(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110392580 A
(43)申请公布日 2019.10.29

(21)申请号 201880017528.6

(22)申请日 2018.02.21

(30)优先权数据
62/463316 2017.02.24 US
15/820708 2017.11.22 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2019.09.11

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2018/019025 2018.02.21

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2018/156634 EN 2018.08.30

(71)申请人 免疫医疗公司
地址 美国新泽西州

(72)发明人 D.M.戈登伯格 S.V.戈文丹

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
代理人 罗文锋 彭昶

(51)Int.Cl.
A61K 47/68(2006.01)
A61K 31/33(2006.01)
C07K 16/30(2006.01)

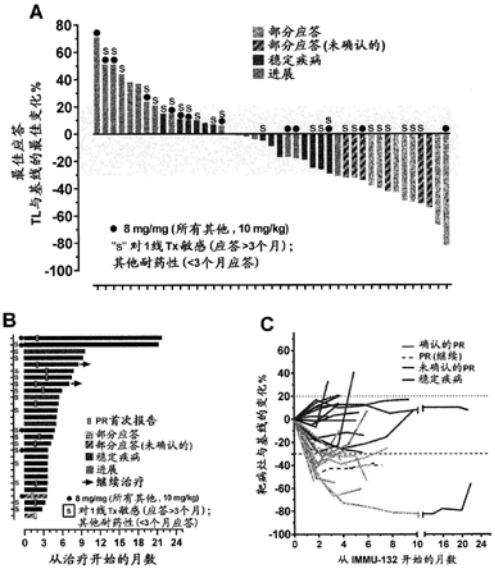
权利要求书2页 说明书56页
序列表6页 附图26页

(54)发明名称

用靶向TROP-2的拓扑异构酶-I抑制性抗体-药物缀合物(ADC)治疗小细胞肺癌(SCLC)

(57)摘要

本发明涉及用包含附接至抗Trop-2抗体或抗原结合抗体片段的药物的治疗性ADC治疗SCLC。优选地，所述药物是SN-38。更优选地，所述抗体是hRS7抗体，并且所述ADC是沙西妥珠单抗戈维替康。所述ADC可以介于4mg/kg与16mg/kg之间、优选4、6、8、9、10、12或16mg/kg、最优选8至10mg/kg的剂量施用。当以指定的剂量和时间表施用时，所述ADC可减小实体肿瘤的大小、减少或消除转移并且有效治疗对标准疗法，如放射疗法、化学疗法或免疫疗法具有耐药性的癌症。出人意料地，所述ADC可有效治疗伊立替康或托泊替康难治或从伊立替康或托泊替康治疗复发的癌症。优选地，所述ADC作为与一种或多种其他抗癌治疗，如卡铂或顺铂的组合疗法施用。



CN 110392580 A

1.一种治疗小细胞肺癌(SCLC)的方法,所述方法包括向患有SCLC的人患者施用抗Trop-2抗体-药物缀合物(ADC),所述抗Trop-2抗体-药物缀合物包含与抗Trop-2抗体或其抗原结合片段缀合的SN-38。

2.如权利要求1所述的方法,其中所述癌症是转移性的(mSCLC)。

3.如权利要求1所述的方法,其中所述ADC作为一线疗法施用至先前尚未针对所述SCLC治疗过的患者。

4.如权利要求1所述的方法,其中所述ADC作为二线或更晚疗法施用至已经接受过针对所述SCLC的先前癌症治疗的患者。

5.如权利要求1所述的方法,其中所述患者先前已从使用标准抗癌剂的治疗复发或对使用标准抗癌剂的治疗具有抗性。

6.如权利要求1所述的方法,其中所述患者先前已从使用托泊替康或伊立替康的治疗复发或对使用托泊替康或伊立替康的治疗具有抗性。

7.如权利要求4所述的方法,其中所述SCLC对使用含铂的剂的化学疗法敏感。

8.如权利要求4所述的方法,其中所述SCLC对使用含铂的剂的化学疗法具有抗性。

9. 如权利要求1所述的方法,其中所述ADC以4 mg/kg与16 mg/kg之间的剂量施用。

10. 如权利要求9所述的方法,其中所述剂量选自由以下组成的组:4 mg/kg、6 mg/kg、7 mg/kg、8 mg/kg、9 mg/kg、10 mg/kg、12 mg/kg以及16 mg/kg。

11. 如权利要求9所述的方法,其中所述剂量介于8 mg/kg至10 mg/kg之间。

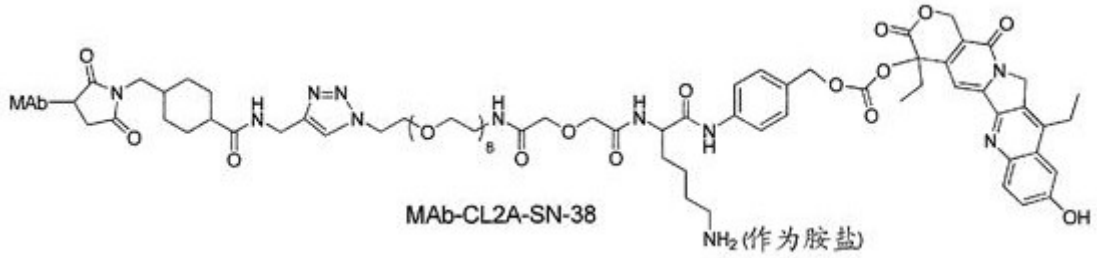
12. 如权利要求1所述的方法,其中所述抗体是人源化RS7抗体,所述人源化RS7抗体包含轻链CDR序列CDR1 (KASQDVSIAVA,SEQ ID NO:1)、CDR2 (SASYRYT,SEQ ID NO:2)和CDR3 (QQHYITPLT, SEQ ID NO:3)以及重链CDR序列CDR1 (NYGMN,SEQ ID NO:4)、CDR2 (WINTYTGEPTYTDDFKG,SEQ ID NO:5)和CDR3 (GGFGSSYWYFDV,SEQ ID NO:6)。

13.如权利要求1所述的方法,其中所述治疗使得肿瘤大小减小至少15%、至少20%、至少30%或至少40%。

14.如权利要求2所述的方法,其还包括减小大小或消除转移。

15. 如权利要求1所述的方法,其中所述癌症是其他疗法难治的,但对所述ADC有反应。

16.如权利要求1所述的方法,其中在所述SN-38与所述抗体之间存在CL2A接头,并且所述ADC的结构是MAb-CL2A-SN-38



MAb-CL2A-SN-38。

17.如权利要求1所述的方法,其中每个抗体分子上附接有6个或更多个SN-38分子。

18.如权利要求1所述的方法,其中每个抗体分子上附接有6-8个SN-38分子。

19.如权利要求1所述的方法,其中每个抗体分子上附接有7-8个SN-38分子。

20.如权利要求1所述的方法,其中所述抗体是IgG1或IgG4抗体。

21.如权利要求1所述的方法，其中所述抗体具有选自由以下组成的组的同种异型：G1m3、G1m3,1、G1m3,2、G1m3,1,2、nG1m1、nG1m1,2以及Km3同种异型。

22.如权利要求1所述的方法，其中所述ADC剂量以具有选自由以下组成的组的周期的时间表每周一次或两次施用至所述人受试者：(i)每周；(ii)每隔一周；(iii)治疗一周，随后停药两周、三周或四周；(iv)治疗两周，随后停药一周、两周、三周或四周；(v)治疗三周，然后停药一周、两周、三周、四周或五周；(vi)治疗四周，随后停药一周、两周、三周、四周或五周；(vii)治疗五周，随后停药一周、两周、三周、四周或五周；以及(viii)每月。

23.如权利要求22所述的方法，其中所述周期重复4次、6次、8次、10次、12次、16次或20次。

24.如权利要求1所述的方法，其中所述ADC与选自由以下组成的组的一种或多种治疗方式组合施用：未缀合的抗体、免疫缀合物、基因疗法、化学疗法、治疗性肽、细胞因子疗法、局部放射疗法、外科手术、干扰RNA疗法、药物、毒素以及细胞因子。

25. 如权利要求24所述的方法，其中所述药物、毒素或化学治疗剂选自由以下组成的组：5-氟尿嘧啶、阿法替尼、阿普立定、阿扎立平、阿那曲唑、蒽环类药物、阿西替尼、AVL-101、AVL-291、苯达莫司汀、博来霉素、硼替佐米、博舒替尼、苔藓抑素-1、白消安、刺孢霉素、喜树碱、卡铂、10-羟基喜树碱、卡莫司汀、西乐葆、苯丁酸氮芥、顺铂(CDDP)、Cox-2抑制剂、伊立替康(CPT-11)、SN-38、卡铂、克拉屈滨、喜树碱、环磷酰胺、克唑替尼、阿糖胞苷、达卡巴嗪、达沙替尼、地尼西宝、多西他赛、更生霉素、柔红霉素、阿霉素、2-吡咯啉子基阿霉素(2P-DOX)、氰基-吗啉代阿霉素、阿霉素葡糖苷酸、表柔比星葡糖苷酸、埃罗替尼、雌莫司汀、表鬼臼毒素、埃罗替尼、恩替诺特、雌激素受体结合剂、依托泊苷(VP16)、依托泊苷葡糖苷酸、磷酸依托泊苷、依西美坦、芬戈莫德、夫拉平度、氟尿苷(FUdR)、3',5'-O-二油酰基-FudR(FUdR-dO)、氟达拉滨、氟他胺、法呢基-蛋白转移酶抑制剂、福他替尼、吉尼替彼、GDC-0834、GS-1101、吉非替尼、吉西他滨、羟基脲、依鲁替尼、伊达比星、伊德利塞、异环磷酰胺、伊马替尼、L-天冬酰胺酶、拉帕替尼、来那度胺、亚叶酸、LFM-A13、洛莫司汀、氮芥、美法仑、巯基嘌呤、6-巯基嘌呤、甲氨蝶呤、米托蒽醌、光辉霉素、丝裂霉素、米托坦、诺维本、来那替尼、尼洛替尼、亚硝基脲、奥拉帕尼、普卡霉素、丙卡巴肼、紫杉醇、PCI-32765、喷司他丁、PSI-341、雷洛昔芬、司莫司汀、索拉非尼、链脲霉素、SU11248、舒尼替尼、他莫昔芬、替莫唑胺(DTIC的水性形式)、反铂、沙利度胺、硫鸟嘌呤、塞替派、替尼泊苷、托泊替康、乌拉莫司汀、瓦他拉尼、长春瑞滨、长春碱、长春新碱、长春花生物碱以及ZD1839。

26.如权利要求24所述的方法，其中所述药物是顺铂或卡铂。

用靶向TROP-2的拓扑异构酶-I抑制性抗体-药物缀合物(ADC)治疗小细胞肺癌(SCLC)

[0001] 受让人:免疫医学公司(IMMUNOMEDICS,INC.)

[0002] 相关申请

[0003] 本申请是2017年11月22日提交的美国专利申请序列号15/820,708的部分继续申请,所述美国专利申请序列号15/820,708是2016年3月14日提交的美国专利申请序列号15/069,208的部分继续申请,所述美国专利申请序列号15/069,208是2015年3月25日提交的美国专利申请序列号14/667,982(现已发布的美国专利号9,493,573)的部分继续申请,所述美国专利申请序列号14/667,982是2013年7月23日提交的美国申请号13/948,732(现为美国专利号9,028,833)的分案,其根据美国法典第35篇第119条(e)款要求2012年12月13日提交的美国临时专利申请61/736,684和2013年1月7日提交的美国临时专利申请61/749,548的权益。申请15/069,208根据美国法典第35篇第119条(e)款要求2015年3月16日提交的美国临时专利申请62/133,654、2015年3月16日提交的美国临时专利申请62/133,729、2015年3月25日提交的美国临时专利申请62/138,092、2015年5月4日提交的美国临时专利申请62/156,608以及2015年10月15日提交的美国临时专利申请62/241,881的权益。申请15/069,208根据美国法典第35篇第119条(e)款要求2016年12月1日提交的美国临时专利申请62/428,655的权益。本申请根据美国法典第35篇第119条(e)款要求2017/2/24提交的美国临时专利申请62/463,316的权益。各优先权申请的正文以引用的方式整体并入本文。

[0004] 序列表

[0005] 本申请含有已通过EFS-Web以ASCII格式提交并且特此以引用的方式整体并入的序列表。所述ASCII副本创建于2018年2月14日,名称为IMM370WO1_SL.txt并且大小为7,887字节。

技术领域

[0006] 本发明涉及用于治疗小细胞肺癌(SCLC)的抗Trop-2抗体-药物缀合物(ADC)的组合物和使用方法。优选地,所述ADC是抗Trop-2-SN-38缀合物,如沙西妥珠单抗戈维替康。更优选地,可使用诸如CL2A的接头将药物附接至所述抗体或抗体片段。然而,可使用其他接头、其他已知的细胞毒性药物以及将药物缀合至抗体的其他已知的方法。最优选地,所述抗体或其抗原结合片段是人源化RS7抗体。所述抗体或片段可与每个抗体或片段,药物部分或药物-接头部分的1-12、1-6、1-5、6-8或7-8个拷贝附接。所述ADC用于治疗对一线含铂化学疗法具有化学敏感性或化学耐药性的SCLC患者。在某些实施方案中,所述ADC可用于SCLC的一线治疗。出人意料地,尽管所述ADC也是拓扑异构酶I的抑制剂,但所述ADC在SCLC患者中有用,所述患者从托泊替康疗法复发或未能对托泊替康疗法有反应。所述ADC在转移性SCLC(mSCLC)的二线对比晚期是类似有活性的。ADC可单独使用或与一种或多种选自由以下组成的组的治疗方式一起作为组合疗法使用:外科手术、放射疗法、化学疗法、免疫调节剂、细胞因子、化学治疗剂、促凋亡剂、抗血管生成剂、细胞毒性剂、药物、毒素、放射性核素、RNAi、siRNA、第二抗体或抗体片段以及免疫缀合物。在优选的实施方案中,ADC与其他治疗方式的

组合表现出协同作用,并且比单独ADC或其他治疗方式或单独施用的ADC和其他治疗方式的作用果的总和更有效地诱导癌细胞死亡。出人意料地,皮下施用抗Trop-2 ADC不会在施用部位导致不可接受的局部毒性,并且在替代实施方案中,所述ADC可静脉内或皮下施用。

[0007] 相关技术

[0008] 源自神经内分泌祖细胞的小细胞肺癌(SCLC)占所有肺癌的大约15%且具有6%的最低5年存活率之一(Alvarado-Luna等人,2016,Transl Lung Cancer Res 5:26-38;Siegel等人,2017,CA Cancer J Clin 67:7-30)。这是因为它具有高度侵袭性,约三分之二的患者在诊断时患有转移性疾病(Fruh等人,2013,Ann Oncol 24(6):vi99-105)。而IV期SCLC的一线治疗是姑息治疗,但具有60%-75%的高初始应答率,结果通常较差,在使用基于铂的化学疗法情况下(Fruh等人,2013,Ann Oncol 24(6):vi99-105)中值无进展存活期(PFS)仅为5.5个月且中值总体存活期(OS)为<10个月(Foster等人,2011,Cancer 117:1262-71;Wolfson等人,2011,Int J Radiat Oncol Biol Phys 81:77-84)。

[0009] 对二线治疗的应答一直较差,如<10%,并且在二线或三线化学疗法后中值存活期仅为4或5个月(Hurwitz等人,2009,Oncologist 14:986-94;Schneider,2008,J Natl Compr Canc Netw6:323-31),尤其是对一线治疗存在耐药性时(即,应答持续时间<3个月)。自1998年以来,这种情况下唯一批准的药物是适用于对基于铂的疗法敏感(应答持续时间超过3个月)的复发患者的托泊替康(O'Brien等人,2006,J Clin Oncol 24:5441-7;Perez-Soler等人,1996,J Clin Oncol 14:2785-90)。然而,伊立替康、紫杉烷、长春瑞滨和吉西他滨也经常给与至患有化学敏感性复发性疾病的患者(Furuse等人,1996,Oncology 53:169-72;Smit等人,1998,Br J Cancer 77:347-51;Sandler,2001,Oncology(Williston Park)15:11-2;van der Lee等人,2001,Ann Oncol 12:557-61)。

[0010] 最近随机II期和III期临床试验(包括对照组中的托泊替康)的综述显示在二线中的13%至17%应答率(Inoue等人,2008,J Clin Oncol 26:5401-6;Jotte等人,2011,J Clin Oncol 29:287-93;Horita等人,2015,Sci Rep 5:15437),但在患有化学敏感性疾病的患者中应答率高达20%,并且对于化学耐药性的那些患者应答率仅为4%(von Pawel,2003,Lung Cancer 41(Suppl 4):S3-8)。然而,二线中的这些应答和/或疾病稳定化并未转化为改善的存活率。例如,Hagmann和同事(Hagmann等人,2015,J Cancer 6:1148-5418)报告使用托泊替康的应答率为22.5%,并且中值PFS为2.4个月且中值OS为5个月。在三线情况下,未实现客观应答,同时报告了中值PFS为1.3个月且中值OS为2.5个月(Hagmann等人,2015,J Cancer 6:1148-5418)。其他已建立的单剂化学疗法或使用铂加依托泊苷组合的再治疗也一直令人失望,从而产生与单独托泊替康相似的存活结果(Hagmann等人,2015,J Cancer 6:1148-5418)。伊立替康显示非常低的应答或没有应答以及1.7个月的中值进展时间(TTP),同时也已经报告了4.6个月的中值OS(Pallis等人,2009,Lung Cancer 65:187-91)。吉西他滨未给与任何客观应答,并且产生6周的中值TTP和6.4个月的中值OS,而培美曲塞在43名患者中实现2个应答(ORR,4%)(Jalal等人,2009,J Thorac Oncol 4:93-6)。因此,患有SCLC的患者、尤其是患有广泛疾病的那些患者的管理的进展在过去20年中一直令人失望。几乎所有患者早期复发并在一年内死亡。

[0011] 对于用于SCLC患者的一线或晚期的更有效的治疗存在需要。对于用于对标准化学疗法(如含铂化学疗法、托泊替康或伊立替康)具有耐药性的患者的更好疗法存在特别需

要。

发明内容

[0012] 本发明涉及用于治疗SCLC(无论是一线还是二线或更晚)的改进的方法和组合物。所述方法和组合物特别用于治疗对标准化学疗法(如使用基于铂的或喜树碱化合物如伊立替康和托泊替康)具有耐药性的SCLC患者。主题方法涉及使用抗Trop-2 ADC、优选使用抗Trop-2-SN-38 ADC的治疗。在更优选的实施方案中,使用诸如CL2A接头的接头将抗体部分附接至药物部分。最优选地,所述抗Trop-2是人源化RS7(hRS7)抗体或抗原结合抗体片段。本发明的方法和组合物提供相对于用于SCLC的护理标准的显著改善的治疗,当以下文详细论述的优选剂量使用时具有更高的功效和仅可控制的毒性。

[0013] 在各种实施方案中,所述ADC可单独使用或作为与一种或多种其他治疗方式的组合疗法使用,所述其他治疗方式如外科手术、放射疗法、化学疗法、免疫调节剂、细胞因子、化学治疗剂、促凋亡剂、抗血管生成剂、细胞毒性剂、药物、毒素、放射性核素、RNAi、siRNA、第二抗体或抗体片段或免疫缀合物。优选地,ADC与其他治疗方式的组合比单独使用或个别治疗的作用的总和更有效。

[0014] 在具体实施方案中,抗Trop-2抗体可以是人源化RS7抗体(参见例如,美国专利号7,238,785,其附图和实施例部分以引用的方式并入本文),其包含轻链CDR序列CDR1(KASQDVSIAVA,SEQ ID NO:1);CDR2(SASYRYT,SEQ ID NO:2);和CDR3(QQHYITPLT,SEQ ID NO:3)以及重链CDR序列CDR1(NYGMN,SEQ ID NO:4)、CDR2(WINTYTGEPTYTDDFKG,SEQ ID NO:5)和CDR3(GGFGSSYWYFDV,SEQ ID NO:6)。然而,如下文所讨论,其他抗Trop-2抗体是已知的并且可用于主题ADC中。许多用于癌症治疗的细胞毒性药物是本领域熟知的,并且任何这种已知的药物均可缀合至目标抗体。在更优选的实施方案中,与抗体缀合的药物是喜树碱,最优选SN-38(参见,例如,美国专利号9,028,833,其附图和实施例部分以引用的方式并入本文)。

[0015] 所述抗体部分可以是单克隆抗体、抗原结合抗体片段、双特异性或其他多价抗体或其他基于抗体的分子。所述抗体可具有各种同种型,优选地人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4,更优选地包含人IgG1铰链和恒定区序列。所述抗体或其片段可以是嵌合、人源化或人抗体,以及其变型,如半IgG4抗体(被称为“单一抗体”),如由van der Neut Kolfschoten等人(Science 2007;317:1554-1557)所描述。更优选地,所述抗体或其片段可被设计或选择为包含属于特定同种异型的人恒定区序列,其可在所述ADC施用至人受试者时导致减小的免疫原性。用于施用的优选同种异型包括非G1m1同种异型(nG1m1),如G1m3、G1m3,1、G1m3,2或G1m3,1,2。更优选地,所述同种异型是选自由以下组成的组:nG1m1、G1m3、nG1m1,2和Km3同种异型(Jefferies和Lefranc,2009,mAbs 1(4):1-7)。

[0016] 待缀合至所述抗体或抗体片段的药物可选自由以下组成的组:蒽环类药物、喜树碱、微管蛋白抑制剂、美登木素生物碱(maytansinoid)、刺孢霉素、奥瑞斯他汀、氮芥、乙烯亚胺衍生物、烷基磺酸酯、亚硝基脲、三氮烯、叶酸类似物、紫杉烷、COX-2抑制剂、嘧啶类似物、嘌呤类似物、抗生素、酶抑制剂、表鬼臼毒素、铂配位络合物、长春花生物碱、取代的脲、甲基肼衍生物、肾上腺皮质抑制剂、激素拮抗剂、抗代谢物、烷基化剂、抗有丝分裂剂、抗血管生成剂、酪氨酸激酶抑制剂、mTOR抑制剂、热休克蛋白(HSP90)抑制剂、蛋白酶体抑制剂、

HDAC抑制剂、促凋亡剂以及其组合。

[0017] 有用的具体药物可选自由以下组成的组:5-氟尿嘧啶、阿法替尼、阿普利啶、阿扎立平、阿那曲唑、蒽环类药物、阿西替尼、AVL-101、AVL-291、苯达莫司汀、博来霉素、硼替佐米、博舒替尼、苔藓虫素-1、白消安、刺孢霉素、喜树碱、卡铂、10-羟基喜树碱、卡莫司汀、塞来昔布、苯丁酸氮芥、顺铂、COX-2抑制剂、伊立替康(CPT-11)、SN-38、卡铂、克拉屈滨、喜树碱(camptothecan)、克唑替尼、环磷酰胺、阿糖胞苷、达卡巴嗪、达沙替尼、地尼西宝(dinaciclib)、多西他赛、更生霉素、柔红霉素、DM1、DM3、DM4、阿霉素、2-吡咯啉子基阿霉素(2-PDox)、2-PDox的前药形式(pro-2-PDox)、氰基-吗啉代阿霉素、阿霉素葡糖苷酸、内皮抑素、表柔比星葡糖苷酸、埃罗替尼、雌莫司汀、表鬼臼毒素、埃罗替尼、恩替诺特、雌激素受体结合剂、依托泊苷(VP16)、依托泊苷葡糖苷酸、磷酸依托泊苷、依西美坦、芬戈莫德、氟尿苷(FUdR)、3',5'-O-二油酰基-FudR(FUdR-dO)、氟达拉滨、氟他胺、法呢基-蛋白转移酶抑制剂、夫拉平度、福他替尼、吉尼替彼、GDC-0834、GS-1101、吉非替尼、吉西他滨、羟基脲、依鲁替尼、伊达比星、伊德利塞、异环磷酰胺、伊马替尼、拉帕替尼、来那度胺、亚叶酸、LFM-A13、洛莫司汀、氮芥、美法仑、巯基嘌呤、6-巯基嘌呤、甲氨蝶呤、米托蒽醌、光辉霉素、丝裂霉素、米托坦、单甲基奥瑞斯他汀F(MMAF)、单甲基奥瑞斯他汀D(MMAD)、单甲基奥瑞斯他汀E(MMAE)、诺维本、来那替尼、尼洛替尼、亚硝基脲、奥拉帕尼、普卡霉素、丙卡巴肼、紫杉醇、PCI-32765、喷司他丁、PSI-341、雷洛昔芬、司莫司汀、SN-38、索拉非尼、链脲霉素、SU11248、舒尼替尼、他莫昔芬、替莫唑胺、反铂、沙利度胺、硫鸟嘌呤、塞替哌、替尼泊苷、托泊替康、乌拉莫司汀、瓦他拉尼、长春瑞滨、长春碱、长春新碱、长春花生物碱以及ZD1839。优选地,所述药物是SN-38。

[0018] 主题ADC的优选最佳剂量可包括介于4mg/kg与18mg/kg之间的剂量,优选每周一次、每周两次或每隔一周给与。最佳给药方案可包括以下治疗周期:治疗连续两周、随后停药一周、两周、三周或四周,或交替的治疗周和停药周,或治疗一周、随后停药两周、三周或四周,或治疗三周、随后停药一周、两周、三周或四周,或治疗四周、随后停药一周、两周、三周或四周,或治疗五周、随后停药一周、两周、三周、四周或五周,或每两周一次、每三周一次或每月一次施用。治疗可延长任何数量的周期,优选至少2、至少4、至少6、至少8、至少10、至少12、至少14或至少16个周期。所使用的示例性剂量可包括1mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、4mg/kg、5mg/kg、6mg/kg、7mg/kg、8mg/kg、9mg/kg、10mg/kg、11mg/kg、12mg/kg、13mg/kg、14mg/kg、15mg/kg、16mg/kg、17mg/kg、18mg/kg、19mg/kg、20mg/kg、22mg/kg以及24mg/kg。优选的剂量是4、6、8、9、10、12、14、16或18mg/kg。更优选的剂量是6-12、6-8、7-8、8-10、10-12或8-12mg/kg。普通技术人员将认识到,在选择ADC的最佳剂量时,可考虑多种因素,如年龄、一般健康状况、特定器官功能或重量以及先前疗法对特定器官系统(例如,骨髓)的影响,并且可在治疗过程期间增加或减少施用的剂量和/或频率。可根据需要重复剂量,在少至4至8个剂量后观察到肿瘤缩小的迹象。本文公开的优化的施用剂量和时间表在人受试者中显示出人意料的优异功效和降低的毒性,这可能是从动物模型研究无法预测的。出人意料地,优异的功效允许治疗先前被发现对一种或多种标准抗癌疗法具有耐药性的肿瘤。更出人意料地,已经发现所述治疗在先前对喜树碱具有耐药性的肿瘤中是有效的,如伊立替康(SN-38的母体化合物)。

[0019] 所述ADC用于治疗癌症,如SCLC和mSCLC。这种用途可以是一线、二线或在癌症进展

的晚期。所述组合物和使用方法在喜树碱耐药性以及喜树碱敏感性癌症中是有效的。通常，所述抗Trop-2 ADC用于治疗表达Trop-2抗原的任何癌症。然而，在优选的具体实施方案中，所述癌症是SCLC或mSCLC。

附图说明

[0020] 图1.使用hRS7(抗Trop-2)、hPAM4(抗MUC5ac)、hMN-14(抗CEACAM5)或非特异性对照hA20(抗CD20)的SN-38缀合物，携带Capan1人胰腺癌的无胸腺裸鼠的临床前体内治疗。

[0021] 图2.与对照相比，使用抗TROP2-CL2A-SN-38缀合物，携带BxPC3人胰腺癌的无胸腺裸鼠的临床前体内治疗。

[0022] 图3A.CL2-SN-38和CL2A-SN-38的结构。

[0023] 图3B.使用COLO 205结肠腺癌，连接至CL2对CL2A接头的抗Trop-2 ADC对比hA20 ADC和盐水对照的比较功效。如箭头所示，每周两次处理动物，持续4周。将COLO 205小鼠(N＝6)用0.4mg/kg ADC处理并且每周两次测量肿瘤。

[0024] 图3C.使用Capan-1胰腺癌，连接至CL2对CL2A接头的抗Trop-2 ADC对比hA20 ADC和盐水对照的比较功效。如箭头所示，每周两次处理动物，持续4周。将Capan-1小鼠(N＝10)用0.2mg/kg ADC处理并且每周测量肿瘤。

[0025] 图4A.hRS7-SN-38 ADC在若干实体瘤-异种移植物疾病模型中的治疗功效。在携带人非小细胞肺肿瘤、结肠直肠肿瘤、胰腺肿瘤或鳞状细胞肺肿瘤异种移植物的小鼠中研究hRS7-CL2-SN-38和hRS7-CL2A-SN-38 ADC处理的功效。所有ADC和对照以指定的量施用(表示为每剂量SN-38的量;长箭头＝缀合物注射液，短箭头＝伊立替康注射液)。将携带Calu-3肿瘤的小鼠(N＝5-7)每4天注射hRS7-CL2-SN-38，共注射4次(q4dx4)。

[0026] 图4B.hRS7-SN-38 ADC在若干实体瘤-异种移植物疾病模型中的治疗功效。在携带人非小细胞肺肿瘤、结肠直肠肿瘤、胰腺肿瘤或鳞状细胞肺肿瘤异种移植物的小鼠中研究hRS7-CL2-SN-38和hRS7-CL2A-SN-38 ADC处理的功效。所有ADC和对照以指定的量施用(表示为每剂量SN-38的量;长箭头＝缀合物注射液，短箭头＝伊立替康注射液)。将携带COLO 205肿瘤的小鼠(N＝5)用ADC注射8次(q4dx8)或每2天用伊立替康的MTD注射总共5次(q2dx5)。

[0027] 图4C.hRS7-SN-38 ADC在若干实体瘤-异种移植物疾病模型中的治疗功效。在携带人非小细胞肺肿瘤、结肠直肠肿瘤、胰腺肿瘤或鳞状细胞肺肿瘤异种移植物的小鼠中研究hRS7-CL2-SN-38和hRS7-CL2A-SN-38 ADC处理的功效。所有ADC和对照以指定的量施用(表示为每剂量SN-38的量;长箭头＝缀合物注射液，短箭头＝伊立替康注射液)。将Capan-1(N＝10)用指示的剂每周两次处理，持续4周。

[0028] 图4D.hRS7-SN-38 ADC在若干实体瘤-异种移植物疾病模型中的治疗功效。在携带人非小细胞肺肿瘤、结肠直肠肿瘤、胰腺肿瘤或鳞状细胞肺肿瘤异种移植物的小鼠中研究hRS7-CL2-SN-38和hRS7-CL2A-SN-38 ADC处理的功效。所有ADC和对照以指定的量施用(表示为每剂量SN-38的量;长箭头＝缀合物注射液，短箭头＝伊立替康注射液)。将携带BxPC-3肿瘤的小鼠(N＝10)用指示的剂每周两次处理，持续4周。

[0029] 图4E.hRS7-SN-38 ADC在若干实体瘤-异种移植物疾病模型中的治疗功效。在携带人非小细胞肺肿瘤、结肠直肠肿瘤、胰腺肿瘤或鳞状细胞肺肿瘤异种移植物的小鼠中研究

hRS7-CL2-SN-38和hRS7-CL2A-SN-38 ADC处理的功效。所有ADC和对照以指定的量施用(表示为每剂量SN-38的量;长箭头＝缀合物注射液,短箭头＝伊立替康注射液)。除了每周给予两次ADC持续4周外,携带SK-MES-1肿瘤(N＝8)的小鼠接受CPT-11的MTD(q2dx5)。

[0030] 图5A.hRS7-CL2A-SN-38在Swiss-Webster小鼠中的耐受性。向五十六只Swiss-Webster小鼠相隔3天给予缓冲液或hRS7-CL2A-SN-38的2个腹膜内剂量(每个剂量4、8或12mg/kg的SN-38;每个剂量250、500或750mg缀合蛋白/kg)。在最后一次注射后7天和15天,将来自每组的7只小鼠实施安乐死,进行血细胞计数和血清化学分析。图表示出每组中具有升高的AST水平的动物的百分比。

[0031] 图5B.hRS7-CL2A-SN-38在Swiss-Webster小鼠中的耐受性。向五十六只Swiss-Webster小鼠相隔3天给予缓冲液或hRS7-CL2A-SN-38的2个腹膜内剂量(每个剂量4、8或12mg/kg的SN-38;每个剂量250、500或750mg缀合蛋白/kg)。在最后一次注射后7天和15天,将来自每组的7只小鼠实施安乐死,进行血细胞计数和血清化学分析。图表显示每组中具有升高的ALT水平的动物的百分比。

[0032] 图5C.hRS7-CL2A-SN-38在食蟹猴中的耐受性。将每组6只猴用缓冲液(对照)或0.96mg/kg的hRS7-CL2A-SN-38或1.92mg/kg的SN-38当量/剂量(60和120mg/kg缀合物蛋白)间隔3天注射两次。所有动物在第-1天、第3天和第6天取血。在第11天在0.96mg/kg组中和在第3天在1.92mg/kg组中将4只猴子放血。食蟹猴中的嗜中性粒细胞计数的变化。

[0033] 图5D.hRS7-CL2A-SN-38在食蟹猴中的耐受性。将每组6只猴用缓冲液(对照)或0.96mg/kg的hRS7-CL2A-SN-38或1.92mg/kg的SN-38当量/剂量(60和120mg/kg缀合物蛋白)间隔3天注射两次。所有动物在第-1天、第3天和第6天取血。在第11天在0.96mg/kg组中和在第3天在1.92mg/kg组中将4只猴子放血。食蟹猴中血小板计数的变化。

[0034] 图6.抗Trop-2-紫杉醇ADC针对MDA-MB-468人乳腺癌的体外功效。

[0035] 图7.抗Trop-2-紫杉醇ADC针对BxPC-3人胰腺癌的体外功效。

[0036] 图8A.抗Trop-2 ADC(hRS7-SN-38对MAB650-SN-38)在Capan-1人胰腺癌中的体外功效的比较。

[0037] 图8B.抗Trop-2 ADC(hRS7-SN-38对MAB650-SN-38)在BxPC-3人胰腺癌中的体外功效的比较。

[0038] 图8C.抗Trop-2 ADC(hRS7-SN-38对MAB650-SN-38)在NCI-N87人胃腺癌中的体外功效的比较。

[0039] 图9A.裸或SN-38缀合的hRS7对162-46.2抗体在BxPC-3人胰腺癌中的细胞毒性的比较。

[0040] 图9B.裸或SN-38缀合的hRS7对162-46.2抗体在MDA-MB-468人乳腺癌中的细胞毒性的比较。

[0041] 图10.根据RECIST标准最佳应答的IMMU-132I/II期数据。

[0042] 图11.用于进展时间和最佳应答(RECIST)的IMMU-132I/II期数据。

[0043] 图12.与单独IMMU-132、卡铂或顺铂、非靶向ADC或盐水对照相比,与IMMU-132和卡铂或顺铂的组合疗法。

[0044] 图13.与IMMU-132或单独卡铂或盐水对照相比,与IMMU-132加卡铂的组合疗法。

[0045] 图14.与单独IMMU-132或顺铂或盐水对照相比,与IMMU-132加顺铂的组合疗法。

[0046] 图15.与单独IMMU-132、卡铂或顺铂或盐水对照相比，用与IMMU-132和卡铂或顺铂的组合疗法治疗的小鼠中的恶病质。

[0047] 图16.应答可评估患者的抗肿瘤应答和持续时间的图形表示。(A)根据RECIST 1.1标准，所选靶病变的直径总和的最佳百分比变化和最佳总体应答描述符。关于沙西妥珠单抗戈维替康起始剂量以及患者是对先前一线疗法敏感还是耐药来鉴定患者。具有未确认的部分应答的患者在首次观察到的客观应答后4-6周他们的下一次CT评估时未能保持≥30％。根据RECIST 1.0这些患者的最佳总体应答是稳定疾病。(B)实现稳定疾病或更好的那些患者的从治疗开始的应答持续时间。示出肿瘤缩小达到≥30％的时间，以及沙西妥珠单抗戈维替康起始剂量和对一线疗法的敏感性。(C)实现稳定疾病或更好的患者的应答动力学。持续治疗的具有确认的部分应答的两名患者用虚线示出。

[0048] 图17.(A)参与沙西妥珠单抗戈维替康试验的所有53名SCLC患者的卡普兰-迈耶(Kaplan-Meier)导出的无进展曲线和(B)总体存活曲线。

[0049] 图18.被诊断为患有晚期SCLC的这名64岁男性从2013年7月至2013年11月接受卡铂作为一线治疗，并于2013年11月和12月添加依托泊苷。疾病于2014年5月复发。在开始沙西妥珠单抗戈维替康之前，在基线时(2014年5月)的肿瘤病灶包括隆突下淋巴结(20mm)和右肾上腺肿瘤(A)(直径43x34mm的肾上腺肿块)以及肝脏右叶和左叶中的多个不可测量的病灶、右肺门增厚、左上叶肺结节和食管增厚。根据RECIST 1.1，治疗2个月后的应答评价显示50％减小(B)(肾上腺肿块收缩至14mm，隆突下淋巴结缩小至17mm)。通过第二次应答评估，肾上腺肿块不再可见，而隆突下结节从治疗开始约11个月经历其最大缩小(至11mm)，产生82％的最大缩小率。患者经历21个月的应答持续时间(2014年7月至2016年3月)。(C)来自针对Trop-2染色并评分为2+的肾上腺肿块的活组织检查的免疫组织学，但在肿瘤细胞中稀疏分布。

[0050] 图19.图示出IMMU-132疗法在自13岁以来1包/天吸烟者的57岁男性中的作用，所述男性在2012年被诊断为患有转移性小细胞神经内分泌癌，从2012年10月至2013年1月接受卡铂和依托泊苷作为一线疗法并且在复发后，从2013年9月至2013年11月接受托泊替康，无应答。由于疾病进展，所述患者从2013年11月至2014年4月转为卡铂与依托泊苷的组合，并且从2014年5月至2014年6月进一步转为紫杉醇。在2014年9月，他开始使用沙西妥珠单抗戈维替康，实现持久应答。示出来自基线和治疗2个月后当总和从230mm减小至138mm(40％缩小)时的5个靶病灶中的4个的CT图像。(A)在基线时测量为79x65mm的右肾上腺肿块的轴向切片；(B)在第一次评估时显示减小至48x26mm。(C)在基线时测量为52x38mm的左肾上腺肿块；(D)在第一次评估时为36x17mm。(E)在基线时以冠状面(60x55mm)示出的左腋窝肿块，并且在治疗2个月(F)后，其缩小至30x24mm。(G)以冠状面(21x12mm)示出的右上叶肺肿块缩小至16x12mm(H)。(I)针对Trop-2染色的肺活组织检查的免疫组织学，肿瘤细胞染色的范围从阴性至3+，但总体评分为2+。

具体实施方式

[0051] 定义

[0052] 除非另外指明，否则一个/种(a/an)意指一个(种)或多个(种)。

[0053] 如本文所用，“约”意指加或减10％。例如，“约100”将包括介于90与110之间的任何

数字。

[0054] 如本文所描述，抗体是指全长(即，天然存在的或通过正常免疫球蛋白基因片段重组方法形成的)免疫球蛋白分子(如，IgG抗体)或免疫球蛋白分子的免疫活性(即，特异性结合)部分，如抗体片段。

[0055] 抗体片段是抗体的一部分，诸如$F(ab')_2$、Fab'、Fab、Fv、sFv等。抗体片段也可包括单结构域抗体和IgG4半分子，如下文所讨论。无论结构如何，抗体片段与全长抗体识别的相同抗原结合。术语“抗体片段”也包括由抗体的可变区组成的分离片段，如由重链和轻链的可变区组成的“Fv”片段，以及其中轻链可变区和重链可变区通过肽接头(“scFv蛋白”)连接的重组单链多肽分子。

[0056] 嵌合抗体是重组蛋白，其含有包括来源于一种物种的抗体、优选啮齿动物抗体的互补决定区(CDR)可变结构域，而抗体分子的恒定结构域来源于人抗体的恒定结构域。对于兽医学应用，嵌合抗体的恒定结构域可来源于其他物种，如猫或狗的恒定结构域。

[0057] 人源化抗体是重组蛋白，其中将来自一种物种的抗体(例如啮齿动物抗体)的CDR从啮齿动物抗体的可变重链和可变轻链转移到人重链和轻链可变结构域(例如，框架区序列)中。抗体分子的恒定区来源于人抗体的那些恒定区。在某些实施方案中，可将来自亲本(啮齿动物)抗体的有限数量的框架区氨基酸残基取代到人抗体框架区序列中。

[0058] 人抗体是例如从转基因小鼠获得的抗体，所述转基因小鼠已被“工程化”以响应于抗原激发产生特异性人抗体。在这种技术中，将人重链和轻链基因座的元件引入到来源于胚胎干细胞系的小鼠品系中，所述胚胎干细胞系含有内源性鼠类重链和轻链基因座的靶向破坏。转基因小鼠可合成对特定抗原具有特异性的人抗体，并且小鼠可用于产生分泌人抗体的杂交瘤。用于从转基因小鼠获得人抗体的方法由Green等人，Nature Genet.7:13(1994)；Lonberg等人，Nature 368:856(1994)和Taylor等人，Int.Immun.6:579(1994)描述。完全人抗体也可通过基因或染色体转染方法以及噬菌体展示技术构建，所有技术都是本领域已知的。关于从来自未免疫供体的免疫球蛋白可变结构域基因组库(repertoire)体外产生人抗体及其片段，参见例如McCafferty等人，Nature 348:552-553(1990)。在这种技术中，将抗体可变结构域基因同框克隆到丝状噬菌体的主要或次要外壳蛋白基因中，并在噬菌体颗粒的表面上展示为功能性抗体片段。因为丝状颗粒包含噬菌体基因组的单链DNA拷贝，所以基于抗体的功能性质的选择也导致选择编码表现出这些性质的抗体的基因。以此方式，噬菌体模拟B细胞的一些性质。噬菌体展示可以多种形式进行，关于综述，参见例如Johnson和Chiswell，Current Opinion in Structural Biology 3:5564-571(1993)。人抗体也可通过体外活化的B细胞来产生。参见美国专利号5,567,610和5,229,275，其实施例部分以引用的方式并入本文。

