



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107592813 A

(43)申请公布日 2018.01.16

(21)申请号 201580060700.2

(22)申请日 2015.11.18

(30)优先权数据

62/081,914 2014.11.19 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.05.08

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2015/061310 2015.11.18

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/081584 EN 2016.05.26

(71)申请人 伊缪诺金公司

地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 B·M·哈钦斯

(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 陈文平 侯宝光

(51)Int.Cl.

A61K 47/50(2017.01)

A61K 47/68(2017.01)

A61K 31/5365(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

权利要求书4页 说明书20页

序列表9页

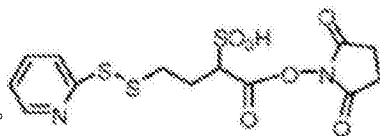
(54)发明名称

用于制备细胞结合剂-细胞毒性剂缀合物的方法

(57)摘要

本发明提供一种用于制备细胞结合剂细胞毒性剂缀合物的新型方法。所述方法包括以下步骤:(a)使细胞毒性剂与由结构式(I)表示的双功能交联试剂或其盐在包含缓冲剂的缓冲溶液中反应,以提供包含细胞毒性剂-接头化合物的第一混合物,其中所述缓冲溶液具有高缓冲能力;以及(b)使来自步骤(a)的包含细胞毒性剂-接头化合物的第一混合物与细胞结合剂在pH为4至9的溶液中反应,以提供包含所述细胞结合剂细胞毒性剂缀合物的第二混合物。根据本文所述的方法制备的细胞结合剂细胞毒性剂缀合物也包括

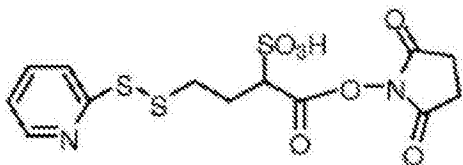
于本发明中。



(I)

1. 一种用于制备细胞结合剂细胞毒性剂缀合物的方法,所述方法包括以下步骤:

(a) 使细胞毒性剂与由以下结构式表示的双功能交联试剂:



或其盐在包含缓冲剂的缓冲溶液中反应,以提供包含细胞毒性剂-接头化合物的第一混合物,其中所述缓冲溶液具有高缓冲能力;

(b) 使从步骤(a)获得的所述第一混合物中的所述细胞毒性剂-接头化合物与细胞结合剂在pH为4至9的溶液中反应,以提供包含所述细胞结合剂细胞毒性剂缀合物的第二混合物。

2. 如权利要求1所述的方法,其中所述细胞结合剂易于片段化。

3. 如权利要求1或2所述的方法,其中所述细胞毒性剂是美登木素生物碱。

4. 如权利要求3所述的方法,其中所述细胞毒性剂是DM4。

5. 如权利要求1-4中任一项所述的方法,其中所述缓冲剂与所述双功能交联试剂的摩尔比是1.5:1至12.5:1。

6. 如权利要求5所述的方法,其中所述缓冲剂与所述双功能交联试剂的所述摩尔比是2:1至8:1。

7. 如权利要求5所述的方法,其中所述缓冲剂与所述双功能交联试剂的所述摩尔比是4:1至6:1。

8. 如权利要求5所述的方法,其中所述缓冲剂与所述双功能交联试剂的所述摩尔比是5:1。

9. 如权利要求1-8中任一项所述的方法,其中所述缓冲溶液具有4至9的pH。

10. 如权利要求9所述的方法,其中所述缓冲溶液具有7.5至8.5的pH。

11. 如权利要求10所述的方法,其中所述缓冲溶液具有7.9至8.5、8.0至8.4或8.1至8.3的pH。

12. 如权利要求9所述的方法,其中所述缓冲溶液具有8.2的pH。

13. 如权利要求1-12中任一项所述的方法,其中所述缓冲剂选自由以下组成的组:柠檬酸盐缓冲剂、乙酸盐缓冲剂、琥珀酸盐缓冲剂和磷酸盐缓冲剂。

14. 如权利要求1-12中任一项所述的方法,其中所述缓冲剂选自由以下组成的组: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)、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)、MES (2-(N-吗啉代)乙磺酸)及其组合。

15. 如权利要求14所述的方法,其中所述缓冲剂是EPPS。

16. 如权利要求1-15中任一项所述的方法,其中所述缓冲溶液还包含氯化钠。

17. 如权利要求1-16中任一项所述的方法,其中所述缓冲溶液还包含有机溶剂。

18. 如权利要求17所述的方法,其中所述有机溶剂是DMA。

19. 如权利要求17或18所述的方法,其中所述有机溶剂以所述缓冲溶液的1体积%-99体积%、50体积%-99体积%、60体积%-99体积%或70体积%-99体积%的量存在。

20. 如权利要求19所述的方法,其中所述有机溶剂以所述缓冲溶液的50体积%-90体积%、55体积%-85体积%、60体积%-80体积%或65体积%-75体积%的量存在。

21. 如权利要求19所述的方法,其中所述有机溶剂以所述缓冲溶液的70体积%的量存在。

22. 如权利要求1-21中任一项所述的方法,其中在步骤(a)的所述反应中使用相对于所述双功能交联试剂摩尔过量的量的所述细胞毒性剂。

23. 如权利要求22所述的方法,其中所述细胞毒性剂与所述双功能交联试剂的摩尔比是1.1:1至20:1、1.1:1至10:1、1.1:1至5:1或1.1:1至2:1。

24. 如权利要求23所述的方法,其中所述细胞毒性剂与所述双功能交联试剂的所述摩尔比是1:1:1至1.3:1。

25. 如权利要求23所述的方法,其中所述细胞毒性剂与所述双功能交联试剂的所述摩尔比是1.2:1。

26. 如权利要求1-25中任一项所述的方法,其中步骤(a)中的所述反应进行1小时至2小时。

27. 如权利要求1-25中任一项所述的方法,其中步骤(a)中的所述反应进行2小时至5小时。

28. 如权利要求1-25中任一项所述的方法,其中步骤(a)中的所述反应进行5小时至20小时。

29. 如权利要求28所述的方法,其中步骤(a)中的所述反应进行5小时至15小时。

30. 如权利要求28所述的方法,其中步骤(a)中的所述反应进行4小时至8小时或5小时至7小时。

31. 如权利要求28所述的方法,其中步骤(a)中的所述反应进行6小时。

32. 如权利要求1-31中任一项所述的方法,其中步骤(a)中的所述反应在15℃至25℃的温度下进行。

33. 如权利要求32所述的方法,其中步骤(a)中的所述反应在17℃至23℃、18℃至22℃或19℃至21℃的温度下进行。

34. 如权利要求32所述的方法,其中步骤(a)中的所述反应在20℃的温度下进行。

35. 如权利要求1-32中任一项所述的方法,其中步骤(b)中的所述溶液具有5.0-9.0、5.5-9.0、6.0-9.0或6.5-9.0的pH。

36. 如权利要求35所述的方法,其中步骤(b)中的所述溶液具有7.5-8.5的pH。

37. 如权利要求35所述的方法,其中步骤(b)中的所述溶液具有8.0-8.4或8.1-8.3的pH。

38. 如权利要求35所述的方法,其中步骤(b)中的所述溶液具有8.2的pH。

39. 如权利要求1-38中任一项所述的方法,其中步骤(b)中的所述溶液包含选自由以下组成的组的缓冲剂:柠檬酸盐缓冲剂、乙酸盐缓冲剂、琥珀酸盐缓冲剂和磷酸盐缓冲剂。

40. 如权利要求1-38中任一项所述的方法,其中步骤(b)中的所述溶液包含选自由以下组成的组的缓冲剂: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)、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)、MES(2-(N-吗啉代)乙磺

酸)及其组合。

41. 如权利要求40所述的方法,其中所述缓冲剂是EPPS。

42. 如权利要求1-41中任一项所述的方法,其中步骤(b)中的所述溶液还包含有机溶剂。

43. 如权利要求42所述的方法,其中所述有机溶剂是DMA。

44. 如权利要求42或43所述的方法,其中所述有机溶剂以所述溶液的1体积%-25体积%、2体积%-20体积%、2体积%-15体积%或2体积%-10体积%的量存在。

45. 如权利要求44所述的方法,其中所述有机溶剂以所述溶液的2.5体积%-7.5体积%、3体积%-7体积%、4体积%-6体积%或4.5体积%-5.5体积%的量存在。

46. 如权利要求45所述的方法,其中所述有机溶剂以所述溶液的5体积%的量存在。

47. 如权利要求1-46中任一项所述的方法,其中步骤(b)的所述溶液中所述细胞结合剂的浓度是5g/L至100g/L。

48. 如权利要求47所述的方法,其中所述细胞结合剂的所述浓度介于5g/L至50g/L之间。

49. 如权利要求47所述的方法,其中所述细胞结合剂的所述浓度介于10g/L至40g/L之间。

50. 如权利要求47所述的方法,其中所述细胞结合剂的所述浓度是介于15g/L至25g/L之间、18g/L至22g/L或19g/L至21g/L。

51. 如权利要求50所述的方法,其中所述细胞结合剂的所述浓度是20g/L。

52. 如权利要求1-51中任一项所述的方法,其中步骤(b)中的所述反应进行10小时至30小时。

53. 如权利要求52所述的方法,其中步骤(b)中的所述反应进行15小时至25小时。

54. 如权利要求52所述的方法,其中步骤(b)中的所述反应进行8小时至24小时、12小时至20小时、14小时至18小时或15小时至17小时。

55. 如权利要求54所述的方法,其中步骤(b)中的所述反应进行16小时。

56. 如权利要求52所述的方法,其中步骤(b)中的所述反应进行18小时至26小时、20小时至24小时或19小时至23小时。

57. 如权利要求52所述的方法,其中步骤(b)中的所述反应进行22小时。

58. 如权利要求1-57中任一项所述的方法,其中步骤(b)中的所述反应在15℃至25℃的温度下进行。

59. 如权利要求58所述的方法,其中步骤(b)中的所述反应在20℃的温度下进行。

60. 如权利要求1-59中任一项所述的方法,其中所述双功能交联试剂与所述细胞结合剂的摩尔比是2至10。

61. 如权利要求60所述的方法,其中所述双功能交联试剂与所述细胞结合剂的所述摩尔比是3至6。

62. 如权利要求61所述的方法,其中所述双功能交联试剂与所述细胞结合剂的所述摩尔比是3.5至5。

63. 如权利要求62所述的方法,其中所述双功能交联试剂与所述细胞结合剂的所述摩尔比是4.0。

64. 如权利要求1-63中任一项所述的方法,其中所述方法还包括通过将所述溶液的所述pH调节至5或5以下来淬灭步骤(b)中的所述反应的步骤。

65. 如权利要求1-64中任一项所述的方法,其中所述方法还包括纯化所述第二混合物以提供纯化的细胞结合剂细胞毒性剂缀合物。

66. 如权利要求65所述的方法,其中通过使所述第二混合物经受切向流过滤、选择沉淀法、吸附过滤法、吸附色谱法、非吸附色谱法或其组合来纯化所述混合物。

67. 如权利要求66所述的方法,其中通过使所述第二混合物经受切向流过滤来纯化所述混合物。

68. 如权利要求1-67中任一项所述的方法,其中所述细胞结合剂是抗体。

69. 如权利要求67所述的方法,其中所述抗体是单克隆抗体。

70. 如权利要求69所述的方法,其中所述抗体是人源化单克隆抗体。

71. 如权利要求70所述的方法,其中所述抗体选自huN901、huMy9-6、huB4、huC242、曲妥珠单抗、比伐珠单抗、西罗珠单抗、CNT095、huDS6、利妥昔单抗、抗Her2抗体、抗EGFR抗体、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。

