



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107735090 B

(45) 授权公告日 2021.04.06

(21) 申请号 201680038303.X

(72) 发明人 S.V. 戈文丹 J.B. 盖尔

(22) 申请日 2016.06.29

N.J. 霍尔曼 D.M. 戈登伯格

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 107735090 A

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

(43) 申请公布日 2018.02.23

代理人 李志强 罗文锋

(30) 优先权数据

14/789375 2015.07.01 US

(51) Int.Cl.

A61K 31/4745 (2006.01)

15/161806 2016.05.23 US

A61K 45/06 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2017.12.28

(56) 对比文件

US 2010/233779 A1, 2010.09.16

(86) PCT国际申请的申请数据

US 2014/227180 A1, 2014.08.14

PCT/US2016/040002 2016.06.29

US 2004/0208883 A1, 2004.10.21

(87) PCT国际申请的公布数据

王妮等. Click Chemistry合成1,2,3-三唑

W02017/004144 EN 2017.01.05

氨基酸衍生物.《精细化工》.2009,第26卷

审查员 肖愿

(73) 专利权人 免疫医疗公司

权利要求书3页 说明书94页

地址 美国新泽西州

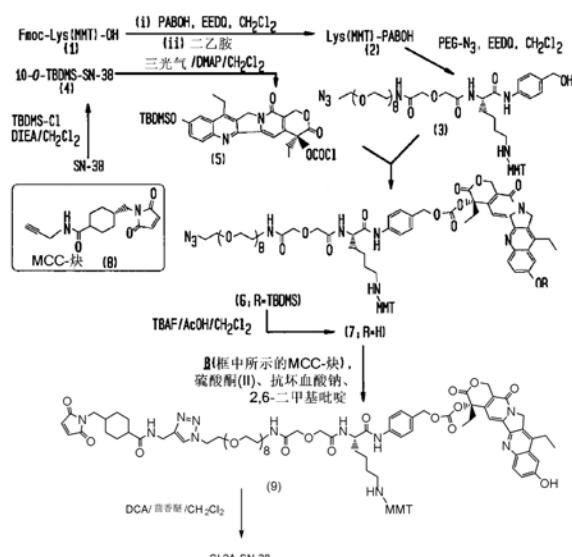
序列表73页 附图8页

## (54) 发明名称

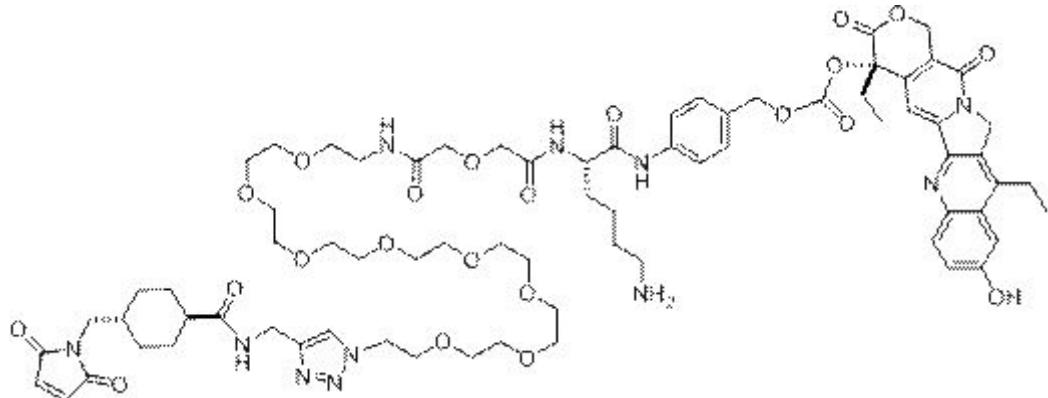
具有CL2A接头的抗体-SN-38免疫缀合物

## (57) 摘要

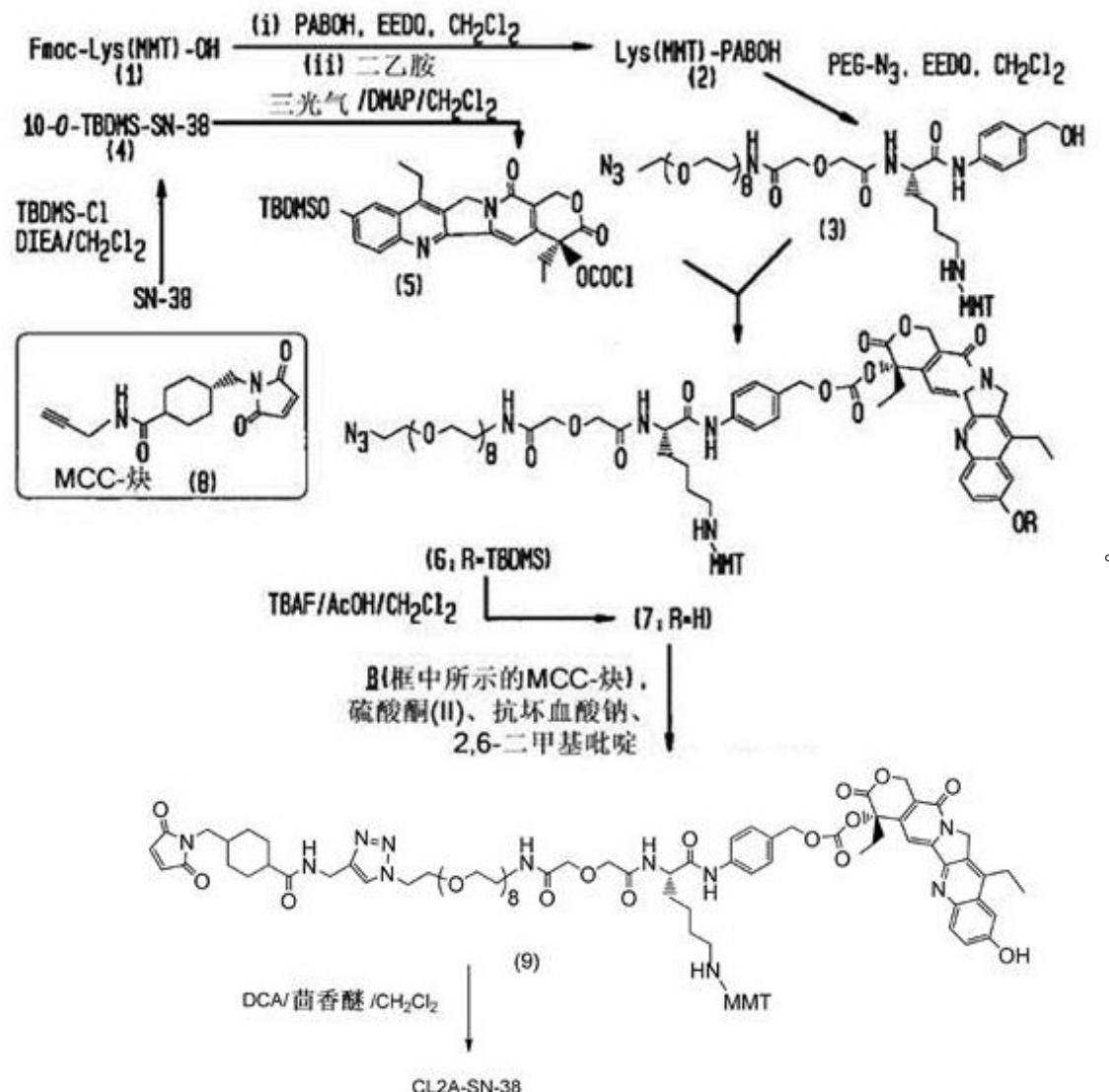
本发明涉及用于制备蛋白质或肽的SN-38缀合物, 优选抗体或抗原结合抗体片段的免疫缀合物的改进方法和组合物。更优选地, 使用CL2A接头以每个抗体或抗体片段1-12个, 更优选6-8个, 或者1-5个SN-38部分将所述SN-38连接至所述抗体或抗体片段。最优选地, 所述免疫缀合物以大规模批次制备, 对本文公开的反应方案进行各种修改以优化大规模的产率和回收率。其它实施方案涉及施用免疫缀合物的优化的剂量和/或日程表, 以使疾病治疗的效力最大化并使施用的副作用最小化。



1. 一种制备下述结构的化合物CL2A-SN-38的方法，



所述方法包括进行如下所示的反应方案：



2. 根据权利要求1所述的方法，其还包括使用1.1倍摩尔过量的四丁基氟化铵来除去甲硅烷基保护基，并且将中间体6转化成中间体7。

3. 根据权利要求1所述的方法，其还包括用pH为5.3的0.05 M乙酸钠缓冲液对包含中间体6的有机提取物进行三次洗涤。

4. 根据权利要求1所述的方法,其还包括用pH为5.3的0.05 M乙酸钠缓冲液对包含中间体7的有机提取物进行两次洗涤。
5. 根据权利要求1所述的方法,其中不用水洗涤包含中间体7或中间体8的有机提取物。
6. 根据权利要求1所述的方法,其还包括通过用二氯甲烷、乙酸乙酯和甲醇的混合物从硅胶柱的分步洗脱来纯化中间体7。
7. 根据权利要求1所述的方法,其中不将中间体9暴露于三苯基膦。
8. 根据权利要求1所述的方法,其还包括形成二相混合物,所述二相混合物包含:
  - a) 水中的硫酸铜和抗坏血酸钠;和
  - b) 二氯甲烷中的中间体7、中间体8和2,6-可力丁。
9. 根据权利要求8所述的方法,其还包括在室温下将所述二相混合物搅拌过夜。
10. 根据权利要求1所述的方法,其还包括通过EDTA洗涤和层析来纯化中间体9。
11. 根据权利要求1所述的方法,其还包括将中间体9浓缩成固体以供贮存,之后从中间体9除去甲硅烷基基团以形成CL2A-SN-38。
12. 根据权利要求11所述的方法,其还包括(i)形成固体中间体9的溶液;和(ii)使溶液中的中间体9与二氯乙酸和茴香醚反应以形成CL2A-SN-38。
13. 根据权利要求12所述的方法,其还包括通过逐滴添加叔丁基甲基醚(t-BME)来沉淀CL2A-SN-38。
14. 根据权利要求1所述的方法,其还包括使CL2A-SN38的马来酰亚胺部分与蛋白质或肽反应以制备缀合有SN38的蛋白质或肽。
15. 根据权利要求14所述的方法,其中所述马来酰亚胺部分与所述蛋白质或肽上的还原性巯基反应。
16. 根据权利要求14所述的方法,其中所述蛋白质或多肽是抗体或抗原结合抗体片段,并且所述缀合有SN-38的抗体或抗体片段是免疫缀合物。
17. 根据权利要求16所述的方法,其还包括通过切向流过滤(TFF)来纯化所述免疫缀合物。
18. 根据权利要求17所述的方法,其中使用25至30个渗透体积的缓冲液用50,000道尔顿分子量截留膜进行所述TFF。
19. 根据权利要求16所述的方法,其还包括在pH 6.0至7.0的Good氏生物缓冲液中配制所述免疫缀合物,并且冻干所述免疫缀合物以供贮存。
20. 根据权利要求19所述的方法,其中所述Good氏生物缓冲液选自由2-(N-吗啉代)乙磺酸(MES)、3-(N-吗啉代)丙磺酸(MOPS)、4-(2-羟乙基)哌嗪-1-乙磺酸(HEPES)和1,4-哌嗪二乙磺酸(PIPES)组成的组,pH范围为6-7,并且缓冲液浓度为10-100 mM。
21. 根据权利要求19所述的方法,其中所述Good氏生物缓冲液选自由2-(N-吗啉代)乙磺酸(MES)、3-(N-吗啉代)丙磺酸(MOPS)、4-(2-羟乙基)哌嗪-1-乙磺酸(HEPES)和1,4-哌嗪二乙磺酸(PIPES)组成的组,pH范围为6.5至7,并且缓冲液浓度为25 mM。
22. 根据权利要求20或21所述的方法,其中所述缓冲液是pH为6.5的25 mM MES缓冲液。
23. 根据权利要求16所述的方法,其中所述抗体是双特异性抗体或单克隆抗体。
24. 根据权利要求16所述的方法,其中所述抗体片段选自由以下组成的组:F(ab')<sub>2</sub>、F(ab)<sub>2</sub>、Fab'、Fab、Fv、scFv、单域抗体或IgG4抗体的半分子。

25. 根据权利要求16所述的方法,其中将所述抗体或抗体片段连接到1-12个拷贝的CL2A-SN38之间。

26. 根据权利要求16所述的方法,其中将所述抗体或抗体片段连接到6-8个拷贝的CL2A-SN38之间。

27. 根据权利要求16所述的方法,其中将所述抗体或抗体片段连接到1-5个拷贝的CL2A-SN38之间。

28. 根据权利要求16所述的方法,其中所述抗体是抗癌抗体、抗传染病抗体或抗自身免疫性疾病抗体。

29. 根据权利要求16所述的方法,其中所述抗体选自由以下组成的组:抗CD74抗体LL1、抗CD22抗体LL2、抗CD22抗体RFB4、抗EGP-1抗体RS7、抗MUC5AC抗体PAM4、抗粘蛋白抗体KC4、抗CD19抗体A19、抗CD20抗体A20、抗CEACAM5抗体MN-14、抗CEACAM6抗体MN-15、抗CEACAM6抗体MN-3、抗IGF-1R抗体R1、抗CSAp抗体Mu-9、抗AFP抗体Imm 31、抗TAG-72抗体CC49、抗PSMA抗体J591、抗PSMA抗体HuJ591、抗PSMA二聚体抗体AB-PG1-XG1-026、抗PSMA抗体D2/B、抗碳酸酐酶IX抗体G250和抗HLA-DR抗体hL243。

30. 根据权利要求16所述的方法,其中所述抗体或抗体片段结合选自由以下组成的组的抗原:碳酸酐酶IX、甲胎蛋白(AFP)、 $\alpha$ -辅肌动蛋白-4、ART-4、B7、Ba 733、BAGE、BrE3抗原、CA125、CAMEL、CAP-1、CASP-8/m、CCL19、CCL21、CD1、CD1a、CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD11A、CD14、CD15、CD16、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD29、CD30、CD32b、CD33、CD37、CD38、CD40、CD40L、CD44、CD45、CD46、CD52、CD54、CD55、CD59、CD64、CD66a-e、CD67、CD70、CD70L、CD74、CD79a、CD80、CD83、CD95、CD126、CD132、CD133、CD138、CD147、CD154、CDC27、CDK-4/m、CDKN2A、CTLA-4、CXCR4、CXCR7、CXCL12、HIF-1 $\alpha$ 、结肠特异性抗原-p (CSAp)、CEACAM5、CEACAM6、c-Met、DAM、EGFR、EGFRvIII、EGP-1 (TROP-2)、EGP-2、ELF2-M、Ep-CAM、成纤维细胞生长因子(FGF)、Flt-1、Flt-3、叶酸受体、G250抗原、GAGE、gp100、GR0- $\beta$ 、H2B、H3、H4、HLA-DR、HM1.24、人绒毛膜促性腺激素(HCG)、HER2/neu、HMGB-1、缺氧诱导因子(HIF-1)、HSP70-2M、HST-2、Ia、IGF-1R、IFN- $\gamma$ 、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、IFN- $\lambda$ 、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-23、IL-25、胰岛素样生长因子-1 (IGF-1)、KS1-4、Le-Y、LDR/FUT、巨噬细胞迁移抑制因子(MIF)、MAGE、MAGE-3、MART-1、MART-2、NY-ESO-1、TRAG-3、mCRP、MCP-1、MIP-1A、MIP-1B、MIF、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC5ac、MUC13、MUC16、MUM-1/2、MUM-3、NCA66、NCA95、NCA90、PD-1、PD-L1、PD-1受体、胎盘生长因子、p53、PLAGL2、前列腺酸性磷酸酶、PSA、PRAME、PSMA、P1GF、ILGF、ILGF-1R、IL-6、IL-25、RS5、RANTES、T101、SAGE、S100、存活蛋白、存活蛋白-2B、TAC、TAG-72、胰糖蛋白、TRAIL受体、TNF- $\alpha$ 、Tn抗原、Thomson-Friedenreich抗原、肿瘤坏死抗原、VEGFR、ED-B纤连蛋白、WT-1、17-1A抗原、补体因子C3、C3a、C3b、C5a、C5、bcl-2、bcl-6、Kras和癌基因产物。

## 具有CL2A接头的抗体-SN-38免疫缀合物

[0001] 相关申请

[0002] 本申请是2016年5月23日提交的美国专利申请序列号15/161,806的部分继续申请,所述美国专利申请序列号15/161,806是2015年7月1日提交的美国专利申请序列号14/789,375(现在为公告的美国专利号9,345,489)的分案申请,所述美国专利申请序列号14/789,375是2014年4月17日提交的美国专利序列号14/255,508(现在为公告的美国专利号9,107,960)的分案申请,所述美国专利序列号14/255,508是2013年7月23日提交的美国专利申请序列号13/948,732(现在为公告的美国专利号9,028,833)的继续部分申请,所述美国专利申请序列号13/948,732要求2012年12月13日的美国临时专利申请61/736,684和2013年1月7日提交的61/749,548在35U.S.C.119(e)下的权益。

[0003] 序列表

[0004] 本申请含有序列表,该序列表已经以ASCII格式电子提交并且通过引用整体并入本文。2016年6月27日创建的所述ASCII拷贝命名为IMM340W018\_SL.txt并且大小为60,632字节。

### 发明领域

[0005] 本发明涉及用于产生可靶向癌细胞、传染病生物体和/或与自身免疫性疾病相关细胞的治疗性免疫缀合物的改进合成方案,所述缀合物含有抗体部分和选自喜树碱药物组的药物部分。抗体和药物部分通过增加治疗效力的胞内可切割的键联来连接。最优先地,喜树碱是SN-38,并且连接抗体部分和药物部分的接头是CL2A,如下所述。在具体的实施方案中,免疫缀合物可以提供最佳效力和最小毒性的特定剂量和/或施用日程表施用。本文公开的用于人治疗用途的SN-38缀合抗体的施用的优化剂量和日程表显示从动物模型研究中无法预测的出乎意料的优异的效力,允许有效治疗对标准抗癌治疗(包括母体化合物伊立替康(CPT-11))有抗性的癌症。本文公开的新型合成方案提供了CL2A-SN-38缀合物的改进合成效率,污染性副产物的水平显著更低。

[0006] 发明背景

[0007] 多年来,特异性靶向药物治疗领域的科学家的目标是使用单克隆抗体(MAb)将毒性剂特异性递送至人癌症。已经开发了与肿瘤相关的MAb和合适的毒性剂的缀合物,但是在癌症治疗中尚且成败参半,并且在其它疾病(如传染病和自身免疫性疾病)中几乎没有应用。毒性剂最通常是化学治疗药物,然而发射颗粒的放射性核素,或者细菌或植物毒素也已经与MAb缀合,特别是用于癌症的治疗(Sharkey和Goldenberg,CA Cancer J Clin.2006年7-8月;56 (4) :226-243),并且最近与放射免疫缀合物用于某些传染病的临床前治疗(Dadachova和Casadevall,Q J Nucl Med Mol Imaging 2006;50 (3) :193-204)。

[0008] 使用MAb-化学治疗药物缀合物的优点是(a)化学治疗药物本身结构明确;(b)化学治疗药物使用非常明确的缀合化学连接到MAb蛋白,通常在远离MAb抗原结合区的特定位点;(c)MAb-化学治疗药物缀合物可以比涉及MAb和细菌或植物毒素的化学缀合物更可重复地制备,因此更适于商业开发和监管批准;和(d)MAb-化学治疗药物缀合物比放射性核素

MAb缀合物全身毒性低几个数量级。

[0009] 蛋白质-药物缀合物的早期工作表明,一旦药物已经内化到靶细胞中,药物优选以其原始形式释放,以使蛋白质-药物缀合物成为有用的治疗剂。Trouet等人(Proc.Natl.Acad.Sci.USA79:626-629 (1982))显示了在药物和抗体部分之间使用特异性肽接头的优点,所述肽接头以溶酶体切割以释放完整药物。值得注意的是,基于肿瘤内部的pH常常低于正常生理pH的观察,开发了使用温和酸可切割接头(诸如含有腙的接头)制备的MAb-化学治疗药物缀合物(Willner等人,美国专利5,708,146,Trail等人(Science261:212-215 (1993))。第一种批准的MAb-药物缀合物吉妥珠单抗奥佐米星(gemtuzumab ozogamicin)在抗CD33抗体人源化P67.6和有效的加利车霉素衍生物之间引入了酸不稳定的腙键。Sievers等人,J Clin Oncol.19:3244-3254 (2001);Hamann等人,Bioconjugate Chem.13:47-58 (2002)。在一些情况下,制备MAb-化学治疗药物缀合物,化学治疗药物与MAb之间具有还原不稳定的受阻二硫键(Liu等人,Proc Natl Acad Sci USA 93:8618-8623 (1996))。

[0010] 另一种可裂解的接头涉及组织蛋白酶B不稳定的二肽间隔物,如Phe-Lys或Val-Cit,类似于含有1至4个氨基酸的Trouet等人的溶酶体不稳定肽间隔物,其另外在药物和二肽之间并入可折叠的间隔物(Dubowchik等人,Bioconjugate Chem.13:855-869 (2002);Firestone等人,美国专利6,214,345 B1;Doronina等人,Nat Biotechnol.21:778-784 (2003))。后一种方法也用于制备喜树碱的免疫缀合物(Walker等人,Bioorg Med Chem Lett.12:217-219 (2002))。已经探索的另一个可切割部分是并入到抗体和化学治疗药物之间的接头中的酯键联。Gillimard和Saragovi已经发现,当紫杉醇的酯与抗大鼠p75 MAb,MC192或抗人TrkA MAb,5C3缀合时,发现缀合物表现出靶特异性毒性。Gillimard和Saragovi,Cancer Res.61:694-699 (2001)。

[0011] 目前抗体-药物缀合物设计的概念强调使用仅在胞内切割的稳定键连接到抗体的超毒性药物的使用。这种方法已被用于设计超级毒性药物,如加利车霉素、单甲基奥瑞斯他汀-E(MMAE)和美登木素生物碱的缀合物。尽管与MAb的非常稳定的键合导致循环的稳定,但缀合物也在肝脏、脾脏和肾脏中加工,从而在那些器官中释放出毒性药物,并潜在地降低了疾病治疗应用中的治疗窗口。虽然ADCETRIS®(本妥昔单抗维多汀(brentuximab vedotin))用于霍奇金氏淋巴瘤以及KADCYLA®(阿多曲妥珠单抗美坦新(ado-trastuzumab emtansine))用于难治性乳腺癌的目前监管批准是令人鼓舞的,但最大可施用剂量的加利车霉素缀合物在非霍奇金氏淋巴瘤中的治疗效力缺乏及其随后停用,以及用于AML的吉妥珠单抗奥佐米星的市场召回指向在ADC中使用的超毒性剂的限制。

[0012] 本发明的缀合物比未缀合的或“裸”抗体或抗体片段具有更大的效力,尽管此类未缀合的抗体部分已经用于特定情况。例如,在癌症中,裸抗体已经在治疗淋巴瘤(阿仑珠单抗和利妥昔单抗)、结肠直肠癌和其它癌症(西妥昔单抗和贝伐珠单抗)、乳腺癌(曲妥珠单抗)以及现在在临床开发中的大量抗体(例如,依帕珠单抗、维妥珠单抗、米拉珠单抗)中发挥作用。在这些情况的大多数中,临床用途已经涉及将这些裸的或未缀合的抗体与其它疗法(如化学疗法或放射疗法)组合。

[0013] 已经公开了使用CL2A接头将治疗药物如SN-38连接到抗体部分(例如美国专利号7,999,083和8,080,250,实施例部分通过引用并入本文)。然而,需要制备和使用CL2A和

MAb-CL2A-SN-38缀合物的更有效的方法,包括导致最大效力和最小毒性的优化的剂量方案,以及CL2A-SN-38和抗体-CL2A-SN-38缀合物的有效大规模生产。

## 发明内容

[0014] 本发明通过提供用于制备和施用喜树碱-抗体免疫缀合物的改进的方法和组合物解决了本领域的未满足的需求。优选地,喜树碱是SN-38。所公开的方法和组合物可用于治疗多种疾病和病况,其对于其它治疗形式是难治性的或不太响应的,并且可包括下述疾病,针对所述疾病可以开发或者可用或已知用于选择性靶向的合适抗体或抗原结合抗体片段。可用主题免疫缀合物治疗的优选疾病或病况包括例如癌症、自身免疫性疾病、免疫功能障碍疾病或由感染性生物体引起的疾病。

[0015] 本发明的各种实施方案涉及用于产生CL2A-SN-38和mAb-CL2A-SN-38缀合物的新合成方案,如图1中所例示。出乎意料的是,新的合成方案显示了改进的生产效率和产率,污染副产物的水平显著降低。在具体的实施方案中,新的合成方案可包括使用在本发明的实践中发现有利的特定中间体、前体、反应步骤和/或反应条件。尽管图1和权利要求1中所示的方案可以作为合成方案的一个特别优选的实施方案公开,但是普通技术人员将认识到可以在本发明的范围内使用替代方案。

[0016] 已经发现在要求保护的发明的实践中出乎意料地有利的具体步骤或条件可以包括以下中的一个或多个:(i)在将甲硅烷基保护的中间体6(图1)转化成脱甲硅烷化的中间体7(图1)中,四丁基氟化铵以1.1倍摩尔过量使用,而非如先前公开(例如美国专利号9,107,960)以1.4倍摩尔过量使用。此水平的试剂同样有效地脱甲硅烷化,同时降低了杂质特征,从而提高了中间体7的纯度并且导致改进的产率。(ii)如先前公开(美国专利号9,107,960),在制备中间体6和7两者中的水性检测中(图1),后处理涉及对于中间体6用0.05M乙酸钠缓冲液,pH5.3将有机提取物洗涤4次,以及对于中间体7用0.25M柠檬酸盐缓冲液,pH6洗涤4次,随后在每种情况下用水洗涤。在改进的过程中,对于中间体6将缓冲液洗涤减少到3倍,并且对于中间体7将缓冲液洗涤减少到2倍,并且在两种情况下都除去水洗涤。这些修改大大减少了水-有机乳液的形成,并改进了有机提取物中的产物回收率。(iii)美国专利9,107,960中公开的中间体7(图1)的层析纯化包括使用二氯甲烷-甲醇混合物进行洗脱。在改进的过程中,洗脱修改为使用二氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇混合物的组合,其中改变甲醇浓度,然后改变二氯甲烷-甲醇混合物的浓度。这导致了中间体的更好且更快的分离,并且改进了回收率。使用这些改进的程序,通过结合这些过程改变,从中间体4到中间体7的3步顺序的总产率从29-40%的范围改进到64%。

[0017] CL2A-SN-38的合成方案可进一步利用以下改进中的一个或多个。(iv)在先前公开的合成方案(美国专利号9,107,960)中,中间体7和8(图1)产生中间体9(图1)之间的铜(+1)催化反应使用二氯甲烷中溴化亚铜和三苯基膦与添加的叔胺(如二异丙基乙胺)的预先形成的复合物进行。随后发现,在单独存在三苯基膦的情况下,中间体7的产物质量随时间劣化,表明该试剂的有害作用,一旦铜催化反应完成就要求其迅速除去。这有可能降低纯化的中间体9的产率(图1)。如在下面的实施例中所公开的,在本方案中,使用含有水中的硫酸铜和抗坏血酸和二氯甲烷中的中间体7和8以及2,6-可力丁(2,6-collidine)的双相混合物进行反应。通过搅拌双相溶液过夜,通常18小时,转化完成,粗产物通过用EDTA水溶液简单洗

涤而与硫酸铜和抗坏血酸盐分离。这随后进行层析纯化，导致产物产率改善。修改的程序避免使用三苯基膦。(v) 中间体9(图1)在溶液中以及作为无溶剂的分离材料的稳定性特征显示产物维持纯度>97%，作为固体产物在-20℃下贮存4天或作为二氯甲烷中的溶液在室温贮存1天。在后一种情况下，在室温下贮存4天将纯度降低到89.4%，而贮存在-20℃的溶液显示仅92%的纯度。如美国专利号9,107,960所述，使用层析法和EDTA洗涤后得到的二氯甲烷中的物质本身，来进行二氯乙烷(DCA)和茴香醚介导的脱保护反应。在该情况下，随溶液形式的中间体9的贮存长度，最终材料(产物10，其是CL2A-SN-38)的质量变化。在改进的过程中，将纯化后的中间体9(图1)浓缩为固体，随后将所述固体用于最终步骤。该修改消除了最终脱保护步骤之前中间体9产物质量变化的不确定性。该步骤的进一步改变涉及在反应之后将粗产物的溶液，在数小时内逐滴加入剧烈搅拌的叔丁基甲基醚(t-BME)中，这使得产物以可过滤固体的形式沉淀。如果反应混合物的添加不是逐渐的，并且如果不剧烈搅拌的话，则产物就会变成油状物而不是固体。(vi) 在将中间体1转化为中间体2(图1)和将中间体2转化为中间体3(图1)时，将EEDQ用作酰胺偶联剂。但是，这些反应不受所示的特定试剂的限制。本领域技术人员将认识到，酰胺偶联可以用许多不同的试剂完成，如综述于Han S-Y和Kim Y-A. Recent development of peptide coupling reagents in organic synthesis. *Tetrahedron* 2004;60:2447-2467。

[0018] 在其它实施方案中，所要求保护的发明涉及喜树碱，如SN-38的抗体缀合物的治疗用途，所述抗体缀合物在体外具有纳摩尔毒性，相比于加利车霉素、美登木素生物碱或MMAE等超毒性化学治疗剂的亚纳摩尔至皮摩尔毒性。使用不具有超毒性的药物允许使用不需要细胞内化来释放游离药物，而是允许药物的一些胞外释放的抗体-药物接头。用本文所述的CL2A接头，在24小时内释放50%的缀合药物，从而通过胞外和胞内两者释放来增加药物的生物利用度。另外，相对无毒性药物的使用允许施用较高剂量的ADC，导致更好的疗效。

[0019] 并入主题免疫缀合物中的抗体可以是各种同种型，优选人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4，更优选其包含人IgG1铰链和恒定区序列。抗体或其片段可以是嵌合、人源化或完全人抗体或其抗原结合片段，如半-IgG4抗体，如由van der Neut Kolfschoten等人(Science 2007;317:1554-1557)所述，或单域抗体(例如纳米抗体)，如商品化的(例如ABLYNX®, Ghent, Belgium)。更优选地，可以设计或选择抗体或其片段以包含属于特定同种异型的人恒定区序列，这在将免疫缀合物施用于人受试者时可以导致降低的免疫原性。优选的同种异型施用包括非G1m1同种异型(nG1m1)，如G1m3、G1m3,1、G1m3,2或G1m3,1,2。更优选地，同种异型选自nG1m1、G1m3、nG1m1,2和Km3同种异型。

[0020] 使用的抗体可以与本领域已知的任何疾病相关抗原结合。当疾病状态是癌症时，例如，许多由肿瘤细胞表达或以其它方式与肿瘤细胞相关的抗原是本领域已知的，包括但不限于碳酸酐酶IX、甲胎蛋白(AFP)、 $\alpha$ -辅肌动蛋白-4、A3、A33抗体特异性抗原、ART-4、B7、Ba 733、BAGE、BrE3抗原、CA125、CAMEL、CAP-1、CASP-8/m、CCL19、CCL21、CD1、CD1a、CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD11A、CD14、CD15、CD16、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD29、CD30、CD32b、CD33、CD37、CD38、CD40、CD40L、CD44、CD45、CD46、CD52、CD54、CD55、CD59、CD64、CD66a-e、CD67、CD70、CD70L、CD74、CD79a、CD80、CD83、CD95、CD126、CD132、CD133、CD138、CD147、CD154、CDC27、CDK-4/m、CDKN2A、CTLA-4、CXCR4、CXCR7、CXCL12、HIF-1 $\alpha$ 、结肠特异性抗原-p(CSap)、CEACAM5、CEACAM6、c-Met、DAM、EGFR、EGFRvIII、EGP-1(TROP-2)、EGP-2、

ELF2-M、Ep-CAM、成纤维细胞生长因子(FGF)、F1t-1、F1t-3、叶酸受体、G250抗原、GAGE、gp100、GRO-β、HLA-DR、HM1.24、人绒毛膜促性腺激素(HCG)及其亚基、HER2/neu、组蛋白H2B、组蛋白H3、组蛋白H4、HMGB-1、缺氧诱导因子(HIF-1)、HSP70-2M、HST-2、Ia、IGF-1R、IFN-γ、IFN-α、IFN-β、IFN-λ、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-23、IL-25、胰岛素样生长因子-1(IGF-1)、KC4抗原、KS-1抗原、KS1-4、Le-Y、LDR/FUT、巨噬细胞迁移抑制因子(MIF)、MAGE、MAGE-3、MART-1、MART-2、NY-ESO-1、TRAG-3、mCRP、MCP-1、MIP-1A、MIP-1B、MIF、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC5ac、MUC13、MUC16、MUM-1/2、MUM-3、NCA66、NCA95、NCA90、胰腺癌粘蛋白、PD-1、PD-L1、PD-1受体、胎盘生长因子、p53、PLAGL2、前列腺酸性磷酸酶、PSA、PRAME、PSMA、P1GF、ILGF、ILGF-1R、IL-6、IL-25、RS5、RANTES、T101、SAGE、S100、存活蛋白、存活蛋白-2B、TAC、TAG-72、腱糖蛋白、TRAIL受体、TNF-α、Tn抗原、Thomson-Friedenreich抗原、肿瘤坏死抗原、VEGFR、ED-B纤连蛋白、WT-1、17-1A抗原、补体因子C3、C3a、C3b、C5a、C5、血管发生标志物、bcl-2、bcl-6、Kras、癌基因标志物和癌基因产物(参见例如Sensi等人,Clin Cancer Res 2006,12:5023-32;Parmiani等人,J Immunol 2007,178:1975-79;Novellino等人Cancer Immunol Immunother 2005,54:187-207)。优选地,抗体结合AFP、CEACAM5、CEACAM6、CSAp、EGP-1(TROP-2)、AFP、MUC5ac、CD74、CD19、CD20、CD22或HLA-DR。

[0021] 可以利用的示例性抗体包括但不限于hR1(抗IGF-1R,美国专利申请序列号13/688,812,于11/29/12提交)、hPAM4(抗MUC5ac,美国专利号7,282,567)、hA20(抗CD20,美国专利号7,151,164)、hA19(抗CD19,美国专利号7,109,304)、hIMMU31(抗AFP,美国专利号7,300,655)、hLL1(抗CD74,美国专利号7,312,318)、hLL2(抗CD22,美国专利号5,789,554)、hRFB4(抗CD22,美国专利号9,139,649)、hMu-9(抗CSAp,美国专利号7,387,773)、hL243(抗HLA-DR,美国专利号7,612,180)、hMN-14(抗CEACAM5,美国专利号6,676,924)、hMN-15(抗CEACAM6,美国专利号8,287,865)、hRS7(抗EGP-1,美国专利号7,238,785)、hMN-3(抗CEACAM6,美国专利号7,541,440)、Ab124和Ab125(抗CXCR4,美国专利号7,138,496),每篇引用的专利或申请的实施例部分通过引用并入本文。更优选地,抗体是IMMU-31(抗AFP)、hRS7(抗TROP-2)、hMN-14(抗CEACAM5)、hMN-3(抗CEACAM6)、hMN-15(抗CEACAM6)、hLL1(抗CD74)、hLL2(抗CD22)、hL243或IMMU-114(抗HLA-DR)、hA19(抗CD19)或hA20(抗CD20)。如本文中所用,术语依帕珠单抗(epratuzumab)和hLL2可互换,术语维妥珠单抗(veltuzumab)和hA20、hL243g4P、hL243gamma4P和IMMU-114也可互换。在具体的优选实施方案中,免疫缀合物可以是具有CL2A接头的hMN-14-SN-38、hMN-3-SN-38、hMN-15-SN-38、hIMMU-31-SN-38、hRS7-SN-38、hR1-SN-38、hA20-SN-38、hPAM4-SN-38、hL243-SN-38、hLL1-SN-38、hRFB4-SN-38、hMu-9-SN-38或hLL2-SN-38缀合物。

[0022] 使用的替代抗体包括但不限于阿昔单抗(抗糖蛋白IIb/IIIa)、阿仑珠单抗(alemtuzumab)(抗CD52)、贝伐珠单抗(抗VEGF)、西妥昔单抗(抗EGFR)、吉妥珠单抗(抗CD33)、替伊莫单抗(ibritumomab)(抗CD20)、帕尼单抗(panitumumab)(抗EGFR)、利妥昔单抗(抗CD20)、托西莫单抗(抗CD20)、曲妥珠单抗(抗ErbB2)、(lambrolizumab)(抗PD-1受体)、纳武单抗(抗PD-1受体)、伊匹单抗(ipilimumab)(抗CTLA-4)、阿巴伏单抗(abagovomab)(抗CA-125)、阿德木单抗(adecatumumab)(抗EpCAM)、atlizumab(抗IL-6受体)、贝那利珠单抗(benralizumab)(抗CD125)、奥比妥珠单抗(obinutuzumab)(GA101、抗

CD20)、CC49(抗TAG-72)、AB-PG1-XG1-026(抗PSMA、美国专利申请11/983,372、保藏为ATCC PTA-4405和PTA-4406)、D2/B(抗PSMA、WO 2009/130575)、托珠单抗(tocilizumab)(抗IL-6受体)、巴利昔单抗(basiliximab)(抗CD25)、达利珠单抗(抗CD25)、依法珠单抗(抗CD11a)、GA101(抗CD20;Glycart Roche)、莫罗单抗(muromonab)-CD3(抗CD3受体)、那他珠单抗(抗α4整联蛋白)、奥马珠单抗(抗IgE);抗TNF-α抗体,如CDP571(0fei等人,2011,Diabetes 45: 881-85)、MTNFA1、M2TNFA1、M3TNFA1、M3TNFABI、M302B、M303(Thermo Scientific, Rockford, IL)、英利昔单抗(Centocor, Malvern, PA)、赛妥珠单抗聚乙二醇(certolizumab pegol)(UCB, Brussels, Belgium)、抗CD40L(UCB, Brussels, Belgium)、阿达木单抗(adalimumab)(Abbott, Abbott Park, IL)、Benlysta(Human Genome Sciences);用于治疗阿尔兹海默氏病的抗体,如Alz 50(Ksiezak-Reding等人,1987,J Biol Chem 263:7943-47)、甘特如单抗(gantenerumab)、索拉珠单抗(solanezumab)和英利昔单抗;抗纤维蛋白抗体,如59D8,T2G1s、MH1;抗CD38抗体,如MOR03087(MorphoSys AG)、MOR202(Celgene)、HuMax-CD38(Genmab)或达拉珠单抗(daratumumab)(Johnson&Johnson);(抗HIV抗体,如P4/D10(美国专利8,333,971)、Ab 75、Ab 76、Ab 77(Paulik等人,1999,Biochem Pharmacol 58:1781-90),以及Polymun(Vienna, Austria)描述和出售的抗HIV抗体,也记载于美国专利5,831,034、美国专利5,911,989和Vcelar等人,AIDS 2007;21(16):2161-2170和Joos等人,Antimicrob Agents Chemother.2006;50(5):1773-9,全部通过引用并入本文;和针对病原体的抗体,如CR6261(抗流感)、艾韦单抗(exbivirumab)(抗乙肝)、非维珠单抗(felvizumab)(抗呼吸道合胞病毒)、福拉韦单抗(foravirumab)(抗狂犬病病毒)、莫维珠单抗(motavizumab)(抗呼吸道合胞病毒)、帕利珠单抗(palivizumab)(抗呼吸道合胞病毒)、帕诺库单抗(panobacumab)(抗假单胞菌)、瑞非韦鲁单抗(rafivirumab)(抗狂犬病病毒)、瑞加韦单抗(regavirumab)(抗巨细胞病毒)、司韦单抗(sevirumab)(抗巨细胞病毒)、tivirumab(抗乙肝)和乌珠单抗(urtoxazumab)(抗大肠杆菌)。

[0023] 优选地,抗体部分连接到至少一个药物部分,更优选1至约5个药物部分,或约7至12个药物部分。在各个实施方案中,抗体部分可以连接到4至6个药物部分,6至8个药物部分或7至8个药物部分。每个抗体部分的药物部分的数目可以是1、2、3、4、5、6、7、8或更多。

[0024] 各种实施方案可涉及主题方法和组合物用于治疗癌症的用途、所述癌症包括但不限于非霍奇金氏淋巴瘤、B-细胞急性和慢性淋巴样白血病、伯基特淋巴瘤、霍奇金氏淋巴瘤、急性大B细胞淋巴瘤、毛细胞白血病、急性髓性白血病、慢性髓性白血病、急性淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、T细胞淋巴瘤和白血病、多发性骨髓瘤、瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症、癌、黑素瘤、肉瘤、神经胶质瘤、骨和皮肤癌。癌症可包括口腔癌、食管癌、胃肠道癌、肺道癌、肺癌、胃癌、结肠癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、子宫癌、子宫内膜癌、宫颈癌、膀胱癌、胰腺癌、骨癌、脑癌、结缔组织癌、肝癌、胆囊癌、膀胱癌、肾癌、皮肤癌、中枢神经系统癌和睾丸癌。

[0025] 可以潜在用主题免疫缀合物治疗的示例性自身免疫或免疫功能障碍疾病包括急性免疫性血小板减少症、慢性免疫性血小板减少症、皮肌炎、西登哈姆舞蹈病、重症肌无力、系统性红斑狼疮、狼疮性肾炎、风湿热、多腺综合征、大疱性类天疱疮、寻常型天疱疮、糖尿病(例如青少年糖尿病)、亨诺-许兰氏紫癜、链球菌后肾炎、结节性红斑、高安氏动脉炎、ANCA相关性血管炎、艾迪生病、类风湿性关节炎、多发性硬化症、结节病、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、古德帕斯彻氏综合征、闭塞性血栓炎、舍格伦综合征、原发性胆汁性肝硬化、桥本甲状腺炎、甲状腺毒症、硬皮病、慢性活动性肝炎、多发性肌炎/皮肌炎、多发性软骨炎、寻常型天疱疮、韦格纳氏肉芽肿、膜性肾病、肌萎缩性侧索硬化症、脊髓痨、巨细胞动脉炎/多肌痛、恶性贫血、快速进行性肾小球性肾炎、银屑病、纤维化肺泡炎、移植物抗宿主病 (GVHD)、器官移植排斥、脓毒症、败血症和炎症。

[0026] 另外,主题方法和组合物可用于治疗传染病,例如涉及病原体如细菌、立克次氏体、支原体、原生动物、真菌、病毒、寄生虫或其它微生物媒介感染的疾病。实例包括引起 AIDS 的人免疫缺陷病毒 (HIV)、结核分枝杆菌、无乳链球菌、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、嗜肺军团菌、化脓链球菌、大肠杆菌、淋病奈瑟菌、脑膜炎奈瑟菌、肺炎球菌、新型隐球菌、荚膜组织胞浆菌、流感嗜血杆菌 B、苍白密螺旋体、莱姆病螺旋体、西尼罗病毒、铜绿假单胞菌、麻风分枝杆菌、流产布鲁氏菌、狂犬病病毒、流感病毒、巨细胞病毒、单纯疱疹病毒 I、单纯疱疹病毒 II、人血清细小样病毒、呼吸道合胞病毒、水痘带状疱疹病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、麻疹病毒、腺病毒、人 T 细胞白血病病毒、埃巴病毒、鼠白血病病毒、腮腺炎病毒、水泡性口炎病毒、辛德比斯病毒、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒、疣病毒、蓝舌病毒、仙台病毒、猫白血病病毒、reovirus、脊髓灰质炎病毒、猿猴病毒 40、小鼠乳腺肿瘤病毒、登革热病毒、风疹病毒、恶性疟原虫、间日疟原虫、鼠弓形虫、让氏锥虫、克鲁斯锥虫、罗得西亚锥虫、布氏锥虫、曼氏血吸虫、日本血吸虫、牛巴贝虫、埃尔梅利亚虫 (*Elmeria tenella*)、旋盘尾丝虫、热带利什曼原虫 (*Leishmania tropica*)、旋毛线虫 (*Trichinella spiralis*)、小泰勒虫 (*Theileria parva*)、水泡绦虫 (*Taenia hydatigena*)、羊绦虫 (*Taenia ovis*)、牛肉绦虫 (*Taenia saginata*)、胞生绦虫 (*Echinococcus granulosus*)、科氏中殖孔绦虫 (*Mesocestoides corti*)、关节炎支原体 (*Mycoplasma arthritidis*)、猪鼻支原体 (*M. hyorhinis*)、口腔支原体 (*M. orale*)、精氨酸支原体 (*M. arginini*)、拉氏无胆甾支原体 (*Acholeplasma laidlawii*)、唾液支原体 (*M. salivarium*) 和肺炎支原体 (*M. pneumoniae*)。列出抗感染生物体 (抗毒素和抗病毒抗体) 以及其它靶标的抗体的综述包含于 Casadevall, Clin Immunol 1999;93 (1) :5-15, 所述文献通过引用并入本文。

[0027] 在涉及癌症治疗的某些实施方案中,药物缀合物可以与另一种治疗形式 (例如手术、放射疗法、化学疗法、裸抗体的免疫疗法、放射免疫疗法、免疫调节剂或疫苗) 组合使用。相似的组合疗法可以用于治疗其它适合于抗体部分的疾病,如自身免疫性疾病。例如,喜树碱缀合物可以与 TNF 抑制剂、B 细胞抗体、干扰素、白细胞介素和其它有效药剂联合用于治疗自身免疫性疾病,如类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、舍格伦综合征、多发性硬化症、血管炎、以及 I 型糖尿病 (青少年糖尿病)。这些组合疗法可以允许在此类组合中给予较低剂量的每种治疗剂,从而减少某些严重的副作用,并且潜在地减少所需的治疗过程。

[0028] 在传染病中,药物免疫缀合物可以与其它治疗药物、免疫调节剂、裸 MAb 或疫苗 (例如针对肝炎、HIV 或乳头瘤病毒的 MAb 或基于这些病毒的免疫原的疫苗或激酶抑制剂,如在乙肝中) 组合。针对这些和其它病毒病原体的抗体和基于抗原的疫苗是本领域已知的,并且在一些情况下已经在商业上使用。最近由 Reichert 和 Dewitz (Nat Rev Drug Discovery 2006;5:191-195) (通过引用并入本文) 综述了抗感染性单克隆抗体的开发,其总结了已经寻求的裸抗体治疗所针对的优选病原体,导致在 III 期临床试验中或正在销售的抗体针对的仅 2 种病原体 (呼吸道合胞病毒和耐甲氧西林金黄色葡萄球菌),另有 25 种在临床研究中

以及20种在临床研究中中断。对于组合疗法,例如在美国专利号4,925,648、5,332,567、5,439,665、5,601,825、5,609,846、5,612,016、6,120,768、6,319,500、6,458,933、6,548,275;以及美国专利申请公开号20020136690和20030103982中公开了放射免疫疗法用于治疗传染病的用途,所述专利各自的实施例部分通过引用并入本文。

[0029] 免疫缀合物的优选最佳剂量可包括3mg/kg至18mg/kg的剂量,优选每周一次、每周两次、每隔一周或每三周一次给予。最佳给药日程表可以包括连续两周的治疗周期,随后是一周、二周、三周或四周的休息,或交替疗法和休息的周,或治疗一周,然后休息两周、三周或四周,或者治疗三周,然后休息一周、二周、三周或四周,或者治疗四周,然后休息一周、两周、三周或四周,或者治疗五周,然后是休息一周、两周、三周、四周或五周,或每两周一次、每三周一次或一个月一次施用。治疗可延长任何数目的周期,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。示例性的使用剂量可以包括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和24mg/kg。优选的剂量是4、6、8、9、10、12、14、16或18mg/kg。最优选的剂量是8或10mg/kg。本领域普通技术人员将认识到,在选择免疫缀合物的最佳剂量时可以考虑多种因素,诸如年龄、一般健康状况、特定器官功能或体重以及既往治疗对特定器官系统(例如骨髓)的影响,并且在治疗过程期间可以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剂后观察到肿瘤缩小的证据。本文公开的施用的优化的剂量和日程表在人受试者中显示出乎意料的优异效力和降低的毒性,这从动物模型研究中不能预测。令人惊讶的是,优异的效力允许治疗先前发现对一种或多种标准抗癌疗法(包括在体内衍生出SN-38的母体化合物CPT-11)具有抗性的肿瘤。

[0030] 用要求保护的本组合物和方法取得的令人惊讶的结果是高剂量的抗体-药物缀合物的出乎意料的耐受性,即使在重复输注的情况下,仅有观察到的恶心、呕吐和腹泻的相对较低等级的毒性以及皮疹,或可控的中性粒细胞减少症。另一个令人惊讶的结果是抗体-药物缀合物没有积累,这不同于具有与白蛋白、PEG或其它载体缀合的SN-38的其它产物。即使在反复或增加给药后,缺乏积累与改进的可耐受性和缺乏严重毒性相关。这些令人惊讶的结果允许优化剂量和递送日程表,具有出乎意料的高效力和低毒性。所要求保护的方法提供以前具有抗性癌症的个体中的肿瘤大小缩小15%或更多、优选20%或更多、优选30%或更多、更优选40%或更多(如以最长直径测量)。本领域普通技术人员将认识到肿瘤大小可以通过多种不同技术来测量,例如总肿瘤体积、任何维度的最大肿瘤大小或几个维度的大小测量的组合。这可以用标准的放射学程序进行,如计算机体层摄影术、超声波检测和/或正电子发射断层扫描。测量大小的手段不如通过免疫缀合物治疗观察肿瘤大小减小,优选导致消除肿瘤的趋势重要。

[0031] 尽管免疫缀合物可以作为定期推注施用,但是在替代实施方案中,免疫缀合物可以通过连续输注抗体-药物缀合物来施用。为了在血液中增加免疫缀合物的C<sub>max</sub>和延长PK,连续输注可以例如通过留置导管施用。此类装置在本领域中是已知的,如HICKMAN®、BROVIAC®或PORT-A-CATH®导管(参见例如Skolnik等人, Ther Drug Monit 32: 741-48, 2010),并且可以使用任何此类已知的留置导管。多种连续输注泵在本领域中也是已知的,并且可以使用任何此类已知的输注泵。连续输注的剂量范围可以在每天0.1至

2.0mg/kg之间。更优选地,这些免疫缀合物可以在2-5小时,更优选2-3小时的相对短时间内通过静脉内输注来施用。

[0032] 在特别优选的实施方案中,免疫缀合物和给药日程表可以在对标准疗法有抗性的患者中有效。例如,可以将mAb-CL2A-SN-38免疫缀合物施用于对先前用SN-38的母体药剂伊立替康的治疗没有响应的患者。令人惊讶的是,伊立替康抗性患者可以对mAb-CL2A-SN-38显示部分响应。免疫缀合物特异性靶向肿瘤组织的能力可以通过治疗剂的改进靶向和增强递送来克服肿瘤抗性。不同SN-38免疫缀合物,或SN-38-抗体缀合物与缀合至放射性核素、毒素或其它药物的抗体组合的组合可以提供更加改进的效力和/或降低的毒性。特定的优选受试者可以是转移性结肠癌患者、三重阴性乳腺癌患者、HER+,ER+,孕酮+乳腺癌患者、转移性非小细胞肺癌(NSCLC)患者、转移性胰腺癌患者、转移性肾细胞癌患者、转移性胃癌患者、转移性前列腺癌患者或转移性小细胞肺癌患者。在不同的实施方案中,治疗可适用于治疗一线、二线、三线或其它患者。

[0033] 某些实施方案涉及用于以改进的产率和/或效率大规模制备CL2A-SN38缀合物和抗体-CL2A-SN-38免疫缀合物的改进方法。在图1所示的合成方案中阐述了特别优选的实施方案。优选地,CL2A接头末端处的马来酰亚胺基团与抗体部分或其它靶向肽或蛋白质上还原性半胱氨酸残基上的巯基侧链反应,尽管将CL2A部分连接至抗体部分的其它方法是已知的并且可以使用。在进一步优选的实施方案中,由CL2A-SN-38部分制备的免疫缀合物通过切向流过滤来纯化,从而避免了尺寸排阻和疏水相互作用柱上的繁琐的层析,并且能够在纯化后获得高蛋白质回收率。

[0034] 附图简述

[0035] 图1:改进的大规模生产CL2A-SN-38的新方案。

[0036] 图2:用MAb-CL2A-SN-38缀合物体内治疗携带Capan1人胰腺癌的无胸腺裸小鼠。

[0037] 图3:用MAb-CL2A-SN-38缀合物体内治疗携带BxPC3人胰腺癌的无胸腺裸小鼠。

[0038] 图4:用hMN-14-CL2A-SN-38缀合物体内治疗携带LS174T人结肠癌的无胸腺裸小鼠。

[0039] 图5A:hRS7-SN-38ADC在携带人非小细胞肺肿瘤异种移植物的小鼠中的治疗效力。每4天用hRS7-CL2-SN-38注射携带Calu-3肿瘤的小鼠(N=5-7),总共注射4次(q4dx4)。所有ADC和对照以所示的量(以每剂量SN-38的量表示;长箭头=缀合物注射,短箭头=伊立替康注射)施用。

[0040] 图5B:hRS7-SN-38ADC在携带人结肠直肠肿瘤异种移植物的小鼠中的治疗效力。给COLO 205荷瘤小鼠(N=5)注射ADC达8次(q4dx8)或每2天注射伊立替康的MTD共计5次注射(q2dx5)。所有ADC和对照以所示的量(以每剂量SN-38的量表示;长箭头=缀合物注射,短箭头=伊立替康注射)施用。

[0041] 图5C:hRS7-SN-38ADC在携带人胰腺癌异种移植物的小鼠中的疗效。将Capan-1(N=10)荷瘤小鼠(N=10)每周两次用所示试剂处理4周。所有ADC和对照以所示的量(以每剂量SN-38的量表示;长箭头=缀合物注射,短箭头=伊立替康注射)施用。

[0042] 图5D:hRS7-SN-38ADC在携带人胰腺癌异种移植物的小鼠中的疗效。将BxPC-3荷瘤小鼠(N=10)每周两次用所示试剂处理4周。所有ADC和对照以所示的量(以每剂量SN-38的量表示;长箭头=缀合物注射,短箭头=伊立替康注射)施用。

[0043] 图5E: hRS7-SN-38ADC在携带人鳞状细胞肺癌异种移植植物的小鼠中的治疗效力。除ADC每周两次给药4周外,SK-MES-1荷瘤(N=8)小鼠接受CPT-11的MTD(q2dx5)。所有ADC和对照以所示的量(以每剂量SN-38的量表示;长箭头=缀合物注射,短箭头=伊立替康注射)施用。

[0044] 图6:依帕珠单抗(Emab)-SN-38和维妥珠单抗(Vmab)-SN-38缀合物在皮下Ramos模型中的比较效力。对具有平均为约0.35cm<sup>3</sup>(0.20-0.55cm<sup>3</sup>)的肿瘤的裸小鼠(每组N=10)每周两次施用0.25或0.5mg的每种缀合物达4周。

[0045] 图7A:在携带皮下Ramos肿瘤的裸小鼠中,Emab抗CD22-SN-38缀合物(实线)与无关拉贝珠单抗(Lmab)-SN-38缀合物(虚线)的特异性。每周两次腹膜内对动物给予75μg的每种缀合物/剂量(54.5μg/kg的SN-38,基于22g的平均重量)达4周。存活基于到3.0cm<sup>3</sup>的进展前时间(TTP),肿瘤以平均大小0.4cm<sup>3</sup>开始。在每个图中显示比较Emab-SN-38与Lmab-SN-38缀合物的中值存活(显示)的P值。

[0046] 图7B:在携带皮下Ramos肿瘤的裸小鼠中,Emab抗CD22-SN-38缀合物(实线)与无关拉贝珠单抗(Lmab)-SN-38缀合物(虚线)的特异性。每周两次对动物腹膜内给予125μg的每种缀合物/剂量(91μg/kg的SN-38,基于22g的平均重量)达4周。存活基于到3.0cm<sup>3</sup>的进展前时间(TTP),肿瘤以平均大小0.4cm<sup>3</sup>开始。在每个图中显示比较Emab-SN-38与Lmab-SN-38缀合物的中值存活(显示)的P值。

[0047] 图7C:在携带皮下Ramos肿瘤的裸小鼠中,Emab抗CD22-SN-38缀合物(实线)与无关拉贝珠单抗(Lmab)-SN-38缀合物(虚线)的特异性。每周两次对动物腹膜内给予250μg的每种缀合物/剂量(182μg/kg的SN-38,基于平均重量22g)达4周。存活基于到3.0cm<sup>3</sup>的进展前时间(TTP),肿瘤以平均大小0.4cm<sup>3</sup>开始。在每个图中显示比较Emab-SN-38与Lmab-SN-38缀合物的中值存活(显示)的P值。对于每周给予伊立替康腹膜内注射(6.5μg/剂量;SN-38当量与Emab-SN-38缀合物的250-μg剂量大致相同)的另一组动物,也显示了存活曲线(实心灰色)。

