



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105592861 A

(43) 申请公布日 2016. 05. 18

(21) 申请号 201480054398. 5

(22) 申请日 2014. 07. 30

(30) 优先权数据

13306119. 2 2013. 08. 02 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2016. 03. 31

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2014/066345 2014. 07. 30

(87) PCT国际申请的公布数据

W02015/014879 EN 2015. 02. 05

(71) 申请人 赛诺菲

地址 法国巴黎

(72) 发明人 S·阿萨杜里安 D·米格纳德

(74) 专利代理机构 北京市嘉元知识产权代理事
务所(特殊普通合伙) 11484

代理人 刘彬

(51) Int. Cl.

A61K 47/48(2006. 01)

A61P 35/00(2006. 01)

权利要求书3页 说明书49页

序列表6页 附图3页

(54) 发明名称

抗 Muc1 类美登素免疫偶联抗体用于治疗实
体瘤的用途

(57) 摘要

本发明涉及一种用于治疗癌症用途的偶联物,其包含:(i) 与人粘蛋白-1(MUC1) 糖蛋白结合的细胞结合剂,其与(ii) 至少一种细胞毒性剂连接,其中所述偶联物以至少 120mg/m²的剂量施用。

1. 一种用于治疗癌症用途的偶联物,其包含:(i)与人粘蛋白-1(MUC1)糖蛋白结合的细胞结合剂,其与(ii)至少一种细胞毒性剂连接,其中所述偶联物以至少120mg/m²的剂量施用。

2. 根据权利要求1用于其用途的偶联物,其中所述细胞结合剂结合MUC1糖蛋白的细胞外结构域。

3. 根据权利要求1或2用于其用途的偶联物,其中所述细胞结合剂识别和结合MUC1糖蛋白上的CA6糖表位。

4. 根据权利要求1-3任一项的用于其用途的偶联物,其中所述细胞结合剂是抗体或其表位结合片段。

5. 根据权利要求4用于其用途的偶联物,其中所述抗体或其表位结合片段包含一个或多个具有选自下组的氨基酸序列的互补决定区(CDR):SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6。

6. 根据权利要求5用于其用途的偶联物,其中所述抗体或其表位结合片段包含序列SEQ ID NO:1的CDR1-H、序列SEQ ID NO:2的CDR2-H、序列SEQ ID NO:3的CDR3-H、序列SEQ ID NO:4的CDR1-L、序列SEQ ID NO:5的CDR2-L和序列SEQ ID NO:6的CDR3-L。

7. 根据权利要求5或6的用于其用途的偶联物,其中所述抗体或其表位结合片段包含序列SEQ ID NO:7的重链可变区或与其至少85%相同的序列。

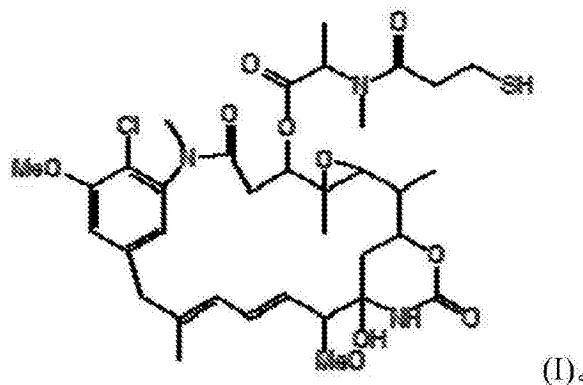
8. 根据权利要求5-7任一项用于其用途的偶联物,其中所述抗体或其表位结合片段包含序列SEQ ID NO:8的轻链可变区或与其至少85%相同的序列。

9. 根据权利要求4-8任一项用于其用途的偶联物,其中所述表位结合片段选自下组:Fv、Fab、F(ab')₂、Fab'、dsFv、(dsFv)₂、scFv、sc(Fv)₂、双抗体和VHH。

10. 根据权利要求1-8任一项用于其用途的偶联物,其中所述细胞结合剂是包含序列SEQ ID NO:9的重链和序列SEQ ID NO:10的轻链或与其至少85%相同的序列的单克隆抗体。

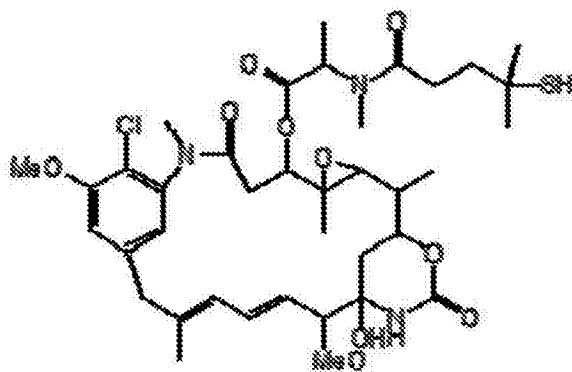
11. 根据权利要求1-10任一项用于其用途的偶联物,其中所述至少一种细胞毒性剂选自下组:类美登素、小分子药物(small drug)、茅屋霉素衍生物、细霉素衍生物、前药、紫杉烷、CC-1065和CC-1065类似物。

12. 根据权利要求11用于其用途的偶联物,其中所述至少一种细胞毒性剂是式(I)的美登素DM1



13. 根据权利要求11用于其用途的偶联物,其中所述至少一种细胞毒性剂是式(II)的

美登素DM4



(II)。

14. 根据权利要求1-13任一项用于其用途的偶联物,其中所述细胞结合剂经由可裂解或不可裂解接头与所述至少一种细胞毒性剂连接。

15. 根据权利要求14用于其用途的偶联物,其中所述接头选自下组:N-琥珀酰亚胺基吡啶基二硫代丁酸酯(SPDB)、4-(吡啶-2-基二硫基)-2-磺基-丁酸(磺基SPDB)和琥珀酰亚胺基(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯(SMCC)。

16. 根据权利要求14用于其用途的偶联物,其中所述接头是N-琥珀酰亚胺基吡啶基二硫代丁酸酯(SPDB)且所述细胞毒性剂是DM4。

17. 根据权利要求14用于其用途的偶联物,其中所述接头是4-(吡啶-2-基二硫基)-2-磺基-丁酸(磺基SPDB)且所述细胞毒性剂是DM4。

18. 根据权利要求1-17任一项用于其用途的偶联物,其中所述偶联物的特征在于药物比抗体比(DAR)为3-4,所述DAR从细胞毒性剂浓度(c_D)比细胞结合剂浓度(c_A)的比率计算:

$$DAR = c_D / c_A$$

其中

$$c_D = [(\epsilon_{A280} \times A_{252}) - (\epsilon_{A252} \times A_{280})] / [(\epsilon_{D252} \times \epsilon_{A280}) - (\epsilon_{A252} \times \epsilon_{D280})]$$

$$c_A = [A_{200} - (c_D \times c_{D200})] / c_{A200}$$

且

ϵ_{D252} 和 ϵ_{D280} 分别是所述细胞毒性剂在252nm和280nm的摩尔消光系数,

ϵ_{A252} 和 ϵ_{A280} 分别是所述细胞结合剂在252nm和280nm的摩尔消光系数,且

A_{252} 和 A_{280} 分别是使用经典分光光度计设备测量的所述偶联物在252nm(A_{252})和280nm(A_{280})的吸光度。

19. 根据权利要求1-18任一项用于其用途的偶联物,其中所述偶联物以150mg/m²-240mg/m²的剂量施用。

20. 根据权利要求1-19任一项用于其用途的偶联物,其中所述偶联物以190mg/m²的剂量施用。

21. 根据权利要求1-20任一项用于其用途的偶联物,其中所述偶联物的施用每3周作为新的周期重复。

22. 根据权利要求21用于其用途的偶联物,其中所述周期的中位数是2。

23. 根据权利要求1-22任一项用于其用途的偶联物,其中所述偶联物静脉内施用。

24. 根据权利要求23用于其用途的偶联物,其中所述偶联物以1mL/min的速率施用30分

钟且随后在不存在超敏反应的情况下增加至2mL/min的最大速率。

25. 根据权利要求1-24任一项用于其用途的偶联物,其中所述癌症是实体瘤。

26. 根据权利要求1-25任一项用于其用途的偶联物,其中所述癌症是CA60阳性肿瘤。

27. 根据权利要求25或26用于其用途的偶联物,其中所述癌症选自下组:乳腺癌和卵巢癌。

28. 根据权利要求27用于其用途的偶联物,其中所述癌症是乳腺癌。

29. 根据权利要求28用于其用途的偶联物,其中所述乳腺癌是三阴性乳腺癌,对雌激素、孕酮或HER2的受体都非阳性。

30. 根据权利要求1-29任一项用于其用途的偶联物,其中所述治疗的患者之前已用基于奥沙利铂(oxaliplatin)、顺铂、卡铂(carboplatin)和/或紫杉醇(paclitaxel)、多西紫杉醇(docetaxel)的方案治疗。

31. 根据权利要求1-30任一项用于其用途的偶联物,其与角膜炎预防剂或治疗眼部的组合物组合。

32. 一种用于治疗癌症用途的偶联物,其包含:(i)与人粘蛋白-1(MUC1)糖蛋白结合的细胞结合剂,其与(ii)至少一种细胞毒性剂连接,所述癌症选自下组:乳腺癌和卵巢癌。

33. 一种用于在患者中治疗癌症的方法,其包括以至少120mg/m²的剂量将偶联物施用至有需要的患者,所述偶联物包含:(i)与人粘蛋白-1(MUC1)糖蛋白结合的细胞结合剂,其与(ii)至少一种细胞毒性剂连接。

34. 一种制品,其包含:

a)包装材料;

b)偶联物,其包含(i)与人粘蛋白-1(MUC1)糖蛋白结合的细胞结合剂,其与(ii)至少一种细胞毒性剂连接;和

c)在所述包装材料中包含的标签或包装插页,表明所述偶联物以至少120mg/m²的剂量施用。

35. 一种制品,其包含:

a)包装材料;

b)偶联物,其包含(i)与人粘蛋白-1(MUC1)糖蛋白结合的细胞结合剂,其与(ii)至少一种细胞毒性剂连接;和

c)在所述包装材料中包含的标签或包装插页,表明施用所述偶联物用于治疗选自下组的癌症:乳腺癌和卵巢癌。

抗Muc1类美登素免疫偶联抗体用于治疗实体瘤的用途

发明领域

[0001] 本发明涉及一种用于治疗癌症用途的偶联物,其包含:(i)与人粘蛋白-1(MUC1)糖蛋白结合的细胞结合剂,其与(ii)至少一种细胞毒性连接,其中所述偶联物以至少120mg/m²的剂量施用。

[0002] 发明背景

[0003] 已有多项开发特异性摧毁靶癌细胞而不损害周边、非癌细胞和组织的抗癌治疗剂的尝试。这种治疗剂具有在人患者中大幅改进癌症治疗的潜力。

[0004] 一种有前景的方式是将细胞结合剂如单克隆抗体与细胞毒性药物连接。取决于细胞结合剂的选择,基于在这些细胞表面上表达的分子表达概貌可设计这些细胞毒性偶联物以仅识别和结合特定的癌细胞类型。

[0005] 国际专利申请W0 02/16401描述了鼠类单克隆抗体DS6,其与由人浆液性卵巢癌表达的抗原CA6反应。该鼠类单克隆抗体DS6可因此靶向癌细胞。

[0006] CA6抗原更具体地在U.S. 专利号7,834,155中作为由癌细胞表达的MUC1粘蛋白受体上的唾液酸糖表位得到表征。该专利还提供了抗体,特别是人源化的抗体如人源化的hDS6抗体,其能够识别MUC1粘蛋白受体的这种CA6唾液酸糖表位。

[0007] 细胞毒性药物如甲氨蝶呤、柔红霉素、阿霉素、长春新碱、长春碱、美法仑、丝裂霉素C和苯丁酸氮芥已与多种鼠类单克隆抗体连接用于细胞毒性偶联物。在一些情况中,药物分子与抗体分子通过媒介载剂分子如血清白蛋白连接。

[0008] 特异性识别特定类型的癌细胞的细胞毒性偶联物的开发在持续改进用于治疗具有癌症的患者方法中至关重要。

[0009] 为此,本发明涉及特异性靶向表达在癌细胞表面的分子/受体的包含细胞结合剂如抗体和细胞毒性剂的偶联物的开发。

[0010] 更具体地,本发明还涉及偶联物,其包含抗体,优选是人源化的抗体,其识别由癌细胞表达的Muc1粘蛋白受体CA6唾液酸糖表位且可在细胞毒性剂的背景中用于抑制表达CA6糖表位的细胞生长。这样的偶联物之一是SAR566658。

[0011] SAR566658是由针对肿瘤相关的唾液酸糖表位CA6(huDS6)的人源化单克隆抗体与细胞毒性类美登素DM4偶联组成的免疫偶联物。

[0012] 更具体地,本发明提供识别Muc1粘蛋白受体CA6唾液酸糖表位的细胞毒性偶联物,对于所述偶联物,有必要确定施用的合适剂量和方案进而获得良好耐受的抗癌治疗,其能够治疗承受癌症的患者特别是承受CA6阳性癌症尤其是乳腺癌或卵巢癌的患者。

[0013] 发明概述

[0014] 本发明因此涉及一种用于治疗癌症用途的偶联物,其包含:(i)与人粘蛋白-1(MUC1)糖蛋白结合的细胞结合剂,其与(ii)至少一种细胞毒性剂连接,其中所述偶联物以至少120mg/m²的剂量施用。

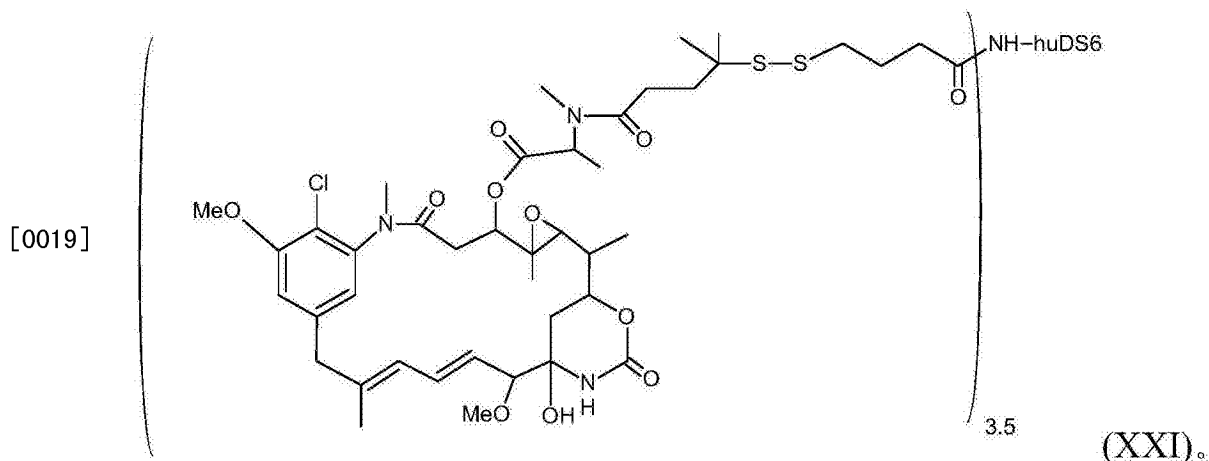
[0015] 本发明还涉及一种用于治疗癌症用途的偶联物,其包含:(i)与人粘蛋白-1(MUC1)糖蛋白结合的细胞结合剂,其与(ii)至少一种细胞毒性剂连接,所述癌症选自下组:乳腺癌

和卵巢癌。

[0016] 在本发明的一些实施方案中,所述细胞结合剂是人源化抗CA6抗体且所述细胞毒性剂是类美登素。

[0017] 在进一步的实施方案中,所述细胞结合剂是包含序列SEQ ID NO:9的重链和序列SEQ ID NO:10的轻链的人源化抗CA6抗体huDS6,且所述细胞毒性剂是美登素化合物如DM1或DM4。

[0018] 在具体的实施方案中,用于本发明上下文的偶联物是下列式(XXI)的化合物SAR566658



[0020] 本发明还涉及一种制品,其包含:

[0021] a)包装材料;

[0022] b)偶联物,其包含(i)与人粘蛋白-1(MUC1)糖蛋白结合的细胞结合剂,其与(ii)至少一种细胞毒性剂连接;更具体地式(XXI)的化合物SAR566658,和

[0023] c)在所述包装材料中包含的标签或包装插页,表明所述偶联物以至少120mg/m²的剂量施用。

[0024] 本发明还涉及一种制品,其包含:

[0025] a)包装材料;

[0026] b)偶联物,其包含(i)与人粘蛋白-1(MUC1)糖蛋白结合的细胞结合剂,其与(ii)至少一种细胞毒性剂连接;更具体地式(XXI)的化合物SAR566658,和

[0027] c)在所述包装材料中包含的标签或包装插页,表明施用所述偶联物用于治疗选自下组的癌症:乳腺癌和卵巢癌。

[0028] 发明详述

[0029] 定义

[0030] 在本发明的上下文中,术语“MUC1糖蛋白”指人中的MUC1基因编码的粘蛋白。MUC1是在其胞外结构域具有大量O-连接糖基化的糖蛋白。MUC1具有120-225kDa的核心蛋白质质量,其随糖基化增加至250-500kDa。其超过细胞表面延伸200-500nm。该蛋白通过跨膜结构域锚定至许多上皮细胞的顶部表面。超过跨膜结构域的是包含用于释放大胞外结构域的裂解位点的SEA结构域。胞外结构域包含20个氨基酸可变数目串联重复(VNTR)结构域,在不同个体中具有20-120不等的重复数目。这些重复中富含允许重度O-糖基化的丝氨酸、苏氨酸和脯氨酸残基。

[0031] 在本发明的上下文中,术语“CA6糖表位”或“CA6唾液酸糖表位”指存在于MUC1糖蛋白胞外结构域上的肿瘤相关抗原,其因为携带唾液酸依赖的糖表位由Kearse et al. (2000)Int.J.Cancer.88:866-872鉴定。

[0032] 如本文使用,“与参照序列至少85%相同”的序列是在其全长上与参照序列的全长具有85%或更多,具体地90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%或100%的序列同一性的序列。

[0033] “序列同一性”的百分比可通过比较在比较窗口中以最优方式对齐的两个序列确定,其中与参照序列(其不包含添加或缺失)相比,比较窗口中的多肽序列部分可包含添加或缺失(即,缺口),以供两序列的最优比对。该百分比通过以下方式来计算:测定两序列中相同氨基酸残基出现的位置数以获得匹配位置数,用匹配位置数除以比较窗口中的位置总数,并用结果乘以100以获得序列同一性百分比。用于比较的序列的最优比对通过全局成对比对使用例如Needleman和Wunsch J.Mol.Biol.48:443(1970)的算法实施。序列同一性百分比可举例来说使用具有BLOSUM62矩阵的Needle程序和下列参数轻易测定:缺口开放=10、缺口延伸=0.5。

[0034] 在本发明的上下文中,“保守氨基酸取代”是其中氨基酸残基由具有化学性质(例如电荷或疏水性)相似的侧链基团的另一氨基酸残基取代的一种取代。通常,保守氨基酸取代不会实质上改变蛋白质的功能性质。具有化学性质相似的侧链的氨基酸的组的实例包括1)脂肪族侧链:甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸;2)脂肪族-羟基侧链:丝氨酸和苏氨酸;3)含有酰胺的侧链:天冬酰胺和谷氨酰胺;4)芳香族侧链:苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸;5)碱性侧链:赖氨酸、精氨酸和组氨酸;6)酸性侧链:天冬氨酸和谷氨酸;和7)含硫侧链:半胱氨酸和甲硫氨酸。保守氨基酸取代组为:缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸,苯丙氨酸-酪氨酸-色氨酸,赖氨酸-精氨酸,丙氨酸-缬氨酸,谷氨酸-天冬氨酸,和天冬酰胺-谷氨酰胺。

[0035] 如本文所使用,术语“受试者”指哺乳动物,如啮齿类动物、猫、犬和灵长类动物。特别地,根据本发明的受试者为人。

[0036] 如本文使用,“偶联物”、“免疫偶联物”、“抗体-药物偶联物”或“ADC”具有相同的含义且可互换。

[0037] 贯穿本申请,术语“包含”应理解为涵盖所有具体提及的特征以及任选的、其他的、未指定的特征。如本文所用,使用术语“包含”还公开其中不存在除具体提及特征以外的任何特征的实施方案(即“由.....组成”)。

[0038] 细胞结合剂

[0039] 本文使用的术语“细胞结合剂”指特异性识别和结合细胞表面上的人粘蛋白-1(MUC1)糖蛋白的作用剂。在具体的实施方案中,细胞结合剂结合,更具体地特异性结合如上文“定义”部分所限定的MUC1糖蛋白的胞外结构域。在另一实施方案中,细胞结合剂识别和结合如上文“定义”部分所限定的MUC1糖蛋白上的CA6糖表位。

[0040] 在一个实施方案中,细胞结合剂特异性识别人MUC1糖蛋白,特别是MUC1糖蛋白的胞外结构域,更具体地MUC1糖蛋白上的CA6糖表位,由此其允许偶联物以靶向的方式作用,伴随极少的非特异性结合导致的副作用。

[0041] 在另一实施方案中,本发明的细胞结合剂还特异性识别人MUC1糖蛋白,特别是MUC1糖蛋白的胞外结构域,更具体地MUC1糖蛋白上的CA6糖表位,由此偶联物将与靶细胞接

触足够的时间以允许偶联物的细胞毒性剂部分在细胞上作用且/或以允许偶联物有足够的时间由细胞内化。

[0042] 本发明的偶联物作为治疗剂的有效性取决于与人粘蛋白-1(MUC1)糖蛋白,特别是MUC1糖蛋白的胞外结构域,更具体地MUC1糖蛋白上的CA6糖表位结合的适当细胞结合剂的仔细选择。细胞结合剂可以是任何目前已知的种类,或成为已知,且包括肽和非肽,只要其与人MUC1糖蛋白,特别是MUC1糖蛋白的胞外结构域,更具体地MUC1糖蛋白上的CA6糖表位结合。一般而言,这些可以是抗体(特别是单克隆抗体)、淋巴因子、激素、生长因子、维生素、营养物质转运分子(例如转铁蛋白),或任何其他细胞结合分子物质。

[0043] 可使用的更具体的细胞结合剂的实例包括:

[0044] -多克隆抗体;

[0045] -单克隆抗体;

[0046] -抗体的表位结合片段如Fab、Fab'、F(ab')₂或Fv。

[0047] 合适的细胞结合剂的选择是一个依赖于靶向的具体细胞群体的选择问题,但一般而言,如果可获得或能够制备合适的,则优选抗体或其表位结合片段,更优选为单克隆抗体。

[0048] “抗体”可以是其中两条重链通过二硫键彼此连接且每一重链通过二硫键与轻链连接的天然或常规抗体。存在两种类型的轻链, λ (l)和 κ (k)。存在五类(或同型)决定抗体分子功能活性的主要重链:IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。每种链含有不同序列结构域。轻链包含两个结构域或区:可变结构域(VL)和恒定结构域(CL)。重链包含四个结构域:一个可变结构域(VH)和三个恒定结构域(CH1、CH2和CH3,统称为CH)。轻链(VL)和重链(VH)二者的可变区决定对抗原的结合识别和特异性。轻链(CL)和重链(CH)的恒定区结构域赋予重要生物特性,如抗体链联合、分泌、经胎盘活动性、补体结合和与Fc受体(FcR)的结合。Fv片段是免疫球蛋白Fab片段的N端部分,且由一条轻链和一条重链的可变部分组成。抗体的特异性在于抗体结合位点与抗原决定区间的结构互补性。抗体结合位点是由主要来自超变或互补决定区(CDR)的残基构成。有时候,来自非超变或框架区(FR)的残基影响总体结构域结构,且因此影响结合位点。

