



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104093425 A

(43) 申请公布日 2014. 10. 08

(21) 申请号 201280068773. 2

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2012. 12. 13

A61K 39/395 (2006. 01)

(30) 优先权数据

61/570, 139 2011. 12. 13 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 08. 01

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/069527 2012. 12. 13

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/090590 EN 2013. 06. 20

(71) 申请人 伊缪诺金公司

地址 美国马萨诸塞

(72) 发明人 刘芳 G·W·安普莱特

D·H·梅舒拉姆

(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

权利要求书10页 说明书33页

(54) 发明名称

N-羟基琥珀酰亚胺用于改善缀合物的稳定性的用途

(57) 摘要

本发明提供了用于在外源 NHS 存在的情况下产生具有改善的稳定性的细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物的方法。在一些实施方案中,本发明的方法包括添加一定摩尔比的相对于在修饰反应过程中作为双官能接头的水解/氨解的结果产生的 NHS 量的外源 NHS。

1. 一种用于制备具有连接于其的接头的细胞结合剂的方法,所述方法包括在外源 N- 羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 存在的情况下将细胞结合剂与双官能交联试剂接触以将接头共价地连接于所述细胞结合剂,从而制备包含具有连接于其的接头的细胞结合剂的混合物。

2. 一种用于制备包含通过接头化学地偶联于细胞毒素剂的细胞结合剂的细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物的方法,所述方法包括:

(a) 将细胞结合剂与双官能交联试剂接触以将接头共价地连接于所述细胞结合剂,从而制备包含具有连接于其的接头的细胞结合剂的第一混合物,

(b) 将所述第一混合物经历切向流过滤、选择性沉淀、非吸附色谱、吸附过滤、吸附色谱或其组合,从而制备具有连接于其的接头的细胞结合剂的纯化的第一混合物,

(c) 通过将具有连接于其的接头的细胞结合剂与细胞毒素剂反应来将细胞毒素剂缀合于所述纯化的第一混合物中的具有连接于其的接头的细胞结合剂,从而制备包含 (i) 含有通过接头化学地偶联于细胞毒素剂的细胞结合剂的细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物、(ii) 游离细胞毒素剂和 (iii) 反应副产物的第二混合物,和

(d) 将第二混合物经历切向流过滤、选择性沉淀、非吸附色谱、吸附过滤、吸附色谱或其组合以将所述细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物从所述第二混合物的其它组分纯化出来,从而制备所述细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物的纯化的第二混合物,

其中在步骤 (a) 期间或之后以及在步骤 (c) 之前添加外源 N- 羟基琥珀酰亚胺。

3. 根据权利要求 2 所述的方法,其中在外源 N- 羟基琥珀酰亚胺存在的情况下进行步骤 (a) 中的接触。

4. 根据权利要求 2 所述的方法,其还包括在外源 N- 羟基琥珀酰亚胺存在的情况下在步骤 (a) 之后保持所述第一混合物。

5. 根据权利要求 4 所述的方法,其中在具有约 4.0 至约 9.0 的 pH 的溶液进行所述保持。

6. 根据权利要求 5 所述的方法,其中所述 pH 为约 5.0 至约 8.0。

7. 根据权利要求 2 所述的方法,其中在步骤 (b) 中添加外源 N- 羟基琥珀酰亚胺。

8. 根据权利要求 2 所述的方法,其还包括在外源 N- 羟基琥珀酰亚胺存在的情况下在步骤 (b) 之后保持所述纯化的第一混合物。

9. 根据权利要求 8 所述的方法,其中在具有约 4.0 至约 9.0 的 pH 的溶液中进行所述保持。

10. 根据权利要求 9 所述的方法,其中所述 pH 为约 5.0 至约 8.0。

11. 根据权利要求 2 至 10 中任一项所述的方法,其中在步骤 (b) 和 (d) 中使用切向流过滤。

12. 根据权利要求 2 至 10 中任一项所述的方法,其中在步骤 (b) 和 (d) 中使用吸附色谱。

13. 根据权利要求 2 至 10 中任一项所述的方法,其中在步骤 (b) 中使用吸附色谱以及在步骤 (d) 中使用切向流过滤。

14. 根据权利要求 2 至 10 中任一项所述的方法,其中在步骤 (b) 和 (d) 中使用非吸附色谱。

15. 根据权利要求 2 至 10 中任一项所述的方法,其中在步骤 (b) 中使用切向流过滤以

及在步骤 (d) 中使用吸附色谱。

16. 根据权利要求 2 至 15 中任一项所述的方法,其中在具有约 4.0 至约 9.0 的 pH 的溶液中进行步骤 (a) 中的接触。

17. 根据权利要求 16 所述的方法,其中所述 pH 为约 6.0 至约 8.0。

18. 根据权利要求 16 所述的方法,其中所述 pH 为约 6.5 至约 7.5。

19. 根据权利要求 2 至 18 中任一项所述的方法,其中在具有约 4.0 至约 9.0 的 pH 的溶液中进行步骤 (c) 中的缀合。

20. 根据权利要求 19 所述的方法,其中所述 pH 为约 5.0 至约 8.0。

21. 根据权利要求 19 所述的方法,其中所述 pH 为约 6.5 至约 7.5。

22. 一种用于制备包含通过接头化学地偶联于细胞毒素剂的细胞结合剂的细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物的方法,所述方法包括:

(a) 将细胞结合剂与双官能交联试剂接触以将接头共价连接于细胞结合剂,从而制备包含具有连接于其的接头的细胞结合剂的第一混合物,

(b) 通过将具有连接于其的接头的细胞结合剂与细胞毒素剂反应来将细胞毒素剂缀合于所述第一混合物中的具有连接于其的接头的细胞结合剂,从而制备包含 (i) 含有通过接头偶联于细胞毒素剂的细胞结合剂的细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物、(ii) 游离细胞毒素剂和 (iii) 反应副产物的第二混合物,和

(c) 将所述第二混合物经历切向流过滤、选择性沉淀、非吸附色谱、吸附过滤、吸附色谱或其组合,以将所述细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物从所述第二混合物的其它组分纯化出来,从而制备所述细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物的纯化的第二混合物,

其中在步骤 (a) 的过程中或之后和在步骤 (b) 之前添加所述外源 N-羟基琥珀酰亚胺。

23. 根据权利要求 22 所述的方法,其中在外源 N-羟基琥珀酰亚胺存在的情况下进行步骤 (a) 中的接触。

24. 根据权利要求 22 所述的方法,其还包括在外源 N-羟基琥珀酰亚胺存在的情况下在步骤 (a) 后保持所述第一混合物。

25. 根据权利要求 24 所述的方法,其中在具有约 4.0 至约 9.0 的 pH 的溶液中进行所述保持。

26. 根据权利要求 25 所述的方法,其中所述 pH 为约 6.0 至约 8.0。

27. 根据权利要求 22 至 26 中任一项所述的方法,其中在步骤 (c) 中使用切向流过滤。

28. 根据权利要求 22 至 26 中任一项所述的方法,其中在步骤 (c) 中使用吸附色谱。

29. 根据权利要求 22 至 26 中任一项所述的方法,其中在步骤 (c) 中使用非吸附色谱。

30. 根据权利要求 22 至 29 中任一项所述的方法,其中在具有约 4.0 至约 9.0 的 pH 的溶液中进行步骤 (a) 中的接触。

31. 根据权利要求 30 所述的方法,其中所述 pH 为约 6.0 至约 8.0。

32. 根据权利要求 30 所述的方法,其中所述 pH 为约 6.5 至约 7.5。

33. 根据权利要求 22 至 32 中任一项所述的方法,其中在具有约 4.0 至约 9.0 的 pH 的溶液中进行步骤 (b) 中的缀合。

34. 根据权利要求 33 所述的方法,其中所述 pH 为约 5.0 至约 8.0。

35. 根据权利要求 33 所述的方法,其中所述 pH 为约 6.5 至约 7.5。

36. 一种用于制备包含通过接头化学地偶联于细胞毒素剂的细胞结合剂的细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物的方法,所述方法包括:

(a) 将细胞结合剂与包含化学地偶联于接头的细胞毒素剂的细胞毒素剂-接头化合物接触,以将细胞毒素剂-接头化合物共价地偶联于所述细胞结合剂,从而制备包含含有通过接头化学地偶联于细胞毒素剂的细胞结合剂的所述细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物的混合物,和

(b) 将包含所述细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物的混合物经历切向流过滤、选择性沉淀、非吸附色谱、吸附过滤、吸附色谱或其组合,以纯化所述缀合物,其中在步骤(a)的过程中或之后和在步骤(b)之前添加外源N-羟基琥珀酰亚胺。

37. 根据权利要求36所述的方法,其中在外源N-羟基琥珀酰亚胺存在的情况下进行步骤(a)中的接触。

38. 根据权利要求36所述的方法,其还包括在外源N-羟基琥珀酰亚胺存在的情况下在步骤(a)后保持所述混合物。

39. 根据权利要求38所述的方法,其中在具有约4.0至约9.0的pH的溶液中进行所述保持。

40. 根据权利要求39所述的方法,其中所述pH为约6.0至约8.0。

41. 根据权利要求36至40中任一项所述的方法,其中通过将细胞毒素剂与包含接头的双官能交联试剂接触以将所述细胞毒素剂共价地连接于所述接头来制备细胞毒素剂-接头化合物,并从而制备包含所述细胞毒素剂-接头化合物的混合物。

42. 根据权利要求36至41中任一项所述的方法,其中在与所述细胞结合剂接触之前纯化所述细胞毒素剂-接头化合物。

43. 根据权利要求36至41中任一项所述的方法,其中在与细胞结合剂接触之前不纯化所述细胞毒素剂-接头化合物。

44. 根据权利要求36至43中任一项所述的方法,其中在具有约4.0至约9.0的pH的溶液中进行步骤(a)中的接触。

45. 根据权利要求44所述的方法,其中所述pH为约6.0至约8.0。

46. 根据权利要求44所述的方法,其中所述pH为约6.5至约7.5。

47. 一种用于制备包含通过接头化学地偶联于细胞毒素剂的细胞结合剂的细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物的方法,所述方法包括:

(a) 将细胞结合剂与双官能交联试剂接触以将接头共价地连接于所述细胞结合剂,从而制备包含具有连接于其的接头的细胞结合剂的第一混合物,

(b) 将所述第一混合物经历切向流过滤、选择性沉淀、非吸附色谱、吸附过滤、吸附色谱或其组合,从而制备具有连接于其的接头的细胞结合剂的纯化的第一混合物,

(c) 通过将所述具有连接于其的接头的细胞结合剂与细胞毒素剂在外源N-羟基琥珀酰亚胺存在的情况下反应,来将细胞毒素剂缀合于所述纯化的第一混合物中的具有连接于其的接头的细胞结合剂,从而制备包含(i)含有通过接头偶联于细胞毒素剂的细胞结合剂的细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物、(ii)游离细胞毒素剂和(iii)反应副产物的第二混合物,和

(d) 将所述第二混合物经历切向流过滤、选择性沉淀、非吸附色谱、吸附过滤、吸附色谱

或其组合以将所述细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物从所述第二混合物的其它组分纯化出来,从而制备细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物的纯化的第二混合物。

48. 根据权利要求 47 所述的方法,其中在步骤 (b) 和 (d) 中使用切向流过滤。

49. 根据权利要求 47 所述的方法,其中在步骤 (b) 和 (d) 中使用吸附色谱。

50. 根据权利要求 47 所述的方法,其中在步骤 (b) 和 (d) 中使用非吸附色谱。

51. 根据权利要求 47 所述的方法,其中在步骤 (b) 中使用吸附色谱以及在步骤 (d) 中使用切向流过滤。

52. 根据权利要求 47 所述的方法,其中在步骤 (b) 中使用切向流过滤以及在步骤 (d) 中使用吸附色谱。

53. 根据权利要求 47 至 52 中任一项所述的方法,其中在具有约 4.0 至约 9.0 的 pH 的溶液中进行步骤 (a) 中的接触。

54. 根据权利要求 53 所述的方法,其中所述 pH 为约 6.0 至约 8.0。

55. 根据权利要求 53 所述的方法,其中所述 pH 为约 6.5 至约 7.5。

56. 根据权利要求 47 至 55 中任一项所述的方法,其中在具有约 4.0 至约 9.0 的 pH 的溶液中进行步骤 (c) 中的缀合。

57. 根据权利要求 56 所述的方法,其中所述 pH 为约 5.0 至约 8.0。

58. 根据权利要求 56 所述的方法,其中所述 pH 为约 6.5 至约 7.5。

59. 一种用于制备包含通过接头化学地偶联于细胞毒素剂的细胞结合剂的细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物的方法,所述方法包括:

(a) 将细胞结合剂与双官能交联试剂接触以将接头共价地连接于所述细胞结合剂,从而制备包含具有连接于其的接头的细胞结合剂的第一混合物,

(b) 通过将具有连接于其的接头的细胞结合剂与细胞毒素剂在外源 N- 羟基琥珀酰亚胺存在的情况下反应,来将细胞毒素剂缀合于所述第一混合物中的所述具有连接于其的接头的细胞结合剂,从而制备包含 (i) 含有通过所述接头化学地偶联于所述细胞毒素剂的细胞结合剂的所述细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物、(ii) 游离细胞毒素剂和 (iii) 反应副产物的第二混合物,和

(c) 将所述第二混合物经历切向流过滤、选择性沉淀、非吸附色谱、吸附过滤、吸附色谱或其组合以将所述细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物从所述第二混合物的其它组分纯化出来,从而制备所述细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物的纯化的第二混合物。

60. 根据权利要求 59 所述的方法,其中在步骤 (c) 中使用切向流过滤。

61. 根据权利要求 59 所述的方法,其中在步骤 (c) 中使用吸附色谱。

62. 根据权利要求 59 所述的方法,其中在步骤 (c) 中使用非吸附色谱。

63. 根据权利要求 59 至 62 中任一项所述的方法,其中在具有约 4.0 至约 9.0 的 pH 的溶液中进行步骤 (a) 中的接触。

64. 根据权利要求 63 所述的方法,其中所述 pH 为约 6.0 至约 8.0。

65. 根据权利要求 63 所述的方法,其中所述 pH 为约 6.5 至约 7.5。

66. 根据权利要求 59 至 65 中任一项所述的方法,其中在具有约 4.0 至约 9.0 的 pH 的溶液中进行步骤 (c) 中的缀合。

67. 根据权利要求 66 所述的方法,其中所述 pH 为约 5.0 至约 8.0。

68. 根据权利要求 66 所述的方法,其中所述 pH 为约 6.5 至约 7.5。

69. 一种用于制备包含通过接头化学地偶联于细胞毒素剂的细胞结合剂的细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物的方法,所述方法包括:

(a) 将细胞结合剂与双官能交联试剂接触以将接头共价地连接于所述细胞结合剂,从而制备包含具有连接于其的接头的细胞结合剂的第一混合物,

(b) 将所述第一混合物经历切向流过滤、选择性沉淀、非吸附色谱、吸附过滤、吸附色谱或其组合,从而制备具有连接于其的接头的细胞结合剂的纯化的第一混合物,

(c) 通过将所述具有连接于其的接头的细胞结合剂与细胞毒素剂反应,来将细胞毒素剂缀合于所述纯化的第一混合物中的所述具有连接于其的接头的细胞结合剂,从而制备包含 (i) 含有通过所述接头化学地偶联于所述细胞毒素剂的细胞结合剂的细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物、(ii) 游离细胞毒素剂和 (iii) 反应副产物的第二混合物,

(d) 在外源 N- 羟基琥珀酰亚胺存在的情况下温育所述第二混合物;和

(e) 在步骤 (d) 之后将所述第二混合物经历切向流过滤、选择性沉淀、非吸附色谱、吸附过滤、吸附色谱或其组合,以将所述细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物从所述第二混合物的其它组分纯化出来,从而制备通过所述接头化学地偶联于所述细胞毒素剂的细胞结合剂的纯化的第二混合物。

70. 根据权利要求 69 所述的方法,其中在具有约 4.0 至约 9.0 的 pH 溶液中进行步骤 (d) 中的温育。

71. 根据权利要求 70 所述的方法,其中所述 pH 为约 5.0 至约 8.0。

72. 根据权利要求 70 所述的方法,其中所述 pH 为约 6.5 至约 7.5。

73. 根据权利要求 69 至 72 中任一项所述的方法,其中在具有约 4.0 至约 9.0 的 pH 的溶液中进行步骤 (a) 中的接触。

74. 根据权利要求 73 所述的方法,其中所述 pH 为约 6.0 至约 8.0。

75. 根据权利要求 73 所述的方法,其中所述 pH 为约 6.5 至约 7.5。

76. 根据权利要求 69 至 75 中任一项所述的方法,其中在具有约 4.0 至约 9.0 的 pH 的溶液中进行步骤 (c) 中的缀合。

77. 根据权利要求 76 所述的方法,其中所述 pH 为约 5.0 至约 8.0。

78. 根据权利要求 76 所述的方法,其中所述 pH 为约 6.5 至约 7.5。

79. 根据权利要求 69 至 78 中任一项所述的方法,其还包括在步骤 (c) 与 (d) 之间将所述第二混合物经历切向流过滤、选择性沉淀、非吸附色谱、吸附过滤、吸附色谱或其组合,以将所述细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物从所述第二混合物的其它组分纯化出业,从而在步骤 (d) 之前制备所述细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物的纯化的第二混合物。

80. 根据权利要求 79 所述的方法,其中在外源 N- 羟基琥珀酰亚胺存在的情况下进行纯化。

81. 根据权利要求 79 或 80 所述的方法,其中将所述第二混合物在步骤 (c) 与 (d) 之间经历切向流过滤。

82. 根据权利要求 69 至 81 中任一项所述的方法,其中在步骤 (e) 中使用切向流过滤。

83. 根据权利要求 69 至 81 中任一项所述的方法,其中在步骤 (e) 中使用吸附色谱。

84. 根据权利要求 69 至 81 中任一项所述的方法,其中在步骤 (e) 中使用非吸附色谱。

85. 根据权利要求 69 至 84 中任一项所述的方法,其中在步骤 (b) 中使用切向流过滤。
86. 根据权利要求 69 至 84 中任一项所述的方法,其中在步骤 (b) 中使用吸附色谱。
87. 根据权利要求 69 至 84 中任一项所述的方法,其中在步骤 (b) 中使用非吸附色谱。
88. 一种用于制备包含通过接头化学地偶联于细胞毒素剂的细胞结合剂的缀合物的方法,所述方法包括:

(a) 将细胞结合剂与双官能交联试剂接触以将接头共价地连接于所述细胞结合剂,从而制备包含具有连接于其的接头的细胞结合剂的第一混合物,

(b) 通过将所述具有连接于其的接头的细胞结合剂与细胞毒素剂反应,来将细胞毒素剂缀合于所述第一混合物中的所述具有连接于其的接头的细胞结合剂,从而制备包含 (i) 含有通过所述接头化学地偶联于所述细胞毒素剂的细胞结合剂的细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物、(ii) 游离细胞毒素剂和 (iii) 反应副产物的第二混合物,

(c) 在外源 N- 羟基琥珀酰亚胺存在的情况下温育所述第二混合物 ;和

(d) 将所述第二混合物在步骤 (c) 之后经历切向流过滤、选择性沉淀、非吸附色谱、吸附过滤、吸附色谱或其组合,以将所述细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物从所述第二混合物的其它组分纯化出来,从而制备所述细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物的纯化的第二混合物。