用于制备细胞结合剂-细胞毒性剂缀合物的方法

[0001] 相关申请的引用

[0002] 本申请根据35U.S.C. §119 (e) 要求2014年11月19日提交的美国临时申请号62/081,914的提交日期的权益,所述申请的全部内容(包括所有附图、式、说明书、权利要求书和序列表)以引用的方式并入本文。

[0003] 发明背景

[0004] 适用于治疗癌症和其他疾病的抗体-药物-缀合物(ADC)通常由三种不同的元素组成:细胞结合剂;接头;以及细胞毒性剂。将细胞结合剂(如抗体)与细胞毒性剂缀合的常规方法采用两个不同的反应步骤。在第一反应步骤中,使抗体与双功能交联试剂反应以产生接头修饰的抗体。然后任选地从过量的接头或水解的接头试剂纯化修饰的抗体产物。在第二反应步骤中,使接头修饰的抗体与含有反应性基团例(如硫醇)的细胞毒性剂反应以产生抗体-细胞毒性剂缀合物,所述缀合物在另外的纯化步骤中再次纯化。这种常规方法可能需要两个纯化步骤,这降低了总体产率并且使得所述方法对于大规模制造ADC来说是繁琐且不经济的。

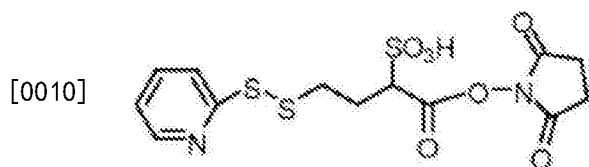
[0005] 或者,细胞毒性剂可首先与双功能交联试剂反应以形成细胞毒性剂-接头化合物,然后使所述化合物与细胞结合剂反应以形成细胞结合剂-细胞毒性剂缀合物(缀合反应)。细胞毒性剂、双功能交联试剂和所得到的细胞毒性剂-接头化合物通常是疏水性化合物,并且在水中具有低溶解度。因此,需要在缀合反应中存在一定量的有机溶剂以溶解细胞毒性剂-接头化合物。另一方面,大量有机溶剂的存在可能对抗体稳定性具有不利影响。因此,当使用低浓度的细胞结合剂、细胞毒性剂和/或双功能交联试剂时,本领域的方法可能局限于细胞结合剂-细胞毒性剂缀合物的小规模制备。

[0006] 鉴于前述,需要开发用于制备具有高抗体稳定性的细胞结合剂-细胞毒性剂缀合物并且适合于大规模生产的改进的方法。

[0007] 发明概述

[0008] 本发明提供适于大规模生产抗体-药物-缀合物(ADC)的新型方法。所述方法包括以下步骤:

[0009] (a) 使细胞毒性剂与由以下结构式表示的双功能交联试剂:



[0011] 或其盐在包含缓冲剂的缓冲溶液中反应,以提供包含细胞毒性剂-接头化合物的第一混合物,其中所述缓冲溶液具有高缓冲能力;以及

[0012] (b) 使来自步骤(a)的第一混合物中的细胞毒性剂-接头化合物与细胞结合剂在pH为4至9的溶液中反应,以提供包含所述细胞结合剂细胞毒性剂缀合物的第二混合物。

[0013] 已经出人意料地发现,与在步骤(a)的反应中使用低缓冲能力的缓冲溶液制备的缀合物相比,当在步骤(a)的反应中使用高缓冲能力的缓冲溶液时,所得到的细胞结合剂缀

合物具有显著更少的抗体片段化。此外,高浓度的细胞结合剂(例如,抗体)可用于缀合反应(即,本发明方法的步骤(b))中,这使得所述方法对于大规模生产来说更加经济。此外,与本领域的方法相比,缀合溶液中需要较少量的有机溶剂(例如,二甲基乙酰胺(DMA)),这可增加抗体和所得到的缀合物的稳定性。

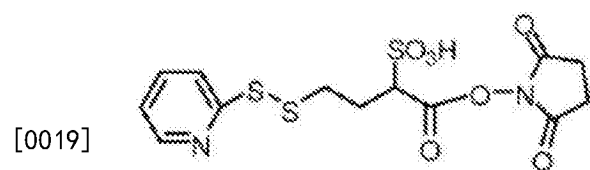
[0014] 本发明的方法提供具有高纯度和/或稳定性的细胞结合剂细胞毒性剂缀合物。具体地说,与现有技术中描述的方法相比,本发明的方法减少抗体片段化。

[0015] 本发明还涉及使用本文所述的方法制备的细胞结合剂细胞毒性剂缀合物。

[0016] 发明详述

[0017] 本发明提供一种用于制备细胞结合剂细胞毒性剂缀合物的新型方法。所述方法包括以下步骤:

[0018] (a) 使细胞毒性剂与由以下结构式表示的双功能交联试剂:



sSPDB

[0020] 或其盐在包含缓冲剂的缓冲溶液中反应,以提供包含细胞毒性剂-接头化合物的第一混合物,其中所述缓冲溶液具有高缓冲能力;以及

[0021] (b) 使从步骤(a)获得的第一混合物中的细胞毒性剂-接头化合物与细胞结合剂在pH为4至9的溶液中反应,以提供包含所述细胞结合剂细胞毒性剂缀合物的第二混合物。

[0022] 如本文所用,“盐”是指本文所述的化合物的衍生物,其中通过制备母体化合物的酸盐或碱盐对母体化合物改性。更具体地说,盐是指其中通过使母体化合物与无机或有机碱如碱金属氢氧化物或烷基胺反应来改性母体化合物的衍生物。在一个实施方案中,所述盐是钠盐。或者,所述盐是三烷基铵盐,例如N,N-二异丙基乙基铵盐。

[0023] 在一个实施方案中,细胞结合剂(例如,抗体或其抗原结合片段)易于片段化。如本文所用,“片段化”是指破坏蛋白质(例如抗体)中的共价键。在一个实施方案中,片段化是指在游离硫醇存在下还原链间二硫键。片段化还可包括蛋白质主链的裂解以及侧链的片段化或修饰(参见例如,Vlasak, J. 和 Ionescu, R. Fragmentation of monoclonal antibodies. mAbs 3:3, 253-263, 2011年5月/6月)。易于片段化的示例性抗体或抗原结合片段包括但不限于IgG4, 包含 λ 轻链、Fab或F(ab')₂的抗体。可使用主要基于分子大小的分离技术或涉及氨基酸侧链化学的分离技术来鉴别片段化。主要基于分子大小的分离技术包括但不限于尺寸排阻色谱法(SEC)、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和与SDS一起的毛细管电泳(CE-SDS)。涉及氨基酸侧链化学的分离技术包括但不限于液相色谱法,如反相HPLC、疏水相互作用HPLC、阴离子交换HPLC、快速蛋白质液相色谱法(FPLC)、超高效液相色谱法(UPLC)等。

[0024] 在某些实施方案中,本发明方法的步骤(a)中使用的缓冲溶液具有高缓冲能力。如本文所用,“缓冲能力”是指缓冲溶液在添加的酸或碱存在下防止反应混合物的pH的显著变化的能力。

[0025] 在一个实施方案中,相对于双功能交联试剂,缓冲溶液包含摩尔过量的缓冲剂。在另一个实施方案中,缓冲溶液中缓冲剂与双功能交联试剂的摩尔比是1.1:1至50:1;1.2:1至30:1;1.3:1至25:1;或1.5:1至12.5:1。更具体地说,缓冲剂与双功能交联试剂的摩尔比是2:1至8:1。甚至更具体地说,缓冲剂与双功能交联试剂的摩尔比是4:1至6:1。在另一个更具体的实施方案中,缓冲剂与双功能交联试剂的摩尔比是5:1。

[0026] 在某些实施方案中,本发明方法的步骤(a)中的缓冲溶液具有4至9的pH。更具体地说,pH是4.5至8.5、5.0至8.5、5.5至8.5、6.0至8.5、6.5至8.5、7.0至8.5、7.1至8.5、7.2至8.5、7.3至8.5、7.4至8.5、7.5至8.5、7.5至8.4、7.5至8.3、5.0至6.5、5.0至6.0、或5.5至6.5。在一个具体实施方案中,pH是7.5至8.5(例如,7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4或8.5)。在另一个具体实施方案中,pH是7.9至8.5、8.0至8.4或8.1至8.3。甚至更具体地说,pH是8.2。或者,pH是4.5至5.5(例如,4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4或5.5)。在另一个替代方案中,pH是4.7至5.3、4.8至5.2或4.9至5.1。甚至更具体地说,pH是5.0。

[0027] 可使用本领域中已知的任何合适的缓冲剂。合适的缓冲剂包括例如但不限于柠檬酸盐缓冲剂、乙酸盐缓冲剂、琥珀酸盐缓冲剂和磷酸盐缓冲剂。在一个实施方案中,缓冲剂选自自由以下组成的组: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)、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)、MES(2-(N-吗啉代)乙磺酸)及其组合。更具体地说,缓冲剂是EPPS。

[0028] 在某些实施方案中,缓冲溶液还可包含惰性盐以维持缓冲液的离子强度。在一个实施方案中,缓冲溶液还包含氯化钠。

[0029] 在某些实施方案中,步骤(a)的缓冲溶液包含有机溶剂。更具体地说,有机溶剂是二甲基乙酰胺(DMA)。在一个实施方案中,步骤(a)的缓冲溶液包含水与有机溶剂的混合物。更具体地说,步骤(a)的缓冲溶液包含水与DMA的混合物。有机溶剂(例如,DMA)可以缓冲溶液的1体积%-99体积%、5体积%-99体积%、10体积%-99体积%、20体积%-99体积%、30体积%-99体积%、40体积%-99体积%、50体积%-99体积%、60体积%-99体积%、70体积%-99体积%、80体积%-99体积%、90体积%-99体积%的量存在。在一个实施方案中,有机溶剂(例如DMA)以缓冲溶液的50体积%-90体积%、55体积%-85体积%、60体积%-80体积%或65体积%-75体积%的量存在。在更具体的实施方案中,有机溶剂(例如DMA)以缓冲溶液的70体积%的量存在。

[0030] 在某些实施方案中,在步骤(a)的反应中使用摩尔等量的细胞毒性剂和双功能交联试剂。在某些实施方案中,在步骤(a)的反应中使用相对于双功能交联试剂摩尔过量的细胞毒性剂。在一个实施方案中,细胞毒性剂与双功能交联试剂的摩尔比是1.01:1至20:1、1.1:1至20:1、1.1:1至10:1、1.1:1至5:1、1.1:1至4:1、1.1:1至3:1、1.1:1至2:1、1.1:1至1.5:1、1.1:1至1.4:1或1.1:1至1.3:1。更具体地说,细胞毒性剂与双功能交联试剂的摩尔比是1.2:1。

[0031] 在某些实施方案中,在步骤(a)的反应中使用相对于细胞毒性剂摩尔过量的双功能交联试剂。在一个实施方案中,双功能交联试剂与细胞毒性剂的摩尔比是1.01:1、1.1:1至20:1、1.1:1至10:1、1.1:1至5:1、1.1:1至4:1、1.1:1至3:1、1.1:1至2:1、1.1:1至1.5:1、

1.1:1至1.4:1或1.1:1至1.3:1。

[0032] 在某些实施方案中,本发明方法的步骤(a)中的反应通过将细胞毒性剂与双功能交联试剂sSPDB在上述缓冲溶液中混合来进行。使反应进行2分钟至1周、1小时至48小时、1小时至36小时、1小时至24小时、5小时至20小时、5小时至15小时、6小时至14小时、4小时至8小时、5小时至7小时、1小时至5小时、1小时至4小时、1小时至2小时或2小时至5小时。在一个实施方案中,使反应进行1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、11小时、12小时、13小时、14小时、15小时等。