[0059] 治疗剂是与抗体部分分开、同时或依序施用或者与抗体部分(即，抗体或抗体片段或子片段)缀合并且适用于治疗疾病的化合物、分子或原子。治疗剂的实例包括抗体、抗体片段、药物、毒素、核酸酶、激素、免疫调节剂、促凋亡剂、抗血管生成剂、硼化合物、光敏剂或染料以及放射性同位素。所使用的治疗剂在下文更详细地描述。

[0060] 免疫缀合物是与至少一种治疗剂和/或诊断剂缀合的抗体、抗体片段或融合蛋白。

[0061] 多特异性抗体是可同时结合至至少两个具有不同结构的靶标(例如，两种不同的抗原、在同一抗原上的两个不同表位或半抗原和/或抗原或表位)的抗体。多特异性、多价抗

体是具有多于一个结合位点的构建体，并且所述结合位点具有不同的特异性。

[0062] 双特异性抗体是可同时结合至两个不同靶标的抗体。双特异性抗体(bsAb)和双特异性抗体片段(bsFab)可具有至少一个特异性地结合至例如肿瘤相关抗原的臂和至少一个特异性地结合至带有治疗剂或诊断剂的可靶向缀合物的其他臂。许多双特异性融合蛋白可使用分子工程化产生。

[0063] 抗Trop-2抗体

[0064] 主题ADC可包括结合至Trop-2的抗体或其片段。在具体的优选实施方案中，抗Trop-2抗体可以是人源化RS7抗体(参见例如，美国专利号7,238,785，所述专利以引用的方式整体并入本文)，其包含轻链CDR序列CDR1(KASQDVSIAVA，SEQ ID NO:1)、CDR2(SASYRYT，SEQ ID NO:2)和CDR3(QQHYITPLT，SEQ ID NO:3)以及重链CDR序列CDR1(NYGMN，SEQ ID NO:4)、CDR2(WINTYTGEPTYTDDFKG，SEQ ID NO:5)和CDR3(GGFGSSYWYFDV，SEQ ID NO:6)。

[0065] RS7抗体是针对人原发性鳞状细胞肺癌的粗膜制备而产生的鼠IgG_1。(Stein等人，Cancer Res.50:1330,1990)。RS7抗体识别表征为簇13的46-48kDa糖蛋白。(Stein等人，Int.J.Cancer Supp.8:98-102,1994)。所述抗原被命名为EGP-1(上皮糖蛋白-1)，但也称为Trop-2。

[0066] Trop-2是I型跨膜蛋白，并且已从人(Fornaro等人，Int J Cancer 1995;62:610-8)和小鼠细胞(Sewedy等人，Int J Cancer 1998;75:324-30)二者克隆。除了作为肿瘤相关钙信号转导蛋白(Ripani等人，Int J Cancer 1998;76:671-6)的作用之外，人Trop-2的表达还显示出对于肿瘤发生和结肠癌细胞的侵袭性是必要的，这可有效地减少针对Trop-2的细胞外结构域的多克隆抗体(Wang等人，Mol Cancer Ther 2008;7:280-5)。

[0067] Trop-2作为实体癌的治疗靶标的日益增长的兴趣(Cubas等人，Biochim Biophys Acta 2009;1796:309-14)由另外的报告证明，所述报告记录了过表达的Trop-2在乳腺癌(Huang等人，Clin Cancer Res 2005;11:4357-64)、结肠直肠癌(Ohmachi等人，Clin Cancer Res 2006;12:3057-63;Fang等人，Int J Colorectal Dis 2009;24:875-84)和口腔鳞状细胞癌(Fong等人，Modern Pathol 2008;21:186-91)中的临床意义。表达高水平的Trop-2的前列腺基底细胞被富集以获得体外和体内干细胞活性的最新证据尤其值得注意(Goldstein等人，Proc Natl Acad Sci USA 2008;105:20882-7)。

[0068] 流式细胞术和免疫组织化学染色研究已经显示，RS7 MAb检测许多肿瘤类型上的抗原，与正常人组织的结合有限(Stein等人，1990)。Trop-2主要由癌，如肺癌、胃癌、膀胱癌、乳腺癌、卵巢癌、子宫癌和前列腺癌表达。在动物模型中使用放射性标记的鼠RS7 MAb进行的定位和治疗研究已证明肿瘤靶向和治疗功效(Stein等人，1990;Stein等人，1991)。

[0069] 在来自肺、乳腺、膀胱、卵巢、子宫、胃和前列腺的肿瘤中显示出强RS7染色。(Stein等人，Int.J.Cancer 55:938,1993)肺癌病例包括鳞状细胞癌和腺癌二者。(Stein等人，Int.J.Cancer 55:938,1993)两种细胞类型均被强染色，从而表明RS7抗体不能鉴别非小细胞肺癌的组织学分类。

[0070] RS7 MAb快速内化到靶细胞中(Stein等人，1993)。RS7 MAb的内化速率常数介于两种其他快速内化MAb的内化速率常数之间，其已被证明可用于免疫毒素产生。(同上)已充分证明免疫毒素缀合物的内化是抗肿瘤活性的要求。(Pastan等人，Cell 47:641,1986)药物免疫缀合物的内化已被描述为抗肿瘤功效的主要因素。(Yang等人，Proc.Nat'l

Acad.Sci.USA 85:1189,1988)因此,RS7抗体表现出治疗应用的若干重要性质。

[0071] 虽然hRS7抗体是优选的,但其他抗Trop-2抗体是已知的和/或可公开获得的,并且在替代实施方案中可用于主题ADC中。虽然人源化或人抗体对于降低的免疫原性是优选的,但在替代实施方案中可使用嵌合抗体。如下文所讨论,抗体人源化的方法是本领域熟知的,并且可用于将可用的鼠或嵌合抗体转化为人源化形式。

[0072] 抗Trop-2抗体可从许多来源商购获得,并且包括LS-C126418、LS-C178765、LS-C126416、LS-C126417(LifeSpan BioSciences,Inc.,Seattle,WA);10428-MM01、10428-MM02、10428-R001、10428-R030(Sino Biological Inc.,Beijing,China);MR54(eBioscience,San Diego,CA);sc-376181、sc-376746,Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz,CA);MM0588-49D6(Novus Biologicals,Littleton,CO);ab79976和ab89928(ABCAM®,Cambridge,MA)。

[0073] 其他抗Trop-2抗体已经公开于专利文献中。例如,美国公布号2013/0089872公开了保藏在日本筑波的国际专利生物保藏中心(International Patent Organism Depositary,Tsukuba,Japan)的抗Trop-2抗体K5-70(登录号FERM BP-11251)、K5-107(登录号FERM BP-11252)、K5-116-2-1(登录号FERM BP-11253)、T6-16(登录号FERM BP-11346)和T5-86(登录号FERM BP-11254)。美国专利号5,840,854公开了抗Trop-2单克隆抗体BR110(ATCC号HB11698)。美国专利号7,420,040公开了以登录号141205-05保藏在IDAC(加拿大国际保藏机构,温尼伯,加拿大)的杂交瘤细胞系AR47A6.4.2产生的抗Trop-2抗体。美国专利号7,420,041公开了以登录号141205-03保藏在IDAC的杂交瘤细胞系AR52A301.5产生的抗Trop-2抗体。美国公布号2013/0122020公开了抗Trop-2抗体3E9、6G11、7E6、15E2、18B1。编码代表性抗体的杂交瘤保藏在美国典型培养物保藏中心(ATCC),登录号PTA-12871和PTA-12872。美国专利号8,715,662公开了以保藏号PD 08019、PD 08020和PD 08021保藏在AID-ICLC(Genoa,Italy)的杂交瘤产生的抗Trop-2抗体。美国专利申请公布号20120237518公开了抗Trop-2抗体77220、KM4097和KM4590。美国专利号8,309,094(Wyeth)公开了通过序列表鉴定的抗体A1和A3。本段落上述引用的每个专利或专利申请的实施例部分以引用的方式并入本文。非专利公布Lipinski等人(1981,Proc Natl.Acad Sci USA,78:5147-50)公开了抗Trop-2抗体162-25.3和162-46.2。

[0074] 许多抗Trop-2抗体是本领域已知的和/或可公开获得的。如下文所论述,用于制备针对已知抗原的抗体的方法是本领域常规的。人Trop-2蛋白的序列也是本领域已知的(参见,例如,GenBank登录号CAA54801.1)。用于产生人源化、人或嵌合抗体的方法也是已知的。普通技术人员在根据本领域的一般知识阅读本公开时将能够将能够在主题ADC中制造和使用抗Trop-2抗体的种属。

[0075] 已经公开了除ADC以外的免疫治疗剂的抗Trop-2抗体的用途。鼠IgG2a抗体依决洛单抗(PANOREX®)已被用于治疗结肠直肠癌,尽管鼠抗体不适合人类临床使用(Baeuerle&Gires,2007,Br.J Cancer 96:417-423)。据报告,低剂量皮下施用依决洛单抗可诱导针对疫苗抗原的体液免疫应答(Baeuerle和Gires,2007)。阿德木单抗(MT201)(一种完全人抗Trop-2抗体)已被用于转移性乳腺癌和早期前列腺癌,并且据报告通过ADCC和CDC活性发挥作用(Baeuerle和Gires,2007)。已报告MT110(一种单链抗Trop-2/抗CD3双特异性抗体构建体)针对卵巢癌的功效(Baeuerle和Gires,2007)。卡妥索单抗(一种对Trop-2、CD3

和Fc受体具有结合亲和力的杂合小鼠/大鼠抗体)据报告具有针对卵巢癌的活性(Baeuerle和Gires,2007)。普罗昔铵(一种包含与假单胞菌外毒素融合的抗Trop-2单链抗体的免疫毒素)已经在头颈癌和膀胱癌中进行了测试(Baeuerle和Gires,2007)。这些研究均未包括关于使用抗Trop-2抗体-药物缀合物的任何公开内容。

[0076] 喜树碱缀合物

[0077] 用于制备包含附接至抗体或抗原结合抗体片段的喜树碱治疗剂的免疫缀合物的非限制性方法和组合物在下文进行了描述。在优选的实施方案中,通过在药物与抗体之间放置限定的聚乙二醇(PEG)部分(即,含有限定数量的单体单元的PEG)来增强药物的溶解度,其中限定的PEG是优选含有1-30个单体单元、更优选含有1-12个单体单元、最优选含有6-8个单体单元的低分子量PEG。

[0078] 优选地,第一接头在一端连接药物,并且可在另一端用乙炔或叠氮化物基团终止。这种第一接头可包含在一端具有叠氮化物或乙炔基团并且在另一端具有不同的反应性基团(如羧酸或羟基)的限定的PEG部分。所述双官能限定的PEG可附接至氨基醇的胺基团上,并且后者的羟基可附接至呈碳酸酯形式的药物上的羟基。或者,所述限定的双官能PEG的非叠氮化物(或乙炔)部分任选地附接至L-氨基酸或多肽的N-末端,其C-末端附接至氨基醇的氨基,并且后者的羟基附接至分别呈碳酸酯或氨基甲酸酯形式的药物的羟基。

[0079] 包含抗体偶联基团和与第一接头的叠氮化物(或乙炔)基团互补的反应性基团(即乙炔(或叠氮化物))的第二接头可经由乙炔-叠氮化物环加成反应与药物-(第一接头)缀合物反应以提供最终的双官能药物产品,其可用于缀合至靶向疾病的抗体。抗体偶联基团优选地是硫醇或硫醇反应性基团。

[0080] 下文提供了在涉及CPT类似物如SN-38的药物-接头前体制剂中在C-20碳酸酯存在下选择性再生10-羟基的方法。也可使用药物中的反应性羟基的其他保护基团,如SN-38中的酚羟基,例如叔丁基二甲基甲硅烷基或叔丁基二苯基甲硅烷基,并且在将衍生化的药物连接至抗体偶联部分之前通过四丁基氟化铵对这些进行脱保护。除了'BOC'之外,CPT类似物的10-羟基可替代地被保护为酯或碳酸酯,以使得双官能CPT与抗体缀合而没有这种保护基团的先前脱保护。在施用生物缀合物后,保护基团在生理pH条件下容易地脱保护。

[0081] 在称为'点击化学'的乙炔-叠氮化物偶联中,叠氮化物部分可在L2上,乙炔部分在L3上。或者,L2可含有乙炔,L3含有叠氮化物。'点击化学'是指乙炔部分与叠氮化物部分之间的铜(+1)催化的环加成反应(Kolb HC和Sharpless KB,Drug Discov Today 2003;8:1128-37),尽管已知并且可使用替代形式的点击化学。点击化学在近中性pH条件下在水溶液中发生,并且因此适合于药物缀合。点击化学的优点在于它是化学选择性的,并且补充其他众所周知的缀合化学如硫醇-马来酰亚胺反应。

[0082] 示例性的优选实施方案涉及药物衍生物和抗体的具有以下所示的通式(1)的缀合物。

[0083] MAb-[L2]-[L1]-$[AA]_m$-[A']-药物(1)

[0084] 其中MAb是靶向疾病的抗体;L2是包含抗体偶联部分和一个或多个乙炔(或叠氮化物)基团的交联剂的组分;L1包含在一端具有与L2中的乙炔(或叠氮化物)部分互补的叠氮化物(或乙炔)的限定的PEG以及在另一端的反应性基团如羧酸或羟基;AA是L-氨基酸;m是值为0、1、2、3或4的整数;并且A'是选自乙醇胺、4-羟基苄醇、4-氨基苄醇或取代的或未取代

的乙二胺的组的另外的间隔基。'AA'的L氨基酸选自丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸以及缬氨酸。如果A'基团含有羟基，则它连接至分别呈碳酸酯或氨基甲酸酯形式的药物的羟基或氨基。

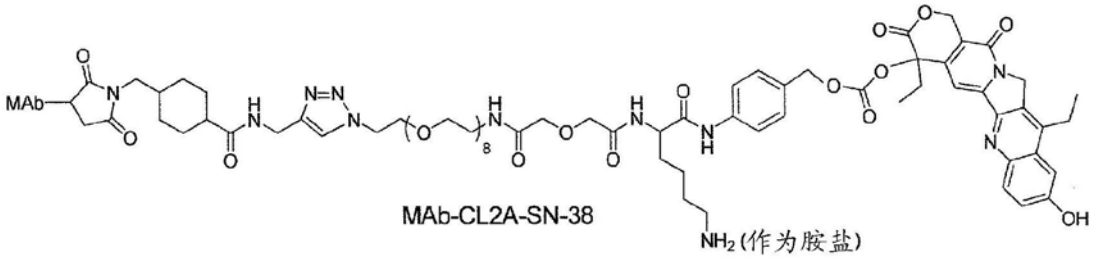
[0085] 在式1的优选实施方案中，A'是衍生自L-氨基酸的取代的乙醇胺，其中所述氨基酸的羧酸基团被羟甲基部分置换。A'可衍生自以下L-氨基酸中的任一种：丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸以及缬氨酸。

[0086] 在式1的优选实施方案的缀合物的实例中，m是0，A'是L-缬氨醇，并且药物由SN-38例示。在式1的另一个实例中，m是1并且由衍生化的L-赖氨酸代表，A'是L-缬氨醇，并且药物由SN-38例示。在此实施方案中，使用赖氨酸氨基的正交保护基团首先在氨基酸如赖氨酸的羧酸与缬氨醇的氨基之间形成酰胺键。除去赖氨酸的N-末端上的保护基团，从而保持赖氨酸的侧链上的保护基团完整，并且N-末端与在另一端具有叠氮化物(或乙炔)的限定的PEG上的羧基偶联。缬氨醇的羟基然后附接至10-羟基保护的SN-38的20-氯甲酸酯衍生物，并且此中间体与携带抗体结合部分的L2组分以及参与点击环加成化学的互补的乙炔(或叠氮化物)基团偶联。最后，除去赖氨酸侧链和SN-38两者处的保护基团得到此实施例的产物。

[0087] 虽然不希望受理论束缚，但在细胞内蛋白水解后产生的小MW SN-38产物(即缬氨醇-SN-38碳酸酯)具有通过涉及缬氨醇的氨基和碳酸酯的羰基的分子内环化释放完整SN-38的额外途径。

[0088] 在另一个优选的实施方案中，具有通式1的A'是A-OH，其中A-OH是可塌缩的部分，如4-氨基苄醇或在苄基位置被C_1-C_{10}烷基取代的取代的4-氨基苄醇，并且后者经由其氨基附接至L-氨基酸或包含至多4个L-氨基酸部分的多肽；其中N-末端附接至终止于抗体结合基团中的交联剂。

[0089] 在优选实施方案的另一个实例中，具有通式1的A'的A-OH衍生自取代的4-氨基苄醇，并且'AA'由通式1中m＝1情况下的单个L-氨基酸组成，并且药物以SN-38例示。AA的单个氨基酸可选自以下L-氨基酸中的任一种：丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸以及缬氨酸。4-氨基苄醇部分上的取代基R(A'的A-OH实施方案)是氢或选自C1-C10烷基的烷基。此式的实例(其中单个氨基酸AA是L-赖氨酸并且R＝H，并且药物由SN-38例示)被称为MAb-CL2A-SN-38(下文所示)。所述结构与接头MAb-CL2-SN-38的区别在于单个赖氨酸残基取代CL2接头中发现的Phe-Lys二肽。将Phe-Lys二肽设计为溶酶体酶的组织蛋白酶B裂解位点，其被认为对于结合的药物的细胞内释放是重要的。出人意料地，尽管消除组织蛋白酶裂解位点，但包含CL2A接头的免疫缀合物在体内显然比包含CL2接头的那些更有效。

[0090] 

[0091] 在优选的实施方案中，AA包含可被细胞内肽酶裂解的多肽部分，优选二、三或四肽。实例是：Ala-Leu、Leu-Ala-Leu和Ala-Leu-Ala-Leu(SEQ ID NO:9)(Trouet等人，1982)。

[0092] 在另一个优选的实施方案中，缀合物的L1组分含有具有1-30个重复单体单元的限定的聚乙二醇(PEG)间隔基。在进一步优选的实施方案中，PEG是具有1-12个重复单体单元的限定的PEG。PEG的引入可涉及使用可商购的异双官能化PEG衍生物。异双官能PEG可含有叠氮化物或乙炔基团。

[0093] 在优选的实施方案中，L2具有在2-40个、但优选2-20个、并且更优选2-5个范围内的多个乙炔(或叠氮化物)基团和单个抗体结合部分。在代表性实例中，'L2'组分附加至2个炔属基团，从而导致附接附加两个叠氮化物的SN-38分子。与MAb的键合可涉及琥珀酰亚胺。

[0094] 在优选的实施方案中，当双官能药物含有硫醇反应性部分作为抗体结合基团时，使用硫醇化试剂在抗体的赖氨酸基团上产生抗体上的硫醇。用于通过修饰MAb的赖氨酸基团将硫醇基团引入到抗体上的方法是本领域熟知的(Wong于Chemistry of protein conjugation and cross-linking,CRC Press,Inc.,Boca Raton,FL(1991),第20-22页中)。或者，使用还原剂如二硫苏糖醇(DTT)轻微还原抗体上的链间二硫键(Willner等人，Bioconjugate Chem.4:521-527(1993))可在抗体上产生7至10个硫醇；其具有在MAb的远离抗原结合区的链间区域中并入多个药物部分的优点。在更优选的实施方案中，SN-38附接至还原的二硫化物巯基导致形成抗体-SN-38免疫缀合物，其中每个抗体分子共价附接有6至8个SN-38部分。提供用于附接药物或其他治疗剂的半胱氨酸残基的其他方法是已知的，如使用半胱氨酸工程化的抗体(参见美国专利号7,521,541，其实施例部分以引用的方式并入本文)。

[0095] 在替代优选的实施方案中，化学治疗部分是选自由以下组成的组：阿霉素(DOX)、表柔比星、吗啉代阿霉素(吗啉代-DOX)、氰基吗啉代-阿霉素(氰基吗啉代-DOX)、2-吡咯啉基-阿霉素(2-PDOX)、Pro-2PDOX、CPT、10-羟基喜树碱、SN-38、托泊替康、勒托替康(lurtotecan)、9-氨基喜树碱、9-硝基喜树碱、紫杉烷、格尔德霉素、安莎霉素和埃博霉素。在更优选的实施方案中，化学治疗部分是SN-38。优选地，在优选实施方案的缀合物中，抗体连接至至少一个化学治疗部分；优选1至约12个化学治疗部分；最优选约6至约8个化学治疗部分。

[0096] 此外，在优选的实施方案中，接头组分'L2'包含硫醇基团，所述硫醇基团与在所述抗体的一个或多个赖氨酸侧链氨基处引入的硫醇反应性残基反应。在此类情况下，通过本领域充分描述的程序，将抗体用硫醇反应性基团如马来酰亚胺、乙烯基砜、溴乙酰胺或碘乙酰胺预衍生化。

[0097] 在这种工作的背景下，出人意料地发现了一种方法，通过所述方法可制备CPT药物-接头，其中CPT另外具有10-羟基。这种方法包括但不限于保护10-羟基作为叔丁氧基羰

基(BOC)衍生物,随后制备药物-接头缀合物的倒数第二个中间体。通常,除去BOC基团需要用强酸如三氟乙酸(TFA)处理。在这些条件下,含有待除去的保护基团的CPT20-O-接头碳酸酯也易于裂解,从而产生未修饰的CPT。事实上,如本领域所阐述的,使用可温和除去的甲氧基三苯甲基(MMT)保护基团用于接头分子的赖氨酸侧链的原理正是为了避免这种可能性(Walker等人,2002)。发现通过进行短持续时间的反应,最佳3至5分钟,可能选择性除去酚BOC保护基团。在这些条件下,主要产物是去除10-羟基位置的'BOC'、而'20'位置的碳酸酯为完整的产物。

[0098] 替代方法涉及用除'BOC'以外的基团保护CPT类似物的10-羟基位置,以使得最终产物准备好与抗体缀合而不需要使10-OH保护基团脱保护。将10-OH转化为酚碳酸酯或酚酯的10-羟基保护基团易容易地在体内施用缀合物后通过生理pH条件或通过酯酶脱保护。He等人已经描述了在生理条件下在10位置处的酚碳酸酯对比10-羟基喜树碱的20位置处的叔碳酸酯的更快除去(He等人,Bioorganic&Medicinal Chemistry 12:4003-4008(2004))。SN-38上的10-羟基保护基团可以是'COR',其中R可以是取代的烷基如"$N(CH_3)_2-(CH_2)_n-$",其中n是1-10并且其中末端氨基任选地呈季盐形式以增强水溶性;或简单的烷基残基如"$CH_3-(CH_2)_n-$",其中n是0-10;或者它可以是烷氧基部分,如"$CH_3-(CH_2)n-O-$",其中n是0-10,或"$N(CH_3)_2-(CH_2)_n-O-$",其中n是2-10,或"$R_1O-(CH_2-CH_2-O)_n-CH_2-CH_2-O-$",其中$R_1$是乙基或甲基,并且n是具有0-10的值的整数。如果最终衍生物将是碳酸酯,则通过用所选试剂的氯甲酸酯处理容易地制备这些10-羟基衍生物。通常,使用三乙胺作为碱,用摩尔当量的二甲基甲酰胺中的氯甲酸酯处理含有10-羟基的喜树碱如SN-38。在这些条件下,20-OH位置不受影响。为了形成10-O-酯,使用所选试剂的酰基氯。

[0099] 在制备药物衍生物和抗体的具有通式1的缀合物的优选方法中,其中描述符L2、L1、AA和AX如前面部分中所描述,首先制备双官能药物部分[L2]-[L1]-$[AA]_m$-[A-X]-药物,随后将双官能药物部分缀合至抗体(在本文中表示为"MAb")。

[0100] 在制备药物衍生物和抗体的具有通式1的缀合物的优选方法中,其中描述符L2、L1、AA和A-OH如前面部分中所描述,通过首先经由酰胺键将A-OH连接至AA的C-末端、随后将AA的胺末端偶联至L1的羧酸基团来制备双官能药物部分。如果AA不存在(即m=0),则A-OH经由酰胺键直接附接至L1。交联剂[L1]-$[AA]_m$-[A-OH]附接至药物的羟基或氨基,并且其随后经由点击化学通过借助于L1和L2中叠氮化物(或乙炔)与乙炔(或叠氮化物)基团之间的反应而附接至L1部分。

[0101] 在一个实施方案中,所述抗体是单克隆抗体(MAb)。在其他实施方案中,所述抗体可以是多价和/或多特异性MAb。抗体可以是鼠、嵌合、人源化或人单克隆抗体,并且所述抗体可以是完整、片段(Fab、Fab'、$F(ab)_2$、$F(ab')_2$)或亚片段(单链构建体)形式、或具有IgG1、IgG2a、IgG3、IgG4、IgA同种型或来自其的亚分子。

[0102] 抗体制备

[0103] 用于制备针对几乎任何靶抗原(如Trop-2)的单克隆抗体的技术是本领域熟知的。参见例如,Köhler和Milstein,Nature 256:495(1975);以及Coligan等人(编辑),CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY,第1卷,第2.5.1-2.6.7页(John Wiley&Sons 1991)。简言之,单克隆抗体可通过以下步骤获得:用包含抗原的组合物注射小鼠,移除脾脏以获得B淋巴细胞,使B淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合以产生杂交瘤,克隆所述杂交瘤,选择产生针对所述抗

原的抗体的阳性克隆，培养产生针对所述抗原的抗体的克隆，以及从所述杂交瘤培养物分离所述抗体。

[0104] MAb可通过许多广泛接受的技术从所述杂交瘤培养物分离和纯化。此类分离技术包括使用蛋白-A或蛋白-G Sepharose的亲和色谱法、尺寸排阻色谱法和离子交换色谱法。参见例如，Coligan第2.7.1-2.7.12页和第2.9.1-2.9.3页。此外，参见Baines等人，，“Purification of Immunoglobulin G(IgG)，”于METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY，第10卷，第79-104页(The Humana Press，Inc.1992)中。

[0105] 各种技术，诸如制备嵌合或人源化抗体，可涉及抗体克隆和构建的工序。目标抗体的抗原结合Vκ(可变轻链)和V_H(可变重链)序列可通过各种分子克隆工序，如RT-PCR、5'-RACE和cDNA文库筛选获得。可通过PCR扩增克隆表达鼠MAb的细胞的MAb的V基因并测序。为确认其保真性，可在细胞培养中以嵌合Ab表达克隆的V_L和V_H基因，如Orlandi等人所述(Proc.Natl.Acad.Sci.，USA，86:3833(1989))。然后可根据V基因序列设计和构建人源化MAb，如Leung等人所述(Mol.Immunol.，32:1413(1995))。

[0106] cDNA可从任何已知的杂交瘤系或产生鼠MAb的转染细胞系通过一般分子克隆技术制备(Sambrook等人，Molecular Cloning，A laboratory manual，第2版(1989))。MAb的Vκ序列可使用引物VK1BACK和VK1FOR(Orlandi等人，1989)或由Leung等人(BioTechniques，15:286(1993))描述的延伸引物组扩增。VH序列可使用引物对VH1BACK/VH1FOR(Orlandi等人，1989)或由Leung等人(Hybridoma，13:469(1994))描述的与鼠IgG的恒定区退火的引物进行扩增。人源化V基因可通过长寡核苷酸模板合成和PCR扩增的组合构建，如Leung等人(Mol.Immunol.，32:1413(1995))所述。

[0107] Vκ的PCR产物可亚克隆至分期载体，诸如基于pBR327的包含Ig启动子、信号肽序列和简便限制性位点的分期载体VKpBR。V_H的PCR产物可亚克隆至类似的分期载体，诸如基于pBluescript的VHpBS。可分别从VKpBR和VHpBS切下含有Vκ和V_H序列以及启动子和信号肽序列的表达盒，并连接至适当的表达载体，诸如pKh和pG1g中(Leung等人，Hybridoma，13:469(1994))。表达载体可共转染至适当的细胞，并监测上清液流体中嵌合人源化或人MAb的生成。或者，可切下Vκ和V_H表达盒并亚克隆至单个表达载体，如pdHL2中，如Gillies等人(J.Immunol.Methods 125:191(1989)并且还在Losman等人，Cancer，80:2660(1997)中示出)所描述。

[0108] 在替代实施方案中，表达载体可转染至宿主细胞，所述宿主细胞预先改造为在无血清培养基中进行转染、生长和表达。可使用的示例性细胞系包括Sp/EEE、Sp/ESF和Sp/ESF-X细胞系(参见，例如，美国专利号7,531,327；7,537,930和7,608,425；其实例部分各自以引用方式并入本文)。这些示例性细胞系基于Sp2/0骨髓瘤细胞系，转染有突变的Bcl-EEE基因，暴露至甲氨蝶呤以扩增转染基因序列，并且预先改造为用于蛋白质表达的无血清细胞系。

[0109] 嵌合抗体

[0110] 嵌合抗体是其中人抗体的可变区被例如小鼠抗体的可变区，包括小鼠抗体的互补决定区(CDR)置换的重组蛋白。当施用至受试者时，嵌合抗体表现出降低的免疫原性和增加的稳定性。用于克隆鼠免疫球蛋白可变区的一般技术已公开于例如Orlandi等人，Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 6:3833(1989)中。构建嵌合抗体的技术是本领域技术人员熟知

的。作为实例，Leung等人，Hybridoma 13:469(1994)通过将编码鼠LL2(抗CD22单克隆抗体)的V_{κ}和V_{H}结构域的DNA序列与相应的人κ和IgG_1恒定区结构域组合生成LL2嵌合体。

[0111] 人源化抗体

[0112] 主题ADC可包括结合至Trop-2的抗体或其片段。在具体的优选实施方案中，抗Trop-2抗体可以是人源化RS7抗体(参见例如，美国专利号7,238,785，所述专利以引用的方式整体并入本文)，其包含轻链CDR序列CDR1(KASQDVSIAVA，SEQ ID NO:1)、CDR2(SASYRYT，SEQ ID NO:2)和CDR3(QQHYITPLT，SEQ ID NO:3)以及重链CDR序列CDR1(NYGMN，SEQ ID NO:4)、CDR2(WINTYTGEPTYTDDFKG，SEQ ID NO:5)和CDR3(GGFGSSYWYFDV，SEQ ID NO:6)。

[0113] 用于产生人源化MAb的技术是本领域熟知的(参见例如，Jones等人，Nature 321:522(1986)；Riechmann等人，Nature 332:323(1988)；Verhoeyen等人，Science 239:1534(1988)；Carter等人，Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 89:4285(1992)；Sandhu，Crit.Rev.Biotech.12:437(1992)以及Singer等人，J.Immun.150:2844(1993))。嵌合或鼠单克隆抗体可通过将来自小鼠免疫球蛋白的可变重链和轻链的小鼠CDR转移到人抗体的相应可变结构域中来进行人源化。嵌合单克隆抗体中的小鼠框架区(FR)也被人FR序列置换。由于简单地将小鼠CDR转移到人FR通常会导致抗体亲和力的减少或甚至丧失，另外的修饰对于恢复鼠抗体的初始亲和力可为必须的。这可通过将FR区中的一个或多个人残基取代为其鼠对应部分，以获得对其表位具有良好的结合亲和力的抗体来实现。参见例如Tempest等人，Biotechnology 9:266(1991)和Verhoeyen等人，Science 239:1534(1988)。用于取代的优选残基包括位于CDR残基侧链的1、2或3埃内，位于CDR序列附近，或预期与CDR残基相互作用的FR残基。

[0114] 人抗体

[0115] 使用组合方法或用人免疫球蛋白基因座转化的转基因动物来产生完全人抗体的方法是本领域已知的(例如，Mancini等人，2004，New Microbiol.27:315-28；Conrad和Scheller，2005，Comb.Chem.High Throughput Screen.8:117-26；Brekke和Loset，2003，Curr.Opin.Pharmacol.3:544-50)。完全人抗体也可通过基因或染色体转染方法以及噬菌体展示技术构建，所有技术都是本领域已知的。参见例如，McCafferty等人，Nature 348:552-553(1990)。预期此类完全人抗体表现出比嵌合或人源化抗体甚至更少的副作用并且在体内起基本上内源性人抗体的作用。

[0116] 在一个替代方案中，可使用噬菌体展示技术来产生人抗体(例如，Dantas-Barbosa等人，2005，Genet.Mol.Res.4:126-40)。人抗体可从正常人或从表现出特定疾病状态如癌症的人产生(Dantas-Barbosa等人，2005)。从患病个体构建人抗体的优点在于循环抗体谱系可偏向针对疾病相关抗原的抗体。

[0117] 在这种方法的一个非限制性实例中，Dantas-Barbosa等人(2005)构建了来自骨肉瘤患者的人Fab抗体片段的噬菌体展示库。一般来说，从循环血液淋巴细胞获得总RNA(同上)。从μ、γ和κ链抗体谱系克隆重组Fab并插入噬菌体展示文库中(同上)。将RNA转化成cDNA并用于使用针对重链和轻链免疫球蛋白序列的特异性引物制备Fab cDNA文库(Marks等人，1991，J.Mol.Biol.222:581-97)。根据Andris-Widhopf等人(2000，于：Phage Display Laboratory Manual，Barbas等人(编辑)，第1版，Cold Spring Harbor Laboratory Press，Cold Spring Harbor，NY第9.1至9.22页中)进行文库构建。将最终Fab片段用限制性核酸内

切酶消化，并插入噬菌体基因组中，以制备噬菌体展示库。可如本领域中所已知，通过标准噬菌体展示方法对所述文库进行筛选。噬菌体展示可以多种形式进行，关于综述，参见例如Johnson和Chiswell,Current Opinion in Structural Biology 3:5564-571(1993)。

[0118] 人抗体也可通过体外活化的B细胞来生成。参见美国专利号5,567,610和5,229,275，其以引用方式整体并入本文。熟练技术人员将认识到，这些技术是示例性的，并且可使用用于制备和筛选人抗体或抗体片段的任何已知方法。

[0119] 在另一个替代方案中，使用标准免疫实验方案，已进行遗传工程化以产生人抗体的转基因动物可用来产生针对基本上任何免疫原性靶标的抗体。用于从转基因小鼠获得人抗体的方法由Green等人,Nature Genet.7:13(1994);Lonberg等人,Nature 368:856(1994)以及Taylor等人,Int.Immun.6:579(1994)公开。所述系统的非限制性实例为来自Abgenix(Fremont,CA)的XENOMOUSE®(例如Green等人,1999,J.Immunol.Methods 231:11-23,以引用的方式并入本文)。在XENOMOUSE®和类似动物中，已使小鼠抗体基因失活并置换为功能性人抗体基因，而小鼠免疫系统的其余部分保持完整。

[0120] 用含有人IgH和Igκ基因座的部分的种系构型YAC(酵母人工染色体)转化XENOMOUSE®，所述基因座部分包括大部分可变区序列连同辅助基因和调控序列。人可变区谱系可用于获得产生抗体的B细胞，所述B细胞可通过已知的技术加工成杂交瘤。用靶抗原免疫的XENOMOUSE®将通过正常免疫应答产生人抗体，其可通过上文论述的标准技术收获和/或产生。可获得XENOMOUSE®的多种品系，所述品系各自能够产生不同类别的抗体。转基因产生的人抗体已证明具有治疗潜能，同时保留正常人抗体的药物动力学性质(Green等人,1999)。熟练的技术人员将认识到，所要求保护的组合物和方法不限于使用XENOMOUSE®系统，而是可利用已进行遗传工程化以产生人抗体的任何转基因动物。

[0121] 已知抗体和靶标抗原

[0122] 如上所述，在优选的实施方案中，ADC用于治疗癌症。在某些实施方案中，靶癌症可表达一种或多种靶肿瘤相关抗原(TAA)。可用于治疗癌症的具体抗体包括但不限于LL1(抗CD74)、LL2或RFB4(抗CD22)、维妥珠单抗(hA20,抗CD20)、利妥昔单抗(抗CD20)、奥比妥珠单抗(GA101,抗CD20)、兰布罗利珠单抗(抗PD-1受体)、纳武单抗(抗PD-1受体)、伊匹单抗(抗CTLA-4)、RS7(抗上皮糖蛋白-1(EGP-1,也称为Trop-2))、PAM4或KC4(两者均为抗粘蛋白)、MN-14(抗癌胚抗原(CEA,也称为CD66e或CEACAM5)、MN-15或MN-3(抗CEACAM6)、Mu-9(抗结肠特异性抗原-p)、Immu31(抗α-胎蛋白)、R1(抗IGF-1R)、A19(抗CD19)、TAG-72(例如,CC49)、Tn、J591或HuJ591(抗PSMA(前列腺特异性膜抗原))、AB-PG1-XG1-026(抗PSMA二聚体)、D2/B(抗PSMA)、G250(抗碳酸酐酶IXMAb)、L243(抗HLA-DR)、阿仑单抗(抗CD52)、贝伐单抗(抗VEGF)、西妥昔单抗(抗EGFR)、吉妥珠单抗(抗CD33)、替伊莫单抗(抗CD20)、帕尼单抗(抗EGFR)、托西莫单抗(抗CD20)、PAM4(又名克伐珠单抗,抗粘蛋白)和曲妥珠单抗(抗ErbB2)。优选地，所述抗体是hRS7抗体。

[0123] 此类抗TAA抗体是本领域中已知的(例如美国专利号5,686,072;5,874,540;6,107,090;6,183,744;6,306,393;6,653,104;6,730,300;6,899,864;6,926,893;6,962,702;7,074,403;7,230,084;7,238,785;7,238,786;7,256,004;7,282,567;7,300,655;7,

312,318;7,585,491;7,612,180;7,642,239;以及美国专利申请公布号20050271671;20060193865;20060210475;20070087001;各自的实施例部分以引用的方式并入本文)。所用的具体已知的抗体包括hPAM4(美国专利号7,282,567)、hA20(美国专利号7,151,164)、hA19(美国专利号7,109,304)、hIMMU-31(美国专利号7,300,655)、hLL1(美国专利号7,312,318)、hLL2(美国专利号5.789.554)、hMu-9(美国专利号7,387,772)、hL243(美国专利号7,612,180)、hMN-14(美国专利号6,676,924)、hMN-15(美国专利号8,287,865)、hR1(美国专利号9,441,043)、hRS7(美国专利号7,238,785)、hMN-3(美国专利号7,541,440)、AB-PG1-XG1-026(美国专利申请11/983,372,其保藏为ATCC PTA-4405和PTA-4406)以及D2/B(WO 2009/130575),关于附图和实施例部分,每一个列举的专利或申请的文本以引用的方式并入本文。

[0124] 可被靶向的其他可用肿瘤相关抗原包括碳酸酐酶IX、B7、CCL19、CCL21、CSAp、HER-2/neu、BrE3、CD1、CD1a、CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD11A、CD14、CD15、CD16、CD18、CD19、CD20(例如,C2B8、hA20、1F5MAb)、CD21、CD22、CD23、CD25、CD29、CD30、CD32b、CD33、CD37、CD38、CD40、CD40L、CD44、CD45、CD46、CD47、CD52、CD54、CD55、CD59、CD64、CD67、CD70、CD74、CD79a、CD80、CD83、CD95、CD126、CD133、CD138、CD147、CD154、CEACAM5、CEACAM6、CTLA-4、α-胎蛋白(AFP)、VEGF(例如,AVASTIN®、纤连蛋白剪接变体)、ED-B纤连蛋白(例如,L19)、EGP-1(Trop-2)、EGP-2(例如,17-1A)、EGF受体(ErbB1)(例如,ERBITUX®)、ErbB2、ErbB3、因子H、FHL-1、Flt-3、叶酸盐受体、Ga733、GRO-β、HMGB-1、缺氧诱导因子(HIF)、HM1.24、HER-2/neu、组蛋白H2B、组蛋白H3、组蛋白H4、胰岛素样生长因子(ILGF)、IFN-γ、IFN-α、IFN-β、IFN-λ、IL-2R、IL-4R、IL-6R、IL-13R、IL-15R、IL-17R、IL-18R、IL-2、IL-6、IL-8、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-25、IP-10、IGF-1R、Ia、HM1.24、神经节苷脂、HCG、L243所结合的HLA-DR抗原、CD66抗原即CD66a-d或它们的组合、MAGE、mCRP、MCP-1、MIP-1A、MIP-1B、巨噬细胞迁移抑制因子(MIF)、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC5ac、胎盘生长因子(PlGF)、PSA(前列腺特异性抗原)、PSMA、PAM4抗原、PD-1受体、PD-L1、NCA-95、NCA-90、A3、A33、Ep-CAM、KS-1、Le(y)、间皮素、S100、腱生蛋白、TAC、Tn抗原、汤姆森-弗里德里希抗原、肿瘤坏死抗原、肿瘤血管生成抗原、TNF-α、TRAIL受体(R1和R2)、Trop-2、VEGFR、RANTES、T101以及癌症干细胞抗原、补体因子C3、C3a、C3b、C5a、C5和致癌基因产物。