89. 根据权利要求 88 所述的方法,其中在具有约 4.0 至 9.0 的 pH 的溶液中进行步骤 (c) 中的温育。

90. 根据权利要求 89 所述的方法,其中所述 pH 为约 5.0 至约 8.0。

91. 根据权利要求 89 所述的方法,其中所述 pH 为约 6.5 至约 7.5。

92. 根据权利要求 88 至 91 中任一项所述的方法,其中在具有约 4.0 至 9.0 的 pH 的溶液中进行步骤 (a) 中的接触。

93. 根据权利要求 92 所述的方法,其中所述 pH 为约 6.0 至约 8.0。

94. 根据权利要求 92 所述的方法,其中所述 pH 为约 6.5 至约 7.5。

95. 根据权利要求 88 至 94 中任一项所述的方法,其中在具有约 4.0 至 9.0 的 pH 的溶液中进行步骤 (b) 中的缀合。

96. 根据权利要求 95 所述的方法,其中所述 pH 为约 5.0 至约 8.0。

97. 根据权利要求 95 所述的方法,其中所述 pH 为约 6.5 至约 7.5。

98. 根据权利要求 88 至 97 中任一项所述的方法,其还包括在步骤 (b) 与 (c) 之间将所述第二混合物经历切向流过滤、选择性沉淀、非吸附色谱、吸附过滤、吸附色谱或其组合步骤,以将所述细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物从所述第二混合物的其它组分纯化出来,从而在步骤 (c) 之前制备所述细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物的纯化的第二混合物。

99. 根据权利要求 98 所述的方法,其中在外源 N- 羟基琥珀酰亚胺存在的情况下在步骤 (b) 与 (c) 之间进行所述第二混合物的纯化。

100. 根据权利要求 98 或 99 所述的方法,其中将所述第二混合物在步骤 (b) 与 (c) 之间经历切向流过滤。

101. 根据权利要求 88 至 100 中任一项所述的方法,其中在步骤 (d) 中使用切向流过滤。

102. 根据权利要求 88 至 100 中任一项所述的方法,其中在步骤 (d) 中使用吸附色谱。

103. 根据权利要求 88 至 100 中任一项所述的方法,其中在步骤 (d) 中使用非吸附色谱。

104. 一种用于制备包含通过接头化学地偶联于细胞毒素剂的细胞结合剂的细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物的方法,所述方法包括:

(a) 将细胞结合剂与细胞毒素剂接触以形成包含所述细胞结合剂和所述细胞毒素剂的第一混合物,随后将所述第一混合物与包含接头的双官能交联试剂在具有约 4 至约 9 的 pH 的溶液中接触,以提供包含 (i) 含有通过所述接头化学地偶联于所述细胞毒素剂的细胞结合剂的细胞结合剂细胞毒素剂缀合物、(ii) 游离细胞毒素剂和 (iii) 反应副产物的第二混合物;

(b) 在外源 N- 羟基琥珀酰亚胺存在的情况下温育所述第二混合物;和

(c) 将所述第二混合物在步骤 (b) 后经历切向流过滤、选择性沉淀、非吸附色谱、吸附过滤、吸附色谱或其组合,以将所述细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物从所述第二混合物的其它组分纯化出来,从而制备所述细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物的纯化的第二混合物。

105. 根据权利要求 104 所述的方法,其中在将所述第一混合物与所述双官能交联试剂接触后立即进行步骤 (b) 的温育。

106. 根据权利要求 104 或 105 所述的方法,其中在具有约 4.0 至 9.0 的 pH 的溶液中进行步骤 (b) 中的温育。

107. 根据权利要求 106 所述的方法,其中所述 pH 为约 5.0 至约 8.0。

108. 根据权利要求 106 所述的方法,其中所述 pH 为约 6.5 至约 7.5。

109. 根据权利要求 104 至 108 中任一项所述的方法,其中在具有约 4.0 至约 9.0 的 pH 溶液中进行步骤 (a) 中的接触。

110. 根据权利要求 109 所述的方法,其中所述 pH 为约 6.0 至 8.0。

111. 根据权利要求 104 至 110 中任一项所述的方法,其还包括在步骤 (a) 与 (b) 之间将所述第二混合物经历切向流过滤、选择性沉淀、非吸附色谱、吸附过滤、吸附色谱或其组合,以将所述细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物从所述第二混合物的其它组分纯化出来,从而在步骤 (b) 之前制备所述细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物的纯化的第二混合物。

112. 根据权利要求 111 所述的方法,其中在外源 N- 羟基琥珀酰亚胺存在的情况下在步骤 (a) 与 (b) 之间进行所述第二混合物的纯化。

113. 根据权利要求 111 或 112 所述的方法,其中将所述第二混合物在步骤 (a) 与 (b) 之间经历切向流过滤。

114. 根据权利要求 104 至 113 中任一项所述的方法,其中在步骤 (c) 中使用切向流过滤。

115. 根据权利要求 104 至 113 中任一项所述的方法,其中在步骤 (c) 中使用吸附色谱。

116. 根据权利要求 104 至 113 中任一项所述的方法,其中在步骤 (c) 中使用非吸附色谱。

117. 一种用于制备包含通过接头化学地偶联于细胞毒素剂的细胞结合剂的细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物的方法,所述方法包括:

(a) 将细胞结合剂与细胞毒素剂在外源 N- 羟基琥珀酰亚胺存在的情况下接触,以形成包含所述细胞结合剂和所述细胞毒素剂的第一混合物,随后将所述第一混合物与包含接头

的双官能交联试剂于具有约 4 至约 9 的 pH 的溶液中接触,以提供包含 (i) 含有通过接头化学地偶联于所述细胞毒素剂的细胞结合剂的细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物、(ii) 游离细胞毒素剂和 (iii) 反应副产物的第二混合物;和

(b) 将所述第二混合物经历切向流过滤、选择性沉淀、非吸附色谱、吸附过滤、吸附色谱或其组合,以将所述细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物从所述第二混合物的其它组分纯化出来,从而制备所述细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物的纯化的第二混合物。

118. 一种用于制备包含通过接头化学地偶联于细胞毒素剂的细胞结合剂的细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物的方法,所述方法包括:

(a) 将细胞结合剂与细胞毒素剂接触以形成包含所述细胞结合剂和所述细胞毒素剂的第一混合物,随后将所述第一混合物与包含接头的双官能交联试剂在外源 N- 羟基琥珀酰亚胺存在的情况下于具有约 4 至约 9 的 pH 的溶液中接触,以提供包含 (i) 含有通过所述接头化学地偶联于所述细胞毒素剂的细胞结合剂的细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物、(ii) 游离细胞毒素剂和 (iii) 反应副产物的第二混合物;和

(b) 将所述第二混合物经历切向流过滤、选择性沉淀、非吸附色谱、吸附过滤、吸附色谱或其组合,以将所述细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物从所述第二混合物的其它组分纯化出来,从而制备所述细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物的纯化的第二混合物。

119. 根据权利要求 117 或 118 所述的方法,其中在具有约 4.0 至约 9.0 的 pH 的溶液中的进行步骤 (a) 的接触。

120. 根据权利要求 119 所述的方法,其中所述 pH 为约 6.0 至 8.0。

121. 根据权利要求 117 至 120 中任一项所述的方法,其中在步骤 (b) 中使用切向流过滤。

122. 根据权利要求 117 至 120 中任一项所述的方法,其中在步骤 (b) 中使用吸附色谱。

123. 根据权利要求 117 至 120 中任一项所述的方法,其中在步骤 (b) 中使用非吸附色谱。

124. 一种用于制备包含通过接头化学地偶联于细胞毒素剂的细胞结合剂的细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物的方法,所述方法包括:

(a) 将细胞结合剂与包含化学地偶联于接头的细胞毒素剂的细胞毒素剂-接头化合物接触,以将所述细胞毒素剂-接头化合物共价地连接于所述细胞结合剂,从而制备包含含有通过所述接头化学地偶联于细胞毒素剂的细胞结合剂的细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物的混合物;

(b) 在外源 N- 羟基琥珀酰亚胺存在的情况下温育步骤 (a) 的所述混合物;和

(c) 将所述混合物在步骤 (b) 后经历切向流过滤、选择性沉淀、非吸附色谱、吸附过滤、吸附色谱或其组合,以将所述细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物从所述混合物的其它组分纯化出来,从而制备所述细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物的纯化的混合物。

125. 根据权利要求 124 所述的方法,其中通过将细胞毒素剂与包含接头的双官能交联试剂接触以将所述细胞毒素剂共价地连接于接头,来制备所述细胞毒素剂-接头化合物。

126. 根据权利要求 124 或 125 所述的方法,其中在与所述细胞结合剂接触之前纯化所述细胞毒素剂-接头化合物。

127. 根据权利要求 124 或 125 所述的方法,其中在与所述细胞结合剂接触之前不纯化

所述细胞毒素剂-接头化合物。

128. 根据权利要求 124 至 127 中任一项所述的方法,其中在具有约 4.0 至 9.0 的 pH 的溶液中进行步骤 (b) 中的温育。

129. 根据权利要求 128 所述的方法,其中所述 pH 为约 5.0 至约 8.0。

130. 根据权利要求 128 所述的方法,其中所述 pH 为约 6.5 至约 7.5。

131. 根据权利要求 124 至 130 中任一项所述的方法,其中在具有约 4.0 至 9.0 的 pH 的溶液中进行步骤 (a) 中的接触。

132. 根据权利要求 131 所述的方法,其中所述 pH 为约 6.0 至约 8.0。

133. 根据权利要求 131 所述的方法,其中所述 pH 为约 6.5 至约 7.5。

134. 根据权利要求 124 至 133 中任一项所述的方法,其还包括在步骤 (a) 与 (b) 之间将步骤 (a) 的所述混合物经历切向流过滤、选择性沉淀、非吸附色谱、吸附过滤、吸附色谱或其组合,以将所述细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物从所述混合物的其它组分纯化出来,从而在步骤 (b) 之前制备所述细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物的纯化的混合物。

135. 根据权利要求 134 所述的方法,其中在外源 N-羟基琥珀酰亚胺存在的情况下在步骤 (a) 与 (b) 之间进行所述混合物的纯化。

136. 根据权利要求 134 或 135 所述的方法,其中在步骤 (a) 与 (b) 之间将步骤 (a) 的混合物经历切向流过滤。

137. 根据权利要求 124 至 136 中任一项所述的方法,其中在步骤 (c) 中使用切向流过滤。

138. 根据权利要求 124 至 136 中任一项所述的方法,其中在步骤 (c) 中使用吸附色谱。

139. 根据权利要求 124 至 136 中任一项所述的方法,其中在步骤 (c) 中使用非吸附色谱。

140. 根据权利要求 2 至 139 中任一项所述的方法,其中所述非吸附色谱选自 SEPHADEX™ 树脂、SEPHACRYL™ 树脂、SUPERDEX™ 树脂和 BIO-GEL® 树脂。

141. 根据权利要求 1 至 140 中任一项所述的方法,其中所述吸附色谱选自羟基磷灰石色谱法、疏水性电荷诱导色谱法 (HCIC)、疏水相互作用色谱法 (HIC)、离子交换色谱法、混合模式离子交换色谱法、固定金属亲和色谱法 (IMAC)、染料配体色谱法、亲和色谱法、反相色谱法及其组合。

142. 根据权利要求 1 至 141 中任一项所述的方法,其中所述细胞结合剂选自抗体、干扰素、白细胞介素 2 (IL-2)、白细胞介素 3 (IL-3)、白细胞介素 4 (IL-4)、白细胞介素 6 (IL-6)、胰岛素、EGF、TGF- α 、FGF、G-CSF、VEGF、MCSF、GM-CSF 和转铁蛋白。

143. 根据权利要求 142 所述的方法,其中所述细胞结合剂为抗体。

144. 根据权利要求 143 所述的方法,其中所述抗体为单克隆抗体。

145. 根据权利要求 143 所述的方法,其中所述抗体为人源化单克隆抗体。

146. 根据权利要求 143 所述的方法,其中所述抗体选自 huN901、huMy9-6、huB4、huC242、曲妥珠单抗、比伐单抗、西罗珠单抗、CNT095、huDS6、利妥昔单抗、抗-CD27L 抗体、抗-EGFRvIII 抗体、抗-Cripto 抗体、抗-CD138 抗体、抗-CD38 抗体、抗-EphA2 抗体、整联蛋白靶向抗体、抗-CD37 抗体、抗-叶酸受体抗体、抗-Her3 抗体和抗-IGFIR 抗体。

147. 根据权利要求 1 至 146 中任一项所述的方法,其中所述细胞毒素剂选自类美登素、

紫杉烷类、CC1065 以及前述毒素剂的类似物。

148. 根据权利要求 147 所述的方法,其中所述细胞毒素剂为类美登素。

149. 根据权利要求 148 所述的方法,其中所述类美登素包含硫醇基。

150. 根据权利要求 148 所述的方法,其中所述类美登素为 DM1。

151. 根据权利要求 148 所述的方法,其中所述类美登素为 DM4。

152. 根据权利要求 1 至 151 中任一项所述的方法,其中所述细胞结合剂通过化学键被化学地偶联于所述细胞毒素剂,所述化学键选自二硫键、酸不稳定键、光不稳定键、肽酶不稳定键、硫醚键和酯酶不稳定键。

153. 根据权利要求 1 至 152 中任一项所述的方法,其中所述双官能交联试剂包含可与所述细胞结合剂的赖氨酸残基形成酰胺键的反应性部分。

154. 根据权利要求 153 所述的方法,其中所述反应性部分为羧酸部分或反应性酯部分。

155. 根据权利要求 153 所述的方法,其中所述双官能交联试剂包含 N-琥珀酰亚胺酯部分或 N-磺基琥珀酰亚胺酯部分。

156. 根据权利要求 155 所述的方法,其中所述双官能交联试剂还包含基于马来酰亚胺的部分。

157. 根据权利要求 155 所述的方法,其中所述双官能交联试剂选自 4-(马来酰亚胺甲基)环己基羧酸 N-琥珀酰亚胺酯 (SMCC)、N-琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)-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-琥珀酰亚胺酯 (KMUA)、 γ -马来酰亚胺基丁酸 N-琥珀酰亚胺酯 (GMBS)、N-(β -马来酰亚胺基丙酰氧基)琥珀酰亚胺酯 (BMPS)、 ϵ -马来酰亚胺基己酸 N-羟基琥珀酰亚胺酯 (EMCS)、间-马来酰亚胺苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯 (MBS)、N-(α -马来酰亚胺乙酰氧基)-琥珀酰亚胺酯 (AMAS)、6-(β -马来酰亚胺丙酰氨基)己酸琥珀酰亚胺酯 (SMPH)、4-(对-马来酰亚胺苯基)-丁酸 N-琥珀酰亚胺酯 (SMPB)、磺基-Ma1、PEG₄-Ma1、CX1-1、4-(2-吡啶基二硫代)丁酸 N-琥珀酰亚胺酯 (SPDB)、4-(2-吡啶基二硫代)戊酸 N-琥珀酰亚胺酯 (SPP) 和 4-(2-吡啶基二硫代)2-磺基丁酸 N-琥珀酰亚胺酯 (磺基-SPDB)。

158. 根据权利要求 157 所述的方法,其中所述双官能交联试剂为 4-(马来酰亚胺甲基)环己基羧酸 N-琥珀酰亚胺酯 (SMCC)、4-(2-吡啶基二硫代)戊酸 N-琥珀酰亚胺酯 (SPP) 或 4-(2-吡啶基二硫代)丁酸 N-琥珀酰亚胺酯 (SPDB)。

159. 根据权利要求 1 至 158 中任一项所述的方法,其中所述外源 N-羟基琥珀酰亚胺对所述双官能交联剂的摩尔比为约 0.5 至约 1000。

N- 羧基琥珀酰亚胺用于改善缀合物的稳定性的用途

[0001] 交叉参考相关申请

[0002] 本专利申请要求 2011 年 12 月 13 提交的美国临时专利申请 No. 61/570, 139 的利益, 将所述美国临时专利申请通过引用并入本文。

[0003] 发明背景

[0004] 对癌症和其它疾病的治疗是有用的抗体 - 药物缀合物通常由三个不同的元件组成: 细胞结合剂、接头和细胞毒素剂。常用制剂方法之一包括修饰步骤, 其中将细胞结合剂与双官能接头反应以形成共价地连接于具有反应性基团的接头的细胞结合剂; 纯化步骤, 其中将修饰抗体从修饰反应的组分纯化出来; 缀合步骤, 其中将修饰细胞结合剂与细胞毒素剂反应以从接头 (使用反应性基团) 至细胞毒素剂形成共价化学价; 和第二纯化步骤, 其中将缀合物从缀合反应的其它组分纯化出来。

[0005] 尽管在制备抗体 - 药物缀合物上取得了进展, 但目前的方法受到几个因素限制。例如, 双官能交联剂对抗体的结合在本领域中目前使用的条件下是异质的, 这导致包含稳定的酰胺键和不稳定的酯键的缀合物。据认为缀合物中不稳定酯键的存在导致药物从缀合物释放和缀合物的不稳定性。

[0006] 最近的临床试验已显示抗体 - 药物缀合物在治疗许多不同类型的癌症中的有前景的作用。因此, 存在对改进的制备更稳定的并且比由目前的方法产生的抗体 - 药物缀合物更纯的抗体 - 药物缀合物的方法的需要。本发明提供了这样的方法。本发明的这些和其它有利方面以及另外的发明特征根据本文中提供的本发明的描述将变得显然。

[0007] 发明概述

[0008] 本发明提供了用于在外源 N- 羧基琥珀酰亚胺 (NHS) 存在的情况下制造具有改善的稳定性的细胞结合剂 - 细胞毒素剂缀合物的方法。

[0009] 发明详述

[0010] 本领域技术人员将理解, 包含化学地偶联于细胞毒素剂的抗体的缀合物 (“抗体 - 细胞毒素剂缀合物”) 通常如下进行制备: 利用双官能交联试剂 (通常利用交联试剂上的 N- 羧基琥珀酰亚胺 (NHS) 反应基团) 修饰抗体, 纯化具有连接于其的接头的抗体, 将细胞毒素剂缀合于具有连接于其的接头的抗体, 和纯化抗体 - 细胞毒素剂缀合物。本发明通过使稳定地键合于细胞结合剂的接头的量减少至最少和使导致缀合物不稳定性的不期望的副反应降至最低来改进这样的方法。

[0011] 作为双官能接头 (例如, SPP、SPDB、SMCC) 的水解 / 氨解的结果, 在修饰反应过程中产生少量 NHS。NHS 目前被本领域技术人员当作修饰反应的不期望的 (或至少中性) 副产物。因此, 目前的方法通常包括在添加细胞毒素剂之前纯化修饰抗体, 这导致在缀合反应之前 NHS 的除去。

[0012] 令人惊讶地发现, 在外源 NHS 存在的情况下制备抗体 - 细胞毒素剂缀合物导致缀合物的稳定性的显著增加, 如通过游离类美登素的释放测量的。因此, 本发明提供了用于在外源 NHS 存在的情况下制造具有改善的稳定性的细胞结合剂 - 细胞毒素剂缀合物的方法。

[0013] 本发明提供了用于制备细胞结合剂 - 细胞毒素剂缀合物的方法, 所述方法包括添

加外源 NHS。如本文中所示，“外源 NHS”是指在方法过程中从外部来源添加的 NHS，并且不是指在修饰反应过程中作为双官能接头的水解 / 氨解的结果产生的 NHS。