[0033] 步骤(a)的反应可在任何合适的温度下进行。在一个实施方案中,反应可在10℃至50℃、10℃至40℃或10℃至30℃的温度下进行。在另一个实施方案中,反应可在15℃至25℃、16℃至24℃、17℃至23℃、18℃至22℃或19℃至21℃的温度下进行。在另一个实施方案中,反应可在15℃、16℃、17℃、18℃、19℃、20℃、21℃、22℃、23℃、24℃或25℃下进行。或者,反应可在较低温度,如低于10℃或低于0℃下进行(条件是防止溶液冷冻,例如通过用以溶解细胞毒性剂的有机溶剂和/或双功能交联试剂的存在)。在一个实施方案中,反应可在-10℃至0℃、0℃至10℃或0℃至5℃的温度下进行。

[0034] 在某些实施方案中,在本发明方法的步骤(a)中从使细胞毒性剂和双功能交联试剂反应获得的第一混合物可在与细胞结合剂反应之前储存长时段(如1天、2天、3天、4天、5天、6天、1周、2周、3周、1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、1年、2年或5年)。第一混合物可在较低温度(例如,低于10℃、低于5℃或低于0℃、或在-10℃至0℃、0℃至10℃或0℃至5℃的温度下)以冷冻状态储存。或者,第一混合物可在步骤(a)的反应完成之后在室温或在10℃至25℃、15℃至25℃或20℃至25℃的温度下储存。

[0035] 在某些实施方案中,第一混合物包含细胞毒性剂-接头化合物和杂质,如未反应的细胞毒性剂、未反应的双功能交联试剂和反应副产物,如水解的双功能交联试剂和/或细胞毒性剂的二聚体。

[0036] 在某些实施方案中,在本发明方法的步骤(b)中在使第一混合物中的细胞毒性剂-接头化合物与细胞结合剂反应之前,第一反应混合物基本上不进行纯化。如本文所用,术语“基本上纯化的”是指少于50%、少于40%、少于30%、少于20%、少于10%、少于9%、少于8%、少于7%、少于6%、少于5%、少于4%、少于3%、少于2%或少于1%的杂质(如未反应的细胞毒性剂、未反应的双功能交联试剂和反应副产物,如水解的双功能交联试剂和/或细胞毒性剂的二聚体)在本发明方法的步骤(b)中在使第一反应混合物中的细胞毒性剂-接头化合物与细胞结合剂反应之前除去。

[0037] 在某些实施方案中,使从本发明方法的步骤(a)获得的第一混合物与pH为4至9.5至9.5至9.6至9.6.3至9.6.3至8.7、6.4至8.6、6.5至8.5、7.3至8.7或7.4至8.6的溶液(例如,缀合缓冲溶液)中的细胞结合剂反应,以提供包含细胞结合剂细胞毒性剂缀合物的第二混合物。更具体地说,溶液的pH为7.5至8.5(例如,7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4或8.5)。在另一个更具体的实施方案中,溶液的pH为7.9至8.5、8.0至8.4或8.1至8.3。在更具体的实施方案中,溶液的pH为8.2。在另一个具体实施方案中,溶液的pH为6.5至7.5(例如,6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4或7.5)。

[0038] 在某些实施方案中,步骤(b)中的溶液包含缓冲剂。可使用本领域中已知的任何合适的缓冲剂。合适的缓冲剂包括例如但不限于柠檬酸盐缓冲液、乙酸盐缓冲液、琥珀酸盐缓

冲液和磷酸盐缓冲液。在一个实施方案中,缓冲剂选自由以下组成的组: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)、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)、MES (2-(N-吗啉代)乙磺酸)及其组合。更具体地说,缓冲剂是EPPS。溶液还可包含惰性盐以维持缓冲液的离子强度。在一个实施方案中,缓冲溶液还包含氯化钠。

[0039] 在某些实施方案中,本发明方法的步骤(b)的溶液还包含有机溶剂。更具体地说,有机溶剂是二甲基乙酰胺(DMA)。在一个实施方案中,步骤(b)的溶液包含水与有机溶剂的混合物。更具体地说,步骤(b)的溶液包含水与DMA的混合物。有机溶剂(例如,DMA)可以溶液的1体积%-99体积%、1体积%-90体积%、1体积%-80体积%、1体积%-70体积%、1体积%-60体积%、1体积%-50体积%、1体积%-40体积%、1体积%-30体积%、1体积%-25体积%、2体积%-20体积%、2体积%-15体积%、2体积%-10体积%、2.5体积%-7.5体积%、3体积%-7体积%、4体积%-6体积%或4.5体积%-5.5体积%的量存在。更具体地说,有机溶剂(例如DMA)以溶液的5体积%的量存在。

[0040] 在某些实施方案中,在本发明方法的步骤(b)中,通过将包含细胞结合剂的水溶液添加至从本发明方法的步骤(a)获得的第一混合物来使第一混合物与细胞结合剂反应。或者,将从步骤(a)获得的第一混合物添加至包含细胞结合剂的水溶液中。在某些实施方案中,将从步骤(a)获得的第一混合物在与细胞结合剂反应之前进行pH调节。在一个实施方案中,在与细胞结合剂反应之前,将第一混合物的pH调节至具有与包含细胞结合剂的水溶液的pH相等的pH。

[0041] 在某些实施方案中,用高浓度的细胞结合剂进行步骤(b)中的反应。在一个实施方案中,步骤(b)的溶液中细胞结合剂的浓度是5g/L至100g/L。更具体地说,浓度是5g/L至50g/L、5g/L至40g/L、10g/L至40g/L、10g/L至30g/L或15g/L至25g/L。在更具体的实施方案中,浓度是15g/L至25g/L、18g/L至22g/L或19g/L至21g/L。在更具体的实施方案中,浓度是20g/L。

[0042] 在某些实施方案中,在本发明的方法中使用相对于细胞结合剂,过量的量的双功能交联试剂。在一个实施方案中,双功能交联试剂与细胞结合剂的摩尔比在1至20、2至10、3至8或3至6的范围内。在另一个实施方案中,双功能交联试剂与细胞结合剂的摩尔比是3.5至5,例如3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9或5.0。

[0043] 在某些实施方案中,使步骤(b)中的反应进行5小时至48小时、10小时至48小时、10小时至30小时、15小时至25小时。在具体实施方案中,使步骤(b)中的反应进行8小时至24小时、12小时至20小时、14小时至18小时或15小时至17小时。在更具体的实施方案中,使步骤(b)中的反应进行16小时。在另一个实施方案中,使步骤(b)中的反应进行14小时至30小时、18小时至26小时、20小时至24小时或19小时至23小时。在更具体的实施方案中,使步骤(b)中的反应进行22小时。

[0044] 步骤(b)中的反应可在任何合适的温度下进行。在一个实施方案中,反应可在10℃至50℃、10℃至40℃或10℃至30℃的温度下进行。在另一个实施方案中,反应可在15℃至25℃、16℃至24℃、17℃至23℃、18℃至22℃或19℃至21℃的温度下进行。在另一个实施方案中,反应可在15℃、16℃、17℃、18℃、19℃、20℃、21℃、22℃、23℃、24℃或25℃下进行。或

者,反应可在较低温度,如低于10℃或低于0℃下进行(条件是防止溶液冷冻,例如通过用以溶解细胞毒性剂的有机溶剂和/或双功能交联试剂的存在)。在一个实施方案中,反应可在-10℃至0℃、0℃至10℃或0℃至5℃的温度下进行。

[0045] 在某些实施方案中,本发明的方法还包括步骤(b)之后的淬灭步骤。在一个实施方案中,通过将从步骤(b)获得的第二混合物的pH快速调节至低pH(例如,小于或等于6.5、小于或等于6.0、小于或等于5.5、小于或等于5.4、小于或等于5.3、小于或等于5.2、小于或等于5.1、小于或等于5.0的pH)来实现淬灭。在一个实施方案中,将第二混合物的pH调节至4.0至6.5、4.5至6.0、4.5至5.5、4.6至5.4、4.7至5.3、4.8至5.2或4.9至5.1的pH。在更具体的实施方案中,将第二混合物的pH调节至pH 5.0。可通过向第二混合物中添加酸来调节第二混合物的pH。更具体地说,可通过向第二混合物中添加乙酸来调节第二混合物的pH。

[0046] 在另一个实施方案中,通过向第二混合物中添加一种或多种淬灭剂以淬灭任何未反应的细胞毒性剂和/或未反应的双功能交联试剂来实现淬灭。如本文所用,术语“淬灭剂”是指与游离细胞毒性剂和/或双功能交联试剂反应的试剂。

[0047] 在一个实施方案中,可使用马来酰亚胺或卤代乙酰胺淬灭试剂,如4-马来酰亚胺丁酸、3-马来酰亚胺丙酸、N-乙基马来酰亚胺、碘乙酰胺或碘乙酰胺基丙酸,以确保细胞毒性剂中的任何未反应的基团(如硫醇)被淬灭。淬灭步骤可有助于防止细胞毒性剂的二聚化,特别是具有未反应的硫醇基团的细胞毒性剂(例如DM1)。二聚化的细胞毒性剂可能难以除去。淬灭步骤还可使与天然抗体二硫化物基团的任何不希望的硫醇-二硫化物交换反应最小化。用极性带电荷的硫醇淬灭试剂(如4-马来酰亚胺丁酸或3-马来酰亚胺丙酸)淬灭后,将过量的未反应的细胞毒性剂转化成极性、带电荷的水溶性加合物,所述加合物可在纯化步骤中容易地与共价连接的缀合物分离。还可使用非极性和中性硫醇淬灭试剂淬灭。

[0048] 在一个实施方案中,通过使混合物与同未反应的双功能交联试剂反应的淬灭试剂接触来淬灭混合物。例如,可将亲核试剂添加至混合物以淬灭任何未反应的双功能交联试剂。亲核试剂优选地是含有氨基的亲核试剂,如赖氨酸、牛磺酸和羟胺。

[0049] 在某些实施方案中,使步骤(b)的反应进行至淬灭步骤(即调节pH和/或使第二混合物与上述淬灭剂接触)之前完成。

[0050] 在反应步骤(b)之后,使细胞结合剂细胞毒性剂缀合物经受纯化步骤。在此方面,可使用切向流过滤(TFF)(其为基于膜的切向流过滤法)、非吸附色谱法、吸附色谱法、吸附过滤法、选择沉淀法或任何其他合适的纯化方法以及其组合从混合物的其他组分(例如,游离双功能交联剂、游离细胞毒性剂和反应副产物)中纯化细胞结合剂细胞毒性剂缀合物。

[0051] 在本发明的一个实施方案中,使用单一纯化步骤(例如TFF)纯化细胞结合剂细胞毒性剂缀合物。优选地,使用单一纯化步骤(例如,TFF)将缀合物纯化并交换到适当的制剂中。在本发明的另一个实施方案中,使用两个顺序纯化步骤纯化细胞结合剂细胞毒性剂缀合物。例如,可通过选择沉淀、吸附过滤、吸附色谱法或非吸附色谱法首先纯化缀合物,随后用TFF纯化。本领域普通技术人员将理解,细胞结合剂细胞毒性剂缀合物的纯化使能够分离包含与细胞毒性剂化学偶联的细胞结合剂的稳定缀合物。

[0052] 任何合适的TFF系统可用于纯化,包括Pellicon型系统(Millipore,Billerica,Mass.)、Sartocon Cassette系统(Sartorius AG,Edgewood,N.Y.)和Centrasette型系统(Pall Corp.,East Hills,N.Y.)。