[0049] “互补决定区”或“CDR”指共同定义天然免疫球蛋白结合位点的天然Fv区结合亲和性和特异性的氨基酸序列。免疫球蛋白的轻链和重链各具有三个CDR,分别称为CDR1-L、CDR2-L、CDR3-L和CDR1-H、CDR2-H、CDR3-H。因此,常规抗体抗原结合位点包含六个CDR,包括来自重链和轻链各个V区的CDR集合。

[0050] “框架区”(FR)指插入CDR间的氨基酸序列,即指单一物种的不同免疫球蛋白中相对保守的免疫球蛋白轻链和重链可变区中的那些部分。免疫球蛋白的轻链和重链各具有四个FR,分别称为FR1-L、FR2-L、FR3-L、FR4-L和FR1-H、FR2-H、FR3-H、FR4-H。

[0051] 如本文所使用的“人框架区”是与天然存在的人抗体框架区实质上(约85%,或更多,例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)相同的框架区。

[0052] 在本发明背景下,免疫球蛋白轻链或重链中的CDR/FR定义基于IMGT的定义(Lefranc et al.(2003)Dev Comp Immunol.27(1):55-77;www.imgt.org)确定。

[0053] 如本文所使用的术语“抗体”指代常规抗体及其片段,以及单一结构域抗体及其片段,特别是单一结构域抗体的可变重链,和嵌合、人源化、双特异性或多特异性抗体。

[0054] 如本文所使用,抗体或免疫球蛋白还包括“单一结构域抗体”,最近已对其进行了描述且其为其互补决定区为单一结构域多肽的一部分的抗体。单一结构域抗体的实例包括重链抗体、天然不含轻链的抗体、源自常规四链抗体的单一结构域抗体、工程化的单一结构域抗体。单一结构域抗体可源自任何物种,包括但不限于小鼠、人、骆驼、美洲驼、山羊、兔和牛。单一结构域抗体可为天然存在的单一结构域抗体,其被认为是不含轻链的重链抗体。具体而言,骆驼科(Camelidae)物种举例来说骆驼、单峰骆驼(dromedary)、美洲驼(llama)、羊驼(alpaca)和原驼(guanaco)产生天然不含轻链的重链抗体。骆驼科重链抗体还缺少CH1结构域。

[0055] 本领域已将这些不含轻链的单一结构域抗体的可变重链称为“VHH”或“纳米抗体”。与常规VH结构域相似,VHH含有四个FR和三个CDR。纳米抗体具有优于常规抗体的优势:其比IgG分子小约10倍,且因此适当折叠的功能性纳米抗体可通过体外表达来产生,同时获得高产率。此外,纳米抗体非常稳定,且抗蛋白酶的作用。纳米抗体的性质和产生已由Harmsen和De Haard HJ(Appl.Microbiol.Biotechnol.2007年11月;77(1):13-22)加以综述。

[0056] 如本文使用的术语“单克隆抗体”或“mAb”指单一氨基酸组成的抗体分子,其针对特定抗原且不应理解为该抗体需要通过任何具体方法产生。单克隆抗体可通过B细胞或杂交瘤的单克隆产生,但也可以是重组的,即通过蛋白工程化产生。

[0057] 术语“嵌合抗体”指工程化抗体,以其最广的含义包含来自一种抗体的一个或多个区和来自一个或多个其他抗体的一个或多个区。具体地嵌合抗体包含源自非人动物的抗体的VH结构域和VL结构域,其与另一抗体(尤其是人抗体)的CH结构域和CL结构域联合。作为非人动物,可使用任何动物如小鼠、大鼠、仓鼠、兔等等。嵌合抗体还可指代对至少两种不同抗原具有特异性的多特异性抗体。在实施方案中,嵌合抗体具有小鼠来源的可变结构域和人来源的恒定结构域。

[0058] 术语“人源化抗体”指最初完全或部分为非人来源的抗体,且已对其修饰以替代某些氨基酸(特别地,重链和轻链的框架区中的氨基酸)以避免或最小化人的免疫反应。人源化抗体的恒定结构域大多为人CH和CL结构域。在实施方案中,人源化抗体具有人来源的恒定结构域。

[0059] (常规)抗体的“片段”包含完整抗体的一部分,尤其完整抗体的抗原结合区或可变区。抗体片段的实例包括Fv、Fab、F(ab')₂、Fab'、dsFv、(dsFv)₂、scFv、sc(Fv)₂、由抗体片段形成的双抗体、双特异性和多特异性抗体。常规抗体的片段还可以是单一结构域抗体,例如重链抗体或VHH。

[0060] 术语“Fab”指代具有约50,000Da分子量和抗原结合活性的抗体片段,其中在通过用蛋白酶木瓜蛋白酶处理IgG获得的片段中,重链N末端约侧大约一半和整个轻链通过二硫键键结在一起。

[0061] 术语“F(ab')₂”指具有约100,000Da分子量和抗原结合活性的抗体片段,其在通过用蛋白酶胃蛋白酶处理IgG获得的片段中,其比经由铰链区的二硫键键合的Fab稍大。

[0062] 术语“Fab”指具有约50,000Da分子量和抗原结合活性的抗体片段,其通过剪切F(ab')₂片段铰链区的二硫键获得。

[0063] 单链Fv(“scFv”)多肽是共价连接的VH::VL异源二聚体,其通常由包含通过肽编码

接头连接的VH和VL编码基因的基因融合物表达。本发明的人scFv片段包含保持处于适当构象的CDR,特别是通过使用基因重组技术。二价和多价抗体片段可通过单价scFv的联合自发形成或可由肽接头通过偶联单价scFv生成,如二价sc(Fv)₂。

[0064] “dsFv”是通过二硫键稳定的VH:VL异源二聚体。

[0065] “(dsFv)₂”指代通过肽接头偶联的两个dsFv。

[0066] 术语“双特异性抗体”或“BsAb”指代在单一分子内组合两种抗体的抗原结合位点的抗体。因此,BsAb能够同时结合两种不同抗原。如例如EP 2 050 764 A1中所述,已经越来越频繁地使用基因工程来设计、修饰和产生具有结合性质和效应物功能的理想组合的抗体或抗体衍生物。

[0067] 术语“多特异性抗体”指代在单一分子内组合两种或更多种抗体的抗原结合位点的抗体。

[0068] 术语“双抗体”指具有两个抗原结合位点的小抗体片段,所述片段在同一多肽链(VH-VL)中包含与轻链可变结构域(VL)连接的重链可变结构域(VH)。通过在相同链的两个结构域间使用短到不允许配对的接头迫使所述结构域与另一链的互补结构域配对并产生两个抗原结合位点。

[0069] 在具体的实施方案中,表位结合片段选自下组:Fv、Fab、F(ab')₂、Fab'、dsFv、(dsFv)₂、scFv、sc(Fv)₂、双抗体和VHH。

[0070] 在具体的实施方案中,本发明的偶联物包含抗体或其表位结合片段,其包含一个或多个具有选择下组的氨基酸序列的CDR:SYNMH(SEQ ID NO:1)、YIYPGNGATNYNQKFQK(SEQ ID NO:2)、GDSVPFAY(SEQ ID NO:3)、SAHSSVSFMH(SEQ ID NO:4)、STSSLAS(SEQ ID NO:5)和QQRSSFPLT(SEQ ID NO:6)。

[0071] 在另一实施方案中,本发明的偶联物可包含抗体或其表位结合片段,其包含序列SEQ ID NO:1的CDR1-H、序列SEQ ID NO:2的CDR2-H和序列SEQ ID NO:3的CDR3-H。

[0072] 在另一实施方案中,本发明的偶联物可包含抗体或其表位结合片段,其包含序列SEQ ID NO:4的CDR1-L、序列SEQ ID NO:5的CDR2-L和序列SEQ ID NO:6的CDR3-L。

[0073] 在另一实施方案中,本发明的偶联物可包含抗体或其表位结合片段,其包含序列SEQ ID NO:1的CDR1-H、序列SEQ ID NO:2的CDR2-H、序列SEQ ID NO:3的CDR3-H、序列SEQ ID NO:4的CDR1-L、序列SEQ ID NO:5的CDR2-L和序列SEQ ID NO:6的CDR3-L。

[0074] 还提供了包含抗体或表位结合片段的偶联物,所述抗体或表位结合片段含有下列序列的重链可变区或与其至少85%,更具体地至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的序列:

[0075]

QAQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGYIYPGNGATNYNQKFQKGKATLTADPSSSTAYMQISSLTSEDSAVYFCARGDSVPFAYWGQGTLLTVSA(SEQ ID NO:7),

[0076] 优选条件是所述序列包含序列SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3。

[0077] 还提供了包含抗体或表位结合片段的偶联物,所述抗体或表位结合片段含有下列序列的轻链可变区或与其至少85%,更具体地至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的序列:

[0078]

EIVLTQSPATMSASPGERVTITCSAHSSVSFMHWFQQKPGTSPKLWIYSTSSLASGVPARFGGSGSGTSYSLTISSM
EAEDAATYYCQQRSSFPLTFGAGTKLELKR(SEQ ID NO:8),

[0079] 优选条件是所述序列包含序列SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6。

[0080] 还提供了包含抗体或表位结合片段的偶联物,所述抗体或表位结合片段含有下列序列的重链或与其至少85%,更具体地至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的序列:

[0081]

QAQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGYIYPGNGATNYNQKFQGKATLTADPSSS
TAYMQISSLTSEDSAVYFCARGDSVPFAYWGQGTLLTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV
TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTTPVLDSGFSFLYSLKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO:9),

[0082] 优选条件是所述序列包含序列SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3。

[0083] 还提供了包含抗体或表位结合片段的偶联物,所述抗体或表位结合片段含有下列序列的轻链或与其至少85%,更具体地至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的序列:

[0084]

EIVLTQSPATMSASPGERVTITCSAHSSVSFMHWFQQKPGTSPKLWIYSTSSLASGVPARFGGSGSGTSYSLTISSM
EAEDAATYYCQQRSSFPLTFGAGTKLELKRRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ
SGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ ID NO:10),

[0085] 优选条件是所述序列包含序列SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6。

[0086] 在另一实施方案中,提供了拥有具备对应SEQ ID NO:7的氨基酸序列的人源化或表面重整的重链可变区的人源化抗MUC1抗体及其表位结合片段。

[0087] 相似地,提供了拥有具备对应SEQ ID NO:8的氨基酸序列的人源化或表面重整的轻链可变区的人源化抗MUC1抗体及其表位结合片段。

[0088] 本文使用的术语“人源化抗体”指包含源自非人免疫球蛋白的最小序列的嵌合抗体。

[0089] 如本文使用,“嵌合抗体”是将其中恒定区或其部分改变、替换或交换进而可变区与不同物种或属于另一抗体种类或亚类的恒定区连接的抗体。“嵌合抗体”还指将其中可变区或其部分改变、替换或交换进而恒定区与不同物种或属于另一抗体种类或亚类的可变区连接的抗体。

[0090] 人源化的目标是减少异种抗体如鼠抗体的免疫原性以供导入进入体内,同时保持抗体的全部抗原结合亲和性和特异性。人源化抗体或为了不被其他哺乳动物排斥而适应性调整的抗体可采用若干技术来产生,如表面重整(resurfacing)和CDR嫁接(CDR grafting)。如本文使用,表面重整技术综合使用分子建模、统计学分析和诱变,进而改变抗体可变区的非CDR表面,从而模拟目标宿主的已知抗体的表面。

[0091] 抗体的表面重整的策略和方法,和在不同的宿主中减少抗体免疫原性的其他方

法,公开在美国专利5,639,641中。简言之,在具体方法中,(1)生成汇集的抗体重链和轻链可变区的位置比对,得到一组重链和轻链可变区框架表面暴露位置,其中所有可变区的比对位置至少约98%相同;(2)针对啮齿类抗体(或其片段)限定一组重链和轻链可变区框架表面暴露的氨基酸残基;(3)鉴定与该组啮齿类表面暴露氨基酸残基最相似的一组重链和轻链可变区框架表面暴露氨基酸残基;(4)将步骤(2)中限定的该组重链和轻链可变区框架表面暴露氨基酸残基用步骤(3)中鉴定的该组重链和轻链可变区框架表面暴露氨基酸残基替代,除了那些位于该啮齿类抗体的互补决定区的任何残基的任何原子的5 Å范围内的氨基酸残基;和(5)产生具有结合特异性的人源化啮齿类抗体。

[0092] 可以使用多种其他的技术对抗体进行人源化,包括CDR嫁接(EP0239400;W091/09967;美国专利5,530,101和5,585,089),镶饰(veneering)或表面重整(EP0592106;EP0519596;Padlan E.A.,1991,Molecular Immunology 28(4/5):489-498;Studnicka G.M.et al.,1994,Protein Engineering 7(6):805-814;Roguska M.A.etal.,1994,PNAS 91:969-973),和链改组(chain shuffling)(美国专利5,565,332)。人抗体可通过本领域中已知的多种方法来制备,包括噬菌体展示法。也参见美国专利4,444,887,4,716,111,5,545,806和5,814,318;和国际专利申请W098/46645、W0 98/50433、W0 98/24893、W0 98/16654、W096/34096、W0 96/33735和W091/10741。

[0093] 这种人源化抗体的一个实施方案是人源化huDS6抗体,其包含序列SEQ ID NO:9的重链和序列SEQ ID NO:10的轻链,或其表位结合片段,或与其至少85%,更具体地至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的序列,优选条件是所述序列包含序列SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6。

[0094] 细胞毒性剂

[0095] 本文使用的术语“细胞毒性剂”指降低或阻断细胞功能或生长和/或引起细胞损坏的物质。相应地,在本发明偶联物中使用的细胞毒性剂可以是任何导致细胞死亡或诱导细胞死亡,或以某种方式减少细胞活力的化合物。细胞毒性剂的实例包括如下文定义的一类美登素和类美登素类似物、前药、茅屋霉素衍生物、类毒素、细霉素衍生物、CC-1065和CC-1065类似物。

[0096] 可用于本发明以形成偶联物的细胞毒性剂包括类美登素和类美登素类似物。合适的类美登素实例包括美登醇和美登醇类似物。类美登素是抑制微管形成且对哺乳动物细胞高度毒性的药物。

[0097] 适当的美登醇类似物的例子包括具有经修饰的芳香环的那些和在其他位置具有修饰的那些。这些适当的类美登素公开在美国专利4,424,219;4,256,746;4,294,757;4,307,016;4,313,946;4,315,929;4,331,598;4,361,650;4,362,663;4,364,866;4,450,254;4,322,348;4,371,533;6,333,410;5,475,092;5,585,499;和5,846,545中。

[0098] 具有经修饰芳香环的美登醇的适当类似物的具体实例包括:

[0099] (1)C-19-去氯(美国专利号4,256,746),通过安丝菌素(ansamycin)P2的LAH还原制备;

[0100] (2)C-20-羟基(或C-20-去甲基)+/-C-19-去氯(美国专利号4,361,650和4,307,016),通过使用链霉菌(*Streptomyces*)或放线菌(*Actinomyces*)的去甲基化或使用LAH的去

氯化制备;和

[0101] (3)C-20-去甲氧基,C-20-酰氧基(-OCOR),+/-去氯(美国专利号4,294,757),通过使用酰氯的酰化制备。

[0102] 具有其他位置的修饰的美登醇合适的类似物的具体实例包括:

[0103] (1)C-9-SH(美国专利号4,424,219),通过美登醇与H₂S或P₂S₅的反应制备);

[0104] (2)C-14-烷氧基甲基(去甲氧基/CH₂OR)(美国专利号4,331,598);

[0105] (3)C-14-羟甲基或酰氧基甲基(CH₂OH或CH₂OAc)(美国专利号4,450,254),从诺卡氏菌(*Nocardia*)制备;

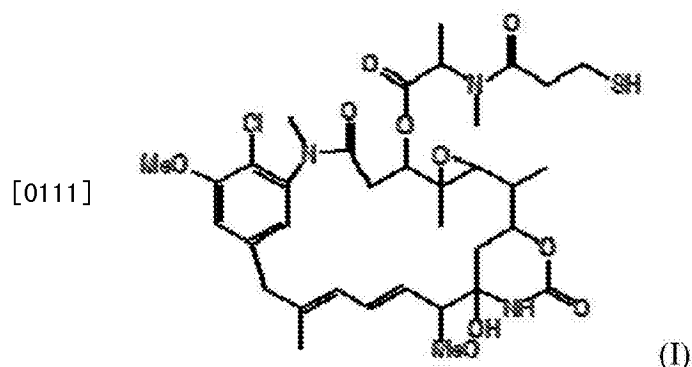
[0106] (4)C-15-羟基/酰氧基(美国专利号4,364,866),通过链霉菌(*Streptomyces*)转化美登醇而制备;

[0107] (5)C-15-甲氧基(美国专利号4,313,946和4,315,929),从滑桃树(*Trewia nudiflora*)分离;

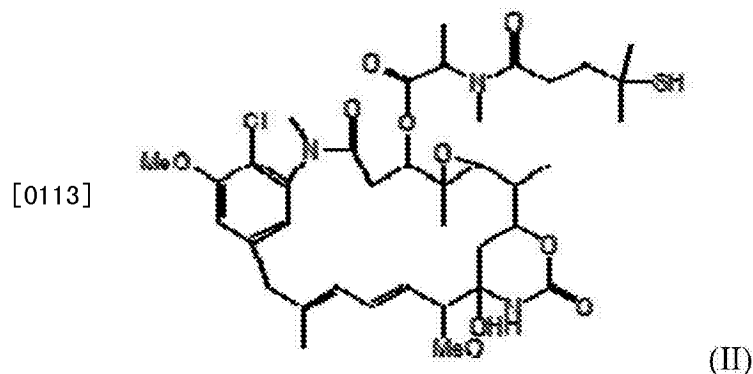
[0108] (6)C-18-N-去甲基(美国专利号4,362,663和4,322,348),通过链霉菌(*Streptomyces*)对美登醇去甲基化而制备;以及

[0109] (7)4,5-去氧(美国专利号4,371,533),通过三氯化钛/LAH还原美登醇而制备。

[0110] 在具体的实施方案中,本发明的偶联物利用含有硫醇的类美登素(DM1),其正式命名为N^{2'}-去乙酰基-N^{2'}-(3-巯基-1-氧代丙基)-美登素作为细胞毒性剂。DM1由下列结构式(I)所示:



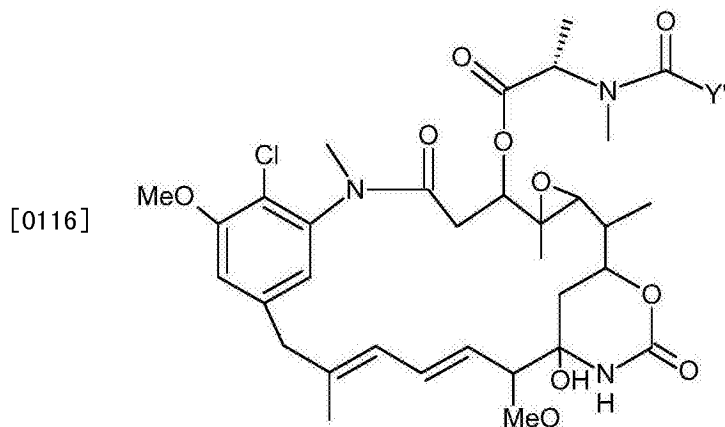
[0112] 在另一个实施方案中,本发明的偶联物利用含有硫醇的类美登素DM4,其正式命名为N^{2'}-去乙酰基-N^{2'}-(4-甲基4-巯基-1-氧代戊基)-美登素作为细胞毒性剂。DM4由下列结构式(II)所示:



[0114] 在本发明进一步的实施方案中,可以使用其他美登素,包括在携带硫原子的碳原子上携带单烷基或二烷基取代的含硫醇和二硫化物的类美登素。这些包括在C-3、C-14具有

羟甲基, C-15羟基或C-20去甲基, 具有携带受阻巯基的酰基的酰化氨基酸侧链的类美登素, 其中携带硫醇官能团的酰基的碳原子具有一个或者两个取代基, 所述取代基是CH₃、C₂H₅、具有1-10个碳原子的直链或支链烷基或烯基、具有3-10个碳原子的环状烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳基或杂环烷基, 并且进一步, 其中取代基之一可以是H, 并且其中酰基在羰基官能团与硫原子之间具有至少3个碳原子的直链长度。

[0115] 这类其他的美登素包括由式(III)表示的化合物:



[0117] 其中:

[0118] Y' 表示

[0119] $(CR_7R_8)_1(CR_9=CR_{10})_p(C\equiv C)_qAr(CR_5R_6)_mDu(CR_{11}=CR_{12})_r(C\equiv C)_sBt(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ$,

[0120] 其中:

[0121] R₁和R₂分别独立地为CH₃、C₂H₅, 具有1-10个碳原子的直链烷基或烯基、具有3-10个碳原子的支链或环状烷基或烯基、苯基、被取代的苯基或杂环芳基或杂环烷基, 另外, R₂可以是H;

[0122] A、B、D为具有3-10个碳原子的环烷基或环烯基, 未取代的或者取代的芳基或杂环芳基或杂环烷基;

[0123] R₃、R₄、R₅, R₆、R₇、R₈、R₉、R₁₀、R₁₁和R₁₂分别独立地为H、CH₃、C₂H₅、具有1-10个碳原子的直链烷基或烯基、具有3-10个碳原子的支链或环状烷基或烯基、苯基、被取代的苯基或杂环芳基或杂环烷基;

[0124] l、m、n、o、p、q、r、s和t分别独立地为0或者1-5的整数, 条件是:l、m、n、o、p、q、r、s和t当中的至少两个不同时为零; 且

[0125] Z是H、SR或-COR, 其中R是具有1-10个碳原子的直链烷基或烯基、具有3-10个碳原子的支链或环状烷基或烯基、或者未被取代的或者被取代的芳基或杂环芳基或杂环烷基。

[0126] 式(III)的优选实施方案包括一些式(III)的化合物, 其中:

[0127] R₁是甲基, R₂是H, 且Z是H;

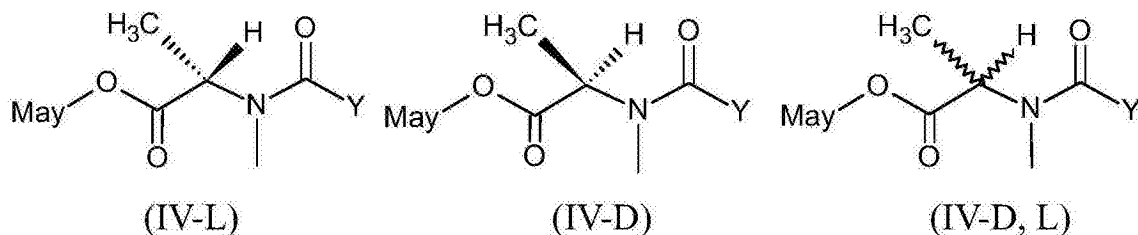
[0128] R₁和R₂是甲基, 且Z是H;

[0129] R₁是甲基, R₂是H, 且Z是-SCH₃;

[0130] R₁和R₂是甲基, 且Z是-SCH₃。

[0131] 这些额外的美登素还包括式(IV-L)、(IV-D)或(IV-D, L)所表示的化合物:

[0132]



[0133] 其中:

[0134] Y代表 $(CR_7R_8)_1(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ$,

[0135] 其中:

