯化的第一混合物中其上结合了连接体的细胞结合剂缀合,以及 (d) 使第二混合物经受切向流过滤、吸附色谱法、吸附过滤、选择性沉淀或它们的组合,以从第二混合物的其它成分中纯化通过连接体与药物化学偶联的细胞结合剂,从而制备纯化的第二混合物。

[0010] 发明详述

[0011] 本发明提供一种制备相当高纯度和稳定性的细胞结合剂-药物缀合物的方法。这样的组合物因为该缀合物的高纯度和稳定性可用于治疗疾病。包含细胞结合剂例如与药物如美登木素生物碱化学偶联的抗体的组合物描述于例如美国专利申请公布号 2004/0241174A1 中。在本上下文中,相当高纯度被认为是: (a) 大于 90%, 优选大于 95% 的缀合物种类为单体, 和 / 或 (b) 缀合物制备物中游离药物水平小于 2%(相对于总药物)。

[0012] 在这方面,本发明的方法包括 (a) 用双功能交联试剂修饰细胞结合剂,以使连接体与细胞结合剂共价连接,从而制备第一混合物,该混合物包含其上结合了连接体的细胞结合剂, (b) 使第一混合物经受切向流过滤、吸附色谱法、吸附过滤、选择性沉淀或它们的组合,以从第一混合物的其它成分中纯化其上结合了连接体的细胞结合剂,从而制备纯化的其上结合了连接体的细胞结合剂的第一混合物, (c) 通过在 pH 为大约 4 至大约 9 的溶液中使其上结合了连接体的细胞结合剂与药物起反应,以制备第二混合物,该混合物包含 (i) 通过连接体与药物化学偶联的细胞结合剂、(ii) 游离药物和 (iii) 反应副产物,来使药物与纯化的第一混合物中其上结合了连接体的细胞结合剂缀合,和 (d) 使第二混合物经受切向流过滤、吸附色谱法、吸附过滤、选择性沉淀或它们的组合,以除去非缀合的药物、反应物和副产物以及获得相当纯化的细胞结合剂-药物缀合物。

[0013] 优选地,在纯化步骤中利用切向流过滤(TFF,也称为交叉流过滤、超滤和渗滤)和 / 或吸附色谱法树脂。然而,当 TFF 用于第一个纯化步骤(步骤 b)中,在(步骤 c)中缀合应用的 pH 为 6.0-6.5,并且于第二个纯化步骤(步骤 d)中应用吸附色谱法树脂时,优选吸附色谱法树脂为非离子交换树脂。在另一个优选的实施方案中,TFF 用于两个纯化步骤中,或吸附色谱法树脂用于两个纯化步骤中。替代选择地,吸附色谱法树脂用于第一个纯化步骤中,和 TFF 用于第二个纯化步骤中。TFF 和吸附色谱法树脂的组合也可用于第一个和 / 或第二个纯化步骤中。

[0014] 可以利用任何适合的 TFF 系统,包括 Pellicon 型系统

(Millipore, Billerica, MA)、Sartocon Cassette 系统 (Sartorius AG, Edgewood, NY) 和 Centrasette 型系统 (Pall Corp., East Hills, NY)。

[0015] 可以利用任何适合的吸附色谱法树脂。优选的吸附色谱法树脂包括用于羟磷灰石色谱法、疏水电荷诱导色谱法 (HCIC)、疏水作用色谱法 (HIC)、离子交换色谱法、混合式离子交换色谱法、固定化金属离子亲和色谱法 (IMAC)、染料配体色谱法、亲和色谱法、反相色谱法及其组合的树脂。适用的羟磷灰石树脂的实例包括陶瓷羟磷灰石 (I 型和 II 型 CHT, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)、HA Ultrogel 羟磷灰石 (Pall Corp., East Hills, NY) 和陶瓷氟磷灰石 (I 型和 II 型 CFT, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)。适用的 HCIC 树脂的实例为 MEPhypercel 树脂 (Pall Corp., East Hills, NY)。适用的 HIC 树脂的实例包括 Butyl-Sepharose、Hexyl-Sepharose、Phenyl-Sepharose 和 Octyl Sepharose 树脂 (均来自 GE Healthcare, Piscataway, NJ) 以及 Macro-prep Methyl 和 Macro-Prep t-Butyl 树脂 (Bio-rad Laboratories, Hercules, CA)。适用的离子交换树脂的实例包括 SP-Sepharose、CM-Sepharose 和 Q-Sepharose 树脂 (均来自 GE Healthcare, Piscataway, NJ) 和 Unosphere S 树脂 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)。适合的混合式离子交换树脂的实例包括 Bakerbond ABx 树脂 (JTBaker, Phillipsburg NJ)。适用 IMAC 树脂的实例包括 Chelating Sepharose 树脂 (GE Healthcare, Piscataway, NJ) 和 Profinity IMAC 树脂 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)。适用染料配体树脂的实例包括 Blue Sepharose 树脂 (GE Healthcare, Piscataway, NJ) 和 Affi-gelBlue 树脂 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)。适合的亲和树脂的实例包含 Protein A Sepharose 树脂 (例如, MabSelect, GE Healthcare, Piscataway, NJ), 其中细胞结合剂为抗体, 和凝集素亲和树脂例如 Lentil Lectin Sepharose 树脂 (GE Healthcare, Piscataway, NJ), 其中细胞结合剂携带适当的凝集素结合部位。替代选择地, 可应用对细胞结合剂特异的抗体。这样的抗体可以固定在, 例如, Sepharose 4Fast Flow 树脂 (GE Healthcare, Piscataway, NJ) 上。适合的反相树脂的实例包括 C4、C8 和 C18 树脂 (Grace Vydac, Hesperia, CA)。

[0016] 根据本发明的方法, 制备第一混合物, 其包括其上结合了连接体的细胞结合剂, 以及反应物和其它的副产物。通过使第一混合物经受纯化方法, 从反应物和副产物中纯化修饰的细胞结合剂。在这点上, 可应用切向流过滤 (TFF) 例如基于膜的切向流过滤方法、吸附色谱法、吸附过滤或选择性沉淀或任何其它适用的纯化方法、以及它们的组合来纯化第一混合物。该第一个纯化步骤提供纯化的第一混合物, 换言之, 与根据本发明纯化前的第一混合物相比, 增加了其上结合了连接体的细胞结合剂的浓度和降低了未结合的双功能交联试剂的量。

[0017] 在纯化第一混合物以获得纯化的其上结合了连接体的细胞结合剂的第一混合物后, 通过在 pH 为大约 4 至大约 9 的溶液中使其上结合了连接体的细胞结合剂与药物起反应, 因此制备第二混合物, 其包含 (i) 通过连接体与药物化学偶联的细胞结合剂、(ii) 游离药物和 (iii) 反应副产物, 来使药物与第一纯化的混合物中其上结合了连接体的细胞结合剂缀合。尽管缀合反应在大约 pH 4 至大约 pH 9 进行, 但反应优选在 pH 为大约 6 或更低或在 pH 为大约 6.5 或更大进行, 最优选在 pH 为大约 4 至大约 6 或在 pH 为大约 6.5 至大约 9, 尤其在 pH 为 4 至小于 6 或在 pH 大于 6.5 至 9。当缀合步骤在 pH 为大约 6.5 或更大进行时,

一些含巯基的药物通过二硫键形成可倾向于二聚化。在该情形下,考虑到高效率的反应,可能需要从反应混合物中除去痕量金属和 / 或氧,以及任选添加抗氧化剂或使用具有更反应性离去基团的连接体,或添加超过一等分量的药物。

[0018] 任选地,可省略修饰的细胞结合剂的纯化。在如此情形下,药物可与交联试剂同时或在稍后时间点例如在加入交联试剂后 1、2、3 或更多小时加入到细胞结合剂中。

[0019] 本发明方法可任选包括向本发明方法中所用的缀合步骤中添加蔗糖,以增加细胞结合剂-药物缀合物的溶解度和回收率。期望地,蔗糖加入的浓度为大约 0.1% (w/v) 至大约 20% (w/v) (例如大约 0.1% (w/v)、1% (w/v)、5% (w/v)、10% (w/v)、15% (w/v) 或 20% (w/v))。优选地,蔗糖加入的浓度为大约 1% (w/v) 至大约 10% (w/v) (例如大约 2% (w/v)、大约 4% (w/v)、大约 6% (w/v) 或大约 8% (w/v))。另外,缀合反应也可包括添加缓冲剂。可应用本领域已知的任何适用的缓冲剂。适用的缓冲剂包括例如柠檬酸盐缓冲剂、乙酸盐缓冲剂、琥珀酸盐缓冲剂和磷酸盐缓冲剂。

[0020] 缀合步骤后,使第二混合物经受纯化步骤。在这点上,第二混合物可应用切向过滤 (TFF) 例如基于膜的切向过滤方法、吸附色谱法、吸附过滤、选择性沉淀或任何其它适用的纯化方法、以及它们的组合进行纯化,这些都在本文中提及。该第二个纯化步骤提供纯化的第二混合物,换言之,与根据本发明纯化前的第二混合物相比,增加了通过连接体与药物化学偶联的细胞结合剂的浓度和降低了第二混合物中的一种或多种其它成分的量。

[0021] 细胞结合剂可为与细胞结合的任何适合的物质,所述细胞一般和优选为动物细胞 (例如人细胞)。细胞结合剂优选为肽或多肽。适用的细胞结合剂包括例如抗体 (例如,单克隆抗体和其片断)、淋巴因子、激素、生长因子、营养运输分子 (例如转铁蛋白) 和特异性结合细胞表面上靶分子的任何其它物质或分子。