[0053] 任何合适的吸附色谱树脂可用于纯化。优选的吸附色谱树脂包括羟磷灰石色谱法、疏水电荷诱导色谱法 (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、固定化金属亲和色谱法 (IMAC)、染料配体色谱法、亲和色谱法、反相色谱法以及其组合。合适的羟磷灰石树脂的实例包括陶瓷羟磷灰石 (CHT I型和II型, Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.)、HA Ultrogel羟磷灰石 (Pall Corp., East Hills, N.Y.) 和陶瓷氟磷灰石 (CFT I型和II型, Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.)。合适的HCIC树脂的实例是MEP Hypercel树脂 (Pall Corp., East Hills, N.Y.)。合适的HIC树脂的实例包括丁基-琼脂糖、己基-琼脂糖、苯基-琼脂糖和辛基琼脂糖树脂 (全部来自GE Healthcare, Piscataway, N.J.) 以及Macro-prep甲基和Macro-Prep叔丁基树脂 (Biorad Laboratories, Hercules, Calif.)。合适的离子交换树脂的实例包括SP-琼脂糖、CM-琼脂糖和Q-琼脂糖树脂 (全部来自GE Healthcare, Piscataway, N.J.) 以及Unosphere S树脂 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.)。合适的混合模式离子交换剂的实例包括Bakerbond ABx树脂 (JT Baker, Phillipsburg N.J.)。合适的IMAC树脂的实例包括螯合琼脂糖树脂 (GE Healthcare, Piscataway, N.J.) 和Profinity IMAC树脂 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.)。合适的染料配体树脂的实例包括蓝色琼脂糖树脂 (GE Healthcare, Piscataway, N.J.) 和Affi-gel蓝色树脂 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.)。合适的亲和树脂的实例包括蛋白质A琼脂糖树脂 (例如, MabSelect, GE Healthcare, Piscataway, N.J.), 其中细胞结合剂是抗体; 以及凝集素亲和树脂, 例如Lentil凝集素琼脂糖树脂 (GE Healthcare, Piscataway, N.J.), 其中细胞结合剂携带适当的凝集素结合位点。或者, 可使用对细胞结合剂具有特异性的抗体。这种抗体可固定至例如琼脂糖4快速流动树脂 (GE Healthcare, Piscataway, N.J.)。合适的反相树脂的实例包括C4、C8和C18树脂 (Grace Vydac, Hesperia, Calif.)。

[0054] 任何合适的非吸附色谱树脂可用于纯化。合适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), 并且其他是本领域的普通技术人员已知的。

[0055] 通过本发明的方法制备的细胞结合剂-细胞毒性剂缀合物具有基本上高的纯度和稳定性。在本发明的一方面, 基本上高纯度的细胞结合剂-细胞毒性剂缀合物具有一个或多个以下特征: (a) 小于25%、小于20%、小于15% (例如, 小于或等于15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%) 的抗体片段化, (b) 大于90% (例如, 大于或等于91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)、优选大于95%的缀合物物质是单体的, (c) 缀合物制剂中的非缀合接头含量小于约10% (例如, 小于或等于约9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或0%) (相对于总接头), (d) 小于10%的缀合物物质是交联的 (例如, 小于或等于约9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或0%), (e) 缀合物制剂中的游离细胞毒性剂含量小于约2% (例如, 小于或等于约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%) (相对于总细胞毒性剂, mol/mol) 和/或 (f) 储存后的游离细胞毒性剂含量无显著增加 (例如, 在约1周、约2周、约3周、约1个月、约2个月、约3个月、约4个月、约5个月、约6个月、约1年、约2年、约3年、约4年或约5年)。游离细胞毒性剂含量的“显著增加”意指在一定储存时间 (例

如,约1周、约2周、约3周、约1个月、约2个月、约3个月、约4个月、约5个月、约6个月、约1年、约2年、约3年、约4年或约5年)后,游离细胞毒性剂含量的增加小于约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%。

[0056] 如本文所用,术语“非缀合接头”是指与双功能交联试剂共价连接的细胞结合剂,其中细胞结合剂不通过双功能交联试剂的接头共价偶联至细胞毒性剂(即,“非缀合接头”可由CBA-L表示,其中CBA表示细胞结合剂,并且L表示双功能交联试剂。相反,细胞结合剂细胞毒性剂缀合物可由CBA-L-D表示,其中D表示细胞毒性剂)。

[0057] 在一个实施方案中,细胞结合剂细胞毒性剂缀合物中的细胞毒性剂与细胞结合剂(即,DAR)的平均摩尔比是约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或约4.5至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或约5.5)。

[0058] 细胞结合剂

[0059] 为了在本发明的方法中使用,细胞结合剂可以是与细胞,通常且优选动物细胞(例如,人细胞)结合的任何合适的试剂。细胞结合剂优选地是肽或多肽。合适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, α 、 β 、 γ)、淋巴因子(例如,IL-2、IL-3、IL-4、IL-6)、激素(例如,胰岛素,TRH(促甲状腺激素释放激素)、MSH(促黑素细胞激素)、类固醇激素如雄激素和雌激素)、生长因子和集落刺激因子如EGL、TGF- α 、FGF、VEGF、G-CSF、M-CSF和GM-CSF(Burgess, Immunology Today 5:155-158(1984))、营养转运分子(例如转铁蛋白)、维生素(例如叶酸)、以及特异性地结合细胞表面上的靶分子的任何其他试剂或分子。

[0060] 当细胞结合剂是抗体时,其与为多肽或糖表位(glycotope)并且可能是跨膜分子(例如受体)或配体(如生长因子)的抗原结合。示例性抗原包括分子(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;促卵泡激素;降钙素;促黄体激素;胰高血糖素;凝血因子(如因子vmc、因子IX、组织因子(TF)和血管性血友病因子(von Willebrands factor));抗凝血因子,如蛋白质C;心房利钠因子;肺表面活性剂;纤溶酶原激活物(如尿激酶或人尿或组织型纤溶酶原激活物(t-PA));蛙皮素;凝血酶;造血生长因子;肿瘤坏死因子- α 和- β ;脑啡肽酶;RANTES(对通常T细胞表达和分泌活化的调控);人巨噬细胞炎性蛋白(MIP-1- α);血清白蛋白(如人血清白蛋白);苗勒抑制物质(Muellerian-inhibiting substance);松弛肽A链;松弛肽B链;前松弛肽;小鼠促性腺激素相关肽;微生物蛋白质(如 β -内酰胺酶);DNA酶;IgE;细胞毒性T淋巴细胞相关抗原(CTLA),如CTLA-4;抑制素;活化素;血管内皮生长因子(VEGF);激素或生长因子受体;蛋白质A或D;类风湿因子;神经营养因子(如骨源性神经营养因子(BDNF)、神经营养蛋白-3、-4、-5或-6(NT-3、NT4、NT-5或NT-6)),或神经生长因子(如NGF- β);血小板源性生长因子(PDGF);成纤维细胞生长因子(如aFGF和bFGF);表皮生长因子(EGF);转化生长因子(TGF),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;crypto; α _v β 6;整联蛋白;VEGF;VEGFR;EGFR;成纤维细胞生长因子受体(FGFR)(例如,FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4);转铁蛋白受体;IRTA1;IRTA2;IRTA3;IRTA4;IRTA5;CD蛋白,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或公开于美国专利申请公布号2008/0171040或美国专利申请公布号2008/0305044并且以引用的方式整体并入的结合一种或多种肿瘤相关抗原或细胞表面受体的抗体;促红细胞生成素;骨诱导因子;免疫毒素;骨形态发生蛋白(BMP);干扰素,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,例如像HIV包膜的一部分;转运蛋白;归巢受体;地址素;调控蛋白;整联蛋白,如CD11a、CD11b、CD11c、CD18、ICAM、VLA-4和VCAM;肿瘤相关抗原,如HER2、HER3或HER4受体;内皮糖蛋白;c-Met;IGF1R;前列腺抗原如PCA3、PSA、PSGR、NGEP、PSMA、PSCA、TMEFF2和STEAP 1;LGR5;B7H4;以及任何以上列出的多肽的片段。

[0061] 此外,与骨髓细胞结合的GM-CSF可用作来自急性骨髓性白血病的患病细胞的细胞结合剂。与活化的T细胞结合的IL-2可用于预防移植体移植排斥,用于治疗和预防移植体抗寄主疾病以及用于治疗急性T细胞白血病。与黑素细胞结合的MSH可用于治疗黑色素瘤,针对黑色素瘤的抗体也可以。叶酸可用于靶向在卵巢肿瘤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状细胞癌(如肺及头和颈鳞状细胞癌)。促生长素抑制素可用于靶向成神经细胞瘤和其他肿瘤类型。

[0062] 可分别用雌激素(或雌激素类似物)或雄激素(或雄激素类似物)作为细胞结合剂成功地靶向乳腺癌和睾丸癌。

[0063] 如本文所用的术语“抗体”是指任何免疫球蛋白、任何免疫球蛋白片段,如Fab、Fab'、F(ab')₂、dsFv、sFv、微型抗体、双链抗体、三链抗体、四链抗体(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))。任何合适的抗体可用作细胞结合剂。本领域的普通技术人员将理解,适当的抗体的选择将取决于待靶向的细胞群体。在此方面,在特定细胞群体(通常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)的类型和数量将决定用于本发明组合物中的适当抗体的选择。细胞表面表达谱对于多种细胞类型是已知的,包括肿瘤细胞类型;或者如果是未知的,则可使用常规分子生物学和组织化学技术来测定。

[0064] 抗体可以是多克隆或单克隆,但最优选单克隆抗体。如本文所用,“多克隆”抗体是指通常包含在免疫动物的血清中的抗体分子的异质群体。“单克隆”抗体是指对特定抗原具有特异性的抗体分子的均质群体。单克隆抗体通常由B淋巴细胞的单个克隆(“B细胞”)产生。单克隆抗体可使用本领域的技术人员已知的各种技术获得,包括标准杂交瘤技术(参见例如, Kohler和Milstein, Eur. J. Immunol., 5:511-519 (1976); Harlow和Lane (编辑),

Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Press (1988); 以及 C.A. Janeway 等人 (编辑), Immunobiology, 增刊第5版, Garland Publishing, New York, N.Y. (2001))。简言之, 产生单克隆抗体的杂交瘤方法通常涉及将任何合适的动物 (通常且优选小鼠) 用抗原 (即“免疫原”) 注射。随后处死动物, 并且从其脾脏分离的B细胞与人骨髓瘤细胞融合。产生杂交细胞 (即, “杂交瘤”), 其在体外无限增殖并且以所需特异性持续分泌高滴度的抗体。可使用本领域已知的任何合适的方法来鉴别产生具有所需特异性的抗体的杂交瘤细胞。此类方法包括例如酶联免疫吸附测定 (ELISA)、蛋白质印迹分析和放射免疫测定。筛选杂交瘤群体以分离单独克隆, 其各自将单个抗体物种分泌至抗原。因为每个杂交瘤是衍生自与单个B细胞融合的克隆, 所以其产生的所有抗体分子的结构相同, 包括其抗原结合位点和同种型。单克隆抗体也可使用其他合适的技术来产生, 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)) 或包含抗体片段的噬菌体展示文库, 如Fab和scFv (单链可变区) (参见例如美国专利号5, 885, 793和5, 969, 108, 以及国际专利申请公布WO 92/01047和WO 99/06587)。

[0065] 单克隆抗体可从任何合适的动物分离或在任何合适的动物中产生, 但优选在哺乳动物、更优选小鼠或人且最优选人中产生。用于在小鼠中产生抗体的方法是本领域的技术人员熟知的并且在本文中描述。关于人抗体, 本领域的普通技术人员将理解, 可从用适当抗原疫苗接种或免疫的人受试者的血清分离多克隆抗体。或者, 可通过修改用于在非人动物如小鼠中产生人抗体的已知技术来产生人抗体 (参见例如, 美国专利号5, 545, 806、5, 569, 825和5, 714, 352, 以及美国专利申请公布号2002/0197266 A1)。