[0136] R_1 和 R_2 分别独立地为 CH_3 、 C_2H_5 、具有1-10个碳原子的直链烷基或烯基、具有3-10个碳原子的支链或环状烷基或烯基、苯基、被取代的苯基或杂环芳基或杂环烷基,且此外 R_2 可以是H;[0137] R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 分别独立地为H、 CH_3 、 C_2H_5 、具有1-10个碳原子的直链烷基或烯基、具有3-10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基或杂环烷基;[0138] l 、 m 和 n 分别独立地为1-5的整数,且此外 n 可以为0;

[0139] Z是H、SR、-COR,其中R是具有1-10个碳原子的直链或支链烷基或烯基、具有3-10个碳原子的环烷基或烯基、或者未取代或者取代的芳基或杂环芳基或杂环烷基;且

[0140] May代表类美登素,其携带侧链C-3、C-14羟甲基、C-15羟基或C-20去甲基。

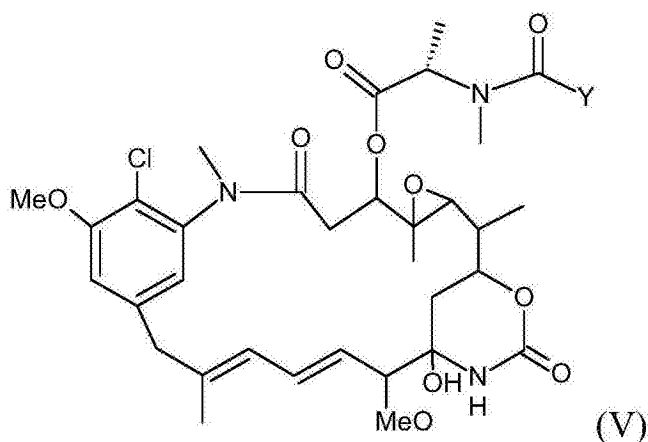
[0141] 式(IV-L)、(IV-D)和(IV-D, L)的优选实施方案包括式(IV-L)、(IV-D)和(IV-D, L)的化合物,其中:

[0142] R_1 是甲基, R_2 是H, R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 分别为H, l 和 m 分别为1, n 是0, 且Z是H。[0143] R_1 和 R_2 是甲基, R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 分别为H, l 和 m 是1, n 是0, 且Z是H。[0144] R_1 是甲基, R_2 是H, R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 分别为H, l 和 m 分别为1, n 是0, 且Z是 $-SCH_3$ 。[0145] R_1 和 R_2 是甲基, R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 分别为H, l 和 m 是1, n 是0, 且Z是 $-SCH_3$ 。

[0146] 在一个实施方案中,细胞毒性剂由(IV-L)表示。

[0147] 这些其他的美登素还包括由式(V)表示的化合物:

[0148]



[0149] 其中:

[0150] Y代表 $(CR_7R_8)_1(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ$,

[0151] 其中:

[0152] R_1 和 R_2 分别独立地为 CH_3 、 C_2H_5 、具有1-10个碳原子的直链烷基或烯基、具有3-10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基或杂环烷基,并且另外 R_2 可以是H;

[0153] R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 分别独立地为H、 CH_3 、 C_2H_5 、具有1-10个碳原子的直链烷基或烯基、具有3-10个碳原子的支链或环状烷基或烯基、苯基、被取代的苯基或杂环芳基或杂环烷基;

[0154] l 、 m 和 n 分别独立地为1-5的整数,并且另外 n 可以为0;且

[0155] Z 是H、SR或 $-COR$,其中 R 是具有1-10个碳原子的直链烷基或烯基、具有3-10个碳原子的支链或环状烷基或烯基、或者未取代的或者取代的芳基或杂环芳基或杂环烷基。

[0156] 式(V)的具体实施方案包括式(V)的化合物,其中:

[0157] R_1 是甲基, R_2 是H, R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 分别为H, l 和 m 分别为1, n 是0,且 Z 是H。

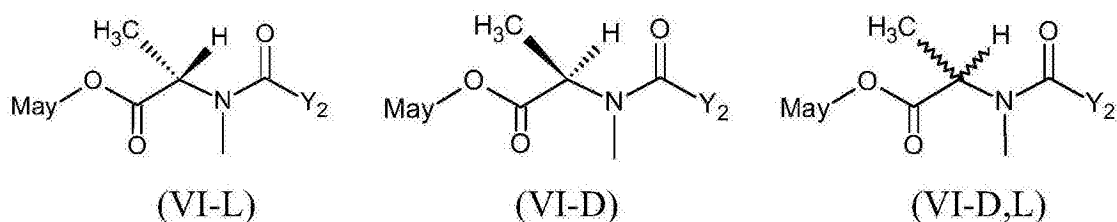
[0158] R_1 和 R_2 是甲基, R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 分别为H, l 和 m 是1, n 是0,且 Z 是H。

[0159] R_1 是甲基, R_2 是H, R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 分别为H, l 和 m 分别为1, n 是0,且 Z 是 $-SCH_3$ 。

[0160] R_1 和 R_2 是甲基, R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 分别为H, l 和 m 是1, n 是0,且 Z 是 $-SCH_3$ 。

[0161] 这些其他的美登素进一步包括由式(VI-L)、(VI-D)或(VI-D,L)所示的化合物:

[0162]



[0163] 其中:

[0164] Y_2 代表 $(CR_7R_8)_1(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ_2$,

[0165] 其中:

[0166] R_1 和 R_2 分别独立地为 CH_3 、 C_2H_5 、具有1-10个碳原子的直链烷基或烯基、具有3-10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基或杂环烷基,并且另外 R_2 可以是H;

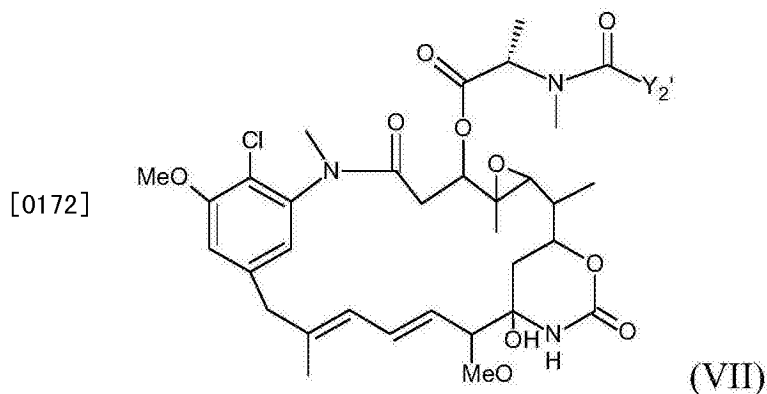
[0167] R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 分别独立地为H、 CH_3 、 C_2H_5 、具有1-10个碳原子的直链烷基或烯基、具有3-10个碳原子的支链或环状烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳基或杂环烷基;

[0168] l 、 m 和 n 分别独立地为1-5的整数,并且另外 n 可以为0;

[0169] Z_2 是SR或 COR ,其中 R 是具有1-10个碳原子的直链烷基或烯基、具有3-10个碳原子的支链或环状烷基或烯基、或者未取代的或者取代的芳基或杂环芳基或杂环烷基;且

[0170] May是类美登素。

[0171] 这些其他的美登素还包括由式(VII)所示的化合物:



[0173] 其中：

[0174] Y_2' 代表

[0175] $(CR_7R_8)_1(CR_9=CR_{10})_p(C\equiv C)_qA_r(CR_5R_6)_mDu(CR_{11}=CR_{12})_r(C\equiv C)_sB_t(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ_2$ ，

[0176] 其中：

[0177] R_1 和 R_2 分别独立地为 CH_3 、 C_2H_5 ，具有1-10个碳原子的直链或支链烷基或烯基、具有3-10个碳原子的环状烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳基或杂环烷基，并且另外 R_2 可以是H；

[0178] A、B和D分别独立地为具有3-10个碳原子的环烷基或环烯基，未取代的或者取代的芳基或杂环芳基或杂环烷基；

[0179] R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_9 、 R_{10} 、 R_{11} 和 R_{12} 分别独立地为H、 CH_3 、 C_2H_5 、具有1-10个碳原子的直链烷基或烯基、具有3-10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基或杂环烷基；

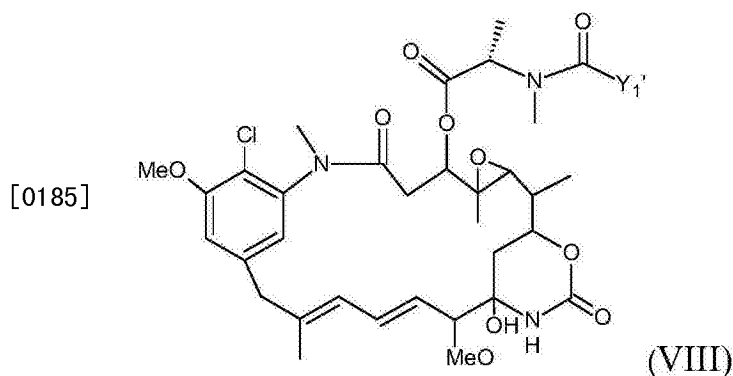
[0180] l 、 m 、 n 、 o 、 p 、 q 、 r 、 s 和 t 分别独立地为0或者1-5的整数，条件是 l 、 m 、 n 、 o 、 p 、 q 、 r 、 s 和 t 当中的至少两个不同时为零；且

[0181] Z_2 是SR或-COR，其中R是具有1-10个碳原子的直链烷基或烯基、具有3-10个碳原子的支链或环状烷基或烯基、或者未取代的或者取代的芳基或杂环芳基或杂环烷基。

[0182] 式(VII)的特定实施方案包括式(VII)的化合物，其中： R_1 是甲基且 R_2 是H。

[0183] 上述类美登素可与上述“细胞结合剂”部分定义的细胞结合剂偶联，特别是包含序列SEQ ID NO:9的重链和序列SEQ ID NO:10的轻链的人源化抗体huDS6，其中所述细胞结合剂，特别是包含序列SEQ ID NO:9的重链和序列SEQ ID NO:10的轻链的人源化huDS6抗体，与类美登素使用存在于在类美登素C-3、C-14羟甲基、C-15羟基或C-20去甲基发现的酰化氨基酸链的酰基上的硫醇或二硫官能团连接，且其中所述酰化氨基酸侧链的酰基在其位于有一个或两个取代基的碳原子处具有其硫醇或二硫官能团，所述取代基为 CH_3 、 C_2H_5 、具有1-10个碳原子的直链烷基或烯基、具有3-10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基或杂环烷基，并且另外所述取代基之一可以是H，并且其中所述酰基在羰基官能团与硫原子之间具有至少3个碳原子的直链长度。

[0184] 在本发明的一个实施方案中，所述偶联物是包含如上述“细胞结合剂”部分定义的细胞结合剂的偶联物，特别是包含序列SEQ ID NO:9的重链和序列SEQ ID NO:10的轻链的人源化huDS6抗体，所述细胞结合剂偶联至式(VIII)的类美登素：



[0186] 其中：

[0187] Y_1' 代表

[0188] $(CR_7R_8)_1(CR_9=CR_{10})_p(C\equiv C)_qA_r(CR_5R_6)_mD_u(CR_{11}=CR_{12})_r(C\equiv C)_sB_t(CR_3R_4)_nCR_1R_2S-$ ，

[0189] 其中

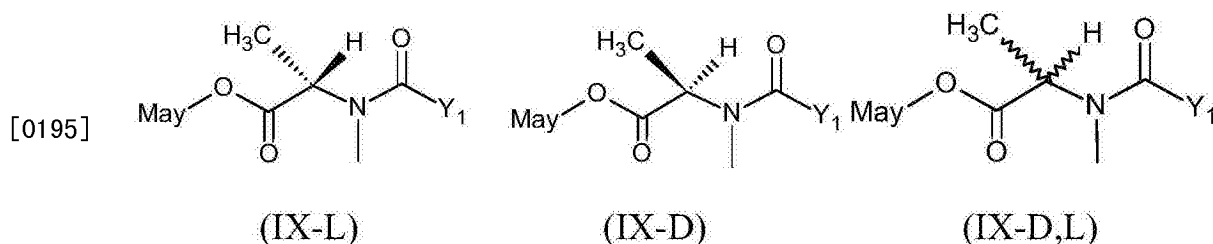
[0190] A、B和D分别独立地为具有3-10个碳原子的环烷基或环烯基，未取代的或者取代的芳基或杂环芳基或杂环烷基；

[0191] R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_9 、 R_{10} 、 R_{11} 和 R_{12} 分别独立地为H、 CH_3 、 C_2H_5 、具有1-10个碳原子的直链烷基或烯基、具有3-10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基或杂环烷基；且

[0192] l 、 m 、 n 、 o 、 p 、 q 和 t 分别独立地为0或者1-5的整数，条件是 l 、 m 、 n 、 o 、 p 、 q 、 r 、 s 和 t 中的至少两个不同时为零。

[0193] 具体地， R_1 是甲基， R_2 是H，或者 R_1 和 R_2 是甲基。

[0194] 本发明的另一实施方案中，所述偶联物是包含如上述“细胞结合剂”部分定义的细胞结合剂的偶联物，特别是包含序列SEQ ID NO:9的重链和序列SEQ ID NO:10的轻链的人源化huDS6抗体，所述细胞结合剂偶联至式(IX-L)、(IX-D)或(IX-D,L)的类美登素：



[0196] 其中：

[0197] Y_1 代表 $(CR_7R_8)_1(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2S-$ ，

[0198] 其中

[0199] R_1 和 R_2 分别独立地为 CH_3 、 C_2H_5 、具有1-10个碳原子的直链烷基或烯基、具有3-10个碳原子的支链或环状烷基或烯基、苯基、被取代的苯基、杂环芳基或杂环烯基，并且另外 R_2 可以是H；

[0200] R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 分别独立地为H、 CH_3 、 C_2H_5 、具有1-10个碳原子的直链烷基或烯基、具有3-10个碳原子的支链或环状烷基或烯基、苯基、被取代的苯基或杂环芳基或杂环烷基；

[0201] l 、 m 和 n 分别独立地为1-5的整数，并且另外 n 可以为0；且

[0202] May代表美登醇,其携带侧链C-3、C-14羟甲基、C-15羟基或C-20去甲基。

[0203] 式(IX-L)、(IX-D)或(IX-D,L)的具体实施方案包括式(IX-L)、(IX-D)或(IX-D,L)的化合物,其中:

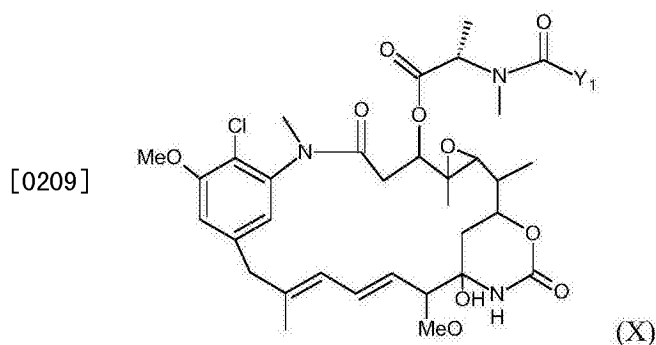
[0204] R_1 是甲基且 R_2 是H,或者 R_1 和 R_2 是甲基,

[0205] R_1 是甲基, R_2 是H, R_5 , R_6 , R_7 和 R_8 分别为H; l 和 m 分别为1;并且 n 是0,

[0206] R_1 和 R_2 是甲基; R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 分别为H; l 和 m 分别是1;并且 n 是0。

[0207] 更具体地,所述细胞毒性剂由式(IX-L)所示。

[0208] 本发明的另一实施方案中,所述偶联物是包含如上述“细胞结合剂”部分定义的细胞结合剂的偶联物,特别是包含序列SEQ ID NO:9的重链和序列SEQ ID NO:10的轻链的人源化huDS6抗体,所述细胞结合剂偶联至式(X)的类美登素:



[0210] 其中取代基如上式(IX)定义。

[0211] 在进一步的实施方案中,上述化合物中 R_1 是H, R_2 是甲基, R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 分别为H, l 和 m 分别为1,且 n 是0。

[0212] 在进一步的实施方案中,上述化合物中 R_1 和 R_2 是甲基, R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 分别为H, l 和 m 分别为1,且 n 是0。

[0213] 此外,优选L-氨基酰基立体异构体。

[0214] 2004年5月20日提交的美国专利申请号10/849,136教导的每种类美登素也可在本发明的偶联物中用作细胞毒性剂。

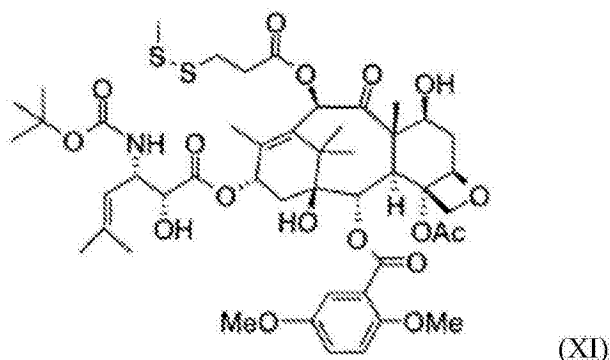
[0215] 可对如上述“细胞结合剂”部分定义的细胞结合剂特别是抗体与类美登素药物的偶联物评价它们在体外抑制各种不期望细胞系的增殖的能力。例如,细胞系诸如人类表皮癌细胞系A-431、人小细胞肺癌细胞系SW2、人乳房肿瘤细胞系SKBR3和伯基特(Burkitt's)淋巴瘤细胞系Namalwa能够很容易地用于评价这些化合物的细胞毒性。可以将待评估的细胞暴露到所述化合物24小时,并通过已知的方法以直接检验测量存活的细胞分数。随后可以从检验的结果计算 IC_{50} 值。

[0216] 根据本发明的偶联物中使用的细胞毒性剂也可以是紫杉烷或其衍生物。

[0217] 紫杉烷类化合物是一类化合物家族,其包括细胞毒性天然产品帕利他西(paclitaxel)(紫杉醇)和半合成衍生物多西紫杉醇(docetaxel)(泰索帝(Taxotere)),两种化合物都广泛用于癌症治疗中。紫杉烷类化合物是有丝分裂纺锤体毒剂,其抑制微管蛋白的解聚,引起细胞死亡。尽管多西紫杉醇和帕利他西都是可以用于癌症治疗的试剂,但由于它们对正常细胞的非特异性毒性,因此它们的抗肿瘤活性是有限的。

[0218] 用于偶联物制备中的具体紫杉烷为式(XI)的紫杉烷:

[0219]



[0220] 用于合成可以用于本发明细胞毒性偶联物的紫杉烷类化合物的方法,连同用于将紫杉烷类化合物偶联至如上述“细胞结合剂”部分定义的细胞结合剂如包含序列SEQ ID NO:9的重链和序列SEQ ID NO:10的轻链的人源化huDS6抗体的方法详细描述于美国专利号5,416,064、5,475,092、6,340,701、6,372,738和6,436,931以及美国专利申请号10/024,290、10/144,042、10/207,814、10/210,112和10/369,563中。

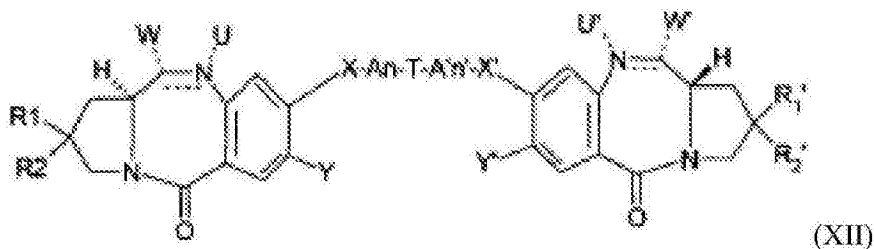
[0221] 根据本发明的细胞毒性剂也可以是茅屋霉素衍生物。茅屋霉素衍生物是吡咯并[1,4]苯并二氮杂~~革~~(PBD),一种已知的化合物类型,其通过共价结合到DNA小沟中的鸟嘌呤的N2而表现出生物性能。PBD包括一些小沟结合剂例如安曲霉素(anthramycin)、新安拉霉素(neothramycin)和DC-81。

[0222] 保持高细胞毒性并可以被有效连接至如上述“细胞结合剂”部分定义的细胞结合剂的新型茅屋霉素衍生物公开在国际申请号PCT/IB2007/000142中,细胞结合剂-茅屋霉素衍生物复合物允许完全(permit the full measure of)仅针对不期望的细胞的、以靶向模式应用的茅屋霉素衍生物的细胞毒性作用,因此避免了由于对非靶向健康细胞的损伤而引起的副作用。

[0223] 根据本发明的细胞毒性剂可包含一种或者多种茅屋霉素衍生物,其经由连接基团连接至如上述“细胞结合剂”部分定义的细胞结合剂,如包含序列SEQ ID NO:9的重链和序列SEQ ID NO:10的轻链的人源化huDS6抗体。所述连接基团是通过常规方法共价结合到茅屋霉素衍生物的化学部分的一部分。在具体的实施方案中,该化学部分可以经由二硫键共价结合至茅屋霉素衍生物。

[0224] 可以用于本发明的茅屋霉素衍生物具有下文所示的式(XII):

[0225]



[0226] 其中

[0227] ——代表任选的单键;

[0228] 代表单键或双键;

[0229] 条件是当 代表单键时,U和U'相同或不同,独立地代表H,并且W和W'相同或不同,独立地选自OH,醚如-OR,酯(例如乙酸酯)如-OCOR,碳酸酯如-OCOOR,氨基甲酸酯如-

OCNRR', 环氨基甲酸酯进而使得N10和C11是环的一部分, 脲如-NRCONRR', 硫代氨基甲酸酯如-OCSNHR, 环硫代氨基甲酸酯进而使得N10和C11是环的一部分, -SH, 硫化物如-SR, 亚砷如-SOR, 砷如-SOOR, 磺酸酯如-SO₃-, 磺酰胺如-NRSOOR, 胺如-NRR', 任选地环胺进而使得N10和C11是环的一部分, 羟胺衍生物如-NROR', 酰胺如-NRCOR', 叠氮基如-N₃, 氰基, 卤素, 三烷基或三芳基磷、氨基酸衍生基团。优选W和W'相同或不同, 并且是OH、Ome、Oet、NHCONH₂、SMe;

[0230] 并且当  代表双键时, U和U'不存在, 且W和W'代表H;

[0231] ■R₁、R₂、R₁'、R₂'相同或不同并独立地选自卤化物或任选地由一个或者多个Ha₁、CN、NRR'、CF₃、OR、芳基、Het、S(O)_qR取代的烷基, 或R₁和R₂以及R₁'和R₂'分别共同形成含有基团=B和=B'的双键。

[0232] 在一个实施方案中, R₁和R₂以及R₁'和R₂'分别共同形成含有基团=B和=B'的双键。

[0233] ■B和B'相同或不同并独立地选自任选地被一个或者多个Ha₁、CN、NRR'、CF₃、OR、芳基、Het、S(O)_qR取代的烯基, 或者B和B'代表氧原子。

[0234] 在一个实施方案中, B=B'。

[0235] 在进一步的实施方案中, B=B'=CH₂或=CH-CH₃,

[0236] ■X、X'相同或不同并独立地选自一个或多个-O-、-NR-、-(C=O)-、-S(O)_q-。

[0237] 在一个实施方案中, X=X'。

[0238] 在进一步的实施方案中, X=X'=O。

[0239] ■A和A'相同或不同并独立地选自任选含有氧、氮或硫原子的烷基或烯基, 所述烷基或烯基分别任选地由一个或者多个Ha₁、CN、NRR'、CF₃、OR、S(O)_qR、芳基、Het、烷基、烯基取代。

[0240] 在一个实施方案中, A=A'。

[0241] 在进一步的实施方案中, A=A'=直链未取代的烷基。

[0242] ■Y和Y'相同或不同并独立地选自H、OR;

