



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104302324 A

(43) 申请公布日 2015. 01. 21

(21) 申请号 201280069240. 6

申请人 伊缪诺金公司

(22) 申请日 2012. 12. 07

(72) 发明人 G·舒尔茨 F·奥斯特罗斯

(30) 优先权数据

61/568, 640 2011. 12. 08 US

61/722, 367 2012. 11. 05 US

T·海德尔 C·布鲁彻 G·尼曼

A·恩格林 C·尤尔克 B·德尔肯

A·瓦滕贝格-德曼特 C·楚贝

M·古切 K·贝诺斯特 M·柯尼希

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 08. 07

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2012/074867 2012. 12. 07

代理人 陈文平 徐志明

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/083817 EN 2013. 06. 13

(51) Int. Cl.

A61K 47/48 (2006. 01)

A61P 35/00 (2006. 01)

(83) 生物保藏信息

DSM ACC2874 2007. 12. 11

DSM ACC2875 2007. 12. 11

(71) 申请人 生物测试股份公司

地址 德国德赖艾希

权利要求书4页 说明书107页

序列表9页 附图40页

(54) 发明名称

靶向 CD138 的免疫偶联物的用途

(57) 摘要

提供了用于治疗与表达 CD138 的靶细胞相关的疾病的方法,包括:对需要的受试者,特别是人,施用包含至少一种靶向 CD138 表达细胞的工程化靶向抗体和至少一种效应物分子的免疫偶联物,其中工程化靶向抗体与效应物分子功能性连接以形成免疫偶联物,其中优选工程化靶向抗体的至少一部分赋予 IgG4 同种型特性,其中免疫偶联物以包括至少两个剂量的多剂量方案施用,其中积极治疗周期内施用的总剂量是总最大耐受剂量 (AMTD) 或 AMTD 的一部分且其中所述 AMTD 和 / 或所述部分超过在免疫偶联物作为单一剂量 (包括作为多个单一剂量方案的部分) 施用产生剂量限制性毒性 (DLT) 的剂量和 / 或超过在免疫偶联物作为单一剂量 (包括作为积极治疗周期内多个单一剂量方案的部分) 施用时的最大耐受剂量 (MTD)。

1. 用于治疗与表达 CD138 的靶细胞相关的疾病的方法,包括:  
向需要的受试者,特别是人类受试者,施用免疫偶联物,所述免疫偶联物包含至少一种靶向于表达 CD138 的细胞的工程化靶向抗体,和  
至少一种效应物分子,其中所述工程化靶向抗体与所述效应物分子功能性连接以形成所述免疫偶联物,

其中优选地所述靶向抗体的至少一部分赋予 IgG4 同种型性质,

其中

所述免疫偶联物以包括至少两个剂量的多剂量方案施用,其中在积极治疗周期内施用的总剂量是总最大耐受剂量 (AMTD) 或 AMTD 的一部分且其中所述 AMTD 和 / 或所述部分超过在所述免疫偶联物作为单一剂量 -- 包括作为多个单一剂量方案的部分的单一剂量 -- 施用产生剂量限制性毒性 (DLT) 的剂量和 / 或超过在所述免疫偶联物作为单一剂量 -- 包括作为所述积极治疗周期内的多个单一剂量方案的部分的单一剂量 -- 施用时的最大耐受剂量 (MTD)。

2. 权利要求 1 的方法,其中所述免疫偶联物在 21 天的积极治疗周期中施用,优选所述 21 天内施用至少三次。

3. 前述权利要求任一项的方法,其中所述免疫偶联物以均等剂量施用。

4. 前述权利要求任一项的方法,其中所述多剂量方案持续 3 周且之后是静止期。

5. 权利要求 4 的方法,其中在所述静止期中维持无进展存活或稳定的疾病。

6. 权利要求 5 的方法,其中在所述静止期中所述免疫偶联物在所述受试者的体液中的水平是至少  $0.5 \mu\text{g/ml}$ 、至少  $1 \mu\text{g/ml}$ 、至少  $2 \mu\text{g/ml}$ 、至少  $3 \mu\text{g/ml}$ 、 $4 \mu\text{g/ml}$ 、 $5 \mu\text{g/ml}$  或  $6 \mu\text{g/ml}$  和 / 或其中分离的靶细胞的超过 80%、超过 90%、超过 95% 的 CD138 在完成所述偶联物的施用后 4-24 小时内被所述免疫偶联物占据。

7. 前述权利要求任一项的方法,其中所述效应物是类美登醇,特别是 DM4,且其中在所述 21 天内施用于所述患者的类美登醇的总量超过  $2\text{mg/m}^2$ 、超过  $3\text{mg/m}^2$ 、超过  $4\text{mg/m}^2$ 、超过  $5\text{mg/m}^2$ 、超过  $6\text{mg/m}^2$ 、超过  $7\text{mg/m}^2$ 、超过  $8\text{mg/m}^2$ 、超过  $9\text{mg/m}^2$  或超过  $10\text{mg/m}^2$ 。

8. 前述权利要求任一项的方法,其中所述 AMTD 超过所述 DLT 的剂量至少 20%、至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 80%、至少 90%、至少 100% 或至少 120% 和超过所述 MTD 的剂量至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 80%、至少 90%、至少 100%、至少 120% 或至少 140%。

9. 前述权利要求任一项的方法,其中所述 AMTD 是至少  $240\text{mg/m}^2$ , 优选  $300\text{mg/m}^2$ , 优选  $360\text{mg/m}^2$ , 优选  $420\text{mg/m}^2$  且导致所述 DLT 的剂量是  $200\text{mg/m}^2$ 。

10. 前述权利要求任一项的方法,其中所述 AMTD 是至少  $240\text{mg/m}^2$ , 优选  $300\text{mg/m}^2$ , 优选  $360\text{mg/m}^2$ , 优选  $420\text{mg/m}^2$  且所述 MTD 是至少  $160\text{mg/m}^2$  或至少  $180\text{mg/m}^2$ 。

11. 前述权利要求任一项的方法,其中所述积极治疗周期包括所述施用进行至少一次,优选以均等剂量进行至少三周,且优选积极治疗周期之后是至少一周的静止期,其合起来限定至少 28 天的治疗周期,且其中在一个、两个或更多个治疗周期后,至少获得稳定的疾病。

12. 权利要求 11 的方法,其中所述免疫偶联物在所述三周期间每隔两天、每隔三天、每隔四天或每隔五天施用。

13. 权利要求 11 或 12 的方法, 其中至少稳定的疾病在三个、四个、五个、六个、七个治疗周期中维持。

14. 权利要求 13 的方法, 其中在达到至少稳定的疾病后, 所述免疫偶联物作为所述积极治疗周期内少于两次的维持疗法施用, 优选作为  $60\text{mg}/\text{m}^2$ – $280\text{mg}/\text{m}^2$ , 包括约  $70\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $80\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $90\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $100\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $110\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $120\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $130\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $140\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $150\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $160\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $170\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $180\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $190\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $200\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $210\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $220\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $230\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $240\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $250\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $260\text{mg}/\text{m}^2$  和约  $270\text{mg}/\text{m}^2$  的重复单一剂量。

15. 权利要求 14 的方法, 其中在所述维持疗法期间获得越过 3 个月的至少无进展存活、稳定的疾病和 / 或轻微响应。

16. 前述权利要求任一项的方法, 其中所述免疫偶联物在所述积极治疗周期内作为重复的多个剂量的施用导致总有效量和所述受试者体液中所述免疫偶联物的第一水平, 且其中相当于所述总有效量的量作为单一剂量或所述积极治疗周期中的重复的单一剂量施用, 导致所述受试者体液中所述免疫偶联物的第二水平, 其中所述第一水平等于或低于所述第二水平, 例如比所述第二水平低超过 10%、超过 20% 或超过 30%。

17. 权利要求 16 的方法, 其中所述积极治疗周期持续 21 天和 / 或所述重复的多个剂量由 3 个均等的, 优选等距的剂量组成, 更优选在第 1、8 和 15 天施用。

18. 权利要求 16 或 17 的方法, 其中所述总有效量超过  $200\text{mg}/\text{m}^2$ , 为约  $220\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $240\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $260\text{mg}/\text{m}^2$  或约  $280\text{mg}/\text{m}^2$ 。

19. 一种用于治疗与表达 CD138 的靶细胞相关的疾病的方法, 包括:

在积极治疗周期内向需要的患者施用包含免疫偶联物和药学上可接受的载体的药物组合物, 任选地所述积极治疗周期之后是静止期, 其中所述免疫偶联物包含

至少一种靶向于表达 CD138 的细胞的靶向剂, 和

至少一种效应物分子, 其中所述靶向剂与所述效应物分子功能性连接以形成所述免疫偶联物,

且其中至少一周一次施用的所述免疫偶联物的剂量是约  $20\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $30\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $40\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $50\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $60\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $70\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $80\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $90\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $100\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $110\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $120\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $130\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $140\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $150\text{mg}/\text{m}^2$  或约  $160\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $170\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $180\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $190\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $200\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $210\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $220\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $230\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $240\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $250\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $260\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $270\text{mg}/\text{m}^2$  或约  $280\text{mg}/\text{m}^2$ , 且所述药物组合物单独地或与细胞毒性剂结合施用至少三周。

20. 权利要求 19 的方法, 其中所述积极治疗周期持续至少 21 天且所述免疫偶联物以约  $40\text{mg}/\text{m}^2$ –约  $140\text{mg}/\text{m}^2$  的剂量一周施用一次。

21. 前述权利要求任一项所述的方法, 其中在至少两个 21 天治疗周期后, 任选地各所述 21 天治疗周期之后是静止期, 所述施用之后进一步施用所述免疫偶联物或药物组合物作为维持治疗。

22. 权利要求 21 所述的方法, 其中所述维持治疗包括施用所述免疫偶联物或包含所述免疫偶联物的药物组合物 (i) 每三到六周一次或 (ii) 重复的多个剂量, 其中免疫偶联物的各单个剂量低于原始治疗单个剂量约  $10\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $20\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $30\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $40\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $50\text{mg}/\text{m}^2$ 。

$\text{m}^2$ 、约  $60\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $70\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $80\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $90\text{mg}/\text{m}^2$  或约  $100\text{mg}/\text{m}^2$  和 / 或其中单个剂量以超过所述单个剂量的间隔的时间间隔施用,例如超过 1、2、3、4、5、6、7 天。

23. 前述权利要求任一项所述的方法,其中所述免疫偶联物作为多剂量方案施用在完成施用后 0-2 小时产生至少  $7\mu\text{g}/\text{ml}$ 、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、40、50、60 或  $70\mu\text{g}/\text{ml}$  的平均血浆水平。

24. 前述权利要求任一项所述的方法,进一步包括

测定所述免疫偶联物或包含所述免疫偶联物的药物的施用完成后 0-4 小时,包括约 1、2 或 3 小时时,患者体液中所述免疫偶联物或血液效率参数的基准水平 (RL),

在所述免疫偶联物的后续施用中测定所述后续施用完成后 0-4 小时时所述免疫偶联物或血液效率参数的后续水平 (SL),

比较所述 RL 和所述 SL,

(i) 确定  $\text{RL} > \text{SL}$ ,

则在所述后续施用后的治疗周期中提高所述总剂量 5-100%,包括 10-50% 或 20-30%,和 / 或

(ii) 确定  $\text{RL} < \text{SL}$ ,

则在所述后续施用后的治疗周期中降低所述总剂量 5-100%,包括 10-50% 或 20-30%。

25. 前述权利要求任一项所述的方法,进一步包括

测定施用单个剂量的所述免疫偶联物或包含所述免疫偶联物的药物组合物完成后 0-2 小时,体液中所述免疫偶联物的水平,

确定所述免疫偶联物的水平是否低于或高于  $7\mu\text{g}/\text{m}^2$ 、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20  $\mu\text{g}/\text{m}^2$ ,

如果所述水平低于  $7\mu\text{g}/\text{m}^2$ 、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20  $\mu\text{g}/\text{m}^2$ ,则在下一治疗周期中提高所述单个剂量至少  $10\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $20\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $30\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $40\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $50\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $60\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $70\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $80\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $90\text{mg}/\text{m}^2$  或约  $100\text{mg}/\text{m}^2$ ,或者

如果所述水平高于  $7\mu\text{g}/\text{m}^2$ 、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20  $\mu\text{g}/\text{m}^2$ ,则在下一治疗周期中维持所述单个剂量或降低所述单个剂量至少  $10\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $20\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $30\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $40\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $50\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $60\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $70\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $80\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $90\text{mg}/\text{m}^2$  或约  $100\text{mg}/\text{m}^2$ 。

26. 前述权利要求任一项所述的方法,进一步包括施用至少一种细胞毒性剂,包括两种或三种细胞毒性剂,至少一周一次或一治疗周期一次。

27. 权利要求 26 所述的方法,其中所述细胞毒性剂是来那度胺和 / 或地塞米松。

28. 权利要求 26 及任何之后权利要求所述的方法,其中所述受试者先前未暴露于包含靶向于表达 CD138 的细胞的抗体的免疫偶联物、来那度胺和 / 或地塞米松。

29. 权利要求 26 或 27 所述的方法,其中所述受试者先前已暴露于包含靶向于表达 CD138 的细胞的抗体的免疫偶联物、来那度胺和 / 或地塞米松。

30. 权利要求 29 所述的方法,其中所述受试者对于所述靶向于表达 CD138 的细胞的抗体的免疫偶联物、来那度胺和 / 或地塞米松的暴露有响应。

31. 权利要求 30 所述的方法,其中所述表达 CD138 的靶细胞对于靶向于表达 CD138 的细胞的抗体的免疫偶联物、来那度胺和 / 或地塞米松的暴露是不显效的。

32. 权利要求 29 所述的方法,其中所述受试者在所述施用后复发。

33. 权利要求 26 及任何之后权利要求所述的方法,其中来那度胺以 5-35mg,优选约 25mg 的剂量或以低于 25、20、15 或 10mg 的剂量施用,例如口服一天一次,共 21 天,和 / 或其中地塞米松以 20-50mg,优选约 40mg 的剂量或以低于 40 或 30mg 的剂量施用,例如口服一天一次,共 21 天。

34. 前述权利要求任一项的方法,其中所述受试者患有包含表达 CD138 的靶细胞的实体肿瘤,且其中所述实体肿瘤对于癌症激素疗法或化疗不显效或者所述受试者在激素疗法或化疗后复发,其中所述施用导致至少肿瘤生长延迟或肿瘤停滞。

35. 权利要求 34 的方法,其中所述免疫偶联物以重复的多剂量方案施用,具有 20mg/m<sup>2</sup>-160mg/m<sup>2</sup> 的单个剂量。

36. 权利要求 34 的方法,其中所述实体肿瘤是雌激素受体阴性的和 / 或孕酮阴性的和 / 或 Her2/neu 阴性的。

37. 前述权利要求任一项的方法,其中在所述免疫偶联物或药物组合物的施用之前施用靶向于表达 CD138 的细胞的未偶联抗体,其中所述免疫偶联物在所述未偶联抗体的施用完成后 1-6 小时,优选 2-4 小时施用。

38. 权利要求 37 的方法,其中所述未偶联抗体以对应于所述受试者体液中 10-30 μg/ml 免疫偶联物的水平 -- 特别是受试者的血浆水平 -- 的剂量施用。

39. 权利要求 38 的方法,其中所施用的剂量大致对应于向所述受试者施用免疫偶联物完成后 0-2 小时体液中所述免疫偶联物的理论水平和实际水平之间的差异。

40. 权利要求 37 或任何后续权利要求的方法,其中所述抗体以 10-40mg/m<sup>2</sup>,优选 20-30mg/m<sup>2</sup> 的剂量施用。

41. 权利要求 37 或任何后续权利要求的方法,其中所述免疫偶联物以低于没有所述未偶联抗体的施用的情况下所施用的剂量最多 10mg/m<sup>2</sup>-30mg/m<sup>2</sup> 的单个剂量施用。

42. 一种试剂盒,包括抗前述权利要求任一项的免疫偶联物的抗体及在单独容器中的关于如何通过添加所述抗体到从受试者获得的体液中来测定所述体液中所述免疫偶联物的水平的使用说明。

## 靶向 CD138 的免疫偶联物的用途

### 技术领域

[0001] 本发明涉及方法和治疗方案,特别是用于人类受试者的方法和治疗方案,其包括施用针对表达 CD138 的细胞而设计的免疫偶联物。本发明还涉及抗癌组合、包含所述抗癌组合的药物组合物及其在治疗具有表达 CD138 的靶细胞的癌症中的用途。本发明特别涉及与不包括该组合全部组分的治疗相比在治疗中显示出协同作用或未预料到的加性效应的抗癌组合。

### [0002] 发明背景

[0003] CD138 作为细胞外基质的受体,在多发性骨髓瘤 (MM) 细胞上过表达,并且已显示其影响 MM 细胞的发育和 / 或增殖。仅举几例,CD138 还在卵巢癌、宫颈癌 (Numa 等,2002)、子宫内膜癌 (Choi 等,2007)、肾癌、胆囊、膀胱移行细胞癌、胃癌 (Wiksten 等,2008)、前列腺腺癌 (Zellweger 等,2003)、乳癌 (mammary carcinoma) (Loussouarn 等,2008)、非小细胞肺癌 (Shah 等,2004)、鳞状细胞肺癌 (Toyoshima 等,2001) 的细胞、结肠癌细胞和霍奇金淋巴瘤及非霍奇金淋巴瘤的细胞、结肠直肠癌 (Hashimoto 等,2008)、肝癌 (Li 等,2005)、慢性淋巴细胞白血病 (CLL)、胰腺 (Conejo 等,2000) 和头颈癌 (Anttonen 等,1999) 的细胞上表达。

[0004] 将本文中用来阐明本发明特别是用来提供关于实施的附加细节的出版物和其他资料 (包括专利) 通过引用方式并入本文。简便起见,在下文中通过作者和日期来引用这些出版物,并且 / 或将这些出版物按作者的字母顺序列于所附的参考文献部分中。

[0005] Tassone 等 (2004) 报道了鼠 IgG1 抗体 B-B4 与在 MM 细胞表面上表达的 CD138 抗原的优异结合。Tassone 还报道了针对多发性骨髓瘤细胞的免疫偶联物 B-B4-DM1 的高细胞毒性,所述免疫偶联物包含作为效应物分子的类美登醇 (maytansinoid) DM1 (另见美国专利公布 20070183971)。

[0006] Ikeda 等 (2008 和 2009) 报道了基于 B-B4 的免疫偶联物 BT062 的有前景的体外结果和异种移植模型中的结果。

[0007] 虽然 Tassone 等和 Ikeda 等为提供对 MM 的有效治疗和提供在此治疗中可采用的物质组合物做出了贡献,但本领域中仍然存在多种需求。

[0008] 尽管使用免疫偶联物,特别是具有与靶向剂 (其结合例如不仅在靶细胞如肿瘤细胞上表达而且在执行生物体中的重要功能的非靶细胞上表达的抗原) 功能性连接的高毒性效应物分子的那些,已经显示在破坏靶细胞上是有效的,但其中许多由于其对于非靶细胞的毒性而不成功。事实上,许多免疫偶联物在临床试验过程中不得不中止,因为不能找到有效性和毒性之间的平衡 (治疗窗): 在免疫偶联物可以赋予对抗疾病方面的益处的浓度下,其毒性变得不可接受。因此,特别是对于高毒性的效应物分子,问题通常不仅在于免疫偶联物的靶向剂事实上是否能够将效应物携带至靶标并使效应物在靶标处释放,而且在于该相同的免疫偶联物在到达其靶细胞的路途中是否破坏或攻击不可接受数量的对于生物体的存活重要的细胞或器官。

[0009] 美国专利公开 20110123554 公开了包括施用靶向 CD138 的免疫偶联物 (特别地以可耐受量) 以对抗疾病的方法和治疗方案。但是,尽管这些结果表明免疫偶联物可能在可

耐受的同时是有效的,但仍存在对于进一步改进的治疗方案的需要。

[0010] 特别是仍存在为包括与 CD138 的表达相关的浆细胞增生性病症(例如 MM)的与 CD138 的表达相关的疾病提供适合的治疗方案的需要。更特别的是仍然需要通过仅以平衡毒性和对抗疾病的有效性的水平采用一定可耐受量的免疫偶联物和/或通过将免疫偶联物与已知有效对抗所讨论的病症的细胞毒性剂组合,从而确保使针对也表达 CD138 的非肿瘤细胞的毒性保持在临床可接受的水平的治疗方案。还需要减少对用来减轻疾病其他症状的药物的需要和对于用于在用最近的在前治疗实现一定程度的疾病控制后保持患者的健康处于无疾病或有限疾病状态的维持疗法的需要的治疗方案。

[0011] 在某些实施方式中,本发明满足了这些需求中一种或多种,并满足了本领域的其他需求,这对于技术人员而言,在获悉以下公开内容后将变得更加显而易见。

## 发明内容

[0012] 本发明涉及用于治疗与表达 CD138 的靶细胞相关的疾病的方法,包括:

[0013] 向需要的患者施用包含免疫偶联物和药学上可接受的载体的药物组合物一周至少一次至少三周的时间,其中任选地各三周的期间之后是静止期,其中所述免疫偶联物包含

[0014] 至少一种靶向于表达 CD138 的细胞的靶向剂,和

[0015] 至少一种效应物分子,其中所述靶向剂与所述效应物分子功能性连接以形成所述免疫偶联物,且其中至少一周一次施用的所述免疫偶联物的剂量是约  $20\text{mg}/\text{m}^2$ –约  $280\text{mg}/\text{m}^2$ ,例如以约  $40\text{mg}/\text{m}^2$ –约  $140\text{mg}/\text{m}^2$  的剂量一周一次,且所述药物组合物单独地或与细胞毒性剂结合施用至少三周。

[0016] 本发明还涉及用于治疗与表达 CD138 的靶细胞相关的疾病的方法,包括:

[0017] 向需要的受试者,特别是人类受试者,施用免疫偶联物,其包含

[0018] 至少一种靶向于表达 CD138 的细胞的工程化靶向抗体,和

[0019] 至少一种效应物分子,其中所述工程化靶向抗体与所述效应物分子功能性连接以形成所述免疫偶联物,

[0020] 其中优选地所述靶向抗体的至少一部分赋予 IgG4 同种型性质,其中

[0021] 所述免疫偶联物以包括至少两个剂量的多剂量方案施用,其中在积极治疗周期(如包含 21 天的积极治疗周期)内施用的总剂量是总最大耐受剂量 (AMTD) 或 AMTD 的一部分且其中所述 AMTD 和/或所述部分超过在所述免疫偶联物在所述积极治疗周期内施用一次(优选在第 1 天)时产生剂量限制性毒性 (DLT) 的剂量和/或超过在所述免疫偶联物作为单一剂量(包括重复的单一剂量)施用时的最大耐受剂量 (MTD)。

[0022] 所述 AMTD 可以超过所述 DLT 的剂量至少 20% 和超过所述 MTD 的剂量至少 30%。所述 AMTD 可以是至少  $240\text{mg}/\text{m}^2$ , 优选  $300\text{mg}/\text{m}^2$ , 更优选  $360\text{mg}/\text{m}^2$  或  $420\text{mg}/\text{m}^2$ , 且产生所述 DLT 的剂量可以是  $180\text{mg}/\text{m}^2$  或是  $200\text{mg}/\text{m}^2$ 。所述 AMTD 可以是至少  $240\text{mg}/\text{m}^2$ , 优选  $300\text{mg}/\text{m}^2$ , 更优选  $360\text{mg}/\text{m}^2$  或  $420\text{mg}/\text{m}^2$ , 且所述 MTD 可以是至少  $160\text{mg}/\text{m}^2$  或至少  $180\text{mg}/\text{m}^2$ 。

[0023] 所述免疫偶联物可以在 21 天内施用至少三次,优选以均等剂量。

[0024] 所述多剂量方案可以持续 3 周且之后可以是静止期。在该静止期中,可以维持无进展存活或稳定的疾病。在所述静止期中受试者体液中的免疫偶联物的水平可以是至少或

最高 0.5  $\mu\text{g/ml}$ 、1  $\mu\text{g/ml}$  或 2  $\mu\text{g/ml}$ 、3  $\mu\text{g/ml}$ 、4  $\mu\text{g/ml}$ 、5  $\mu\text{g/ml}$  或 6  $\mu\text{g/ml}$ 。

[0025] 在一个实施方式中,表达 CD138 的靶细胞(特别是分离的表达 CD138 的靶细胞,优选从非实体肿瘤分离的靶细胞如骨髓抽吸物中的骨髓瘤(myeloma)细胞)的“受体占领(receptor occupancy)”在例如根据本发明的免疫偶联物施用完成后 24 小时内,优选 18、12、8 或 4 小时内超过 60%、超过 70%、超过 75%、超过 80%、超过 85%、超过 90%或超过 95%。在后续施用之前或分别地在施用完成后超过 48 小时、超过 72 小时、超过 96 小时(4 天)、超过 120 小时(5 天)或超过 144 小时(6 天)表达 CD138 的靶细胞的“受体占领”小于 70%、小于 60%、小于 55%、小于 50%、小于 45%或小于 40%。

[0026] 在一个实施方式中,免疫偶联物施用完成后 24、18、12、8 或 4 小时表达 CD138 的靶细胞的“受体占领”与施用完成后超过 48 小时、超过 72 小时、超过 96 小时(4 天)、超过 120 小时(5 天)或超过 144 小时(6 天)所述靶细胞的“受体占领”的差异为至少 5%、至少 10%、至少 15%、至少 20%、至少 25%、至少 30%、至少 35%、至少 40%、至少 45%或至少 50%,优选 10% -50%或 20% -40%。

[0027] 在进一步的实施方式中,免疫偶联物施用完成后 24 小时,优选 18、12 或 8 或 4 小时内,表达 CD138 的靶细胞的“受体占领”是高的,即超过 60%、超过 70%、超过 75%、超过 80%、超过 85%、超过 90%或超过 95%,甚至当免疫偶联物以相对低的浓度(例如,以占到免疫偶联物在 21 天治疗周期中施用一次时所确定的免疫偶联物 DLT 的不到 50%、不到 60%、不到 70%、不到 80%,但一般超过免疫偶联物 DLT 的 10%、超过 20%或超过 30%的浓度)施用时。在再进一步的实施方式中,在后续施用之前或分别地在施用完成后超过 48 小时、超过 72 小时、超过 96 小时(4 天)、超过 120 小时(5 天)或超过 144 小时(6 天)表达 CD138 的靶细胞的“受体占领”低于 70%、低于 60%、低于 55%、低于 50%、低于 45%或低于 40%,甚至当免疫偶联物以相对高的浓度(例如,以占到免疫偶联物在 21 天治疗周期中施用一次时所确定的免疫偶联物 DLT 的超过 50%、超过 60%、超过 70%、超过 80%的浓度)施用时。

[0028] 本发明还涉及在 21 天内向受试者施用(优选按照本文中描述的任何一种方法施用)总量超过 2mg/m<sup>2</sup>、超过 3mg/m<sup>2</sup>、超过 4mg/m<sup>2</sup>、超过 5mg/m<sup>2</sup>、超过 6mg/m<sup>2</sup>、超过 7mg/m<sup>2</sup>、超过 8mg/m<sup>2</sup>、超过 9mg/m<sup>2</sup> 或超过 10mg/m<sup>2</sup> 的类美登醇,特别是 DM4。

[0029] 所述施用可以一周进行至少一次,优选以均等剂量进行至少三周,之后优选是例如一周的静止期。在这种情况下中的“静止期”意指按照对患者建立的治疗时间表应当施用但还未施用下一剂量的时间点之后的时间段。例如,在涉及第 1、8 和 15 天的每周施用的施用方案中,静止期限定第 22 天之后的时间,此时没有施用。在这一实例中,这一静止期导致两周的无治疗间期。后接静止期的至少三周限定了至少 28 天的治疗周期,且其中在两个或更多个治疗周期后,可以获得至少稳定的疾病。免疫偶联物例如可以在所述三周期间每隔 2 天、每隔 3 天、每隔 4 天或每隔 5 天施用。至少稳定的疾病可以在 3、4、5、6、7 个治疗周期中维持。在达到至少稳定的疾病后,免疫偶联物可以作为维持治疗在所述 21 天内施用少于三次或少于两次,优选所述 21 天内一次,优选地作为 60mg/m<sup>2</sup>-200mg/m<sup>2</sup>,包括约 70mg/m<sup>2</sup>、约 80mg/m<sup>2</sup>、约 90mg/m<sup>2</sup>、约 100mg/m<sup>2</sup>、约 110mg/m<sup>2</sup>、约 120mg/m<sup>2</sup>、约 130mg/m<sup>2</sup>、约 140mg/m<sup>2</sup>、150mg/m<sup>2</sup>、约 160mg/m<sup>2</sup>、约 170mg/m<sup>2</sup>、约 180mg/m<sup>2</sup>、约 190mg/m<sup>2</sup> 和约 200mg/m<sup>2</sup> 的重复的单一剂量施用。在维持治疗期间可以获得至少无进展存活、稳定的疾病和 / 或轻微响应超过 3

个月。

[0030] 所述免疫偶联物在持续至少 21 天的治疗周期中作为重复的多个剂量施用可以在各周期的最后施用后导致总有效量和受试者体液中免疫偶联物的第一水平,且其中当等同于所述总有效量的量在所述治疗周期中作为单一剂量或重复的单一剂量施用时,其可以导致所述受试者体液中免疫偶联物的第二水平,其中所述第一水平可以等于或低于第二水平,例如比第二水平低超过 10%、超过 20%或超过 30%。

[0031] 治疗周期可以持续 21 天和 / 或重复的多个剂量可以由 3 个均等的,优选等距的剂量组成,更优选在第 1、8 和 15 天施用。总有效量可以是超过 / 最高 200mg/m<sup>2</sup>、约 220mg/m<sup>2</sup>、约 240mg/m<sup>2</sup>、约 260mg/m<sup>2</sup>、约 280mg/m<sup>2</sup>、约 300mg/m<sup>2</sup>、约 360mg/m<sup>2</sup> 或约 420mg/m<sup>2</sup>。

[0032] 免疫偶联物或药物组合物可以施用至少两个 21 天的治疗周期,在各治疗周期之间具有一周的静止期。在至少两个 21 天的治疗周期后可以接着施用,任选地各 21 天的治疗周期之后是静止期和 / 或免疫偶联物或药物组合物作为维持治疗的进一步施用。维持治疗可以包括施用免疫偶联物或包含该免疫偶联物的药物组合物 (i) 每 3-6 周一次或 (ii) 重复的多个剂量,其中免疫偶联物的各单个剂量低于原始治疗单个剂量约 10mg/m<sup>2</sup>、约 20mg/m<sup>2</sup>、约 30mg/m<sup>2</sup>、约 40mg/m<sup>2</sup>、约 50mg/m<sup>2</sup>、约 60mg/m<sup>2</sup>、70mg/m<sup>2</sup>、约 80mg/m<sup>2</sup>、约 90mg/m<sup>2</sup>、约 100mg/m<sup>2</sup>、约 110mg/m<sup>2</sup> 或约 120mg/m<sup>2</sup> 和 / 或其中单个剂量可以超过所述单个剂量的间隔的时间间隔施用,例如超过 1、2、3、4、5、6、7 天。所述免疫偶联物作为多剂量方案的任何施用可以在施用完成后 0-2 小时导致至少 7 μg/ml、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、40、50、60、70、80、90 或 100 μg/ml 的平均血浆水平。

[0033] 本发明的方法可以进一步包括测定施用所述免疫偶联物或包含该免疫偶联物的药物组合物完成后 0-4 小时 (包括约 1、2、3 或 4 小时) 患者体液中所述免疫偶联物或血液效率参数 (efficacy blood parameter) 的基准水平及测定所述免疫偶联物的后续施用中在所述后续施用完成后 0-4 小时所述所述免疫偶联物或血液效率参数的后续水平,其中当基准水平高于后续水平时,所述后续施用之后的治疗周期中的总剂量可以提高 5-100%,包括 10-50%或 20-30%,和 / 或当基准水平低于后续水平时,所述后续施用之后的治疗周期中的总剂量可以降低 5-100%,包括 10-50%或 20-30%。

[0034] 本发明的方法还可以进一步包括测定施用单个剂量的所述免疫偶联物或包含该免疫偶联物的药物组合物完成后 0-2 小时体液中所述免疫偶联物的水平,其中如果所述水平低于 7 μg/ml、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 μg/ml,则单个剂量可以在下一治疗周期中提高至少 10mg/m<sup>2</sup>、20mg/m<sup>2</sup>、约 30mg/m<sup>2</sup>、约 40mg/m<sup>2</sup>、约 50mg/m<sup>2</sup>、约 60mg/m<sup>2</sup>、70mg/m<sup>2</sup>、约 80mg/m<sup>2</sup>、约 90mg/m<sup>2</sup> 或约 100mg/m<sup>2</sup>。

[0035] 本发明的方法还可以进一步包括测定施用单个剂量的所述免疫偶联物或包含该免疫偶联物的药物组合物完成后 0-2 小时体液中所述免疫偶联物的水平,其中如果所述水平高于 50 μg/ml、60、70、80 或 100 μg/ml,则单个剂量可以在下一治疗周期中降低至少 10mg/m<sup>2</sup>、20mg/m<sup>2</sup>、约 30mg/m<sup>2</sup>、约 40mg/m<sup>2</sup>、约 50mg/m<sup>2</sup>、约 60mg/m<sup>2</sup>、70mg/m<sup>2</sup>、约 80mg/m<sup>2</sup>、约 90mg/m<sup>2</sup>、约 100mg/m<sup>2</sup>、约 110mg/m<sup>2</sup> 或约 120mg/m<sup>2</sup>。

[0036] 在任何一种本发明的方法中,至少一种细胞毒性剂 (包括两种或三种) 可以一周施用至少一次或在治疗周期中施用一次。所述细胞毒性剂可以是来那度胺和 / 或地塞米松。该药物组合所施用的所述受试者先前可以暴露于或未暴露于包含靶向表达 CD138 的细

胞的免疫偶联物、来那度胺和 / 或地塞米松。受试者可以对暴露于靶向表达 CD138 的细胞的免疫偶联物、来那度胺和 / 或地塞米松有响应。表达 CD138 的靶细胞可以对暴露于靶向表达 CD138 的细胞的免疫偶联物、来那度胺和 / 或地塞米松是不显效的。受试者可以在所述先前暴露后复发。来那度胺可以以 5-35mg、优选约 25mg 的剂量或者以低于 25、20、15 或 10mg 的剂量施用,更优选在例如 21 或 28 天的治疗周期中一天一次口服施用,和 / 或地塞米松可以以 20-50mg,优选约 40mg 的剂量或者以低于 40 或 30mg 的剂量施用,例如,在例如 21 或 28 天的治疗周期中一天一次口服施用或者例如在 28 天内的第 1-4、9-12、17-20 天或例如在第 1、8、15 和 22 天施用。

[0037] 受试者可以患有包含表达 CD138 的靶细胞的实体肿瘤,且所述实体肿瘤可以对于癌症激素治疗或化疗不显效或者受试者可以在激素治疗或化疗后复发,其中所述施用可以导致至少肿瘤生长延迟或肿瘤停滞 (tumor stasis)。所述免疫偶联物可以以具有 20mg/m<sup>2</sup>-160mg/m<sup>2</sup> 的单个剂量的重复多剂量方案施用。实体肿瘤可以是雌激素受体阴性的和 / 或孕酮受体阴性的和 / 或 Her2/neu 阴性的,包括所有三种为三重阴性的,例如三阴性乳腺癌。

[0038] 在所述免疫偶联物或药物组合物的施用之前也可以施用不同的靶向剂,例如靶向于表达 CD138 的细胞的未偶联抗体,其中所述免疫偶联物在所述未偶联抗体施用完成后 1-6 小时,优选 2-4 小时施用。未偶联抗体可以以对应于受试者体液中 10-30 μg/ml 的免疫偶联物的水平,特别是受试者的血浆水平的剂量施用。施用的这一剂量可以大致对应于所述免疫偶联物施用于所述受试者完成后 0-2 小时体液中所述免疫偶联物的理论水平和实际水平之间的差异。靶向剂可以以 10-40mg/m<sup>2</sup>,优选 20-30mg/m<sup>2</sup> 的剂量施用。结果,免疫偶联物可以以低于没有所述未偶联抗体的施用的情况下施用的剂量最多 10mg/m<sup>2</sup>、最多 20mg/m<sup>2</sup> 或最多 30mg/m<sup>2</sup> 的单个剂量施用。

[0039] 本文描述的本发明治疗方法的特征也适应于医学应用的情况,例如,如在以下医学应用中:

[0040] a) 免疫偶联物用于制备治疗需要的受试者(特别是人类受试者)的与表达 CD138 的靶细胞相关的疾病的药物的用途(或用于治疗需要的受试者(特别是人类受试者)的与表达 CD138 的靶细胞相关的疾病的免疫偶联物),该免疫偶联物包含:

[0041] 至少一种靶向于表达 CD138 的细胞的工程化靶向抗体,和

[0042] 至少一种效应物分子,其中所述工程化靶向抗体与所述效应物分子功能性连接以形成所述免疫偶联物,

[0043] 其中优选地所述靶向抗体的至少一部分赋予 IgG4 同种型性质,

[0044] 其中所述免疫偶联物以包括至少两个剂量的多剂量方案施用,其中在积极治疗周期内施用的总剂量是总最大耐受剂量 (AMTD) 或 AMTD 的一部分且其中所述 AMTD 和 / 或所述部分超过在所述免疫偶联物作为单一剂量(包括作为多个单一剂量方案的部分)施用时产生的剂量限制性毒性 (DLT) 的剂量和 / 或超过在所述免疫偶联物作为单一剂量(包括作为所述积极治疗周期内的多个单一剂量方案的部分)施用时的最大耐受剂 (MTD);

[0045] b) 包含免疫偶联物和药学上可接受的载体的药物组合物用于制备治疗需要的患者中与表达 CD138 的靶细胞相关的疾病的药物的用途(或用于治疗需要的患者中与表达 CD138 的靶细胞相关的疾病的包含免疫偶联物和药学上可接受的载体的药物组合物),该免疫偶联物包含至少一种靶向于表达 CD138 的细胞的靶向剂,和至少一种效应物分子,其

中所述靶向剂与所述效应物分子功能性连接以形成所述免疫偶联物,

[0046] 其中所述药物组合物在积极治疗周期内施用,任选地所述积极治疗周期之后是静止期,

[0047] 且其中至少一周一次施用的所述免疫偶联物的剂量是约 20mg/m<sup>2</sup>、约 30mg/m<sup>2</sup>、约 40mg/m<sup>2</sup>、约 50mg/m<sup>2</sup>、约 60mg/m<sup>2</sup>、70mg/m<sup>2</sup>、约 80mg/m<sup>2</sup>、约 90mg/m<sup>2</sup>、约 100mg/m<sup>2</sup>、约 110mg/m<sup>2</sup>、约 120mg/m<sup>2</sup>、约 130mg/m<sup>2</sup>、约 140mg/m<sup>2</sup>、约 150mg/m<sup>2</sup> 或约 160mg/m<sup>2</sup>、约 170mg/m<sup>2</sup>、约 180mg/m<sup>2</sup>、约 190mg/m<sup>2</sup>、约 200mg/m<sup>2</sup>、约 210mg/m<sup>2</sup>、约 220mg/m<sup>2</sup>、约 230mg/m<sup>2</sup>、约 240mg/m<sup>2</sup>、约 250mg/m<sup>2</sup>、约 260mg/m<sup>2</sup>、约 270mg/m<sup>2</sup> 或约 280mg/m<sup>2</sup>,且所述药物组合物单独地或与细胞毒性剂结合施用至少三周。

[0048] 本发明还涉及包含抗所述免疫偶联物的抗体及在单独的容器中的关于如何通过添加所述抗体到从受试者获得的体液中来测定所述体液中所述免疫偶联物的水平的使用说明的试剂盒。所述试剂盒可以进一步包含含有至少一种靶向于表达 CD138 的细胞的工程化靶向抗体和至少一种效应物分子的免疫偶联物,其中所述工程化靶向抗体与所述效应物分子功能性连接以形成所述免疫偶联物。

[0049] 工程化靶向抗体可以包含针对 CD138 的抗原结合区 (ABR) 和另外的抗体区域,其中,所述另外的抗体区域的至少一部分属于人抗体并且赋予所述 IgG4 同种型性质。

[0050] 疾病可以是多发性骨髓瘤,特别是复发性或难治性多发性骨髓瘤。难治性多发性骨髓瘤包括“原发性难治性骨髓瘤”和“复发性难治性骨髓瘤”。

[0051] 在靶细胞上表达 CD138 的所述疾病还可以选自肾细胞癌、子宫内膜癌、宫颈癌、前列腺腺癌、胰腺癌、胃癌、膀胱癌、乳腺癌、肝癌、结肠直肠癌、结肠癌、鳞状细胞癌、肺癌 (特别是鳞状细胞肺癌)、非霍奇金淋巴瘤、胸腺癌、子宫癌、尿道癌 (urinary carcinoma) 或卵巢癌。

[0052] 在优选实施方式中,免疫偶联物均一地靶向表达 CD138 的靶细胞。

[0053] 在某些实施方式中,本发明的工程化靶向抗体可以

[0054] (i) 基本由非人抗体的针对 CD138 的抗原结合区 (ABR) 构成,或

[0055] (ii) 包含针对 CD138 的抗原结合区 (ABR) 和另外的抗体区域,其中,所述抗原结合区属于人抗体,并且其中所述另外的抗体区域的至少一部分属于人抗体。

[0056] 所述 ABR 可以分别包含:

[0057] (a) 包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸残基 99-111 的重链可变区 CDR3,和

[0058] (b) 包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸残基 89-97 的轻链可变区 CDR3。

[0059] 所述 ABR 还可以分别包含:

[0060] (a) 包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸残基 31-35 和 51-68 的重链可变区 CDR1 和 CDR2,和 / 或

[0061] (b) 包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸残基 24-34 和 50-56 的轻链可变区 CDR1 和 CDR2。

[0062] 所述另外的抗体区域可以分别包含下述 (a) 和 / 或 (b) 以及其突变:

[0063] (a) 包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸残基 123-448,和 / 或

[0064] (b) 包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸残基 108-214,

[0065] 且其突变

[0066] (i) 保持或降低所述工程化靶向抗体的抗体依赖性细胞毒性和 / 或补体依赖性细

胞毒性,和 / 或

[0067] (ii) 使所述工程化靶向抗体稳定。

[0068] 所述抗体可以包含与 SEQ ID NO :2 具有至少约 70%、更优选 80%、85%或 90%的序列同一性的轻链和与 SEQ ID NO :1 具有至少约 70%、更优选 80%、85%或 90%的序列同一性的重链,并且包含上文具体说明的抗原结合区。

[0069] 效应物分子可以通过连接物与所述工程化靶向抗体连接。该连接物可以包含二硫键。效应物分子(例如 DM4)可能在靶向抗体和效应物分子之间提供空间位阻。效应物分子可以是至少一种类美登醇(例如,DM1、DM3 或 DM4)、紫杉烷、另一种微管抑制剂或 DNA 靶向剂如 CC1065,或其类似物。

[0070] 免疫偶联物可以以小于 150%、140%、130%、120%、110%、100%、90%、80%、70%、60%或 50%的靶向变异(targeting variation)结合 CD138。

[0071] 在本文公开的方法的某些实施方式中,免疫偶联物可以包含:

[0072] 靶向 CD138 的靶向剂,该靶向剂包含

[0073] 分离的多肽,所述分离的多肽包含免疫球蛋白重链或其部分的氨基酸序列,其中,所述免疫球蛋白重链或其部分与 SEQ ID NO :1 具有至少 70%的序列同一性。所述免疫球蛋白重链或其所述部分的恒定区可以是 IgG4 同种型的恒定区。

[0074] 免疫偶联物的靶向剂可以包含与 SEQ ID NO :2 具有至少约 70%的序列同一性的轻链序列。免疫偶联物的靶向剂还可以包含与 SEQ ID NO :1 具有至少约 70%的序列同一性的重链序列。

[0075] 本发明还涉及药物组合物,所述药物组合物包含:用于抑制、推迟和 / 或防止肿瘤生长和 / 或肿瘤细胞扩散的本文指定的任何免疫偶联物,和一种或多种药学上可接受的赋形剂。

[0076] 所述药物组合物可以包含本文指定的细胞毒性剂。

[0077] 本发明还涉及试剂盒,所述试剂盒包含:在单独容器中的一种或多种剂型的所述药物组合物,和在单独容器中的使用说明,其用来说明如何将所述一种或多种剂型(例如,作为重复的单一剂量或本文讨论的其他治疗方案)施用至有需要的受试者特别是人类受试者。

[0078] 特别地,在某些实施方式中,本发明还提供用于治疗与表达 CD138 的靶细胞相关的疾病的本文描述的免疫偶联物,其中所述免疫偶联物以本文描述的时间表和 / 或剂量施用。以这种方式使用的免疫偶联物可以包含在药物组合物中。免疫偶联物或药物组合物也可以包含在试剂盒中,其中所述试剂盒进一步包含在单独的容器中的细胞毒性剂和 / 或靶向于 CD138 的未偶联抗体(也在本文中描述)。免疫偶联物 / 药物组合物及细胞毒性剂和 / 或未偶联抗体如本文描述的同时、单独或顺序地施用。类似地,免疫偶联物 / 药物组合物、细胞毒性剂和 / 或靶向于 CD138 的未偶联抗体可以是用于以本文描述的方式同时、单独或顺序使用的组合制剂的形式。

[0079] 在本发明的一个方面,对本文公开的任何免疫偶联物的施用对于获益于该施用的受试者(特别是人类受试者)或该受试者的细胞进行。还可以将免疫偶联物用于制造治疗此类病症的药物。

[0080] 免疫偶联物用于制备治疗受试者的与表达 CD138 的靶细胞相关的疾病的药物的

用途,其中所述免疫偶联物包含:

[0081] (i) 至少一种靶向于表达 CD138 的细胞的靶向剂,和

[0082] (ii) 至少一种效应物分子,任选地与一种或多种细胞毒性剂组合,

[0083] 其中所述靶向剂与所述效应物分子功能性连接以形成免疫偶联物,其中所述受试者对于一种或多种细胞毒性剂(包括免疫调节剂和/或蛋白酶体抑制剂)的治疗无反应(难治性疾病)或反应差或从该治疗复发,

[0084] 且其中所述免疫偶联物施用于受试者,优选静脉内施用。

[0085] 用于同时、单独或顺序用于治疗受试者的与表达 CD138 的靶细胞相关的疾病的免疫偶联物和治疗不良副作用的药剂的组合制剂,其中所述免疫偶联物包含:

[0086] (i) 至少一种靶向于表达 CD138 的细胞的靶向剂,和

[0087] (ii) 至少一种效应物分子,

[0088] 其中所述靶向剂与所述效应物分子功能性连接以形成免疫偶联物,其中所述受试者对于一种或多种细胞毒性剂(包括免疫调节剂和/或蛋白酶体抑制剂)的治疗无反应、反应差或从该治疗复发,

[0089] 且其中所述免疫偶联物以单独施用时  $5\text{mg}/\text{m}^2$ – $140\text{mg}/\text{m}^2$  的免疫偶联物的药代动力学等价量(pharmacokinetic equivalent)施用于受试者,优选静脉内施用。

[0090] 免疫偶联物和用于治疗不良副作用的药剂用于制备同时、单独或顺序用于治疗受试者的与表达 CD138 的靶细胞相关的疾病的组合制剂的用途,其中所述免疫偶联物包含:

[0091] (i) 至少一种靶向于表达 CD138 的细胞的靶向剂,和

[0092] (ii) 至少一种效应物分子,其中所述靶向剂与所述效应物分子功能性连接以形成免疫偶联物,

[0093] 其中所述受试者对于一种或多种细胞毒性剂(包括免疫调节剂和/或蛋白酶体抑制剂)的治疗无反应、反应差或从该治疗复发,且其中所述免疫偶联物以单独施用时  $5\text{mg}/\text{m}^2$ – $840\text{mg}/\text{m}^2$  的免疫偶联物的药代动力学等价量施用于受试者,优选静脉内施用。

[0094] 本发明还涉及抗癌组合,其包含:

[0095] 至少一种细胞毒剂和至少一种免疫偶联物,所述免疫偶联物包含靶向于表达 CD138 的细胞的靶向剂,和

[0096] 至少一种效应物分子,其中,所述靶向剂功能性地与所述效应物分子连接而形成所述免疫偶联物;其中

[0097] (a) 所述组合的协同率(synergy ratio)大于 1、大于 1.1、大于 1.2、大于 1.3、大于 1.4,或

[0098] (b) 所述组合的协同率约为 1 且所述效应物分子和所述细胞毒性剂具有重叠作用模式,

[0099] 且其中,所述抗癌组合是药物组合物或包含单独容器中的至少一种细胞毒性剂和至少一种免疫偶联物的试剂盒。

[0100] 细胞毒剂可以是:蛋白酶体抑制剂、免疫调节剂或抗血管生成剂、DNA 烷基化剂、组蛋白脱乙酰酶或其中两种以上的混合物。

[0101] 细胞毒剂可以是硼替佐米(bortezomib)或卡非佐米(carfilzomib)、沙立度胺(thalidomide)、来那度胺(lenalidomide)或泊马度胺(pomalidomide)、美法仑

(melphalan) 或其中两种以上的混合物。

[0102] 所述抗癌组合的效应物分子和细胞毒性剂可以具有重叠作用模式,且其中这些作用模式优选包括抑制微管或诱导细胞周期停滞(美法仑、硼替佐米和来那度胺或沙立度胺是诱导细胞周期停滞的细胞毒剂)。作为另外一种选择,它们可以具有非重叠作用模式。

[0103] 如果所述抗癌组合是药物组合物的部分,该药物组合物可以包含至少一种药学上可接受的赋形剂。

[0104] 所述抗癌组合还可以是试剂盒的部分,其中至少一种细胞毒性剂和至少一种免疫偶联物储存在单独的容器中。

[0105] 本发明还涉及治疗与表达 CD138 的靶细胞相关的疾病的方法,所述方法包括:

[0106] 向有需要的患者施用有效量的本文所述的抗癌组合或包含至少一种细胞毒剂和至少一种免疫偶联物的抗癌组合,所述免疫偶联物包含靶向于表达 CD138 的细胞的靶向剂和至少一种效应物分子,其中所述靶向剂功能性地与所述效应物分子连接而形成所述免疫偶联物,且其中所述免疫偶联物克服了患者抵抗所述细胞毒性剂的难治性表型。

[0107] 本发明还涉及治疗与表达 CD138 的靶细胞相关的疾病的方法,所述方法包括:

[0108] 向有需要的患者施用有效量的本文所讨论的抗癌组合,且其中所述免疫偶联物克服了难治性表型。

[0109] 本发明还涉及用于治疗与表达 CD138 的靶细胞相关的非浆细胞增生性疾病的方法,所述方法包括:

[0110] 向有需要的受试者或向所述非浆细胞增生性疾病影响的细胞施用有效量的免疫偶联物,所述免疫偶联物包含

[0111] 至少一种靶向于表达 CD138 的细胞的靶向剂,和

[0112] 至少一种效应物分子,其中,所述靶向剂功能性地与所述效应物分子连接而形成所述免疫偶联物,

[0113] 其中,在所述受试者中,所述 CD138 以相似的水平在所述靶细胞和非靶细胞上表达;或者其中,在所述受试者中,所述 CD138 在所述靶细胞上的表达水平低于表达 CD138 的所述非靶细胞上的表达水平。

[0114] 表达 CD138 的所述非靶细胞可以是上皮细胞。

[0115] 本发明还涉及治疗与表达 CD138 的靶细胞相关的非浆细胞增生性疾病的方法,所述方法包括:

[0116] 向有需要的受试者或向所述非浆细胞增生性疾病影响的细胞施用有效量的免疫偶联物,所述免疫偶联物包含

[0117] 至少一种靶向于表达 CD138 的细胞的靶向剂,和

[0118] 至少一种效应物分子,其中,所述靶向剂功能性地与所述效应物分子连接而形成所述免疫偶联物,

[0119] 其中,所述疾病的靶细胞在 24 小时、2 天、3 天、4 天、5 天、6 天期间或永久地脱落 CD138。

[0120] 所述疾病可以是乳腺癌。

[0121] 本发明还提供至少一种细胞毒性剂和至少一种免疫偶联物的组合制剂,其同时、单独或顺序使用用于治疗受试者的与表达 CD138 的靶细胞相关的疾病,其中所述免疫偶联

物包含：

[0122] (i) 靶向于表达 CD138 的细胞的靶向剂,和

[0123] (ii) 至少一种效应物分子,

[0124] 其中,所述靶向剂功能性地与所述至少一种效应物分子连接而形成所述免疫偶联物;

[0125] 且其中所述受试者具有难治性表型、在治疗后复发或之前未经历治疗。

[0126] 至少一种细胞毒性剂和至少一种免疫偶联物用于制备同时、单独或顺序使用用于治疗受试者的与表达 CD138 的靶细胞相关的疾病的组合制剂的用途,其中所述免疫偶联物包含:

[0127] (i) 靶向于表达 CD138 的细胞的靶向剂,和

[0128] (ii) 至少一种效应物分子,

[0129] 其中,所述靶向剂功能性地与所述至少一种效应物分子连接而形成所述免疫偶联物,且其中所述受试者具有难治性表型、在治疗后复发或之前未经历治疗。

[0130] 在一个优选实施方式中,至少一种细胞毒性剂和至少一种免疫偶联物的组合的协同率大于 1、大于 1.1、大于 1.2、大于 1.3 或大于 1.4。另一选择是,至少一种细胞毒剂和至少一种免疫偶联物的组合产品的协同率约为 1 并且所述效应物分子和所述细胞毒性剂具有重叠的作用模式。

[0131] 在优选的实施方式中,至少一种细胞毒性剂和至少一种免疫偶联物的组合与各单独药剂相比具有更高的效率。更高的效率通过血液效率参数的变化定义,例如 M- 蛋白水平、游离  $\kappa$  轻链和其它相关参数,其相对于各单一药剂正向改变。特别地,更高的效率可以通过例如 M- 蛋白水平的 % 下降、M- 蛋白水平下降的程度或 M- 蛋白减少的持续时间定义。

[0132] 用于治疗受试者的与表达 CD138 的靶细胞相关的非浆细胞增生性疾病的免疫偶联物,其中,所述免疫偶联物包含:

[0133] (i) 至少一种靶向于表达 CD138 的细胞的靶向剂,和

[0134] (ii) 至少一种效应物分子,

[0135] 其中,所述靶向剂功能性地与所述效应物分子连接而形成所述免疫偶联物,

[0136] 且其中,在所述受试者中 CD138 在靶细胞上的表达水平与 CD138 在非靶细胞上的表达水平相似(相等)或更低。

[0137] 免疫偶联物在制造用于治疗受试者的与表达 CD138 的靶细胞相关的非浆细胞增生性疾病的药物中的应用,其中,所述免疫偶联物包含:

[0138] (i) 至少一种靶向于表达 CD138 的细胞的靶向剂,和

[0139] (ii) 至少一种效应物分子,

[0140] 其中,所述靶向剂功能性地与所述效应物分子连接而形成所述免疫偶联物,且其中在所述受试者中 CD138 在靶细胞上的表达水平与 CD138 在非靶细胞上的表达水平相似(相等)或更低。

[0141] 本发明还涉及治疗与表达 CD138 的靶细胞相关的非浆细胞增生性疾病的方法,所述方法包括:

[0142] 向有需要的受试者或向所述非浆细胞增生性疾病的细胞施用有效量的免疫偶联物,所述免疫偶联物包含

[0143] 至少一种靶向于表达 CD138 的细胞的靶向剂,和

[0144] 至少一种效应物分子,其中,所述靶向剂功能性地与所述效应物分子连接而形成所述免疫偶联物;其中免疫偶联物诱导至少肿瘤停滞,优选实体瘤的消退 (remission)。

[0145] 该消退可以是随后有一段所述肿瘤不发生重新生长的时间间隔的消退 (完全消退)。该时间间隔可以大于 1 周、2 周、3 周、4 周、5 周、6 周、7 周、8 周、9 周、10 周、半年或 1 年或更久。

[0146] 所述实体瘤可以是胰腺癌或乳腺癌。

[0147] 所述疾病可以是肾细胞癌、子宫内膜癌、宫颈癌、前列腺腺癌、胰腺癌、胃癌、膀胱癌、乳腺癌、肝癌、结肠直肠癌、结肠癌、鳞状细胞癌、肺癌 (特别是鳞状细胞肺癌)、非霍奇金淋巴瘤、胸腺癌、子宫癌、尿道癌或卵巢癌,为原发性肿瘤以及源自原发性肿瘤的转移性肿瘤的形式。

[0148] 所述实体肿瘤可以是乳腺癌,其为雌激素受体阴性的和 / 或孕酮受体阴性的和 / 或 Her2/neu 阴性的。根据本发明的实体肿瘤也可以是乳腺癌,其对于紫杉烷治疗无反应或反应差或者是激素抵抗的。

[0149] 靶细胞如骨髓细胞的受体占领在免疫偶联物施用完成后的 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 或 12 小时可以超过 70%、超过 80%、超过 90%或超过 75%。

[0150] 附图简要说明

[0151] 图 1 提供了连接有效应物分子的 nBT062 的示意性描绘图。

[0152] 图 2 是 BT062 的化学描绘图。

[0153] 图 3 显示了安丝菌素 P-3 向美登醇的转化 (简洁起见,略去了立体化学)。

[0154] 图 4 是 DM4 的代表性合成方案。

[0155] 图 5 是抗体偶联 (nBT062 与 DM4) 的示意性描绘图。

[0156] 图 6 显示了对 nBT062-SPDB-DM4、nBT062-SPP-DM1、nBT062-SMCC-DM1 和 nBT062 抗体与 OPM-2 细胞的结合的分析。将不同浓度的 nBT062 抗体和偶联物给予细胞并通过 FACS 分析测量了平均荧光。

[0157] 图 7A-7D 描绘了 nBT062-DMx 偶联物对 MOLP-8 (CD138+) 细胞和 BJAB (CD138-) 细胞的体外细胞毒性。在平底平板中培养细胞并使之与所示浓度的免疫偶联物温育 5 天。添加 WST 试剂并再持续 3 小时以评估细胞活力。在 D 中,分析了在封闭性抗体存在 (1  $\mu$  M nBT062) 或不存在时 nBT062-SPDB-DM4 的细胞毒性活性。

[0158] 图 8 显示了与对照相比用 BT062 治疗的小鼠中异种移植胰腺癌的完全消退。完全消退保持:在无治疗观察期中未观察到肿瘤再生长。

[0159] 图 9 显示了与对照相比用 BT062 治疗的小鼠中异种移植乳腺癌的完全消退。完全消退保持,因为在无治疗观察期中,未观察到肿瘤再生长。

[0160] 图 10 显示了与对照或紫杉烷相比用 2mg/kg 或 4mg/kg BT062 (每周一次) 治疗的小鼠中异种移植乳腺癌的完全消退。在每周一次 1mg/kg BT-062 下,实现肿瘤停滞。这定义为最小有效剂量。

[0161] 图 11 显示了与溶剂对照相比用 4mg/kg 和 23.85mg/kg BT062 (每周一次) 治疗的小鼠中异种移植原发性肺腺癌的完全消退。

[0162] 图 12 显示了与溶剂对照相比用 4mg/kg 和 23.85mg/kg BT062 (每周一次) 治疗的

小鼠中异种移植膀胱（移行细胞）癌（转移样品）的完全消退。

[0163] 图 13 图示了对  $40\text{mg}/\text{m}^2$ – $120\text{mg}/\text{m}^2$  的剂量的快速血浆清除，而此处的  $160\text{mg}/\text{m}^2$  的剂量所表明更高剂量则显示出更接近于预期值的血浆清除。

[0164] 图 14 显示了与理论  $C_{\text{max}}$  值相比较的测得的 BT062 的  $C_{\text{max}}$  值。

[0165] 图 15 和图 16 显示出  $C_{\text{max}}$  值在所示的重复的单一剂量方案的若干治疗周期中通常是相似的。

[0166] 图 17 明确了并不能将快速血浆清除归因于可溶性 CD138 所引起的缓冲效应。

[0167] 图 18 描绘了在所示治疗周期过程中用施用的不同剂量的 BT062 治疗的人类受试者的无进展存活，其中各积极治疗周期持续 21 天且相应的剂量在各周期的第 1、8 和 15 天施用。各个 21 天的周期之后是 7 天的静止期（28 表示每“周期”21+7 天）。

[0168] 如可看到的，14 名患者进行研究治疗超过 3 个月。据报告这些患者中的两名无进展存活至少 300 天（约 10 个月）。

[0169] 图 19 在 (A) 中显示了三周内和之后一周长静止期中每周施用的不同剂量下的  $C_{\text{max}}$  值的过程且在 (B) 中显示了施用完成后 0–2 小时不同剂量的  $C_{\text{max}}$  值。理论  $C_{\text{max}}$  值也显示。

[0170] 图 20 显示了对于三周内每周接受  $50\text{mg}/\text{m}^2$ （之后是 7 天的静止期）的患者测量的血清 M- 蛋白水平。显示了第 –111 至 169 天。箭头指示 BT062 的治疗。

[0171] 图 21 显示了对于三周内每周接受  $65\text{mg}/\text{m}^2$ （之后是 7 天的静止期）的患者（寡分泌多发性骨髓瘤）测量的  $\lambda$ – $\kappa$  FLC 水平（在第一次治疗前强烈提高，第 1–57 天强烈降低）。显示了第 –83 至 163 天。

[0172] 图 22 显示了对于三周内每周接受  $80\text{mg}/\text{m}^2$ （之后是 7 天的静止期）的患者（寡分泌多发性骨髓瘤）测量的  $\lambda$ – $\kappa$  FLC 水平（在第一次治疗前强烈提高，稳定两个周期）。显示了第 –111 至 85 天。

[0173] 图 23 显示了对于三周内每周接受  $100\text{mg}/\text{m}^2$ （之后是 7 天的静止期）的患者（寡分泌多发性骨髓瘤）测量的  $\lambda$ – $\kappa$  FLC 水平（降低 3 个月）。显示了第 –83 至 141 天。

[0174] 图 24 显示了对于三周内每周接受  $3 \times 120\text{mg}/\text{m}^2$ （之后是 7 天的静止期）的患者测量的尿 M- 蛋白水平。显示了第 –27 至 337 天。

[0175] 图 25 显示了对于三周内每周接受  $3 \times 160\text{mg}/\text{m}^2$ （之后是 7 天的静止期）的患者测量的血清 M- 蛋白水平。显示了第 –20 至 57 天，其表明轻微响应。

[0176] 图 26 显示了对于以三周间隔接受  $160\text{mg}/\text{m}^2$  的患者测量的  $\kappa$  FLC 水平。显示了第 –21 至 101 天。

[0177] 图 27 显示了作为  $160\text{mg}/\text{m}^2$  的重复单一剂量施用的 BT062 的血浆水平与在相等长度（21 天）的积极治疗周期中施用三次的  $100\text{mg}/\text{m}^2$  和  $120\text{mg}/\text{m}^2$  多剂量的对比。

[0178] 图 28 显示了在 BT062 延长施用期间作为  $160\text{mg}/\text{m}^2$  的重复单一剂量 BT062 的血清 M- 蛋白水平，其导致具有可控副作用的轻微响应。

[0179] 图 29 显示了对于用  $160\text{mg}/\text{m}^2$  的重复单一剂量 BT062 治疗的患者重复单一剂量施用中随时间的血清 M 蛋白水平和  $C_{\text{max}}$  值（也参见图 28）。

[0180] 图 30 显示了在异种移植小鼠模型（MOLP–8MM 异种移植模型）中组合疗法对肿瘤体积（TV）中值的效果。结果显示了 BT062 与来那度胺的组合的效果。

[0181] 图 31 显示了在异种移植小鼠模型中组合疗法对肿瘤体积 (TV) 中值的效果。结果显示了 BT062 与 VELCADE 的组合的效果。

[0182] 图 32 显示了在体外来那度胺对表达 CD138 的不同细胞的效果,特别是 MOLP-A 细胞 (A)、RPMI8226 细胞 (B)、NCI-H929 细胞 (C) 和 U266 细胞 (D)。注意,CD138 表达在体内不受来那度胺和地塞米松组合治疗的影响 (L363MM 异种移植模型) (数据未显示)。

[0183] 图 33 显示了体内 (L363MM 异种移植模型) 药物组合研究的结果,其中 BT062 (2mg/kg, 4mg/kg) 在第 1、8、15、22 和 29 天静脉内施用;来那度胺在第 0-4、7-11、14-18、21-25、28-32 天口服施用和地塞米松在第 0、7、14、21 和 28 天皮下施用。相对于来那度胺和地塞米松的简单组合,肿瘤体积的可观的减小可以特别地在 4mg/kg BT062 剂量方案的情况中观察到。结果以模型中相对于静脉内施用的溶剂对照的中值相对肿瘤体积的效应来显示。第 X 天的中值相对肿瘤体积在此处和在后续图中计算如下:第 X 天的单个肿瘤的相对体积 (单个 RTV) 通过将第 X 天的该单个肿瘤体积 (Tx) 除以第 0 天的同一肿瘤的单个体积 (T0) 乘以 100% 来计算。组肿瘤体积表示为组中所有肿瘤的中值或平均 (几何) RTV (组中值 / 平均 RTV)。

[0184] 图 34 显示了对于安排三周内每周接受 80mg/m<sup>2</sup> 的 BT062,之后 7 天的静止期的患者测量的血清 M- 蛋白水平。BT062 与来那度胺和地塞米松组合施用。显示了第 -13 至 106 天,其表明轻微响应。

[0185] 图 35 显示了体内 (NMRI 裸鼠中人源乳腺癌模型) 研究的结果,其中 BT062 (0.5mg/kg, 1mg/kg, 2mg/kg, 4mg/kg) 在第 0、7、14、21、28 和 35 天静脉内施用和紫杉酚 (taxol) (10mg/kg) 在第 1、8、15 和 22 天静脉内施用。BT062 在较高浓度下显示较优结果。结果显示为模型中相对于静脉内施用的 PBS 的平均相对肿瘤体积的效果。对于按天的中值相对肿瘤体积的计算,参见图 33。