[0125] 归于更具有治疗耐药性前体恶性肿瘤细胞群体的癌症干细胞(Hill和Perris,J.Natl.Cancer Inst.2007;99:1435-40)具有可在某些癌症类型中被靶向的抗原,如前列腺癌(Maitland等人,Ernst Schering Found.Sympos.Proc.2006;5:155-79)、非小细胞肺癌(Donnenberg等人,J.Control Release 2007;122(3):385-91)和成胶质细胞瘤(Beier等人,Cancer Res.2007;67(9):4010-5)中的CD133,以及结直肠癌(Dalerba er al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 2007;104(24)10158-63)、胰腺癌(Li等人,Cancer Res.2007;67(3):1030-7)和头颈部鳞状细胞癌(Prince等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 2007;104(3)973-8)中的CD44。乳腺癌治疗的另一个有用靶标是Taylor等人(Biochem.J.2003;375:51-9)描述的LIV-1抗原。

[0126] 检查点抑制剂抗体已用于癌症治疗。免疫检查点是指在免疫系统中负责维持自身耐受性和调节免疫系统应答的程度,以尽量减少外周组织损伤的抑制途径。然而,肿瘤细胞也可活化免疫系统检查点,以减少针对肿瘤组织的免疫应答的有效性。针对细胞毒性T-淋

巴细胞抗原4(CTLA4,也称为CD152)、程序性细胞死亡蛋白1(PD1,也称为CD279)和程序性细胞死亡1配体1(PD-L1,也称为CD274)的示例性检查点抑制剂抗体可与一种或多种其他剂组合使用,以增加针对患病细胞、组织或病原体的免疫应答的有效性。示例性抗PD1抗体包括兰布罗利珠单抗(MK-3475,MERCK)、纳武单抗(BMS-936558,BRISTOL-MYERS SQUIBB)、AMP-224(MERCK)和匹地利珠单抗(CT-011,CURETECH LTD.)。抗PD1抗体可例如从ABCAM® (AB137132)、BIOLEGEND® (EH12.2H7、RMP1-14)和AFFYMETRIX EBIOSCIENCE(J105、J116、MIH4)商购获得。示例性抗PD-L1抗体包括MDX-1105(MEDAREX)、MEDI4736(MEDIMMUNE)、MPDL3280A(GENENTECH)和BMS-936559(BRISTOL-MYERS SQUIBB)。抗PD-L1抗体也可例如从AFFYMETRIX EBIOSCIENCE(MIH1)商购获得。示例性抗CTLA4抗体包括伊匹单抗(Bristol-Myers Squibb)和曲美木单抗(PFIZER)。抗PD1抗体可例如从ABCAM® (AB134090)、SINO BIOLOGICAL INC.(11159-H03H、11159-H08H)以及THERMO SCIENTIFIC PIERCE(PA5-29572、PA5-23967、PA5-26465、MA1-12205、MA1-35914)商购获得。伊匹单抗最近被FDA批准用于转移性黑素瘤的治疗(Wada等人,2013,J Transl Med 11:89)。

[0127] 巨噬细胞迁移抑制因子(MIF)是先天性和适应性免疫和细胞凋亡的重要调控因子。据报道,CD74是MIF的内源性受体(Leng等人,2003,J Exp Med 197:1467-76)。拮抗性抗CD74抗体对MIF介导的细胞内途径的治疗作用可用于治疗一系列广泛的疾病状态,如膀胱癌、前列腺癌、乳腺癌、肺癌和结肠癌(例如,Meyer-Siegler等人,2004,BMC Cancer 12:34;Shachar和Haran,2011,Leuk Lymphoma 52:1446-54)。米拉珠单抗(hLL1)是具有用于治疗MIF介导的疾病的治疗用途的示例性抗CD74抗体。

[0128] 所使用的各种其他抗体是本领域中已知的(例如,美国专利号5,686,072;5,874,540;6,107,090;6,183,744;6,306,393;6,653,104;6,730.300;6,899,864;6,926,893;6,962,702;7,074,403;7,230,084;7,238,785;7,238,786;7,256,004;7,282,567;7,300,655;7,312,318;7,585,491;7,612,180;7,642,239和美国专利申请公布号20060193865;各自以引用的方式并入本文)。

[0129] 所用的抗体可从广泛的已知来源商购获得。例如,许多分泌抗体的杂交瘤系可自美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection(ATCC,Manassas,VA))获得。大量针对各种疾病靶标(包括肿瘤相关抗原)的抗体已保藏于ATCC和/或已公布可变区序列并且可获得以用于所要求保护的方法和组合物中。参见例如,美国专利号7,312,318;7,282,567;7,151,164;7,074,403;7,060,802;7,056,509;7,049,060;7,045,132;7,041,803;7,041,802;7,041,293;7,038,018;7,037,498;7,012,133;7,001,598;6,998,468;6,994,976;6,994,852;6,989,241;6,974,863;6,965,018;6,964,854;6,962,981;6,962,813;6,956,107;6,951,924;6,949,244;6,946,129;6,943,020;6,939,547;6,921,645;6,921,645;6,921,533;6,919,433;6,919,078;6,916,475;6,905,681;6,899,879;6,893,625;6,887,468;6,887,466;6,884,594;6,881,405;6,878,812;6,875,580;6,872,568;6,867,006;6,864,062;6,861,511;6,861,227;6,861,226;6,838,282;6,835,549;6,835,370;6,824,780;6,824,778;6,812,206;6,793,924;6,783,758;6,770,450;6,767,711;6,764,688;6,764,681;6,764,679;6,743,898;6,733,981;6,730,307;6,720,155;6,716,966;6,709,653;6,693,176;6,692,908;6,689,607;6,689,362;6,689,355;6,682,737;6,682,736;6,682,734;6,673,344;6,653,104;6,652,852;6,635,482;6,630,144;6,610,

833;6,610,294;6,605,441;6,605,279;6,596,852;6,592,868;6,576,745;6,572;856;6,566,076;6,562,618;6,545,130;6,544,749;6,534,058;6,528,625;6,528,269;6,521,227;6,518,404;6,511,665;6,491,915;6,488,930;6,482,598;6,482,408;6,479,247;6,468,531;6,468,529;6,465,173;6,461,823;6,458,356;6,455,044;6,455,040,6,451,310;6,444,206’6,441,143;6,432,404;6,432,402;6,419,928;6,413,726;6,406,694;6,403,770;6,403,091;6,395,276;6,395,274;6,387,350;6,383,759;6,383,484;6,376,654;6,372,215;6,359,126;6,355,481;6,355,444;6,355,245;6,355,244;6,346,246;6,344,198;6,340,571;6,340,459;6,331,175;6,306,393;6,254,868;6,187,287;6,183,744;6,129,914;6,120,767;6,096,289;6,077,499;5,922,302;5,874,540;5,814,440;5,798,229;5,789,554;5,776,456;5,736,119;5,716,595;5,677,136;5,587,459;5,443,953;5,525,338。这些仅仅是示例性的，并且许多其他抗体及其杂交瘤是本领域已知的。熟练技术人员将认识到，针对几乎任何疾病相关抗原的抗体序列或分泌抗体的杂交瘤可通过在ATCC、NCBI和/或USPTO数据库中简单搜索针对目标选定疾病相关靶标的抗体来获得。可使用本领域熟知的标准技术扩增、切除克隆的抗体的抗原结合结构域，连接至表达载体中，转染到适应宿主细胞中并用于蛋白质产生。

[0130] 抗体同种异型

[0131] 治疗性抗体的免疫原性与输注反应的风险增加和治疗性应答的持续时间减少相关(Baert等人,2003,N Engl J Med 348:602-08)。治疗性抗体在宿主中诱导免疫应答的程度可部分地通过抗体的同种异型来确定(Stickler等人,2011,Genes and Immunity 12:213-21)。抗体同种异型涉及抗体的恒定区序列中特定位置处的氨基酸序列变型。含有重链γ-型恒定区的IgG抗体的同种异型被命名为Gm同种异型(1976,J Immunol 117:1056-59)。

[0132] 对于常见的IgG1人抗体而言，最普遍的同种异型是G1m1(Stickler等人,2011,Genes and Immunity 12:213-21)。然而，G1m3同种异型在白种人(Caucasians)中也是常见的(Stickler等人,2011)。已经报告了当向非G1m1(nG1m1)接受者(如G1m3患者)施用时，G1m1抗体含有倾向于诱导免疫应答的同种异型序列(Stickler等人,2011)。当向G1m1患者施用时，非G1m1同种异型抗体不是作为免疫原性的(Stickler等人,2011)。

[0133] 人G1m1同种异型包含重链IgG1的CH3序列中Kabat位置356处的氨基酸天冬氨酸和Kabat位置358处的氨基酸亮氨酸。nG1m1同种异型包含Kabat位置356处的氨基酸谷氨酸和Kabat位置358处的氨基酸甲硫氨酸。G1m1和nG1m1同种异型二者包含Kabat位置357处的谷氨酸残基，并且所述同种异型有时称为DEL和EEM同种异型。针对示例性抗体利妥昔单抗(SEQ ID NO:7)和维妥珠单抗(SEQ ID NO:8)，以下示出G1m1和nG1m1同种异型抗体的重链恒定区序列的非限制性实例。

[0134] 利妥昔单抗重链可变区序列(SEQ ID NO:7)

[0135] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKAEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0136] 维妥珠单抗重链可变区(SEQ ID NO:8)

[0137] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0138] Jefferis和Lefranc(2009,mAbs 1:1-7)综述了为IgG同种异型的特征的序列变型和它们对免疫原性的影响。他们报道了与G1m17同种异型中的Kabat 214处的赖氨酸残基相比,G1m3同种异型的特征在于Kabat位置214处的精氨酸残基。nG1m1,2同种异型的特征在于Kabat位置356处的谷氨酸、Kabat位置358处的甲硫氨酸和Kabat位置431处的丙氨酸。G1m1,2同种异型的特征在于Kabat位置356处的天冬氨酸、Kabat位置358处的亮氨酸和Kabat位置431处的甘氨酸。除重链恒定区序列变体之外,Jefferis和Lefranc(2009)报告了κ轻链恒定区中的同种异型变体,其中Km1同种异型的特征在于Kabat位置153处的缬氨酸和Kabat位置191处的亮氨酸,Km1,2同种异型的特征在于Kabat位置153处上的丙氨酸和Kabat位置191处的亮氨酸,并且Km3同种异型的特征在于Kabat位置153处的丙氨酸和Kabat位置191处的缬氨酸。

[0139] 关于治疗性抗体,维妥珠单抗和利妥昔单抗分别是对治疗各种各样的血液恶性肿瘤和/或自身免疫疾病有用的、针对CD20的人源化和嵌合IgG1抗体。表1比较了利妥昔单抗对比维妥珠单抗的同种异型序列。如在表1中所示,利妥昔单抗(G1m17,1)是DEL同种异型IgG1,在利妥昔单抗中的赖氨酸相对维妥珠单抗中的精氨酸在Kabat位置214(重链CH1)处具有额外序列变化。已经报告了在受试者中维妥珠单抗比利妥昔单抗的免疫原性小(参见例如,Morchhauser等人,2009,J Clin Oncol 27:3346-53;Goldenberg等人,2009,Blood 113:1062-70;Robak和Robak,2011,BioDrugs 25:13-25),所述作用已经被归因于人源化抗体与嵌合抗体之间的差异。然而,EEM与DEL同种异型之间的同种异型的差异可能也解释了维妥珠单抗的较低免疫原性。

[0140] 表1.利妥昔单抗对比维妥珠单抗的同种异型

[0141]

		重链位置和相关的同种异型					
	完整同种异型	214(同种异型)		356/358(同种异型)		431(同种异型)	
利妥昔单抗	G1m17,1	K	17	D/L	1	A	-
维妥珠单抗	G1m3	R	3	E/M	-	A	-

[0142] 为了减小治疗性抗体在nG1m1基因型个体中的免疫原性,希望选择的抗体同种异型对应于G1m3同种异型,其特征在于Kabat 214处的精氨酸;和nG1m1,2无效同种异型,其特征在于Kabat位置356处的谷氨酸、Kabat位置358处的甲硫氨酸以及Kabat位置431处的丙氨酸。出人意料地,发现在长时间段内重复皮下施用G1m3抗体不会产生显著免疫应答。在替代实施方案中,与G1m3同种异型有共同之处的人IgG4重链具有Kabat 214处的精氨酸、Kabat 356处的谷氨酸、Kabat 359处的甲硫氨酸和Kabat 431处的丙氨酸。由于免疫原性似乎至少部分与这些位置处的残基相关,人IgG4重链恒定区序列用于治疗抗体也是优选的实施方案。G1m3 IgG1抗体与IgG4抗体的组合也可用于治疗剂施用。

[0143] 纳米抗体

[0144] 纳米抗体是大小为约12-15kDa(长度为约110个氨基酸)的单结构域抗体。纳米抗体可选择性地结合至靶标抗原,如完整大小的抗体,并且具有类似的抗原亲和力。然而,由于其大小较小,因此能够更好地穿透实体肿瘤。较小的大小也有助于稳定纳米抗体,其比完整大小的抗体更耐pH和极端温度(Van Der Linden等人,1999,Biochim Biophys Act 1431:37-46)。单结构域抗体最初根据如下发现开发:骆驼科(骆驼、羊驼、美洲驼)具有无轻链的完全功能抗体(例如,Hamsen等人,2007,Appl Microbiol Biotechnol 77:13-22)。重链抗体由单个可变结构域(V_{HH})和两个恒定结构域(C_H2和C_H3)组成。像抗体那样,纳米抗体可开发和用作多价和/或双特异性构建体。纳米抗体的人源化形式正在商业开发中,其靶向许多靶抗原,如IL-6R、vWF、TNF、RSV、RANKL、IL-17A&F和IgE(例如,ABLYNX®、Ghent、Belgium),在癌症和其他疾病中具有潜在临床用途(例如,Saerens等人,2008,Curr Opin Pharmacol 8:600-8;Muyldermans,2013,Ann Rev Biochem 82:775-97;Ibanez等人,2011,J Infect Dis 203:1063-72)。

[0145] 纳米抗体的血浆半衰期小于完全大小的抗体,主要通过肾脏途径消除。因为它们缺乏Fc区,所以不表现出补体依赖性细胞毒性。

[0146] 纳米抗体可通过以下步骤制备:用靶抗原免疫骆驼、美洲驼、羊驼或鲨鱼,然后分离mRNA,克隆至文库并筛选抗原结合。纳米抗体序列可通过标准技术人源化(例如,Jones等人,1986,Nature 321:522;Riechmann等人,1988,Nature 332:323;Verhoeyen等人,1988,Science 239:1534;Carter等人,1992,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 89:4285;Sandhu,1992,Crit.Rev.Biotech.12:437;Singer等人,1993,J.Immun.150:2844)。由于骆驼科与人FR序列之间的高同源性,人源化相对直接。

[0147] 在各种实施方案中,主题ADC可包括用于将缀合的药物靶向递送至靶标癌细胞的纳米抗体。所用的纳米抗体公开于例如美国专利号7,807,162;7,939,277;8,188,223;8,217,140;8,372,398;8,557,965;8,623,361和8,629,244中,各自的实施例部分以引用的方式并入本文)。

[0148] 抗体片段

[0149] 抗体片段是抗体的抗原结合部分,诸如$F(ab')_2$、Fab'、$F(ab)_2$、Fab、Fv、sFv、scFv等。识别特定表位的抗体片段可通过已知技术制备。$F(ab')_2$片段,例如可通过胃蛋白酶消化抗体分子来制备。这些和其他方法描述于,例如Goldenberg,美国专利第4,036,945号和第4,331,647号以及其中所包含的参考文献中。还参见Nisonoff等人,Arch Biochem.Biophys.89:230(1960);Porter,Biochem.J.73:119(1959),Edelman等人,于METHODS IN ENZYMOLOGY第1卷,第422页(Academic Press 1967),和Coligan,第2.8.1-2.8.10页和第2.10.-2.10.4页。或者,可构建Fab'表达文库(Huse等人,1989,Science,246:1274-1281),以使快速和简易鉴定具有所需特异性的单克隆Fab'片段。

[0150] 单链Fv分子(scFv)包括VL结构域和VH结构域。VL和VH结构域缔合形成靶标结合位点。这两个结构域还通过肽接头(L)共价连接。如果VL结构域是scFv分子的N-末端部分,则scFv分子表示为VL-L-VH,或如果VH结构域是scFv分子的N-末端部分,则表示为VH-L-VL。制备scFv分子和设计适合肽接头的方法描述于以下文献中:美国专利号4,704,692;美国专利号4,946,778;R.Raag和M.Whitlow,"Single Chain Fvs."FASEB第9卷:73-80(1995)和R.E.Bird和B.W.Walker,"Single Chain Antibody Variable Regions,"TIBTECH,第9卷:

132-137(1991)。

[0151] 其他抗体片段,例如单结构域抗体片段,是本领域已知的并且可用于受权利要求书保护的构建体。单结构域抗体(VHH)可例如通过标准免疫技术从骆驼、羊驼或美洲驼获得。(参见例如,Muyldermans等人,TIBS 26:230-235,2001;Yau等人,J Immunol Methods 281:161-75,2003;Maass等人,J Immunol Methods 324:13-25,2007)。VHH可具有强大的抗原结合能力,并且可与传统VH-VL对无法触及的新表位相互作用(Muyldermans等人,2001)。羊驼血清IgG含有约50%的骆驼科仅重链IgG抗体(HCAb)(Maass等人,2007)。可使用已知的抗原诸如TNF-α免疫羊驼,并且可分离结合至以及中和靶抗原的VHH(Maass等人,2007)。已鉴定扩增几乎所有编码羊驼VHH的序列的PCR引物,并且可用于构建羊驼VHH噬菌体展示文库,所述文库可用于通过本领域熟知的标准生物淘选技术进行抗体片段分离(Maass等人,2007)。

[0152] 抗体片段也可通过全长抗体的蛋白水解或通过在大肠杆菌或另一种宿主中表达编码该片段的DNA来制备。抗体片段可通过常规方法使用胃蛋白酶或木瓜蛋白酶消化全长抗体来获得。例如,抗体片段可通过使用胃蛋白酶来酶促裂解抗体来产生以提供大约100kD以$F(ab')_2$表示的片段。此片段可使用硫醇还原剂和任选地由二硫键联的裂解产生的巯基基团的封端基团进一步裂解,以产生大约50kd Fab'单价片段。或者,使用木瓜蛋白酶进行酶促裂解直接产生两个单价Fab片段和一个Fc片段。

[0153] 还可使用裂解抗体的其他方法,如分离重链以形成单价轻链-重链片段、进一步裂解片段,或其他酶促、化学或遗传技术,只要所述片段结合至由完整抗体识别的抗原即可。

[0154] 双特异性和多特异性抗体

[0155] 双特异性抗体可用于许多生物医学应用中。例如,具有用于肿瘤细胞表面抗原和用于T细胞表面受体的结合位点的双特异性抗体可指导通过T细胞的特异性肿瘤细胞的溶解。识别神经胶质瘤和T细胞上的CD3表位的双特异性抗体已经成功用于治疗人患者的脑肿瘤(Nitta,等人Lancet.1990;355:368-371)。优选的双特异性抗体是抗CD3X抗Trop-2抗体。在替代实施方案中,抗CD3抗体或其片段可附接至针对B细胞相关抗原的抗体或片段,如抗CD3 X抗CD19、抗CD3 X抗CD20、抗CD3 X抗CD22、抗CD3 X抗HLA-DR或抗CD3 X抗CD74。在某些实施方案中,本文公开的用于治疗剂递送的技术和组合物可与作为靶向部分的双特异性或多特异性抗体一起使用。

[0156] 用于产生双特异性或多特异性抗体的许多方法是已知的,如例如美国专利号7,405,320所公开,所述专利的实施例部分以引用的方式并入本文。双特异性抗体可通过四源杂交瘤方法产生,所述方法包括使各自产生识别不同抗原位点的单克隆抗体的两种不同杂交瘤的融合(Milstein和Cuello,Nature,1983;305:537-540)。

[0157] 另一制造双特异性抗体的方法使用异双官能性交联剂以化学系栓两个不同单克隆抗体(Staerz,等人Nature,1985;314:628-631;Perez,等人Nature,1985;316:354-356)。双特异性抗体也可通过将两种亲本单克隆抗体中的每种还原成相应半分子,然后将其混合并使其再氧化以获得杂合体结构(Staerz和Bevan.Proc Natl Acad Sci U S A.1986;83:1453-1457)。另一替代方案涉及使用适当接头使两种或三种单独纯化的Fab'片段化学交联。(参见例如,欧洲专利申请0453082)。

[0158] 其他方法包括通过经由逆转录病毒来源的穿梭载体将独特的选择性标记基因转

移至相应的亲本杂交瘤中，随后将它们融合(DeMonte,等人Proc Natl Acad Sci U S A.1990,87:2941-2945)；或使用含有不同抗体的重链和轻链基因的表达质粒转染杂交瘤细胞系来提高产生杂合体杂交瘤的效率。

[0159] 可将同源V_H和V_L结构域与具有适当组成和长度(通常由多于12个氨基酸残基组成)的肽接头接合以形成具有结合活性的单链Fv(scFv)。制造scFv的方法公开于美国专利号4,946,778和美国专利号5,132,405中，所述专利各自的实施例部分以引用的方式并入本文。肽接头长度减小至小于12个氨基酸残基防止了相同链上V_H和V_L结构域的配对，并且迫使V_H和V_L结构域与其他链上的互补结构域的配对，从而形成功能多聚体。与3与12个氨基酸残基之间的接头接合的V_H和V_L结构域的多肽链主要形成二聚体(称为双抗体)。使用0与2个氨基酸残基之间的接头，有助于形成三聚体(称为三抗体)和四聚体(称为四抗体)，但除接头长度之外，寡聚化的准确模式似乎取决于V结构域(V_H-接头-V_L或V_L-接头-V_H)的组成以及取向。

[0160] 用于产生多特异性或双特异性抗体的这些技术就低收率、纯化的必要性、低稳定性或技术的劳动密集性而言表现出许多困难。最近，已利用一种称为“对接锁定”(DNL)的技术来产生几乎任何所需抗体、抗体片段或其他效应分子的组合(参见例如美国专利号7,521,056;7,527,787;7,534,866;7,550,143;7,666,400;7,858,070;7,871,622;7,906,121;7,906,118;8,163,291;7,901,680;7,981,398;8,003,111和8,034,352，所述专利各自的实施例部分以引用的方式并入本文)。所述技术利用称为锚定结构域(AD)和二聚化与对接结构域(DDD)的互补蛋白质结合结构域，其彼此结合并且允许组装范围为二聚体、三聚体、四聚体、五聚体和六聚体的复杂分子。这些以高产率形成稳定复合物而不需要广泛纯化。DNL技术允许组装单特异性、双特异性或多特异性抗体。本领域已知的用于制备双特异性或多特异性抗体的任何技术可用于实施本发明要求保护的方法。

[0161] 缀合方案

[0162] 抗体或其片段可缀合至一种或多种治疗剂或诊断剂。治疗剂不需要相同但是可不同，例如药物和放射性同位素。举例来说，^{131}I可并入抗体或融合蛋白的酪氨酸中并且药物附接至赖氨酸残基的ε氨基。治疗剂和诊断剂还可例如附接至还原的SH基团和/或碳水化合物侧链。用于制备治疗剂或诊断剂与抗体或融合蛋白的共价或非共价缀合物的许多方法在本领域中是已知的并且可利用任何这种已知方法。

[0163] 治疗剂或诊断剂可经由二硫键形成而附接在还原抗体组分的铰链区。或者，此类剂可使用异双官能交联剂，如3-(2-吡啶基二硫代)丙酸N-琥珀酰基酯(SPDP)附接。Yu等人，Int.J.Cancer 56:244(1994)。用于这种缀合的一般技术是本领域中众所周知的。参见例如，Wong,CHEMISTRY OF PROTEIN CONJUGATION AND CROSS-LINKING(CRC Press 1991)；Upeslacis等人，“Modification of Antibodies by Chemical Methods,”于MONOCLONAL ANTIBODIES:PRINCIPLES AND APPLICATIONS,Birch等人(编著)，第187-230页(Wiley-Liss,Inc.1995)；Price,“Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies,”于MONOCLONAL ANTIBODIES:PRODUCTION,ENGINEERING AND CLINICAL APPLICATION,Ritter等人(编著)，第60-84页(Cambridge University Press 1995)。或者，治疗剂或诊断剂可经由抗体Fc区中的碳水化合物部分缀合。碳水化合物基团可用于增加结合至硫醇基的相同剂的负载，或碳水化合物部分可用于结合不同的治疗剂或

诊断剂。

[0164] 经由抗体碳水化合物部分将肽偶联至抗体组分的方法是本领域技术人员熟知的。参见例如Shih等人,Int.J.Cancer 41:832(1988);Shih等人,Int.J.Cancer 46:1101(1990);以及Shih等人,美国专利号5,057,313,其以引用的方式整体并入本文。一般方法涉及使具有氧化碳水化合物部分的抗体与具有至少一个游离胺官能的载体聚合物反应。这种反应产生初始席夫碱(亚胺)键联,所述键联可通过还原成仲胺来稳定,以形成最终缀合物。

[0165] 如果用作免疫缀合物的抗体组分的抗体是抗体片段,则可能不存在Fc区。然而,有可能将碳水化合物部分引入全长抗体或抗体片段的轻链可变区中。参见,例如,Leung等人,J.Immunol.154:5919(1995);Hansen等人,美国专利号5,443,953(1995);Leung等人,美国专利号6,254,868,所述文献均以引用的方式整体并入本文。使用工程化的碳水化合物部分来附接治疗剂或诊断剂。

[0166] 用于将载体部分附接至靶向分子的替代方法涉及使用点击化学反应。点击化学方法最初构想为通过将小亚基以模组方式连接在一起来快速生成复合物的方法。(参见例如,Kolb等人,2004,Angew Chem Int Ed 40:3004-31;Evans,2007,Aust J Chem 60:384-95。)各种形式的点击化学反应是本领域已知的,如胡伊斯根(Huisgen)1,3-偶极环加成铜催化反应(Tornoe等人,2002,J Organic Chem 67:3057-64),其通常称为“点击反应”。其他替代方案包括环加成反应,诸如Diels-Alder、亲核取代反应(特别是小张力环如环氧基和氮丙啶化合物)、脲化合物的羰基化学形成以及涉及碳-碳双键的反应,诸如硫醇-炔反应中的炔烃。

[0167] 叠氮化物炔烃胡伊斯根环加成反应使用铜催化剂在存在还原剂的情况下催化末端炔烃基附接至第一分子的反应。在存在包含叠氮化物部分的第二分子的情况下,叠氮化物与活化的炔烃反应以形成1,4-二取代的1,2,3-三唑。铜催化反应在室温下进行,并且具有足够的特异性,以使得反应产物的纯化通常不是必须的。(Rostovstev等人,2002,Angew Chem Int Ed 41:2596;Tornoe等人,2002,J Org Chem 67:3057。)叠氮化物和炔烃官能团对水介质中的生物分子为基本上惰性的,从而使反应在复合物溶液中进行。所形成的三唑在化学上是稳定的,未经受酶裂解,从而使得点击化学产物在生物系统中是高度稳定的。虽然铜催化剂对活细胞是有毒的,但基于铜的点击化学反应可在体外用于免疫缀合物形成。

[0168] 已提出用于生物分子的共价修饰的无铜点击反应。(参见例如,Agard等人,2004,J Am Chem Soc 126:15046-47。)无铜反应使用环张力代替铜催化剂来促进[3+2]叠氮化物-炔烃环加成反应(同上)。例如,环辛炔是包含内部炔烃键的8碳环结构。闭环结构诱导了乙炔的显著键角变形,乙炔与叠氮化物基团反应形成三唑具有高度反应性。因此,环辛炔衍生物可用于无铜点击反应(同上)。

[0169] Ning等人(2010,Angew Chem Int Ed 49:3065-68)报告了另一种类型的无铜点击反应,涉及张力促进的炔烃-硝酮环加成反应。为解决初始环辛炔反应的缓慢速率,将吸电子基团邻近附接至三键(同上)。此类取代环辛炔的实例包括二氟化环辛炔、4-二苯并环辛炔醇和氮杂环辛炔(同上)。替代无铜反应涉及张力促进的炔烃-硝酮环加成反应,得到N-烷基化异噁唑啉(同上)。据报告,所述反应具有特别快的反应动力学,并且用于肽和蛋白质的位点特异性修饰的一锅三步骤方案(同上)。硝酮通过适当的醛与N-甲基羟胺的缩合反应制备,并且环加成反应在乙腈和水的混合物中进行(同上)。这些和其他已知的点击化学反应

可用于在体外将载体部分附接至抗体。

[0170] Agard等(2004,J Am Chem Soc 126:15046-47)证明了在全乙酰化的N-叠氮乙酰甘露糖胺存在的情况下,在CHO细胞中表达的重组糖蛋白导致相对应的N-叠氮乙酰唾液酸生物并入糖蛋白的碳水化合物中。叠氮基衍生化的糖蛋白与生物素化环辛炔特异性反应以形成生物素化糖蛋白,而无叠氮基部分的对照糖蛋白仍然未标记(同上)。Laughlin等人(2008,Science 320:664-667)使用类似的技术来代谢标记与全乙酰化N-叠氮基乙酰半乳糖胺一起孵育的斑马鱼胚胎中的细胞表面聚糖。叠氮基衍生化的聚糖与二氟化环辛炔(DIFO)试剂反应以使聚糖在体内可视化。

[0171] 狄尔斯-阿尔德(Diels-Alder)反应也用于分子的体内标记。Rossin等人(2010,Angew Chem Int Ed 49:3375-78)报告了携带反式环辛烯(TCO)反应性部分和^{111}In标记的四嗪DOTA衍生物的肿瘤定位的抗TAG72(CC49)抗体之间的体内收率为52%。将TCO标记的CC49抗体施用至携带结肠癌异种移植物的小鼠,在1天后注射^{111}In标记的四嗪探针(同上)。放射性标记的探针与肿瘤定位的抗体的反应的结果是在肿瘤中产生显著的放射性定位,如在注射放射性标记探针三小时后活小鼠的SPECT成像所示,肿瘤与肌肉的比率为13:1(同上)。结果确认了TCO和四嗪标记分子的体内化学反应。

[0172] 此类部分化学缀合至生物分子的替代方法是本领域熟知的,并且可利用任何此类已知的方法。免疫缀合物形成的一般方法例如公开在美国专利号4,699,784;4,824,659;5,525,338;5,677,427;5,697,902;5,716,595;6,071,490;6,187,284;6,306,393;6,548,275;6,653,104;6,962,702;7,033,572;7,147,856以及7,259,240中,每一个所述专利的实施例部分以引用的方式并入本文。

[0173] 优选的缀合方案是基于硫醇-马来酰亚胺、硫醇-乙烯基砜、硫醇-溴乙酰胺或在中性或酸性pH下易于进行的硫醇-碘乙酰胺反应。这消除了对缀合的更高pH条件的需要,例如在使用活性酯时将是必需的。以下在实施例部分中描述了示例性缀合方案的进一步细节。

[0174] 治疗性治疗

[0175] 在另一方面,本发明涉及一种治疗受试者的方法,所述方法包括向受试者施用治疗有效量的如本文所述的抗体-药物缀合物(ADC)。可用本文所述的ADC治疗的疾病包括但不限于B细胞恶性肿瘤(例如,非霍奇金淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、多发性骨髓瘤、霍奇金淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、急性淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、毛细胞白血病),使用例如针对另一种CD22表位(hRFB4)的抗CD22抗体如hLL2 MAb(依帕珠单抗,参见美国专利号6,183,744)或针对其他B细胞抗原如CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD37、CD40、CD40L、CD52、CD74、CD80或HLA-DR的抗体。其他疾病包括但不限于内胚层来源的消化系统上皮细胞的腺癌,诸如乳腺癌和非小细胞肺癌的癌症,以及其他癌、肉瘤、神经胶质肿瘤、骨髓性白血病等。特别地,有利地使用针对由恶性实体瘤或造血系统赘瘤(例如胃肠肿瘤、胃肿瘤、结肠肿瘤、食道肿瘤、肝肿瘤、肺肿瘤、乳腺肿瘤、胰腺肿瘤、肝脏肿瘤、前列腺肿瘤、卵巢肿瘤、睾丸肿瘤、脑肿瘤、骨肿瘤、尿路上皮或淋巴肿瘤、肉瘤或黑素瘤)产生或与其相关的抗原(例如癌胚抗原)的抗体。所述治疗剂可根据疾病状态和缀合物的耐受性给予一次或重复给予,并且还可任选地与其他治疗模态组合使用,所述其他治疗模态如外科手术、外部辐射、放射性免疫疗法、免疫疗法、化学疗法、反义疗法、干扰RNA疗法、基因疗法等。各组合将适于肿瘤类型、分期、患者病状和先前疗法,和由管理医

师考虑的其他因素。

[0176] 如本文所用，术语“受试者”是指任何动物(即，脊椎动物和无脊椎动物)，包括但不限于哺乳动物，包括人。并不希望所述术语限于特定年龄或性别。因此，成年和新生受试者以及胎儿，无论是男性还是女性，都由所述术语涵盖。本文给出的剂量用于人类，但可根据体重或平方米大小调整至其他哺乳动物以及儿童的大小。

[0177] 在一个优选的实施方案中，包含抗Trop-2抗体如hRS7 MAb的治疗性缀合物可用于治疗癌，如食道癌、胰腺癌、肺癌、胃癌、结肠癌和直肠癌、膀胱癌、乳腺癌、卵巢癌、子宫癌、肾癌和前列腺癌，如美国专利号7,238,785;7,517,964和8,084,583中所公开，其实施例部分以引用的方式并入本文。hRS7抗体是包含轻链互补决定区(CDR)序列CDR1(KASQDVSIAVA，SEQ ID NO:1)、CDR2(SASYRYT，SEQ ID NO:2)和CDR3(QQHYITPLT，SEQ ID NO:3)以及重链CDR序列CDR1(NYGMN，SEQ ID NO:4)、CDR2(WINTYTGEPTYTDDFKG，SEQ ID NO:5)和CDR3(GGFGSSYWYFDV，SEQ ID NO:6)的人源化抗体。

[0178] 在优选的实施方案中，用于治疗人疾病的抗体是抗体的人或人源化(CDR移植)型式;但是也可使用抗体的鼠类和嵌合型式。与递送剂相同物种的IgG分子对于使免疫应答最小化是最优选的。此情形在考虑重复治疗时特别重要。对于人，人或人源化IgG抗体由患者产生抗IgG免疫应答的可能性较低。诸如hLL1和hLL2的抗体在结合至靶细胞上的内化抗原后快速内化，这意指所携带的化学治疗性药物快速内化至细胞中。然而，具有较慢内化速率的抗体也可用于实施选择性疗法。

[0179] 在另一个优选的实施方案中，与本发明的喜树碱缀合物组合使用的治疗剂可包含一种或多种同位素。适用于治疗患病组织的放射性同位素包括但不限于-^{111}In、^{177}Lu、^{212}Bi、^{213}Bi、^{211}At、^{62}Cu、^{67}Cu、^{90}Y、^{125}I、^{131}I、^{32}P、^{33}P、^{47}Sc、^{111}Ag、^{67}Ga、^{142}Pr、^{153}Sm、^{161}Tb、^{166}Dy、^{166}Ho、^{186}Re、^{188}Re、^{189}Re、^{212}Pb、^{223}Ra、^{225}Ac、^{59}Fe、^{75}Se、^{77}As、^{89}Sr、^{99}Mo、^{105}Rh、^{109}Pd、^{143}Pr、^{149}Pm、^{169}Er、^{194}Ir、^{198}Au、^{199}Au、^{227}Th以及^{211}Pb。治疗性放射性核素优选地具有在20至6,000keV范围内、优选地在60至200keV的范围内(对于俄歇发射体)、在100-2,500keV的范围内(对于β发射体)和在4,000-6,000keV的范围内(对于α发射体)的衰变能。可用的β粒子发射核素的最大衰变能为优选地20-5,000keV、更优选地100-4,000keV以及最优选地500-2,500keV。另外优选的是基本上随俄歇发射粒子而衰变的放射性核素。例如，Co-58、Ga-67、Br-80m、Tc-99m、Rh-103m、Pt-109、In-111、Sb-119、I-125、Ho-161、Os-189m和Ir-192。可用的β粒子发射核素的衰变能为优选地<1,000keV、更优选地<100keV以及最优选地<70keV。另外优选的是基本上随α粒子的产生而衰变的放射性核素。此类放射性核素包括但不限于:Dy-152、At-211、Bi-212、Ra-223、Rn-219、Po-215、Bi-211、Ac-225、Fr-221、At-217、Bi-213、Th-227和Fm-255。可用的α粒子发射放射性核素的衰变能优选地是2,000-10,000keV、更优选地3,000-8,000keV并且最优选地4,000-7,000keV。有用的另外潜在放射性同位素包括^{11}C、^{13}N、^{15}O、^{75}Br、^{198}Au、^{224}Ac、^{126}I、^{133}I、^{77}Br、^{113m}In、^{95}Ru、^{97}Ru、^{103}Ru、^{105}Ru、^{107}Hg、^{203}Hg、^{121m}Te、^{122m}Te、^{125m}Te、^{165}Tm、^{167}Tm、^{168}Tm、^{197}Pt、^{109}Pd、^{105}Rh、^{142}Pr、^{143}Pr、^{161}Tb、^{166}Ho、^{199}Au、^{57}Co、^{58}Co、^{51}Cr、^{59}Fe、^{75}Se、^{201}Tl、^{225}Ac、^{76}Br、^{169}Yb等。

[0180] 放射性核素和其他金属可例如使用附接至抗体或缀合物的螯合基团递送。如NOTA、DOTA以及TETA的巨环螯合剂可与各种金属和放射性金属一起使用，最特别地分别与放射性核素镓、钇和铜一起使用。可通过根据目标金属调整环大小而使此类金属螯合物复

合物变得非常稳定。可使用其他环型螯合物，如用于络合^{223}Ra的大环聚醚。

[0181] 与本文所述的喜树碱缀合物组合使用的治疗剂还包括，例如，化学治疗药物，如长春花生物碱、蒽环霉素、表鬼臼毒素、紫杉烷、抗代谢物、酪氨酸激酶抑制剂、烷化剂、抗生素、Cox-2抑制剂、抗有丝分裂剂、抗血管生成剂和促凋亡剂，特别是阿霉素、甲氨蝶呤、紫杉醇、其他喜树碱以及来自这些和其他类别的抗癌剂的其他等。其他癌症化学治疗药物包括氮芥、烷基磺酸酯、亚硝基脲、三氮烯、叶酸类似物、嘧啶类似物、嘌呤类似物、铂配位络合物、激素等。合适的化学治疗剂描述于REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES，第19版(Mack Publishing Co.1995)和GOODMAN AND GILMAN'S THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS，第7版(MacMillan Publishing Co.1985)以及这些出版物的修订版所述。其他合适化学治疗剂(如实验性药物)为本领域的技术人员所已知。

[0182] 所使用的示例性药物包括但不限于5-氟尿嘧啶、阿法替尼、阿普立定、阿扎立平、阿那曲唑、蒽环霉素、阿西替尼、AVL-101、AVL-291、苯达莫司汀、博来霉素、硼替佐米、博舒替尼、苔藓抑素-1、白消安、刺孢霉素、喜树碱、卡铂、10-羟基喜树碱、卡莫司汀、塞来昔布、苯丁酸氮芥、顺铂(CDDP)、Cox-2抑制剂、伊立替康(CPT-11)、SN-38、卡铂、克拉屈滨、喜树碱、克唑替尼、环磷酰胺、阿糖胞苷、达卡巴嗪、达沙替尼、地尼西宝、多西他赛、更生霉素、柔红霉素、阿霉素、2-吡咯啉并阿霉素(2P-DOX)、氰基-吗啉代阿霉素、阿霉素葡糖苷酸、表柔比星葡糖苷酸、埃罗替尼、雌莫司汀、表鬼臼毒素、埃罗替尼、恩替诺特、雌激素受体结合剂、依托泊苷(VP16)、依托泊苷葡糖苷酸、磷酸依托泊苷、依西美坦、芬戈莫德、氟尿苷(FUdR)、3',5'-O-二油酰基-FudR(FUdR-dO)、氟达拉滨、氟他胺、法呢基-蛋白转移酶抑制剂、夫拉平度、福他替尼、吉尼替彼、GDC-0834、GS-1101、吉非替尼、吉西他滨、羟基脲、依鲁替尼、伊达比星、伊德利塞、异环磷酰胺、伊马替尼、L-天冬酰胺酶、拉帕替尼、来那度胺、亚叶酸、LFM-A13、洛莫司汀、氮芥、美法仑、巯基嘌呤、6-巯基嘌呤、甲氨蝶呤、米托蒽醌、光辉霉素、丝裂霉素、米托坦、诺维本、来那替尼、尼洛替尼、亚硝基脲、奥拉帕尼、普卡霉素、丙卡巴肼、紫杉醇、PCI-32765、喷司他丁、PSI-341、雷洛昔芬、司莫司汀、索拉非尼、链脲霉素、SU11248、舒尼替尼、他莫昔芬、替莫唑胺(DTIC的水性形式)、反铂、沙利度胺、硫鸟嘌呤、塞替派、替尼泊苷、托泊替康、尿嘧啶氮芥、瓦他拉尼、长春瑞滨、长春碱、长春新碱、长春花生物碱以及ZD1839。此类剂可以是本文所述的缀合物的一部分，或者可在缀合物之前、同时或之后与所述缀合物组合施用。或者，可将本领域已知的一种或多种治疗性裸抗体与所描述的缀合物组合使用。示例性治疗性裸抗体如上所述。

[0183] 在优选的实施方案中，与DNA断裂抗体缀合物(例如，SN-38-ADC)组合使用的治疗剂是微管抑制剂，如长春花生物碱、紫杉烷、美登木素生物碱或奥瑞斯他汀。示例性的已知微管抑制剂包括紫杉醇、长春新碱、长春碱、美登素、埃博霉素、多西他赛、圆皮海绵内酯、康普瑞汀、鬼臼毒素、CI-980、苯基阿夕斯丁、五加前胡素、卡拉新、2-甲氧基雌二醇、E7010、甲氧基苯磺酰胺、长春瑞滨、长春氟宁、长春地辛、尾海兔素、海绵抑制素、根霉素、泰斯多汀、软海绵素、哈米特林、念珠藻素52、MMAE以及甲磺酸艾日布林。