[0048] 图8:在施用IMMU-130(拉贝珠单抗-NS-38)之前,患者的既往治疗史。先前的治疗包括IV期CRC结肠切除术/肝切除术(偏叶),肝转移的射频消融治疗,肺转移的楔形切除术,以及伊立替康/奥沙利铂,Folfirinox,Folfirinox+贝伐珠单抗,贝伐珠单抗+5-FU/亚叶酸(leucovorin),FolFiri,Folfiri+西妥昔单抗和单独的西妥昔单抗的化学疗法。患者通过每隔一周慢速IV输注接受16mg/kg剂量的IMMU-132,共17个治疗剂量。

## 具体实施方式

[0049] 定义

[0050] 在下面的描述中,使用了多个术语,并且提供以下定义以帮助理解所要求保护的主题。本文中没有明确定义的术语根据其普通和常规的含义使用。

[0051] 除非另外指明,一个或一种意为“一个/种或多个/种”。

[0052] 术语“约”在本文中用来表示值的正负百分之十(10%)。例如,“约100”是指90至110之间的任何数字。

[0053] 如本文使用,抗体是指免疫球蛋白分子(例如,IgG抗体)的全长(即,天然存在的或由正常免疫球蛋白基因片段重组过程形成的)或免疫球蛋白分子的抗原结合部分如抗体片

段。抗体或抗体片段可以在要求保护的主题的范围内缀合或以其它方式衍生化。此类抗体包括但不限于IgG1、IgG2、IgG3、IgG4(和IgG4亚型)以及IgA同种型。

[0054] 抗体片段是抗体的一部分,诸如F(ab')<sub>2</sub>、F(ab)<sub>2</sub>、Fab'、Fab、Fv、scFv(单链Fv)、单域抗体(DAB或VHH)等,包括上文引用的IgG4的半抗体(van der Neut Kolfschoten等人(Science 2007; 317 (14 Sept) :1554-1557)。单域抗体的市售形式,称为纳米抗体(ABLYNX®, Ghent, Belgium)在下文中进一步详细讨论。不管结构如何,使用的抗体片段与被完整抗体识别的相同抗原结合。术语“抗体片段”还包括合成或遗传工程改造蛋白,其与抗体一样通过结合特定抗原以形成复合物起作用。例如,抗体片段包括由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、其中的轻链和重链可变区通过肽接头连接的重组单链多肽分子(“scFv蛋白”),以及由模拟高变区的氨基酸残基组成的小识别单位,如CDR。Fv片段可以以不同方式构建以产生多价和/或多特异性结合形式。在多价的情况下,它们具有超过一个针对特定表位的结合位点,而对于多特异性形式,结合超过一个表位(针对相同抗原或针对一种抗原和不同抗原中的任一种)。

[0055] 裸抗体通常是不与治疗剂缀合的完整抗体。这是因为抗体分子的Fc部分提供效应或免疫功能,例如补体结合和ADCC(抗体依赖性细胞毒性),其将机制设定为可能导致细胞溶解的作用。然而,Fc部分可以不是抗体治疗功能所需要的,但是相反其它机制,如细胞凋亡、抗血管生成、抗转移活性、抗粘连活性,如抑制异型或同型粘附,以及干扰信号传导通路可以发挥作用并干扰疾病进展。裸抗体包括多克隆和单克隆抗体及其片段,其包括鼠抗体以及某些重组抗体,如嵌合抗体、人源化抗体或人抗体及其片段。如本文所用,“裸的”与“未缀合的”是同义的,并且意指未连接或缀合至治疗剂。

[0056] 嵌合抗体是重组蛋白质,所述重组蛋白质含有包括衍生自一个物种,优选啮齿动物抗体,更优选鼠抗体的抗体的互补决定区(CDR)的重链和轻链抗体链的可变域。对于兽医应用,嵌合抗体的恒定结构域可以来源于其它物种,如灵长类、猫或狗的恒定结构域。

[0057] 人源化抗体是将来自一个物种的抗体(例如鼠抗体)的CDR从鼠抗体的重链和轻链可变区转移到人重链和轻链可变区(框架区)中的重组蛋白。抗体分子的恒定区来源于人抗体的恒定区。在一些情况下,可以修饰人源化抗体框架区的特定残基,特别是与CDR序列接触或接近的那些残基,例如用来自原始鼠、啮齿类、非人灵长类动物或其它抗体的相应残基替换。

[0058] 人抗体是例如从已经“工程化”以响应抗原攻击产生人抗体的转基因小鼠获得的抗体。在该技术中,将人重链和轻链基因座的元件引入源自含有内源性重链和轻链基因座靶向破坏的胚胎干细胞系的小鼠品系中。转基因小鼠可以合成对各种抗原具有特异性的人抗体,并且该小鼠可以用于产生人抗体分泌型杂交瘤。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) 描述了从转基因小鼠获得人抗体的方法。完全人抗体也可以通过遗传或染色体转染方法以及噬菌体展示技术来构建,所有这些技术都是本领域已知的。关于在体外从未免疫供体的免疫球蛋白可变域基因库中产生人抗体及其片段,参见例如McCafferty等人,Nature 348: 552-553 (1990)。在该技术中,将抗体可变区基因框内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显示为功能性抗体片段。因为丝状颗粒含有噬菌体基因组的单链DNA拷贝,所以基于抗体功能性的选择也导致编码显示出那些性质的抗体

的基因的选择。这样,噬菌体模拟B细胞的一些特性。噬菌体展示可以以各种形式进行,关于其综述,参见例如Johnson和Chiswell,Current Opinion in Structural Biology 3: 5564-571 (1993)。人体抗体也可以通过体外活化的B细胞产生。参见美国专利号5,567,610和5,229,275,所述专利各自的实施例部分通过引用并入本文。

[0059] 如本文使用,传染病是涉及病原体如细菌、立克次氏体、支原体、原生动物、真菌、病毒、寄生虫或其它微生物媒介感染的疾病。实例包括引起AIDS的人免疫缺陷病毒(HIV)、结核分枝杆菌、无乳链球菌、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、嗜肺军团菌、化脓链球菌、大肠杆菌、淋病奈瑟菌、脑膜炎奈瑟菌、肺炎球菌、新型隐球菌、荚膜组织胞浆菌、流感嗜血杆菌B、苍白密螺旋体、莱姆病螺旋体、西尼罗病毒、铜绿假单胞菌、麻风分枝杆菌、流产布鲁氏菌、狂犬病病毒、流感病毒、巨细胞病毒、单纯疱疹病毒I、单纯疱疹病毒II、人血清细小样病毒、呼吸道合胞病毒、水痘带状疱疹病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、麻疹病毒、腺病毒、人T细胞白血病病毒、埃巴病毒、鼠白血病病毒、腮腺炎病毒、水泡性口炎病毒、辛德比斯病毒、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒、疣病毒、蓝舌病毒、仙台病毒、猫白血病病毒、reovirus、脊髓灰质炎病毒、猿猴病毒40、小鼠乳腺肿瘤病毒、登革热病毒、风疹病毒、恶性疟原虫、间日疟原虫、鼠弓形虫、让氏锥虫、克鲁斯锥虫、罗得西亚锥虫、布氏锥虫、曼氏血吸虫、日本血吸虫、牛巴贝虫、埃尔梅利亚虫、旋盘尾丝虫、热带利什曼原虫、旋毛线虫、小泰勒虫、水泡绦虫、羊绦虫、牛肉绦虫、胞生绦虫、科氏中殖孔绦虫、关节炎支原体、猪鼻支原体、口腔支原体、精氨酸支原体、拉氏无胆甾支原体、唾液支原体和肺炎支原体。列出抗感染生物体(抗毒素和抗病毒抗体)以及其它靶标的抗体的综述包含于Casadevall,Clin Immunol 1999;93(1):5-15,所述文献通过引用并入本文。

[0060] 治疗剂是与结合部分(例如抗体或抗体片段)分开、同时或依次施用,并且可用于治疗疾病的分子或原子。治疗剂的实例包括但不限于抗体、抗体片段、缀合物、药物、细胞毒性剂、促凋亡剂、毒素、核酸酶(包括DNA酶和RNA酶)、激素、免疫调节剂、螯合剂、硼化合物、光敏剂或染料、放射性同位素或放射性核素、寡核苷酸、干扰RNA、肽、抗血管生成剂、化学治疗剂、细胞因子、趋化因子、前药、酶、结合蛋白或肽或其组合。

[0061] 免疫缀合物是与治疗剂缀合的抗体、抗体片段或其它抗体部分。如本文所用,术语“缀合物”和“免疫缀合物”可互换使用。

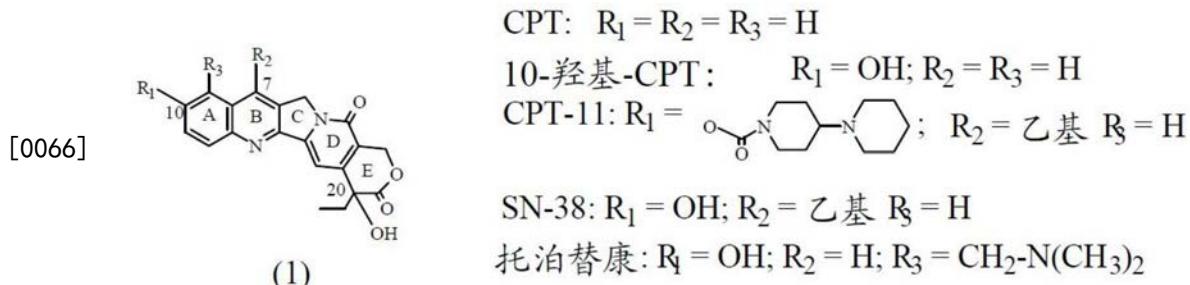
[0062] 如本文所用,术语抗体融合蛋白是重组产生的抗原结合分子,其中一种或多种天然抗体、单链抗体或抗体片段与另一部分,如蛋白质或肽、毒素、细胞因子、激素等连接。在某些优选的实施方案中,融合蛋白可包含融合在一起的两种或更多种相同或不同的抗体、抗体片段或单链抗体,其可结合相同的表位、在相同的抗原上的不同表位或不同的抗原。

[0063] 免疫调节剂是当存在时改变、抑制或刺激身体免疫系统的治疗剂。通常,使用的免疫调节剂刺激免疫细胞增殖或在免疫应答级联中被激活,如巨噬细胞、树突细胞、B细胞和/或T细胞。然而,在一些情况下,免疫调节剂可抑制免疫细胞的增殖或活化,如在自身免疫性疾病的治疗中。如本文所述的免疫调节剂的实例是细胞因子,所述细胞因子是与特定抗原接触后由一种细胞群(例如,引发的T-淋巴细胞)释放,并且充当细胞之间的胞间介质的约5-20kDa的可溶性小蛋白。如本领域技术人员将理解的,细胞因子的实例包括淋巴因子、单核因子、白细胞介素和几种相关的信号传导分子,如肿瘤坏死因子(TNF)和干扰素。趋化因子是细胞因子的子集。某些白细胞介素和干扰素是刺激T细胞或其它免疫细胞增殖的细胞

因子的实例。

[0064] CPT是喜树碱的缩写。如本申请所用,CPT代表喜树碱本身或喜树碱的类似物或衍生物。喜树碱及其一些类似物的结构(带有所示的编号和用字母A-E标记的环)在下面的图1中的式1中给出。

[0065] 图1



[0067] 缩写:

[0068] DCA-二氯乙酸

[0069] Fmoc-芴甲氧羰基氯化物(Fluorenylmethyloxycarbonyl chloride)

[0070] EEDQ-2-乙氧基-1-乙氧基羰基-1,2-二氢喹啉

[0071] MCC-炔-4-(N-马来酰亚胺基甲基)-N-(2-丙炔基)环己烷-1-咪唑羧酰胺

[0072] MMT-单甲氧基三苯甲基

[0073] PABOH-对氨基苯甲醇

[0074] PEG-聚乙二醇

[0075] TBAF-四正丁基氟化铵

[0076] TBDMS-叔丁基二甲基甲硅烷基

[0077] 喜树碱缀合物

[0078] 下文描述了用于制备包含连接到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。在优选的实施方案中,通过在药物和抗体之间放置确定的聚乙二醇(PEG)部分(即,含有限定数目的单体单元的PEG)来增强药物的溶解度,其中定义的PEG是低分子量PEG,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8个单体单元。

[0079] 优选地,第一接头在一端连接药物,并可在另一端以乙炔或叠氮基团终止。该第一接头可包含限定的PEG部分,其一端具有叠氮基或乙炔基,另一端具有不同的反应性基团,如羧酸或羟基。所述双官能的限定的PEG可以连接到氨基醇的氨基,并且后者的羟基可以以碳酸酯的形式连接到药物上的羟基。或者,所述限定的双官能PEG的非叠氮化物(或乙炔)部分可以连接到L-氨基酸或多肽的N端,C端连接到氨基醇的氨基上,后者的羟基可分别以碳酸酯或氨基甲酸酯的形式与药物的羟基连接。

[0080] 包含抗体偶联基团和与第一接头的叠氮化物(或乙炔)基团互补的反应基团(即乙炔(或叠氮化物))的第二接头可以通过经由乙炔-叠氮化物环加成反应与药物-(第一接头)缀合物反应以提供可用于缀合到疾病靶向抗体的最终双官能药物产品。抗体偶联基团优选为巯基或巯基反应性基团。

[0081] 下文提供了在涉及CPT类似物如SN-38的药物-接头前体的制备中在C-20碳酸酯存在下选择性再生10-羟基基团的方法。也可以使用其它用于药物中的反应性羟基,如SN-38

中的酚羟基的保护基,如叔丁基二甲基甲硅烷基或叔丁基二苯基甲硅烷基,并且在将衍生物与抗体偶联部分连接前可以通过四丁基氟化铵脱保护。或者CPT类似物的10-羟基作为除‘BOC’以外的酯或碳酸酯保护,使得双官能CPT与抗体缀合,而事先不对该保护基进行脱保护。在施用生物缀合物后,保护基团可以容易地在生理pH条件下脱保护。

[0082] 在称为“点击化学”的乙炔-叠氮化物偶联中,叠氮化物部分可以在L2上,乙炔部分在L3上。或者,L2可以含有乙炔,L3含有叠氮化物。“点击化学”是指乙炔部分和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),尽管可选形式的点击化学是已知的并且可以使用。反应可以使用溴化亚铜和三苯基膦的混合物,以在二氯甲烷等非极性有机溶剂中高效偶联。然而,如下所公开,三磷化合物对于某些目的是不利的,并且可以使用促进点击偶联步骤的替代方法。点击化学的优点在于它具有化学选择性,并补充了其它公知的缀合化学,如硫醇-马来酰亚胺反应。在以下讨论中,在缀合物包含抗体或抗体片段的情况下,可以取代另一类型的结合部分,例如靶向肽。

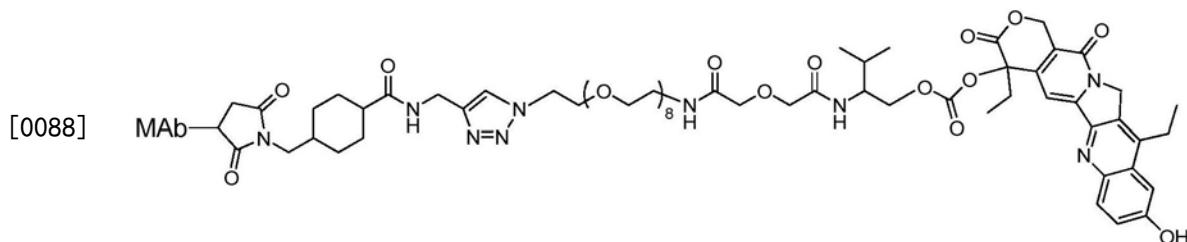
[0083] 示例性的优选实施方案涉及通式2的药物衍生物和抗体的缀合物，

[0084] MAb-「L2」-「L1」-「AA」<sub>m</sub>-「A'」-药物 (2)

[0085] 其中MAb是疾病靶向抗体；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包含限定的PEG,在一端具有叠氮化物(或乙炔),与L2中的乙炔(或叠氮化物)部分互补,并且在另一端具有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(优选1)的整数；并且A'是选自乙醇胺、4-羟基苯甲醇、4-氨基苯甲醇或取代或未取代的乙二胺的另外的间隔物。“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、酪氨酸和缬氨酸。如果A'基团含有羟基,则其分别与碳酸酯或氨基甲酸酯形式的药物的羟基或氨基连接。

[0086] 在式2的优选实施方案中,通式2的“A”为A-OH,其中A-OH为可折叠部分如4-氨基苯甲醇或苄基位置处用C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>烷基取代的4-氨基苯甲醇,而后者通过其氨基连接到L-氨基酸或包含多达4个L-氨基酸部分的多肽;其中N端连接到终止于抗体部分结合基团的交联剂。

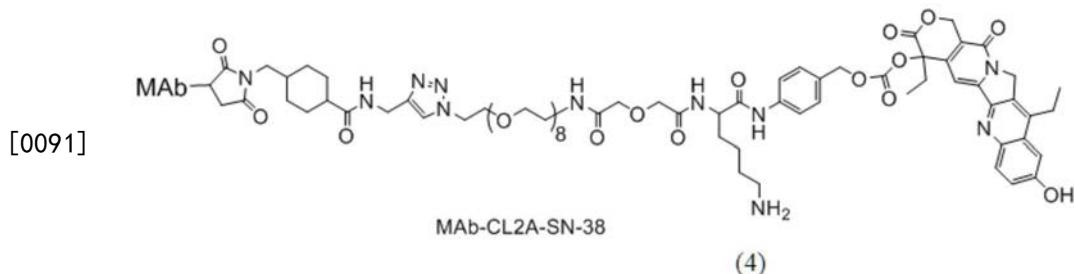
[0087] 下面给出优选实施方案的一个实例,其中通式(2)的A'的A-OH实施方案衍生自取代的4-氨基苯甲醇,“AA”由在通式(2)中m=1的单一L-氨基酸组成,并且药物以SN-38为例。结构如下所示(式3,称为MAb-CLX-SN-38)。AA的单一氨基酸选自下列L-氨基酸中的任何一种:丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸。4-氨基苯甲醇部分上的取代基R(A'的A-OH实施方案)是氢或选自C1-C10烷基的烷基。



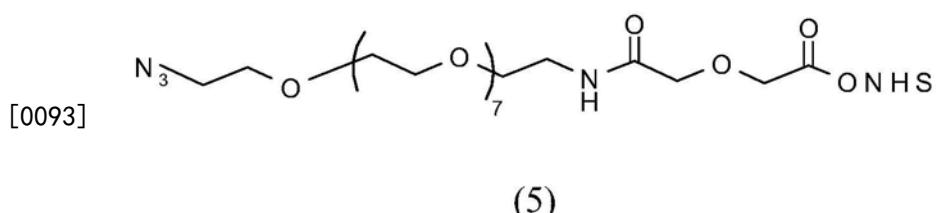
[0089] MAb-CLX-SN-38 (3)

[0090] 式3的Mab-CLX-SN-38的实施方案，其中单一氨基酸AA是L-赖氨酸并且R=H，并且

药物以SN-38示例(式4;称为MAb-CL2A-SN-38)。



[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)间隔物。在进一步优选的实施方案中,PEG是具有1至12个(更优选8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可以含有叠氮基或乙炔基。下文在式5中给出含有8个重复单体单元的异双官能的限定PEG的实例,其中“NHS”为琥珀酰亚胺基:



[0094] 在优选的实施方案中,生产CL2A-SN-38的方法如图1所示。在该实施方案中,在用于制备免疫缀合物MAb-CL2A-SN-38的CL2A-SN-38的制备中已经进行了某些显著的过程改变。对例如在美国专利号7,999,083中公开的程序的这些改变对于本领域的普通技术人员不是显而易见的,包括以下变化。

[0095] 1) 尽管己烷先前用于沉淀Lys(MMT)-PABOH(图1中的中间体2),但庚烷替代己烷作为更安全的替代物。残余的未除去的二乙胺通过NMR分光法测定。如果检测到二乙胺的存在,则将该物质进一步纯化以除去二乙胺,这避免了由于中间体2中存在二乙胺而导致的产率降低。

[0096] 2) 在由SN-38制备10-O-TBDMS-SN-38(图1中的中间体4)中,先前用作反应溶剂的二甲基甲酰胺(DMF)用二氯甲烷(DCM)替换,从而使反应后更容易除去溶剂。为了便于放大以及针对在DMF中反应的情况下偶尔观察到的一些降低的产物产率,进行从DMF到DCM的转换。尽管已经使用了其它溶剂,用叔丁基二甲基甲硅烷基氯化物保护羟基通常使用DMF作为溶剂进行(Greene TW and Wuts PGM, Protecting Groups in Organic Synthesis, John Wiley&Sons, Inc., 1999; 第127-132页)。在SN-38的情况下,使用DMF是优选的,因为该材料仅微溶于DCM。在DCM介质中产物形成的高产率出乎意料,并且无法预料。

[0097] 3) 在图1中10-O-TBDMS-SN-38转化为其氯甲酸酯反应性中间体5的过程中,将三光气分批而非一批加入到二氯甲烷溶液中。这保留了产率,同时避免了大规模生产中反应温度的潜在危险升高。

[0098] 4) 在叠氮基-PEG-Lys(MMT)-PABO-CO-20-O-SN-38(图1中的中间体7)和MCC-炔(图1中的中间体8)之间的环加成反应以产生倒数第二个中间体MCC-PEG-Lys(MMT)-PABOCO-20-O-SN-38(图1中的中间体9)中,发现如果首先用EDTA提取处理反应混合物以除去铜盐,则产物是不稳定的,导致产率降低。令人惊讶的是,还发现如果首先进行反应混合物的层

析,然后用EDTA提取除去硅胶柱中未完全捕捉的残留铜盐,则产物是稳定的。这一过程的改变也通过避免形成不需要的副产物而导致产率的提高。在纯化之前通过简单地颠倒操作顺序(即首先进行层析,然后用EDTA提取)来提高中间体9的稳定性无法预料。

[0099] 5) 在与上面第4项中所述相同的反应中,当反应时间减少到14小时而不是18-24小时时,获得了改进的产率。

[0100] 合成方案的附加改进并入图1,这在优先权美国专利9,107,960中没有公开。对于本方案的这些改变对于本领域普通技术人员而言不是显而易见的,包括以下改变。

[0101] 6) 起始材料1到中间体2的两步转化最初涉及从第一步分离中间体。这个过程是缩短的,使得起始材料1和中间体2之间的中间体的分离不再是必要的。对这种两步转化的进一步工艺改进涉及所使用的挥发性二乙胺的量的大量减少、安全性的提高以及在中间体2的分离过程中促进其随后的除去。

[0102] 7) 方案中未示出的MCC-炔(中间体8)的两步制备原来涉及每个步骤后的层析纯化;对于两个步骤改变反应条件,从而允许通过结晶或沉淀分离中间体8及其前体两者,而不诉诸于层析法。

[0103] 8) 中间体3向中间体7的两步转换最初涉及中间体6的分离。这个过程得到简化,使得中间体6的分离不再是必需的。对这两步转化的进一步工艺改进包括减少每个步骤之后的相分离数目(这导致产率增加且得到的乳剂减少)以及减少脱保护所需的TBAF的量,从而导致改进的纯度特征。用于中间体7的分离的层析条件也得到改进,以确保杂质的充分分离和从塔中完全回收产物。

[0104] 9) 中间体7转化为中间体9的原始条件涉及使用三苯基膦( $\text{PPh}_3$ )以及溴化铜(I);这些条件促成了中间体9的缓慢降解,因此用提供中间体9的好得多的溶液稳定性和终产物CL2A-SN-38的好得多的总体质量的条件[硫酸铜(II)、抗坏血酸钠和2,6-二甲基吡啶]替换。

[0105] 对上述合成方案的改变导致生产产率和效率的显著改进,以及终产物中和各种中间步骤处污染性副产物的存在减少。污染物的减少进一步允许简化或消除中间体合成反应中的某些纯化步骤,这也改进产率和效率。

[0106] 在CL2A-SN-38产物形成后,其可以与靶向分子,例如与肿瘤相关抗原或其它疾病相关抗原结合的抗体缀合。在某些实施方案中,当双官能药物含有硫醇反应性部分作为抗体结合基团时,通过使用硫醇化试剂,待标记的抗体上的硫醇可以在抗体的赖氨酸基团的侧链,而非还原性半胱氨酸残基上产生。通过修饰mAb赖氨酸基团将巯基引入抗体的方法是公知的(Wong in Chemistry of protein conjugation and cross-linking, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL (1991), 第20-22页)。或者,使用还原剂三-(2-羧乙基)膦(TCEP)轻微还原抗体上的链间二硫键可以在抗体上产生7至10个硫醇;其具有的优点在于将多个药物部分并入远离抗原结合区的MAb的链间区域中。此外,用TCEP还原后,还原性抗体的预纯化不是必需的,并且将二硫化物还原抗体与硫醇反应性CL2A-SN-38原位缀合。

[0107] 在另一个优选的实施方案中,通过使用50,000Da分子量截留膜的切向流过滤(TFF)法使用25至30个渗透体积的缀合物配制缓冲液纯化抗体和CL2A-SN-38的缀合物,以纯化数百克的缀合物。该方法避免了对使用在尺寸排阻和疏水层析柱上昂贵且繁琐的层析纯化的需要。

[0108] 在又一个实施方案中,缀合物在pH6至7.0的Good氏生物缓冲液中配制,并冻干以供贮存。优选地,Good氏缓冲液选自由以下组成的组:2-(N-吗啉代)乙磺酸(MES)、3-(N-吗啉代)丙磺酸(MOPS)、4-(2-羟基乙基)哌嗪-1-乙磺酸(HEPES)和1,4-哌嗪二乙磺酸(PIPES),pH范围为6-7,优选pH范围为6.5-7,且缓冲液浓度为10-100mM,优选25mM。最优秀的制剂缓冲液是25mM MES, pH6.5。

[0109] 在进一步的实施方案中,将纯化的缀合物与赋形剂例如海藻糖和聚山梨醇酯80混合,冻干,并且在-20℃至8℃的温度范围内以冻干物的形式贮存。

#### [0110] 通用抗体技术

[0111] 用于制备针对实际上任何靶抗原的单克隆抗体的技术是本领域公知的。参见例如Kohler和Milstein, *Nature* 256:495 (1975), 以及Coligan等人(编), *CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY*, 第1卷, 第2.5.1-2.6.7页(John Wiley&Sons 1991)。简而言之,单克隆抗体可以通过如下获得:用包含抗原的组合物注射小鼠,取出脾脏以获得B淋巴细胞,将B淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合以产生杂交瘤,克隆杂交瘤,选择产生针对抗原的抗体的阳性克隆,培养产生针对抗原的抗体的克隆,并从杂交瘤培养物中分离抗体。在期望用于人治疗或诊断的抗体的情况下,普通技术人员理解相应的人抗原蛋白质或肽优先用于诱导抗体产生。

[0112] 各种技术(如嵌合或人源化抗体的生产)可涉及抗体克隆和构建的程序。用于目的抗体的抗原结合V<sub>k</sub>(可变轻链)和V<sub>H</sub>(可变重链)序列可以通过多种分子克隆程序如RT-PCR、5'-RACE和cDNA文库筛选获得。来自表达鼠抗体的细胞的抗体的V基因可以通过PCR扩增进行克隆并测序。为了证实其真实性,如Orlandi等(*Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 86:3833 (1989))所述,克隆的V<sub>L</sub>和V<sub>H</sub>基因可以在细胞培养物中表达为嵌合抗体。基于V基因序列,然后可以如Leung等人(*Mol. Immunol.*, 32:1413 (1995))所述的那样设计和构建人源化抗体。

[0113] 通过通用分子克隆技术(Sambrook等人, *Molecular Cloning, A laboratory manual*, 第2版(1989)),可从生成鼠抗体的任何已知的杂交瘤系或转染的细胞系制备cDNA。抗体的V<sub>k</sub>序列可以使用引物VK1BACK和VK1FOR(Orlandi等人, 1989)或Leung等人(*BioTechniques*, 15:286 (1993))描述的延伸的引物组进行扩增。可以使用引物对VH1BACK/VH1FOR(Orlandi等人, 1989)或Leung等(*Hybridoma*, 13:469 (1994))描述的与鼠IgG恒定区退火的引物扩增V<sub>H</sub>序列。人源化V基因可以通过长寡核苷酸模板合成和PCR扩增的组合来构建,如Leung等人(*Mol. Immunol.*, 32:1413 (1995))所述。

[0114] 可以将V<sub>k</sub>的PCR产物亚克隆到分期载体,例如含有Ig启动子、信号肽序列和方便的限制位点的基于pBR327的分期载体VKpBR。可将V<sub>H</sub>的PCR产物亚克隆到相似的分期载体中,如基于pBluescript的VHpBS。含有V<sub>k</sub>和V<sub>H</sub>序列以及启动子和信号肽序列的表达盒可以从VKpBR和VHpBS中切下并分别连接到合适的表达载体如pKh和pG1g中(Leung等人, *Hybridoma*, 13:469 (1994))。可以将表达载体共转染到合适的细胞中,并且监测上清液的嵌合抗体、人源化抗体或人抗体的产生。或者,如Gillies等人所述(*J. Immunol. Methods* 125: 191 (1989)并且也在Losman等人, *Cancer*, 80:2660 (1997)中显示,可将V<sub>k</sub>和V<sub>H</sub>表达盒切下并亚克隆到单一表达载体如pdHL2中。

[0115] 在另一个实施方案中,可以将表达载体转染到预先适应于在无血清培养基中转染、生长和表达的宿主细胞中。可以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;所述专利各自的实施例部

分通过引用并入本文)。这些示例性细胞系基于Sp2/0骨髓瘤细胞系,其用突变Bcl-EEE基因转染,暴露于甲氨蝶呤以扩增转染的基因序列并且为了表达蛋白质而预先改变为无血清细胞系。

[0116] 嵌合抗体和人源化抗体

[0117] 嵌合抗体是已经将人抗体的可变区用例如小鼠抗体的可变区(包括小鼠抗体的互补决定区(CDR))替换的重组蛋白。当对受试者施用时,嵌合抗体表现出降低的免疫原性和增加的稳定性。构建嵌合抗体的方法在本领域是公知的(例如,Leung等人,1994,Hybridoma 13:469)。

[0118] 嵌合单克隆抗体可以通过如下进行人源化:将来自小鼠免疫球蛋白的重和轻可变链的小鼠CDR转移到人抗体的相应可变域中。嵌合单克隆抗体中的小鼠框架区(FR)也被人FR序列置换。为了保持人源化单克隆抗体的稳定性和抗原特异性,可将一个或多人FR残基替换为小鼠对应残基。人源化单克隆抗体可用于治疗性处理受试者。用于生产人源化单克隆抗体的技术是本领域熟知的。(参见例如Jones等人,1986,Nature,321:522;Riechmann等人,Nature,1988,332:323;Verhoeyen等人,1988,Science,239:1534;Carter等人,1992,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA,89:4285;Sandhu,Crit.Rev.Biotech.,1992,12:437;Tempest等人,1991,Biotechnology 9:266;Singer等人,J.Immun.,1993,150:2844)。

[0119] 其它实施方案可以涉及非人灵长类动物抗体。用于在狒狒中制备治疗有用抗体的通用技术可以参见例如Goldenberg等人,WO 91/11465(1991)和Losman等人,Int.J.Cancer 46:310(1990)。在另一个实施方案中,抗体可以是人单克隆抗体。此类抗体可以从转基因小鼠获得,所述转基因小鼠已经被工程化以响应抗原攻击而产生特异性人抗体,如下文讨论。

[0120] 人抗体

[0121] 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Losset,2003,Curr.Opin.Pharmacol.3:544-50;所述文献各自通过引用并入本文)。预期此类完全人抗体比嵌合或人源化抗体表现出甚至更少的副作用,并在体内作为基本上内源性人抗体发挥功能。在某些实施方案中,要求保护的方法和程序可以利用通过此类技术产生的人抗体。

[0122] 在一个备选中,可以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,通过引用并入本文)。人抗体可以从正常人或表现出特定疾病状态(例如癌症)的人产生(Dantas-Barbosa等人,2005)。从患病个体构建人抗体的优点是循环抗体库可以偏向针对疾病相关抗原的抗体。

[0123] 在该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文库。通常,从循环血液淋巴细胞获得总RNA(同上)。从 $\mu$ 、 $\gamma$ 和 $\kappa$ 链抗体库中克隆重组Fab,并将其插入到噬菌体展示文库中(同上)。将RNA转化为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,通过引用并入本文)。文库构建按照Andris-Widhopf等人(2000,于:Phage Display Laboratory Manual,Barbas等人(编),第1版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NY第9.1至9.22页,通过引用并入本文)进行。最终的Fab片段用限制性内切酶消化并插入噬菌体基因组中以制备噬菌体展示文库。

此类文库可以通过标准的噬菌体展示方法进行筛选。熟练技术人员将认识到,该技术仅是示例性的,并且可以利用通过噬菌体展示制备和筛选人抗体或抗体片段的任何已知方法。

[0124] 在另一个备选中,使用如上所讨论的标准免疫方案,已经遗传工程化以产生人抗体的转基因动物可以用于产生针对基本上任何免疫原性靶的抗体。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) 描述了从转基因小鼠获得人抗体的方法。这种系统的非限制性实例是来自Abgenix (Fremont, CA) 的 **XenoMouse®** (例如Green等人,1999, J. Immunol. Methods 231: 11-23, 通过引用并入本文)。在此动物和类似的动物中,已灭活小鼠抗体基因并且用功能性人抗体基因取代,而小鼠免疫系统的其余部分保持完整。

[0125] 使用种系构建的YAC (酵母人工染色体) 转化 **XenoMouse®**, 所述YAC包含人 IgH 和 Igκ 基因座的部分, 包括大部分可变区序列, 以及辅助基因和调节序列。人可变区库可用于产生抗体生成性B细胞, 其可通过已知技术加工成杂交瘤。用靶抗原免疫将通过正常的免疫应答产生人抗体, 其可以通过上文讨论的标准技术收获和/或生产。此类转基因小鼠的多种品系是可用的, 其中的每种都能够产生不同类别的抗体。已显示转基因产生的人抗体具有治疗潜力, 同时保留正常人抗体的药代动力学性质 (Green等人, 1999)。熟练技术人员将认识到, 要求保护的组合物和方法不限于使用特定系统, 而是可以使用任何已经被遗传工程化以产生人抗体的转基因动物。

#### [0126] 生产抗体片段

[0127] 例如, 可以通过常规方法通过胃蛋白酶或木瓜蛋白酶消化完整抗体来获得抗体片段。例如, 抗体片段可以通过用胃蛋白酶对抗体进行酶切来产生以提供表示为  $F(ab')_2$  的 5S 片段。该片段可以使用硫醇还原剂和任选地封闭基团进一步切割以产生 3.5S Fab' 单价片段, 所述封闭基团用于由二硫化物连接断裂产生的巯基。或者, 使用胃蛋白酶的酶切产生两个单价Fab片段和一个Fc片段。用于产生抗体片段的示例性方法公开于美国专利号 4,036,945; 美国专利号 4,331,647; Nisonoff 等人, 1960, Arch Biochem Biophys, 89:230; Porter, 1959, Bio chem. J., 73:119; Edelman 等人, 1967, METHODS IN ENZYMOLOGY, 第 422 页 (Academic Press), 以及 Coligan 等人 (编), 1991, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, (John Wiley&Sons)。

[0128] 也可以使用切割抗体的其它方法, 例如分离重链以形成单价轻-重链片段, 片段的进一步切割或其它酶、化学或遗传技术, 只要片段结合被完整抗体识别的抗原。例如, Fv 片段包含  $V_H$  和  $V_L$  链的结合。这种结合可以是非共价的, 如记载于 Inbar 等人, 1972, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69:2659。或者, 可变链可通过分子间二硫键连接或通过化学品如戊二醛交联。参见 Sandhu, 1992, Crit. Rev. Biotech., 12:437。

[0129] 优选地, Fv 片段包含通过肽接头连接的  $V_H$  和  $V_L$  链。这些单链抗原结合蛋白 (scFv) 通过构建包含通过寡核苷酸接头序列连接的编码  $V_H$  和  $V_L$  结构域的 DNA 序列的结构基因来制备。将结构基因插入表达载体中, 随后将其导入宿主细胞如大肠杆菌中。重组宿主细胞合成具有桥接两个 V 结构域的接头肽的单一多肽链。生产 scFv 的方法在本领域是公知的。见 Whitlow 等人, 1991, Methods: A Companion to Methods in Enzymology 2:97; Bird 等人, 1988, Science, 242:423; 美国专利号 4,946,778; Pack 等人, 1993, Bio/Technology, 11: 1271, 以及 Sandhu, 1992, Crit. Rev. Biotech., 12:437。

[0130] 抗体片段的另一种形式是单域抗体 (dAb) , 有时称为单链抗体。用于产生单域抗体的技术是本领域公知的 (参见例如Cossins等人, Protein Expression and Purification, 2007, 51:253-59; Shuntao等人, Molec Immunol 06, 43:1912-19; Tanha等人, J.Biol.Chem.2001, 276:24774-780)。其它类型的抗体片段可以包含一个或多个互补决定区 (CDR)。CDR肽 (“最小识别单位”) 可以通过构建编码目的抗体的CDR的基因来获得。例如通过使用聚合酶链式反应从抗体产生细胞的RNA合成可变区来制备此类基因。参见Larrick等人, 1991, Methods:A Companion to Methods in Enzymology 2:106; Ritter等人 (编) , 1995, MONOCLONAL ANTIBODIES:PRODUCTION, ENGINEERING AND CLINICAL APPLICATION, 第 166-179 页 (Cambridge University Press) ; Birch等人, (编) , 1995, MONOCLONAL ANTIBODIES:PRINCIPLES AND APPLICATIONS, 第137-185页 (Wiley-Liss, Inc.)。

### [0131] 抗体变异

[0132] 在某些实施方案中,可以改变抗体的序列,例如抗体的Fc部分,以优化缀合物的生理学特性,例如血清中的半衰期。取代蛋白质中的氨基酸序列的方法在本领域是公知的,例如通过定点诱变 (例如Sambrook等人, Molecular Cloning, A laboratory manual, 第2版, 1989)。在优选的实施方案中,变异可涉及Fc序列中一个或多个糖基化位点的添加或除去 (例如,美国专利号6,254,868,其实施例部分通过引用并入本文)。在其它优选的实施方案中,可以进行Fc序列中的特定氨基酸取代 (例如,Hornick等人, 2000, J Nucl Med 41:355-62; Hinton等人, 2006, J Immunol 176:346-56; Petkova等人2006, Int Immunol 18:1759-69; 美国专利号7,217,797; 所述文献各自通过引用并入本文)。

### [0133] 抗体同种异型

[0134] 治疗性抗体的免疫原性与输注反应的风险增加和治疗响应的持续时间减少有关 (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部分可以通过抗体的同种异型来确定 (Stickler等人, 2011, Genes and Immunity 12:213-21)。抗体同种异型与抗体恒定区序列中特定位置处的氨基酸序列变异有关。含有重链  $\gamma$  型恒定区的 IgG 抗体的同种异型称为 Gm 同种异型 (1976, J Immunol 117:1056-59)。

[0135] 对于常见的 IgG1 人抗体,最普遍的同种异型是 G1m1 (Stickler等人, 2011, Genes and Immunity 12:213-21)。然而, G1m3 同种异型在高加索人中也经常发生 (Stickler等人, 2011)。据报道, G1m1 抗体含有在施用非 G1m1 (nG1m1) 接受体如 G1m3 患者时倾向于诱导免疫应答的同种异型序列 (Stickler等人, 2011)。当对 G1m1 患者施用时,非 G1m1 同种异型抗体不是免疫原性的 (Stickler等人, 2011)。

[0136] 人 G1m1 同种异型在重链 IgG1 的 CH3 序列中包含 Kabat 位置 356 处的氨基酸天冬氨酸和 Kabat 位置 358 处的亮氨酸。nG1m1 同种异型包含 Kabat 位置 356 处的氨基酸谷氨酸和 Kabat 位置 358 处的甲硫氨酸。G1m1 和 nG1m1 同种异型两者在 Kabat 位置 357 包含谷氨酸残基,并且同种异型有时称为 DEL 和 EEM 同种异型。下文对示例性抗体利妥昔单抗 (SEQ ID NO:85) 和维妥珠单抗 (SEQ ID NO:86) 显示了 G1m1 和 nG1m1 同种异型抗体的重链恒定区序列的非限制性实例。

### [0137] 利妥昔单抗重链可变区序列 (SEQ ID NO:85)

[0138] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVTVPSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKAEPKSCDKTHCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV

VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK  
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW  
QQGNVFSCSVMHEALHNHTQKSLSLSPGK

[0139] 维妥珠单抗重链可变区序列 (SEQ ID NO:86)

[0140] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVWSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVV  
TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHCPCPAPELLGGPSVLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV  
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK  
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW  
QQGNVFSCSVMHEALHNHTQKSLSLSPGK

[0141] Jefferis和Lefranc (2009, mAbs 1:1-7) 综述了 IgG 同种异型的特征性序列变异及其对免疫原性的影响。他们报道, G1m3 同种异型的特征在于 Kabat 位置 214 处的精氨酸残基, 与 G1m17 同种异型中 Kabat 214 处的赖氨酸残基相比。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。除了重链恒定区序列变体外, Jefferis 和 Lefranc (2009) 报道了  $\kappa$  轻链恒定区中的同种异型变体, 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 处的丙氨酸和 Kabat 位置 191 处的亮氨酸, 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。

[0142] 关于治疗性抗体, 维妥珠单抗和利妥昔单抗分别是针对 CD20 的人源化和嵌合 IgG1 抗体, 其用于治疗很多种血液恶性肿瘤和/或自身免疫性疾病。表 1 比较利妥昔单抗与维妥珠单抗的同种异型序列。如表 1 所示, 利妥昔单抗 (G1m17, 1) 是 DEL 同种异型 IgG1, 具有在利妥昔单抗中赖氨酸对维妥珠单抗中精氨酸的 Kabat 位置 214 (重链 CH1) 处另外的序列变异。已经报道, 维妥珠单抗在受试者中比利妥昔单抗免疫原性低 (参见例如 Morchhauser 等人, 2009, J Clin Oncol 27:3346-53; Goldenberg 等人, 2009, Blood 113:1062-70; Robak & Robak, 2011, BioDrugs 25:13-25), 即归因于人源化抗体和嵌合抗体之间的差异的效应。然而, EEM 和 DEL 同种异型之间的同种异型差异也可能说明维妥珠单抗的免疫原性较低。

[0143] 表 1: 利妥昔单抗与维妥珠单抗的同种异型

		重链位置和相关同种异型					
		完全同种异型	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	I	A
[0144]	维妥珠单抗	G1m3	R	3	E/M	-	A

[0145] 为了降低 nG1m1 基因型个体中治疗性抗体的免疫原性, 期望选择抗体的同种异型以对应于以 Kabat 214 处的精氨酸为特征的 G1m3 同种异型和以 Kabat 位置 356 处的谷氨酸、Kabat 位置 358 处的甲硫氨酸和 Kabat 位置 431 处的丙氨酸为特征的 nG1m1, 2 空-同种异型。令人惊讶的是, 发现长时间段内重复皮下施用 G1m3 抗体不会导致显著的免疫应答。在替代实施方案中, 与 G1m3 同种型共同的人 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涉及那些

位置处的残基,人IgG4重链恒定区序列用于治疗性抗体的用途也是优选的实施方案。G1m3 IgG1抗体与IgG4抗体的组合也可以用于治疗性施用。

**[0146] 已知的抗体**

**[0147]** 在各种实施方案中,要求保护的方法和组合物可以利用本领域已知的多种抗体中的任一种。使用的抗体可以从许多已知来源商购获得。例如,多种分泌抗体的杂交瘤细胞系可从美国典型培养物保藏中心(ATCC, Manassas, VA)获得。针对各种疾病靶标(包括但不限于肿瘤相关抗原)的大量抗体已经被保藏在ATCC和/或具有公开的可变区序列,并且可用于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,每篇所述专利的实施例部分通过引用并入本文。这些仅是示例性的,并且极其多种其它抗体及其杂交瘤在本领域中是已知的。熟练技术人员将认识到,可以通过简单搜索ATCC、NCBI和/或USPTO数据库中针对所选疾病相关感兴趣靶标的抗体来获得针对几乎任何疾病相关抗原的抗体序列或抗体分泌杂交瘤。使用本领域公知的标准技术,可以将克隆的抗体的抗原结合结构域扩增出来,切出,连接到表达载体中,转染到改变的宿主细胞中,并用于蛋白质生产(参见例如美国专利号7,531,327、7,537,930、7,608,425和7,785,880,每篇所述美国专利的实施例部分通过引用并入本文)。

**[0148]** 可以在要求保护的方法和组合物的范围内使用的特定抗体包括但不限于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)、拉姆布罗力珠单抗(lambrolizumab)(抗PD-1受体)、纳武单抗(抗PD-1

受体)、伊匹单抗(抗CTLA-4)、RS7(抗表皮糖蛋白-1(EGP-1,又称为TROP-2))、PAM4或KC4(两者为抗粘蛋白)、MN-14(抗癌胚抗原(CEA,又称为CD66e或CEACAM5))、MN-15或MN-3(抗CEACAM6)、Mu-9(抗结肠特异性抗原-p)、Immuno 31(抗甲胎蛋白)、R1(抗IGF-1R)、A19(抗CD19)、IMMU-H2B(抗H2B)、IMMU-H3(抗H3)、IMMU-H4(抗H4)、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IX MAb)、L243(抗HLA-DR)阿仑珠单抗(抗CD52)、贝伐珠单抗(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(又称为克里伏妥珠单抗(clivatuzumab)、抗粘蛋白)和曲妥珠单抗(抗ErbB2)。此类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；和美国专利申请公开号20050271671；20060193865；20060210475；20070087001；美国专利申请序列号14/180,646；所述专利各自的实施例部分通过引用并入本文)。使用的特定已知抗体包括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(美国专利申请13/688,812)、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,保藏为ATCC PTA-4405和PTA-4406)和D2/B(WO 2009/130575)，每篇所述专利或申请的文本就附图和实施例部分而言通过引用并入本文。

[0149] 可以使用所述的缀合物靶向的其它有用的抗原包括碳酸酐酶IX、甲胎蛋白(AFP)、 $\alpha$ -辅肌动蛋白-4、A3、A33抗体特异性的抗原、ART-4、B7、Ba 733、BAGE、BrE3抗原、CA125、CAMEL、CAP-1、CASP-8/m、CCL19、CCL21、CD1、CD1a、CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD11A、CD14、CD15、CD16、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD29、CD30、CD32b、CD33、CD37、CD38、CD40、CD40L、CD44、CD45、CD46、CD52、CD54、CD55、CD59、CD64、CD66a-e、CD67、CD70、CD70L、CD74、CD79a、CD80、CD83、CD95、CD126、CD132、CD133、CD138、CD147、CD154、CDC27、CDK-4/m、CDKN2A、CTLA-4、CXCR4、CXCR7、CXCL12、HIF-1 $\alpha$ 、结肠特异性抗原-p(CSAP)、CEACAM5、CEACAM6、c-Met、DAM、EGFR、EGFRvIII、EGP-1(TROP-2)、EGP-2、ELF2-M、Ep-CAM、成纤维细胞生长因子(FGF)、F1t-1、F1t-3、叶酸受体、G250抗原、GAGE、gp100、GRO- $\beta$ 、组蛋白H2B、组蛋白H3、组蛋白H4、HLA-DR、HM1.24、人绒毛膜促性腺激素(HCG)及其亚基、HER2/neu、HMGB-1、缺氧诱导因子(HIF-1)、HSP70-2M、HST-2、Ia、IGF-1R、IFN- $\gamma$ 、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、IFN- $\lambda$ 、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-23、IL-25、胰岛素样生长因子-1(IGF-1)、KC4抗原、KS-1抗原、KS1-4、Le-Y、LDR/FUT、巨噬细胞迁移抑制因子(MIF)、MAGE、MAGE-3、MART-1、MART-2、NY-ESO-1、TRAG-3、mCRP、MCP-1、MIP-1A、MIP-1B、MIF、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC5ac、MUC13、MUC16、MUM-1/2、MUM-3、NCA66、NCA95、NCA90、PAM4抗原、胰腺癌粘蛋白、PD-1、PD-L1、PD-1受体、胎盘生长因子、p53、PLAGL2、前列腺酸性磷酸酶、PSA、PRAME、PSMA、P1GF、ILGF、ILGF-1R、IL-6、IL-25、RS5、RANTES、T101、SAGE、S100、存活蛋白、存活蛋白-2B、TAC、TAG-72、腱糖蛋白、TRAIL受体、TNF-

$\alpha$ 、Tn抗原、Thomson-Friedenreich抗原、肿瘤坏死抗原、VEGFR、ED-B纤连蛋白、WT-1、17-1A抗原、补体因子C3、C3a、C3b、C5a、C5、血管发生标志物、bcl-2、bcl-6、Kras、癌基因标志物和癌基因产物(参见例如Sensi等人,Clin Cancer Res 2006,12:5023-32;Parmiani等人,J Immunol 2007,178:1975-79;Novellino等人Cancer Immunol Immunother 2005,54:187-207)。

[0150] 如流式细胞术所示并且可以作为选择用于药物缀合免疫疗法的合适抗体的指南的造血恶性细胞上合适的抗原(簇命名,或CD)靶标的综合分析是2008年1月15日在线发表的Craig和Foon,Blood;DOL 10.1182/blood-2007-11-120535。

[0151] CD66抗原由具有相似结构的五种不同的糖蛋白CD66a-e组成,分别由癌胚抗原(CEA)基因家族成员BCG、CGM6、NCA、CGM1和CEA编码。这些CD66抗原(例如CEACAM6)主要在粒细胞、消化道的正常上皮细胞和各种组织的肿瘤细胞中表达。也作为适合于癌症的靶标包括的是癌症睾丸抗原,如NY-ESO-1(Theurillat等人,Int.J.Cancer 2007;120(11):2411-7),以及髓性白血病(Kozlov等人,Cancer Genet.Cytogenet.2005;163(1):62-7)以及B细胞疾病中的CD79a,以及对于非霍奇金氏淋巴瘤的CD79b(Poison等人,Blood 110(2):616-623)。许多前述抗原公开于美国临时申请序列号60/426,379,标题为“Use of Multi-specific,Non-covalent Complexes for Targeted Delivery of Therapeutics,”2002年11月15日提交。癌症干细胞(其归于更具疗法抗性的前体恶性细胞群体(Hill和Perris,J.Natl.Cancer Inst.2007;99:1435-40))具有可以在某些癌症类型中靶向的抗原,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)和胶质母细胞瘤(Beier等人,Cancer Res.2007;67(9):4010-5)中的CD133,以及结肠直肠癌(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)和头颈鳞状细胞癌(Prince等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 2007;104(3):973-8)中的CD44。用于乳腺癌疗法的另一种有用的靶是由Taylor等人(Biochem.J.2003;375:51-9)描述的LIV-1抗原。

[0152] 对于多发性骨髓瘤疗法,已经描述了针对例如CD38和CD138(Stevenson,Mol Med 2006;12(11-12):345-346;Tassone等人,Blood 2004;104(12):3688-96)、CD74(Stein等人,同下)、CS1(Tai等人,Blood 2008;112(4):1329-37)和CD40(Tai等人,2005;Cancer Res.65(13):5898-5906)的合适的靶向抗体。

[0153] 巨噬细胞迁移抑制因子(MIF)是先天性和过继性免疫和凋亡的重要调节剂。已经报告了CD74是MIF的内源受体(Leng等人,2003,J Exp Med 197:1467-76)。拮抗性抗CD74抗体对MIF介导的胞内途径的疗效可以用于治疗一大批疾病状态,如膀胱癌、前列腺癌、乳腺癌、肺癌、结肠癌和慢性淋巴细胞性白血病(例如Meyer-Siegler等人,2004,BMC Cancer 12:34;Shachar&Haran,2011,Leuk Lymphoma 52:1446-54);自身免疫性疾病,如类风湿性关节炎和系统性红斑狼疮(Morand&Leech,2005,Front Biosci 10:12-22;Shachar&Haran,2011,Leuk Lymphoma 52:1446-54);肾病,如肾异基因移植排斥(Lan,2008,Nephron Exp Nephrol.109:e79-83);以及许多炎性疾病(Meyer-Siegler等人,2009,Mediators Inflamm epub March 22,2009;Takahashi等人,2009,Respir Res 10:33;米拉珠单抗(Milatuzumab)(hLL1)是用于治疗MIF介导的疾病的治疗应用的示例性抗CD74抗体。

[0154] 抗TNF- $\alpha$ 抗体是本领域中已知的,并且可以用于治疗免疫疾病,如自身免疫性疾病、免疫功能障碍(例如移植物抗宿主病、器官移植排斥)或糖尿病。针对TNF- $\alpha$ 的已知抗体包括人抗体CDP571(0fei等人,2011,Diabetes 45:881-85);鼠抗体MTNFA1、M2TNFA1、M3TNFA1、M3TNFAB1、M302B和M303(Thermo Scientific, Rockford, IL);英利昔单抗(Centocor, Malvern, PA);赛妥珠单抗聚乙二醇(UCB, Brussels, Belgium);和阿达木单抗(Abbott, Abbott Park, IL)。这些和许多其它已知的抗TNF- $\alpha$ 抗体可以用于要求保护的方法和组合物中。用于治疗免疫失调或自身免疫疾病的其它抗体包括但不限于抗B细胞抗体,维妥珠单抗、依帕珠单抗、米拉珠单抗或hL243;托珠单抗(抗IL-6受体);巴利昔单抗(抗CD25);达利珠单抗(抗CD25);依法珠单抗(抗CD11a);莫罗单抗-CD3(抗CD3受体);抗CD40L(UCB, Brussels, Belgium);那他珠单抗(抗 $\alpha$ 4整联蛋白)和奥马珠单抗(抗IgE)。

[0155] 检查点抑制剂抗体主要用于癌症治疗。免疫检查点是指免疫系统中负责维持自身耐受性和调节免疫系统反应程度以使外周组织损伤最小化的抑制途径。然而,肿瘤细胞也可以激活免疫系统检查点以降低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以与一种或多种其它药剂组合使用以增强针对疾病细胞,组织或病原体的免疫应答的有效性。示例性抗PD1抗体包括拉姆布罗力珠单抗(MK-3475, MERCK)、纳武单抗(BMS-936558, BRISTOL-MYERS SQUIBB)、AMP-224(MERCK)和皮地利珠单抗(pidilizumab)(CT-011, CURETECH LTD.)。抗PD1抗体可购自例如ABCAM®(AB137132)、BIOLEGEND®(EH12.2H7, RMP1-14)和AFFYMETRIX EBIOSCIENCE(J105, J116, MIH4)。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抗体也可购自AFFYMETRIX EBIOSCIENCE(MIH1)。示例性抗CTLA4抗体包括伊匹单抗(Bristol-Myers Squibb)和曲美母单抗(tremelimumab)(PFIZER)。抗PD1抗体可购自例如AB CAM®(AB134090)、SINO BIOLOGICAL INC.(11159-H03H, 11159-H08H)和THERMO SCIENTIFIC PIERCE(PA5-29572, PA5-23967, PA5-26465, MA1-12205, MA1-35914)。伊匹单抗最近已经受到FDA批准用于治疗转移性黑素瘤(Wada等人,2013, J Transl Med 11:89)。

[0156] 在另一个优选的实施方案中,使用下述抗体,所述抗体被迅速内化,然后重新表达,加工并在细胞表面上呈递,使细胞能够对循环缀合物持续摄取和累积。最优秀的抗体/抗原对的实例是LL1、抗CD74MAb(不变链,II类特异性分子伴侣,Ii)(参见例如美国专利号6,653,104、7,312,318;所述专利各自的实施例部分通过引用并入本文)。CD74抗原在B细胞淋巴瘤(包括多发性骨髓瘤)和白血病、某些T细胞淋巴瘤、黑素瘤、结肠、肺和肾癌、胶质母细胞瘤和某些其它癌症上高度表达(Ong等人,Immunology 98:296-302(1999))。在癌症中使用CD74抗体的综述包含在Stein等人,Clin Cancer Res. 2007年9月15日;13(18Pt 2):5556s-5563s,通过引用并入本文。