[0186] 图 36 显示了体内 (NMRI 裸鼠中 CD138IHC 评分 2-3 的人源乳腺癌模型) 研究的结果,其中 BT062 (1mg/kg, 2mg/kg, 4mg/kg, 8mg/kg) 在第 0、7、14、21、28 和 35 天静脉内施用和多西他赛 (10mg/kg) 第 0、7 和 14 天静脉内施用。BT062 在较高浓度下显示较优结果。结果显示为模型中相对于静脉内施用的 PBS 的平均相对肿瘤体积的效果。对于按天的中值相对肿瘤体积的计算,参见图 33。

[0187] 图 37 显示了体内 (NMRI 裸鼠中 CD138IHC 评分 1-2 的人源乳腺癌模型) 研究的结果,其中 BT062 (1mg/kg, 2mg/kg, 3mg/kg, 4mg/kg) 在第 0、7、14、21、28 和 35 天静脉内施用和多西他赛 (10mg/kg) 第 0、7 和 14 天静脉内施用。没有观察到治疗方案的差异。结果显示为模型中相对于静脉内施用的 PBS 的平均相对肿瘤体积的效果。对于按天的中值相对肿瘤体积的计算,参见图 33。

[0188] 图 38 显示了体内 (NMRI 裸鼠中人源前列腺癌模型) 研究的结果,其中 BT062 (1mg/kg, 2mg/kg, 4mg/kg, 8mg/kg) 在第 0、7、14、21、28 和 35 天静脉内施用和多西他赛 (10mg/kg) 第 0、7 和 14 天静脉内施用。BT062 在较高浓度下显示较优结果。结果显示为对于平均相对肿瘤体积的效果。

[0189] 多西他赛与最高浓度的 BT062 同样有效且允许随时间维持低的肿瘤体积。

[0190] 本发明的各种优选实施方式的详细说明

[0191] 本发明涉及向有需要的受试者特别是人类受试者 (患者) 施用本文所述的包含

CD138 靶向剂的免疫偶联物,并且涉及将该免疫偶联物的效应物分子递送至靶位点并在靶位点处或在靶位点中释放效应物分子,所述靶位点特别是靶细胞、组织和 / 或器官。更特别的是,本发明涉及包含此类 CD138 靶向剂和与所述靶向剂连接的强力效应物分子的免疫偶联物。在靶位点处或在靶位点中效应物分子可以通过免疫偶联物的切割和 / 或与免疫偶联物的靶向剂部分解离得到激活。所述免疫偶联物可以单独施用,也可以作为抗癌组合的部分来施用,所述抗癌组合包含细胞毒性剂,所述细胞毒性剂例如但不限于蛋白酶体抑制剂(例如硼替佐米、卡非佐米)、免疫调节剂 / 抗血管生成剂(例如,沙立度胺、来那度胺或泊马度胺)、DNA 烷基化剂(例如,美法仑)或皮质激素类(例如,地塞米松),其中,在治疗癌症时,与单一疗法中单独使用的免疫偶联物和 / 或单一疗法中单独使用的细胞毒性剂相比,所述抗癌组合具有协同效应或未预料到的加合效应。

[0192] 可以将本发明的免疫偶联物施用至有治疗需要的受试者或施用至从所述有治疗需要的受试者分离出的细胞。在靶细胞、组织和 / 或器官处或者在靶细胞、组织和 / 或器官中,通过切割 / 解离可以从免疫偶联物释放出效应物分子。

[0193] 在一个实例中,通过 nBT062 抗体靶向于表达 CD38 的细胞并包含 DM4 作为效应物分子的免疫偶联物 BT062 以  $40\text{mg}/\text{m}^2$  的量施用于患有复发性 / 难治性多发性骨髓瘤的患者 14 次,如在重复的多剂量方案中,其中各积极治疗周期的长度是 21 天,每周期三个剂量在周期的第 1、8 和 15 天施用,且一周的静止期在下一积极治疗周期开始前插入。以不同的方式表示,治疗周期是 28 天,每周期三个剂量在周期的第 1、8 和 15 天施用且在第 22 天无施用,从而在该实例中导致约两周的无治疗期间。在该实例中,免疫偶联物静脉内施用于患者以使得其可以更好地集中在肿瘤细胞中和 / 或肿瘤细胞处。BT062 的血浆浓度的测量显示在初始测量期(施用结束后最多 2 小时)中,BT062 的  $C_{\text{max}}$  值显著低于理论计算值而没有观察到 DLT(剂量限制性毒性),表明 BT062 集中在肿瘤靶标处而不是随机地与靶 CD138 和非靶 CD138 连接。由 sCD138(可溶性 CD138)导致的“缓冲效应”可以被排除(比较图 17)。如以下在以  $80\text{mg}/\text{m}^2$  施用的情况中讨论的,靶细胞处的快速集中可以确认。

[0194] 积极治疗周期是由活性剂(此处通常指免疫偶联物)的规则施用限定的并排除任何静止期的治疗周期。积极治疗周期通常包括三周的主动治疗且认为不是以施用的最后剂量结束,而是以进一步施用应当进行的时间。因此,包括第 1 天的  $120\text{mg}/\text{m}^2$ 、第 8 和 15 天的  $65\text{mg}/\text{m}^2$  的剂量的积极治疗周期被认为在第 21 天结束且为 21 天长。尽管积极治疗周期一般持续 21 天,其范围可以为至少两周(14 天)至四周(28 天)。在后一情况中,积极治疗周期和“完全”或“完整”治疗周期是相同的。在积极治疗周期期间,活性剂有规律地施用。这包括例如以交替的 2 或 3 天的间隔、以 4 天的间隔、以逐步增加的间隔如在第 1、3、6、10、15 天。治疗周期可以在主动治疗之外进一步包括静止期。例如,在上述实例中,在 28 天的治疗周期中的上述施用方案被认为不包括第 22 天的施用。这样的治疗周期(包括静止期)在本文中也称为“完全”或“完整”治疗周期。无治疗期描述其中不给予治疗的时间段。因此,在上述实例中,无治疗期在第 16 天开始。在静止期开始时,没有免疫偶联物施用于患者。在优选的实施方式中,在这一期间中不施用任何种类的治疗。静止期可以持续例如 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 天或更通常一周。无治疗期可以持续 14、15、16、17、18、19、20、21 天或更长。

[0195] 在另一个实例中,免疫偶联物 BT062 作为重复的多个剂量以各  $50\text{mg}/\text{m}^2$  的量施用

于患有复发性 / 难治性多发性骨髓瘤的患者 18 次, 其中各治疗周期的长度是 21 天, 每周期三个剂量在周期的第 1、8 和 15 天施用, 且一周的静止期在下一治疗周期开始前插入。以不同的方式表示, 治疗周期是 28 天, 每周期三个剂量在周期的第 1、8 和 15 天施用且在第 22 天无施用。在该实例中, 免疫偶联物静脉内施用于患者以使得其可以更好地集中在肿瘤细胞中和 / 或肿瘤细胞处。没有提供另外的手段以从免疫偶联物释放效应物分子。6 个治疗周期很好地耐受且在六个周期内可以实现至少稳定的疾病, 使得血清 M- 蛋白在第 3 和第 5 治疗周期后下降近 25% (图 20)。

[0196] 在再另一实例中, 免疫偶联物 BT062 作为重复的多个剂量以各  $65\text{mg}/\text{m}^2$  的量施用于患有复发性 / 难治性多发性骨髓瘤的患者 19 次, 其中各治疗周期的长度是 28 天, 每周期三个剂量在周期的第 1、8 和 15 天施用且在第 22 天无施用。因此无治疗期是下一治疗期开始之前的 14 天。在这一浓度下, 血浆水平仍低于理论  $C_{\text{max}}$  (相对于理论  $C_{\text{max}}$  的平均百分比 = 60%; 表 11a), 但未达到对于较低剂量例如  $40\text{mg}/\text{m}^2$  或  $50\text{mg}/\text{m}^2$  观察到的程度 (相对于理论  $C_{\text{max}}$  的平均百分比 = 33%; 表 11a)。但是, 血清 FLC 水平的强烈降低可以在仅单一治疗周期后观察到且可以保持两个月 (图 21)。除在  $65\text{mg}/\text{m}^2$  的剂量水平下达到相对于理论  $C_{\text{max}}$  的较高百分比外, 未达到理论  $C_{\text{max}}$  的总血浆浓度 (此处平均总  $17.7\text{mg}/\text{m}^2$ , 表 11b) 与  $40\text{mg}/\text{m}^2$  或  $50\text{mg}/\text{m}^2$  的较低浓度下观察到的 (平均总  $18.6\text{mg}/\text{m}^2$  和  $23.0\text{mg}/\text{m}^2$ , 表 11b) 类似。因此, 尽管相对于理论  $C_{\text{max}}$  的平均百分比提高超过 10%、超过 20% 或超过 25%, 优选 15-25%, 未达到理论  $C_{\text{max}}$  的总血浆浓度可以停留在不同浓度下, 停留在  $15\text{-}25\text{mg}/\text{m}^2$  的范围内, 即  $20\text{mg}/\text{m}^2$  左右。对于研究的 32 名患者中的 14 名患者, 报告了至少 3 个月的无进展存活 (图 18), 对于这些患者中的 4 名, 报告了至少 168 天的无进展存活。这 4 名患者之一在 9 次治疗后显示出明显的血清 M 蛋白降低 (患者 No. 6, 也请参见图 20), 且对于另一名患者, 可以在前 2 个月内观察到 FLC 的强烈降低 (患者 No. 19, 也请参见图 24)。首次 DLT 在  $140\text{mg}/\text{m}^2$  群组中观察到 (患者 No. 23), 但对于同一剂量水平下的 6 名其它患者未报告 DLT。对于每周用  $160\text{mg}/\text{m}^2$  的剂量治疗的四名患者中的两名 (患者 No. 30 和 32), 观察到 DLT 并导致在后续周期中剂量降低到  $140\text{mg}/\text{m}^2$ 。

[0197] 在再另一实例中, 免疫偶联物 BT062 作为重复的多个剂量以  $80\text{mg}/\text{m}^2$  的量施用于患有非分泌性复发性 / 难治性多发性骨髓瘤的患者 (图 18 中的患者 No. 12) 15 个周期, 其中各治疗周期的长度是 28 天, 每周期三个剂量在周期的第 1、8 和 15 天施用且在第 22 天无施用。在该实例中, 免疫偶联物静脉内施用于患者以使得其可以更好地集中在肿瘤细胞中和 / 或肿瘤细胞处。在这一浓度下, 血浆水平仍低于理论  $C_{\text{max}}$ , 但未达到对于较低剂量例如  $40\text{mg}/\text{m}^2$  观察到的程度 (相对于理论  $C_{\text{max}}$  的平均百分比 = 33%; 表 11a)。在  $80\text{mg}/\text{m}^2$  下三次施用, 因而三周内总共施用  $240\text{mg}/\text{m}^2$  (总剂量) 后, 免疫偶联物保持良好耐受。在肿瘤靶标处的快速集中可以在这一剂量下确认。表 12 显示受体占领 (RO) 测量的结果。此时, BT062 与受体 (CD138) 的结合在多发性骨髓瘤患者的骨髓 (因而是肿瘤位点) 中的多发性骨髓瘤细胞上测量。受体 (CD138) 结合的 BT062 用抗 -May 抗体染色 (样品 1)。总 CD138 在受体被 BT062 饱和后用抗 -May 抗体测量 (样品 2)。与 IgG1 同种型的温育确定与样品的非特异性结合 (样品 3)。表 12 中的第 1 列显示完成施用后 4 小时内的测量结果。如可以看到的, 施用结束后 4 小时内的受体占领在这一情况中是 99%。患者显示部分响应。施用的时间长度 (施用时间) 随施用方式明显不同。

[0198] 静脉内 (IV) 施用的施用时间一般按 mg/min 定义 (对于前 15 分钟 1mg/min 且如果耐受的话,对于其余时间 3mg/min) 且因此随对于患者指定的剂量水平增加。用于在施用后冲洗施用管线的时间也是变化的。在本研究中,对于  $10\text{mg}/\text{m}^2$ – $200\text{mg}/\text{m}^2$  的剂量,最短的输注时间是 18 分钟和最大的输注时间是 3 小时 2 分钟,平均 1 小时 36 分钟。如果  $200\text{mg}/\text{m}^2$  完全以 1mg/min 施用,这可能导致长达 8 小时的施用。在可选实施方式中,免疫偶联物可以作为静脉内浓注在 1 分钟内施用。

[0199] 因此,根据本发明的施用从施用开始后的 0–8 小时之间的任何时间“完成”,一般在 0–4 小时内,通常在从施用开始的 2 小时内。

[0200] 图 22 显示经历用于复发性 / 难治性患者的相同施用方案 (作为重复的多个剂量的  $80\text{mg}/\text{m}^2$ ,其中各治疗周期的长度是 28 天,每周期三个剂量在周期的第 1、8 和 15 天施用且在第 22 天无施用) 的患者 (图 18 中的患者 13)。在第一治疗日之前  $\lambda - \kappa$  的强增加可以稳定两个周期。

[0201] 图 18 中的患者 12 (如上所述作为重复的多个剂量的  $80\text{mg}/\text{m}^2$ ) 显示部分响应约 8 个月的时间。

[0202] 在进一步的实例中,免疫偶联物 BT062 作为重复的多个剂量以  $100\text{mg}/\text{m}^2$  的量施用于患有复发性 / 难治性多发性骨髓瘤的患者 6 次,其中各积极治疗周期的长度是 21 天,每周期三个剂量在第 1、8 和 15 天施用且具有一周的静止期 (在第 22 天无施用,有效地导致施用的两周中断)。在该实例中,免疫偶联物静脉内施用于患者以使得其可以更好地集中在肿瘤细胞中和 / 或肿瘤细胞处。

[0203] 图 23 显示患者 15 (图 18,具有寡分泌 MM 的复发性难治性患者) 的这一剂量方案的结果,其显示无进展存活越过 3 个月。

[0204] 在该浓度下,血浆水平仅在前两次施用期间低于理论  $C_{\text{max}}$  (表 11a),指向在该剂量下每周给药后免疫偶联物的蓄积。但是,在具有作为重复的多个剂量的  $120\text{mg}/\text{m}^2$  的等同试验中,这些值下降,表明  $100\text{mg}/\text{m}^2$  的结果在单一患者中可以是偏离且也表明在甚至更高剂量下,可以不发生显著的蓄积。在三周内分别  $100\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $120\text{mg}/\text{m}^2$  和大部分  $140\text{mg}/\text{m}^2$  的三次施用 (总共施用  $300\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $360\text{mg}/\text{m}^2$  和  $420\text{mg}/\text{m}^2$ ) 后,免疫偶联物保持良好耐受。在各周期中  $3 \times 100\text{mg}/\text{m}^2$  ( $300\text{mg}/\text{m}^2$ ) 或  $3 \times 120\text{mg}/\text{m}^2$  ( $360\text{mg}/\text{m}^2$ ) 的三个 21 天周期 (在 12 周中  $3 \times 300\text{mg}/\text{m}^2 = 900\text{mg}/\text{m}^2$  和在 12 周中  $3 \times 360\text{mg}/\text{m}^2 = 1080\text{mg}/\text{m}^2$ ) 后与  $640\text{mg}/\text{m}^2$  (四个 21 天的周期,各  $160\text{mg}/\text{m}^2$ ) 相比没有观察到 DLT。

[0205] 在进一步的实例中,免疫偶联物 BT062 作为重复的多个剂量以  $120\text{mg}/\text{m}^2$  的量施用于患有复发性 / 难治性多发性骨髓瘤的患者 6 次,其中各积极治疗周期的长度是 21 天 (每周期三个剂量在第 1、8 和 15 天施用) 和一周的静止期。在该实例中,免疫偶联物静脉内施用于患者以使得其可以更好地集中在肿瘤细胞中和 / 或肿瘤细胞处。

[0206] 图 24 显示患者 19 (图 18,具有寡分泌 MM 的复发性难治性患者) 的这一剂量方案的结果,其显示未确认的轻微响应,尽管有多个治疗延迟 (x)。

[0207] 在该浓度下,血浆水平仍低于理论  $C_{\text{max}}$  (表 11a),表明在该剂量下每周给药后无相关的免疫偶联物蓄积。在三周内  $120\text{mg}/\text{m}^2$  的三次施用 (总共施用  $360\text{mg}/\text{m}^2$ ) 后,免疫偶联物保持良好耐受。在各周期中  $3 \times 120\text{mg}/\text{m}^2$  ( $360\text{mg}/\text{m}^2$ ) 的三个 21 天周期后没有观察到 DLT。

[0208] 在进一步的实例中,免疫偶联物 BT062 作为重复的多个剂量以  $160\text{mg}/\text{m}^2$  的量施用

于患有复发性 / 难治性多发性骨髓瘤的患者 7 次, 其中各积极治疗周期的长度是 21 天 (每周三个剂量在第 1、8 和 15 天施用) 和一周的静止期。在该实例中, 免疫偶联物静脉内施用于患者以使得其可以更好地集中在肿瘤细胞中和 / 或肿瘤细胞处。图 25 显示患者 31 的结果 (M- 蛋白降低超过 25%, 限定为轻微响应), 如可以从图 18 看到的, 其在该浓度下不显示 DLT。

[0209] 如图 18 中所示的, 4 名患者中的 2 名在  $160\text{mg}/\text{m}^2$  下显示 DLT (升高的肝酶, 嗜中性细胞减少症) 但可以继续  $160\text{mg}/\text{m}^2$  的治疗, 在该施用方案中, MAD 是  $160\text{mg}/\text{m}^2$ , 而  $140\text{mg}/\text{m}^2$  确定为 MTD (在该浓度下 6 名患者中的 1 名显示 DLT)。

[0210]

| 每三周单一剂量          | 每三周单一剂量 | 重复的单一剂量                                            |
|------------------|---------|----------------------------------------------------|
| 160              | 200     | 240, 300, 360, 420                                 |
| 药物相关不良事件<br>如眼毒性 | DLT     | 无严重药物相关毒性 (直至目前), 420 剂量下 6 个中一个 DLT (掌跖红斑感觉不良综合征) |

[0211] 表 1: 在三周内递送的 BT062 的总量导致不同的药物耐受性。3 周时间内  $200\text{mg}/\text{m}^2$  的单一剂量导致 DLT (靶标相关毒性)。在 3 周时间内以 3 个时间间隔施用的类似的总剂量 ( $3 \times 80\text{mg}/\text{m}^2$ ,  $3 \times 100\text{mg}/\text{m}^2$ ,  $3 \times 120\text{mg}/\text{m}^2$ ,  $3 \times 140\text{mg}/\text{m}^2$ ) 在患者中不导致任何严重的药物相关毒性。

[0212] 在再另一实例中, 免疫偶联物 BT062 作为重复的多个剂量以  $80\text{mg}/\text{m}^2$  的量共施用于患有复发性多发性骨髓瘤的患者共四个周期, 其中各治疗周期的长度是 28 天, 每周三个剂量在周期的第 1、8 和 15 天施用且在第 22 天无施用。同时,  $25\text{mg}$  每日口服剂量的来那度胺在第 1-21 天施用且  $40\text{mg}$  的地塞米松每周施用 (第 1、8、15、22 天)。在该实例中, 免疫偶联物静脉内施用于患者以使得其可以更好地集中在肿瘤细胞中和 / 或肿瘤细胞处。尽管治疗周期 2 和 3 延迟开始且省略周期 3 的第 15 天的 BT062 剂量和周期 3 的第 15-21 天的来那度胺, 在第一周期后实现的轻微响应得到维持 (图 34)。

[0213] 在另一实例中, 免疫偶联物 BT062 作为  $220\text{mg}/\text{m}^2$  的重复的多个剂量共施用于患有胰腺肿瘤的患者, 由于实体肿瘤比与实体团块不相关的恶性肿瘤更快地捕捉免疫偶联物, 其中各治疗周期的长度是 28 天, 每周三个剂量在周期的第 1、8 和 15 天施用且在第 22 天无施用。同时, 施用  $10\text{mg}$  每日口服剂量的免疫调节剂来那度胺。在该实例中, 免疫偶联物静脉内施用于患者以使得其可以更好地集中在肿瘤细胞中和 / 或肿瘤细胞处。所述施用之后是由 21 天周期的第 1 天时  $160\text{mg}/\text{m}^2$  免疫偶联物的重复单一剂量组成的维持治疗, 共 4 个月。

[0214] CD138 或多配体蛋白聚糖 -1 (syndecan-1) (又称 YND1、SYNDECAN、SDC、SCD1、CD138 抗原, SwissProt 登录号: P18827human) 是膜糖蛋白, 最初被描述为存在于源于上皮的细胞上, 随后在造血细胞上发现 (Sanderson, 1989)。CD138 具有长的细胞外结构域, 该结构域通过硫酸乙酰肝素链 (Langford, 1998; Yang, 2007) 与可溶分子 (例如, 生长因子 EGF、FGF、

HGF) 和不可溶分子 (例如, 细胞外基质组分胶原和纤维连接蛋白) 结合, 且充当细胞外基质的受体。通过粘附细胞所表达的肝素结合分子, CD138 还介导细胞与细胞的粘附。已显示, CD138 具有作为骨髓瘤细胞的生长因子的共受体的作用 (Bisping, 2006)。对浆细胞分化的研究显示, 还必须认为 CD138 是分化抗原 (Bataille, 2006)。

[0215] 在恶性造血中, CD138 在大部分 MM 细胞、卵巢癌、肾癌、胆囊癌、乳腺癌、前列腺癌、肺癌、结肠癌的细胞和霍奇金氏及非霍奇金氏淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病 (CLL) (Horvathova, 1995)、急性淋巴细胞白血病 (ALL)、急性粒细胞白血病 (AML) (Seftalioglu, 2003(a); Seftalioglu, 2003(b))、实体组织肉瘤、结肠癌以及其他表达 CD138 的血液恶性肿瘤和实体瘤 (Carbone 等, 1999; Sebestyen 等, 1999; Han 等, 2004; Charnaux 等, 2004; O'Connell 等, 2004; Orosz 和 Kopper, 2001) 的细胞上高度表达。CD138 的表达还与不同类型的胃肠恶性肿瘤有关 (Conejo 等, 2000)。如表 2 所示, 存在与 CD138 的表达 / 过表达相关的多种致癌细胞系。

[0216]

| 细胞系      | 来源      | 敏感性                   | CD138 表达 |          |
|----------|---------|-----------------------|----------|----------|
|          |         | IC <sub>50</sub> (nM) | RFI*     | 受体 / 细胞  |
| NCI-H929 | MM      | 0.38                  | 502      | 788, 752 |
| PC-3     | 前列腺癌    | 0.79                  | 541      | 195, 671 |
| U266     | MM      | 1.59                  | 617      | 782, 987 |
| MOLP-2   | MM      | 1.78                  | 425      | 161, 064 |
| SK-BR-3  | 乳腺癌     | 2.72                  | 485      | 444, 350 |
| LNCaP    | 前列腺癌    | 7.39                  | 179      | 23, 388  |
| CAPAN-2  | 胰腺癌     | 15.51                 | 328      | n. d.    |
| PANC-1   | 胰腺癌     | 36.38                 | 34       | 18, 085  |
| T47D     | 乳腺癌     | 89.28                 | 217      | 42, 264  |
| Jurkat   | T 细胞淋巴瘤 | 39.00                 | n. d.    | 0        |

[0217]

[0218] 表 2: 不同细胞系上的 CD138 表达。就 MM 而言, 据显示, 对 BT062 的敏感性与 CD138 的更高表达相关 (RFI = 相对荧光指数)。

[0219] 例如, 所观察到的乳腺癌细胞系和胰腺癌细胞系的敏感性远小于 MM 细胞系的敏感性。但是, 如实验部分所述, 在使用了来自乳腺癌患者和胰腺癌患者的细胞的异种移植小鼠模型中, 所获得的结果与相似的 MM 异种移植模型中的结果相比不仅可比较, 而且明显更好。在这两种情况下最终可以获得完全消退, 但相似的 MM 模型却显示出肿瘤生长的明显延

迟而非完全消退。

[0220] 虽然在胰腺癌中早期和晚期肿瘤之间的多配体蛋白聚糖-1的 mRNA 表达没有表现差别,但是在乳癌中,已报道弱 IHC 染色或无 IHC 染色反映出 CD138 可以随时间的推移而丧失。已报道了 CD138 表达的丧失,并通常将其与表达迁移相关联,即在周边基质上重新表达 (Loussouarn, 2008)。因此可以预期,CD138 靶向剂的靶标会随时间而减少。

[0221] 已显示 CD138 表达阳性的其他癌症是多种卵巢腺癌、移行细胞膀胱癌、肾透明细胞癌、鳞状细胞肺癌和子宫癌 (参见例如 Davies, 2004 ;Barbareschi 等, 2003 ;Mennerich 等, 2004 ;Anttonen 等, 2001 ;Wijdenes, 2002)。

[0222] 对活动性 (有症状的) 多发性骨髓瘤和相关的浆细胞增生性病症的治疗作为可以通过本发明的免疫偶联物来治疗的疾病的实例。

[0223] 本文所用的浆细胞增生性病症意思是浆细胞和 / 或血液的病症,例如 MGUS、SMM、活动性 (有症状的) MM、Waldenström 氏巨球蛋白血症、孤立性浆细胞瘤 (solitary plasmacytoma)、系统性 AL 淀粉样变性和 POEMS 综合征。

[0224] 多发性骨髓瘤 (MM) 是指浆细胞的恶性增殖,通常起源于骨髓,主要累及患者的骨骼,并且呈现出由于特定受累部位和血浆蛋白形成中的异常导致的临床特征。该病况的特征通常在于:位于各种骨 (尤其是头骨) 的髓中的、引起可触知的骨肿胀的多个弥漫性灶或者异常或恶性浆细胞的结状积累物,且偶尔在骨骼外部位。在进行放射学检查时,骨损伤可能具有特征性的“穿凿 (punched out)”表象。骨髓瘤中所涉及的细胞通常在血清和尿中产生异常蛋白和 / 或异常的蛋白水平。该疾病通常从意义未定的单克隆丙种球蛋白病 (MGUS) 发展为郁积型多发性骨髓瘤 (SMM) 直至活动性多发性骨髓瘤 (MM)。这些病况的症状不同,但包括高血钙、肾功能不全、疲劳、贫血、骨痛、自发性骨折、感染频率升高或感染持续时间延长、或者异常的尿色或气味。当本发明述及多发性骨髓瘤时,其是指 (MGUS)、郁积型多发性骨髓瘤 (SMM) 和活动性多发性骨髓瘤 (MM) 以及可以最终发展为活动性 MM 的其他的浆细胞恶性增生。

[0225] MGUS 是 MM 的临床良性先兆病况,比 MM 更常见,其出现在 1% 的超过 50 岁的人群中和 3% 的超过 70 岁的人群中 (Greipp 和 Lust, 1995)。重要的是将 MGUS 患者和 MM 患者区分开,因为可以安全地观察 MGUS 患者而无需采取治疗。

[0226] 然而,在长期的随访过程中,在 241 位 MGUS 患者中,有 59 位患者 (24.5%) 继续发展了 MM 或相关病症 (参见 Kyle 等, 1993)。

[0227] 术语丙种球蛋白病是指患者的免疫球蛋白合成的原发障碍。

[0228] 单克隆丙种球蛋白病是指通常与淋巴细胞或浆细胞的单一克隆 (其通常作为单一峰在血清蛋白电泳 (SPEP) 上可见) 的增殖相关的一组病症中的任何一种,其特征是在患者的血清或尿中存在单克隆免疫球蛋白。

[0229] 已报道,在老年人中,郁积型 (Smoldering) MM (SMM) 在有症状的多发性骨髓瘤发作之前出现。通常认为郁积型多发性骨髓瘤是 MGUS 的晚期;甚至在进展时,郁积型多发性骨髓瘤通常缺乏溶骨性损伤或有症状的多发性骨髓瘤的其他主要特征。

[0230] MM 的临床症状包括贫血、高血钙、肾功能不全和溶解性骨损伤。下表 3 中提供了在该疾病从意义未定的单克隆丙种球蛋白病 (monoclonal gammopathy of undetermined significance, MGUS) 发展为郁积型多发性骨髓瘤 (SMM) 直至活动性多发性骨髓瘤 (MM) 时该

疾病的进程和严重程度的区别特征。该表还总结了检测、诊断和监控这些病况的方法。这些症状和技术对本领域的技术人员而言是熟悉的。

[0231]

|                          |    |     |      |
|--------------------------|----|-----|------|
| 表 3                      |    |     |      |
|                          |    |     |      |
| 对 MM、SMM 或 MGUS 的临床特征的比较 |    |     |      |
|                          |    |     |      |
| 特征                       | MM | SMM | MGUS |

[0232]

|                                                                         |                         |                       |                      |
|-------------------------------------------------------------------------|-------------------------|-----------------------|----------------------|
| 髓浆细胞                                                                    | $\geq 10\%$             | $\geq 10\%$           | $< 10\%$             |
| 血清 M 蛋白                                                                 | $\geq 3 \text{ g/dL}$   | $\geq 3 \text{ g/dL}$ | $< 3 \text{ g/dL}$   |
| Bence-Jones                                                             | $\geq 1 \text{ g/24 h}$ | $< 1 \text{ g/24 h}$  | $< 1 \text{ g/24 h}$ |
| 尿中的蛋白                                                                   | 有                       | 有                     | 有                    |
| 贫血                                                                      | 通常有                     | 可能                    | 无                    |
| 高血钙、肾功能不全                                                               | 可能有                     | 无                     | 无                    |
| 溶解性骨损伤                                                                  | 通常有                     | 无                     | 无                    |
|                                                                         |                         |                       |                      |
| <b>MM = 多发性骨髓瘤</b>                                                      |                         |                       |                      |
| <b>SMM = 郁积型多发性骨髓瘤</b>                                                  |                         |                       |                      |
| <b>MGUS = 意义未定的单克隆丙种球蛋白病</b>                                            |                         |                       |                      |
|                                                                         |                         |                       |                      |
|                                                                         |                         |                       |                      |
| <b>通过多发性骨髓瘤的严重程度和临床特征来进行分期</b>                                          |                         |                       |                      |
|                                                                         |                         |                       |                      |
|                                                                         |                         |                       |                      |
| 疾病进展期                                                                   |                         |                       |                      |
|                                                                         |                         |                       |                      |
| <b>I 期 (活动性 MM)</b>                                                     |                         |                       |                      |
| 相对少的癌细胞已扩散至全身各处。血液中的红细胞数量和钙量正常。在骨中未发现肿瘤(浆细胞瘤)。血液或尿中的 M 蛋白水平很低。可能没有疾病症状。 |                         |                       |                      |
|                                                                         |                         |                       |                      |
| <b>II 期 (活动性 MM)</b>                                                    |                         |                       |                      |

[0233]

|                                                                                                                                                                            |  |  |  |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|--|--|
| 中等数量的癌细胞已扩散至全身各处。                                                                                                                                                          |  |  |  |
|                                                                                                                                                                            |  |  |  |
| <b>III 期 (活动性 MM)</b>                                                                                                                                                      |  |  |  |
| <p>相对大量的癌细胞已扩散至全身各处。可能有一个或多个以下情况：<br/>           红细胞数量减少，从而引起贫血。<br/>           血液中的钙量很高，因为骨已受到伤害。<br/>           发现了多于 3 个骨瘤(浆细胞瘤)。<br/>           在血液或尿中发现高水平的 M 蛋白。</p> |  |  |  |
|                                                                                                                                                                            |  |  |  |
| <b>MM 的临床特征</b>                                                                                                                                                            |  |  |  |
|                                                                                                                                                                            |  |  |  |
| 高血钙                                                                                                                                                                        |  |  |  |
| 肾功能不全                                                                                                                                                                      |  |  |  |
| 贫血                                                                                                                                                                         |  |  |  |
|                                                                                                                                                                            |  |  |  |
| <b>单克隆蛋白:</b>                                                                                                                                                              |  |  |  |
|                                                                                                                                                                            |  |  |  |
| SPEP (血清蛋白电泳)                                                                                                                                                              |  |  |  |
| SPIEP (血清蛋白免疫电泳)                                                                                                                                                           |  |  |  |
| 尿蛋白免疫电泳(Bence – Jones 蛋白)                                                                                                                                                  |  |  |  |
|                                                                                                                                                                            |  |  |  |
| <b>MM 的诊断</b>                                                                                                                                                              |  |  |  |
| 骨髓中浆细胞>10%或组织活检上的聚集物或浆细胞瘤                                                                                                                                                  |  |  |  |
| <b>单克隆蛋白:</b>                                                                                                                                                              |  |  |  |
| 血清 M 蛋白>3 g/dl 或                                                                                                                                                           |  |  |  |

[0234]

|         |  |  |  |
|---------|--|--|--|
| 尿中 M 蛋白 |  |  |  |
|---------|--|--|--|

[0235] 在临床上，通常通过患者骨髓中的恶性浆细胞增生来识别活动性多发性骨髓瘤(MM)。这些增生性浆细胞产生免疫球蛋白，且演化自 B 淋巴细胞。通过电泳测试，可以检测

出患者血清和 / 或尿中的由浆细胞产生的免疫球蛋白。

[0236] 如表 3 所示,对血清 M 蛋白的测量是评估不同时期的 MM 的重要工具。

[0237] “M 蛋白”是指通常显示为电泳凝胶上的窄条带或免疫电泳中的异常弧的单克隆蛋白。其代表同源免疫球蛋白的增殖,所述同源免疫球蛋白是由源自单个共同细胞的克隆细胞产生的,例如,以单一类别或亚类的重链和单一类型的轻链为特征的单克隆免疫球蛋白(亦称为 M 尖峰(M-spike),更广泛地称为副蛋白(paraprotein))。

[0238] “血清蛋白电泳”(SPE 或 SPEP)和“免疫固定电泳”(IFE)可以检测包括多发性骨髓瘤(MM)在内的若干种浆细胞增生性病症中所产生的单克隆免疫球蛋白。在所有人中,至多 61%的这些发现不与临床症状相关,从而使得可以诊断意义未定的单克隆丙种球蛋白病(MGUS)。然而,SPE 和 IFE 并不会检测出所有的单克隆免疫球蛋白,特别是仅分泌轻链的时候。

[0239] 那些“游离轻链分子”(FLC)包括  $\lambda$  轻链和  $\kappa$  轻链。浆细胞产生五个重链类型中的一种以及  $\lambda$  和  $\kappa$  分子之一。通常,与重链合成相比,约有 40%的过量游离轻链产生。除了完整免疫球蛋白分子外,浆细胞还分泌游离轻链(FLC,  $\lambda$  或  $\kappa$ ),并且血清轻链水平由相对合成率( $\kappa > \lambda$ )和肾排泄( $\kappa > \lambda$ )决定。当存在单克隆免疫球蛋白时, $\kappa : \lambda$  比可以高于或小于正常范围,取决于相关 FLC 的类别。FLC 的血清半衰期是 2 ~ 6 小时,相比之下,IgA 的是 5 天,IgM 的是 6 天,而 IgG 的是 21 天。因此,测量血清 FLC 水平使得远比测量完整免疫球蛋白更快地评估肿瘤对疗法的响应。同样地,对血清 FLC 的测量使得可以更早地检测到复发。

[0240] 非浆细胞增生性疾病也与 CD138 的表达有关。

[0241] 胰腺癌

[0242] 主要病例包括外分泌型。这些外分泌癌的大部分都是导管腺癌(此外,更加罕见的亚型包括囊瘤、腺泡细胞瘤和肉瘤)。内分泌胰腺癌是产生激素的肿瘤。

[0243] 原位癌是指早期癌,在该期间其局限于其所始于的细胞层。在乳腺癌中,原位是指癌细胞仍局限于导管(原位导管癌)或小叶(原位小叶癌)。其尚未生长至更深的乳腺组织中或扩散至身体的其他器官,有时将其称为非侵袭性或侵袭前期乳腺癌。

[0244] 侵袭性(浸润性)癌

[0245] 胰腺的外分泌细胞和内分泌细胞形成类型完全不同的肿瘤。

[0246] 外分泌肿瘤

[0247] 此类肿瘤是迄今为止最常见的胰腺癌类型,且多数胰腺外分泌肿瘤是恶性的。外分泌胰腺癌中约 95%是腺癌(腺癌是始于腺细胞的癌)。这些癌通常始于胰导管中,但其有时是从制造胰酶的细胞发展而来(腺泡细胞癌)。

[0248] 外分泌胰导管癌的较不常见的类型包括腺鳞癌、鳞状细胞癌和巨大细胞癌。

[0249] 内分泌肿瘤

[0250] 内分泌胰腺肿瘤并不常见。作为一个群体,还将其称为胰腺神经内分泌肿瘤(NET),或有时称为胰岛细胞肿瘤。胰岛细胞肿瘤有几种亚型。根据其所始于的制造激素的细胞的类型来命名每种亚型:

[0251] 用来描述外分泌胰腺癌的分期的主要系统是美国癌症联合委员会(AJCC)的 TNM 系统,由美国癌症协会(ACS)提供。用于分期的 TNM 系统包含 3 条关键信息:

[0252] T 描述了原发瘤的尺寸,以厘米 (cm) 测量,且描述了癌是否已在胰腺内扩散或扩散到了附近器官。在 TX、T0、T1、T2、T3 和 T4 间加以区别,其中数字越大,表明疾病越晚期。

[0253] N 描述了向附近 (区域性的) 淋巴结的扩散。N 的类别包括 NX、N0 和 N1。

[0254] M 表示癌是否已转移 (扩散) 至身体的其他器官。(胰腺癌扩散的最常见部位是肝、肺和腹膜——消化器官周围的空间。)M 的类别包括 MX、M0 和 M1。

[0255] 在确定了 T、N 和 M 的类别后,将此信息组合以指定分期,即被称作时期划分的过程。

[0256] 0 期 (Tis, N0, M0): 肿瘤局限于胰导管细胞的顶层,且并未侵袭更深的组织。其并未扩散至胰腺外部。有时将这些肿瘤称为原位胰腺癌或胰腺上皮内瘤变 III (PanIn III)。

[0257] IA 期 (T1, N0, M0): 肿瘤局限于胰腺,且尺寸小于 2cm。其并未扩散至附近的淋巴结或远距离部位。

[0258] IB 期 (T2, N0, M0): 肿瘤局限于胰腺,且尺寸大于 2cm。其并未扩散至附近的淋巴结或远距离部位。

[0259] IIA 期 (T3, N0, M0): 肿瘤正在生长到胰腺外部但未进入大血管。其并未扩散至附近的淋巴结或远距离部位。

[0260] IIB 期 (T1-3, N1, M0): 肿瘤局限于胰腺或者正在生长到胰腺外部但未进入附近的大血管或主神经。其已扩散至附近的淋巴结但未至远距离部位。

[0261] III 期 (T4, 任何 N, M0): 肿瘤正在生长到胰腺外部进入附近的大血管或主神经。其可能已经或尚未扩散到附近的淋巴结。其并未扩散至远距离部位。

[0262] IV 期 (任何 T, 任何 N, M1): 癌已扩散至远距离部位。

[0263] 虽然并非正式属于 TNM 系统,其他因素在确定预后 (前景) 中也是重要的。有时将癌症级别 (在显微镜下观察时,细胞的异常程度) 以等级 G1-G4 排列,其中 G1 癌看上去最像正常细胞且具有最佳前景。

[0264] 对于接受外科手术的患者,另一个重要因素是切除的程度——是否移除了整个肿瘤。有时将该因素以等级 R0 (移除了目视可见的和显微镜下可见的全部肿瘤)-R2 (未能除去一些目视可见的肿瘤) 排列。

[0265] 从实践角度讲,在不进行外科手术的情况下,通常不能准确确定癌已扩散了多远。这也是医生经常使用更简单的分期系统的原因,该系统根据是否可能通过外科手术来移除癌症而对癌症进行分组。将这些组称为可切除的、局部晚期的 (不可切除的) 和转移的。这些术语可以用来描述外分泌胰腺癌和内分泌胰腺癌。

[0266] 可切除的: 如果癌仅在胰腺中 (或刚好扩散至胰腺外) 并且外科医生能够移除整个肿瘤,则称其为可切除的。

[0267] 局部晚期的 (不可切除的): 如果癌尚未扩散至远距离器官但仍不能用外科手术来完全移除,则称其为局部晚期的。不能移除癌的原因通常是其有太多部分存在于附近的血管中。

[0268] 转移的: 当癌已扩散至远距离器官时,称其为转移的。仍可以进行外科手术,但其目标将是减轻症状而不是治愈癌症。

[0269] 对胰腺神经内分泌癌的分期并不像外分泌胰腺癌那样。而是将统计数据分解为不同的时期: 局部的 (仅在胰腺中)、区域的 (扩散至附近的淋巴结或组织) 和远距离的 (扩

散至远距离部位,例如肝)。

[0270] 通过在显微镜下的癌细胞的外貌来对膀胱肿瘤进行分组。

[0271] 移行细胞癌(亦称泌尿道上皮癌)是到目前为止最常见的膀胱癌类型。此组内还有亚型。根据细胞形状和其是否倾向于扩散和侵袭至其他器官,来命名这些亚型。(如果其可能生长至膀胱壁内深处,则称其为侵袭性的,如果不可能,则其为非侵袭性的。)根据显微镜下细胞的外貌,对这些肿瘤进行等级划分。如果细胞看上去更像正常细胞,则将该癌称为低等级癌。当细胞看上去非常异常,则癌是高等级的。低等级癌倾向于更缓慢地生长,且其后果优于高等级癌。

[0272] 该定义中还包括:鳞状细胞癌(不常见;通常是侵袭性的);腺癌(不常见;几乎都是侵袭性的);小细胞(罕见)。

[0273] 该定义中还包括其他罕见的膀胱癌。

[0274] 还将膀胱癌分期为:

[0275] 0a 期(Ta, N0, M0):

[0276] 癌是非侵袭性的乳头状癌。其已经向膀胱的中空中心生长但尚未生长至膀胱壁的肌肉或结缔组织中。其并未扩散至淋巴结或远距离部位。

[0277] 0is 期(Tis, N0, M0):

[0278] 癌是扁平的非侵袭性癌,亦称作扁平原位癌(CIS)。癌仅在膀胱内衬层中生长。其既未向膀胱的中空部分向内生长也未侵袭膀胱壁的肌肉或结缔组织。其并未扩散至淋巴结或远距离部位。

[0279] I 期(T1, N0, M0):

[0280] 癌已生长至膀胱内衬层下的结缔组织层中,且未生长至膀胱壁的厚肌肉层中。癌并未扩散至淋巴结或远距离部位。

[0281] II 期(T2, N0, M0):

[0282] 癌已生长至膀胱壁的厚肌肉层中,但其并未完全穿过肌肉而到达膀胱周围的脂肪组织层。癌并未扩散至淋巴结或远距离部位。

[0283] III 期(T3 或 T4a, N0, M0):

[0284] 癌已完全通过膀胱而生长至膀胱周围的脂肪组织层中(T3)。其可能已经扩散至前列腺、子宫或阴道(T4a)。其未向骨盆或腹壁中生长。癌并未扩散至淋巴结或远距离部位。

[0285] IV 期(T4b, N0, M0) 或(任何 T, N1 ~ 3, M0) 或(任何 T, 任何 N, M1):

[0286] 癌已通过膀胱壁而扩散至骨盆或腹壁(T4b)且/或已扩散至淋巴结(N1 ~ 3)且/或已扩散至诸如骨、肝或肺等远距离部位(M1)。

[0287] 胆囊癌的类型

[0288] 超过 9 成(即,超过 90%)的胆囊癌是腺癌。腺癌是始于具有腺样性质的细胞的癌,这种细胞排列在身体的多种内表面和外表面(包括消化系统内部)。

[0289] 值得特别提及的胆囊腺癌类型被称作乳头状腺癌,或只称作乳头状癌。其为在显微镜下观察时其细胞以手指样的伸出物形式排列的胆囊癌。通常,乳头状癌不太可能生长至肝或附近的淋巴结中。其倾向于具有比多数其他类型的胆囊腺癌更好的预后(前景)。在所有胆囊癌中,约有 6%是乳头状腺癌。

[0290] 存在能够发展为胆囊癌的其他类型的癌,例如腺鳞癌、鳞状细胞癌和小细胞癌,但

这些并不常见。

[0291] 胆囊癌的以下时期是根据 AJCC 的 TNM 系统来区分的：

[0292] 0 期 :Tis, N0, M0 :仅在胆囊的上皮层中存在小癌。其并未扩散至胆囊外部。

[0293] IA 期 :T1(a 或 b), N0, M0 :肿瘤生长至固有层 (lamina propria) (T1a) 或肌肉层 (T1b)。其并未扩散至胆囊外部。

[0294] IB 期 :T2, N0, M0 :肿瘤生长至肌周纤维组织。其并未扩散至胆囊外部。

[0295] IIA 期 :T3, N0, M0 :肿瘤通过浆膜层延伸和 / 或直接生长至肝和 / 或另一种附近结构中。其并未扩散至淋巴结或远离胆囊的组织或器官。

[0296] IIB 期 :T1-T3, N1, M0 :除了胆囊中的任何生长外, 肿瘤已扩散至附近的淋巴结 (N1)。其并未扩散至远离胆囊的组织或器官。

[0297] III 期 :T4, 任何 N, M0 :肿瘤侵袭进入肝内的主血管, 或已到达多于一个的除肝脏以外的附近器官。其可能已经或尚未扩散至淋巴结。其并未扩散至远离胆囊的组织或器官。

[0298] IV 期 :任何 T, 任何 N, M1 :肿瘤已扩散至远离胆囊的组织或器官。

[0299] 乳腺癌

[0300] 腺癌通常是指始于腺组织 (即制造并分泌物质的组织) 的癌类型。对于乳腺癌的情况, 乳房的导管和小叶是腺组织, 因此始于这些区域的癌通常称作腺癌。乳腺癌有若干类型, 但其中一些相当罕见。在一些情况下, 单个乳腺肿瘤可以具有这些类型的组合或具有侵袭性癌和原位癌的混合。

[0301] 原位导管癌 (DCIS ; 亦称管内癌) 是最常见的非侵袭性乳腺癌类型。

[0302] 侵袭性 (或浸润性) 导管癌 (IDC) 是最常见的乳腺癌类型。侵袭性 (浸润性) 导管癌 (IDC) 始于乳房的乳通道 (导管)、突破导管壁并生长至乳房的脂肪组织中。就此而言, 其可能能够通过淋巴系统和血流扩散 (转移) 至身体的其他部分。约 8 成 (即, 约 80%) 的侵袭性乳腺癌是浸润性导管癌。IDC 患者显示出 CD138 的表达 (Loussouarn 等, 2008)。

[0303] 三阴性乳腺癌描述了其细胞缺乏雌激素受体和孕酮受体并且在其表面上没有过量的 HER2 蛋白的乳腺癌 (通常是侵袭性导管癌)。相比多数其他类型的乳腺癌, 三阴性乳腺癌倾向于更快速地生长和扩散。由于该肿瘤细胞缺乏这些确定的受体, 激素疗法和靶向 HER2 的药物都不能有效抵抗这些癌 (但是如有需要仍然可以使用化疗)。

[0304] 在术语“乳癌”范围内的其他乳腺癌是炎性乳腺癌、髓样癌、化生性癌、粘液癌、管状癌、乳头状癌、腺样囊性癌 (囊性腺样癌)、叶状肿瘤。

[0305] 外科手术、放射或化疗组成了标准癌症疗法。有时采用激素疗法。激素疗法是全身性疗法形式。将其最常用作辅助疗法来帮助降低外科手术后癌症重现的风险, 但也可以将其作为新辅助治疗来使用。还使用其来治疗已经在治疗后复发或已扩散的癌症。雌激素促进约 2/3 的乳腺癌的生长, 所述乳腺癌包含雌激素受体 (ER 阳性癌) 和 / 或孕酮受体 (PR 阳性癌)。因此, 以使用了阻断雌激素效果或降低雌激素水平的若干方法来治疗 ER 阳性和 PR 阳性乳腺癌。然而, 激素疗法对缺乏 ER 或 PR 的患者无效。

[0306] 乳癌还遵从以下分期系统：

[0307] 0 期 :非典型的细胞未扩散至导管或小叶 (产乳器官) 外部而进入周边的乳房组织。关于原位癌, 将其分类为两种类型 :“原位导管癌” (DCIS), 其为高度可治且非致命的极早期癌 ; 和“原位小叶癌” (LCIS), 其并非癌, 而是鉴定女性具有升高的发展乳腺癌的风险的

指示征。

[0308] I 期 : 癌不大于 2 厘米 ( 约 1 英寸 ) 且尚未扩散至周边的淋巴结或乳房外部。

[0309] II 期 : 根据肿瘤的尺寸和其是否已扩散至淋巴结, 将该时期划分为两类 :

[0310] IIA 期乳腺癌——肿瘤小于 2 厘米并且已扩散至最多 3 个腋下淋巴结。或者, 肿瘤已生长到大于 2 厘米, 但不大于 5 厘米, 且尚未扩散至周边淋巴结。

[0311] IIB 期乳腺癌——肿瘤已生长到 2-5 厘米并且已扩散至最多 3 个腋下淋巴结。或者, 肿瘤大于 5 厘米, 且尚未扩散至周边淋巴结。

[0312] III 期 : 此期也划分为两类 :

[0313] III A 期 A 乳腺癌——肿瘤大于 2 厘米但小于 5 厘米, 并且已扩散至最多 9 个腋下淋巴结。

[0314] III B 期乳腺癌——癌已扩散至乳房附近的组织, 包括皮肤、胸壁、肋骨、肌肉或者胸壁中或锁骨上的淋巴结。

[0315] IV 期 : 此时, 癌已扩散至其他器官或组织, 例如肝、肺、脑、骨骼系统或锁骨附近的淋巴结。

[0316] 肺癌

[0317] 存在 4 种类型的神经内分泌肺肿瘤, 即 : 大细胞神经内分泌癌、非典型类癌瘤、典型类癌瘤和小细胞肺癌。

[0318] 类癌瘤是始于弥散神经内分泌系统的细胞的肿瘤。典型和非典型的类癌瘤在显微镜下看上去不同。典型类癌生长缓慢且仅在极少情况下扩散到肺外部, 约 9 成 ( 即, 约 90% ) 的肺类癌是典型类癌。

[0319] 出于治疗目的, 区分出了治疗方式非常不同的两种主要肺癌类型, 即小细胞肺癌 (SCLC) 和非小细胞肺癌 (NSCLC)。如果癌同时具有两种类型的特征, 则称其为混合型小细胞 / 大细胞癌。

[0320] 在所有肺癌中, 约有 10% ~ 15% 是小细胞型。SCLC 的其他名称是燕麦细胞癌和小细胞未分化癌。

[0321] 该癌经常始于胸部中心附近的支气管中。虽然癌细胞小, 但其可以快速分裂、形成大肿瘤并扩散至淋巴结和遍布全身的其他器官。极少选用外科手术, 外科手术也从来不是所施予的唯一治疗。治疗包括细胞毒性剂, 例如消除该广泛传播的疾病的药物。

[0322] 存在三种亚型的 NSCLC, 即鳞状细胞癌、腺癌、大细胞 ( 未分化 ) 癌。

[0323] 非小细胞肺癌的分期

[0324] 用来对非小细胞肺癌分期的系统是 AJCC ( 美国癌症联合委员会 ) 的系统。使用罗马数字 0-IV (0-4) 来描述各时期。将一些时期进一步划分为 A 和 B。规则是, 数字越小, 癌的扩散程度越低。数字越大, 例如 IV 期 (4 期), 意味着癌症越晚期。

[0325] 还为鳞状细胞癌 ( 头颈癌 ) 开发了包括 I 期 -IV 期的相应的分期系统。I 期癌症是小的、局部的且通常可治愈的, II 期和 III 期癌症通常是局部晚期的且 / 或已扩散至局部淋巴结, 而 IV 期癌症通常是转移的 ( 已扩散至远距离的身体部分 ) 且通常认为是不能手术的。

[0326] 本发明情况下的治疗包括 : 防止或减缓进展、稳定疾病状态、消退疾病或改善与表达 CD138 的细胞相关的病症的一种或多种症状。治疗因此包括防止或减缓严重程度的升高

或消退病症。对于 MM 的情况,通常仅有 II 期或 III 期活动性 MM 的患者接受初级治疗(最初仅以 3~6 个月的间隔观察 I 期患者或 SMM 患者),本发明的治疗不仅包括对例如任何活动性时期的 MM 的治疗,而且包括对出现在以传统方式治疗的疾病状态之前的疾病状态形式的治疗。治疗还特别包括防止从一种疾病状态进展为下一种:对于 MM 的情况,这可以是例如从 MGUS 进展为 SMM,或从 SMM 进展为活动性 MM 的 I 期或 MM 的其他期。对于外分泌胰腺癌的情况,例如,从 I 期进展到 II 期,其包括在此时期内由 AJCC 所建立的类别反映出的任何恶化,例如从 IA 到 IB。然而,该术语还包括保持现状,例如保持稳定疾病和如下文所讨论的在受治疗的患者体内引发某种响应。如果患者显示出尤其是一种或多种以下情况的可观察减少和/或可测量减少或者消失,则患者也得到了成功的“治疗”,所述情况为:癌细胞数量的减少或癌细胞消失;肿瘤尺寸减小;对癌细胞浸润至周边器官包括癌扩散至软组织和骨的抑制(即,减缓至某种程度,且优选终止);对肿瘤迁移的抑制(即,减缓至某种程度,且优选终止);对肿瘤生长的某种程度的抑制;和/或与特定癌症相关的一种或多种症状在某种程度上的缓解;降低的患病率和死亡率;和生活质量问题的改进。通常,对于 MM 的情况,通过测量患者血清和/或尿中的 M 蛋白水平和/或测量患者血清和/或尿中的 FLC 水平,可以监控某种治疗对患者疾病状态的效果。对于与表达 CD138 的细胞相关的其他病症的情况,测量其他参数来评估本发明的治疗的效果。CRP(C 反应蛋白)是用于临床癌症监控的非特异性炎症参数。仅举几例,对于胰腺癌,可以测量的相关参数是 CA19-9(糖类抗原 19.9,经常在胰腺癌中增多的肿瘤标志物)、胆红素或 CRP。此外,可以使用诸如超声波扫描术、CT、MRT 等成像手段。在头颈癌中,使用了依赖于肿瘤类型的生物标志物(例如,针对 Merkel 细胞的 NSE(神经元特异性烯醇化酶),CEA(癌胚抗原));在乳腺癌中,可以使用 CA15-3Her2 的表达和钙粘素的表达来作为标志物,同时通过诸如 NSE 等血清标志物来监控治疗。

[0327] 在诊断有症状的受试者的病况时,可以将膀胱肿瘤抗原(BTA)和 NMP22 测试与膀胱镜检(使用细的发光管在膀胱内进行观察)一起使用。这些测试还用来随访一些治疗后的患者,不过仍然推荐膀胱镜检和尿细胞学(使用显微镜来寻找尿中的癌细胞)作为用于诊断和随访的标准测试。在膀胱镜检之间,经常使用 BTA 和 NMP22 测试。正常值可以使得减少膀胱镜检的实施频率。然而,这些测试不能代替尿细胞学和膀胱镜检。

[0328] 对于晚期膀胱癌,用于其他癌症的一些标志物(例如 CEA、CA125、CA19-9 和 TPA(组织多肽抗原))可能增多,并且可以用来在治疗过程中和治疗后随访患者。对于肺癌,不存在确定的标志物,CEA 或 NSE 可能会增多。

[0329] 已知诸如骨髓瘤细胞或乳癌细胞等肿瘤细胞可脱落 CD138。表面 CD138 的丧失与骨髓瘤的较差预后相关。在诸如头颈癌或肺癌的其他肿瘤学适应征中还检测到了高水平的可溶 CD138(Anttonen 等,1999)。表面多配体蛋白聚糖-1 的丧失与 EMT(上皮间叶细胞转化)相关,该过程描述了恶性细胞转化为分化程度更低或差的细胞,且该转化与侵袭和转移期有关。这在例如转移的乳腺癌中有所报道(Loussouarn 等,2008)。

[0330] 药剂的有效量,特别是本发明的免疫偶联物或包含免疫偶联物的药物组合物的有效量,是指对“治疗”受试者特别是人受试者(患者)的疾病或病症所需的量。对于癌症的情况,例如 MM,药剂的有效量可以减少癌细胞数量、减小肿瘤尺寸、抑制(即,减缓至某种程度,优选终止)癌细胞浸润至周边器官、抑制(即,减缓至某种程度,优选终止)肿瘤转移、

在某种程度上抑制肿瘤生长、且 / 或在某种程度上缓解与该癌症相关的一种或多种症状。参见本文对“治疗”的定义。

[0331] “药代动力学等价量”，例如  $200\text{mg}/\text{m}^2$  的“药代动力学等价量”是指免疫偶联物的下述量：在将所述免疫偶联物与用于治疗不良副作用（实际包括潜在的不良副作用）的试剂组合施用（包括共施用）时，所述免疫偶联物的量所导致的药代动力学与用  $200\text{mg}/\text{m}^2$  的剂量时所观察到的相等，其中所述不良副作用主要作用于同样表达 CD138 的非靶细胞。这些等价量可以略小于 200 或略高于 200，视另一试剂而定。包括例如小于  $160\text{mg}/\text{m}^2$ 、小于  $170\text{mg}/\text{m}^2$ 、小于  $180\text{mg}/\text{m}^2$ 、小于  $190\text{mg}/\text{m}^2$ 、小于  $210\text{mg}/\text{m}^2$ 、小于  $220\text{mg}/\text{m}^2$ 、小于  $230\text{mg}/\text{m}^2$  和小于  $240\text{mg}/\text{m}^2$  的有效量。例如，本领域的技术人员会预料到，与皮质激素类或抗生素的共施用会使免疫偶联物的剂量略微更高，甚至在对皮肤有副作用的情况下，但这是本领域技术人员能够容易确定的。

[0332] 为了评估施用药物（此处为免疫偶联物）的成功程度（即其产生功能性响应的能力，即其功效），区分了对施用的不同“响应”。

[0333] 响应通常通过测量血液效率参数评估。典型的血液效率参数是 M- 蛋白水平、FLC 水平或与针对免疫偶联物的功效所讨论的疾病（特别是讨论的癌症）相关的其它标志物（疾病特异性标志物）。功效指示给定治疗的有益改变的能力。

[0334] 对于 MM 和其他浆细胞增生性疾病，将响应区分如下：

[0335] 术语完全响应 (CR) 是指：对血清和尿的免疫固定阴性，且任何软组织浆细胞瘤消失，并且骨髓中的浆细胞小于 5%；

[0336] 术语严格完全响应 (sCR) 是指上文定义的 CR，加正常的 FLC 比，且根据免疫组化或免疫荧光，骨髓中不存在无性繁殖细胞；

[0337] 术语非常好的部分响应 (VGPR) 是指：可通过免疫固定检测的血清和尿的 M 组分，但在电泳上检测不到；或者，血清 M 组分的减少 90% 以上或更多，且尿 M 组分小于  $100\text{mg}/24$  小时；

[0338] 术语部分响应 (PR) 是指：血清 M 组分的减少超过 50%，且 24 小时尿 M 蛋白减少 90% 以上或减少至小于  $200\text{mg}/24$  小时；如果血清和尿的 M 蛋白不可测量，则需要用相关 (involved) FLC 水平和非相关 (uninvolved) FLC 水平间的差值降低 50% 以上来代替 M 蛋白标准；如果血清和尿的 M 蛋白不可测量且血清游离轻链测定也不可测量，则需要用骨髓浆细胞减少 50% 以上来代替 M 蛋白标准，只要基线百分比 (baseline percentage) 大于 30% 即可；除上述标准以外，如果存在于基线处，则还要求软组织浆细胞瘤的尺寸减少 50% 以上 (Durie 等, 2006)。

[0339] 有关复发性 / 难治性骨髓瘤患者的术语轻微响应 (MR) 在本发明范围内是指：血清 M 蛋白的减少 25% 至 49%，且 24 小时尿 M 蛋白减少 50% - 89%，其仍超过  $200\text{mg}/24$  小时；除上述标准外，如果存在于基线处，还要求软组织浆细胞瘤的尺寸减少程度为 25% - 49%；而且，溶解性骨损伤的尺寸和数量都没有增加（压缩骨折的出现并不排除响应）。

[0340] 然而，虽然未被正式归类，响应还包括血清 FLC 水平下降至少 30%、优选至少 40% 或 50%。这在不能测量 M 蛋白的情况下特别重要。

[0341] 对于本发明的浆细胞增生性疾病，术语稳定的疾病 (SD) 是指不符合 CR、VGPR、PR 或进展性疾病的标准的情况，其中术语进展性疾病 (PD) 是指下述参数中的任何一个或多

个从最低响应值升高 25%：

[0342] - 血清 M 组分（绝对增加必须  $\geq 0.5\text{g}/100\text{ml}$ ）和 / 或

[0343] - 尿 M 组分（绝对增加必须  $\geq 200\text{mg}/24$  小时）和 / 或

[0344] - 仅在血清和尿 M 蛋白水平不可测量的患者中：相关 FLC 水平和不相关 FLC 水平间的差异（绝对增加必须大于  $100\text{mg}/\text{l}$ ）

[0345] - 骨髓浆细胞百分比（绝对百分比必须  $\geq 10\%$ ）

[0346] - 新生骨损伤或软组织浆细胞瘤的确定发展，或现有骨损伤或软组织浆细胞瘤的尺寸的确定增加

[0347] - 仅能够归因于浆细胞增生性病征的高血钙症的发展（校正后的血清钙高于  $11.5\text{mg}/100\text{ml}$ ）。

[0348] 术语复发性骨髓瘤在本文中是指受试者的活动性 MM 的一种形式，其中，所述受试者曾接受至少一种在先治疗方案，且其不符合复发性 / 难治性骨髓瘤的标准。

[0349] 术语难治性骨髓瘤通常是指：在即使实施了治疗浆细胞的数量也在持续增多时的疾病状态，即该疾病在进行评估时已证明，该疾病状态与所实施的治疗方案无关。

[0350] 术语复发性 / 难治性骨髓瘤在本文中是指：在进行补救治疗（salvage therapy）时的疾病复发，或在最近一次治疗 60 天内发生的进展。

[0351] 术语难治性表型包括任何类型的难治性骨髓瘤，即难治性骨髓瘤和复发性 / 难治性骨髓瘤。

[0352] 术语复发性或难治性骨髓瘤覆盖了复发性骨髓瘤、难治性骨髓瘤和复发性 / 难治性骨髓瘤。

[0353] 如果 CD138 靶细胞在例如疗法 / 治疗期间以与无这种疗法 / 治疗的情况下相同的速率继续分裂和 / 或肿瘤继续生长，则肿瘤或 CD138 靶细胞据说对于这种疗法 / 治疗是不显效的。

[0354] 肿瘤生长延迟是指相对于无治疗情况下的正常肿瘤生长延迟的肿瘤生长。

[0355] 肿瘤停滞是指肿瘤尺寸没有进一步增长的状态。

[0356] 消退是指肿瘤尺寸的减小（部分消退），包括肿瘤的完全根除和不存在再生长（完全消退）。

[0357] 激素疗法包括使用激素的治疗。癌症激素疗法用于对抗靶细胞。激素疗法用于例如乳腺癌或前列腺癌的情况中并包括施用雌激素和孕酮或其衍生物。

[0358] 化疗是在标准化治疗方案中用抗癌药物如紫杉烷或用这类药物的组合治疗癌细胞。

[0359] 维持治疗是在先治疗之后的治疗，且目的在于保持在完成所述原始治疗时获得的状态。例如，如果在先治疗导致部分响应，则维持治疗设计用于保持部分响应。

[0360] 在下文更详细讨论的临床研究中，在进入所述研究前，受试者已接受了用至少一种免疫调节剂和蛋白酶体抑制剂疗法进行的已失败的治疗。如果受试者在采用他或她的先前方案时经历了进展性疾病（PD），则将疾病考虑为治疗难治性的。

[0361] 有关 SMM 患者的术语“进展为”例如“活动性 MM”，在本发明的情况中是指：进展证据，所述进展基于针对 MM 的进展性疾病的 IMWG（国际骨髓瘤工作组）标准；和据认为与潜在的无性繁殖浆细胞增生性病征有关的以下一种或多种：新生软组织浆细胞瘤或骨

损伤的发展、高血钙 ( $> 11\text{mg}/100\text{ml}$ )、血红蛋白减少  $2\text{g}/100\text{ml}$  以上和血清肌酸酐水平  $\geq 2\text{mg}/100\text{ml}$  (Kyle 和 Rajkumar, 2009)。

[0362] 无进展存活是从治疗开始至疾病进展或死亡 (无论死亡的过程) (以先到达为准) 的期间。当提及“无进展存活”而不涉及时间段时,暗示无进展超过 3 个月。

[0363] 多发性骨髓瘤的发病机理涉及骨髓瘤细胞通过细胞表面的粘附分子与骨髓基质细胞 (BMSC) 以及细胞外基质 (ECM) 的结合。该结合触发并因此可被认为最终负责引起多发性骨髓瘤细胞生长、抗药性、MM 细胞在骨髓环境中的迁移 (Munshi 等, 2008)。特别而言,多发性骨髓瘤细胞通过针对 I 型胶原的多配体蛋白聚糖-1 (CD138) 与 ECM 粘附,该粘附诱导了基质金属蛋白酶 1 的表达,从而促进了骨的重吸收和肿瘤侵袭 (Hideshima 等, 2007)。多发性骨髓瘤细胞和骨髓微环境间的相互作用导致激活了多向性增生性和抗凋亡的级联。

[0364] 对于多发性骨髓瘤患者,以及对于患有与骨痛相关的其他疾病的患者,存在多种支持性治疗来治疗该症状与其它症状。适合的药物包括可以延缓骨损伤的双膦酸盐 (例如氨羟二磷酸二钠、唑来膦酸)。已证明这些试剂能够减少骨溶性骨损伤并防止骨折 (Ludwig 等, 2007)。其主要通过静脉来给药,从而降低骨并发症 (如骨折) 的风险并降低异常高的血钙水平 (高血钙症)。数据显示,双膦酸盐减少与 MM 相关的骨痛。如果骨较弱或破裂的话,患者还可以接受外科手术。