[0022] 本文所用的术语“抗体”是指任何免疫球蛋白,任何免疫球蛋白片断例如 Fab、F(ab')₂、dsFv、sFv、双抗体和三链抗体,或免疫球蛋白嵌合体,它们可与细胞表面上的抗原结合 (例如,它们含有互补决定区 (CDR))。任何适用的抗体可用作细胞结合剂。本领域普通技术人员将理解,适当抗体的选择将取决于要被靶向的细胞群。在这点上,在特定细胞群 (一般和优选为病态细胞群) 中选择性表达的细胞表面分子 (即抗原) 的类型和数目将决定用于本发明组合物中的适当抗体的选择。对于广泛多种的细胞类型 (包括肿瘤细胞类型),细胞表面表达特性是已知的,或者如果不知道,可应用常规分子生物学和组织化学技术来测定。

[0023] 抗体可为多克隆或单克隆抗体,但最优选为单克隆抗体。本文所用的“多克隆”抗体是指异质群体的抗体分子,一般包含在免疫动物的血清中。“单克隆”抗体是指均质群体的抗体分子,其对特定抗原为特异性的。单克隆抗体一般是通过 B 淋巴细胞 (“B 细胞”) 单个克隆产生的。应用本领域技术人员已知的各种技术包括标准杂交瘤技术,可获得单克隆抗体 (参见,例如, **Köhler** 和 Milstein, Eur. J. Immunol, 5:511-519 (1976), Harlow 和 Lane (编辑), Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Press (1988), 和 C. A. Janeway 等 (编辑), Immunobiology, 第五版, Garland Publishing, New York, NY (2001))。简要地,生产单克隆抗体的杂交瘤方法一般包括给任何适用的动物 (一般和优选为小鼠) 注射抗原 (即“免疫原”)。随后处死动物,将从其脾脏分离出的 B 细胞与人骨髓瘤细胞融合。产生杂交细胞 (即“杂交瘤”), 其在体外无限地增生和连续地分泌具有期望特异性的高滴度

抗体。本领域已知的任何适当的方法可用于鉴定产生具有期望特异性的抗体的杂交瘤细胞。这样的方法包括例如酶联免疫吸附测定法 (ELISA)、蛋白印迹分析和放射性免疫测定法。筛选杂交瘤群体以分离各个克隆,每个克隆分泌针对抗原的单一抗体种类。因为每个杂交瘤为由与单一 B 细胞融合产生的克隆,其产生的所有抗体分子在结构上是相同的,包括它们的抗原结合部位和同种型。也可应用其它合适的技术生产单克隆抗体,包括 EBV- 杂交瘤技术 (参见,例如, Haskard 和 Archer, *J. Immunol. Methods*, 74(2):361-67(1984), 和 Roder 等, *Methods Enzymol*, 121:140-67(1986))、噬菌体载体表达系统 (参见,例如, Huse 等, *Science*, 246:1275-81(1989)) 或包含抗体片段如 Fab 和 scFv (单链可变区) 的噬菌体展示文库 (参见,例如, 美国专利 5,885,793 和 5,969,108, 和国际专利申请 WO 92/01047 和 WO 99/06587)。

[0024] 单克隆抗体可从任何适合的动物中分离或在其中产生,但是优选在哺乳动物中,更优选在小鼠或人中,和最优选在人中产生。在小鼠中产生抗体的方法对本领域技术人员来说是众所周知的,并被描述在本文中。至于人抗体,本领域普通技术人员将理解,多克隆抗体可从用适当抗原接种或免疫过的受试人的血清中分离出来。替代选择地,通过适应性改变在非人类动物例如小鼠中产生人抗体的已知技术可产生人抗体 (参见,例如, 美国专利 5,545,806、5,569,825 和 5,714,352, 以及美国专利申请公布号 2002/0197266A1)。

[0025] 虽然是人类治疗应用的理想选择,人抗体,尤其人单克隆抗体,通常比小鼠单克隆抗体更难以产生。然而,小鼠单克隆抗体当给人施用时,引起快速宿主抗体应答,这可减少抗体药物缀合物的治疗或诊断潜能。为了防止发生这些并发症,优选单克隆抗体不被人免疫系统认为是“外来物”。

[0026] 为了这个目的,噬菌体展示可用于产生这种抗体。在这点上,应用标准分子生物学和重组 DNA 技术,可产生编码抗体的抗原结合可变 (V) 域的噬菌体文库 (参见,例如, Sambrook 等 (编辑), *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 第三版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York(2001))。为了特异性结合期望的抗原,选择编码具有期望特异性的可变区的噬菌体,并重新构建包含所选可变域的完全人抗体。将编码重构抗体的核酸序列引入适当的细胞系如用于杂交瘤生产的骨髓瘤细胞中,使得具有单克隆抗体特性的人抗体由该细胞分泌 (参见,例如, Janeway 等, 上文, Huse 等, 上文和美国专利 6,265,150)。替代选择地,单克隆抗体可由对特异性人重和轻链免疫球蛋白基因是转基因的小鼠生产。这样的方法是本领域已知的,并被描述于例如美国专利 5,545,806 和 5,569,825 以及 Janeway 等, 上文中。

[0027] 最优选地,抗体是人源化抗体。本文所用的“人源化”抗体是其中小鼠单克隆抗体的互补决定区 (CDR) (其形成抗体的抗原结合环) 嫁接在人抗体分子的框架上的抗体。由于小鼠和人抗体框架的相似性,本领域中公认这种方法产生的单克隆抗体与人抗体是抗原相同的,但能与产生 CDR 序列的小鼠单克隆抗体结合相同的抗原。生产人源化抗体的方法是本领域中众所周知的,并被详细地描述在例如 Janeway 等, 上文, 美国专利 5,225,539、5,585,089 和 5,693,761, 欧洲专利号 0239400B1, 和英国专利号 2188638 中。也可应用美国专利 5,639,641 和 Pedersen 等, *J. Mol Biol*, 235:959-973(1994) 中所述的抗体表面再建技术,产生人源化抗体。尽管本发明组合物的缀合物中所用的抗体最优选为人源化单克隆抗体,但如上所述的人单克隆抗体和小鼠单克隆抗体也在本发明的范围内。

[0028] 具有至少一个抗原结合部位并因此识别和结合位于靶细胞表面上的至少一个抗原或受体的抗体片断,也在本发明的范围内。在此方面,完整抗体分子的蛋白酶剪切可产生多种抗体片断,所述抗体片断保留识别和结合抗原的能力。例如用木瓜蛋白酶有限消化抗体分子一般产生三个片断,其中两个是相同的且称作 Fab 片断,因为它们保留母体抗体分子的抗原结合活性。用胃蛋白酶裂解抗体分子正常产生两种抗体片断,其中一种保留了该抗体分子的两个抗原结合臂,因此称作 $F(ab')_2$ 片断。用二硫苏糖醇或巯基乙胺还原 $F(ab')_2$ 片断产生称作 Fab' 片断的片断。应用常规重组 DNA 技术,可产生单链可变区片断 (sFv) 抗体片断,它由截短的 Fab 片断组成,所述 Fab 片断包含经合成肽与抗体轻链的 V 域连接的抗体重链的可变 (V) 域 (参见,例如,Janeway 等,上文)。类似地,通过重组 DNA 技术,可制备二硫化物稳定的可变区片断 (dsFv) (参见,例如,Reiter 等,Protein Engineering,7:697-704(1994))。然而,本发明上下文中的抗体片断不限于这些抗体片断的示例类型。可应用任何适合的能识别和结合期望细胞表面受体或抗原的抗体片断。抗体片断进一步描述在例如 Parham, J. Immunol, 131:2895-2902(1983), Spring 等 J. Immunol, 113:470-478(1974), 和 Nisonoff 等 Arch. Biochem. Biophys., 89:230-244(1960)。应用本领域已知的任何适用方法例如放射性免疫测定法 (RIA)、ELISA、蛋白质印迹、免疫沉淀法和竞争性抑制测定法,可以测定抗体-抗原结合 (参见,例如,Janeway 等,上文,和美国专利申请公布号 2002/0197266A1)。

[0029] 此外,所述抗体可为嵌合的抗体或其抗原结合片段。“嵌合的”是指抗体包含至少两个获自或产生自至少两种不同种类的免疫球蛋白或其片断 (例如,两种不同的免疫球蛋白,如与鼠免疫球蛋白可变区组合的人免疫球蛋白恒定区)。抗体也可作为结构域抗体 (dAb) 或其抗原结合片段,例如,骆驼化 (camelid) 抗体 (参见,例如,Desmyter 等, Nature Struct. Biol, 3:752, (1996)), 或鲨鱼抗体,例如,新抗原受体 (IgNAR) (参见,例如,Greenberg 等, Nature, 374:168(1995) 和 Stanfield 等, Science, 305:1770-1773(2004))。

[0030] 任何适用的抗体可用于本发明的上下文中。例如单克隆抗体 J5 为鼠 IgG2a 抗体,其对常见急性淋巴细胞性白血病抗原 (CALLA) 有特异性 (Ritz 等, Nature, 283:583-585(1980)), 可用于靶向表达 CALLA 的细胞 (例如,急性淋巴细胞性白血病细胞)。单克隆抗体 MY9 为鼠 IgG1 抗体,其特异性结合 CD33 抗原 (Griffin 等, Leukemia Res., 8:521(1984)), 可靶向作用于表达 CD33 的细胞 (例如,急性髓性白血病 (AML) 细胞)。

[0031] 类似地,单克隆抗体抗-B4 (也指作 B4) 为鼠 IgG1 抗体,其结合 B 细胞上的 CD19 抗原 (Nadler 等, J. Immunol., 131:244-250(1983)), 可用于靶向表达 CD19 的 B 细胞或病态细胞 (例如,非何杰金淋巴瘤细胞和慢性淋巴性白血病细胞)。N901 为鼠单克隆抗体,其结合神经内分泌起源的细胞包括小细胞肺肿瘤上发现的 CD56 (神经细胞粘附分子) 抗原,它可用于缀合物中使药物靶向于神经内分泌起源的细胞。J5、MY9 和 B4 抗体在它们用作缀合物的一部分之前,优选被表面重建或人源化。抗体的表面重建或人源化描述于例如, Roguska 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:969-73(1994)。