[0157] 优选用抗CD74抗体治疗的疾病包括但不限于非霍奇金氏淋巴瘤、霍奇金病、黑素瘤、肺癌、肾癌、结肠癌、多形性胶质母细胞瘤、组织细胞瘤、髓性白血病和多发性骨髓瘤。在靶细胞表面上短时间段持续表达CD74抗原,然后使抗原内化,并重新表达抗原,使得LL1靶向抗体与其携带的任何化疗部分一起被内化。这允许LL1-化学治疗药物缀合物的高度且治疗性浓度在此类细胞内累积。内化的LL1-化学治疗药物缀合物通过溶酶体和内体循环,并

且化疗部分在靶细胞内以活性形式释放。

[0158] 在另一个优选的实施方案中,可以使用针对病原体的治疗性缀合物,因为针对病原体的抗体是已知的。例如,特异性结合由感染性病灶引起或与之相关的标志物(包括病毒、细菌、真菌或寄生性感染,例如由病原体,如细菌、立克次氏体、支原体、原生动物、真菌、病毒引起),以及与此类生物体有关的抗原和产物的抗体和抗体片段已经特别记载于 Hansen 等人,美国专利号3,927,193 和 Goldenberg 美国专利号4,331,647、4,348,376、4,361,544、4,468,457、4,444,744、4,818,709 和 4,624,846,各自的实施例部分通过引用并入本文,以及上面引用的 Reichert 和 Dewitz。列出抗感染生物体(抗毒素和抗病毒抗体)以及其它靶标的抗体的综述包含于 Casadevall, Clin Immunol 1999; 93 (1) :5-15, 所述文献通过引用并入本文。

[0159] 在优选的实施方案中,病原体选自由以下组成的组:HIV病毒、结核分枝杆菌、无乳链球菌、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、嗜肺军团菌、化脓链球菌、大肠杆菌、淋病奈瑟菌、脑膜炎奈瑟菌、肺炎球菌、新型隐球菌、荚膜组织胞浆菌、流感嗜血杆菌B、苍白密螺旋体、莱姆病螺旋体、铜绿假单胞菌、麻风分枝杆菌、流产布鲁氏菌、狂犬病病毒、流感病毒、巨细胞病毒、单纯疱疹病毒I、单纯疱疹病毒II、人血清细小样病毒、呼吸道合胞病毒、水痘带状疱疹病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、麻疹病毒、腺病毒、人T细胞白血病病毒、埃巴病毒、鼠白血病病毒、腮腺炎病毒、水泡性口炎病毒、辛德比斯病毒、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒、疣病毒、蓝舌病毒、仙台病毒、猫白血病病毒、reovirus、脊髓灰质炎病毒、猿猴病毒40、小鼠乳腺肿瘤病毒、登革热病毒、风疹病毒、西尼罗河病毒、恶性疟原虫、间日疟原虫、鼠弓形虫、让氏锥虫、克鲁斯锥虫、罗得西亚锥虫、布氏锥虫、曼氏血吸虫、日本血吸虫、牛巴贝虫、埃尔梅利亚虫、旋盘尾丝虫、热带利什曼原虫、旋毛线虫、小泰勒虫、水泡绦虫、羊绦虫、牛肉绦虫、胞生绦虫、科氏中殖孔绦虫、关节炎支原体、猪鼻支原体、口腔支原体、精氨酸支原体、拉氏无胆甾支原体、唾液支原体和肺炎支原体,如公开于美国专利号6,440,416,其实施例部分通过引用并入本文。

[0160] 在更优选的实施方案中,包含抗gp120 和其它此类抗HIV抗体的本发明的药物缀合物可用作AIDS患者中的HIV的治疗剂;并且针对结核分枝杆菌的抗体的药物缀合物适合作为药物抗性肺结核的治疗剂。已经检测了抗gp120 MAb(抗HIV MAb)和毒素(如假单胞菌外毒素)的融合蛋白的抗病毒性质(Van Oigen 等人, J Drug Target, 5:75-91, 1998)。在AIDS患者中治疗HIV感染的尝试失败,可能是由于效力不足或不可接受的宿主毒性。本发明的CPT药物缀合物有利地缺乏蛋白毒素的此类毒性副作用,因此有利地用于治疗AIDS患者的HIV感染。这些药物缀合物可以单独给药,或与单独给药时对此类患者有效的其它抗生素或治疗剂联合给药。候选抗HIV抗体包括由 Johansson 等人 (AIDS. 2006年10月3日; 20 (15) : 1911-5) 描述的P4/D10抗包膜抗体以及由 Polymun (Vienna, Austria) 描述和销售,也描述于美国专利5,831,034,美国专利5,911,989 和 Vcelar 等人, AIDS 2007; 21 (16) : 2161-2170 和 Joos 等人, Antimicrob. Agents Chemother. 2006; 50 (5) : 1773-9(全部通过引用并入本文) 的抗HIV抗体。HIV的优选靶向剂是这些抗体的各种组合以克服抗性。

[0161] 用于治疗自身免疫性疾病或免疫系统功能障碍(例如,移植抗宿主病,器官移植排斥)的抗体是本领域已知的并且可以使用所公开的方法和组合物缀合至CL2A-SN-38。用于治疗自身免疫/免疫功能障碍疾病的抗体可结合示例性抗原,包括但不限于BCL-1、BCL-

2、BCL-6、CD1a、CD2、CD3、CD4、CD5、CD7、CD8、CD10、CD11b、CD11c、CD13、CD14、CD15、CD16、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD33、CD34、CD38、CD40、CD40L、CD41a、CD43、CD45、CD55、TNF- $\alpha$ 、干扰素、IL-6和HLA-DR。与上文讨论的这些和其它靶抗原结合的抗体可用于治疗自身免疫或免疫功能障碍疾病。可以用免疫缀合物治疗的自身免疫疾病包括急性特发性血小板减少性紫癜、慢性特发性血小板减少性紫癜、皮肌炎、西登哈姆舞蹈病、重症肌无力、系统性红斑狼疮、狼疮性肾炎、风湿热、多腺性综合征、大疱性类天疱疮、糖尿病、亨诺-许兰氏紫癜、链球菌后肾炎、结节性红斑、高安动脉炎、ANCA相关血管炎、艾迪生病、类风湿性关节炎、多发性硬化、结节病、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、古德帕斯彻氏综合征、闭塞性血栓性脉管炎、舍格伦综合征、原发性胆汁性肝硬化、桥本甲状腺炎、甲状腺毒症、硬皮病、慢性活动性肝炎、多发性肌炎/皮肌炎、多软骨炎、大疱性类天疱疮、寻常型天疱疮、韦格纳氏肉芽肿、膜性肾病、肌萎缩性侧索硬化症、脊髓痨、巨细胞动脉炎/多肌痛、恶性贫血、快速进行性肾小球性肾炎、银屑病或纤维化肺泡炎。

[0162] 在要求保护的方法和组合物的实践中,上文讨论的抗体和针对疾病相关抗原的其它已知抗体可以用作CL2A-SN-38-免疫缀合物。

[0163] 双特异性和多特异性抗体

[0164] 双特异性抗体可用于许多生物医学应用。例如,具有肿瘤细胞表面抗原和T-细胞表面受体的结合位点的双特异性抗体可以指导T细胞裂解特定的肿瘤细胞。识别神经胶质瘤和T细胞上的CD3表位的双特异性抗体已成功用于治疗人患者的脑瘤(Nitta等人, Lancet. 1990; 355: 368-371)。在某些实施方案中,本文公开的用于治疗剂缀合的技术和组合物可以与作为抗体部分的双特异性或多特异性抗体一起使用。

[0165] 生产双特异性或多特异性抗体的许多方法是已知的,如例如在美国专利号7,405,320中公开,其实施例部分通过引用并入本文。双特异性抗体可以通过四源杂交瘤(quadroma)法产生,该方法涉及两种不同杂交瘤的融合,每种产生识别不同抗原位点的单克隆抗体(Milstein和Cuello, Nature, 1983; 305: 537-540)。

[0166] 产生双特异性抗体的另一种方法使用异双官能交联剂来化学栓系两种不同的单克隆抗体(Staerz等人Nature. 1985; 314: 628-631; Perez等人Nature. 1985; 316: 354-356)。双特异性抗体也可以通过将两种母体单克隆抗体中的每一种还原成相应的半分子,然后将其混合并使其再氧化以获得杂合结构而产生(Staerz和Bevan. Proc Natl Acad Sci U S A. 1986; 83: 1453-1457)。另一个替代方案涉及使用适当的接头将两个或三个单独纯化的Fab'片段化学交联。(参见例如欧洲专利申请0453082)。

[0167] 其它方法包括提高产生杂交杂交瘤的效率,通过将不同的选择性标志物经由逆转录病毒衍生的穿梭载体转移到相应的母体杂交瘤中,随后将所述母体杂交瘤融合(DeMonte等人Proc Natl Acad Sci U S A. 1990, 87: 2941-2945);或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进行。

[0168] 可以将关联V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>结构域用适当组成和长度的肽接头(通常由超过12个氨基酸残基组成)连接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,所述专利各自的实施例部分通过引用并入本文。肽接头长度减少至少于12个氨基酸残基防止了V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>结构域在同一链上的配对,并且强制V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>结构域与其它链上的互补结构域配对,导致形成功能性多聚体。用3-12个氨基酸残基之间

的接头连接的V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>结构域的多肽链主要形成二聚体(称为双抗体)。使用0至2个氨基酸残基的接头,三聚体(称为三抗体)和四聚体(称为四抗体)是有利的,但是除了接头长度外,寡聚的确切模式似乎取决于V-结构域的组成及取向(V<sub>H</sub>-接头-V<sub>L</sub>或V<sub>L</sub>-接头-V<sub>H</sub>)。

[0169] 这些用于生产多特异性或双特异性抗体的技术在低产率、纯化的必要性、低稳定性或技术的劳动强度方面表现出各种困难。最近,已知使用称为“DOCK-AND-LOCK™”(DNL™)的双特异性构建体来产生事实上任何期望抗体、抗体片段和其它效应分子的组合(参见例如美国专利号7,550,143;7,521,056;7,534,866;7,527,787和USSN 11/925,408,其各自的实施例部分通过引用并入本文)。该技术利用互补的蛋白质结合结构域,称为锚定结构域(AD)和二聚化和对接结构域(DDD),它们相互结合并允许装配复杂结构,范围为二聚体、三聚体、四聚体、五聚体和六聚体。这些以高产率形成稳定的复合物而不需要大量纯化。该技术允许装配单特异性、双特异性或多特异性抗体。本领域已知用于制备双特异性或多特异性抗体的任何技术可以用于目前要求保护的方法的实践中。

[0170] 例如对于癌症疗法优选的使用组合包括CD20+CD22抗体、CD74+CD20抗体、CD74+CD22抗体、CEACAM5(CEA)+CEACAM6(NCA)抗体、胰岛素样生长因子(ILGF)+CEACAM5抗体、EGP-1(例如RS-7)+ILGF抗体、CEACAM5+EGFR抗体。此类抗体不仅需要组合使用,而且可以作为各种形式的融合蛋白如IgG、Fab、scFv等组合,如记载于美国专利号6,083,477、6,183,744和6,962,702以及美国专利申请公开号20030124058、20030219433、20040001825、20040202666、20040219156、20040219203、20040235065、20050002945、20050014207、20050025709、20050079184、20050169926、20050175582、20050249738、20060014245和20060034759,各自的实施例部分通过引用并入本文。

[0171] 预靶向

[0172] 双特异性或多特异性抗体也可用于预靶向技术。预靶向是最初开发用于解决直接靶向抗体的缓慢血液清除(这对正常组织如骨髓造成不想要的毒性)的多步骤过程。在预靶向的情况下,放射性核素或其它治疗剂连接到小递送分子(可靶向构建体),其在血液中在几分钟内被清除。首先,施用具有可靶向构建体以及靶抗原的结合位点的预靶向双特异性或多特异性抗体,使游离抗体从循环中清除,然后施用可靶向构建体。

[0173] 预靶向方法公开于例如Goodwin等人,美国专利号4,863,713;Goodwin等人,J.Nucl.Med.29:226,1988;Hnatowich等人,J.Nucl.Med.28:1294,1987;Oehr等人,J.Nucl.Med.29:728,1988;Klibanov等人,J.Nucl.Med.29:1951,1988;Sinitsyn等人,J.Nucl.Med.30:66,1989;Kalofonos等人,J.Nucl.Med.31:1791,1990;Schechter等人,Int.J.Cancer 48:167,1991;Paganelli等人,Cancer Res.51:5960,1991;Paganelli等人,Nucl.Med.Commun.12:211,1991;美国专利号5,256,395;Stickney等人,Cancer Res.51:6650,1991;Yuan等人,Cancer Res.51:3119,1991;美国专利号6,077,499、7,011,812、7,300,644、7,074,405;6,962,702、7,387,772、7,052,872、7,138,103、6,090,381、6,472,511、6,962,702和6,962,702,每篇所述专利通过引用并入本文。

[0174] 治疗或诊断受试者中的疾病或病症的预靶向方法可以通过以下方式提供:(1)向受试者施用双特异性抗体或抗体片段;(2)任选地向受试者施用清洁组合物,并使组合物从循环中清除抗体;并且(3)向受试者施用含有一种或多种螯合的或化学结合的治疗剂或诊断剂如SN-38的可靶向构建体。

[0175] 可靶向构建体

[0176] 在某些实施方案中,可以选择用于预靶向的用一种或多种治疗剂或诊断剂标记的可靶向构建体肽以结合双特异性抗体,其具有针对可靶向构建体肽的一个或多个结合位点和一个或多个针对与疾病或病况相关的靶抗原的结合位点。双特异性抗体可以用于预靶向技术,其中抗体可以首先施用于受试者。可以允许足够的时间以使双特异性抗体与靶抗原结合并且使未结合的抗体从循环中清除。然后可以将可靶向构建体如标记的肽施用于受试者,并允许与双特异性抗体结合并定位于患病的细胞或组织处。

[0177] 此类可靶向构建体可以具有多种多样的结构,并且不仅针对与可靶向构建体以高亲和力结合的抗体或片段的可用性,而且还针对在预靶向方法和双特异性抗体(bsAb)或多种异性抗体内使用时的快速体内清除进行选择。疏水剂在引发强烈的免疫反应方面是最好的,而亲水剂对于快速体内清除是优选的。因此,建立了疏水性和亲水性特征之间的平衡。这可部分通过使用亲水性螯合剂来抵消许多有机部分固有的疏水性来完成。而且,可以选择具有相反溶液性质的可靶向构建体的亚单位,例如含有氨基酸的肽,其中一些氨基酸是疏水性的并且一些氨基酸是亲水性的。

[0178] 可以使用具有少至两个氨基酸残基,优选2-10个残基的肽并且还可以偶联至其它部分,如螯合剂。接头应该是低分子量缀合物,优选具有小于50,000道尔顿的分子量,有利地小于约20,000道尔顿、10,000道尔顿或5,000道尔顿的分子量。更通常地,可靶向构建体肽将具有四个或更多个残基和一个或多个半抗原,用于结合例如双特异性抗体。示例性半抗原可以包括In-DTPA(铟-二亚乙基三胺五乙酸)或HSG(组胺琥珀酰甘氨酸)。可靶向构建体还可以包含一个或多个螯合部分,如DOTA(1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸)、NOTA(1,4,7-三氮杂-环壬烷-1,4,7-三乙酸)、TETA(对-溴乙酰氨基-苄基-四乙胺四乙酸)、NETA([2-(4,7-二羧基甲基[1,4,7]三氮杂环壬烷-1-基-乙基]-2-羧基甲基-氨基]乙酸)或其它已知的螯合部分。例如可以使用螯合部分来结合治疗和/或诊断放射性核素、顺磁离子或造影剂。

[0179] 可靶向构建体还可以在主链结构中包含非天然氨基酸(例如D-氨基酸)以增加肽在体内的稳定性。在替代实施方案中,可以使用其它主链结构,如由非天然氨基酸或类肽构建的主链结构。

[0180] 使用固相支持物和重复正交脱保护和偶联的标准技术,在自动肽合成仪上方便地合成用作可靶向构建体的肽。稍后用于缀合螯合部分或其它试剂的肽中的游离氨基团有利地用标准保护基如Boc基团封闭,而N端残基可被乙酰化以增加血清稳定性。此类保护基团是本领域技术人员所公知的。见Greene和Wuts *Protective Groups in Organic Synthesis*, 1999 (John Wiley and Sons, N.Y.)。当制备肽以稍后在双特异性抗体系统内使用时,它们有利地从树脂上切下以产生相应的C端酰胺,以抑制体内羧肽酶活性。

[0181] 当使用利用双特异性抗体的预靶向时,抗体将含有由靶组织产生或与靶组织相关的抗原的第一结合位点和可靶向构建体上的半抗原的第二结合位点。示例性半抗原包括但不限于HSG和In-DTPA。针对HSG半抗原制备的抗体是已知的(例如679抗体)并且可以容易地并入到适当的双特异性抗体(参见,例如,美国专利号6,962,702;7,138,103和7,300,644,就实施例部分而言通过引用并入本文)。然而,其它半抗原和与其结合的抗体是本领域已知的并且可以使用,例如In-DTPA和734抗体(例如美国专利号7,534,431,实施例部分通过引

用并入本文)。

[0182] DOCK-AND-LOCK™ (DNL™)

[0183] 在优选的实施方案中,二价或多价抗体以DOCK-AND-LOCK™ (DNL™) 复合物形成(参见,例如,美国专利号7,521,056;7,527,787;7,534,866;7,550,143和7,666,400,所述专利各自的实施例部分通过引用并入本文)。通常,该技术利用了cAMP依赖性蛋白激酶(PKA)的调节(R)亚基的二聚化和对接域(DDD)序列和源自多种AKAP蛋白质的任一种的锚定结构域(AD)序列之间发生的特异性和高亲和力结合相互作用(Baillie等人,FEBS Letters.2005;579:3264.Wong和Scott,Nat.Rev.Mol.Cell Biol.2004;5:959)。DDD和AD肽可以连接到任何蛋白质、肽或其它分子。由于DDD序列自发地二聚化并与AD序列结合,所以该技术允许在可以与DDD或AD序列连接的任何选择的分子之间形成复合物。

[0184] 尽管标准的DNL™复合物包含具有与一个AD连接分子连接的两个DDD连接分子的三聚体,但复合物结构的变化允许形成二聚体、三聚体、四聚体、五聚体、六聚体和其它多聚体。在一些实施方案中,DNL™复合物可以包含两种或更多种抗体、抗体片段或融合蛋白,其结合相同的抗原决定簇或结合两种或更多种不同的抗原。该DNL™复合物也可包含一种或多种其它效应物,如蛋白质、肽、免疫调节剂、细胞因子、白细胞介素、干扰素、结合蛋白、肽配体、载体蛋白、毒素、核糖核酸酶如豹蛙抗瘤酶(onconase)、抑制性寡核苷酸如siRNA、抗原或异种抗原、聚合物如PEG、酶、治疗剂、激素、细胞毒性剂、抗血管生成剂、促凋亡剂或任何其它分子或聚集体。

[0185] 在由第二信使cAMP与R亚基结合触发的研究得最好的信号转导途径之一中发挥主要作用的PKA首先在1968年从兔骨骼肌中分离出来(Walsh等人,J.Biol.Chem.1968;243:3763)。全酶的结构由两个由R亚基以无活性形式保持在一起的催化亚基组成(Taylor,J.Biol.Chem.1989;264:8443)。发现PKA的同工酶,其具有两种R亚基类型(RI和RII),并且每种类型具有 $\alpha$ 和 $\beta$ 同种型(Scott,Pharmacol.Ther.1991;50:123)。因此,PKA调节亚基的四种同种型是RI $\alpha$ 、RI $\beta$ 、RII $\alpha$ 和RII $\beta$ 。R亚基仅作为稳定的二聚体分离,并且已经显示了二聚化结构域由RII $\alpha$ 的前44个氨基末端残基组成(Newlon等人,Nat.Struct.Biol.1999;6:222)。如下面所讨论,其它调节亚基的氨基酸序列的类似部分参与二聚化和对接,每个位于调节亚基的N端末端附近。cAMP与R亚基的结合导致释放活性催化亚基以实现一大批丝氨酸/苏氨酸激酶活性,其通过PKA的区室化经由其与AKAP对接而朝向选定的底物定位(Scott等人,J.Biol.Chem.1990;265:21561)。

[0186] 从在1984年表征第一种AKAP微管相关蛋白-2起(Lohmann等人,Proc.Natl.Acad.Sci USA.1984;81:6723),超过50种定位于各种亚细胞位点,包括质膜、肌动蛋白细胞骨架、细胞核、线粒体和内质网的AKAP已经鉴定为在范围为酵母到人的物种具有多种多样的结构(Wong和Scott,Nat.Rev.Mol.Cell Biol.2004;5:959)。用于PKA的AKAP的AD是14-18个残基的两亲性螺旋(Carr等人,J.Biol.Chem.1991;266:14188)。AD的氨基酸序列在各个AKAP之间是相当不同的,对RII二聚体报道的结合亲和力范围为2-90nM(Alto等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA.2003;100:4445)。AKAP只会与二聚体R亚基结合。对于人RII $\alpha$ ,AD结合由23个氨基末端残基形成的疏水表面(Colledge和Scott,Trends Cell Biol.1999;6:216)。因此,人RII $\alpha$ 的二聚化结构域和AKAP结合结构域都位于相同的N-端44个氨基酸序列内(Newlon等人,Nat.Struct.Biol.1999;6:222;Newlon等人,EMBO J.2001;

20:1651),其在本文中称为DDD。

[0187] 我们已经开发了利用人PKA调节亚基的DDD和AKAP的AD作为优异的一对接头模块以将任何两个实体(下文中称为A和B)对接成非共价复合物的平台技术,该非共价复合物可以通过在策略位置处将半胱氨酸残基引入DDD和AD两者中进一步锁定到DNL<sup>TM</sup>复合物中,以促进二硫键的形成。该方法的一般方法如下。通过如下构建实体A:通过将DDD序列链接到A的前体,从而导致在下文称为a的第一组件。因为DDD序列会实现二聚体的自发形成,所以A将由a<sub>2</sub>组成。通过如下构建实体B:将AD序列连接至B的前体,从而产生下文称为b的第二组件。包含在a<sub>2</sub>中的DDD的二聚体基序将创建与b中所含的AD序列结合的对接位点,从而促进a<sub>2</sub>和b的即刻缔合以形成由a<sub>2</sub>b组成的二元三聚复合体。通过随后的反应使这种结合事件变为不可逆,以通过二硫键桥共价固定两个实体,这基于有效局部浓度的原理非常有效地发生,因为初始结合相互作用应当将置于DDD和AD两者上的反应性巯基基团变得接近(Chmura等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA.2001;98:8480),以位点特异性连接。使用接头、衔接头模块和前体的各种组合,可以生产和使用不同化学计量的极其多种DNL<sup>TM</sup>构建体(参见例如美国专利号7,550,143;7,521,056;7,534,866;7,527,787和7,666,400)。

[0188] 通过将DDD和AD远离两种前体的官能团连接,预计此类位点特异性连接也保持两种前体的原有活性。这种方法本质上是模块化的,并且潜在可以应用于位点特异性且共价连接一大批物质,包括多肽、蛋白质、抗体、抗体片段和其它具有广泛活性的效应物部分。利用下文实施例中描述的构建AD和DDD缀合效应物的融合蛋白方法,事实上任何蛋白质或肽都可以并入DNL<sup>TM</sup>构建体中。然而,该技术不是限制性的,并且可以使用其它的缀合方法。

[0189] 已知用于制备融合蛋白的多种方法,包括核酸合成、杂交和/或扩增以产生编码感兴趣融合蛋白的合成双链核酸。可以通过标准分子生物学技术(参见例如Sambrook等人, Molecular Cloning, A laboratory manual, 第2版, 1989)将此类双链核酸插入用于融合蛋白生产的表达载体中。在此类优选实施方案中,AD和/或DDD部分可以连接到效应蛋白或肽的N端或C端。然而,熟练技术人员将认识到,AD或DDD部分与效应物部分的连接位点可以随效应物部分的化学性质和参与其生理活性的效应物部分的各部分而变化。多种效应物部分的位点特异性连接可以使用本领域已知的技术进行,例如使用二价交联剂和/或其它化学缀合技术。

[0190] AD和DDD部分中的结构-功能关系

[0191] 对于不同类型的DNL<sup>TM</sup>构建体,可以使用不同的AD或DDD序列。下面提供了示例性的DDD和AD序列。

[0192] DDD1

[0193] SHIQIPPGLETLLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:1)

[0194] DDD2

[0195] CGHIQIPPGLETLLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:2)

[0196] AD1

[0197] QIEYLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:3)

[0198] AD2

[0199] CGQIEYLAKQIVDNAIQQQAGC (SEQ ID NO:4)

[0200] 熟练技术人员将认识到,DDD1和DDD2基于蛋白激酶A的人RII $\alpha$ 同种型的DDD序列。

然而,在替代实施方案中,DDD和AD部分可以基于蛋白激酶A的人RI $\alpha$ 形式的DDD序列和相应的AKAP序列,如以下DDD3、DDD3C和AD3中例举。

[0201] DDD3

[0202] SLRECELYVQKHNIQALLKDSIVQLCTARPERPMAFLREYFERLEKEEAK (SEQ ID NO:5)

[0203] DDD3C

[0204] MSCGGSLRECELYVQKHNIQALLKDSIVQLCTARPERPMAFLREYFERLEKEEAK (SEQ ID NO:6)

[0205] AD3

[0206] CGFEELAWKIAKMIWSDFQQGC (SEQ ID NO:7)

[0207] 在其它替代实施方案中,AD和/或DDD部分的其它序列变体可用于构建DNL<sup>TM</sup>复合物。例如,人PKA DDD序列只有四种变体,对应于PKA RI $\alpha$ 、RII $\alpha$ 、RI $\beta$ 和RII $\beta$ 的DDD部分。RII $\alpha$  DDD序列是上面公开的DDD1和DDD2的基础。下面显示了四种人PKA DDD序列。DDD序列代表RII $\alpha$ 的残基1-44、RII $\beta$ 的1-44、RI $\alpha$ 的12-61和RI $\beta$ 的13-66。(注意,DDD1的序列从人PKA RII $\alpha$  DDD部分略微修饰。)

[0208] PKA RI $\alpha$

[0209] SLRECELYVQKHNIQALLKDVSVQLCTARPERPMAFLREYFEKLEKEEAK (SEQ ID NO:8)

[0210] PKA RI $\beta$

[0211] SLKGCELYVQLHGIQQVLKDCIVHLCISKPERPMKFLREHFEKLEKEENRQILA (SEQ ID NO:9)

[0212] PKA RII $\alpha$

[0213] SHIQIPPGLELLQGYTVEVGQQPPDLVDFAVEYFTRLREARRQ (SEQ ID NO:10)

[0214] PKA RII $\beta$

[0215] SIEIPAGLLELLQGFTVEVLRHQPADLLEFALQHFTRLQQENER (SEQ ID NO:11)

[0216] AD和DDD域的结构-功能关系一直是调查的主题。(参见例如Burns-Hamuro等人,2005,Protein Sci 14:2982-92;Carr等人,2001,J Biol Chem 276:17332-38;Alto等人,2003,Proc Natl Acad Sci USA 100:4445-50;Hundsrucker等人,2006,Biochem J 396:297-306;Stokka等人,2006,Biochem J 400:493-99;Gold等人,2006,Mol Cell 24:383-95;Kinderman等人,2006,Mol Cell 24:397-408,其全部内容在此引入并入本文)。

[0217] 例如,Kinderman等人(2006,Mol Cell 24:397-408)检测了AD-DDD结合相互作用的晶体结构,并得出结论:人DDD序列含有在二聚体形成或AKAP结合中重要的许多保守氨基酸残基,以下SEQ ID NO:1中加下划线。(参见Kinderman等人,2006的图1,通过引用并入本文)。熟练技术人员将认识到,在设计DDD序列的序列变体时,希望避免改变任何加下划线的残基,而对对于二聚化和AKAP结合不太重要的残基可以进行保守氨基酸取代。

[0218] SHIQIPPGLLELLQGYTVEVLRQQQPPDLVEFAVEYFTRLRERA (SEQ ID NO:1)

[0219] 如下文更详细讨论,对20种常见L-氨基酸中的每种已经表征了保守氨基酸取代。因此,基于Kinderman(2006)的数据和保守氨基酸取代,基于SEQ ID NO:1的潜在替代DDD序列显示在表2中。在设计表2时,仅考虑了高度保守的氨基酸取代。例如,用带电荷的残基仅取代相同电荷的残基,将具有小侧链的残基取代为相似大小的残基,仅将羟基侧链取代为其它羟基,等等。由于脯氨酸对氨基酸二级结构的独特效应,不用其它残基取代脯氨酸。以下SEQ ID NO:12至SEQ ID NO:31中显示了有限数量的此类潜在替代性DDD部分序列。熟练技术人员将认识到,可以通过标准技术,例如使用商业肽合成仪或公知的定点诱变技术,构

建DDD部分属内的大量替代种类。氨基酸取代对AD部分结合的影响也可以通过标准结合测定容易地确定,例如如Alto等人(2003,Proc Natl Acad Sci USA 100:4445-50)公开。

[0220] 表2:DDD1中的保守氨基酸取代(SEQ ID NO:1)。以SEQ ID NO:87公开的共有序列。

S	H	I	Q	I	P	P	G	<u>L</u>	T	E	<u>L</u>	<u>L</u>	Q	G	<u>Y</u>	T	<u>V</u>	E	<u>V</u>	<u>L</u>	R
T	K		N				A		S	D			N	A		S		D			K
R																					

[0221]

Q	Q	P	P	D	<u>L</u>	<u>V</u>	E	F	A	<u>V</u>	E	<u>Y</u>	F	T	R	<u>L</u>	R	E	A	R	A
N	N			E			D		L		D			S	K		K	D	L	K	L
									I								I	V		I	V

- [0222] THIQIPPGLELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:12)
- [0223] SKIQIPPGLELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:13)
- [0224] SRIQIPPGLELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:14)
- [0225] SHINIPPGLELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:15)
- [0226] SHIQIPPALELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:16)
- [0227] SHIQIPPGLELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:17)
- [0228] SHIQIPPGLTDLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:18)
- [0229] SHIQIPPGLELLNGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:19)
- [0230] SHIQIPPGLELLQAYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:20)
- [0231] SHIQIPPGLELLQGYSVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:21)
- [0232] SHIQIPPGLELLQGYTVDVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:22)
- [0233] SHIQIPPGLELLQGYTVEVLKQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:23)
- [0234] SHIQIPPGLELLQGYTVEVLRNQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:24)
- [0235] SHIQIPPGLELLQGYTVEVLRQNPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:25)
- [0236] SHIQIPPGLELLQGYTVEVLRQQPPPELVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:26)
- [0237] SHIQIPPGLELLQGYTVEVLRQQPPDLVDFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:27)
- [0238] SHIQIPPGLELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFLVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:28)
- [0239] SHIQIPPGLELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFIVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:29)
- [0240] SHIQIPPGLELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFVVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:30)
- [0241] SHIQIPPGLELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVDYFTRLREARA (SEQ ID NO:31)
- [0242] Alto等人(2003,Proc Natl Acad Sci USA 100:4445-50)进行各种AKAP蛋白的AD序列的生物信息学分析,以设计称为AKAP-IS (SEQ ID NO:3)的RII选择性AD序列,对DDD的结合常数为0.4nM。将AKAP-IS序列设计为AKAP与PKA结合的肽拮抗剂。在AKAP-IS序列中取代倾向于降低与DDD的结合的残基在下面的SEQ ID NO:3中加下划线。熟练技术人员将认识到,在设计AD序列的序列变体时,希望避免改变任何加下划线的残基,同时可以对对于DDD结合不太重要的残基进行保守性氨基酸取代。表3显示了AKAP-IS (AD1,SEQ ID NO:3)序列中潜在的保守性氨基酸取代,类似于上表2中对DDD1 (SEQ ID NO:1)所示的取代。
- [0243] 有限数量的此类潜在替代AD部分序列显示于下文的SEQ ID NO:32至SEQ ID NO:49中。同样,基于Alto等人(2003)的数据,熟练技术人员可以制备、测试和使用可能的AD部

分序列属内的非常大量的种类。注意到,Alto (2003) 的图2显示了根据实际的结合实验,可以在保留与DDD部分的结合活性的情况下做出的甚至更大数量的潜在氨基酸取代。

[0244] AKAP-IS

[0245] QIEYLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:3)

[0246] 表3:AD1中的保守氨基酸取代 (SEQ ID NO:3)。共有序列以SEQ ID NO:88公开。

	<b>Q</b>	<b>I</b>	<b>E</b>	<b>Y</b>	<b>L</b>	<b>A</b>	<b>K</b>	<b>Q</b>	<b>I</b>	<b>V</b>	<b>D</b>	<b>N</b>	<b>A</b>	<b>I</b>	<b>Q</b>	<b>Q</b>	<b>A</b>
[0247]	N	L	D	F	I		R	N			E	Q			N	N	L I V

[0248] NIEYLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:32)

[0249] QLEYLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:33)

[0250] QVEYLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:34)

[0251] QIDYLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:35)

[0252] QIEFLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:36)

[0253] QIETLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:37)

[0254] QIESLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:38)

[0255] QIEYIAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:39)

[0256] QIEYVAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:40)

[0257] QIEYLARQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:41)

[0258] QIEYLAKNIVDNAIQQA (SEQ ID NO:42)

[0259] QIEYLAKQIVENAIQQA (SEQ ID NO:43)

[0260] QIEYLAKQIVDQAIQQA (SEQ ID NO:44)

[0261] QIEYLAKQIVDNAINQA (SEQ ID NO:45)

[0262] QIEYLAKQIVDNAIQNA (SEQ ID NO:46)

[0263] QIEYLAKQIVDNAIQQL (SEQ ID NO:47)

[0264] QIEYLAKQIVDNAIQI (SEQ ID NO:48)

[0265] QIEYLAKQIVDNAIQV (SEQ ID NO:49)

[0266] Gold等人 (2006, Mol Cell 24:383-95) 利用结晶学和肽筛选开发SuperAKAP-IS序列 (SEQ ID NO:50), 与RII同种型相比对PKA的RII同种型显示高5个数量级的选择性。加下划线的残基表示相对于AKAP-IS序列的氨基酸取代位置, 其增加了与RII $\alpha$ 的DDD部分的结合。在该序列中, N端Q残基被编号为残基编号4, 并且C端A残基是残基编号20。可以进行取代以影响对RII $\alpha$ 的亲和力的残基是残基8、11、15、16、18、19和20 (Gold等人, 2006)。预期在某些替代实施方案中, 可以用SuperAKAP-IS序列替换AKAP-IS AD部分序列来制备DNL<sup>TM</sup>构建体。可以替换AKAP-IS AD序列的其它替代序列显示在SEQ ID NO:51-53中。下划线标出了相对于AKAP-IS序列的取代。预期与SEQ ID NO:4所示的AD2序列一样, AD部分还可以包含额外的N端残基半胱氨酸和甘氨酸以及C端残基甘氨酸和半胱氨酸。

[0267] SuperAKAP-IS

[0268] QIEYVAKQIVDYAIHQA (SEQ ID NO:50)

[0269] 备选AKAP序列

- [0270] QIEYKAKQIVDHAIHQA (SEQ ID NO:51)  
[0271] QIEYHAKQIVDHAIHQA (SEQ ID NO:52)  
[0272] QIEYVAKQIVDHAIHQA (SEQ ID NO:53)  
[0273] Gold等人的图2公开了来自多种AKAP蛋白的额外DDD结合序列,下文显示。  
[0274] RII特异性AKAP  
[0275] AKAP-KL  
[0276] PLEYQAGLLVQNAIQQAI (SEQ ID NO:54)  
[0277] AKAP79  
[0278] LLIETASSLVKNNAIQLSI (SEQ ID NO:55)  
[0279] AKAP-Lbc  
[0280] LIEEAASRIVDAVIEQVK (SEQ ID NO:56)  
[0281] RI特异性AKAP  
[0282] AKAPce  
[0283] ALYQFADRFSELVISEAL (SEQ ID NO:57)  
[0284] RIAD  
[0285] LEQVANQLADQIIKEAT (SEQ ID NO:58)  
[0286] PV38  
[0287] FEELAWKIAKMIWSDVF (SEQ ID NO:59)  
[0288] 双重特异性AKAP  
[0289] AKAP 7  
[0290] ELVRLSKRLVENAVLKAV (SEQ ID NO:60)  
[0291] MAP2D  
[0292] TAAEVVSARIVQVVTAEEAV (SEQ ID NO:61)  
[0293] DAKAP1  
[0294] QIKQAAFQLISQVILEAT (SEQ ID NO:62)  
[0295] DAKAP2  
[0296] LAWKIAKMIVSDVMQQ (SEQ ID NO:63)  
[0297] Stokka等人(2006,Biochem J 400:493-99)也开发了AKAP与PKA结合的肽竞争剂,在SEQ ID NO:64-66中所示。肽拮抗剂命名为Ht31 (SEQ ID NO:64)、RIAD (SEQ ID NO:65) 和 PV-38 (SEQ ID NO:66)。Ht-31肽对PKA的RII同种型表现出更大的亲和力,而RIAD和PV-38对RI表现出更高的亲和力。  
[0298] Ht31  
[0299] DLIEEAASRIVDAVIEQVKAAGAY (SEQ ID NO:64)  
[0300] RIAD  
[0301] LEQYANQLADQIIKEATE (SEQ ID NO:65)  
[0302] PV-38  
[0303] FEELAWKIAKMIWSDVFQQC (SEQ ID NO:66)  
[0304] Hundsrucker等人(2006,Biochem J 396:297-306)开发出AKAP与PKA结合的其它肽竞争剂,其与PKA的RII形式的DDD的结合常数低至0.4nM。Hundsrucker等人的表1中提供

了各种AKAP拮抗肽的序列,复制在下表4中。AKAPIS代表合成的RII亚基结合肽。所有其它肽源自所示AKAP的RII结合结构域。

[0305] 表4:AKAP肽序列

[0306] 肽序列

	<b>AKAPIS</b>	QIEYLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:3)
[0307]	<b>AKAPIS-P</b>	QIEYLAKQIPDNAIQQA (SEQ ID NO:67)
	Ht31	KGADLIEEAASRIVDAVIEQVKAAG (SEQ ID NO:68)
	Ht31-P	KGADLIEEAASRIPDAPIEQVKAAG (SEQ ID NO:69)
	AKAP7 $\delta$ -wt-pep	PEDAEVLVRLSKRLVENAVLKAVQQY (SEQ ID NO:70)
	AKAP7 $\delta$ -L304T-pep	PEDAEVLVRTSKRLVENAVLKAVQQY (SEQ ID NO:71)
	AKAP7 $\delta$ -L308D-pep	PEDAEVLVRLSKRDVENAVLKAVQQY (SEQ ID NO:72)
	AKAP7 $\delta$ -P-pep	PEDAEVLVRLSKRLPENAVLKAVQQY (SEQ ID NO:73)
	AKAP7 $\delta$ -PP-pep	PEDAEVLVRLSKRLPENAPLKAVQQY (SEQ ID NO:74)
	AKAP7 $\delta$ -L314E-pep	PEDAEVLVRLSKRLVENAVEKAVQQY (SEQ ID NO:75)
[0308]	AKAP1-pep	EEGLDRNEEIKRAAFQIISQVISEA (SEQ ID NO:76)
	AKAP2-pep	LVDDPLEYQAGLLVQNAIQQAIAEQ (SEQ ID NO:77)
	AKAP5-pep	QYETLLIETASSLVKNAIQLSIEQL (SEQ ID NO:78)
	AKAP9-pep	LEKQYQEQLEEEVAKVIVSMSIAFA (SEQ ID NO:79)
	AKAP10-pep	NTDEAQEELAWKIAKMINSDIMQQA (SEQ ID NO:80)
	AKAP11-pep	VNLDDKKAVLAEKIVAEAIEKAEREL (SEQ ID NO:81)
	AKAP12-pep	NGILELETKSSKLVQNIQTAVDQF (SEQ ID NO:82)
	AKAP14-pep	TQDKNYEDELTQVALALVEDVINYA (SEQ ID NO:83)
	Rab32-pep	ETSAKDNINIEEAARFLVEKILVNH (SEQ ID NO:84)

[0309] 下面通过参考AKAP IS序列 (SEQ ID NO:3) 加下划线示出在不同AKAP蛋白的AD结构域中高度保守的残基。残基与Alto等人(2003)观察到的相同,具有C端丙氨酸残基的添加。(参见Hundsrucker等人(2006)的图4,其通过引用并入本文)。对RII DDD序列具有特别高亲和力的肽拮抗剂的序列是AKAP-IS、AKAP7 $\delta$ -wt-pep、AKAP7 $\delta$ -L304T-pep和AKAP7 $\delta$ -L308D-pep的那些。

[0310] AKAP-IS

[0311] QIEYLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:3)

[0312] Carr等人(2001, J Biol Chem 276:17332-38)检测了来自人和非人蛋白质的不同AKAP结合DDD序列之间的序列同源性程度,并且鉴定了DDD序列中在不同的DDD部分中似乎是最高度保守的残基。这些在下面通过参考SEQ ID NO:1的人PKARI $\alpha$  DDD序列加下划线表示。特别保守的残基用斜体字进一步表示。残基与Kinderman等人(2006)提出对于结合AKAP蛋白质重要的那些残基重叠,但并不相同。熟练技术人员将认识到,在设计DDD的序列变体时,最优先避免改变最保守的残基(斜体),并且优先也避免改变保守残基(下划线),同时保

守氨基酸取代可以认为是既不加下划线也不是斜体的残基。

[0313] **SHIQIPPG<sub>L</sub>TELLQGYTVEVLRQ<sub>Q</sub>OPPDLVEFAVEYFTR<sub>L</sub>REARA**  
(SEQ ID NO:1)

[0314] 基于Carr等人(2001)的数据,DDD1 (SEQ ID NO:1) 序列的修饰的一组保守氨基酸取代显示在表5中。熟练技术人员可以容易地得到如上文针对表1和表2所公开的替代DDD氨基酸序列。

[0315] 表5:DDD1 (SEQ ID NO:1) 中的保守氨基酸取代。共有序列公开为SEQ ID NO:89。

<b>S</b>	<b>H</b>	<b>I</b>	<b>Q</b>	<b>I</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>G</b>	<b>L</b>	<b>T</b>	<b>E</b>	<b>L</b>	<b>L</b>	<b>Q</b>	<b>G</b>	<b>Y</b>	<b>T</b>	<b>V</b>	<b>E</b>	<b>V</b>	<b>L</b>	<b>R</b>
T			N					S									I				

[0316]

<b>Q</b>	<b>Q</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>D</b>	<b>L</b>	<b>V</b>	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>A</b>	<b>V</b>	<b>E</b>	<b>Y</b>	<b>E</b>	<b>T</b>	<b>R</b>	<b>L</b>	<b>R</b>	<b>E</b>	<b>A</b>	<b>R</b>	<b>A</b>
N										I	D			S	K		K		L	I	V

[0317] 熟练技术人员将认识到,使用本领域标准技术和仅常规实验,可以使用DDD或AD氨基酸序列中的这些和其它氨基酸取代产生AD或DDD部分属内的种类。

[0318] 替代DNL<sup>TM</sup>结构

[0319] 在某些替代实施方案中,DNL<sup>TM</sup>构建体可以使用替代构建的抗体或抗体片段形成,其中AD部分可以连接在 $\kappa$ 轻链( $C_k$ )的C端而非重链上Fc的C端末端。可以制备替代形成的DNL<sup>TM</sup>构建体,如2012年6月1日提交的临时美国专利申请序列号61/654,310,2012年6月20日提交的61/662,086,2012年7月19日提交的61/673,553和2012年8月13日提交的61/682,531,其全部内容通过引用并入本文。轻链缀合的DNL<sup>TM</sup>构建体表现出在体外增强的Fc效应物功能活性和体内改进的药代动力学、稳定性和抗淋巴瘤活性(Rossi等人,2013,Bioconjug Chem 24:63-71)。

[0320] 可以如临时美国专利申请序列号61/654,310、61/662,086、61/673,553和61/682,531中所公开那样制备 $C_k$ -缀合的DNL<sup>TM</sup>构建体。简而言之,通过重组工程产生 $C_k$ -AD2-IgG,由此将AD2肽融合至 $\kappa$ 轻链的C端末端。因为 $C_k$ 的天然C端是半胱氨酸残基,其与 $C_{H1}$ 形成二硫键桥,所以使用16个氨基酸残基“铰链”接头将AD2与 $C_k$ - $V_{H1}$ 二硫键桥隔开。使用之前用于表达同源 $C_{H3}$ -AD2-IgG模块的pdHL2载体构建 $C_k$ -AD2-IgG-维妥珠单抗和 $C_k$ -AD2-IgG-依帕珠单抗的哺乳动物表达载体。合成了2208-bp的核苷酸序列,其构成范围为 $V_k$ / $C_k$ 内含子内的Bam HI限制位点到 $C_k$ 内含子的Xho I限制位点3'的pdHL2载体序列,其中在 $C_k$ 编码序列的3'末端处以符合读码框的方式插入铰链接头(EFPKPSTPPGSSGGAP,SEQ ID NO:162)和AD2的编码序列。将该合成序列通过Bam HI和Xho I限制位点插入维妥珠单抗和依帕珠单抗的IgG-pdHL2表达载体中。如针对 $C_{H3}$ -AD2-IgG模块所述进行具有SpESFX-10的克隆的产生。通过批量滚瓶培养中的稳定转染的生产克隆产生 $C_k$ -AD2-IgG-维妥珠单抗和 $C_k$ -AD2-IgG-依帕珠单抗,并且使用MabSelect (GE Healthcare) 蛋白A亲和层析从上清液中在一步中纯化。

[0321] 在之前针对22-(20)-(20)描述(Rossi等人,2009,Blood 113:6161-71)的相同的

DNL<sup>TM</sup>方法之后,将C<sub>k</sub>-AD2-IgG-依帕珠单抗与C<sub>H1</sub>-DDD2-Fab-维妥珠单抗,一种源自维妥珠单抗的基于Fab的模块以产生bsHexAb 22\*- (20) - (20),其中22\*指示依帕珠单抗的C<sub>k</sub>-AD2模块,并且每个(20)代表维妥珠单抗Fab的稳定二聚体。将22\*- (20) - (20)的性质与22- (20) - (20)(包含具有相似组成和分子大小但不同构造的C<sub>H3</sub>-AD2-IgG-依帕珠单抗的同源Fc-bsHexAb)的性质相比较。

[0322] 在之前针对20-2b描述(Rossi等人,2009,Blood 114:3864-71)的相同的DNL<sup>TM</sup>方法之后,将C<sub>k</sub>-AD2-IgG-维妥珠单抗与IFN $\alpha$ 2b-DDD2(具有其C端末端融合的DDD2肽的IFN $\alpha$ 2b模块)缀合以产生20\*-2b,其包含具有与每条轻链融合的二聚体IFN $\alpha$ 2b的维妥珠单抗。将20\*-2b的性质与20-2b(其是同源Fc-IgG-IFN $\alpha$ )的性质进行比较。

[0323] 通过MabSelect亲和层析从DNL<sup>TM</sup>反应混合物中分离出bsHexAb和IgG-IFN $\alpha$ 中的每种。两种C<sub>k</sub>衍生的原型,即包含依帕珠单抗(抗CD22)和维妥珠单抗(抗CD20)的四个Fab的抗CD22/CD20双特异性六价抗体和包含维妥珠单抗和四个分子的干扰素- $\alpha$ 2b的CD20靶向性免疫细胞因子与它们的Fc衍生对应物相比表现出在体外增强的Fc效应物功能,以及体内改进的药代动力学、稳定性和抗淋巴瘤活性。

#### [0324] 氨基酸取代

[0325] 在替代实施方案中,公开的方法和组合物可以涉及具有一个或多个取代的氨基酸残基的蛋白质或肽的生产和使用。例如,用于制造DNL<sup>TM</sup>构建体的DDD和/或AD序列可以如上讨论进行修改。

[0326] 熟练技术人员将意识到,通常,氨基酸取代通常涉及用相对相似性质的另一种氨基酸替换氨基酸(即保守性氨基酸取代)。各种氨基酸的性质和氨基酸取代对蛋白质结构和功能的影响已经成为本领域广泛研究和知识的主题。

[0327] 例如,可以考虑氨基酸的亲水指数(Kyte&Doolittle,1982,J.Mol.Biol.,157:105-132)。氨基酸的相对亲水特性有助于所得蛋白质的二级结构,这又决定了蛋白质与其它分子的相互作用。根据其疏水性和电荷特性,对每个氨基酸分配亲水性指数(Kyte&Doolittle,1982),这些是:异亮氨酸(+4.5);缬氨酸(+4.2);亮氨酸(+3.8);苯丙氨酸(+2.8);半胱氨酸/胱氨酸(+2.5);甲硫氨酸(+1.9);丙氨酸(+1.8);甘氨酸(-0.4);苏氨酸(-0.7);丝氨酸(-0.8);色氨酸(-0.9);酪氨酸(-1.3);脯氨酸(-1.6);组氨酸(-3.2);谷氨酸(-3.5);谷氨酰胺(-3.5);天冬氨酸(-3.5);天冬酰胺(-3.5);赖氨酸(-3.9);和精氨酸(-4.5)。在进行保守性取代时,优选使用亲水指数在±2以内的氨基酸,更优选±1以内,进一步优选±0.5以内。

[0328] 氨基酸取代也可考虑氨基酸残基的亲水性(例如,美国专利号4,554,101)。已经将亲水性值分配给氨基酸残基:精氨酸(+3.0);赖氨酸(+3.0);天冬氨酸(+3.0);谷氨酸(+3.0);丝氨酸(+0.3);天冬酰胺(+0.2);谷氨酰胺(+0.2);甘氨酸(0);苏氨酸(-0.4);脯氨酸(-0.5.+-.1);丙氨酸(-0.5);组氨酸(-0.5);半胱氨酸(-1.0);甲硫氨酸(-1.3);缬氨酸(-1.5);亮氨酸(-1.8);异亮氨酸(-1.8);酪氨酸(-2.3);苯丙氨酸(-2.5);色氨酸(-3.4)。用具有相似亲水性的其它氨基酸替代氨基酸是优选的。

[0329] 其它考虑因素包括氨基酸侧链的大小。例如,用具有大体积侧链的氨基酸(例如色氨酸或酪氨酸)替换具有紧密侧链的氨基酸如甘氨酸或丝氨酸通常不是优选的。各种氨基酸残基对蛋白质二级结构的影响也是一个考虑因素。通过经验研究,已经确定了不同氨基

酸残基对蛋白质结构域采用 $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠或反转角二级结构的倾向的影响,并且是本领域已知的(参见例如Chou&Fasman,1974,Biochemistry,13:222-245;1978,Ann.Rev.Biochem.,47:251-276;1979,Biophys.J.,26:367-384)。

[0330] 基于此类考虑和广泛的经验研究,已经构建了保守性氨基酸取代表并且是本领域已知的。例如:精氨酸和赖氨酸;谷氨酸和天冬氨酸;丝氨酸和苏氨酸;谷氨酰胺和天冬酰胺;和缬氨酸,亮氨酸和异亮氨酸。或者:Ala (A) leu、ile、val; Arg (R) gln、asn、lys; Asn (N) his、asp、lys、arg、gln; Asp (D) asn、glu; Cys (C) ala、ser; Gln (Q) glu、asn; Glu (E) gln、asp; Gly (G) ala; His (H) asn、gln、lys、arg; Ile (I) val、met、ala、phe、leu; Leu (L) val、met、ala、phe、ile; Lys (K) gln、asn、arg; Met (M) phe、ile、leu; Phe (F) leu、val、ile、ala、tyr; Pro (P) ala; Ser (S)、thr; Thr (T) ser; Trp (W) phe、tyr; Tyr (Y) trp、phe、thr、ser; Val (V) ile、leu、met、phe、ala。

[0331] 氨基酸取代的其它考虑因素包括残基是否位于蛋白质内部或是否暴露于溶剂。对于内部残基,保守取代包括:Asp和Asn;Ser和Thr;Ser和Ala;Thr和Ala;Ala和Gly;Ile和Val;Val和Leu;Leu和Ile;Leu和Met;Phe和Tyr;Tyr和Trp。(参见例如PROWL网站rockefeller.edu)。对于溶剂暴露的残基,保守取代将包括:Asp和Asn;Asp和Glu;Glu和Gln;Glu和Ala;Gly和Asn;Ala和Pro;Ala和Gly;Ala和Ser;Ala和Lys;Ser和Thr;Lys和Arg;Val和Leu;Leu和Ile;Ile和Val;Phe和Tyr。(同上)。已经构建了各种矩阵以帮助选择氨基酸取代,如PAM250得分矩阵、Dayhoff矩阵、Grantham矩阵、McLachlan矩阵、Doolittle矩阵、Henikoff矩阵、Miyata矩阵、Fitch矩阵、Jones矩阵、Rao矩阵、Levin矩阵和Risler矩阵(同上)。

[0332] 在确定氨基酸取代时,还可以考虑分子间或分子内键的存在,例如形成带正电荷的残基(例如His、Arg、Lys)和带负电荷的残基(例如,Asp, Glu)之间的离子键(盐桥),或邻近半胱氨酸残基之间的二硫键。

[0333] 在编码蛋白质序列中用任何氨基酸取代任何其它氨基酸的方法是公知的,并且是熟练技术人员常规实验的事情,例如通过定点诱变技术或通过合成和装配编码氨基酸取代的寡核苷酸并剪接成表达载体构建体。

[0334] 噬菌体展示

[0335] 要求保护的组合物和/或方法的某些实施方案可涉及各种靶分子、细胞或组织的结合肽和/或肽模拟物。可通过本领域已知的任何方法来鉴定结合肽,包括但不限于噬菌体展示技术。噬菌体展示的各种方法和用于产生多种多样的肽群体的技术是本领域熟知的。例如,美国专利号5,223,409;5,622,699和6,068,829公开了制备噬菌体文库的方法。噬菌体展示技术涉及遗传操作噬菌体,使得小肽可以在其表面上表达(Smith和Scott,1985,Science 228:1315-1317;Smith和Scott,1993,Meth. Enzymol. 21:228-257)。除了肽之外,更大的蛋白质结构域例如单链抗体也可以展示在噬菌体颗粒的表面上(Arap等人,1998,Science 279:377-380)。

[0336] 可以通过淘选来分离针对给定器官、组织、细胞类型或靶分子选择性的靶向氨基酸序列(Pasqualini和Ruoslahti,1996,Nature 380:364-366;Pasqualini,1999,The Quart.J.Nucl.Med. 43:159-162)。简而言之,将含有推定的靶向肽的噬菌体文库施用于完整的生物体或分离的器官、组织、细胞类型或靶分子,并收集含有结合的噬菌体的样品。可

以从靶器官、组织、细胞类型或者靶分子中洗脱与靶结合的噬菌体,然后通过在宿主细菌中培养它们来扩增。

[0337] 在某些实施方案中,可以在淘选轮次之间在宿主细菌中繁殖噬菌体。不同于被噬菌体裂解,细菌取而代之可以分泌显示特定插入物的噬菌体的多个拷贝。若想要的话,可以将扩增的噬菌体再次暴露于目标器官、组织、细胞类型或靶分子,并且收集用于另外的淘选轮次。可以进行多轮淘选,直到获得选择性或特异性结合剂的群体。肽的氨基酸序列可以通过测序对应于噬菌体基因组中靶向肽插入物的DNA来确定。然后可以通过标准蛋白质化学技术(Arap等人,1998,Smith等人,1985)将鉴定的靶向肽作为合成肽产生。

[0338] 在一些实施方案中,可以使用扣除方案来进一步减少背景噬菌体结合。扣除的目的是从文库中除去与除感兴趣的靶以外的靶结合的噬菌体。在替代实施方案中,可以针对对照细胞、组织或器官进行预筛选噬菌体文库。例如,可以在针对对照正常细胞系预筛选文库后鉴定肿瘤结合肽。扣除之后,可以针对感兴趣的分子、细胞、组织或器官筛选文库。其它扣除方案方法是已知的,并且可以用于所要求保护的方法的实践中,例如如美国专利号5,840,841、5,705,610、5,670,312和5,492,807中所公开。