[0365] 在一个实施方式中,免疫偶联物使骨痛和 / 或骨并发症 (例如骨坏死) 减少,特别是减少至可接受的水平。减少至可接受水平特别包括能够中断施用可减轻这些疼痛或以减少所述骨并发症为目的的药物。通常施用诸如氨羟二磷酸二钠 (pamidronate)、唑来膦酸和氯膦酸盐 (clodronate) 等双膦酸盐来减轻 MM 患者的骨并发症 (例如骨坏死) 并由此减轻与所述并发症相关的骨痛。常见的双膦酸盐包括:用于口服施用的 FOSOMAX、BONIVA、ACTONEL、DIDRONEL 和 SKELID,和用于静脉内的施用的 BONEFOS、AREDIA 和 ZOMETA。

[0366] 在多发性骨髓瘤细胞归巢至骨髓基质室后,多发性骨髓瘤细胞与 BMSC 间的粘附使具有血管生成活性和促进肿瘤生长活性的多种细胞因子上调,例如,白细胞介素-6 (IL-6) 和胰岛素样生长因子 1 (IGF-1) (Hideshima 等, 2007)。由这些细胞因子引发的信号传导级联最终导致了 MM 细胞对常规治疗的抗性 (Anderson 等, 2000 ;Hideshima 等, 2006)。

[0367] 在正常人的造血室中,CD138 的表达限于浆细胞 (Wijdenes, 1996 ;Chilosi, 1999),且 CD138 不在外周血淋巴细胞、单核细胞、粒细胞和红细胞上表达。特别而言,CD34+ 干细胞和祖细胞不表达 CD138,且抗 CD138 的 mAb 并不影响造血干细胞培养物中的集落形成单位的数量 (Wijdenes, 1996)。在非造血室中,CD138 主要在肺、肝、皮肤、肾和肠的单层和复层上皮细胞上表达。在内皮细胞上仅看到弱染色 (Bernfield, 1992 ;Vooijs, 1996)。已报道 CD138 在人淋巴瘤细胞中以多态形式存在 (Gattei, 1999)。胃肠道、皮肤和眼的 CD138 上皮组织是最易于被本发明的免疫偶联物靶向而导致毒性的非靶组织。

[0368] 已报道单克隆抗体 B-B4、BC/B-B4、B-B2、DL-101、1D4、MI15、1. BB. 210、2Q1484、5F7、104-9、281-2,特别是 B-B4,对 CD138 有特异性。其中 B-B4、1D4 和 MI15 既识别 CD138 的完整分子又识别其核心蛋白,并且据显示可识别相同或紧密相关的表位 (Gattei, 1999)。先前的研究报道,B-B4 并不识别可溶性 CD138,而是仅识别膜结合形式的 CD138 (Wijdenes, 2002)。

[0369] 最初的抗 CD138 抗体是由 Diaclone SAS(法国)开发的,即鼠亲代 Mab B-B4,其系使用标准杂交瘤技术用人多发性骨髓瘤细胞系 U266 进行免疫化而产生的(Clement,1995; Wijdenes,1996)。B-B4 与人多配体蛋白聚糖-1(CD138)上的核心蛋白残基 90-93 间的线状表位结合(Wijdenes,1996;Dore,1998)。与 CD138 的表达模式相符,已显示 B-B4 可与浆细胞系 PRMI8226 强烈反应,但不与内皮细胞反应。另外与 CD138 的表达模式相符的是,B-B4 还与上皮细胞系 A431(源自角化细胞)和 HepG2(源自肝细胞)反应。免疫毒素 B-B4-皂草素(saporin)也对浆细胞系 PRMI8226 具有高毒性,事实上其毒性明显高于游离的皂草素。然而,从所测试的两种上皮细胞系看,B-B4-皂草素仅对细胞系 A431 显示出毒性,虽然在无性系形成测定中 B-B4-皂草素未显示出对 A431 细胞的生长物的抑制效果(Vooijs,1996)。其他研究者报道了 MM 相关抗原缺乏针对肿瘤的特异性(Couturier,1999)。

[0370] 与类美登醇 DM1 共价连接的 B-B4 显示出对多发性骨髓瘤细胞系和细胞的选择性细胞毒性,以及在 SCID 小鼠的人多发性骨髓瘤异种移植模型中的抗癌活性(Tassone,2004)。

[0371] 本发明使用术语肿瘤细胞来包括癌细胞以及可能会或不会构成实体瘤一部分的癌前期细胞。优选的待治疗肿瘤细胞是造血系统恶性肿瘤的细胞。

[0372] 根据本发明的实体肿瘤是通常不含囊肿或液体区域的异常组织团块。根据本发明的实体肿瘤包含表达 CD138 的靶肿瘤细胞并因此是恶性的实体肿瘤。不同类型的实体肿瘤针对形成实体肿瘤的细胞类型命名。实体肿瘤的实例是肉瘤、癌瘤和淋巴瘤。造血系统恶性肿瘤一般不形成实体肿瘤。乳腺癌和前列腺癌是恶性实体肿瘤的两个实例。

[0373] 本发明的靶向剂能够与靶细胞所表达的分子联结,且包括肽和非肽。特别的是,本发明的靶向剂包括靶向抗体和非免疫球蛋白靶向分子,所述非免疫球蛋白靶向分子可以基于非免疫球蛋白蛋白,非免疫球蛋白蛋白包括但不限于 **AFFILIN®** 分子、**ANTICALINS®** 和 **AFFIBODIES®**。非免疫球蛋白靶向分子还包括非肽靶向分子,例如靶向性的 DNA 和 RNA 寡核苷酸(适体),还有生理配体,特别是所讨论的抗原(例如 CD138)的配体。

[0374] 本发明的靶向抗体是天然抗体或基于天然抗体,或者以合成手段或通过遗传工程制得的,其与感兴趣的一种或多种细胞(靶细胞)上的抗原结合。本发明的靶向抗体包括单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)或抗体片段。可以改造靶向抗体,从而例如提高其对靶细胞的亲和力(Ross,2003)或降低其免疫原性。可以将靶向抗体连接至包含效应物分子的脂质体制剂(Carter,2001)。抗体片段包含完整抗体的一部分,优选是完整抗体的抗原结合区或可变区。本发明的抗体片段的实例包括:Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub> 和 Fv 片段,还有微型双功能抗体(diabody);结构域抗体(dAb)(Ward,1989;美国专利第 6,005,079 号);线状抗体;单链抗体分子;和由抗体片段构成的多特异性抗体。在单链可变区片段抗体(scFv)中,可以通过含有例如序列(甘氨酸<sub>4</sub>丝氨酸)<sub>n</sub>的短氨基酸连接物来连接重链和轻链(VH 和 VL),所述短氨基酸连接物具有足够的柔性来使两个结构域装配成具有功能的抗原结合口袋。增加各种信号序列可以使得靶向抗体进行更精确的靶向。增加轻链恒定区(CL)可以使得通过二硫键发生二聚体化,从而得到提高的稳定性和亲合力。如果可以获得针对感兴趣的靶标的 mAb,则可以通过 RT-PCR 来获得用于构建 scFv 的各种区,其中,所述 RT-PCT 从提取自亲代杂交瘤的 mRNA 克隆出可变区。另一选择是,可以

通过噬菌体展示技术从新产生 scFv (Smith, 2001)。本文所用的术语“功能性片段”, 当用来描述靶向抗体时, 意在指所述靶向抗体的部分, 所述部分能够与所描述的抗体所特异性结合的抗原特异性地结合。本发明的双特异性抗体可以例如具有至少一个针对靶组织有反应性的臂和一个针对连接物部分有反应性的臂 (美国专利公布 20020006379)。本发明的双特异性抗体还可以结合靶细胞上的多于一个抗原 (Carter, 2001)。可以对本发明的抗体进行修饰, 例如通过引入半胱氨酸残基来引入巯基的修饰 (Olafsen, 2004)。

[0375] 根据本发明, 靶向抗体可以源自任何来源, 并且可以是但不限于骆驼抗体、鼠抗体、嵌合人 / 小鼠抗体或嵌合人 / 猴抗体, 特别是嵌合人 / 小鼠抗体, 例如 nBT062。

[0376] 人源化抗体是包含源自人抗体的序列和源自非人抗体的序列的抗体, 其也在本发明的范围内。使抗体人源化的适合方法包括 CDR 移植 (互补决定区移植) (EP0239400; W091/09967; 美国专利第 5, 530, 101 和 5, 585, 089 号)、饰面 (veneering) 或表面重塑 (resurfacing) (EP 0592106; EP 0519596; Padlan, 1991; Studnicka 等, 1994; Roguska 等, 1994)、链改组 (美国专利第 5, 565, 332 号) 和 DeImmunosation™ (Biovation, LTD)。在 CDR 移植中, 将小鼠互补决定区 (CDR), 例如来自 mAb B-B4 的小鼠互补决定区 (CDR) 移植到人可变区框架中, 随后将其与人恒定区接合, 从而产生人 B-B4 抗体 (hB-B4)。通过 CDR 移植而人源化的若干抗体现已进入临床应用, 包括 MYLOTARG (Sievers 等, 2001) 和 HECEPTIN (Pegram 等, 1998)。

[0377] 表面重塑技术使用分子建模、统计分析和诱变的组合来修改抗体可变区的非 CDR 表面, 从而使该表面模拟靶宿主的已知抗体的表面。在例如美国专利第 5, 639, 641 号中, 公开了抗体表面重塑的策略和方法以及用于降低抗体在不同宿主中的免疫原性的其他方法。可以通过包括噬菌体展示法在内的本领域的多种已知方法来制造人抗体。另外参见美国专利第 4, 444, 887、4, 716, 111、5, 545, 806 和 5, 814, 318 号; 和国际专利申请公布 W098/46645、W098/50433、W098/24893、W098/16654、W096/34096、W096/33735 和 W091/10741。

[0378] 本文中将至下述物称为工程靶向抗体: 已受到任何非天然修饰的靶向抗体, 例如嵌合人 / 小鼠抗体或嵌合人 / 猴抗体, 人源化抗体或经改造可以例如提高其对靶细胞的亲和力或降低其免疫原性的抗体, 还有抗体片段, 尤其是此类已受到任何非天然修饰的靶向抗体的功能性片段, 微型双功能抗体; 结构域抗体; 线状抗体; 单链抗体分子; 和多特异性抗体。

[0379] 嵌合抗体保持了非人抗体 (例如, 其所基于的鼠抗体) 的抗体结合区域 (ABR 或 Fab 区), 而任何恒定区可以由例如人抗体来提供。通常, 嵌合和 / 或抗体的恒定区交换不会影响抗体的亲和力, 因为参与抗原结合的抗体区域不受此交换的影响。在本发明的优选实施方式中, 本发明的工程抗体, 特别是嵌合抗体, 其结合亲和力 (由  $K_D$  值表示) 可以高于其所基于的相应非人抗体。特别的是, nBT062 抗体及基于其的抗体的抗体亲和力可以高于鼠 B-B4。

[0380] 在本发明另一个优选实施方式中, 包含这些工程抗体 / 嵌合抗体的免疫偶联物也显示出此更高的抗体亲和力。在某些实施方式中, 这些免疫偶联物还可以显示出其他有利性质, 例如肿瘤负荷的降低程度比包含 B-B4 的其对应免疫偶联物的更高。在优选实施方式中, 工程靶向抗体特别是嵌合靶向抗体显示出以小于 1.6、小于 1.5 或者约 1.4 或小于 1.4

的解离常数  $K_D$  (nM) 为特征的结合亲和力,而与其鼠对应物的抗体亲和力以约 1.6 或大于 1.6 的解离常数  $K_D$  (nM) 为特征。包含靶向剂(例如靶向抗体)的免疫偶联物可以以优选小于 2.6、小于 2.5、小于 2.4、小于 2.3、小于 2.2、小于 2.1、小于 2.0、小于 1.9 或约 1.9 的解离常数  $K_D$  (nM) 为特征,而包含鼠对应抗体的免疫偶联物可以以约 2.6 或大于 2.6 的解离常数  $K_D$  (nM) 为特征(比较表 12,材料和方法)。

[0381] 基础抗体分子是双功能结构,其中可变区结合抗原,同时剩余的恒定区可以引发不依赖于抗原的应答。抗体的主要类别,即 IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM,是通过恒定区来确定的。这些类别可以进一步划分为亚类(同种型)。例如,IgG 类别具有 4 个同种型,即 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4,这些同种型是通过恒定区来确定的。在各种人抗体类别中,仅人 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgM 已知可以有效地激活补体系统。虽然恒定区不构成抗原结合部位,恒定区和铰链区的构造可以对分子赋予区段性的柔性,该柔性使得该分子可以与抗原结合。

[0382] 不同的 IgG 同种型可以结合诸如单核细胞、B 细胞核 NK 细胞等细胞上的 Fc 受体,从而激活细胞以使之释放细胞因子。不同的同种型还可以激活补体,从而导致局部或全身性的炎症。特别的是,不同的 IgG 同种型可以以不同的程度结合 Fc  $\gamma$  R。Fc  $\gamma$  R 是属于 Ig 超家族的一组表面糖蛋白,其主要在白细胞上表达。Fc  $\gamma$  R 糖蛋白分为三个类别,即 Fc  $\gamma$  RI (CD64)、Fc  $\gamma$  RII (CD32) 和 Fc  $\gamma$  RIII (CD16)。IgG1、IgG2 和 IgG3 与各种这些 Fc  $\gamma$  R 糖蛋白类别牢固结合,而 IgG4 却显示出弱得多的结合。特别的是,IgG4 是 Fc  $\gamma$  RI 的中等结合物,其引起相对低的 ADCC(抗体依赖性细胞介导的细胞毒性)或甚至不引起 ADCC,并且不结合 Fc  $\gamma$  RIIIA 或 Fc  $\gamma$  RIIB。IgG4 是抑制性受体 Fc  $\gamma$  RIIB 的弱结合物。此外,IgG4 仅介导微弱的补体结合或不介导补体结合(complement fixation),且仅介导微弱的补体依赖性细胞毒性(CDC)或不介导 CDC。在本发明的情况下,可以具体采用 IgG4 来防止 Fc 介导的对肝 FcR 的靶向,这是因为 IgG4 不显示与 LSEC(肝窦状隙内皮细胞)上的 Fc  $\gamma$  RII 的相互作用,不显示或显示出微弱的与 Kupffer 细胞(巨噬细胞)上的 Fc  $\gamma$  RI-III 的相互作用,且不显示与肝 NK 细胞上的 Fc  $\gamma$  RIII 的相互作用。进一步减少任何 CDC 的某些突变也是本发明的一部分。例如,已显示位于位置 327、位置 330 和位置 331 处的 IgG4 残基可减少 ADCC(抗体依赖性细胞介导的细胞毒性)和 CDC(Amour, 1999 ;Shields, 2001)。使抗体稳定的更多突变之一也是本发明的一部分(在本文中亦称其为“稳定化突变”)。这些突变特别包括 IgG4 的 CH2 区中的亮氨酸至谷氨酸的突变和 IgG4 铰链核心中的丝氨酸至脯氨酸的交换。在本发明的某些实施方式中,这些突变使半分子的数量减少到了小于 10%、小于 5% 且优选到小于 2% 或 1%。此外,如此稳定化的抗体的体内半衰期可以提高若干天,包括 1 天、2 天、3 天、4 天或多于 5 天(Schuurman, 1999)。

[0383] 当本发明述及包含赋予 IgG4 同种型性质的工程靶向抗体的免疫偶联物时,其意思是,该工程靶向抗体显示的与表达 Fc 受体的细胞的亲和力比 IgG1 同种型抗体显著降低。优选由明显有别于 ABR 的另外的抗体区来赋予这些性质,其中,所述另外的抗体区在人抗体的全部或部分中。结果是,与用 IgG1 同种型抗体所通常观察到的诱导 CDC 或 ADCC 的潜力相比,诱导 CDC 或 ADCC 的潜力显著降低(相对于其 IgG1 同种型对应抗体降低超过 90%)或完全失去。通过使用处于其未偶联形式的工程靶向抗体,可以在细胞类测定中测量该性质。CDC 和 ADCC 可以通过不同的方法来测量,例如在 Cancer Immunol. Immunother., 36, 373(1993)中公开的方法或 GUAVA 细胞毒性测定。对于包含至少一部分赋予 IgG4 同种型性

质的工程靶向抗体的免疫偶联物,其总体益处是对结合特异性的改进和降低的毒性。所得到的降低的与 Fc 受体的亲和力还提高了对肿瘤细胞的抗原特异性靶向,从而使针对 CD138 阴性的细胞的毒性降低。

[0384] 对于本文公开的包括靶向抗体在内的靶向剂,还可以就其与抗原特别是与 CD138 的结合亲和力来对其进行描述或说明。靶向剂(如靶向抗体)的优选结合亲和力的特征为小于 1.6、小于 1.5 或者约 1.4 或小于 1.4 的解离常数  $K_D$  (nM)。对于包含所述靶向剂(如靶向抗体)的免疫偶联物,解离常数  $K_D$  (nM) 优选小于 1.6、小于 1.5 或小于 2.5、小于 2.4、小于 2.3、小于 2.2、小于 2.1、小于 2.0、小于 1.9 或约为 1.9。

[0385] 本发明的抗原结合区(ABR)将根据所采用的靶向抗体或工程靶向抗体的类型而有所不同。在天然存在的抗体中以及多数嵌合和人源化抗体中,抗原结合区是由重链的前 2 个结构域和轻链构成的。然而,在不含轻链的重链抗体中,抗原结合区将仅由例如重链的前 2 个结构域构成,而在将抗体分子的轻链和重链可变结构域组合在单多肽链中的单链抗体(ScFv)中,ABR 仅由一条多肽分子提供。FAB 片段通常通过木瓜蛋白酶消化来获得,且具有一条轻链和部分重链,因此包含仅具有一个抗原组合部位的 ABR。另一方面,微型双功能抗体是具有两个抗原结合区的小抗体片段。然而,在本发明的情况下,靶向抗体或工程靶向抗体的抗原结合区是主要决定该靶向抗体或工程靶向抗体的结合特异性的任何区域。

[0386] 如果称 ABR 或另一靶向抗体区“属于某个抗体”,例如人或非人抗体,其在本发明的情况下意思是 ABR 与对应的天然存在的 ABR 相同或基于对应的天然存在的 ABR。如果 ABR 具有天然存在的 ABR 的结合特异性,则该 ABR 基于天然存在的 ABR。然而,这种 ABR 可以包含例如点突变、添加、缺失或翻译后修饰(例如糖基化)。特别而言,这种 ABR 与天然存在的 ABR 序列可以具有超过 70%、超过 80%、超过 90%、优选超过 95%、超过 98% 或超过 99% 的序列同一性。

[0387] nBT062(另见图 1)是鼠人嵌合 IgG4mAb,即嵌合版本的 B-B4。制造该嵌合版本的 B-B4 是为了降低 HAMA(人抗小鼠抗体)应答,同时保持针对 CD138 的 B-B4 的抗体结合区域的功能性。令人惊奇的是,使用包含此工程靶向抗体的免疫偶联物而获得的结果要均一得多(减小了结果间的差异)。下文详述了制造 nBT062 的操作规程。表达 nBT062 的中华仓鼠卵巢细胞已于 2007 年 12 月 11 日保藏于 DSMZ-德国微生物菌种保藏中心(DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig)。保藏号为 DSM ACC2875。基于 B-B4 的 CD138 特异性嵌合抗体在本文中通常称作 c-B-B4。

[0388] 已经从对 nBT062 的核苷酸序列的翻译中预测了重链和轻链的氨基酸序列。将重链和轻链的预测氨基酸序列示于表 4 中。预测的可变区为粗体,预测的 CDR 有下划线。

[0389] 表 4. nBT062 的预测的氨基酸序列

[0390] -nBT062 重链预测序列(SEQ ID NO:1):

[0391]

```

1      QVQLQQSGSE LMMPGASVKI SCKATGYTFS NYWIEWVKQR PGHGLEWIGE
51     ILPGTGRTIY NEKFKGKATF TADISSNTVQ MQLSSLTSED SAVYYCARRD
101    YYGNFYIAMD YWGQGTSTVTV SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL
151    VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTPVSSSLGT
201    KTYTCNVDPK PSNTKVDKRV ESKYGPPCPD CPAPEFLGGP SVFLFPPKPK
251    DTLNISRTPE VTCVVDVDSQ EDPEVQFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQFNS
301    TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKGL PSSIEKTISK AKGQPREPQV
351    YTLPPSQEEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPVL
401    DSDGSFFLYS RLTVDKSRWQ EGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLGLG (K)

```

[0392] C 端赖氨酸易于受到剪切,并可能因某种程度的不完全剪切而存在。括号中的 (K) 并不是 SEQ ID NO :1 的部分。

[0393] -nBT062 轻链预测序列 (SEQ ID NO :2) :

[0394]

```

1      DIQMTQSTSS LSASLGDRVT ISCSASQGIN NYLNWYQQKP DGTVELLIYY
51     TSTLQSGVPS RFSGSGSGTD YSLTISNLEP EDIGTYQCQQ YSKLPRTFGG
101    GTKLEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY PREAKVQWKV
151    DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG
201    LSSPVTKSFN RGEK

```

[0395] 表 5. 显示了对 Krabat 和 Chothia 的一般 CDR 定义和预测的 nBT062 的 CDR 的比较。

[0396]

### Kabat CDR 定义

### nBT062

|    |                |                       |
|----|----------------|-----------------------|
| 轻链 | CDR1: 残基 24-34 | <u>CDR1: 残基 24-34</u> |
|    | CDR2: 残基 50-56 | <u>CDR2: 残基 50-56</u> |
|    | CDR3: 残基 89-97 | <u>CDR3: 残基 89-97</u> |

[0397]

|    |                 |                       |
|----|-----------------|-----------------------|
| 重链 | CDR1: 残基 31-35  | <u>CDR1: 残基 31-35</u> |
|    | CDR2: 残基 50-56  | CDR2: 残基 51-68        |
|    | CDR3: 残基 95-102 | CDR3: 残基 99-111       |

**Chothia CDR 定义****nBT062**

|    |                |                |
|----|----------------|----------------|
| 轻链 | CDR1: 残基 26-32 | CDR1: 残基 24-34 |
|    | CDR2: 残基 50-52 | CDR2: 残基 50-56 |
|    | CDR3: 残基 91-96 | CDR3: 残基 89-97 |

|    |                 |                 |
|----|-----------------|-----------------|
| 重链 | CDR1: 残基 26-32  | CDR1: 残基 31-35  |
|    | CDR2: 残基 52-56  | CDR2: 残基 51-68  |
|    | CDR3: 残基 96-101 | CDR3: 残基 99-111 |

[0398] 还可以使用完全人抗体。可以通过噬菌体展示方法来选择这些抗体，其中使用了 CD138 或其抗原决定簇来选择性地结合表达例如 B-B4 可变区的噬菌体（参见 Krebs, 2001）。将该方法有利地与亲和力成熟技术结合以提高抗体的亲和力。本文所述的所有抗体是分离的抗体（参见美国专利公布 20090175863）。

[0399] 在一个实施方式中，处于未偶联形式的靶向抗体的内化程度中等或较差。于 37℃ 温育 3 小时后，中等内化为约 30% - 约 75% 的全部抗体内化，较差内化为约 0.01% 至最多约 30% 的内化。在另一个优选实施方式中，靶向抗体结合 CD138，例如，抗体 B-B4、BC/B-B4、B-B2、DL-101、1D4、MI15、1. BB. 210、2Q1484、5F7、104-9、281-2，特别是 B-B4。通过使 SP02/0 骨髓瘤细胞与 Balb/c 小鼠脾细胞杂交而产生的杂交瘤细胞已于 2007 年 12 月 11 日保藏于 DSMZ- 德国微生物菌种保藏中心 (DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg1, D-38124 Braunschweig)。这些表达 B-B4 的杂交瘤细胞的保藏号为 DSM ACC2874。在另一个实施方式中，靶向抗体基本不与非细胞表面所表达的 CD138 结合。当在本发明的情况下将特定抗体的名称与术语“靶向抗体”组合时，例如“nBT062 靶向抗体”，其意思是该靶向抗体具有抗体 nBT062 的结合特异性。如果称靶向抗体是“基于”特定抗体，其意思是该靶向抗体具有该抗体的结合特异性，但可以采取与以上对靶向抗体的描述相符的任何形式。当在本发明的情况下将特定抗原的名称与术语“靶向抗体”组合时，例如“CD138 靶向抗体”，其意思是该靶向抗体具有针对 CD138 的结合特异性。如果在本发明的情况下，举例而言，称靶向抗体“选择性地”作某事（例如，“选择性地靶向细胞表面所表达的 CD138”）或对某物有“选择性”，其意思是，在所提供的实例情况下，与细胞表面所表达的任何其他抗原相比，对细胞表面所表达的 CD138 有显著的选择性（即，对 CD138 阳性细胞的亲和力高于 CD138 阴性细胞）。由于此选择性，可以大幅度减少或甚至

避免指定环境中的不良副作用。

[0400] 本发明的“非免疫球蛋白靶向分子”包括源自非免疫球蛋白蛋白的靶向分子以及非肽靶向分子。该定义中所包括的非免疫球蛋白小蛋白经设计而对特别是表面所表达的 CD138 具有特异亲和力。这些非免疫球蛋白小蛋白包括基于支架 (scaffold) 的工程分子, 例如 AFFILIN 分子, 其分子量较低, 例如 10kDa-20kDa。适合的框架包括例如  $\gamma$  晶型。这些分子在其天然状态时对靶分子没有特异的结合活性。通过对暴露于溶剂的氨基酸进行局部限定的随机化来改造蛋白表面, 从而产生了全新的结合部位。由此将之前的非结合性蛋白转化成了特异性的结合蛋白。此类分子可以经特定设计而结合靶标 (例如 CD138) 且使得可以对一种或多种效应物分子进行特定递送 (参见 [www.scilproteins.com](http://www.scilproteins.com) 上的 scil Proteins GmbH, 2004)。另一类非免疫球蛋白靶向分子源自脂质运载蛋白 (lipocalin), 且包括例如 ANTICALINS, 其在结构上与免疫球蛋白有些类似。然而, 脂质运载蛋白由具有 160-180 个氨基酸残基的单多肽链构成。可以将脂质运载蛋白的结合口袋重新塑形, 从而使之以更高的亲和力和特异性识别感兴趣的分子 (参见例如 Beste 等, 1999)。人造细菌受体, 例如以商标市售的那些 (AffibodyAB), 也在本发明的范围内。这些人造细菌受体分子是小的简单蛋白, 并且可以由三螺旋束构成, 所述三螺旋束基于蛋白 A (金黄色葡萄球菌) 的一个 IgG 结合结构域的框架。这些分子具有与多种免疫球蛋白相似的结合性质, 但要更小, 其分子量通常不超过 10kDa, 并且也比较稳定。适合的人造细菌受体分子在例如美国专利第 5, 831, 012、6, 534, 628 和 6, 740, 734 号中有所描述。

[0401] 其他“非免疫球蛋白靶向分子”是所讨论的抗原的生理配体。CD138 的生理配体例如包括但不限于: ADAMTS4 (聚蛋白多糖酶 -1 (aggrecanase-1))、抗凝血酶 -3、bFGF、组织蛋白酶 G、CCL5 (RANTES)、CCL7、CCL11、CCL17、CD44、胶原蛋白 (1 型胶原蛋白、2 型胶原蛋白、3 型胶原蛋白、4 型胶原蛋白、5 型胶原蛋白、6 型胶原蛋白)、CXCL1、弹性蛋白酶、gp120、HGF [肝细胞生长因子]、层粘附蛋白 -1、层粘附蛋白 -2、层粘附蛋白 -5、中期因子 (midkine)、MMP-7、中性粒细胞弹性蛋白酶和多效蛋白 (pleiotrophin) (HBNF、HBGF-8)。非肽靶向分子包括但不限于结合 CD138 的 DNA 和 RNA 寡核苷酸 (适体)。

[0402] 本发明的“效应物分子”是分子或其衍生物或类似物, 其结合至靶向剂 (特别是靶向抗体和 / 或工程靶向抗体) 并产生所需的效应, 例如, 凋亡或其他类型的细胞死亡, 或对靶细胞的持续细胞周期停滞。本发明的效应物分子包括能够在靶细胞中产生所需效应的分子, 且包括但不限于细胞毒性药物, 包括低分子量的细胞毒性药物 (分子量小于 1500Da、优选小于 1400Da、小于 1200Da、小于 1000Da、小于 800Da、小于 700Da、小于 600Da、小于 500Da、小于 300Da, 但通常大于 120Da)。根据本发明, 这些细胞毒性药物通常是非蛋白质的生物细胞毒性药物, 并且包含另一细胞毒性药物或在施用时诱导另一细胞毒性药物的产生, 所述另一细胞毒性药物具有至少 5 个碳原子、10 个碳原子、优选多于 12 个碳原子、经常多于 20 个碳原子且有时多于 30、40 或 50 个碳原子, 且通常具有至少一个环结构, 例如苯环, 该环结构如苯环经常具有取代基。然而, 经常相互连接的环结构是这些分子的一部分。这些非蛋白质的生物细胞毒性药物可以嵌入 DNA 中 (DNA 嵌入剂) 或使 DNA 烷基化, 抑制微管形成, 是有丝分裂抑制剂、DNA 结构完整性所涉及的酶 (例如组蛋白脱乙酰基) 的抑制剂或对细胞至关重要的酶的抑制剂, 且引起对细胞代谢的破坏。还可以将效应物分类为放射性核素、生物响应修饰剂、成孔剂 (pore-forming agent)、核糖核酸酶、具有凋亡诱导活性的凋亡信

号传导级联蛋白、反义寡核苷酸、抗代谢剂、抗氧化性物质、抗体或细胞因子以及其功能性衍生物或类似物 / 片段。

[0403] 在优选实施方式中,特别是当免疫偶联物的靶向抗体所基于的抗体的天然形式可内化性较差时,效应物分子提高免疫偶联物的内部效应物递送。在另一个优选实施方式中,效应物在处于其原生形式时是非选择性的。在某些实施方式中,效应物在处于其原生形式时具有较高的非选择性毒性,包括全身性毒性。本发明的效应物分子的“原生形式”是在连接到靶向剂以形成免疫偶联物之前的效应物分子。在另一个优选实施方式中,效应物分子的非选择性毒性在与靶向剂偶联时基本消失。在又一个优选实施方式中,效应物分子在到达靶细胞时在靶细胞中引起细胞死亡或细胞周期停滞(包括持续的细胞周期停滞)。

[0404] 本发明的效应物分子包括但不限于抗肿瘤试剂,特别是下文定义的细胞内化疗剂。

[0405]

| 效应物                                               | 分子量(g/mol [Da]) |
|---------------------------------------------------|-----------------|
| 多柔比星(Doxorubicin)                                 | 564             |
| 道诺霉素(Danurubicin)                                 | 528             |
| 长春碱(Vinblastin)                                   | 811             |
| 多西他赛(Docetaxel)                                   | 808             |
| 紫杉醇(Paclitaxel)                                   | 854             |
| 埃博霉素 B (Epothilone B)                             | 508             |
| 伏立诺他(Vorinostat)                                  | 264             |
| 新制癌菌素(Neocarzinostatin)                           | 660             |
| 卡奇霉素 $\gamma$ 1 (Calicheamicin $\gamma$ 1)        | 1368            |
| 埃斯培拉霉素(Esperamicin)                               | 1342            |
| 氨甲喋呤(Methotrexate)                                | 454             |
| 水飞蓟素组分(Sylimarin components)                      | 482             |
| 马索罗酚(Masoproco)                                   | 302             |
| 氨基乙酰丙酸(Aminolevulinic acid)                       | 132             |
| 米替福新(Miltefosine)                                 | 407             |
| 表没食子儿茶素没食子酸酯<br>(Epigallocatechin gallate) (EGCG) | 459             |
| 补骨脂素(Psoralene)                                   | 186             |
| 美法仑(Melphalan)                                    | 304             |

[0406] 表 6 提供了可以作为效应物分子的低分子量细胞毒性药物的实例。

[0407] 低分子量细胞毒性药物（分子量见上）可以优选是抗有丝分裂剂，更特别而言，是影响微管蛋白的试剂，其包括微管蛋白聚合的抑制剂，例如类美登醇、海兔毒素（及衍生物，如奥瑞斯汀（auristatin）和羧酚肽（cryptophycin），以及强力的紫杉类化合物（紫杉烷）药物（Payne, 2003）。小分子高细胞毒性药物的定义中还包括其他微管蛋白干扰剂，例如埃博毒素（epothilone）类（例如，伊沙匹隆（ixabepilone）），和秋水仙碱衍生物（下文进一步讨论了微管蛋白干扰剂）。

[0408] 效应物分子类美登醇包括具有任何来源的类美登醇，包括但不限于合成的美登醇和美登醇的类似物及衍生物。

[0409] 美登素是最初源自埃塞俄比亚灌木美登木（*Maytenus serrata*）的天然产物（Remillard, 1975；美国专利第 3, 896, 111 号）。该药物抑制微管蛋白聚合，导致有丝分裂阻断和细胞死亡（Remillard, 1975；Bhattacharyya, 1977；Kupchan, 1978）。美登素的细胞毒性比临床使用的影响微管蛋白聚合的抗癌药物（例如长春花生物碱和紫杉酚（taxol））的细胞毒性高 200–1000 倍。然而，美登素的临床试验表明其因较高全身性毒性而缺乏治疗前景。美登素和类美登醇具有高细胞毒性，但是，其严重的全身性副作用极大地限制了其在癌症治疗中的临床应用，该副作用主要由于其对肿瘤的较差选择性。用美登素进行的临床试验显示出对中枢神经系统和胃肠系统的严重不良作用。

[0410] 已经从包括滑桃树（*Trewia nudiflora*）种子组织在内的其他植物中分离出了类美登醇（美国专利第 4, 418, 064 号）。

[0411] 某些微生物也产生类美登醇，例如美登醇和 C-3 美登醇酯（美国专利第 4, 151, 042 号）。

[0412] 本发明涉及具有任何来源的类美登醇，包括以下专利所公开的合成美登醇和美登醇类似物：例如，美国专利第 4, 137, 230、4, 248, 870、4, 256, 746、4, 260, 608、4, 265, 814、4, 294, 757、4, 307, 016、4, 308, 268、4, 308, 269、4, 309, 428、4, 313, 946、4, 315, 929、4, 317, 821、4, 322, 348、4, 331, 598、4, 361, 650、4, 362, 663、4, 364, 866、4, 371, 533、4, 424, 219 和 4, 151, 042 号。

[0413] 在优选实施方式中，类美登醇是含巯基的类美登醇，且更优选根据 Chari 等的美国专利第 6, 333, 410 号或 Chari 等（Chari, 1992）中所公开的方法来制造。

[0414] 在本发明的情况下，DM-1（N<sup>2</sup>-去乙酰基-N<sup>2</sup>-(3-巯基-1-氧代丙基)-美登素）是优选的效应物分子。DM1 的细胞毒性比美登素大 3 ~ 10 倍，并且已通过用二硫键将 DM1 连接到针对肿瘤相关抗原的单克隆抗体上而将 DM1 转变成了前药。这些偶联物（有时称作“肿瘤激活的前药”（TAP））中的某些在血液隔室中并无细胞毒性，这是因为其在与靶细胞联结并被内化时得到激活，从而释放药物（2001）。已开发了若干种抗体-DM1 偶联物（Payne, 2003），且已在临床试验中对其进行了评估。例如，对结肠直肠癌患者的 huC242-DM1 治疗得到了良好的耐受，不诱导任何可检测的免疫应答，且循环时间长（Tolcher, 2003）。

[0415] 其他特别优选的类美登醇包含具有空间位阻的巯基键的侧链，例如但不限于类美登醇 N<sup>2'</sup>-去乙酰基-N<sup>2'</sup>-(4-巯基-1-氧代戊基)-美登素，亦称作“DM3”，和 N<sup>2'</sup>-去乙酰基-N<sup>2'</sup>-(4-甲基-4-巯基-1-氧代戊基)-美登素，亦称作“DM4”。DM4 的合成示于图 3 和图 4 中，并且在本文别处有所描述。DM4 与 DM1 和 DM3 的不同之处在于 DM4 在其 α C 上带有

甲基。这在 DM4 通过连接物（特别是，但不限于，包含二硫键的连接物）连接到靶向剂（例如 nBT062）上时造成了空间位阻。美国专利公布 2004/0235840（公布于 2004 年 11 月 25 日，并通过引用将其完整地并入本文）公开了带有空间位置受阻的巯基的多种的类美登醇（具有一个或两个取代基，特别是烷基取代基，例如 DM4 的甲基取代基）。DM3 和 DM4 的与硫原子相邻的碳原子上的烷基（例如甲基）所带来的空间位阻可以影响免疫偶联物的细胞内切割速率。可变的烷基单元因此可以影响体外和体内的效力、功效和安全性 / 毒性。

[0416] 据 Goldmahker 等在美国专利公布 2006/0233814 中的报道，一旦药物在其靶标处得到释放，这种位阻会诱导游离药物的烷基化（例如，甲基化）。该烷基化可以提高药物的稳定性，从而使得所谓的旁观者效应可以出现。然而，本领域的技术人员将意识到，含有位于当用连接物将效应物连接到靶向剂上时会造成空间位阻的位置上的取代基（例如烷基）的其他效应物分子也是本发明的一部分（美国专利公布 2004/0235840）。优选的是，该位阻诱导化学修饰（例如游离药物的烷基化）来提高其总体稳定性，这使得该药物不仅可以在表达 CD138 的肿瘤细胞中诱导细胞死亡或持续的细胞周期停滞，而且还可以可选地影响例如通常不表达 CD138 的辅助细胞，例如支持或保护肿瘤不受药物影响的辅助细胞（特别是肿瘤基质和肿瘤脉管系统的细胞），从而使其支持或保护功能减弱或丧失。

[0417] 在 I 期和 II 期临床试验中评估了美登素，该临床试验由美国国家癌症中心 (NCI) 依 IND#11,857（于 1975 年 9 月 19 日提交至 FDA）而资助。在血液恶性肿瘤患者中观察到了完全响应和部分响应，在患有广谱实体瘤的患者中观察到了部分响应 (Blum 和 Kahlert, 1978 ; Issell 和 Crooke, 1978 ; Chabner 等, 1978 ; Eagan 等, 1978 ; Cabanillas 等, 1978)。但是却注意到了明显的毒性，包括恶心、呕吐、腹泻、肝功能检测升高、嗜睡和外周神经病（参见美登素 IND#11,857，年度报告，1984 年 2 月；Blum 和 Kahlert, 1978 ; Issell 和 Crooke, 1978 ; Chabner 等, 1978）。毒性效果阻止了进一步的开发。

[0418] 在另一实施方式中，效应物分子可以表示紫杉烷。紫杉烷是一类微管蛋白干扰剂 (Payne2003)。紫杉烷是有丝分裂纺锤体毒，其抑制微管蛋白的解聚，导致微管装配速率升高和细胞死亡。在例如美国专利第 6,436,931、6,340,701、6,706,708 号和美国专利公布 20040087649、20040024049 和 20030004210 中，公开了本发明范围内的紫杉烷。在例如美国专利第 6,002,023 号、美国专利第 5,998,656 号、美国专利第 5,892,063 号、美国专利第 5,763,477 号、美国专利第 5,705,508 号、美国专利第 5,703,247 号和美国专利第 5,367,086 号中公开了其他紫杉烷。本发明的优选实施方式可以是高效力的包含巯基或二硫化物基团的紫杉烷。如本领域技术人员将意识到的，PEG 基化的紫杉烷（例如美国专利第 6,596,757 号中描述的那些）也在本发明的范围内。

[0419] 本发明包括影响 DNA 的其他效应物分子，更特别的是，嵌入试剂，例如蒽环类及衍生物（道诺霉素 (daunorubicin)、戊柔比星 (valrubicin)、多柔比星 (doxorubicin)、阿柔比星 (acliarubicin)、表柔比星 (epirubicin)、伊达比星 (idarubicin)、氨柔比星 (amrubicin)、吡柔比星 (pirarubicin)、佐柔比星 (zorubicin))，和蒽二酮类，例如链霉素衍生的物质（放线菌素、丝裂霉素、博来霉素、放线菌素 A(aactinomycin)）或安吡啶。

[0420] 效应物分子可以是更特别的 DNA 烷基化剂，例如，且更特别是氮芥及类似物（例如环磷酰胺、美法仑、雌氮芥）、烷基磺酸酯、亚硝基脲、环乙亚胺、胍、乙烯亚胺以及诸如三亚胺醌 (Trenimon) 和二溴甘露醇（甘露醇类似物）等其他物质。特别的是，优选的 DNA 烷基

化剂是 CC-1065 类似物或衍生物（美国专利第 5,475,092、5,585,499、6,716,821 号）和倍癌霉素 (duocarmycin)。

[0421] CC-1065 是强力的抗肿瘤抗生素，其分离自泽耳链霉菌 (*Streptomyces zelensis*)，且已在体外显示出其具有突出的细胞毒性（美国专利第 4,169,888 号）。本发明的范围内还包括例如美国专利第 5,475,092、5,585,499、5,739,350 号中所描述的 CC-1065 类似物或衍生物。本领域技术人员将容易地意识到，美国专利第 5,846,545 号中所描述的经修饰的 CC-1065 类似物或衍生物，和例如美国专利第 6,756,397 号中所描述的 CC-1065 类似物或衍生物的前药，也在本发明的范围内。在本发明的某些实施方式中，可以例如按照美国专利第 6,534,660 号中的描述来合成 CC-1065 类似物或衍生物。

[0422] 还包括了其他 DNA 烷基化效应物分子，例如铂类物质（如，卡铂 (carboplatin)、奈达铂 (nedaplatin)、奥沙利铂 (oxaliplatin)、三铂 (triplatin)、沙铂 (satraplatin)）。

[0423] 在影响 DNA 的效应物分子中，还包括了拓扑异构酶 I 和 II 的抑制剂，例如喜树属 (*Camptotheca*) 来源的物质（贝洛替康 (belotecan)、拓扑替康 (topotecan)）和鬼臼毒素及衍生物（依托泊苷、替尼泊苷）。

[0424] 影响 DNA 的效应物分子的其他亚类包括抗代谢物，例如叶酸类似物（氨甲喋呤，已知是二氢叶酸还原酶抑制剂）或氨基喋呤。还包括干扰嘌呤或嘧啶代谢的代谢物，特别是腺苷脱氨酶抑制剂（喷司他丁 (pentostatin)）或卤化的 / 核糖核苷酸还原酶抑制剂（克拉屈滨 (cladribine)、氯法拉滨 (clofarabine)、硫代嘌呤和噻唑呋林。其他抗代谢物包括 DNA 聚合酶抑制剂（阿糖胞苷）、核糖核苷酸还原酶抑制剂（吉西他滨）和低甲基化剂（阿扎胞苷、丁西他滨）和核糖核苷酸还原酶抑制剂。更常见的还包括 DNA 交联物质，例如顺铂。

[0425] 本发明的效应物分子可以是抗肿瘤抗生素，其定义为修饰或损伤 DNA 的效应物分子，包括烯二炔抗生素，例如卡奇霉素 (calicheamicin，其包括例如  $\gamma$  II, N-乙酰基卡奇霉素和卡奇霉素的其他衍生物)。卡奇霉素以序列特异性方式结合 DNA 的小沟，发生重排并露出自由基，从而导致双链 DNA 的断裂，进而导致细胞凋亡和死亡。美国专利第 5,053,394 号中描述了在本发明的情况下可以使用的卡奇霉素效应物分子的一个实例。该化合物与单克隆抗体一起用于免疫偶联物中，且公布为吉姆单抗奥佐米星 (gemtuzumab ozogamicin) 和伊珠单抗奥佐米星 (inotuzumab ozogamicin)。

[0426] 烯二炔的亚组包括色素蛋白埃斯培拉霉素 (esperamycin) 和新制癌菌素。特别而言，曲贝替定 (trabectedin)，其也被归为 DNA 损伤剂类别（抗肿瘤抗生素）？曲贝替定引起 DNA 骨架断裂，其可以分离自海鞘（亦称其为海鞘素 (ecteinascidin) 743 或 ET-743)，由 ZELITA 和 JOHNSON & JOHNSON 以品牌名 YONDELIS 销售。

[0427] 另一组优选效应物分子是诸如但不限于影响细胞代谢的毒素等物质。特别而言，酶抑制剂（例如但不限于 :0laprib 或更优选的蛋白酶体（例如硼替佐米）和蛋白激酶抑制剂，或脂肪氧合酶抑制剂（例如马索罗酚））是本发明的一部分。还包括受体拮抗剂，例如但不限于内皮素 A 受体拮抗剂（例如阿曲生坦 (atrasentan)）或性类固醇（例如干扰雌酮代谢的睾内酯）。另外包括了与雌激素受体相互作用的物质，例如植物衍生的多酚，例如但不限于被称作植物雌激素的类异黄酮、芪、水飞蓟素、苯丙素苷 (phenylpropanoid glycoside)。

[0428] 还适合作为效应物分子的是影响细胞代谢的物质,例如用于光动力疗法或放射疗法的物质,包括但不限于卟啉衍生物(例如 $\delta$ -氨基乙酰丙酸)。乙丙昔罗(efaproxiral)是放射致敏剂,其通过降低血红蛋白-氧亲和力来提高氧水平。还包括类维生素A(第一、第二和第三代),特别是维甲酸(tretinoine),即全反式视黄酸(ATRA),用来治疗急性早幼粒细胞白血病(APML),由ROCHE针对此适应症以品牌名VESANOID销售。类维生素A是在化学上与维生素A相关的一类化合物,其发挥多种功能,例如激活肿瘤抑制基因。目前,其用来治疗皮肤癌和炎性皮肤病症。

[0429] 在另一优选实施方式中,效应物分子可以影响信号传导途径,例如但不限于钙信号传导。实例是三氧化二砷或氯化三甲基锡,其中后者是具有较高毒性的有机锡化合物。

[0430] 本发明还包括影响抗药性机制的效应物分子,其可以包括例如抗多药物抗性(anti-multidrug resistance activity)(通过P-糖蛋白抑制)。二环杂芳族化合物及衍生物可以作为非限制性实例。

[0431] 另一个效应物分子类别可以包括干扰凋亡信号传导途径的物质或更特别为蛋白,包括但不限于反义寡核苷酸,更特别为寡脱氧核苷酸,例如oblimersen(INN,商品名genasense;亦称augmerosen和bcl-2反义寡脱氧核苷酸G3139),其为实际上作为对若干类型癌症(包括慢性淋巴白血病、B细胞淋巴瘤和乳腺癌)的可能的治疗而被研究的反义寡脱氧核糖核苷酸。已提出,该化合物可以通过阻断Bcl-2的产生并通过使癌细胞对化疗更敏感而杀死癌细胞。可以作为效应物分子的其它诱导凋亡类的物质包括植物多酚,例如但不限于水飞蓟素,其能够干扰细胞周期调节因子和参与凋亡的蛋白。

[0432] 效应物分子可以是蛋白质,例如那些具有凋亡诱导活性的凋亡信号传导级联蛋白,包括但不限于粒酶(Granzyme)B、粒酶A、半胱天冬酶-3、半胱天冬酶-7、半胱天冬酶-8、半胱天冬酶-9、截短的Bid(tBid)、Bax和Bak。

[0433] 其他效应物分子可以包括酶,例如但不限于天门冬酰胺酶或具有抗肿瘤活性的其他酶。

[0434] 本发明的药物-效应物分子还可以是抗原生动物药物,例如米替福新。

[0435] 在另一个实施方式中,效应物分子可以是植物多酚,例如但不限于补骨脂素及其羟基代谢物。

[0436] 具有一种上述抗肿瘤活性(例如,诱导凋亡、细胞周期停滞)或其他活性(例如清除自由基、金属螯合活性、雌激素受体干扰活性、抗氧化剂、干扰药物代谢酶)的植物多酚,例如,类黄酮、鞣质(原花色素)、芪类物质、类姜黄素和木脂体也是可能的效应物分子。更具体而言,能够作为具有抗氧化和细胞保护性质的金属螯合物而嵌入DNA的补骨脂素及其羟基代谢物是优选的效应物分子。特别优选的是白藜芦醇及多羟基化的衍生物,以及类黄酮,例如儿茶素和表儿茶素,更具体为表没食子儿茶素3-没食子酸酯,其可以充当抗氧化剂。

[0437] 效应物分子的另一实施方式可以表示毒素。毒素可以包括细菌毒素如,但不限于,白喉毒素或内毒素A,植物毒素如,但不限于,蓖麻毒素、其它生物碱和多酚,霉菌毒素如 $\alpha$ 鹅膏菌素或更特别地鹅膏菌素类和鬼笔毒素类。毒素不仅可以是细菌源的,也可以是真菌、植物、脊椎动物和无脊椎动物源的,其全部可以遗传或化学修饰。此外,毒素也可以是环境毒素如,但不限于二甲基汞。毒素也可以是海兔毒素(dolastoxin)10和海兔毒素15,它们

是从海洋海兔截尾海兔 (*Dolabella auricularia*) 分离出的小肽,其已显示与微管蛋白相互作用。

[0438] 对效应物分子根据其机制进行宽泛分类也是可能的:

[0439] 抗肿瘤药和免疫调节剂(按照 ATC 码 L01)特别是“细胞内化疗剂”

[0440] ATC:解剖学治疗性化学分类系统(WHO)

[0441] 1) 抗有丝分裂剂或影响微管的分子(微管蛋白结合剂),例如长春花生物碱及类似物(长春花生物碱(长春碱、长春新碱、长春氟宁、长春地辛、长春瑞滨)和紫杉烷(紫杉醇、Larotaxel、多西他赛))多拉司他汀(及衍生物,例如奥瑞斯汀)和羧酚肽,美登素和秋水仙碱衍生物,埃博霉素(例如伊沙匹隆)。

[0442] 2) 影响 DNA 复制

[0443] a) 嵌入试剂,例如蒽环类(道诺霉素、戊柔比星、多柔比星、阿柔比星、表柔比星、伊达比星、氨柔比星、吡柔比星、佐柔比星),和蒽二酮类,例如链霉素衍生的物质(放线菌素、丝裂霉素、博来霉素、放线菌素 D)或安吡啶,

[0444] b) 烷基化剂,例如氮芥、亚硝基脲、烷基磺酸酯、环乙亚胺、胍(甲基胍)、三氮烯、环氧化物、乙烯亚胺、六甲蜜胺、二溴甘露醇、倍癌霉素及类似物/立体异构体、三亚胺醌、雌氮芥、CC-1065,

[0445] c) 烷基化样试剂,例如铂(例如,卡铂、奈达铂、奥沙利铂、四硝酸三铂、沙铂),

[0446] d) 拓扑异构酶 I 特异性抑制剂,例如喜树属物质(贝洛替康、拓扑替康),

[0447] e) 拓扑异构酶 II 特异性抑制剂,例如鬼臼毒素及衍生物(依托泊苷、替尼泊苷),

[0448] f) 通过干扰下述物质而影响 DNA/RNA 合成的抗代谢物:

[0449] - 叶酸,例如二氢叶酸还原酶抑制剂(例如氨甲喋呤、氨基蝶呤)、胸苷酸合成酶抑制剂,

[0450] - 嘌呤,例如腺苷脱氨酶抑制剂(喷司他丁)、卤化的/核糖核苷酸还原酶抑制剂(克拉屈滨、氯法拉滨)、硫代嘌呤、噻唑呋林,

[0451] - 嘧啶,例如 DNA 聚合酶抑制剂(阿糖胞苷)、核糖核苷酸还原酶抑制剂(吉西他滨)、低甲基化剂(阿扎胞苷、丁西他滨),

[0452] - 脱氧核糖核苷酸,例如核糖核苷酸还原酶抑制剂羟基脲,

[0453] g) 其他 DNA 交联剂,例如铂类化合物(例如顺铂),

[0454] 3) 其他 DNA 干扰物质,例如,诸如爱萨霉素 A(elsamycin A)等“抗肿瘤/细胞毒性抗生素”,诸如 CC-1065 等其他抗生素,以及抗生素亚类,如细菌来源的烯二炔卡奇霉素或色素蛋白烯二炔埃斯培拉霉素(esperamicin)(极具毒性的 DNA 剪接剂)或新制癌菌素(新制癌菌素抗生素组的其他成员是巨毛霉素、放线菌黄质、可达菌素(kedarcidin)和马杜肽菌素(maduropeptin))或曲贝替定(DNA 骨架断裂),

[0455] 4) 影响细胞代谢的毒素,例如 HSP90 抑制剂、氯尼达明(Lonidamide)(抑制呼吸和糖酵解,从而导致细胞 ATP 减少)

[0456] a) 酶抑制剂,例如 Olaprib(PARP 抑制剂)、CDK 抑制剂(Alvocidib)、蛋白酶体(硼替佐米)、蛋白激酶抑制剂、马索罗酚(脂肪氧合酶抑制剂),

[0457] b) 受体拮抗剂,例如马桑苷(甘氨酸受体拮抗剂(植物毒素))、阿曲生坦、类维生素 X 受体(贝沙罗汀)、诸如甾内酯等性类固醇、雌激素受体干扰物质,

[0458] c) 光敏剂或用于光动力疗法的其他化合物(卟吩姆钠(Porfirmer Sodium))、卟啉衍生物(例如  $\delta$ -氨基乙酰丙酸),

[0459] d) 放射致敏剂,例如乙丙昔罗,其通过降低血红蛋白-氧亲和力来提高氧水平,

[0460] e) 影响信号传导途径(例如,  $\text{Ca}^{2+}$  信号传导)的物质,例如,三氧化二砷和氯化三甲基锡,

[0461] f) 干扰代谢的其他物质,例如类维生素及衍生物维甲酸(ATRA),

[0462] 5) 影响表观遗传学过程,例如HDAC抑制剂(例如帕比司他(Panobinostat)、伏立诺他(Vorinostat)、丙戊酸、MGCD0103(莫西司他(Mocetinostat)),这些目前处在临床开发阶段,针对皮肤T细胞淋巴瘤、急性骨髓白血病、霍奇金淋巴瘤或滤泡性淋巴瘤),

[0463] 6) 影响抗药性机制,例如抑制P-糖蛋白的二环杂芳族化合物,

[0464] 7) 诱导凋亡信号传导/机制的物质,包括蛋白以及反义寡脱氧核苷酸,如Oblimersen(商品名Genasense),

[0465] 8) 酶,例如天门冬酰胺酶,

[0466] 9) 抗原生动物药物,例如米替福新,

[0467] 10) 具有一种上述抗肿瘤活性(例如,诱导凋亡、细胞周期停滞)或另外的活性(例如清除自由基、金属螯合活性、雌激素受体干扰活性、抗氧化剂、干扰药物代谢酶)的植物多酚,例如,类黄酮、鞣质(原花色素)、芪类物质、类姜黄素和木脂体。更具体而言,补骨脂素及其羟基代谢物,白藜芦醇及多羟基化衍生物,类黄酮,例如儿茶素和表儿茶素,更具体为表没食子儿茶素3-没食子酸酯,

[0468] 11) 其他天然物质及衍生物,例如外毒素A、白喉毒素及其衍生物,其中,可以以化学手段或遗传手段来修饰所述衍生物。

[0469] 还可以根据效应物分子所属的物质类别来对效应物分子进行分类,例如无机化合物、芳香化合物、金属类化合物、细胞代谢相关蛋白、酶、肽、寡核苷酸(例如反义核苷酸)、细菌毒素、植物衍生的毒素和多酚(例如鞣质)、类黄酮和香豆素以及类萜、生物碱、抗肿瘤抗生素(例如烯二炔抗生素)、霉菌毒素、来自无脊椎动物和脊椎动物的毒素、环境毒素。

[0470] 本发明的免疫偶联物包含至少一种靶向剂(特别是靶向抗体)和一种效应物分子。该免疫偶联物可以包含用于例如稳定化的其他分子。对于免疫偶联物,术语“偶联物”通常用来定义靶向剂与一种或多种效应物分子的操作性联结,且并不试图仅指任何类型的操作性联结,特别不限于化学的“偶联”。只要靶向剂能够结合靶位且所连接的效应物充分发挥所要求的功能(特别是在递送到靶位时),任何连接模式都是适合的。本发明的偶联方法包括但不限于:在对效应物分子和/或靶向抗体进行或不进行预先修饰的情况下将效应物分子与靶向抗体直接连接,或者通过连接物来连接。可以在功能上将连接物分为例如:酸不稳定的、光不稳定的连接物,可酶切的连接物(例如可以通过肽酶来切割的连接物)。在本发明的多个实施方式中,优选可切割的连接物。可以在存在于细胞环境特别是细胞内环境中的且对经切割而释放的药物没有不利效果的条件切割此类可切割的连接物。诸如pH4或5等低pH,由于其存在于某些细胞内区室中,会切割酸不稳定的连接物,而通过例如红外光可以切割光不稳定的连接物。然而,优选的是在存在于多数细胞中的生理条件下切割的连接物或被该条件切割的连接物,且在本文中称其为生理可切割的连接物。因此,在本发明的多个实施方式中,优选二硫键连接物。通过可以在生理条件下发生的二硫键交换,可

以切割这些连接物。优选的异双功能二硫键连接物包括但不限于：3-(2-吡啶基二硫代)丙酸 N-琥珀酰亚胺酯 (SPDP) (参见例如 Carlsson 等, (1978)), 4-(2-吡啶基二硫代)丁酸 N-琥珀酰亚胺酯 (SPDB) (参见例如美国专利第 4,563,304 号)、4-(2-吡啶基二硫代)戊酸 N-琥珀酰亚胺酯 (SPP) (参见例如 CAS 登录号 341498-08-6)、4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸 N-琥珀酰亚胺酯 (SMCC) (参见例如 Yoshitake 等, (1979)) 和 4-甲基-4-[2-(5-硝基-吡啶基)-二硫代]戊酸 N-琥珀酰亚胺酯 (SMNP) (参见例如美国专利第 4,563,304 号)。用于本发明组合物的最优选的连接物分子是 SPP、SMCC 和 SPDB。

[0471] 其他适合的连接物可以含有“不可切割的”键,例如但不限于马来酰亚胺甲基环己烷羧酸磺酸基琥珀酰亚胺酯 (SMCC),其是能够将化合物与含 SH 的化合物连接起来的异双功能连接物。双功能和异双功能连接物分子,例如糖类定向异双功能连接物分子(如 S-(2-硫代吡啶基)-L-半胱氨酸酰肼 (TPCH)),也在本发明的范围内 (Vogel, 2004)。效应物分子,例如类美登醇,可以通过两个反应步骤的方法来与靶向抗体偶联。作为第一步所述方法包括:用交联试剂(例如吡啶基二硫代丙酸 N-琥珀酰亚胺酯 (SPDP))修饰所述靶向抗体,从而将二硫代吡啶基团引入所述靶向抗体。在第二步中,可以向经修饰的抗体添加具有巯基的反应性类美登醇(例如 DM1),从而将经修饰的抗体中的硫代吡啶基团置换掉,并且产生了由二硫键连接的具有细胞毒性的类美登醇/抗体偶联物(美国专利第 5,208,020 号)。然而,一步式偶联方法(例如 Chari 等的美国专利公布 20030055226 中所公开的方法)也在本发明的范围内。在本发明的一个实施方式中,将同一类或不同类的多个效应物分子连接至靶向抗体。如本文别处所讨论的,所采用的连接物的特性可以影响旁观者杀伤 (Kovtun 等, 2006)。另见对图 13 的讨论。对于制备免疫偶联物的方法,另见专利第 5,208,030、5,416,064、6,333,410、6,441,163、6,716,821、6,913,748、7,276,497 号和美国申请 2005/0169933 号。

[0472] 如美国专利第 6,716,821 号中所述,CC-1065 类似物或衍生物可以通过例如 PEG 连接基团而与靶向剂偶联。

[0473] 通过连接物(美国专利第 5,877,296 号和美国专利第 5,773,001 号)或根据美国专利第 5,712,374 号和美国专利第 5,714,586 号中公开的偶联方法,可以将卡奇霉素偶联至靶向抗体。美国专利公布 20040082764 中公开了制备卡奇霉素偶联物的另一种优选方法。本发明的免疫偶联物可以采用重组融合蛋白的形式。

[0474] 以带连接物或不带连接物的连接为形式的操作性联结在本文中称作“功能性连接”。

[0475] 一毫克 (mg) 的免疫偶联物 BT062 包含约 3.5DM4 分子 (1DM4 具有大约 800Da 的分子量)。因此 1mg 免疫偶联物包含 2800Da 的 DM4。

[0476] BT062 的分子量是大约 150000Da。因此,1mg 免疫偶联物包含约 1/53mg DM4 分子。因此 4mg/ml 的抗体对应于约 4/53DM4 分子,其为 75  $\mu$ g/ml。160mg/m<sup>2</sup> 的免疫偶联物对应于约 2.5-3.5,特别地约 3mg/m<sup>2</sup> 的 DM4。

[0477] 根据本发明,超过 2、2.5、3、3.5 或甚至 4mg/m<sup>2</sup>DM4 可以以重复的单一剂量或多个剂量(包括重复的多个剂量)施用于受试者而没有 DLT。

[0478] 在本发明的情况下,基本上由某些成分构成的免疫偶联物意思是抗体/免疫偶联物由指定成分和不显著影响抗体基本特性的任何附加材料或成分构成。

[0479] 本发明的一些免疫偶联物具有空间位置受阻的效应物分子,并且包含可切割的连接物(HICL-受阻的免疫偶联物,可切割的连接物)。免疫偶联物的未受阻对应物(UI:未受阻的免疫偶联物)包含通过可切割连接物(CL)与效应物分子连接的针对CD138的工程靶向抗体,并且在本文中将其描述为UICL。UICL是包含工程靶向抗体但其中效应物分子的空间位置未受阻的与HICL的等同的免疫偶联物。HICL/UICL对的实例是BT062和nBT062-SPP-DM1。包含不可切割连接物的此类免疫偶联物的未受阻对应物(UINCL)是指包含工程靶向抗体的其中效应物分子的空间位置未受阻并且包含不可切割连接物的等同的免疫偶联物。对于BT062(nBT062-SPDB-DM4),nBT062-SMCC-DM1可以构成包含不可切割连接物的此类未受阻对应物(UINCL)的实例。

[0480] 免疫偶联物的抑制肿瘤生长的活性(=肿瘤生长抑制活性)是相对量度。其描述了相对于最高性能的免疫偶联物(其活性设为100%)的活性的偶联物的肿瘤生长抑制活性。例如,如果将最高性能免疫偶联物(如BT062,其引起32天的肿瘤生长延迟(TGD))的活性设为100%,则例如nBT062-DM1(其显示出18天的肿瘤生长延迟(TGD))的活性计算如下:

[0481] 肿瘤生长抑制活性=

[0482]  $100 \times (\text{TGD}_{\text{nBT062-DM1}} / \text{TGD}_{\text{BT062}})$ ,

[0483] 更一般地:

[0484] 肿瘤生长抑制活性=

[0485]  $100 \times (\text{TGD}_{\text{样品}} / \text{TGD}_{\text{参照物}})$ .