[0184] 在替代优选的实施方案中，与DNA断裂ADC(如SN-38抗体缀合物)组合使用的治疗剂是PARP抑制剂，如奥拉帕尼、他拉唑帕尼(BMN-673)、鲁卡帕尼、维利帕尼、CEP 9722、MK 4827、BGB-290、ABT-888、AG014699、BSI-201、CEP-8983或3-氨基苯甲酰胺。

[0185] 在另一个替代方案中，与抗体或免疫缀合物组合使用的治疗剂是酪氨酸激酶抑制

剂,如依鲁替尼(PCI-32765)、PCI-45292、CC-292(AVL-292)、ONO-4059、GDC-0834、LFM-A13或RN486。

[0186] 在另一个替代方案中,与抗体或免疫缀合物组合使用的治疗剂是PI3K抑制剂,如伊德利塞、渥曼青霉素、去甲氧基绿胶霉素、哌立福辛、PX-866、IPI-145(度维利塞)、BAY80-6946、BEZ235、RP6530、TGR1202、SF1126、INK1117、GDC-0941、BKM120、XL147、XL765、Palomid529、GSK1059615、ZSTK474、PWT33597、IC87114、TG100-115、CAL263、PI-103、GNE477、CUDC-907、AEZS-136或LY294002。

[0187] 可与喜树碱缀合物一起使用的治疗剂还可包含与靶向部分缀合的毒素。在此方面可使用的毒素包括蓖麻毒素、相思豆毒素、核糖核酸酶(RNA酶)、DNA酶I、葡萄球菌肠毒素A、美洲商陆抗病毒蛋白、白树毒素(gelonin)、白喉毒素、假单胞菌外毒素和假单胞菌内毒素。(参见例如,Pastan.等人,Cell(1986),47:641;以及Sharkey和Goldenberg,CA Cancer J Clin.2006年七月-八月;56(4):226-43。)适合用于在本文使用的另外毒素是本领域的技术人员已知的,并且在美国专利号6,077,499中公开。

[0188] 另一类治疗剂可包含一种或多种免疫调节剂。所使用的免疫调节剂可选自细胞因子、干细胞生长因子、淋巴毒素、造血因子、集落刺激因子(CSF)、干扰素(IFN)、促红细胞生成素、血小板生成素以及其组合。特别有用的是淋巴毒素,如肿瘤坏死因子(TNF);造血因子,如白细胞介素(IL);集落刺激因子,如粒细胞集落刺激因子(G-CSF)或粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF);干扰素,如干扰素-α、-β、-γ或-λ;以及干细胞生长因子,如命名为"S1因子"的干细胞生长因子。包括在细胞因子之中的是:生长激素,如人生长激素、N-甲硫氨酰基人生长激素以及牛生长激素;甲状旁腺激素;甲状腺素;胰岛素;胰岛素原;松弛素;松弛素原;糖蛋白激素,如促卵泡激素(FSH)、促甲状腺激素(TSH)以及促黄体激素(LH);肝细胞生长因子;前列腺素、成纤维细胞生长因子;催乳素;胎盘催乳素、OB蛋白;肿瘤坏死因子-α和-β;苗勒抑制物质;小鼠促性腺激素相关的肽;抑制素;活化素;血管内皮生长因子;整联蛋白;促血小板生成素(TPO);神经生长因子,如NGF-β;血小板生长因子;转化生长因子(TGF),如TGF-α和TGF-β;胰岛素样生长因子-I和-II;促红细胞生成素(EPO);骨诱导因子;干扰素,如干扰素-α、-β、-γ以及-λ;集落刺激因子(CSF),如巨噬细胞-CSF(M-CSF);白细胞介素(IL),如IL-1、IL-1α、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-21、IL-25、LIF、kit配体或FLT-3、血管抑素、血小板反应蛋白、内皮抑素、肿瘤坏死因子以及淋巴毒素(LT)。如本文所用,术语细胞因子包括来自天然来源或来自重组细胞培养物的蛋白质和天然序列细胞因子的生物活性等效物。

[0189] 所用的趋化因子包括RANTES、MCAF、MIP1-α、MIP1-β以及IP-10。

[0190] 本领域普通技术人员将认识到,包含与抗体或抗体片段缀合的喜树碱的主题免疫缀合物可单独使用或与一种或多种其他治疗剂组合使用,所述其他治疗剂如第二抗体、第二抗体片段、第二免疫缀合物、放射性核素、毒素、药物、化学治疗剂、放射疗法、趋化因子、细胞因子、免疫调节剂、酶、激素、寡核苷酸、RNAi或siRNA。此类另外的治疗剂可单独施用、与主题抗体-药物免疫缀合物组合施用或附接至主题抗体-药物免疫缀合物。

[0191] 制剂和施用

[0192] 缀合物的合适施用途径包括但不限于口服、肠胃外、皮下、直肠、经粘膜、肠内施

用、肌内、髓内、鞘内、直接心室内、静脉内、玻璃体内、腹膜内、鼻内或眼内注射。优选的施用途径是肠胃外。或者，可局部而非全身方式施用化合物，例如经由将化合物直接注射到实体瘤中。

[0193] 免疫缀合物可根据已知方法进行配制以制备药学上有用的组合物，由此将所述免疫缀合物与药学上合适的赋形剂组合成混合物。无菌磷酸盐缓冲盐水是药学上合适的赋形剂的一个实例。其他合适赋形剂是本领域技术人员熟知的。参见例如Ansel等人，PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS,第5版(Lea&Febiger 1990)和Gennaro(编著)，REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES,第18版(Mack Publishing Company 1990)及其修订版。

[0194] 在一个优选的实施方案中，在Good氏生物缓冲液(pH 6-7)中，使用选自由以下组成的组的缓冲液配制免疫缀合物:N-(2-乙酰胺基)-2-氨基乙磺酸(ACES)、N-(2-乙酰胺基)亚氨基二乙酸(ADA)、N,N-双(2-羟乙基)-2-氨基乙磺酸(BES)、4-(2-羟乙基)哌嗪-1-乙磺酸(HEPES)、2-(N-吗啉代)乙磺酸(MES)、3-(N-吗啉代)丙磺酸(MOPS)、3-(N-吗啉基)-2-羟基丙磺酸(MOPSO)以及哌嗪-N,N'-双(2-乙磺酸)[Pipes]。更优选的缓冲液是MES或MOPS，优选地在20至100mM的浓度范围内，更优选地约25mM。最优选的是25mM MES,pH 6.5。制剂还可包含25mM海藻糖和0.01％v/v聚山梨醇酯80作为赋形剂，由于添加的赋形剂而使最终缓冲液浓度变为22.25mM。优选的储存方法是以缀合物的冻干制剂储存在-20℃至2℃的温度范围内，最优选地储存在2℃至8℃的温度范围下。

[0195] 主题免疫缀合物可被配制用于经由例如推注、缓慢输注或连续输注进行静脉内施用。优选地，本发明的抗体在少于约4小时的时间内，并且更优选地在少于约3小时的时间内输注。例如，前25-50mg可在30分钟，优选地甚至15分钟内输注，并且其余的部分在接下来的2-3小时内输注。用于注射的制剂可以单位剂型提供，例如在安瓿瓶或多剂量容器中，并添加防腐剂。组合物可采取诸如悬浮液、溶液或于油性或水性媒介物中的乳液的形式，并且可含有配制剂，如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。或者，活性成分可以是在使用前与合适的媒介物(例如不含热原的无菌水)一起复原的粉末形式。

[0196] 另外的制药方法可用于控制治疗缀合物的作用持续时间。可通过使用聚合物来复合或吸附免疫缀合物来制备控释制剂。例如，生物相容性聚合物包括聚(乙烯-共-乙酸乙烯酯)的基质以及硬脂酸二聚体和癸二酸的聚酸酐共聚物的基质。Sherwood等人，Bio/Technology 10:1446(1992)。从这种基质释放免疫缀合物的速率取决于免疫缀合物的分子量、基质内的免疫缀合物的量以及分散颗粒的大小。Saltzman等人，Biophys.J.55:163(1989)；Sherwood等人，同上。其他固体剂型描述于以下文献中：Ansel等人，PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS,第5版(Lea和Febiger 1990)和Gennaro(编著)，REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES,第18版(Mack PublishingCompany 1990)，及其修订版。

[0197] 一般而言，用于人的施用的免疫缀合物的剂量将根据诸如患者年龄、体重、身高、性别、一般医学病状和先前病史的因素而变化。期望为接受者提供在约1mg/kg至24mg/kg范围内的作为单次静脉输注的免疫缀合物的剂量，但如情况需要也可施用较低或较高的剂量。对于70kg患者1-20mg/kg的剂量例如是70-1,400mg，或对于1.7-m患者是41-824mg/m^2。剂量可在需要时重复，例如每周一次持续4-10周、每周一次持续8周或每周一次持续4周。还

可根据维持治疗的需要以更低的频率给与，诸如每隔一周一次持续若干个月或每月一次或每季度一次持续许多个月。优选的剂量可包括但不限于1mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、4mg/kg、5mg/kg、6mg/kg、7mg/kg、8mg/kg、9mg/kg、10mg/kg、11mg/kg、12mg/kg、13mg/kg、14mg/kg、15mg/kg、16mg/kg、17mg/kg、18mg/kg、19mg/kg、20mg/kg、22mg/kg以及24mg/kg。可使用在1至24mg/kg范围内的任何量。然而，在优选的实施方案中，剂量范围可以是4至16mg/kg、6至12mg/kg或8至10mg/kg。

[0198] 所述剂量优选地多次、每周一次或两次施用。可使用4周、更优选8周、更优选16周或更长的最小剂量方案。施用时间表可包括按选自由以下组成的组的周期每周一次或两次施用：(i)每周；(ii)每隔一周；(iii)治疗一周，随后停药两周、三周或四周；(iv)治疗两周，随后停药一周、两周、三周或四周；(v)治疗三周，然后停药一周、两周、三周、四周或五周；(vi)治疗四周，随后停药一周、两周、三周、四周或五周；(vii)治疗五周，随后停药一周、两周、三周、四周或五周；以及(viii)每月。所述周期可重复4、6、8、10、12、16或20次或更多次。

[0199] 或者，可每2周或3周一次剂量施用免疫缀合物，总共重复至少3次剂量。或者，每周两次，持续4-6周。如果使剂量降至大约200-300mg/m^2(对于1.7-m患者为每剂量340mg，或者对于70kg患者为4.9mg/kg)，那么其可每周施用一次或甚至两次持续4至10周。或者，可减少剂量时程，即每2周或每3周持续2-3个月。然而已经确定，甚至可通过缓慢静脉内输注，根据重复给药循环施用甚至更高的剂量，如12mg/kg每周一次或每2-3周一次。给药时程可任选地以其他时间间隔重复，并且剂量可在对剂量和时程进行适当调整下通过各种胃肠外途径给与。

[0200] 在优选的实施方案中，所述免疫缀合物用于治疗癌症。癌症的实例包括但不限于癌、淋巴瘤、成胶质细胞瘤、黑素瘤、肉瘤和白血病、骨髓瘤或淋巴恶性肿瘤。此类癌症的更特定实例如下所述并且包括：鳞状细胞癌(例如上皮鳞状细胞癌)、尤因氏肉瘤(Ewing sarcoma)、韦尔姆斯氏瘤(Wilms tumor)、星形细胞瘤、肺癌(包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌和肺鳞状癌)、腹膜癌、胃部癌或胃癌(包括胃肠癌)、胰腺癌、多形性成胶质细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝细胞瘤、肝细胞癌、神经内分泌肿瘤、甲状腺髓样癌、甲状腺分化癌、乳腺癌、卵巢癌、结肠癌、直肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、唾液腺癌、肾脏癌或肾癌、前列腺癌、外阴癌、肛门癌、阴茎癌以及头颈癌。术语“癌症”包括原发性恶性细胞或肿瘤(例如细胞未迁移至受试者体内原始恶性肿瘤或肿瘤部位以外的部位的肿瘤)和继发性恶性细胞或肿瘤(例如由转移产生的肿瘤，恶性细胞或肿瘤细胞迁移至与原始肿瘤部位不同的次级部位)。

[0201] 癌症或恶性肿瘤的其他实例包括但不限于：急性儿童成淋巴细胞性白血病、急性成淋巴细胞性白血病、急性淋巴细胞性白血病、急性骨髓性白血病、肾上腺皮质癌、成人(原发性)肝细胞癌、成人(原发性)肝癌、成人急性淋巴细胞性白血病、成人急性骨髓性白血病、成人霍奇金氏淋巴瘤、成人淋巴细胞性淋巴瘤、成人非霍奇金氏淋巴瘤、成人原发性肝癌、成人软组织肉瘤、AIDS相关性淋巴瘤、AIDS相关性恶性疾病、肛门癌、星形细胞瘤、胆管癌、膀胱癌、骨癌、脑干神经胶质瘤、脑瘤、乳癌、肾盂和输尿管癌、中枢神经系统(原发性)淋巴瘤、中枢神经系统淋巴瘤、小脑星形细胞瘤、大脑星形细胞瘤、宫颈癌、儿童(原发性)肝细胞癌、儿童(原发性)肝癌、儿童急性成淋巴细胞性白血病、儿童急性骨髓性白血病、儿童脑干神经胶质瘤、儿童小脑星形细胞瘤、儿童大脑星形细胞瘤、儿童颅外胚细胞瘤、儿童霍奇金

氏病、儿童霍奇金氏淋巴瘤、儿童下丘脑和视通路神经胶质瘤、儿童成淋巴细胞性白血病、儿童成神经管细胞瘤、儿童非霍奇金氏淋巴瘤、儿童松果体和幕上原始神经外胚层瘤、儿童原发性肝癌、儿童横纹肌肉瘤、儿童软组织肉瘤、儿童视通路和下丘脑神经胶质瘤、慢性淋巴细胞性白血病、慢性髓细胞性白血病、结肠癌、皮肤T细胞淋巴瘤、内分泌胰岛细胞癌、子宫内膜癌、室管膜瘤、上皮癌、食道癌、尤因氏肉瘤和相关肿瘤、外分泌胰腺癌、颅外胚细胞瘤、性腺外胚细胞瘤、肝外胆管癌、眼癌、女性乳癌、戈谢氏病(Gaucher's Disease)、胆囊癌、胃部癌、胃肠道良性肿瘤、胃肠道肿瘤、胚细胞瘤、妊娠性滋养层细胞瘤、毛细胞白血病、头颈癌、肝细胞癌、霍奇金氏淋巴瘤、高丙种球蛋白血症、下咽癌、肠癌、眼内黑素瘤、胰岛细胞癌、胰岛细胞胰腺癌、卡波济氏肉瘤(Kaposi's Sarcoma)、肾癌、喉癌、唇口腔癌、肝癌、肺癌、淋巴增生性病症、巨球蛋白血症、男性乳癌、恶性间皮瘤、恶性胸腺瘤、成神经管细胞瘤、黑素瘤、间皮瘤、原发灶隐匿的转移性鳞状颈癌、转移性原发性鳞状颈癌、转移性鳞状颈癌、多发性骨髓瘤、多发性骨髓瘤/浆细胞赘瘤、骨髓发育不良综合症、髓细胞性白血病、骨髓性白血病、骨髓增生性病症、鼻腔和副鼻窦癌、鼻咽癌、成神经细胞瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、非黑素瘤皮肤癌、非小细胞肺癌、原发灶隐匿性转移性鳞状颈癌、口咽癌、骨肉瘤/恶性纤维肉瘤、骨肉瘤/恶性纤维组织细胞瘤、骨肉瘤/骨骼的恶性纤维组织细胞瘤、卵巢上皮癌、卵巢胚细胞瘤、卵巢低恶性潜能肿瘤、胰腺癌、病灶蛋白血症、真性红细胞增多症、副甲状腺癌、阴茎癌、嗜铬细胞瘤、垂体肿瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、原发性肝癌、前列腺癌、直肠癌、肾细胞癌、肾盂和输尿管癌、成视网膜细胞瘤、横纹肌肉瘤、唾液腺癌、肉状瘤病肉瘤、塞扎里综合症(Sezary Syndrome)、皮肤癌、小细胞肺癌、小肠癌、软组织肉瘤、鳞状颈癌、胃癌、幕上原始神经外胚层和松果体瘤、T细胞淋巴瘤、睾丸癌、胸腺瘤、甲状腺癌、肾盂和输尿管的移行细胞癌、移行肾盂和输尿管癌、滋养层细胞瘤、输尿管和肾盂细胞癌、输尿管癌、子宫癌、子宫肉瘤、阴道癌、视通路和下丘脑神经胶质瘤、阴门癌、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、韦尔姆斯氏瘤,以及除赘瘤以外位于上列器官系统中的任何其他过度增生性疾病。

[0202] 本文所述和要求保护的方法和组合物可用于治疗恶性或癌变前疾患,并且用于预防进展为赘生性或恶性状态,包括但不限于上述那些病症。此类用途表明了已知或怀疑先前进展为赘瘤或癌症的疾患,特别是在已发生包括增生、化生或最特别地发育异常的非赘生性细胞生长的情况下(关于此类异常生长疾患的综述,参见Robbins和Angell,Basic Pathology,第2版,W.B.Saunders Co.,Philadelphia,第68-79页(1976))。

[0203] 发育异常通常是癌症的预兆,并且主要可见于上皮中。其是非赘生性细胞生长的最无序形式,涉及个别细胞一致性和细胞结构取向的丧失。在存在慢性刺激或炎症的情况下,发育异常特征性地发生。可治疗的发育异常病症包括但不限于:无汗性外胚层发育不良、前面部发育不良、窒息性胸廓发育不良、心房-手指发育不良、支气管肺发育不良、大脑发育不良、宫颈发育不良、软骨外胚层发育不良、锁骨颅骨发育不良、先天性外胚层发育不良、颅骨干发育不良、颅腕跗发育不良、颅骨干骺端发育不良、牙本质发育异常、骨干结构不良、外胚层发育不良、牙釉质发育不良、脑性眼球发育不全、偏侧骨骺发育不良、多发性骨骺发育不良、点状骨骺发育不良、上皮异常增生、面指生殖器发育异常、家族性颌骨纤维性发育异常、家族性白色皱褶性发育异常、纤维肌肉发育异常、骨纤维性结构不良、旺盛骨性发育不良、遗传性肾视网膜发育不良、有汗性外胚层发育不良、少汗性外胚层发育不良、淋巴细胞减少性胸腺发育不良、乳腺发育不良、下颌骨颜面发育不良、干骺端发育不良、蒙蒂尼

氏发育异常(Mondini dysplasia)、单骨纤维性骨发育不良、粘液上皮发育异常、多发性骨骺发育不良、眼耳脊椎发育不良、眼齿指发育不良、眼椎骨发育不全、牙原性发育不良、眼下颌骨发育不良、根尖周牙骨质结构不良、多骨纤维性结构不良、假性软骨发育不全性脊椎骨骺发育不良、视网膜发育不良、中隔-眼发育不良、脊椎骨骺发育不良和脑室径向发育不良。

[0204] 可治疗的另外赘生前病症包括但不限于良性异常增生性病症(例如良性肿瘤、纤维囊性疾患、组织肥大、肠息肉或腺瘤以及食道异常增生)、粘膜白斑病、角化病、博文氏病(Bowen's disease)、慢性光化性皮炎(Farmer's Skin)、日光性唇炎以及日光性角化病。在优选的实施方案中,本发明的方法用于抑制癌症,特别是上文列出的那些癌症的生长、进展和/或转移。

[0205] 其他过度增生性疾病、病症和/或疾患包括但不限于恶性肿瘤和相关病症的进展和/或转移,如白血病(包括急性白血病;例如急性淋巴细胞性白血病、急性髓细胞性白血病[包括成髓细胞性、早幼粒细胞性、骨髓单核细胞性、单核细胞性和红白血病])和慢性白血病(例如,慢性髓细胞性[[粒细胞性]白血病和慢性淋巴细胞性白血病)、真性红细胞增多症、淋巴瘤(例如,霍奇金氏病和非霍奇金氏病)、多发性骨髓瘤、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、重链病和实体瘤,包括但不限于肉瘤和癌,如纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、骨原性肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤因氏瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、胰腺癌、乳癌、卵巢癌、前列腺癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝细胞瘤、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎癌、韦尔姆斯氏瘤、宫颈癌、睾丸癌、肺癌、小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神经胶质瘤、星形细胞瘤、成神经管细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、成血管细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质瘤、脑脊膜瘤、黑素瘤、成神经细胞瘤以及成视网膜细胞瘤。

[0206] 可用免疫缀合物治疗的自身免疫性疾病可包括急性和慢性免疫血小板减少症、皮肌炎、西登哈姆氏舞蹈病、重症肌无力、系统性红斑狼疮、狼疮肾炎、风湿热、多腺性综合症、大疱性类天包疮、青少年糖尿病、过敏性紫癜、链球菌感染后肾炎、结节性红斑、高安氏动脉炎、ANCA相关血管炎、爱迪生氏病、类风湿性关节炎、多发性硬化症、肉状瘤病、溃疡性结肠炎、多形性红斑、IgA肾病、结节性多动脉炎、强直性脊柱炎、古德帕斯丘综合症、血管闭塞性脉管炎、干燥综合症、原发性胆汁性肝硬化、桥本氏甲状腺炎、甲状腺素症、硬皮病、慢性活动性肝炎、多肌炎/皮肌炎、多软骨炎、寻常型天疱疮、韦格纳氏肉芽肿病、膜性肾病、肌萎缩性侧索硬化、脊髓痨、巨细胞性动脉炎/多肌痛、恶性贫血、急进性肾小球肾炎、银屑病或纤维性肺泡炎。

[0207] 药盒

[0208] 各种实施方案可涉及药盒,所述药盒含有适用于治疗患者的癌症的组分。示例性药盒可含有至少一种如本文所述的药物-缀合的抗体。如果含有用于施用的组分的组合物未配制成经由消化道递送,如通过口服递送,那么可包括能够通过一些其他途径递送药盒部件的装置。用于诸如胃肠外递送的应用的一种类型的装置是注射器,其用于将组合物注射至受试者体内。还可使用吸入装置。

[0209] 药盒部件可包装在一起或分成两个或更多个容器。在一些实施方案中,所述容器可以是含有适用于复原的组合物的无菌冻干制剂的小瓶。药盒也可含有一种或多种适用于

其他试剂的复原和/或稀释的缓冲液。可使用的其他容器包括但不限于小袋、托盘、盒、管等。药盒部件可包装并且无菌保持在容器内。可以包括的另一种组件是提供给药盒使用者的说明书。

[0210] 实施例

[0211] 以下实施例是本发明的实施方案的展示，并且不限制权利要求的范围。

[0212] 实施例1.用IMMU-132(沙西妥珠单抗戈维替康)(一种抗Trop-2-SN-38抗体药物缀合物(ADC))靶向治疗胃肠(GI)癌

[0213] Trop-2是在许多上皮癌中非常普遍的肿瘤相关糖蛋。其升高的表达一直与更具侵袭性的疾病和不良预后有关。结合至Trop-2的细胞外结构域的人源化mAb与SN-38(IMMU-132;平均药物:mAb比率＝7.6)(CPT-11的活性成分)缀合。在人肿瘤异种移植物中的有效活性之后，在患有各种实体瘤(包括胃肠癌)的患者(pt)中开始I/II期试验。

[0214] 方法:患有转移性癌症的患者在用标准疗法治疗失败后招募，以在3周周期的第1天和第8天给与的8.0mg/kg的剂量开始。MTD被确定为12mg/kg;选择8和10mg/kg的剂量水平用于II期测试。

[0215] 结果:六十名患有晚期胃肠癌的患者被招募在I/II期试验中。在29例CRC患者中(9例以10mg/kg治疗，20例以8mg/kg治疗)，1例具有PR(部分应答)并且14例具有SD(稳定疾病)作为RECIST的最佳应答，其中进展时间(TTP)对于PR(-65％)为50+周，并且对于SD患者(5例持续)中值为21+周。十三例CRC患者具有KRAS突变，7例显示SD，中值TTP为19.1+周(范围，12.0-34.0;3例持续)。在所治疗的15例胰腺癌患者中(5例以8mg/kg，7例以10mg/kg，并且3例以12mg/kg)，7例具有SD作为最佳应答，中值TTP为15.0周。在11例食道癌患者中(9例以8mg/kg开始，1例以10mg/kg，并且1例以18mg/kg)，8例进行了CT评估，显示1例PR，TTP为30+周;并且4例具有17.4+、21.9、26.3和29.9周的SD。在5例胃癌患者中(2例以8mg/kg，并且3例以10mg/kg)，仅3例进行了CT评估，都具有SD(1例靶病灶减少19％且持续TTP为29+周)。

[0216] 嗜中性粒细胞减少症是主要的剂量限制性毒性，伴有疲劳、腹泻、恶心和呕吐等作为其他通常报告的毒性。然而，在完整试验中来自75名患者的毒性概况分别显示仅17.3％和2.7％的3级和4级嗜中性粒细胞减少症，以及仅6.7％的3级腹泻。

[0217] 结论:IMMU-132在患有各种复发性转移性胃肠癌的患者中显示高治疗指数。它具有与内化的癌症选择性mAb缀合的中等毒性药物，其可在21天周期内每周一次x2在数月内重复给与。

[0218] 实施例2.抗Trop-2-SN-38抗体-药物缀合物的产生和使用

[0219] 如美国专利号7,238,785中所描述产生人源化RS7(hRS7)抗Trop-2抗体，所述专利的附图和实施例部分以引用的方式并入本文。根据美国专利7,999,083(其实施例10和12以引用的方式并入本文)产生附接至CL2A接头的SN-38并与hRS7(抗Trop-2)、hPAM4(抗MUC5ac)、hA20(抗CD20)或hMN-14(抗CEACAM5)抗体缀合。缀合方案使得每个抗体分子附接约6个SN-38分子的比例。

[0220] 将携带皮下人胰腺或结肠肿瘤异种移植物的免疫受损的无胸腺裸鼠(雌性)用特异性CL2A-SN-38缀合物或对照缀合物进行处理或不进行处理。观察特异性缀合物的治疗功效。图1示出Capan 1胰腺肿瘤模型，其中hRS7(抗Trop-2)、hPAM4(抗MUC-5ac)和hMN-14(抗CEACAM5)抗体的特异性CL2A-SN-38缀合物显示出比对照hA20-CL2A-SN-38缀合物(抗CD20)

和未处理的对照更好的功效。类似地，在人胰腺癌的BXPC3模型中，特异性hRS7-CL2A-SN-38显示出比对照处理更好的治疗功效(图2)。

[0221] 实施例3.抗Trop-2-SN-38 ADC针对各种上皮癌的体内功效

[0222] 摘要

[0223] 此研究的目的是评价SN-38-抗Trop-2(hRS7)ADC针对几种人实体瘤类型的功效，并且评估其在小鼠和猴中的耐受性，后者与人相似，具有hRS7的组织交叉反应性。将两种SN-38衍生物CL2-SN-38和CL2A-SN-38与抗Trop-2-人源化抗体hRS7缀合。将所述免疫缀合物在体外针对稳定性、结合和细胞毒性进行了表征。在表达Trop-2抗原的五种不同的人实体瘤-异种移植物模型中测试功效。在小鼠和食蟹猴中评估毒性。

[0224] 两种SN-38衍生物的hRS7缀合物在药物替代(约6)、细胞结合(K_d约1.2nmol/L)、细胞毒性(IC_{50}约2.2nmol/L)、体外血清稳定性($t/_{1/2}$约20个小时)方面是等效的。将细胞暴露于ADC展示出导致PARP裂解的信号传导途径，但注意到在p53和p21上调中对比游离SN-38的差异。当与非靶向对照ADC相比时，hRS7-SN-38在无毒剂量下在携带Calu-3(P≤0.05)、Capan-1(P<0.018)、BxPC-3(P<0.005)和COLO 205肿瘤(P<0.033)的小鼠中产生显著抗肿瘤作用。小鼠耐受2×12mg/kg的剂量(SN-38当量)，仅具有ALT和AST肝酶水平的短暂升高。输注2×0.96mg/kg的食蟹猴仅表现出血细胞计数的瞬时下降，但重要的是，所述值不会低于正常范围。

[0225] 总之，抗Trop-2 hRS7-CL2A-SN-38 ADC针对一系列人实体瘤类型提供了显著且特异性的抗肿瘤作用。在临床相关剂量下在猴中良好耐受，其中组织Trop-2表达与人相似。

[0226] 引言

[0227] 对实体瘤患者的成功伊立替康治疗受到限制，这在很大程度上是由于CPT-11前药转化为活性SN-38代谢物的转化率低。其他人已经检查了非靶向形式的SN-38，作为绕过这种转化需求并将SN-38被动地递送至肿瘤的手段。将SN-38与人源化抗Trop-2抗体hRS7共价缀合。这种抗体-药物缀合物在一系列皮下人癌症异种移植物模型(包括非小细胞肺癌、胰腺癌、结肠直肠癌和鳞状细胞肺癌)中具有特异性抗肿瘤作用，全部在无毒剂量下(例如，≤3.2mg/kg累积SN-38当量剂量)。Trop-2在许多上皮癌中广泛表达，但也在一些正常组织中表达，并且因此在食蟹猴中进行剂量递增研究以评估这种缀合物的临床安全性。猴耐受24mg SN-38当量/kg，只有轻微的、可逆的毒性。鉴于其肿瘤靶向和安全性概况，hRS7-SN-38在对伊立替康有反应的实体瘤的管理方面提供显著改善。

[0228] 材料和方法

[0229] 细胞系、抗体和化学治疗剂-本研究中使用的所有人癌细胞系均购自美国典型培养物保藏中心。这些包括Calu-3(非小细胞肺癌)、SK-MES-1(鳞状细胞肺癌)、COLO 205(结肠腺癌)、Capan-1和BxPC-3(胰腺癌)和PC-3(前列腺腺癌)。在Immunomedics,Inc.制备人源化RS7IgG和对照人源化抗CD20(hA20 IgG，维妥珠单抗)和抗CD22(hLL2 IgG，依帕珠单抗)抗体。伊立替康(20mg/mL)从Hospira,Inc.获得。

[0230] SN-38免疫缀合物和体外方面-先前已经描述了CL2-SN-38的合成(Moon等人，2008,J Med Chem 51:6916-26)。如所述(Moon等人,2008,J Med Chem 51:6916-26；Govindan等人,2009,Clin Chem Res 15:6052-61)进行其与hRS7 IgG的缀合和血清稳定性。如前述实施例中所述进行CL2A-SN-38(M.W.1480)及其hRS7缀合物的制备，以及稳定性、

结合和细胞毒性研究。

[0231] 体内治疗研究-对于所有动物研究,SN-38免疫缀合物和伊立替康的剂量以SN-38当量显示。基于6的平均SN-38/IgG替代比,至20-g小鼠的500μg ADC的剂量(25mg/kg)含有0.4mg/kg的SN-38。伊立替康剂量同样显示为SN-38当量(即,40mg伊立替康/kg相当于24mg/kg的SN-38)。

[0232] 4至8周龄的NCr雌性无胸腺裸鼠(nu/nu)和10周龄的雄性Swiss-Webster小鼠购自Taconic Farms。由SNBL USA,Ltd在食蟹猴(食蟹猕猴(Macaca fascicularis);2.5-4kg雄性和雌性)中进行耐受性研究。

[0233] 用不同的人癌细胞系皮下植入动物。肿瘤体积(TV)通过使用卡尺在二维空间测量来确定,并且体积定义为:$L\times w^2/2$,其中L是肿瘤的最长尺寸并且w是最短的。当治疗开始时,肿瘤的大小范围在0.10与0.47cm^3之间。每个实验中的处理方案、剂量和动物数目描述于结果中。将冻干的hRS7-CL2A-SN-38和对照ADC重构并根据需要在无菌盐水中稀释。除伊立替康(其静脉内施用)外,所有试剂均腹膜内施用(0.1mL)。给药方案受到之前调查的影响,其中ADC每4天或每周两次给与持续不同时间长度(Moon等人,2008,J Med Chem 51:6916-26;Govindan等人,2009,Clin Chem Res 15:6052-61)。这种给药频率反映了缀合物的体外血清半衰期的考虑,以允许更连续地暴露于ADC。

[0234] 统计数据-生长曲线显示为初始TV随时间推移的变化百分比。肿瘤生长的统计分析是基于曲线下面积(AUC)。通过线性曲线建模获得个体肿瘤生长的概况。f检验用于在生长曲线的统计分析之前确定组之间的方差齐性。双尾t检验用于评估各种处理组与对照之间的统计显著性,除了盐水对照,其中使用单尾t检验(显著性在$P\leq 0.05$)。AUC的统计学比较仅进行直至组内第一只动物由于进展而被安乐死的时间。

[0235] 药代动力学和生物分布-将^{111}In放射性标记的hRS7-CL2A-SN-38和hRS7 IgG注射到携带皮下SK-MES-1肿瘤(约0.3cm^3)的裸鼠中。将一组静脉内注射20μCi(250-μg蛋白质)的^{111}In-hRS7-CL2A-SN-38,而另一组接受20μCi(250-μg蛋白质)的^{111}In-hRS7 IgG。在不同的时间点,将小鼠(每个时间点5只)麻醉,经由心脏内穿刺术放血,且然后实施安乐死。取出肿瘤和各种组织,称重并通过γ闪烁计数以确定每克组织的注射剂量百分比(%ID/g)。第三组在施用^{111}In-hRS7-CL2A-SN-38之前3天注射250μg未标记的hRS7-CL2A-SN-38且同样进行了尸检。双尾t检验用于在使用f检验确定方差齐性之后比较hRS7-CL2A-SN-38和hRS7 IgG摄取。使用WinNonLin软件(ParsightCorp.)进行关于血液清除的药代动力学分析。

[0236] 在Swiss-Webster小鼠和食蟹猴中的耐受性-简言之,将小鼠分成4组,每组在第0天和第3天接受2-mL腹膜内注射乙酸钠缓冲液对照或3种不同剂量的hRS7-CL2A-SN-38(4、8或12mg/kg SN-38),然后进行血液和血清收集,如结果中所述。向食蟹猴(3只雄性和3只雌性;2.5-4.0kg)施用2种不同剂量的hRS7-CL2A-SN-38。结果中描述了被取血以用于评价可能的血液学毒性和血清化学的猴的剂量、时间和数量。

[0237] 结果

[0238] hRS7-CL2A-SN-38的稳定性和效力-使用两种不同的键联来将SN-38缀合至hRS7 IgG(图3A)。第一种称为CL2-SN-38,并且先前已有描述(Moon等人,2008,J Med Chem51:6916-26;Govindan等人,2009,Clin Chem Res 15:6052-61)。使用CL2合成的变化来除去接头内的苯丙氨酸部分来产生CL2A接头。这种变化简化了合成,但不影响缀合结果(例如,

CL2-SN-38和CL2A-SN-38两者均每个IgG分子并入约6个SN-38)。并排比较发现血清稳定性、抗原结合或体外细胞毒性无显著差异。这一结果是令人惊讶的,因为CL2中的苯丙氨酸残基是组织蛋白酶B(一种溶酶体蛋白酶)的设计的裂解位点的一部分。

[0239] 为了确认SN-38接头从CL2至CL2A的变化不会影响体内效力,在携带COLO 205(图3B)或Capan-1肿瘤(图3C)的小鼠中分别使用每周两次×4周的0.4mg或0.2mg/kg SN-38对hRS7-CL2A和hRS7-CL2-SN-38进行了比较,并且在两项研究中起始肿瘤大小均为0.25cm^3。与未处理(在COLO 205模型中对比盐水$AUC_{14天}$P<0.002;在Capan-1模型中对比盐水$AUC_{21天}$P<0.001)和非靶向抗CD20对照ADC,hA20-CL2A-SN-38(在COLO-205模型中$AUC_{14天}$P<0.003;在Capan-1模型中$AUC_{35天}$:P<0.002)的相比,hRS7-CL2A和CL2-SN-38缀合物两者均显著抑制肿瘤生长。在Capan-1模型中研究结束时(第140天),50%的用hRS7-CL2A-SN-38处理的小鼠和40%的hRS7-CL2-SN-38小鼠无肿瘤,而只有20%的hA20-ADC处理的动物没有明显疾病迹象。如图3所示,与CL2相比,CL2A接头产生稍微更高的功效。

[0240] 作用机制-体外细胞毒性研究证明hRS7-CL2A-SN-38针对几种不同的实体瘤系具有在nmol/L范围内的IC_{50}值(表2)。游离SN-38情况下的IC_{50}在所有细胞系中低于缀合物。尽管Trop-2表达与对hRS7-CL2A-SN-38的敏感性之间没有明显相关性,但ADC对比游离SN-38的IC_{50}比率在较高Trop-2表达细胞中较低,最可能反映出当存在更多抗原时内化药物的能力增强。

[0241] 已知SN-38活化细胞中的若干信号传导途径,从而导致细胞凋亡(Cusack等人,2001,Cancer Res 61:3535-40;Liu等人2009,Cancer Lett 274:47-53;Lagadec等人,2008,Br J Cancer 98:335-44)。初始研究在体外检查了参与早期信号传导事件和1个晚期凋亡事件[聚-ADP-核糖聚合酶(PARP)的裂解)]的2种蛋白质($p21^{Waf1/Cip1}$和p53)的表达(未示出)。在BxPC-3中,SN-38导致$p21^{Waf1/Cip1}$表达增加20倍(未示出),而hRS7-CL2A-SN-38仅产生10倍增加(未示出),这一发现与此细胞系中游离SN-38情况下的较高活性一致(表2)。然而,hRS7-CL2A-SN-38使Calu-3中的$p21^{Waf1/Cip1}$表达相对于游离SN-38增加超过2倍(未示出)。

[0242] 在p53表达中观察到hRS7-CL2A-SN-38-与游离SN-38介导的信号传导事件之间的更大差异(未示出)。在BxPC-3和Calu-3中,在游离SN-38情况下p53的上调直到48小时才明显,而hRS7-CL2A-SN-38在24小时内上调p53(未示出)。另外,与SN-38相比,暴露于ADC的细胞中的p53表达在两种细胞系中均更高(未示出)。令人感兴趣的是,尽管hRS7 IgG对$p21^{Waf1/Cip1}$表达没有明显影响,但它确实诱导BxPC-3和Calu-3两者中p53的上调,但仅在暴露48小时后(未示出)。就后来的细胞凋亡事件而言,当与SN-38或缀合物一起孵育时,PARP的裂解在两种细胞系中都是明显的(未示出)。裂解的PARP的存在在BxPC-3中24小时较高(未示出),这与p21的高表达及其较低的IC_{50}相关。与ADC相比,游离SN-38情况下的更高裂解程度与细胞毒性结果一致。

[0243] hRS7-SN-38的功效-由于Trop-2在若干人癌症中广泛表达,因此在若干不同的人癌症模型中进行了研究,所述模型使用hRS7-CL2-SN-38键联开始,但稍后使用了具有CL2A键联的缀合物。与施用等量非靶向hLL2-CL2-SN-38的动物相比,每4天×4给与0.04mg SN-38/kg hRS7-CL2-SN-38的携带Calu-3的裸鼠具有显著改善的反应(相应地TV=0.14±0.22cm^3对比0.80±0.91cm^3;$AUC_{42天}$P<0.026;图4A)。当剂量增加至0.4mg/kg SN-38时,观察

到剂量反应(图4A)。在这种较高剂量水平下,给与特异性hRS7缀合物的所有小鼠在28天内“治愈”,并且在第147天保持无肿瘤直至研究结束,而肿瘤在用不相关的ADC处理的动物中重新生长(特异性对比不相关的$AUC_{98天}$:P=0.05)。在接受hRS7 IgG和SN-38的混合物的小鼠中,到第56天肿瘤进展>4.5倍(TV=1.10±0.88cm^3;对比hRS7-CL2-SN-38 $AUC_{56天}$P<0.006)(图4A)。

[0244] 还在人结肠(COLO 205)和胰腺(Capan-1)肿瘤异种移植物中检查了功效。在携带COLO 205肿瘤的动物中(图4B http://clincancerres.aacrjournals.org/content/17/10/3157.long-F3),与对照抗CD20 ADC(hA20-CL2-SN-38)或hRS7 IgG相比,hRS7-CL2-SN-38(0.4mg/kg,q4dx8)在28天处理期内阻止肿瘤生长,肿瘤显著更小(分别TV=0.16±0.09cm^3、1.19±0.59cm^3和1.77±0.93cm^3;$AUC_{28天}$P<0.016)。

[0245] 表2.在各种实体瘤系中SN-38和hRS7-SN-38的Trop-2表达和体外细胞毒性

	经由 FACS 的 Trop-2 表达			细胞毒性结果				
细胞系	中值荧光(背景)	阳性百分比	SN-38	95% CI	hRS7-SN-38	95% CI	ADC/游离SN-38比率	
[0246]			IC_{50} (nmol/L)	IC_{50} (nmol/L)	IC_{50} (nmol/L)	IC_{50} (nmol/L)	
Calu-3	282.2 (4.7)	99.6%	7.19	5.77–8.95	9.97	8.12-12.25	1.39
COLO 205	141.5 (4.5)	99.5%	1.02	0.66-1.57	1.95	1.26-3.01	1.91
Capan-1	100.0 (5.0)	94.2%	3.50	2.17-5.65	6.99	5.02-9.72	2.00
PC-3	46.2 (5.5)	73.6%	1.86	1.16-2.99	4.24	2.99-6.01	2.28
SK-MES-1	44.0 (3.5)	91.2%	8.61	6.30-11.76	23.14	17.98-29.78	2.69
BxPC-3	26.4 (3.1)	98.3%	1.44	1.04-2.00	4.03	3.25-4.98	2.80