[0243] 在一个实施方案中, Y=Y'。

[0244] 在进一步的实施方案中, Y=Y'=O烷基, 更优选O甲基。

[0245] ■T是-NR-、-O-、-S(O)_q或者4-10元芳基、环烷基、杂环或杂芳基, 所述基团分别任选地由一个或者多个Ha₁、CN、NRR'、CF₃、R、OR、S(O)_qR和/或接头(linker)取代, 或者支链烷基, 所述支链烷基任选地由一个或者多个Ha₁、CN、NRR'、CF₃、OR、S(O)_qR和/或接头取代, 或者直链烷基, 所述直链烷基由一个或多个Ha₁、CN、NRR'、CF₃、OR、S(O)_qR和/或接头取代。

[0246] 在一个实施方案中, T是4-10元芳基或杂芳基, 更优选苯基或吡啶, 其任选地由一个或者多个接头取代。

[0247] 所述接头包含连接基团。适当的连接基团是本领域中公知的, 并且包括硫醇、硫化物、二硫化物基团、硫醚基团、酸不稳定性基团、光不稳定性基团、肽酶不稳定性基团和酯酶不稳定性基团。优选的是二硫化物基团和硫醚基团。

[0248] 当连接基团是含有硫醇-、硫键(或者所谓硫醚-S-)或二硫键(-S-S-)的基团时, 携带所述硫醇-、硫键或二硫键基团的侧链可以是直链或支链、芳族或杂环。本领域普通技术人员能够很容易地识别适当的侧链。

[0249] 在一个实施方案中,所述接头具有式-G-D-(Z)P-S-Z'

[0250] 其中

[0251] G是单键或双键、-O-、-S-或-NR-;

[0252] D是单键或-E-、-E-NR-、-E-NR-F-、-E-O-、-E-O-F-、-E-NR-CO-、-E-NR-CO-F-、-E-CO-、-CO-E-、-E-CO-F-、-E-S-、-E-S-F-、-E-NR-C-S-、-E-NR-CS-F-;

[0253] 其中E和F相同或不同且独立地选自直链或支链-(OCH₂CH₂)_i烷基(OCH₂CH₂)_j-、-烷基(OCH₂CH₂)_i-烷基-、-(OCH₂CH₂)_i-、-(OCH₂CH₂)_i环烷基(OCH₂CH₂)_j-、-(OCH₂CH₂)_i杂环(OCH₂CH₂)_j-、-(OCH₂CH₂)_i芳基(OCH₂CH₂)_j-、-(OCH₂CH₂)_i杂芳基(OCH₂CH₂)_j-、-烷基-(OCH₂CH₂)_i烷基(OCH₂CH₂)_j-、-烷基-(OCH₂CH₂)_i-、-烷基-(OCH₂CH₂)_i环烷基(OCH₂CH₂)_j-、-烷基(OCH₂CH₂)_i杂环(OCH₂CH₂)_j-、-烷基-(OCH₂CH₂)_i芳基(OCH₂CH₂)_j-、-烷基(OCH₂CH₂)_i杂芳基(OCH₂CH₂)_j-、-环烷基-烷基-、-烷基-环烷基-、-杂环-烷基-、-烷基-杂环-、-烷基-芳基-、-芳基-烷基-、-烷基-杂芳基-、-杂芳基-烷基-;

[0254] 其中,i和j相同或不同且是整数并独立地选自0、1-2000;

[0255] Z是直链或支链-烷基-;

[0256] p是0或1;

[0257] Z'代表H、硫醇保护基团例如COR₂₀或SR₂₀,其中R₂₀代表H、甲基、烷基、任选地取代的环烷基、芳基、杂芳基或杂环,条件是当Z'是H时,所述化合物与通过由于在PBD部分之一的亚胺键-NH=上加入硫醇基团-SH而发生的分子内环化所形成的相应化合物平衡。

[0258] ■n、n'相同或不同,是0或1。

[0259] ■q是0、1或2。

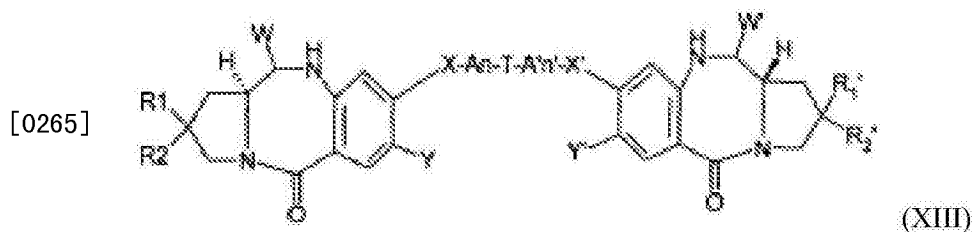
[0260] ■R和R'相同或不同,并且独立选自H、烷基、芳基,所述基团分别任选地由Ha1、CN、NRR'、CF₃、R、OR、S(O)_qR、芳基、Het取代;

[0261] 或者其药物上可以接受的盐、水合物或水合盐、或者这些化合物的多形态晶体结构或其光学异构体、外消旋物、非对映异构体和对映异构体。

[0262] 具有几何和立体异构体的通式(XII)的化合物也是本发明的一部分。

[0263] 已知式(XII)的茅屋霉素衍生物的N-10、C-11双键在存在水、醇、硫醇、伯胺或仲胺、脒和其他亲核试剂时容易以可逆的方式被转化成相应的亚胺加成物。这种过程是可逆的,并且能够在存在脱水剂时在非质子有机溶剂中、在真空中或高温下容易地再生成相应的茅屋霉素衍生物(Tozuka(1983)J.Antibiotics 36:276)。

[0264] 因此通式(XIII)的茅屋霉素衍生物的可逆衍生物也可以用于本发明中:



[0266] 其中A、X、Y、n、T、A'、X'、Y'、n'、R1、R2、R1'、R2'如上文式(VII)定义,W和W'相同或不同并选自OH,醚如-OR,酯(例如乙酸酯)如-OCOR,-COOR,碳酸酯如-OCOOR,氨基甲酸酯如-OCONRR',环氨基甲酸酯进而使得N10和C11是环的一部分,脒如-NRCONRR',硫代氨基甲酸酯如-OCSNHR,环硫代氨基甲酸酯进而使得N10和C11是环的一部分,-SH,硫化物如-SR,亚砷

如-SOR, 砜如-SOOR, 磺酸酯如-SO₃-, 磺酰胺如-NRSOOR, 胺如-NRR', 任选地环胺进而使得 N10 和 C11 是环的一部分, 羟胺衍生物如-NROR', 胺如-NRCOR, -NRCONRR', 叠氮基如-N₃, 氰基, 卤素, 三烷基或三芳基磷、氨基酸衍生基团。优选地, W 和 W' 相同或不同并且是 OH、Ome、Oet、NHCONH₂、SMe。

[0267] 因此式(XIII)的化合物可认为是溶剂化物, 在溶剂是水时包含水; 这些溶剂化物可以是特别有用的。

[0268] 在进一步的实施方案中, 本发明的茅屋霉素衍生物选自下组:

[0269] • 8,8'-[1,3-亚苯基双(亚甲基氧基)]-双[(S)-2-亚乙-(E)-基-7-甲氧基-1,2,3,11a-四氢-5H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂~~葑~~-5-酮]

[0270] • 8,8'-[5-甲氧基-1,3-亚苯基双(亚甲基氧基)]-双[(S)-2-亚乙-(E)-基-7-甲氧基-1,2,3,11a-四氢-5H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂~~葑~~-5-酮]

[0271] • 8,8'-[1,5-亚戊基双(氧基)]-双[(S)-2-亚乙-(E)-基-7-甲氧基-1,2,3,11a-四氢-5H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂~~葑~~-5-酮]

[0272] • 8,8'-[1,4-亚丁基双(氧基)]-双[(S)-2-亚乙-(E)-基-7-甲氧基-1,2,3,11a-四氢-5H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂~~葑~~-5-酮]

[0273] • 8,8'-[3-甲基-1,5-亚戊基双(氧基)]-双[(S)-2-亚乙-(E)-基-7-甲氧基-1,2,3,11a-四氢-5H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂~~葑~~-5-酮]

[0274] • 8,8'-[2,6-亚吡啶基双(氧基)]-双[(S)-2-亚乙-(E)-基-7-甲氧基-1,2,3,11a-四氢-5H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂~~葑~~-5-酮]

[0275] • 8,8'-[4-(3-叔丁氧羰基氨基丙氧基)-2,6-亚吡啶基双-(亚甲基氧基)]-双[(S)-2-亚乙-(E)-基-7-甲氧基-1,2,3,11a-四氢-5H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂~~葑~~-5-酮]

[0276] • 8,8'-[5-(3-氨基丙氧基)-1,3-亚苯基双(亚甲基氧基)]-双[(S)-2-亚乙-(E)-基-7-甲氧基-1,2,3,11a-四氢-5H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂~~葑~~-5-酮]

[0277] • 8,8'-[5-(N-甲基-3-叔丁氧羰基氨基丙基)-1,3-亚苯基双-(亚甲基氧基)]-双[(S)-2-亚乙-(E)-基-7-甲氧基-1,2,3,11a-四氢-5H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂~~葑~~-5-酮]

[0278] • 8,8'-{5-[3-(4-甲基-4-甲基二硫基-戊酰基氨基)丙氧基]-1,3-亚苯基双(亚甲基氧基)}-双[(S)-2-亚乙-(E)-基-7-甲氧基-1,2,3,11a-四氢-5H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂~~葑~~-5-酮]

[0279] • 8,8'-[5-乙酰基硫代甲基-1,3-亚苯基双(亚甲基氧基)]-双[(S)-2-亚甲基-7-甲氧基-1,2,3,11a-四氢-5H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂~~葑~~-5-酮]

[0280] • 双-{2-[(S)-2-亚甲基-7-甲氧基-5-氧代-1,3,11a-四氢-5H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂~~葑~~-8-基氧基]-乙基}-氨基甲酸叔丁酯

[0281] • 8,8'-[3-(2-乙酰基硫代乙基)-1,5-亚戊基双(氧基)]-双[(S)-2-亚甲基-7-甲氧基-1,2,3,11a-四氢-5H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂~~葑~~-5-酮]

[0282] • 8,8'-[5-(N-4-巯基-4,4-二甲基丁酰基)氨基-1,3-亚苯基双(亚甲基氧基)]-双[7-甲氧基-2-亚甲基-1,2,3,11a-四氢-5H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂~~萘~~-5-酮]

[0283] • 8,8'-[5-(N-4-甲基二巯基-4,4-二甲基丁酰基)-氨基-1,3-亚苯基双(亚甲基氧基)]-双[7-甲氧基-2-亚甲基-1,2,3,11a-四氢-5H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂~~萘~~-5-酮]

[0284] • 8,8'-[5-(N-甲基-N-(2-巯基-2,2-二甲基乙基)氨基-1,3-亚苯基(亚甲基氧基))-双[7-甲氧基-2-亚甲基-1,2,3,11a-四氢-5H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂~~萘~~-5-酮]

[0285] • 8,8'-[5-(N-甲基-N-(2-甲基二巯基-2,2-二甲基乙基)氨基-1,3-亚苯基(亚甲基氧基))-双[7-甲氧基-2-亚甲基-1,2,3,11a-四氢-5H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂~~萘~~-5-酮]

[0286] • 8,8'-[(4-(2-(4-巯基-4-甲基)-戊酰氨基-乙氧基)-吡啶-2,6-二甲基)-二氧基]-双[(S)-2-亚乙-(E)-基-7-二甲氧基-1,2,3,11a-四氢-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂~~萘~~-5-酮]

[0287] • 8,8'-[(1-(2-(4-甲基-4-甲基二巯基)-戊酰氨基-乙氧基)-苯-3,5-二甲基)-二氧基]-双[(S)-2-亚乙-(E)-基-7-二甲氧基-1,2,3,11a-四氢-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂~~萘~~-5-酮]

[0288] • 8,8'-[(4-(3-(4-甲基-4-甲基二巯基)-戊酰氨基-丙氧基)-吡啶-2,6-二甲基)-二氧基]-双[(S)-2-亚乙-(E)-基-7-二甲氧基-1,2,3,11a-四氢-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂~~萘~~-5-酮]

[0289] • 8,8'-[(4-(4-(4-甲基-4-甲基二巯基)-戊酰氨基-丁氧基)-吡啶-2,6-二甲基)-二氧基]-双[(S)-2-亚乙-(E)-基-7-二甲氧基-1,2,3,11a-四氢-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂~~萘~~-5-酮]

[0290] • 8,8'-[(4-(3-[4-(4-甲基-4-甲基二巯基-戊酰基)-哌嗪-1-基]-丙基)-吡啶-2,6-二甲基)-二氧基]-双[(S)-2-亚乙-(E)-基-7-二甲氧基-1,2,3,11a-四氢-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂~~萘~~-5-酮]

[0291] • 8,8'-[(1-(3-[4-(4-甲基-4-甲基二巯基-戊酰基)-哌嗪-1-基]-丙基)-苯-3,5-二甲基)-二氧基]-双[(S)-2-亚乙-(E)-基-7-二甲氧基-1,2,3,11a-四氢-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂~~萘~~-5-酮]

[0292] • 8,8'-[(4-(2-{2-[2-(4-甲基-4-甲基二巯基-戊酰基氨基)-乙氧基]-乙氧基}-乙氧基)-吡啶-2,6-二甲基)-二氧基]-双[(S)-2-亚乙-(E)-基-7-二甲氧基-1,2,3,11a-四氢-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂~~萘~~-5-酮]

[0293] • 8,8'-[(1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-甲基-4-甲基二巯基-戊酰基氨基)-乙氧基]-乙氧基]-乙氧基]-乙氧基}-乙氧基)-苯-3,5-二甲基)-二氧基]-双[(S)-2-亚乙-(E)-基-7-二甲氧基-1,2,3,11a-四氢-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂~~萘~~-5-酮]

[0294] • 8,8'-[(1-(2-{2-[2-(4-甲基-4-甲基二巯基-戊酰基氨基)-乙氧基]-乙氧基})-

乙氧基)-苯-3,5-二甲基)-二氧基]-双[(S)-2-亚乙-(E)-基-7-二甲氧基-1,2,3,11a-四氢-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂~~葑~~-5-酮]

[0295] • 8,8'-[(4-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-甲基-4-甲基二硫基-戊酰基氨基)-乙氧基]-乙氧基]-乙氧基]-乙氧基]-乙氧基}-乙氧基)-吡啶-2,6-二甲基)-二氧基]-双[(S)-2-亚乙-(E)-基-7-二甲氧基-1,2,3,11a-四氢-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂~~葑~~-5-酮]

[0296] • 8,8'-[(1-(2-[甲基(2-甲基-2-甲基二硫基-丙基)-氨基]-乙氧基)-苯-3,5-二甲基)-二氧基]-双[(S)-2-亚乙-(E)-基-7-二甲氧基-1,2,3,11a-四氢-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂~~葑~~-5-酮]

[0297] • 8,8'-[(4-(3-[甲基(4-甲基-4-甲基二硫基-戊酰基)-氨基]-丙基)-吡啶-2,6-二甲基)-二氧基]-双[(S)-2-亚乙-(E)-基-7-二甲氧基-1,2,3,11a-四氢-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂~~葑~~-5-酮]

[0298] • 8,8'-[(4-(3-[甲基(2-甲基-2-甲基二硫基-丙基)-氨基]-丙基)-吡啶-2,6-二甲基)-二氧基]-双[(S)-2-亚乙-(E)-基-7-二甲氧基-1,2,3,11a-四氢-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂~~葑~~-5-酮]

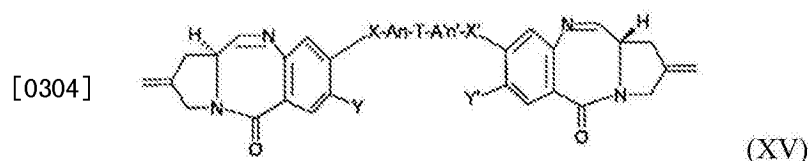
[0299] • 8,8'-[(1-(4-甲基-4-甲基二硫基)-戊酰基氨基)-苯-3,5-二甲基)-二氧基]-双[(S)-2-亚乙-(E)-基-7-二甲氧基-1,2,3,11a-四氢-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂~~葑~~-5-酮]

[0300] 以及相应的巯基衍生物或其药物上可以接受的盐、水合物或水合盐或者这些化合物的多形态晶体结构或它们光学异构体、外消旋物、非对映异构体和对映异构体。

[0301] 具体的化合物是下列式(XIV)或(XV)所示那些:



[0303] 或



[0305] 其中X、X'、A、A'、Y、Y'、T、n、n'是如上式(XII)中定义。

[0306] 可以根据本领域技术人员公知的许多方法制备式(XII)的化合物。可以通过采用或改编下面所描述的方法或本领域技术人员能够理解的变化合成所述化合物。适当的修饰和取代对于本领域技术人员是容易明白的、公知的或者通过科技文献是容易获得的。具体地,这些方法可以在R.C.Larock, Comprehensive Organic Transformations, Wiley-VCH Publishers, 1999中发现。

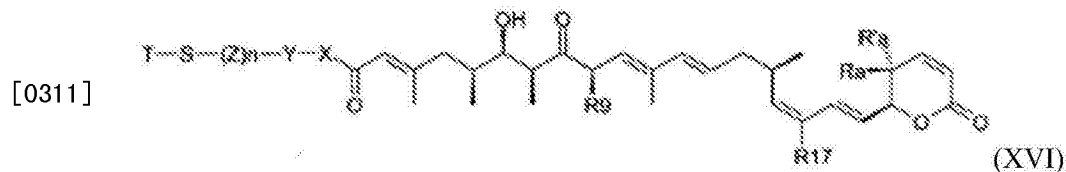
[0307] 可以用于本发明的合成茅屋霉素衍生物的方法描述在国际申请号PCT/IB2007/000142中。可以通过多种合成途径制备本发明的化合物。试剂和原材料是商业上可以获得的,或者容易由本领域普通技术人员通过公知的技术合成的(参见例如WO 00/12508, WO

00/12507, WO 2005/040170, WO 2005/085260, FR1516743, M. Mori等人, 1986, Tetrahedron, 42:3793-3806)。

[0308] 根据本发明的细胞毒性剂还可以是细霉素(leptomycin)衍生物。

[0309] 根据本发明, “细霉素衍生物”指在Kalesse等人(2002), Synthesis 8:981-1003中所定义的细霉素家族的成员, 并且包括: 细霉素如细霉素A和细霉素B, Calystatins, Ratjadone如Ratjadone A和Ratjadone B, Anguinomycin如Anguinomycin A、B、C、D, 春雷霉素(kasusamycin)、Leptolstatin、Leptofuranin如Leptofuranin A、B、C、D。优选细霉素A和B的衍生物。

[0310] 更具体的, 本发明的细霉素衍生物可以具有式(XVI):



[0312] 其中

[0313] Ra和Ra'是H或-Alk; 优选地, Ra是-Alk, 优选甲基且Ra'是H;

[0314] R17是烷基, 所述烷基任选由OR、CN、NRR'、全氟烷基取代; 优选R17是烷基, 更优选是甲基或乙基;

[0315] R9是烷基, 所述烷基任选由OR、CN、NRR'、全氟烷基取代; 优选R9是烷基, 更优选是甲基;

[0316] X是-O-或-NR-; 优选地, X是-NR-;

[0317] Y是-U-、-NR-U-、-O-U-、-NR-CO-U-、-U-NR-CO-、-U-CO-、-CO-U-;

[0318] 优选地, 当X是-O-时, Y是-U-、-NR-U-、-U-NR-CO-;

[0319] 其中U选自直链或支链-Alk-、-Alk(OCH₂CH₂)_m-、-(OCH₂CH₂)_m-Alk-、-Alk(OCH₂CH₂)_m-Alk-、-(OCH₂CH₂)_m-、环烷基-、杂环-、环烷基-Alk-、-Alk-环烷基-、杂环-Alk-、-Alk-杂环-;

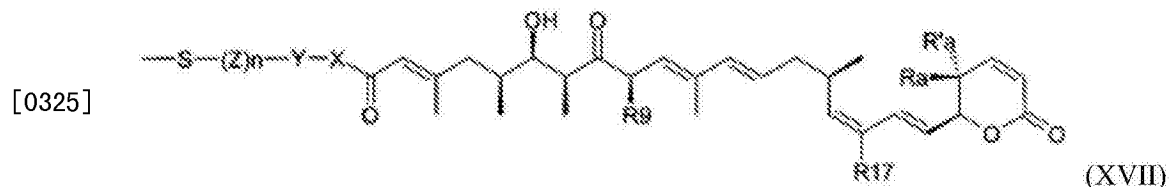
[0320] 其中m是选自1-2000的整数;

[0321] 优选地, U是直链或支链-Alk-;

[0322] Z是-Alk-;

[0323] n是0或1; 优选地, n是0;

[0324] T代表H, 硫醇保护基团例如Ac, R₁或SR₁, 其中R₁代表H、甲基、Alk、环烷基, 任选地取代的芳基或杂环, 或T代表



[0326] 其中

[0327] Ra、Ra'、R17、R9、X、Y、Z、n是如上定义的;

[0328] 优选地, T是H或SR₁, 其中R₁代表Alk, 更优选甲基;

[0329] R和R'相同或不同, 为H或烷基;

[0330] Alk代表直链或支链烷基；优选Alk代表 $-(CH_2-q(CH_3)_q)_p-$ ，其中p代表1-10的整数；且q代表0-2的整数；优选地，Alk代表 $-(CH_2)-$ 或 $-C(CH_3)_2-$ 。

[0331] 或者它们的药物上可以接受的盐、水合物或水合盐，或者这些化合物的多形态晶体结构或它们光学异构体、外消旋物、非对映异构体和对映异构体。

[0332] 具体的化合物可以选自：

[0333] • (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-羟基-3,5,7,9,11,15,17-七甲基-19-((2S,3S)-3-甲基-6-氧代-3,6-二氢-2H-吡喃-2-基)-8-氧代-十九碳-2,10,12,16,18-戊烯酸的(2-甲基硫基-乙基)-酰胺

[0334] • (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-羟基-3,5,7,9,11,15,17-七甲基-19-((2S,3S)-3-甲基-6-氧代-3,6-二氢-2H-吡喃-2-基)-8-氧代-十九碳-2,10,12,16,18-戊烯酸]的二-[(2-硫基乙基)-酰胺

[0335] • (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-羟基-3,5,7,9,11,15,17-七甲基-19-((2S,3S)-3-甲基-6-氧代-3,6-二氢-2H-吡喃-2-基)-8-氧代-十九碳-2,10,12,16,18-戊烯酸的(2-硫基乙基)-酰胺

[0336] • (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-羟基-3,5,7,9,11,15,17-七甲基-19-((2S,3S)-3-甲基-6-氧代-3,6-二氢-2H-吡喃-2-基)-8-氧代-十九碳-2,10,12,16,18-戊烯酸的(2-甲基二硫基-乙基)-酰胺

[0337] • (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-羟基-3,5,7,9,11,15,17-七甲基-19-((2S,3S)-3-甲基-6-氧代-3,6-二氢-2H-吡喃-2-基)-8-氧代-十九碳-2,10,12,16,18-戊烯酸的(2-甲基-2-甲基二硫基-丙基)-酰胺

[0338] • (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-羟基-3,5,7,9,11,15,17-七甲基-19-((2S,3S)-3-甲基-6-氧代-3,6-二氢-2H-吡喃-2-基)-8-氧代-十九碳-2,10,12,16,18-戊烯酸的(2-硫基-2-甲基-丙基)-酰胺