[0014] 在一个实施方案中，本发明提供了用于制备细胞结合剂 - 细胞毒素剂缀合物的方法，所述方法包括添加约 0.1mM 至约 300mM 的外源 NHS。例如，本发明的方法包括添加约 0.1mM、约 0.2mM、约 0.3mM、约 0.4mM、约 0.5mM、约 0.6mM、约 0.7mM、约 0.8mM、约 0.9mM、约 1.0mM、约 1.1mM、约 1.3mM、约 1.5mM、约 1.7mM、约 1.9mM、约 2.0mM、约 2.1mM、约 2.3mM、约 2.5mM、约 2.7mM、约 2.9mM、约 3.0mM、约 3.1mM、约 3.3mM、约 3.5mM、约 3.7mM、约 3.9mM、约 4.0mM、约 4.1mM、约 4.3mM、约 4.5mM、约 4.7mM、约 4.9mM、约 5.0mM、约 5.1mM、约 5.3mM、约 5.5mM、约 5.7mM、约 5.9mM、约 6.0mM、约 6.1mM、约 6.3mM、约 6.5mM、约 6.7mM、约 6.9mM、约 7.0mM、约 7.1mM、约 7.3mM、约 7.5mM、约 7.7mM、约 7.9mM、约 8.0mM、约 8.1mM、约 8.3mM、约 8.5mM、约 8.7mM、约 8.9mM、约 9.0mM、约 9.1mM、约 9.3mM、约 9.5mM、约 9.7mM、约 9.9mM、约 10mM、约 11mM、约 12mM、约 13mM、约 14mM、约 15mM、约 16mM、约 17mM、约 18mM、约 19mM、约 20mM、约 25mM、约 30mM、约 35mM、约 40mM、约 45mM、约 50mM、约 55mM、约 60mM、约 65mM、约 70mM、约 75mM、约 80mM、约 85mM、约 90mM、约 95mM、约 100mM、约 110mM、约 120mM、约 130mM、约 140mM、约 150mM、约 160mM、约 170mM、约 180mM、约 190mM、约 200mM、约 210mM、约 220mM、约 230mM、约 240mM、约 250mM、约 260mM、约 270mM、约 280mM、约 290mM 或约 300mM 外源 NHS。在一个实施方案中，本发明的方法包括添加约 0.1mM 至约 5mM、约 0.1mM 至约 10mM、约 1.0mM 至约 5mM、约 1.0mM 至约 10mM、约 5.0mM 至约 10mM、约 10mM 至约 20mM、约 20mM 至约 30mM、约 30mM 至约 40mM、约 40mM 至约 50mM、约 50mM 至约 60mM、约 60mM 至约 70mM、约 70mM 至约 80mM、约 80mM 至约 90mM、约 90mM 至约 100mM、约 100mM 至约 110mM、约 110mM 至约 120mM、约 120mM 至约 130mM、约 130mM 至约 140mM、约 140mM 至约 150mM、约 150mM 至约 160mM、约 160mM 至约 170mM、约 170mM 至约 180mM、约 180mM 至约 190mM、约 190mM 至约 200mM、约 200mM 至约 220mM、约 220mM 至约 240mM、约 240mM 至约 260mM、约 260mM 至约 280mM 或约 280mM 至约 300mM 外源 NHS。在另一个实施方案中，本发明的方法包括添加约 10mM 至约 200mM、约 20 至约 150mM、约 50 至约 150mM 或约 20 至约 100mM 外源 NHS。

[0015] 在一些实施方案中，本发明的方法包括添加相对于作为双官能接头的水解 / 氨解的结果在修饰反应过程中产生的 NHS 的量的一定摩尔比的外源 NHS。本领域技术人员可测定在特定修饰过程中产生的 NHS 的量，因为产生的 NHS 的量基本上与使用的双官能接头的量相等。本领域技术人员随后可向反应混合物中添加相对于在修饰反应中产生的 NHS 的量的一定摩尔比的外源 NHS。在一个实施方案中，相对于在修饰反应过程中产生的 NHS 的量添加约 2 至约 200 倍的外源 NHS。例如，本发明的方法包括添加相对于在修饰反应中产生的 NHS 的量约 2 倍、约 5 倍、约 10 倍、约 15 倍、约 20 倍、约 25 倍、约 50 倍、约 100 倍、或约 200 倍的外源 NHS。

[0016] 在一些实施方案中，本发明的方法包括添加相对于双官能接头的量的一定摩尔比的外源 NHS。在一个实施方案中，外源 NHS 对双官能交联试剂的摩尔比为约 0.5 至约 1000 (例如，约 1 至约 900、约 5 至约 750、约 50 至约 500、约 100 至约 500、约 0.5 至约 500 或约 100 至约 1000)。例如，本发明的方法包含相对于双官能接头的量约 0.5 倍、约 1 倍、约 2 倍、约 5、约 10 倍、约 15、约 20 倍、约 25、约 50 倍、约 100 倍、约 200 倍、约 300 倍、约 400 倍、约 500 倍、约 600 倍、约 700 倍、约 800 倍、约 900 或约 1000 倍的 NHS。

[0017] 已描述了许多用于制备细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物的方法(参见,例如,美国临时专利申请 No. 61/468,997、美国专利 5,208,020、美国专利 6,441,163、美国专利 7,811,572、美国专利申请公布 No. 2006/0182750、美国专利申请公布 No. 2008/0145374、美国专利申请公布 No. 2011/0003969 和美国专利申请公布 No. 2012/0253021)。本申请人已令人惊讶地发现在用于制备细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物的方法的过程中在任意点上外源 NHS 的添加对缀合物稳定性具有有益效应。因此,本发明的方法包括在制备细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物的方法的过程中在任意点上添加外源 NHS。例如,本发明的方法包括将外源 NHS 添加至修饰步骤(即,其中将细胞结合剂与双官能接头反应的步骤)、缀合步骤(即,其中将修饰细胞结合剂与细胞毒素剂反应的步骤)、纯化步骤或在前述步骤的任何步骤之间的保持步骤。在一个实施方案中,本发明的方法包括将外源 NHS 添加至修饰步骤(即,将 NHS 添加至修饰反应)、修饰步骤与纯化步骤之间的保持步骤、修饰步骤与缀合步骤之间的保持步骤、纯化步骤、缀合步骤、缀合步骤与纯化步骤之间的保持步骤和/或两个纯化步骤之间的保持步骤。

[0018] 在一个实施方案中,本发明提供了用于制备具有连接于其的接头的细胞结合剂的方法,所述方法包括在外源 NHS 存在的情况下将细胞结合剂与双官能交联试剂反应,以将接头共价地连接于细胞结合剂,从而制备包含具有连接于其的接头的细胞结合剂的混合物。

[0019] 根据本发明的方法,将细胞结合剂与双官能交联试剂(即,修饰反应)接触产生包含具有连接于其的细胞结合剂以及反应物和其它副产物的第一混合物。在本发明的一些实施中,第一混合物包含具有稳定和不稳定地键合于其的接头的细胞结合剂以及反应物和其它副产物。当接头与细胞结合剂之间的共价键在正常贮存条件下在一段时期(所述时期可从数月变化至数年)内未被显著削弱或断裂时,接头被“稳定地”键合于细胞结合剂。相反地,当接头与细胞结合剂之间的共价键在正常贮存条件下在一段时期(所述时期可从数月变化至数年)内被显著削弱或断裂,则接头被“不稳定地”键合于细胞结合剂。

[0020] 修饰反应优选在约 4 至约 pH9 的 pH(例如,约 4.5 至约 8.5、约 5 至约 8、约 5.5 至约 7.5、约 6 至约 7、约 6 至约 8、约 6 至约 9 或约 6.5 至约 7.5 的 pH) 下进行。在一些实施方案中,修饰反应在约 6 至约 8 的 pH(例如,约 6、约 6.5、约 7、约 7.5 或约 8 的 pH) 下进行。

[0021] 在本发明的一个实施方案中,修饰细胞结合剂从反应和副产物的纯化通过将第一混合物经历纯化法来进行。在这一点上,第一混合物可使用切向流过滤(TFF)例如基于膜的切向流过滤法、非吸附色谱、吸附色谱、吸附过滤或选择性沉淀或任何其它适当的纯化法以及其组合来进行纯化。该第一纯化步骤提供了纯化的第一混合物,即相较于在根据本发明的纯化之前的第一混合物增加的具有连接于其的接头的细胞结合剂的浓度和减少的未键合的双官能交联试剂的量。优选地,第一混合物使用切向流过滤来进行纯化。

[0022] 在纯化第一混合物以获得具有连接于其的接头的细胞结合剂的纯化的第一混合物后,通过将具有连接于其的接头的细胞结合剂与细胞毒素剂在具有约 4 至约 9 的 pH 的溶液中反应来将细胞毒素剂缀合于第一纯化的混合物中的具有连接于其的接头的细胞结合剂,从而形成第二混合物,其中产生包含(i)通过接头化学地偶联于细胞毒素剂的细胞结合剂、(ii)游离细胞毒素剂和(iii)反应副产物的第二混合物。

[0023] 任选地,可省略修饰细胞结合剂的纯化。因此,在本发明的一个实施方案中,未将

包含具有连接于其的细胞结合剂以及反应物和其它副产物的第一混合物经历纯化法。在这样的情况下,可将细胞毒素剂与交联试剂同时添加,或可一些更晚的点,例如在将交联试剂添加至细胞结合剂后 1、2、3 或更多个小时添加细胞毒素剂。通过将修饰细胞结合剂与细胞毒素剂在具有约 4 至约 9 的 pH 的溶液中反应来将修饰细胞结合剂缀合于细胞毒素剂(例如,类美登素),其中缀合步骤导致稳定的细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物、非稳定的细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物、非缀合细胞毒素剂(即,“游离”细胞毒素剂)、反应物和副产物的混合物的形成。

[0024] 缀合反应优选在约 4 至约 pH9 的 pH(例如,约 4.5 至约 8.5、约 5 至约 8、约 5.5 至约 7.5、约 6.0 至约 7 或约 6.5 至约 7.5 的 pH) 下进行。在一些实施方案中,缀合反应在约 6 至约 6.5 的 pH(例如,5.5 至 7 的 pH、5.7 至 6.8 的 pH、5.8 至 6.7 的 pH、5.9 至 6.6 的 pH 或 6 至 6.5 的 pH)、约 6 或更低的 pH(例如,约 4 至 6、约 4 至约 5.5、约 5 至 6 的 pH) 或约 6.5 或更高的 pH(例如,6.5 至约 9、约 6.5 至约 7、约 7 至约 9、约 7.5 至约 9 或 6.5 至约 8 的 pH) 下进行。在一个实施方案中,缀合反应在约 4 的 pH 至低于 6 的 pH 下或在高于 6.5 至 9 的 pH 下进行。当缀合步骤在约 6.5 或更高的 pH 下进行,一些含巯基细胞毒素剂可易于通过二硫键形成二聚化。在一个实施方案中,可能需要从反应混合物除去痕量金属和/或氧以及任选地添加抗氧化剂或使用具有更具反应性的离去基团的接头或以超过一个等分添加细胞毒素剂来使得在这样的情况下能够进行高效反应。

[0025] 本发明的方法可任选地包括将蔗糖添加至用于本发明的方法的缀合步骤,以增加细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物的稳定性和回收。令人想要地,以约 0.1% (w/v) 至约 20% (w/v)(例如,约 0.1% (w/v)、1% (w/v)、5% (w/v)、10% (w/v)、15% (w/v) 或 20% (w/v)) 的浓度添加蔗糖。优选地,以约 1% (w/v) 至 10% (w/v)(例如,约 0.5% (w/v)、约 1% (w/v)、约 1.5% (w/v)、约 2% (w/v)、约 3% (w/v)、约 4% (w/v)、约 5% (w/v)、约 6% (w/v)、约 7% (w/v)、约 8% (w/v)、约 9% (w/v)、约 10% (w/v) 或约 11% (w/v)) 的浓度添加蔗糖。此外,缀合反应还可包括缓冲剂的添加。可使用本领域已知的任何适当的缓冲剂。适当的缓冲剂包括例如柠檬酸盐缓冲剂、醋酸盐缓冲剂、琥珀酸盐缓冲剂和磷酸盐缓冲剂。在优选实施方案中,缓冲剂选自 HEPPSO(N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-(2-羟基丙磺酸))、POPSO(哌嗪-1,4-双-(2-羟基-丙烷-磺酸)脱水物)、HEPES(4-(2-羟乙基)哌嗪-1-乙磺酸)、HEPPS(EPPS)(4-(2-羟乙基)哌嗪-1-丙磺酸)、TES(N-[三(羟甲基)甲基]-2-氨基乙磺酸)及其组合。

[0026] 在缀合步骤后,将缀合物经历纯化步骤。在这一点上,缀合混合物可使用切向流过滤(TFF)例如基于膜的切向流过滤法、非吸附色谱、吸附色谱、吸附过滤或选择性沉淀或任何其它适当纯化法以及其组合来纯化。本领域技术人员将理解,缀合步骤后的纯化使得能够分离包含化学地偶联于细胞毒素剂的细胞结合剂的稳定的缀合物。

[0027] 在一个实施方案中,本发明提供了用于制备包含化学地偶联于细胞毒素剂的细胞结合剂的缀合物的方法,所述方法包括在修饰步骤后的第一纯化步骤和在第二纯化步骤,其中方法包括外源 NHS。可在本发明的方法过程中的任意点上添加外源 NHS(即,至修饰步骤、至缀合步骤、至纯化步骤或至上述步骤的任一个之间的保持步骤)。例如,在一个实施方案中,本发明提供了用于制备包含通过接头化学地偶联于细胞毒素剂的细胞结合剂的细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物的方法,所述方法包括(a)将细胞结

合剂与双官能交联试剂接触,以将接头共价地连接于细胞结合剂,从而制备包含具有连接于其的接头的细胞结合剂的第一混合物,(b) 将第一混合物经历切向流过滤、选择性沉淀、非吸附色谱、吸附过滤、吸附色谱或其组合,从而制备具有连接于其的接头的细胞结合剂的纯化的第一混合物,(c) 通过将具有连接于其的接头的细胞结合剂与细胞毒素剂反应来将细胞毒素剂缀合于纯化的第一混合物中的具有连接于其的接头的细胞结合剂,从而制备包含 (i) 含有通过接头化学地偶联于细胞毒素剂的细胞结合剂的细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物、(ii) 游离细胞毒素剂和 (iii) 反应副产物的第二混合物,和 (d) 将第二混合物经历切向流过滤、选择性沉淀、非吸附色谱、吸附过滤、吸附色谱或其组合以将细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物从第二混合物的其它组分纯化出来,从而制备细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物的纯化的第二混合物,其中在步骤 (a) 期间或之后以及在步骤 (c) 之前添加外源 NHS(即,在外源 NHS 存在的情况下进行步骤步骤 (a) 中的接触,所述方法包括在外源 NHS 存在的情况下在步骤 (a) 之后保持混合物,在步骤 (b) 中添加外源 NHS 和 / 或方法包括在外源 NHS 存在的情况下在步骤 (b) 之后保持第一混合物)。在另一个实施方案中,本发明提供了用于制备包含通过接头化学地偶联于细胞毒素剂的细胞结合剂的细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物的方法,方法包括:(a) 将细胞结合剂与双官能交联试剂接触以将接头共价连接于细胞结合剂,从而制备包含具有连接于其的接头的细胞结合剂的第一混合物,(b) 将第一混合物经历切向流过滤、选择性沉淀、非吸附色谱、吸附过滤、吸附色谱或其组合,从而制备具有连接于其的接头的细胞结合剂的纯化的第一混合物,(c) 通过将具有连接于其的接头的细胞结合剂与细胞毒素剂在外源 N- 羟基琥珀酰亚胺存在的情况下反应来将细胞毒素剂缀合于纯化的第一混合物中的具有连接于其的接头的细胞结合剂,从而制备包含 (i) 含有通过接头化学地偶联于细胞毒素剂的细胞结合剂的细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物、(ii) 游离细胞毒素剂和 (iii) 反应副产物的第二混合物,和 (d) 将第二混合物经历切向流过滤、选择性沉淀、非吸附色谱、吸附过滤、吸附色谱或其组合以将细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物从第二混合物的其它组分纯化出来,从而制备细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物的纯化的第二混合物。在另一个实施方案中,本发明提供了用于制备包含通过接头化学地偶联于细胞毒素剂的细胞结合剂的细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物的方法,方法包括:(a) 将细胞结合剂与双官能交联试剂接触以将接头共价地连接于细胞结合剂,从而制备包含具有连接于其的接头的细胞结合剂的第一混合物,(b) 将第一混合物经历切向流过滤、选择性沉淀、非吸附色谱、吸附过滤、吸附色谱或其组合,从而制备具有连接于其的接头的细胞结合剂的纯化的第一混合物,(c) 通过将具有连接于其的接头的细胞结合剂与细胞毒素剂反应来将细胞毒素剂缀合于纯化的第一混合物中的具有连接于其的接头的细胞结合剂,从而制备包含 (i) 含有通过接头化学地偶联于细胞毒素剂的细胞结合剂的细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物、(ii) 游离细胞毒素剂和 (iii) 反应副产物的第二混合物,(d) 在外源 N- 羟基琥珀酰亚胺存在的情况下温育第二混合物;和 (e) 在步骤 (d) 之后将第二混合物经历切向流过滤、选择性沉淀、非吸附色谱、吸附过滤、吸附色谱或其组合以将细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物从第二混合物的其它组分纯化出来,从而制备通过接头化学地偶联于细胞毒素剂的细胞结合剂的纯化的第二混合物。

[0028] 本文中描述的任何纯化法可用于本发明的方法。在本发明的一个实施方案中,在纯化步骤中使用切向流过滤(TFF,也称为交叉流过滤、超滤和渗滤)和 / 或吸附色谱树脂。

例如,本发明的方法可包含在修饰步骤后使用 TFF 的第一纯化步骤和在缀合步骤后使用 TFF 的第二纯化步骤。或者,本发明的方法可包括在修饰步骤后使用吸附色谱的第一纯化步骤和在缀合步骤后使用吸附色谱的第二纯化步骤。本发明的方法还可包括在修饰步骤后使用吸附色谱的第一纯化步骤和在缀合步骤后使用 TFF 的第二纯化步骤,或在修饰步骤后使用 TFF 的第一纯化步骤和在缀合步骤后使用吸附色谱的第二纯化步骤。

[0029] 在本发明的一个实施方案中,将非吸附色谱用作纯化步骤。例如,本发明的方法可包括在修饰步骤后使用非吸附色谱的第二纯化步骤和在缀合步骤后使用非吸附色谱的第二纯化步骤。

[0030] 在另一个实施方案中,本发明提供了用于制备包含化学地偶联于细胞毒素剂的细胞结合剂的缀合物的方法,其中在修饰反应后和在缀合反应前,未将包含具有连接于其的接头的细胞结合剂的第一混合物经历,并且其中所述方法包括外源 NHS。可在在本发明的方法过程中的任意点上添加外源 NHS(即,至修饰步骤、至缀合步骤、至纯化步骤或至上述步骤的任一个之间的保持步骤)。因此,在一个实施方案中,本发明提供了用于制备包含通过接头化学地偶联于细胞毒素剂的细胞结合剂的细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物的方法,所述方法包括:(a) 将细胞结合剂与双官能交联试剂接触以将接头共价地连接于细胞结合剂,从而制备包含具有连接于其的接头的细胞结合剂的第一混合物,(b) 通过将具有连接于其的接头的细胞结合剂与细胞毒素剂反应来将细胞毒素剂缀合于第一混合物中的具有连接于其的接头的细胞结合剂,从而制备包含(i) 含有通过接头偶联于细胞毒素剂的细胞结合剂的细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物、(ii) 游离细胞毒素剂和(iii) 反应副产物的第二混合物,和(c) 将第二混合物经历切向流过滤、选择性沉淀、非吸附色谱、吸附过滤、吸附色谱或其组合,以将细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物从第二混合物的其它组分纯化出来,从而制备细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物的纯化的第二混合物,其中在步骤(a)的过程中或之后和在步骤(b)之前添加外源 N-羟基琥珀酰亚胺(即,在外源 NHS 存在的情况下进行步骤(a)中的接触和/或所述方法包括在外源 NHS 存在的情况下在步骤(a)之后保持第一混合物)。在另一个实施方案中,本发明提供了用于制备包含通过接头化学地偶联于细胞毒素剂的细胞结合剂的细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物的方法,所述方法包括:(a) 将细胞结合剂与双官能交联试剂接触以将接头共价连接于细胞结合剂,从而制备包含具有连接于其的接头的细胞结合剂的第一混合物,(b) 通过将具有连接于其的接头的细胞结合剂与细胞毒素剂在外源 N-羟基琥珀酰亚胺存在的情况下反应来将细胞毒素剂缀合于第一混合物中的具有连接于其的接头的细胞结合剂,从而制备包含(i) 含有通过接头偶联于细胞毒素剂的细胞结合剂的细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物、(ii) 游离细胞毒素剂和(iii) 反应副产物的第二混合物,和(c) 将第二混合物经历切向流过滤、选择性沉淀、非吸附色谱、吸附过滤、吸附色谱或其组合,以将细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物从第二混合物的其它组分纯化出来,从而制备细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物的纯化的第二混合物。在另一个实施方案中,本发明提供了用于制备包含通过接头化学地偶联于细胞毒素剂的细胞结合剂的缀合物的方法,所述方法包括:(a) 将细胞结合剂与双官能交联试剂接触以将接头共价地连接于细胞结合剂,从而制备包含具有连接于其的接头的细胞结合剂的第一混合物,(b) 通过将具有连接于其的接头的细胞结合剂与细胞毒素剂反应来将细胞毒素剂缀合于第一混合物中的具有连接于其的接头的细胞结合剂,从而制备包含(i) 含有通过接头化学地偶联于细