[0247] 伊立替康(24mg SN-38/kg,q2dx5)的MTD在COLO 205细胞中与hRS7-CL2-SN-38一样有效,因为小鼠血清可比人血清更有效地将伊立替康转化为SN-38(Morton等人,2000,Cancer Res 60:4206-10),但伊立替康中的SN-38剂量(2,400μg累积)比在缀合物(总计64μg)情况下高37.5倍。

[0248] 当以等效于hRS7-CL2-SN-38缀合物的SN-38剂量给与时,携带Capan-1的动物(图4C)对单独伊立替康未显示显著反应(例如,在第35天,在给与0.4mg SN-38/kg hRS7-SN-38的动物中平均肿瘤大小是0.04±0.05cm^3,对比在给与0.4mg/kg SN-38的伊立替康处理的动物中1.78±0.62cm^3;$AUC_{第35天}$P<0.001;图4C)。当伊立替康剂量增加10倍至4mg/kg SN-38时,应答得到改善,但仍不如0.4mg/kg SN-38剂量水平的缀合物显著(TV=0.17±0.18cm^3对比1.69±0.47cm^3,$AUC_{第49天}$P<0.001)(图4C)。与伊立替康处理的动物相比,相等剂量的非靶向hA20-CL2-SN-38也具有显著抗肿瘤作用,但特异性hRS7缀合物显著优于不相关的ADC(TV=0.17±0.18cm^3对比0.80±0.68cm^3,$AUC_{第49天}$P<0.018)(图4C)。

[0249] 然后将使用hRS7-CL2A-SN-38 ADC的研究扩展至2种其他人上皮癌模型。在携带BxPC-3人胰腺肿瘤的小鼠中(图4D),与用盐水或等量非靶向hA20-CL2A-SN-38处理的对照小鼠(相应地TV=0.24±0.11cm^3对比1.17±0.45cm^3和1.05±0.73cm^3;$AUC_{第21天}$P<0.001)或以高10倍的SN-38等效剂量给与的伊立替康(相应地TV=0.27±0.18cm^3对比0.90±0.62cm^3;$AUC_{第25天}$P<0.004)(图4D)相比,hRS7-CL2A-SN-38再次显著抑制肿瘤生长。令人感兴趣的是,在用0.4mg/kg的ADC处理的携带SK-MES-1人鳞状细胞肺肿瘤的小鼠中(图4E),肿瘤

生长抑制优于盐水或未缀合的hRS7 IgG(相应地TV＝0.36±0.25cm^3对比1.02±0.70cm^3和1.30±1.08cm^3;$AUC_{28天}$,P<0.043),但非靶向hA20-CL2A-SN-38或伊立替康的MTD提供与特异性hRS7-SN-38缀合物相同的抗肿瘤作用(图5E)。

[0250] 在所有鼠类研究中,hRS7-SN-38 ADC在体重减轻方面良好地耐受(未示出)。

[0251] hRS7-CL2A-SN-38的生物分布-使用相应的^{111}In标记的底物,在携带SK-MES-1人鳞状细胞肺癌异种移植物的小鼠中比较hRS7-CL2A-SN-38或未缀合的hRS7 IgG的生物分布(未示出)。进行药代动力学分析以确定hRS7-CL2A-SN-38相对于未缀合的hRS7的清除率(未示出)。ADC比等量的未缀合的hRS7更快地清除,其中ADC表现出短约40％的半衰期和平均停留时间。尽管如此,这对肿瘤摄取具有最小影响(未示出)。虽然在24小时和48小时时间点存在显著差异,但到72小时(峰值摄取),肿瘤中两种剂的量相似。在正常组织中,肝和脾差异最显著(未示出)。在注射后24小时,在肝脏中hRS7-CL2A-SN-38比hRS7 IgG多＞2倍(未示出)。相反,在脾脏中,在峰值摄取(48小时时间点)处存在比hRS7-CL2A-SN-38多3倍的亲本hRS7 IgG(未示出)。剩余组织中的摄取和清除通常反映血液浓度的差异(未示出)。

[0252] 因为给与治疗的每周两次剂量,所以检查了在注射^{111}In标记的抗体之前3天首先接受0.2mg/kg(250μg蛋白质)预剂量的hRS7 ADC的一组动物中的肿瘤摄取。与未接受预剂量的动物相比,预先给药的小鼠中的^{111}In-hRS7-CL2A-SN-38在每个时间点显著降低(例如,在72小时,预先给药的肿瘤摄取是12.5％±3.8％ID/g,对比在未给与预剂量的动物中25.4％±8.1％ID/g;P＝0.0123;未示出http://clincancerres.aacrjournals.org/content/17/10/3157.long-F4)。预给药对血液清除或组织摄取没有明显影响(未示出)。这些研究表明,在一些肿瘤模型中,特异性抗体的肿瘤增积可通过一个或多个前面的剂量减少,这可能解释了治疗反应的特异性可随着ADC剂量增加而减少的原因以及未指示进一步剂量递增的原因。

[0253] hRS7-CL2A-SN-38在Swiss-Webster小鼠和食蟹猴中的耐受性Swiss-Webster小鼠在3天内耐受2个剂量,4、8和12mg SN-38/kg的hRS7-CL2A-SN-38中的每一个,具有最小的瞬时体重减轻(未示出)。未发生造血毒性,并且血清化学仅揭示升高的天冬氨酸转氨酶(AST,图5A)和丙氨酸转氨酶(ALT,图5B)。在处理后七天,所有3个处理组中的AST均升至正常水平(＞298U/L)(图5A),最大比例的小鼠处于2×8mg/kg组中。然而,到处理后15天,大多数动物都在正常范围内。在处理的7天内ALT水平也高于正常范围(＞77U/L)(图5B)并且到第15天具有正常化的证据。来自所有这些小鼠的肝脏未显示组织损伤的组织学证据(未示出)。就肾功能而言,仅葡萄糖和氯化物水平在处理组中略微升高。在2×8mg/kg下,7只小鼠中的5只具有略微升高的葡萄糖水平(273-320mg/dL的范围,正常上限263mg/dL),其到注射后15天恢复正常。类似地,氯化物水平略有升高,在2个最高剂量组中在116至127mmol/L的范围内(正常范围上限115mmol/L)(在2×8mg/kg组中57％,并且在2×12mg/kg组中100％),并在注射后保持升高至15天。这也可指示胃肠毒性,因为大多数氯化物是通过肠道吸收获得的;然而,在终止时,在所检查的任何器官系统中不存在组织损伤的组织学证据(未示出)。

[0254] 因为小鼠不表达由hRS7鉴定的Trop-2,所以需要更合适的模型来确定hRS7缀合物用于临床用途的潜力。免疫组织学研究揭示人和食蟹猴中的多种组织中的结合(乳腺、眼、胃肠道、肾、肺、卵巢、输卵管、胰腺、甲状旁腺、前列腺、唾液腺、皮肤、胸腺、甲状腺、扁桃体、输尿管、膀胱和子宫;未示出)。基于这种交叉反应性,在猴中进行耐受性研究。

[0255] 接受2×0.96mg SN-38/kg的hRS7-CL2A-SN-38的组在输注后和直到研究结束没有显著临床事件。体重减轻不超过7.3％，并且到第15天恢复至适应重量。在大多数血细胞计数数据中注意到短暂下降(嗜中性粒细胞和血小板数据显示在图5C和图5D中)，但值未下降到正常范围以下。在血清化学中未发现异常值。在第11天(最后一次注射后8天)尸检的动物的组织病理学显示造血器官(胸腺、下颌和肠系膜淋巴结、脾和骨髓)、胃肠器官(胃、十二指肠、空肠、回肠、盲肠、结肠和直肠)、女性生殖器官(卵巢、子宫和阴道)中以及注射部位处的微观变化。这些变化在从最小至中等的范围内，并且在所有组织中在恢复期(第32天)结束时完全逆转，除了在胸腺和胃肠道中之外，其在此后的时间点趋向于完全恢复(未示出)。

[0256] 在缀合物的2×1.92mg SN-38/kg剂量水平下，存在1例因胃肠道并发症和骨髓抑制引起的死亡，并且此组中的其他动物显示出与2×0.96mg/kg组相似但更严重的不良事件(未示出)。这些数据表明剂量限制毒性与伊立替康相同；即肠道和血液学。因此，hRS7-CL2A-SN-38的MTD介于2×0.96与1.92mg SN-38/kg之间，其代表2×0.3至0.6mg/kg SN-38的人等效剂量。

[0257] 论述

[0258] Trop-2是在许多上皮肿瘤(包括肺癌、乳腺癌、结肠直肠癌、胰腺癌、前列腺癌和卵巢癌)上表达的蛋白质，从而使其成为递送细胞毒性剂的潜在重要靶标(Ohmachi等人，2006,Clin Cancer Res 12:3057-63;Fong等人,2008,Br J Cancer 99:1290-95;Cubas等人,2009,Biochim Biophys Acta 1796:309-14)。当与Trop-2结合时，RS7抗体内化(Shih等人,1995,Cancer Res 55:5857s-63s)，其能够直接细胞内递送细胞毒素。

[0259] SN-38是有效的拓扑异构酶-I抑制剂，在几种细胞系中具有在纳摩尔范围内的IC_{50}值。它是用于治疗结肠直肠癌并且还在肺癌、乳腺癌和脑癌中具有活性的前药伊立替康的活性形式。推断呈ADC的形式的直接靶向的SN-38将通过克服后者的低和患者可变的生物转化为活性SN-38而相对于CPT-11显著改善治疗(Mathijssen等人,2001,Clin Cancer Res 7:2182-94)。

[0260] 插入原始CL2衍生物中的Phe-Lys肽允许经由组织蛋白酶B裂解。为了简化合成过程，在CL2A中消除了苯丙氨酸，且因此除去了组织蛋白酶B裂解位点。令人感兴趣的是，与用CL2获得的宽概况相比，这种产物具有更好定义的色谱概况(未示出)，但更重要的是，这种改变对并排测试中缀合物的结合、稳定性或效力没有影响。这些数据表明CL2中的SN-38主要通过在pH敏感的碳酸苄酯键处裂解成SN-38的内酯环而不是组织蛋白酶B裂解位点而从缀合物释放。

[0261] hRS7 ADC针对一系列实体瘤细胞系的体外细胞毒性始终具有在nmol/L范围内的IC_{50}值。然而，暴露于游离SN-38的细胞表现出与ADC相比较低的IC_{50}值。还报告了ENZ-2208(Sapra等人,2008,Clin Cancer Res 14:1888-96;Zhao等人,2008,Bioconjug Chem 19:849-59)和NK012(Koizumi等人,2006,Cancer Res 66:10048-56)的游离与缀合的SN-38之间的这种差异。ENZ-2208利用支化PEG连接每个PEG约3.5至4个SN-38分子，而NK012是含有20重量％SN-38的胶束纳米颗粒。使用我们的ADC，随着Trop-2表达水平在肿瘤细胞中增加，这种差异(即，游离对比缀合的SN-38的效力比)降低，从而表明靶向递送药物的优点。就体外血清稳定性而言，hRS7-SN-38的CL2和CL2A-SN-38形式产生约20个小时的$t_{1/2}$，这与对于ENZ-2208报告的12.3分钟的短$t_{1/2}$形成对比(Zhao等人,2008,Bioconjug Chem 19:849-

59)，但是与24小时后在生理条件下从NK01257％释放SN-38相似(Koizumi等人，2006，Cancer Res 66:10048-56)。

[0262] 用hRS7-SN-38(CL2-SN-38或CL2A-SN-38)处理携带肿瘤的小鼠显著抑制5种不同肿瘤模型中的肿瘤生长。在其中4个中，观察到肿瘤消退，并且在Calu-3的情况下，所有接受最高剂量的hRS7-SN-38的小鼠在研究结束时是无肿瘤的。与人不同，伊立替康通过小鼠中的血浆酯酶非常有效地转化为SN-38，具有大于50％转化率，并且在小鼠中比在人中产生更高的效力(Morton等人，2000，Cancer Res 60:4206-10;Furman等人，1999，J Clin Oncol 17:1815-24)。当伊立替康以高10倍或等效SN-38水平施用时，hRS7-SN-38在控制肿瘤生长方面显著更好。只有当伊立替康以24mg/kg q2dx5(多37.5倍的SN-38)的其MTD施用时，它才与hRS7-SN-38的有效性相当。在患者中，我们期望这种优势更有利于hRS7-CL2A-SN-38，因为伊立替康的生物转化将大大降低。

[0263] 还在一些抗原表达细胞系(如SK-MES-1)中显示，使用抗原结合ADC不能保证比非结合的不相关的缀合物更好的治疗反应。这不是不寻常或出人意料的发现。实际上，当与伊立替康相比时，前面提到的非结合SN-38缀合物增强治疗活性，并且因此预期不相关的IgG-SN-38缀合物具有一些活性。这与肿瘤具有不成熟的渗漏血管的事实有关，所述血管允许大分子比正常组织更好地通过(Jain，1994，Sci Am 271:58-61)。使用我们的缀合物，50％的SN-38将在约13小时内释放，此时pH降低至模拟溶酶体水平的水平(例如，在37℃下pH 5.3；数据未示出)，而在血清的中性pH下，释放速率降低近2倍。如果不相关的缀合物进入酸性肿瘤微环境，则预期局部释放一些SN-38。其他因素，如肿瘤生理学和对药物的先天敏感性，也将在定义这种“基线”活性中发挥作用。然而，只要存在足够的抗原来捕获特异性抗体，具有较长停留时间的特异性缀合物应该具有相对于这种基线反应增强的效力。SK-MES-1模型中的生物分布研究还表明，如果肿瘤抗原由于连续给药而变得饱和，则特异性缀合物的肿瘤摄取减少，这产生类似于用不相关的缀合物发现的治疗结果。

[0264] 尽管我们的ADC与其他SN-38递送剂的已公开报告之间进行直接比较具有挑战性，但可进行一些一般性观察。在我们的治疗研究中，最高个体剂量是0.4mg/kg的SN-38。在Calu-3模型中，在20g小鼠中仅给予4次注射，总累积剂量为1.6mg/kg SN-38或32μg SN-38。使用其10mg/kg×5的MTD进行ENZ-2208的多项研究(Sapra等人，2008，Clin Cancer Res 14:1888-96;Pastorini等人，2010，Clin Cancer Res 16:4809-21)，并且用NK012进行的临床前研究涉及其30mg/kg×3的MTD(Koizumi等人，2006，Cancer Res 66:10048-56)。因此，使用hRS7-SN-38以分别比ENZ-2208和NK012中报告的剂量少30倍和55倍的SN-38当量获得显著抗肿瘤作用。即使hRS7 ADC(0.04mg/kg)少10倍，也观察到显著抗肿瘤作用，而较低剂量的ENZ-2208未呈现，并且当NK012剂量降低4倍至7.5mg/kg时，效力丧失(Koizumi等人，2006，Cancer Res 66:10048-56)。正常小鼠未显示急性毒性，累积剂量超过1周24mg/kg SN-38(1,500mg/kg缀合物)，从而表明MTD更高。因此，用7.5至15倍低量的SN-38当量有效地处理携带肿瘤的动物。

[0265] 生物分布研究揭示hRS7-CL2A-SN-38具有与亲本hRS7 IgG相似的肿瘤摄取，但是在肝脏摄取高2倍的情况下清除显著更快，这可能是由于SN-38的疏水性。随着ADC通过肝脏清除，预期肝脏和胃肠道毒性将是剂量限制性的。尽管小鼠具有肝转氨酶升高的证据，但胃肠道毒性最好是轻微的，只有短暂的体重减轻，并且在组织病理学检查时未注意到异常。令

人感兴趣的是，未注意到血液学毒性。然而，猴显示出与针对伊立替康所预期相同的毒性概况，其中胃肠道和血液学毒性是剂量限制性的。

[0266] 因为由hRS7识别的Trop-2不在小鼠中表达，所以在具有与人类相似的Trop-2组织表达的猴中进行毒性研究是重要的。耐受0.96mg/kg/剂量(约12mg/m^2)的猴具有轻微和可逆的毒性，其外推为约0.3mg/kg/剂量(约11mg/m^2)的人剂量。在NK012的I期临床试验中，实体瘤患者耐受每3周一次28mg/m^2的SN-38，具有4级嗜中性粒细胞减少症作为剂量限制性毒性(DLT;Hamaguchi等人,2010,Clin Cancer Res 16:5058-66)。类似地，使用ENZ-2208的I期临床试验揭示剂量限制性发热性嗜中性粒细胞减少症，建议施用10mg/m^2每3周或16mg/m^2(如果向患者施用G-CSF)Kurzrock等人,AACR-NCI-EORTC International Conference on Molecular Targets and Cancer Therapeutics;2009年11月15-19日;Boston,MA;Poster No C216;Patnaik等人,AACR-NCI-EORTC International Conference on Molecular Targets and Cancer Therapeutics;2009年11月15-19日;Boston,MA;Poster No C221)。因为猴耐受22mg/m^2的累积人等效剂量，所以似乎即使hRS7与许多正常组织结合，但单次hRS7 ADC处理的MTD可能与其他非靶向SN-38剂相似。实际上，抗Trop-2抗体的特异性似乎在定义DLT中不起作用，因为毒性概况与伊立替康相似。更重要的是，如果可如在用刚好0.03mg SN-38当量/kg/剂量的人等效剂量响应的小鼠中那样在人中实现抗肿瘤活性，那么可在临床上实现显著抗肿瘤反应。

[0267] 总之，猴中的毒理学研究与小鼠中的体内人癌症异种移植物模型组合已经表明，这种靶向Trop-2的ADC在若干不同上皮起源的肿瘤中是有效的治疗剂。

[0268] 实施例4.包含hRS7和紫杉醇的抗Trop-2 ADC

[0269] 通过将紫杉醇(TAXOL®)缀合至hRS7抗人Trop-2抗体(hRS7-紫杉醇)来制备新的抗体-药物缀合物(ADC)。最终产物的平均药物与抗体替代比为2.2。使用两种不同的Trop-2阳性细胞系作为靶标在体外对这种ADC进行测试:BxPC-3(人胰腺癌)和MDA-MB-468(人三阴性乳腺癌)。在添加ADC之前一天，从组织培养物收获细胞，并以每孔2000个细胞接种到96孔板中。第二天将细胞暴露于游离紫杉醇($6.1x10^{-11}$至$4x10^{-6}$M)或hRS7-紫杉醇的药物等效物。为了比较，还在$3.84x10^{-12}$至$2.5x10^{-7}$M的范围下测试了hRS7-SN-38和游离SN-38。将板在37℃下孵育96小时。在此孵育期后，将MTS底物添加至所有板，并以半小时间隔读取显色，直至未处理的对照孔具有大约1.0的OD_{492nm}读数。使用Microsoft Excel和Prism软件作为相对于未处理细胞的生长百分比测量生长抑制(非线性回归以产生S形剂量反应曲线，其产生IC_{50}值)。

[0270] hRS7-紫杉醇ADC在MDA-MB-468乳腺细胞系中表现出细胞毒活性(图6)，其中IC_{50}值比hRS7-SN-38高大约4.5倍。游离紫杉醇比游离SN-38更有效(图6)。而游离SN-38的IC_{50}为$1.54x10^{-9}$M，游离紫杉醇的IC_{50}小于$6.1x10^{-11}$M。对于BxPC-3胰腺细胞系获得类似的结果(图7)，其中hRS7-紫杉醇ADC具有比hRS7-SN-38 ADC高大约2.8倍的IC_{50}值。这些结果表明抗Trop-2缀合的紫杉醇的体外功效，IC_{50}值在纳摩尔范围内，类似于hRS7-SN-38 ADC。

[0271] 实施例5.抗Trop-2抗体的细胞结合测定

[0272] 获得针对人Trop-2的两种不同鼠单克隆抗体用于ADC缀合。从滚瓶中生长的杂交瘤(ATCC,HB-187)纯化第一抗体162-46.2。第二抗体MAB650购自R&D Systems(Minneapolis,MN)。对于结合的比较，Trop-2阳性人胃癌NCI-N87用作靶标。在结合测定前

一天，将细胞(1.5x10^5/孔)接种到96孔板中。第二天早上，使用162-46.2、MAB650和鼠RS7(0.03至66nM)生成剂量/反应曲线。将这些第一抗体在4℃下与细胞一起孵育1.5小时。冲洗孔，并且在4℃下将抗小鼠HRP第二抗体添加至所有孔持续1小时。再次洗涤孔，然后添加发光底物。使用Envision板阅读器读取板，并且值被报告为相对发光单位。

[0273] 全部三种抗体具有类似的K_D值，对于RS7为0.57nM，对于162-46.2为0.52nM并且对于MAB650为0.49nM。然而，当比较162-46.2和MAB650与RS7的最大结合(B_{max})时，它们分别减少25％和50％(B_{max}对于RS7为11,250，对于162-46.2为8,471并且对于MAB650为6,018)，从而表明与RS7相比具有不同的结合性质。

[0274] 实施例6.抗Trop-2 ADC(MAB650-SN-38)的细胞毒性

[0275] 用SN-38和MAB650制备新颖的抗Trop-2 ADC，从而产生6.89的平均药物与抗体替代比。使用两种不同的人胰腺癌细胞系(BxPC-3和Capan-1)和人三阴性乳腺癌细胞系(MDA-MB-468)作为靶标进行细胞毒性测定以比较MAB650-SN-38和hRS7-SN-38 ADC。

[0276] 在添加ADC之前一天，从组织培养物收获细胞并接种到96孔板中。在第二天将细胞以3.84x10^{-12}至2.5x10^{-7}M的药物范围暴露于hRS7-SN-38、MAB650-SN-38和游离SN-38。未缀合的MAB650用作与MAB650-SN-38蛋白质等效剂量下的对照。将板在37℃下孵育96小时。在此孵育期后，将MTS底物添加至所有板，并以半小时间隔读取显色直至对于未处理的细胞达到大约1.0的OD_{492nm}。使用Microsoft Excel和Prism软件作为相对于未处理细胞的生长百分比测量生长抑制(非线性回归以产生S形剂量反应曲线，其产生IC_{50}值。

[0277] 如图8所示，hRS7-SN-38和MAB650-SN-38具有相似的生长抑制作用，其中IC_{50}值在低nM范围内，这对于这些细胞系中的SN-38-ADC是典型的。在人Capan-1胰腺癌细胞系中(图8A)，与MAB650-SN-38 ADC的4.1nM和游离SN-38的1.0nM相比，hRS7-SN-38 ADC显示3.5nM的IC_{50}。在人BxPC-3胰腺癌细胞系中(图8B)，与MAB650-SN-38 ADC的3.0nM和游离SN-38的1.0nM相比，hRS7-SN-38 ADC显示2.6nM的IC_{50}。在人NCI-N87胃腺癌细胞系中(图8C)，与MAB650-SN-38 ADC的4.1nM和游离SN-38的4.3nM相比，hRS7-SN-38 ADC显示3.6nM的IC_{50}。

[0278] 总之，在这些体外测定中，两种抗Trop-2抗体hRS7和MAB650的SN-38缀合物显示出针对几种肿瘤细胞系的相同功效，这与游离SN-38的功效相似。因为抗Trop-2抗体的靶向功能在体内将是比在体外更重要的因素，所以数据支持抗Trop-2-SN-38 ADC作为将在体内非常有效的一类，如上述实施例中针对hRS7-SN-38所证明的。

[0279] 实施例7.抗Trop-2 ADC(162-46.2-SN-38)的细胞毒性

[0280] 用SN-38和162-46.2制备新颖的抗Trop-2 ADC，从而产生6.14的药物与抗体替代比。使用两种不同的Trop-2阳性细胞系(BxPC-3人胰腺癌和MDA-MB-468人三阴性乳腺癌)作为靶标进行细胞毒性测定以比较162-46.2-SN-38和hRS7-SN-38 ADC。

[0281] 在添加ADC之前一天，从组织培养物收获细胞，并以每孔2000个细胞接种到96孔板中。在第二天将细胞以3.84x10^{-12}至2.5x10^{-7}M的药物范围暴露于hRS7-SN-38、162-46.2-SN-38或游离SN-38。未缀合的162-46.2和hRS7分别用作与162-46.2-SN-38和hRS7-SN-38相同的蛋白质等效剂量下的对照。将板在37℃下孵育96小时。在此孵育期后，将MTS底物添加至所有板，并以半小时间隔读取显色，直至未处理的对照孔具有大约1.0的OD_{492nm}读数。使用Microsoft Excel和Prism软件作为相对于未处理细胞的生长百分比测量生长抑制(非线性回归以产生S形剂量反应曲线，其产生IC_{50}值)。

[0282] 如图9A和图9B所示，当与hRS7-SN-38相比时，162-46.2-SN-38 ADC具有相似的IC_{50}值。当针对BxPC-3人胰腺癌细胞系进行测试时(图9A)，与162-46.2-SN-38的10.6nM和游离SN-38的1.6nM相比，hRS7-SN-38具有5.8nM的IC_{50}。当针对MDA-MB-468人乳腺癌细胞系进行测试时(图9B)，与162-46.2-SN-38的6.1nM和游离SN-38的0.8nM相比，hRS7-SN-38具有3.9nM的IC_{50}。单独游离抗体对任一Trop-2阳性癌细胞系显示很小的细胞毒性。

[0283] 总之，比较与相同的细胞毒性药物缀合的三种不同抗Trop-2抗体的体外功效，所有三种ADC针对多种Trop-2阳性癌细胞系都表现出等效的细胞毒性作用。这些数据支持并入药物缀合的ADC中的一类抗Trop-2抗体是表达Trop-2的实体瘤的有效抗癌治疗剂。

[0284] 实施例8.使用包含缀合至SN-38的hRS7抗体的IMMU-132抗Trop-2 ADC进行临床试验

[0285] 概述

[0286] 本实施例报告来自I期临床试验和正在进行的IMMU-132的II期扩展的结果，IMMU-132是通过pH敏感接头缀合至SN-38的内化人源化hRS7抗Trop-2抗体的ADC(平均药物-抗体比率＝7.6)。Trop-2是由许多人癌症以高密度(约$1x10^5$)、频率和特异性表达的I型跨膜钙转导蛋白，而正常组织表达有限。携带Capan-1人胰腺肿瘤异种移植物的裸小鼠的临床前研究揭示，IMMU-132能够将比来源于最大耐受的伊立替康疗法多120倍的SN-38递送至肿瘤。

[0287] 本实施例报告了多次先前疗法治疗失败的25名患者的初始I期试验(一些包括拓扑异构酶-I/II抑制性药物)过程期间获得，并且正在进行的II期扩展现在报告69名患者，包括结肠直肠癌(CRC)、小细胞和非小细胞肺癌(分别为SCLC、NSCLC)、三阴性乳腺癌(TNBC)、胰腺癌(PDC)、食道癌和其他癌症。

[0288] 如下文所详细讨论，血清中未检测到Trop-2，但在大部分存档的肿瘤中强烈表达(≥2^+)。在3+3试验设计中，在重复21天周期的第1天和第8天给与IMMU-132，以8mg/kg/剂量开始，然后12和18mg/kg，直到剂量限制性嗜中性粒细胞减少症。为优化最小延迟的累积处理，II期集中于8和10mg/kg(n分别＝30和14)。此时在49名报告相关AE的患者中，28％中出现嗜中性粒细胞减少症≥G3(4％G4)。最初在这些患者中的最常见的非血液毒性是疲劳(55％；≥G3＝9％)、恶心(53％；≥G3＝0％)、痢疾(47％；≥G3＝9％)、脱发(40％)和呕吐(32％；≥G3＝2％)。在6名患者中发现纯合UGT1A1*28/*28，其中2名具有较严重的血液和胃肠毒性。在I期和扩展期中，目前有48名患者(不包括PDC)可根据RECIST/CT评估为最佳反应。七名(15％)患者具有部分应答(PR)，包括CRC患者(N＝1)、TNBC患者(N＝2)、SCLC患者(N＝2)、NSCLC患者(N＝1)和食道癌患者(N＝1)，并且另外27名患者(56％)患有稳定的疾病(SD)，总共38名患者(79％)具有疾病应答；13名CT可评估的PDC患者中的8名(62％)患有SD，在他们最后一次先前治疗中，与8.0周相比，中值进展时间(TTP)为12.7周。剩余48名患者的TTP为12.6+周(范围6.0至51.4周)。

[0289] 血浆CEA和CA19-9与反应相关。尽管给药达数月，但未检测到抗hRS7或抗SN-38抗体。在3天内从血清清除缀合物，符合其中每天释放50％的SN-38的体内动物研究，血清中＞95％的SN-38结合至非葡萄糖醛酸形式的IgG，并且浓度比给与伊立替康的患者中报告的SN-38高100倍。这些结果显示，含有hRS7-SN-38的ADC在转移性实体癌中具有治疗活性，具有可控制的痢疾和嗜中性粒细胞减少。

[0290] 药代动力学

[0291] 将两种ELISA方法用于测量IgG(使用抗hRS7个体基因型抗体捕获)和完整的缀合物(使用抗SN-38 IgG/具有抗hRS7个体基因型抗体的探针捕获)的清除。通过HPLC测量SN-38。总IMMU-132级分(完整的缀合物)的清除比IgG(未示出)更快,从而反映SN-38从缀合物的已知逐渐释放。SN-38(未结合和总体)的HPLC测定显示出血清中＞95％的SN-38结合至IgG。低浓度的SN-38G暗示,结合至IgG的SN-38受到保护,免于葡萄糖醛酸化。缀合物的ELISA和SN-38HPLC的比较揭示二者重叠,从而暗示ELISA是用于监测SN-38清除的替代。

[0292] 给药方案和患者池的总结提供于表3中。

[0293] 表3.临床试验参数

[0294]

给药方案	每周一次持续 2 周，每 21 天施用，持续直至 8 个周期。在初始入选时，如果≥ G2 治疗相关毒性，则推迟和减少计划剂量；方案修改为仅在≥ G3 毒性时剂量推迟和减少。
剂量水平组	8、12、18 mg/kg；随后减少至 10 mg/kg 的中间剂量水平。
组大小	标准期 I [3+3]设计；扩展包括约 15 名选择癌症患者。
DLT	G4 ANC ≥ 7 天；≥G3 任何持续时间的发热性嗜中性粒细胞减少；G4 Plt ≥ 5 天；G4 Hgb；4 级 N/V/D 任何持续时间/G3 N/V/D 持续＞48 小时；G3 输注相关反应；相关的≥G3 非血液毒性。
最大可接受剂量(MAD)	其中≥2/6 患者耐受的最大剂量，第 1 个 21 天周期，有/无推迟或减少或≥ G3 毒性。
患者	转移性结肠直肠癌、胰腺癌、胃癌、食道癌、肺癌(NSCLC、

[0295]

	SCLC)、三阴性乳腺癌(TNBC)、前列腺癌、卵巢癌、肾癌、膀胱癌、头颈癌、肝细胞癌。在转移性癌症的标准治疗方案后难治/复发。先前含伊立替康疗法不是入选必须的。无>5 cm 大面积病灶。 必须是 4 周以上任何大外科手术，以及 2 周以上放疗或化疗方案。不包括吉尔波特症候群或已知的 CNS 转移性疾病。

[0296] 临床试验状态

[0297] 报告了总共69名各种转移性癌症患者(包括25名I期患者),它们具有3次先前疗法的中值。八名患者在CT评估之前具有临床进展和撤除。十三名CT可评估的胰腺癌患者单独报告。PDC患者中的中值TTP(进展时间)是11.9周(2至21.4周的范围),相比之下之前最后治疗的中值TTP为8周。

[0298] 总共48名患有各种癌症的患者具有至少1次CT评估,由此确定最佳应答(图10)和进展时间(TTP;图11)。为了总结最佳应答数据,在8名可评估TNBC(三阴性乳腺癌)患者中,有2例PR(部分应答)、4例SD(稳定疾病)和2例PD(进行性疾病),总计应答[PR+SD]为6/8(75％)。对于SCLC(小细胞肺癌),在4名可评估患者中,有2例PR、0例SD和2例PD,总计应答为2/4(50％)。对于CRC(结肠直肠癌),在18名可评估患者中,有1例PR、11例SD和6例PD,总计应答为12/18(67％)。对于食道癌,在4名可评估患者中,有1例PR、2例SD和1例PD,总计应答为3/4(75％)。对于NSCLC(非小细胞肺癌),在5名可评估患者中,有1例PR、3例SD和1例PD,总计应答为4/5(80％)。在所有治疗的患者内,在48名可评估患者中,有7例PR、27例SD和14例PD,总计应答为34/48(71％)。这些结果证明,抗Trop-2 ADC(hRS7-SN-38)显示出针对一系列广

泛的人患者实体瘤的显著临床功效。

[0299] 所报告的治疗副作用(不良事件)总结于表4中。如从表4的数据显而易见,hRS7-SN-38的治疗功效以ADC的剂量实现,显示可接受的低水平的不利副作用。

[0300] 表4.

[0301]

IMMU-132-01 的相关不良事件列表 标准: 总计≥ 10%或≥ 3 级			
	N = 47 名患者		
	总计	3 级	4 级
疲劳	55%	4 (9%)	0
恶心	53%	0	0
腹泻	47%	4 (9%)	0
嗜中性粒细胞减少症	43%	11 (24%)	2 (4%)
脱发	40%	-	-
呕吐	32%	1 (2%)	0
贫血	13%	2 (4%)	0
味觉障碍	15%	0	0
发热	13%	0	0
腹痛	11%	0	0
低钾血症	11%	1 (2%)	0
WBC 减少	6%	1 (2%)	0
发热性嗜中性粒细胞减少症	6%	1 (2%)	2 (4%)
深静脉血栓形成	2%	1 (2%)	0
按 CTCAE v 4.0 分级			

[0302] 对抗Trop-2 ADC的示例性部分应答通过CT数据(未示出)确认。作为CRC的示例性PR,初诊为CRC的62岁妇女经历初次半结肠切除。四个月后,由于肝脏转移她经历了肝脏切除,并接受7个月的FOLFOX治疗和1个月的5FU。她出现多个病灶,主要位于肝脏中(通过免疫组织分析3+Trop-2)在初始诊断后,以8mg/kg的起始剂量进入hRS7-SN-38试验约1年。在她首次CT评估时,实现PR,靶病灶减少37%(未示出)。患者继续治疗,在10个月治疗后实现最大减少65%(未示出),CEA从781ng/mL减少至26.5ng/mL,之后稍后进展3个月。

[0303] 作为NSCLC的示例性PR,65岁男性被诊断为IIIB级NSCLC(鳞状细胞癌)。碳铂/依托泊苷(3mo)以及7000cGy XRT的初始治疗使得应答持续10mo。然后除经历腰椎板切除术之外,他从Tarceva维持治疗开始,继续直到他被考虑进入IMMU-132试验。他在5个月的Tarceva之后接受第一剂量的IMMU-132,此时右肺出现5.6cm病灶以及大量胸膜腔积液。他在两个月后正好完成第6个剂量,此时首次CT显示主要靶病灶减小至3.2cm(未示出)。

[0304] 作为SCLC的示例性PR,65岁妇女被诊断为低分化SCLC。在2个月之后终止的接受卡铂/依托泊苷(Topo-II抑制剂)后,无应答,然后是2个月之后终止的托泊替康(Topo-I抑制剂),也无应答,她接受1个月后终止的局部XRT(3000cGy)。然而,在接下来一个月内进展继续。患者下个月从IMMU-132开始(12mg/kg;减少至6.8mg/kg;Trop-2表达3+),并且在两个月的IMMU-132之后,靶病灶减少38%,包括主要肺病灶中出现大量减少(未示出)。在接受12个剂量之后,患者进展3个月。

[0305] 这些结果的意义在于,它们显示抗Trop-2 ADC是有效的,即使在多次先前治疗之后失效或进展的患者中也是如此。

[0306] 总之,在所用的剂量下,主要毒性是可控制的嗜中性粒细胞减少症,3级毒性很少。IMMU-132显示了三阴性乳腺癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、结肠直肠癌和食道癌的复发/难治患者中活性(PR和持久性SD)的证据,包括具有拓扑异构酶-I抑制剂治疗的复发既往史的患者。这些结果示出抗Trop-2 ADC在一系列广泛的耐受现有疗法的癌症中的功效。

[0307] 实施例9.双功能SN-38产物与轻度还原的抗体的缀合

[0308] 使用CL2A接头将抗CEACAM5人源化MAb,hMN-14(也称为拉贝珠单抗);抗CD22人源化MAb,hLL2(也称为依帕珠单抗);抗CD20人源化MAb,hA20(也称为维妥珠单抗);抗EGP-1人源化MAb,hRS7和抗粘蛋白人源化MAb,hPAM4(也称为克伐珠单抗)缀合至SN-38。用含有5.4mM EDTA的40mM PBS(pH 7.4)中的以50-70倍摩尔过量使用的二硫苏糖醇(DTT)还原每种抗体,在37℃(浴)下45分钟。通过尺寸排阻色谱法和/或渗滤法纯化还原的产物,并缓冲液交换至pH6.5的合适缓冲液中。通过Ellman测定确定硫醇含量,并且在6.5至8.5SH/IgG范围内。或者,用在5-7范围内的pH的磷酸盐缓冲液中的三(2-羧乙基)膦(TCEP)还原抗体,随后原位缀合。使用7%-15%v/v的DMSO作为共溶剂使还原的MAb与约10至15倍摩尔过量的CL2A-SN-38反应,并在环境温度下孵育20分钟。通过离心SEC纯化缀合物,通过疏水性柱,且最后通过超滤-渗滤。通过366nm处的吸光度测定产物的SN-38并与标准值相关联,而蛋白质浓度由280nm处的吸光度推断,校正在此波长下SN-38吸光度的溢出。以这种方式,确定了SN-38/MAb替代比。将纯化的缀合物作为冻干制剂储存在玻璃小瓶中,在真空下加盖并储存在-20℃的冰箱中。对于这些缀合物获得的SN-38摩尔替代比(MSR)通常在5-7的范围内。

[0309] 实施例10.SCLC中使用抗Trop-2 ADC的组合疗法

[0310] 由于顺铂是在晚期小细胞肺癌(SCLC)中与伊立替康组合使用的主要化学治疗剂之一,因此在携带人SCLC肿瘤(DMS 53)的小鼠中进行了实验,所述实验测试顺铂与IMMU-132的组合。此外,卡铂在这种肿瘤模型中进行了测试,因为它也在临床上用于SCLC中。

[0311] 将雌性C.B.-17 SCID小鼠皮下注射与基质胶1:1混合的由DMS 53储备肿瘤(20%w/v)加从组织培养物收获的细胞(每只小鼠$5x10^6$个细胞)制备的肿瘤悬浮液。一旦肿瘤达到$0.270\pm0.048cm^3$的平均肿瘤体积,就将动物分成9个不同的处理组,每组9只小鼠。三组小鼠接受IMMU-132(500、250或100μg腹膜内),而对照组接受用h679(一种人源化抗组胺-琥珀酰基-甘氨酸IgG)制备的非肿瘤靶向抗体-药物缀合物(h679-SN-38;500μg腹膜内)。全部每周施用两次,持续4周。两组仅接受每周顺铂(5mg/kg腹膜内)或卡铂(50mg/kg腹膜内)的化学疗法,持续4周。两组接受IMMU-132(250μg静脉内每周x4周)加顺铂或卡铂的组合。最终未处理的对照组小鼠接受盐水(100μL腹膜内,每周两次x4周)。测量肿瘤并且小鼠每周称重两次。

[0312] 结果

[0313] 不同组的平均肿瘤体积在图12中示出。与盐水对照动物相比,所有三种剂量的IMMU-132均提供显著抗肿瘤作用($P<0.0161$;AUC单尾t检验)。与所有单一疗法组(包括对照h679-SN-38)相比,使用最高剂量的IMMU-132(500μg)的疗法在携带肿瘤的小鼠中产生显著更大的肿瘤消退($P<0.0032$;AUC双尾t检验)。

[0314] 对于组合组,IMMU-132(250μg)加卡铂(图13)在对照卡铂单一疗法组中的第一只

小鼠在第41天(治疗第14天)达到其肿瘤体积＞1.0cm^{3}的终点时接近显著性(P＝0.0983;AUC双尾t检验)。然而,就绝对平均肿瘤体积而言,在这一天,当与卡铂单一疗法相比时,IMMU-132(250μg)加卡铂的组合具有显著更小的肿瘤(分别0.166±0.019cm^{3}对比0.602±0.224cm^3;P＝0.0004,双尾t检验)。当与仅用IMMU-132(250μg每周两次)处理的小鼠相比时,IMMU-132(每周一次)加卡铂处理的动物在第73天时具有显著更小的肿瘤(比较的最后一天,由于几只小鼠达到终点;分别0.745±0.162cm^{3}对比0.282±0.153cm^3;P＝0.0003,AUC双尾t检验)。

[0315] 当与顺铂单一疗法相比时,用IMMU-132(250μg)和顺铂的组合处理的小鼠(图14)表现出显著肿瘤生长抑制(P＝0.0002,AUC双尾t检验)。当在第73天(比较的最后一天,由于顺铂单一疗法组中的几只小鼠达到终点)比较肿瘤体积时,组合组的肿瘤比顺铂单一疗法组中的那些肿瘤小约6.2倍(分别0.123±0.040cm^{3}对比0.758±0.240cm^3;P<0.0001,双尾t检验)。同样,用IMMU-132(250μg)与顺铂组合的每周时间表处理的小鼠具有比仅用IMMU-132(250μg)处理的动物显著更小的肿瘤,即使在单一疗法组中IMMU-132每周施用两次(P<0.0001,AUC双尾t检验)。最后,IMMU-132加顺铂的组合证明优于所有其他组,包括IMMU-132加卡铂组合和高剂量IMMU-132(500μg)单一疗法处理组(P<0.0066,AUC双尾t检验)。