[0032] 此外,单克隆抗体 C242 结合 CanAg 抗原 (参见例如,美国专利 5,552,293), 可用于使缀合物靶向于表达 CanAg 的肿瘤,例如结直肠癌、胰腺癌、非小细胞肺癌和胃癌。

HuC242 为单克隆抗体 C242 的人源化形式（参见例如，美国专利 5,552,293）。生产 HuC242 的杂交瘤保藏于 ECACC，鉴别号为 90012601。应用 CDR 嫁接方法学（参见，例如，美国专利 5,585,089、5,693,761 和 5,693,762）或表面重建技术（参见，例如，美国专利 5,639,641），可制备 HuC242。HuC242 可用于使缀合物靶向于表达 CanAg 抗原的肿瘤细胞，例如，结直肠癌、胰腺癌、非小细胞肺癌和胃癌细胞。

[0033] 为了靶向于卵巢癌和前列腺癌细胞，抗 MUC1 抗体可用作缀合物中的细胞结合剂。抗 MUC1 抗体包括例如，抗 HMFG-2（参见，例如，Taylor-Papadimitriou 等，Int. J. Cancer, 28:17-21(1981)）、hCTM01（参见，例如，van Hof 等，Cancer Res., 56:5179-5185(1996)）和 DS6。通过应用抗 - 前列腺特异性膜抗原 (PSMA) 作为细胞结合剂如 J591，前列腺癌细胞也可被缀合物靶向（参见，例如，Liu 等，Cancer Res., 57:3629-3634(1997)）。另外，应用抗体曲妥单抗，可以靶向表达 Her2 抗原的癌细胞例如乳腺癌、前列腺癌和卵巢癌。与胰岛素样生长因子受体结合的抗 IGF-IR 抗体也可用于缀合物。

[0034] 尤其优选的抗体为人源化单克隆抗体，其实例包括 huN901、huMy9-6、huB4、huC242、曲妥单抗、比伐单抗、西罗珠单抗和利妥昔单抗（参见，例如，美国专利 5,639,641 和 5,665,357，美国临时专利申请号 60/424,332（其相关于美国专利公开号 2005/0118183A1），国际专利申请 WO 02/16401，Pedersen 等，上文，Roguska 等，上文，Liu 等，上文，Nadler 等，上文，Colomer 等，Cancer Invest., 19:49-56(2001)，Heider 等，Eur. J. Cancer, 31A:2385-2391(1995)，Welt 等，J. Clin. Oncol, 12:1193-1203(1994)，和 Maloney 等，Blood, 90:2188-2195(1997)）。最优选地，抗体为 huN901 人源化单克隆抗体或 huMy9-6 人源化单克隆抗体。其它优选的抗体包括 CNT095、huDS6、huB4 和 huC242。其它人源化单克隆抗体是本领域已知的，可结合本发明使用。

[0035] 虽然细胞结合剂优选为抗体，但细胞结合剂也可为非抗体分子。适用的非抗体分子包括例如，干扰素（例如， α 、 β 或 γ 干扰素）、淋巴因子（例如，白细胞介素 2 (IL-2)、IL-3、IL-4 或 IL-6）、激素（例如胰岛素）、生长因子（例如，EGF、TGF- α 、FGF 和 VEGF）、集落刺激因子（例如，G-CSF、M-CSF 和 GM-CSF（参见，例如 Burgess, Immunology Today, 5:155-158(1984)）、生长抑素和转铁蛋白（参见，例如，O'Keefe 等，JBiol. Chem., 260:932-937(1985)）。例如，与髓样细胞结合的 GM-CSF 可用作细胞结合剂靶向于急性髓样细胞白血病细胞。此外，与活化 T 细胞结合的 IL-2 可用于预防移植植物排斥，用于治疗 and 预防移植植物抗宿主病，和用于治疗急性 T 细胞白血病。表皮生长因子 (EGF) 可靶向于鳞癌如肺癌和头颈癌。生长抑素可用于靶向成神经瘤细胞和其它肿瘤细胞类型。

[0036] 缀合物可包含任何适合的药物，一般为细胞毒性剂。本文所用的“细胞毒性剂”是指导致细胞死亡、引诱细胞死亡或减少细胞生存力的任何化合物。适用的细胞毒性剂包括例如，美登木素生物碱和美登木素生物碱类似物、紫杉烷类 (taxoids)、CC-1065 和 CC-1065 类似物和多拉司他汀和多拉司他汀类似物。在本发明优选的实施方案中，细胞毒性剂为美登木素生物碱，包括美坦西醇和美坦西醇类似物。美登木素生物碱为抑制微管形成的化合物，对哺乳动物细胞具有强毒性。适合的美坦西醇类似物的实例包括具有修饰的芳环的那些和在其它位置具有修饰的那些。这样的美登木素生物碱被描述在例如，美国专利 4,256,746、4,294,757、4,307,016、4,313,946、4,315,929、4,322,348、4,331,598、4,361,650、4,362,663、4,364,866、4,424,219、4,371,533、4,450,254、5,475,092、

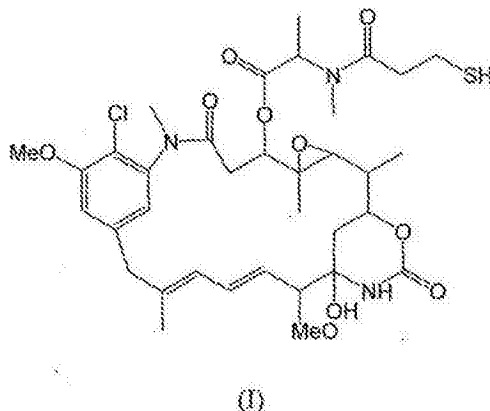
5, 585, 499、5, 846, 545 和 6, 333, 410 中。

[0037] 具有经修饰的芳环的美坦西醇类似物的实例包括：(1)C-19-去氯（美国专利 4, 256, 746）（通过 LAH 还原安丝菌素（ansamycin）P2 制得），(2)C-20-羟基（或 C-20-去甲基）+/-C-19-去氯（美国专利 4, 361, 650 和 4, 307, 016）（通过应用链霉菌（Streptomyces）或放线菌（Actinomyces）脱甲基或应用 LAH 脱氯而制得）和 (3)C-20-去甲氧基、C-20-酰氧基（-OCOR）、+/-去氯（美国专利 4, 294, 757）（通过应用酰基氯酰化而制得）。

[0038] 在除芳环以外的位置具有修饰的美坦西醇类似物的实例包括：(1)C-9-SH（美国专利 4, 424, 219）（通过用 H_2S 或 P_2S_5 与美坦西醇反应制得），(2)C-14-烷氧基甲基（去甲氧基 / CH_2OR ）（美国专利 4, 331, 598），(3)C-14-羟甲基或酰氧基甲基（ CH_2OH 或 CH_2OAc ）（美国专利 4, 450, 254）（由诺卡氏菌（Nocardia）制得），(4)C-15-羟基 / 酰氧基（美国专利 4, 364, 866）（通过用链霉菌转换美坦西醇而制得），(5)C-15-甲氧基（美国专利 4, 313, 946 和 4, 315, 929）（从滑桃树（Trewia nudiflora）中分离出的）(6)C-18-N-去甲基（美国专利 4, 362, 663 和 4, 322, 348）（通过用链霉菌将美坦西醇脱甲基而制得）和 (7)4, 5-脱氧（美国专利 4, 371, 533）（通过三氯化钛 / LAH 还原美坦西醇而制得）。

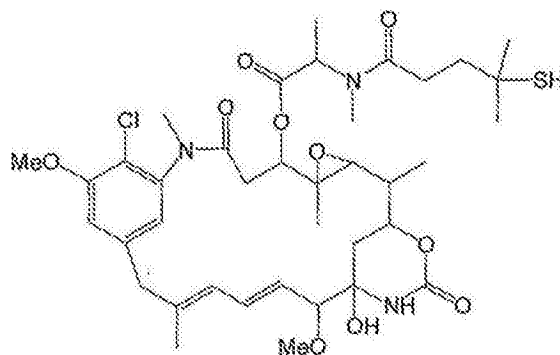
[0039] 本发明优选的实施方案中，缀合物应用含有硫醇的美登木素生物碱 DM1，也称为 $N^{2'}$ -脱乙酰- $N^{2'}$ -(3-巯基-1-氧代丙基)-美登素，作为细胞毒性剂。DM1 的结构由式 (I) 表示：

[0040]



[0041] 在本发明另一个优选的实施方案中，缀合物应用含有硫醇的美登木素生物碱 DM4，也称为 $N^{2'}$ -脱乙酰- $N^{2'}$ -(4-甲基-4-巯基-1-氧代戊基)-美登素，作为细胞毒性剂。DM4 的结构由式 (II) 表示：

[0042]

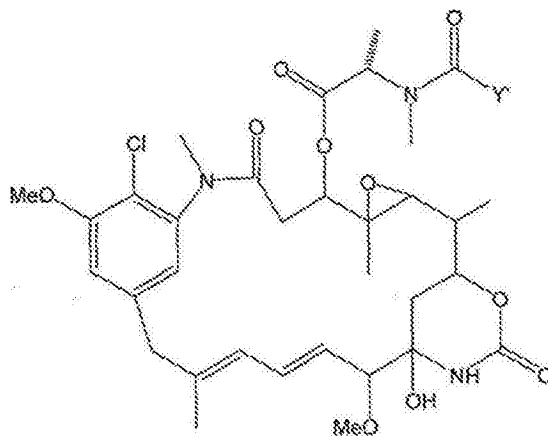


(II)