胞毒素剂的细胞结合剂的细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物、(ii) 游离细胞毒素剂和 (iii) 反应副产物的第二混合物, (c) 在外源 N- 羟基琥珀酰亚胺存在的情况下温育第二混合物; 和 (d) 将第二混合物在步骤 (c) 之后经历切向流过滤、选择性沉淀、非吸附色谱、吸附过滤、吸附色谱或其组合, 以将细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物从第二混合物的其它组分纯化出来, 从而制备细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物的纯化的第二混合物。本文中描述的任何纯化法可用作缀合反应后的纯化步骤。在优选实施方案中, 将切向流过滤、吸附色谱或非吸附色谱用作缀合反应后的纯化步骤。

[0031] 在另一个实施方案中, 本发明提供了用于制备包含化学地偶联于细胞毒素剂的细胞结合剂的缀合物的方法, 其中将修饰反应和缀合反应组合入单个步骤, 随后进行纯化步骤 (如在美国临时专利申请 No. 61/468, 997 和美国专利申请公布 No. 2012/0253021 中描述的), 并且其中方法包括外源 NHS。可在本发明的方法过程中的任意点上添加外源 NHS (即, 至组合修饰 / 缀合步骤、至纯化步骤或至上述步骤之间的保持步骤)。因此, 在一个实施方案中, 本发明提供了用于制备包含通过接头化学地偶联于细胞毒素剂的细胞结合剂的细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物的方法, 所述方法包括: (a) 将细胞结合剂与细胞毒素剂在外源 N- 羟基琥珀酰亚胺存在的情况下接触以形成包含细胞结合剂和细胞毒素剂的第一混合物, 随后将第一混合物与包含接头的双官能交联试剂在具有约 4 至约 9 的 pH 的溶液中接触, 以提供包含 (i) 含有通过接头化学地偶联于细胞毒素剂的细胞结合剂的细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物、(ii) 游离细胞毒素剂和 (iii) 反应副产物的第二混合物; 和 (b) 将第二混合物经历切向流过滤、选择性沉淀、非吸附色谱、吸附过滤、吸附色谱或其组合, 以将细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物从第二混合物的其它组分纯化出来, 从而制备细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物的纯化的第二混合物。在另一个实施方案中, 本发明提供了用于制备包含通过接头化学地偶联于细胞毒素剂的细胞结合剂的细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物的方法, 所述方法包括: (a) 将细胞结合剂与细胞毒素剂接触以形成包含细胞结合剂和细胞毒素剂的第一混合物, 随后将第一混合物与包含接头的双官能交联试剂在外源 N- 羟基琥珀酰亚胺存在的情况下于具有约 4 至约 9 的 pH 的溶液中接触, 以提供包含 (i) 含有通过述接头化学地偶联于细胞毒素剂的细胞结合剂的细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物、(ii) 游离细胞毒素剂和 (iii) 反应副产物的第二混合物; 和 (b) 将第二混合物经历切向流过滤、选择性沉淀、非吸附色谱、吸附过滤、吸附色谱或其组合, 以将细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物从第二混合物的其它组分纯化出来, 从而制备细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物的纯化的第二混合物。在另一个实施方案中, 本发明提供了用于制备包含通过接头化学地偶联于细胞毒素剂的细胞结合剂的细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物的方法, 方法包括: (a) 将细胞结合剂与细胞毒素剂接触以形成包含细胞结合剂和细胞毒素剂的第一混合物, 随后将第一混合物与包含接头的双官能交联试剂于具有约 4 至约 9 的 pH 的溶液中接触, 以提供包含 (i) 含有通过述接头化学地偶联于细胞毒素剂的细胞结合剂的细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物、(ii) 游离细胞毒素剂和 (iii) 反应副产物的第二混合物; (b) 在外源 N- 羟基琥珀酰亚胺存在的情况下温育第二混合物; 和 (c) 将第二混合物在步骤 (b) 之后经历切向流过滤、选择性沉淀、非吸附色谱、吸附过滤、吸附色谱或其组合, 以将细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物从第二混合物的其它组分纯化出来, 从而制备细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物的纯化的第二混合物。在一个实施方案中, 在将第一混合物与双官能交联试剂接触后立即进行步骤 (b) 的

温育（即，在组合修饰/缀合步骤后的保持步骤）。在一个实施方案中，方法包括将第二混合物经历步骤（a）与（b）之间的纯化步骤，以将细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物从第二混合物的其它组分纯化出来，从而在保持步骤之前（即，在步骤（b）之前）制备细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物的纯化的第二混合物。本文中描述的任何纯化法可用于本发明的方法。在优选实施方案中，切向流过滤、吸附色谱或非吸附色谱用作纯化步骤。

[0032] 在一个实施方案中，本发明提供了用于制备包含化学地偶联于细胞毒素剂的细胞结合剂的缀合物的方法，其中所述方法包括将预形成的细胞毒素剂-接头化合物缀合于细胞结合剂，如美国专利 6,441,163 以及美国专利申请公布 No. 2011/0003969 和 2008/0145374 中描述的，并且其中方法包括外源 NHS。可在本发明的方法的过程中的任意点上添加外源 NHS（即，至缀合步骤、至纯化步骤或上述步骤之间的保持步骤）。例如，在一个实施方案中，本发明提供了用于制备包含通过接头化学地偶联于细胞毒素剂的细胞结合剂的细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物的方法，所述方法包括（a）将细胞结合剂与包含化学地偶联于接头的细胞毒素剂的细胞毒素剂-接头化合物接触，以将细胞毒素剂-接头化合物共价地连接于细胞结合剂，从而制备包含含有通过接头化学地偶联于细胞毒素剂的细胞结合剂的细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物的混合物和（b）将包含细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物的混合物经历切向流过滤、选择性沉淀、非吸附色谱、吸附过滤、吸附色谱或其组合，以纯化缀合物，其中在步骤（a）期间或之后和在步骤（b）之前添加外源 N-羟基琥珀酰亚胺（即，在外源 NHS 存在的情况下进行步骤（a）中的接触或方法包括在外源 NHS 存在的情况下在（a）之后保持混合物）。在另一个实施方案中，本发明提供了用于制备包含通过接头化学地偶联于细胞毒素剂的细胞结合剂的细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物的方法，所述方法包括：（a）将细胞结合剂与包含化学地偶联于接头的细胞毒素剂的细胞毒素剂-接头化合物接触，以将细胞毒素剂-接头化合物共价地连接于细胞结合剂，从而制备包含含有通过接头化学地偶联于细胞毒素剂的细胞结合剂的细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物的混合物；（b）在外源 N-羟基琥珀酰亚胺存在的情况下温育步骤（a）的混合物；和（c）将混合物在步骤（b）后经历切向流过滤、选择性沉淀、非吸附色谱、吸附过滤、吸附色谱或其组合，以将细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物从混合物的其它组分纯化出来，从而制备细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物的纯化的混合物。方法任选地包括将步骤（a）的混合物经历步骤（a）与（b）之间的纯化，以将细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物从混合物的其它组合分纯化出来，从而在保持步骤（步骤（b））之前制备细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物的纯化的混合物。步骤（a）与（b）之间的纯化步骤任选地在外源 NHS 存在的情况下进行。本文中描述的任何纯化法可用于本发明的方法。在优选实施方案中，切向流过滤、吸附色谱或非吸附色谱用作纯化步骤。

[0033] 在一个实施方案中，通过将细胞毒素剂与包含接头双官能交联试剂接触来制备细胞毒素剂-接头化合物，以将细胞毒素剂共价地连接于接头。在将细胞毒素剂-接头化合物与细胞结合剂接触之前，将细胞毒素剂-接头化合物任选地经历纯化。

[0034] 在本发明的一个实施方案中，本发明的方法包括在缀合步骤后两个分开的纯化步骤。可在外源 NHS 存在的情况下进行缀合反应后的纯化步骤。例如，本发明的方法可包括缀合步骤，随后进行纯化步骤（在外源 NHS 不存在或存在的情况下），随后在外源 NHS 存在的情况下进行保持步骤，随后进行另一个纯化步骤。本文中描述的任何纯化法可用作缀合

反应后的纯化步骤。在优选实施方案中,切向流过滤、吸附色谱、非吸附色谱或其组合在缀合反应后用作纯化步骤。

[0035] 任何适当的 TFF 系统可用于纯化,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)。

[0036] 任何适当的吸附色谱树脂可用于纯化。优选吸附色谱树脂包括羟基磷灰石色谱法、疏水性电荷诱导色谱法 (HCIC)、疏水相互作用色谱法 (HIC)、离子交换色谱法、混合模式离子交换色谱法、固定金属亲和色谱法 (IMAC)、染料配体色谱法、亲和色谱法、反相色谱法及其组合。适当的羟基磷灰石树脂的实例包括陶瓷羟基磷灰石 (CHT I 型和 II 型, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)、HA Ultrogel 羟基磷灰石 (Pall Corp., East Hills, NY) 和陶瓷氟磷灰石 (CFT I 型和 II 型, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)。适当的 HCIC 树脂的实例为 MEP Hypercel 树脂 (Pall Corp., East Hills, NY)。适当的 HIC 树脂的实例包括丁基-Sepharose、己基-Sepaharose、苯基-Sepharose 和辛基 Sepharose 树脂 (全部来自 GE Healthcare, Piscataway, NJ) 以及 Macro-prep 甲基和 Macro-Prep 叔-丁基树脂 (Biorad Laboratories, Hercules, CA)。适当的离子交换树脂的实例包括 SP-Sepharose、CM-Sepharose 和 Q-Sepharose 树脂 (全部来自 GE Healthcare, Piscataway, NJ) 以及 Unosphere S 树脂 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)。适当的混合模式离子交换剂的实例包括 Bakerbond ABx 树脂 (JT Baker, Phillipsburg NJ)。适当的 IMAC 树脂的实例包括螯合 Sepharose 树脂 (GE Healthcare, Piscataway, NJ) 和 Profinity IMAC 树脂 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)。适当的染料配体树脂的实例包括 Blue Sepharose 树脂 (GE Healthcare, Piscataway, NJ) 和 Affi-gel Blue 树脂 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)。适当的亲和树脂的实例包括蛋白 A Sepharose 树脂 (例如, MabSelect, GE Healthcare, Piscataway, NJ), 其中细胞结合剂为抗体, 和外源凝集素亲和树脂例如兵豆属植物外源凝集素 Sepharose 树脂 (GE Healthcare, Piscataway, NJ), 其中细胞结合剂具有适当的外源凝集素结合部位。或者, 可使用对于细胞结合剂是特异的抗体。可将这样的抗体固定于例如 Sepharose 4Fast Flow 树脂 (GE Healthcare, Piscataway, NJ)。适当的反相树脂的实例包括 C4、C8 和 C18 树脂 (Grace Vydac, Hesperia, CA)。

[0037] 任何适当的非吸附色谱树脂可用于纯化。适当的非吸附色谱树脂的实例包括但不限于 SEPHADEX™ G-25、G-50、G-100、SEPHACRYL™ 树脂 (例如, S-200 和 S-300)、SUPERDEX™ 树脂 (例如, SUPERDEX™75 和 SUPERDEX™200)、**BIO-GEL®树脂** (例如, P-6、P-10、P-30、P-60 和 P-100) 以及对于本领域技术人员来说是已知的其它树脂。

[0038] 在一个实施方案中, 本发明的方法还包括在外源 NHS 存在的情况下包括一个或多个 (例如, 一、二或三个) 保持步骤 (即, 将外源 NHS 添加至保持步骤), 以将不稳定地结合的接头从细胞结合剂释放。保持步骤包括在用双官能交联试剂修饰细胞结合剂后, 在将细胞毒素剂缀合于具有连接于其的接头的细胞结合剂后, 和 / 或在纯化步骤之后保持混合物。

[0039] 保持步骤包括将溶液维持在适当的温度 (例如, 约 2℃ 至约 37℃) 进行适当的时期 (例如, 约 1 小时至约 1 周) 以从细胞结合剂释放不稳定结合的接头, 同时大体上不从细胞结合剂释放稳定结合的接头。在一个实施方案中, 保持步骤包括将溶液维持在低温 (例

如,约 2℃至约 10℃或约 4℃)、室温(例如,约 20℃至约 30℃或约 20℃至约 25℃)或升高的温度(例如,约 30℃至约 37℃)。

[0040] 保持步骤的持续时间取决于进行维持步骤时的温度。例如,保持步骤的持续时间可通过在升高的温度上进行保持步骤来显著减少,最大温度受限于细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物的稳定性。保持步骤可包括维持溶液约 1 小时至约 1 天(例如,约 1 小时、约 2 小时、约 3 小时、约 4 小时、约 5 小时、约 6 小时、约 7 小时、约 8 小时、约 9 小时、约 10 小时、约 12 小时、约 14 小时、约 16 小时、约 18 小时、约 20 小时、约 22 小时或约 24 小时),约 5 小时至约 1 周,约 12 小时至约 1 周(例如,约 12 小时、约 16 小时、约 20 小时、约 24 小时、约 2 天、约 3 天、约 4 天、约 5 天、约 6 天或约 7 天),进行约 12 小时至约 1 周(例如,约 12 小时、约 16 小时、约 20 小时、约 24 小时、约 2 天、约 3 天、约 4 天、约 5 天、约 6 天或约 7 天)或约 1 天至约 1 周。

[0041] 在一个实施方案中,保持步骤包括将溶液维持在约 2℃至约 8℃的温度,进行至少约 12 小时直至 1 天的时间。

[0042] 用于保持步骤的 pH 值优选为约 4 至约 9(例如,约 4.5 至约 8.5 或约 5 至约 8)。在一个实施方案中,用于保持步骤的 pH 值从约 5 变化至约 7.5(例如,约 5.5 至约 7.5、约 6 至约 7.5、约 6.5 至约 7.5、约 7 至约 7.5、约 5 至约 7、约 5 至约 6.5、约 5 至约 5.5、约 5.5 至约 7、约 6 至约 6.5 或约 6 至约 7)。例如,用于保持步骤的 pH 值可以为约 4、约 4.5、约 5、约 5.5、约 6、约 6.5、约 7、约 7.5、约 8、约 8.5 或约 9。

[0043] 可在将细胞结合剂缀合于细胞毒素剂之前或之后进行保持步骤。在一个实施方案中,在用双官能交联试剂修饰细胞结合剂之后直接进行保持步骤。例如,本发明的方法包括在用双官能交联试剂修饰细胞结合剂之后并且在缀合之前进行保持步骤。在修饰细胞结合剂后,可在保持步骤之前和/或保持步骤之后,但在缀合步骤之前进行纯化。在另一个实施方案中,在将细胞毒素剂缀合于具有连接于其的细胞结合剂之后并且在纯化步骤之前直接进行保持步骤。在另一个实施方案中,在缀合和纯化步骤之前进行保持步骤,随后进行另外的纯化步骤。

[0044] 在具体实施方案中,保持步骤可包括在约 2℃至约室温在于约 5-7.5 或约 6.5-7.5 的 pH 下温育混合物约 1 小时至约 1 周。

[0045] 本发明提供了用于制备包含化学地偶联于细胞毒素剂的细胞结合剂的稳定缀合物的组合物的方法,其中所述组合物大体上不含不稳定的缀合物。在这方面,本发明提供了用于制备具有显著高的纯度和稳定性的细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物的方法。由缀合物的高纯度和稳定性,这样的组合物可用于治疗疾病。包含化学地偶联于细胞毒素剂例如类美登素的细胞结合剂例如抗体的组合物描述于例如美国专利 7,374,762 和美国专利申请公布 No. 2007/0031402 中。在本发明的一个方面,具有显著地高的纯度的细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物下列特征的一个或多个特征:(a) 大于约 90%(例如,大于或等于约 91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%),优选大于约 95%的缀合物种类是单体的,(b) 缀合物制剂中未缀合接头水平低于约 10%(例如,少于或等于约 9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或 0%)(相对于总的接头)、(c) 少于 10%的缀合物种类被交联(例如,少于或等于约 9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或 0%),(d) 缀合物制剂中的游离细胞毒素剂水平少于约 2%(例如,少于或等于约 1.9%、1.8%、1.7%、1.6%、

1.5%、1.4%、1.3%、1.2%、1.1%、1.0%、0.9%、0.8%、0.7%、0.6%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%或0%)(相对于总的细胞毒素剂),和/或(e)贮存后(例如,在约1周、约2周、约3周、约1月、约2月、约3月、约4月、约5月、约6月、约1年、约2年或约5年后)游离细胞毒素剂水无显著升高。游离细胞毒素剂水平的“显著升高”意指在一定的贮存时间后,游离细胞毒素剂的水平的升高少于约0.1%、约0.2%、约0.3%、约0.4%、约0.5%、约0.6%、约0.7%、约0.8%、约0.9%、约1.0%、约1.1%、约1.2%、约1.3%、约1.4%、约1.5%、约1.6%、约1.7%、约1.8%、约1.9%、约2.0%、约2.2%、约2.5%、约2.7%、约3.0%、约3.2%、约3.5%、约3.7%或约4.0%。

[0046] 如本文中所用,术语“未缀合的接头”是指与双官能交联试剂共价连接的细胞结合剂,其中细胞结合剂未通过双官能交联试剂的接头共价地偶联于细胞毒素剂(即,“未缀合的接头”可由CBA-L表示,其中CBA表示细胞结合剂并且L表示双官能交联试剂。相反地,细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物可由CBA-L-D表示,其中D表示细胞毒素剂)。

[0047] 在一个实施方案中,细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物中的细胞毒素剂对细胞结合剂的平均摩尔比为约1至约10、约2至约7、约3至约5、约2.5至约4.5(例如,约2.5、约2.6、约2.7、约2.8、约2.9、约3.0、约3.1、约3.3、约3.4、约3.5、约3.6、约3.7、约3.8、约3.9、约4.0、约4.1、约4.2、约4.3、约4.4、约4.5)、约3.0至约4.0、约3.2至约4.2、约4.5对5.5(例如,约4.5、约4.6、约4.7、约4.8、约4.9、约5.0、约5.1、约5.2、约5.3、约5.4、约5.5)。

[0048] 细胞结合剂可以是结合细胞,通常且优选地动物细胞(例如,人细胞)的任何适当的试剂。细胞结合剂优选为肽或多肽。适当的细胞结合剂包括例如抗体(例如,单克隆抗体及其片段)、干扰素(例如, $-\alpha$ 、 $-\beta$ 、 $-\gamma$)、淋巴因子(例如,白细胞介素2(IL-2)、白细胞介素3(IL-3)、白细胞介素4(IL-4)、白细胞介素6(IL-6)、激素(例如,胰岛素、TRH(促甲状腺激素释放激素)、MSH(黑素细胞刺激素)、类固醇激素,例如雄激素类和雌激素类)、生长因子和集落刺激因子,例如表皮生长因子(EGF)、转化生长因子 α (TGF- α)、成纤维细胞生长因子(FGF)、血管内皮生长因子(VEGF)、集落刺激因子(CSF),例如G-CSF, M-CSF和GM-CSF(Burgess, Immunology Today 5:155-158(1984))、营养物转运分子(例如,转铁蛋白)、维生素(例如,叶酸)以及特异性结合细胞表面上的靶分子的任何其它试剂或分子。