[0316] IMMU-132加卡铂处理以及IMMU-132加顺铂处理两者均被小鼠良好耐受。这种肿瘤模型的不寻常的方面是观察到携带DMS53肿瘤的小鼠表现出恶病质(图15),其重量从开始平均下降大于15%。例如,在盐水对照小鼠中,当肿瘤负荷从第27天的0.270±0.053cm^{3}增加至第41天的0.683±0.185cm^{3}时,动物的体重下降16.9%±3.4%。然而,随着IMMU-132(500μg)单一疗法或IMMU-132加卡铂或顺铂的组合的抗肿瘤作用变得明显,小鼠再次开始增加体重。例如,在IMMU-132加卡铂组中,小鼠到第38天失去其最大体重(15.3%±5.6%),之后,随着肿瘤消退它们开始恢复这种减轻的体重,其中小鼠到第58天返回至起始肿瘤的100%。在此期间,肿瘤在第27天从0.270±0.050cm^{3}的起始大小消退至0.128±0.0.018cm^3。然而,随着肿瘤再生至比治疗开始时更大的尺寸(第73天为0.282±0.153cm^3),动物再次开始减轻体重。简言之,由于这些疗法使肿瘤负荷减少,恶病质的衰弱作用在这些小鼠中被逆转,从而进一步表明这些组合在这种人SCLC疾病模型中的益处。

[0317] 实施例11.使用抗Trop-2-SN-38 ADC治疗人mSCLC患者

[0318] 概述

[0319] 托泊替康(一种拓扑异构酶I抑制剂)被批准作为对一线含铂方案敏感的患者的二线疗法,但在二十年中没有新疗法被批准用于治疗转移性小细胞肺癌(mSCLC)。在此实施例中,研究了新型抗体-药物缀合物(ADC)沙西妥珠单抗戈维替康,其由靶向Trop-2并含有伊立替康的活性代谢物SN-38(也是拓扑异构酶I抑制剂)的抗体组成。使用2种先前疗法的中值(范围1-7)的患者在21天周期的第1天和第8天接受ADC,其中给与10个剂量的中值(范围,1至63)。主要等级≥3的毒性是可控的嗜中性粒细胞减少症、疲劳和腹泻。尽管多达63次重复剂量,但ADC没有免疫原性。

[0320] 43名可评估患者中的49%具有从基线的肿瘤大小减小;客观应答率(部分应答)是16%,并且稳定疾病在49%的患者中实现。基于意向性治疗(N＝53)分析,中值无进展存活和中值总体存活分别是3.6和7.0个月。这种ADC在对于对一线化学疗法具有化学敏感性或化学耐药性的患者中并且还在二线托泊替康疗法失败的患者中均具有活性。这些数据支持

使用沙西妥珠单抗戈维替康作为晚期mSCLC的新治疗剂。

[0321] 方法

[0322] 患有mSCLC的≥18岁且复发或对用于IV期转移性疾病的至少一种先前标准线治疗难治且具有CT可测量的肿瘤的患者入选。他们被要求具有0或1的东部肿瘤协作组(ECOG)表现状态、足够的骨髓、肝和肾功能以及如在I期试验中描述的其他资格(Starodub等人,2015,Clin Cancer Res 21:3870-8)。先前疗法必须在入选前至少4周完成。

[0323] 对于多种癌症(ClinicalTrials.gov,NCT01631552)进行的这部分篮子试验的总体目标是评价沙西妥珠单抗戈维替康在mSCLC患者中的安全性和抗肿瘤活性。沙西妥珠单抗戈维替康以50mg/h的初始输注速率静脉内施用,在3小时内完成(随后在60-90分钟内完成输注)。任选地开出术前用药(例如,苯海拉明、醋氨酚和地塞米松)以降低输注反应的风险。在21天周期的第1天和第8天给与8或10mg/kg的剂量,偶然延迟(最多2周)。通过用于血细胞减少的支持性造血生长因子疗法、如在方案中规定的剂量延迟和/或修改(例如,先前剂量的25%)或通过标准医学实践来管理毒性。继续治疗直至疾病进展、替代抗癌疗法的开始、不可接受的毒性或撤回同意。

[0324] 53名患者参加mSCLC(30名女性,23名男性,中值年龄63岁(范围,44-82)。从初始诊断至用沙西妥珠单抗戈维替康治疗的中值时间是9.5个月(范围,3至53)。大多数患者接受大量预处理,先前治疗线的中值为2(范围,1至7)。每个人接受顺铂或卡铂加依托泊苷。22名(41%)患者接受过1种先前治疗线,而14名(26%)和17名(32%)分别给与2和≥3种先前化学疗法方案。此外,18名(33%)接受托泊替康和/或伊立替康,9名(16%)接受紫杉烷,并且5名(9%)接受免疫检查点抑制剂治疗,包括纳武单抗(N=4)或阿特珠单抗(N=1)。

[0325] 基于对含铂前线疗法的应答持续时间大于或小于3个月,分别存在27名(51%)和26名(49%)化学敏感性和化学耐药性患者。大多数患者患有广泛疾病,转移至多个器官,包括肺(66%)、肝脏(59%)、淋巴结(76%)、胸部(34%)、肾上腺(25%)、骨(23%)和胸膜(6%)。其他疾病部位包括胰腺(N=4)、脑(N=2)、皮肤(N=2)以及食管壁、卵巢和窦(各1例)。

[0326] 主要终点是具有确认的客观应答的患者的比例,由每个机构的放射学组或签约的局部放射学服务大约每8周评估直至疾病进展。通过实体瘤的应答评价标准,1.1版(RECIST 1.1)评估客观应答(Eisenhauer等人,2009,Eur J Cancer 45:228-47)。部分(PR)或完全应答(CR)需要在初始应答后的4至6周内确认。临床受益率(CBR)被定义为具有客观应答加稳定疾病(SD)≥4个月的那些患者。每3个月监测存活,直至死亡或撤回同意。

[0327] 在定期访问期间或者如果有必要则更频繁地进行安全性评估。在施用沙西妥珠单抗戈维替康之前和当临床上指示时常规检查血细胞计数和血清化学。

[0328] 统计分析-分析中包括的数据来自2013年11月至2016年6月入选的患者,随访至2017年1月31日。不良事件(AE)的频率和严重程度由MedDRA优选项和系统器官类(SOC)版本10定义,严重程度由NCI-CTCAE v4.03评估。评价所有接受沙西妥珠单抗戈维替康的患者的毒性。

[0329] 所述方案提供了对接受≥2个剂量(1个周期)并且具有其初始8周CT评估的患者确定客观应答率(ORR)。应答持续时间根据RECIST 1.1标准定义,其中客观应答从首次应答证据直到进展时间标记,而稳定疾病持续时间从治疗开始直到进展标记。从治疗开始直到确

定进展的客观评估(PFS)或死亡(OS)来定义PFS和OS。使用MedCalc统计软件,版本16.4.3(Ostend,Belgium),通过卡普兰-迈耶方法估计应答持续时间、PFS和OS,具有95%置信区间(CI)。

[0330] 沙西妥珠单抗戈维替康和组分的肿瘤Trop-2免疫组织化学和免疫原性-通过IHC染色Trop-2的存档肿瘤标本并如先前报告进行解释(Starodub等人,2015,Clin Cancer Res 21:3870-8)。阳性需要至少10%的肿瘤细胞被染色,强度评分为1+(弱)、2+(中等)和3+(强)。通过赞助者进行的酶联免疫吸附测定,在基线时且然后在每个偶数周期之前采集的血清样品中监测对沙西妥珠单抗戈维替康、IgG抗体和SN-38的抗体应答(Starodub等人,2015,Clin Cancer Res 21:3870-8)..。ADC和IgG的检测灵敏度是50ng/mL,并且抗SN-38抗体的检测灵敏度是170ng/mL。

[0331] 表5.所有患者(N=53)的基线人口统计学和疾病特征

[0332]

年龄	岁(中值; 范围)	63 (44 - 82)
性别, N (%)	女性	30 (56)
	男性	23 (44)
种族, N (%)	白种人	47(88)
	黑人	3 (6)
	其他	3 (6)
ECOG, N (%)	0	6 (11)
	1	47(89)
转移部位, N (%)	肺	35 (66)
	肝脏	18 (59)
	淋巴结	40 (76)
	胸部	18 (34)
	肾上腺	13 (25)
	骨	12 (23)
	胸腔积液	3 (5)
	胰腺	4 (7)
	骨盆	2 (3)
	脑	2 (3)
	皮肤	2 (3)
	其他	3 (5)
先前治疗线	1	22 (41)
N (%)	2	14 (26)
	≥3	17 (32)
对 1 线化学疗法的敏感性, N (%)	敏感	27 (51)
	耐药	26 (49)
先前疗法, N (%)	铂和依托泊苷	53 (100)
	托泊替康和/或伊立替康	18 (33)
	紫杉烷	9 (16)
	检查点抑制剂(CPI)	5 (9)

[0333]

[0334] 结果

[0335] 患者-从2013年11月至2016年6月,53名患者参加mSCLC(30名女性,23名男性,中值

年龄63岁(范围44-82)(表5)。从初始诊断至用沙西妥珠单抗戈维替康治疗的中值时间是9.5个月(范围,3至53)。大多数患者接受大量预处理,先前治疗线的中值为2(范围,1至7)。每个人接受顺铂或卡铂加依托泊苷。22名(41%)患者接受过1种先前治疗线,而14名(26%)和17名(32%)分别给与2和≥3种先前化学疗法方案。此外,18名(33%)接受托泊替康和/或伊立替康,9名(16%)接受紫杉烷,并且5名(9%)接受免疫检查点抑制剂治疗,包括纳武单抗(N=4)或阿特珠单抗(N=1)。基于对含铂前线疗法的应答持续时间大于或小于3个月,分别存在27名(51%)和26名(49%)化学敏感性和化学耐药性患者。大多数患者患有广泛疾病,转移至多个器官,包括肺(66%)、肝脏(59%)、淋巴结(76%)、胸部(34%)、肾上腺(25%)、骨(23%)和胸膜(6%)(表5)。其他疾病部位包括胰腺(N=4)、脑(N=2)、皮肤(N=2)以及食管壁、卵巢和窦(各1例)。

[0336] 治疗暴露、安全性和耐受性-在入选的53名患者中,2016年5月首次治疗的两名患者在2017年1月31日的截止日期继续沙西妥珠单抗戈维替康疗法。所有其他患者已停止治疗,否则正在监测存活。已经施用了超过590个剂量(超过295个周期),每位患者的中值为10个剂量(范围,1-63)。没有报告输注相关反应。

[0337] 15名患者的初始剂量以8mg/kg的起始剂量给与;10mg/kg是接下来的38名患者的起始剂量。在2个剂量组之间,25名患者接受≥10个剂量(≥5个循环),并且2名患者接受62和63个剂量(>30个周期)。中值治疗持续时间是2.5个月(范围,1至23)。嗜中性粒细胞减少症(≥2级)是剂量减少的唯一指征,并且在中值为2.5个剂量(范围,1至9)后,在10mg/kg剂量水平的29%(11/38)患者中记录。以8mg/kg治疗的15名患者中的2名(13%)具有减少,一名在2个剂量后,并且另一名在41个剂量后(20个周期)。一旦减少,另外的减少是不常见的。未观察到治疗相关的死亡。

[0338] 在此试验中,10名患者在第一次应答评估之前退出;四名接受1个剂量,五名接受2个剂量,并且另一名接受4个剂量。在接受1或2个剂量后,3名患者没有资格进行应答评估,因为一名患者混合了SCLC和NSCLC的组织学,并且另外2名患者在接受第一剂量的沙西妥珠单抗戈维替康后被诊断为患有试验前脑和/或脊髓转移。根据方案指南,在一个剂量后报告CTCAE 3级不良事件(嗜中性粒细胞减少症和疲劳)并且未及时恢复以进行第二个剂量的两名患者中止。4名患者在2个剂量后退出研究,2名撤回同意并且2名因2级疲劳而退出。另外一名患者在4次治疗后离开了研究,因为同时存在多种合并症,在第一次应答评估之前突然死亡。

[0339] 在接受至少一个剂量的沙西妥珠单抗戈维替康的53名患者中最常报告的AE是恶心、腹泻、疲劳、脱发、嗜中性粒细胞减少症、呕吐和贫血(表6)。34%(18/53)的患者中发生3或4级嗜中性粒细胞减少症,并且仅1名患者患有发热性嗜中性粒细胞减少症。其他3级或4级不良事件很少,并且包括疲劳(13%)、腹泻(9%)、贫血(8%)、碱性磷酸酶增加(8%)和低钠血症(8%)。虽然在8mg/kg剂量组中需要减少剂量的患者较少(13%对比10mg/kg中的28%),但10mg/kg剂量水平同样耐受良好,其中在少数患者中进行剂量调整和/或生长因子支持。

[0340] 表6.不论因果关系,在>15%(所有等级)或≥2%(≥3级)的患者中(按所有等级排序)发生的不良事件的发生频率(N=53)。

[0341]

	所有等级		3级和4级	
不良事件(N=53)	N	%	N	%
腹泻	28	52.8	5	9.4
恶心	27	50.9	-	-
疲劳	25	47.2	7	13.2
嗜中性粒细胞减少症	23	43.4	18	34.0
呕吐	18	34.0	-	-
腹痛	16	30.2	-	-
厌食症	15	28.3	-	-
贫血	14	26.4	3	5.7
脱发	12	22.6	-	-
便秘	11	20.8	-	-
低镁血症	10	18.9	-	-
脱水	9	17.0	-	-
呼吸困难	9	17.0	-	-
咳嗽	8	15.1	-	-
低氧	3	5.7	2	3.8
发热性嗜中性粒细胞减少症	1	1.9	1	1.9

[0342] 功效-如所描述的,在入选的53名mNSCLC患者中,10名患者在首次CT应答评估之前中止,留下43名患者在接受至少两个剂量的沙西妥珠单抗戈维替康和至少一次随访扫描后进行方案需要的客观应答评估。图16提供应答的一系列图形表示,包括43名患者的靶病灶的直径总和的最佳百分比变化的瀑布图(图16A)、示出实现PR或SD状态的那些患者的应答持续时间的图(图16B)以及跟踪具有PR和SD的患者随时间推移的应答变化的曲线图(图16C)。

[0343] 43名CT可评估的患者中的21名(49%)经历了从基线的肿瘤尺寸的减小(图16A)。7名患者发生确认的部分应答(≥30%减小),产生16%的ORR(表7)。这些患者的中值应答时间为2.0个月(范围,1.8至3.6个月),卡普兰-迈耶估计的中值应答持续时间为5.7个月(95%CI:3.6,19.9)。七名应答者中的两名在最后一次随访中持续应答(即患者存活、无疾病进展并且未开始替代抗癌治疗),从治疗开始一名为7.2+个月并且另一名为8.7+个月(图1B,图1C)。

[0344] 表7.SCLC患者中沙西妥珠单抗戈维替康(IMMU-132)的应答总结

[0345]

最佳总体应答，N (%)	
进行应答评估的总数	43
PR (确认的)	7 (16%)
PRu (未确认的；伴随>30%缩小的 SD 作为最佳应答)	6 (14%)
SD	15 (35%)
PD	15 (35%)
临床受益率(PR+SD ≥4 个月) N (%)	17/43 (40%)
确认的客观应答的持续时间，月数中值(95% CI)	5.7 (3.6，19.9)
无进展存活，月(N = 53)，中值(95% CI)	3.6 (2.0，4.3)
总体存活，月(N = 53)，中值(95% CI)	7.0 (5.5，8.3)
对 1 线敏感的患者(N = 24)中的 IMMU-132 应答评估	
PFS (中值月数；95% CI)	3.8 (2.8，6.0)
OS (中值月数；95% CI)	8.3 (7.0，13.2)
临床受益率(PR+SD ≥4 个月) N (%)	12/24 (50%)
对 1 线耐药性的患者(N = 19)中的 IMMU-132 应答评估	
PFS (中值月数；95% CI)	3.6 (1.8，3.8)
OS (中值月数；95% CI)	6.2 (4.0，10.5)
临床受益率(PR+SD ≥4 个月) N (%)	5/19 (26%)
接受 IMMU-132 作为二线的患者(N = 19)	
PFS，中值月数(95% CI)	
OS (中值月数；95% CI)	3.6 (2.0，5.3)
临床受益率(PR+SD ≥4 个月) N (%)	8.1 (7.5，10.5)
接受 IMMU-132 作为≥3 线的患者(N = 24)	7/19 (37%)
PFS，中值月数(95% CI)	
OS (中值月数；95% CI)	3.7 (1.8，5.5)
临床受益率(PR+SD ≥4 个月) N (%)	7.0 (6.2，20.9)
作为≥3 线给与的 IMMU-132 以及	9/24 (38%)
先前托泊替康/伊立替康(N = 15)	
PFS，中值月数(95% CI)	3.6 (3.3，5.5)
OS (中值月数；95% CI)	8.8 (6.2，20.9)
临床受益率(PR+SD ≥4 个月) N (%)	6/15 (40%)
无先前托泊替康/伊立替康(N = 9)	
PFS，中值月数(95% CI)	3.7 (1.7，4.3)
OS (中值月数；95% CI)	5.5 (3.2，8.3)
临床受益率(PR+SD ≥4 个月) N (%)	3/9 (33%)

[0346] 在21名患者(49％)中确定稳定疾病(SD)，并且包括最初具有＞30％肿瘤减小且在随后的确认性CT时未维持的6名(14％)(未确认的PR或PRu)，以及3名具有≥20％肿瘤减小的患者。值得注意的是，10名患者的SD为≥4个月(卡普兰-迈耶导出的中值＝5.6个月，95％CI：5.2，9.7)，其与确认的PR组的中值PFS无显著差异(7.9个月，95％CI：7.6，21.9；P＝0.1620)，并且临床受益率(CBR：PR+SD≥4个月)为40％(17/43)。实际上，甚至这10名SD患者的OS与7名确认的PR患者没有显著差异(分别8.3个月，95％CI 7.5，22.4个月对比9.2个月，95％CI：6.2，20.9；P＝0.5599)。这表明SD维持适当的持续时间(≥4个月)应该是目标终点。

在意向性治疗(ITT)基础上(N＝53),中值PFS为3.6个月(95％CI:2.0,4.3)(图17(A)),而中值OS为7.0个月(95％CI:5.5,8.3),17名患者存活并且5名患者失去随访(1名1.8个月后,1名5个月后,并且3名11.4-12.8个月后)(图17(B))。

[0347] 具有客观应答评估的43名患者中的13名以8mg/kg进行治疗,其中一名确认PR(8％),一名未确认PR,以及三名SD。在10mg/kg组(N＝30)中,6名患者具有确认的PR(20％),并且12名具有SD,包括5名一次CT显示减小＞30％(PRu)。CBR为47％(14/30),从而表明10mg/kg的起始剂量提供更好的总体应答。

[0348] 将具有应答评估的24名患者分类为对基于铂的化学疗法的一线敏感(表7)。4名(17％)实现确认的PR,并且9名具有SD,包括4名单次扫描显示＞30％肿瘤减小(PRu)。19名患者具有耐药性,其中3名(16％)具有确认的PR,并且6名具有SD,包括2名具有PRu。化学敏感组和化学耐药组的中值PFS分别为3.8个月(95％CI:2.8,6.0)和3.6个月(95％CI:1.8,3.8),而中位OS分别为8.3个月(95％CI:7.0,13.2)和6.2个月(95％CI:4.0,10.5)(表7)。在化学敏感组与化学耐药组之间未发现PFS或OS的显著差异(分别P＝0.3981和P＝0.3100)。

[0349] 43名患者中的19名在二线环境中接受了沙西妥珠单抗戈维替康,并且3/19(16％)具有PR和7名SD作为最佳应答(后者中的两名具有一次＞30％肿瘤缩小)。在这些患者中观察到的应答与给与沙西妥珠单抗戈维替康作为其三线或更高治疗线(N＝24)的患者相同,其中4名确认PR(16％)和8名SD,包括4名SD患者在一次CT时具有＞30％肿瘤缩小。未发现PFS或OS的持续时间的显著差异(分别P＝0.9538和P＝0.6853)。应答分析总结在表7中。

[0350] 在接受免疫检查点抑制剂(CPI)的先前治疗的五名患者中,一名患者经历未确认的PR(在第一次评估时缩小54％,未经另外治疗或评估而撤回同意);两名实现SD,其中一名具有17％肿瘤缩小持续8.7个月并且另一名肿瘤大小没有变化持续3.7个月;一名患有进展性疾病,而第五名患者在一个周期的沙西妥珠单抗戈维替康后撤回同意。所有CPI治疗的患者在接受沙西妥珠单抗戈维替康之前未能对CPI做出应答或进展,从而表明患者在接受CPI治疗后可对IMMU-132有反应。

[0351] 在接受沙西妥珠单抗戈维替康作为三线或稍后线治疗的24名患者中,15名先前已接受托泊替康和/或伊立替康,而9名患者从未接受过这些剂。这两组的客观应答相似,PFS无显著差异(3.8对比3.7个月;P＝0.7341)。然而,接受先前托泊替康疗法的用沙西妥珠单抗戈维替康治疗的那些患者具有比未接受先前托泊替康疗法的那些患者显著更长的OS(8.8个月,95％CI:6.2,20.9对比5.5个月,95％CI:3.2,8.3;P＝0.0357)。此组中更长的OS可能反映了对铂敏感的患者中托泊替康的已知活性,并且因此可能具有更好的长期结果。

[0352] 在一线卡铂加依托泊苷疗法复发后给与沙西妥珠单抗戈维替康的患者示于图18中。具有相当大的肿瘤减小的另一个实施例在图19中示出。

[0353] 肿瘤标本的免疫组织化学(IHC)染色-从29名患者获得存档肿瘤标本,但是4名不足以进行审查,留下25例可评估的肿瘤,其中92％为阳性,其中2例(8％)具有强染色(3+)并且十三例(52％)中度(2+)染色。这些患者中的23名进行了客观应答评估。此组中有5名确认PR和2名未确认的PR;五名具有2+染色,而另外两名是1+(未示出),从而表明更高的表达提供了更好的应答。然而,针对IHC评分的PFS和OS值的评估显示没有明显的趋势(未示出),并且对于IHC评分为组合的0和1+的患者(N＝10)对比组合的2+和3+的患者(N＝13)的PFS和OS的卡普兰-迈耶估计指示基于IHC评分没有显著差异(PFS,P＝0.2661;OS,P＝0.7186)(未示

出)。

[0354] ADC、SN-38或hRS7抗体的免疫原性-在维持治疗甚至长达22个月的患者中未检测到针对沙西妥珠单抗戈维替康、所述抗体或SN-38的中和抗体。

[0355] 论述

[0356] SCLC对前线化学疗法复发继续分为两类,即在第一次基于铂的疗法的三个月内发生的耐药性复发以及在治疗后至少3个月后发生的敏感性复发(O'Brien等人,2006,J Clin Oncol 24:5441-7;Perez-Soler等人,1996,J Clin Oncol 14:2785-90)。虽然关于复发性SCLC的最佳管理仍存在一些模糊性,但托泊替康(一种类似于此处研究的ADC中使用的SN-38的拓扑异构酶-I抑制剂)是唯一被批准用于化学敏感性复发的产品,得到了众多试验的支持(O'Brien等人,2006,J Clin Oncol 24:5441-7;Horita等人,2015,Sci Rep 5:15437)。然而,托泊替康的功效和不良事件在先前的研究中有很大差异,如在14篇文章中报告的超过一千名患者的荟萃分析所证明的,托泊替康在化疗耐药性前线患者中的客观应答率为5%,而在化学敏感性患者中的客观应答率为17%(Horita等人,2015,Sci Rep 5:15437)。69%、1%和24%的患者分别有≥3级嗜中性粒细胞减少症、血小板减少症和贫血症,并且大约2%的患者死于这种化学疗法(Horita等人,2015,Sci Rep 5:15437)。因此,托泊替康在对基于铂的化学疗法表现出敏感性后复发的患者中在这种二线环境中显示出一些前景,但具有相当大的血液学毒性。然而,Lara等人(2015,J Thorac Oncol 10:110-5)最近甚至对这一结论提出了挑战,他断言铂敏感性与托泊替康治疗后改善的PFS和OS不密切相关,这是其目前批准的适应症。

[0357] 在这种情况下,此处报告的结果是,在中值为2(范围,1至7)的先前疗法后在延长的晚期疾病患者(IV期)中使用沙西妥珠单抗戈维替康是有希望的。根据RECIST 1.1,49%的患者显示肿瘤测量值从基线减小,ORR为16%并且中值应答持续时间为5.7个月(95%CI:3.6,19.9)。在35%的患者中发现稳定疾病,其中14%的这些SD患者具有>30%的肿瘤缩小作为最佳应答,尽管在第二次扫描中未维持。≥4个月的临床受益率为40%。中值PFS和OS分别为3.6和7.0个月。令人感兴趣的是,10名SD患者的中值OS为8.3个月(95%CI:7.5,22.4),这与PR患者的中值OS为9.2个月(95%CI:6.2,20.9)无统计学差异(P=0.5599)。在接受10mg/kg作为其起始剂量的组(N=30)中,在6名(20%)中存在确认的客观应答,另外5名患者单次CT显示≥30%肿瘤减小(PRu)。此外,此组在10mg/kg剂量下的临床受益率为47%。这支持10mg/kg的优选剂量。还值得注意的是,基于肿瘤Trop-2的免疫组织化学染色需要的患者选择的缺乏,尽管有人提出强染色与更好的应答相关,但是在IHC评分方面未发现PFS或OS的显著差异。

[0358] 如所提及,PFS和OS在SD>4个月或PR的患者之间没有显著差异。在大多数ORR评估中,未考虑具有未确认的PR(即,在一次CT时>30%肿瘤减小)或具有SD的患者。然而,在此的结果指示具有确认的PR或SD持续超过4个月的患者之间的应答持续时间没有差异(图16B)。实际上,动态追踪个体患者的PR或SD应答(特别是当SD持续≥4个月时,这是确认PR的类似时间范围)表明两个组通过保持低于基线肿瘤尺寸持续数月的临床受益(图16C)。尽管具有确认PR的患者的PFS趋势比SD持续≥4个月的患者组更长(P=0.1620),但这两组的OS无显著差异(P=0.5599)。因此,虽然这种初始分析中的患者数量相对较少,但数据表明,在实现适当的持续时间时,应更多地考虑将疾病稳定作为临床活动性的重要指标,类似于接

受免疫检查点抑制剂的患者的随访。

[0359] 基于先前化学敏感性(N＝24)或化学耐药性(N＝19)评价患者显示与沙西妥珠单抗戈维替康治疗无应答差异(表7)。与化疗耐药组的PFS和OS分别为3.6个月和6.2个月相比,在一线中化学敏感的患者的PFS和OS结果为3.8和8.3个月。没有统计学差异,似乎沙西妥珠单抗戈维替康可在二线或稍后线疗法中施用至患者,而不管患者对一线化学疗法是化学敏感的还是化学耐药的。这与托泊替康不同,托泊替康仅在那些对一线顺铂和依托泊苷化学疗法显示≥3个月应答的SCLC患者中指示((O'Brien等人,2006,J Clin Oncol 24:5441-7;Perez-Soler等人,1996,J Clin Oncol 14:2785-90)。在Perez-Solar等人(1996,J Clin Oncol 14:2785-90)研究的28名患者中,11％具有PR,中值存活期为5个月并且一年存活率为3.5％。

[0360] 尽管托泊替康和SN-38两者均是DNA拓扑异构酶I酶的抑制剂,当通过使DNA复合物稳定来合成DNA时,DNA拓扑异构酶I酶负责放松超螺旋DNA螺旋,从而导致单链DNA断裂的累积(Takimoto&Arbuck,1966,Camptothecins.于:Chabner&Long(编著).Cancer Chemotherapy and Biotherapy.第二版Philadelphia:Lippincott-Raven;第463-84页中),但沙西妥珠单抗戈维替康在托泊替康治疗后复发的患者中显示出活性。因此,托泊替康耐药或复发可能不是施用沙西妥珠单抗戈维替康的禁忌症,并且由于在对顺铂和依托泊苷具有化学耐药性的患者中具有相似的活性而可在患有转移性SCLC的患者中具有作为二线治疗剂的特殊价值,不管化学敏感性状态。

[0361] 在二线环境中批准托泊替康后的二十年中,没有新的剂在二线或后期治疗中被许可用于转移性SCLC治疗。然而,T细胞检查点受体抑制剂程序性细胞死亡蛋白(PD-1)和细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(CTLA-4)最近存在进展(Antonia等人,2016,Lancet Oncol 17:883-95)。这些作者在患有复发性SCLC的患者中进行了有或无CTLA-4抗体伊匹单抗的纳武单抗的I-II期试验。单独纳武单抗实现10％应答率,而组合具有19％至23％的应答率和32％的疾病控制率(Antonia等人,2016,Lancet Oncol 17:883-95)。然而,在SCLC中有或无化学疗法的伊匹单抗的最近研究未能证实这些结果(Reck等人,2016,J Clin Oncol 34:3740-48)。由于观察到沙西妥珠单抗戈维替康可能在使用免疫检查点抑制剂的治疗失败的患者中具有活性,所以正在进一步研究这一点,特别是因为有证据显示在患有其他癌症类型的患者中在用免疫检查点抑制剂治疗后的此类应答(Bardia等人,2017,J Clin Oncol 35:2141-48;Faltas等人,2016,Clin Genitourin Cancer 14:e75-9;Heist等人,2017,J Clin Oncol 35:2790-97;Tagawa等人,2017,J Clin Oncol 35:abstract 327)。

[0362] 尽管最近在免疫疗法和SCLC的其他新颖靶标的鉴定方面取得了进展(Rudin等人,2017,Lancet Oncol 18:42-51),但这仍然是致命的疾病,尤其是在对一线疗法具有化学耐药性的群体中。在大量预治疗的晚期、复发性、IV期SCLC患者中的沙西妥珠单抗戈维替康的当前结果表明,这种ADC在托泊替康之前或之后在化学敏感性和化学耐药性SCLC患者的治疗中均具有用途。

[0363] ***

[0364] 本领域的技术人员将显而易见的是,可对本发明的产物、组合物、方法和工序进行各种修改和变型。因此,本发明旨在涵盖此类修改和变型,前提条件是它们在所附权利要求书的范围及其等同形式内。

序列表

<110> 免疫医学公司(IMMUNOMEDICS, INC.)

<120> 用靶向 TROP-2 的拓扑异构酶-I 抑制性抗体-药物缀合物(ADC)治疗小细胞肺癌(SCLC)

<130> IMM370WO1

<140>
<141>

<150> 15/820,708
<151> 2017-11-22

<150> 62/463,316
<151> 2017-02-24

<160> 9

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0001]

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 1
Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Ala Val Ala
1 5 10

<210> 2
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 2
Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr
1 5

<210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 3
Gln Gln His Tyr Ile Thr Pro Leu Thr
1 5

<210> 4
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 4
Asn Tyr Gly Met Asn
1 5

<210> 5
<211> 17
<212> PRT
[0002] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 5
Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Thr Asp Asp Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 6
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 6
Gly Gly Phe Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 7
<211> 330
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 7

```
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1               5                  10                  15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
            20                  25                  30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
        35                  40                  45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
    50                  55                  60
```

[0003]

```
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65                  70                  75                  80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
                85                  90                  95

Lys Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
            100                 105                 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
        115                 120                 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
    130                 135                 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145                 150                 155                 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
```

165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

[0004]

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 8
<211> 330
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 8

```
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1               5                  10                  15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
            20                  25                  30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
        35                  40                  45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
    50                  55                  60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65                  70                  75                  80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
                85                  90                  95
```

[0005]

```
Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
            100                 105                 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
        115                 120                 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
    130                 135                 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145                 150                 155                 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
                165                 170                 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
            180                 185                 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
        195                 200                 205
```

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
[0006] 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 9
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 9
Ala Leu Ala Leu
1

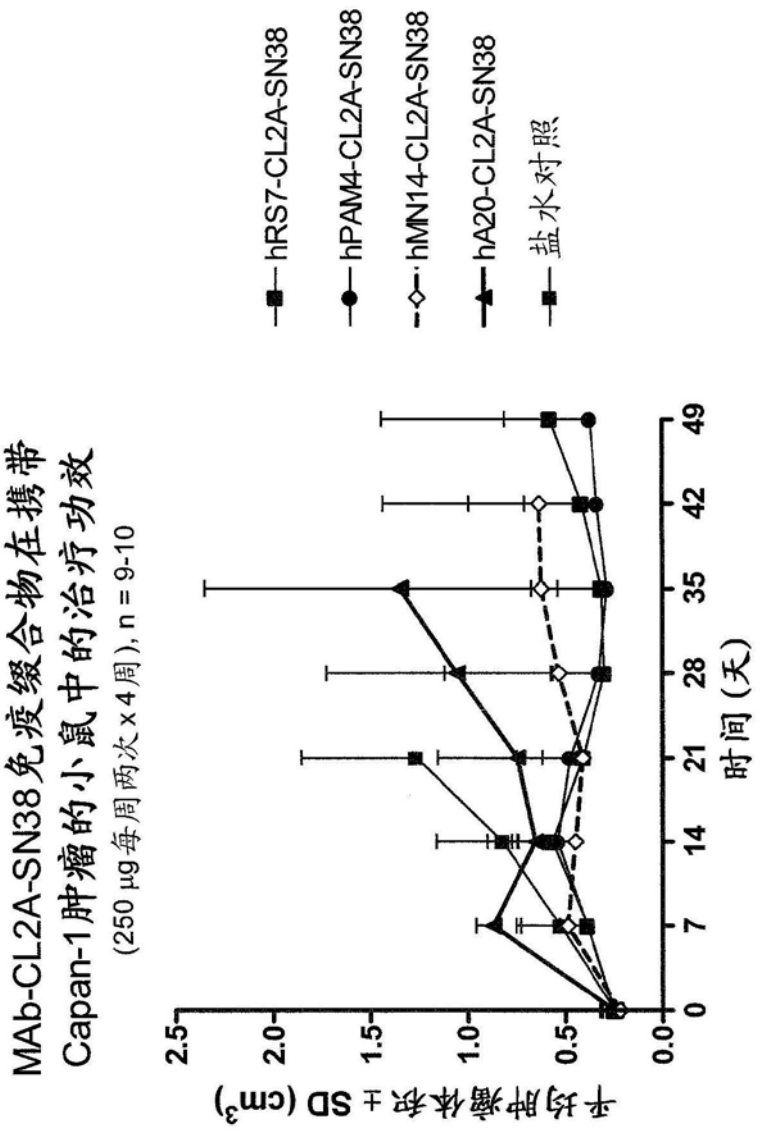

MAb-CL2A-SN38免疫缀合物在携带
Capan-1肿瘤的小鼠中的治疗功效
(250 μg每周两次x4周), n = 9-10
hRS7-CL2A-SN38
hPAM4-CL2A-SN38
hMN14-CL2A-SN38
hA20-CL2A-SN38
盐水对照
平均肿瘤体积 ± SD (cm³)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0
7
14
21
28
35
42
49
时间 (天)

图1

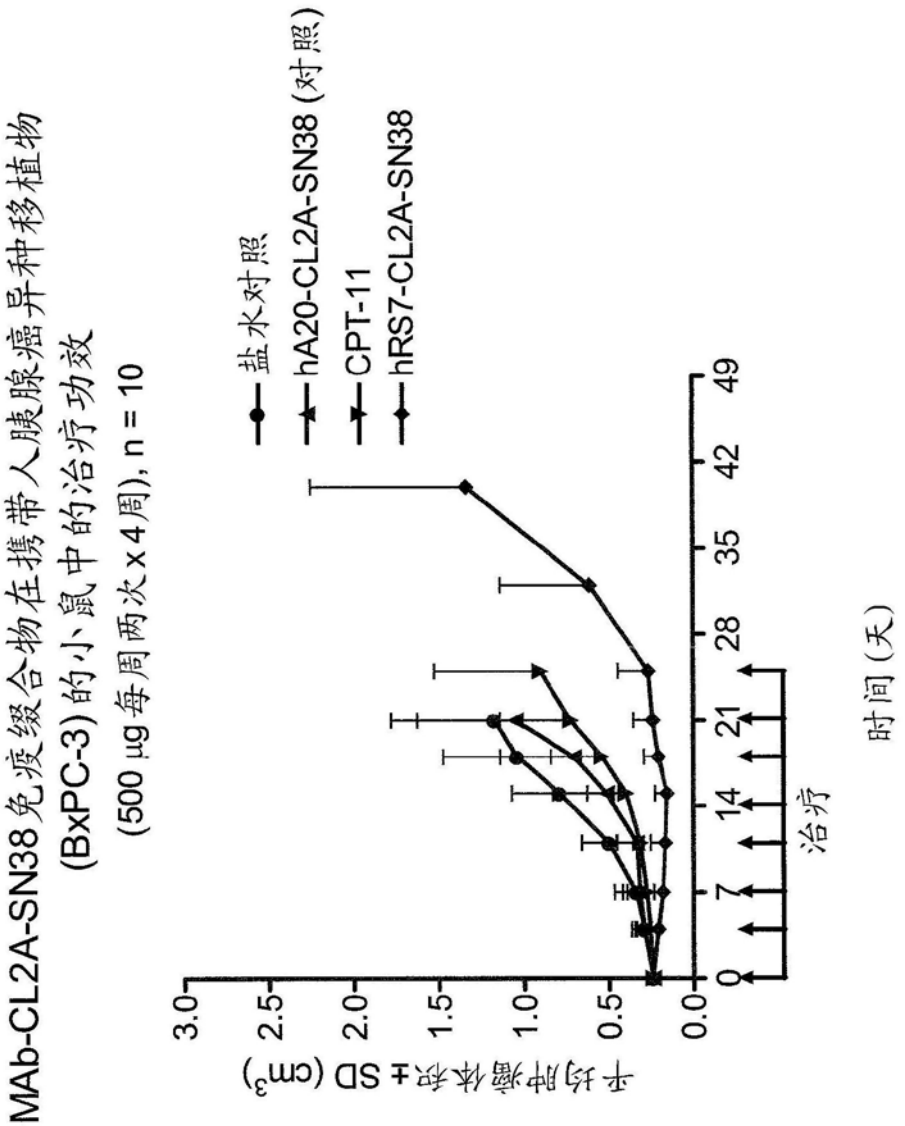
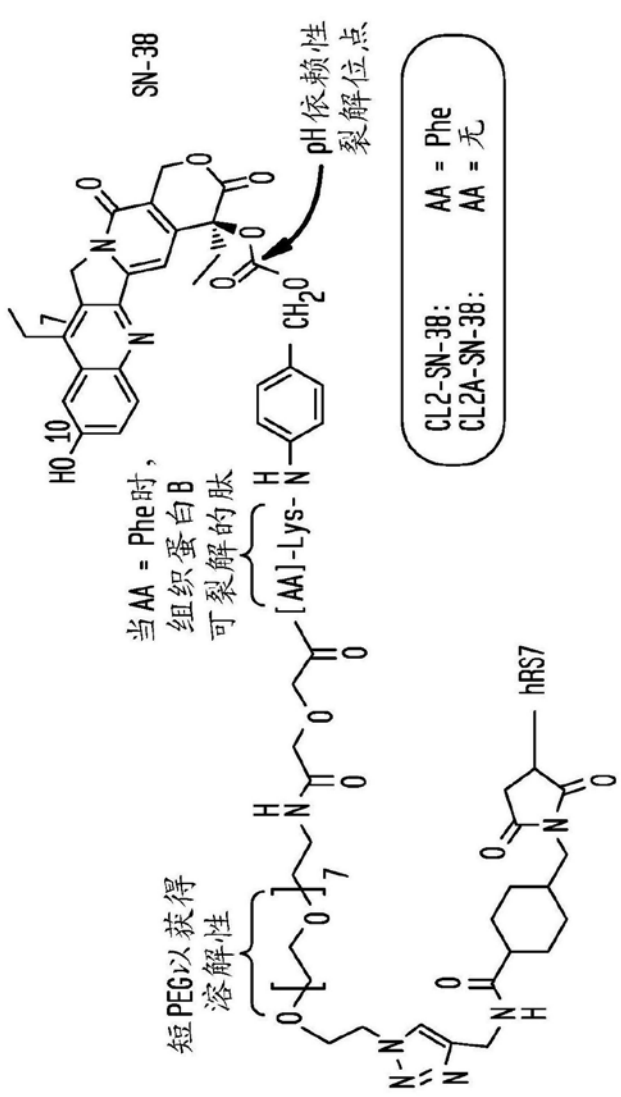

MAb-CL2A-SN38 免疫缀合物在携带人胰腺癌异种移植物
(BxPC-3) 的小鼠中的治疗功效
(500 μg 每周两次 x 4 周), n = 10
盐水对照
hA20-CL2A-SN38 (对照)
CPT-11
hRS7-CL2A-SN38
平均肿瘤体积 ± SD (cm³)
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0
7
14
21
28
35
42
49
治疗
时间 (天)

图2



剂	SN-38/IgG 替代比	游离 SN-38 (%)	人血清 半衰期 (h)	细胞结合： Kd (nM) (95%置信区间)	细胞毒性： IC_{50} (nM) (95%置信区间)
hRS7-CL2-SN-38	6.2	0.7	22.1	1.19 (0.89 至 149)	4.12 (2.88 至 5.89)
hRS7-CL2A-SN-38	6.1	0.6	20.3	1.09 (0.97 至 1.21)	4.24 (2.99 至 6.01)