[0043] 其它美登素可用于本发明的上下文中,包括例如,在携带硫原子的碳原子上携带单或双烷基取代的含有硫醇和二硫化物的美登木素生物碱。尤其优选的为如下美登木素生物碱:在 C-3 位置具有 (a) C-14 羟甲基、C-15 羟基或 C-20 去甲基官能度,和 (b) 被携带阻碍巯基的酰基酰化的氨基酸侧链,其中携带硫醇官能度的酰基碳原子具有一或两个取代基,所述取代基为 CH_3 、 C_2H_5 、具有 1 至 10 个碳原子的直链或支链烷基或链烯基、具有 3 至 10 个碳原子的环状烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳族基或杂环烷基,和进一步地其中取代基之一可为 H, 且其中酰基在羰基官能度和硫原子之间具有至少三个碳原子长度的直链。

[0044] 用于本发明的上下文中另外的美登素包括由式 (III) 表示的化合物:

[0045]



(III),

[0046] 其中 Y' 代表

[0047] $(\text{CR}_7\text{R}_8)_1(\text{CR}_9=\text{CR}_{10})_p\text{C}\equiv\text{C}_q\text{A}_r(\text{CR}_5\text{R}_6)_m\text{D}_u(\text{CR}_{11}=\text{CR}_{12})_r(\text{C}\equiv\text{C})_s\text{B}_t(\text{CR}_3\text{R}_4)_n-\text{CR}_1\text{R}_2\text{SZ}$, 其中 R_1 和 R_2 各自独立为 CH_3 、 C_2H_5 、具有 1 至 10 个碳原子的直链烷基或链烯基、具有 3 至 10 个碳原子的支链或环状烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳族基或杂环烷基,和其中 R_2 也可可为 H,

[0048] 其中 A、B、D 为具有 3-10 个碳原子的环烷基或环烯基、简单的或取代的芳基或杂环芳族基或杂环烷基,

[0049] 其中 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_9 、 R_{11} 和 R_{12} 各自独立为 H、 CH_3 、 C_2H_5 、具有 1 至 10 个碳原子的直链烷基或链烯基、具有 3 至 10 个碳原子的支链或环状烷基或烯基、苯基、取代的苯基

或杂环芳族基或杂环烷基,

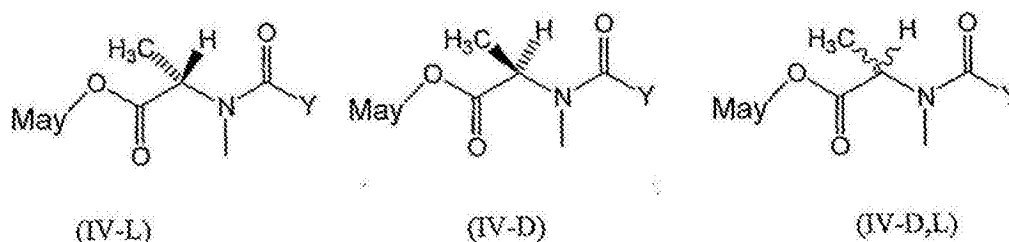
[0050] 其中 l, m, n, o, p, q, r, s 和 t 各自独立为零或 1 至 5 的整数, 条件是 l, m, n, o, p, q, r, s 和 t 之中的至少两个在任何一次时都不为零, 和

[0051] 其中 Z 为 H, SR 或 COR , 其中 R 是具有 1 至 10 个碳原子的直链烷基或链烯基、具有 3 至 10 个碳原子的支链或环状烷基或烯基、或简单的或取代的芳基或杂环芳族基或杂环烷基。

[0052] 式 (III) 优选的实施方案包括其中 (a) R_1 为 H, R_2 为甲基和 Z 为 H , (b) R_1 和 R_2 为甲基且 Z 为 H , (c) R_1 为 H, R_2 为甲基和 Z 为 $-SCH_3$, 和 (d) R_1 和 R_2 为甲基且 Z 为 $-SCH_3$ 的式 (III) 化合物。

[0053] 这类另外的美登素也包括式 (IV-L)、(IV-D) 或 (IV-D, L) 所表示的化合物:

[0054]



[0055] 其中 Y 代表 $(CR_7R_8)_1(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ$,

[0056] 其中 R_1 和 R_2 各自独立为 CH_3, C_2H_5 、具有 1 至 10 个碳原子的直链烷基或链烯基、具有 3 至 10 个碳原子的支链或环状烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳族基或杂环烷基, 和其中 R_2 也可作为 H ,

[0057] 其中 R_3, R_4, R_5, R_6, R_7 和 R_8 各自独立为 H, CH_3, C_2H_5 、具有 1 至 10 个碳原子的直链烷基或链烯基、具有 3 至 10 个碳原子的支链或环状烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳族基或杂环烷基,

[0058] 其中 l, m 和 n 各自独立为 1 至 5 的整数, 且另外 n 可为零,

[0059] 其中 Z 为 H, SR 或 COR , 其中 R 是具有 1 至 10 个碳原子的直链或支链烷基或链烯基、具有 3 至 10 个碳原子的环状烷基或烯基、或简单的或取代的芳基或杂环芳族基或杂环烷基, 和

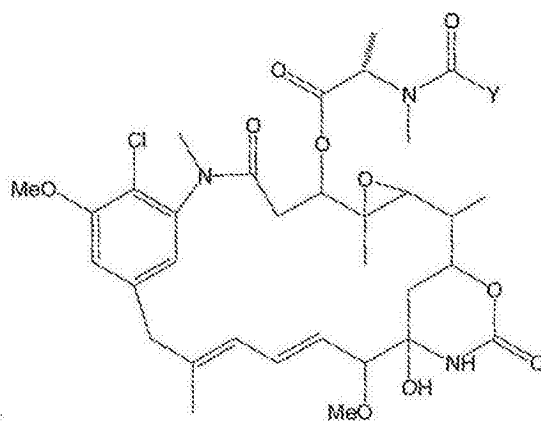
[0060] 其中 May 代表在 C-3、C-14 羟甲基、C-15 羟基或 C-20 去甲基上携带侧链的美登木素生物碱。

[0061] 式 (IV-L)、(IV-D) 和 (IV-D, L) 优选的实施方案包括其中 (a) R_1 为 H, R_2 为甲基, R_5, R_6, R_7 和 R_8 各自为 H, l 和 m 各自为 1, n 为 0, 和 Z 为 H , (b) R_1 和 R_2 为甲基, R_5, R_6, R_7 和 R_8 各自为 H, l 和 m 各自为 1, n 为 0, 和 Z 为 H , (c) R_1 为 H, R_2 为甲基, R_5, R_6, R_7 和 R_8 各自为 H, l 和 m 各自为 1, n 为 0, 和 Z 为 $-SCH_3$, 或 (d) R_1 和 R_2 为甲基, R_5, R_6, R_7 和 R_8 各自为 H, l 和 m 各自为 1, n 为 0, 和 Z 为 $-SCH_3$ 的式 (IV-L)、(IV-D) 和 (IV-D, L) 的化合物。

[0062] 优选地, 细胞毒性剂是由式 (IV-L) 所表示的。

[0063] 另外优选的美登素也包括由式 (V) 表示的化合物:

[0064]



(V)

[0065] 其中 Y 代表 $(CR_7R_8)_1(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ$,

[0066] 其中 R_1 和 R_2 各自独立为 CH_3 、 C_2H_5 、具有 1 至 10 个碳原子的直链烷基或链烯基、具有 3 至 10 个碳原子的支链或环状烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳族基或杂环烷基, 和其中 R_2 也可 H,

[0067] 其中 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 各自独立为 H、 CH_3 、 C_2H_5 、具有 1 至 10 个碳原子的直链烷基或链烯基、具有 3 至 10 个碳原子的支链或环状烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳族基或杂环烷基,

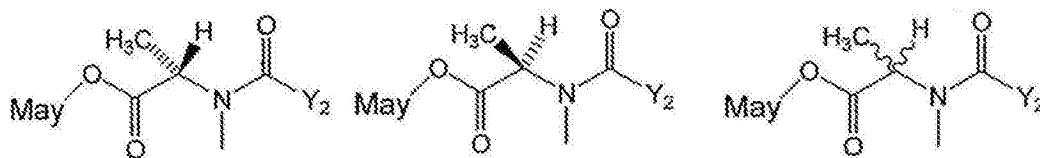
[0068] 其中 1、m 和 n 各自独立为 1 至 5 的整数, 且另外 n 可为零, 和

[0069] 其中 Z 为 H、SR 或 COR, 其中 R 具有 1 至 10 个碳原子的直链烷基或链烯基、具有 3 至 10 个碳原子的支链或环状烷基或烯基、或简单的或取代的芳基或杂环芳族基或杂环烷基。

[0070] 式 (V) 优选的实施实施方案包括其中 (a) R_1 为 H, R_2 为甲基, R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 各自为 H; 1 和 m 各自为 1; n 为 0, 和 Z 为 H, (b) R_1 和 R_2 为甲基, R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 各自为 H, 1 和 m 各自为 1; n 为 0, 和 Z 为 H, (c) R_1 为 H, R_2 为甲基, R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 各自为 H, 1 和 m 各自为 1, n 为 0, 和 Z 为 $-SCH_3$, 或 (d) R_1 和 R_2 为甲基, R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 各自为 H, 1 和 m 为 1, n 为 0, 和 Z 为 $-SCH_3$ 的式 (V) 化合物。

[0071] 再进一步优选的美登素包括由式 (VI-L)、(VI-D) 或 (VI-D, L) 表示的化合物:

[0072]



(VI-L)

(VI-D)

(VI-D, L)

[0073] 其中 Y_2 代表 $(CR_7R_8)_1(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ_2$,

[0074] 其中 R_1 和 R_2 各自独立为 CH_3 、 C_2H_5 、具有 1 至 10 个碳原子的直链烷基或链烯基、具有 3 至 10 个碳原子的支链或环状烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳族基或杂环烷基, 和其中 R_2 也可 H,

[0075] 其中 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 各自独立为 H、 CH_3 、 C_2H_5 、具有 1 至 10 个碳原子的直链环状烷基或烯基、具有 3 至 10 个碳原子的支链或环状烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳

族基或杂环烷基,

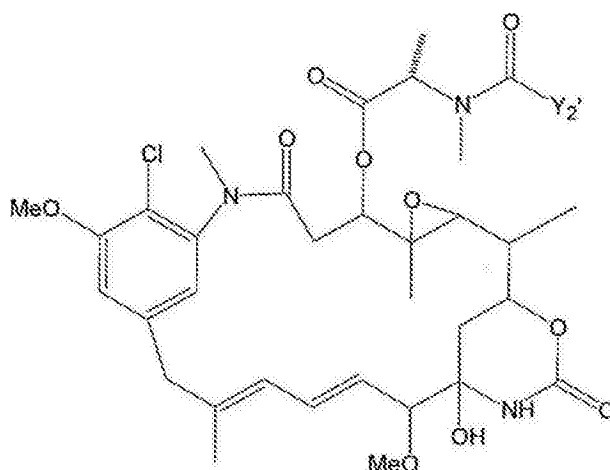
[0076] 其中 l, m 和 n 各自独立为 1 至 5 的整数, 并且另外 n 可为零,

[0077] 其中 Z_2 为 SR 或 COR, 其中 R 是具有 1 至 10 个碳原子的直链烷基或链烯基、具有 3 至 10 个碳原子的支链或环状烷基或烯基、或简单的或取代的芳基或杂环芳族基或杂环烷基, 和

[0078] 其中 May 代表美登木素生物碱。

[0079] 另外优选的美登素包括由式 (VII) 表示的化合物:

[0080]



(VII).

[0081] 其中 Y_2 代表

[0082] $(CR_7R_8)_1(CR_9=CR_{10})_p(C \equiv C)_{qA_r}(CR_5R_6)_mDu(CR_{11}=CR_{12})_r(C \equiv C)_sB_t(CR_3R_4)_n-CR_1R_2SZ_2$,

[0083] 其中 R_1 和 R_2 各自独立为 CH_3 、 C_2H_5 、具有 1 至 10 个碳原子的直链或支链烷基或链烯基、具有 3 至 10 个碳原子的环状烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳族基或杂环烷基, 且另外 R_2 也可作为 H,

[0084] 其中 A、B、D 各自独立地为具有 3-10 个碳原子的环烷基或环烯基、简单的或取代的芳基、或杂环芳族基或杂环烷基,

[0085] 其中 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_9 、 R_{11} 和 R_{12} 各自独立为 H、 CH_3 、 C_2H_5 、具有 1 至 10 个碳原子的直链烷基或链烯基、具有 3 至 10 个碳原子的支链或环状烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳族基或杂环烷基,

[0086] 其中 l, m, n, o, p, q, r, s 和 t 各自独立为零或 1 至 5 的整数, 条件是 l, m, n, o, p, q, r, s 和 t 之中的至少两个在任何一次时都不为零, 和

[0087] 其中 Z_2 为 SR 或 $-COR$, 其中 R 是具有 1 至 10 个碳原子的直链烷基或链烯基、具有 3 至 10 个碳原子的支链或环状烷基或烯基、或简单的或取代的芳基或杂环芳族基或杂环烷基。

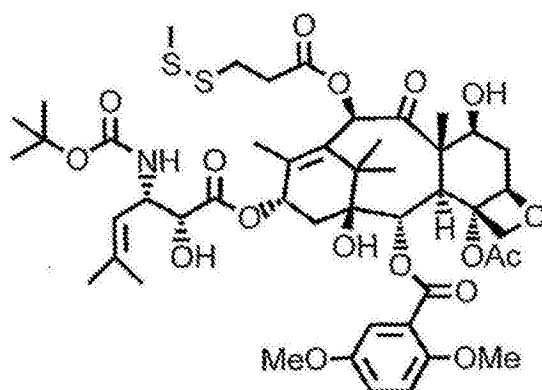
[0088] 式 (VII) 优选的实施方案包括其中 R_1 为 H 和 R_2 为甲基的式 (VII) 化合物。

[0089] 除美登木素生物碱之外, 用于缀合物中的细胞毒性剂可为紫杉烷或其衍生物。紫杉烷为一族化合物, 包括细胞毒性天然产物紫杉醇(**Taxol®**), 和半合成的衍生物多西他赛(**Taxotere®**), 两者均广泛用于癌症治疗。紫杉烷为有丝分裂纺锤体毒剂, 抑制微管蛋白解聚, 导致细胞死亡。虽然多西他赛和紫杉醇是癌症治疗中有用的药物, 但它们的抗肿瘤

活性由于它们对正常细胞的非特异毒性而受到限制。此外,象紫杉醇和多西他赛化合物本身不足够有效地用于细胞结合剂的缀合物中。

[0090] 用于制备细胞毒性缀合物的优选紫杉烷为式 (VIII) 的紫杉烷:

[0091]



(VIII)

[0092] 合成可用于本发明上下文中的紫杉烷的方法以及使紫杉烷缀合至细胞结合剂例如抗体的方法,详细描述在美国专利 5,416,064、5,475,092、6,340,701、6,372,738、6,436,931、6,596,757、6,706,708 和 6,716,821,和美国专利申请公布号 2004/0024049A1 中。

[0093] 细胞毒性剂也可作为 CC-1065 或其衍生物。CC-1065 为从泽耳链霉菌 (*Streptomyces zelensis*) 培养肉汤中分离出来的有效抗肿瘤抗生素。CC-1065 在体外与通常使用的抗癌药物例如多柔比星、氨甲蝶呤和长春新碱相比,作用强大约 1000 倍 (Bhuyan 等, *Cancer Res.*, 42:3532-3537 (1982))。CC-1065 及其类似物描述在美国专利 5,585,499、5,846,545、6,340,701 和 6,372,738 中。CC-1065 的细胞毒性潜能与其烷化活性和其结合 DNA 或嵌入 DNA 的活性相关。这两种活性归于该分子的单独部分。在这方面,烷化活性包含在环丙吡咯并吡啶 (CPI) 亚单位并且 DNA 结合活性归于 CC-1065 的两个吡咯并吡啶亚单位。

[0094] 几个 CC-1065 类似物是本领域已知的,也可用作缀合物中的细胞毒性剂 (参见,例如,Warpehoski 等, *J. Med. Chem.*, 31:590-603 (1988))。已经开发了一系列的 CC-1065 类似物,其中 CPI 部分被环丙苯并吡啶 (CBI) 部分代替 (Boger 等, *J. Org. Chem.*, 55:5823-5833 (1990), 和 Boger 等, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1:115-120 (1991))。这些 CC-1065 类似物保持母体药物的体外高效能,而不引起小鼠迟发性毒性。像 CC-1065 一样,这些化合物为烷化剂,其共价结合 DNA 小沟,引起细胞死亡。

[0095] 通过经靶向递送至肿瘤部位改变体内分布,可极大地提高 CC-1065 类似物的治疗功效,导致对非靶组织更低的毒性,并因此降低全身性毒性。为了这个目的,已经产生了 CC-1065 的类似物和衍生物与细胞结合剂的缀合物,其特异靶向于肿瘤细胞 (参见,例如,美国专利 5,475,092、5,585,499 和 5,846,545)。这些缀合物在体外一般显示高度靶特异性细胞毒性,和在小鼠中人肿瘤异种移植模型中显示抗肿瘤活性 (参见,例如,Chari 等, *Cancer Res.*, 55:4079-4084 (1995))。

[0096] 合成 CC-1065 类似物的方法详细地描述于美国专利 5,475,092、5,585,499、5,846,545、6,534,660、6,586,618 和 6,756,397 和美国专利申请公布号 2003/0195365A1

中。

[0097] 药物例如氨甲蝶呤、柔红霉素、多柔比星、长春新碱、长春碱、美法仑、丝裂霉素 C、苯丁酸氮芥、加利车霉素、小管素 (tubulysin) 和小管素类似物、倍癌霉素和倍癌霉素类似物、多拉司他汀和多拉司他汀类似物,也可用于本发明的上下文中。多柔比星和柔红霉素化合物(参见,例如,美国专利 6,630,579)也可用作药物。

[0098] 药物缀合物可通过体外方法制得。为了连接药物或前体药物至抗体上,应用连接基团。适合的连接基团是本领域众所周知的,包括二硫基、对酸不稳定的基团、对光不稳定的基团、对肽酶不稳定的基团和对酯酶不稳定的基团。优选的连接基团为二硫基。例如,使用抗体和药物或前体药物之间的二硫化物交换反应可构成缀合物。通过中间载体分子例如血清白蛋白,药物分子也可与细胞结合剂连接。

[0099] 根据本发明,通过使双功能交联试剂与细胞结合剂反应,从而导致连接体分子与细胞结合剂共价连接,修饰细胞结合剂。本文所用的“双功能交联试剂”为使细胞结合剂与药物(如本文所述的药物)共价连接的任何化学部分。在本发明优选的实施方案中,连接部分的一部分由药物提供。在这方面,药物包含连接部分,其为更大连接体分子的一部分,连接体分子用于使细胞结合剂与药物连接。例如,为了形成美登木素生物碱 DM1,对美登素 C-3 羟基的侧链进行修饰,以具有游离的巯基 (SH)。美登素的这种硫醇化形式可与修饰的细胞结合剂起反应,形成缀合物。因此,最终的连接体由两种组分组装而成,其中一种组分由交联试剂提供,而另一种组分由 DM1 的侧链提供。