[0049] 当细胞结合剂是抗体时,其结合抗原,所述抗原是多肽和可以是跨膜分子(例如受体)或配体例如生长因子。示例性抗原包括分子例如肾素;生长激素,包括人生长激素和牛生长激素;生长激素释放因子;甲状旁腺激素;促甲状腺激素;脂蛋白; α -1-抗胰蛋白酶;胰岛素A-链;胰岛素B-链;胰岛素原;滤泡刺激激素;降钙素;促黄体激素;胰高血糖素;凝血因子例如因子viii、因子IX、组织因子(TF)和von Willebrands因子;抗-凝血因子例如蛋白C;心钠素;肺表面活性剂;血纤溶酶原激活物,例如尿激酶或人纤溶酶原激活物(t-PA);铃蟾肽;凝血酶;造血生长因子;肿瘤坏死因子 $-\alpha$ 和 $-\beta$;脑啡肽酶;RANTES(在激活上受调节的,通常T-细胞表达和分泌的);人巨噬细胞炎性蛋白(MIP-1 $-\alpha$);血清白蛋白,例如人血清白蛋白;Muellerian抑制物质;松弛素A-链;松弛素B-链;松弛素原;小鼠促性腺素相关肽;微生物蛋白,例如 β -内酰胺酶;DNA酶;IgE;细胞毒素T淋巴细胞相关抗原(CTLA),例如CTLA-4;抑制素;活化素;血管内皮生长因子(VEGF);激素或生长因子的受体;蛋白A或D;类风湿因子;神经营养因子例如骨来

源的神经生长因子 (BDNF), 神经生长因子 -3、-4、-5 或 -6 (NT-3、NT4、NT-5 或 NT-6) 或神经生长因子例如 NGF- β ; 血小板衍生生长因子 (PDGF); 成纤维细胞生长因子例如 aFGF 和 bFGF; 表皮生长因子 (EGF); 转化生长因子 (TGF) 例如 TGF- α 和 TGF- β , 包括 TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、TGF- β 4 或 TGF- β 5; 胰岛素样生长因子 -I 和 -II (IGF-I 和 IGF-II); des (1-3)-IGF-I (脑 IGF-I)、胰岛素样生长因子结合蛋白、EpCAM、GD3、FLT3、PSMA、PSCA、MUC1、MUC16、STEAP、CEA、TENB2、EphA 受体、EphB 受体、叶酸受体、FOLR1、间皮素、cripto、 $\alpha_v\beta_6$ 、整联蛋白、VEGF、VEGFR、EGFR、转铁蛋白受体、IRTA1、IRTA2、IRTA3、IRTA4、IRTA5; CD 蛋白例如 CD2、CD3、CD4、CD5、CD6、CD8、CD11、CD14、CD19、CD20、CD21、CD22、CD25、CD26、CD28、CD30、CD33、CD36、CD37、CD38、CD40、CD44、CD52、CD55、CD56、CD59、CD70、CD79、CD80、CD81、CD103、CD105、CD134、CD137、CD138、CD152 或美国专利申请公布 No. 2008/0171040 或美国专利申请公布 No. 2008/0305044 (将所述美国专利申请公布通过引用整体并入本文) 中公开的结合一种或多种肿瘤相关抗原或细胞表面受体的抗体; 红细胞生成素; 骨诱导因子; 免疫毒素; 骨形态发生蛋白 (BMP); 干扰素, 例如干扰素 - α 、- β 和 - γ ; 集落刺激因子 (CSF), 例如, M-CSF, GM-CSF 和 G-CSF; 白细胞介素 (IL), 例如, IL-1 至 IL-10; 超氧化物歧化酶; T-细胞受体; 表面膜蛋白; 衰变加速因子; 病毒抗原例如, HIV 包膜的部分; 转运蛋白; 归巢受体; 地址素; 调节蛋白; 整联蛋白例如 CD11a、CD11b、CD11c、CD18、ICAM、VLA-4 和 VCAM; 肿瘤相关抗原例如 HER2、HER3 或 HER4 受体; 内皮因子、c-Met、1GF1R、PSGR、NGEP、PSMA、PSCA、LGR5、B7H4 以及上文列出的多肽的任一种的片段。

[0050] 此外, 结合骨髓细胞的 GM-CSF 可用作针对来自急性髓性白血病的患病细胞的细胞结合剂。结合活化的 T 细胞的 IL-2 可用于移植排斥的预防, 用于移植物抗宿主病的治疗和预防, 和用于急性 T 细胞白血病的治疗。结合黑色素细胞的 MSH 可用于治疗黑色素瘤, 正如针对黑色素瘤的抗体可用于治疗黑色素瘤一样。叶酸可用于靶向卵巢和其它肿瘤上表达的叶酸受体。表皮生长因子可用于靶向鳞癌例如肺以及头颈癌。生长抑素可用于靶向神经母细胞瘤和其它肿瘤类型。

[0051] 乳腺和睾丸的癌症可分别被作为细胞结合剂的雌激素 (或雌激素类似物) 或雄激素 (或雄激素类似物) 成功靶向。

[0052] 如本文中所用, 术语“抗体”是指任何免疫球蛋白、任何免疫球蛋白片段例如 Fab、Fab'、F(ab')₂、dsFv、sFv、微型抗体、双链抗体、三链抗体、四链抗体、纳米抗体、蛋白水解激活抗体、结构域抗体、单链抗体等 (Parham, J. Immunol. 131:2895-2902 (1983); Spring 等人, J. Immunol. 113:470-478 (1974); Nisonoff 等人, Arch. Biochem. Biophys. 89:230-244 (1960); Kim 等人, Mol. Cancer Ther., 7:2486-2497 (2008); Carter, Nature Revs., 6:343-357 (2006)) 或免疫球蛋白嵌合体, 其可结合细胞表面上的抗原 (例如, 其包含互补决定区 (CDR))。任何适当的抗体可用作细胞结合剂。本领域技术人员将理解适当的抗体的选择将取决于待被靶向的细胞群体。在这一点上, 在特定细胞群体 (通常地且优选地患病细胞群体) 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的组合物的适当的抗体的选择。细胞表面表达特征谱对于多种细胞类型包括肿瘤细胞类型是已知的, 或如果未知时, 可使用常规分子生物学和组织化学技术来测定。抗体可以是双特异性抗体 (Morrison, SL, Nature biotechnology, 25(11):1233-4 (2007))。

[0053] 抗体可以是多克隆的或单克隆的,但最优选是单克隆抗体。如本文中所用,“多克隆”抗体是指通常包含在被免疫的动物的血清中的抗体分子的异质群体。“单克隆”抗体是指对于特定抗原是特异性的抗体分子的同质群体。单克隆抗体通常由单个克隆的B淋巴细胞(“B细胞”)产生。单克隆抗体可使用本领域技术人员已知的多种技术来获得,包括标准杂交瘤技术(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 等人(编辑), Immunobiology, 第5版, Garland Publishing, New York, NY(2001))。简而言之,产生单克隆抗体的杂交瘤法通常包括利用抗原(即,“免疫原”)注射任何适当的动物,通常且优选地小鼠。随后杀死动物,将从其脾分离的B细胞与人骨髓瘤细胞融合。产生杂交细胞(即,“杂交瘤”),其可无限增殖并在体外连续分泌高滴度的具有期望的特异性的抗体。本领域已知的任何适当方法可用于鉴定产生具有期望的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(ELISA)、Western 印迹分析和放射免疫测定。筛选杂交瘤的群体以分离单个克隆,所述克隆的每一个分泌针对抗原的单一抗体种类。因为每一个杂交瘤是来源于与单个B细胞融合的克隆,因此其产生的所有抗体分子在结构上包括它们的抗原结合部位和同种型是相同的。单克隆抗体还可使用其它适当的技术包括 EBV- 杂交瘤技术(参见,例如, Haskard 和 Archer, J. Immunol. Methods, 74(2):361-67(1984), 和 Roder 等人, Methods Enzymol., 121:140-67(1986))、噬菌体载体表达系统(参见,例如, Huse 等人, Science, 246:1275-81(1989))或包含抗体片段例如 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 以及国际专利申请公布 No. WO 92/01047 和 WO 99/06587)来产生。

[0054] 单克隆抗体可从任何适当的动物分离或可在其中产生,但优选在哺乳动物,更优选小鼠或人,最优选人中产生。用于在小鼠中产生抗体的方法对于本领域技术人员来说是公知的并且在本文中进行了描述。关于人抗体,本领域技术人员将理解多克隆抗体可从利用适当的抗原接种或免疫的人受试者的血清分离。或者,人抗体可通过采用用于在非人动物例如小鼠中产生人抗体的已知技术来产生(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 No. 2002/0197266 A1)。

[0055] 虽然是人的治疗应用的理想选择,但人抗体,特别地人单克隆抗体,通常比小鼠单克隆抗体更难产生。然而,小鼠单克隆抗体,当给人施用,诱导快速宿主抗体反应,这可减小抗体-细胞毒素剂缀合物的治疗或诊断潜能。为了克服这些并发症,单克隆抗体优选地不被免疫系统识别为“外来的”。

[0056] 为此目的,噬菌体展示可用于产生抗体。在这一点上,编码抗体的抗原结合可变(V)结构域的噬菌体文库可使用标准分子生物学和重组DNA技术来产生(参见,例如, Sambrook 等人(编辑), Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 第3版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York(2001))。选择编码具有期望的特异性的可变区的噬菌体的对期望的抗原的特异性结合,重建包含选择的可变结构域的完全人抗体。将编码重建抗体的核酸序列引入适当的细胞系,例如用于杂交瘤产生的骨髓瘤细胞,以便具有单克隆抗体的特征的人抗体由细胞分泌(参见,例如, Janeway 等人, 同上, Huse 等人, 同上, 和美国专利 6,265,150)。或者,可从对于特定人重链和轻链免疫球蛋白基因是转基因的小鼠产生单克隆抗体。这样的方法在本领域是已知的并且描述于例如美国专利 5,545,806 和

5, 569, 825 以及 Janeway 等人 (同上) 中。

[0057] 最优选地, 抗体是人源化抗体。如本文中所用, “人源化” 抗体是其中将形成抗体的抗原结合环的小鼠单克隆抗体的互补决定区 (CDR) 移植至人抗体分子的构架上的抗体。归因于小鼠与人抗体的构架的相似性, 通常在本领域接受: 该方法产生在抗原性上与人抗体相同但结合与 CDR 所源自的小鼠单克隆抗体结合的抗原相同的抗原的单克隆抗体。用于产生人源化抗体的方法在本领域是公知的并且详细地描述于例如 Janeway 等人 (同上)、美国专利 5, 225, 539、5, 585, 089 和 5, 693, 761、欧洲专利 0239400 B1 以及英国专利 2188638 中。人源化抗体还可使用美国专利 5, 639, 641 和 Pedersen 等人, *J. Mol. Biol.*, 235:959-973(1994) 中描述的抗体表面重建技术来产生。虽然本发明组合物的缀合物中使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。

[0058] 具有至少一个抗原结合部位, 从而识别并结合至少一个存在于靶细胞表面上的抗原或受体的抗体片段也在本发明的苦海无边内。在这方面, 完整抗体分子的蛋白质水解切割可产生保留识别并结合抗原的能力的许多抗体片段。例如, 利用蛋白酶木瓜蛋白酶对抗体分子的有限消化通常产生三个片段, 所述片段中的两个片段相同并且被称为 Fab 片段, 因为它们保留亲代抗体分子的抗原结合活性。利用酶胃蛋白酶对抗体分子的切割通常产生两个抗体片段, 所述片段中的一个保留抗体分子的两个抗原结合臂, 从而被称为 $F(ab')_2$ 片段。利用二硫苏糖醇或巯基乙胺对 $F(ab')_2$ 片段的还原产生称为 Fab' 片段的片段。单链可变区片段 (sFv) 抗体片段 (其由包含通过合成肽连接于抗体轻链的 V 结构域的抗体重链的可变 (V) 结构域的截断的 Fab 片段组成) 可使用常规重组 DNA 技术 (参见, 例如, Janeway 等人, 同上) 来产生。类似地, 二硫化物稳定的可变区片段 (dsFv) 可通过重组 DNA 技术来制备 (参见, 例如, Reiter 等人, *Protein Engineering*, 7:697-704(1994))。然而, 本发明的背景中的抗体片段不限于抗体片段的这些示例性类型。可使用识别并结合期望的细胞表面受体或抗原的任何适当的抗体片段。抗体片段进一步描述于例如 Parham, *J. Immunol.*, 131:2895-2902(1983); Spring 等人, *J. Immunol.*, 113:470-478(1974); 和 Nisonoff 等人, *Arch. Biochem. Biophys.*, 89:230-244(1960) 中。抗体-抗原结合可使用本领域已知的任何适当的方法来测定, 所述方法是例如放射免疫测定 (RIA)、ELISA、Western 印迹、免疫沉淀和竞争性抑制测定 (参见, 例如, Janeway 等人, 同上, 和美国专利申请公布 No. 2002/0197266A1)。

[0059] 此外, 抗体可以是嵌合抗体或其抗原结合片段。关于“嵌合”, 其意指抗体包含至少两个获自或来源于至少两个不同物种的免疫球蛋白或其片段 (例如, 两种不同免疫球蛋白, 例如与鼠免疫球蛋白可变区组合的人免疫球蛋白恒定区)。抗体还可以是结构域抗体 (dAb) 或其抗原结合片段, 例如, 骆驼抗体 (参见, 例如, Desmyter 等人, *Nature Struct. Biol.*, 3:752, (1996)) 或鲨鱼抗体, 例如, 新的抗原受体 (IgNAR) (参见, 例如, Greenberg 等人, *Nature*, 374:168(1995) 和 Stanfield 等人, *Science*, 305:1770-1773(2004))。

[0060] 任何适当的抗体可用于本发明的背景。例如, 单克隆抗体 J5 是对于常见急性淋巴细胞白血病抗原 (CALLA) 是特异性的鼠 IgG2a 抗体 (Ritz 等人, *Nature*, 283:583-585(1980)), 并且可用于靶向表达 CALLA 的细胞 (例如, 急性淋巴母细胞白血病细胞)。单克隆抗体 MY9 是特异性结合 CD33 抗原的鼠 IgG1 抗体 (Griffin 等

人, *Leukemia Res.*, 8:521 (1984)), 并且可用于靶向表达 CD33 的细胞 (例如, 急性髓性白血病 (AML) 细胞)。

[0061] 类似地, 单克隆抗体抗 -B4 (也称为 B4) 是结合 B 细胞上的 CD19 抗原的鼠 IgG1 抗体 (Nadler 等人, *J. Immunol.*, 131:244-250 (1983)), 并且可用于靶向 B 细胞或表达 CD19 的患病细胞 (例如, 非何杰金氏淋巴瘤细胞和慢性淋巴母细胞白血病细胞)。N901 是结合在神经内分泌来源包括小细胞肺肿瘤的细胞上发现的 CD56 (神经细胞粘附分子) 抗原的鼠单克隆抗体, 其可在缀合物中用于将药物靶向神经内分泌来源的细胞。优选在 J5、MY9 和 B4 抗体用作缀合物的部分之前将其进行表面重建或人源化。抗体的表面重建或人源化描述于例如 Roguska 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:969-73 (1994) 中。

[0062] 此外, 单克隆抗体 C242 结合 CanAg 抗原 (参见, 例如, 美国专利 5, 552, 293), 并且可用于将缀合物靶向表达 CanAg 的肿瘤例如结直肠癌、胰腺癌、非小细胞肺癌和胃癌。HuC242 是单克隆抗体 C242 的人源化形式 (参见, 例如, 美国专利 5, 552, 293)。将 HuC242 所产生自的杂交瘤以 ECACC 标识号 90012601 保藏。HuC242 可使用 CDR- 移植法 (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) 来制备。HuC242 可用于将缀合物靶向表达 CanAg 抗原的肿瘤细胞, 例如结直肠癌细胞、胰腺癌细胞、非小细胞肺癌细胞和胃癌细胞。

[0063] 为了靶向卵巢癌和前列腺癌细胞, 可将抗 -MUC1 抗体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 等人, *Int. J. Cancer*, 28:17-21 (1981))、hCTM01 (参见, 例如, van Hof 等人, *Cancer Res.*, 56:5179-5185 (1996)) 和 DS6。前列腺癌细胞还可通过使用抗 -前列腺 - 特异性膜抗原 (PSMA) 作为细胞结合剂例如 J591, 利用缀合物来靶向 (参见, 例如, Liu 等人, *Cancer Res.*, 57:3629-3634 (1997))。此外, 表达 Her2 抗原的癌细胞例如乳腺癌和卵巢癌可使用抗体曲妥珠单抗来靶向。结合胰岛素样生长因子受体的抗 -IGF-IR 抗体还可用于缀合物。结合 CD27L、EGFRvIII、Cripto、CD138、CD38、EphA2、整联蛋白、CD37、叶酸受体和 Her3 的抗体还可用于缀合物。

[0064] 在一个实施方案中, 抗体选自 huN901、huMy9-6、huB4、huC242、曲妥珠单抗、比伐单抗、西罗珠单抗、利妥昔单抗、huDS6、国际专利申请公布 No. WO 2010/124797 中描述的抗 - 间皮素抗体 (例如 MF-T)、美国专利申请公布 No. 2010/0093980 中描述的抗 -cripto 抗体 (例如 huB3F6)、美国专利申请公布 No. 2007/0183971 中描述的抗 -CD138 抗体 (例如 huB-B4)、美国专利 No. 7, 736, 644 和 7, 628, 986 以及美国专利申请公布 No. 2010/0111979; 2009/0240038; 2009/0175887; 2009/0156790 和 2009/0155282 中描述的抗 -EGFRvIII 抗体、国际专利申请公布 No. WO/2011/039721 和 WO/2011/039724 中描述的人源化 EphA2 抗体 (例如 2H11R35R74)、国际专利申请公布 No. WO 2008/047242 中描述的抗 -CD38 抗体 (例如 hu38SB19)、美国临时申请 No. 61/307, 797、61/346, 595 和 61/413, 172 以及美国专利申请公布 No. 2012/0009181 中描述的抗 - 叶酸受体抗体 (例如, huMov19); 美国专利 5, 958, 872 和 6, 596, 743 中描述的抗 -IGF1R 抗体; 美国专利申请公布 No. 2011/0256153 中描述的抗 -CD37 抗体 (例如, huCD37-3); 美国专利申请公布 No. 2006/0127407 中描述的抗 - 整联蛋白 $\alpha_v\beta_6$ 抗体 (例如, CNT095); 和国际专利申请公布 No. WO 2012/019024 中描述的抗 -Her3 抗体。特别优选的抗体是本文中描述的人源化单克隆抗体。

[0065] 虽然细胞结合剂优选为抗体,但细胞结合剂还可以是非抗体分子。适当的非抗体分子包括例如,锚蛋白重复蛋白(DARPins;Zahnd等人,J.Biol.Chem.,281,46,35167-35175,(2006);Binz等人,Nature Biotechnology,23:1257-1268(2005))或锚蛋白样重复蛋白或例如美国专利申请公布No.2007/0238667;美国专利7,101,675;以及国际专利申请公布No.WO/2007/147213和WO/2007/062466)中描述的合成肽、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等人,J.Biol.Chem.,260:932-937(1985))。例如,GM-CSF,其结合髓系细胞,可用作细胞结合剂来靶向急性髓性白细胞。此外,IL-2,其结合活化的T-细胞,可用于预防移植排斥,用于治疗或预防移植抗宿主病,和用于治疗急性T细胞白血病。表皮生长因子(EGF)可用于靶向鳞癌例如肺癌和头颈癌。生长抑素可用于靶向神经母细胞瘤细胞和其它肿瘤细胞类型。