[0066] 虽然是用于人中的治疗性应用的理想选择, 人抗体、特别是人单克隆抗体通常比小鼠单克隆抗体更难以产生。然而, 当施用于人时, 小鼠单克隆抗体诱导快速的宿主抗体应答, 这可降低抗体-细胞毒性剂缀合物的治疗或诊断潜力。为了克服这些并发症, 单克隆抗体优选不被人免疫系统识别为“外来”。

[0067] 为此, 可使用噬菌体展示来产生抗体。在此方面, 可使用标准分子生物学和重组DNA技术产生编码抗体的抗原结合可变(V)结构域的噬菌体文库 (参见例如, Sambrook等人 (编辑), Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 增刊第3版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (2001))。选择编码具有所需特异性的可变区的噬菌体以用于特异性结合所需抗原, 并且重组包含所选可变结构域的完整人抗体。将编码重组抗体的核酸序列引入合适的细胞系, 如用于杂交瘤产生的骨髓瘤细胞, 以使得具有单克隆抗体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; 以及美国专利号6, 265, 150)。或者, 可从针对特定人重链和轻链免疫球蛋白基因转基因的小鼠产生单克隆抗体。此类方法是本领域已知的并且描述于例如美国专利号5, 545, 806和5, 569, 825以及Janeway等人, 同上中。

[0068] 最优选地, 抗体是人源化抗体。如本文所用, “人源化”抗体是其中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)接枝到人抗体分子的框架上的抗体。由于小鼠抗体和人抗体的框架的相似性, 本领域普遍接受的是, 此方法产生与人抗体抗原性相同但是与CDR序列所源自的小鼠单克隆抗体结合相同抗原的单克隆抗体。用于产生人源化抗体的方法是本领域熟知的, 并且在例如Janeway等人, 同上, 美国专利号5, 225, 539、5, 585,

089和5,693,761、欧洲专利号0239400B1和英国专利2188638中进行了详细描述。人源化抗体也可使用美国专利号5,639,641和Pedersen等人, *J. Mol. Biol.*, 235:959-973 (1994) 中描述的抗体表面重构技术产生。虽然本发明组合物的缀合物中采用的抗体最优选是人源化单克隆抗体,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。

[0069] 具有至少一个抗原结合位点且因此识别并结合存在于靶细胞表面上的至少一种抗原或受体的抗体片段也在本发明的范围内。在此方面,完整抗体分子的蛋白水解裂解可产生保留识别和结合抗原的能力的多种抗体片段。例如,具有蛋白酶木瓜蛋白酶的抗体分子的有限消化通常产生三个片段,其中两个是相同的并且被称为Fab片段,因为它们保留亲本抗体分子的抗原结合活性。用酶胃蛋白酶裂解抗体分子通常产生两个抗体片段,其中之一保留抗体分子的两个抗原结合臂且因此被称为F(ab')₂片段。用二硫苏糖醇或巯基乙胺还原F(ab')₂产生被称为Fab'片段的片段。可使用常规重组DNA技术产生由包含经由合成肽连接至轻链抗体的V结构域的抗体重链的可变(V)结构域的截短Fab片段组成的单链可变区片段(sFv)抗体片段(参见例如,Janeway等人,同上)。类似地,二硫键稳定的可变区片段(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,本发明背景下的抗体片段不限于这些示例性类型的抗体片段。可采用识别并结合所需细胞表面受体或抗原的任何合适的抗体片段。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); 以及Nisonoff等人, *Arch. Biochem. Biophys.*, 89:230-244 (1960) 中。可使用本领域中已知的任何合适的方法,例如像放射免疫测定(RIA)、ELISA、蛋白质印迹、免疫沉淀和竞争抑制测定来测定抗体-抗原结合(参见例如,Janeway等人,同上;和美国专利申请公布号2002/0197266A1)。

[0070] 此外,抗体可以是嵌合抗体或其抗原结合片段。“嵌合”意指抗体包含至少两种获自或源自至少两种不同物种的免疫球蛋白或其片段(例如,两种不同的免疫球蛋白,如与鼠免疫球蛋白可变区组合的人免疫球蛋白恒定区)。抗体还可以是结构域抗体(dAb)或其抗原结合片段,例如像骆驼科动物抗体(参见例如,Desmyter等人, *Nature Struct. Biol.*, 3:752, (1996)),或鲨鱼抗体,例如像新的抗原受体(IgNAR)(参见例如,Greenberg等人, *Nature*, 374:168 (1995);和Stanfield等人, *Science*, 305:1770-1773 (2004))。

[0071] 任何合适的抗体可用于本发明的背景中。例如,单克隆抗体J5是对普通型急性成淋巴细胞性白血病抗原(CALLA)具有特异性的鼠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,急性成淋巴细胞性白血病细胞)。单克隆抗体MY9是与CD33抗原特异性结合的鼠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,急性骨髓性白血病(AML)细胞)。

[0072] 类似地,单克隆抗体抗-B4(也称为B4)是与B细胞上的CD19抗原结合的鼠IgG1抗体(Nadler等人, *J. Immunol.*, 131:244-250 (1983)),并且可用于靶向表达CD19的B细胞或患病细胞(例如,非霍奇金氏淋巴瘤细胞和慢性成淋巴细胞性白血病细胞)。N901是一种鼠单克隆抗体,其结合在神经内分泌起源的细胞上发现的CD56(神经细胞粘附分子)抗原,包括小细胞肺肿瘤,其可用于缀合物中以使药物靶向神经内分泌源的细胞。在其用作缀合物的一部分之前,J5、MY9和B4抗体优选进行表面重构或人源化。抗体的表面重构或人源化描述于例如,Roguska等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:969-73 (1994) 中。

[0073] 此外,单克隆抗体C242与CanAg抗原结合(参见例如,美国专利号5,552,293),并且可用于使缀合物靶向表达CanAg的肿瘤,如结肠直肠癌、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,美国专利号5,552,293)。自其产生HuC242的杂交瘤以ECACC标识号90012601保藏。HuC242可使用CDR-接枝方法(参见例如,美国专利号5,585,089、5,693,761和5,693,762)或表面重构技术(参见例如,美国专利号5,639,641)制备。HuC242可用于使缀合物靶向表达CanAg抗原的肿瘤细胞,例如像结肠直肠癌、胰腺癌、非小细胞肺癌和胃癌细胞。

[0074] 为了靶向卵巢癌和前列腺癌细胞,抗MUC1抗体可用作缀合物中的细胞结合剂。抗-MCCI抗体包括例如抗HMG-2(参见例如,Taylor-Papadimitriou等人.,Int.J.Cancer,28:17-21(1981))、hCTM01(参见例如,van H等人,Cancer Res.,56:5179-5185(1996))和DS6。前列腺癌细胞也可通过使用抗前列腺特异性膜抗原(PSMA)作为细胞结合剂(如J591)来用缀合物靶向(参见例如,Liu等人,Cancer Res.,57:3629-3634(1997))。此外,可通过使用抗Her2抗体(例如曲妥珠单抗)作为细胞结合剂,用缀合物靶向表达Her2抗原的癌细胞,如乳腺癌、前列腺癌和卵巢癌。表达表皮生长因子受体(EGFR)及其变体(如III型缺失突变体,EGFRvIII)的细胞可通过使用抗EGFR抗体用缀合物靶向。抗EGFR抗体描述于国际专利申请号PCT/US 11/058,385和PCT/US 11/058,378中。抗EGFRvIII抗体描述于美国专利号7,736,644和7,628,986以及美国申请公布2010/0111979、2009/0240038、2009/0175887、2009/0156790和2009/0155282中。结合胰岛素样生长因子受体的抗IGF-IR抗体(如描述于美国专利号7,982,024中的那些)也可用于缀合物。与CD27L、Cripto、CD138、CD38、EphA2、整联蛋白、CD37、叶酸、CD20、PSGR、NGEP、PSCA、TMEFF2、STEAP1、内皮糖蛋白和Her3结合的抗体也可用于缀合物中。

[0075] 在一个实施方案中,抗体选自由以下组成的组:huN901;huMy9-6;huB4;huC242;抗HER2抗体(例如,曲妥珠单抗);比伐珠单抗;西罗珠单抗;利妥昔单抗;huDS6;描述于国际专利申请公布WO 2010/124797中的抗间皮素抗体(如MF-T)、描述于美国专利申请公布2010/0093980中的抗cripto抗体(如huB3F6);描述于美国专利申请公布2007/0183971中的抗CD138抗体(如huB-B4);描述于国际专利申请号PCT/US 11/058,385和PCT/US 11/058,378中的抗EGFR抗体(如EGFR-7);描述于美国专利号7,736,644和7,628,986以及美国专利申请公布2010/0111979、2009/0240038、2009/0175887、2009/0156790和2009/0155282中的抗EGFRvIII抗体;描述于国际专利申请公布WO 2011/039721和WO 2011/039724中的人源化EphA2抗体(如2H11R35R74);描述于国际专利申请公布WO 2008/047242中的抗CD38抗体(如hu38SB19);描述于国际专利申请公布WO 2011/106528和美国申请专利公布2012/0009181(例如,huMov19)中的抗叶酸抗体;描述于美国专利号5,958,872、6,596,743和7,982,024中的抗IGFIR抗体;描述于美国专利申请公布2011/0256153(例如,huCD37-3)中的抗CD37抗体;描述于美国申请公布2006/0127407中的抗整联蛋白 $\alpha_v\beta_6$ 抗体(例如,CNT095);以及描述于国际专利申请公布WO 2012/019024中的抗Her3抗体。在一个实施方案中,细胞结合剂是结合FGFR2的抗体或其抗原结合片段(例如,描述于US2014/030820中的那些,其全部教导以引用的方式并入本文)。在另一个实施方案中,细胞结合剂是结合FGFR2和FGFR4的抗体或其抗原结合片段(例如,描述于US 2014/301946中的那些,其全部教导以引用的方式并入本文)。

[0076] 在另一个实施方案中,细胞结合剂结合人FGFR3 (SEQ ID NO:11)。更具体地说,细胞结合剂结合人FGFR3 (SEQ ID NO 11) 且包含具有序列GYMFTSYGIS (SEQ ID NO 1) 的CDRH1、具有序列WVSTYNGDTNYAQKFQG (SEQ ID NO 2) 的CDRH2、具有序列VLGYYSIDGYYYGMDV (SEQ ID NO 3) 的CDRH3、具有序列GGNNIGDKSVH (SEQ ID NO 4) 的CDRL1、具有序列LDTERPS (SEQ ID NO 5) 的CDRL2、以及具有序列QVWDSGSDHV (SEQ ID NO 6) 的CDRL3。甚至更具体地说,细胞结合剂还包含以下的可变重链氨基酸序列:

[0077]

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYMFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGVSTYNGDTNYAQKFQGRVTVTDTSTSTAYMELRSLRSEDTAVYYCARVLGYYSIDGYYYGMDVWGQGTITVTVSS (SEQ ID NO 7)

[0078] 和以下的可变轻链氨基酸序列:

[0079]

QSVLTQPPSLSVAPGKTATFTCGGNNIGDKSVHWYRQKPGQAPVLVLYLDTERPSGIPERMSGSNFGNTATLTITRV EAGDEADYYCQVWDSGSDHVVFGGGKLTVLG (SEQ ID NO 8)。

[0080] 在另一个更具体的实施方案中,细胞结合剂还包含含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的轻链和含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的重链。在另一个实施方案中,细胞结合剂还包含各自含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的两个轻链和各自含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的两个重链。