[0486]

|                 | TGD*(天) | %活性** |
|-----------------|---------|-------|
| PBS             | 0       | 0     |
| nBT062-SMCC-DM1 | 18      | 56    |
| BT062           | 32      | 100   |
| nBT062-SPP-DM1  | 13      | 40    |

[0487]

[0488] 表7: 基于接受450 μg/kg剂量的治疗组的针对SCID小鼠的MOLP-8肿瘤异种移植物的nBT062-DMx的肿瘤生长延迟(TGD)和%活性。

[0489] (\*) 以天数计的肿瘤生长延迟(TGD)是治疗组达到预定尺寸(160mm<sup>3</sup>)的平均时间(天)减去对照组达到该预定尺寸的平均时间(天)。

[0490] (\*\*) 肿瘤生长抑制活性 =  $100 \times (\text{TGD}_{\text{样品}} / \text{TGD}_{\text{BT062}})$ 。将BT062的活性定义为100%。

[0491] 在表7提供的实例中, BT062提供了超出其未受阻对应物(nBT062-SPP-DM1)60%的抑制肿瘤生长的活性, 和超出包含不可切割连接物的其未受阻对应免疫偶联物(nBT062-SMCC-DM1)44%的抑制肿瘤生长的活性。

[0492] 如上文所讨论的, 某些药物(例如类美登醇)虽然有效但毒性很高, 其处于原生(即未偶联的)形式时会非选择性地毁坏细胞。将具有细胞毒性的类美登醇连接至抗体可

以在药物达到靶细胞前使药物保持在非激活态 (Lambert, 2005)。若干种抗体-类美登醇偶联物已在进行临床开发。

[0493] 用于治疗 CD56 阳性实体瘤 (小细胞肺癌和神经内分泌癌) 的 IMG901 (huN901-DM1, BB-10901) 已进行了 I 期和 II 期研究。在这些研究中, 每 6 周连续 4 周施用 IMG901, 且 IMG901 通常得到了良好的耐受 (Fossella 等, 2005; Lorigan 等, 2006; McCann 等, 2007; Carter 和 Senter, 2008; Johnson 等, 2008)。该免疫偶联物的抗体部分, huN901, 显示出了显著的 CDC 或 ADCC 活性。对同一免疫偶联物进行了治疗 CD56 阳性多发性骨髓瘤的研究。在 I 期研究中, 每 3 周向使用成熟多发性骨髓瘤治疗已失败的 CD56 阳性多发性骨髓瘤患者连续 2 周施用 IMG901, 该施用初步证明了安全性以及临床活性。据报道, 18 位患者已接受 IMG901 (接受 40、60、75、90、112 和 140mg/m<sup>2</sup>/ 周的患者各为 3 位)。据报道, 初步药代动力学 (PK) 结果表明了在剂量和观察到的最高血清浓度之间存在近似线性的关系。已观察到引人关注的临床活性具有可耐受安全性特性。使用欧洲骨髓移植标准, 在 3 位经过大量预治疗的患者 (接受 60、90 和 112mg/m<sup>2</sup>/ 周的患者各为 1 位) 中记录了确定的轻微响应 (MR)。用 60、90、112 和 140mg/m<sup>2</sup>/ 周的剂量时, 报道了持久的稳定疾病 (Chanan-Khan 等, 2007; Chanan-Khan 等, 2008)。另外, 在扩展期研究中, 服用 75mg/m<sup>2</sup>/ 周剂量的 IMG901 进行进一步的研究。在较高剂量下, 对于来那度胺和地塞米松组合治疗 (多发性骨髓瘤的标准治疗方案) 报告了外周神经病变。

[0494] 对 MLN2704 (huJ591-DM1) 进行了治疗去势难治性前列腺癌 (castration-resistant prostate cancer) 的研究 (Milowsky 等, 2006; Brand 和 Tolcher, 2006)。在进展性转移去势难治性前列腺癌患者中, MLN2704 的 I 期试验研究了在每 4 周施用 1 次 MLN2704 时 MLN2704 的安全性特性、药代动力学、免疫原性和抗肿瘤活性。结果显示, 可以安全地重复施用治疗剂量的 MLN2704 (Galsky 等, 2008)。用另一种 DM1 免疫偶联物 (即靶向 CD44v6 的比伐单抗莫登素 (bivatuzumab mertansine), CD44v6 在头颈癌和其他实体瘤上表达) 进行了平行试验。在采用最密集的施用计划 (每周施用) 的临床试验中, 与皮肤角化细胞上的 CD44v6 的结合在一位患者中介导了具有致命后果的严重皮肤毒性, 其导致了比伐单抗莫登素的开发程序的终止 (Tijink 等, 2006; Sauter 等, 2007; Rupp 等, 2007; Riechelmann 等, 2008)。

[0495] CD44v6 不仅在各种癌细胞上表达, 还在正常皮肤组织中表达, 并且在此方面与 CD138 相似, CD138 同样不仅在癌细胞上而且在正常皮肤组织中表达。令人惊奇的是, 发现了 BT062 显示出临床功效, 并且没有像比伐单抗美坦新 (bivatuzumab mertansine) 所呈现的皮肤毒性样的不可耐受的副作用。见图 28, 其显示, 重复的最多 160mg/m<sup>2</sup> 的单剂量 BT062 至少导致了在延长的时间段内具有可控副作用的稳定疾病。该图特别地显示由血清 M- 蛋白 (M- 蛋白水平降低  $\geq 25\%$ ) 限定的轻微响应。仅在保持期 (400-421 天) 后, M- 蛋白水平提高, 但可以在接受下一剂量后稳定。总的来说, 存在无进展存活约 22 个月, 轻微响应的时间为 19 个月。还预先显示, 10 个重复的 20mg/m<sup>2</sup> 单剂量 (持续超过 6 个月的治疗)、5 个重复的 40mg/m<sup>2</sup> 单剂量、5 个重复的 80mg/m<sup>2</sup> 单剂量、6 个重复的 160mg/m<sup>2</sup> 单剂量和首先 1 次 200mg/m<sup>2</sup> 单剂量随后 6 个重复的 160mg/m<sup>2</sup> 单剂量 (因此, 总剂量为 1160mg/m<sup>2</sup>) 得到了良好耐受 (也参见美国专利公开 20110123554)。

[0496] CD138 还在正常血细胞和其他细胞上表达, 这些细胞的毁坏会导致不可耐受的副

作用,由此导致本文中后面讨论的严重不良事件 (SAE)。尽管如此,在直至  $120\text{mg}/\text{m}^2$  的重复的单一剂量方案中未发现对表达 CD138 的任何类型的非癌 / 非肿瘤细胞的剂量限制性毒性。当  $120\text{mg}/\text{m}^2$  在第 1、8 和 15 天施用时的 3 周和 1 周的静止期导致  $360\text{mg}/\text{m}^2$  的总剂量。因此,尽管在这种一周一次治疗方案的情况中的总最大耐受剂量 (AMTD) 高于在 BT062 的情况中免疫偶联物仅作为单一剂量施用时预先确定为  $160\text{mg}/\text{m}^2$  的最大耐受剂量 (MTD),但此时在 21 天周期的第一天。事实上,AMTD 较高,包括高于预先确定的剂量限制性毒性 (DLT) (在 BT062 的情况中,对于免疫偶联物作为单一剂量的施用,例如一次,例如在三周 (21 天) 积极治疗周期中的第 1 天,是  $200\text{mg}/\text{m}^2$ ) 超过 50%、60%、70%、80%、90%、100%。这构成与其它免疫偶联物的显著差异,其中在免疫偶联物作为单一剂量 (包括重复的单一剂量),例如在三周内一次性施用,和以多剂量方案施用,例如三周 (21 天) 内每周一次的三次施用,之间可能没有发现 DLT 或 MTD 的差异。

[0497] 总最大耐受剂量 (AMTD) 的效果与本文中其它地方限定的 MTD 的效果相同。但是,术语“总”传达的意思是施用不是作为特定时间段,例如,三周 (21 天) 的积极治疗周期内的单一剂量或重复的单一剂量进行,而是在所述特定时间段内,免疫偶联物按间隔,例如每周间隔,如在 21 天周期的第 1、8 和 15 天施用。优选地,均等剂量例如以 7 天间隔 (例如,第 1、8 和 15 天)、3 天间隔 (例如,第 1、4、7、10、13 和 16 天)、4 天间隔、5 天间隔或 6 天间隔施用。但是,施用的轻微变化 (如本文中其它地方描述的初始增强施用) 也在本发明的范围内。施用间隔可以在各周期后增加或减少 (也参见本文中其它地方讨论的维持治疗)。例如,第一和任选的第二周期可以包括每隔两天的施用,而在之后的周期中,间隔可以例如逐步地增加到 4、5、6 或 7 天。AMTD 的一部分包括例如约 95% 的 AMTD、约 90% 的 AMTD、约 85%、约 80%、约 75%、约 70%、约 65%、约 60%、约 55%、约 50%、约 45% 的 AMTD。假定例如理论免疫偶联物 AMTD 是  $100\text{mg}/\text{m}^2$ , 95% 的部分是例如  $95\text{mg}/\text{m}^2$ 。

[0498] 不良事件 (AE) 可以根据 NCI-CTCAE v4.0 (癌症治疗评估计划,不良事件的常用术语标准,3.0 版, DCTD, NCI, NIH, DHHS, 2003 年 3 月 31 日), 国立癌症研究所, 美国国立卫生研究院, 公布日 2006 年 8 月 9 日) 来评估。对于未列入 CTCAE v4.03 的 AE, 严重性按照以下标准通过研究者评估:

[0499] 仅 1 级和 2 级 AE 是可接受的, 从而 1 级 (轻度) 需要最少或不需要治疗且干扰患者的日常活动, 和 2 级 (中度) 导致低水平的不便或考虑治疗措施。中度事件可以引起对受试者的功能活动的一些干扰。

[0500] 3 级 (严重) 和 4 级 (威胁生命) 的 AE 被认为是不可接受的, 它们的发生限定 DLT (剂量限制性毒性), 如果没有另外通过研究特异性 DLT 标准限定 (参见下文)。

[0501] 3 级和 4 级的 AE 也称作严重不良事件 (SAE) 且包括淋巴细胞减少、白细胞减少、血小板减少、中性粒细胞减少、心跳停止、心房纤维性颤动、肺栓塞和深静脉血栓形成。可以采用其它研究特异性的标准 (参见下文)。

[0502] 剂量限制性毒性 (DLT) 使用按照以上所述的 NCI CTCAE v4.0 的分级确定。一般地, 至少 3 级的所有毒性限定为 DLT。可以使用的进一步的研究特异性 DLT 标准列举如下:

[0503] 非血液学的:

[0504] • 任何等级的脱发都不认为是 DLT

[0505] • 尽管进行了最适的止吐药物治疗但仍持续超过 3 天的 3-4 级恶心和呕吐<sup>a</sup>。

- [0506] • 尽管进行了最适的止泻药物治疗但仍持续超过 3 天的 3-4 级腹泻<sup>a</sup>。
- [0507] a. 最适的止泻和止吐治疗由每位研究者来确定。
- [0508] 血液学的：
- [0509] • 持续超过 5 天的 4 级中性粒细胞减少。
- [0510] • 3 级或更高等级的中性粒细胞减少且间隔 4 小时两次连续确定的温度高于或等于 101° F。
- [0511] • 4 级血小板减少
- [0512] • 3 级或更高等级的血小板减少,伴有出血现象且必须使用血小板输血。
- [0513] • 3 级中性粒细胞减少、3 级血小板减少不认为是 DLT。
- [0514] 最大耐受剂量 (MTD) 定义为施用单一剂量或重复的单一剂量的任何受试者发生剂量限制性毒性 (DLT) 的剂量。如很容易明白的, MTD 可以根据本发明容易地对于众多的免疫偶联物确定。这些 DLT 可以在第一和后续的治疗周期中发生。特别地,施用单一剂量或重复的单一剂量的 6 个受试者中的一个发生 DLT。优选考虑第一周期中的 DLT。
- [0515] 在剂量逐步上升过程中,优选仅考虑第一周期中的 DLT。
- [0516] 研究特异性不良事件 (AE)
- [0517] 在临床研究的观察期中患者或临床研究受试者中出现或恶化的任何不利或非预期的病征、症状或疾病。AE 可以是以下任何一种：
- [0518] • 新的疾病,
- [0519] • 治疗的病征或症状或者基础病症的恶化或者伴随疾病的恶化,
- [0520] • 与参与临床研究或者研究药物治疗或比较药物的效应不相关,
- [0521] • 一种或多种上述因素的组合。
- [0522] 一般地,术语“不良事件”的使用不显示与研究药物治疗的因果关系。
- [0523] 严重不良事件 (SAE)
- [0524] SAE 是任何剂量下的任何不利的医学事件发生或效应：
- [0525] • 导致死亡,
- [0526] - 死亡是 AE 的结果而不是 AE 本身。所有死亡,无论原因或关系,必须对于研究的患者报告
- [0527] • 威胁生命,
- [0528] - 威胁生命意味着在事件发生时患者处于事件的直接死亡风险下。这不包括在这得更严重时可能导致死亡的事件
- [0529] • 导致持续或重大的残疾或失能,
- [0530] • 是天生不正常或出生缺陷,或
- [0531] • 是另一种医学上重要的状况
- [0532] - 不立即威胁生命或导致死亡或住院但可能危害患者 / 受试者或可能需要医学介入以防止上述所列的之一的重要医学事件也应报告为“严重的”
- [0533] 不良事件的因果关系
- [0534] 指的是 AE 与研究产品的关系。因果关系按照以下标准分类：
- [0535] 不相关的
- [0536] 对于可选原因 (例如服用的非研究产品、似乎可信的临床可选方式如偶然损伤、

基础或伴随疾病的预期进展、药理学不相容的时间关系、间发的疾病)的合理解释被认为似乎可信的 AE

[0537] 相关的

[0538] 与研究产品的可能合理的临床和 / 或药理关系不能排除 (例如缺乏似乎可信的可选方式) 的 AE。

[0539] 进行曲妥珠单抗 (T-DM1) 的免疫偶联物形式用于治疗 HER2 过表达转移乳腺癌的 I 期研究以调查每周施用或每 3 周施用一次的 T-DM1 的安全和药代动力学。在两项研究中, 与 T-DM1 有关的级别  $\geq 2$  的 AE 很少出现且可控制。在使用 MTD 或更低的剂量时观察到了目标肿瘤响应 (Burris 等, 2006 ; Krop 等, 2007 ; Beeram 等, 2008 ; Holden 等, 2008)。已启动了 II 期研究, 在该研究中对 HER2 阳性的转移乳腺癌每 3 周施用一次 T-DM1 (Beeram 等, 2008 ; Carter 和 Senter, 2008 ; Holden 等, 2008)。正在进行针对二线 HER2 阳性转移乳腺癌的评估 T-DM1 的 III 期临床试验和针对一线、二线和三线 HER2 阳性转移乳腺癌的评估 T-DM1 的 II 期临床试验。对在进行了赫赛汀类治疗 (Herceptin-based treatment) 时已发生进展的 HER2 阳性转移乳腺癌患者, 计划进行与帕妥珠单抗组合的 Ib 期临床试验。已用比伐单抗莫登素完成了三个 I 期临床试验, 比伐单抗莫登素是在结肠直肠癌和表达 C242 的其他癌中发现的抗原为靶标的 huC242 抗体的 DM1- 偶联物。发现用每周施用和每 3 周施用一次的 huC242-DM1 进行的治疗是安全的且得到了耐受 (Rowinsky 等, 2002 ; Tolcher 等, 2003 ; Helft 等, 2004)。

[0540] 四项研究正在研究使用含巯基的 DM4 类美登醇 (其也是 BT062 的成分) 的免疫偶联物 :

[0541] 在患有表达 Can-Ag 的癌的受试者中, 在 I 期研究中研究了比伐单抗莫登素的类似物, IMGN242 (huC242-DM4) (Tolcher 等, 2006)。受试者每 3 周接受一次剂量为  $18\text{mg}/\text{m}^2$ - $297\text{mg}/\text{m}^2$  的 IMGN242 的单 IV 输注。在其第二个治疗周期中以  $223\text{mg}/\text{m}^2$  的剂量水平所治疗的 6 个受试者中, 有 2 个遭受了剂量限制性毒性。 $168\text{mg}/\text{m}^2$  水平的药物受到了良好耐受, 且并未诱导任何可检测的抗体响应 (Mita 等, 2007)。基于来自 I 期研究的最初安全性结果, 启动了 II 研究, 以针对治疗表达 CanAg 的胃癌来对  $168\text{mg}/\text{m}^2$  的 IMGN242 进行评估 (Sankhala 等, 2007)。在两个临床试验中用 IMGN242 对 45 位患者进行了治疗。基于安全性和全面的临床药代动力学 (PK) / 药效学 (PD) 分析, 将 II 期研究修改为以  $126\text{mg}/\text{m}^2$  的剂量治疗低血浆 CanAg 水平患者并以  $168\text{mg}/\text{m}^2$  治疗高血浆 CanAg 水平患者 (Qin 等, 2008)。

[0542] 针对治疗患有 CD33 阳性急性骨髓白血病 (AML) 的受试者, 还用偶联有 DM4 的 huMy9-6 抗体 (AVE9633) 进行了 I 期研究。该治疗方案由使用  $15\text{mg}/\text{m}^2$ - $260\text{mg}/\text{m}^2$  的剂量每 3 周进行一次的 IV 输注组成。在单剂量研究中, 未注意到相关的骨髓抑制或响应 (Giles 等, 2006)。第二个 I 期研究用由 28 天周期中的第 1 天和第 8 天的 IV 输注组成的治疗方案来研究 AVE9633, 此 I 期研究也显示出 AVE9633 得到良好耐受, 它也提供了抗白血病活性的证据, 包括具有持续至少 4 个月的完全响应 (不足的血小板响应, 依赖于输血) 的 1 个受试者 (Legrand 等, 2007)。另外两种 DM4- 免疫偶联物 (SAR3419 和 BIIB015) 已进入了临床试验。

[0543] SAR3419 (huB4-DM4) 是由通过二硫键与类美登醇衍生物 DM4 偶联的人源化 IgG1 单克隆抗体 huB4 (其特异性靶向 CD19 抗原) 组成的抗体 - 药物偶联物。CD19 分子的表达在

所有 B 淋巴细胞上发现,包括原 B 细胞,但在成熟成为浆细胞的过程中丧失。CD19 抗原也在滤泡样树突细胞的膜上和大多数稳定的 B 细胞系上表达。在结合 CD19 抗原后,SAR3419 经历内化和 DM4 的细胞内释放。在 I/II 期研究中,SAR3419 通过每周 8-12 个剂量静脉内输注于患有表达 CD19 的复发性 / 难治性 B 细胞 NHL 的患者。四十四名患者入组 10-70mg/m<sup>2</sup> 的 7 个剂量水平。主要组织学是滤泡性 B 细胞 (18 ;41%) 和弥漫性大 B 细胞 (17 ;39%)。先前方案的中位数是 3 (1-8) 且 19 名患者接受先前的移植。28 名患者入组剂量渐增部分。在 70mg/m<sup>2</sup> 的 6 名患者中,1 名患者具有方案限定的中性粒细胞减少的剂量限制性毒性 (DLT), 和 2 名患者具有迟发的 2 级重大毒性:与角膜沉积物相关的视力模糊和左束支传导阻滞。最大耐受剂量 (MTD) 限定为 55mg/m<sup>2</sup>,而涉及每三周单一施用的方案中的 MTD 是 160mg/m<sup>2</sup>。55mg/m<sup>2</sup> 的 MTD 下的 22 名患者中,4 名患者在 6-8 个剂量后具有相关的可逆性 3-4 级毒性:视神经毒性、感觉异常、中性粒细胞减少和血小板减少。在 20mg/m<sup>2</sup> 或更高剂量下的 38 名患者中,12 (32%) 名患者实现客观反应,包括 6CR/CRu (完全反应 / 未证实的完全反应),没有明显的剂量效应,MTD (55mg/m<sup>2</sup>) 下的 22 名患者中,8 (36%) 名具有反应,包括 3 个 CR/Cru。可评估反应持续时间 (RD) 的 9 名患者中,4 名患者具有 6- 至少 12 个月范围的 RD。总之,可以说,包括 3 个剂量的三周 (21 天) 给药方案中的总最大耐受剂量 (AMTD) 不超过包括单一剂量 (例如,在第一天) 的三周 (21 天) 给药方案中的 MTD。

[0544]

|                                 | 每周一次方案                    | 对应于总浓度(假定 70 kg 和 1.9 m <sup>2</sup> 体表面积) |
|---------------------------------|---------------------------|--------------------------------------------|
| <b>BT062</b>                    | MTD 140 mg/m <sup>2</sup> | 266 mg                                     |
| <b>SGN-35 (Batlett 等, 2008)</b> | 最多 1,2 mg/kg              | 84 mg                                      |

[0545]

|                                                 |                            |        |
|-------------------------------------------------|----------------------------|--------|
| <b>SAR3419 (Coiffer 等, 2011)</b>                | MTD 55 mg/m <sup>2</sup>   | 110mg  |
| <b>T-DM1 (Holden 等, 2008)</b>                   | 2.4 mg/kg 下的 MTD           | 168 mg |
| <b>SGN-75 (抗-CD70; MMAF) (SEATTLE GENETICS)</b> | 研究 0.3-0.6 mg/kg (未达到 MTD) |        |

[0546] 表 8 :以重复的多剂量方案 (每周一次) 施用的免疫偶联物的比较。

[0547] 如可从上表看到的, BT062 可以每周一次以较高剂量 (至少总共 266mg 的量) 施用。与所列的其它免疫偶联物相反, BT062 显示特征性药代动力学。特别地, BT062 显示本文中其它地方描述的 BT062 的观察和理论 C<sub>max</sub> 值的特征性差异。

[0548] 此外,从其他免疫偶联物 (例如靶向 CD33 的 Mylotarg) 已知,在低剂量时免疫偶联物的活性可能不足以治疗患者。通过例如施用重组人粒细胞集落刺激因子 (rhG-CSF) 来敏化表达 CD33 的靶细胞可以缓解此问题 (Fianchi 等, Annals of Oncology, 200819(1) :

128-134)。

[0549] 以上研究说明,对不同的免疫偶联物特别是包含类美登醇(例如 DM1 或 DM4)的免疫偶联物的响应区别很大。人受试者中的 BT062 试验不仅在不同的稳定疾病剂量(特别是最多至 160mg/m<sup>2</sup> 的剂量)下显示出针对表达 CD138 的非癌细胞的可耐受的毒性,而且显示出在每周施用方案中最多约 50mg/m<sup>2</sup> 剂量下的快速血浆清除。

[0550] 本文所述的免疫偶联物可以与细胞毒性剂组合施用。本文中将这些组合也称作抗癌组合产品。

[0551] 对药物组合配对成分的选择

[0552] 已发展了用于设计组合化疗方案的一套规则(Takimoto, 2006)。遵循这些规则,通常会提高特定组合实现组合化疗相对于单试剂治疗的三种最重要的理论优势中的至少一种的机会,其中所述三种最重要的理论优势为:

[0553] 1) 通过使用具有非干扰性剂量限制性毒性的试剂,使细胞杀伤最大化,同时使宿主毒性最小化;

[0554] 2) 提高抗肿瘤细胞的药物活性的范围,其中所述肿瘤细胞对特定类型的疗法有内源抗性;和

[0555] 3) 防止或减缓具有新抗性的肿瘤细胞的发展。

[0556] 在选择用于组合化疗方案的试剂时,建议考虑的原则包括:

[0557] a) 选择已知作为单一试剂诱导完全消退的药物,

[0558] b) 应组合选择具有不同的作用模式的药物和具有加合或协同细胞毒性效应的药物,

[0559] c) 选择具有不同的剂量限制性毒性的药物,

[0560] d) 选择具有不同的抗性模式的药物,从而使交叉抗性最小化。

[0561] 此外,应当以药物的最佳剂量和计划来施用药物(e),并且应当以一致的间隔来进行施用,而无治疗期应当尽可能短,以考虑正常组织的恢复(f)(Takimoto 等, 2009)。

[0562] 协同效应或仅加合效应可以被多种因素抵消:例如,通过例如相互结合,抗癌组合产品的成分可以使彼此失活。此外,抗癌组合产品的一种成分可以干扰另一种成分的作用模式。例如,来那度胺使诸如 CD138 等细胞粘附受体下调,CD138 是本发明的免疫偶联物的靶标(Quach 等, 2010, Udi 等, 2010)。蛋白酶体抑制剂硼替佐米引起 G2/M 细胞周期停滞(Wang 等, 2009),其还受到抗有丝分裂剂的影响。因此,如果免疫偶联物的效应物分子是类美登醇,其与硼替佐米会具有共同的作用靶标,这被认为是不利的。

[0563] 已在癌症疗法中广泛使用的本发明的细胞毒性剂的剂量、施用途径和推荐用法是本领域已知的,且已在例如 Physician's Desk Reference(PDR) 等文献中有所描述。PDR 公开了已用于治疗各种癌症的试剂的剂量。这些细胞毒性剂的有效给药方案和剂量将取决于所治疗的特定癌症、疾病的程度和本领域的技术医师所熟悉的其他因素,并且可以由医师来确定。2006 年版的 Physician's Desk Reference(PDR) 公开了沙立度胺(第 979-983 页)、VELCADE(第 2102-2106 页)和美法仑(第 976-979 页)的作用机制和优选的治疗剂量及给药计划。本领域技术人员可以参阅 PDR,使用一种或多种以下参数,来确定可以根据本发明的教导而使用的化疗剂和偶联物的给药方案和剂量。所述参数包括:

[0564] 1. 综合索引,依照 a) 制造商 b) 产品(使用公司名称或有商标的药物名)c) 类别

索引（例如，“蛋白酶体抑制剂”、“DNA 烷基化剂”、“美法仑”等）d) 通用 / 化学索引（非商标的一般药物名称）。

[0565] 2. 药物的彩色图像

[0566] 3. 产品信息，与 FDA 标签相符，包括 a) 化学信息 b) 功能 / 作用 c) 适应征和禁忌症 d) 试验研究、副作用、警告。

[0567] 在本文中，采用组合产品的一个目的是减少本发明的免疫偶联物的有效剂量，从而降低其副作用并开辟具有可接受副作用的新治疗途径。另一目的是减少先前采用的细胞毒性剂（例如 VELCADE 或来那度胺）的有效剂量并优选降低这些试剂的副作用。类似的是，剂量积极结果 (dosages Positive consequence) 包括但不限于治疗延长、更高剂量、其他应用计划、对治疗的更好且更持久的响应。

[0568] 通过使用本发明的免疫偶联物，可以使对诸如来那度胺、美法仑（研究进行中）等药物显示出难治性表型的患者再次敏感。

[0569] 术语“细胞毒性剂”包括“细胞毒性 / 癌药物”，其包括化疗剂，特别是通常在快速分裂的细胞中使用的化疗剂，即：

[0570] - 烷基化剂，例如氮芥（例如美法仑、环磷酰胺、二氯甲基二乙胺、尿嘧啶氮芥、苯丁酸氮芥、异环磷酰胺）或亚硝基脲（例如，卡氮芥、洛莫司汀、链佐星）或烷基磺酸酯；

[0571] - 烷基化样试剂，例如顺铂、卡铂、奈达铂、奥沙利铂；或非经典烷基化剂，例如四嗪、氮烯唑胺、甲基苄肼、六甲蜜胺；

[0572] - 蒽环类，例如多柔比星和脂质体多柔比星 (DOXIL)；

[0573] - 生物碱，例如长春新碱。

[0574] 术语“细胞毒性剂”还包括免疫调节药物 (ImiD)，例如因其多向性免疫调节性质而在骨髓瘤治疗中使用的沙立度胺（或类似物）、来那度胺 (CC-5013)、泊马度胺、乙替咪 (actimid)。它们通常通过抑制 TNF  $\alpha$  的产生而显示出抗炎活性，此外还显示出抗血管生成活性和免疫调节性质，例如 T 细胞共刺激和对调节性 T 细胞的影响 (Quach 等, 2010)。

[0575] 术语“细胞毒性剂”还包括类固醇，例如但不限于地塞米松和泼尼松，还包括蛋白酶体抑制剂，例如在依赖于抑制促凋亡途径的赘生性细胞中诱导激活程序化细胞死亡的硼替佐米 (VELCADE) 或卡非佐米。

[0576] 其他强力的细胞毒性剂包括：抑制酶拓扑异构酶 II 的依托泊苷；阿糖胞苷，当细胞周期停留在 S 期 (DNA 合成) 时阿糖胞苷在进行转换时会损伤 DNA 并因此特别地影响快速分裂的细胞（例如癌细胞）。此外，诸如长春花生物碱、紫杉烷等微管抑制剂（如在上文的效应物分子篇幅中所述）也可以作为本发明的细胞毒性剂。

[0577] 该定义还包括：激酶抑制剂，例如索拉非尼 (sorafenib)；或 HDAC (组蛋白脱乙酰酶) 抑制剂，例如罗咪酯肽 (romidepsin)；以及生长因子抑制剂，抗激素剂，抗血管生成剂，保心药，免疫刺激剂，免疫抑制剂，血管生成抑制剂，蛋白酪氨酸激酶 (PTK) 抑制剂。

[0578] 该定义还包括抗体类细胞毒性剂，抗体类细胞毒性剂包括具有本领域认可的细胞毒性效果的免疫偶联物和抗体。抗 CD40 是优选的抗体。其他抗体包括但不限于例如 AVASTIN (贝伐单抗) 或 MYELOMACIDE (米拉珠单抗 (milatuzumab))。

[0579] 沙罗度胺 (Thalomid) ( $\alpha$ -(N-苯二甲酰亚氨基)戊二酰亚胺；沙立度胺) 是免疫调节剂。沙立度胺的实验式是 C<sub>13</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>，且克分子量为 258.2。沙立度胺的 CAS 编号为

50-35-1。其看似具有多重作用,包括以各种方式抑制骨髓瘤细胞的生长和生存的能力,以及抑制新血管生长的能力。

[0580] 来那度胺 (REVLIMID) 是沙立度胺的衍生物,其代表第二代免疫调节化合物 (ImiD),其最初是作为 TNF  $\alpha$  抑制剂被开发的。来那度胺的效果包括:生长停滞或凋亡,消除骨髓瘤细胞与骨髓基质细胞的粘附,和调节促进骨髓瘤细胞的细胞生长、存活和抗药性的细胞因子 (Morgan 等,2006)。来那度胺对沙立度胺难治性患者有效。除了对免疫细胞的效果以外,已提示 ImiD (例如来那度胺) 会引起细胞周期停滞在 G0/G1 期。此外,认为 ImiD 使细胞粘附受体 (VLA-4, VLA-5, CD138) 下调 (Quach 等,2010, Udi 等,2010)。

[0581] 可以预期 CD138 的下调会减少任何 CD138 靶向剂 (例如 BT062) 与靶细胞的结合。

[0582] 可以将蛋白酶体抑制剂进一步划分为以下亚组:

[0583] a) 具有 C 端环氧酮结构的天然存在的肽衍生物,  $\beta$ -内酯衍生物,阿克拉霉素 A, 乳胞素 (lactacystin), clasto- 乳胞素;和

[0584] b) 合成抑制剂 (包括经修饰的肽醛、 $\alpha$  环氧酮结构、 $\beta$  环氧酮结构、乙烯基砜、硼酸残余物、频哪醇酯)。本发明优选的蛋白酶体抑制剂是硼替佐米 (PS341; VELCADE, 见下文的讨论)。所提出的一种机制提示了蛋白酶体抑制可以防止促凋亡因子的降解,从而允许在依赖于抑制促凋亡途径的增生性细胞中激活程序化细胞死亡。此外,硼替佐米引起 G2/M 细胞周期停滞 (Wang 等,2009)。因此,硼替佐米可能干扰作为本发明的免疫偶联物的一部分的抗有丝分裂剂,例如,干扰同样在该细胞周期阶段起作用的类美登醇 DM4 的效果。此外,参与凋亡的 PARP (聚 (ADP-核糖) 聚合酶) 切割也受到 DM4 和硼替佐米的影响。因此,包含抗有丝分裂剂的免疫偶联物与显示出硼替佐米特征的蛋白酶体抑制剂的组合不符合之前为获得协同效应而提出的一般原则 (Takimoto 等,2009)。

[0585] VELCADE (硼替佐米) 是用来治疗多发性骨髓瘤的蛋白酶体抑制剂。据信,VELCADE 作用于骨髓瘤细胞,从而引起细胞死亡,和 / 或通过作用于骨微环境来间接抑制骨髓瘤细胞生长和生存。在不限于特定理论或作用模式的情况下,VELCADE 因此破坏了正常的细胞过程,从而导致了促进凋亡的蛋白酶体抑制。

[0586] 地塞米松是合成的糖皮质激素类固醇激素,其充当抗炎剂和免疫抑制剂。当施用至癌症患者时,地塞米松可以对抗癌症疗法的副作用。还可以单独给予地塞米松,或将其与其他抗癌剂 (包括沙立度胺、来那度胺、硼替佐米、阿霉素或长春新碱) 一起给予。

[0587] 可以与 BT062 组合使用的治疗物质还包括免疫调节剂 (例如,沙立度胺和来那度胺和玻马利度胺)、蛋白酶体抑制剂 (例如,硼替佐米和卡非左咪)、类固醇 (例如地塞米松)、烷基化剂和高剂量化疗、组合产品 (例如,美法仑和泼尼松 (MP),长春新碱、多柔比星 (阿霉素) 和地塞米松 (VAD)) 和双膦酸盐。

[0588] 目前,在临床试验中研究了特别是抗骨髓瘤药物的很多组合产品。使用组合产品的目的通常是:增强有效性,克服难治性表型 (例如骨髓瘤细胞的难治性表型),因使用更低浓度的组合产品配对成分中的一种而减少副作用,或其组合。例如,已显示出使用低剂量的来那度胺和低剂量的地塞米松可降低毒性 (Rajkumar 等,2010)。

[0589] 尤其是在复发性或难治性多发性骨髓瘤患者中,正在研究和已经研究了若干种药物组合。

[0590] 组合化疗剂的标准实例是长春新碱、地塞米松和多柔比星的三元组合产品 (VAD)

方案)。

[0591] 已将蛋白酶体抑制剂(例如硼替佐米(VELCADE))与骨髓瘤药物(例如美法仑和泼尼松)进行了组合(VMP)。该组合产品导致了16%的完全响应率和89%的总体响应率(Mateos等,2006)。

[0592] 已批准将硼替佐米与脂质体多柔比星组合用于复发性或难治性患者(Ning等,2007)。

[0593] 在若干临床研究中研究了与地塞米松、美法仑、泼尼松和/或沙立度胺组合使用的硼替佐米。

[0594] 在多发性骨髓瘤患者中,对与脂质体多柔比星、环磷酰胺和地塞米松组合的硼替佐米的研究也在进行中。目前正在研究含有伏立诺他的组合产品,其目的是使硼替佐米难治性患者对硼替佐米重新敏感。

[0595] 口服施用的沙立度胺已与美法仑/泼尼松(MPT)(Facon等,2006)或者地塞米松或苯达莫司汀组合(Pönisch等,2008)。

[0596] 此外,与单独使用地塞米松相比,与地塞米松组合使用的免疫调节药物来那度胺(REVLIMID)导致了肿瘤进展时间延期和存活率升高(Weber等,2006)。在新诊断的患者中还研究了与地塞米松组合的来那度胺(Rajkumar等,2005)以及来那度胺与美法仑/泼尼松的组合(RMP)(Palumbo等,2006)。

[0597] Lutz等的美国专利公布2010/0028346描述了某种免疫偶联物与化疗剂的协同效应。

[0598] 术语“与……组合”并不限于恰好同时的施用。相反,该术语涵盖了本发明的免疫偶联物与其他方案(例如放射疗法)或试剂(特别是上述细胞毒性剂)在一定时间间隔内的依次施用,从而使其可以共同作用来提供益处(例如,活性升高,副作用减少),其中,所述益处与仅使用本发明的免疫偶联物或者仅使用例如所述其他方案或试剂的治疗相比有所增加。优选的是,所述免疫偶联物和其他一种或多种试剂以加合方式作用,特别优选的是,它们以协同方式作用。适合的是,以对实现计划的目的有效的量来提供这些分子。熟练的医学从业者能够凭经验确定或通过考虑试剂的药代动力学和作用模式来确定每种治疗剂的适合剂量以及适合的施用时机和施用方法。本发明情况中所用的“共施用”是指与免疫偶联物同时施用,且经常以组合剂型施用。

[0599] 协同效应是两种成分(例如免疫偶联物和细胞毒性剂)的超过了严格加合效应的效应。下文进一步讨论的多种因素可以抵消这些协同效应。

[0600] 协同性的计算方式如下(Yu等,2001;Gunaratnam等,2009):

[0601] 比率(r) = 预期FTV(组合)/观察的FTV(组合)

[0602] FTV:分数肿瘤体积 = 平均肿瘤体积(测试)/平均肿瘤体积(对照)

[0603] 比率>1则认为有协同性,而r<1则表示小于加合。

[0604] 比率(r)在大于1时还被称为“协同比”。

[0605] 活性等级是对组合效果的另一种测量。该等级基于 $\text{Log}_{10}$ 细胞杀伤。

[0606]  $\text{Log}_{10}$ 细胞杀伤 =  $(T-C)/T_d \times 3.32$

[0607] 其中,(T-C)或肿瘤生长延迟是治疗组(T)和对照组(C)的肿瘤达到预定尺寸( $600\text{mm}^3$ )所需的时间的中值(天)。T<sub>d</sub>是肿瘤倍增时间,其基于对照小鼠中的肿瘤体积中

值;而 3.32 是每 log 细胞生长的细胞倍增数 (Bissery 等,1991)。大于 2.8 的  $\text{Log}_{10}$  细胞杀伤表明所述组合具有高活性,2.0-2.8 的  $\text{log}_{10}$  细胞杀伤表明所述组合非常有活性,1.3-1.9 的  $\text{log}_{10}$  细胞杀伤表明所述组合有活性,0.7-1.2 的  $\text{log}_{10}$  细胞杀伤表明所述组合具有中等活性,小于 0.7 的  $\text{log}_{10}$  细胞杀伤表明所述组合无活性。

[0608] 本领域技术人员会意识到,免疫偶联物的优选工程靶向抗体部分 nBT062 的氨基酸序列可以发生变化而不失去抗体部分的靶向 CD138 的功能性。在抗原结合区 (ABR) 的重链可变区 CD3 包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸残基 99-111 并且轻链可变区 CDR3 包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸残基 89-97 时,尤其如此。有利的是,还分别保留了抗原结合区 (ABR) 的包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸残基 31-35 和 51-68 的重链可变区 CDR1 和 CDR2,和 / 或 (b) 包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸残基 24-34 和 50-56 的轻链可变区 CDR1 和 CDR2。

[0609] 术语“序列同一性”是指对核苷酸序列或氨基酸序列的同一性的量度。通常,对序列进行比对以获得排序最高的匹配。“同一性”本身在本领域中具有公认的意义且可以使用公开的技术来计算得到。(参见例如,Computational Molecular Biology, Lesk, A.M. 编, Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W. 编, Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M. 和 Griffin, H.G. 编, Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. 和 Devereux, J. 编, M Stockton Press, New York, 1991)。存在测量两个多核苷酸序列或多肽序列间的同一性的多种方法,术语“同一性”对技术人员而言是公知的 (Carillo, H. 和 Lipton, D., SIAM J Applied Math 48: 1073 (1988))。

[0610] 通过常规使用已知计算机程序,例如用于起始序列比对的 DNAsis 软件 (Hitachi Software, San Bruno, Calif.) 和随后的用于多序列比对的 ESEE3.0 版 DNA/ 蛋白序列软件 (cabottrog.mbb.sfu.ca), 可以确定任何特定核酸分子与例如 nBT062 的核酸序列或其部分的同一性是否为至少 50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99%。

[0611] 通过常规使用已知计算机程序,例如 BESTFIT 程序 (Wisconsin Sequence Analysis Package, 8 版, 适用于 Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, Wis. 53711), 可以确定氨基酸序列与例如 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2 或者其部分的同一性是否为至少 50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99%。BESTFIT 使用 Smith 和 Waterman, Advances in Applied Mathematics 2: 482-489 (1981) 的局部同源性算法来找出两个序列间的最佳同源性区段。

[0612] 当使用 DNAsis、ESEE、BESTFIT 或任何其他序列比对程序来确定特定序列与本发明的参照序列的同一性是否例如 95% 时, 设定参数以使得: 在参照核酸序列或氨基酸序列的全长上计算同一性百分比, 并且允许占参照序列中的核苷酸总数最多 5% 的同源性空位。

[0613] 如果在本发明的情况下述及与特定序列的残基组合间的某一序列同一性, 则该序列同一性涉及所有指定残基的总和。

[0614] 如上文所讨论的, BT062 是包含靶向 CD138 的嵌合抗体 nBT062 的免疫偶联物, 其

中 nBT062 通过连接物（此处为 SPDB）与抑制细胞生长的类美登醇衍生物 DM4 连接。图 1 和图 2 提供了 BT062 的化学描绘图。包含 nBT062 和类美登醇效应物分子的免疫偶联物通常特征在于其连接物和类美登醇效应物，例如，nBT062-SMCC-DM1 是包含 nBT062、SMCC（含有硫酯键的“不可切割”的连接物）和作为效应物的 DM1 的免疫偶联物。更常见的是，还可以将包含 nBT062 和效应物分子的免疫偶联物描述为 nBT062-连接物-效应物，或只描述为 nBT062-效应物（nBT062N，其中 N 是本文所述的任何效应物，另见美国专利公布 20090232810）。

[0615] 在一个实例中，BT062 结合 CD138 阳性的多发性骨髓瘤细胞。一旦靶细胞将免疫偶联物内化和 / 或释放，DM4 就从靶向分子释放出，从而恢复其原有的 DM4 细胞毒性效力。因此，BT062 提供了靶向型抗体有效载荷（TAP），其中，在细胞毒性药物到达 / 内化进表达 CD138 的靶细胞前，DM4 与 nBT062 的功能性连接使细胞毒性药物保持失活。

[0616] 研究 BT062 在本文所讨论的多发性骨髓瘤细胞和动物模型中的细胞毒性的非临床研究的数据表明，在鼠模型中得到良好耐受的剂量的 BT062 具有非常显著的抗骨髓瘤活性。

[0617] 对复发性或复发性 / 难治性多发性骨髓瘤患者已经进行开放式、剂量递增、重复单剂量的 I 期研究（US 专利公开：20110123554；国际公开：W02010 128087）。

[0618] 可以通过任何途径来施用本文公开的免疫偶联物，包括静脉内、胃肠外、口服、肌肉内、鞘内或作为气溶胶。递送模式将视所需的效果而定。技术人员将容易知晓本发明的特定治疗的最佳施用途径。适合的剂量将取决于施用途径和所指征的治疗，并且可以由技术人员根据目前的治疗规程来容易地确定。

[0619] 包含本发明的免疫偶联物和 / 或任何其他细胞毒性剂作为活性成分的药物组合物可以根据常规的药物配制技术来制备。参见例如 Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 17 版（1985, Mack Publishing Co., Easton, Pa.）。通常，将有效量的活性成分与药物可接受的载剂相混合。载剂可以采用多种形式，视施用所需的制剂形式而定，例如，静脉内、口服、胃肠外、鞘内、透皮或通过气溶胶。

[0620] 本发明的抗癌组合产品可以优选为药物组合物形式或为在不同容器中包含抗癌组合产品的成分的试剂盒形式。经常将试剂盒的成分以相互组合的方式施用，它们通常以组合剂型或以单独剂型共施用。此类试剂盒还可以包含例如其他成分、用于施用成分或组合产品的器件、用于合并成分的器件和 / 或如何使用并施用成分的说明。

[0621] 对于口服施用，可以将免疫偶联物和 / 或细胞毒性剂配制成固体或液体制剂，例如胶囊、丸剂、片剂、锭剂、熔融性剂（melt）、粉末、悬浮液或乳液。在制备口服剂型的组合物时，可以采用任何常见的药物介质，例如：用于口服液体制剂（例如悬浮液、酏剂和溶液的水、二醇、油、醇、调味剂、防腐剂、着色剂和悬浮剂等；或者，用于口服固体制剂（例如粉末、胶囊和片剂）的诸如淀粉、糖、稀释剂、成粒剂、润滑剂、粘合剂和崩解剂等载剂。片剂和胶囊因其易于施用而代表最有利的口服单位剂型，在此情况下显然采用固体药物载剂。如有需要，通过标准技术可以使片剂具有糖衣或肠溶衣。活性试剂必须稳定，从而可以通过胃肠道。如有必要，可以使用用于稳定通过的适合的试剂，其可以包括文献中描述的磷脂或卵磷脂衍生物，以及脂质体、微粒（包括微球体和大球体（macro-sphere））。

[0622] 对于肠胃外施用，可以将免疫偶联物和 / 或细胞毒性剂溶解在药物载剂中，并作

为溶液或悬浮液来施用。适合的载剂的说明性实例为：水、盐水、磷酸盐缓冲溶液 (PBS)、右旋糖溶液、果糖溶液、乙醇，或者动物油、植物油或合成的油。载剂还可以包含其他成分，例如防腐剂、悬浮剂、增溶剂和缓冲剂等。在用未偶联的靶向剂和 / 或免疫偶联物和 / 或细胞毒性剂进行脑室内施用或鞘内施用时，还可以将其溶解在脑脊髓液中。

[0623] 可以将施用至受试者的剂量指定为该受试者（包括人和非人动物）每单位表面积的量。可以向这样的受试者以（多剂量）单一剂量方案（一般持续 21 天）施用所述剂量，其量优选为但不限于约  $5\text{mg}/\text{m}^2$ –约  $300\text{mg}/\text{m}^2$ ，包括约  $10\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $20\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $40\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $50\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $60\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $80\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $100\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $120\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $140\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $150\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $160\text{mg}/\text{m}^2$  和约  $200\text{mg}/\text{m}^2$ 。在（重复的）多剂量方案中，总剂量可以在一个周期（一般持续 21 天）内施用于这种受试者，且可以优选为但不限于约  $120\text{mg}/\text{m}^2$ –约  $840\text{mg}/\text{m}^2$ 。包括约  $120\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $130\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $140\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $150\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $180\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $195\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $240\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $300\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $360\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $420\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $450\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $480\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $600\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $720\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $840\text{mg}/\text{m}^2$ 。总剂量优选以至少三个单个剂量施用，其中剂量施用可以是等时的，例如每周一次，优选在第 1、8、15 天，或在例如 21 天的时间内非等时施用。施用的单个剂量可以是约  $3\times 40\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $3\times 50\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $3\times 60\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $3\times 65\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $3\times 80\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $3\times 100\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $3\times 120\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $3\times 140\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $3\times 150\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $3\times 160\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $3\times 200\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $3\times 240\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $3\times 280\text{mg}/\text{m}^2$ 。

[0624] 免疫偶联物一次或经一系列治疗适当地施用。在多剂量方案中，这些量可以一天一次、一周一次或每两周一次施用。单一高剂量或可选地一个接一个短时施用的多个低剂量的负荷剂量，接着以较长间隔安排的多个剂量构成本发明的优选实施方式。例如，在多剂量方案中， $100$ – $160\text{mg}/\text{m}^2$  之间的任何负荷剂量可以与一个或两个  $40$ – $100\text{mg}/\text{m}^2$  的后续剂量组合。在优选的实施方式中，剂量的时间安排对于受试者进行调整，从而在第二和 / 或任何后续治疗之前经过足够的时间以使得先前剂量已基本上代谢，但受试者的系统中存在的免疫偶联物的量仍然抑制、延迟和 / 或防止肿瘤的生长。示例性的“重复的多剂量”方案包含每周一次约  $10$ 、 $20$ 、 $40$ 、 $50$ 、 $60$ 、 $65$ 、 $80$ 、 $100$ 、 $120$ 、 $140$ 、 $160$ 、 $180$ 、 $200$ 、 $220$  或  $240\text{mg}/\text{m}^2$  的免疫偶联物的施用剂量。或者，例如  $160\text{mg}/\text{m}^2$  的高初始剂量可以接着一个、两个或三个例如约  $20\text{mg}/\text{m}^2$  的每周维持剂量。其它组合可以由本领域技术人员容易地确定。但是，其它剂量方案可以是有用的。这一疗法的进展容易通过已知技术和分析方法监测。剂量可以特别地根据它们是否施用用于预防性或治疗性目的、任何先前治疗的过程、患者的临床病史、患者的疾病状态、患者的肿瘤负荷、患者的遗传易感性、患者的伴随疾病、第一次治疗时的疾病阶段、患者经历的副作用和负责医生的考虑而变化。

[0625] 当免疫偶联物的剂量 X 据说显著超过另一剂量 Y 时，它意味着总（例如，总计）剂量 X 超过总（例如，单一）剂量 Y 至少 10%（例如，如果剂量 X 是  $100\text{mg}/\text{m}^2$ ，显著超过剂量 X 的剂量 Y 是至少  $110\text{mg}/\text{m}^2$ ），优选约 20%，更优选约 30%、40%、50%、60% 或甚至更高。

[0626] 术语单个剂量特别地在用于多剂量方案中的情况中时用于描述在单次施用中施用的限定剂量且可以与例如在积极治疗周期中施用的总剂量（其是在所述治疗周期中施用的单个剂量的总和）相反。例如，持续例如 21 天的积极治疗周期中  $100\text{mg}/\text{m}^2$  的三个单个剂量导致  $300\text{mg}/\text{m}^2$  的总剂量。

[0627] 患者的体液如，例如，患者的血浆、血清或血浆中免疫偶联物的水平通过本领域中公知的方法测量。血浆水平可以通过不同药代动力学 (PK) 分析（如在材料和方法中描述

的一种)评估。血清或血浆或其它血液衍生体液中免疫偶联物的水平通常分别在相应施用开始后 2-4 小时测定,其中所述施用优选为输注的形式。这一般地对应于施用(特别地输注)完成后 0-2 小时。

[0628] 在一个实施方式中,本发明涉及维持治疗。

[0629] 如可在图 28 中看到的,每 21 天一次最高  $160\text{mg}/\text{m}^2$  的长期治疗成功地获得稳定的疾病或甚至轻微响应,但至少获得无进展存活。该图也显示 BT062 的血浆浓度随时间提高,表明所治疗的肿瘤负荷降低。

[0630] 这种类型的治疗良好地适合于在例如每周施用的重复的多剂量方案之后。每三周一次最高  $160\text{mg}/\text{m}^2$  剂量的典型维持疗法可以跟随重复的多剂量方案(例如,每周一次,三周时间)。取决于肿瘤负荷,可以采用降低的剂量,从而例如免疫偶联物的血浆水平或其它相关参数可以用于确定维持治疗的适宜给药。维持可以通过免疫偶联物的阈水平实现,其在受试者中持久地存在/维持,以使得可获得恒定量的免疫偶联物。在优选的实施方式中,受试者中的肿瘤/靶细胞持久地暴露于免疫偶联物,从而新的肿瘤细胞不可能生长,或者它们由于受试者中免疫偶联物的持续存在而快速破坏,免疫偶联物的持续存在通过受试者的例如血浆中免疫偶联物的特定可测量水平反映。

[0631] 维持治疗优选降低施用频率。但是,特别地导致例如施用的免疫偶联物的降低的总剂量的其它维持治疗也是优选的。特定的维持治疗设计特别地取决于肿瘤负荷。免疫偶联物水平和/或其它血液效率参数如 M-蛋白、FLC 或肿瘤/癌症特异性标志物可以在受试者(患者)的体液如血浆、血清或尿液中测定,且维持剂量和剂量频率可以独立于血液效率参数水平的水平或变化进行。可以用于本发明的这一情况以及其它情况中的试剂盒可以包括标志物,特别是抗免疫偶联物(例如,抗免疫偶联物的毒素部分)的抗体,优选标记的抗体,其可以用于定量受试者的体液中的免疫偶联物。从例如标记的抗体的结合获得的信号可以与受试者体液中存在的免疫偶联物的量相关。用于维持治疗的合适的单个剂量水平(用于重复的多个剂量以及重复的单一剂量)例如是  $60\text{--}160\text{mg}/\text{m}^2$ 。

[0632] 延长的无治疗时期可以是对于患者有益的。令人惊异的是,据发现在甚至延长的静止期(见第 400-421 天)后,仍可以维持稳定的疾病(见图 28)。

[0633] 在一个实施方式中,本发明涉及施用方案,优选具有快速血浆清除。该方案一般在限定间期(周期)的至少三个连续周的给定周中提供小于约  $280\text{mg}/\text{m}^2$ 、小于  $120\text{mg}/\text{m}^2$ 、小于  $100\text{mg}/\text{m}^2$ 、小于  $80\text{mg}/\text{m}^2$ ,包括不超过约  $40\text{mg}/\text{m}^2$ 、更优选不超过约  $20\text{mg}/\text{m}^2$ 、甚至更优选不超过约  $10\text{mg}/\text{m}^2$ 。 $10\text{mg}/\text{m}^2\text{--}280\text{mg}/\text{m}^2$  的范围转化为约  $1.43\text{mg}/\text{m}^2\text{--}40\text{mg}/\text{m}^2$  的平均每日剂量。因此,约  $1.4\text{mg}/\text{m}^2\text{--}17.14\text{mg}/\text{m}^2$  的平均每日剂量,包括约  $5.7\text{mg}/\text{m}^2$ 、约  $7.1\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $8.58\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $9.28\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $11.4\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $14.28\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $17.1\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $22.85\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $25.7\text{mg}/\text{m}^2$  ( $180\text{mg}/\text{m}^2$ )、 $28.58\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $34.2\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $40\text{mg}/\text{m}^2$  平均每日剂量是本发明的部分。最高  $100\text{mg}/\text{m}^2$  的低剂量施用方案与早期消除相中(即在施用完成后最多 2 小时的施用过程中的任何时间)的快速血浆清除相关。区分低剂量施用方案与其它低剂量方案的是快速血浆清除,其通过该时间段内优选低于理论  $C_{\text{max}}$  的 55%、低于 50%、低于 40%或低于 35%的测量  $C_{\text{max}}$  限定(表 11)。

[0634] 施用方案在较高水平下伴随低血浆清除率,其通过超过理论  $C_{\text{max}}$  的 55%、通常 60%、70%、80%或 90%的血浆清除率限定,其在本文中称为中等(等于或大于理论  $C_{\text{max}}$  值的 55%,但小于 80%)或慢血浆清除率(等于或大于理论  $C_{\text{max}}$  值的 80%)。在这些清

除率下,令人惊异地发现,尽管血浆中存在相对高的免疫偶联物浓度,这些施用方案仍不产生 DLT。尽管存在表达 CD138 的非靶细胞(例如,生命器官如非任何治疗的靶标的上皮的细胞)上 CD138 的表达水平在 CD138 中相对较高(使用 CD138 抗体 BB4 的免疫组织化学分析显示这种抗体对上皮的反应性与 MM 患者浆细胞匹配(US 美国公布 20070183971))的事实。在免疫组织化学分析中产生相同评分(例如,如在上述实例中的 3 个加号(+++))的靶细胞和非靶细胞上 CD138 的表达水平在本文中称作相当的表达水平且是本发明的部分。在可选的实施方式中,靶细胞上的表达水平实际上始终低于上皮的表达水平(例如,1 个加号(+)或 2 个加号(++)相对于对于上皮的 3 个加号(+++))。一些肿瘤靶细胞显示混合的表达水平,如一些细胞具有 2 个加号的表达水平和一些具有 3 个加号的表达水平。代表性细胞数(如 100 个随机采样细胞)的平均值确定是否所述的这些肿瘤靶细胞落入具有与上皮的表达水平相当或较低的表达水平的定义中。这些治疗方案一般在至少限定积极治疗周期的三个连续周每周给予高于  $40\text{mg}/\text{m}^2$ ,但低于 180 或甚至  $280\text{mg}/\text{m}^2$ ,其转化为约  $5.71\text{mg}/\text{m}^2$ –约  $25.71\text{mg}/\text{m}^2$ (180)、 $40\text{mg}/\text{m}^2$ (280) 的每日剂量。

[0635] 对于患者 8(编号参见图 18),值得注意的是,尽管该患者存在 FLC 的提高直到第 141 天,但在 168 天的整个治疗过程中没有疾病进展(也参见图 21),从而反映了 BT062 施用的功效,尽管患者 6 显示无疾病进展 6 个周期(图 20)。

[0636] 图 19B 明确地证明在输注过程中可假定损失了约  $20\mu\text{g}/\text{ml}$  的恒定量。这从样品中测定的血浆水平(定义为  $C_{\text{max}}$ )与理论可获得的  $C_{\text{max}}$  值之间的差异计算。在表 11c 中,显示了在输注结束后 0–2 小时测定的血浆水平的绝对值并与理论可获得的  $C_{\text{max}}$  血浆值(如通过以下公式计算的“理论  $C_{\text{max}}$ ”)比较。

[0637] 根据以下假定参数计算理论  $C_{\text{max}}$  :

[0638] 患者体表面积  $1.9\text{m}^2$

[0639] 患者重量 70Kg

[0640] 患者血浆体积  $40\text{ml}/\text{kg}$

[0641]

$$\frac{(\text{施用的剂量} \times \text{表面积}) / \text{体重}}{\text{血浆体积}}$$

[0642] 在某些实施方式中,本发明也涉及治疗方案,其中剂量可以按照体液如血浆中发现的血液效率参数的测量水平适应性修改。这允许患者定制的治疗。例如, BT062 的剂量可以按照施用(如输注)完成后 0–4 小时测定的血浆水平适应性修改。

[0643] 如可在图 29 中看到的,参数 M-蛋白(其水平的降低)在该患者中表明疾病改善。同时, BT062 的血浆水平( $C_{\text{max}}$  值)提高。随着增加的治疗周期,肿瘤负荷降低并伴随在 BT062 输注完成后 0–4 小时后血浆中测定的血浆水平(“ $C_{\text{max}}$  值”)提高,从而观察到 M-蛋白水平和  $C_{\text{max}}$  之间的负相关。 $C_{\text{max}}$  值的增加可以通过肿瘤体积的减小解释,其意味着存在较少的肿瘤细胞,其反映在 M-蛋白水平的降低。较少的作为靶标源的 CD138 导致较少的 BT062 结合位点。结果,更多的 BT062 可以在血浆中检测。因此, $C_{\text{max}}$  值可以用于评价对治疗的响应( $C_{\text{max}}$  的提高与功效相关)。如果在给定情况中, $C_{\text{max}}$  值在与在先注射(或任何注射,在没有观察到功效的情况下)的  $C_{\text{max}}$  相比提高例如 10%、20% 或更多,这表明肿瘤上

存在较少的结合位点并因此肿瘤大小减小。在这一实例中,剂量可以在下一治疗周期中调节到较低剂量。结果,需要较低的药物量且可以防止毒性。

[0644] 重复的单剂量是指施用顺序,其中,认为在一次施用之后进行的施用独立于该在先施用。因此,在本文中,可以认为每次施用后的受试者血液中的免疫偶联物水平是相等的。每次施用免疫偶联物时,预期在血液中最初存在相等水平的免疫偶联物。

[0645] 根据免疫偶联物的同种型(对 BT062 情况,为 IgG4)的理论计算出的半衰期来定义重复的单剂量中的“单剂量”之间的施用间隔。

[0646] 通常,治疗性抗体的半衰期主要取决于抗体特性/其结构特征(例如,与 Fc 受体的结合)和靶标。例如,Fc 部分与新生儿受体 FcRn 的结合亲和力影响半衰期。通过与核内体中的 FcRn 结合,抗体从溶酶体降解中被解救出,并且再循环至循环中,从而延长了半衰期。对于 IgG4,已报道半衰期为 15.6(+/-4.5) 天(Alyanakian 等,2003;Salfeld 等,2007)。在本文述及的研究中,已选择了施用间隔为 3 周的“重复的单剂量”。然而,对于重复的单剂量而言,替代性的间隔为约 3 周,约 4 周,以及约 5 周或约 6 周。对于 3 周的而言,述及“约”是指 +/-96 小时,而对于 4-6 周的情况,述及“约”是指 +/-120 小时。

[0647] 多剂量方案或多剂量是指序列的施用,其中某一施用之后的施用被认为是依赖于前一施用。因此,在现在的情况中,受试者血液中免疫偶联物的水平在第二和后续施用中预期高于在初始施用之前存在的基础水平。在免疫偶联物初始施用后的各施用时,在血液中预期存在特定的免疫偶联物水平。根据免疫偶联物的同种型(在 BT062 的情况中为 IgG4)的理论计算半衰期限定多个剂量的单个“剂量”之间的施用间隔,如在重复的单一剂量的情况中。

[0648] 对于 IgG4,已报告了 15.6(+/-4.5) 天的半衰期(Alyanakian 等,2003;Salfeld 等,2007)。在本文所称的研究中,选择了具有一周的施用间隔的“多剂量”。但是,可以选择甚至更短的施用间隔,如 4 天或甚至 3 天。或者,可以选择更长的间隔。但是,多剂量至少暗示 21 天时期中至少 2 次施用。在一周的情况中提及“约”是指 +/-32 小时,在 4 天的情况中是指 +/-18 小时和在 3 天的情况中是指 +/-12 小时。重复的多剂量是指在后续治疗周期(其可以包括间断的静止期或无治疗期,包括延长的静止期或无治疗期)中施用的多个剂量,其总体上不消除先前施用的多个剂量的效应。

[0649] 但是,第一和各后续施用后免疫偶联物的实际水平取决于施用过程中即时/施用完成后(特别地施用完成后 0-2 小时)免疫偶联物从例如血浆的实际“清除”(“血浆清除率”)。在 40mg/m<sup>2</sup> 下 32min 至 1 小时 30min 范围内的中值输注时间是 40min。在 120mg/m<sup>2</sup> 的剂量水平下,1 小时 40min 至 2 小时 30min 范围内的中值输注时间是 2 小时 2min。因此,在 IV 施用中,在某些实施方式中约 1mg/m<sup>2</sup> 可以平均每分钟施用,但每 30 秒约 1mg/m<sup>2</sup> 至每 120 秒约 1mg/m<sup>2</sup> 的施用次数也适当地在范围内。令人惊异的是,发现 BT062 从血浆的清除比理论预期值或类似的免疫偶联物具有的值快得多。这一观察允许设计新的设计方案在单一疗法中用于单独以及其它相关药剂(特别是细胞毒性剂)结合以提供有效抗癌组合的免疫偶联物。

[0650] 总有效量是在给药方案期间优选以均等剂量,在例如三周内例如每周一次,如在 21 天给药方案的第 1、8 和 15 天或在其中第 22 天无剂量施用的 28 天给药方案的第 1、8、15 天施用的免疫偶联物的有效量。

[0651] 容易通过已知的技术和测定来监视治疗的进展。剂量可以有所变化,并取决于但不限于:其施用是否是出于预防性或治疗性目的、任何先前的疗程、患者的临床史、患者的疾病状态、患者的肿瘤负荷、患者的遗传倾向性、患者的伴发疾病、接受第一次治疗时的疾病阶段和对靶向剂/免疫偶联物的响应、患者经受的副作用和主治医师的判断。

[0652] 低剂量方案的优点很多。然而,可能最显著的优点是使产生不良副作用的风险最小化。虽然免疫偶联物通常可以对靶细胞和正常细胞进行灵敏的区分,从而使得毒副作用比多数常规化疗药物的更少,但是很多免疫偶联物仍然未完全摆脱副作用。尽管具有突出的靶向性,兴趣抗原通常还在非癌细胞上表达,而这些非癌细胞在治疗过程中的毁坏将产生不良副作用。对于 CD138,该抗原特别地在上皮细胞上表达。此外,免疫偶联物可能在体内受到与靶细胞中或靶细胞处的进程无关的加工,一定百分比的效应物分子可能在远离靶细胞的位置得到释放,从而产生毒副作用。

[0653] 已显示本发明的免疫偶联物在低剂量下有效,并同时显示出临床可接受的毒性(每三周一次提供最高  $160\text{mg}/\text{m}^2$  的剂量)。在每三周一次(例如,在第 1 天)提供最多至少  $120\text{mg}/\text{m}^2$  的剂量但在任何情况下小于  $160\text{mg}/\text{m}^2$  的剂量时,所测试的免疫偶联物也在人受试者中显示出快速血浆清除。

[0654] 表 9 和 10 显示了重复的单一剂量方案中所观察到的清除。

[0655]

| 剂量 BT062<br>( $\text{mg}/\text{m}^2$ ) | 人的 BT062 血浆水平( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) |         |         |
|----------------------------------------|------------------------------------------|---------|---------|
|                                        | 理论 Cmax                                  | 有效 Cmax | 有效 Cmax |

[0656]

|     |     | (周期 1) 平均 (最低; 最高)    | (周期 4)平均(最低; 最高)     |
|-----|-----|-----------------------|----------------------|
| 10  | 7   | 1.11                  | n.a.                 |
| 20  | 14  | 2.9<br>(1.66; 4.44)   | 7.06<br>(6.79; 7.34) |
| 40  | 27  | 4.31<br>(0.97; 9.86)  | 2.51<br>(1.02; 3.68) |
| 80  | 54  | 18.8<br>(13.4; 23.6)  | 14.2<br>(7.4; 21)    |
| 120 | 81  | 21.4<br>(15.1; 28.7)  | n.a.                 |
| 160 | 109 | 81.2<br>(73.7; 85.5)  | 77.4                 |
| 200 | 136 | 82.0<br>(68.0; 102.4) | n.a.                 |

[0657] n. a. 数据不可得

[0658] 表 9: 输注结束后的血浆浓度, 和从已接受单剂量 / 重复的单剂量的 BT062 的患者获得的血浆中的 BT062 的有效 C<sub>max</sub> 平均值 (第 1 和第 4 周期)。在 21 天的周期中进行的重复的剂量施用。C<sub>max</sub> 值是在输注后 0 ~ 2 小时获得的。施用周期: 第 1 周期: 第 1 天; 第 2 周期: 第 22 天; 第 3 周期: 第 43 天; 第四周期: 第 64 天, 等等。

[0659]

| 剂量<br>BT062<br>(mg/m <sup>2</sup> ) | 人的 BT062 血浆水平(μg/ml)   |                                  |                                    |                               |                                |
|-------------------------------------|------------------------|----------------------------------|------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
|                                     | 理论<br>C <sub>max</sub> | 有效<br>C <sub>max</sub><br>(周期 1) | 理论 C <sub>max</sub><br>的百分比<br>(n) | 有效 C <sub>max</sub><br>(周期 4) | 理论 C <sub>max</sub><br>的百分比(n) |

[0660]

|     |     |      |           |      |         |
|-----|-----|------|-----------|------|---------|
| 10  | 7   | 1.1  | 15% (3)   | n.a. | n.a.    |
| 20  | 14  | 2.9  | 20% (4)   | 7.06 | 49% (2) |
| 40  | 27  | 4.31 | 16% (3)   | 2.51 | 9% (3)  |
| 80  | 54  | 18.8 | 34% (3)   | 14.2 | 26% (2) |
| 120 | 81  | 21.4 | 26.5% (3) | n.a. | n.a.    |
| 160 | 109 | 81.2 | 74.5% (4) | 77.4 | 71% (1) |
| 200 | 136 | 82.0 | 60% (3)   | n.a. | n.a.    |

[0661] n. a. 数据不可得

[0662] n: 患者数

[0663] 表 10: 从已接受单剂量 / 重复的单剂量的 BT062 的患者获得的血浆中的 BT062 的有效  $C_{max}$  平均值 (第 1 和第 4 周期)。在 21 天的周期中进行的重复的剂量施用。最大值是在注射后的前 2 小时内获得的。 $C_{max}$  值是在输注后 0 ~ 2 小时获得的。用占理论计算的  $C_{max}$  的百分数来指示有效  $C_{max}$ 。施用周期: 第 1 周期: 第 1 天; 第 2 周期: 第 22 天; 第 3 周期: 第 43 天; 第四周期: 第 64 天, 等等。

[0664] 理论  $C_{max}$  如上所述计算。

[0665] 虽然在人受试者的血浆中 BT062 的半衰期证明显著低于食蟹猴中 (天) 和活体外人血浆中 (14 天) 观察到的血浆半衰期, 免疫偶联物在人受试者中仍显示功效, 甚至以低至  $20\text{mg}/\text{m}^2$  的施用, 表明加速的肿瘤靶向和肿瘤细胞结合 (其导致提高的功效)。

[0666] 加速的肿瘤靶向可以通过多发性骨髓瘤患者的骨髓中多发性骨髓瘤细胞上受体 (CD138) 占领的测量证实。如可在表 11e 中看到的, 在不同的重复多剂量方案中, 骨髓中肿瘤位点处的受体占领在免疫偶联物施用结束后四小时内接近 100%, 支持抗体介导的加速肿瘤靶向。因此, 本发明涉及具有 70-100%, 优选 80-100%, 更优选 90-100%, 甚至更优选超过 94、95、96、97 或 98% “受体占领”(RO) 的早期 (即施用完全后 0-12、0-10、0-8、0-6 或 0-4 小时) 靶组织受体 (CD138) 占据。“受体”在此是 CD138 且 RO 按照以下公开测量:

[0667]  $RO = (MFI \text{ 样品 } 1 - MFI \text{ 样品 } 3) / (MFI \text{ 样品 } 2 - MFI \text{ 样品 } 3)$