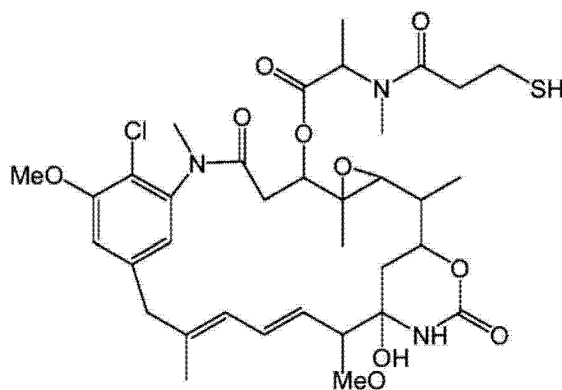
[0066] 缀合物可包含任何适当的细胞毒素剂。如本文中所用,“细胞毒素剂”是指导致细胞死亡、诱导细胞死亡或减小细胞活力的任何化合物。适当的细胞毒素剂包括例如类美登素和类美登素类似物、紫杉烷、CC-1065和CC-1065类似物以及多拉司他汀及多拉司他汀类似物。在本发明的优选实施方案中,细胞毒素剂为类美登素,包括美登醇和美登醇类似物。类美登素是抑制微管形成并且对哺乳动物细胞具有高度毒性的化合物。适当的美登醇类似物的实例包括具有修饰芳香环的美登醇类似物和在其它位置具有修饰的美登醇类似物。这样的类美登素描述于例如美国专利4,256,746;4,294,757;4,307,016;4,313,946;4,315,929;4,322,348;4,331,598;4,361,650;4,362,663;4,364,866;4,424,219;4,371,533;4,450,254;5,475,092;5,585,499;5,846,545和6,333,410中。

[0067] 具有修饰芳环的美登醇类似物的实例包括:(1)C-19-脱氯(美国专利4,256,746)(通过安丝菌素P2的LAH还原制备的)、(2)C-20-羟基(或C-20-去甲基)+/-C-19-脱氯(美国专利4,361,650和4,307,016)(通过使用链霉菌属(*Streptomyces*)或放线菌属(*Actinomyces*)的去甲基作用或使用LAH的脱氯作用制备的)和(3)C-20-去甲氧基、C-20-酰氧基(-OCOR)、+/-脱氯(美国专利4,294,757)(通过使用酰氯的酰化作用制备的)。

[0068] 具有除芳环外的位置的修饰的美登醇类似物的实例包括:(1)C-9-SH(美国专利4,424,219)(通过美登醇与H₂S或P₂S₅的反应制备的)、(2)C-14-烷氧甲基(脱甲氧基/CH₂OR)(美国专利4,331,598)、(3)C-14-羟甲基或酰氧甲基(CH₂OH或CH₂OAc)(美国专利4,450,254)(从诺卡尔菌属(*Nocardia*)制备的)、(4)C-15-羟基/酰氧基(美国专利4,364,866)(通过链霉菌属对美登醇的转化制备的)、(5)C-15-甲氧基(美国专利4,313,946和4,315,929)(从滑桃树分离的)、(6)C-18-N-去甲基(美国专利4,362,663和4,322,348)(通过链霉菌属对美登醇的去甲基作用制备的)和(7)4,5-脱氧(美国专利4,371,533)(通过美登醇的三氯化钛/LAH还原制备的)。

[0069] 在本发明的优选实施方案中,缀合物利用含硫醇基类美登素DM1(也称为N^{2'}-去乙酰基-N^{2'}-(3-巯基-1-氧戊基)-美坦辛作为细胞毒素剂。DM1的结构由式(I)表示:

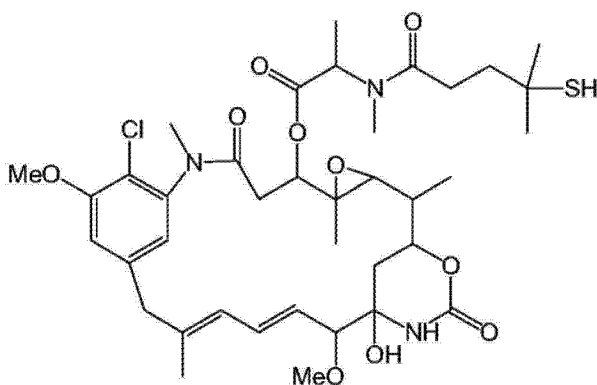
[0070]



(I)

[0071] 在本发明的另一个优选实施方案中, 缀合物利用含硫醇基类美登素 DM4 (也称为 $N^{2'}$ -去乙酰基- $N^{2'}$ -(4-甲基-4-巯基-1-氧戊基)-美坦辛) 作为细胞毒素剂。DM4 的结构由式 (II) 表示:

[0072]

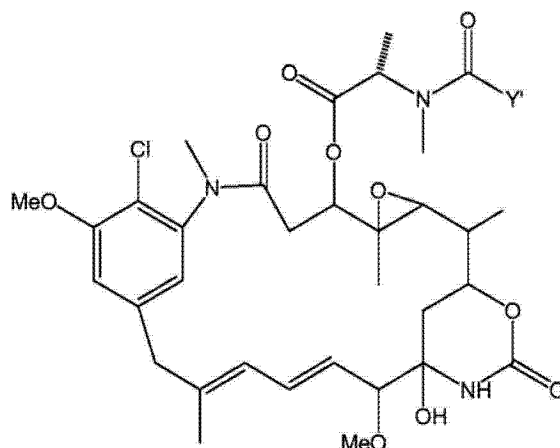


(II)

[0073] 可在本发明的背景中使用其它美坦辛, 包括例如含硫醇和二硫化物的类美登素 (在具有硫原子的碳原子上具有单或二-烷基取代)。特别优选的是在 C-3 位置上具有 (a) C-14 羟甲基、C-15 羟基或 C-20 去甲基官能团, 和 (b) 具有拥有阻碍巯基的酰基的酰化氨基酸侧链的美登素, 其中具有硫氢基官能团的酰基的碳原子具有一个或两个取代基, 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烯基、具有 3 至 10 个碳原子的环烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳基或杂环烷基, 并且另外地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三个碳原子的直链长度。

[0074] 用于本发明的背景的另外的类美登素包括由式 (III) 表示的化合物:

[0075]



(III),

[0076] 其中 Y' 表示

[0077] $(\text{CR}_7\text{R}_8)_1(\text{CR}_9=\text{CR}_{10})_p(\text{C}\equiv\text{C})_q\text{A}_o(\text{CR}_5\text{R}_6)_m\text{D}_u(\text{CR}_{11}=\text{CR}_{12})_r(\text{C}\equiv\text{C})_s\text{B}_t(\text{CR}_3\text{R}_4)_n\text{C R}_1\text{R}_2\text{SZ}$,
其中 R_1 和 R_2 各自独立地是 CH_3 、 C_2H_5 、具有 1 至 10 个碳原子的直链烷基或烯基、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基或杂环烷基,并且其中 R_2 还可以是 H,

[0078] 其中 A、B、D 为具有 3 至 10 个碳原子的环烷基或环烯基、简单或取代的芳基或杂环芳基或杂环烷基,

[0079] 其中 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_9 、 R_{10} 、 R_{11} 和 R_{12} 各自独立地是 H、 CH_3 、 C_2H_5 、具有 1 至 10 个碳原子的直链烷基或烯基、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基或杂环烷基,

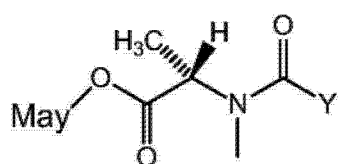
[0080] 其中 l、m、n、o、p、q、r、s 和 t 各自独立地是零或 1 至 5 的整数,只要 l、m、n、o、p、q、r、s 和 t 的至少两个在任一时刻不为零,和

[0081] 其中 Z 为 H、SR 或 COR,其中 R 为具有 1 至 10 个碳原子的直链烷基或烯基、具有 3 至 10 个碳原子的支链或环状烷基或烯基或简单的或取代的芳基或杂环芳基或杂环烷基。

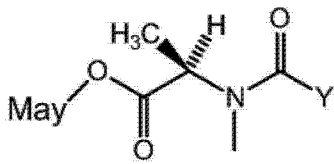
[0082] 式 (III) 的优选实施方案包括式 (III) 的化合物,其中 (a) R_1 为 H, R_2 为甲基并且 Z 为 H, (b) R_1 和 R_2 为甲基并且 Z 为 H, (c) R_1 为 H, R_2 为甲基,并且 Z 为 $-\text{SCH}_3$,以及 (d) R_1 和 R_2 为甲基,并且 Z 为 $-\text{SCH}_3$ 。

[0083] 这样的另外的类美登素还包括由式 (IV-L)、(IV-D) 或 (IV-D, L) 表示的化合物:

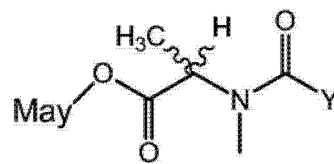
[0084]



(IV-L)



(IV-D)



(IV-D, L)

[0085] 其中 Y 表示 $(\text{CR}_7\text{R}_8)_1(\text{CR}_5\text{R}_6)_m(\text{CR}_3\text{R}_4)_n\text{CR}_1\text{R}_2\text{SZ}$,

[0086] 其中 R_1 和 R_2 各自独立地为 CH_3 、 C_2H_5 、具有 1 至 10 个碳原子的直链烷基或烯基、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基或杂环烷基,并且其中 R_2 还可以为 H,

[0087] 其中 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 各自独立地为 H、 CH_3 、 C_2H_5 、具有 1 至 10 个碳原子的直链烷基或烯基、具有 3 至 10 个碳原子的支链或环状的烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳基或杂环烷基，

[0088] 其中 1、m 和 n 各自独立地为 1 至 5 的整数，并且此外 n 可为零，

[0089] 其中 Z 为 H、SR 或 COR，其中 R 为具有 1 至 10 个碳原子的直链或支链烷基或烯基、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基或杂环烷基，和

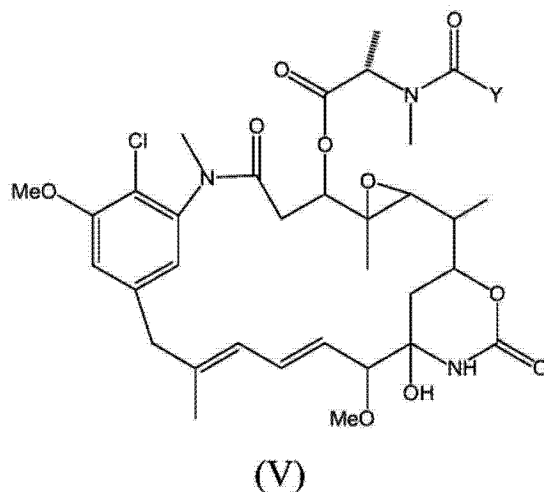
[0090] 其中 May 表示在 C-3、C-14 羟甲基、C-15 羟基或 C-20 脱甲基上具有侧链的类美登素。

[0091] 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 (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，并且 Z 为 H，(b) R_1 和 R_2 为甲基， R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 各自为 H，1 和 m 为 1，n 为 0，并且 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，并且 Z 为 $-SCH_3$ 或 (d) R_1 和 R_2 为甲基， R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 各自为 H，1 和 m 为 1，n 为 0，并且 Z 为 $-SCH_3$ 。

[0092] 优选地，细胞毒素剂由式 (IV-L) 表示。

[0093] 另外的优选类美登素还包括由式 (V) 表示的化合物：

[0094]



[0095] 其中 Y 表示 $(CR_7R_8)_1(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ$ ，

[0096] 其中 R_1 和 R_2 各自独立地为 CH_3 、 C_2H_5 、具有 1 至 10 个碳原子的直链烷基或烯基、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基或杂环烷基，并且其中 R_2 还可以是为 H，

[0097] 其中 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 各自独立地为 H、 CH_3 、 C_2H_5 、具有 1 至 10 个碳原子的直链烷基或烯基、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基或杂环烷基，

[0098] 其中 1、m 和 n 各自独立地为 1 至 5 的整数，并且此外 n 可以为零，和

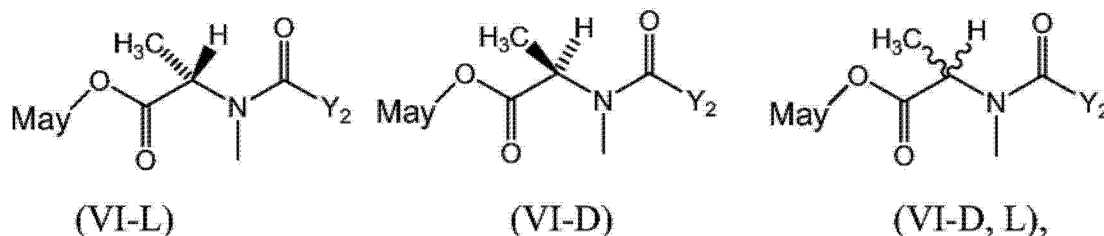
[0099] 其中 Z 为 H、SR 或 COR，其中 R 为具有 1 至 10 个碳原子的直链烷基或烯基，具有 3 至 10 个碳原子的支链或环状烷基或烯基，或简单的或取代的芳基或杂环芳基或杂环烷基。

[0100] 式 (V) 的优选实施方案包括式 (V) 的化合物，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; 并且 Z 为 H, (b) R_1 和 R_2 为甲基; R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 各自为 H, l 和 m 为 1; n 为 0; 并且 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, 并且 Z 为 $-\text{SCH}_3$ 或 (d) R_1 和 R_2 为甲基, R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 各自为 H, l 和 m 为 1, n 为 0, 并且 Z 为 $-\text{SCH}_3$ 。

[0101] 其它优选类美登素包括由式 (VI-L)、(VI-D) 或 (VI-D, L) 表示的化合物:

[0102]



[0103] 其中 Y_2 表示 $(\text{CR}_7\text{R}_8)_1(\text{CR}_5\text{R}_6)_m(\text{CR}_3\text{R}_4)_n\text{CR}_1\text{R}_2\text{SZ}_2$,

[0104] 其中 R_1 和 R_2 各自独立地为 CH_3 、 C_2H_5 、具有 1 至 10 个碳原子的直链烷基或烯基、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基或杂环烷基, 并且其中 R_2 还可以为 H,

[0105] 其中 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 各自独立地为 H、 CH_3 、 C_2H_5 、具有 1 至 10 个碳原子的直链烷基或烯基、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基或杂环烷基,

[0106] 其中 l 、 m 和 n 各自独立地为 1 至 5 的整数, 并且此外 n 可为零,

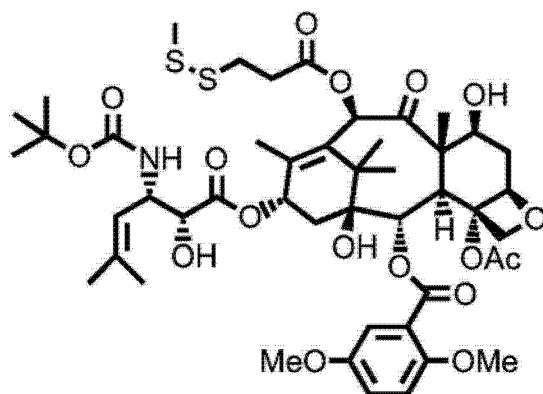
[0107] 其中 Z_2 为 SR 或 COR, 其中 R 为具有 1 至 10 个碳原子的直链烷基或烯基、具有 3 至 10 个碳原子的支链或环状烷基或烯基、或简单或取代的芳基、或杂环芳基或杂环烷基, 以及

[0108] 其中 May 为类美登素。

[0109] 除了类美登素以外, 缀合物中使用的细胞毒素剂还可以是紫杉烷或其衍生物。紫杉烷类是包括紫杉酚(Taxol®) (细胞毒素天然产物) 和多西他赛(Taxotere®) (半合成衍生物) 的化合物的家族, 所述两种化合物被广泛用于癌症的治疗。紫杉烷类是抑制微管解聚, 从而导致细胞死亡的有丝分裂纺锤体的毒物。虽然多西他赛和紫杉酚在癌症的治疗中是有用的试剂, 但它们的抗肿瘤活性因它们对正常细胞的非特异性毒性而受到限制。此外, 化合物如紫杉酚和多西他赛本身不具有充足的效力来用于细胞结合剂的缀合物。

[0110] 用于制备细胞毒性缀合物的优选紫杉烷为式 (VIII) 的紫杉烷:

[0111]



(VIII)

[0112] 用于合成用于本发明的背景的紫杉烷类的方法连同用于将紫杉烷类缀合于细胞结合剂例如抗体的方法详细地描述于美国专利 5,416,064 ;5,475,092 ;6,340,701 ;6,372,738 ;6,436,931 ;6,596,757 ;6,706,708 ;6,716,821 和 7,390,898。

[0113] 细胞毒素可以是 CC-1065 或其衍生物。CC-1065 为从泽耳链霉菌 (*Streptomyces zelensis*) 的培养液分离的有效力的抗-肿瘤抗生素。CC-1065 的体外效力约为通常使用的抗癌药物例如多柔比星、甲氨蝶呤和长春新碱的约 1000 倍 (Bhuyan 等人, *Cancer Res.*, 42:3532-3537 (1982))。CC-1065 及其类似物公开于美国专利 5,585,499 ;5,846,545 ;6,340,701 和 6,372,738 中。CC-1065 的细胞毒性效力与其烷化活性和其 DNA 结合或 DNA 嵌入活性相关。这两种活性存在于分子的分开的部分。在这方面,烷化活性包含于环丙吡咯并吡啶 (CPI) 亚单位中, DNA 结合活性存在于 CC-1065 的两个吡咯并吡啶亚单位中。

[0114] 几种 CC-1065 类似物在本领域中是已知的并且也可在缀合物中用作细胞毒素剂 (参见,例如, Warpehoski 等人, *J. Med. Chem.*, 31:590-603 (1988))。已开发了一系列其中 CPI 部分被环丙烷并苯并吡啶 (CBI) 部分替代的 CC-1065 类似物 (Boger 等人, *J. Org. Chem.*, 55:5823-5833 (1990), 和 Boger 等人, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1:115-120 (1991))。这些 CC-1065 类似物维持亲代药物的高体外效力,而不在小鼠中引起延迟的毒性。与 CC-1065 一样,这些化合物是共价结合于 DNA 的小沟以引起细胞死亡的烷化剂。

[0115] CC-1065 类似物的治疗效率可通过经由至肿瘤部位的靶向递送改变体内分布,从而导致对非靶向组织的低毒性和从而更低的全身性毒性来获得极大改善。为此目的,已产生 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缀合物 (参见,例如,美国专利 5,475,092 ;5,585,499 和 5,846,545)。这些缀合物通常在体外显示高靶特异性细胞毒性以及在小鼠的人肿瘤异种移植物模型中显示抗肿瘤活性 (参见,例如, Chari 等人, *Cancer Res.*, 55:4079-4084 (1995))。

[0116] 用于合成 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 ;6,756,397 和 7,329,760 中。

[0117] 药物例如甲氨蝶呤、道诺霉素、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、tubulysin 和 tubulysin 类似物、多卡米星和多卡米星类似物、拉司他汀和拉司他汀类似物也可用作本发明的细胞毒素剂。多柔比星和道诺霉素化合物 (参见,例如,美国专利 6,630,579) 还可用作细胞毒素剂。

[0118] 细胞结合剂-胞毒素剂缀合物可通过体外法来制备。为了将细胞毒素剂连接于抗

体,使用连接基团。适当的连接基团在本领域中是公知的,包括二硫化物基团、酸不稳定基团、光不稳定基团、肽酶不稳定基团和酯酶不稳定基团以及不可切割的连接基团。

[0119] 根据本发明,细胞结合剂通过将双官能交联试剂与细胞结合剂反应,从而导致接头分子至细胞结合剂的共价连接来进行修饰。如本文中所用“双官能交联试剂”是指具有两个反应性基团的试剂;所述两个反应性基团之一能够与细胞结合剂反应,而另一个基团能够与细胞毒素剂反应来连接细胞结合剂与细胞毒素剂,从而形成缀合物。

[0120] 可将任何适当的双官能交联试剂与本发明结合使用,只要接头试剂提供治疗性的保留,例如分别地细胞毒素剂和细胞结合剂的细胞毒性和靶向特征,同时提供可接受的毒性特征谱。优选地,接头分子通过化学键(如上所述的)将细胞毒素剂联接于细胞结合剂,以便细胞毒素剂和细胞结合剂彼此化学地偶联(例如,共价键合)。