#### [0339] 纳米抗体

[0340] 纳米抗体是大小约12-15kDa(约110个氨基酸长度)的单域抗体。纳米抗体可选择性结合靶抗原,如全长抗体,并且对抗原具有相似的亲和力。但是,由于它们的尺寸小得多,它们可以能够更好地渗透到实体瘤中。较小的尺寸也有助于纳米抗体的稳定性,所述纳米抗体比全尺寸抗体对pH和极端温度更具抗性(Van Der Linden等人,1999,Biochim Biophys Act 1431:37-46)。在发现骆驼科(骆驼、羊驼、美洲驼)拥有没有轻链的全功能抗体后,最初开发单域抗体(例如,Hamser等人,2007,Appl Microbiol Biotechnol 77:13-22)。重链抗体由单一可变域( $V_{HH}$ )和两个恒定结构域( $C_{H2}$ 和 $C_{H3}$ )组成。与抗体一样,可以开发纳米抗体,并且用作多价和/或双特异性构建体。纳米抗体的人源化形式在商业开发中,其靶向到多种靶抗原,诸如IL-6R、vWF、TNF、RSV、RANKL、IL-17A&F和IgE(例如**ABLYNX®**,Ghent,Belgium),在癌症、炎症、传染病、阿尔茨海默氏病、急性冠脉综合征和其它病症中具有潜在的临床用途(例如,Saerens等人,2008,Curr Opin Pharmacol 8:600-8;Muyldermands,2013,Ann Rev Biochem 82:775-97;Ibanez等人,2011,J Infect Dis 203:1063-72)。

[0341] 纳米抗体的血浆半衰期比全大小抗体短,主要通过肾脏途径消除。因为它们缺少Fc区,所以它们不显示补体依赖性细胞毒性。

[0342] 纳米抗体可以通过用靶抗原免疫骆驼、美洲驼、羊驼或鲨鱼,然后通过分离mRNA,克隆入文库中并筛选抗原结合来产生。纳米抗体序列可以通过标准技术(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)人源化。由于骆驼科和人FR序列之间的高度同源性,人源化是相对直接的。

[0343] 在各种实施方案中,主题CL2A-SN-38缀合物可以包含用于将缀合药物靶向递送至细胞、组织、器官或病原体的纳米抗体。使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,各自的

实施例部分通过引用并入本文)。

[0344] 缀合方案

[0345] 优选的缀合方案基于在中性或酸性pH下容易的硫醇-马来酰亚胺、硫醇-乙烯基砜、硫醇-溴乙酰胺或硫醇-碘乙酰胺反应。这避免了需要更高pH条件进行缀合,例如当使用活性酯时所必需。示例性缀合方案的进一步细节在下面的实施例部分中描述。

[0346] 治疗性处理

[0347] 另一方面,本发明涉及治疗受试者的方法,其包括向受试者施用治疗有效量的如本文所述的治疗性缀合物。可用本文所述治疗性缀合物治疗的疾病包括但不限于B细胞恶性(例如,非霍奇金氏淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、多发性骨髓瘤、霍奇金氏淋巴瘤、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),使用例如抗CD22抗体如hLL2MAb(依帕珠单抗,参见美国专利号6,183,744),针对另一种CD22表位(hRFB4)或针对其它B细胞抗原的抗体,如CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD37、CD40、CD40L、CD52、CD74、CD80或HLA-DR。其它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,癌症如乳腺癌和非小细胞肺癌,以及其它癌、肉瘤、神经胶质瘤、髓性白血病等。有利使用针对抗原,例如癌胚抗原(由恶性实体瘤或造血新生物,例如胃肠、胃、结肠、食道、肝、肺、乳房、胰腺、肝、前列腺、卵巢、睾丸、脑、骨或淋巴肿瘤、肉瘤或黑素瘤产生或与之相关)的抗体。取决于疾病状态和缀合物的耐受性,可以一次或重复给予此类治疗剂,并且还可以任选地与其它治疗形式如手术、外部放射、放射免疫疗法、免疫疗法、化学疗法、反义疗法、干扰RNA疗法、基因疗法等组合使用。每种组合将适应于肿瘤类型、阶段、患者状况和在先治疗以及管理医师考虑的其它因素。

[0348] 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。该术语并不意图限于特定的年龄或性别。因此,成年和新生儿受试者以及胎儿(无论是雄性还是雌性)都由该术语涵盖。本文给出的剂量针对人,但是可以根据重量或平方米大小调整到其它哺乳动物以及儿童的体格。

[0349] 在优选的实施方案中,包含抗EGP-1(抗TROP-2)抗体如hRS7M Ab的治疗缀合物可用于治疗癌症,如食管癌、胰腺癌、肺癌、胃癌、结肠癌和直肠癌、泌尿膀胱癌、乳腺癌、卵巢癌、子宫癌、肾癌和前列腺癌,如公开于美国专利号7,238,785;美国专利号7,517,964和8,084,583,其中的实施例部分通过引用并入本文。hRS7抗体是包含轻链互补决定区(CDR)序列CDR1(KASQDVSIAVA,SEQ ID NO:90);CDR2(SASYRYT,SEQ ID NO:91);和CDR3(QQHYITPLT,SEQ ID NO:92)和重链CDR序列CDR1(NYGMN,SEQ ID NO:93);CDR2(WINTYTGEPTYTDDFKG,SEQ ID NO:94)和CDR3(GGFGSSYWYFDV,SEQ ID NO:95)的人源化抗体。

[0350] 在另一个优选的实施方案中,包含抗CEACAM5抗体(例如,hMN-14,labretuzumab)和/或抗CEACAM6抗体(例如hMN-3或hMN-15)的治疗缀合物可以用于治疗表达CEACAM5和/或CEACAM6的多种癌症之任一种,如公开于美国专利号7,541,440;7,9513,69;5,874,540;6,676,924和8,267,865,其各自的实施例部分通过引用并入本文。可以使用抗CEACAM5、抗CEACAM6或两者的组合治疗的实体瘤包括但不限于乳腺癌、肺癌、胰腺癌、食管癌、甲状腺髓样癌、卵巢癌、结肠癌、直肠癌、膀胱癌、口腔癌和胃癌。大部分癌(包括胃肠道、呼吸道、泌尿生殖道和乳腺癌)表达CEACAM5,并且可以用主题免疫缀合物治疗。hMN-14抗体是包含轻链可变区CDR序列CDR1(KASQDVGTSA;SEQ ID NO:96)、CDR2(WTSTRHT;SEQ ID NO:97)和CDR3

(QQYSLYRS; SEQ ID NO:98), 和重链可变区CDR序列CDR1 (TYWMS; SEQ ID NO:99)、CDR2 (EIHPDSTINYAPSLKD; SEQ ID NO:100) 和CDR3 (LYFGFPWFAY; SEQ ID NO:101) 的人源化抗体。

[0351] hMN-3抗体是包含轻链可变区CDR序列CDR1 (RSSQSIVHSNGNTYLE, SEQ ID NO:102)、CDR2 (KVSNRFS, SEQ ID NO:103) 和CDR3 (FQGSHVPPT, SEQ ID NO:104) 和重链CDR序列CDR1 (NYGMN, SEQ ID NO:105)、CDR2 (WINTYTGEPTYADDFKG, SEQ ID NO:106) 和CDR3 (KGWMDFNSSLDY, SEQ ID NO:107) 的人源化抗体。

[0352] hMN-15抗体是包含轻链可变区CDR序列SASSRVSYIH (SEQ ID NO:108)、GTSTLAS (SEQ ID NO:109) 和QQWSYNPPT (SEQ ID NO:110); 以及重链可变区CDR序列DYYMS (SEQ ID NO:111)、FIANKANGHTTDYSPSVKG (SEQ ID NO:112) 和DMGIRWNFDV (SEQ ID NO:113) 的人源化抗体。

[0353] 在另一个优选的实施方案中, 包含抗CD74抗体(例如hLL1, 米拉珠单抗, 公开于美国专利号7,074,403;7,312,318;7,772,373;7,919,087和7,931,903,各自的实施例部分通过引用并入本文)的治疗缀合物可以用于治疗多种表达CD74的癌症中的任一种, 包括但不限于肾癌、肺癌、肠癌、胃癌、乳腺癌、前列腺癌或卵巢癌, 以及多种血液癌症, 如多发性骨髓瘤、慢性淋巴细胞性白血病、急性淋巴母细胞性白血病、非霍奇金氏淋巴瘤和霍奇金氏淋巴瘤。hLL1抗体是包含轻链CDR序列CDR1 (RSSQSLVHRNGNTYLN; SEQ ID NO:114), CDR2 (TVSNRFS; SEQ ID NO:115) 和CDR3 (SQSSHVPPT; SEQ ID NO:116) 以及重链可变区CDR序列CDR1 (NYGVN; SEQ ID NO:117), CDR2 (WINPNTGEPTFDDDFKG; SEQ ID NO:118) 和CDR3 (SRGKNEAWFAY; SEQ ID NO:119) 的人源化抗体。

[0354] 在另一个优选的实施方案中, 包含抗CD22抗体(例如, hLL2, 依帕珠单抗, 在美国专利号5,789,554;6,183,744;6,187,287;6,306,393;7,074,403和7,641,901中公开,各自的实施例部分通过引用并入本文,或嵌合或人源化RFB4抗体)的治疗缀合物可用于治疗表达CD22的多种癌症中的任一种, 包括但不限于B细胞淋巴瘤的无痛形式、B细胞淋巴瘤的侵袭形式、慢性淋巴性白血病、急性淋巴性白血病, 非霍奇金氏淋巴瘤、霍奇金氏淋巴瘤、伯基特淋巴瘤, 滤泡性淋巴瘤或弥漫性B细胞淋巴瘤。抗CD22缀合物也用于治疗自身免疫性疾病, 如急性免疫性血小板减少症、慢性免疫性血小板减少症、皮肌炎、西登哈姆舞蹈病、重症肌无力、系统性红斑狼疮、狼疮性肾炎、风湿热、多腺综合征、大疱性类天疱疮、寻常型天疱疮、糖尿病(例如青少年糖尿病)、亨诺-许兰氏紫癜、链球菌后肾炎、结节性红斑、高安氏动脉炎、ANCA相关性血管炎、艾迪生病、类风湿性关节炎、多发性硬化症、结节病、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、古德帕斯彻氏综合征、闭塞性血栓炎、舍格伦综合征、原发性胆汁性肝硬化、桥本甲状腺炎、甲状腺毒症、硬皮病、慢性活动性肝炎、多发性肌炎/皮肌炎、多发性软骨炎、寻常型天疱疮、韦格纳氏肉芽肿、膜性肾病、肌萎缩性侧索硬化症、脊髓痨、巨细胞动脉炎/多肌痛、恶性贫血、快速进行性肾小球性肾炎、银屑病、纤维化肺泡炎、移植植物抗宿主病(GVHD)、器官移植排斥、脓毒症、败血症和炎症。hLL2抗体是包含轻链CDR序列CDR1 (KSSQSVLYSANHKYLA, SEQ ID NO:120)、CDR2 (WASTRES, SEQ ID NO:121) 和CDR3 (HQYLSSWTF, SEQ ID NO:122) 和重链CDR序列CDR1 (SYWLH, SEQ ID NO:123)、CDR2 (YINPRNDYTEYNQNFKD, SEQ ID NO:124) 和CDR3 (RDITTFY, SEQ ID NO:125) 的人源化抗体。

[0355] 在优选的实施方案中,包含抗CSAp抗体(如hMu-9MAb)的治疗性缀合物可用于治疗结肠直肠癌以及胰腺癌和卵巢癌,如美国专利号6,962,702;7,387,772;7,414,121;7,553,953;7,641,891和7,670,804中公开,各自的实施例部分通过引用并入本文。hMu-9抗体是包含轻链CDR序列CDR1RSSQSIVHSNGNTYLE,SEQ ID NO:126)、CDR2(KVSNRFS,SEQ ID NO:127)和CDR3(FQGSRVPYT,SEQ ID NO:128)和重链可变CDR序列CDR1(EYVIT,SEQ ID NO:129),CDR2(EIYPGSGSTSNEKFK,SEQ ID NO:130)和CDR3(EDL,SEQ ID NO:131)的人源化抗体。

[0356] 包含hPAM4MAb的治疗性缀合物可以用于治疗胰腺癌或其它实体瘤,如在美国专利号7,238,786和7,282,567中所公开的,各自的实施例部分通过引用并入本文。hPAM4抗体是包含轻链可变区CDR序列CDR1(SASSSVSSSYLY,SEQ ID NO:132);CDR2(STSNLAS,SEQ ID NO:133);和CDR3(HQWNRYPYT,SEQ ID NO:134);和重链CDR序列CDR1(SYVLH,SEQ ID NO:135);CDR2(YINPYNDGTQYNEKFKG,SEQ ID NO:136)和CDR3(GFGGSYGFAY,SEQ ID NO:137)的人源化抗体。

[0357] 在另一个优选的实施方案中,包含抗AFP MAb(如IMMU31)的治疗性缀合物可用于使用人源化、嵌合和人抗体形式治疗肝细胞癌、生殖细胞瘤和其它产生AFP的肿瘤,如美国专利号7,300,655中公开,其实施例部分通过引用并入本文。IMMU31抗体是包含重链CDR序列CDR1(SYVIH,SEQ ID NO:138)、CDR2(YIHPYNGGTKYNEKFKG,SEQ ID NO:139)和CDR3(SGGGDPFAY,SEQ ID NO:140)和轻链CDR1(KASQDINKYIG,SEQ ID NO:141)、CDR2(YTSALLP,SEQ ID NO:142)和CDR3(LQYDDLWT,SEQ ID NO:143)的人源化抗体。

[0358] 在另一个优选的实施方案中,包含抗HLA-DR MAb(例如hL243)的治疗缀合物可用于治疗淋巴瘤、白血病、皮肤癌、食管癌、胃癌、结肠癌、直肠癌、胰腺癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、膀胱癌、子宫内膜癌、宫颈癌、睾丸癌、肾癌、肝癌、黑素瘤或其它产生HLA-DR的肿瘤,如美国专利号7,612,180中公开,其实施例部分通过引用并入本文。hL243抗体是包含重链CDR序列CDR1(NYGMN,SEQ ID NO:144)、CDR2(WINTYTREPTYADDFKG,SEQ ID NO:145)和CDR3(DITAVVPTGFDY,SEQ ID NO:146)和轻链CDR序列CDR1(RASENIYSNLA,SEQ ID NO:147)、CDR2(AASNLAD,SEQ ID NO:148)和CDR3(QHFWTTPWA,SEQ ID NO:149)的人源化抗体。

[0359] 在另一个优选的实施方案中,包含抗CD20MAb(诸如维妥珠单抗(hA20)、1F5、奥比妥珠单抗(GA101)或利妥昔单抗)的治疗缀合物可用于治疗淋巴瘤、白血病、免疫性血小板减少性紫癜、系统性红斑狼疮、舍格伦综合征、伊文思综合征、关节炎、动脉炎、寻常型天疱疮、肾移植排斥反应、心脏移植排斥反应、类风湿性关节炎、伯基特淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、小淋巴细胞性淋巴瘤、弥漫性B细胞淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病、急性淋巴细胞性白血病、I型糖尿病、GVHD、多发性硬化症或多发性骨髓瘤,如美国专利号7,435,803或8,287,864中所公开,各自的实施例部分通过引用并入本文。hA20(维妥珠单抗)抗体是包含轻链CDR序列CDRL1(RASSSVSYIH,SEQ ID NO:150)、CDRL2(ATSNLAS,SEQ ID NO:151)和CDRL3(QQWTSNPPT,SEQ ID NO:152)和重链CDR序列CDRH1(SEQ ID NO:153)、CDRH2(AIYPGNGDTSYNQKFKG,SEQ ID NO:154)和CDRH3(STYYGGDWYFDV,SEQ ID NO:155)的人源化抗体。

[0360] 在另一个优选的实施方案中,包含抗CD19MAb(如hA19)的治疗缀合物可用于治疗B细胞相关淋巴瘤和白血病,如非霍奇金氏淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病或急性淋巴母细胞性白血病。可以治疗的其它疾病状况包括自身免疫性疾病,如急性或慢性免疫性血小板

减少症、皮肌炎、西登哈姆舞蹈病、重症肌无力、系统性红斑狼疮、狼疮性肾炎、风湿热、多腺综合征、大疱性类天疱疮、寻常型天疱疮、糖尿病、亨诺-许兰氏紫癜、链球菌后肾炎、结节性红斑、高安氏动脉炎、艾迪生病、类风湿性关节炎、多发性硬化症、结节病、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、古德帕斯彻氏综合征、闭塞性血栓炎、舍格伦综合征、原发性胆汁性肝硬化、桥本甲状腺炎、甲状腺毒症、硬皮病、慢性活动性肝炎、多发性肌炎/皮肌炎、多发性软骨炎、寻常型天疱疮、韦格纳氏肉芽肿、膜性肾病、肌萎缩性侧索硬化症、脊髓痨、巨细胞动脉炎/多肌痛、恶性贫血、快速进行性肾小球性肾炎、银屑病、纤维化肺泡炎,如美国专利号7,109,304、7,462,352、7,902,338、8,147,831和8,337,840中所公开,各自的实施例部分通过引用并入本文。hA19抗体是包含轻链CDR序列CDR1 KASQSVVDYDGDSYLN (SEQ ID NO:156) ; CDR2 DASNLVS (SEQ ID NO:157) ; 和CDR3 QQSTEDPWT (SEQ ID NO:158) 和重链CDR序列CDR1 SYWMN (SEQ ID NO:159) ; CDR2 QIWPGDGDTNYNGKFKG (SEQ ID NO:160) 和CDR3 RETTTVGRYYYAMDY (SEQ ID NO:161) 的人源化抗体。

[0361] 包含抗腱糖蛋白抗体的治疗性缀合物可用于治疗造血和实体瘤,并且包含针对抗腱糖蛋白的抗体的缀合物可用于治疗实体瘤,优选脑癌如胶质母细胞瘤。

[0362] 优选地,用于治疗人疾病的抗体是人抗体或人源化(CDR移植)形式的抗体;尽管可以使用鼠和嵌合形式的抗体。通常优选与递送剂相同物种的IgG分子以使免疫应答最小化。这在考虑重复治疗时尤为重要。对于人,人或人源化IgG抗体不太可能从患者产生抗IgG免疫应答。抗体如hLL1和hLL2在与靶细胞上的内化抗原结合后迅速内化,这意味着携带的化疗药物也快速内化到细胞中。但是,内化速度较慢的抗体也可以用来实现选择性治疗。

[0363] 由于针对病原体的抗体是已知的,所以可以使用针对病原体的治疗性缀合物。例如,特异性结合由感染性病灶引起或与之相关的标志物(包括病毒、细菌、真菌或寄生性感染,例如由病原体,如细菌、立克次氏体、支原体、原生动物、真菌、病毒引起),以及与此类生物体有关的抗原和产物的抗体和抗体片段已经特别记载于Hansen等人,美国专利号3,927,193和Goldenberg美国专利号4,331,647、4,348,376、4,361,544、4,468,457、4,444,744、4,818,709和4,624,846,各自的实施例部分通过引用并入本文,以及上面引用的Reichert和Dewitz。在优选的实施方案中,病原体选自由以下组成的组:HIV病毒、结核分枝杆菌、无乳链球菌、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、嗜肺军团菌、化脓链球菌、大肠杆菌、淋病奈瑟菌、脑膜炎奈瑟菌、肺炎球菌、新型隐球菌、荚膜组织胞浆菌、流感嗜血杆菌B、苍白密螺旋体、莱姆病螺旋体、铜绿假单胞菌、麻风分枝杆菌、流产布鲁氏菌、狂犬病病毒、流感病毒、巨细胞病毒、单纯疱疹病毒I、单纯疱疹病毒II、人血清细小样病毒、呼吸道合胞病毒、水痘带状疱疹病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、麻疹病毒、腺病毒、人T细胞白血病病毒、埃巴病毒、鼠白血病病毒、腮腺炎病毒、水泡性口炎病毒、辛德比斯病毒、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒、疣病毒、蓝舌病毒、仙台病毒、猫白血病病毒、reovirus、脊髓灰质炎病毒、猿猴病毒40、小鼠乳腺肿瘤病毒、登革热病毒、风疹病毒、西尼罗河病毒、恶性疟原虫、间日疟原虫、鼠弓形虫、让氏锥虫、克鲁斯锥虫、罗得西亚锥虫、布氏锥虫、曼氏血吸虫、日本血吸虫、牛巴贝虫、埃尔梅利亚虫、旋盘尾丝虫、热带利什曼原虫、旋毛线虫、小泰勒虫、水泡绦虫、羊绦虫、牛肉绦虫、胞生绦虫、科氏中殖孔绦虫、关节炎支原体、猪鼻支原体、口腔支原体、精氨酸支原体、拉氏无胆甾支原体、唾液支原体和肺炎支原体,如美国专利号6,440,416中所公开,其实施例部分通过引用并入本文。

[0364] 包含抗gp120和其它此类抗HIV抗体的本发明的药物缀合物可以用作AIDS患者中的HIV的治疗剂;并且针对结核分枝杆菌的抗体的药物缀合物适合作为药物抗性肺结核的治疗剂。已经检测了抗gp120 MAb(抗HIV MAb)和毒素(如假单胞菌外毒素)的融合蛋白的抗病毒性质(Van Oigen等人,J Drug Target,5:75-91,1998)。在AIDS患者中治疗HIV感染的尝试失败,可能是由于效力不足或不可接受的宿主毒性。本发明的药物缀合物有利地缺乏蛋白毒素的此类毒性副作用,因此有利地用于治疗AIDS患者的HIV感染。这些药物缀合物可以单独给药,或与单独给药时对此类患者有效的其它抗生素或治疗剂联合给药。候选抗HIV抗体包括由Johansson等人(AIDS.2006年10月3日;20(15):1911-5)描述的P4/D10抗包膜抗体以及由Polymun(Vienna,Austria)描述和销售,也描述于美国专利5,831,034,美国专利5,911,989和Vcelar等人,AIDS 2007;21(16):2161-2170和Joos等人,Antimicrob Agents Chemother.2006;50(5):1773-9(全部通过引用并入本文)的抗HIV抗体。HIV的优选靶向剂是这些抗体的各种组合以克服抗性。

[0365] 可以通过使用多价、多特异性或多价、单特异性抗体实现对细胞和病原体的更有效并入。此类二价和双特异性抗体的实例参见美国专利号7,387,772、7,300,655、7,238,785和7,282,567,各种的实施例部分通过引用并入本文。这些多价或多特异性抗体特别优先用于靶向癌症和感染性生物体(病原体),其表达多个抗原靶标且甚至同一抗原靶标的多个表位,但常常逃避抗体靶向和对于免疫治疗足够的结合,这是由于细胞或病原体上单一抗原靶标的表达或可用性不足。通过靶向多种抗原或表位,所述抗体在靶标上显示更高的结合和滞留时间,因此给本发明中靶向的药物提供更高的饱和度。

[0366] 治疗性缀合物也可用于治疗自身免疫性疾病或免疫系统功能障碍(例如移植植物抗宿主病,器官移植排斥)。用于治疗自身免疫/免疫功能障碍疾病的抗体可结合示例性抗原,包括但不限于BCL-1、BCL-2、BCL-6、CD1a、CD2、CD3、CD4、CD5、CD7、CD8、CD10、CD11b、CD11c、CD13、CD14、CD15、CD16、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD33、CD34、CD38、CD40、CD40L、CD41a、CD43、CD45、CD55、CD56、CCD57、CD59、CD64、CD71、CD74、CD79a、CD79b、CD117、CD138、FMC-7、H2B、H3、H4、HLA-DR和MIF。与上文讨论的这些和其它靶抗原结合的抗体可用于治疗自身免疫或免疫功能障碍疾病。可以用免疫缀合物治疗的自身免疫疾病包括急性特发性血小板减少性紫癜、慢性特发性血小板减少性紫癜、皮肌炎、西登哈姆舞蹈病、重症肌无力、系统性红斑狼疮、狼疮性肾炎、风湿热、多腺性综合征、大疱性类天疱疮、糖尿病、亨诺-许兰氏紫癜、链球菌后肾炎、结节性红斑、高安动脉炎、ANCA相关血管炎、艾迪生病、类风湿性关节炎、多发性硬化、结节病、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、古德帕斯彻氏综合征、闭塞性血栓性脉管炎、舍格伦综合征、原发性胆汁性肝硬化、桥本甲状腺炎、甲状腺毒症、硬皮病、慢性活动性肝炎、多发性肌炎/皮肌炎、多软骨炎、大疱性类天疱疮、寻常型天疱疮、韦格纳氏肉芽肿、膜性肾病、肌萎缩性侧索硬化症、脊髓痨、巨细胞动脉炎/多肌痛、恶性贫血、快速进行性肾小球性肾炎、银屑病或纤维化肺泡炎。

[0367] 普通技术人员将认识到,包含缀合至抗体或抗体片段的喜树碱的主题免疫缀合物可以单独使用或与一种或多种其它治疗剂组合使用,所述其它治疗剂如第二抗体、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以分开、与主题抗体-药物免疫缀合物联合或连接到主题抗体-药物免疫缀合物施用。

[0368] 在某些实施方案中,与本发明的喜树碱缀合物组合使用的治疗剂可以包含一种或多种同位素。用于治疗疾病组织的放射性同位素包括但不限于:<sup>111</sup>In、<sup>177</sup>Lu、<sup>212</sup>Bi、<sup>213</sup>Bi、<sup>211</sup>At、<sup>62</sup>Cu、<sup>67</sup>Cu、<sup>90</sup>Y、<sup>125</sup>I、<sup>131</sup>I、<sup>32</sup>P、<sup>33</sup>P、<sup>47</sup>Sc、<sup>111</sup>Ag、<sup>67</sup>Ga、<sup>142</sup>Pr、<sup>153</sup>Sm、<sup>161</sup>Tb、<sup>166</sup>Dy、<sup>166</sup>Ho、<sup>186</sup>Re、<sup>188</sup>Re、<sup>189</sup>Re、<sup>212</sup>Pb、<sup>223</sup>Ra、<sup>225</sup>Ac、<sup>59</sup>Fe、<sup>75</sup>Se、<sup>77</sup>As、<sup>89</sup>Sr、<sup>99</sup>Mo、<sup>105</sup>Rh、<sup>109</sup>Pd、<sup>143</sup>Pr、<sup>149</sup>Pm、<sup>169</sup>Er、<sup>194</sup>Ir、<sup>198</sup>Au、<sup>199</sup>Au、<sup>227</sup>Th和<sup>211</sup>Pb。治疗性放射性核素优选具有20–6,000keV范围内的衰变能量,优选对于俄歇发射体范围为60–200keV,对于β发射体为100–2,500keV,以及对于α发射体为4000–6000keV。有用的β-粒子发射核素的最大衰变能量优选为20–5,000keV,更优选100–4,000keV,最优选500–2,500keV。放射性核素也是优选的,所述放射性核素基本上随着俄歇发射颗粒而衰变。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。有用的β-粒子发射核素的衰变能量优选<1,000keV,更优选<100keV,最优选<70keV。还优选的是随着α-粒子的产生而大幅衰变的放射性核素。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。有用的α粒子发射放射性核素的衰变能量优选为2,000–10,000keV,更优选3,000–8,000keV,最优选4,000–7,000keV。使用的其它潜在放射性同位素包括<sup>11</sup>C、<sup>13</sup>N、<sup>15</sup>O、<sup>75</sup>Br、<sup>198</sup>Au、<sup>224</sup>Ac、<sup>126</sup>I、<sup>133</sup>I、<sup>77</sup>Br、<sup>113m</sup>In、<sup>95</sup>Ru、<sup>97</sup>Ru、<sup>103</sup>Ru、<sup>105</sup>Ru、<sup>107</sup>Hg、<sup>203</sup>Hg、<sup>121m</sup>Te、<sup>122m</sup>Te、<sup>125m</sup>Te、<sup>165</sup>Tm、<sup>167</sup>Tm、<sup>168</sup>Tm、<sup>197</sup>Pt、<sup>109</sup>Pd、<sup>105</sup>Rh、<sup>142</sup>Pr、<sup>143</sup>Pr、<sup>161</sup>Tb、<sup>166</sup>Ho、<sup>199</sup>Au、<sup>57</sup>Co、<sup>58</sup>Co、<sup>51</sup>Cr、<sup>59</sup>Fe、<sup>75</sup>Se、<sup>201</sup>Tl、<sup>225</sup>Ac、<sup>76</sup>Br、<sup>169</sup>Yb等等。

[0369] 放射性核素和其它金属可以例如使用连接至抗体或缀合物的螯合基团递送。诸如NOTA、DOTA和TETA等的大环螯合物与多种金属和放射性金属,最特别是分别与镓、钇和铜的放射性核素一起使用。通过对感兴趣的金属修改环尺寸来使此类金属螯合复合物变得非常稳定。可以使用其它环型螯合物,如用于螯合<sup>223</sup>Ra的大环聚醚。

[0370] 与本文描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、蒽环类药物、表鬼臼毒素(epidophyllotoxin)、紫杉烷、抗代谢药、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、抗血管生成剂和促细胞凋亡剂,特别是多柔比星、甲氨蝶呤、taxol、其它喜树碱、以及这些和其它类别的抗癌剂的其它治疗剂,等等。其它癌症化学治疗药物包括氮芥、磺酸烷基酯、亚硝基脲(nitrosourea)、三氮烯、叶酸类似物、嘧啶类似物、嘌呤类似物、铂配位复合物、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)以及于GOODMAN AND GILMAN'S THEPHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS,第7版(MacMillan Publishing Co.1985)以及这些出版物的修订版本。其它合适的化学治疗剂如实验药物是本领域技术人员已知的。

[0371] 示例性的使用药物包括但不限于5-氟尿嘧啶、阿法替尼、阿普利定(aplidin)、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(bosutinib)、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(celebrex)、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(camptothecans)、克唑替尼(crizotinib)、环磷酰胺、阿糖胞苷、达卡巴嗪、达沙替尼(dasatinib)、dinaciclib、多西他赛、更生霉素、柔红霉素、多柔比星、2-吡咯啉并阿霉素(2-pyrrolinodoxorubicine,2P-DOX)、氯基-吗啉代多柔比星、葡糖苷酸多柔比星、葡糖苷酸表柔比星、厄洛替尼、雌莫司汀、表鬼臼毒素、厄洛替尼、恩

替诺特(entinostat)、雌激素受体结合剂、依托泊昔(VP16)、依托泊昔葡萄糖昔酸、磷酸依托泊昔、依西美坦、芬戈莫德(fingolimod)、氟尿昔(FUDR)、3',5'-0-二油酰基-FudR(FUDR-d0)、氟达拉滨、氟他胺、法尼基-蛋白转移酶抑制剂、夫拉平度(flavopiridol)、福他替尼(fostamatinib)、ganetespib、GDC-0834、GS-1101、吉非替尼、吉西他滨、羟基脲、依鲁替尼(ibrutinib)、伊达比星、艾代拉利司(idelalisib)、异环磷酰胺、伊马替尼、L-门冬酰胺酶、拉帕替尼、来那度胺(lenolidamide)、亚叶酸、LFM-A13、洛莫司汀、氮芥、美法仑、巯嘌呤、6-巯嘌呤、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(neratinib)、尼洛替尼(nilotinib)、亚硝基脲、奥拉帕尼(olaparib)、普卡霉素(plicomycin)、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、链佐星、SU11248、舒尼替尼、他莫昔芬、替莫唑胺(temazolomide)(DTIC的水性形式)、反铂(transplatinum)、沙利度胺、硫鸟嘌呤、塞替派、替尼泊昔、托泊替康、尿嘧啶氮芥、伐他拉尼(vatalanib)、长春瑞滨、长春碱、长春新碱、长春花生物碱和ZD1839。此类试剂可以是本文所述的缀合物的一部分,或者可以在缀合物之前,同时或之后,与所述缀合物组合施用。或者,可以将本领域已知的一种或多种治疗性裸抗体与所述缀合物组合使用。上面描述了示例性的治疗性裸抗体。

[0372] 可以与喜树碱缀合物一起使用的治疗剂还可以包含与靶向部分缀合的毒素。可用于这方面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、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7-8月;56(4):226-43)。适合于本文中使用的其它毒素是本领域技术人员已知的并且在US 6,077,499中公开。

[0373] 而另一类治疗剂可以包含一种或多种免疫调节剂。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、促血小板生成素及其组合。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- $\alpha$ 、- $\beta$ 、- $\gamma$ 或- $\lambda$ )和干细胞生长因子(如称为“S1因子”)。细胞因子中包括生长激素如人生长激素、N-甲硫氨酰人生长激素和牛生长激素;甲状腺激素;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)和黄体生成素(LH);肝生长因子;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 $\alpha$ 和 $\beta$ ;苗勒(mullerian)抑制物质;小鼠促性腺激素相关肽;抑制素;激活素;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- $\beta$ ;血小板生长因子;转化生长因子(TGF)如TGF- $\alpha$ 和TGF- $\beta$ ;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- $\alpha$ 、- $\beta$ 、- $\gamma$ 和- $\lambda$ ;集落刺激因子(CSF)如巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF);白细胞介素(IL),如IL-1、IL-1 $\alpha$ 、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、血管抑制素、血小板反应蛋白、内皮抑素、肿瘤坏死因子和淋巴毒素(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价物。

[0374] 使用的趋化因子包括RANTES、MCAF、MIP1- $\alpha$ 、MIP1- $\beta$ 和IP-10。

[0375] 配制和施用

[0376] 缀合物的合适施用途径包括但不限于口服,肠胃外,直肠,透粘膜,肠施用,髓内,鞘内,直接心室内,静脉内或腹膜内注射。优选的施用途径是肠胃外。或者,可以以局部而非全身的方式施用化合物,例如通过将化合物直接注射到实体瘤中。

[0377] 可以根据已知方法配制免疫缀合物以制备药学上有用的组合物,由此将免疫缀合物与药学上合适的赋形剂混合在混合物中。无菌磷酸盐缓冲盐水是药学上合适的赋形剂的一个实例。其它合适的赋形剂是本领域技术人员所公知的。参见例如Ansel等人, PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, 第5版 (Lea&Febiger 1990) 以及Gennaro (编), REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 第18版 (Mack Publishing Company 1990) 以及其修订版本。

[0378] 在优选的实施方案中,使用选自由以下组成的组的缓冲液,将免疫缀合物配制在Good氏生物缓冲液 (pH 6-7) 中;N-(2-乙酰氨基)-2-氨基乙磺酸 (ACES);N-(2-乙酰氨基) 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 (MOPS);和哌嗪-N,N'-双(2-乙磺酸) [Pipes]。更优选的缓冲剂是MES或MOPS, 优选浓度范围为20至100mM, 更优选约25mM。最优选的是25mM MES, pH6.5。配制剂可以进一步包含25mM海藻糖和0.01% v/v聚山梨酯80作为赋形剂, 由于加入的赋形剂, 最终缓冲液浓度修改为22.25mM。优选的贮存方法是在-20°C至2°C的温度范围内贮存的缀合物的冻干制剂, 最优选贮存在2°C至8°C。

[0379] 免疫缀合物可以配制用于通过例如推注、缓慢输注或连续输注进行静脉内施用。优选地, 本发明的抗体在小于约4小时的时段内输注, 并且更优选在小于约3小时的时段内输注。例如, 第一个25-50mg可以在30分钟, 优选甚至15分钟内输注, 剩余部分在接着的2-3小时内输注。用于注射的配制剂可以以单位剂量形式呈现在例如添加防腐剂的安瓿中或多剂量容器中。组合物可以采取在油性或水性载体中的混悬液、溶液或乳液形式, 并且可以含有配制试剂如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。或者, 活性成分可以是粉末形式, 用于在使用前用合适的载体如无菌无热原水构建。

[0380] 可以采用另外的药物方法来控制治疗性缀合物的作用持续时间。控制释放制剂可以通过使用聚合物复合或吸附免疫缀合物来制备。例如, 生物相容性聚合物包括聚(乙烯-共-乙酸乙烯酯) 基质和硬脂酸二聚体与癸二酸的聚酸酐共聚物基质。Sherwood等人, Bio/Technology 10:1446 (1992)。免疫缀合物从此类基质释放的速率取决于免疫缀合物的分子量、基质内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。其它固体剂型描述于Ansel等人, PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, 第5版 (Lea&Febiger 1990), 以及Gennaro (编), REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 第18版 (Mack Publishing Company 1990), 修订版。

[0381] 通常, 对人施用的免疫缀合物的剂量将随诸如患者年龄、体重、身高、性别、一般医疗状况和既往病史等因素而变化。可以期望为接受者提供约1mg/kg至24mg/kg范围内的免疫缀合物的剂量作为单次静脉内输注, 尽管也可以根据情况指示施用更低或更高的剂量。例如, 对于70kg患者的1-20mg/kg剂量例如是对于1.7-m患者的70-1,400mg, 或41-824mg/

$\text{m}^2$ 。剂量可根据需要重复,例如,每周一次达4-10周、每周一次达8周或每周一次达4周。根据维持治疗的需要,也可以不太频繁地给予,例如每隔一周达几个月或每月或每季度达多个月。优选的剂量可以包括但不限于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和24mg/kg。可以使用1至24mg/kg范围内的任何量。该剂量优选多次施用,每周一次或两次。可以使用4周、更优选8周、更优选16周或更长的最小剂量日程表。施用日程表可包括每周施用一次或两次,按选自由以下组成的组的周期: (i) 每周; (ii) 每隔一周; (iii) 治疗一周,然后休息两周、三周或四周; (iv) 治疗两周,然后是休息一周、二周、三周或四周; (v) 治疗三周,接着休息一周、二周、三周、四周或五周; (vi) 治疗四周,接着休息一周,两周,三周,四周或五周; (vii) 治疗五周,接着休息一周、两周、三周、四周或五周; 及 (viii) 每月。该周期可以重复4、6、8、10、12、16或20次或更多次。

[0382] 或者,免疫缀合物可以每2或3周作为一个剂量施用,重复总计至少3个剂量。或者,每周两次,持续4-6周。如果剂量降低到约200-300mg/ $\text{m}^2$  (对于1.7- $\text{m}$ 患者为340mg/剂量,或者对于70kg患者为4.9mg/kg),则它可以每周施用一次或者甚至两次达4-10周。或者,可以减少剂量日程表,即每2或3周达2-3个月。然而,已经确定甚至更高的剂量,例如每周一次或每2-3周一次12mg/kg可以通过缓慢静脉内输注施用,以进行重复的给药循环。给药日程表可以任选地以其它时间间隔重复,并且在适当调整剂量和日程表的情况下,剂量可以通过各种肠胃外途径给予。

[0383] 在优选的实施方案中,免疫缀合物用于治疗癌症。癌症的实例包括但不限于癌瘤、淋巴瘤、胶质母细胞瘤、黑素瘤、肉瘤和白血病、骨髓瘤或淋巴样恶性肿瘤。这些癌症的更具体的实例在下文中指出,并且包括:鳞状细胞癌(例如上皮鳞状细胞癌)、尤因肉瘤、维尔姆斯瘤、星形细胞瘤、肺癌、包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌和肺鳞状细胞癌、腹膜癌、胃癌或胃瘤、包括胃肠癌、胰腺癌、多形性胶质母细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝瘤、肝细胞癌、神经内分泌肿瘤、甲状腺髓样癌,分化型甲状腺癌、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、肾癌或肾瘤、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,其中的细胞没有迁移到除原始恶性肿瘤或肿瘤部位以外的受试者身体部位的那些肿瘤)和继发性恶性细胞或肿瘤(例如由转移,恶性细胞或肿瘤细胞迁移至不同于原始肿瘤部位的继发部位引起的那些肿瘤)。

[0384] 癌症或恶性肿瘤的其它实例包括但不限于急性儿童淋巴母细胞性白血病、急性淋巴母细胞性白血病、急性淋巴细胞性白血病、急性髓性白血病、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、成人急性髓性白血病、成人霍奇金氏淋巴瘤、成人淋巴细胞性白血病、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相关淋巴瘤、AIDS相关的恶性肿瘤、肛门癌、星形细胞瘤、胆管癌、膀胱癌、骨癌、脑干胶质瘤、脑肿瘤、乳腺癌、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、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、儿童急性淋巴母细胞性白血病、儿童急性髓性白血病、儿童脑干神经胶质瘤、儿童小脑星形细胞瘤、儿童脑星形细胞瘤、儿童颅外生殖细胞瘤、儿童霍奇金病、儿童霍奇金氏淋巴瘤、儿童下丘脑和视觉通路胶质瘤、儿童淋巴母细胞性白血病、儿童髓母细胞瘤、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肿瘤、儿童原发性肝癌、儿

童横纹肌肉瘤、儿童软组织肉瘤、儿童视觉通路和下丘脑胶质瘤、慢性淋巴细胞性白血病、慢性髓性白血病、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、食管癌、尤因氏肉瘤和相关肿瘤、外分泌腺肿瘤、颅外生殖细胞肿瘤、性腺外生殖细胞肿瘤、肝外胆管癌、眼癌、女性乳腺癌、戈谢病、胆囊癌、胃癌、胃肠类癌肿瘤、胃肠肿瘤、生殖细胞肿瘤、妊娠滋养层肿瘤、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、卡波西肉瘤、肾癌、喉癌、唇和口腔癌、肝癌、肺癌、淋巴增殖性病症、巨球蛋白血症、男性乳腺癌、恶性间皮瘤、恶性胸腺瘤、髓母细胞瘤、黑素瘤、间皮瘤、转移性隐匿性原发性鳞状细胞颈癌、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/浆细胞瘤、骨髓增生异常综合征、髓性白血病、髓性白血病、骨髓增殖性病症、鼻腔和鼻窦癌、鼻咽癌、神经母细胞瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、非黑素瘤皮肤癌、非小细胞肺癌、隐性原发性转移性鳞状颈癌、口咽癌、骨/恶性纤维肉瘤、骨肉瘤/恶性纤维组织细胞瘤、卵巢上皮癌、卵巢生殖细胞肿瘤、卵巢低度恶性潜能肿瘤、胰腺癌、副蛋白血症、真性红细胞增多症、甲状腺旁腺癌、阴茎癌、嗜铬细胞瘤、垂体瘤、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、肾盂癌和输尿管癌、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、涎腺癌、结节病肉瘤、塞扎里综合征、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、肾盂和输尿管移行细胞癌、移行肾盂和输尿管癌、滋养层肿瘤、输尿管和肾盂细胞癌、尿道癌、子宫癌、子宫肉瘤、阴道癌、视觉通路和下丘脑胶质瘤、外阴癌、瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症、肾母细胞瘤和位于上文列出的器官系统中的除新生物以外的任何其它过度增殖性疾病。

[0385] 本文所述和要求保护的方法和组合物可用于治疗恶性或恶性前病况并防止进展至新生性或恶性状态,包括但不限于上述那些病症。此类用途在已知或怀疑在进展到新生物或癌症之前的病况中指示,特别是在已经发生由增生、化生或最具体地发育异常组成的非新生性细胞生长的情况下(对于此类异常生长状况的综述,参见Robbins和Angell, *Basic Pathology*, 第2版, W.B.Saunders Co., Philadelphia, 第68-79页(1976))。

[0386] 发育异常通常是癌症的先兆,并且主要见于上皮。它是非新生性细胞生长的最无序形式,涉及单独细胞统一性和细胞结构取向的损失。发育异常在存在慢性刺激或炎症的地方特征性发生。可以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、异侧发育不良、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、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、颅腕跖骨发育不良、颅干骨后端发育不良、牙本质发育不良、骨干发育不良、外胚层发育不良、釉质发育不良、脑性眼球发育不良、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、上皮发育不良、面-指-生殖器发育不良、家族性颌骨纤维发育不良、家族性白色皱襞性发育不良、纤维肌性发育不良、骨纤维发育不良、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异常、乳腺发育不良、面骨发育不良、干骨后端发育不良、蒙迪尼(Mondini)发育不良、单骨纤维发育不良、粘膜上皮发育不良、多发性骺软骨发育不良、眼耳脊椎发育不良、眼齿指发育不良、眼椎骨发育不良、牙发育异常、眼下颌骨(ophthalmomandibulomelic)发育不良、根尖周牙骨质异常增生、多骨纤维发育不良、假性软骨发育不全性脊椎骨骺发育不良、视网

膜发育不良、透明隔-视神经发育不良、脊椎骨骼发育不良和室径向发育异常。

[0387] 可以治疗的其它肿瘤前病症包括但不限于良性增殖失调病症(例如,良性肿瘤、纤维囊性病况、组织肥大、肠息肉或腺瘤和食管发育不良)、白斑、角化病、鲍文氏疾病,农民皮肤(Farmer's Skin)、日光性唇炎和日光性角化病。

[0388] 在优选的实施方案中,本发明的方法用于抑制癌症的生长、进展和/或转移,特别是上面列出的那些。

[0389] 另外的过度增生疾病、病症和/或病况包括但不限于: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、早幼粒细胞、髓单核细胞、单核细胞和红白血病])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(polycythemia vera)、淋巴瘤(例如,霍奇金病和非霍奇金病)、多发性骨髓瘤、瓦尔丹斯特伦氏巨球蛋白血症、重链病、以及实体瘤,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、成骨肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤(lymphangioendothelioma)、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、乳腺癌、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、肝癌、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎性癌、威尔姆斯氏瘤(Wilm's tumor)、宫颈癌、睾丸肿瘤、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(emangioblastoma)、听神经瘤、少突神经胶质瘤、脑膜瘤、黑素瘤、神经母细胞瘤和成视网膜细胞瘤。

[0390] 可以用免疫缀合物治疗的自身免疫疾病可以包括急性和慢性免疫性血小板减少症、皮肌炎、西登哈姆舞蹈病、重症肌无力、系统性红斑狼疮、狼疮性肾炎、风湿热、多腺综合征、大疱性类天疱疮、寻常型天疱疮、糖尿病、亨诺-许兰氏紫癜、链球菌后肾炎、结节性红斑、高安氏动脉炎、ANCA相关性血管炎、艾迪生病、类风湿性关节炎、多发性硬化症、结节病、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、古德帕斯彻氏综合征、闭塞性血栓炎、舍格伦综合征、原发性胆汁性肝硬化、桥本甲状腺炎、甲状腺毒症、硬皮病、慢性活动性肝炎、多发性肌炎/皮肌炎、多发性软骨炎、寻常型天疱疮、韦格纳氏肉芽肿、膜性肾病、肌萎缩性侧索硬化症、脊髓痨、巨细胞动脉炎/多肌痛、恶性贫血、快速进行性肾小球性肾炎、银屑病或纤维化肺泡炎。

[0391] 试剂盒

[0392] 各种实施方案可涉及包含适合于治疗患者中的患病组织的组分的试剂盒。示例性的试剂盒可以包含如本文所述的至少一种缀合的抗体或其它靶向部分。如果含有用于施用的组分的组合物未配制用于通过消化道递送,例如通过口服递送,则可以包括能够通过其它途径递送试剂盒组分的装置。用于应用如肠胃外递送的一类装置是用于将组合物注射到受试者体内的注射器。也可以使用吸入装置。

[0393] 试剂盒组分可以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合于重建的组合物的无菌冻干制剂的小瓶。试剂盒也可以含有一种或多种适合于重构和/或稀释其它试剂的缓冲液。可以使用的其它容器包括但不限于小袋、托盘、盒、管等。试剂盒组分可以在容器内包装并无菌维持。可以包含的另一个组件是对使用

试剂盒实现其用途的人的用法说明。

[0394] 实施例

[0395] 本发明的各种实施方案通过以下实施例进行阐述,而不限制其范围。

[0396] 概述

[0397] 以下使用的缩写是:DCC,二环己基碳化二亚胺;NHS,N-羟基琥珀酰亚胺,DMAP,4-二甲基氨基吡啶;EEDQ,2-乙氧基-1-乙氧基羰基-1,2-二氢喹啉;MMT,单甲氧基三苯甲基;PABOH,对氨基苯甲醇;PEG,聚乙二醇;SMCC,琥珀酰亚胺基4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯;TBAF,四丁基氟化铵;TBDMS,叔丁基二甲基甲硅烷基氯化物。

[0398] 根据Moon等人(J.Medicinal Chem. 51:6916-6926,2008) (其通过引用并入本文)所述的程序,使用三光气和DMAP制备以下实施例中的羟基化合物的氯甲酸酯。提取后处理是指用氯仿、二氯甲烷或乙酸乙酯提取,并任选用饱和碳酸氢盐、水和饱和氯化钠洗涤。除非另有说明,使用230-400目硅胶和甲醇-二氯甲烷梯度,使用至多15%v/v甲醇-二氯甲烷进行快速层析。通过如下进行反相HPLC:方法A,使用配有预柱滤器的7.8×300mm C18HPLC柱,并且在10分钟内以流速3mL/分钟使用100%溶剂A至100%溶剂B的溶剂梯度,并且以流速4.5mL/分钟保持于100%溶剂B,达5或10分钟;或通过方法B,使用配有预柱滤器的4.6×30mm Xbridge C18,2.5μm柱,以流速1.5mL/分钟使用100%溶剂A至100%溶剂B的溶剂梯度,达4分钟,和以流速为2mL/分钟使用100%溶剂B,达1分钟。溶剂A是0.3%乙酸铵水溶液, pH 4.46,而溶剂B是9:1乙腈-乙酸铵水溶液(0.3%), pH 4.46。通过设置在360nm和254nm的双重在线吸光度检测器监测HPLC。

[0399] 实施例1:CL2A-SN-38的制备

[0400] 用于合成CL2A-SN-38的优选反应方案显示在图1中。在美国专利9,107,960中描述的合成方案的先前版本是图1所示的改进方案的基础。在本实施例中讨论了美国专利No.9,107,960中公开的底物、中间体和反应。在下面的实施例中描述了图1中并入的美国专利号9,107,960的方案的进一步改进。

[0401] 0-(2-叠氮乙基)-0'-(N-二羟乙酰基-2-氨基乙基)-Lys (MMT)-PABOH] 七乙二醇(中间体3)的制备:在500mL单颈烧瓶中,加入市售的Fmoc-Lys (MMT)-OH(16g)、对氨基苯甲醇(3.26g)和EEDQ(6.52g),随后加入无水二氯甲烷(80mL)。搅拌过夜后,加入二乙胺(25mL),再过6小时后,将反应混合物浓缩至约50mL的体积。这用庚烷稀释,并且将溶液浓缩回到50mL。用庚烷再追加两次(每次50mL)提供在底部含有胶状物质的两相混合物。将胶质物质在二氯甲烷(24mL)中吸收,搅拌,并且处理为缓慢加入庚烷(80mL)。搅拌1小时后,过滤浆液,以得到13.02g(99.6%产率)Lys (MMT)-PABOH(中间体2,图1)。如果发现存在残留的二乙胺,则将该物质进一步任选地通过层析法纯化。将Lys (MMT)-PABOH(11.51g)与0-(2-叠氮基乙基)-0'-(N-二羟乙酰基-2-氨基乙基)七乙二醇(PEG-N<sub>3</sub>;12.107g)的无水二氯甲烷(90mL)溶液混合。向该搅拌的溶液中加入EEDQ(5.54g)。约18小时后,将反应混合物浓缩并通过使用乙酸乙酯-甲醇梯度洗脱在硅胶上层析来纯化,以获得纯的标题产物(中间体3,图1)。

[0402] TBDMS-SN-38(中间体4)的制备:使用二氯甲烷而不是二甲基甲酰胺作为溶剂对制备物进行改性,这使得易于后处理。将二异丙基乙胺(36.6g)的无水二氯甲烷(160mL)溶液加入到SN-38(33g)。将悬浮液置于冰/水浴中冷却并搅拌。向该搅拌的悬浮液中加入叔丁基

二甲基甲硅烷基氯化物(31.72g)的二氯甲烷(125mL)溶液。移去冷浴，并且将反应混合物搅拌4小时。将透明的反应混合物用380mL在10%氯化钠溶液中的0.2M HCl和300mL 10%氯化钠溶液洗涤。干燥并除去溶剂后，从乙酸乙酯-庚烷中沉淀产物，得到38.75g(91%产率)的TBDMS-SN-38。

**[0403] 10-0-TBDMS-SN-38-20-0-氯甲酸酯(反应性中间体5)的产生和0-(2-叠氮基乙基)-0'--[ (N-二甘醇基-2-氨基乙基)-Lys (MMT)-PABOCO-20-0-SN-38]七乙二醇(中间体7)的制备：**为了避免所需量的三光气的团块添加的大量放热曲线，改进的方法通过在30分钟内将三光气(0.24g)的无水二氯甲烷(4mL)溶液加入二氯甲烷(17mL)中的0.94g TBDMS-SN-38和DMAP(0.76g)的搅拌混合物来创造。如通过反应混合物的淬灭(用无水甲醇淬灭)的等分试样的HPLC分析所确定的，这导致98.5%转化为反应中间体(图1中的5)。因此，确保了所需产物的清洁形成，没有由于用未反应的SN-38对初始形成的氯甲酸酯的淬灭而形成二聚体材料的证据。虽然加入团块导致5.8℃至17.6℃的大幅放热曲线，但是缓慢加入使内部温度始终保持在<10℃，同时不危害反应的质量。使用250mL无水二氯甲烷中11.25g(22.2mmol) TBDMS-SN-38并且如上文对小规模反应所述按比例使用其它试剂，重复相同的方法。15分钟后，在8分钟内加入25.01g在二氯甲烷(125mL)中的0-(2-叠氮乙基)-0'--[ (N-二羟乙酰基-2-氨基乙基)-Lys (MMT)-PABOH]七乙二醇(中间体3,图1)溶液。75分钟后，反应混合物依次用50mM乙酸钠缓冲液，pH5.3，水和盐水洗涤，用无水硫酸钠干燥。然后将产物溶液与四氢呋喃(31mL)中的1M四丁基氟化铵、无水二氯甲烷(34mL)和乙酸(3mL)的混合物搅拌。2小时后，反应混合物用0.25M柠檬酸盐缓冲液，pH6，水和盐水洗涤，用无水硫酸钠干燥。在硅胶上层析，用甲醇-二氯甲烷混合物梯度洗脱，得到17.3g(产率52%)标题产物(中间体7)。

**[0404] CL2A-SN-38的制备：**将无水二氯甲烷(130mL)中的0-(2-叠氮基乙基)-0'--[ (N-二羟乙酰基-2-氨基乙基)-Lys (MMT)-PABOCO-20-0-SN-38]七乙二醇(中间体7,10.2g)与4-(N-马来酰亚胺甲基)-N-(2-丙炔基)环己烷-1-甲酰胺(中间体8['MCC-炔']；3.78克)混合。向其中加入二氯甲烷(100mL)中的三苯基膦(0.38g)、溴化亚铜(0.24g)和二异丙基乙胺(0.25mL)的混合物。将反应混合物在环境室温下搅拌14小时。将物质浓缩并通过层析法纯化；纯产物溶液用EDTA，水和盐水洗涤。获得产物0-{2-[ (1,2,3-三唑基)-4-[4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-甲酰氨基甲基]乙基}-0'-[ (N-二羟乙酰基-2-氨基乙基)-Lys (MMT)-PABOCO-20-0-SN-38]七乙二醇(中间体9)，其量为10.8g(89%产率)，优于先前得到的最大产率67%。由于反应时间缩短(14小时对18-41小时)，这种改进的程序改进了产率，并通过先进行层析，然后用EDTA提取避免了先前遇到的中间体9的稳定性问题。将二氯甲烷中的产物溶液与茴香醚(2.8g)混合，冷却至<5℃，并且与二氯乙酸(5.8g)反应2小时。终产物CL2A-SN-38从叔丁基甲基醚中以81%的总产率(以2个步骤)沉淀出来。

**[0405] 实施例2：用于合成CL2A-SN-38的改进方案**

**[0406]** 虽然上述实施例1中公开的合成方案适用于CL2A-SN-38的大规模制备，但是本文公开了进一步的改进，这些改进在9,107,960的申请日之前是未知的且不能预测的。

**[0407]** 本文公开的CL2A接头包含含有限定数量的PEG单体的PEG部分。如图1所示，在优选的实施方案中，接头中使用的PEG单体的数量是8。然而，在本发明范围内的替代实施方案可以使用1-30，更优选1-12，更优选6-10，更优选8的PEG单体数目。

[0408] 有3个主要阶段,其中下列各项中进行了过程改进: (a) 在将中间体6转化为中间体7中; (b) 在将中间体8转化为中间体9中; 和 (c) 在将中间体9转化为中间体10中。

[0409] 中间体7的制备中的产率改进

[0410] 在甲硅烷基保护的中间体6向脱甲硅基化的中间体7的转化中,所使用的四丁基氟化铵从先前的形式中的1.4倍摩尔过量变为本方案中的1.1倍摩尔过量。此水平的试剂同样有效,并且也降低了杂质特征,从而提高了中间体7的纯度特征并导致产率的改进。

[0411] 中间体6和7两者的制备中的含水后处理如下降低。在之前的形式中,后处理涉及对于中间体6用0.05M乙酸钠缓冲液(pH5.3)洗涤有机提取物四次以及对于中间体7用0.25M柠檬酸盐缓冲液(pH6)洗涤四次,随后在每种情况下用水洗涤。在改进的方案中,对于中间体6和7,缓冲液洗涤分别减少到3次和2次,并且在这两种情况下都除去水洗涤。这些修改大大减少了乳液的形成,并改进了有机提取物中产物的回收率。