[0668] MFI = 通过流式细胞术测量的平均荧光强度

[0669] 骨髓抽吸物中骨髓瘤细胞的样品。

[0670] 样品 1: 结合的免疫偶联物, 此处是 BT062, 用抗 -May (May = 类美登醇) 抗体染色。

[0671] 样品 2: 总 CD138 在免疫偶联物的受体饱和后用抗 -May 测量。

[0672] 样品 3: 非特异性结合通过与 IgG1 同种型抗体孵育测量。

[0673] 如上所述, 从治疗的 MM 患者的血浆中异常快速的清除在早期消除相中观察到 (在输注过程中和输注后即输注完成后约 0-2 小时早已观察到), 一般接着在最高  $120\text{mg}/\text{m}^2$  的剂量水平下正常终末消除期, 从而对于  $160\text{mg}/\text{m}^2$  下的所有 4 名患者和  $200\text{mg}/\text{m}^2$  剂量 (3 名患者) 观察到更典型的清除特征, 即使清除率仍低于理论  $C_{max}$  值。另外, 在早期消除相显示快速血浆清除的施用方案中, 例如 20、40、80 和  $120\text{mg}/\text{m}^2$ , 不仅观察到早期消除相的快速血浆清除, 而且观察到响应 (尿 M- 蛋白的降低), 包括在重复的单一剂量后响应表现为尿

M- 蛋白降低超过 50%（结果未显示）。

[0674] 如上面所讨论的, 数据支持在早期消除相中观察到的所治疗 MM 患者血浆中的快速消除可能与靶细胞处的高受体占领相关。

[0675] 令人惊异的是, 在多剂量方案中发现在远高于  $120\text{mg}/\text{m}^2$  且事实上接近于对重复的单一剂量方案确定的  $160\text{mg}/\text{m}^2$  的 DLT 下发生快速血浆清除, 这由于在多剂量方案中降低了免疫偶联物的毒性而打开了强效的单一疗法和组合疗法的可能性。

[0676] 表 11a 显示持续 3 周 (21 天) 的每周差异给药施用方案 (因此多剂量方案) 后的理论  $C_{\text{max}}$  值的%。在  $65\text{mg}/\text{m}^2$  群组中理论  $C_{\text{max}}$  的百分比比所显示的较低给药群组中的高:  
[0677]

|                | 40<br>$\text{mg}/\text{m}^2$ | 50<br>$\text{mg}/\text{m}^2$ | 65<br>$\text{mg}/\text{m}^2$ | 80<br>$\text{mg}/\text{m}^2$ | 100<br>$\text{mg}/\text{m}^2$ | 120<br>$\text{mg}/\text{m}^2$ |
|----------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| <i>C1, D1</i>  | 29%                          | 24%                          | 43%                          | 42%                          | 61%                           | 69%                           |
| <i>C1, D8</i>  | 39%                          | 29%                          | 63%                          | 42%                          | 81%                           | 74%                           |
| <i>C1, D15</i> | 43%                          | 31%                          | 72%                          | 44%                          | 89%                           | 79%                           |
| <i>C2, D1</i>  | 33%                          | 26%                          | 52%                          | 45%                          | 94%                           | 62%                           |
| <i>C2, D8</i>  | 37%                          | 40%                          | 61%                          | 50%                          | 102%                          | 67%                           |
| <i>C2, D15</i> | 41%                          | 35%                          | 52%                          | 43%                          | 111%                          | 67%                           |
| <i>C3, D1</i>  | 28%                          | 30%                          | 52%                          | 39%                          | 109%                          |                               |
| <i>C3, D8</i>  | 30%                          | 29%                          | 71%                          | 53%                          | 121%                          |                               |
| <i>C3, D15</i> | 26%                          | 35%                          | 73%                          | 41%                          | 142%                          |                               |
| <i>C4, D1</i>  | 24%                          | 24%                          |                              |                              | 125%                          |                               |
| <i>C4, D8</i>  | 30%                          | 45%                          |                              |                              | 123%                          |                               |
| <i>C4, D15</i> | 35%                          | 42%                          |                              |                              | 135%                          |                               |
| 平均值<br>(%)     | 33%                          | 33%                          | 60%                          | 44%                          | 108%                          | 69%                           |
| 标准差            | 6%                           | 7%                           | 11%                          | 4%                           | 24%                           | 6%                            |

[0678] 表 11a: 理论  $C_{\text{max}}$  的% :CX 是指周期号 :C1 是周期 1, 其中各周期是 21 天长, 之后一个无治疗周 (或各周期被认为是 28 天长, 在第 22 天无施用)。DX 是周期内免疫偶联物施用的日期 ;D8 是周期的第 8 天。%理论  $C_{\text{max}}$  如上所示计算。100 $\text{mg}/\text{m}^2$  的高标准差和 120 $\text{mg}/\text{m}^2$  下相对低的  $C_{\text{max}}$  百分位表明 100 $\text{mg}/\text{m}^2$  下的高百分位是偏差。

[0679]

|                | 与理论 C <sub>max</sub> 相比缺失的浓度[mg/m <sup>2</sup> ] |                         |                         |                         |                          |                          |
|----------------|--------------------------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                | 40<br>mg/m <sup>2</sup>                          | 50<br>mg/m <sup>2</sup> | 65<br>mg/m <sup>2</sup> | 80<br>mg/m <sup>2</sup> | 100<br>mg/m <sup>2</sup> | 120<br>mg/m <sup>2</sup> |
| <i>C1, D1</i>  | 19,3                                             | 25,7                    | 24,9                    | 31,5                    | 26,5                     | 25,4                     |
| <i>C1, D8</i>  | 16,4                                             | 24,2                    | 16,3                    | 31,4                    | 13,0                     | 21,6                     |
| <i>C1, D15</i> | 15,5                                             | 23,5                    | 12,2                    | 30,5                    | 7,2                      | 17,5                     |
| <i>C2, D1</i>  | 18,2                                             | 24,9                    | 21,2                    | 29,7                    | 4,3                      | 31,2                     |
| <i>C2, D8</i>  | 16,9                                             | 20,3                    | 17,3                    | 27,0                    | -1,5                     | 26,6                     |
| <i>C2, D15</i> | 16,0                                             | 21,9                    | 21,2                    | 31,0                    | -7,7                     | 26,8                     |
| <i>C3, D1</i>  | 19,4                                             | 23,8                    | 21,3                    | 33,0                    | -6,0                     |                          |
| <i>C3, D8</i>  | 19,1                                             | 24,2                    | 12,8                    | 25,8                    | -14,4                    |                          |
| <i>C3, D15</i> | 19,9                                             | 21,9                    | 11,7                    | 32,1                    | -28,4                    |                          |
| <i>C4, D1</i>  | 20,6                                             | 25,8                    |                         |                         | -17,1                    |                          |
| <i>C4, D8</i>  | 19,0                                             | 18,8                    |                         |                         | -15,8                    |                          |
| <i>C4, D15</i> | 17,7                                             | 19,7                    |                         |                         | -24,1                    |                          |
| 平均值            | 18.6                                             | 23.0                    | 17.7                    | 29.9                    | 6.8                      |                          |
| SD             | 1.5                                              | 2.4                     | 4.7                     | 1.0                     | 13.2                     |                          |

[0680] 表 11b

[0681]

|                | 每周期中与理论 C <sub>max</sub> 相比缺失的平均浓度 |                         |                         |                         |                          |                          |
|----------------|------------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                | 40<br>mg/m <sup>2</sup>            | 50<br>mg/m <sup>2</sup> | 65<br>mg/m <sup>2</sup> | 80<br>mg/m <sup>2</sup> | 100<br>mg/m <sup>2</sup> | 120<br>mg/m <sup>2</sup> |
| <i>C1, D1</i>  |                                    |                         |                         |                         |                          |                          |
| <i>C1, D8</i>  | 17,1                               | 24,5                    | 17,8                    | 31,1                    | 15,6                     | 21,5                     |
| <i>C1, D15</i> |                                    |                         |                         |                         |                          |                          |

[0682]

|                |      |      |      |      |       |      |
|----------------|------|------|------|------|-------|------|
| <i>C2, D1</i>  | 17,0 | 22,4 | 19,9 | 29,2 | -1,7  | 28,2 |
| <i>C2, D8</i>  |      |      |      |      |       |      |
| <i>C2, D15</i> |      |      |      |      |       |      |
| <i>C3, D1</i>  | 19,5 | 23,3 | 15,3 | 30,3 | -16,3 |      |
| <i>C3, D8</i>  |      |      |      |      |       |      |
| <i>C3, D15</i> |      |      |      |      |       |      |
| <i>C4, D1</i>  | 19,1 | 21,4 |      |      | -19,0 |      |
| <i>C4, D8</i>  |      |      |      |      |       |      |
| <i>C4, D15</i> |      |      |      |      |       |      |

[0683] 表 11c

[0684] 表 11b 和 11c: CX 是指周期号: C1 是周期 1, 其中各周期是 21 天长, 之后一个无治疗周 (或各周期被认为是 28 天长, 在第 22 天无施用)。DX 是周期内免疫偶联物施用的日期; D8 是周期的第 8 天。表 11b 显示的是绝对项中基于实际  $C_{max}$ , 各剂量水平下与理论  $C_{max}$  相比缺失的浓度 ( $mg/m^2$ )。在表 11c 中, 显示每次施用的实际数。在右侧显示各个周期内的平均浓度。还值得注意的是, 所显示的一个周期内和三个周期的平均浓度 (11c) 是相当的和恒定的。除  $100mg/m^2$  下的偏差外, 缺失的浓度也保持相对恒定。

[0685]

| 剂量<br>( $mg/m^2$ ) | 时间(天)                        | 患者 | 血浆水平/平均值<br>( $\mu g/ml$ ) | SD ( $\mu g/ml$ ) |
|--------------------|------------------------------|----|----------------------------|-------------------|
| 40                 | 给药前                          | 4  | 0                          | 0                 |
| 40                 | 0 (施用的天), 2 (施用完后<br>成后的 hr) | 4  | 7,78                       | 2,23              |
| 40                 | 下一剂量之前                       | 4  | 0,69                       | 0,33              |
| 40                 | 7,2                          | 4  | 10,67                      | 4,93              |

[0686]

|     |        |   |       |       |
|-----|--------|---|-------|-------|
| 40  | 下一剂量之前 | 4 | 0,63  | 0,55  |
| 40  | 14,2   | 4 | 11,61 | 5,50  |
| 40  | 下一剂量之前 | 4 | 0,70  | 0,62  |
| 50  | 给药前    | 3 | 0     | 0     |
| 50  | 0,2    | 3 | 8,20  | 0,90  |
| 50  | 下一剂量之前 | 3 | 0,45  | 0,46  |
| 50  | 7,2    | 3 | 9,70  | 3,58  |
| 50  | 下一剂量之前 | 3 | 0,49  | 0,45  |
| 50  | 14,2   | 3 | 10,43 | 3,47  |
| 50  | 下一剂量之前 | 2 | 0,38  | 0,53  |
| 65  | 给药前    | 4 | 0     | 0     |
| 65  | 0,2    | 4 | 19,18 | 8,43  |
| 65  | 下一剂量之前 | 4 | 1,41  | 0,66  |
| 65  | 7,2    | 4 | 27,83 | 8,95  |
| 65  | 下一剂量之前 | 4 | 1,63  | 0,66  |
| 65  | 14,2   | 4 | 31,94 | 18,12 |
| 65  | 下一剂量之前 | 4 | 1,77  | 0,93  |
| 80  | 给药前    | 3 | 0     | 0     |
| 80  | 0,2    | 3 | 22,81 | 3,20  |
| 80  | 下一剂量之前 | 3 | 1,30  | 0,53  |
| 80  | 7,2    | 3 | 22,91 | 6,37  |
| 80  | 下一剂量之前 | 3 | 1,27  | 0,68  |
| 80  | 14,2   | 3 | 23,81 | 6,46  |
| 80  | 下一剂量之前 | 3 | 1,41  | 0,70  |
| 100 | 给药前    | 4 | 0     | 0     |

[0687]

|     |        |   |       |       |
|-----|--------|---|-------|-------|
| 100 | 0,2    | 4 | 41,40 | 23,02 |
| 100 | 下一剂量之前 | 3 | 3,77  | 0,78  |
| 100 | 7,2    | 3 | 54,85 | 24,34 |
| 100 | 下一剂量之前 | 3 | 4,13  | 1,82  |
| 100 | 14,2   | 3 | 60,70 | 29,81 |
| 100 | 下一剂量之前 | 3 | 6,04  | 2,63  |
| 120 | 给药前    | 2 | 0     | 0     |
| 120 | 0,2    | 2 | 56,00 | 32,46 |
| 120 | 下一剂量之前 | 2 | 2,35  | 2,74  |
| 120 | 7,2    | 2 | 59,85 | 30,96 |
| 120 | 下一剂量之前 | 2 | 2,50  | 6,68  |
| 120 | 14,2   | 2 | 63,90 | 28,82 |
| 120 | 下一剂量之前 | 2 | 3,05  | 10,42 |

[0688] 表 11d 代表每周施用之前和之后 40-120mg/m<sup>2</sup> 之间的剂量水平下免疫偶联物血浆水平的平均值 (μg/ml)。在下一施用之前平均血浆水平 (“下一剂量之前”) 开始轻微提高。在 65 和 80mg/m<sup>2</sup> 下, 下一剂量之前的水平保持高于 1 μg/ml。在 100 和 120mg/m<sup>2</sup> 下, 下一施用之前的水平在大约 2 和 4 μg/ml 之间, 因此后续治疗的血浆水平稍微高于第一周期中的水平, 表明在下一注射前的一些蓄积。

[0689]

| 患者 ID | 每周剂量水平 (mg/m <sup>2</sup> ) | 期间的周期 No. | 受体占领 (R0) |
|-------|-----------------------------|-----------|-----------|
| 12    | 80                          | C8D15*    | 99%       |
| 12    | 80                          | C13D15**  | 37%       |
| 12    | 80                          | C14D15**  | 51%       |
| 22    | 140                         | C1D1*     | 86%       |
| 23    | 140                         | C1D1*     | 背景到高      |
| 26    | 140                         | C1D1*     | 95%       |
| 28    | 140                         | C1D8**    | 58%       |
| 24    | 140                         | C1D1*     | 94%       |

|    |     |       |     |
|----|-----|-------|-----|
| 25 | 140 | C1D1* | 98% |
| 30 | 160 | C1D1* | 98% |
| 31 | 160 | C1D1* | 76% |

[0690]

[0691] 表 12:重复的多剂量方案中的受体占领 (RO):骨髓受体占领通过流式细胞术测量。骨髓抽吸物中的骨髓瘤细胞通过 CD138 和 CD38 染色 (未显示) 表征。结合的 BT062 用抗 -May 抗体染色 (样品 1)。总 CD138 在用 BT062 受体饱和后用抗 -May 抗体测量 (样品 2)。与 IgG1 同种型抗体孵育测定与样品的非特异性结合 (样品 3)。CD138 的占据用以下公式计算:

[0692]  $RO = (MFI \text{ 样品 } 1 - MFI \text{ 样品 } 3) / (MFI \text{ 样品 } 2 - MFI \text{ 样品 } 3)$

[0693] 其中 MFI = 平均荧光强度

[0694] 各周期持续 28 天,具有在第 1、8 和 15 天所示剂量的施用。例如,C13D15 表示在第 13 周期中第 15 天施用的剂量。在以上的三个中,测量是基于恰在下一施用之前 (12 小时内) 采集的样品和用双星号 (\*\*) 标记并因此在最后施用后超过 6 天。其余的测量在 BT062 施用后 (此处为施用完成后 4 或 12 或 24 小时内) 直接获得 (\*)。如可以看到的,RO 只在下一施用前相对低,而 RO 恰好在施用后高。

[0695] 图 13 说明  $40\text{mg}/\text{m}^2$ - $120\text{mg}/\text{m}^2$  范围的单一剂量施用的快速血浆清除,而此处  $160\text{mg}/\text{m}^2$  的剂量所示的较高剂量显示较接近于理论值的血浆清除。图 17 明确快速血浆清除不能归因于由可溶性 CD138 引起的缓冲效应。图 14 显示 BT062 的测量的  $C_{\text{max}}$  值如何与理论  $C_{\text{max}}$  值比较。

[0696] 图 19A 和 19A 以及表 11a 说明包括多个剂量的施用方案中的快速血浆清除。如可在涉及在第 1、8 和 15 天施用单个剂量和在周期 (例如,21 天) 内累计接近于与免疫偶联物的重复单一剂量 ( $3 \times 50\text{mg}/\text{m}^2 = 150\text{mg}/\text{m}^2$ , vs.  $160\text{mg}/\text{m}^2$ ) 的 DLT 对应的剂量的方案中看到的,实际  $C_{\text{max}}$  值保持远低于理论  $C_{\text{max}}$  值的 50%,而在重复单一剂量中的 DLT 水平下,实际  $C_{\text{max}}$  值远高于理论  $C_{\text{max}}$  值的 50%。

[0697] 表 11b 显示在实际  $C_{\text{max}}$  平均远高于理论  $C_{\text{max}}$  的 50% 的浓度下,与理论  $C_{\text{max}}$  相比缺失的浓度在提供的实例中平均上保持类似,即大约  $20 \mu\text{g}/\text{ml}$  (也参见图 19B)。这可以指向“漏槽 (sink)”,其快速“吸附 / 吸收”特定部分的免疫偶联物,但随着剂量提高变得较不引人注意。事实上,这一效应在  $100\text{mg}/\text{m}^2$  下仅表现为在第一单个剂量中出现。但是,它在  $120\text{mg}/\text{m}^2$  下重现,从而使得很可能  $100\text{mg}/\text{m}^2$  是偏差。但是,此处也观察到较高周期下  $20 \mu\text{g}/\text{ml}$  的漏槽。

[0698] 因此,本发明还涉及用供给到这一漏槽中的靶向剂 (优选未偶联抗体) 而不是免疫偶联物 (其包含不仅是毒性的而且一般也是昂贵的效应物分子) 进行预处理的方法。如本领域技术人员理解的,漏槽可以包括肿瘤靶细胞以及其它组织的 CD138 表达细胞。因此,在本发明的一个方面中,在输注后迅速地或在输注过程中总是与理论  $C_{\text{max}}$  相比缺失恒定量的  $\pm 20 \mu\text{g}/\text{ml}$  的免疫偶联物 (图 19B),由此被认为快速地被所述漏槽 (本文中也称作“抗原漏槽”) 吸附 / 吸收 / 与所述漏槽结合。在这种实施方式中,这种漏槽未被免疫偶联

物填充,而是被另一种药剂(优选结合 CD138 的药剂)填充。在这一实施方式中,不同于在施用过程中/施用后使得免疫偶联物被吸附/吸收,施用替代的吸附剂/吸收剂,例如未偶联抗体。假定免疫偶联物在漏槽中损失且因此潜在地不导致治疗效应,预处理可以用于 a) 使可能与该“漏槽”相关的毒性最小化和 b) 降低获得等同结果所需的免疫偶联物量。

[0699] 这一预处理可以由 20  $\mu$ g/ml (+/-) 的未偶联抗-CD138 抗体或其片段(优选 nBT062) 的施用组成,且可以填充这一漏槽。

[0700] 在构成与其它免疫偶联物的施用方案相比低剂量的重复的 160mg/m<sup>2</sup> 单一剂量下,终末清除特征更接近于正常,即更接近于理论 C<sub>max</sub> 值。但是,血清中 FLC 的快速降低可以在仅单一施用后观察到,其本身在第二、第三和第四施用后表现为部分响应(图 26)。

[0701] 类似物和衍生物

[0702] 治疗剂(例如细胞毒性剂)领域的技术人员容易理解的是,可以对本文所述的每个此类试剂进行修饰,所得到的化合物仍然保留起始化合物的特异性和/或活性。技术人员还将理解的是,可以使用多种这些化合物来替代本文所述的治疗剂。因此,本发明的治疗剂包括本文所述的化合物的类似物和衍生物。

[0703] 出于说明免疫偶联物用途的目的,现将给出并说明一些非限制性应用。

[0704] 材料和方法

[0705] 嵌合抗体的构建(cB-B4:nBT062)

[0706] B-B4

[0707] 在这些实验中使用了之前表征过的鼠抗体 B-B4(Wijdenes 等, Br J Haematol., 94(1996), 318)。

[0708] B-B4 和 cB-B4/nBT062 的克隆和表达

[0709] 按照教科书中(例如在 Sambrook, Molecular Cloning, A Laboratory Manual; 第二版, (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA 中)的详细描述,或在使用试剂盒时按照制造商的说明书的推荐,实施了标准重组 DNA 技术。使用标准 PCR 方法进行了对小鼠可变区的 PCR 克隆和修饰。使用了在相应的结果部分中所示的引物。

[0710] cB-B4/nBT062 的表达

[0711] 通过胰蛋白酶处理和离心,收集了在补充有 10% FCS、580  $\mu$ g/ml L-谷氨酰胺、50 单位/ml 的青霉素和 50  $\mu$ g/ml 的链霉素的 DMEM 中培养的指数生长期 COS 细胞,并在 PBS 中进行洗涤。将细胞重悬于 PBS 中,使最终浓度为  $1 \times 10^7$  个细胞/ml。将 700  $\mu$ g 的 COS 细胞悬浮液转移至 Gene Pulser 比色杯中,并且与重链和  $\kappa$  轻链表达载体 DNA(各 10  $\mu$ g 或 13  $\mu$ g Supervector)混合。使用 Bio-Rad Gene Pulser 于 1900V、25  $\mu$ F 对细胞进行电穿孔。将转化后的细胞在补充有 10% 的无丙种球蛋白 FBS、580  $\mu$ g/ml L-谷氨酰胺、50 单位/ml 的青霉素和 50  $\mu$ g/ml 的链霉素的 DMEM 中培养 72 小时,随后收集含有抗体的细胞培养物上清液。

[0712] 用来测量 cB-B4/nBT062 的表达水平的捕获 ELISA

[0713] 用 100  $\mu$ l 等分量的 0.4  $\mu$ g/ml 山羊抗人 IgG 抗体 PBS 稀释液包被 96 孔平板(4 $^{\circ}$ C, 过夜)。用 200  $\mu$ l/孔的洗涤缓冲液(PBS+0.1% Tween-20)洗涤平板 3 次。用含 0.2% BSA、0.02% Tween-20 的 PBS 封闭孔,随后添加 200  $\mu$ l 的包含所分泌的抗体的细胞培养物上清液(于 37 $^{\circ}$ C 温育 1 小时)。用洗涤缓冲液洗涤孔 6 次,随后用山羊抗人  $\kappa$  轻链过氧化

物酶偶联物检测已结合的抗体。

[0714] 从细胞培养物上清液中纯化 cB-B4/nBT062

[0715] 依照制造商的推荐,使用蛋白 A ImmunoPure Plus 试剂盒 (Pierce, Rockford, IL) 从已转化的 COS7 细胞上清液中纯化出 cB-B4 抗体。

[0716] cB-B4 的结合和竞争测定

[0717] 考虑到在结果部分中所描述的变化,依照制造商的推荐,使用 Diaclone (France) sCD138 试剂盒分析了 B-B4 和 cB-B4 与 CD138 的结合活性。

[0718] RNA 制备和 cDNA 合成

[0719] 使杂交瘤 B-B4 细胞生长,并依照制造商的操作规程,用 Qiagen Midi 试剂盒 (Hilden, Germany) 处理细胞以分离出 RNA。依照制造商的操作规程,使用 Amersham Biosciences (Piscataway, NJ) 的第一链合成试剂盒对约 5  $\mu$ g B-B4RNA 进行逆转录以产生 B-B4cDNA。

[0720] B-B4 免疫球蛋白 cDNA 的克隆

[0721] 使用 IgH 引物 MHV7 (5' -ATGGGCATCAAGATGGAGTCACAGACCCAGG-3') [SEQ ID NO : 3] 和 IgG1 恒定区引物 MHC1 (5' -CAGTGGATAGACAGATGGGGG-3') [SEQ ID NO :4],通过 PCR 来扩增免疫球蛋白重链 (IgH) 的 cDNA。类似地,使用三种不同的 Ig  $\kappa$  引物 MKV2 (5' -ATG GAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTG-3') [SEQ ID NO :5]、MKV4 (5' -ATGAGGGCCCCTGCTCAGTTT TTTGGCTTCTTG-3') [SEQ ID NO :6] 和 MKV9 (5' -ATGGTATCCACACCTCAGTTCCTTG-3') [SEQ ID NO :7],且每个都与引物 MKC (5' -ACTGGATGGTGGGAAGATGG-3') [SEQ ID NO :8] 组合,来扩增免疫球蛋白轻链 (IgL)。根据制造商的说明,使用 TOPO-TA 克隆试剂盒 (Invitrogen, Carlsbad, CA),将所有扩增产物都直接与 pCR2.1-TOPO 载体连接。

[0722] 在 LB- 氨苄青霉素-Xgal 琼脂平板上选择转染有连接后的 pCR2.1 载体构建体的大肠杆菌 TOP10 细菌 (Invitrogen)。将单个白色菌落接种至小规模的培养基中,过夜生长,并根据制造商的说明使用 QIAprep Spin Miniprep 试剂盒分离出质粒。

[0723] cDNA 序列的确定

[0724] 使用 BigDye Termination v3.0 Cycle Sequencing Ready Reaction 试剂盒 (ABI, Foster City, CA) 来对质粒进行测序。使用在 GeneAmp9600PCR 仪上循环的 1210 引物和 1233 引物,对每个选择的质粒进行双向测序。在 ABI 毛细管测序仪上完成了电泳序列分析。

[0725] 重复进行 RT-PCR、克隆和 DNA 序列分析的完整循环,从而为每条免疫球蛋白链获得了三组完全独立的序列信息。

[0726] B-B4V  $\kappa$  DNA 序列

[0727] 第 1 条链的合成在三个独立的反应中进行。根据制造商的说明,将通过使用引物 MKC 和 MKV2 (序列见上) 而产生的 PCR 产物连接至 pCR2.1-TOPO 载体中。对来自每个独立的 RT-PCR 反应组的克隆进行双向测序。用 MKV2 引物获得的产物的序列与源自诸如 MOPC-21、SP2 和 Ag8 等骨髓瘤融合伴侣 (Carroll 等, Mol Immunol., 25(1988), 991; Cabilly 等, Gene, 40(1985); 157) 的非表达性  $\kappa$  转录本高度相似,并因此将该产物忽略。

[0728] 使用 MKC 与 MKV4 和 MKV9 引物的 PCR 产物彼此相似,且仅在前导序列引物内的摆动位置 (wobble position) 上有区别。

[0729] B-B4VH DNA 序列

[0730] 在三个独立的反应中进行第 1 条链的合成,对来自每个第 1 条链产物的 PCR 产物克隆并测序。对来自每个第 1 条链的 5 个克隆进行了测序。

[0731] 嵌合 cB-B4 表达载体的构建

[0732] 嵌合表达载体的构建需要将适合的前导序列添加到 VH 和 V $\kappa$  上,其上游是 BamHI 限制性位点和 Kozak 序列。Kozak 共有序列对可变区序列的高效翻译而言非常重要。其界定了正确的 AUG 密码子,使核糖体可以从该密码子开始进行翻译,而且,最关键的单碱基是位于该 AUG 起始密码子上游 -3 位置的腺嘌呤(或次优选的鸟嘌呤)。前导序列选择 Kabat 数据库(Kabat 等, NIH National Technical Information Service, 1991)中最相似的序列。在正向(For)引物(两条引物都具有序列 5' -AGAGAAGCTGATTGCCTCTGCTCAGTTCCTTGGTCTCC-3' [SEQ ID NO:9];下划线标出了限制性位点;Kozak 序列为粗体)内编码了这些添加物。此外,嵌合表达载体的构建引入了人  $\gamma$ 1 恒定区的 5' 端到天然 ApaI 限制性位点的片段,并与 B-B4 的 J 区 3' 末端相邻,并且在轻链中添加剪接供体位点和 HindIII 位点。剪接供体序列对于可变区与其适当的恒定区的正确框内连接从而剪掉 V:C 内含子是重要的。在表达构建体中,在 B-B4V $\kappa$  序列下游编码了  $\kappa$  内含子 +CK。类似的是,在表达构建体中,在 B-B4VH 序列下游编码了  $\gamma$ -4CH。

[0733] 首先仔细分析了 B-B4VH 和 V $\kappa$  基因来鉴定出任何不需要的剪接供体位点、剪接受体位点、Kozak 序列和会随后干扰功能性全抗体的亚克隆和/或表达的任何额外的亚克隆限制性位点的存在。在 V $\kappa$  序列中发现了不需要的 HindIII 位点,在不改变氨基酸序列的情况下,利用定点诱变通过 PCR 来必要地除去了该位点。对于此反应,使用了寡核苷酸引物 BT03(5' -CAACAGTATAGTAAGCTCCCTCGACGTTCTGGTGG-3' ) [SEQ ID NO:10] 和 BT04(5' -CCACCGAACGTCCGAGGGAGCTTACTATACTGTTG-3' ) [SEQ ID NO:11],并且根据 Stratagene (La Jolla, CA) Quick change Mutagenesis 试剂盒操作规程进行了诱变。

[0734]  $\kappa$  链嵌合引物

[0735] 将独立于 PCR 引物序列的确定无疑的 B-B4V $\kappa$  前导序列与 Kabat 数据库中的鼠前导序列进行比对。B-B4VH 前导的最接近的匹配是 VK-10ARS-A (Sanz 等, PNAS, 84 (1987), 1085)。经 SignalP 算法 (Nielsen 等, Protein Eng, 10 (1997) ;1) 预测,该前导序列可正确切割。设计了引物 CBB4Kfor (见上) 和 g2258 (5' -CGCGGGATCCACTCAGTTTGATTTCAGCTTGGTGCCTCC-3' [SEQ ID NO:12];下划线标出了限制性位点) 来产生包含此完整前导、B-B4V $\kappa$  区和 HindIII 及 BamHI 末端限制性位点的 PCR 产物,用于克隆至 pKN100 表达载体中。正向引物 CBB4K 引入了 HindIII 限制性位点、Kozak 翻译起始位点和 VK-10ARS-A 前导序列。反向引物 g2258 引入了剪接供体位点和 BamHI 限制性位点。将得到的片段克隆至 pKN100 的 HindIII/BamHI 限制性位点中。

[0736] 重链嵌合引物

[0737] 将独立于 PCR 引物序列的确定无疑的 B-B4VH 前导序列与 Kabat 数据库中的鼠前导序列进行比对。B-B4VK 前导的最接近的匹配是 VH17-1A (Sun 等, PNAS, 84 (1987), 214)。经 SignalP 算法预测,该前导序列可正确切割。设计了引物 cBB4Hfor (见上) 和 g22949 (5' -CGATGGGCCCTTGGTGGAGGCTGAGGAGACGGTGACTGAGGTTCC-3' [SEQ ID NO:13];下划线标出了限制性位点) 来产生包含 VH17-1A 前导、B-B4VH 区和 HindIII 及 ApaI 末端限制性位点的 PCR 产物,用于克隆至 pG4D200 表达载体中。正向引物 cBBHFor 引入了 HindIII 限制性

位点、Kozak 翻译起始位点和 VH17-1A 前导序列。反向引物 g22949 引入了 5' 末端的  $\gamma$  4C 区和天然 ApaI 限制性位点。将得到的片段克隆至 pG4D200 的 HindIII/ApaI 限制性位点中，从而得到 pG4D200cBB4。

[0738] cBB4 抗体的产生

[0739] 将一小瓶 COS7 细胞解冻并使之在补充有带有抗生素的 10% 的 Fetal clone I 血清的 DMEM 中生长。一周后，以 pG4D200cBB4+pKN100cBB4 (各 10  $\mu$ g DNA) 或无 DNA 对细胞 (0.7ml,  $10^7$  个细胞/ml) 进行电穿孔。将细胞铺板接种至 8ml 生长培养基中，生长 4 天。电穿孔重复进行了 7 次。

[0740] 嵌合抗体的检测

[0741] 使用了夹心 ELISA 来测量 COS7 上清液中的抗体浓度。瞬时转染的 COS7 细胞分泌了约 6956ng/ml 的抗体 (数据未示出)。

[0742] cB-B4 的结合活性

[0743] 为了测定 COS7 培养物上清液中的 cB-B4 的结合活性，使用了 Diaclone sCD138 试剂盒，其为固相夹心 ELISA。已经用对 sCD138 有特异性的单克隆抗体包被了所提供的微滴定带 (microtiter strip) 的孔。在首次温育时，将 sCD138 和生物素化的 B-B4 (bio-B-B4) 抗体同时与无标记的测试抗体 (B-B4 或 cB-B4) 的连续稀释液一起温育。

[0744] 在此测定中，已降低了 bio-B-B4 的浓度，以获得与低浓度无标记抗体的竞争 (不同的是，COS7 细胞培养物上清液中的 cB-B4 浓度过低以致不能获得足够的竞争)。该测定的结果揭示，两种抗体对 CD138 具有相同的特异性 (数据未示出)。

[0745] cB-B4 的纯化

[0746] 依照制造商的推荐，使用蛋白 AimmunoPure Plus 试剂盒 (Pierce) 从 COS7 细胞上清液中纯化出嵌合 B-B4 (数据未示出)。

[0747]  $K_D$  的确定 :nBT062/BB4 的比较

[0748] 可溶性 CD138 的纯化

[0749] 使用 1ml 缀合有 B-B4 的 “HiTrap NHS-activated HP” 柱，通过 FPLC 从 U-266 细胞培养物上清液中纯化出了可溶性 CD138 抗原。将 pH7.4 的 PBS 缓冲液中的细胞培养物上清液加载到柱上，随后用 pH11 的 50mM 三乙胺将 CD138 抗原洗脱至 2ml 的级分 (fraction) 中。立即用 375  $\mu$ l 1M Tris-HCl (pH3) 中和洗脱出的 CD138，以防止结构破坏和 / 或功能破坏。

[0750] CD138 的生物素化

[0751] 使用了 Sulfo-NHS-LC (Pierce) 来标记 CD138。NHS 激活的生物素与伯氨基 (如赖氨酸残基) 在 pH7-9 的缓冲液中高效反应，从而形成稳定的酰胺键。

[0752] 对于 CD138 的生物素化，使用蛋白脱盐离心柱 (Pierce) 来使 50  $\mu$ l 的 CD138 脱盐。将生物素化试剂 (EZ-Link Sulfo NHS-LC-Biotin, Pierce) 溶解在冰冷却的去离子水中，至 0.5mg/ml 的最终浓度。将生物素化试剂和捕获试剂溶液混合，使生物素化试剂与捕获试剂相比为 12 倍的摩尔过量 (50pmol CD138 :600pmol 生物素化试剂)，并在轻柔摇动小瓶的同时于室温温育 1 小时。使用蛋白脱盐柱除去未结合的生物素化试剂。

[0753] bCD138 的固定

[0754] BIACORE 测定中所使用的传感器芯片 (SENSOR CHIP SA, BIACORE AB) 经设计可

以结合生物素化分子,以进行 BIACORE 系统中的相互作用分析。表面由预先固定有链霉亲和素且准备以高亲和力捕获生物素化配体的羧甲基化右旋糖酐基质构成。通过人工注射,使用  $10 \mu\text{L}$ / 分钟的流速在 SENSOR CHIP SA 上进行 bCD138 的固定。用 50mM NaOH 中的 1M NaCl 连续进行三次 1 分钟的注射,从而使芯片表面得到调整处理。随后用生物素化的 CD138 注射 1 分钟。

[0755] 使用 BIACORE 来确定不同抗体的  $K_D$

[0756] BIACORE C 的软件使用预定的掩码 (mask),即用于不同实验的所谓“向导 (Wizard)”,其中仅可改变某些设定。由于最初 BIACORE C 是为了测量浓度而开发,所以没有设计用来进行亲和力测量的向导。然而,使用适当的设定,用于“非特异性结合”的向导可以用来测量亲和力速率常数并因此用来确定  $K_D$ 。用该向导测量了两个流动单元 (flow cell),并且通过用 BIACORE 运行缓冲液执行“Regeneration1”来将解离期设为 90 秒。用 10mM pH2.5 的甘氨酸-HCl 执行了等同于真实再生的“Regeneration2”。该步骤之后,配体 CD138 再次处于其结合感受状态。在整个程序中,使用 HBS-EP 作为运行和稀释缓冲液。为了确定不同抗体 ( $\sim 150\text{kDa}$ ) 与 CD138 的结合,分析了不同浓度 (100、50、25、12.5、6.25 和 3.13nM) 时的结合与解离。通过计算速率常数  $k_a$  和  $k_d$ ,确定了解离平衡常数。随后,用 BIAevaluation 软件通过  $k_d$  和  $k_a$  的商来计算分析物的  $K_D$  值。其结果示于表 13 中。

[0757]

| 抗体              | 亲和力        |               |
|-----------------|------------|---------------|
|                 | $K_D$ (nM) | 平均 $K_D$ (nM) |
| nBT062          | 1.4        | 1.4 +/- 0.06  |
|                 | 1.4        |               |
|                 | 1.5        |               |
| B-B4            | 1.7        | 1.6 +/- 0.06  |
|                 | 1.7        |               |
|                 | 1.6        |               |
| nBT062-SPDB-DM4 | 1.9        | 1.9 +/- 0.00  |
|                 | 1.9        |               |
|                 | 1.9        |               |
| B-B4-SPP-DM1    | 2.6        | 2.6 +/- 0.06  |
|                 | 2.7        |               |
|                 | 2.6        |               |

[0758] 表 13 :对 nBT062 和 B-B4 的  $K_D$  值的对比分析。对平均  $K_D$  值,给出了标准偏差。

[0759] 讨论

[0760] 从三个独立实验中计算出了每种抗体的平均  $K_D$  值。结果显示,在所有测量中,

nBT062 显示出比 B-B4 略低的  $K_D$  值（平均  $K_D$  值分别为 1.4nM 和 1.6nM）。

[0761] 免疫偶联物的制备

[0762] nBT062-DM1 和 huC242-DM1

[0763] 如 Chari 之前所述 (Chari 等, Cancer Res. 1(1992), 127), 由微生物发酵产物安丝菌素 P-3 合成了含巯基的类美登醇 DM1。之前已描述了人源化 C242(huC242) 的制备 (Roguska 等, PNAS, 91(1994), 969)。按以前的描述 (Liu 等, PNAS, 93(1996), 8618) 制备了抗体-药物偶联物。平均每个抗体分子连接了 3.5 个 DM1 分子。

[0764] nBT062-DM4

[0765] BT062 是抗体-药物偶联物, 其由通过连接物与 nBT062 嵌合单克隆抗体经由二硫键而连接的具有细胞毒性的类美登醇药物 DM4 构成。类美登醇是抑制微管蛋白聚合和微管装配的抗有丝分裂剂 (Remillard 等, Science 189(1977), 1002)。BT062 (nBT062-DM4) 的示意性化学描绘图示于图 1 和图 2 中。

[0766] FACS 分析和 WST 细胞毒性测定

[0767] FACS 分析

[0768] OPM-2 细胞是显示出高度表达 CD138 的浆细胞白血病细胞系。将 OPM-2 细胞与不同浓度的 nBT062、nBT062-SPDB-DM4、nBT062-SPP-DM1 或 nBT062-SMCC-DM1 温育 (如图 6 所示)。洗涤细胞, 并在 FACS 分析中使用带荧光标记的二抗检测已结合 CD138 的抗体或偶联物。用在这些实验中测得的平均荧光对抗体浓度进行作图。

[0769] 细胞活力测定

[0770] 在平底平板中以 3000 个细胞/孔接种 CD138<sup>+</sup>MOLP-8 细胞。以 1000 个细胞/孔接种 CD138<sup>-</sup>BJAB 对照细胞。用不同浓度的 nBT062-SPDB-DM4、nBT062-SPP-DM1 或 nBT062-SMCC-DM1 (如图 7 所示) 处理细胞 5 天。根据制造商的说明 (ROCHE), 添加 WST 试剂 (水溶性四唑盐, ROCHE) 来测量细胞活力。将该试剂在 MOLP-8 细胞上温育 7.5 小时, 而在 BJAB 细胞上温育 2 小时。根据使用标准程序在微孔板读取仪中测得的光密度, 计算了存活的细胞的分数的。

[0771] 讨论

[0772] 通过 FACS 分析了 nBT062-SPDB-DM4、nBT062-SPP-DM1、nBT062-SMCC-DM1 或 nBT062 的结合。将作为靶细胞的 CD138<sup>+</sup>OPM-2 细胞与 nBT062 或免疫偶联物温育, 并使用带荧光标记的二抗检测已结合细胞的分子。在图 6 中, 用平均荧光对不同抗体浓度或偶联物浓度进行作图, 平均荧光是已结合细胞的抗体的量的量度。结果显示, nBT062-SPDB-DM4、nBT062-SPP-DM1 和 nBT062-SMCC-DM1 显示出非常相似的结合特性。此外, 该结果强烈暗示, 未偶联的抗体的结合特性不受所偶联的毒素的影响。

[0773] 在细胞活力测定中, 分析了抗体针对 CD138<sup>+</sup>MOLP-8 靶细胞和针对 CD138<sup>-</sup>BJAB B 淋巴母细胞瘤对照细胞的细胞毒性活性。将两种细胞系接种到平底平板中, 并且与浓度逐步升高的免疫偶联物温育。使用未偶联的抗体作为对照。添加免疫偶联物后 5 天, 使用用来测量细胞活力的 WST 试剂分析了细胞毒性活性。在图 7A-7C 中, 用存活细胞相对于经载质对照处理的对照细胞的分数的对逐步升高的免疫偶联物浓度进行了作图。结果显示, nBT062-SPDB-DM4、nBT062-SPP-DM1 和 nBT062-SMCC-DM1 针对 MOLP-8 细胞的细胞毒性活性非常相似。如所预期的, 免疫偶联物并不杀伤 CD138<sup>-</sup>BJAB 对照细胞, 这表明所有的免疫偶联

物都通过与 CD138 的细胞特异性结合来发挥作用。在竞争实验中,将 MOLP-8 细胞与摩尔过量的未偶联的 nBT062 预温育。预温育基本封闭了 nBT062-SPDB-DM4 的细胞毒性,从而提供了进一步的证据证明免疫偶联物通过与细胞表面上的 CD138 的特异性结合来杀伤细胞(图 7D)。

[0774] 指示物:胰腺癌/乳癌和其他癌-异种移植模型

[0775] 总体实验设定

[0776] 根据 CD138 表达分析(对肿瘤组织微阵列的免疫组化分析),从原发性肿瘤采集物(即,从源自患者的肿瘤)选出了候选肿瘤。这些肿瘤显示与患者肿瘤相似的特征,因为它们在小鼠中以低数量传代,以保持原始特征。在皮下移植和肿瘤成形(诱导期为 30 天)后,以两个不同浓度(450  $\mu$ g/kg 和 250  $\mu$ g/kg)的类美登醇 DM4 静脉内注射免疫偶联物 BT062(各基于所连接的 DM4 的分子量,1mg DM4 与 52mg 抗体偶联,相当于总质量为 53mg; 450  $\mu$ g/kg DM4 = 23.850  $\mu$ g)。持续 10 周(对于治疗植入了胰腺肿瘤的小鼠而言)和持续 5 周(对于植入了乳腺、肺和膀胱肿瘤的小鼠而言)每周施用一次免疫偶联物。随后无治疗观察期以研究可能的肿瘤再生长。

[0777] 实施例 1:胰腺癌

[0778] 将胰腺肿瘤组织(PAXF736(Kuesters 等,2006))植入 NMRI 小鼠中(双侧)。该植入的肿瘤源自患者的原发性胰腺癌(分化较差的,浸润性腺癌(外分泌癌))。未观察到副作用。经免疫组化研究鉴定,该患者的肿瘤为高度表达 CD138 的组织。然而,通过流式细胞术表面染色而在致瘤细胞系上检测到,CD138 的表达并未达到与多发性骨髓瘤患者的骨髓瘤浆细胞相似的程度。

[0779] 在肿瘤已达到直径约 6mm-8mm(最小 5mm)的尺寸后,开始用 BT062 进行治疗。一周两次测量了肿瘤直径。根据公式  $a \times b \times b/2$  来计算肿瘤体积,其中,“a”是最长轴,“b”是与 a 垂直的轴。测试组相对于载质对照组的肿瘤体积抑制计算为相对肿瘤体积中值比(T/C)。

[0780] 将测试组相对于对照组的 RTV(相对肿瘤体积)中值比乘以 100%,从而计算出对应于特定天的肿瘤抑制(T/C(%))。

[0781]

测试组天<sub>x</sub>的中值肿瘤体积

$$T/C(\text{天}_x) = \frac{\text{测试组天}_x \text{的中值肿瘤体积}}{\text{对照组天}_x \text{的中值肿瘤体积}} \times 100\%$$

对照组天<sub>x</sub>的中值肿瘤体积

[0782] 这种每周施用 BT062 可以显著减小肿瘤体积。在图 8 中可见,观察到了剂量依赖性的部分消退和完全消退。该图显示,当剂量为 23.85mg/kg 时,可以在植入肿瘤后 28 天取得完全消退,而当剂量为 13.25mg/kg 时,可以在植入肿瘤后 35 天取得完全消退。值得注意的是,52 天后 13.25mg/kg 施用方案中的所有小鼠都仍然活着(8/8),而对照组的 8 只小鼠却已减少到了 1 只。小于 10% 的 T/C 值指征完全消退(CR)(Bissery 等,1991)。据此标准,在全部两个治疗组中均实现了 CR,这反映出通过 BT062 而实现的完全消退。

[0783] 引人注意的是,在无治疗的观察阶段,未检测到肿瘤的再生长,从而确认了在此模型中的完全治愈。

[0784]

| 相对肿瘤体积(%)                 | 第 52 天: 平均(±) | 范围      | T/C (%) |
|---------------------------|---------------|---------|---------|
| 对照                        | 2055          | 2055    |         |
| BT062-DM4;<br>13.25 mg/kg | 0 (±1.0)      | 0 - 3.5 | 0.0     |

[0785]

|                           |           |         |     |
|---------------------------|-----------|---------|-----|
| BT062-DM4;<br>23.85 mg/kg | 0 (±0.01) | 0 - 0.1 | 0.0 |
|---------------------------|-----------|---------|-----|

[0786] 表 14 :肿瘤体积为胰腺癌异种移植小鼠模型

[0787] 实施例 2 :乳腺癌

[0788] 将患者的原发性乳房肿瘤（通过 IHC 分析确定为 CD138 强阳性）植入 NMRI（裸）小鼠中（双侧）。乳腺癌皮肤转移为 M1 期。其为不对赫赛汀产生响应的肿瘤（具有中等表达的低 Her2）。该肿瘤呈雌激素受体阴性和孕酮受体阴性并因此对激素疗法无反应。根据 IHC 染色结果（通过 BT062 检测到的强的均一的 CD138 表达，（激素受体雌激素和孕酮的三阴性表达）；Her2 表达评分为 2 以下（认为对赫赛汀无响应））选择了待植入的肿瘤。

[0789] 在肿瘤已达到大约 100mm<sup>3</sup> 的尺寸后，开始用 BT062 进行治疗。根据公式  $a \times b \times b/2$  来计算肿瘤体积，其中，“a”是最长轴，“b”是与 a 垂直的轴。将测试组中相对于载质对照组的肿瘤体积抑制计算为相对肿瘤体积中值比（T/C）。BT062 每周一次以 13.25mg/kg 的负荷剂量（其在第 1 天给予）施用，接着每周一次 4mg/kg 的剂量。在其它剂量组中，施用 23.85mg/kg 的高剂量。

[0790] 每周施用一次 BT062 可以显著减小肿瘤体积。观察到了剂量依赖性的部分消退和完全消退。该免疫偶联物得到了良好的耐受，在每次注射后都对体重没有影响。在全部两个治疗组中都获得了小于 10% 的 T/C 值，这反映出通过施用 BT062 实现的完全消退。在图 9 中可以看到，在 21 天后实现了抗肿瘤效果（即，完全消退），可以认为这是对 BT062 的快速响应。如可从图 35 和 36 看到的，较低剂量方案也是有效的。如可从图 37 看到的，对多西他赛治疗无响应的小鼠模型也对 BT062 治疗无响应，尽管对紫杉醇无响应的模型对 BT062 治疗反应良好（图 35）。与胰腺模型相比，治疗持续时间可以减短一半（用 5 周代替 10 周），并且将 13.25mg/kg 的低剂量减至 4mg/kg 来实现类似的效果，即完全消退和无肿瘤的再生长。并未预料到乳癌的更短治疗时间，这是因为在进行 IHC 分析时 CD138 表达水平是相似的。因此，关于对治疗持续时间的一般性推荐，不能从 CD138 表达水平中得出结论。21 天后，全部两个治疗组以及对照组的所有小鼠都仍然活着。在无治疗的观察阶段（最后一次施用免疫偶联物后 39 天），未检测到肿瘤的再生长，从而确认了完全治愈。

[0791]

| 相对肿瘤体积(%)                         | 平均值<br>(第 21 天)    | 范围        | T/C |
|-----------------------------------|--------------------|-----------|-----|
| 对照(PBS)                           | 533 ( $\pm$ 149.5) | 339 – 878 |     |
| BT062-DM4;<br>13.25 mg/kg/4 mg/kg | 0 ( $\pm$ 0.02)    | 0 – 0.1   | 0.0 |
| BT062-DM4;<br>23.85 mg/kg         | 0 ( $\pm$ 1.75)    | 0 – 6.6   | 0.0 |

[0792] 表 15 :肿瘤体积是乳腺癌异种移植小鼠模型。

[0793]

| FFPE组织样品                   | 染色评分(膜)         |                 |
|----------------------------|-----------------|-----------------|
|                            | 0.25 $\mu$ g/ml | 0.05 $\mu$ g/ml |
| 乳腺, 肿瘤<br>Mets, -061909-13 | 3 Homo          | 2-3 Homo        |
| 乳腺, 肿瘤<br>未知, -061909-12   | 2-3 Homo        | 1-2 Hetero      |
| 乳腺, 肿瘤<br>Mets, -061909-09 | 3 Hetero        | 2 Focal         |

[0794]

|                         |          |            |
|-------------------------|----------|------------|
| 乳腺, 肿瘤<br>原发, -111904-4 | 3 Hetero | 1-3 Hetero |
| 乳腺, 肿瘤<br>原发, -111904-1 | 3 Hetero | 1 Hetero   |
| 正常皮肤样品1                 | 3 Homo   | 3 Homo     |
| 正常皮肤样品1                 | 3 Homo   | 3 Homo     |

[0795] 表 16 :CD138 在乳腺癌细胞上相对上皮细胞上的表达

[0796] 实施例 3 :膀胱癌

[0797] 将膀胱肿瘤 (通过 IHC 分析确定为 CD138 强阳性), 即移行细胞癌植入 NMRI (裸) 小鼠中。

[0798] 在肿瘤已达到大约 100mm<sup>3</sup> 的尺寸后, 开始用 BT062 进行治疗。一周两次测量了肿瘤直径。根据公式  $a \times b \times b/2$  来计算肿瘤体积, 其中, “a” 是最长轴, “b” 是与 a 垂直的轴。

将测试组中相对于载质对照组的肿瘤体积抑制计算为相对肿瘤体积中值比 (T/C)。

[0799] 每周施用 BT062 来试图使肿瘤体积显著减小。对任何剂量依赖性的部分消退和完全消退进行追踪。

[0800] 实施例 4 :肺癌

[0801] 将肺癌 (通过 IHC 分析确定为 CD138 强阳性) 植入 NMRI (裸) 小鼠中。

[0802] 在肿瘤已达到直径大于 5mm 的尺寸后,开始用 BT062 进行治疗。一周两次测量了肿瘤直径。根据公式  $a \times b \times b/2$  来计算肿瘤体积,其中,“a”是最长轴,“b”是与 a 垂直的轴。将测试组中相对于载质对照组的肿瘤体积抑制计算为相对肿瘤体积中值比 (T/C)。

[0803] 完全消退可以在两个剂量组 (4mg/kg 和 23.85mg/kg,每周一次) 中实现。在无治疗期中,未观察到再生长,从而确认了肿瘤的完全根除。

[0804] 实施例 5 :

[0805] 为研究转移性肿瘤,将源自膀胱肿瘤的转移性患者组织 (通过 IHC 分析确定为 CD138 强阳性) 植入 NMRI (裸) 小鼠中。

[0806] 完全消退也可以在该模型中两个剂量组 (4mg/kg 和 23.85mg/kg,每周一次) 中实现。在无治疗期中,未观察到再生长,从而确认了肿瘤的完全根除。

[0807] 实施例 6 :

[0808] 为研究较低剂量的 BT062 的功效和与临床使用的药物紫杉醇 (红豆杉醇) 比较,将实施例 2 的乳腺肿瘤植入 NMRI (裸) 小鼠中。较低剂量的 BT062 (0.5mg/kg、1mg/kg、2mg/kg 和 4mg/kg) 每周施用一次 (图 35)。在每周一次的 4 和 2mg/kg 下,观察到完全消退,在无治疗期中没有再生长。紫杉醇治疗的小鼠在 10mg/kg 下仅显示轻微肿瘤生长。DM4 以对应于 4mg BT062 中的量使用,但不导致肿瘤反应。以 1mg/kg 的浓度,可以实现“肿瘤停滞”,即肿瘤不生长但体积也不减小。这也称为最小有效剂量,因为在该组中,7 只小鼠中的 2 只具有部分消退和 7 只小鼠中的 3 只具有完全消退而无肿瘤再生长。

[0809] 最小有效剂量也可能略微低于 1mg/kg 但高于 0.5mg/kg。

[0810] 实施例 7 和 8 :

[0811] 此处, BT062 在较低剂量下研究并与临床使用的药物多西他赛比较,如在实施例 6 中。较低剂量的 BT062 (1mg/kg、2mg/kg、4mg/kg 和 8mg/kg) 每周施用一次。在每周一次的 8mg/kg 下,在具有显示 2-3 分的 CD138 IHC 染色的肿瘤且也对多西他赛有反应的小鼠的治疗过程中观察到完全消退,而具有显示 1-2 分的 CD138 IHC 染色的肿瘤且对多西他赛没有反应的小鼠也对 BT062 没有反应 (图 36 和 37)。

[0812] 实施例 9 :

[0813] 为研究较低剂量的 BT062 的功效和与临床使用的药物多西他赛 (10mg/kg) 比较,将原发性胰腺肿瘤植入 NMRI (裸) 小鼠中。患者来源的肿瘤具有通过 IHC 分析确定的高但异质的 CD138 染色且评分为 3。较低剂量的 BT062 (1mg/kg、2mg/kg、4mg/kg 和 8mg/kg) 每周施用一次 (图 38)。在每周一次的 4 和 8mg/kg 下,观察到完全消退,但发生可能是肿瘤异质性的效果的无治疗期再生长。多西他赛治疗的小鼠在治疗期以及无治疗期显示完全消退。

[0814] 用 BT062 进行的人试验

[0815] 在本发明的情况下,人受试者对低剂量方案响应良好。甚至在不存在会对靶细胞上的 CD138 表达的质和量进行补偿的任何附加治疗时也是如此 (参照 MYLOTARG)。小鼠模

型显示出,在小鼠中得到良好耐受的剂量的 BT062 具有非常显著的抗骨髓瘤活性,而有效性在相对更高的剂量时明显更佳(结果未显示),从而引起下述问题:在多种非肿瘤细胞上表达 CD138 的人受试者耐受多高的剂量。

[0816] I 期研究

[0817] 进行此研究是为了测试 BT062 在治疗复发性或复发性难治性多发性骨髓瘤患者时的效果(好与差)和确定 MTD(最大耐受剂量)。

[0818] 到现在为止,募集了 32 位患者。在 32 位患者中,至少有 12 位经历了通过至少接受第 4 个治疗周期而表现出的减弱的疾病进展,但有 4 位患者仍在接受治疗。该试验在不同部位进行,并且用不同的剂量水平( $10\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $20\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $40\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $80\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $120\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $160\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $200\text{mg}/\text{m}^2$ )对 3 患者和 4 患者组进行治疗,且治疗周期数为 1-31 之间的任意数(结果未显示)。本领域的技术人员将意识到,更多的治疗周期是可行的并且在本发明的范围内,例如 10-50 个、10-100 个、10-200 个或更多个。

[0819] 用相对低的剂量水平(即  $20\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $40\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $80\text{mg}/\text{m}^2$  和  $120\text{mg}/\text{m}^2$ )减轻了疾病进展,其中接受  $20\text{mg}/\text{m}^2$  的第二个剂量水平的一位患者在 10 个 21 天的治疗周期中未显示出疾病进展。在一些患者中,可以观察到稳定的疾病和响应,包括轻微和部分响应。

[0820] 在这些剂量水平上,如上所述(见表 9 和表 10),还观察到了 BT062 从血浆中的快速清除。这些低剂量施用方案的一些药代动力学特性示于图 13 中。

[0821] 也施用  $160\text{mg}/\text{m}^2$  的  $200\text{mg}/\text{m}^2$  的剂量。 $160\text{mg}/\text{m}^2$  的剂量确定为 MTD 且该组中的研究也扩展。 $200\text{mg}/\text{m}^2$  的剂量确定为 MAD。

[0822] 每 21 天进行  $10\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $20\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $40\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $80\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $120\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $160\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $200\text{mg}/\text{m}^2$  的重复的单一剂量方案,意味着在第 1 天、第 22 天、第 43 天、第 64 天、第 85 天、第 106 天等等。疾病已经并将要通过医生的血液学评估、临床症状和临床化学以及通过随时间测量患者的血清和尿中的 M-蛋白水平(以 g/dL 计)和患者的血清中的游离轻链(FLC)水平(结果未显示)来监测。

[0823] 免疫球蛋白评估

[0824] 在筛选时分析 Ig 抗体的量,包括确定 IgG 亚类。

[0825] M-蛋白的定量和血清游离轻链的测定

[0826] 首先,在第 1-3 个治疗周期的第 1 天使用免疫电泳(IEP)和免疫固定电泳(IFE)对来自血清和 24 小时尿采集物中的 M 蛋白进行定量,从而评估对治疗的响应。对于第 3 个及后续的治疗周期,在第 15 天探访时进行 M 蛋白定量,从而可以获得用来在下一个治疗周期开始前评估响应的结果。一般性定量免疫球蛋白评估与 M 蛋白定量一起完成。

[0827] 用血清样品来进行 FLC 测定,从而检查不具有可检测的 M 蛋白的多发性骨髓瘤受试者(非分泌型/低分泌型骨髓瘤)并使得可以检测到对治疗的早期响应。因此,在第 1 个治疗周期的第 1、2、3 和 8 天,在第 4 个周期的第 2、3、8 和 15 天,以及在全部其他周期的第 1、8 和 15 天,进行了血清 FLC 测定。在筛选时和在结束访查时分析了 M 蛋白和 FLC。将第 1 周期第 1 天的评估作为基线值。

[0828]

| 剂量<br>mg/m <sup>2</sup> | 尿/血清 M-蛋白测量和 FLC 测量                                                                                                                                                                                                                                    |
|-------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 20                      | <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ 在前七个周期中, 疾病基于临床症状和血清 FLC 稳定,</li> <li>➤ 尿 M-蛋白在第 8 次治疗后降低</li> <li>➤ 在第 8 次治疗后达到轻微响应的 M-蛋白标准</li> <li>➤ 尿 M-蛋白水平从基线降低超过 50%</li> <li>➤ 在周期 10 后疾病进展</li> <li>➤ 0,06 和 0,1 g/dL(定义为不可测量的)之间的血清 M-蛋白</li> </ul> |
| 40                      | <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ 稳定的疾病 14 周</li> <li>➤ 血清 M-蛋白在第一次治疗后降低并稳定 14 周</li> <li>➤ 在治疗后观察到的疾病进展在周期 6 开始时(第 105 天)保持</li> <li>➤ 尿 M-蛋白从筛选时的 0 提高到最大约 16 mg/24h(定义为不可测量的)</li> </ul>                                                     |
| 160                     | <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ 血清 FLC 水平在治疗的第 1 天之前-21 天开始的筛选期间提高</li> <li>➤ 血清 FLC 水平在第一次治疗后非常快地降低且在第 8</li> </ul>                                                                                                                          |

[0829]

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|--|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | <p>天已接近 25%降低</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ 与基线相比, FLC 水平在第 1 周期内降低约 40%且在第 2、第 3 和第 4 次治疗后降低超过 50%</li> <li>➤ 部分响应的 FLC 标准非常早地达到</li> <li>➤ 在第 4 治疗周期结束后疾病进展</li> <li>➤ 不可测量的血清 M-蛋白 = 0; 尿 M-蛋白从基线的 140 mg/24h 降低到第 2 次治疗之前的 120 mg/24h(定义为不可测量的) =&gt; 非分泌性骨髓瘤</li> </ul> |
|--|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

[0830] 表 17 提供在重复的单一剂量方案中选定患者中针对尿 / 血清 M- 蛋白和血清 FLC 测量进行的观察。

[0831] 在 BT062 的重复单一剂量方案中, 在 200mg/m<sup>2</sup> 剂量组治疗的患者的粘膜中观察到 DLT。BT062 的靶标 (CD138) 在粘膜中表达且这些组织和器官中的毒性可以被认为是靶标相

关的。未确定为 DLT 的严重不良事件在患者的眼中观察到。但是,据认为眼毒性与效应物化合物相当相关,因为存在着也在其它 DM4 偶联物如 SAR3419 或非靶向 CD138 的 IMGN388 发现的典型毒性。这种眼毒性在第 3 周期后 3 天的重复单一剂量研究中的一名患者中及在第 4 周期后 4 天的其它患者中发生。在重复单一剂量研究的最大施用剂量组 (160mg/kg) 中, CD138 相关毒性在最初几天发生但也在重复周期后发生,它们大多数被认为是轻度到中度。  
[0832]

| 剂量                       | 图  | 尿/血清 M-蛋白测量和 FLC 测量                                                       |
|--------------------------|----|---------------------------------------------------------------------------|
| 3 x 50 mg/m <sup>2</sup> | 20 | 血清 M-蛋白降低 6 个周期:<br>至少稳定的疾病可以在 6 个周期实现, 在第 3 和第 5 治疗周期期间/之后血清 M 蛋白降低近 25% |

[0833]

|                           |    |                                                                |
|---------------------------|----|----------------------------------------------------------------|
| 3 x 65 mg/m <sup>2</sup>  | 21 | 游离 λ-κ 轻链<br>血清 FLC 水平的强降低可以在仅单一治疗周期后观察到                       |
| 3 x 120 mg/m <sup>2</sup> | 24 | 尿 M-蛋白降低<br>在第 1 和重复周期后实现尿 M 蛋白的降低, 在第 3、第 7 和第 10 周期后降低超过 50% |

[0834] 表 18 提供在重复的多剂量方案中选定患者中针对尿 / 血清 M- 蛋白和血清 FLC 测量进行的观察。

[0835] 对来自血浆的 BT062 和 DM4 的确定

[0836] 为了评估 BT062 的单剂量 PK 性质, 在 IV 施用 BT062 后, 在第 1 个治疗周期期间进行了大规模的血浆采样。在第 4 个治疗周期期间进行了相同的评估。在全部其他治疗周期的第 1 天和第 8 天, 以及在进行结束访查和随访时, 还以较小的规模获得血浆样品。血浆中 BT062 的量通过如下描述的 PK ELISA 方法测定:

[0837] 实验描述:

[0838] 微量滴定板的孔首先在 2-8℃ 下用抗 - 类美登醇 (抗 -DM4) 抗体包被过夜并在用分析缓冲液 (0.5% BSA/TBS) 封闭后在下一天与血浆样品孵育。它们事先在分析缓冲液中以至少 1:100 稀释。样品中包含的 BT062 抗体被固定在板中的抗 -DM4 抗体结合。在孵育后, 未结合的物质通过洗涤除去。然后, 添加 HRP- 偶联的次级抗体, 其结合 BT062 抗体。未结合的次级抗体通过另一洗涤步骤除去。这之后, TMB 底物溶液吸移到所有孔中。

[0839] 颜色反应与在样品孵育过程中结合的 BT062 的量成比例地发生。颜色反应使用终止溶液结束, 其使得颜色从蓝色变成黄色。最终测量用光度计在 450nm 波长下进行。

[0840] 浓度和光密度之间的关系使用 Magellan V6.6 软件评价。如果测量来自临床试验的样品 (来自多发性骨髓瘤患者的血浆样品), 应当对于各患者以 1:100 稀释的“给药前 (pre-dose)”血浆 (用 BT062 治疗前的血浆) 准备单个标准曲线。如果除了分析缓冲液中

必须的 1:100 稀释外,临床测试样品必须进一步稀释(由于高 BT062 浓度),这种稀释应当以 1:100 稀释的(相关患者的)给药前血浆准备。对于稳定性测试(例如,冻/融稳定性。储存稳定性),BT062 标准品以及对应的样品或过程中对照以 1:100 稀释的肝素血浆池准备。

[0841] 对脱落的 CD138 和 HAPA 的确定

[0842] 针对脱落的/可溶性 CD138(sCD138)水平,对所有给药前血浆样品进行了评估,从而研究 sCD138 水平和抗肿瘤活性之间的潜在相关性。这些测量还可以确定:小于预期 C<sub>max</sub> 的值并不依赖于在施用 BT062 前就存在的 sCD138 的量(见图 17)。通过评估人抗产品抗体(human antiprodukt antibody)(HAPA),评估了来自每个治疗周期第 1 天和来自结束访查和随访的给药前血浆样品,以检测针对 BT062(药物产品)的体液应答的存在。

[0843] 所观察到的脱落的 CD138 的测量结果

[0844] 在骨髓瘤患者中,可以观察到高水平的 sCD138,其可能是骨髓瘤患者的预后指示(Maisnar 等,2005)。

[0845] MGUS 和 MM 的患者可能显示出高水平的可溶 CD138,且伴有更高水平的  $\beta$  2-微球蛋白和骨髓中升高的浆细胞含量(Aref 等,2003)。

[0846] 使用试剂盒来确定可溶性 CD138。令人惊奇的发现是,在用 20mg/m<sup>2</sup> 的 BT062 治疗的一名患者(确认为 003-003)就尿 M 蛋白水平而言显示出轻微响应,虽然该患者在治疗前显示出了高水平的 sCD138。

[0847] 在不同的受试者中确定了可溶性(s)CD138 值。

[0848]

| 受试者     | sCD138(ng/ml) |
|---------|---------------|
| 002-003 | 61.3          |
| 001-002 | 196           |
| 002-004 | 56.7          |
| 003-003 | 2583          |
| 平均      | 724.1         |

[0849] 表 19:患者 003-003(剂量 20mg/m<sup>2</sup>)显示出非常高的 sCD138 值。然而,该患者在 M 蛋白水平上取得了轻微响应。