图3A

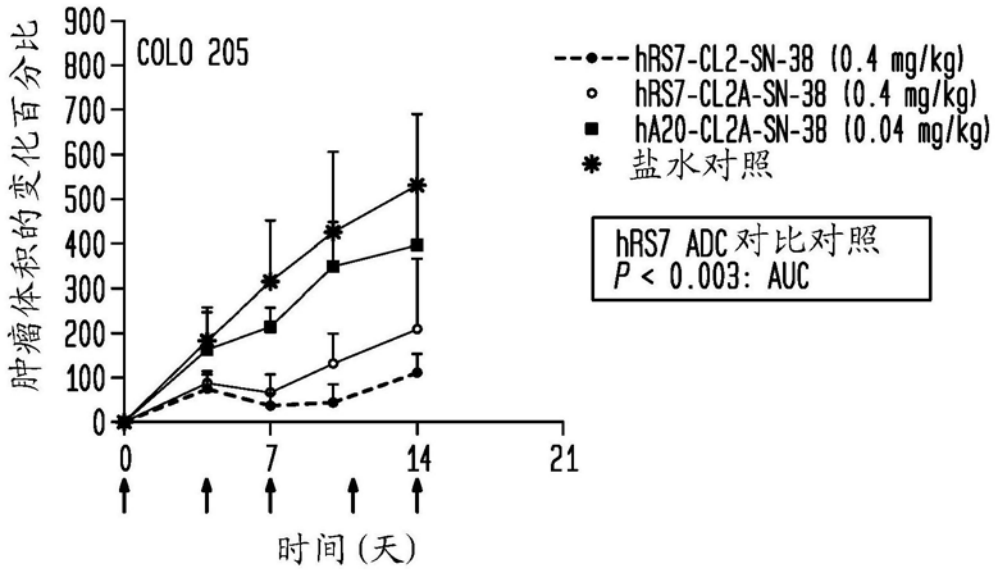

COLO 205
肿瘤体积的变化百分比
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
0
7
14
21
时间(天)
hRS7-CL2-SN-38 (0.4 mg/kg)
hRS7-CL2A-SN-38 (0.4 mg/kg)
hA20-CL2A-SN-38 (0.04 mg/kg)
盐水对照
hRS7 ADC对比对照
P < 0.003: AUC

图3B

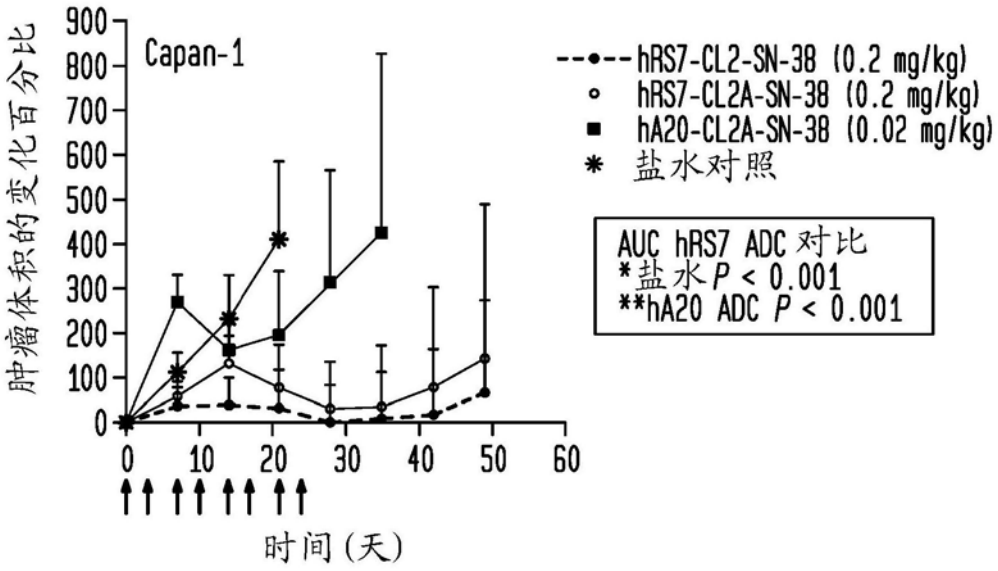

Capan-1
肿瘤体积的变化百分比
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
0
10
20
30
40
50
60
时间(天)
hRS7-CL2-SN-38 (0.2 mg/kg)
hRS7-CL2A-SN-38 (0.2 mg/kg)
hA20-CL2A-SN-38 (0.02 mg/kg)
盐水对照
AUC hRS7 ADC对比
*盐水P < 0.001
**hA20 ADC P < 0.001

图3C

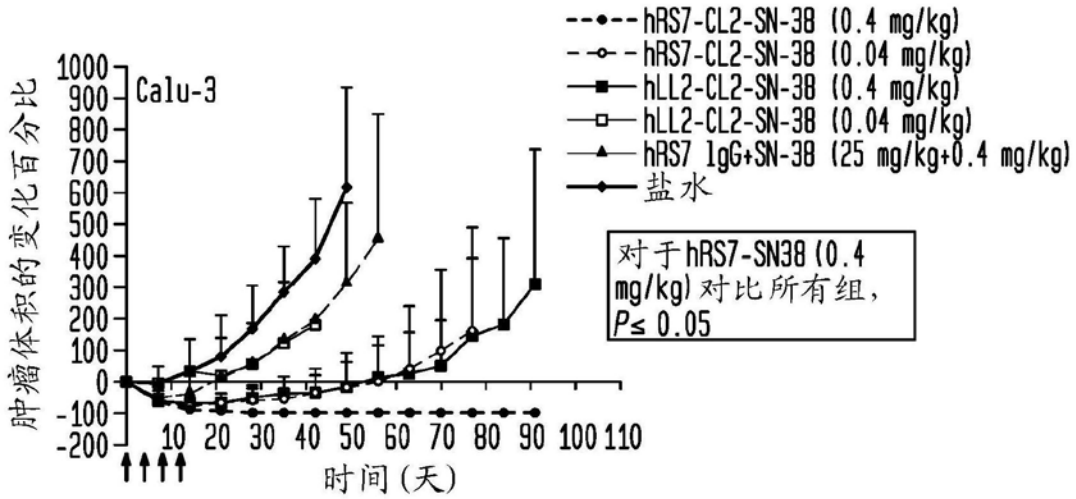

Calu-3
肿瘤体积的变化百分比
时间(天)
hRS7-CL2-SN-38 (0.4 mg/kg)
hRS7-CL2-SN-38 (0.04 mg/kg)
hLL2-CL2-SN-38 (0.4 mg/kg)
hLL2-CL2-SN-38 (0.04 mg/kg)
hRS7 IgG+SN-38 (25 mg/kg+0.4 mg/kg)
盐水
对于hRS7-SN38 (0.4 mg/kg)对比所有组，P≤ 0.05

图4A

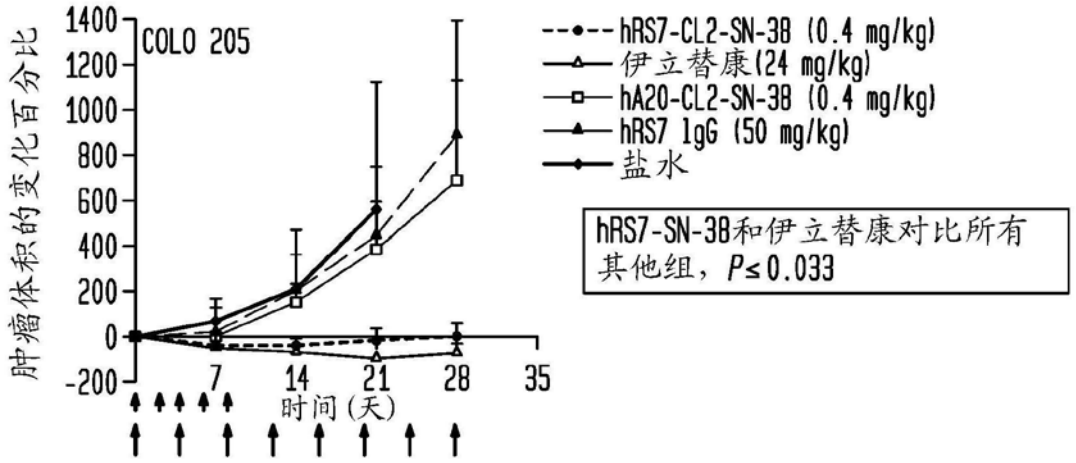

COLO 205
肿瘤体积的变化百分比
时间(天)
hRS7-CL2-SN-38 (0.4 mg/kg)
伊立替康(24 mg/kg)
hA20-CL2-SN-38 (0.4 mg/kg)
hRS7 IgG (50 mg/kg)
盐水
hRS7-SN-38和伊立替康对比所有其他组，P≤ 0.033

图4B

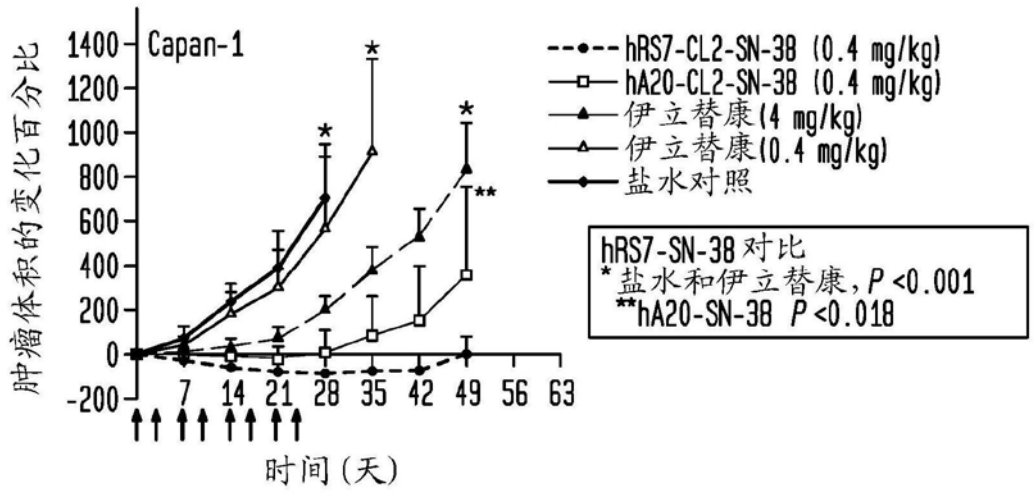

Capan-1
肿瘤体积的变化百分比
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
-200
7 14 21 28 35 42 49 56 63
时间(天)
hRS7-CL2-SN-38 (0.4 mg/kg)
hA20-CL2-SN-38 (0.4 mg/kg)
伊立替康(4 mg/kg)
伊立替康(0.4 mg/kg)
盐水对照
hRS7-SN-38 对比
*盐水和伊立替康, P <0.001
**hA20-SN-38 P <0.018

图4C

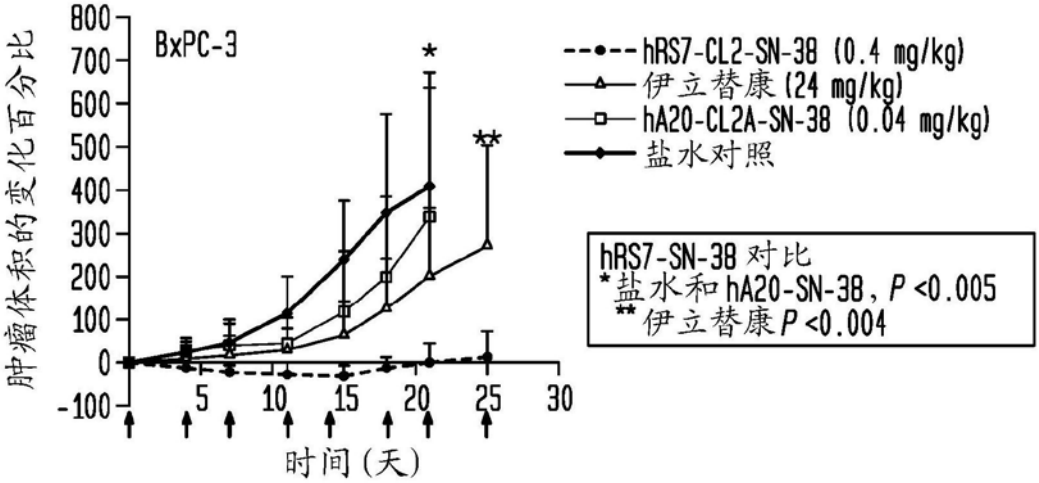

BxPC-3
肿瘤体积的变化百分比
800
700
600
500
400
300
200
100
0
-100
5 10 15 20 25 30
时间(天)
hRS7-CL2-SN-38 (0.4 mg/kg)
伊立替康 (24 mg/kg)
hA20-CL2A-SN-38 (0.04 mg/kg)
盐水对照
hRS7-SN-38 对比
*盐水和 hA20-SN-38, P <0.005
**伊立替康 P <0.004

图4D

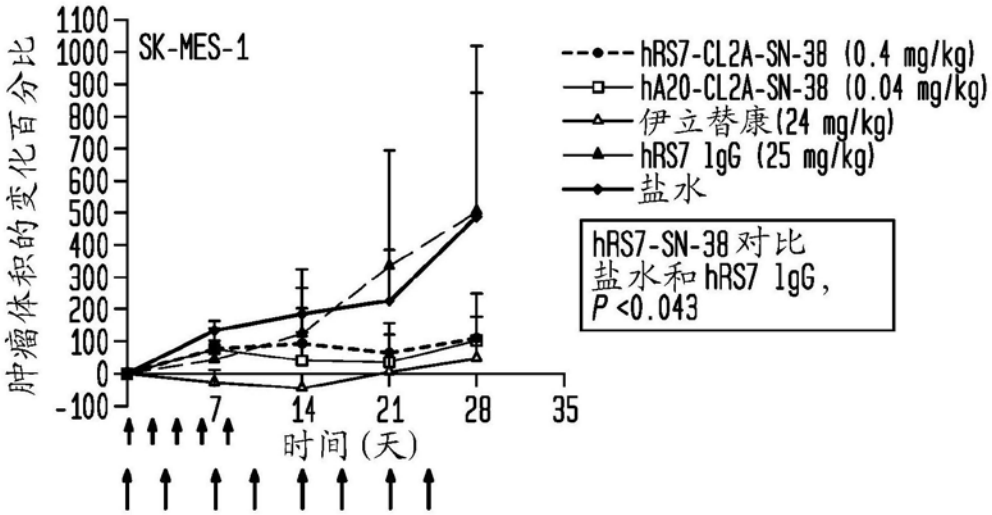

SK-MES-1
肿瘤体积的变化百分比
1100
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
-100
7
14
21
28
35
时间(天)
hRS7-CL2A-SN-38 (0.4 mg/kg)
hA20-CL2A-SN-38 (0.04 mg/kg)
伊立替康(24 mg/kg)
hRS7 IgG (25 mg/kg)
盐水
hRS7-SN-38对比
盐水和hRS7 IgG,
P <0.043

图4E

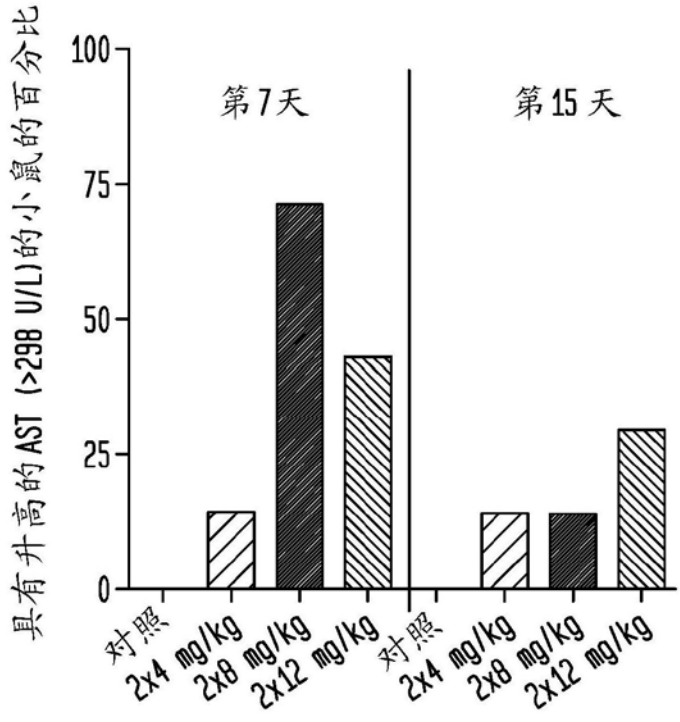

具有升高的AST (>298 U/L)的小鼠的百分比
100
75
50
25
0
第7天
第15天
对照
2x4 mg/kg
2x8 mg/kg
2x12 mg/kg
对照
2x4 mg/kg
2x8 mg/kg
2x12 mg/kg

图5A

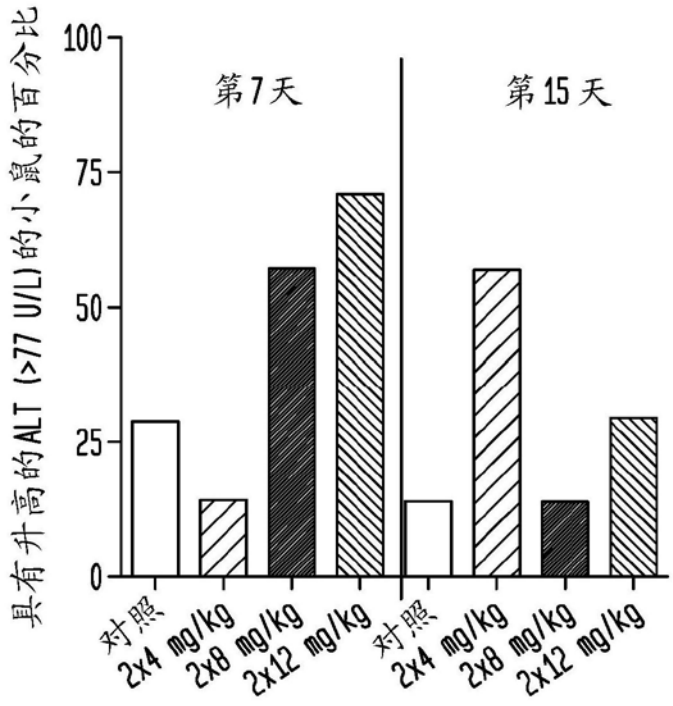

具有升高的ALT (>77 U/L)的小鼠的百分比
100
75
50
25
0
第7天
第15天
对照
2x4 mg/kg
2x8 mg/kg
2x12 mg/kg
对照
2x4 mg/kg
2x8 mg/kg
2x12 mg/kg

图5B

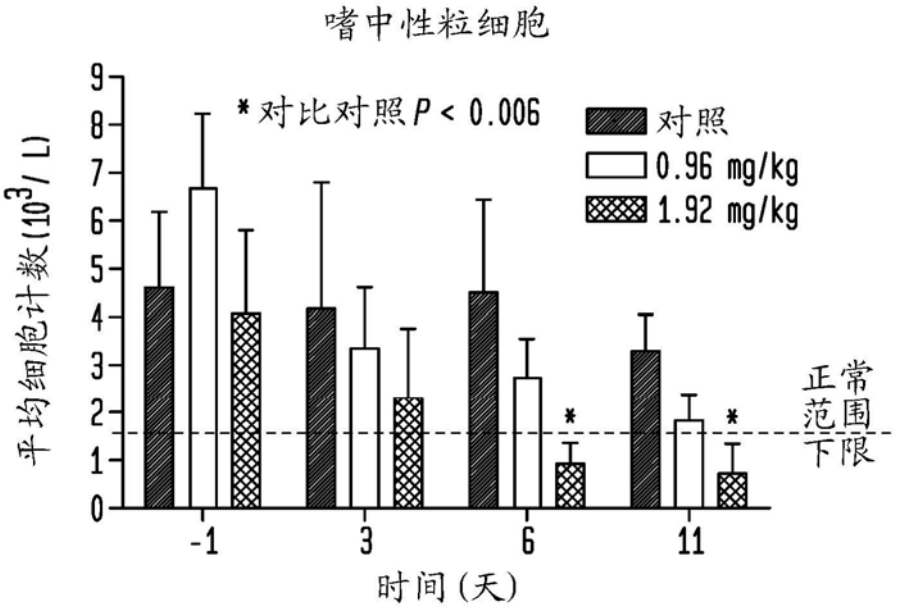

嗜中性粒细胞
*对比对照P < 0.006
对照
0.96 mg/kg
1.92 mg/kg
平均细胞计数(10^3/ L)
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
正常范围下限
*
*
-1
3
6
11
时间(天)

图5C

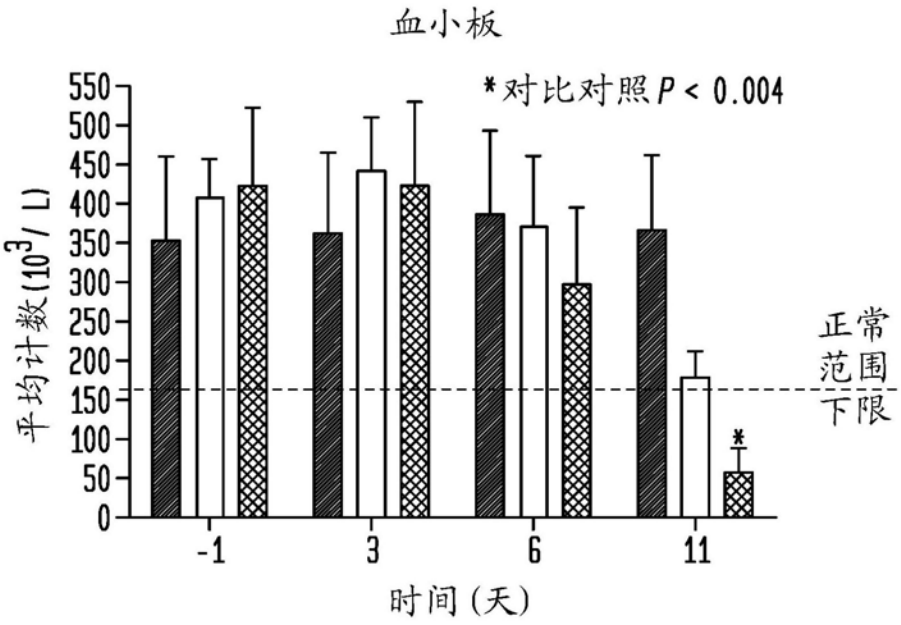
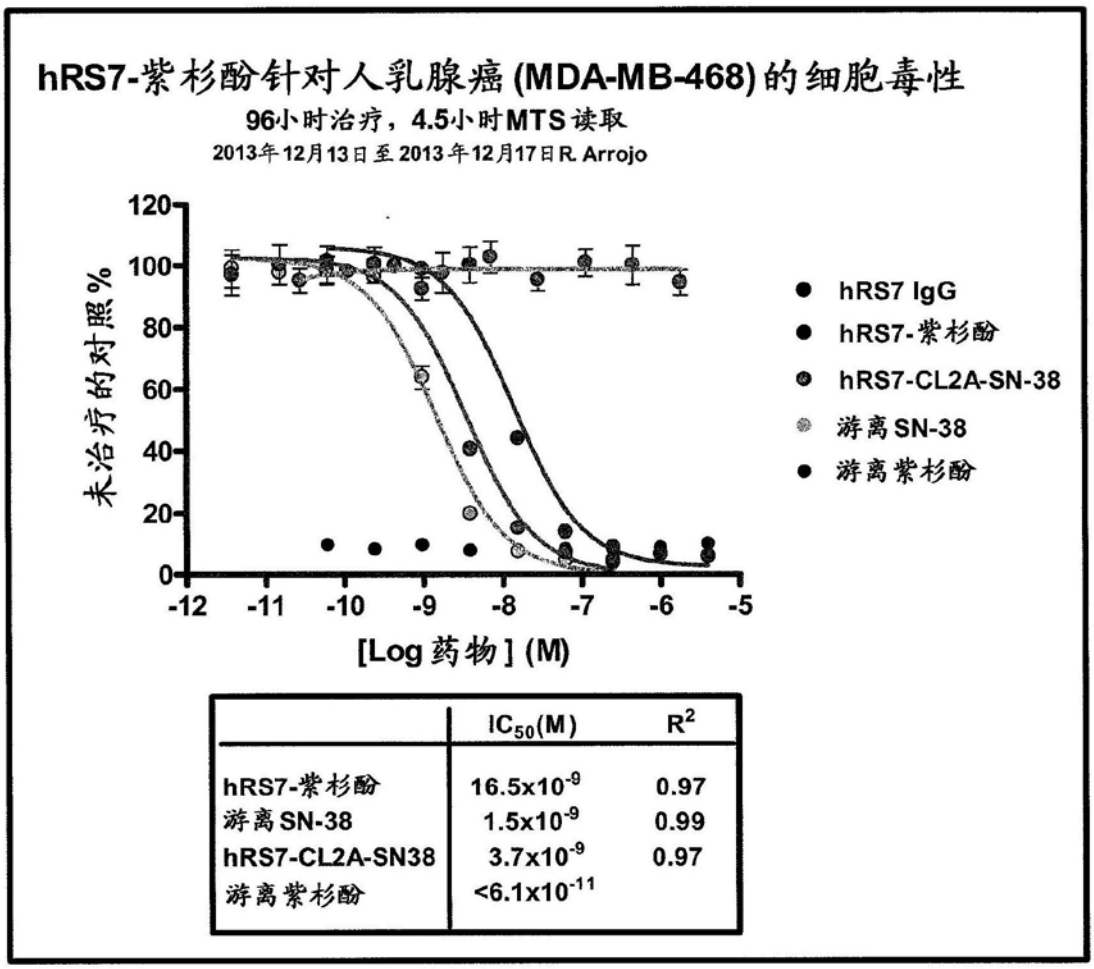
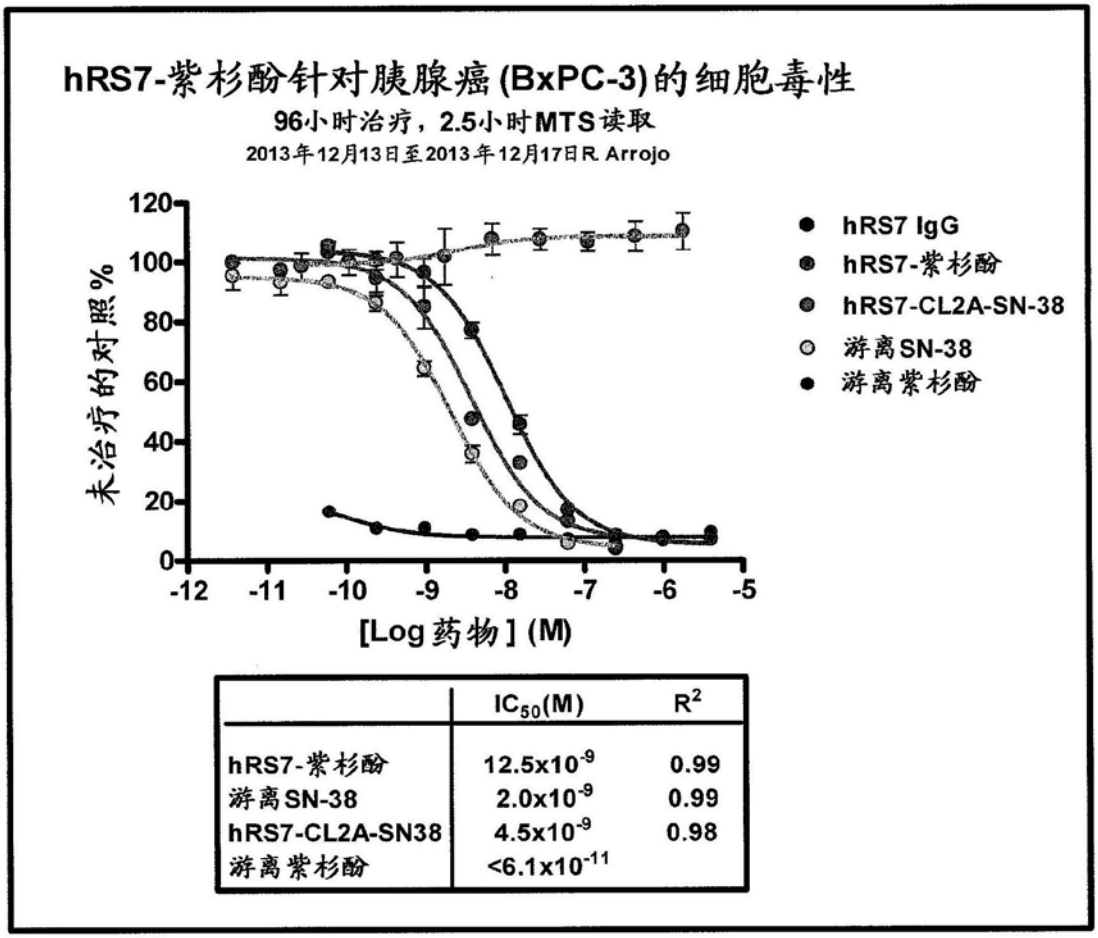

血小板
*对比对照P < 0.004
平均计数(10^3/ L)
550
500
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
-1
3
6
11
*
正常范围下限
时间(天)

图5D



	IC_{50}(M)	R^2
hRS7-紫杉酚	$16.5x10^{-9}$	0.97
游离SN-38	$1.5x10^{-9}$	0.99
hRS7-CL2A-SN38	$3.7x10^{-9}$	0.97
游离紫杉酚	$<6.1x10^{-11}$	

图6



	IC_{50}(M)	R^2
hRS7-紫杉酚	$12.5x10^{-9}$	0.99
游离SN-38	$2.0x10^{-9}$	0.99
hRS7-CL2A-SN38	$4.5x10^{-9}$	0.98
游离紫杉酚	$<6.1x10^{-11}$	

图7

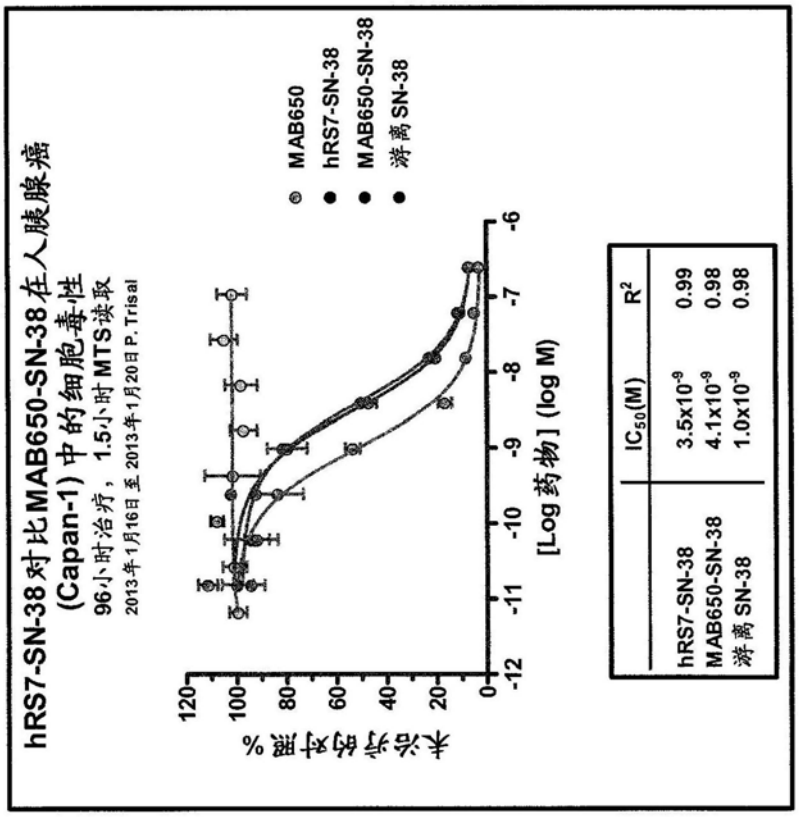

hRS7-SN-38对比MAB650-SN-38在人胰腺癌
(Capan-1)中的细胞毒性
96小时治疗，1.5小时MTS读取
2013年1月16日至2013年1月20日 P. Trisal
MAB650
hRS7-SN-38
MAB650-SN-38
游离SN-38
未治疗的对照%
[Log药物] (log M)
IC50(M)
R2
hRS7-SN-38 3.5x10-9 0.99
MAB650-SN-38 4.1x10-9 0.98
游离SN-38 1.0x10-9 0.98

图8A

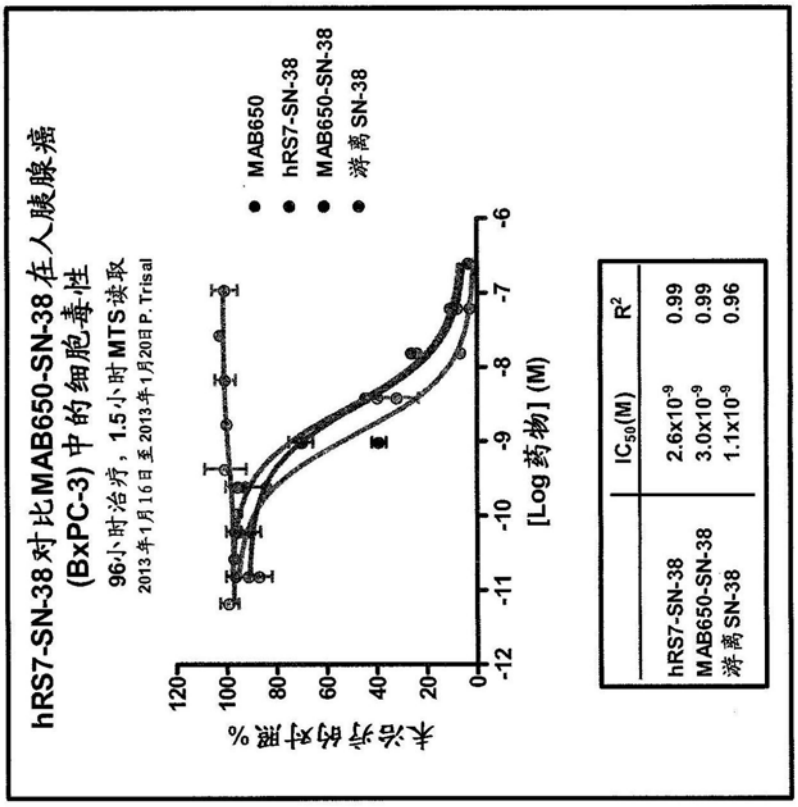
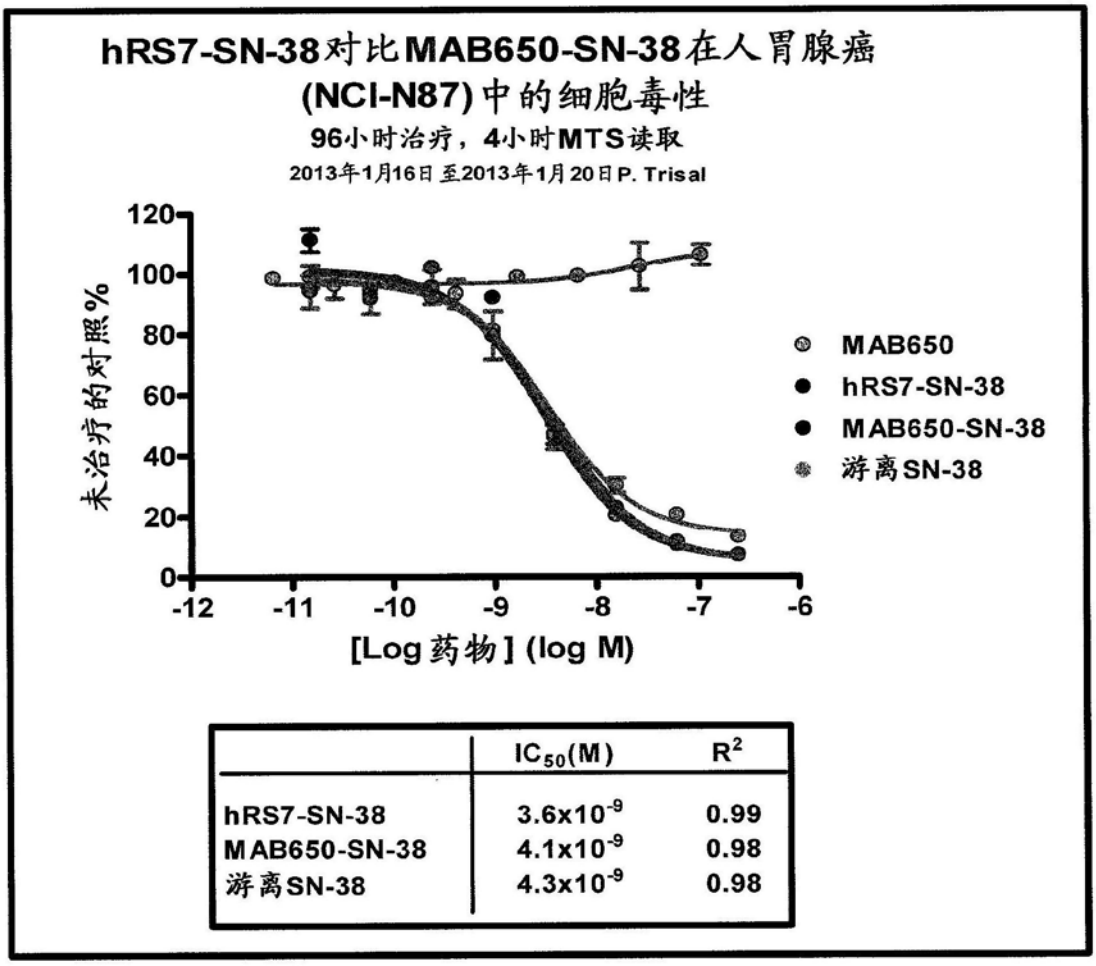

hRS7-SN-38对比MAB650-SN-38在人胰腺癌
(BxPC-3)中的细胞毒性
96小时治疗，1.5小时MTS读取
2013年1月16日至2013年1月20日P.Trisal
MAB650
hRS7-SN-38
MAB650-SN-38
游离SN-38
未治疗的对照%
120
100
80
60
40
20
0
-12
-11
-10
-9
-8
-7
-6
[Log药物](M)
IC50(M)
R2
hRS7-SN-38 2.6x10-9 0.99
MAB650-SN-38 3.0x10-9 0.99
游离SN-38 1.1x10-9 0.96

图8B



	IC_{50}(M)	R^2
hRS7-SN-38	$3.6x10^{-9}$	0.99
MAB650-SN-38	$4.1x10^{-9}$	0.98
游离SN-38	$4.3x10^{-9}$	0.98

图8C

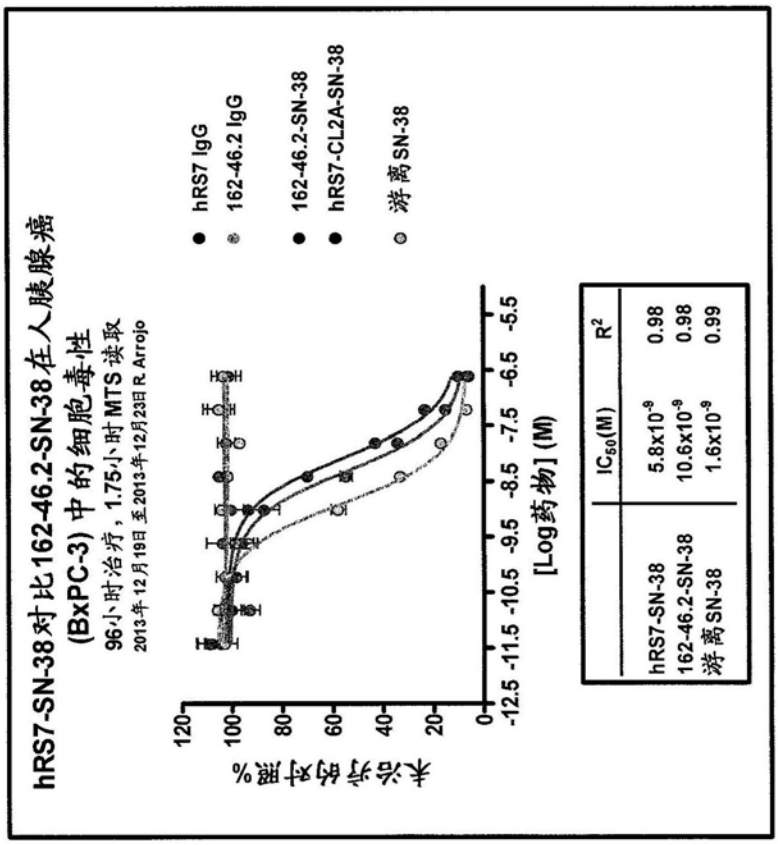

hRS7-SN-38对比162-46.2-SN-38在人胰腺癌
(BxPC-3)中的细胞毒性
96小时治疗，1.75小时MTS读取
2013年12月19日至2013年12月23日 R. Arrojo
hRS7 IgG
162-46.2 IgG
162-46.2-SN-38
hRS7-CL2A-SN-38
游离SN-38
未治疗的对照%
120
100
80
60
40
20
0
-12.5 -11.5 -10.5 -9.5 -8.5 -7.5 -6.5 -5.5
[Log药物] (M)
IC50(M) R2
hRS7-SN-38 5.8x10-9 0.98
162-46.2-SN-38 10.6x10-9 0.98
游离SN-38 1.6x10-9 0.99