[0412] 中间体7的层析纯化先前涉及使用二氯甲烷-甲醇混合物进行洗脱。在图1的改进方案中,将洗脱液修改为具有不同甲醇浓度的二氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇混合液的组合,然后加入不同浓度的二氯甲烷-甲醇混合液。这导致了中间体的更好且更快的分离,并且改进了回收率。下面的实施例4更详细地讨论了所用溶剂的比例。

[0413] 从中间体4到中间体7的3步序列的总产率通过引入这些过程改变从29-40%范围改进到64%。

[0414] 中间体9的制备中过程稳健性的改进

[0415] 在先前公开的方案中,使用二氯甲烷中的溴化亚铜和三苯基膦的新形成的复合物进行中间体7和8之间的铜(+1)催化反应以产生中间体9,其中加入叔胺如二异丙基乙基胺。该程序运行良好,纯化后产生50-60%产率的中间体9。但是,需要注意控制复合物中的溴化亚铜与三苯基膦的比例。显示了,在单独存在三苯基膦的情况下,中间体9的产物质量随时间劣化,表明该试剂的有害作用,一旦铜催化的反应完成就要求快速除去该试剂。这带来了一定的局限性,可能导致纯化的中间体9的产率降低,特别是在大规模制备中。

[0416] 在本文公开的改进程序中,使用水中含有硫酸铜和抗坏血酸以及二氯甲烷中的中间体7和8以及2,6-可力丁的双相混合物进行反应。通过搅拌双相溶液过夜,通常18小时,转化完成,并且粗产物通过用EDTA水溶液简单洗涤而与硫酸铜和抗坏血酸盐分离,并通过层析法纯化。产物产率类似于以溴化亚铜/三苯基膦为催化剂的产率,但是改进的方案避免了使用三苯基膦及其对中间体稳定性的可能影响。

[0417] 制备终产物10(CL2A-SN-38)的过程改进

[0418] 中间体9在溶液中以及作为无溶剂的分离材料的稳定性特征显示产物维持>97%的纯度,作为固体产物在-20℃下贮存4天或作为二氯甲烷中的溶液在室温贮存1天。在后一种情况下,在室温下贮存4天将纯度降低到89.4%,而贮存在-20℃的溶液显示仅92%的纯度。在先前公开的方案中,使用层析法和EDTA洗涤后得到的二氯甲烷中的物质本身,用于由二氯乙烷(DCA)和茴香醚介导的脱保护反应。在该情况下,根据溶液形式的中间体9的贮存长度,最终材料(CL2A-SN-38)的质量变化。在改进的方案中,将纯化后的中间体9浓缩成固体,随后将其用于最终的脱保护步骤。该修改消除了最终脱保护步骤之前中间体9产物质量变化的不确定性。

[0419] 另一种改进涉及反应后将粗产物溶液在数小时内逐滴加入剧烈搅拌的叔丁基甲

基醚(t-BME)中,从而使产物能够以可过滤的固体形式沉淀。如果反应混合物的添加不是逐渐的并且如果搅拌不剧烈,则产物是油析出来的,而非作为固体沉淀。

[0420] 其它改变可以并入到图1的合成方案中的各个步骤中。例如,在将中间体1转化为中间体2和将中间体2转化为中间体3的过程中,EEDQ显示为酰胺偶联剂。然而,普通技术人员会认识到,可以使用许多替代试剂完成酰胺偶联,如在Han S-Y和Kim Y-A. Recent development of peptide coupling reagents in organic synthesis. *Tetrahedron* 2004;60:2447-2467;以及Valleur E和Bradley M. Amide bond formation:beyond the myth of coupling reagents. *Chem Soc Rev* 2009;38:606-631中综述。在非限制性实例中,有用的酰胺偶联剂可以选自:(1) 碳二亚胺试剂,如二环己基碳二亚胺(DCC)、二异丙基碳化二亚胺(DIC)或1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺(EDC),与选自由以下组成的组的添加剂结合使用:1-羟基-1H-苯并三唑(HOBt)、N-羟基琥珀酰亚胺(HOSu)和二甲基氨基吡啶(DMAP);(2) 脲鎓盐0-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲六氟磷酸盐(HATU)和0-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲六氟磷酸盐(HBTU);(3) N-乙氧基羰基-2-乙氧基-1,2-二氢喹啉(EEDQ)和N-异丁氧基羰基-2-异丁氧基-1,2-二氢喹啉(IIDQ);和(4) 异丁基氯甲酸盐。

[0421] 实施例3:使用1.1对1.4当量的四丁基氟化铵(TBAF)将中间体6脱硅烷化为中间体7

[0422] 将溶解在14mL DCM中的粗中间体6(13.78g;0.873mmol)冷却并用1.4当量含有乙酸(0.126g)的1M四丁基氟化铵(TBAF)处理,反应混合物维持于≤20℃。1小时后,反应混合物用0.25M柠檬酸盐缓冲液,pH6(3×10mL)、水和5%氯化钠溶液洗涤,用无水硫酸钠干燥。HPLC显示粗产物7的85.5%纯度,四个峰位置处的杂质如下:1.0% (相对保留时间或RRT为0.79)、2.4% (RRT为0.864)、1.5% (RRT为0.94)和3.7% (RRT为1.162)。当使用1.1当量的1M TBAF进行相同的反应时,产物的HPLC纯度稍微改进至88.2%,但杂质显著下降:0.3% (RRT为0.79)、0.7% (RRT为0.864)、0.8% (RRT为0.94)和2.4% (RRT为1.162)。这些杂质特征的改进简化了随后的层析分离。

[0423] 实施例4:在中间体7的层析中使用三元溶剂系统对二元溶剂系统

[0424] 将17.2g粗中间体7的溶液施加到填充在流动相A(MPA)(其为15%二氯甲烷(DCM)/乙酸乙酯)的硅胶柱。使用0-5%甲醇-MPA,然后是5%甲醇-MPA和5%甲醇-DCM的2:1混合物;5%甲醇/MPA和5%甲醇-DCM的1:2混合物;最后是5%甲醇/DCM,通过分步梯度进行洗脱。收集的7个级分显示产物纯度>93%,导致产物产率69.6%相对于之前公开的二元层析洗脱系统的44.7%产率。在后一种系统中,将17.2g粗中间体7的溶液在与改进的程序相同的条件下施加到硅胶柱,但是用0-5%甲醇-DCM混合物通过分步梯度洗脱。仅在2个级分中获得纯度>93%的产物,导致产率44.7%。在随后的实验中,用30%DCM/乙酸乙酯制备MPA,然后将其与不同的甲醇浓度混合以洗脱。

[0425] 实施例5:在中间体4向中间体7的三步转化中改进产率的步骤

[0426] 将133mL二氯甲烷(DCM)中的8.868g(17.5mmol)TBDMS-SN-38(中间体3)和4-[N,N-二甲基氨基]吡啶(DMAP;7.06g;3.3当量)的溶液在氮气下搅拌,并冷却至2.6℃的内部温度。在6分钟内向该溶液中加入44mL DCM中的三光气(2.4g;8.088mmol)的溶液。将反应混合物在20分钟内加热至15℃的内部温度并在15-16℃保持10分钟。将反应混合物冷却至6.4℃

的内部温度,随后加入97.5mL无水DCM中的中间体3(18.03mmol,1.03当量)的溶液,同时保持内部温度于≤15℃。将反应混合物搅拌3.5小时,并且用50mM乙酸钠,pH5.3,缓冲液(3×97.5g)和10%氯化钠(97.5g)洗涤,并用无水硫酸钠干燥过夜。

[0427] 将过滤的溶液冷却至≤15℃的内部温度,并用27mL含有乙酸的DCM(2.52g,42.0mmol,2.4当量)的DCM中的1M TBAF(19.3mL,19.3mmol,1.1当量)溶液处理。将混合物在10–16℃搅拌45分钟,然后用400g 0.25M柠檬酸盐缓冲液(pH 6)和200g 10%氯化钠的2×300g混合物洗涤,并用无水硫酸钠干燥。将干燥的溶液浓缩至约50mL,并且施加到填充在30%DCM/乙酸乙酯(MPA)中的400g硅胶柱中。用含有递增浓度的甲醇(MPA中的1–5%甲醇)的分步梯度进行洗脱,然后用2:1MPA/DCM中的5%甲醇、1:2MPA/DCM中的5%甲醇和5%甲醇/DCM洗脱。将纯度≥94%的最纯的级分合并,浓缩至约50mL,用乙酸乙酯(EtOAc;2×80mL)和EtOAc/庚烷(1:1;160mL)追加至终体积35–50mL,并用160mL庚烷稀释。将沉淀的固体产物过滤并在40℃下真空干燥。产量为17.21g(调整残余3.2wt%庚烷后为64.3%)。产物中间体7的HPLC纯度为95%。<sup>1</sup>H NMR谱证实了结构。分离的产率64.3%高于先前公开的方案获得的29–40%。

[0428] 实施例6:在三苯基膦存在下中间体9的稳定性

[0429] 在0摩尔%(对照)、10摩尔%和20摩尔%三苯基膦的存在下,在室温下,在96小时的时段内评价中间体9的纯的组合层析级分。下面的表6显示在三苯基膦存在下产物质量恶化。

[0430] 表6:在三苯基膦(Ph<sub>3</sub>P)存在下在室温下中间体9(溶液形式)的%HPLC纯度

	样品	0 h	6 h	26 h	96 h
[0431]	中间体9+无Ph <sub>3</sub> P(0 mol%)	96.0 %	94.2 %	93.7 %	91.6 %
	中间体9+Ph <sub>3</sub> P(10 mol%)	不可得	88.2 %	84.8 %	85.5 %
	中间体9+Ph <sub>3</sub> P(20 mol%)	71.6 %	73.0 %	67.5 %	68.8 %

[0432] 实施例7:用于制备中间体9的改进

[0433] 给琥珀色瓶装入中间体7(n=8;232g;157mmol;1当量)和二氯甲烷(2.1kg)以形成溶液。将该溶液转移到配有顶置式搅拌器、温度探头和氮气层的12-L圆底烧瓶。向圆底烧瓶装入中间体8(77g,280mmol,1.8当量)、二氯甲烷(1.2kg)、1M硫酸铜(II)溶液(32g)、1M(+)-抗L-坏血酸钠溶液(93g)和2,6-二甲基吡啶(20g)。将所得溶液搅拌过夜。18.5小时后,将反应混合物用1.5L 0.1M EDTA溶液(pH5.5)洗涤6次。将有机层浓缩至0.7L,并且通过在11"宽的柱上填充的6kg硅胶上通过快速层析进行纯化。用供连续分步梯度用的体积5.8、14.5、14.5、23.2、23.2、23.2、23.2和46.4升的0–8%甲醇–二氯甲烷混合物进行洗脱。将纯级分合并,并且蒸发溶剂。回收率:145g(52.6%产率;HPLC纯度:96.5%)。

[0434] 实施例8:中间体9的稳定性特征

[0435] 中间体9使用硫酸铜/抗坏血酸钠水溶液和中间体7和8的DCM溶液的双相混合物制备。产物分离给出纯中间体9的60–65%产率。对无溶剂产物(固体产物)和来自层析的组合纯级分(溶液形式)两者进行稳定性分析。表7给出通过HPLC分析得到的稳定性数据。根据数

据,确定中间体9在脱保护为CL2A-SN-38之前在低温下以固体形式最佳贮存。

[0436] 表7:在各种条件下贮存的中间体9的%HPLC纯度

HPLC 峰	溶液形式: -20 °C, 4 天	溶液形式: 室温, 1 天	溶液形式: 室温, 4 天	固体产 物: -20 °C, 4 天
[0437] 中间体 9 (RRT 1.0)	92.0 %	97.8 %	89.4 %	97.3 %
	IMP (RRT 0.396)	2.4 %	0 %	2.7 %
	IMP (RRT 0.805)	4.9 %	2.2 %	6.4 %
IMP: 杂质峰; RRT: HPLC 上的相对保留时间, 中间体 9 的 RRT 呈现为 1。				

[0438] 实施例9:制备CL2A-SN-38(终产物10)

[0439] 将中间体9(145g)溶于二氯甲烷(1.7kg)中,并将该溶液转移到配有顶置式搅拌器、温度探头和氮气层的5-L圆底烧瓶中。向溶液中加入茴香醚(39g;359mmol,4.35当量),并将溶液冷却至4°C。在20分钟内加入二氯乙酸(107g,831mmol,10.08当量),温度保持于≤4°C。加入后,将温度升至15°C,并将反应混合物搅拌4小时。将该反应混合物在1.5小时内加入叔丁基甲基醚(t-BME;3.8kg),置于配有顶置式搅拌器、加料漏斗和氮气入口的22-L圆底烧瓶中,同时保持剧烈混合。将得到的浆液在室温下搅拌12小时。使固体沉降,并且倾析上清液。用4%二氯甲烷/t-BME冲洗固体,用t-BME浆化并过滤。收集的固体在≤40°C真空干燥,得到124.3g标题化合物,为黄色固体(产率93.6%)。

[0440] 实施例10:CL2A-SN-38与抗体的缀合

[0441] 在这些研究中使用抗CEACAM5人源化MAb hMN-14、抗CD22人源化MAb hLL2、抗CD20人源化MAb,hA20、抗EGP-1人源化MAb hRS7和抗粘蛋白人源化MAb,hPAM4。用范围为7-7.4的pH的磷酸盐缓冲液中的三(2-羧乙基)膦(TCEP)温和还原每种抗体,将pH调节至6.5,并使用5-10%v/v DMSO作为共溶剂与约10倍摩尔过量的CL2A-SN-38反应,并在环境温度下温育20分钟。任何过量的硫醇用N-乙基马来酰亚胺封端,所述N-乙基马来酰亚胺作为相对于抗体10倍摩尔过量的水溶液使用。

[0442] 使用20-30渗滤体积的最终制剂缓冲液25mM MES, pH 6.5,通过切向流动过滤(TFF)纯化缀合物。该方法避免了尺寸排阻和疏水柱上的繁琐顺序纯化,由此能够以容易的方式纯化数百克缀合物。通过在366nm处的吸光度并与标准值相关测定产物的SN-38。蛋白质浓度从280nm处的吸光度推断,针对在该波长处SN-38吸光度的溢出校正。由此确定SN-38/MAb置换比(DAR)。将纯化的缀合物作为冻干制剂贮存在玻璃小瓶中,在真空下加盖并贮存在-20°C冷冻箱中。表8中示出了对于通常在5至7范围内的这些缀合物中的一些获得的DAR。

[0443] 表8:一些缀合物中的SN-38/MAb药物/MAb比率(DAR)

[0444]	MAb	缀合物	DAR
	hMN-14	hMN-14-[CL2A-SN-38]	6.1
	hRS7	hRS7-CL2A-SN-38	5.8
	hA20	hA20-CL2A-SN-38	5.8
	hLL2	hLL2-CL2A-SN-38	5.7
	hPAM4	hPAM4-CL2A-SN-38	5.9

[0445] 实施例11:在人胰腺癌或结肠癌的临床前模型中的体内治疗效力

[0446] 用特异性CL2A-SN-38缀合物或对照缀合物处理携带皮下人胰腺或结肠肿瘤异种移植植物的免疫受损的无胸腺雌性裸小鼠,或保持未处理。观察特异性缀合物的治疗效力。图2显示Capan 1胰腺肿瘤模型,其中hRS7(抗EGP-1)、hPAM4(抗粘蛋白)和hMN-14(抗CEACAM5)抗体的特异性CL2A-SN-38缀合物显示比对照hA20-CL2A-SN-38缀合物(抗CD20)和未处理的对照更好的效力。类似地,在人胰腺癌的BXPC3模型中,特异性hRS7-CL2A-SN-38显示比对照治疗更好的疗效(图3)。同样,在人结肠癌的侵袭性LS174T模型中,用特异性hMN-14-CL2A-SN-38处理比非处理更有效(图4)。

[0447] 实施例12:人源化抗TROP-2 IgG-SN-38缀合物用于有效治疗多种上皮癌的用途

[0448] 本研究的目的是评估SN-38-抗TROP-2抗体-药物缀合物(ADC)针对几种人实体瘤类型的效力,并评估其在小鼠和猴中的可耐受性,后者与hRS7的组织交叉反应性与人相似。将两种SN-38衍生物CL2-SN-38(参见美国专利号7,591,994)和CL2A-SN-38与抗TROP-2-人源化抗体hRS7缀合。体外表征免疫缀合物的稳定性、结合和细胞毒性。在表达TROP-2抗原的5种不同的人实体瘤-异种移植模型中测试效力。在小鼠和食蟹猴中评估毒性。

[0449] 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)和体外血清稳定性( $t_{1/2}$ 约20小时)中等同。将细胞暴露于ADC表明导致PARP切割的信号传导途径,但注意到在p53和p21上调中与游离SN-38的差异。当与非靶向对照ADC相比时,在携带Calu-3( $P \leq 0.05$ )、Capan-1( $P < 0.018$ )、BxPC-3( $P < 0.005$ )和COLO 205肿瘤( $P < 0.033$ )的小鼠中,无毒剂量的hRS7-SN-38产生显著的抗肿瘤效果。小鼠耐受 $2 \times 12\text{mg/kg}$ (SN-38当量)的剂量,ALT和AST肝酶水平仅短暂升高。以 $2 \times 0.96\text{mg/kg}$ 输注的食蟹猴仅表现出血液计数的短暂下降,尽管重要的是,这些值不落入正常范围下。

[0450] 我们推断抗TROP-2 hRS7-CL2A-SN-38 ADC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。它在猴中耐受良好,组织TROP-2表达与人相似。(Cardillo等人,2011,Clin Cancer Res 17:3157-69)。

[0451] 用伊立替康对实体瘤患者的成功治疗已经受到限制,主要是由于CPT-11前药对活性SN-38代谢物的较低转化率。其他人已经检查了SN-38的非靶向形式作为规避这种转换的需要以及将SN-38被动递送到肿瘤的手段。我们将SN-38共价缀合到人源化抗TROP-2抗体hRS7。这种抗体-药物缀合物在一系列s.c.人癌症异种移植植物模型,包括非小细胞肺癌、胰腺癌、结肠直肠癌和鳞状细胞肺癌中均在非毒剂量(例如 $\leq 3.2\text{mg/kg}$ 累积SN-38当量剂量)下具有特异的抗肿瘤作用。

[0452] TROP-2在许多上皮癌中广泛表达,但在一些正常组织中表达,因此在食蟹猴中进行剂量递增研究以评估该缀合物的临床安全性。猴耐受 $24\text{mg SN-38当量/kg}$ ,仅有轻微的可逆的毒性。鉴于其肿瘤靶向性和安全性特征,hRS7-CL2A-SN-38可以在管理对伊立替康响

应的实体瘤中提供改善。

[0453] 人滋养层细胞表面抗原 (TROP-2) ,也称为GA733-1 (胃抗原733-1) 、EGP-1 (上皮糖蛋白-1) 和TACSTD2 (肿瘤相关钙信号转导物) ,在多种人癌中表达,并且在一些中具有预后意义,与更具侵袭性的疾病相关(参见例如Alberti等人,1992,Hybridoma 11:539-45; Stein等人,1993,Int J Cancer 55:938-46;Stein等人,1994,Int J Cancer Suppl.8:98-102)。TROP-2在用鼠TROP-2转染的小鼠胰腺癌细胞系中的功能作用的研究揭示了在体外的低血清条件下增加的增殖、迁移和非贴壁依赖性生长,以及在体内增强的生长速率及增加的Ki-67表达的证据和更高的转移可能性(Cubas等人,2010,Mol Cancer 9:253)。

[0454] TROP-2抗原在许多上皮癌中的分布使其成为有吸引力的治疗靶标。Stein和同事(1993,Int J Cancer 55:938-46)表征了称为RS7-3G11 (RS7) 的抗体,其结合存在于许多实体瘤中的EGP-1,但该抗原也在一些正常组织中表达,通常以较低的强度,或在限制的区域中表达。使用放射性标记的RS7在许多人肿瘤异种移植植物中记录了靶向和治疗效力(Shih等人,1995,Cancer Res 55:5857s-63s;Stein等人,1997,Cancer 80:2636-41;Govindan等人,2004,Breast Cancer Res Treat 84:173-82) ,但是这种内化抗体在未缀合形式中未显示治疗活性(Shih等人,1995,Cancer Res 55:5857s-63s)。然而,在体外,它已经表明针对TROP-2阳性癌的抗体依赖性细胞毒性(ADCC)活性。

[0455] 我们报道了使用与SN-38(作为伊立替康活性组分的拓扑异构酶-I抑制剂)的几种衍生物或CPT-11偶联的抗CEACAM5 (CD66e) IgG制备抗体-药物缀合物(ADC) (Moon等人,2008,J Med Chem 51:6916-26;Govindan等人,2009,Clin Cancer Res 15:6052-61)。衍生物在其体外血清稳定性性质方面有所不同,并且体内研究发现一种形式(称为CL2)比其它具有或多或少稳定性的键联更有效防止或抑制人结肠和胰腺癌异种移植植物的生长。

[0456] 重要的是,这些作用发生在无毒剂量下,最初的测试未能确定剂量限制性毒性(Govindan等人,2009,Clin Cancer Res 15:6052-61)。这些结果是令人鼓舞的,但也是令人惊讶的,因为CEACAM5抗体未被内化,一种认为对于ADC的成功关键的性质。我们推测抗CEACAM5-SN-38缀合物的治疗活性可能与抗体定位后肿瘤内SN-38的缓慢释放有关。由于当细胞在其生长周期的S期期间暴露时伊立替康表现最佳,预期持续释放改进响应。实际上,与非靶向血浆延伸剂如聚乙二醇(PEG)或胶束偶联的SN-38相对于单独的伊立替康或SN-38显示改进的效力(例如Koizumi等人,2006,Cancer Res 66:10048-56) ,为这一机制提供了额外的支持。

[0457] 鉴于RS7抗体与上皮癌的广泛反应性及其内化能力,我们假设RS7-SN-38缀合物不仅可以从药物的持续释放中获益,而且也可以从直接的胞内递送获益。因此,我们使用人源化形式的鼠RS7抗体(hRS7)制备并测试了SN-38缀合物的效力。对SN-38衍生物进行了修饰(Govindan等人,2009,Clin Cancer Res 15:6052-61) ,其改进了缀合物的质量而不改变其体外稳定性或其体内效力。这种新的衍生物(称为CL2A)目前是SN-38与抗体缀合的优选试剂。在本文中,我们显示了在植入裸小鼠中的几种上皮癌细胞系中在无毒剂量时hRS7-SN-38缀合物的效力,其它研究揭示了可以耐受实质上更高的剂量。更重要的是,在与人相似的组织中也表达TROP-2的猴中的毒性研究显示在比小鼠中的治疗有效剂量明显更高的量耐受hRS7-CL2A-SN-38,提供了该缀合物是用于治疗具有一大批上皮癌的患者的有希望的药剂的证据。

[0458] 材料和方法

[0459] 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)以及PC-3(前列腺腺癌)。在Immunomedics, Inc.制备人源化RS7 IgG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)获自Hospira, Inc.。

[0460] 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, 还见美国专利号7,591,994)。如描述(Moon等人, 2008, J Med Chem 51:6916-26; Govindan等人, 2009, Clin Cancer Res 15:6052-61)进行其与hRS7 IgG的缀合和血清稳定性。如先前所述(Moon等人, 2008, J Med Chem 51:6916-26)进行CL2A-SN-38(M.W.1480)及其hRS7缀合物的制备和稳定性、结合和细胞毒性研究。制备细胞裂解物,并对p21<sup>Waf1/Cip</sup>、p53和PARP(聚-ADP-核糖聚合酶)进行免疫印迹法。

[0461] 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替换比率,500 $\mu$ g ADC对20-g小鼠(25mg/kg)的剂量含有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)。4-8周龄的NCr雌性无胸腺裸(nu/nu)小鼠以及10周龄的雄性Swiss-Webster小鼠购自Taconic Farms。可耐受性研究由SNBL USA, Ltd.在食蟹猴(成束猴(Macaca fascicularis); 2.5-4kg雄性和雌性)中进行。对动物皮下植入不同的人癌细胞系。肿瘤体积(TV)通过使用游标卡尺以二维测量来确定,体积定义为:L $\times$ w<sup>2</sup>/2,其中L是肿瘤的最长维度,并且w是最短的。治疗开始时,肿瘤大小范围为0.10至0.47cm<sup>3</sup>。结果中描述了每个实验中的治疗方案、剂量和动物数量。将冻干的hRS7-CL2A-SN-38和对照ADC重建并按需要在无菌生理盐水中稀释。除静脉内施用的伊立替康外,所有试剂腹膜内注射(0.1mL)。给药方案受到我们先前的研究的影响,其中每4天或每周两次给予ADC达不同的时间长度(Moon等人, 2008, J Med Chem 51:6916-26; Govindan等人, 2009, Clin Cancer Res 15:6052-61)。该给药频率反映了缀合物的体外血清半衰期的考虑,以允许更持续暴露于ADC。

[0462] 统计量。生长曲线确定为初始TV随时间的变化百分比。肿瘤生长的统计分析基于曲线下面积(AUC)。通过线性曲线建模获得单独的肿瘤生长的特征。在统计分析生长曲线之前,使用f-检验来确定组间的等方差性(equality of variance)。除使用单因素t检验的盐水对照( $P \leq 0.05$ )外,使用双因素t检验评估各处理组和对照之间的统计学显著性。仅进行AUC的统计学比较,直至组内的第一只动物由于进展而实施安乐死为止。

[0463] 药代动力学和生物分布。将<sup>111</sup>In-放射性标记的hRS7-CL2A-SN-38和hRS7IgG注射入携带s.c SK-MES-1肿瘤(约0.3cm<sup>3</sup>)的裸小鼠中。给一组静脉内注射20 $\mu$ Ci(250- $\mu$ g蛋白质)的<sup>111</sup>In-hRS7-CL2A-SN-38,而另一组接受20 $\mu$ Ci(250- $\mu$ g蛋白质)的<sup>111</sup>In-hRS7IgG。在各时间点,将小鼠(每个时间点5只)麻醉,通过心内穿刺放血,然后实施安乐死。取出肿瘤和各种组织,称重,并通过 $\gamma$ 闪烁计数以确定每克组织的注射剂量百分比(% ID/g)。在施用<sup>111</sup>In-hRS7-CL2A-SN-38之前3天,给第三组注射250 $\mu$ g未标记的hRS7-CL2A-SN-38,并同样进行尸检。使用f-检验确定等方差性后,使用2因素t检验比较hRS7-CL2A-SN-38和hRS7IgG摄取。使用WinNonLin软件(Parsight Corp.)进行对血液清除的药代动力学分析。

[0464] Swiss-Webster小鼠和食蟹猴中的可耐受性。简而言之,将小鼠分成4组,每组在第

0天和第3天时接受2-mL i.p.注射的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) ,随后进行血液和血清收集,如结果中所述。对食蟹猴(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。在结果中描述了用于评估可能的血液学毒性和血清化学的剂量、次数和放血的猴数量。

[0465] 结果

[0466] hRS7-CL2A-SN-38的稳定性和效力。使用两种不同的键联将SN-38缀合至hRS7 IgG。第一种称为CL2-SN-38,并且先前已有描述(Moon等人,2008,J Med Chem 51:6916-26; Govindan等人,2009,Clin Cancer Res 15:6052-61)。由于除去苯丙氨酸部分,对CL2接头的合成做出改变。这种改变简化了合成,但不影响缀合结果(例如,CL2-SN-38和CL2A-SN-38两者并入每个IgG分子约6个SN-38)。并排比较发现在血清稳定性、抗原结合或体外细胞毒性方面没有显著差异(未显示)。

[0467] 为了确认从CL2到CL2A的SN-38接头的变化不影响体内效力,在带有COLO 205或Capan-1肿瘤的小鼠中比较hRS7-CL2A和hRS7-CL2-SN-38(未显示),分别使用0.4mg或0.2mg/kg SN-38每周两次×4周,并且在两项研究中使用0.25cm<sup>3</sup>大小的起始肿瘤。hRS7-CL2A和CL2-SN-38缀合物两者与未处理(COLO 205模型中AUC<sub>14天</sub>P<0.002对盐水;Capan-1模型中AUC<sub>21天</sub>P<0.001对盐水),和非靶向抗CD20对照ADC,hA20-CL2A-SN-38(COLO 205模型中AUC<sub>14天</sub>P<0.003;Capan-1模型中AUC<sub>35天</sub>:P<0.002)相比显著抑制肿瘤生长。在Capan-1模型中的研究结束时(第140天),50%的用hRS7-CL2A-SN-38处理的小鼠和40%的hRS7-CL2-SN-38小鼠是无瘤的,而只有20%的经hA20-ADC处理的动物没有可见的疾病迹象。重要的是,在两种肿瘤模型中,2种特异性缀合物之间的效力没有差异。

[0468] 作用机制。体外细胞毒性研究表明,hRS7-CL2A-SN-38针对几个不同的实体瘤系具有nmol/L范围内的IC<sub>50</sub>值(表9)。游离SN-38的IC<sub>50</sub>在所有细胞系中低于缀合物。尽管TROP-2表达与对hRS7-CL2A-SN-38的敏感性之间没有相关性,但是在TROP-2表达更高的细胞中,ADC对游离SN-38的IC<sub>50</sub>比率更低,最可能反映了当存在更多的抗原时使药物内化的能力增强。

[0469] 表9:在几种实体瘤系中TROP-2的表达和SN-38和hRS7-SN-38的体外细胞毒性

[0470]	细胞系	通过 FACS 的 TROP-2 表达		细胞毒性结果				
		中值荧光(背景)	百分比阳性	SN-38	95% CI	hRS7-SN-38 <sup>a</sup>	95% CI	ADC/游离 SN-38 比率

			IC <sub>50</sub> (nmol/L)					
							Calu-3 (4.7)	COLO 205 (4.5)
[0471]	Calu-3	282.2	99.6%	7.19	5.77–8.95	9.97	8.12–12.2	1.39
	COLO 205	141.5	99.5%	1.02	0.66–1.57	1.95	1.26–3.01	1.91
	Capan-1	100.0	94.2%	3.50	2.17–5.65	6.99	5.02–9.72	2.00
	PC-3	46.2	73.6%	1.86	1.16–2.99	4.24	2.99–6.01	2.28
	SK-MES-1	44.0	91.2%	8.61	6.30–11.7	23.14	17.98–29.	2.69
	BxPC-3	26.4	98.3%	1.44	1.04–2.00	4.03	3.25–4.98	2.80

[0472] <sup>a</sup>IC<sub>50</sub>值显示为hRS7–SN–38的SN–38当量

[0473] 已知SN–38激活细胞中的几种信号传导途径,导致细胞凋亡。我们最初的研究在体外检测了涉及早期信号传导事件的2种蛋白质(p21<sup>Waf1/Cip1</sup>和p53)和1种涉及晚期凋亡事件[多聚ADP–核糖聚合酶(PARP)的切割]的蛋白质的表达(未显示)。在BxPC–3中,SN–38导致p21<sup>Waf1/Cip1</sup>表达增加20倍,而hRS7–CL2A–SN–38导致仅增加10倍,与在此细胞系中用游离SN–38得到的较高活性一致的发现(表9)。然而,hRS7–CL2A–SN–38相对于游离SN–38使Calu–3中的p21<sup>Waf1/Cip1</sup>表达增加超过2倍(未显示)。

[0474] 在p53表达中观察到hRS7–CL2A–SN–38和游离SN–38介导的信号传导事件之间更大的差异。在BxPC–3和Calu–3两者中,用游离SN–38的p53上调不明显,直到48小时,而hRS7–CL2A–SN–38在24小时内上调p53(未显示)。另外,与SN–38相比,暴露于ADC的细胞中的p53表达在这两种细胞系中更高(未显示)。令人感兴趣的是,尽管hRS7IgG对p21<sup>Waf1/Cip1</sup>表达没有明显的影响,但它确实诱导了BxPC–3和Calu–3两者中p53的上调,但仅在暴露48小时之后。就后来的细胞凋亡事件而言,当与SN–38或缀合物一起温育时,PARP的切割在这两种细胞系中都是明显的(未显示)。切割的PARP的存在在BxPC–3中在24小时时更高,这与p21的高表达和其较低的IC<sub>50</sub>相关。游离SN–38相对于ADC得到的更高程度的切割与细胞毒性发现一致。

[0475] hRS7–SN–38的效力。因为TROP–2在几种人瘤中广泛表达,所以在几种不同的人瘤症模型中进行了研究,其从hRS7–CL2–SN–38键联的评估开始,但随后使用具有CL2A连接的缀合物。与施用相当量的hLL2–CL2–SN–38的动物相比,每4天×4给予0.04mg SN–38/kg hRS7–CL2–SN–38的Calu–3荷瘤裸小鼠具有显著改进的应答(分别为TV=0.14±0.22cm<sup>3</sup>对0.80±0.91cm<sup>3</sup>;AUC<sub>42天</sub>P<0.026;图5A)。当剂量增加到0.4mg/kg SN–38时观察到剂量响应。在此较高的剂量水平下,给予特异性hRS7缀合物的所有小鼠在28天内“治愈”,并且保持无瘤状态直到第147天的研究结束,而用无关ADC治疗的动物肿瘤再生(特异性对无关AUC<sub>98天</sub>:P=0.05)。在接受hRS7IgG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<sup>3</sup>;AUC<sub>56天</sub>P<0.006对hRS7–CL2–SN–38)。

[0476] 在人结肠(COLO 205)和胰腺(Capan–1)肿瘤异种移植物中也检测了效力。在COLO 205荷瘤动物中(图5B),hRS7–CL2–SN–38(0.4mg/kg,q4dx8)在28天的治疗期内防止肿瘤生长,与对照抗CD20 ADC(hA20–CL2–SN–38)或hRS7 IgG相比具有显著更小的肿瘤(分别为TV=0.16±0.09cm<sup>3</sup>,1.19±0.59cm<sup>3</sup>和1.77±0.93cm<sup>3</sup>;AUC<sub>28天</sub>P<0.016)。伊立替康(24mg SN–

38/kg, q2dx5) 的MTD与hRS7-CL2-SN-38一样有效,因为小鼠血清可以比人血清更有效地将伊立替康转化成SN-38,但是伊立替康中的SN-38剂量(2400 $\mu$ g累积)比缀合物(总共64 $\mu$ g)大37.5倍。

[0477] 当以与hRS7-CL2-SN-38缀合物相当的SN-38剂量给予时,带有Capan-1的动物对单独的伊立替康没有显示明显的响应(例如,在第35天,平均肿瘤大小为在给予0.4mg SN-38/kg hRS7-SN-38的动物中0.04±0.05cm<sup>3</sup>对给予0.4mg/kg SN-38的经伊立替康处理的动物中1.78±0.62cm<sup>3</sup>;AUC<sub>第35天</sub>P<0.001;图5C)。当伊立替康剂量增加10倍至4mg/kg SN-38时,响应改善,但仍不如0.4mg/kg SN-38剂量水平的缀合物显著(TV=0.17±0.18cm<sup>3</sup>对1.69±0.47cm<sup>3</sup>,AUC<sub>第49天</sub>P<0.001)。与伊立替康处理的动物相比,等剂量的非靶向性hA20-CL2-SN-38也具有显著的抗肿瘤作用,但是特异性hRS7缀合物显著优于无关的ADC(TV=0.17±0.18cm<sup>3</sup>对0.80±0.68cm<sup>3</sup>,AUC<sub>第49天</sub>P<0.018)。

[0478] 随后将hRS7-CL2A-SN-38 ADC的研究扩展到2种其它人上皮癌模型。在携带BxPC-3人胰腺肿瘤的小鼠中(图5D),与用盐水或等量的非靶向性hA20-CL2A-SN-38(分别为TV=0.24±0.11cm<sup>3</sup>对1.17±0.45cm<sup>3</sup>和1.05±0.73cm<sup>3</sup>;AUC<sub>第21天</sub>P<0.001),或以高10倍的SN-38当量剂量给予的伊立替康(分别为TV=0.27±0.18cm<sup>3</sup>对0.90±0.62cm<sup>3</sup>;AUC<sub>第25天</sub>P<0.004)处理的对照小鼠相比,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5E),肿瘤生长抑制优于生理盐水或未缀合的hRS7 IgG(分别为TV=0.36±0.25cm<sup>3</sup>对1.02±0.70cm<sup>3</sup>和1.30±1.08cm<sup>3</sup>;AUC<sub>第28天</sub>,P<0.043),而非靶向hA20-CL2A-SN-38或伊立替康MTD提供了与特异性hRS7-SN-38缀合物相同的抗肿瘤作用。在所有的小鼠研究中,hRS7-SN-38 ADC在体重减轻方面是良好耐受的(未显示)。

[0479] hRS7-CL2A-SN-38的生物分布。使用各自的<sup>111</sup>In-标记的底物,在携带SK-MES-1人鳞状细胞肺肿瘤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(未显示)。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(未显示)。ADC比等量的未缀合的hRS7更快清除,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的影响(未显示)。虽然在24小时和48小时的时间点上有显著差异,但到72小时(峰值摄取),这两种药剂在肿瘤中的量是相似的。在正常组织中,肝脏和脾脏差异是最显著的(未显示)。在注射后24小时,肝中的hRS7-CL2A-SN-38比hRS7 IgG多>2倍。相反,在脾脏中,在峰值摄取时(48小时时间点)存在比hRS7-CL2A-SN-38多3倍的母体hRS7 IgG。其余组织中的摄取和清除通常反映血液浓度的差异。

[0480] 由于给予每周两次的剂量用于治疗,所以检测了注射<sup>111</sup>In标记的抗体之前3天首先接受预剂量0.2mg/kg(250 $\mu$ g蛋白质)的hRS7ADC的一组动物中的肿瘤摄取。与没有接受预剂量的动物相比,在预先给药的小鼠中<sup>111</sup>In-hRS7-CL2A-SN-38的肿瘤摄取在每个时间点显著降低(例如,在72小时,预给药的肿瘤摄取为12.5%±3.8%ID/g对在未给予预给药的动物中25.4%±8.1%ID/g;P=0.0123)。预给药对血液清除或组织摄取没有明显的影响(未显示)。这些研究表明,在一些肿瘤模型中,特异性抗体的肿瘤增殖可以通过前面的剂量减少,这可能解释了为何治疗应答的特异性可以随着ADC剂量的增加而减少以及为何未指示进一步剂量递增。

[0481] Swiss-Webster小鼠和食蟹猴中hRS7-CL2A-SN-38的可耐受性。Swiss-Webster小

鼠在3天内耐受2个剂量,各4、8和12mg SN-38/kg hRS7-CL2A-SN-38,具有最小的短暂体重减轻(未显示)。没有发生造血毒性,并且血清化学只揭示升高的天冬氨酸转氨酶(AST)和丙氨酸转氨酶(未显示)。在治疗后7天,在所有3个处理组中,AST升至正常水平(>298U/L)以上(未显示),其中小鼠的最大比例在2×8mg/kg组中。但是,到治疗后15天,大部分动物在正常范围内。在治疗7天内,ALT水平也高于正常范围(>77U/L)(未显示),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没有显示组织损伤的组织学证据(未显示)。在肾功能方面,只有葡萄糖和氯化物水平在治疗组中略有升高。在2×8mg/kg下,7只小鼠中的5只小鼠具有略微升高的葡萄糖水平(范围为273-320mg/dL,正常上限263mg/dL),其到注射后15天恢复正常。类似地,氯化物水平略微升高,在2个最高剂量组(2×8mg/kg组中57%的小鼠和2×12mg/kg组中100%小鼠)中范围为116至127mmol/L(正常范围上限115mmol/L),并保持升高到注射后15天。这也表明胃肠道毒性,因为大部分氯化物是通过肠道吸收获得的;然而,在终止时,在所检测的任何器官系统中都没有组织损伤的组织学证据(未显示)。

[0482] 因为小鼠不表达由hRS7结合的TROP-2,所以需要更合适的模型来确定hRS7缀合物用于临床应用的潜力。免疫组织化学研究揭示了在人和食蟹猴两者中多种组织(乳房、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;未显示)中的结合。基于此交叉反应性,在猴中进行了可耐受性研究。

[0483] 接受2×0.96mg SN-38/kg hRS7-CL2A-SN-38的组在输注后并且到研究结束没有显著的临床事件。体重减轻不超过7.3%,并到第15天恢复到顺应体重。在大部分血液计数数据(未显示)中注意到短暂降低,但是数值并未低于正常范围。在血清化学中没有发现异常值。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在造血器官(胸腺、下颌骨和肠系膜淋巴结、脾和骨髓)、胃肠器官(胃、十二指肠、空肠、回肠、盲肠、结肠和直肠)、雌性生殖器官(卵巢、子宫和阴道)和注射部位的微观变化。这些变化范围为最小到中等,并且在恢复期结束时(第32天)在所有组织中完全逆转,除了胸腺和胃肠道(它们趋向于在此后来的时间点时完全恢复)外。

[0484] 在缀合物的2×1.92mg SN-38/kg剂量水平下,存在源自胃肠道并发症和骨髓抑制的1例死亡,并且此组内的其它动物显示了与2×0.96mg/kg组相比相似的但更严重的不良事件。这些数据表明剂量限制性毒性与伊立替康的毒性相同;即肠和血液学。因此,hRS7-CL2A-SN-38的MTD位于2×0.96-1.92mg SN-38/kg之间,这代表2×0.3-0.6mg/kg SN-38的人当量剂量。

[0485] 讨论

[0486] 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,使其成为递送细胞毒性剂的潜在重要靶标。当与TROP-2结合时,RS7抗体内化(Shih等人,1995,Cancer Res 55:5857s-63s),这实现细胞毒素的直接细胞内递送。

[0487] 已经探索了化疗药物与抗体的缀合达30多年。由于大部分ADC不被肿瘤加工,而是由正常组织加工,所以存在这些药物在达到肿瘤中治疗水平之前对正常器官系统的毒性过大的风险。与任何治疗一样,治疗窗是决定ADC潜力的关键因素,因此我们选择SN-38作为TROP-2靶向性ADC的药物组分,而不是检测“超毒性”药物。

[0488] SN-38是有效的拓扑异构酶-I抑制剂,在几个细胞系中具有纳摩尔范围内的IC<sub>50</sub>值。用于治疗结肠直肠癌,并且在肺癌、乳腺癌和脑癌中也有活性的正是前药伊立替康的活性形式。我们推断ADC形式的直接靶向性SN-38相对于CPT-11通过克服后者的较低的且患者可变的对活性SN-38的生物转化将是显著改进的治疗剂。

[0489] 插入原始CL2衍生物中的Phe-Lys肽允许通过组织蛋白酶B进行的可能的切割。为了简化合成过程,在CL2A中,消除了苯丙氨酸,因此除去了组织蛋白酶B切割位点。令人感兴趣的是,与用CL2获得的宽特征相比,该产物具有更好的层析特征(未显示),但更重要的是,这种改变在并排测试中对缀合物的结合、稳定性或效力没有影响。这些数据表明,主要通过在与SN-38的内酯环的pH敏感性碳酸苄酯键而非组织蛋白酶B切割位点处切割从缀合物释放CL2中的SN-38。

[0490] hRS7ADC对一系列实体瘤细胞系的体外细胞毒性始终具有nmol/L范围内的IC<sub>50</sub>值。然而,暴露于游离SN-38的细胞与ADC相比表明更低的IC<sub>50</sub>值。对于ENZ-2208 (Sapra等人, 2008, Clin Cancer Res 14:1888-96) 和NK012 (Koizumi等人, 2006, Cancer Res 66:10048-56) 也报道了游离的和缀合的SN-38之间的此种差异)。ENZ-2208利用分支PEG连接每个PEG约3.5-4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,随着肿瘤细胞中TROP-2表达水平的增加,这种差异(即,游离的对缀合的SN-38的效力比率)降低,这表明了靶向递送药物的优势。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小时的t<sub>1/2</sub>,这与对ENZ-2208报道的短t<sub>1/2</sub>12.3分钟 (Zhao等人, 2008, Bioconjug Chem 19:849-59) 形成对比,但类似于在生理条件下24小时后从NK012的57% SN-38释放 (Koizumi等人, 2006, Cancer Res 66:10048-56)。

[0491] 用hRS7-SN-38(具有CL2-SN-38或CL2A-SN-38)治疗带有肿瘤的小鼠显著抑制5种不同肿瘤模型中的肿瘤生长。在它们中的4种中,观察到肿瘤消退,并且在Calu-3的情况下,在研究结束时,所有接受最高剂量hRS7-SN-38的小鼠均无肿瘤。与人中不同,伊立替康在小鼠中通过血浆酯酶以大于50%的转化率非常有效地转化为SN-38,并且在小鼠中比在人中产生更高的效力。当伊立替康以高10倍等同的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的其MTD(多37.5倍的SN-38)施用时,其的确等于hRS7-SN-38的效率。在患者中,我们预计此优势更有利于hRS7-CL2A-SN-38,因为伊立替康的生物转化率将大大降低。

[0492] 我们还在一些表达抗原的细胞系(如SK-MES-1)中显示,使用抗原结合性ADC未保证比非结合性无关缀合物更好的治疗响应。这不是一个不常见的或意想不到的发现。实际上,当与伊立替康相比时,早先提到的非结合性SN-38缀合物增强了治疗活性,因此预期无关的IgG-SN-38缀合物具有一些活性。这与肿瘤具有未成熟的泄漏血管,这允许比正常组织更好地使大分子通过的事实相关。使用我们的缀合物,当pH降低到模拟溶酶体水平的水平(例如,37°C下的pH 5.3;数据未显示)时,50%的SN-38将在约13小时内释放,而在血清的中性pH,释放速度降低近2倍。如果无关的缀合物进入酸性肿瘤微环境,则预期会局部释放一些SN-38。其它因素,如肿瘤生理学和对药物的先天敏感性,也将在确定这种“基线”活性中发挥作用。然而,只要有足够的抗原捕获特异性抗体,具有较长停留时间的特异性缀合物应当具有相对于该基线响应提高的效力。SK-MES-1模型中的生物分布研究还显示,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,这产生类似于用无关缀

合物发现的治疗结果。

[0493] 尽管在我们的ADC和其它SN-38递送剂的公开报告之间进行直接比较是有挑战性的,但是可以进行一些一般的观察。在我们的治疗研究中,最高的单独剂量是0.4mg/kg SN-38。在Calu-3模型中,在20g小鼠中对于总累积剂量1.6mg/kg SN-38或32 $\mu$ gSN-38只给予4次注射。用ENZ-2208的多次研究使用10mg/kg  $\times$  5的其MTD进行,并且用NK012进行的临床前研究涉及30mg/kg  $\times$  3的其MTD。因此,显著的抗肿瘤效果用分别比ENZ-2208和NK012中报道的剂量少30倍和55倍SN-38当量的hRS7-SN-38获得。即使小10倍的hRS7 ADC (0.04mg/kg),也观察到显著的抗肿瘤效果,而较低剂量的ENZ-2208未呈现出来,并且当NK012剂量降低4倍至7.5mg/kg时,丧失效力(Koizumi等人,2006,Cancer Res 66:10048-56)。正常小鼠没有显示急性毒性,在1周内累积剂量为24mg/kg SN-38 (1,500mg/kg缀合物),表明MTD更高。因此,用低7.5-15倍量的SN-38当量有效治疗荷瘤动物。

[0494] 作为拓扑异构酶-I抑制剂,SN-38诱导细胞DNA的显著损伤,其中p53和p21<sup>WAF1/Cip1</sup>的上调导致胱天蛋白酶激活和PARP的切割。当我们BxPC-3和Calu-3细胞暴露于ADC时,p53和p21<sup>WAF1/Cip1</sup>两者均上调,高于基础水平。另外,在两种细胞系中PARP的切割也是明显的,证实了这些细胞中的凋亡事件。感兴趣的是相对于p53,在由游离的SN-38和我们的hRS7-SN-38两者对BxPC-3和Calu-3中的p21<sup>WAF1/Cip1</sup>的更高的上调。这可以指示这2种细胞系中p53突变状态以及p21<sup>WAF1/Cip1</sup>介导的凋亡的p53非依赖性通路的使用。

[0495] 令人感兴趣的观察结果是相对于游离SN-38,hRS7-ADC介导的24小时时BxPC-3和Calu-3两者中p53的早期上调。甚至裸的hRS7IgG可以在这些细胞系中上调p53,尽管仅在暴露48小时之后。已经将TROP-2过表达和抗体交联与几种MAPK相关的信号传导事件以及胞内钙释放联系起来。尽管hRS7的结合不足以诱导BxPC-3和Calu-3中的凋亡,如由PARP切割缺乏所证明的,它可能足以引发细胞,使得包含与hRS7缀合的SN-38可以导致对肿瘤生长的更大的抑制作用。目前进行研究以了解哪些途径参与SN-38的hRS7传递,以及它们可以与游离的SN-38多么不同,以及p53信号在这种信号传导中可以发挥何种作用。

[0496] 生物分布研究揭示了hRS7-CL2A-SN-38具有与母体hRS7IgG类似的肿瘤摄取,但以高2倍的肝摄取明显更快地清除,这可能是由于SN-38的疏水性。随着ADC通过肝脏清除,肝和胃肠毒性预计会受到剂量限制。虽然小鼠有肝转氨酶升高的证据,但胃肠道毒性最好是轻微的,只有短期的体重减轻,组织病理学检测后没有发现异常。令人感兴趣的是,未见血液学毒性。然而,猴显示与对伊立替康预期相同的毒性特征,胃肠和血液毒性是剂量限制性的。

[0497] 因为hRS7识别的TROP-2不在小鼠中表达,所以在具有与人相似的TROP-2组织表达的猴中进行毒性研究是非常重要的。猴耐受0.96mg/kg/剂量(约12mg/m<sup>2</sup>),具有轻度和可逆的毒性,这外推到约0.3mg/kg/剂量(约11mg/m<sup>2</sup>)的人剂量。在NK012的I期临床试验中,实体瘤患者耐受每3周28mg/m<sup>2</sup>的SN-38,具有4级中性粒细胞减少症作为剂量限制性毒性(Hamaguchi等人,2010,Clin Cancer Res 16:5058-66)。类似地,使用ENZ-2208的I期临床试验揭示了剂量限制性发热性中性粒细胞减少症,建议每3周施用10mg/m<sup>2</sup>或者如果对患者施用G-CSF则为16mg/m<sup>2</sup>。由于猴耐受22mg/m<sup>2</sup>的累积人当量剂量,所以可能的是即使hRS7结合到许多正常组织,用于hRS7ADC单一处理的MTD可以类似于其它非靶向性SN-38剂的MTD。事实上,抗TROP-2抗体的特异性似乎在限定DLT中没有起作用,因为毒性特征与伊立替康的

毒性特征相似。更重要的是,如果可以用仅0.03mg SN-38当量/kg/剂量的人当量剂量与在响应的小鼠中一样在人中实现抗肿瘤活性,那么在临幊上就可以实现显著的抗肿瘤响应。

[0498] 总之,猴的毒理学研究与小鼠中体内人癌症异种移植物模型相结合表明,靶向TROP-2的这种ADC在不同上皮来源的几种肿瘤中是有效的治疗剂。

[0499] 实施例13:用于治疗血液恶性肿瘤的抗CD22(依帕珠单抗)缀合的SN-38

[0500] 我们先前发现,当用CL2A接头制备时,可以成功地使用与SN-38缀合的缓慢内化的抗体,所述CL2A接头允许每24小时大约50%的IgG-结合的SN-38在血清中解离。在该研究中,对于治疗B细胞恶性肿瘤检测了分别用依帕珠单抗(迅速内化)和维妥珠单抗(缓慢内化),即人源化抗CD22和抗CD20 IgG制备的SN-38缀合物的效力。这两种抗体-药物缀合物都针对多种人淋巴瘤/白血病细胞系具有类似的纳摩尔活性,但是SN-38的缓慢释放甚至损害相对于无关缀合物的体外效力区分。当SN-38与抗CD22缀合物稳定连接时,其效力降低40-55倍。因此,只有用较不稳定、缓慢解离的CL2A接头进行进一步的研究。在体内,即使Ramos表达比CD22多15倍的CD20,在携带Ramos异种移植物的小鼠中CD22和CD20抗体-药物缀合物之间发现了类似的抗肿瘤活性,表明依帕珠单抗-SN-38缀合物(Emab-SN-38)的内化增强了它的活性。Emab-SN-38在体内比非结合性无关IgG-SN-38缀合物更有效,在无毒剂量下消除大部分完善建立的Ramos异种移植物。体外和体内研究显示Emab-CL2A-SN-38可以与未缀合的维妥珠单抗联合以实现更有效的治疗。因此,Emab-SN-38在远低于毒性水平的剂量下在淋巴瘤和白血病中有活性,因此代表单独或与抗CD20抗体疗法组合的具有治疗潜力的新的有希望的药剂。(Sharkey等人,2011,Mol Cancer Ther 11:224-34)。

[0501] 引言

[0502] 大量努力集中于白血病和淋巴瘤的生物治疗,其中未缀合的抗体(例如,利妥昔单抗、阿仑珠单抗、奥法木单抗)、放射免疫缀合物(<sup>90</sup>Y-替伊莫单抗、<sup>131</sup>I-托西莫单抗)和药物缀合物(吉妥珠单抗奥佐米星)获得美国食品和药物管理局(FDA)的批准。另一种抗体-药物缀合物(ADC)本妥昔单抗维多汀(SGN-35;抗CD30-奥瑞斯他汀E)最近获得了FDA加速批准用于霍奇金氏淋巴瘤和间变性大细胞淋巴瘤。在临床前和临床开发中还有许多其它的ADC,其靶向CD19、CD22、CD37、CD74和CD79b。

[0503] 针对所有这些靶标的抗体是药物载体的合理选择,因为它们是内化的。CD22的内化和特异性使其成为白血病和淋巴瘤的一个特别重要的靶标,临床研究中至少有3种不同的抗CD22缀合物,包括CMC-544(酸不稳定缀合的加利车霉素)、抗CD22-美坦辛缀合物(稳定连接MCC-DM1)和CAT-3888(正式为BL22;假单胞菌外毒素单链融合蛋白)。所有这些缀合物中的活性剂具有亚纳摩尔效力(即所谓的超毒性剂)。

[0504] 我们最近开发了将抗体与SN-38(衍生自前药伊立替康的具有低纳摩尔效能的拓扑异构酶I抑制剂)缀合的方法(Govindan等人,2009,Clin Cancer Res 15:6052-62;Moon等人,2008,J Med Chem 51:6916-26)。首先使用用缓慢内化的抗CEACAM5抗体制备的缀合物检测四种SN-38键联化学物(Govindan等人,2009,Clin Cancer Res 15:6052-62;Moon等人,2008,J Med Chem 51:6916-26)。缀合物保留了CEACAM5结合,但SN-38在人血清中的解离速率不同,半衰期从约10至67小时变化(Govindan等人,2009,Clin Cancer Res 15:6052-62)。最终,选择具有中间体稳定性(在24-35小时内解离约50%)的称为CL2的接头用于进一步开发。最近对CL2进行了修饰,消除了组织蛋白酶B可切割的二肽中的苯丙氨酸,以

简化并改善制造产率。新的衍生物(称为CL2A)保留对SN-38的pH敏感性碳酸酯键联,但不再被组织蛋白酶B选择性切割。然而,它具有与原始CL2接头相同的血清稳定性和体内活性(Cardillo等人,2011,Clin Cancer Res 17:3157-69)。因为用缓慢内化的抗CEACAM5-SN-38发现了没有毒性的显著效力,所以我们推测其在肿瘤中定位后从抗体缓慢释放SN-38有助于其活性。因此,本报告的主要目的是评估用两种抗体使用CL2A接头制备的缀合物的治疗前景,所述抗体对B细胞癌高度特异但在其抗原表达和内化特性上不同。

[0505] 依帕珠单抗(Emab)是快速内化的(例如,在1小时内 $\geq 50\%$ )人源化抗CD22IgG1,其已经在淋巴瘤和白血病中以非缀合物或缀合形式广泛评估。维妥珠单抗(Vmab)是一种人源化抗CD20抗体,其也正在临床研究,但缓慢内化(例如,在1小时内约10%)。CD20在非霍奇金氏淋巴瘤中通常以比CD22高得多的水平表达,而CD22优选在急性淋巴母细胞性白血病(ALL)中表达,而不是在多发性骨髓瘤中表达。这两种抗体在患者中作为未缀合的试剂是有效的,但是只有维妥珠单抗在鼠异种移植模型中有活性(Stein等人,2004,Clin Cancer Res 10:2868-76)。基于显示与未缀合的维妥珠单抗组合的<sup>90</sup>Y-Emab在NHL模型中具有增强的效力的先前研究(Mattes等人,2008,Clin Cancer Res 14:6154-60),我们还检测了Emab-SN-38+Vmab组合,因为这可以提供额外的益处而不会竞争相同的靶抗原或具有额外的毒性。