[0850] 组合研究

[0851] 在 I/IIa 期多剂量递增研究中,BT062 在患有复发性或复发性/难治性多发性骨髓瘤的受试者中与来那度胺和地塞米松组合。

[0852] 一个治疗周期由 28 天组成,或者换句话说,21 天的主动治疗接着 7 天无治疗(静止期)。BT062 在第 1、8 和 15 天以 80mg/m<sup>2</sup> 的浓度施用,来那度胺(Len)(25mg)每天一次在第 1-21 天施用和地塞米松(Dex)(40mg)在第 1、8、15 和 22 天施用。在所有周期的第 1 天 BT062 治疗与第 1 天的 Len 和地塞米松同时。如可从图 34 看到的,轻微响应在第一治疗

周期后观察并在第 4 周期开始时（第 99 天）保持，即使第 2 和 3 周期的开始延迟一周且 BT062 的治疗在第 85 天省略且 Len 的治疗在第 85-91 天省略和 Dex 剂量在第 3 周期中降低到 20mg/m<sup>2</sup>。如对于本领域技术人员明确的，来那度胺、地塞米松或 BT062 浓度可以根据毒性和功效降低。功效通过体液评估，优选地通过血液效率参数如 M- 蛋白或 FLC（取决于 MM 疾病类型）或反映疾病状态的来自体液或骨髓的其它标志物。

[0853] 利用此处公开的这一治疗方案，具有较低毒性的与 Len/Dex 的组合是可能的，或者与这一免疫偶联物组合，组合配对成分的施用可以调节，例如降低以最小化与其施用相关的毒性。因为这一方案提供较佳耐受性，其适用于与其它药物组合，从而具有较低或至少不是更高的毒性量但具有相同或甚至更好的功效。

[0854] 已对细胞系中作为 BT062 的组合配对成分的可能的抗骨髓瘤药物候选物进行了评估：

[0855] 细胞系研究

[0856] 在异种移植小鼠模型中组合研究之前进行了细胞系中的研究。使用中值效应分析 (median effect analysis)，依照 Chou 和 Tally (1984)，在不同的细胞系中进行了协同性确定。此处，计算了每种药物和每个细胞系的细胞毒性效果的 IC<sub>50</sub> 值，随后计算了每对药物的 IC<sub>50</sub> 比。随后使细胞暴露于这些药物混合物或单独药物的连续稀释液。使用 CompuSyn 软件 (ComboSyn, Inc., Paramus, NJ) 分析了实验数据。分别计算并报告每个独立实验中的组合指数 (CI)。在此分析中，小于 1、等于 1 和大于 1 的 CI 分别表示协同性、加合性和拮抗性。根据该方法的作者 T. C. Chou 的分类 (CompuSyn. 用户手册, 2004)，协同性和拮抗性的级别如下：

[0857]

| 组合指数     | 描述      |
|----------|---------|
| < 0.1    | 非常强的协同性 |
| 0.1-0.3  | 强协同性    |
| 0.3-0.7  | 协同性     |
| 0.7-0.85 | 中等协同性   |
| 0.85-0.9 | 轻度协同性   |
| 0.9-1.1  | 几乎为加合性  |
| 1.1-1.2  | 轻度拮抗性   |

[0858]

|          |         |
|----------|---------|
| 1.2-1.45 | 中等拮抗性   |
| 1.45-3.3 | 拮抗性     |
| 3.3-10   | 强拮抗性    |
| > 10     | 非常强的拮抗性 |

[0859]

| 细胞<br>药物 | RPMI 8226 | MOLP8       | U266        |
|----------|-----------|-------------|-------------|
| 硼替佐米     | 加合性       | 轻度拮抗性       | 拮抗性         |
| 沙立度胺     | 加合性到协同性   | 加合性到轻度拮抗性   | 拮抗性         |
| 来那度胺     | 协同性       | 加合性到协同性     | 轻度拮抗性到中等拮抗性 |
| 美法仑      | 加合性到协同性   | 轻度拮抗性到中等拮抗性 | 加合性到轻度协同性   |
| 地塞米松     | 未确定       | 加合性         | 加合性         |

[0860] 表 20: 对根据 Chou 和 Tally (1984) 的方法对在细胞系中获得的协同性结果的评估。

[0861] 在此实例中, 将 MOLP8 细胞系用于 BT062 与硼替佐米、沙立度胺、来那度胺、美法仑和地塞米松的组合。

[0862] 与沙立度胺或硼替佐米的组合, 既未导致协同效应, 也未导致加合效应, 而是导致了拮抗效应。与这些细胞培养物研究相反, 在下述异种移植模型中, 与硼替佐米的组合具有协同性。

[0863] 使用 MOLP8 人多发性骨髓瘤细胞, 已对作为异种移植研究中的 BT062 的组合配对成分的可能的抗骨髓瘤药物候选物进行了评估。

[0864] 实施例 1

[0865] 用 BT062 和来那度胺的组合疗法的抗骨髓瘤效果

[0866] 用 MOLP8 人骨髓瘤细胞对雌 SCID 小鼠进行皮下接种。在肿瘤接种后 11 天, 开始了仅用 BT062 或用 BT062 与来那度胺的组合进行的治疗。使用了单独的或与来那度胺组合的浓度为 100  $\mu$ g、200  $\mu$ g 和 400  $\mu$ g 的 BT062, 其中, 所述来那度胺在第 1-5 天和第 8-12 天以 100mg/kg 的剂量腹膜内给药。对照组动物接受了使用同样的施用计划和施用途径的磷酸盐缓冲盐水 (PBS)。通过测量肿瘤尺寸监视了肿瘤生长, 计算公式为长  $\times$  宽  $\times$  高  $\times$  1/2 (确定于第 10、14、18 和 21 天)。

[0867] 协同性的计算方式如下 (Yu 等, 2001 ; Gunaratnam 等, 2009) :

[0868] 比率 (r) = 预期 FTV (组合) / 观察到的 FTV (组合)

[0869] FTV :分数肿瘤体积=平均肿瘤体积 ( 测试 ) / 平均肿瘤体积 ( 对照 )

[0870] 比率 > 1 则认为有协同性, 而  $r < 1$  则表示小于加合。

[0871] 比率 (r) 在大于 1 时, 在此被称为“协同比”。

[0872] 从表 21 中可见, 28 天后在 200  $\mu$  g 和 400  $\mu$  g 的 BT062 浓度中观察到了协同性 :

[0873]

| 天  | BT062<br>100 | 来那度胺 | BT062 100 +<br>Len (观察的) | BT062 100 +<br>Len 预期的 | 比率<br>(exp/obs) |
|----|--------------|------|--------------------------|------------------------|-----------------|
| 10 | 0,93         | 1,00 | 0,97                     | 0,93                   | 0,96            |
| 14 | 0,75         | 0,82 | 0,59                     | 0,61                   | 1,04            |

[0874]

|           |                      |             |                                  |                                |                         |
|-----------|----------------------|-------------|----------------------------------|--------------------------------|-------------------------|
| <b>17</b> | 0,52                 | 0,45        | 0,23                             | 0,23                           | 1,02                    |
| <b>21</b> | 0,53                 | 0,42        | 0,19                             | 0,22                           | 1,19                    |
| <b>24</b> | 0,44                 | 0,55        | 0,18                             | 0,24                           | 1,30                    |
| <b>28</b> | 0,33                 | 0,46        | 0,17                             | 0,15                           | 0,90                    |
|           |                      |             |                                  |                                |                         |
|           | <b>BT062<br/>200</b> | <b>来那度胺</b> | <b>BT062 200 +<br/>Len (观察的)</b> | <b>BT062 100 +<br/>Len 预期的</b> | <b>比率<br/>(exp/obs)</b> |
| <b>10</b> | 1,02                 | 1,00        | 1,00                             | 1,02                           | 1,02                    |
| <b>14</b> | 0,45                 | 0,82        | 0,51                             | 0,37                           | 0,73                    |
| <b>17</b> | 0,13                 | 0,45        | 0,14                             | 0,06                           | 0,41                    |
| <b>21</b> | 0,08                 | 0,42        | 0,07                             | 0,03                           | 0,45                    |
| <b>24</b> | 0,11                 | 0,55        | 0,06                             | 0,06                           | 1,08                    |
| <b>28</b> | 0,13                 | 0,46        | 0,03                             | 0,06                           | 1,86                    |
|           |                      |             |                                  |                                |                         |
|           | <b>BT062<br/>400</b> | <b>来那度胺</b> | <b>BT062 400 +<br/>Len (观察的)</b> | <b>BT062 100 +<br/>Len 预期的</b> | <b>比率<br/>(exp/obs)</b> |
| <b>10</b> | 0,94                 | 1,00        | 0,91                             | 0,95                           | 1,04                    |
| <b>14</b> | 0,44                 | 0,82        | 0,24                             | 0,36                           | 1,49                    |
| <b>17</b> | 0,09                 | 0,45        | 0,06                             | 0,04                           | 0,63                    |
| <b>21</b> | 0,04                 | 0,42        | 0,04                             | 0,02                           | 0,44                    |
| <b>24</b> | 0,04                 | 0,55        | 0,03                             | 0,02                           | 0,80                    |
| <b>28</b> | 0,04                 | 0,46        | 0,01                             | 0,02                           | 1,43                    |

[0875] 表 21 :MOLP8 异种移植物中的分数肿瘤体积。

[0876] 已将不同浓度的 BT062 单独或与来那度胺组合施用到了具有肿瘤的异种移植物中。FTV 表示相对肿瘤体积。使用预期 FTV 与所观察到的 FTV 的比率值来确定协同效应。大于 1 的比率表示协同性。

[0877]

| 药剂    | 每注射<br>的剂量   | 总剂<br>量      | T/C (%)<br>(第 17 天) | 消退  |     | 第 77 天无<br>肿瘤存活 | 结果       |
|-------|--------------|--------------|---------------------|-----|-----|-----------------|----------|
|       |              |              |                     | 部分  | 完全  |                 |          |
| PBS   | (0.2 ml)     | -            | -                   | 0/6 | 0/6 | 0/6             |          |
| BT062 | 100<br>ug/kg | 100<br>ug/kg | 35                  | 0/6 | 0/6 | 0/6             | 活性       |
| BT062 | 200<br>ug/kg | 200<br>ug/kg | 14                  | 0/6 | 0/6 | 0/6             | 活性       |
| BT062 | 400<br>ug/kg | 400<br>ug/kg | 9                   | 4/6 | 1/6 | 0/6             | 高度活<br>性 |
| 来那度胺  | 100<br>mg/kg | 1g/kg        | 31                  | 0/6 | 0/6 | 0/6             | 活性       |
| BT062 | 100<br>ug/kg | 100<br>ug/kg | 19                  | 0/6 | 0/6 | 0/6             | 活性       |
| 来那度胺  | 100<br>mg/kg | 1g/kg        |                     |     |     |                 |          |
| BT062 | 200<br>ug/kg | 200<br>ug/kg | 12                  | 2/6 | 0/6 | 0/6             | 活性       |
| 来那度胺  | 100<br>mg/kg | 1g/kg        |                     |     |     |                 |          |
| BT062 | 400<br>ug/kg | 400<br>ug/kg | 6                   | 5/6 | 4/6 | 0/6             | 高度活<br>性 |
| 来那度胺  | 100<br>mg/kg | 1g/kg        |                     |     |     |                 |          |

[0878] 表 22 :来那度胺 BT062 组合 :不同剂量时的效果。

[0879] 图 30 和 31 显示在异种移植小鼠模型中组合疗法对中值肿瘤体积 (TV) 的效果。图 30 中的结果显示组合的加性效应。值得注意的是,当与 100  $\mu$  g/kg 剂量的来那度胺组合时,组合导致 100  $\mu$  g/kg 免疫偶联物的剂量。对于协同性比率,请参照上表。

[0880] 实施例 2

[0881] 用 BT062 和 VELCADE 的组合疗法的抗骨髓瘤效果

[0882] 在使用 MOLP8 多发性骨髓瘤细胞 (IMGN Inc.) 的异种移植研究中,对 VELCADE 作为 BT062 的潜在多发性骨髓瘤药物组合配对成分进行了评估。在植入肿瘤后 11 天,开始了

仅用 BT062 或用 BT062 与 VELCADE 的组合进行治疗。使用了单独的或与 VELCADE 组合的 100  $\mu$ g、200  $\mu$ g 和 400  $\mu$ g 浓度的 BT062, 其中, 所述 VELCADE 在第 1、4、8 和 11 天以 1mg/kg 的剂量给药。对照组动物接受了使用同样的施用计划和施用途径的磷酸盐缓冲盐水 (PBS)。通过测量肿瘤尺寸监视了肿瘤生长, 计算公式为长  $\times$  宽  $\times$  高  $\times 1/2$  (分别确定于第 10、14、17、21、24 和 28 天)。

[0883] 如在组合研究的实施例 1 中, 计算了协同性。

[0884] 从表 23 中可见, 在所有的 BT062 剂量方案中, 在第 25 天在 BT062 与 VELCADE 的组合中观察到了协同性。文献中报道的 R 值甚至更高 (Yu 等, 2001)。

[0885]

| 天  | BT062<br>100 | Velcade | BT062 100 +<br>Velcade (观察的) | 预期的  | 比率(exp/obs) |
|----|--------------|---------|------------------------------|------|-------------|
| 10 | 1,06         | 1,05    | 1,04                         | 1,12 | 1,07        |
| 14 | 0,74         | 0,84    | 0,56                         | 0,62 | 1,11        |

[0886]

|    |              |         |                          |      |                    |
|----|--------------|---------|--------------------------|------|--------------------|
| 18 | 0,44         | 0,96    | 0,28                     | 0,42 | 1,54               |
| 21 | 0,39         | 0,80    | 0,23                     | 0,31 | 1,38               |
| 25 | 0,48         | 0,95    | 0,26                     | 0,46 | 1,75               |
|    |              |         |                          |      |                    |
| 天  | BT062<br>200 | Velcade | BT062 200 + Vel<br>(观察的) | 预期的  | 比率(exp/obs)        |
| 10 | 1,02         | 1,05    | 1,07                     | 1,12 | 1,07               |
| 14 | 0,52         | 0,84    | 0,45                     | 0,44 | 0,98               |
| 18 | 0,13         | 0,96    | 0,10                     | 0,12 | 1,19               |
| 21 | 0,10         | 0,80    | 0,05                     | 0,08 | 1,47               |
| 25 | 0,10         | 0,95    | 0,04                     | 0,09 | 2,09               |
|    |              |         |                          |      |                    |
| 天  | BT062<br>400 | Velcade | BT062 400 + Vel<br>(观察的) | 预期的  | 协同性比率<br>(exp/obs) |
| 10 | 1,09         | 1,05    | 1,04                     | 1,15 | 1,10               |
| 14 | 0,45         | 0,84    | 0,43                     | 0,38 | 0,88               |
| 18 | 0,08         | 0,96    | 0,09                     | 0,08 | 0,89               |
| 21 | 0,05         | 0,80    | 0,04                     | 0,04 | 0,98               |
|    |              |         |                          |      |                    |
| 25 | 0,04         | 0,95    | 0,02                     | 0,03 | 1,36               |

[0887] 表 23 :用 VELCADE 进行的组合治疗。

[0888] 分数肿瘤体积 (FTV) 表示平均肿瘤体积 (测试)/ 平均肿瘤体积 (对照)。预期 FTV (组合) 与观察到的 FTV (组合) 的比率。大于 1 的比率值表示协同性, 小于 1 的比率值表示加合效应。

[0889]

| 药剂      | 每注射的剂量       | 治疗天数<br>(TX 开始<br>日期 =<br>接种后第<br>10 天) | T/C<br>(%) | (T-C),<br>以天<br>计 | Log<br>细胞<br>杀灭 | 消退  |     | 第 67<br>天无<br>肿瘤<br>存活 | 结果       |
|---------|--------------|-----------------------------------------|------------|-------------------|-----------------|-----|-----|------------------------|----------|
|         |              |                                         |            |                   |                 | 部分  | 完全  |                        |          |
| PBS     | (0.2<br>ml)  | 第 1 天                                   | -          | -                 | -               | 0/6 | 0/6 | 0/6                    |          |
| BT062   | 100<br>ug/kg | 第 1 天                                   | 43         | 5,5               | 0,5             | 0/6 | 0/6 | 0/6                    | 无活<br>性  |
| BT062   | 200<br>ug/kg | 第 1 天                                   | 11         | 14,5              | 1,3             | 1/6 | 0/6 | 0/6                    | 活性       |
| BT062   | 400<br>ug/kg | 第 1 天                                   | 7          | 31,5              | 2,8             | 4/6 | 2/6 | 0/6                    | 高度<br>活性 |
| Velcade | 1<br>mg/kg   | days 1, 4,<br>8, 11                     | 100        | 0,5               | 0,0             | 0/6 | 0/6 | 0/6                    | 无活<br>性  |
| BT062   | 100<br>ug/kg | 第 1 天                                   | 20         | 10,5              | 0,9             | 1/6 | 0/6 | 0/6                    | 活性       |
| Velcade | 100<br>mg/kg | days 1, 4,<br>8, 11                     |            |                   |                 |     |     |                        |          |
| BT062   | 200<br>ug/kg | 第 1 天                                   | 7          | 23,5              | 2,1             | 4/6 | 1/6 | 0/6                    | 高度<br>活性 |
| Velcade | 100<br>mg/kg | 第 1, 4, 8,<br>11 天                      |            |                   |                 |     |     |                        |          |
| BT062   | 400<br>ug/kg | 第 1 天                                   | 7          | 36,5              | 3,2             | 6/6 | 0/6 | 0/6                    | 高度<br>活性 |

[0890] 表 24 :VELCADE BT062 组合 :不同剂量时的效果。

[0891] 图 31 显示了在异种移植小鼠模型中该组合疗法对肿瘤体积 (TV) 中值的效果。结果显示,在所用的模型中,单独的 VELCADE 治疗对肿瘤体积没有效果。与 BT062 的组合提供了协同效应。值得注意的是,当与 mg/kg VELCADE 的剂量组合时,协同导致 100  $\mu$ g/kg 免疫偶联物的剂量。关于协同比,请参见上表。

[0892] 实施例 3 :BT062/ 美法仑

[0893] 已将 RPMI 细胞皮下植入裸鼠中。当肿瘤达到约  $100\text{mm}^3$  的总体积时,将小鼠随机分组。静脉内注射 2 个不同浓度的 BT062,即  $400\mu\text{g/kg}$  和  $100\mu\text{g/kg}$ ,每个都基于所连接的 DM4 的分子量。用 PBS 作为阴性对照。每组使用了 8 只各具有 1 个肿瘤(单侧植入)的小鼠。每周用 BT062 进行定量给药,随后在注射 BT062 后一天每周腹膜内施用一次美法仑( $3\text{mg/kg}$ )(结果未显示)。

[0894] 实施例 4 :体内药物组合研究 BT062/ 来那度胺 / 地塞米松

[0895] 尽管体外不同细胞系在 24h 来那度胺孵育后显示浓度依赖性 CD138 降低(图 32(A)-(D)),体内药物组合研究显示  $4\text{mg/kg}$ 、 $20\text{mg/kg}$  来那度胺和  $1.25\text{mg/kg}$  地塞米松的组合在 L363MM 异种移植模型中高度有效。

[0896] 在这一模型中,高侵袭性的表达 CD138 浆细胞骨髓瘤细胞系 L363 皮下植入 NOD/SCID 小鼠中。治疗在肿瘤达到大约  $100\text{mm}^3$  的尺寸时开始。BT062 每周一次在第 1、8、15、22、29 天以  $2\text{mg/kg}$  或  $4\text{mg/kg}$  的浓度单独或与来那度胺(其在第 0-4、7-11、14-18、21-25 和 28-32 天口服给予)和地塞米松(其在第 0、7、14、21 和 28 天腹膜内给予)组合静脉内施用。肿瘤尺寸每周一次测量。 $4\text{mg/kg}$  BT062 单独在减少肿瘤生长方面是活性的。 $4\text{mg/kg}$  BT062 与 Len/Dex 的组合对于肿瘤生长抑制显示较高活性,优于单一药剂(Len/Dex 单独;BT062 单独)(图 33)。

[0897] 在获悉上述公开内容后,对技术人员而言很多其他特征、修改和改进将变得显而易见。因此将所述其他特征、修改和改进认为是本发明的一部分,其范围则通过对本发明的概括和所附权利要求来确定。

[0898] 参考文献

[0899] Abdelkefi 等;“Single autologous stem-cell transplantation followed by maintenance therapy with thalidomide is superior to double autologous transplantaion in multiple myeloma:results of a multicenter randomized clinical trial;”Blood ;111 ;2008 ;pp. :1805-1810.

[0900] Akkina 等;“Modeling human lymphoid precursor cell gene therapy in the SCID-hu mouse;”Blood ;84 ;1994 ;pp. :1393-1398.

[0901] Armour 等;“Recombinant human IgG molecules lacking Fcgamma receptor I binding and monocyte triggering activities;”Eur J Immunol ;29(8) ;1999 ;pp. :2613-24.

[0902] Anderson 等;“Multiple Myeloma:New Insights and Therapeutic Approaches;”Hematology ;2000 ;pp. :147-165.

[0903] Anderson 等;“Multiple Myeloma;Hematology Am Soc Hematol Educ Program; 2002 ;pp. :214-40.

[0904] Anttonen 等:“Syndecan-lexpression has prognostic significance in head and neck carcinoma;”Br J of Cancer79(3/4),1999, pp. :558-564.

[0905] Anttonen 等;“High syndecan-lexpression is associated with favourable outcome in squamous cell lung carcinoma treated with radical surgery;”Lung Cancer ;32(3) ;June2001 ;pp. :297-305.

- [0906] Aref 等：“Syndecan-1 in multiple myeloma: relationship to conventional prognostic factors;” *Hematology* ;8;2003;pp.:221-228.
- [0907] Barbareschi 等;“High syndecan-1 expression in breast carcinoma is related to an aggressive phenotype and to poorer prognosis;” *Cancer* ;98(3); August1, 2003;pp.:474-83.
- [0908] Bartlett 等,“A phase I study of SGN-30 immunotherapy in patients with refractory or recurrent CD30+ hematologic malignancies,” *Blood*, vol. 111, 2008, pp.:1848-1854.
- [0909] Bataille 等;“The phenotype of normal, reactive and malignant plasma cells. Identification of “many and multiple myelomas” and of new targets for myeloma therapy;” *Haematologica* ;91(9); September 2006;pp.:1234-40.
- [0910] Bayer-Garner 等;“Syndecan-1 (CD138) immunoreactivity in bone marrow biopsies of multiple myeloma: shed syndecan-1 accumulates in fibrotic regions;” *Mod Pathol.* ;14(10); October 2001;pp.:1052-8.
- [0911] Beeram 等;“A phase I study of trastuzumab-DM1 (T-DM1), a first-in-class HER2 antibody-drug conjugate (ADC), in patients (pts) with advanced HER2+ breast cancer (BC);” *ASCO Meeting; Abstracts* ;May 20, 2008;pp.:1028.
- [0912] Berenson 等;“New drugs in multiple myeloma;” *Curr Opin Support Palliat Care* ;2(3); September 2008;pp.:204-10.
- [0913] Bernfield 等;“Biology of the syndecans: a family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans;” *Annu Rev Cell Biol* ;8;1992;pp.:365-393.
- [0914] Beste 等;“Small antibody-like proteins with prescribed ligand specificities derived from the lipocalin fold;” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* ;96;1999;pp.:1898-1903.
- [0915] Bhattacharyya 等;“Maytansine binding to the vinblastine sites of tubulin;” *FEBS Lett.* ;75;1977;pp.:159-162.
- [0916] Bisping 等;“Targeting receptor kinases by a novel indolinone derivative in multiple myeloma: abrogation of stroma-derived interleukin-6 secretion and induction of apoptosis in cytogenetically defined subgroups;” *Blood* ;107(5); March 1, 2006;pp.:2079-89.
- [0917] Bissery 等, “Experimental Antitumor Activity of Taxotere (RP56976, NSC628503), a Taxol Analogue”, *Cancer Research* 51, 1991, PP.:4845-4852.
- [0918] Bladé 等;“Advances in therapy of multiple myeloma;” *Curr Opin Oncol* ;20(6); November 2008;pp.:697-704.
- [0919] Blum 等;“Maytansine: A Phase I study of an ansa macrolide with antitumor activity;” *Cancer Treat Rep* ;62;1978;pp.:435-438.
- [0920] Brand 等;“Management of high risk metastatic prostate cancer: the case for novel therapies;” *J Urol* Dec;176(6Pt2); 2006;pp.:S76-80.

[0921] Blättler 等;“Drugs to Enhance the Therapeutic Potency of Anticancer Antibodies:Antibody-Drug Conjugates as Tumor-Activated Prodrugs;”Ojima, I., Vite, G. D. and Altmann, K. -H., Editors;Anticancer Agents-Frontiers in Cancer Chemotherapy, American Chemical Society, Washington, DC, 2001;2001;pp.:317-338.

[0922] Bross 等;“Approval summary:gemtuzumab ozogamicin in relapsed acute myeloid leukemia;”Clin Cancer Res;7;2001;pp.:1490-1496.

[0923] Burris 等;“A Phase I study of a first-in-class HER2antibody-drug conjugate in subjects with HER2-overexpressing metastatic breast cancer;”29<sup>th</sup> Annual San Antonio Breast Cancer Symposium(SABCS);Poster Abstract#2070;2006.

[0924] Cabanillas等;“Phase I study of maytansine using a3day schedule;”Cancer Treat Rep;62;1978;pp.:425-428.

[0925] Carbone 等;“AIDS-related plasma-blastic lymphomas of the oral cavity and jaws:a diagnostic dilemma. Ann;”Otol. Rhinol. Laryngol;108;1999;pp.:95-99.

[0926] Carlsson 等, “Protein thiolation and reversible protein-protein conjugation. N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionate, a new heterobifunctional reagent;”Biochem J;173;1978;pp.:723-737.

[0927] Carter P;“Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies;”Nat Rev Cancer;1;2001;pp.:118-129.

[0928] Carter 和 Senter, “Antibody-Drug Conjugates”, The Cancer Journal, Vol. 14(3), 2008, pp.:154-169

[0929] Chabner 等;“Initial clinical trials of maytansine,an antitumor plant alkaloid;”Cancer Treat Rep;62;1978;pp.:429-433.

[0930] Chanan-Khan 等;“Phase I Study of huN901-DM1(BB-10901)in Patients with Relapsed and Relapsed/Refractory CD56-Positive Multiple Myeloma;”Blood;108(11);Abstract#1174(ASH Meeting);November16, 2007.

[0931] Chanan-Khan 等;“Phase I Study of IMGN901in Patients with Relapsed and Relapsed/Refractory CD56-Positive Multiple Myeloma;”Blood(ASH Annual Meeting Abstracts);112;November2008;pp.:3689.

[0932] Chari 等;“Immunoconjugates containing novel maytansinoids:promising anticancer drugs;”Cancer Res;52;1992;pp.:127-131.

[0933] Chari 等;“Enhancement of the selectivity and antitumor efficacy of a CC-1065analogue through immunoconjugate formation;”Cancer Res.;55;1995;pp.:4079-4084.

[0934] Charnaux 等;“RANTES(CCL5)induces a CCR5-dependent accelerated shedding of syndecan-1(CD138)and syndecan-4from HeLa cells and forms complexes with the shed ectodomains of these proteoglycans as well as with those of CD44;”Glycobiology;15(2);2005;pp.:119-130.

[0935] Chen 等;“Engraftment of human hematopoietic precursor cells with

secondary transfer potential in SCID-hu mice ; "Blood ;84 ;1994 ;pp. :2497-2505.

[0936] Chilosì 等 ; "CD138/syndecan-1:a useful immunohistochemical marker of normal and neoplastic plasma cells on routine trephine bone marrow biopsies ; "Mod Pathol. ;12 ;1999 ;pp. :1101-1106.

[0937] Choi 等 ; "Syndecan-1,a key regulator of cell viability in endometrial cancer ; "Int J Cancer121(4) ;2007 ;pp. :741-50.

[0938] Chou和Talalay ; "Quantitative analysis of dose-effect relationships:the combined effects of multiple drugs on enzyme inhibitors ; "Adv.Enzyme Regul.22 ; 1984, pp. :27-55.

[0939] Clément 等 ; "B-B2and B-B4,two new mAb against secreting plasma cells ; "Leucocyte Typing V ;Oxford Press. ;1 ;1995 ;pp. :714-715.

[0940] Coiffier 等 , "Phase I/II study of the anti-CD19maytansinoid immunoconjugate SAR3419administered weekly to patients with relapsed/refractory B-cell non-Hodgkin's lymphoma(NHL), "2011ASCO Annual Meeting, Chicago , Illinois, June2011, Unpublished conference proceedings, 2011.

[0941] Conejo 等 ; "Syndecan-1expression is up-regulated in pancreatic but not in other gastrointestinal cancers ; "Int J Cancer ;88(1) ;2000Oct1 ;pp. :12-20.

[0942] Couturier 等 ; "Validation of213Bi-alpha radioimmunotherapy for multiple myeloma ; "Clinical Cancer Research5(10Suppl.) ;Oct1999 ;pp. :3165s-3170s.

[0943] Davies EJ等 ; "Distribution and Clinical Significance of Heparan Sulfate Proteoglycans ; "Ovarian Cancer Clin Cancer Res ;10(15) ;2004 ;pp. :5178-86.

[0944] DeGeorge 等 ; "Regulatory considerations for preclinical development of anticancer drugs ; "Cancer Chemother Pharmacol ;41(3) ;1998 ;p. :173-85.

[0945] Dmoszyńska A. ; "Diagnosis and the current trends in multiple myeloma therapy ; "Pol Arch Med Wewn ;118(10) ;October2008 ;pp. :563-6.

[0946] Dhodapkar 等 ; "Syndecan-1is a multifunctional regulator of myeloma pathobiology:control of tumor cell survival,growth,and bone cell differentiation ; "Blood ;91 ;1998 ;pp. :2679-2688.

[0947] Dimopoulos 等 ; "The role of novel drugs in multiple myeloma ; "Annals of Oncology19(Supplement7) ;2008 ;pp. :vii121-127.

[0948] Dore 等 ; "Identification and location on syndecan-1core protein of the epitopes of B-B2and B-B4monoclonal antibodies ; "FEBS Lett ;26 ;1998 ;pp. :67-70.

[0949] Dowell 等 ; "Pharmacokinetics of gemtuzumab ozogamicin,an antibody-targeted chemotherapy agent for the treatment of patients with acute myeloid leukemia in first relapse ; "J Clin Pharmacol ;41 ;2001 ;pp. :1206-1214.

[0950] Durie 等 ; "Myeloma management guidelines:a consensus report from the Scientific Advisors of the International Myeloma Foundation ; "Hematol J,4(6) ; 2003 ;pp. :379-98.

[0951] Durie 等 ; "International uniform response criteria for multiple

myeloma ; "Leukemia ;20(12) ;December2006 ;pp. :2220.

[0952] Eagan 等 ; "Early clinical study of an intermittent schedule for maytansine(NSC-153858):brief communication ;"J Natl Cancer Insti(Bethesda) ;60 ; 1978 ;pp. 93-96.

[0953] Edinger 等 ; "Noninvasive assessment of tumor cell proliferation in animal models ; "Neoplasia ;1 ;1999 ;pp. :303-310.

[0954] Facon 等 ; "Superiority of melphalan - prednisone(MP)+thalidomide(THAL) over MP and autologous stem cell transplantation in the treatment of newly diagnosed elderly patients with multiple myeloma ;"J. Clin. Oncol. ;24(Suppl.18) ; Abstract1 ;2006.

[0955] Fossella 等 ; "Phase II Trial of BB-10901(huN901-DM1)given weekly for four consecutive weeks every6weeks in patients with relapsed SCLC and CD56-positive small cell carcinoma ;"J Clin Onco,ASCO Annual Meeting Proceedings ;23(16S),Part I of II ;June1, 2005 ;7159 ;Supplement.

[0956] Galsky 等 ; "Phase I Trial of the Prostate-Specific Membrane Antigen - Directed Immunoconjugate MLN2704in Patients With Progressive Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer ;"Journal of Clinical Oncology ;May1, 2008 ; pp. :2147-2154.

[0957] Gattei 等 ; "Characterization of Anti-CD138monoclonal antibodies as tools for investigating the molecular polymorphism of syndecan-1in human lymphoma cells ; "Br J Haematol. ;104 ;1999 ;pp. :152-162.

[0958] Ghobrial 等 ; "Emerging drugs in multiple myeloma ;"Expert Opin Emerg Drugs ;12(1) ;March2007 ;pp. :155-63.

[0959] Giles 等 ; "Phase I study of AVE9633, an AntiCD33-Maytansinoid Immunoconjugate, Administered as an Intravenous Infusion in Patients with Refractory/Relapsed CD33-Positive Acute Myeloid Leukemia(AML) ;"Blood ;108(11) ; November16, 2006.

[0960] Greipp 等 ; "International staging system for multiple myeloma,"J Clin Oncol ;23(15) ;May20, 2005 ;pp. :3412-20.

[0961] Greipp 和 Lust ; "Pathogenetic relation between monoclonal gammopathies of undetermined significance and multiple myeloma ;"Stem Cells. Aug. 13Suppl2 ; 1995 ;pp. :10-21.

[0962] Gunaratnum 等 ; "G-quadruplex compounds and cis-platin act synergistically to inhibit cancer cell growth in vitro and in vivo ;"Biochemical Pharmacology ;78 ;2009 ;pp. :115-122.

[0963] Hamann 等 ; "An anti-CD33antibody-calicheamicin conjugate for treatment of acute myeloid leukemia ;"Choice of linker ;Bioconjug Chem ;13 ;2002 ;pp. :40-46.

[0964] Han 等 ; "New insights into syndecan-2expression and tumourigenic activity in colon carcinoma cells ;"J Mol Histol ;35(3) ;2004 ;pp. :319-26.

- [0965] Hashimoto 等;“Colorectal Association of loss of epithelial syndecan-1with stage and local metastasis of colorectal adenocarcinomas:an immunohistochemical study of clinically annotated tumors;”BMC Cancer8;2008;p.185.
- [0966] Helft 等;“A phase I study of cantuzumab mertansine administered as a single intravenous infusion once weekly in patients with advanced solid tumors;”Clin Cancer Res;10(13);2004Jul1;pp.:4363-8.
- [0967] Hideshima 等;“Perifosine, an oral bioactive novel alkylphospholipid, inhibits Akt and induces in vitro and in vivo cytotoxicity in human multiple myeloma cells;”Blood;107(10);2006;pp.:4053-62.
- [0968] Hideshima 等;“Understanding multiple myeloma pathogenesis in the bone marrow to identify new therapeutic targets;”Nat Rev Cancer;7(8);2007;pp.:585-98.
- [0969] Hiroshi 等;“The Monoclonal Antibody nBT062Conjugated to Cytotoxic Maytansinoids Has Potent and Selective Cytotoxicity against CD138Positive Multiple Myeloma Cells in Vitro and in Vivo;”Blood;(ASH Annual Meeting Abstracts);112;November2008;p.:1716.
- [0970] Holden 等;“A phase I study of weekly dosing of trastuzumab-DM1(T-DM1) in patients(pts)with advanced HER2+breast cancer(BC);”ASCO Meeting Abstracts;May20, 2008;p.:1029.
- [0971] Horvathova 等;In:al.SFSe,ed.Leucocyte Typing V.;Oxford:Oxford University Press;1995;pp.:713-714.
- [0972] Huang 等;“Validation and reduction of FACT/GOG-Ntx subscale for platinum/paclitaxel-induced neurologic symptoms:a gynecologic oncology group study;”Int J Gynecol Cancer;17;2007;pp.:387-93.
- [0973] Hwang 等;“New Frontiers in the Treatment of Multiple Myeloma;”Scientific World Journal;6;December6, 2006;pp.:1475-503.
- [0974] Ikeda 等;“The monoclonal antibody nBT062conjugated to maytansinoids has potent and selective cytotoxicity against CD138positive multiple myeloma cells in vitro and in vivo;”Clin.Cancer Research;15(12);2009.
- [0975] Ishitsuka 等;“Targeting CD56by the maytansinoid immunoconjugate IMGN901(huN901-DM1):a potential therapeutic modality implication against natural killer/T cell malignancy;”Br. J. Haematol;141(1);April2008;pp.:129-31.
- [0976] Issell 等;“Maytansine;”Cancer Treat Rev;5;1978;pp.:199-207.
- [0977] Jemal 等;“Cancer statistics;”CA Cancer J Clin;58;2008;pp.:71-96.
- [0978] Johnson 等;“Novel and Targeted Agents for Small Cell Lung Cancer;”ASCO Educational Book;January1, 2008;pp.:363-367.
- [0979] Kovtun 等;“Antibody-drug conjugates designed to eradicate tumors with homogeneous and heterogeneous expression of the target antigen;”Cancer Res;

66(6);2006;pp.:3214-21.

[0980] Kuesters 等;“Correlation of ErbB2Gene Status,mRNA and Protein Expression in a Panel of>100Human Tumor Xenografts of Different Origin; Onkologie;29;2006;pp:249-256

[0981] Krebs 等;“High-throughput generation and engineering of recombinant human antibodies;”J.Immunol.Methods;254;2001;pp.:67-84.

[0982] Krop 等;“A Phase I Study of Trastuzumab-DM1,a First-in-Class HER2Antibody-Drug Conjugate(ADC),in patients with HER2+Metastatic Breast Cancer;”14th European Cancer Conference(ECC014);Poster#2118;2007.

[0983] Kupchan 等;“Structural requirements for antileukemic activity among the naturally occurring and semisynthetic maytansinoids;”J Med Chem;21;1978; pp.:31-37.

[0984] Kyle;“Benign monoclonal gammopathy-after 20 to 35 years of follow-up;”Mayo Clin Proceedings68(1);1993;pp.:26-36.

[0985] Kyle 等;“Multiple myeloma;”N Engl J Med;351(18);October28,2004; pp.:1860-73.

[0986] Kyle等;“Criteria for diagnosis,staging,risk stratification and response assessment of multiple myeloma;”Leukemia;23;2009;pp.:3-9.

[0987] Kyoizumi 等;“Implantation and maintenance of functional human bone marrow in SCID-hu mice;”Blood;79;1992;pp.:1704-1711.

[0988] Kyoizumi 等;“Preclinical analysis of cytokine therapy in the SCID-hu mouse;”Blood;81;1993;pp.:1479-1488.

[0989] Lambert JM;“Drug-conjugated monoclonal antibodies for the treatment of cancer;”Current Opinion in Pharmacology;5;2005;pp.:543-549.

[0990] Langford 等;“Multiple heparan sulfate chains are required for optimal syndecan-1function;”J Biol Chem;273(45);November6,1998;pp.:29965-71.

[0991] Legrand等;“An open label,dose escalation study of AVE9633administered as a single agent by intravenous(IV)infusion weekly for2weeks in a4-week cycle to patients with relapsed or refractory CD33-positive Acute Myeloid Leukemia(AML);”Blood;118(11);November16,2007.

[0992] Li 等;“Clinicopathological significance of expression of paxillin,syndecan-1and EMMPRIN in hepatocellular carcinoma;”World J Gastroenterol.11(10);2005;pp.:1445-51.

[0993] Liu 等;“Eradication of large colon tumor xenografts by targeted delivery of maytansinoids;”Proc Natl Acad Sci U S A;93;1996;pp.:8618-8623.

[0994] Lousouarn 等;“Prognostic impact of syndecan-1expression in invasive ductal breast carcinomas;”Br J Cancer;28;2008;pp.:1993-1998

[0995] Lorigan 等;“Phase I trial of BB-10901(huN901-DM1)given daily by IV infusion for three consecutive days every three weeks in patients with SCLC

and other CD56-positive solid tumors; "European Journal of Cancer Supplements; 4(12); 2006; pp.:195.

[0996] Ludwig 等; "Supportive care in multiple myeloma Best Practice&Research Clinical Haematology; " 20; Issue4; 2007; pp.:817-835.

[0997] McCann 等; "Phase II trial of huN901-DM1 in patients with relapsed small cell lung cancer (SCLC) and CD56-positive small cell carcinoma; " J Clin Onco; ASCO Annual Meeting Proceedings Part1; 25(18S); 2007 June 20; Supplement; p.:18084.

[0998] Mateos 等; "Bortezomib plus melphalan and prednisone in elderly untreated patients with multiple myeloma: results of a multicenter phase 1/2 study; " Blood; 108; 2006; pp.:2165-2172.

[0999] McCune 等; "The SCID-hu mouse: murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function; " Science; 241; 1998; pp.:1632-1639.

[1000] Mennerich 等; "Shift of syndecan-1 expression from epithelial to stromal cells during progression of solid tumours; " Eur J Cancer; 40(9); June 2004; pp.:1373-82.

[1001] Milowsky 等; "Phase I/II trial of the prostate-specific membrane antigen (PSMA)-targeted immunoconjugate MLN2704 in patients (pts) with progressive metastatic castration resistant prostate cancer (CRPC); " J Clin Onco; ASCO Annual Meeting Proceedings Part I; 24(18S); 2006 p.:4500.

[1002] Mita 等; "A phase I study of a CanAg-targeted immunoconjugate, huC242-DM4, in subjects with CanAg-expressing solid tumors; " J Clin Onco; ASCO Annual Meeting Proceedings Part1; 25(18S); 2007 June 20; Supplement; p.:3062.

[1003] Mitsogiannis 等; "Plasmacytoid transitional cell carcinoma of the urinary bladder; " Urology 66(1); 2005; p.194.

[1004] Morgan 等; "Advances in oral therapy for multiple myeloma; " Lancet Oncol; 7(4); April 2006; pp.:316-25.

[1005] Mosmann T.; "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays; " J Immunol Methods; 65; 1983 pp.:55-63.

[1006] Munshi 等; "Plasma cell disorders; " In: Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, editors; Harrison's Principles of Internal Medicine; 16th ed; New York: McGraw-Hill Medical Publishing Division; 2008. pp.:700-707.

[1007] Namikawa 等; "Growth of human myeloid leukemias in the human marrow environment of SCID-hu mice; " Blood; 82; 1993; pp.:2526-2536.

[1008] NCCN Guidelines; "NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology; " Multiple Myeloma V.2. 2009; National Comprehensive Cancer Network; November 9, 2008; available at [www.nccn.org](http://www.nccn.org).

- [1009] Ning 等;“Liposomal doxorubicin in combination with bortezomib for relapsed or refractory multiple myeloma;”Oncology(Williston Park);21(12);November277;pp.:1503-8.
- [1010] Numa 等;”Syndecant-expression in cancer of the uterine cervix:association with lymph node metastasis;Int J Oncol.20(1);pp.:200239-43.
- [1011] Ocio 等,“New drugs in multiple myeloma:mechanisms of action and phase I/II clinical findings;”Lancet Oncol:9(12);December2008;pp.:1157-65.
- [1012] O’Connell 等;“CD138(Syndecan-1), a Plasma Cell Marker Immunohistochemical Profile in Hematopoietic and Nonhematopoietic Neoplasms;”Am J Clin Pathol;121;2004;pp.:254-263.
- [1013] Ojima 等;“Tumor-specific novel taxoid-monoclonal antibody conjugates;”J. Med. Chem. ;45;2002;pp. 5620 - 5623.
- [1014] Oken 等;“Toxicity And Response Criteria Of The Eastern Cooperative Oncology Group;”Am J Clin Oncol ;5;1982;pp.:649-655.
- [1015] Olafsen 等;“Covalent disulfide-linked anti-CEA diabody allows site-specific conjugation and radiolabeling for tumor targeting applications;”Prot. Eng. Design&Selection17;1;2004;pp.:21-27.
- [1016] Orosz 等;“Syndecant-expression in different soft tissue tumours;”Anticancer Res;21(1B);2001;pp.:733-7.
- [1017] Padlan,EA;“A possible procedure for reducing the immunogenicity of antibody variable domains while preserving their ligand-binding properties;”Mol. Immunol. ;28;1991;pp.:489 - 498.
- [1018] Palacios 等;“B-B4monoclonal antibody and identification of human bone marrow plasma cells;”Br J Haematol ;96(3);March1997;pp.:655-657.
- [1019] Palumbo 等;“Oral revlimid plus melphalan and prednisone(R-MP)for newly diagnosed multiple myeloma:results of a multicenter Phase I/II study;”Blood;108;(ASH Annual Meeting Abstracts);Abstract800;2006.
- [1020] Palumbo 等;“Treatment of newly diagnosed myeloma;”Leukemia;23;November13, 2008;pp.:449-456.
- [1021] Patriarca 等;“Considerations in the treatment of multiple myeloma:a consensus statement from Italian experts;”Eur J Haematol ;82(2);February2009;pp.:93-105.
- [1022] Payne G.;“Progress in immunoconjugate cancer therapeutics;”Cancer Cell ;3;2003;pp.:207-212.
- [1023] Pegram 等;“Phase II study of receptor-enhanced chemosensitivity using recombinant humanized anti-p185HER2/neu monoclonal antibody plus cisplatin in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer refractory to chemotherapy treatment;”J. Clin. Oncol. ;16;1998;pp.:2659 - 2671.
- [1024] Podar 等;“Bone marrow microenvironment and the identification of new

targets for myeloma therapy; "Leukemia;23(1);January2009 ;pp.:10-24.

[1025] Qin 等; "The pharmacokinetics and pharmacodynamics of IMG242(huC242-DM4)in patients with CanAg-expressing solid tumors;"Journal of Clinical Oncology,2008ASCO Annual Meeting Proceedings(Post-Meeting Edition); 26(15S);May20,2008;Supplement;p.:3066.

[1026] Quach 等: "Mechanism of action of immunomodulatory drugs(ImiDS)in multiple myeloma, "Leukemia;24;2010 ;pp.:22-32.

[1027] Raje等; "Therapeutic use of immunomodulatory drugs in the treatment of multiple myeloma;"Expert Rev Anticancer Ther ;6(9);September2006 ;pp.:1239-47.

[1028] Rajkumar 等; "Combination therapy with lenalidomide plus dexamethasone(Rev/Dex)for newly diagnosed myeloma; "Blood;December15,2005; 106(13);pp.:4050 - 4053.

[1029] Rajkumar等; "Phase III clinical trial of thalidomide plus dexamethasone compared with dexamethasone alone in newly diagnosed multiple myeloma:A clinical trial coordinated by the Eastern cooperative Oncology Group; "J Clin Oncol2006 ;24 ;pp.:431-436.

[1030] Rajkumar 等; "A Randomized Trial of Lenalidomide Plus High-Dose Dexamethasone(RD)Versus Lenalidomide Plus Low-Dose Dexamethasone(Rd)in Newly Diagnosed Multiple Myeloma(E4A03):A Trial Coordinated by the Eastern Cooperative Oncology Group; "Blood;110;2007;p.:74.

[1031] Rawstron 等; "Circulating plasma cells in multiple myeloma:characterization and correlation with disease stage; "Br J Haematol; 97;1997 ;pp.:46-55.

[1032] Remillard 等; "Antimitotic activity of the potent tumor inhibitor maytansine; "Science;198;1975 ;pp.:1002-1005.

[1033] Richardson等; "New treatments for multiple myeloma; "Oncology(Williston Park);19(14);December2005 ;pp.:1781-92.

[1034] Richardson等; "Lenalidomide in multiple myeloma;"Expert Rev Anticancer Ther,6(8);August2006 ;pp.:1165-73.

[1035] Richardson 等; "New Drugs for Myeloma; "Oncologist Jun;12(6);2007; pp.:664-89.

[1036] Richardson 等; "Lenalidomide,bortezomib,and dexamethasone as front-line-therapy for patients with multiple myeloma(MM):preliminary results of a phase I/II study; "Blood;110;2007;p.:63a.

[1037] Riechelmann等; "Phase I trial with the CD44v6-targeting immunoconjugate bivatuzumab mertansine in head and neck squamous cell carcinoma; "Oral Oncol; 44(9);September2008 ;pp.:823-9.

[1038] Roh 等; "Synectan-1expression in gallbladder cancer and its prognostic significance; "Eur Surg Res.41(2);2008 ;pp.:245-50.

- [1039] Roguska 等;“Humanization of murine monoclonal antibodies through variable domain resurfacing;”Proc Natl Acad Sci U S A;91;1994;pp.:969-973.
- [1040] Ross 等;“Prostate stem cell antigen as therapy target:tissue expression and in vivo efficacy of an immunoconjugate;”Cancer Res.;May1,2002;62(9) pp.:2546-53.
- [1041] Ross 等;“Anticancer Antibodies;”Am J Clin Path;119;April17,2003; pp.:472-485.
- [1042] Rowinsky 等;“SB-408075,a tumor-activated immunoconjugate targeting the C242CanAg antigen with a potent maytansinoid payload:phase I, pharmacokinetic(PK),and biological studies;”Proc Am Soc Clin Oncol21:Abstract#118;2002.
- [1043] Rupp 等;“Safety and pharmacokinetics of bivatuzumab mertansine in patients with CD44v6-positive metastatic breast cancer:final results of a phase I study;”Anticancer Drugs;18(4);April2007;pp.:477-485.
- [1044] Salfeld, “Isotype selection in antibody engineering”,Nat.Biotechnol.25(12),2007,pp.1369-1372.
- [1045] Sanderson 等;“B lymphocytes express and lose syndecan at specific stages of differentiation;”Cell Regul.;1989;1;pp.:27-35.
- [1046] Sandhu 等;“Human hematopoiesis in SCID mice implanted with human adult cancellous bone;”Blood;88;1996;pp.:1973-1982.
- [1047] Sankhala 等;“A phase I and pharmacokinetic study of a CanAg-targeted immunoconjugate,HuC242-DM4,in patients with CanAg-expressing solid tumors;”AACR-NCI-EORTC“Molecular Targets and Cancer Therapeutics”International Conference; Abstract#B70;2007.
- [1048] Sasaki 等;“Bisphosphonate risedronate reduces metastatic human breast cancer burden in bone in nude mice;”Cancer Res.;55;1995;pp.:3551-3557.
- [1049] Sauter 等;,,Pharmacokinetics,immunogenicity and safety of bivatuzumab mertansine,a novel CD44v6-targeting immunoconjugate,in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck;”Int J Oncol.;30(4);April2007;pp.:927-35.
- [1050] Schneider 等;“Two subsets of peripheral blood plasma cells defined by differential expression of CD45antigen;”Br J Haematol;97;1997;pp.:56-64.
- [1051] Schuurman, 等;“Normal human immunoglobulin G4is bispecific:it has two different antigen-combining sites;”Immunology;97;1999;pp.:693-698.
- [1052] Sebestyen 等;“Syndecan-1(CD138)expression in human non-Hodgkin lymphomas.Br J Haematol;”104(2);1999;pp.:412-9.
- [1053] Seftalioglu 等;“Syndecan-1/CD138expression in normal myeloid,acute lymphoblastic and myeloblastic leukemia cells;”Acta Histochem;105;2003; pp.:213-221.
- [1054] Seftalioglu 等;“Syndecan-1(CD138)expression in acute myeloblastic

leukemia cells--an immuno electron microscopic study; "Acta Oncol;42;2003; pp. :71-74.

[1055] Senter 等; "Cures and regressions of established tumors with monoclonal antibody auristatin conjugates; "Abstract#2062, American Association for Cancer Res. (San Francisco, CA: American Association for Cancer Res.) ;2007 ;p. :414.

[1056] Shah 等; "Expression of syndecan-1 and expression of epidermal growth factor receptor are associated with survival in patients with nonsmall cell lung carcinoma; "Cancer 101(7) ;2004 ;pp. :1632-8.

[1057] Shields 等; "High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma R1, Fc gamma R2, Fc gamma R3, and Fc gamma R4 and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R. ; "J Biol Chem;276(9) ;2001 ;pp. :6591-604.

[1058] Sievers 等; "Efficacy and safety of gemtuzumab ozogamicin in patients with CD33-positive acute myeloid leukemia in first relapse; "J. Clin. Oncol. ;19; 2001 ;pp. 3244 - 3254.

[1059] Sievers 等; "Mylotarg: antibody-targeted chemotherapy comes of age; "Curr. Opin. Oncol. ;13;2001 ;pp. 522 - 527.

[1060] Smith R. ; "Single chain antibody variable region fragments; "available at [www.stanford.edu/~smithr/science/scfv.html](http://www.stanford.edu/~smithr/science/scfv.html) (last updated on May, 2001).

[1061] Strobeck M; "Multiple Myeloma therapies; "Nature Reviews Drug Discovery ;6(3) ;March 2007 ;pp. :181-82.

[1062] Studnicka 等; "Human-engineered monoclonal antibodies retain full specific binding activity by preserving non-CDR complementarity-modulating residues; "Protein Eng. ;7(6) ;1994 pp. :805-814.

[1063] Tai 等; "Immunomodulatory drug lenalidomide (CC-5013, IMiD3) augments anti-CD40/SGN-40-induced cytotoxicity in human multiple myeloma: clinical implications; "Cancer Res. 2005 Dec 15;65(24):11712-20.

[1064] Takimoto 等; "Principles of oncologic pharmacotherapy; "Cancer Management: A multidisciplinary Approach; 11<sup>th</sup> Edition; Chapter 3; 2008; April 15, 2009; available at <http://www.cancernetwork.com/display/article/10165/1402628>.

[1065] Tassone 等; "Cytotoxic activity of the maytansinoid immunoconjugate B-B4 - DM1 against CD138<sup>+</sup> multiple myeloma cells; "Blood; 104(12) ;2004; pp. :3688-3696.

[1066] Terpos 等; "European Myeloma Network The use of bisphosphonates in multiple myeloma: recommendations of an expert panel on behalf of the European Myeloma Network; "Ann Oncol. 20(8) ;2009 ;pp. :1303-17.

[1067] Tijink 等; "A phase I dose escalation study with anti-CD44v6 bivatuzumab mertansine in patients with incurable squamous cell carcinoma of the head and

neck or esophagus ; "Clin Cancer Res ;12(20Pt1) ;October15, 2006 ;pp. :6064-72.

[1068] Tolcher 等 ; "A Phase I study of huC242-DM4to assess the safety and pharmacokinetics of huC242-DM4administered as a single intravenous infusion once every three weeks to subjects with solid tumors ; "European Journal of Cancer Supplements ;12(4) ;2006p. :66.

[1069] Tolcher 等 ; "Cantuzumab mertansine, a maytansinoid immunoconjugate directed to the CanAg antigen: a phase I, pharmacokinetic, and biologic correlative study ; "J Clin Oncol ;21 ;2003 ;pp. :211-222.

[1070] Tomayko 等 ; "Determination of subcutaneous tumor size in athymic(nude) mice ; "Cancer Chemother. Pharmacol, 24 ;1989 ;pp. :148.

[1071] Toyoshima 等 ; "Expression of syndecan-1 is common in human lung cancers independent of expression of epidermal growth factor receptor ; "Lung Cancer31(2-3) ;2001 ;pp. :193-202.

[1072] Udi, "In vitro analyse von Standard und innovativen anti-Multiplen Myelom(MM)-Therapien auf MM-Zelllinien und deren Interaktion mit dem Knochenmark(KM)-Milieu, "Diss. Medical University Clinic and Polyclinic, Albert-Ludwigs-University Freiburg, Freiburg, Germany, 2010.

[1073] Urashima 等 ; "The development of a model for the homing of multiple myeloma cells to human bone marrow ; "Blood ;90 ;1997 ;pp. :754-765.

[1074] Vogel, CW ; "Preparation of immunoconjugates using antibody oligosaccharide moieties ; "Methods in Molecular Biology: Bioconjugation protocols strategies and methods ;283 ;2007pp. :87-108.

[1075] Vooijs 等 ; "Efficacy and toxicity of plasma-cell-reactive monoclonal antibodies B-B2 and B-B4 and their immunotoxins ; "Cancer Immunol Immunother ;42 ;1996 ;pp. :319-328.

[1076] Wang 等 ; "Targeted proteasome inhibition by Velcade induces apoptosis in human mesothelioma and breast cancer cell lines ; "Cancer Chemother Pharmacol ; December4, 2009.

[1077] Ward 等 ; "Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from Escherichia coli ; "Nature ;341 ;1989 ;pp. :544-546.

[1078] Wargalla 等 ; "Rate of internalization of an immunotoxin correlates with cytotoxic activity against human tumor cells ; "Proc. Natl. Acad. Sci. USA ;86 ;1989 ;pp. :5146-5150.

[1079] Weber 等 ; "Lenalidomide plus high-dose dexamethasone provides improved overall survival compared to high-dose dexamethasone alone for relapsed or refractory multiple myeloma(MM): results of 2 Phase III studies (MM-009, MM-010) and subgroup analysis of patients with impaired renal function ; "Blood ;108 ;(ASH Annual Meeting Abstracts) ;Abstract3547 ;2006.

[1080] Wiksten 等 ; "Comparison of the prognostic value of a panel of tissue

tumor markers and established clinicopathological factors in patients with gastric cancer; "Gastric:Anticancer Res.28(4C);2008;pp.:2279-87.

[1081] Wijdenes 等;"A plasmocyte selective mAb(B-B4)recognizes syndecan-1;"Br J Haematol;94(2)August1996;pp.:318-23.

[1082] Wijdenes 等;"CD138;"J Biol Regul Homeost Agents;16(2)April-June2002;pp.:152-155.

[1083] Witzig 等;"Detection of myeloma cells in the peripheral blood by flow cytometry;"Cytometry;26;1996;pp.:113-120.

[1084] Xie 等;"Pharmacokinetics and biodistribution of the antitumor immunoconjugate,cantuzumab mertansine(huC242-DM1),and its two components in mice;"J Pharmacol Exp Ther.;308(3);March2004;pp.:1073-82.

[1085] Yang 等;"Genetically fluorescent melanoma bone and organ metastasis models;"Clin Cancer Res;5;1999;pp.:3549-3559.

[1086] Yang 等;"Whole-body optical imaging of green fluorescent protein-expressing tumors and metastases;"Proc Natl Acad Sci U S A;97;200;pp.:1206-1211.

[1087] Yang 等;"The syndecan-1heparan sulfate proteoglycan is a viable target for myeloma therapy;"Blood;110(6);September15,2007pp.:2041-8.

[1088] Yasui 等;"Recent advances in the treatment of Multiple Myeloma;"Curr Pharm Biotechnol;7(5);October2006;pp.:381-93.

[1089] Yoshitake 等;"Conjugation of glucose oxidase from Aspergillus niger and rabbit antibodies using N-hydroxysuccinimide ester of N-(4-carboxycyclohexylmethyl)-maleimide;"Eur J Biochem;101;1979;pp.:395-399.

[1090] Yu 等;"Antitumor synergy of CV787,a prostate cancer-specific adenovirus,and paclitaxel and docetaxel;"Cancer Research;61;January15,2001;pp.:517-525.

[1091] Zellweger 等;"Tissue microarray analysis reveals prognostic significance of syndecan-1expression in prostate cancer;"Prostate55(1);2003;pp.:20-9.

[0001]

## 序列表

<110> 生物测试股份公司  
伊诺谿金公司.