[0339] 或者它们的药物上可以接受的盐、水合物或水合盐，或者这些化合物的多形态晶体结构或它们光学异构体、外消旋物、非对映异构体和对映异构体。

[0340] 为了将衍生物连接至如上述“细胞结合剂”部分定义的细胞结合剂上，衍生物必须包含允许将该衍生物通过连接基连接到细胞结合剂的部分(连接基团)，其中所述连接基例如二硫键、硫键(或本文中称作硫醚)、酸不稳定性基团、光不稳定性基团或酯酶不稳定性基团。制备所述衍生物进而其含有将细霉素衍生物连接至细胞结合剂所必要的部分，例如通经由二硫键、硫醚键、酸不稳定性基团、光不稳定性基团、肽酶不稳定性基团或酯酶不稳定性基团。为进一步增强在水溶液中的溶解度，连接基团可以含有聚乙二醇间隔物。在一个实施方案中，使用硫或二硫连接基，因为靶细胞的还原环境会引起硫键或二硫化物的裂解，并释放伴随细胞毒性增加的衍生物。

[0341] 可以通过多种合成途径制备本发明的化合物。试剂和原材料是商业上可以获得的，或者容易由本领域普通技术人员通过公知技术合成的。用于合成可以用于本发明细胞毒性偶联物的细霉素衍生物的方法以及用于将所述细霉素衍生物偶联至细胞结合剂如抗体的方法详细描述在欧洲专利申请号06290948.6中。

[0342] 在根据本发明的细胞毒性偶联物中所使用的细胞毒性剂也可以是CC-1065或其衍生物。

[0343] CC-1065是有效的抗-肿瘤抗生素,其是从泽耳链霉菌(*Streptomyces zelensis*)的培养液分离的。CC-1065在体外的效力是通常使用的抗癌药物如阿霉素、氨甲蝶呤和长春新碱的大约1000倍(B.K.Bhuyan等人,Cancer Res.42:3532-3537)。CC-1065及其类似物公开在美国专利号6,372,738、6,340,701、5,846,545和5,585,499。

[0344] CC-1065的细胞毒性效力与其烷基化活性及其DNA-结合或DNA-插入活性相关。这两种活性位于分子的不同部分。因此,烷基化活性包含在环丙基吡咯并吲哚(cyclopropapyrroloindole)(CPI)亚基中,DNA-结合活性位于两个吡咯并吲哚亚基中。

[0345] 尽管CC-1065作为细胞毒性剂具有某些吸引人的特征,但其在治疗用途中有限制。将CC-1065施用至小鼠造成延迟的肝中毒,导致单次静脉内剂量12.5 μ g/kg后第50天死亡(V.L.Reynolds等人,1986,J.Antibiotics,XXIX:319-334)。这已经激发了试图开发不会造成延迟毒性的类似物的努力,且已对以CC-1065为模型合成更简单的类似物进行了描述(M.A.Warpehoski等人,1988,J.Med.Chem.31:590-603)。

[0346] 在另一系列类似物中,CPI部分被替换为环丙基苯并吲哚(CBI)部分(D.L.Boger等人,1990,J.Org.Chem.,55:5823-5833;D.L.Boger等人,1991,BioOrg.Med.Chem.Lett.1:115-120)。这些化合物保持亲代药物的高体外效力,而没有在小鼠中引起延迟毒性。与CC-1065类似,这些化合物是烷基化剂,其以共价模式结合至DNA的小沟从而引起细胞死亡。然而,对最有前途的类似物阿多来新(Adozelesin)和卡折来新(Carzelesin)的临床评估得到了令人失望的结果(B.F.Foster等人,1996,Investigational New Drugs,13:321-326;I.Wolff等人,1996,Clin.Cancer Res.,2:1717-1723)。这些药物显示治疗效果差,因为它们系统毒性高。

[0347] 通过经由靶向递送到肿瘤位点改变体内分布,获得对非靶向组织的低毒性,并进而获得较低系统毒性,如此能够大大改善CC-1065类似物的治疗效力。为了达到该目标,已对CC-1065的类似物和衍生物与特异性靶向肿瘤细胞的细胞结合剂的偶联物进行了描述(美国专利5,475,092;5,585,499;5,846,545)。通常这些偶联物显示体外的高度靶特异性细胞毒性,且在小鼠的人肿瘤异种移植模型中表现了出色的抗肿瘤活性(R.V.J.Chari等人,1995,Cancer Res.,55:4079-4084)。

[0348] 最近,已经描述了在水性介质中溶解度增强的CC-1065类似物的前药(欧洲专利申请号06290379.4)。在这些前药中,分子的烷基化部分的酚基用官能团保护,其使得药物在酸性水溶液中保存时仍稳定,并且为药物提供了与未保护的类似物相比提高的水溶性。保护基团在体内生理pH容易裂解以提供相应的活性药物。在EP 06290379.4中所描述的前药中,将酚取代基保护为含有磺酸的氨基甲酸苯酯,其在生理条件具有电荷,且因此具有增强的水溶性。为了进一步增强水溶性,可以将任选的聚乙二醇间隔物引入到吲哚亚基和可裂解连接基如二硫化物基团间的接头中。这种间隔物的引入不会改变药物的效力。

[0349] 合成可以用于本发明细胞毒性偶联物的CC-1065类似物的方法以及用于将这些类似物偶联到细胞结合剂例如抗体的方法详细描述在EP06290379.4和美国专利号5,475,092、5,846,545、5,585,499、6,534,660和6,586,618以及美国申请号10/116,053和10/265,452中。

[0350] 药物如甲氨蝶呤(methotrexate)、柔红霉素(daunorubicin)、阿霉素(doxorubicin),长春新碱(vincristine),长春碱(vinblastine),美法仑(melphalan),丝

裂霉素C(mitomycin C), 苯丁酸氮芥(chlorambucil), 卡奇霉素(calicheamicin), tubulysin和tubulysin类似物, 多卡霉素(duocarmycin)和多卡霉素类似物, 多拉司他汀(dolastatin)和多拉司他汀类似物也适于本发明偶联物的制备。药物分子还可与抗体分子通过中介载体分子如血清白蛋白连接。如在例如美国专利号6,630,579中所述的Doxarubicin和道诺霉素(Danorubicin)化合物也可以是有有效的细胞毒性剂。

[0351] 在本发明具体的实施方案中, 至少一种细胞毒性剂为式(I)的美登素DM1。在本发明另一具体的实施方案中, 至少一种细胞毒性剂是式(II)的美登素DM4。

[0352] 这些细胞毒性剂与如本文公开的细胞结合剂、抗体、抗体的表位结合片段偶联。

[0353] 接头

[0354] 如本文所使用, “接头”意为包含将多肽共价连接至药物部分的共价键或原子链的化学部分。

[0355] 偶联物可通过体外方法来制备。为将药物或前药与细胞结合剂特别是抗体连接, 使用连接基团。合适的连接基团为本领域所熟知且包含二硫化物基团、硫醚基团、酸不稳定性基团、光不稳定性基团、肽酶不稳定性基团和酯酶不稳定性基团。

[0356] 如上述“细胞结合剂”部分定义的细胞结合剂特别是本发明的抗体与如上述“细胞毒性剂”部分定义的细胞毒性剂的偶联可使用多种双功能蛋白偶联剂来制造, 所述双功能蛋白偶联剂包括但不限于N-琥珀酰亚胺基吡啶基二硫代丁酸酯(SPDB)、丁酸4-[(5-硝基-2-吡啶基)二硫]-2,5-二氧代-1-吡咯烷基酯(硝基-SPDB)、4-(吡啶-2-基二硫基)-2-磺基-丁酸(磺基-SPDB)、(2-吡啶基二硫基)丙酸N-琥珀酰亚胺基酯(SPDP)、(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺基酯(SMCC)、亚胺基硫烷(IT)、亚胺基酯的双功能衍生物(例如二亚胺代己二酸二甲酯(dimethyl adipimidate)HCL)、活性酯(如辛二酸二琥珀酰亚胺酯(disuccinimidyl suberate))、醛(如戊二醛)、双-叠氮基化合物(如双(对-叠氮基苯甲酰基)己二胺)、双-重氮衍生物例如双-(对-重氮苯甲酰基)-乙二胺、二异氰酸酯(如甲苯2,6-二异氰酸酯)和双-活性氟化合物(如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。

[0357] 在具体的实施方案中, 所述接头选自下组: N-琥珀酰亚胺基吡啶基二硫代丁酸酯(SPDB)、4-(吡啶-2-基二硫基)-2-磺基-丁酸(磺基-SPDB)和(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺基酯(SMCC)。

[0358] 本发明的偶联物的细胞结合剂可经由可裂解或不可裂解接头与至少一种细胞毒性剂共价连接。

[0359] 接头可为促进细胞毒性剂在细胞中释放的“可裂解接头”。举例来说, 可使用酸不稳定性接头、肽酶敏感性接头、酯酶不稳定性接头、光不稳定性接头或含有二硫化物的接头(例如, 参见美国专利号5,208,020)。接头还可为在一些情况中可能引起更佳耐受的“不可裂解接头”(举例来说SMCC接头)。

[0360] 可替换地, 包含如本发明上述“细胞结合剂”部分定义的细胞结合剂特别是抗体和细胞毒性多肽的融合蛋白可通过重组技术或肽合成来制造。DNA的长度可包含编码偶联物的两个部分的各别区域, 其彼此相邻或通过编码接头肽的区隔开, 该接头肽不会破坏偶联物的预期性质。

[0361] 本发明的细胞结合剂特别是抗体还可通过使多肽与激活前药的酶偶联来用于依赖性酶介导的前药疗法中, 所述酶将前药(例如, 肽基化疗剂, 参见W081/01145)转换为活性

抗癌药物(例如,参见W0 88/07378和美国专利号4,975,278)。可用于ADEPT的免疫偶联物的酶组份包含任何能够以将前药转化为其活性、细胞毒性更强的形式的方式作用于前药的酶。可用于本发明方法中的酶包含但不限于碱性磷酸酶,其可用于将含磷酸酯的前药转化为游离药物;芳基硫酸酯酶,其可用于将含硫酸酯的前药转化为游离药物;胞嘧啶脱胺酶,其可用于将非毒性氟胞嘧啶转化为抗癌药物5-氟尿嘧啶;蛋白酶,如沙雷氏菌(*serratia*)蛋白酶、嗜热菌蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶、羧肽酶和组织蛋白酶(例如组织蛋白酶B和L),其可用于将含肽前药转化为游离药物;D-丙氨酰羧肽酶,其可用于转换含有D-氨基酸取代基的前药;碳水化合物裂解酶,例如O-半乳糖苷酶和神经胺糖酸苷酶,其可用于将糖基化前药转化为游离药物;P-内酰胺酶,其可用于将经P-内酰胺衍生的药物转化为游离药物;和青霉素(*penicillin*)酰胺酶,如青霉素V酰胺酶或青霉素G酰胺酶,其可用于将胺氮处分别经苯氧基乙酰基或苯基乙酰基衍生的药物转化为游离药物。所述酶可通过本领域熟知的技术(如使用上文所论述的异双功能性交联试剂)共价结合至本发明多肽。

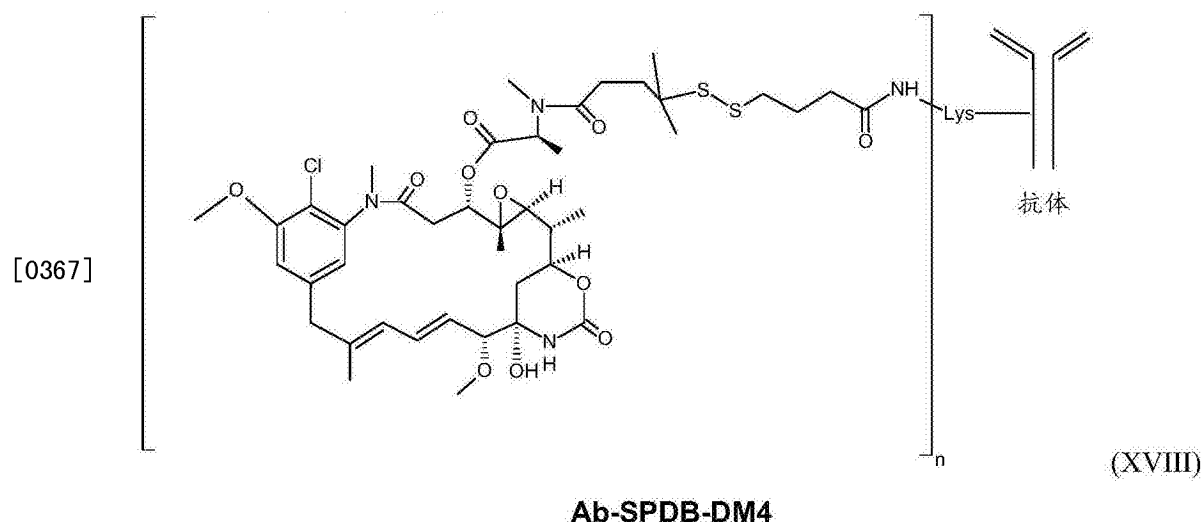
[0362] 根据具体的实施方案,在本发明偶联物中,细胞毒性剂为类美登素,具体为DM1或DM4。

[0363] 在这种偶联物中,如上述“细胞结合剂”部分定义的细胞结合剂特别是抗体通过连接基团偶联至所述至少一种细胞毒性剂。具体地,所述连接基团为不可裂解接头,例如SPDB、磺基-SPDB或SMCC。

[0364] 在具体的实施方案中,所述接头是N-琥珀酰亚胺基吡啶基二硫代丁酸酯(SPDB)且所述细胞毒性剂是DM4。在另一具体的实施方案中,所述接头是4-(吡啶-2-基二硫基)-2-磺基-丁酸(磺基-SPDB)且所述细胞毒性剂是DM4。

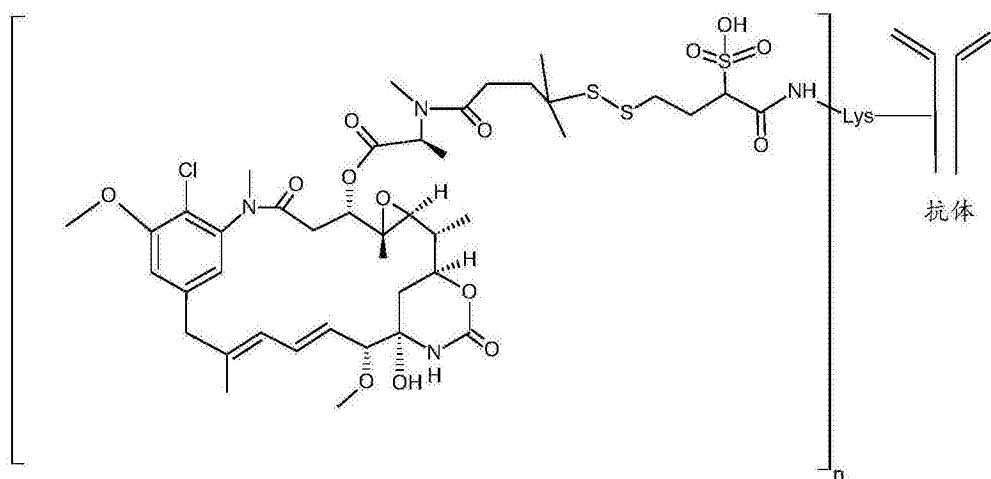
[0365] 更具体地,所述偶联物选自下组:

[0366] i)式(XVIII)的抗体-SPDB-DM4偶联物



[0368] ii)式(XIX)的抗体-磺基-SPDB-DM4偶联物

[0369]



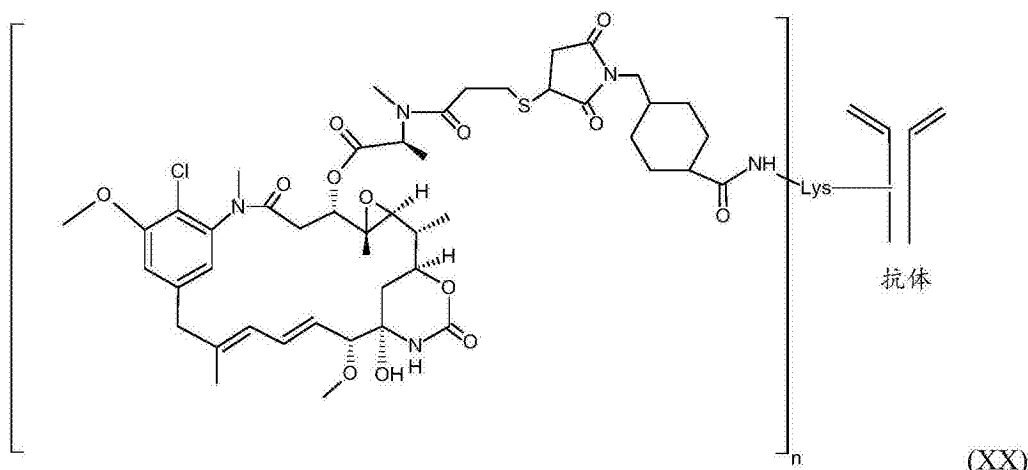
(XIX)

Ab-磺基 SPDB-DM4

[0370] 和

[0371] iii)式(XX)的抗体-SMCC-DM1偶联物

[0372]



(XX)

Ab-SMCC-DM1

[0373] 一般地,可以通过包括下列步骤的方法来获得偶联物:

[0374] (i)使任选缓冲的细胞结合剂(例如根据本发明的抗体)水溶液与接头和细胞毒性化合物的溶液接触;

[0375] (ii)然后,任选地将在(i)中形成的偶联物与未反应的细胞结合剂分开。

[0376] 可以用缓冲剂如例如磷酸钾、乙酸盐、柠檬酸盐或N-2-羟基乙基哌嗪-N'-2-乙磺酸(Hepes缓冲剂)缓冲细胞结合剂水溶液。缓冲剂取决于细胞结合剂的性质。细胞毒性化合物在有机极性溶剂,例如二甲亚砜(DMSO)或二甲基乙酰胺(DMA)中的溶液中。

[0377] 反应温度通常在20℃和40℃间。反应时间可以从1变化至24小时。可以通过具有折射计量和/或UV检测仪的大小排阻层析(SEC)来监测细胞结合剂和细胞毒剂间的反应。若偶联物收率太低,则可以延长反应时间。

[0378] 本领域技术人员可以使用多种不同层析法来实施步骤(ii)的分离:可以例如通过SEC、吸附层析(如离子交换层析,IEC)、疏水相互作用层析(HIC)、亲和层析、混合支持物层析诸如羟磷灰石层析或高效液相层析(HPLC)来纯化偶联物。也可以使用通过透析或渗滤的纯化。

[0379] 如本文中所使用的,术语“聚集体”意为可以在两个或更多个细胞结合剂间形成的缔合物,所述药剂通过偶联修饰或不然。可以在许多参数,如溶液中高浓度的细胞结合剂、溶液的pH、高剪切力、键合二聚体的数目及其疏水特征、温度的影响下形成聚集体(参见Wang和Gosh,2008,J.Membrane Sci.,318:311-316,及其中引用的参考文献);注意到这些中的一些参数的相对影响没有清楚确立。在蛋白质和抗体的情况中,本领域技术人员会参考Cromwell等(2006,AAPS Journal,8(3):E572-E579)。可以用技术人员公知的技术诸如SEC来测定聚集体含量(见Walter等,1993,Anal.Biochem.,212(2):469-480)。

[0380] 在步骤(i)或(ii)后,可以将含有偶联物的溶液进行额外的色谱、超滤和/或渗滤步骤(iii)。

[0381] 在这些步骤结束时在水溶液中回收偶联物。

[0382] 在本发明其中细胞毒性剂是类美登素的实施方案中,为将类美登素连接至如上文“细胞结合剂”部分中所定义的细胞结合剂如包含序列SEQ ID NO:9的重链和序列SEQ ID NO:10的轻链的人源化huDS6抗体连接,类美登素可包含连接部分。连接部分包含允许在特定位点的完全活性的类美登素释放的化学键。合适的化学键为本领域熟知且包括二硫键、酸不稳定键、光不稳定性键、肽酶不稳定性键和酯酶不稳定性键。优选地为二硫键。

[0383] 连接部分还包含具有反应性的化学基团。在实施方案中,具有反应性的化学基团可与类美登素经由二硫键连接部分共价连接。

[0384] 具体的具有反应性的化学基团为N-琥珀酰亚胺酯和N-磺基琥珀酰亚胺酯。

[0385] 具体的包含含有具有反应性的化学基团的连接部分的类美登素为类美登素的C-3酯和其类似物,其中连接部分包含二硫键且化学反应基团包含N-琥珀酰亚胺酯和N-磺基琥珀酰亚胺酯。

[0386] 类美登素上的许多位置可作为与连接基团化学连接的位置发挥作用。举例来说,具有羟基的C-3位置,具有羟甲基修饰的C-14位置,具有羟基修饰的C-15位置和具有羟基基团的C-20位置都预期有用。然而,C-3位置是优选的且美登醇的C-3位置是特别优选的。

[0387] 尽管就含有二硫键的连接部分而言,已描述了具有连接部分的美登醇的酯类合成,本领域的技术人员将理解具有其他化学键的连接部分(如上文所述)也可用于本发明,就如其他类美登素也可以。其他化学键的具体实例包括酸不稳定性键、光不稳定性键、肽酶不稳定性键和酯酶不稳定性键。美国专利号5,208,020的内容教导了具有这种键的类美登素的产生。

[0388] 具有携带反应性基团的二硫部分的类美登素和类美登素衍生物的合成描述于美国专利号6,441,163和6,333,410和美国申请号10/161,651中。

[0389] 包含具有反应性的基团的类美登素如DM1与如上文“细胞结合剂”部分所定义的细胞结合剂特别是抗体(如包含序列SEQ ID NO:9的重链和序列SEQ ID NO:10的轻链的人源化huDS6抗体)反应以产生细胞毒性偶联物。这些偶联物可通过HPLC或通过凝胶过滤纯化。

[0390] 在美国专利号6,333,410和美国申请号09/867,598、10/161,651和10/024,290中提供了数种用于产生这种细胞结合剂-类美登素特别是抗体-类美登素偶联物的出色的方案。

[0391] 一般而言,在水性缓冲剂中的抗体溶液可与摩尔过量的具有携带反应性基团的二硫部分的类美登素一起温育。反应混合物可通过添加过量的胺(如乙醇胺、牛磺酸等)淬灭。

类美登素-抗体偶联物随后可通过凝胶过滤纯化。

[0392] 每抗体分子结合的类美登素分子数目可通过分光光度测量在252nm和280nm处的吸光度的比率确定。优选平均1-10个类美登素分子/抗体分子。

[0393] 类美登素与细胞结合剂可使用PEG连接基团连接,如美国专利申请号10/024,290中所述。这些PEG连接基团在水和在非水溶剂中都可溶,且可用于将一种或多种细胞毒性剂与细胞结合剂接合。示例性的PEG连接基团包括异双功能PEG接头,其在一个末端通过功能性巯基或二巯基团且在另一端通过活性酯与细胞毒性剂和细胞结合剂在接头的相反末端结合。

[0394] 作为使用PEG连接基团合成细胞毒性偶联物的一般实例,具体细节再次参照美国申请号10/024,290。合成始于一种或多种带有反应性PEG部分的细胞毒性剂与细胞结合剂的反应,导致通过细胞结合剂(如包含序列SEQ ID NO:9的重链和序列SEQ ID NO:10的轻链的人源化huDS6抗体)的氨基酸残基替代每种反应性PEG部分的末端活性酯,以获得包含与细胞结合剂通过PEG连接基团共价键合的一种或多种细胞毒性剂的细胞毒性偶联物。