图9A

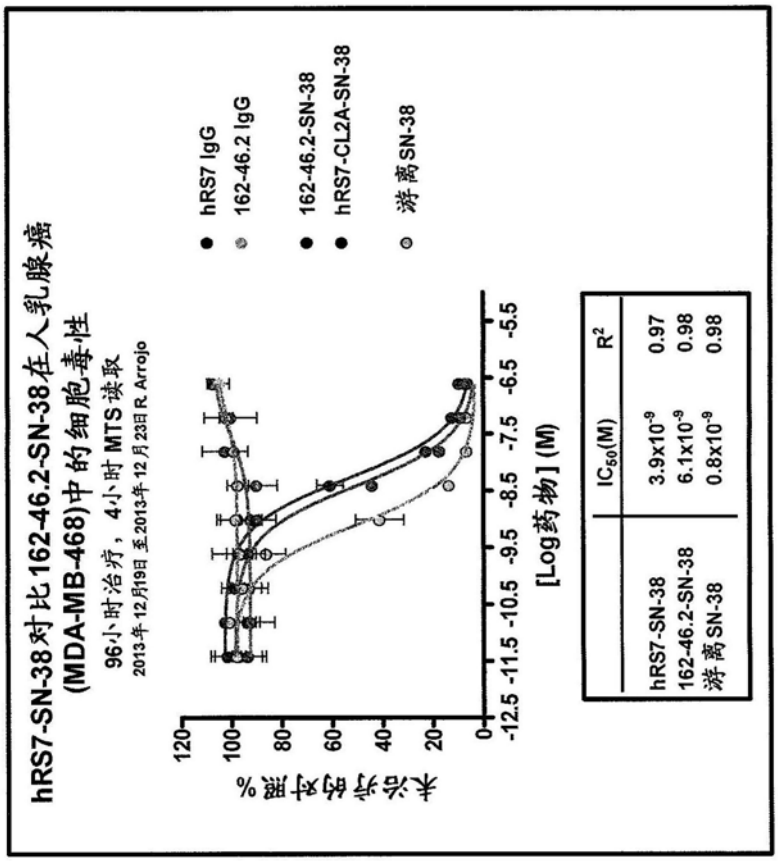

hRS7-SN-38对比162-46.2-SN-38在人乳腺癌
(MDA-MB-468)中的细胞毒性
96小时治疗，4小时MTS读取
2013年12月19日至2013年12月23日 R. Arrojo
hRS7 IgG
162-46.2 IgG
162-46.2-SN-38
hRS7-CL2A-SN-38
游离SN-38
未治疗的对照%
120
100
80
60
40
20
0
-12.5 -11.5 -10.5 -9.5 -8.5 -7.5 -6.5 -5.5
[Log药物] (M)
IC50(M) R2
hRS7-SN-38 3.9x10-9 0.97
162-46.2-SN-38 6.1x10-9 0.98
游离SN-38 0.8x10-9 0.98

图9B

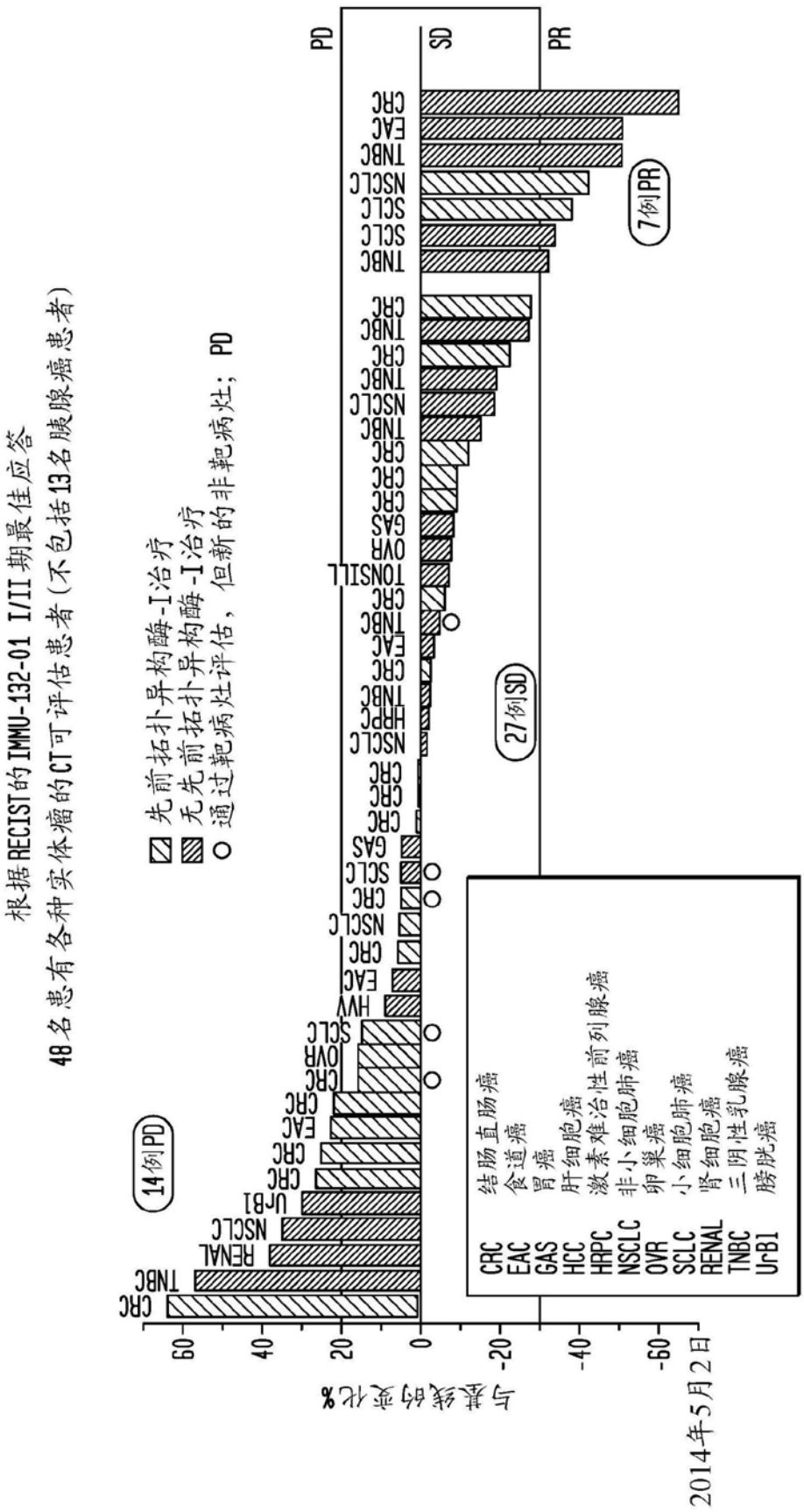

根据RECIST的IMMU-132-01 I/II期最佳应答
48名患有各种实体瘤的CT可评估患者(不包括13名胰腺癌患者)
先前拓扑异构酶-I治疗
无先前拓扑异构酶-I治疗
通过靶病灶评估，但新的非靶病灶；PD
PD
SD
PR
14例PD
27例SD
7例PR
CRC 结肠直肠癌
EAC 食道癌
GAS 胃癌
HCC 肝细胞癌
HRPC 激素难治性前列腺癌
NSCLC 非小细胞肺癌
OVR 卵巢癌
SCLC 小细胞肺癌
RENAL 肾细胞癌
TNBC 三阴性乳腺癌
UrBl 膀胱癌
60
40
20
0
-20
-40
-60
2014年5月2日

图10

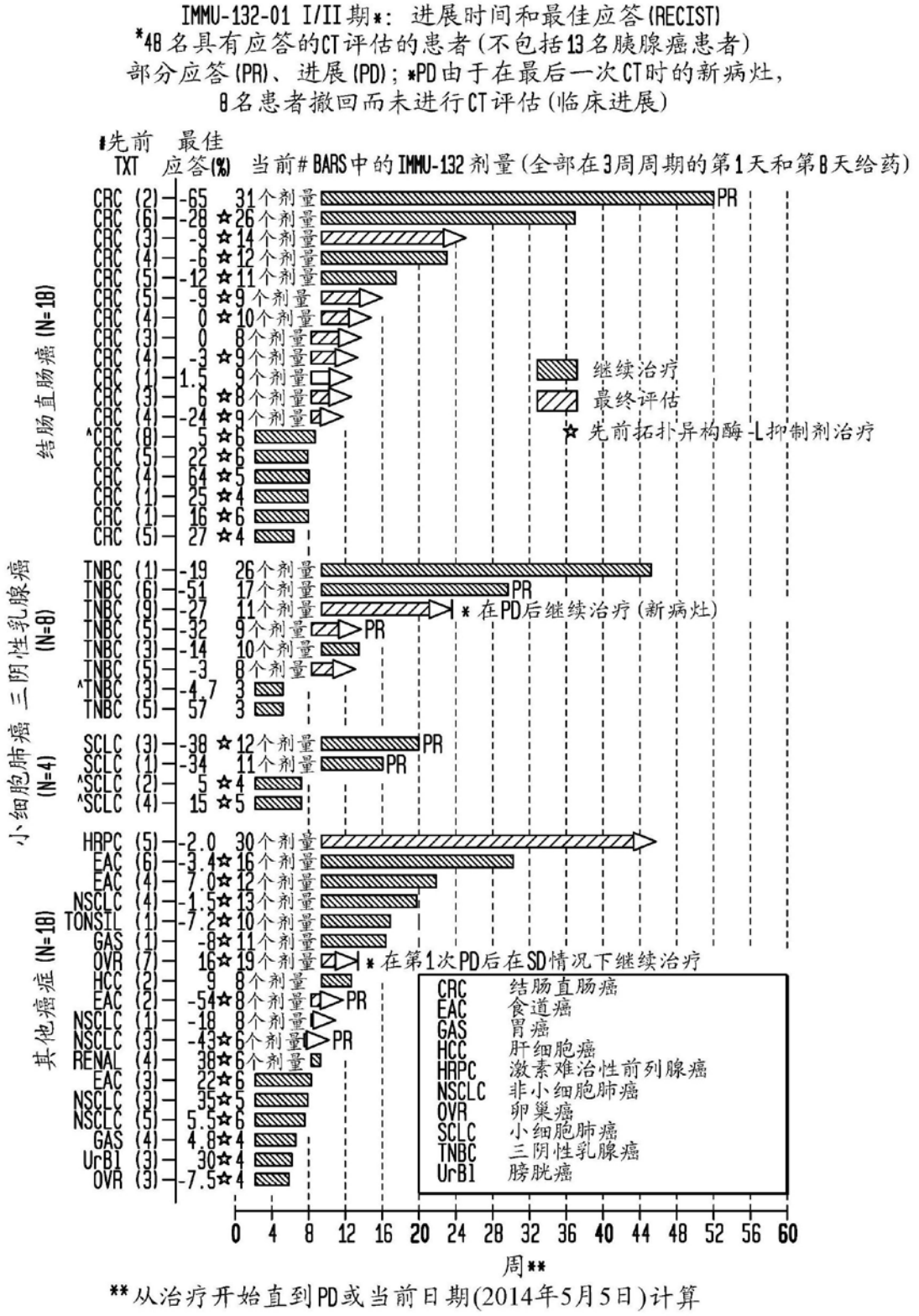

IMMU-132-01 I/II期*：进展时间和最佳应答(RECIST)
*48名具有应答的CT评估的患者(不包括13名胰腺癌患者)
部分应答(PR)、进展(PD)；*PD由于在最后一次CT时的新病灶，
8名患者撤回而未进行CT评估(临床进展)
#先前 最佳
TXT 应答(%) 当前#BARS中的IMMU-132剂量(全部在3周周期的第1天和第8天给药)
结肠直肠癌 (N=18)
小细胞肺癌 (N=4)
三阴性乳腺癌 (N=8)
其他癌症 (N=18)
继续治疗
最终评估
☆先前拓扑异构酶-I抑制剂治疗
* 在PD后继续治疗(新病灶)
* 在第1次PD后在SD情况下继续治疗
CRC 结肠直肠癌
EAC 食道癌
GAS 胃癌
HCC 肝细胞癌
HRPC 激素难治性前列腺癌
NSCLC 非小细胞肺癌
OVR 卵巢癌
SCLC 小细胞肺癌
TNBC 三阴性乳腺癌
UrBl 膀胱癌
0 4 8 12 16 20 24 28 32 36 40 44 48 52 56 60
周**
**从治疗开始直到PD或当前日期(2014年5月5日)计算

图11

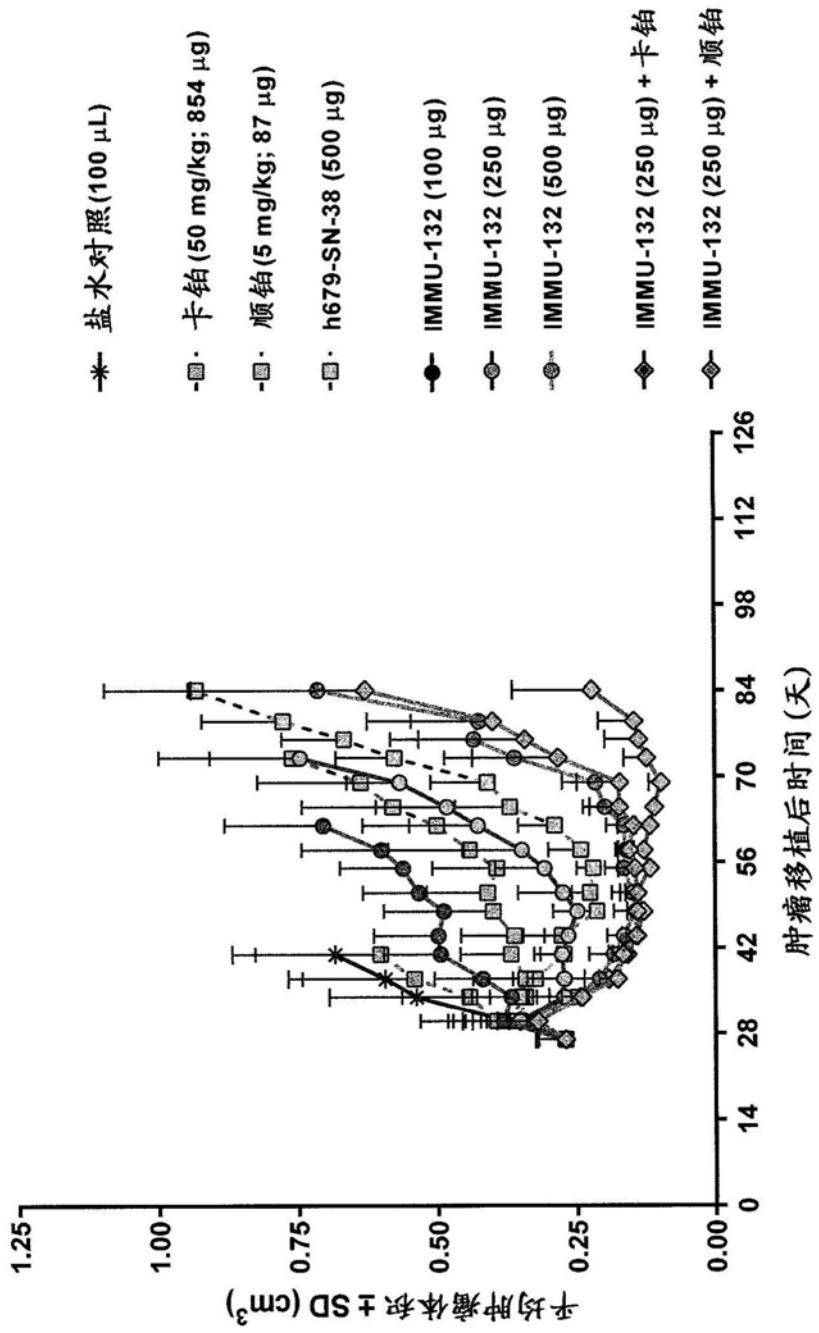

盐水对照(100 μL)
卡铂(50 mg/kg; 854 μg)
顺铂(5 mg/kg; 87 μg)
h679-SN-38 (500 μg)
IMMU-132 (100 μg)
IMMU-132 (250 μg)
IMMU-132 (500 μg)
IMMU-132 (250 μg) + 卡铂
IMMU-132 (250 μg) + 顺铂
平均肿瘤体积 ± SD (cm³)
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
0
14
28
42
56
70
84
98
112
126
肿瘤移植后时间(天)

图12

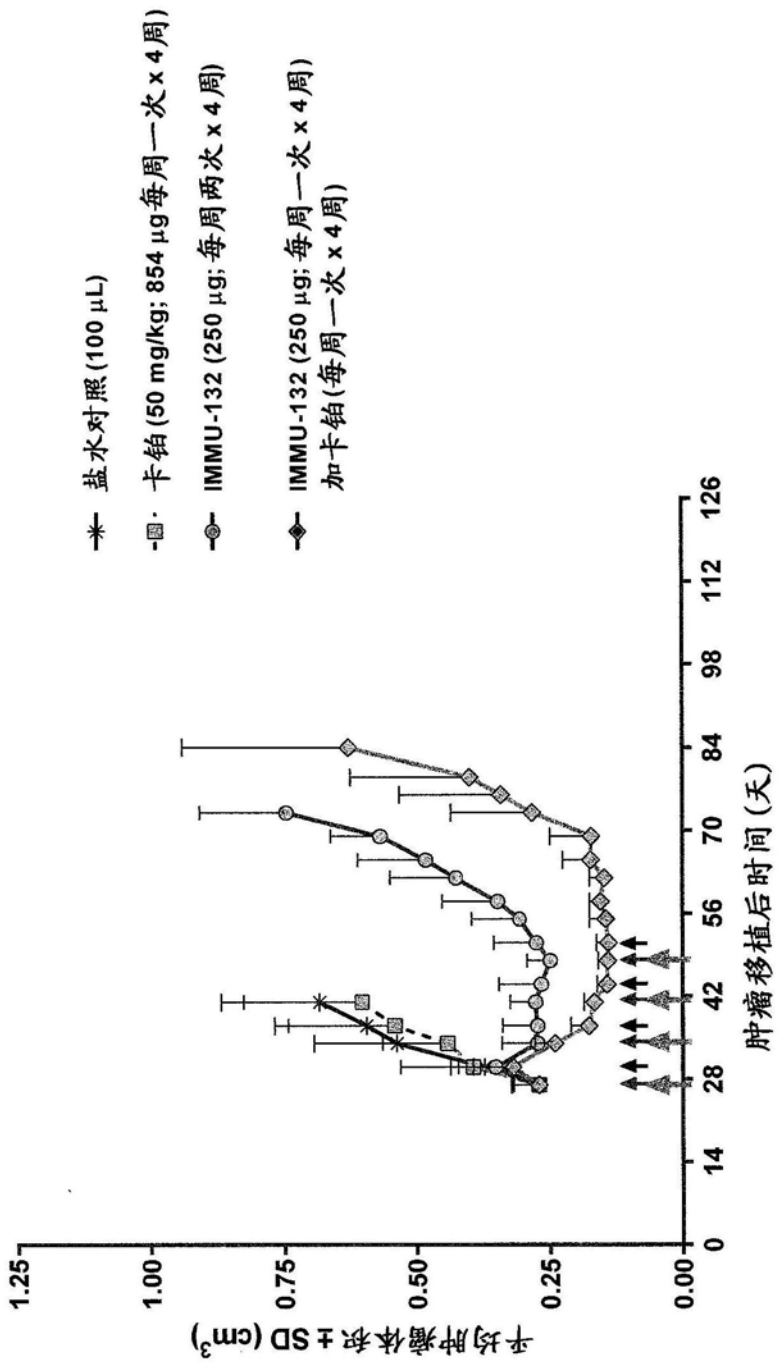

盐水对照(100 μL)
卡铂(50 mg/kg; 854 μg每周一次 x 4周)
IMMU-132 (250 μg; 每周两次 x 4周)
IMMU-132 (250 μg; 每周一次 x 4周)
加卡铂(每周一次 x 4周)
平均肿瘤体积 ± SD (cm³)
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
0
14
28
42
56
70
84
98
112
126
肿瘤移植后时间(天)

图13

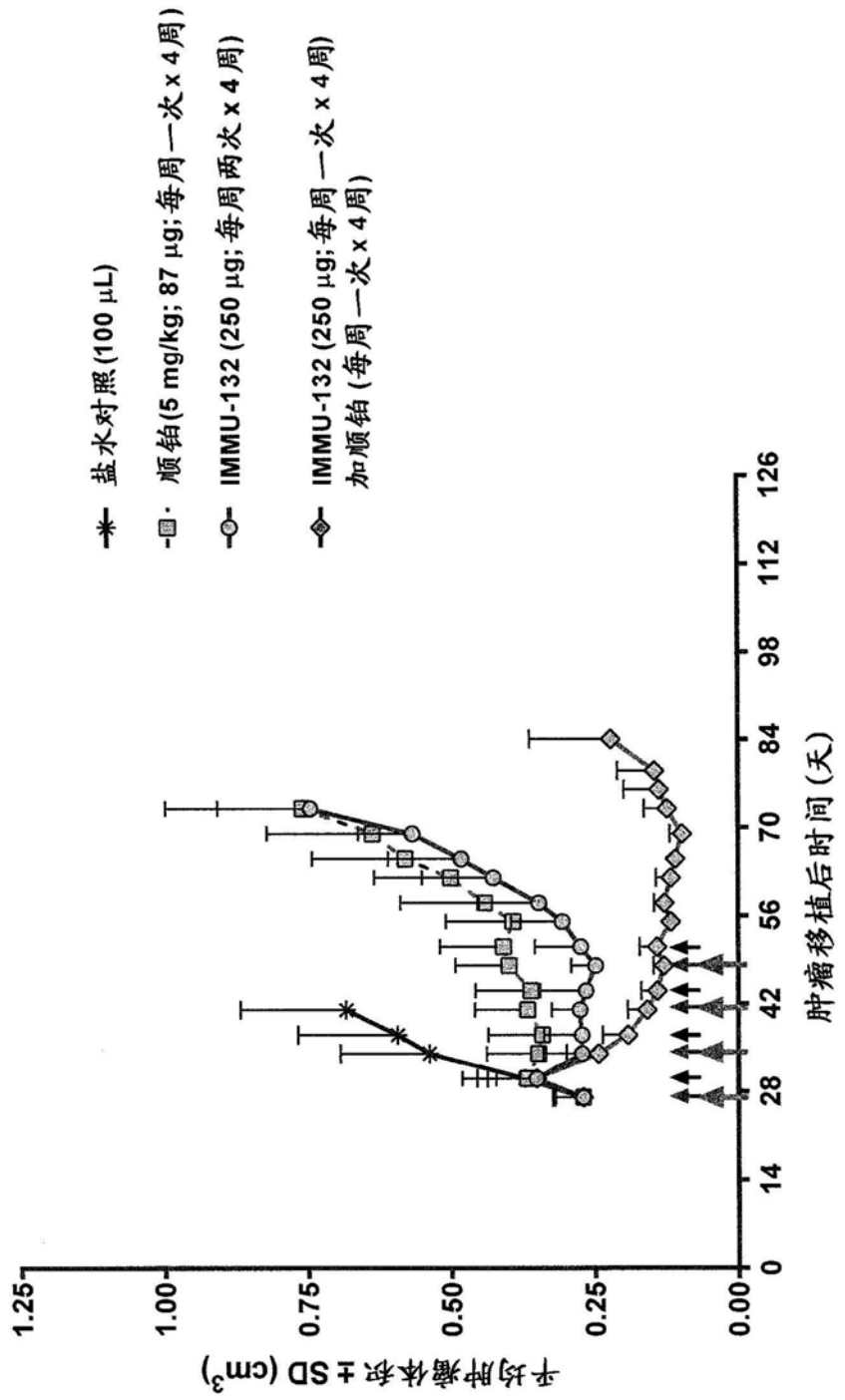

盐水对照(100 µL)
顺铂(5 mg/kg; 87 µg; 每周一次 x 4 周)
IMMU-132 (250 µg; 每周两次 x 4 周)
IMMU-132 (250 µg; 每周一次 x 4 周)
加顺铂 (每周一次 x 4 周)
平均肿瘤体积 ± SD (cm³)
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
0
14
28
42
56
70
84
98
112
126
肿瘤移植后时间 (天)

图14

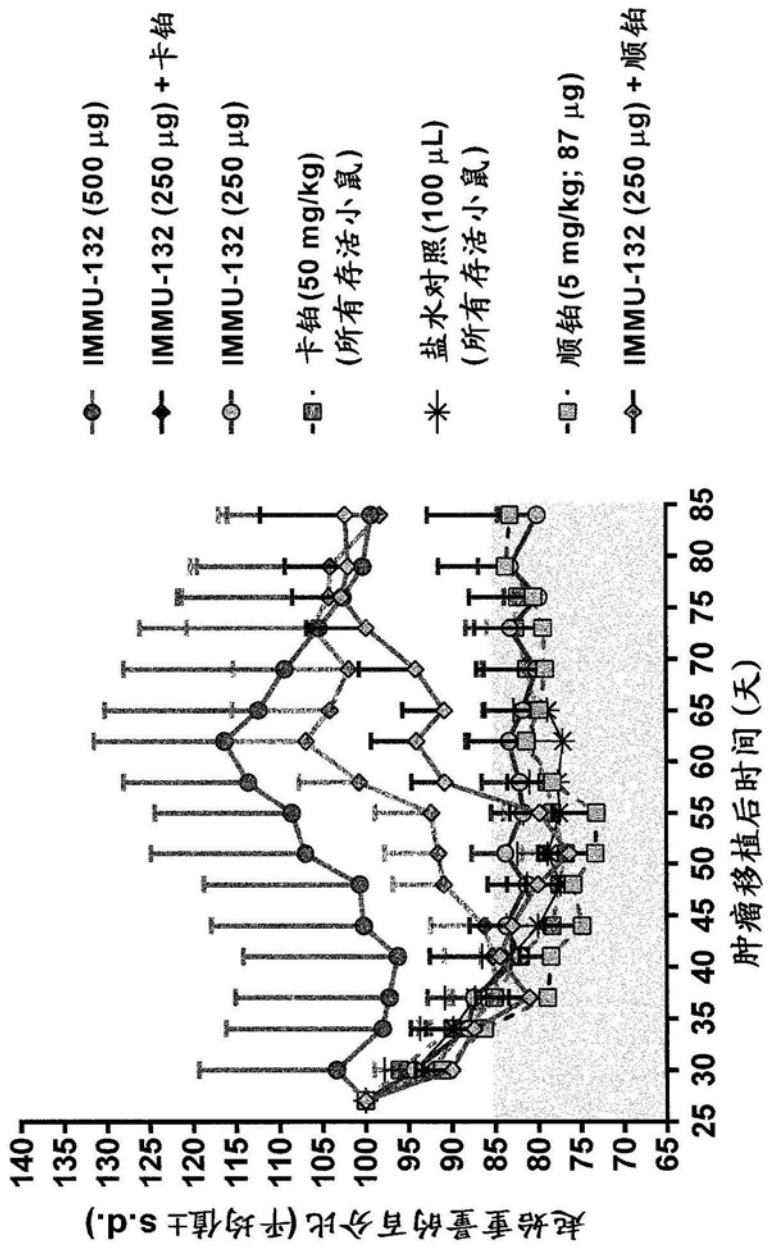

IMMU-132 (500 μg)
IMMU-132 (250 μg) + 卡铂
IMMU-132 (250 μg)
卡铂(50 mg/kg)
(所有存活小鼠)
盐水对照(100 μL)
(所有存活小鼠)
顺铂(5 mg/kg; 87 μg)
IMMU-132 (250 μg) + 顺铂
相对于体重的百分比(平均值± s.d.)
肿瘤移植后时间(天)

图15

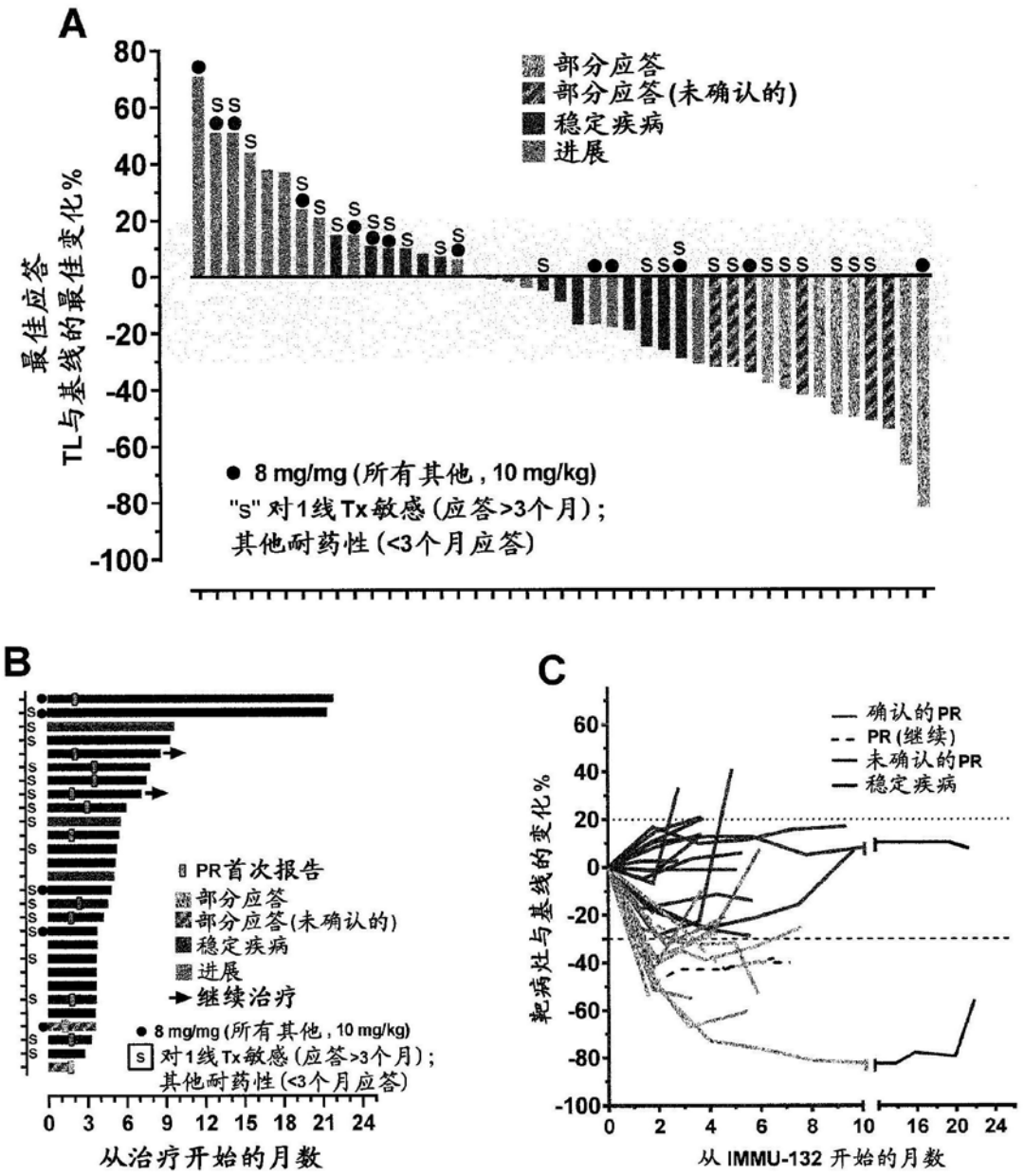

A
最佳应答
TL与基线的最佳变化%
80
60
40
20
0
-20
-40
-60
-80
-100
部分应答
部分应答(未确认的)
稳定疾病
进展
● 8 mg/mg (所有其他, 10 mg/kg)
"S" 对1线Tx敏感 (应答>3个月);
其他耐药性 (<3个月应答)
B
PR首次报告
部分应答
部分应答(未确认的)
稳定疾病
进展
继续治疗
● 8 mg/mg (所有其他, 10 mg/kg)
S 对1线Tx敏感 (应答>3个月);
其他耐药性 (<3个月应答)
0 3 6 9 12 15 18 21 24
从治疗开始的月数
C
靶病灶与基线的变化%
60
40
20
0
-20
-40
-60
-80
-100
确认的PR
PR (继续)
未确认的PR
稳定疾病
0 2 4 6 8 10 16 20 24
从 IMMU-132 开始的月数

图16

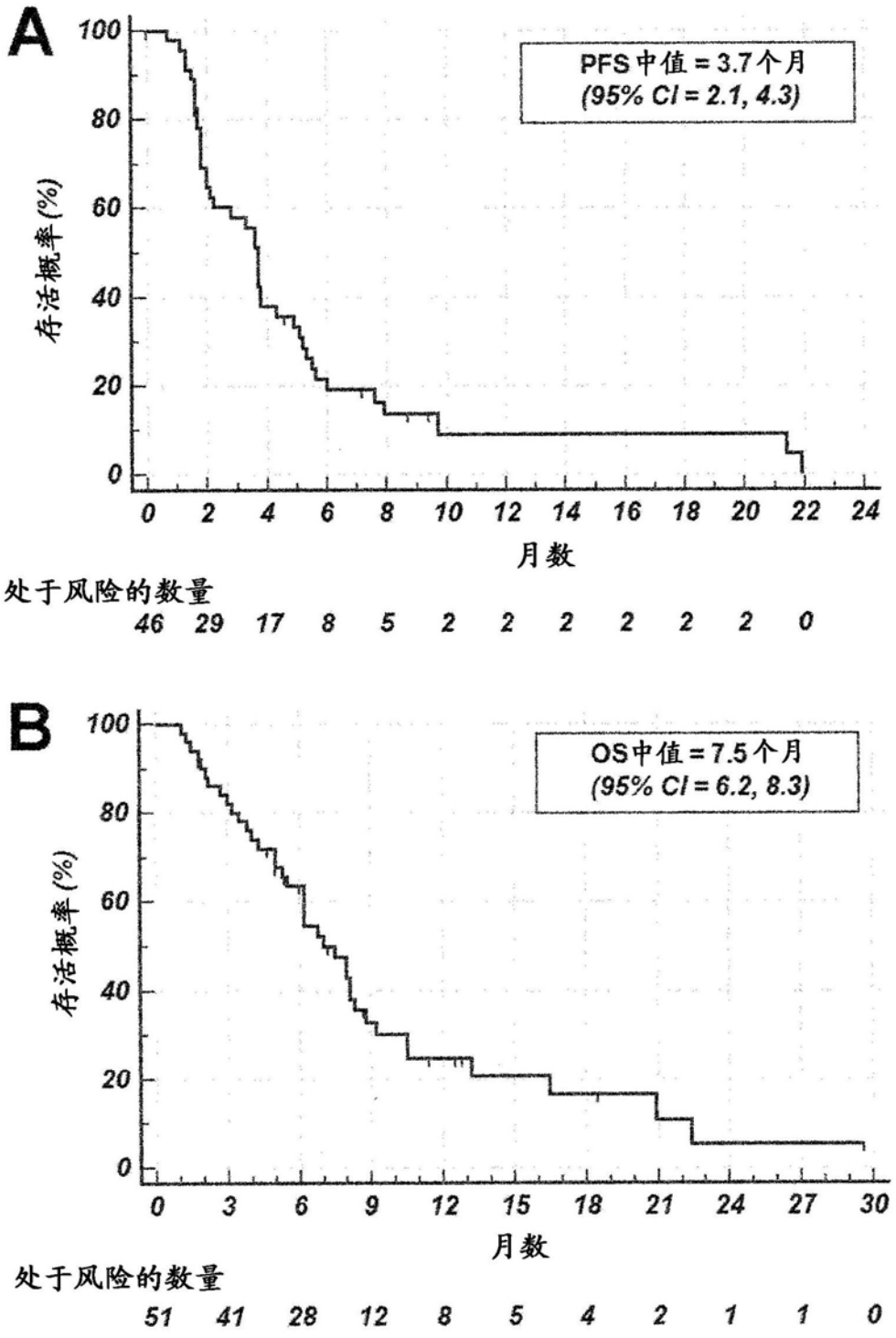

A
PFS中值=3.7个月
(95% CI=2.1, 4.3)
存活概率(%)
100
80
60
40
20
0
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24
月数
处于风险的数量
46 29 17 8 5 2 2 2 2 2 2 0
B
OS中值=7.5个月
(95% CI=6.2, 8.3)
存活概率(%)
100
80
60
40
20
0
0 3 6 9 12 15 18 21 24 27 30
月数
处于风险的数量
51 41 28 12 8 5 4 2 1 1 0

图17

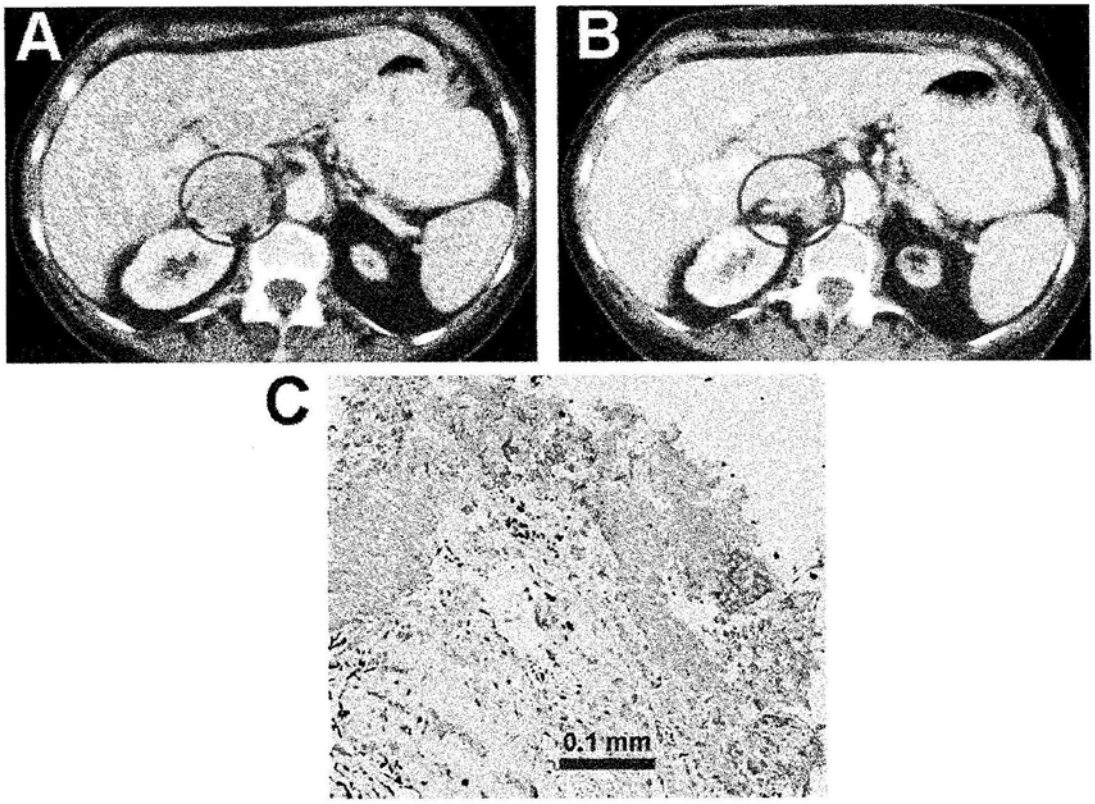


图18

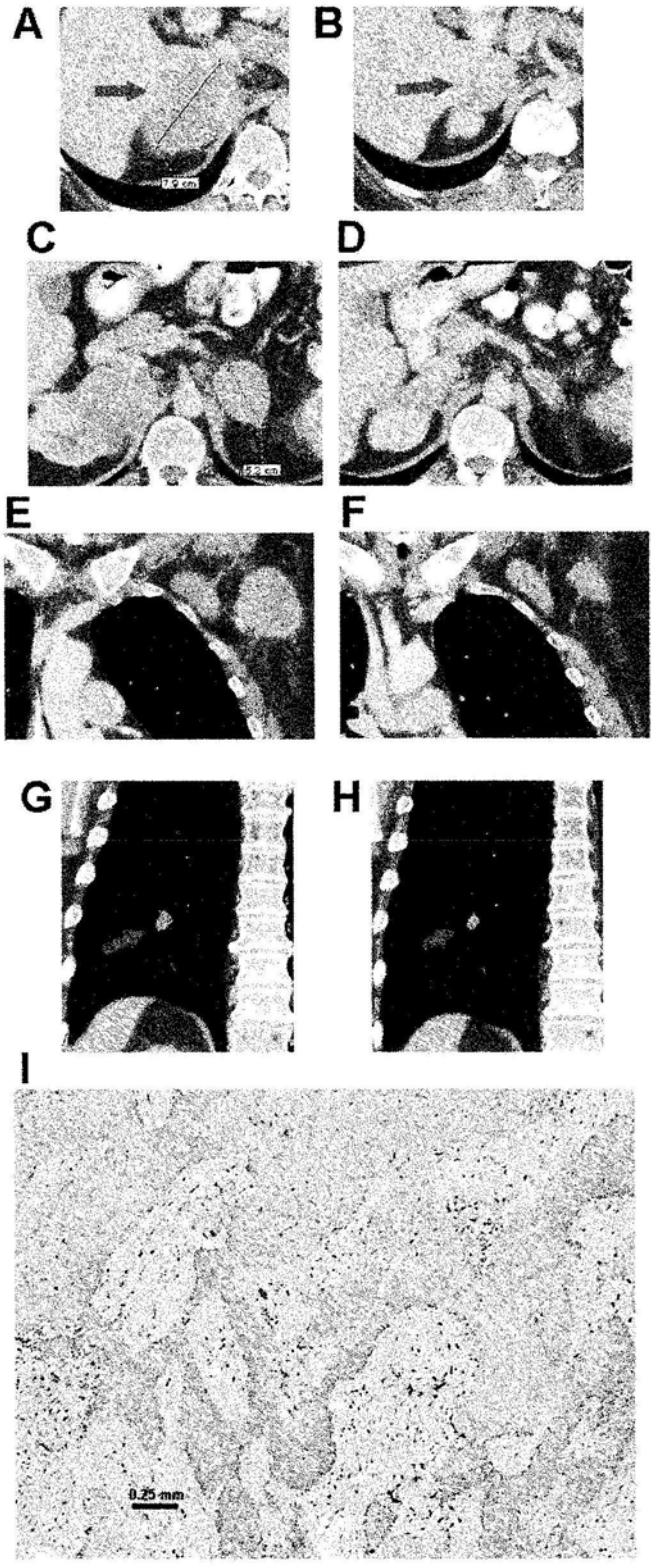


图19