[0081] 特别优选的抗体是本文描述的人源化单克隆抗体。实例包括但不限于huN901、huMy9-6、huB4、huC242、人源化单克隆抗Her2抗体(例如,曲妥珠单抗)、比伐珠单抗、西罗珠单抗、CNT095、huDS6和利妥昔单抗(参见例如,美国专利号5,639,641和5,665,357;美国临时专利申请号60/424,332(其与美国专利号7,557,189相关);国际(PCT)专利申请公布WO 02/16401;Pedersen等人,同上;Roguska等人,同上;Liu等人,同上;Nadler等人,同上;Colomer等人,Cancer Invest.,19:49-56(2001);Heider等人,Eur.J.Cancer,31A:2385-2391(1995);Welt等人,J.Clin.Oncol.,12:1193-1203(1994);以及Maloney等人,Blood,90:2188-2195(1997))。其他人源化单克隆抗体是本领域中已知的且可结合本发明使用。

[0082] 在一个实施方案中,细胞结合剂是huMy9-6或其他相关抗体,其描述于美国专利号7,342,110和7,557,189(以引用的方式并入本文)中。

[0083] 在另一个实施方案中,细胞结合剂是抗叶酸受体抗体,其描述于美国临时申请号61/307,797、61/346,595、61/413,172和美国申请号13/033,723(公布为US 2012-0009181 A1)中。所有这些申请的教导都以引用的方式整体并入本文。

[0084] 在另一个实施方案中,细胞结合剂是特异性地结合人叶酸受体1 (FOLR1) 的人源化抗叶酸抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体包含:(a) 包含GYFMN的重链CDR1;包含RIHPYDGDTFYNQXaa1F Xaa2Xaa3的重链CDR2;和包含YDGSRAMDY的重链CDR3;以及(b) 包含KASQSVSFAGTSLMH的轻链CDR1;包含RASNLEA的轻链CDR2;和包含QQSREYPYT的轻链CDR3;其中Xaa1选自K、Q、H和R;Xaa2选自Q、H、N和R;并且Xaa3选自G、E、T、S、A和V。优选地,重链CDR2序列包含RIHPYDGDTFYNQKFQG。

[0085] 在另一个实施方案中,抗叶酸抗体是特异性地结合人叶酸受体1的人源化抗体或其抗原结合片段,其包含具有以下的氨基酸序列的重链

[0086]

QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTGYFMNWVKQSPGQSLEWIGRIHPYDGDFTYNQKFQGKATLTVDKSSN
TAHMELLSLTSEDFAVYYCTRYDGSRAMDYWGQGT TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP
VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP
APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK。

[0087] 在另一个实施方案中,抗叶酸抗体是由质粒DNA编码的人源化抗体或其抗原结合片段,所述质粒DNA在2010年4月7日以ATCC保藏且具有ATCC保藏号PTA-10772和PTA-10773或10774。

[0088] 在另一个实施方案中,抗叶酸抗体是人源化抗体或其抗原结合片段,其包含与

[0089]

QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTGYFMNWVKQSPGQSLEWIGRIHPYDGDFTYNQKFQGKATLTVDKSSN
TAHMELLSLTSEDFAVYYCTRYDGSRAMDYWGQGT TTVTVSS至少约90%、95%、99%或100%相同的重链可变结构域;以及与

[0090]

DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIIISCKASQSVSFAGTSLMHWHYHQPQGPRLLIYRASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTL
NISPVEAEDAATYYCQQSREYPYTFGGGTKLEIKR;或

[0091]

DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIIISCKASQSVSFAGTSLMHWHYHQPQGPRLLIYRASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTL
TISPVEAEDAATYYCQQSREYPYTFGGGTKLEIKR至少约90%、95%、99%或100%相同的轻链可变结构域。

[0092] 虽然细胞结合剂优选地是抗体,但细胞结合剂也可以是非抗体分子。合适的非抗体分子包括例如,干扰素(例如, α 、 β 或 γ 干扰素)、淋巴因子(例如,白介素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))、生长激素抑制素和转铁蛋白(参见例如,O'Keefe等人,J. Biol. Chem., 260:932-937(1985))。例如,与骨髓细胞结合的GM-CSF可用作细胞结合剂以靶向急性骨髓性白血病细胞。此外,与活化的T细胞结合的IL-2可用于预防移植体移植排斥,用于治疗和预防移植体抗宿主疾病以及用于治疗急性T细胞白血病。表皮生长因子(EGF)可用于靶向鳞状癌(如肺癌和头颈癌)。生长激素抑制素可用于靶向成神经细胞瘤细胞和其他肿瘤细胞类型。

[0093] 细胞毒性剂

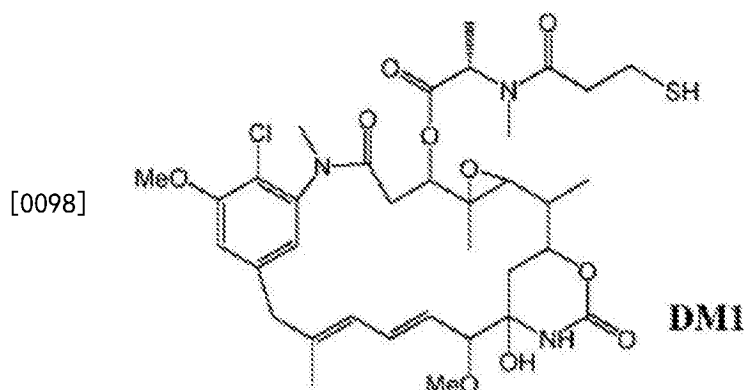
[0094] 如本文所用,“细胞毒性剂”是指导致细胞死亡、诱导细胞死亡或降低细胞活力的任何化合物。合适的细胞毒性剂包括例如,美登木素生物碱和可缀合的安丝菌素(参见例如,2011年11月3日提交的国际专利申请号PCT/US11/59131)、紫杉烷类、CC-1065和CC-1065类似物,以及多拉司他汀和多拉司他汀类似物。在本发明的一个具体实施方案中,细胞毒性剂是美登木素生物碱,包括美登醇和美登醇类似物。美登木素生物碱是抑制微管形成且对哺乳动物细胞具有高毒性的化合物。合适的美登醇类似物的实例包括具有修饰的芳香环的那些和具有在其他位置处的修饰的那些。此类美登木素生物碱描述于例如,美国专利号4,

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。

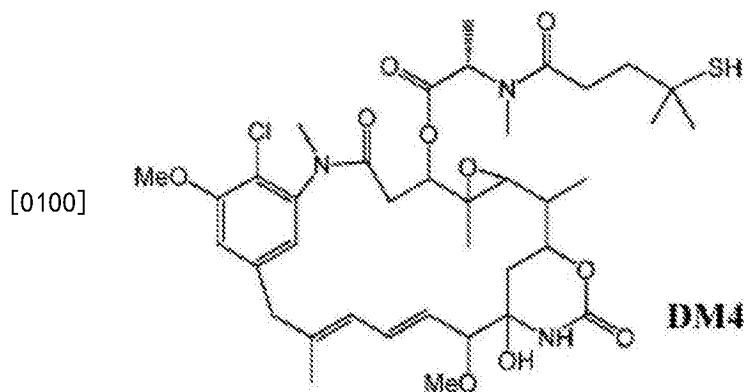
[0095] 具有修饰的芳香环的美登醇类似物：(1) C-19-脱氯(美国专利号4,256,746)(通过LAH还原安丝菌素P2制备)；(2) C-20-羟基(或C-20-脱甲基)+/-C-19-脱氯(美国专利号4,361,650和4,307,016)(通过使用链霉菌属或放线菌属脱甲基化或使用LAH脱氯而制备)；以及(3) C-20-脱甲氧基、C-20-酰氧基($-OCOR$)、+/-脱氯(美国专利号4,294,757)(通过使用酰基氯酰化而制备)。

[0096] 具有除芳香环之外的位置修饰的美登醇类似物的实例包括：(1) C-9-SH(美国专利号4,424,219)(通过美登醇与 H_2S 或 P_2S_5 的反应而制备)；(2) C-14-烷氧基甲基(脱甲氧基/ CH_2OR)(美国专利号4,331,598)；(3) C-14-羟甲基或酰氧基甲基(CH_2OH 或 CH_2OAc)(美国专利号4,450,254)(由诺卡氏菌属(*Nocardia*)制备)；(4) C-15-羟基/酰氧基(美国专利号4,364,866)(通过链霉菌属转化美登醇而制备)；(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)；(6) C-18-N-脱甲基(美国专利号4,362,663和4,322,348)(通过链霉菌属对美登醇脱甲基化而制备)；以及(7) 4,5-脱氧基(美国专利号4,371,533)(通过三氯化钛/LAH还原美登醇而制备)。

[0097] 在本发明的一个具体实施方案中,可用于本发明的方法中的细胞毒性剂是含硫醇的美登木素生物碱DM1,还称为 $N^{2'}$ -脱乙酰基- $N^{2'}$ -(3-巯基-1-氧代丙基)-美登素。DM1的结构由式(I)表示:

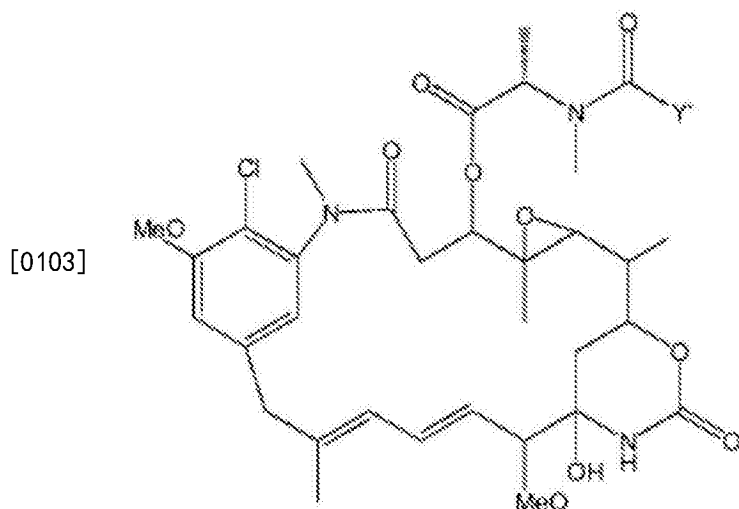


[0099] 在本发明的另一个优选实施方案中,可用于本发明的方法中的细胞毒性剂是含硫醇的美登木素生物碱DM4,还称为 $N^{2'}$ -脱乙酰基- $N^{2'}$ -(4-甲基-4-巯基-1-氧代丙基)-美登素。DM4的结构由式(II)表示:



[0101] 可在本发明的背景中使用其他美登木素生物碱,包括例如在带有硫原子的碳原子上带有单或二烷基取代的含硫醇和二硫化物的美登木素生物碱。特别优选的是在C-3位具有以下的美登木素生物碱:(a) C-14羟甲基、C-15羟基或C-20脱甲基官能团,和(b) 具有携带位阻巯基的酰基的酰化氨基酸侧链,其中携带硫醇官能团的酰基的碳原子具有一个或两个取代基,所述取代基携带具有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、苯基、取代的苯基或杂环芳族或杂环烷基基团,并且另外其中一个取代基可以是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。

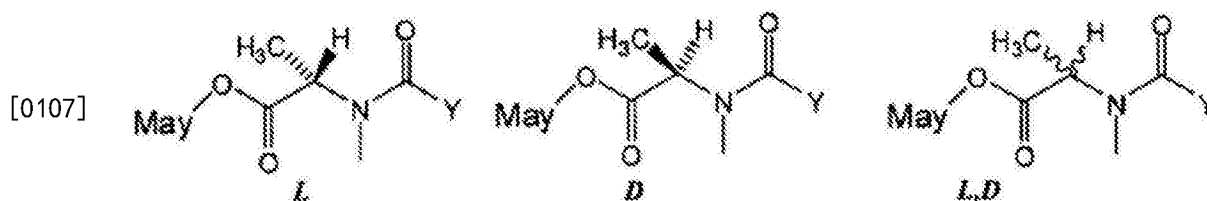
[0102] 用于本发明的背景中的另外美登木素生物碱包括由式(III)表示的化合物:



[0104] 其中Y'表示

[0105] $(CR_7R_8)_1 (CR_9=CR_{10})_p (C=C)_q A_o (CR_5R_6)_m D_u (CR_{11}=CR_{12})_r (C=C)_s B_t (C R_3R_4)_n CR_1R_2SZ$, 其中 R_1 和 R_2 各自独立地是具有1至10个碳原子的线性烷基或烯基、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香族或杂环烷基基团,并且其中 R_2 还可以是H,其中A、B、D是具有3-10碳原子的环烷基或环烯基、简单或取代的芳基或杂环芳香族或杂环烷基基团,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、具有1至10个碳原子的线性烷基或烯基、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香族或杂环烷基基团,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,条件是l、m、n、o、p、q、r、s和t中的至少两个在任何时候不是零,并且其中Z是H、SR或COR,其中R是具有1至10个碳原子的线性烷基或烯基、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香族或杂环烷基基团。式(III)的优选实施方案包括式(III)的化合物,其中(a) R_1 是H, R_2 是甲基且Z是H, (b) R_1 和 R_2 是甲基且Z是H, (c) R_1 是H, R_2 是甲基且Z是 $-SCH_3$,以及(d) R_1 和 R_2 是甲基且Z是 $-SCH_3$ 。

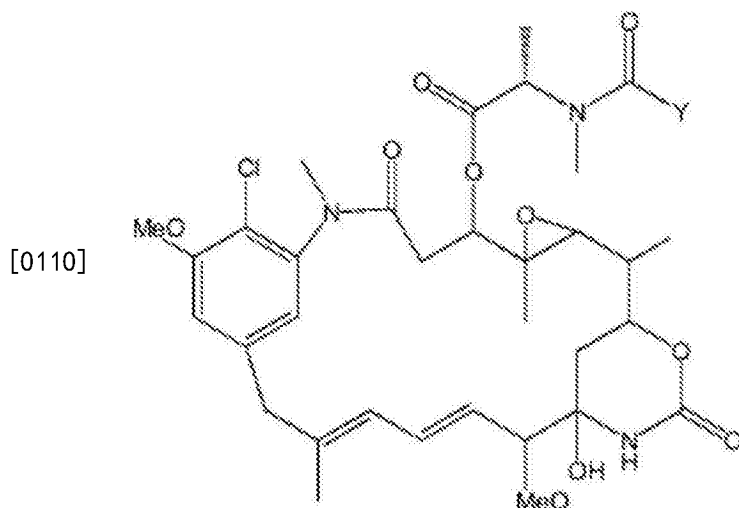
[0106] 此类另外的美登木素生物碱还包括由式(IV-L)、(IV-D)或(IV-D,L)表示的化合物:



[0108] 其中Y表示 $(CR_7R_8)_1 (CR_5R_6)_m (CR_3R_4)_n CR_1R_2SZ$, 其中 R_1 和 R_2 各自独立地是具有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香族或杂环烷基基团,并且其中 R_2 还可以是H,其中 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 各自独立地是H、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香族或杂环烷基基团,其中 l 、 m 和 n 各自独立地是1至5的整数,并且此外 n 可以是零,其中 Z 是H、SR或COR,其中 R 是具有1至10个碳原子的直链或支链烷基或烯基、具有3至10个碳原子的环状烷基或烯基、或简单或取代的芳基或或杂环芳香族或杂环烷基基团,并且其中 May 表示在C-3、C-14羟甲基、C-15羟基或C-20脱甲基处携带侧链的美登木素生物碱。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 是H, R_2 是甲基, R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 各自是H, l 和 m 各自是1, n 是0,并且 Z 是H;(b) R_1 是H, R_2 是甲基, R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 各自是H, l 和 m 是1, n 是0,并且 Z 是H;(c) R_1 是H, R_2 是甲基, R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 各自是H, l 和 m 各自是1, n 是0,并且 Z 是 $-SCH_3$,或(d) R_1 和 R_2 是甲基, R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 各自是H, l 和 m 是1, n 是0,并且 Z 是 $-SCH_3$ 。优选地,细胞毒性剂由式(IV-L)表示。

[0109] 另外优选的美登木素生物碱还包括由式(V)表示的化合物:



[0111] 其中 $(CR_7R_8)_1(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ$, 其中 R_1 和 R_2 各自独立地是具有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香族或杂环烷基基团,并且其中 R_2 还可以是H,其中 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 各自独立地是H、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香族或杂环烷基基团,其中 l 、 m 和 n 各自独立地是1至5的整数,并且此外 n 可以是零,其中 Z 是H、SR或COR,其中 R 是具有1至10个碳原子的直链或支链烷基或烯基、具有3至10个碳原子的环状烷基或烯基、或简单或取代的芳基或或杂环芳香族或杂环烷基基团,并且其中 May 表示在C-3、C-14羟甲基、C-15羟基或C-20脱甲基处携带侧链的美登木素生物碱。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 是H, R_2 是甲基, R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 各自是H, l 和 m 各自是1, n 是0,并且 Z 是H;(b) R_1 是H, R_2 是甲基, R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 各自是H, l 和 m 是1, n 是0,并且 Z 是H;(c) R_1 是H, R_2 是甲基, R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 各自是H, l 和 m 各自是1, n 是0,并且 Z 是 $-SCH_3$,或(d) R_1 和 R_2 是甲基, R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 各自是H, l 和 m 是1, n 是0,并且 Z 是 $-SCH_3$ 。

[0112] 式(V)的优选实施方案包括式(V)的化合物,其中(a) R_1 是H, R_2 是甲基, R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 各自是H; l 和 m 各自是1; n 是0;并且 Z 是H,(b) R_1 和 R_2 是甲基; R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 各自是H, l 和 m 是1; n

是0;并且Z是H,(c) R₁是H,R₂是甲基,R₅、R₆、R₇和R₈各自是H,l和m各自是1,n是0,并且Z是-SCH₃,或(d) R₁和R₂是甲基;R₅、R₆、R₇和R₈各自是H,l和m是1,n是0,并且Z是-SCH₃。

[0113] 除了美登木素生物碱之外,缀合物中使用的细胞毒性剂还可以是紫杉烷或其衍生物。紫杉烷是一类化合物,其包括紫杉醇(紫杉酚.RTM.) (一种细胞毒性天然产物) 和多西他赛(泰索帝.RTM.) (一种半合成衍生物),其均广泛用于治疗癌症。紫杉烷是抑制微管蛋白的解聚、从而导致细胞死亡的有丝分裂纺锤体毒素。虽然多西他赛和紫杉醇是治疗癌症的有用药物,但由于其对正常细胞的非特异性毒性,其抗肿瘤活性受到限制。此外,化合物如紫杉醇和多西他赛本身不能有效地用于细胞结合剂的缀合物。

[0114] 为了可以更全面地理解本文所描述的本发明,阐述以下实施例。应理解,这些实施例仅是出于说明性目的,并且不应被解释为以任何方式限制本发明。

实施例

[0115] 实施例1.

[0116] 分析方法:

[0117] 使用在252nm和280nm下抗体和DM4组分的实验确定或计算的消光系数来测量抗体和缀合物浓度。

[0118] 通过SEC-HPLC,使用Tosoh Bioscience TSK G3000SWXL(7.8x300mm),5μm粒径柱测定单体、高分子量物质。流动相是160mM磷酸钾,含有15%异丙醇的212mM氯化钾(pH 7.0),以0.5mL/分钟的流速运行,通过280nm下的吸光度检测。

[0119] 使用Agilent 2100Bioanalyzer与2100Expert软件,使用Protein230试剂盒(部件号5087-1518)测量抗体片段。通过添加变性缓冲液(补充为含有1.6mM N-乙基马来酰亚胺(NEM))来制备变性样品,并且将样品加热至70℃持续5分钟。所有其他步骤,包括稀释、样品和梯度负载和分析均根据Agilent Protein 230试剂盒说明书进行。通过所有小于抗体单体种类的峰的总和(排除已知的糖基化人为现象)除以所有抗体相关峰的总和来计算抗体片段化百分比。

[0120] 原位反应制备(本发明方法的步骤(a))

[0121] 通过使DM4(12mM)与70.0%(v/v) DMA和30%(v/v)的四种研究缓冲液(200mM琥珀酸酯,pH 5.0;20mM琥珀酸酯,pH 5.0;167mM EPPS,67mM NaCl,2mM EDTA pH 8.2;20mM EPPS,pH 8.2)之一中的SPDB或磺基-SPDB接头(10mM)反应来进行细胞毒性剂-接头化合物形成的原位反应。将混合物涡旋并在20.0℃下孵育6小时,且不经任何纯化立即使用。

[0122] 缀合物制备(本发明方法的步骤(b)):

[0123] 通过将适量的缀合缓冲液(50mM EPPS,20mM氯化钠,2mM EDTA,pH 8.2)与计算量的DMA混合以达到2.5%或10%的最终DMA水平来制备缀合混合物。然后将已经先前通过凝胶过滤色谱法缓冲液交换到缀合缓冲液中的抗体1,抗FOLR1抗体添加至此混合物中以实现最终靶抗体浓度。添加实现3:4的美登木素生物碱与抗体比率(MAR)所需的原位反应混合物的计算量,并且将反应物立即混合。然后将缀合反应物在20.0℃下在轨道振荡器上以160rpm混合孵育22小时。在孵育期结束时,通过添加6.5%(v/v)的1M乙酸将pH 8.2反应混合物进行pH调节,并通过0.22μm PVDF过滤器过滤。通过凝胶过滤纯化过滤的pH调节的反应混合物,并通过紫外可见吸收光谱、通过高效液相色谱(SEC-HPLC)的大小排阻色谱和非还

原CE-SDS (GelChip) 分析纯化的缀合物。

[0124] 表1

原位条件	缀合条件	片段(%)		单体 (%)		产率(%)		美登木素生物碱 Inc 效率 (%)	
		sSPDB	SPDB	sSPDB	SPDB	sSPDB	SPDB	sSPDB	SPDB
[0125] 167 mM EPPS, pH 8.2	40 g/L 10% DMA	11.2	11.3	95.8	95.3	87.4	89.5	87.1	78.2
	10 g/L 10% DMA	9.5	9.4	96.3	95.7	90.9	89.0	66.9	74.7
	10 g/L 2.5% DMA	13.4	11.9	96.7	96.1	90.3	86.7	67.1	60.1
20 mM EPPS, pH 8.2	40 g/L 10% DMA	15.2	11.1	95.3	95.0	86.8	88.6	88.4	82.1
	10 g/L 10% DMA	13.7	9.3	96.0	95.5	90.5	88.5	67.8	79.4
	10 g/L 2.5% DMA	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d

[0126] 表2.

原位条件	缀合条件	片段(%)		单体 (%)		产率(%)		Inc 效率 (rMAR/MAR, %)	
		sSPDB	SPDB	sSPDB	SPDB	sSPDB	SPDB	sSPDB	SPDB
[0127] 200 mM 琥珀酸酯, pH 5.0	40 g/L 10% DMA (26/25)	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
	10 g/L 10% DMA (10/09)	9.1	9.7	96.26	95.74	91.0	89.3	66.1	68.6
	10 g/L 2.5% DMA	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
[0128] 10 mM 琥珀酸酯, pH 5.0	40 g/L 10% DMA	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
	10 g/L 10% DMA (14/13)	12.1	10.4	96.05	95.42	89.4	87.8	67.1	80.4
	10 g/L 2.5% DMA	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d

[0129] 如表1和表2中所示,当将具有高缓冲能力的缓冲溶液用于sSPDB和DM4的原位反应(即,步骤(a)的反应)时,与通过使用具有低缓冲能力的缓冲液来制备的缀合物相比,所得到的缀合物具有显著更少的抗体片段化。相比之下,当SPDB用作双功能交联试剂时,缓冲能力对抗体片段化没有显著影响。SPDB接头的结构在以下示出:



[0131] 实施例2.