[0395] 可使用任何技术来形成本发明的偶联物分子。具体地,可以经由酸不稳定性接头,或者通过光不稳定性接头来连接本发明的茅屋霉素衍生物与抗体或如上文“细胞结合剂”部分中所定义的其他细胞结合剂。可以将衍生物与具有合适序列的肽缩合,随后与细胞结合剂连接以生成肽酶不稳定性接头。可以将偶联物制备为含有伯羟基基团,其可以琥珀酰化,并且与细胞结合剂连接以生成可以通过胞内酯酶裂解而释放游离衍生物的偶联物。优选地,将衍生物合成为含有游离的或受保护的硫醇基团,然后经由二硫键或硫醚连接来将一种或多种含有二硫化物或硫醇的衍生物分别与细胞结合剂共价连接。

[0396] US专利号5,416,064和5,475,092中教导了多种偶联方法。可以修饰茅屋霉素衍生物以获得游离的氨基基团,且随后经由酸不稳定性接头或光不稳定性接头连接至抗体或其它细胞结合剂。可以将具有游离氨基或羧基基团的茅屋霉素衍生物与肽缩合,随后与细胞结合剂连接以生成肽酶不稳定性接头。可以将接头上具有游离羟基基团的茅屋霉素衍生物琥珀酰化,并且与细胞结合剂连接以生成可以通过胞内酯酶裂解而释放游离的药物的偶联物。最优选地,处理茅屋霉素衍生物以生成游离的或受保护的硫醇基团,随后经由二硫键将含有二硫化物或硫醇的茅屋霉素二聚体与细胞结合剂连接。

[0397] 在一个实施方案中,单克隆抗体或细胞结合剂-茅屋霉素衍生物偶联物是那些经由二硫键连接的偶联物,如上文所讨论的,其能够递送茅屋霉素衍生物。通过已知方法如通过用琥珀酰亚氨基吡啶基-二硫代丙酸酯(SPDP)修饰单克隆抗体(Carlsson等,1978, Biochem.J., 173:723-737)来制备这种细胞结合偶联物。随后通过用含有硫醇的茅屋霉素衍生物处理来置换所得的硫代吡啶基基团以生成二硫化物连接的偶联物。可替换地,在芳基二硫代茅屋霉素衍生物的情况下,通过用先前导入抗体分子中的巯基基团直接置换茅屋霉素衍生物的芳基-硫醇来影响细胞结合偶联物的形成。可以很容易地通过任一方法制备含有经由二硫桥连接的1至10个茅屋霉素衍生物的偶联物。

[0398] 更具体地,用含有硫醇的茅屋霉素衍生物(1.3摩尔当量/二硫代吡啶基基团)处理在含有2mM EDTA的0.05M磷酸钾缓冲液(pH 7.5)中的2.5mg/ml浓度的经二硫代-硝基吡啶基修饰的抗体的溶液。用分光光度法于325nm监测从修饰的抗体释放的硫醇硝基吡啶,并且在约16小时中完成。通过凝胶过滤通过Sephadex G-25或Sephacryl S300柱将抗体-茅屋霉

素衍生物偶联物纯化,并且去掉未反应的药物和其它低分子量材料。可以通过测量230nm和275nm的吸光度比率来测定每个抗体分子结合的茅屋霉素衍生物部分数目。可通过此方法经由二硫键连接平均1-10个茅屋霉素衍生物分子/抗体分子。

[0399] 可以使用先前由Liu等,1996,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,93:8618-8623所描述的方法来测定偶联对针对抗原表达细胞的结合亲和力的影响。可以通过细胞增殖曲线的反推来测量茅屋霉素衍生物及其抗体偶联物对细胞系的细胞毒性,如Goldmacher等,1985,J.Immunol.,135:3648-3651所述。可以通过克隆形成(clonogenic)测定法来测定这些化合物对粘着细胞系的细胞毒性,如Goldmacher等,1986,J.Cell Biol.,102:1312-1319所述。

[0400] 药物比抗体比率

[0401] 根据实施方案,根据本发明的偶联物特征在于如通过DAR UV测量的“药物比抗体比率”(或“DAR”)为1-10,举例来说2-5、具体3-4,更具体地3.5。这一般是包括类美登素分子的偶联物的情况。

[0402] 此DAR值可随所使用细胞结合剂特别是抗体和药物(即细胞毒性剂)的性质以及用于偶联的实验条件(如细胞毒性剂/细胞结合剂比率、反应时间、溶剂和共溶剂(如果存在)的性质)而变化。因此,细胞结合剂与细胞毒性剂间的接触导致包含数种药物对抗体比率彼此不同的偶联物;任选地裸细胞结合剂;任选地聚集物。因此,所测定的DAR为平均值。

[0403] 可用于测定DAR(此处成为DAR UV)的方法包括以分光光度计方式测量基本上纯化的偶联物溶液在 λ_D 与280nm的吸光度的比率。280nm是通常用于测量蛋白质浓度例如抗体浓度的波长。选择波长 λ_D 进而允许辨别药物与抗体,即如本领域的技术人员所知, λ_D 是药物具有高吸光度的波长且 λ_D 与280nm距离足够远以避免药物与抗体吸收峰的大量重叠。在类美登素分子的情况下 λ_D 可选择为252nm。DAR计算的方法可源自Antony S.Dimitrov(编辑),LLC,2009,Therapeutic Antibodies and Protocols,第525,445卷,Springer Science:

[0404] 偶联物在 λ_D (A_{λ_D})和280nm(A_{280})的吸光度使用典型分光光度计装置(以允许计算“DAR”参数)测量。吸光度可如下表示:

$$[0405] \quad A_{\lambda_D} = (C_D \times \epsilon_{D\lambda_D}) + (C_A \times \epsilon_{A\lambda_D})$$

$$[0406] \quad A_{280} = (C_D \times \epsilon_{D280}) + (C_A \times \epsilon_{A280})$$

[0407] 其中:

[0408] C_D 和 C_A 分别为溶液中药物和抗体的浓度

[0409] $\epsilon_{D\lambda_D}$ 和 ϵ_{D280} 分别为药物在 λ_D 和280nm下的摩尔消光系数

[0410] $\epsilon_{A\lambda_D}$ 和 ϵ_{A280} 分别为抗体在 λ_D 和280nm下的摩尔消光系数。

[0411] 对这两个具有两个未知数的等式进行解析产生以下等式:

$$[0412] \quad C_D = [(\epsilon_{A280} \times A_{\lambda_D}) - (\epsilon_{A\lambda_D} \times A_{280})] / [(\epsilon_{D\lambda_D} \times \epsilon_{A280}) - (\epsilon_{A\lambda_D} \times \epsilon_{D280})]$$

$$[0413] \quad C_A = [A_{280} - (C_D \times \epsilon_{D280})] / \epsilon_{A280}$$

[0414] 随后自药物浓度对抗体浓度的比率计算平均DAR: $DAR = C_D / C_A$ 。

[0415] 在具体的实施方案中, λ_D 是252nm。

[0416] 相应地,在具体的实施方案中,所述偶联物的特征在于药物比抗体比率(DAR)为3-4,具体为3.5,从细胞毒性剂浓度(C_D)比西细胞结合剂的浓度(C_A)的比率计算DAR;

$$[0417] \quad DAR = C_D / C_A$$

[0418] 其中

[0419] $C_D = [(\epsilon_{A280} \times A_{252}) (\epsilon_{A252} \times A_{280})] / [(\epsilon_{D252} \times \epsilon_{A280}) (\epsilon_{A252} \times \epsilon_{D280})]$

[0420] $C_A = [A_{280} - (C_D \times \epsilon_{D280})] / \epsilon_{A280}$

[0421] 且

[0422] ϵ_{D252} 和 ϵ_{D280} 分别为细胞毒性剂在252nm和280nm的摩尔消光系数,

[0423] ϵ_{A252} 和 ϵ_{A280} 分别为细胞结合剂在252nm和280nm的摩尔消光系数,且

[0424] A_{252} 和 A_{280} 分别为偶联物在252nm(A_{252})和280nm(A_{280})的吸光度,使用经典分光光度设备测量。

[0425] 治疗

[0426] 发明人证明患有癌症的患者特别是乳腺癌或卵巢癌患者,更具体地乳腺癌患者当对她施用偶联物SAR566658至少120mg/m²的剂量时展示了至少一种特定的响应。

[0427] 本发明因此涉及用于治疗癌症的偶联物,其包含:(i)与人粘蛋白-1(MUC1)糖蛋白结合的细胞结合剂,如上文“细胞结合剂”部分中定义,其与(ii)至少一种细胞毒性剂(如上文“细胞毒性剂”部分定义)连接,其中所述偶联物以至少120mg/m²的剂量施用。

[0428] 本发明还涉及偶联物用于制造目的在于治疗癌症的药物的用途,所述偶联物包含:(i)与人粘蛋白-1(MUC1)糖蛋白结合的细胞结合剂,如上文“细胞结合剂”部分中定义,其与(ii)至少一种细胞毒性剂(如上文“细胞毒性剂”部分定义)连接,其中所述偶联物以至少120mg/m²的剂量施用。

[0429] 本发明还涉及用于在患者中治疗癌症的方法,其包括向对其有需要的患者施用至少120mg/m²的剂量偶联物,所述偶联物包含:(i)与人粘蛋白-1(MUC1)糖蛋白结合的细胞结合剂的,如上文“细胞结合剂”部分中定义,其与(ii)至少一种细胞毒性剂(如上文“细胞毒性剂”部分定义)连接。

[0430] 在本发明的上下文中,如本文使用,术语“治疗”或“进行治疗”意为逆转、减轻应用该术语的病症或病况、抑制所述病症或病况的进程或预防所述病症或病况,或这些病症或病况的一种或多种症状。

[0431] 如本文使用的术语“治疗癌症”意为抑制肿瘤恶性细胞的生长和/或从所述肿瘤转移的进程。这种治疗也使得肿瘤生长消退,即可测量的肿瘤大小的减少。在具体的实施方案中,这种治疗使得肿瘤或转移部分消退。在另一具体的实施方案中,这种治疗使得肿瘤或转移完全消退。

[0432] 根据本发明,术语“患者”或“对其有需要的患者”意在针对受恶性肿瘤影响或可能受影响的人或非人哺乳动物。

[0433] 在具体的实施方案中,待治疗的患者可能已在之前用其他抗癌疗法进行了治疗。具体地,待治疗的患者之前可能已经用基于奥沙利铂、顺铂、卡铂和/或紫杉醇、多西紫杉醇的方案进行了治疗。

[0434] 本发明偶联物的“治疗上有效的量”意为以合理的益处/风险比可应用至任何医学治疗的对于治疗所述癌症疾病足够的偶联物的量。然而,可以理解的是本发明偶联物的每日总用量将通过主治医师在合理医学判断范围内决定。对于任何特定患者的具体治疗上有效的剂量水平将取决于多种因素,包括待治疗的病症和病症的严重程度;具体采用的偶联物的活性;采用的具体组合物、患者的年龄、体重、一般健康、性别和饮食;施用时间,施用途径和采用的具体偶联物的排泄率;治疗持续时间;与具体采用的具体偶联物组合或同时使

用的药物和类似的医学领域熟知的因素。

[0435] 在具体的实施方案中,施用至患者的偶联物治疗上有效的量为 $120\text{mg}/\text{m}^2$ – $240\text{mg}/\text{m}^2$ 的剂量,更具体地 $150\text{mg}/\text{m}^2$ – $240\text{mg}/\text{m}^2$,特别是 $190\text{mg}/\text{m}^2$ 的剂量。

[0436] 在进一步的实施方案中,将本发明的偶联物根据取决于待治疗患者(年龄、体重、治疗史等)的方案重复施用,其可通过熟练的医师确定。在本发明的一方面中,根据在每次施用间具有3周间隔的间歇性的程序将本发明的偶联物施用至患者,取决于对之前施用的耐受,所述间隔可延长1–2周。相应地,在具体的实施方案中,偶联物的施用每3周作为新周期重复。

[0437] 在进一步的实施方案中,周期的中位数是2。

[0438] 本发明的偶联物可以药物组合物的形式施用,所述药物组合物包含药物上可接受的赋形剂,且任选地包含缓释基质如可生物降解的聚合物以形成治疗组合物。

[0439] “药学上”或“药学上可接受”指当施用至哺乳动物、尤其是人(如果合适)时并不产生不利、过敏或其他不良反应的分子实体和组合物。药学上可接受的载剂或赋形剂是指无毒性固体、半固体或液体填充剂、稀释剂、封装材料或任何类型的配制辅助剂。

[0440] 包含本发明的偶联物的药物组合物的形式和施用途径天然取决于待治疗的病况、疾病的严重程度、患者的年龄、体重和性别等。

[0441] 本发明的偶联物可经配制以供局部、口服、非胃肠、鼻内、静脉内、肌肉内、皮下或眼内施用等。在具体的实施方案中,本发明的偶联物静脉内施用。

[0442] 具体地,包含本发明的偶联物的药物组合物可含有对于能够注射的制剂为药学上可接受的媒介。这些可具体为等渗、无菌、盐水溶液(磷酸一钠或磷酸二钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙或氯化镁等等或所述盐的混合物),或在视情况添加无菌水或生理盐水后允许构成可注射溶液的干燥、尤其是冻干的组合物。

[0443] 为制备药物组合物,可将有效量的本发明偶联物溶解或分散于药学上可接受的载剂或水性介质中。

[0444] 适于可注射使用的药物形式包括无菌水性溶液或分散液和无菌粉末以供临场制备无菌可注射溶液或分散液。在所有情况中,所述形式必须无菌且必须以存在易注射性的程度流动。其必须在制造和储存条件下稳定且必须针对如细菌和真菌等微生物的污染作用进行防腐。

[0445] 载剂还可为溶剂或分散介质,其包括例如水、乙醇、多元醇(如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)及其合适的混合物。可保持合适的流动性,例如通过包衣如卵磷脂的使用,在分散液的情况中通过维持所需颗粒大小和通过使用表面活性剂、稳定剂、冷冻保护剂或抗氧化剂。微生物作用的预防可通过抗细菌和抗真菌剂带来。在许多情况中,优选包括等渗剂例如糖或氯化钠。

[0446] 无菌可注射溶液可通过将所需量的活性化合物与视需要上文所列举的几种其他成份并入适当溶剂中,随后进行过滤灭菌进行制备。一般而言,分散液通过将各种无菌活性成份并入含有基本分散介质和来自那些上文所列举成份的所需其他成份的无菌媒介中进行制备。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况中,优选制备方法是真空干燥和冷冻干燥技术,其可从预先经无菌过滤的溶液产生由活性成份加上任一期望的额外成份构成的粉末。

[0447] 配制后,溶液将以与剂量配制物兼容的方式并以治疗有效的量来施用。配制物可容易地以如上文所述的可注射溶液类型等多种剂型施用,但还可采用药物释放胶囊等。

[0448] 例如,对于水性溶液的非胃肠施用,溶液(如果必要)应经适当缓冲且借助足量盐水或葡萄糖首先使液体稀释剂等渗。这些特定的水性溶液尤其适于静脉内、肌内、皮下和腹膜内施用。就此而言,在本发明启示下,本领域技术人员会知晓可以采用的无菌水性介质。举例来说,可将一个剂量溶解于1ml NaCl等渗溶液中并添加至1000ml皮下注射液中或在所提出的输注位点处注射(例如,参见“Remington's Pharmaceutical Sciences”第15版,第1035-1038页和第1570-1580页)。取决于所治疗受试者的情况,剂量必然将发生一些变化。负责施用的人在任何情况中将决定个体受试者的合适剂量。

[0449] 在具体的实施方案中,本发明的偶联物以1mL/min的速率适当地静脉内施用30分钟且随后在不存在超敏反应时增加至2mL/min的最大速率。

[0450] 根据本发明待治疗的癌症包括任何类型的恶性肿瘤,特别是实体瘤,如乳腺癌和卵巢癌。

[0451] 在一个实施方案中,根据本发明待治疗的癌症为CA6阳性肿瘤。在进一步的实施方案中,待治疗的癌症是乳腺癌,更具体为三阴性乳腺癌,其对雌激素、孕酮或HER2受体都为非阳性。

[0452] 本发明的偶联物可与药物组合施用以预防或控制角膜炎,特别是与角膜炎预防或治疗性的眼用组合物组合施用。

[0453] 序列简述

[0454]	SEQ ID	序列	描述
	1	SYNMH	huDS6 的 CDR1-H

[0455]

2	YIYPGNGATNYNQKFKG	huDS6 的 CDR2-H
3	GDSVPFAY	huDS6 的 CDR3-H
4	SAHSSVSFMH	huDS6 的 CDR1-L
5	STSSLAS	huDS6 的 CDR2-L
6	QQRSSFPLT	huDS6 的 CDR3-L
7	QAQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKASGY TFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGYIYP GNGATNYNQKFQGKATLTADPSSSTAY MQISLTSEDSAVYFCARGDSVPFAYW GQGTLLTVSA	huDS6 的重链可变区
8	EIVLTQSPATMSASPGERVITITCSAHSSV SFMHWFQKPGTSPKLWIYSTSSLAS GVPARFGGSGSGTSYSLTISSMEAEDAA TYYCQQRSSFPLTFGAGTKLELKR	huDS6 的轻链可变区
9	QAQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKASGY TFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGYIYPG NGATNYNQKFQGKATLTADPSSSTAYM QISLTSEDSAVYFCARGDSVPFAYWGQ GTLTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK	huDS6 的重链

[0456]	10 EIVLTQSPATMSASPGERVITCSAHSSV SFMHWFQQKPGTSPKLWIYSTSSLASGV PARFGGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATY YCQQRSSFPLTFGAGTKLELKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSITLTLSKADYEEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC	huDS6 的重链
--------	--	-----------

[0457] 附图简述

[0458] 图1在剂量递增测定中根据剂量水平和考虑的关键事件总结治疗的患者。

[0459] 图2展示了在实施例展示的治疗过程中观察到的最差等级眼毒性。

[0460] 图3展示了在实施例的2.6.3节中测量的DLC0减少(每患者和每周期)。

实施例

[0461] 材料和方法

[0462] 试验设计

[0463] 将本试验设计作为化合物SAR566658的开放标签、剂量递增研究,其每3周通过静脉内(IV)输注作为单一作用剂在具有CA6阳性和难治型实体瘤的成人患者中施用以确定SAR566658的最大耐受剂量(MTD)。

[0464] 主要终点

[0465] 为确定每三周SAR566658IV的剂量限制毒性(DLT)和最大耐受剂量(MTD),根据National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events Version 4.03(NCI CTCAE v.4.03)对毒性进行分级。

[0466] 除非与SAR566658化合物无关,将剂量限制毒性定义为在研究治疗最初3周中下列任何事件:

[0467] ○血液学毒性:

[0468] -连续7天或更多天的4级嗜中性白细胞减少症,

[0469] -发热性嗜中性白细胞减少症或嗜中性白细胞减少症感染,

[0470] -4级血小板减少症,或具有3级血小板减少症的需要输血的出血。

[0471] ○非血液学毒性:

[0472] -4级输液反应或3级输液反应,如果所述输液反应不能在24小时内解决,且不能施用IMP的完整剂量,

[0473] -4级呕吐或3级恶心或呕吐在48小时内未解决至≤1级,尽管已进行充分的止吐治疗,

[0474] -任何其他3级或更高级非血液学临床副作用事件(AE),

[0475] -任何3级或更高级实验室异常,

[0476] -由于延迟恢复至基线或等级≤1,导致治疗延迟多于2周的与SAR566658相关的任

何毒性。

[0477] 剂量递增规则

[0478] 10mg/m²的剂量为SAR566658的初始剂量水平(DL)。

[0479] 基于在治疗的最初周期观察到的毒性,将加速剂量递增方案用于两次最初的DL 10mg/m²和20mg/m²:1患者每DL且2DL间100%剂量递增直至报告任何等级≥2的SAR566658-相关AE。如果由患者报告SAR566658-相关AE等级≥2,则将两名额外患者以相同DL治疗且剂量递增不得按经典方案进行。

[0480] 即使不存在毒性,从40mg/m²的DL,剂量递增按经典方案(“3+3”)进行。剂量增加25%-50%,而不是100%,且顺序组群的各具有CA6-阳性晚期实体瘤的3-6位患者每3周用SAR566658相继更高的剂量治疗。直至追踪至少3位以现有剂量水平治疗的患者至少3周且满足下文描述的剂量递增准则时,才可纳入更高剂量水平:

[0481]

在周期 1 于给定 DL 的具有 DLT 的患者数目	剂量递增决定准则
最初 3 位中的 0 位	使至少 3 位患者在下一剂量水平进入
3 位中≥2	剂量递增将停止。如果≤3 位患者在该剂量治疗,则三位(3)额外患者在之前 DL 进入。
3 位中的 1 位	在该 DL 至多 6 位患者进入。

[0482]

	如果 3 位额外患者中的 0 位经历 DLT, 则随后进行下一剂量水平。 如果至多 3 位额外患者中的 1 位或更多经历 DLT, 则随后停止剂量递增。如果≤3 位患者在该剂量治疗, 则三(3)位额外的患者在之前 DL 进入。
--	---

[0483] 研究群体

[0484] 对于具有CA6阳性实体瘤的患者,无可用的标准疗法。

[0485] 通过免疫组化(IHC)定义的CA6的阳性(即≥30%的肿瘤细胞为温和至强烈的膜染色)在中心实验室于最新获得的肿瘤样品上评估。

[0486] SAR566558

[0487] 制剂:SAR566558作为在30mL玻璃小瓶中含有用于输液125mg的溶液的25mL萃取浓缩物。

[0488] 施用途径:SAR566558通过IV输注以1mL/min的速率施用30分钟且随后在不存在超敏反应的情况下增加至2mL/min的最大速率。

[0489] 剂量方案/持续时间: SAR566658在第1天施用,每21天重复。其构成治疗的1个周期。患者可持续治疗直至疾病进展、不可接受的毒性或自愿停止,随后是最少30天的随访。

[0490] 在最后的患者在剂量递增阶段治疗后(周期2的结尾)计划首次试验截止日期,进而使所有患者具有至少2个可评估的周期。首次试验截止日期实际上在最后的患者在剂量递增阶段治疗后的5周实施。因此仅将该患者的周期1包括在内。

[0491] 研究时期

[0492] 首位患者治疗的日期:2010年9月15日

[0493] 最后的患者治疗的日期:2013年6月12日

[0494] 患者数目

[0495] ■参与的:43

[0496] ■治疗的:34

[0497] ■可评估的:

[0498] -安全性:34

[0499] -DLT:34

[0500] -药代动力学:33

[0501] -药效学:34

[0502] -效力:33

[0503] 结果

[0504] 1.研究患者

[0505] 1.1.患者责任

[0506] 从2010年9月15日至2013年6月12日,在美国2处和欧洲2处(1处在西班牙且1处在法国),43位患者进入该I期研究的递增步骤且34位进行了治疗。

[0507] 1.2.研究处置

[0508] 在34位患者中,28位停止了研究治疗,6位仍在治疗中。在SAR566658治疗的群体中最普遍的治疗停止原因是如表1中所述的‘进行性疾病’。其他治疗停止的原因对3位患者为不良事件(AE):#840002 019在120mg/m²(胰腺癌患者中肝功能检查增加),#840002 029在190g/m²(在胰腺癌患者中不相关的肺栓塞),#840001037在240mg/m²(相关的腹泻和呕吐)。

[0509] 表1-研究治疗停止的原因(治疗的群体)

[0510]