#### [0506] 材料和方法

[0507] 细胞系。Ramos、Raji、Daudi(伯基特淋巴瘤)和JeKo-1(套细胞淋巴瘤)购自美国典型培养物保藏中心。REH、RS4;11、MN-60和697(ALL)购自德国微生物菌种保藏中心(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen)。WSU-FSCCL(滤泡性NHL)由Mitchell R. Smith博士(Fox Chase癌症中心,Philadelphia,PA)赠予。所有的细胞系都在含有10-20%胎牛血清的推荐的补充培养基中,在37°C的湿润CO<sub>2</sub>培养箱(5%)中培养,并定期检测支原体。

[0508] 抗体和缀合方法。依帕珠单抗和维妥珠单抗分别是人源化抗CD22和抗CD20 IgG1单克隆抗体。将人源化抗CEACAM5 IgG1拉贝珠单抗(Lmab)和人源化抗TROP-2抗体RS7(均来自Immunomedics, Inc.)用作非结合性无关对照。在本文中,Emab-SN-38、Vmab-SN-38和Lmab-SN-38是指使用上述CL2A接头制备的缀合物。人血清中的体外研究显示每天从IgG中释放大约50%的活性SN-38部分(Cardillo等人,2011,Clin Cancer Res 17:3157-69)。称为CL2E的另一种接头(参见美国专利号7,999,083和8,080,250)在14天内在人血清中是稳定的,但是它含有组织蛋白酶B切割位点以便在溶酶体中处理时促进SN-38的释放。在美国专利号7,999,083和8,080,250中给出了制备CL2E的方法以及CL2A和CL2E接头的结构。缀合物含有每个IgG约6个SN-38单位(例如,1.0mg的IgG-SN-38缀合物含有约16 $\mu$ g的SN-38)。

[0509] 体外细胞结合和细胞毒性。使用在4°C温育1小时的未缀合的特异性和无关的抗体进行流式细胞术,使用也在4°C温育1小时的异硫氰酸荧光素(FITC)-Fc $\gamma$ 片段特异性山羊抗人IgG(Jackson ImmunoResearch)揭示结合。使用Cell1Quest软件包在FACSCALIBUR®流式细胞仪(Becton Dickinson)上测定中值荧光。

[0510] 使用MTS染料还原测定法(Promega)测定细胞毒性。剂量响应曲线[有/无山羊抗人Fc $\gamma$ F(ab')<sub>2</sub>; Jackson ImmunoResearch]由一式三份测定的平均值产生,并且使用PRISM® GraphPad软件(v5)计算IC<sub>50</sub>值,使用F检验对数据的最佳拟合曲线进行统计学

比较。显著性设定为P<0.05。

[0511] 免疫印迹法。在暴露于测试试剂24或48小时后,通过蛋白质印迹法揭示了早期(p21表达)和晚期(PARP裂解)凋亡的标志物。

[0512] 体内研究。通过从培养物(>95%存活力)中植入 $1 \times 10^7$ 个细胞(0.2mL)到4到6周岁的雌性裸小鼠(Taconic)中来启动皮下Ramos模型。从植入起三周,将肿瘤范围为0.4至 $0.8\text{cm}^3$ (通过卡尺测量,L×W×D)的动物分成各组具有相同肿瘤尺寸范围的动物。每周至少测量一次肿瘤大小和体重,当肿瘤长到 $3.0\text{cm}^3$ 时或者若它们经历体重减少20%或更多,则从研究中移除动物。在雌性重症联合免疫缺陷(SCID)小鼠(Taconic)中分别静脉注射 $2.5 \times 10^6$ 和 $1 \times 10^7$ 个细胞,开始静脉内WSU-FSCCL和697模型。WSU-FSCCL细胞施用后5天开始治疗,并在697接种后7天开始治疗。每天观察动物,使用后肢麻痹或其它发病迹象作为替代存活终点。所有治疗均在≤0.2mL中腹膜内给予。具体的剂量和频率在结果部分中给出。因为小鼠有效地将伊立替康转换成SN-38,所以伊立替康给药在SN-38当量的基础上调整;SN-38摩尔当量基于ADC质量的1.6%和伊立替康质量的60%。

[0513] 以Kaplan-Meier曲线表示效力,使用进展前时间(TTP)作为如上所示的替代存活终点。通过使用PRISM® GraphPad软件的对数秩检验进行统计分析(显著性,P<0.05)。

[0514] 结果

[0515] 抗原表达和体外细胞毒性。所有细胞系都对SN-38高度敏感,其中EC<sub>50</sub>值范围为对于Daudi为 $0.13\text{nmol/L}$ 到对于RS4;11为 $2.28\text{nmol/L}$ (表10)。除697和RS4;11外,Emab-SN-38抗CD22缀合物的效力比SN-38低2至7倍。这是我们的靶向性以及其它非靶向性的SN-38缀合物的常见发现。尽管在抗原表达方面存在差异,但是Emab-CL2A-SN-38和Vmab-CL2A-SN-38与非结合性Lmab-CL2A-SN-38抗CEACAM5缀合物具有相似的效力,这可能是由于在4天的MTS测定期间约90%SN-38的解离。使用较短暴露时间的其它体外程序也不能有效地区分缀合物效力的差异。例如,暴露1天后膜联蛋白V染色未能发现未处理的细胞和处理的细胞之间的差异(未显示)。p21的上调和PARP切割也分别作为凋亡的早期和晚期标志物进行检测。Ramos不表达p21。然而,检测到PARP切割,但仅在暴露48小时后,在SN-38处理的细胞中更强烈地表达(未显示)。WSU-FSCCL细胞系表达p21,但是p21上调和PARP切割都不明显,直到Emab-CL2A-SN-38暴露后48小时。然而,在用游离的SN-38暴露24小时后观察到这两者(未显示)。尽管游离SN-38的凋亡事件的强度增强和较早的激活与其相对于IgG缀合形式的更低EC<sub>50</sub>一致,但结果表明暴露期为至少48小时是必需的,但是此时大约75%SN-38将从缀合物中释放。

[0516] 表10:通过FACScan得到的CD20和CD22表达和通过SN-38和特异性Emab抗CD22-SN-38、Vmab抗CD20-SN-38和Lmab抗CEACAM5-SN-38缀合物的MTS测定法得到的针对几种造血肿瘤细胞系的体外细胞毒性

	CD20 表达	CD22 表达	EC <sub>50</sub> 值 <sup>a</sup>									
				细 胞 系	中 值	荧 光	中 值	荧 光	SN-38, 95%	Emab-SN-38, 95% CI	Vmab-SN-38, 95% CI	Lmab-SN-38, 95% CI
NHL:Burkitt												
	Raji	422.2 (6.8)	45.9 (6.8)		1.42	0.8–2.4	2.10	1.2–3.8	ND	—	ND	—
								4.61	2.2–9.5	4.88	2.7–9.0	3.73
	Ramo s	620.4 (4.1)	40.8 (4.1)		0.40	0.2–0.7	2.92	1.6–5.4	ND	—	ND	—
								9.84	4.5–21.6	13.56	4.9–37.2	8.08
	Daud i	815.1 (5.9)	145.0 (5.9)		0.13	0.1–0.2	0.52	0.4–0.7	ND	—	ND	—
[0517]	NHL:滤泡性 WSU											
	-FSC	97.4 (4.9)	7.7 (4.9)	0.50	0.3–1.0	0.68	0.4–1.1	ND	—	ND		
	CL							1.05	0.8–1.4	0.83	0.6–1.1	1.17
									0.8–1.7			.1
NHL:套细胞												
	Jeko-1	604.6 (6.5)	11.2 (6.5)	ND	—	2.25	1.3–3.8	1.98	1.1–3.5	2.27	1.3–3.9	
ALL:B 细胞												
	REH	12.3 (4.1)	22.9 (4.1)	0.47	0.3–0.9	1.22	0.8–1.9	ND	—	ND	—	
	697	6.9 (4.2)	16.0 (4.2)	2.23	1.3–3.9	2.67	1.7–3.7	ND	—	ND	—	
	RS4; 11	3.7 (4.1)	23.3 (4.1)	2.28	1.1–4.9	1.68	1.0–3.0	ND	—	ND	—	
	MN-60	21.5 (5.8)	10.3 (5.8)	1.23	0.6–2.1	3.65	2.2–6.2	ND	—	ND	—	

[0518] 缩写:CI, 置信区间;ND, 未确定。<sup>a</sup>EC<sub>50</sub>表示为Emab-SN-38中SN-38的摩尔当量。

[0519] 我们再次检测了PARP切割和p21表达, 这次在用Emab-CL2A-SN-38+Vmab处理的细胞中。确认在Ramos中的早期研究, PARP切割首先仅发生在暴露于缀合物48小时后, 在交联抗体存在下表达不变(未显示)。暴露于维妥珠单抗超过48小时对PARP切割没有影响, 但是当加入交联抗体时在24小时内切割强烈(未显示)。然而, 当维妥珠单抗单独(无交联剂)与Emab-CL2A-SN-38联合时, 在暴露24小时后发生PARP切割(未显示), 表明维妥珠单抗可诱导更快速的凋亡发生, 甚至在没有交联的情况下。在WSU-FSCCL细胞系中唯一显著的差异是该组合在48小时时极大地增强了p21表达(未显示), 再次表明维妥珠单抗与Emab-CL2A-SN-38缀合物组合时凋亡诱导的加速。与Ramos相比WSU-FSCCL中凋亡诱导的延迟可能通过CD22和CD20的较低表达来解释。

[0520] 超毒性剂通常使用在血清中高度稳定的接头, 因为它们的过早释放会增加毒性, 但是必须内化这些缀合物以最佳递送药物。因为依帕珠单抗快速内化, 所以我们检测了它是否可以从更稳定连接的SN-38中受益, 比较CL2A连接的Emab-SN-38缀合物与血清稳定的CL2E-SN-38缀合物的体外细胞毒性。这两种缀合物都具有相似的结合亲和力(未显示), 但是在3种细胞系中, 更稳定的Emab-CL2E-SN-38比CL2A缀合物的效力低大约40至55倍(未显

示)。尽管CL2A缀合物缺乏特异性,但Emab-CL2E-SN-38一致地比非结合性Lmab-抗CEACAM5-CL2E-SN-38缀合物具有多约两倍的效力(未显示)。我们推断,不太可能的是更稳定连接的缀合物适合于缓慢内化的维妥珠单抗缀合物,因此只能用CL2A连接的SN-38缀合物继续我们的研究。

[0521] 由于体外测定的限制,在异种移植模型中评估效力。如表10所示,所有的淋巴瘤细胞系都具有比CD22更高的CD20表达。Daudi具有最高的CD22和CD20表达,但它在体内对未缀合的维妥珠单抗是非常敏感的,并且体外测试揭示了对SN-38的最高的敏感性(表10)。这些性质可能使得难以评估归因于SN-38缀合物相对于未缀合抗体的活性差异,特别是当未缀合的依帕珠单抗不是动物中有效的治疗剂时。因为之前已经使用Ramos显示将<sup>90</sup>Y-Emab与维妥珠单抗组合的优势(Mattes等人,2008,Clin Cancer Res 14:6154-60),所以我们选择开始在Ramos人Burkitt细胞系中比较Emab-CL2A-SN-38和Vmab-CL2A-SN-38缀合物。尽管流式细胞术显示比CD22高15倍的CD20表达,但是Ramos异种移植物的免疫组织学显示丰富的CD22和CD20,其中CD22似乎比CD20更均匀地表达(未显示)。

[0522] 未治疗动物中的Ramos异种移植物迅速进展,在6天内从0.4cm<sup>3</sup>的起始大小达到3.0cm<sup>3</sup>终止大小(未显示),并且如先前所报道的,维妥珠单抗和依妥珠单抗都不明显地影响完善确立的Ramos异种移植物进展(Sharkey等人,2009,J Nucl Med 50:444-53)。与使用其它SN-38缀合物的先前发现一致,用4周、每周两次、0.5mg/剂量治疗方案治疗的动物都没有明显的体重减轻。这两种缀合物在控制肿瘤生长方面高度有效,到4周治疗结束,并且80%或更多的动物没有肿瘤迹象(图6)。0.25mg Vmab-CL2A-SN-38剂量在前4周内控制生长较好,但在0.5mg时,对于两种缀合物均观察到类似的早期生长控制。因此,尽管CD20表达比CD22高15倍,但有利的是将Emab-CL2A-SN-38与Vmab-CL2A-SN-38比较。因此,其余的研究集中在单独的或与未缀合的维妥珠单抗组合的Emab-SCL2A-N-38。

[0523] Emab-CL2A-SN-38剂量-响应和特异性。对特异性Emab-CL2A-SN-38和无关的Lmab-CL2A-SN-38缀合物观察到剂量-响应关系,但Emab-CL2A-SN-38在测试的3个水平中的2个具有显著更好的生长控制,并且具有有利于中间剂量的特异性缀合物的强烈趋势(图7)。再次,0.25mg的Emab-CL2A-SN-38消融大部分肿瘤;在这里,在12周的监测期结束时,10只动物中的7只是无瘤的,体重没有变化。单独给予伊立替康的动物(6.5μg/剂量;与0.25mg缀合物大致相同的SN-38当量)具有1.9周的中值存活,11只动物中的3只在研究结束时无肿瘤,这与无关的Lmab-CL2A-SN-38缀合物的3.45周的中值存活不是显著不同的(P=0.452;图7C)。

[0524] 在697-播散性白血病模型中,盐水处理的动物的中值存活仅为从肿瘤接种起17天。给予未缀合的依帕珠单抗加上伊立替康(与0.5mg缀合物相同摩尔当量的SN-38)的动物具有相同的中值存活,而从肿瘤接种起7天开始每周两次给予0.5mg Emab-CL2A-SN-38的动物存活至24.5天,显著长于未治疗的动物(P<0.0001)或与伊立替康一起给予未缀合的依帕珠单抗的动物(P=0.016)。然而,Emab-CL2A-SN-38并不显著优于无关缀合物(中值存活=22天;P=0.304),这最可能反映了该细胞系中CD22的低表达。

[0525] Emab-CL2A-SN-38与未缀合的Vmab抗CD20组合。我们先前报道了在皮下Ramos模型中<sup>90</sup>Y-Emab与未缀合的维妥珠单抗组合时改进的响应(Mattes等人,2008,Clin Cancer Res 14:6154-60),并且因此用Emab-CL2A-SN-38检测了此可能性。在一项初步研究中,对携带平均大约0.3cm<sup>3</sup>的皮下Ramos肿瘤的5只动物给予维妥珠单抗(0.1mg)、0.1mg Emab-CL2A-SN-

38或Emab-CL2A-SN-38+Vmab(所有药剂每周给予两次达4周)。到2.0cm<sup>3</sup>的中值TPP分别为22、14和77天以上(单独的维妥珠单抗对Emab-CL2A-SN-38,P=0.59;Emab-CL2A-SN-38+Vmab对Emab-CL2A-SN-38,P=0.0145),提供维妥珠单抗与Emab-CL2A-SN-38的组合改进了整体治疗响应的初步指示。在也使用每周2次、4周治疗方案的随访研究中,给予0.1mg Emab-CL2A-SN-38加0.1mg维妥珠单抗的11只动物中的6只在开始治疗起16周没有肿瘤的证据,而接受单独的或与0.1mg对照Lmab-CL2A-SN-38一起的维妥珠单抗的动物的中值存活分别为1.9和3.3周,其中11只动物中的3只在这些组的每组中在16周时无肿瘤(未示出)。尽管较长的中值TPP和更多的存活者,但两组之间没有发现显著差异。因此,在具有大量CD20和中等水平CD22的Ramos模型中,以无毒剂量水平给予的Emab-CL2A-SN-38缀合物没有显著优于未缀合的抗CD20疗法,但是添加Emab-CL2A-SN-38至未缀合的抗CD20疗法似乎改善了响应而没有毒性。重要的是强调SN-38缀合物的给药水平远低于其最大耐受剂量,因此这些结果不应解释为未缀合的抗CD20疗法等同于Emab-CL2A-SN-38缀合物的疗法。

[0526] 使用具有CD20和CD22低表达的WSU-FSCCL滤泡性NHL细胞系在静脉内植入模型中进行另外两项研究(未显示)。盐水处理的动物的中值存活时间是距肿瘤植入40至42天。以含有与0.3mg ADC相同的SN-38当量的剂量给予的单独伊立替康(未显示)增加中值存活(分别为49对40天,P=0.042),但15只动物中的14只在第49天是疾病进展的,同一天除去盐水组中15只动物中的最后4只(未显示)。尽管其CD20表达相对较低,但单独的维妥珠单抗(每周两次35μg×4周)在该模型中是有效的。在第一项研究中,中值存活增加至91天,2例治愈(161天),并且在第二项中增加至第77天,但是89天后没有存活者(单独的维妥珠单抗对盐水处理,这两项研究中P<0.001)。与伊立替康和维妥珠单抗组合的未缀合的依帕珠单抗(0.3mg/剂量)具有与单独维妥珠单抗相同的中值存活,表明依妥珠单抗和伊立替康都不促成净响应。

[0527] 如所预期的,由于WSU-FSCCL的低CD22表达,单独的Emab-CL2A-SN-38没有在Ramos中那样有效。在0.15mg剂量下,与盐水组相比没有看到显著的益处,但是在0.3mg时,中值存活增加到63天,与盐水处理的动物相比提供了显著的改进(P=0.006)。第二项研究使用0.3mg Emab-CL2A-SN-38,与盐水组相比证实存活增强(75对40天;P<0.0001)。该响应的特异性在第一项研究中不明显,其中在0.15或0.3mg剂量水平下,无关的Lmab-CL2A-SN-38缀合物和Emab-CL2A-SN-38的中值存活没有差异(在2个剂量水平下,对于Emab-CL2A-SN-38对抗CEACAM5-CL2A-SN-38缀合物分别为42对49天和63对63天)。然而,在第二项研究中,0.3mg剂量的Emab-CL2A-SN-38比无关缀合物提供显著改进的存活(75对49天;P<0.0001)。同样,在这个模型中显示特异性的困难最可能与低CD22表达有关。

[0528] 将特异性Emab-CL2A-SN-38与维妥珠单抗组合显著提高存活,具有比对照Lmab-CL2A-SN-38更强的响应的证据。例如,在第一项研究中,用维妥珠单抗加0.15或0.3mg对照缀合物治疗的动物分别具有98天和91天的中值存活,其与单独维妥珠单抗的中值存活(91天;未显示)相似。然而,维妥珠单抗加0.15mg特异性Emab-CL2A-SN-38缀合物使中值存活增加至140天。虽然这种改进并不显著高于单独的维妥珠单抗(P=0.257),但是与维妥珠单抗一起时将Emab-CL2A-SN-38剂量增加至0.3mg时,在研究结束时10只动物中的6只保持存活,提供相对于对照缀合物加维妥珠单抗的显著存活优势(P=0.0002)。在第二项研究中,单独的维妥珠单抗的中值存活比第一项中短(77对91天),而具有维妥珠单抗的对照缀合物的中

值存活时间仍为91天,现在这相对于单独维妥珠单抗产生显著的存活优势( $P<0.0001$ )。将特异性Emab-CL2A-SN-38缀合物与维妥珠单抗组合将中值存活延长至126天,这明显长于对于单独的Emab-CL2A-SN-38和维妥珠单抗分别的75和77天的中值存活(各自为 $P<0.0001$ )。然而,在这项研究中,相对于与对照抗CEACAM5-CL2A-SN-38缀合物的组合,它并不完全满足统计学改进的要求( $P=0.078$ )。

[0529] 讨论

[0530] 在过去10年中,ADC在癌症治疗方面已经取得了实质性的进步,但是也存在一些挫折。通常当研究人员选择检测毒性太强而不能单独使用的药物,但当与抗体缀合时,这些所谓的超毒性剂在临床前检测中产生了显著改进的响应时发生收获。最近将本妥昔单抗维多汀,一种奥瑞斯他汀缀合物批准用于霍奇金氏淋巴瘤以及曲妥珠单抗-DM1抗HER2-美坦辛缀合物作为单一药剂在对未缀合的曲妥珠单抗有抗性的乳腺癌中的临床成功表明,这些携带超毒性剂的ADC正成为接受的治疗形式。然而,用本身在皮摩尔范围中有效力的药剂制备的缀合物可以具有增加的毒性风险,如最近决定从市场召回抗CD33-加利车霉素缀合物吉妥珠单抗奥佐米星提出(Ravandi, 2011, J Clin Oncol 29:349-51)。因此,ADC的成功可以取决于鉴定合适的化学物质以将药物和抗体结合在一起,以及限定充分表达以允许细胞毒性剂的充分和选择性递送的合适的靶标。

[0531] 我们开发了用于将SN-38缀合到IgG的CL2A接头,其允许SN-38从血清中的缀合物缓慢释放(每天约50%)。用这种接头,缓慢内化的抗体可以是一种有效的治疗剂,可能是因为定位于肿瘤的缀合物即使没有被内化也会局部释放足够量的药物。CL2A接头最近也用于针对TROP-2的抗体,据报道该抗体被快速内化(Cardillo等人, 2011, Clin Cancer Res 17: 3157-69)。因此,似乎缓释机制对于内化和非内化抗体是有益的。

[0532] 在本报告中,我们通过对于治疗B细胞恶性肿瘤比较用依帕珠单抗(快速内化抗CD22 IgG)和维妥珠单抗(缓慢内化抗CD20 IgG)制备的SN-38缀合物扩大了我们对CL2A接头的评估。先前对依帕珠单抗的鼠亲本的研究表明,大部分抗体在1小时内内化并且5小时内50%的CD22在细胞表面上再表达(Shih等人, 1994, Int J Cancer 56:538-45)。这种内化和再表达过程将允许可能补偿CD22的较低表面表达的胞内递送。由于许多B细胞恶性肿瘤表达比CD22多得多的CD20,所以靶向CD20的缀合物可通过在肿瘤中定位后释放其毒性有效载荷来递送更多摩尔的药物。

[0533] 由于SN-38从缀合物释放到培养基中,体外细胞毒性研究不能区分特异性缀合物或甚至无关缀合物的效力。实际上,单独的SN-38比缀合物稍有效,这可以反映其加速的进入细胞并参与拓扑异构酶I的能力。因为其它研究揭示在可以看到凋亡的早期迹象前缀合物需要48小时暴露,所以我们得出结论,体外测试将不能区分这2种缀合物的效力,因此需要进行体内研究。

[0534] 在异种移植模型中,这两种缀合物都具有相似的针对Ramos肿瘤的抗肿瘤活性,流式细胞术已经表明其表达比CD22多几乎15倍的CD20。这对于选择Emab抗CD22-CL2A-SN-38缀合物提供了支持,尤其是因为它可以与未缀合的Vmab抗CD20疗法组合,而不用考虑任何一种药剂会干扰另一种药剂的结合。实际上,如果使用抗CD20-CL2A-SN-38缀合物,则可能给出的总IgG蛋白剂量将低于有效未缀合的抗CD20抗体治疗通常所需的水平,因为剂量限制性毒性将由SN-38含量驱动。将更多未标记的抗CD20添加至抗CD20-CL2A-SN-38缀合物

将会有降低缀合物的摄取并潜在地降低其效力的风险。然而,正如我们之前在使用放射性标记的依帕珠单抗与未缀合的维妥珠单抗的联合研究中所表明,可以从两种药剂获得益处,以其最大有效和安全的剂量给药。体外研究表明维妥珠单抗,即使在不存在用于增强信号传导的交联的情况下,加速了Emab-CL2A-SN-38引发的凋亡事件。因此,只要Emab-CL2A-SN-38缀合物与抗CD20缀合物一样有效,选择Emab-CL2A-SN-38缀合物是合乎逻辑的选择,因为它允许更有效的组合疗法,即便在其中的一种或两种抗原的表达较低的肿瘤中。

[0535] 因为使用超毒性药物的大多数ADC是稳定连接的,所以我们也测试了血清稳定但在胞内可切割的抗CD22-CL2E-SN-38缀合物,但是确定它比使用CL2A接头的效力低40-55倍。其他人已经检测了与抗CD20或抗CD22抗体缀合的多种超毒性药物,发现内化缀合物通常更有活性,而且还观察到如果释放的药物穿透细胞膜,则即使缓慢内化抗体也是有效的。尽管CL2A型接头可以适合于SN-38,但对于毒性较大的药剂来说,它可能并不是最佳的,即使血清中的小的持续释放也会增加毒性并危及治疗窗。

[0536] Emab-CL2A-SN-38在携带Ramos的小鼠中以0.6mg的累积剂量(75 $\mu$ g,每周两次,持续4周)是有活性的,其外推至仅2.5mg/kg的人剂量。因此,Emab-CL2A-SN-38应该对患者有足够的治疗窗。此外,将有效且安全剂量的抗TROP-2-CL2A-SN-38缀合物与最大耐受剂量的<sup>90</sup>Y-标记的抗体组合,没有显著的毒性增加但具有改进的效力(Sharkey等人,2011,Mol Cancer Ther 10:1072-81)。因此,这些SN-38抗体缀合物的安全性和效力特征对于其它组合疗法是非常有利的。

[0537] 尽管伊立替康不常用于治疗造血癌症,但SN-38在淋巴瘤和白血病细胞系中与在实体瘤中一样有效(Cardillo等人,2011,Clin Cancer Res 17:3157-69)。在WSU-FSCCL细胞系中,特异性的和无关的IgG缀合物明显优于伊立替康,而在Ramos中,无关缀合物的中值TTP比伊立替康长,但不显著更好。这些结果与其它研究一致,所述研究已经表明非特异性IgG是一种优异的药物载体,并且在体内比用白蛋白或聚乙二醇(PEG)-Fc制备的游离药物或缀合物更有效。虽然PEG-SN-38缀合物具有显著的抗肿瘤作用,但其以最大耐受量给予,范围为10至30mg/kg SN-38当量(Sapra等人,2009,Haematologica 94:1456-9)。相比之下,在4周内对携带Ramos的动物给予的SN-38的最大累积剂量仅为1.6mg/kg(即给药0.25mg Emab-SN-38在4周内每周两次给予),并且这是无毒的。

[0538] Emab-CL2A-SN-38的具体治疗活性似乎在具有较高CD22表达的细胞系中得到改进。例如,在Ramos中,在所检测的3个不同剂量水平中的2个时记录到单独的Emab-CL2A-SN-38的特定疗效,并且完全消融相当大数量的肿瘤。相比之下,在低约2.5倍的CD22表达的WSU-FSCCL中,在2项研究中的1项研究中与无关抗CEACAM5-CL2A-SN-38缀合物相比,Emab-CL2A-SN-38显著改进存活。然而,重要的是强调,当与未缀合的抗CD20疗法组合使用时,Emab-CL2A-SN-38放大治疗响应。因此,即使在CD22表达不高的情况下,这两种治疗的组合也可以增加响应。

[0539] 总之,使用不太稳定的CL2A-SN-28接头,Emab抗CD22-CL2A-SN-38缀合物在体内在无毒剂量下与类似的抗CD20-CL2A-SN-38缀合物同样有活性,尽管实际上CD20表达比CD22高超过1个对数倍。即使当CD22表达低时,治疗响应通过Emab-CL2A-SN-38与未缀合的Vmab抗CD20疗法的组合而受益,表明当这两种抗原都存在时,组合疗法可改进许多B细胞恶性肿瘤的响应。目前的研究表明,这种组合在多种淋巴瘤和白血病临床前模型中非常有效,但似

乎具有更少的宿主毒性。

[0540] 实施例14:用于治疗CD74+人癌症的抗CD74-CL2A-SN-38缀合物

[0541] CD74是抗体-药物缀合物(ADC)的有吸引力的靶标,因为其在抗体结合后内化并再循环。CD74主要与血液癌症有关,但在实体癌中也表达。因此,检测了用人源化抗CD74抗体米拉珠单抗制备的ADC用于治疗表达CD74的实体瘤的效用。使用可切割接头(CL2A和CL2E)制备了米拉珠单抗-多柔比星和两种米拉珠单抗-SN-38缀合物,它们在其血清中的稳定性以及它们如何在溶酶体中释放SN-38方面不同。通过流式细胞术和免疫组织学确定CD74的表达。在人癌细胞系A-375(黑素瘤)、HuH-7和Hep-G2(肝癌)、Capan-1(胰腺癌)和NCI-N87(胃癌)和Raji伯基特淋巴瘤中进行体外细胞毒性和体内治疗研究。将米拉珠单抗-SN-38ADC与用抗TROP-2和抗CEACAM6抗体制备的SN-38ADC在表达其靶抗原的异种移植物中进行比较。

[0542] 米拉珠单抗-多柔比星在淋巴瘤模型中是最有效的,而在A-375和Capan-1中,只有米拉珠单抗-CL2A-SN-38显示治疗益处。尽管CD74的表面表达比TROP-2或CEACAM6低得多,但米拉珠单抗-CL2A-SN-38在Capan-1中与抗TROP-2-CL2A-SN-38具有相似的效力,但在NCI-N87中,抗CEACAM6和抗TROP-2缀合物是优异的。在单一剂量水平下在2种肝癌细胞系中的研究表明相对于盐水处理的动物但非相对于无关的IgG缀合物有显著的益处。在一些实体瘤异种移植物中CD74是ADC的合适靶标,其效力主要受CD74表达一致性的影响,并且CL2A连接的SN-38缀合物提供最佳的治疗响应。

[0543] 引言

[0544] 称为不变链或Ii的CD74是II型跨膜糖蛋白,其与HLA-DR结合并抑制抗原肽与II类抗原呈递结构的结合。它充当伴侣分子,将不变链复合物引导至内体和溶酶体,在B细胞成熟过程中使用由NF- $\kappa$ B介导的途径,以及在通过与CD44相互作用的T细胞应答中的辅助分子(Naujokas等人,1993,Cell 74:257-68),并且它是促炎细胞因子,巨噬细胞迁移抑制因子的受体(Leng等人,2003,J Exp Med 197:1467-76,它参与激活细胞增殖和存活途径。

[0545] 在正常人组织中,CD74主要在B细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突细胞、朗格汉斯细胞、活化的T细胞亚群和胸腺上皮细胞(未显示)中表达,并且其以超过90%的B细胞肿瘤中表达(Burton等人,2004,Clin Cancer Res 10:6606-11;Stein等人,2004,Blood 104:3705-11)。早期的研究有关于CD74是否存在于膜上的相互矛盾的数据,部分是因为针对不变链的抗体对分子的胞质部分是特异性的,而且还由于存在有表面上相对较少的拷贝,并且其在细胞表面上的半衰期很短。细胞表面上大约80%的CD74与MHC II抗原HLA-DR结合(Roche等人,1993,PNAS USA 90:8581-85)。使用鼠抗CD74抗体LL1,估计Raji伯基特淋巴瘤细胞系具有 $4.8 \times 10^4$ 个拷贝/细胞,但是由于细胞内快速转运,每天内化并分解代谢约 $8 \times 10^6$ 个抗体分子(Hansen等人,1996,Biochem J 320:293-300)。因此,CD74内化是高度动态的,抗体迅速从表面移动并且在细胞内卸载,然后在表面上重新表达CD74。Fab'内化正好与IgG结合一样快发生,表明不需要二价结合。后来用鼠LL1的CDR移植形式,即米拉珠单抗(hLL1)的研究发现抗体可以改变B细胞增殖、迁移和粘附分子表达(Stein等人,2004,Blood 104:3705-11;Qu等人,2002,Proc Am Assoc Cancer Res 43:255;Frolich等人,2012,Arthritis Res Ther 14:R54),但抗CD74抗体的特殊的内化特性使其成为细胞内递送癌症治疗剂的有效载体(例如,Griffiths等人,2003,Clin Cancer Res 9:6567-71)。基于临床

前效力和毒理学结果,已经启动了多发性骨髓瘤(Kaufman等人,2008,ASH Annual Meeting Abstracts,112:3697),以及非霍奇金氏淋巴瘤和慢性淋巴瘤细胞性白血病中使用米拉珠单抗-多柔比星的I期临床试验。

[0546] 令人感兴趣的是,CD74还在非造血癌症,如胃癌、肾癌、膀胱癌、非小细胞肺癌、某些肉瘤和胶质母细胞瘤中表达(例如Gold等人,2010,Int J Clin Exp Pathol 4:1-12),因此它可以是表达该抗原的实体瘤的治疗靶标。由于米拉珠单抗-多柔比星缀合物在血液癌症模型中高度有活性,因此它是该评估的合理选择。然而,我们最近开发了将高度有效的拓扑异构酶I抑制剂SN-38与抗体缀合的程序。SN-38是伊立替康的活性形式,其药理学和代谢是公知的。这些缀合物在实体瘤细胞系中具有纳摩尔效力,并发现它们对未活化内化的抗体有活性。先前的研究表明优先允许SN-38以半衰期约1天从血清中的缀合物解离的接头(CL2A),而不是在血清中更稳定或不太稳定的其它接头。然而,鉴于米拉珠单抗的特殊内化能力,开发了一种新的接头(CL2E),其在血清中高度稳定,但可以在被吸入溶酶体时释放SN-38。

[0547] 目前的研究检测了使用这三种米拉珠单抗抗CD74缀合物(一种具有多柔比星和两种SN-38缀合物)用于主要针对实体瘤的有效疗法的前景。

[0548] 材料和方法

[0549] 人肿瘤细胞系。Raji伯基特淋巴瘤、A-375(黑素瘤)、Capan-1(胰腺癌)、NCI-N87(胃癌)、Hep-G2肝癌和MC/CAR骨髓瘤细胞系购自美国组织培养物保藏中心(Manassas,VA)。HuH-7肝癌细胞系购自日本健康科学资源库(Japan Health Science Research Resources Bank)(Osaka,Japan)。将所有细胞系在含有10%至20%胎牛血清和补充剂的推荐培养基中于37°C在湿润的CO<sub>2</sub>培养箱(5%)中培养。将细胞传代<50次并定期检测支原体。

[0550] 抗体和缀合方法。米拉珠单抗(抗CD74 MAb)、依帕珠单抗(抗CD22)、维妥珠单抗(抗CD20)、拉贝珠单抗(抗CEACAM5)、hMN15(抗CEACAM6)和hRS7(抗TROP-2)是人源化IgG<sub>1</sub>单克隆抗体。制备CL2A和CL2E接头及其SN-38衍生物,并与抗体缀合,如上述实施例中所述。如先前所述(Griffiths等人,2003,Clin Cancer Res 9:6567-71)制备米拉珠单抗-多柔比星缀合物。通过IgG的二硫化物还原,随后与这些接头的相应马来酰亚胺衍生物反应制备所有缀合物。分光光度分析估计药物:IgG摩尔取代比率为5-7(1.0mg蛋白质含有约16μg SN-38或25μg多柔比星当量)。

[0551] 体外细胞结合和细胞毒性。比较未缀合的和缀合的米拉珠单抗与抗原阳性细胞的细胞结合的测定法和细胞毒性测试使用MTS染料还原法(Promega,Madison, WI)。

[0552] 流式细胞术和免疫组织学。流式细胞术以仅提供对膜结合或膜和细胞质抗原的评估的方式进行。在福尔马林固定的石蜡包埋的皮下肿瘤异种移植物切片上进行免疫组织化学染色,不用抗原修复方法,使用10μg/mL的抗体进行染色,其用抗人IgG缀合物揭示。

[0553] 体内研究。雌性裸小鼠(4-8周龄)或雌性SCID小鼠(7周龄)购自Taconic(Germantown, NY)并在1周检疫后使用。包括盐水对照在内的所有药剂每周两次腹膜内施用,持续4周。结果中给出具体的剂量。通过每周体重测量评估毒性。对于Raji伯基特淋巴瘤模型,给SCID小鼠静脉内注射0.1mL培养基中的2.5×10<sup>6</sup>个Raji细胞。5天后,动物接受缀合物或盐水的单次静脉内注射(0.1mL)(N=10/组)。每天观察小鼠的疼痛和瘫痪迹象,并且在发生后肢麻痹,初始体重减少>15%时或者若在其它情况下濒死(替代存活终点),实施安乐

死。

[0554] 通过卡尺以二维方式测量皮下肿瘤,并且按照 $L \times w^2/2$ 计算肿瘤体积 (TV),其中L是最长的直径并且w是最短的直径。每周至少进行一次测量,当肿瘤生长至 $1.0\text{cm}^3$ 时(即替代存活终点),动物终止。将A-375黑素瘤细胞系( $0.2\text{mL}$ 中 $6 \times 10^6$ 个细胞)植入裸小鼠中,并且当肿瘤平均为 $0.23 \pm 0.06\text{cm}^3$ (N=8/组)时开始治疗。使用来自连续传代的肿瘤的肿瘤悬浮液( $0.3\text{mL}$ 的15%w/v肿瘤悬浮液)与来自组织培养物的 $8 \times 10^6$ 个细胞的组合将Capen-1皮下植入裸小鼠中。当TV平均为 $0.27 \pm 0.05\text{cm}^3$ (N=10/组)时开始治疗。通过皮下注射基质胶和 $1 \times 10^7$ 个来自末端培养物的细胞的 $0.2\text{mL}$  1:1 (v/v)混合物来启动NCI-N87胃肿瘤异种移植植物。当TV平均为 $0.249 \pm 0.045\text{cm}^3$ (N=7/组)时开始治疗。遵循相同的程序以在裸小鼠中形成Hep-G2和HuH-7肝癌异种移植植物。当Hep-G2平均为 $0.364 \pm 0.062\text{cm}^3$ (N=5/组)和HuH-7平均为 $0.298 \pm 0.055\text{cm}^3$ (N=5/组)时开始治疗。

[0555] 使用上文提及的替代端点确定中值存活时间,以Kaplan-Meier存活曲线表示效力。以 $P < 0.05$ 的显著性,通过使用Prism GraphPad软件(LaJolla, CA)的对数秩(Mantel-Cox)检验进行分析。

#### [0556] 结果

[0557] 人肿瘤细胞系和异种移植植物中的CD74表达。源于4种不同实体瘤类型的6种细胞系主要基于透化细胞的分析(表11)鉴定为CD74阳性,因为实体瘤细胞系中仅膜CD74的MFI经常比背景MFI(除A-375黑素瘤细胞系外)高 $<2$ 倍。Raji中的表面CD74表达比实体瘤细胞系高 $>5$ 倍,但透化的Raji细胞中的总CD74与大多数实体瘤细胞系相似。

[0558] 表11:表示为米拉珠单抗阳性门控细胞的均值荧光强度(MFI)的通过流式细胞术得到的CD74表达。

细胞系		表面		表面和胞质	
		hLL1 (bkgd) <sup>a</sup>	MFI 比率 hLL1:bkgd	hLL1 (bkgd) <sup>b</sup>	MFI 比率 hLL1:bkgd
[0559]	Panc CA <sup>c</sup>	Capen-1	22 (12)	1.8	248 (5)
		Hs746T	17 (8)	2.1	144 (5)
	胃	NCI-N87	5 (4)	1.3	220 (6)
	黑素瘤	A-375	16 (3)	5.3	185 (6)
	肝癌	Hep-G2	9 (6)	1.5	156 (5)
	淋巴瘤	HuH-7	8 (5)	1.6	114 (4)
		Raji	59 (3)	19.6	143 (5)
					28.6

[0560] ND,未完成

[0561] <sup>a</sup>仅与GAH-FITC一起温育的细胞的背景MFI。

[0562] 免疫组织学显示Raji皮下异种移植植物具有大体均匀且强烈的染色,具有突出的细胞表面标记(未显示)。Hep-G2肝癌细胞系对实体瘤具有最均匀的摄取及中等强度但主要为细胞质的染色(未显示),接着是A-375黑素瘤细胞系,其具有略为不太均匀的染色及较为强烈的但主要是细胞质的表达(未显示)。Capen-1胰腺(未显示)和NCI-N87(未显示)的胃癌细

胞系具有中度(Capan-1)至强烈(NCI-N87)CD74染色,但它不是均匀分布的。HuH-7肝瘤细胞系(未显示)具有最小均匀且最弱的染色。

[0563] 缀合物的免疫反应性。未缀合的米拉珠单抗、米拉珠单抗-CL2A-SN-38和米拉珠单抗-CL2E-SN-38缀合物的 $K_d$ 值没有显著差异,平均分别为0.77nM、0.59nM和0.80nM。在MC/CAR多发性骨髓瘤细胞系中测量的未缀合的和多柔比星缀合的米拉珠单抗的 $K_d$ 值分别为 $0.5 \pm 0.02$ nM和 $0.8 \pm 0.2$ nM(Sapra等人,2008,Clin Cancer Res 14:1888-96)。

[0564] 缀合物的体外药物释放和血清稳定性。在部分模拟溶酶体条件,即低pH(pH 5.0)的环境中并且在组织蛋白酶B的存在或不存在下测定自巯基乙醇封端的CL2A和CL2E接头的SN-38的释放机制。CL2E-SN-38底物在不存在酶的情况下在pH5下是惰性的(未显示),但是在组织蛋白酶B存在下,在Phe-Lys位点处的切割以34分钟的半衰期快速进行(未显示)。活性SN-38的形成需要SN-38第10位的氨基甲酸酯键的分子内环化,其发生得更慢,半衰期为10.7小时(未显示)。

[0565] 如所预期的,组织蛋白酶B对CL2A接头中活性SN-38的释放没有影响。然而,CL2A具有可切割的碳酸苄基酯键,在pH5.0以类似于CL2E接头的速率释放活性SN-38,半衰期为约10.2小时(未显示)。具有pH敏感的酰胺键的米拉珠单抗-多柔比星缀合物在pH 5.0下具有7至8小时的半衰期(未示出)。

[0566] 虽然所有这些接头在溶酶体相关条件下以相对相似的速率释放药物,但它们在血清中具有非常不同的稳定性。米拉珠单抗-CL2A-SN-38在 $21.55 \pm 0.17$ 小时中释放50%的游离SN-38(未显示),与其它CL2A-SN-38缀合物一致。然而,CL2E-SN-38缀合物是高度惰性的,半衰期推测为约2100小时。米拉珠单抗-多柔比星缀合物在98小时中释放50%的多柔比星,这与2种其它抗体-多柔比星缀合物(未显示)类似。

[0567] 细胞毒性。与这些缀合物的评估有关的重大问题是游离多柔比星和SN-38在造血和实体瘤细胞系中的相对效力。我们的小组先前报道了SN-38在几种B细胞淋巴瘤和急性白血病细胞系中有活性,其效力范围为0.13-2.28nM(Sharkey等人,2011,Mol Cancer Ther 11:224-34)。随后用于体内治疗研究的4种实体瘤细胞系中的SN-38效能范围为2.0-6nM(未显示)。多柔比星有混合响应,在Raji淋巴瘤和A-375黑素瘤细胞系中有3-4nM的效力,但它对Capan-1、NCI-N87和Hep G2细胞系具有小几乎10倍的效力。比较SN-38与多柔比星的效力的其它研究发现:LS174T结肠癌,18对18(分别为SN-38对多柔比星的nM效力);MDA-MB-231乳腺癌,2对2nM;SK-OV-4卵巢癌,18对90nM;Calu-3肺腺癌,32对582nM;Capan-2胰腺癌,37对221nM;和NCI-H466小细胞肺癌,0.1对2nM。因此,SN-38在这6种细胞系中的4种中比多柔比星强5到20倍,在LS174T和MDA-MB-231中具有相似的效力。这些数据共同表明,多柔比星比SN-38具有更小的对实体瘤的效果,而SN-38似乎在实体瘤和造血肿瘤中同样有效。

[0568] 如预期,3种缀合物形式在体外通常比游离药物的效力低某个数量级,因为预期两种药物都容易地转运到细胞中,而药物缀合物需要抗体结合以在细胞内运输药物(未示出)。CL2A连接的SN-38缀合物是一个例外,因为超过90%的SN-38在4天的测定期内从缀合物释放到培养基中(Cardillo等人,2011,Clin Cancer Res 17:3157-69;Sharkey等人,2011,Mol Cancer Ther 11:224-34)。因此,即使缀合物快速内化,也难以区分游离药物和CL2A连接的药物之间的差异。

[0569] 与游离SN-38相比,稳定的CL2E连接的SN-38在Raji细胞系中表现相对较好,但它

在4种实体瘤细胞系中具有实质性(7至16倍)更低的效力,表明CD74的相对较低的表面表达可以在使这些实体瘤中的药物转运最小化方面起作用。与所有细胞系中的游离多柔比星相比时,米拉珠单抗-多柔比星缀合物在其效力上具有实质性差异,这与实体瘤细胞系中CL2E-SN-38缀合物与游离的SN-38具有相似的量级。

[0570] 在上文提及的6种另外的细胞系中,米拉珠单抗-CL2A-SN-38缀合物比米拉珠单抗-多柔比星缀合物(未显示)的效力高9至60倍,但是再次,该结果在很大程度上受下述事实影响:CL2A连接的缀合物在4天的温育期内将其大部分SN-38释放到培养基中,而多柔比星缀合物在此同一时间段内最多会释放50%的其药物。在这些其它细胞系中未检测到CL2E连接的米拉珠单抗。

[0571] 人肿瘤异种移植植物的体内治疗。先前用各种抗体制备的米拉珠单抗-多柔比星或SN-38缀合物的体内研究已经表明,它们在远低于其最大耐受剂量的剂量下是有效的(Griffiths等人,2003,Clin Cancer Res 9:6567-71;Sapra等人,2005,Clin Cancer Res 11:5257-64;Govindan等人,2009,Clin Cancer Res 15:6052-61;Cardillo等人,2011,Clin Cancer Res 17:3157-69;Sharkey等人,2011,Mol Cancer Ther 11:224-34),因此体内测试集中于在耐受性良好的水平比较相似但固定量的每种缀合物。

[0572] 初步研究首先在淋巴瘤的播散性Raji模型中检测多柔比星和SN-38缀合物,以评估与2种SN-38缀合物(未显示)相比米拉珠单抗-多柔比星缀合物如何。所有特异性缀合物比具有仅20天的中值存活的非靶向拉贝珠单抗-SN-38缀合物或盐水处理的动物显著更好( $P<0.0001$ )。尽管体外研究显示Raji中的SN-38缀合物具有多达8倍的优势,但用米拉珠单抗-多柔比星缀合物观察到最好的存活,其中对所有动物均给予单一的17.5mg/kg(350 $\mu$ g)剂量,并且在研究结束时(第112天)给予2.0mg/kg(40 $\mu$ g)的7/10只动物存活(例如,17.5mg/kg剂量米拉珠单抗-多柔比星与米拉珠单抗-CL2A-SN-38, $P=0.0012$ )。即便体外研究表明两种缀合物在内化时以相似的速率释放活性SN-38,但是存活对于更稳定的CL2E-SN-38缀合物显著更低( $P<0.0001$ 和 $P=0.0197$ ,对于CL2A对CL2E分别为17.5和2.0mg/kg剂量)。

[0573] 从A-375黑素瘤细胞系开始检测了5种实体瘤细胞系,因为它对多柔比星和SN-38都具有最好的体外响应。A-375异种移植植物生长迅速,盐水处理的对照动物的中值存活时间仅为10.5天(未显示)。12.5mg/kg(0.25mg/动物)每周两次剂量的米拉珠单抗-CL2A-SN-38缀合物延长存活到28天( $P=0.0006$ ),这显著好于具有17.5天的中值存活的对照依帕珠单抗-CL2A-SN-38缀合物( $P=0.0089$ ),后者与盐水处理的动物没有显著差异( $P=0.1967$ )。米拉珠单抗-CL2A缀合物比米拉珠单抗-CL2E-SN-38缀合物提供显著更长的存活( $P=0.0014$ ),所述米拉珠单抗-CL2E-SN-38缀合物具有与其对照依帕珠单抗-CL2E-SN-38缀合物相同的14天的中值存活。尽管给予比SN-38缀合物高2倍的米拉珠单抗多柔比星的剂量,但是中值存活并不比盐水处理的动物(10.5天)好。

[0574] 与A-375黑素瘤模型一样,在Capan-1中,仅CL2A连接的SN-38缀合物是有效的,具有35天的中值存活,与未处理的动物显著不同( $P<0.036$ )(未显示),即便在较低剂量(5mg/kg;每只动物100 $\mu$ g)( $P<0.02$ )。米拉珠单抗-CL2E和非靶向依帕珠单抗-CL2A-SN-38缀合物或者高2倍的剂量的米拉珠单抗-多柔比星缀合物都不提供任何存活优势( $P=0.44$ ,相对于盐水)。值得注意的是,在给予相同剂量的内化抗TROP-2CL2A-SN-38缀合物(hRS7-SN-38;IMMU-132)的动物的相同研究中,中值存活等于米拉珠单抗-CL2A-SN-38(未显示)。先前已

经将hRS7-CL2A-SN-38缀合物鉴定为用于治疗多种实体瘤的感兴趣的ADC (Cardillo等人, 2011, Clin Cancer Res 17:3157-69)。Capan-1上表面结合hRS7的MFI为237 (未显示), 相比之下米拉珠单抗为22 (见表11)。因此, 尽管具有明显较低的表面抗原表达, 但是在该模型中, 米拉珠单抗-CL2A-SN-38缀合物与hRS7-CL2A-SN-38缀合物一样好地表现。

[0575] 由于在2种实体瘤异种移植物中具有较差的治疗结果的米拉珠单抗-多柔比星缀合物, 焦点转移到将米拉珠单抗-SN-38缀合物与用针对TROP-2 (hRS7) 或CEACAM6 (hMN-15) (其在许多实体瘤的表面上更高度表达 (Blumenthal等人, 2007, BMC Cancer 7:2; Stein等人, 1993, Int J Cancer 55:938-46)) 的其它人源化抗体制备的SN-38缀合物的比较。检测了另外三种异种移植植物模型。

[0576] 在胃肿瘤模型NCI-N87中, 给予17.5mg/kg/剂量 (350μg) 米拉珠单抗-CL2A-SN-38的动物在存活上提供了一些改善, 但是与盐水处理动物 (31天对14天; P=0.0760) 或与非结合性维妥珠单抗抗CD20-CL2A-SN39缀合物 (21天; P=0.3128) (未显示) 相比未能满足统计学显著性。然而, hRS7- 和hMN-15-CL2A缀合物分别显著将中值存活改善到66和63天 (P=0.0001)。表面表达的TROP-2和CEACAM6的MFI分别是795和1123, 远高于只有5的CD74 (见表11)。免疫组织学显示在该细胞系的异种移植物中CD74的相对强烈的胞质表达, 但重要的是它是散在的, 仅出现在肿瘤内的限定袋中 (未显示)。CEACAM6和TROP-2比CD74 (未显示) 更均匀地表达, CEACAM6在胞质和膜上更强烈地存在, 并且TROP-2主要存在于膜上。因此, 用抗CEACAM6和抗TROP-2缀合物的改善的存活最有可能反映在NCI-N87中更高的抗原密度和更均匀的表达。

[0577] 在Hep-G2肝瘤细胞系 (未显示) 中, 免疫组织学显示CD74的非常均匀的表达及中度细胞质染色, 并且流式细胞术显示相对较低的表面表达 (MFI=9)。hMN-15的MFI为175, 并且免疫组织学显示CEACAM6的膜和细胞质表达相当均匀, 具有非常强烈的膜染色的分离袋 (未显示)。在携带Hep-G2异种移植物的动物中的研究发现与盐水处理组中的21天相比, 米拉珠单抗-CL2A-SN-38将存活延长至45天 (p=0.0048), 而hMN-15-CL2A-SN-38缀合物将存活改进到35天。存在着与hMN-15-CL2A-SN-38相比有利于米拉珠单抗缀合物的趋势, 但是它没有达到统计学显著性 (46对35天; P=0.0802)。然而, 非结合性维妥珠单抗-CL2A-SN-38缀合物提供了与米拉珠单抗缀合物类似的存活优势。我们先前观察到, 用非结合性缀合物的治疗结果可以与特定CL2A连接的缀合物类似, 特别是在较高蛋白质剂量下, 但特异性缀合物和对照缀合物的滴定通常选择性显露出来。因此, 特异性缀合物在此细胞系中在这些剂量下都没有提供选择性治疗优势。

[0578] 使用HuH-7肝瘤细胞系 (未显示) 的另一项研究发现hMN-15-SN-38缀合物比米拉珠单抗-CL2A缀合物提供更长 (35对18天), 但不显著不同的存活优势 (P=0.2944), 所述HuH-7肝瘤细胞系与Hep-G2具有相似的表面表达, 但是略低的胞质水平 (参见表11)。尽管hMN-15和米拉珠单抗缀合物均显著优于盐水处理的动物 (分别为P=0.008和0.009), 但是在该剂量水平下, 缀合物再次都不与非靶向性维妥珠单抗-SN-38缀合物显著不同 (分别为P=0.4602和0.9033)。CEACAM6表面表达在该细胞系中相对较低 (MFI=81), 并且免疫组织学显示CD74 (未显示) 和CEACAM6 (未显示) 都非常微弱且高度分散。

[0579] 讨论

[0580] 用于肿瘤选择性化疗的抗体-药物缀合物 (ADC) 方法是当前相当感兴趣的领域 (例

如Govindan等人,2012,Expert Opin Biol Ther 12:873-90;Sapra等人,2011,Expert Opin Biol Ther 20:1131-49)。采用超毒性药物来替代之前已经使用的常规化学治疗剂最近在很大程度上获得了临床成功(Pro等人,2012,Expert Opin Biol Ther 12:1415-21; LoRusso等人,2011,Clin Cancer Res 17:437-47)。然而,靶点选择、抗体和药物接头都是影响ADC最佳性能的因素。例如,在曲妥珠单抗-DM1的情况下,在表达该抗原的肿瘤上HER2是丰富的,抗体被内化,并且抗体本身具有抗肿瘤活性,所有这些都可以结合起来以提高疗效。形成鲜明对比的是,CD74在细胞表面上以低得多的水平表达,但其独特的内化并且表面重新表达特性已经允许米拉珠单抗抗CD74ADC在造血癌症异种移植模型中是有效的,即使使用中等毒性的药物,如多柔比星(Griffiths等人,2003,Clin Cancer Res 9:6567-71; Sapra等人,2005,Clin Cancer Res 11:5257-64)。尽管多柔比星在造血癌症中更频繁使用,而SN-38和其它喜树碱可施用于实体瘤患者,但我们决定评估米拉珠单抗的多柔比星和SN-38缀合物在实体瘤中的效用。米拉珠单抗-多柔比星缀合物在各种血液癌症的异种移植模型中有效,导致其临床测试(NCT01101594和NCT01585688),而几种SN-38缀合物在实体瘤和血液肿瘤模型中有效,导致在结肠直肠癌和多种上皮癌的I期临床试验(NCT01270698和NCT01631552)中正在进行的2种新的SN-38缀合物。

[0581] 在体外,未缀合的多柔比星和SN-38与多柔比星针对Raji淋巴瘤细胞系具有相似的效力,但SN-38在多种不同的实体瘤细胞系中更有效。令人感兴趣的是,在体内,与米拉珠单抗-SN-38缀合物相比,米拉珠单抗-多柔比星缀合物在Raji中提供最好的响应。然而,在Capan-1和A-375中,米拉珠单抗-多柔比星不如CL2A-连接的SN-38米拉珠单抗缀合物有效,尽管体外测试已经表明A-375对游离的多柔比星与对游离的SN-38同等敏感。另外两种细胞系MDA-MB-231乳腺癌和LS174T结肠癌在体外用游离的多柔比星也与SN-38具有相似的效力,但是由于体外试验表明SN-38在实体癌症和血液癌症方面同样有效,并且在评估的大多数实体瘤细胞系中SN-38的效力比多柔比星高5到20倍,因此我们决定聚焦于2种米拉珠单抗-SN-38缀合物用于实体瘤治疗。然而,为了更好地评价米拉珠单抗-SN-38缀合物的效用,我们包括了与用针对存在于多种实体瘤中的其它抗原的抗体制备的SN-38ADC的比较评估。

[0582] 我们以前已经研究了在Capan-1细胞系中用内化的hRS7抗TROP-2CL2A连接的SN-38缀合物的治疗响应(Cardillo等人,2011,Clin Cancer Res 17:3157-69),因此比较了米拉珠单抗和hRS7SN-38缀合物的效力。在这项研究中,与对照抗体相比,两种缀合物都显著改善了存活,其中各自的CL2A-连接的SN-38缀合物优于CL2E-连接的缀合物。由于流式细胞术已经表明在Capan-1中TROP-2的表达高于CD74,此结果表明CD74的运输能力(已知其是特殊的)比TROP-2更有效。然而,公知的是,肿瘤内细胞间的抗原可及性(即膜与细胞质,生理学和“结合位点”屏障)和分布是影响每种形式的靶向治疗,特别是那些依赖于产物对单独细胞的足够胞内递送的靶向治疗的关键因素(Thurber等人,2008,Adv Drug Del Rev 60:1421-34)。在抗原在肿瘤内的所有细胞中不均匀表达的情况下,具有在肿瘤中定位后缓慢释放其有效载荷的靶向剂(如CL2A连接的缀合物)将允许药物散布到非靶向旁观者细胞,从而提高其效力范围。事实上,按照结合位点屏障效应,高抗原表达可以潜在地阻碍肿瘤渗透,但是胞外释放机制可以提供药物在肿瘤内弥散的机制。这种机制也被认为有助于我们使用弱内化抗体,如本文中使用的抗CEACAM5和抗CEACAM6检测的其它缀合物的效力。基于米拉珠单抗的缀合物更严重依赖于抗体与肿瘤细胞的直接相互作用,利用CD74的快速内化