[0132] 将抗体2(具有带SEQ ID No:10的氨基酸序列的轻链和具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的重链的抗FGFR3抗体)浓缩至30mg/mL,并且渗滤到反应缓冲液(50mM EPPS,20mM氯化钠,2mM EDTA,pH 8.2)持续10个渗滤体积,并进一步浓缩至45g/L。在167mM EPPS、66.7mM NaCl、2mM EDTA (pH 8.2) 和70.0% (v/v) DMA中,相对于抗体,使相对于磺基-SPDB (10mM) 的1.2摩尔比的DM4 (12mM) 与4.68摩尔比的磺基-SPDB反应。原位反应在 $20^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ 下进行 10 ± 4 小时,然后添加至具有DMA的抗体2中,以实现在50mM EPPS、20mM NaCl、2mM EDTA (pH 8.2 ± 0.2) 和5.0% DMA (v/v) 中20mg/mL的最终Ab浓度。缀合反应在 $20.0 \pm 3.0^{\circ}\text{C}$ 下进行 16 ± 8 小时。在反应后,通过添加6.5% (v/v) 的1M乙酸将缀合混合物快速pH调至5.0。将pH调节的混合物浓缩至20mg/mL,并且与基础制剂缓冲液(10mM乙酸酯,pH 5.0 ± 0.1) 渗滤16个渗滤体积。使用浓缩的蔗糖储备溶液(45%,w/v) 和聚山梨酯-20 (10%,w/v),将纯化的缀合物以5.0mg/mL配制在10mM乙酸酯、9% (w/v) 蔗糖、0.01% (w/v) 聚山梨醇酯-20 (吐温-20) (pH5.0) 中。

序列表

<110> IMMUNOGEN, INC.

<120> 用于制备细胞结合剂-细胞毒性剂缀合物的方法

<130> 121162-03020

<150> 62/081914

<151> 2014-11-19

<160> 11

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 1

Gly Tyr Met Phe Thr Ser Tyr Gly Ile Ser

1 5 10

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 2

Trp Val Ser Thr Tyr Asn Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 3

Val Leu Gly Tyr Tyr Asp Ser Ile Asp Gly Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp

1 5 10 15

Val

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 4

Gly Gly Asn Asn Ile Gly Asp Lys Ser Val His

1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 5

Leu Asp Thr Glu Arg Pro Ser

1 5

<210> 6

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 6

Gln Val Trp Asp Ser Gly Ser Asp His Val Val

1 5 10

<210> 7

<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 7

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Met Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Val Ser Thr Tyr Asn Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Val Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Val Leu Gly Tyr Tyr Asp Ser Ile Asp Gly Tyr Tyr Tyr Gly
 100 105 110
 Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 8

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 8

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Leu Ser Val Ala Pro Gly Lys
 1 5 10 15
 Thr Ala Thr Phe Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Asp Lys Ser Val
 20 25 30
 His Trp Tyr Arg Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Met Tyr
 35 40 45
 Leu Asp Thr Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Met Ser Gly Ser
 50 55 60
 Asn Phe Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Thr Arg Val Glu Ala Gly
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Gly Ser Asp His
 85 90 95
 Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105

<210> 9

<211> 456

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 9

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1	5	10	15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Met Phe Thr Ser Tyr			
20	25	30	
Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met			
35	40	45	
Gly Trp Val Ser Thr Tyr Asn Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe			
50	55	60	
Gln Gly Arg Val Thr Val Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr			
65	70	75	80
Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
85	90	95	
Ala Arg Val Leu Gly Tyr Tyr Asp Ser Ile Asp Gly Tyr Tyr Tyr Gly			
100	105	110	
Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser			
115	120	125	
Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr			
130	135	140	
Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro			
145	150	155	160
Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val			
165	170	175	
His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser			
180	185	190	
Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile			
195	200	205	
Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val			
210	215	220	
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala			
225	230	235	240
Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro			
245	250	255	
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val			
260	265	270	
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val			
275	280	285	
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln			
290	295	300	
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln			
305	310	315	320

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala			
325	330	335	
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro			
340	345	350	
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr			
355	360	365	
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser			
370	375	380	
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr			
385	390	395	400
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr			
405	410	415	
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe			
420	425	430	
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys			
435	440	445	
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
450	455		
<210> 10			
<211> 214			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成			
<400> 10			
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Leu Ser Val Ala Pro Gly Lys			
1	5	10	15
Thr Ala Thr Phe Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Asp Lys Ser Val			
20	25	30	
His Trp Tyr Arg Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Met Tyr			
35	40	45	
Leu Asp Thr Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Met Ser Gly Ser			
50	55	60	
Asn Phe Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Thr Arg Val Glu Ala Gly			
65	70	75	80
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Gly Ser Asp His			
85	90	95	
Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys			
100	105	110	

Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln
 115 120 125
 Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly
 130 135 140
 Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly
 145 150 155 160
 Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala
 165 170 175
 Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser
 180 185 190
 Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val
 195 200 205
 Ala Pro Ala Glu Cys Ser
 210
 <210> 11
 <211> 795
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 11
 Met Gly Ala Pro Ala Cys Ala Leu Ala Leu Cys Val Ala Val Ala Ile
 1 5 10 15
 Val Ala Gly Ala Ser Ser Glu Ser Leu Gly Thr Glu Gln Arg Val Val
 20 25 30
 Gly Arg Ala Ala Glu Val Pro Gly Pro Glu Pro Gly Gln Glu Leu Val
 35 40 45
 Phe Gly Ser Gly Asp Ala Val Glu Leu Ser Cys Pro Pro Pro Gly Gly
 50 55 60
 Gly Pro Met Gly Pro Thr Val Trp Val Lys Asp Gly Thr Gly Leu Val
 65 70 75 80
 Pro Ser Glu Arg Val Leu Val Gly Pro Gln Arg Leu Val Leu Asn Ala
 85 90 95
 Ser His Glu Asp Ser Gly Ala Tyr Ser Cys Arg Gln Arg Leu Thr Arg
 100 105 110
 Val Leu Cys His Phe Ser Val Arg Val Thr Asp Ala Pro Ser Ser Gly
 115 120 125
 Asp Asp Glu Asp Gly Glu Asp Glu Ala Glu Asp Thr Gly Val Asp Thr
 130 135 140
 Gly Ala Pro Tyr Trp Thr Arg Pro Glu Arg Met Asp Lys Lys Leu Leu
 145 150 155 160

Ala Val Pro Ala Ala Asn Thr Val Arg Phe Arg Cys Pro Ala Ala Gly		
165	170	175
Asn Pro Thr Pro Ser Ile Ser Trp Leu Lys Asn Gly Arg Glu Phe Arg		
180	185	190
Gly Glu His Arg Ile Gly Gly Ile Lys Leu Arg His Gln Gln Trp Ser		
195	200	205
Leu Val Met Glu Ser Val Val Pro Ser Asp Arg Gly Asn Tyr Thr Cys		
210	215	220
Val Val Glu Asn Lys Phe Gly Ser Ile Arg Gln Thr Tyr Thr Leu Asp		
225	230	235
Val Leu Glu Arg Ser Pro His Arg Pro Ile Leu Gln Ala Gly Leu Pro		
245	250	255
Ala Asn Gln Thr Ala Val Leu Gly Ser Asp Val Glu Phe His Cys Lys		
260	265	270
Val Tyr Ser Asp Ala Pro His Ile Gln Trp Leu Lys His Val Glu Val		
275	280	285
Asn Gly Ser Lys Val Gly Pro Asp Gly Thr Pro Tyr Val Thr Val Leu		
290	295	300
Lys Thr Ala Gly Ala Asn Thr Thr Asp Lys Glu Leu Glu Val Leu Ser		
305	310	315
Leu His Asn Val Thr Phe Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Thr Cys Leu Ala		
325	330	335
Gly Asn Ser Ile Gly Phe Ser His His Ser Ala Trp Leu Val Val Leu		
340	345	350
Pro Ala Glu Glu Glu Leu Val Glu Ala Asp Glu Ala Gly Ser Val Tyr		
355	360	365
Ala Gly Ile Leu Ser Tyr Gly Val Gly Phe Phe Leu Phe Ile Leu Val		
370	375	380
Val Ala Ala Val Thr Leu Cys Arg Leu Arg Ser Pro Pro Lys Lys Gly		
385	390	395
Leu Gly Ser Pro Thr Val His Lys Ile Ser Arg Phe Pro Leu Lys Arg		
405	410	415
Gln Val Ser Leu Glu Ser Asn Ala Ser Asn Ser Ser Asn Thr Pro Leu		
420	425	430
Val Arg Ile Ala Arg Leu Ser Ser Gly Glu Gly Pro Thr Leu Ala Asn		
435	440	445
Val Ser Glu Leu Glu Leu Pro Ala Asp Pro Lys Trp Glu Leu Ser Arg		
450	455	460
Ala Arg Leu Thr Leu Gly Lys Pro Leu Gly Glu Gly Cys Phe Gly Gln		

465	470	475	480
Val Val Met Ala Glu Ala Ile Gly Ile Asp Lys Asp Arg Ala Ala Lys			
	485	490	495
Pro Val Thr Val Ala Val Lys Met Leu Lys Asp Asp Ala Thr Asp Lys			
	500	505	510
Asp Leu Ser Asp Leu Val Ser Glu Met Glu Met Met Lys Met Ile Gly			
	515	520	525
Lys His Lys Asn Ile Ile Asn Leu Leu Gly Ala Cys Thr Gln Gly Gly			
	530	535	540
Pro Leu Tyr Val Leu Val Glu Tyr Ala Ala Lys Gly Asn Leu Arg Glu			
545	550	555	560
Phe Leu Arg Ala Arg Arg Pro Pro Gly Leu Asp Tyr Ser Phe Asp Thr			
	565	570	575
Cys Lys Pro Pro Glu Glu Gln Leu Thr Phe Lys Asp Leu Val Ser Cys			
	580	585	590
Ala Tyr Gln Val Ala Arg Gly Met Glu Tyr Leu Ala Ser Lys Cys Ile			
	595	600	605
His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Thr Glu Asp Asn Val			
	610	615	620
Met Lys Ile Ala Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Val His Asn Leu Asp			
625	630	635	640
Tyr Tyr Lys Lys Thr Thr Asn Gly Arg Leu Pro Val Lys Trp Met Ala			
	645	650	655
Pro Glu Ala Leu Phe Asp Arg Val Tyr Thr His Ser Asp Val Ser Phe			
	660	665	670
Gly Val Leu Leu Trp Glu Ile Phe Thr Leu Gly Gly Ser Pro Tyr Pro			
	675	680	685
Gly Ile Pro Val Glu Glu Leu Phe Lys Leu Leu Lys Glu Gly His Arg			
	690	695	700
Met Asp Lys Pro Ala Asn Cys Thr His Asp Leu Tyr Met Ile Met Arg			
705	710	715	720
Glu Cys Trp His Ala Ala Pro Ser Arg Pro Thr Phe Lys Leu Val Glu			
	725	730	735
Asp Leu Asp Arg Val Leu Thr Val Thr Ser Thr Asp Glu Tyr Leu Asp			
	740	745	750
Leu Ser Ala Pro Phe Glu Tyr Ser Pro Gly Gly Gln Asp Thr Pro Ser			
	755	760	765
Ser Ser Ser Ser Gly Asp Asp Ser Val Phe Ala His Asp Leu Leu Pro			
	770	775	780

Pro	Ala	Pro	Pro	Ser	Ser	Gly	Gly	Ser	Arg	Thr
785					790					795