<120> 靶向 CD138 的免疫偶联物的用途

<130> 332630W0/CJS

<140>  
<141>

<150> 61/722,367  
<151> 2012-11-05

<150> 61/568,640  
<151> 2011-12-08

<160> 13

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1  
<211> 448  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 嵌合人/小鼠抗体的重链氨基酸序列 (预测的)

<220>  
<221> CDR1  
<222> (31)..(35)

<220>  
<221> CDR2  
<222> (51)..(68)

<220>  
<221> CDR3  
<222> (99)..(111)

<400> 1

[0002]

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

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

Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Glu Ile Leu Pro Gly Thr Gly Arg Thr Ile Tyr Asn Glu Lys Phe  
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Ile Ser Ser Asn Thr Val Gln  
65 70 75 80

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

Ala Arg Arg Asp Tyr Tyr Gly Asn Phe Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp  
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro  
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr  
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr  
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro  
165 170 175

[0003]

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr  
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp  
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr  
210 215 220

Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro  
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser  
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp  
260 265 270

Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn  
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val  
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu  
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys  
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr  
340 345 350

[0004]

Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr  
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu  
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu  
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys  
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly  
435 440 445

<210> 2

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 嵌合人/小鼠抗体的轻链氨基酸序列（预测的）

<220>

<221> CDR1

<222> (24)..(34)

<220>

<221> CDR2

<222> (50)..(56)

<220>

<221> CDR3

[0005]

<222> (89).. (97)

<400> 2

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn Tyr  
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Glu Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Ile Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Arg  
85 90 95

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

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

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

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

[0006]

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210

<210> 3

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> IgH 引物 MHV7

<400> 3

atgggcatca agatggagtc acagaccag g

31

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> IgG1 恒定区引物 MHCG1

<400> 4

cagtggatag acagatgggg g

21

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

[0007]

<220>

<223> Ig kappa 引物 MKV2

<400> 5

atggagacag acacactcct gctatgggtg

30

<210> 6

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> Ig kappa 引物 MKV4

<400> 6

atgagggcc ctcctcagtt ttttggttc ttg

33

<210> 7

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> Ig kappa 引物 MKV9

<400> 7

atggatcca cacctcagtt ccttg

25

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物 MKC

<400> 8

actggatggt gggaagatgg

20

[0008]

|       |                                                        |    |
|-------|--------------------------------------------------------|----|
| <210> | 9                                                      |    |
| <211> | 50                                                     |    |
| <212> | DNA                                                    |    |
| <213> | 人工序列                                                   |    |
| <220> |                                                        |    |
| <223> | 正向 (For) 引物                                            |    |
| <400> | 9                                                      |    |
|       | agagaagctt gccgccacca tgattgcctc tgctcagttc ctgtgtctcc | 50 |
| <210> | 10                                                     |    |
| <211> | 35                                                     |    |
| <212> | DNA                                                    |    |
| <213> | 人工序列                                                   |    |
| <220> |                                                        |    |
| <223> | 寡核苷酸引物 BT03                                            |    |
| <400> | 10                                                     |    |
|       | caacagtata gtaagctccc tcggacgttc ggttg                 | 35 |
| <210> | 11                                                     |    |
| <211> | 35                                                     |    |
| <212> | DNA                                                    |    |
| <213> | 人工序列                                                   |    |
| <220> |                                                        |    |
| <223> | 寡核苷酸引物 BT04                                            |    |
| <400> | 11                                                     |    |
|       | ccaccgaacg tccgaggag ctactatac tgttg                   | 35 |
| <210> | 12                                                     |    |
| <211> | 41                                                     |    |
| <212> | DNA                                                    |    |
| <213> | 人工序列                                                   |    |
| <220> |                                                        |    |
| <223> | 引物 g2258                                               |    |

[0009]