[0100] 任何适合的双功能交联试剂可结合本发明使用,只要该连接体试剂分别提供药物和细胞结合剂的治疗性(例如细胞毒性)和靶向特性的保留。优选地,连接体分子通过化学键(如上所述)连接药物至细胞结合剂,使得药物和细胞结合剂彼此化学偶联(例如,共价键合)。优选地,连接试剂为可裂解性连接体。更优选地,连接体为温和条件下可裂解的,即在不影响药物活性的细胞内的条件下。适用的可裂解性连接体的实例包括二硫化物连接体、对酸不稳定的连接体、对光不稳定的连接体、对肽酶不稳定的连接体和对酯酶不稳定的连接体。包含二硫化物的连接体是通过生理条件下可发生的二硫化物交换可裂解的连接体。对酸不稳定的连接体是在酸性 pH 下可裂解的连接体。例如,某些细胞内的小室如核内体和溶酶体具有酸性的 pH (pH 4-5),所提供的条件适合裂解对酸不稳定的连接体。对光不稳定的连接体适用于可接触光的体表和许多体腔。此外,红外线可渗入组织。对肽酶不稳定的连接体可用于裂解细胞内外或细胞外的某些肽(参见,例如, Trouet 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79:626-629(1982), 和 Umemoto 等, Int. J. Cancer, 43:677-684(1989))。

[0101] 优选地,药物通过二硫键与细胞结合剂连接。连接体分子包含可与细胞结合剂起反应的反应性化学基团。优选的与细胞结合剂起反应的反应性化学基团为 N-琥珀酰亚氨基酯和 N-磺基琥珀酰亚氨基酯。另外,连接体分子包含反应性化学基团,优选二硫代吡啶基,其可与药物起反应形成二硫键。尤其优选的连接体分子包括例如, 3-(2-吡啶二硫基)丙酸 N-琥珀酰亚氨基酯 (SPDP) (参见,例如, Carlsson 等, Biochem. J, 173:723-737(1978)), 4-(2-吡啶二硫基)丁酸 N-琥珀酰亚氨基酯 (SPDB) (参见,例如, 美国专利 4,563,304), 4-(2-吡啶二硫基)戊酸 N-琥珀酰亚氨基酯 (SPP) (参见,例如, CAS 登记号 341498-08-6) 和美国专利 6,913,748 中描述的其它反应性交叉-连接体,在此将其全文引入,作为参考。

[0102] 虽然优选将可裂解性连接体用于本发明方法中,非裂解性连接体也可用于产生上述的缀合物。非裂解性连接体为能以稳定的共价的方式连接药物例如美登木素生物碱、紫杉烷或 CC-1065 类似物至细胞结合剂的任何化学部分。因此,非裂解性连接体在药物或细胞结合剂保持活性的条件下,实质上可抵抗酸引起的裂解、光引起的裂解、肽酶引起的裂解、酯酶引起的裂解和二硫键断裂。

[0103] 在药物和细胞结合剂之间形成非裂解性连接体的合适交联试剂是本领域众所周知的。非裂解性连接体的实例包括具有与细胞结合剂起反应的 N-琥珀酰亚氨基酯或 N-磺基琥珀酰亚氨基酯部分以及药物起反应的马来酰亚胺基-或以卤代乙酰基为基础的部分的连接体。包含马来酰亚胺基为基础的部分的交联试剂包括 4-(马来酰亚胺基甲基)环己烷羧酸 N-琥珀酰亚氨基酯 (SMCC)、SMCC 的“长链”类似物 N-琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)-环己烷-1-羧基-(6-酰氨基己酸酯) (LC-SMCC)、 κ -马来酰亚胺基十一酸 N-琥珀酰亚胺基酯 (KMUA)、 γ -马来酰亚胺基丁酸 N-琥珀酰亚胺基酯 (GMBS)、 ϵ -马来酰亚胺基己酸 N-羟基琥珀酰亚胺酯 (EMCS)、间-马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯 (MBS)、N-(α -马来酰亚胺基乙酰氧基)-琥珀酰亚胺酯 (AMAS)、琥珀酰亚胺基-6-(β -马来酰亚胺基丙酰氨基)己酸酯 (SMPH)、4-(对-马来酰亚胺基苯基)-丁酸 N-琥珀酰亚胺基酯 (SMPB) 和 N-(对-马来酰亚胺基苯基)-异氰酸酯 (PMPI)。包含卤代乙酰基为基础的部分的交联试剂包括 N-琥珀酰亚胺基-4-(碘代乙酰基)-氨基苯甲酸酯 (SIAB)、碘醋酸 N-琥珀酰亚胺基酯 (SIA)、溴乙酸 N-琥珀酰亚胺基酯 (SBA) 和 3-(溴乙酰氨基)丙酸 N-琥珀酰亚胺基酯 (SBAP)。

[0104] 缺少硫原子的可形成非裂解性连接体的其它交联试剂也可用于本发明方法中。这样的连接体可由以二羧酸为基础的部分产生。合适的以二羧酸为基础的部分包括但不限于通式 (IX) 的 α, ω -二羧酸:

[0105] $\text{HOOC-X}_1\text{-Y}_n\text{-Z}_m\text{-COOH}$

[0106] (IX),

[0107] 其中 X 为具有 2 至 20 个碳原子的直链或支链烷基、链烯基或炔基, Y 为携带 3 至 10 个碳原子的环烷基或环烯基, Z 为携带 6 至 10 个碳原子的取代或未取代的芳族基,或取代或未取代的其中杂原子选自 N、O 或 S 的杂环基,和其中 1、m 和 n 各自为 0 或 1,条件是 1、m 和 n 不同时全部为零。

[0108] 本文公开的许多非裂解性连接体详细描述于美国专利申请号 10/960,602 中,它相应于美国专利申请公布号 2005/0169933A1。

[0109] 替代选择地,如同美国专利 6,441,163B1 中所公开,药物可首先被修饰以引入适合与细胞结合剂起反应的反应性酯。这些含有活化连接体部分的美登木素生物碱与细胞结合剂的反应,提供了另一种产生可裂解的或非可裂解的细胞结合剂美登木素生物碱缀合物的方法。

[0110] 关于美登木素生物碱、包含它的细胞毒性剂、药物缀合物和相关制备方法的附加信息公开在美国专利申请号 11/352,121 和美国专利申请号 10/849,136 中,后者相应于美国专利申请公布号 2004/0235840A1。

[0111] 下列实施例进一步举例说明本发明,当然不应以任何方式将其解释为限制本发明的范围。

具体实施方式

[0112] 实施例 1

[0113] 本实施例应用 TFF 证明用异双功能修饰试剂修饰的抗体的纯化。

[0114] 在 20℃, 在含有 50mM NaCl、2mM EDTA 和 5% 乙醇的 50mM 磷酸钾缓冲液 (pH 7.5) 中, 将 huN901 单克隆抗体 (终浓度 8mg/ml) 与 4-(2-吡啶基二硫基) 戊酸 N-琥珀酰亚氨基酯 (SPP, 5.6 倍摩尔过量) 一起孵育大约 180 分钟。在第一组中, 应用 Sephadex™ G25F 树脂柱, 用含有 50mM NaCl 和 2mM EDTA 的 50mM 磷酸钾缓冲液 (pH 6.5) 使柱平衡并洗脱, 将反应混合物纯化。在第二组中, 应用 Pellicon XLTFF 系统 (Millipore, Billerica, MA) 纯化反应混合物, 应用 10,000 分子量截断膜 (Ultracel™再生纤维素薄膜, Millipore, Billerica, MA) 将抗体渗滤 (5 个体积) 至 50mM 磷酸钾、50mM NaCl (pH 6.5) 和 2mMEDTA 中。两种样品在含有 50mM NaCl 和终浓度为 3%DMA 的 pH6.5 磷酸钾缓冲液中与 DM1 (相对于未结合的连接体 1.7 倍摩尔过量) 缀合过 18 小时。

[0115] 在两组中, 用分光光度测量法 (波长 280nm) 测定结合修饰和纯化步骤的产率。通过用二硫苏糖醇处理以释放吡啶-2-硫酮 (它在 343nm 处消光系数为 $8,080\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), 也测定了连接体/抗体的比值。用分光光度测量法 (波长 280nm 和 252nm) 测定缀合步骤的药物/抗体的比值。此外, 通过 Hisep HPLC 测量除去 SPP 相关的小分子种类。

[0116] 得到的数据描述于表 1 中。

[0117] 表 1: 应用 G-25F 与 TFF 比较的修饰的 huN901 的纯化方法

[0118]

		Sephadex™ G25F 树脂	TFF
修饰步骤	步骤产率	94 %	98 %
	连接体/抗体的比值	4.9	4.9
	SPP 相关的小分子	0.2 %	0.2 %
缀合步骤	药物/抗体的比值	3.7	3.7

[0119] 如表 1 所示, TFF 的应用产生药物缀合物产物, 其质量至少相当于非吸附色谱法 (G25) 方法, 但更方便和可规模化生产。

[0120] 实施例 2

[0121] 本实施例应用吸附色谱法证明用异双功能修饰试剂修饰的抗体的纯化。

[0122] 在室温, 在含有 50mM NaCl、2mM EDTA 和 5% 乙醇的 50mM 磷酸钾缓冲液 (pH 6.5) 中, 将 huB4 抗体用 4-(2-吡啶基二硫基) 丁酸 N-琥珀酰亚氨基酯 (SPDB, 5.4 倍摩尔过量) 修饰 120 分钟。在第一组中, 应用如实施例 1 所述的 Sephadex™ G25F 树脂, 将反应混合物纯化。在第二组中, 将反应混合物装载至陶瓷羟磷灰石柱 (CHT, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), 在 12.5mM 磷酸钾缓冲液 (pH 6.5) 中使柱平衡并用 80mM 磷酸钾缓冲液 (pH 6.5) 洗脱。