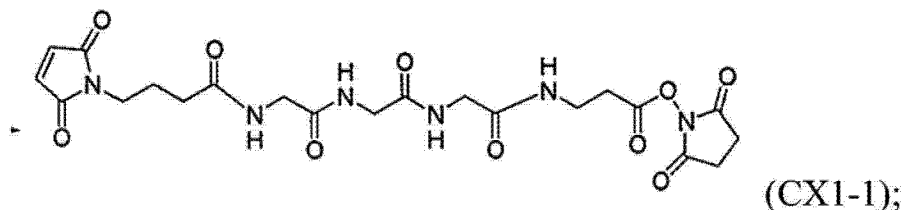
[0121] 在一个实施方案中,将细胞结合剂通过选自二硫键、酸不稳定键、光不稳定键、肽酶不稳定键和酯酶不稳定键的化学键化学地偶联于细胞毒素剂。

[0122] 在一个实施方案中,双官能交联试剂包含不可切割接头。不可切割接头是能够以稳定的共价方式将细胞毒素剂例如类美登素、紫杉烷或 CC-1065 类似物连接于细胞结合剂的任何化学部分。因此,不可切割接头在细胞毒素剂或细胞结合剂在其下保持活性的条件下具有显著的对酸诱导的切割、光诱导的切割、肽酶诱导的切割、酯酶诱导的切割和二硫键切割的抗性。

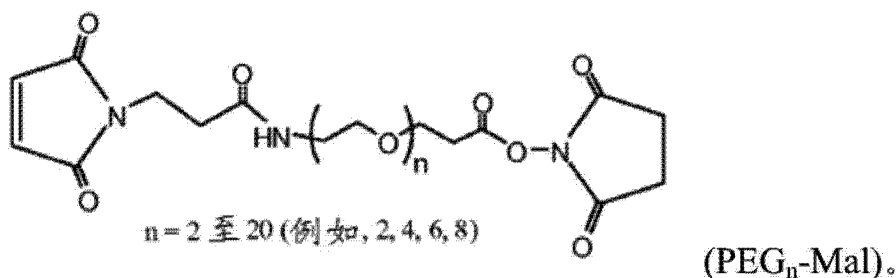
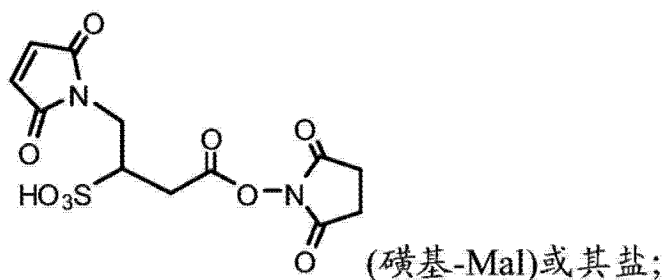
[0123] 在细胞毒素剂与细胞结合剂之间形成不可切割接头的适当的交联试剂在本领域是公知的。在一个实施方案中,细胞毒素剂通过硫醚键化学地偶联于细胞结合剂。不可切割接头的实例包括具有用于与细胞毒素剂反应的基于马来酰亚胺基的部分或基于卤代乙酰基的部分的接并没有。这样的双官能交联试剂在本领域是公知的(参见美国专利申请公布 No. 2010/0129314 ;2009/0274713 ;2008/0050310 ;2005/0169933 和 Pierce Biotechnology Inc. P. O. Box 117, Rockland, IL 61105, USA),包括但不限于 4-(马来酰亚胺甲基)环己基羧酸 N-琥珀酰亚胺酯(SMCC)、N-琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)-环己烷-1-羧基-(6-酰氨基己酸酯),其为 SMCC 的“长链”类似物(LC-SMCC), κ -马来酰亚胺基十一酸 N-琥珀酰亚胺酯(KMUA)、 γ -马来酰亚胺基丁酸 N-琥珀酰亚胺酯(GMBS)、 ϵ -马来酰亚胺基己酸 N-羟基琥珀酰亚胺酯(EMCS)、间-马来酰亚胺苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯(MBS)、N-(α -马来酰亚胺乙酰氧基)-琥珀酰亚胺酯(AMAS)、6-(β -马来酰亚胺丙酰氨基)己酸琥珀酰亚胺酯(SMPH)、4-(对-马来酰亚胺苯基)-丁酸 N-琥珀酰亚胺酯(SMPB)和 N-(对-马来酰亚胺苯基)异氰酸酯(PMPI)。包含基于卤代乙酰基部分的交联试剂包括 4-(碘代乙酰基)-氨基苯甲酸 N-琥珀酰亚胺酯(SIAB)、碘乙酸 N-琥珀酰亚胺酯(SIA)、溴乙酸 N-琥珀酰亚胺酯(SBA)和 3-(溴乙酰氨基)丙酸 N-琥珀酰亚胺基(SBAP)、双-马来酰亚胺基聚乙二醇(BMPEO)、BM(PEO)₂、BM(PEO)₃、N-(β -马来酰亚胺基丙酰氧基)琥珀酰亚胺酯(BMPS)、5-马来酰亚胺基戊酸 NHS、HBVS、4-(4-N-马来酰亚胺苯基)-丁酸酰肼·HCl(MPBH)、(4-乙烯基磺酰基)苯甲酸琥珀酰亚胺酯(SVSB)、二硫基双-马来酰亚胺基乙烷(DTME)、1,4-双-马来酰亚胺基丁烷(BMB)、1,4-双马来酰亚胺基-2,3-二羟基丁烷(BMDB)、双-马来酰亚胺己烷(BMH)、双-马来酰亚胺乙烷(BMOE)、4-(N-马来酰亚胺基-甲基)环己烷-1-羧酸磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-SMCC)、(4-碘代-乙酰基)氨基苯甲酸磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-SIAB)、间-马来酰亚胺苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯(磺

基-MBS)、N-(γ -马来酰亚胺丁氧基)磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-GMBS)、N-(ϵ -马来酰亚胺己酰基氧)磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-EMCS)、N-(κ -马来酰亚胺辛酰基氧)磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-KMUS)和4-(对-马来酰亚胺苯基)丁酸磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-SMPB) CX1-1、磺基-Mal(或其盐)和PEG_n-Mal。优选,双官能交联试剂为 SMCC。

[0124]



[0125]

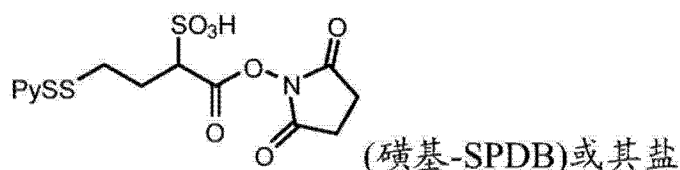


[0126] 在一个实施方案中,连接试剂为可切割接头。适当的可切割接头的实例包括二硫化物接头、酸不稳定的接头、光不稳定性接头、肽酶不稳定接头以及酯酶不稳定接头。含二硫化物的接头是可通过二硫化物交换切割的接头,所述切割可在生理条件下发生。酸不稳定接头是可在酸性 pH 下切割的接头。例如,某些细胞内区室例如内体和溶酶体具有酸性 pH (pH4-5), 并且提供适合于切割酸不稳定接头的条件。光不稳定性接头在身体表面上和在许多光可到达的体腔中是有用的。此外,红外线可穿透组织。肽酶不稳定接头可用于切割细胞内部或外部的某些肽(参见,例如, Trouet 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79:626-629 (1982) 和 Umemoto 等人, Int. J. Cancer, 43:677-684 (1989))。在一个实施方案中,可切割接头在温和条件,即细胞毒素剂的活性在其下不受影响的细胞内的条件下被切割。

[0127] 在一个实施方案中,将细胞毒素剂通过二硫键连接于细胞结合剂。接头分子包含可与细胞结合剂反应的活性化学基团。在一个实施方案中,双官能交联试剂包含可与细胞结合剂的赖氨酸残基形成酰胺键的反应性部分。可与细胞结合剂的赖氨酸残基形成酰胺键的反应部分的实例包括羧酸部分和反应性酯部分,例如 N-琥珀酰亚胺酯、N-磺基琥珀酰亚胺酯、硝基苯基(例如,2 或 4-硝基苯基)酯、二硝基苯(例如,2,4-二硝基苯基)酯、磺基-四氟苯基(例如,4-磺基-2,3,5,6-四氟苯基)酯和五氟苯酯。

[0128] 用于与细胞结合剂反应的优选活性化学基团为N-琥珀酰亚胺酯和N-磺基琥珀酰亚胺酯。此外,接头分子包含可与细胞毒素剂反应以形成二硫键的反应性化学基团,优选二硫吡啶基。使得能够将细胞结合剂通过二硫键与细胞毒素剂连接的双官能交联试剂在本领域是已知的,包括例如3-(2-吡啶基二硫代)丙酸N-琥珀酰亚胺基(SPDP)(参见,例如,Carlsson等人,Biochem. J., 173:723-737(1978))、4-(2-吡啶基二硫代)丁酸N-琥珀酰亚胺酯(SPDB)或其盐(参见,例如,美国专利4,563,304)、4-(2-吡啶基二硫代)戊酸N-琥珀酰亚胺酯(SPP)(参见,例如,CAS注册号341498-08-6)和4-(2-吡啶基二硫代)2-磺基丁酸N-琥珀酰亚胺酯(磺基-SPDB)(参见,例如,美国专利申请公布No. 2009/0274713)。可用于引入二硫键的其它双官能交联试剂在本领域是已知的并且描述于美国专利6,913,748、6,716,821以及美国专利申请公布No. 2009/0274713和2010/0129314中,将所述美国专利和美国专利申请公布全部通过引用整体并入本文。

[0129]



[0130] 形成不可切割接头的不存在硫原子的其它交联试剂还可用于本发明的方法。这样的接头可来源于基于二羧酸的。适当的基于二羧酸的部分包括但不限于通式(IX)的 α, ω -二羧酸:

[0131] $\text{HOOC-X}_1\text{-Y}_n\text{-Z}_m\text{-COOH}$

[0132] (IX),

[0133] 其中X为具有2至20个碳原子的直链或支链烷基、烯基或炔基,Y为具有3至10个碳原子的环烷基或环烯基,Z为具有6至10个碳原子的取代的或未取代的芳香基,或其中杂原子选自N、O或S的取代或未取代的杂环基团,并且其中1、m和n各自为0或1,只要1、m和n不同时全部为零。

[0134] 本文中公开的许多不可切割接头更详细地描述于美国专利申请公布No. 2005/0169933 A1中。

[0135] 下列实施例进一步举例说明本发明,但当然不应当被解释为以任何方式限定其范围。

[0136] 实施例1

[0137] 本实施例显示在修饰反应或用于制备细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物的方法的过程中添加N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)的有益效应。具体地,本实施例显示NHS至修饰反应的添加对抗体-类美登素缀合物的稳定性具有有益效应。

[0138] 使用先前描述的方法(参见,例如,美国专利5,208,020和美国专利申请公布No. 2006/0182750),在向修饰反应添加或不添加外源NHS的情况下将人源化huN901抗体与异双官能交联试剂SMCC和类美登素DM1反应,以以约3.0的类美登素对抗体的比率(MAR)(也称为药物对抗体的比率)产生缀合物。

[0139] 关于先前描述的方法,首先将huN901(18mg/mL)与SMCC(相对于抗体的量5.0倍摩尔过量)反应以形成修饰抗体。在21°C下于50mM磷酸钾、50mM氯化钾、2mM EDTA、pH6.5

和 10% DMA 中进行修饰反应 150 分钟。总共约 0.6mM NHS 从 SMCC 的氨解反应（这导致接头至抗体的连接）与 SMCC 的水解的组合释放。利用 0.5M 乙酸将 pH 调整至 5.0 来淬灭修饰反应，使用于含有 2mM EDTA 的 20mM 乙酸钠（pH5.0）中平衡和洗脱的 Sephadex G25F 树脂的柱子来纯化修饰抗体。纯化后，将修饰抗体（4mg/mL）与类美登素 DM1（相对于抗体的量 4.2 倍摩尔过量；相对于抗体上的接头的测量的量 1.3 倍的过量）反应以形成缀合抗体。在 21℃ 于含有 2mM EDTA 和 5% DMA 的 20mM 乙酸钠缓冲液（pH5.0）中进行缀合反应约 20 小时。随后使用于 10mM 琥珀酸钠（pH5.0）中平衡和洗脱的 Sephadex G25F 树脂的柱子纯化反应混合物。

[0140] 关于其中添加外源 NHS 的方法，将 huN901（18mg/mL）与 SMCC 反应以形成修饰抗体。将修饰反应在 21℃ 于添加有 20mM、50mM 或 100mM 外源 NHS 的 50mM 磷酸钾、50mM 氯化钾、2mM EDTA、10% DMA 中进行 150 分钟。将 6.7、10 和 17.5 倍摩尔过量（相对于抗体的量）的 SMCC 分别用于包含 20mM、50mM 和 100mM NHS（添加的 NHS 对已存在的 NHS 的摩尔比为约 25、42 或 48 倍）的反应。对于包含更高水平的 NHS 的样品需要更高浓度的 SMCC 来克服高浓度 NHS 对 SMCC 整合的抑制效应。利用 0.5M 乙酸将 pH 调整至 5.0 来淬灭反应，使用于含有 2mM EDTA 的 20mM 乙酸钠（pH5.0）中平衡和洗脱的 Sephadex G25F 树脂的柱子纯化修饰抗体。纯化后，将修饰抗体（4mg/mL）与类美登素 DM1（相对于抗体的量 3.7 至 4.2 倍摩尔过量；相对于抗体上接头的测量的量 1.3 倍过量）反应以形成缀合抗体。将缀合反应在 21℃ 于含有 2mM EDTA 和 5% DMA 的 20mM 乙酸钠缓冲液（pH5.0）中进行约 20 小时。随后使用于 10mM 琥珀酸钠（pH5.0）中平衡和洗脱的 Sephadex G25F 树脂的柱子纯化反应混合物。

[0141] 分析通过在修饰反应中利用或不利用外源 NHS 的方法制备的缀合物的不可还原的种类缀合物单体和游离类美登素。

[0142] 通过还原 SDS 凝胶电泳分析缀合物的不可还原种类的水平。更具体地，测量个别还原的缀合物种类（包括还原的轻链、还原的重链、交联的轻链 - 轻链、交联的轻链 - 重链等）的峰面积，通过不可还原的种类的面积之和对所有种类的面积之和的比率来计算不可还原的种类的水平。

[0143] 通过尺寸排阻 HPLC 分析缀合物的单体水平。更具体地，使用设置至 252nm 或 280nm 的波长的吸光度检测器测量单体、二聚体、聚集体和低分子量种类的峰面积，通过单体面积对总面积的比率计算单体水平。

[0144] 存在于缀合物中的游离类美登素的量通过双柱（HiSep 和 C18 柱）HPLC 来分析。更具体地，使用设置至 252nm 的波长的吸光度检测器测量总的游离类美登素种类（于梯度中洗脱的和通过洗脱时间与已知标准的比较鉴定的）的峰面积，使用通过已知量的标准峰面积产生的标准曲线计算类美登素的量。

[0145] 根据游离类美登素释放和单体的缀合物稳定性通过 10mM 琥珀酸钠中的液体缀合物在 4℃ 贮存过程中的稳定性测试来估计。

[0146] 如下面表 1 中所示，基于根据于游离类美登素的稳定性，在外源 NHS 存在的情况下于修饰反应中产生的缀合物优于在无外源 NHS 的情况下产生缀合物。根据单体和不可还原的种类的缀合物稳定性对于所有测试的样品是可比较的。

[0147] 表 1. 通过在修饰反应中利用或不利用外源 NHS 产生的 huN901 缀合物（SMCC 接头、

DM1 类美登素) 的至关重要的性质的比较

[0148]

添加的外源NHS	0 mM NHS	20 mM NHS	50 mM NHS	100 mM NHS
不可还原的种类(%)	8.8	7.0	7.2	7.7
缀合物单体 (t=0时的%)	96.8	97.1	97.2	97.1
缀合物单体 (在4℃进行10个月后的%)	96.8	97.0	97.0	96.9
游离类美登素(t=0时的%)	0.1	0.1	0.1	0.1
游离类美登素 (在4℃进行10.5个月后的%)	7.3	2.8	1.8	1.3

[0149] 本实施例中提供的实验结果显示了在修饰反应过程中添加外源 NHS 对缀合物稳定性的有益效应。具体地, 这些结果确认了 huN901-SMCC-DM1 缀合物的稳定性, 如通过游离类美登素的释放测量的, 当将外源 NHS 添加至修饰反应时, 得到显著增强。

[0150] 实施例 2

[0151] 本实施例显示在用于制备细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物的方法的缀合反应的过程中添加 N- 羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 的有益效应。具体地, 本实施例显示了将 NHS 添加至缀合反应对抗体-类美登素缀合物的稳定性具有有益效应。

[0152] 使用先前描述的方法 (参见, 例如, 美国专利 5, 208, 020 和美国专利申请公布 No. 2006/0182750), 在将外源 N- 羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 添加或不添加至缀合反应的情况下, 将人源化 huN901 抗体与异双官能交联试剂 SMCC 和类美登素 DM1 反应, 以以约为 3.0 的类美登素对抗体的比率 (MAR), 也称为药物对抗体的比率产生缀合物。

[0153] 为了进行该研究, 将 huN901 (18mg/mL) 与 SMCC (相对于抗体的量 5.0 倍摩尔过量) 反应以形成修饰抗体。在 21℃ 于 50mM 磷酸钾、50mM 氯化钾、2mM EDTA, pH6.5 和 10% DMA 中进行修饰反应 150 分钟。利用 0.5M 乙酸将 pH 调整至 5.0 来淬灭反应, 使用含有 2mM EDTA 的 20mM 乙酸钠 (pH5.0) 中平衡和洗脱的 Sephadex G25F 树脂的柱子纯化修饰抗体。纯化后, 将修饰抗体 (4mg/mL) 与类美登素 DM1 (相对于抗体的量 4.2 倍摩尔过量; 相对于抗体上接头的测量的量 1.3 倍过量) 反应以形成缀合抗体。将缀合反应在含有 2mM EDTA 和 5% DMA 的 20mM 乙酸钠缓冲液中进行。通过添加磷酸三钠将缀合 pH 调整至 pH6.5。建立一个无 NHS 添加 (先前描述的方法) 的缀合反应, 建立添加额外 20mM、50mM 或 100mM NHS (本发明的方法) 的三个缀合反应。将缀合反应保持约 20 小时。随后使用 10mM 琥珀酸钠 (pH5.0) 中平衡和洗脱的 Sephadex G25F 树脂的柱子纯化反应混合物。

[0154] 使用实施例 1 中描述的方法分析通过在修饰反应中利用或不利用外源 NHS 的方法制备的缀合物的不可还原的种类缀合物单体和游离类美登素。根据游离类美登素 (不可还原的种类) 和单体的缀合物稳定性通过在 4℃ 贮存过程中的稳定性测试来估计。

[0155] 如下面表 2 中所示,基于游离类美登素的稳定性,在缀合反应中利用外源 NHS 产生的缀合物优于在无外源 NHS 存在的情况下产生的缀合物。根据不可还原的种类和单体的缀合物的稳定性是可比较的。

[0156] 表 2. 通过在缀合反应中利用或不利用外源 NHS 的方法产生的 huN901 缀合物 (SMCC 接头、DM1 类美登素) 的至关重要的性质的比较

[0157]

添加的外源NHS	0 mM NHS	20 mM NHS	50 mM NHS	100 mM NHS
不可还原的种类(%)	8.5	8.9	8.7	7.9
缀合物单体 (t=0时的%)	96.7	96.8	96.8	96.8
缀合物单体 (在4℃进行10个月后的%)	96.8	96.8	96.8	96.9
游离类美登素 (t=0时的%)	0.1	ND	ND	ND
游离类美登素 (在4℃进行10.5个月后的%)	6.7	3.1	2.8	2.4

[0158] ND - 未检测到的

[0159] 本实施例中提供的实验结果显示了在缀合反应过程中添加外源 NHS 对缀合物稳定性的有益效应。具体地,这些结果确认了 huN901-SMCC-DM1 缀合物缀合物的稳定性,如通过游离类美登素的释放测量的,当将外源 NHS 添加至缀合反应时,得到显著增强。