<400> 12

cgcggggatcc actcacgttt gatttccagc ttggtgcctc c

41

<210> 13

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物 g22949

<400> 13

cgatgggccc ttggtggagg ctgaggagac ggtgactgag gticc

45

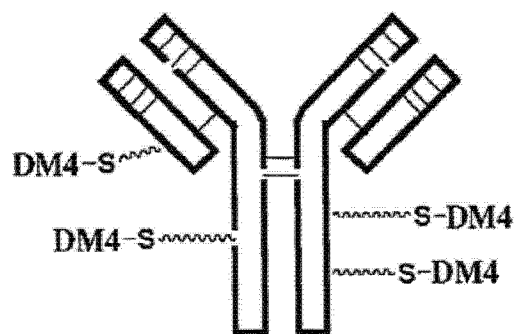


图 1

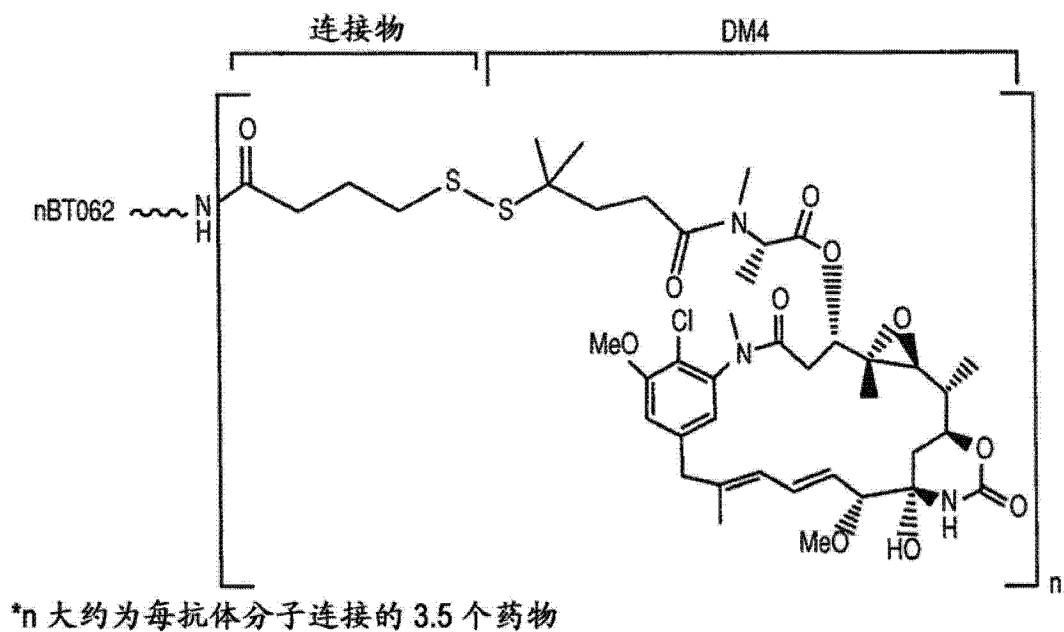


图 2

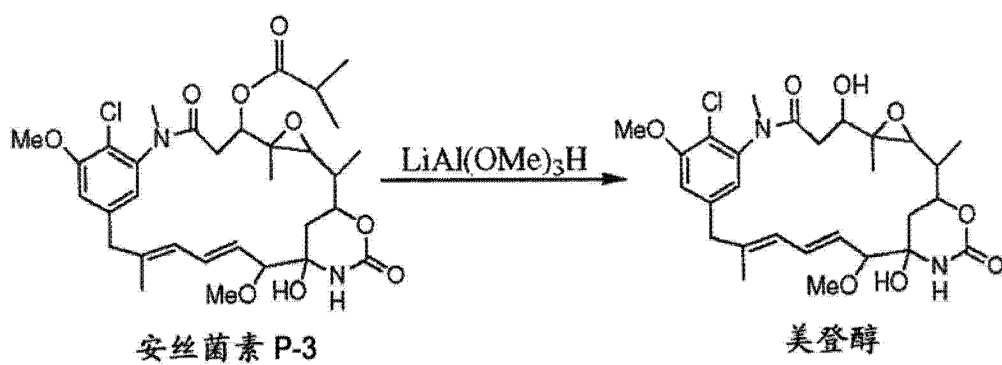


图 3

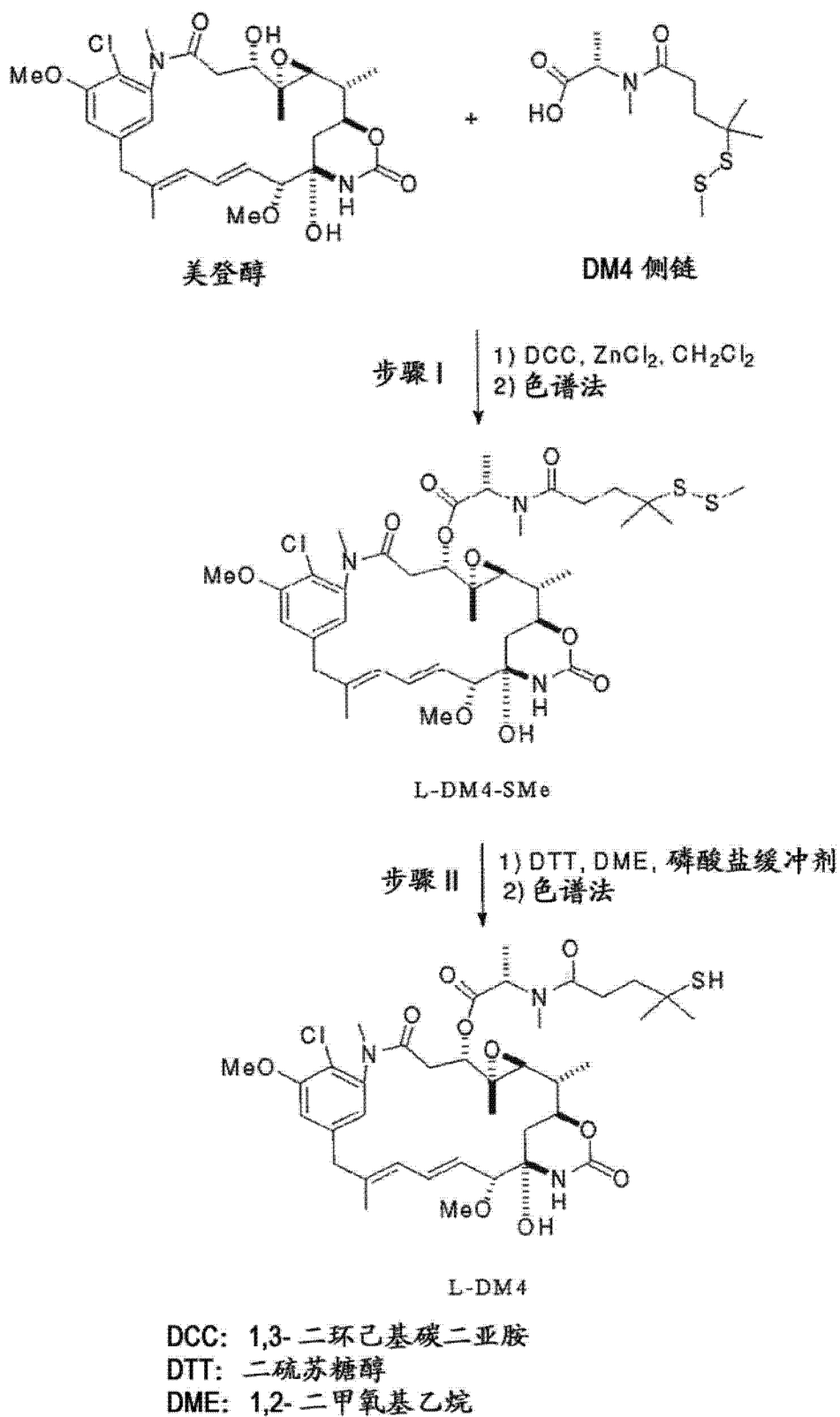


图 4



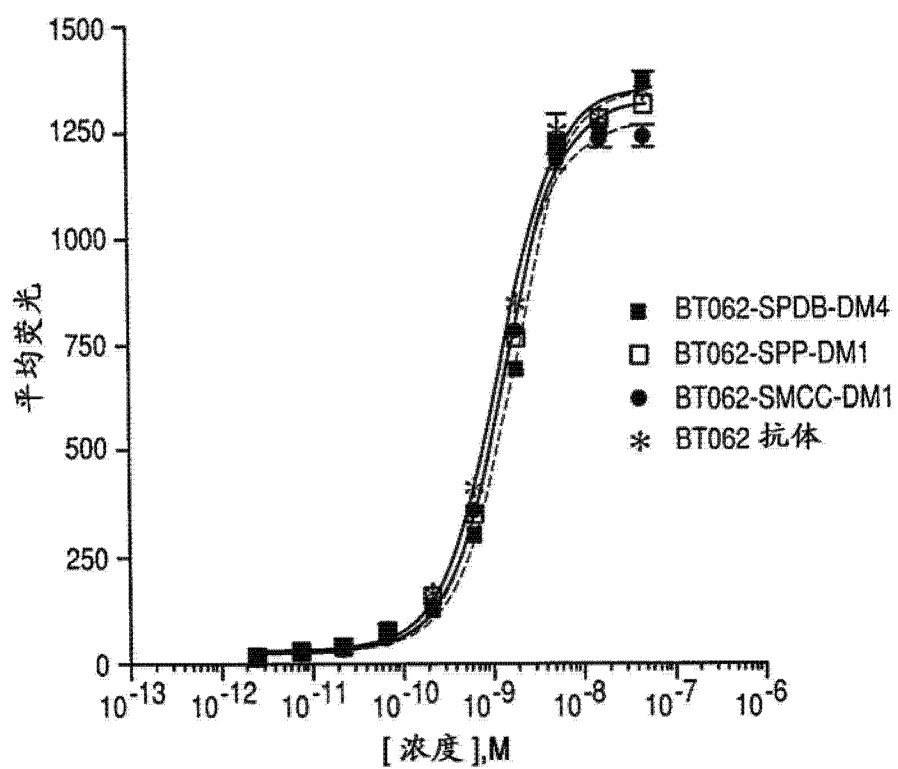


图 6

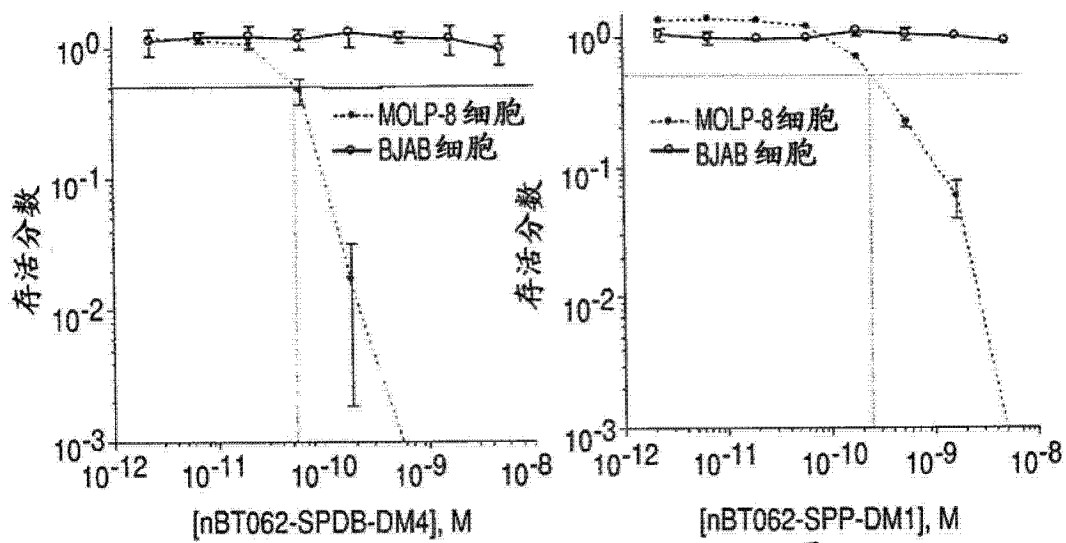


图 7A

图 7B

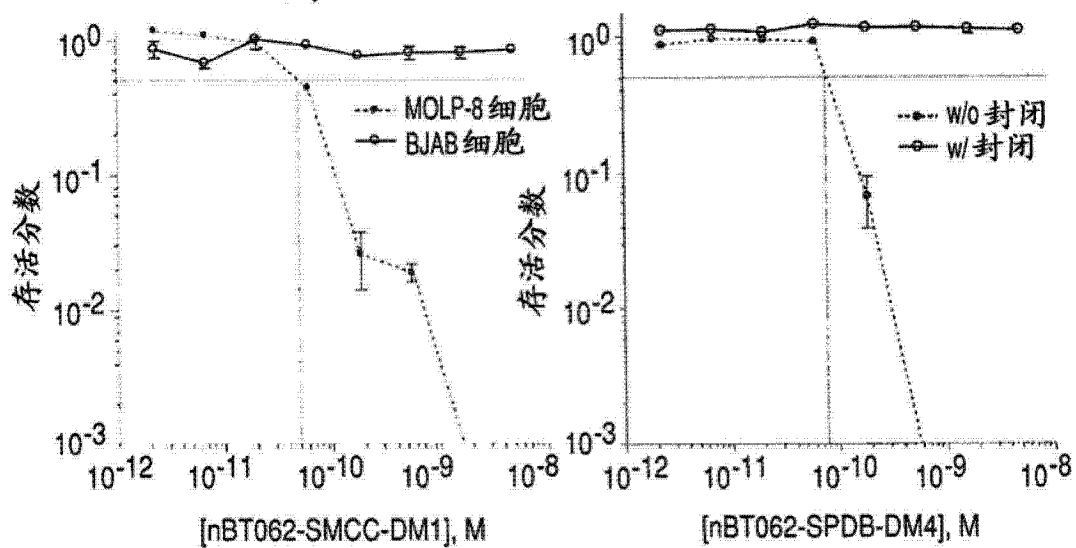


图 7C

图 7D

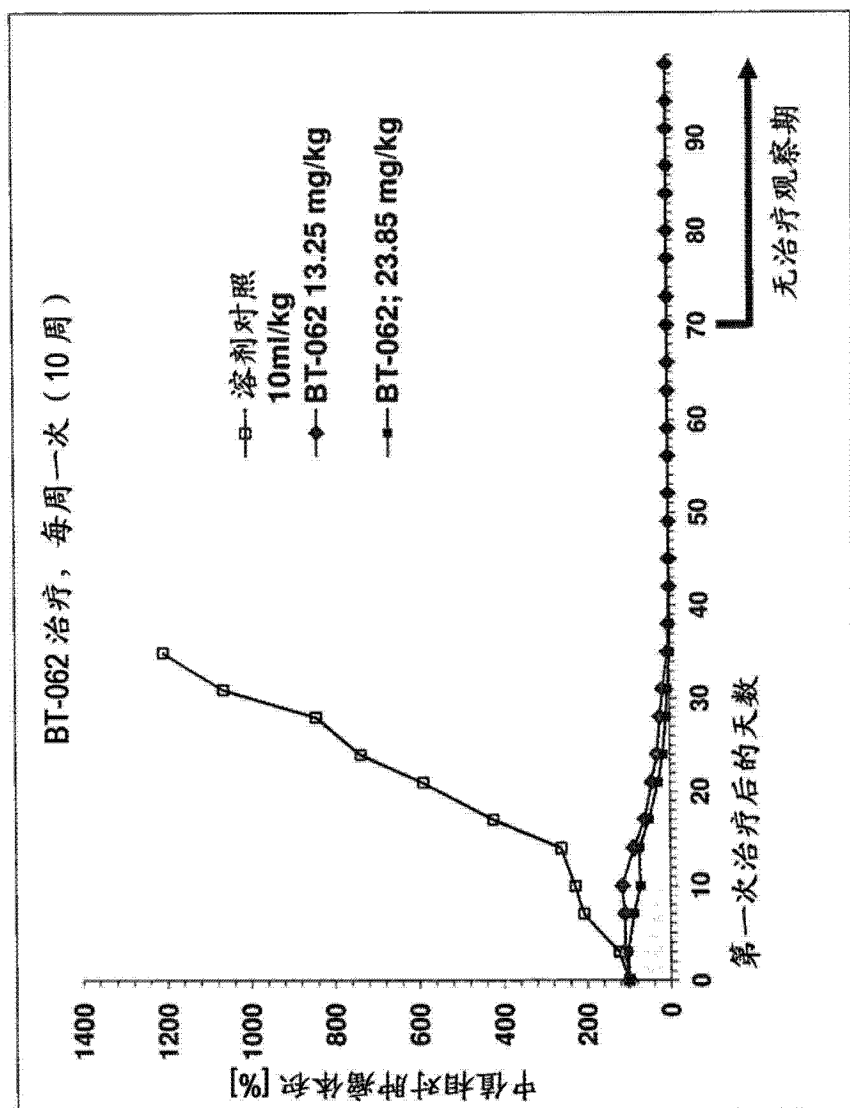


图 8

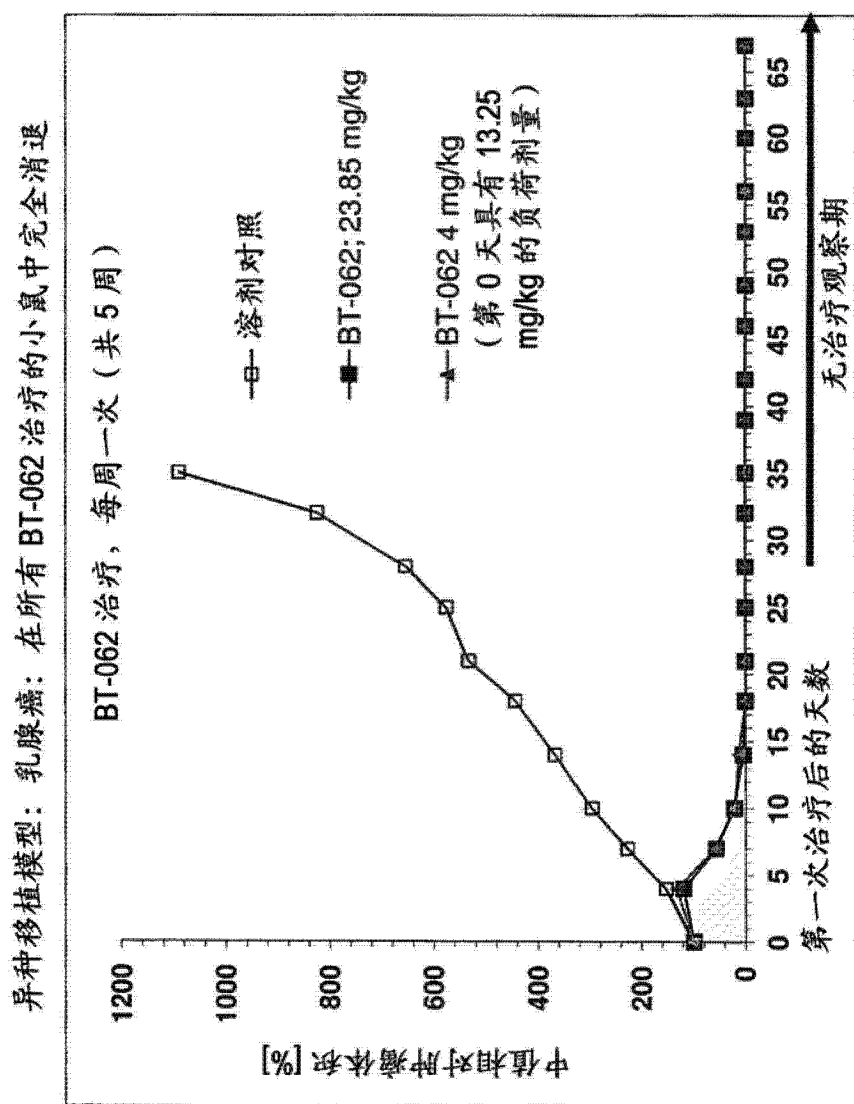


图 9

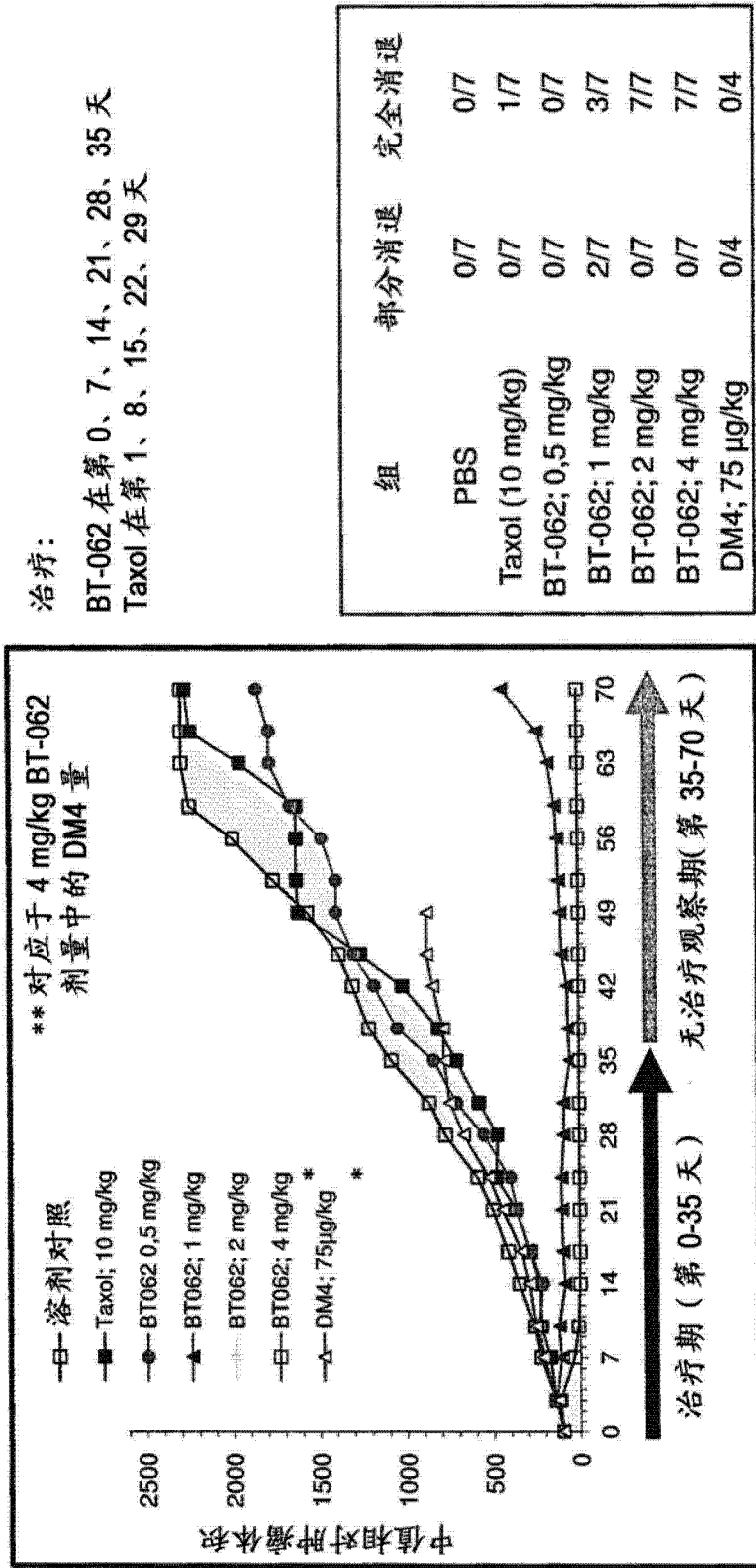


图 10

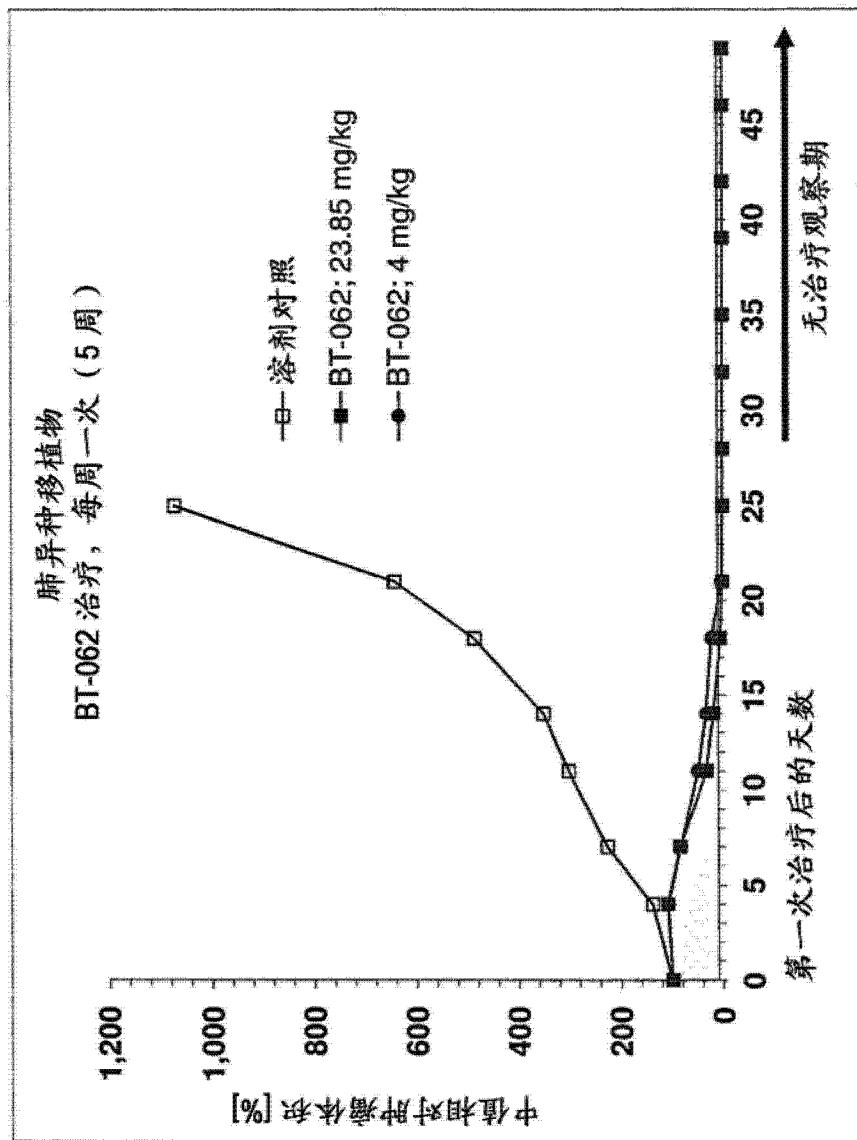


图 11

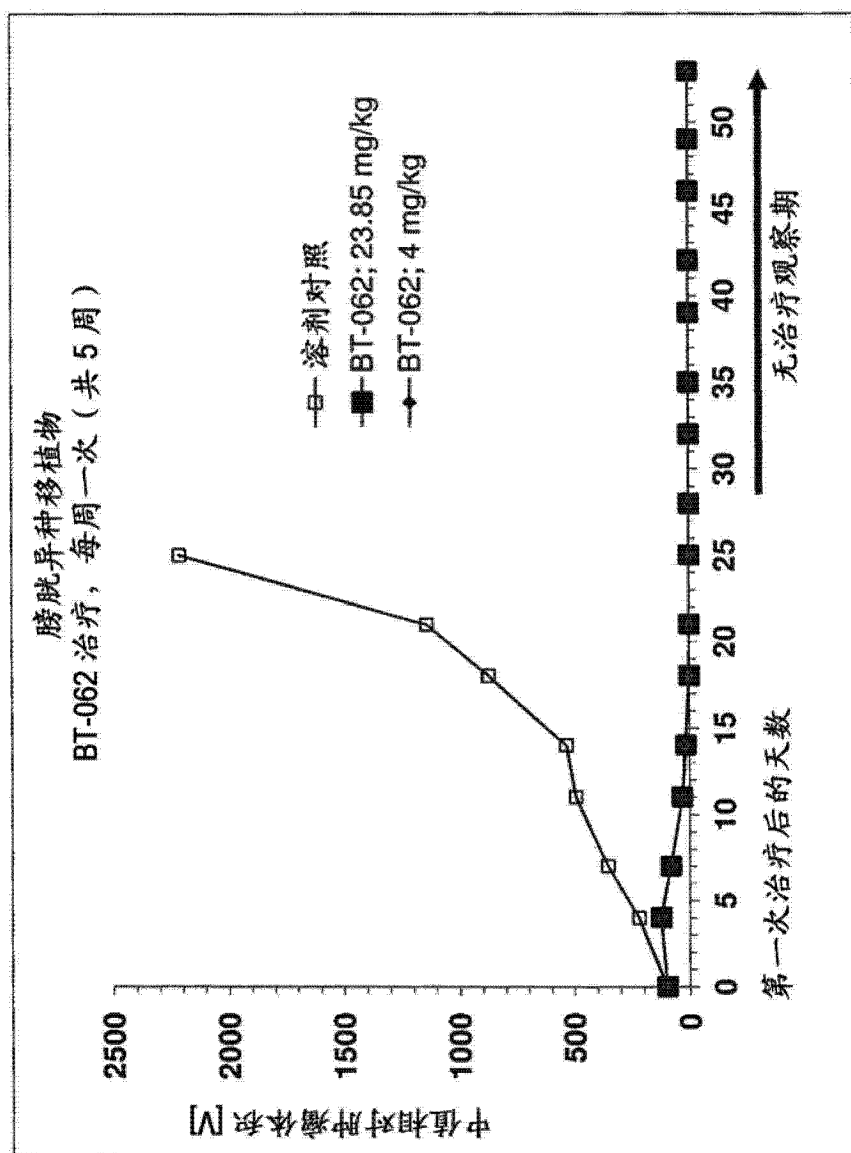


图 12

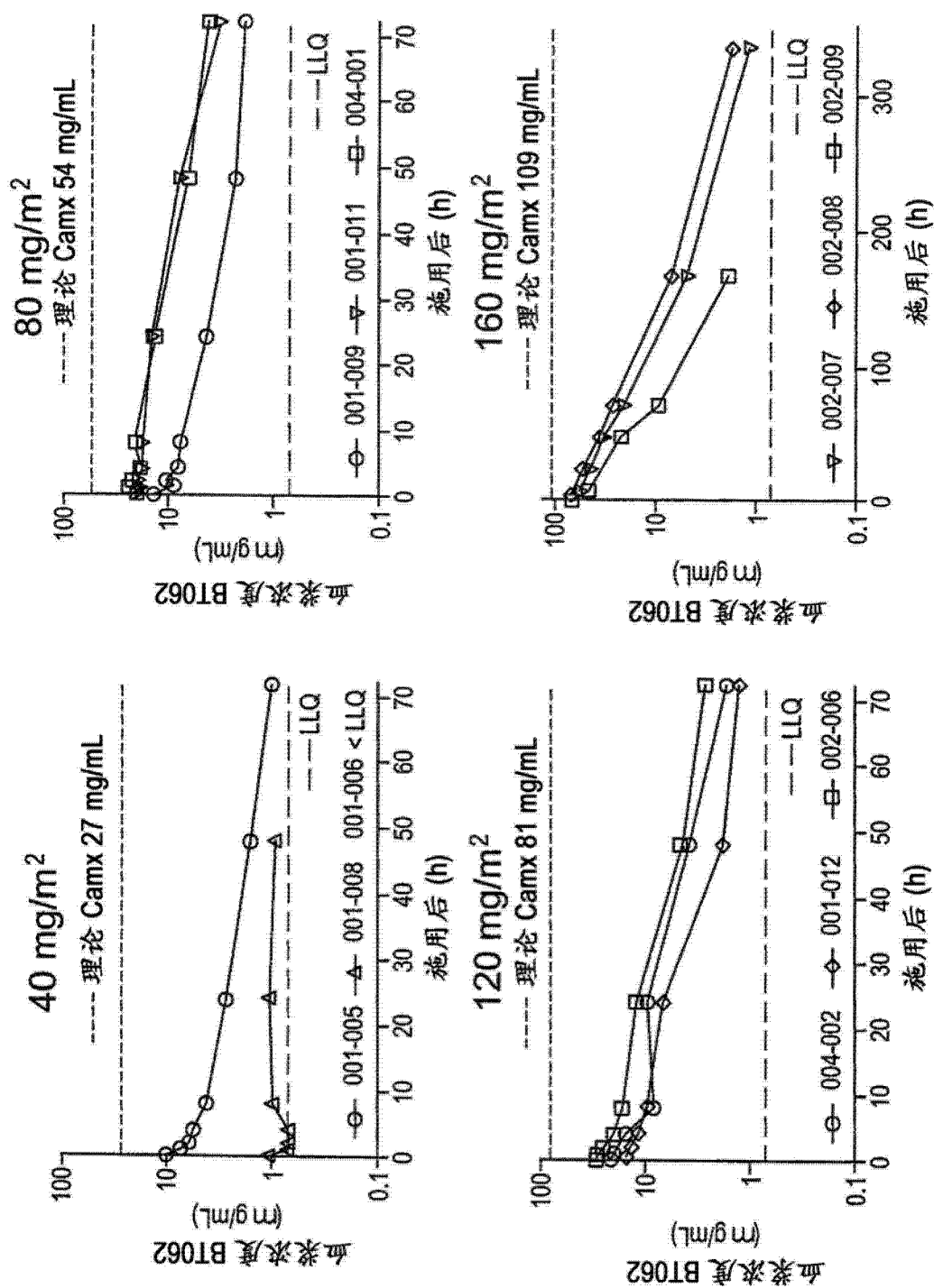


图 13

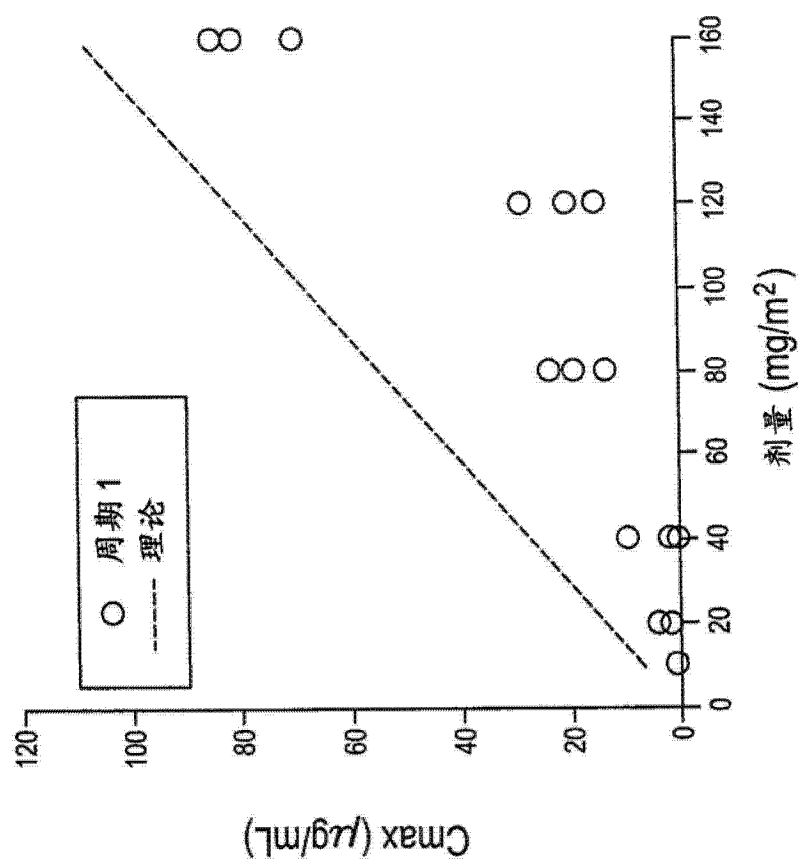


图 14

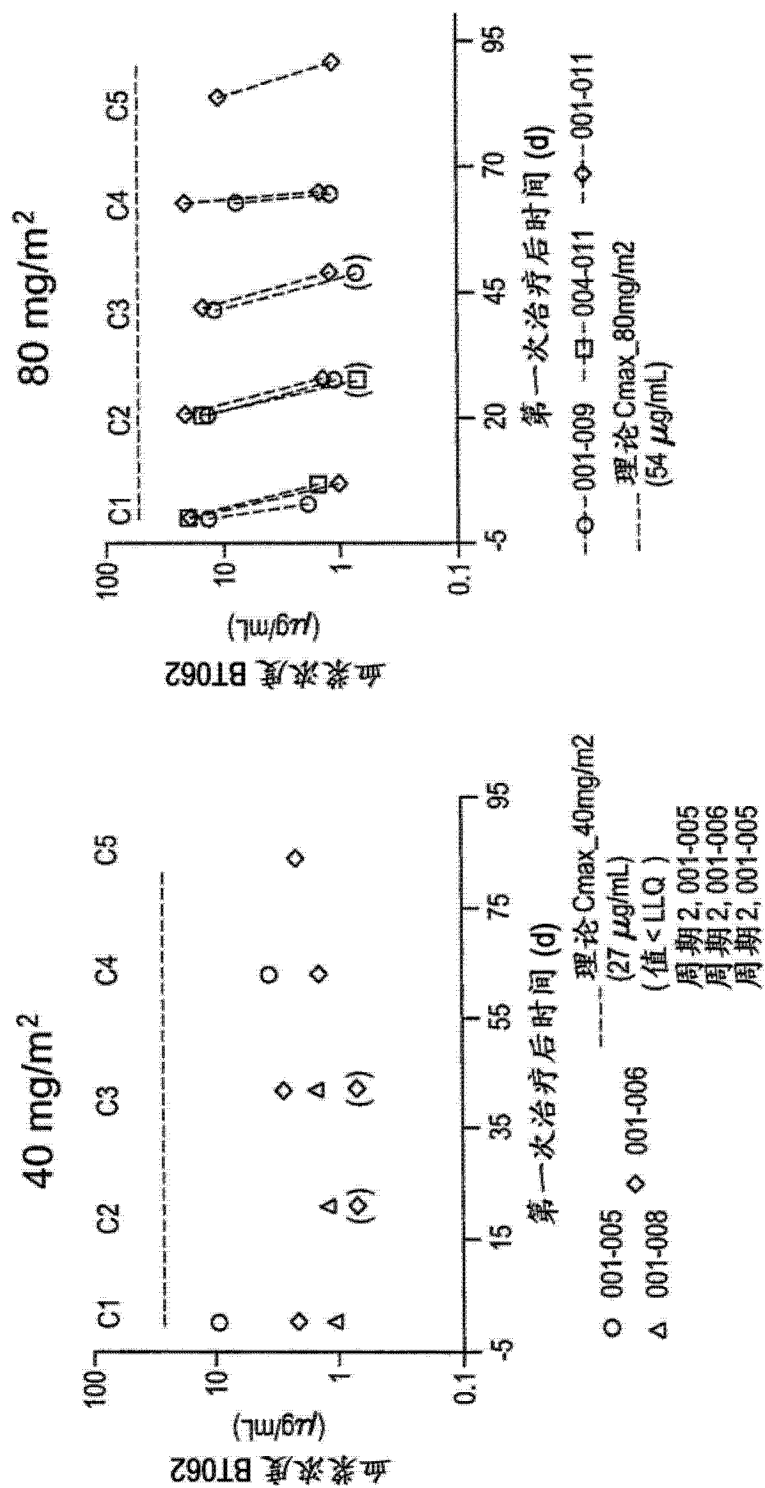


图 15

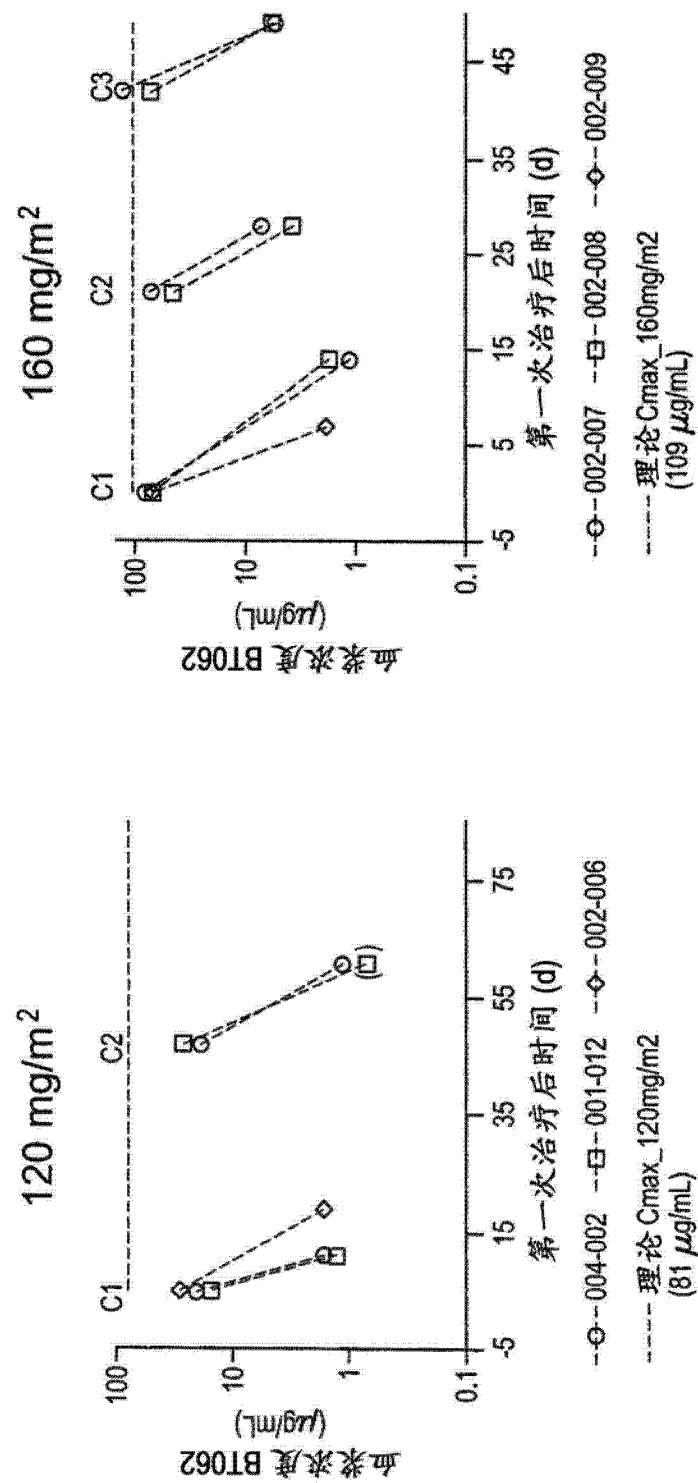


图 16

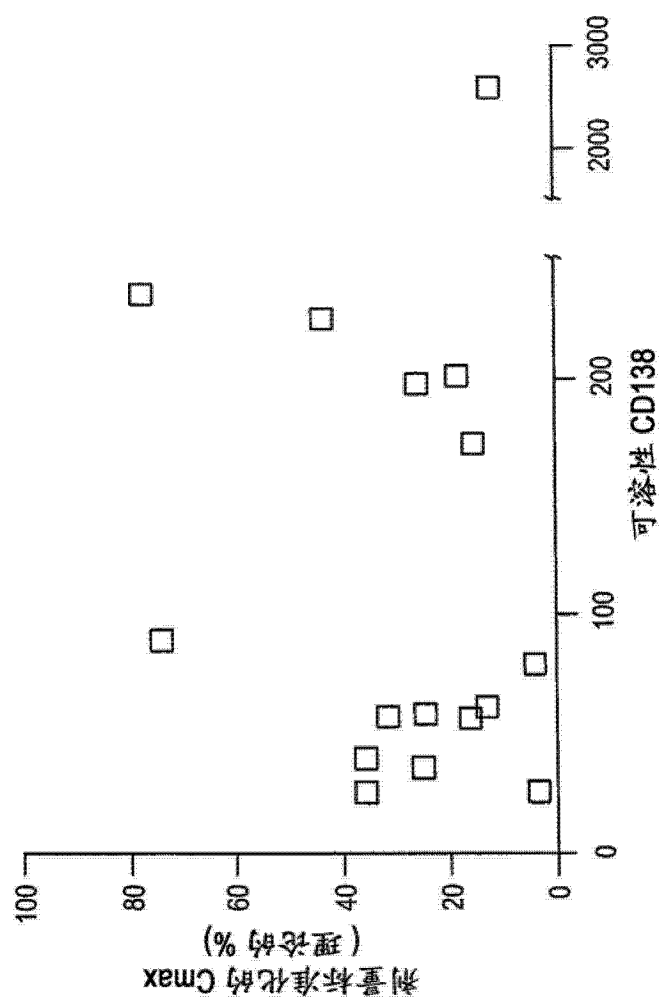


图 17

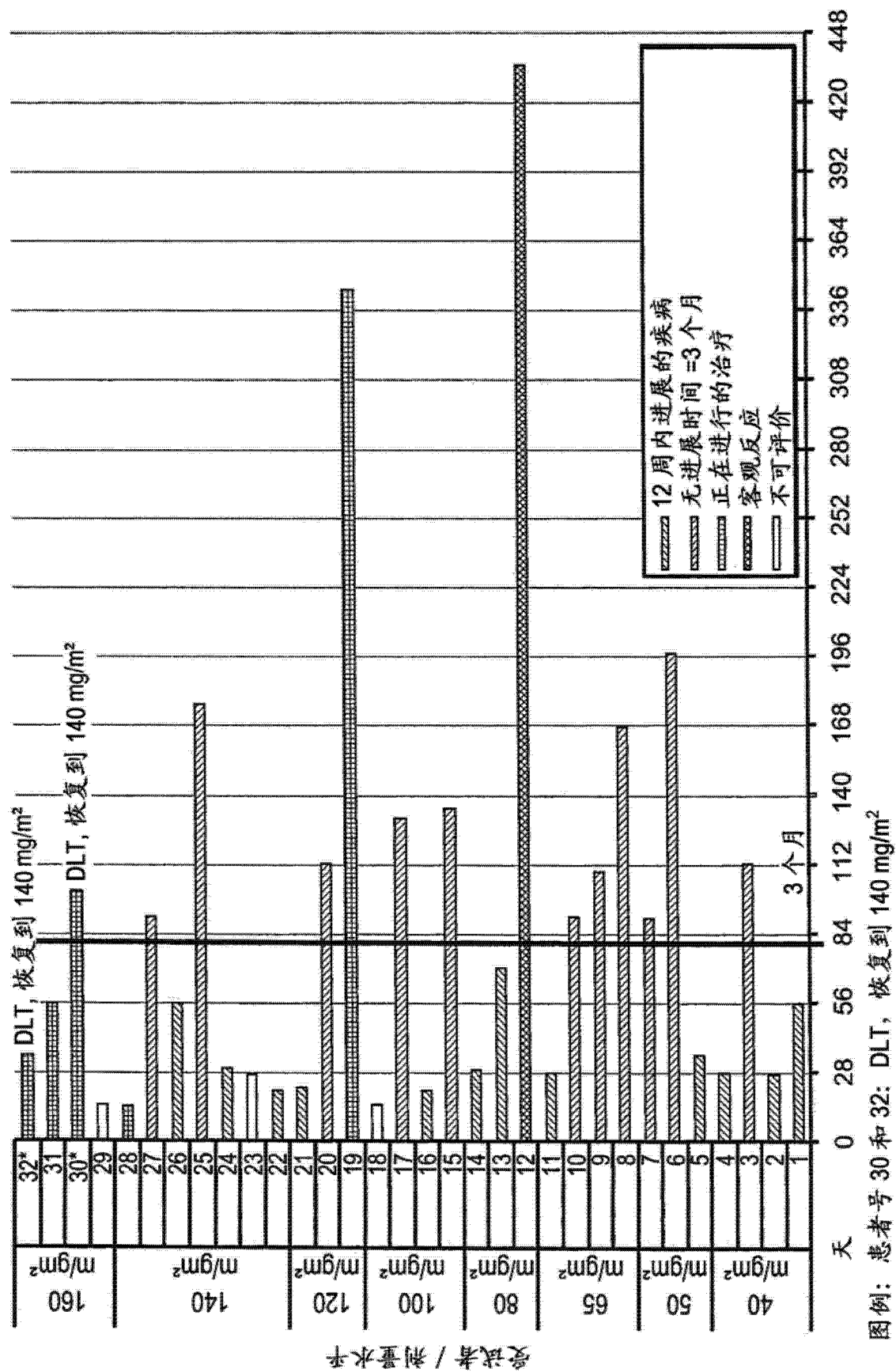


图 18

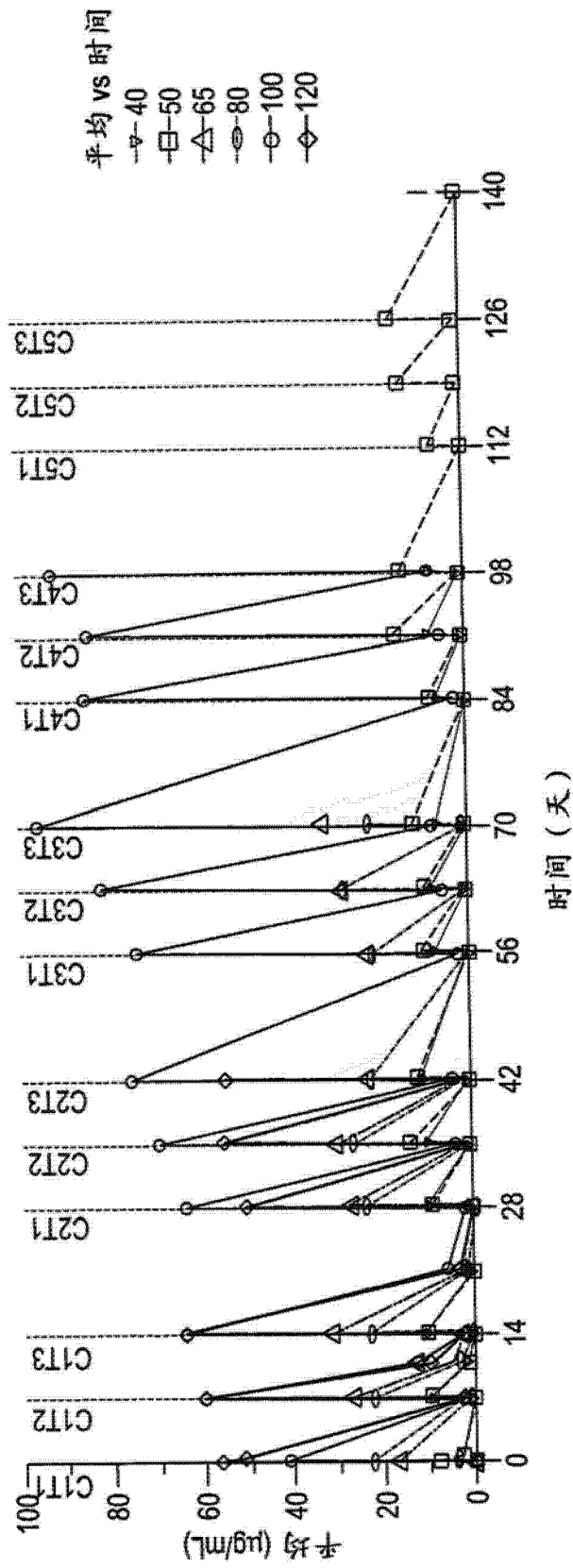


图 19A

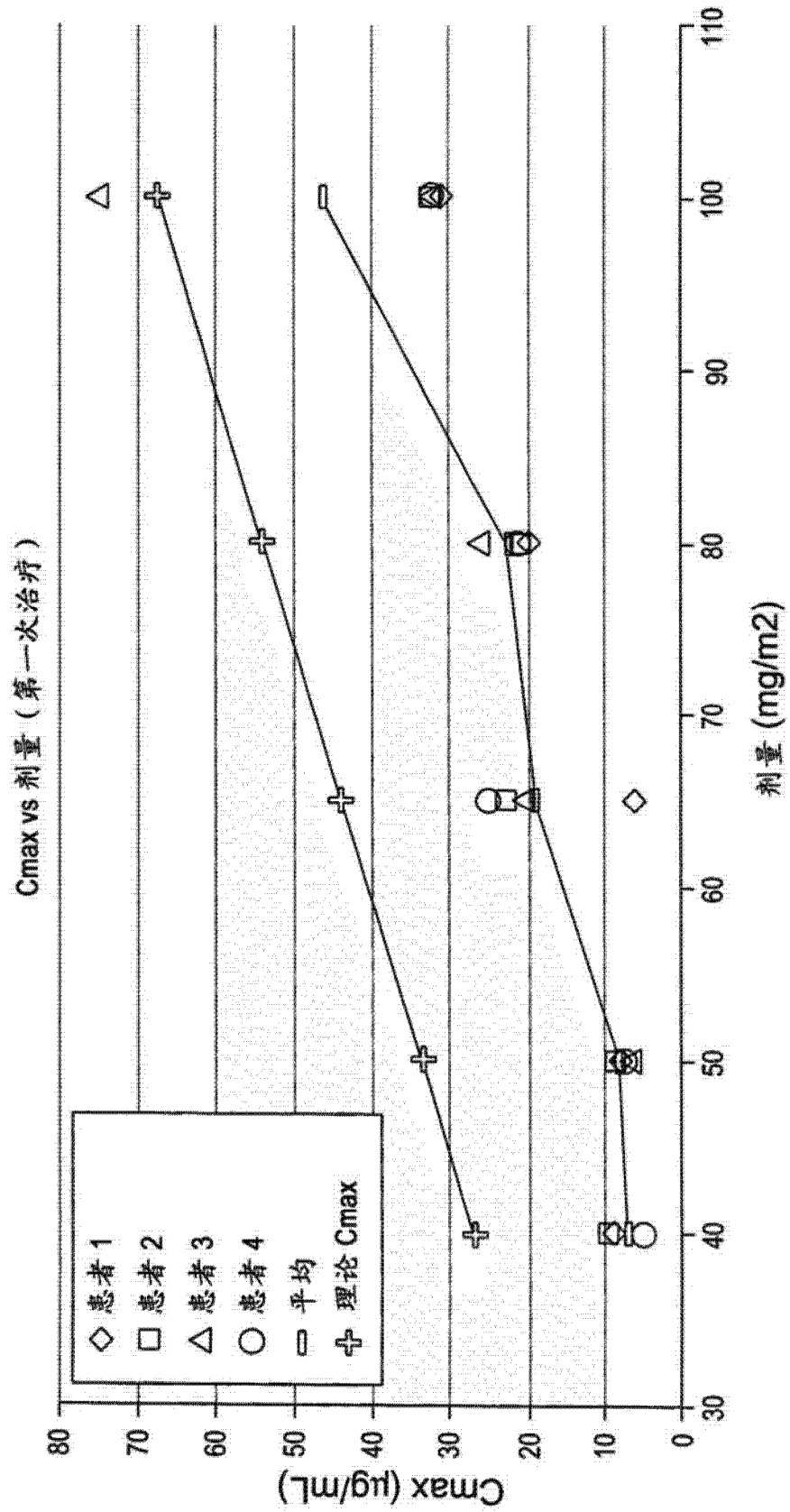


图 19B

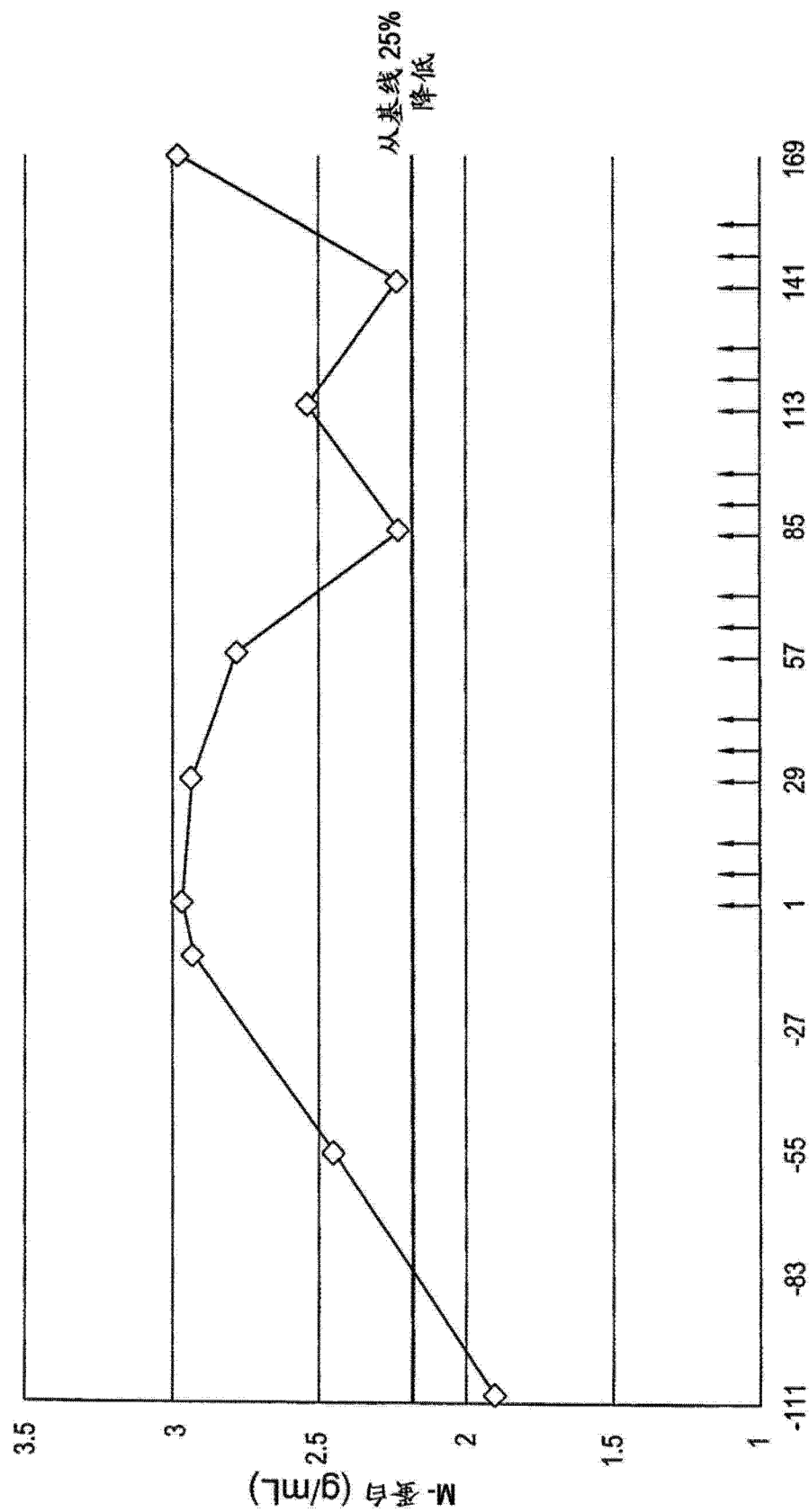


图 20

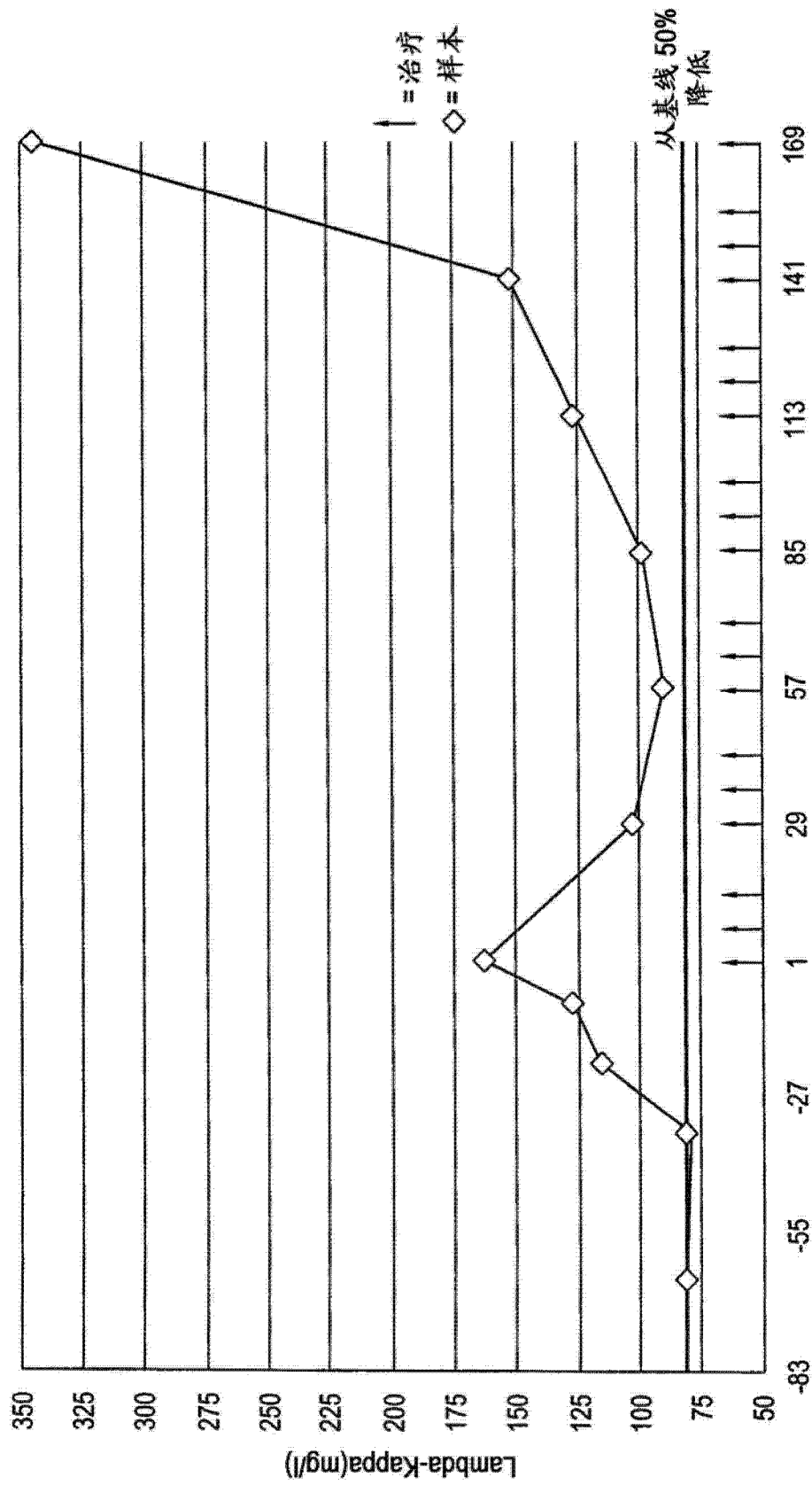


图 21

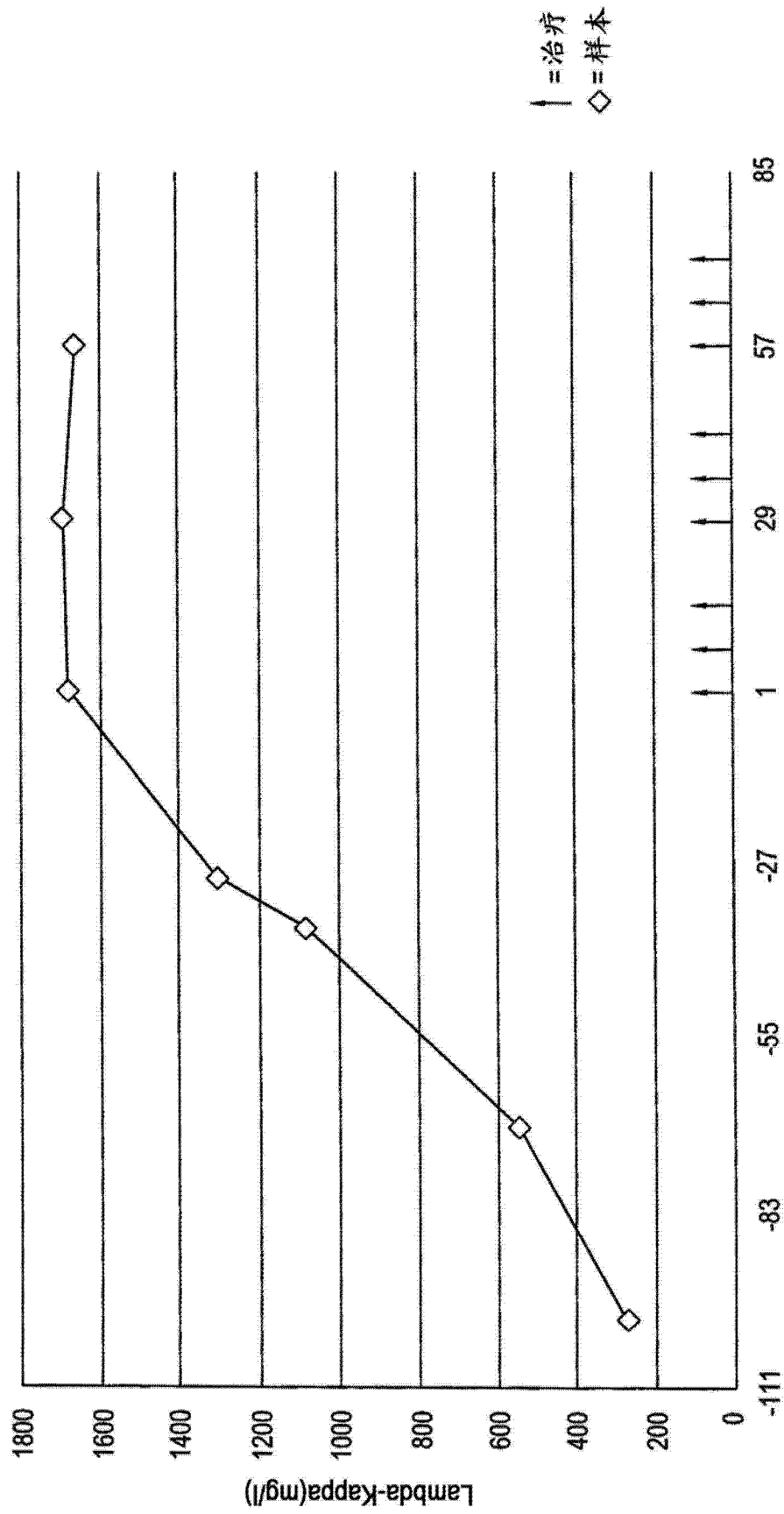


图 22

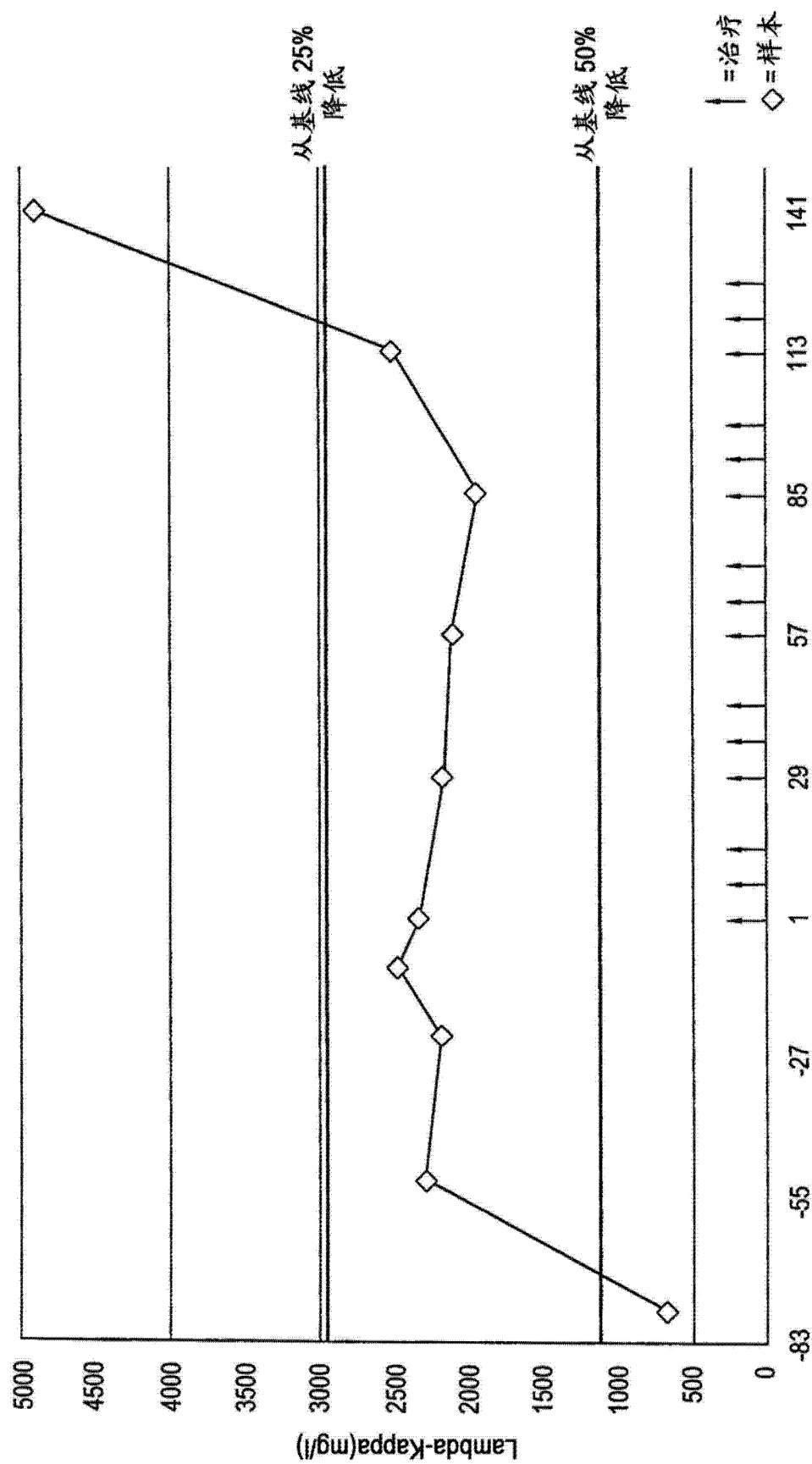


图 23

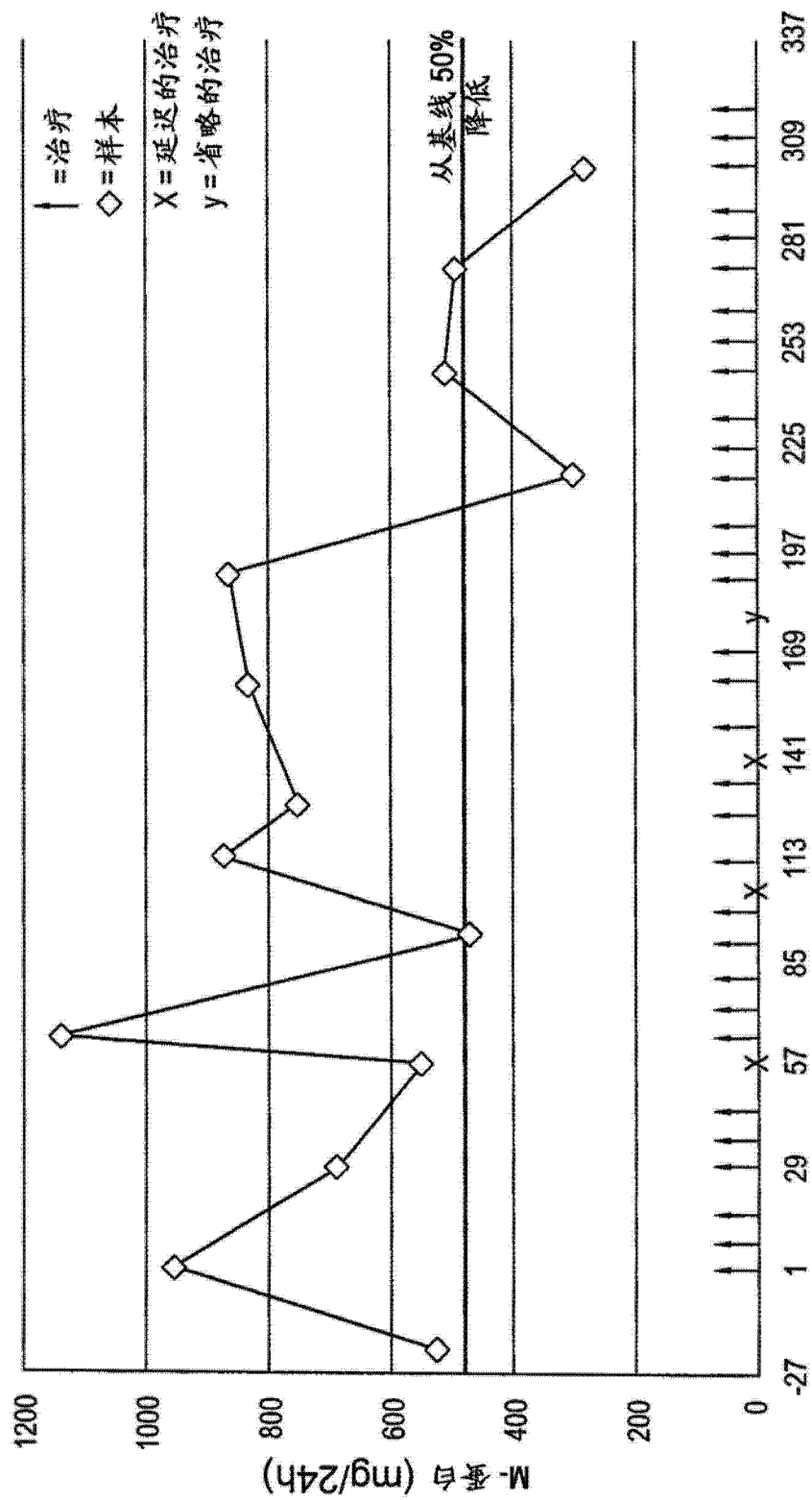


图 24

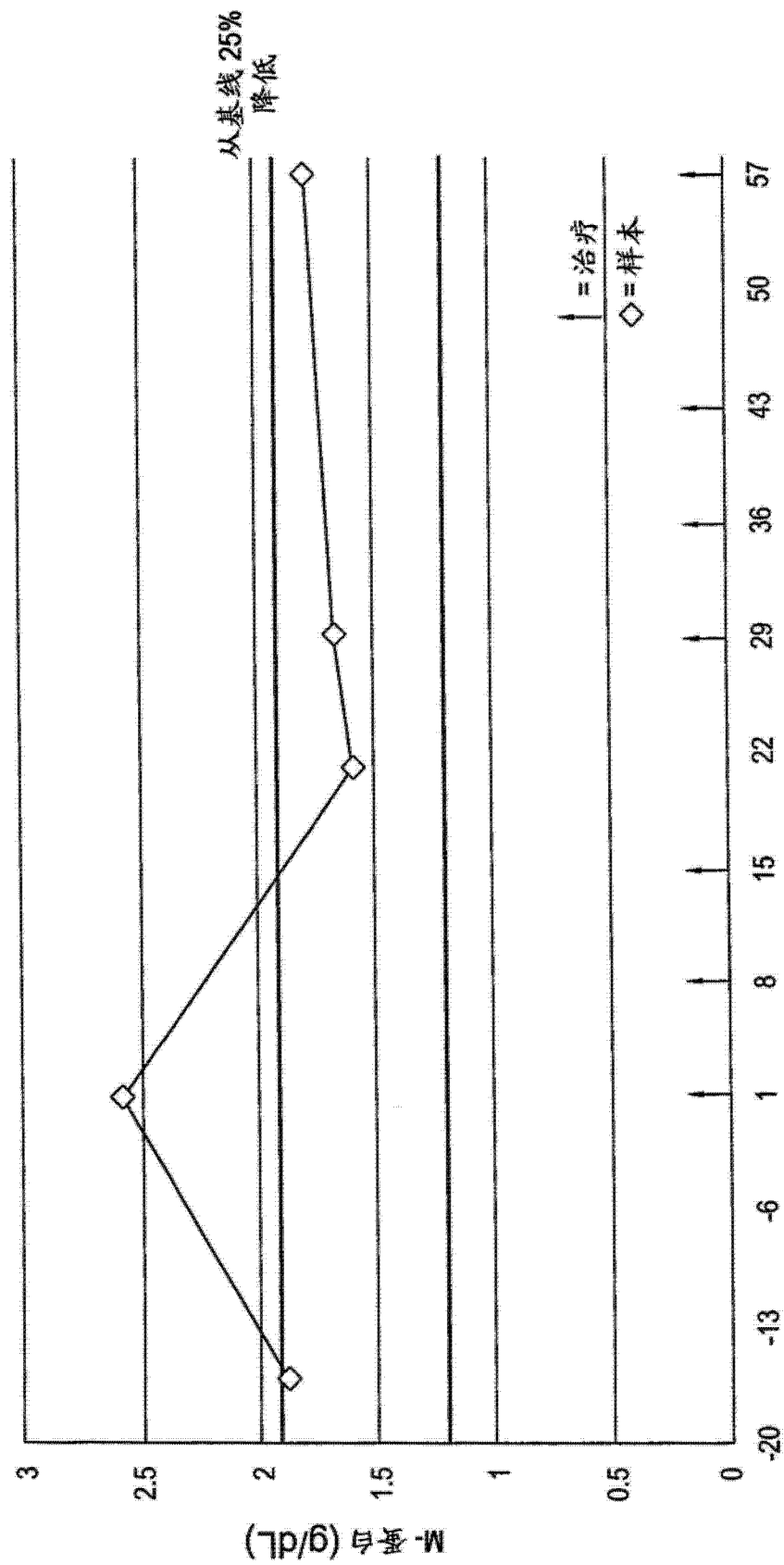


图 25

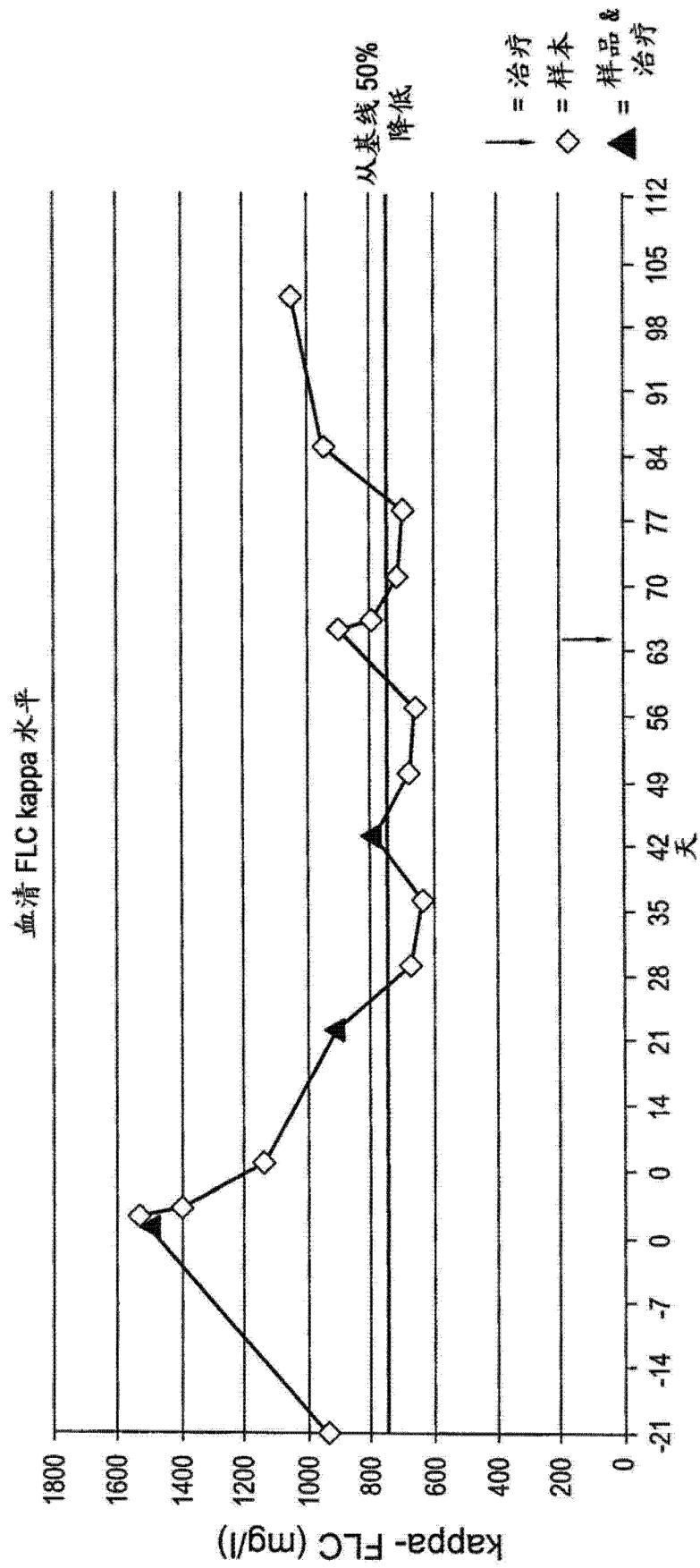


图 26

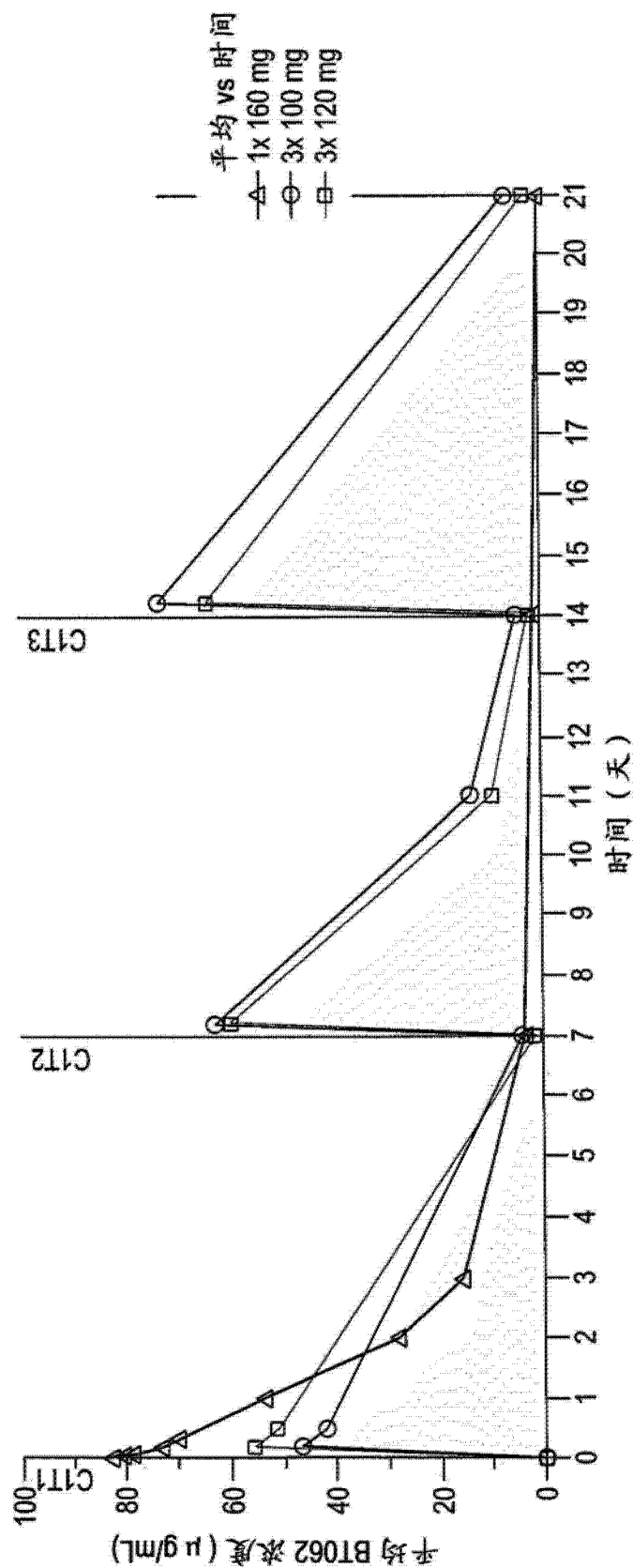


图 27

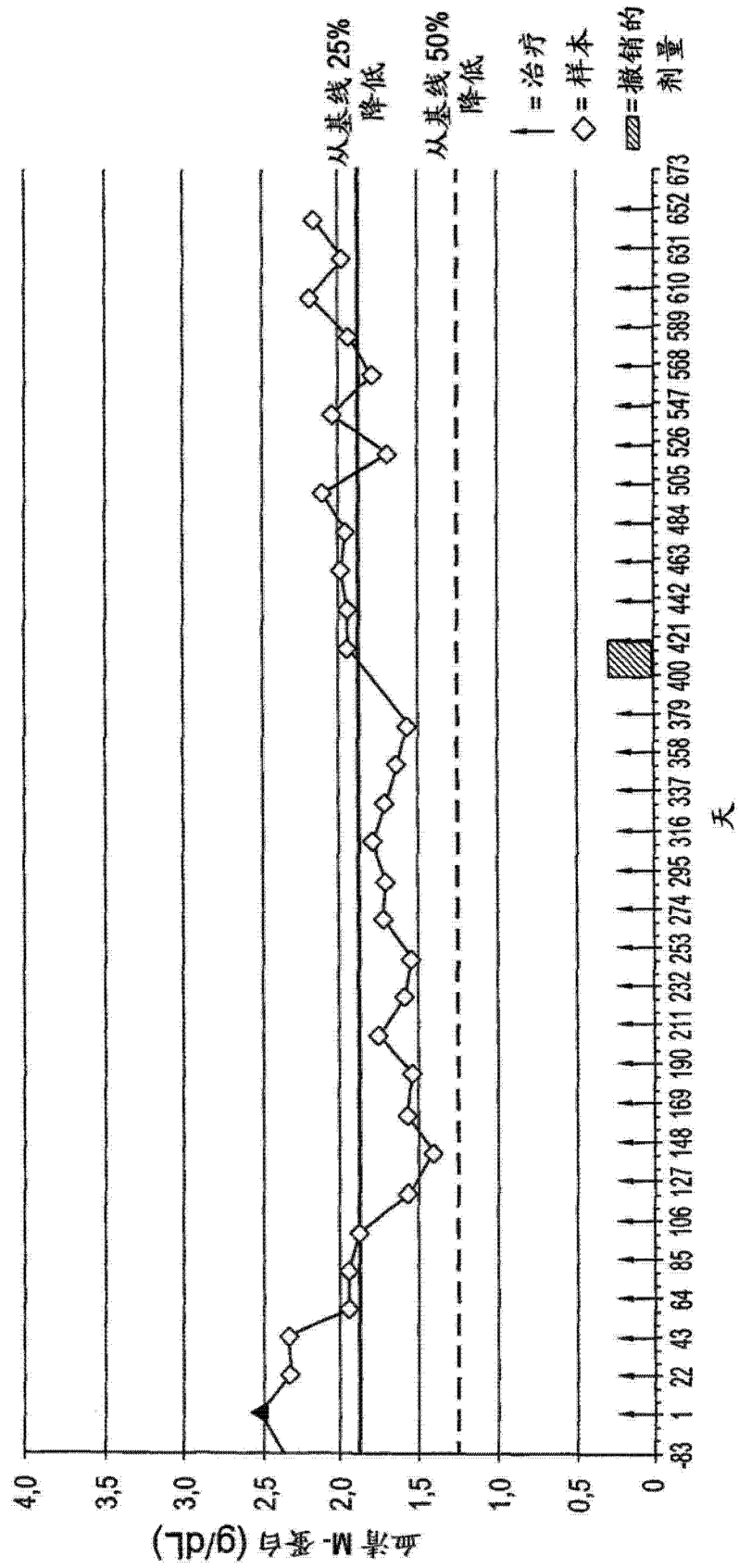


图 28

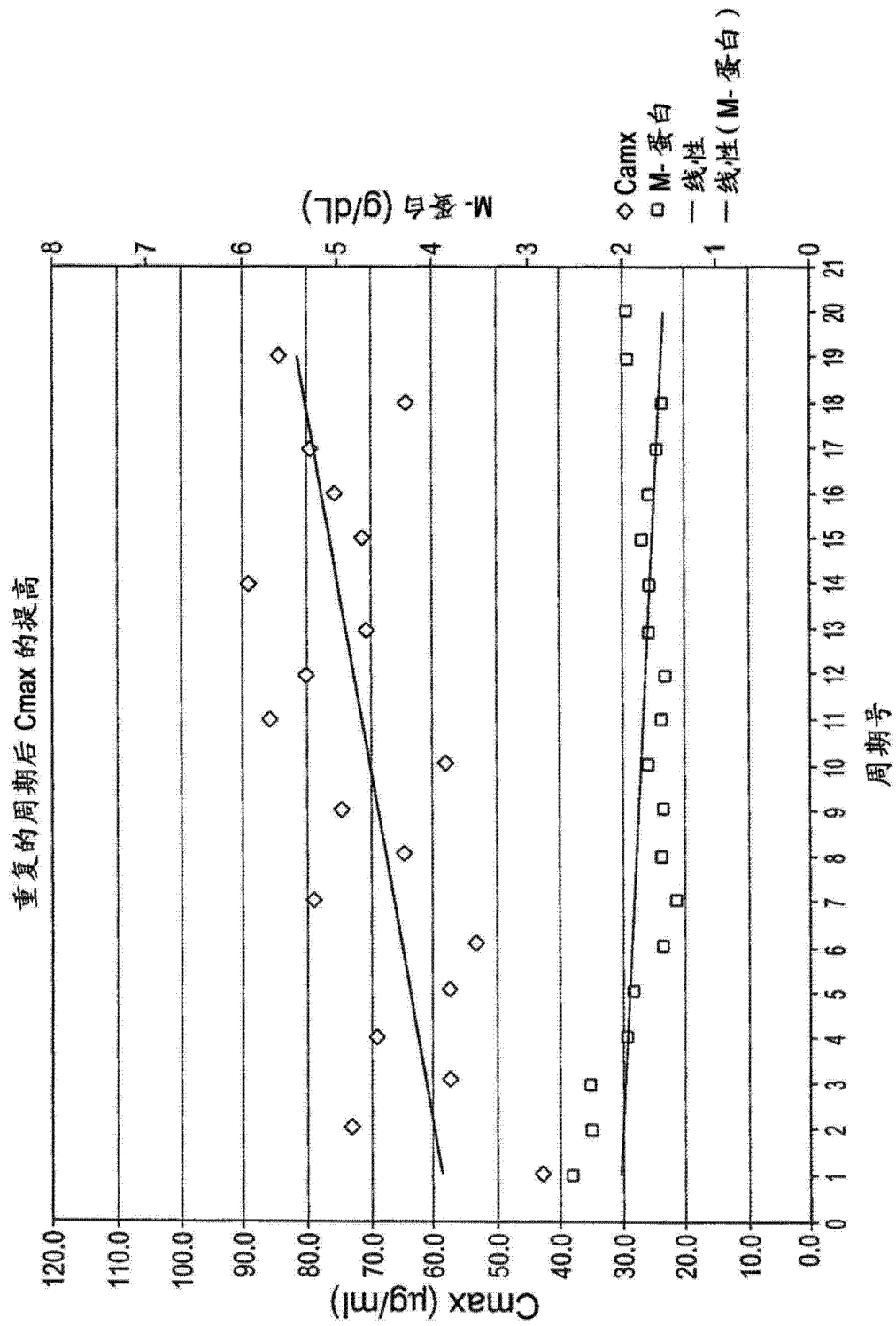


图 29

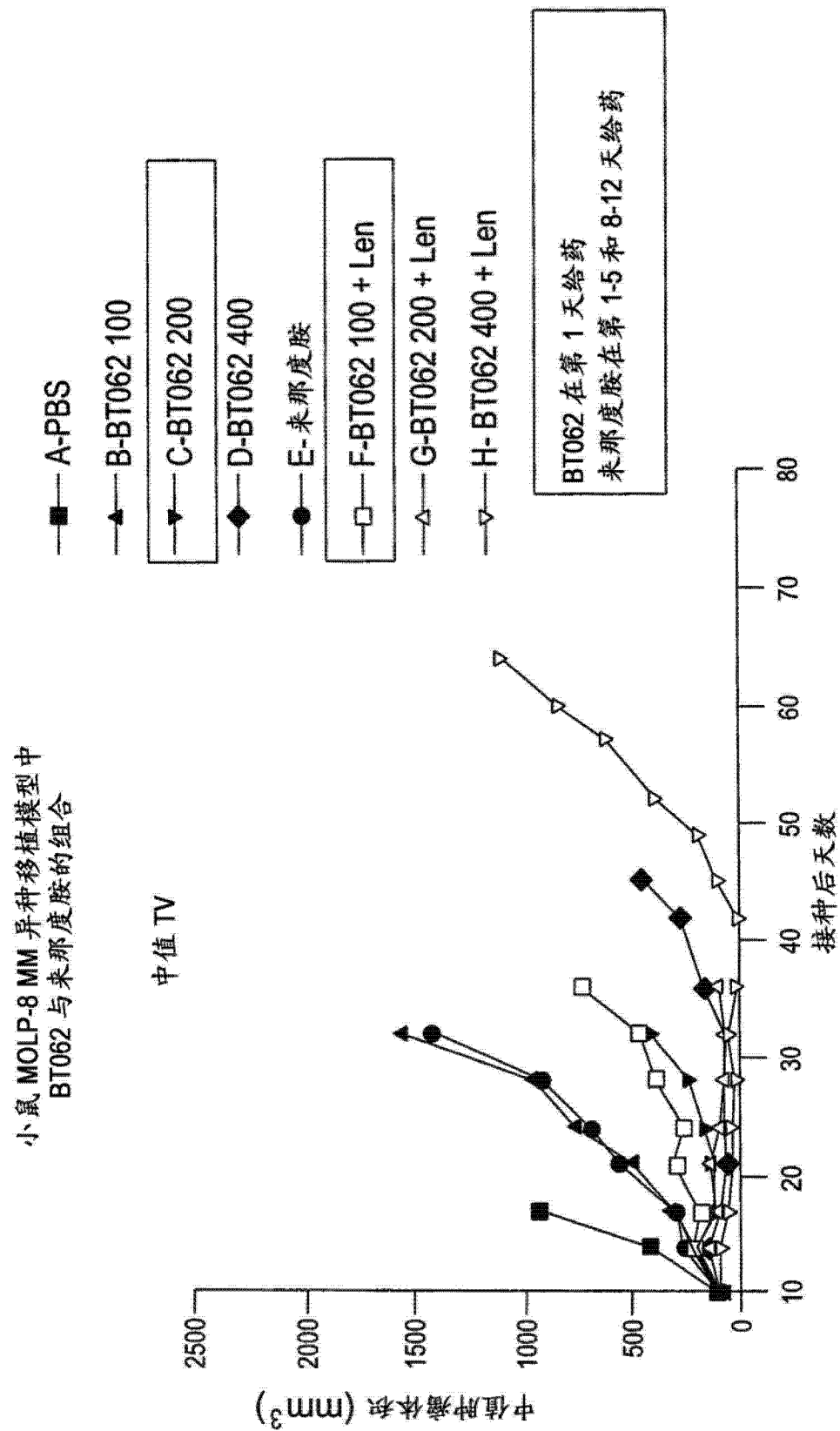


图 30

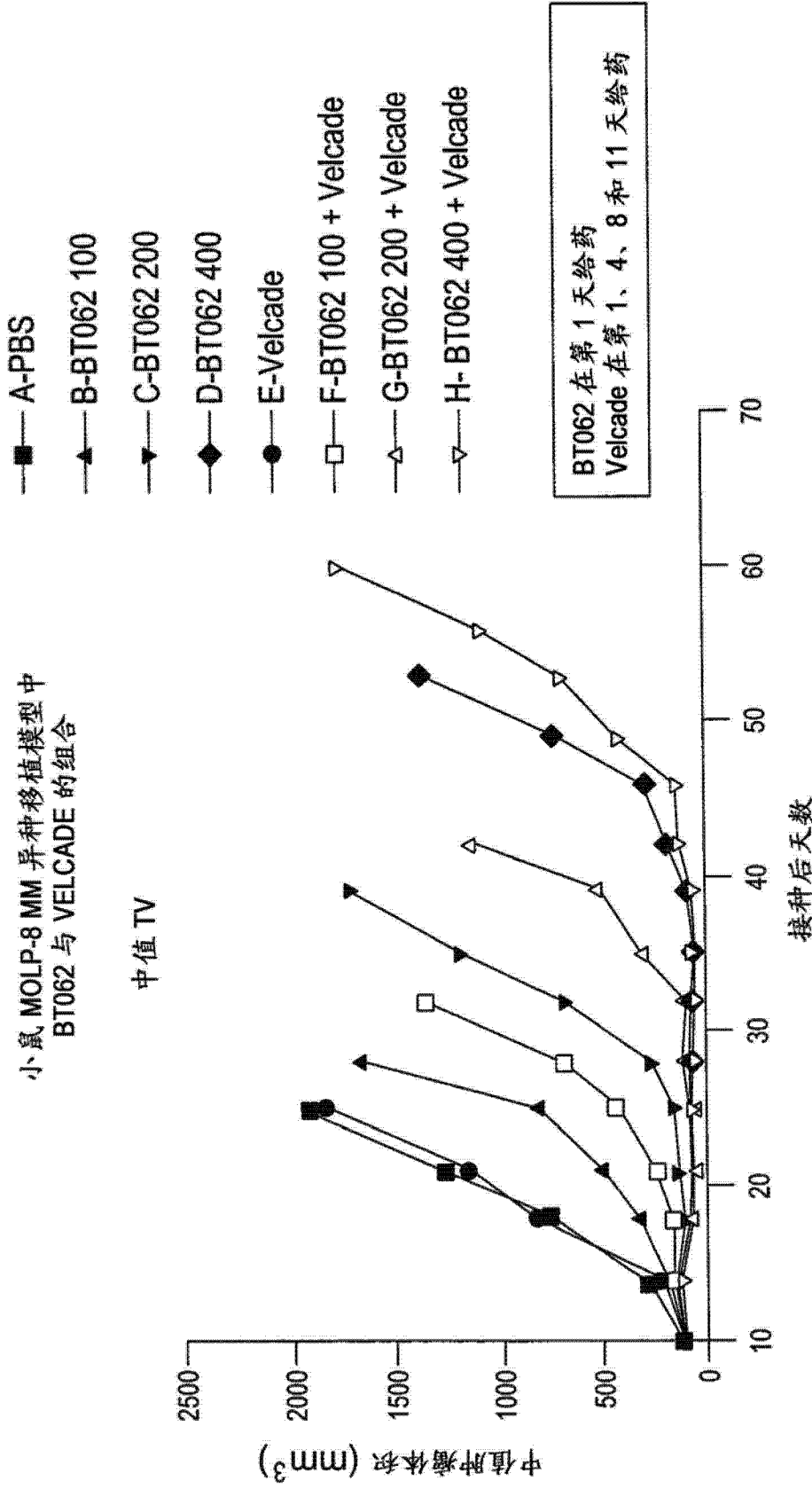


图 31

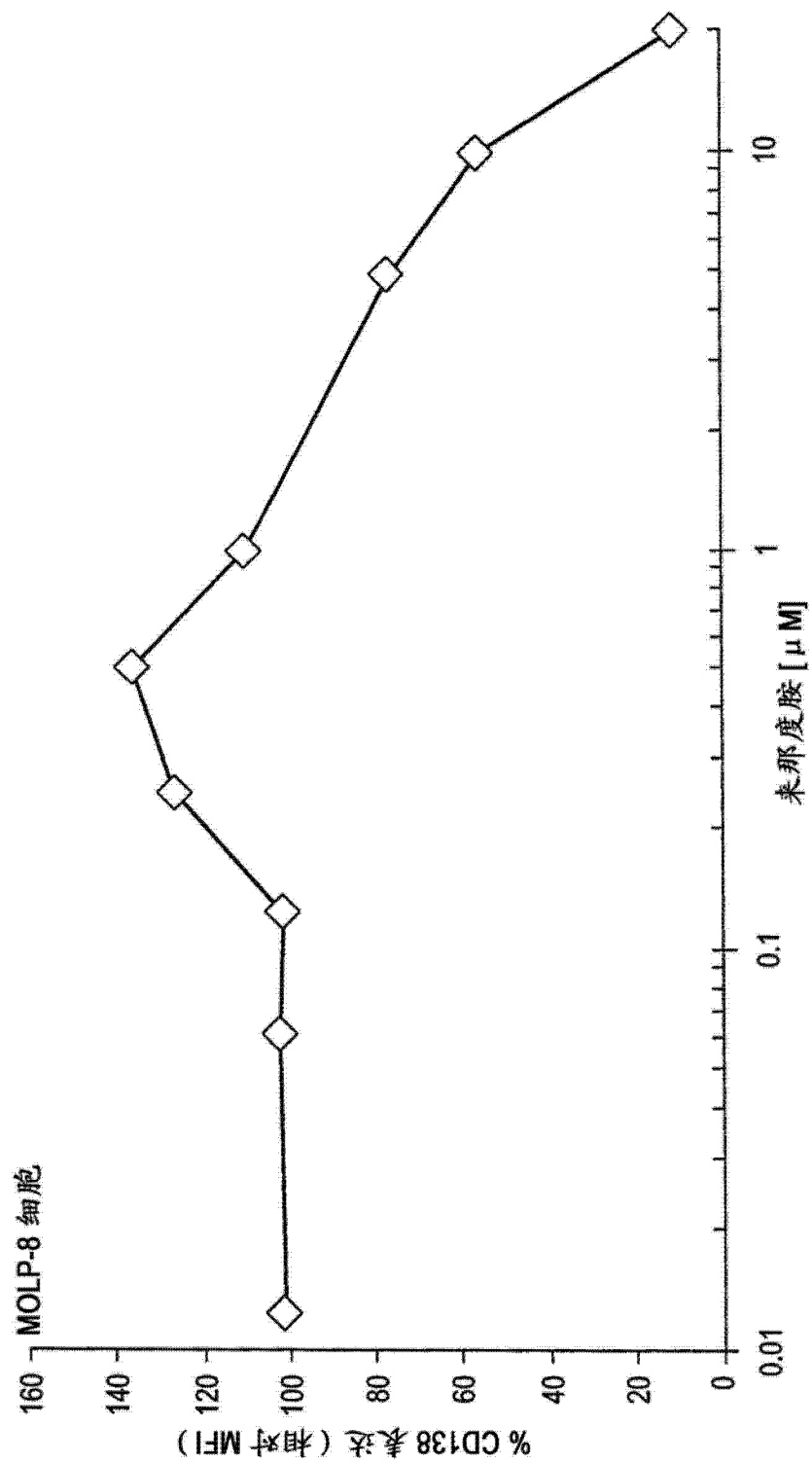


图 32A

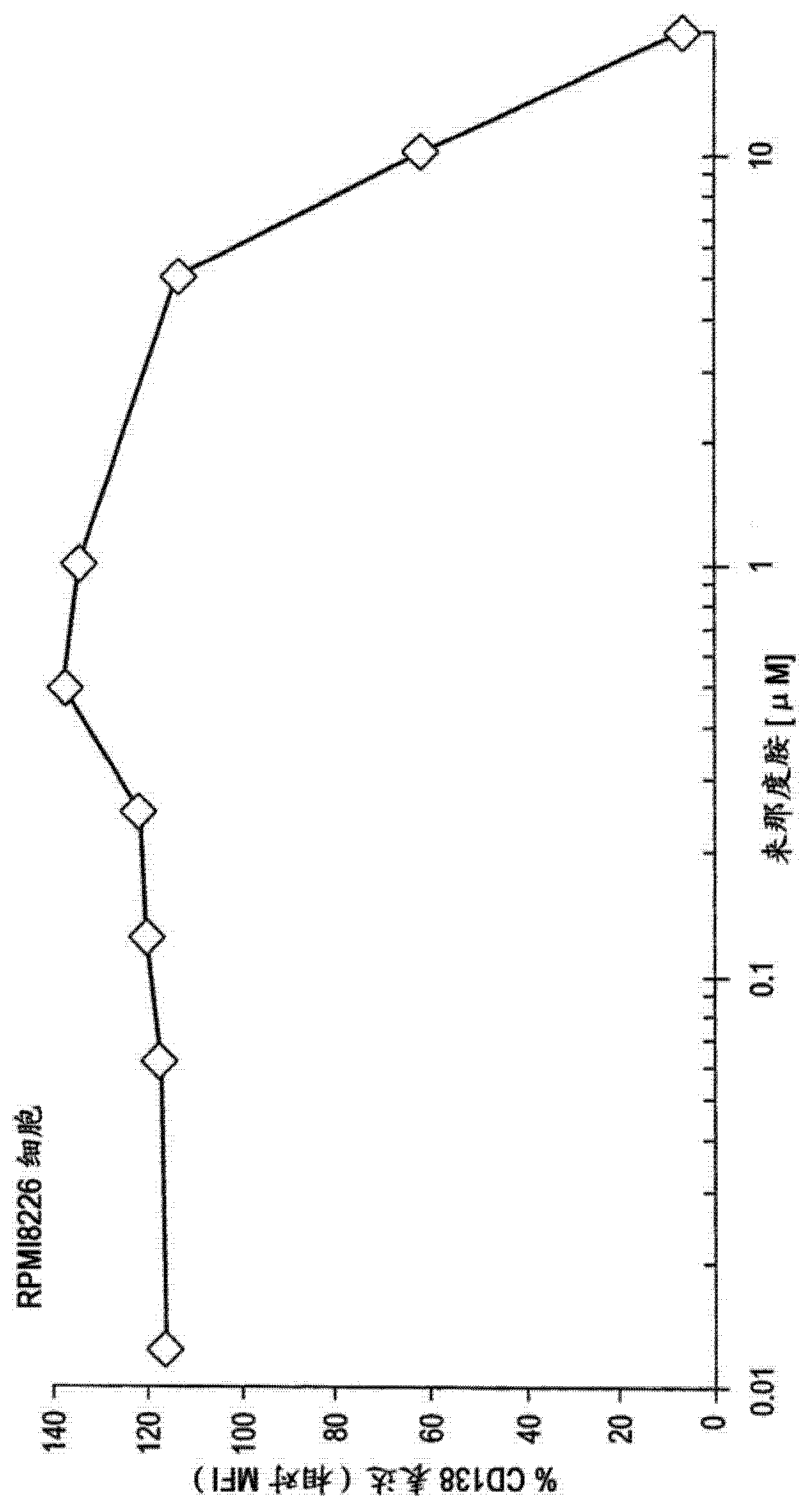


图 32B

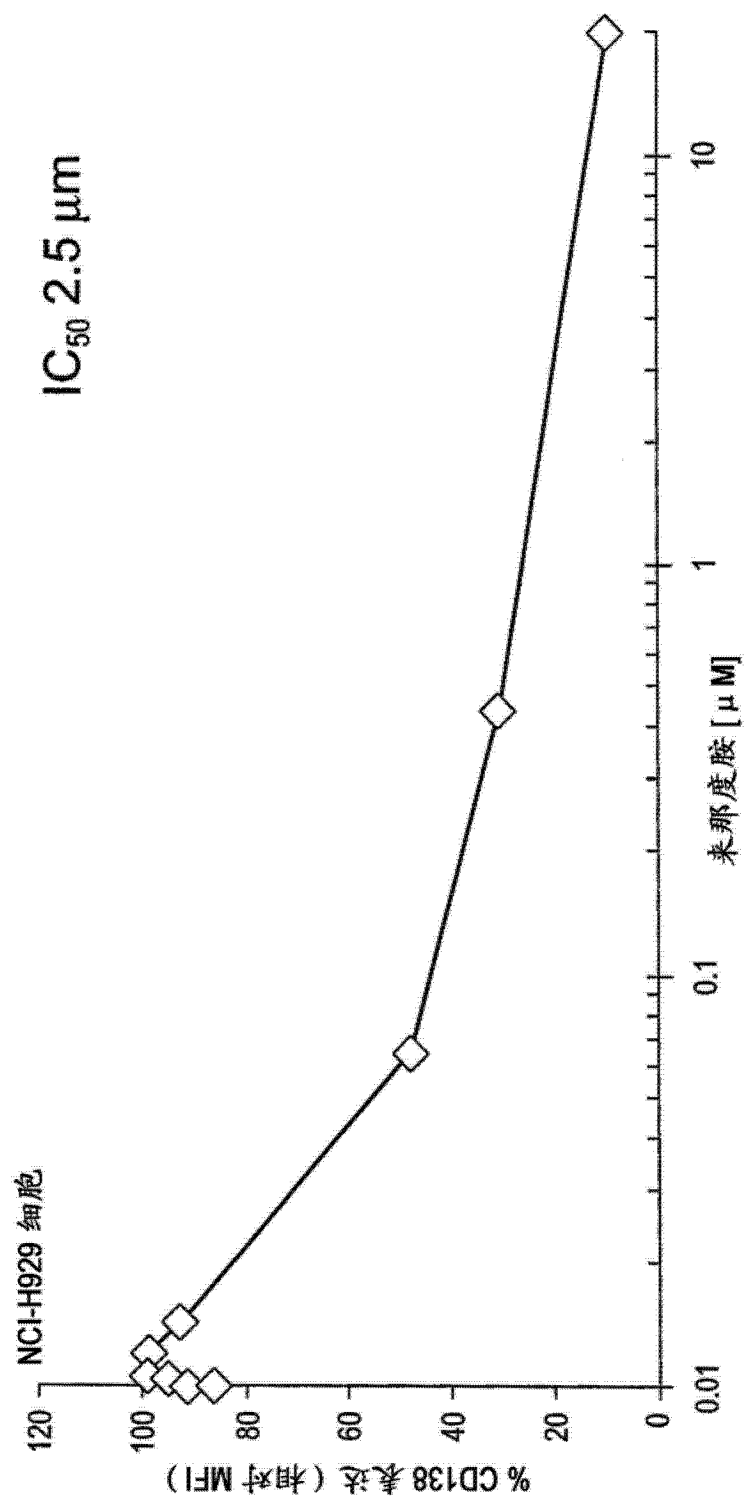


图 32C

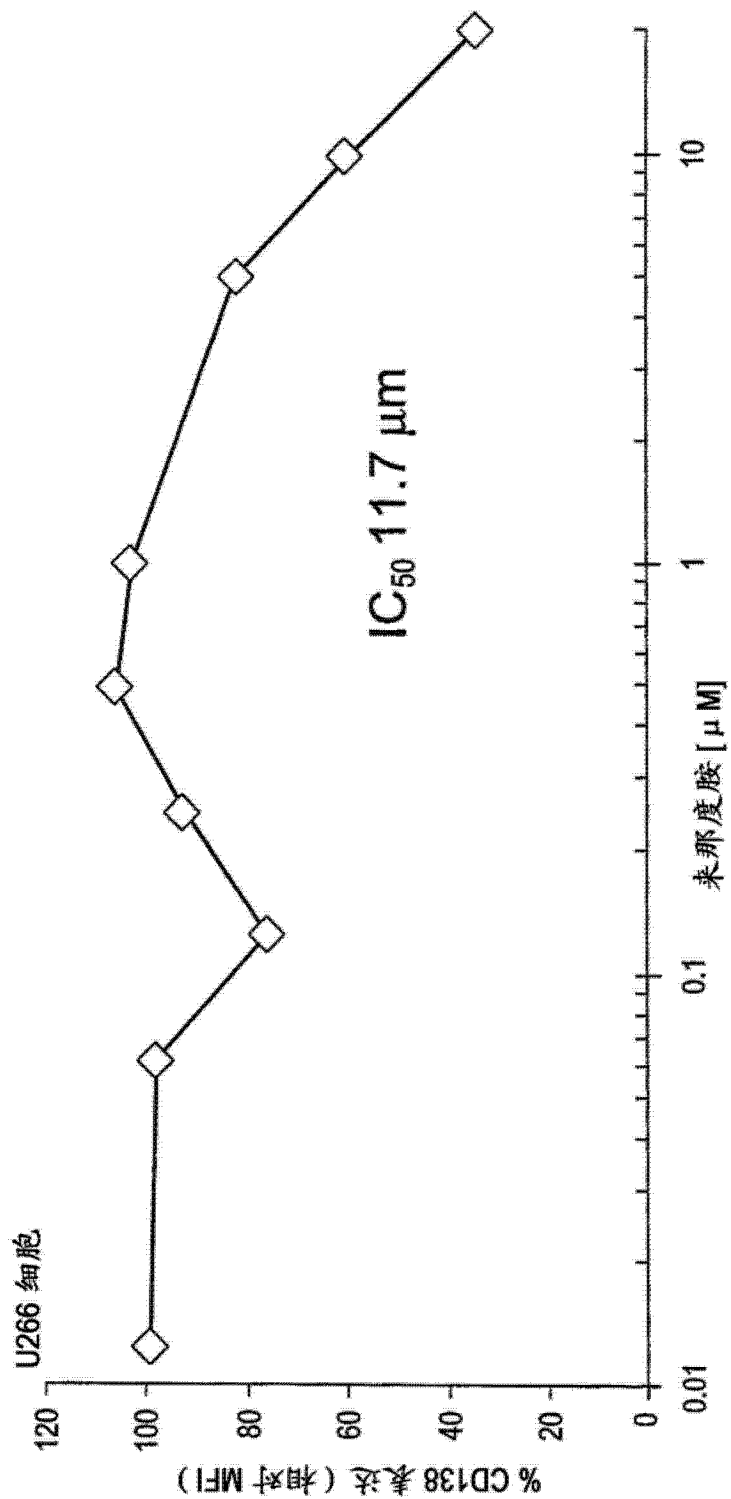


图 32D

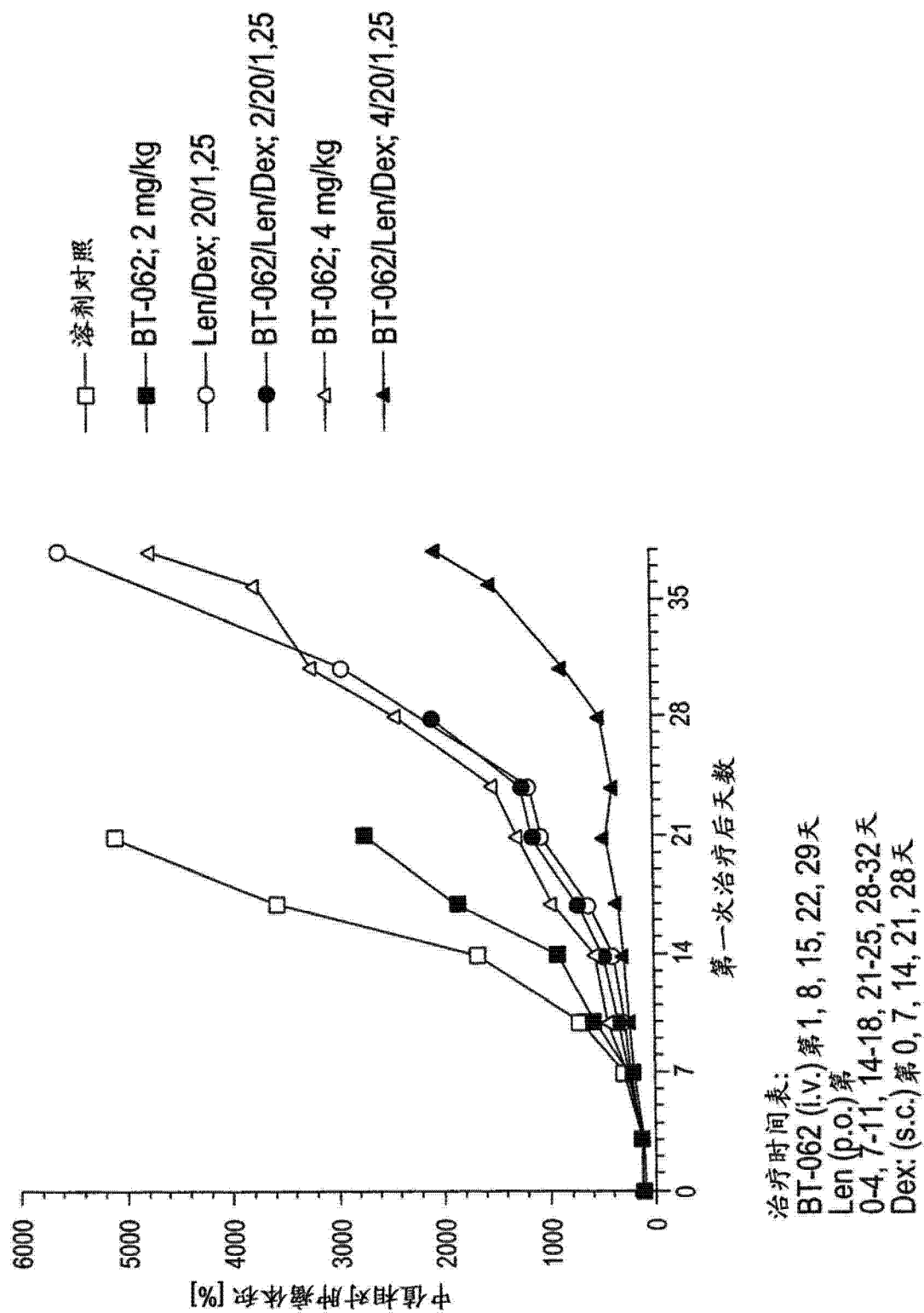


图 33

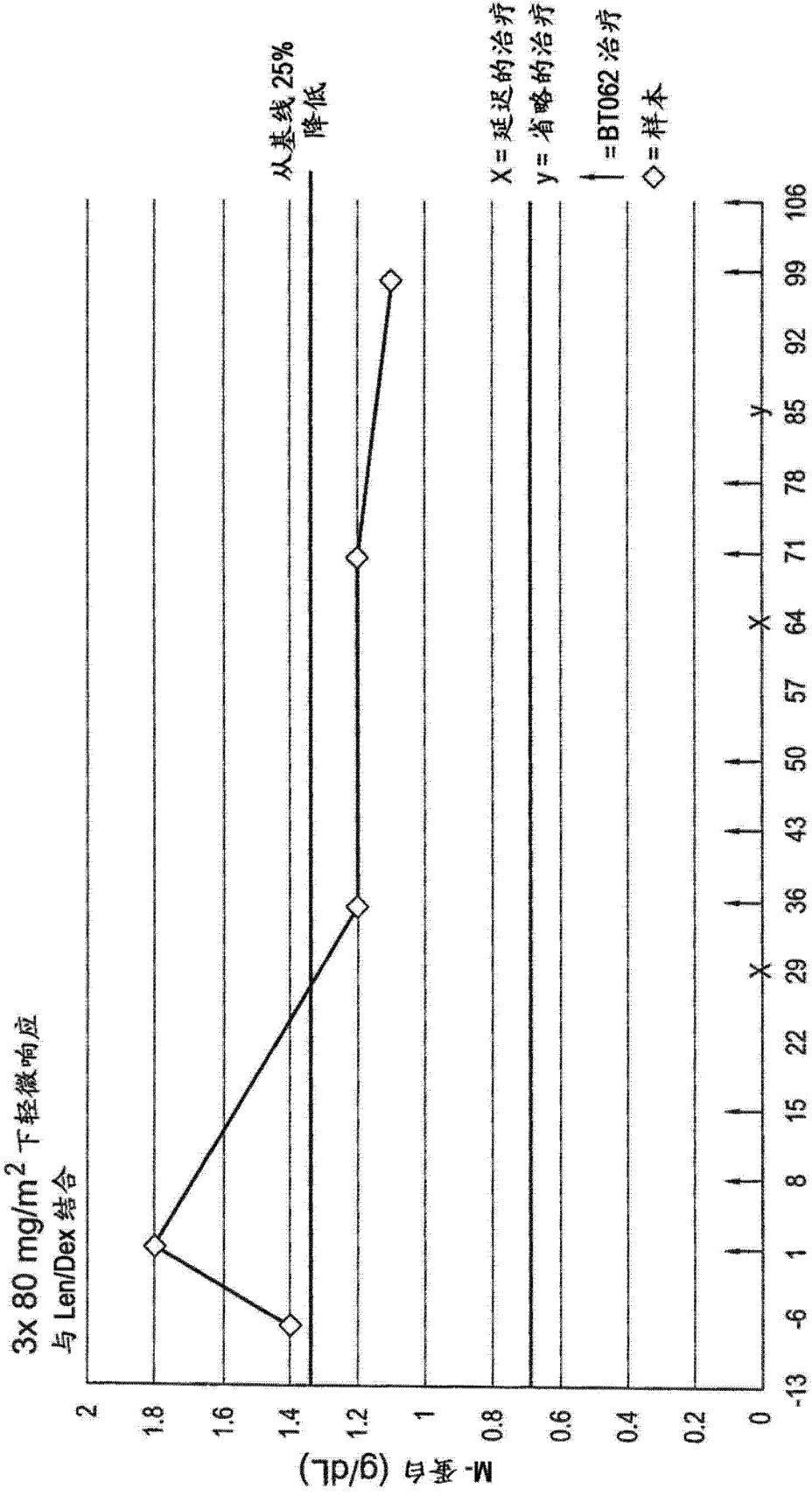


图 34

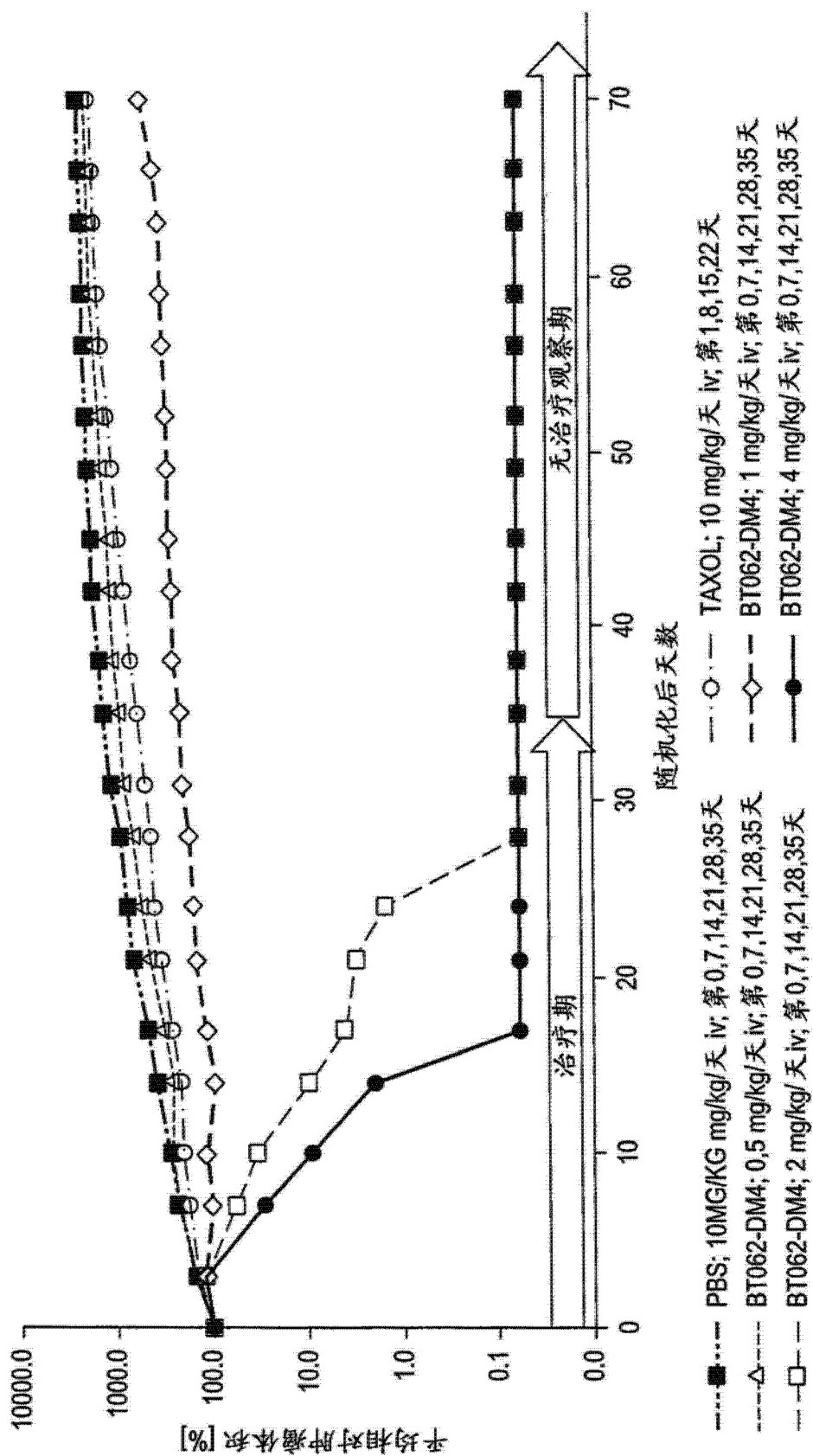


图 35

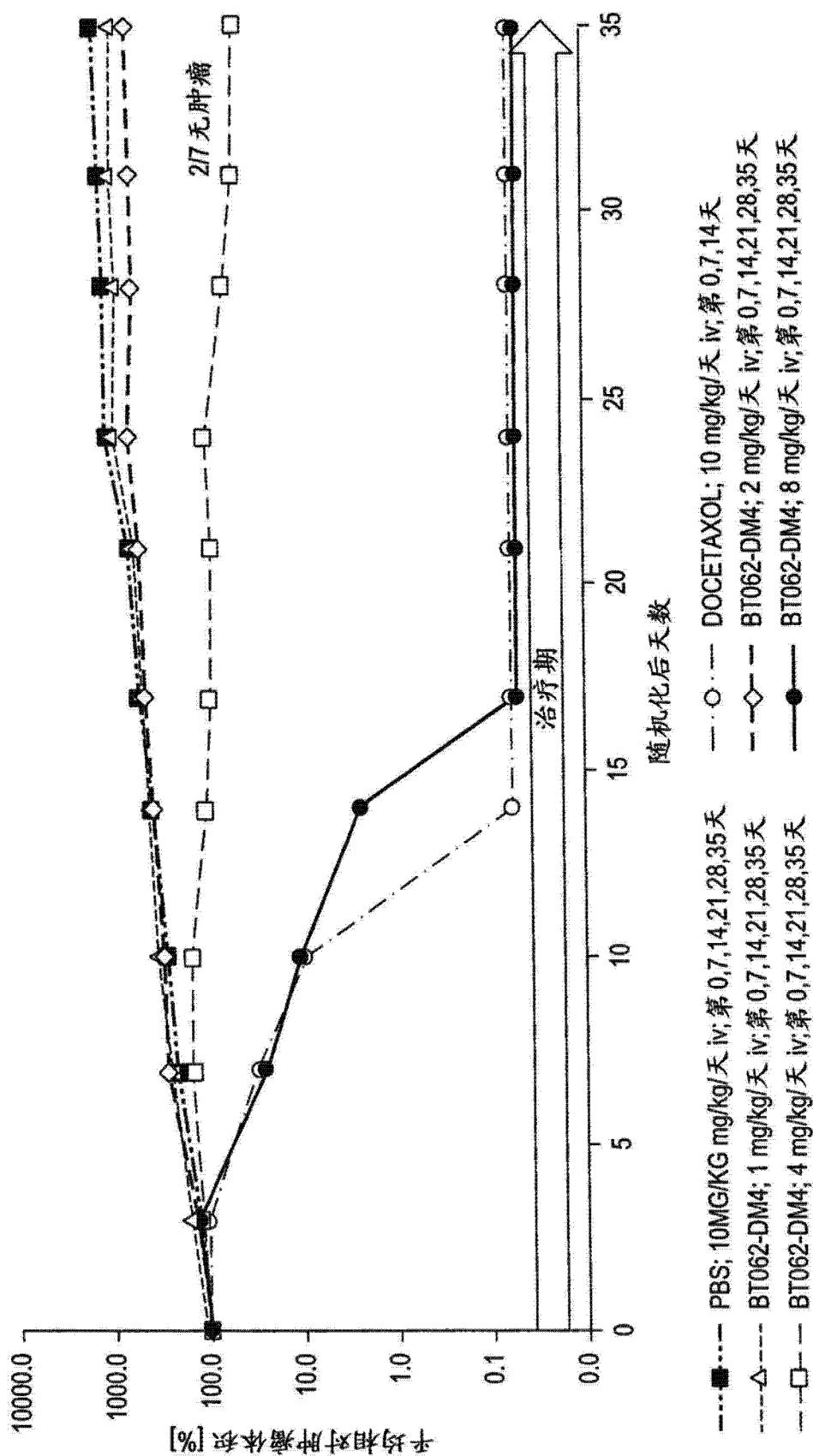


图 36

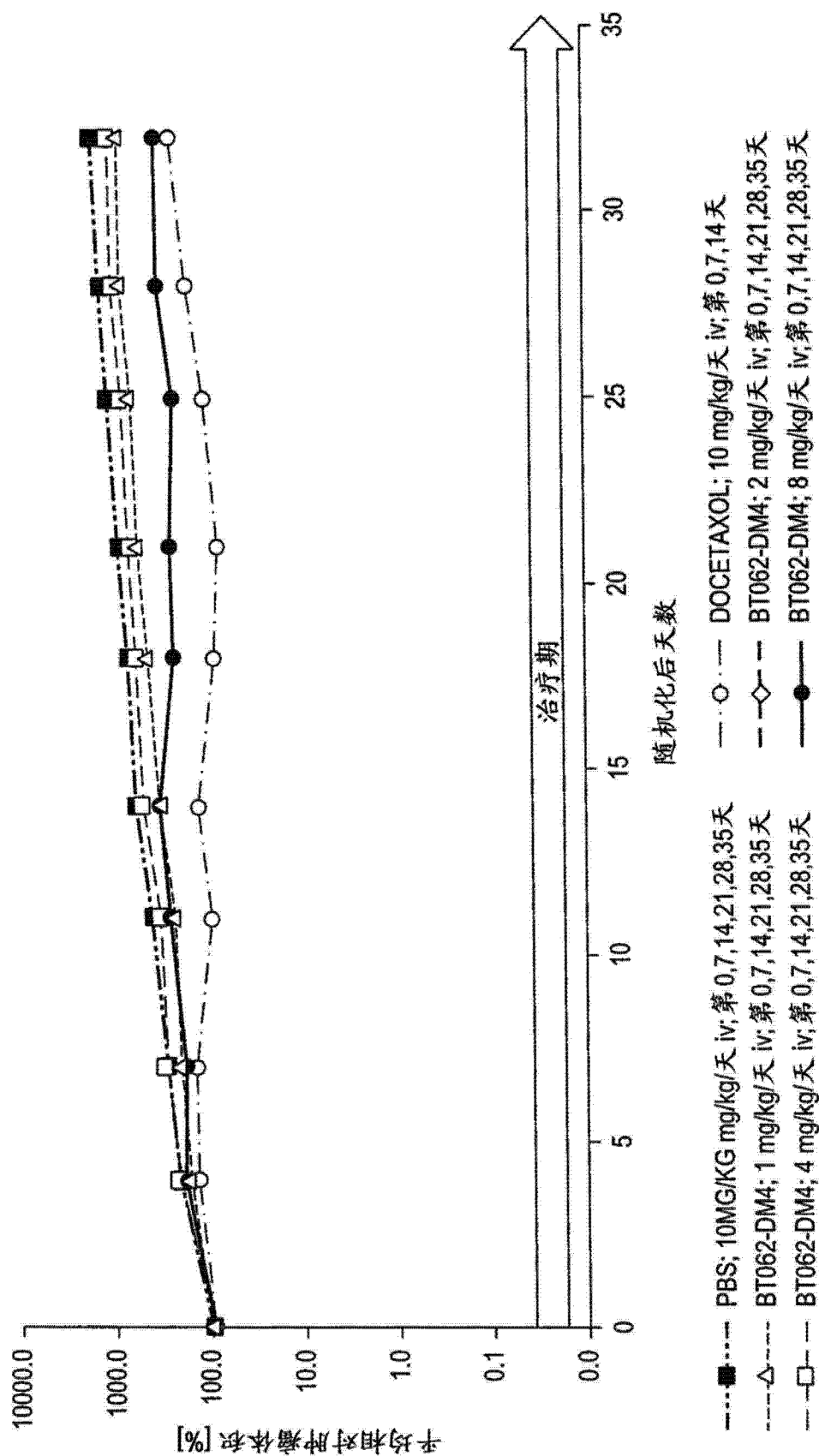


图 37

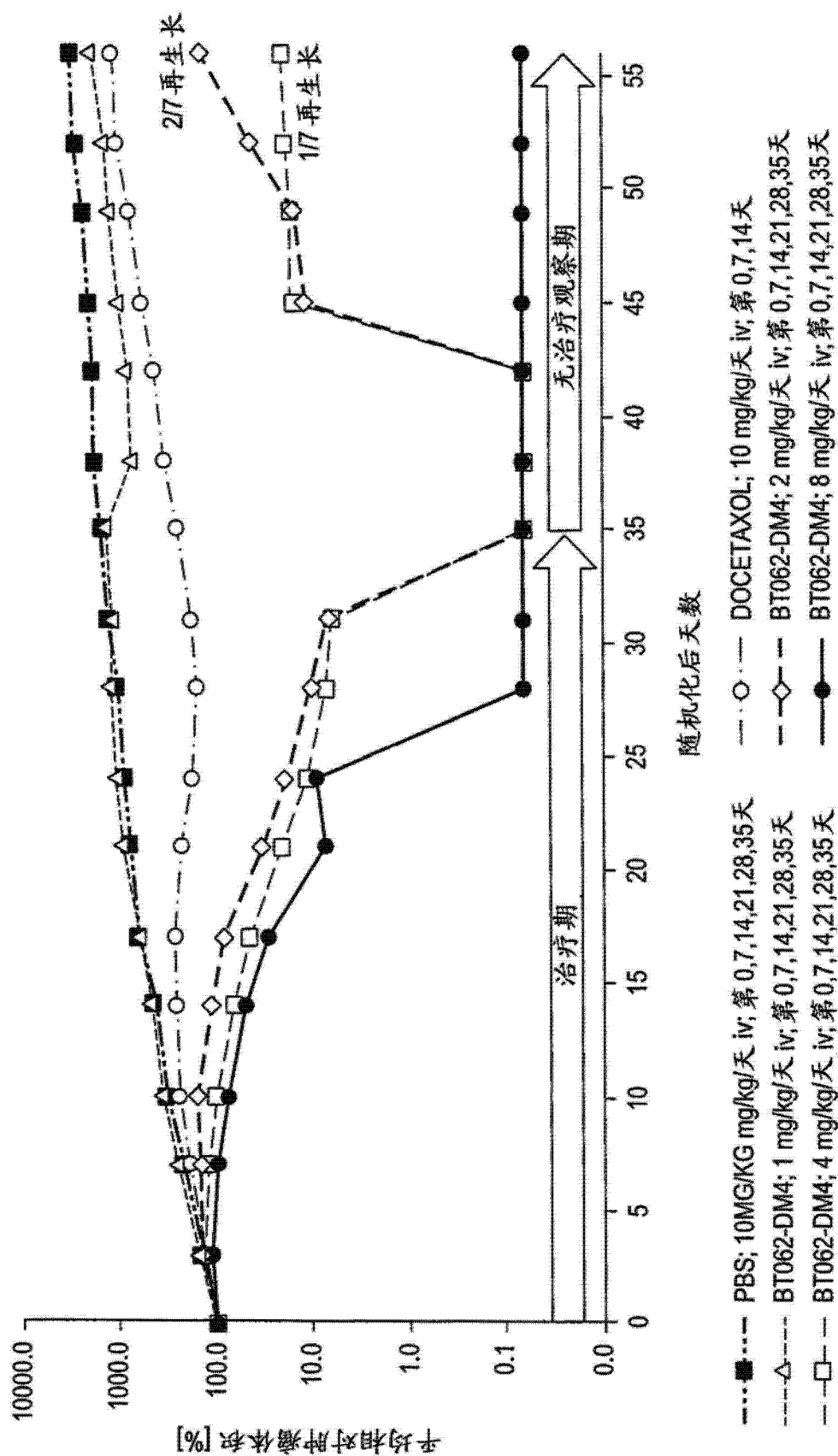


图 38