[0123] 在两组中, 如实施例 1 所述测定产率和连接体/抗体的比值。第一组具有 91% 的产

率和 4.2 的连接体 / 抗体的比值。第二组具有 89% 的产率和 4.2 的连接体 / 抗体的比值。

[0124] 在 20℃, 在含有 2.7% 蔗糖和 5% 乙醇的 10mM 磷酸钠缓冲液 (pH 7.5) 中, 将 CNT095 抗体 (终浓度 10mg/ml) 用 4-(2-吡啶基二硫基) 丁酸 N-琥珀酰亚氨基酯 (SPDB, 4.5 倍摩尔过量) 修饰 120 分钟。在第一组中, 应用 Sephadex™ G25F 树脂, 在含有 12.5mM NaCl 和 0.5mMEDTA 的 12.5mM 磷酸钾缓冲液 (pH 6.6) 中, 将反应混合物纯化。在第二组中, 将反应混合物装载至 SP Sepharose Fast Flow 柱 (GEHealthcare, Piscataway, NJ), 用 10mM 磷酸钠缓冲液 (pH 7.5) 使柱平衡并用含有 50mM NaCl 的 50mM 磷酸钾缓冲液 (pH 7.5) 洗脱。

[0125] 在两组中, 如实施例 1 所述测定产率和连接体 / 抗体的比值。第一组具有 96% 的产率和 4.0 的连接体 / 抗体的比值。第二组具有 97% 的产率和 4.1 的连接体 / 抗体的比值。

[0126] 本实施例中获得的数据证明吸附色谱法可用于纯化被异双功能修饰试剂修饰的抗体。

[0127] 实施例 3

[0128] 本实施例证明在 pH 6.5 以上经修饰的抗体与药物缀合的有益效果。

[0129] 在第一个实验中, CNT095 抗体如实施例 2 所述修饰并纯化。然后将修饰的抗体分成两组。在第一组中, 在 20℃, 在含有 12.5mMNaCl、0.5mM EDTA、3%DMA 和每连接体 1.7 倍摩尔过量的药物的 pH 6.5 的 12.5mM 磷酸钾缓冲液中进行缀合。在第二组中, 缀合反应在 pH 7.5 下进行。缀合的抗体经 NAP-10 柱纯化。

[0130] 测量两组的药物 / 抗体的比值。得到的数据描述于表 2 中。

[0131] 表 2: pH 6.5 与 7.5 比较的缀合反应的药物 / 抗体的比值

[0132]

反应时间 (小时)	pH 6.5 缀合反应的药物/ 抗体的比值	pH 7.5 缀合反应的药物/ 抗体的比值
0.5	-	3.0
1	2.3	3.4
1.5	--	3.5
2	2.8	3.5
2.75	-	3.6
3.5	3.2	3.6
5	3.4	3.7

[0133] 如表 2 中描述的数据所示, 缀合在 pH 7.5 比在 pH 6.5 进行得更快。

[0134] 在第二个实验中, huB4 人源化单克隆抗体被以下修饰: (a) 相对于抗体 4.9 倍摩尔过量的 SPDB, 或 (b) 相对于抗体 4.8 倍摩尔过量的 SPDB。在两种情形下, 室温, 在含 50mM 磷酸钾、50mM 氯化钾和 2mM EDTA (pH 6.5) 的 5% 乙醇中进行反应总计 120 分钟。将样品 (a) 经 Sephadex™ G25F 树脂柱纯化, 所述柱在 pH 6.5 的 50mM 磷酸钾、50mM 氯化钠和 2mM EDTA 中平衡。将样品 (b) 等同纯化, 除了将色谱缓冲液调节至 pH 7.5。室温, 在终浓度为 3% 的二甲基乙酰胺 (DMA) 中将两种样品与 DM4 (相对于结合连接体 1.7 倍摩尔过量) 缀合 18 小

时。

[0135] 因此,样品(a)在 pH 6.5 缀合,样品(b)在 pH 7.5 缀合。然后将这些样品经 Sephadex™G25F 树脂柱纯化,所述柱在 pH 6.5 的 9.6mM 磷酸钾和 4.2mM 氯化钠中平衡。两种样品在 4℃ 孵育至多 7 个月,并间隔地分析释放的游离药物。得到的数据描述于表 3 中。

[0136] 表 3: 游离药物随时间从 pH 6.5 和 7.5 缀合的样品中的释放

[0137]

时间(月)	pH 6.5 缀合	pH 7.5 缀合
0	1.0	0.8
1.5	1.8	1.0
2.5	3.2	1.9
7	4.0	2.8

[0138] 如表 3 中描述的数据所示,相对于在 pH 6.5 缀合的样品(a),游离药物从在 pH 7.5 缀合的样品(b)中的释放实质上更慢。相应地,与在 pH 6.5 制备的药物缀合物产物相比,在 pH 7.5 制备的药物缀合物产物就游离药物随时间的释放而论显示出更稳定。在 pH 7.5 的缀合也比在 pH 6.5 缀合显示出更好的药物掺合,因而需要应用的药物更少。

[0139] 实施例 4

[0140] 本实施例证明在 pH 6.0 以下修饰的抗体与药物缀合的有益效果。

[0141] 在 20℃,在含有 50mM NaCl、2mM EDTA 和 5% 乙醇的 50mM 磷酸钾缓冲液(pH 7.5)中,将 huN901 单克隆抗体(终浓度 8mg/ml)与 4-(2-吡啶基二硫基)戊酸 N-琥珀酰亚氨基酯(SPP, 5.6 倍摩尔过量)一起孵育大约 180 分钟。在第一组中,应用 Sephadex™G25F 树脂柱,用含有 50mM NaCl 和 2mM EDTA 的 50mM 柠檬酸钠缓冲液(pH 5.0)使柱平衡并洗脱,将反应混合物纯化。在第二组中,应用 Sephadex™G25F 树脂柱,用含有 50mM NaCl 和 2mM EDTA 的 50mM 磷酸钾缓冲液(pH 6.5)使柱平衡并洗脱,将反应混合物纯化。室温,在终浓度为 3% 的二甲基乙酰胺(DMA)中将两种样品与 DM4(相对于结合的连接体 1.7 倍摩尔过量)缀合 3、19、25、48 和 120 小时。

[0142] 因此,第一组样品在含有 50mM NaCl 和 2mM EDTA 的 50mM 柠檬酸钠缓冲液(pH 5.0)中缀合,第二组样品含有 50mM NaCl 和 2mM EDTA 的 50mM 磷酸钠缓冲液(pH 6.5)中缀合。然后将这些样品经 Sephadex™G25F 树脂柱纯化,所述柱用含有 50mM NaCl 的 50mM 磷酸钾缓冲液(pH 6.5)平衡并洗脱。

[0143] 在两组中,通过用二硫苏糖醇处理以释放吡啶-2-硫酮(它在 343nm 处消光系数为 8,080M⁻¹cm⁻¹),测定了连接体/抗体的比值。用分光光度测量法(波长 280nm 和 252nm)测定缀合步骤的药物/抗体的比值。

[0144] 第一组具有 4.3 的连接体/抗体的比值。第二组具有 4.2 连接体/抗体的比值。

[0145] 两组随时间的药物/抗体的比值描述于表 4 中。

[0146] 表 4:DM1 掺入 SPP 修饰的 huN901 中的速度,为缀合 pH 的函数

反应时间 (小时)	药物/抗体的比值(mol/mol)	
	pH 5.0 缀合	pH 6.5 缀合
3	2.43	2.97
19	3.38	3.28
25	3.41	NT
48	3.46	3.17
120	3.44	2.85

[0147] 从表 4 中所述的数据明显的是,与在 pH 6.5 缀合时制成的缀合物相比,通过使修饰的抗体与药物在 pH 5.0 缀合而制成的缀合物在缀合反应过程中达到更高和更稳定水平的结合药物。除增加稳定性之外,结果表明与应用相同量的药物在 pH 6.5 缀合相比,在 pH 5.0 缀合时达到了更高的药物 / 抗体水平,因而表明在 pH 5.0 时更有效率的药物应用。

[0148] 两组中,测定了随时间的缀合物单体量。得到的数据描述于表 5 中。

[0149] 表 5: 在 SPP 修饰的 huN901 与 DM1 缀合期间,缀合 pH 对缀合物单体水平的影响

[0150]

反应时间 (小时)	缀合物单体(%)	
	pH 5.0 缀合	pH 6.5 缀合
3	98.5	98.0
19	98.8	98.2
25	99.1	NT
48	99.2	98.3
120	99.2	97.8

[0151] 从表 5 中所述的数据明显的是,与在 pH 6.5 缀合时制成的缀合物相比,通过使修饰的抗体与药物在 pH 5.0 缀合而制成的缀合物具有更高水平的缀合物单体。

[0152] 实施例 5

[0153] 本实施例进一步证明在 pH 小于 6 时药物与修饰的抗体缀合的益处。

[0154] 在室温,在 50mM 磷酸钾缓冲液 (pH 6.5)、50mM NaCl、2mMEDTA 和 5% 乙醇中,将 BIWA 4 抗体用 SPP (SPP 的摩尔过量如表 6 所示) 修饰 120-140 分钟。等分样的修饰抗体经单独 NAP 25 柱纯化,所述柱用有多种 pH 值 (pH 4.6-6.5) 的缓冲液平衡。pH 4.6-5.9 缓冲液由 35mM 柠檬酸钠、150mM 氯化钠和 2mM EDTA 组成。pH 6.5 缓冲液为含有 2mM EDTA 的 PBS。

[0155] 在二甲基乙酰胺 (DMA, 终浓度 3%) 中,将修饰的抗体在各种 pH 下与 DM1 (相对于连接体 1.7 倍摩尔过量) 缀合。在室温孵育 17-18 小时后,缀合的抗体样品通过用 PBS (pH 6.5) 平衡的 NAP 25 柱进行色谱法纯化。通过用二硫苏糖醇处理以释放吡啶-2-硫酮 (它在 343nm 处消光系数为 $8,080 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$),测定了连接体 / 抗体的比值 (表 6 中的 L/A)。用分光光度测量法 (波长 280nm 和 252nm) 测定缀合步骤的药物 / 抗体的比值。通过 SEC-HPLC