[0160] 实施例 3

[0161] 本实施例显示将 N- 羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 添加至用于制备细胞结合剂 - 细胞毒素剂缀合物的保持步骤的有益效应。具体地,本实施例显示了在缀合反应后在外源 NHS 存在的情况下温育抗体 - 类美登素缀合物具有对抗体 - 类美登素缀合物的稳定性的有益效应。

[0162] 使用先前描述的方法 (参见,例如,美国专利 5, 208, 020 和美国专利申请公布 No. 2006/0182750), 在于缀合反应物的纯化后向保持步骤添加或不添加外源 NHS 的情况下将人源化 huN901 抗体与异双官能交联试剂 SMCC 和类美登素 DM1 反应, 以以约 3.0 的类美登素对抗体的比率 (MAR) (也称为药物对抗体的比率) 产生缀合物。将纯化的缀合物在外源 NHS 不存在或存在的情况下在不同的 pH 值下保持, 随后经历纯化, 随后测量缀合物的稳定性。

[0163] 关于缀合物的产生, 首先将 huN901 (18mg/mL) 与 SMCC (相对于抗体的量 5.0 倍摩尔过量) 反应以形成修饰抗体。在 21℃ 下于 50mM 磷酸钾、50mM 氯化钾、2mM EDTA、pH6.5 和 10% DMA 中进行修饰反应 150 分钟。利用 0.5M 乙酸将 pH 调整至 5.0 来淬灭反应, 使用于含有 2mM EDTA 的 20mM 乙酸钠 (pH5.0) 中平衡和洗脱的 Sephadex G25F 树脂的柱子来纯化修饰抗体。纯化后, 将修饰抗体 (6mg/mL) 与类美登素 DM1 (相对于抗体的量 4.2 倍摩尔

过量；相对于抗体上的接头的测量的量 1.3 倍的过量）反应以形成缀合抗体。将缀合反应在 21℃ 于含有 2mM EDTA 和 5% DMA 的 20mM 乙酸钠缓冲液 (pH5.0) 中进行约 20 小时。随后使用于三种不同缓冲液：10mM 琥珀酸钠 pH5.0；50mM 磷酸钠、2mM EDTA pH6.6；或 50mM 磷酸钠，2mM EDTA pH7.5 中平衡和洗脱的 Sephadex G25F 树脂的柱子纯化反应混合物。

[0164] 关于利用或不利用外源 NHS 的保持研究，将每一个不同 pH 值上的纯化的缀合物浓缩，并利用 NHS 原液稀释至 10mg/mL 的抗体浓度和 0mM、20mM、50mM 或 150mM 的 NHS 浓度。使用 1M NaOH 将 NHS 原液溶液调整至与纯化的缀合物相同的 pH。将反应混合物在环境温度下保持约 20 小时，随后使用于 10mM 琥珀酸钠 pH5.0 中平衡和洗脱的 Sephadex G25F 树脂的柱子进行纯化。

[0165] 使用实施例 1 中描述的方法分析通过在保持步骤中利用或不利用外源 NHS 的方法制备的缀合物的不可还原的种类，缀合物单体和游离类美登素。根据游离类美登素（不可还原的种类）释放和单体的缀合物稳定性通过在 4℃ 贮存过程中的稳定性测试来估计。

[0166] 如下面表 3 中所示，在测试的所有三个 pH 值下，基于游离类美登素的稳定性，利用添加至维持步骤的外源 NHS 制备的缀合物优于在无外源 NHS 添加的情况下制备的缀合物。对于保持步骤在更高的 pH 值上 (pH6.5 和 7.5)，当 NHS 在保持步骤中存在时，缀合物的稳定性得到更显著的改善。保持 pH 值或添加的外源 NHS 的量对不可还原的种类的水平没有显著效应。

[0167] 表 3. 通过在缀合后保持步骤中添加或不添加外源 NHS 的方法产生的 huN901 缀合物 (SMCC 接头、DM1 类美登素) 的缀合物稳定性的比较

[0168]

		0 mM NHS	20 mM NHS	50 mM NHS	150 mM NHS
pH 5.0	不可还原的种类(%)	8.9	8.3	8.4	8.6
	游离类美登素(t=0时的%)	ND	ND	0.1	ND
	游离类美登素(在4℃进行10个月后的%)	6.1	5.3	4.8	5.2
pH 6.5	不可还原的种类(%)	9.9	10.4	10.5	11.2
	游离类美登素(t=0时的%)	0.1	ND	ND	ND
	游离类美登素(在4℃进行10个月后的%)	5.1	2.5	2.0	1.6
pH 7.5	不可还原的种类(%)	10.6	10.9	9.2	NT
	游离类美登素(t=0时的%)	ND	ND	ND	ND
	游离类美登素(在4℃进行10个月后的%)	3.8	2.1	1.3	0.9

[0169] ND - 未检测到的

[0170] NT - 未测试的

[0171] 如下面表 4 中显示的,就单体而言,缀合物稳定性可与在保持步骤中添加或未添加外源 NHS 的情况下产生的缀合物相比较。

[0172] 表 4. 通过在缀合后保持步骤中添加或未添加外源 NHS 的情况下产生的 huN901 缀合物 (SMCC 接头、DM1 类美登素) 的百分比单体的比较

[0173]

		0 mM	20 mM	50 mM	150 mM
		NHS	NHS	NHS	NHS
pH 5.0	缀合物单体(t=0时的%)	96.7	96.8	96.8	96.9
	缀合物单体(在4℃进行10个月后的%)	96.9	96.9	96.8	96.9
pH 6.5	缀合物单体(t=0时的%)	96.6	96.7	96.7	96.7
	缀合物单体(在4℃进行10个月后的%)	96.8	96.7	96.7	96.7
pH 7.5	缀合物单体(t=0时的%)	96.5	96.6	96.7	96.6
	缀合物单体(在4℃进行10个月后的%)	96.7	96.6	96.5	96.6

[0174] 本实施例中提供的实验结果显示了在外源 NHS 存在的情况下温育 (即,保持) 抗体 - 类美登素缀合物对缀合物稳定性的有益效应。具体地,这些结果确认了 huN901-SMCC-DM1 缀合物缀合物的稳定性,如通过游离类美登素的释放测量的,当将外源 NHS 添加至缀合反应物纯化后的保持步骤时,得到显著增强。

[0175] 实施例 4

[0176] 本实施例显示在用于制备细胞结合剂 - 细胞毒素剂缀合物的方法的修饰反应过程中添加 N- 羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 的有益效应。具体地,本实施例显示了向修饰反应添加外源 NHS 对抗体 - 类美登素缀合物的稳定性具有有益效应。

[0177] 使用先前描述的方法 (参见,例如,美国专利 7,811,572),在向修饰反应添加或不添加外源 NHS 的情况下,将人源化 huC242 抗体与异双官能交联试剂 SPDB 和类美登素 DM4 反应,以以约 4.0 的类美登素对抗体的比率 (MAR) (也称为药物对抗体的比率) 产生缀合物。

[0178] 关于先前描述的方法,首先将 huC242 (8mg/mL) 与 SPDB (相对于抗体的量 5.8 倍摩尔过量) 反应以形成修饰抗体。在室温下于 50mM 磷酸钾、50mM 氯化钾、2mM EDTA、pH6.5 和 5% DMA 中进行修饰反应 150 分钟。总共约 0.3mM NHS 从 SPDB 的氨解反应 (这导致接头至抗体的连接) 与 SPDB 的水解的组合释放。在缀合反应之前不进行纯化修饰抗体。相反地,将未纯化的修饰抗体稀释至 4.0mg/mL,并与类美登素 DM4 (相对于抗体的量 9.8 倍摩尔过量) 反应以形成缀合抗体。将缀合反应在室温下于含有 5% DMA 的 50mM 磷酸钾、50mM 氯化钠、2mM EDTA 和 pH6.5 中进行约 19 小时。随后使用于磷酸盐缓冲液 pH6.5 中平衡和洗脱的 Sephadex G25F 树脂的柱子纯化反应混合物。

[0179] 关于其中添加外源 NHS 的方法,在室温下将 huC242 (8mg/mL) 与 SPDB 于 50mM 磷酸钾、50mM 氯化钠、2mM EDTA、5% DMA 和 1.6mM、3.1mM 或 6.3mM 外源 NHS (添加的 NHS 对已存在的 NHS 的摩尔比分别为约 5、10 或 20) 中反应 150 分钟。将未纯化的修饰抗体稀释至 4mg/

mL, 并与类美登素 DM4 (相对于抗体的量 9.8 倍摩尔过量) 反应以形成缀合抗体。在室温下于含有 5% DMA 的 50mM 磷酸钾、50mM 氯化钠、2mM EDTA、pH6.5 中进行缀合反应约 19 小时。随后使用于磷酸盐缓冲液 pH6.5 中平衡和洗脱的 Sephadex G25F 树脂的柱子纯化反应混合物。

[0180] 分析通过在修饰反应中利用或不利用外源 NHS 的方法制备的缀合物的缀合物单体和游离类美登素。

[0181] 通过尺寸排阻 HPLC 分析缀合物的单体水平。更具体地, 使用设置至 280nm 的波长的吸光度检测器测量单体、二聚体、聚集体和低分子量种类的峰面积, 通过单体面积对总面积的比率计算单体水平。

[0182] 存在于缀合物中的游离类美登素的量通过 HiSep HPLC 来分析。更具体地, 使用设置至 252nm 的波长的吸光度检测器测量总的游离类美登素种类 (于梯度中洗脱的和通过洗脱时间与已知标准的比较鉴定的) 的峰面积, 使用 A252 的吸光度从流通峰计算结合的种类美登素的峰面积, 通过将游离类美登素的峰面积除以游离和结合的种类美登素的总的峰面积来计算游离类美登素的百分比。

[0183] 根据游离类美登素释放的缀合物稳定性通过在 4°C 贮存过程中的稳定性测试来估计。

[0184] 如下面表 5 中所示, 基于在 $t = 0$ 时以及在 4°C 贮存 59 周后观察到游离类美登素水平, 在修饰反应中添加外源 NHS 产生的缀合物优于无外源 NHS 存在的情况下产生的缀合物。对于所有测试的样品, 根据单体的缀合物稳定性是可比较的。

[0185] 表 5. 通过在修饰反应中利用或不利用另外的 NHS 的方法产生的 huC242 缀合物 (SPDB 接头、DM4 类美登素的至关重要的性质的比较

[0186]

添加的外源 NHS	0 mM	1.6 mM	3.1 mM	6.3 mM
	NHS	NHS	NHS	NHS
缀合物单体($t = 0$ 时的%)	95.1	94.9	95.3	95.7
游离类美登素($t = 0$ 时的%)	1.1	0.8	0.7	0.5
游离类美登素(在 4°C 进行 59 周时的%)	2.8	2.1	1.8	1.4

[0187] 本实施例中提供的实验结果显示了在修饰反应过程中添加外源 NHS 对缀合物稳定性的有益效应。具体地, 这些结果确认了 huC242-SPDB-DM4 缀合物的稳定性, 如通过游离类美登素的释放测量的, 当将外源 NHS 添加至修饰反应时, 得到显著增强。

[0188] 实施例 5

[0189] 本实施例显示在用于制备细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物的方法的缀合反应过程中添加 N- 羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 的有益效应。具体地, 本实施例显示了 NHS 至缀合反应的添加对抗体-类美登素缀合物的稳定性具有有益效应。

[0190] 使用先前描述的方法 (参见, 例如, 美国专利 5, 208, 020 和美国专利申请公布 No. 2006/0182750), 在向缀合反应添加或不添加外源 N- 羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 的情况下, 将人源化 huDS6 抗体与异双官能交联试剂 SPDB 和类美登素 DM4 反应, 以以约 3.5 的类美登

素对抗体的比率 (MAR) (也称为药物对抗体的比率) 产生缀合物。

[0191] 关于该研究,将 huDS6 (10mg/mL) 与 SPDB (相对于抗体的量的 4.3 倍摩尔过得) 反应以形成修饰抗体。在室温下于 50mM 磷酸钾、100mM 氯化钠和 5% DMA, pH7.5 中进行修饰反应 60 分钟。使用于 50mM 磷酸钾、100mM 氯化钠、pH7.5 中平衡和洗脱的 Sephadex G25F 树脂的柱子纯化修饰抗体。纯化后,将修饰抗体 (4mg/mL) 与类美登素 DM4 (相对于抗体的量 6.8 倍摩尔过量;相对于抗体上接头的测量的 1.7 倍过量) 反应以形成缀合抗体。在 50mM 磷酸钾、100mM 氯化钠和 5% DMA, pH7.5 中进行缀合反应。不使用添加的 NHS (先前描述的方法) 或使用添加的 0.3mM NHS (本发明的方法) 来设置两个缀合反应。将缀合反应在室温下保持约 21 小时。随后使用于磷酸缓冲液 pH6.5 中平衡和洗脱的 Sephadex G25F 树脂的柱子纯化反应混合物。

[0192] 使用如实施例 4 中描述的 HPLC 分析通过在缀合反应中利用或不利用外源 NHS 的方法制备的缀合物的缀合物单体和游离类美登素。通过在 4°C 贮存过程中的稳定性测试估计根据游离类美登素释放的缀合物的稳定性。

[0193] 如下面表 6 中所示,基于根据游离类美登素的稳定性,利用少至 0.3mM 的添加至缀合反应的外源 NHS 产生的缀合物优于无外源 NHS 的情况下产生的缀合物。

[0194] 表 6. 通过在缀合反应中利用或不利用外源 NHS 的方法产生的 huDS6-SPDB-DM4 的至关重要性质的比较

[0195]

添加的外源 NHS	0mM NHS	0.3mM NHS
缀合物单体 (在 4°C 进行 1 天的%)	95.6	95.3
游离类美登素 (在 4°C 进行 1 天的%)	1.1	0.4
游离类美登素 (在 4°C 进行 24 周的%)	2.8	1.0

[0196] 本实施例中提供的实验结果显示了在缀合反应过程中添加外源 NHS 对缀合物稳定性的有益效应。具体地,这些结果确认了 huDS6-SPDB-DM4 缀合物的稳定性,如通过游离类美登素的释放测量的,当将外源 NHS 添加至缀合反应时,得到显著增强。

[0197] 实施例 6

[0198] 本实施例显示在用于制备细胞结合剂-细胞毒素剂缀合物的方法的修饰反应过程中添加 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 的有益效应。具体地,本实施例显示了 NHS 至修饰反应的添加具有对抗体-类美登素缀合物的稳定性的有益效应。

[0199] 使用先前描述的方法 (参见,例如,美国专利 5,208,020 和美国专利申请公布 No. 2006/0182750),在将外源 NHS 添加至或不添加至修饰反应的情况下,将人源化 huDS6 抗体与异双官能交联试剂 SPDB 和类美登素 DM4 反应,以以约 3.0 的类美登素对抗体的比率 (MAR) (也称为药物对抗体的比率) 产生缀合物。

[0200] 关于先前描述的方法,首先将 huDS6 (10mg/mL) 与 SPDB (相对于抗体的量 4.3 倍摩尔过量) 反应以形成修饰抗体。在室温下于 50mM 磷酸钾、100mM 氯化钠、pH7.5 和 5% DMA 中进行修饰反应 15 分钟。总共约 0.3mM NHS 从 SPDB 的氨解反应 (这导致接头至抗体的连接) 与 SPDB 的水解的组合释放。使用于 50mM 磷酸钾、100mM 氯化钠、pH7.5 中平衡和洗脱

的 Sephadex G25F 树脂的柱子纯化修饰抗体。纯化后,将修饰抗体 (4mg/mL) 与类美登素 DM4 (相对于抗体的量 7.1 倍摩尔过量;相对于抗体上接头的测量的量 1.7 倍过量) 反应以形成缀合抗体。在室温下于 50mM 磷酸钾、100mM 氯化钠、pH7.5 和 5% DMA 中进行缀合反应约 20 小时。随后使用于磷酸盐缓冲液 pH6.5 (缓冲液 B) 中平衡和洗脱的 Sephadex G25F 树脂的柱子纯化反应混合物。

[0201] 关于其中添加外源 NHS 的方法,将 huDS6 (10mg/mL) 与 SPDB 在室温下于具有另外的 3mM NHS (添加的 NHS 对已存在的 NHS 的摩尔比为约 10 倍) 的 50mM 磷酸钾、100mM 氯化钠、pH7.5、5% DMA 中反应 15 分钟。使用于 50mM 磷酸钾、100mM 氯化钠、pH7.5 中平衡和洗脱的 Sephadex G25F 树脂的柱子纯化修饰抗体。纯化后,将修饰抗体 (4mg/mL) 与类美登素 DM4 (相对于抗体 6.6 倍摩尔过量;相对于抗体上接头的测量的量 1.7 倍过量) 反应以形成缀合抗体。在室温下于 50mM 磷酸钾、100mM 氯化钠、pH7.5 和 5% DMA 中进行缀合反应约 20 小时。使用于磷酸盐缓冲液 pH6.5 (缓冲液 B) 中平衡和洗脱的 Sephadex G25F 树脂的柱子纯化反应混合物。

[0202] 使用如实施例 4 中所述的 HPLC 分析通过在修饰反应中利用或不利用外源 NHS 的方法制备的缀合物的缀合物单体和游离类美登素。通过在 4°C 贮存过程中的稳定性测试估计根据游离类美登素的缀合物的稳定性。

[0203] 如下面表 7 中所示,基于根据游离类美登素的稳定性,通过在修饰反应中添加外源 NHS 产生的缀合物优于在外源 NHS 不存在的情况下产生的缀合物。

[0204] 表 7. 通过在修饰反应中利用或不利用外源 NHS 的方法产生的 huDS6-SPDB-DM4 的至关重要的性质的比较

[0205]

添加的外源 NHS	0mM NHS	3mM NHS
缀合物单体 (t = 0 时的%)	95.7	95.4
游离类美登素 (t = 0 时的%)	0.8	0.2
游离类美登素 (在 4°C 进行 62 周后的%)	5.6	1.9

[0206] 本实施例中提供的实验结果显示了在修饰反应过程中添加外源 NHS 对缀合物稳定性的有益效应。具体地,这些结果确认了 huDS6-SPDB-DM4 缀合物的稳定性,如通过游离类美登素的释放测量的,当将外源 NHS 添加至缀合反应时,得到显著增强。

[0207] 本文中引用的所有参考资料,包括出版物、专利申请和专利通过引用并入本文,其引用程度就如同将每一个参考资料个别且特别地通过引用并入本文并且以其整体示于本文中一样。

[0208] 术语“一个 / 一种 (a)”和“一个 / 一种 (an)”和“所指物 (the)”以及相似指示物在描述本发明的说明书中 (尤其在下列权利要求的上下文中) 的使用,除非在本文中另有所指或通过上下文明确地显示相反,否则被解释为覆盖单数和复数。术语“包含”、“具有”、“包括”和“含有”,除非另有所指,否则被解释为开放性术语 (即,意指“包括,但不限于”)。除非在本文中另有所指,否则本文中的值的范围的引用仅意欲用作单个地提及落在范围内的每一个单独的值的速写法,并且每一个单独的值被并入说明书,就如同其在本文中被个

别地引用一样。除非在本文中另有所指,或通过上下文中明确地显示相反,否则本文中描述的所有方法可以以任何适当的顺序进行。除非本文中另有所指,本文中提供的任何和所有实例或示例性语言(例如,“例如”)的使用仅意欲用于更好的举例说明本发明,而不对本发明的范围作出限定。本文中的语言不应当被解释为表示任何非要求的元件为本发明的实践所必需的。

[0209] 本发明的优选实施方案在本文中进行了描述,包括本发明人已知的用于进行本发明的最好模式。当阅读前述说明时,这些优选实施方案的变化可变得对于本领域技术人员来说是显然的。本发明人预期本领域技术人员在适当时使用这样的变化,本发明人期望本发明以与本文中明确地描述的方式不同的方式实践本发明。因此,本发明包括由适用法律允许的附录于其的权利要求中引用的主题的所有变化和同等物。此外,除非本文中另有所指或由上下文显示明确相反,否则其所有可能变化中的上述元件的任何组合包括在本发明中。