和重新表达,其可以补偿其在细胞表面上较低的丰度。然而,当CD74高度分散在肿瘤内并且没有将缀合物保留在肿瘤内的机制时,这种优势将是减轻的,药物从缀合物缓慢释放的益处将丧失。我们小组先前对人胃肠道肿瘤的综述表明,它们通常具有高水平的表达及良好的一致性(Gold等人,2010,Int J Clin Exp Pathol 4:1-12)。

[0583] 在我们对用于SN-38的合适接头的最初评估期间,检测了许多不同的衍生物,包括设计为在SN-38的20-羟基位置偶联的“CL2E”样接头,其类似于CL2A接头。然而,该抗体缀合物缺乏足够的抗肿瘤活性,并且没有继续研究。鉴于米拉珠单抗出色的内化特性,我们决定重新审视SN-38接头化学,假设CD74缀合物的快速内化将增强更稳定缀合物的载药量。我们推测,如果离去基团是酚性的,这可以促进环化,因此,CL2E接头设计成在SN-38的酚10位处连接。

[0584] 在开始时,CL2E连接的SN-38缀合物在Raji细胞系中与CL2A缀合物具有相似得有希望的IC<sub>50</sub>,这与以下观点一致:如果快速内化,则两种缀合物都会以几乎相同的速度释放SN-38的活性形式。然而,如已经提到,CL2A缀合物的体外活性很大程度上受到SN-38释放到培养基中的影响,并且不一定反映完整缀合物的摄取。当发现CL2E连接的缀合物在实体瘤细胞系中比CL2A缀合物的效力小得多时,这表明CD74的较低表面表达通过米拉珠单抗结合而影响了SN-38的内化。然而,当Raji中的体内研究显示米拉珠单抗-CL2A-SN-38优于CL2E缀合物时,必须考虑会影响CL2E的效力的一些其它因素。一个可能的解释是CL2E-SN-38中的接头设计使药物的20位未衍生化,使得内酯基团易于开环。事实上,用伊立替康进行的研究显示,SN-38的效力被许多因素减弱,其中内酯环打开为羧酸形式,该羧酸形式仅占完整内酯形式的效力的10%。相反,CL2A连接的SN-38在20-羟基位置处衍生化,这是在生理条件下使喜树碱中的内酯基团稳定的过程。因此,SN-38的内酯环在CL2A而非CL2E缀合物中得到保护而不被切割。因此,内酯环的去稳定化可以促成CL2E在体内的效力降低。由于在酸性条件下进行了体外稳定性研究和血清稳定性分析,所以我们没有直接测量这些缀合物中任一种的SN-38的羧酸形式。

[0585] 总之,体外和体内结果表明,米拉珠单抗-多柔比星缀合物在Raji淋巴瘤细胞系中优于CL2A-SN-38缀合物,这可以反映与CL2A缀合物相比多柔比星缀合物改进的稳定性。然而,CL2A-SN-38缀合物比高度稳定的CL2E-SN-38缀合物更有效的发现表明潜在与药物或细胞系敏感性的活化有关的其它问题可以起作用。

[0586] CD74在细胞生物学中具有多种作用;在抗原呈递细胞中,其在处理抗原肽中可以具有更主要的作用,在实体瘤的情况下,其作用可以与存活有关。这些不同的作用可以影响胞内的运输和加工。或者,CL2E连接的SN-38的较低效力可以反映SN-38中内酯开环的药物失活,暗示特定接头的重要性。最后,在实体瘤模型中,在针对用更为可及(表面表达)且丰富的其它内化(hRS7)或内化较差的抗体(hMN15)制备的缀合物测量时,抗原可及性似乎在限定米拉珠单抗-CL2A-SN-38的效力中具有明显作用。我们怀疑这一发现对于靶向治疗是普遍的,但是这些研究至少表明,即使在靶抗原的表面表达最小时,CD74靶向药物的独特的内化特性也可以提供显著的效力。

[0587] 实施例15:使用hRS7-SN-38(IMMU-132)治疗治疗法抗性转移性结肠癌(mCRC)

[0588] 患者是患有mCRC的62岁女性,在2012年1月最初表现出转移性疾病。她在诊断后数周具有腹腔镜检测回肠横结肠切除术作为第一种疗法,然后在新辅助背景中接受4个周期

的FOLFOX(亚叶酸、5-氟尿嘧啶,奥沙利铂)化疗,之后在2012年3月进行右侧肝切除术以除去右肝叶中的转移性病灶。这随后是2012年6月恢复的辅助FOLFOX方案,总共12个周期的FOLFOX。在8月,由于神经毒性恶化,奥沙利铂从方案中退出。她上一轮5-FU是在2012年9月25日。

[0589] 2013年1月完成的CT显示肝转移。随后将她评估为入选IMMU-132 (hRS7-CL2A-SN-38) 调查性研究的良好候选者。她的病史中的合并症包括哮喘、糖尿病、高血压、高胆固醇血症、心脏杂音,食管裂孔疝、甲状腺功能减退症、心皮隧道综合征 (carpel tunnel syndrome)、青光眼、抑郁、下肢不宁综合征和神经病。她的手术史包括输卵管结扎 (1975)、甲状腺切除术 (1983)、胆囊切除术 (2001)、心皮隧道释放 (2008) 和青光眼手术。

[0590] 在进入该试验时,她的靶病灶是肝左叶中的3.1-cm肿瘤。非靶病灶包括肝脏内几个低密度的肿块 (hypo-attenuated mass)。她的基线CEA是781ng/ml。

[0591] 在患者签署知情同意书后,IMMU-132以每周一次的日程表通过输注给予连续2周,然后休息一周,这构成了治疗周期。根据耐受,重复这些周期。IMMU-132 (8mg/kg) 的首次输注于2013年2月15日开始,并且在没有值得注意的事件的情况下完成。她在第一个周期过程中经历了恶心 (2级) 和疲劳 (2级),并且从那时起一直在继续治疗,没有发生重大不良事件。她在2013年3月报告了脱发和便秘。在2013年4月8日进行的首次响应评估 (6次剂量后) 通过计算机体层摄影术 (CT) 显示靶病灶缩小了29%。2013年3月25日,她的CEA水平下降至230ng/ml。在2013年5月23日的第二次响应评估 (10次剂量后) 中,靶病灶缩小了39%,因此根据RECIST标准构成部分响应。到2013年6月14日,她一直继续治疗,接受6个周期,构成12个剂量的8mg/kg hRS7-CL2A-SN-38 (IMMU-132)。自开始本调查治疗以来,她整体健康和临床症状相当大地改进。

[0592] 实施例16:hRS7-SN-38 (IMMU-132) 用于治疗治疗法抗性转移性乳腺癌的用途

[0593] 患者是57岁女性,在2005年被初诊为患有IV期三重阴性乳腺癌 (ER/PR阴性,HER-neu阴性)。她在2005年经历了其左乳房的损伤切除术,随后在2005年9月在辅助背景中进行了剂量密集 (Dose-Dense) ACT。之后,她接受了放射治疗,这于11月完成。当患者于2012年初在对侧 (右侧) 乳房中触及到肿块时鉴定出疾病的局部复发,并且然后用CMF (环磷酰胺、甲氨蝶呤、5-氟尿嘧啶) 化疗治疗。她的疾病在同一年中复发,在胸壁皮肤中有转移性病灶。然后她接受了卡铂+ TAXOL®化疗方案,在此期间导致血小板减少症。她的病情进展,并且她开始每周服用多柔比星,这持续6剂。皮肤疾病也在进展。在2012年9月26日的FDG-PET扫描显示胸壁上疾病进展和增大且硬的腋窝淋巴结。对患者给予羟考酮来控制疼痛。

[0594] 自2012年10月至2013年2月,对她给予IXEMPRA®(每2周持续4个月),此时胸壁病灶开放并出血。然后对她进行XELODA®,这由于其手脚神经损伤以及便秘而未良好耐受。皮肤病灶是进行性的,然后她在给出知情同意书后入选IMMU-132试验。患者还有甲状腺功能亢进和视力障碍的病史,具有CNS疾病的高风险 (但脑MRI对CNS疾病为阴性)。入选该试验时,她右侧乳房皮肤病灶 (靶标) 测量为最大直径4.4cm和2.0cm。她具有右乳房中另一个非靶病灶和左右腋下各一个肿大的淋巴结。

[0595] 第一次IMMU-132输注 (12mg/kg) 于2013年3月12日开始,对其良好耐受。她的第二次输注由于在输注安排日的3级绝对中性粒细胞计数 (ANC) 减少 (0.9) 而延迟,晚1周。延迟

一周后并且在接受NEULASTA®后,施用她的第二次IMMU-132,在9mg/kg下减少了25%的剂量。此后,她按照方案按时接受IMMU-132,每周一次达2周,然后休息一周。在3个治疗周期之后,她在2013年5月17日的第一次响应评估显示了,靶病灶的长直径的总和减少43%,根据RECIST标准构成部分响应。她正在继续9mg/kg剂量水平的治疗。自她用IMMU-132开始治疗以来,她的整体健康状况和临床症状大为改善。

[0596] 实施例17:hRS7-SN-38 (IMMU-132) 用于治疗难治性转移性非小细胞肺癌的用途

[0597] 这是一名60岁男性,被诊断为非小细胞肺癌。对患者给予卡铂、贝伐珠单抗化疗方案达6个月,并且显示响应,然后在进展后在接着的2年内接受用卡铂、依托泊昔、TAXOTERE®、吉西他滨的进一步化疗过程,偶然响应持续不超过2个月。患者然后表现出测量为6.5x4cm的左侧纵膈肿块和胸腔积液。

[0598] 在签署知情同意书后,每隔一周对患者给予18mg/kg剂量的IMMU-132。在前两次注射过程中,经历短期的中性粒细胞减少和腹泻,在4小时内有4次排便,但是这些在2天内消退或响应症状性药物。在总共6次IMMU-132输注后,指数病灶的CT评估显示22%的减少,刚好低于部分响应但有确定的肿瘤缩小。患者继续再进行这种治疗达两个月,此时CT指出指数病灶直径总和的45%肿瘤缩小的部分响应,由此根据RECIST标准构成部分响应。

[0599] 实施例18:hRS7-CL2A-SN-38 (IMMU-132) 用于治疗难治性转移性小细胞肺癌的用途

[0600] 这是一名65岁女性,被诊断为小细胞肺癌,涉及她的左肺、纵膈淋巴结并且具有左侧顶脑叶转移的MRI证据。先前的化疗包括卡铂、依托泊昔和托泊替康,但未见响应。放射治疗也无法控制她的疾病。然后,每三周一次以18mg/kg的剂量对她给予IMMU-132,总共输注5次。第二剂量后,她经历了低血压和2级中性粒细胞减少症,这在下一次输注前改善。在第五次输注之后,CT研究显示其靶标左肺肿块缩小了13%。脑MRI也显示这种转移减少10%。她每3周继续她的IMMU-132给药,再持续3个月,并继续显示其病况的客观和主观改善,左肺肿块减少25%并且脑转移减少21%。

[0601] 实施例19:用hRS7-CL2A-SN-38 (IMMU-132) 治疗具有IV期转移性疾病的胃癌患者

[0602] 该患者是一名60岁男性,在40年期间有吸烟史和过量饮酒的时期。他经历了体重减轻、进食不适和抗酸剂未缓解的疼痛、频繁的腹痛、下腰痛、以及最近在两个腋下可触及的结节。他寻求医疗建议,并且在检测后,基于经由胃镜的活组织检查,显示在胃食管连接处有腺癌,包括一些鳞状特征。放射学研究(CT和FDG-PET)也揭示了左右腋窝、纵膈区、腰脊柱和肝脏中的转移性疾病(右叶中2个肿瘤和左侧中1个,所有测量为直径2-4cm)。对他进行胃肿瘤切除,然后他接受用表柔比星、顺铂和5-氟尿嘧啶的化疗疗程。在4个月和6周的休息期后,他转为多西他赛化疗,根据转移性肿瘤的CT测量及一些总体恶化证实的进展,这也未能控制其疾病。

[0603] 然后对患者给予每隔一周输注的10mg/kg剂量的IMMU-132 (hRS7-CL2A-SN-38) 总共6个剂量,之后进行CT研究评估他的疾病状况。这些输注是耐受良好的,有一些轻微的恶心和腹泻,这用症状药物控制。CT研究揭示了他的指数转移性病灶的总数减少了28%,因此他继续再服用此疗法达5个疗程。随访CT研究表明,疾病在IMMU-132疗法前根据RECIST标准从其基线仍然降低了约35%,并且他的总体状况似乎也有所改善,患者恢复了对其疾病得到控制的乐观态度。

[0604] 实施例20:仅使用IMMU-130(拉贝珠单抗-CL2A-SN-38)治疗对先前的化学免疫疗法难治性的晚期结肠癌患者

[0605] 患者是具有IV期转移性结肠癌病史的50岁男性,其在2008年首次得到诊断,并给予分别用于原发性和转移性结肠癌的结肠切除术和部分肝切除术。然后他接受化疗,如图8所示,所述化疗包括伊立替康、奥沙利铂、FOLFIRINOX(5-氟尿嘧啶、亚叶酸、伊立替康、奥沙利铂)和贝伐珠单抗,以及贝伐珠单抗联合5-氟尿嘧啶/亚叶酸,几乎持续2年。此后,在接下来的一年或更长期间对他给予单独或与FOLFIRI(亚叶酸、5-氟尿嘧啶、伊立替康)化疗联合的西妥昔单抗的过程。在2009年,他在化疗免疫治疗期间接受了针对其肝转移的射频消融治疗,并且在2010年后期,他经历了肺转移瘤的楔形切除术,几个月后在2011年初重复进行。尽管在2011年具有化疗免疫疗法,但是2011年末出现新的肺转移,并且在2012年可见肺转移和肝转移两者。他的基线血浆癌胚抗原(CEA)滴度在经历用IMMU-130的抗体药物治疗前为12.5ng/mL。放射科医师通过计算机体层摄影术测量肿瘤大小变化的指标病灶是右肺中叶和肝转移,两者总数为91mm,作为IMMU-130(抗CEACAM5-CL2A-SN-38)疗法前基线时其最长直径的总和。

[0606] 该患者每隔一周通过缓慢IV输注接受16mg/kg剂量IMMU-130,总共17个治疗剂量。患者对治疗耐受良好,第一次治疗后仅具有1级恶心、腹泻和疲劳,这在治疗4和5后出现但之后未出现,由于他接受了针对这些副作用的药物。治疗3后,他确实显示脱发(2级),这存在于随后的治疗期间。恶心、腹泻和偶尔呕吐持续仅2-3天,并且第一次输注后其疲劳持续2周。在其它情况下,患者对治疗耐受良好。由于接受与SN-38缀合的这种人源化(CDR移植)抗体的持续时间长,因此对他的血液测量抗拉贝珠单抗抗体,并且均未被检出,即便是在16剂量后。

[0607] 在4次治疗后进行第一次计算机体层摄影术(CT)测量,并且显示从在该治疗之前在基线时进行的测量总和的28.6%指标病灶变化。在8次治疗后,这种降低变为40.6%,因此根据RECIST标准构成部分缓解。将这一响应再维持2个月,此时他的CT测量表明指数病灶比基线测量小31.9%,但略高于测量的40.6%的先前降低。因此,基于对肺和肝脏中指数病灶的小心的CT测量,先前的化疗和免疫疗法(包括伊立替康(SN-38的母体分子))失败的此患者当经由抗CEACAM5人源化抗体拉贝珠单抗(hMN-14)靶向时显示对伊立替康(或喜树碱)的活性代谢物SN-38的客观响应。令人惊讶的是,尽管伊立替康(CPT-11)通过体内释放SN-38而发挥作用,但SN-38缀合的抗CEACAM5抗体证明在结肠直肠癌患者中是有效的,这通过在患者早先未能响应其最后一次含有伊立替康的疗法后诱导部分响应证明。患者的血浆CEA滴度降低也证实了CT发现:在第三次治疗剂量之后,其从12.6ng/mL的基线水平下降至2.1ng/mL,并且在剂量8至12之间为1.7至3.6ng/mL。CEA的正常血浆滴度通常认为在2.5和5.0ng/mL之间,因此这种疗法实现了其血液中CEA滴度的正常化。

[0608] 实施例21:用IMMU-130治疗晚期结肠癌患者

[0609] 该患者是最初诊断为转移性结肠癌(IV期)的75岁女性。她有右侧部分结肠部份切除术和小肠切除,随后接受FOLFOX、FOLFOX+贝伐珠单抗、FOLFIRI+雷莫芦单抗(ramucirumab)和FOLFIRI+西妥昔单抗达一年半,此时她显示疾病进展,疾病传播到后穹窿、网膜,腹腔内有腹水,胸腔右侧有胸腔积液。她在治疗前的基线CEA滴度是15ng/mL。每周两次对她给予6mg/kg IMMU-130(抗CEACAM5-CL2A-SN-38)达连续2周,然后休息一周(3周周

期),持续超过20剂,这是耐受非常好的,没有任何主要的血液学或非血液学毒性。在治疗2个月内,她的血浆CEA滴度适度缩小至1.3ng/mL,但在8周评估时,她显示指数肿瘤病灶缩小了21%,这在13周时增加到27%缩小。令人惊讶的是,此时患者的腹水和胸腔积液均减少(后者消失),从而显著改善了患者的整体状况。患者继续她的研究治疗。

[0610] 实施例22:用IMMU-130治疗的具有IV期转移性疾病的胃癌患者

[0611] 患者是52岁男性,由于胃不适和与进食有关的疼痛达约6年而寻求医疗照顾,并且在过去12个月内体重减轻。胃部触诊揭示一个硬块,然后胃镜检查,揭示胃下部有溃疡型肿块。对该肿块进行活组织检查并且诊断为胃腺癌。除了肝功能测试、LDH和CEA升高外,实验室检测没有发现具体的异常变化,后者为10.2ng/mL。该患者然后进行全身PET扫描,除了胃肿瘤之外,还揭示了左腋窝和肝右叶中的转移性疾病(2个小转移)。对患者进行胃肿瘤切除,然后对其转移性肿瘤进行基线CT测量。手术后4周,他接受3个疗程的联合化疗,其由顺铂和5-氟尿嘧啶(CF)的方案组成,但是对这未良好耐受,因此改用多西他赛治疗。基于CT扫描,该疾病似乎稳定了约4个月,但是随后患者对进一步的体重减轻、腹痛、食欲不振和极度疲劳的抱怨引起重复的CT研究,这显示转移大小增加20%的总和并且初始胃切除部位处有疑似病灶。

[0612] 然后,以8mg/kg的每周日程表给患者给予IMMU-130(抗CEACAM5-CL2A-SN-38)的实验疗法。他对这耐受良好,但3周后显示2级中性粒细胞减少症和1级腹泻。他的第四次输注推迟了一周,然后重新建立每周输注,对于接下来的4次注射没有腹泻或中性粒细胞减少症的证据。然后,患者接受CT检查以测量其转移肿瘤大小并查看胃切除的原始区域。根据RECIST标准,放射科医师测量与IMMU-130治疗前的基线相比转移性病灶的总和减少23%。在原始的胃切除区域中,似乎没有任何明显的病灶。此时患者的CEA滴度为7.2ng/mL,比IMMU-130前基线值14.5ng/mL大大降低。患者继续以相同剂量8.0mg/kg每周一次IMMU-130治疗,并且在总共13次输注后,他的CT研究显示,一个肝转移消失了,并且所有转移性病灶总和减少41%,根据RECIST构成部分响应。患者的全身情况改善,并且他恢复了正常的活动,同时继续接受每3周8mg/kg IMMU-130的维持治疗,再进行4次注射。在血液CEA的最后一次测量中,该值为4.8ng/mL,这在吸烟者的正常范围内,对于该患者就是此情况。

[0613] 实施例23:用hMN-15-CL2A-SN-38治疗复发性三重阴性转移性乳腺癌

[0614] 患有三重阴性转移性乳腺癌的以前用贝伐珠单抗加紫杉醇治疗而无响应的58岁女性表现为向几个肋骨、腰椎的转移,左肺中测量有直径3cm的孤立性病灶,伴有相当大的骨痛和疲劳。对她给予每个IgG与6个SN-38分子缀合的抗CEACAM6人源化单克隆抗体hMN-15IgG的实验疗法。每三周对她给予12mg/kg的输注,重复4剂,作为一个疗程。除了短期的2级中性粒细胞减少症和一些初期腹泻外,她良好耐受治疗,然后在休息2个月后再重复一个疗程。放射学检测表明她有根据RECIST标准的部分响应,因为指数病灶的直径总和减少了39%。她的一般情况(包括骨痛)也有所改善,并且她恢复到与她患病前几乎相同的活动水平。

[0615] 实施例24:用hMN-15-SN-38治疗复发性,通常抗性转移性结肠癌

[0616] 46岁女性患有IV期转移性结肠癌,有原发病灶切除的既往病史,也有同时肝转移到两个肝叶,以及扩散至右肺的单一病灶;这些转移瘤由CT测量为直径2至5cm。她在3年的时段内经历了各种化疗过程,包括5-氟尿嘧啶、亚叶酸、伊立替康、奥沙利铂、西妥昔单抗和

贝伐珠单抗。在两个时间,有疾病稳定或短期响应的证据,但她测量的病灶没有减少30%或更多。她在hMN-15-CL2A-SN-38治疗前的基线时血浆CEA滴度是46ng/mL,并且她的总指数病灶测量为总和92mm。

[0617] 在21天的周期内,用hMN-15-CL2A-SN-38的治疗以12mg/kg每周一次进行2周,之后为一周的休息期。该周期重复3次,仅伴有短期的中性粒细胞减少症和胃肠道副作用(恶心、呕吐、腹泻)。令人惊讶的是,尽管未能响应FOLFIRI治疗(其包括伊立替康,或CPT-11),但患者在完成治疗后根据RECIST标准仍显示部分缓解。然后对于接着的6个月,对她进行每个月一次以16mg/kg剂量的此疗法的维持日程表。随访扫描显示,作为部分响应(PR),她的疾病仍然得到控制,并且患者一般处于具有Kaaarnofsky的表现状态为90%的良好状况中。

[0618] 实施例25:用抗CSAp-SN-38缀合物治疗的具有IV期转移性疾病的结肠癌患者

[0619] 此患者在切除9cm乙状结肠腺癌,然后用FOLIFIRI和西妥昔单抗进行化学免疫疗法达6个月,然后用FOLFOX,随后再用贝伐珠单抗约9个月的时段后,表现出结肠癌转移到肝左叶和两个肺。在最初的切除并且然后开始治疗后10个月,根据病灶生长和出现于左肾上腺中的新转移,认为存在的稳定疾病显示进展。此时她的血浆CEA为52ng/mL,并且她的一般情况似乎恶化了,伴有腹痛、疲劳和交界性贫血,提示可能内部出血。

[0620] 现在每周对她给予12mg/kg剂量的hMu-9(抗CSAp)抗体的CL2A-SN-38缀合物达两周,休息一周,作为治疗周期,然后重复另外的治疗周期,每周测量她的血液计数,并接受针对胃肠道反应的阿托品药物。在第一次治疗周期之后注意到2级脱发,但是仅有1级中性粒细胞减少症。在3个治疗周期后,她的血浆CEA滴度降至19ng/ml,此时她的CT测量结果显示肝脏和肺部指数病灶减少了24.1%。在另外3个疗程后,她显示指数病灶31.4%的CT降低和肾上腺肿块大小约40%的缩小。认为该患者响应抗CSAp-CL2A-SN-38抗体-药物疗法,并继续该疗法。她的一般状况似乎有所改善,不容易疲劳,没有腹痛或不适,通常更有能量。

[0621] 实施例26:用抗CEACAM6-CL2A-SN-38免疫缀合物处理乳腺癌

[0622] 该患者具有三重阴性(不表达雌激素受体、孕酮受体或Her2/neu)转移性乳腺癌,该乳腺癌在过去3年内在几种不同的治疗后复发。她在两个肺中都出现了几个小肿瘤,以及向其C4、C5、T2和T3椎骨以及双侧肋骨的转移。由于她的溶骨性病灶,她正在进行标准治疗,现在开始用hMN-15-CL2A-SN-38以16mg/kg的剂量每周一次治疗3周,暂停一周,然后将此3-每周-周期疗法再恢复两次。在治疗后2周,进行CT扫描以评估响应,并且注意到2个小肺转移已经消失,而1个更大的病灶似乎减少了约40%。向椎骨的转移仍然存在,但C4和C5病灶似乎小约25%。在肋骨转移中,6个小病灶中的2个似乎在尺寸上减少得非常多,并且不确定是有活性的还是小的疤痕或坏死区域。患者的肿瘤标志物以及LDH滴度似乎显示稳定或降低的水平,表明疾病进展已经停止,并且还有一些疾病减少的证据。主观上,患者感觉好多了,不容易疲劳和骨痛并且呼吸改善。每次治疗后,她经历了一些极少的恶心和呕吐,一周之内就可以消退。唯一的另一副作用是短期的血小板减少症,这也在7天内消退。正在对她观察,并且将在2个月内恢复治疗周期。

[0623] 实施例27:用组合抗CEACAM5和抗CEACAM6-CL2A-SN-38免疫缀合物治疗转移性结肠癌

[0624] 该患者具有转移性结肠癌)具有肝脏中疾病的CT证据(右叶5cm病灶,左叶3cm病灶),以及对右肺的2个转移(2cm和3cm大小)。先前切除了结肠的原发性癌症,并且由于异

时性肝脏和肺部转移,患者具有术后治疗过程。在治疗期间,肝转移生长,并且一个肺转移变为两个,因此该患者是实验性化学免疫疗法的候选者。然后他开始服用双重抗体-药物缀合物拉贝珠单抗(hMN-14)-CL2A-SN-38和hMN-15-CL2A-SN-38的疗程,每种药物每隔一天以8mg/kg剂量给予,每周一次,持续2周,然后每月重复达4个月。治疗后两周,通过CT和实验室检查评估患者的状态。CT扫描显示右肝叶中的大肿瘤缩小50%,左叶中肿瘤缩小约33%,并且肺转移对于两个肿瘤累计缩小约20%。他的血液CEA滴度从治疗开始时的22ng/mL降至此随访时的6ng/mL。主观上,患者表示自己感觉更强壮,并且在日常活动中似乎更有活力。副作用是暂时性血小板减少症和白细胞减少症(在治疗后2周内恢复到正常范围),以及数次恶心和呕吐(由镇吐药控制)。按照计划,患者将在疾病状态的另一次检查后约2个月内恢复这些治疗周期。

[0625] 实施例28:连续输注抗体-药物缀合物

[0626] 先前对患者进行直肠癌切除,并按照常规治疗接受手术前和手术后的放射化疗。她已经没有肿瘤长达四年,但是现在表现出向右肝叶的3个大的转移性病灶,这通过常规CT和随访血液CEA值发现,所述血液CEA值在初始治疗后从3.0ng/mL升至6.3ng/mL。对她给予留置导管并且在17天内连续输注2mg/kg剂量的拉贝珠单抗-CL2A-SN-28。然后她在5周后以1mg/kg接受重复连续输注疗法,现在持续3周。三周后,CT扫描和血液CEA监测显示,1个肝转移消失了,并且另外两个相同或稍小。血液CEA滴度现在测量为2.4ng/mL。她不是症状性的,并且仅在治疗期间经历2级恶心和呕吐,2级中性粒细胞减少症,两者都随时间消退。

[0627] 实施例29:用抗CEACAM5免疫缀合物治疗晚期转移性结肠癌

[0628] 患者是50岁男性,其用针对转移性结肠癌的既往治疗失败。一线治疗是在第一周期以IROX(伊立替康+奥沙利铂)开始的**FOLFIRINOX + AVASTIN®**(以逐步方式建立)。在开始这种治疗之后,患者的CT显示肝转移瘤大小减小。这随后进行手术以除去肿瘤组织。辅助化疗是一线方案的延续(没有IROX部分),这导致短暂的无复发期。在约1年的时间间隔后,CT揭示肝转移复发。这导致二线方案(FOLFIRI+西妥昔单抗)的开始。另一个CT显示肝转移的响应。然后,进行肝转移的RF消融,然后继续用FOLFIRINOX+西妥昔单抗的辅助化疗,然后是维持西妥昔单抗达约1年。另一个CT扫描显示没有疾病的证据。进一步的扫描显示可能的肺结节,这已被证实。这导致了肺结节的楔形切除。随后,重新开始FOLFIRI+西妥昔单抗并继续。后来的CT扫描显示肺和肝转移。

[0629] 在施用hMN-14-CL2A-SN-38免疫缀合物时,患者具有晚期转移性结肠癌,具有肺和肝两者的转移,其对伊立替康(喜树碱)无响应。以12mg/kg的剂量施用hMN-14-CL2A-SN-38免疫缀合物,这每隔一周重复。患者根据RECIST标准显示部分响应及转移性肿瘤的降低。

[0630] 值得注意的是,在这12mg/kg(每隔一周给予)群组中仅一名患者显示2级血液学(中性粒细胞减少症),并且大多数患者具有1级或2级恶心、呕吐或脱发-这是抗体-药物缀合物的活性的体征,但耐受良好。抗体部分在喜树碱的改善的靶向性中的作用解释了先前对未缀合的伊立替康有抗性的癌症中SN-38部分的效力。

[0631] 实施例30:用抗MUC5ac-CL2A-SN-38免疫缀合物治疗转移性胰腺癌

[0632] 此44岁患者具有转移性胰腺癌的病史,胰头部的胰腺导管腺癌不能手术,并且显示向肝脏的左右叶的转移,前者测量为3x4cm,后者测量为2x3cm。对患者给予吉西他滨的过程,但没有显示客观响应。四周后,以8mg/kg的剂量每周两次对他i.v.给予hPAM4-CL2A-SN-

38达2周,休息一周,然后再重复2个周期。一周后进行CT研究,并且显示肿瘤肿块(所有部位)总体减少32% (部分响应),以及其血液CA19-9滴度从基线时的220降至放射学评估时的75。患者在每次用抗体-药物缀合物治疗后仅显示1级恶心和呕吐,并且在最后一次治疗周期结束时显示2级中性粒细胞减少症,这在4周后消退。没有给予预防输注反应的麻醉前用药。

[0633] 实施例31:hL243-CL2A-SN-38用于治疗抗性转移性结肠癌(mCRC)的用途

[0634] 患者是67岁的男性,患有转移性结肠癌。诊断后不久进行横结肠切除术后,患者在部分肝切除术以除去肝左叶中的转移性病灶之前接受4个周期的新辅助背景中的FOLFOX化疗。这随后是FOLFOX辅助方案,共10个周期的FOLFOX。

[0635] CT显示肝转移。他的靶病灶是肝左叶中3.0cm的肿瘤。非靶病灶包括肝脏内几个低密度的肿块。基线CEA是685ng/mL。

[0636] 在患者签署知情同意书后,每隔一周给予hL243-CL2A-SN-38 (10mg/kg) 达4个月。患者在第一次治疗后经历恶心(2级)和疲劳(2级),并继续治疗,无重大不良事件。进行的第一次响应评估(8剂后)通过计算机体层摄影术(CT)显示靶病灶缩小26%,并且其CEA水平降至245ng/mL。在第二次响应评估(12剂量)中,靶病灶缩小了35%。他的整体健康状况和临床症状得到相当大的改善。

[0637] 实施例32:用IMMU-114-CL2A-SN-38(抗HLA-DR-SN-38)处理复发滤泡性淋巴瘤

[0638] 在接受R-CHOP化疗以用于在各种区域淋巴结(颈部、腋窝、纵膈、腹股沟、腹部)和骨髓累及中呈现出广泛疾病的滤泡性淋巴瘤后,每周以10mg/kg的剂量给这名68岁男性给予实验剂IMMU-114-CL2A-SN-38(抗HLA-DR-CL2A-SN-38)达3周,休息3周,然后给予第二个疗程,再持续3周。然后通过CT对他评估指数肿瘤病灶的变化,并且根据CHESON标准显示23%的降低。再重复治疗2个过程,然后根据CT显示肿瘤缩小55%,这是部分响应。

[0639] 实施例33:用IMMU-114-CL2A-SN-38治疗复发性慢性淋巴细胞性白血病

[0640] 根据慢性淋巴细胞性白血病国际研讨会和世界卫生组织分类的定义,具有CLL病史的67岁男性在用氟达拉滨、地塞米松和利妥昔单抗,以及CVP方案的在先治疗之后呈现出复发性疾病。他现在有与全身的淋巴结肿大相关的发烧和盗汗、减少的血红蛋白和血小板生成,以及迅速上升的白细胞计数。他的LDH升高,并且β-2-微球蛋白几乎是正常的两倍。以每周8mg/kg的给药方案对患者给予用IMMU-114-CL2A-SN-38缀合物的治疗达4周,休息2周,然后再次重复周期。评估显示患者的血液学参数正在改善,并且他的循环CLL细胞的数目似乎在减少。然后再恢复治疗3个周期,此后他的血液学和实验室值表明他有部分响应。

[0641] 实施例34:使用hMN-15-CL2A-SN-38治疗难治性转移性非小细胞肺癌

[0642] 患者是58岁男性,经诊断患有非小细胞肺癌。最初对他给予卡铂、贝伐珠单抗的化疗方案达6个月,并显示响应,然后在进展后在接着的2年内进一步接受卡铂、依托泊苷、TAXOTERE®、吉西他滨的化疗过程,偶然响应持续不超过2个月。患者然后呈现出测量为5.5x3.5cm的左侧纵膈肿块和胸腔积液。

[0643] 在签署知情同意书后,对患者每隔一周以12mg/kg的剂量给予hMN-15-CL2A-SN-38。在前两次注射的过程中,经历短期的中性粒细胞减少症和腹泻,但这些在2天内消退或响应症状性药物。总共6次输注hMN-15-SN-38之后,靶病灶的CT评估显示22%的减少。患者继续此治疗达两个月,并且通过CT发现45%的部分响应。

[0644] 实施例35:用hA19-CL2A-SN-38处理滤泡性淋巴瘤患者。

[0645] 一名60岁的男性表现腹部疼痛,有可触及的肿块。患者进行了CT和FDG-PET研究,这证实了存在肿块以及在纵膈、腋窝和颈部淋巴结中存在病理性腺损伤。除了升高的LDH和β-2-微球蛋白外,实验室检测并不显著。骨髓活检揭示了几种小梁旁和血管周围淋巴样聚集体。这些是淋巴细胞的,根据免疫染色,表达CD20、CD19和CD10。最终诊断为2级滤泡性淋巴瘤,IVA期,FLIPI得分为4。最大累及结节的最长直径为7cm。对患者给予用CL2A接头与SN-38缀合的人源化抗CD19单克隆抗体IgG (hA19) (6个药物分子/IgG)。每周给药6mg/kg达连续4周,休息两周,然后每6周重复4治疗周的周期。5个周期后,骨髓和成像(CT)评估显示部分响应,其中可测量的病灶减少约60%,并且骨髓的浸润少得多。而且,LDH和β-2-微球蛋白滴度也降低。

[0646] 实施例36:用hA19-CL2A-SN-38处理复发性前体B细胞ALL

[0647] 此51岁女性已经在针对前体、Philadelphia染色体阴性、B细胞ALL的疗法下,所述ALL显示CD19、CD20、CD10、CD38和CD45的ALL细胞染色。超过20%的骨髓和血液淋巴母细胞表达CD19和CD20。患者接受了用氯法拉滨和阿糖胞苷的在先治疗,导致相当大的血液学毒性,但没有响应。也开始高剂量阿糖胞苷(ara-C)的过程,但患者不能耐受。通过输注6mg/kg对她每周给予hA19-CL2A-SN-38疗法达5周,然后休息2周,再重复此治疗2次。令人惊讶的是,她的血液和骨髓计数有所改善,足以确定部分响应。由于中性粒细胞减少(3级)休息2个月后,每隔一周以8mg/kg恢复治疗,再进行4个疗程。此时,她得到极大改善,并且正在考虑进行维持治疗,试图把她带到可成为干细胞移植候选者的阶段。

[0648] 实施例37:用抗CD22-CL2A-SN-38免疫缀合物治疗淋巴瘤

[0649] 患者是具有复发弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)的62岁男性。在6个疗程的R-CHOP化疗免疫治疗后,他现在呈现出纵膈、腋窝和腹股沟淋巴结中广泛的淋巴结扩散。每周以12mg/kg的剂量对他给予依帕珠单抗-CL2A-SN-38(抗CD22) x3,休息一周,然后再重复另外两个周期。一周后,通过CT成像对患者进行评估,并测量其肿瘤总体积并显示下降了35%(部分响应),这在未来3个月内似乎保持不变。副作用仅为治疗后的血小板减少症和1级恶心和呕吐,这在2周内消退。没有给予减少输注反应的治疗。

[0650] 实施例38:在一一线背景中用维妥珠单抗和依帕珠单抗-CL2A-SN-38组合疗法滤泡性淋巴瘤。

[0651] 35岁女性诊断为低级且良好FLIPI评分的滤泡性淋巴瘤,在其颈部淋巴结、两个腋窝和纵膈中呈现。她的脾脏没有扩大,并且骨髓活组织检查没有揭示疾病累及。她在症状上没有太大累及,只有升高的温度、盗汗、和比平常略疲倦的时段。她的内科医生决定不采取观察和等待的过程,而是对此女性给予不太积极的疗法,该疗法组合人源化抗CD20单克隆抗体维妥珠单抗的每周x4周(200mg/m<sup>2</sup>)皮下疗程与每周两次抗CD22依帕珠单抗-CL2A-SN-38疗程(每次输注剂量为8mg/kg)。这种组合疗法在2个月后重复,并且之后通过CT和FDG-PET成像研究以及骨髓活组织检查来评估患者。令人惊讶的是,注意到所有疾病都减少了约90%,然后在休息4周后再对她给予此组合疗法的另一过程。4周后评估显示放射学(和骨髓活组织检查)完全响应。她的内科医生决定在8个月后重复这一过程,并且放射/病理测试显示持续完全缓解。

[0652] 实施例39:使用维妥珠单抗-CL2A-SN-38的滤泡性淋巴瘤的一线治疗

[0653] 患者是41岁女性,呈现出低度滤泡性淋巴瘤,具有可测量的双侧颈部和腋窝淋巴结(各2-3cm)、直径4cm的纵膈肿块和肿大的脾脏。对她给予维妥珠单抗-CL2A-SN-38(抗CD20-CL2A-SN-38)疗法的3个疗程,每个疗程由每3周输注一次的10mg/kg组成。治疗完成后,通过CT的其肿瘤测量显示80%的降低。然后,再对她给予2个治疗过程,并且CT测量表明实现了完全响应。这由FDG-PET成像证实。

[0654] 实施例40:用与CL2A-SN-38缀合的1F5人源化抗体治疗复发的DLBCL

[0655] 53岁女性在显示对给予6个周期的R-CHOP化疗部分响应后8个月,在纵膈和腹部主动脉旁部位处呈现出复发性弥漫性大B细胞淋巴瘤。她拒绝进行更多的细胞毒性化疗,因此给予较温和的治疗,该治疗由每隔一周一次、输注5次的10mg/kg用CL2A接头与每分子抗体约6分子的SN-28缀合的人源化1F5抗CD20单克隆抗体组成。CT和FDG-PET研究表明,其淋巴瘤进一步减少了40%,因此在4周的休息期后,每3周以8mg/kg的剂量恢复治疗,输注总共5次。她的疾病评估揭示约80%的减少。

[0656] 实施例41:用利妥昔单抗-CL2A-SN-38治疗复发性慢性淋巴细胞性白血病

[0657] 具有8年CLL史的62岁男性呈现出疾病进展,该男性在过去响应了氟达拉滨、环磷酰胺和利妥昔单抗治疗,并且在复发后部分响应依鲁替尼,持续9个月。以12mg/kg的日程表每2周对患者给予利妥昔单抗-CL2A-SN-38单一治疗达3个疗程,降低到每隔一周8mg/kg,再持续4个疗程。观察到血细胞减少持续改善,这通过超过50%或血红蛋白水平高于11g/分升、绝对中性粒细胞计数高于1500个细胞/cmm、或血小板计数高于11k/cmm反映,这可持久约9个月。

[0658] 实施例42:用维妥珠单抗-CL2A-SN-38联合苯达莫司汀的DLBCL的一线治疗。

[0659] 一名59岁的男性表现出多个部位的DLBCL,包括胸部、腹部、腹股沟淋巴结和脾脏肿大,如通过CT、FDG-PET和免疫组织学/病理诊断证实。苯达莫司汀在第1天和第2天以90mg/m<sup>2</sup>的剂量给予,在第7天和第14天以6mg/kg的剂量与维妥珠单抗-CL2A-SN-38联合给药,每4周给予四个周期。此后,评估在放射学上显示部分响应。休息2个月后,将治疗再重复2个周期,然后放射学评估显示完全响应。血细胞减少症,主要是中性粒细胞减少症,是可管理的,并没有达到3级水平。

[0660] 实施例43:用维妥珠单抗-CL2A-SN-38联合来那度胺对套细胞淋巴瘤(MCL)的一线治疗。

[0661] 该患者是一名68岁男性,在呈现出胃肠道不适和嗜睡后被诊断患有MCL。结肠镜检测揭示了一个7cm的盲肠肿块,并且他的检测显示他有IV期疾病。每28天在第1天至第21天每天对他给予口服25mg来那度胺组合疗法。在两个周期后,每隔一周以剂量10mg/kg对他给予维妥珠单抗-CL2A-SN-38,进行3次治疗,休息2周。然后,将这再次重复。该治疗完成后两周,患者显示其测量的指数病灶的部分响应,并显现其它淋巴结的减少。四个月后,将来那度胺治疗重复21天,接着2个疗程的维妥珠单抗-SN-38。然后显示他的疾病进一步降低,尽管还不是完全响应。

[0662] 实施例44:具有复发性/难治性弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)的患者的依帕珠单抗-SN-38疗法

[0663] 具有体重减轻症状的65岁男性经历了腹上部肿块的活检,其被诊断为弥漫性大B细胞淋巴瘤。他用6个周期的标准R-CHOP(利妥昔单抗、环磷酰胺、多柔比星、长春新碱和泼

尼松)治疗。他有长期且持续的中性粒细胞减少症(700ANC),伴有轻度血小板减少症(50-70k/mL),但没有真正的贫血症。他的IPI较高。治疗后腹上部肿块未显示任何改变,并将其置于抗CD22依帕珠单抗-CL2A-SN-38的温和治疗方案中。这是每隔一周输注4mg/kg达4次输注,然后每3周一次再输注3次的方案。他的腹上淋巴瘤在一周后通过CT测量,并显示52%的显著减少。患者每3周将这种治疗再继续3个月,并继续显示其淋巴瘤肿块减少,伴随其体重稳定并且能量和活动改善。

[0664] 实施例45:具有复发滤泡性淋巴瘤的患者的人源化RFB4疗法

[0665] 一名42岁女性呈现出其下腹部剧烈、持续和重度的疼痛,该疼痛向她的背部辐射。实验室检测并不显著,但腹部超声显示左前下方的异质性实体肿块,测量为7.5x6.2x7.0cm。CT扫描显示左小肠系膜内的大肿块,伴有邻近的淋巴结的累及。肿块的CT引导穿刺活检显示其为3级滤泡性淋巴瘤。免疫组织化学显示B细胞型,及CD19、CD20、CD22、Bcl-2和Bcl-6阳性结果。PET研究显示膈肌上方、骨髓中或脾脏内无疾病,但骨髓活检确实证实淋巴瘤的累及。患者经历6个疗程的R-CHOP化疗,导致4个月后对此疗法的完全响应。然而,10个月后,她经历了复发,伴随着腹部肿块和邻近淋巴结的复发,以及脾脏肿大和更多的骨髓累及,如通过PET和活检研究确定。她现在开始每周以剂量8mg/kg用使用CL2A接头与每个IgG为6个SN-38分子缀合的人源化抗CD22单克隆抗体RFB4的治疗过程达3周,然后以8mg/kg每隔一周再继续4次治疗。两周后,她进行了CT和FDG-PET研究,并且其腹部损伤和脾脏显示40%的减少和骨髓累及的普遍减少。休息4周后,每周以4mg/kg治疗4周,接着每隔一周6mg/kg再进行5次治疗,所有测量病灶大小的总和的进一步可测量的减少为总共60%。对于接下来的5个月,患者每月一次继续8mg/kg hRFB4-CL2A-SN-38的维持治疗,并维持其治疗响应。

[0666] 实施例46:患有复发性/难治性急性淋巴母细胞性白血病的患者的依帕珠单抗-CL2A-SN-38疗法。

[0667] 具有CD22+前体B细胞急性淋巴母细胞性白血病(ALL)的29岁男性尚不响应PEG-门冬酰胺酶、环磷酰胺、柔红霉素、阿糖胞昔(ara-C)、长春新碱、亚叶酸、泼尼松、甲氨蝶呤和6-巯嘌呤的治疗,以及用G-CSF(Neupogen)的支持疗法,其在改良的Larson方案下作为诱导/维持治疗给予。患者的白血病是Philadelphia染色体阴性。根据血液和骨髓白血病母细胞计数,患者只显示最小的响应,4个月后疾病进展。然后以6mg/kg的初始日程表对他给予依帕珠单抗-CL2A-SN-38的每周给药达4周,然后每隔一周减少至6mg/kg再进行6次输注。然后通过血液和骨髓白血病母细胞以及脾脏大小和骨髓累及的FDG研究对患者进行评估,并且似乎实现了部分响应,患者一般体征和症状伴随改善。然后在接下来的8个月中继续此治疗,但是每隔一周以5mg/kg进行,治疗3周并且休息2周,并且实现了完全消退。目前正将患者作为造血干细胞移植的候选者评估。

[0668] 实施例47:患有复发/难治性急性淋巴母细胞性白血病的患者的人源化RFB4-CL2A-SN-38疗法

[0669] 在未能对HIDAC(高剂量ara-C疗法)响应之后,以每周10mg/kg的给药日程表对此名具有前体B细胞急性淋巴母细胞性白血病的20岁男性给予用与SN-38缀合的hRFB4IgG(平均6个药物分子/IgG)的人源化抗CD22疗法达两周,然后休息1周,接着每隔一周输注10mg/kg,再进行5次治疗。然后评估患者是否存在血液和骨髓白血病母细胞,并显示>90%的降

低。休息4周后,重复该治疗过程,并且在4周后的评估显示完全响应,没有最小限度残留疾病,如通过PCR测量。

[0670] 实施例48:在接受R-CHOP化疗的DLBCL患者中使用依帕珠单抗-CL2A-SN-38的巩固治疗

[0671] 这名56岁的女性被诊断为CD20和CD22阳性的3期弥漫性大B细胞淋巴瘤,该女性具有双侧颈部淋巴结肿大和测量为1.5-2.0cm的颈部淋巴结,以及3cm的右侧腋窝淋巴结以及测量为2.5-3.0cm的腹膜后和双侧盆腔淋巴结。对她进行每21天用非格司亭和预防性抗生素给予的标准R-CHOP化疗方案。接受6个周期的此治疗后,给予患者2个月的休息期,然后置于用每隔一周输注达3次治疗的8mg/kg依帕珠单抗-CL2A-SN-38的巩固治疗。虽然R-CHOP化疗后的响应是最小程度的(测量病灶的少于30%变化),但是用依帕珠单抗-CL2A-SN-38的巩固治疗导致部分响应(所有指标病灶的总和减少>50%)。休息3个月后,重复用依帕珠单抗-CL2A-SN-38治疗的此过程,再次对患者给予非格司亭和预防性抗生素,并维持其良好的缓解。

[0672] 实施例49:用IMMU-31-CL2A-SN-38治疗复发性转移性睾丸癌

[0673] 患者是30岁的男性,该男性具有其右侧睾丸的切除睾丸癌的病史,具有向两个肺的同步转移,该转移对联合化疗良好响应。诊断时,他的甲胎蛋白(AFP)血液滴度升高于1,110ng/mL,但是成功治疗后降至109ng/mL。现在,他在3年的时间段内呈现出逐渐升高的AFP滴度,因此对他的身体进行了CT和FDG-PET扫描,揭示了向两个肺的肺转移的复发。他接受用以6个药物分子/IgG与SN-38缀合的抗AFP抗体IMMU-31 IgG的治疗。他接受每周剂量12mg/kg的这种抗体-药物缀合物,持续4周周期的3周,再重复一个周期,但治疗剂减少至10mg/kg。然后将这再重复2个循环。两周后,他的肺部放射学检查揭示了转移已经消失了。他的血液AFP滴度现在是18ng/mL。患者恢复到正常活动并实现了完全响应。

[0674] 实施例50:用IMMU-31-CL2A-SN-38治疗复发性转移性肝细胞癌

[0675] 具有乙肝感染、酒精过量和吸烟史的58岁男性首先产生肝硬化,然后诊断为肝细胞癌。在切除其肝脏的部分后他有表现时,也有累及的区域淋巴结。患者接受索拉非尼治疗的过程,表明一些普遍的改善,但没有其区域淋巴结或2个肺(右肺)转移的任何降低。肝脏CT也提示可能有剩余肝实质中的复发。现在对该患者给予3个疗程的IMMU-31-CL2A-SN-38治疗,每个疗程包含每周16mg/kg达4周周期中的2周的日程表。在包括6个剂量的3个疗程之后,对患者进行重新评估,并且显示其循环AFP滴度从2,000ng/mL的基线值降低至170ng/mL,以及他的测量指标病灶的总和的20%减少。休息2个月后,再进行3个周期治疗过程,但每次输注的剂量降低到1mg/kg。一个月后,所有测量的病灶较大降低,降低到基线的35%,以及AFP血液滴度略微降低到100ng/mL。只要没有疾病进展或限制性毒性,患者正在进行每月一剂的维持治疗。

[0676] 实施例51:免疫缀合物贮存

[0677] 将实施例2中描述的缀合物纯化并用2-(N-吗啉代)乙磺酸(MES),pH 6.5进行缓冲液交换,并进一步用海藻糖(25mM终浓度)和聚山梨酯80(0.01%v/v终浓度)配制,最终缓冲液浓度由于添加赋形剂而变为22.25mM。将配制的缀合物冻干并贮存在密封的小瓶中,贮存在2°C-8°C。冻干的免疫缀合物在贮存条件下是稳定的并保持其生理活性。

[0678] \*\*\*

[0679] 从以上描述中,本领域技术人员可以容易地确定本发明的基本特征,并且在不脱离本发明的精神和范围的情况下,可以无需过度实验对本发明进行各种改变和修改以使其适应各种用途和条件。本文引用的所有专利,专利申请和出版物都通过引用并入本文。

## 序列表

<110> IMMUNOMEDICS, INC.