测定了缀合物单体、高分子量种类和低分子量种类,其应用在含有 0.2M 氯化钾和 20% 异丙醇的 0.2M 磷酸钾缓冲液 (pH 7.0) 中平衡和发展的 TSKG3000SWXL 柱。

[0157] 该分析结果数据描述于表 6 中。

[0158] 表 6: 药物缀合物产物相对于 pH 的特性

[0159]

缓冲液	SPP 的摩尔 过量	L/A	D/A	单体(%)	高分子 量(%)	低分子 量(%)	缀合步骤的产 率(%)
pH 4.6	4.7	3.8	3.6	97.5	2.2	0.4	74
pH 5.1	4.4	4.7	3.6	97.6	1.9	0.6	75
pH 5.6	5.0	4.9	3.6	97.7	1.5	0.8	85
pH 5.9	5.5	5.3	3.7	96.4	2.3	1.4	76
pH 6.5	6.6	6.4	3.7	95.1	2.8	1.9	71

[0160] 表 6 中描述的数据证明与在 pH 6.5 的缀合相比,在 pH 6.0 以下时 SPP 修饰的 BIWA 4 与 DM1 的缀合是高效率的。在更低 pH 时,降低了达到特定最终药物 / 抗体比值要求的连接体和药物的量,特别是 SPP 连接体与 DM1 的量。此外,在更低 pH 时,缀合物单体、高分子量种类和低分子量种类的水平是更优化的,且产率得到提高。

[0161] 实施例 6

[0162] 本实施例证明纯化修饰的抗体的步骤可任选地被除去。药物可以与双功能修饰试剂同时加入或在稍后的时间加入。

[0163] 在修饰试剂后添加药物的实例中,在 20℃,将 20mg/mL 浓度的人源化单克隆抗体 CNT095 用双功能修饰试剂 SPDB (SPDB 相对于抗体 4.6 倍摩尔过量) 修饰 120 分钟。修饰缓冲液为含有 5.3% 蔗糖和 5% 乙醇的 44mM 磷酸盐缓冲液 (pH 7.5)。一等分样的修饰抗体经 Sephadex™ G25F 树脂纯化 (标准 4 步骤法),在含有 12.5mM NaCl 的 12.5mM 磷酸钾缓冲液 (pH 7.5) 平衡并洗脱,随后在室温使最终浓度为 10mg/mL 修饰抗体与 DM4 (药物相对于结合的连接体 1.7 倍摩尔过量) 在含有 12.5mM NaCl 和 10%DMA 的 12.5mM 磷酸钾缓冲液 (pH 7.5) 中缀合 20 小时。第二等分样的修饰抗体在 120 分钟修饰反应结束时,没有进行进一步的纯化立即缀合 (3 步骤法)。

[0164] 调节修饰反应混合物的蛋白质和缓冲液浓度,以产生 10mg/mL 浓度的修饰蛋白质和含有 5.9mM NaCl 和 2.7% 蔗糖的 28mM 磷酸钾缓冲组合物 (pH 7.5)。然后加入 DM4 (相对于开始 SPDB 1.7 倍摩尔过量),调节 DMA 至终浓度为 10%。在室温孵育 20 小时后,将两种等分样的缀合抗体经 Sephadex™ G25F 树脂纯化,所述树脂在 pH 5.5 的 10mM 组氨酸和 10% 蔗糖中平衡。

[0165] 通过用二硫苏糖醇处理以释放吡啶 -2- 硫酮 (它在 343nm 处消光系数为 8,080M⁻¹cm⁻¹),测定了连接体 / 抗体 (L/A) 的比值。用分光光度测量法 (波长 280nm 和 252nm) 测定缀合步骤的药物 / 抗体 (D/A) 的比值和产率。通过 SEC-HPLC 分析测定了单体的百分数。通过 HPLC 在 Hisep 柱上分析测定了游离药物的百分数。这些分析的结果描述于表 7 中。

[0166] 表 7: 任选除去修饰抗体的纯化步骤

[0167]

参数	4 步骤法	3 步骤法
开始 SPDB	4.6x	4.6x
L/A	4.1	没有测定
D/A	3.9	4.0
产率	79%	91%
%单体	95.8%	96.1%
%游离药物	2.4%	1.1%

[0168] 如表 7 中描述的结果所证明的,在本发明上下文中可除去纯化修饰的抗体的步骤。

[0169] 实施例 7

[0170] 本实施例证明纯化抗体的改良方法,所述抗体用异双功能修饰试剂修饰然后与美登木素生物碱缀合。

[0171] 将如实施例 1 所述的用 SPP (7 倍摩尔过量) 修饰并在 Sephadex™G25F 树脂上纯化的 huN901 抗体与美登木素生物碱 DM1 (相对于连接体 1.7 倍摩尔过量,溶于二甲基乙酰胺 (DMA), 终浓度 3%) 缀合。

[0172] 第一样品缀合物通过标准色谱法在 Sephadex™ G25F 树脂上在磷酸盐缓冲盐水 (PBS, pH 6.5) 中纯化。

[0173] 第二缀合物样品如实施例 1 所述通过 Pellicon XL TFF 系统 (Millipore, Billerica, MA) 纯化。

[0174] 第三缀合物样品应用 MEP Hypercell 树脂柱纯化,所述柱在 50mM Tris (pH 8.0) 中平衡,并用 50mM 醋酸钠 (pH 4.0) 洗脱。

[0175] 第四缀合物样品应用 UNOsphere S 树脂柱纯化,所述柱在 50mM 磷酸钠 (pH 6.5) 中平衡,并用 0.2M NaCl 和 50mM 磷酸钠 (pH 6.5) 洗脱。

[0176] 第五缀合物样品应用 CHT 树脂柱 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) 纯化,所述柱在 50mM 磷酸钠 (pH 6.5) 中平衡,并用 0.3M NaCl 和 50mM 磷酸钠 (pH 6.5) 洗脱。

[0177] 第六缀合物样品应用 SP Sepharose 树脂柱纯化,所述柱在 35mM 柠檬酸钠、10mM 氯化钠 (pH 5.0) 中平衡,并用 0.25M NaCl、35mM 柠檬酸钠 (pH 5.0) 洗脱。

[0178] 应用在 pH 7.0 的包含 0.2M 氯化钾和 20% 异丙醇的 0.2M 磷酸钾缓冲液中平衡和发展的 TSKG3000SW_{XL} 树脂柱,通过 SEC-HPLC 测定缀合物单体。通过将缀合抗体的产率除以缀合的修饰抗体的量 (在波长 280nm 处用分光光度测量法测定),测定了缀合步骤的产率。

[0179] 这些分析的结果描述于表 8 中。

[0180] 表 8: 缀合纯化步骤的比较

[0181]

缀合物样品	缀合纯化步骤	缀合物单体%	步骤的产率%
1 (对照)	G25F 树脂	93.2	86
2 (发明)	TFF	92.8	85
3 (发明)	MEP Hypercell 树脂	94.5	74
4 (发明)	UNOsphere 树脂	96.3	81
5 (发明)	CHT 树脂	97.9	72
6 (发明)	SP Sepharose 树脂	95.1	81

[0182] 表 8 中的结果表明,所有本发明的纯化方法(第 2-6 组)均得到相似于对照方法(第 1 组)所获得的产率。发明的每种色谱方法产生了缀合物单体水平的提高且容易大规模地生产。

[0183] 除 CHT(陶瓷羟磷灰石)之外,在相似色谱法条件下也可应用 CFT(陶瓷氟磷灰石)。替代选择地,CHT 和 CFT 树脂二者都可用于非吸附的方式,使得期望的产物(实质上单体缀合物)不被该树脂保留,而保留高分子量种类,因而与期望的产物分离。

[0184] 虽然用于缀合的标准缓冲剂/溶剂组合物包含 3%DMA、50mM 磷酸钾、50mM NaCl 和 2mM EDTA, pH 6.5(如实施例 1 所用的),但其它组分与本文所述的一些色谱法步骤更兼容并相对于标准方法提供其它的益处。例如,缀合可在 3%DMA、12.5mM 磷酸钾、12.5mM NaCl 和 0.5mM EDTA (pH 6.5)中进行。在这些条件下,在 huB4 抗体中 DM4 掺入的量相对于连接体掺入的量比标准条件下高大约 10%。此外,这些条件更适合装载至树脂例如阳离子交换和 CHT 树脂上。

[0185] 本文引用的所有参考文献,包括出版物、专利申请和专利,均在此引入作为参考,如同各个参考文献被分别和具体地指明在此引入作为参考,且在此引入各个参考文献的全文。

[0186] 在描述本发明的上下文中(尤其在下列权利要求的上下文中)应用术语“a”和“an”和“the”和相似指代,均应被解释为涵盖单数和复数,除非本文另外指明或明显与上下文相矛盾。术语“包含”、“具有”、“包括”和“含有”,除非另外注明均应被解释为开放式术语(即意指“包括但不限于”)。本文列举的值范围除非本文另外指明,仅仅旨在用作个别表示落在这个范围的各个单独值的速记方法,各个单独的值被并入说明书中,如同本文个别地列举一样。本文所述的所有方法可以以任何合适的次序进行,除非本文另外指明或另外明显与上下文相矛盾。本文提供的任何和所有实例或示例性语言(例如,“例如”)的应用仅仅旨在更好地阐释本发明而不形成对本发明范围的限制,除非另外声明。不应将说明书中的任何语言解释为表示任何未要求保护的要素是实施本发明所必需的。

[0187] 本文描述了本发明的优选实施方案,包括发明人已知的实施本发明的最好方式。本领域普通技术人员在阅读上述说明后,那些优选的实施方案的变化可变得明显。发明人预期技术人员适当时应用这样的变化,发明人打算以本文明确描述以外的方式实施本发明。因此,本发明包括可适用法律允许的在此所附权利要求中所述的主题的所有修饰和等

同物。而且,上述要素以其所有可能变化的任何组合都包括在本发明中,除非本文另外指明或另外明显与上下文相矛盾。