	最初计划的 SAR566658 剂量水平(mg/m ²)						全部 剂量
	≤60 (N=11)	90 (N=3)	120 (N=3)	150 (N=3)	190 (N=6)	240 (N=8)	
原因 ^a							
不良经历	0	0	1	0	1	1	3
进行性疾病 ^b	11	3	2	3	4	2	25
同意撤出							0
其他							0
全部	11 / 11	3 / 3	3 / 3	3 / 3	5 / 6	3 / 8	28 / 34

[0511] ^a—一种原因每患者

[0512] ^b包括放射影像学记录的疾病进展和/或生物学进展”

[0513] 1.3.人口统计学和基线特征

[0514] 已知在基线的患者特征数据示于表2中。

[0515] 大量患者为女性(23/34,68%),年龄32-77岁(11位患者 ≥ 65)且具有良好的ECOG表现状态(100%0或1级)。

[0516] 原发肿瘤位置是多样的,但卵巢癌是最常见的肿瘤(13/34,38%),随后为胰腺(10/34,29%)和乳腺(4/34,12%)。癌瘤(carcinoma)是最常见的组织学类型,主要为腺癌(13/34,38%)和上皮癌(13/34,38%,全部为卵巢癌)。

[0517] 最频繁涉及的器官为:肝脏(18/34,53%)、腹膜(13/34,38%)、淋巴结(13/34,38%)和肺(11/34,32%)。

[0518] 表2-人口统计学和基线特征

[0519]

	最初计划的 SAR566658 剂量水平 (mg/m ²)						全部剂量
	≤60	90	120	150	190	240	
患者总数	11	3	3	3	6	8	34
性别							
男性	2	3	1	1	3	1	11 (32.4%)
女性	9	0	2	2	3	7	23 (67.6%)
年龄(岁)							
中位数(最小-最大)	66 (32-70)	49 (37-64)	64 (55-65)	60 (58-63)	50 (48-77)	57 (42-70)	58.5 (32-77)
≥65	6	0	1	0	2	2	11
首次输注前的 ECOG 表现状态							
0	5	1	2	2	2	5	17 (50%)
1	6	2	1	1	4	3	17 (50%)
原发肿瘤的解剖部位							
卵巢	4	0	2	0	1	6	13
胰腺	4	1	1	0	3	1	10
乳腺	2	0	0	1	1	0	4
头和颈	1	2	0	0	0	0	3
肺	0	0	0	0	1	1	2
其他 ^a	0	0	0	2	0	0	2
涉及的器官数目							
中位数 (最小-最大)	3 (1-4)	1 (1-4)	2 (1-3)	2 (1-4)	2.5 (2-3)	2.5 (1-4)	2.5 (1-4)
涉及的主要器官							
肝脏	6	2	0	2	5	3	18
腹膜	4	0	2	1	2	4	13
肺	4	1	1	1	0	4	11
淋巴结	4	1	1	1	2	4	13
之前的放射治疗							
是	5	2	1	2	3	0	13

[0520] ^a包括膀胱癌和子宫内膜癌(每种有1位患者)

[0521] 如表3所述,全部患者对于CA6的表达(IHC)在研究入口都是可评估的。二十七位患者(27/34,79.4%)具有CA6阳性肿瘤,其具有至少30%具有2+和3+膜染色强度的阳性肿瘤细胞。七位患者具有低于该阈值的染色细胞百分数,因为他们中的大多数都在修正案3中的该阈值实施前被纳入。

[0522] 表3-膜CA6表达(免疫组化试验)

[0523]

在类别为强度分数 2+或 3+的染色细胞%	N (%)
[0-10[	6 (17.6%)
[10-20[	0
[20-30[	1
[30-50[	12 (35.3%)
[50-80[	12 (35.3%)
[80-100[	3 (8.8%)

[0524] 2. 结果-安全性

[0525] 2.1. 剂量和持续时间

[0526] 在34位患者中施用共114个周期:19个周期在剂量水平 $\leq 60\text{mg}/\text{m}^2$,7个周期在剂量水平 $90\text{mg}/\text{m}^2$,17个周期在剂量水平 $120\text{mg}/\text{m}^2$,23个周期在剂量水平 $150\text{mg}/\text{m}^2$,18个周期在剂量水平 $190\text{mg}/\text{m}^2$ 且30个周期在剂量水平 $240\text{mg}/\text{m}^2$,如表4中所述。

[0527] 整体的周期中位数为2,范围在1-14(在 $120\text{mg}/\text{m}^2$)。然而,在剂量 $\geq 120\text{mg}/\text{m}^2$ 接受的周期数目相比较低剂量更高,在较低剂量中大多数患者由于1或2周期后的疾病进展而停止。

[0528] 观察到少数几个周期的延迟(18/114周期),且其大多数是由于在剂量 $\geq 150\text{mg}/\text{m}^2$ 时的角膜炎,其为预期的SAR566658毒性。

[0529] SAR566658剂量的减少非常少(7/114周期)且其中的5位由于角膜炎从 $240\text{mg}/\text{m}^2$ 减少至 $190\text{mg}/\text{m}^2$ (表4)。

[0530] 相对剂量强度(RDI)在全部剂量水平接近1,除了在 $240\text{mg}/\text{m}^2$ (0.79),原因是6/8患者中的周期延迟和/或剂量减少。

[0531] 表4-周期数目-剂量修饰

[0532]

	最初计划的 SAR566658 剂量水平(mg/m^2)						全部剂量
	≤ 60	90	120	150	190	240	
患者的 N	11	3	3	3	6	8	34
具 ≥ 1 的周期延迟的患者 N	1	0	2	3	2	5	13
周期的 N							
总数	19	7	17	23	18+	30+	114+

[0533]

	最初计划的 SAR566658 剂量水平(mg/m^2)						全部剂量
	≤ 60	90	120	150	190	240	
中位数[范围]	2 [1-4]	2 [2-3]	2 [1-14]	8 [5-10]	2+ [2-6]	3.5 [1-9]	2 [1-14]
周期延迟的 N	1	0	2	7	3	5	18
中位数 RDI	0.98	0.99	0.95	0.88	1.00	0.79	
[范围]	[0.9-1.0]	[1.0-1.0]	[0.8-1.0]	[0.8-0.9]	[0.8-1.0]	[0.7-1.0]	
中位实际剂量强度 ($\text{mg}/\text{m}^2/\text{周}$)	13.51	29.85	37.91	44.03	63.24	63.51	-

[0534] N数目, RDI相对记录强度

[0535] 2.2.不良事件

[0536] 治疗紧急AE(TEAE)定义为在进行治疗阶段期间观察到的AE,定义为从首次给药至SAR566658的最终给药后30天的阶段。

[0537] 三十三位(33/34,97.1%)患者具有至少一次临床TEAE全部分级,无论与研究治疗的关系如何(此处并未报告实验室异常)。除主要从150mg/m²DL观察到的眼部事件,未观察到剂量依赖的AE。

[0538] 最频繁的临床TEAE(全部等级,无论与研究治疗的关系如何,在至少6位患者中)为:

[0539] -虚弱/疲劳(HLT)(28位患者,82.3%,包括16位具有研究药物相关事件的患者)

[0540] -降低的食欲(13位患者,38.2%,包括4位具有研究-药物相关事件的患者)

[0541] -角膜炎(11位患者,32.4%,全部考虑研究-药物相关事件),

[0542] -胃肠道和腹痛(HLT)(10位患者,29.4%),

[0543] -恶心(10位患者,29.4%,包括6位具有研究-药物相关事件的患者)

[0544] -周围神经病变(HLT)(10位患者,29.4%,包括5位具有研究-药物相关事件的患者)。值得注意的是,3位患者具有感觉异常或感觉迟钝,包括1位在同一周期具有感觉异常/感觉迟钝两者和周围神经病变。共12位患者具有周围神经事件。

[0545] -干眼症(8位患者,23.5%,包括5位具有研究-药物相关事件的患者)

[0546] -便秘,呕吐,肌肉骨骼和结缔组织痛(HLT)(每种事件:8位患者,23.5%)

[0547] -腹泻(7位患者,20.6%)

[0548] -焦虑,水肿(HLT)(每种事件:6位患者,17.6%)。

[0549] 眼部事件如角膜炎、干眼症以及周围神经病变是伴随SAR566658的预期事件,且归因于DM4-装载的ADC(参见2.6.1)。

[0550] 认为与研究治疗相关的整体TEAE是按如下降序:虚弱/疲劳(16位患者)、角膜炎(11位患者)、恶心、呕吐(每种有6位患者)、周围神经病变或感觉异常/感觉迟钝(分别有5和3位患者),干眼症(5位患者)、食欲降低和视力模糊(每种有4位患者)。

[0551] 十一位(32.3%)患者具有至少一项3-4级TEAE(无论与研究治疗的关系如何,排除实验室异常):下列剂量水平各有1位:60、90、120和150mg/m²,3位(50%) 在190mg/m²的剂量水平,且4位(50%) 在240mg/m²的剂量水平。共四位患者具有认为是与研究治疗相关的至少一项3-4级临床TEAE:角膜炎(2位患者,包括一位具有3级的视力模糊的患者)、呕吐和腹泻(1位患者),且1位患者具有下列事件:FEV1减少和射血分数减少(在肺栓塞和疾病进展的背景中)。除一位以外的全部都在240mg/m²DL观察。两位其他患者具有认为是与研究治疗相关的3-4级的实验室异常:在150mg/m²的嗜中性白细胞减少症(1位患者)和在120mg/m²的转氨酶升高(1位患者)。

[0552] 血液检查异常(嗜中性粒细胞减少、贫血和血小板减少)通过对研究治疗所收集的血液评估来确定(表5)。在150和190mg/m²DL观察到两位3级的嗜中性白细胞减少症,一位中导致周期延迟。

[0553] 表5-血液毒性-患者的最差等级

[0554]

	初始计划的 SAR566658 剂量水平(mg/m ²)						全部 剂量
	≤60	90	120	150	190	240	
治疗的患者总数 [N]	11	3	3	3	6	8	34
可评估的患者总数* [N]	11	3	3	3	6	8	34
白细胞减少症 N (Gr 3-4 N)	5 (1)	1 (0)	1 (0)	2 (0)	2 (0)	4(0)	15(0)
可评估的患者总数* [N]	11	3	3	3	6	8	34
嗜中性白细胞减少症 N (Gr 3-4 N)	2 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)	1 (1)	1 (0)	5 (2)
可评估的患者总数* [N]	11	3	3	3	6	8	34
贫血 N (Gr 3-4 N)	10 (0)	3 (0)	3 (0)	2 (0)	5 (0)	7(0)	30 (0)
可评估的患者总数* [N]	11	3	3	3	6	8	34
血小板减少症 N (Gr 3-4 N)	3 (0)	0 (0)	1 (0)	1 (0)	3 (0)	2 (0)	10(0)

[0555] *如果对于两次输注间的给定检查至少具有血细胞计数,则患者是可评估的。

[0556] 五位胰腺癌患者具有严重的肝功能检查异常(2位患者具有3级的转氨酶AST或ALT,4位患者具有3级的碱性磷酸酶升高,3位患者具有3级的胆红素升高)而无明显的剂量关系。未报告4级。

[0557] 五位患者在不同低剂量具有1级的肌酐增加,且未报告≥2的等级。

[0558] 2.3.MTD和剂量限制毒性的确定

[0559] 共34位患者已在研究的剂量递增部分以9种剂量水平进行了治疗:1位在10mg/m²、1位在20mg/m²、4位在40mg/m²、5位在60mg/m²、在下列DL各3位:90、120和150mg/m²,6位在190mg/m²且8位在240mg/m²。

[0560] 全部患者对于安全性和剂量限值毒性(DLT)都是可评估的。DLT观察期定义为研究治疗的第一周期。满足DLT准则但在周期1后(后续周期)观察到的DLT以及不良事件示于表6。

[0561] 表6在周期1和后续周期定义为DLT(实际数据)的毒性

[0562]

SAR566658 剂量水平	治疗患者的 N	周期 1	后续周期
≤60mg/m ²	11	-	-
90 mg/m ²	3	-	-
120 mg/m ²	3	-	-
150 mg/m ²	3	-	-
190 mg/m ²	6	-	-
240 mg/m ²	8	腹泻 3 级 (037)	在周期 2 的 3 级的角膜炎 (033, 040)

[0563] Gr:等级;Cy:周期

[0564] 图1根据剂量水平和在剂量递增决定中考虑在内的关键事件总结了治疗的患者。

[0565] 按照规程,将加速的剂量递增方案用于两种最初的剂量水平(DL)且基于在治疗的最初周期中观察到的毒性。在10mg/m²(DL1)和20mg/m²(DL2)治疗的患者中存在等级≥2的不相关毒性或肺功能检查的改变,使得剂量递增至DL2和随后的DL3。从该40mg/m²的DL3,剂量递增至经典方案向前进行(3+3设计)。

[0566] 三位患者在40mg/m²治疗。未观察到DLT。然而，全部患者在周期1结束时经历了一氧化碳弥散能力(DLCO)减少，三位患者在1周后的重复检查得到确认，但值仍在正常范围。根据NCI-CTC 4.03这些减少转变成0或1级。如在规程中所示，咨询了外部肺病学家。同时，研究委员会决定允许在该DL纳入额外患者。该患者不具有DLT但也在周期1结束时经历了DLCO的减少。这4位患者的专家审查和评估如下：“与基线值相比DLCO>15%的减少是评估肺毒性的显著变化。然而，患者病史是主要的因素。具体地，晚期恶性疾病且特别是已知对肺有毒性且在检查前1年内接受的在先疗法(“召回”现象)是混淆因素。此外，如果仍在正常范围内则减少并没有显著的价值”。专家未将这些DLCO减少事件认作DLT，而是将其认作在预期的波动范围内，且他们推荐奉行剂量递增。该决定进一步得到了研究委员会认可。

[0567] 自从继续进行该决定，在第四剂量水平(60mg/m²)治疗了三位患者。他们都未经历DLT。一位患者(840002008)在周期1结束时经历了DLCO减少>15%，其发生在恶化的具有被动性肺不张的胸腔积液背景中(疾病进展)。2位其他患者未经历DLCO减少>15%。然而，3位患者中的2位具有异于预期的药代动力学(PK)概貌：C_{max}按照剂量比例符合预期，但AUC较低。作为结果，决定招收2位额外的患者以在该DL获得额外的PK数据。这2位最后患者(第4和第5)的PK参数(C_{max}、AUC、CL和V_{ss})反映了对于60mg/m²的剂量水平能够有何种预期。C_{max}、AUC、CL和V_{ss}值反映了能够有何种预期。在该相同剂量水平的2位患者(5位中的2位)的非预期的PK结果至今仍无解释且可能源自患者间的差异。在2位在该DL4(60mg/m²)治疗的额外患者中未观察到DLT且未观察到DLCO减少>15%。一位患者在周期1在疾病进展的背景中(不相关4级总体健康状况恶化和3级高胆红素血症)经历了2种严重的AE(SAE)。该患者在接受了他的首次输注后第27天死于恶性疾病。两位患者在DL4(60mg/m²)在记录在案的疾病进展的背景中观察到不相关的3级或4级AE：一位患者(上述)经历了门静脉血栓、高胆红素血症、总体健康状况恶化，且一位患者具有转氨酶增加和碱性磷酸酶增加。两位患者具有转移性胰腺癌。研究委员会同意递增至下一剂量(DL5 90mg/m²)。

[0568] 三位患者已在每种下列剂量水平进行了治疗：第5DL(90mg/m²)、第6DL(120mg/m²)、第7DL(150mg/m²)和第8DL(190mg/m²)。未报告DLT，其允许在后续DL的剂量递增。在90mg/m²，一位患者(840001015)在周期1结束时经历了DLCO减少>15%，其发生于肺淋巴管炎恶化的背景中。在120mg/m²，一位患者(724001022)在周期1结束时经历了DLCO减少>15%，其发生于患者的一般状况恶化、腹水增加和呼吸肌无力的情况中，按照肺病学家的报告其可解释PFT结果中的该种减少。在150mg/m²，一位患者(724001026)在周期1结束时经历了DLCO减少>15%，其在重复检查中未确认。

[0569] 三位患者已在第九剂量水平(240mg/m²)进行了治疗。其中无经历DLT者且在周期1结束时未观察到DLCO减少>15%。然而，最先治疗的患者在周期2中形成了3级角膜炎。该事件发生在DLT观察时期外，但满足DLT准则并在剂量递增确定过程中将其考虑在内。决定等待在240mg/m²治疗的第二和第三患者的周期2完成进而捕获任何可在周期2中发生的严重的眼部不良事件。同时，2位计划筛选的患者已在最低DL 190mg/m²进行了治疗。他们在周期1结束时未形成任何DLT或DLCO减少>15%。鉴于2位在240mg/m²DL治疗的最后的患者在其第二治疗周期过程中未形成任何严重的眼部毒性，决定以在240mg/m²DL治疗3位另外的患者。这些额外的患者之一在周期1结束时经历了DLT(3级腹泻)。在240mg/m²治疗的6位患者中，1/6的患者在周期1经历了DLT(3级腹泻)，1/3的患者在周期2经历了3级角膜炎(在该时间，

一位患者未接受周期1且2位患者刚接受了周期2输注)。决定通过在DL 240mg/m²纳入两位另外的患者以遵循谨慎态度且遵循安全性直至周期2完成。此外,由于患者在周期1经历了未满足DLT准则的恶心和呕吐,推荐在研究治疗施用前的预防性止吐药物。两位额外的患者因此在240mg/m²进行了治疗。在周期1结束时未观察到DLT且无DLC0减少>15%。然而,第7和第8两位患者形成了2级角膜炎。此外,在该剂量治疗的第6位患者在周期2形成了3级角膜炎,导致周期3的延迟且剂量减少至190mg/m²。

[0570] 结论:

[0571] 在240mg/m²的最高剂量,治疗的八位患者中的一位在周期1经历了DLT(使用症状矫正治疗恢复的3级腹泻)。在7位接受第二周期的患者中,2位经历了3级角膜炎(其满足DLT准则),其导致在降低剂量的周期3施用的延迟。此外,4位其他患者在周期2经历了2级角膜炎,其导致3位患者中周期3的延迟。将DL 240mg/m²认作不可行且定义为最大施用剂量(MAD)。

[0572] 在DL 190mg/m²,治疗了五位患者;其全部至少接受了2个周期。三位患者形成了2级角膜炎:2位患者在周期2(包括一位在治疗施用前具有2级角膜炎的患者,其在临床上由C1D1解决)且1位患者在周期1(已知该患者报告来自C1D1的干眼症)。角膜炎事件导致在这3位患者的一位中周期3的延迟。即使在DL190治疗的5位患者中的3位经历了角膜炎,该眼部毒性与在DL240所观察到的相比对研究者来说似乎不那么严重,更可管理,对研究治疗的影响较低。此外,这3位患者中的2位具有预先存在的眼部异常,其可能影响了眼部评估。

[0573] 因此,第6位患者在190mg/m²进行了治疗以完成在该剂量的登记。该患者未形成任何DLT。

[0574] 选择DL190mg/m²作为推荐剂量。

[0575] 2.4.严重的副作用

[0576] 八位患者具有至少一种治疗紧急SAE,全部认作与研究治疗不相关。

[0577] 表7-严重的TEAE

	SAR566658 剂量水平	患者#	周期	SAE
[0578]	60 mg/m ²	008	周期 1	疾病进展 (NR)
	120 mg/m ²	022	周期 1	肠梗阻(NR)
	150 mg/m ²	023	周期 5	腹部疼痛、背部疼痛、肠梗阻(NR)
	190 mg/m ²	035	周期 2	转移到 CNS (NR)
		036	周期 2	疾病进展 (NR)
		029	周期 1	颈部疼痛(NR)
			周期 2	腹部疼痛、肺栓塞(NR)
	240 mg/m ²	038	周期 1	设备相关感染(NR)
		033	周期 2	腹部疼痛 (NR)
			周期 4	腹部疼痛, GI 出血(NR)

[0579] NR:与研究治疗不相关;Cy:周期;CNS中枢神经系统;GI胃肠道

[0580] 2.5.死亡

[0581] 34位治疗的患者中,9位患者具有死亡记录。根据研究者,全部患者死于恶性疾病。两位患者(#008和036)在末次输注起的30天内死亡,分别在周期1第27天和周期2第18天。

[0582] 2.6.其他安全性措施:特定安全性

[0583] 2.6.1.眼部毒性

[0584] 眼部不良事件主要从150mg/m²报告,如使用其他类美登素装载的ADC所观察(表8和图2)。

[0585] 相关的眼部事件包括:干眼症、视力模糊、角膜炎、畏光、流泪增加、眼部疼痛。总共15位患者(44.1%)具有至少一种具有下列严重性的相关眼部事件:3位患者中1级,10位患者中2级且2位患者中3级。报告了很少认为与研究治疗不相关的其他轻度至中度眼部事件:眼红斑痤疮(ocular rosacea),眼分泌物和病毒性结膜炎。

[0586] 双侧角膜炎是使用SAR566658观察到的一种主要眼部事件。该事件前经常为如轻度至中度干眼症、视力模糊或畏光的症状。这些初步症状主要在周期1观察到,而随后在第二和后续的研究治疗过程中给出了角膜炎的诊断。眼科报告经常描述浅层角膜炎,其具有挽救角膜中央区的角膜积存(corneal depot)。在240mg/m²仅在2位严重病例中报告了上皮炎症(或间质炎症)。开始局部治疗并包括人工泪液和皮质类固醇。目前在1-3周内观察到症状的恢复,其取决于初始的严重性。如果症状在给定周期的第21天仍存在,则延迟接下来的周期且一旦症状消失,且条件是用裂隙灯观察的病灶稳定,则眼科医生给予绿灯以恢复治疗。

[0587] 由于在NCI CTC v4.03中不存在1级角膜炎,全部角膜炎评为2级。然而在这些2级类别中,存在具有相关症状和不具有症状的浅层角膜炎。即使在数个周期中角膜炎持续表现为相同的2级,该角膜炎得到足够的改善以允许研究治疗的施用,但其不反映等级的变化。事实上,该分类并不允许捕获2级的改善。

[0588] 两位患者在周期2以240mg/m²的过程中经历了3级眼部毒性。该事件在第二周期的第8天至第15天之间开始,伴随丧失的视觉灵敏度、视力模糊和干眼症。眼科学家记录了3级双侧角膜炎,其具有挽救角膜中央区的线性积存。给予人工滴眼液和外用皮质类固醇。在周期2访问结束时(第21天),注意到视力丧失和症状的部分恢复且眼科学家报告了角膜炎的改善(从3级至2级)。在2位患者中周期3都延迟了2周,且施用了减少的剂量(190mg/m²)。

[0589] 就发病率、等级或对研究治疗的影响而言,在剂量水平之间观察到了差异。在检查的最高剂量水平(240mg/m²)观察到最高发病率,最差等级和对研究治疗的最高影响。就发生周期而言,未观察到差异。

[0590] 目前,全部相关的眼部AE得到恢复或迅速得到管理,允许具有局部治疗(人工滴眼液和皮质类固醇)的治疗持续。

[0591] 表8-在治疗过程中最差等级相关的眼部AE(按患者和按周期)

[0592]