<120> 具有 CL2a 接头的抗体-SN-38 免疫缀合物

<130> IMM340W018

<140>

<141>

<150> 15/161, 806

<151> 2016-05-23

<150> 14/789, 375

<151> 2015-07-01

<160> 162

<170> PatentIn 3.5 版

[0001] <210> 1

<211> 44

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成  
多肽

<400> 1

Ser His Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly Tyr

1 5 10 15

Thr Val Glu Val Leu Arg Gln Gln Pro Pro Asp Leu Val Glu Phe Ala

20 25 30

Val Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala

35 40

<210> 2

<211> 45

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成

多肽

<400> 2

Cys Gly His Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly

1

5

10

15

Tyr Thr Val Glu Val Leu Arg Gln Gln Pro Pro Asp Leu Val Glu Phe

20

25

30

Ala Val Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala

35

40

45

[0002] <210> 3

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成

肽

<400> 3

Gln Ile Glu Tyr Leu Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile Gln Gln

1

5

10

15

Ala

<210> 4

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成  
肽

<400> 4

Cys Gly Gln Ile Glu Tyr Leu Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile  
1 5 10 15

Gln Gln Ala Gly Cys  
20

<210> 5

<211> 50

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成  
多肽

[0003]

<400> 5

Ser Leu Arg Glu Cys Glu Leu Tyr Val Gln Lys His Asn Ile Gln Ala  
1 5 10 15

Leu Leu Lys Asp Ser Ile Val Gln Leu Cys Thr Ala Arg Pro Glu Arg  
20 25 30

Pro Met Ala Phe Leu Arg Glu Tyr Phe Glu Arg Leu Glu Lys Glu Glu  
35 40 45

Ala Lys

50

<210> 6

<211> 55

<212> PRT

<213> 人工序列

&lt;220&gt;

<223> 人工序列的描述：合成  
多肽

&lt;400&gt; 6

Met	Ser	Cys	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Glu	Cys	Glu	Leu	Tyr	Val	Gln	Lys
1					5				10				15		

His	Asn	Ile	Gln	Ala	Leu	Leu	Lys	Asp	Ser	Ile	Val	Gln	Leu	Cys	Thr
									25				30		

Ala	Arg	Pro	Glu	Arg	Pro	Met	Ala	Phe	Leu	Arg	Glu	Tyr	Phe	Glu	Arg
						35			40				45		

Leu	Glu	Lys	Glu	Glu	Ala	Lys
					55	

[0004] &lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

<223> 人工序列的描述：合成  
肽

&lt;400&gt; 7

Cys	Gly	Phe	Glu	Glu	Leu	Ala	Trp	Lys	Ile	Ala	Lys	Met	Ile	Trp	Ser
1					5				10				15		

Asp	Val	Phe	Gln	Gln	Gly	Cys
					20	

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 51

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 8

Ser Leu Arg Glu Cys Glu Leu Tyr Val Gln Lys His Asn Ile Gln Ala  
 1 5 10 15

Leu Leu Lys Asp Val Ser Ile Val Gln Leu Cys Thr Ala Arg Pro Glu  
 20 25 30

Arg Pro Met Ala Phe Leu Arg Glu Tyr Phe Glu Lys Leu Glu Lys Glu  
 35 40 45

Glu Ala Lys  
 50

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 54

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人

[0005]

&lt;400&gt; 9

Ser Leu Lys Gly Cys Glu Leu Tyr Val Gln Leu His Gly Ile Gln Gln  
 1 5 10 15

Val Leu Lys Asp Cys Ile Val His Leu Cys Ile Ser Lys Pro Glu Arg  
 20 25 30

Pro Met Lys Phe Leu Arg Glu His Phe Glu Lys Leu Glu Lys Glu Glu  
 35 40 45

Asn Arg Gln Ile Leu Ala  
 50

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 44

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 10

Ser His Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly Tyr  
 1 5 10 15

Thr Val Glu Val Gly Gln Gln Pro Pro Asp Leu Val Asp Phe Ala Val  
 20 25 30

Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Arg Gln  
 35 40

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 44

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 11

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

[0006]

Val Glu Val Leu Arg His Gln Pro Ala Asp Leu Leu Glu Phe Ala Leu  
 20 25 30

Gln His Phe Thr Arg Leu Gln Gln Glu Asn Glu Arg  
 35 40

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 44

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

<223> 人工序列的描述：合成  
 多肽

&lt;400&gt; 12

Thr His Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly Tyr  
 1 5 10 15

Thr Val Glu Val Leu Arg Gln Gln Pro Pro Asp Leu Val Glu Phe Ala  
 20 25 30

Val Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala  
 35 40

<210> 13  
 <211> 44  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述：合成  
 多肽

<400> 13  
 Ser Lys Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly Tyr  
 1 5 10 15

[0007]

Thr Val Glu Val Leu Arg Gln Gln Pro Pro Asp Leu Val Glu Phe Ala  
 20 25 30

Val Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala  
 35 40

<210> 14  
 <211> 44  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述：合成  
 多肽

<400> 14  
 Ser Arg Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly Tyr  
 1 5 10 15

Thr Val Glu Val Leu Arg Gln Gln Pro Pro Asp Leu Val Glu Phe Ala  
 20 25 30

Val Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala  
 35 40

<210> 15  
 <211> 44  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述：合成  
 多肽

<400> 15  
 Ser His Ile Asn Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly Tyr  
 1 5 10 15

[0008]

Thr Val Glu Val Leu Arg Gln Gln Pro Pro Asp Leu Val Glu Phe Ala  
 20 25 30

Val Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala  
 35 40

<210> 16  
 <211> 44  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述：合成  
 多肽

<400> 16  
 Ser His Ile Gln Ile Pro Pro Ala Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly Tyr  
 1 5 10 15

Thr Val Glu Val Leu Arg Gln Gln Pro Pro Asp Leu Val Glu Phe Ala  
 20 25 30

Val Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala  
 35 40

<210> 17  
 <211> 44  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述：合成  
 多肽

<400> 17  
 Ser His Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Ser Glu Leu Leu Gln Gly Tyr  
 1 5 10 15

[0009]

Thr Val Glu Val Leu Arg Gln Gln Pro Pro Asp Leu Val Glu Phe Ala  
 20 25 30

Val Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala  
 35 40

<210> 18  
 <211> 44  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述：合成  
 多肽

<400> 18  
 Ser His Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Asp Leu Leu Gln Gly Tyr  
 1 5 10 15

Thr Val Glu Val Leu Arg Gln Gln Pro Pro Asp Leu Val Glu Phe Ala  
 20 25 30

Val Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala  
 35 40

<210> 19  
 <211> 44  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述：合成  
 多肽

<400> 19  
 Ser His Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Asn Gly Tyr  
 1 5 10 15

[0010]

Thr Val Glu Val Leu Arg Gln Gln Pro Pro Asp Leu Val Glu Phe Ala  
 20 25 30

Val Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala  
 35 40

<210> 20  
 <211> 44  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述：合成  
 多肽

<400> 20  
 Ser His Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Ala Tyr  
 1 5 10 15

Thr Val Glu Val Leu Arg Gln Gln Pro Pro Asp Leu Val Glu Phe Ala  
 20 25 30

Val Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala  
 35 40

<210> 21  
 <211> 44  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述：合成  
 多肽

<400> 21  
 Ser His Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly Tyr  
 1 5 10 15

[0011]

Ser Val Glu Val Leu Arg Gln Gln Pro Pro Asp Leu Val Glu Phe Ala  
 20 25 30

Val Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala  
 35 40

<210> 22  
 <211> 44  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述：合成  
 多肽

<400> 22  
 Ser His Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly Tyr  
 1 5 10 15

Thr Val Asp Val Leu Arg Gln Gln Pro Pro Asp Leu Val Glu Phe Ala  
 20 25 30

Val Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala  
 35 40

<210> 23  
 <211> 44  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述：合成  
 多肽

<400> 23  
 Ser His Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly Tyr  
 1 5 10 15

[0012]

Thr Val Glu Val Leu Lys Gln Gln Pro Pro Asp Leu Val Glu Phe Ala  
 20 25 30

Val Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala  
 35 40

<210> 24  
 <211> 44  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述：合成  
 多肽

<400> 24  
 Ser His Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly Tyr  
 1 5 10 15

Thr Val Glu Val Leu Arg Asn Gln Pro Pro Asp Leu Val Glu Phe Ala  
 20 25 30

Val Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala  
 35 40

<210> 25  
 <211> 44  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述：合成  
 多肽

<400> 25  
 Ser His Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly Tyr  
 1 5 10 15

[0013]

Thr Val Glu Val Leu Arg Gln Asn Pro Pro Asp Leu Val Glu Phe Ala  
 20 25 30

Val Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala  
 35 40

<210> 26  
 <211> 44  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述：合成  
 多肽

<400> 26  
 Ser His Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly Tyr  
 1 5 10 15

Thr Val Glu Val Leu Arg Gln Gln Pro Pro Glu Leu Val Glu Phe Ala  
 20 25 30

Val Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala  
 35 40

<210> 27  
 <211> 44  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述：合成  
 多肽

<400> 27  
 Ser His Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly Tyr  
 1 5 10 15

[0014]

Thr Val Glu Val Leu Arg Gln Gln Pro Pro Asp Leu Val Asp Phe Ala  
 20 25 30

Val Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala  
 35 40

<210> 28  
 <211> 44  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述：合成  
 多肽

<400> 28  
 Ser His Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly Tyr  
 1 5 10 15

Thr Val Glu Val Leu Arg Gln Gln Pro Pro Asp Leu Val Glu Phe Leu  
 20 25 30

Val Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala  
 35 40

<210> 29  
 <211> 44  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述：合成  
 多肽

<400> 29  
 Ser His Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly Tyr  
 1 5 10 15

[0015]

Thr Val Glu Val Leu Arg Gln Gln Pro Pro Asp Leu Val Glu Phe Ile  
 20 25 30

Val Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala  
 35 40

<210> 30  
 <211> 44  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述：合成  
 多肽

<400> 30  
 Ser His Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly Tyr  
 1 5 10 15

Thr Val Glu Val Leu Arg Gln Gln Pro Pro Asp Leu Val Glu Phe Val  
 20 25 30

Val Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala  
 35 40

<210> 31  
 <211> 44  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述：合成  
 多肽

<400> 31  
 Ser His Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly Tyr  
 1 5 10 15

[0016]

Thr Val Glu Val Leu Arg Gln Gln Pro Pro Asp Leu Val Glu Phe Ala  
 20 25 30

Val Asp Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala  
 35 40

<210> 32  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述：合成  
 肽

<400> 32  
 Asn Ile Glu Tyr Leu Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile Gln Gln  
 1 5 10 15

Ala

<210> 33

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成  
肽

<400> 33

Gln Leu Glu Tyr Leu Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile Gln Gln

1 5 10 15

Ala

[0017]

<210> 34

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成  
肽

<400> 34

Gln Val Glu Tyr Leu Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile Gln Gln

1 5 10 15

Ala

<210> 35

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成  
肽

<400> 35

Gln Ile Asp Tyr Leu Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile Gln Gln  
1 5 10 15

Ala

<210> 36

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

[0018] <223> 人工序列的描述：合成  
肽

<400> 36

Gln Ile Glu Phe Leu Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile Gln Gln  
1 5 10 15

Ala

<210> 37

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成  
肽

<400> 37

Gln Ile Glu Thr Leu Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile Gln Gln

1

5

10

15

Ala

&lt;210&gt; 38

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

<223> 人工序列的描述：合成  
肽

&lt;400&gt; 38

Gln Ile Glu Ser Leu Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile Gln Gln

1

5

10

15

[0019]

Ala

&lt;210&gt; 39

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

<223> 人工序列的描述：合成  
肽

&lt;400&gt; 39

Gln Ile Glu Tyr Ile Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile Gln Gln

1

5

10

15

Ala

&lt;210&gt; 40

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成

肽

<400> 40

Gln Ile Glu Tyr Val Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile Gln Gln

1 5 10 15

Ala

<210> 41

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

[0020]

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成

肽

<400> 41

Gln Ile Glu Tyr Leu Ala Arg Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile Gln Gln

1 5 10 15

Ala

<210> 42

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成

肽

<400> 42

Gln Ile Glu Tyr Leu Ala Lys Asn Ile Val Asp Asn Ala Ile Gln Gln  
1 5 10 15

Ala

<210> 43

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成  
肽

<400> 43

Gln Ile Glu Tyr Leu Ala Lys Gln Ile Val Glu Asn Ala Ile Gln Gln  
1 5 10 15  
[0021]

Ala

<210> 44

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成  
肽

<400> 44

Gln Ile Glu Tyr Leu Ala Lys Gln Ile Val Asp Gln Ala Ile Gln Gln  
1 5 10 15

Ala

<210> 45

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成  
肽

<400> 45

Gln Ile Glu Tyr Leu Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile Asn Gln

1

5

10

15

Ala

<210> 46

<211> 17

<212> PRT

[0022] <213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成  
肽

<400> 46

Gln Ile Glu Tyr Leu Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile Gln Asn

1

5

10

15

Ala

<210> 47

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成

肽

<400> 47

Gln Ile Glu Tyr Leu Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile Gln Gln  
1 5 10 15

Leu

<210> 48

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成

肽

<400> 48

[0023] Gln Ile Glu Tyr Leu Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile Gln Gln  
1 5 10 15

Ile

<210> 49

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成

肽

<400> 49

Gln Ile Glu Tyr Leu Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile Gln Gln  
1 5 10 15

Val

<210> 50

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成  
肽

<400> 50

Gln Ile Glu Tyr Val Ala Lys Gln Ile Val Asp Tyr Ala Ile His Gln

1 5 10 15

Ala

<210> 51

<211> 17

[0024] <212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成  
肽

<400> 51

Gln Ile Glu Tyr Lys Ala Lys Gln Ile Val Asp His Ala Ile His Gln

1 5 10 15

Ala

<210> 52

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成  
肽

<400> 52

Gln Ile Glu Tyr His Ala Lys Gln Ile Val Asp His Ala Ile His Gln  
1 5 10 15

Ala

<210> 53

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成  
肽

[0025]

<400> 53

Gln Ile Glu Tyr Val Ala Lys Gln Ile Val Asp His Ala Ile His Gln  
1 5 10 15

Ala

<210> 54

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成  
肽

<400> 54

Pro Leu Glu Tyr Gln Ala Gly Leu Leu Val Gln Asn Ala Ile Gln Gln  
1 5 10 15

Ala Ile

<210> 55

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成  
肽

<400> 55

Leu Leu Ile Glu Thr Ala Ser Ser Leu Val Lys Asn Ala Ile Gln Leu

1 5 10 15

Ser Ile

[0026]

<210> 56

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成  
肽

<400> 56

Leu Ile Glu Glu Ala Ala Ser Arg Ile Val Asp Ala Val Ile Glu Gln

1 5 10 15

Val Lys

<210> 57

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成  
肽

<400> 57

Ala Leu Tyr Gln Phe Ala Asp Arg Phe Ser Glu Leu Val Ile Ser Glu  
1 5 10 15

Ala Leu

<210> 58

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

[0027] <223> 人工序列的描述: 合成  
肽

<400> 58

Leu Glu Gln Val Ala Asn Gln Leu Ala Asp Gln Ile Ile Lys Glu Ala  
1 5 10 15

Thr

<210> 59

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成  
肽

<400> 59

Phe Glu Glu Leu Ala Trp Lys Ile Ala Lys Met Ile Trp Ser Asp Val

1

5

10

15

Phe

&lt;210&gt; 60

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

<223> 人工序列的描述：合成  
肽

&lt;400&gt; 60

Glu Leu Val Arg Leu Ser Lys Arg Leu Val Glu Asn Ala Val Leu Lys

1

5

10

15

[0028] Ala Val

&lt;210&gt; 61

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

<223> 人工序列的描述：合成  
肽

&lt;400&gt; 61

Thr Ala Glu Glu Val Ser Ala Arg Ile Val Gln Val Val Thr Ala Glu

1

5

10

15

Ala Val

&lt;210&gt; 62

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成

肽

<400> 62

Gln Ile Lys Gln Ala Ala Phe Gln Leu Ile Ser Gln Val Ile Leu Glu

1 5 10 15

Ala Thr

<210> 63

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

[0029]

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成

肽

<400> 63

Leu Ala Trp Lys Ile Ala Lys Met Ile Val Ser Asp Val Met Gln Gln

1 5 10 15

<210> 64

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成

肽

<400> 64

Asp Leu Ile Glu Glu Ala Ala Ser Arg Ile Val Asp Ala Val Ile Glu

1 5 10 15

Gln Val Lys Ala Ala Gly Ala Tyr  
20

<210> 65  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述：合成  
肽

<400> 65  
Leu Glu Gln Tyr Ala Asn Gln Leu Ala Asp Gln Ile Ile Lys Glu Ala  
1 5 10 15

Thr Glu

[0030]

<210> 66  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述：合成  
肽

<400> 66  
Phe Glu Glu Leu Ala Trp Lys Ile Ala Lys Met Ile Trp Ser Asp Val  
1 5 10 15

Phe Gln Gln Cys  
20

<210> 67  
<211> 17  
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成  
肽

<400> 67

Gln Ile Glu Tyr Leu Ala Lys Gln Ile Pro Asp Asn Ala Ile Gln Gln  
1 5 10 15

Ala

<210> 68

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

[0031] <223> 人工序列的描述: 合成  
肽

<400> 68

Lys Gly Ala Asp Leu Ile Glu Glu Ala Ala Ser Arg Ile Val Asp Ala  
1 5 10 15

Val Ile Glu Gln Val Lys Ala Ala Gly

20 25

<210> 69

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成  
肽

<400> 69

Lys Gly Ala Asp Leu Ile Glu Glu Ala Ala Ser Arg Ile Pro Asp Ala

1	5	10	15
---	---	----	----

Pro Ile Glu Gln Val Lys Ala Ala Gly

20	25
----	----

<210> 70

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成  
肽

<400> 70

Pro Glu Asp Ala Glu Leu Val Arg Leu Ser Lys Arg Leu Val Glu Asn

1	5	10	15
---	---	----	----

[0032] Ala Val Leu Lys Ala Val Gln Gln Tyr

20	25
----	----

<210> 71

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成  
肽

<400> 71

Pro Glu Asp Ala Glu Leu Val Arg Thr Ser Lys Arg Leu Val Glu Asn

1	5	10	15
---	---	----	----

Ala Val Leu Lys Ala Val Gln Gln Tyr

20	25
----	----

<210> 72

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成

肽

<400> 72

Pro Glu Asp Ala Glu Leu Val Arg Leu Ser Lys Arg Asp Val Glu Asn

1 5 10 15

Ala Val Leu Lys Ala Val Gln Gln Tyr

20 25

<210> 73

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

[0033]

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成

肽

<400> 73

Pro Glu Asp Ala Glu Leu Val Arg Leu Ser Lys Arg Leu Pro Glu Asn

1 5 10 15

Ala Val Leu Lys Ala Val Gln Gln Tyr

20 25

<210> 74

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成

肽

<400> 74

Pro Glu Asp Ala Glu Leu Val Arg Leu Ser Lys Arg Leu Pro Glu Asn  
 1 5 10 15

Ala Pro Leu Lys Ala Val Gln Gln Tyr

20 25

<210> 75

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成  
 肽

<400> 75

Pro Glu Asp Ala Glu Leu Val Arg Leu Ser Lys Arg Leu Val Glu Asn  
 1 5 10 15

[0034]

Ala Val Glu Lys Ala Val Gln Gln Tyr

20 25

<210> 76

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成  
 肽

<400> 76

Glu Glu Gly Leu Asp Arg Asn Glu Glu Ile Lys Arg Ala Ala Phe Gln  
 1 5 10 15

Ile Ile Ser Gln Val Ile Ser Glu Ala

20 25

<210> 77

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成  
肽

<400> 77

Leu Val Asp Asp Pro Leu Glu Tyr Gln Ala Gly Leu Leu Val Gln Asn

1 5 10 15

Ala Ile Gln Gln Ala Ile Ala Glu Gln

20 25

<210> 78

<211> 25

<212> PRT

[0035] <213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成  
肽

<400> 78

Gln Tyr Glu Thr Leu Leu Ile Glu Thr Ala Ser Ser Leu Val Lys Asn

1 5 10 15

Ala Ile Gln Leu Ser Ile Glu Gln Leu

20 25

<210> 79

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成

肽

&lt;400&gt; 79

Leu Glu Lys Gln Tyr Gln Glu Gln Leu Glu Glu Glu Val Ala Lys Val  
 1 5 10 15

Ile Val Ser Met Ser Ile Ala Phe Ala

20 25

&lt;210&gt; 80

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人工序列的描述：合成

肽

&lt;400&gt; 80

[0036] Asn Thr Asp Glu Ala Gln Glu Glu Leu Ala Trp Lys Ile Ala Lys Met  
 1 5 10 15

Ile Val Ser Asp Ile Met Gln Gln Ala

20 25

&lt;210&gt; 81

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人工序列的描述：合成

肽

&lt;400&gt; 81

Val Asn Leu Asp Lys Lys Ala Val Leu Ala Glu Lys Ile Val Ala Glu  
 1 5 10 15

Ala Ile Glu Lys Ala Glu Arg Glu Leu

20

25

&lt;210&gt; 82

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

<223> 人工序列的描述：合成  
肽

&lt;400&gt; 82

Asn Gly Ile Leu Glu Leu Glu Thr Lys Ser Ser Lys Leu Val Gln Asn  
1 5 10 15Ile Ile Gln Thr Ala Val Asp Gln Phe  
20 25

[0037] &lt;210&gt; 83

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

<223> 人工序列的描述：合成  
肽

&lt;400&gt; 83

Thr Gln Asp Lys Asn Tyr Glu Asp Glu Leu Thr Gln Val Ala Leu Ala  
1 5 10 15Leu Val Glu Asp Val Ile Asn Tyr Ala  
20 25

&lt;210&gt; 84

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

<223> 人工序列的描述：合成  
肽

&lt;400&gt; 84

Glu Thr Ser Ala Lys Asp Asn Ile Asn Ile Glu Glu Ala Ala Arg Phe  
1 5 10 15Leu Val Glu Lys Ile Leu Val Asn His  
20 25

&lt;210&gt; 85

&lt;211&gt; 330

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

<223> 人工序列的描述：合成  
多肽

[0038]

&lt;400&gt; 85

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
1 5 10 15Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
20 25 30Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
35 40 45Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
50 55 60Leu 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 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

[0039]

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
-----	-----	-----

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> 86

<211> 330

[0040] <212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成  
多肽

<400> 86

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

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

[0041] 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  
 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  
 [0042] 325 330

<210> 87

<211> 44

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成  
多肽

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> Ser 或 Thr

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (2)..(2)

<223> His, Lys 或 Arg

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (4)..(4)  
<223> Gln 或 Asn

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (8)..(8)  
<223> Gly 或 Ala

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (10)..(10)  
<223> Thr 或 Ser

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (11)..(11)  
<223> Glu 或 Asp

[0043] <221> MOD\_RES  
<222> (14)..(14)  
<223> Gln 或 Asn

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (15)..(15)  
<223> Gly 或 Ala

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (17)..(17)  
<223> Thr 或 Ser

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (19)..(19)  
<223> Glu 或 Asp

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (22)..(22)

<223> Arg 或 Lys

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (23)..(24)

<223> Gln 或 Asn

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (27)..(27)

<223> Asp 或 Glu

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (30)..(30)

<223> Glu 或 Asp

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (32)..(32)

<223> Ala, Leu, Ile 或 Val

[0044]

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (34)..(34)

<223> Glu 或 Asp

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (37)..(37)

<223> Thr 或 Ser

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (38)..(38)

<223> Arg 或 Lys

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (40)..(40)

<223> Arg 或 Lys

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (41)..(41)

<223> Glu 或 Asp

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (42)..(42)

<223> Ala, Leu, Ile 或 Val

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (43)..(43)

<223> Arg 或 Lys

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (44)..(44)

<223> Ala, Leu, Ile 或 Val

<400> 87

Xaa Xaa Ile Xaa Ile Pro Pro Xaa Leu Xaa Xaa Leu Leu Xaa Xaa Tyr

1

5

10

15

[0045]

Xaa Val Xaa Val Leu Xaa Xaa Xaa Pro Pro Xaa Leu Val Xaa Phe Xaa

20

25

30

Val Xaa Tyr Phe Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

35

40

<210> 88

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成  
肽

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> Gln 或 Asn

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (2)..(2)

<223> Ile, Leu 或 Val

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (3)..(3)

<223> Glu 或 Asp

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (4)..(4)

<223> Tyr, Phe, Thr 或 Ser

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (5)..(5)

<223> Leu, Ile 或 Val

[0046]

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (7)..(7)

<223> Lys 或 Arg

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (8)..(8)

<223> Gln 或 Asn

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (11)..(11)

<223> Asp 或 Glu

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (12)..(12)

<223> Asn 或 Gln

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (15)..(16)

<223> Gln 或 Asn

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (17)..(17)

<223> Ala, Leu, Ile 或 Val

<400> 88

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ala Xaa Xaa Ile Val Xaa Xaa Ala Ile Xaa Xaa

1 5 10 15

Xaa

<210> 89

<211> 44

<212> PRT

<213> 人工序列

[0047]

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成  
多肽

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> Ser 或 Thr

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (4)..(4)

<223> Gln 或 Asn

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (10)..(10)

<223> Thr 或 Ser

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (18)..(18)

<223> Val, Ile, Leu 或 Ala

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (23)..(23)

<223> Gln 或 Asn

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (33)..(33)

<223> Val, Ile, Leu 或 Ala

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (34)..(34)

<223> Glu 或 Asp

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (37)..(37)

[0048] <223> Thr 或 Ser

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (38)..(38)

<223> Arg 或 Lys

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (40)..(40)

<223> Arg 或 Lys

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (42)..(42)

<223> Ala, Leu, Ile 或 Val

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (44)..(44)

<223> Ala, Leu, Ile 或 Val

<400> 89

Xaa His Ile Xaa Ile Pro Pro Gly Leu Xaa Glu Leu Leu Gln Gly Tyr  
 1 5 10 15

Thr Xaa Glu Val Leu Arg Xaa Gln Pro Pro Asp Leu Val Glu Phe Ala  
 20 25 30

Xaa Xaa Tyr Phe Xaa Xaa Leu Xaa Glu Xaa Arg Xaa  
 35 40

<210> 90

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成  
肽

<400> 90

[0049] Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Ala Val Ala  
 1 5 10

<210> 91

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成  
肽

<400> 91

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr  
 1 5

<210> 92

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成  
肽

<400> 92

Gln Gln His Tyr Ile Thr Pro Leu Thr

1 5

<210> 93

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成  
肽

<400> 93

Asn Tyr Gly Met Asn

1 5

[0050]

<210> 94

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成  
肽

<400> 94

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Thr Asp Asp Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 95

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成  
肽

<400> 95

Gly Gly Phe Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val  
1 5 10

<210> 96

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成  
肽

<400> 96

[0051] Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ser Val Ala  
1 5 10

<210> 97

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成  
肽

<400> 97

Trp Thr Ser Thr Arg His Thr  
1 5

<210> 98

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成  
肽

<400> 98

Gln Gln Tyr Ser Leu Tyr Arg Ser

1 5

<210> 99

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成  
肽

<400> 99

Thr Tyr Trp Met Ser

1 5

[0052]

<210> 100

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成  
肽

<400> 100

Glu Ile His Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu Lys

1 5 10 15

Asp

<210> 101

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成  
肽

<400> 101

Leu Tyr Phe Gly Phe Pro Trp Phe Ala Tyr  
1 5 10

<210> 102

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成  
肽

<400> 102

[0053] Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu  
1 5 10 15

<210> 103

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成  
肽

<400> 103

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser  
1 5

<210> 104

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成  
肽

<400> 104

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Pro Thr

1 5

<210> 105

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成  
肽

<400> 105

Asn Tyr Gly Met Asn

1 5

[0054]

<210> 106

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成  
肽

<400> 106

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 107

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成  
肽

<400> 107

Lys Gly Trp Met Asp Phe Asn Ser Ser Leu Asp Tyr  
1 5 10

<210> 108

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成  
肽

<400> 108

[0055] Ser Ala Ser Ser Arg Val Ser Tyr Ile His  
1 5 10

<210> 109

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成  
肽

<400> 109

Gly Thr Ser Thr Leu Ala Ser  
1 5

<210> 110

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成  
肽

<400> 110

Gln Gln Trp Ser Tyr Asn Pro Pro Thr

1 5

<210> 111

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成  
肽

<400> 111

Asp Tyr Tyr Met Ser

1 5

[0056]

<210> 112

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成  
肽

<400> 112

Phe Ile Ala Asn Lys Ala Asn Gly His Thr Thr Asp Tyr Ser Pro Ser

1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 113

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成  
肽

<400> 113

Asp Met Gly Ile Arg Trp Asn Phe Asp Val  
1 5 10

<210> 114

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成  
肽

<400> 114

[0057] Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Arg Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His  
1 5 10 15

<210> 115

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成  
肽

<400> 115

Thr Val Ser Asn Arg Phe Ser  
1 5

<210> 116

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成  
肽

<400> 116

Ser Gln Ser Ser His Val Pro Pro Thr

1 5

<210> 117

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成  
肽

<400> 117

Asn Tyr Gly Val Asn

1 5

[0058]

<210> 118

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成  
肽

<400> 118

Trp Ile Asn Pro Asn Thr Gly Glu Pro Thr Phe Asp Asp Asp Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 119

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成  
肽

<400> 119

Ser Arg Gly Lys Asn Glu Ala Trp Phe Ala Tyr  
1 5 10

<210> 120

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成  
肽

<400> 120

[0059] Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ala Asn His Lys Tyr Leu Ala  
1 5 10 15

<210> 121

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成  
肽

<400> 121

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser  
1 5

<210> 122

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成  
肽

<400> 122

His Gln Tyr Leu Ser Ser Trp Thr Phe

1 5

<210> 123

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成  
肽

<400> 123

Ser Tyr Trp Leu His

1 5

[0060]

<210> 124

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成  
肽

<400> 124

Tyr Ile Asn Pro Arg Asn Asp Tyr Thr Glu Tyr Asn Gln Asn Phe Lys

1 5 10 15

Asp

<210> 125

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成  
肽

<400> 125

Arg Asp Ile Thr Thr Phe Tyr

1 5

<210> 126

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成  
肽

<400> 126

[0061] Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu  
1 5 10 15

<210> 127

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成  
肽

<400> 127

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 128

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成  
肽

<400> 128

Phe Gln Gly Ser Arg Val Pro Tyr Thr

1 5

<210> 129

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成  
肽

<400> 129

Glu Tyr Val Ile Thr

1 5

[0062]

<210> 130

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成  
肽

<400> 130

Glu Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

<210> 131

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成  
肽

<400> 131  
Glu Asp Leu  
1

<210> 132  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述: 合成  
肽

<400> 132  
Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Tyr  
1 5 10

[0063] <210> 133  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述: 合成  
肽

<400> 133  
Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser  
1 5

<210> 134  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述: 合成  
肽

<400> 134  
His Gln Trp Asn Arg Tyr Pro Tyr Thr  
1 5

<210> 135  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述: 合成  
肽

<400> 135  
Ser Tyr Val Leu His  
1 5

[0064] <210> 136  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述: 合成  
肽

<400> 136  
Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Gln Tyr Asn Glu Lys Phe Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 137  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成  
肽

<400> 137  
Gly Phe Gly Gly Ser Tyr Gly Phe Ala Tyr  
1 5 10

<210> 138  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述: 合成  
肽

<400> 138  
Ser Tyr Val Ile His  
1 5

[0065] <210> 139  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述: 合成  
肽

<400> 139  
Tyr Ile His Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 140  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列

〈220〉

〈223〉 人工序列的描述：合成  
肽

〈400〉 140

Ser Gly Gly Gly Asp Pro Phe Ala Tyr  
1 5

〈210〉 141

〈211〉 11

〈212〉 PRT

〈213〉 人工序列

〈220〉

〈223〉 人工序列的描述：合成  
肽

〈400〉 141

Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Tyr Ile Gly  
1 5 10

[0066]

〈210〉 142

〈211〉 7

〈212〉 PRT

〈213〉 人工序列

〈220〉

〈223〉 人工序列的描述：合成  
肽

〈400〉 142

Tyr Thr Ser Ala Leu Leu Pro  
1 5

〈210〉 143

〈211〉 8

〈212〉 PRT

〈213〉 人工序列

〈220〉

<223> 人工序列的描述: 合成  
肽

<400> 143  
Leu Gln Tyr Asp Asp Leu Trp Thr  
1 5

<210> 144  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述: 合成  
肽

<400> 144  
Asn Tyr Gly Met Asn  
1 5

[0067] <210> 145  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述: 合成  
肽

<400> 145  
Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Arg Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 146  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成  
肽

<400> 146

Asp Ile Thr Ala Val Val Pro Thr Gly Phe Asp Tyr  
1 5 10

<210> 147

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成  
肽

<400> 147

Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala  
1 5 10

[0068]

<210> 148

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成  
肽

<400> 148

Ala Ala Ser Asn Leu Ala Asp  
1 5

<210> 149

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成  
肽

<400> 149  
Gln His Phe Trp Thr Thr Pro Trp Ala  
1 5

<210> 150  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述: 合成  
肽

<400> 150  
Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile His  
1 5 10

[0069] <210> 151  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述: 合成  
肽

<400> 151  
Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser  
1 5

<210> 152  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述: 合成  
肽

<400> 152  
Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr  
1 5

<210> 153  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述: 合成  
肽

<400> 153  
Ser Tyr Asn Met His  
1 5

[0070] <210> 154  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述: 合成  
肽

<400> 154  
Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 155  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成  
肽

<400> 155  
Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asp Val  
1 5 10

<210> 156  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述: 合成  
肽

<400> 156  
Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Leu Asn  
1 5 10 15

[0071] <210> 157  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述: 合成  
肽

<400> 157  
Asp Ala Ser Asn Leu Val Ser  
1 5

<210> 158  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述: 合成  
肽

<400> 158  
Gln Gln Ser Thr Glu Asp Pro Trp Thr  
1 5

<210> 159  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述: 合成  
肽

<400> 159  
Ser Tyr Trp Met Asn  
1 5

[0072] <210> 160  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述: 合成  
肽

<400> 160  
Gln Ile Trp Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Phe Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 161  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成  
肽

<400> 161  
Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr  
1 5 10 15

<210> 162

[0073] <211> 16  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成  
肽

<400> 162  
Glu Phe Pro Lys Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser Ser Gly Gly Ala Pro  
1 5 10 15

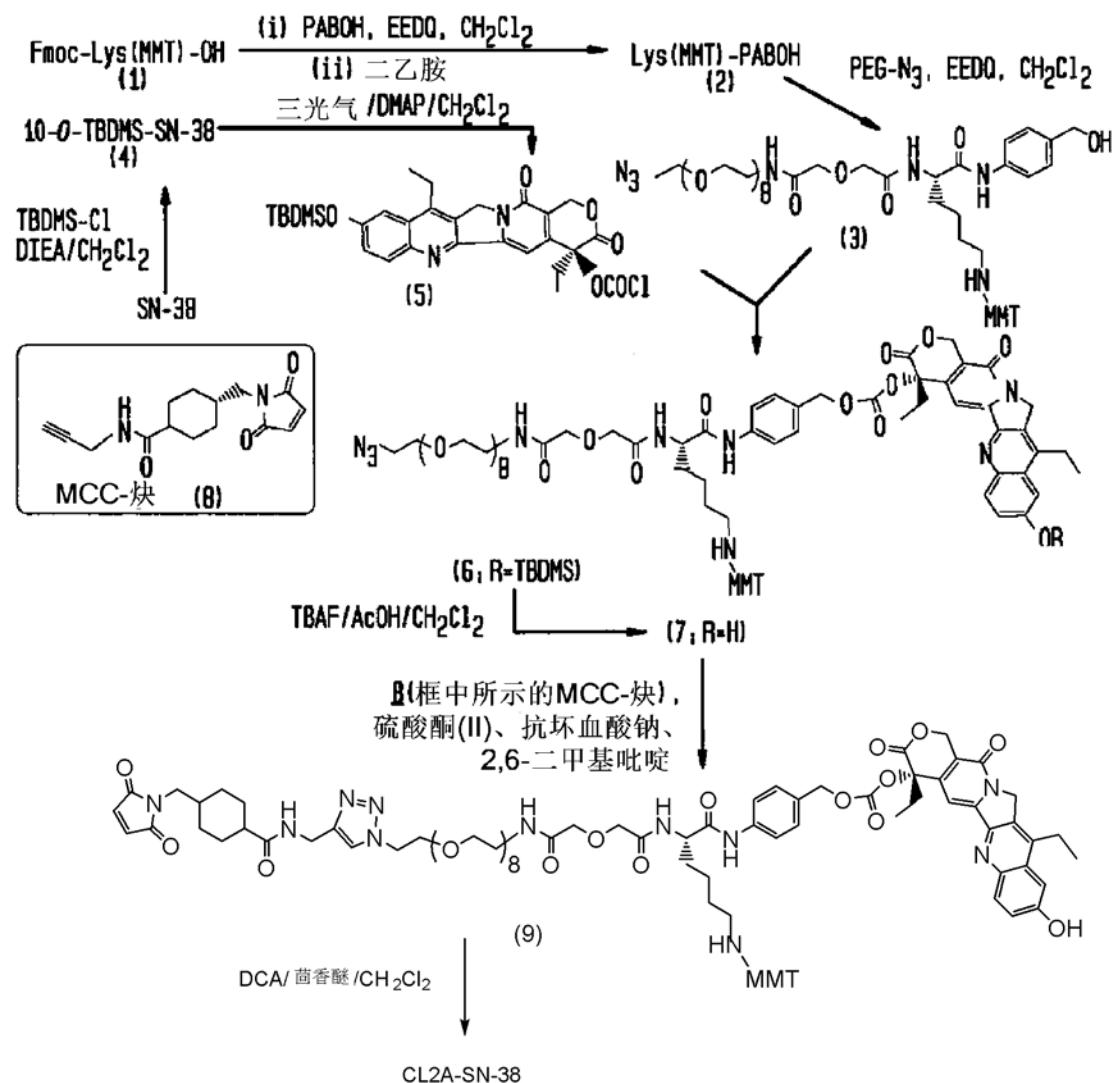


图1

Capan-1荷瘤小鼠中MAb-CL2A-SN38  
免疫缀合物的治疗效力

(250  $\mu$ g 每周两次 $\times$ 4周), n = 9-10

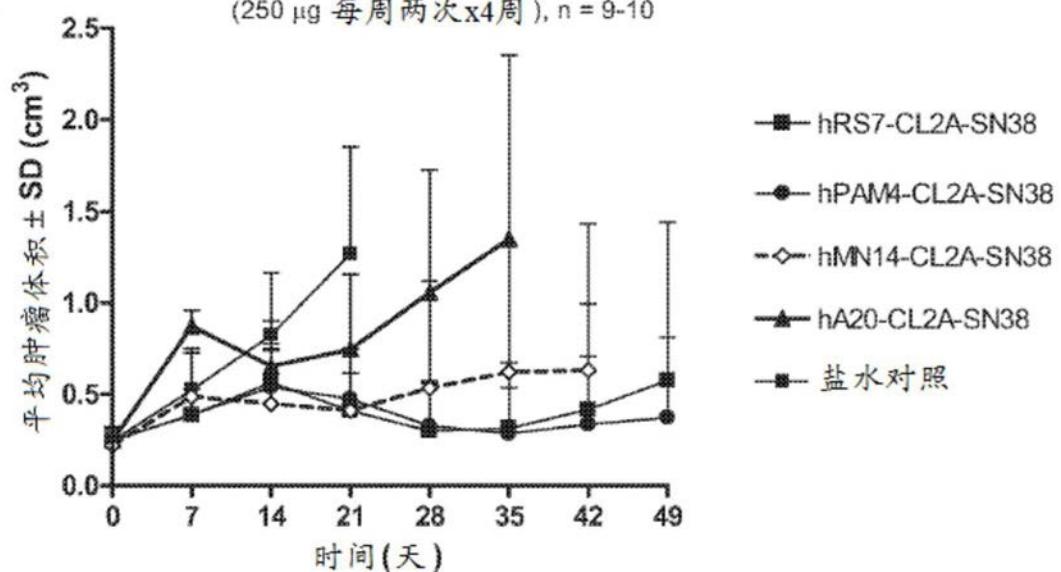


图2

在携带人胰腺癌异种移植物(BxPC-3)的小鼠中

MAb-CL2A-SN38免疫缀合物的治疗效力

(500  $\mu$ g 每周两次 $\times$ 4周), n = 10

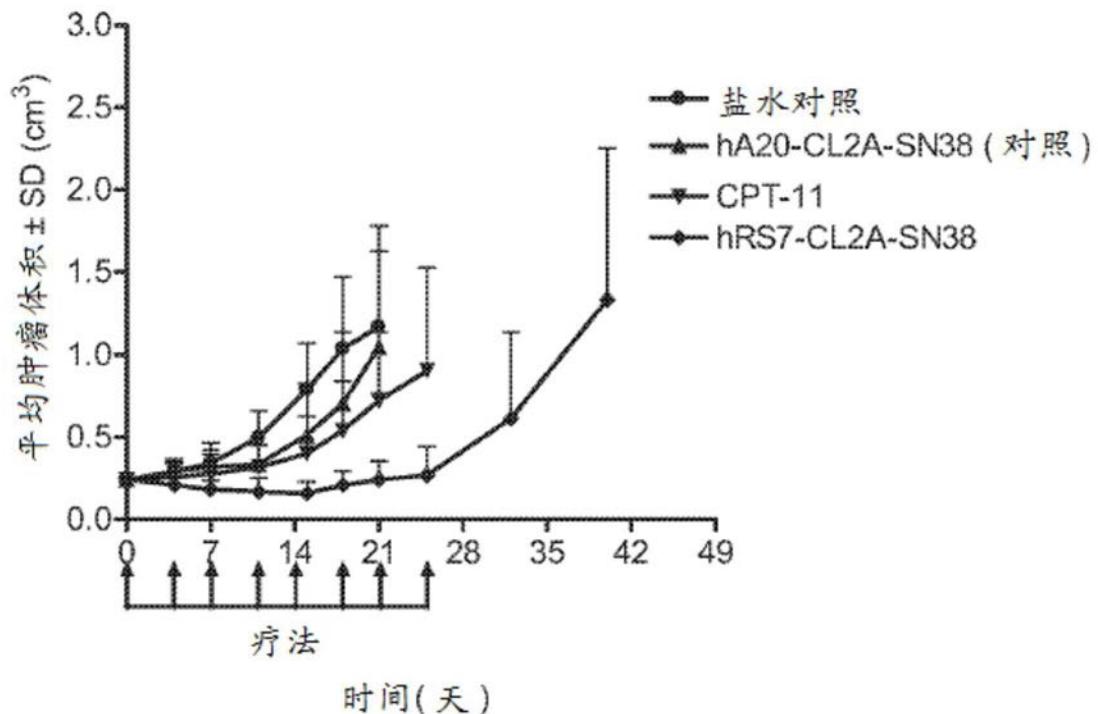


图3

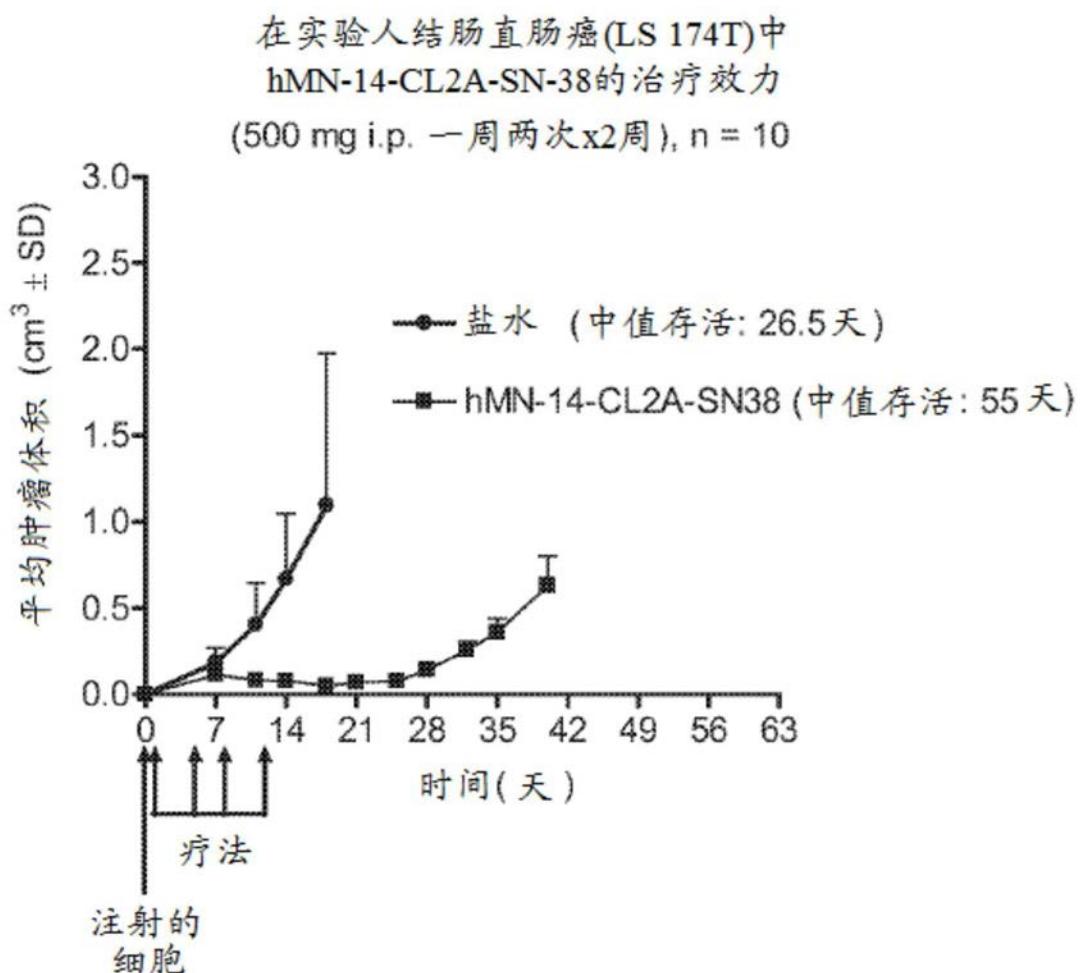


图4

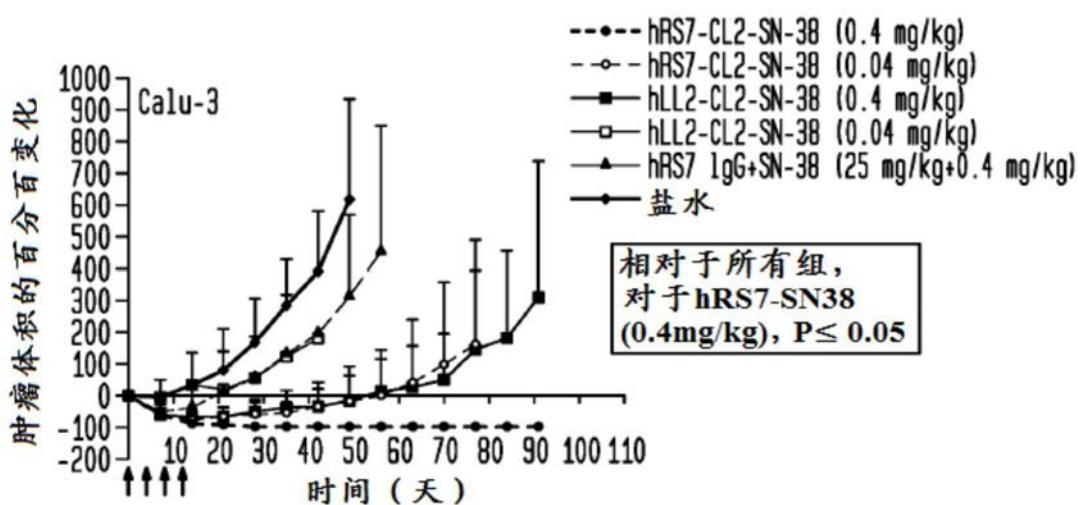


图5A

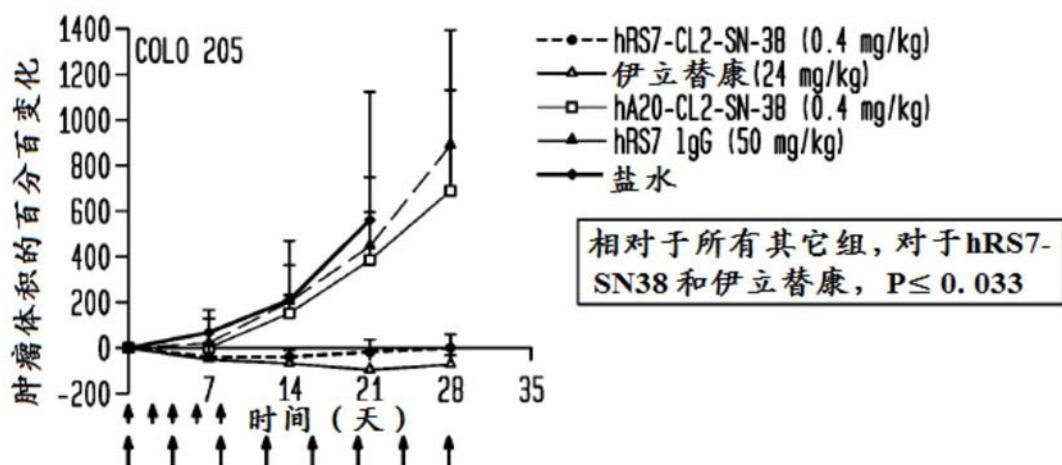


图5B

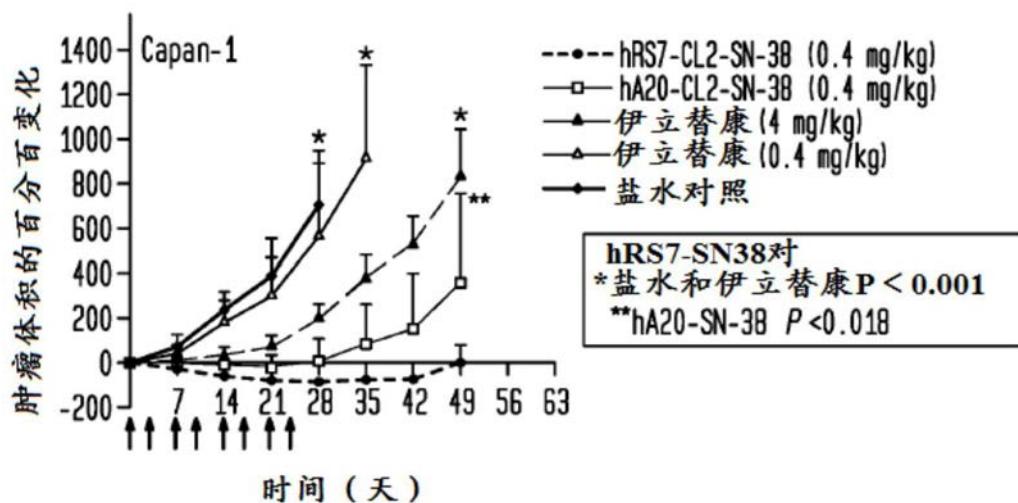


图5C

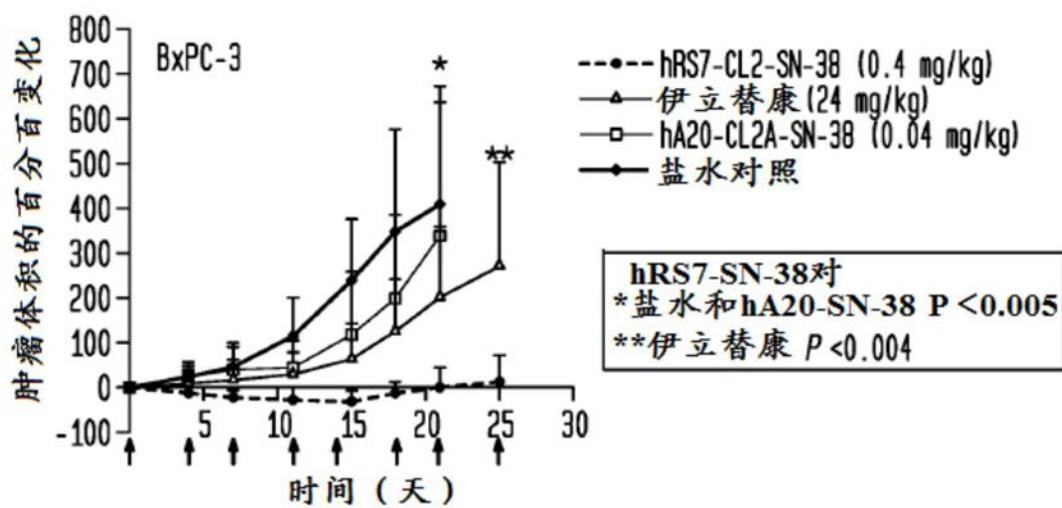


图5D

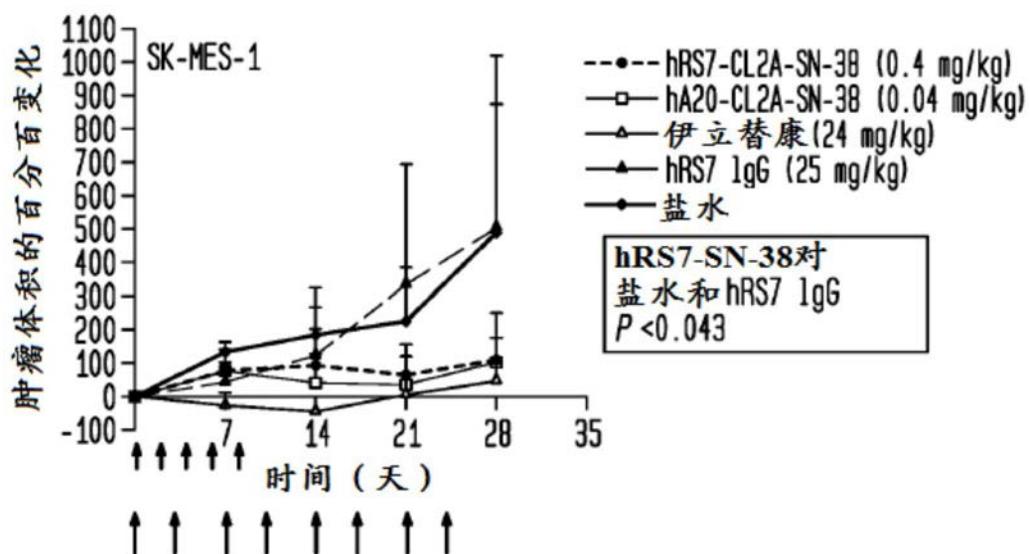


图5E

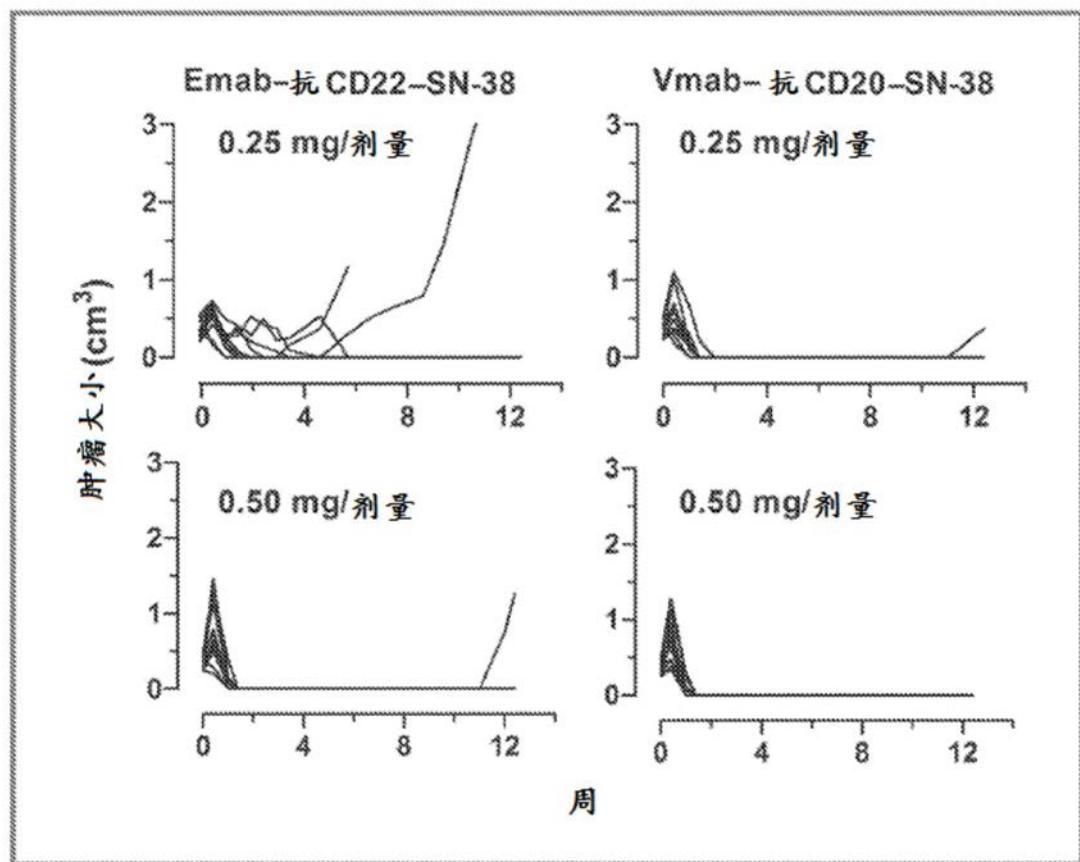
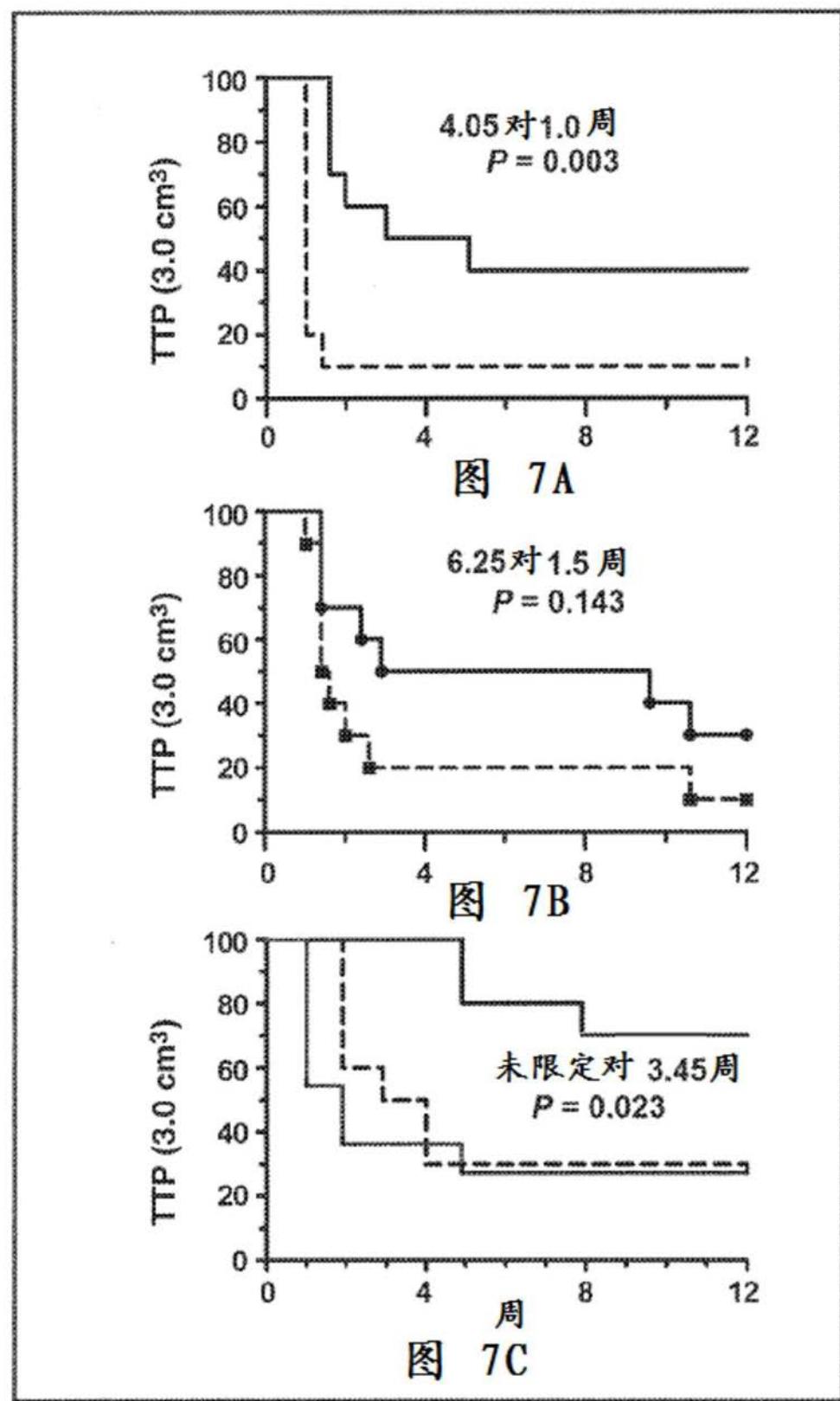


图6



拉贝珠单抗 - SN-38 : 患者 009

手术, 化疗 / MAb 治疗史

患者 095-009  
年龄 50, ECOG 0

手术或程序  
IV期 CRC  
结肠切除术/肝切除术  
(部分叶)  
Iri/ox  
Folfirinox  
Folfirinox+Bev

化学疗法  
Bev/5FU-Lv  
FolFiri  
FolFiri+  
西妥昔单抗  
FolFiri+Bev

响应

2008  
IV期 CRC  
结肠切除术/肝切除术  
(部分叶)  
Iri/ox  
Folfirinox  
Folfirinox+Bev

2009  
肝转移  
消融疗法  
射频

2010  
肝转移  
消融疗法  
射频

2011  
肺转移  
楔形切除  
新肺转移  
楔形切除

2012  
肺转移和肝转移

图 8

179

↑ 黑色箭头 = 根据CT的肿瘤响应  
↑ 蓝色箭头 = 根据CT无可评估的疾病

↑ 红色箭头 = 根据CT的肿瘤进展  
↑ 绿色箭头 = 稳定

2012 2013

血浆 CEA (ng/mL)

基线 :	12.6
给药前 #4:	2.1
给药前 #8:	1.7
给药前 #12:	3.6

继续治疗;  
在 2013 年 2 月 22 日接受第 16 剂。  
在 4 月的下一次响应评估

拉贝珠单抗 -SN-38  
-28.8%  
-40.6%  
-31.9%