SAR566658 剂量水平	具有眼部毒 性的患者 N	患者 #	周期	眼部 AE	结果	周期延 迟剂量 ↓
≤60 mg/m ²	2 pts/11	004	周期 1	1 级视力模糊	恢复	
		007	周期 1	2 级干眼症	恢复	
120 mg/m ²	0 / 3	-				
150 mg/m ²	2 患者 / 3	023	周期 2-3-4-5	2 级角膜炎	恢复	DD-DR
		026	周期 1-2-3-4-5-6-7	1 级干眼症	恢复	DDx3
			周期 3-5-6-7-8	2 级角膜炎	恢复	
190 mg/m ²	5 患者 / 6	031	周期 2-3	2 级角膜炎	恢复	
		030	周期 2-3-4-5-6	1 级干眼症	恢复	
			周期 3-4-6	2 级角膜炎	恢复	DD
		035	周期 1-2	2 级角膜炎	恢复	DD
			周期 2	1 级泪液分泌增 加	恢复	
		036 ^a	周期 1-2	1 级畏光 1 级泪液分泌增 加	恢复 未恢复	
		043 ^b	周期 1	1 级眼部疼痛	恢复	
			周期 2	1 级视力模糊	未恢复	
240 mg/m ²	6 患者 / 8	034 ^b	周期 2-3-4-5-6-7-8	2 级角膜炎	未恢复	
		038 ^b	周期 2-3	2 级角膜炎	未恢复	DD-DR
		033	周期 2	2 级干眼症	恢复	
				3 级角膜炎	恢复	DD-DR
				2 级视力模糊	恢复	
		040	周期 1-2	1 级干眼症	恢复	
			周期 2	3 级角膜炎	恢复	DD-DR
				3 级视力模糊	恢复	
		041	周期 2	2 级角膜炎	恢复中	DD-DR
		042	周期 2	2 级角膜炎	恢复	DD-DR
总共	15 患者 / 34	发生率的中位周期角膜炎: 角膜炎(11 位患者)周期 2 [1-3]; 干眼症(6 位患者) 周期 1 [1-2]				

[0593] ^a在末次IP起30天内的死亡时间时持续的事件[0594] ^b仍在治疗中

[0595] 2.6.2. 周围神经病变

[0596] 十二位(35%)患者在研究治疗的过程中具有周围神经病变(HLT)或感觉异常/感觉迟钝(HLT)。强度全部为轻度至中度,且这些事件无一导致研究治疗延迟或停止。应当注意的是,全部患者之前都用化疗预先治疗,包括下列化合物中的一种或组合:奥沙利铂、顺铂、卡铂、紫杉醇或多西紫杉醇。此外,2位患者在研究入口具有周围神经病变(021和035)。

[0597] 神经事件归因于在8位患者中的研究治疗。

[0598] 未观察到明显的关于周围神经病变的剂量依赖性(包括感觉异常和感觉迟钝)。

[0599] 表9-按照初始计划的剂量的最差等级周围神经病变(按患者和按周期)

[0600]

SAR5666 58 剂量 水平	可评估患 者的 N	周围神经病变 ^a		感觉异常/感觉迟钝 ^b		任何周围神经事件	
		全部等级	3-4 级	全部等级	3-4 级	全部等级	3-4 级
≤60 mg/m ²	11	2	0	0	0	2	0
90 mg/m ²	3	0	0	1	0	1	0
120 mg/m ²	3	1	0	0	0	1	0
150 mg/m ²	3	2	0	0	0	2	0
190 mg/m ²	6	1	0	0	0	1	0
240 mg/m ²	8	4	0	2	0	5	0
总共	34	10 (29.4%)	0	3	0	13 (35.3%)	0

[0601] ^a HLT周围神经病变NEC(周围神经病变,外周感觉神经病变)。[0602] ^b HLT

[0603] 2.6.3.肺部毒性

[0604] 按照规程,在研究入口和每周期结束时实施肺功能检查。在周期1结束时(DLT观察期结束时),将PFT结果送至外部肺病学家以获得关于潜在肺部毒性的建议。

[0605] 目前在周期1未观察到可归因于肺部毒性的PFT异常(图3)。

[0606] 在120mg/m²治疗的患者中观察到了一例间质性肺炎。该位具有转移性卵巢癌(涉及盆腔淋巴结和腹膜)的患者(724001021)接受了共14周期且在周期12形成了具有1级呼吸困难和咳嗽的肺部症状。在同一周期实施了胸部CT扫描,展示肺部的异常。此外,PFT检查展示了约14%的DLC0减少。因此延迟了研究治疗且给出了类固醇和抗生素处方。患者感觉更好,具有较少的呼吸困难和咳嗽。新的胸部CT扫描确认了之前的放射学发现且放射学家描述肺部病灶并不与疾病明显相关,但不能排除可能的与治疗研究的相关性。PFT与基线相比再次展示了约16%的DLC0减少。确定实施用支气管肺泡灌洗的支气管镜。持续抗生素和类固醇。

[0607] 在3月12日,治疗延迟2周后,患者感觉更好,咳嗽和呼吸困难得到改善。支气管肺泡灌洗后的微生物检查为阴性,未发现肿瘤细胞且细胞学检查展示嗜中性粒细胞和嗜酸性粒细胞浸润。由于这些发现,不能排除研究治疗的关系。然而,考虑到良好的整体状况,呼吸症状的改善和在其肿瘤上实现的益处,研究者与发起人一致决定持续相同剂量的治疗(按照规程),尽管与基线相比DLC0减少在10-20%内。施用了周期13和周期14。咳嗽和呼吸困难在周期14的过程中恢复。CT扫描展示了疾病进展(淋巴结病灶的增加)并停止治疗。DLC0与基线相比减少约35%。他否认了呼吸症状。末次输注后的45天研究中认为解决了间质性肺炎。

[0608] 3.效力结果

[0609] 抗肿瘤临床活性从≥120mg/m²的剂量观察到,即对于放射学可评估的病灶肿瘤大小减少或肿瘤相关症状(如疼痛…)的长期稳定或改善。[0610] 在33位可对肿瘤响应进行评估的患者中,一位确认了PR,且报告了15位稳定的疾病(表10)。SD和PR主要在≥120mg/m²的剂量观察到。事实上在19位对于这些剂量的响应

可评估的患者中,观察到13位SD(包括2位未确认的PR和1位待确认的PR)和1位PR。

[0611] 应该注意的是,无论剂量如何,这些按照肿瘤类型的PR/SD如下:

[0612] -9位胰腺癌患者中短持续时间的2位SD,

[0613] -4位乳腺癌患者中的1位PR和1位未确认的PR(即SD)(已知2位未响应患者分别以10和40mg/m²进行了治疗),

[0614] -13位可评估的卵巢癌患者中的7位SD(包括一位未确认的PR和1位待确认的PR)。

[0615] 在以150mg/m²治疗的63岁乳腺癌患者(724001026)中报告了PR。在周期2观察到PR,在周期4和6以靶病灶中57%的最大减少得以确认。她在研究入口具有2个肝部靶病灶和多重肺部非靶病灶。之前的抗癌疗法包括3种之前的化疗线:聚乙二醇化阿霉素-环磷酰胺,随后是紫杉醇和研究药物(IND)持续5个月,随后吉西他滨(gemcitabine)和IND持续1个月。该乳腺肿瘤是三阴性,对雌激素、孕酮或HER2都非阳性。按照IHC在归档肿瘤上的CA6表达(研究入口前1年)展示了70%3+膜染色。她接受了共8周期的研究治疗且由于记录的肝部疾病进展(靶病灶的增加和新病灶的发生)停止。

[0616] 15位SD中,研究者报告了2位未确认的PR和1位待确认的PR:

[0617] -一位患者(#724001021)以120mg/m²:卵巢癌,65岁,用3种之前的化疗线预先治疗(紫杉醇-卡铂7个月,拓扑替康4个月和聚乙二醇化阿霉素1个月)。她在研究入口涉及腹膜和淋巴结。在研究治疗过程中观察到靶病灶的常规减少且在周期10观察到最大:与基线评估相比周期8为28.8%,周期10为36.6%且周期12为27.6%。在周期14观察到靶病灶的疾病进展并停止患者的研究治疗。按照IHC归档肿瘤上的CA6表达(研究入口前12年)展示了40%3+膜染色。

[0618] -一位患者(#250001031)以190mg/m²:乳腺癌,49岁,用数种之前的抗癌治疗进行了预先治疗(氟尿嘧啶-表柔比星-环磷酰胺、卡培他滨(capecitabine)、甲氨蝶呤-环磷酰胺(endoxan)、多西紫杉醇、诺维本诺维本(navelbine)、艾日布林(eribulin)以及激素疗法)。她在研究入口涉及肝脏、淋巴结和骨。在周期2观察到靶病灶的减少(55%),在周期4仍存在(71%),但在周期4诊断了癌性脑膜炎并停止治疗。按照IHC在归档肿瘤上的CA6表达(研究治疗入口前6年)展示了50%2+膜染色。

[0619] -一位患者(840001041)以240mg/m²:卵巢癌,67岁,在2010年10月诊断,随后进行手术和辅助化疗(紫杉醇-卡铂)治疗。2013年1月诊断了淋巴结复发且她进入了试验。在周期2观察到靶病灶的减少(35%)且应该在周期4进行确认。此外,还报告了肿瘤标记物从39.5至11.3UI/L(CA125)的减少。按照IHC在归档肿瘤上的CA6表达展示了15%2+和35%3+膜染色。

[0620] 此外,研究者报告了在一位58岁患有膀胱癌的男性患者中从周期1观察到的整体状态的改善。在研究入口,他涉及盆腔淋巴结,导致双侧肢体水肿。CT扫描展示稳定直至周期10,在周期10中观察到新的病灶且患者停止研究治疗。

[0621] 表10-最佳整体响应

[0622]	SAR566658 剂量水平	治疗的患者 N	PR	SD	PD	NE
	≤60 mg/m ²	11	0	1	10	-
	90 mg/m ²	3	0	1	2	-

	SAR566658 剂量水平	治疗的患者 N	PR	SD	PD	NE
	120 mg/m ²	3	0	2 #021 PR 未确 认	1	-
[0623]	150 mg/m ²	3	1 #026 乳腺癌	2	0	-
	190 mg/m ²	5	0	2 #031 PR 未确 认	3	1* (#043)
	240 mg/m ²	8	0	7	1	0
	总共	33	1	15	17	1*

[0624] *太早,患者尚不可评估

[0625] 4. 药代动力学(PK)结果

[0626] ●具有 $t_{1/2z}$ 约5天的SAR566658的平行消除概貌

[0627] ●暴露至SAR566658(C_{max} 和AUC),在10-240mg/m²的剂量范围增加,无重大偏离剂量比例的偏差

[0628] ●在20-240mg/m²的剂量范围,清除率大体恒定在0.5-0.9L/天之间,除2位以60mg/m²治疗的患者($CL \sim 1.5-2L/天$)

[0629] ●整体上,总可变性为低到中等。

序列表

<110> 赛诺菲
<120> 抗 Muc1 类美登素免疫偶联抗体用于治疗实体瘤的用途
<130> FR2013/032
<160> 10
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> huDS6 的 CDR1-H

<400> 1

Ser Tyr Asn Met His
1 5

<210> 2
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

[0001]

<220>
<223> huDS6 的 CDR2-H

<400> 2

Tyr Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Ala Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 3
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> huDS6 的 CDR3-H

<400> 3

Gly Asp Ser Val Pro Phe Ala Tyr
1 5

<210> 4
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> huDS6 的 CDR1-L

<400> 4

Ser Ala His Ser Ser Val Ser Phe Met His
1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> huDS6 的 CDR2-L

<400> 5

Ser Thr Ser Ser Leu Ala Ser
1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> huDS6 的 CDR3-L

<400> 6

[0002]

Gln Gln Arg Ser Ser Phe Pro Leu Thr
1 5

<210> 7

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> huDS6 的重链可变区

<400> 7

Gln Ala Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Ala Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Pro Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Ile Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Asp Ser Val Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 8

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> huDS6 的轻链可变区

<400> 8

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala His Ser Ser Val Ser Phe Met
20 25 30

[0003]

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
35 40 45

Ser Thr Ser Ser Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Gly Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Phe Pro Leu Thr
85 90 95

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
100 105

<210> 9

<211> 447

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> huDS6 的重链

<400> 9

Gln Ala Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Ala Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Pro Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Ile Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Asp Ser Val Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125
 Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 130 135 140
 [0004]
 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 145 150 155 160
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 165 170 175
 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 180 185 190
 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 195 200 205
 Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 210 215 220
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 260 265 270

Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	
	275						280					285				
Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	
	290					295				300						
Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	
305					310					315					320	
Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	
				325					330					335		
Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	
			340					345					350			
Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	
		355					360					365				
Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	
	370					375					380					
Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	
385					390					395					400	
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	
			405						410					415		
Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	
			420					425					430			
His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys		
		435					440					445				
<210>	10															
<211>	213															
<212>	PRT															
<213>	人工序列															
<220>																
<223>	huDS6 的轻链															
<400>	10															
Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Met	Ser	Ala	Ser	Pro	Gly	
1				5					10					15		
Glu	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Ser	Ala	His	Ser	Ser	Val	Ser	Phe	Met	
			20					25						30		

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
35 40 45

Ser Thr Ser Ser Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Gly Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Phe Pro Leu Thr
85 90 95

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

[0006]

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

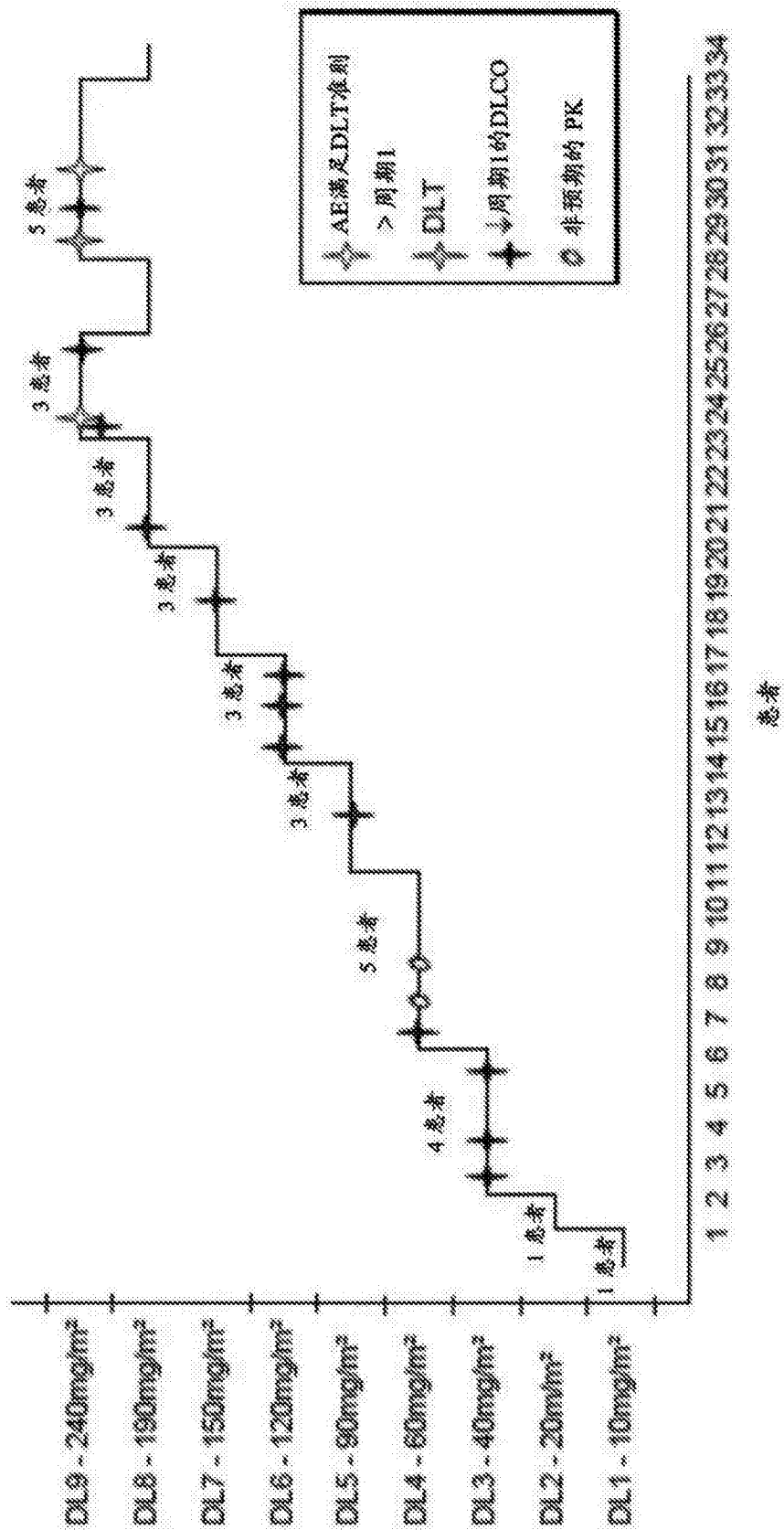


图1

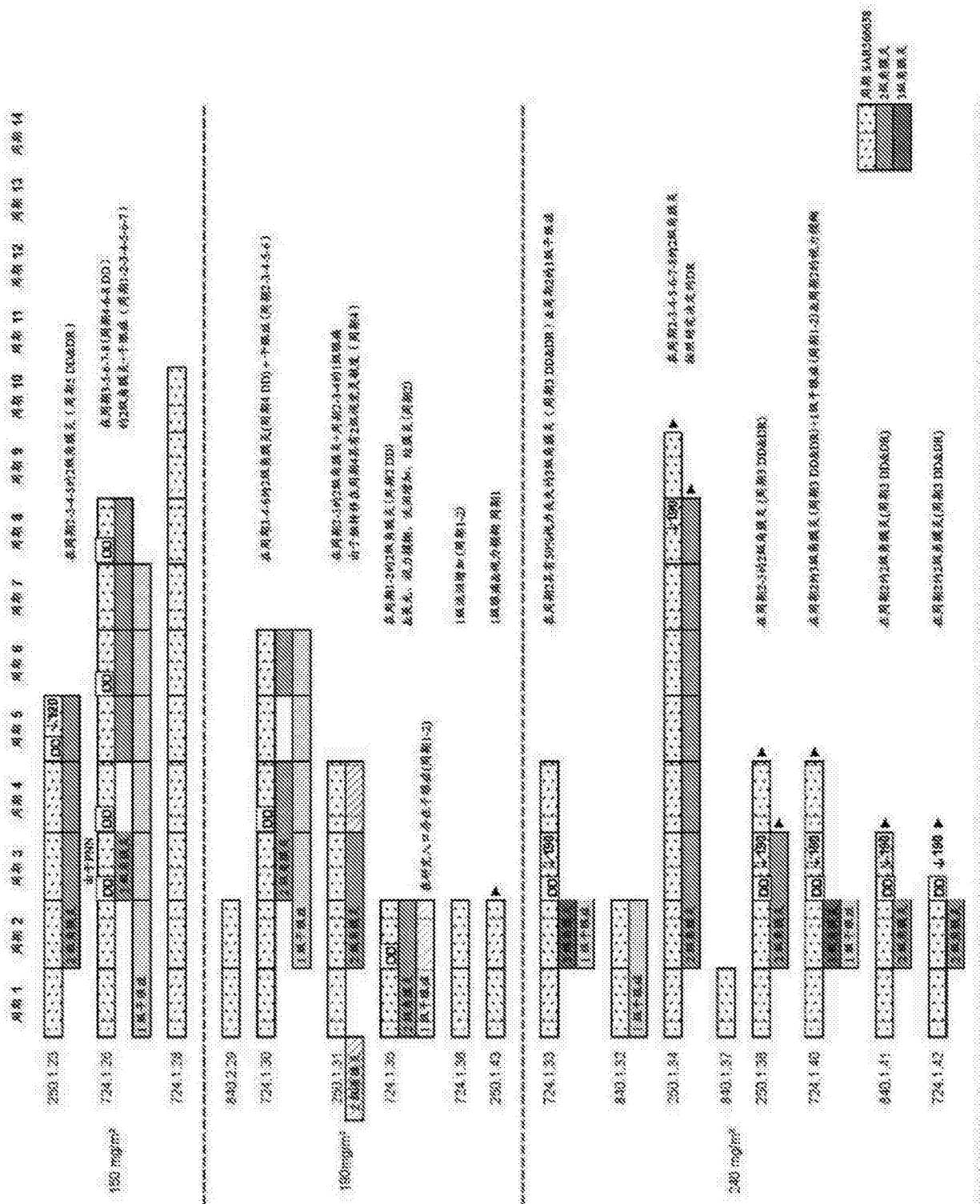


图2

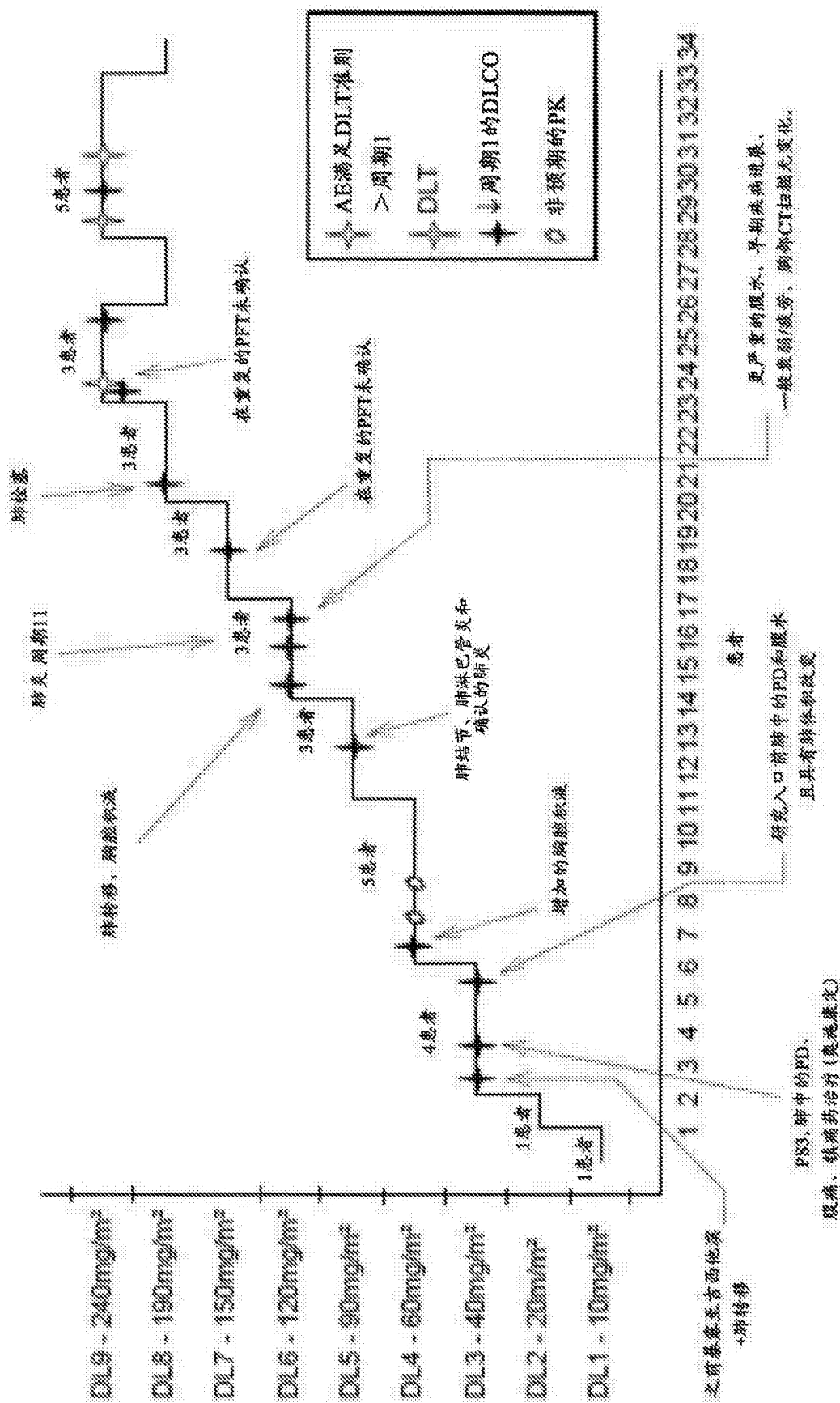


图3